

쥐 간세포의 일차배양과 분화기능 측정

김진희·이재호·박정극·최태부*
건국대학교 미생물공학과, ¹동국대학교 화학공학과

Primary culture of adult rat hepatocytes and assay of hepatic functions

Jin Hee Kim, Jae Ho Lee, ¹Jung Keug Park and Tae Boo Choe

Dept. of Microbial Eng. Konkuk University

¹Dept. of Chemical Eng. Dongguk University

ABSTRACT

Rat hepatocytes were isolated by collagenase perfusion method and cultured on the collagen coated dish or on the floating collagen membrane. Using the primary cultured hepatocytes, the efficiency of cell attachment and the hepatic functions such as gluconeogenesis, ureogenesis and albumin synthesis were studied. The cell viability was kept above 50% until 5 days and the hepatic functions of ammonia metabolism and albumin synthesis were maintained until 7 days. Floating collagen membrane was found to be more efficient than the collagen coated dish for the maintenance of hepatic functions in-vitro.

서론

간은 신체 대사활동에 있어서 중심적인 역할을 담당하며, 여러가지 복합적인 기능을 지니고 있어 in-vitro에서 생화학적 연구에 좋은 장기라 할 수 있다 (1, 2). 따라서 간세포에 관한 연구를 위해서는 isolated perfused liver, incubated liver slice, suspension of isolated hepatic parenchymal cells 그리고 continuous liver cell line 등이 이용되어 왔으나 이러한 방법에는 세포생존도 및 간기능의 저하라는 한계를 가지고 있다. Isolated perfused liver와 incubated liver slice의 사용은 이들이 분리되지 않은 조직이어서 간을 구성하고 있는 각각의 세포 기능 파악이 어려우며 hepatic parenchymal cell suspension의 사용은 간세포의 낮은 생존률과 in-vitro에서 대사능의 급격한 감소 등이 문제가 되며, hepatomas 또는 liver explants로 부터 얻어진 liver cell line의 경우는 안정되기는 하나 in-vivo에서 간세포

가 지나는 다양한 대사기능을 지니지 못하는 단점이 있다. 따라서 비교적 장시간 생존을 유지하며, 다양한 대사능을 지닌 liver parenchymal cell의 분리 및 배양에 의해 이러한 문제점을 극복하려는 시도가 이루어지고 있다.

간세포의 분리에 사용되는 방법은 기계적인 방법과 효소처리 방법으로 나눌 수 있는데 초기의 간세포의 분리는 거의 기계적인 방법에 의한 것으로 간조직을 각각의 cell suspension으로 분리하는 가능하였으나 거의 모든 cell이 손상을 받아 생존률이 낮았다 (2). Howard 등은 간조직 분해를 위한 효소인 collagenase를 보고하였고 이어 Berry와 Friend의 collagenase perfusion 방법의 개발로 collagenase가 조직내에서 균일하게 작용할 수 있도록 하여 높은 생존률과 수율을 지닌 간세포의 분리 및 간세포의 일차배양이 가능하게 되었다(3, 4). 또 Wagle 등에 의해 개선된 방법과 더불어 Seglen은 collagenase perfusion 방법에서 효소의 최적조건과 최적농

도 등에 관한 연구 등으로 간세포 분리의 일반적인 방법을 정리함으로써 현재 이 방법이 널리 사용되어지고 있다(2, 5, 6).

