

Chitosan-alginate를 이용한 돼지 일차 간세포의 캡슐화 및 간기능 활성화

이지현, 이두훈*, 김상규, 박정극*, 김성구
 부경대학교 생물공학과, 동국대학교 화학공학과*
 전화 (051) 620-6188, Fax (051) 620-6180

Abstract

Chitosan-alginate capsules were formed by the electrostatic interactions and had appropriate mechanical strength, permeability to albumin and stability to hepatocyte. Pig hepatocytes were isolated and immobilized in chitosan-alginate capsules. Encapsulation in 3 minutes and spheroid formation period of 24 hours were optimum condition for the high liver function. Pig hepatocytes density of 9.0×10^6 cells/mL in capsules was suitable for the application to bioartificial liver support system.

서론

간세포는 대사작용, 분비작용, 배설작용, 해독작용 및 영양분 저장작용등 인간의 몸에서 매우 복잡하고 다양한 기능을 수행하는 중요한 장기이다. 그러므로 급성 간부전 환자 및 간이식 대기상태 환자의 간질환 치료를 위해 간기능 세포인 hepatocyte를 배양하여 체내이식이나 체외보조기구로서 사용하는 방법 등의 기술을 통한 인공간 개발이 그 해결책으로 제시되고 있다(1, 2). 그러나 인공간을 디자인해서 치료에 이용하는 데 있어서 가장 큰 문제점은 중간 혹은 개체간에 발생하는 면역거부반응이다. 이러한 관점에서 면역반응을 억제시킬 수 있는 pore의 크기를 조절한 인공막으로 간기능을 수행할 수 있는 간세포를 이용할 필요가 있다. Chitosan은 용액의 농도, 이온강도, pH 등에 의해 pore 크기가 달라지기 때문에 투과성의 조절이 가능하다. Chitosan 용액의 pH가 6일 때 확산실험으로 결정된 pore의 크기는 205 Å이므로 hepatocyte를 캡슐화시킬 경우, immunoisolation이 가능함을 보여준다(3, 4). 본 연구에서는 pig hepatocyte를 인공간에 이용하고자 간세포 구상체의 캡슐화 방법을 확립하여 높은 생존율과 대사기능을 유지할 수 있음을 확인함으로써 인공간에 적용 여부를 평가하였다.

재료 및 방법

도축장에서 돼지간을 분리하여 left medial liver lobe를 two-step collagenase perfusion으로 간세포를 분리하였다(5). 약 200g liver tissue를 유속 200mL/min으로 관류하여 보통 8×10^8 개의 세포를 얻었으며 생존도는 95%이상이다.

배양배지로는 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(0.1g/L)을 첨가하여 HDM(hormonally defined medium)이라 하였다. 분리된 간세포를 spinner flask에서 부유배양하여 약 200 μ m의 구상체를 형성하여 chitosan-alginate capsule에 고정화한 후 6-well plate에서 배양하였다.

Chitosan (0.5% w/v)은 glutamic acid 용액 (0.5% w/v)에 첨가하였으며 calcium chloride와 glucose를 각각 0.1M과 0.15M로 첨가하였다. Alginate (0.5% w/v)는 증류수에 녹여 glucose를 첨가하였다. 간세포와 간세포 구상체는 1.5×10^6 cells/ml의 세포농도가 되도록 각각 chitosan 용액과 혼합하여 이 용액을 drop generator로 alginate 용액에 사출하여 구형의 캡슐을 만들었다. 3분간의 캡슐화 과정 뒤, 형성된 캡슐은 mesh로 걸러서 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)용액으로 3번 세척하였다. 배양된 간세포의 해독능력을 조사하기 위하여 배지에 첨가된 암모니아의 분해량을 아산제약의 indophenol kits(AM 505-K)를 사용하여 측정하였다. 간세포가 암모니아를 제거함으로써 분비하는 요소양을 측정하기 위해 DAM-TSC [diacetylmonoxime (6g/L), thiosemicarbazide(0.3g/L)] 20mL과 34% H_3PO_4 100mL을 혼합한 정색시약을 배양액과 표준용액에 각각 첨가하고 100 $^\circ\text{C}$ 에서 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1(a)은 캡슐화 공정중 alginate 용액내 교반하는 시간을 달리하였을 때 간세포의 암모니아 제거속도를 나타내었다. 3분간의 캡슐화 과정이 최적임을 보인다. 1분간의 캡슐화공정후 만들어진 캡슐은 강도가 약하여 쉽게 파괴되었으며 5분 이상의 캡슐화공정은 간세포의 생존율에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 생성되는 캡슐막의 두께를 보면 250 μ m(1min), 275 μ m(3min), 345 μ m(5min), 484 μ m(15min)으로 크게 차이가 나며 물질확산등에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

