

생쥐 태아 Fibroblast 세포와 공동배양이 초기 생쥐배 분할구의 체외 발생능에 미치는 영향

김진호 · 정병현 · 이훈택 · 정길생
건국대학교, 동물자원연구센터

Effect of Co-Culture Mouse Fetal Fibroblast Cell on *In Vitro* Development of Blastomeres Separated from Mouse Preimplantation Embryos

Kim, J.H., B.H. Chung, H.T. Lee and K.S. Chung

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

The development of isolated blastomeres from mammalian preimplantation embryos has been basically studied for the multiplication of embryos from superior animals. Therefore, this study was investigated the effect of co-culture with mouse fetal fibroblast cells(MFFC) on *in vitro* development of blastomeres from mouse preimplantation embryos. Mature female ICR mice were treated with hormone to induce superovulation and embryos were collected at each 2, 4, and 8-cell stage. Then, after removing zona pellucida with protease, blastomeres were isolated by micropipetting, or reconstituted with different stage blastomere, and incubated for 72 hrs either in T6 or TCM199 or on the monolayer of MFFC, which was prepared with fibroblast cells from 14~15 day mouse fetus. After incubation, we examined their development rates every day and the nuclei numbers of each blastocyst by Hoechst-33342 staining. In the development rates of blastomeres, there were no significant differences between media but the higher rates were found in the monolayer of MFFC, regardless of reconstitution. In addition, blastomeres cultured with MFFC had slightly greater number of nuclei than those cultured in single media. Generally, the higher development rates of blastomeres were found from earlier stage embryos than the later ones, regardless of culture conditions. Reconstituted blastomeres had more nuclei but did not show the higher development rates, compared to the single blastomeres. Taken together, our results suggest that co-culture with MFFC have a beneficial effect on the *in vitro* development of blastomeres from mouse embryos.

I. 서 론

가축에 있어서 인위적으로 일란성 쌍자를 생산하는 방법은 우수한 능력을 가진 가축의 생산성을 제고시키는 획기적인 방법으로 이용될 수 있다. 일란성 쌍자를

생산하기 위해 수정란의 분할구의 분리배양은 Tarkowski(1956)가 생쥐의 2-세포기 배에서 분할구를 분리배양에 성공한 이래 많은 연구자들에 의해 국내외적으로 연구되어 왔다. 특히 수정란의 각 할구 체외배양에 관한 많은 연구가 이루어져 왔는데 Tarkowski와 Wroblewska(1967)은 4-, 8-세포기 생

취배의 할구를 분리배양하여 17~38% 분할구가 배반포단계까지 발달한다고 보고했으며, 최근 Togashi 등(1987)은 생쥐 2-세포기 및 4-세포기 수정란의 분할구를 체외에서 배양하여 발생율을 95% 이상까지 높이는데 성공하였다. 그러나 8-세포기 이후에서 분리된 분할구들의 발생율은 극히 저조한 실정이다(Seike 등, 1989).

한편 수정란의 초기배 발달과정에 있어서 2-cell 이후의 각 할구는 시간적 차이를 두고 발달함에 따라 하나의 수정란 내에서도 크기가 작고 발달단계가 앞선 할구들이 나타나게 되며(Graham과 Deussen, 1978; Graham과 Lehtonen, 1979), 이러한 할구들은 배반포기로 분화시 inner cell mass (ICM)에 분포하는 경향이 있다는 사실이 알려져 있다(Kelly 등, 1978; Spindle, 1982), 따라서 발달단계가 서로 다른 수정란의 각 할구를 분리하여 chimeric embryo를 만들어 발달시켰을 때 배반포의 ICM은 주로 발달단계가 앞선 할구에서 유래한 세포들로 이루어질 가능성이 있고 동시에 이들로부터 발생하는 개체도 발생단계가 앞선 할구에서 유래할 가능성이 있다(Seidel, 1983; Willadsen, 1981), 그러므로 발달 단계가 서로 다른 할구들로 chimeric embryo를 만들어 발달시킴으로써 하나의 수정란으로부터 다수의 유전적 동일 개체를 얻을 수 있는 가능성을 제시하고 있으며, 실제 Willadsen(1981)은 이런 원리를 이용하여 면양의 8-세포기 할구 하나를 4-세포기 할구 하나와 함께 발달시킴으로써 하나의 8-세포기로부터 유전적 동질성을 갖춘 다섯 마리의 양을 얻는데 성공하였으며, 가토에서도 분할구를 분리배양하여 일란성 쌍자를 생산한 보고가 있다(Xianzhong과 Foote, 1987).

