

무혈청 배지에서 계대배양한 비적응 CHO (Chinese Hamster Ovary) 세포의 증식력 개선에 관한 연구

¹이 승 선 · ¹이 진 성 · ¹변 순 휘 · ²박 흥 우 · † 최 태 부
¹건국대학교 미생물 공학과, ²한양대학교 화학공학과
(접수 : 2006. 1. 31., 게재승인 : 2006. 6. 23.)

Improvement of Proliferation Capacity of Non-adapted CHO Cells Subcultured Using Serum Free Media in Long-term Culture

Seung-sun Lee¹, Jin-sung Lee¹, Soon-hyu Byun¹, Hong-woo Park², and Tae-boo Choe†

¹Dept. of Microbial Engineering, Konkuk University, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea

²Dept. of Chemical Engineering, Hanyang University, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

(Received : 2006. 1. 31., Accepted : 2006. 6. 23.)

Animal cell culture industry has a large market and an exponential growth rate among biological industry field. Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most widely used cell lines for recombinant protein production. They can avoid infection from polio, herpes, hepatitis B, HIV, measles, adenovirus and etc. Moreover it is easy to transfection recombinant genes and possible to suspension culture. Serum free media is one of the most important factor of protein production. Because serum has problems. Serum is not defined the contents until now, it has a number of proteins, lipids, carbohydrates and unknown molecules that cause of risk involve in infection and high cost of product purification. CHO cell line cultured using serum free media were the basis of a very successful method to produce (glyco-)protein in mammalian cells, which are then used as pharmaceutical products. Also, the low protein content of the developed medium facilitates downstream processing and product purification. But non-adapted CHO cells have a limit of proliferation cultured using serum free media and it takes very long time to adapt non-adapted cells to serum free media. There are a number of causes of a limit of proliferation using serum free media. Absence of growth factors and growth stimulating molecules is a major factor of the reasons. It makes growth signals and moves cell cycle. And increase of cellular stress is another reason. It induces increase of intracellular ROS concentration. The purpose of this study is about improvement of proliferation capacity of non-adapted CHO cells cultured using serum free media without adaptation process.

Key Words : CHO cell, serum free media, IGF-I, ROS

서 론

현재 산업용 동물 세포주로는 FDA로부터 안정성과 효용성이 승인된 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포주가 널리 사용되고 있다. CHO 세포가 숙주세포로 널리 사용된 주된 이유는 첫째, Polio, Herpes, Hepatitis B, HIV, Measles, Adenovirus 등의 인간에 해로운 바이러스가 CHO 세포에서는 복제가 되지 않으므로 안전하고, 둘째, 부유 배양이 가

능해 대량 배양이 용이하며, 셋째, 효율적인 유전자 증폭 시스템이 있어 미생물에 비해 낮은 동물세포주의 단위 세포당 생산성을 높일 수 있다는 장점이 있다. 현재 대부분의 동물세포이용 재조합 단백질 생산은 CHO 세포를 이용하고 있으며, 국내에서 개발 중인 인간유래 치료용 단백질의 대부분 또한 CHO 세포의 현탁 배양기술을 기반으로 하고 있다(1-3).

또한 대량 생산을 위해서는 무혈청 배지의 개발이 필수적이다. *In vitro*에서 동물세포배양기술이 확립된 이래로 동물세포의 성장을 촉진하기 위하여 통상적으로 사용되어 온 것이 혈청이다. 그러나 일차세포 (primary cells) 및 확립된 세포주 (established cell lines)의 생존 및 성장에 광범위하게 사용되어 온 혈청은 그 구성성분이 알려지지 않은 혼

† Corresponding Author : Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
Tel : +82-2-450-3523, Fax : +82-2-3436-5594
E-mail : tbchoe@konkuk.ac.kr

합물로서 세포배양에서의 생리적 활성이 아직도 완전히 파악되지 않고 있다(4). 혈청은 동물로부터 채취되기 때문에 prion이나 바이러스 감염의 우려도 있다. 또한 공급자의 설비 및 기술수준에 따라서 품질의 현격한 차이를 가져올 수 있고, 생산 시기에 따라 혈청 구성성분이 동일하지 않으므로 일련의 실험이나, 생물공학 제품의 생산에 있어서 lot number가 동일한, 즉 동시에 생산된 혈청을 사용해야 한다. 따라서 동물세포의 배양에 대한 연구 및 동물세포의 배양에 의한 생물공학 제품의 생산에 있어서, 완전히 정의된 조건에서 세포를 배양하기 위해서는 혈청이 포함되지 않은 화학적으로 정의된 배지를 개발해야 할 필요성과 그 중요성은 일찍부터 인식되어 왔다(5, 6). 이와 같이 무혈청 배지는 혈청이 갖는 생물학적 불확실성을 제거해 줄 뿐만 아니라, 단일항체나 다른 고분자물질을 산업적인 규모로 생산할 때 분리, 정제 시 간섭하는 단백질이 존재하지 않기 때문에 전체적인 공정의 효율을 높여줄 수 있고 배지의 모든 성분이 정량된 상태로 공급되고 동물 유래 물질이 첨가되지 않기 때문에 각종 오염으로부터 자유롭고 전체 공정과 제품의 검증이 혈청 배지에 비해 쉽게 이루어진다는 장점이 있다(7). 또한 공급 및 가격의 불안정성과 높은 가격으로 인한 문제, 안전성 여부 또한 없앨 수 있다 (8).

