

단백질 가수분해물을 이용한 인간 피부 섬유아세포의 저온 보존액 개발

변순휘 · 최태부*

건국대학교 미생물공학과

Development of hypothermic preservation solution for the human dermal fibroblast using protein hydrolysates

Soon-hwi Byoun and Tae-boo Choe*

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

Abstract Stable cell preservation is an essential factor in the regenerative medicine for cell therapies and transplantation of biologic materials. In this study, we studied to provide more stable hypothermic preservation by protection of cell damage during the preservation at 4°C. The result of searching for key components that have excellent efficacy in hypothermic preservation of cells, we have identified the fact that the hypothermic preservation adding protein hydrolysates such as yeast hydrolysate is far superior to others. All protein hydrolysates that are derived from animal, plant and microbe sources have superior efficacy, especially the peptides which have molecular weights under 10 kDa have the best efficacy among the components of protein hydrolysate. The protein hydrolysates prevented the decrease of ATP level in the cells caused by hypothermic environment and they inhibited the generation of ROS. Adding antioxidants and control agents of osmotic pressure were showed to have more superior efficacy in hypothermic preservation. Finally, KUL261 solution (DMEM/F12 1 : 1 medium, yeastolate 1%, α -tocopherol 100 μ M, dextran 2.5%), the preservation solution developed in this study, showed the best efficacy in both cell viability and cell growth more than other conventional preservation solutions. In conclusion, the improved hypothermic preservation solution that contains the protein hydrolysates as a key component provide the best preservation efficacy. It provides better efficacy than other preservation solutions and will contribute to both the development of regenerative medicine and global commercialization in this therapeutic field.

Keywords: hypothermic preservation, preservation solution, protein hydrolysate, human dermal fibroblast

서 론

최근 생명공학 기술과 의료수준의 향상으로 살아있는 세포를 이용하여 다양한 질병의 치료에 적용하는 세포치료 연구가 활발히 이루어지고 있다(1-3). 이에 따라 동물세포의 이용성은 기존의 세포 생산물 이용 분야에서부터 세포 자체를 직접 이용하는 분야까지 그 범위가 확대되고 있다.

세포를 이용한 모든 치료 및 공정은 세포가 살아있어야 하며 세포의 고유 기능이 유지되어 있는 상태여야 하기 때문에 세포의 생존을 유지시키는 세포 보존기술은 세포를 이용하는 모든 분야에서 매우 중요한 요소 기술이다.

세포는 보존과정에서 온도가 감소함에 따라 수많은 스트레스를 받게 된다. 산화체계의 파괴로 활성산소가 생성되고, 이는 세포내에서 지질산화, DNA 및 RNA 손상, 세포골격의 변화 등을 일으킨다. 또한 세포막의 구조나 유동성, 구성 분 등의 변화로 인해 막수용체가 활성화되고, apoptosis를 일으킬 수 있는 일련의 과정이 진행된다. 세포막의 Na^+ - K^+ 펌프와 Ca^{2+} 이온 채널이 멈추면서 세포의 이온 균형이

*Corresponding author

Tel: +82-2-450-3523, Fax: +82-2-3436-5594

e-mail: tbchoe@konkuk.ac.kr

무너지고, 이는 세포내 칼슘농도의 증가, 삼투압 차이 발생, 세포의 붕괴로 이어 진다(4-7).

저온보존에서의 세포 손상은 추가적인 스트레스 관련 반응을 유발할 수 있다. 온도가 낮아지면서 발생하는 대부분의 반응은 세포에 손상을 일으키지만, 저온에서는 일부 세포의 생존반응이 활성화되기도 한다. 이는 세포가 스스로 스트레스를 줄이고 손상을 최소화하는 방향으로 반응하는 것을 말한다. 많은 경우에서 이러한 생존반응은 ATP와 같은 에너지를 더욱 빠르게 소비하기 때문에 결과적으로는 더 나쁜 상황이 되고, 결국에는 에너지 부족 등의 원인으로 세포사멸에 이르게 된다(8, 9).

세포나 조직의 저온보존에는 콜린스 (Collins)액, 유로콜린스 (Euro-Collins)액, Celsior[®]액, HTK (Custodiol[®])액, UW (University of Wisconsin, Viaspan[®])액 등의 보존액이 종래부터 이용되고 있으며, 현재 가장 널리 사용되고 있는 UW액은 다양한 장기 (organs)의 이식에서 주로 적용되고 있다(10-15). 하지만 이러한 용액들도 실제 임상에서는 장기를 24시간 이상 보존하기가 어려운 실정이다(11). 또한 장기 보존을 최적화하기 위해 설계된 용액이기 때문에 세포의 종류에 따라 보존능력이 상이하거나 그 효과가 미미한 단점을 가진다. 따라서 최근에는 UW액에 항산화제를 비롯한 다양한 유효성분을 첨가하여 사용하는 등, 조직 및 세포 보존에 더욱 적합한 보존액이 개발되고 있다(16-18).

본 연구에서는 동물세포의 저온보존에서 우수한 보존능력을 나타내는 유효성분을 탐색하고, 개선된 저온보존액을 개발함으로써 보다 안정적인 세포 저온보존 기술을 제공하고자 하였다. 또한 동물세포 저온보존에 대한 향후 개발 방향을 제시하고자, 저온에 의한 세포손상 원인과 유효성분의 손상 보호효과를 평가하였다.

재료 및 방법

세포주 및 세포배양

저온보존에 사용한 human dermal fibroblast (HDF)는 성인의 피부조직에서 분리한 세포를 Mordern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였으며, 세포의 배양은 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic (Gibco)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 2~3일 간격으로 계대 배양하여 8~12 세대의 세포를 실험에 이용하였다.

저온보존 방법

세포의 보존에 사용한 보존액은 DMEM/F12 (1:1)배지를 기본 보존액으로 여기에 다양한 첨가물을 섞어 사용하였으며, 저온보존액으로 사용한 무혈청배지는 시판중인 CHO protein-free medium (C5467, Sigma)을 구입하여 사용하였

다. 세포의 보존은 배양중인 세포를 회수하여 약 1.0×10^6 cells/ml의 세포 농도가 되도록 보존액으로 현탁시킨 다음, 2 ml 용적의 cryogenic vial에 담아 4°C cold chamber에서 보존하였다. 보존 용기는 느린 상태로 1~10 rpm의 속도로 서서히 회전시키면서 보존하고 2~3일 간격으로 세포 생존율을 측정하여 저온보존액의 효과를 평가하였다.

