

## 정소세포의 체외 혼합배양 방법을 이용한 생쥐 정원 줄기세포 확립

이원영<sup>1</sup> · 김희찬<sup>1</sup> · 김동훈<sup>2</sup> · 정학재<sup>2</sup> · 박진기<sup>2</sup> · 송혁<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 의료생명대학 식품생명과학부, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립축산과학원

## Establishment of Spermatogonial Stem Cells using Total Testicular Cell Culture System in Mouse

Won Young Lee<sup>1</sup>, Hee Chan Kim<sup>1</sup>, Dong Hoon Kim<sup>2</sup>, Hak Jae Chung<sup>2</sup>, Jin Ki Park<sup>2</sup> and Hyuk Song<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal & Food Bioscience, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University, Chung-ju 380-701, Korea

<sup>2</sup>Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

### ABSTRACT

Spermatogenesis is initiated from spermatogonial stem cells (SSCs) that has an ability of self-renewal and unipotency to generate differentiating germ cells. The objective of this study is to develop the simple method for derivation of SSCs using non-sorting of both spermatogonia and feeder cells. Simply uncapsulated mouse testes were treated with enzymes followed by surgical mincing, and single cells were cultured in stempro-34™ cell culture media at 37°C. After 5 days of culture, aciniform of SSC colony was observed, and showed a strong alkaline phosphatase activity. Molecular characterization of mouse SSCs showed that most of the mouse SSC markers such as integrin  $\alpha 6$  and  $\beta 1$ , CD9 and Stra8. In addition, pluripotency embryonic stem cell (ESC) marker Oct4 were expressed, however Sox2 expression was lowered. Interestingly, expression of SSC markers such as Vasa, Dazl and PLZF were stronger than mouse ESC (mESC). This data suggest that generated mouse SSCs (mSSCs) in this study has at least similar biomarkers expression to mESC and mSSCs derived from other study. Immunocytochemistry using whole mSSC colony also confirmed that mSSCs generated from this study expressed SSC specific biomarkers such as c-kit, Thy1, Vasa and Dazl. In conclusion, mSSCs from 5 days old mouse testes were successfully established without sorting of spermatogonia, and this cells expressed both mESC and SSC specific biomarkers. This simple derivation method for mSSCs may facilitate the study of spermatogenesis.

(Key words : Mouse spermatogonial stem cells (mSSCs), Alkaline phosphatase, Oct4, Vasa, Dazl, PLZF)

### 서 론

정자 형성과정은 생식세포의 체세포 분열, 감수분열, 형태학적 변형 등이 동반 수행되는 매우 복잡한 과정이다. 정원 줄기세포는 이렇게 복잡한 정자 형성과정의 시작이며, 자기복제가 가능하며, 성숙된 정자로 분화될 수 있는 능력을 가지고 있는 세포를 말한다(Aponte 등, 2005; Clermont, 1972; Meistrich, 1993; van Pelt 등, 1996). 최초로 성체 정소에서 정원 줄기세포의 존재가 확인된 이후(Oakberg, 1956), 쥐(Nagano 등, 1998; Ryu 등, 2007), 돼지(Goel 등, 2007), 인간(Liu 등, 2011)의 정소에서 정원

줄기세포가 확인되었다. 또한, 분리된 정원 줄기세포를 남성불임 생쥐에 이식했을 때 정상적인 정자 형성과정의 유도되고 성숙한 정자를 생산하는 것을 확인하였으며(Brinster와 Zimmermann, 1994), 정원 줄기세포에 녹색형광 유전자를 삽입하여 형질전환 정자와 동물을 생산한 바 있다(Nagano 등, 2001; Ryu 등, 2007; Sato 등, 2011).