이런 여러 가지 필요성에 의해 현재 다양한 무혈청 배지가 개발, 판매되고 있고, 또 많은 무혈청 배지가 개발 중에 있다(9-11). 그러나 이러한 일련의 노력에도 불구하고 무혈청 배지는 많은 문제점을 안고 있다. 먼저 혈청에 존재하는 성분들을 완전히 대체하지 못하고 있다. 혈청을 극복하기 위해 현재 무혈청 배지에는 세포의 성장을 조절하는 insulin, 5-triiodo thyronin, hydrocortisone, estrogen, androgen, progesterone, prolactin 등의 성장 호르몬과 증식을 촉진하는 heparin-binding growth factor, platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor, interleukin 등의 성장인자를 첨가하고 있다(12). 이외에도 철분, 구리 등의 무기물질과 iron 운반체인 transferrin, 항산화 물질인 selenium, lipid 전구체인 linoleic acid, cholin, ethanolamine, phosphorylethanolamine 등이 첨가된다(13-15).

그럼에도 불구하고 많은 경우 동물세포 배양에 있어 혈청을 사용하고 있는 것은 아직도 혈청을 완전히 대체할 수 있는 배지가 개발되지 않았거나, 일부 산업에서 사용하는 배지성분들이 공개되지 않았기 때문이다. 또한 현재까지 보고된 대부분의 무혈청 배지는 특정세포만 잘 자라게 하고, 혈청대신에 사용하는 세포 성장 인자, 흡착 인자 등은 고가이다. 뿐만 아니라 무혈청 배지에서는 혈청을 포함한 배지에서보다 세포 사멸 및 배양 중 축적되는 독성 물질에 의해서 세포 성장 속도 및 생존을 감소가 유발되고 이에 따른 생산성 저하와 숙주세포단백질의 유출로 인해 산물 생산이 안정적이지 못한 점이 보고되고 있다(16).

그러므로 효과적으로 산업적 대량 생산을 하기 위해서는 CHO 세포의 현탁 배양 기술을 기반으로 하여 자체적으로 좀 더 개선된 무혈청 배지를 개발하며, 다양한 세포주의 무혈청 배지 적응 (adaptation) 기술, 그리고 고효율 현탁 배양 기술의 기반 확보, 개발한 무혈청 배지의 검증

기술의 확보 등이 필요하다. 특히 대부분의 경우 세포를 무혈청 배지에서 바로 배양할 수 없기 때문에 별도의 적응 기간을 거치게 된다. 보통 이 적응기간을 거처서 무혈청 배지에 적응된 세포주를 선별하는 기간이 짧게는 6개월에서 길게는 1년 이상 소요된다(17).

본 연구에서는 무혈청 배지에 적용되지 않은 비적용 CHO 세포를 이용하여 무혈청 배지에서 비적용 CHO 세포가 증식이 멈추는 이유를 알아보고 별도의 적응기간 없이 장기간 계대배양이 가능하도록 무혈청 배지에 몇 가지 성분을 첨가하여 증식력을 개선시키고자 하였다. 먼저 혈청의 유무가 비적용 CHO 세포의 계대배양에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청을 농도별로 첨가하고 세포의 농도를 비교하였다. 또한 무혈청 배지에서 세포가 받는 스트레스를 알아보기 위해 ROS (radical oxygen species) 농도를 측정하였고, 세포고사 (apoptosis)의 유무를 FACS (fluorescence activated cell sorter)를 이용해 알아봤다. 마지막으로 IGF (insulin-like growth factor)를 첨가해 무혈청 배지에서 장기간 배양시 세포의 증식력에 미치는 영향을 조사하였다(18-27).

재료 및 방법

세포주 및 세포배양

본 실험에서 사용한 세포주는 확립된 DG44 세포주에 재조합시킨 세포주 S/CHO hu-17 A3로서, DHFR (dihydrofolate reductase) selection system을 이용하여 B형 간염 바이러스의 surface antigen에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 세포주이다. 발현백터는 CMV promoter를 가지고 있으며, 항체의 heavy chain과 light chain은 각각 별도의 발현백터로 구성되어 있다. 각 발현백터에는 DHFR 유전자가 각각 별도의 signal sequence와 함께 포함되어 있다. lipofection 방법을 사용하여 백터를 도입한 것으로, 전통적인 G418 항생제 사용 선발 및 MTX 농도 증가 방법으로 유전자 증폭을 실시하면서 고발현 세포주만을 선발한 세포주이다(28). 이 세포주는 B형 간염 바이러스 중화를 위해 간염바이러스의 표면 항원인 S protein에 대한 마우스 항체를 기초로 하여 CDR grafting 방법으로 인간화된 항체를 발현하는 세포주로서, 한양대에서 분양받아 사용하였다.

세포의 배양은 5% dialyzed fetal bovine serum (dFBS, Gibco BRL), 0.22% sodium bicarbonate, 320 nM methotrexate (MTX, Sigma)를 첨가한 MEM- α (Gibco BRL) 배지를 기본 배지로 하여 37°C, 5% CO₂ 습윤 배양기에서 하였고 세포의 농도가 5×10^5 cells/ml 되도록 하여 계대 배양하며 실험에 사용하였다. 장기배양 실험은 계대 수를 신속히 증가시키기 위해 2일에 한번씩 계대 배양하는 방법을 사용하였다.

실험 재료

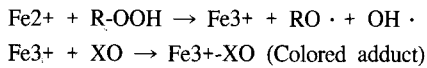
무혈청 배지는 Sigma의 CHO 세포용 무혈청 배지인 CHO protein free medium, C5467을 사용하였다. PeroxiDetect Kit, catechin, 2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT)는 Sigma에서 구입해서 사용했고, L- α -Lysophosphatidylcholine

(LPC)는 두산바이오텍, insulin-like growth factor 1(IGF-I)은 JRH bioscience의 LongR³IGF-I을 사용하였다. Apoptosis detection kit는 BD Pharmingen의 Annexin V-FITC apoptosis detection kit I을 구입해서 사용했다.

