

## 세포형태에 따른 쥐 간세포의 분화기능

이 재 호 · 박 정 극 · 최 태 부\*  
전국대학교 미생물공학과, \*동국대학교 화학공학과

### Effect of cell morphology on the hepatic functions of adult rat hepatocytes

Jae Ho Lee, Jung Keug Park<sup>1</sup> and Tae Boo Choe\*

Dept. of Microbial Eng. Konkuk University  
<sup>1</sup>Dept. of Chemical Eng. Dongguk University

#### ABSTRACT

Rat hepatocytes were isolated and cultured on the petri dishes treated with various coating materials. Untreated or collagen coated petri dish gave monolayer culture of hepatocyte and proteoglycan, dermatan sulfate, and BSA treated petri dish gave hemispheroid. The untreated Primaria petri dish gave spheroid type of hepatocyte, and heparin and hyaluronic acid treatment gave multilayers. To sustain high cell viability, monolayer cultured hepatocytes was more useful, while it was found that the hemispheroid or spheroid type hepatocytes was more active in the hepatic functions such as ammonia metabolism and albumin synthesis.

#### 서 론

In vitro에서의 간세포는 in vivo에서와 달리 한정된 생존력과 대사능을 지니므로 해서 간세포의 생리적 연구나 간세포를 이용한 인공간 개발에 어려움을 주고 있다. 최근에 와서 세포의 증식능력이나 분화기능의 발현은 세포자체의 유전적 정보뿐만 아니라 세포-세포간의 접촉이나 세포-세포간 물질의 상호작용에 의해서 크게 영향을 받는다는 이론에 따라 in vitro에서의 간세포 분화기능의 유지나 발현도 이러한 관점에서 그 문제를 해결하려는 시도가 많아지고 있다(1, 3). 그 예로 배양용기의 표면을 다양한 물질로 처리하여 간세포의 부착력을 증가시키거나 감소시킴으로써 세포의 생존도와 분화기능의 유지를 향상시키는 방법이나 간세포들이 서로 뭉쳐자라게 함으로써 단층배양때와는 다른 세포형태를 가지게

하는 방법들이 그것이다. 그림 1은 배양용기를 여러 가지 물질로 처리하였을 때 생길 수 있는 간세포의 배양형태를 보여주는 것으로 monolayer, multilayer, hemispheroid, spheroid 등의 형태로 나눌 수 있다. 표면처리 물질로는, 간세포의 carbohydrate sequence에 대한 특이적인 인식능력을 이용하여 culture dish의 표면을 carbohydrate-polymer로 처리하는 방법이 주로 쓰이고 있다(3-5). Kobayashi 그룹은 lactose-carrying polystyrene(PVLA) 배양용기를 이용하고 여기에 insulin이나, growth hormone 등을 첨가하여 간세포가 서로 뭉쳐진 상태의 multilayer-aggregation을 형성시켜 간세포의 분화기능 발현과 함께 장기생존성을 보고 하였다. 간세포를 고밀도로 배양하면서 분화기능의 발현을 최대화 하기 위한 또 다른 방법으로는 in vivo에서와 비슷한 형태의 세포괴(spheroid)형성을 유도하는 것으