체외 배양 정원 줄기세포주의 확립은 형질전환 정자 및 동물의 생산 연구는 물론 생식세포 분화와 관련된 남성불임, 정자형성과정 기전 연구 등의 연구에 반드시 필요하다. 이러한 기초 연구를 위해서는 반드시 대량의 정원 줄기세포가 필요하며, 체외에서 정원 줄기세포의 확보 및 대량 증식 기술이 수반되어야 한다. 체외배양 생쥐 정

\* 본 연구는 농촌진흥청 연구과제(PJ009846)의 지원을 받아 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-43-840-3522, E-mail: lovelyhusband@kku.ac.kr

원 줄기세포는 정원세포를 분리, 확보한 후, 세포주기 억제 물질인 mitomycin C가 처리된 생쥐 배아 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 위에서 배양하는 방법이 성공된 이래(Kanatsu-Shinohara 등, 2003), Stempro-34 배양액에서 MEF와 같은 지지세포가 없는 상태에서 배양하는 것이 가능해졌다(Kanatsu-Shinohara 등, 2011). 하지만, 여전히 정원 줄기세포의 체외배양을 위해서는 전체 정소세포에서 정원세포를 따로 분리해야만 하는 과정이 필요하며, 이를 위해서 다양한 정원세포 유래 표지인자의 항체를 이용해야 하며, 분리과정에서 불필요한 세포의 손실을 가져올 수 있으며, 초기 세포의 특성이 변성되는 경우도 발생할 수 있다. 따라서 정원 줄기세포를 체외에서 배양할 때 수행해야 하는 정원세포의 기계적 분리 방법을 배제하고, 효과적인 정원 줄기세포 군집을 확보하는 것이 정원 줄기세포를 이용한 다양한 연구의 효율성을 높이는데 반드시 필요하다.

현재까지 생쥐를 비롯한 모든 동물 중에서 정확한 정원 줄기세포 특이 발현 표지인자에 대한 논란이 제기되고 있지만, 정원 줄기세포의 분리와 특성 분석을 위해서 정원 줄기세포 특이 표지인자의 발굴이 필요한 실정이다. 생쥐의 경우 Stra8, Neurog3, promyelocytic leukemia zinc finger(PLZF), Ret, Oct4 등이 표지인자로 보고되었고, 배아 줄기세포의 표지인자인 Nanog, teratocarcinoma derived growth factor1(TDGF1)은 발현되지 않는 것으로 보고되어 어지고 있다(Kanatsu-Shinohara 등, 2011). 정원 줄기세포의 확립 후 정확한 특성분석은 감수분열을 통한 세포의 정자 형성이 최종적이지만, 세포단계에서 위에 언급된 표지인자의 발현을 확인하는 것이 최소한의 정원 줄기세포의 특성을 분석하는 것이다.

본 연구는 체외에서 정원 줄기세포주를 확립하고, 배양하기 전에 정원세포를 기계적으로 분리하는데 따라 발생할 수 있는 정원세포의 물리적 손실을 방지하기 위하여, sertoli 세포와 Leydig 세포가 혼합된 정소세포의 배양을 통해 초기 정원 줄기세포주를 확립하였다. 또한, 확립된 초기 정원 줄기세포의 줄기세포로서의 특성을 분자생물학적 방법으로 규명하여 효율적인 정원 줄기세포 확립 방법을 구축하는 것을 목표로 하였다.

## 재료 및 방법

### 생쥐 정원 줄기세포 분리 및 배양 방법

본 실험에 사용된 정소는 5일령 C57/BL6 생쥐로부터 채집되었으며, Orientbio에서 구입하여 사용하였다. 5일령 생쥐의 정소부게 5배의 효소 1 (0.5 mg/ml type collagenase IV, 0.01 mg/ml DNase I, 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 0.1 mg/ml hyaluronidase)을 상온에서 10분간 처리 후, PBS를 이용해 효소를 제거하였다. 이어서 효소 2 (5 mg/ml collagenase IV, 0.01 mg/ml DNase I, and 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitor)를 10분간 처리한 후, PBS를 이용해 효소를 제거하였다. 40  $\mu$ m 나일론 망을 이용하여 분리되지 않은 조직을 제거한 후 적혈구 제거를 위해 RBC 제거 용액에 5분간 반응시켰다. 효