ROS 측정

배지내 ROS 측정

Sigma사의 PeroxiDetect Kit를 이용해서 배지내 ROS를 측정하였다. peroxides가 Fe²⁺ 이온을 Fe³⁺ 이온으로 변환시키면 Fe³⁺ 이온이 xlenol orange와 결합해서 발색이 되고, 발색된 용액을 560 nm에서 읽는 방법으로 측정하였다(29).



세포내 ROS 측정

세포내 ROS를 측정하기 위해 FACS를 사용하였다. 배양된 세포를 수거하고 PBS로 수세한다. 다시 원심분리하고 PBS로 resuspension시킨다. DCF-DA를 20 uM 농도로 첨가한 후 10분간 37°C에서 배양한다. 다시 원심분리해서 세포를 회수한 후 PBS로 resuspension하고 FACS를 이용해 형광을 읽는 방법으로 세포내 ROS의 양을 측정했다(30).

세포고사 측정

배양한 세포를 수거하고 PBS로 수세한다. 원심분리해서 상등액을 제거하고 PBS 100 ul로 재현탁시킨 다음 Annexin V-FITC와 propidium iodide를 각각 5 ul씩 첨가하고 상온에서 15분간 방치한 후 FACS를 이용해 형광을 읽는 방법으로 세포고사를 측정했다.

결과 및 고찰

무혈청 배지에서 비적응 CHO 세포의 증식 한계

무혈청 배지에서 비적응 CHO 세포를 10회 이상 계대배양 할 수 있어야 치료용 단백질 대량생산 배지로 이용 가능하다. 그러나 현재 적응기간을 거치지 않은 세포의 경우 무혈청 배지에서 계대배양에 한계가 있다. 본 연구에서는 CHO 세포용 무혈청 배지인 Sigma C5467 배지를 이용하여 비적응 CHO 세포의 계대 배양에서의 문제점과 해결방안을 찾고자하였다.

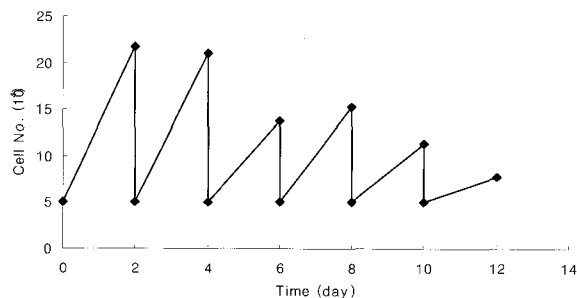


Figure 1. Cell density of non-adapted CHO cells subcultured using serum free media, C5467.

비적응 CHO 세포를 별도의 적응기간 없이 바로 무혈청 배지에서 배양을 시작하고 계대 수를 신속히 증가시키기 위해 48시간에 한 번씩 계대하여 증식곡선을 작성하였다. Fig. 1에서와 같이 무혈청 배지에서 계대가 진행될수록 세포가 더 이상 증식하지 못하는 것을 알 수 있다. 또한 5회 이상 계대가 이어질 경우 급격한 세포 수의 감소가 나타나는 것을 알 수 있었다. 반복 실험을 통하여 비적응 CHO 세포의 경우 무혈청 배지에서 대체로 5-7회의 계대배양이 가능함을 알 수 있었다. 반면에 무혈청 배지에 적응된 CHO 세포의 경우에는 별다른 문제없이 장기간 배양이 가능하였다(Data not shown).

혈청 농도에 따른 CHO 세포의 증식력 차이

앞선 결과와 같이 무혈청 배지에서 세포의 계대배양이 충분한 기간 동안 이어지지 못하는 이유가 무혈청 배지의 경우 혈청이 빠져 있기 때문에 배지의 성분이 세포가 충분히 증식하는데 필요한 영양 성분이나 성장 인자, 신호 전달물질을 포함하고 있지 않기 때문이라고 여겨진다. 때문에 혈청 배지와 무혈청 배지에 각각 혈청을 농도별로 첨가하고 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보았다.

무혈청 배지는 혈청대체 성분이 다량 첨가되어 있기 때문에 같은 농도의 혈청이 첨가된 경우 MEM-α와 비교했을 때 우수한 증식 능력을 보였으나, 역시 무혈청 배지에서도 혈청의 농도가 높을수록 세포의 증식이 활발히 일어나는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

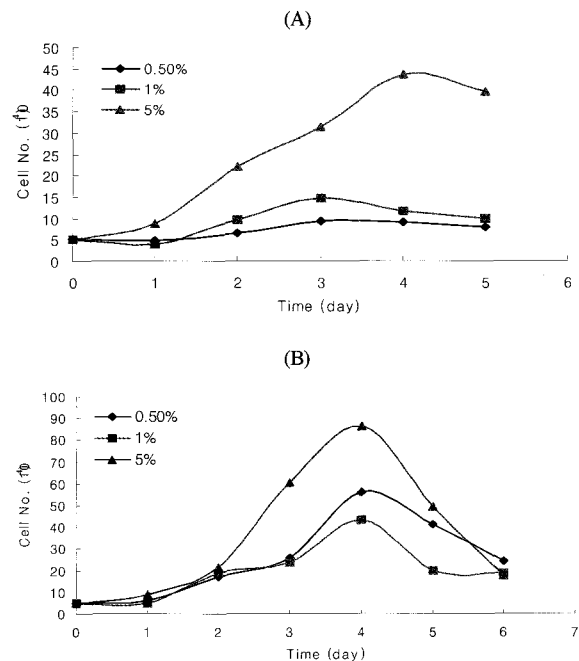


Figure 2. Effect of FBS concentration on the growth curves of non-adapted CHO cells cultured using MEM-α (A) and serum free media, C5467 (B).

