

간세포구상체의 냉동보존 후 냉동보존액에 따른 세포 생존도와 기능에 대한 연구

성균관대학교 의과대학 외과학교실

박재범 · 이광웅 · 김성주 · 이석구 · 박제훈 · 우돈희 · 조재원

The Viability and Function of Cryopreserved Hepatocyte Spheroids with Different Cryopreservation Solutions

Jae Berm Park, M.D., Kwang-Woong Lee, M.D., Sung-Joo Kim, M.D., Suk-Koo Lee, M.D., Je Hoon Park, M.D., Don Hee Woo, M.D. and Jae-Won Joh, M.D.

Purpose: The bioartificial liver via extracorporeal circulation and the hepatocyte transplantation have been studied due to donor organ shortage. Hepatocyte spheroids, which are tightly packed multicellular aggregates, showed enhanced liver specific activities. The authors have studied the bioartificial liver system using hepatocyte spheroids. For the effective application of this system, the effective cryopreservation technique is necessary. In this study, the aim was to evaluate the viability and function of cryopreserved hepatocyte spheroids with different cryopreservation solutions and to elucidate the efficiency of cryopreservation.

Methods: Hepatocytes were isolated Sprague-Dawley rat. The hepatocyte spheroids were formed with 24 hours by rotational culturing. The hepatocyte spheroids were frozen in different cryopreservation solutions (UW solution, William E media, FBS and mixture) by programmed linear freezer, preserved in liquid nitrogen tank for 24 hours and cultured for 4 days after thawing. For the viabilities of each hepatocyte spheroids, the MTT assay was made and for their hepatocyte specific functions, ammonia clearance, urea nitrogen synthesis and albumin secretion of the spheroids were evaluated.

Results: The viabilities of the cyropreserved hepatocyte spheroids after culturing for 4 hours following thawing were 64.8 ± 10.2 , 33.2 ± 9.7 , 69.3 ± 8.7 and 48.4 ± 15.5 % in the UW, WE, FBS and MIX media, respectively. The ammonia

clearance of the spheroids cyropreserved in the UW solution was 0.93 ± 0.13 mM/well/day, which was not significantly different from that of the freshly cultured spheroids. With regard to the urea nitrogen synthesis, the cryopreserved spheroids in the UW, FBS and MIX solutions were not significantly different from the freshly cultured spheroids. The amount of albumin secretion of the cryopreserved spheroids in the UW solution was significantly higher than those of cryopreserved spheroids in the other solutions.

Conclusion: With regard to the viability and function, the hepatocyte spheroids cryopreserved in the UW solution were not significantly different from the freshly cultured spheroids, which were superior to the other cryopreserved spheroids. Further studies relating to the optimal culture and cryopreservation environments, such as freezing rate or cryoprotectant from damage during freezing, are needed. (*J Korean Surg Soc* 2003;65:181-189)

Key Words: Hepatocyte spheroids, Cryopreservation solution, Viability, Function

중심 단어: 간세포구상체, 냉동보존액, 생존도, 기능

Department of Surgery, Sungkyunkwan University School of Medicine, Samsung Medical Center, Seoul, Korea

서 론

우리나라는 B형 간염 바이러스의 유행지역으로 B형 간염 보균자가 전체 인구의 8%로 추정되고 있다. 또 이로 인한 합병증으로 그중 20~30%가 10년 내에 간경화로 진행되고 있다. 우리나라의 간암사망률은 인구 10만 명당 23명으로 보고되고 있고, 총 사망률의 약 10%는 간염, 간경변, 간암과 관련된 것으로 추정된다. 또 매년 많은 수의 환자들이 만성 간질환 외에 급성 또는 전격성 간염 그리고 소아의 대사성 간질환으로 인한 간부전으로 사망하고 있다. 이러한 환자들의 치료책으로 여러 연구가 진행되고 있지만 가장 효과적인 방법은 간이식이다. 우리나라에서도 1988년 간이식이 시작된 이래 현재까지 간이식이 활발히 이루어지

책임저자 : 조재원, 서울시 강남구 일원동 50번지
☎ 137-710, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 외과
Tel: 02-3410-3466, Fax: 02-3410-0040
E-mail: jwjoh@smc.samsung.co.kr

접수일 : 2002년 3월 7일, 게재승인일 : 2003년 7월 3일
본 연구는 2002년 추계외과학술대회에 포스터로 발표하였음.

고 있다. 그러나 공여간의 부족으로 많은 환자들이 이식을 기다리다가 간이식의 적절한 시기를 놓쳐 사망하는 것이 현실이다. 이에 대한 해결책으로 간이능이 회복되는 기간 또는 이식에 필요한 공여간이 생길 때까지 기다리는 동안 환자의 생명유지를 위한 최소한의 기능을 대신하고 신경학적 손상을 포함한 간부전의 후유증을 최소화하고 일시적으로 간을 보조하기 위한 치료법의 연구가 활발히 이루어지고 있다. 체외 순환을 이용한 생체 인공간(bio-artificial liver, BAL)과 간세포 이식이 연구의 일환으로 진행되고 있다.

간세포의 이식은 간세포만을 분리, 배양하여 간문맥 등에 주입하여 이식하는 방법으로 간이식에 비해 기술적으로 간단하고 비용이 적게 드는 장점이 있고, 간세포의 배양을 통해 간이식에서 시간적으로 제한되어 있는 이식편 사용의 시간적 제한을 수일 또는 수주로 연장할 수 있는 장점이 있다. 이에 급성 간부전 또는 전격성 간부전 환자에서 간세포 이식이 시행되어 간이식으로 연결시키거나 간세포 이식 자체로 생명을 연장하거나 임상 증상을 호전시켰다는 임상 보고들이 있다.(1-4)

간세포 이식과 더불어 간이식의 대체 또는 간이식으로의 연결 수단으로써 체외 순환을 이용한 생체 인공간을 들 수 있다.(5,6) 인공간 연구에서 해결해야 하는 주요 관심사는 간부전을 극복할 수 있는 간세포의 종류와 수, 효율적인 대량 간세포배양기술, 기능을 최대화할 수 있는 생체반응기(bioreactor)의 개발, 간세포기능을 지속적으로 유지시키기 위한 배양 기술, 그리고 필요한 시기에 쉽게 이용할 수 있기 위한 냉동보존방법의 개발, 면역학적인 문제 등이 있다.