간세포는 부착성 세포이므로 배양을 위해서는 적당한 표면에 부착하여야 한다. 간세포의 일차배양(primary culture)은 cell suspension보다 장시간 배양이 가능하며 collagenase 처리에 따른 세포막 손상을 배양초기에 회복시킬 수 있는 장점을 지닌다(7). 일차배양에 있어 간세포는 일반적인 조직배양 용기인 polystyrene dish에서는 monolayer를 형성하지 못하며 여러가지 대사기능이 2~3일 내로 급격히 감소한다. 따라서 간세포의 monolayer 형성을 위해서는 plastic이나 glass 표면에 rat tail collagen, floating collagen gel을 첨가하거나 nylon mesh 위에 collagen gel을 처리하는 방법 등이 이용되고 있다. 이렇게 배양된 간세포는 hepatic biochemistry와 physiology의 연구, xenobiotics의 영향, hepatotoxicity 등의 연구에 주로 사용되며(7, 9~11), 간세포의 고밀도 배양과 장시간 배양을 이용하여 간의 질병, 간이식수술, 간제거수술 후 일시적으로 간세포가 간의 대사기능을 대신하는 인공간에 응용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(12~14).

본 연구에서는 쥐의 간으로부터 생존률이 높은 간세포를 분리하고 이를 collagen coated dish와 collagen gel dish에서 일차배양하여 간세포가 갖는 분화기능의 변화에 대하여 조사하였다.

실험재료 및 방법

Collagen-coated dish의 준비

Michalopoulos 등(8)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. Rat tail로부터 뽑아낸 collagen fiber를 약간 말린 후 400mg을 취하여 3% acetic acid 100ml에 넣어 4°C에서 24시간 정도 녹인 후 녹지 않은 fiber를 원심분리하여 제거하고, pH 4.2로 조정한 후 0.45 μ m Millipore membrane으로 멸균하였다. Collagen 용액 30 μ l와 HBSS 3.0ml를 60 \times 15mm Petri dish에 첨가한 후 dish를 실온에서 30분간 방치, 용액의 색이 yellow에서 reddish yellow로 변하면 humidified CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂, 95% Air)에서 20시간 정도 incubation한 후 살균된 Pasteur Pipette으로 dish의 solution을 제거한 후 사용하였다.

Collagen gel dish의 준비

Rat tail로부터 뽑아낸 collagen fiber 1g을 24시간 동안 살균된 70% alcohol에 담가 살균한 후 48시간 동안 4°C에서 살균된 0.001% acetic acid solution 300ml에 녹였다. 24시간 동안 방치하여 녹지 않은 fiber를 침전시킨 후 clear solution을 실험에 사용하였다. 위의 collagen solution 1.7ml를 60 \times 15mm petri dish에 고르게 coating한 후 10배로 농축된 DMEM medium 0.4ml를 첨가한다. 약 15초간 tissue culture plate를 흔들어 준 후 gel형성을 위하여 실온에서 30초간 방치하였다가 cell을 접종하였다(8).

간세포의 분리

간세포는 몸무게 200~250g의 Sparque-Dawley rats를 Seglen(2)의 collagenase perfusion technique에 의해서 분리하였으며 분리된 간세포의 생존율은 약 90%였다.

간세포 배양

Cell suspension을 10% FCS(fetal calf serum, Hyclone)와 hormone(Insulin 5 μ g/ml, Dexamethasone 2 μ g/ml, Aprotinin 5KIU/ml)이 첨가된 William's E 배지에 농도가 8 \times 10⁵ cells/ml되게 희석하고 3ml를 60 \times 15mm collagen coated dish (Nunc, 21cm²)에 접종하여 최종농도가 1 \times 10⁵ cell/0.15ml/cm²되게 하였다. Cell attachment를 위하여 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂, 95% air)에서 4시간 배양한 후, 부착되지 않은 세포의 제거를 위해 10% FCS와 hormone이 함유된 새로운 배지 5ml로 교환하였다. Collagen gel dish를 이용할 경우에는 살균된 Pasteur pipette으로 Petri dish의 가장자리를 swirling한다. 따라서 배양시간이 경과됨에 따라 collagen gel이 Petri dish의 바닥에서 분리되어 떠있는 상태가 되므로 이를 floating collagen membrane이라고도 한다. 배지교환 후 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 각종 실험을 실시하였으며 간세포는 일주일간 배양하면서 실험에 이용하였다.

