

## 돼지 웅성 생식선 줄기세포의 체외배양기법 개발

김용희<sup>1</sup> · 김병각<sup>1</sup> · 이용안<sup>1</sup> · 김방진<sup>1</sup> · 김기중<sup>1</sup> · 이명식<sup>2</sup> · 임기순<sup>3</sup> · 류범용<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 동물자원과학과, <sup>2</sup>농촌진흥청 축산과학원 한우개량사업소, <sup>3</sup>농촌진흥청 축산과학원 동물바이오효공학과

### Development of *In Vitro* Culture System for Male Germline Stem Cells in Porcine

Yong-Hee Kim<sup>1</sup>, Byung-Gak Kim<sup>1</sup>, Yong-An Lee<sup>1</sup>, Bang-Jin Kim<sup>1</sup>, Ki-Jung Kim<sup>1</sup>,  
Myeong Sik Lee<sup>2</sup>, Gi-Sun Im<sup>3</sup> and Buom-Yong Ryu<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science & Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea

<sup>2</sup>Hanwoo Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Pyungchang 232-950, Korea

<sup>3</sup>Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

#### ABSTRACT

Spermatogonial stem cells(SSCs) only are responsible for the generation of progeny and for the transmission of genetic information to the next generation in male. Other *in vitro* studies have cultured SSCs for proliferation, differentiation, and genetic modification in mouse and rat. Currently, information regarding *in vitro* culture of porcine Germline Stem Cell(GSC) such as gonocyte or SSC is limited and is in need of further studies. Therefore, in this study, we report development of a successful culture system for gonocytes of neonatal porcine testes. Testis cells were extracted from 10~14-day-old pigs. These cells were harvested using enzymatic digestion, and the harvested cells were purified with combination of percoll, laminin, and gelatin selection techniques. The most effective culture system of porcine gonocytes was established through trial experiments which made a comparison between different feeder cells, medium, serum concentrations, temperatures, and O<sub>2</sub> tensions. Taken together, the optimal condition was established using C166 or Mouse Embryonic Fibroblast(MEF) feeder cell, Rat Serum Free Medium(RSFM), 0% serum concentration, 37°C temperature, and O<sub>2</sub> 20% tension. Although we discovered the optimal culture condition for proliferation of porcine gonocytes, the gonocyte colonies ceased to expand after one month. These results suggest inadequate acquirement of ingredients essential for long term culture of porcine GSCs. Consequently, further study should be conducted to establish a successful long-term culture system for porcine GSCs by introducing various growth factors or nutrients.

(Key words : Spermatogonial stem cells, Germline stem cells, Gonocyte, Porcine, *In vitro* culture)

#### 서 론

생식세포란 한 세대의 유전적 정보를 다음 세대로 전달하는 중요한 매개체로서 감수 분열과 체세포 분열을 통하여 최종적으로 웅성에서는 정자를 자성에서는 난자를 생성한다. 배아기 때의 생식세포는 초기 형태의 생식세포로서 primordial germ cell(PGC)이라고 불리며 proximal epiblast에서 발생되어 요막 기저부에 위치하고 있다가 hindgut을 통하여 genital ridge로 이동하고 군집을 형성한다(McLaren, 2003). Genital ridge에 군집 형성 후 웅성생식세포는 gonocyte로 분화되어 정소내 세정관의 중심부에 존재하고 있다가 출생 후 세정관의 기저막으로 이동하고 정원줄기세포로 분화된다(Brinster, 2002). 정원줄기세포는 세정

관의 기저부에 위치하는데, 이는 정원줄기세포와 주변 Sertoli 세포들간의 밀접한 상호작용에 의해 일어나는 것이라고 여겨진다(Chiarini-Garcia 등, 2003). 일반적으로 정원줄기세포는 niche라 불리는 특별한 미세환경에서 존재하고 주변 인자들과의 상호 작용에 의하여 자가증식(self-renewal) 또는 분화가 조절되어 정원세포, 정모세포, 정세포 그리고 최종적으로 정자를 생성하는 정자형성과정을 일으킨다(Schofield, 1978). 그러나 정원줄기세포는 성체 쥐의 경우 정소 내 3,333개 세포당 1개(Tegelenbosch와 de Rooij, 1993), 성체 랫트에서는 정소 내 500개 세포당 1개로써 매우 소수로 존재하는 것으로 알려지고 있다(Huckins, 1971; Orwig 등, 2002). 따라서 순수도가 높은 비율의 생식선 줄기 세포군을 확보하는 것은 생식선 줄기세포의 생물학적, 분자적 연구를 위한 가장 첫 단계가 된다.

\* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070401034012)과 교육과학기술부 21세기프론티어연구개발사업 세포응용연구사업단의 연구비 지원(과제번호: SC-5140)에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-31-670-4687, E-mail: byryu@cau.ac.kr

생식선 줄기세포의 순수도 증진을 위한 연구는 세포 표면에서 발현되는 특이적 단백질에 대한 항체를 이용한 분리법(fluorescence activated cell sorting, magnetic activated cell sorting) (Shinohara 등, 2000; Kubota 등, 2003; Ryu 등, 2004; Ryu 등, 2005), 세포외 기질물질(extracellular matrix)을 이용한 분리법(Shinohara 등, 1999; Orwig 등, 2002) 등이 사용되어지고 있고, 이들 분리법을 통해 순수도가 증진된 정원줄기세포는 체외 배양조건 확립을 위한 연구에 폭넓게 이용되고 있다.

생식선 줄기세포의 체외 배양 연구는 줄기세포의 기작을 연구하기 위한 가치 있는 연구 중 하나이다. 성공적인 체외 배양을 위해서는 배양환경(배양액, 공배양세포, 성장인자 그리고 대기조건 등)의 적절한 선택이 필요하다. 2003년 Brinster 팀에서는 성숙, 미성숙 쥐 정원줄기세포의 *in vitro* 환경 효과를 검증하기 위해 7일 배양 연구를 실시하였고, 공배양세포, 배양액, 성장인자가 정원줄기세포의 성장 및 분화에 주는 영향을 보여주었다(Nagano 등, 2003). 최근 보고된 생쥐 정원줄기세포의 장기간 배양 성공 연구 역시 배양 환경의 중요성을 잘 보여주고 있다(Kanatsu-shinohara 등, 2003). 하지만 현재 정원줄기세포의 특성, 기작 등에 관한 정보가 충분치 않은 관계로 안정적인 배양 환경을 확립하는 데는 많은 어려움이 따르고 있는 실정이다. 특히 중, 대형 가축의 줄기세포 연구는 실험동물 연구와 비교하여 생물학적인 정보가 더욱 적기 때문에 가축을 대상으로 한 연구 결과는 실용적인 측면에서 더욱 가치가 있다고 보여진다.

본 연구는 가축 산업 및 생명공학기 기법의 개발에 유용성이 높은 돼지를 대상으로 생식선 줄기세포의 체외 배양 조건을 구명하고 이를 통한 돼지 생식선 줄기세포의 특성 연구와 활용법 개발을 위한 기반 기술을 확립하기 위하여 실시하였다. 본 연구에서는 어린 돼지의 정소로부터 회수된 생식선 줄기세포의 체외 배양조건을 확립하기 위하여 배양환경(세포배양액, 공배양 세포, 혈청 첨가, 온도, 산소농도)에 따른 생식선 줄기세포의 형태 및 수적인 변화 양상을 조사하였다. 결과적으로 돼지 생식선 줄기세포는 적절한 배양 환경 하에서 실험동물의 연구에서 나타났던 형태로 유사한 세포괴를 형성하였고 1 달여 간 증식하는 양상을 보였다. 본 연구에서 시도된 돼지 생식선 줄기세포의 체외 배양조건 구명에 관한 결과들은 향후 생식선 줄기세포의 활용법 개발에 대한 기반기술로서 사용되어질 수 있을 것이라고 사료된다.

## 재료 및 방법

### 돼지 정소 세포회수

돼지 정소세포를 회수하기 위하여 생후 10~14일령의 3원 교잡종 돼지(Landrace×Yorkshire×Duroc)의 정소를 외과적인 방법으로 회수한 후 4°C PBS 용액에 담아 실험실로 운반하였다. 백막을 제거하고 정소조직을 가위로 잘게 자른 후 collagenase(1 mg/ml, type IV Sigma, Cat. No. C5138)와 hyaluronidase(1 mg/ml; Sigma, Cat. No. H3884)가 첨가된 Dulbecco Phosphate Buffered Saline(DPBS, Gibco BRL, Cat. No. 14200) 용액에 넣어 37°C에서 10분간

배양하여 세정관을 분리하였다. 이후 분리된 세정관을 DPBS로 3회 세척하고 0.25% trypsin - EDTA(Gibco BRL, Cat. No. 25300) 용액으로 옮겨 37°C에서 5분간 처리하였다. Trypsin을 비활성화 시키기 위해서 세포가 담긴 배양액에 Fetal Bovine Serum(Defined FBS; HyClone, Cat. No. SH30070.03)을 첨가하였다. 이후 세포부유액을 nylon mesh(pore size, 40 μm Falcon, Cat. No. REF 352340)에 통과시켜 잔여조직을 제거하고 생식선 줄기세포인 gonocyte를 포함하는 정소세포를 회수하였다.