이러한 간세포이식이나 생체 인공간의 생체반응기에 충진되는 간세포의 기능 유지 및 보존을 위한 연구로 초기에는 배양액에 여러 가지 성장요소들을 첨가하는 방법들이 시도되었다.(6,7) 한편, 간내의 상피세포 혹은 췌도 세포를 함께 배양하여 간세포의 기능을 향상시키려는 연구들도 있었다.(8,9) 또한 간세포가 단일 세포의 형태가 아닌 구상체(spheroid)를 형성했을 때 그 기능이 향상된다는 보고들도 있다. 그리고 이런 구상체의 형성은 회전을 이용한 배양에서 효과적으로 이루어질 수 있었다.(10,11) 그리고 안정된 환경에서 지속적인 기능 유지를 위해 간세포를 캡슐화하는 방법들에 대한 연구들이 있었다.(12)

한편 간세포를 분리 직후 사용하는데 실제 임상에서는 한계가 있기 때문에 간세포이식 또는 생체 인공간에서 대량의 간세포를 언제든 쉽게 공급하기 위해 간세포를 장기 보존하여 필요할 때 바로 이용할 수 있는 냉동저장법에 대한 연구가 진행되어 왔다.(8,13-20)

그러나 대부분의 연구는 단층배양, 단일세포에 대한 냉동 보존에 대한 연구가 대부분으로, 구상체를 대상으로 한 냉동보존 연구는 많지 않다. 기존의 냉동 보존에 관한 연구들을 살펴보면 냉동 보존 후의 기능에 냉동보존 전의 배양 상태가 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다.(21,22) 또 냉

동 시에 세포내에는 얼음 결정이 형성되어 세포에 손상을 주는데 이런 손상을 최소화할 수 있는 최적의 냉동 보존에 대한 연구에서 냉동 보존 후 생존도 및 기능에 영향을 미치는 주요 요인으로는 냉동 속도와 냉동보존액을 들고 있다.(14,23) 냉동 속도로는 multistep freezing 또는 linear freezing protocol 등이 시도되었다. 그리고 냉동보호제로 10% DMSO가 첨가되었을 때 간세포의 생존도와 기능유지에 좋은 결과를 보이는 것으로 보고되었다. 일반적으로 냉동 보존액으로는 Williams' E media나 UW 용액, L-15 media, FBS 등이 시도되었다.(24)

이러한 연구들을 종합하여 본 연구에서는 간세포 이식이나 생체 인공 간의 세포 구성 요소로서, 간세포를 기능을 최대화시키는 간세포 구상체를 여러 가지 조건의 냉동 보존액에서 냉동 보존한 후 그 생존도와 기능의 평가를 하여 적절한 냉동보존액 및 냉동 보존 조건을 알아보고 냉동 보존의 효율성을 알아보고자 하였다.

방 법

1) 간세포의 구득 및 간세포의 생존도 측정

Sprague-Dawley 백서(수컷 125~180 g, 3~4주령)를 이용하여 EDTA 완충액(EDTA perfusion buffer, 500 ml, pH 7.4)과 collagenase 완충액(0.05% collagenase buffer, 200 ml, pH 7.45)을 이용한 변형된 Seglen의 방법을 이용하여 간세포를 분리하였다.(25) 분리된 간세포 부유액의 100 μ l를 취하여 0.4% trypan blue (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 900 μ l에 섞은 후 hemocytometer를 이용하여 구득한 세포의 수를 측정하고 세포 생존도를 측정하였다. 얻어진 간세포의 생존도가 85% 이상인 경우 다음 단계의 실험을 진행하였다.

2) 간세포의 배양 및 구상체 형성

먼저 배양액으로 growth hormone, EGF, Dexamethasone, penicillin 등을 포함한 Williams E medium을 준비한다. 교반 플라스크(Celstir suspension culture flask, Wheaton, Milville, NJ, USA)의 내부를 실리콘 코팅액(Sigmacote, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)으로 미리 처리한 뒤 준비된 배양액에 간세포의 농도가 5×10^5 개/ml인 세포 현탁액 200 ml를 각 플라스크에 넣어 95% O₂로 10분간 배양액을 포화시킨 후 37°C CO₂ incubator에서 60 RPM의 속도로 교반하면서 배양하였다. 최초 배양 6~12시간 안에 배양액의 1/2를 교체하고 95% O₂를 재충전하고 그 후는 24시간마다 배양액의 1/2를 교환하며 2일간 배양하였다. 간세포 구상체는 약 36~48시간 정도 배양하며 형성됨을 확인할 수 있었다.

3) 간세포의 냉동 및 냉동보관

형성된 간세포 구상체를 원추형 튜브(conical bottom centrifuge tube, Falcon, Becton Dickinson, NY)에 옮겨 50 G에

Table 1. Cryopreservation solution

	Composition (%)			
	William E medium	UW cold storage solution	FBS	DMSO
WE	70	—	20	10
UW	—	70	20	10
MIX	35	35	20	10
FBS	—	—	90	10

UW cold storage solution (ViaSpan, DuPont pharmaceutical Co, Deluth, GA); FBS (Fetal bovine serum, Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA); DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA); In this article, each mixture solutions were respectively abbreviated to the WE, UW, MIX and FBS solution.

서 3분 동안 원심 분리하여 Williams E medium으로 세척하고 각각의 냉동보존액(Table 1)에 3.5×10^6 cell/1.5 ml tube의 세포밀도로 부유시켜 Programmed Freezing System (Cryomed, Forma Scientific Inc)에 의해 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 linear freezing시켜 -80°C 에 이른 뒤 액체질소저장용기에 옮겨 24시간 보관하였다.

4) 간세포의 해동과 배양

24시간 액체 질소에서 보관된 간세포 구상체 보존 튜브를 37°C 의 물에 3~4분간 침수시켜 빠르게 해동시킨 후 부유액을 Williams E medium을 첨가하여 4배 희석하여 50 G에서 3분 동안 원심 분리하는 세척 과정을 3회 반복하였다. 이렇게 세척된 간세포 구상체를 실리콘 코팅으로 전 처리한 6 well plate에 각각 3.5×10^6 개씩 접종하고 세포 배양액 4 ml를 첨가하여 37°C CO₂ incubator에서 정치 배양하였다. 접종 4시간 후 배양액의 1/2를 교체하고 매 24시간마다 배양액의 1/2를 교체하며 3일간 배양하였다. 배양액 교체 시 배양액 표본을 수집하여 간세포 구상체의 기능을 측정하였다.

