

## 독성 및 약물대사 연구를 위한 한국인 부분 간 유래 간세포의 품질 및 활용성 평가

노정권<sup>1</sup>, 장인근<sup>1</sup>, 김효은<sup>1</sup>, 이종은<sup>1</sup>, 양말숙<sup>1</sup>, 장은미<sup>1</sup>, 이지현<sup>2</sup>, 박혜정<sup>2</sup>, 김영아<sup>2</sup>, 이석구<sup>3</sup>, 정호상<sup>4</sup>, 안준익<sup>4</sup>, 이두훈<sup>1\*</sup>

### Quality and Availability Evaluation of Human Hepatocytes Isolated from Resected Partial Livers for Toxicology and Drug Metabolism Studies in Korea

Jeong-Kwon Noh<sup>1</sup>, In Keun Jang<sup>1</sup>, Hyo Eun Kim<sup>1</sup>, Jong Eun Lee<sup>1</sup>, Mal Sook Yang<sup>1</sup>, Eun Mi Jang<sup>1</sup>, Ji-Hyun Lee<sup>2</sup>, Hey-Jung Park<sup>2</sup>, Young-A Kim<sup>2</sup>, Suk-Koo Lee<sup>3</sup>, Ho-Sang Jeong<sup>4</sup>, Joon-Ik Ahn<sup>4</sup>, and Doo-Hoon Lee<sup>1\*</sup>

접수: 2014년 1월 21일 / 게재승인: 2014년 2월 15일  
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Demand for *in vitro* pharmacological evaluation and toxicity test using human hepatocytes has been increasing. In USA and Europe, human hepatocytes obtained from donated whole liver unsuitable for transplantation were distributed to researchers and deposited in cell bank facility as cryopreserved vial. In Korea, however, incidence of transplantation-inappropriate whole liver has been quite low and the whole livers almost have so severe liver disease such as fatty or fibrotic liver that cannot meet the demand. In this study we aimed to isolate human hepatocytes from liver resection surgery-originated partial liver, and assure the isolated

human hepatocytes and its cryopreserved hepatocytes to be qualified for the *in vitro* pharmacological evaluation and drug toxicity tests. We compared those with commercially available human hepatocyte, BD GenTest™ by cell morphology, hepatic gene expression, urea synthesis, albumin secretion, ammonia removal, and cytochrome P450 induction activities. Changes in hepatotoxic gene expression after cryopreservation are evaluated with a typical hepatotoxic drug, acetaminophen. Consequently, the fresh hepatocytes from the partial liver and its cryopreserved hepatocytes expressed their intrinsic hepatic functions well and showed equal hepatotoxicity gene expression trend regardless to cryopreservation. Therefore, liver resection surgery-originated partial liver can be used as a useful source of human hepatocytes for various pharmacological and hepatotoxicity test.

**Keywords:** Human hepatocyte, Partial liver, Drug metabolism, Drug screening

<sup>1</sup>라이프리버(주) 의학연구소

<sup>1</sup>Biomedical Research Center, Lifeliver Co. Ltd., Yongin 448-807, Korea

Tel: +82-2-3410-3603, Fax: +82-31-896-8579

e-mail: doohoon@empas.com

<sup>2</sup>삼성생명과학연구소

<sup>2</sup>Samsung Biomedical Research Institute, Seoul 135-710, Korea

<sup>3</sup>성균관대학교 의과대학 외과

<sup>3</sup>Department of Surgery, School of Medicine, Sungkyunkwan University, Seoul 135-710, Korea

<sup>4</sup>식품의약품안전평가원

<sup>4</sup>National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, MFDS, Cheongwon 363-700, Korea

### 1. 서론

신약 개발이 증가함에 따라 약물대사 및 수송체 (transporter) 상호작용을 *in vitro* 평가하기 위해 가장 적합한 모델인 인체 간세포에 대한 수요가 증가하고 있다 [1]. 하지만, 초대배양

인체 간세포는 정상 간 조직에서 분리해야 하기 때문에 얻기가 매우 어렵고, 냉동 보존 효율이 낮아 [2] 현재 국내에서의 활용성이 매우 낮은 상태이다. 대체 세포원으로써 동물 간세포나 HepG2 세포와 같은 간암 세포주가 사용되고 있지만, 인체 특이적인 약리 특성을 반영하지 못하는 한계를 가지고 있다 [3]. 따라서 국내에서는 인체 간세포를 이용한 *in vitro* 약물평가가 필요한 경우 미국 및 유럽 등지의 간세포 공급업체들로부터 동결된 간세포를 수입하여 사용하고 있는 실정이다 [4].

여러 보고에 따르면, 한국인에서 자주 나타나는 약물대사 효소 변이가 있고 그로 인해 약물에 대한 반응이 다르게 나타난다고 한다 [5,6]. 이처럼 인종간에 따라 간 대사의 차이가 크기 때문에 미국 및 유럽의 간세포 공급업체에서는 간 기증자의 인종을 적시하고 있다. 또한 최근의 신약개발에서 개인맞춤약물의 개발이 활발히 진행되는 경향에 비추어 한국인에 맞는 약물대사 연구를 위해서 한국인 간세포의 공급이 절실히 요구되고 있다.

뇌사자 장기 기증이 활성화된 미국이나 유럽의 경우, 기증은 되었으나 이식에는 부적합하여 버려지는 기증간을 활용하여 BD (Beckton Dickinson, San Jose, USA), Life technology (Carlsbad, USA), BioreclamationIVT (Brussels, Belgium) 등의 업체를 통해 약리평가를 위한 인체 간세포를 분리하고 냉동 보존하여 이를 제약회사 등의 연구에 공급하고 있다. 하지만, 국내의 경우 전체 간이식의 대부분이 생체기증 간이식이며 [7], 기증된 뇌사자의 간은 대부분 이식에 사용되고 있어서 인체 간세포 분리를 위한 간 조직 원료로 활용될 수 있는 경우는 매우 드물다. 또한 약물대사에 관여하는 효소의 유전적 다양성은 인종간 차이뿐만 아니라 개인간에도 차이를 보이기 때문에 [5,6] 여러 사람의 간세포를 하나로 균질시킨 형태로 동결보존하여 약물대사에 있어 개인 간 차이에 따른 오차를 줄이는 방식으로 약물 대사 연구에 사용하기도 한다 [8].

