

## 배양중 흰쥐 간세포의 세포소기관 표지효소의 변천

영남대학교 의과대학 해부학교실

송인환 · 김주영 · 성언기 · 이용창

### 서 론

모든 생명체의 세포는 여러가지 종류의 소기관으로 구성되어 있으며 이들은 각각 고유의 기능을 수행함으로써 세포의 생존, 분열, 성숙을 가능하게 하여 생명력을 유지시키고 있다.

골지체는 1899년 Golgi에 의해 개의 적수 신경세포에서 처음 발견되었으며 그 이후로 전자현미경의 출현과 더불어 효소염색법과 자가방사선사진술 등의 발견으로 그 기능과 구조에 대한 것이 많이 알려지게 되었다. 골지체는 내형질막과 분비소체 사이에서 dictyosomes 구조를 취하며 내형질막쪽을 cis면, 분비소체 쪽을 trans면 이라고하는데 염색되어지는 효소도 그면에 따라 다르다. cis면은  $OsO_4$  침착으로 염색할 수 있으며 trans면은 thiamine pyrophosphatase와 acid phosphatase로 염색할 수 있고 periodic-acid-silver, methenamine, 5-nucleotidase와 adenylatecyclase로는 두 면 모두 염색이 가능하다.<sup>1)</sup> 특히 thiamine pyrophosphatase를 이용한 골지체의 연구가 많이 이루어지고 있다.<sup>2~3)</sup>

생체막은 핵막, 원형질막을 포함한 모든 세포 소기관을 둘러싸는 막이다. 다른 부위의 생체막 사이에도 서로 밀접한 연관 관계를 가지며 30여종 이상의 효소가 존재하는데 alkaline phosphatase는 이런 생체막에 고루 존재

하는 효소이다. 원형질막은 세포안과 바깥을 경계지우는 막으로서 복합효소와 물리적 방법을 혼합하여 세포를 분리할 때 손상을 많이 받는다.<sup>4)</sup> 배양된 신장세포에서는 alkaline phosphatase가 심하게 감소되었다고 하였으며<sup>5)</sup> chick embryo의 1차 생식세포에서 alkaline phosphatase가 배양 2일경이 지나야야 출현한다고 하였다.<sup>6)</sup> 또한 흰쥐의 간세포에서 방사선 조사후 2일째까지 alkaline phosphatase가 증가한다는 보고도 있다.<sup>7)</sup>

사립체는 모든 유핵세포의 세포질에 존재하는 소기관으로 음식물을 인산화에 의해 세포에서 이용될 수 있는 에너지의 형태인 ATP로 바꾼다. succinate dehydrogenase는 에너지 전환에 필요한 효소중의 하나인데 사립체의 내막에 존재한다. 심근세포의 사립체는 배양중에 시간이 지남에 따라 그 수가 증가하고 점점 길어지며 미세사 형태를 띠게 된다고 하였고<sup>8)</sup> 배양중의 심근세포와 심장내피세포로 succinate dehydrogenase염색을 하면 심근세포에서는 강한 반응을 보이고 내피세포에서는 약한 반응을 보인다고 하였으며<sup>9~10)</sup> 신장 세포에서는 succinate dehydrogenase가 심한 감소를 보인다고 하였다.

본 실험에서 3개의 세포 소기관의 표지효소를 염색한 이유는 이들 세포소기관은 세포가 살아가는데 반드시 필요하고 서로 밀접한 연관관계가 있기 때문이다. 생체막이 제대로 기

\* 본 연구의 일부는 1987년도 영남대학교 교내연구 조성비로 이루어짐.

