

줄기세포재생 치료를 위한 배지의 전압 반응 실험

윤기철*, 김정태*, 김범수**, 이준***, 이종철[°]

Experiment of Response with Voltage for Stem Cell Regeneration Treatment

Ki-Cheol Yoon*, Jung-Tae Kim*, Beom-Su Kim**, Jun Lee***, Jong-Chul Lee[°]

요약

본 논문은 줄기세포 재생 치료를 위해 사용되는 배지에 직류전압을 인가하여 배지에 반응되는 전기적인 저항값, 전류값 그리고 전압값의 상태에 대해 분석하였다. 배지에 반응되는 전압은 줄기세포 분화 유도 과정에서 전기적인 자극에 연관되며 반응 전압 상태에 따라 분화의 상태에 대해 확인 할 수 있다. 배지의 반응 전압에서 전압변화 레벨이 적으면 줄기세포 자극 조건이 안정적이며 만일 전압 변화 레벨이 심하면 줄기세포 자극 조건이 불안정하여 줄기세포 분화 과정에서 상당한 손실을 따르게 될 수 있다. 본 연구는 줄기세포 재생 치료의 가능성을 위해 전기적인 자극 조건의 최적화 하는데 도움이 될 것으로 기대한다.

Key Words : stem cell, stimulation, DC voltage, incubator, plate

ABSTRACT

In this paper, the electrical values of resistance, current, and voltage condition of reactivity is analyzed by applying the direct current (DC) voltage in medium for stem cell regeneration treatment. The voltage response by medium is related to electrical stimulation in the process of induction of differentiation for stem cell and the differentiation condition can be checked depending on the response of voltage condition. If the voltage level is lower in reacting response of a medium, the stem cell stimulation condition is stable, and if the voltage changing level is higher, the stem cell stimulation condition is unstable and a considerable loss will be resulted in the differentiation process.

In this research, the optimization of electrical stimulation condition is expected for possible stem cell regeneration treatment.

I. 서 론

오늘날 인간의 평균 수명의 증가와 더불어 심혈관질

환, 신경질환, 당뇨병, 골관절염 등 퇴행성 질환 및 말기 장기부전 질환의 빌병률이 크게 증가하고 있다. 이러한 난치성 질환은 조직 손상이 심하지 않은 경우 기

* 본 연구는 광운대학교 2014년도 교내연구비(2014-0095) 지원으로 수행되었습니다.

** 본 연구는 원광골재생연구소 및 본셀비아오텍 부설연구소에서 수행되었습니다.

◆ First Author : Korea Advanced Institute of Science and Technology, The Cho Chun Skik Graduate School for Green Transportation, kcyoon98@kaist.ac.kr 정회원

◦ Corresponding Author : Kwanwoon University, Dept. of Electronics Convergence Engineering, jclee@kw.ac.kr, 종신희원

* Kwanwoon University, Dept. of Radio Science and Engineering, taurren@empas.com

** Bonecell Biotech Inc. R&D Center, osteokim@bonecell.co.kr

*** Wonkwang Bone Regeneration Research Institute, omslee@wku.ac.kr

논문번호 : KICS2016-04-057, Received April 14, 2016; Revised June 29, 2016; Accepted July 21, 2016

존의 약물 투여 및 외과적 수술법으로 치료가 가능하다. 그러나 중상이 심한 많은 환자들의 경우 손상된 조직을 완전히 재생 시키고 기능을 회복시키기보다 근본적인 치료술이 필요하다. 줄기세포는 다양한 세포 및 조직으로 분화가 가능하여 기존의 방법으로는 치유가 어려운 난치성 질환을 위한 새로운 치료제로서 각광받고 있다^[1].