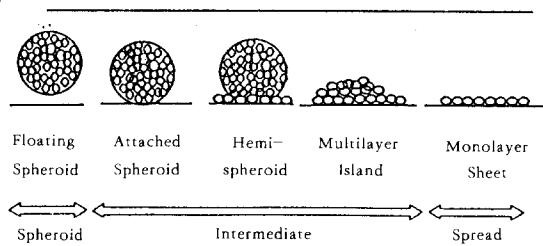


Fig 1. Various assembling forms of cultured hepatocyte

로 간세포의 일차배양시 culture dish의 표면을 세포의 3차원적 구조체형성을 위한 세포간 결합물질, 즉 extracellular matrix(ECM) 성분인 proteoglycans, glycosaminoglycans 등으로 처리하여 monolayer보다 높은 밀도의 세포들이 서로 응집되어 있는 spheroid 형성을 유도하였으며 이렇게 형성된 간 spheroid는 낮은 세포증식 능력을 보이는 반면에 장시간에 걸친 세포 대사기능을 유지하는 것으로 보고되고 있다(6-12). Rojkind 등(13)은 ECM 성분중 biomatrix라고 하는 connective tissue fibers를 분리하여 간세포를 biomatrix 위에서 배양한 결과 spheroid 형성이 유도됨을 보고 하였으며 Masushima 등(14)은 간세포와 sinusoidal endothelial cell과의 coculture에 의한 spheroid 형성유도가 hybrid artificial liver의 제작에 유용하다고 보고하였다. 본 연구에서는 간세포를 이용한 인공간 개발을 목적으로 Koide 등이 발표한 방법에 따라 간세포 spheroid를 유도하고 이를 이용하여 시간에 따른 간세포의 생존도와 분화기능의 변화를 조사하였다.

## 실험재료 및 방법

### Extracellular matrix(ECM)에서 proteoglycans 추출방법

ECM에서 proteoglycan의 추출법은 Koide 등의 방법에 따랐다(6). Rat에서 꺼낸 간조직을 적당한 metal mesh에 눌러서 으갠다. Mesh를 통과한 조직을 차례로 1M NaCl을 포함하는 증류수, butanol/ether(4:6)에 녹여 protein과 lipid를 제거한다. 여기서 다시 DNase와 RNase를 처리하여 핵산을 제거한다. 남아 있는 fiber성분으로부터 10mM EDTA를 포함하는 4M-guanidine-HCl로 proteoglycan을 추출한다. 추출액을 8M urea로 dialysis하여 단백질을 침전시키고 원심분리 한뒤 상등액을 다시 0.

05M sodium phosphate buffer로 dialysis 한뒤 PEG를 이용하여 3배정도 농축하여 사용한다.

### Petri dish의 표면처리법

간세포를 monolayer, multilayer, spheroid 등의 형태로 배양하기 위해 Petri dish의 표면을 다음과 같은 물질로 처리한다; collagen type I (from rat tail, 250 $\mu$ g/ml, Sigma), proteoglycans(from rat liver, 100 $\mu$ g/ml), heparin(250 $\mu$ g/ml, Sigma), dermatan sulfate(chondroitin sulfate B, 250 $\mu$ g/ml, Sigma), hyaluronic acid(250 $\mu$ g/ml, Sigma), bovine serum albumin(BSA, 60 $\mu$ g/ml, Sigma). 60 $\times$ 15mm polystyrene dish(Nunc, 21cm<sup>2</sup>)에 coating 하고자 하는 solution 1.0ml을 넣고 고르게 편 다음 공기건조 시킨다. 사용전 UV lamp 아래서 뚜껑을 열어 둔채 overnight시켜 멸균하고 PBS로 세척한 뒤 사용한다. 표면에 positive charge를 띤 Petri dish인 Primaria(Falcon)는 표면처리를 하지 않고 그대로 사용하였다.

### 간세포 배양

간세포는 Seglen(2)의 collagenase perfusion technique에 의해서 분리하였다. 세포농도  $1 \times 10^6$  cells/ml인 William's E 배지 (insulin dexamethasone, aprotinin 2000U/ml과 EGF 10ng/ml을 첨가하고 혈청은 제거 하였음) 3ml을 여러가지 성분으로 미리 coating된 Petri dish에 접종하여 최종 세포농도가 1.5 $\times$ 0.15ml/cm<sup>2</sup>이 되게 한 다음 CO<sub>2</sub> incubator (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air)에서 배양을 시작한다. 4시간 후 Petri dish를 기울여 배지를 제거하고 다시 새로운 배지 5ml을 첨가한다. 세포생존도는 Petri dish내의 배양액을 제거하고 collagenase를 이용하여 바닥에서 세포들을 완전히 떼어낸 뒤 아래에서 설명한 대로 ATP농도를 측정하여 결정하였다. 매 2일 마다 배지를 교환할 때 NH<sub>4</sub>Cl 1mM을 첨가하여 4시간 후의 암모니아 농도를 측정하여 암모니아 제거속도를 계산하였다. 또 매 2일 마다 배지를 교환한 후 16시간 뒤 배양액내의 albumin농도를 측정하여 이것을 16시간 동안 간세포가 분비한 albumin의 양으로 계산하였다. 암모니아 제거속도 및 albumin생성속도 측정은 monolayer나 multilayer의 경우에는 배양 24시간 후 부터 실험을 시작하였고 spheroid의 경우에는 배양 72시간 후부터 실험을 시작하였다. 암모니아 농도는 Wako Pure Chem. (Japan)에서 구입한 assay kits(indophenol

method)에 의해 측정하였다.

