

배아기 간(幹)세포의 비장내 이식에 관한 연구

인제대학교 부산백병원 외과학교실, ¹해부학교실

최 창 수 · 양 영 철¹ · 최 영 길

A Study on Intrasplenic Transplantation of Embryonic Stem Cells

Chang Soo Choi, M.D., Young Churl Yang, Ph.D.¹ and Young Kil Choi, M.D.

Purpose: The authors evaluated the morphological and proliferative properties of embryonic stem (ES) cells following intrasplenic transplantation. The results were compared with those obtained following intrasplenic transplantation of cultured hepatocytes.

Methods: ES cells of blastocysts were collected from superovulated Sprague Dawley rats. Hepatocytes were collected from the liver of 7-week old rats by perfusion of collagenase. The ES cells and hepatocytes were cultured for 6 days and transplanted into the rat spleen. The properties of the ES cells and cultured hepatocytes following transplantation were investigated by morphological methods.

Results: ES cells in the culture proliferated faster than hepatocytes, and differentiated to various shaped cells. Following transplantation, ES cells were distributed near the periarterial lymphatic sheath. Cultured hepatocytes gathered chiefly around the trabeculae. On PCNA stain of transplanted ES cells, positive cells appeared on day 7 and became distinct on days 10 and 14. Transplanted hepatocytes showed no PCNA positive cells on day 14. On electron microscopic examination, ES cells differentiated to hepatocyte-like structures on day 10, and became functioning hepatocytes on day 14. Transplanted hepatocytes formed bile canaliculi on day 10, although development of organelles was insufficient on day 14.

Conclusion: ES cells proliferated faster than cultured hepatocytes. Intrasplenic ES cells proliferated at the germinal center and hepatocytes around the trabecula. ES cells differentiated to cells that had the function of hepatocytes. (J Korean Surg Soc 2001;60:549-557)

Key Words: Intrasplenic transplantation, Embryonic stem cell, Transplanted hepatocyte

중심 단어: 비장내간세포이식, 배아기간세포, 이식간세포

Departments of Surgery and ¹Anatomy, Inje University College of Medicine, Busan Paik Hospital, Busan, Korea

서 론

비장내 간(肝)세포이식은 동물 모델에서 불완전한 기능을 부분적으로 회복시키는데 성공한 몇 가지 방법이 보고되어 있다.(1) 그러나 이식된 간세포의 생존을 위하여 다량의 간세포를 주입할 경우 전색의 위험이 있으므로 안전하게 이식할 수 있는 간세포 수가 제한되어 있고 출혈, 문맥압항진 등의 심각한 합병증을 일으킬 수도 있다.(2) 또 성인이나 태아의 간세포를 배양하여 이식할 경우 간세포의 생존을 위하여 in vitro 상태에서의 유사성, 간세포 분리와 이식 사이의 지연시간, 생리적 자극에 대한 최대 반응, 그리고 증식을 자극하는 주기의 타이밍 등 많은 인자를 고려해야 하며(3) 배양 간세포가 분화되거나 분열하여 재생되는 것이 아니므로 간세포의 증식상태를 유지 보존하기가 매우 까다롭고 성공률이 낮다. 즉 간세포의 비장내 이식은 일시적으로 효과가 있지만 시간이 경과할수록 합병증과 이식실패의 빈도가 높다.

배아기 간(幹)세포는 모든 세포로 분화될 수 있으며, 특별한 처리를 하지 않아도 유용한 몇 가지 조직으로 분화되고 적은 수의 세포를 주입하여도 많은 세포로 증식할 수 있다는 이점이 있다.(4) 최근 배아기 간(幹)세포의 다능성을 이용하여 말기 간부전을 회복시킨 보고가 있으며 배아기 간(幹)세포 주입기술이 간이식을 기다리는 간부전 환자에게 1~2일의 시간적 여유를 줄 수 있다고 하였다.(5) 이러한 연구 결과는 반복적인 배아기 간(幹)세포 주입으로 간이식 수술을 대체할 수 있을 것이라는 가능성도 보여 주고 있다.

근년 마우스에서 확립된 배아기 간(幹)세포 수립기술과 분화유도에 관한 성과를 바탕으로 다른 동물에서도 배아

책임저자 : 최창수, 부산시 부산진구 개금동 633-165
☎ 614-735, 인제대학교 부산백병원 외과
Tel: 051-890-6045, Fax: 051-898-9427

접수일 : 2001년 2월 28일, 게재승인일 : 2001년 3월 17일
본 논문은 1998년 인제대학교 학술연구조성비 보조로 이루어졌음.

기 간(幹)세포의 수립 및 분화능에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는데(6) 현재까지 다양한 동물 중에서 배아기 간(幹)세포 혹은 배아기 간(幹)세포성 세포의 수립이 보고 되었으며 embryoid body 및 기형종 형성, chimera체내에서의 광범위한 분화능 등이 확인되었다.(7) 그러나 간세포 이식을 위한 세포분화 유도시 배아기 간(幹)세포가 여러 가지 효소의 조작과 성장중인 간(肝)세포의 배지를 첨가한 짧은 기간 동안의 배양 후 비장 내로 이식되었을 때 배아기 간(幹)세포가 간(肝)세포로의 분화의 다능성을 유지할 수 있는지에 대해서는 증명된 바가 없다. 이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 발생시기의 포배로부터 얻은 배아기 간(幹)세포를 간(肝)세포로 분화시킨 후 비장 내에 이식하였을 때 이것이 활착하여 자랄 수 있는지 알아보고, 배양한 성장 간세포를 비장 내에 이식한 군과 형태학적으로 비교하고자 하였다.

방 법

1) 실험동물의 처치

Sprague Dawley계(14주) 흰쥐로부터 포배기의 배아기 간(幹)세포를 얻기 위하여 동복임신 기법을 이용하였다. FSH (Sigma, USA) 50 units를 10 ml의 생리식염수에 희석하여 1 ml씩 피하주사하고 50시간 후 LH (Sigma, USA) 37,000 units를 740 ml의 주사용 생리식염수에 희석하여 0.1 ml씩 피하주사 한 다음, 암컷 2마리에 수컷 1마리의 비율로 합사시키고 vaginal plug을 확인한 날을 임신 '0'일로 하여 4일된 포배를 채취하였다. 포배의 채취 시는 개복하여 가능하면 붙어 있는 조직이 적도록 자궁과 난관을 적출한 다음 hyaluronidase 0.5 mg/ml가 들어 있는 배아기 간(幹)세포 배양액이나 bicarbonate-free MEM/PVP (Gibco, USA) 100 μ l내에 두었다.

