

培養細胞의 性染色質에 관한 細胞學的 研究

1. 培養期間을 달리한 고양이, 물뿔트, 닭의 培養細胞에 있어서의 性染色質에 대하여

姜 永 善·朴 相 大

(서울大·文理大·動物學科)

The Cytological Studies of Sex Chromatin in Cultured Cells.

1. The frequency and pattern of sex chromatin in cultured cat, guinea-pig and chick embryo cells, with special reference to the various cultured stages.

KANG, Yung Sun and Sang Dai PARK

(Dept. of Zoology, Seoul National University)

(1965. 8. 27 接受)

SUMMARY

The frequency and pattern of sex chromatin in primary cultured cells of kidney cortex of cats and guinea-pigs, and muscle of chick embryos were examined and compared to those of in vivo condition, with special reference to the various cultured stages.

1. In cat, the frequencies of sex chromatin positive I of peripheral position were average 62.7% in female, and 15% in male, whereas those of non-peripheral position were 5.8% in female and 0.1% in male. The incident proportion between them showed a marked difference—approximately 10 times higher in female than male. These results fairly indicated that a distinct nuclear dimorphism with regard to the sex chromatin positive I was established in cultured cells. The position of sex chromatin was usually peripheral location. The tendency of frequencies, with reference to the cultured stages, was low count in primary extracted and initial stage cells, but it showed a peaked frequency in 10—13 days after primary culture, and after that the frequencies were decreased gradually. Compared between in vitro and in vivo condition of the same tissues, the cells in vivo exhibited the sex chromatin in high frequency at the peak showed stage.

2. In guinea-pig, the frequencies of peripheral positive I were 36.8% in female and 6.3% in male, while non-peripheral positions were 6.1% in female and 3.5% in male. Its incidence was a rate of nearly 4 times higher in female than male.

The nuclear dimorphism was also established in cultured cells of guinea-pig. The position and the incident frequency showed a similar pattern as in cat except the primary extracted cells.

3. In chick embryo, the frequencies of sex chromatin positive I of peripheral position were 38.2% in female, and 18.3% in male, non-peripheral position, however, was hardly to find. These results suggested that the definite sexual dimorphism was unable to find in chick embryo cultured cells. The position and the incident tendency were a similar pattern as in above mammals and the frequency was higher in vitro cells.

緒 論

培養細胞의 性染色質(Sex-chromatin)에 관한 研究는 Orsi and Ritter(1958)에 의하여 사람의 癌組織을 材料로 시작되었으며 그후 많은 사람에 의하여 주로 性染色質

의 本質과 生成起源을 究明하는 研究分野에 집중되어 왔다. 그중에도 性染色質의 起源을 추구한 分野에서는 많은 進展을 보여 주었으나(Morishima et al., 1962; Bishop and Bishop, 1963), 그 出現率과 樣相에 대한 研究結果는 in vivo의 경우와 顯著한 差異가 나고 있다. 이러한

事實 때문에 지금까지 第一性徵으로써 性二型 판단의 효과적인 基準으로 論議되어온 性染色質의 本質에 대해서 보다 광범위하고 면밀한 檢討를 필요로 하고 있다.

著者들은 이미 哺乳類와 鳥類의 여러종류에서 性染色質을 in vivo의 상태에서 研究한 結果를 수차례 건져 報告한바 있다(Kang et al., 1962; 1963 a; 1963 b).

著者들은 培養細胞를 材料로 할 경우 性染色質의 動的인 活動에 대한 계속적인 分析을 추구할수 있다는 점에 착안하여 고양이, 물뿔트, 닭을 材料로 培養細胞에 있어서 培養期間을 달리한 條件下에서 性染色質의 出現率과 樣相을 調査하고 아울러 in vivo의 結果와 비교 檢討함으로써 性染色質의 本質의인 問題에 보다 명확한 資料를 얻고져 本 實驗에 착수 하였다.

材料 및 方法

實驗動物로는 고양이(*Felis catus*)와 물뿔트(*Cavies rufescens*)의 생후 40 일인 것 각 한쌍과 10 일에서 20 일 사이에 孵化중인 닭(*Gallus gallus var. domesticus*, White leghorn variety)의 胚 30 개를 사용 하였다.

