

배지에 따른 제브라피쉬(*Danio rerio*) 배아 유래세포의 성장 효과에 관한 연구

이기영[†] · 김종연 · 조수근

군산대학교 해양과학대학 해양생명과학부

Effect of Culture Media on Embryonic Cell Growth in Zebrafish, *Danio rerio*

Ki-Young Lee[†], Jong-Yeon Kim and Soo-Gun Jo

School of Marine Life Science, College of Ocean Science & Technology,
Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

ABSTRACT : To optimize the cell culture conditions of zebrafish embryonic cells, we compared the efficiency of three types of medium, DMEM, K-NAC and D-NAC. In this study, we showed that the cells grown in K-NAC have better plating efficiency than DMEM, especially in the case of low cell seeding density. However, cells grew slower in K-NAC than those in DMEM in confluent cultures. The effect of 0.1% zebrafish embryo extracts was minimal. The presence of 1% trout serum in culture medium significantly increased the growth rate of cells ($p<0.05$). No difference was found at $2\sim 3\times 10^5$ cell seeding density ($p<0.05$). At $4\sim 5\times 10^5$ cell seeding density, cells grew better in DMEM than K-NAC ($p<0.1$). The results suggest that supplementation of NAC and A2P in Keratinocyte SFM may improve plating efficiency when cells are plated at low population. No difference was found for cell growth in either medium with 5%, 10% or 15% FBS supplemented ($p<0.05$). Cells culture in D-NAC grew significantly better than those in DMEM ($p<0.05$). Our results clearly showed that the use of NAC and A2P in the culture medium has a positive effect on cell growth regardless of the amount of FBS added.

Key words : Zebrafish, Embryonic cell, NAC, A2P.

요 약 : 제브라피쉬 배아 유래세포의 최적 성장조건을 확립하기 위해 3종류의 배지 DMEM, K-NAC, D-NAC 그룹에서의 세포 성장률을 비교하였다. 실험 결과, 접종밀도에 따른 성장률의 경우, DMEM에 비해 K-NAC 그룹에서 초기 접종 효율이 높게 나타났으며, 후기 성장률은 DMEM 그룹에서 높게 나타났다. K-NAC, DMEM 그룹 모두 FBS 농도에 의한 성장차는 보이지 않았으며, 0.1% embryo extract를 첨가한 배지에서 효과는 낮게 나타났으나 1% trout serum 첨가한 경우 매우 높은 성장률을 보였다($p<0.05$). $2\sim 3\times 10^5$ 밀도로 접종한 그룹에서는 유의차가 없었으나, $4\sim 5\times 10^5$ 밀도에서는 DMEM 그룹이 K-NAC 그룹보다 다소 높은 성장률을 보였다($p<0.1$). DMEM과 D-NAC 그룹에서의 FBS 농도에 따른 성장률을 비교한 결과, FBS 농도에 따른 성장차는 유의하지 않았으나($p<0.05$), D-NAC의 모든 실험군이 DMEM 그룹에 비해 높은 성장률을 보였다($p<0.05$).

서 론

제브라피쉬와 같은 작은 어류는 척추동물 발생이나 독성학 분야에서 매우 인기 있는 모델 생물이다(Powers, 1989; Rossant and Hopkins, 1992). 제브라피쉬는 빠른 성장과 3개월 만에 성숙 시기, 빠른 난 발생 시간, 광주기기에 의한

산란 및 체외수정의 특성으로 모델 생물로 많이 이용되고 있는 어류이다(Streinsinger et al., 1981).