또한 포유동물 수정란의 체외배양에 있어서 나타나는 cell block 현상을 극복하고 배의 발생능을 향상시키는 방법으로 가축의 난관내 배양(Camous 등, 1984; Eyestone 등, 1987)이나 여러 종류의 somatic cell과 공동배양(Gandolfi와 Moor, 1987)을 실시하는 것이 배의 발생능을 향상시킨다고 보고하였다. 국내에서는 정 등(1988)과 이 등(1990)이 생쥐의 분할구를 단순배양액에서 발달시킨 후 이식하여 일란성 쌍자를 생산하는데 성공하였으나, 그 효용이 저조한 실정이다. 특히 생쥐 초기배에서 분리된 분할구가 배반포까지의 발달율은 높으나 구성세포수가 생체내에서

발달한 배반포보다 훨씬 적어 임신율이 매우 저조하다고 보고되었다(Rand, 1985; Wiley 등, 1986; Roblero와 Rizzo, 1986; 정 등, 1988).

이에 본 연구는 생쥐 초기배의 분할구를 이용하여 하나의 수정란으로부터 다수의 복제 생쥐생산 방법을 개발하고자 생쥐 난자의 투명대를 제거하고 2-, 4-, 8-세포기의 할구를 분리 배양하였고, 분할구의 배발달에 있어 somatic cell과 공동배양에 의한 배 발생능과 발달단계가 상이한 분할구들을 재조합하여 발생능을 검토하고자 실시하였다.

II. 재료 및 연구방법

1) 공시동물과 수정란의 회수

본 실험에 사용된 공시동물로는 ICR계통의 생쥐를 공시하며 이들의 주령은 4~10주, 체중은 15~35g의 것을 사용하였으며 다배란 유도를 위하여 마리당 5IU의 PMSG를 복강에 주사하고 48시간 후 동일한 방법으로 5IU의 hCG를 주사하였다. 수정을 위하여 hCG 주사후 1:1의 비율로 웅성생쥐와 합사시키고 익일 아침에 질전의 유무를 확인하여 질전이 있는 개체를 수정란의 발달단계에 따라 경추탈출법으로 도살하고 난관을 적출하여 관류법으로 수정란을 회수한 후 형태적으로 정상적인 수정란만을 실험에 공시하였다.

2) 배양액

수정란의 관류 및 배양에 사용된 용액은 T6와 TCM199으로 0.1N HCl과 NaOH를 사용하여 pH 7.4~7.6으로 조정하며 삼투압은 270~290 mOsm으로 조절하여 사용하며 10% fetal calf serum(FCS, Sigma, U.S.A)을 첨가하여 사용직전 0.22 μ m의 filter를 사용하여 여과 제공하여 실험에 공시하였다.

3) 투명대의 제거와 분할구 분리 및 배양

수정란을 0.5% protease(Sigma, U.S.A) 배양액에서 3~5분간 노출시켜 투명대를 제거하였으며 Ca, Mg free PBS에서 pipetting으로 할구를 분리하여 실험에 공시하였다. 분리된 분할구를 10% fetal calf serum이 첨가된 T6와 TCM199 배양액 또는 임신 14~15일째의 자성생쥐의 자궁의 태아에서 fetal fibroblast cell들을 채취하여 37°C, 5% CO₂에서 개대

배양을 실시하여, 단층배양된 생쥐태아 fibroblast 세포의 조건에서 37°C, 5% CO₂로 72시간 배양하였다.