수술용 현미경(Olympus, Japan)상 팽창된 난관 속에 cumulus cell mass가 매몰되어 있는 수정란이 비쳐서 투명하게 관찰되었으며 난관을 겹자로 잡고 24 G 바늘로 팽창부에 구멍을 내면 수정란이 배지 내로 빠져 나오는 것을 볼 수 있었다. 수정란이 나오면 핀셋으로 난관과 붙어 있는 다른 조직을 방울로부터 제거하였고 각 방울들을 조심스럽게 검사하여 cumulus cell이 균일하게 퍼지면 입이 달린 micropipette으로 수정란을 수확하였다. 최소한의 양(5 μ l 이하)으로 배지방울에 수정란을 옮긴 다음 5~6개의 방울을 지나면서 배아를 세척하여 함께 채취된 cumulus cell을 제거하였다.

2) 배아기 간(幹)세포의 분리와 배양액의 제조

투명대에 둘러싸인 포배를 37°C하에서 교반시키면서 1% dispase 용액(Gibco, USA) 2 ml로 15분간 처리하여 투명대가 녹는 것을 확인하면서 떨어지도록 한 다음 효소희

석용액 2 ml를 가하여 교반시키면서 2회 세척하고 원심분리하여 내세포덩이를 얻었다. 내세포덩이는 다시 37°C하에서 교반시키면서 1 mg/ml type IV collagenase 용액(Gibco, USA)에 1시간 두었다가 상층액을 제거한 후 내세포덩이 세포를 분리하였다. 이것을 배아기 간(幹)세포 배양액 내에서 하룻밤 두면 세포들은 서로 응집하며 embryoid body를 형성하였는데 이를 다시 type IV collagenase 용액에 1시간동안 처리하여 각각의 세포를 분리한 후 배아기 간(幹)세포 배양액에서 배양하였다.

배아기 간(幹)세포 배양액은 20% fetal calf serum (Gibco, USA), glutamine (1 mM), β -mercaptoethanol (0.1 mM Sigma, USA), nonessential amino acid stock (0.1%, Gibco, USA), penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 μ g/ml, Gibco, USA), fungizone (1.25 μ g/ml, Gibco, USA), gentamycin (50 ng/ml, Gibco, USA), kanamycin (100 ng/ml, Gibco, USA)을 혼합한 후 Dulbecco's modified eagle's medium (no pyruvate, high glucose, with glutamine formula Gibco, USA)로 500 ml가 되도록 채워서 제조하였다.

성장배지 5 ml를 75 cm² culture flask에 풀고 분리된 배아기 간(幹)세포를 접종한 후 성장 간세포 배지 1 ml를 첨가하여 총 용량이 6 ml되게 만들어 37°C에서 배양하였다. 배아기 간(幹)세포는 6일 동안 배양한 후 37°C 하에서 교반시키면서 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA 용액(Gibco, USA)으로 15분간 처리하여 바닥에 부착한 세포가 배양용기 표면에서 떨어지도록 하였다.

3) 관류법에 의한 간세포 분리와 배양액의 제조

흰쥐를 ether로 2분 동안 경마취시키고 복강 내에 ketamine (50 mg/ml, 10 ml) 0.5 ml를 주사, 5분 후 개복하여 생리식염수에 적신 꺼즈로 장을 우측으로 젖혀서 문맥이 잘 보이도록 시야를 확보하였다. 문맥에 상, 하로 두 개의 봉합사 매듭을 걸어 놓고 하부 매듭을 먼저 결찰한 다음 간에 허혈 손상이 생기지 않도록 재빨리 도관을 삽입하여 상부의 매듭을 결찰하고, 복부 하대정맥에도 같은 요령으로 뚜껑이 있는 도관을 삽입하고 관류액과 혈액을 배출시켰다.

분당 30 ml 속도로 peristaltic pump (Fisher, USA)를 작동시켜 38°C에 항온을 유지시킨 전관류용 완충액 150 ml를 문맥에 관류시킨 후 절개를 연장하여 심장을 노출시킨 다음 횡격막 부근의 흉부 하대정맥에 봉합사의 매듭을 걸었다. 복부 하대정맥을 결찰하면 흉부하대정맥이 팽창되는데 이때 우심방을 절개하여 다른 도관을 우심방에서 하대정맥을 지나 횡격막 부근의 흉부하대정맥까지 유도하여 봉합사의 매듭을 결찰하고 도관의 끝은 항온수조내의 병 속에 넣고 4~5분간 관류가 원활하게 이루어지는 것을 확인하였다.

관류액을 38°C로 항온시킨 Ca²⁺ free hank solution 용액

(Gibco, USA) 100 ml에 collagenase 100 mg을 첨가하여 여과한 용액 100 ml로 바꾸어 10~20분간 순환시켜, 간이 소화되면 간엽들이 부어 올라 효소액이 삼출되어 나오는데 이때 관류를 중지하고 각 간소엽을 가위로 절단하여 Ca^{2+} free hank solution 10 ml를 넣은 사알레에 옮겼다. 수술용 무구핀셋과 가위로 간을 가볍게 찢어 소화된 간에서 간세포들을 분리하였다.

간세포가 혼합된 용액은 10 ml pipette으로 천천히 흡입, 배출을 반복하여 세포가 고르게 분산되도록 한 다음 cell strainer (Falcon 2340, USA, 40 μ m nylon)를 이용하여 여과하였다. 여과액을 50 ml 원심분리관 2개에 모아서 4°C하 800 rpm으로 1분간 원심분리 하면 바닥에는 간세포가, 상층에는 세포조각, 섬유모세포, 적혈구 등이 모이게 되는데 상층액은 멸균된 30 ml 주사기를 이용하여 제거하고 이 과정을 3~4회 반복하여 상층액이 투명해 지고 간세포만 남도록 처리하였다. 간세포의 활성을 trypan blue (Gibco, USA)를 이용하여 검사하였으며 1×10^3 세포/ 0.2 ml \cdot cm²의 밀도가 되도록 배양용기에 분주하여 매일 배양액을 갈아주면서 6일간 배양하였다.

