

# 점탄성 유체 기반 혈액 세포로부터 전립선 암세포의 비표지적, 연속 분리

임현정<sup>1</sup>, 김태은<sup>1</sup>, 추승희<sup>2</sup>, 박지은<sup>3</sup>, 주설우<sup>3</sup>, 엄준식<sup>3</sup>, 박규빈<sup>4</sup>, 오가영<sup>3</sup>, 김여진<sup>4</sup>, 안준석<sup>3</sup>, 남정훈<sup>1,3,4\*</sup>

인천재능대학교 인공지능바이오연구소<sup>1</sup>, 인천대학교 생명공학부 나노바이오전공<sup>2</sup>,

인천재능대학교 송도바이오과<sup>3</sup>, 인천재능대학교 송도바이오생명과<sup>4</sup>

## Label-free, continuous separation of prostate cancer cells among blood cells using a viscoelastic fluid

Hyunjung Lim<sup>1</sup>, Tae Eun Kim<sup>1</sup>, Seung Hee Choo<sup>2</sup>, Jion Park<sup>3</sup>, Seolwoo Joo<sup>3</sup>, Junsik Eom<sup>3</sup>, Kyu Been Park<sup>4</sup>, Gayeong Oh<sup>3</sup>, Yeojin Kim<sup>4</sup>, Jun Seok An<sup>3</sup>, Jeonghun Nam<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Artificial Intelligent-Bio Research Center, Incheon Jaeneung University, Korea

<sup>2</sup>College of Life Sciences and Bio engineering, Incheon National University, Korea

<sup>3</sup>Department of Song-do Bio Engineering, Incheon Jaeneung University, Korea

<sup>4</sup>Department of Song-Do Bio Life Engineering, Incheon Jaeneung University, Korea

\*jhnam77@gmail.com

### Abstract

Circulating tumor cells (CTCs) have gained increasing attention as non-invasive biomarkers for clinical diagnosis and oncological research. According to recent developments in microfluidics, separation of CTCs from blood sample has been demonstrated using microfluidic devices. Recently, viscoelastic microfluidics has been widely applied to particle/cell separation and concentration, due to its advantages including simple channel structure and wide flow rate ranges. Here, we utilized a viscoelastic fluid in a microchannel for a sheathless, label-free, continuous separation of CTCs from white blood cells (WBCs). As a proof of concept, fluorescent particles (diameters of 10 and 20  $\mu\text{m}$ ) were used and successfully separated in 2000 ppm xanthan gum solution at 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

### 1. 연구 배경

최근 기존의 조직생검을 대체하는 기술로 액체생검 기술이 주목을 받고 있다. 기존 침습적인 방식의 조직생검 대신 채취가 용이한 생체유체 시료, 특히 혈액을 기반으로 한 액체생검 기술은 암의 조기진단 및 전이 여부 검사뿐만 아니라 종양학 관련 다양한 연구 분야에 활용 가능하게 되었다. 순환종양세포(circulating tumor cell, CTC)는 말초 혈류에서 발견되는 종양세포로서, 원발성 종양 조직으로부터 떨어져나와 혈류를 따라 흐르며 암의 전이를 일으키는 것으로 알려져 있다 [1]. 이러한 순환종양세포는 종양에 대한 주요한 정보를 포함하고 있는 것으로 알려져 있어, 조기진단 및 암의 치료 과정에 대한 실시간 모니터링, 암에 관한 연구에 주요한 바이오마커로 이용되고 있다. 그러나 순환종양세포는 약 1ml의 혈액 내에 10억개의 혈액 세포 대비 1-10개 정도로 극히 희박한 농도로 존재하기 때문에 분석 이전에 순환종양세포의 분리 및 농축 과정이 필수적으로 요구된다.

최근 미세유체소자 기술의 혁신적인 개발에 따라 혼합 시료로부터 세포 분리 및 농축 등의 제어 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 별도의 외력 사용 없이 미세유체소자 내의 채널 구조 및 유체역학적인 특성을 기반으로 세포를 제어하는 기술이 순환종양세포의 분리를 목적으로 활용된 바가 있다 [2]. 이를 위하여 미세한 크기의 필터를 이용하는 방식, 미세유동채널의 특수 형태 설계를 이용하는 방식 등이 차용되었다. 그러나 이러한 방식은 채널의 정교한 설계 및 3차원 구조물 제작을 위한 복잡한 공정을 거쳐야 한다는 한계점이 존재한다. 이를 극복할 수 있는 방법으로 최근 비뉴턴성 점탄성 유체 기반의 미세유체역학 기술이 주목을 받고 있다. 점탄성 유체는 고분자 화합물을 극미량 혼합한 용액으로서, 유체 내부의 일차수직응력차의 불균일한 분포에 의하여 유동방향과 수직인 방향으로 탄성력이 작용하게

된다. 이 탄성력을 기반으로 점탄성 유체 내에 부유된 미세입자나 세포를 유동 중에 측면으로 이동시킬 수 있으며, 탄성력이 입자/세포의 크기에 비례하기 때문에 크기별 분리가 가능하다는 특징이 존재한다. 또한, 기존의 물과 같은 뉴턴성 유체를 이용하여 채널의 구조, 유체역학적인 특징을 이용하는 기술과 달리 점탄성 유체를 이용할 경우 복잡한 채널 구조 없이 직사각형 단면의 일자 채널 내에서도 다양한 힘의 구배를 활용할 수 있다는 장점을 갖는다. 이러한 장점을 기반으로 하여 점탄성 유체 기반 세포 포커싱 및 농축, 크기 기반의 세포 분리 등 다양한 활용 연구가 발표되었다 [3].