줄기세포는 배아 줄기세포와 성체 줄기세포로 구분되며 성체 줄기세포는 조혈모세포(HSC : hematopoietic stem cell)와 중간엽 줄기세포(MSC : mesenchymal stem cell)이고 중간엽 줄기세포는 골수에서 추출이 용이하여 골세포, 근육세포, 연골세포 및 지방세포 등으로 분화가 용이하여 특정 배양 조건하에 연골, 뼈, 근육, 인대 및 지방 조직 등으로 분화를 유도가 가능함으로 여러 난치성 질환에 대한 세포 치료제의 가능성이 대해 많은 연구가 진행되고 있다^[2]. 줄기세포 배양을 위해 cell plate 내에지를 주입하게 되는데 배지에는 세포의 영양소인 다양한 종류의 성장인자(growth factors), 단백질, 비타민류, 무기염류, 호르몬 등을 포함하고 있다^[3].

줄기세포 분화 유도를 위해 다양한 자극 조건이 존재하는데 이중에서 약물주입을 위한 주사요법과 기계적인 자극 요법 그리고 전기적인 자극 요법이 있다. 전기적인 자극 요법은 자기장 에너지, 초음파 등이 있으며 초음파는 조직 내의 세포를 기계적으로 자극시킬 수 있는 수단으로 뼈의 성장, 골절, 근육조직의 치유, 골 형성 세포의 증식 조직 등 손상된 조직의 수복에 효과적이라 알려져 있다^[4]. 하지만 초음파 자극요법은 에너지 흡수와 반사파 그리고 탐촉자(transducer)의 효율로 인해 열이 발생하므로 조직에 화상을 입어 세포가 괴사될 가능성이 크다^[5]. 그러므로 열적인 조직 손상을 고려했을 때 직류 전압(DC:Direct Current)을 이용하여 줄기세포 분화 유도를 하는 것이 효율적이며 이는 온도의 영향을 받지 않는다는 장점을 가지고 있다. 그러므로 본 논문은 초음파의 열적 손상을 고려하여 줄기세포 유도를 위해 사용되는 배지에 직류전압을 인가하여 자극시킴으로써 배지에 반응되는 전기적인 저항(resistance) 값과 전류 값 그리고 전압 값 상태의 확인을 통해 전압 자극의 최적의 조건에 대해 증명하기 위한 실험을 수행하였다. 본 연구는 인체의 줄기세포 재생 치료를 위해 전자 및 통신 기반의 기술을 접목시킴으로써 현대의학 융합 기술을 발전시키고자 한다^[6,7]. 더 나아가 줄기세포 치료를 위해 직류전압을 사용하게 된다면 직류 전압원을 공급 받기 위해 전자기 혹은 태양열(solar cell)을 이용할 수 있을 뿐만 아니라 전자통

신 분야를 비롯하여 신재생 에너지 기술 분야에 융합이 가능할 것으로 사료된다^[8,9].

II. 줄기세포 자극 조건 분석

줄기세포 재생 치료를 위한 자극 조건은 그림 1과 같이 약물주입을 위한 주사요법이 있으며 의약품 중에서는 저분자 화학합성 의약품 있다^[10].

저분자 화학합성 의약품은 빠른 약효와 대량 생산의 편의성을 장점으로 연구 개발이 지속적으로 발전해 왔으나, 새로운 물질 신약 개발이 한계에 도달하여 막대한 연구개발 비용에 대한 효율성이 감소하기 시작하였고 또한 질환에 대한 표적 치료가 불가능해 약물에 대한 부작용의 부담으로 새로운 치료제가 요구되었다^[10]. 이러한 단점을 극복하기 위해 체내의 세포 조직에 부족한 성분이나 효소를 보충하는 치료 방법으로 알부민(albumin)이나 인슐린(insulin) 등이 등장하였으나 약물이 치료 목적 조직에 전달되는 과정 속에서 대사과정을 거치게 되므로 약물의 손실이 발생함과 동시에 치료의 효과가 떨어지게 된다^[11].