간세포 배양액은 10% fetal calf serum (Gibco, USA), penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 μ g/ml, Gibco, USA), fungizone (1.25 μ g/ml, Gibco, USA), insulin (10^{-9} M, Gibco, USA), dexamethasone (10^{-5} M)을 잘 혼합하고 Dulbecco's modified eagle's medium (no pyruvate, high glucose formula Gibco, USA)으로 500 ml가 되도록 맞추어 제조한 후 4°C 하에서 저장하고 사용하기 전 37°C로 맞추었다.

4) 배아기 간(幹)세포와 간세포의 비장내 이식

6일 동안 배양한 후 채취한 배아기 간(幹)세포와 간세포는 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Gibco, USA)를 이용하여 배양용기에서 분리한 후 800 g에서 15분간 원심분리 하여 trypsin-0.53 mM EDTA 용액(Gibco, USA)을 제거하고 5 X 10^3 개 세포를 26 G의 바늘을 끼운 3 ml 주사기에 준비하였다.

배양세포의 비장내 이식을 위하여 실험동물의 좌측 늑골 하부를 소독한 후 개복하였다. 비장을 완전히 노출시켜 위로 가는 상부의 두 개의 혈관을 결찰하고 다른 혈관을 모두 봉합사로 견인하여 혈류가 일시적으로 완전 차단되게 하였다. 배양세포를 비장의 꼬리부분에서 26 G의 주사기를 통하여 서서히 주입하였으며 주사기를 빼고 난 부위는 수술용 보비를 이용하여 지혈시켰다.

5) 광학현미경용 조직표본의 제작

배양세포를 비장내 이식한 후 3일, 7일, 10일, 14일을 경과한 다음 실험동물을 희생시키고 비장을 채취하였다. 채취한 조직은 neutral buffered formalin (pH 7.4)으로 고정하고 탈수와 청명과정을 거친 후 파라핀으로 포매하여 6 μ m

의 조직절편을 얻어 탈파라핀하여 함수시켰다. 일반적인 조직소견은 H&E 염색을 시행하고 면역조직화학적인 PCNA에 대한 염색은 DAKO LSAB kit (DAKO, USA)를 이용하였다.

면역조직화학을 위하여 절편은 탈파라핀 후 3% hydrogen peroxide에 5분간 반응시킨 뒤 증류수로 수세하고 신선한 tris 완충액에 5분간 둔 다음 생리식염 인산염 완충액으로 5분 반응시키고 PCNA에 대한 항체로 1시간 반응시킨 후 tris 완충액 bath에 5분간 두었다.

반응시킨 절편은 생리식염 인산염 완충액으로 만든 biotinylated anti-rabbit와 anti-mouse immunoglobulins으로 10분간 반응시킨 후 tris 완충액으로 수세하고 0.05 M tris 완충액 (pH 7.6)으로 제조한 streptavidin peroxidase내에서 10분간 둔 다음 다시 tris 완충액으로 수세 후 tris bath에 5분간 두었다. 발색반응은 2 ml의 기질 완충액을 눈금있는 시험관에 넣고 각 완충액 2 ml마다 AEC chromogen 액을 1방울씩 첨가하고 즉시 혼합한 다음 완충액 2 ml마다 기질-hydrogen peroxide 용액 1방울씩 첨가하고 즉시 혼합하여 제조한 기질-chromogen 용액으로 10분간 반응시켰다.

6) 전자현미경용 조직표본의 제작

이식 비장을 채취하여 4°C 생리식염수에 5분간 담구어 혈액을 완전 제거하였다. 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 수세한 다음 4°C의 2% glutaraldehyde-phosphate buffer (pH 7.4) 용액에 2시간 동안 담구어 고정하고 두께 0.5 mm 이내로 잘게 썰어 바이알에 넣었다. 전고정으로 4°C의 2% glutaraldehyde-phosphate buffer 용액에서 1시간 처리하고 0.1 M phosphate buffer로 10분간 3회 수세한 다음 4°C의 0.1 M phosphate buffer 내에 하룻밤 두었다. 후고정은 0.1 M phosphate buffer로 실온에서 5분간 수세한 다음 1% osmium tetroxide-phosphate buffer로 1시간 동안 deep black이 될 때까지 고정하고 0.1 M phosphate buffer로 10분씩 3회, 2~3차 증류수로 10분간 수세하였다.

탈수는 30%, 50%, 80%, 90%, 95%, 100% ethyl alcohol로 각각 5분씩 3회 실시하고 마지막은 10분간 3회 실시하였다. 청명과 수지침투과정은 실온에서 propylene oxide를 이용하여 3회 각 10분간 실시하여 polyresin을 이용하여 beam capsule에 embedding하고 dry oven에서 35~37°C에서 8~18시간, 45~50°C에서 하룻밤, 55~60°C에서 1일, 실온에서 하루 동안 두는 방법으로 중합시켜 블럭을 만들었다. 전자현미경 관찰을 위하여 초박절편기(LKB, Netherland)를 이용하여 금색이나 회색을 띠는 절편을 200 mesh의 구리 그리드에 얹어 uranyl acetate-lead citrate (Biorad, USA) 이중 전자염색을 시행하였다. 전자염색한 그리드는 100 kv, 61 μ A 상태의 투과 전자현미경(JEOL Japan)으로 5000배에서 주로 관찰하였다.