소에 의해 분리된 생쥐 정소세포는 0.2% 젤라틴이 코팅된 12 well 배양 접시에  $2 \times 10^5$ /well의 비율로 분주하여 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 배양하였다. 배양액은 Kanatsu-Shinohara 등 (2011)이 사용한 배양액을 수정하여 사용하였으며, 배양액 조성은 insulin-transferrin-selenium (ITS; 25  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, or 30 nM, Gibco, 41400-045), 6 mg/ml glucose (Sigma-Aldrich, G6152), 2 mM L-glutamine (Gibco, 25030), 1% NEAA solution (Gibco, 11140), 1% vitamin solution (Gibco, 11120), 100 unit/ml penicillin/streptomycin (Gibco, 15140), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, 11360), 0.1 mM vitamin C (Sigma-Aldrich, A44-03), 1  $\mu$ g/ml lactic acid (Sigma-Aldrich, L1750), 30 ng/ml estradiol (Sigma-Aldrich, E2758), 60 ng/ml progesterone (Sigma-Aldrich, P7756), 0.2% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, A7906), 1% knockout serum replacement (Gibco, 10828), 20 ng/ml mEGF (Millipore, Billerica, MA, USA, EA140), 10 ng/ml bFGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA, AF-100-18B), 10 ng/ml GDNF (R&D systems, Minneapolis, MN, USA, 512-GF-010), and  $10^3$  U/ml leukemia inhibitory factor (Millipore, EA140) 이 포함된 Stempro-34<sup>TM</sup> (Gibco, 10640-019) 배지를 사용하였다. 1주일 간격으로 0.005% trypsin-EDTA (Gibco, 25300-054)로 떼어낸 후 새로운 배양 접시에 옮겨 주었으며, 분자 생물학적 분석은 5 passage 이상 배양된 생쥐 정원 줄기세포를 이용하였다.

### Alkaline Phosphate (AP) 염색

AP 염색은 CBA-300 AP 염색 kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)를 이용하였으며, 제조사의 방법에 따라 실행하였다. 고정액에 10분간 반응하여 세포를 고정시킨 후 PBS를 이용하여 3회 세척하였다. AP 염색 시약을 10~20 분간 반응시킨 후 PBS로 세척한 후 현미경을 이용해 관찰하였다.

### Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 생쥐 정원 줄기세포 군집으로부터 총 RNA를 회수한 후, DNaseI (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA, M0303S)을 30분간 처리하여 genomic DNA를 제거한 후, 0.2M EDTA (Sigma-Aldrich, E6635)를 10분간 처리하여 효소 반응을 정지시켰다. cDNA 합성은 1  $\mu$ g 총 RNA를 RT-PCR Premix kit (iNtRON, Seongnam, South Korea, 25081)을 이용하여 합성하였다. PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초 조건으로 30회 반응시켰으며, PCR에 사용한 Primer는 Table1에 정리하였다. 마커 유전자의 발현 정도 비교를 위해 생쥐 배아 줄기세포와 생쥐 배아 섬유아세포를 대조군으로 사용하였다.

### Western Blot

Proprep kit (iNtRON, 17081)를 이용하여 생쥐 정원 줄기세포 군집으로부터 총 단백질을 분리한 후, 50  $\mu$ g 씩 10~12% SDS-Acrylamide gel을 이용하여 단백질을

**Table 1. Primers used for the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)**

Gene	Forward primer	Reverse primer	Size
Integrin- $\alpha$ 6	5'-CAGGCCTTCTCCGTCAAATA-3'	5'-AGGAGTCGCGGATATCITT-3'	503 bp
Integrin- $\beta$ 1	5'-CCTACTTCTGCACGATGIGA-3'	5'-CACCTTCTGGAGAATCCAAG-3'	577 bp
CD9	5'-AGTGCATCAAATACCTGCTCTTC-3'	5'-CTTTAATCACCTCATCCTTGTTGG-3'	330 bp
Stra8	5'-GCCAGAATGTATCCGAGAA-3'	5'-CTCACTCTGTCCAGGAAAC-3'	651 bp
Dazl	5'-GCTGATATTTGCCCAATGAA-3'	5'-ATGCTTCGGTCCACAGACTT-3'	89 bp
PLZF	5'-CCACCTTCGCTCACATACAG-3'	5'-TGTTGGCTCTTGAGTGTGCTC-3'	89 bp
Vasa	5'-CCAAAAGTGACATATATACCC-3'	5'-TTGGTTGATCAGTTCTCGAG-3'	417 bp
Oct4	5'-GCGTTCCTTTGGAAAGGTGTT-3'	5'-CTCGAACCACATCCTTCTCT-3'	312 bp
Sox2	5'-CCCCCGCGGGAACAGCA-3'	5'-TCGGCGCCGGGAGGTACAT-3'	448 bp
GAPDH	5'-CACTCAAGATTGTCAGCA-3'	5'-CATACTTGGCAGGT-3'	339 bp

분리한 후 polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad Laboratories, 162-0177)으로 옮겨 항체 반응하였다. 항체 반응은 5% 탈지유가 포함된 Tris Buffered Saline - Tween (TBS-T)를 사용하였고, 1차 항체는 4°C에서 12시간 2차 항체는 실온에서 1시간 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence (ECL) 반응 후 X-ray film에 인화하였다. Western blot에 사용한 항체는 Table 2에 정리하였다.

