

체내 수정된 Mouse 1-세포배의 체외발생에 미치는 혈관내피세포주(tHUE-2세포) 배양액의 영향

박홍대 · 이훈택* · 정길생* · 三井洋司**

대구대학교 생물공학과

Effect of Conditioned Medium of Human Endothelial Cell Line(tHUE-2 cell) on *In Vitro* Development of Mouse 1-cell Embryos *In Vivo* Fertilized

Park, H. D., H. T. Lee*, K. S. Chung* and Y. Mitsui**

Department of Biotechnology, Daegu University

SUMMARY

Culture medium (ASF-301) of tHUE-2 cell, human endothelial cell line, and culture medium of these cells (conditioned medium: CM) which affect embryonic development of *in vivo* fertilized 1-cell embryos of mouse were examined. Two-cell stage block of mouse embryos was overcome in ASF-301 and CM without EDTA, which usually added in basic medium (modified Whitten Medium: MWM, control) to overcome the 2-cell stage block. The developmental rates of embryos to the blastocyst stage were significantly increased in MWM containing 12.5% of growth factors added to ASF-301 (10mg/l transferrin, 1mg/l insulin, 0.01mg/l EGF) than those of 100% addition and control, 78.0% vs 20.8 and 52.3%, respectively ($P < 0.05$), but the growth factors was not affected the hatching rate of blastocyst. Using ASF-301 or CM which was not treated, embryonic development into the blastocyst and hatched blastocyst stages were not affected. However, proportions of embryonic development into the blastocyst and hatched blastocyst stages were significantly higher in dilution (ASF-301 1:10: CM 1:3~1:6) than those in control ($P < 0.05$). In ASF-301 dialyzed M.W. < 10000 dialysis membrane, the developmental rate upto the hatched blastocyst stage was significantly increased, compared to ASF-301 which was not dialyzed ($P < 0.05$), and hatching rate of blastocyst of these group was significantly increased than those in MWM ($P < 0.05$). Compared to CM which was not dialyzed, however, in dialyzed CM was significantly decreased, compared to untreated CM ($P < 0.05$), especially any hatched blastocyst was not appeared. As a result of these experiments indicated that a kind or proper treatment such as a dilution of complex synthetic cell culture medium and conditioned medium, and that a optimal concentration of growth factors are useful for embryo culture *in vitro*.

* 건국대학교 동물자원연구센터 (Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University)

** 日本 通商省 工業技術院 生命科學工業技術研究所

I. 서 론

Human을 포함한 포유동물(특히 대가축동물) 난자의 착상전 초기배발생용 배지로서는 체세포배양에 이용되는 소위 complex synthetic medium인 TCM-199, MEM, Hams' F-10 등을 많이 이용하고 있다. 그런데 배발생에 이러한 배지들의 효과에 대한 것은 이들 배지에 포함되어져 있는 아미노산의 영향으로 생각하지만(Rosenkrans 등, 1991; Imai 등, 1993), 실제로는 거의 경험적으로 사용하고 있는 실정이다. 또 미성숙난자들의 체외성숙이나 수정난자의 체외발생에는 여러 종류의 체세포(Menozo 등, 1990; Takahashi 등, 1994) 또는 생식기유래세포(Rexroad 와 Powell, 1988; Ellington 등, 1990; Voelkel 등, 1985)와 함께 공동배양, 동종 또는 이종의 생식기를 이용한 기관배양(Xu 등, 1992; Ellington 등, 1990)이 이용되어져 왔다. 이 중에서 생식세포유래인 난관(Eyestone 과 First, 1989) 및 자궁세포(Voelkel 등, 1985)들을 이용한 공동배양으로 양호한 결과를 얻고 있다. 그러나 이들 생식세포는 체외에서 혈청첨가배지에서 배양이 어렵고, 또한 배양된다고 하더라도 장기간의 배양은 거의 불가능하다고 한다(Xu 등, 1992; 友岡, 1989).

한편 공동배양에 이용되는 여러 종류의 세포는 실험 할 때마다 항상 준비를 해야 하는 어려운 점과 난관상피세포에 따라 배발생 촉진작용에 변이를 나타내기도 한다. 이러한 문제점은 cell line을 이용함으로써 해결할 수 있다는 것이 보고되었으며, 이러한 cell line도 여러가지 증식인자를 분비하고 있다는 것이 밝혀졌다(Menozo 등, 1990; Hernandez-Ledezma 등, 1993; Hawk 와 Wall, 1994).