저온보존액 첨가물

HDF 세포의 저온보존에서 보존 효과를 향상시키기 위해 단백질 가수분해물, 에너지원, 항산화제, 삼투압 조절물질 등 다양한 물질들을 첨가하였다. 단백질 가수분해물은 미생물 유래의 yeastolate (Gibco), yeast hydrolysate (USB), 식물 유래의 soy protein hydrolysate (Sigma), wheat protein hydrolysate (Sigma), 동물 유래의 gelatin hydrolysate, peptone (BD)을 사용하였다. 단백질은 분리대두단백 (isolated soy protein: ISP)과 gelatin을 사용하였으며, 아미노산은 RPMI-1640 아미노산 혼합액 (Sigma)을 2배 희석 (0.5X)하거나 2배 농축 (2X)하여 사용하였다. 또한 a-tocopherol (Sigma)은 항산화제로, dextran (Sigma)은 삼투압 조절물질로 사용하였다. 에너지원으로 첨가한 ATP disodium salt, glucose, glutamate, pyruvate는 모두 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. 기존 세포 보존액은 현재 가장 널리 사용되고 있는 UW (University of Wisconsin)용액과 HypoThermosol[®] (HTS, BioLife Solutions)용액을 이용하여 저온보존 능력을 비교 평가하였다.

분리대두단백 가수분해 및 분획

분리대두단백의 가수분해는 Neutrase[®] 0.8 L (Novozymes) 효소를 사용하여 최적 반응조건 (pH 6.8, 온도 50°C, 희석율 13.3 kg water/ 1 kg protein, 효소량 18 mAU/g protein)에서 60분간 가수분해하고 효소의 비활성화를 위해 90°C에서 5분 동안 가열하였다(19). 가수분해액은 4500 g에서 15분간 원심분리하고 상등액을 0.2 µm syringe filter로 여과한 후 여과액을 동결건조하였다. 가수분해물의 분자량은 15% acrylamide gel (100 µg/well sample loading)에서 100 V 전압으로 SDS-PAGE를 수행하여 확인하였으며, 이후에 Vivaspin2 UF filter (Vivascience)를 사용하여 지시된 방법에 따라 각기 다른 분자량 (1만~3만, 5천~1만, 2천~5천, 2천 이하)으로 가수분해물을 분획하고 이를 동결건조한 후 실험에 사용하였다.

세포내 ATP level 측정

저온보존 기간 동안 세포내 ATP level의 변화는 luciferase를 이용한 ApoSENSOR[™] ATP detection kit (BioVision)를 사용하여 측정하였다(20). 약 1.0×10^6 cells/ml의 세포 농도로 4°C에서 저온보존 중인 보존액을 1 ml 취한 다음

6000 g에서 1분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 PBS 1 ml로 세척한 후 다시 원심분리를 통해 세포를 회수, PBS 1 ml로 재현탁하였다. 그런 다음 trypan blue를 이용하여 생세포수를 계수하고 5.0×10^5 cells/ml 농도로 PBS에 희석하였다. 이후 상기 농도로 희석된 세포 현탁액 10 μ l을 발광 측정용 96 well plate (white well)에 loading한 후 지시된 실험법에 따라 ATP level을 평가하였다. Luminescence signal은 microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 590 nm emission filter에서 3회 측정하여 평균값을 사용하였다.

세포내 ROS level 측정

세포내 ROS level의 측정은 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하여 측정하였다(21). 저온보존 중인 세포는 ATP assay와 동일한 방법으로 세포를 회수, 세척하여 trypan blue를 이용해 생세포를 계수한 후 5.0×10^5 cells/ml 농도로 PBS에 희석하였다. 이후 상기 농도로 희석된 세포 현탁액 20 μ l을 형광 측정용 96 well plate (white well)에 loading하고 20 uM의 DCFH-DA를 100 μ l 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Fluorescence signal은 반응 종료 후 microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 528 nm의 파장에서 3회 측정하여 평균값을 사용하였다.

세포 생존율 측정

세포 생존율의 측정은 trypan blue exclusion법을 이용하였다(22). 세포현탁액을 0.4% trypan blue solution과 1 : 1로 혼합한 후 hemacytometer를 이용하여 생세포수와 사세포수를 계수하고 식 (1)과 같이 총세포수에 대한 생세포수의 비율로 세포 생존율을 산출 하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \left(\frac{\text{viable cell number}}{\text{total cell number}} \right) \times 100 \quad (1)$$

세포 성장을 측정

세포 성장률의 측정은 해동 후 세포를 5.0×10^4 cells/ml의 초기농도로 35 mm culture dish에 loading 한 후 1일 간격으로 7일간 생세포를 계수하여 세포성장의 경향성을 확인하였다.

결과 및 고찰

단백질 가수분해물의 저온보존 개선 효과

HDF의 저온보존에서 세포의 보존 효과를 향상시켜주

는 성분을 탐색하기 위해 다양한 가수분해물을 저온보존액에 첨가하여 세포생존율을 조사하였다. 4°C에서 일주일간 HDF를 저온보존한 결과 yeastolate 농도에 의존적으로 세포 생존율이 향상되는 것이 확인되었으며(Fig. 1A), soy protein hydrolysate와 wheat protein hydrolysate를 첨가한 저온보존에서도 세포생존율이 높게 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 또한 동물성 단백질 가수분해물인 peptone을 농도별로 첨가한 HDF의 저온보존에서도 농도에 의존적으로 세포생존율이 향상되었다(Fig. 1C). 따라서 미생물, 식물, 동물 유래 가수분해물을 포함하는 단백질 가수분해물은 HDF의 저온보존에서 세포생존율을 유지하는데 공통적으로 우수한 효과를 보이는 것으로 판단되었다.

