

Culture of Human Articular Chondrocytes in Serum-free Media

Yong-Soo Choi, Sang Min Lim, Chang Woo Lee[¶], Dong Il Kim^{*}

^{*}Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea;

and [¶] Good shepherd hospital, Yeoksam-dong, Seoul, Korea

TEL: +82-32-860-7515, FAX: +82-32-872-4046

Abstract

The aim of this study is to optimize the monolayer cultivation of human articular chondrocytes in serum-free media. For this purpose, chondrocytes were isolated from human articular cartilage and monolayer cultures were performed in DMEM/F12 medium with 10% fetal bovine serum (FBS) or serum-free media (SFM) containing various supplements and epidermal growth factor (EGF). Western blotting analysis, RT-PCR, dimethylmethylene blue (DMB) assay were carried out to evaluate the synthesis of collagen type II (Col. II) and glycosaminoglycans (GAGs). We observed that SFM with EGF stimulated the cell growth while the amounts of synthesized GAGs and Col. II were decreased gradually. However, the Col. II mRNA level was increased when the SFM was replaced by media containing 10% FBS. This study suggests that it is possible to obtain large amount of human articular chondrocytes by short-term monolayer cultures in SFM.

서 론

일반적으로 혈청은 *in vitro*에서 동물세포의 성장을 촉진하기 위해 배지에 첨가하여 사용되고 있다. 그러나 혈청은 구성 성분이 알려지지 않은 혼합물로 세포배양에서의 활성이 아직 완전히 파악되지 않고 있다. 또한 동물유래 혈청을 통한 외래 바이러스 등의 감염 가능성을 배제할 수 없기 때문에 무혈청 배지에서의 배양은 필수적이다. 최근에 미국 FDA 등에서는 생물제제의 생산에 무혈청 배지 사용을 요구할 뿐만 아니라, 동물유래 물질의 사용을 제한하는 것이 좋다고 권고하고 있다. 따라서 동물세포를 이용하여 생물의약품을 생산할 경우에는 무혈청 배지의 개발이 반드시 필요하다.

본 연구에서는 혈청을 첨가하여 배양된 기존의 상용 연골세포 치료제인 Carticel

(Genzyme) 등의 세포수(1.2×10^7 cells/mL)를 얻을 수 있는 SFM 개발을 목표로 하였다. 이를 위하여 연골조직으로부터 세포를 분리한 후 무혈청 배지에서 평판 배양을 통하여 세포증식을 최대화하는 것에 주 안점을 두었다. 10%의 혈청이 첨가된 배지를 사용한 경우와 세포의 성장을 비교하였으며 성장에 따른 연골세포의 특성인 Col. II 및 GAGs의 양을 확인하기 위하여 Western blotting analysis, RT-PCR, DMB assay를 실시하였다.

재료 및 방법

연골세포분리

사람의 관절 연골세포를 분리하기 위한 연골조직은 정형외과에서 수술한지 24시간 이내에 확보하여 그로부터 연골세포를 분리하였다. 연골조직을 70% 알콜에 30초 동안 넣었다가 PBS로 수회 세척을 하고 작은 절편으로 자른 후 다시 PBS로 3회 세척을 하여 Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12) 배지로 옮겼다. 세포 외 기질을 제거하기 위하여 0.2% type II collagenase를 첨가하였다. 12~24시간 후 상등액을 취하여 1000 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 PBS로 2회 세척을 하여 단일 연골세포로 분리하였다.¹⁾

평판배양

단일 연골세포를 10% FBS를 첨가 또는 첨가하지 않은 DMEM/F-12 배지로 현탁한 후 2×10^4 cells/cm² 농도로 접종하였다. 무혈청 배지의 기본 첨가제로서 ITSE (10 mg/mL insulin, 5.5 mg/mL transferrin, 5 mg/mL selenium, 2 mg/mL ethanolamine), 50 mg/mL ascorbic acid-2-phosphate, 100 mg/mL kanamycin, 200 mg/mL insulin, 그리고 10 ng/mL EGF를 첨가하였다. 배양은 5% CO₂가 공급되는 37°C, humidified CO₂ incubator에서 수행하였다. 배지는 3일 간격으로 교환하되 혈청 첨가 배지는 모두 교환하였으나 무혈청 배지는 50%만 새 배지로 갈아주었다. 계대배양은 7~10일 마다 수행하였다.