본 연구는 생취배의 체외배양에 있어서 무혈청으로 배양된 human 혈관 내피세포주인 tHUE-2세포의 배양에 이용하는 ASF-301배지와, 이 세포를 배양한 conditioned 배지의 이용 가능성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 수정란자의 회수

ICR계 암컷(4~6주령)과 수컷(10주령 이상)을 이

용하였다. 과배란은 PMSG, hCG를 각각 7.5IU씩, 48시간 간격으로 복강내 주사하여 유도하였다. 그리고 hCG주사후 바로 수컷과 1:1의 비율로 교미시켰다. 익일 아침에 질전검사를 통하여 교미의 유무를 확인하였다. 수정란자는 hCG주사후 20시간째에 암컷 생취를 경추탈골법으로 죽인 후 난관팽대부로 부터 회수하였다. 회수된 난자들은 100NF unit/ml의 hyaluronidase를 함유한 PBS용액에 수분간 배양하여 cumulus cell를 제거한 후, 형태적으로 정상인 수정난자만을 회수하여 실험에 제공하였다.

2. 배양액

배배양용의 기초배지로서는 10 μ M의 mercaptoethanol과 50 μ M의 EDTA를 함유한 modified Whitten medium(미쓰비시생명과학연구소)을 이용하였다. 한편 human 혈관내피세포주(tHUE-2, 일본공업기술원 생명공학공업기술연구소 생체정보부 세포기능 연구실에서 개발했던 human 태반 유래의 혈관내피세포주)의 무혈청배지는 EDTA가 함유되지 않은 100 mg/l BSA, 10mg/l transferrin, 1mg/l insulin, 0.01mg/l EGF를 함유한 ASF-301(日本, 味の素社)이었다. 그리고 tHUE-2를 대량배양(대량배양법은 위의 실험실 방법에 준함, 1 \times 10⁶cells/ml, 225cm²의 flask용기에서 약 6~10일간)으로 얻었던 배양액을 1, 500rpm으로 10분간 원심하여 상청액을 다시 여과(0.4 μ m의 millipore filter로서) 멸균후, 소위 tHUE-2세포의 conditioned 배지(CM)로서 이용하였다.

한편 ASF-301과 CM을 각각 투석하였다. 투석(시료는 10~15ml)은 분자량 10000이하를 제거할 수 있는 반투막인 cellophane tube(Viking사)를 이용하였다. 투석외액은 기초배지로, 외액량은 투석시료의 100배, 외액의 교환은 6시간 간격으로 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 행하였다.

3. 배의 체외배양

회수된 정상 수정난자를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ in air의 incubator에서, 여러 종류의 배지로 배양하였다. 그리고 배반포 또는 hatched 배반포까지의 배발생을 24시간 간격으로 관찰하였다.

4. 통계분석

본 연구의 결과들은 χ^2 검정으로 유의성을 검토하였다.

III. 결 과

1. 여러가지 배지의 효과

수정난자의 체외발생에 미치는 여러가지 배지의 효과를 검토한 결과는 Table 1에 제시한 바와 같다. 4~8세포기까지의 배발생율은 기초배지구(79.0%), ASF-301구(75.0%), CM구(65.9%)간의 유의차는 없었다. 그러나 상실배와 배반포까지의 배발생율은 기초배지구(48.1과 46.9%)로서 가장 높았으며, 특히 배반포까지는 ASF-301구(18.2%), CM구(9.1%)보다도 유의하게 높았다($P < 0.05$). 그리고 상실배에서 배반포로의 배발생율은 ASF-301구와 CM구에서 각각 16/28(57.1%)와 8/17(47.1%)로서 기초

배지구의 38/39(97.4%)보다 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). 한편 ASF-301구에서의 배반포까지의 배발생율은 CM구보다도 높았지만, 유의성은 인정되지 않았다.

2. ASF-301에 함유된 growth factor의 효과

ASF-301에 첨가되는 growth factor들(실험방법 참조)을 기초배지에 전부 첨가하였을 때 1(100%구)로 하였고, 1/2(50%구), 1/4(25%구), 1/8(12.5%구)씩을 첨가하여, 이들 growth factor가 배의 체외발생율에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 2에 요약한 바와 같다.