2002년 최초로 제브라피쉬(lee et al., 2002)가 복제된 이후 여러 연구자들에 의해 연구가 진행되고 있지만(Bubenshchikova et al, 2005; Di Bernardino, 2006), 이 기술은 효율이 낮은 문제점으로 인해 아직까지 응용 범위에 제한적이다. 어류의 핵치환 효율을 높이기 위해서는 세포의 재프로그래밍 등 세포의 특성을 이해하는 것이 필수적이다. 어류의 복제효율은 실험단계상 수많은 환경요인 중 대표적으로 1) 수핵란

[†] 교신저자: 전북 군산시 미룡동 산 68, 군산대학교 해양과학대학 해양생명과학부, (우) 573-301, (전) +82-63-469-1832, (팩) +82-63-469-1832, E-mail: leekiy@kunsan.ac.kr

으로 사용되어지는 미수정란의 난질 상태, 2) 공여핵원으로 사용되어지는 세포의 세포주기 및 활성상태, 3) 실험자의 물리적 정교함 등이 있지만, 이 중 공여핵원으로 사용되는 세포의 상태에 따른 요인이 크게 작용한다. 이러한 환경요소들로 인해 어류의 복제에 더 이상의 큰 기술적 진보를 보이지 못하고 있으며, 지속적인 해결책이 요구되어지고 있다.

현재까지 제브라피쉬(*Danio rerio*)의 세포배양에 관한 연구보고로는, 제브라피쉬의 배아 세포배양(Helmrich et al., 1999; Fan et al., 2004), 포배기의 배아와 성체조직으로부터의 세포의 배양(Lee et al., 2002; Colloid et al., 1992; Driever and Rangini, 1993; Ghosh and Colodi, 1994) 및 배아 유래의 세포를 이용한 생식계열 키메라(Chimeras)의 생산(Chunguang et al., 2001) 등이 보고되었다. 이들 보고는 대부분 배지 성분으로 bovine insulin, trout embryo extract, 낮은 농도의 trout serum, fetal bovine serum 등이 이용되었다. 그러나 세포의 후기 Passage에서 관찰된 세포의 느린 성장과 고배수성은 유전자 조작에서의 세포주의 성장을 저체시켰고(Lee et al., 2002) 성장 단계별 최적 배양조건에 관한 체계적인 연구 보고는 매우 미흡하다. 지금까지의 어류 세포배양은 단일 종류의 배지를 이용하여 초기배양에서 후기배양까지 이루어졌으며, 배지 조성에 따른 초기 및 후기 성장에 대한 비교 데이터가 전무하였다. 또한, 세포배양액에 첨가되는 인자들이 대부분 포유동물 세포배양에 근간을 두고 있기 때문에 낮은 세포배양 효율 등 문제점으로 지적되고 있다.

이에 본 연구는 상기한 문제점을 극복하고자 어류 세포 배양조건 최적화의 일환으로 제브라피쉬 배아 유래 세포주를 이용하여 NAC, A2P와 같은 성분들의 조성에 따른 세포의 성장단계별 능력 및 특성을 평가하였다.

재료 및 방법

본 연구는 순환여과식으로 사육하고 있는 Tubingen Line의 제브라피쉬(*Danio rerio*)를 이용하였다. 실험을 위하여 브라인슈림프(*Artemia*)와 인공사료를 공급하였고, 28°C 항온실에서 광주기(14L/10D)에 의해 산란을 유도하였다. 어미의 산란을 유도한 후 채란된 난을 말라카이트그린(malachite green)으로 일차 처리한 후 세정하여 5~20 somite 단계까지 발생시켜 세포배양 실험에 이용하였다.

본 실험에 사용한 배양액은 사용 전에 미리 조제하여 준비하여 냉장실에 보관하면서 실험에 이용하였다. 세포배양은 DMEM {15% fetal bovine serum, 1% trout serum (TS), 0.1% embryonic extracts (EE), 10 ng/mL bovine insulin이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Media}, K-NAC {5% fetal bovine serum (FBS), 1% trout serum (TS), N-acetyl-L-cysteine (NAC), L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt (A2P)가 첨가된 Keratinocyte SFM}, D-NAC {5% fetal bovine serum (FBS), 1% trout serum (TS), 0.1% embryonic extracts (EE), 10 ng/mL bovine insulin, N-acetyl-L-cysteine (NAC), L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt (A2P)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Media}의 3 종류 배양액을 이용하여 수행되었다.

