

일차배양된 인체 청신경종양의 Schwann 세포의 냉동저장과 재배양

울산대학교 의과대학 이비인후과학교실·생화학교실*
유영상·이재담*

Vital Freezing of Human Schwann Cells from Acoustic Tumor for Storage and Reculture

Young-Sang Yue, M.D., Jae-Dam Lee, M.D.*

Department of Otolaryngology · Biochemistry, College of Medicine,
University of Ulsan*

= Abstract =

The procedure to recover viable and unaltered cells from frozen culture has been established for fibroblasts and lymphocytes etc. Vital freezing of Schwann cells from human acoustic tumors to reestablish cultures for future studies would also be of great importance.

We report a technique for vital freezing of human Schwann cells from acoustic tumor which enables to be recultured after long-term storage in refrigerator of -138°C and evaluate cellular morphology, antigenic characteristic against S-100 protein and replicative properties of Schwann cells on the bovine pituitary extract.

KEY WORDS : Acoustic tumor · Schwann cell · Vital freezing · Reculture.

서 론

법을 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

일차배양된 세포의 냉동보관후 세포 특성을 변화시키지 않고 재배양 하는 것을 체계적이고 지속적인 연구수행을 위해서 매우 중요하다. 이러한 냉동보존 및 재배양법은 fibroblast, 임파구, 심근세포, 근육세포 및 신경세포 등에서 확립되어 있으나 인체 청신경종양의 Schwann 세포에서는 확립되어 있지 못하다.

저자들은 인체 청신경종양의 발생기전을 연구하기 위한 기초단계의 하나로 일차배양된 청신경종양의 Schwann 세포를 냉동보관 후 재배양하여 형태학적인 검사 및 생물학적인 검사를 실시하였다. 냉동보존방법과 재배양방

재료 및 방법

세포의 일차배양 청신경종양으로 진단된 환자에서 수술시 채취한 종양조직을 $100\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin, $100\mu\text{g/ml}$ 의 penicillin과 $0.25\mu\text{g/ml}$ 의 fungizone이 들어있는 phosphate buffered saline(PBS)에 담구어 무균조작하에 약 2mm^3 의 크기로 잘게 썬 다음 PBS(4°C , PH 7.2)로 2~3회 원심분리(900g, 5분) 세척후 침전물을 15% fetal calf serum(FCS), 25mM HE-PES, $1.25\mu\text{g/ml}$ 의 dispase(Boehringer 165~

859), 0.05% collagenase(Worthington 4196)와 0.1% hyaluronidase(Sigma H-3884)가 들어있는 RPMI1640(GIBCO) 배양액 약 4~5ml에 넣고 pasteur pipet으로 격렬하게 피펫한 후 하루밤동안 37°C, 5% CO₂의 humidified incubator에 둔다. 다음날 실온에서 원심분리 세척후 15% FCS와 항생제 및 항진균제가 들어있는 RPMI1640 배양액으로 교체한후 10µg/ml의 D-poly-L-lycin (Sigma P-1274)이 발려있는 glass coverslip과 배양 flask(Falcon)에 분주한후 37°C, 5% CO₂의 incubator속에서 배양한다. 24시간후 배양액을 교환하고 이후 배양 상태에 따라 2~4일마다 배양액을 교환한다. Glass coverslip은 S-100 protine에 대한 면역화학검사를 실시하였으며 배양 flask내의 세포는 confluent 해지면 계대배양 후 냉동보관한다.

냉동보관

배양용기내의 세포를 trypsin/EDTA용액으로 분리후 PBS(4°C, PH 7.2)용액으로 수회 원심분리 세척후 침전물에 10% DMSO, 20% FCS가 있는 RPMI1640 배양액을 3cc 넣고 2개의 cryovial 용기에 넣고 단계적으로 얼린다음 -138°C 냉동고에 보관한다.

재 배 양

냉동보관된 세포는 냉동고로부터 37°C 수조로 가능한 빨리 옮겨와서 녹인 후 RPMI1640 배양액(4°C)으로 수회 원심분리 세척후 10% FCS의 RPMI1640 배양액에 침전물을 넣고 배양 flask와 glass coverslip에 분주후 CO₂ incubator에서 배양한다.

