

# 배양접시 표면 젖음성 조절을 통한 활성화되지 않은 성상세포의 분리 및 배양

제갈 옥<sup>1</sup>, 박은영<sup>1</sup>, 고은민<sup>1</sup>, 신현정<sup>1\*</sup>

한국과학기술원 기계공학과<sup>1</sup>

## Isolation and culture of astrocytes without activation by modifying wettability of culture plate surface

Uk Jegal<sup>1</sup>, Eunyoung Park<sup>1</sup>, Eunmin Ko<sup>1</sup> and Jennifer H. Shin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Mechanical Engineering, KAIST, Republic of Korea

\* [j\\_shin@kaist.ac.kr](mailto:j_shin@kaist.ac.kr)

### Abstract

Astrocytes have cell-cell adhesion and cell-substrate adhesion, in contrast to microglia, which exhibit only cell-substrate adhesions in brain glial cells. Based on astrocytes' relatively strong cell-substrate adhesion, astrocytes are often isolated by eliminating other glial cells with weaker cell-substrate adhesion using an orbital shaker. However, this procedure may result in unintended activation of astrocytes due to fluid shear stimulation generated by shaking. This study demonstrates the process of isolating astrocytes without activating them by exploiting the cell adhesion characteristics of astrocytes and modifying the wettability of the culture plate surface via iCVD technology.

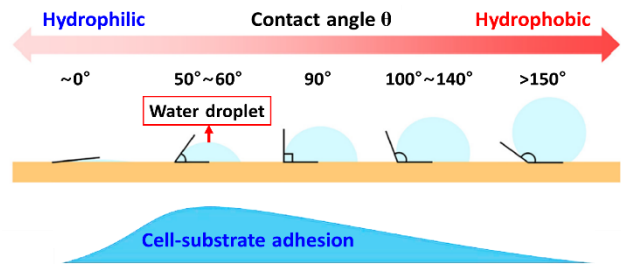
### 1. 연구배경

세포 부착(cell adhesion)은 세포-기질 부착(cell-substrate adhesion)과 세포 간 부착(cell-cell adhesion)으로 분류될 수 있다. 대부분의 세포에는 세포-기질 부착이 존재하는데, 세포 간 부착의 경우에는 세포의 종류에 따라 존재하지 않을 수도 있다. 예를 들어, 뇌의 신경아교세포(glia cell) 중에서, 미세아교세포(microglia)에서는 오직 세포-기질 부착이 존재하는 반면에, 성상세포(astrocyte)의 경우에는 세포 간 부착과 더불어 세포-기질 부착 모두가 존재한다. 또한, 성상세포는 다른 신경아교세포들에 비해 상대적으로 강한 세포-기질 부착력을 가지고 있기 때문에, 다양한 신경아교세포 내에서 성상세포를 분리하기 위해, 일반적으로 회전 진탕기(orbital shaker)를 활용하여 세포-기질 부착력이 약한 다른 신경아교세포들을 진탕(250 rpm, 18 hr)을 통해 제거함으로써 성상세포를 분리하게 된다 [1], [2]. 그러나 이 과정에서 진탕에 의해 발생하는 유체 전단(fluid shear)에 의한 자극으로 인해 의도치 않은 성상세포의 활성화가 나타날 수 있어, 기존의 분리 방법은 비활성 상태의 대조세포군을 확보하기 어렵다는 문제가 있다. 따라서, 물리적 자극에 의한 활성화 가능성을 최소화 하여 성상세포를 분리할 수 있는 방법을 고안할 필요가 있다.

