

# 어류혈청이 메기(*Silurus asotus*) 간세포의 단층배양에 미치는 영향

권혁추\* · 최성희 · 김은희 · 한덕우 · 권준영  
 선문대학교 응용생물과학부

## Effect of Fish Serum on the Primary Monolayer Culture of Catfish (*Silurus asotus*) Hepatocytes

Hyuk Chu KWON\*, Seong Hee CHOI, Eun Hee KIM, Deug Woo HAN  
 and Joon Yeong KWON

Department of Applied Biological Sciences, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea

Effects of sera from several fish species and insulin on the development of cultured *Silurus asotus* hepatocytes were investigated. Hepatocytes with high viability (95%) were obtained from the livers of male catfish by two step collagenase perfusion. Isolated hepatocytes, initially showed a typical round-shape, firmly attached to the culture dish within 24 h. In the presence of catfish serum, hepatocytes attached each other, spread well on the dish and developed into monolayer after 3-4 days of incubation. Cells within the established monolayer became polygonal in shape and their nuclei and boundaries being clearly visible under the microscope. In contrast, when incubated in FBS-supplemented or serum-free medium, cells managed to form small clusters, each made of 2-10 cells. Cells in FBS-supplemented medium further developed into larger clusters. However, these clusters failed to develop into monolayer. In addition, when insulin was deprived from culture medium, formation of monolayer also failed. From these data, it can be concluded that the presence of both catfish serum and insulin is necessary for the formation of monolayer of catfish hepatocytes and the functional role of fish serum may differ from that of insulin and can not be displaced by FBS-supplementation.

Key words: *Silurus asotus*, Fish serum, Hepatocyte culture, Catfish

### 서 론

간은 척추동물의 내부 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 특히 당 및 지질 대사, 단백질의 합성, 호르몬 대사, 외인성의 독성 물질 제거 등 많은 기능을 수행한다. 최근 간세포는 내분비계 장애물질의 에스트로젠 활성을 검색하는데 중요하게 이용되고 있으며, 이를 효율적으로 활용하기 위해서는 간세포 배양과 같은 *in vitro* 실험계의 확립이 필요하다. 간세포배양은 세포를 배양액 중에 부유시켜 배양하는 것보다 dish에 단층으로 부착시켜 배양하는 단층 배양법(monolayer culture)이 간세포의 생존 및 기능 수행에 효율적이다(Segner, 1998). 배양액의 종류, pH, 삼투압, 온도 및 혈청의 포함 유무에 따라 어류 배양 간세포의 형태 및 기능상의 차이를 나타낸다(Mommsen et al., 1994; Kim and Takemura, 2003). 배양 간세포의 생존 및 기능에 관한 많은 논문에도 불구하고 배양 간세포의 형태 및 단층 배양에 미치는 연구는 거의 없다(Segner, 1998). 뱀장어의 간세포는 dish를 fibronectin으로 코팅하고, 송아지 혈청(FBS)이 포함된 배양액을 사용하여 단층세포의 특징인

다각형을 형성하였다(Hayashi and Ooshiro, 1975)고 보고하였지만, 다른 어종에서 완전한 단층세포를 형성하였다는 보고는 거의 없다. 또한 Hayashi and Ooshiro (1986)는 같은 뱀장어 간세포배양에 있어서 insulin, glucagon, 프로락틴 및 EGF 등이 간세포의 증식, 유지 및 형태에 미치는 영향에 대해 검토하였는데, 이중 insulin은 세포의 신전, 접착 및 유지에 중요한 요소라 하였으나, 다른 어종에서 검토된 적은 없다. 어류 간세포배양을 이용한 실험은 무지개송어의 간세포를 많이 이용하여 왔는데, 송어의 간세포는 세포 부착을 위한 기질 및 배양액의 종류, 혈청의 포함유무에 관계없이 다각형의 형태를 나타내지 않고, 원형의 상태를 유지하면서 세포끼리 서로 연결되어 세포 집합체의 덩어리를 형성한다(Kwon et al., 1993). 이 처럼 몇 가지 어종에서 간세포 배양법이 확립되어 간에서의 물질 대사 등을 연구하여 왔지만 간세포의 형태 형성, 특히 단층세포의 형성에 대한 연구는 적다.

본 연구는 *in vitro*에서의 Vitellogenin (Vg) 합성기구 및 환경 호르몬 관련 연구에 필요한 메기(*Silurus asotus*) 간세포 배양법을 확립하는데 있어서, 어류 혈청 및 insulin이 메기(*Silurus asotus*) 간세포의 단층세포 형성에 미치는 영향에 대해 검토하였다.

