

Rat Primary Hepatocyte의 2차원 배양과 3차원 배양에 따른 생리 활성능과 대사능에 관한 연구

임맑음*, 김영지*, 신유리안나, 오건봉, 황성수, 김영임, 허태영, 옥선아†

농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과

Evaluation of primary hepatocyte function using 2D or 3D culture method for primary rat hepatocytes

Malgum Lim*, Yeongji Kim*, Yurianna Shin, Keon Bong Oh, Seongsoo Hwang, Youngim Kim, Tai-Young Hur, Sun A Ock†

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, 1500, Kongjwipatjwi-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do, (55365) Republic of Korea

ABSTRACT

There is a growing interest in the application of primary hepatocytes for treatment of liver diseases in humans and for drug development. Several studies have focused on long-term survival and di-differentiation blocking of primary hepatocytes in an in vitro culture system. Therefore, the present study also aimed to optimize an in vitro culture system using primary rat hepatocytes. Primary rat hepatocytes from 6-week-old male Crl:CD rats were isolated using a modified two-step collagenase perfusion. Healthy 3.5×10^6 primary rat hepatocytes were seeded into a 2 dimensional (2D) culture in a 25T culture flask coated with collagen type I or into a 3D culture in a 125-ml spinner flask for 7 days. Production of plasma protein (*ALB* and *TF*), apoptosis (*BAX* and *BCL2*), and *CYP* (*CYP3A1*) related genes were compared between the 2D and 3D culture systems. The 3D culture system had an advantage over the 2D system because of the relatively high expression of *ALB* and low expression of *BAX* in the 3D system. However, the level of *CYP3A1* did not improve in the 3D culture with and without the presence of a dexamethasone inducer. Therefore, 3D culture has an advantage for albumin production and primary rat hepatocyte survivability, but a low expression of *CYP3A1* indicated that primary rat hepatocytes require a high - density culture for stress reduction by continuous flow.

(Key words: Rat, Primary hepatocyte, 3D culture system, *CYP3A1*)

서 론

간은 탄수화물 대사, 아미노산 및 단백질 대사 지방 대사, 비타민 및 무기질 대사 해독 작용 및 살균 작용 등 다수의 대사작용 등 여러 가지의 중요한 기능을 담당 하고 있다(Maria Shulman 등, 2013). 그러므로 간질환이 발생하게 되면 인체에 치명적인 영향을 미치게 된다 이 경우 간 이식만이 유일한 해결 방법이지만 공여간은 턱없이 부족하며 비용이 많이 들 뿐만 아니라 거부반응이란 잠재적 위험이 따른다(Nyberg 등, 2000). 간 이식의 대체방법으로는 인공간 시스템 또는 간세포 이식이 있다(Allen 등, 2001; Xiao-Lei Shi 등, 2016). 생인공간

은 간 부전환자의 혈장을 분리한 후 간세포를 고농도로 충전된 반응기로 처리하여 환자에게 되돌려주어 환자의 간기능 회복을 돕는 시스템이다 따라서 우수한 성능의 생인공간을 개발하기 위해서 간세포가 간 기능 활성을 지속적으로 유지하는 배양법을 개발하는 것이 요구된다(Lee 등, 2004).

간세포는 부착의존성 세포로서 2-dimemsion(2D)배양 할 경우 collagen, 라민, 젤라틴 등과 같은 다양한 extra cellular matrices(ECM)에서 배양이 필수적이며 특히 collagen type 1 에서 가장 좋은 효율을 보이는 것을 알려져 있다(Rajan 등, 2006). 이렇게 배양된 간세포는 간 기능평가를 위해서 약물대사에 중요한 drug-metabolizing cytochrome P450 enzyme

* 두 사람은 공동 주 저자로 기여한 바가 같다

† Correspondence: Sun-A Ock, PhD

Tel: +82-63-238-7255

E-mail: ouksuna@hotmail.com, ocksa@korea.kr

(CYPs)들이 주로 평가된다 CYPs는 사람에서 500여개의 subspecies가 존재하고, 스테로이드와 xenobiotic metabolism을 촉진하고 몸의 항상성을 유지하는데 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Gomez 등, 2010; Godoy 등, 2013; Soldatow 등, 2013; Maruyama 등, 2016). 사람의 경우 CYPs 중 CYP3A4가 일반적인 약물 대사의 약 50%를 대사하는 것으로 알려져 있다. 실험동물인 랫트의 경우 마우스에 비해 상대적으로 큰 크기의 간과 쉬운 핸들링으로 간세포 추출 및 간세포 배양의 기본연구에 사용되고 있다(Wu 등, 1995). 랫트의 경우 CYPs로 CYP3A1이 사람의 CYP3A4와 유사한 기능을 하는 것으로 알려져 있고, 간의 기능을 평가하기 위한 항목으로 주로 사용된다(Zuber 등, 2002; Wójcikowski 등, 2012).

대부분의 간세포의 경우 부적절한 *in vitro* 환경 조건으로 *in vitro*에서 2D 배양시 2일내로 알부민과 CYPs의 기능이 소실되어 탈분화가 일어나는 것으로 알려져 있다(Chenxia 등, 2015; Kegel 등, 2016), 이러한 문제점을 개선하기 위하여 *in vivo* 환경과 유사한 spinner flask(Sung Mun Yang 등, 2000)나 concave micro molds(Da Yoon No 등, 2012) 등을 이용한 3 dimension(3D)배양이 시도되고 있다. 3D 환경에서 배양된 간세포는 구상체를 형성하여 밀착 연결이나 체내 간소엽 조직과 유사한 구조를 이루어 형태학적인 측면이나 생존력 간 특이 기능의 활성 측면에서 2D 보다 우수하다고 알려져 있다(Landry 등, 1985; Koide 등, 1990). 그러나 3D 배양의 문제점은 3D 배양을 위해 사용된 장비에 의해 발생하는 지속적인 유속 때문에 세포에 스트레스가 유발되는 것이며 이것의 감소를 위해서 고농도 세포 배양이 추천되고 있다 따라서 대부분의 선행 실험들은 동일한 실험 조건하에서 2D와 3D의 배양 환경을 비교하지 못하였다

