

## 저혈청 배지에서 인간 전골수세포(HL-60)를 이용한 tPA 생산과 세포사멸기작에 관한 연구

김현구 · 성기돈 · 김태호 · 안주희 · 함문선 · 박진서<sup>1</sup> · 이현용\*  
강원대학교 식품공학과, <sup>1</sup>한림대학교 유전공학과

**The Production of Tissue Type-Plasminogen Activator and Mechanism of Cell Death from Human Promyelocytes (HL-60) in Low Serum Containing Medium.** Hyun-Gu Kim, Ki-Don Sung, Tae-Ho Kim, Ju-Hee Ahn, Moon-Sun Ham, Jin-Seo Park<sup>1</sup> and Hyeon-Yong Lee\*. Department of Food Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea. <sup>1</sup>Department of Genetic Engineering, Hanlym University, Chuncheon 200-801, Korea - HL-60 was cultivated to produce tPA (tissue-type plasminogen activator) and study the mechanism of cell death. Maximum cell density and tPA production were obtained as  $5.27 \times 10^6$  cells/ml and 324 ng/ml, respectively under perfusion cultivation. tPA production was enhanced to 420 ng/ml in adding 160 nM of phorbol ester. The cells were gradually differentiated to granulocytes rather than proliferation. By Fluorescent microscope, apoptosis was prevailed except the death phase and in high agitation speed, but necrosis was prevailed in thawed cells and during the latter periods of the cultivation. It was also proved that tPA was most produced in apoptosis. To obtain higher tPA productivity, the cells must be maintained in apoptosis, not necrosis phase when the cells were dying.

생물공학 분야에서 최근에 크게 각광 받고 있는 동물세포 배양 공학(Animal Cell Culture Engineering) 분야는 목적 단백질의 손쉬운 합성과 분비, 단백질 분자의 folding, post-translational modification 등의 이점 때문에, 이 기술을 이용하여 많은 생물 의약품을 생산해내고 있다(1). 이중 심근경색등 혈전증(thrombosis)의 치료제로 쓰이는 tissue type Plasminogen Activator(tPA) (1, 12, 15)는 55,000~77,000 Dalton의 분자량을 가지는 serine protease로서 인체의 여러 부위에서 분비(17)가 되며, single chain tPA 상태로 존재하다가 fibrin을 만나게 되면 two chain tPA로 활성화되어 scu-PA나 urokinase같은 다른 plasminogen activator와 같이 plasminogen을 plasmin으로 활성화(13, 14)시켜 불용성 fibrin을 분해한다(2, 3, 11, 12, 16). tPA를 생산할 수 있는 세포주로는 human melanoma, human fibroblasts, human umbilical vein endothelial 세포등이 있으며, 유전자 재조합된 chinese hamster ovary(CHO) 세포에서 tPA가 생산되고 있다(10, 18). 유전자 재조합된 세포는 많은 양의 tPA를 생산하지만 국제법 규정에 묶여 국내에서의 산업화가 어렵고 유전자 재조합되지 않은 세포로부터 생산되는 tPA의 양은 20~80 ng/ml 정도로 미량이 생산되고 있기 때문에 새로운 세포주로부터 생산되는 tPA의 필요성이 증가되고 있다.

한편 동물세포 배양에 있어서 세포사멸은 생산성을 저하시키는 치명적인 요소인데, 세포사멸은 apoptosis와

necrosis의 두 경로로 이루어진다(5-7). Apoptosis는 빠른 세포전환 속도를 나타내는 간, 장내피, 피부, 림프기관 같은 조직에서 발생하는데 세포독성의 T-임파구와 natural killer cell들이 바이러스에 감염된 세포나 암세포, 불필요한 세포에 대해 apoptosis를 유도한다. 세포배양중 apoptosis는 필수 영양소(glutamine, glucose) 제한시 또는 산소 부족시 발생하나 necrosis는 갑작스럽고 심각한 세포손상을 유발하는 심한 충격에 의해서 발생하는 데 세포배양 중 necrosis는 심한 충격이나 세포배양 말기 높은 농도의 ammonia와 lactic acid에 의해서 나타난다. 이같은 사멸 기작에 따른 목적 단백질의 생산성과의 관계를 규명하는 연구 결과는 국내에서 아직까지 없었다. 따라서 본 연구에서는 기존의 세포들과는 다른 세포주에서 tPA 생산의 경제성을 확보하기 위해 여러 혈청 농도와 다양한 배양 방법을 이용하여 세포 생육과 tPA 생산성을 조사했으며, induction factor를 첨가했을 때의 세포 생육과 tPA 생산성 변화, 그리고 배양에 따른 세포 사멸 기작을 조사했으며, 대량배양중 교반속도를 증가시켰을 때 어떠한 세포사멸 경로를 거치는지 조사했다. 또한 세포사멸이 tPA 생산성에 어떠한 영향을 주는지도 함께 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포주 및 세포배양

