

미성숙 돼지 정조세포 배양에 미치는 배양액, 배양온도 및 공배양 효과

김현종[†] · 조상래 · 최선호 · 한만희 · 손동수 · 류일선 · 김인철 · 이장희 · 김일화¹ · 임경순²
축산연구소 가축유전자원시험장

Effects of Culture Medium, Temperature and Coculture on Culture of Immature Porcine Spermatogonia Cells

H. J. Kim[†], S. R. Cho, S. H. Choi, M. H. Han, D. S. Son, I. S. Ryu, I. C. Kim,
J. H. Lee, I. H. Kim¹ and K. S. Im²
National Livestock Research Institute

SUMMARY

This study was carried out for development of effective preservation on animal genetic resources. Spermatogonia cells are the germline stem cells and they can be restored to adult animal with proliferation and differentiation intentionally. When the spermatogonia cells were purified from seminiferous tubules and were cultured at 32°C, the cells were actively proliferated. The culture medium consisted of TCM199 plus 10% FCS and coculture with Sertoli cells supported cultivation of spermatogonia cells. By passing 40 days of incubation, spermatogonia cells formed the germline colony or shape of ES-like colony or reconstruction of pseudo-seminiferous tubule shape. At 40 days, the cultured cells were no sign for differentiation to spermatocyte or spermatid. The experiment of induced differentiation of this cells is needed.

(Key words : spermatogonia, coculture, medium, temperature, porcine)

서 론

최근 생식줄기세포 연구 분야에서 복제 수정란에서 유래한 인간 배아 줄기세포 (Whang 등, 2004), 다능성인 배아 줄기세포를 전능성인 생식세포로 분화 (Hubner 등, 2003; Toyooka 등, 2003; Geijsen 등, 2004) 등 괄목할만한 성과들이 나오고 있는데, 웅성 연구분야 중 정조세포 체양배양과 이식에서도 큰 연구 성과가 이루어지고 있다(Brinster와 Zimmermann, 1994; Tesarik 등, 1999; Brinster,

2002). 자연적인 생식줄기세포인 정조세포는 체내에서 정모세포, 정자세포, 정자로 지속적인 분화가 일어나는 특징을 가지고 있다. 체외에서 배양한 정조세포를 체내로 이식하면 정상적으로 조정 기능을 수행하는데, 이러한 정조세포를 줄기세포 특징을 이용하여 유전자원 보존 및 복원에 활용할 수 있다면 기존의 동물유전자원 보존방법보다 효율적일 것이다.

일본 Kanatsu-Shinohara 연구팀(2004)에 의해 생쥐 정조세포를 90일 이상 장기간 배양하여 유사배

¹ 충북대학교 수의학과(Chungbuk National University)

² 서울대학교 동물자원학과(Seoul National University)

[†] Correspondence : E-mail ; hyunjong@rda.go.kr

아줄기세포 (ES-like cell line)의 형성을 보고하였으며, 이들 세포들을 분화 처리하여 혈액, 심장근육, 신경 등 다양한 분화를 확인하였다. 외형상으로는 배아 줄기세포와 흡사하나 배아 줄기세포는 수정란에서 유래하여 윤리적 문제가 발생되지만, 유일한 자연적 생식 줄기세포인 정조세포에서 유래한 유사 배아 줄기세포는 이러한 문제가 유발되지 않는 장점이 있다.

미국 펜실바니아대 연구팀(2002)은 정소조직을 면역 결핍 생쥐의 등에 이식하여 운동성 있는 정자생성을 보고했으며, Hong 등 (2004)에 의해 송사리의 정조세포를 2년간 배양하여 cell line화 한 후 필요에 따라 체외에서 감수분열과 정자 형성과정을 유기하여 운동성 정자를 생성한다는 보고도 있었다. 그러나 포유동물에서 감수분열을 포함한 체내에서 일어나는 정자 생성과정의 체외에서 완전한 재현은 아직까지 모호한 상태이다. 포유동물의 체외 정자 생산과정이 밝혀진다면 (1) 유전자원 보존방법으로 활용뿐만 아니라 (2) 조정세포 생성의 기작 이해 (3) 웅성 생식세포의 직접적인 유전자 변형 (4) 웅성요인에 따른 불임의 처치 등에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. 정소의 준비 및 정조세포 분리