인체 간으로부터 간세포를 분리하는 방법은, 전간 (whole liver)의 경우 간문맥 등의 혈관을 통해 간 조직 전체를 EDTA 용액과 콜라겐분해효소용액을 순차적으로 관류하는 방식이 일반적이다 [9]. 그러나, 간 조직이 절단되어 일부 혈관이 노출된 부분 간의 경우 효소용액을 조직 전체로 고르게 관류하기가 까다롭다. 따라서 일부 국내 연구에서도 부분 간 조직으로부터 간세포를 분리해 내기 위해 관류방식 대신 간 조직을 잘게 자른 후 이를 콜라겐분해효소용액에 현탁시켜 간세포를 얻어내는 방식을 이용하기도 하였다 [10,11]. 그러나, 이 방식은 비교적 1~2 g의 작은 크기의 간 조직에 적용되었고, 간 절제수술 후 분리되는 30 g 이상의 부분 간에는 적용이 힘들다. 관류방식에 비해 고농도의 콜라겐분해효소가 필요하며, 효소 분해와 잘게 자르는 작업에 긴 시간이 소요되어 간세포 생존율 (viability) 및 수율 (yield)이 낮은 것으로 판단된다 [10,11].

본 연구에서는 국내에서 발생빈도가 낮은 뇌사자 이식부적합 전간 대신, 여러 가지 질환으로 시행되는 간 절제수술 시 얻어지는 부분 간 조직으로부터 콜라겐분해효소를 관류하는

방식으로 간세포를 분리하였다. 간 조직 획득 과정에서 허혈 시간 및 질환 등의 기증간의 상태에 따른 간세포 분리 수율과 생존율 등을 확인하였고, 요소 합성능, 알부민 분비능, 암모니아 제거능, 사이토크롬 P450 유도능력과 같은 간세포의 특이 기능을 평가하였으며, 아세트아미노펜을 이용하여 약물독성 평가를 실시하였다. 또한 동결 보존한 간세포의 기능 변화를 상품화된 외국 동결 보존 간세포와 비교함으로써 국내 활용 가능성을 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 인체 간 조직 획득

인체 간 절제수술 시 얻어지는 부분 간을 연구에 활용하기 위해 삼성서울병원 기관윤리위원회에서 승인을 받은 후 연구를 진행하였다. 간 절제 수술 환자가 발생하면 감염성 질환 (B, C형 간염, 매독, 에이즈) 여부와 중증 지방간, 담즙 정체 및 섬유화 여부를 먼저 확인하여 해당될 경우 기증 대상에서 제외하였다. 또한 수술 방법이 복강경 수술인 경우에도 제외하였다. 간세포 분리가 곧바로 진행되기 어려울 경우에는 수술실에서 노출된 혈관에 HTK용액 (histidine ketoglutarate tryptophan, Custodiol®, Brantford, Canada)을 여러 차례 주입한 다음 간세포 분리 시까지 냉장으로 보관하였다.

### 2.2. 간세포 분리, 배양 및 동결

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma-Aldrich, St Louis, USA)가 포함된 관류용액과 콜라겐분해효소 (collagenase, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)가 0.04% (w/v) 포함된 관류용액을 부분 간 절단면의 노출된 혈관들로 순차적으로 관류하여 간세포를 분리하였다. 자세한 방법은 본 연구자들의 앞서 보고한 논문에 기술되어 있다 [12]. 1단계 관류용액인 EDTA 용액을 약 10분간 관류한 후, 콜라겐분해효소 용액으로 관류하였다. 관류용액은 37°C로 충분히 데운 후 사용하였다. 관류 종료 후 4°C Williams' E 배지 (WelGENE, Daegu, Korea)에 침지된 간 조직을 수술칼로 풀어헤친 후, 250 µm 메쉬, 150 µm 메쉬로 거른 후 50 g에서 2분간 총 4회 원심분리를 반복하여 간세포를 정제하였다. 정제된 간세포의 세포수와 생존율은 trypan blue method로 측정하였다.

간세포 배양에 사용된 HDM (hormonally defined medium) 배지는 Williams' E 배지를 기반으로 하였으며, bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 0.1%, epidermal growth factor (대웅제약, Seoul, Korea) 20 ng/mL, insulin (Janssen Korea, Seoul, Korea) 0.25 U/mL, hydrocortisone (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 1.4 µM, glutamine (Life Technologies, Carlsbad, USA) 4 mM, glucagon (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 1 µg/mL, H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 3 ng/mL, CuSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 0.1 mM, Zn SO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 50 pM을 첨가하여 사용하였다. 제 1형 콜라겐이 코팅된 6-well 배양플레이트에

mL당  $5 \times 10^5$  농도로 2 mL씩 접종하였다.

정제된 간세포는 DMSO 12% (v/v), human albumin 4% (w/v, 녹십자, Seoul, Korea), 300 mM glucose를 포함하는 HTK 용액을 mL당  $5 \times 10^6$ 개의 농도로 1.5 mL씩 동결바이알에 담아 냉동용기 (Mr. Frosty™ freezing container, ThermoFisher scientific, Waltham, USA)에 넣어 -70°C deepfreezer에서 overnight 후 액체질소에 보관하였다. 해동은 37°C에서 90초간 침지 후, 해동배지 20 mL로 50 g, 3분간 원심분리 후 trypan blue method로 세포수와 생존율을 측정하였다. 부착율은 간세포를 24시간 플레이트에 부착시킨 후 부착되지 않은 세포를 회수하고 trypan blue counting하는 방법으로 측정하였다. 대조군으로는 BD biosciences에서 공급하는 BD GenTest™ Inducible-Qualified Human CryoHepatocytes (BD Bioscience, San Jose, USA) 3가지 로트를 구매하여 사용하였다.

### 2.3. 요소 합성량 측정

요소는 간세포 특이 대사산물로서 간세포의 활성 지표이다. 요소의 양은 urea nitrogen assay kit (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)을 이용하였다. 인산 34% 용액 10 mL에 DAM-TSC 시액 2 mL를 첨가하여 사용 직전 반응 용액을 만들었다. 반응 용액 750 µL에 검체 배지와 요소 표준 용액을 농도별로 40 µL씩 넣고 끓는 물에 10분을 반응시킨 후 차가운 물에 식혀 주었다. 발색물을 530 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며 이를 요소 표준 용액에 의한 표준곡선과 비교하여 농도로 환산하여 계산하였다.