이 연구에서는 *in vitro*에서 장기간 안정적으로 간세포를 배양하는 방법을 찾기 위하여 쉽고 간편한 일차 간세포 분리 방법을 확립하고, 동일한 세포 농도에서 2D 혹은 3D 배양 방법에 따른 일차 간세포의 간세포 표지 인자의 발현 세포의 생존능 및 간 기능 대사평가를 Real-time PCR을 통해 검증하였다. 또한 CYP3A1의 inducer인 dexamethasone을 처리하여 간 기능을 평가 하였다

재료 및 방법

1. 시약 및 배양액

간세포의 분리에 사용된 모든 배양액은 Gibco(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, 별도로 표시된 경우가 아니면 모든 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 간세포 분리를 위한 배지로 5% fetal bovine serum(FBS)이

첨가된 Liver Perfusion Medium(1x)로 관류를 하였고, 간세포를 해리시키기 위하여 Liver Digest Medium(1x), 세포를 세척하는 과정에는 Liver Wash Medium(1x)가 사용되었다. Hepatocyte maintenance media (HMM)는 Williams' media에 10% FBS와 Hepatocytes maintenance supplement, 0.1 μ M Dexamethasone (Dex), 1x antibiotic antimycotic(Gibco, Grand Island, NY, USA)가 첨가되었고, 5% CO₂ 항온항습기에 overnight시켰다.

2. 간세포 분리

6주령의 수컷 Crl:CD(SD)Rat(Charles River; 오리엔트 바이오, 서울) (170~200 g, 오리엔트) 5두가 간세포 분리에 사용되었다. 랫트는 Avertin(300 mg/kg)을 복강 투여하여 마취 시킨 후 개복하여 간문맥에 카테터(24 G)를 삽입하고, 하대정맥을 절단하여 방혈 후 정맥을 수술용 실(KRUUSE PGA, Polyglycolic Acid, Absorbable Suture, Langeskov, Denmark)로 묶어 배양액이 흘러 나가지 못하도록 하였다 또한 심장 위의 상대정맥에 카테터(24 G)를 삽입하여 간문맥으로 들어간 배양액이 나오도록 시술하였다. 일차 간세포의 분리 과정은 collagen 효소를 사용한 Two-step collagenase perfusion 방법을 약간 변형하여 사용하였다(Selgan, 1976; Knobloch 등 2012). 배양액은 일차적으로 Liver Perfusion Medium 250 ml을 약 15분 간 통과시켜 혈액을 세척하고 응고를 방지 하였다 그 다음 Liver Digest Medium 250 ml을 약 12분간 통과하여 간의 기질을 분해시켰다 Liver Digest medium 투입 후 간이 부풀어 오르면서 시간이 지남에 따라 흐물흐물하게 되며, 관류가 끝난 뒤 간을 떼어 Liver Wash Buffer가 담겨있는 150 mm dish 위에 올려놓고 핀셋을 이용하여 피막을 벗겨냈다 그 후 tissue grinder(Chemglass life science LLC, Vineland, NJ, USA)와 pore size 100 μ m와 40 μ m의 strainer(Corning, NY, USA)를 차례로 여과 시켜 세포 혼탁액을 회수하였다. 세포 혼탁액을 원심분리기에서 57 x g로 2분간 원심 분리한 후, 세포들을 회수하였다 세포들을 Williams' media로 재현탁 후 한번 더 원심 분리하여 세포에 있는 부유물들을 제거해 줬다. 회수된 세포 pellet은 15 ml conical tube에 옮겨져 6 ml의 Williams' media 로 현탁 되었고, 추가로 4 ml의 10x PBS가 첨가된 90% percoll을 섞어 200 x g로 7분간 4°C에서 원심 분리하여 바닥에 살아있는 분리된 간세포를 회수하였다(Lecluyse와 alexander, 2010). 최종적으로 회수된 세포는 Williams' media로 수세하여 trypan blue exclusion test로 살아있는 세포 수를 측정하였다

3. 간세포의 배양

일차 간세포의 배양은 2D 혹은 3D 배양으로 배양되었다. 2D 배양을 위해서는 collagen type I 이 코팅된 25T flask(Corning®

BioCoat™ Cellware, Collagen Type I, Tewksbury, MA, USA)가 사용되었고, 3D 배양을 위해서는 125 ml spinner flask(Corning, NY, USA)가 사용 되었다(Fig. 1). 2D 와 3D 배양을 위해서 간에서 막 분리된 신선한 3.5×10^6 개의 일차 간세포가 각각 seeding되었다. 2D 배양의 경우 관례적인 평판배양법에 따라 배양되었다. Spinner flask의 배양액은 50 ml을 사용 하였고, Spinner flask의 양쪽에 위치한 cap은 산소공급을 원활히 하기 위하여 잠그지 않고 덮어 두는 형태로 multi stirrer의 위에서 120 rpm으로 배양 되었다(Fig. 1). 3D 배양의 경우 세포의 형태의 관찰을 위하여 매일 50ul의 세포 현탁액을 채취하여 현미경 아래에서 형태학적 변화를 분석 하였다. 2D와 3D 세포배양을 위한 배양액은 이틀에 한번씩 충분히 산소가 포화된 신선한 HMM으로 교체 되어 7일간 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터 속에서 배양되었다