4~8세포기까지의 배발생율의 경우 100%와 50%구는 각각 58.3%와 46.8%로서 다른 3구보다도 유의하게 낮았으며($P < 0.05$), 12.5%구는 기초배지구와 25%구보다도 높았으나 유의차는 인정되지 않았다. 상실배와 배반포까지의 각각의 배발생율은 4~8세포기까

Table 1. Effect of various culture medium on development of mouse 1 cell embryos *in vivo* fertilized

| Treatment | No. of cultured embryos | No. (%) of developed embryos to | | | |
|-----------|-------------------------|---------------------------------|----------|-------------------------|-----------------------|
| | | 2 cell | 4~8 cell | Morula | Blastocyst |
| MWM | 81 | 78(96.3) | 64(79.0) | 39(48.1) ^b | 38(46.9) ^b |
| ASF-301 | 88 | 84(95.5) | 66(75.0) | 28(31.8) ^{a,b} | 16(18.2) ^a |
| CM | 88 | 85(96.6) | 58(65.9) | 17(19.3) ^a | 8(9.1) ^a |

a,b: Values with different superscripts in the same column of each group are significantly ($P < 0.05$) different.

Table 2. Effect of growth factors in ASF-301 medium on development of mouse 1 cell embryos *in vivo* fertilized

| Treatment | No. of cultured embryos | No. (%) of developed embryos to | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 2 cell | 4~8 cell | Morula | Blastocyst | Hatched blastocyst | |
| MWM | 44 | 43(97.7) | 36(81.2) ^b | 25(56.8) ^b | 23(52.3) ^b | 17(38.6) ^b | |
| Growth factors ¹⁾ (%) | 100 | 48 | 45(93.8) | 28(58.3) ^a | 18(37.5) ^{a,b} | 10(20.8) ^a | 6(12.5) ^a |
| | 50 | 47 | 43(91.5) | 22(46.8) ^a | 14(29.8) ^a | 9(19.1) ^a | 5(10.6) ^a |
| | 25 | 50 | 50(100) | 44(88.0) ^b | 35(70.0) ^{b,c} | 29(58.0) ^b | 18(36.0) ^b |
| | 12.5 | 50 | 49(98.0) | 45(90.0) ^b | 40(80.0) ^c | 39(78.0) ^c | 27(54.0) ^b |

1) 100%: MWM + 10mg /l transferrin + 1mg /l insulin + 0.01mg /l EGF

50%: MWM + 5mg /l transferrin + 0.5mg /l insulin + 5 μ g /l EGF

25%: MWM + 2.5mg /l transferrin + 0.25mg /l insulin + 2.5 μ g /l EGF

12.5%: MWM + 1.25mg /l transferrin + 0.125mg /l insulin + 1.75 μ g /l EGF

a,b,c: Values with different superscripts in the same column of each group are significantly ($P < 0.05$) different.

지의 배발생율과 비슷한 경향을 나타내었으며, 특히 12.5%구는 각각 80.0와 78.0%로서 다른 모든 구보다도 유의하게 높았다($P < 0.05$). 한편 부화배반포까지의 배발생율의 경우는 12.5%첨가구에서 54.0%로서 가장 높았지만, 기초배지구의 38.6%와는 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 기초배지에서의 배반포의 부화율은 23개중 17개, 73.9%로서 growth factor 첨가구들(55.5~69.2%)보다도 높았다.

3. ASF-301의 희석효과

ASF-301에서의 배발생율은 기초배지보다 저조하였으나(Table 1), ASF-301에 함유된 적정농도의 growth factor들은 배발생에 효과가 있었다(Table 2). 여기서는 ASF-301을 기초배지로서 1:2, 1:3, 1:10으로 희석하였다. 이 희석한 배지가 배의 발생에 어떤 영향을 미치는가를 검토하였고, 그 결과는 Table 3에 요약하였다. 4~8세포기까지의 배발생율은 1:10구에서 95.9%로 가장 높았고, 특히 기초배지(73.3%), ASF-301구(78.7%), 1:2구(81.6%)보다도 유의하게 높았다($P < 0.05$). 상실배까지의 배발생율은 기초배지구(55.6%)와 ASF-301구(55.3%)에서는 거의 비슷하였으나, ASF-301배지를 희석해감에 따라 차츰 증가하였으며, 특히 1:10구는 83.7%로서 가장 높았고, 다른 모든 구보다도 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). 그리고 배반포까지의 배발생율은 ASF-301구(25.5%)는 기초배지의 51.1%보다도 유의하게 낮았지만($P < 0.05$), ASF-301배지를 희석해감에 따라 차츰 증가하여

1:10구에서는 83.7%로서, 기초배지구보다도 유의하게 높았다($P < 0.05$). 한편 부화배반포까지의 배발생율도, 그리고 배반포의 부화율도 배반포까지의 배발생과 거의 비슷한 경향으로서 1:10구에서 가장 양호한 성적을 나타내었다.