결 과

1) 배아기 간(幹)세포와 간세포의 배양과 증식능

배아기 간(幹)세포의 분리시 포배는 원형의 투명대에 둘러싸여 있었으며 안쪽에는 얇은 영양막세포들이 배열하고 한쪽으로 내세포덩이를 확인할 수 있었다. 1% dispase 로 포배를 처리하면 투명대와 안쪽의 세포들이 분리되고 투명대에는 구멍이 뚫리게 되며, 이 구멍을 통하여 영양막세포들이 분리되어 나오고 마지막으로 오디와 같은 내세포덩이가 분리되었다. 내세포덩이를 collagenase로 처리하여 각각의 세포들로 분리한 다음 하룻밤이 지나면 내세포덩이의 세포들은 embryoid body를 형성하였으며 이 embryoid body를 멸균된 카테터를 이용하여 분리한 다음

다시 collagenase로 분리한 결과 이들은 약 30~40개의 세포들로 구성되어 있었다(Fig. 1).

배양 2일 후 배아기 간(幹)세포들은 분열하여 수가 증가하면서 원형이나 삼각형 내지 다각형에 가까운 세포들이 돌기를 내면서 바닥에 부착하여 자라고 있었다. 배양 6일 후 중심부에는 세포질이 적은 쉘포모양의 세포들이 모여 있었으며 주위에는 세포질이 풍부하며 가늘고 긴 돌기를 가진 섬유모세포양 배아기 간(幹)세포들이 자라고 있었다(Fig. 1).

관류법으로 분리한 간세포를 분리 직후부터 4시간 동안 배양한 결과 큰 원형의 간세포들이 일부 바닥에 부착되어 있었다(Fig. 1). 배양 2일째 간세포는 세포질이 증가하여 원형의 세포에서 긴 사각형이나 다각형의 세포들로 바닥에 부착하여 자라고 있었고, 배양 6일째에는 모든 세포들

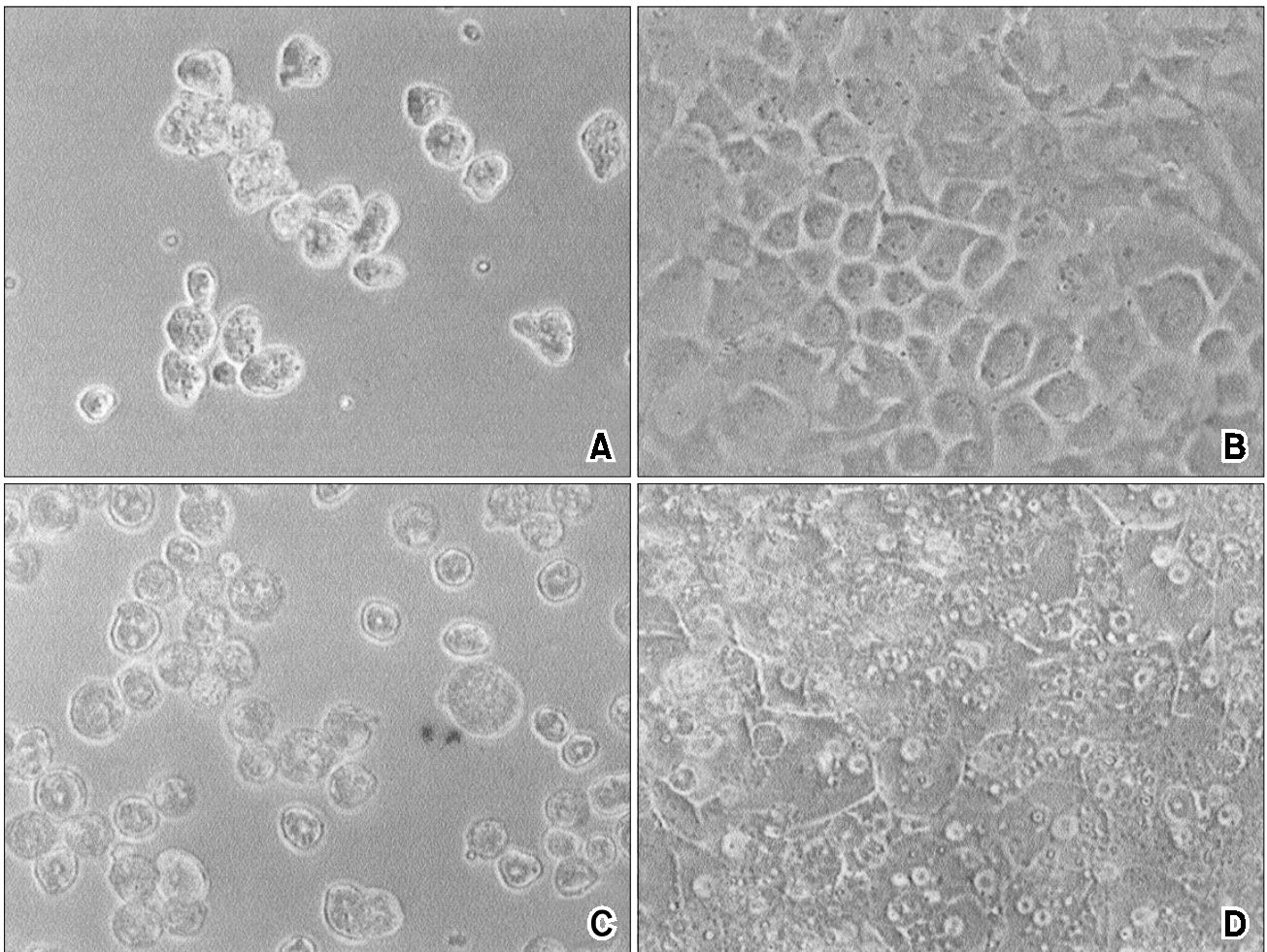


Fig. 1. Phase-contrast micrograph of inner cell mass separated by type IV collagenase (1A), embryonic stem (ES) cells cultured for 6 days (1B), hepatocytes isolated by perfusion of collagenase (1C), and isolated hepatocytes cultured for 6 days (1D). ES cells rapidly proliferated and changed to comma-shaped cells aggregated in the central portion. Hepatocytes changed to polygonal cells with increased cytoplasm secreting numerous vesicles (×200).

이 배양용기의 바닥에 다각형의 간세포들이 빈틈없이 부착하여 자라고 있어 세포간의 뚜렷한 경계를 확인할 수 있었으며 세포질 내에서는 작은 분비과립들이 산재하고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 1).

