

폴리우레탄 폼을 이용한 쥐 일차 간세포의 구상체 배양

안재일·이두훈·이윤신*·이재석**·최운소***·박정극

동국대학교 공과대학 화학공학과, 서울대학교 의과대학 의공학연구소*
광주과학기술원 신소재공학과**, (주)동성화학 중앙연구소***
(1998년 3월 10일 접수, 1998년 5월 20일 채택)

Formation of Spheroids of Adult Rat Primary Hepatocytes in Polyurethane Foam

J.I. Ahn, D.H. Lee, Y.S. Lee*, J.S. Lee**, Y.S. Choi***, J.K. Park

Department of Chemical Engineering Dongguk University
Institute and Department of Biomedical Engineering College of Medicine Seoul National University*
Department of Materials Science and Engineering Kwangju Institute of Science and Technology (K-JIST)**
Central Research Institute***, Dong Sung Chemical Co., LTD**
(Received March 10, 1998, Accepted May 20, 1998)

요약: 본 논문은 급성 간 부전 환자나 간이식 대기상태에 있는 환자에 이용하기 위한 체외 간 보조장치를 개발하기 위한 기초 실험에 관한 것이다. 밀도 33kg/m^3 , 평균 직경 $500\mu\text{m}$, 60-70%의 window를 가진 폴리우레탄 폼을 15% NCO-프리폴리머로 제조하였다. 폴리우레탄 폼에 접종된 간세포는 3일 후에 거의 모두 $100\sim 150\mu\text{m}$ 크기의 구상체를 형성하였다. BSA 코팅을 한 폴리우레탄 폼은 BSA로 코팅하지 않은 폴리우레탄 폼보다 간세포 구상체 형성 시간이 더 짧았다. 폴리우레탄 폼에 형성된 간세포 구상체의 간 기능을 증명하기 위하여 암모니아 제거율과 요소 및 알부민 분비율을 측정하였다. 폴리우레탄 폼은 간세포 구상체 배양에 적합하며, 폴리우레탄 폼 내에서의 간세포 구상체 배양은 체외 간 보조장치로의 개발 가능성이 높다.

Abstract: This paper is fundamental study to develop the extracorporeal liver support system for patient with fulminant hepatic failure (FHF) or being expected for orthotopic liver transplantation. The polyurethane foam, which is composed of the density of 33kg/m^3 , the average pore diameter of $500\mu\text{m}$, the closed window of 60-70%, was manufactured with the prepolymer of 15% NCO-. Hepatocytes were inoculated to form spheroids in polyurethane foam. The time of spheroid formation in BSA(Bovine Serum Albumin) coated polyurethane foam was shorter than that in raw polyurethane foam. To verify the function of hepatocyte spheroids, we measured ammonia removal rate, urea and albumin secretion rate. Polyurethane foam was suitable for culture of hepatocyte spheroids. And culture of hepatocyte spheroids in polyurethane foam has high possibility in using as an extracorporeal liver support system.

Key words: Extracorporeal liver support system, polyurethane foam, hepatocyte spheroids

서 론

간은 체내로 들어오는 각종 독성물질의 해독과 체내에 필요한

효소 및 단백질의 합성을 비롯한 다양한 신진대사를 조절하는 필수적인 기관이다. 간은 유해물질에 가장 먼저 노출되는 환경에 있으면서도 다량의 혈류를 포함하고, 또한 왕성한 재생능력을 가지고 있다. 그러나 어떤 원인에 의하여 간세포의 파괴속도가 재생속도를 능가하게 되면 간의 괴사로 인한 전격성 간손상으로 진행하게 된다. 최근의 의학 발달에도 불구하고 전격성 간손상(fulminant hepatic failure, FHF) 환자의 경우 치사율이

*본 연구는 1996년도 보건복지부 지원 보건의료기술 개발사업 연구비(HMP-96-E-5-1012-A)에 의해 이루어졌음.

통신저자: 박정극, (100-715) 서울시 중구 필동 3가 26번지,
Tel. (02)260-3365, Fax. (02)271-3489

90%에 이르고 있는 실정이다[1]. 그러나 최근 간 이식술의 발달로 생존율이 70%에 이르는 간질환의 획기적인 치료 효과를 올리고 있지만 공여간의 제한으로 이식 대기 환자 중 10%만이 간이식을 받는 실정이다. 이에 따라 간이식 대기기간동안, 또는 간세포의 재생능력이 다시 활발해질 때까지 간기능을 대행해 줄 수 있는 체외 순환형의 간 보조장치를 개발하기에 이르렀다 [1-3].

인공간의 개발은 최근에 급부상 하고 있는 조직공학(tissue engineering)분야에서 이루어지고 있다. 이는 동물세포 배양기술의 한 분야로 다양한 조직을 체외에서 재구성하여 생체내 특성을 그대로 가진 조직으로 분화를 유도하여 실제 생체내의 기능을 갖도록 하는 기술이다[4,5]. 인공간은 신장과는 달리 투석막과 같은 장치로는 대체할 수 없기 때문에 주로 동물의 간세포를 이용하여 만든다[6]. 따라서 분리된 간세포를 높은 활성을 보유한 채로 장기간 유지시키는 연구가 인공간 개발에 필수적인 요소가 된다. 일반적인 배양조건에서 간세포는 매우 짧은 시간 안에 간기능을 상실하며 빠른 속도로 괴사한다. 동물의 간에서 분리된 일차 간세포가 3차원 구조를 가지는 구형의 집합체(구상체, spheroid)를 재구성할 수 있다는 것이 알려졌고[7,8] 간세포를 구상체(Spheroid) 형태로 배양하면 단층의 형태로 배양하는 것 보다 형태학적인 면, 생존력, 간 특이 기능의 활성 측면에서 우수하다는 것이 알려졌다[9-11]. 간세포 구상체는 플라스틱 배양 표면 및 여러 가지 물질이 코팅된 표면에서 형성시키기도 하였으며[11] 최근에는 부유 교반을 이용하여 많은 양의 구상체를 형성시키기도 하였다[12,13]. 그러나 부유 상태의 구상체는 다시 반응기에 적당한 방법으로 고정화되어야 하므로 공정이 하나 더 추가되는 단점이 있다. 또한 분리된 간세포를 체외 인공간 보조장치에 사용하기 위해서는 고농도의 많은 간세포가 장기간 유지될 수 있어야 한다. 간세포 단층 배양은 구상체 배양보다 수십-수백배 넓은 부착 표면이 필요하고 세포 그 자체도 활성을 쉽게 잃는 단점을 가지고 있다. 이에 간세포 구상체 형성과 많은 부착 표면을 제공할 수 있는 폴리우레탄 폼을 사용하기도 하였다[14-16]. 폴리우레탄은 우수한 기계적 성질과 비교적 좋은 생체적합성을 가지고 있어 여러 가지 생체 의료용 고분자로 많이 사용되고 있다. 또 폴리우레탄 폼은 단위 부피당 높은 표면적을 제공해 주는 다공성 구조를 가지고 있어 고밀도 세포 배양을 위해 사용되기도 하였다[17].