### 2.4. 알부민 분비량 측정

간세포 활성 지표로서 알부민 농도는 ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) 방법을 이용하여 측정하였다. Bicarbonate coating buffer 를 사용하여 1차 항체 (goat anti-human albumin antibody, Bethyl, Montgomery, USA)를 2 µg/mL의 농도로 희석하여 96 well plate의 well당 100 µL씩 넣고 4°C에서 16~18시간 동안 정치하여 1차 항체를 바닥에 흡착시켰다. PBS-T 200 µL로 세 번 세척한 후 고정화 용액인 3% 알부민/PBS용액을 well당 100 µL씩 넣고 1시간 동안 상온에서 정치시킨 후 PBS-T 200 µL로 두 번 세척하였다. PBS로 100배 희석된 배지 상층액과 PBS에 농도별로 희석된 표준 알부민을 well 당 100 µL씩 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 0.4 mg/mL OPD (o-phenylenediamine, Sigma-Aldrich, St Louis, USA)와 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 µL/mL를 포함한 용액을 well 당 100 µL씩 넣어 실온에서 발색 반응을 유도하였고 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 well 당 100 µL씩 넣어 발색 반응을 중지시켰다. 흡광도는 microplate reader (VersaMax™, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 490 nm에서 측정하였다.

### 2.5. 암모니아 제거능 측정

배양한 간세포의 해독능력을 알아보기 위해 암모니아 분해능을 조사하였다. 배지에 1 mM NH<sub>4</sub>Cl을 첨가하여 4시간 뒤 잔존하는 암모니아량을 암모니아 assay kit (Indophenol method, 아산제약, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 정색 저해 성분을 제거하고 배지 내 요소를 고정시키기 위한 제단 백시약 (팅스텐산 나트륨 50 g/L) 160 µL에 검체 배지 40 µL를 넣고 잘 섞은 뒤 발색시약 A, B, C를 각각 250, 125, 250 µL를 넣고 잘 섞어준다. 반응은 37°C 항온조에서 20분간 진행시키고, 발색물을 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 1 mM NH<sub>4</sub>Cl이 포함되지 않은 배지와 포함하는 배지를 이용해 만든 암모니아 표준 곡선과 비교하여 암모니아 농도를 환산하였다.

### 2.6. 유전자 발현 측정

분리된 간세포와 동결 후의 유전자의 발현 변화가 있는지 확인하기 위하여 단층 배양된 간세포 특이 유전자의 발현을 확인하였다. 그리고 간세포 동결 여부에 따른 약물에 의한 간독성 유전자 발현 양상을 비교하기 위하여 대표적 간독성 약물인 아세트아미노펜 (acetaminophen, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 처리한 후 유전자 발현 변화를 역전사-중합효소 연쇄반응방법 (RT-PCR)을 통해 살펴보았다. 아세트아미노펜에 의해 유전자 발현이 감소하는 것으로 알려져 있는 BHMT (betaine-homocystaine S-methyltransferase), CA3 (carbonic anhydrase 3, muscle specific), HAO2 (hydroxyacid oxidase 2), RB1 (retinoblastoma 1), THRSP (thyroid hormone responsive) 와 아세트아미노펜에 의해 발현이 증가하는 것으로 알려져 있는 CYP2E1의 유전자 발현을 확인해 보았다.

시험관에 들어 있는 세포에 0.5 mL의 트라이 졸 (Tri-Zol)을 넣고 세포를 회수한 후 100 µL의 클로로포름을 첨가하고 잘 섞어 주었다. 상온에서 10분 동안 방치한 다음 12,000 rpm으로 15분간 원심분리 후 맨 위층의 상층액을 eppendorf tube로 옮겼다. 여기에 500 µL의 이소프로판올을 첨가한 후 잘 섞고 10분 동안 상온에서 방치한 다음 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 0.5 mL의 75% 에탄올을 넣고 잘 섞은 후 7500 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 다시 상층액을 버리고 남은 75% 에탄올을 잘 말린 후 DEPC를 넣고 65°C에서 5분 동안 방치하여 RNA를 용출시켰다. 용출된 RNA는 분광광도계에서 흡광도를 측정하고 RNA의 양을 정량하였다. RNA 2 µg을 1,000 U AMV Reverse Transcriptase 0.1 µL, 2.5 mM dNTP 혼합물 4 µL, Oligo (DT) 1 µL, RNase inhibitor 0.5 µL, 10배의 RT 버퍼를 이용하여 최종 30 µL로 맞추는 다음 30°C 10분, 42°C 30분, 99°C 5분 동안 역전사 반응을 시켰다. 이렇게 얻어진 cDNA로 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 중합효소 연쇄반응은 Taq DNA Polymerase Kit (K05 611003, Koma biotech, Seoul, Korea)를 이용하여 디옥시리보핵산 완충용액 (Taq buffer) 2.5 µL에 상보적인 DNA (cDNA) 2 µL, 5 Unit/µL 디옥시리보핵산 중합효소 (Taq polymerase) 0.1 µL, 2.5 mM dNTP 혼합물 2 µL, 멸균된 3차 증류수 17.4

μL와 각각의 유전자에 대한 합성된 10 pmol의 프라이머를 함께 넣어 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. Primer는 albumin (F: 5- tgcttgatgtgctgatgacaggg -3, R: 5- aaggcaagtcagcaggcattc tcac -3), Transferrin (F: 5- tctatgggtcaaaagaggatc c -3, R: 5- ga gagctgaatagtgggaattc -3), α1-antitrypsin (F: 5- ccatgtttgcaaaaga gcaac -3, R: 5- ggaagtaaggtatagtcaggt -3), Glutamine Synthase (GS) (F: 5- gtcaagatgctggggactaa -3, R: 5- tacgattggctacaccacca -3), Tyrosine Amino Transferase (TAT) (F: 5- gctaaggacgtcattc tgacaag-3, R: 5- gtctccatgatctcatcagctaaag -3), Tryptophan 2,3-DiOxygenase (TDO) (F: 5- atacagagcacttcagggagc -3, R: 5- gtt gggttcattctcggtatc -3), CYP2E1 (F: 5- acagagaccaccagcacaact -3, R: 5- atgagcggggaatgacacaga -3), BHMT (5- gtgtgggagcttga aacctt -3, 5- tctgggagatcgatgaatcc -3), carbonic anhydrase 3 (CA3) (5- ctgccaagaccatctgtaac -3, 5- aactcgcattctcatgtcc -3), hydroxyacid oxidase2 (HAO2) (5- cgaaaccagttgaggaggaa -3, 5- tacagcagccaccactctg -3), retinoblastoma 1 (RB1) (5- ttgcagtatg cttccaccag -3, 5- taggagggtgtctctctca -3), 및 thyroid hormone responsive (5- taaccaagcgttaccccaag -3, 5- cactctcgtctcacttcc -3)로 수행하였다. 아가로스 2% 젤에서 전기 영동시킨 PCR 반응물을 EtBr (Ethidium Bromide)로 염색하여 자외선 투영기 (Gel Doc™ XR, BIO-RAD, Hercules, USA)로 염색 양상을 조사하고 사진을 찍었다. 대조군으로서 GAPDH의 발현양을 조사하였다.

