

마이크로 인쇄기법을 이용한 hippocampal 세포의 신경망 형성을 위한 패터닝

진종주, 이길선, 안동준, 권광민*, 박정호*, 김진희**, 김기호**, 이경진**
고려대 화학공학과, 고려대 전기공학과*, 고려대 물리학과 신경망 동역학 연구센터**

Micropatterning for hippocampal neuronal network by micro contact printing

Jongjoo Jin, Gil Sun Lee, Dong June Ahn, Gwangmin Kwon*, James Jungho Pak*,
Jinhee Kim**, Gi-Ho Kim**, Kyoung J. Lee**

Department of Chemical Engineering, Korea University, Department of Electrical
Engineering, Korea university,* National Creative Research Initiative Center for
Neurodynamics and Department of Physics Korea university**

서론

여러 신경세포들의 결합으로 이루어진 생물학적 신경망은 물리학적인 관점에서 보아 '복잡계'의 패러다임에 속하는 대표적 생물계이다. 고등동물의 뇌를 구성하는 신경망은 현재의 컴퓨터 알고리즘 및 구조로는 모사하기 어려운 고도의 전산학적 기능을 갖는다. 신경망, 더 나아가, 신경계가 수행하는 이 놀라운 기능들을 이해하려는 연구가 전 세계적으로 진행되어져 오고 있다.[1-2] 이러한 복잡한 신경망에서 수행하는 정보처리 방식을 분석하고 이해하는 것은 인공지능 분야, 컴퓨터 논리회로와 같은 분야에 새로운 길을 제시할 수 있다. 또한 기하급수적으로 늘어가는 정보량의 처리를 위해서는 이런 연구가 필수적이라 하겠다.

신경세포들은 시냅스 부위에서 축색(axon) 말단으로부터 인접세포들의 가지돌기(dendrite)로 신호를 전달한다. 이때 신호전달 방식은 재배양하는 기술을 이용하여 축색둔덕(axon hillock)에서 활동전위(action potential)를 찾아내는 것이다. 그러나, 현재의 세포배양 기술로는 무질서하고 복잡한 신경망을 형성하여 인접한 세포들과의 수많은 상호작용으로 인하여 복잡한 신호를 나타나게 된다. 이를 찾아낸다고 하여도 분석하고 이해하는데에는 어려움이 있다. 따라서, 최근에는 단순한 신경망 구축을 위해 세포가 원하는 위치에만 흡착할 수 있는 표면에 선택적 패터닝에 대한 연구가 활발하다. 이를 위해 표면을 작용기가 다른 두 종류의 물질로 화학적 처리 방법을 이용하고 있다.[1]

이때 사용하는 일반적인 방법은 photolithography를 이용한 방법[2]과 lithographic mask 또는 topographic feature를 가지고 laser ablation을 사용하는 방법[3] 등이 있다. 본 논문에서는 최근에 활발히 연구되고 있는 elastomeric polydimethylsiloxane(PDMS) microstamp 방법을 이용한 마이크로 인쇄기법 (micro contact printing)을 사용하였다. 세포들이 흡착이 잘 되는 cytophilic한 물질로 원하는 패턴을 표면에 결합시킨 후, 나머지 채워지지 않은 부분에는 세포들이 흡착이 덜 되는 물질로 self-assembly를 한 후에 hippocampal neuron을 패터닝된 성장 실험을 하였다. [4-5]

실험

Stamp 제작에 사용될 mask pattern은 Si wafer에 photolithography 방법을 이용하여 다양한 마이크로 패턴들을 형성하였다. 이렇게 형성된 mask pattern을 petri dish의 바닥에 위치시킨 후 PDMS elastomer 와 curing agent를 부피비로 10:1로 섞은 용액을 적당량 붓

는다. 그리고, 1시간정도 상온에서 방치하고 기포가 없어질 때까지 기다린다. 이후 65°C에서 1시간이상 baking 하여 단단하게 굳게 한 후, 조심스럽게 mask pattern에서 분리하여 사용한다. 이렇게 제작된 micro stamp에 coating 하려는 물질인 poly-D-lysine Laminin(PDLL)은 poly-D-lysine(PDL)과 lyminin을 부피비로 4:1로 섞어서 사용하였다. 한편, 기판에 전사되는지 확인하고자 PDL의 말단에 형광이 달린 fluorescein isothiocyanate labeled poly-L-lysine(PDL-FITC, Sigma Chemical Co.)을 사용하였다.

