

간세포 혼합 구상체의 형성 및 간기능 활성화

이 두훈, ¹이지현, ¹김성구, 박 정극동국대학교 화학공학과, 부경대학교 생물공학과¹

전화 (02) 2260-3365, FAX (02) 2271-3489, E-mail: jkpark@dongguk.edu

서 론

급성 간부전 환자나 간이식 대기상태에 있는 환자에 이용하기 위한 체외 간 보조 장치에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다(1). 간은 신장과는 달리 투석막과 같은 장치로는 대체할 수 없기 때문에 주로 동물의 간세포를 이용하게 된다. 따라서 분리된 간세포를 높은 활성을 보유한 체로 장기간 유지시키는 연구가 인공간 개발에 필수적인 요소가 된다. 간세포의 효과적 배양법 중의 하나가 간의 비실질세포(2) 및 인체 섬유아 세포(3) 등과 같이 배양하는 것이다. 그러나, 이러한 혼합배양 연구는 단층 배양에 한정되어 생인공간에 적용하기 위한 scale-up에 어려움이 따른다.

본 연구에서는 혼합배양 기술을 간세포 구상체 배양에 적용하여 이종 세포간 상호작용이 존재하는 혼합 구상체를 형성하였으며 이러한 혼합 구상체의 조직학적 특성과 간기능 활성을 살펴보았다.

실험 재료 및 방법

간세포의 분리는 two-step collagenase perfusion 방법(4)을 사용하였으며 180-200g 정도의 S.D. rat을 사용하였다. 분리된 간세포를 trypan blue dye exclusion 방법과 hemacytometer를 사용하여 세포 농도와 생존도를 측정하였다. 보통 $2\sim 3 \times 10^8$ 개 정도의 세포가 얻어지며 85% 이상의 생존도를 갖는다.

간세포와 혼합배양을 위한 비실질세포로는 인체 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast, H-fib), 쥐 전립선 내피세포 (rat prostate endothelial cells, RPEn) 및 쥐 간 상피세포 (rat liver epithelial cells, RLEp)를 사용하였다.

실리콘 용액으로 코팅된 6-well plate에 간세포를 5×10^5 cells/mL 농도로 well 당 3mL를 넣은 후 각각의 비실질세포를 2×10^5 cells/mL로 첨가하였다. Well plate는 orbital shaker(95 rpm)를 이용하여 교반하여 구상체가 형성되도록 유도하였다. 부유 배양 19시간 후 각각의 간세포 응집체를 Ca-alginate에 고정화하여 더 이상의

응집이 일어나는 것을 방지하였다.

비실질세포가 간세포와 같이 응집을 일으키는지 여부는 고정화 전의 간세포 응집체를 콜라겐이 코팅된 디쉬에 plating 함으로서 확인하였으며, 혼합구상체의 구조는 hematoxilin-eosin (HE) staining, 전자현미경, 면역 염색등을 통하여 확인하였다.

구성된 혼합 구상체의 간기능을 확인하기 위하여 암모니아 제거율 및 알부민 분비 속도를 배양 배지를 분석하여 측정하였다.

결과 및 토론

콜라겐 코팅 디쉬에 단층을 형성한 간세포 구상체를 확인한 결과 RPEn은 대부분의 구상체에서 관찰되었으나 RLEp나 H-fib.는 일부 간세포 구상체에서 같이 존재함을 확인하였다(Figure 1). 즉, EPEn은 간세포와의 부착능력이 높다는 것을 알 수 있다.

