

## 소 난관 상피세포의 배양 상층액에서 생쥐 배의 체외발달

김 선 구  
밀양산업대학교

### *In Vitro* Development of Mouse Embryos in Culture Supernatant of Bovine Oviductal Epithelial Cell

Kim, Seon Koo  
Miryang National University

#### SUMMARY

This study was conducted to examine the effect of culture supernatant of bovine oviductal epithelial cell(BOEC) on *in vitro* development of mouse embryos. To obtain the culture supernatant, ampullary epithelial cell, ithmic epithelial cell and ciliated epithelial cell of bovine oviduct were cultured in Ham's F-10 supplemented with 10% FCS.

The development rates of mouse embryos to blastocyst stage were significantly( $P < 0.05$ ) higher in BOEC-culture supernatant(72.3~82.3%) than in Ham's F-10(50.7%). The proportions of embryonic development into hatched blastocysts were significantly( $P < 0.05$ ) higher in ampullary cell supernatant(43.2%), ithmic cell supernatant(48.4%) and ciliated cell supernatant(27.7%) than in Ham's F-10(14.4%). On the other hand, the effect of ciliated cell supernatant was lower than those of other cell supernatants( $P < 0.05$ ). And there was no difference between ampullary cell supernatant and ithmic cell supernatant.

(Key words : Mouse, Embryo, IVD, BOEC, Supernatant)

#### I. 서 론

포유동물의 배를 체외에서 배양하면 일시적 또는 기능적으로 발달이 지연되거나 중지되는 현상을 나타내는데 이를 극복하기 위하여 체세포와 공동배양하는 것이 보편화 되고 있다. 이것은 체세포들이 공동배양되는 다른 세포들의 생존성을 증가시키기 때문이며 섬유아세포(Voelkel 등, 1985), 영양배엽(Heyman 등, 1987; Pool 등, 1988), 난구세포(Goto 등, 1988), 난관상피세포(Eyesten and First, 1989), 기타 체세포(Carney 등, 1990; Goto 등, 1992) 등에 대하여 검토되었다. 그 중에서도 난관상피세포를 이용한 공동배양이 채취와 배양이 용이하고 배 발생능을 향상시키는

효과가 높아서 널리 이용되고 있다(Ellington 등, 1990; Gandolfi 등, 1989).

난관상피세포가 배의 체외발달을 촉진시키는 기작에 대하여 명확하지는 않으나 난관상피에서 혈청알부민과 면역글로불린을 다량 함유한 단백질의 분비(Kapur and Johnson, 1986) 난관상피세포로부터 당단백질과 같은 특수단백질과 배의 정상발육을 촉진하는 인자생산(Wang 등, 1990) 그리고 배의 발달을 저해하는 독성제거 및 공동배양되는 세포들의 대사산물인 배의 부화촉진(Kane 등, 1992)이라 하였다. 그러나 난관상피세포와 공동배양된 배들의 체외발달성적은 아직도 체내에서의 발달과정을 재현하지 못하고 있다.

한편 배의 발달을 증진시키는 난관기능의 종 특이성 여부에 대하여 boland(1984)와 Bavister(1988)는

토끼난관 내에서 생쥐, 면양, 산양, 돼지, 소, 말 등의 배 발달이 촉진된다는 사실을 통하여 배의 발달에 대한 난관기능의 종 특이성이 없다고 하였으며, Eyston(1985)도 면양의 난관에서 소의 배가 정상적으로 발달된다고 하였다. 이처럼 배의 발달에 대한 난관기능의 종 특이성이 존재하지 않는다는 사실은 난관내 배양뿐만 아니라 난관상피세포와의 공동배양에서도 같은 것으로 인식되고 있는데, Goto 등(1992)은 난관상피세포를 포함한 여러 종류의 동물체세포들과 소의 체외수정란을 공동배양하여 이를 확인하였다.

