

쥐 간세포 일차배양 세포의 생존능과 대사능에 단층과 복층 콜라젠 젤이 미치는 영향의 비교

정 미 경 · 이 혜 경 · *이 회 구 · **양 은 경 · **박 정 극 · ***이 태 규 · ***임 종 순 · †박 순 희
생명공학연구소 바이러스중앙R.U., *세포중앙R.U., **동국대학교 화학공학과, ***럭키바이오테크연구소

Comparison of Single and Sandwich Collagen Gel on the Survival and Metabolism of Rat Hepatocytes Primary Cell Culture

Mi-Kyung Chung, Hae Kyung Lee, Hee Gu Lee*, Eun Kyung Yang**, Jung Keug Park**, Tae Gyu Lee***, Jong Soon Lim***, and Sue Nie Park †

Virus/Oncology R.U., *Celluar Oncology R.U., KRIBB, Taejon 305-333, Korea

**Dept. of Chemical Engineering, Dongkuk Univ., Seoul 100-715, Korea,

***Lucky Biotech Research Center, Taejon 305-343, Korea

ABSTRACT

We compared the effects of two different systems of collagen matrix protein application on the survival and the biological functions of cultured primary hepatocytes. The rat liver primary hepatocytes were grown for approximately 40 days *in vitro* either on single collagen gel or between collagen sandwich gels. The morphological changes were observed for this culture period. While the hepatocytes grown on single gel began to die around at 7 days of culture, the cells grown between collagen gels still maintained their viability and began to die after 15 days. As markers for liver hepatic functions, we determined the biochemical activities of hepatocytes such as the secretions of albumin, fibronectin, fibrinogen, urea, and the reduction of secreted ammonia. We found that the rat hepatocytes cultured between collagen gels maintained fairly good biochemical functions than the hepatocytes cultured on single gel did. Therefore, the application of an extracellular matrix protein, collagen, in sandwich form was confirmed as a better choice for maintaining the functional hepatocytes culture for long term *in vitro*.

서 론

간세포는 대사작용, 분비작용, 배설작용, 해독작용과 영양분 저장작용 등 신체 활동에 매우 중요한 역할을 담당한다. 그러므로 간염 또는 간암을 포함한 다양한 간질환이 발생하는 경우 인체에 치명적인 영

향을 미치는 경우가 많다. 이들 간질환에 대한 치료 기술로서 우리나라 간질환의 대다수를 차지하는 급성간염 환자의 경우 간기능 회복을 위해 일정 시간 동안 간기능을 보조할 수 있는 기술이 제공되거나 간세포 성장이 활성화되는 기술이 제공된다면 많은 환자의 생명을 구할 수 있을 것으로 예측되고 있다. 그리고 간조직이 영구적으로 그 기능을 잃게 되는 만성간염이나 간암환자의 경우 체외 인공간 보조기

† Corresponding Author

의 사용이나 조직배양 기술에 의한 인공간의 이식 등과 같은 기술 개발이 해결책으로 제시되고 있다(1).

따라서 간세포의 기능을 활성화 시킬 수 있는 인자나 유전자의 이용기술, 간세포의 재생능을 증가시키는 기술, 그리고 체외 인공 간보조기의 제조 및 이식용 인공간의 개발 등에 대한 연구의 중요성이 인식되었고 특히 간세포의 배양연구를 통해 간질환 환자에 적용가능한 기술 개발을 목표로 많은 연구가 수행되고 있다(2). 이러한 시도는 많은 부분이 *in vitro*에서 간세포 배양시 생존능과 대사능의 유지 및 효율적인 증식능의 유도 등에 의존한다고 할 수 있다. *In vitro*에서 간세포의 일차배양시 일반적인 조직 배양 용기인 polystyrene dish에서는 monolayer를 형성하지 못하여 여러 가지 대사기능이 2~3일내로 급격히 감소한다. 따라서 간세포의 monolayer 형성을 위해서 plastic dish 표면에 rat tail collagen, floating collagen gel을 첨가하거나 nylon mesh위에 collagen gel을 처리하는 방법들이 이용되고 있다(3, 4). 이러한 방법들은 간세포의 생존능을 오래 유지시켜 주지는 못하며, 주로 간세포의 유전자 조절, 대사, 암화 기작, 이식 및 냉동 저장 등을 연구하는데 이용되고 있다(5, 6). 현재까지 간세포의 장기 배양을 위해 다양한 방법들이 이용되고 있는데 그 예로 두 층의 collagen 사이에 간세포를 sandwich 형태로 배양하는 방법, 간조직에서 분리한 간질세포와 co-culture하는 방법, complex extracellular matrix나 호르몬 등의 성장조절인자의 첨가, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등을 이용하는 방법들이 개발되었다(7-10). 이러한 방법들중 세포와 세포의 기질(extracellular matrix, ECM)간의 상호작용이 여러 가지 생물학적 현상의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌는데, 세포외기질이 간세포의 세포극성 형성과 유지를 조절하며, 증식과 분화 단계에 관여한다는 보고에 따라 세포외기질을 이용하여 간세포의 장기 배양에 대한 연구가 이루어지고 있다(8, 11). 특히 두 층의 collagen 사이에 간세포를 sandwich 형태로 배양하는 경우 간세포가 *in vivo* 상태와 유사하게 actin filaments가 형성, 유지되는 반면에 단층배양의 경우는 비정상적인 stress fiber가 형성되어 실제적으로 세포외기질의 3차원적 배열 구조가 간세포 배양에 커다란 영향을 미칠 수 있음이 보고되어 있다(8). 이러한 변화를 유발하는 기작으로는 cytoskeletal filaments가 liver-specific gene의 전사를 조절하는 신호를 핵내