#### Albumin 농도 측정

간세포의 단백질 합성 및 분비기능의 지표로서 배양액내의 albumin 농도를 측정하였다. 측정방법은 표준 rat albumin(Capel-60130340, Japan)과 goat anti-rat albumin-antiserum (Capel-02130341)을 이용하여 Single Radial Immunodiffusion (SRID) 방법으로 측정하였다.

#### 세포내의 ATP 측정

간세포의 viability 유지의 지표로서 세포 내의 ATP 양을 측정하였다. 세포내 ATP 추출과 측정방법은 serum free media에 녹인 0.01% collagenase solution (Type I, Sigma)으로 분리한 간세포 suspension 100  $\mu$ l를 polystyrene vial (12 $\times$ 47mm)에 취하여 체세포의 ATP 추출시약(NRS. Lumac)을 HEPES-magnesium buffer (pH 7.75) 7ml로 용해시킨 것 100  $\mu$ l를 섞은 후 Luminometer (LKB-wallac, Model 1250)로 10초 동안의 빛의 양을 측정, standard ATP의 빛의 양과 비교하여 ATP의 양을 계산하였다.

### 실험 결과 및 고찰

#### 세포형태 및 생존도

Table 1은 여러가지 coating material로 처리된 culture dish에서 배양된 간세포의 형태와 7일 후 ATP 양을 측정한 것이다. 표면처리를 하지 않았을 경우와 collagen으로 처리하였을 경우 간세포는 monolayer 형태를 이루며 자랐고, heparin과 hyaluronic acid의 경우에는 multilayer, 그리고 proteoglycans, dermatan sulfate (D. S.), BSA의 경우에는 hemispheroid, 그리고 표면처리를 하지 않은 Primaria는 spheroid 형태를 형성하였다. 배양액 내에 혈청이 첨가되면 spheroid는 형성되지 않았다. 여기서 세포가 하나씩 넓게 퍼져 자라면 monolayer로, 단층형태가 몇 겹으로 자라면 multilayer로, 여러 겹의 세포가 부풀어 올라 반구 모양이 되면 hemispheroid로, 그리고 Petri dish로 부터 완전히 이탈되어 뭉쳐 자라면 spheroid로 간주하였다. Asano (6) 등이 전자현미경을 관찰한 바에 의하면 hemispheroid 혹은 spheroid에서는 간세포의 모양이 둥글고 column을 형성하여 세포가 생체조직에서와 유사한 형태를 이루고 있다고 하였다. 예를 들어 간

Table 1. Coating material regulation of cell assembling of adult rat hepatocytes in primary culture

| Coating material           | Growth pattern  | ATP content ( $\mu$ g/dish) |                          |
|----------------------------|-----------------|-----------------------------|--------------------------|
|                            |                 | 0 day                       | 7 day                    |
| None                       | Sheet monolayer | 0.640                       | 0.059 (8.3) <sup>1</sup> |
| Collagen                   | Sheet monolayer | 0.762                       | 0.406 (47.9)             |
| Proteoglycans <sup>2</sup> | Hemispheroid    | 0.843                       | 0.344 (36.7)             |
| Heparin                    | Multilayer      | 0.833                       | 0.301 (32.5)             |
| Dermatan sulfate           | Hemispheroid    | 0.727                       | 0.338 (41.8)             |
| Hyaluronic acid            | Multilayer      | 0.845                       | 0.284 (30.2)             |
| BSA                        | Hemispheroid    | 0.604                       | 0.267 (35.1)             |
| Primaria                   | Spheroid        | 0.603                       | 0.318 (47.4)             |

<sup>1</sup> Calculated cell viability(%). The viability of freshly isolated hepatocytes(0 day) was assumed as 90%.