또한 주사요법의 경우 체내의 침습 방식으로 인해 환자의 고통이 수반되어 이를 극복하기 위해 그림 2와 같은 시스템을 통한 초음파 치료 요법이 연구 및 시행되고 있으며 자극 조건은 하루 20분 동안 주파수 1.5 MHz, 강도 30 mW/cm², PRF(Pulse Repetition Rate) 1 kHz 및 듀티사이클 20%에서 인큐베이터(incubator) 환경 조건은 CO₂ 5%, O₂ 5%, 37°C의 온도 조건에서 배양 유도를 시행한 것으로 분석 되었다^[12].

장점은 치료하는 동안 인체의 통증이 없이 골절 및 염증 그리고 암치료에 탁월하지만 체내에서 반사파와 흡수 그리고 감쇄로 인해 열이 발생하여 조직 손상(화상) 및 세포의 괴사가 발생되는 단점을 가지고 있다^[5].

그러므로 이를 극복하기 위해서는 직류전압을 이용



그림 1. 화학 합성 의약품 및 바이오의약품^[10,13,14]
Fig. 1. Chemical drug and biologics^[10,13,14]

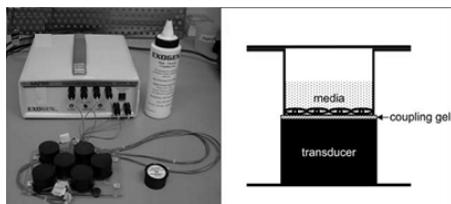


그림 2. 초음파 자극 시스템^[15]
Fig. 2. Stimulation for ultrasound system^[15]

하여 세포의 자극을 통해 통증 없이 치료가 가능하도록 연구의 필요성이 있으며 직류전압의 자극이 가능하지 파악하기 위해서는 배지에 전압을 인가하여 반응하는 전기적인 상태를 파악하는 것이 중요하다.

III. 실험 방법 및 과정

줄기세포의 분화를 유도하기 위해 사용되는 배지에 직류전압을 자극하여 배지의 전기적인 반응 상태를 확인함으로써 자극 조건이 적절한지에 대해 결과를 얻을 수 있고 직류 전압을 다양한 값으로 배지에 인가한 상태에서 배지에서 발생되는 전압이 입력과 같으면 안정적인 자극이 이루어지며 입력 전압과 상이한 결과가 나타나게 된다면 이는 자극 조건이 적절하지 않다는 것을 실험을 통해 확인 할 수 있었다. 그러므로 본 연구에서는 배지에 다양한 직류전압 값을 인가하여 배지에서 반응되는 전압 값을 분석함으로써 줄기세포 배양을 위한 최적의 조건인지에 대해 분석 및 실험을 하였다. 본 실험에서 진행되는 결과는 직류전압인가로 인해 배지의 자극을 통하여 줄기세포 분화 유도를 위한 최적의 자극 조건인지에 대해 조기 파악 할 수 있다는 가능성이 대해 제시를 한다.

줄기세포 배양 유도를 위해 사용되는 배지의 자극 조건은 그림 3과 같이 직류 전압을 사용하였으며 자유 공간의 water-bath에서 멀균을 통해 37°C의 온도를 만족 시키면서 plate에 α-MEM Medium(배지)^[16]을 주사기를 통해 주입함으로써 전원공급 장치를 사용함으로써 양(+)의 전극과 음(-)의 전극을 인가하였다^[15].

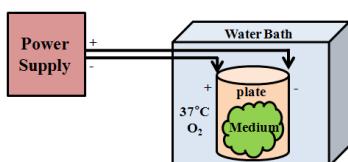


그림 3. 전원공급 장치를 이용한 배지 자극 실험 구성도
Fig. 3. Block diagram for experimental of stimulation in medium using power supply

IV. 실험 조건 및 결과

줄기세포 배양 유도를 위해 사용되는 배지의 자극 조건 직류 전압이며 배지를 주사기(syringe)를 이용하여 plate에 주입한 후 그림 4와 같이 양(+)의 전압과 음(-)의 전압을 인가하였다.