분석방법

연골세포를 1, 3, 6, 9일간 배양하여 0.25% trypsin-EDTA를 처리한 후 hemocytometer를 이용하여 trypan blue dye exclusion method로 세포의 수 및 viability를 확인하였다. 연골세포가 성장하면서 배지로 배출하는 proteoglycan의 양은 Blyscan™ assay kit (Biocolor Ltd.)를 사용하여 측정하였다. 기준 시료 물질로

chondroitin-1,4-sulfate를 사용하여 standard curve를 작성하였으며 신뢰도 98% 이상에서 시료를 정량하였다.²⁾ 세포 내 Col. II의 합성량을 확인하기 위하여 Shakibaei 등³⁾이 제시한 immunoblotting 방법을 부분 수정하여 수행하였다. 각 시료 단백질 총량은 Bradford protein assay kit를 사용하였다. 계대배양에 따른 Col. II mRNA 양의 변화를 확인하기 위해서는 RT-PCR을 수행하였다. TRIzol reagent를 이용하여 RNA를 추출하였으며 AMV reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 증폭된 PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동 하였다.

결과 및 고찰

세포성장

연골세포를 무혈청 배지에서 배양한 경우 12 well plate에서는 혈청을 첨가한 배지 대비 86.4%의 성장을 보였으며(Fig. 1a), 60 mm dish에서 배양한 경우에는 112% 성장하였다(Fig. 1b). 이는 EGF에 의하여 DNA 합성 및 세포분열이 활성화되어 세포 성장에 도움이 된 것으로 사료된다. 재현성 실험에서 혈청 첨가 배지에서는 성장 속도가 느려지는 문제가 있었으나 무혈청 배지의 경우 세포 성장 속도는 일정하게 유지되었다.

GAGs 합성

연골세포가 성장함에 따라 세포 밖으로 배출하는 GAGs의 양은 무혈청 배지에서 EGF를 첨가한 경우 합성이 저하되었다(Fig. 2). 일반적으로 EGF는 extracellular matrix (ECM)의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있으며 본 결과에서도 EGF에 의해 GAGs의 합성이 저해됨을 확인하였다.⁴⁾

Collagen type II 합성

연골세포의 성장에 따른 Col. II의 합성은 혈청 첨가 배지의 경우 시간에 따라 증가하였으나 무혈청 배지에 EGF를 첨가한 배지의 경우 배양 초기에 합성이 급속히 증가한 후 시간에 따라 줄어들었다(Fig. 3).

Redifferentiation

무혈청 배지에서 3회 계대배양 후 Col. II mRNA를 확인하였고 이를 다시 무혈청 배지로 계대배양 하였을 때 mRNA의 양은 감소되었다. 반면 무혈청 배지에서 배양하던 연골세포를 혈청 배지로 계대배양 한 경우 Col. II mRNA의 양이 다시 증

가되었다(Fig. 4). 이는 무혈청 배지에서 배양된 연골세포를 관절염 환자의 치료를 위해 신체내로 이식하였을 때 다시 ECM 등의 합성을 할 수 있다는 간접증거로 생각할 수 있다.

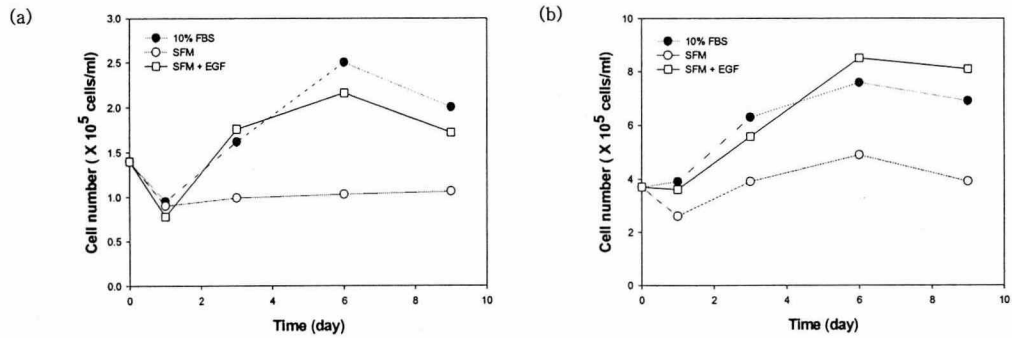


Fig. 1. Cell growth in 12 well plates (a), and 60 mm dishes (b).