\*Corresponding author: hckwon@sunmoon.ac.kr

## 재료 및 방법

### 간세포 분리 및 배양

체중 150-200 g의 2년생 수컷 메기(*Silurus asotus*)의 간을 세포배양에 이용하였다. 메기 간세포의 분리 및 배양은 Kwon et al. (1993)의 방법을 수정하여 이루어졌다. 먼저 메기를 2-phenoxyethanol로 마취시켜 외부를 알콜로 잘 소독한 후 복부를 절개하여 간을 채취하였다. 쓸개와 함께 채취한 간을  $Ca^{2+}$ -free Ringer액(120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM  $KH_2PO_4$ , 23 mM  $NaHCO_3$ , pH 7.4)으로 10분 동안 간 혈관을 통해 관류시켜 간내에 존재하는 혈액 등의 불순물을 제거하였다. Collagenase (0.4 mg/mL, Type IV, Sigma)와 BSA (0.5 mg/mL)를 포함하는  $Ca^{2+}$ -free Ringer액으로 25분간 실온(약 25°C)에서 관류하여 간을 소화시켰으며,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -free Ringer액 30 mL를 주입하여 효소의 활성을 억제하였다. 소화된 간은 쓸개를 제거한 후 30 mL  $Ca^{2+}$ -free Ringer액에 넣어 수술용 가위로 가볍게 썰어 현탁액을 만들었다. 나일론 망을 이용해서 세포 현탁액을 50 mL용 conical tube 내로 여과시켰다. 여과된 세포 현탁액을 800 rpm로 2분간 원심 분리하여 침전된 간세포를 얻었다.  $Ca^{2+}$ -free Ringer액 40 mL를 다시 현탁시켜 간실질세포 이외의 물질을 제거하였다. 이런 과정을 3번 반복하였다. 이렇게 얻어진 세포에 소량의 Ringer액을 첨가하여 현탁액으로 하였다. 세포 생존률은 Trypan Blue 염색법으로 측정하였다. 세포는  $3-4 \times 10^5$  cells/dish의 밀도로 60 mm petri dish (Falcon)에서 배양되었다. 배양액은 L-15 medium (Sigma)에  $0.2 \mu M$  bovine insulin (Sigma), streptomycin (100  $\mu g/mL$ ), penicillin (70  $\mu g/mL$ )을 첨가하여 사용하였다. 모든 배양은 5%  $CO_2$ 하의 25°C에서 3 mL 배양액을 넣어 수행하였다. 배양액에 포함된 FBS 및 어류(메기, 틸라피아, 붕어) 혈청의 농도는 1, 3 및 5%로 하였다. 어류 혈청은 모두 수컷 성어로부터 채취하여 분리하였으며, 배양에 사용하기까지 -80°C에 보존하였다. 배양액은 24 또는 48시간마다 새로운 배양액으로 교환되었다. 모든 배양은 적어도 두 번 이상 반복되었다. 사진은 위상차 현미경(Nikon TMS)을 사용하여 모두 400배의 비율로 촬영하였다.

## 결 과

효소 분리법에 의해 얻어진 간세포는 약 95%의 생존율을 나타냈다. 배양액내 혈청의 포함 유무와 관계없이 collagenase에 의해 분리된 직후의 간세포는 구형(Fig. 1)의 상태를 유지하다 1-2일후에는 2-10개씩 서로 연결된 형태를 보였다. 1-5%의 메기 혈청이 포함된 배양액에서 배양 후 3-4일에 완전한 단층을 형성하였다. 이 때의 세포의 모습은 원형에서 다각형의 형태로 보였고, 세포끼리 서로 연결되어 완전한 단층을 이루었다. 세포와 세포의 경계가 뚜렷하였고, 핵의 모습이 명확하게 관찰되었다. 3과 5% 메기 혈청 사이에 단층 형성에 차이점은 없었으나, 1%의 메기혈청은 약간의 세포 공간이 관찰되었다(Fig. 2b,e,h). 3-5%의 메기 혈청이 포함된 간세포의 단층

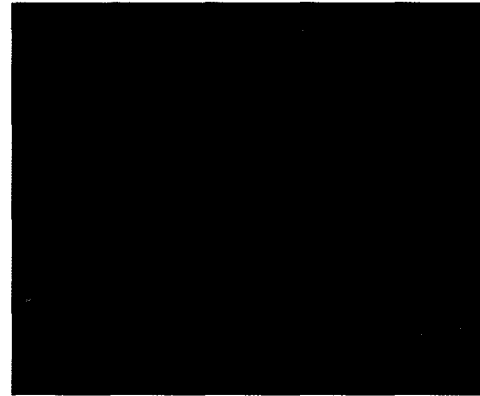


Fig. 1. Phase-contrast photomicrographs of catfish (*Silurus asotus*) hepatocytes immediately after isolation. The original magnification was  $\times 400$ .