**2.7. 싸이토크롬 P450 fold induction 측정**

약물대사에 관여하는 대표적 싸이토크롬 P450 효소인 CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9의 fold induction 효과를 초대배양 간세포, 동결 보존 간세포, 상용 동결 보존 간세포에서 비교하였다.

싸이토크롬 P450 1A2 fold induction 분석의 경우, 부착된 간세포에 2 μM의 3-MC (3-methylcholanthrene, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 또는 25 μM의 rifampicin (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 으로 72시간 동안 처리한 후 제거하고, 그 다음 10 μM의 EROD (7-ethoxyresorufin, Sigma-Aldrich, St Louis, USA)과 10 μM의 dicumarol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 을 처리하여 30분간 반응시킨 후 상등액을 취하여 530 nm/590 nm 파장에서 형광 마이크로플레이트 측정기 (GloMax™ Multi+ fluorescence microplate reader, Promega, Madison, USA)로 형광 세기 (fluorescence intensity)를 측정하였다. 이 때 대조군은 3-MC와 또는 rifampicin을 처리하지 않은 조건이었다.

싸이토크롬 P450 3A4 fold induction 분석의 경우, P450 Glo™ CYP3A4 assay kit (Promega, Madison, USA)를 사용하였고 세포에 25 μM의 rifampicin으로 72시간 동안 배양한 후 제거하고, 그 다음 50 μM의 luciferin-PFBE로 3시간 동안 처리하여 그 상등액을 취하였다. 그 다음 50 μL의 상등액과 50 μL의 luciferin 반응액을 혼합하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 형광 마이크로플레이트 측정기로 발광도를 측정하였다. 이 때 대조군은 rifampicin을 처리하지 않은 조건이었다.

싸이토크롬 P450 2C9 fold induction 분석의 경우, P450-Glo™ CYP2C9 assay kit (Promega, Madison, USA)를 사용하였고 세포에 25 μM의 rifampicin으로 72시간 동안 배양한 후 제거하고, 그 다음 100 μM luciferin H를 함유하는 배지를 각 well에 1 mL씩 넣고 37°C에서 3시간 반응시킨 후 상등액을 취하였다. 그 다음 50 μL의 상등액과 50 μL의 luciferin 반응액을 혼합하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 형광 마이크로플레이트 측정기로 발광도를 측정하였다. 이 때 대조군은 rifampicin을 처리하지 않은 조건이었다.

**2.8. 통계분석**

통계적 유의성은 SPSS version 18.0 소프트웨어를 이용한 ANOVA 테스트로 검정하였고, *p*<0.05인 경우 통계적으로 유의한 차이로 간주하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 간세포 분리 수율 평가**

본 연구에서는 한국인의 간 절제 시 얻어진 부분 간으로부터 분리 및 배양된 초대배양 간세포와 이를 동결 보존한 간세포의 생존율, 분리효율, 배양품질 등을 해외로부터 수입한 동결 간세포와 비교하였다. 본 연구에 적용된 간세포에 대한 정보를 Table 1에 도시하였다. Table 1에서 GenTest™는 BD bioscience에서 공급하는 이식부적합 기증 간으로부터 분리 및 동결된 인체 간세포이며, Fresh는 인체 부분 간으로부터 얻어진 초대배양 간세포이고, Cryo는 부분 간으로부터 얻어진 간세포를 동결·해동한 후 배양한 간세포이다. 각 군당 각각 3, 5, 3개의 샘플을 비교하였다.

간세포의 수율과 생존율, 부착율 (plateability) 등은 기존에 보고된 바와 같이 각각의 환자에 따라 편차가 크게 나타났다 [13]. 인체로부터 분리된 간 조직이 상온에서 보관된 시간을 온열 허혈시간 (warm ischemic time) 이라고 하는데, 온열 허혈시간이 30분 이상인 Fresh-4, Fresh-5의 경우, 간세포 수율 (yield, 간 조직 g 당 분리된 간세포의 수)은 매우 낮게 나타났다. 온열 허혈시간이 짧은 간 조직의 경우에는 조직의 크기에 따라 10<sup>9</sup>개 이상의 간세포를 얻을 수 있는 것으로 나타났으며, 이는 100개 이상의 동결바이알을 만들 수 있는 양으로써, 다양한 종류의 약물대사연구에 충분히 활용할 수 있는 양으로 판단된다. 또한 공동으로 연구를 수행한 삼성서울병원에서의 간 절제수술은 연평균 400건 이상 시행되고 있고, 이 중에서 B형 간염 등의 제외기준을 적용하면 연 50건 이상의 부분 간 조직을 얻을 수 있을 것으로 예상되므로 부분 간 유래 간세포는 국내 약물대사 연구의 세포공급원으로써 적합한 것으로 사료된다.

Table 1에서 볼 수 있는 바와 같이 동결 보존된 간세포의 경우 동결 또는 해동 시 입은 손상에 의해 부착율이 떨어지는 경우가 많았다. 특히, Cryo-3의 경우는 Fresh-2를 동결 보존한 샘플인데, 부착율이 약 10% 가량 떨어진 것을 보여 주고 있

**Table 1.** Information of BD GenTest™ hepatocytes and the human partial livers used in this study and results of hepatocyte isolation and thawing

