

Fabrication and application of cell-based microfluidic chip for eye-irritation test of chemicals

Sujin Cho and Seog Woo Rhee[★]

Department of Chemistry, Kongju National University, Kongju, 32588, Korea
(Received July 12, 2021; Revised September 15, 2021; Accepted September 17, 2021)

화학 물질의 안자극 시험용 세포 기반 미세유체 칩의 제작 및 응용

조수진 · 이석우[★]

공주대학교 화학과

(2021. 7. 12. 접수, 2021. 9. 15. 수정, 2021. 9. 17. 승인)

Abstract: This study presents the development of cell-based microfluidic chips for the performance of acute eye irritation tests due to chemicals and examined some of their applications. Microfluidic chips were fabricated by photolithography and soft lithography, and they had three compartments with different areas for cell culture. Rabbit corneal epithelial cells were used for the eye irritation test. The death of cells cultured inside the chip was monitored at regular time intervals after treatment with an aqueous solution of chemicals, and the cell death rate constants were calculated based on the viability curve. The performance of the microfluidic chip was verified by examining the effects of cell-cell junctions, cell-substrate adhesion, and initial cell numbers compared to cell death rates. Eye irritation tests were performed at various concentrations of an aqueous solution of sodium dodecyl sulfate (SDS), a standard substance for the eye irritant test. The cells were exposed to the SDS aqueous solution for 300 s, and the resulting eye irritation was assessed by cell viability. Finally, the equation for calculating the toxicity score (*TS*) was derived based on the weighting factor for each compartment in the chip. The cell-based microfluidic chip developed in this study may be used for eye irritation tests from chemicals used in cosmetics and pharmaceuticals.

요약: 본 연구에서는 화학 물질의 급성 안자극 시험을 수행하기 위한 세포 기반 미세유체 칩의 개발과 응용에 관한 연구를 수행하였다. 포토리소그래피와 소프트리소그래피 공정을 이용하여 미세유체 칩을 제작하였으며, 칩은 배양 면적이 다른 3개의 세포 배양 구획으로 이루어져 있다. 세포 기반 안자극 시험은 토끼 각막 상피 세포를 사용하여 수행하였다. 미세유체 칩에 배양된 세포에 화학 물질 수용액을 처리한 후 일정한 간격으로 세포를 관찰하고, 생존율 곡선을 기반으로 세포 사멸에 대한 속도 상수를 계산하였다. 세포-세포 사이의 연결, 세포-기판 사이의 부착, 초기 세포 수 변화가 세포 사멸 속도에 미치는 영향을 조사하여 미세유체 칩의 성능을 검증하였다. 안자극 시험의 표준물질인 sodium dodecylsulfate

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)41-850-8491 Fax : +82-(0)41-856-8613

E-mail : jsanrhee@kongju.ac.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(SDS) 수용액의 다양한 농도 조건에서 안자극 시험을 수행하였다. 화학 물질의 수용액에 300초 동안 노출시킨 세포의 생존율을 이용하여 안자극을 시험하였다. 최종적으로 미세유체 칩의 각 구획에 대한 가중치를 기반으로 독성 점수(toxicity score, TS) 산출식을 얻었다. 본 연구에서 개발한 세포 기반 미세유체 칩은 화장품과 제약에 사용되는 화학 물질의 안자극 시험에 활용될 수 있을 것이다.

Key words: cell-based microfluidic chip, eye irritation test, adherent cells, cell death rate, toxicity scores

1. 서 론

동물 실험이란 교육, 시험, 연구, 생산 등 과학적 목적과 산업적 목적을 위하여 실험동물을 대상으로 실시하는 실험 또는 과학적 절차를 말한다. 지금까지 수많은 실험동물을 사용하여 화학 물질의 안전성을 평가하였고, 그에 따라 수많은 동물들이 희생되었다. 실험동물의 복지를 위하여 1959년 William Russell과 Rex Burch는 동물 실험에 관한 3R 원칙(replacement, reduction, refinement)을 제안하였고, 이후 유럽을 중심으로 화학 물질의 안전성을 평가하기 위해 실험동물을 대체하는 동물 대체 시험법(alternatives to animal testing)이 개발되어 사용되기 시작하였다.¹ 농약과 제약 분야에서는 아직까지 실험동물을 이용한 화학 물질의 안전성 평가 실험이 이루어지고 있지만, 동물 실험을 수행하기 전 다양한 동물 대체 시험법을 거쳐 실험동물의 수를 감소시키고자 하는 노력을 기울이고 있다. 현재 화장품 분야에서는 거의 모든 나라에서 동물 실험을 거쳐 만든 화장품의 유통과 판매를 금지하고 있으며, 한국은 2016년 화장품법을 개정하여 화장품 원료 및 제품에 대한 동물 실험을 전면 금지하고 있다.²

제약과 화장품 산업의 성장으로 많은 약물을 사용하게 됨으로써 일부 약물이 눈에 영향을 미쳐 안구 독성이 발생한다는 사실이 밝혀졌다. 따라서 약물이나 약물 후보군에 사용되는 화학 물질의 안자극(eye irritation)을 평가하기 위한 다양한 동물 시험법과 동물 대체 시험법이 개발되어 사용되고 있다.^{3,4} 안자극 평가에 대한 대표적인 동물 시험법은 살아 있는 토끼의 눈을 사용하는 Draize test⁵가 있고, 동물 대체 시험법으로는 적출된 동물의 기관을 사용하는 isolated chicken eye test (ICE)⁶와 bovine corneal opacity and permeability test (BCOP)⁷가 있고, 유정란의 용모 요막을 사용하는 hen's egg test-chorioallantoic membrane (HET-CAM)⁸, 토끼 각막 세포주를 이용한 short time exposure (STE) test⁹, 인공 조직을 이용한 3D reconstructed human

cornea epithelium model¹⁰ 등이 있다. 이 중에서 급성 안자극 시험법으로 국제 공인을 받은 것은 HET-CAM과 STE test이다.