인간 전골수세포(HL-60, ATCC)를 10% FBS(Gibco, USA)를 함유한 RPMI 1640(Gibco)에 57.47 mg/l Gentamycin sulfate(Sigma, USA)를 첨가하여 75 cm<sup>2</sup> T-flask

\*Corresponding author.

Key words: Human promyelocytes, tPA production, apoptosis, necrosis

에서 세포를 생육하였다. 이때 혈청은 60°C에서 30분간 증탕시켜 성장억제 물질을 불활성화 시켰다. 세포배양은 우선 75 cm<sup>2</sup> T-flask에 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 접종시킨 후 37°C 항온 CO<sub>2</sub> incubator에서 5일간 정치배양 시켰다. 2주 마다 혈청의 농도를 단계적으로 낮추어 2%까지 세포를 적응시켰을 때, 500 ml Spinner vessel(Belco, USA)에 5×10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 세포를 접종시킨 후 37°C, 30 rpm, pH 7.0으로 유지시키며, 24시간 주기로 일정량의 배지를 교체해 주면서 연속관류배양(Perfusion cultivation)을 실시하였다. 생세포수(viable cell density)와 생육도(viability)는 24시간마다 소량의 sample을 취하여 trypan blue dye exclusion 방법(8)으로 haemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다.

**tPA 생산성 향상 및 사멸도 측정**

tPA 생산성 향상을 위해서 Phorbol 12-myristate 13-acetate를 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 후 배양

배지내에서 농도가 160 nM이 되도록 배지에 첨가했다. 세포 분화 형태는 Giemsa stain법을 이용했다(8). Giemsa stain을 만들기 위해 Giemsa powder 1 g을 66 ml Glycerol에 녹이고 60°C에서 12시간동안 incubation후 66 ml methanol을 첨가하고 다시 24시간동안 incubation시켰다. 상온에서 1% Giemsa solution에 20~30분간 sample을 spotting한 slide를 담근 후 증류수로 세척하고 적당히 염색이 되었는지 현미경으로 관찰하였다. 염색이 잘 되었으면 모든 slide면을 세척하고 방치시켜 건조시켰다. 완전히 건조된 후 사진촬영을 하였다.

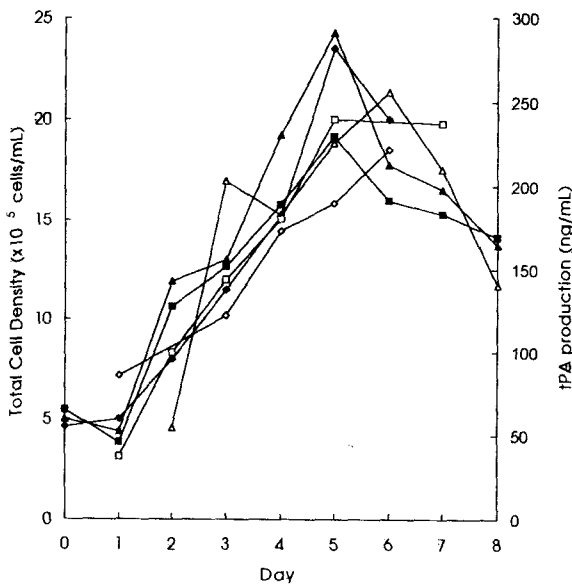
세포 사멸 기작을 확인하기 위해서 형광염색을 위한 염색시약은 Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>이 없는 PBS에 acridine orange와 ethidium bromide를 각각 100 µg/ml가 되도록 녹였다(8). 이 두 용액을 섞고 세포농도가 5×10<sup>5</sup>에서 5×10<sup>6</sup> cells/ml가 되는 세포 현탁액 100 µl에 염색시약 4 µl를 첨가했다. 이 후 형광현미경(Olympus, Japan)으로 세포를 관찰했다.