plate는 24 well이며 각 well마다 은바(silver) 코팅(coating)을 하여 전극 연결이 용이하도록 구성을 하였다. plate 주변 온도는 인체의 환경 온도와 같도록 37°C로 유지시켰고 이를 위해 water-bath에 물을 가열하여 37°C로 유지시켰다. 실험을 위한 배지는 α-MEM^[17]을 사용하였으며 배지의 양은 3 ml을 plate에 주입하였다^[17]. 배지의 자극 조건을 위해 인가된 전압은 참고문헌 [18]를 참고 했을 때, 각각 0.5V와 1.0V 그리고 1.5V를 인가하였으며 이때, 각각의 인가전압에 따른 배지의 전기적인 반응을 관찰 했을 때 배지에서 반응되는 전압의 레벨(level) 변화 상태와 온도 변화에 대해 관찰을 하여 배지 상태의 안정과 불안정적인 응답 상태를 확인 하였다. 전압 레벨 변화에 따른 온도 상태를 확인하기 위해 각각의 인가전압 마다 약 20분 동안 관찰을 하였다.

실험을 위해 사용되는 장비는 그림 5와 같이 전원공급기와 디지털멀티미터(DMM:Digital Multimeter)과 LRC 미터(meter) 그리고 온도계를 사용하였으며 저항(R) 값과 그리고 전류(I) 값을 측정하기 위해 LRC 미터를 사용하였고, 디지털 멀티미터의 단자를 이용하여 배지의 위치를 변경하면서 응답 전압 레벨 상태를 확인 하였다.

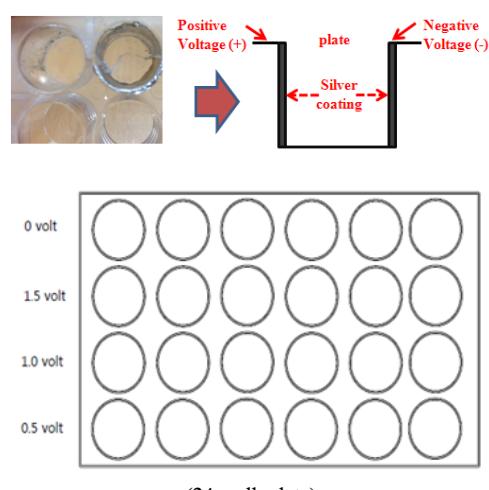


그림 4. plate의 전극 연결
Fig. 4. Electrode connection to plate



그림 5. 실험 사진
Fig. 5. Photograph of the experiment

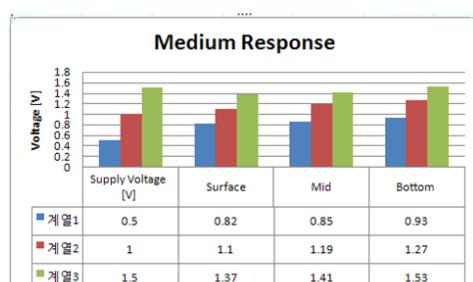
위치의 명칭은 far, near, surface, mid., bottom 등으로 구분하였으며 여기서 far와 near는 plate에 연결되는 전극과의 먼 위치 혹은 가까운 위치의 차이이며 디지털 멀티미터의 test-bar를 배지에 연결했을 때 전극 근처에 연결한 것과 약간 벗어난 위치에 연결했을 때의 전기적인 반응 차이점을 확인하기 위한 의도였다. 또한 surface는 plate에 주입된 배지의 표면, mid.는 중간 그리고 bottom은 plate의 바닥면을 의미하여 test-bar를 배지의 표면과 바닥 그리고 중간 면에 연결을 하여 전압 레벨 변화 상태를 관찰 했었다. 표 1은 LRC 미터를 이용하여 측정된 R 및 I에 대한 값을 제시한다. 표 2는 배지에 전압을 인가했을 때 반응되는 전압 레벨에 대해 제시하였고 신뢰성을 위해 3회의 실험을 재 반복 하였을 때 거의 일치하다는 것을 확인 할 수 있었다. 상기 표 2에서 R, I, V는 옴(ohm)의 법칙을 토대로 얻은 계산식과 무관하다. 그 이유는 최초 인가되는 전압과 배지에서 나오는 전압 값은 서로 다르며 그 이유는 배지에 전압이 인가되면 배지에서 화학적인 반응을 일으켜 인가되는 전압과 상이한 전압이 나오게 되므로 이는 더욱 세밀한 분석이 필요할 것으로 판단된다. 하지만 배지를 통해 나오는 전압은 추후 세포에 전기적인 자극을 시행할 때, 귀중한 참고 자료가 될 것으로 사료된다.