세포를 이용한 독성 시험은 배양 시스템에서 성장한 살아있는 세포를 사용하는 시험법이다. 세포 기반 독성 시험법의 개발 및 활용으로 실험동물의 사용을 피하거나 줄일 수 있다. 소량의 시험 물질을 사용하고, 짧은 시간 동안 많은 병행 시험/반복 시험을 수행할 수 있으며, 비교적 저렴한 가격으로 시험을 수행할 수 있는 것이 세포 기반 독성 시험법의 장점이다.¹¹ 기본적으로 세포 기반 독성 평가는 제어된 환경에 노출된 세포의 생존율을 분석하여 정량적인 평가를 수행한다. 또한 제어된 환경에 노출된 세포가 분비하는 대사 물질에 기반한 생체 표지 물질(biomarker)을 분석하거나, 세포 내 소기관의 변화를 분석하여 처리한 약물과 독성 사이의 상관관계를 분석한다. 세포 기반 독성 평가에 사용되는 세포 또는 세포주는 약물의 표적 조직으로부터 유래된 세포를 사용하여야 한다.¹²

최근에는 동물 대체 시험법의 또 다른 방법으로 lab-on-a-chip (LOC) 시스템을 기반으로 한 미세유체 칩 시험법에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.¹³⁻¹⁵ Lab-on-a-chip은 실험실의 각종 구성 요소를 소형화하여 하나의 칩에 구현하는 것을 일컫으며, 소형화, 소량의 시료 사용, 분석 시간 단축, 다중 시료의 동시 분석, 저가의 1회용 칩의 대량생산 등의 장점을 가지고 있다.¹⁶ 독성 시험을 위한 세포 기반 미세유체 칩은 현재 연구 개발 단계에 있지만, human-on-a-chip의 구현을 목표로 활발한 연구를 진행하고 있다.¹⁷ Lab-on-a-chip을 이용한 *in vitro* 시험법은 독성 평가 과정의 초기 단계에서 후보 약물에 대한 선별 시험법으로 사용될 수 있어 실험동물을 줄일 수 있다. 개별적인 동물 대체 시험법으로 모든 동물 실험을 완전히 대체할 수는 없지만, 다양한 동물 대체 시험법을 조합하여 human-on-a-chip을 구현할 경우 다기능성 동물 대체 시험법으로 활용될 수 있기 때문에 많은 대학과 연구소에서 활발한 연구를 진행하고 있다.¹⁷

본 연구에서는 포토리소그래피와 소프트리소그래피 공정을 이용하여 미세유체 칩을 개발하고, 미세유체 칩에 배양된 세포에 화학 물질의 수용액을 노출시킨 후 세포의 거동을 분석하여 화학 물질에 대한 급성 안 자극을 평가할 수 있는 시험 방법을 개발하고자 하였다. 대상 세포로는 공인 시험법인 STE test에 사용하는 토끼 각막 상피 세포 SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea) 세포를 사용하였고, 대상 화학 물질로는 안 자극 시험의 표준물질인 sodium dodecylsulfate (SDS)를 사용하였다. 최종적으로 배양된 세포를 다양한 농도의 화학 물질 수용액에 노출시켜 생존율을 측정한 후, 실험 결과를 기반으로 가중치 부여 규칙을 정립하고, 정량적인 독성 점수 (toxicity score, TS) 계산식을 도출하여 공인 시험법인 HET-CAM 시험법의 IS 결과와 비교하여 상관성을 정립함으로써 미세유체 칩 기반 급성 안 자극 시험법을 개발하고자 하였다.

2. 재료와 방법

2.1. 시약 및 기구

SU-8 50 (Microchem), propylene glycol monomethyl ether acetate (PGMEA, Sigma Aldrich Co.) trichloro (1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane (97%, Sigma Aldrich Co.), polydimethylsiloxane (PDMS, Dow Corning), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Invitrogen Gibco) Eagle's minimum essential medium (EMEM, Corning), 0.25% trypsin/EDTA (Invitrogen Gibco), fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Gibco), penicillin/streptomycin (P/S, Invitrogen Gibco), phosphate buffer silane (PBS, Invitrogen Gibco), calcein AM (CA, Thermo Fisher), sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma Aldrich Co.)는 제조회사로부터 시약급으로 구입하여 정제 없이 사용하였다. 필름 마스크는 Nepco에서 인쇄하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 미세유체 칩의 제작 및 성능 평가

실리콘 웨이퍼 (3")를 10분 동안 플라즈마로 처리 (plasma cleaner, PDC-002, Harrick plasma)하여 웨이퍼 표면의 유기물을 제거하였다. 웨이퍼를 스핀 코팅기(Spin 1200, Midas) 위에 올려놓고 감광제(SU-8 50)를 도포하였다. 500 rpm에서 10초, 1,000 rpm에서 1분 동안 회전시켜 100 µm 두께로 도포하였다. 감광제가 도포된 실리콘 웨이퍼를 가열판(DP-25, Labotec)에 올려놓고 65 °C에서 10분, 95 °C에서 30분 동안 가열