고양이와 물뿔트에서는 腎臟의 皮質部分을, 닭은 筋肉을 材料로하여 直徑 3~5 mm³ 정도로 썰은 組織片을 0.25% trypsin (in PBS) 溶液에다 magnetic stirring 함으로써 細胞를 分離시켰다(trypsinization). 分離된 細胞는 inactivated calf serum 20%를 가한 TC media 199 에다 一定期間(3, 5, 7, 10, 13, 15, 20, 30 일) 培養하였는데 여기 사용한 培養器는 cover slip(10×50 mm)이 붙은 Leighton culture tube 와 milk dilution bottle 이다.

Trypsinization 직후의 細胞는 Mittwoch(1963)의 方法으

로, Leighton culture tube 에서 培養한 細胞는 Dewitt(1959)의 方法에 따라 각각 標本을 만들어서 Klinger(1957)의 buffered-thionin 으로 染色하였다. 그리고 milk dilution bottle 에서 培養한 細胞는 E.D.T.A. 溶液으로 細胞를 harvest 하여 air-drying 方法으로 標本을 만든 후 역시 thionin 에 染色하였다. 이러한 각 標本の 作成過程에서 固定하기 전에 isotonic solution 에 15 분간 處理하였다. 또 性染色質의 構造의인 研究를 위해서 aceto-orcein 에 의한 復染色도 실시했다.

性染色質의 識別基準은 著者들의 前論文에 따랐으며, 觀察과 寫眞作成은 Leitz 顯微鏡과 MIKAS 顯微接寫器를 사용하여 이루어졌다(1500×).

結果 및 考察

각 動物의 培養時期에 따라 임의의 細胞 300 개를 觀察하여 性染色質의 數的인 變異와 出現頻度 및 核內位置에 대해서 얻은 結果는 Table 1 에 종합하여 표시 하였다.

우선 고양이에서는 性染色質 陽性 I 가운데 核膜附近에 位置하는 것이(Fig. 1) 雌性에서 平均 62.7%(3.7~90.6%), 雄性에서는 6.5%(2.3~9.3%), 한편 核內에 散在하고 있는 것은 雌性에서 5.8%(0~11%), 雄性은 0.1%(0~5%)로 性에 따른 差異를 나타내고 있다(우 68.5%, ⊙ 6.6%). 그리고 陽性 II 는 全細胞의 4%(우 4.2%, ⊙ 0.2%)이며 雄性에서는 거의 찾아볼수 없다. 따라서 性染色質의 核內位置는 核膜附近이 압도적으로 많음을 알수 있다.

Table 1. Frequency(%) and position of sex chromatin in cultured cat, guinea-pig and chick embryo cells. 300 cells from each cultured stages were observed.

Days after primary explant.	Sex	0		3		5		7		10		13		15		20		30		Average (%)	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Cat	P. 1	3.7	2.3	26	2.3	73.6	2	86	11	90.6	9	90.3	8.7	87	4.3	75	6.3	32.6	9.3	62.7	6.5
	P. 2			3		4		4.6		2		2.3	1.3	0.6	0.6	12.3		8		4.1	0.2
	Non-P.			4.7		1	1.3	9	1.6	6		7	5	11		2.6		10.6		5.8	0.1
	Total	3.7	2.3	33.7	2.3	78.6	3.3	99.6	12.6	98.6	9	99.6	15	98.6	5	89.9	6.3	51.2	9.3	72.6	6.8
Guinea Pig	P. 1			32.6	5	29	5.6	46.3	7.7	64	6.6	52	5.3	38.3	7	41.3	11.6	27.6	8.3	36.8	6.3
	P. 2			8		0.6	0.3	4.6		4.6	1	3		2.3	1.3	1	6	9	1	3.7	1.7
	Non-P.			1		9		9		6.6	3	10.3	1.3	3	6	4	15.6	11.6	6	6.1	3.5
	Total			41.6	5	38.6	5.9	60	7.7	75.2	10.6	65.3	6.6	43.6	14.3	46.3	33.2	48.2	15.3	46.6	11.5
Chick embryo	P. 1	14.3	2	45	8.3	33	29.3	52.6	25	63.3	18	33	19.3	45	24.6	31	19.3	26.3	19.3	38.2	18.3
	P. 2	0.6		0.3		3	0.3	10.6		1	0.6	3.6	1	7	3	0.6	1	1	0.3	3.0	0.7
	Non-P.			1			0.6			2										0.3	0.07
	Total	15	2	46.3	8.3	36	30.2	63.2	25	66.3	18.6	36.6	20.3	52	27.6	31.6	20.3	27.3	19.6	41.5	19.1

