

백서의 초대 배양 간세포를 이용한 MTT assay¹⁾

하헌 · 윤수홍 · 다케루 후지이* · 히토시 호리**
효성여자대학교 약학대학 · 제국제약* · 도쿠시마 대학**

MTT Assay Using Primary Cultured Rat Hepatocytes

Hun Ha, Soo Hong Yoon, Takeru Fujii* and Hitoshi Hori**

College of Pharmacy, Hyosung Women's University
Teikoku Seiyaku, Kagawa, Japan*
University of Tokushima, Tokushima, Japan**

ABSTRACT

The tetrazolium dye, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), is reduced by live but not dead cell, and this reaction is used as the end point in a rapid drug screening assay. It can also be used for accurate determinations of drug sensitivity but only if a quantitative relationship is established between cell number and MTT-formazan production. Several conditions were examined to devise an *in vitro* assay method in primary cultured hepatocytes, such as optimum wavelength, optimal MTT concentration, optimal incubation time, and cell density.

서 론

in vitro 실험에 적절한 chemosensitivity assay로는 여러 방법이 있으나, 모든 형태의 세포에 적용되는 것은 없다. 근래에 tetrazolium 염색법이 각광을 받고 있는데, 그 중에서 MTT assay법은 cell proliferation과 cytotoxicity를 *in vitro*에서 분석하는데 매우 유용하게 간주되어 왔다.²⁾ 물론 이 방법의 가장 큰 매력은 방사성 동위원소를 사용하지 않는데 있으며, 간편성, 신속성 그리고 정확성에 있다. 또한 기질과 생성물이 서로 다른 파장에서 흡수

극대를 나타내므로, 배양액을 제거한 이후에 별도의 수세과정이 필요없고, 이것이 end-point로 isotope를 사용하는 방법보다 월등한 장점이 된다.

Tetrazolium 염인 MTT는 단지 생세포에 의해서만 분해되므로, 이 반응은 drug-screening assay에 사용되어 왔다. 즉 수용성 염인 MTT를 불용성 침전물인 보랏빛의 formazan으로 환원시키는데 (Fig. 1), 여기에는 mitochondrial 효소인 succinate dehydrogenase를 필요로 한다.³⁾ 또한 세포수와 생성된 formazan 사이에 양적인 관계가 설정된다면, 약물의 감수성을 결정짓는 데에도 응용될 수가 있다. 최근에 이러한 이유로, MTT

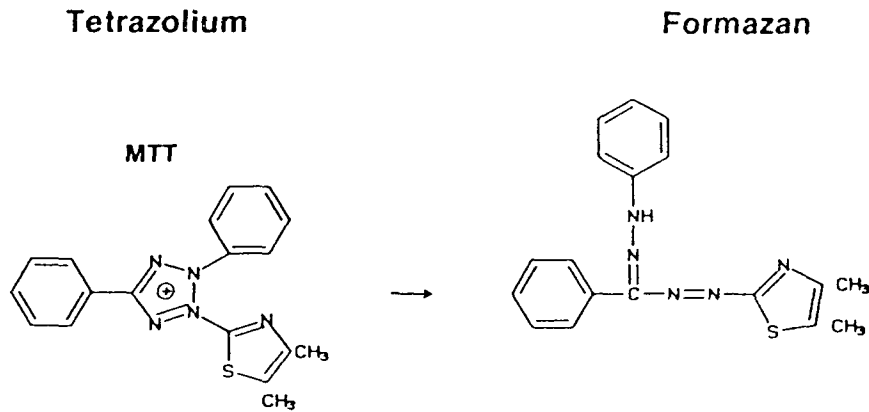


Fig. 1. Structures of MTT tetrazolium and formazan.

assay가 암세포의 수 및 대사능력을 가늠할 수 있기 때문에 항암제 감수성 test에 사용되고 있다.⁴⁾

초대배양 간세포가 본래의 세포기능을 완벽하게 갖추고 있어서 간기능 연구에 매우 유용하다.⁵⁾ 이를 이용해서 MTT assay를 실행하는데 최적의 실험조건을 찾고자, MTT formazan의 spectrum scanning과 MTT의 농도, 세포 밀도, incubation 시간 등을 검토하였다.