세포배양은 제브라피쉬 최적 생육온도인 28.5°C와 5% CO₂ 농도 조건을 갖춘 incubator에서 수행되었으며, 다음과 같은 과정으로 세포를 확보하였다. 자연교배 후 수정된 수정란들을 세정한 다음 외형적으로 정상적인 깨끗한 수정란만을 골라서 페트리디쉬에 옮긴 후 체절단계의 배아(5~20 somite)를 확보하였다. 분리된 배아에 3 mg/mL의 Pronase (Sigma)를 첨가하여 난막(chorion)을 제거하였으며, 난막이 제거된 이들 배이를 Holtfreter's solution (3.5 g NaCl, 0.2 g NaHCO₃, 0.12 g CaCl₂ · H₂O, 0.05 g KCl, pH 6.5~7.1)으로 3차례 세척 후 항생제(100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin)가 첨가된 0.9×PBS (Sigma)를 사용하여 세척하였다. 세척된 배아에 0.04% bleach (Sigma)을 3분간 처리하였고, 이들 배아에 0.25% 트립신을 첨가한 다음 세포 분쇄 후 인큐베이터에서 10분간 방치하였다. 이들 세포를 Dulbecco's Modified Eagle Media (Gibco BRL)으로 두 차례 세척 후 각 배양액을 첨가한 다음 배양용기에 접종하여 세포배양을 실시하였다.

실험 결과의 통계 처리는 SigmaStat version 3.1 (Jandel Scientific, San Rafael, CA)를 이용하여 ANOVA-test에 의해 실시하였으며 P-value 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 세포의 접종 밀도별 DMEM과 K-NAC 그룹에서의 성장률

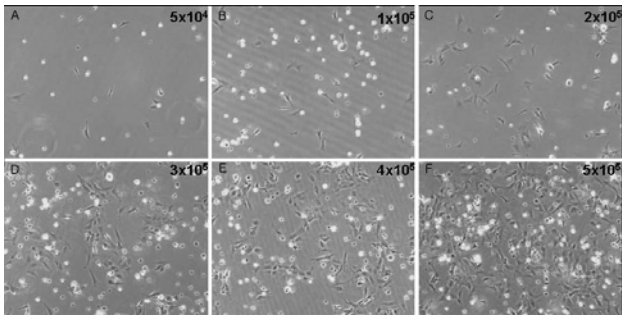


Fig. 1. Zebrafish embryonic cells at one day after plating in DMEM supplemented ($\times 100$).

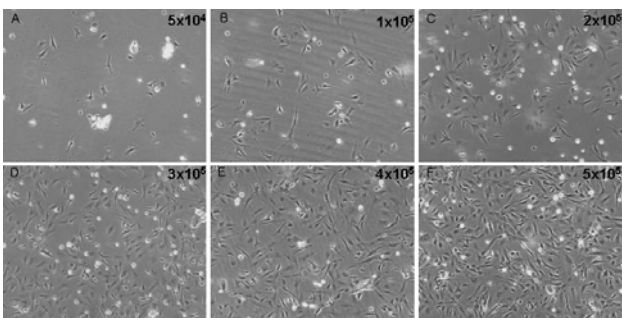


Fig. 2. Zebrafish embryonic cells at one day after plating in K-NAC supplemented ($\times 100$).

제브라피쉬의 배아(수정 후 15~25시간) 유래의 세포에 DMEM과 K-NAC 배지를 각각 첨가하여 세포배양하였으며, 첫 2주 동안은 멜라닌 색소의 침착을 억제하기 위해 25 ng/mL의 basic fibroblast growth factor (Invitrogen)을 배지에 첨가하여 수행하였다. 접종 후 24시간에 각각의 배지에서의 세포 성장 상태를 비교한 결과, 저밀도 배양에서 K-NAC 그룹에서의 접종 효율이 DMEM 그룹보다 더 높게 나타났으며, 특히 낮은 접종 밀도에서 효율이 높은 것으로 나타났다 (Fig. 1, 2).