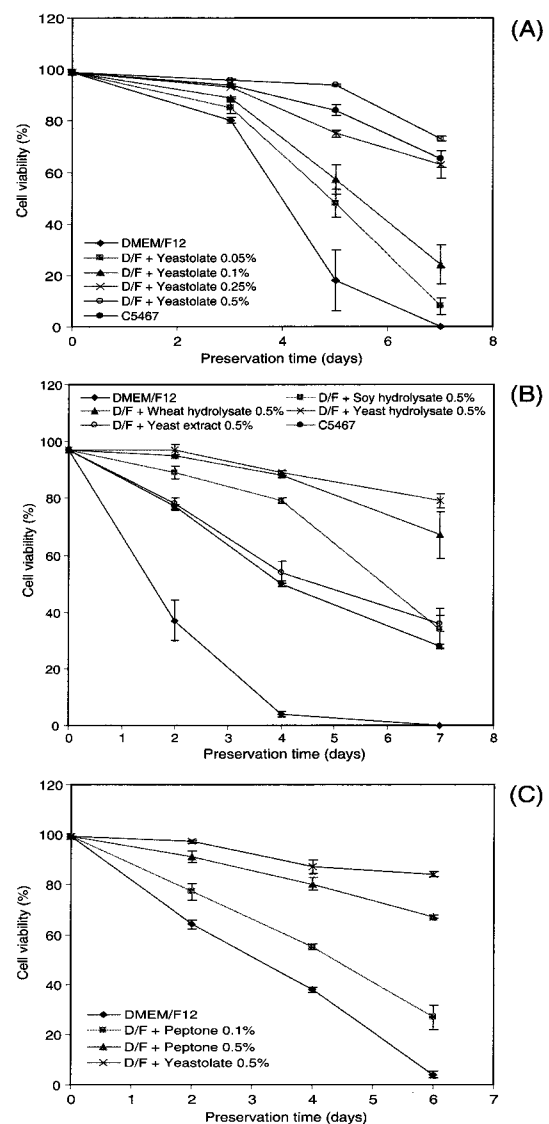


Fig. 1. Effect of various protein hydrolysates in hypothermic preservation of human dermal fibroblast (HDF). (A): various concentrations of yeastolate (B): soy protein hydrolysate, wheat protein hydrolysate, yeast hydrolysate, yeast extract (C): various concentrations of peptone.

분자량에 따른 단백질 가수분해물의 저온보존 효과

세포의 저온보존에서 우수한 효과를 나타내는 단백질 가수분해물의 성분을 명확히 알아보기 위하여 분자량에 따른 단백질 가수분해물의 효과를 조사하였다. 분리대두단백 및 젤라틴 단백질과 동 단백질의 가수분해물을 이용하여 HDF를 저온보존한 결과, 가수분해물 첨가군과 달리 단백질 첨가군에서는 보존 효과가 나타나지 않았다(Fig. 2A). 또한 아미노산 혼합액을 기본 아미노산 농도의 0.5배, 2배에 해당하는 농도로 DMEM/F12 배지에 첨가하여 저온보존한 경우에도 세포 생존율의 개선 효과가 크지 않음을 확인하였다(Fig. 2B). DMEM/F12 배지에 기본적으로 아미노산 성분이 다수 포함되어 있다는 점을 감안하면 아미노산 성분이 저온에서 세포손상을 막아주는 주된 성분은 아닌 것으로 판단되며, 단백질 가수분해물의 주성분인 펩타이드가 저온보존 동안의 세포손상을 막아주는 것으로 사료된다.

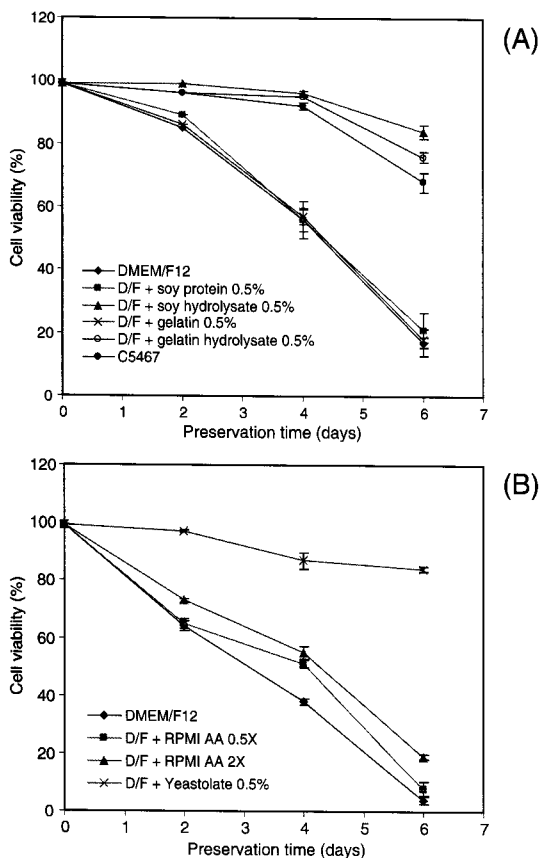


Fig. 2. Effect of proteins (A) or amino acids (B) in hypothermic preservation of human dermal fibroblast (HDF).

분자량에 따른 펩타이드의 저온보존 효과를 확인하기 위해 효소를 이용하여 분리대두단백을 가수분해한 결과, 단백질이 약 30 kDa 이하의 다양한 크기를 가진 펩타이드로 분해됨을 확인하였다(data not shown). 분자량 별로 분획된 펩타이드 (Isolated soyprotein hydrolyste, ISPH)를

DMEM/F12 배지에 0.5%씩 첨가하여 HDF를 저온보존한 결과, 5~10 kDa 크기의 펩타이드에서 가장 우수한 저온보존 효과를 나타냈으며 10~30 kDa 크기의 펩타이드에서는 개선 효과가 나타나지 않았다(Fig. 3). 분획하지 않은 분리대두단백 가수분해물에서 개선 효과가 다소 낮은 이유는 10~30 kDa 크기의 펩타이드가 높은 비율로 함유되어있기 때문인 것으로 판단된다. 또한 이전 실험에서 우수한 저온보존 효과를 나타낸 gelatin 가수분해물 및 wheat protein 가수분해물의 분자량을 조사한 결과, 펩타이드 크기가 모두 10 kDa 미만이었다(data not shown). 따라서 세포의 저온보존에서 단백질 가수분해물의 보존 개선 효과는 주로 10 kDa 이하의 펩타이드 성분에 의한 것으로 사료된다.