5) 간세포의 활성도 조사 및 기능의 평가

(1) 간세포 구상체의 생존도 측정(MTT assay): 간세포 내의 미토콘드리아가 보유한 P450 산화효소의 활성 측정을 통한 세포의 생존도를 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 대조군으로 배양된 간세포 구상체와 냉동 보존 후 해동시킨 구상체를 MTT 용액(MTT powder 5 mg/ml-PBS) 200µl가 첨가된 배양액에서 6시간 동안 배양하여 청색의 결정체가 형성된 것을 확인한 후 lysing buffer (45% dimethyl formamide, 10% SDS, pH 4.7)를 첨가하여 12시간 방치하였다. 세포 용해액을 590 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 냉동보존군의 흡광도를 비교하여 생존도를 구하였다.

(2) 간세포 구상체의 기능 측정

① 암모니아 제거율; 배양한 간세포의 해독 능력을 알아보기 위해 암모니아 분해능을 조사하였다. 배지에 1 mM NH₄Cl을 첨가하여 시간에 따른 암모니아 분해 속도를 암모니아 assay kit (indophenol method, 아산제약)를 사용하여 측정하였다. 정색 저해 성분을 제거하고 배지 내 요소를 고정시키기 위한 제단백시약(텅스텐간 나트륨 50 g/L) 1 ml에 배양한 배지 상층액 0.25 ml를 넣고 잘 섞은 뒤 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전물로부터 분리된 상층액을 옮겨 담고 발색 시약 A (페놀 40 g/L), B (수산화 나트륨 35.6 g/L), C (10% 차아염소산 나트륨 30 g/L)를 각각 1 ml, 0.5 ml, 1 ml를 차례로 넣고 섞은 후 37°C 에서 20분간 반응시키고 파란색의 발색물을 630 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이를 1 mM NH₄Cl이 포함되지 않은 배지와 포함하는 배지를 이용해 만든 표준 곡선과 비교하여 단위시간당 분해된 암모니아의 농도를 환산하였다.

② 요소함성능; 요소의 양은 urea nitrogen assay kit (Sigma diagnostic 535)을 이용하였다. 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 3 ml에 배지와 요소 표준용액을 200µl씩 넣고 끓는 물에 정확히 10분간 반응을 시킨 후 식혀 주었고, 분홍색 발색물을 530 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며 이를 요소 표준 용액(urea nitrogen standard solution)에 의한 standard curve와 비교하여 농도로 환산하여 시간당 생성한 요소 농도를 계산하였다.

③ 알부민 분비능 분석; 알부민 농도는 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. Bicarbonate coating buffer (Na₂CO₃ 0.04 M, NaHCO₃ 0.06 M)를 사용하여 1차 항체(IgG fraction to rat albumin, Cappel 55727)를 2µg/ml의 농도로 희석하여 96 well plate의 well당 100µl씩 넣고 4°C 에서 16~18시간 동안 정치하여 1차 항체를 바닥에 흡착시켰다. PBS-T (0.05% Tween20 (Polyxyethylene Sorbitan Monolaurate, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)/PBS (phosphate buffered saline)) 200µl로 세 번 세척한 후 고정화 용액인 3% caseine/PBS 용액을 well당 100µl를 넣고 1시간 실온에서 정치한 후 PBS-T로 3회 세척하였다. PBS로 희석된 배지 상층액과 PBS 희석된 표준 알부민(purified rat albumin, Cappel 55952)을 PBS로 10배 희석하여 well당 100µl씩 넣고 실온에서 1시간 정치하였다. 여기에 0.4 mg/ml OPD (o-phenylenediamine)와 0.4 µl/ml H₂O₂ (30%)를 포함한 Citrate-phosphate buffer를 well당 100µl씩 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 2 M H₂SO₄를 well 당 100µl씩 넣어 반응을 중지시켰다. 흡광도는 ELISA reader (Ceres UV9000HDi, Bio-Tek Instruments)로 490 nm에서 측정하였다.

6) 통계 처리

통계 처리는 SPSS 10.0 for Window[®]를 이용하였으며 각 군의 간세포 구상체의 생존도와 기능의 비교에는 비모수적 검정법의 Friedman test를 통해 통계적으로 유의한 차이를 검정하였다. 그리고 각 군 간의 차이를 개별적으로 검정하기 위하여 순위를 이용한 다중비교법(Dunnnett's test)을 이용하였다. P value가 <0.05일 때 통계적으로 의미 있는 것으로 보았다.

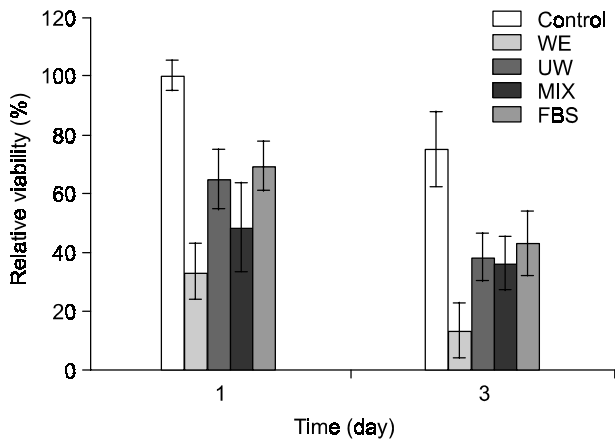


Fig. 1. Changes in relative cell viability of rat hepatocytes spheroids during 3-day culture periods after thawing. Cell viability was measured by MTT assay (n=4).

결 과

1) 세포 냉동 보존이 간세포 구상체의 생존도에 미치는 영향

간세포 구득 시 세포 생존율이 80% 이상인 경우 이를 현탁 배양을 하면 크기 100~200µm의 구상체가 형성된다. 본 연구에서는 평균 87.4±1.8%의 세포 생존율을 지닌 간세포를 사용하여 구상체를 형성시켰다. 형성된 간세포는 Table 1에 명기된 각각의 세포 냉동보존용액에 3.5×10⁶개/tube의 세포 밀도로 냉동 보존을 실시하였다. 냉동된 세포는 액체 질소에 침지하여 24시간을 보관하였다. 일련의 해동 과정을 거친 간세포 구상체는 3~4×10⁶개/well의 밀도로 세포배양용 6 well culture plate에서 배양을 하며, 해동직후, 세포 배양 간에 MTT assay를 이용하여 세포 생존도를 확인하였다.