Fig. 1(b)는 간세포 구상체 형성시 응집정도에 따른 암모니아 제거속도이다. 구상체로 존재하는 간세포 사이에는 tight junction이 관찰되고 세포접촉이 증가하여 생존력, 간 기능 활성면에서 우수하다고 알려져있다. 시간의 경과에 따라 구상체의 크기가 증가하였으며 24시간 응집후 약 200 μ m의 구상체를 형성하였다. 이 구상체를 캡슐화 하였을 때 최적의 간세포 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

Fig. 2는 chitosan-alginate capsule 내의 간세포 밀도에 따른 암모니아 제거속도와 요소 생성속도이다. 인공간에 적용하기 위해서는 reactor 내에 충전되는 capsule의 부피를 최소화할 필요가 있다. 본 결과에 따르면 9.0×10^5 cells/mL의 세포농도에서도 충분히 간세포의 활성을 나타냄을 보인다.

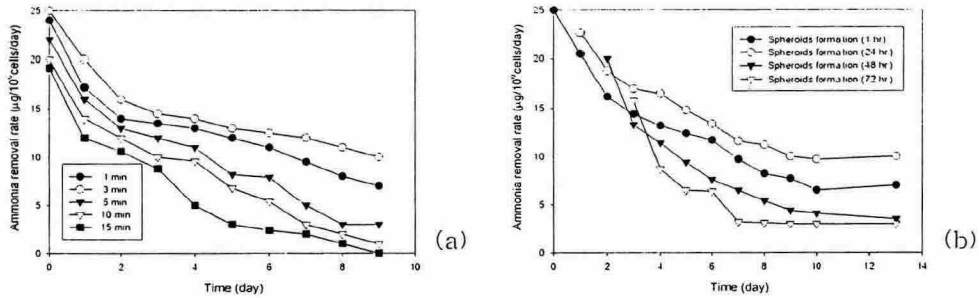


Fig. 1. Effect of (a)capsulation time and (b)spheroids formation time on ammonia removal rate of pig hepatocytes in chitosan-alginate capsules.

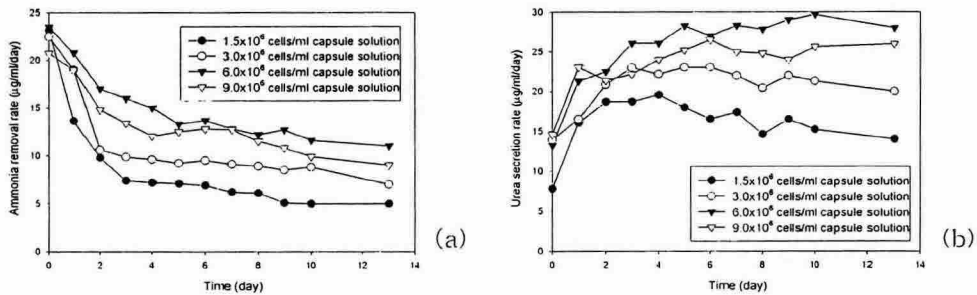


Fig. 2. Effect of cell density on (a)ammonia removal and (b)urea secretion rate of pig hepatocytes in chitosan-alginate capsules.

참고문헌

1. T. Hui, J. Rozga and A. A. Demetriou, "Bioartificial liver support"(2001), *J. Hepatobiliary Pancreat Surg.* 8, 1-15
2. V. Dixit and G. Gitnick, "Artificial liver support : State of the art"(1996), *Scand.J. Gastroenterol.* 31, 101-104
3. J. H. Son, S. H. Yu and S. K. Kim, "Animal cell culture and the production of monoclonal antibody(MAb) using biopolymer membrane"(1998), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13, 13-19
4. S. K. Kim, S. H. Yu, J. H. Lee, J. Y. Lee, A. Rademacher, D. H. Lee, J. G. Park, "Effect of collagen concentration on the viability and metabolic function of encapsulated hepatocytes"(2001), *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 423-427
5. H. G. Koebe, S. A. Pahernik, M. Sproedf, W. E. Thasier and F. W. Schiedberg, "Porcine hepatocytes from slaughterhouse organs: An unlimited resource for bioartificial liver devices"(1995), *ASAIO Journal.* 41, 189-193