### 돼지 정원줄기세포 순수도 증진

정소세포로부터 순수도 높은 생식선 줄기세포를 얻기 위한 첫 단계로 회수된 정소세포를 대상으로 비연속적 Percoll 농도법을 적용하였다(Goel S 등, 2007). 각각 1.5 ml의 40%와 20% Percoll 액을 순차적으로 15 ml 튜브(Falcon)에 주입하여 두 개의 Percoll 층을 만들었다. 40% Percoll은 40% Percoll solution(Sigma, Cat. No. P1644), 10% 10x DPBS, 1% FBS, 0.5% 항생제 (50 units/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin Gibco BRL, Cat. No. 154140), and 48.8% ultra-pure water(Gibco BRL, Cat. No. 15230)을 혼합하여 제조하였고, 20% Percoll은 20% Percoll solution, 10% 10x DPBS, 1% FBS, 0.5% 항생제 (50 units/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin), and 68.8% ultra-pure water를 혼합하여 제조하였다. 세포부유액 2 ml(5×10<sup>6</sup> 세포/ml)를 Percoll 층의 최상부에 Percoll 층과 섞이지 않게 조심스럽게 주입하여 넣고 600×g, 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. Percoll의 상층부분에 있는 미세 세포들을 제거하고 gonocyte 세포가 있는 중층(20%와 40% Percoll 사이 층)을 회수한 후 기본배양액 [DMEM(Gibco BRL, Cat. No. 12100-046)에 10% FBS, 6 mM L-glutamine (Gibco BRL, Cat. No. 25030), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma, Cat. No. M7522), 100 units/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin 첨가]을 이용하여 희석하고 600×g, 4°C에서 7분 원심분리 하였다. 회수된 세포부유액에 남아있는 Percoll을 없애기 위하여 기초배양액으로 2회 추가 세척을 실시하였다.

순수도를 높이기 위한 두 번째 방법으로 gonocyte의 경우 세포의 기질 물질과 gelatin 등에 친화력이 없다는 특성을 고려하여 laminin(Sigma, Cat. No. L2020)이 피복된 배양 접시와 gelatin(Sigma, Cat. No. G2500)이 피복된 배양 접시를 순차적으로 이용하여 정소세포들로부터 gonocyte를 회수하였다. Laminin이 피복된 배양접시의 준비를 위하여 먼저 60-mm Petri dishes(Falcon)에 laminin 용액(20 μg laminin / 1 ml DPBS)을 넣고 37°C에서 12시간 배양하였다. 배양 후 Petri dish를 DPBS로 세척하고, 세포들의 비특이적 부착을 막기 위하여 0.05% BSA(Sigma, Cat. No. A3803) 용액을 이용하여 37°C에서 1시간 전배양하였다. Gelatin 피복을 위하여 Petri dish에 0.2% gelatin 액을 넣고 상온에서 1시간 배양하여 전처리하였다.

기초배양액을 이용하여 희석된 3 ml의 세포부유액(총 1.0×10<sup>7</sup> 세포)을 laminin이 피복된 배양접시에 넣고 20분간 배양한 후 배양접시 바닥에 부착되지 않은 세포들을 회수하였다. 회수된 세포를 기본배양액으로 희석하고 다음 단계로서 gelatin이 피복된 배양접시에 넣고 37°C에서 12시간 배양한 후 배양접시를 DPBS로 3회 세척하는 방법으로 배

양접시 바닥에 부착되지 않은 세포들을 회수하였다. 이와 같은 방법으로 회수되어진 gonocyte의 순수도는 약 60~80%이었다.

#### 체외 배양

기본 배양조건으로는 GDNF(10 ng/ml R&D System, Cat. No. 212-GD), GFR  $\alpha$ 1(75 ng/ml R&D System, Cat. No. 560-GR), bFGF(1 ng/ml BD Biosciences, Cat. No. 354060)가 첨가된 rat serum free medium(RSFM; Ryu 등, 2005)과 배양 환경으로서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> 조건을 사용하였다(이하 기본 배양조건). 배양시 2~3일 간격으로 배양액을 교체하였고, 계대배양은 1주일 간격으로 실시하였으며, 피펫을 이용하여 배양접시내 배양액을 흡입하고 방출하는 것을 반복하는 물리적 방법으로 공배양세포들로부터 배양되어지는 세포들을 회수하였다.

#### 공배양세포의 준비

체외 배양 조건을 규명하기 위하여 SIM mouse embryo derived thioguanine and ouabain resistant(STO), mouse embryonic fibroblast(MEF), pig embryonic fibroblast(PEF), C166(mouse yolk-sac endothelial cell line, ATCC, Cat. No. CRL-2581) 세포를 배양하고 이를 공배양세포로 이용하여 공배양세포의 처리 효과를 비교하였다. 실험을 위한 공배양세포 STO, MEF, PEF, C166 세포는 각각  $0.5 \times 10^5$ ,  $0.5 \times 10^5$ ,  $0.625 \times 10^5$ ,  $0.25 \times 10^5/\text{cm}^2$ 씩 준비하였다. 모든 세포는 공배양세포로 사용하기 전에 mitomycin C(500 ug/ml; Sigma, Cat. No. M4287)로 처리되었다.

#### 세포배양액

세포 배양액의 효과를 비교하기 위하여 DMEM, Minimal Essential Medium- $\alpha$  (MEM  $\alpha$ , Gibco BRL, Cat. No. 12000-022), Mouse serum free medium(MSFM; Kubota 등, 2004), RSFM 배양액을 사용하였고 세포배양은 공배양 세포로서 MEF 혹은 C166를 사용하였고 기본 배양조건하에서 실시하였다. 또한, 배양액에 첨가되는 혈청 농도 변화에 따른 효과를 알아보기 위하여 기본 배양조건하에 배양액에 FBS가 각각 0%, 1%, 15% 첨가된 배양액을 사용하였다.