**Immunocytochemistry**

4% paraformaldehyde를 10분간 처리하여 생쥐 정원 줄기세포 군집을 고정시킨 후, 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS를 10분간 처리하여 이용하여 세포막의 투과성을 높였다. 이후 2% Bovine Serum Albumin (BSA)가 첨가된 PBS에 항체를 희석하여 1차 항체는 4°C에서 12시간 2차 항체는 실온에서 1시간 반응시킨 후 DAPI 염색을 실행하였다. 염색된 생쥐 정원 줄기세포 군집은 mounting solution (DAKO, Carpinteria, CA, USA, S3025)을 이용해 slide glass에 올린 후, 공초점 현미경을 이용해 이미징 분석을 실행하였다. Immunocytochemistry에 사용한 항체는 Table 2에 정리하였다.

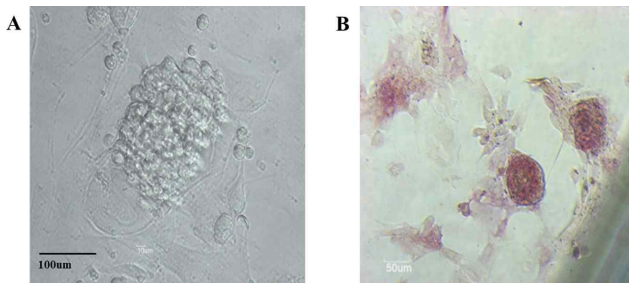
**결과 및 고찰**

생쥐 정소를 적출한 후, 정소를 기계적 분리와 collagen등의 효소를 이용해 단일 세포화한 후 정원세포 특이 항체 등을 이용해 정원세포를 분리하지 않고, 정원세포가 Sertoli 세포와 Leydig 세포가 혼합된 형태로 stempro-34™ 배양액에서 배양한 결과, 배양 3일째에 정원 줄기세포의 군집이 형성됨을 관찰하였고, 배양 5일째에는 포도송이 모양의 증식된 정원 줄기세포 군집이 형성됨을 확인하였다(Fig. 1). 확립된 정원 줄기세포 군집의 줄기세포 특성을 확인하기 위하여 1차로 alkaline phosphatase (AP) 염색을 진행하였다. AP 염색 결과, 포도송이 모양의 정원 줄기세포 군집에서 AP 염색에 대해 강한 반응을 보였다(Fig. 1). AP에 의해 강하게 염색되는 정원 줄기세포 군집을 1주일 간격으로 계대 배양한 결과, 10 passage 이상 지속적으로 체외 배양이 가능했다.

또한 확립된 생쥐 정원 줄기세포의 특성을 분석하기 위하여 배아 줄기세포의 표지인자인 Oct4, Sox2와 음성 생식세포의 표지인자로 알려진 integrin  $\alpha$ 6, integrin  $\beta$ 1, CD-