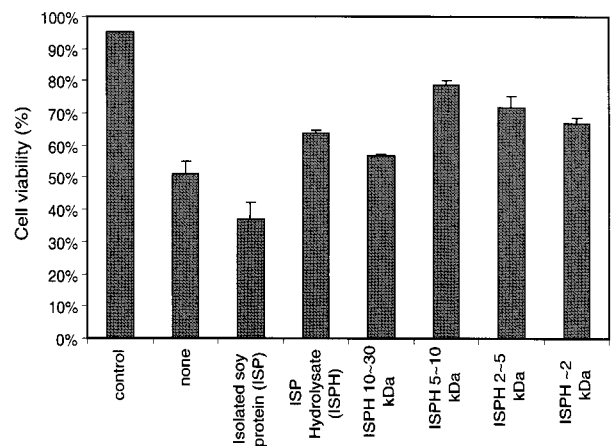


Fig. 3. Viability of human dermal fibroblast (HDF) at different molecular weights of ISPH (isolated soyprotein hydrolysate) after 11 days of hypothermic preservation.

에너지원 첨가에 의한 효과

세포의 저온보존에서 에너지원의 첨가가 세포 생존율을 향상시킬 수 있는지 확인하기 위하여 다양한 농도의 ATP와 여타의 에너지원을 사용하여 HDF를 저온보존 하였다. 1~10 mM 농도의 ATP를 DMEM/F12 배지에 첨가하여 저온보존한 결과 농도에 의존적으로 세포 생존율이 향상됨을 확인하였다(Fig. 4). 하지만 고농도의 ATP를 첨가한 저온보존에서도 yeastolate 1%를 첨가한 저온보존의 세포 생존율에는 미치지 못하였다. ATP, glucose, pyruvate, glutamate 등의 다양한 에너지원을 첨가한 실험에서는 ATP를 제외한 모든 에너지원에서 개선 효과가 현저하지 않았지만, pyruvate 및 glutamate를 첨가한 경우에는 다소간 세포생존율을 높여주었다(Fig. 5). Glucose를 첨가한 실험군에서는 개선효과가 나타나지 않았는데, ATP 생성 기작의 하위 단계 물질보다 상위 단계의 물질은 세포가 에너지원으로 바로 이용하기 힘들기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 세포 대사활동이 극히 제한되는 저온보존에서 세포 생존율을 높게 유지시켜주기 위해서는 최종 단계의 에너지원을 직접 첨가해 주는 방법이 유효할 것으로 판단된다.

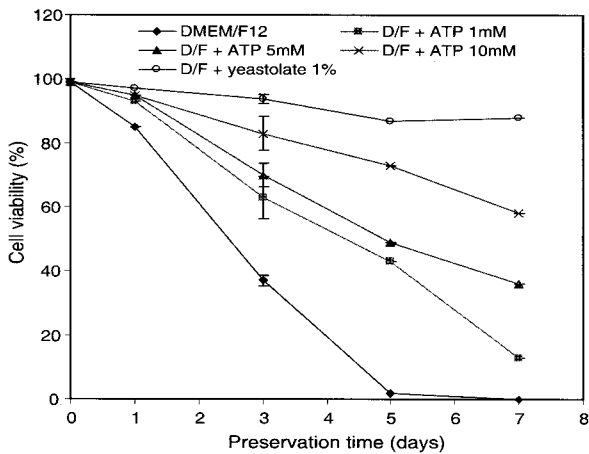


Fig. 4. Effect of adenosine triphosphate (ATP) in hypothermic preservation of human dermal fibroblast (HDF).

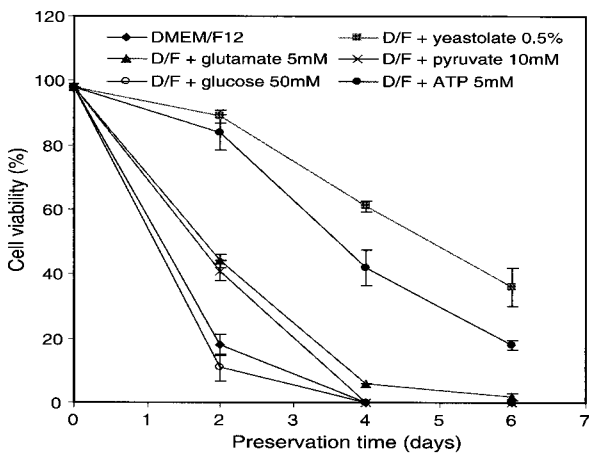


Fig. 5. Effect of various energy sources in hypothermic preservation of human dermal fibroblast (HDF).

세포내 ATP 감소 억제 효과

저온 스트레스에 의한 세포죽음의 원인과 저온보존에서 세포죽음을 막아주는 첨가물의 효과를 알아보기 위해 HDF의 저온보존 기간 동안 세포내 ATP level의 변화를 조사하였다. 세포내 ATP level의 감소는 세포막에 존재하는 Na⁺-K⁺ ATPase와 Ca²⁺ ATPase 등의 기능을 정지시켜 세포의 이온 균형을 붕괴시키고, 이는 결국 세포내 칼슘농도의 증가, 삼투압 차이 발생 등에 의한 세포괴사(necrosis)를 일으킨다. 또한 세포내 ATP level의 감소는 세포사멸(apoptosis)의 주된 원인으로 작용하기 때문에 ATP level의 측정은 세포생존율의 평가와 세포사멸의 지표로 주로 사용되고 있다(20). 사세포의 경우 세포내 ATP가 모두 소멸한 상태이므로 본 연구에서는 생세포만을 선별하여 ATP level을 측정하였으며, 세포죽음의 원인이 세포내 ATP level의 감소에 의한 것인지 조사하였다.

저온보존 이전의 세포내 ATP level을 기본값으로 보존 기간 동안 ATP level의 변화를 측정한 결과, 무혈청배지

와 yeastolate를 첨가한 보존액에서는 세포내 ATP level이 높게 유지되었으나 기본보존액인 DMEM/F12배지를 사용한 보존액에서는 ATP level의 감소가 관찰되었다(Fig. 6A). 이 결과는 저온보존에 의한 세포죽음이 세포내 ATP 소모에 의한 것이라는 종래의 이론과 일치하는 것이며, 단백질 가수분해물이 저온 스트레스에 의한 세포내 ATP 감소를 막아주는 핵심 성분으로 작용함을 의미한다.