Fig. 1에서와 같이 냉동보존용액에 따라 해동 후의 생존율에서 차이가 보임을 확인하였다. 해동 후 4시간의 배양 뒤 시행한 MTT assay에서 대조군 대비 세포 생존율은 각각 WE군 33.2±9.7%, UW군 64.8±10.2%, MIX군이 48.4±15.5% 그리고 FBS군이 69.3±8.7%였다. 이는 대조군과 비교하여 통계적으로 유의성이 있는 감소를 보였다. 특히 WE군은 UW 및 FBS군에 대해 유의하게 낮은 생존율을 나타냈다(P<0.05).

3일간의 배양기간 동안 세포 생존율은 지속적으로 감소하여 해동 직후의 40~70%까지 감소하는 것으로 확인하였다. 그중 배양 3일째 세포 생존율의 감소는 UW군이 가장

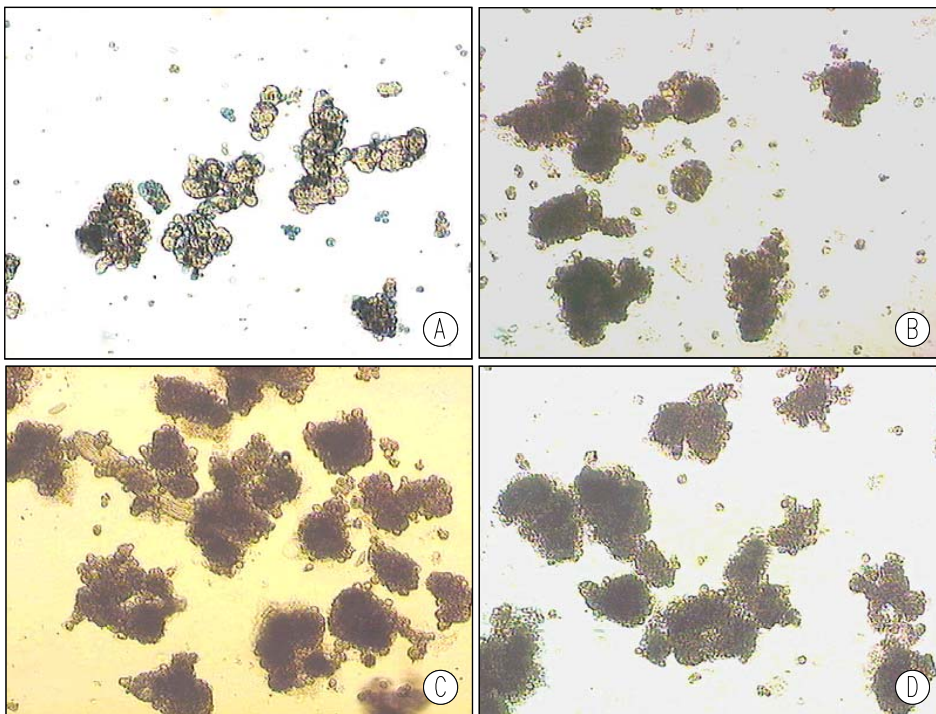


Fig. 2. Microscopic photographs of post-thawed rat hepatocytes spheroids (40×). Spheroids before cryopreservation as a control group (A), after freezing in WE solution (B), UW solution (C), FBS solution (D).

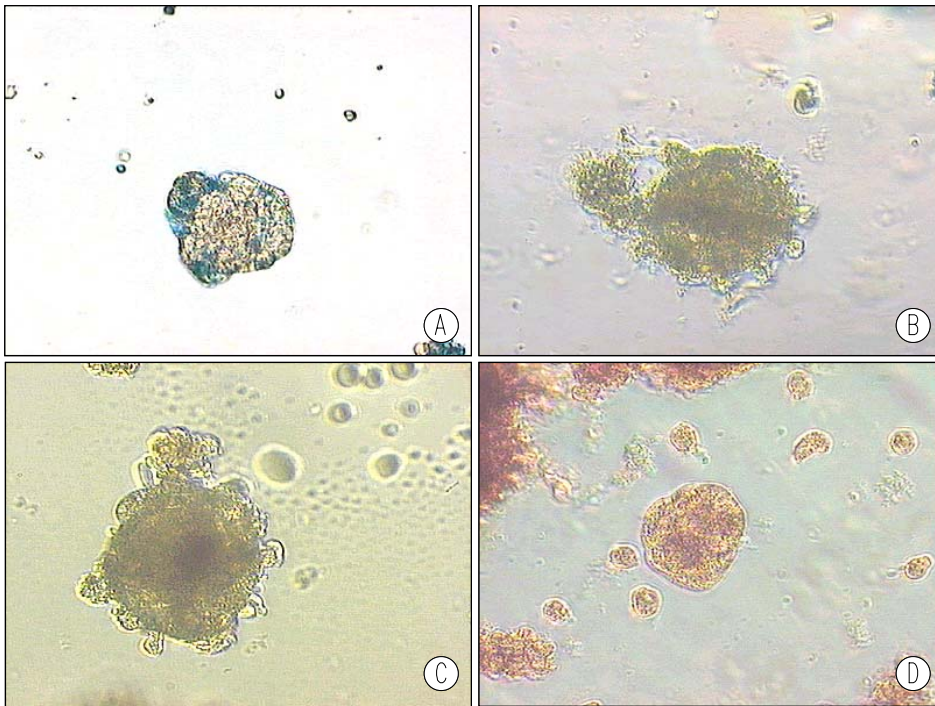


Fig. 3. Microscopic photographs of post-thawed rat hepatocytes spheroids (100×). Spheroids before cryopreservation as a control group (A), after freezing in WE solution (B), UW solution (C), FBS solution (D).

적어 배양 1일째와 비교하여 74.9%의 세포 생존율이 유지되는 것으로 조사되었다.