4. CM의 효과

tHUE-2세포를 배양했던 배지, 즉 CM이 배의 체외 발생율에 미치는 영향을 검토하였다 (Table 4). CM 그 자체를 이용했을 경우의 결과는 Table 1과 거의 비슷한 경향으로써 배반포 및 부화배반포까지의 배발생율은 각각 11.3와 1.2%로서 기초배지구의 44.6와 12.1%의 각각보다 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). 그러나 CM을 기초배지로서 1:3, 1:6, 1:9, 1:12로 희석하면 배발생율이 상승하는 것을 알 수 있고, 특히 1:3구와 1:6구에서 발생의 어떤 발생단계라도 다른 구의 각각보다 높았으며, 상실배(67.5와 68.3%), 배반포(67.5와 65.9%), 부화배반포(38.8와 43.9%)까지의 발생율은 기초배지구의 각각보다도 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편 1:9구와 1:12구에서의 배반포(36.6와 37.8%)까지의 배발생율은 기초배지구보다도 낮았지만, 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 부화배반포(22.0와 24.4%)까지의 배발생율은 기초배지구의 보다 높았고, 특히 1:12구는 유의하게 높았다 ($P < 0.05$).

5. ASF-301과 CM의 투석효과

ASF-301과 CM을 투석하였을 때 배발생에 미치는

Table 3. Effect of dilution of ASF-301 medium on development of mouse 1 cell embryos *in vivo* fertilized

| Treatment | No. of cultured embryos | No. (%) of developed embryos to | | | | | |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 2 cell | 4~8 cell | Morula | Blastocyst | Hatched blastocyst | |
| MWM | 45 | 43(95.6) | 33(73.3) ^a | 25(55.6) ^{a,b} | 23(51.1) ^b | 12(26.7) ^b | |
| ASF 301 | 47 | 47(100) | 37(78.7) ^a | 26(55.3) ^a | 12(25.5) ^a | 5(10.6) ^a | |
| Dilution ratio ¹⁾ | 1: 2 | 49 | 48(98.0) | 40(81.6) ^a | 33(67.3) ^{a,b,c} | 29(59.2) ^b | 23(46.9) ^c |
| | 1: 3 | 51 | 47(92.2) | 44(96.3) ^{a,b} | 38(74.5) ^{b,c} | 37(72.5) ^{b,c} | 28(54.9) ^{c,d} |
| | 1:10 | 49 | 48(98.0) | 47(95.9) ^b | 41(83.7) ^c | 41(83.7) ^c | 33(70.2) ^d |

1) ASF-301:MWM

a,b,c,d: Values with different superscripts in the same column of each group are significantly ($P < 0.05$) different.

Table 4. Effect of dilution of CM on development of mouse 1 cell embryos *in vivo* fertilized

| Treatment | No. of cultured embryos | No. (%) of developed embryos to | | | | | |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | | 2 cell | 4~8 cell | Morula | Blastocyst | Hatched blastocyst | |
| MWM | 83 | 80(96.4) | 63(75.9) ^{a,b,c} | 40(48.2) ^{a,b} | 37(44.6) ^b | 10(12.1) ^b | |
| CM | 83 | 82(98.8) | 69(83.1) ^{b,c} | 48(57.8) ^{b,c} | 11(13.3) ^a | 1(1.2) ^a | |
| Dilution ratio ¹⁾ | 1: 3 | 80 | 78(97.5) | 69(86.3) ^c | 54(67.5) ^c | 54(67.5) ^c | 31(38.8) ^d |
| | 1: 6 | 82 | 79(96.3) | 71(86.6) ^c | 56(68.3) ^c | 54(65.9) ^c | 36(43.9) ^d |
| | 1: 9 | 82 | 78(95.1) | 55(67.1) ^a | 35(42.7) ^{a,b} | 30(36.6) ^b | 18(22.0) ^{b,c} |
| | 1:12 | 82 | 80(97.6) | 58(70.7) ^{a,b} | 32(39.0) ^a | 31(37.8) ^b | 20(24.4) ^c |

1) CM:MWM

a,b,c,d: Values with different superscripts in the same column of each group are significantly ($P < 0.05$) different.

