

Liver Specific Functions of Hepatocyte Spheroids Cultured with 100% Fetal Bovine Serum

이두훈, 박정극

동국대학교 공과대학 화학공학과

전화 (02) 2260-3365, FAX (02) 2271-3489

서론

최근의 의학 발달에도 불구하고 전격성 간손상(fulminant hepatic failure, FHF) 환자의 경우 치사율이 90%에 이르고 있으며 이러한 경우의 생존율을 높이기 위하여 간조직과 간세포를 이용하여 hollow fiber module 등 체외의 간 보조장치로서 생물학적 반응기 시스템(1)을 응용하기에 이르렀다. 이러한 생인공간의 개발을 위해서는 간세포를 간의 특이 기능 활성이 우수한 상태로 장기간 배양하는 기술이 필수적으로 선행되어야 한다. 일반적인 배양조건에서 간세포는 매우 짧은 시간 안에 간기능을 상실하며 빠른 속도로 괴사한다. 그러나, 일차 간세포가 3차원 구조를 가지는 구형의 꼭 짜여진 집합체(구상체, spheroid)를 재구성할 수 있다는 것이 알려졌으며, 구상체로 존재하는 간세포 사이에는 tight junction이 관찰되고 광범위한 세포 접촉과 담즙 세관과 비슷한 구조가 나타나는 등의 체내 간소엽 조직과 유사한 구조를 보이는 등 형태학적인 면, 생존력, 간 특이 기능의 활성 측면에서 간세포를 단층으로 배양하는 것 보다 우수하다는 것이 알려졌다(2, 3).

보통 생인공간에 사용되는 간세포는 동물이나 인체에 사용되기 전에 세포 배양 배지에서 배양된다. 그러나, 간세포가 실제로 접하게 되는 것은 환자의 혈장임에도 불구하고 혈장으로 배양된 간세포의 활성을 보고한 문헌은 매우 드물다. 따라서 혈장이나 혈청을 이용한 간세포 배양 결과는 매우 중요한 생인공간 설계 정보를 준다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 간세포 단층과 구상체를 100% 소태혈청으로 배양하여 그 간기능 활성을 비교하였다. 그 결과 간세포 구상체가 간세포 단층보다 혈청에서 높은 활성을 나타내어 생인공간에 적합한 간세포 배양법임을 알 수 있었다.

실험 재료 및 방법

쥐 간세포의 분리

간세포의 분리는 Seglen-method(4)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 rat을 사용하였으며 trypan blue staining 방법에 의하여 세포 수를 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), Hydrocortison (3.5 μ M), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 μ M), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (50pM), H_2SeO_3 (3 μ g/l), Linoleic acid(50mg/l), NaHCO_3 (1.05g/l), HEPES(1.19g/l), Penicillin(0.0588g/l), Streptomycin (0.100g/l)을 첨가하여 사용하였으며 이를 HDM (hormonally defined medium)이라 하였다. 혈청은 Gibco Co.의 우태혈청(FBS)을 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.

간세포 구상체 형성을 위한 폴리우레탄 폼 (PUF)

간세포 구상체 형성을 위한 PUF는 NCO-prepolymer 방법으로 제조하였으며 앞서 발표한 논문에 자세한 방법을 서술하였다(5). 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 polypropylene glycol(PPG, 분자량 3,000, (주)동성화학) 1 mol 당 crude MDI(diphenylmethane-4,4'-diisocyanate) 9.13 mol을 반응시켜 15%의 NCO- 잔기를 갖는 prepolymer를 제조하였다. 여기에 촉매와 계면활성제를 넣고 발포제로 물 7.5%를 첨가하여 5000rpm으로 10초간 교반하여 폼을 제조하였다. 제조된 PUF는 직경 35mm, 두께 2mm 크기의 disk 형태로 절단하여 에탄올에 하루동안 방치한 다음 3차 증류수로 세번 세척한다. 두 번의 PBS(phosphate buffered saline) 세척 후 가압 멸균하였다. 이 과정에서 PUF 내부의 기포는 거의 제거된다. 동일한 크기의 well 에 PUF 조각을 넣은 후 배양 배지로 다시 한번 세척한 후에 간세포를 접종하였다. 산소전달을 돕기 위해 orbital shaker로 교반하였다. 접종된 간세포는 2-3일이 경과하면 구상체를 형성하며 이때 배양 배지를 혈청으로 교체하였다.