혈청에 의한 증식력의 차이는 계대배양에서도 나타났다. 무혈청 배지에 혈청을 농도별로 첨가하고 계대배양을 한 결과 혈청이 1% 이상 첨가된 경우 10회 이상 계대가 진행

되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

이런 결과로 미루어 볼 때 무혈청 배지에 혈청을 대체할 수 있는 성분을 더 첨가해야만 세포의 계대 배양 횟수가 10회 이상으로 길어질 것으로 판단되었다.

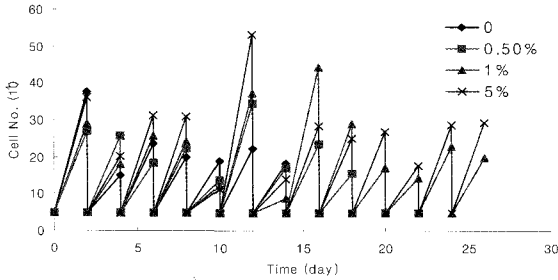


Figure 3. Effect of FBS concentration on the cell density of non-adapted CHO cells subcultured using serum free media, C5467.

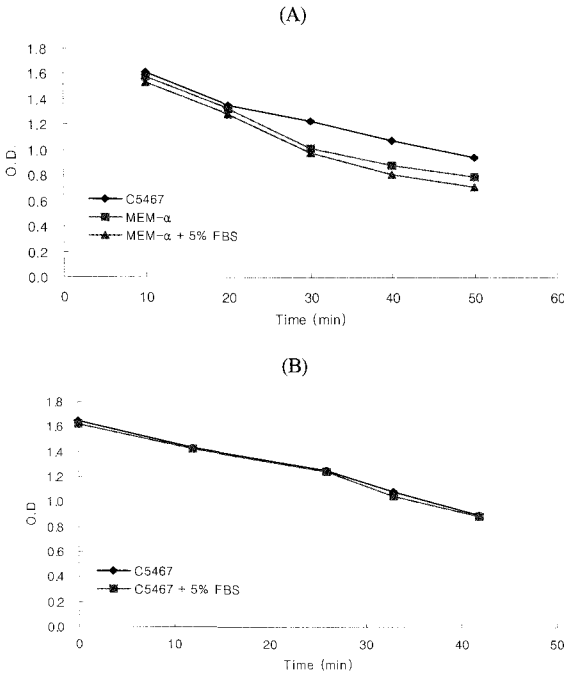


Figure 4. Anti-oxidative capacity of different media (A) and effect of FBS concentration on serum free media, C5467 (B).

배지내 ROS 농도 측정

무혈청 배지에서 CHO 세포를 장기간 배양할 때 혈청 배지에서 배양한 세포에 비해 세포내 스트레스의 축적이 클 것으로 예상되고 이러한 현상이 세포의 증식을 중단시키는 하나의 원인이 될 수 있다. 따라서 세포의 스트레스에 가장 영향을 미치는 인자로 활성산소를 고려하였으며 세포 내·외의 ROS 농도를 측정하여 세포에 축적되는 스트레스의 정도를 알아보고 ROS가 세포의 계대배양에 미치는 영향을 조사했다.

먼저 무혈청 배지가 혈청 배지와 비교해서 ROS 제거속도에 차이가 있는지 알아보았다. 혈청 배지인 MEM-α와 무혈청 배지인 C5467의 ROS 제거속도를 측정한 결과 MEM-α가 C5467보다 ROS 제거 속도가 빨랐다(Fig. 4A) 이는 세

포가 만들어내는 ROS가 MEM-α에서 더 효과적으로 제거될 수 있다는 것을 의미하고 무혈청 배지인 C5467에 ROS scavenger를 첨가하여 ROS 제거능을 강화시켜 줄 필요가 있을 것으로 생각된다(20).

앞선 결과에서 나타난 것처럼 혈청이 세포의 증식에 결정적인 역할을 하기 때문에, 혈청이 배지에 있는 ROS 농도에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 배지의 ROS 제거 속도를 측정했다. 그러나 측정 결과 혈청의 첨가가 배지에 있는 ROS의 제거에는 크게 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 4B).

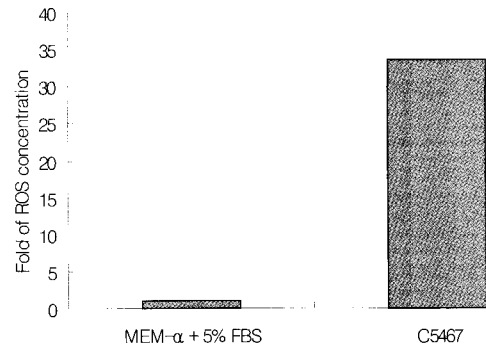


Figure 5. Intracellular ROS concentration of non-adapted CHO cells cultured using MEM-α with 5% FBS and serum free media, C5467.