* P.,: Pheripheral

다음 물못트에서는 陽性 I 중에 核膜附近인 것이 雌性에서 平均 36.8%(0~64%), 雄性에서 6.3%(0~9%)이며, 核內散在인 것은 雌性에서 6.1%(0~11.6%), 雄性에서 3.5%(0~15.6%)로 全培養期間을 통해서 雌性이 雄性보다 4 배가량 높은 出現率(우 42.9%, ♂ 9.8%)을 보여주고 있다. 그리고 陽性 II 는 全細胞의 4% 정도(우 3.7%, ♂ 1.7%)이며 位置는 고양이에서와 같이 核膜附近이 대다수이다. 그러나 trypsinization 직후의 細胞에서는 많은 染色質塊가 散在해 있음으로 해서 典型的인 性染色質의 識別이 힘들었다.

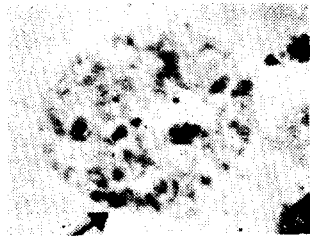


Fig. 1. Thionin-orcein double stained preparation from cat kidney cultured cell showing sex chromatin positive I.

담에서는 陽性 I 중에 核膜附近인 것이 雌性에서 平均 38.2%(14~63%), 雄性에서는 18.3%(2~25%)로 雌性이 2 배 정도 많은 出現率을 보이는 반면 核內散在인 것은 거의 찾아볼수 없다(우 0.3%, ♂ 0.07%). 그리고 陽性 II 는 3% 정도(우 3.0%, ♂ 0.7%)이며 性染色質의 核內位置도 위의 哺乳類의 경우와 유사하다.

이상의 結果로 培養時期에 따른 다소간의 差異는 있으나 고양이와 물못트에서는 trypsinization 직후의 細胞를 제외한 전 期間을 통해서 性染色質을 기준으로 核二型을 인정할수 있다고 하겠다. 그러나 담에서는 확정을 내릴수 없다. 이러한 단정은 核二型 판단에 있어서 이전 學者들의 基準에 기초를 둔 것이다.(Barr, 1960).

일찌기 Burlington(1959)은 고양이 腎臟의 培養細胞에서 核膜附近에 位置하는 性染色質이 雌性에서 38~43%의 出現率을 나타낸다고 報告한 바 있으나 對照區 없는 實驗으로 核二型에 관한 언급은 없었다. Miles(1960 b)는 사람의 羊膜細胞에서 여자가 51~85%, 남자가 5~12%의 出現率을 나타낸다고 하였고 또 Schwarzacher(1963)는 사람의 皮膚를 plasma clot에서 培養하여 살아있는 상태의 여자의 細胞에서 46%, 남자에서는 7.5%, 한편 Feulgen's reaction 을 한 染色標本에서는 여자가 73%, 남자가 1.0%로 報告하였다. 사람에서 報告된 性染色質의 雌雄兩性에 따른 出現率의 差異는 著者들이 고양이에서 觀察한 結果와 대체로 비슷하다. 이점은 食肉目的 性染色質의 出現樣相이 靈長目과 비슷하다고 한 이전 學

者들의 意見(Graham and Barr, 1959; Moore, 1962)과 일치하는 것이다.

물못트의 培養細胞에 대한 研究는 아직 報告된바 없다. Miles(1960)는 같은 齧齒目 중에서 쥐의 心臟, 腎臟, 脾臟을 [材料로 6~33일 까지 培養한 細胞에서 雌性은 1.0~23%, 雄性은 0~0.8%의 性染色質을 나타내며(雌性이 10 여배) 한편 Golden hamster 를 가지고는 雌性에서 10~64%, 雄性에서 4~21%의 出現率을 얻었다. 그런데 생쥐의 경우는 많은 染色質塊의 散在로 性染色質의 識別이 힘들어 전체적으로 核二型의 명확한 구별은 불가능하다고 하였다. Hulliger et al.(1963)는 토끼의 皮下結體組織과 白血球를 材料로 plasma clot 培養을 통하여 研究한 바 있다. 이들은 trypsinization 직후의 細胞에서는 性染色質의 觀察이 불가능하였으나 일정시간후 Fibrocyte 細胞가 增殖하여 된 타원형의 細胞에서는 雌性에서 平均 91.5% 雄性에서는 0.3%로서 核二型이 명확하였다. 물못트에 대한 本實驗의 結果는 위에서 提及한 두 경우의 齧齒目에서 報告된 結果와 일치하고 있다. 따라서 이 事實은 같은 目에 속하는 動物에 있어서는 性染色質의 樣相이 類似하다고한 著者들의 前報告(Kang et al., 1963b)에 밑바침이 되는 것이다.