능과 구조를 유지하지 못할 때 세포는 외부 환경으로부터 자신을 보호할 수 없을 뿐더러 세포 소기관의 유지도 불가능 할 것이다. 단백질은 조형내형질막에서 만들어지고 단백질 이외의 성분은 활면 내형질막과 골지체에서 만들어진다. 그외 여러 가지 분비과립들도 내형질막에서 만들어져 골지체에서 농축되고 변화되어 분비될 수 있는 형태로 만들어진다. 이러한 세포 소기관의 표지효소를 일련별로 염색하여 관찰, 비교, 검토 함으로서 효소 분리에 의해 얻어진 간세포의 초기 배양과정에서 일어나는 회복, 성장, 활동상황등을 추적할 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. 실험재료

간세포 분리효소는 collagenase(Gibco) 10mg과 hyaluronidase(Sigma) 20mg을 20ml Phosphate buffered saline(이하 PBS)에 녹여 사용하였고 배지로는 insulin과 dexamethasone을 보완한 modified Dulbecco's minimum essential media에 fetal bovine serum을 20%로 첨가하여 사용하였다. 실험동물로는 생후 5일된 Sprague-Dawley종 흰쥐를 사용하였다.

2. 세포배양

생후 5일된 Sprague-Dawley종 흰쥐 10마리를 암수구별없이 희생시킨 다음 간을 분리하여 4C PBS에 보관하였다. 이렇게하여 간 조직이 모두 모이면 수술용칼로 잘게 자른후 4C PBS로 혈구세포를 씻어내고 37C 효소용액에 넣어서 40분간 shaking incubator에서 처리하였다. 이렇게하여 손해진 간조직을 80 mesh의 체를 통과시키며 부수고 다시 120 mesh의 체를 통과시키며 섬유조직을 걸러내어 세포성분만을 모은 다음 100G에서 3분간

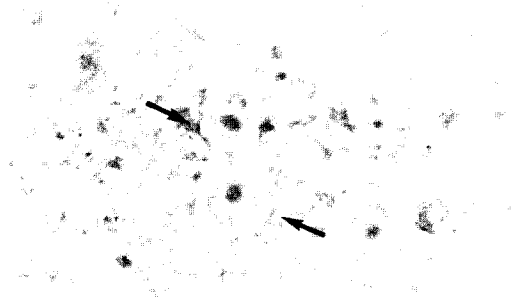


Fig. 1. Thiamine pyrophosphatase stain in hepatocyte on 2nd day of culture. Reactions are visible around nucleus (arrows).

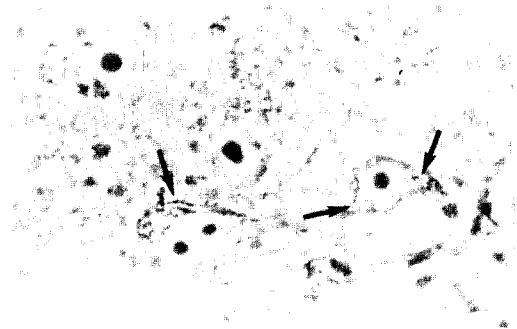


Fig. 2. Thiamine pyrophosphatase stain in hepatocyte on 4th day of culture. Strong reactions are visible(arrows)

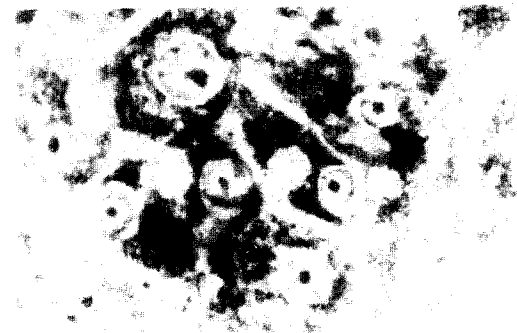


Fig. 3. Succinate dehydrogenase stain in hepatocyte on 2nd day of culture. Strong homogeneous reactions are visible in all cytoplasm.