본 연구에서는 간세포 구상체 형성에 적합한 폴리우레탄 폼을 제조하려 하였다. 간세포 구상체 배양에 적합한 폼은 충분한 영양을 공급하기 위해서 대부분이 pore이어야 하기 때문에 겔보기 밀도는 가능한 한 작아야 한다. 간세포 구상체의 크기가 100-150 μ m이므로 폴리우레탄 폼의 pore의 크기는 300-500 μ m가 적당하다. 배지와 세포가 폴리우레탄 폼 내에 들어가야 하므로 폴리우레탄 폼의 pore는 열려있어야 하나 접착한 간세포가 모두 흘러 빠져나가지 않도록 window(pore와 pore 사이의 얇은 막)는 60-70%는 있어야 한다. 반응기 충전에 용이하도록 적당한

강도를 가지고 있어 가공이 쉬운 폴리우레탄 폼을 만들어야 하고 간세포에 해가 되지 않게 독성 물질이 없어야 한다. 그러나 폴리우레탄 폼의 이러한 물성은 상호 연관을 갖고 있기에 위와 같은 물성을 모두 갖는 폴리우레탄 폼을 얻기는 쉽지 않다. 따라서, 위에 언급한 특성 중에서 pore의 크기와 window 개방 정도는 구상체 형성에 있어서 매우 중요한 요인이므로 이에 중점을 두어 폴리우레탄 폼의 제조 조건을 최적화하려 하였다. 이와 더불어 체외 간 보조장치로서의 개발 가능성을 알아보기 위하여 제조된 폼에 간세포를 접종하여 구상체의 형성을 확인하였으며, 폴리우레탄 폼 내의 간세포 구상체의 암모니아 제거, 요소 및 알부민의 분비와 같은 간 특이 기능 활성을 관찰하였다.

실험 재료 및 방법

1. 폴리우레탄 폼의 제조 및 준비

폴리우레탄 폼을 제조하는 방법에는 혼합하는 형태에 따라 크게 세 가지 방법으로 나누어진다[18]. 본 실험에서 사용한 폴리우레탄 폼 제조 방법은 two-component 방법과 NCO- 프리폴리머에 의한 방법이다.

Two-component 방법은 NCO기를 가진 isocyanate를 제외한 모든 원료들(polyol, H₂O, catalyst, surfactant : polyol mixture라 함)을 400rpm으로 먼저 혼합시킨 후에 polyol 및 H₂O와 반응할 수 있는 적당량의 isocyanate를 첨가하고 5000rpm으로 mixing하여 폼을 제조하는 방법인데 각각의 조성을 제조하고자 하는 폼에 따라 조절할 수 있는 방법이다. NCO-프리폴리머 방법은 MDI(Diphenylmethane-4-4'-diisocyanate)를 플라스크에 넣고 polyol을 서서히 가하면서 70-80 $^{\circ}$ C의 온도에서 4시간동안 중합한다. 이때 MDI를 과량으로 넣으면 중합 후 NCO잔기가 남게 된다. 여기서 얻어진 프리폴리머에 surfactant, catalyst, H₂O를 넣고 고속으로 회전하여 혼합하면 폴리우레탄 폼을 얻을 수 있다. 순수한 diphenylmethane-4-4'-diisocyanate는 Pure MDI를 말하며 상온에서 Pure MDI가 고체이기 때문에 carbodiimide화하여 액체 상태로 만들어 취급이 용이하도록 한 것이 Liquid MDI이다. Crude MDI는 반복 단위인 phenylmethane isocyanate가 하나이상 있는 MDI를 말한다. 그림 1은 배양에 사용된 폴리우레탄 폼의 제조 방법인 NCO-프리폴리머 방법을 나타낸 것이다. polypropylene glycol(M.W. : 3000, 동성화학) 1몰당 Crude MDI 9.13몰을 반응시켜 먼저 15%의 NCO잔기를 갖는 프리폴리머를 제조하였다. 반응은 70~80 $^{\circ}$ C를 유지하면서 Crude MDI에 polypropylene glycol을 조금씩 첨가하면서 200rpm으로 4시간 동안 질소 하에서 진행하였다. 합성된 15% NCO-프리폴리머에 계면활성제(B-4113, TH. Goldschmidt, Germany)는 1.5%, 촉매(Kao-1, Kao, Japan)는 1.0%, 물은 7.5%를 첨가하여, 5000rpm의 속도로 약 10초동안 교반시킨 후 방치하면 발포된다. 제조된 폼은 phase contrast microscope를 사

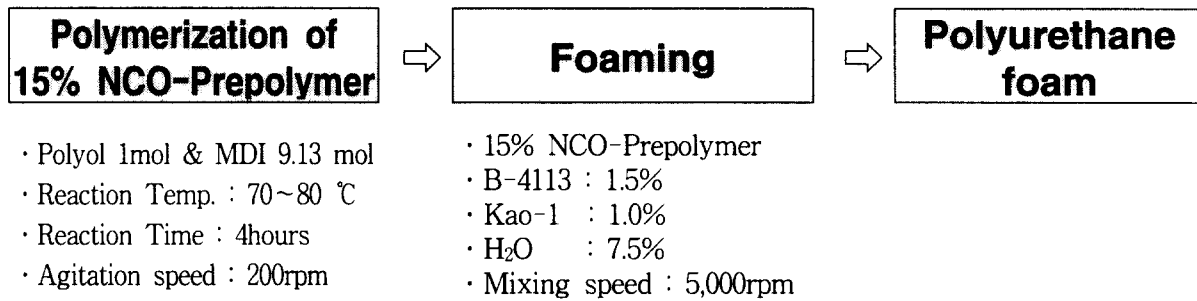


그림 1. 폴리우레탄 폼 제조 순서
Fig. 1. The manufacturing processes of polyurethane foam

용하여 관찰하였다.