담을 材料로 實驗한 것으로는 Miles(1962)가 孵化 2 주에서 생후 2 개월까지의 材料에서 心臟, 腎臟, 脾臟을 培養하여 2 주에서 1 개월까지를 觀察한 바 있다. 그는 脾臟에서는 雌性이 높으나 (우 56~62%; ♂ 26~43%), 腎臟에서는 이와 반대이며 (우 4~10% ♂ 24~29%), 心臟에서는 腎臟의 경우와 거의 같은 出現率(우 7~18%; ♂ 10~25%)을 나타낸다고 하여 組織에 따른 特性을 인정하면서 전체적으로는 核二型의 존재를 否定하고 있다. 本實驗材料에서는 組織이 달라 비교의 대상은 꼭 되지 못하나 性染色質을 통해서 核二型을 인정할수 없다는 점과 脾臟에서의 出現率은 대체로 비슷하다. 性染色質의 出現率은 같은 材料動物에서도 器官에 따라 그 相異性이 인정되고 있고(Fraccaro and Lindsten, 1959), 또 그 器官의 細胞分裂 能力에 反比例로 좌우된다는 點도 알려져 있다(Miles, 1960 a). Fig. 2 는 核膜附近에 位置하는 陽性 I 이 培養時期에 따라 나타나는 出現率의 경향을 나타낸 것이다. 여기서 보면 고양이에서는 trypsinization 직후의 細胞는 性染色質의 出現率이 가장 낮으며, 培養후 제 10~13 일째의 細胞群에서 最高出現率을 나타내다가 그후 서서히 감소하는 경향을 보여준다. 물못트 역시 trypsinization 직후의 細胞를 제외하고는 고양이와 類似한 경향을 보이며 담에서는 제 10 일째를 頂點으로 하여 점차 감소한다.

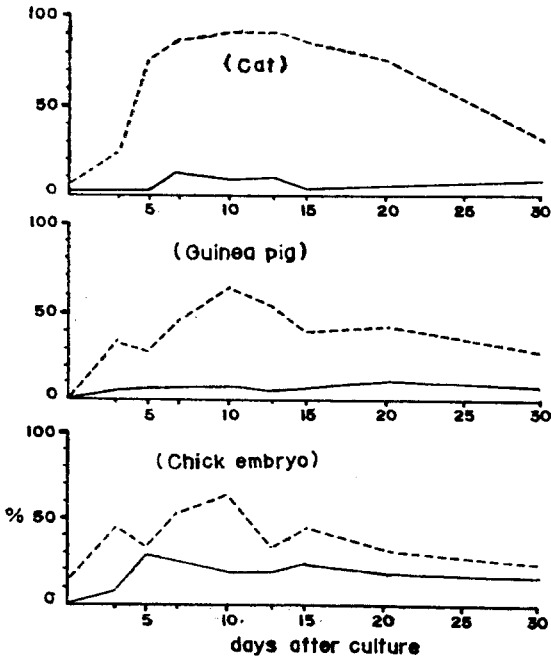


Fig. 2. Frequency distribution of sex chromatin positive I in cultured cells at various cultured stages.

전체적으로 初期培養細胞에서는 核内の 많은 染色質塊가 散在해 있으므로 해서 典型的인 性染色質의 觀察이 힘들고 第1次分裂이 끝나는 時期인 3 일째까지 서서히 그 出現率의 상승을 보이다가 그후 점차 증가하여 10~15 일째에서 最高點의 出現率을 보인뒤에 다시 감소하는 경향을 나타내고 있다.