4. 면역 형광 염색

면역 형광 염색을 위해 collagen coated chamber slide (Corning, NY, USA)에 2.5×10^4 cell가 농도로 하루 동안 세포를 부착 시키고 formalin solution 10%, neutral buffer에 고정한 후, 0.1% triton X-100, 1% BSA가 첨가된 PBS(PBST)를 사용하여

3회 세척하였다. 최종적으로 30분 동안 이 용액에 침전하여 세포의 투과성을 증가시키고, blocking을 유도하였다. 이 후 1차 항체인 Goat anti-albumin IgG(희석 배수, 1:100)과 Rabbit anti-transferrin IgG(희석 배수, 1:100)를 1시간 동안 room temperature(RT)에서 반응시켜 주었고 15분간 3회 세척 뒤 각각 Donkey anti-goat IgG-FITC(희석 배수, 1:200)와 항체 Goat anti-rabbit IgG-FITC(희석 배수, 1:200)를 1시간 동안 RT에서 반응 시켜 주었다. 그 후에 PBST로 15분간 3회 세척 뒤 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride(DAPI)로 핵을 대조 염색하여 VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)로 봉입 하고, 형광 현미경(Leica DMI 6000B, Wetzlar, Germany) 아래에서 녹색은 특이 단백질의 positive reaction으로 판단하였고, 블루는 핵으로 판단하였다

5. Dexamethasone(Dex)을 이용한 CYP3A1 유도

분리된 3.5×10^6 개의 일차 간세포를 각각 25T flask와 spinner flask에 hepatocyte maintenance media를 이용하여 seeding 하였으며 24시간이 지난 뒤 10uM Dex이 처리된 HMM으로 교체 하여 48시간 동안 CYP3A1를 유도하였다(Lu

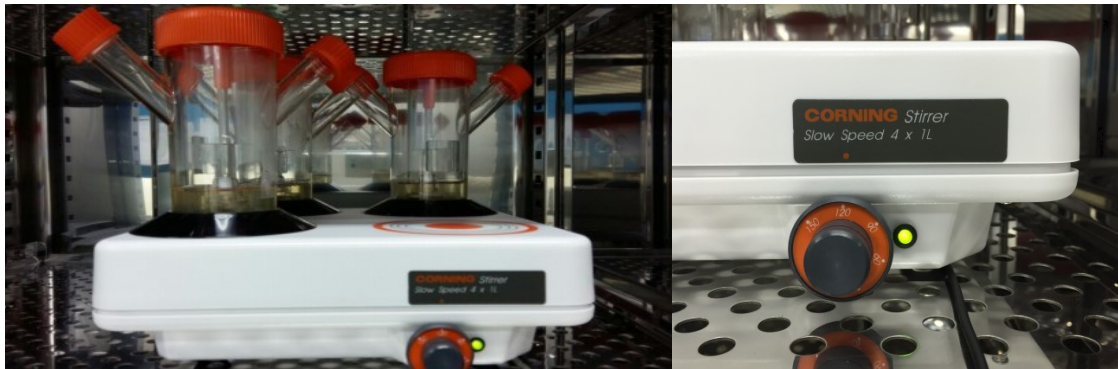


Figure 1. Equipment used for 3D culture of primary rat hepatocytes.

Table 1. Primer sequences used for real-time PCR

Gene	Primer sequence	Size	GenBank accession number
<i>ALB</i>	5'-AACAGACCTCACCAAAATCAACAA-3' 5'-ATCCGCGCATTCCAACA-3'	61	NM_134326.2
<i>TF</i>	5'-AGCCTTTGTGAAGCACCAGACT-3' 5'-AGCCCATGCAGCAGTGTCT-3'	64	NM_001013110.1
<i>BAX</i>	5'-CAGGACA1CCACCAAGA-3' 5'-CCAGTTCATCGCCAATTTCG-3'	58	U32098.1
<i>BCL2</i>	5'-TGGGATGCCTTTGTGGAAC-3' 5'-AGACTGCCAGGAGAAATCAAACA-3'	66	U34964.1
<i>CYP3A1</i>	5'-GAGGCAAGAGAAAGGCAAACC-3' 5'-TCCATGCTGTAGGCACCAA-3'	60	NM_013105.2
<i>GAPDH</i>	5'-CCTGGAGAAACCTGCCAAGTAT-3' 5'-CTCGCCGCCTGCTT-3'	58	NM_017008.4

와 Li, 2001; Wójcikowski 등, 2012).

6. 유전자 정량분석(Real-time PCR)

세포의 total RNA는 RNeasy mini kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사 방법에 준하여 추출되었다. 추출된 RNA 500 ng 과 Omniscript Reverse Transcriptase(QIAGEN, Hilden, Germany), 10× RT buffer, dNTP mix, RNase inhibitor, oligo dT를 이용하여 37°C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 StepOnePlus Real-Time PCR System(Agilent Technology, Santa Clara, USA)을 이용하여 SYBR Green master mix (Applied Biosystems, CA, USA)을 사용하여 수행하였으며 Specific gene 분석을 위해 사용된 primer sequence는 Table 1에 나타내었다. 유전자 발현의 상대적 정량은 ΔCt 값을 계산하고 난 다음 $\Delta\Delta Ct$ 값을 구하여 relative quantity(RQ) 값으로 계산하였다. 실험은 모두 5 반복으로 수행되었다. Internal control은 *GAPDH*를 사용하였고 간 기능 특이 유전자(*ALB*과 *TF*), 약물대사에 중요한 유전자(*CYP3A1*), 세포 사에 관여된 유전자들(pro-apoptosis인 *BAX*, anti-apoptosis인 *BCL2*) 분석 하였다. Real-time PCR 완료 후 최종산물은 전기영동을 실시하여 특이적으로 증폭을 검증하였다.

이 실험을 위해 사용된 대조군은 특별한 언급이 없는 한 랫트의 간으로부터 분리되고 회수된 직후의 일차 간세포의 total RNA가 사용되었다.