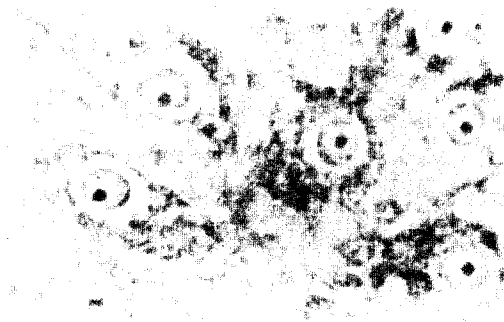


Fig. 4. Succinate dehydrogenase stain in hepatocyte on 4th day of culture. Weak reactions are accumulated at some portions of cytoplasm.

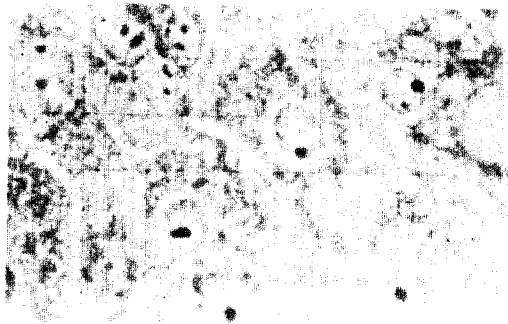


Fig. 5. Alkaline phosphatase stain in hepatocyte on 3th day of culture. Weak reactions are visible through all cytoplasm.

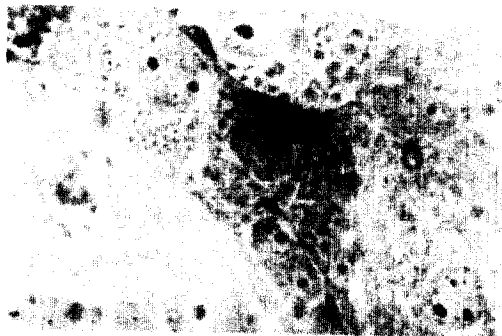


Fig. 6. Alkaline phosphatase stain in hepatocyte on 5th day of culture. Accumulated strong reaction granules are visible through all cytoplasm.

원침하여 세포를 모으고 이를 4C PBS로 세척하였다. 이러한 세척조작을 2회 반복하여 세포에 붙어있는 효소용액을 제거한뒤 배양액으로 교환하여 trypan blue dye exclusion test로 살아 있는 세포수를 산정하여  $4 \times 10^6/ml$ 이 되도록 희석하였다. 효소염색을 위해서 cover-glass가 깔린 90mm 평판집시에 세포가 포함된 배양액 10ml를 넣어 세포를 배양하였다. 배양 24시간 후 배양액을 교환하여 부유하는 죽은 세포를 제거하였고 그 이후로는 이틀에 한번씩 배양액을 교환해주면서 6일동안 매일 같은 시간에 효소염색을 시행하였다.

### 3. 실험방법

세포소기관으로서 골지체, 사립체, 형질막의 표지효소인 thiamine pyrophosphatase, succinate dehydrogenase, alkaline phosphatase 염색을 시행하였다. 배양중 관찰은 도립위상차 현미경으로 하였으며 염색후 사진은 35mm Olympus 위상차 현미경으로 기록하였다.

#### 1) succinate dehydrogenase

1. 생리식염수로 세척
2. 60% acetone에서 15분 고정
3. 세척
4. 37C incubation medium에서 1시간 방치
5. 세척
6. 탈수
7. canada balsam으로 mount

Incubation medium은 0.2M phosphate buffer, pH7.6 용액 5ml와 0.2M sodium succinate 5ml를 섞어서 nitrotetrazolium blue chloride 10mg을 녹인후 여과하여 사용하였다.

#### 2) thiamine pyrophosphatase

1. 생리식염수로 세척
2. 10% formol calcium에 15분 고정
3. 세척

4. 37°C incubation medium에 1시간 30분 방치
5. 세척
6. 1% ammonium sulfide yellow 용액에 1분간 방치
7. 세척
8. glycerin gelly로 mount

Incubation medium은 50mg thiamine pyrophosphate chloride를 증류수 7ml에 녹인 후 맹렬하게 섞으면서 0.2M tris-malate buffer, pH6.5 용액 10ml와 0.025M magnesium chloride 용액 5ml를 섞은 후 1% lead nitrate 3ml를 첨가하여 사용하였다.