이와 같은 일련의 연구결과로 보아 난관상피세포의 기능이 배의 체외발달과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 난관의 상피조직은 분비세포, 섬모세포로 구성되는데 이들의 분포와 기능은 난관의 부위에 따라 다른 것으로 알려졌다 (Hunter, 1988). 또한 난관액중 배의 정상적인 발달에 필요한 단백질과 발생 자극인자가 일부는 혈장에서 유래되고 일부는 난관상피세포로부터 분비된다고 하여(Gandolfi 등, 1989) 배의 발달에 대한 난관상피세포 기능에 대하여 깊은 관심을 모으고 있다. Eystone 등(1989)은 소의 난관상피를 배양하여 단층세포를 작성하고 이들 배양액을 이용하여 서도 수정란의 높은 체외발달 효과를 얻었다고 하였다. 그러므로 난관상피세포 배양 상층액은 포유동물배의 체외배양을 위하여 유효하게 쓰여질 것으로 본다. 이에 따라 본 연구에서는 난관상피세포를 난관부위별로 분리하여 따로 배양하고 여기서 얻어진 배양상층액에서 생쥐배를 배양하여 체외발달에 미치는 효과를 비교 검토코자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 배의 회수

실험동물로 CB6/F1 교잡종 생쥐(Chares River/Wiga, Sulfeld, Germany) 4~6주령의 암컷과 10~12주령의 수컷을 사용하였다. 배를 회수하기 위하여 암컷 생쥐에 PMSG(Sigma, USA) 5IU를 복강 주사하고 48시간 후에 hCG(Sigma, USA) 5IU를 다시 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG 주사후 바로 수컷과 1:1의 비율로 합사시켜 자연교미를 유도하고 48시간 후 생쥐를 도살하여 난관을 척출시킨 다음 실험 현미경하에서 Ham's F-10용액을 관류시켜 2세포

기배를 회수하였다. 회수된 배는 Ham's F-10용액으로 3회 세척하고 정상적인 배만을 골라서 실험에 사용하였다.

### 2. 난관상피세포 배양

소의 난관상피세포 배양은 Ouhibi(1988)의 방법을 약간 변경하여 실시하였다. 즉, 도살장에서 임신이 안된 암소로부터 난관을 채취하여 600 IU/ml의 penicillin이 함유된 생리적 식염수에 넣어서 실험실로 운반하였다. 먼저 지방과 결합조직을 제거하고 0.25% trypsin이 포함된 PBS용액으로 관류시킨 다음 난관 한쪽을 절찰하여 PBS용액을 채우고 37°C에서 45분간 배양하였다.