**tPA 정량 및 활성과 glucose 농도 측정**

배지내 tPA 함량은 ELISA kit(American Diagnostica inc., U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. tPA 활성 측정은 fibrin plate법을 이용하여 측정을 했다(9, 16). 배지내 Glucose 농도는 Glucose 측정 kit(Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Japan)를 이용하여 측정하였다.

**결 과**

Fig. 1은 HL-60 세포를 여러 농도의 혈청을 함유한 배지에서 T-flask 배양 했을 때, 세포생육과 tPA 생산을 나타낸 그림이다. 5%, 3%, 1%의 혈청을 함유한 세 배양조건 모두 배양 5일째에서 최대 세포 농도를 나타내고 있는데, 5% 혈청농도를 함유한 배양 배지에서 최대 세포 농도인 2.45×10<sup>6</sup> cells/ml를 나타내었다. 배양 말기로 갈수록 tPA 생산량이 증가하고 있으며 배양 6~7일째에서 최대 tPA 생산량을 나타내었다. 최대 tPA 생산량은 5% 혈청함유 배지에서 260 ng/ml였다. 3% FBS로 혈청의 농도를 낮춰 배양 했을 때 1% FBS 농도에서보다 최대 세포 농도가 낮게 나왔는데 이는 3% FBS를 함유한 배지에 세포가 완전히 적응하지 못한 결과이다. 이와같이



**Fig. 1.** The cell growth and tPA production in a 75 cm<sup>2</sup> T-flask under batch cultivations with various concentrations of serum.

—▲— Cell Density (5% FBS), —■— Cell Density (3% FBS), —◆— Cell Density (1% FBS), —△— tPA (5% FBS), —□— tPA (3% FBS), —◇— tPA (1% FBS)

**Table 1.** The comparison of cell density and tPA production from the growth of human promyelocytes in various concentrations of serum containing medium.

Concentration of serum (FBS)	Maximum cell density (cells/ml)		Maximum tPA production (ng/ml)	
	No addition	Addition*	No addition	Addition
5%	2.45×10 <sup>6</sup>	5.2 ×10 <sup>5</sup>	260	330
3%	1.8 ×10 <sup>6</sup>	5.23×10 <sup>5</sup>	240	420
1%	2.3 ×10 <sup>6</sup>	5.5 ×10 <sup>5</sup>	225	352

\*added 160 nM Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

혈청 농도를 낮추더라도 세포 생육과 tPA 생산성에는 크게 영향이 없는 것으로 판단됐다. Table 1은 T-flask에서 회분 배양시 세포 생육과 tPA 생산성과의 결과를 정리한 결과이다. Phorbol ester(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)를 넣지 않았을 때, T-flask에서의 최대 세포 농도는  $2.45 \times 10^6$  cells/ml이며 이 때 tPA 생산량은 260 ng/ml였다. Phorbol ester를 첨가했을 때, 최대 세포 농도는  $5.5 \times 10^6$  cells/ml였으며 최대 tPA 생산량은 420 ng/ml로 증가되었다. 전반적으로 혈청의 농도를 낮추더라도 세포 농도와 tPA의 생산성에는 큰 영향을 주지 않지만, phorbol ester를 첨가했을 때는 첨가하지 않았을 때보다 약 1.6배 정도 생산성이 향상되는 것으로 나타났다.

Fig. 2는 2% 혈청을 함유한 배지에서 spinner vessel을 이용하여 회분 배양을 실시하였을 때 세포 생육과 tPA 생산성, glucose 잔존량을 나타낸 것이다. Lag time이 T-flask 배양에서 보다 길어졌는데 이는 working volume이 30 ml에서 500 ml로 증가함에 따른 결과이다.