4) 분할구의 할구수 측정

분할구의 체외 발달능력을 알아보기 위하여 배반포까지 발달된 분할구들을 Hoechst 33342(Sigma, U. S. A)를 이용하여 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 할구수를 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 생쥐 수정란의 분할구 발생능

투명대를 제거한 2, 4 및 8- 세포기 생쥐 수정란을 분리한 후 단순배양액에서 또는 생쥐태아 fibroblast 세포들과 공동배양에서 72시간 배양시킨 후 배반포까지의 발달율과 발달된 배반포의 세포수를 조사한 결과는 Table 1에 제시한 바와 같다.

생쥐의 2-세포기 배에서 분리된 분할구들의 발달성적은 배양조건에 상관없이 배반포까지 80% 이상의 높은 발달율을 보였으며, 배반포의 세포수에 있어서도

20개 이상으로 양호하였다. 그러나 4-와 8- 세포기에서 분리된 분할구의 발달율은 단순 배양액에서는 각각 73~74%와 61~63%로, 생쥐태아 fibroblast 세포와의 공동배양시 각각 81%와 71~73%보다 유의하게 저조하였다. 이러한 결과는 Tarkowski와 Wroblewska(1967)가 보고한 4-와 8-세포기 분할구의 배반포까지의 각각 발달율이 37.8%, 17.2%인 것과 비교하여 볼 때 경이적으로 높은 성적이지만, 정 등(1988)이 보고한 2~8세포기의 분할구 발달율 90~94%와 Togashi 등(1987)이 보고한 2-세포기의 분할구 발달율 96%보다는 약간 저조하였다. 따라서 초기배 분할구의 배양조건에 따라서 그 발생능이 좌우된다고 사료된다.

본 연구에서 FCS가 첨가된 단순배양액인 T6와 TCM199 배양액에서 배반포까지의 발달율과 발달한 것의 세포수에 있어서 이들 배양액들간의 차이는 나타나지 않았다. 그러나 생쥐태아 fibroblast 세포와 공동 배양하였을 때 단순배양액보다 배반포까지의 발달율과 발달된 배반포의 세포수가 증가하는 경향이 있었다. 종합적으로 볼 때 Rossant(1976)가 보고한 것과

Table 1. *In vitro* development of blastomeres from 2-, 4-, and 8-cell mouse embryos in simple media and co-culture with mouse fetal fibroblast cells(MFFC).

Source of blastomere	Culture conditions	No. of blastomeres cultured	No. of blastomeres developed to			No. of nuclei Mean ± SE
			cleavage	morular	blastocyst (%)	
Blastomeres from 2-cell embryos	T6+FCS	161	152	148	140(86.9)	20 ± 3
	TCM199+FCS	145	134	125	120(82.8)	20 ± 2
	T6+FCS & MFFB	147	143	141	136(92.5)	21 ± 3
	TCM199+FCS & MFFB	151	145	142	137(90.7)	21 ± 3
Blastomeres from 4-cell embryos	T6+FCS	137	118	111	102(74.4)	10 ± 3
	TCM199+FCS	142	121	116	104(73.2)	10 ± 2
	T6+FCS & MFFB	142	128	124	115(80.9)*	11 ± 2
	TCM199+FCS & MFFB	149	134	130	120(80.5)*	11 ± 2
Blastomeres from 8-cell embryos	T6+FCS	145	117	104	89(61.4)	5 ± 2
	TCM199+FCS	197	171	158	124(62.9)	5 ± 3
	T6+FCS & MFFB	147	128	116	105(71.4)*	6 ± 3
	TCM199+FCS & MFFB	152	135	123	111(73.0)*	6 ± 2

* P vs. control(T6+FCS) < 0.05

일치하는 것으로 분할구의 발달율에 있어서 분할구가 유래된 본래 수정란의 발달단계가 진행된 것일수록 그 발달율이 저조하였으며, 배반포까지 발달한 것의 세포수에 있어서도 동일한 결과를 나타내었다.

2. 발달 단계가 다른 분할구의 재조합과 발생능

생쥐 초기배로부터 분리된 분할구의 발생능을 제고시키기 위하여 발달단계가 상이한 수정란으로부터 분리된 분할구들을 재조합한 후, 단순배양액이나 생쥐태아 fibroblast 세포의 단층배양에서 72시간 배양하였다. 이들 재조합 분할구들의 배반포까지의 발달율과 발달된 배반포의 세포수를 조사한 결과는 Table 2에 요약하였다.

