

미세유동시스템 내에서의 입자의 위치제어 연구

Control of the Motions of Particles in Microfluidic System

저자	허윤석
(Authors)	Yun Seok Heo
출처	<u>한국정밀공학회지 31(6)</u> , 2014.6, 521-525 (5 pages)
(Source)	Journal of the Korean Society for Precision Engineering <u>31(6)</u> , 2014.6, 521-525 (5 pages)
발행처	<u>한국정밀공학회</u>
(Publisher)	Korean Society Of Precision Engineering
URL	http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE02414353
APA Style	허윤석 (2014). 미세유동시스템 내에서의 입자의 위치제어 연구. 한국정밀공학회지, 31(6), 521- 525.
이용정보 (Accessed)	계명대학교 114.71.4.120 2016/07/12 10:44 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

미세유동시스템 내에서의 입자의 위치제어 연구

Control of the Motions of Particles in Microfluidic System

허윤석 ^{1,⊠} Yun Seok Heo^{1,⊠}

Manuscript received: 2014.3.25 / Revised: 2014.5.5 / Accepted: 2014.5.5

Circulating tumor cells (CTCs) in the bloodstream of cancer patients provide an accessible source for detection, characterization, and monitoring of nonhematological cancers. The effectiveness of the CTC-Chip for the isolation of ovarian cancer cells was demonstrated by adapting the herringbone-chip (HB-Chip). The motions of the particles on the HB chip were simulated by a unique combination of buoyant, gravitational forces, and helical flows with a computational modeling. The motions of cells are demonstrated by applying polystylene bead and ovarian cancer cells into the microfabricated HB-Chip. The experimental results from beads and cells are well accordance with the simulated ones, as previously reported by Toner group. Thus, I expect that these modeling and experimental skills will play key roles in the clinical applications on CTC isolation as well as the basic research on characterization of CTCs under flow.

Key Words: Microfluidics (미세유체), Herringbone Chip (헤링본칩), Circulating tumor cell (혈중종양세포), Ovarian cancer (난소암), Motion of Particle (입자유동)

기호설명

 F_d : Drag force acting on the particle V_m : Velocity of fluid V_p : Velocity of particle F_b : Buoyancy acting on the particle ρ_m : Density of fluid F_g : Gravity acting on the particle ρ_p : Density of particle g: Gravitational acceleration R: Radius **1. 서尾**

혈중종양세포(CTC)는 암이 처음 발생한 부분, 즉 전이성을 가지는 부분에서 떨어져 나와 혈액 중에 순환하는 세포로써 암이 전이 될 수 있는 잠 재적인 원인을 제공한다. 예를 들어 혈중종양세포 는 상피암 중에서 주로 발견되며 대장암, 폐암, 전 립선암, 유방암, 난소암 등에서 발생될 수 있다.¹ 특히 본 연구에서 다루고자 하는 난소암은 50~70 세 사이의 여성에서 주로 발견되며 자궁경부암에 이어 두 번째로 흔한 부인과 암으로 5년 생존율이 15~20%로 불과하여 암의 진행과 치료경과에 대한 정확한 진단이 요구되어지는 질병이다.² 현재 암을 진단하는 일반적인 방법은 조직의 일정부분을 떼 어내어 조사하는 생검(Biopsy)인데 정확한 생검부 위를 결정하는 것이 쉽지 않을 뿐 만 아니라 치료 경과에 따른 조직의 반복적 생검이 어렵다는 단점 이 있다. 이에 비해 최근 연구되어지고 있는 바이 오칩을 활용한 액체 생검(Liquid Biopsy)방법은 간 단히 혈액 시료만 채취하여 혈액 내에 존재하는 혈중종양세포를 검출을 통해 암의 진행과 암의 치 료경과를 가늠할 수 있는 장점이 있다. 이러한 장 점으로 인해 혈중종양세포 분리 바이오칩 연구가 중요하나 아직까지는 난소암 세포 분리를 바이오 칩에 적용한 사례는 드물다.

