

콜라젠 스폰지를 이용한 쥐 일차 간세포 배양

이 두 훈, 이 종 원, 박 정 극

동국대학교 공과대학 화학공학과

전화 (02) 2260-3365, FAX (02) 2271-3489

서 론

최근의 의학 발달에도 불구하고 전격성 간손상(fulminant hepatic failure, FHF) 환자의 경우 치사율이 90%에 이르고 있으며 이러한 경우에는 장기 이식이 현재까지는 가장 높은 생존율을 보이는 치료 방법이다. 그러나, 기증되는 장기의 심각한 부족현상으로 인하여 환자들은 이식될 간이 얻어지기 전에 사망하고 있다(1). 또한 최근에 간의 부분 이식이 증가하고 있으나 이러한 경우에도 적당한 기증자를 찾기까지 환자의 생명을 연장하여야 한다. 분리된 간세포를 이러한 목적을 달성하기 위하여 환자에게 이식하거나 또는 hollow fiber module 등 체외 간 보조장치의 핵심 요소로서 이용하려는 연구가 많이 보고되고 있다(2-4). 이를 달성하기 위해서는 간세포를 그 특이 기능 활성이 우수한 채로 배양하는 기술이 필수적이다. 체외에서 배양된 간세포의 기능유지에 영향을 미치는 인자는 동종 및 이종세포 상호작용, 호르몬이나 성장인자, 그리고 세포외 기질 성분 등의 다양한 인자에 영향을 받는다(5-7). 간세포를 효과적으로 배양하기 위하여 우레탄이나 PLLA(poly (L-lactic acid)) 등으로 만들어진 다공성 기질이 사용되기도 하였다(2, 8).

본 연구에서는 보다 간세포에 적합하고 가교정도에 따라 분해정도를 조절할 수 있는 콜라젠을 이용하여 다공성 스폰지를 제조하였으며 이를 이용하여 쥐 일차 간세포를 배양하였다. 콜라젠 스폰지에 배양된 간세포는 단층 배양의 경우보다 높은 간기능 활성을 나타내어 이를 이용한 인공간의 개발이나 간세포 이식과 같은 조직 공학적 응용이 가능할 것으로 기대된다.

실험 재료 및 방법

쥐 간세포의 분리

간세포의 분리는 Seglen-method(9)에 기초를 두고 변형된 방법을 실행하는데, 이는 *in situ* 상태에서 collagenase로 간의 기질을 분해하여 간세포를 얻는 기술로서, 2단계로 시행하는데 그 방법은 다음과 같다. 180-200 g 체중의 Sprague-Dawley rat의 복부를 열어 1단계로서, 간문맥(portal vein)을 찾아서 catheter를 꽂은 다음 perfusion buffer 용액(NaCl 8 g/L, KCl 0.4 g/L, NaH₂PO₄ 2H₂O 0.078 g/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.151 g/L, HEPES(4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthane-Sulfonic acid, Sigma Chem Co.) 2.38 g/L, EDTA(Ethylenediaminetetraacetic Acid, Gibco BRL Co.) 0.19 g/L,

Sodium bicarbonate 0.35 g/L, Glucose 0.9 g/L, Penicillin 100 Unit /mL, Streptomycin 10 mg/mL, Amphotericin B 25 μ g/mL)을 25 mL/min의 속도로 10분 동안 흐르게 하여 충분히 세척한다. 2단계로는 Collagenase 용액(Collagenase(Gibco BRL) 0.5 g/L, Trypsin inhibitor(Gibco BRL) 0.05 g/L, NaCl 8 g/L, KCl 0.4 g/L, CaCl₂ 0.56 g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 0.078 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 0.151 g/L, HEPES 2.381 g/L, Sodium bicarbonate 0.35 g/L, Penicillin 100 Unit/mL, Streptomycin 10 mg/mL, Amphotericin B 25 μ g/mL)을 catheter를 통해서 20 mL/min의 유속으로 10분 동안 1단계와 같은 방법으로 흐르게 한다. 간을 떼어내어 petridish에 옮긴 후 메스로 간의 capsule을 자르면 간세포가 풀어져 나오기 시작한다. 풀어진 간 조직을 William's Medium E(Gibco BRL)로 세척하여 거즈에 거르고, 100 μ m pore의 나일론 메쉬에 거른 후 4°C에서 원심분리(500rpm, 50g, 2분)한다. 간세포의 viability는 trypan blue staining 방법에 의하여 측정하였다. 보통 200 g의 쥐로부터 약 2-3 $\times 10^8$ 개 정도의 간세포를 회수할 수 있으며 viability는 90% 이상이다.

