

위 연구는 과학기술부 21세기프론티어 연구개발사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (과제관리번호 SC11011)에 의해 수행되었습니다.

P-38 동결보존액의 조성에 따른 인간배아줄기세포의 대량 동결보존에 관한 연구

하성윤¹ · 오선경^{1,2} · 김희선^{1,2} · 구승엽^{1,2} · 지병철³ · 서창석^{1,2,3}
김석현^{1,2} · 최영민^{1,2} · 김정구² · 문신용^{1,2}

서울대학교 의과대학 의학연구원 인구의학연구소¹, 산부인과학교실²,
분당서울대학교병원 산부인과³

Background & Objectives: 인간배아줄기세포가 많은 연구실에서 효율적으로 연구되기 위해서는 대량으로 간편하게 동결할 수 있는 방법에 대한 연구가 필수적이다. 기존의 인간배아줄기세포의 동결 방법은 주로 배아의 동결보존에 사용된 방법과 같은 초자화동결법을 이용하여 왔다. 그러나 이 방법은 극히 소량의 세포만을 동결할 수 있고 액체 질소에 직접적으로 노출됨으로써 세포 오염의 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 본 연구에서는 대량의 인간배아줄기세포를 간단하고 안전하게 동결 보존할 수 있는 방법에 대해 연구하고자 하였다.

Method: 인간배아줄기세포는 서울대 인구의학연구소에서 확립된 SNUhES3를 사용하였다. 세포군은 계대 후 5일에 가늘게 뽑은 유리 피펫을 이용해 약 200~300개 정도의 세포로 구성된 작은 세포덩어리로 잘랐다. 세포덩어리는 튜브에 모아서 가라 앉힌 후에 상층액을 제거하였다. 동결 보존액의 조성에 따른 차이를 비교하고자 동결보존액은 i) DF; 10% DMSO, 90% FBS, ii) DC; 10% DMSO, 90% 세포배양액 (20% serum replacement, 80% DMEM-F12, basic FGF 제외) iii) DEF; 5% DMSO, 10% ethylene glycol (EG), 50% FBS, 35% DMEM-F12의 세 가지 조성으로 준비하였다. 각각의 동결보존액을 모아진 세포에 처리하여 cryovial로 옮기고, freezing container (Nalgene)에서 분당 1°C씩 떨어져 -70°C가 되도록 한 후 액체질소에 보관하였다. 급속용해는 37°C 수조에서 빠르게 녹인 후 배양액으로 동결액을 희석하고 새 영양세포층 위에서 배양하였다. 용해 후 생존율을 비교하였고, 인간배아줄기세포의 특성을 유지하고 있는지 확인하기 위해 alkaline phosphatase (AP) 및 SSEA-1, 4의 발현 여부를 조사하였으며 배아체의 형성을 조사하였다.

Results: 위의 세포를 용해한 후, 10일 후의 세포군 생성률은 DEF군에서 약 14.0%로 DF (3.0%)군, DC (3.0%) 군보다 뚜렷하게 높은 것을 확인할 수 있었다. 세 번 이상의 반복실험 결과 DEF군에서 SNUhES3의 생존율은 지속적으로 12~19%를 유지하였다. 급속용해 후 세포군은 약 3~4일이 지난 후에 관찰할 수 있었으며, 10일 후에 동결하지 않은 세포군의 7일째와 비슷한 크기를 보였다. 동결보존 후의 세포는 배양 중에도 안정된 인간배아줄기세포의 형태를 가지고 있었고, 90% 이상의 계대 안정성을 보였다. 2계대 후에 AP와 SSEA-4 염색 결과 양성 반응이 나타났고, SSEA-1에 대해서는 음성 반응을 나타내어 정상적인 인간배아줄기세포의 특성을 지니고 있는 것을 확인하였다. 배아체 역시 동결보존하지 않았던 세포와 유사하게 형성되었다.

Conclusions: 인간배아줄기세포를 간편하게 대량 동결보존하기 위해서 동결방지제를 적절히 배합하여 사용해 본 결과, 안정된 생존률을 확인할 수 있었고 고유의 특성도 유지하고 있음을 알 수 있었다.

위 연구는 과학기술부 21세기프론티어연구개발사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (과제관리번호 (SC11011)에 의해 수행되었습니다.

P-39 Protein Profiling by SELDI-TOF Mass Spectrometry and Differential Expressions of Apoptosis Regulators in Human Testis with Obstructive and Nonobstructive Azoospermia

Kim SK¹, Lee HJ², An SY², Kim HS¹, Park YS³, Seo JT³, Yoon YD¹

¹Laboratory of Reproductive Endocrinology, Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul, Korea, ²Department of Physiology, Eulji University School of Medicine, Taejeon, Korea, ³Samsung Cheil Hospital, Seoul, Korea

Background & Objectives: To provide evidence that a pathological process of apoptosis in testicular cells may participate in developing hypospermatogenesis of the patients with nonobstructive azoospermia and to find the effective biomarkers by protein profiling using surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS).

Method: We investigated the differential expressions of Fas/FasL, caspase-3 and Bcl-2 related gene families and provided protein profiling by SELDI-TOF MS in normal testis and in some selected human testicular pathologies. By means of RT-PCR and immunohistochemistry, differential expressions of Fas/FasL, caspase-3 and Bcl-2 related gene families were evaluated in the human testis. The frequency of apoptosis of testicular cells was demonstrated by the in situ 3'-end-labelling method. SELDI analysis was performed by using hydrophobic chips (H4) to compare and identify differences in the protein expression patterns between testicular pathologies and normal testis at the molecular weight from 10 to 100 kDa (i.e., using SPA as a matrix).

Results: Fas and FasL mRNAs were increased in testes with Sertoli cell only (SCO) syndrome and Klinefelter's syndrome. Immunohistochemistry demonstrated the intense coexpressions of Fas and FasL in Leydig cells of normal testes, however, this was not associated with the presence of apoptotic interstitial cells. The positive staining of FasL in the seminiferous tubules was also observed in Sertoli cells and Fas expression was detected on occasional spermatocytes in normal testes. In the testes with SCO syndrome, increased immunostaining of Fas and FasL was detected in both Sertoli and interstitial cells and the increased apoptotic cells were also observed in some of SCO patients. In the testes with maturation arrest, the expression of FasL was only increased in/around Sertoli cells. The differential expressions of proteins in testicular pathologies (SCO syndrome, Klinefelter's syndrome, maturation arrest, and hypogonadotropic hypogonadism) and normal cases were examined by SELDI MS using H4 ProteinChip array. In general, there were less peaks in the testicular pathologies than in normal cases. Especially, the 16 kDa peak in the testicular pathologies was lower (around 70%, intensity) in case of SCO or disappeared in cases of maturation arrest, Klinefelter's syndrome and hypogonadotropic hypogonadism.

Conclusions: The present study demonstrates that disorders of the control and regulation of apoptosis