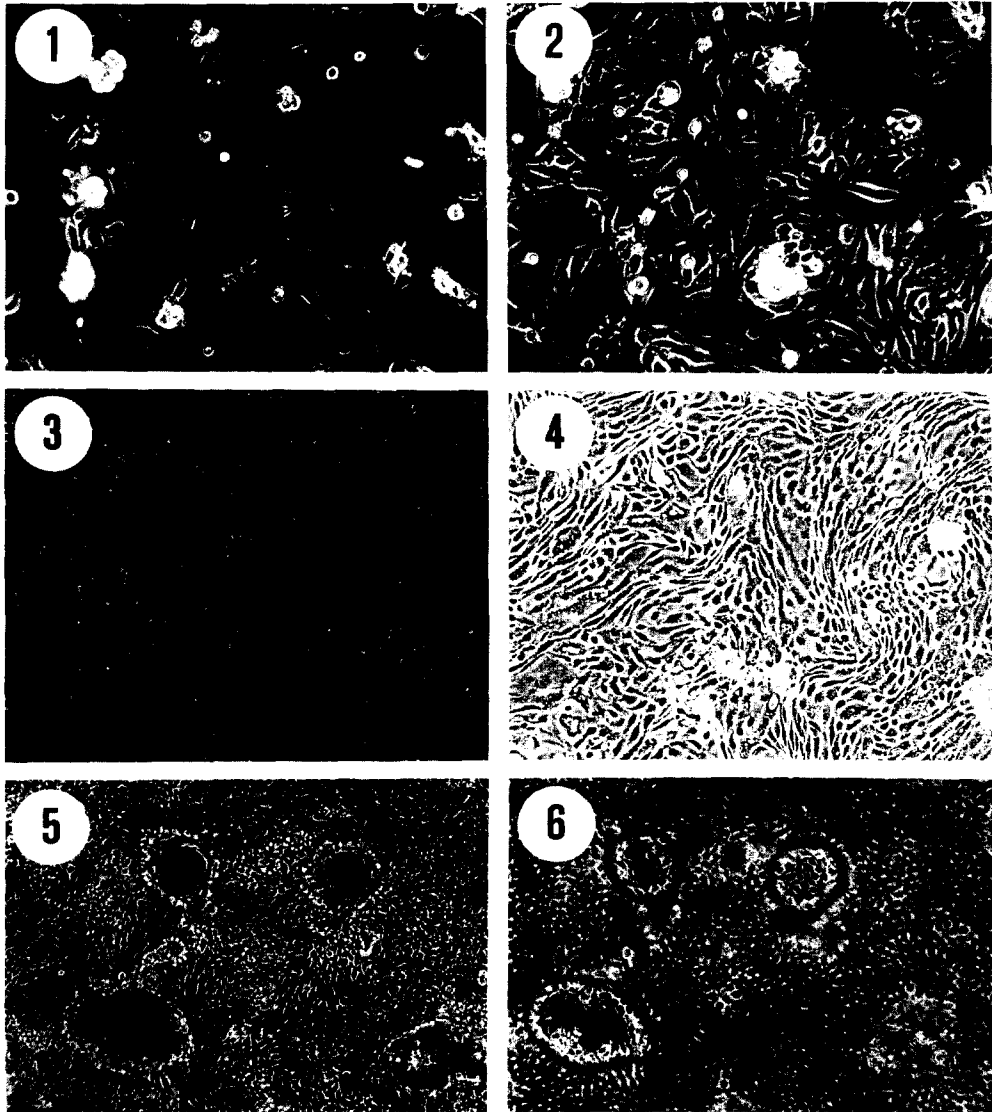
이어서 trypsin용액을 난관에 관류시켜 상피세포를 채취하고 동량의 FCS를 첨가하여 trypsin의 독성을 제거한 다음 가볍게 pipetting을 되풀이 하여 cell cluster를 분리하였다. 이것을 시험관에 넣고 175 × g에서 5분간 원심분리하여 3회 세척한 다음 10% FCS가 포함된 Ham's F-10용액을 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 공기조건에서 배양하였다. 세포가 배양접시에 접촉된 것을 확인한 후 배양액을 교체하고 상층액을 채취하여 섬모상피세포(ciliated cell)를 분리하였다. 이 용액을 다시 원심분리하여 동일한 조건으로 배양하였다. 배양액은 48시간마다 교체하였다.

### 3. 배양액 및 배의 체외배양

기본 배양액으로는 Ham's F-10에 FCS 15%를 추가하여 사용하였다. 또한 난관상피세포 배양 상층액은 상피세포가 단층배양을 형성한 후 상층액을 회수하여 -30°C에서 냉동하여 보관하였다가 해동하여 0.2 μm millipore filter로 제균하여 사용하였다. 상피세포 배양상층액은 난관팽대부 세포에서 유래된 것과 난관협부 세포에서 유래된 것 그리고 섬모상피세포에서 유래된 것을 각각 따로 채취하여 사용하였다. 준비된 배양액은 4-well dish에 각각 1ml씩 넣고 회수된 생쥐배를 각 well당 20개 내외를 이식하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기조건에서 배양하였다.