로 전달함으로 유발될 것으로 추정하고 있는 경우와 specific extracellular matrix나 간세포 표면 항원의 발현 조절 등이 관련될 수 있고 나아가서 이들의 발현조절에 관련되는 신규 조절인자들의 발현 또한 조절될 수 있을 것으로 추정된다. 그러나 아직까지 중요한 기작에 대한 연구나 관련 인자들이 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구자들은 간질환 치료에 응용할 수 있는 다양한 기술을 수립하는데 필요한 기반기술을 확립하기 위해 먼저 본 연구에서는 쥐의 간으로부터 생존율이 높은 간세포(hepatic parenchymal cells)의 분리 및 배양기술을 확립하고 간세포의 알부민(albumin), 파이브로넥틴(fibronectin), 피브리노겐(fibronogen) 등의 생산과 분비기능 그리고 요소 생산능과 암모니아 제거능 등을 측정하여 간세포의 기능 변화를 조사할 수 있는 생화학적 분석법을 수립하고자 하였으며 이를 기반으로 간세포의 증식 및 분화에 관련되는 인자들의 탐색 및 그 작용기작을 밝히기 위한 연구를 수행하고자 한다. 이를 위해서 먼저 본연구에서는 간세포의 성장에 중요한 영향을 미치는 extracellular matrix protein으로 밝혀진 콜라겐을 코팅한 배양용기에서 일차배양(primary cell culture)을 장기간 유지하면서 간세포의 기능에 대한 변화를 분석하였다. 특히 쥐의 간세포를 한 층의 hydrated collagen matrix 위에서 배양하는 단층 배양(single gel) 경우와 간세포를 두 층의 hydrated collagen matrix 사이에 sandwich 형태로 배양하는 복층 배양법(sandwich gel)에 의해 정상적인 간과 비슷한 3차원적 구조에서 간세포가 성장하는 환경을 제공하는 경우를 비교 분석하여 간세포의 생존능의 유지 또는 기능의 유지에 더욱 효율적인 배양 시스템의 수립을 위한 기반을 마련하고자 하였다. 그 결과 *in vitro*에서 일차배양을 한 뒤 간세포의 생존능과 여러 가지 대사 기능이 복층 배양법을 사용한 경우에 단층 배양법을 사용한 경우보다 더욱 효율적으로 장기간 유지되는 것을 관찰하였다. 위 결과를 기반으로 본 연구팀에서는 복층배양법으로 간세포를 배양시 발현이 증가하거나 새로이 발현이 유도되어 간세포의 증식이나 분화에 영향을 미치는 인자를 분리하기 위해 Liang과 Pardee 등에 의해 보고된 differential display method(DD-PCR)법을 수립하였다(12). 이 기술을 이용하여 현재 복층 배양법으로 유도된 신규 발현된 mRNA를 분리하고 신규 인자를 분리한 결과 간세포 특이적인 표면항원으로 간세포 특이적 유전자치료법에 중요하게 응용

되고 있는 rat asialoglycoprotein receptor(13)과 유사성을 지녔으나 새로운 유전자 H1(논문 준비중)을 분리하여 분석중이다.

실험 재료 및 방법

배지와 시약

간세포 일차배양(primary cell culture)을 위한 배지로는 10% fetal bovine serum(FBS)이 든 dulbecco's modified eagle medium(DMEM)에 glucagon(10 ng/mL), insulin(10 μ g/mL), hydrocortisone(10^{-7} M)을 첨가하여 사용하였다.

관류액(perfusion buffer)은 154 mM sodium chloride, 5.6 mM potassium chloride, 5.5 mM glucose, 25 mM sodium bicarbonate, 20 mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine -N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES), pH 7.4로 만들어 사용하였고, hanks' balanced salt solution(1X HBSS)은 138 mM sodium chloride, 5.4 mM potassium chloride, 0.33 mM sodium phosphate, 0.33 mM potassium phosphate, 0.8 mM magnesium sulfate, 5.6 mM glucose, pH 7.4로 만들어 사용하였다.

간세포의 분리

간세포는 몸무게 200~250g의 Sprague-Dawley 쥐의 간에서 Seglen(14)과 Aiken 등(15)의 콜라겐 분해효소를 이용하는 perfusion 방법에 의해서 분리하였다(16). 쥐를 pentobarbital(5 mg/100g body weight)로 마취시킨 후 문정맥에 cannula를 삽입하여 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 함유한 관류액 200 mL을 25 mL/min의 속도로 관류시켰다. 관류액은 silicone tubing을 통과하면서 90% CO₂와 10% O₂로 평형(equilibration)시키고, 중탕용기에서 37°C로 온도를 맞춘 뒤 간으로 들어가게 하였다. 관류액을 모두 통과시킨 후 5 mM calcium chloride를 함유한 0.05% 콜라겐 분해효소(Sigma Collagenase Type IV) 200 mL을 재차 통과시켰다. 이때 간이 부풀어 오르기 시작하는 것을 관찰할 수 있다. 관류(Perfusion)가 끝나면 간을 떼어내어 ice-cold perfusion buffer에 넣어 세포를 분리한 후 나일론 메쉬(nylon mesh)에 여과하여 세포용액을 모았다. 이 세포용액을 table top centrifuge(Beckman GS-6R, U.S.A.)에서 50×g로 5분간 원심분리하여 세포들을 회수하였다. 세포들을 12.5 mL의 관류액에 재부유시킨 후 percoll 10.8