간세포 부착률의 측정

Collagen, 혹은 poly-D-lysine(250 μ g/ml)으로 coating된 dish에 혈청을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 간세포의 부착률 변화를 조사하였다. 또 혈청농도를 0.5%, 1%, 5%, 10%로 변화시켜 coating한 dish에 세포를 접종하여 attachment 변화를 조사하였다.

Ammonia 농도 및 Urea 생성농도 측정

배양 24시간 후 배지에 1mM NH₄Cl을 첨가하여 시간에 따른 암모니아의 농도변화와 urea 생성농도를 측정하였다. 또한 48시간 간격으로 배지 교환시마다 1mM NH₄Cl을 첨가하여 같은 실험을 행하였다. Urea 농도의 측정은 아산제약에서 구입한 assay kits(urease-indophenol method)에 의해 측정하였고 암모니아 농도는 Wako Pure Chem. (Japan)에서 구입한 assay kits(indophenol method)를 이용하여 측정하였다.

Glucose 농도 측정

간세포의 배양시간과 배지교환에 따른 glucose의 농도변화를 측정하였다. 측정방법은 glucose oxidase와 peroxidase를 이용한 colorimetric method에 의해 결정하였다(15).

Albumin 농도 측정

표준 rat albumin(Capel-60130340, Japan)과 goat anti-rat albumin-antiserum(Capel-02130341)을 이용하여 Single Radial Immunodiffusion(SRID) 방법으로 측정하였다.

세포내 ATP 측정

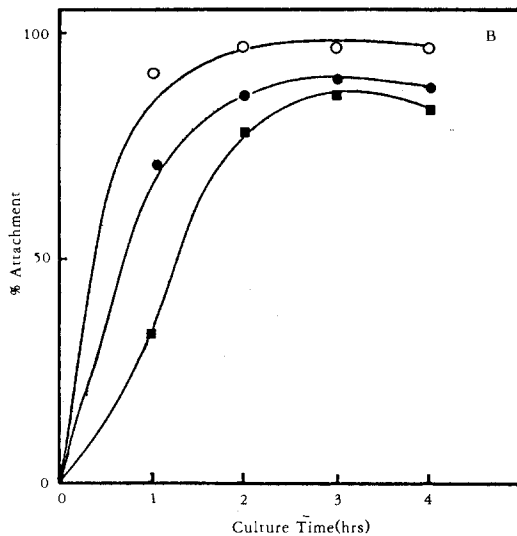
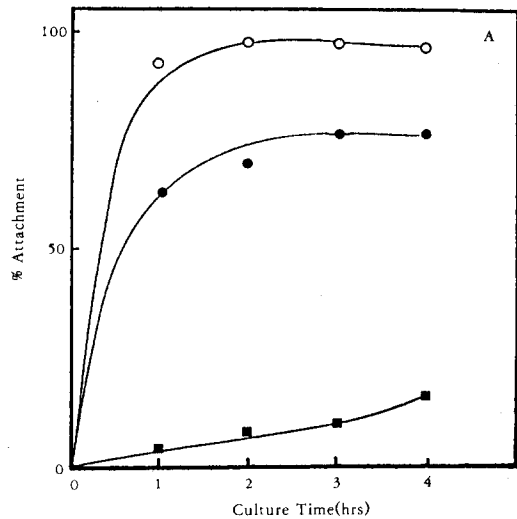
간세포의 일차배양을 시작한 후 세포 생존도를 측정하기 위하여 세포를 flask 표면에서 떼어낼 경우 세포생존도가 급격히 감소하는 현상을 피하기 위하여 세포내 ATP를 측정하여 간접적으로 세포생존도를 조사하는 방법을 이용하였다. 이는 죽은 세포의 경우 세포내 ATP 농도가 급격히 감소하는 점을 이용한 것이다. Serum free media에 녹인 0.01% collagenase solution(Type I, Sigma)으로 분리한 간세포 suspension 100 μl를 polystyrene vial(12 × 47mm)에 취하여 체세포의 ATP 추출시약(NRS. Lumac)을 HEPES-magnesium buffer(pH 7.75) 7ml로 용해시킨 것 100 μl를 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