표 1. 배지의 R, I에 대한 측정값
Table 1. Measurement results for R, I in the medium

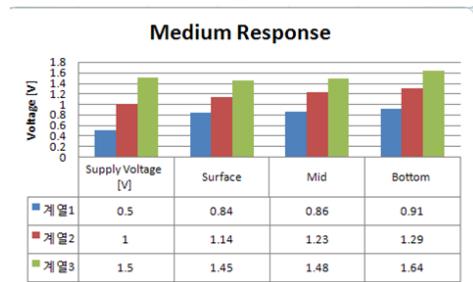
Bias Voltage [V]	Medium Output	
	R [Ω]	I [mA]
0.5	1.98	0.03
1.0	1.29	0.04
1.5	1.87	0.05

표 2. 배지 반응의 실험 전압 값
Table 2. Value for experimental voltage of medium response

N	posit.	Volt. [V]	Input			Medium	Output	Voltage [V]
			Surface	Mid	Bottom			
1st	Far	0.5	0.78-0.79	0.84-0.85	0.96-0.97			
		1.0	1.1-1.11	1.17-1.18	1.32-1.33			
		1.5	1.41-1.43	1.42-1.44	1.55-1.56			
	Near	0.5	0.82-0.83	0.85-0.86	0.965-0.975			
		1.0	1.13-1.14	1.2-1.21	1.34-1.35			
		1.5	1.43-1.44	1.46-1.48	1.6-1.61			
2nd	Far	0.5	0.83-0.84	0.89-0.9	0.92-0.93			
		1.0	1.11-1.12	1.21-1.22	1.29-1.3			
		1.5	1.41-1.43	1.43-1.44	1.55-1.56			
	Near	0.5	0.85-0.86	0.89-0.9	0.93-0.94			
		1.0	1.15-1.16	1.25-1.26	1.3-1.31			
		1.5	1.46-1.47	1.5-1.52	1.63-1.65			
3rd	Far	0.5	0.82-0.83	0.85-0.87	0.93-0.94			
		1.0	1.1-1.11	1.19-1.2	1.27-1.28			
		1.5	1.37-1.38	1.41-1.43	1.53-1.55			
	Near	0.5	0.84-0.85	0.86-0.87	0.91-0.92			
		1.0	1.14-1.15	1.23-1.24	1.29-1.3			
		1.5	1.45-1.46	1.48-1.49	1.64-1.66			



(a)



(b)

그림 6. 3차 실험결과의 그래프 (a) far, (b) near
Fig. 6. Graph of the third experiment result (a) far, (b) near

상기 실험에 의거, 전기 자극법을 이용한 줄기세포 재생 및 치료를 위해 사용되는 배지는 화학반응이 발생하여 인가된 전압에 비해 다소 차이가 나는 전압 값이 발생하기 때문에 추후 전기 자극법을 이용한 줄기 세포의 자극 및 분화에 대한 실험을 할 때, 이를 참고하여 바이어스 전압을 절충함으로써 해당 값에 맞추어 인가하게 된다면 줄기세포가 분화하는데 도움이 되리라 사료된다.