또한 ATP를 농도별로 첨가하여 HDF를 저온보존하고 24시간 후 세포내 ATP level을 측정된 결과, ATP 농도에 의존적으로 세포내 ATP level의 감소를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 6B). 하지만 ATP 1 mM을 첨가한 보존액에서는 세포내 ATP level의 감소를 막지 못하였는데, 이는 외부에서 공급된 ATP의 농도가 낮아 세포내 유입이 많지 않았기 때문인 것으로 사료된다. Rat hepatocytes의 저온보존에 대한 Mario 등의 연구에서는 5~10 mM의 ATP의 첨가에 의해 세포내 ATP content가 증가하며, ATP의 세포내 유입이 농도에 따른 확산기전으로 이루어진다고 보고한 바 있다(23). 하지만 몇몇 연구에서는 고농도의 ATP 첨가에 의해 오히려 세포사멸이 유도된다고 보고하기도 하였다(24, 25).

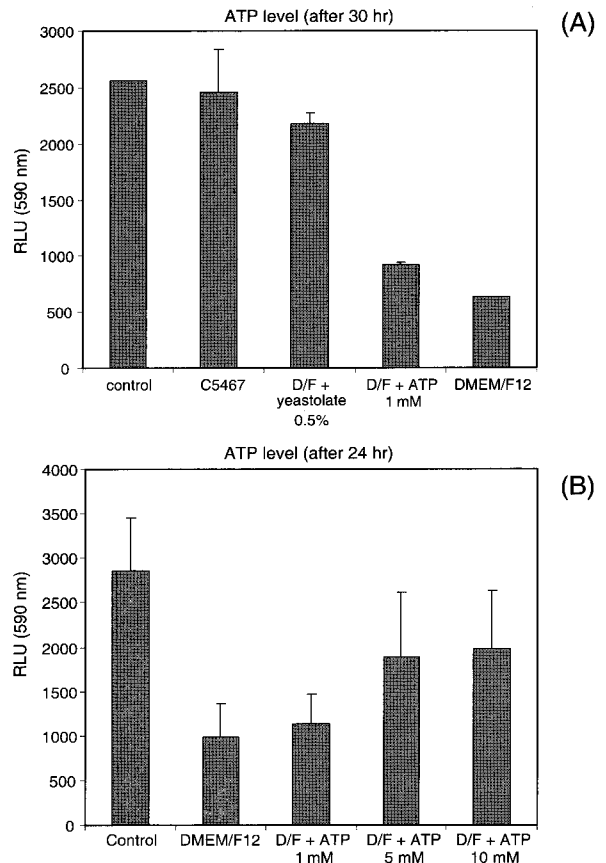


Fig. 6. Changes in cellular ATP level according to various additives in hypothermic preservation of human dermal fibroblast (HDF). (A): yeastolate or ATP (B): various concentrations of ATP.

이상의 결과를 종합하면 저온스트레스에 의한 세포의 죽음은 세포내 ATP level 감소에 따른 세포괴사 및 세포 사멸과 관련이 있으며, 개선된 저온보존액으로서 단백질 가수분해물과 적정 농도의 ATP 첨가는 저온보존기간 동안 높은 세포생존율을 유지시키는데 효과적일 것으로 사료된다.

세포내 활성산소 억제 효과

세포는 환경의 변화에 대해 민감하게 반응하는데 세포의 보존과정에서 발생하는 저온 스트레스는 세포내 산화체계를 파괴하고 이에 따라 활성산소가 생성되게 된다. 본 실험에서는 저온보존에 의한 세포내 활성산소 증가를 확인하고, 세포의 저온보존에서 우수한 보존효과를 보인 yeastolate와 ATP를 대상으로 이들의 첨가가 세포내 활성산소 농도에 미치는 영향을 알아보았다. DCFH-DA법을 이용해 저온보존 24시간 후의 세포내 활성산소를 측정된 결과, 저온보존 전과 비교하여 세포내 활성산소의 증가를 확인할 수 있었다. Yeastolate와 ATP를 기본 저온보존액에 첨가한 실험군에서는 무첨가군에 비해 낮은 활성산소 수준을 나타내었는데, 그 중 yeastolate 첨가군에서 가장 우수한 활성산소 억제능력이 관찰되었다. ATP를 1~10 mM 농도범위로 첨가한 경우에는 활성산소의 농도 의존적인 감소가 관찰된 반면 그 효과는 yeastolate 1% 첨가군의 감소효과에 비해 낮은 수준이었다(Fig. 7). 따라서 단백질 가수분해물의 첨가에 의한 세포내 활성산소 억제는 저온에서 세포의 보존 효과를 높여줄 것으로 사료된다.

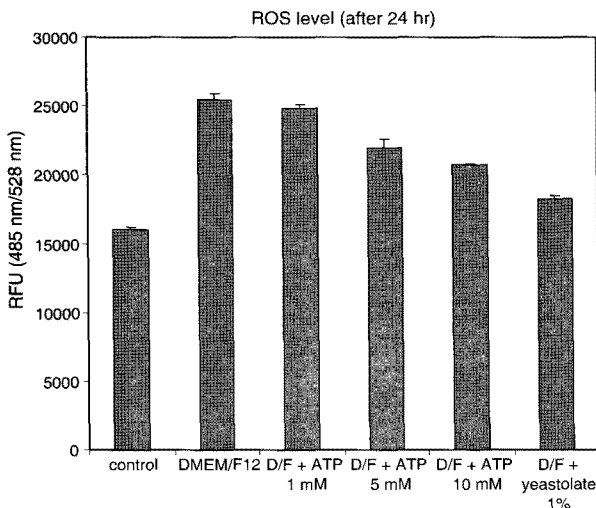


Fig. 7. Changes in cellular reactive oxygen species (ROS) level according to various additives in hypothermic preservation of human dermal fibroblast (HDF).

항산화제 및 삼투압 조절물질 첨가에 의한 세포 보존 효과

HDF의 4°C 저온보존에서 세포생존율의 향상효과를 나타낸 단백질 가수분해물, 에너지원과 항산화제의 복합첨

가에 의한 개선효과를 알아보기 위해 yeastolate와 ATP, α -tocopherol을 함께 보존액에 첨가한 후 보존기간 동안 세포생존율을 조사하였다. 실험결과 단독 첨가에 의해서는 향상효과가 나타나지 않는 α -tocopherol도 yeastolate 및 ATP와 복합처리했을 경우에는 더욱 우수한 세포생존율을 유지시켜주는 것으로 나타났다 (Fig. 8A). 상기 결과는 무혈청배지에 항산화제를 첨가한 것과 유사한 경향을 나타내는 것으로(26), 이는 무혈청배지에 식물성 가수분해물이 포함되어 있기 때문으로 판단된다. 따라서 단백질 가수분해물과 항산화제를 동시에 첨가해 주는 것이 저온스트레스에 의한 세포죽음을 막고 저온보존 기간 동안 높은 세포생존율을 유지시키기 위한 적절한 방법이 될 것으로 사료된다.