배양기내 온도와 산소 농도에 따른 배양 효과를 조사하기 위하여 기본 배양조건하에서 온도의 경우 37°C와 38.5°C로 조정된 조건하에서 온도에 따른 배양효과를 조사하였고 산소 농도의 경우에는 각각 산소 농도 5%, 10%, 20%로 조정된 조건하에서 배양효과를 조사하였다.

## 결 과

#### 공배양세포의 처리 효과

돼지 생식선 줄기세포의 체외 배양 조건을 규명하기 위하여 첫 번째 단계로서 다양한 종류의 공배양세포들의 처리 효과를 검증하였다. 기본 배양조건으로서 실험동물을 대상으로 개발되었던 GDNF, GFR  $\alpha$ 1과 bFGF가 첨가된 무혈청 배양액(RSFM)을 기본 배양액으로 사용하였고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> 조건을 기본 배양 조건으로 사용하였

다. 마우스와 랫트와 같은 실험동물을 대상으로 한 연구 결과를 토대로 배양 중 생식선 줄기세포들이 배아줄기세포와 유사한 세포괴를 형성한다는 것을 기준으로 배양 중 세포괴의 형성(Fig. 1) 여부와 세포괴의 수적 변화를 관찰하였다. 다양한 공배양 세포들 중 배아줄기세포와 실험동물의 정원줄기세포의 배양에 효과가 있는 것으로 알려진 STO와 MEF 세포의 효율을 조사하였고, 또한 PEF와 C166 세포의 효과를 검증하였다. 결과로서 1~2주간의 배양 동안 STO와 PEF 공배양세포 처리군에서는 전반적으로 단일 세포 혹은 2~4세포들의 결합 정도만이 관찰되었었고 세포괴의 형성은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 1(A), (B)). 반면 MEF와 C166 처리군에서는 처리 간 큰 차이 없이 배양되는 생식선 줄기세포들의 분열, 증식 양상인 세포괴의 형성이 관찰되었고, 배양 일이 경과함에 따라 세포괴의 크기가 증가됨이 관찰되었다(Fig. 1(C), (D), 흰색 원).

#### 세포배양액의 처리 효과

배양액의 처리효과를 조사하기 위하여 DMEM, MEM  $\alpha$ , MSFM과 RSFM의 효과를 조사하였다. C166와 MEF를 공배양 세포로 사용한 1~2주간의 배양 기간 동안 DMEM과 MEM  $\alpha$ 의 처리군에서는 세포괴의 형성이 거의 관찰되지 않았던 반면 MSFM에서는 처리된 공배양세포 조건 간에 큰 차이 없이 일정 수의 세포괴 형성이 관찰되었다(Fig. 2). 그러나 RSFM의 처리에서 MSFM의 처리와 비교하여 세포괴의 수 및 형성된 세포괴의 크기 등에서 더 높은 증가양상이 관찰되었다(Fig. 5(A), (B)).

#### 배양 온도 및 혈청 첨가 효과

세포 배양 시 배양기내 온도를 돼지의 체온과 유사한 38.5°C로 유지하였다. 이 처리에서 세포괴의 형성은 관찰되지 않았으며, 배양일이 경과됨에 따라 돼지 정소로부터 gonocyte의 분리과정 중 소수 혼입되었던 정소세포들의 증

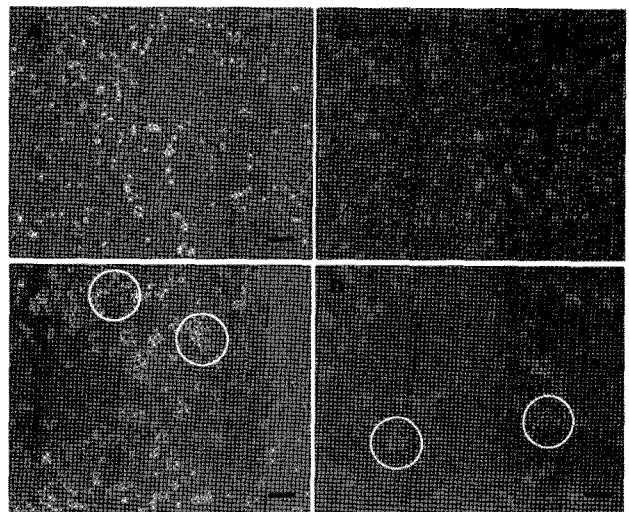
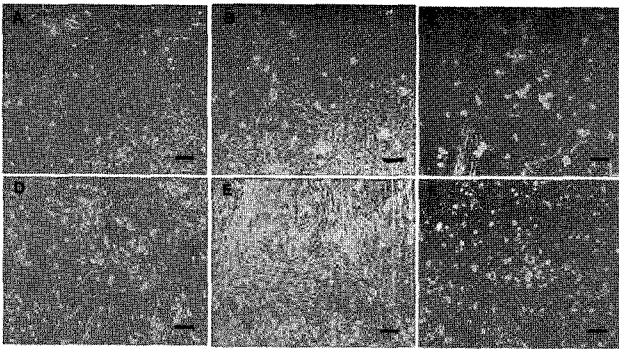