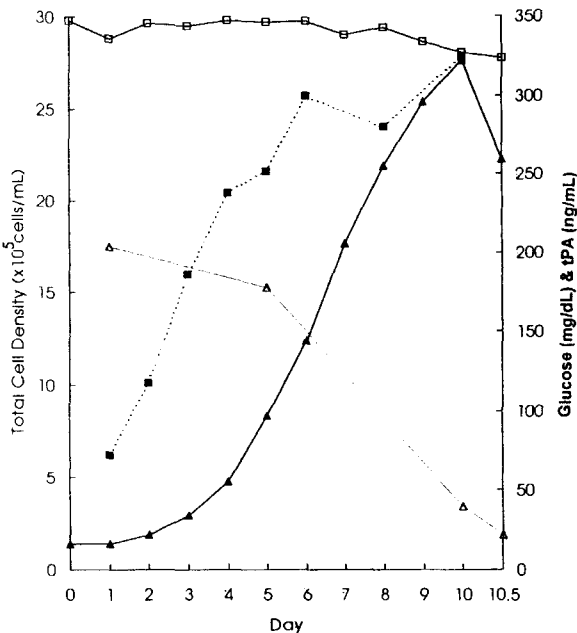


Fig. 2. The cell growth and tPA production by a spinner vessel in 2% serum containing medium. —▲— Cell Density, —□— pH, —■— tPA, —△— Glucose

배양 10일 째에서 최대 세포 농도는  $2.76 \times 10^6$  cells/ml였으며 최대 tPA 생산량은 324 ng/ml였다. T-flask 배양에서 보다 spinner vessel에서 배양에서 tPA의 양이 증가했음을 알 수 있으며 높은 생육도를 나타냄에 따라 glucose 잔존량이 크게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. Fig. 3은 연속관류배양(perfusion cultivation)을 실시하였을 때의 세포 생육과 tPA 생산성과의 관계를 나타낸 그림이다. 연속 관류 배양 시작 23일째에서  $5.27 \times 10^6$  cells/ml의 최대 세포 농도에 도달했는데, 이 때의 Perfusion rate는 0.18 ml/min 였다. Spinner vessel 하에서 연속 관류 배양시에 최대 tPA 생산량은 324 ng/ml였으며 tPA 생산속도는 0.061 mg/day였고 총 tPA 생산량은 3.05 mg/50일이었다. Table 2는 회분 배양과 연속 관류 배양 하에서의 배양시 여러 생육 변수들을 정리한 것이다. 회분배양에서 보다 연속 관류 배양시에, 최대 세포농도는 약 2배 가량 높았으나 최대 tPA 생산량은 두 배양조건 모두에서 324 ng/ml를 얻었다. 그러나 비생육속도나 비 tPA 생산속도, 비 glucose 소비 속도는 연속 관류 배양 보다는 회분 배양하에서 더 높은 것을 알 수 있다.

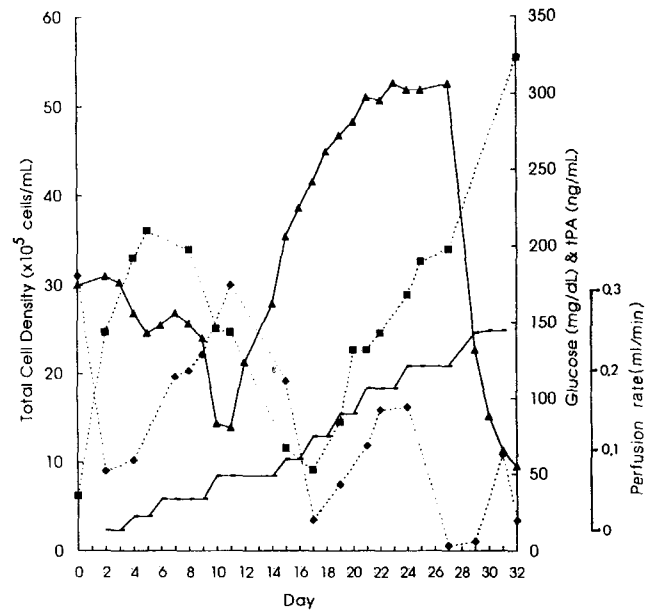


Fig. 3. Kinetics of cell growth and tPA production for perfusion cultivation of HL-60 cells in 2% FBS containing medium. —▲— Cell Density, —◆— Glucose, —■— tPA, —□— Perfusion rate