<sup>2</sup> Extracted from ECM.

조직의 형태적인 특징인 bile canaliculi가 형성되어 실제로 bile acid가 분비되고 albumin생성능이나 mitochondrial enzyme activity가 증가하는 것으로 보고하고 있다. 여러가지 형태로 배양된 간세포의 7일째 생존도를 ATP 농도를 통해서 간접적으로 알아보면 Table 1에서 볼 수 있듯이 배양을 시작할 때 (0 day)를 90%로 볼 때 표면처리를 하지 않은 경우를 제외하고는 모두 30% 이상을 유지하였다. 그러나 시간에 따른 세포생존도는 그림 2를 보면 알 수 있듯이 collagen으로 처리한 경우 5일까지는 간세포의 초기 생존율이 그대로 지속되다가 6, 7일째 부터 급작스럽게 감소한 데 반해 dermatan sulfate로 표면처리를 한 경우나 표면에 positive charge를 띄우고 있는 Primaria dish의 경우에는 hemispheroid 혹은 spheroid가 완성되는 3일까지는 세포 생존도가 50%선으로 떨어졌으나 일단 spheroid가 완성되면 그 상태가 7일째 까지 유지되는 경향을 보였다. Petri dish의 표면을 collagen이나 fibronectin, laminin과 같은 anchorage glycoprotein으로 처리할 경우 간세포의 attachment가 일어나고 뒤이어 간세포의 spreading이 일어나 간세포는 monolayer로 자라게 된다. 이처럼 단층형태로 자란 세포들은 제한된 범위내에서 이지만 in-vitro에서 세포 증식이 일어나거나 세포 생존도가 오래 유지 될 수 있다는 보고가 있다(15, 16). 반면에 Petri dish의 표면을 peoteoglycan과 같은 물질로 처리한 경우에는 간세포들이 바닥에 달라붙는 과정이 방해를 받게되고 이

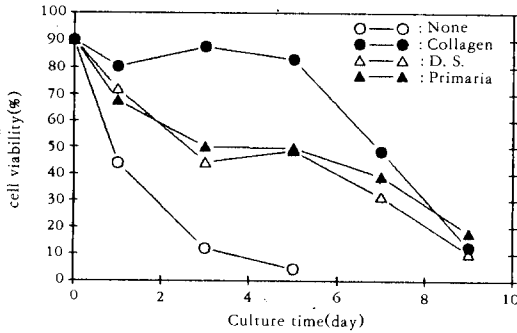


Fig. 2. Effect of coating material on the viability of adult rat hepatocytes in primary culture.

사이에 spheroid가 형성되므로 여기에서 빠진 세포들은 날개의 세포로 남게되므로 자연히 쉽게 죽는 것으로 보인다. 전체적으로 보아 배양형태에 관계없이 배양 7일째의 세포 생존율은 30-50%에 이르게 되고 배양 9일째에는 10-20%에 이르러 대부분의 세포가 사멸하는 것으로 나타났다.

간세포 대사기능의 변화

그림 3과 4는 collagen 및 D. S.를 처리한 Petri dish와 Primaria에서 각각 간세포의 암모니아 제거 속도와 albumin생성속도를 나타낸 것이다. Monolayer와 spheroid형태의 배양에 있어서 단위체적당 암모니아 제거속도는 각각 2-5 및 3-4( $\mu\text{g ammonia/ml/hr}$ )로 세포의 사멸과 함께 감소하는 경향을 보이고 있으나 단위세포당 암모니아 제거속도는 각각 4-6과 6-12( $\mu\text{g ammonia}/\mu\text{g ATP/hr}$ )로 후자의 경우가 훨씬 높게 나타났다. 단위세포당 암모니아 제거속도는 3일째 부터 7일째 까지 거의 같은 수준을 유지하다가 9일째 그 값이 크게 증가하는 것처럼 보이는 것은 간세포의 대사기능이 갑자기 증가한 것이라기 보다는 세포생존도와 비례한다고 볼 수 있는 ATP양이 매우 낮아져서 생기는 결과라고 보아야 할 것이다. Albumin의 합성속도도 그림 4에 나타난 대로 암모니아 제거속도와 비슷한 경향을 보이고 있다. 즉 단위체적당 albumin생성속도는 두 경우 모두 0.5-1( $\mu\text{g albumin/ml/hr}$ )로써 세포사멸과 함께 감소하거나 (collagen의 경우), 초기와 비슷한 수준을 유지하고 있다.(D. S. 및 Primaria의 경우). 그러나 단위 세포당 albumin생성속도를 보면 monolayer의 경우에는 0.3-1.5( $\mu\text{g albumin}/\mu\text{g ATP/hr}$ )로써 시간이 지남에 따라 감소하는 경향이 뚜렷