mL과 1.2 mL의 HBSS(10X) 용액을 섞은 percoll 용액 위에 세포용액을 얹어 500×g로 5분간 원심분리하여 분리된 간세포들을 회수하여 DMEM 배지로 두 번 세척하였다(17). 세척한 세포는 trypan blue로 염색하여 생존 세포수를 측정하였다.

간세포 배양 및 형태 분석

세포를 10% FBS와 호르몬(insulin 10 μ g/mL, glucagon 10 ng/mL, hydrocortisone 10^{-7} M)이 첨가된 DMEM배지에 희석하여 60×15 mm 콜라겐 젤 배양 용기(gel dish; Nunc, 21cm²)에 최종농도가 2×10⁶ mL이 되게 접종하였다. 콜라겐 젤은 콜라겐 젤 용액(10X DMEM, pH 7.4와 1.11 mg/mL 농도로 만든 콜라겐 용액을 1:9로 섞어서 제조) 1 mL을 60-mm 세포 배양 접시에 고르게 편 뒤 37°C에서 1시간 이상을 방치하여 젤화(gelation)가 일어나도록 하였다(single gel). Sandwich system인 복층 배양법은 single gel을 37°C의 5% CO₂ 항온 배양기에서 하루를 배양한 뒤 콜라겐 젤 용액 1 mL을 세포위에 더 첨가하였다. 이때 먼저 배양액을 버리고 두번째 콜라겐 젤을 조심스럽게 배양접시 전체에 고루 펴고 37°C에서 30분간 젤화시킨 후 새 배양액을 첨가하였다. 일정한 배양기간 동안 간세포의 형태적인 변화를 inverted phase photomicroscope(Leitz, Germany)로 관찰하였다. 또한 기능분석을 위한 생화학적 및 면역학적 분석을 위해서 이를 간격으로 배지를 회수하여 분석 전까지 4°C에 보관한 후 사용하였다.

알부민 농도 측정

간세포의 중요한 대사기능의 하나인 단백질 합성 및 분비 기능의 지표로서 배양액 내의 알부민 농도를 측정하였다. 측정방법은 채취한 배지 상층액을 순수 분리한 쥐의 알부민(Cappel 55952)과 쥐의 알부민에 대해 제조한 goat-anti-mouse-IgG 항체(Cappel 55727)를 이용하여 enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA) 방법으로 분석하였다(16). 알부민 항체를 1 μ g/mL의 농도로 coating buffer에 희석한 다음 96-well plate(NUNC-Immuno Plate, Maxisorp, Newbury Park, CA)의 한 well당 100 μ l씩 넣어 4°C에서 16~18시간동안 반응시켜 plate에 항체를 부착시킨 후 0.5%(v/v) Tween 20을 함유한 PBST(Phosphate buffered saline plus 0.5% Tween)로 3번 세척하였다. Blocking 용액인 3% 카제인(casein)을 각 well에

100 μ l씩 넣어 30분 동안 반응시키고 PBST로 3번 세척하였다. 음성대조군으로 배지와 PBS를 사용하였으며, 양성대조군으로는 표준항원인 쥐의 알부민을 각각 0.03 μ g/ml~2 μ g/ml의 농도별로 처리하고 측정하고자 하는 간세포 배양액을 PBS 용액으로 1:80으로 희석하여 well에 100 μ l씩 처리하여 1시간 동안 반응시킨 다음 다시 PBST로 세척하였다. 여기에 쥐 알부민에 대한 peroxidase-conjugated sheep IgG 100 μ l를 1시간 동안 재차 반응시킨 후 PBST로 세척하고 0.4 mg/mL o-phenylenediamine과 0.012% (v/v) hydrogen peroxide를 함유한 citrate buffer(25 mM citrate, 50 mM phosphate, pH 5.0)를 넣어 실온에서 10분동안 발색시켰다. 이 반응물에 2.5 N sulfuric acid를 100 μ L씩 넣어 반응을 정지시킨 다음 ELISA reader(Titertek Multiskan MCC/340, Labsystems, Finland)를 사용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 농도는 각각의 ELISA plate에서 얻은 standard curve를 이용하여 결정하였다.