한편, iCVD(Initiated Chemical Vapor Deposition) 공정을 통해, 배양접시 표면의 젖음성(wettability)을 제어할 수 있다고 알려져 있다 [3]. 이 공정은 기화된 단량체 (monomer)가 활성화되면서 고분자 중합 반응이 이루어져, 임의의 기판 표면 위로 고분자 초박막을 증착시키는 공정이다. 일반적인 배양접시 표면에 대한 젖음각(contact angle)은, 친수성에 해당되는 60° 정도인 것으로 알려져 있고, 상대적으로 더 친수화가 되거나 소수화가 될 경우, 세포가 배양접시 표면에 잘 부착하지 못하게 된다 (그림 1). 구체적으로, CHMA

(Cyclohexyl Methacrylate)라는 단량체를 활용하여 iCVD 공정을 통해 CHMA 동종 중합체(CHMA homopolymer, p(CHMA))를 배양접시 표면에 증착 시켰을 때, 표면의 접촉각이 80°가 되어 상대적으로 소수화가 되기 때문에, 세포 간 부착에는 아무런 영향을 주지 않으면서 세포와 배양접시 표면과의 부착은 방지되는 상태로 세포를 배양할 수 있게 된다.

이 연구는, p(CHMA)를 증착시킴으로써 소수화된 배양접시 표면에 신경아교세포들을 배양했을 때, 세포 간 부착이 존재하는 성상세포가 시간이 지남에 따라 3차원으로 스펀로이드화 되어 분리되는 결과를 확인함으로써, 물리적 자극에 의한 활성화 가능성을 최소화한 성상세포 분리 과정을 보여준다.



→ Relationship between surface wettability and cell-substrate adhesion  
※ Contact angle of conventional culture dish surface ≈ 60°

그림 1. 세포-기질 부착(cell-substrate adhesion)과 표면 젖음성 (wettability) 과의 상관관계

### 2. 연구방법

회전 진탕기를 활용한 성상세포 분리의 경우, 우선 생후 1~2일이 지난 쥐의 대뇌피질로부터 신경아교세포를 채취해야 한다. 이렇게 채취한 세포들은, DMEM 배양액에 10% FBS와 1%

Penicillin-streptomycin을 추가한 배양액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10~14일 간 Poly-D-lysine(PDL) coated T-75 flask에 배양한다. 마지막으로 회전 진탕기를 활용하여, 250 rpm 으로 18시간 동안 진탕함으로써, 세포-기질 부착력이 약한 다른 신경 아교세포들을 제거하고 성상세포를 분리할 수 있게 된다 (그림 2(a)).

p(CHMA)가 증착된 배양접시 표면을 활용한 성상세포 분리의 경우, 마찬가지로 우선 생후 1~2일이 지난 쥐의 대뇌피질로부터 신경아교세포를 채취해야 한다. 이렇게 채취한 세포들은, DMEM 배양액에 10% FBS와 1% Penicillin-streptomycin을 추가한 배양액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서, 표면이 p(CHMA)로 증착된 배양접시 내에 배양한다. 배양을 시작한 이후로부터 3~4일차에서, 표면으로부터 세포 간 부착을 지닌 성상세포가 3차원 스페로이드화 되어 분리되는데, 4일차에서 분리되었던 스페로이드가 다시 표면에 부착할 수 있기 때문에, 이를 방지하기 위해 모든 세포를 새로운 배양접시에 같은 방식으로 배양함으로써 표면에 부착되었던 스페로이드를 다시 분리해낸다.

p(CHMA)가 증착된 배양접시 표면으로부터 분리된 스페로이드와 진탕을 통해 분리된 성상세포로부터, qRT-PCR을 활용하여 성상세포 활성화와 관계된 유전자 발현 양상을 확인한다. (GFAP: 활성화된 성상세포(반응성 성상세포) 지표, C3: A1 반응성 성상세포 지표)

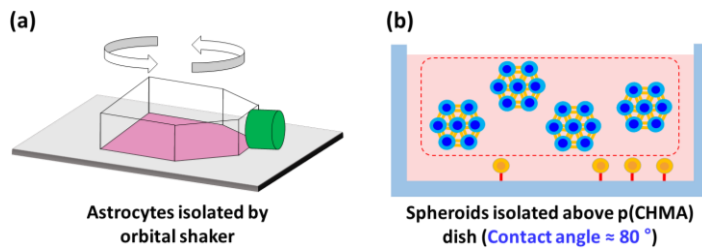


그림 2. (a) 회전 진탕기를 활용(250 rpm, 18 hr)한 성상세포 분리, (b) p(CHMA)가 증착된 배양접시 표면을 활용한 성상세포 분리

### 3. 연구결과

p(CHMA)가 증착된 배양접시 표면으로부터, 배양을 시작한 이후 5일차 일 때, 세포 간 부착이 없고 세포-기질 부착이 존재하는 미세아교세포는 배양접시 표면에 부착되어 있고, 세포 간 부착이 있는 성상세포는 스페로이드화 되어 표면으로부터 분리된 양상을, 위상차 현미경을 통해 확인할 수 있었다.