실제 세포가 성장되는 유리기판의 cleaning은 인쇄되어질 물질들이 표면과 빠른 결합을 유도하고 결합력을 높이기 위하여 중요하다. 먼저, 유리기판을 사각 jar에다 황산과 nochromix (GODAX Laboratories, Inc)를 소량 넣고 stirring 하면서 20분간 cleaning한다. 꺼낸 기판을 DI-water(18.2MΩ·cm)로 20번 이상 세척한 뒤 질소가스로 purge한다. 이렇게 만들어진 clean glass는 표면에 -OH기가 존재하게 되어 contact angle이 wetting을 나타낸다. 이 기판을 다시 3-mercapto propyltrimethoxysilane(3-MPS, Aldrich, 95%)와 methanol(Fluka, 99.8%)를 1.5 vol%비로 섞은 후 stirring 하면서 기판을 15분간 self-assembly를 한다. 유리기판의 -OH기와 3-MPS의 silanol(Si-OH)가 가수분해반응(hydrolysis)에 의해 silanize되면서 기판은 다시 -SH를 말단기로 가지는 기판으로 만들어진다. 여기서 꺼낸 기판을 methanol로 수 차례 세척 후에 110°C oven에서 20간 baking 하여 막을 안정하게 만든다. 이 유리기판에 pH 6.7 buffer로 만든 0.1M 2-N-morpholino ethanesulfonic acid(MES, Aldrich) 용액에 0.1 mg/ml로 녹인 N- γ -maleimidobutyryloxysuccinimide ester(sulfo-GMBS, Pierce Chemical Company) 용액을 2ml 정도 dropping 하여 30min간 반응시킨다. 기판에 남아 있는 용액은 DI-water로 수 차례 세척 후 질소로 purging한다.

이러한 방법으로 준비되어진 기판에 우리가 전사하고자 하는 물질인 PDLL과 PLL-FITC는 우선 micro stamp에 coating해야 한다. PDLL과 PLL-FITC는 각각 pH 7.4인 PBS에 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비로 녹여서 준비한다. 이 용액들 stamp의 pattern 위에 dropping하고 5분 정도 지난 후 질소가스로 drop을 제거하고 충분히 건조시킨 후 stamp를 뒤집어 유리기판 위에 5분간 접촉시킨다. 조심스럽게 stamp를 떼어낸 후에 패턴이 찍히지 않고 전처리된 유리기판 상태로 남아 있는 부분은 pH 7.4인 PBS에 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비로 녹인 PEG (3400 MW, 98%, SunBio, Inc.)로 30분간 self-assembly한다. 이 기판은 DI-water로 다시 수 차례 씻은 후 세포를 배양하게 되는데 직경 1.5cm의 culture ring을 pattern 주위로 올린 다음 분쇄된 세포를 50 μl 를 넣는다. 분쇄된 세포가 유리기판 바닥에 붙을 때까지 20분 정도 기다린 후 결합하지 않은 세포를 제거하고 배지를 더 채워 1.5ml로 만들어 incubator에 보관한다. 배지는 2일마다 교체한다. 배양조건은 37°C, 5% CO₂이고, 세포는 2일된 쥐 뇌의 hippocampus(해마조직)를 사용한다. 배지는 glia 세포의 성장을 억제하고 신경세포(nerve cell)만 주로 자라게 하는 serum-free B27/Neurobasal (Life Technologies, Gaithersburg, MD)를 2ml/100ml 비로 넣은 후 antibiotics (penicillin+streptomycin) 1.5ml 첨가하여 혼합하여 사용한다. 세포의 성장과정은 phase contrast microscope으로 관찰한다. Figure 1은 사용된 master 패턴을 나타내는 현미경 사진이고, Figure 2는 실험방법을 대략적으로 묘사한 것이다.