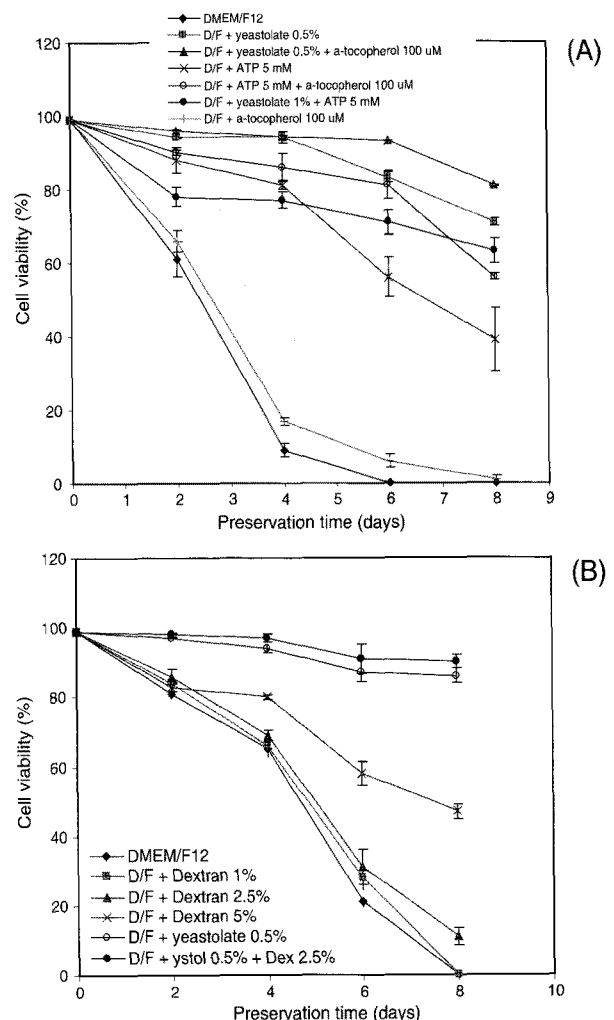


Fig. 8. Synergic effect of various additives in hypothermic preservation of human dermal fibroblast (HDF). (A): yeastolate, ATP, α -tocopherol (B): yeastolate, dextran.

HDF의 저온보존에서 세포 생존율의 향상 효과가 확인된 yeastolate와 ATP를 함께 첨가하여 저온보존한 경우에

는 yeastolate를 단독으로 첨가한 보존에 비해 오히려 낮은 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 8A). 이는 yeastolate에 의해 우선적으로 세포내 ATP level의 감소가 억제되는 상황에서 여분의 ATP가 추가적으로 공급되기 때문인 것으로 판단된다. 세포외부에서 ATP를 직접 공급함으로써 유발되는 효과는 매우 다양한데, 몇몇 연구에서는 ATP의 공급에 의해 세포사멸이 유발되거나 세포막의 침투성이 증가된다고 보고한 바 있다(24, 25, 27). 따라서 세포내 ATP가 고갈되는 상황에서 ATP를 공급하는 것은 세포 생존에 유리할 수 있으나, 정상적인 ATP level이 유지되는 상태에서 필요치 않은 ATP의 공급은 오히려 세포 생존에 불리한 것으로 판단된다.

또다른 세포손상의 원인인 저온보존액과 세포 내부의 삼투압 차이는 세포팽창을 유발하고 결국 세포를 붕괴시키는데, 삼투압 조절 물질의 첨가는 이러한 세포손상을 감소시킬 수 있다(28). 따라서 본 실험에서는 삼투압을 적절히 조절하기 위한 콜로이드성 고분자 물질로 dextran을 사용하여 저온보존액에서의 세포 보호효과를 평가하였다. Dextran을 다양한 농도로 DMEM/F12 배지에 첨가하고 HDF를 저온보존한 결과, 농도에 의존적으로 세포 생존율이 증가함을 확인할 수 있었으며, yeastolate와 함께 첨가한 경우에도 세포 생존율의 상승효과가 관찰되었다(Fig. 8B). 따라서 단백질 가수분해물과 함께 삼투압 조절 물질을 첨가하는 방법은 저온보존에서의 세포손상을 더욱 감소시키는데 효과적일 것으로 사료된다.

기존 저온보존액과의 비교 평가

개선된 저온보존 기술을 개발하기 위해 상기 연구에서 확인된 유효성분을 첨가한 저온보존액과 현재 널리 사용되고 있는 저온보존액을 비교 평가하였다. 미국 위스콘신 대학교에서 개발한 UW (University of Wisconsin) 용액은 조직보존 및 장기보존 등에서 현재 가장 널리 사용되고 있는 저온보존액이며, HypoThermosol® (HTS) 용액은 미국 BioLife Solutions 사가 개발한 세포 및 조직보존을 위한 개선된 저온보존액이다(29). 본 연구에서 최종적으로 개발한 저온보존액은 KUL261 (Konkuk University Laboratory 261)용액이라 명명하였는데, 성분으로는 DMEM/F12(1:1) 배지를 기본성분으로 사용하고 여기에 단백질 가수분해물로서 yeastolate 1%, 항산화제로서 α -tocopherol 100 μ M, 삼투압 조절물질로서 dextran 2.5%를 첨가한 것이다.

상기의 저온보존액을 이용하여 HDF를 저온보존하고 2일 간격으로 세포 생존율을 측정하여 저온보존액을 비교 평가한 결과, KUL261용액에서 가장 오랜 기간 높은 세포 생존율을 유지하는 것을 확인하였다(Fig. 9). 기존의 저온보존액인 UW 및 HTS 용액은 DMEM/F12 배지를 이용한 저온보존에 비해서는 비교적 높은 세포 생존율을 유지하였으나, DMEM/F12 배지에 yeastolate 1%를 첨가한 저온보존에 비해서는 낮은 세포 생존율을 나타내었다.