간세포 배양 배지 및 단층 배양

배양 배지로는 William's E Medium에 Epidermal growth factor(20 μ g/l), Insulin (10mg/l), CuSO₄·5H₂O(0.1 μ M), ZnSO₄·7H₂O(50pM), H₂SeO₃(3 μ g/l), Linoleic acid(50mg/l), NaHCO₃(1.05g/l), HEPES(1.19g/l), Penicillin(0.0588g/l), Streptomycin (0.100g/l)을 첨가하여 사용하였다. 단층배양에 사용하는 직경 35mm 배양 well (Nunc Co. 6 well plate)은 0.5 mg/ml 농도의 collagen(Type 1, Cellmatrix, Nitta gelatin, Japan) 용액으로 바닥을 두 번 적신 후 건조시키고 UV에 16시간 노출시킨 후 간세포 접종 직전 배양 배지로 한번 세척한 후 사용하였다.

콜라겐 스폰지 제조 및 가교

초산에 녹인 pH 3~4, 농도 0.5~0.75(W/V)%의 콜라겐 용액 1 ml를 24 well plate의 각 well에 도포하고 -85°C의 초저온 냉동고에서 12시간 이상 냉동시킨 뒤 -80°C의 진공동결건조기(SAMWON, SFDSM 06, Korea)에서 24시간 동안 동결건조시켰다. 동결건조된 다공성 형태의 콜라겐 스폰지를 진공오븐에 넣고 먼저 2시간정도 진공을 걸어 스폰지 내의 미량의 수분을 제거한 뒤 110°C 까지 온도를 상승시켜 24시간동안 진공을 걸어주었다. 그리고 온도가 30°C까지 내려간 뒤 진공을 제거하였다. 이 방법은 1차적으로 콜라겐 분자 내에 공유결합을 형성하여 구조를 안정화시켜 가교시에 구조의 변화를 막을 수 있다(10).

콜라겐 스폰지를 1% hexamethylene diisocyanate (: HMDI, Aldrich Co.)/methanol 용액에 넣어 실온에서 2시간 동안 방치하여 가교결합시켰다. 가교후 흐르는 물에 충분히 세척 후(24시간) 사용 전 까지 에탄올에 보관한다.

12well plates에 sponge를 깔고 7.5×10^5 cells/well의 농도로 간세포를 접종하였다. 간세포 접종 후 shaker에서 4시간 동안 교반 후 부착하지 않은 cell을 제거하였으며 거의 대부분의 세포가 콜라젠 스폰지에 접종되었다.

간기능 활성도 측정

배양된 간세포 구상체의 detoxification능력을 조사하기 위하여 암모니아의 분해속도를 아산제약의 indophenol kits를 사용해서 측정하였고 이에 따른 urea 생성농도는 Blood urea nitrogen assay kit(Sigma Co.)를 사용하여 측정하였다. 암모니아의 제거 속도를 측정하기 위하여 배양 3일째 부터 1mM NH_4Cl 을 첨가한 배지를 사용하였다. 간세포의 중요한 대사기능의 하나인 알부민의 합성 및 분비는 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 법을 사용하였는데, 1차항체(IgG fraction to rat albumin), 알부민 표준, 2차항체(Peroxidase-Conjugated IgG fraction to rat albumin)는 OGARNON TECHNIKA CORPORATION 시약을 사용하였으며, 1차항체는 $2\mu\text{g/ml}$ 를 2차항체는 1/5000을 사용하였다.

