

Cytodex-3 를 이용한 부착성 동물세포의 미립담체 배양

김정희^{1*} · 최준호¹ · 웨이슈후²

¹한국과학기술원 생물공학과 ²미네소타대학교 화학공학과

Microcarrier Culture of an Anchorage-dependent Cell Using Cytodex-3

Kim, Jun H^{1*}, Joon H. Choi¹ and Wei S. Hu²

¹Department of Biological Science and Engineering, KAIST, Seoul 130-012, Korea

²Department of Chemical Engineering, University of Minnesota, USA

Possibility of using microcarriers for the growth of a transformed human embryonic kidney cell line 293 was investigated. The cell grew well in a static culture such as T-flasks with medium of DME/F12 (3:1) mixture supplemented with 5% FBS, but it was most difficult to make the cells grow on microcarriers mainly due to the low attachment efficiency and poor spreading at initial stage of the culture. Consequently, 30-50% of the cells were lost upon inoculation into microcarrier suspension and significant fraction of the microcarrier became bald.

The medium supplemented with the concentrated conditioned medium by hepatoma cell line HpG2 supported the active growth of the cells on microcarrier and the cells showed a very healthy and well spreading morphology. It was probable that some spreading and attachment factors of HpG2 conditioned medium were effective for 293 cells.

최근 생물공학분야에서 자연 또는 유전자 재조합 된 동물세포의 배양을 통하여 백신, TPA, 인터페론, 단일클론항체 등과 같은 유용물질들의 생산에 많은 관심을 갖게 되었다. 이러한 유용물질들의 대부분이 부착성 동물세포에 의해 생성되기 때문에 부착성 동물세포의 대량배양을 위한 미립담체에 대한 세포배양 기술이 활발히 개발되고 있다. 1967년 Van Wezel(1)에 의해 이온교환수지로 사용되던 DEAE-Sephadex A-50의 표면 전하량(charge-density)를 조절함으로써 최초로 부착성 동물세포의 미립담체 배양에 성공한 이래 세포의 부착과 증식을 극대화하기 위한 많은 종류의 미립담체가 개발되고 상품화되어 왔다. 그러나 미립담체에 대한 동물세포의 배양에 있어서 표면(substrate)에 부착(attachment)되는 그리고 탈착(detachment)되는 과정을 조절할 수 있는 배양기술이 아직까지 확고하게 정립

되지 못하였고 그 각각의 과정이 동물세포의 종류에 따라 특이하다(2, 3).

본 논문에서는 재조합 동물세포를 미립담체를 이용하여 배양하는 과정에서 serum에 의한 세포의 증식 저해현상과 이를 극복하여 정상적인 세포의 증식을 유도하거나 증식을 촉진시킬 수 있는 conditioned microcarrier 및 conditioned medium의 효과를 고찰함으로써 부착성 동물세포를 효율적으로 미립담체를 사용하여 배양할 수 있는 방법에 관하여 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

Cell line

형질전환된 human embryonic kidney cell line 293, Vero cell line, 그리고 HpG 2 cell line 을 미배

Key words: Microcarrier culture, serum free medium condition medium, autocrine growth factor

*Corresponding author.

소타대학의 W.S. Hu 교수로부터 분양받아 사용하였다.

세포배양과 배양배지

배양배지로는 DMEM(Gibco, U.S.A)과 F12(Gibco, U.S.A)의 3:1 mixture에 5% FBS(Fetal Bovine Serum)을 첨가하여 사용하였다. Cell line은 T-flask를 이용하여 37°C의 항온 CO₂ 배양기에서 3일 간격으로 배지를 교체하면서 계대배양하였다.

Trypsinization 방법

0.02% Ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)를 함유한 phosphate balanced solution(PBS)에 존재하는 0.2% Trypsin을 이용하여 37°C의 항온 CO₂ 배양기에서 5~10분간 반응시킴으로써 trypsinization을 수행하였다.

미립담체 및 세포성장의 측정

세포배양에 사용된 미립담체는 cytodex-3(Pharmacia, U.S.A)를 5g/l로 사용하였다. 세포의 성장은 nuclei counting method(4)를 이용하여 hemocytometer로 측정하였다. 세포반응기로부터 2ml의 sample을 취하여 이중 미립담체를 모아 0.1M citric acid에 녹여진 0.1%(w/w) crystal violet을 1ml 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 Paster pipette을 이용하여 shearing 함으로써 미립담체로부터 nuclei를 탈착시켜 counting하였다.