**Table 2. Anti-bodies used for the western blot (WB) and immunocytochemistry (ICC)**

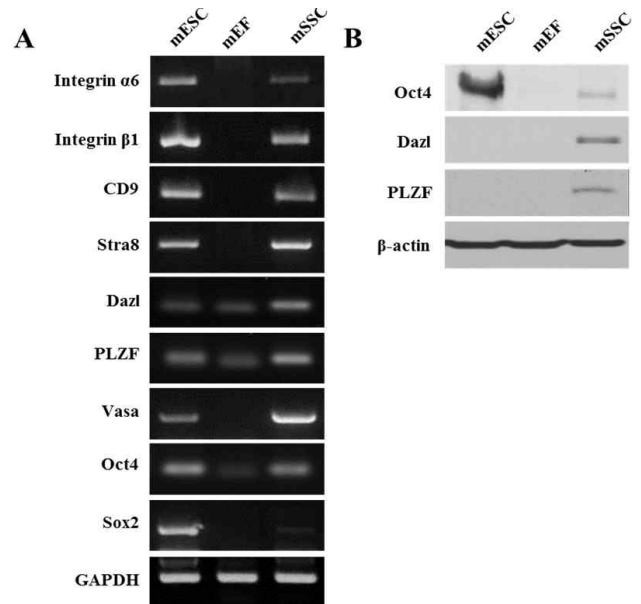
Gene	Company	Catalog No.	Dilution rate	Use
Oct4	Santa Cruz Biotechnology	SC-5279	1:1,000	WB
PLZF	Santa Cruz Biotechnology	SC-22839	1:1,000	WB
Dazl	Santa Cruz Biotechnology	SC-27999	1:1,000, 1:100	WB, ICC
c-kit	Santa Cruz Biotechnology	SC-5535	1:100	ICC
Thy1	Santa Cruz Biotechnology	SC-6071	1:100	ICC
Vasa	Santa Cruz Biotechnology	SC-48707	1:100	ICC
$\beta$ -actin	Santa Cruz Biotechnology	SC-47778	1:1,000	WB



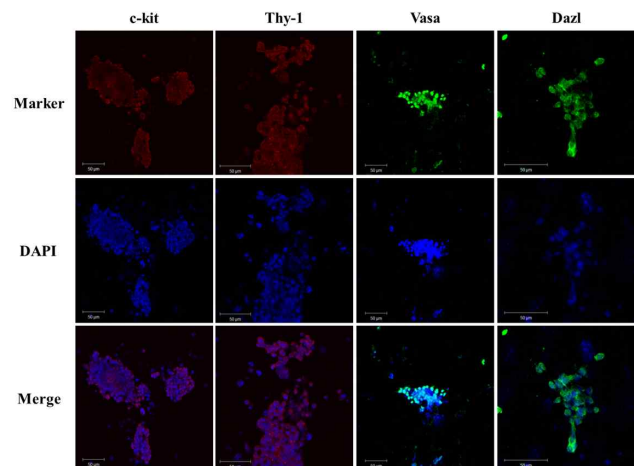
**Fig. 1.** Morphological characteristics of mouse spermatogonial stem cells (mSSCs) at 5 days post-culture of mixed total testicular cells. (A) Colony formation of mSSC, and (B) alkaline phosphatase (AP) staining of mSSC colony.

9, *Stra8*, *Vasa*, *Dazl*, *PLZF*의 messenger RNA(mRNA)의 발현을 역전사 연쇄증합효소반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용해 확인하였다. RT-PCR 결과, 생쥐의 배아 줄기세포에서 표지인자인 *Oct4*와 *Sox2*는 확립된 정원 줄기세포에서 배아 줄기세포보다 적은 양으로 발현하였으며, 음성 생식세포 표지인자로 알려진 *integrin α6*, *integrin β1*, *CD9*의 발현도 생쥐 배아 줄기세포보다 적은 것을 확인하였다(Fig. 2A). 하지만 생쥐의 정원 줄기세포 표지인자로 보고된 *Stra8*, *Vasa*, *Dazl*의 발현은 배아 줄기세포보다 많이 발현됨을 확인하였고, *PLZF*의 발현도 생쥐 정원 줄기세포에서 배아 줄기세포보다 많이 발현됨을 확인하였다(Fig. 2A). 단백질 수준에서 정원 줄기세포 표지인자의 발현을 확인하기 위해 western blot을 실시한 결과, 전분화능 표지인자인 *Oct4*는 예상대로 생쥐의 배아 줄기세포에서 많이 발현한 반면, 정원 줄기세포 표지인자인 *Dazl*과 *PLZF*는 정원 줄기세포에서 많이 발현함을 보여 주었다(Fig. 2B). 정원 줄기세포 군집에서 *Vasa*와 *Dazl*의 항체를 이용한 immunocytochemistry(ICC) 분석 결과, RT-PCR과 western blot에서도 출된 결과와 동일하게 정원 줄기세포 군집을 형성하는 각각의 세포에서 *Vasa*와 *Dazl*이 발현됨을 확인하였다(Fig. 3). 또한, ICC 분석 결과, 정자세포의 대표적인 표지인자인 *c-kit* 단백질이 발현됨을 확인하였고, 정원 줄기세포의 표지인자로 보고된 *Thy1*의 발현도 확인하였다(Fig. 3).