### 4. 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과들의 통계분석은  $\chi^2$  검정으로 실시하였다.



**Fig. 1.** Phase contrast microphotographs of bovine oviductal epithelial cells in culture

- 1 :** Non-dense 2 days old culture showing only the attached fraction.
- 2 :** Non-dense 3 days old culture showing the attached fraction.
- 3 :** A confluent culture showing the attached as well as non-attached ciliated cell aggregates growing in suspension.
- 4 :** A confluent culture after removal of the ciliated cells in suspension. A characteristic wavy contoured growth pattern was observed.
- 5 :** Subcultured ciliated cell aggregates attached giving rise to confluent monolayers. The attached cells could lose ciliary activity.
- 6 :** The plane of focus was changed to the cell aggregates which had not attached. The aggregates grew in suspension to finally form cystic structures with cilia on the outer surface.

### III. 결 과

소 난관 상피세포의 배양에서 단층세포형성이 쉽게 이루어졌다. Trypsin처리 영향에 불구하고 단층세포 배엽이 일주일 이내에 완성되었는데 배양개시후 수시간내에 세포들이 배양접시 바닥에 접촉상태를 보였고 세포들이 spindle을 내고 상호간에 communication을 통하여 증식하였다(Fig. 1-1,2).

이러한 모습은 난관팽대부 세포에서 다소 왕성하고 증식이 빠른 것으로 관찰되었다. 난관상피세포는 배양 직후 세포들이 각각 흩어져 있으나 시간이 경과함에 따라 바닥에 접촉하여 단층세포를 형성하는 세포군과 무리를 형성하여 섬모운동을 하는 부유세포(ciliated cell)군으로 나누어졌다(Fig. 1-3,4). 단층세포상층의 부유세포군을 분리하여 배양시켰을 때 바닥에 접촉하여 monolayer가 쉽게 형성되었고 접촉되지 못한 세포들은 운동성을 상실하고 포낭의 모습을 형성하였다(Fig. 1-5,6).

난관상피세포를 배양한 상층액을 가지고 생쥐배를 체외배양시킨 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 생쥐배의 체외발달에 대한 배양액의 효과는 상실배까지는 처리간에 차이를 나타내지 않았다. 그러나 배반포기까지의 배발달율은 Ham's F-10에서 50.7%인 반면 배양상층액에서 72.3~80.2%로 유의적으로 높은 성적을 나타내었다( $P < 0.05$ ). 또한 부화배반포까지의 배발달율은 Ham's F-10에서 14.4%이었다.

배양상층액에서는 27.7~48.4%로 배양액간에 현저한 차이를 보였다( $P < 0.05$ ). 한편 부화배반포기까지의 발달에 대한 난관상피세포 배양 상층액 간의 효과를 보면 섬모상피세포 유래의 상층액에서 배발달(27.7%)보다는 난관팽대부 상피세포 유래 상층액에서 배

발달(43.2%)과 난관협부 상피세포 유래 상층액에서 배발달(48.4%)이 유의적으로 높았으며( $P < 0.05$ ) 난관상피세포 채취부위인 난관 팽대부와 난관협부간에는 차이가 없었다.