2) 비장내 이식의 광학현미경 소견

배아기 간(幹)세포를 이식한 후 3일째에 비장의 PALS (periarterial lymphatic sheath) 근처에 이식한 배아기 간(幹)세포들이 분포하였는데 핵은 불규칙한 다각형이었고 대식세포가 많았다. 7일째에 핵은 타원형으로 관찰되었으며 PALS 근처에서 세포의 수나 크기가 증가하면서 작은 소엽상으로 모여 있었다. 10일째에는 타원형의 핵을 가진 세포들이 크기나 수가 증가하면서 여러 개의 작은 소엽들을 이루고 있었고, 14일째에는 작은 소엽들이 모여서 마치 배중심을 형성하듯이 큰 소엽을 구성하고 있었다

(Fig. 2).

배양 간세포는 이식 후 3일째에 비장의 적비수와 백비수의 경계부위에서 결합조직인 trabecula 근처에 분포하였는데 간세포의 둥근 핵을 관찰할 수 있었다. 7일째에 경계부의 백비수 쪽에서 원형의 핵을 가진 밝게 염색된 간세포들이 모여있는 것이 관찰되었고, 10일째에는 간세포들이 전형적인 형태로 trabecula주위에서 타원형의 작은 소엽을 이루고 있었다. 14일째에는 trabecula가 많은 백비수 부위에 큰 소엽을 이루어 분포하고 있었다(Fig. 2).

3) PCNA 면역염색 소견

비장내 이식후 배아기 간(幹)세포의 PCNA 반응세포는 7일째에 미약한 양성반응을 보이는 세포들이 출현하였으며 이식 후 10일째에는 뚜렷한 PCNA 반응을 보이는 세포들이 소수 출현하였다. 14일째에는 10일째와 비슷한 소견

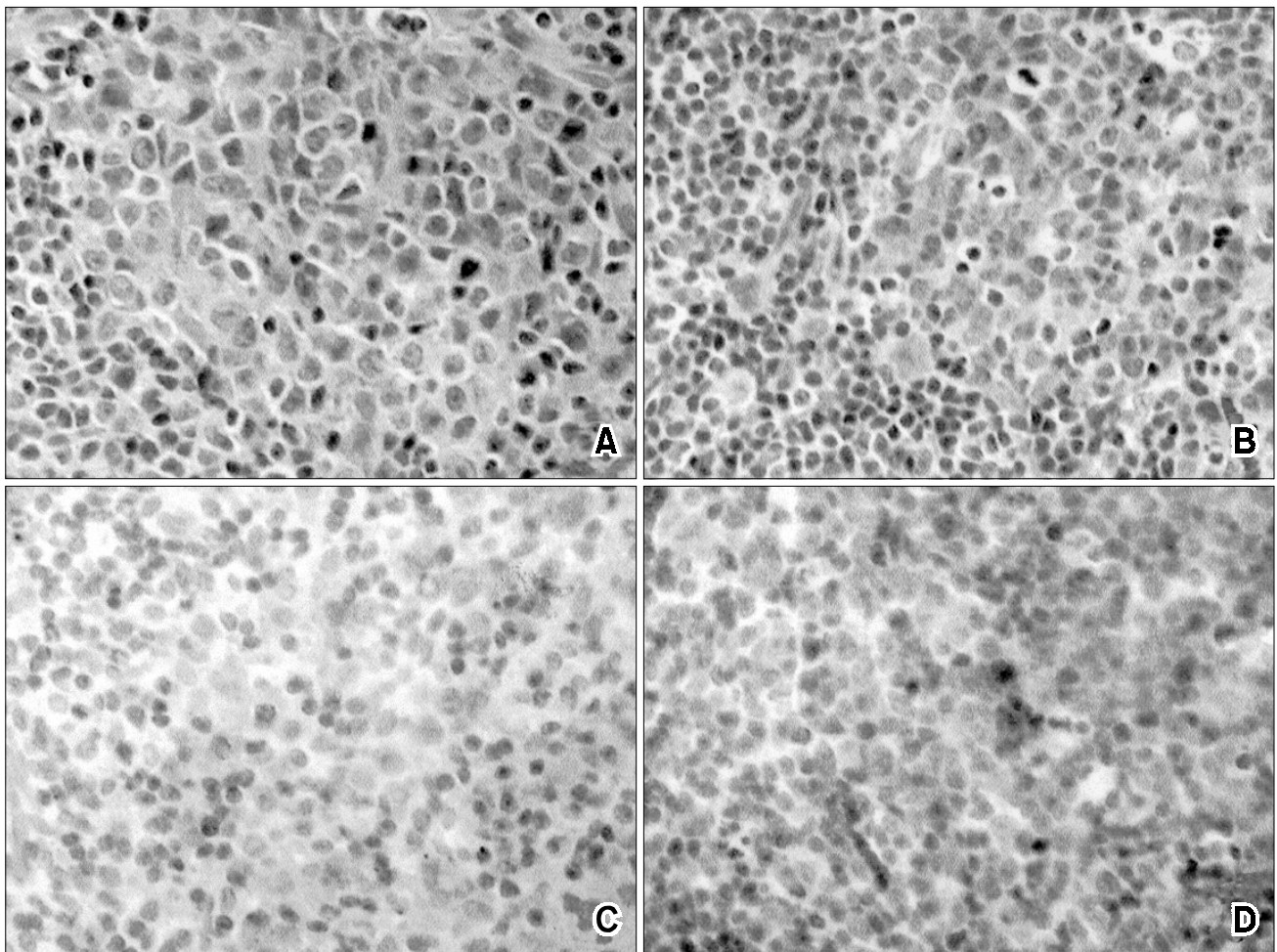


Fig. 2. H&E staining micrograph of cultured ES cells (2A), cultured hepatocytes (2B), PCNA immunolocalization of ES cells (2C), and cultured hepatocytes (2D) on 14 days following intrasplenic transplantation. ES cells were distributed near the periarterial lymphatic sheath and hepatocytes gathered around the trabeculae. Transplanted ES cells showed distinct PCNA positive cells ($\times 400$).