Table 2. Summary of growth parameters in cultivating human promyelocytes in 2% serum containing medium according to two different cultivation processes

	Maximum cell density (cells/ml)	Specific growth rate (1/day)	Specific glucose consumption rate ( $\mu\text{g}/\text{cell}/\text{day}$ )	Maximum tPA concentration (ng/ml)	Specific tPA production rate (ng/cell/day)
Batch culture	$2.76 \times 10^6$	0.178	$1.42 \times 10^{-5}$	324	$2.09 \times 10^{-5}$
Perfusion culture	$5.27 \times 10^6$	0.08	$1.52 \times 10^{-6}$	324	$4.92 \times 10^{-6}$

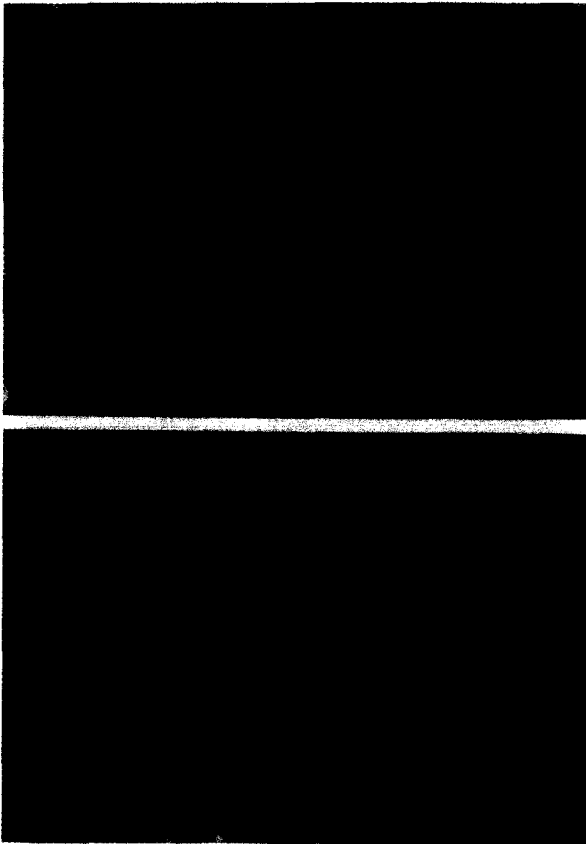


Fig. 4. Comparison of normal cells and differentiated cells by adding phorbol ester (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate). (A) Normal cells; (B) Differentiated cells 2 days after adding 160 nM phorbol ester.

tPA 생산성 향상을 위해 induction factor로서 Phorbol 12-myristate 13-acetate(Sigma Co., U.S.A.)를 사용하였다. Phorbol ester는 tPA에 대한 mRNA의 농도를 증가시키며, melanoma cell에서 어떤 48 kDa의 세포내 단백질의 합성과 인산화를 자극하는 것으로 알려져 있다(4). Fig. 4는 이 phorbol ester를 세포 배양물에 최종 농도가 160 nM이 되도록 첨가하여 배양 시간에 따라 세포의 morphology의 변화를 관찰한 사진이다. Induction factor 첨가시 배양 기간이 증가됨에 따라 proliferation보다는 granulocytes로 분화됨을 알 수 있다. Fig. 5는 5%, 3%, 1% 혈청 농도와 phorbol ester를 주입한 배양 배지에서 세포의 생육과 tPA 생산성을 비교해 본 그래프이다. Phorbol ester 주입 후 세포 농도의 증가는 없었으며 5~6일 후 세포 수가 급격히 감소함을 볼 수가 있다. tPA 생산량도 거의 일정한 수준을 보였으나 phorbol ester를 첨가하지 않은 쪽보다 tPA 생산성이 높은 것을 관찰할 수 있었으며(Table 1), 3% 혈청을 함유한 배양배지에서 420 ng/ml의 최대 tPA 생산성을 나타내었다. 이상의 결과를 종합해 보면 phorbol ester를 넣었을 때가 넣지 않았을 때보다 tPA 생산이 약 150~200% 정도 증가되었고, 혈청 농도는 tPA 생산성에 크게 영향을 주지 않