### IV. 고 찰

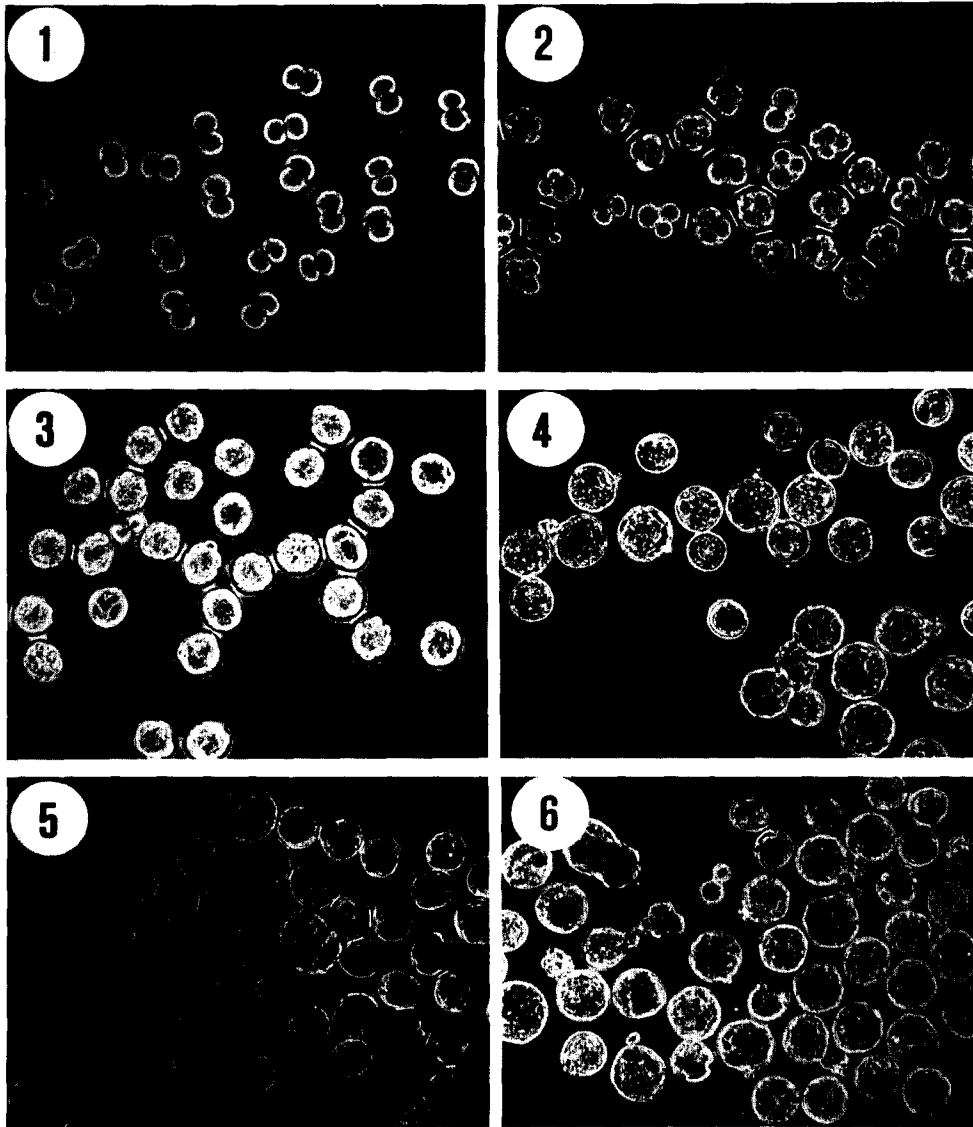
생쥐배의 체외발달에 대한 난관상피세포의 영향은 난관상피세포에서 배의 발달에 필요한 인자를 분비하기 때문이라는 것이 사실이다. 또한 Serum에도 배발달에 필요한 요소가 포함되어 있어서 (Rizzino, 1989) 생쥐배의 초기 발생에는 배양액에 20%의 FCS가 첨가되면 충분하다고 하였다(Wu 등, 1981). 따라서 본 실험에서 상실배에 도달하기까지는 배양액간에 차이가 나타나지 않은 것으로 사료된다. 그러나 배반포 단계이후 상피세포 배양 상층액에서 유의적으로 높은 성적을 보였다. 이것은 배가 분할초기에 자체 난황물질로 영양을 섭취하나 배반포가 되면서 조직영양소를 이용하게 된다는 사실을 고려할 때, 이시기에 난관 상피세포에서 배양액내로 분비된 미지성장인자의 영향을 받은 것으로 사료된다(Wang 등, 1990; McCaffery 등, 1992; 오 등 1993).