폴리우레탄 폼을 직경 35mm, 두께 2mm인 원판으로 자르고 에탄올에 하루동안 방치한 다음 3차 증류수로 세번 세척한다. 두번의 PBS(Phosphate Buffered Saline)세척 후 폴리우레탄 폼의 멸균과 폴리우레탄 폼 내의 기포 제거를 위해 가압 멸균하여 세포 배양 배지로 다시 한번 세척한 후 간세포 배양에 사용하였다. 또한 구상체 형성에 적합한 표면 성질 개선을 위해 폴리우레탄 폼을 BSA(Bovine serum albumin)로 coating하였다. 폴리우레탄 폼은 먼저 3차 증류수에 넣고 폴리우레탄 폼을 가압 멸균하여 폴리우레탄 폼 내의 기포를 제거하였다. 기포를 제거한 폴리우레탄 폼을 BSA용액(600µg/ml)에 하루동안 반응시킨 후 건조하였다. 그 다음 PBS로 2번 세척 후 vacuum을 걸어 폴리우레탄 폼 내에서 미세 기포를 제거한 다음 간세포 배양 배지로 세척한 후 간세포 배양에 사용하였다.

2. 쥐 간세포의 분리

간 세포의 분리는 Seglen-method[10]에 기초를 두고 변형된 방법을 실행하였다. 이는 *in situ* 상태에서 collagenase로 간의 기질을 분해하여 2단계로 시행한다[19,20]. 중량이 180-200g의 Sprague-Dawley rat을 동물용 마취제인 1mg/100g 렘폰(Xylazine, 바이엘코리아(주))과 5.8mg/100g 케타민(염산케타민, 염화벤젠제토늄 10µg/100g, 유한양행)을 주사하여 마취시키고 쥐의 복부를 연다. 간 문맥(portal vein)을 찾아 catheter를 꽂은 다음 perfusion buffer 용액(NaCl 8 g/L, KCl 0.4 g/L, NaH₂PO₄ 2H₂O 0.078 g/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.151 g/L, HEPES(4-(2-HydroxyEt-hyl)-1-PiperazineEthane-Sulfonic acid, Sigma Chem Co.) 2.38 g/L, EDTA(Ethylenediaminetetraacetic Acid, Gibco BRL Co.) 0.19 g/L, Sodium bicarbonate 0.35 g/L, Glucose 0.9 g/L, Penicillin 100 Unit /mL, Streptomycin 10 mg/mL, Amphotericin B 25 µg/mL)을 25 mL/min의 속도로 10분 동안 흐르게 하여 충분히 세척한다. 이때 perfusion buffer 용액의 온도는 37°C가 유지되게 하고 실리콘 튜브를 통과시키면서 90% O₂/10% CO₂ 의 혼합가스로 평형시켰으며 간으로 공기 방울이 들어가지 않도록 간으로 들어가 바로 앞부분에 bubble trapper를 설치하였다. 2단계로는

Collagenase 용액(Collagenase(Gibco BRL) 0.5 g/L, Trypsin inhibitor(Gibco BRL) 0.05 g/L, NaCl 8 g/L, KCl 0.4 g/L, CaCl₂ 0.56 g/L, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.078 g/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.151 g/L, HEPES 2.381 g/L, Sodium bicarbonate 0.35 g/L, Penicillin 100 Unit/mL, Streptomycin 10 mg/mL, Amphotericin B 25 µg/mL)을 catheter를 통해서 20 mL/min의 유속으로 10분 동안 1단계와 같은 방법으로 흐르게 한다. Perfusion buffer 용액이 흐르기 시작하면 암적색의 간은 혈액이 빠지면서 바로 노랗게 변하며 collagenase가 들어있는 collagenase 용액이 흐르기 시작하면 간의 기질이 분해되기 시작하여 간이 조금씩 부풀기 시작한다. 관류가 끝날 무렵에는 처음 보다 약 2배가량 커지게 된다. 이러한 간을 떼어내어 petri dish에 옮긴 후 메스로 간의 capsule을 자르면 간세포가 풀어져 나오기 시작한다. 풀어진 간 조직을 William's Medium E(Gibco BRL)로 세척하여 거즈에 거르고, 100 µm pore의 나일론 메쉬에 거른 후 4°C에서 원심분리(500rpm, 50g, 2분)한다. 이러한 원심분리 조건에서 간세포는 대부분 가라앉으며 간의 다른 비실질세포는 대부분 부유상태로 있게 된다. 위의 원심분리를 3회 반복하면 간세포만을 얻을 수 있다. 간세포의 viability는 trypan blue staining 방법에 의하여 측정하였다. 보통 200 g의 쥐로부터 약 2-3×10⁸ 개 정도의 간세포를 회수할 수 있다.

3. 간세포 배양 배지 및 단층 배양

간세포 배양에 사용한 배지는 무혈청 배지로서 기본 배지로는 Williams' Medium E(Gibco BRL)을 사용하였으며 여기에 epidermal growth factor(20 µg/L, Gibco BRL), insulin(10 mg/L, Gibco BRL), CuSO₄ 5H₂O(0.1 µM, Sigma Chem. Co), ZnSO₄ 7H₂O(50 pM, Sigma Chem. Co.), H₂SeO₃(3µg/L, Sigma Chem. Co.), Linoleic acid(50 mg/L, Sigma Chem. Co.), NaHCO₃(1.05 g/L, Gibco BRL), HEPES(1.19 g/L, Sigma Chem. Co), Penicillin(100 Unit/mL, Gibco BRL), Streptomycin(10 mg/mL, Gibco BRL), Amphotericin B(25 µg/mL, Gibco BRL)를 첨가하여 실험에 사용하였다.

단층배양에 사용하는 직경이 35mm인 배양 well(6 well plate, Nunc Co.)은 0.5 mg/mL 농도의 collagen(Type I calf

skin, Sigma Chem. Co.) 용액으로 바닥을 두 번 적신후 멸균과 건조를 위해 UV에 16시간 노출시킨 후 보관하였으며, 간세포 접종 직전 배양배지로 한번 세척한 후 사용하였다. 5×10^5 viable cells/mL 농도의 간세포 용액을 well 당 2 mL 씩 접종하였고 4시간 경과 후 배지를 교체하였다. 그 후로는 매일 배지를 교체하였다. 사용된 배지는 암모니아, 요소, 알부민 분석을 위하여 -20°C 에서 보관하였다.

