

Collagen Gel을 이용한 사람의 고환 조직배양에 관한연구

경희대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이충현 · 이상철 · 이선주 · 손준웅 · 장성구 · 김진일 · 채수응

A Study on Growth of Human Testicular Tissue in 3-Dimensional Collagen Gel Tissue Culture

Choong-Hyun Lee, Sang Cheol Lee, Sun Joo Lee, Joon Woong Sohn, Sung-Goo Chang,
Jin Il Kim and Soo Eung Chai

From the Department of Urology, School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

= Abstract =

A recently developed collagen gel culture technique has been applied to study on growth in tissue of human testicular tissue. Minimum Eagle's medium supplemented with amino acid, 10% Fetal Bovine Serum and 0.1mM non-essential amino acid are employed. Tissue fragments on collagen gel are fixed at time intervals for the histologic findings of testis. The mature spermatids are maintained for 2 weeks and can be observed until four weeks. But the rate of glucose consumption is increased contrary to histologic findings.

Key Words : Tissue culture, Human testis.

서 론

어떤 개체가 생존하기 위해서는 세포와 세포 간의 상호작용이 필수적이고, 특히 다세포 동물에서는 세포간의 상호작용과 세포간의 연락 기능은 생존을 위한 중요한 생리적 현상의 하나라 할 수 있겠다. 이와 마찬가지로 고환내에도 Sertoli세포, Leydig세포, 정세포, 관주의 세포가 존재하고 이들 세포들이 서로 밀접한 관련성을 가지고 상호작용(Skinner, 1991)을 하고 있어, 이 세포간 상호작용이 파괴되면 비정상적인 생리작용으로 변해 어떤 병적인 상태하에 놓이게 된다. 최근 분자 생물학과 세포 배양술의 발달로 인해 고환내의 여러 세포들 특히 Sertoli세포에 대해 많은 연구가 이루어져, 이들 세포의 기능과 세포학적 특성이 많이 밝혀졌다. 그러나 이들 연구는 각 세포들은 따로따로 분리하여 시행을 한 관계로 정상적인 세포간의 상호작용이 결여된 상태라 할 수 있겠다. 이에 저자들은 고환의 한 세포가 아니라

고환조직 전체를 최근에 개발된 collagen gel을 이용한 3차원적 방법으로 조직배양을 실시하여, 일정 시간 간격에 따른 조직학적 변화를 연구 관찰하여 향후 시행할 고환의 내분비학적 연구에 필요한 기본 모델을 확립하고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

34세된 2차 불임 환자에서 고환조직 검사를 시행하였고, 이때 얻은 고환조직을 1×1mm정도로 세절한후, 미리 사용 배양액에서 72시간 이상을 dehydrate시킨 pigskin collagen gel(Health Design Industries, Rochester, NY)을 1×1cm정도로 자른후, 이 collagen gel위에 세절된 고환조직을 5개씩 분주하여 6well plate(Falcon, Cat. No. 3046) 내에서 배양하였다. 이런 모든 조작은 감염을 막기 위해서 laminar flow hood내에서 무균적으로 시행하였고, 사용된 배양액은 Eagles Minimum Essential Media(Gibco, Cat. No. 32001095 AJ)에 비활성화 시킨 10%

결 과

Fetal Bovine Serum(Gibco, Cat. No. 230-6140 AJ)와 0.1mM non-essential amino acids를 첨가하였고, 감염방지를 위해 cefotaxim(Hoechst, Germany)을 ml당 95 μ g, gentamicin(종근당, 한국)을 ml당 100 μ g을 추가하여 진공펌프(Millipore, Cat. No. xx55000,00)을 연결시킨 상태에서 0.22 μ m여과지가 달린 배양액 여과기(corning, Cat. No. 25942)에 여과 시켰다.

배양은 각 well에 배양액을 collagen gel의 윗면에 평행하도록 넣고, 이 6well plate를 humidified, 5% CO₂, 37°C의 배양기(Sanyo Co. 175/175T, Japan)에 배양하면서, 3일 마다 배양액을 교환하였다.

이들 배양된 조직들은 2주간격으로 최고 14주까지 채취하여 Bouin's액에 고정시켜 Hema-toxylin and Eosin염색 하에 광학 현미경으로 조직의 변화를 관찰하였고, 다른 parameter로 배양액을 채취해 Glucose(HK) 20에 증류수 20ml를 서서히 가하여 용액을 만든 다음 1ml를 큐벨(V.W.R. 58017-847)에 넣어 분광기(Beckman, spectrophotometer, U.S.A)를 340nm에서 1차 흡광도를 구하여 glucose의 농도를 산출하였다. 이 glucose 농도는 각 well마다 3회 반복 측정하였고, 0시간을 기준으로 각 24, 48, 72시간 후의 배양액 내의 glucose 농도를 백분율로 하여 glucose 소모율로 계산하였고, 이 glucose 소모율을 배양 시작 후 4,8,14주에 반복하여 배양 기간에 따른 glucose 소모율을 비교 하였다.