세포내 ROS 농도 측정

배지의 종류와 혈청의 유무에 따라 세포내에서 생성되는 ROS의 제거 속도를 비교한 결과 무혈청 배지에서 세포내 ROS의 제거 속도가 비교적 더딘 것으로 예비 실험을 통하여 확인 됐다. 따라서 배지의 ROS 제거 능력이 세포의 증식에 미치는 영향을 좀 더 명확하게 밝히기 위해 배지의 종류와, 혈청의 첨가 여부, 계대 시간 등에 따른 세포내 ROS의 농도를 FACS를 이용하여 측정하였다.

먼저 비적응 세포가 무혈청 배지로 옮겨지면서 받는 스트레스를 측정하기 위해 혈청이 5% 첨가된 MEM-α에서 배양하던 세포를 무혈청 배지인 C5467로 옮기고 ROS를 측정하였다(Fig. 5). 그 결과 세포를 혈청 배지에서 무혈청 배지로 옮기게 되면 세포내 ROS가 약 33.5배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이는 급격한 배양 환경의 변화가 세포에 과도한 스트레스를 유발한다는 것을 의미한다. 또한 혈청 배지인 MEM-α와 무혈청 배지인 C5467에서 모두 혈청의 농도에 따라 ROS의 농도 역시 변하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6). 앞선 결과에서(Fig. 4B) 혈청 자체가 갖는 ROS 제거 능력은 아주 미미하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 세포내 ROS를 측정한 결과 혈청의 농도에 따라 세포내 ROS의 농도가 현저히 감소하는 것은 혈청이 부족 할수록 세포가 받는 스트레스가 증가하는 것을 의미하며, 이는 배지에 항산화제를 직접 첨가한 경우에도 계대 배양 횟수가 크게 증가하지 않는 것으로 미루어 볼 때(Fig. 11) 혈청에 포함된 증식인자가 세포 내에서 ROS를 스스로 제거할 수 있는 항산화 효소의 생산을 돕는 것으로 보아야 할 것

이다.

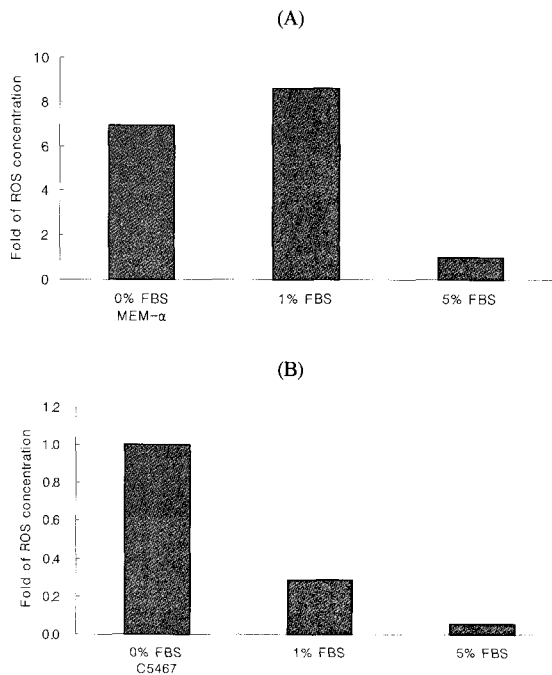


Figure 6. Effect of FBS concentration on the intracellular ROS concentration of non-adapted CHO cells cultured using MEM-α (A) and serum free media, C5467 (B).

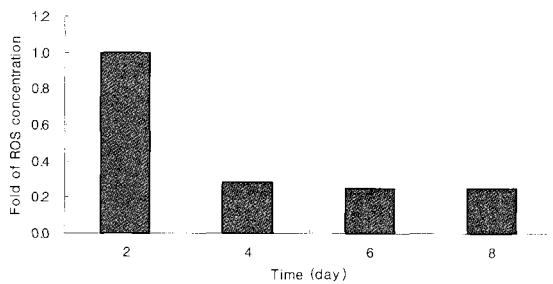


Figure 7. Effect of culture time on the intracellular ROS concentration of non-adapted CHO cells cultured using serum free media, C5467.

계대 배양의 횟수가 증가할수록 지속적으로 ROS의 양이 증가하는지를 알아보기 위해 계대 횟수에 따른 ROS 농도를 측정하였다(Fig. 7). 계대 횟수에 따라 ROS의 양이 증가하지는 않았고 혈청 배지에서 무혈청 배지로 처음 옮겨졌을 때 ROS가 가장 많이 증가하고 그 이후 일정하게 유지되는 것을 알 수 있었다. 이것은 세포가 필요한 항산화 효소를 생산하여 무혈청 배지의 환경에 적응하기 때문으로 생각되었다. 그러나 계대가 계속되어도 세포내 ROS의 양은 여전히 5% 혈청배지에 비해 4-5배 높게 유지되었으며 (0.05 vs. 0.2 fold of ROS concentration) 이러한 환경이 장기간 계속 될 경우 세포 증식에 영향을 줄 것으로 판단된다.

세포고사 측정

앞선 결과에서 세포를 무혈청 배지로 옮겨서 배양할 경우 세포내 ROS가 급격하게 증가한다는 것을 알 수 있었

다. 이러한 ROS의 증가가 세포의 DNA 손상을 유발하거나 세포사멸 (apoptosis)을 유발하는지 또한 무혈청 배지에서 세포의 증식이 멈추는 것이 세포사멸 때문인지, 아니면 단순히 세포주기 (cell cycle)가 멈추는 것인지 확인하기 위해 5회 이상 무혈청 배지에서 계대가 진행된 적응세포와 비적응세포를 대상으로 apoptosis detection을 시행하였다.

시행결과 적응 세포와 비적응 세포 모두 특별한 세포사의 징후는 나타나지 않았다(Fig. 8). 이로 미루어 볼 때 무혈청 배지에서 세포의 증식이 멈추는 이유는 세포사멸이 아닌 단순한 세포 주기의 정지 때문인 것으로 생각된다.