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 μ g/ml를 2차항체는 1/5000을 사용하였다.

결과 및 토론

혈청으로 배양된 간세포 단층 및 구상체의 형태

Figure 1은 배지와 혈청으로 간세포를 단층 형태로 배양한 경우의 사진이다. 총 배양 기간 4일(혈청 배양 1일)된 사진으로서 혈청으로 배양한 경우는 핵의 윤곽이 흐려지고 세포질 내에 많은 양의 지질소포(lipid droplet)가 축적되었다. 지질 축적

은 전형적인 세포 손상 반응으로서 이것은 혈청에 높은 농도로 포함되어 있는 triglyceride와 같은 지질에 의한 현상으로 판단된다[6].

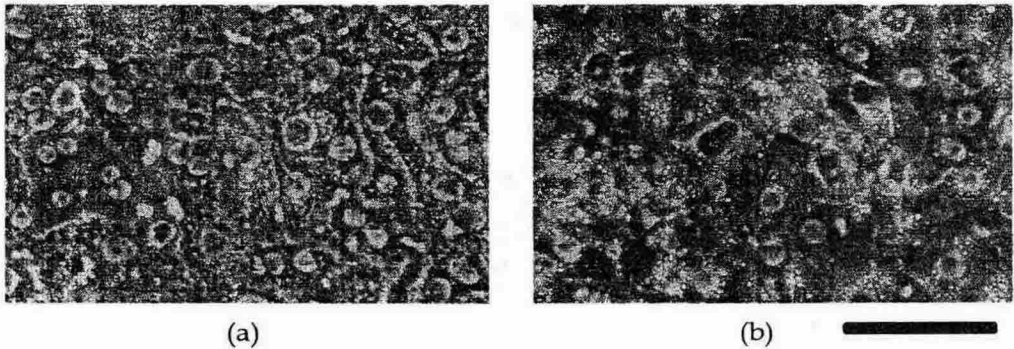


Figure 1. Monolayer of rat primary hepatocytes cultured with hormonally defined media(a) and fetal bovine serum (b) for 4 days. Arrows indicate lipid droplets. Bar indicates $100 \mu\text{m}$.

Figure 2는 구상체 형태로 배양된 간세포의 사진이다. 구상체 형태로 배양된 경우 배지를 혈청으로 교체한 후 2일 까지는 형태의 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나, 혈청으로 배양한 기간이 길어짐에 따라 구상체 표면의 세포가 괴사되어 표면이 거칠어지는 것을 관찰 할 수 있었다(2b). HDM으로 계속 배양된 경우는 상대적으로 표면의 변화가 적었다(2a).

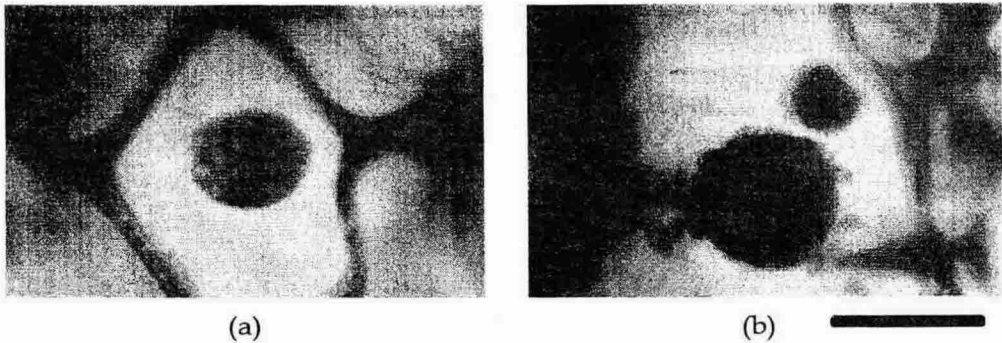


Figure 2. Microscopic pictures of hepatocyte spheroids cultured with hormonally defined media (a) and fetal bovine serum (b) for 9 days. The spheroids were formed within pore of polyurethane foams. Bar indicates $200 \mu\text{m}$.