7. 통계 처리

본 연구에서 수행된 mRNA 발현 분석은 5회 반복하였으며 통계프로그램은 Statistical Package for the Social Sciences(SPSS, IBM)을 이용하여 One-way ANOVA에 의해 사후검증-다중비교(Tukey)에 의해 평균 간 차이를 $p < 0.05$ 의 수준에서 유의성을 분석하였다. 실험 결과 값은 relative quantification(RQ)로 오차바는 $RQ \pm \min$ 과 $RQ \pm \max$ 로 나타내었다.

결 과

1. 랫트 간으로부터 얻어낸 Hepatocyte의 형태학적 분석

변형된 Two-step collagenase perfusion 방법을 사용하여 6주령의 170~200 g 랫트의 간으로부터 평균 $\sim 1.48 \times 10^7$ 개의 일차 간세포를 회수 할 수 있음을 확인하였다. 일차 간세포를 2D 혹은 3D로 7일간 체외 배양시 2D의 조건 아래에서 배양된 간세포들은 다각형의 모양을 하고 있으며 세포질이 뚜렷하고 간세포 특유의 bipolar nucleus의 특성을 보였다(Fig. 2A). 또한 DAPI 염색시에도 핵의 명확한 bipolar nucleus 형태를 확인 할 수 있었다(Fig. 2A). 3D 배양조건 아래에서 배양된

간세포는 1일째부터 단일 세포들이 서로 엉겨 붙어 구상체를 형성하며 구상체의 크기가 시간이 지남에 따라 증가 함을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

2. 면역 형광 염색에 의한 간세포 검증

분리 회수된 일차 간세포가 정상적인 간세포임을 검증하기 위하여 간세포에서 주요하게 발현되는 단백질인 Albumin과 Transferrin 단백질의 발현을 확인 하였다(Fig. 3). 2D 배양 조건아래에서 회수 후 24시간 동안 부착된 일차 간세포는 Albumin과 Transferrin의 각 특이 항체에 표지된 녹색 형광이 세포질에서 발현되었고 특히 핵막 주변에서 강하게 발하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 분리된 세포가 정상적인 간세포임을 확인할 수 있었다.

3. 체외 배양 조건에 따른 일차 간세포의 생리학적 특성 분석

2D와 3D 배양 조건 아래에서 7일간 배양된 일차 간세포의 hepatic marker인 *ALB*와 *TF*의 mRNA 발현량을 분석하였다(Fig. 4A). *ALB*의 경우 대조군(RQ=1)과 비교하여 7일째 2D 배양(RQ=0.011)과 3D배양(RQ=0.029)모두에서 발현량이 유의적으로($p < 0.05$) 급격하게 감소하였다. 2D와 3D를 비교하였을 때는 2D가 유의적으로($p < 0.001$) ~3배가 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4Aa). *TF*의 경우 대조군(RQ=1)과 비교하여 7일째 역시 2D배양(RQ=0.143)과 3D배양(RQ=0.138) 모두에서 발현 양이 유의적으로($p < 0.001$) 감소 하였고, 2D배양과 3D배양 간에는 유의성이($p < 0.001$) 없었다(Fig. 4Ab).

Real-time PCR의 산물들은 전기영동을 통해 gel image의 분석을 통해 *ALB*와 *TF*의 검출이 모든 군에서 확인 되었다(Fig. 4C).

4. 체외 배양 조건에 따른 일차 간세포의 생존능

2D와 3D 배양 조건 아래에서 7일간 배양된 일차 간세포의 생존능을 확인하기 위해 세포사와 관련pro-apoptosis의 *BAX*와 anti-apoptosis의 *BCL2*의 mRNA 발현량을 확인 하였다(Fig. 4B). *BAX*의 경우 대조군(RQ=1)과 비교하여 실험군들인 2D(RQ=3.249)와 3D(RQ=1.945)배양 모두에서 유의적인($p < 0.001$) 증가를 확인하였다. 2D와 3D배양을 비교하였을 때는 2D배양에서 ~1.7배의 유의적인($p < 0.001$) 증가가 확인 되었다(Fig. 4Ba). *BAX*의 경우도 역시 대조군에 비하여 실험군인 2D(RQ=8.501)와 3D(RQ=9.459)배양 모두에서 유의적인($p < 0.001$) 증가가 확인되었다. 2D와 3D배양을 비교하였을 때는 유의성($p < 0.05$)이 없었다.

Real-time PCR의 산물들은 전기영동 후 gel image의 분석 결과 통해 *BAX*와 *BCL2*의 검출이 모든 군에서 확인 되었다(Fig. 4C).