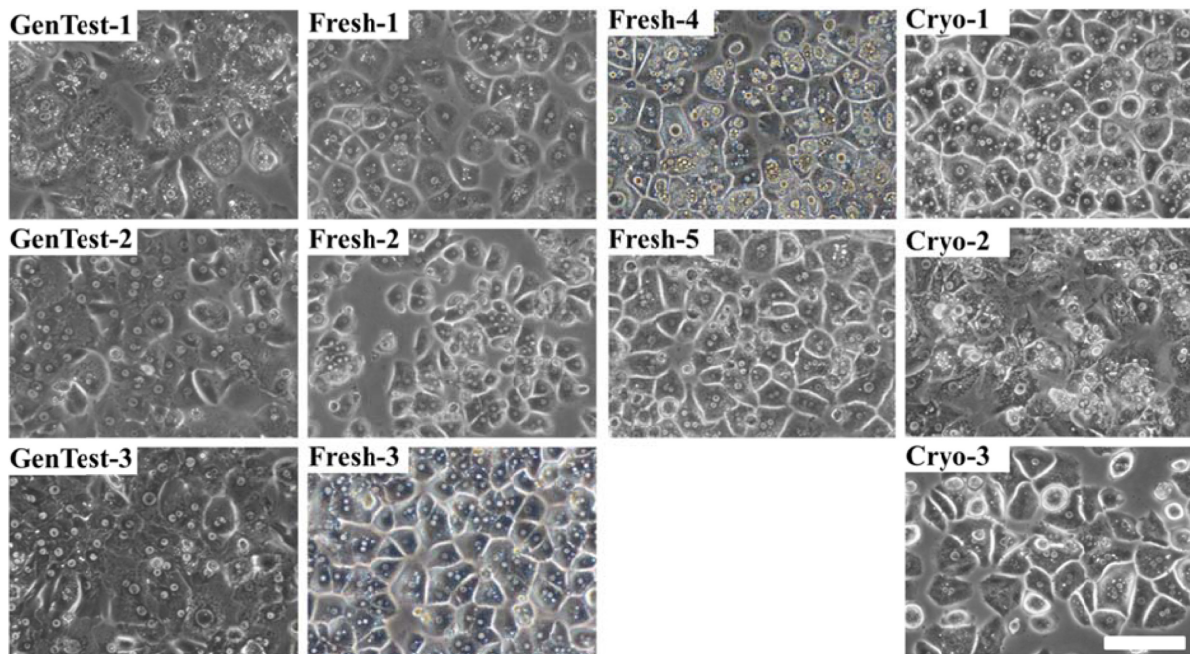
	Age	Diagnosis	Liver weight (g)	Ischemic time (min)		Yield ( $\times 10^7$ /g)	Total cell yield ( $\times 10^7$ )	Viability (%)	Thawing		Plateability (%)
				Warm	Cold				Yield ( $\times 10^6$ )	Viability (%)	
GenTest-1	48	Head Trauma							4.4	92.5	22.5
GenTest-2	59	ICH stroke							6.0	86.9	61.3
GenTest-3	64	ICH stroke							9.2	94.3	90.5
		Mean $\pm$ SD							6.5 $\pm$ 2.4	91.9 $\pm$ 3.9	58.1 $\pm$ 34.1
Fresh-1	70	Hepatocellular carcinoma	88	40	10	1.2	106	81.8			72.5
Fresh-2	1.1	Biliary atresia	38	10	30	1.7	65	71.0			64.5
Fresh-3	1	Hepatoblastoma	80	20	30	4.1	326	87.5			85.3
Fresh-4	51	Hemoangiopericytoma	50	120	30	0.1	5	91.0			89.2
Fresh-5	74	Liver adenoma	30	95	20	0.3	9	87.3			84.0
		Mean $\pm$ SD	57.2 $\pm$ 25.6	57.0 $\pm$ 48.2	24.0 $\pm$ 8.9	1.5 $\pm$ 1.6	102.2 $\pm$ 131.9	83.7 $\pm$ 7.8			79.1 $\pm$ 10.3
Cryo-1	71	Adenocarcinoma	58	50	20	0.43	25	87.6	6.5	90.0	78.5
Cryo-2	42	Brain death	122	60	30	0.1	12	82.0	4.2	83.5	65.5
Cryo-3	1.1	Biliary atresia	38	10	30	1.7	65	71.0	4.5	85.0	55.3
		Mean $\pm$ SD	72.7 $\pm$ 43.9	40.0 $\pm$ 26.5	26.7 $\pm$ 5.8	0.7 $\pm$ 0.8	34.0 $\pm$ 27.6	80.2 $\pm$ 8.4	5.1 $\pm$ 1.3	86.2 $\pm$ 3.4	66.4 $\pm$ 11.6

다. 즉, 해동 후 trypan blue method을 이용한 생존율보다는 부착율이 간세포의 상태를 더 잘 반영하는 것으로 나타났다.

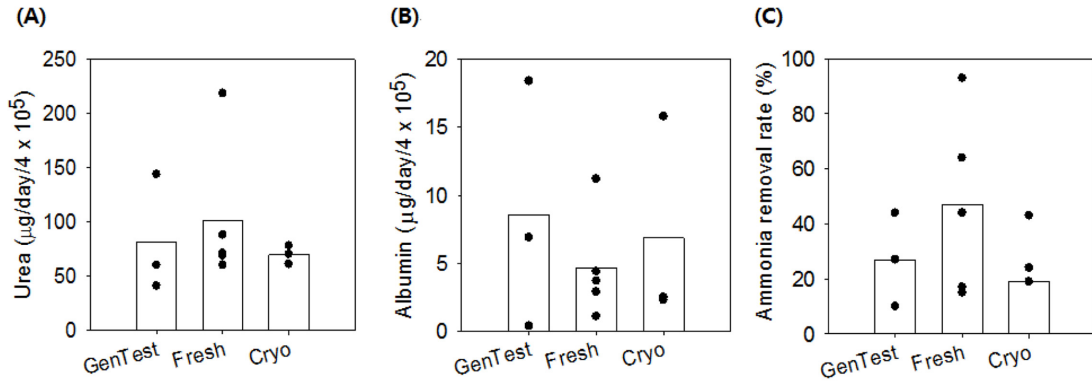
### 3.2. 간세포의 간 기능 및 유전자 발현 비교

인체 간세포는 동결 및 해동 조건에 따라 간세포 생존율, 부착율, 효소 활성 및 알부민 분비능 등이 떨어지는 등의 영향을 받는다고 보고되어 있다 [14].

먼저 초대배양 간세포와 동결 간세포 (Cryo 및 GenTest™)의 전반적인 간 기능 및 유전자 발현 양상을 확인하기 위해 배양플레이트에 부착된 간세포 사진을 통해 부착된 간세포의 정성적인 상태를 확인하였다 (Fig. 1). 그 결과 동결 보존 후 해동되어 배양플레이트에 단층으로 부착 배양된 간세포 (Cryo)는 초대배양 간세포 (Fresh)와 양성 대조군으로써 상용화된 인체 간세포 (이하 GenTest™)와 비교 시 형태학적으로



**Fig. 1.** Morphology of human hepatocytes cultured on collagen type I-coated well plates for 1 day. ‘GenTest’ indicates cryopreserved human hepatocytes of BD Bioscience GenTest™; ‘Fresh’, fresh hepatocytes from human partial liver in this study; ‘Cryo’, cryopreserved human hepatocytes after isolation from human partial liver. Bar represents 100  $\mu$ m.