난관상피세포의 난관내에서 분포상태는 부위에 따라 달라서 섬모상피세포는 난관팽대부에 많고 분비상피세포도 팽대부에 많으나 분비기능은 난관협부에서 현저하며(Hunter, 1988), 난관팽대부와 협부에서 분비되는 난관액의 이온조성도 서로 다른 것으로 알려졌다(Roblero 등, 1976). 그럼에도 불구하고 난관상피세포 배양 상층액의 효과는 부위별로 차이를 나타내지 않았다. 이와 유사한 결과는 이미 소의 난관상피세포와 수정란의 공동배양에서 보고되었던 바(서, 1990; 박 등, 1992), 난관상피세포의 채취부위는 고려할 필

**Table 1. *In vitro* development of mouse embryos in culture medium**

Medium	No of embryos	No. (%) of embryos developed to		
		Morula	Blastocys	Hatched blastocyst
Ham's F-10 with 15% FCS	146	121(82.9) <sup>a</sup>	74(50.7) <sup>a</sup>	21(14.4) <sup>a</sup>
Ampullary cell supernatant	125	109(87.2) <sup>a</sup>	97(77.6) <sup>b</sup>	54(43.2) <sup>b</sup>
Itamic cell supernatant	126	117(92.9) <sup>a</sup>	101(80.2) <sup>b</sup>	61(48.4) <sup>b</sup>
Ciliated cell supernatant	112	101(90.2) <sup>a</sup>	81(72.3) <sup>b</sup>	31(27.7) <sup>c</sup>

Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Phase contrast microphotographs of mouse embryos culture to test the influence of culture supernatant on the formation of blastocysts

- 1 : Two cell stage. The early embryos (cleavage stages) were obtained at this stage by flushing the oviducts.
- 2 : 4~8 cell stage after 1 day culture.
- 3 : Morula Approx. 2 days culture.
- 4 : Blastocysts were obtained after 3 days culture. Arrow points to a blastocyst in the process of hatching.
- 5 : Expanded blastocysts from an experiment in which the embryos were grown in Ham's F-10 medium supplemented with 15% foetal calf serum(FCS).
- 6 : Expanded blastocysts obtained when ithmic cell culture supernatant was used.

요가 없는 것으로 판단된다. 한편 섬모상피세포 배양 상층액의 배발달에 대한 성적은 낮아서 feeder cell로서 섬모상피세포의 효과는 적은 것으로 보인다. 배의 정상적인 발달을 돕는 것이 난관 상피세포로부터 분비되는 단백질과 여러 자극인자(Gandoffi, 1989)라는 사실을 고려하여 볼 때 이것은 난관상피세포중 분비세포의 기능이 주된 것으로 사료된다.

## V. 적 요

본 연구는 소의 난관상피세포 배양 상층액이 생쥐배의 체외발달에 대한 효과를 검토하기 위하여 실시하였다. 난관상피세포 배양 상층액은 난관팽대부 상피세포와 난관협부 상피세포 및 난관섬모 상피세포를 따로 배양해서 수집하였다.

배양된 생쥐 2세포배의 배반포기까지 체외발달율은 15% FCS가 추가된 Ham's F-10용액(50.7%)에 비하여 난관상피세포 배양상층액(72.3~80.2%)에서 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ). 생쥐배들이 부화배반포까지 체외발달율은 Ham's F-10용액(14.4%)에서 보다 난관팽대부상피세포 배양 상층액(43.2%), 난관협부 상피세포 배양 상층액(48.4%) 및 난관섬모상피세포 배양 상층액(27.7%)에서 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ). 한편, 섬모상피세포 배양 상층액의 효과는 다른 상피세포 배양 상층액의 효과보다 낮았으며( $P < 0.05$ ), 팽대부상피세포와 협부상피세포간에는 배양상층액의 체외발달에 미치는 효과에 차이가 없었다.