결과 및 토론

콜라젠 스폰지에 배양된 간세포의 형태

Fig. 1은 Hematoxylin-eosin 염색을 이용한 조직분석 방법에 의하여 확인한 콜라젠 스폰지 내의 간세포 형태이다. 단면에 나타난 모든 간세포가 스폰지 표면에 부착되어 있었으며 일부 간세포는 그림 1에서 처럼 속이 비어있는 구조를 형성하는 것이 관찰되었다.



Fig. 1 Histology of rat hepatocytes cultured in collagen sponge. (630 \times).

콜라젠 스폰지에 배양된 간세포의 간기능 활성

Fig. 2에 콜라젠 스폰지에 배양된 간세포와 단층으로 배양된 간세포의 암모니아 제거능과 알부민 분비능을 나타내었다. 스폰지의 경우에 알부민 분비능이 높은 수준으로 계속 유지되는 것은 스폰지 내에 부착된 간세포의 형태가 단층의 경우와는 달

리 지나치게 납작해지지 않기 때문에 판단된다.

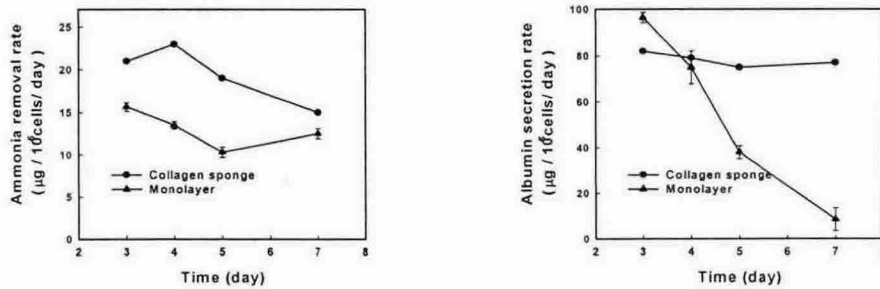


Fig. 2 Ammonia removal and albumin secretion rate of hepatocytes cultured on collagen coated plastic surfaces and seeded in collagen sponges.

참고문헌

1. V. Dixit and G. Gitnick, "Artificial liver support : State of the art", Scand. J. Gastroenterol. Vol.31, Suppl. 220, 101-14, 1996
2. Kaufmann, P. M., S. Heimrath, B. S. Kim, and D. J. Mooney, "Highly porous polymer matrices as a three-dimensional culture system for hepatocytes", *Cell Transplantation*, 6(5), 463-468, 1997
3. Jacek Rozga, Achilles A. Demetriou, et.al., "Isolated Hepatocytes in a Bioartificial Liver: A Single Group View and Experience", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 43, 645-653, 1994.
4. Russel A. Shatford, Scott L. Nyberg, Wei-Shou Hu, et.al., "Hepatocytes Function in a Hollow Fiber Bioreactor: A Potential Bioartificial Liver", *J. of Surgical Research*, Vol 53, 549-557, 1992
5. A.P.Li, Dale J.Beck, "A Simplified Method for the Culturing of Primary Adult Rat and Human Hepatocytes as Multicellular Spheroids", *In Vitro Cell.Dev.Biol.*, 28A: 673-677, 1992
6. C. Guguen-Guillouzo, B. Clement, G. Baffet, C. Beaumont, E. Morel-Chany, D. Glaise, "Maintenance and rebersibility of active albumin secretion by adult rat hepaticocytes co-cultured with another liver epithelial cell type", *Exp.Cell Res.*, Vol. 143, 47-54, 1983
7. Dunn, J. C. Y., R. G. Tompkins, and M. L. Yarmush, "Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration", *Biotechnol. Prog.* 7: 237-245. 1991
8. Matsushita, T., H. Ijima, N. Koide, and K. Funatsu, "High albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the pores of polyurethane foam", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 324-326, 1991
9. Seglen, P. O., "Preparation of rat liver cells", In D. M. Prescott(ed.) *Method in Cell Biology*, Vol. 13, pp29-83, Academic Press, New York, 1978.
10. C. S. Chen, I. V. Yannas, and M. Spector. Pore strain behavior of collagen-glycosaminoglycan analogues of extracellular matrix. *Biomaterials* 16: 777-783, 1995.