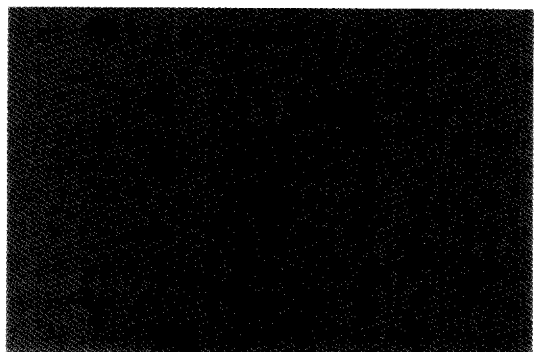
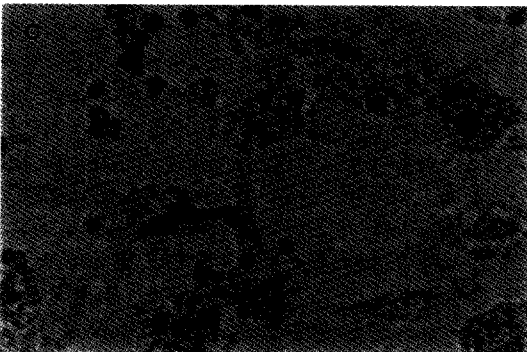
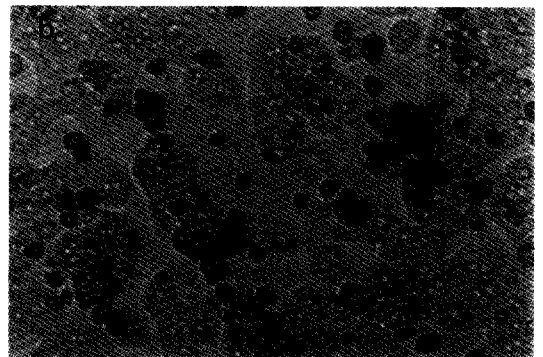
파이브로넥틴과 피브리노겐의 농도측정

파이브로넥틴과 피브리노겐의 농도 측정은 위의 알부민 ELISA 측정법과 동일한 방법으로 분석하였다. 파이브로넥틴의 농도 측정은 rat fibronectin (Chemicon, FC017), goat- anti-rat fibronectin antibody와 anti fibronectin sheep IgG-HRP conjugate(Biogenesis) 등을 사용 하였으며, 피브리노겐의 농도 측정은 rat fibrinogen(Sigma F6755)을 항원으로, 항체는 goat-anti-rat fibrinogen(Cappel # 55731), 그리고 goat-anti-rat fibrinogen-HRP conjugate(Nordic Immunology, 4572) 등을 사용하여 측정하였다.

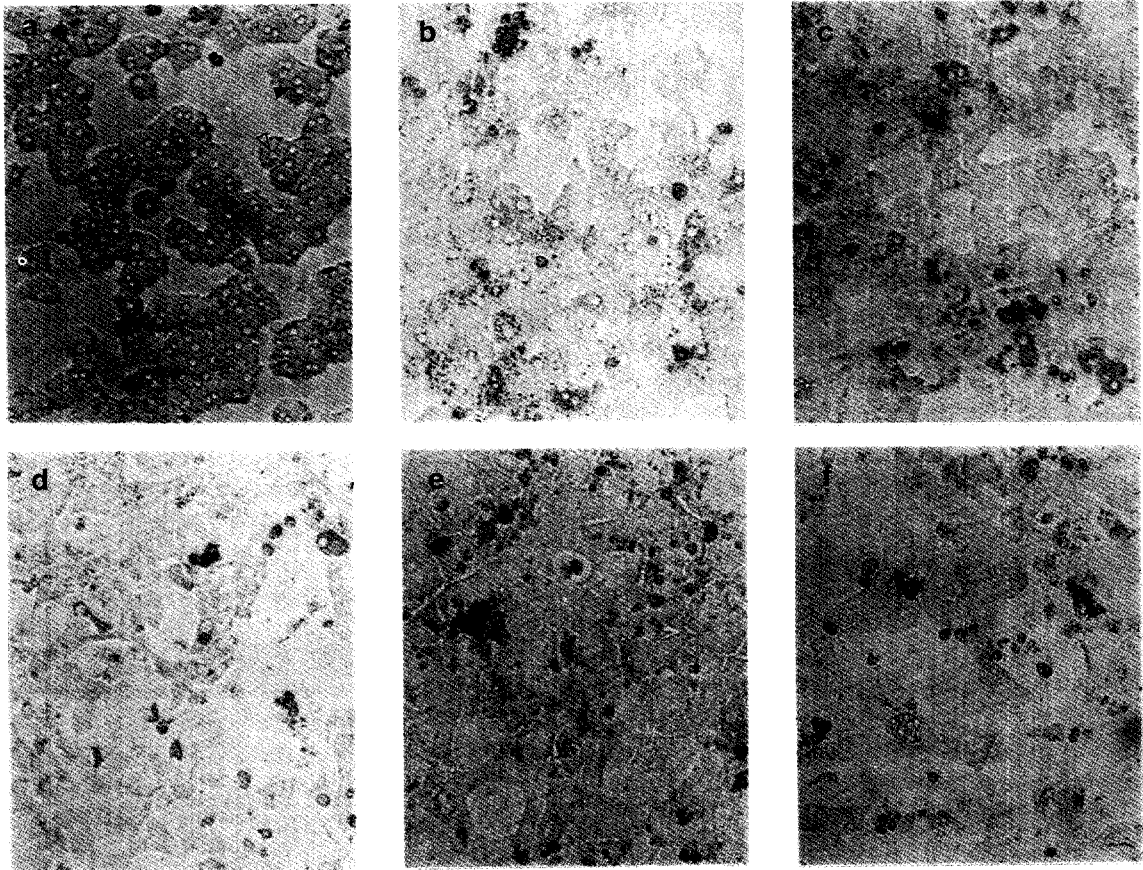
요소와 암모니아 농도측정

배양된 간세포에서 간세포의 해독능력을 조사하기 위하여 요소합성 능력과 암모니아의 분해속도를 측정하였다. 48시간 간격으로 배지 교체시 배양 상층액을 얻어 간세포의 배양 시간에 따른 요소 생성농도와 암모니아의 농도 변화를 측정하였다.