혈청 첨가에 따른 간세포의 부착

간세포 배양에서 Petri dish의 표면처리와 배양액 내의 혈청첨가가 세포부착에 미치는 영향을 알아보

기 위하여 naked polystyrene dish를 control로 하여 실험한 결과를 그림 1에 나타내었다. 그림 1A는 혈청을 첨가하지 않은 경우에 있어 간세포의 부착을 나타낸 것으로 naked polystyrene dish의 경우 거의 부착이 일어나지 않았으나 poly-D-lysine을 처리한 경우에는 약 60%의 세포가 그리고 collagen으로 표면처리를 한 경우에는 90% 이상의 세포들이 1시간 내에 부착되었다. 그러나 그림 1B에서 볼 수 있듯이 배양액 내의 10%의 혈청을 첨가하게 되면 poly-D-lysine을 처리한 dish나 naked dish에서도 모두 세포 부착이 증가됨을 알 수 있다. 그림 1C는 혈청농도에



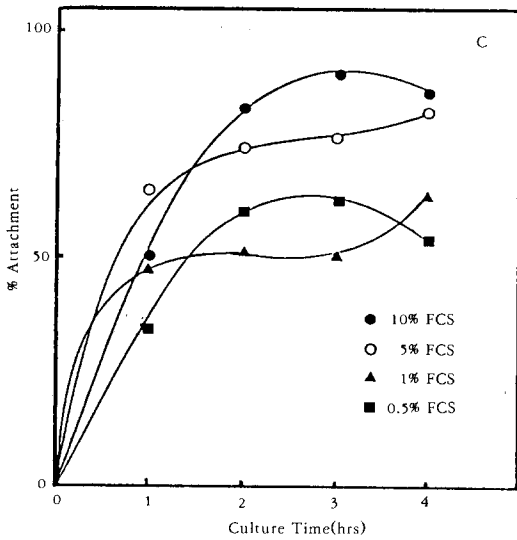


Fig. 1. A: Attachment of rat hepatocytes on collagen coated dish; ○, poly-D-lysine coated dish; ● and naked polystyrene dish; ■. Hepatocytes were incubated without serum. B: symbol; see A. Hepatocytes were incubated with 10% fetal calf serum. C: Effect of calf serum on the attachment of rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated without further addition of serum.

다른 영향을 알아본 것으로 혈청농도 0.5~1.0%에서는 간세포의 부착률이 60% 수준이었고 혈청농도 5~10%에서는 80~90%로 증가하였다.

혈청을 첨가하지 않은 naked dish의 경우 부착이 잘되지 않는 이유는 간세포가 분비하는 albumin이 polystyrene dish의 표면에 먼저 binding하면서 간세포의 부착을 방해하기 때문인 것으로 보이며 이에 반해 혈청의 첨가로 인해 세포부착이 증진되는 이유는 혈청내에 존재하는 attachment-promoting factor(예를 들어 fibronectin)들이 adsorption-inhibitory activity를 지닌 albumin보다 polystyrene바닥에 결합하는 힘이 크고 따라서 이들이 plastic에 결합되면 세포부착을 유도하기 때문이다. 그러나 collagen을 처리한 dish에서는 혈청을 첨가한 경우나 첨가하지 않은 경우에 있어서 간세포 부착에 별다른 차이를 보이지 않았는데 그 이유는 간세포에 존재하는 collagen receptor에 간세포가 우선적으로 결합할 수 있으므로 혈청내에 존재하는 attachment-pro-

moting factor가 큰 효과를 주지 못한 것으로 생각된다.