본 실험에서는 기초배양액에 BSA만을 첨가한 배양액을 대조구로하여 단순배양액에 FCS를 BSA대신

첨가하였을 때 분할구의 발달율은 79% 정도로 첨가되는 혈청의 효과는 차이가 없었다. 그러나 생쥐태아 fibroblast 세포와 공동배양을 실시하였을 때 분할구의 발달율은 발달단계가 상이한 분할구들의 재조합 구성에 상관없이 유의하게 향상되었으며, 발달된 배반포의 세포수에 있어서도 향상되는 경향이 있었다. Table 1에서 보여준 바와 같이, 생쥐태아 fibroblast 세포와의 공동배양시 4-와 8-세포기의 분할구 발달율은 81%와 72%, 배반포의 세포수는 11개와 6개였는데, 이들 분할구들을 재조합하여 배양했을 때 발달율은 80%로 차이가 없었으나 배반포의 세포수는 21개로 4개 이상의 세포증식 효과를 나타내었다. 따라서 발달단계가 진전된 분할구(1/8)들을 2-세포기 또는 4-세포기의 분할구와 재조합시켜 발달시키는 것이 일관성 쌍자를 생산하기 위한 효율적인 방법이라고 사료된다.

Table 2. *In vitro* development of reconstituted with different stage blastomere from mouse embryos in simple media and co-culture with mouse fetal fibroblast cells(MFFC).

Recombination of blastomeres	Culture condition	No. of blastomeres cultured	No. of blastomeres developed to			No. of nuclei Mean ± SE
			cleavage	morular	blastocyst (%)	
1/2+1/4	T6+BSA	187	172	162	148(79.1)	32±2
	T6+FCS	174	162	149	137(78.7)	31±2
	TCM199+FCS	154	147	140	123(79.8)	32±2
	T6+FCS & MFFB	154	149	147	140(90.9)*	34±2*
	TCM199+FCS & MFFB	152	150	146	141(92.7)*	33±2*
1/4+1/8	T6+BSA	141	122	114	99(70.2)	19±3
	T6+FCS	152	128	112	106(69.7)	19±3
	TCM199+FCS	147	132	119	105(71.4)	18±3
	T6+FCS & MFFB	134	127	119	107(79.8)*	21±3*
	TCM199+FCS & MFFB	149	134	127	121(81.2)*	21±3*
1/4+2/8	T6+BSA	134	127	110	107(79.8)	32±3
	T6+FCS	115	110	94	90(78.3)	33±3
	TCM199+FCS	115	114	102	91(79.1)	33±3
	T6+FCS & MFFB	147	135	128	123(83.6)*	34±3*
	TCM199+FCS & MFFB	142	134	122	118(83.0)*	35±3*

* P vs control(T6+FCS) < 0.05

1/2, 1/4, 1/8 : Blastomeres from 2, 4, and 8 cell stage embryos, respectively

IV. 적 요

우수 포유동물 수정란의 이용효율을 향상시키기 위하여 포유동물의 착상전 배로부터 분리된 할구의 성공적인 발달에 관한 기본 연구를 실시하여 왔다. 이에 본 연구는 생쥐의 착상전 배로부터 분리된 할구가 생쥐태아 fibroblast 세포와의 공동배양이 할구의 체외발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 성숙한 ICR 자성생쥐를 다배란을 유기하기 위해 호르몬 처리를 하였으며, 수정란은 2-, 4-, 8-세포기 단계에서 채란하였다. 채란한 수정란은 protease로 처리해 투명대를 제거한 후 micropipette를 이용하여 할구를 분리하고, 이것들로 각기 다른 단계의 할구를 재조합한 후, T6, TCM199 및 14~15일된 생쥐 태아로부터 추출한 생쥐태아 fibroblast 세포와 공동배양을 72시간동안 실시하였다. 배양 후 발달율을 조사하였으며, 각각의 배반포로부터 Hoechst 33342 염색에 의해 핵수를 조사하였다.