세포면역화학검사 및 세포증식성 검사

세포면역화학검사는 rabbit anti human S-100 antibody를 이용하여 간접면역형광법으로 검사하였으며 세포증식성은 재배양된 Schwann 세포를 24well plate에 well당 2×10⁴개의 세포를 분주후 본원부설 연구소에서 Brookes 법¹⁾으로 만든 bovine pituitary extract를 10µg/ml, 100µg/ml의 농도로 첨가한 후 ³H thymidine uptake를 측정하였다. 나머지 세포는 4회

계대배양후 스스로 성장을 멈추었다.

결 과

청신경종양환자로부터 적출된 종양 조직의 일차배양세포(Fig 1, 2)와 3개월간 냉동보관후 재배양된 세포(Fig 3)는 형태학적인 특징과 세포면역화학적 특징을 유지하였다. 재배양된 4회 계대배양된 세포에서도 S-100 protein을 발현함을 알 수 있었다. Bovine pituitary ext-

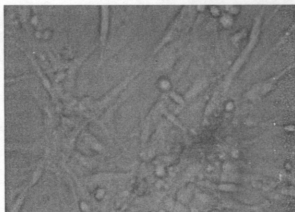


Fig. 1 Phase-contrast micrograph of primary Schwann cells from acoustic neuroma culture showing cluster of bipolar Schwann cells (x250)



Fig. 2 Immunofluorescent staining with the anti S-100 protein antibody of primary Schwann cells showing strong cytoplasmic and nuclear staining (x 250)

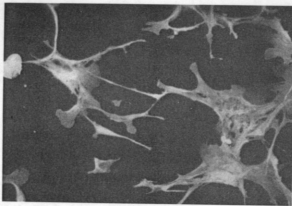


Fig. 3 Immunofluorescent staining with the anti S-100 protein antibody of recultured Schwann cells which preserve the antigenic characteristic of Schwann cells (x250)

라를 이용한 세포증식성 검사에서도 재배양 후 4회 계대배양된 세포에서 10 μ g/ml에서 170% 100 μ g/ml에서 300%의 세포증식을 보였다 (Fig 4).

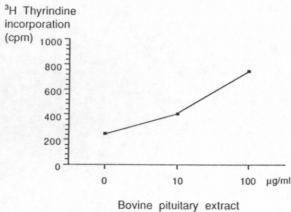


Fig. 4 DNA synthesis in recultured Schwann cells from human acoustic tumor in the presence of bovine pituitary extract

고찰

세포배양법을 이용한 연구는 주위의 환경요인과 생체내의 여러가지 요인을 배제한 생체내에서 세포 생물학적 연구를 할 수 있어 교란변수를 통제할 수 있는 장점을 가지고 있어 의학분야의 연구에 널리 이용되고 있다. 그러

나 세포배양을 시작하면 계속 계대배양을 하여야하므로 적절한 연구과제가 없으면 세포배양을 중단해야만 했다. 따라서 특정 세포에 따라 지속적이고 효과적인 연구를 위하여 일차배양세포의 냉동보관법과 재배양법이 개발되었으며 fibroblasts(Taylor et al, 1978)¹⁰⁾, 입과구(Pegg, 1976)⁶⁾, 심근세포(Kasten & Yip, 1970)⁴⁾, 근육세포(Carter & Askanas, 1981; Liveson et al, 1975)^{3,5)} 및 신경세포(Silani et al, 1986)⁹⁾등에서 냉동보관 및 재배양법이 보고되어 있다.

청신경종양으로부터의 조직배양은 대개 Scarpini법²⁸⁾을 이용한다. 이것은 화학적 세포분리뿐 아니라 물리적 세포분리를 병행하여 성숙세포 주위에 있을 수 있는 많은 결체조직과 myelin을 분리해 내기 위한 것이다. 세포면역화학적 검사는 Schwann 세포에 있는 항원인 S-100, Laminin등에 대한 항원항체반응을 보는 경우가 많으나 S-100에 대한 반응이 장기간 배양후에도 Schwann 세포에 나타나며 axon의 접촉이 없고 myelin 생성이 없는 경우에도 나타나는 이점을 가지고 있다⁷⁾. Fibroblast를 감별하기 위해서 fibronectin에 대한 반응을 보아 Schwann 세포임을 증명하기도 하나 본 연구에서는 시행하지 않았다.