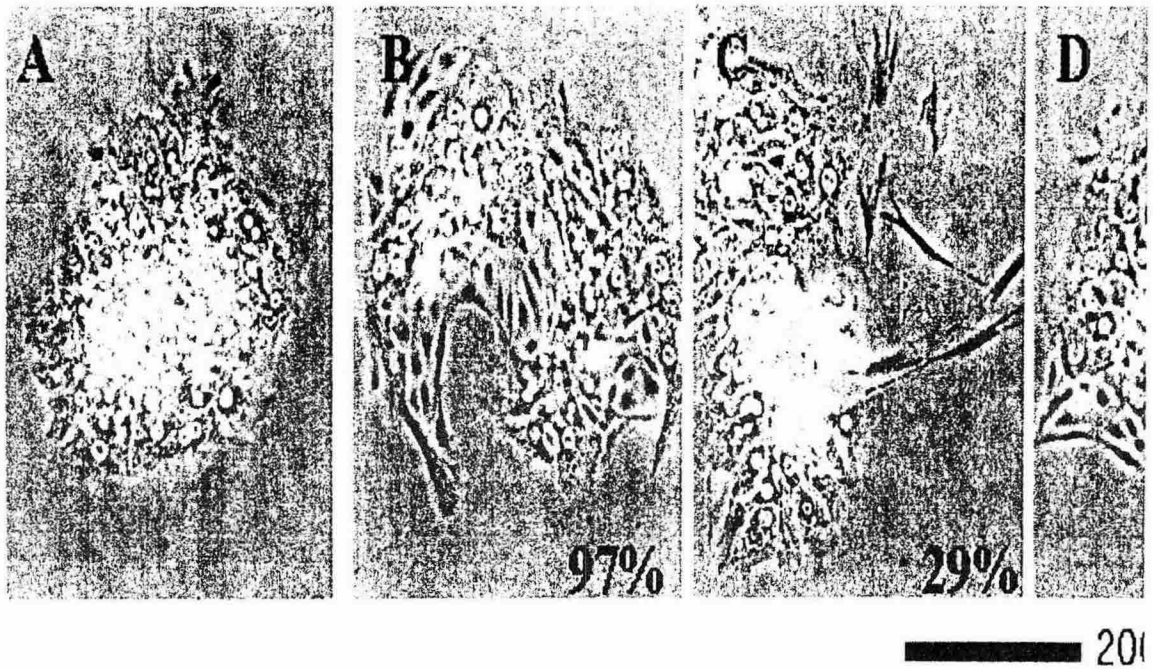


Figure 1. Light microscopic pictures of hepatocyte aggregates pure (A) and co-cultured with RPEn (B), H-fib (C) and RLEp (D) plated on collagen coated

dishes. The aggregates were flattened for 1 days. Percentages labeled in the bottom of each pictures are the incorporation efficiency (counting 100 spheroids) of NPCs to hepatocytes.

조직 검사 결과 내피 세포인 RPE_n은 구상체의 표면에 결합조직 세포인 H-fib.는 구상체의 내부에 위치하는 것을 확인하였다. 이는 세포의 *in vivo*에서의 특성이 그대로 반영된 것으로 생각된다. Figure 2는 laminin에 대한 면역염색 사진으로서 실제 간 조직과 유사하게 간세포와 내피세포 세포 경계에서 laminin이 축적되어 있음을 알 수 있다.

