

## Tubulogenesis of TM4 Sertoli cells *in vitro*

Seung Ho Park, Jin Kook Choi, Myung Chan Gye

Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyonggi University, Suwon, Korea

### 서론

세정관 상피인 Sertoli cells은 germ cells의 생존, 증식 및 분화를 위해 필수적인 성장인자를 제공하며 정자형성과정에 필수적인 기능을 한다. 생체내에서 ECM은 integrin과 직접적인 결합에 의한 신호전달이나 ECM 내에 존재하는 성장인자가 세포 수용체와의 결합에 의한 신호전달과정을 통해 세포의 생존, 증식 및 분화조절에 관여한다 (Streuli, 1999). 정소의 발생과정에서 일어나는 세정관형성에는 Sertoli cells과 extracellular matrix(ECM)의 상호작용은 testicular cord 형성에 중요한 역할을 한다 (Wei and Mahowald, 1994). 세정관내에 basement membrane은 Sertoli cells과 myoid cells에 협력에 의해 생성되며, Sertoli cells을 myoid cells과 공배양하면 Sertoli cells은 cord-like structures을 형성하는데 (Tung and Fritz, 1990), 이와 유사하게 재구성된 기저막 위에서 배양된 Sertoli cells에서도 cord formation이 일어나므로 ECM은 cord formation을 위해 중요한 역할을 한다 (Hadley *et al.*, 1990; Oscar *et al.*, 1993). 신장된 cord가 형성된 후, Sertoli cells은 빠르게 분열하여 Sertoli cells 사이에 밀착결합이 형성되면서 lumen을 형성하고 tubule로 분화한다. 이런 분화는 Sertoli cells의 주변 세포들과의 상호작용에 의한 다양한 활성분자와 그 수용체들간의 일련의 상호작용으로 일어난다 (Russell, Bartke and Goh, 1989). Hepatocyte growth factor (HGF)는 여러 종류의 세포에서 mitogenic, morphogenic과 chemotactic activities를 갖는 다기능적 성장인자이며 (Matsumoto and Nakamura, 1996; Hiroyuki *et al.*, 1997), ECM의 형성과 분해에 영향을 주고, MMPs의 발현을 촉진한다고 보고되어있다(Wang and Keiser, 2000). 따라서 세정관 관강구조의 형성 과정에서 일어나는 Sertoli cell 과 ECM과의 상호작용 과정에서 HGF의 작용가능성이 있었다. 본 연구에서는 체

외에서 Sertoli cell의 관강형성에 미치는 세포의 기질의 영향을 조사하고, 그 과정에서 나타나는 MMPs 발현의 변화를 추적하는 한편 그 조절요인으로써 HGF의 역할을 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포주 및 ECM

실험에 사용한 세포주는 TM4 (mouse, Sertoli cell) cell로 10% FBS가 포함된 DMEM 배지 (GIBCO BRL Co.)를 사용하여 배양하였으며, ECM으로는 Engelberth-Holm-Swarm sarcoma로부터 추출한 GFR-Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA)을 사용하였다.

#### Matrigel 위에서 TM4 cell의 배양

GFR-Matrigel을 배양액과 1.5:1의 비율로 섞어서  $cm^2$ 당  $100\mu l$ 로 처리한 다음 5%  $CO_2$ ,  $37^\circ C$ 에서 1시간 배양하여 gel을 응고시킨 후, 응고된 gel 위에 TM4 cell line을  $4 \times 10^4$  cells/ $cm^2$  으로 1ml를 분주하여 배양하였고, HGF는 각각 배양액 내에 5 ng/ml로 첨가하였으며, 세포의 형태적 관찰은 도립현미경(Olympus, Japan)하에서 관찰하였다.

#### RT-PCR을 이용한 c-MET 발현의 확인

TM4 cell을 60mm dish에서 monolayer가 되도록 배양한 후, Trizol kit를 이용하여 total RNA을 추출한 후, Takara RNA PCR kit (AMV, ver 2.1)을 사용하여 역전사 증폭하였다. c-MET의 primer는 van der Wee와 Hofmann (1999)의 방법을 따랐으며, 725bp 크기의 PCR 생성물을 확인하였다.

#### Zymography를 이용한 MMP-2 / -9 발현의

## 확인

배양시간별로 TM4 cell의 conditioned media를 채취하여 1 mg/ml gelatin을 첨가한 7% acryamide gel에서 SDS-PAGE를 실시하였다. 영동 후 효소반응용액에서 37°C 21시간 정치한 후 Coomassie 용액으로 염색하여 밴드를 확인하였다. MMPs의 특이적인 저해제 1,10-phenanthroline을 처리로 비특이적 밴드를 확인하여 MMP-2와 -9을 구분하였다.