Fig. 1. Development of porcine gonocytes comparative between feeder layers. (A) Porcine gonocytes on STO cells mitotically inactivated by mitomycin C. (B) Porcine gonocytes on a PEF feeder layer. (C) Colonies of gonocyte on a MEF feeder and (D) a C166 feeder. Bar=100 um (A~D).

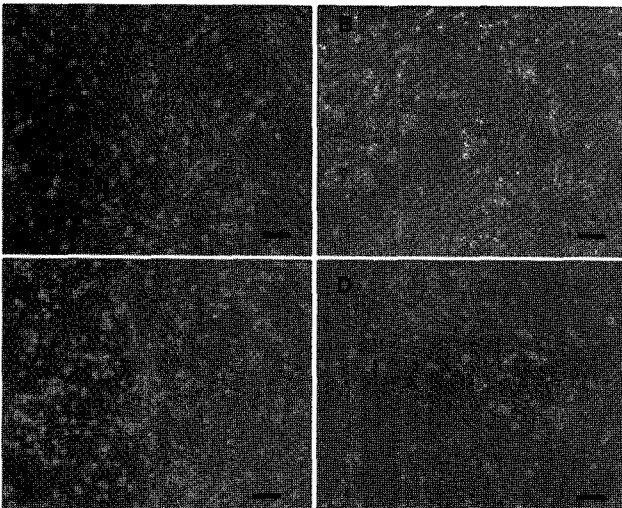


**Fig. 2. Comparison of medium between DMEM, MEM $\alpha$ , and MSFM.** (A~C) Gonocytes in culture medium with (A) DMEM, (B) MEM $\alpha$ , and (C) MSFM on a C166 feeder. (D~F) *In vitro* culture conditions using different medium, (D) DMEM, (E) MEM $\alpha$ , and (F) MSFM, on a MEF feeder. Bar=100  $\mu$ m (A~F).

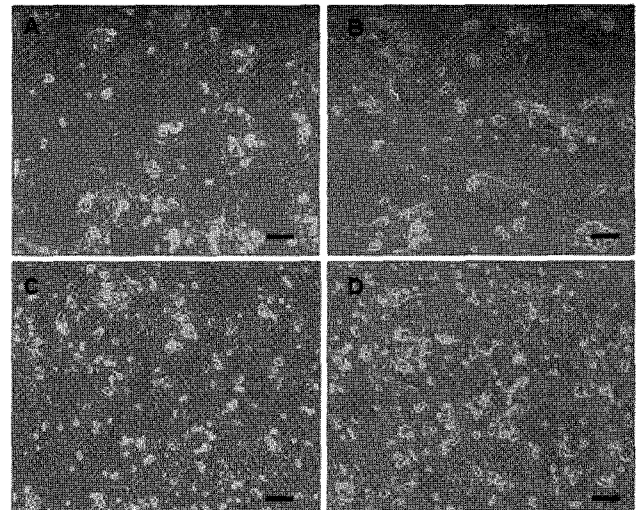
식이 상대적으로 증가하면서 점차적으로 정소세포들이 배양접시 바닥을 가득 채우는 양상이 관찰되었다(Fig. 3(A), (C)). 따라서 배양기 내의 온도 조건을 기본 조건인 37°C로 재조정하고 1% 또는 15%의 FBS를 기본 배양액 내에 첨가하였을 때 배양에 미치는 효과를 조사하였다. 1~2주간의 배양기간 동안 기본 배양액에 혈청을 첨가한 처리군에서 배양 초기에는 일정 정도의 세포피 형성이 관찰되었으나 배양일이 경과됨에 따라 세포피의 수가 감소되는 양상이 관찰되었으며, 상대적으로 혼입되었던 정소세포들의 증식은 배양일이 경과됨에 따라 증가되는 양상을 나타내었다(Fig. 3(B), (D)).

**배양 시 산소 농도 효과**

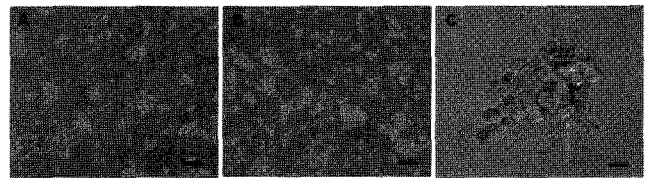
산소의 대기 농도(20%)와 비교하여 낮게 조정된 산소



**Fig. 3. Effect of temperature or serum concentrations on gonocyte proliferation.** (A) There were no effect of growth for gonocytes at 38.5°C, although testicular cells except for gonocyte were expanded more vigorously on a C166 feeder or (C) a MEF feeder. (B) Conditions contained serum (1%) stimulated proliferating testicular cells other than gonocytes on a C166 feeder or (D) a MEF feeder. Bar = 100  $\mu$ m (A~D).