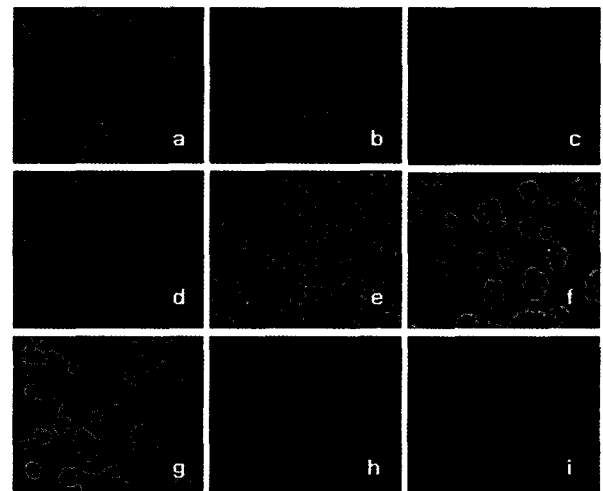


Fig. 2. Phase-contrast photomicrographs of catfish hepatocytes cultured in L-15 medium (a, d, and g) or L-15 with 3% catfish serum (b, e, and h) or L-15 with 5% fetal bovine serum (c, f, and i). Hepatocytes were cultured in the presence of insulin for 2 days (a, b, and c), 4 days (d, e, and f) and 12 days (g, h, and i). The original magnification was  $\times 400$ .

형성은 적어도 단층 형성 후 적어도 10일간은 양호한 상태를 유지하였으며, 그 후 서서히 dish로부터 세포 탈락이 관찰되었다. 어류혈청은 메기뿐 아니라 틸라피아, 붕어의 혈청도 메기 간세포의 단층 형성에 메기 혈청과 유사한 효과를 나타냈다 (data not shown). FBS를 포함한 배양액 또는 무혈청 배양액에서는 배양기간 동안 세포의 단층을 관찰할 수 없었다. FBS를 포함한 배양에서는 혈청농도에 관계없이 2-3일후 10-20여개의 세포들끼리 연결되어 2-3층의 다층 형태의 작은 세포 집단을 형성하였으며, 배양 12일후에는 커다란 세포집단을 이루었다 (Fig. 2c,f,i). 무혈청 배양에서의 세포들은 배양직후의 둥근 모양을 보이다 2-10개의 세포가 서로 연결되어 작은 세포 집단을 형성하였으나, FBS가 포함된 배양에 비해 세포 군집은 작았다(Fig. 2a,d,g). Insulin이 단층 형성에 영향을 미치는가를

조사하였는데, insulin이 포함되지 않은 배양에서는 혈청의 존재 유무와 관계없이 배양 기간 내내 단층이 형성되는 것을 관찰 할 수 없었으며, 배양 초기의 원형 상태를 유지하였다 (Fig. 3). 어류 혈청이 포함된 배양에서도 insulin이 포함되지 않으면 세포들은 둥근 모양을 유지하여 insulin이 세포가 알게 뻔어나가는 것을 유도하는 것으로 관찰되었다. 3% 메기혈청으로 4일간 배양 후 혈청이 포함되지 않은 무혈청 배양액으로 바꾸어 배양하여도 10일 이상 단층형성이 유지되었다(Fig. 4). 또한 무혈청 배양액으로 4일간 배양한 후 메기혈청이 포함된 배양액으로 배양하면 단층이 형성되는 것이 관찰되었으나, 메기 혈청에 의한 단층 형성에 비하면 세포상태는 양호하지 못했다(Fig. 5).