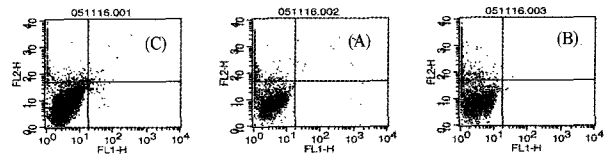


Figure 8. Apoptosis detection assay for control (C) cultured using MEM-α with 5% FBS, adapted (A) and non-adapted (NA) CHO cells cultured using serum free media, C5467.

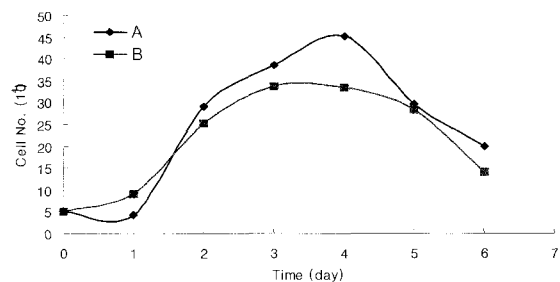


Figure 9. Growth curve of non-adapted CHO cells transferred from serum free media to MEM-α with 5% FBS (A) and to serum free media with 25 ng IGF-I (B).

세포 증식의 회복

무혈청 배지에서 비적응 세포의 증식이 멈추는 이유가 세포사멸이 아닌 세포주기의 정지에 의한 것인지 좀 더 명확하게 밝히기 위해, 무혈청 배지에서 증식이 멈춘 세포를 다시 혈청이 5% 첨가된 MEM-α 와 IGF-I 25 ng/ml이 첨가된 무혈청 배지로 옮겨서 재배양하고 증식곡선을 구했다.

혈청과 IGF-I이 첨가된 배지로 옮긴 세포는 둘 다 유도 없이 하루만에 증식이 회복되는 양상을 보였는데(Fig. 9) 이는 상당수 세포의 세포 주기가 멈춘 상태로 있다가 세포주기를 다시 진행시키는 역할을 하는 혈청과 IGF-I이 공급되자 곧바로 세포 주기가 회복되기 때문인 것으로 생각된다. 만약 세포사멸이 활발히 진행되고 있었다면 이 결과에서처럼 단시간 내에 완벽하게 증식력을 회복할 수 없었을 것이다.

이 결과로 미루어 볼 때 정지된 세포 주기를 다시 진행시킬 수 있는 물질을 배지에 첨가한다면 세포의 계대 횟수를 증가시키는데 효과가 있을 것으로 생각되었다.

첨가물이 계대 배양에 미치는 영향

앞서 나타난 결과와 같이 무혈청 배지에는 세포의 증식

에 필요한 인자가 충분히 포함되어 있지 않고, 그렇기 때문에 세포가 상당한 스트레스를 받게 된다. 이런 스트레스 때문에 세포내 ROS의 양이 증가하고 세포주기가 멈춰 세포의 증식이 멈추게 되는 것이다. 이를 보완하기 위해 세포 주기의 진행을 돕는 것으로 알려진 IGF-I을 배지에 첨가하고 세포의 증식에 차이가 있는지 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 CHO 세포를 이용해 세포를 별도의 적응 기간 없이 무혈청 배지에서 배양했을 때 세포의 증식이 중단되는 원인을 찾고 배지 첨가 성분을 통해 이를 개선하고자 했다.

현재 개발된 무혈청 배지는 아직까지 혈청을 대체할 만한 성분을 포함하고 있지 않다. 때문에 무혈청 배지에 적용되지 않은 비적용 세포의 경우 계대 배양에 한계가 있다. 이런 한계가 나타나는 원인은 다양할 것으로 생각이 되지만 혈청의 부재로 인해 세포가 받게 되는 스트레스와 그로인한 세포주기의 정지가 가장 근본적인 원인으로 생각된다.

무혈청 배지에서 세포가 받는 스트레스의 정도를 알아보고 배양 환경과 첨가물에 따른 ROS 농도의 변화를 측정하기 위해 배지와 세포의 ROS 농도를 측정하였다. ROS 농도를 측정한 결과 무혈청 상태에서 세포내 ROS가 엄청난 양으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 이것은 혈청이 항산화능력을 갖고 있어서가 아니라 세포가 무혈청 환경에서 극심한 스트레스상태에 놓이기 때문인 것으로 생각된다. 이렇듯 증가한 ROS가 세포의 증식이 멈추게 되는 원인 중 하나로 생각되고, 항산화제를 첨가한 경우에도 증식력이나 ROS의 농도에 큰 차이가 없었던 것으로 미루어 보아 근본적으로 혈청과 같은 강력하게 증식을 촉진하는 성분을 배지에 첨가해야 할 것으로 여겨진다.

ROS 이외에 세포의 증식이 멈추는 또 다른 원인으로 세포사멸의 여부를 확인했다. 무혈청 배지에서 배양한 적응 세포와 비적용 세포 모두 특별한 세포사멸의 징후가 나타나지 않았다. 또한 무혈청 배지에서 증식이 멈춘 세포를 회수해 다시 혈청배지에서 배양한 경우 곧바로 증식력이 회복되기 때문에 대규모의 세포사멸은 발생하지 않는 것으로 생각된다.

