

## 생쥐 Leydig 세포 공배양에 의한 Sertoli 세포 밀착결합의 변화

최진국, 계명찬  
경기대학교 생물학과

### 서론

밀착결합 (tight junction, TJ)은 다양한 상피조직 및 내피세포에서 다른 종류의 세포간 결합장치 및 세포간 부착분자들과 함께 발견되어 세포간격을 통한 수분, 이온, 생물학적 분자, 및 면역세포의 확산 및 자유로운 이동을 제한하는 투과장벽 (permeability barrier) 및 세포막에 존재하는 단백질 입자의 자유로운 이동을 제한하는 울타리 (fence)로서 기능한다. 인접 Sertoli 세포 사이에 형성되는 밀착결합은 혈액-정소 장벽 (blood-testis barrier, BTB)을 형성하여 혈액으로부터 세정관 내부로 물질 및 면역세포 등의 자유로운 이동을 제한하여 세정관 내부의 독특한 환경을 조성하며 BTB의 이상은 남성불임의 원인 가운데 하나로 정자형성 및 남성불임 연구분야에서 중요한 주제이다. 본 연구에서는 Sertoli 세포 사이에 형성되는 BTB의 기능조절에 관여하는 Leydig 세포의 역할을 조사하고자 생쥐의 Sertoli 세포 단층배양체를 Leydig 세포와 공배양하면서 밀착결합 유전자인 claudin-1 및 claudin-11 발현의 변화 및 상피투과저항 (transepithelial resistance, TER)의 변화를 추적하였다.

### 재료 및 방법

ICR계의 생 후 3주된 수컷 생쥐로부터 정소의 간층조직으로부터 Leydig 세포를 분리한 후 culture dish에 배양하였다. 세정관 덩어리로부터 Sertoli 세포를 분리하여 1차 배양한 후 저장액 처리를 통해 생식세포들을 제거한 후 1회 계대배양하였다. Cell culture plate insert에 접종한 후 monolayer를 형성하였다. Bottom well에 Leydig 세포를 배양한 상태 및 단순히 배양액 만을 첨가한 상태에서 세포 culture plate insert 위에 형성된 Sertoli 세포 monolayer를 위치하고 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 RNA를 추출하여 semiquantitative RT-PCR 방법으로 claudin-1 및 claudin-11의 발현을 조사하였다. 한편 배양을 진행하는 동안 12시간 간격으로 밀착결합의 기능변화를 조사하기 위해 TER을 측정하였다. 이를 위해 2개의 은전극 시스템을 이용한 conductivity meter를 이용하여 TER을 측정하였다. 측정에 앞서 배양액의 TER 값을 0으로 조정한 후 시료의 TER을 측정하였다. 세포를 배양하지 않은 insert 만의 TER 값을 blank 값으로 하고 시료의 TER 측정 전 후로 blank를 측정하여 그 평균값을 시료의 측정 값에서 제한 값을 TER로 산출하였다. 공배양 시작 시점의 TER 값을 측정하고 24시간 간격으로 TER 값을 측정하여 TER의 순변화 (net change in TER)를 산출하였다. 4회 이상의 TER 값의 평균값의 통계학적 유의성은 Student's *t*-test로 검증하였다.

### 결과 및 고찰

Leydig 세포와의 공배양 한 Sertoli cell에서 claudin-11의 발현이 유의하게 증가하였다. claudin-1의 발현에는 유의한 차이가 없었다. TER 값은 Leydig 세포와의 공배양 유무에 관계없이 세포 culture plate 내에 Sertoli 세포 배양이 진행됨에 따라 24시간 까지 급격히 증가하였고 이후 48시간까지는 서서히 증가 또는 유지되었다. 이는 배양에 따라 Sertoli 세포 수의 증가 및 분화에 따른 세포간 밀착결합의 강화의 결과로 추측된다. Chung과 Cheng이 rat Sertoli 세포를 이용한 실험에서도 이와 같은 결과가 확인되었다. 배양 시작 시점의 TER 값을 기준으로 한 TER 값의 변화량 (net changes in TER)은 배양시작 24시간 후에는 공배양군에서 약간 높았으나 유의하지 않았고, 48시간 후에는 공배양군에서 대조군 보다 유의하게 높았다. 이로부터 Leydig 세포에서 기원된 확산 가능한 인자가 Sertoli 세포 사이의 밀착결합의 발현 및 기능을 증가시켰을 것으로 추측된다. 이와 유사하게 뇌조직의 내피 세포에서 밀착결합 유전자발현 및 TER이 astrocyte에서 분비되는 인자들에 의해 영향을 받는 것으로 보고되었다. 현재까지 다양한 조직에서 성장인자, 사이토카인, 세포외기질 등 다양한 생물학적 활성 분자들이 밀착결합 유전자발현 및 투과장벽 기능의 조절에 관여하는 것으로 보고되었다. Leydig 세포는

LH의 자극을 받아 testosterone을 생성하므로 Leydig 세포와의 공배양 효과가 Leydig 세포 기원의 steroid에 의해 매개되었을 가능성이 있다. 그러나 steroid 이외에 성장인자 또는 사이토카인 등에 의해 매개되는 Leydig 세포와 Sertoli 세포 상호작용에 의한 밀착결합의 조절 가능성을 배제할 수는 없을 것이다. 결론적으로 Leydig 세포와 Sertoli 세포 사이의 상호작용은 Sertoli 세포에서 발현되는 밀착결합의 구조와 기능의 중요한 요인으로 사료된다.