

# 심근세포 성숙도 및 수축력 향상을 위한 AgNW 기반의 기능성 폴리머 캔틸레버

정민영<sup>1,\*</sup> · 심유리<sup>1,\*</sup> · 윤하영<sup>1,\*</sup> · 김동수<sup>1</sup> · 이동원<sup>1,2,3,+</sup>

## AgNW-based functional polymer cantilever to improve maturity and contractility of cardiomyocytes

Min-young Jeung<sup>1,\*</sup>, Yu-ri Sim<sup>1,\*</sup>, Ha-young Yun<sup>1,\*</sup>, Dong-Su Kim<sup>1</sup>, and Dong-Weon Lee<sup>1,2,3,+</sup>

### Abstract

Herein, we propose a functional polymer cantilever to enhance maturation and contractile force of cardiomyocytes. The proposed cantilever consists of a surface-patterned polymer substrate and silver nanowires (AgNWs). The AgNWs are transferred to the PDMS substrate using conventional molding techniques. This thin metallic surface significantly improves the adhesion of cardiomyocyte on the surface-patterned PDMS with the hydrophobic characteristics. In addition, the use of AgNWs improves the visibility of the conducting PDMS substrate for the observation of cardiomyocyte through an inverted microscope. The AgNWs also assist in synchronizing each cardiomyocyte to maximize its contractile force.

**Keywords :** Functional polymer cantilever, Ag nano-wires, Micro grooves, Cardiomyocytes, Contraction force

### 1. 서 론

신약 개발에 있어서 개발 비용과 기간은 치료법의 다양성을 저해하는 가장 큰 요소로 작용한다 [1]. 심장의 기능적 이상으로 인한 심장박동이 비정상적인 주기로 발생하거나 신체의 조직에 필요한 혈액을 제대로 공급하지 못하는 경우 부정맥 또는 심부전이 발생하게 된다 [2]. 부정맥은 여전히 사망의 주요 원인으로 부적절한 약물 사용으로 인한 부작용이 가장 큰 원인이다 [3-5]. 이온채널 연구와 전기생리학 실험은 단일 세포에서 이

온의 세포막 통과에 따른 전류, 전압을 측정한다 [6]. Manual patch-clamp는 전기생리학 분야에서 ‘gold standard’ 로 약물 독성 평가에 필수적이지만 데이터 처리량이 매우 낮고, 노동집약적인 방법이다. 낮은 데이터 처리량을 개선하기 위하여 auto patch clamp 기술이 보급되고 있지만 기기가 매우 고가이고, manual patch-clamp 보다 데이터의 신뢰성이 낮다는 단점이 있다 [7]. Patch-clamp와 더불어 최근 CiPA(Comprehensive in vitro proarrhythmia Assay)에서 새로운 독성 평가 기준으로 논의 중인 MEA는 세포 단위에서 FP(Field potential)의 측정을 통하여 약물에 의한 부정맥 유발을 판단할 수 있다 [8]. 하지만 전해질 용액 내에서 노출되는 미세 전극은 노이즈가 심하고 전극 끝에서 전해질이 확산되므로 장시간 스크리닝에 수집된 결과의 질이 떨어진다. In vitro system 은 본래 장기가 갖는 구조 및 기능을 유사하게 재현하는 것이 필요하다. Mechano physiology 플랫폼 및 heart on a chip 은 심장과 유사한 환경을 재현하고, 심장 조직의 기계적인 운동 능력을 평가하는 방법이다 [9,10]. 기계 생리학적 방법은 데이터 수집이 매우 간단하고, 기기를 다루는 것보다 세포배양이 수집 결과에 신뢰성을 높인다.