이상의 결과들은 평균치±표준편차로 표시하였으며, 각 기간에 따른 glucose 소모율은 student t-test를 이용하여 유의성 판정을 하였다.

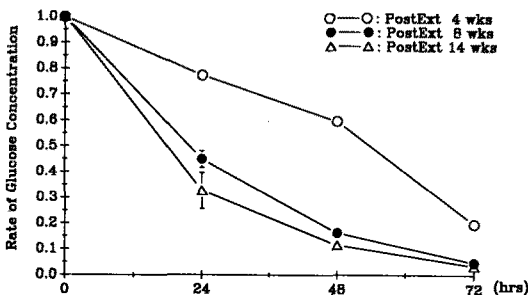


Fig. 1. The rate of glucose concentration according to duration of culture compared with time 0 hr. The rate of glucose consumption increased with duration of culture($p < 0.05$).

Glucose 소모율에 관한 연구에서는 배양후 4주에서 24, 48, 72시간 후에 77.3 \pm 2.4%, 59.7 \pm 0.7%, 19.7 \pm 0.4%, 이던 것이, 배양후 8주에는 44.9 \pm 3.3%, 16.3 \pm 0.2%, 4.8 \pm 0.4%, 14주 후에는 32.7 \pm 7.0%, 11.6 \pm 0.4%, 3.5 \pm 0.2%로 배양기간이 증가함에 따라 glucose 소모율은 증가함을 알수 있었다(그림 1).

고환의 조직학적 검사로 배양전의 정상고환 조직은 배양후 2주까지 정상 조직소견을 유지하였고(그림 2), 배양후 4주부터 정세관내 세포들의 핵이 pyknotic 해지면서 부분적으로 변성에 빠지기 시작한 조직은 배양후 6주에 거의 모든 정세관의 변성을 관찰할 수 있었으나 아

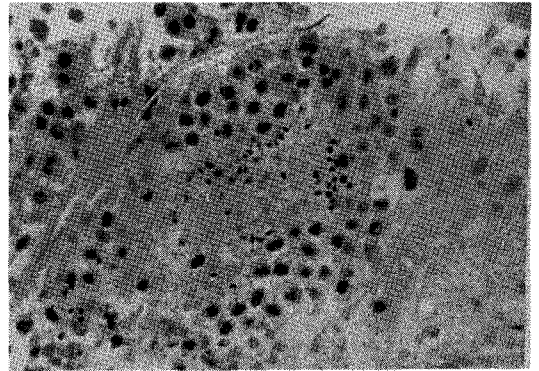


Fig. 2. Photomicrograph from human testicular tissue, which was obtained by 3-dimensional collagen gel tissue culture for 2 weeks. Note normal Sertoli cells, Leydig cells and matured spermatid. Reduced from $\times 400$.

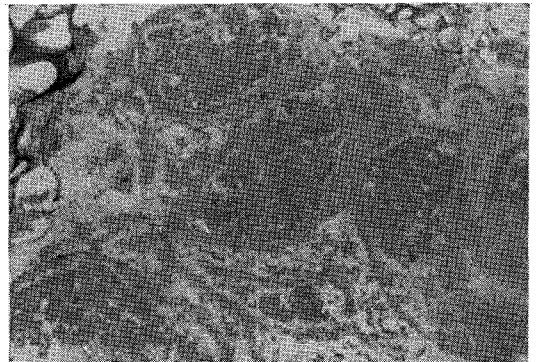


Fig. 3. Human testicular tissue after 14 weeks cultured. It reveals all cells were degenerated and fibrotic tissues were proliferated. Reduced from $\times 100$.

직 성숙된 spermatid는 관찰할 수 있었고, 배양후 14주에는 정세관의 형태를 알아 볼 수 없을 정도로 모든 세포가 완전히 변성이 일어났다(그림 3). 그리고 배양후 14주에 실시한 Masson-Trichrome 염색에서 정세관내와 정세관 주위에도 심한 섬유질 조직의 증식이 있었다.

고 안

수많은 다른 종류의 세포를 같은 개체가 정상적인 생존과 분화를 하고 정상적인 기능을 유지하기 위해서는 여러 세포간의 상호작용과 관련이 매우 중요한 현상이라 하겠다. 특히 고환은 정상적인 정자를 형성하기 위해 정세관내의 Sertoli세포와 고환 간질 내의 Leydig세포, 그리고 정세관 주위의 관주위 세포들이 서로 밀접한 연관성을 이루고 이들 세포간에 서로 수많은 분비물질을 내어 정상적인 기능을 하게끔 상호 연관작용(Skinner, 1991)을 하고 있다. 그러므로 이런 세포와 세포간의 상호작용을 연구하기 위해 여러 학자들이 각기 다른 세포들을 분리하여 독립적인 한개의 세포들을 주축으로 연구를 시행하여 왔다(Tindall et al., 1985; Ascoli 1981). 그 중에서도 특히 Sertoli 세포에 대한 연구가 많이 이루어져(Weish et al., 1975; Lipsultz et al., 1982) androgen binding protein, transferrin, ceruloplasmin, inhibin, Mullerian duct inhibitory agent등을 분비하는 것 외에도 TGF α , TGF β , IGF-I, IL-1같은 성장인자와 여러 종류의 효소와 단백질(Skinner et al., 1988; Papadopoulos, 1991)을 분비하여 이들 물질들이 각자 여러 특성들을 가지고 성장과 분화, 또는 억제 작용을 하는 것이 밝혀졌다.