요소(Urea) 농도의 측정은 아산제약에서 구입한



(A)



(B)

Fig. 1. Inverted phase photomicrographs of the cultures of hepatic parenchymal cells(PC) isolated from rat liver. Panel A. Single gel (a~d): 1 days (a); 3 days (b); 7 days (c); 10 days (d) after seeding. Panel B. Sandwich gel (a~f): 2 days (a); 10 days (b); 15 days (c); 23 days (d); 27 days (e); 30 days (f) after seeding. Type I (mononuclear) (open arrow) and type II (binuclear) PC (arrowhead) isolated by percoll gradient centrifugation were identified. Original Magnification 320X.

assay kits(urease- indophenol method)로 측정하였다. 각 시간별로 채취한 0.02 mL의 배양액을 2.0 mL의 urease 용액(0.68 U/mL)에 섞어 잘 혼합하여 37°C에서 5분간 방치한 후에 정색시약(0.06% NaOCl)을 2.0 mL씩 넣어 다시 37°C에서 10분 동안 반응시키고 1시간 이내에 배지를 대조군으로 해서 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 얻은 측정값을 이용하여 아래 식에 대입하여 생산된 요소량을 계산하였다.

요소질소량(mg/mL) = (검체흡광도/표준액흡광도) × 표준액포시치(30 mg/mL)

암모니아 농도는 아산제약에서 구입한 assay kits (Indophenol method)를 이용하여 측정하였다. 각 시간별로 얻은 배지 1 mL에 제단백시약(펄스텐산나트륨) 4.0 mL을 섞은 후 원심분리하여 얻은 상층액 2.0 mL에 발색시약 A(phenol 40 g/L)는 2.0 mL, 발색시약 B(NaOH 35.6 g/L)는 1.0 mL, 발색시약 C(10% NaOCl 30 ml/L)는 2.0 mL을 넣어서 37°C에서 20분 동안 반응시킨 다음 630 nm에서 배양액을 대조군으로 하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 아래 식에 대입하여 암모니아 농도를 계산하였다.

$\text{NH}_3\text{-N}$ 함량($\mu\text{g}/\text{mL}$) = (검체의 흡광도/표준의 흡광도) \times 400($\mu\text{g}/\text{mL}$)

실험 결과 및 고찰

단층 및 복층 콜라젠 젤 사용에 의한 간세포 배양 및 형태분석

간세포는 콜라젠 분해효소를 이용한 perfusion으로 모두 $2\text{-}3 \times 10^5$ 세포가 분리되었으며, 한 층의 콜라젠 젤로 덮은 60×15 mm 배양 용기에 2×10^6 세포를 넣어 배양한 결과 형태학적으로 type I 과 type II의 실질세포(parenchymal cell)들이 관찰되었고, type III 실질세포는 관찰되지 않았다(Fig. 1의 A와 B의 a). Type III 실질세포는 percoll gradient에 의해 분리시 간질세포(stromal cell)와 함께 분리되는 것으로 알려져 있다(7). Fig. 1의 A와 B는 각각 단층의 콜라젠 젤 상에서 배양한 간세포와 복층의 sandwich collagen gel사이에서 간세포를 배양한 경우에 배양 시간 경과에 따른 간세포의 형태학적 변화를 inverted phase microscope을 이용한 현미경 관찰을 통해 나타낸 것이다. 단층 콜라젠 젤 배양의 경우 7일(A의 c)에 생존 세포수가 배양 첫날과 3일에 비해(A의 a, b) 현저하게 감소하고 10일 이상(A의 d)이 지나면 생존 세포수가 거의 남아 있지 않음을 알 수 있었다. 그러나 복층 콜라젠 젤에서 배양한 경우에는 배양 이틀째부터 10일과 15일 이상 생존이 잘 유지되는 것을 관찰할 수 있었다(B의 a~c). 그리고 20일이 경과하면서(B의 d) 간세포가 넓게 팽창되면서 세포수가 점차로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 복층 콜라젠 젤에서 23일(B의 e) 이상 30일(B의 f) 정도 배양한 경우의 형태가 단층 콜라젠 젤 배양시의 10일(A의 d) 배양시와 세포 생존 수 및 형태가 유사함을 확인할 수 있었다. 따라서 복층 콜라젠 젤을 이용하는 경우가 단층 콜라젠 젤을 이용하는 경우에 비해 간세포의 *in vitro* primary cell culture시 간세포의 생존율을 상당히 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다.