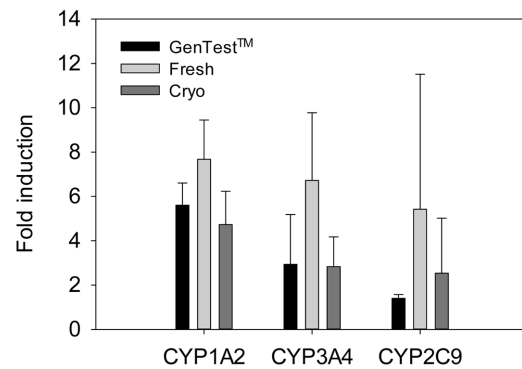
**Fig. 2.** Urea synthesis (A), albumin secretion (B) and ammonia removal activities (C) of primary human hepatocytes in culture. Human hepatocytes were plated and cultured with 1 mM NH<sub>4</sub>Cl supplemented hormonally defined medium for 1 day. Media sampling for ammonia removal activity assay were conducted after 4 hr of cultivation; and for urea synthesis and albumin secretion assay after 1 day of cultivation. Culture medium was harvested for the assay. Dots indicate each value of the activities and bars show the means of each group.

별다른 차이가 없는 성상을 보였다.

두 번째로 요소 합성량, 알부민 분비량, 암모니아 제거율을 통해 동결 간세포의 간 기능을 초대배양 간세포, 상용 동결 간세포와 비교하여 살펴보았다 (Fig. 2). 그 결과 동결 간세포 Cryo는 상용 인체간세포 GenTest™과 비교하여 유사한 간 기능 (알부민 분비능, 요소 합성능)을 보였으며, 초대배양 간세포 (Fresh)와 비교하였을 때에도 큰 차이를 보이지 않았다. 다만, 군당 개체 수가 적어 통계적으로는 유의하지 않지만 ( $p > 0.05$ ), 동결 간세포 (Cryo, GenTest™)는 암모니아 제거능에 있어 Fresh에 비해 다소 떨어지는 경향을 보였다 (Fig. 2).

간은 효소적 약물 대사 기관으로 약물대사에 관여하는 기작은 phase I과 phase II로 나뉘어 진다. Phase I은 50~100여개의 사이토크롬 P450 계열 효소로 구성되어 있으며, phase I 해독에 참여하는 주요 사이토크롬 P450 효소들 중 CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 이 현재 시장에서 사용되고 있는 대부분의 약물들을 일차 대사한다고 알려져 있으며 [15] 사이토크롬 P450 효소들의 활성은 동결조건에 따라 그 활성이 감소된다고 알려져 있다 [16]. 군당 개체 수가 적어 통계적으로는 유의하지 않지만 ( $p > 0.05$ ), 본 연구에서도 이들 세 가지 사이토크롬 효소들의 fold induction은 동결된 간세포 (GenTest, Cryo)에서 대체로 감소되는 경향을 보였다. 특히 같은 군의 세포를 사용한 Fresh-2와 Cryo-3를 비교했을 때, Cryo-3가 Fresh에 비해 CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 fold induction이 각각 60, 68.5, 47.4%씩 감소되었다. 동결 기술의 향상이 필요할 것으로 사료된다. 상용 동결 간세포인 GenTest™와 Cryo의 P450 fold induction은 유사한 활성을 보였다 (Fig. 3).

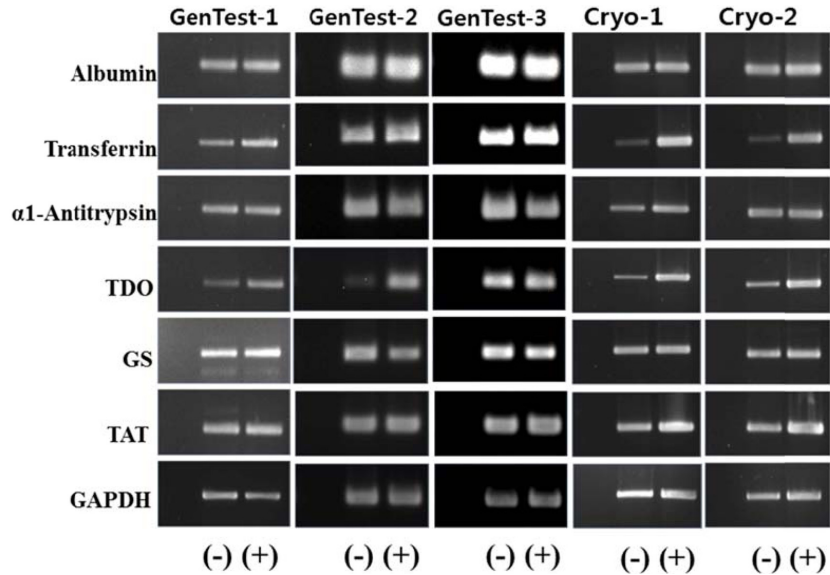
동결에 따른 간세포 특이 유전자발현 변화는 간에서 발현되는 유전자로 알려진 알부민 (albumin), 알파-1 안티트립신 ( $\alpha$ 1- antitrypsin), 글루타민 합성효소 (glutamine synthase, GS), 트랜스페린 (transferrin), 트립토판 디옥시게네이스 (tryptophan 2,3-DiOxygenase, TDO), 타이로신 아미노 트랜스퍼레이스 (tyrosine amino transferase, TAT)의 유전자 발현을 동결되지 않은 인체 간세포 (fresh hepatocyte)를 대조군 (-)으로



**Fig. 3.** Cytochrome P450 fold induction activities of “GenTest™”, commercially available cryopreserved hepatocytes, “Fresh” and “Cryo”, hepatocytes isolated from partial liver tissues in this study. Data are the mean±S.D. of each group.

하여 비교하였다 (Fig. 4). 실험 결과, GenTest-3를 제외한 GenTest-1, GenTest-2, Cryo-1, Cryo-2에서 트랜스페린과 트립토판 디옥시게네이스 유전자 발현양이 대조군 (-)에 비해 감소되어 있는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 간 특이 유전자발현 등 간세포 고유 활성은 인종, 성별, 나이, 기증자의 질환, 간세포 분리 시 허혈시간, 생존율, 배양액 조성, 배양 형태, 동결/해동 등 다양한 조건이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 [14,17]. 또한, 간세포 유전자 발현은 동결 및 해동에 영향을 받지 않고 간세포가 플레이트에 부착한 후에 변화된다고 보고 하고 있다 [18]. 따라서, 동결 간세포의 특이 유전자 발현 변화는 동결 및 해동 자체보다는 세포 고유 특성에 따른 부작용이나 배양 형태의 변화를 통하여 나타나는 것으로 추측된다.