한 후, 웨이퍼를 마스크 정렬기(mask aligner, MDA-400M, Midas)에 올려놓고 패턴이 새겨진 필름 마스크로 덮은 후, 26초 동안 노광하였다. 웨이퍼를 다시 가열판에 옮긴 후, 65 °C에서 1분, 95 °C에서 4분 동안 가열하였다. PGMEA로 노광되지 않은 부분의 감광제를 제거하고, 질소 기체로 건조하여 웨이퍼에 패턴만 남도록 하였다. 감압 용기에 약 100 µL의 trichloro (1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane을 포함하는 작은 용기와 페트리 접시(100 mm)에 담긴 건조한 웨이퍼를 넣고, 감압 하(0.6 atm)에서 30분 동안 실란화과정을 수행하였다. PDMS 중합체용 수지(prepolymer)와 경화제 (curing agent)를 10:1의 질량비로 일회용 플라스틱 컵에 넣어 혼합한 후, 감압 하에서 30분 동안 기포를 제거하여 PDMS 혼합물을 제조하였다. 제작한 마스터가 들어 있는 페트리 접시에 20 g의 PDMS 혼합물을 넣은 후, 감압 하에서 10분 동안 기포를 제거하였다. 수평을 맞춘 65 °C 오븐에서 4시간 동안 가열하여 PDMS를 경화하였다. Coverslip (24×40 mm², Corning Inc.)을 2% Micro 90™ (Cole Parmer Instrument Co.) 용액에 넣고 실온에서 18시간 방치한 후, 5분 동안 초음파 처리를 하였다. Micro 90™을 제거하고 3차 증류수로 10회 세척한 후, laminar flow hood (PCHC-777A2-04, CHC Lab)에서 건조하였다. 의료용 칼로 PDMS를 잘라낸 후, 생검용 펀치로 주입구와 배출구에 구멍을 뚫었다. PDMS와 coverslip을 1분 30초 동안 산소 플라즈마로 처리한 후 부착시켜 미세유체 칩을 제작하였다. 미세유체 칩을 형광 현미경(IX 71, Olympus)의 스테이지에 올려놓고, 약물 주입구에 100 µL의 파란색 식용 색소 수용액을 주입하고, time-lapse 이미지를 촬영하여 각 세포 배양 구획에 수용액이 도달하는 데 걸리는 시간을 측정하였다.

2.2.2. 세포의 배양

생쥐에서 추출한 BALB/3T3 섬유아세포(fibroblast)는 한국생명과학연구원의 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 계대 배양을 통해 본 연구에 사용하였다. 성장 배지는 DMEM 배지에 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 토끼(rabbit)에서 추출한 SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea, CCL-60) 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 계대 배양을 통해 본 연구에서 사용하였다. 성장 배지는 L-glutamine을 포함하는 EMEM 배지에 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였다.

2.2.3. 미세유체 칩에서 세포의 배양 및 SDS 수용액의 안자극 평가

미세유체 칩에 성장 배지를 주입하고, 약 1시간 동안 인큐베이터에 넣어 칩 내부의 기포를 제거하였다. 성장 배지를 제거하고 각 세포 주입구에 30 μL 의 세포 현탁액 (2.5×10^6 cells/mL)을 주입한 후, 모든 구획의 세포가 confluence 상태가 되도록 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 대기 조건인 인큐베이터(MCO-20AIC, SANYO)에서 약 24시간 동안 배양하였다. 모든 구획에서 성장 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척한 후, 빛이 차단된 상태에서 calcein AM 용액을 5분 동안 처리하였다. Calcein AM 용액을 제거하고, PBS로 2회 세척하였다. 약물 주입구에 다양한 농도의 SDS 수용액 100 μL 를 주입하고, 형광 현미경(IX 71, Olympus)으로 300초 동안 일정한 시간 간격으로 각 구획의 세포에 대한 형광 이미지를 촬영하였다. Image Pro-Plus[®] version 7.0 (Media Cybernetics)을 이용하여 각 이미지의 세포를 계수하여 세포 생존율을 계산하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. 미세유체 칩의 구성 요소

화학 물질의 세포 기반 안자극 시험을 수행할 수 있는 미세유체 칩의 도안을 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에 나타낸 바와 같이 4개의 도안은 각각 세포 배양 구획 R1~R3 (1~3 mm^2)의 조합을 다르게 한 것이다. 도안 1의 R1과 도안 2의 R1 (-1, -2, -3)은 1 mm^2 , 도안 1의 R2와 도안 3의 R2 (-1, -2, -3)은 2 mm^2 , 도안 1의 R3과 도안 4의 R3 (-1, -2, -3)은 3 mm^2 의 세포 배양 면적을 갖는다. 세포 하나의 크기는 대략

30~35 μm 이고, 각 구획의 세포가 confluence 상태로 되면 R1에는 약 1,000개, R2에는 약 2,000개, R3에는 약 3,000개의 세포가 존재하게 된다. 동일한 농도를 갖는 일정한 부피의 화학 물질 수용액이 주입될 때, 각 구획에 존재하는 세포수가 서로 다르기 때문에 정해진 시간 동안 세포에 대한 화학 물질의 영향의 정도가 달라질 수 있으며, 측정된 각 구획에서의 세포 생존율은 서로 다를 수 있다. 세포의 초기 개수의 상댓값으로 R1~R3 구획에서 얻어진 결과에 서로 다른 가중치를 부여할 수 있기 때문에 보다 재현성 높은 정량적인 안자극 지표 계산식을 도출할 수 있다. 각 주입구 및 배출구의 지름은 약물 주입구 (A) 6 mm, 약물 배출구 (B) 3 mm, 세포 주입구 (C) 2 mm로 4개의 도안 모두 동일한 크기로 제작되었다. 도안 1은 세포 기반 안자극 시험용, 도안 2~4는 칩의 성능 검증용으로 사용하였다.