### 3) alkaline phosphatase

1. 생리식염수로 세척
2. 60% acetone에서 15분 고정
3. 세척
4. 37°C incubation medium에서 1시간 방치
5. 세척
6. 2% cobalt nitrate에 2분간 방치
7. 세척
8. 1% ammonium sulfide yellow 용액에 1분간 방치
9. 세척
10. glycerin gelly로 mount

Incubation medium은 2% sodium glycerophosphate 5ml와 2% sodium barbitone 5ml를 섞은 후 증류수 10ml를 더하고 2% calcium chloride 1ml와 2% magnesium sulphate 0.4ml 그리고 chloroform 한방울을 섞어 사용하였다.

## 성 적

### 1. Thiamine pyrophosphatase

반응강도의 척도로서 다음과 같이 표시하였다. 반응이 핵주위에서 가장 자리쪽으로 넓

게 나타나면 ++, 핵주위에 국한되어 나타나면 +, 겨우 눈에 띈 정도면 ±로 하였다.

배양 1일째는 핵주위에서 겨우 눈에 띄는 미약한 양성반응을 보였으며 2일째에 접어들면서 반응강도가 다소 강해져서 핵주위에서 두드러진 반응을 보였고 일부세포에서는 세포질 가장자리 쪽으로 퍼져나가는 두드러진 반응을 보이기도 하였다. 배양 4일째에 접어들면서 대부분의 세포에서 세포질 넓게 망상 구조를 취하며 강한 반응을 나타내었다(표1).

Table 1. Variation of reaction intensity for thiamine pyrophosphatase of rat hepatocyte in culture.

Day on culture	1	2	3	4	5	6
Intensity	±	+	+	++	++	++

### 2. Succinate dehydrogenase

반응강도의 척도로서 다음과 같이 표시하였다. 반응이 세포전반에 걸쳐 중첩되어 강하게 나타나면 +++, 세포 전반에 걸쳐 나타나면 ++, 세포 군데군데 나타나면 +, 겨우 눈에 띈 정도면 +로 하였다.

배양 1일째는 효소반응이 세포 전반에 걸쳐 중첩되어 나타났으며 이러한 중첩된 반응은 세포의 중심쪽으로 갈수록 더욱 심하였고 가장자리 쪽으로 갈수록 다소 약해졌다. 배양 2-3 일째가 되면서 1일째 보였던 강한중첩 반응은 보이지 않고 세포 전반에 걸쳐 비교적 고루 분포된 강한 양성반응을 보여 주었으며 시간이 지남에 따라 강도가 약해지는 경향을 보였다. 배양 4일 이후부터는 반응과립들이 군데군데 밀집되어 나타났고 그 강도는 이전에 비해 약해졌으며 이러한 강도를 6일째까지 유지하였다.(표2)

Table 2. Variation of reaction intensity for succinate dehydrogenase of rat hepatocyte in culture.

Day on culture	1	2	3	4	5	6
Intensity	+++	+-	++	+	+	+

### 3. Alkaline phosphatase

반응강도의 척도로서 다음과 같이 표시하였다. 반응이 세포전반에 걸쳐 덩어리져 나타날 때 +++, 세포전반에 걸쳐 강한 반응을 나타낼 때 ++, 세포전반에 걸쳐 약한 반응을 나타낼 때 + 대조군과 비교하여 두드러진 차이가 없을 때 ±로 하였다.

배양초기에는 세포전반에 걸쳐 반응이 나타나기는하나 대조군에 비해 이렇다할 차이점이 없었으며 3일째에 접어들면서 그 반응강도가 다소 강해지기 시작하였으며 5일이 지나면서 부터는 큰 반응과립들이 세포질 전반에 걸쳐 강하게 나타났다(표3).