지금까지 연구된 혈중종양세포 분리 칩은 주로 EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) 등의 항체 를 칩 내부에 제작된 수 많은 미세 기둥에 코팅한 다음 암세포와의 상호작용을 이용하여 세포를 포 획한다.3 이 기술은 유체의 속도에 따라 혈중 종양 세포가 미세유동채널 내를 이동하다가 세포와 미 세 기둥 표면 사이의 항원 항체 반응의 상호 작용 에 의해 세포가 표면에 부착됨으로써 포획되는 원 리를 이용하는 것이다. 이는 표면에 붙은 세포가 유체의 속도에 의해 떨어질 가능성이 있고 세포가 무작위로 어디에 붙어 있을지 모를 뿐 만 아니라 불충분한 표면과의 상호 작용으로 인해 혈중종양 세포가 검출되지 못 할 확률이 존재한다. 이런 단 점을 극복하고 정밀한 유체유동제어를 통해 보다 더 효율적으로 혈중종양세포를 검출하기 위해 혈중 종양세포와 표면과의 상호 작용을 증가시킨 Herring Bone Chip (HB-Chip)이 개발되었다.^{4,5} 처음 Herring Bone 디자인은 미세유동채널 내의 특징 중 하나인 낮은 레이놀즈수로 인해 유체의 혼합이 이루어 지 지 않는 단점을 극복하기 위하여 미세유체혼합기 (Micro-mixer)로 개발되었으나⁶ Toner group에 의해 혈중종양세포 분리칩으로 처음 연구되었다. 하지만 난소암 세포의 분리는 아직 연구된 바가 없으므로 본 연구에서는 난소암 세포 분리를 위한 전 단계로 미세유동채널 내에서의 유동 제어와 세포 위치 제 어 가능성을 연구하였다. 먼저, 미세유동채널 내의 검출 확률을 높일 수 있는 Herring Bone Chip (HB-Chip)을 제작한 다음 혈중난소암 세포 분리를 위한 유동 현상을 수치적으로 해석하였고 실험적으로 입자 및 세포 이동 현상을 제어하였다.

이러한 바이오칩 상에서의 유체 및 입자제어 기술은 합리적인 치료방법과 전이 암의 주요 전이 인자 연구를 위해 필요할 뿐 만 아니라, 암 환자 의 혈액 속에 아주 적은 수의 종양세포를 정확하 고 민감하게 확인하기 위해 필수적으로 선행되어 야 하는 부분이다. 예를 들어 정상 세포와 암세포 를 분리하기 위해서는 유동장 내에서의 세포 특성 (크기, 밀도 등)에 따른 세포의 분리 유형에 대한 해석이 선행되어야 한다.⁷

2. 연구 방법

2.1 COMSOL 시뮬레이션

COMSOL Multiphysics 4.3b를 사용하여 HB Chip 내에 입자 유동을 컴퓨터 모델링을 수행하였다. 첫 번째 시뮬레이션 (입자의 유동 방향의 측면 이 동 없는 유동)은 크기가 폭1000μm, 길이1930μm, 높이50µm의 미세유동 채널 천장에 HB 패턴은 15 개를 형성한 다음 미세채널내의 유동 현상을 모델 링 하였다. 미세채널은 1개의 입구(inlet)와 1개의 출구(Outlet)로 구성되어 있으며 입구(inlet)의 유속 은 1.98×10⁻⁴ m/s로 지정하였으며 출구(outlet)는 자 유단(no pressure)으로 설정하였다. 채널 속을 흐르 는 유체는 물의 특성을 지정하였으며, 메쉬(mesh) 는 free triangular, swept1, 2로 나누고 최대 크기를 각각 20, 15, 15 로 제한하였다. 유속의 입자 추적 을 설정해 주고 입자의 크기는 10~20μm로 설정했 으며 time dependent로 유동을 해석을 하였다. 두 번째 시뮬레이션(입자의 유동 방향의 측면 이동이 있는 유동)은 크기가 폭 1200µm, 길이 2230µm, 높 이 50μm 인 미세유동채널로 HB패턴은 9번째에서 측면으로 전위(shift)해서 이 후 9개의 패턴을 추가 하였다. 메쉬(mesh)의 종류에 따른 최대크기는 각 각 20, 15, 15로 나머지 설정은 첫번째 모델링과 같 게 하였다.

2.2 HB-Chip 제작

Fig. 1(a)에서 보여지듯이 HB-Chip은 HB 패턴을 가진 상층부(top layer)와 유체가 흘러 가는 주 채널 (main channel)을 가진 하층부(bottom layer)의 두 개 층으로 이루어져 있다. 두 층은 모두 의 polydimethylsiloxane (PDMS)를 이용하여 제작 되었 다. 즉, 소프트 리소그라피 기술을 이용하여 실리 콘 웨이퍼 위에 SU-8으로 패턴을 형성하였다. 높이 는 60µm로 제작 되었다. 그 위에 PDMS를 부어 오 븐에 75℃로 4시간 정도 보관하고 고형화된 PDMS 를 웨이퍼에서 제거한다. 유체가 흐르는 아래 기본 패턴이 있는 PDMS와 HB 패턴이 있는 플라즈마 처리를 통해 PDMS를 친수성(hydrophilic)으로 만들 어 준 후 양 PDMS를 결합하여 칩을 완성한다.