그러나 접종 후 4일째, K-NAC의 경우 세포가 고밀도에 도달하는 시점에서 DMEM보다 더딘 성장을 보였다(Fig. 3). 0.5×10^4 ($p=0.003$)과 1×10^5 ($p=0.007$)의 저밀도에서의 세포 성장률은 DMEM보다 1%의 TS가 첨가된 K-NAC에서 더 높게 나타났다. $2 \sim 3 \times 10^5$ 의 세포밀도에서는 DMEM과 K-NAC의 차이점이 거의 없었으며($p < 0.05$), $4 \sim 5 \times 10^5$ 세포밀도에서 K-NAC보다 DMEM에서의 세포 성장률이 더 높았다($p < 0.1$).

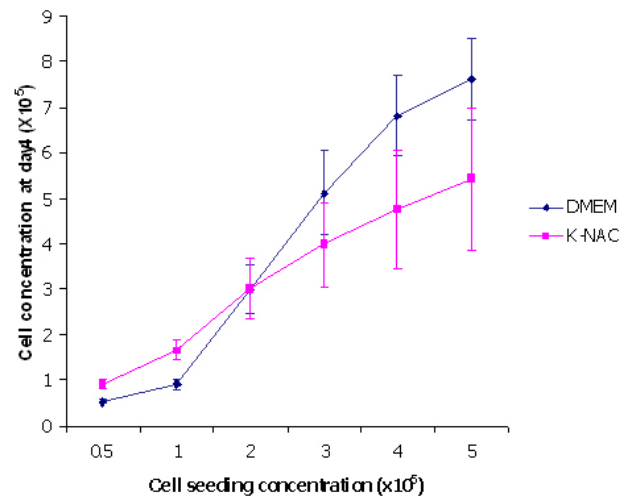


Fig. 3. Comparison of cell performance in DMEM supplemented and K-NAC supplemented. Cell concentration varied from 0.5 to 5×10^5 cells/ 3.8 cm^2 was propagated in both media. Number of cells were counted at day 7 after plating (error bar=standard deviation).

2. FBS 농도별 DMEM 그룹에서의 1%의 TS, 0.1%의 EE 그리고 1% TS와 0.1% EE의 혼합 배양시 세포의 성장률 접종 후 7일째 각각의 배지에서의 세포 성장을 확인하였다. 실험결과, 5% FBS 그룹에서 약간 높은 성장률을 보였지만 10% FBS 그룹과 큰 차이는 없었다.

1%의 TS를 첨가하였을 때는 첨가하지 않은 그룹의 2배 정도로 배양 상태가 좋았지만 역시 FBS의 농도와는 상관성이 없었다. 즉, 1%의 TS를 첨가한 그룹에서의 세포 성장률은 상당히 증가되었으며, FBS의 농도는 영향을 미치지 않았다 ($p < 0.05$).

0.1%의 EE만을 첨가한 배양액의 경우, 5%의 FBS에서는 배양상태의 변화가 거의 없었지만, 10%의 FBS 배양조건에서의 세포 성장률이 약간 증가하였음을 보여주었다. 그러나 1%의 TS만은 첨가한 그룹에 비해 세포의 성장률은 아주 저조하였으며, 1%의 TS와 0.1%의 EE를 혼합하여 첨가한 배양액에서의 세포의 성장률이 가장 높게 나타났다(Fig. 4).

3. FBS 농도별 DMEM과 D-NAC에서의 세포 성장률 FBS의 농도를 달리한 DMEM과 D-NAC 그룹에서의 세포 성장효과를 비교하기 위해 접종 후 4일째 확인한 결과 (Fig. 5), 앞선 실험 결과와 마찬가지로 배양액 FBS의 5%,