Table 3. Variation of reaction intensity for alkaline phosphatase of rat hepatocyte in culture.

Day on culture	1	2	3	4	5	6
Intensity	±	±	+	++	+++	+++

## 고 찰

다세포 유기체에 있어서 개개세포가 외부 환경에 직접적 영향을 받기보다는 유기체의 전체적인 상태에 의해 간접적 영향을 받는다. 이러한 다세포 유기체의 세포가 배양 상태에 있게 되었을때는 유기체의 호르몬이나 신경 등 여러 영향에서 벗어나 세포에 영향을 미치는 환경이 일정한 배양액내의 영향만 받는다고 볼 수 있다. 이러한 상황에서 효소복합체리와

물리적 방법을 함께 사용하여 분리한 간세포의 표지효소의 변천상황을 추적함으로써 초기 배양과정에서 일어나는 회복, 성장, 활동상황을 알아보고자 각 표지효소별로 이를 추적하였다.

Thiamine pyrophosphatase는 골지체의 cis면에서 나타나는 표지효소이다. 골지체는 세포 종류에 따라 크기도 다를 뿐 더러 cisterna의 수도 다양하다.<sup>1)</sup> 골지체에대한 연구는 이하선세포, 섬유모세포, 치아모세포, 갑상선세포, 간세포등이 좋은 대상으로 되어있다.<sup>1)</sup> Thiamine pyrophosphatase염색에 있어 3일째까지 약한 반응을 보이다가 4일이 지나면서 ++의 강한 반응을 보이고 있다. 배양초기에는 세포가 분리과정에서 입은 손상에서 벗어나지 못한 상태일 것이고 시간이 지남에 따라 회복되어 고유의 기능을 찾아간다고 볼 수 있다. 4일경의 thiamine pyrophosphatase반응은 2주정도의 장기간 세포 배양에서 볼 수 있는 정도의 강도를 보이는 것으로 보아 골지체의 기능은 4일 이후로 안정상태에 접어 든다고 볼 수 있겠다.

alkaline phosphatase는 세포의 막성 성분에 존재하는 표지효소이다. 따라서 막성구조를 가지는 형질막, 사립체, 골지체, 내형질막, 분해소체등 어디서나 존재한다. 그러나 특히 분비세포에서 볼 때 세포소기관의 양적비교로 보아 내형질막과 분해소체가 그 중 대부분을 차지한다.<sup>11)</sup> 실험 성적에서 보듯이 3일째부터 Alkaline phosphatase반응이 강해지기 시작하여 5일 이후부터는 아주 강한 반응을 보이고 있으며 이는 thiamine pyrophosphatase반응의 증가시기 보다 조금 앞서는 것을 주목해 볼 때 내형질막의 회복과 재생이 3일째에 들어서면서 활발해지기 시작하고 그 영향으로 골지체의 활동이 증가된것으로 추측된다. 골지체의 기능이 증가되며 분비세포로서의 기능이 활발해져 분비소체의 증가와 함께 5

일정부터 alkaline phosphatase의 반응이 아주 약하게 일어난 것으로 추측된다.