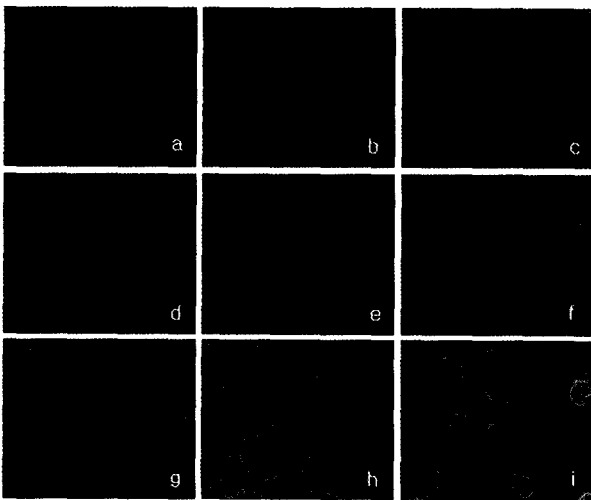


Fig. 3. Effect of insulin on the morphology of catfish hepatocytes. Hepatocytes were cultured in L-15 medium (a, d, and g) or L-15 with 3% catfish serum (b, e, and h) or L-15 with 5% fetal bovine serum (c, f, and i). Hepatocytes were cultured in the absence of insulin for 7 days (a, b, and c), 11 days (d, e, and f) and 14 days (g, h, and i). The original magnification was  $\times 400$ .

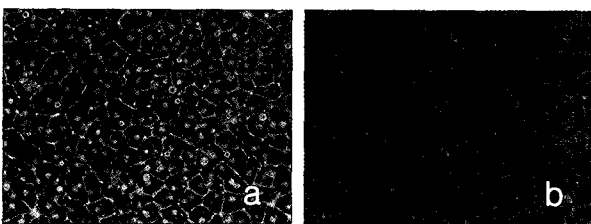


Fig. 4. Morphological changes of hepatocytes cultured in the presence of 3% catfish serum for 5 days (a) and subsequently, in the absence of fish serum for 10 days (b). Medium was replaced every 24 h. The original magnification was  $\times 400$ .

고 찰

어류의 간세포 배양계는 간에서의 vitellogenin (Vg) 합성 메커니즘을 구명하는데 많이 이용되어 왔으며(Kwon and

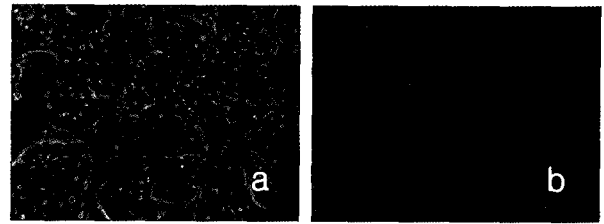


Fig. 5. Morphological changes of hepatocytes cultured in the absence of fish serum for 3 days (a) and subsequently, in the presence of 3% fish serum for 10 days (b). Medium was replaced every 24 h. The original magnification was  $\times 400$ .

Mugiya, 1994; Kim and Takemura, 2003; Kwon et al., 2005), 최근에는 내분비계 장애 물질의 에스트로젠 활성을 검색하는데 유용한 도구로서 빈번하게 사용되어 지고 있다(Navas and Segner, 2000; Nakari and Pessala, 2005). 배양 간세포의 생존 및 기능에 관한 많은 연구에도 불구하고 배양 간세포의 형태에 관한 연구는 많지 않다. 쥐와 닭의 간세포는 분리된 직후는 콜라겐 코팅된 dish 위에서 원형의 상태를 유지하다 3-4일 후에는 완전한 단층을 형성하지만(Boehm et al., 1988) 어류의 경우 이들 동물과 달리 단층을 형성하는 경우는 드물다. 효소에 의해 분리된 간세포를 dish에 부착시키기 위해 콜라겐, fibronectin과 같은 세포의 기질(extra cellular matrix)들이 사용되어 왔다. 최근에는 이들 세포의 기질 이외에 dish 표면을 화학적으로 처리한 Falcon primaria dish가 간세포 부착을 위해 많이 사용되고 있다. 어류 간세포들이 이들 기질에 부착하는 정도는 어종에 따라 다르다(Segner, 1998). Dish에 콜라겐 및 fibronectin의 기질 처리는 비용도 많이 들고, 번거로워 primaria dish가 많이 이용되고 있다 (Kwon et al., 1993). 또한 간세포의 부착정도, 형태 및 생존은 배양액의 종류, pH, 삼투압, 온도 및 혈청의 포함 유무에 따라 차이를 나타낸다 (Mommsen et al., 1994). 메기를 이용한 본 연구에서는 primaria dish와 어류 혈청을 이용하여 완전한 간세포 단층이 형성되었다. 대부분의 어류 간세포 배양 실험의 경우, 어류 혈청에 의해 단층을 형성했다는 보고는 없다. 뱀장어의 간세포가 fibronectin 코팅된 dish와 10%의 FBS가 포함된 조건에서 다각형의 단층 세포를 형성하였지만(Hayashi and Ooshiro, 1975), 다른 어종에서 FBS를 사용하여 완전한 형태의 단층을 이루었다는 보고는 거의 없다. 최근 광우병에 의해 FBS의 구입이 어렵고, 가격도 비싸기 때문에 어류의 간세포 배양에 어류 유래의 혈청을 이용하는 것이 바람직하다. 어류 간세포배양에 통상 10-20% FBS를 배양액에 포함하여 사용하고 있지만, 메기의 경우 본 연구결과에서 나타난 것처럼 1-3%의 어류 혈청이면 완전한 단층을 형성하는데 문제가 없어, FBS 대신 어류 혈청의 사용이 권장된다. 또한 메기 간세포 배양은 같은 종의 혈청 뿐 아니라 붕어, 틸라피아 등 다른 어종의 혈청도 단층배양이 가능하다는 것은 매우 흥미롭다. 한편 어류 혈청을 사용하여 간세포배양을 하는 경우, 어류 혈청에 포함된 내인성의