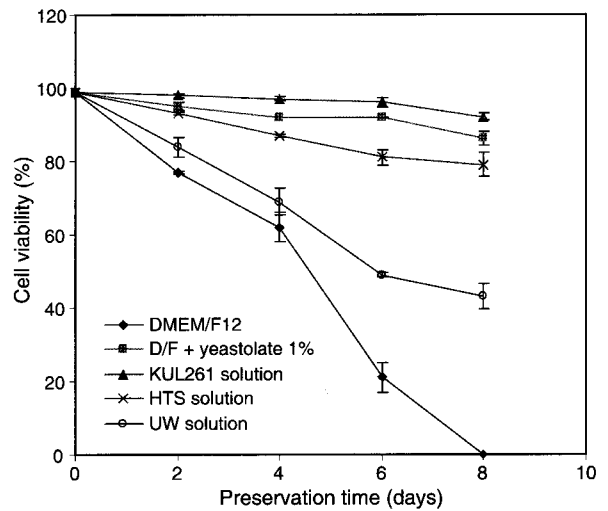


Fig. 9. Comparison of different preservation solutions in hypothermic preservation of human dermal fibroblast (HDF).

또한 저온보존 후 세포의 회복율을 평가하기 위해 HDF를 사용하여 보존기간에 따른 세포 성장률을 조사하였다. DMEM/F12배지를 사용하여 HDF를 보존한 경우에는 보존 후 정상적인 세포 성장이 이루어지지 않은 반면, UW 및 HTS 보존액을 사용한 경우 2일간 저온보존한 후 (data not shown) 그리고 KUL261 용액을 사용한 경우는 6일 동안 저온보존한 후에도 정상적인 세포 성장이 이루어짐을 확인하였다(Fig. 10).

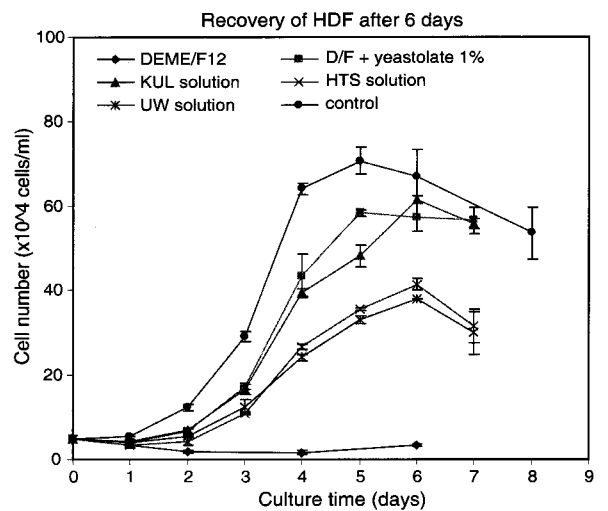


Fig. 10. Recovery of growth rates of human dermal fibroblast (HDF) after 6 days of hypothermic preservation in different preservation solutions.

이상의 결과를 종합해 보면, 본 연구에서 개발한 KUL261 용액은 기존의 저온보존액보다 우수한 세포 보존 능력을 가지며, 세포를 이용하는 다양한 분야에서 효율적이고 안정적인 세포 보존기술을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

치료용 단백질을 생산하는 생물약품 산업이나 세포치료제 및 이식용 세포를 다루는 재생의학 분야 등의 세포 기반 산업에서 안정적인 세포의 보존은 필수적인 요소이다. 본 연구에서는 인간 피부 섬유아세포의 4℃ 저온보존에서 우수한 성능을 나타내는 개선된 저온보존액을 개발하고, 저온에 의한 세포 손상을 보호함으로써 보다 안정적인 세포 저온보존 기술을 제공하고자 하였다.

세포의 저온보존에서 우수한 효능을 나타내는 핵심 성분을 탐색한 결과, yeast hydrolysate 등의 단백질 가수분해물을 첨가한 보존액에서 월등히 뛰어난 보존효과가 나타남을 확인하였다. 단백질 가수분해물은 미생물, 식물, 동물 유래 단백질 가수분해물에서 모두 우수한 효과를 나타냈으며, 특히 단백질 가수분해물 성분 중 분자량 10kDa 이하의 펩타이드를 첨가한 저온보존에서 우수한 보존효과가 나타났다. 저온에 의한 세포손상에 대해 단백질 가수분해물은 세포내 ATP level의 감소를 막아주고 ROS 생성을 억제하는 것으로 나타났으며, 항산화제 및 삼투압 조절물질을 단백질 가수분해물과 함께 첨가하였을 때 더욱 우수한 세포 보존효과를 보였다. 최종적으로 본 연구에서 개발한 KUL261 저온보존액 (DMEM/F12 1:1 medium, yeastolate 1%, α -tocopherol 100 μ M, dextran 2.5%)은 기존의 저온보존액에 비해 세포 생존율 및 성장률에서 월등히 우수한 성능을 나타내었다.

결론적으로, 핵심 유효성분으로 단백질 가수분해물을 포함하는 개선된 저온보존액은 기존의 보존액보다 월등히 우수한 보존효과를 제공하며, 세포치료제 및 재생의학 분야의 발전과 글로벌 상업화에 기여할 수 있을 것이다.

결 론

본 논문은 2008학년도 건국대학교의 지원에 의하여 연구되었음.