本實驗에서 나타난 培養時期에 따른 出現率의 경향성은 Therkelsen and Peterson(1962)이 사람의 皮膚의 上皮細胞와 骨髓細胞를 培養하여 얻은 結果와 비슷하다. 그리고 初期培養細胞에서는 染色質塊가 많아 典型的인 性染色質의 식별이 힘들거나 出現率의 頻도가 낮은 것은 Hulliger et al.(1963)의 結果와 일치한다. 長期培養한 細胞나 cell line 으로 固定된 細胞群에서 性染色質의 出現頻도가 달라지거나 또는 樣相이 달라진다는 報告는 이미 많은 學者들에 의해 확인되고 있다. 이에 대해서 Dewitt (1959)는 cell line 에서 性染色質의 頻도가 낮은 것은 分化되지 못한 사람의 anaplastic 腫腸에서와 같이 細胞가 分化되지 못한 形態에서 흔히 볼수 있는 점이며 이러한 現象은 그 細胞가 由來한 Donor의 性에는 무관한 것이 라고 말하고 있다. 한편 Miles(1962)와 Therkelsen and Peterson(1962)은 이것은 細胞自體가 異常化(malignance)에 관련해서가 아니라 in vitro 의 상태로 인하여 招來된 結果라고 설명하고 있다. Fig. 3은 같은 材料動物의 雌

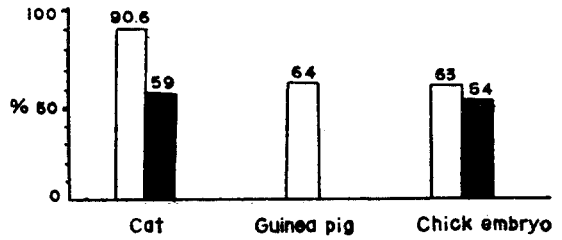


Fig. 3. Comparison by the incidence of sex chromatin positive I cells in vivo (white bar) and in vitro (black bar).

性的 동일 組織에서 in vivo 상태와 出現率이 最高를 나타내는 時期의 in vitro 細胞 中에 核膜附近에 位置하는 性染色質의 出現率을 비교한 것이다.

고양이에서는 培養후 10 일째의 細胞에서 90.6%의 出現率인 반면 in vivo 상태에서는 腎臟의 輸尿細胞에서 59%(Kang, et al. 1962)를 나타내고 있다. 물뿔트에서도 培養후 10 일째의 細胞에서 64%를 보여주고 있으나 in vivo 의 結果는 비교하지 못했다. 닭에서는 10 일째의 細胞에서 63%이며 in vivo 상태에서는 Kosin and Ishizaki (1959)가 같은 筋肉細胞에서 52%임을 報告한 바 있다.

내체로 培養細胞에서 in vivo 상태 보다 出現率이 높음을 알수있다. 이러한 事實은 이미 Miles(1962), Fraccaro and Lindsten(1959)등 여러 學者에 의해 확인되고 있다.

이상에서 論議한 바와 같이 in vitro 에서 性染色質의 出現率에 현저한 變化를 갖어오는 外的要因, 다시 말하자면 hetero-chromatinization 을 방해하는 원인이 무엇인가하는 本質的인 문제에 대해서는 앞으로 더 깊은 研究가 있어야 할줄안다.

摘 要

고양이와 물뿔트의 腎臟의 皮質部分과 닭胚의 筋肉을 培養하여 얻은 細胞에서 培養時期를 달리해서 性染色質의 出現率과 樣相을 調査하고 이를 in vivo 의 結果와 比較檢討하여 얻은 結果는 다음과 같다.

1. 고양이에서는 性染色質陽性 I 中에 核膜附近인 것이 雌性에서 平均 62.7%, 雄性은 6.5%, 그리고 核內散在인 것은 雌性이 5.8%, 雄性은 0.1%로서 雌性이 10 여배 높은 率을 나타내고 있어 性染色質陽性 I 을 基準으로 核二型을 認定할수 있다. 그리고 性染色質의 核內的 位置는 核膜附近이 壓到的으로 많다.

培養時期에 따른 出現率의 경향성은 初期培養細胞에서는 낮으나 培養후 10~13 일에 最高率을 보이고 그후

점차 감소하는 경향을 나타낸다. 그리고 같은 組織細胞의 in vivo 의 出現率과 本實驗에서의 最高의 出現率을 나타낼 때의 것과는 비교하면 後者에서 높다.

2. 콜로이드에서는 陽性 I 중의 核膜附近인 것이 雌性에서 36.8%, 雄性에서 6.3%, 그리고 核內散在인 것은 雌性에서 6.1%, 雄性에서 3.5%로써 雌性이 4 배가량 높으며 여기서도 核二型을 認定할 수 있다.