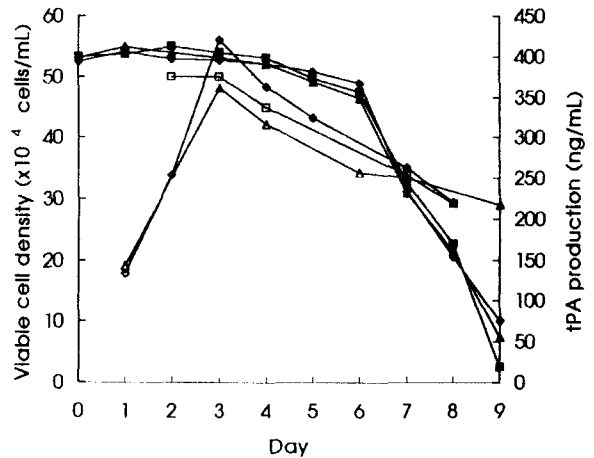


Fig. 5. The effect of phorbol ester on cell growth and tPA production in various concentrations of serum and 160 nM phorbol ester containing medium in batch cultivations.

- 5% FBS containing medium (cell density)
- ◆— 3% FBS containing medium (cell density)
- ▲— 1% FBS containing medium (cell density)
- 5% FBS containing medium (tPA)
- ◇— 3% FBS containing medium (tPA)
- △— 1% FBS containing medium (tPA)

Table 3. The comparison of tPA production from several cell lines

Cell lines	Concentration of total tPA (ng/ml)
HL-60 (Human promyelocytes)*	159.15
HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells)**	17.7
WI-38 (Human fibroblast cells)***	16.5
IMR-90 (Human fibroblast cells)***	11.9
G-361 (Human melanoma cells)***	71.6

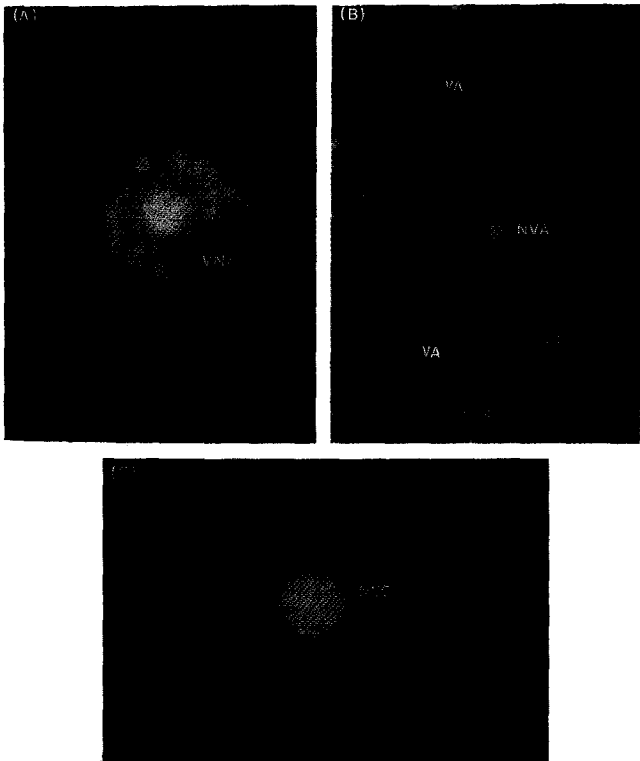
\*Cultured in a 500 ml spinner vessel in 2% FBS containing medium.

\*\*Cultured in Endothelial Growth Medium containing 2% FCS in T-flask.

\*\*\*Cultured in DMEM/F-12 medium in the absence of FCS in T-flask.

는다는 것을 알 수 있었다. Table 3은 기존에 tPA가 생산된다고 보고된 세포들과 본 연구에서 이용된 HL-60와의 tPA 생산성을 비교한 것으로(18), HL-60는 다른 세포들보다 생산성이 높은 것을 알 수 있다.