생후 1~2주 된 돼지의 정소를 분리하여, 백막을 제거하고 정소실질을 세분하여, 세분된 정소실질을 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS (Gibco, USA)에 0.8mg/ml 농도의 collagenase (Gibco, USA), 0.01mg/ml DNase (Sigma, USA), 1 μ g/ml trypsin inhibitor (Sigma, USA)가 첨가된 배양액에서 shaking water bath로 1시간 교반하였다. 효소에 의해 분해된 정관들을 3번 세척한 후 0.5mg/ml trypsin (Sigma, USA)이 첨가된 배양액으로 5분간 추가 교반한 후, 0.1mg/ml trypsin inhibitor와 0.2mg/ml DNase를 첨가한 다음 40 μ m Nylon mesh를 통과시켜 세포들을 더욱 분리한 후 신선한 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS로 교체하였다. 분리된 세포들을 Percoll (Sigma, USA)을 이용하여 20%와 40% 두 개 층으로 불연속 밀도 구배를 만들어 원심분리 후 20%와 40% 연접한 층

에서 세포들을 회수하였다. 회수된 세포들을 32 $^{\circ}$ C 가슴배양기에 60mm dish (Falcon, USA) 12시간 배양하여, 바닥에 부착된 세포들이 회수되지 않게 주의하여 상층을 분리하여 원심분리한 후 정조세포들을 회수하였다.

2. 정조세포의 배양

분리된 정조세포들을 2,000cells/cm²의 농도로 TCM199 (Gibco, USA)에 10% 소 태아 혈청을 첨가하여 배양하거나, Ham's F-10 (Gibco, USA)에 10% 소 태아 혈청을 첨가하여 32 $^{\circ}$ C와 38.5 $^{\circ}$ C 가슴배양기에서 각각 배양하였다. 배양 직후, 1일, 2일, 3일, 5일까지 배양하며 세포 증식 정도와 세포 형태 변화를 관찰하였다.

3. 세르틀리 세포와의 공배양

정조세포와 분리된 세포들을 회수하여 1 \times 10⁵ cells/cm² 농도로 4 well dish에 배양한 후, 정조세포들을 추가하여 공배양하였다.

4. 결과 분석

세포증식 정도를 결정하기 위하여 배양세포들을 5군데 영상 캡처해서 cells/cm²로 환산하여 결정하였다.

결과 및 고찰

1. 돼지 정조세포 배양에서 배양온도와 배양액이 미치는 영향

분리된 돼지 정조세포들을 배양액 TCM199와 Ham's F-10과 배양온도 32 $^{\circ}$ C와 38.5 $^{\circ}$ C로 나누어서 배양한 결과는 Table 1과 같다. 처음 파종하였을 때 정조세포수는 각 처리별로 2,000cells/cm²이었으나, 배양 1일, 2일, 3일, 5일부터 처리별로 분열속도가 달랐다. 32 $^{\circ}$ C로 배양했을 때가 분열속도가 빨랐으며, Ham's F-10보다 TCM199로 배양하였을 때 분열속도가 더욱 빨랐다. 배양 5일째에는 정조세포수가 32 $^{\circ}$ C 배양조건에서 TCM199로 배양했을 때 14,000 cells/cm²로 증식되었다. Fig. 1은 배양 5일째 처리별로 정조세포들이 분열되는 양상의 사진들이다. 정조세포들이 포도상을 형성하며 증식

Table 1. Effects of culture temperature and medium on culture of spermatogonia cells (cells/cm²)

Culture temperature	Medium	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 5
32°C	TCM199	2,000	3,200	5,700	8,700	14,000
	Ham's F-10	2,000	3,000	4,200	6,500	8,600
38.5°C	TCM199	2,000	2,500	2,800	4,200	5,700
	Ham's F-10	2,000	2,400	2,700	4,100	5,200