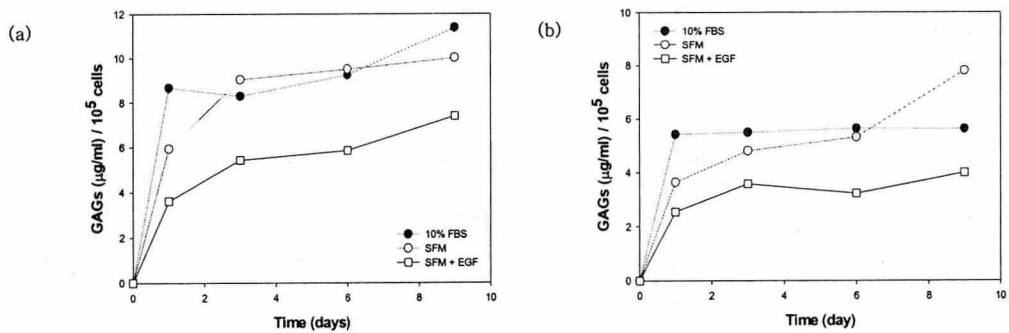


Fig. 2. Synthesis of GAGs in 12 well plates (a), and 60 mm dishes (b).

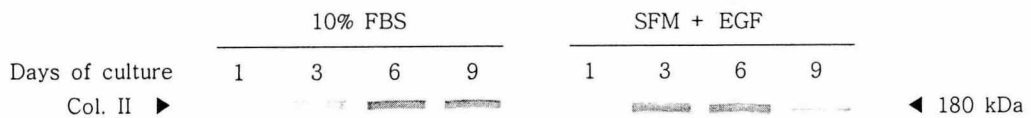


Fig. 3. Western blotting analysis of synthesis of Col. II in 60 mm dishes.

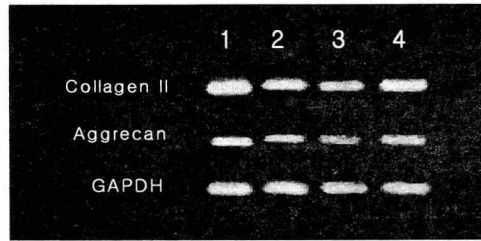


Fig. 4. RT-PCR. Lane 1: 10% FBS media at $P=3$; lane 2: SFM with EGF at $P=3$; lane 3: SFM with EGF at $P=4$; lane 4: 10% FBS media at $P=4$.

요 약

본 연구에서는 연골조직으로부터 세포를 분리한 후 10%의 혈청 첨가 배지와 무혈청 배지에서의 세포 성장속도, GAGs 합성 및 Col. II의 발현을 확인하였다. EGF를 첨가한 무혈청 배지는 연골세포의 증식에 매우 효과적이었으나 GAGs 합성 및 Col. II의 합성을 저해하였다. 또한 무혈청 배지에서 배양한 세포를 차후 신체내로 이식한다면 연골세포의 특성인 Col. II를 재합성할 수 있음을 간접적으로 확인하였다. 이는 무혈청 배지를 이용하여 평판배양 시 짧은 기간 내 연골세포 치료제로서 가능한 세포수를 얻기 위한 모델로서 유용할 것으로 생각된다. 또한 계대배양에 따른 분화 및 형태의 변화 등의 문제점들은 생분해성 지지체와 연계하여 해결할 수 있을 것으로 생각되며, 차후 위의 SFM을 이용한 3D 배양에 대한 연구를 수행할 예정이다.

참고문헌

1. Yoon Y. M., S. J. Kim, C. D. Oh, J. W. Ju, W. K. Song, Y. J. Yoo, T. L. Juh, and J. S. Chun, Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase (2002), *J. Biol. Chem.*, **277**, 412-420
2. Farndale R. W., D. J. Buttle, and J. Barrett, Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue (1986), *Biochem. Biophys. Acta*, **883**, 173-177
3. Shakibaei M., G. Schulze-Tanzil, P. de Souza, T. John, M. Rahmanzadeh, R. Rahmanzadeh, and H. J. Merker, Inhibition of mitogen-activated protein kinase induces apoptosis of human chondrocytes (2001), *J. Biol. Chem.*, **276**, 13289-13294
4. Prins A. P., J. M. Lipman, and L. Sokoloff, Effect of purified growth factors on rabbit articular chondrocytes in monolayer culture. I. DNA synthesis (1982), *Arthritis Rheum.* **25**(10), 1217-1227