배양 조건과 교반에 의한 세포사멸의 원인과 이에 따른 tPA 생산성과의 관계를 규명하기 위해서 형광 염색법을 이용하여 실험한 결과가 Fig. 6이다(5-7). 배양초기부터 apoptosis가 증가하여 중기에서 apoptosis는 최대가 되며 말기에는 apoptosis가 감소하고 necrosis가 증가하는 것을 관찰했다. 이는 배양 초반이나 중반에는 glutamine과 glucose 등의 영양분 고갈이나 세포의 자연 노화에 의

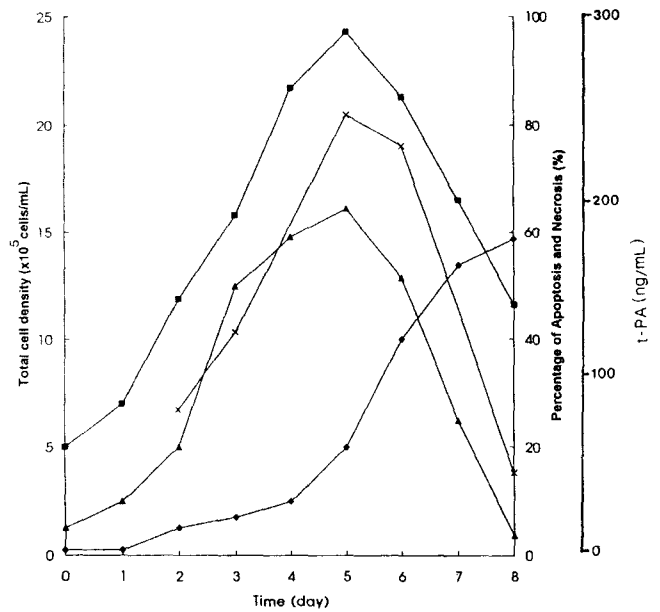


**Fig. 6. Photographs of apoptotic cells and necrotic cells in cultivating HL-60 cells.**  
 (A) Viable non-apoptotic cells (VNA); (B) Viable apoptotic cells (VA) and Non-viable apoptotic cells (NVA); (C) Necrotic cells (NEC)

해서 세포가 사멸하지만 배양 말기에는 ammonia 등의 대사 축적물에 의해서 세포가 사멸한다는 것을 의미한다. Phorbol ester를 첨가하여 인위적으로 세포를 분화시켰을 때도 apoptosis가 우세했으며, spinner vessel에서 agitation 속도를 증가시켰을 때도 apoptosis가 우세했다. 하지만 액체 질소에서 stock된 세포를 thawing 했을 때는 necrosis가 우세하였다. 이런 자료를 바탕으로 Fig. 7은 세포 사멸과 생육 곡선, tPA 생산성을 비교한 그림이다. 그림에서 볼 수 있듯이 apoptosis는 세포 생육이나 tPA 생산성에는 크게 영향을 주지 않으나 necrosis는 크게 영향을 주는 요소가 된다. 그러므로 zeolite같은 물질을 배양액에 첨가하여 ammonia 등을 제거하는 방법이나 동결과 해동을 피함으로써 tPA 생산성 저하를 피할 수 있고 세포의 생존율을 높일 수 있을 것이다.

**고 찰**

인간 전 골수세포를 이용하여 tPA 생산성을 관찰하였고 생산성을 향상시키기 위하여 세포 분화물질인 phorbol ester를 첨가하여 tPA 생산을 극대화 하고자 하였다. phorbol ester를 넣지 않았을 때 최대 tPA 생산량은 260 ng/ml였으나 phorbol ester를 첨가했을 때는 420 ng/ml



**Fig. 7. The pattern of cell death in batch cultivation of HL-60 cells according to cultivation time.**  
 -■- Cell Density, -▲- Apoptosis, -◆- Necrosis, -×- tPA

로 약 2배 가량 생산성이 증가되었으며 granulocytes로 세포가 분화되었다. 혈청의 농도를 단계적으로 낮춰 세포에 적응시켰을 때 세포는 저 혈청 농도에서도 잘 생육하였으며 tPA 생산성도 저하되지 않았다. 세포 사멸 기작 연구에 있어서 배양초기, 중반에 발생하는 세포사멸은 주로 apoptosis였으며 배양말기에는 necrosis가 우세하였다. Phorbol ester 첨가시, agitation 속도를 높였을 때에도 주로 apoptosis로 세포가 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 stock된 세포를 해동했을 때 주된 세포사멸은 necrosis임을 확인했다. tPA 생산 측면에서 보았을 때 apoptosis는 tPA 생산에 영향을 주지 않았으나 necrosis는 크게 영향을 주는 요소임을 확인했다.