4. 폴리우레탄 폼 내에서의 간세포 구상체 배양

배지로 세척한 폴리우레탄 폼(지름 35mm, 두께 2mm)을 6-well plate에 미리 넣어 놓았다. 위의 간에서 분리된 간세포를 1×10^6 cells/mL 농도의 세포 용액을 3.3ml 접종하였다. 세포 접종 후 37°C , 5% CO_2 /95% air CO_2 incubator 내에서 배양하였다. 초기 접종 4시간 후 간세포가 접종된 폴리우레탄 폼을 다른 well에 옮긴 후 배지에 남아 있는 간세포를 측정하여 폴리우레탄 폼 내에 접종된 간세포의 농도를 결정하였다. 배지는 접종 후 4시간, 24시간 경과 후 교체해 주며 그 후로는 매일 갈아주었다. 사용된 배지는 암모니아, 요소, 알부민 분석을 위하여 -20°C 에서 보관하였다. 배지 교체는 총 3.3mL 중 폴리우레탄 폼이 품고 있는 양인 1.3mL를 제외한 2mL를 교체해 주었다. 배양 시작 후 2일 정도 경과하면 직경 100-150 μm 의 간세포 구상체가 형성된다. 간세포 구상체의 형성 과정과 변화를 관찰하기 위하여 phase contrast microscope를 사용하였다.

5. 암모니아 농도 측정

간세포 구상체의 해독 능력을 알아보기 위하여 간의 주요 대사기능의 하나인 암모니아 분해능을 조사하였다. 배양 시작 48시간 경과 후부터는 배지에 1mM NH_4Cl 을 첨가하여 시간에 따른 암모니아 분해속도를 측정하였다. 암모니아는 assay kit(indophenol method, 아산제약)를 사용하여 측정하였는데 그 방법은 다음과 같다. 정색저해 성분을 제거하고 배지내 효소를 고정시키기 위한 제단백시약(텅스텐산나트륨 50g/L) 640 μL 에 간세포 배양 배지와 표준액을 각각 160 μL 를 넣고 잘 섞은 후 발색시약 A(페놀 40g/L), B(수산화나트륨 35.6g/L), C(10% 차아염소산나트륨)를 각각 1mL, 0.5mL, 1mL를 차례로 넣은 후 37°C 에서 20분간 반응시키고 630nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6. 요소 농도 측정

간세포 구상체의 해독 능력을 알아보기 위하여 간의 주요 대사기능인 요소 분비량을 조사하였다. 요소의 양은 Sigma assay kit(Sigma diagnostics 535)로 측정하였는데 그 방법은 다음과 같다. Bun acid(ferric chloride in phosphoric and sulfuric acids)와 Bun color (diacetyl monoxime 0.18(w/v)% and thiosemicarbazide)를 3:2 부피비로 섞은 용액 3mL에 배지와 요소 표준용액을 36 μL 씩 넣고 끓는물에 10분간 반응시키면

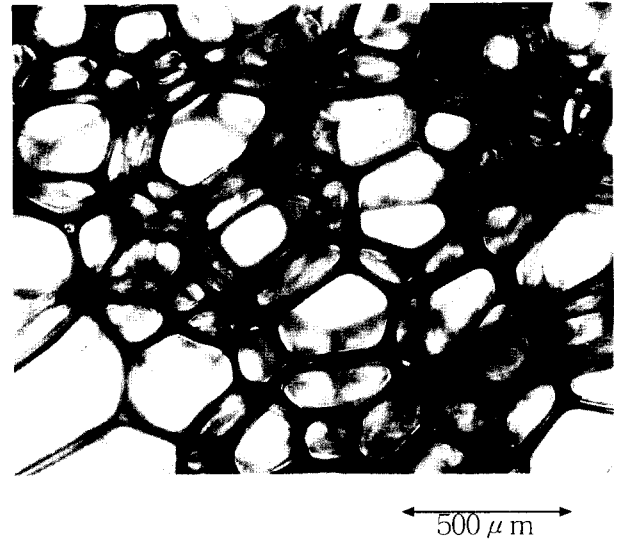


그림 2. 15% NCO-프리폴리머로 제조한 폴리우레탄 폼 사진(40배)
Fig. 2. Light microscopic picture of polyurethane foam. Arrow indicates 500 μm (40 \times , Manufactured by 15% NCO-prepolymer)

분홍색을 띠게 되고 이를 530nm 파장에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

7. 알부민 농도 측정

간의 특이 기능중의 하나로서 중요한 대사 기능의 하나인 알부민 분비능을 측정하여 간세포의 활성도를 예측하였다. 측정 방법은 다음과 같다. Bicarbonate coating buffer(Na_2CO_3 0.04 M, NaHCO_3 0.06 M)를 사용하여 1차항체(IgG fraction to rat albumin, Cappel 55727)를 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석하여 96 well plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp)의 well 당 100 μL 씩 넣고 4°C 에서 16~18시간 동안 정치하여 1차 항체를 바닥에 흡착시킨 후 PBST(0.05% Tween20(Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate, Sigma Chem Co.)/PBS(phosphate buffered saline)) 200 μL 로 세번 세척한다. 고정화 용액인 PBS 3% Casein 용액을 well 당 100 μL 를 넣고 1시간 실온에서 정치한 후 PBST 세척 과정을 반복하였다. PBS로 100배 희석된 배지 상등액과 PBS로 희석된 standard albumin(purified rat albumin, Cappel 55952)을 well당 100 μL 를 넣고 실온에서 1시간 정치하여 반응시키고 다시 PBST 세척을 한다. 여기에 2차 항체(peroxidase-conjugated IgG fraction to rat albumin, Cappel 55776)를 PBS로 5000배 희석하여 well당 100 μL 씩 넣고 실온에서 1시간 정치한다. 여기에 0.4 mg/mL OPD(o-phenylenediamine)와 0.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ H_2O_2 (30%)를 포함한 Citrate-phosphate buffer(0.1M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 48.5mL + 0.2M Na_2HPO_4 , 51.5mL)를 well당 100 μL 씩 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 2M H_2SO_4 를 well당 100 μL 씩 넣어 반응을 중지시켰으며, 흡광도는 ELISA reader(Ceres UV900 HDi, Bio-Tek Instruments)로