암모니아 분해속도

간의 detoxification 기능을 조사할 목적으로 배지 내에 1mM NH₄Cl을 첨가하여 시간에 따른 암모니아 농도변화와 이에 따른 urea 생성농도를 조사하여 그림 2에 나타내었다. 암모니아 농도는 배양 4시간 후

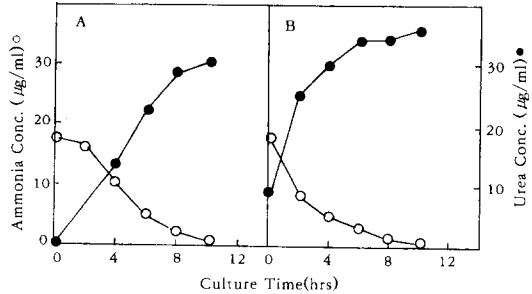


Fig. 2. Variation of ammonia and urea concentrations in the primary culture of rat hepatocytes, A) using collagen coated dish or B) using floating collagen membrane. 1 mM of NH₄Cl was loaded in the medium at the beginning of culture.

절반 수준으로 감소했으며 10시간 후에는 거의 처리됨을 알 수 있다. 이를 10시간 평균 처리 속도로 환산하면 1.7µg ammonia/ml/hr에 해당한다. 암모니아 농도의 감소가 간세포의 ureogenesis 기능에 의한 것이라는 것은 증가되는 urea의 농도로 알 수 있다. Floation collagen membrane의 경우 단순히 collagen을 처리한 dish에서 보다 암모니아 제거속도 및 urea 생성속도가 높게 나타났는데 특히 초기 4시간 동안의 암모니아 제거속도는 3.0µg ammonia/ml/hr 이고 urea 생성속도는 7.2µg urea/ml/hr으로써 collagen coating의 경우보다 월등히 높았다. 이는 간세포가 collagen coated dish에서 보다 floating collagen membrane에서 보다 더 안정된 세포의 부착으로 인해 대사기능이 활발한 것으로 생각된다(8).

48시간 간격으로 배지교환시마다 1mM NH₄Cl을 첨가하여 암모니아 농도변화와 이에 따른 urea 농도변화를 비교하여 그림 3에 나타내었다. 이 그림에서 볼 수 있듯이 간세포의 암모니아 제거속도는 160시간까지 거의 일정하게 유지되었다. 이 경우 배지내에 혈청을 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우에 비해 시간경과에 따라 더 안정된 대사능 유지를 보여

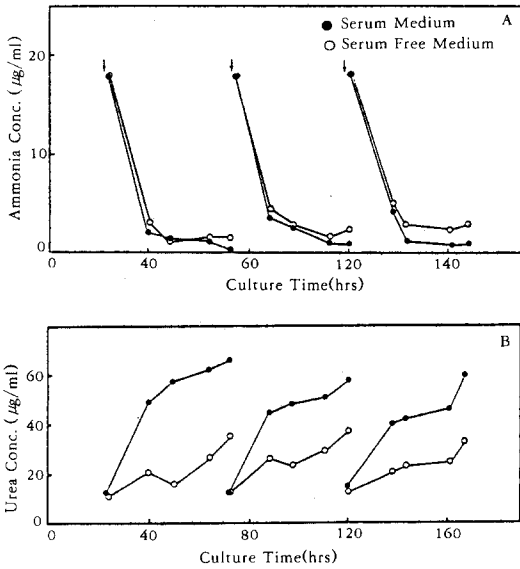


Fig. 3. Variation of ammonia and urea concentration in the primary culture of rat hepatocytes. A) ammonia concentration, B) urea concentration. 1mM of NH_4Cl was loaded in the culture medium at the beginning of culture; ●, NH_4Cl was not loaded; ○.

주었다. 따라서 혈청의 첨가가 장시간 동안 간세포의 대사능 유지에 유리한 것으로 보인다.