**Fig. 4. Oxygen tension changes for culture environment.** (A, C) The number of gonocyte colonies on a C166 (A) or MEF feeder (C) in 5% O<sub>2</sub> condition was fewer than (B, D) colonies on a C166 (B) or MEF feeder (D) in 10% O<sub>2</sub> condition. However, their colony forming rate in 5% and 10% O<sub>2</sub> was less than in general oxygen tension (20% O<sub>2</sub>). Bar=100  $\mu$ m (A~D).



**Fig. 5. *In vitro* growth of male porcine gonocytes.** (A, B) Expansion of gonocytes cultured with C166 (A) or MEF (B) feeder cell, RFSM, 0% serum concentration, 37°C temperature, and 20% O<sub>2</sub> tension. (C) Enlargement of colony at 4weeks. Bar=100  $\mu$ m (A~D).

5%, 10%의 효율을 검증한 결과, 두 조건 모두에서 세포피의 형성이 관찰되었으나 산소농도 10%에서 5%보다 세포피의 수 및 형성 정도가 높게 나타났다(Fig. 4). 그러나 산소농도 10% 조건에서의 유의한 상승효과는 20% 농도와 비교하였을 때 많은 차이를 나타내지 않았다(사진 예시되지 않음). 상기 결과들을 토대로 공배양 세포 MEF와 C166, GDNF(10 ng/ml), GFR $\alpha$ 1(75 ng/ml)과 bFGF(1 ng/ml)이 첨가된 RFSM, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 20% O<sub>2</sub>를 사용하는 배양조건을 이용하여 돼지 gonocyte 배양을 시도하였을 때, 세포피의 증가가 가장 활발하게 나타났다.

**돼지 생식선 줄기세포의 장기간 배양**

상기 결과들을 토대로 GDNF(10 ng/ml), GFR $\alpha$  (75 ng/ml)와 bFGF(1 ng/ml)가 첨가된 RFSM, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>와 공배양세포로서 C166와 MEF를 사용하는 배양조건을 이용하여 돼지 생식선 줄기세포의 장기간 배양을 시도한 결과, passage가 경과되어도 생식선 줄기세포의 증식 양상인 세포피가 나타남이 관찰되었다(Fig. 5). 그러나 passage 4(1달 이상 배양) 이후에는 세포피의 증가 양상이 나타나지 않았으며, 형성되었던 세포피가 점차 줄어드는 양상이 관찰되었다.

## 고 찰

음성의 gonocyte는 배아의 PGC가 postnatal 정소의 정원줄기세포로 발달하기까지 그 사이를 연결해주는 발생과정 중의 생식선 줄기세포이다. 포유동물에서 gonocyte와 정원줄기세포는 정소 내 매우 소수만이 존재하는데 설치류의 경우 정소 세포 중 각각 약 1%와 0.03% 정도로 존재하는 것으로 추정되고 있다(Tegelenbosch와 de Rooij, 1993; Orwig 등, 2002). 따라서 생식선 줄기세포의 연구를 위해서는 정소로부터 생식선 줄기세포의 순수도가 증진된 세포군의 회수 및 확보가 주요한 선결조건이 된다. 본 연구에서는 Percoll을 이용한 원심분리법과 세포외 기질물질인 laminin과 gelatin의 연속적 선택법을 이용하여 생식선 줄기세포의 순수도를 증진시켰고 증진된 세포군을 대상으로 체외 배양기법을 연구하였다.

줄기세포의 체외 배양을 위하여 줄기세포의 성장에 좋은 환경을 제공하는 것으로 기대되는 특정 세포주, 즉 공배양세포를 사용하는 배양법이 널리 사용되고 있다. 공배양세포가 줄기세포와 함께 배양되었을 때의 기대되는 주요 효과는 줄기세포의 부착력을 증가시키고, 줄기세포와 상호작용하여 다양한 인자를 생성함으로써 줄기세포의 성장에 좋은 영향을 주는 측면 등으로 이해되고 있다 (Kanatsu-Shinohara 등, 2005). 대표적인 공배양세포로서 STO와 MEF는 다양한 종들의 배아줄기세포의 배양에 유용성이 보고되고 있으며, 현재 설치류에 있어서 음성 생식선 줄기세포의 체외배양에도 효과적으로 사용되고 있다(Piedrahita 등, 1990; Ropeter-Scharfenstein 등, 1996; Kanatsu-Shinohara 등, 2003; Kubota 등, 2004; Ryu 등, 2005). 최근 Li 등(2003, 2004)은 돼지 배아줄기세포의 배양시 공배양세포로서 동종에서 유래된 PEF를 사용하여 MEF 사용시와 유사한 배양 효과를 얻었다고 보고하였다(Li 등, 2003, 2004). 본 연구의 돼지 생식선 줄기세포 배양시 공배양세포의 효과에 있어서는 그간의 배아줄기세포 연구 결과들과 다소 차이 있는 결과로서 STO나 PEF 처리에서는 유효한 배양 효과가 나타나지 않았다. 반면, MEF와 조혈모 줄기세포(hematopoietic stem cell; HSC)와 공배양되었을 때 HSC를 안정적으로 증식시키고 줄기세포의 특성을 유지시켜 주는 효과를 가지고 있다고 보고되었던(Lu 등, 1996) endothelial cell line인 C166 처리에서는 보다 좋은 배양 효과를 얻을 수 있었다. 현재까지 줄기세포의 배양을 위하여 다양한 종류의 공배양 세포들이 적용되고 있지만 공배양세포의 배양효과에 관한 원인 분석은 복합적인 요인들의 상호작용으로 인하여 명확히 분석하기는 어려운 실정이다. 따라서 돼지 생식선 줄기세포의 배양 시 공배양세포의 효과에 대하여는 추후 좀 더 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