단층 콜라젠 젤(Single gel)과 복층 콜라젠 젤(sandwich gel) 배양법에 의한 간세포 단백질 분비능의 비교

두 층의 collagen gel 사이에서 배양한 간세포와 단층의 collagen gel 상에서 배양된 간세포의 기능적인 차이점을 분석 및 비교하기 위해 간 특유의 기능을 조사하였다. Fig. 2, 3과 4에 알부민, 파이프

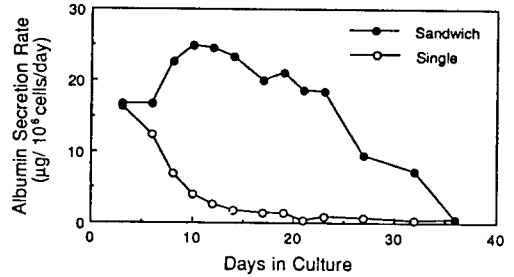


Fig. 2. Albumin secretion rate of rat hepatocytes grown in the two culture systems. Closed circles represent data obtained for the sandwich culture and open circles represent data obtained for the single gel culture. Albumin secretion rate was higher for the sandwich system compared to the one for single gel culture until the end of 40 days culture period.

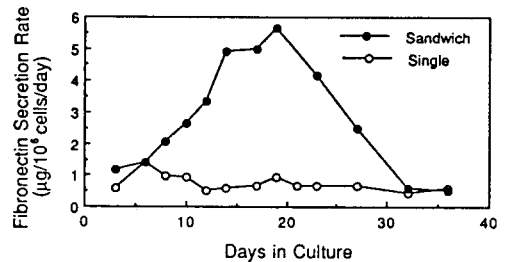


Fig. 3. Fibronectin secretion rate of rat hepatocytes. Closed circles represent data obtained for the sandwich culture and open circles represent data obtained for the single gel culture. Fibronectin secretion rate was significantly higher for the sandwich system compared to the one for single gel culture until the 30 days culture period.

로넥틴, 피브리노겐 등의 생성량을 약 5주 동안의 간세포 배양을 통해 측정된 값을 각각 나타내었다.

알부민 분비능 검색

간세포의 중요한 대사기능의 하나로, 간에서 분비되는 단백질의 40% 이상을 차지하는 알부민의 합성과 분비를 들 수 있다. 특히 알부민 분비는 *in vitro* 배양에서 그 기능을 쉽게 잃게 되며, 배양액 내에 첨가된 성장인자(EGF)와 호르몬(dexamethasone)

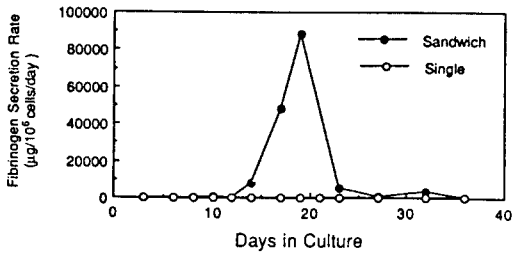


Fig. 4. Fibrinogen secretion rate of rat hepatocytes. Closed circles represent data obtained for the sandwich culture and open circles represent data obtained for the single gel culture. Fibrinogen secretion rate was significantly higher for the sandwich system compared to the one for single gel culture between 14 days and 24 days culture period.

등에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다(10). Fig. 2는 collagen gel을 처리한 배양접시에서 단층젤(single gel)과 두 층의 collagen gel(sandwich system) 사이에서 배양된 간세포의 알부민 분비량을 비교한 것이다.

배양 초기(3일째)의 알부민 분비량은 거의 동일하나 6일째 이후부터 현저한 차이를 나타냈다. 단층배양의 경우에는 알부민 분비속도가 계속적으로 감소하여 14일째는 거의 없는 것으로 나타난 반면에, 복층배양에서는 10일째에 24 µg/10⁶ cells/day 로 가장 많은 양의 알부민을 분비하였고, 배양 32일째 까지도 단층배양보다 계속적으로 높은 분비량을 유지하였다. 이같은 알부민 분비량은 *in vivo*에서 간의 알부민 분비량과 유사한 것으로 나타났다(19, 20).

파이버로넥틴 분비능 검색

Fig. 3은 두 종류의 배양 조건에서 간세포의 파이버로넥틴 생성량을 나타낸 것이다. 복층배양에서 파이버로넥틴의 생성량은 배양을 시작한 후부터 점차적으로 증가하여 19일째에 최고치인 5.5 µg/10⁶ cells/day를 나타내었다. 그 후 서서히 감소되어 32일째에는 파이버로넥틴의 농도가 배양 초기값까지 떨어졌다. 단층배양의 경우는 전체 배양기간동안 복층배양에 비해 현저히 낮은 분비율을 나타내었다.

피브리노젠 분비능 검색

피브리노젠의 생성은 복층배양에서 12일째까지

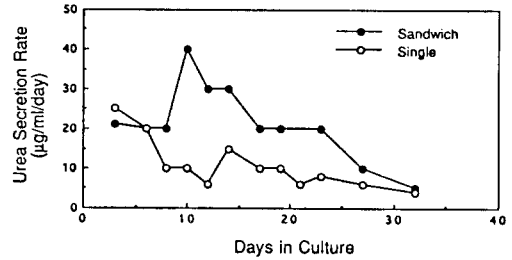


Fig. 5. Urea secretion rate determined from collected culture medium by enzymatic assay. Closed circles represent data obtained for the sandwich culture and open circles represent data obtained for the single gel culture. Urea secretion rate was significantly higher for the sandwich system compared to the one for single gel culture until the 30 days culture period.