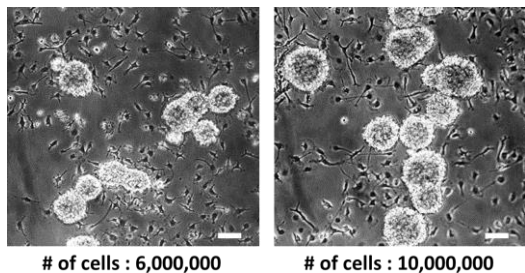


그림 3. p(CHMA)가 증착된 배양접시 표면 위의 성상세포가 포함된 3차원 스페로이드 (Scale bar : 150 μm)

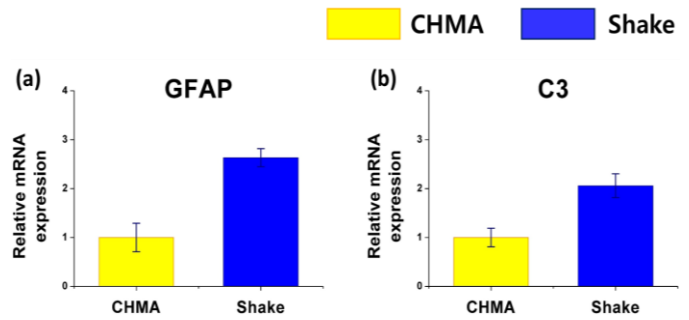


그림 4. p(CHMA)가 증착된 배양접시 표면 위의 성상세포와 진탕을 통해 분리된 성상세포로부터, (a) GFAP과 (b) C3에 대한 유전자 발현 결과

p(CHMA)가 증착된 배양접시 표면으로부터 분리된 스페로이드와 진탕을 통해 분리된 성상세포로부터, qRT-PCR을 활용하여 성상세포 활성화와 관계된 유전자 발현 양상을 확인하였다. GFAP은 활성화된 성상세포, 즉 반응성 성상세포에 대한 단백질이고, C3는 반응성 성상세포 중 A1 반응성 성상세포에 대한 마커로서 뇌신경 혈관단위 (neuro vascular unit)에 유해한 인자로 알려져 있다. 진탕을 통해 분리시킨 성상세포와 비교했을 때, p(CHMA)가 증착된 배양접시로부터 3차원 스페로이드화 되어 분리된 성상 세포에서, GFAP 발현과 C3 발현 모두 상대적으로 2배 이상 낮게 나타났음을 확인하였다. 이는 물리적 자극을 최소화하여, 성상세포를 분리하고자 했던 실험 목적에 맞는 긍정적인 결과로 볼 수 있다.

이 연구 결과는, 배양접시 표면의 젖음성 차이와 세포 간 부착이 존재하는 성상세포의 특성을 활용함으로써, 물리적 자극에 의한 성상세포의 활성화 가능성을 최소화하여 성상세포를 분리할 수 있음을 보여준다. 따라서, 해당 연구 내용은 성상세포에 대한 비활성화 상태의 대조 세포군을 확보하는데 용이하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 4. Acknowledgements

This research was supported by the Basic Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the MSIT(NRF-2021R1A4A1031198).

### 5. 참고문헌

1. Hu, Y., et al. (2021). "Matrix stiffness changes affect astrocyte phenotype in an in vitro injury model." *NPG Asia Materials* **13**(1).
2. Zhao, X., et al. (2014). "Control of astrocyte progenitor specification, migration and maturation by Nkx6.1 homeodomain transcription factor." *PLoS One* **9**(10): e109171.
3. Choi, M., et al. (2018). "Polymer Thin Film-Induced Tumor Spheroids Acquire Cancer Stem Cell-like Properties." *Cancer Res* **78**(24): 6890-6902.