일반적으로 *Oct4*, *Nanog*, *Thy1* 등은 전분화능을 가진 줄기세포의 표지인자로 알려져 있다. *Oct4*의 발현은 생쥐의 정원세포 이전의 생식세포와 미분화 정원 줄기세포에서 보고되고 있으며(Pesce 등, 1998; Tadokoro 등, 2002), *Oct4*의 발현은 체외에서 생쥐 정원 줄기세포의 배양과 유지, 자가복제 능력을 유지하는데 필수적인 것으로 알려져 오고 있다(Dann 등, 2008). 이러한 보고는 소의 정원 줄기세포 배양에서도 일치되게 보고되는데, 체외배양된 소의 정원세포에서 *Oct4*의 발현이 확인되고, *Oct4*가 발현된 소의 정원세포를 면역 결핍이 유도된 생쥐에 이식했을 때 소의 정원세포가 안정적으로 생쥐의 정소에서 군집을 형성하는 것을 보여주었다(Fujihara 등, 2011). 잠재적인 정원 줄기세포 표지인자인 *Thy1*의 발현은 설치류의 미분화 생식세포와 정원 줄기세포에서 확인되었으며, *Thy1*이 발현된 인간 정원세포에서 전분화능 표지인자인 *Oct4*와 *Nanog*의 발현과 강한 AP 염색이 확인되었다(Ko-



**Fig. 2.** Characterization of mouse spermatogonial stem cells (mSSCs) produced from total testicular cell culture. (A) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of mSSC, mouse embryonic stem cells (mESC) and mouse embryonic fibroblast (mEF) with mSSC markers (*integrin α6*,  $\beta 1$ , *CD9*, *Stra8*, *Dazl*, *Vasa* and *PLZF*), pluripotent markers (*Oct4* and *Sox2*), and *GAPDH* was used as the loading control. (B) Western blot analysis of mSSC compared with both mESC and mEF using *Oct4*, *Dazl*, and *PLZF* antibodies.  $\beta$ -actin was used as the protein loading control.



**Fig. 3.** Immunocytochemistry of mSSC colonies with *c-kit*, *Thy1*, *Vasa*, and *Dazl* antibodies. The upper panel shows expression of specific marker proteins, the middle panel demonstrates the location of nuclei stained by DAPI, and the bottom panel shows the merged images of both markers and nuclei.

bayashi 등, 2009). 또한, *Thy1*이 발현된 세포에서는 정원 줄기세포 표지인자인 *Vasa*와 *PLZF*가 동시에 발현됨을 보고하였다(Reding 등, 2010). 정원 줄기세포 표지 인자에

관한 연구가 지속되고 있으나, Phillips 등 (2010)에 의하면 여러 연구자들에 의해 생쥐 정원 줄기세포는 integrin  $\alpha 6$ , integrin  $\beta 1$ , Thy1, CD9, GFR  $\alpha 1$  등을 발현하며, CD51, c-kit, CD45 등을 발현하지 않는 세포라고 명명하고 있으나, 각각의 표지인자가 조합해서 나타나지는 않는다고 보고하였다 (Phillips 등, 2010). 본 연구에서는 생쥐 정소 유래의 정원세포를 따로 면역화학적 방법으로 분리하지 않고, Sertoli 세포와 Leydig 세포가 혼합된 정소 세포와의 공배양을 통해 정원 줄기세포를 확립하였으며, 확립된 정원 줄기세포에서 Oct4, Thy1, Vasa, Dazl 등의 정원 줄기세포 표지인자가 발현함을 확인하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 확립된 정원 줄기세포가 정자 형성 과정 및 남성불임 연구에 효율적으로 사용될 수 있는 가능성을 시사하고 있다고 사료된다. 또한, 정원세포의 분리 없이도 일반 정소세포와의 공배양을 통해 간편하면서도 효율적으로 정원 줄기세포를 확립할 수 있다는 것을 시사하고 있다.