세포 냉동 보존액에 따른 세포 생존율과 구상체 형태간의 관계를 구상체의 외형 변화를 통하여 관찰하였다(Fig. 2, 3). 냉동보존 후 각 군의 간세포 구상체에서 MTT assay를 통한 생존율 결과와 유사한 경향을 판단할 수 있다. Fig. 2와 3의 (B), (C), (D)는 WE군, UW군, MIX군, FBS군의 해동 후의 세포 구상체로 냉동 전의 구상체 (Fig. 2와 3의 (A))에 비하여 세포의 응집 정도가 약화되었음을 관찰할 수 있었다. 특히 WE군(Fig. 2(B))은 응집되지 않은 단일 세포가 다른 군에 비해서 다수 발견되었으며, 괴사상태의 세포가 구상체와 단일세포 상에서 다수 발견되었다. 대조적으로 UW군의 경우 다른 군에 비해서 세포 구상체의 응집상태가 양호하여 대부분의 간세포가 구상체를 유지하는 것으로 확인하였다.

2) 각 냉동 보존군의 암모니아 제거능의 비교

간세포의 분화 기능의 유지를 확인하기 위하여 세포의 암모니아 제거능을 비교하였다(Fig. 4). 세포 배양액에 포함된 1 mM의 NH₄Cl이 1일 동안 제거되는 양상을 조사하였다. 대조군은 구상체 형성 후 냉동 과정을 거치지 않고 배양한 군을 이용하였다.

암모니아 제거능은 대조군과 비교하여 UW, FBS군은 유의한 차이가 없었으나, WE군과 MIX군은 통계적으로 유의하게 감소하였다(P < 0.05). 배양 기간 동안 대조군은 배양액에 포함된 암모니아의 70~90% 내외를 제거하였으나,

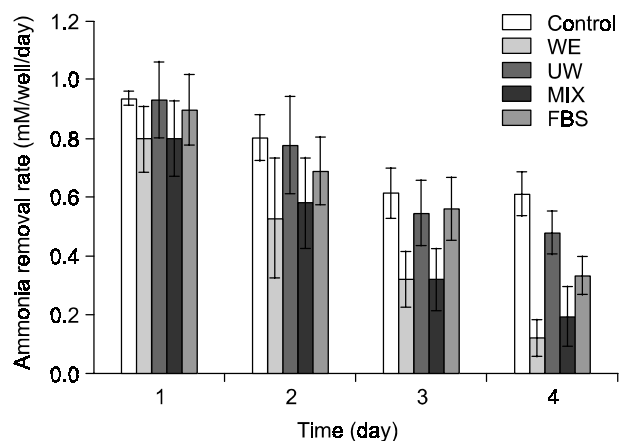


Fig. 4. Changes in ammonia removal rate of cultured rat hepatocytes spheroids after 1-day cryopreservation in different solution (n=4).

WE군의 경우, 배양 1일에는 암모니아 제거능이 0.8±0.11 mM/well/day이었으나 이후 급격히 감소하여 배양 4일에는 0.13±0.06 mM/well/day로 측정되었다.

반면에 UW군은 배양 1일의 암모니아 제거능이 대조군과 차이가 없는 0.93±0.13 mM/well/day를 보였으며 이후 제거능의 감소는 배양4일에 0.48±0.07 mM/well/day로 비교적 완만한 기능의 감소를 보였다. 이러한 경향은 UW 용액을 이용하여 간세포를 냉동 보존 후 사용하였을 시 평균 0.69±0.12 mM/well/day의 암모니아 제거능을 배양 3일 정도까

지 유지할 수 있음을 의미한다.

3) 각 냉동 보존군의 요소합성능의 비교

간세포 배양 효율의 관찰에 있어서 요소 합성능의 측정 은 간세포의 암모니아 대사의 산물로서의 요소의 세포 외 분비량을 확인함으로써 간세포의 대사 기능의 이상 유무를 확인할 수 있는 척도로써 이용된다. 본 연구에서는 Fig. 5의 (A)와 (B)항에서 명기한 바와 같이 1 mM의 암모니아가 첨가된 세포배양액(B)과 첨가하지 않은 일반 세포 배양액에서의 간세포 구상체의 요소합성능을 냉동 보존 전후로 나누어 비교 관찰하였다.

전반적으로 일반배양액에서의 간세포 구상체의 요소합성능은 대조군과 비교할 때 WE군을 제외한 냉동보존군들은 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$). 반면 암모니아 첨가배지에서는 대조군과 비교하여 UW군은 유의한 차이

가 없었으나($P > 0.05$) 그 외의 냉동 보존군은 요소합성능이 저조한 것으로 측정되었다($P < 0.05$).

4) 간세포 구상체의 알부민 분비능의 비교

알부민 분비량은 배양기간 동안 각 실험군이 각각 일정한 수준을 유지하는 양상을 나타내었다(Fig. 6). 알부민 분비량에 있어서 대조군이 암모니아 첨가에 상관없이 210 ng/well/day의 알부민 분비능을 유지한 반면 나머지 냉동보존군들은 대조군의 40~60%의 알부민을 분비하는 것으로 나타났다. 그러나 일반배양액에서 냉동보존군 중 UW군은 타 냉동 보존군보다 유의하게 높은 수준의 알부민 분비능을 나타내었다($P < 0.05$). 반면에 암모니아 첨가 배양액에서 배양한 냉동보존군들의 경우 알부민 분비능의 유의한 차이가 측정되지 않았다. 이는 암모니아 첨가에 따른 세포 손상에 의한 단백질 합성능의 저하에 기인하는 것으로 판단된다.