미립담체에 대한 세포의 부착

Trypsinization 과정을 통하여 얻은 세포의 suspension을 사용할 배지로 세척한 후 세포가 미립담체에 부착하는 과정을 관찰하였다. 즉 미립담체와 혼합하여 suspension을 형성한 뒤 40 rpm으로 교반하면서 spinner flask 내에서 잠시 교반을 중지하고 윗부분의 microcarrier-free zone으로부터 상등액을 얻어 이를 nuclei counting에 의해 남아있는 세포수를 측정함으로써 미립담체에 세포가 부착되는 속도를 측정하였다.

세포반응기와 조업조건

세포반응기는 water-jacket이 부착된 1l round bottom vessel을 이용하여 400ml 배양을 수행하였다(Fig.1). 교반(agitation)은 magnetic stirrer을 이용하여 작동하는 impeller(직경: 7cm, 2개의 45° pitch blade)의 속도를 30~50 rpm으로 하였으며 배

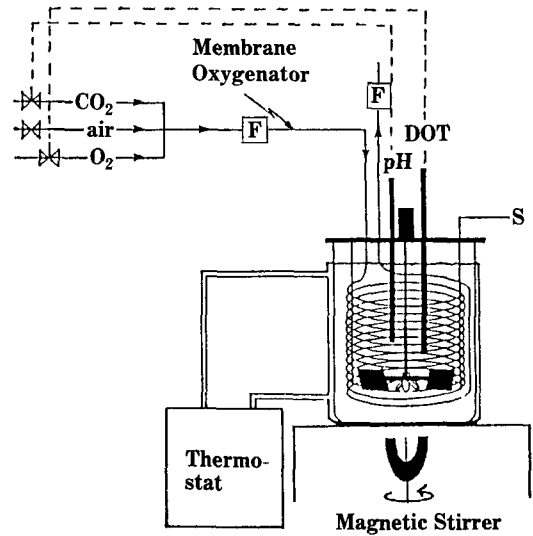


Fig. 1. Schematic diagram of 1-l cell culture reactor. F; 0.2 micron filter, DOT; electrode for dissolved oxygen tension, S; sampling line,

양온도는 thermostat을 이용하여 37°C로 유지하였다. 산소공급은 silicone rubber tubing(Dow Corning)을 배양기 내부에 나선형으로 설치하여 수행하였다. 배양액의 pH와 용존산소의 농도는 pH 조절기 또는 산소전극과 솔레노이드 밸브에 연결된 air/CO₂ 및 air/O₂의 흐름을 on-off 조절하여 pH 7.0 그리고 용존산소는 포화농도의 20~30% 수준으로 조절하였다.

결고 및 고찰

미립담체를 이용한 세포배양

Human embryonic kidney cell line 293을 T-flask 등과 같은 배양용기를 이용하여 CO₂ 배양기 안에서 static culture를 수행하였을 때는 정상적인 세포성장을 보여주지만(Fig.2A) 이를 미립담체를 이용하여 배양할 경우에는 미립담체에 부착된 세포들이 시간이 경과함에 따라 30~50% 이상이 탈착되어 죽어가는 현상 때문에 세포를 증식시킬 수 없었다(Fig.3). 사용하는 미립담체를 cytodex-3 이외의 cytodex-1, gelatin bead, 그리고 glass bead로 대체하였을 때 세포의 성장은 일어나지 않고 점진적인 탈착으로 인하여 죽어가는 사실을 알 수 있었다(결과생략). 또한 세포의 접종량을 5×10^5 , 7.5×10^5 , 그리고 1×10^6 cells/ml로 증가시켜도 미립담체에 부착된 세포가 탈착되어 죽어가는 현상은 극복할 수 없었다. 따라