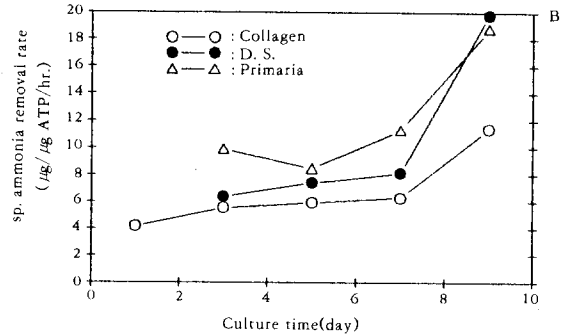
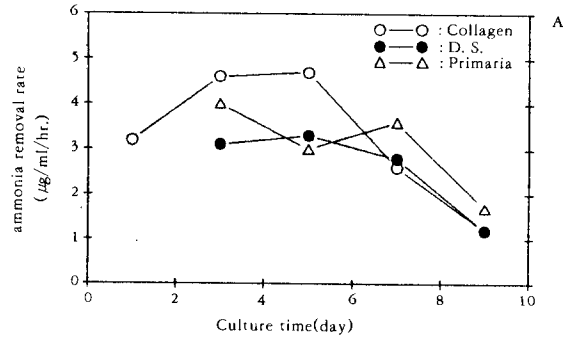


Fig. 3. Effect of coating material on the ammonia metabolism of adult rat hepatocytes in primary culture. A.volumetric rate Bspecific rate

하지만 spheroid의 경우에는 1.5-2.5( $\mu\text{g albumin}/\mu\text{g ATP/hr}$ )내에서 변화하며 오히려 증가하는 형태를 보이고 있어 albumin생성능은 최소한 7일간 유지됨을 알 수 있다. 이것은 spheroid가 monolayer에 비해 in-vitro에서 세포증식은 저하되나 반대로 albumin생성능과 같은 간세포의 분화기능은 더 장기간 유지될 수 있다는 여러 보고와 잘 일치하는 것이다(15-18). 이상의 결과로 보아 간세포의 단층배양은 초기의 세포 생존도를 높게 유지할 수 있으나 세포분화 기능을 장기간 유지시켜야 하는 인공간의 경우에는 hemispheroid 혹은 spheroid의 형성을 유도하는 것이 더 바람직하다. Spheroid가 형성될 때 간세포의 분화기능이 더 길게 유지되는 이유는 아직까지 명확하지 않으나 spheroid에서 관찰되는 intracellular space의 존재와 세포간 물질들이 single cell에 비해 간세포가 가지는 분화기능에 관련된 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로 보고 있다.