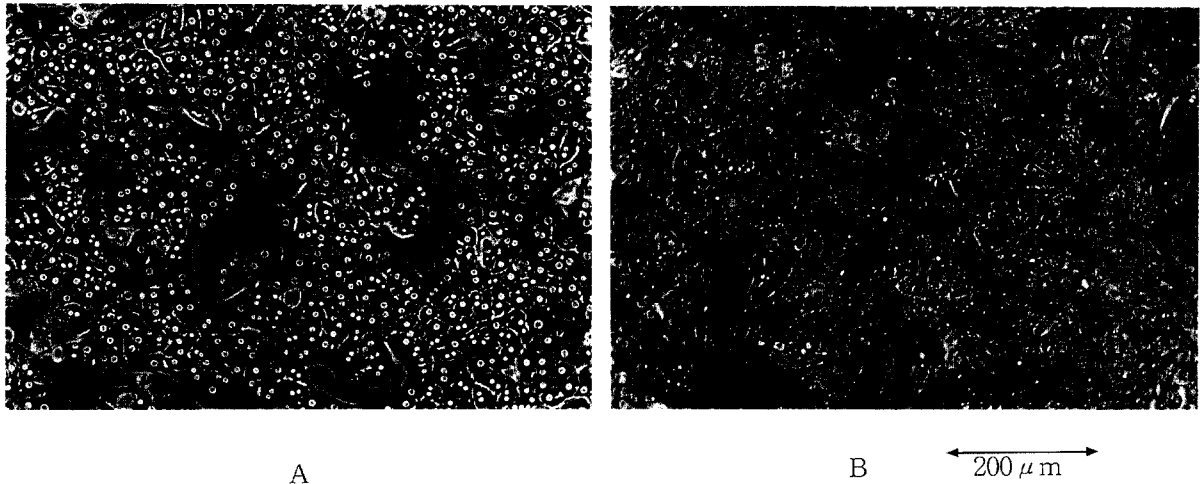


그림 3. 단층 배양에서의 간세포 형태의 변화(100배, A : 1일, B : 5일)
 Fig. 3. Light microscopic pictures of hepatocyte monolayer. Arrow indicates 200 μ m(100 \times , A : 1day, B : 5days)

490nm 파장에서 측정하였다.

결과 및 토론

1. 폴리우레탄 폼 제조

그림 2는 배양에 사용한 폴리우레탄 폼을 나타낸 것이다.

폴리우레탄 폼의 겉보기 밀도는 폼을 5개의 직육면체로 잘라 각각의 부피와 질량을 측정하여 밀도를 평균하였다. 폴리우레탄 폼 pore의 평균 직경은 PUF를 현미경 사진을 찍고 10개의 pore의 직경을 재어 평균하였고, window 측정은 PUF를 최대한 얇게 자른 sheet를 다시 수직으로 잘라 모서리에 노출된 window를 현미경으로 관찰하여 평균하였다.

그 결과 폴리우레탄 폼의 겉보기 밀도는 약 33kg/m³이었고 pore의 평균 직경은 약 500 μ m이었으며, 간세포가 빠지지 않고 부착표면을 제공하는 window는 전체 pore중 60-70%를 차지하였다. 상대적으로 폼의 기계적 물성은 다소 떨어졌으나 충진이나 반응기 제작에는 지장이 없었다.

간세포 구상체에 적합한 폴리우레탄 폼을 만들기 위해서 먼저 경질 폼에 주로 쓰이는 two-component 방법으로 폴리우레탄 폼을 제조하여 밀도를 낮추고 가공이 용이한 폼을 얻으려 하였다. Two-component 방법으로 Crude MDI를 원료로 하여 폼을 제조한 결과 폼의 window는 모두 닫혀 있었다. Liquid MDI, Pure MDI를 원료로 하여 만든 폼은 window가 열렸으나 큰 밀도의 폼을 얻었고 또 Pure MDI를 원료로 하여 만든 폼은 쉽게 부서지는 물성을 가졌다. Pure MDI는 상온에서 고체이기 때문에 two-component 방법으로 폴리우레탄 폼을 만들려면 가열하여 액체상태로 만들어 혼합해야 한다. 폴리우레탄 폼 생성 반응은 발열 반응인데 Pure MDI를 가열하여 반응시키므로 반응이 더디고 반응이 완결되지 않고, 가열하여 액체로 만드는 과정에

서 dimer가 생성된 것 같아 폼의 물성이 좋지 않은 결과를 낳은 것으로 생각된다.

다음은 NCO-프리폴리머 방법으로 15% 프리폴리머를 이용하여 폴리우레탄 폼을 제조하였다. Liquid MDI, Pure MDI로 만든 폼은 pore가 모두 열려 있었고 높은 밀도의 폼을 얻었다. Pure MDI로 만든 폼은 물성이 좋지 않았다. 그러나 Crude MDI를 원료로 15% NCO-프리폴리머를 제조하여 계면활성제(B-4113) 1.5%, 촉매(Kao-1) 1.0%, 물 7.5%를 넣어 발포시킨 결과 그림 2와 같은 간세포 구상체 배양에 적합한 폴리우레탄 폼이 제조되었다. Two-component 방법은 높은 NCO-%를 갖는 MDI를 폴리우레탄 폼 제조에 바로 사용한다. 그러므로 반응성이 좋은 NCO기가 반응을 빨리 진행하게 하여 폼의 생성 반응을 빨리 종결하게 한다. 그래서 Crude MDI의 경우 window가 모두 닫혀 있는 결과를 낳게 하였다. 반면 NCO-프리폴리머 방법은 NCO-%를 낮추어 반응 시간을 조절할 수 있어 상대적으로 원하는 폴리우레탄 폼을 제조하는 것이 용이하다.

후후 폴리우레탄 폼의 물성을 향상하여 간세포 구상체 형성과 배양에 더 적합한 폴리우레탄 폼을 만들어야 할 것이다.

2. 간세포의 단층 배양

간세포는 부착의존성(anchorage dependent) 세포로서 배지 성분에서 따라 다소 차이가 있으나 *in vitro*에서 거의 증식을 하지 않는 것으로 알려져 있다[21]. 일반적인 동물세포 배양용 양전하를 띤 polystyrene flask에 간세포를 접종하면 일부세포는 부착하지만 많은 양의 세포는 서로 응집되어 바닥에 반구상체를 형성하게 된다. 따라서, 단층배양에 사용한 6-well plate는 재료 및 방법에서 설명한 것과 같이 collagen으로 코팅하여 사용하였다. 그림 3은 단층 배양에서의 시간에 따른 간세포의 형태 변화를 나타낸 광학현미경 사진이다. 단층 배양의 경우 접종 3~4시간이 지나면 대부분의 세포가 부착하여 배지를 교체하여도 되지