전혀 검출되지 않았으나 그 후 많은 양이 생산되기 시작하면서 19일째 피브리노겐의 농도가 최고치를 나타냈으며, 그 후 다시 급격히 감소하는 현상을 보였다(Fig. 4). 반면에 단층배양에서는 전 배양기간에 걸쳐 피브리노겐이 거의 생성되지 않았다.

따라서 간세포의 단백질 합성 및 분비능에 있어서 sandwich 법이 단층배양을 사용하는 경우보다 훨씬 더 효율적으로 장기간 유지되고 있음을 알 수 있었다. 이 결과는 간세포가 *in vivo* 상태에서처럼 3차원적 공간에서 여러 종류의 간조직 내의 세포들과 ECM에 의해 둘러 쌓인 상태와 비슷한 경우에 그 기능이 더 효율적으로 유지될 수 있음을 시사한다.

요소 생산능과 암모니아 제거능 검색

간세포는 탄수화물, 지질, 아미노산 등의 대사에 직접적으로 관여하며 간세포의 특이적인 효소에 의해 암모니아가 요소로 전환하는 요소 사이클이 여기에 속한다. Fig. 5에 보인 바와 같이 초기 1주일간의 요소생성량은 두가지 배양 시스템에서 비슷한 양상으로 감소현상을 보였다. 이것은 두 배양 시스템의 경우 모두 세포가 *in vitro*에서의 배양에 적응하는 기간동안 알부민, 파이버로넥틴과 피브리노젠 등의 단백질을 생산하는 기능에 미치는 영향보다 요소 생산능에 미치는 영향이 더 큰 것을 시사하는 것으로 보인다. 한편 초기 적응 기간 이후 단층배양에서 배양된 간세포의 요소 생성능은 급격하게 감소하나

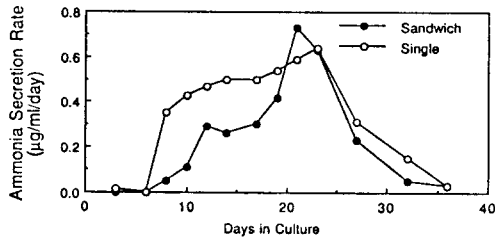


Fig. 6. Ammonia concentration determined from collected culture medium by enzymatic assay. Closed circles represent data obtained for the sandwich culture and open circles represent data obtained for the single gel culture. Ammonia secretion rate was significantly lower for the sandwich system compared to the one for single gel culture until the 18 days culture period.

복층배양에서는 초기 속도가 어느정도 유지되다가 10일째부터 상당히 증가하나 그 후 점차 감소하고, 4주째부터 단층배양에서와 마찬가지로 낮은 분비율을 나타내었다. 한편 요소합성능이 증가하면 분비되는 암모니아의 양이 감소하게 되는데 이를 검색한 결과인 Fig. 6을 보면 간세포가 암모니아를 요소로 합성하는 능력이 떨어짐에 따라 계속 분비되는 암모니아 농도가 높아지는 것을 알 수 있었다. 그러나 여전히 sandwich gel 시스템에서는 단층배양 시스템에서 배양한 경우보다 암모니아 제거능이 효율적인 것을 알 수 있다. 그러나 이 경우도 배양 후 20일이 지나면 세포생존능이 현저히 감소됨에 따라 암모니아 분비량도 함께 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다.

일반적으로 세포와 주위 기질 간의 상호 작용에 의한 세포 기능의 조절도 대부분의 경우에 유전자 발현의 조절에 기인하는 것으로 알려져있으며(21, 22), Dunn 등(23)은 쥐의 간세포를 collagen gel로 복층배양하는 경우 단층배양보다 albumin의 전사활성도가 매우 높다는 것을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 collagen gel이 간세포 일차배양에 미치는 영향을 분석하였으며 특히 single gel과 sandwich gel을 사용하여 그 영향을 비교함으로써 같은 extracellular matrix protein이라도 형성 구조에 따라 세포의 기능에 미치는 영향이 다르다는 것을 확인할 수 있었으며, *in vivo*와 유사한 3차원적 배양법을 이용하였을 때 세포의 생존능과 기능유지에 더욱 효율적임을 확인하였다.

따라서 *in vitro*에서 간세포의 생존능과 대사능을 더 신장시키기 위해서는 이들에 영향을 미치는 다양한 요인들에 대한 더욱 세부적인 연구가 필요하다. 이를 위해서는 앞으로 알부민, 파이브로넥틴, 피브리노겐 등 간세포의 특이적인 단백질 분비에 관여하는 유전자 발현의 조절단계가 명백히 연구되어야만 이를 통해 collagen(ECM) 등에 대한 간세포의 반응을 이해할 수 있을 것으로 기대된다. 나아가 이들 단백질의 분비를 조절하는 인자들을 분석함으로써 간세포의 *in vitro* 배양을 더욱 효율적으로 활성화시킬 수 있는 인자를 분리할 수 있을 것으로 생각되며, 여러 간질환의 치료 기술에 필요한 간세포 성장인자로 이용할 수 있을 것으로 사료된다. 그러므로 이러한 기술을 기반으로 하여 collagen에 의해 간세포의 성장조절에 관여하는 초기 인자들의 발현유도와 이들을 분리하기 위한 시스템을 수립하여 관련 인자들을 분리 및 분석하는 연구가 필요하다. 따라서 본 연구팀에서는 복층배양법으로 간세포를 배양시 신규로 발현되는 인자를 분리하고자 differential display method(DD-PCR)법을 이용하여 신규 발현되는 mRNAs를 분리하고 이들 중 신규 유전자 H1(결과 제시 없음)을 선별하여 분석 중이다. 앞으로 이 유전자의 간세포 증식 및 분화 관련 기능을 연구하고 특히 간세포를 3차원적 구조에서 배양시 그 역할을 분석하는 연구를 진행하여 나갈 것이다.