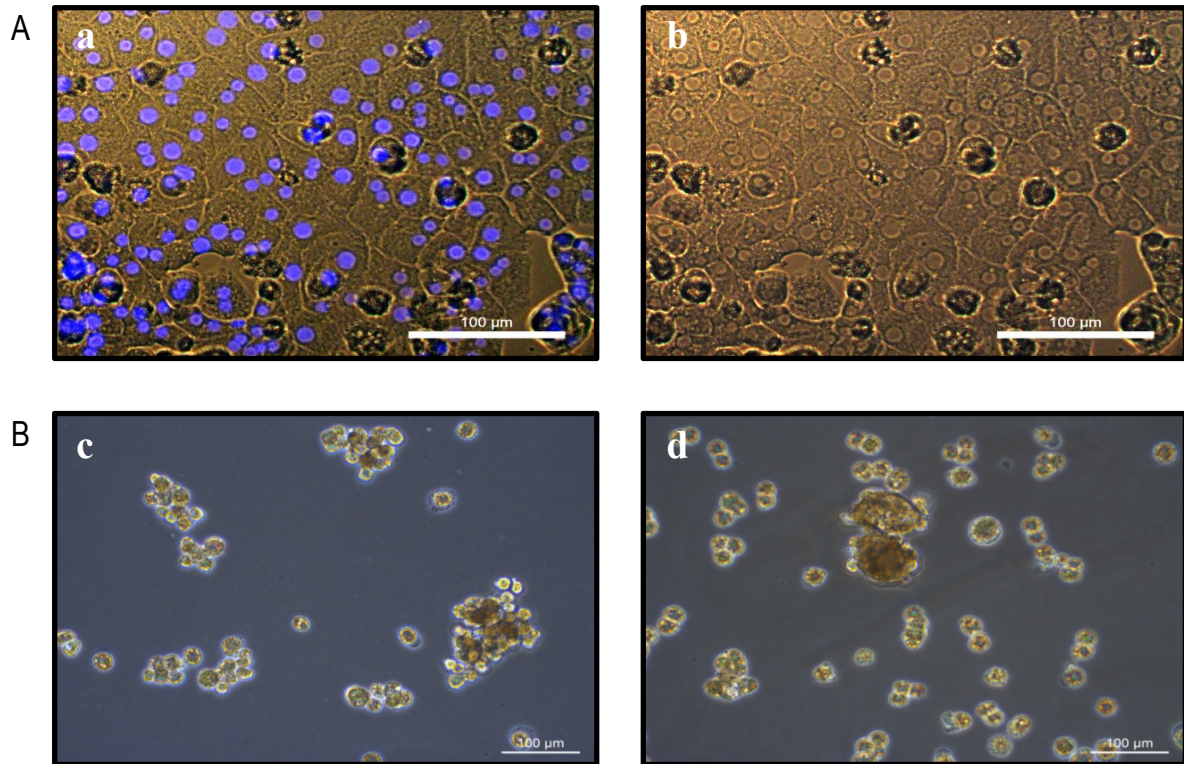


Figure 2. Primary rat hepatocytes were cultured in a 2D (A) or 3D (B) culture in a 25T flask and a 125-ml spinner flask, respectively. Aa and Ab indicate the nuclei are stained with and without DAPI, respectively. Ba and Bb indicate aggregated primary hepatocytes. Scale bars = 100 μ m

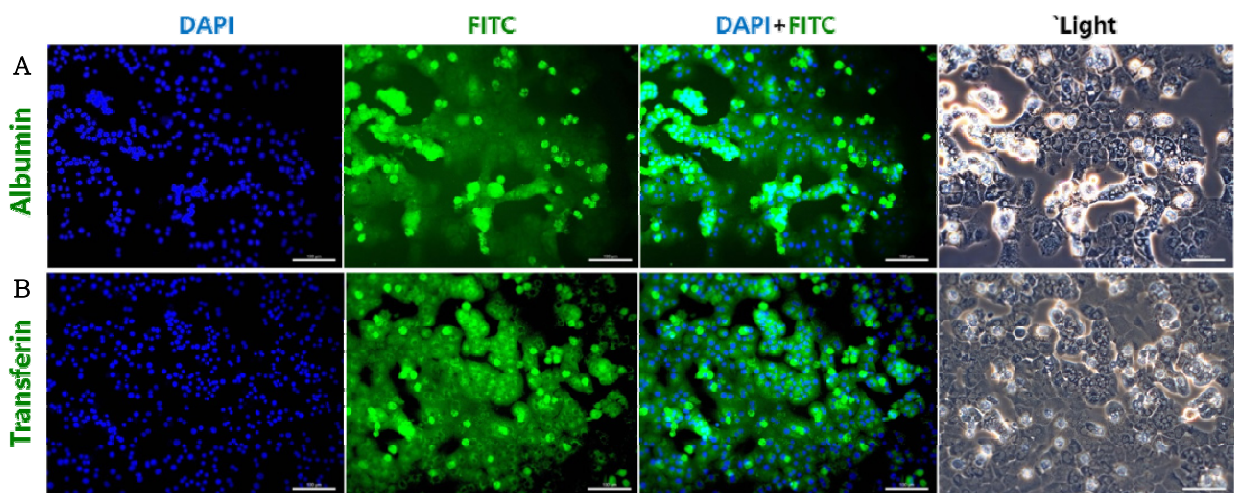


Figure 3. The expression of hepatic marker proteins in primary rat hepatocytes. A and B indicate the expression of albumin and transferrin, respectively. Positive reactions of specific proteins appear green, and the nuclei are stained blue. Scale bars= 100 μ m.