## 결과 및 논의

### ECM에 의한 TM4 cell line의 형태적 변화

TM4 cell line을 혈청을 첨가한 배양액 상태로 배양하면 culture plate 바닥에 부착하여 monolayer 상태로 자라게 되며, 무혈청 상태에선 분주 후 일시적으로 부착하나 시간이 경과함에 따라 대부분은 괴사하고 일부만이 부착하여 자라게 된다. ECM으로 GFR-Matrigel을 고농도(60% v/v)로 처리하여 Matrigel bed을 형성시킨 후, 무혈청상태에서 TM4 cell line을 배양하면 24시간 후 chain 형태를 보이며(Fig. 1A) 이후 chain이 다층으로 두꺼워 지면서(Fig. 1B and C) 4일에는 cord 형태를 보인다 (Fig. 1D). 이후 배양시간을 연장하여도 더 이상의 형태적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 Matrigel은 TM4 cell에 무혈청 조건하에서 cord로의 분화를 유도할 수 있었다. 그러나 cord에서 tubule로의 remodeling을 위해서는 충분한 조건이 아닌 것으로 추측된다. 따라서 tubule의 형성을 위해서는 specific paracrine factors가 요구되었다.

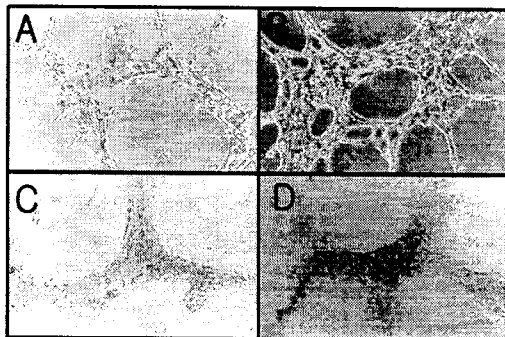


Fig. 1. TM4 Sertoli cells grown on GFR-Matrigel bed in the minimal culture medium. Formation of chain by TM4 cells after 1 day (A). Formation of cords 2 days (B), 4 days(C), and 7 days(D) (X100).

### TM4 cell line에 c-MET의 발현양상

다기능적 성장인자인 HGF는 정소의 분화시기에 세정관에서 발현되며, 그 수용체인 c-MET을 통해 생물학적 효과를 발휘된다. 따라서 HGF를 처리하기 전에 TM4 cell line에서 c-MET의 발현양상을 알아보기 위해 c-MET의 특이적인 primer을 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 c-MET의 725bp 생성물을 확인하였다 (Fig. 2).

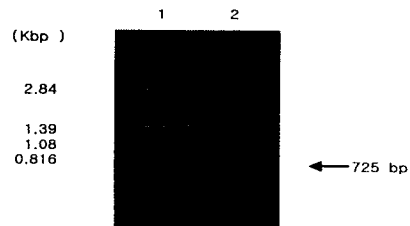


Fig. 2. RT-PCR of c-MET mRNA in TM4 Sertoli cells.. Lane 1 : DNA markers. Lane 2 : TM4 cell.

### HGF 처리에 의한 TM4 cell line의 형태적 변화

GFR-Matrigel bed를 형성시킨 후, 무혈청 조건에서 TM4 cell을 배양하면서 HGF를 처리한 군에서는 HGF 비처리군보다 cord 형성이 빠르게 일어났다(Fig. 3A and B). 이후 cord에서 tubule의 특이적인 형태인 세포들 사이의 공간인 lumen과 같은 구조가 관찰되며 (Fig. 3C), 배양 6일에는 관의 형태로 변화되어 자란다 (Fig. 3D). 이는 TM4 cell의 체외분화를 통한 tubule구조 형성에 ECM과 세포간 상호작용 뿐 아니라 HGF와 같은 성장인자와 세포간 상호작용을 포함한 입체적인 분화조절이 관여하는 것으로 사료된다.

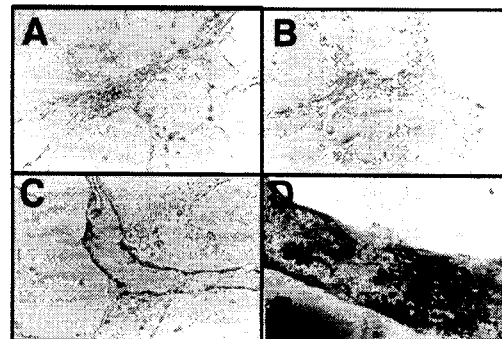
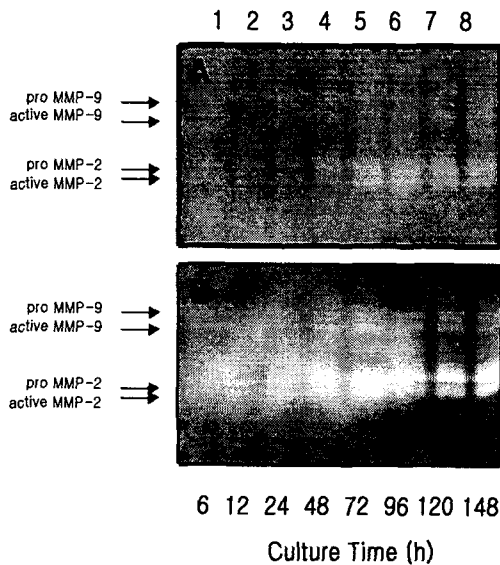