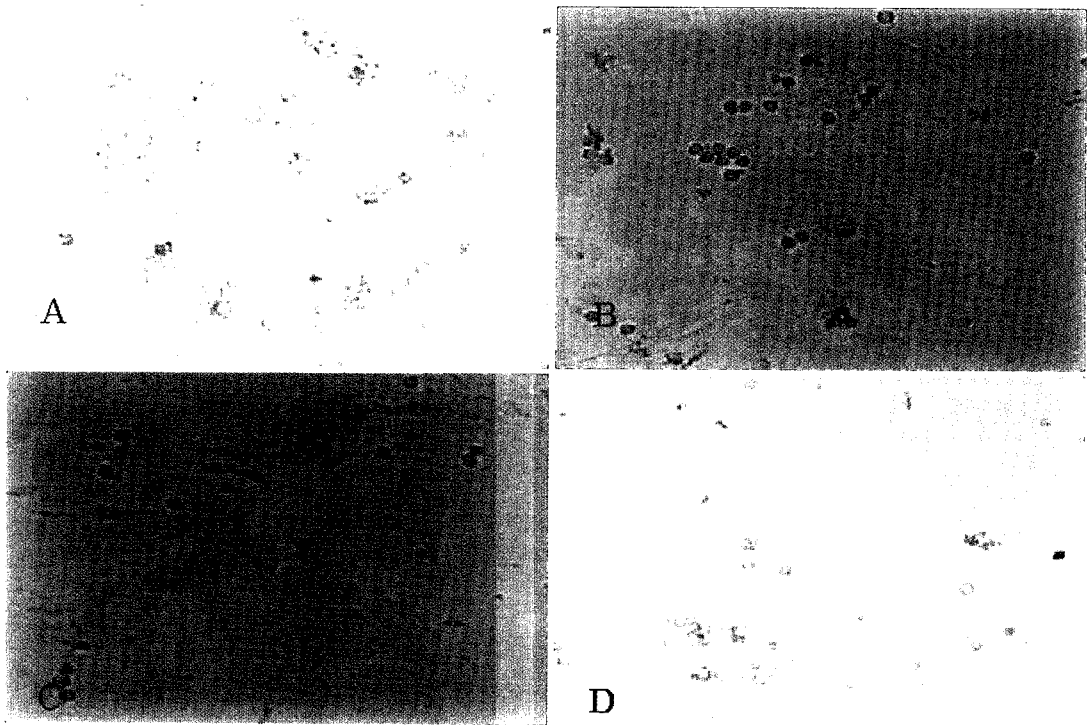


Fig. 1. Spermatogonia cells cultured in TCM199 or Ham's F-10 medium with 32 or 38.5°C for 5 days. A; Cells cultured in TCM199 with 32°C, B; Cells cultured in Ham's F-10 with 32°C, C; Cells cultured in TCM199 with 38.5°C, D; Cells cultured in Ham's F-10 with 38.5°C. (100×).

되는 정도들이 달랐다.

일반 세포들은 37~39°C에서 정상적으로 배양 되는 것과는 달리 조정 관련 세포들은 32°C에서 배양이 더욱 잘 되는 것은 정소가 복강 외부에 저온상태로 유지되는 것과 관련이 있는 것으로 생각 된다. 배양액에 따른 차이는 정확하게 알 수는 없으나, TCM199에서 세포 증식율이 높게 나타난 원인은 추후 더욱 규정되어야 할 것이다. Izadyar 등 (2003)은 소에서 type A 정조세포를 2~4주간 배양

하여 콜로니를 형성하였는데 일부 콜로니는 c-kit에 양성으로 형태학적으로나 분자생물학적 특성으로 볼 때 정모세포와 정자세포로 추정되었으며, 일부 크고 둥근 콜로니는 c-kit 음성으로 정조 줄기세포로 추정된다고 보고하였다. 이들은 배양온도를 32°C와 37°C에서 배양했을 때 37°C에서 세포 증식율이 높았다고 하여 본 실험의 결과와는 달랐다. 이는 축종에 따른 차이나 37와 38.5°C의 차이일 수 있을 것이다. 배양액은 MEM과 KSOM을 비교하

여 MEM이 더 나은 결과를 보였다고 보고하였다.

2. 돼지 정조세포 배양에서 공배양의 효과

분리된 돼지 정조세포들을 배양온도 32°C로 TCM199에서 세르톨리 세포들과 공배양하여 세포 증식 정도를 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 처음 파종하였을 때 정조 세포수는 처리별로 2,000cells/cm²이었으나, 배양 1일, 2일, 3일, 5일 처리별로 분열속도가 달라졌으며(Fig. 2), 배양 40일째에는 공배양 처리에서만 줄기세포 같은 콜로니나 세정관 형태를 만들었다. 한편 정조세포만 배양된 구에서

는 세포 파괴현상이 나타났으며, 세르톨리 세포 배양만 배양된 처리에서는 세포 탈락 현상이 일어났다(Fig. 3).