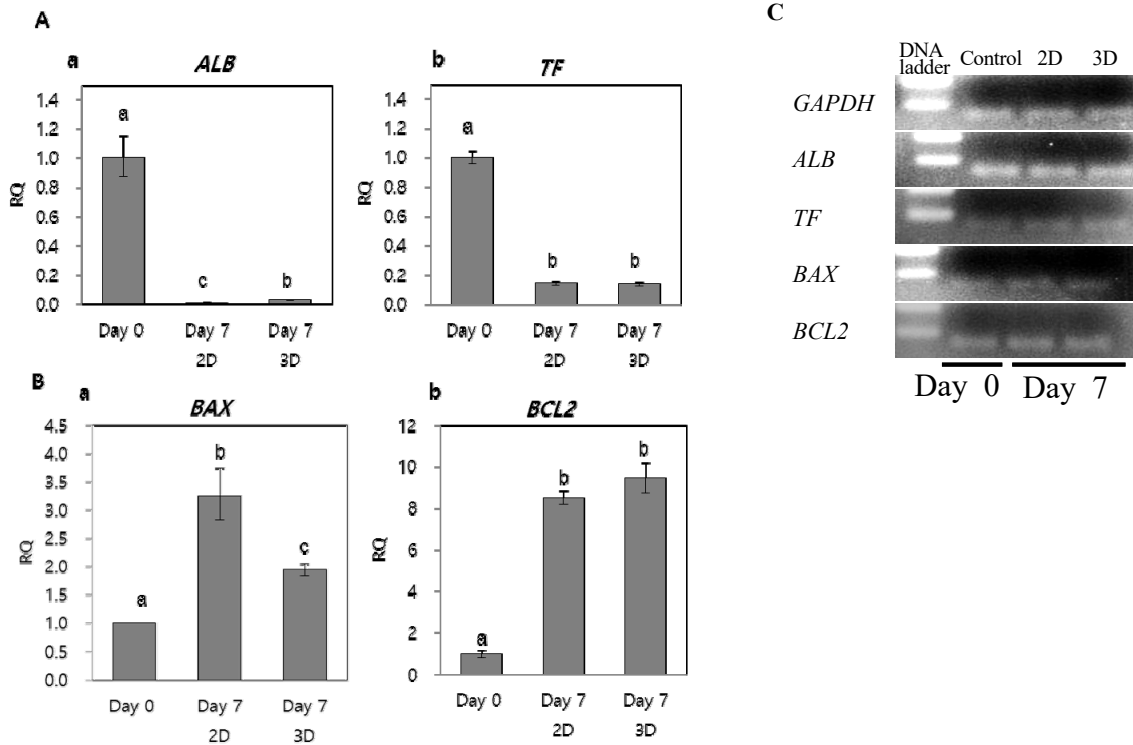


Figure 4. Expression of hepatic marker genes and apoptosis-related genes of primary hepatocytes cultured in different culture methods. A and B show real time PCR results for the expression of hepatic marker genes (a, *ALB*; b, *TF*) and apoptosis-related genes (a, *BAX*; b, *BCL2*), respectively. C is a gel image of products of the real time PCR. Different letters indicate statistical differences (^{a-c} $p < 0.05$). Values were determined from 5 replicates.

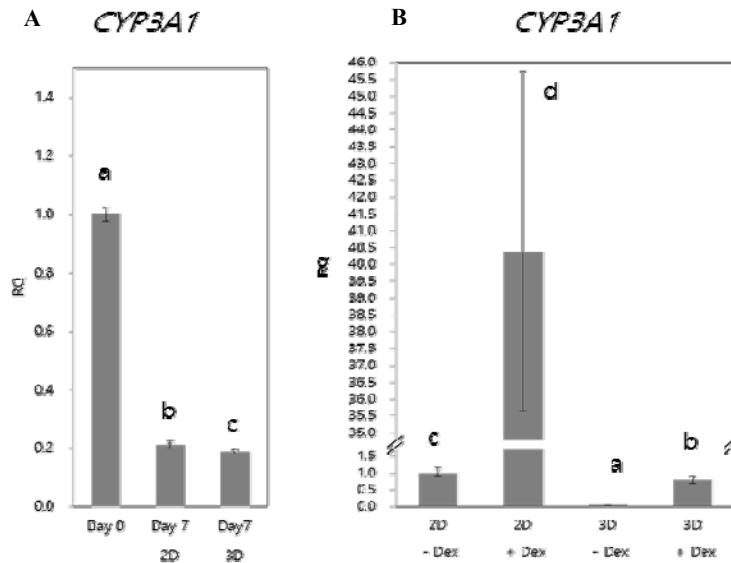


Figure 5. Expression of *CYP3A1* in primary hepatocytes treated with and without Dex. A shows mRNA expression of *CYP3A1* on day 7. B shows mRNA expression of *CYP3A1* on day 3 in primary hepatocytes treated with Dex for 48 hrs. Different letters indicate statistical differences (^{a-c} $p < 0.05$). Values were determined from 5 replicates.

5. 체외에서 배양된 일차 간세포에서 *CYP3A1* 발현

2D와 3D 배양 조건 아래에서 7일간 배양된 일차 간세포의 *CYP3A1*의 발현을 분석하였다(Fig. 5A). 2D(RQ=0.211)와 3D(RQ=0.188)배양 모두에서 유의적인($p < 0.05$) 감소가 확인되었고, 2D와 3D 배양을 비교하였을 때 3D에서 유의적($p < 0.05$) 감소가 확인 되었다(Fig. 5A). 추가로 2D와 3D 배양조건 아래에서 48시간 동안 Dex이 처리된 군들에서 *CYP3A1*의 발현을 분석하였다(Fig. 5B). 대조군으로는 3일 째의 2D 조건 아래에서 Dex의 무 처리군을 사용하였다. 2D+DEX(RQ=40.380)는 대조군(RQ=1)과 비교하여 40배 이상의 유의적($p < 0.001$) 증가를 보였지만 3D+DEX(RQ=0.784)는 유의적($p < 0.001$) 감소가 확인되었다. 비록 3D 배양조건아래에서도 Dex처리군은 무처리군(RQ=0.039)보다 *CYP3A1*의 발현을 20배 유의적으로 증가를 보였지만 2D 배양 조건보다는 극도로 낮은 활성을 나타내었다

고찰

이 연구는 간부전환자의 간 부족 문제를 해결하기 위한 대안으로 *in vitro* 생인공간 개발과 환자들의 신약 개발을 위한 약물대사평가를 위해 쉽게 간세포를 추출하고 간 기능이 최대한 유지되는 일차 간세포를 배양방법을 개발 하는 것이었다. 실험 모델로 비교적 조작이 쉬운 랫트를 사용하여 간단한 two-step collagenase perfusion 방법을 이용하여 마리당 건강한 3×10^7 개의 일차 간세포를 회수 할 수 있었다 이렇게 회수된 일차 간세포의 정상적인 간에서 발현되는 특이 단백질의 발현을 확인 하였고, 동일한 세포 수 조건아래에서 2D배양조건과 3D 배양시 일차 간세포의 기능을 규명하였다