호르몬을 비롯한 여러 물질들이 포함되어 있어, 어떤 특정 물질대사를 연구하는데 지장을 초래할 수 있다. 따라서 본 연구 결과에서와 같이 어류 혈청이 포함된 배양액에서 단층을 형성시킨 후 배양액으로부터 혈청을 제거하여 배양하여도 적어도 1주일 이상 단층이 유지되는 것을 관찰하였다. 이처럼 어류 혈청을 이용하여 단층 세포 형성 후 무혈청으로 바꾸어 배양하여도 단층이 계속 유지되는 것으로부터 단층 세포에 의한 무혈청 배양이 가능하다. 최근 단기간의 간세포 배양 실험에 무혈청 배양법이 많이 이용되고 있는데(Kwon et al., 1993; Kwon and Mugiya, 1994; Kim and Takemura, 2003), 장기간의 배양을 위해서는 어류 혈청에 의한 단층 배양 형성 후 무혈청배양을 시도하는 연구가 필요하다.

메기 간세포 단층 형성을 위해서는 어류 혈청이 필수적이지만, 어류 혈청이 포함되어 있어도 인슐린이 배양액에 포함되지 않으면 단층이 형성되어지지 않는 것이 관찰되어, 인슐린이 세포가 다각형으로 뿔어나가는 것과 세포와 세포사이의 접착에 반드시 필요한 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구 결과는 메기의 간세포배양에 있어서 단층세포를 형성하는데 있어서 insulin과 어류혈청이 중요한 역할을 한다는 최초의 논문이며, 다른 어종의 간세포배양에도 응용 가능할 것으로 생각된다.

## 사 사

본 연구는 전문대학교 2001년도 교내학술연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Boehm, K.D., R.L. Hood and J. Ilan. 1988. Induction of vitellogenin in primary monolayer cultures of cockerel hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 3450-3454.
- Hyashi, S. and Z. Ooshiro. 1975. Gluconeogenesis and glycolysis in isolated perfused liver of the eel. Bull. Jap. Soc. Fish., 41, 201-208.
- Hayashi, S. and Z. Ooshiro. 1986. Primary culture of the eel hepatocytes in the serum free medium. Bull. Jap. Soc. Fish., 52, 1641-1651.
- Kim, B.H. and A. Takemura. 2003. Culture conditions affect induction of vitellogenin synthesis by estradiol-17 $\beta$  in primary cultures of tilapia hepatocytes. Comp. Biochem. Physiol., 135B, 231-239.
- Kwon, H.C., S. Hayashi and Y. Mugiya. 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 $\beta$  I in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol., 104B, 381-386.
- Kwon, H.C. and Y. Mugiya. 1994. Involvement of growth hormone and prolactin on the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the *Anguilla japonica*. Gen. Comp. Endocrinol., 93, 51-60.
- Kwon, H.C., S.H. Choi, Y.U. Kim, O.S. Son and J.Y. Kwon. 2005. Androgenic action on hepatic vitellogenin synthesis in the eel, *Anguilla japonica* is suppressed by an androgen receptor antagonist. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 96, 175-178.
- Mommsen, T.P., T.W. Moon and P.J. Walsh. 1994. Hepatocytes: Isolation, maintenance, and utilization. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Analytical Techniques, Vol. 3. Hochachka, P.W. and T.P. Mommsen, eds. Elsevier Amsterdam, 355-372.
- Nakari, T. and P. Pessala. 2005. *In vitro* estrogenicity of polybrominated flame retardants. Aquatic Toxicol., 74, 272-279.
- Navas, J.M. and H. Segner. 2000. Antiestrogenicity of  $\beta$ -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the aryl-hydrocarbon receptor. Aquatic Toxicol., 51, 79-92.
- Segner, H. 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. Comp. Biochem. Physiol., 120, 71-81.

2005년 12월 28일 접수  
2006년 2월 22일 수리