2.3 Micro Bead 실험

PDMS에 유체를 흘려줄 수 있는 구멍을 낸 뒤 에 관을 이용하여 주사기(3ml)를 연결해 준다. 먼 저 Surfactant(pluronic127) 0.02%를 최소 200µl 이상



Fig. 1 (a) Schematic drawing of HB-Chip. HB patterns are located on the surface of the Top PDMS layer and main flow channel is on the Bottom PDMS layer. (b) Flow patterns on the plane of a crosssection (A-A'). Heavy particles are focusing at the rear edge of HB pattern.

흘려준다. 세포 실험을 하기 전에 테스트를 하기 위함으로 세포와 유사한 Polystyrene Bead (10~20μm, 0.96~1.04g/cm³)를 PBS와 1:50으로 섞어준다. Vortexing 해준 후 약 10μl/min으로 흘려준다.

2.4 난소암 세포 실험

일주일 정도 배양시킨 난소암 세포를 인큐베이 터에서 꺼내어 배양액(media)를 흡입(suction) 해준 다. PBS(10X)로 씻어 준 후 트립신을 처리하여 3분 정도 두어 인큐베이터에 보관하여 준다. 암 세포 가 배양 dish에서 떨어 진 것을 확인한 후 PBS 15ml 정도를 섞어 주어 원심분리(centrifugation, 1000RPM 5분 4℃)를 해준다. 암 세포가 다 가라 앉아 있는 상태에서 상층액을 모두 제거 하여 주 고 7ml 정도 배양액(media)을 넣어 준다. 파이페팅 을 가라앉은 암 세포가 없을 정도로 해준다.

Surfactant(pluronic127) 0.02%를 처리해준 Chip에 주사기(3ml)를 이용하여 암 세포를 10~20 μl/min 으 로 흘려준다.

3. 연구결과

3.1 입자 유동 모델링

Fig. 1(b)에 보듯이 헤링본(HB) 구조의 비스듬한 홈에 의해 유체의 굴절 현상(미세 소용돌이)이 발 생한다. 유체의 흐름에 의해 발생하는 항력(F_d), 입 자의 부력(F_b) 및 중력(F_g)에 의한 세 힘의 균형에 의해 입자의 위치가 결정되어진다.

이론적 모델은 기 발표된 Toner Group 논문의 해석을 기본으로 하여 재해석 하였다.⁶ 항력(F_d)은 주위의 유체의 종류, 운동하는 물체의 형태, 크기, 속도에 따라 달라진다. 특히 작은 물체가 천천히 움직일 때에는 주위 유체의 점성 때문에 속도에 비례한 힘이 작용하는데 여기서 스토크스 법칙이 적용된다. 항력(F_d)은

$$F_{d} = -6\pi R\eta (V_{m} - V_{p})$$
 (a)

식으로 나타낸다. 입자에 작용하는 부력(Fb)은

$$F_b = 4/3\pi R^3 \rho_m g \tag{b}$$

중력(Fg)는

$$Fg = 4/3\pi R^3 \rho_p g \qquad (c)$$

식으로 나타낼 수 있다. 항력은 수직방향과 좌우 (비스듬한 홈)방향으로 힘을 받고 부력과 중력은 위아래 수직방향으로만 힘이 영향을 받는다. 수직 방향으로 작용하는 항력의 크기는 중력과 부력의 힘의 차이보다 작거나 같아야 입자가 모이는 현상 이 일어난다. 그러므로

$$\left| \mathbf{V}_{\mathrm{mz}} \right| \le 2R^2 g/9\eta \left| \rho_{\mathrm{p}} - \rho_{\mathrm{m}} \right| \tag{d}$$

이 성립된다. 따라서 유체 밀도를 조절함으로써 입자를 원하는 위치에 포커싱 할 수 있다.⁶ 이 때 V_{mz}, 즉 유체의 수직방향 속도의 최대치가 중요한 요소로 작용하는데 속도가 너무 높으면 모이는 현 상이 일어나기 힘들기 때문이다.