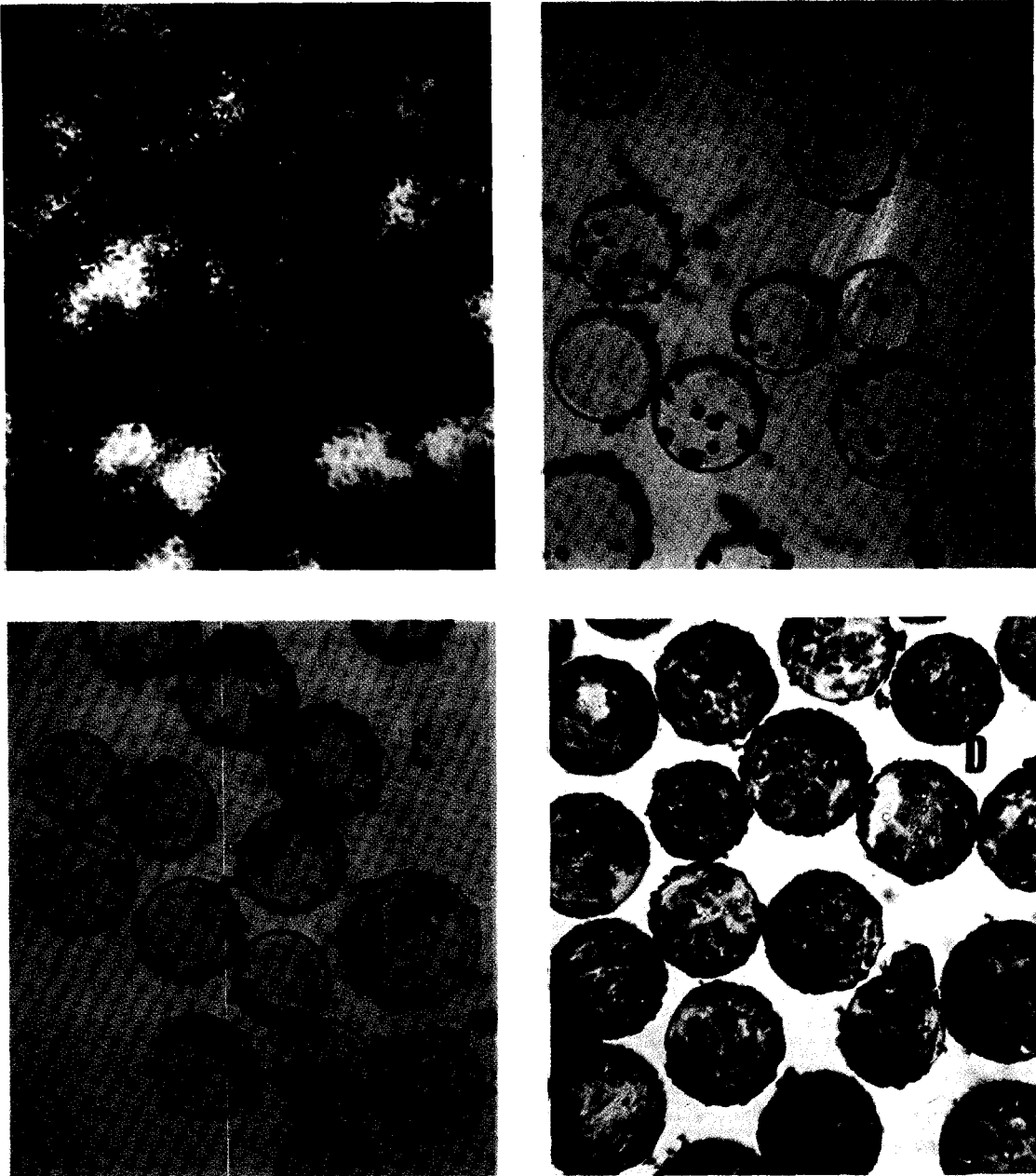


Fig. 2. Microscopic observation of cell growth on static culture (A) and microcarrier culture (B.C.D), A; 4 days, B; 4hr, C; 24hr, D; 4 days

서 cell line 293의 미립담체에 대한 배양에서 초기 접종량에 관계없이 정상적인 세포의 증식을 시킬 수 없었다. 이러한 현상은 부착성 동물세포가 표면 (substrate)에 부착되는 초기과정에서 부착효율 (attachment efficiency)이 낮거나 spreading이 저해받기 때문인 것으로 생각된다.