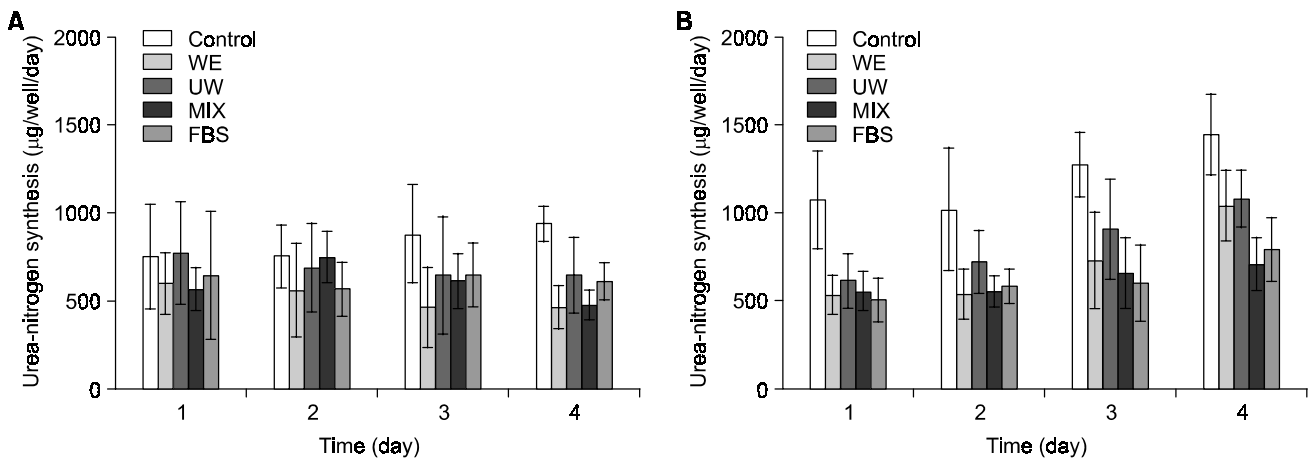


Fig. 5. Urea synthesis of cultured rat hepatocytes spheroids in normal hormone-defined media (A) and 1mM ammonia containing media (B) after 1-day cryopreservation in different solution (n=4).

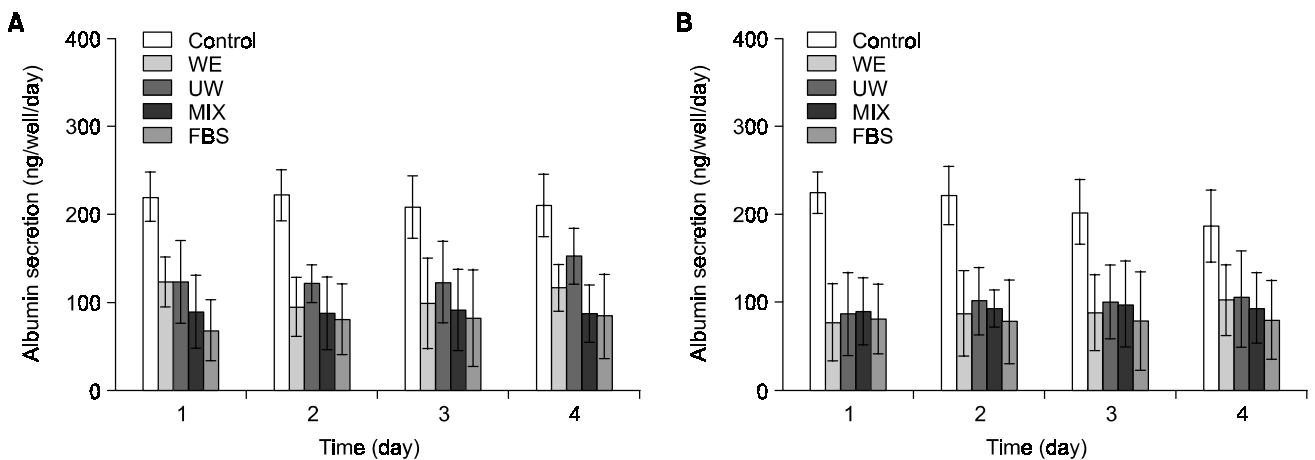


Fig. 6. Albumin secretion rate of cultured rat hepatocytes spheroids in normal hormone-defined media (A) and 1mM ammonia containing media (B) after 1-day cryopreservation in different solution (n=4).

고찰

본 연구에서는 효과적인 간세포의 냉동 보존을 위하여 고려되는 여러 가지 인자들 특히 냉동 보존액에 따른 효과를 조사하였다. 일반적으로 냉동 보존에 의한 간세포 손상을 최소화하기 위해서는 냉동 속도와 해동 속도의 최적화가 필수적인 것으로 고려되고 있다. 이에 따라 본 연구에서는 각 냉동 보존군을 computer programmed linear freezing에 의해 분당 1°C의 냉각 속도를 유지하여 세포를 냉동하였다. 또한 해동 시에는 액체 질소에 보관된 세포 보관 용기를 37°C 온열수조에 침지하여 급속 해동을 하였다. 냉동 보존 후의 세포 생존도의 변화를 확인하기 위하여 해동 후 4시간의 배양 후 MTT assay를 실시하여 확인한 바, 세포 생존도는 해동 전의 세포 구상체의 MTT assay 결과 대비 WE 군 33.2±9.7%, UW군 64.8±10.2%, MIX군이 48.4±15.5% 그리고 FBS군이 69.3±8.7%로 확인하였다. Koebe 등(26)에 의하면 Fluorescein diacetate (FDA)-generated fluorescence 측정법에 의한 방법으로 programmed freezer를 이용하여 냉동 보존 전의 75%까지 결과를 보였다. 세포 생존도를 측정하는 방법으로 제시된 방법에 따라 나름대로의 장단점이 있을 수 있으나, 본 연구에 이용한 MTT assay는 미토콘드리아의 활성을 바탕으로 세포의 생존도를 측정하는 방법이므로 신뢰성이 높다고 할 수 있다. 또한 해동 후의 간세포 구상체의 형태를 관찰한 바에 의하면, 각 냉동 보존액에 따라 구상체의 형태 유지 및 세포의 괴사 현상이 상이하여 WE군에서 구상체 유지가 저조하며, 국소적인 세포의 괴사가 관찰되었다. 반면에 UW와 FBS군에서는 상대적으로 형태 유지가 우수한 것으로 확인하였다(Fig. 2와 Fig. 3). 냉동 속도에 대해 연구된 문헌에 의하면, 급속 냉동에 비하여 서서히 냉동시키는 것이 간세포의 생존도가 더 높은 것으로 보고되고 있다.(14,18,27) 그러나 Mark AR 등의 보고에 의하면 programmed linear freezer를 이용하지 않고도 냉동 전의 60~80%를 나타냈고 많은 실험에서도 비슷한 결과를 나타냈었다. 따라서 일률적인 냉동방법으로 각 냉동 보존용액의 효과를 비교하는 것보다는 각 용액에 따른 냉동 속도의 최적화가 선행되어 비교적 유사한 냉동 환경을 조성하여야 보다 올바른 간세포 냉동 연구가 진행될 것으로 생각된다. 또한 Borel Rinkes 등(28)이 보고한 바에 따르면, 콜라젠젤에 고정화한 간세포를 5~10°C/min의 냉각 속도로 냉동한 경우 세포 생존도가 가장 우수한 것으로 확인되었는데 이는 급속한 냉각이 세포 내에 형성되는 얼음 결정에 의한 세포 손상을 억제하는 효과를 보여준 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서 확인한 냉동 보존액에 따른 세포 냉동 효율을 증진하기 위해서는 상기의 두 가지 고찰 즉 용액에 따른 열전달 속도의 차이와 급속 냉동이 고려되어야 할 것이다.