본 연구의 체외 정원 줄기세포 확립 시 사용된 배양액은 stempro-34<sup>TM</sup>이며, 이 배양액에서 정원 줄기세포가 성공적으로 확립되었다는 것은 생쥐 정원 줄기세포 증식과 군집 형성에 CD34에 의한 세포내 신호전달 체계가 적용된다는 것을 시사하고 있다. 본 연구에서는 정원 줄기세포 군집이 stempro-34<sup>TM</sup> 배양액 조건에서 특이적으로 증식 하였으며, 지지세포로 이용되는 정소 유래 세포들의 증식은 억제되었는데, 이는 stempro-34<sup>TM</sup> 배양액 외에 첨가된 성장인자에 의한 영향으로 사료된다. 정소 유래 기질세포 중 CD34가 발현된 세포는 정원세포의 장기 배양을 유지시키며(Kim 등, 2008), CD34가 발현되는 골수 유래 기질세포에서 정원 줄기세포를 배양했을 때 정원 줄기세포의 증식과 미분화 상태가 유지됨이 보고되고 있다 (Xu 등, 2006). 또한, 소에서 정소 유래 체세포를 지지세포로 이용해 배양한 정원세포는 체외에서 약 45일 정도 배양에 성공했다는 보고가 있어(Fujihara 등, 2011), 정소 유래 비 생식세포가 지지세포로서 정원 줄기세포의 형성 및 유지 배양에 충분할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 사용된 정소 세포의 혼합 공배양 방법은 효율적인 정원 줄기세포 확립에 도움을 줄 것으로 생각되며, 향후 정원 줄기세포를 활용한 정자 형성과정 연구의 촉진에 도움을 줄 것으로 사료된다.

### 인용문헌

1. Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG, van Pelt AM (2005): Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *Apmis* 113:727-742.
2. Brinster RL, Zimmermann JW (1994): Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11298-11302.
3. Clermont Y (1972): Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52:198-236.
4. Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, Denard BS, Garbers DL, Porteus MH (2008): Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor down-regulated during retinoic acid-induced differentiation. *Stem Cells* 26:2928-2937.
5. Fujihara M, Kim SM, Minami N, Yamada M, Imai H (2011): Characterization and *in vitro* culture of male germ cells from developing bovine testis. *J Reprod Dev* 57:355-364.
6. Goel S, Sugimoto M, Minami N, Yamada M, Kume S, Imai H (2007): Identification, isolation, and *in vitro* culture of porcine gonocytes. *Biol Reprod* 77:127-137.
7. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Morimoto H, Ogura A, Shinohara T (2011) Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biol Reprod* 84:97-105.
8. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T (2003): Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 69:612-616.
9. Kim J, Seandel M, Falcatori I, Wen D, Rafii S (2008): CD34+ testicular stromal cells support long-term expansion of embryonic and adult stem and progenitor cells. *Stem Cells* 26:2516-2522.
10. Kobayashi H, Nagao K, Nakajima K, Miura K, Ishii N (2009): Thy-1<sup>+</sup> cells isolated from adult human testicular tissues express human embryonic stem cell genes OCT3/4 and NANOG and may include spermatogonial stem cells. *Reprod Med Biol* 8:71-77.
11. Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W (2011): Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 9:141.
12. Meistrich ML (1993): Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 23:136-141.
13. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL (1998): Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell* 30:389-397.
14. Nagano M, Brinster CJ, Orwig KE, Ryu BY, Avarbock MR, Brinster RL (2001): Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13090-13095.
15. Oakberg EF (1956): A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 99:391-413.
16. Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H (1998): Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 71:89-98.
17. Phillips BT, Gassei K, Orwig KE (2010): Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil*

- Trans R Soc B 365:1663-1678.
18. Reding SC, Stepnoski AL, Cloninger EW, Oatley JM (2010): THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. *Reproduction* 139:893-903.
  19. Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Lin CC, Chang LJ, Avarbock MR, Brinster RL (2007): Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells. *J Androl* 28:353-360.
  20. Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Ogawa T (2011): *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun* 2:472.
  21. Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y (2002): Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev* 113:29-39.
  22. van Pelt AM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, de Rooij DG, Stefanini M (1996): Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biol Reprod* 55:439-444.
  23. Xu FC, Wu SH, Guo Y, Mei XM (2006): Proliferation and undifferentiation of spermatogonial stem cells *in vitro*. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37:625-628.

(Received: 11 September 2013/ Accepted: 25 September 2013)