3.2. 미세유체 칩의 성능 검증

약물 주입구에 100 μL 의 화학 물질 수용액을 주입한 후, 수용액이 각 구획의 끝에 도달하는 시간을 측정하였으며, 한 구획 당 3회 반복한 실험의 평균값과 표준 편차를 나타내었다. 도안 1로 만든 칩에서 얻은 time-lapse 이미지를 Fig. 2에 나타내었고, 도안 1~4로 만든 칩의 각 구획에 약물이 도달하는 시간을 Table 1에 나타내었다.

도안 1로 만든 칩의 경우 각 구획에 수용액이 도달하는 데 걸리는 시간은 평균 R1까지 1.3초, R2까지 2.4초, R3까지 3.3초로 반응 시간 300초에 비해 매우 짧은 지연 시간을 나타내었다.

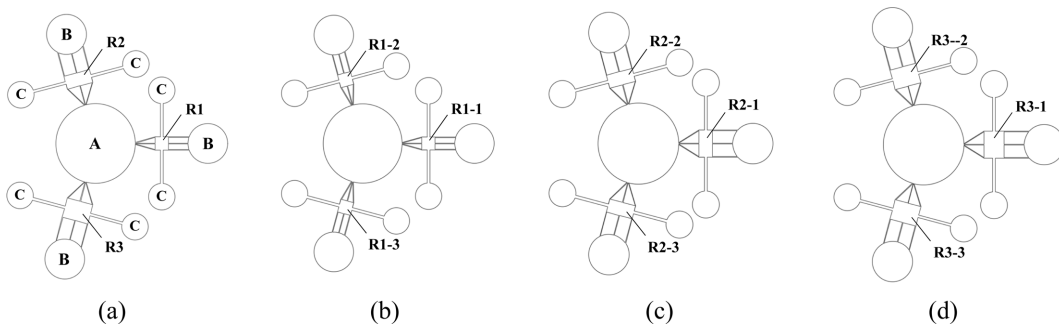


Fig. 1. Designs of microfluidic chips. (a) Design 1 : chip consisting of 3 cell culture compartments R1, R2, R3 of different areas. A : chemical solution inlet, B : solution outlet, C : cell injection port. In the other three designs, only the area of the cell culture compartment is different from that of design 1. (b) Design 2 : chip consisting of three R1 compartments. (c) Design 3 : chip consisting of three R2 compartments. (d) Design 3 : chip consisting of three R3 compartments.

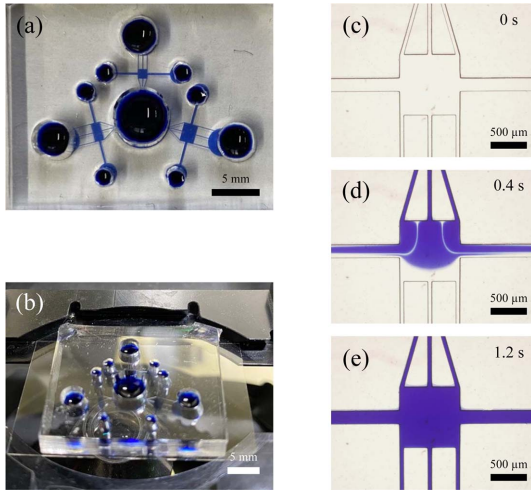


Fig. 2. (a) Photograph of the microfluidic chip filled with trypan blue solution, (b) photograph of the microfluidic chip mounted on the microscope stage. (c)-(e) Time-lapse images obtained after injecting an aqueous chemical solution into the chip fabricated using design 1.

3.3. 세포 사멸 속도에 영향을 미치는 인자

3.3.1. 세포의 종류

세포 사이의 연결 형성이 다른 두 종류의 세포를 도안 1로 만든 미세유체 칩에 confluence 상태로 배양한 후 화학 물질 수용액으로 처리한 후 시간에 따라 측정된 세포 생존율을 Fig. 3에 나타내었다.

BALB/3T3 세포는 피부 조직 중 진피층에 있는 섬유아세포로 물질 수송을 위한 세포 사이의 연결인 간극 연결(gap junction) 및 부착 연결(desmosome)을 형성하지만 밀착 연결(tight junction)은 형성하지 않는다.¹⁸ 반면 SIRC 세포는 각막 조직 중 상피 세포로 세포와 세포 사이에 유체의 흐름을 막을 수 있도록 강한 밀착 연결을 형성하고 있다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 같은 농도의 약물에 노출되었을 때 BALB/3T3 세포의 생존율이 SIRC 세포의 생존율보다 더 빠르게 감소한다. 밀착 연결을 형성하지 못하는 섬유아세포의 경우 세포 사이의 결합이 약하기 때문에 개별 세포가 화학 물질의 영향을 더 쉽게 받는 반면, SIRC 세포의 경우에

Table 1. The time taken for the aqueous chemical solution to reach each compartment of the microfluidic chip fabricated using design 1~4