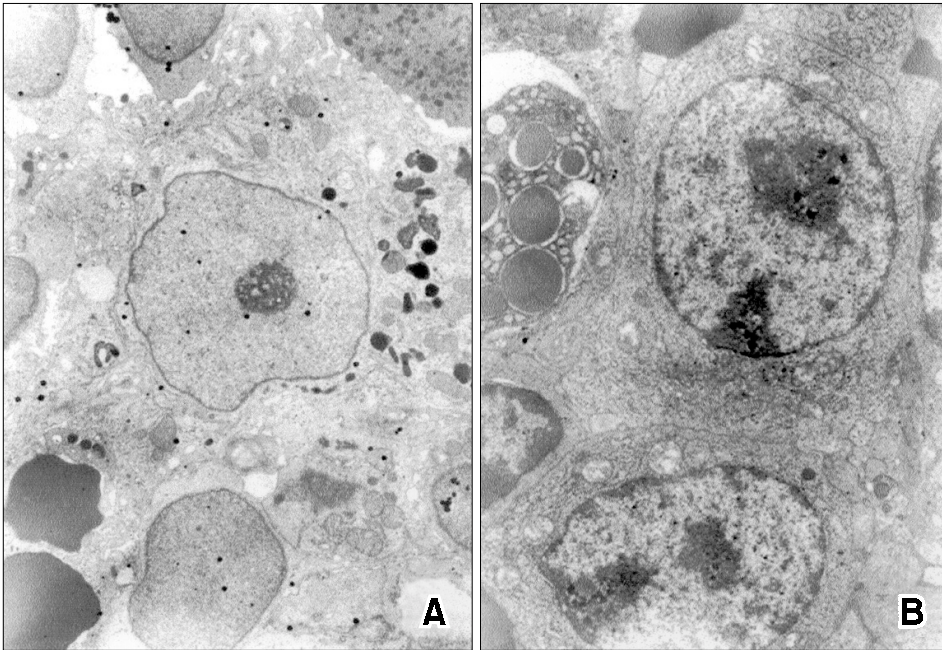


Fig. 3. Electron micrograph of ES cells (3A) and cultured hepatocytes (3B) on 14 days following intrasplenic transplantation. ES cell had euchromatic round nucleus, well developed rough endoplasmic reticulum, a few mitochondria and secretory granules. Cultured hepatocyte showed heterochromatic nucleus with obscure nucleoli, segmented rough endoplasmic reticulum and swollen inactive mitochondria (uranyl acetate-lead citrate, $\times 5,000$).

을 보였다(Fig. 2).

비장 이식 후 간세포의 PCNA 반응세포는 이식 7일째에 한 두 개의 세포에서 반응이 있었을 뿐 대부분의 세포에서는 반응이 나타나지 않았다. 이식 10일째에 미약한 양성반응을 보이는 세포들이 소수 관찰되었으며, 14일째에는 PCNA 반응세포가 관찰되지 않았다(Fig. 2).

4) 전자현미경 소견

배아기 간(幹)세포는 비장내 이식 후 3일째에 세포가 전체적으로 굵은 돌기들을 내어 이웃하는 세포들과 접촉하고 있었다. 세포핵의 염색질은 euchromatic 하였으며 핵막에는 많은 핵공이 뚜렷하게 관찰되었고 세포질 내에는 2~3층으로 이루어진 과립세포질세망이 있었다. 이식 후 7일째의 배아기 간(幹)세포는 주위의 세포들보다 매우 크며 세포막 면으로 이웃하는 세포와 접하고 있었다. 매우 큰 핵은 거의 euchromatic한 염색질로 이루어져 있으며 세포질 내에는 큰 타원형의 사립체와 풍부한 ribosome들이 산재하고 있었다. 10일째에는 euchromatic한 핵을 가지며 뚜렷한 핵소체를 가지고 있고 세포질 내에는 길게 선상으로 배열된 과립세포질세망과 긴타원형의 사립체와 함께 유리 ribosome들이 세포질 전체에 고르게 분포하고 있었다. 세포표면은 이웃하는 세포막과 서로 파동상으로 접촉하고 있었으며 대체로 간세포와 비슷한 구조로 여러 개의 세포가 한 개의 구멍주위에 분포하고 있었다. 14일째의 세포에서는 뚜렷한 핵소체와 euchromatic한 염색질을 가진 등근핵이 관찰되었다. 세포질 내에는 잘 발달된 과립세포질세망, 소수의 사립체와 분비과립을 볼 수 있었으며 세포막은 용모상의 돌기들이 분포하여 이웃하는 세포와 접

촉하고 있었다(Fig. 3).

간세포는 비장내 이식 후 3일째에 이웃하는 세포들과 부착하지 않고 떨어져 있었다. 세포핵은 원형으로 euchromatic 하였으며 핵소체가 뚜렷하게 관찰되었다. 세포질 내에는 ribosome들이 고르게 분포하고 있었으며 분절성 과립세포질세망과 약간의 사립체 들도 관찰할 수 있었다. 이식 후 7일째는 몇 개의 간세포들이 선상으로 배열하고 있었으며 핵내에 핵소체가 뚜렷하였고 약간 heterochromatic 하게 염색질이 변화되었다. 세포질 내에는 많은 사립체와 과립세포질세망과 함께 매우 큰 분비과립들이 관찰되었다. 10일째에 간세포들은 여러 개의 세포가 서로 맞대면서 이어져 세포사이에 bile canaliculi와 같은 관이 형성되어 있었다. 핵은 다소 heterochromatic 하고 뚜렷한 핵소체를 가지고 있었으며 세포질 내에는 소수의 분절된 과립세포질세망, 타원형의 사립체들과 함께 유리 ribosome들이 세포질 전체에 고르게 분포하고 있었다. 14일째에는 불분명한 핵소체와 더욱 heterochromatic한 염색질의 등근 핵이 관찰되었다. 세포질 내에는 분절된 과립세포질세망과 원형의 사립체 그리고 작은 분비과립을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