간세포는 단층 형태로 배양할 때 간세포 고유의 특성을 10 일 이내에 대부분 소실하는 것으로 알려져 있다 [19]. 본 연구에서도 일반적으로 약물대사 평가 시에 많이 사용되고 있는 단층 배양법을 적용하여 시험하였고, 따라서 간 특이 활성들도 배양시간에 따라 정도의 차이는 있지만 점차 낮아지게 된

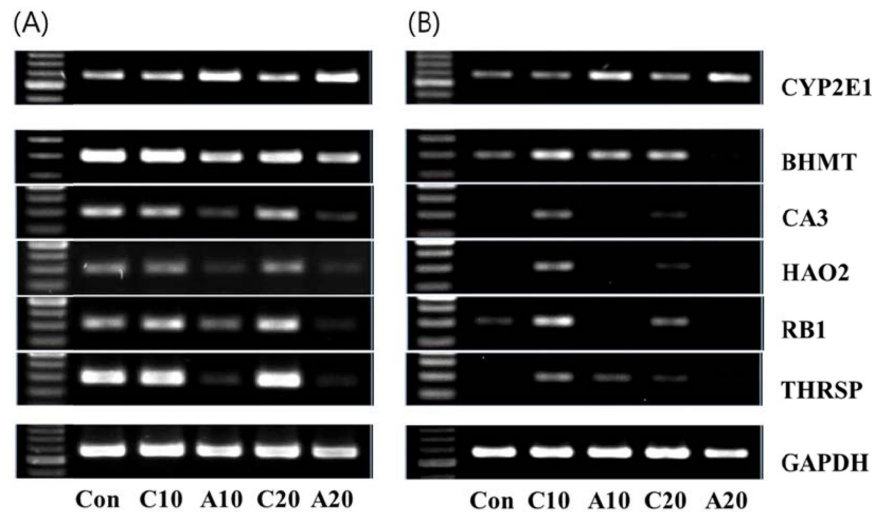


**Fig. 4.** Hepatocyte-specific gene expressions of cryopreserved hepatocytes (GenTest, Cryo) compared with those of fresh hepatocytes. Each sample was analyzed by RT-PCR with primers specific for albumin, transferrin,  $\alpha$ 1-antitrypsin, tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO), glutamine synthase (GS) and tyrosine amino transferase (TAT). Symbol “(-)” means gene expression of fresh hepatocyte and symbol “(+)”, that of GenTest or Cryo.

다. 이러한 이유로 본 연구에서는 해당 세포의 품질을 대표할 수 있는 지표로서 세포 부착율과 배양 초기 (1 day)의 세포 활성을 측정하여 활용성을 평가하였다. 하지만, 새로운 세포 동결보존 방법이나 배양법을 연구하는 경우에는 일주일 이상의 간세포 활성 변화 양상을 비교하는 실험도 필요할 것으로 생각된다.

단층 배양 간세포의 활성 저하 문제를 해결하기 위하여 다양한 장기 (long-term) 배양 방법이 고안되었다. 샌드위치 배양법은 배양플레이트 표면 위 이중으로 되어 있는 세포외기질 두 층 사이에 세포층을 배양하는 형태로써 *in vitro* 상에서

간세포의 고유 특성인 알부민 분비, 요소 합성, 암모니아 제거 및 유전자 발현 등을 단층 배양에 비해 장기간 유지하게 하는 것으로 알려져 있다 [20]. 본 논문에 결과를 나타내지는 않았지만, 본 연구자들의 별도의 배양법 비교 실험에서 샌드위치 배양법으로 20일간의 장기 배양을 통하여 간 기능 변화 양상을 측정해 보았으나 초대배양 간세포와 동결 간세포와의 일관된 차이를 확인할 수는 없었고, 간 기능 저하 양상은 기증 조직마다 다르게 나타났다 (data not shown). 따라서, 동결보존되었던 간세포의 간 기능 활성의 차이를 확인하기 위해서는 좀더 많은 수의 동일 조직 유래 세포에 대해 비교 연



**Fig. 5.** Expression of hepatotoxicity-related genes in fresh hepatocytes (A) and cryopreserved hepatocytes (B) that treated with 10 mM (A10), 20 mM (A20) acetaminophen or solvent only (C10, C20) in culture. Not treated hepatocytes were used for positive control (Con). Each sample was analyzed by RT-PCR with primers specific for CYP2E1, BHMT, CA3, HAO2, RB1, and THRSP.

구를 수행하여야 할 것으로 사료된다.

### 3.3. 약물에 의한 간 독성 유전자 발현

초대 배양 인체 간세포와 동결 보존 인체 간세포간에 유전자 발현의 변화를 확인해 보기 위해 대표적 간 독성 약물인 아세트아미노펜을 10 mM, 20 mM로 각각 처리하여 유전자의 변화양상을 비교해 보았다 (Fig. 5). 그 결과, Fresh와 Cryo 간에 유전자 발현 양상이 유사한 것으로 나타났다. 아세트아미노펜에 의해 유전자 발현이 감소하는 것으로 알려져 있는 BH-MT, CA3, HAO2, RB1, THRSP는 아세트아미노펜을 10 mM (A10), 20 mM (A20)로 처리하였을 때 대조군 (C10, C20)에 비해 해당 유전자의 발현이 감소하였고, 아세트아미노펜을 대사하는 CYP2E1의 경우 유전자 발현이 증가하는 경향을 보였다. 따라서 동결 보존 간세포를 이용한 약리 평가가 가능하다는 것을 확인하였다.

## 4. 결론

본 연구에서는 간 절제수술 시 기증되는 부분 간으로부터 간세포를 분리하고 이를 초대배양한 간세포와 동결 보존한 간세포가 신약개발 등을 위한 전임상 약리 및 독성평가를 하는데 유용하게 사용될 수 있을지 살펴보았다.

그 결과, 간 절제수술 후 기증되는 부분 간으로부터 한 번에 얻을 수 있는 세포의 수는 비록 제한적이지만, 독성 및 약리 평가에 쓰일 만큼의 간세포 수율을 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 분리 동결된 간세포의 알부민 분비, 요소 합성, 압모니아 제거, 싸이토크롬 P450 등 유전자발현 등과 같은 간 기능을 연구용 동결 보존 인체간세포 BD GenTest™와 비교하였을 때, 대조군 초대배양 간세포에 비해 일부 저하된 간 기능을 보이지만 일정 수준 이상을 발현하였고, 현재 약물의 약리 독성 평가 연구로 전세계적으로 사용중인 BD GenTest™와 거의 유사한 수준의 간 기능을 보였다. 이로써 본 연구에서 동결 보존된 간세포가 약물 독성 평가용으로 사용될 수 있음을 확인하였다. 적절한 절차를 거쳐 기증된 수술 후 폐기되는 부분 간은 한국인의 고유 특성을 반영하는 *in vitro* 약물 독성 및 약리 평가 등을 위한 인체 간세포 공급원으로써 사용될 수 있을 것이다.