본 실험의 결과를 토대로 예상하건대, 세포의 냉동 시 얼

음 결정 형성으로 인한 세포 손상에 냉동보존액과 아울러 냉동보존액에 포함된 냉동보호제 및 혈장이 크게 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다. 물론 높은 생존도를 유지할 수 있는 세포 냉동법을 확립하기 위해서는 세포의 물리적인 손상 외에도 세포의 단백질 분비 등의 대사능을 정상 상태로 보전할 수 있도록 하는 연구가 병행되어야 할 것이나, 이 실험에서서와 같이 육안으로 관찰이 가능한 세포의 물리적인 손상이나, 괴사 등은 반드시 극복되어야 할 문제점으로 지적되고 있다. 냉동보존액의 구성에 따른 냉동 보존 전, 후의 세포 생존도는 UW와 FBS군이 가장 효과적인 냉동 보존액인 것으로 확인되었는데, 이는 극저온에서의 용액의 효과라기보다는 냉동 및 해동 시에 거치는 저온상태(-60에서 4°C로)에서 형성되는 얼음 결정 형성을 UW 용액의 구성과 혈청 단백질이 냉동시의 세포손상을 최소화하여 얻은 효과인 것으로 생각된다. 본 연구에서의 UW용액은 간세포의 대사를 최소화시키는 작용을 하고 삼투압을 유지하는 기능이 세포의 팽창을 방지하고 냉동 시 세포내의 얼음 결정으로 인한 손상을 줄이는 효과를 보인 것으로 생각된다.

본 연구에서는 냉동보호제로 10% DMSO를 사용하였다. 초창기에는 DMSO, glycerol, ethylene glycol과 같은 화학약품을 냉동보호용액으로 사용함으로써 안정성 문제에 대한 많은 논란을 초래했으며, 세포 기질에 변형을 일으킬 수 있다는 문제와 해동 후 세척 과정이 절대적으로 필요하기 때문에 즉시 이용할 수 없다는 것 등 여러 가지 문제를 안고 있었다. 따라서 최근에는 침투성 냉동보호용액과 비독성이면서 비침투성인 냉동보호용액을 함께 사용하려는 방법이 많이 권장하고 있으며, 비독성이면서 또한 생분해성인 천연재료를 사용하여 냉동보호용액으로 사용하려는 다양한 연구와 그 응용연구가 진행되고 있는 것으로 알고 있다. 이와 같은 단적인 예가 Sucrose, HES (Hydroxy Ethyl Starch)로써 HES는 현재 적혈구를 냉동보존하는데 냉동보호용액으로 사용되고 있으며 여러 다른 냉동보호제(DMSO, glycerol)와도 혼합하여 사용되고 있는 상황이다.

간세포의 냉동 보존 후 분화 기능의 저하 방지는 세포 생존도의 유지와 아울러 간세포의 냉동 보존법의 개발을 위하여 필수적인 요소이다. 특히 간세포의 냉동보존은 체외 순환형 인공장 장치의 핵심 요소인 간세포의 수급을 자유롭게 할 수 있다는 점에서 매우 중요한 연구로 여겨지고 있다. 많은 연구에서 간세포의 냉동 보존 후 나타나는 분화 기능 감소 현상을 연구하였다. 세포의 냉동 보존 시 유발되는 손상은 크게 두 가지로 구분되는데, 우선 보존액 상에 형성되는 얼음 결정에 의한 세포막의 손상과 세포질에 포함된 물의 얼음 형성이 주요한 것으로 알려져 있다. 대부분의 연구 결과에서 간세포의 분화 기능 감소 현상을 세포막의 손상에 따른 세포막 상의 여러 가지 수용체의 손실 및 세포골격의 변형 등과 연관지어 판단하고 있다. 이를 확인

하기 위하여 단일 세포의 냉동 후 세포의 표면 점착력을 조사하여 비교하는데 이는 세포의 분화 기능의 감소와 상당 부분 연관을 지닌 것으로 판단되고 있다.

본 연구에서 이용된 간세포 구상체의 경우 세포의 응집체이므로 표면에 존재하는 세포들은 매질의 얼음 결정에 의한 손상을 받을 수 있으나 심층부의 세포들은 비교적 그러한 손상으로부터 덜 영향을 받을 것으로 판단된다. 또한 구상체 형성 시 일반적인 단층배양에 비하여 세포의 세포 외기질의 분비가 증진된다는 보고(29)를 감안하면 냉동 과정의 최적화 후에는 세포의 손상이 단일 세포의 경우보다 더욱 경감될 것으로 예상된다. 이와 비슷한 맥락에서 일부에서는 간세포를 캡슐에 고정화한 후 냉동하여 세포 생존도나 기능에 있어서 우수한 것으로 보고되었다. Guyomard 등(30)에 의하면 단층배양된 간세포의 냉동보존과 calcium-alginate bead로 캡슐화된 간세포의 냉동보존에서 캡슐화된 간세포는 냉동 및 해동의 과정에서 손상이 적고 조작성이 우수한 장점이 있다. 향후 간세포 구상체를 캡슐화하여 냉동 보존 전, 후의 생존도와 기능의 유지를 비교해 볼 필요가 있다고 생각된다. 따라서 본 연구에서 얻은 UW 용액을 사용한 간세포 구상체 냉동 보존 효과를 캡슐화 간세포의 냉동 보존에 응용한다면 보다 효율적인 인공간 증진용 간세포 보존법을 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