위와 같은 현상들은 모두 혈청이 없기 때문에 발생하는 것으로 혈청을 대체할 수 있는 첨가물을 배지에 더해주면 세포의 증식이 개선될 것이다. 그래서 몇 가지 첨가물을 이용해 세포의 증식력에 변화가 나타나는지 알아보았다. 첨가물을 이용한 실험에서 IGF-I의 경우 장기배양에서 세포의 수를 안정적으로 유지하고 계대 횟수를 증가시키는 효과를 보였다. 이는 IGF-I이 어느정도 세포의 증식을 유지시켜주는 역할을 하기 때문인 것으로 생각된다.

무혈청 배지에서 비적용 CHO 세포의 계대 배양에 한계가 있는 것은 세포주기가 멈추기 때문인 것으로 생각된다. 세포주기가 멈추는 growth factor와 같이 세포의 증식을 지속적으로 유도할 수 있는 물질이 무혈청 배지에서는 부족하기 때문인 것으로 생각되고, IGF-I과 같은 첨가물을 통해 극복할 수 있는 문제라고 여겨진다.

REFERENCES

1. Ross, J., K. Kao, A. Albee, D. Goodnight, and M. Caple (2001), Development and Customization of Protein-Free, Animal Component-Free Media for the Enhanced Expression of

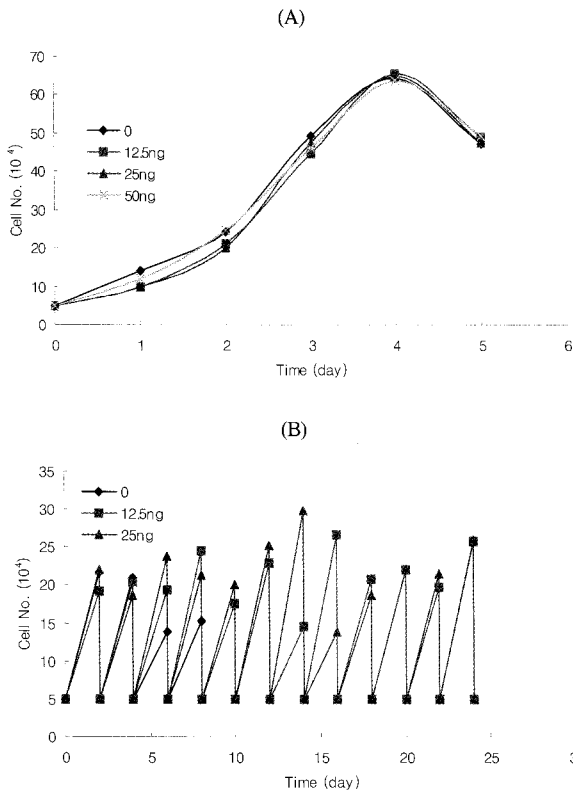


Figure 10. Effect of IGF-I on the cell growth curve (A) and density (B) of non-adapted CHO cells cultured and subcultured using serum free media, C5467.

IGF-I은 세포 성장에 있어 다른 성장 호르몬을 촉진하는 아주 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다(24-27). 또한 혈청 배지와 무혈청 배지에서 CHO 세포의 유전자 발현변화를 측정하던 이전의 연구 결과에 따르면 IGF-I의 발현이 무혈청 배지에서 2배 이상 감소하는 것으로 나타났다(32). 이러한 이유로 해서 무혈청 배지에 IGF-I을 첨가하고 세포의 증식력에 차이가 나타나는지 측정했다.

IGF-I을 농도별로 첨가하고 증식곡선을 구한 결과 증식 곡선 상에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 10A). 그러나 장기배양에서 IGF-I을 첨가한 경우 더 오랫동안 계대 배양이 가능했고 세포의 농도 또한 비교적 안정적으로 유지되는 것을 알 수 있었다(Fig. 10B). 즉 IGF-I의 첨가로 단기적인 증식 촉진 효과를 볼 수는 없었지만 장기적인 배양에서 세포의 증식을 안정적으로 유지시켜 준다는 것을 알 수 있었다. 이는 IGF-I이 혈청의 부재에서 오는 증식 신호의 부족을 어느 정도 상쇄해주는 역할을 하기 때문인 것으로 생각된다.