Conditioned microcarrier의 효과

부착성 동물세포인 Vero cell을 cytodex-3를 이용하여 5일간 배양하여 완전히 confluence 상태에 도달하였을 때 trypsinization 과정을 거쳐 Vero cell을 제거시킨 후 PBS buffer로 세척하여 얻은 conditioned microcarrier를 cell line 293의 미립담체로 사

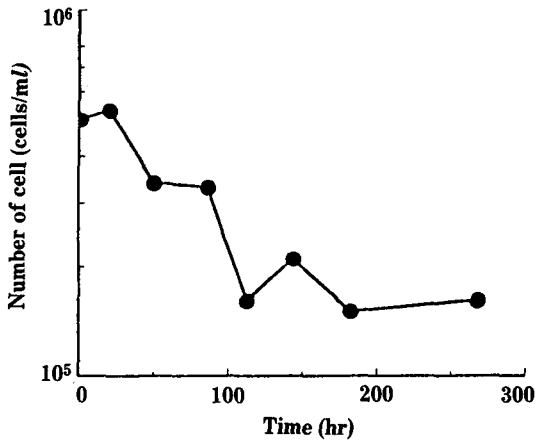


Fig. 3. The cell growth of cell line 293 on microcarrier.

용하였다(6). 약 100 시간 정도의 lag phase 을 보이지만 세포가 미립담체로부터 탈착되어 죽어가는 문제점은 어느 정도 해결되었다. 그러나 배양이 끝난 후 배양상태를 현미경하에서 관찰한 결과 약 1/3 이상의 미립담체가 세포가 없는 텅빈 상태로 있었다. 즉 conditioned microcarrier 에 잔존하는 Vero cell 에 의해 생성된 extracellular matrix 에 의해 cell line 293 의 미립담체에 대한 부착효율과 증식이 어느 정도는 증가함을 확인하였으나 완전히 성공적인 배양을 할 수 없었다(Fig.4).

Conditioned medium 의 효과

Autocrine growth factor(7)를 생성하는 hepatoma cell line, HpG2를 serum-free media에서 약 10 일간 배양한 뒤 배양액을 ultrafiltration membrane (M.W. cut-off, 10000)을 이용하여 약 100 배 농축시켜 얻은 conditioned medium 1% 를 cell line 293 의 배양액에 첨가하였다.

농축된 conditioned medium (concentrated conditioned medium, CCM)의 효과를 관찰하기 위해 cell line 293 의 attachment kinetics 를 조사하였다. 비교 사용한 배지의 종류는 5% serum-containing medium (SCM), serum-free medium (SFM)에 농축된 conditioned medium (CCM)을 1% 첨가한 배지 (SFM+CCM), 그리고 5% SCM+CCM 을 이용하였다. Fig.5에서 볼 수 있듯이 5% SCM에서 세포가 미립담체에 부착되는 속도가 다른 배지의 경우에 비하여 절반 정도로 감소함을 알 수 있었다. 따라서 serum 의 존재는 세포의 부착과정에서 부착되는 속도를 감소시키는 역할을 한다는 점을 확인하였다.

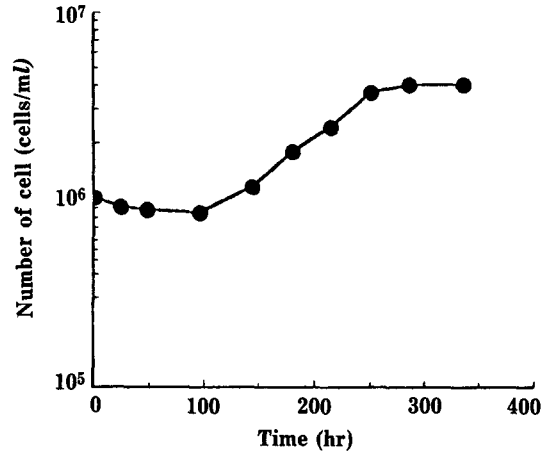


Fig. 4. The effect of conditioned microcarrier on cell growth.

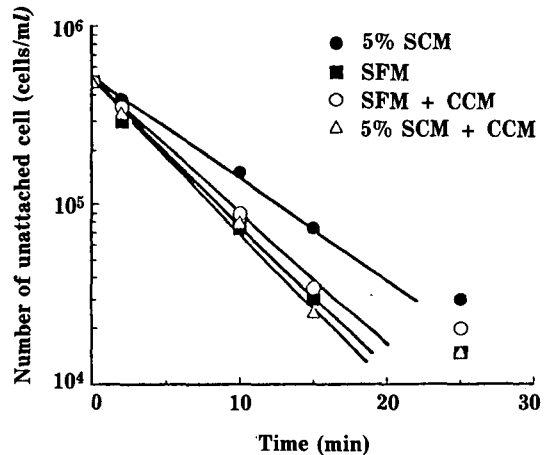


Fig. 5. The attachment kinetic of cells with different media on microcarrier.