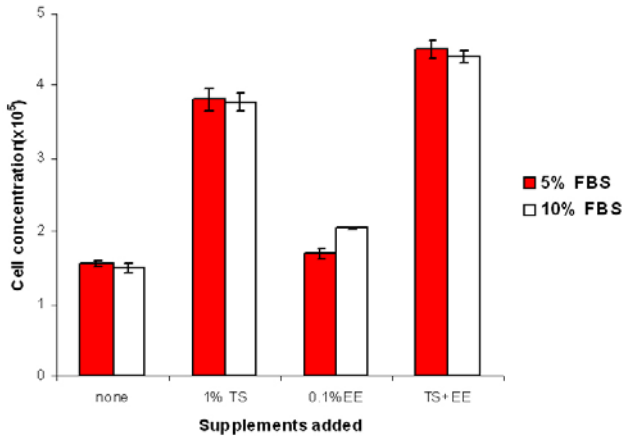


Fig. 4. Identification of essential supplements added to DMEM. DMEM supplemented with 10 ng/mL bovine insulin, 5% (solid bar) or 10% (blank bar) of FBS and combination with either 1% TS, 0.1% EE or both TS and EE. Total of 1×10^5 cells/ 3.8 cm^2 were propagated. Numbers of cells were counted at day 7 after plating (error bar=standard deviation).

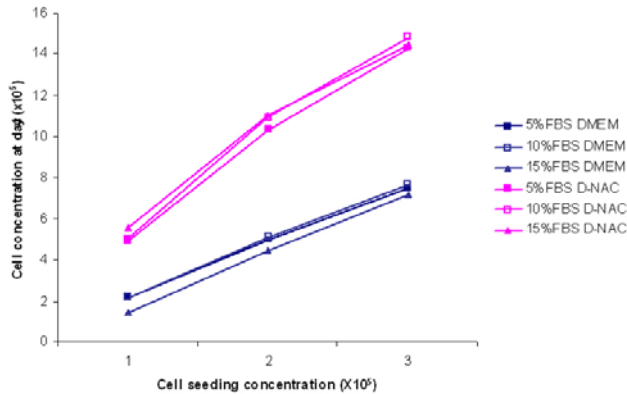


Fig. 5. Comparison of cell performance in DMEM and D-NAC. Cells seeding numbers varied from 1, 2 and 3×10^5 cells/ 3.8 cm^2 were propagated in both media. Numbers of cells were counted at day 4 after plating (error bar=standard deviation).

10%, 15%의 농도 그룹에서 세포 성장률에 큰 차이를 보이지 않았고($p < 0.05$), D-NAC 그룹에서는 DMEM 그룹($p < 0.05$)에 비해 세포 성장이 상당히 좋은 것으로 나타났다.

4. 배양 밀도별 D-NAC와 K-NAC 그룹에서의 세포 성장률

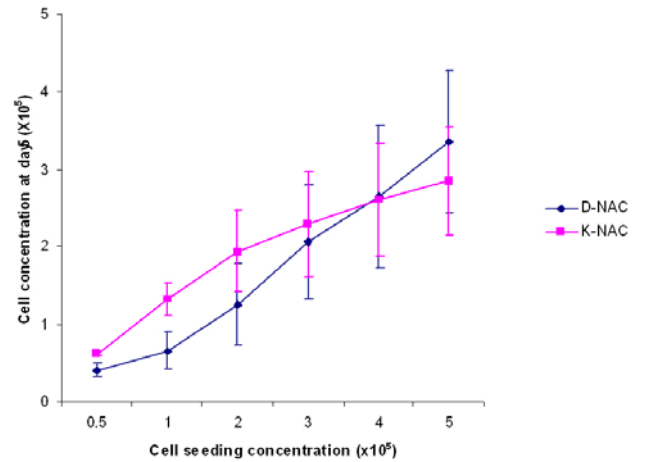


Fig. 6. Comparison of cell performance in D-NAC and K-NAC. Cell concentration varied from 0.5 to 5×10^5 cells/ 3.8 cm^2 was propagated in both media. Numbers of cells were counted at day 5 after plating (error bar=standard deviation).

D-NAC와 K-NAC 그룹에서의 배양 밀도에 따른 성장률을 접종 후 5일째 비교한 결과, 성장률에 있어 그룹간의 두드러진 차이점은 없었다. 하지만 Fig. 6에서 보듯이 4×10^5 cells/ 3.8 cm^2 미만의 배양밀도에서는 K-NAC 그룹이, 4×10^5 cells/ 3.8 cm^2 이상에서는 D-NAC 그룹이 더 높게 나타났다.