재배양후의 세포는 형태학적, 생물학적 특성의 변화가 없어야 일차배양후의 세포와 동등한 실험이 가능하다¹¹⁾. 본 실험에서는 이들 특성 변화를 알아보기 위해 S-100 항원의 모든 유무와 세포배양시 배양촉진제로 보편적으로 쓰이는 bovine pituitary extract에 대한 증식효과를 관찰한 결과 형태학적, 생물학적 특성의 보존을 입증할 수 있었다. 그러나 형태적으로는 재배양시 초기의 방사형 모양이 약간 변형됨을 볼 수 있었는데 S-100 항원을 그대로 보존하는 것으로 보아 fibroblast가 아님을 알 수 있다.

냉동보관법은 액체질소를 이용하여 -170 $^{\circ}$ C의 냉동보관을 하는 것이 보통이나 냉동고를 이용하여도 무관하다고 한다⁶⁾. 단 가능하면 -170 $^{\circ}$ C에 가깝게 온도를 유지할 수 있는 냉동고여야 한다. 청신경종양조직으로 즉시 실험이 불가능할때 혹은 체계적이고 경제적인 연구를

위해서 일차배양세포의 냉동보존은 유용한 방법이 되리라고 생각한다. 말초신경계의 여러가지 질병의 비교연구에도 도움을 줄 수 있는 방법이라고 생각된다.

결 론

- 1) 인체척신경종양의 Schwann세포는 일차배양후 냉동보관후 재배양하여도 형태학적 특성과 생물학적 특성을 유지한다.
- 2) 재배양후 4회이상 계대배양은 성공하지 못하였으며 실험에 사용되는 것은 계대배양 4회이내의 것이 좋다.
- 3) Bovine pituitary extract에 의한 인체척신경종양세포의 증식 효과는 유지되어 있다.

References

- 1) Brockes JP, Fields KL, Reff MC : Studies on cultured rat Schwann cells I, Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. Brain Res 165 : 105~118, 1979
- 2) Scarpini E, Kreider BQ, Lisak RP et al : Establishment of Schwann cell cultures from adult rat peripheral nerves. Exp Neurol 102 : 167~176, 1988
- 3) Carter LS, Askanas V : Vital-freezing of human muscle cultures for storage and reculture. Muscle and Nerve 4 : 367~369, 1981
- 4) Kasten H, Yip D : Reanimation of cultured mammalian myocardial cells during multiple cycles of trypsination-freezing-thawing. In vitro 1 : 246~252, 1974
- 5) Liveson JA, Peterson ER, Crain SM et al : Regeneration in vitro of previously frozen adult mouse and human striated muscle coupled with fetal spinal cord. Exp Neurol 48 : 624~636, 1975
- 6) Pegg E : Long-term preservation of cells and tissues : a review. J Clin Pathol 29 : 276~285, 1976
- 7) Scarpini E, Meola G, Baron PL et al : S-100 protein and laminin : immunocytochemical markers for human Schwann cells in vitro. Exp Neurol 93 : 77~83, 1986
- 8) Scarpini E, Kreider BQ, Lisak RP et al : Cultures of human Schwann cells isolated from fetal nerves. Brain Res 440 : 261~266, 1988
- 9) Silani V, Pizzuti A, Redaelli LM et al : Human neuronal tissue cryopreservation. Neurology 36(Suppl 1) : 261, 1986
- 10) Taylor HA, Riley SE, Parks SE et al : Long-term storage of tissue samples for cell culture. In vitro 14 : 476~478, 1978
- 11) Yong VW, Kim SU, Pleasure DE : Growth factors for fetal and adult human astrocytes in culture. Brain Res 444 : 59~66, 1988