줄기세포를 포함한 모든 세포의 체외배양에 있어서 배양액의 조성은 성공적인 배양에 주요 요인으로 알려져 있다. 세포들의 특성에 맞는 적절한 삼투압과 수소이온 농도의 조정 및 세포대사에 필수적인 첨가물들의 적절한 혼합이 배양액 조성에 주요점이 된다. 최근까지 세포배양을 위하여 다양한 종류의 배양액들이 개발되고 있으며, 줄기세포의 배양을 위하여 첨가물들의 미세조정 등에 따른 효율 증진에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 체외배양 시 혈청은 배양액 첨가물중 중요한 첨가물 중의 하나로 사용

되고 있다. 세포배양액에 첨가물로서 유용 동물로부터 채취된 혈청은 세포 활성화 및 성장에 도움을 주는 여러 물질을 포함한다는 장점으로 인하여 세포배양에 필수적으로 사용되고 있다. 그러나 혈청 사용 시 포함된 성분이 명확히 밝혀져 있지 않다는 점과 혈청이 공급되는 동물의 종이나 연령 등 다수의 요인에 의하여 배양 효과에 변이를 초래한다는 단점을 지니고 있다. 또한 사람의 줄기세포 연구에 있어서는 이종간 혈청 사용에 따른 바이러스의 전이 등의 문제점이 혈청 사용의 제한점으로 대두되고 있다. 여러 장점에도 불구하고 상기와 같은 혈청 사용에 대한 문제점 등으로 인하여 혈청이 배제된 무혈청 배양액을 이용한 배양시스템의 개발에 관심이 모아지고 있다. Kubota 등(2004)은 생쥐 정원줄기세포의 체외배양에 있어서 MEM $\alpha$  배양액을 기본으로 여러 첨가물들의 조정을 통한 생쥐무혈청배양액(mouse serum free medium; MSFM)을 개발하여 성공적인 배양결과를 보고하였다. 이들의 연구에서 무혈청 배양액과 GDNF 처리를 통하여 기능적으로 이상이 없는 생쥐 정원줄기세포의 장기간 배양이 가능하였다. 또한 Ryu 등(2005)은 생쥐에서 개발되었던 무혈청 배양액을 기초로 하여 흰쥐 정원줄기세포의 체외배양을 시도한 결과 지속적인 체외배양효과를 얻을 수 없었으나, 첨가물들의 농도를 미세하게 조정하고 증가시킨 새로운 흰쥐무혈청배양액(RSFM)을 개발하여 7개월 이상 흰쥐 정원줄기세포의 장기 배양증식이 가능함을 보고하였다. 상기 두 연구 모두에서 적정화된 무혈청배양 시스템에 혈청의 첨가 효과를 조사한 결과 0.1%의 저 농도 혈청첨가에서도 배양 시 혼입되었던 정소 유래 somatic cell들의 증식이 활발해지는 반면 정원 줄기세포의 증식은 저하되는 결과를 보고하였다. 이들의 연구를 종합해 보면 정원줄기세포의 체외배양 시 종의 특성에 따라 배양액의 조성이 조정되어야 하며, 적정화된 배양액 조성을 통하여 혈청이 배제된 배양시스템의 활용이 가능함을 알 수 있다. 본 연구에서 돼지 생식선 줄기세포의 배양을 위하여 여러 종류의 배양액을 비교해 본 결과 무혈청배양 조건을 위하여 배양액에 첨가물들의 농도가 증가되었던 RSFM에서 가장 좋은 배양 효과를 얻을 수 있었으며, 혈청 처리 시 상기 연구들의 결과와 유사하게 정소 유래 somatic cell들의 왕성한 증식으로 인하여 생식선 줄기세포의 증식이 저하되는 결과를 얻었다. 따라서 추후 돼지 생식선 줄기세포의 특성에 맞는 배양액 첨가물들의 종류와 미세한 농도 조정을 통하여 적절한 조성을 지닌 무혈청 배양액 개발에 관한 연구가 진행될 경우보다 개선된 배양체계가 구축될 수 있을 것으로 생각된다.