고찰

제브라피쉬는 생리적 특성과 많은 유전정보가 밝혀진 이 유로 현재까지 많은 발생학자들에게 유용한 모델동물로 이용되고 있다(Streisinger et al., 1986; Nusslein-Volhard 1994; Fishman et al., 2001). 또한, 핵치환기법이 성공함에 따라 target-selected mutagenesis 연구로의 응용 가능성을 보여주었다(Lee et al, 2002; Weinholds et al, 2002). 그럼에도 불구하고 아직까지 어류에 있어서 핵치환기법의 낮은 효율로 인해 이 기법의 응용 범위가 제한적으로 진행되고 있다. 이러한 원인은 다양한 요인이 있을 수 있으나 핵치환에 이용되는 공여핵원의 상태 또한 중요한 요인으로 인식되고 있다. 따라서 공여핵원으로 이용되는 세포의 배지 조성에 따라, 성장단계에 따른 최적 배양조건을 확립할 필요가 전제된다. 지금까지 어류의 세포배양에는 세포의 종류에 따라 여러 종류의 배지를 이용한 보고가 있으나(Collodi et al., 1992; Brad-

ford et al., 1994; Ghosh et al., 1994; Helmrich et al., 1999; Fan et al., 2004), 대부분 포유동물 유래의 배지 조성으로 수행되었으며, 또한 세포의 접종 밀도 및 성장단계에 따른 성장률에 대해서는 간과되어왔다.

본 연구에서는 제브라피쉬 배아로부터 확보한 세포를 기존에 보고된 방법(Collodi et al., 1992)을 기초로 하여 Dulbecco's Modified Eagle Media에서 배아 유래 세포주를 확립한 다음 3가지 종류의 배지(DMEM, K-NAC, D-NAC)상에서 접종 밀도별, 각 그룹에서의 성분별, 성장 단계별로 효율을 비교하였다. 실험 결과, 접종 밀도와 초기 및 후기에서 서로 다른 성장률을 보였다. 즉, 접종 후 24시간에 세포 성장 상태는 저밀도 배양의 경우 K-NAC에서의 접종 효율이 DMEM 보다 더 높게 나타났다. FBS의 농도를 달리한 DMEM과 D-NAC 그룹에서는, FBS 5%, 10%, 15%의 농도 그룹에서 세포 성장률에 큰 차이를 보이지 않았지만($p < 0.05$), D-NAC 그룹에서 DMEM 그룹($p < 0.05$)에 비해 세포 성장이 상당히 좋은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 배양액에서의 NAC와 A2P의 사용이 FBS 첨가량에 상관없이 긍정적인 효과가 있다는 것을 보여주며, 이는 낮은 칼슘 농도의 K-NAC 배지에서 줄기세포의 성장과 분열이 증가한다는 보고(Lin et al., 2005)와 연관이 있는 것으로 사료된다. 높은 칼슘 농도는 세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있기 때문에(Rheinwald et al., 1975; Yuspa and Morgan, 1981) 낮은 칼슘 농도의 K-NAC는 이들 세포의 분화를 억제하고 수명을 지속시킨 것으로 판단된다. 또한, K-NAC에 존재하는 NAC와 A2P는 glutathionine의 생성을 촉진하는 것으로(De et al., 2001), 이들 두 성분의 첨가에 의해 세포의 분열능과 수명을 지속시킨다는 보고와 관련되어 보인다(Smith et al., 2000; Studer et al., 2000).