혈청으로 배양된 간세포 단층 및 구상체의 간기능 활성

Figure 3(a)와 3(b)는 각각 HDM과 혈청으로 배양된 간세포 단층과 구상체의 알부민 분비율을 나타낸 것이다. 혈청 배양의 경우 3일째 HDM을 혈청으로 교체하였다. HDM으로 배양한 단층의 경우는 4일째부터 급격히 분비율이 감소한 반면 구상체는 14일 까지도 초기치와 비슷한 분비율을 나타내었다. 혈청 배양의 경우 혈청으

로 교체한 3일째부터 단층의 경우는 HDM의 경우보다도 더 급격히 활성이 상실되어 이들 후에는 1/3로 7일째부터는 거의 알부민을 분비하지 못하였다. 반면 구상체의 경우는 혈청으로 교체한 후 이들 정도는 분비율이 약간 감소하였고 3일째부터 급격히 감소하는 경향을 보였으나 혈청으로 교체 후 4일이 지난 후에도 초기치의 1/2를 유지하였다.

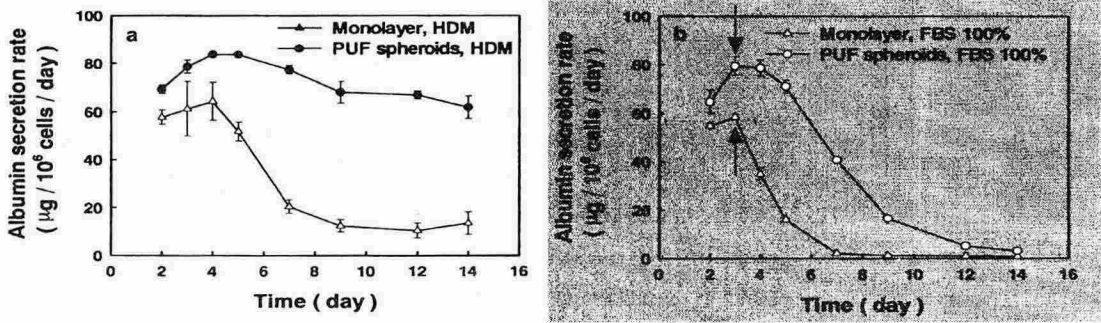


Figure 3. Albumin secretion rates of hepatocyte monolayer and spheroids cultured with HDM (a) and FBS (b). In graph (b), hepatocytes were cultured with HDM for first three days and then the medium was changed with FBS. Arrows in (b) indicate the change point of medium types i.e. from HDM to FBS.

이상의 결과로 볼 때 혈청은 합성 배지보다 간세포의 간기능 활성의 유지에 매우 불리한 조성을 가지고 있는 것으로 판단된다. 또한, 간세포 단층의 경우는 혈청으로 배양한지 이들 만에 알부민 분비 활성이 1/3로 감소한 반면 구상체의 경우는 4일까지도 그 활성이 1/2로 유지되어 간세포 구상체가 단층보다 혈청에서 간기능을 오래 유지할 수 있다는 것을 알 수 있다. 따라서, 간세포 구상체 배양법은 생인공간의 개발에 적합한 배양법이라는 것을 알 수 있다.

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. 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
3. 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
4. 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.
5. Ahn, J. I., D. H. Lee, Y. S. Lee, J. S. Lee, Y. S. Choi, and J. K. Park (1998), Formation of spheroids of adult rat primary hepatocytes in polyurethane foam, *J. KOSOMBE* 19, 215-223.
6. H. W. Matthew, J. Sternberg, P. Stefanovich, J. R. Morgan, M. Toner, R. G. Tompkins, and M. L. Yarmush, "Effects of plasma exposure on cultured hepatocytes : Implications for bioartificial liver support", *Biotech. Bioeng.* Vol.51, 100-111, 1996.