본 연구에서는 별도의 도움유체 및 라벨링 과정 없이 연속유동 상태에서 점탄성 유체를 이용하여 혈액세포로부터 전립선암 세포(DU-145)를 분리하는 소자를 개발하였다. 점탄성 유체 제조를 위한 고분자 화합물 중 잔탄검(xanthan gum)을 이용하였으며, 이는 암세포 분리 연구에 기존에 활용된 바 없는 물질이다. 개념증명을 위하여 전립선암 세포와 백혈구를 모사할 수 있는 형광 인공입자를 이용하여 유동특성을 평가하였으며, 혼합시료로부터 각각 성공적으로 분리됨을 확인하였다.

### 2. 연구 방법

#### (1) 소자 설계 및 제작

실험에 사용된 미세유동채널은 너비 80 $\mu\text{m}$ , 높이 40 $\mu\text{m}$ 의 직사각형 단면의 일자형 미세유동채널로 설계하였다. 채널의 주채널부 길이는 25mm이며, 1개의 주입구와 주채널부에서 3분지로 연결된 2개의 출구를 갖는다. 미세유동채널은 일반적인 소프트 리소그래피 방식을 통해 제작되었다. SU-8 감광제를 이용하여 실리콘 웨이퍼에 제작된 마스터 몰드에 Polydimethylsiloxane (PDMS) 베이스와 경화제를 10:1로 혼합하여 부어 80°C 오븐에서 1시간 경화시킨 뒤 떼어낸 후

oxygen plasma 장비를 통해 비가역적접합하였다.

**(2) 시료 준비**

실험에 사용된 점탄성 유체는 고분자 화합물인 잔탄검 가루를 phosphate-buffered saline (PBS)에 녹여서 제조하였다. 용액의 특성을 평가하기 위하여 500, 1000, 1500, 2000 ppm 농도의 잔탄검 용액을 준비하였다.

제작한 미세유체소자의 유동특성을 분석하여 개념을 증명하기 위하여 전립선암 세포와 백혈구의 크기를 모사할 수 있는 10 μm와 20 μm 직경의 형광 폴리스티렌 인공입자를 선택하였다. 해당 입자는 잔탄검 용액에 약 1.2x10<sup>5</sup> /ml 농도로 부유시켜 사용하였다.

**(3) 실험 과정**

준비된 시료의 주입 및 주입 유동율은 실린지 펌프(Fusion-4000, Chemyx, TX, USA)를 통해 제어되었다. 실험 과정에서 형광 인공입자의 유동은 형광 카메라(CS230B, Olympus)가 장착된 도립현미경(IX71, Olympus)을 통해 관찰하였다.

**3. 연구 결과**

**(1) 작동 원리**

그림 1번은 혈액 세포(백혈구)로부터 전립선암세포를 분리하기 위한 소자의 작동을 나타내는 그림이다. 미세유체채널의 1개의 주입구를 통해 혼합된 시료가 주입되며, 이 때 각 크기의 입자는 랜덤하게 분포한 상태로 흘러가는 것이 확인 가능하다. 개발된 소자의 주채널부는 낮은 종횡비 (종횡비=높이/너비)를 갖는 슬릿 채널 형태로서, 유동 중 잔탄검 용액의 점탄성 특성을 통해 형광 입자는 유동방향과 수직한 채널의 측면 방향으로 가해지는 탄성력의 영향을 받게 된다. 이후 출구영역에서 확인한 결과, 상대적으로 크기가 큰 20 μm 형광입자 (전립선암세포 모사)는 채널의 양쪽 벽면 쪽으로 밀려, 채널의 벽을 따라 흘러 나가는 것을 알 수 있다. 한편, 상대적으로 크기가 작은 10 μm 형광입자 (백혈구 모사)는 채널의 가운데 영역으로 들어와 넓게 분포하는 것을 확인하였다. 이를 통해 출구를 3분지로 설계하면 양쪽 측면 출구에서는 전립선암세포 (DU-145)를 분리하여 수집할 수 있으며, 가운데 출구로는 백혈구를 제거할 수 있다.

그림 1의 하단 그림은 2000ppm의 잔탄검 용액 내에 부유된 10과 20 μm 크기 입자의 유동 패턴을 보여주는 것으로서, 25 μl/min의 유동율을 조건에서 촬영되었다.