실험 방법

Eagle's minimum essential medium (MEM)은 일본 Nissui 제약 제품을, Williams E medium은 Flow Lab.사 제품, Dexamethasone은 Schering 제약 제품, 그리고 collagenase type I, bovine pancreatic insulin, MTT, EGTA 등은 Sigma사 제품을, 0.22 μ m filter는 Millipore사 것을 사용하였다. 기타 필요한 시약은 Wako사 것을 사용했다.

1. 실험동물

Sprague-Dawley계 웅성 rat(체중 200-230g)를 사용하였다.

2. 간세포의 분리

간세포의 분리는 Seglen⁶⁾의 *in situ* collagenase 관류법을 약간 변형하여 행하였다. Rat를

pentobarbital(50mg/kg, Nembutal, Abbott Labs.)로 마취시킨 후, 개복한다. 간 문맥의 일부를 부분 절개한 다음, G-17의 cannulae를 삽입한다. preincubation한 전관류액을 30ml/min의 유속으로 관류시키면서, 간장 아래의 하대정맥을 절단한다. rat의 흉곽부를 열고 우심방을 부분 절개하여 하대정맥 쪽으로 cannulae를 삽입한다. 이렇게 해서 관류액을 완전히 순환시키고, 혈액을 제거한 후, collagenase 용액으로 관류를 재개한다. 완전히 digestion시킨 후, 간을 적출한다. petri dish에서 빙냉하에 두었던 MEM를 가하면서, 수술용 mess로 세절하여 간세포를 분산시킨다. 이 분산액을 gauze 두겹으로 한 세포여과기를 통과시킨다. 최종 용적을 약 160ml 정도로 조정한다. 다음, 4 $^{\circ}$ C, 50 \times g에서 3회 반복 원심분리한다. 침전물, 즉 간 실질세포에 MEM 적당량을 가해 현탁액을 만든다. 일정량의 현탁액을 취해 trypan blue exclusion test에 의해 cell viability를 확인하여 80% 이상일 때 실험을 계속하였다. 배양 medium으로 재현탁하여 아래 실험에 사용한다.

3. 간세포 배양

저속 원심분리법으로 정제한 간세포를 10% Fetal bovine serum과 10⁻⁹M dexamethasone, 10⁻⁹M insulin, kanamycine(명치제약) 30 μ g/ml을 함유한 Williams E medium에 10,000, 50,000,

100,000, 500,000, 1,000,000cells/cm²/well의 밀도로 조정한 후, 12 well plate에 inoculation 한다. 2시간 이후 죽은 간세포와 미부착 간세포를 제거하기 위해 배양액을 교환한다. 12시간 후 다시 2차 배양액 교환 후 재차 약 24시간 이후 배양을 종료한다.

4. MTT assay

MTT solution(5mg/ml stock in phosphate-buffered saline)은 배양이후, 사용 직전에 0.22μm filter로 미량의 formazan을 제거하기 위해 여과 멸균 희석하여 사용한다.

배양한 100μl의 간세포 현탁액을 96 well-plate에 넣고, 10μl의 MTT 용액을 각 well에 첨가하여 37°C에서 1-4시간 동안 배양한다. 상등액을 제거하고 100μl의 acid-isopropanol(0.04N HCl in isopropanol)을 첨가하여 생성된 formazan을 완전히 녹인다. acid-isopropanol 중의 formazan의 흡광도는 Tosoh MPR A₄ microplate reader와 Hitachi U-2000 spectrophotometer를 사용하여 350nm에서 800nm까지 scanning하였다.

결과 및 고찰

1. Choice of optimum wavelength

Fig. 2에서처럼 570nm 근처가 넓은 흡수 peak를 나타낸다. 그래서 570nm를 test 파장으로 정했다. 그러나 Denizot⁷⁾ 등은 formazan의 용매로서 순수 propanol과 ethanol을 사용했는데, 흡수 극대가 560nm라고 밝혔다. 이것은 아마도 formazan의 용매 차이에 따른 용해도차라고 사료된다. 본 실험에서는 acid-isopropanol을 사용했다.