Albumin 생성속도

간세포의 중요한 대사기능의 하나로, 간에서 분비되는 단백질의 40% 이상을 차지하는 albumin의 합성과 분비를 들 수 있다. 특히 albumin 분비는 in vitro 배양에서 그 기능을 쉽게 잃게 되며 배양액 내에 첨가된 성장인자(EGF)와 hormone(dexamethasone) 등에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (16). 그림 4는 배지내에는 dexamethasone과 insulin이 albumin 합성에 미치는 영향을 조사한 것이다. Insulin과 dexamethasone을 함께 첨가한 경우가 insulin이나 dexamethasone을 각각 첨가한 경우보다 albumin 생산에 유리한 것으로 나타났으며 배양액 내에 이 두 가지 hormone을 각각 첨가한 경우에 있어서는 insulin이 dexamethasone보다 좀 더 효과적인 것으로 나타났다. 특히 이 두 가지 hormone의 첨가는 배양초기보다 배양 120시간 후에 측정할 albumin 생산량에서 그 효과가 더 뚜렷하게 나타나는 것으로 보아 간세포의 장기배양과 대사능 유지에 반드시 첨가되어야 할 물질로 사료된다.

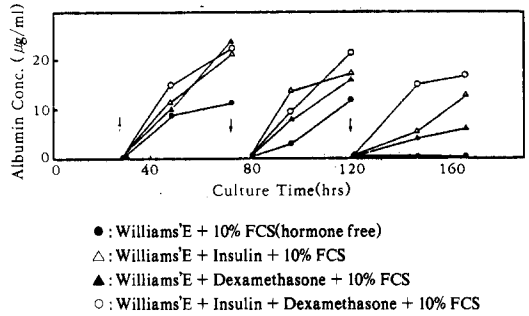
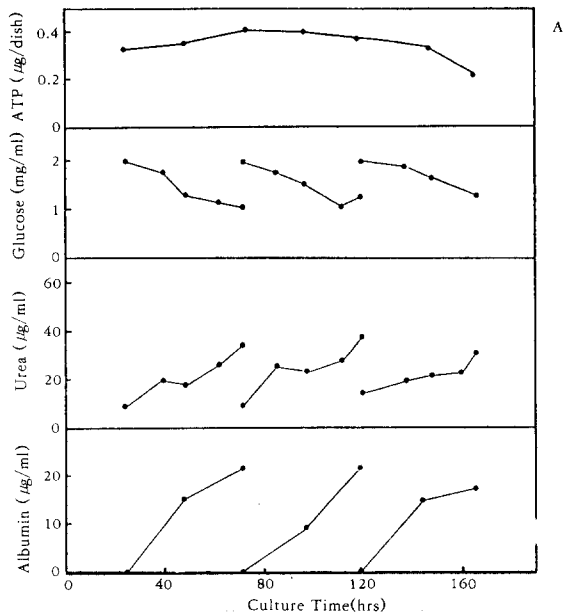


Fig. 4. Effect of insulin and dexamethasone on albumin secretion in the primary culture of rat hepatocytes.

간세포 대사기능의 변화

장시간에 걸친 간세포 대사기능의 변화를 동시에 조사하기 위하여 collagen coated dish와 floating collagen membrane에서 배양된 간세포로부터 세포내 ATP 농도, glucose 농도, 생성 urea 및 albumin 농도를 측정하여 그림 5에 나타내었다. Intracellular activity 및 viability의 척도로써 collagen coated dish에 배양된 간세포의 세포내 ATP 농도를 측정할 결과, 120시간까지는 약 $0.38 \mu\text{g}/\text{dish}$ 까지 약 50%가 감소되었다. 이 결과로 보아 세포 생존도는 120시간까지 90% 정도 유지되다가 그후부터 점차 감