세르톨리 세포와 공배양한 처리에서 월등히 높은 분열효율을 보였는데, 세르톨리 세포에서 분비되는 인자 혹은 상호 접촉 자극으로 이러한 증진 효율을 보인 것으로 사료되며, 40일간 배양한 후에는 공배양된 처리에서 콜로니를 형성하며, 세포구를 만들었다. 형성된 세포구가 배아 줄기세포를 배양했을 때 형성되는 ES cells와 형태상으로는 유사하나 그 특성은 확인되지 않았다. Kanatsu-Shinohara

Table 2. Effect of coculture with Sertoli cells on culture of spermatogonia cells (cells/cm²)

Coculture	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 5
-	2,000	3,200	5,700	8,700	14,000
+	2,000	4,000	8,000	25,000	40,000

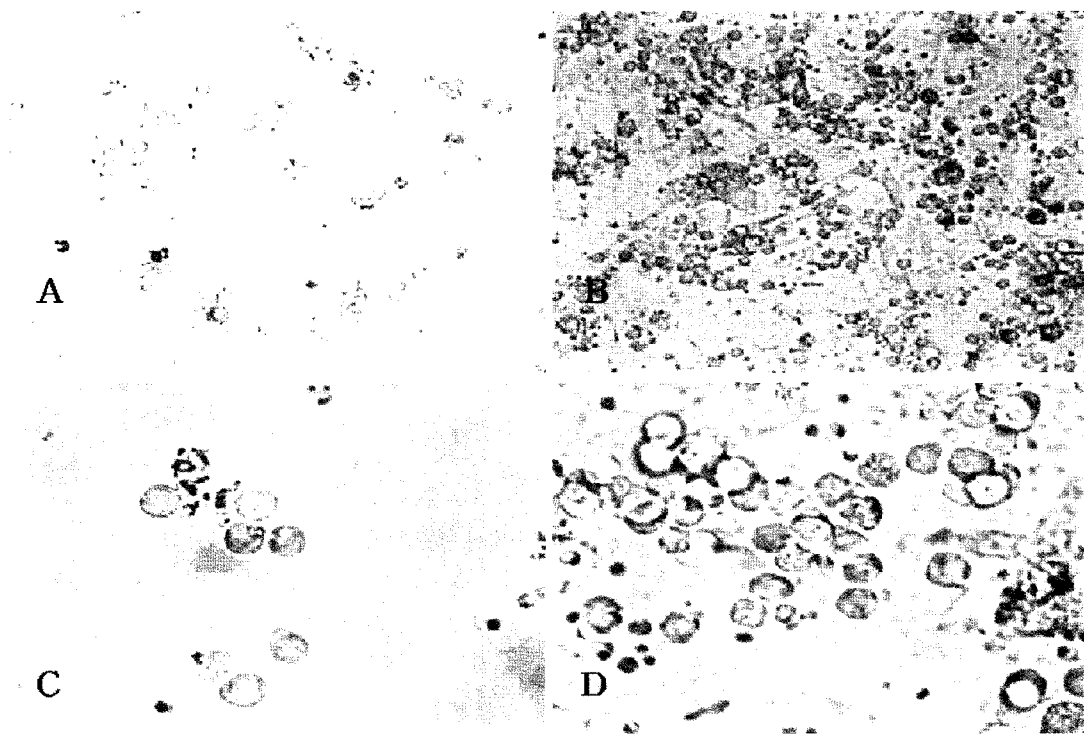


Fig. 2. Spermatogonia cells cultured with or without Sertoli cells for 5 days. A; Cultured spermatogonia cells without Sertoli cells, B; Cultured spermatogonia cells with Sertoli cells (100×), C; Cultured spermatogonia cells without Sertoli cells, D; Cultured spermatogonia cells with Sertoli cells (300×).