입자와 유체의 밀도를 각각 1.04g/cm³, 1.0g/cm³ 이므로 계산한 V_{mz}의 최댓값은 8.71×10⁻⁵m/s이 나 온다. 시뮬레이션의 최대 유속 값은 6.55×10-5m/s, 6.97×10-5m/s이다. V_{mz} 범위 안에 들어오므로 조건 이 성립한다. Fig. 1(b)에서 입자의 밀도가 유체의 밀도 보다 무거운 경우를 보여 주며 항력, 부력, 중력의 균형에 의해 HB 패턴에서 앞쪽으로 꺽여 진 엣지 부분에 입자가 모여짐을 보여 준다. Fig. 2 를 통해 시뮬레이션 결과 또한 입자가 HB 패턴의 엣지 부분에 모여지는 현상을 확인할 수 있다.

3.2 입자 유동 실험

시뮬레이션 한 이론을 바탕으로 Bead와 난소암 을 이용하여 Chip 내 입자 유동을 관찰하였다.



Fig. 2 Particle flow simulation



Fig. 3 Micro Bead Flow

Bead size는 10~20µm를 사용 하여 난소암과 유사 한 조건을 만들어 Chip에 흘려주었다. Fig. 3과 같 이 두 패턴 모두 입자가 모이는 현상을 확인 할 수 있다. 패턴을 중간에 이동시켜 패턴의 변화를 주어도 다시 원래 흐르던 패턴으로 유지하여 흐르 려는 모양을 관찰 할 수 있었다.

그림 4는 난소암을 이용하여 헤링본 Chip에서 입자 유동 관찰을 한 사진이다. 그림 3과 비교해



Fig. 4 Ovarian Cancer flow (×10)

보면 모아지는 현상이 Bead 만큼은 아니지만 어느 정도 세포가 모아지는 것을 볼 수 있다.

4. 결론

HB 구조의 Chip에 의한 입자의 유동해석을 이 론적으로 재해석하고 시뮬레이션과 실험을 통해 입증하였다. HB Chip을 통해 혈액에서 혈중종양세 포를 분리하여 암이 전이될 확률을 찾아내는데 더 효율적일 것이다.

그리고 세포의 물성치를 알고 싶지만 알아내는 것이 쉽지 않은데 우리는 (a)의 식을 이용하여 세 포의 밀도 값을 알아 낼 수 있다. 세포가 모아지 는 최대 속도 값을 측정 한 후 유체의 밀도와 최 대 속도 값을 식에 대입해 주면 입자의 밀도가 나 오게 된다. 입자가 미세 소용돌이에 의해 모아지 는 현상뿐만 아니라 입자에 가해지는 중력, 항력, 부력을 통해 식을 유도하면 반대로 입자의 밀도도 알 수 있다. 또 흐르는 용액의 밀도를 조절하여 입자를 분리 할 수도 있다. 이것을 이용하여 정상 세포와 비정상세포의 밀도가 다르다는 가정 하에, 비정상세포를 밀도를 이용해서 분리하여 CTC 이 외에도 여러 세포를 구분하여 분리하는데 사용할 수 있다.

후 기

본 연구는 2013년도 계명대학교 비사(신진)연 구기금으로 이루어졌음.

REFERENCES

- Steeg, P. S., "Tumor Metastasis: Mechanistic Insights and Clinical Challenges," Nature Medicine, Vol. 12, No. 8, pp. 895-904, 2006.
- Jiang, W., Huang, R., Duan, C., Fu, L., Xi, Y., and et al., "Identification of Five Serum Protein Markers for Detection of Ovarian Cancer by Antibody Arrays," PLoS One, Vol. 8, No. 10, Paper No. e76795, 2013.
- Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., and et al., "Isolation of Rare Circulating Tumour Cells in Cancer Patients by Microchip Technology," Nature, Vol. 450, No. 7173, pp. 1235-1239, 2007.
- Hsu, C. H., Di Carlo, D., Chen, C., and Irimia, D., "Microvortex for Focusing, Guiding and Sorting of Particles," Lap on a Chip, Vol. 8, No. 12, pp. 2128-2134, 2008.
- Stott, S. L., Hsu, C. H., Tsukrov, D. I., Yu, M., Miyamoto, D. T., and et al., "Isolation of Circulating Tumor Cells using a Microvortex-generating Herringbone-chip," PNAS, Vol. 107, No. 43, pp. 18392-18397, 2010.
- Stroock, A. D., Dertinger, S. K., Ajdari, A., Mezić, I., Stone, H. A., and et al., "Chaotic Mixer for Microchannels," Science, Vol. 295, No. 5555, pp. 647-651, 2002.
- Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., and Haber, D. A., "Circulating Tumor Cells: Approaches to Isolation and Characterization," The Journal of Cell Biology, Vol. 192, No. 3, pp. 373-382, 2011.