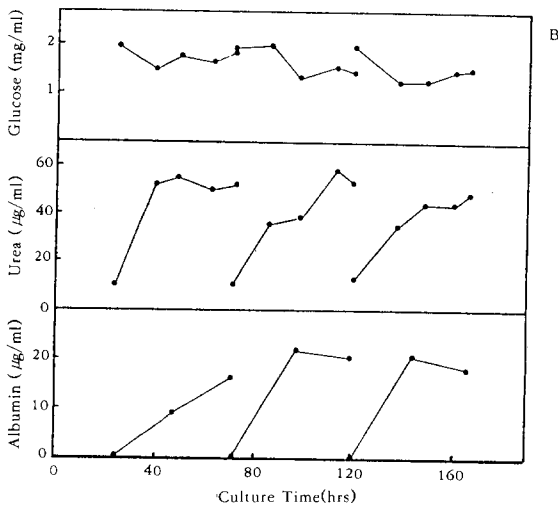


Fig 5. Variation of ATP, glucose, urea and albumin concentration in the primary culture of rat hepatocytes. A) collagen coated dish B) floating collagen membrane.

소하는 것으로 보인다. 배양액 내의 glucose, urea 그리고 albumin 농도의 변화는 간세포의 gluconeogenesis, ureogenesis 그리고 protein synthesis 기능을 나타내는 척도로써 대체로 일주일 정도 그 기능을 유지되는 것으로 보인다. 그러나 전반적인 실험 결과를 보면 floating collagen membrane의 경우가 monolayer culture에 비해 간세포 분화기능이 더 효과적으로 유지된 것으로 나타났다.

요 약

취 간세포를 collagenase perfusion method에 의해 분리한 뒤 collagen coated dish와 floating collagen membrane에서 일차배양하여 간세포의 분화기능을 조사하였다. 두 경우 모두 간세포의 생존율은 5일 이후부터 점차 감소하였거나 간세포에 의한 암모니아 처리기능과 albumin 생성기능은 약 7일간 유지되었다. 또 이러한 분화기능의 유지는 collagen coated dish 보다 floating collagen membrane이 유리한 것으로 나타났다.

감 사

본 연구는 1990년도 과학재단 기초연구과제 연구

비로 수행되었으며 연구비 지원에 심심한 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. Michalopoulos, G., Ganciulli, H. D., Novotuy, A. R., Kligerman, A. D., Strom, S. C., and Jirtle, R. L., (1982) *Cancer Res* **42** 4673-4678.
2. 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.
3. Haward, R. B., Christensen, A. K., Gibbs, F. A. and Persh, L. A. (1967) *J. Cell Biol.* **35** 675-684.
4. Berry, M. N., and Friend, D. S. (1969) *J. Cell Biol*, **43** 506-520.
5. Ingebretsen, W. R. and Walge, S. R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **47**(2) 402-410.
6. David, M. C., Vick, R., and Simeon, M. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45** 421-429.
7. John, D., and Niels, G. (1990) Primary culture of rat hepatocyte. *Method in Molecular Biology* Vol 5. edited by John, M. Walker. pp. 161-176. Humana Press. New Jersey.
8. Michalopoulos, G., and Pitot, H. C. (1975) *Exp. Cell Res.* **94** 70-78.
9. Alphonse, E. S., and Henry, C. P. (1980) *Pharmacol. Rev.* **31**(3) 205-228.
10. Guillouze, A. and Begue, J. M. (1985) *Biochem. Pharmacol.* **34**(16) 2991-2995.
11. Gary, L. E., Arlan, G. R., and Joshna, A. F. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **238**(2) 359-367.
12. Hamada, T., Matsue, H., Takahashi, M., Kumagai, F., and Nase, T. (1990) *Jpn. J. Artif. Organs.* **19**(2) 852-855.
13. Saito, S., Sakagami, K., and Orita, K. (1987) *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* **33** 459-462.
14. Vchino, J., Tsuraya, T., Kuamgai, F., Hamada, T., (1988) *Trans. Am. Soc. Artif. Intern.*

- Organs. **34**(4) 972-977.
15. Bergmeyer, H. V. Methods of Enzymatic analysis. (1983) 3rd ed. **4** 178.
 16. Hutson, S. M., Carol, S. F., Shiman, R., and Jefferson, L. S. (1987) Am. J. Physiol. **252** E291-E298.