본 연구에서는 AgNW(Ag nano-wire) 기반 기능성 폴리머 캔틸레버를 개발을 제안한다. 캔틸레버 상부 표면에는 micro groove 가 패터닝되어 있으며, AgNW 가 groove 사이에 코팅되어 있어 세포간 전기적 동기화가 가능하다. 또한 각각의 캔틸레버에는 레이저 변위계로 측정 가능한 반사판의 집적화로 -nm 범위에서 정밀한 수축력 수집 및 분석이 가능하다. 각각의 캔틸레버 몸체엔 두개의 캔틸레버가 위치하여 수축력 측정에 신뢰성 및 재현

<sup>1</sup> 전남대학교 기계공학과(Graduate School of Mechanical Engineering, Chonnam National University)

Chonnam National University, 77, Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju, 61186, Korea

<sup>2</sup> 전남대학교 차세대 센서 연구 개발 센터 (Center for Next Generation Sensor Research and Development, Chonnam National University)

Chonnam National University, 77, Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju, 61186, Korea

<sup>3</sup> 심혈관 환자맞춤형 차세대 정밀의료기술 선도연구센터 (Advanced Medical Device Research Center for Cardiovascular Disease)

Chonnam National University, 77, Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju, 61186, Korea

<sup>†</sup>Corresponding author: mems@jnu.ac.kr

\*These authors contributed equally to this work.

(Received : May. 15, 2021, Revised : May. 25, 2021, Accepted : May. 30, 2021)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

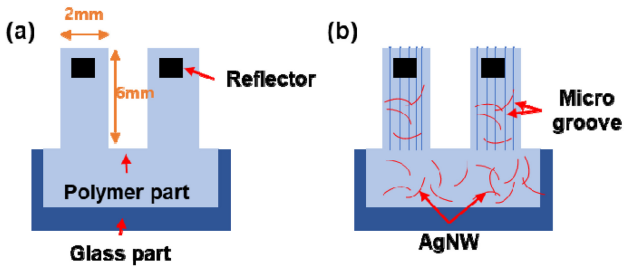


Fig. 1. Schematic illustration of (a) Flat PDMS cantilever, (b) 3 μm groove and AgNW PDMS cantilever.

성을 향상하였다. 제안된 AgNW 기반 기능성 폴리머 캔틸레버는 심근세포의 조직 수준에서 정렬, 성숙도 향상 및 약물의 용량-반응성 검사에서 더욱 높은 정확성을 갖는 플랫폼으로 활용을 기대한다.

## 2. 연구 방법

### 2.1 AgNW 기반의 기능성 폴리머 캔틸레버의 제작

심근세포의 수축력 측정 및 성숙도 향상을 위한 AgNW 기반의 기능성 폴리머 캔틸레버는 Fig. 1과 같이 polymer part와 glass part로 구성된다. Polymer part는 상부 표면에 soft-lithography로 형성된 micro groove(3 μm line and space)가 패터닝되어 있으며, 자유단에 집적화된 반사판은 레이저 변위계를 이용하여 심근세포의 수축력을 정량적으로 측정할 수 있다. Glass part는 캔틸레버 형상 및 무게를 유지하여 배양액 환경에서 PDMS 박막의 변형을 방지한다. 또한 캔틸레버 상부표면에 형성된 micro groove는 표면학적 특성을 통하여 실제 심장과 유사한 구조를 갖도록 심근세포를 정렬하고 코팅된 AgNW는 재료가 갖는 높은 전도성을 통하여 직접적으로 동기화하지 못한 세포들을 간접적으로 동기화할 수 있으며, 이를 통하여 심근세포의 성숙도 향상이 가능하다.

### 2.2 NRVM 추출 및 배양

모든 동물 실험은 전남대학교 동물윤리위원회로부터 승인 후 진행하였다. NRVM(Neonatal rat ventricular Myocytes) isolation은 생후 3일 이내의 Sprague-Dawley Rat에서 적출된 심장을 심방과 심실로 분리하였다. 다음으로 ADS buffer solution (NaCl 120 mM, HEPES 20 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, D-glucose 6 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.8 mM, DI water 1L, pH 7.35)을 이용하여 분리된 심실을 세척 후 Enzyme Solution (Collagenase 0.5 mg/ml, Pancreatin 0.6 mg/ml, ADS buffer solution 50 ml) 및 pre-plating을 통해 단일 심근세포를 획득하였다. 제작된 폴리머 캔