性染色質의 核內的 位置와 培養時期에 따른 出現率의 경향은 trypsinization 직후의 細胞를 제외하고 대체로 고양이에서와 類似하다.

3. 닭에서는 陽性 I 중 核膜附近인 것이 雌性에서 38.2%, 雄性에서는 18.3%로 나타나고 核內散在인 것은 거의 찾아볼 수 없다. 이 정도의 差異로는 核二型 斷定이 곤란하다.

出現率의 경향과 核內的 位置는 대체로 위의 動物에서와 같은 樣相을 나타내고 있다. 性染色質의 出現率도 培養細胞에서 높다.

文 獻

- Barr, M.L., 1960. Sexual dimorphism in interphase nuclei. *Amer. J. Hum. Gen.* 12: 1, 118—127.
- Bishop, A. and O.N. Bishop, 1963. Analysis of tritium-labeled human chromosomes and sex chromatin. *Nature* 199: 4896, 930—932.
- Burlington, H., 1959. Sex Chromatin in cultured cells. *Exp. Cell Res.* 16: 1, 218—219.
- Dewitt, S.H., 1959. Chromocenters resembling sex chromatin in human tissue culture cell lines. *J. Nat. Can. Inst.* 23: 5, 1089—1095.
- Dewitt, S.H., 1962. Chromocenters resembling sex chromatin: Symposium on sex chromatin. *Acta-Cytol.* 6: 1, 95—97.
- Fraccaro, M. and J. Lindsten, 1959. Observations on the so-called sex chromatin in human somatic cells cultivated in vitro. *Exp. Cell Res.* 17, 536—539.
- Graham, M.A. and M.L. Barr, 1959. Sex chromatin in the opossum, *didelphys virginiana*. *Arch. d'Anat. Micros. Morph. Exp.* 48, 111—112.
- Hulliger, L., H.P. Klinger and M. Allgöwer, 1963. Sex chromatin as a marker in some rabbit cells. *Experientia* 19, 1—9.
- Kang, Y.S., W.K. Cho and S.D. Park, 1962. The cytological observations of sex chromatin in some mammals. *Seoul Univ. J. Biol. & Agricult.* 11, 45—60.
- Kang, Y.S., W.K. Cho, and H.S. Park, 1963 a. Cytological studies of the sex chromatin in birds. (I). On the sex chromatin in the pigeon. *Seoul Univ. J. Biol. & Agricult.* 13, 1—8.
- Kang, Y.S., W.K. Cho S.D. Park and H.S. Park, 1963 b. The cytological observations of sex chromatin in squirrel and magpie. *Zoologica* 2, 21—32.
- Klinger, H.P., 1957. The fine structure of the sex chromatin body. *Exp. Cell Res.*, 14, 207—210.
- Kosin, I.L. and H. Ishizaki, 1959. Indicine of sex chromatin in *Gallus domesticus*. *Science* 130, 43—44.
- Miles, C.P., 1960 a. Sexual dimorphism of rat cells in vitro. *Science*, 131, 740.
- Miles, C.P., 1960 b. Morphology and functional relation of sex chromatin in cultured amnion cells. *Exp. Cell Res.* 20: 2, 324—327.
- Miles, C.P., 1962. Tissue culture and sex chromatin. *Acta-Cytol.* 6: 1, 84—89.
- Miles, C.P., 1962. Nuclear chromocenters of cultured chicken cell. *Exp. Cell Res.*, 27: 3, 377—382.
- Mittwoch, U., 1963. Barr bodies and nuclear size in cultured human fibroblasts. *Nature* 138: 4884, 975—977.
- Moore, K.L., 1962. The sex chromatin: its discovery and variations in the animal kingdom. *Acta-Cytol.* 6: 1, 1—13.
- Morishima, A., M.M. Grumbach and J.H., Taylor, 1962. Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 48: 5, 756—763.
- Orsi, E.V. and H.B. Ritter, 1958. A report of sex chromatin in human tumor tissue culture. *Exp. Cell Res.* 15, 244—246.
- Schwarzacher, H.G., 1963. Sex chromatin in living human cells in vitro. *Cytogenetics* 2, 117—128.
- Therkelsen, A.J. and G.G. Peterson, 1962. Frequency of sex chromatin positive cells in the logarithmic and postlogarithmic growth phases of human cells in tissue. *Exp. Cell Res.* 28: 3, 588—590.