## VI. 인용문헌

- Bavister, B. D. 1988. Role of oviductal secretion in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 29:113-154.
- Boland, M. 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*. 21:126-137.
- Carney, E. W., C. Tobback, J. E. Ellington and R. H. Foote. 1990. Co-culture of rabbit 2-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells. *Mol. Reprod. Develop.*, 27:209-215.
- Ellington, J. E., P. B. Farrell., M. E. Simkin., R. H. Foote., E. E. Goldman and A. B. McGrath. 1990. Development and survival after transfer of ceow embryos cultured from 1-2cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine 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 in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.*, 85: 715-720.
- Eyestone, W. H., D. L. Northey and M. L. Leibfried-Rutlege. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprd.*, 32(suppl. 1), 1. 00A(Abstr.).
- Gandolfi, F., A. Tiziana, L. Brevini and R. M. Moor. 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development., *J. Reprod. Fertl. Suppl.*, 38:107-115.
- Goto, K., N. Iwai, Y. Takuma, and Y. Nakanishi. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers, *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
- Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cummulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 83:753.
- Heyman, Y., Y. Menezo, P. Chesne, S. Camous and V. Garnier. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos : Improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27:59-68.
- Hunter, R. H. F. 1988. The fallopian tubes. Springer-Verlag, Berlin, pp 12-29.
- Kane, M. T., E. W. Carney and J. E. Ellington. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in dev-

- elopment of preimplantation embryos *in vitro*. Theriogenology, 38:297-313.
13. Kapur, R. P. and L. V. Johnson. 1986. Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. J. Exp. Zool., 238:249-260.
  14. McCaffery, C., T. G. McEvoy, M. G. Diskin, F. C. Gwazdauskas, M. T. Kane and J. M. Sreenan, 1991. Successful co-culture of 1-4-cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. J. Reprod. Fert., 91:119-124.
  15. Ouhibi, N., Y. Meñezo, G. Benet and B. Nicolle. 1988. Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. Proc. 4th Europ. Embryo Trans, Assoc., pp 135-141.
  16. Pool, S. H., R. W. Rorie, R. J. Pendleton, A. R. Menino and R. A. Godke. 1988. Culture of early-stage bovine embryos inside day-13 and day-14 precultured trophoblastic vesicles. Ann. N. Y Acad. Sei., 54:407.
  17. Rizzino, A. 1987. Defining the roles of growth factors during early mammalian development, in : The mammalian preimplantation embryo (Bavister, B. D). Plenum Press, New York and London, pp 151-174.
  18. Roblero, L., J. D. Biggers and C. P. Lechene. 1976. Electron probe analysis of elemental micro environment of oviductal mouse embryos. J. Reprod. Fert., 46:431-434.
  19. 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, 24: 271-283.
  20. Wang, W. L., H. S. Jiang, K. H. Lu and I. Gordon. 1990. Effect of conditioned medium and glucose concentration on the *in vitro* development of early bovine embryos. Theriogenology, 33:343(Abstract).
  21. Wu, T-C., Y-J. Wan and I. Damjanov. 1981. Rat serum promotes the *in vitro* development of mouse blastocysts during early somitic stages of embryogenesis. J. Exp. Zool., 217: 451-453.
  22. 박춘근, 여인서, 김정익. 1992. 우체의 수정란의 발생능에 미치는 난관상피세포 영향. Proceedings 축산분야종합학술대회, pp. 152.
  23. 서태광. 1990. 한우난포란의 체외수정 및 발생능 향상에 관한 연구. 경북대학교 박사학위논문.
  24. 오종훈, 김동훈, 정형민, 이훈택, 정길생. 1993. 난관상피세포 conditioned medium이 체외수정된 소 수정란의 체외발달에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 17(1):69-74.
- (접수일자 : 1998. 4. 16. /채택일자 : 1998. 5. 25.)