2. Optimal cell density

Fig. 3에서처럼 세포수가 증가함에 따라 흡광도가 비록 직접적으로 세포수에 비례하지는 않지만 증가하는 것이 관찰되었다. 즉 세포수와 흡수파장 사이에는 양호한 상관관계가 성립되는 것을 알 수 있다. well당 세포수가 5×10⁵까지는 흡광도와 선형비

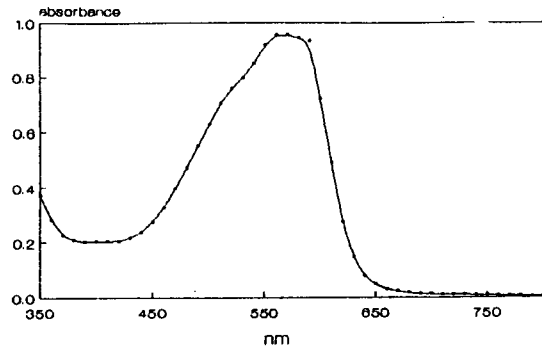


Fig. 2. Absorption spectra of MTT-formazan produced by incubation of rat cultured hepatocytes with MTT (1mg/ml) for 2 hours.

례를 이루지만, 그 이상에서는 오히려 감소한다. 그래서 본 실험에서 5×10⁵cells/well을 test 밀도로 정했다. 초대 배양 단층세포에서는 세포 밀도가 낮을 때, 그 증식능이 활발하고, 그 밀도가 높을 때 증식능이 둔해진다. Mitochondria는 cell cycle 동안 성장하고 분열하는데⁸⁾ 그래서 성장기에 있는 세포는 휴지기에 있는 세포보다 mitochondria에 있어서 보다 더 dehydrogenase 활성이 뚜렷하다. 이러한 이유로 저밀도에서의 세포가 고밀도에서보다도 높은 흡광도를 나타내는것 같다.

이것이 잘 알려진 “contact inhibition” 현상이

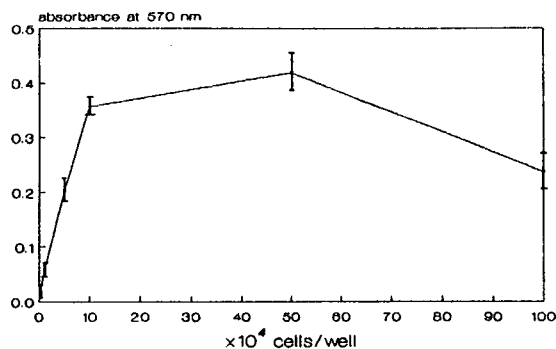


Fig. 3. Relationship between cell number and absorbance. Cells were inoculated to a 96-well plate in various concentrations. After 24hr of culture, numbers of cells were counted, and the MTT assay was performed. Each point and bar represent a mean and standard deviation of 5 samples.

다. Cell-cell contact는 조직 형성과 세포분화 그리고 세포 성장에 있어서 매우 중요한 기전이다. 이것에 대한 연구로는 주로 slime mold⁹⁻¹¹⁾에 대한 것이었다. 세포증식의 "contact inhibition" 현상은 3T3 세포에 대해 광범위하게 연구되어 왔고, 또한 일반적으로 성장 인자의 고갈이나 혹은 성장 저해제의 분비 등으로 설명되어질 수 있다. 다른 방법으로 Glaser^{12,13)} 등은 세포막에 대한 저해제 때문이라고 제안하였는데, 왜냐하면 그들이 3T3 세포의 원형질막을 가함으로써, 3T3 세포의 성장이 저해됨을 발견했기 때문이다. 그러나 cell-cell contact에 대한 세부적인 조절 기전에 대해서는 아직까지 미지의 것이 많다.

3. Optimal MTT concentration

Chemosensitivity assay의 end point는 보통 생존하는 세포수를 직접적으로 혹은 간접적으로 추정하는 것이다. Tetrazolium 염색법의 가치는 세포의 염색물질의 환원능력에 달려 있다. Formazan의 생성은 그 농도가 최대치에 도달할 때까지, 기질 즉 MTT의 농도와 병행하여 증가한다. MTT stock solution (5mg/ml)을 5×10^5 cells/well의 밀

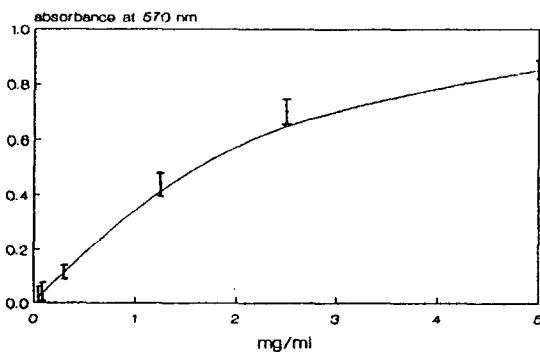


Fig. 4. Effect of MTT concentration on MTT-formazan production. Isolated rat hepatocytes were seeded at a density of 500,000 per well. MTT (a solution of 0 to 5mg/ml) was added. The medium was removed, and the MTT-formazan crystals were dissolved in acid-isopropanol. Each point and bar represent a mean and standard deviation of 5 samples.