V. 결 론

본 논문은 줄기세포 재생 치료에서 세포의 분화 유도 과정 속에서 전기적인 자극의 가능성을 위해 직류 전압 인가의 최적화에 대해 실험을 하였다. 줄기세포 분화 유도를 위해 사용되는 배지에 직류 전압을 인가하여 전기적인 자극의 반응 상태를 확인하였고 배지의 반응 전압 상태에 따라 전압 변화 레벨의 안정성과 불안정성에 대해 분석을 하였다. 전압 레벨의 변화가 적으면 배지의 상태가 양호하여 줄기세포 분화 과정에서 안정된 자극이 가능하지만 만일 전압 레벨 변화가 불안정하면 줄기세포 분화 유도과정 속에서 상당한 손실을 입게 될 수 있다는 것을 확인 할 수 있었다. 직류 전압을 이용하여 자극을 시행 했을 때, 배지의 온도 상태가 안정적임을 확인하였다. 이는 배지의 온도 높게 되면 조직 세포에서 괴사가 일어날 가능성이 크다는 의미를 갖게 된다. 실험을 위해 water-bath에서 물을 가열하여 37°C로 유지하고 plate를 water-bath에 삽입하여 배지를 주사기를 이용하여 3ml을 24 well plate에 주입한 후 온도를 확인 했을 때 27°C라는 것을 확인 하였으며 이는 온도 면에서 안전하다는 뜻을 의미 한다. 직류전압으로 자극이 가능하다면 향후 건전지 혹은 태양열(solar cell)을 이용하여 이동 중에서 치료가 가능할 뿐만 아니라 구성장치가 간단하여 치료하는데 매우 용이할 것으로 기대한다.

References

- [1] S. W. Cho and S. K. Yang, "Stem cell engineering for developing novel therapeutics for regenerative medicine," *BT News*, vol. 17, no. 2, pp. 26-38, 2010.
- [2] Y. H. Kim and J. W. Lee, "A new aspect in cartilage regeneration using mesenchymal stem cells," *Tissue Eng. Regenerative Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 316-320, Jul. 2007.
- [3] G. B. Kim, W. H. Joo, and D. W. Kim, "Composition of a medium for serum-free culture of an adipose-derived stem cell line established with a simian virus 40 T antigen," *J. Life Sci.*, vol. 24, no. 12, pp. 1301-1307, Dec. 2014.
- [4] E. T. Lee, K. T. Lim, J. H. Kim, A. L. Im, H. M. Son, C. S. Cho, P. H. Choung, and J. H. Chung, "Effects of low intensity ultrasound stimulation on the proliferation of alveolar bone marrow stem cell," *Tissue Eng. Regenerative Med.*, vol. 5, no. 4-6, pp. 572-580, Oct. 2008.
- [5] T. Y. Jung, S. J. Park, D. S. Hwang, Y. D. Kim, S. W. Lee, and U. K. Kim, "Effect on bone healing by the application of low intensity pulsed ultrasound after injection of adipose tissue derived stem cells at the implantation of titanium implant in the tibia of diabetes-induced rat," *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 37, no. 4, pp. 301-311, Aug. 2011.
- [6] B. Cho and J. M. Park, "Technology review on multimodal biometric authentication," *J. KICS*, vol. 40, no. 1, pp. 132-141, Jan. 2015.
- [7] J. H. Kim and J. J. Lee, "Development of medical rehabilitation game and rehabilitation possibility using EMG and Gyroscope signal," *J. KICS*, vol. 40, no. 1, pp. 171-182, Jan. 2015.
- [8] G. J. Lim, "A design of IT-convergence plant factory system using the renewable energy," *J. KICS*, vol. 40, no. 4, pp. 769-779, Apr. 2015.
- [9] S. Lee, J. S. Kim, and K. H. Park, "PVC detection based on the distortion of QRS complex on ECG signal," *J. KICS*, vol. 40, no. 4, pp. 731-739, Apr. 2015.
- [10] J. K. Choi, "Trend for research and development of medicine in stem cell," *Industry Brief-HMC Investment Securities Research Center(Forward Solution HMC)*, pp. 1-17, Mar. 2011.
- [11] J. T. Kim, K. C. Yoon, J. C. Lee, B. S. Kim, and J. Lee, "Experiment of iontophoresis optimization for velocity of drug delivery using variation of electrical energy injection," in