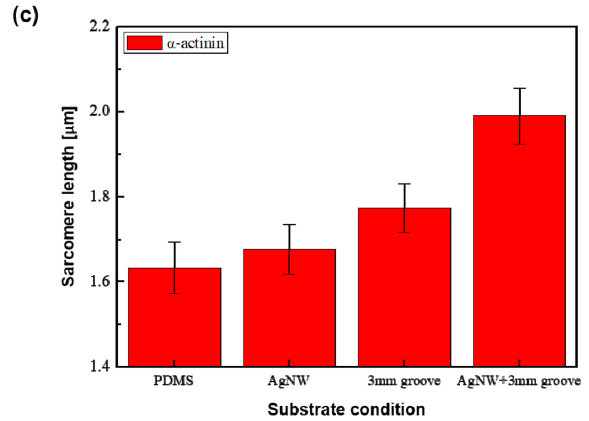
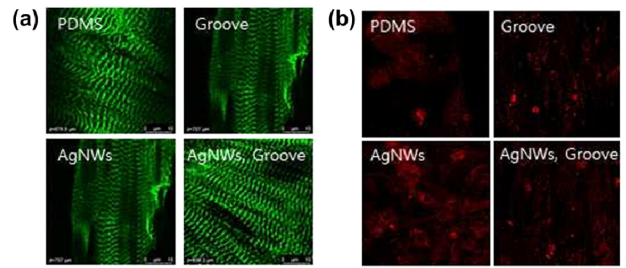


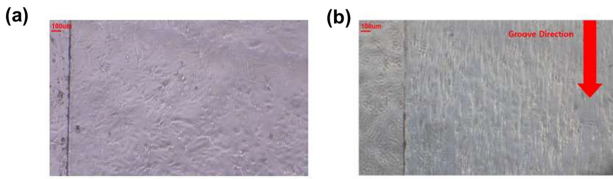
Fig. 2. Immunocytochemically stained images of cardiomyocytes cultured on different surface (a) α-actinin, (b) Connexin 43, (c) Sarcomere length of the cultured cardiomyocytes on different surface.

틸레버 표면에 fibronectin (Corning)을 효과적으로 코팅하기 위하여 산소 플라즈마 처리 (CUTE-IMPR, Femto Science Inc., 100 W, 10 s)를 통하여 표면 개질 후 fibronectin을 dip-coating 하였다. 획득한 심근세포는 1,000 cell mm<sup>2</sup> 밀도로 PDMS 캔틸레버 전면에 분주하였으며, 변위 측정은 배양 후 11일 동안 진행하였다. 또한 심근세포의 배양기간 동안 세포 배양액은 48시간 간격으로 교체하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 기판에 따른 심근세포 성숙도 평가

심근세포는 배양 기질의 형태학적 변화에 의하여 비등방성 특징을 보인다. 심근 세포의 높은 구조적 발달을 위하여 soft-lithography 기술을 통해 복제된 micro groove는 3 mm line and space를 갖는다. Micro groove가 패터닝된 기질에서 심근세포의 비등방성 특징을 확인할 수 있으며, groove 크기에 따라 서로 다른 수축력 및 sarcomere length를 확인할 수 있다. 면역 형광 염색법(ICC staining)을 통하여 배양 기질의 형태학적 변화 및 전도도 특성이 세포 골격의 조직화 및 성숙도 향상이 가능하다는 사실을 증명하였다[Fig. 2]. 이와 같은 결과는 배양 기질의

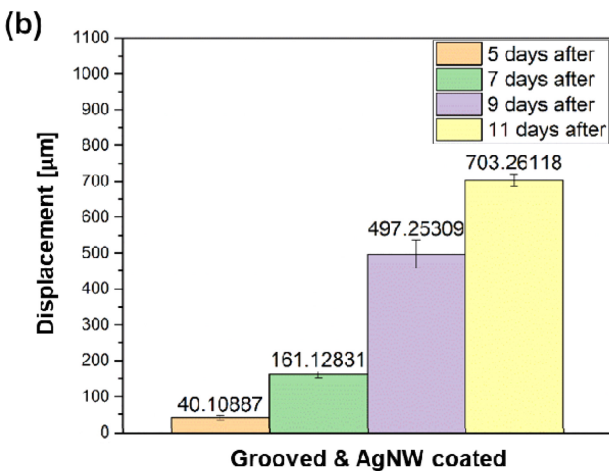
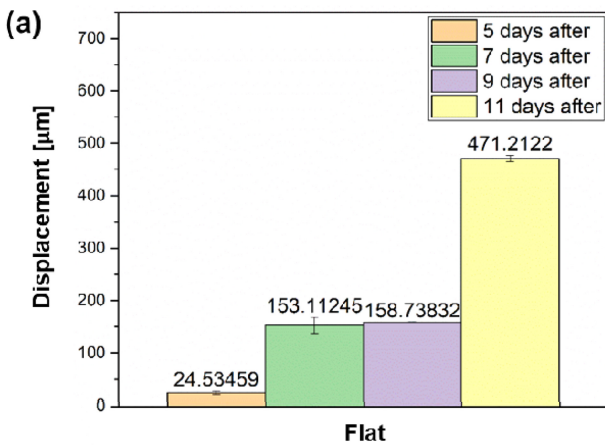