고 찰

배아기 간세포(幹細胞)는 포배(blastocyst)의 내세포덩이(inner cell mass, ICM)로부터 미분화된 상태로 분리되어 체외에서 계대배양이 가능하고 거의 모든 종류의 조직과 세포로 분화하는 다능성(pluripotency)을 지니고 있다. 배아기 간(幹)세포는 마우스에서 처음 수립되었으며,(7) 원승

이(8)와 인간(9)에서도 마우스와 비슷한 방법으로 수립된 배아기 간(幹)세포가 보고되어 있다. 최근에는 흰쥐의 배아기 간(幹)세포로부터 신경전구세포를 분화시켜 척수손상 부위에 이식한 결과 이식세포중 일부가 신경세포로 성숙하면서 축삭을 형성하고 손상으로 끊어진 신경을 연결시켰다는 보고도 있다.(10)

배아기 간(幹)세포는 체내·외에서 광범위한 분화능을 나타내며 배양접시 위에서 embryoid body를 거쳐 박동하는 심근, 신경계 세포 등으로 분화하여 발생초기의 배아와 유사한 구조를 형성하게 된다.(11,12) Embryoid body는 embryo에 비하면 구조적으로 치밀하지 않으며 포유류의 전체 발생과정을 완벽하게 반영한다고 할 수 없으나 이제까지 접근하기가 어려웠던 초기 발생과정을 체외에서 쉽게 재현하고 관찰할 수 있다는 점에서 획기적인 연구재료로 각광을 받고 있다. 발생과정 초기에 발현하는 일부 유전자 및 분화세포는 embryo와 embryoid body 양쪽에서 공통으로 검출되기도 하는데,(13,14) embryoid body는 초기 배아와 유사 구조를 지니는 분화능 외에도 생체내 이식시 기형종 형성 능력이 탁월하고 성체를 구성하는 세 배엽 유래의 모든 조직으로 광범위하게 분화하는 양상을 나타낸다. 배양 접시 상에서의 접착 배양시에도 활발한 분화상을 관찰할 수 있다.(15) 본 연구에서도 내세포덩이를 분리한 후 하룻밤 배양하면 embryoid body를 형성하기 시작하였으며 이 세포들을 다시 collagenase로 분리하여 배양하면 다양한 형태의 세포로 분화되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 embryoid body와 embryo의 발생상의 연관성은, 배아기 간(幹)세포 유래 embryoid body에서 embryo 및 성체에서 발견되는 다분화능을 지닌 세포를 분화 유도할 수 있는 점과 함께 배아기 간(幹)세포가 embryo와 같은 분화능을 지니고 있음을 시사하고 있다.

³H-thymidine을 병합시킨 간세포를 비장내에 이식한 후 간의 부분절제와 같은 증식반응을 일으키고 간세포의 생존율을 DNA를 검사하여 조사한 보고(16)에서는 간세포를 주입한 1주일 이내에 간세포들이 현저하게 감소되었으며 생존한 세포들도 3개월간 지속되었으나 간세포의 증식은 일어나지 않았다. 비장내에 이식한 간세포 m-albumin-RNA도 이식 후 24시간 이내에 100배 감소하였다. 즉 비장내 이식시 초기에 간세포는 세포괴사가 일어나며 그후 어떠한 증식도 일어나지 않기 때문에 급성 간부전시 충분한 대사성 유지를 위한 비장내 간세포이식은 의의가 없는 일이라고 하였다.(16) 본 연구에서 이식한 간세포들은 비장의 trabeculae주위에 소엽을 형성하면서 이식 후 21일까지 살아있었으며, 배아기 간(幹)세포는 간세포보다 빠르게 분열하였고 싹포모양의 세포들과 섬유모세포양 배아기 간(幹)세포들이 자라고 있었다.

이식을 성공적으로 하기 위해서는 이식에 필요한 배아기 간(幹)세포와 이식할 수 있는 적절한 부위가 확보되고

세포의 분열, 증식과 함께 간세포로의 분화가 일어나야 한다. 이식 후 간세포의 기능발현이 용이한 장기로서는 태생기에 간과 같이 혈구를 생산하고 혈액을 보유하는 중요한 기능을 가진 비장이 나은 결과를 보이는 것으로 알려져 있는데(17) 많은 연구자들이 비장으로 이식된 성인이나 태아 간세포는 적어도 1년 동안 bilirubin glucuronidation 기능을 하며 비장은 거의 평생 중요한 기능과 증식성을 가진 간세포를 이식하는데 최상의 이식 장소가 될 것이라고 보고하고 있다.(18) 비장내 간세포 이식이 정상적인 상태에서는 일시적으로만 문맥압항진을 유발하기 때문에 반복 시술로 간의 재생을 유도할 수 있지만 심각한 합병증을 피하기 위해서 간, 폐의 혈류역학 상태와 간세포의 증식성과의 관련성을 조사할 필요가 있다.(19)

배아기 간(幹)세포의 증식과 분화에는 세포분열을 촉진하는 세포증식 인자와 내배엽성세포를 거쳐 간세포로의 분화를 유도하는 세포분화 인자가 필요한데, 증식인자와 분화인자를 단순히 재생 장소에 첨가하는 것만으로는 간세포의 증식이 빠르게 일어나지 않으므로 다른 자극인자의 주입이 필요하다.(20) 본 연구에서는 성장 간세포의 배지를 첨가하였으며 전자 현미경 소견상 배아기 간(幹)세포가 비장내 이식 후 10일째부터 간세포와 비슷한 구조로 분화하였고 14일째에는 간세포의 기능이 가능할 정도로 분화를 보였다. 그러나 비장내에 이식한 간세포는 이식 10일째 간세포들 사이에 bile canaliculi와 같은 관이 형성되어 있었으나 이식 14일째에 세포 소기관의 발달은 간세포의 기능을 할 수 있을 정도에 미치지 못하였다. 배아기 간(幹)세포 분화능에 영향을 미치는 수용성 전달 물질로 분화억제제인 leukemia inhibitory factor가 알려져 있으며(21) 다분화능을 지닌 세포간의, 서로 유사하거나 상이하게 연관된 분화능은 이제까지 기술적으로 어려운 이식 실험에 의해 생체내의 복잡한 환경에서 연구되었으나 배양 접시에서 다능성 세포의 분화상의 추이를 관찰하여 분화 조절인자와 세포간 상호작용의 파악에 이용할 수 있다.(15,22) 어떤 자극인자로 간세포가 증식인자와 분화인자의 영향을 받아 간세포로 분화하여 증식하는데 영향을 받는 지 여러 가지의 신호전달인자를 연구함으로써 밝혀야 할 것이다.