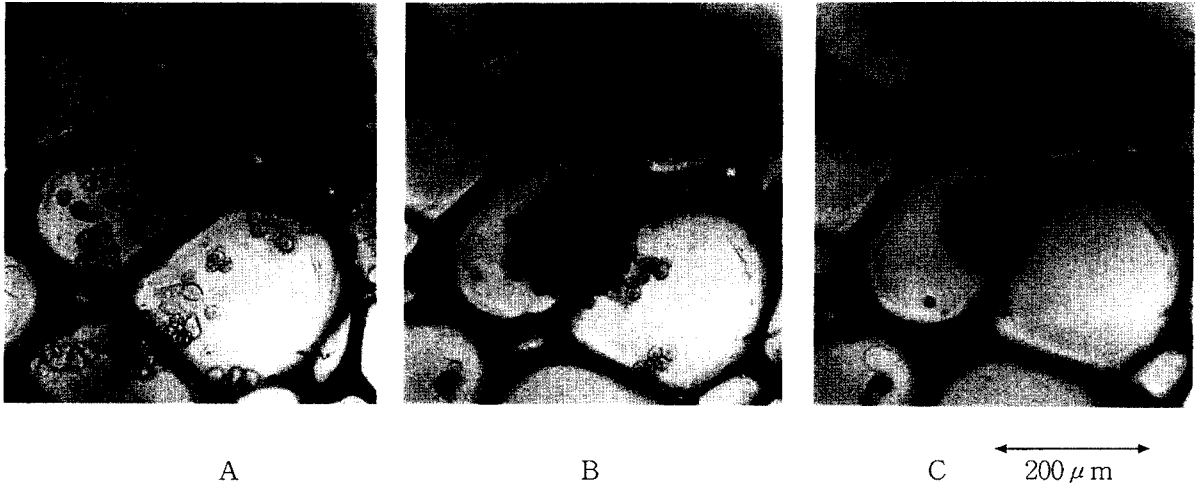


그림 4. 폴리우레탄 폼 내에서의 간세포 형태의 변화(100배, A : 1일, B : 2일, C : 4일)
 Fig. 4. Change of hepatocyte morphology in polyurethane foam. Arrow indicates 200 μ m(100 \times , A : 1day, B : 2days, C : 4days)

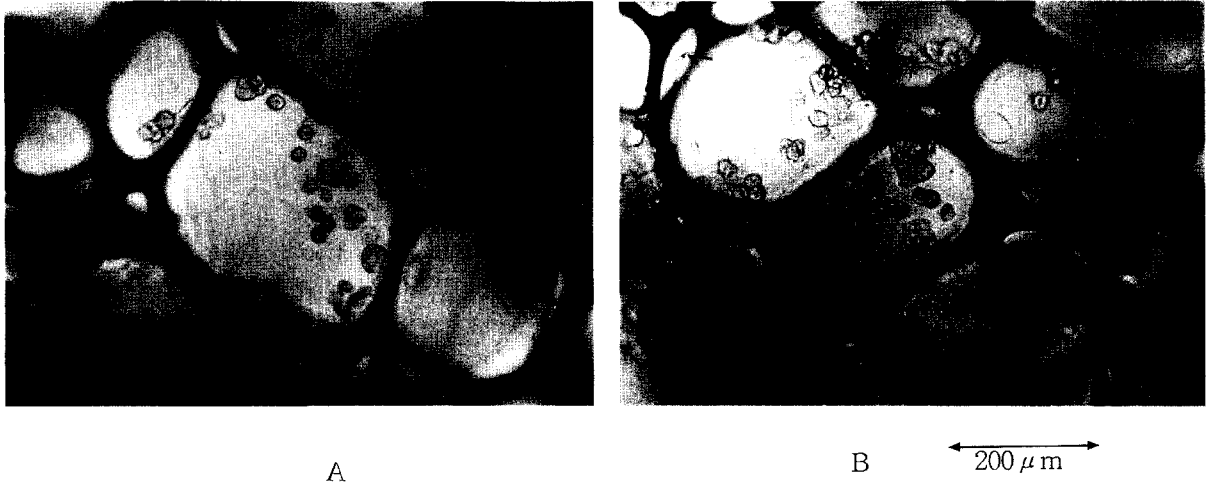


그림 5. Bovine Serum Albumin으로 코팅한 것과 하지 않은 것의 간세포 형태(100배, 1일, A : 알부민 코팅한 폼, B : 코팅하지 않은 폼)
 Fig. 5. Morphology of hepatocytes inoculated in polyurethane foam with and without BSA(Bovine Serum Albumin) coating. Arrow indicates 200 μ m(100 \times , 1day, A : Albumin coating, B : No coating)

만 완전히 spreading이 되려면 하루 정도 지나야 한다. 35 mm 크기의 well에 1×10^6 개의 세포를 접종하였는데 배양 초기 많은 빈 자리가 나타나지만 2~3일이 지나면 간세포가 더욱 넓게 퍼져 배양 표면이 모두 덮이게 된다. 그러나 일주일 정도 경과 하면 배양 표면은 괴사하기 시작하는 간세포로 인하여 다시 빈 표면이 생기기 시작하며, 간세포는 형태가 더욱 길게 늘어나 섬유세포 비슷해지고 세포 괴사는 계속 진행된다. 이와 같이 단층 배양된 간세포는 많은 표면을 다른 간세포나 세포의 기질과 접하고 있는 *in vivo* 상태의 간세포 구조와는 상이한 구조를 가지게 된다.

3. 폴리우레탄 폼 내에서의 간세포 배양

준비된 폴리우레탄 폼을 well에 미리 넣어 놓았다. 세포 배양에 쓰는 폴리우레탄 폼 내에서의 미세 기포 제거는 필수적이다. 미세 기포는 배지의 흐름을 막을 수도 있고 세포의 안정한 접촉에 방해가 될 수도 있다.