**Fig. 3.** Optical microscope image of (a) Flat PDMS cantilever, (b) 3 μm groove and AgNW PDMS cantilever.

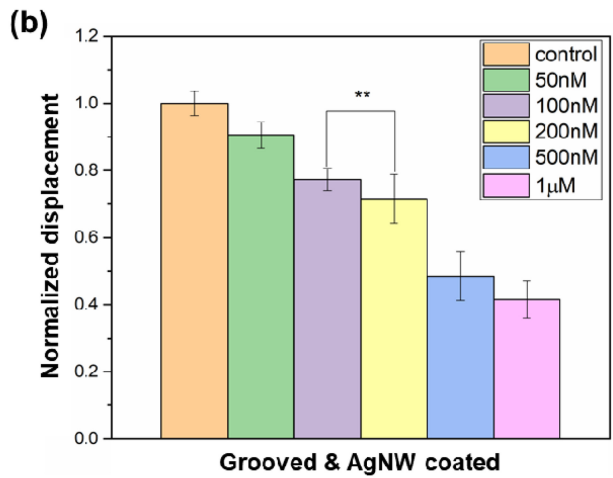
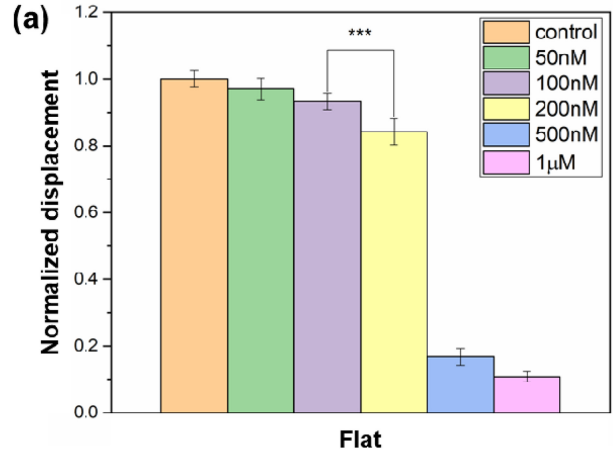
형태학적 변화 및 전도도를 통한 세포 골격의 조직화 및 성숙도 향상이라는 생물학적 의미와 폴리머 캔틸레버의 변위 향상을 통한 추가적인 감도 증가를 기대할 수 있다.

### 3.2 배양 기간에 따른 수축력 측정

심근세포의 형태학적 정렬을 확인하기 위하여 flat, 3 μm groove and AgNW PDMS 캔틸레버 기관에서 배양 후 광학현미경을 사용하여 관찰하였다[Fig. 3]. Flat PDMS 캔틸레버에 배양된 심



**Fig. 4.** Bar plots depicting the displacement over different cell-culture periods from day 5–11 (a) Flat PDMS cantilever, (b) 3 μm groove and AgNW PDMS cantilever.



**Fig. 5.** Effect of verapamil on the contractility of cultured cardiomyocytes. (a) flat PDMS cantilever displacement produced by the contractility of the cultured cardiomyocytes at different verapamil concentrations, (b) 3 μm groove and AgNW PDMS cantilever displacement produced by the contractility of the cultured cardiomyocytes at different verapamil concentrations.

근세포 방향성이 없는 등방성 특징을 나타냈으며, 3 μm groove and AgNW PDMS 캔틸레버에 배양된 심근세포는 캔틸레버의 길이방향으로 정렬되는 비등방성 특징을 나타낸다. 또한 groove가 패턴된 캔틸레버에서 더 많은 심근세포의 수를 확인할 수 있었으며, 이는 더 높은 부착력을 나타낸다. 배양 기질의 패턴은 심근세포의 성장에 대한 방향성을 뚜렷하게 제공한다.