Design 1		Design 2		Design 3		Design 4	
Compartment	Time (s)	Compartment	Time (s)	Compartment	Time (s)	Compartment	Time (s)
R1	1.3±0.1	R1-1	1.3±0.1	R2-1	2.7±0.1	R3-1	3.4±0.2
R2	2.4±0.3	R1-2	1.3±0.2	R2-2	2.8±0.2	R3-2	3.5±0.2
R3	3.3±0.3	R1-3	1.5±0.1	R2-3	2.6±0.1	R3-3	3.6±0.3

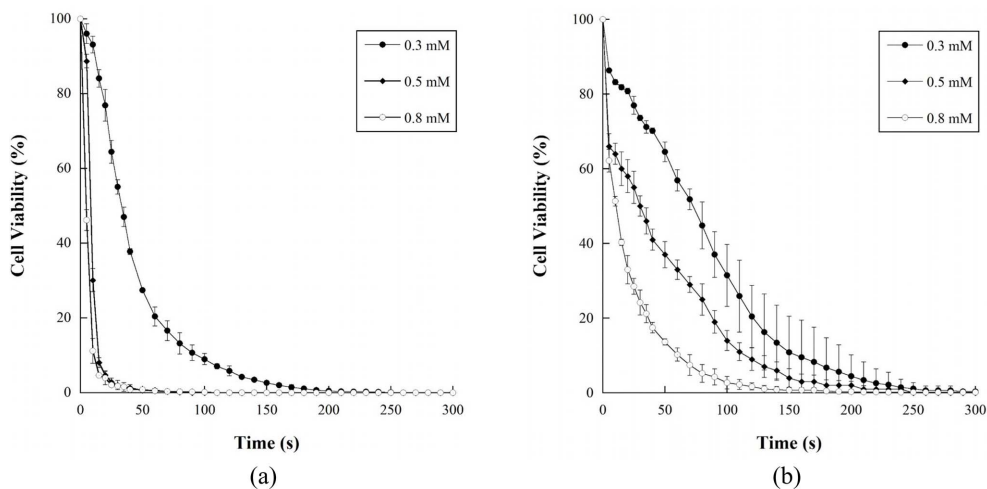


Fig. 3. Cell viability over time in R1 of the chip fabricated using design 1. Three experiments were performed in each cell line and cell viability (mean±SD) was plotted as a function of time. (a) BALB/3T3 fibroblasts. 1061±58 cells were analyzed in each experiment, (b) SIRC rabbit corneal cells. 1051±34 cells were analyzed in each experiment.

는 세포 사이의 밀착 연결을 끊고 기관으로부터 탈락시켜야 하기 때문에 더 많은 시간이 소요된다.^{19,20}

세포 사멸에는 크게 프로그램화된 세포 자살(apoptosis)과 외부 환경의 변화로 인한 세포 괴사(necrosis)가 있다.²¹ 갑작스런 무산소증, 영양소 부족, 열에 대한 노출, 세제와 같은 화학 약품에 대한 노출과 같은 극단적인 물리·화학적 조건에서 세포 괴사는 발생하며, 수동적인 과정으로 나타난다.²² 세포 괴사과정에서 세포 개수는 일반적으로 지수함수로 감소한다.²³ 따라서 주입한 SDS 수용액에 의한 세포 사멸 과정을 1차 속도 법칙으로 가정하고, Fig. 3에 나타낸 자료를 기반으로 생존율의 감소에 대한 속도 상수를 계산하여 Table 2에 나타내었다.

기관에 부착되어 배양되는 세포들이 confluence 상태에 도달하면 세포 사이는 연결이 형성된다. 세포 연결에는 1) 밀착 연결, 2) 부착 연결, 3) 간극 연결 등이 있으며, 세포의 종류에 따라 연결의 종류가 달라진다. Table 2에 나타낸 바와 같이 두 종류의 세포는 SDS 수용액의 농도가 증가하면서 사멸에 대한 속도 상수가 증가하는 것을 볼 수 있다. 동일한 농도에 노출된 두 종류의 세포에 대한 속도 상수를 비교하면, 모든 농도에서 속도 상수는 BALB/3T3 섬유아세포에서 SIRC에서보다 크다. 농도가 낮은 0.3 mM 수용액의 경우 BALB/3T3 섬유아세포의 사멸 속도 상수는 0.14 s^{-1} 로 SIRC의 0.012 s^{-1} 에 비해 12배 정도 크다. 0.5 mM 수용액의 경우 BALB/3T3 섬유아세포의 사멸 속도 상수는 0.84 s^{-1} 로 SIRC의 0.099 s^{-1} 에 비해 9배, 0.8 mM 수용액의 경우 BALB/3T3 섬유아세포의 사멸 속도 상수는 1.58 s^{-1} 로 SIRC의 0.19 s^{-1} 에 비해 8배 정도 크다. 농도가 높을수록 속도 상수의 비율이 더 크며, 농도가 진할수록 속도 상수 비율은 줄어든다. 농도가 매우 진한 경우에는 두 종류의 세포에 대한 사멸 속도가 같아질 것으로 판단된다.

