다양한 matrix를 이용한 돼지 일차 간세포의 배양 및 간기능 활성

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

서 론

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). Hepatocytes를 분리하여 체외기구에 첨가하는 방법에는 캡슐화, 중공사 모듈 등이 이용되어 왔으며 새로운 matrix를 이용한 간세포 지지체에 관한 연구도 이루어 지고 있다. 본 연구에서는 hepatocyte를 인공간에 이용하고자 간세포를 nylon mesh, cotton mesh, korean paper에 부착시켜 배양하여 높은 생존율과 대사기능을 유지할 수 있음을 확인함으로서 인공간에 적용 여부를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 간세포의 분리 배양

도축장에서 돼지간을 분리하여 left medial liver lobe를 two-step collagenase perfusion으로 간세포를 분리하였다(3). 약 200g liver tissue를 유속 200mL/min 으로 관류하여 보통 8×10^8개의 세포를 얻었으며 생존도는 95%이상이다.

배양배지로는 William's E medium에 epidermal growth factor(20μg/L), insulin (10mg/L), hydrocortison (3.5μM), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$(0.1μM), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$(50pM), H_2SeO_3(3μg/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 각각 nylon mesh, cotton mesh, korean paper가 담긴 6-well plate에 5×10^5cells/ml 의 농도로 배양하였다.

2. 세포 생존율 측정 및 대사기능 측정

세포 생존율은 세포수에 비례하는 succinic dehydrogenase 활성을 측정하는 MTT[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma] 분석에 의해 조사하였다. 배양된 간세포의 암모니아의 분해량을 측정하기 위해 제단백 시약 640$\mu\ell$를 간세포 배양액과 표준용액 160$\mu\ell$에 첨가하고 잘 섞어 준다. 발색시약 I (Phenol 10g/L, sodium nitroprusside 50mg/L) 1.0mL, 발색시약 II (NaOH 5g/L, Na_2HPO_4 $12H_2O$ 53.6g/L, sodium hypochlorite 10mL/L) 1.0mL을 첨가하고 잘 섞

어준다음, 37℃에서 20분 동안 반응시키고 5분간 정치시킨 다음 630nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양된 간세포에서 분비되는 요소의 양을 측정하기 위해 정색시약(DAM-TSC 20mL, 34% 인산 100mL) 3mL을 간세포 배양액과 표준용액 100㎕에 첨가하고 잘 섞어 준다음, 100℃에서 10분 동안 반응시키고 5분간 정치시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양된 간세포의 단백질 합성 및 분비 기능의 지표로서 배양액 내의 알부민 농도를 측정하였다. 측정방법은 채취한 배지 상층액을 순수 분리한 돼지의 알부민과 돼지의 알부민에 대해 제조한 goat-anti-pig-IgG 항체를 이용하여 enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA)방법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

Pig hepatocytes를 nylon mesh, cotton mesh, korean paper가 담긴 6-well plate에 5×10^5cells/ml 의 농도로 3ml 씩 분주한 후 2주간 배양하였다. 암모니아 제거속도와 우레아 생성속도는 세가지 matrix의 경우 거의 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 알부민 생성은 korean paper에서 현저히 낮게 나타났는데 이는 각각의 matrix가 가지는 구조에 기인한 것이라 생각된다. 즉 그림에서와 같이 nylon과 cotton mesh의 경우, mesh의 fiber들이 격자를 이루며 일정한 간격을 유지함으로써 간세포가 쉽게 부착하여 안정적으로 퍼져서 자랄 수 있는 반면, korean paper의 경우 불규칙한 구조에 의해 세포의 부착 및 세포간의 접촉이 용이하지 못하여 세포간 접촉에 의해 생성되는 알부민의 농도가 낮게 나타난 것으로 사료된다.

(a) Nylon mesh (b) Cotton mesh (c) Korean paper

Fig. 1. Microscopic pictures of pig hepatocytes cultivated at various matrix.

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. 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