요 약

간세포를 *in vitro*에서 효율적으로 장기간 배양 및 증식을 유도하여 이용하는 기술을 수립하기 위해서 본 연구에서는 일차배양한 쥐 간세포에 중요한 세포외 기질(ECM)인 collagen이 간세포의 장기배양시 생존능과 기능유지에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 간세포를 *in vitro*에서 40여일 간의 장기간 배양시에 일반적으로 사용되고 있는 단층 배양(single gel)법과 *in vivo* 상태의 세포 극성에 유사한 환경을 제공하는 복층 배양(sandwich gel)법으로 배양한 경우에 미치는 영향을 서로 비교하여 보았다. 이를 위해서 간세포의 생존 상태를 비교하였으며 나아가 간세포의 특성인 알부민, 파이브로넥틴, 피브리노겐 등의 단백질 생산 및 분비기능 측정 그리고 요소 생산능과 암모니아 제거능 등을 비교하였다. 복층 배양법이 단층 배양법보다 알부민, 파이브로넥틴, 피브리노겐 등의 분비기능을 훨씬 효율적으로 유지시키는 것을 관찰할 수 있었으며 또한 요소 생산능과 암

모니아 제거능도 훨씬 더 효율적으로 장기간 유지시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 이로써 *in vitro*에서 간세포의 기능을 효율적으로 유지시키기 위해서 간세포 배양시 3차원적 공간을 유지시키는 것이 중요한 요인 중의 하나임을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 1995년 과학기술처의 국가선도기술개발사업 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다. 아울러 본 연구를 수행하는데 기술적인 도움과 조언을 아끼지 않은 전남대학교의 최홍식 선생님, 순천향대학교 이신재 선생님, 본 바이러스중앙연구팀의 권두한 선생님 그리고 중앙대학교의 이재관 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

1. N. L. Sussman and J. H. Kelly(1995), *Scientific American Science and Medicine*, **May/June**, 68.
2. N. L. Sussman, G. T. Gislason, and J. H. Kelly(1994), *J. Clinical Gastroenterology*, **18**, 320.
3. J. R. Bartles, H. M. Feracci, B. Stieger, and A. L. Hubbard(1987), *J. Cell Biol.*, **105**, 1241.
4. D. F. Clayton and J. E. Darnell(1983), *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1552.
5. D. F. Clayton, A. L. Harrelson, and J. E. Darnell(1985), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 2623.
6. E. Derman, K. Krauter, L. Walling, C. Weinberger, M. Ray, and J. E. Darnell(1981), *Cell*, **23**, 731.
7. B. A. Naughton, J. S. Roman, B. Sibanda, and J. P. Weintraub(1993), *Biotechnology and Bioengineering*, **43**, 810.
8. J. C. Y. Dunn, R. G. Tompkins, and M.L. Yarmush(1991), *Biotechnol. Prog.*, **7**, 237.
9. J. Dich, C. Vind, and N. Grunnet(1988), *Hepatology*, **8**, 39.
10. H. C. Isom, T. Secott, I. Georgoff, C. Woodworth, and J. Mummaw(1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 3252.
11. M. David, L. Hansen, J. Vancanti, R. Langer, S. Farmer, and D. Ingler(1992), *J. Cellular Physiol.*, **151**, 497.
12. P. Liang and A. B. Pardee(1992), *Science*, **257**, 967.
13. E. C. Holland, J. O. Leung, and K. Drickamer (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 7338.
14. P. D. Seglen(1976), *Methods in Cell Biology*, Vol 1, (D.M. Prescott, ed.), Academic Press, New York, 29.
15. J. Aiken, L. Cima, B. Scholl, D. Mooney, L. Johnson, R. Langer, and J. P. Vacanti(1990), *J. Pediatric Surgery*, **25**(1), 140.
16. M. N. Berry and D. S. Friend(1969), *J. Cell Biol.* **43**, 506.
17. B. L. Kreamer, J. L. Staecker, N. Sawada, G. L. Sattler, M. T. Hsia, and H. Pitot(1986), *Cell. Dev. Biol.*, **22**, 201.
18. V. A. Bidwell and A. Vartlett(1979), The enzyme linked immunosorbent assay(ELISA), a guide with abstracts of microplate applications, 7, Dynatech Laboratories, INC.
19. T. Matsushita, H. Ijima, N. Koide, K. Funatsu (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 324.
20. H. Ijima, Y. Taniguchi, T. Matsushita, and K. Funatsu(1992), *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 81.
21. M. Chambard, J. Gabrion, and J. Mauchamp (1982), *J. Cell Biol.*, **91**, 157.
22. K. M. Yamada(1983), *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 761.
23. J. C. Y. Dunn, R. G. Rompkins, and M. I. Yarmush(1992), *J. Cell Biol.*, **116**(4), 11043.