

어류혈청이 메기간세포의 단층배양에 미치는 영향

김은희*, 맹성진, 김수진, 권준영, 권혁추

선문대학교 해양생명과학과

서 론

간은 척추동물의 내부 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 특히 당 및 지질대사, 단백질의 합성, 호르몬 대사, 외인성의 독성물질 제거 등 많은 기능을 수행한다. 이러한 연구를 효율적으로 수행하기 위해서는 간세포배양과 같은 *in vitro* 실험계의 확립이 필요하다. 간세포배양은 세포를 배양액 중에 부유시켜 배양하는 것보다 dish에 단층으로 부착시켜 배양하는 단층배양(monolayer culture)법이 간세포의 생존 및 기능수행에 효율적이다. 배양액의 종류, pH, 삼투압, 온도 및 혈청의 포함유무에 따라 어류 배양 간세포의 형태 및 기능상의 차이를 나타낸다. 배양 간세포의 생존 및 기능에 관한 많은 논문에도 불구하고 배양 간세포의 형태에 관한 연구는 많지 않다. 특히 혈청(송아지 및 어류혈청)이 간세포의 단층배양에 미치는 연구는 거의 없다. 뱀장어의 간세포는 fibronectin 코팅된 dish와 Williams' E 배양액에 10%의 송아지 혈청(BSA)이 포함된 조건에서 다각형의 단층세포를 형성하지만, 다른 어종에서 단층세포형성에 대한 보고는 거의 없다. 대부분의 어류간세포배양 실험은 무지개송어를 이용해 단층세포배양이라 하여 왔는데, 송어의 간세포는 기질 및 배양액의 종류, 혈청의 포함유무에 관계없이 다각형의 형태를 나타내지 않고 원형의 상태를 유지하면서 세포끼리 서로 연결되어 집합체의 덩어리를 형성한다. 본 연구는 *in vitro*에서의 메기 Vitellogenin (Vg) 합성기구 및 환경호르몬관련 연구를 수행하는데 있어 가장 중요한 간세포 배양법의 확립에 대해 검토하였다. 특히 어류혈청 및 insulin이 간세포의 단층배양에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 세포배양에서 합성되는 Vg 양을 측정하여 간세포의 활성 및 기능을 비교하였다.

재료 및 방법

체중 150-200g의 2년생 수컷 메기의 간을 세포배양에 이용하였다. 메기 간세포의 분리는 Kwon et al. (1993)의 방법을 약간 수정하여 준비하였다. 간세포 배양은 $3 \times 10^5/\text{cm}^2$ 개의 간세포를 3ml의 배양액에 넣어 60mm petri dish (Falcon)에서 배양하였다. 배양액은 L-15 medium을 이용하였으며, 5% CO₂ (25℃) 조건에서 배양하였다. 배양액에 포함된 BSA 및 메기 수컷 혈청

의 농도는 1, 3, 5 및 10%로 하였다. 배양액은 24 또는 48시간마다 새로운 배양액으로 교환하였다.

메기 Vg은 성숙한 암컷의 혈청을 Sepharose 6B column 을 통해 용출된 Vg 분획을 FPLC (Pharmacia Biotech, Sweden)를 이용한 HiTrap Q (음이온 교환 크로마토그래피)와 Superose 6 column을 통해 분리 정제하였다. Vg 항 혈청 제작 및 Vg 측정을 위한 ELISA법은 Kwon et al. (1990)의 방법을 다소 수정하여 시행하였다.

결과 및 논의

배양액내 혈청의 포함유무와 관계없이 collagenase에 의해 분리된 직후의 간세포는 원형의 상태를 유지하다 1-2일후에는 2-10개씩 서로 연결된 형태를 보였다. 1-5%의 어류혈청이 포함된 배양액에서 배양후 3-4일에 완전한 단층을 형성하였다. 이때의 세포의 모습은 원형에서 다각형의 형태로 되며, 세포와 세포의 경계가 분명하고, 핵의 모습이 명확하게 관찰되었다. 1-5%의 어류혈청중 3%의 어류혈청에서 가장 좋은 단층을 형성하였다. 1-10% BSA를 포함한 배양액 또는 무혈청 배양액에서는 세포의 단층을 관찰할 수 없었다. 무혈청배양에서의 세포들은 2-20개 정도로 서로 연결되었으며, 배양직후의 둥근모양을 배양기간 동안 유지하였다. BSA를 포함한 배양에서는 세포들끼리의 연결과 응집이 무혈청 배양에 비해 더욱 두드러져 커다란 세포집단을 형성하였으며, 이 형태는 배양기간내내 유지되었다. 배양액에 insulin의 존재는 세포의 혈청의 첨가유무와 관계없이 세포형태에 영향을 미쳤다. insulin이 포함되지 않은 배양에서는 어느 경우든 완전한 단층을 관찰 할 수 없었다. 배양세포의 활성을 비교하기 위해 에스트로젠에 의한 Vg 합성을 유도하여 관찰한 바, 어류혈청이 포함된 배양이 BSA 및 무혈청배양 보다 Vg 합성에 있어 다소 높게 측정되었으나, 통계적 유의차는 없었다.

참고문헌

- Kwon, H.C., Hara, A., Mugiya, Y., Yamada, Y. 1990. Enzyme linked immunosorbent assay of vitellogenin in whitespotted charr. Bull. Fac. Fisheries. Hokkaido Univ. 41, 162-180.
- Kwon, H.C., Hayashi, S., Mugiya, Y. 1993. Vitellogenin induction by estradiol in primary hepatocyte culture in the rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol., 104B, 381-386.

*Corresponding author: hckwon@sunmoon.ac.kr