실험결과

1. 전사된 pattern의 확인

전처리된 유리기판 위에 마이크로 인쇄기법에 의하여 전사된 패턴을 확인하고자 광학 현미경에 의한 condensation figure, 형광현미경의 형광이미지와 Atomic force microscope(AFM)에 의한 topography로 확인하였다(Figure3). Condensation figure는 유

리기관을 차가운 곳에 보관하다 갑자기 상온으로 나오면 물방울이 응결된다. 이때 기관 위에 PDLL 패턴이 찍힌 곳과 PEG를 SAMs 한 곳이 고분자 중심 축 결가지에 다른 화학적 작용기를 지녀서 wettability 차이로 물방울 맺힘이 달라지게 된다(Figure 3(A)). 형광 이미지는 전 처리된 유리기관에 PLL의 끝에 형광이 달린 물질로 패턴을 형성한 후 확인한 것이다. 전체적으로 매우 균일하게 전사됨을 확인할 수 있다(Figure 3(B)). 또한, 전사된 물질의 패턴과 높이를 확인하고자 AFM을 이용하여 이미지를 관찰하였다. 유리기관의 거칠기 정도가 크기 때문에 정확한 두께높이를 측정하기 어렵다. 하지만, 대략 3~4nm 정도 높이를 보이는 것으로 보아 단일막에 가까운 막이 형성되었음을 알 수 있었다(Figure 3(C)).

2. 패턴화된 Hippocampus 세포성장

패턴이 형성된 위치대로 자라는지 hippocampus 신경세포를 배양해 보았다. hippocampus 신경세포는 보통 PDL위에 잘 자라는 것으로 보고되어 있는데, 우리는 여기에 또한 세포성장을 배가시킨다는 Laminin을 첨가하여 패턴화 하였고, PDLL로 패턴화되지 않고 남은 부분은 PEG로 self-assembly 하였다. 세포는 보통 음전하를 띄게 되는데, PDLL의 경우는 양전하를 띄게 되어 쉽게 세포가 흡착할 수 있는 반면에, PEG는 음전하를 띄어서 세포의 흡착을 힘들게 만들어서 우리가 원하는 위치에만 세포가 자라게끔 하였다. 우리는 태어난지 2일된 새끼쥐 대뇌의 해마(hippocampus)의 신경세포를 사용하였다. 다른 신경세포들보다 성장이 잘 되는 편이고, 배양시키는 조건에 대하여 많은 연구가 행해졌기 때문에 이 세포를 선택하였다. Figure 4는 세포를 키운 지 5일 후에 관찰한 것으로 패턴을 따라 세포가 잘 자라는 것을 알 수 있다. 하지만, 전체적으로 균일하게 자라지는 못하였다.

또한, 우리는 세포의 농도, 패턴 크기에 따른 변화, PDLL의 농도, PEG의 농도를 바꿔가면서 최적의 조건을 찾으려고 현재 계속 연구를 진행중이다.

감사의 글

본 연구는 한국 과학기술부의 창의적 연구진흥 사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- [1] Davis A. stenger and Thomas M. Mckenna, "Enabling Technologies for Cultures Neural Networks", Academic Press, 1999.
- [2] Banker G, Goslin K. In:Stevens CF, editor. "Culturing nerve cells"1st ed., Cellular and Molecular Neuroscience Series. Cambridge : The MIT Press, 1991.
- [3] D. Kleinfeld, K. H. Kahler, and P. E. Hockberger, "Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates" *J. Neurosci.*, **8**, 4098-4120, 1988.
- [4] M. Scholl, Cl. Sprossler, M. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maclicke, W. Knoll, A. Offenhausser, "Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces" *J. Neuro. Methods*, **104**, 65-75, 2000.
- [5] Y. Xia and G. M. Whitesides, "Soft Lithography", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 550-575, 1998