Table 5. Effect of dialysis of ASF-301 medium and CM on development of mouse 1 cell embryos *in vivo* fertilized

| Treatment | No. of cultured embryos | No. (%) of developed embryos to | | | | |
|------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 2 cell | 4~8 cell | Morula | Blastocyst | Hatched blastocyst |
| MWM | 40 | 39(97.5) | 31(77.5) ^{a,b} | 24(60.0) ^b | 21(52.5) ^c | 11(27.5) ^b |
| ASF-301 | 37 | 37(100) | 28(75.7) ^{a,b} | 21(56.8) ^b | 11(29.7) ^b | 4(10.8) ^b |
| Dialysed ASF-301 | 53 | 51(96.2) | 50(94.3) ^c | 37(69.8) ^b | 34(64.2) ^c | 28(52.8) ^c |
| CM | 51 | 50(98.0) | 43(84.3) ^{b,c} | 37(72.5) ^b | 10(19.6) ^b | 6(11.8) ^b |
| Dialysed CM | 52 | 51(98.1) | 34(65.4) ^a | 21(40.4) ^a | 2(3.8) ^a | 0(0.0) ^a |

a,b,c: Values with different superscripts in the same column of each group are significantly ($P < 0.05$) different.

영향을 검토했던 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. ASF-301투석구는 ASF-301을 그대로 이용하였을 경우보다 배발생율은 전반적으로 상승하였고, 배반포(64.2%), 부화배반포(52.8%)까지의 배발생율은 ASF-301구의 각각보다 유의하게 높았다($P < 0.05$). 또한 이것은 기초배지구의 각각보다도 높았고, 특히 부화배반포까지의 발생율은 유의하게 높았다 ($P < 0.05$).

한편, CM을 투석하였을 경우의 배발생율은 CM을 투석하지 않았을 경우보다 전반적으로 유의하게 낮았으며($P < 0.05$), 특히 부화했던 배반포는 하나도 없었다.

IV. 고 찰

혈관내피세포주의 배양용인 ASF-301배지라든지 CM에는 생쥐배의 2-cell block를 해결하기 위해 첨가되는 EDTA가 함유되어 있지 않음에도 불구하고 이들 구에서는 2-cell block을 극복하였다 (Table 1). 이것은 ASF-301배지에 첨가되어져 있는 growth factor들, 그리고 여러가지 첨가물의 작용에 의한 현상이라고 생각할 수 있다. 한편 CM구가 ASF-301구보다도 배발생율이 낮은 것(Table 1)은 tHUE-2세포가 증식하기 위하여 ASF-301로부터 배발생에 필요한 물질들

을 소비했든지, 또는 tHUE-2세포가 생산·분비하는 물질은 배발생에 효과가 없을지도 모른다.

동물의 종류에 따라 다르지만 착상전 배발생의 어떤 시기부터 특정한 종류의 growth factor들에 대한 반응성이 나타나기 때문에(Rappolee, 1992; Vaughan 등, 1992; Watson 등, 1992) 적당한 종류와 양의 growth factor를 배지에 첨가한다면 배발생에 유효하다(Werb, 1990; Heyner 등, 1993; Keefer 등, 1994). 본 실험(Table 2)에서도 적절한 농도(12.5%)의 growth factor들의 첨가는 기초배지에서의 배발생물보다 전반적으로 양호하였고, 특히 4~8세포기에서 배의 compact시기, 즉 상실배로의 배발생에 영향을 미쳤다. 그러나 과농도의 growth factor들의 첨가는 배의 어떤 단계로의 발생에도 악영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 한편 배의 각 할구들이 배반포시기에 구조적·생화학적 변화가 급격하게 일어난다고 하지만(Blandau, 1971), 실제로 여기서 알 수 있듯이 상실배로 발생한 배는 대부분이 배반포로 발생하였다(기초배지구). 이것은 상실배로 발생하는 compact시기에 배의 내부에서는 현저한 변화가 일어나는 것을 시사하였으며, 따라서 적정농도의 growth factor는 이 시기에 영향을 미치며, 또 배반포로의 발생에도 growth factor들의 농도, 종류등에도 영향을 받는 것(Heyner 등, 1993; Yang 등, 1993; Keefer 등, 1994)으로 사료된다.