Well당 1×10^6 cells/mL 농도의 세포 용액을 3.3mL 접종하였으며, 접종 4시간 후 폴리우레탄 폼을 다른 well에 옮긴 후의 배지에 남아 있는 간세포는 초기 접종량의 약 60%였다. 그러므로 실제로는 4×10^5 cells/mL의 농도로 접종된 것이다. 그림 4에 보이는 것과 같이 폴리우레탄 폼에 접종된 간세포는 하루가 지나면 엉기기 시작하였으며 3일 후에는 거의 모든 간세포가 100~

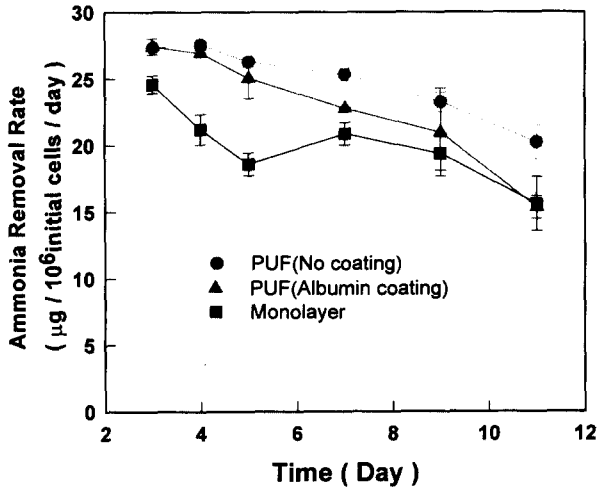


그림 6. 간세포의 단층 배양과 폴리우레탄 폼 내에서 간세포 구상체의 암모니아 제거율
 Fig. 6. Ammonia removal rate of hepatocyte monolayer and spheroids in polyurethane foam

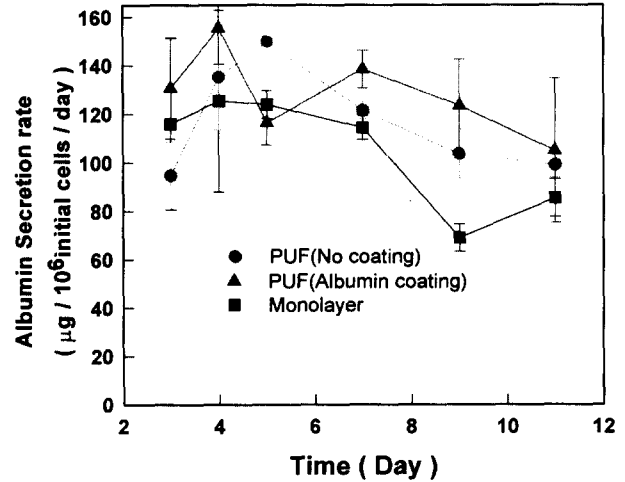


그림 8. 간세포의 단층 배양과 폴리우레탄 폼 내에서 간세포 구상체의 알부민 분비율
 Fig. 8. Albumin secretion rate of rat hepatocytes cultured as monolayer and spheroids

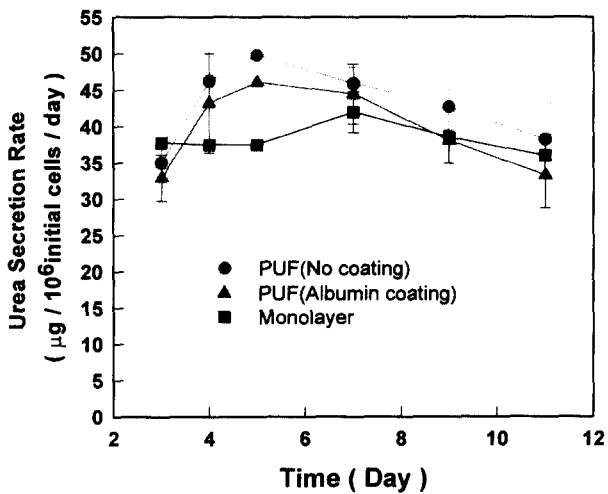


그림 7. 간세포의 단층 배양과 폴리우레탄 폼 내에서 간세포 구상체의 요소 분비율
 Fig. 7. Urea secretion rate of rat hepatocytes cultured as monolayer and spheroids

150µm 크기의 구상체를 형성하였다. Trypan blue staining 방법으로 폴리우레탄 폼을 염색하여 관찰한 결과 대부분의 간세포 구상체가 살아있는 것으로 나타났다. 그림 5는 폴리우레탄 폼을 BSA로 코팅한 것과 하지 않은 것의 간세포 거동을 보인 것이다. BSA 코팅을 하지 않은 폴리우레탄 폼에서의 간세포는 핵이 보일 정도로 간세포가 너무 잘 부착되어 구상체를 형성하는데 걸리는 시간이 더디었다. 반면 BSA로 코팅한 폴리우레탄 폼 내에서의 간세포는 폴리우레탄 폼 표면에 spreading 되지 않은

상태에서 구상체가 되어 구상체를 형성하는데 시간이 짧았다.

4. 간기능 활성도 측정

그림 6과 7은 각각 암모니아의 제거 속도와 요소 분비 속도를 나타낸 것이다. 1mM의 NH₄Cl이 포함된 배지는 구상체가 형성된 후인 2일 경과 후에 첨가하기 시작하였다. 암모니아 제거율의 경우는 폴리우레탄 폼에서 형성된 간세포 구상체가 조금씩 높게 나타났으나 전체적인 경향은 단층 배양의 경우와 비슷하였다. 요소 분비의 경우 구상체 형태로 배양된 간세포에서 3-5일 경에 단층 배양에서는 볼 수 없는 요소 분비량의 증가가 나타났는데 이것은 구상체의 대사가 보다 활발하다는 증거로 생각되며 단층 및 구상체 형태 모두 암모니아 제거율이 감소함에도 불구하고 요소 분비율이 높게 유지되는 것은 세포 자체의 대사 과정에서 발생하는 암모니아에서 유래한 요소의 양도 전체 요소 분비량의 상당한 부분을 차지한다는 것을 의미한다. 그림 8은 알부민의 분비 속도를 나타낸 것이다. 배양 시간이 흐를수록 분비량은 감소하지만 상당 기간동안 알부민이 분비되는 것을 알 수 있었으며 단층으로 배양한 경우보다 높은 분비 속도를 유지하여 구상체 형태의 간세포가 인공간 시스템 제작에 유리한 방법으로 판단된다.

폴리우레탄 폼을 BSA로 코팅한 경우에 구상체가 보다 빠르게 형성되었으나 전체적인 간기능은 비슷하게 나타났다. 구상체 형성 시간의 단축이 간기능의 증대를 유도하지는 못하였으나 실제 환자에 사용하기 위한 인공간 보조 장치의 제작기간은 단축할 수 있는 장점을 가지고 있다.

최근 체외 인공간 순환 장치로 널리 쓰이는 hollow fiber[3]는 간세포를 분리한 후 구상체를 형성시키고 여러 가지 matrix

에 고정하여 반응기에 충전시키는 많은 단계를 거친다. 반면 PUF는 hollow fiber와는 달리 간세포를 분리, 접종한 후 배양하면 바로 구상체가 형성되므로 인공간 보조 장치 제작이 간편하다는 장점이 있다.