Two-step collagenase perfusion 방법을 이용하여 회수된 일차 간세포는 collagen type 1이 코팅된 2D 배양 조건 아래에서 간세포의 전형적 특징인 배양상피세포와 유사한 다각형의 형태를 유지하였고 이것은 앞서 보고된 결과들과도 일치하여 정상적으로 건강하게 분리 되었음을 확인할 수 있었다 (Knobeloch 등, 2012; Schyschka 등, 2013). 이렇게 회수된 일차 간세포는 체외에서 같은 세포수로 3D 배양 혹은 2D 배양 조건으로 배양되었다. 일반적으로 성숙한 간세포의 경우 10-14일 이상 생존과 증식 이 불가능함이 알려져 있고 (Knobeloch 등, 2012), 우리의 결과도 거의 일치 하였다 왜냐하면 동일한 세포수로 다른 2가지 조건 아래에서 배양된 일차 간세포는 배양 조건과 상관없이 배양 7일째에 대부분의 *ALB*와 *TF* 유전자의 현저한 감소로 하였기 때문이다 간에서 대표적으로 생산되어 분비되는 물질인 Albumin은 *ALB* 유전자에 의해 분비되고 전체 단백질의 주요 구성성분이며 간 부

전 상태에 도달하면 Albumin수치가 감소하는 것으로 알려져 있다(Hu 등, 2016). 또 다른 *TF* 유전자에 의해 분비되는 transferrin은 간에서 생성되어 혈액에서 철과 결합하여 몸의 필요한 곳으로 보내주는 기능을 하는 주요 단백질이다 (Giada Sebastiani와 Ann P Walker, 2007). 따라서 이 두 단백질은 간세포의 기능을 나타내는 대표적인 단백질이라 할 수 있겠다 연구에서는 3D 조건이 2D 조건 보다 약간의 *ALB*의 발현량 감소가 적었지만 97% 이상의 감소로 3D 배양 조건도 체외배양의 한계점을 극복하기에는 미흡함을 확인 할 수 있었다 일차 간세포의 생존능에서도 2D 배양조건 보다 3D 배양조건이 pro-apoptosis 유전자인 *BAX*의 낮은 발현을 보여 유리함을 확인할 수 있었다. 이 연구에서 3D 배양이 pro-apoptosis 유전자의 낮은 발현과 *ALB*의 발현 감소폭이 줄어든 이유는 아마도 선행연구의 보고처럼 specific transporters, tight 와 gap junction에 의한 세포간 소통, 모세담관의 형성과 같은 기능이 3D 배양조건아래에서 비록 완벽하지는 않지만 일부 발생되어 나타난 현상으로 생각된다(Berthiaume 등 1996; Yang 등, 2000; Godoy 등, 2013).

간의 대표적인 기능은 탄수화물대사 혈장 단백질 생산 CYPs 발현이다 (Godoy 등, 2013). 이중 우리는 신약 개발을 위해 필요한 약물대사에 관여하는 CYPs 발현을 검증 하였다. CYPs 중 약물대사의 주요한 부분에 관여하는 것은 사람에서는 CYP3A4로 알려져 있으며 랫트는 비록 사람과 약간 다른 CYPs 기능을 가지지만 유사한 기능을 가지는 것이 CYP3A1로 알려져 있다. 현재 연구에서는 CYP3A1을 분석하였지만 기대와 달리 체외에서 7일간 배양시 3D 배양조건도 2D 배양 조건 이상으로 현저한 감소를 보였고 랫트에서 CYP3A1의 활성을 유도하는 유도제로 알려진 Dex의 처리시에도 3D 배양 조건이 2D 배양 조건보다 상대적으로 매우 낮은 활성을 보임을 확인할 수 있었다. 그러나 대부분의 선행 연구들은 3D 배양을 통해 hepatocytes의 약물 대사능에 관여된 CYPs들이 2D 배양 보다 증가 하였다고 보고 하였다(Schyschka 등, 2013). 이런 다른 결과의 원인은 대부분의 3D 배양의 문제점으로 알려진 지속적인 배양액의 유속으로 인한 스트레스와 양분과 산소 흡수의 저하를 극복 하기 위한 고농도의 세포 배양 조건을 충족하지 못한 것이 원인으로 추정된다 왜냐하면 이 실험에서는 2D 조건과 최대한 동일한 조건아래에서 비교하기 위하여 125 ml spinner flask 속에 3.5×10^6 개의 일차 간세포를 배양하였지만, Wu 등 은 250 ml spinner flask 속에 3×10^7 개의 일차 간세포를 배양하여 약 4배 이상의 고 농도로 배양 하였기 때문이다(Wu 등, 2015). 따라서 최근에는 이러한 3D 배양의 단점을 보완한 기계들과 새로운 3D 환경 유지를 위한 metrics가 개발 되고 있다

현재 연구에서는 이상의 결과들을 통해서 체외에서 손쉽게

일차 간세포를 분리 할 수 있음을 보여 주었고 2D와 3D 배양 조건아래에서 일차 간세포의 배양시 3D 배양조건이 혈장 단백질 생산에 유리함과 높은 생존력을 가질 수 있음을 확인할 수 있었다. 동시에 3D 일차 간세포의 배양은 일반적인 세포 배양보다 높은 고농도의 세포수를 유지하여야만 3D 배양을 위해서 사용된 기계적인 스트레스를 최소화 할 수 있음을 증명하였다.