간세포 이식이나 생체 인공간에 필요한 간세포를 그 기능면에서 장기간 안정적으로 보존하는 기술의 확립은 간질환으로부터 치명율을 낮추려는 노력에 한걸음 더 나아갈 수 있는 해결책을 제시해 주는 것이라 생각된다. 이에 본 연구에서는 간세포의 기능을 장기간 유지하며 배양이 가능하며, 또한 생체 인공 간 등에 널리 이용되고 있는 일종의 세포 응집체인 간세포 구상체를 효과적으로 냉동 보존하기 위한 보존용액에 관한 연구를 진행하였다. 기초적인 연구 결과를 토대로 판단하건대 간이식 시에 공여간의 관류액으로 쓰이는 UW 용액을 주로 한 냉동보존용액으로 냉동 보존한 간세포 구상체는 우선 냉동 보존을 하지 않은 간세포 구상체와 비교하였을 때 세포 생존도와 기능에 있어서 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으며 타 냉동보존액과 비교하였을 때 비교적 양호한 세포 생존도와 냉동 이후의 간세포 분화 기능을 유지시키며 간세포를 간세포 구상체의 형태로 냉동 보존할 수 있음을 보여주었다. 그러나 냉동 보존액의 비중과 조성에 따른 냉동기 냉동프로그램의 적절한 조정과 세포의 냉각 또는 해동 과정에서 세포의 저온 또는 냉각 손상을 완화시킬 수 있는 냉동 보호제의 첨가 등의 연구가 이후에 진행되어야 보다 효과적인 간세포의 냉동 보존법 연구가 이루어질 것으로 판단된다.

REFERENCES

- 1) Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994;58:951-2.
- 2) Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997;63:559-69.
- 3) Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000;6:32-40.
- 4) Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998;14;338:1422-6.
- 5) Sussman NL, Gislason GT, Conlin CA, Kelly JH. The Hepatic extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artif Organs* 1994;18:390-6.
- 6) Watanabe FD, Mullon CJ, Hewitt WR, Arkadopoulos N, Kahaku E, Eguchi S, et al. Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial. *Ann Surg* 1997;225:484-94.
- 7) Itoh T, Suzuki M, Mitsui Y. Keratinocyte growth factor as a mitogen for primary culture of rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:1011-5.
- 8) Fautrel A, Joly B, Guyomard C, Guillouzo A. Long term maintenance of drug-metabolizing enzyme activities in rat hepatocytes after cryopreservation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1997;147:110-114.
- 9) Kaufmann PM, Fiegel HC, Kneser U, Pollok JM, Kluth D, Rogiers X. Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Eng* 1999;5(6): 583-96.
- 10) Yamada K, Kamihira M, Hamamoto R, Iijima S. Efficient induction of hepatocyte spheroids in a suspension culture using a water-soluble synthetic polymer as an artificial matrix. *J Biochem (Tokyo)* 1998;123:1017-23.
- 11) Carrillo G, Gendzekhadze K, Ruiz ME, Ruiz M, Ramirez CD, Martinez A, et al. Multiaggregate hepatocyte (HP) spheroids in the hepato-cellular transplant: structural, functional and metabolic characterization. *Transplant Proc* 2001;33:660-1.
- 12) Dixit V, Gitnick G. Artificial liver support: state of the art. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996;220:101-14. Review.
- 13) Innes GK., Fuller BJ, Hobbs KE. Functional testing of hepatocytes following their recovery from cryopreservation. *Cryobiology* 1988;25:23-30.
- 14) Loretz LJ, Li AP, Flye MW, Wilson AG. Optimization of cryopreservation conditions for rat and human hepatocytes. *Xenobiotica* 1989;19:489-98.
- 15) Coundouris JA, Grant MH, Simpson J, Hawksworth GM. Drug

- metabolism and viability studies in cryopreserved rat hepatocytes. *Cryobiology* 1990;27:288-300.
- 16) Utesch D, Diener B, Molitor E, Oesch F, Platt KL. Characterization of cryopreserved rat liver parenchymal cells by metabolism of diagnostic substrates and activities of related enzymes. *Biochemical Pharmacology* 1992;44:309-15.
 - 17) Chesne C, Guyomard C, Fautrel A, Poullain MG, Fremond B, De Jong H, et al. Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology* 1993;18:406-14.
 - 18) Diener B, Utesch D, Beer N, Durk H, Oesch F. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics. *Cryobiology* 1993;30:116-27.
 - 19) Salmon F, Kohl W. Use of fresh and cryopreserved hepatocytes to study the metabolism of pesticides in food-producing animals and rats. *Xenobiotica* 1996;26:803-11.
 - 20) McKay GC, Henderson C, Goldie E, Connel G, Westmoreland C, Grant MH. Cryopreservation of rat hepatocyte monolayer: cell viability and cytochrome P450 content in post-thaw cultures. *Toxicology in vitro* 2002;16:71-79.
 - 21) Hubel A, Tonei M, Cravalho EG, Yarmush ML, Tompkins RG. Intracellular ice formation during the freezing of hepatocytes cultured in a double collagen gel. *Biotech Prog* 1991;7:554-9.
 - 22) Yarmush ML, Toner M, Dunn J, Rotem A, Hubel A, Tompkins RG. Hepatic tissue engineering: Development of critical technologies. *Ann NY Acad Sci* 1992;665:238-52.
 - 23) Harris CL, Toner M, Hubel A, Cravalho EG, Yarmush ML, Tompkins RG. Cryopreservation of isolated hepatocytes: Intracellular ice formation under various chemical and physical conditions. *Cryobiology* 1991;28:436-44.
 - 24) Pahernik SA, Thasler WE, Mueller-Hocker, Schildberg FW, Koebe HG. Hypothermic storage of pig hepatocytes: Influence of difference storage solution and cell density. *Cryobiology* 1996;33:552-66.
 - 25) Seglen PO. Preparation of rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.
 - 26) Koebe HG, Muhling B, Deglmann CJ, Schildberg FW. Cryopreserved porcine hepatocyte cultures. *Chem Biol Interact* 1999;121:99-115.
 - 27) Chesne C, Guillouzo A. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: a critical evaluation of freezing and thawing conditions. *Cryobiology* 1988;25:323-30.
 - 28) Borel Rinkes IH, Toner M, Sheeha SJ, Tompkins RG, Yarmush ML. Long-term functional recovery of hepatocytes after cryopreservation in a three-dimensional culture configuration. *Cell Transplant* 1992;1:281-292.
 - 29) Wu FJ, Friend JR, Hsiao CC, Zilliox MJ, Ko WJ, Cerra FB, et al. Efficient assembly of rat hepatocyte spheroids for tissue engineering applications. *Biotechnol Bioeng* 1996;50:404-15.
 - 30) Guyomard C, Rilland L, Fremond B, Chesne C, Guillouzo A. Influence of alginate gel entrapment and cryopreservation on survival and xenobiotic metabolism capacity of rat hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology* 1996; 141: 349-56.
-