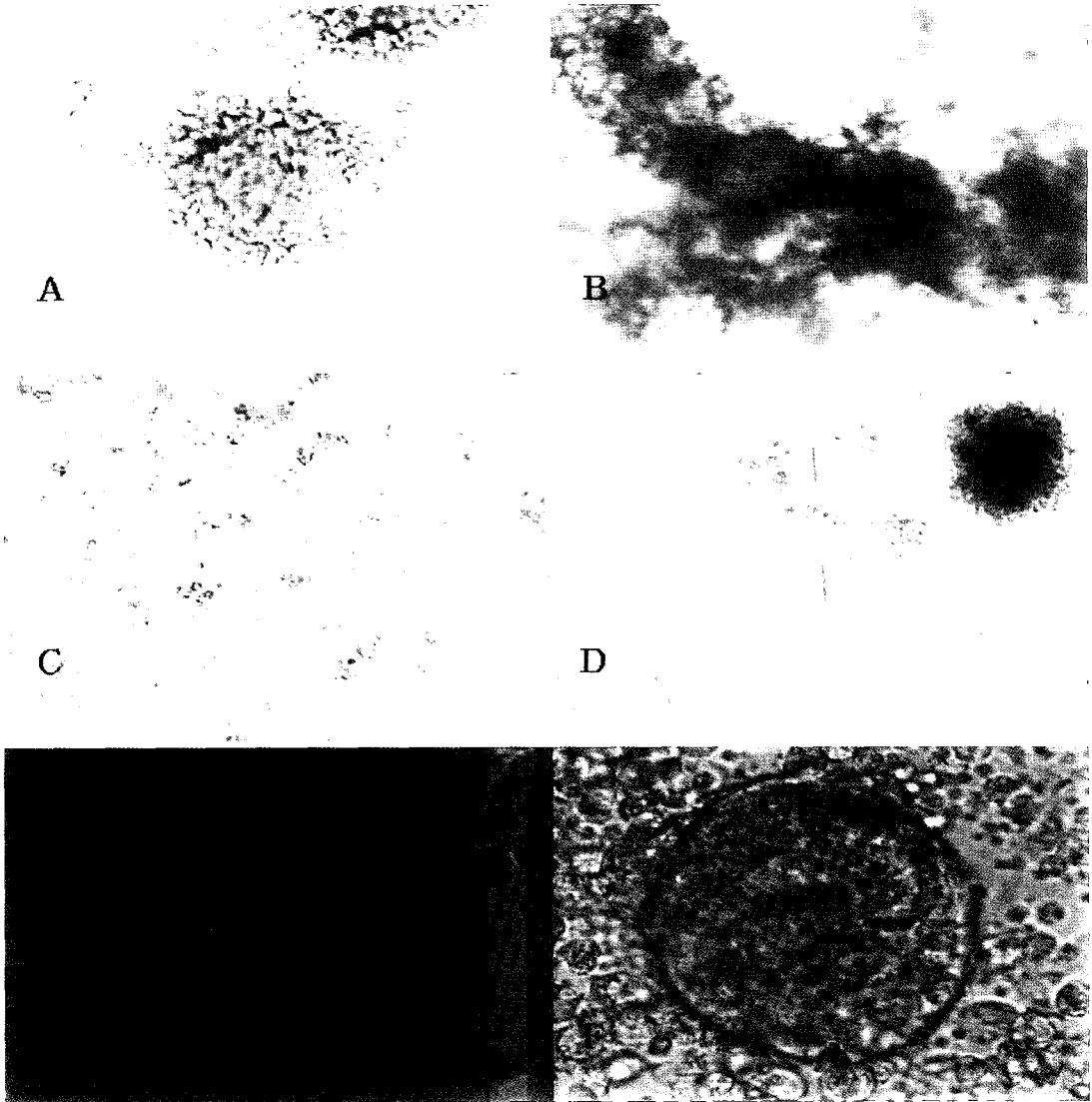


Fig. 3. Spermatogonia cells cultured with or without Sertoli cells for 40 days. A; Cultured spermatogonia cell colony on Sertoli cell monolayer, B; Cultured spermatogonia cell cluster like seminiferous tubule on Sertoli cell monolayer, C; Degenerating spermatogonia cells without Sertoli cells, D; Detached Sertoli cell monolayer cultured without spermatogonia cells (100 \times), E; A colony of germline stem (GS) cells, F; A colony of ES-like cells (300 \times).