도로 1/2에서 1/128까지 희석시켜 최적 MTT solution의 농도를 찾고자 하였다. 5mg/ml 근처에서는 plateau를 형성하였다. 그래서 5배 희석한 농도가 즉 1mg/ml가 적당하리라 생각된다(Fig. 4).

4. Optimal incubation time

Formazan 생성의 kinetics가 Fig. 5에 나타나 있다. 2시간 정도까지 생성이 증가하다가 그 이후로 감소한다. 그래서 2시간으로 정하였다. 또한 고감도가 필요치 않으면 1-2시간이면 충분하리라 사료된다.

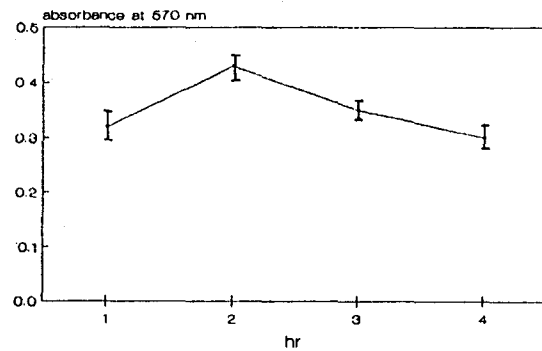


Fig. 5. Cultured rat hepatocytes were incubated with MTT-tetrazolium dye for various length of time. The amount of MTT-formazan was quantitated as described above and each point and bar represent a mean and standard deviation of 4 samples.

결 론

Formazan의 흡수 극대는 570nm 근처에서 상당히 넓게 나타났다. 또한 최적의 세포 농도는 well당 500,000개까지는 세포수와 흡광도가 서로 비례하여 증가하지만 그 이상에서는 오히려 감소하는 경향이 있다. 이는 아마도 "cell-cell contact inhibition" 현상이라 여겨진다. MTT 농도는 stock solution을 5mg/ml로 정해 여러 농도로 희석한 결과, 1mg/ml가 적당하리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1991년도 한국과학재단 목적 기초연구 과제에 의한 결과이며 지면을 통해 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 본 연구의 일부는 1993년도 대한약학회에서 발표, 대구, 1993년 4월
2. Mosman, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Method* 65, 55-63 (1983)
3. Slater, T.F., Sawyer, B., and Strauli, U.: Studies of succinate-tetrazolium reductase system III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochem. Biophys. Acta* 77, 383-393 (1963)
4. Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942 (1987)
5. Koji Sakamoto, Mayumi Tonooka, Koichiro Abe, Kenichi Usami and Takako Kasahara: Comparative Studies on Rat Primary Cultured and Isolated Hepatocytes in the Evaluation of a Therapeutic Agents for Liver Disease. *Japan J. of Pharmacol.* 41, 424-426 (1986)
6. Seglen, P.O.: Preparation of isolated rat liver cells, *Methods Cell Biol.*, 13, 29 (1976)
7. Denizot, F. and Long, R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. of Immunol. Methods*, 89, 271-277 (1986)
8. Okamoto, K., and Takeuchi, I. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 72, 739-746 (1976)
9. Cheung, S., Landfear, S.M., Blumberg, D.D., Cohen, N.S. and Lodish, H.F. *Cell* 24, 785-797 (1981)
10. Kaleko, M. and Rothman, F.G. *Cell* 28, 801-811 (1982)
11. Holley, R.W., Bohlen, P., Fava, R., Baldwin, J. H., Kleeman, G. and Armour, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2251-2255 (1980)
12. Whittenberg, B., and Glaser, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2251-2255 (1977)
13. Whittenberg, B., Raben, D., Lieberman, M.A. and Glaser, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5457-5461 (1978)