배의 체외발생에 있어서 growth factor들을 적정 농도로 첨가하면 배반포의 부화율은 상승한다고 할지라도 기초배지(BSA함유)와는 큰 차이가 없었다(Table 2). 그러나 ASF-301을 적당하게 희석해감에 따라 부화배반포까지의 배발생율은 상승하였다(Table 3). 따라서 배반포의 부화율은 growth factor들의 농도에 의존하기 보다도 오히려 complex synthetic medium의 일종인 ASF-301내에 함유된 아미노산, 비타민 등의 영양물질들을 적당한 희석이라는 처리에 의해 이들 인자의 효과가 나타난 것으로 생각한다(Keefer 등, 1994). 따라서 현재 세포배양에 널리 이용하고 있는 수많은 배지들도 적당한 처리를 한다면 배의 체외배양액으로 이용할 수 있다고 생각한다.

한편, CM을 그대로 이용하면 배발생에는 효과가 없었지만, 이 배지를 적당하게 희석하면 효과적이라는 것으로 밝혀졌다(Table 4). 그러나 Table 2와 3에서

ASF-301에 첨가하는 growth factor들을 12.5%로 희석하였을 경우와, ASF-301을 1:10의 비율로 희석하였을 경우는 배발생에 유효하였지만, CM은 1:3~1:6의 비율로 희석하였을 경우가 배발생에 유효하였다는 것은 tHUE-2 세포를 배양하였을 때 growth factor 뿐만 아니라 배지속의 다른 물질도 이용하였기 때문에 결국 ASF-301보다 CM에는 배에 유용한 물질이 적다는 것과, CM에는 tHUE-2 세포에서 분비되는 cytokine을 비롯한 여러가지 물질(Sumiyoshi, 1992)들이 존재하지만, 이 물질들은 배의 발생에 영향을 미치지 못했다는 것을 시사한다. 따라서 배의 발생에는 ASF-301 그 자체에 의미가 있다고 생각하며, 이것은 특히 growth factor들의 주된 작용이라고 사료된다.

한편, 분자량 10,000이하를 제거하는 투석막으로 배지를 투석하면 ASF-301의 경우는 효과가 있었지만, CM은 오히려 효과가 없었다. 만약 ASF-301의 growth factor들이 배발생에 효과가 있었다고 하더라도 투석에 의해서 insulin(분자량 5,807)과 EGF(분자량 6,045)는 제거되고 transferrin(분자량 75,000)만이 남기 때문에 배발생에는 이들의 인자를 포함하여 10,000이하의 물질들이 고농도일 때는 배발생에 그다지 큰 효과가 없는 것으로 사료되지만, CM을 희석하였을 경우에는 오히려 희석하지 않았을 경우보다 배발생율이 낮았다는 것은 tHUE-2가 생산하는 분자량 10,000이상의 물질들이 배발생에 악영향을 미칠 것으로 생각된다.

V. 적 요

혈관내피세포주인 tHUE-2 세포를 배양하는 ASF-301 배지와, 이 세포를 배양했던 배양액(conditioned medium:CM)이 체내에서 수정된 mouse 1세포배의 체외발생에 미치는 영향을 검토하였다. 기초배지(modified Whitten Medium:MWM)에 첨가하는 EDTA를 함유하지 않은 ASF-301이나 CM에서는 mouse의 2-cell block 현상이 나타나지 않았다. ASF-301에 첨가하는 growth factor들(10mg/l transferrin, 1mg/l insulin, 0.01mg/l EGF)을 12.5%로 희석하여 MWM에 첨가한 결과, 배반포까지의 배발생률(78.0%)은 100%의 첨가구(20.8%)와 growth fac-