**요 약**

tPA 생산과 세포 사멸의 연구를 하기 위해서 인간 전골수세포가 배양되었다. 연속 관류 배양하에서 최대 tPA 생산량은 324 ng/ml이며 최대 세포 농도는 5.27×10<sup>6</sup> cells/ml였다. Phorbol ester를 넣었을 때 tPA 생산량은 420 ng/ml까지 향상되었다. 현광 현미경으로 관찰했을 때, apoptosis는 세포 배양 초기부터 중반까지 우세했고 빠른 교반 속도에서도 우세했다. 그러나 necrosis는 세포 배양 말기와 동결된 세포가 해동 되었을 때 우세했다.

**감사의 말**

본 연구는 생물공정연구센터(BPERC, 95)의 지원으로

수행된 연구로 이에 심심한 사의를 표합니다.

### 참고문헌

1. Butler, M. 1987. Mammalian cell technology. Pp. 91-108. Open University press. UK.
2. Hoylaerts, M., D.C. Rijken, H.R. Lijnen, and Desire Collen. 1982. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **257**(6): 2912-2919.
3. Rijken, D.C., M. Hoylaerts, and D. Collen. 1982. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **257**(6): 2920-2925.
4. Bosman, F., G. Opendakker, J.V. Damme and A. Billiau. 1986. Phorbol Ester Stimulates the synthesis and phosphorylation of a 48 kDa-intracellular protein in plasminogen activator secreting melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**(1): 263-272.
5. Mercille, S. and B. Massie. 1994. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 1140-1154.
6. Singh, R.P., M. Al-Rubeai, C.D. Gregory, and A.N. Emery. 1994. Cell death in bioreactor: A role for apoptosis. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 720-726.
7. Al-Rubeai, M., R.P. Singh, M.H. Goldman, and A.N. Emery. Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol. Bioeng.* **45**: 463-472.
8. Doyle, A., J.B. Griffiths and D.G. Newell. 1993. Cell and tissue culture; Laboratory procedures. 9A:1.12-1.15. John Wiley & Sons. UK.
9. Marsh, N.A. and C.L. Arocha-Pinango. 1972. Evaluation of the fibrin plate method for estimating plasminogen activator. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg)* **28**: 75-88.
10. Lin, A.A., R. Kimura, and W.M. Miller. 1993. Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 339-350.
11. Lucas, M.A., L.J. Fretto, and P.A. Mckee. 1983. The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **258**(7): 4249-4256.
12. Lijnen, H.R. and D. Collen. 1993. Development of thrombolytic agents. *Biotech. Adv.* **11**: 115-130.
13. Liu, J-ning and V. Gurewich. 1983. Substrate inhibition of fibrin-dependent plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **268**(17): 12 257-12259.
14. Fleury, V., S. Loyau, and H. Roger Lijnen, Willem Nieuwenhuizen and Eduardo Angles-cano. 1993. Molecular assembly of plasminogen and tissue-type plasminogen activator on an evolving fibrin surface. *Eur. J. Biochem.* **216**: 549-556.
15. Lee, H.Y. and G.S. Kim. 1988. The production of tissue plasminogen activator from normal human cell line. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**(6): 522-525.
16. Astrup, T. and S. Mullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **40**: 346-351.
17. Bernik, M.B., W.F. White, E.P. Oller, and H.C. Kwan. 1974. Immunologic identity of plasminogen activator in human urine, heart, blood vessels, and tissue culture. *J. Lab. Clin. Med.* **10**: 546-558.
18. Kurokawa, T., Y. Toyoda, and S. Iwasa. 1991. Characterization of monoclonal antibodies against human tissue plasminogen activator (tPA): Quantitation of free tPA in human cell cultures by an ELISA. *J. Biochem.* **109**: 217-222.

(Received 10 August 1995)