3.3.2. 초기 세포 수

SIRC 세포 사이의 밀착 연결 형성 여부가 세포 사

Table 3. Rate constants for the cell death obtained by varying the initial number of SIRC cells. Cells were treated with 1.0 mM SDS aqueous solution

Cell Density (cells/mm ²)	Relative Cell Density*	Rate Constant (s ⁻¹)
170	0.17	3.78
295	0.29	3.61
527	0.52	2.83
784	0.77	1.44
1,012	1.00	0.47

*The value obtained by dividing the initial cell density by 1,012

멸 속도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동일한 구획 내에 배양된 SIRC 세포의 초기 개수를 달리하여 배양한 후 화학 물질 수용액으로 처리한 후 시간에 따른 세포 생존율을 관찰하였고, 생존율 감소에 대한 속도 상수를 계산하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 동일한 농도의 SDS 수용액에 노출시켰을 때, 배양된 세포 개수가 많을수록 시간에 따른 세포 사멸 속도 상수가 감소하는 것을 볼 수 있다. 초기 세포의 개수가 줄어들면 세포와 기질 사이의 연결은 형성되지만, 세포와 세포 사이의 연결을 완전하게 형성하지는 못한다. 초기 세포 개수가 적은 경우(상대값 0.17, 0.29, 0.52)는 세포가 구획 내에 존재하는 기관에 부착되어 있지만 세포와 세포 사이의 밀착 연결을 형성하지는 못하거나 일부만 연결을 형성한다. 따라서 세포 사멸에 대한 속도 상수는 각각 3.78 s^{-1} , 3.61 s^{-1} , 2.83 s^{-1} 로 매우 크다. 하지만 초기 세포 개수가 상대값 0.77에 이르게 되면 많은 세포 사이의 강한 밀착 연결이 형성되어 세포 사멸 속도 상수는 1.44 s^{-1} 로 급격히 감소하며, 거의 모든 세포가 밀착 연결로 강하게 결합된 상태(상대값 1.00)에서는 속도 상수는 더욱 감소하여 0.47 s^{-1} 에 이른다. 따라서 기관에 부착된 세포의 화학 물질에 의한 사멸 속도 상수는 세포와 기관 사이의 부착, 세포와 세포 사이의 연결 정도에 크게 영향을 받는 것을 알 수 있다.

3.3.3. 각 구획에서 시간에 따른 세포 생존율

세포와 세포 사이의 연결, 세포와 기관 사이의 부착이 완전히 형성되었을 때 초기 세포 개수에 따른 세포 사멸 속도를 알아보기 위해 도안 1~4로 만든 칩의 동일한 면적을 갖는 구획에서의 시간에 따른 세포 생존율을 측정하여 생존율의 감소에 대한 속도 상수를 계산하였다(Table 4). 동일한 면적을 갖는 구획에서의 시간에 따른 세포의 생존율은 비슷한 속도로 감소하

Table 2. Rate law data on the cell death of two types of cells cultured inside microfluidic chips. Cells were treated with SDS aqueous solution at various concentrations

Concentration of SDS (mM)	Rate Constant (s ⁻¹)	
	BALB/3T3	SIRC
0.30	0.14	0.012
0.50	0.84	0.099
0.80	1.58	0.19

Table 4. Rate law data on the cell death of SIRC cells cultured inside different compartments of microfluidic chips. Cells were treated with 1.0 mM SDS aqueous solution

Compartment	Rate Constant (s ⁻¹)	Compartment	Average Rate Constant (s ⁻¹)
Design 1 R1	0.47	Design 2 R1 (-1, -2, -3)	0.48±0.01
Design 1 R2	0.38	Design 3 R2 (-1, -2, -3)	0.33±0.02
Design 1 R3	0.26	Design 4 R3 (-1, -2, -3)	0.28±0.02

었다. 또한 구획의 면적이 넓을수록 초기 세포 개수가 많기 때문에 동일한 농도, 동일한 양의 시약에 노출된 세포의 생존율 감소는 더 느리게 나타났다(R1 > R2 > R3 순서).

Table 4에 나타낸 바와 같이 도안 1로 만든 칩의 구획 R1(면적 1 mm²)에서 얻어진 속도 상수는 0.47 s⁻¹이다. 3개의 구획 모두 R1로만 구성된 도안 2로 만든 칩의 각 구획에서 얻어진 평균 속도 상수는 0.48±0.01 s⁻¹로 도안 1로 만든 칩의 구획 R1의 값 0.47 s⁻¹과 매우 잘 일치한다. 도안 1로 만든 칩의 구획 R2 (면적 2 mm²)에서 얻어진 속도 상수는 0.38 s⁻¹로 구획 R1에서의 속도 상수 0.47 s⁻¹에 비해 83 % 정도 수준이다. 구획 R2의 면적은 구획 R1의 2배이므로 동일한 농도의 SDS 수용액에 노출되는 초기 세포 개수의 상대값 역시 구획 R2에서가 구획 R1에서보다 2배이다. 따라서 세포에 의해 소모되는 SDS의 분자는 구획 R2에서가 구획 R1에서보다 많고, SDS 농도의 감소율은 구획 R2에서가 구획 R1에서보다 크다. 따라서 세포 생존율 변화에 대한 속도 상수는 구획 R2에서가 구획 R1에서보다 작다. 3개의 구획 모두 R2로만 구성된 도안 3으로 만든 칩의 각 구획에서 얻어진 속도 상수는 0.33±0.02 s⁻¹로 도안 1로 만든 칩의 구획 R2의 값 0.38 s⁻¹에 비해 다소 작은 값으로 얻어졌다. 도안 1로 만든 칩의 구획 R3(면적 3 mm²)에서 얻어진 속도 상수는 0.26 s⁻¹로 구획 R1에서의 속도 상수 0.47 s⁻¹에 비해 55 % 정도 수준이고, 구획 R2에서의 속도 상수 0.38 s⁻¹에 비해 67 % 정도 수준이다. 3개의 구획 모두 R3으로만 구성된 도안 4의 각 구획에서 얻어진 속도 상수는 0.28±0.02 s⁻¹로 도안 1의 구획 R3의 값 0.26

s⁻¹과 잘 일치한다.