심근세포의 배양기질에 대한 비등방성 특징은 성숙도 뿐만 아니라 수축력을 증가시킨다. 심근세포의 수축/이완에 따른 캔틸레버의 기계적 변형은 자유단에 집적화된 반사판을 통하여 레이저 변위계를 이용한 정량적인 수축력을 배양기간 동안 측정하였다. Fig. 4(a)와 (b)는 서로 다른 배양 기간의 함수로서 flat 및 3 μm groove and AgNW PDMS 캔틸레버의 변위를 나타낸다. 캔틸레버의 변위는 세포 배양 후 5일째부터 확인되었으며, 배양 후 11일차까지 측정하였다. 폴리머 캔틸레버의 변위는 심

근세포 배양 후 11 일까지 증가하는 특성을 나타내며, 수축력이 세포 배양 시간에 크게 영향을 받는다는 것을 확인하였다 [10]. 11 일째에 3  $\mu\text{m}$  groove and AgNW PDMS 캔틸레버의 최대 변위는  $703.2 \pm 15.23 \mu\text{m}$ 이다. Flat PDMS 캔틸레버에서 최대 변위  $471.2 \pm 6.91 \mu\text{m}$ 로 3  $\mu\text{m}$  groove and AgNW PDMS 캔틸레버가 약 1.5배 높은 수축력을 달성하였다. 심근 세포의 수축력이 증가하고 캔틸레버에서 기계적 변형이 증가하는 이유는 micro groove가 3차원 생체환경을 모사하였고, AgNW는 세포간의 전기적 신호를 더욱 원활하게 하여 성숙도를 향상시켜 더 높은 수축력을 달성하였기 때문이다.

### 3.3 약물 반응성 평가

심근세포에서  $\text{Ca}^{2+}$ 는 수축/이완 및 세포 생존 신호 등을 나타내는 필수적인 이온이다. Flat PDMS 캔틸레버와 3  $\mu\text{m}$  groove and AgNW PDMS에 다양한 농도(control, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1  $\mu\text{M}$ )의 Verapamil을 처리하여 농도가 증가함에 따른 약물의 부작용을 확인하였다[Fig. 5, 6]. 심근세포의 수축력과 박동수는 Fig. 5, 6 과 같이 약물 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 약물 농도를 최대 1  $\mu\text{M}$  까지 투여했을 때 flat PDMS 캔틸레버는 약 90%의 수축력이 감소하였지만, 3  $\mu\text{m}$  groove and AgNW PDMS 캔틸레버는 60%의 수축력 감소만 나타남을 확인하였다[Fig. 5]. 박동수는 flat PDMS 캔틸레버 약 60% 감소, 3  $\mu\text{m}$  groove and AgNW PDMS 캔틸레버는 34% 감소하였다[Fig. 6]. 이와 같은 결과는 성숙한 세포에서 더욱 안정적이고 높은 농도까지 약물 용량 반응성 테스트의 가능성을 나타낸다.

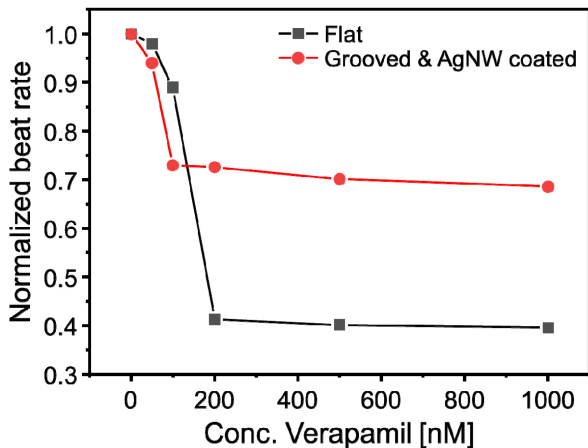


Fig. 6. Beat rates of the cardiomyocyte treated with different verapamil concentrations. (a) flat PDMS cantilever, (b) 3  $\mu\text{m}$  groove and AgNW PDMS cantilever.