또한, FBS 농도(5%, 10%)에 따른 세포 성장을 확인한 결과, 5% FBS 그룹에서 약간 더 높은 성장률을 보였지만 유의차는 없었다. 즉, 본 비교그룹 내에서의 FBS의 농도는 성장률에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 TS를 첨가한 배지에서 첨가하지 않은 그룹에 비해 2배 정도의 성장을 보였으며, 역시 같은 그룹 내에서 FBS의 농도와는 상관이 없었다($p < 0.05$). 이는 포유동물 유래의 serum에 비해 유사한 어류 유래의 serum에 의한 성장 효과로 판단된다. D-NAC와 K-NAC 그룹에서의 배양 밀도에 따른 성장률에 있어 그룹간의 두드러진 차이점은 없었으나, 낮은 배양

밀도에서는 K-NAC 그룹이, 높은 배양밀도에서는 D-NAC 그룹이 높게 나타났으며, 이는 DMEM과 K-NAC 비교 그룹에서와 마찬가지로 유사한 결과를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 보면 대부분 배양세포를 이용한 유전자조작이나 핵치환이 배양 초기상태의 세포를 이용한다는 관점에서 볼 때, 초기 접종시에 NAC와 A2P 및 어류 유래의 serum이 함유된 K-NAC 배지가 어류 세포의 초기 접종에 유리한 것으로 판단된다. 하지만 이들 인자들의 어류 세포 내에서의 정확한 기작과 최적 조건에 관해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행하였습니다(R01-2007-000-11941-0). 군산대학교 해양개발연구소의 논문 인쇄비 지원에도 사의를 표합니다.

인용문헌

- Bradford CS, Sun L, Barnes DW (1994) Basic fibroblast growth factor stimulates proliferation and suppresses melanogenesis in cell cultures derived from early zebrafish embryos. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:78-86.
- Bubenshchikova E, Ju B, Pristyazhnyuk I, Niwa, Kaftanovskaya K, Kinoshita M, Ozato K, Wakamatsu Y (2005) Generation of fertile and diploid fish, medaka (*Oryzias latipes*), from nuclear transplantation of blastula and four-somite-stage embryonic cells into nonenucleated unfertilized eggs. *Cloning Stem Cells* 7(4):255-264.
- Chunguang, Ma, Lianchun F, Ganassin R, Bols N, Collodi P (2001) Production of zebrafish germ line Chimeras from embryo cell cultures. *Proc Natl Acad Sci* 98:2461-2466.
- Collodi P, Kamei Y, Ernst T, Miranda C, Buhler DR, Barnes DWP (1992) Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues. *Cell Biol Toxicol* 8:43-61.
- De AOTa S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM (2001)

- Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 22:999-1013.
- Di Berardino MA (2006) Origin and progress of nuclear transfer in nonmammalian animals. *Methods Mol Biol* 348:3-32.
- Driever W, Rangini Z (1993) Characterization of a cell line derived from zebrafish *Brachydanio rerio* embryos. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 29:749-754.
- Fan L, Crodian J, Collodi P (2004) Culture of embryonic stem cell lines from zebrafish. *Methods Cell Biol* 76:151-160.
- Fishman MC (2001) Zebrafish: the canonical vertebrate. *Science* 294:1290-1291.
- Ghosh C, Collodi P (1994) Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) blastula-stage embryos. *Cytotechnology* 14:21-26.
- Helmrich A, Barnes D (1999) Zebrafish embryonal cell culture. *Methods Cell Biol* 59:29-37.
- Lee KY, Huang H, Ju B, Yang Z, Lin S (2002) Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. *Nat Biotechnol* 20:795-799.
- Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC (2005) Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev* 14:92-102.
- Nusslein-Volhard C (1994) Of flies and fishes. *Science* 266:572-574.
- Rheinwald JG, Green H (1975) Serial cultivation of strains of human eidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-343.
- Smith J, Ladi E, Mayer-Proschel M, Noble M (2000) Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precurscell. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10032-10037.
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F (1986) Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291:293-296.
- Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20:7377-7383.
- Yuspa SH, Morgan DL (1981) Mouse skin cells resistant to terminal differentiation associated with initiation of carcinogenesis. *Nature* 293:72-74.
- Wienholds E, Schulte-Merker S, Walderich B, Plasterk RHA (2002) Target-selected inactivation of zebrafish rag1 gene. *Science* 297:99-102.