할구의 배발달율에 있어 배양액간에는 유의한 차이가 없었으나 단순배양액에서보다 생쥐태아 fibroblast 세포와의 공동배양에서 할구의 재조합에 관계없이 유의하게 높은 성적을 얻었다. 또한 생쥐태아 fibroblast 세포와 공동배양한 경우 단순배양한 할구보다 핵수가 약간 증가하는 경향이 있었다. 일반적으로 할구의 높은 배발달율은 배양조건에 관계없이 후기배보다 초기배에서 관찰이 되었으며, 재조합된 할구는 단순할구와 비교하여 볼때 배반포의 핵수가 더 많았으나 높은 배발달율은 나타나지 않았다.

따라서 본 연구에 있어서의 결과는 생쥐태아 fibroblast 세포와의 공동배양이 생쥐수정란으로부터 분리된 할구의 체외발달에 효과적인 영향을 미친다고 사료된다.

V. 참고문헌

1. Camous, S., Y. Heyman, W. Meziou and Y. Menezo. 1984. Cleavage beyond block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*,72:479-485.
2. Eyestone, W.H., J. Vignieri, and N.L. First. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology*, 27:228.
3. Gandolfi, F. and R.M. Moor. 1987. Stimulation of early development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cell. *J. Reprod. Fert.*,81:23-28.
4. Goto, K., S. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*,83:753-758.
5. Graham, C. F. and Z. A. Deussen. 1978. Features of cell lineage in pre-implantation mouse Development. *J. Embryol. Exp. Morph.*,48:53-72.
6. Graham, C.F. and E. Lehtonen. 1979. Formation and consequences of cell patterns in preimplantation mouse development. *J. Embryol. exp. Morph.*,49:277-294.
7. Kelly, S.J., J.G. Mulnard and C.F. Graham. 1978. Cell division and cell allocation in early mouse development. *J. Embryol. Exp. Morph.*,48:37-51.
8. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad, Jr. R. E. Hammer and R.L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryo. *Theriogenology*, 24:687-691.
9. Rand, G.F. 1985. Cell allocation in half and quadruple-size preimplantation mouse embryos. *J. Exp. Zool.*,236:67-70.
10. Rossant, J. 1976. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 36:283-290.
11. Roblero, L.S. and M.D. Riffo. 1986. High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos *in vitro*. *Fertil. Steril.*,45:412-416

12. Seidel, G.E. 1983. Production of genetically identical sets of mammals : cloning? J. Exp. Zoology.,228:347-354.
13. Seike, N., K. Saeki, K. Utaka, M. Sakai, R. Takagura, Y. Nagao and H. Kanagawa. 1989. Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zonae pellucidae. Theriogenology,32:211-220.
14. Spindle, A. 1982. Cell allocation in pre-implantion mouse chimeras. 1982. J. Exp. Zoology, 219:361-367.
15. Tarkowski, A.K. 1959. Experiments on the developments isolated blastomeres of mouse eggs. Nature, 184:1286-1287.
16. Tarkowski, A.K. and J. Wroblewska. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. J. Embryol. Exp. Morpho.,18:155-180.
17. Togashi, M., H. Suzuki, T. Miyai and M. Ogamoto. 1987. Production of monozygotic twins by splitting of 2-cell stage embryos in mice. Jpn. J. Anim. Reprod.,33:51-57.
18. Willadsen, S.M. 1981. The developmental capacity of blastomeres from 4- & 8-cell sheep embryos. J. Embryol. Exp. Morph., 65:165-172.
19. Wiley, L.M., S. Yamami and D.V. Muyden. 1986. Effect of potassium concentration, type of protein supplement and embryo density on mouse pre-implantation development *in vitro*. Fertil. Steril.,45:119.
20. 정택수, 이상진, 정길생. 1988. 생쥐배 분할구의 *in vitro* 발달에 관한 연구. 가축번식학회지, 12(3) :132-140
21. 이철상, 이경광. 1990. 생쥐 8-세포기합구의 발생능. 한국축산학회지,32:131-138.