- Recombinant Proteins in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells, *Life science* **2**, 3.
2. Lai, D. Z., S. J. Weng, L. Q. Qi, C. M. Yu, L. Fu, T. Yu, and W. Chen (2004), Construction of two robust CHO cell lines resistant to apoptosis and adapted to protein-free medium by over-expression of IgF-1/bcl-2 or bcl-2/cyclin E genes, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **20**(1) 66-72.
 3. Shimamoto, T., N. Nishibori, M. Aosasa, H. Horiuchi, S. Furusawa, and H. Matsuda (2005), Stable production of recombinant chicken antibody in CHO-K1 cell line, *Biologicals*.
 4. Jochems, C. E., J. B. van der Valk, F. R. Stafleu, and V. Baumans (2002), The use of fetal bovine serum : ethical or scientific problem?, *Altern. Lab. Anim.* **30**(2) 219-227.
 5. Zabal, O., A. L. Kobrak, I. A. Lager, A. A. Schudel, and E. L. Weber (2000), Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhea virus, *Rev. Argent Microbiol.* **31**(1), 27-32.
 6. Jayme, D. W. and S. R. Smith (2000), Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture, *Cytotechnology* **33**(1-3), 27-36.
 7. 이희찬, 동물세포 배양에서의 무혈청배지, *Biotechnology News* **2**(3), 242-251
 8. Merten, O. W. (2002), Development of serum-free media for cell growth and production of viruses/viral vaccines: safety issues of animal products used in serum-free media, *Dev. Biol. (Basel)* **111**, 233-257.
 9. Rasmussen, L. K., Yvonne Berger Larsen. and Peter Højrup (2005), Characterization of different cell culture media for expression of recombinant antibodies in mammalian cells: Presence of contaminating bovine antibodies, *Protein Expression and Purification* **41**, 373-377.
 10. Schröder, M., K. Matischak, and P. Friedl (2004), Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11, *J. Biotechnology* **108**, 279-292.
 11. Kallel, H., A. Jouini, S. Majoul, and S. Rourou (2002), Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells, *J. Biotechnology* **95**, 195-204.
 12. Labitzke, R. and P. Friedl (2001), A serum-free medium formulation supporting growth of human umbilical cord vein endothelial cells in long-term cultivation, *Cytotechnology* **35**(2), 87-92.
 13. Shamsuddin M., B. Larsson, and H. Rodriguez-Martinez (1993), Culture of bovine IVM/IVF embryos up to blastocyst stage in semi-defined medium using insulin, transferrin and selenium or growth factors, *Reproduction of Domestic animals* **28**, 209-210.
 14. Metcalfe, H., R. P. Field, and S. J. Froud (1994), The use of 2-hydroxy-2,4,6-cycloheptarin -1-one (tropolone) as a replacement for transferrin, In *Animal Cell Technology: Products of Today, Prospects for Tomorrow*, R. E. Spier, J. B. Griffiths, W. Berthold, Eds., Butterworth-Heinemann, Oxford, 88-90.
 15. Raghu, H. M., S. Nandi, and S. M. Reddy (2002), Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage in vitro I serum-free, semidefined media, *Verterinary Record* **151**, 260-265.
 16. Andrew, C., Boquest, Billy N. Day, and Randall S. Prather (1999), Flow Cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells, *Biology of reproduction* **60**, 1013-1019.
 17. Mary, P., Rosser, Wei Xia, Steven Hartsell, Michael McCaman, Ying Zhu, Soujuan Wang, Susan Harvey, Peter Bringmann and Ronald R. Cobb (2005), Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system, *Protein Expression and Purification* **40**, 237-243.
 18. Jakoby, W. B., *Methods in Enzymology Volume LVIII cell culture*, academic press, 248-262.
 19. Yu, Y. S., X. S. Sun, H. N. Jiang, Y. Han, C. B. Zhao, and J. H. Tan (2002), Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblasts in goats: work in progress, *Theriogenology* **8740**, 1-13.
 20. Yun, Z., M. Takagi and T. Yoshida (2001), Effect of antioxidants on the apoptosis of CHO cells and production of tissue plasminogen activator in suspension culture, *J. Bioscience and Biotechnology* **91**(6), 581-585.
 21. Sakai, K., T. Matsunaga, H. Yamaji, and H. Fukuda (1999), Effects of phospholipids on growth of chinese hamster ovary cells in serum-free media, *J. Bioscience and Biotechnology* **88**(3), 306-309.
 22. Chen, Y., S. Morimoto, S. Kitano, E. Koh, K. Fukuo, B. Jiang, S. Chen, O. Yasuda, A. Hirohara, and T. Ojihara (1995), Lysophosphatidylcholine causes Ca⁺⁺ influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells, *Atherosclerosis* **112**, 69-76.
 23. Fuchsa, B., J. Schiller, U. Wagner, H. Hantzschel, and K. Arnold (2005), The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: Investigations by 31P NMR and MALDI-TOF MS, *Clinical Biochemistry*.
 24. Liu, Chi-hsien, I-ming Chu, and Shiao-min Hwang (2001), Aurintricarboxylic acid exerts insulin-like growth stimulating effects on chinese hamster ovary cells under serum-free conditions, *J. Bioscience and Biotechnology* **91**(6), 576-580.
 25. Morris, A. E. and J. Schmid (2000), Effects of Insulin and LongR3 on serum-free chinese hamster ovary cell cultures expressing two recombinant proteins, *Biotechnol. Prog.* **16**(5), 693-697.
 26. Sunstrom, N. A., R. D. Gay, D. C. Wong, N. A. Kitchen, L. DeBoer, and P. P. Gray (2000), Insulin-like growth factor-I and transferrin mediate growth and survival of Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Prog.* **16**(5), 698-702.
 27. Ratajczak, J., Q. Zhang, E. Pertusini, B. S. Wojczyk, M. A. Wasik, and M. Z. Ratajczak (1998), The role of insulin (INS) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in regulating human erythropoiesis. Studies in vitro under serum-free conditions comparison to other cytokines and growth factors, *Leukemia* **12**(3), 371-81.
 28. Crouse, G. F., R. N. McEwan, and M. L. Pearson (1983), Expression and amplification of engineered mouse dihydrofolate reductase minigenes, *Mol. Cell. Biol.* **3**, 257-266.
 29. Banerjee, D., U. K. Madhusoodanan, M. Sharanabasappa, S. Ghosh, and J. Jacob (2003), Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine, *Clinica Chimica Acta* **337**, 1-2, 147-152.
 30. Gunasekar, P. G., A. G. Kanthasamy, J. L. Borowitz, and G. E. Isom (1995), Monitoring intracellular nitric oxide formation by dichlorofluorescein, in neuronal cells, *J. Neuroscience Methods* **61**, 21.
 31. O'Brien, M. C. and W. E. Bolton (1995), Comparison of cell viability probes compatible with fixation and permeabilization for combined surface and intracellular staining in flow cytometry, *Cytometry* **19**, 243-255.
 32. Seo, S. K. (2004), Change of gene expression in CHO (chinese hamster ovary) cells cultured with serum-free media, Konkuk University.