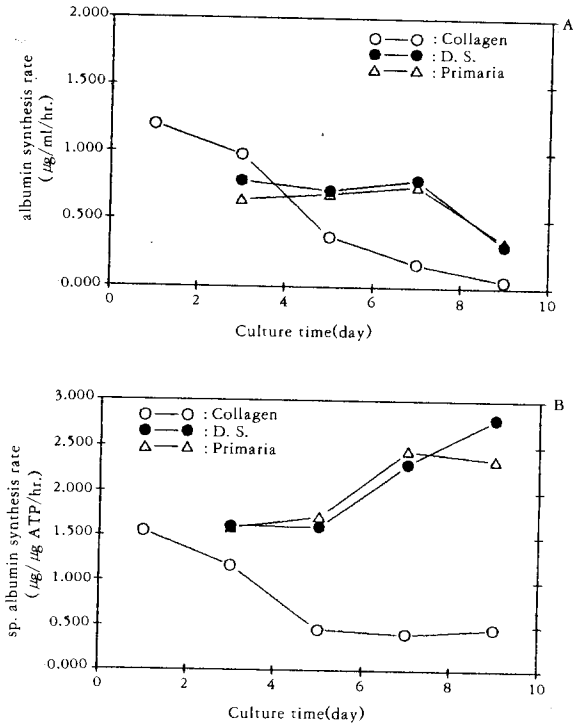


Fig. 4. Effect of coating material on the albumin synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture.

A: volumetric rate B: specific rate

요 약

취 간세포를 분리하고 여러가지 물질로 표면이 처리된 용기를 이용하여 배양하였다. 표면처리를 하지 않았을 경우와 collagen으로 처리하였을 경우 간세포는 monolayer 형태를 이루며 자랐고, heparin과 hyaluronic acid의 경우에는 multilayer, 그리고 proteoglycans, dermatan sulfate(D. S.), BSA의 경우에는 hemispheroid, 그리고 표면처리를 하지 않은 Primaria는 spheroid 형태를 형성하였다. 세포 생존도 면에서는 monolayer가 우수하였고, 간세포의 중요한 대사능이라고 볼 수 있는 암모니아의 제거능이나 albumin 생산성 면에서는 hemispheroid 혹은 spheroid가 우수하였다.

감 사

본 연구는 1990년도 과학재단 기초연구과제 연구

비로 수행되었으며 연구비지원에 심심한 감사를 드립니다.

참고문헌

- Guguen-Guillouzo C. et. al. (1983) Experimental Cell Research 14347.
- Seglen, P. O. (1978) Preparation of rat liver cells., In Method in Cell Biology. Vol. 13., edited by D. M. Prescott., pp. 29-83, Academic Press, New York.
- Kobayashi, A., Akaike, T., Kobayashi, K., and Sumitomo, H. (1986). Macromol. Chem. Rapid Commun. 7 645-650.
- Weigel, P. H., Lee, Y. C., and Schmel, E. (1978) J. Cell Biol. 253(2) 330-333.
- Weigel, P. H., Schnaar, R. L., (1979). J. Bio. Chem. 254(21) 10830-10838.
- Asano, K., Koide, N., and Tsuji, T. (1989) J. Clin. Electron Microscopy, 22(2) 243-252.
- Lora, M. R., and Douglas, M. J. (1984) Mammalian cell culture edited by Jennie, P. M. pp. 239-280. Plenum press. New York.
- Alberts, B., Bray, D., Lewts, J. (1989) Cell adhesion, cell junctions, and the extracellular matrix. Molecular Biology the cell. Edited by Robertson, M. 3rd ed. pp. 802-823. Garland Publishing.
- Koide, K., Shinji, T. and Tanabe, T., (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161(1) 385-391.
- Mizuno, S., Yanagi, K. and Oshima, N. (1990) Jpn. J. Artif. Organs. 19(3) 1161-1164.
- Takabatke, H., Koide, N. and Sakagudri, K. (1990) Jpn. J. Artif. Organs. 19(3) 1168-1168.
- Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R., and Marrceau, N. (1985) J. Cell Biol. 101 914-923.
- Rojkind, M., Gatmaitan, Z. and Reid, L. M. (1980) J. Cell Biol. 87 255-263.
- Matsushime, M., Koide, N., Asano, K. and Sakaguchi, K. (1990) Jpn. J. Artif. Organs. 19 (2) 848-851.

15. Johansson S. and Hook M. (1989) *Biochem. Biophysics Res. Comm.* **161** 385-391.
16. Carlsson R et. al 1986 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** 2403-2406.
17. Sato Y. et. al. (1991) *Jpn J. of Artificial Organs* **20** 145-149.
18. Tobe S. et. al. (1991) *Jpn J. of Artificial Organs* **20** 150-155.