이상의 결과를 볼 때 폴리우레탄 폼은 간세포 구상체 배양에 상당히 적합한 재료로 생각되며 체외 간 보조장치로의 개발 가능성이 가지고 있는 것으로 판단된다.

추후 연구는 간기능 활성도를 적어도 2~3주 동안 초기의 높은 상태로 유지하고 또한 scale up과 반응기 제작에 용이한 보다 개선된 폴리우레탄 폼의 제조와 폴리우레탄 폼의 적절한 표면 개질 그리고 폴리우레탄 폼에 고밀도의 간세포 접종 방법, 간세포 구상체 형성 조건의 최적화 노력이 더욱 필요한 것으로 판단된다.

결 론

15% NCO-Prepolymer를 이용하여 간세포 구상체 형성에 적합한 폴리우레탄 폼을 제조하였고 제조한 폴리우레탄 폼에 간세포를 접종한 결과 적당한 크기의 구상체가 형성되었다. 폴리우레탄 폼에 형성된 간세포의 간 기능 활성을 측정된 결과 단층 배양의 경우와 비슷한 간 기능 활성을 나타내었고 BSA로 dry coating한 폴리우레탄 폼에서 구상체가 좀더 빨리 형성되었다. 그러므로 폴리우레탄 폼은 간세포 구상체 배양에 적합하며 폴리우레탄 폼 내에서의 간세포 구상체 배양은 체외 간 보조장치로의 개발 가능성이 높다.

참 고 문 헌

1. A. Kamlot, J. Rozga, F. D. Watanabe, and A. A. Demetriou, "Review: Artificial Liver Support Systems", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 50, No. 4, pp. 382-391, 1996.
2. J. Rozga, A. A. Demetriou, et.al., "Isolated Hepatocytes in a Bioartificial Liver: A Single Group View and Experience", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 43, pp. 645-653, 1994.
3. R. A. Shatford, S. L. Nyberg, W. S. Hu, et.al., "Hepatocytes Function in a Hollow Fiber Bioreactor: A Potential Bioartificial Liver", *J. of Surgical Research*, Vol 53, pp. 549-557, 1992.
4. S. M. Edgington, "A New Force In Biotech: Tissue Engineering", *Bio/Technol.*, Vol. 12, pp. 361-364, 1994.
5. R. Skalak, "Tissue Engineering", *Proc. The 15th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pp. 1112-1113, 1993.
6. M. Michio, "Hepatic Assist: Present and Future", *Artifi-*

- cial Organs, Vol. 10, No. 3, pp 214-218, 1986.
7. A. P. Li, S. M. Colburn, and D. J. Beck, "A Simplified Method for the Culturing of Primary Adult Rat and Human Hepatocytes as Multicellular Spheroids", *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28A, pp. 673-677, 1992.
8. J. Landry, D. Bernier, C. Ouellet, R. Goyette, and N. Marceau, "Spheroidal Aggregate Culture of Rat Liver Cells: Histotypic Reorganization, Biomatrix Deposition, and Maintenance of Functional Activities", *J. Cell Biol.*, Vol. 101, pp. 914-923, 1985.
9. 이재호, 박정극, 최태부, "세포형태에 따른 쥐 간세포의 분화기능", *한국생물공학회지*, Vol. 7 No. 4, pp. 278-283, 1992.
10. P. O. Seglen, "Preparation of Isolated Rat Liver Cells", *Meth. Cell. Biol.*, Vol. 13, pp. 29-83, 1975.
11. N. Koide, K. Skaguchi, Y. Koide, K. Asano, M. Kawaguchi, H. Matsushima, T. Takenami, T. Shinji, M. Mori, and T. Tsuji, "Formation of Multicellular Spheroids Composed of Adult Rat Hepatocytes in Dishes with Positively Charged Surfaces and under Other Nonadherent Environments", *Exp. Cell. Res.*, Vol. 186, pp. 227-235, 1990.
12. 이두훈, 류재남, 양은경, 정미경, 박순희, 박정극, "교반 용기를 이용한 쥐 일차 간세포의 구상체 배양", *한국생물공학회지*, Vol. 12, No. 4, pp 449-455, 1997.
13. F. J. Wu, J. R. Friend, D. D. Hsiao, M. J. Zilliox, W. J. ko, F. b. Cerra, and W. S. Hu, "Efficient Assembly of Rat Hepatocyte Spheroids for Tissue Engineering Applications", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 50, pp 404-415, 1996.
14. T. Matsushita, H. Ijima, N. Koide, and K. Funatsu, "High Albumin Production by Multicellular Spheroids of Adult Rat Hepatocytes formed in the Pores of Polyurethane Foam", *Appl. Microbiol Biotechnol*, Vol. 36, pp. 324-326, 1991.
15. H. Ijima, Y. Taniguchi, T. Matsushita and K. Funatsu, "Application of Three Dimensional Culture of Adult Rat Hepatocytes in PUF Pores for Artificial Liver Support System", *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, pp. 81-86, 1992.
16. T. Matsushita, H. Ijima, S. Wada, T. Iwahashi and K. Funatsu, "Development of a Hybrid Artificial Liver Support System using PUF/Spheroid Packed-bed", *Animal Cell Technology: Development towards the 21st Century*, pp. 1049-1053, 1995.
17. T. Matsushita, M. Ketayama, K. Kamihata, and K. Funatsu, "Anchorage-dependent mammalian cell culture

- using polyurethane foam as a new substratum for cell attachment*", Appl. Microbiol Biotechnol, Vol. 33, pp. 287-290, 1990.
18. G. Oertel, Polyurethane Handbook, New York, Hanser Publishers, pp 19-22, 1985.
 19. C. Guguen-Guillouzo, "High Yield Preparation of Isolated Human Adult Hepatocytes by Enzymatic of the Liver", Cell Biology International Reports, Vol. 6, No. 6, pp. 625-628, 1982.s
 20. B. D. Foy, and M. L. Yarmush, "Engineering Organ Perfusion Protocols: NMR Analysis of Hepatocyte Isolation from Perfused Rat Liver", Biotechnol. Bioeng., Vol. 43, pp. 661-672, 1993.
 21. N. C. Luetkeke, and G. K. Michalopoulos, "Control of Hepatocyte Proliferation in vitro, The Isolated Hepatocyte, Use in Toxicology and Xenobiotic Biotransformations", E. J. Rauckman and G. M. Padilla, eds., Academic Press Inc., pp. 93-118, 1987.