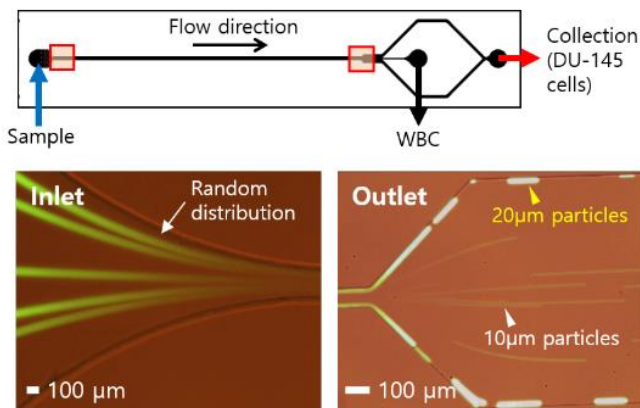


그림 1. 혈액 시료로부터 전립선 암세포 분리를 위한 점탄성 유체 기반 미세유체소자 개략도 및 형광 인공입자를 이용한 개념확인용 실험 결과

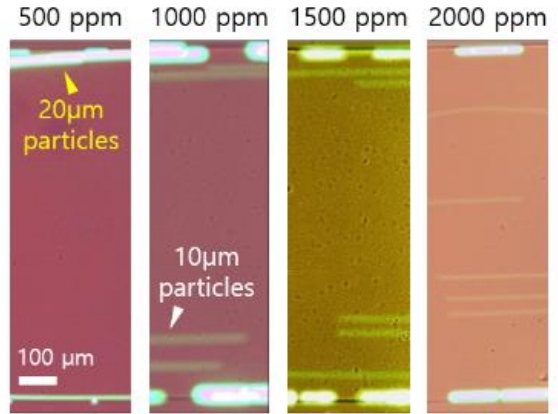


그림 2. 유동율 25 μl/min 조건에서 잔탄검 용액의 농도에 따른 10과 20 μm 형광 인공입자의 유동 분포

**(2) 점탄성 용액의 농도별 유동 특성 평가**

각 크기별 입자의 유동 패턴에 미치는 점탄성 용액의 농도의 영향을 평가하기 위하여 500, 1000, 1500, 2000 ppm 농도의 잔탄검 용액을 각각 이용하였다. 그림 2는 각 농도별 용액을 이용하였을 때, 25 μl/min의 고정된 유동율 조건에서 출구 영역에서의 입자 분포를 보여준다.

잔탄검 용액의 점탄성 특성에 따라 상대적으로 크기가 큰 20 μm 입자는 전체 농도에서 채널의 양쪽 벽면 쪽으로 밀려 채널의 벽을 따라 흘러 나가는 것을 확인하였다. 한편 10 μm 입자는 500 ppm의 잔탄검 용액에서는 20 μm 입자와 함께 채널의 벽을 따라 유동하지만, 잔탄검 용액의 농도가 높아질수록 점차 채널의 가운데 방향으로 그 분포가 이동하는 것을 확인할 수 있었다.

현재의 고정된 유동율 조건 (25 μl/min)에서는 2000 ppm 농도의 잔탄검 용액이 각각 다른 크기의 입자/세포를 분리하기에 가장 유리한 것으로 확인되었다. 그러나 잔탄검 용액의 농도가 높아질수록 점도가 함께 높아지므로 소자의 수율을 높이기 위해 적합하지 않으므로, 향후 소자의 수율을 높일 수 있는 최적화 과정을 위하여 유동율 조건별 입자의 유동 분포 평가 실험을 추가적으로 수행할 것이다. 이후 본 기술은 혈액 내에 존재하는 혈액 세포 대비 크기가 큰 암 세포를 분리 및 추출할 수 있는 플랫폼으로서 활용될 수 있을 것이며, 점탄성 유체의 특성상 단순한 채널 구조 활용 및 단일 주입구 활용이 가능하기 때문에 병렬 채널화를 통해 고수율 플랫폼화가 가능할 것으로 예상된다.

**4. Acknowledgements**

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제의 지원을 받아 수행하였음 (No. 2020R1A2C1014460).

**5.참고 문헌**

[1] K. Pantel and C. Alix-Panabieres. "Circulating tumor cells in cancer patients: Challenges and perspectives." *Trends Mol. Med.*, Vol. 16, p.398-406, 2010  
 [2] K. Louterback, J. D'Silva, L. Liu, A. Wu, R. Austin, J.C. Sturm. "Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 mL/min." *AIP Advances*, Vol.2, p.42107, 2012  
 [3] J. Nam, Y. Shin, J.K.S. Tan, Y.B. Lim, C.T. Lim, S. Kim. "High-throughput malaria parasite separation using a viscoelastic fluid for ultrasensitive PCR detection." *Lab on a Chip*, Vol.16, p.2086-2092, 2016