그리고 Leydig세포와 관주위세포에 대한 연구도 최근에 발달된 면역조직 화학법, 세포유전학, 핵산과 단백질구조의 정제법등과 아울러 Leydig세포의 cell line이 개발되면서 더욱 발전을 이룩하게 되었다. 그러나, 여기에 제시되는 문제점은 과연 이런 독립적인 세포를 이용한 연구들이 학자마다 조건화된 여러배양액의 제조로는 거의 불가능 하므로 저자들은 in vitro 상태와 같거나 또는 유사한 조건만 만들수 있다면 이런 세포와, 세포간의 상호 작용을 연구하는데 획기적인 도움을 줄것으로 생각하고, 어떤 1개 세포가 아닌 고환조직 자체를 3차원

적으로 배양이 가능한가를 보기위해 본 연구를 시행하였다.

고환 조직배양에 관한 연구는 연령이 다른 쥐의 고환조직을 이용하여 수개월간의 Sertoli 세포와 정세포의 배양에 성공하였다 하였고(Steinberger et al., 1964), 그 후에는 고환조직에 관한 연구는 찾아보기 힘들었다. 그러나 최근 collagen gel을 이용한 3차원적 배양방법이 최근에 개발되어 여러 암조직과 정상조직이 원래의 독특한 성질을 유지하면서 배양할 수 있음을 밝혀진 후, 여러 종류의 종양조직을 배양하여서 이를 항암제 감수성 검사에도 이용하게 되었고(Vesico et al., 1987), 이 방법을 이용한 정상 고환조직의 3차원적 조직배양을 실시하여 추후 시행할 고환 내분비학적 연구의 근간으로 삼고자 하였다.

결과로 2주간은 정상적인 고환조직 소건의 유지가 가능하였고 정세포의 분하나 증가는 관찰할 수 없었고, 배양기간이 길어짐에 따라 고환조직에는 심한 변성이 일어나는 이에 반비례하여 glucose 소모율은 증가함을 관찰할 수 있었다. 이는 배양기간의 장기화에 따라 과환조직내의 crisis로 인해 섬유아세포가 증식함으로써 초래된다고 생각된다.

그러므로 앞서 언급한 물질들을 첨가한 조건화된 배양액(Teres et al., 1983)의 연구개발과 더불어 장기간 배양이 가능하리라 생각되며, 특히 Sertoli세포나 Leydig세포를 독립적으로 배양하면서 이들 세포에서 분비되는 물질들(Skinner et al., 1988; Papadopoulos, 1991)을 최근에 개발된 분자 생물학적 연구를 도입해 이들 물질들을 발견, 정제, 분석하여 고환조직 배양에 응용하면 더 좋은 결과가 기대된다 하겠다.

인 용 문 헌

- Ascoli M : Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cell. Gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* 1981, 108, 88-95.
- Hoffman RM, Connors KM, Meerson-Monosov AZ, Herrera H, Price JH : A general native state method for determination of proliferation capacity of human normal and tumor tissues in vitro. *Pro Natl Acad Sci*

- USA 1989, 86, 2013-1017.
- Lipshultz LI, Mufthy L, Tinall DJ : Characterization of human Sertoli cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1982, 55, 228-237.
- Papadopoulos V : Identification and purification, of a human Sertoli cell secreted protein (HSCSP-80) stimulating Leydig cell steroid biosynthesis. *J Clin Endocrinology Metab* 1991, 72, 1332-1339.k
- Skinner MK : Cell-cell interaction on the testis. *Endocrine Rev* 1991, 12, 45-77.
- Skinner MK, Fetterolf PM, Anthony, CT : Purification of a paracrine factor, P-Mod-S, produced by testicular peritubular cells that modulates Sertoli cell function. *J Biol Chem* 1988, 263, 2884-2890.
- Steinberger E, Steinberger A, Perloff WH : Studies on growth in organ culture of testicular tissue from rats of various ages. *Ana Rec* 1964, 148, 581-585.
- Tindall DJ, Rowley DR, Murthy L, Lishultz LI, Chang CH : Structure and biochemistry of the Sertoli cell. *Inter Rev Cytol* 1985, 94, 127-149.
- Tres LL, Kierszenbaum AL : Viability of rat spermatogenic cells in vitro of facilitated by their coculture with Sertoli cell in serum-free hormone-supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80, 3377-3381.
- Vesico RA, Redfern CH, Nelson TJ, Ugoretz A, Stern PH, Hoffman RM : In vitro like drug responses of human tumors grown in three-dimensional gel-supported primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84, 5029-5033.
- Weish MJ, Wiebe JP : Rat Sertoli cell; a rapid method for obtaining viable cell. *Endocrinology* 1975, 96, 618-624.
-