tor들이 첨가되어져 있지 않은 MWM구(52.3%)보다도 유의하게 효과적이었다($P < 0.05$). 그러나 growth factor들은 배반포의 부화율에는 영향을 미치지 않았다. ASF-301이나 CM을 아무런 처리없이 그대로 이용한다면 배반포 또는 부화배반포로의 발생에는 효과가 없었지만, 이들을 MWM로서 적당한 비율(ASF-301은 1:10, CM은 1:3~1:6)로 희석한 처리구에서의 배발생은 각각의 기초배지구보다 유의하게 높았다($P < 0.05$). 한편, ASF-301을 분자량 10,000이하의 투석막으로 투석하였을 경우는 투석하지 않았을 경우보다도 각 단계마다의 배발생율은 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 그리고 기초배지구에서의 배반포의 부화율보다도 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). 그러나 CM을 투석하였을 경우는 투석하지 않았을 경우보다도 배발생율은 유의하게 감소하였고($P < 0.05$), 특히 부화배반포기까지 발달한 경우는 하나도 없었다. 이것은 complex synthetic medium 또는 conditioned 배양액의 적당한 종류와 처리, 및 적정농도의 growth factor 첨가는 초기배 배양에 이용할 수 있다는 것을 시사한다.

VI. 인용문헌

- Blandau, R. J. 1971. The biology of the blastocyst. The University of Chicago, Chicago and London.
- Ellington, J. E., P. B. Farrell, M. E. Simkin, R. H. Foote, E. E. Goidman and A. B. McGrath. 1990. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to moulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fertil., 89:293-299.
- Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or conditioned medium. J. Repro. Fertil., 85:715-720.
- Hawk, H. W. and R. J. Wall. 1994. Improved yield of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. II. media and co-culture cells. Theriogenology, 41:1585-1594.
- Hernandez-Ledezma, J. J., C. Villanueva, J. D. Sikes and R. M. Roberts. 1993. Effects of CZB versus Medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation-*in vitro* fertilization procedures, Theriogenology, 39:1267-1277.
- Heyner, S., N. Shah, R. M. Smith, A. J. Watson and G. A. Schultz. 1993. The role of growth factors in embryos production. Theriogenology, 39:151-161.
- Imai, K., M. Tomizawa, I. Shimohira, H. Okuchi, Y. Goto, M. Saito, O. Dochi and M. Okada. 1993. Effect of β -mercaptoethanol on *in vitro* development of bovine blastocysts derived from IVM-IVF. 日本繁殖技術會誌, 15 :35-40.
- Keefer, C. L., S. L. Stice, A. M. Paprocki and P. Golueke. 1994. *In vitro* culture of bovine IVM-IVF embryos: cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. Theriogenology, 41:1323-1331.
- Menoza, Y., J. F. Guerin and J. C. Czyba. 1990. Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of vero cells. Biol. Reprod. 42:301-306.
- Rappolee, D. A. 1992. Endogenous Insulin like growth factor II mediates growth in pre-implantation mouse embryos through the insulin-like growth factor I receptor: A case study on the role of growth factors in mammalian development. J. Anim. Sci., 70 (Suppl. 2):42-50.
- Rexroad, C. E. and A. M. Powell. 1988. Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. Theriogenology, 29:387-397.

12. Rosenkran, C. F. Jr. and N. L. First. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effect of amino acids and vitamins. *theriogenology*, 35:266(Abstr.)
13. 友岡康弘. 1989. 無血清細胞培養マニュアル. 講談社, 日本, pp. 138-146.
14. Sumiyoshi, A. 1992. 血管内皮細胞の培養とその heterogeneity. *Jap. J. Med. Techno.*, 36:355-359.
15. Takahashi, S., T. Tokunaga and H. Imai. 1994. Co-culture system using mouse embryonic fibroblast cells for *in vitro* fertilized and nuclear transplanted bovine embryos. *Theriogenology*, 41:311.
16. Vaughan, T. J., P. S. James, J. C. Pascall and K. D. Brown. 1992. Expression of the genes for TGF- α , EGF and the EGF receptor during early pig development. *Development*, 116:663-669.
17. Voelkel, S. A., G. F. Amborski, K. G. Hill and R. A. Godke. 1985. Use of a uterine cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. *Theriogenology*, 37:1117-11310.
18. Watson, A. J., A. Hogan, A. Hahnel, K. E. Wiemer and G. A. Schultz. 1992. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:87-95.
19. Werb, Z. 1990. Expression of EGF and TGF- α genes in early mammalian development. *Mol. Reprod. Dev.*, 27:10-15.
20. Xu, K. P., B. R. Yadav, R. W. Rorie, L. Plante, K. F. Betteridge and W. A. King. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 94:33-43.
21. Yang, B. K., X. Yang and R. H. Foote. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 40:521-530.