## 4. 결 론

본 연구에서는 AgNW 기반 기능성 폴리머 캔틸레버의 제작 및 심근세포 배양을 통한 성숙도 향상을 진행하였다. 캔틸레버는 micro groove와 AgNW를 통하여 심근세포를 정렬하고 높은 전기 전도도를 통하여 세포간 간접적인 동기화를 이룰 수 있게 하였다. 면역 형광 염색법(ICC staining)을 통하여 배양 기질의 형태학적 변화 및 전도도에 따른 심근세포의 성숙도를 검토하였으며, grooved and AgNW 배양 기질에서 최대 성숙도를 달성하였다. 레이저 변위계를 이용한 수축력 측정 시스템은 -nm 범위의 미세한 수축력 측정을 통하여 grooved and AgNW를 통한 성숙도의 향상이 수축력에 미치는 효과를 확인하였다. 심근세포의 성숙도와 수축력은 micro groove와 AgNW의 최적화된 배양 기질에서 최대 변위를 달성하였다. 본 연구는 AgNW 기반 기능성 폴리머 캔틸레버 제작 그리고 특성 평가를 통하여 심근세포의 기계적 수축 거동 분석을 통한 약물 스크리닝 및 심근세포의 배양 기질의 형태학적, 외부 자극 없이 전도성 기관을 통한 간접적인 동기화를 통한 특성 분석 플랫폼의 활용 가능성을 증명하였다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No.2017R1E1A1A01074550)

## REFERENCES

- [1] S. M. Paul, D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, and A. L. Schacht, "How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge", *Nat. Rev. Drug Discov.*, Vol. 9, No. 3, pp. 203-214, 2010.
- [2] W. G. Members, T. Thom, N. Haase, W. Rosamond, V. J. Howard, J. Rumsfeld, T. Manolio, Z. J. Zheng, K. Flegal, and C. O'Donnell, "Heart disease and stroke statistics—2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee", *Circulation*, Vol. 113, No. 6, pp. e85-e151, 2006.
- [3] D. S. Yu, D. T. Lee, J. Woo, "Health-related quality of life in elderly Chinese patients with heart failure", *Res Nurs Health*, Vol. 27, No. 5, pp. 332-344, 2004.
- [4] E. A. Woodcock, S. J. Matkovich, "Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Vol. 37, No. 9, pp. 1746-1751, 2005.
- [5] A. Agarwal, J. A. Goss, A. Cho, M. L. McCain, and K. K. Parker, "Microfluidic heart on a chip for higher throughput

- pharmacological studies”, *Lab Chip*, Vol. 13, No. 18, pp. 3599-3608, 2013.
- [6] A. Sharma, W. L. McKeithan, R. Serrano, T. Kitani, P. W. Burrige, J. C. Del Álamo, M. Mercola, and J. C. Wu, “Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to assess drug cardiotoxicity”, *Nat. Protoc.*, Vol. 13, No. 12, pp. 3018-3041, 2018.
- [7] Y. Zhao, S. Inayat, D. Dikin, J. Singer, R. Ruoff, and J. B. Troy, “Patch clamp technique: review of the current state of the art and potential contributions from nanoengineering, Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers”, *Proc. Inst. Mech. Eng., Part N*, Vol. 222, No. 1, pp. 1-11, 2008.
- [8] J. Cools, Q. Jin, E. Yoon, D. Alba Burbano, Z. Luo, D. Cuypers, G. Callewaert, D. Braeken, and D. H. Gracias, “A micropatterned multielectrode shell for 3D spatiotemporal recording from live cells”, *Adv. Sci.*, Vol. 5, No. 4, pp. 1700731(1)-1700731(7), 2018.
- [9] A. W. Feinberg, A. Feigel, S. S. Shevkoplyas, S. Sheehy, G. M. Whitesides, and K. K. Parker, “Muscular thin films for building actuators and powering devices”, *Science*, Vol. 317, No. 5843, pp. 1366-1370, 2007.
- [10] D. S. Kim, Y. J. Jeong, B. K. Lee, A. Shanmugasundaram, and D. W. Lee, “Piezoresistive sensor-integrated PDMS cantilever: A new class of device for measuring the drug-induced changes in the mechanical activity of cardiomyocytes”, *Sens. Actuators, B*, Vol. 240, pp. 566-572, 2017.