Succinate dehydrogenase는 사립체의 표지효소이며 사립체는 외막 내막 외방 내방 등 4개의 막분리로 이루어져 있고 이 succinate dehydrogenase는 내막에 존재하는 효소이다. succinate dehydrogenase는 근육세포에서 많은 양이 포함되어 있으며<sup>12-14)</sup> 사립체 각 막도 간세포에서는 발달이 미약하고 근육세포등에서 잘 발달되어 있다고 한다.<sup>15)</sup> 간세포에 있어서는 사립체가 덩어리로 모여 있거나 단섬유 사이사이에 흩어져 있고 심근세포를 시험관내에서 살아있는 상태로 관찰하면 시간이 지날수록 세포의 분화가 뚜렷해져서 나중에는 아주 성숙된 심근세포를 닮게 되며 사립체의 양은 더욱 증가하여 세포 전반에 걸쳐 분화와 더불어 더욱 증가한다고 볼 수 있다. 그것에반해 내피세포에서 succinate dehydrogenase염색을 추적한 결과 시간이 지남에 따라 미약해져서 1주일경에는 반응이 음성으로 나타났다고 한다.<sup>16)</sup> 이것은 배양상태에서는 생체에서와 같이 혈관벽 물질 이동에 필요한 에너지 소요가 없어졌기 때문일 것으로 추측하고 있으며 간세포에서도 이와 유사한 감소 반응을 보이고 있다. 배양 1일째 ++-, 2,3일째 ++로 나타났는데 여기서는 배양 1일째의 세포는 아직 배양 용기에 완전히 착상한 상태가 아니라 어느정도 수축되어 있는 상태이므로 더 진하게 보인 것 같다. 그러므로 배양 1일째 강한 반응을 보인 것이 2,3일에 비해 유의하다고는 생각되지 않는다. 배양초반기에 강한 반응을 보인 것은 세포분리과정에서 다른 막성분에 비해 사립체는 손상을 많이 받지 않았을 것으로 생각되며 또한 세포분리과정에서 입은 세포 손상의 치유에 많은 에너지가 소요되는 것으로 생각된다. 4일 이후부터는 + 정도의 강도로 감소되어 유지되고 있는데 그 이유는 간세포가 배양상태에 접어들면서 호르몬등의 영향에서

벗어나 담즙분비 활동의 저하와 담즙생성 효소의 감소등 분비세포로서의 주기능이 저하되어 생체에서보다 적은양의 에너지를 필요로 하기 때문으로 여겨진다. 이와같이 3가지 표지효소의 변천이 4일을 경계로 뚜렷한 변화를 보인것은 세포 분리후 배양에 있어서 간세포가 안정을 찾고 제기능을 수행하기 시작하는 것이 분리후 4일 경으로 추측되어진다.

## 요 약

초기배양과정에서 일어나는 간세포의 회복, 성장, 활동상황등을 추적하기 위하여 세포의 생존과 기능에 꼭 필요하고 서로 깊은 연관관계를 가진 골지체, 사립체, 생체막의 표지효소를 일렬별로 추적 하였다. 골지체의 표지효소인 thiamine pyrophosphatase는 배양 4일경부터 장기 배양시의 강도에 접근하였으며 사립체의 표지효소인 succinate dehydrogenase는 시일이 지남에 강도가 감소하여 4일부터는 일정한 강도를 유지하였다. 형질막의 표지효소인 alkaline phosphatase은 2일째부터 반응강도가 강해져 5일째 이후로는 아주 강한반응을 보였다.

이같은 결과를 종합해볼때 1차 배양에 있어 간세포는 세포 분리후 4일경이 지나면서 안정상태에 접어들고 제기능을 수행하나 배양상태에서는 분비세포로서의 고유기능은 감소되는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Malilyn, G.F. and George, E.P. : The Golgi Apparatus. J.Cell Biol., 91(1) 77-103, 1981.
2. Allen, J. and Slater, J.A. : Cytochemical study of Golgi associated thiamine pyrophosphatase in the epididymis of the

- mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 9 : 418-423, 1961.
3. Allen, J.M. : The properties of Golgi-associated nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase. I. Cytochemical analysis. *J. Histochem. Cytochem.*, 11 : 529-541, 1963.
  4. Cristofalo, V.J. and Holecckova, E. : Cell impairment in aging and development. Plenum. Co., New York, 1975, pp 389-420.
  5. Burlington, H. : Enzyme patterns in cultured kidney cells. *Amer.J.Physiol.*, 97 : 68-70, 1959.
  6. Swartz,W.J. : Acid and alkaline phosphatase activity in migrating primordial germ cells of the early chick embryo. *Anat. Rec.*, 202 : 379-385, 1982.
  7. Auda,H.,Rashid,A.M., khaleel A.M., and Nasser, M.J. : Radiation-Induced Change in Liver and Kidney Alkaline Phosphatase and Esterase of Mice. *Radiation Research*. 111 : 457-463, 1987.
  8. Rumery,R.E., Blandau,R.J., and Hagey,P. W. : Observations of living myocardial cells from cultured 48 hour chick hearts. *Anat. Rec.*, 141(3) : 253-262, 1961.
  9. Kasten,F.H. : Cytology and cytochemistry of mammalian myocardial cell in culture. *Acta Histochem.*, 9 : 775-805, 1971.
  10. 성언기 · 이응창 : 배양중 백서 심근 및 내피세포의 세포소기관 표지효소의 변천 대한해부학회지, 19 : 219-227, 1986.
  11. De Robertis,E.D.P. and De Robertis,E.M. F. : Cell and molecular biology 8th ed., S.C.,Philadepia, 1987, pp. 218-240.
  12. Ramadan,A.A., Mèhassen, A.M. Amin, A. M., and Meguid, N.A. : Psoriasis before & after methotrexate treatment II. Location of mitochondria and dehydrogenases. *Folia. Morphol.*, 31(4) 341-4, 1983.
  13. Akagawa,Y., Nikai,H., and Tsure,H. : Changes in the pattern of SDH and PhR Staining in fibers of rat masseter muscle following long-term functional stretch. *Arch. Oral. Biol.* 28(5) : 447-51, 1983.
  14. Talesara,C.L. and Mahant,P. : Succinic-D and myofibrillar ATP-A in the denervated gastrocnemius muscle of young, adult and middle-aged albino rats. : A correlative histochemical and biochemical study. *Cell. Mol. Biol.*, 29(6) : 531-7, 1983.
  15. Chappell and Rees : Mitochondria. Oxford university press. 1972.
  16. Bartman, J. and James,F.D. : Histochemical analysis of microdissected nephrons : enzyme stains. *Stain Technol.*, 41 (4) : 229-233, 1966.
  17. Freshney,R.I. : Culture of animal cells : A manual of basic technique. Liss,A.R., N.Y., 1983, pp. 1-78.
  18. Jean E.Vance and Dennis E.Vance. : Dose rat liver Golgi have the capacity to synthesize phospholipids for lipoprotein secretion. *J. Biol. Chem.*, 263 : 5898-5909, 1983.
  19. Lazarus,S.S. and Wallace,B.J. : Nucleoside phosphatase and thiamine pyrophosphatase activity of rabbit Golgi apparatus. *J.Histochem. cytochem.*, 12 : 729-736, 1964.
  20. Novidoff,A.B. and Goldfischer, S. : Nucleoside-diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47 : 802-810, 1961.

-Abstract-

## Transition of Marker Enzymes of Rat Hepatocyte Organelles in Culture

Song In Hwan, Kim Joo Yung, Sung Eon Ki, Lee Yung Chang

*Department of Anatomy, Yeungnam University  
College of Medicine  
Taegu, Korea*

To investigate recovery, growth, and activity of hepatocyte in primary culture after cell separation, the authors followed up the marker enzyme activities of golgi complex, mitochondria and biologic membrane.

Thiamine pyrophosphatase, the marker enzyme of golgi complex, activity approached the level of long term culture at 4th day. Succinate dehydrogenase, the marker enzyme of mitochondria, activity decreased with time, then it maintained constant level after 4th day. Alkaline phosphatase, the marker enzyme of biological membrane, activity increased from 3rd day, and after 5th day it showed strong reaction.

These data suggested that hepatocytes were stabilized and recovered normal activity 4 day after cell separation. but the main secretory function was speculated to be reduced in culture.