그러나 5% SCM에 1ml의 CCM을 첨가하였을 경우에는 CCM의 효과에 의해 부착속도는 다시 회복되었다. 상기 배지를 이용하여 cytodex-3, 5g/l를 포함한 microcarrier culture를 수행한 결과는 Fig.6에서와 같다. 5% SCM이나 5% SCM+CCM의 배지에서는 세포가 시간이 경과함에 따라 대부분 탈착되었고 결과적으로 세포의 증식은 일어나지 않았다. 반면에 SFM+CCM의 배지에서는 세포가 매우 활발하게 spreading을 시작하면서 왕성하게 증식되었다. 이때 시간의 경과에 따른 세포의 형태를 보면 Fig.2와 같다. 초기상태에 비교적 균일하게 미립담체의 표면에 세포가 부착되었고(B), 대수증식기로 접어들면서 부착된 세포들이 활발하게 spreading과 증식을 하고 있었으며(C), confluence에 도달하여

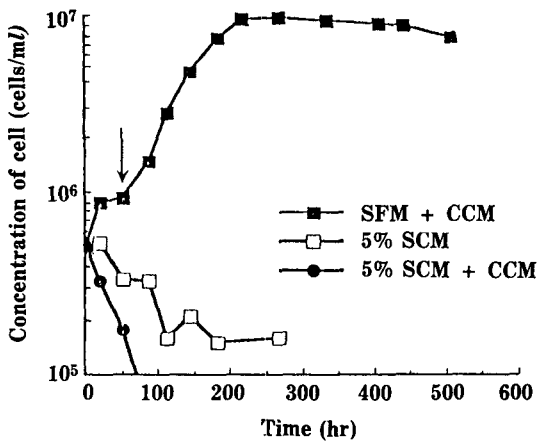


Fig. 6. The effect of CCM on the cell growth, half of the medium was replaced with fresh medium at each sampling point after the arrow indication.

모든 담체의 표면이 세포들로 꼭 차있음을 확인하였다(D). 이때 세포의 농도는 약 10^7 cells/ml에 도달하였다.

이상의 결과로 볼 때 cell line 293의 경우 serum 자체가 담체의 표면에 세포가 부착하는 속도를 감소시킬 뿐만 아니라 일단 담체표면에 부착된 세포가 spreading하는 것을 저해함을 발견하였다. 그 결과 배양시간이 경과함에 따라 결국은 세포가 담체의 표면으로부터 탈착되어 교반시 발생하는 수력학적인 힘 때문에 죽어간다는 사실을 알 수 있었다.

요 약

부착성 동물세포인 recombinant human embr-

ionic kidney cell line 293을 5% FBS가 함유된 DME/F12(3:1) mixture 배지에서 배양할 경우 static culture 에서는 달리 미립담체 배양에서는 낮은 부착효율과 spreading의 저해현상이 관찰되었다. Cell line 293의 미립담체 배양에 있어서 배지내의 serum은 세포의 미립담체에 대한 부착속도(attachment rate)를 감소시킬 뿐만 아니라 세포의 증식을 저해한다는 사실을 확인하였다. 이러한 경우, conditioned microcarrier를 이용함으로써 미립담체로부터 세포의 탈착을 어느 정도 막을 수 있었다. 특히 autocrine growth factor를 생성하는 hepatoma cell line인 HpG 2 cell을 배양하여 얻은 conditioned medium을 serum-free medium에 첨가하여 사용함으로써 세포의 정상적인 성장 뿐만 아니라 growth-stimulation을 유도할 수 있었다.

참고문헌

1. Van Wezel, A.L.: *Nature*, **216**, 64 (1967).
2. Grinell, F.: *Int. Rev. Cytol.*, **53**, 65 (1978).
3. Jacoby, W.B. and I.H. Pastan (eds.): *Methods in Enzymology*, vol. 58, Academic Press, New York. (1979).
4. Hu, W.S., J. Meier and D.I.C. Wang: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 585 (1985).
5. Sato, G.H., A.B. Pandee and D.A. Sirbasku. (eds): *Growth of cells in hormonally defined media*, Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif. vol. 9 (1982).
6. Barnes, D. and G. Sato: *Cell*, **22**, 649 (1980).
7. Burk, R.R.: *Growth of cells in hormonally defined media*, Fischer, G., and R.J. Wieser. (eds.), Springer Verlag Heidelberg (1983).

(Received April 11, 1989)