최근 줄기세포의 배양시 온도 조건에 관한 연구로서 mesenchymal stem cell(MSC)을 동물의 체온보다 낮은 온도에서 배양할 경우 산화(oxydation)에 의한 피해가 줄어 세포활성을 유지시킴에 따라 MSC의 증식에 도움이 된다고 보고되었다(Alexandra 등, 2006). 또한, 배양기내 산소농도를 저 농도로 조정할 경우 배아 발생의 증진 효과 및 배아 줄기세포의 분화 조절에 따른 증식 조절 효과가 있으며, 흰쥐 정원줄기세포의 배양에도 좋은 효과가 있다고 보고되었다(Nagy 등 2003; Ryu 등 2005; Kurosawa 등 2006). 본 연구에서 배양기내 온도와 산소 농도의 효과를 조사한 결과, 돼지의 체온과 유사한 38.5°C의 경우 배양접시 내 somatic cell들의 증식이 왕성해지면서 배양 환경이 저해되는 결과가 초래되었으며, 산소 농도의 경우 저 농도로 조정되었을 경우 전반적인 세포 증식이 저하되는 결과가 나타남에 따

라 저 농도 효과는 나타나지 않았다.

본 연구에서 돼지 생식선 줄기세포의 체외배양을 위하여 여러 배양조건들을 검증한 결과, 공배양 세포로서 MEF와 C166, 무혈청배양액인 RSFM, soluble factor[GDNF(10 ng/ml), GFR $\alpha$ 1(75 ng/ml)와 bFGF(1 ng/ml)]와 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> 조건하에서 생식선 줄기세포의 증식 양상인 세포피의 수가 1달까지 증가하는 결과를 보여주었다. 그러나 passage 4(1달 이상 배양) 이후에는 세포피의 수와 크기가 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 돼지 생식선 줄기세포의 장기간 증식을 위한 추가적인 signal molecules의 발굴이나 배양조건을 개선하기 위한 연구들이 진행되어야 할 것으로 생각된다. 또한, 추후 연구에서는 배양되는 생식선 줄기세포를 대상으로 생식선 줄기세포의 기능적 활성도를 분석할 수 있는 정소내 이식을 통한 활성도 분석이나 유전자 발현 양상들을 조사하여 생식선 줄기세포로서의 특성을 구명하는 접근이 필요할 것으로 사료된다.

### 인용문헌

- Brinster, RL (2002): Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 296: 2174-2176.
- Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russell LD (2003): Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* 126:669-680.
- 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.
- Huckins C (1971): The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* 169:533-557.
- 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.
- Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T (2005): Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum or feeder-free conditions. *Biol Reprod* 72:985-991.
- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2003): Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6487-6492.
- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004): Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 71(3):722-731.
- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004): Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(47):16489-16494.
- Kurosawa H, Kimura M, Noda T, Amano Y (2006): Effect of oxygen on *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 101:26-30.
- Li M, Ma W, Hou Y, Jiao L, Zheng X, Wang WH (2003): Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 65:429-434.
- Li M, Ma W, Hou Y, Sun XF, Sun QY, Wang WH (2004): Improved isolation and culture of embryonic stem cells from Chinese miniature pig. *J Reprod Dev* 50(2):237-244.
- Lu LS, Wang SJ, Auerbach R (1996): *In vitro* and *in vivo* differentiation into B cells, T cells, and myeloid cells of primitive yolk sac hematopoietic precursor cells expanded >100-fold by coculture with a clonal yolk sac endothelial cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25):14782-14797.
- McLaren, A (2003): Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology* 262:1-15.
- Molyneaux K, Wylie C (2004): Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol* 48:537-544.
- Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL (2003): Maintenance of mouse male germline stem cells *in vitro*. *Biol Reprod* 68:2207-2214.
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (2003): Manipulating the Mouse Embryo, a Laboratory manual (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
- Orwig KE, Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL (2002): Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. *Biol Reprod* 66:944-949.
- Piedrahita JA, Anderson GB, Bondurant RH (1990): Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell-lines. *Theriogenology* 34:865-877.
- Piedrahita JA, Anderson GB, Bondurant RH (1990): On the isolation of embryonic stem-cells-comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology* 34:879-901.
- Ropeter-Scharfenstein M, Neubert N, Prella K, Holz W (1996): Identification, isolation and culture of pluripotent cells from the porcine inner cell mass. *J Anim Breed Genet* 113:427-436.
- Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004): Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. *Dev Biol* 274:158-170.
- Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2005): Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14302-14307.
- Schofield R (1978): The relationship between the spleen colony-forming cell and the hematopoietic stem cells. *Blood Cells* 4:7-25.
- Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL (1999): Beta1-



and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 96:5504-5509.

26. Tegelenbosch RA, de Rooij DG (1993): A quantitative

study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. Mutat Res 290:193-200.

(접수일자: 2009. 8. 29 / 채택일자: 2009. 9. 3)