등 (2004)은 이러한 germline stem (GS) cells을 세 정관에 이식하면 정조세포의 특성들을 가지고 정상적인 조절기능을 수행하나, ES-like cells는 ES cells처럼 teratomas를 형성한다고 보고하였다. 초기 연구들을 보면 체외에서 생식세포들이 생존하기 위해서는 생식세포-세르톨리 세포간의 관련이 중요함

을 보여주었다 (Orth와 Boehm, 1990). Marret과 Durand (2000)은 정조세포와 세르톨리 세포와 공배양 효과를 검토한 결과 세포간 전달과 세포외부 기반이 정조세포의 증식에 중요하였으며, 소태아 혈청의 첨가가 체외조건에서 정조세포의 생존을 증진시켰다고 보고하였다. 그러나 최근 공배양을

하지 않고 혈청을 첨가하지 않으면 세포 증식은 이루어지지 않았으나 정조세포의 특성은 유지하여 장기간 배양될 수 있음이 보고되기도 하였다 (Kanatsu-Shinohara 등, 2004).

본 실험의 조건에서는 정조세포의 증식에 세르톨리 세포와의 공배양 자극이 필수적이라는 것을 보여주며, 40일간 배양한 상태에서 ES-like cells의 형성이나 세정관 형태로 재구성은 일어나나, 정조세포의 이후 분화단계인 정모세포나 정자세포, 정자로 분화되는 특별한 징후는 보이지 않았다.

적 요

본 연구는 가축유전자원의 효율적 보존을 위해 정조세포를 줄기세포 형태로 장기보관하면서 필요에 따라 증식, 분화를 통해 가축의 복원에 활용하기 위한 연구의 일부로 진행되었다. 정조세포를 분리하여 배양한 결과 배양온도는 다른 세포들과는 달리 32℃에 세포분열이 활발하였으며, TCM199에 10% FCS를 첨가한 배양액과 세르톨리세포 공배양으로 정조세포의 배양을 지지하였다. 40일령이 지나면서 정조세포 콜로니 즉 germline stem cells를 형성하였으며, 일부에서는 외형상 ES-like cells를 형성하거나, 세정관 형태로 정조세포들이 재구성되었다. 40일령까지 배양한 상태에서는 정조세포의 정모세포나 정자세포로 분화하는 징후를 관찰할 수 없었으며, 추후 이들 세포로 분화를 유지하는 실험이 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

- Brinster RL. 2002. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*, 296:2174-2176.
- Brinster RL and Zimmermann JW. 1994. Spermatogenesis following male germ cell transplantation. *PNAS*, 91:11298-11302.
- Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K and Daley GQ. 2004. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, 427:148-154.
- Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Scholer H, Dobrinski I and Schlatt S. 2002. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*, 418:778-781.
- Hong Y, Liu T, Zhao H, Xu H, Wang W, Liu R, Chen T, Deng J and Gui J. 2004. Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*. *PNAS*, 101:8011-8016.
- Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli J and Moon SY. 2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, 303:1669-1674.
- Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, de la Fuente R, Wood J, Strauss JF III, Boiani M and Scholer HR. 2003. Derivation of oocytes from embryonic stem cells. *Science*, 300:1251-1256.
- Izadyar F, Ouden K, Creemers L, Posthuma G, Parvinen M and Rooij D. 2003. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol. Reprod.*, 68:272-281.
- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A and Shinohara T. 2004. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 119:1001-1012.
- Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A and Shinohara T. 2004. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biol. Reprod.*, 69:612-616.
- Marret C and Durand P. 2000. Culture of porcine spermatogonia: effects of purification of the germ cells, extracellular matrix and fetal calf serum on their survival and multiplication. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40:305-319.

Orth JM and Boehm R. 1990. Functional coupling of neonatal rat Sertoli cells and gonocytes in coculture. *Endocrinology*, 127:2812-2820.

Tesarik J, Bahceci M, Ozcan C, Greco E and Mendoza C. 1999. Restoration of fertility by *in vitro* spermatogenesis. *Lancet*, 353:555-556.

Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R and Noce T. 2003. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *PNAS*, 100:11457-11462.

(접수일: 2005. 1. 15 / 채택일: 2005. 3. 12)