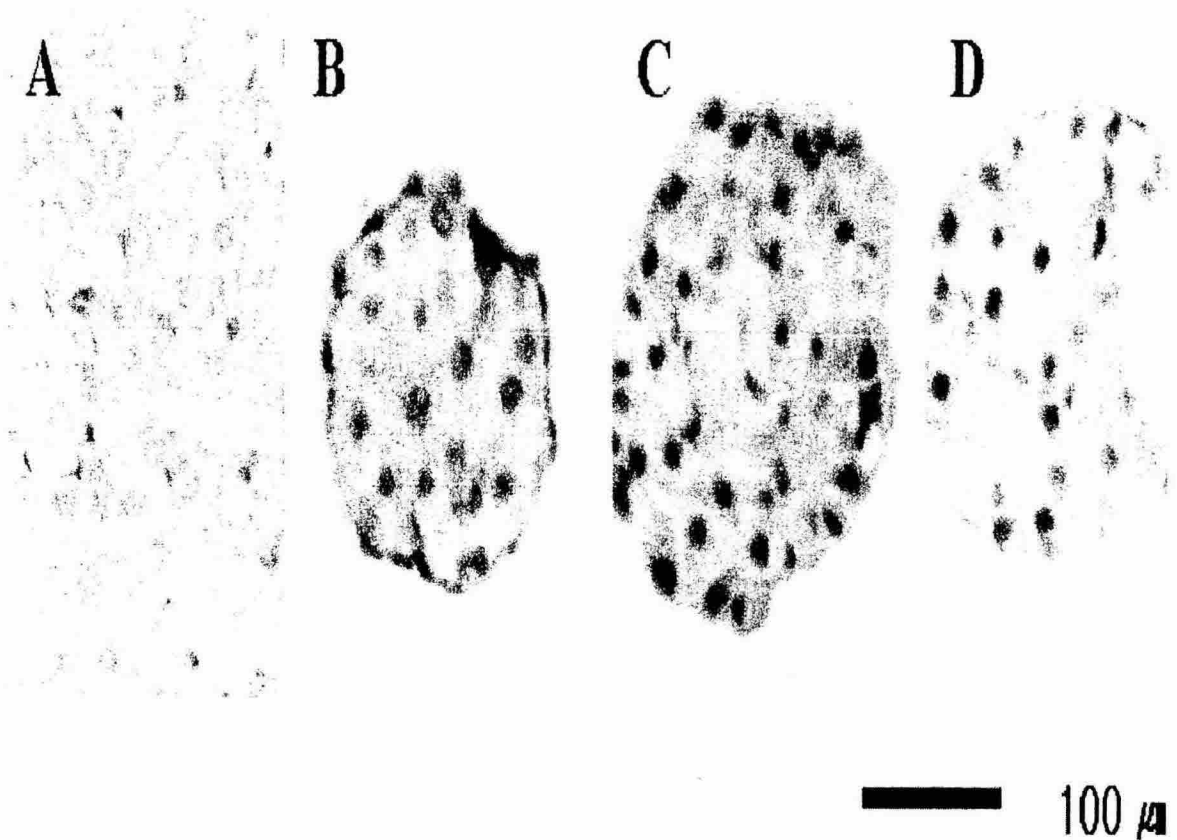


Figure 2. Immunostained hepatocyte spheroids against laminin. Liver tissue (A) and hepatocyte hetero-spheroids of RPE_n (B), H-fib (C) and RLEp (D).

(Laminin : brown color)

Albumin, laminin, collagen type IV 등에 대한 면역 염색 결과를 Table 1에 정리하였다. RPE_n과 같이 형성된 간세포 구상체는 실제 간조직에서 나타나는 것과 유사한 구조적 및 조직학적 특성을 나타내었다.

Table 1. Summary of histological results.

	Hepatocyte marker	Collagen type IV antibody	Laminin antibody	MT staining	Albumin
<i>Liver</i>	○	○	○	X	○
Pure spheroids	○	X	X	X	○
<i>RPE_n hetero-spheroids</i>	○	△	○	X	○
H-fib. hetero-spheroids	△	△	△	○	○
RLEp hetero-spheroids	○	X	X	X	○

혼합 구상체의 간기능을 확인한 결과 RPE_n 혼합 구상체가 간세포만으로 형성된 구상체나 H-fib. 혼합 구상체 보다 훨씬 높은 알부민 분비율을 장기간 유지하였으며 암모니아 제거율은 RPE_n 및 H-fib. 혼합 구상체가 순수 간세포 구상체 보다 제거율이 비교적 높게 유지되었다.

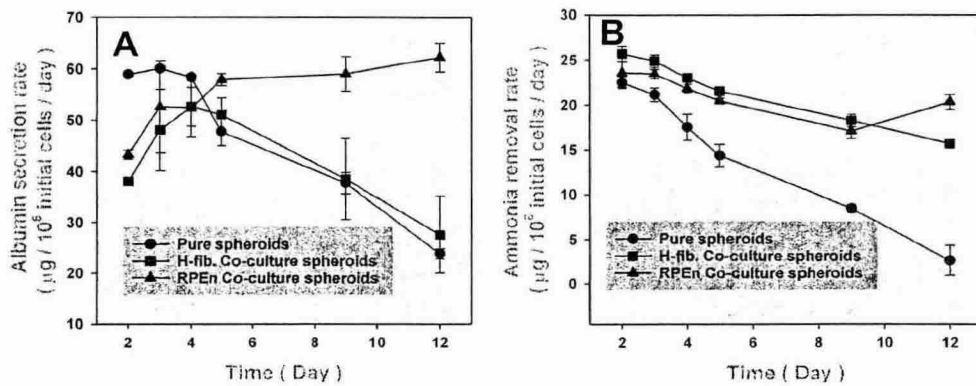


Figure 3. Liver specific functions of pure and co-cultured hepatic aggregates immobilized in Ca-alginate gel.

(A: albumin secretion rate, B: ammonia removal activity.)

이상을 결과로 볼 때 혼합 구상체는 생인공간에 적용할 수 있는 효과적인 간세포 배양법으로 판단되며 이를 이용하면 높은 성능의 생인공 간을 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Jacek Rozga, Achilles A. Demetriou, et.al., *Biotechnology and Bioengineering*, **43**, 645-653, 1994.
2. J.C. Wanson, R. Mosselmans, A. Brouwer, and D.C. Knook, *Biol. Cell*, **56**, 7-16, 1979.
3. G. Michalopoulos, F. Russel, and C. Biles, *In Vitro*, **15**, 796-806, 1979.
4. Seglen P.O., *Meth. Cell. Biol.*, **13**, 29-83, 1975