위의 결과로부터 각 구획에 존재하는 초기 세포 개수의 상대값에 따라 동일 농도에 노출되는 세포 사멸에 대한 속도 상수가 달라지기 때문에 세포 생존율 곡선이 달라지는 것을 알 수 있다.

3.4. 미세유체 칩을 이용한 SDS의 안자극 평가

3.4.1. 독성 점수의 개발

미세유체 칩을 이용한 화학 물질의 안자극을 평가하기 위하여 자극 지표인 독성 점수(Toxicity Score, TS) 계산식을 개발하였다.

$$TS = \frac{(100 - R1 \text{의 생존율 } (\%))}{100} \times \frac{1}{0.5} + \frac{(100 - R2 \text{의 생존율 } (\%))}{100} \times \frac{2}{0.4} + \frac{(100 - R3 \text{의 생존율 } (\%))}{100} \times \frac{3}{0.3}$$

위 식은 다음과 같은 논리로 유도되었다. 도안 1로 만든 칩의 각 구획에서 자란 세포가 confluence 상태에 도달하였을 때, 안자극 표준물질인 SDS의 다양한 농도의 수용액으로 300초 동안 처리한 후 생존율을 측정하였다. 식에서 $\frac{(100 - \text{생존율 } (\%))}{100}$ 는 초기 생존율

100%에서 시험 물질 처리 300초 후의 각 구획의 생존율을 뺀 값 즉, 세포 치사율 (%)이다. 각 구획의 면적에 따른 초기 세포 개수의 가중치를 두기 위해 각 구획에 세포가 confluence 상태에 도달하였을 때 세포 개수의 상대값으로 R1은 1, R2는 2, R3는 3의 가중치를 곱하였다. 각 구획에서의 세포 사멸 속도에 대한 가중치를

Table 5. Cell viability and TS values at different SDS concentrations

Compartment	Cell viability (%)					
	0.1 mM	0.2 mM	0.5 mM	0.8 mM	1.0 mM	3.0 mM
R1	100	33.2	0.00	0.00	0.00	0.00
R2	100	49.5	5.59	0.00	0.00	0.00
R3	100	53.9	11.3	0.00	0.00	0.00
TS	0.00	8.97	15.59	17.00	17.00	17.00

부여하기 위하여 300초 동안 처리한 후 3개의 구획에서 세포가 모두 사멸되는 농도인 1.0 mM에서의 각 구획의 1차 속도 상수의 근사값 0.5, 0.4, 0.3을 식의 분모에 사용하였다. *TS*는 0~17점의 값을 갖는다.

3.4.2. 독성 점수에 의한 SDS 수용액의 안자극 평가
도안 1로 만든 칩에서의 농도별 SDS 수용액 처리 후 세포 생존율과 *TS* 값을 Table 5에 나타내었다. Table 5에 나타낸 바와 같이 미세유체 칩에서 세포의 생존율 변화는 0.2 mM에서 나타나기 시작하고, 0.5 mM에서는 시험 물질 처리 후 R1의 세포 생존율이 0%가 되었고, 0.8 mM부터는 3개의 구획에서 시험 물질 처리 후 세포 생존율이 0%로 안자극 지수의 최고점인 17점을 얻었다.

3.4.3. *TS*와 *IS*의 비교 분석

SDS의 농도별로 *TS*와 공인 시험법인 HET-CAM에서의 *IS*를 비교한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.²⁴

Fig. 4에 나타낸 바와 같이 두 결과를 비교하면 미세유체 칩을 이용한 안자극 시험 방법의 경우 더 낮은 농도에서 일어나는 세포 변화를 관찰할 수 있다. 미세유체 칩에서는 0.20 mM에서부터 안자극이 관찰되고, HET-CAM에서는 0.90 mM에서 안자극이 관찰되기 시작하는 것을 볼 수 있다. HET-CAM의 경우 해부용 현미경으로 혈관의 용해로 인해 적혈구가 유출되는 것을 육안으로 관찰하기 때문에 어느 정도의 유출양이 되어야 붉은색의 관찰이 가능하기 때문에

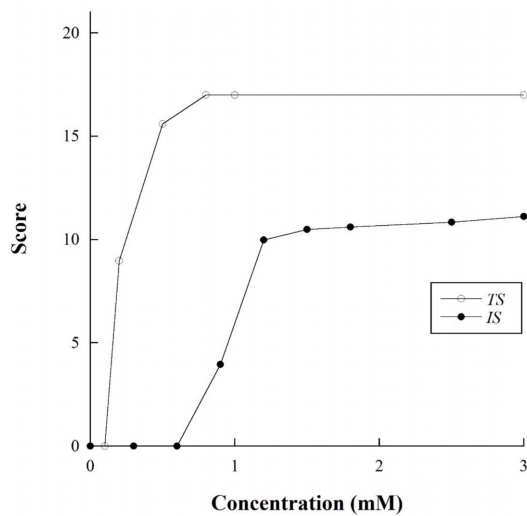


Fig. 4. *TS* and *IS* values at different SDS concentrations.

낮은 농도에서 일어나는 변화를 감지하기가 곤란하다. 이에 반해 미세유체 칩은 형광 현미경을 통해 개별 세포에 대한 변화를 관찰하는 것을 기반으로 하기 때문에 더 낮은 농도에서 일어나는 안자극의 관찰이 가능하다. 따라서 HET-CAM보다 세포 기반 미세유체 칩에서 더 높은 민감도를 갖는 결과를 얻을 수 있다.