Fig. 3. Influence of HGF on tubule formation by TM4 Sertoli cells on GFR-Matrigel. (A) chain formation, 12hr (X100). (B) cord formation, 2days (X100). (C) tubule-like structure, 4days (X100). (D) tubule formation, 7days (X40).

### Zymography을 이용한 MMP-2와 -9의 검출

TM4 cell의 배양과정에서 배양액을 채취하여 gelatin zymography를 수행한 결과 MMP-2와 -9을 검출하였다. MMP-2는 세포의 부착과 함께 검출되기 시작하여 서서히 증가하였으며, MMP-9는 cord가 형성되는 시기 이후에 검출되어 이후 증가하였다. 이는 MMP-9이 형태분화와 밀접한 관련이 있다고 생각된다. 특히 HGF를 처리한 군 (Fig. 4B)에서는 비처리군 (Fig. 4A)보다 MMP-2와 -9이 강한 발현을 보이며, 특히 tubule 형태를 보이는 배양 6일과 7일에는 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 4B land 7 and 8). 따라서 HGF는 MMP-2와 -9의 발현을 증가시키고 이런 MMPs의 발현은 tubule의 형성에 중요한 역할을 수행하는 것으로 사료된다.



**Fig. 4.** Zymography of spent media from the TM4 cells culture on the Matrigel bed. GFR-Matrigel culture of TM4 cells in minimal culture medium without (A) and with (B) HGF (5 ng/ml).

### 요약

TM4 Sertoli cell의 체외 관강형성 유도에 미치는 세포외기질 (ECM) 및 hepatocyte growth factor (HGF)의 역할과 세포분화 과정에서 MMP의 발현의 변화를 조사하였다. Matrigel bed (60%, v/v) 상에서 배양한 TM4 cell은 무혈청 조건하에서 chain 분화단계를 거쳐 cord의 구조로 분화하였다. 그러나 이후의 분화는 일어나지 않았다. TM4 cell에서 c-MET (HGF receptor)의 발

현을 확인하였으며 HGF를 첨가한 배양액에서 분화가 촉진되었으며, cord에서 tubule로의 분화가 유도되었다. 또한 TM4 cell의 분화는 MMP-2 및 MMP-9의 발현이 증가를 수반하였으며 HGF는 MMPs의 발현을 증가시켰다. GFR-Matrigel과 성장인자인 HGF는 무혈청 배지에서 TM4 cell의 체외에서 관강형성에 필요한 환경을 제공하며, MMP-2 및 -9은 TM4 cell의 체외분화 과정에서 조절역할을 수행하는 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Hadley MA, Weeks BS, Lieinman H, Dym M (1990) Laminin promotes formation of cord-like structures by Sertoli cells in vitro. *Dev Biol* 140: 318-327.
- Hiroiyuki S, Elvino J, Tatsuo T, Jonathan B, Sanjay N (1997) An in vitro tubulogenesis system using cell lines derived from the embryonic kidney shows dependence on multiple soluble growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6279-6284.
- Matsumoto K, Nakamura T (1996) Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem* 199: 591-600.
- Oscar FPS, Sanjay KN (1993) HGF-induced tubulogenesis and branching of epithelial cells is modulated by extracellular matrix and TGF- $\beta$ . *Dev Biol* 160: 293-302.
- Russell LD, Bartke A, Goh (1989) Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat* 184: 179-189.
- Streuli C (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11: 634-640.
- Tung PS, Fritz IB (1990) Interactions of Sertoli cells with myoid cells in vitro. *Biol Reprod* 23: 207-217.
- van der Wee K, Hofmann MC (1999) An in vitro tubule assay identifies HGF as a morphogen for the formation of seminiferous tubules in the postnatal

mouse testis. *Exp Cell Res* 252: 175-185.

Wang H, Keiser JA (2000) Hepatocyte growth factor enhance MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 272: 900-905.

Wei G, Mahowald AP (1994) The germline. *Ann Rev Genet* 28: 309-324.