- Proc. KICS Winter Conf.*, pp. 927-928, Jan. 2014.
- [12] K. Sena, R. M. Leven, K. Mazhar, D. R. Sumner, and A. S. Virdi, "Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 31, no. 5, pp. 703-708, May 2005.
- [13] web site : www.bostonks.com/files/attach/image/s/229/275/209/865c598bd72946f1d587e2c2a06a3205.jpg
- [14] web site : cfile220.uf.daum.net/image/266E844855B045851AF704
- [15] K. C. Yoon, J. T. Kim, B. S. Kim, J. Lee, and J. C. Lee, "Experiment on analysis of the electrical characteristic for α -MEM medium for stem cell proliferation," in *Proc. KICS Winter Conf.*, pp. 502-503, Jan. 2016.
- [16] ATCC (American Type Culture Collection) stem cell bank, web site://www.atcc.org.
- [17] Sigma-aldrich.com : Product information, Minimum essential medium eagle (MEM) alpha modifications, Sigma-Aldrich®.
- [18] L. J. Kobelt, A. E. Wilkinson, A. M. McCormick, R. K. Willits, and N. D. Leipzig, "Short duration electrical stimulation to enhance neurite outgrowth and maturation of adult neural stem progenitor cells," *Annals of Biomed. Eng.*, vol. 4, no. 10, pp. 2164-2176, Oct. 2014.

윤 기 철 (Ki-Cheol Yoon)



2011년 8월 : 광운대학교 전파
공학과 졸업 (공학박사)
2012년 2월~2013년 2월 : 한국
과학기술원 연구교수
2013년 3월~2016년 2월 : 광운
대학교 RFIC연구센터 교수
2016년 4월~현재 : 한국과학기
술원 책임연구원

<관심분야> 전파공학, 무선전력전송, 의학물리학, 의
과학 및 바이오공학, 의료초음파

김 정 태 (Jung-Tae Kim)



1992년 2월 : 광운대학교 전자
공학과 졸업(공학사)
1992년 3월~현재 : 광운대학교
전파공학과 석사과정
<관심분야> 전자공학, 전파공
학, 바이오 의료 공학, 무선
전력전송(Wireless Power
Transfer)

김 범 수 (Beom-Su Kim)



2009년 2월 : 전북대학교 생물
학과 졸업(의학박사)
2009년 9월~현재 : 원광글재생
연구소 운영위원
2011년 2월~현재 : (주)본셀바이
오텍 기업부설연구소 연구소
장

<관심분야> 분자세포생물학, 조직공학

이 준 (Jun Lee)



2006년 2월 : 원광대학교 구강
악안면외과 졸업(치의학박사)
2009년 9월~현재 : 원광골재생
연구소 소장
2010년 6월~현재 : (주)본셀바이
오텍 대표이사
2012년 11월~현재 : 원광대학교
부교수

<관심분야> 구강악안면, 조직공학

이 종 철 (Jong-Chul Lee)



1983년 2월 : 한양대학교 전자
공학과 졸업(공학사)
1985년 2월 : 한양대학교 전자
공학과 졸업(공학석사)
1989년 12월 : M. S., Dept. of
E. E., Arizona State Univ.
1994년 5월 : Ph. D., Dept. of
E. E., Texas A&M Univ.
1994년 4월~1996년 2월 : 현대전자 광소자개발실 선
임연구원
1996년 3월~현재 : 광운대학교 전자융합공학과 교수
<관심분야> 초고주파 및 광전자공학, RF-MEMS, 무
선전력전송, 바이오전자, RF소자 응용