약물 독성 및 약리 평가 지표가 되는 간세포의 활성은 기증자의 성별, 연령, 질환에서부터 간 조직의 허혈시간, 생존율, 동결/해동, 배양 조건뿐 아니라 약리 독성 평가를 위한 배양 기간 등 다양한 인자들이 영향을 미친다. 각각의 인자들이 약리평가를 위한 간세포의 활성에 어떠한 영향을 끼치는지 좀 더 많은 샘플 수를 확보한 연구가 필요할 것이다.

## 감사

본 연구는 2011년도 식품의약품안전처 용역연구개발과제의

연구개발비 지원 (11182의 안유607)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Ramboer, E., T. Vanhaecke, V. Rogiers, and M. Vinken (2013) Primary hepatocyte cultures as prominent *in vitro* tools to study hepatic drug transporters. *Drug Metab. Rev.* 45: 196-217.
- Katenz, E., F. W. Vondran, R. Schwartlander, G. Pless, X. Gong, X. Cheng, P. Neuhaus, and I. M. Sauer (2007) Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent. *Liver Transpl.* 13: 38-45.
- Nishimura, M., A. Koeda, Y. Suganuma, E. Suzuki, T. Shimizu, M. Nakayama, T. Satoh, S. Narimatsu, and S. Naito (2007) Comparison of inducibility of CYP1A and CYP3A mRNAs by prototypical inducers in primary cultures of human, cynomolgus monkey, and rat hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet.* 22: 178-186.
- Noh, J. K., I. K. Jang, H. E. Kim, J. E. Lee, M. S. Yang, E. M. Jang, J. H. Lee, H. J. Park, Y. A. Kim, S. K. Lee, and D. H. Lee (2012) Quality and availability evaluation of human hepatocytes isolated from rejected partial livers for toxicology and drug metabolism studies in Korea. *Proceedings of Conference of Korean Society of Toxicology.* May 31, Seoul, Korea.
- Kim, K. A., W. K. Song, K. R. Kim, and J. Y. Park (2010) Assessment of CYP2C19 genetic polymorphisms in a Korean population using a simultaneous multiplex pyrosequencing method to simultaneously detect the CYP2C19\*2, CYP2C19\*3, and CYP2C19\*17 alleles. *J. Clin. Pharm. Ther.* 35: 697-703.
- Shin, D. J., J. Kwon, A. R. Park, Y. Bae, E. S. Shin, S. Park, and Y. Jang (2012) Association of CYP2C19\*2 and \*3 genetic variants with essential hypertension in Koreans. *Yonsei Med. J.* 53:1113-1119.
- Ministry of Health and Welfare, Korean Network for Organ Sharing (2013) Annual report of the transplant 2012, pp. 14-15. Korean Network for Organ Sharing, Osong, Korea.
- Aasa, J., Y. Hu, G. Eklund, A. Lindgren, P. Baranczewski, J. Malmquist, D. Turek, and T. Bueters (2013) Effect of solvents on the time-dependent inhibition of CYP3A4 and the biotransformation of AZD3839 in human liver microsomes and hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 41: 159-169.
- Seglen, P. O. (1972) Preparation of rat liver cells: effect of Ca<sup>++</sup> on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Cell Res.* 74: 450-454.
- Oh, K. T., C. J. Ahn, B. M. Ahn, B. H. Hyun, J. Y. Choi, and H. M. Kim (1992) Primary culture of human hepatocytes from small size sample. *Korean J. Toxicol.* 8: 285-302.
- Kim, H. M., S. B. Han, B. H. Hyun, C. J. Ahn, Y. N. Cha, K. S. Jeong, and G. T. Oh (1995) Functional human hepatocytes: isolation from small liver biopsy samples and primary cultivation with liver-specific functions. *J. Toxicol. Sci.* 20: 565-578.
- Lee, D. H., H. H. Yoon, J. H. Lee, K. W. Lee, S. K. Lee, S. K. Kim, J. E. Choi, Y. J. Kim, and J. K. Park (2004) Enhanced liver-specific functions of endothelial cell-covered hepatocyte heterospheroids. *Biochem. Eng. J.* 20: 181-187.



13. Jang, W. H., H. I. Kim, W. J. Lee, J. S, C. S. Choi, Y. K. Choi, H. C. Young, K. H. Kim, J. I. Park, K. W. Kim, and Y. I. Yang (2009) Intracellular-type cryopreservation solution improves the cryopreservation outcome of primary human hepatocytes. *Tissue Eng. Regen. Med.* 6: 909-915.
14. Terry, C., R. R. Mitry, S. C. Lehec, P. Muiesan, M. Rela, N. D. Heaton, R. D. Hughes, and A. Dhawan (2005) The effects of cryopreservation on human hepatocytes obtained from different sources of liver tissue. *Cell Transplant.* 14: 585-594.
15. Hewitt, N. J., M. J. Lechón, J. B. Houston, D. Hallifax, H. S. Brown, P. Maurel, J. G. Kenna, L. Gustavsson, C. Lohmann, C. Skonberg, A. Guillouzo, G. Tuschl, A. P. Li, E. LeCluyse, G. M. Groothuis, and J. G. Hengstler (2007) Primary hepatocytes: Current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metabolism Reviews.* 39: 159-234.
16. Li, A. P., C. Lu, J. A. Brent, C. Pharm, A. Fackett, C. E. Reugg, and P. M. Silber (1999) Cryopreservation human hepatocytes: Characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. *Chem. Biol. Interact.* 121: 17-35.
17. Gomez-Lechon, M. J., M. T. Donato, J. V. Castell, and R. Jover (2004) Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr. Drug Metab.* 5: 443-462.
18. Richert, L., M. J. Liguori, C. Abadie, B. Heyd, G. Manton, N. Halkic, and W. F. Waring (2006) Gene expression in human hepatocytes in suspension after isolation is similar to the liver of origin, is not affected by hepatocyte cold storage and cryopreservation, but is strongly changed after hepatocyte plating. *Drug Metab. Dispos.* 34: 870-879.
19. Sakai, Y., S. Yamagami, and K. Nakazawa (2010) Comparative analysis of gene expression in rat liver tissue and monolayer and spheroid-cultured hepatocytes. *Cell Tissues Organs* 191: 281-288.
20. Dunn J. C, R. G. Tompkins, and M. L. Yarmush (1991) Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol. Prog.* 7: 237-245.