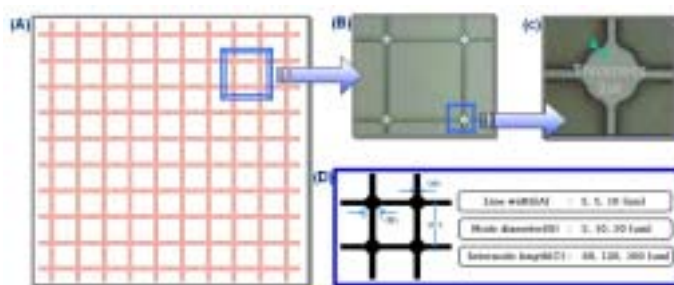


Figure 1. Microscope images of master pattern. (a) Mask layout, (b) and (c) The patterned photoresist master, (d) Grid shape and size.

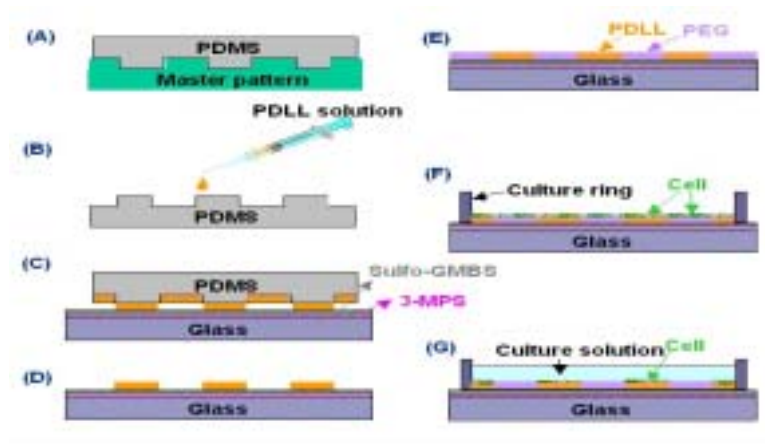


Figure 2. Schematic diagram of experimental method. (a) Fabrication of PDMS microstamp, (b) Coating of PDLL (c) and (d) μ CP, (e) Self Assembly of PEG, (f) Cell attachment on patterned substrate, (g) Pouring of culture media.

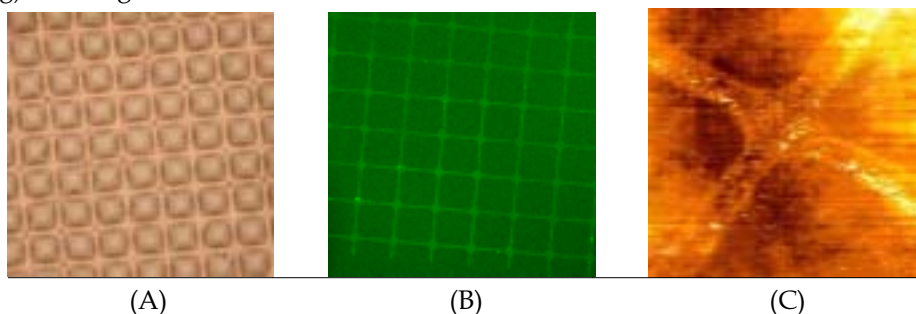


Figure 3. The printed patterns by micro contact printing: (a) Condensation figure, (B) Fluorescence image, (C) AFM topography.

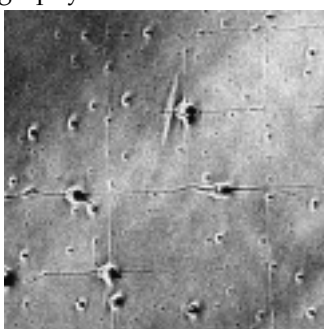


Figure 4. Patterned hippocampus neuronal network structure.