접수 : 2009년 2월 9일, 게재승인 : 2009년 6월 17일

REFERENCES

1. Aejaz, H. M., Aleem, A. K., Parveen, N., Khaja, M. N., Narusu, M. L., and Habibullah, C. M. (2007), Stem cell therapy-present status, *Transplantation Proceedings* **39**(3), 694-699.
2. Aleem Khan, A., Parveen, N., Habeeb, and M. A., Habibullah, C. M. (2006), Journey from hepatocyte transplantation to hepatic stem cells: a novel treatment strategy for liver diseases, *The Indian Journal of Medical Research* **123**(5), 601-614.
3. Webber, D. J. and Minger, S. L. (2004), Therapeutic potential of stem cells in central nervous system regeneration, *Current Opinion in Investigational Drugs* **5**(7), 714-719.
4. Yard, B., Beck, G., Schnuelle, P., Braun, C., Schaub, M., Bechtler, M., Göttmann, U., Xiao, Y., Breedijk, A., Wandschneider, S., Lösel, R., Sponer, G., Wehling, M., and van der Woude F. J. (2004), Prevention of cold-preservation injury of cultured endothelial cells by catecholamines and related compounds, *American Journal of Transplantation* **4**(1), 22-30.
5. Taylor M. J., et. al (1996), Hypothermia in relation to the acceptable limits of ischemia for bloodless surgery, In *Steponkus PL, Advances in Low-temperature Biology* Eds.; JAI Press, London, pp1-64.
6. Nowak, G., Ungerstedt, J., Wernerson, A., Ungerstedt, U., and Ericzon, B. G. (2003), Hepatic cell membrane damage during cold preservation sensitizes liver grafts to rewarming injury, *Journal of Hepato-biliary-pancreatic Surgery* **10**, 200-205.
7. Breton, S. and Brown, D. (1998), Cold-induced microtubule disruption and relocalization of membrane proteins in kidney epithelial cells, *Journal of the American Society of Nephrology* **9**(2), 155-166.
8. Mitchell, S. J., Churchill, T. A., Winslet, M. C., Fuller, B. J. (1999), Energy metabolism following prolonged hepatic cold preservation: benefits of interrupted hypoxia on the adenine nucleotide pool in rat liver, *Cryobiology* **39**(2), 130-137.
9. Vajdová, K., Graf, R., and Clavien, P. A. (2002), ATP-supplies in the cold-preserved liver: A long-neglected factor of organ viability, *Hepatology* **36**(6), 1543-1552.
10. Abrahamse, S. L., van Runnard Heimel, P., Hartman, R. J., Chamuleau, R. A., and van Gulik, T. M. (2003), Induction of necrosis and DNA fragmentation during hypothermic preservation of hepatocytes in UW, HTK, and Celsior solutions, *Cell Transplantation* **12**(1), 59-68.
11. Hart, N. A., Leuvenink Henri, G. D., and Ploeg, R. J. (2002), New solutions in organ preservation, *Transplantation Reviews* **16**(3), 131-141.
12. Meng, Q. (2003), Hypothermic preservation of hepatocytes, *Biotechnology Progress* **19**(4), 1118-1127.
13. Shirouzu, Y., Gu, Y., Koga, M., Sakurai, T., Qi, M., Hiura, A., Sumi, S., and Inoue, K. (2006), Cold preservation of islets in UW solution-with special reference to apoptosis, *The Journal of Surgical Research* **133**(2), 167-175.
14. Roberts, R. F., Nishanian, G. P., Carey, J. N., Sakamaki, Y., Starnes, V. A., and Barr, M. L. (1999), A comparison of the new preservation solution Celsior

- to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury, *Transplantation* **67**(1), 152-155.
15. Janssen, H., Janssen, P. H., and Broelsch, C. E. (2004), UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury, *Liver Transplantation* **10**(12), 1514-1523.
 16. McAnulty, J. F. and Huang, X. Q. (1997), The efficacy of antioxidants administered during low temperature storage of warm ischemic kidney tissue slices, *Cryobiology* **34**(4), 406-415.
 17. Chiang, C. H., Wu, K., Yu, C. P., Perng, W. C., Yan, H. C., Wu, C. P., Chang, D. M., and Hsu, K. (1998), Protective agents used as additives in University of Wisconsin solution to promote protection against ischaemia-reperfusion injury in rat lung, *Clinical Science* **95**(3), 369-376.
 18. Mosbah, I. B., Saidane, D., Peralta, C., Roselló-Catafau J., and Abdennebi, H. B. (2005), Efficacy of polyethylene glycols in University of Wisconsin preservation solutions: a study of isolated perfused rat liver, *Transplantation Proceedings* **37**(9), 3948-3950.
 19. Surowka, K. and Zmudzinski, D. (2004), Functional properties modification of extruded soy protein concentrate using Neutrase, *Czech Journal of Food Sciences* **22**(5), 163-174.
 20. Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J., and Fletcher, J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity, *Journal of Immunological Methods* **160**(1), 81-88.
 21. Carter, W. O., Narayanan, P. K., and Robinson, J. P. (1994), Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells, *Journal of Leukocyte Biology* **55**(2), 253-258.
 22. Poullain, M. G., Fautrel, A., Guyomard, C., Chesne, C., Grislain, L., and Guillouzo, A. (1992), Viability and primary culture of rat hepatocytes after hypothermic preservation: the superiority of the Leibovitz medium over the University of Wisconsin solution for cold storage, *Hepatology* **15**, 97-106.
 23. Mamprin, M. E., Vega, F., and Rodriguez, J. V. (2005), Adenosine 5'triphosphate transport and accumulation during the cold preservation of rat hepatocytes in University of Wisconsin solution, *World Journal of Gastroenterology* **11**(13), 1957-1964.
 24. Richter, C., Schweizer, M., Cossarizza, A., and Franceschi, C. (1996), Control of apoptosis by the cellular ATP level, *FEBS Letters* **378**(2), 107-110.
 25. Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, and S., Nicotera, P. (1997), Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis, *The Journal of Experimental Medicine* **185**(8), 1481-1486.
 26. Byoun, S. H., Park, H. W., and Choe, T. B. (2006), Short-term hypothermic preservation of CHO Cells Using Serum-Free Media, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **21**(4), 306-311.
 27. Giampiero Girolomoni, Maria Lucia Santantonio, Saveria Pastore, Paul R. Bergstresser, Alberto Giannetti, and Ponciano D. Cruz Jr (1993), Epidermal Langerhans Cells Are Resistant to the Permeabilizing Effects of Extracellular ATP: In Vitro Evidence Supporting a Protective Role of Membrane ATPase, *Journal of Investigative Dermatology* **100**, 282-287.
 28. Klöppel, K., Gerlach, J., and Neuhaus, P. (1994), Addition of an osmotic agent to liver preservative solutions in a model of in vitro preservation of hepatocytes, *Langenbecks Archiv für Chirurgie* **379**(6), 329-334.
 29. Bessems, M., Doorschodt, B. M., van Vliet, A. K., and van Gulik T. M. (2004), Preservation of rat livers by cold storage: a comparison between the University of Wisconsin solution and Hypothermosol, *Annals of Transplantation* **9**(2), 35-37.