간세포의 빠른 증식을 위하여 자극하는 여러 인자는 복합적인 세포사이의 상호전달에 의해 이루어지기 때문에 본 연구에서는 성장하고 있는 간세포의 배지를 첨가하여 증식을 유도하였다. 비장내 세포이식에서 배아기 간(幹)세포가 간세포보다 빠르게 증식하였으며, 배양 간세포는 trabecula 근처에서 증식하고 배아기 간(幹)세포는 배 중심의 위치에서 증식이 일어나는 것으로 보아 비장의 배 중심에 있는 분화된 세포보다 더욱 미분화된 세포가 들어감으로써 지속적으로 이식 간세포의 증식을 유발할 수 있을 것으로 추론할 수 있으며 비장내이식후 PCNA반응세포가

배아기 간(幹)세포에서만 주로 나타나고 간세포에서는 미약한 반응만 보이고 있는 것이 이를 뒷받침하는 결과이다.

쥐에서의 배아기 간(幹)세포는 사람과 비슷한 성질을 지니고 있어 윤리상 *in vivo* 에서는 다룰 수 없는 인체의 여러 가지 발생학 연구에도 응용될 수 있다.(10) 또 이러한 연구 결과를 바탕으로 형질변환기법과 접목하여 최근 주목을 받고 있는 난치병의 세포이식 치료 등에도 적용할 수 있게 될 것이다.(14) 본 연구에서 배아기 간(幹)세포가 성장하고 있는 간세포배지를 첨가해줌으로써 간세포로 분화할 수 있는 능력이 확인됨에 따라 다른 세포이식 시에도 같은 방법으로 배아기 간(幹)세포를 목적하는 세포로 유도시킨 후 치료 목적에 맞는 세포를 이식하여 치료할 수 있는 세포이식 치료법에도 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 활용을 위하여 배아기 간(幹)세포의 발생, 분화과정에 있어서의 분자조절기구, 세포 특이적 promoter, 유도 signal 등에 대한 연구가 활발히 이루어져야 할 것이다.

결 론

흰쥐의 발생기 포배로부터 얻은 배아기 간(幹)세포를 비장 내에 이식하여 배양한 간세포의 비장내 이식과 형태학적으로 비교하였다. 배아기 간(幹)세포는 간세포보다 빨리 분열하였으며 여러 가지 형태의 세포로 분화하였다. 비장내 세포이식 후에도 배아기 간(幹)세포가 간세포보다 빠르게 증식하였으며, 그 위치는 배아기 간(幹)세포가 배중심에, 간세포는 결합조직인 trabecula 근처에 주로 분포하고 있었다. 전자현미경 소견상 배아기 간(幹)세포는 비장내 이식 후 포와 비슷한 구조로 분화하여 간세포의 기능이 가능할 정도로 발달하였으나 간세포 이식 시는 비장내에서 기능성 세포 소기관의 발달이 미흡하였다.

REFERENCES

- Calise F, Di-Florio E, Mancini A, Mezza E, Di-Minno R, Ceriello A, et al. Intrasplenic hepatocyte transplantation in the pig: new technical aspects. *Transplant Proc* 1997;29:1999-2001.
- Rosenthal RJ, Chen SC, Hewitt W, Wang CC, Eguchi S, Geller S, et al. Techniques for intrasplenic hepatocyte transplantation in the large animal model. *Surg Endosc* 1996;10:1075-9.
- Borel-Rinkes IHM, Bijma A, Kazemier G, Sinaasappel M, Valerio D, Terpstra OT. Proliferative response of hepatocytes transplanted into spleen or solid support. *J Surg Res* 1994;56:417-23.
- Talbot NC, Powell AM, Rexroad CE Jr. *In vitro* pluripotency of epiblasts derived from bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1995;42:35-52.
- Doetschman TC, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 1988;127:224-7.
- Iannaccone PM, Taborn GU, Garton RL, Caplice MD, Brenin DR. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol* 1994;163:288-92.
- Martin GR. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7634-8.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7844-8.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999;5:1410-2.
- Beddington RSP, Robertson EJ. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 1989;105:733-7.
- Bradley A. Embryonic stem cells; proliferation and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1990;2:1013-7.
- Pedersen RA. Studies of *in vitro* differentiation with embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* 1994;6:543-52.
- Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM, Bettess MD, Rathjen J. Properties and uses of embryonic stem cells; prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:31-47.
- Keller GM. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:862-9.
- Henne-Bruns D, Ambrass FO, Schmiegelow P, Hohne M, Paul D, Kremer B. Intrasplenic hepatocyte transplantation: evaluation of DNA synthesis and proliferation in auxiliary transplanted cells. *Res Exp Med Berl* 1989;189:295-302.
- Kim WH, Lee JH, Han SU, Wang HJ, Kim MW. Can clamping of splenic vessels prevent abrupt increase of portal vein pressure and migration of transplanted hepatocytes to the liver after intrasplenic hepatocyte transplantation. *Hepatogastroenterology* 1998;45:2425-9.
- Kokudo N, Otsu I, Okazaki T, Takahashi S, Sanjo K, Adachi Y, et al. Long-term effects of intrasplenically transplanted adult hepatocytes and fetal liver in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Transpl Int* 1995;8:262-7.
- Gupta S, Yerneni PR, Vemuru RP, Lee CD, Yellin EL, Bhargava KK. Studies on the safety of intrasplenic hepatocyte transplantation: relevance to *ex vivo* gene therapy and liver repopulation in acute hepatic failure. *Hum Gene Ther* 1993;3:249-57.
- Gearhart J. New potential for human embryonic stem cells.

Science 1998;282:1061-2.

- 21) Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. Biol Reprod 1997;57:

1089-95.

- 22) Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, Sauer H. The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. Lab Invest 1998;78:1301-14.
-