이렇게 구축된 배양조건은 사람의 CYP3A4와 거의 유사한 기능을 하는 돼지 모델에 적용되어 사람의 간 생리 대사와 질환 치료를 위한 신약 개발을 위해 사용될 수 있을 것이다

사 사

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(과제 번호 PJ01100203) 사업에 의해 이루어진 것임

REFERENCES

- Allen JW, Hassanein T and Bhatia SN. 2001. Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* 34:447-455.
- Berthiaume F, Moghe PV, Toner M and Yarmush ML. 1996. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB J.* 10:1471-1484.
- Chenxia H and Lanjuan L. 2015. In vitro culture of isolated primary hepatocytes and stem cell-derived hepatocyte-like cells for liver regeneration. *Protein cell.* 6:562-574.
- Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG and Tompkins RG. 1989. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J.* 3:174-177.
- Giada Sebastiani and Ann P Walker. 2007. HFE gene in primary and secondary hepatic iron overload. *World J Gastroenterol.* 13:4673 - 4689.
- Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Böttger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho CS, Choi YJ, Craig Rowlands J, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V, Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CE, Gómez-Lechón MJ, Groothuis GM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Häussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhütter HG, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin Park B, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinji J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EH, Stieger B, Stöber R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Widera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough KM and Hengstler JG. 2013. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 87:1315-1530.
- Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Gombau L, Castell JV and Donato MT. 2010. Evaluation of Potential Hepatotoxicity Induced by Drugs. *Curr. Pharm. Des.* 16:1-15.
- Hu X, Xie P, Li W, Li Z and Shan H. 2016. Direct induction of hepatocyte-like cells from immortalized human bone marrow mesenchymal stem cells by overexpression of HNF4 α . *Biochem Biophys Res Commun.* 478:791-797.
- Kegel V, Deharde D, Pfeiffer E, Zeilinger K, Seehofer D and Damm G. 2016. Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells. *J. Vis. Exp.* 30:e53069.
- Knobeloch D, Ehnert S, Schyschka L, Büchler P, Schoenberg M, Kleeff J, Thasler WE, Nussler NC, Godoy P, Hengstler J and Nussler AK. 2012. Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. *Methods Mol. Biol.* 806:99-120.
- Koide N, Skaguchi K, Koide Y, Asano K, Kawaguchi M, Matsushima H, Takenami, T, Shinji, Mori M and Tsuji T. 1990. Formation of Multicellular Spheroids Composed of Adult Rat Hepatocytes in Dishes with Positively Charged Surfaces and under Other Nonadherent Environments. *Exp. Cell. Res* 1860:227-235.
- Landry J, Bernier D, Ouellet C, Goyette R and Marceau N. 1985. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J. Cell Biol.*

- 1101:914-923.
- Lecluyse EL and Alexandre E. 2010. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol. Biol.* 640:57-82.
- Lee DH, Yoon HH and Park JK. 2014. Hepatocyte culture technology and its application to bioartificial liver. 42:129-138.
- Lu C and Li AP. 2001. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem Biol Interact.* 134:271-281.
- Maruyama M, Fujisawa M, Yokosuka M, Saito TR, Hayama S, Akimoto T and Hakamata Y. 2016. A new in vivo analysis model to detect sexually dimorphic rat liver cytochrome P450 gene expression dependent on growth hormone secretory patterns. *Exp Anim.* [Epub ahead of print]
- No da Y, Lee SA, Choi YY, Park D, Jang JY, Kim DS and Lee SH. 2012. Functional 3D human primary hepatocyte spheroids made by co-culturing hepatocytes from partial hepatectomy specimens and human adipose-derived stem cells. *Plos one*, 7:e50723.
- Nyberg SL, Hibbs JR, Hardin JA, Germer JJ, Platt JL, Paya CV and Wiesner RH. 2000. Influence of human fulminant hepatic failure sera on endogenous retroviral expression in pig hepatocytes. *Liver Transplant.* 6:76-84.
- Rajan N, Habermehl J, Coté MF, Doillon CJ and Mantovani D. 2006. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat Protoc.* 1:2753-2758.
- Schyschka L, Sánchez JJ, Wang Z, Burkhardt B, Müller-Vieira U, Zeilinger K, Bachmann A, Nadalin S, Damm G and Nussler AK. 2013. Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol.* 87:1581-1593.
- Selgan PO. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13:29-83.
- Shulman M and Nahmias Y. 2013. Long-Term Culture and Coculture of Primary Rat and Human Hepatocytes. *Methods Mol. Biol.* 915:287-302.
- Soldatow VY, Griffith LG, Rusyn I and LeCluyse EL. 2013. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol. Res.* 2:23-39.
- Wójcikowski J, Haduch A and Daniel WA. 2012. Effect of classic and atypical neuroleptics on cytochrome P450 3A (CYP3A1) in rat liver. *Pharmacol Rep.* 64:1411-1418.
- Wu FJ, Friend JR, Hsiao CC, Zilliox MJ, Ko WJ, Cerra FB and Hu WS. 1996. Efficient assembly of rat hepatocyte spheroids for tissue engineering applications. *Biotechnol Bioeng.* 50:404-415.
- Xiao-Lei Shi, Yimeng Gao, Yupeng Yan, Hucheng Ma, Lulu Sun, Pengyu Huang, Xuan Ni, Ludi Zhang, Xin Zhao, Haozhen Ren, Dan Hu, Yan Zhou, Feng Tian, Yuan Ji, Xin Cheng, Guoyu Pan, Yi-Tao Ding and Lijian Hui. 2016. Improved survival of porcine acute liver failure by a bioartificial liver device implanted with induced human functional hepatocytes. *Cell Research.* 26:206-216.
- Yang SM, Lee DH and Park JK. 2000. Effects of Degree of Cell-Cell Contact on Liver Specific Functions of Rat Primary Hepatocytes. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5:99-105.
- Zuber R, Anzenbacherová E and Anzenbacher P. 2002. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 6:189-198.

Received August 10, 2016, Revised August 16, 2016,

Accepted September 07, 2016