4. 결론

본 연구에서는 안자극 평가를 위한 세포 기반 미세유체 칩을 개발하고 칩의 성능을 검증하였다. 미세유체 칩은 세포 배양 면적이 다른 3개의 세포 배양 구획과 세포 주입구/배출구, 약물 주입구/배출구로 구성되어 있어 배양되는 세포 개수의 상대값이 서로 다르다. 개발된 세포 기반 미세유체 칩을 이용하여 안자극을 유발하는 주요 물질인 계면활성제 SDS의 안자극 시험을 수행하였다. SDS에 의한 세포의 사멸은 1차 속도 법칙을 따르며, 세포막과 막단백질 용해, 세포-세포 연결 파괴, 세포-기관 부착 파괴 등이 세포 사멸에 영향을 미치는 인자로 밝혀졌다. 정해진 300초의 반응 시간 동안 표준물질로 처리한 후 각 구획에서의 세포 생존율, 반응 속도 상수, 초기 세포 개수에 가중치를 둔 안자극 평가 지표인 *TS*를 얻을 수 있는 계산식을 개발하였고, HET-CAM의 *IS*와 비교하여 본 연구에서 개발한 칩을 검증하였다. 본 연구에서 개발한 안자극 시험용 세포 기반 미세유체 칩은 화학 물질의 안자극 시험의 초기 단계 시험에서 동물 대체 시험법으로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 공주대학교 연구년 사업에 의하여 연구되었음.

References

1. H. R. Ferdowsian and N. Beck, *PLoS ONE*, **6**(9), e24059 (2011).
2. 식품의약품안전처, 화장품정책과, 화장품법 (법률 제 14264호, 2016. 5. 29. 시행), 2016.
3. M. P. Vinardell and M. Mitjans, *J. Pharm. Sci.*, **97**(1), 46-59 (2008).
4. M. Lee, J.-H. Hwang and K.-M. Lim, *Toxicol. Res.*, **33**(3), 191-203 (2017).

5. K. R. Wilhelmus, *Surv. Ophthalmol.*, **45**(6), 493-515 (2001).
6. M. K. Prinsen, C. F. M. Hendriksen, C. A. M. Krul and R. A. Woutersen, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **85**, 132-149 (2017).
7. A. Schrage, S. N. Kolle, M. C. R. Moreno, K. Norman, H. Raabe, R. Curren, B. van Ravenzwaay and R. Landsiedel, *Altern. Lab. Anim.*, **39**(1), 37-53 (2011).
8. J. Scheel, M. Kleber, J. Kreutz, E. Lehringer, A. Mehling, K. Reisinger and W. Steiling, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **59**, 471-492 (2011).
9. Y. Takahashi, M. Koike, H. Honda, Y. Ito, H. Sakaguchi, H. Suzuki and N. Nishiyama, *Toxicol. In Vitro*, **22**(3), 760-770 (2008).
10. K.-M. Jung, S.-H. Lee, Y.-H. Ryu, W.-H. Jang, H.-S. Jung, J.-H. Han, S.-H. Seok, J.-H. Park, Y. Son, Y.-H. Park and K.-M. Lim, *Toxicol. In Vitro*, **25**(1), 403-410 (2011).
11. S. J. Shukla, R. Huang, C. P. Austin and M. Xia, *Drug Discov. Today*, **15**(23-24), 997-1007 (2010).
12. R. Parboosing, G. Mzobe, L. Chonco and I. Moodley, *Med. Chem.*, **13**(1), 13-21 (2016).
13. S. C. McCormick, F. H. Kriel, A. Ivask, Z. Tong, E. Lombi, N. H. Voelcker and C. Priest, *Micromachines*, **8**(4), 124 (2017).
14. Q. Wu, J. Liu, X. Wang, L. Feng, J. Wu, X. Zhu, W. Wen and X. Gong, *BioMed. Eng. OnLine*, **19**(1), 9 (2020).
15. Y. Cong, X. Han, Y. Wang, Z. Chen, Y. Lu, T. Liu, Z. Wu, Y. Jin, Y. Luo and X. Zhang, *Micromachines*, **11**(4), 381 (2020).
16. P. Cui and S. Wang, *J. Pharm. Anal.*, **9**(4), 238-247 (2019).
17. S. Syama and P. V. Mohanan, *Trends Food Sci. Technol.*, **110**, 711-728 (2021).
18. M. A. Garcia, W. J. Nelson and N. Chavez, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**(4), a029181 (2018).
19. Y. Shi, R. Li, J. Yang and X. Li, *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, **12**(2), 70-78 (2020).
20. S. Reichl, *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**(3), 299-307 (2008).
21. S. Orrenius, P. Nicotera and B. Zhivotovsky, *Toxicol. Sci.*, **119**(1), 3-19 (2011).
22. D. V. Krysko, T. V. Berghe, E. Parthoens, K. D'Herde and P. Vandenabeele, *Methods Enzymol.*, **442**, 307-341 (2008).
23. G. C. Forcina, M. Conlon, A. Wells, J. Yinuo Cao and S. J. Dixon, *Cell Syst.*, **4**(6), 600-610 (2017).
24. T. Tian, S. Cho and S. W. Rhee, *BioChip J.*, **13**(2), 142-150 (2019).

Authors' Position

Sujin Cho : Graduate Student
Seog Woo Rhee : Professor