

세포의 휴면처리가 소 태아섬유아세포 유래 핵이식란의 핵상변화와 체외발육에 미치는 영향

최종엽 · 권대진 · 김정익 · 박춘근 · 양부근 · 정희태[†]
강원대학교 동물자원과학대학

Effect of Quiescent Treatment on Nuclear Remodeling and *In Vitro* Development of Nuclear Transfer Embryos Derived from Bovine Fetal Fibroblast Cells

Choi, J. Y., D. J. Kwon, C. I. Kim, C. K. Park, B. K. Yang and H. T. Cheong[†]
College of Animal Resource Science, Kangwon National University

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of quiescent treatment of the donor cells on the nuclear remodeling and *in vitro* development of fetal fibroblast cell-cloned bovine embryos. Serum starved, confluent and nonquiescent cycling fetal fibroblast cells were transferred into the enucleated oocytes. About 20~25% of nuclear transfer embryos fused with a serum starved or confluent cell extruded a polar body, which was slightly lower than that of nontreated control (36%). About 49~51% of nuclear transfer embryos fused with a serum starved or confluent cell had a single chromatin clump, which was slightly higher than that of nontreated control (40%). The proportion of embryos with a single chromatin clump was significantly higher ($P<0.01$) in nuclear transfer embryos without showing a polar body (60.5%) than with a polar body (4.7%). Development rates to the blastocyst stage were 21.7% and 20.9% when serum starved and confluent cells were transferred, which were slightly higher than that of control (14.1%). The result of this study suggests that quiescent treatment by serum starvation or growth to confluency of donor cells could increase the number of embryos with a normal chromatin structure, which results in increased *in vitro* development.

(Key words : Nuclear transfer, Fetal fibroblast cells, Nuclear remodeling, Quiescent treatment, *In vitro* development)

I. 서 론

체세포 핵이식을 이용한 복제동물생산이 면양 (Wilmot 등, 1997; Schnieke 등, 1997), 소 (Cibelli

등, 1998; Kato 등, 1998; Wells 등, 1999) 및 생쥐 (Wakayama 등, 1998) 등에서 성공되고 있는 가운데, 성체세포가 아닌 태아섬유아세포를 이용한 복제생산 (Schnieke 등, 1997; Cibelli 등, 1998)은 형질전환복제 생산을 위한 유용한 수단으로 사용되

[†]Correspondence: 정희태, 200-701, 강원도 춘천시 효자2동, 강원대학교 동물자원과학대학 수의학과, E-mail: htcheong@kangwon.ac.kr

고 있다.

핵이식에 의한 복제동물 생산 과정에서 탈핵 미수정란 세포질에 이식된 세포의 핵은 다양한 형태적 변화를 거치는데, 그 중에서도 가장 특징적인 변화가 이식된 핵의 미성숙 염색체 응축 (pre-mature chromosome condensation; PCC)이다 (Collas 등, 1992b; Cheong 등, 1994). PCC의 형태는 이식된 핵의 세포주기단계 (cell cycle stage)에 영향을 받아 궁극적으로는 핵이식란의 발육에 영향을 미치게 되는데 (Cheong 등, 1993), G1기 세포를 이식할 경우 정상적인 1개의 염색질구조를 나타내어, 정상적으로 발육할 수 있는 것으로 보고되었다 (Cheong 등, 1993). 한편, 체세포 핵이식의 경우, 휴면기인 G0기도 배반포 및 산자로 발생하였는데 (Wilmot 등, 1997), G0기는 G1기의 일정시기에 세포분열을 정지하고 휴면상태로 진입한 상태로, 생리 기능적 특성이 G1기와 유사한 점이 있다. Donor 세포의 G0기 유도는 혈청기아 (serum starvation) 방법 (Campbell 등, 1996)과 자연적으로 발육이 정지된 세포를 이용하는 방법이 있다 (Wakayama 등, 1998). 또한 G0기 동조효과는 떨어지나, 세포의 confluency배양법도 G0/G1기 동조에 효과적인 것으로 보고되었다 (Boquest 등, 1999). 그러나 아직까지 세포주기 등 핵-세포질의 상호작용과 관련된 핵의 초기화와 발육능에 관한 정보가 거의 없는 실정이다. 본 논문은 체세포를 이용한 핵이식에 있어서 세포의 핵과 세포질의 상호작용과 관련이 깊은 세포의 휴면처리가 소 태아섬유아세포 유래 핵이식란의 핵상변화와 체외발육에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 회수한 소 난소로부터 미성숙 난자를 흡인 채취하여 난자성숙용 배양액으로 수회 세척 후 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액 (Gibco-BRL, Grand Island, NY)에 10% FBS (Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH (Sigma, St. Louis, USA), 1 μ g/ml

17 β -estradiol (Sigma) 및 50 μ g/ml gentamycin (Gibco-BRL)이 함유된 배양액을 50 μ l의 drop으로 만들어 mineral oil로 피복하고, 각 drop 당 10개의 난포란을 넣어 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 20~22시간 배양하였다.

2. 태아세포의 분리, 배양 및 보존

임신 3~4개월령의 암소에서 응성 태아를 적출하여 무균적으로 태아의 피부조직을 회수한 다음, 잘게 썰어 0.05% trypsin-EDTA (Gibco-BRL)로 30분간 처리 후 회수된 상층액을 200 \times g로 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 태아세포는 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50 μ g/ml gentamycin이 함유된 DMEM/F12액 3 ml에 재부유시켜 25 ml 배양병 내에 넣어 5% CO₂ 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 세포는 4~6회 passage 배양한 후 회수하여 10% DMSO 및 10% FBS를 함유한 DMEM/F12 용액 중에 1 \times 10⁵cells/ml 농도로 부유시켜 3 ml 냉동 vial에 1 ml씩 넣어 -70°C 냉동고에서 동결한 후 LN₂용기 내에 보관하였다.

3. 태아세포의 휴면처리

동결 용해한 태아세포를 7 ml의 세포배양액으로 200 \times g의 조건에서 5분간 원심분리하여 세척한 다음 재부유시켜 4-well dish에 0.5 ml씩 분주하여 5% CO₂ 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 세포의 휴면 처리는 세포를 세포배양액 (위 2항 참조) 중에서 2~3일간 배양한 후, 0.5% FBS를 함유한 DMEM/F12액으로 교체하여 5일간 추가 배양하는 혈청기아 (SS)방법 (Campbell 등, 1996)과, 세포를 2주 이상 장기 배양하여 높은 세포밀도를 만들어 주는 confluency법을 이용하였다. 한편, 대조구로는 배양 후 2~3일경의 왕성하게 분열 중에 있는 세포 (50~70% confluency)를 핵이식에 사용하였다.

4. 미수정란의 탈핵

난포란을 vortex mixer로 3분간 처리하여 난구 세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 수핵란용으로 사용하였다. 미수정란의 탈핵은 미세조작기를 이용하여 제

1극체와 주변의 세포질을 소량 흡인하여 제2성숙 분열 증기 염색체를 제거하는 방법으로 실시하였다. 탈핵 조작된 세포질은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 Hoechst 33342 (Sigma)를 함유한 TCMBSA액에 15분간 염색하여 형광현미경으로 탈핵 여부를 검사하였다.

5. 핵이식

핵이식 조작은 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B (CB)가 함유된 수정 PBS (mPBS)액 내에서 Cheong 등 (2000)의 방법에 준하여 실시하였다. Donor용 체세포는 0.05% trypsin-EDTA 용액으로 3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리한 후, 200 $\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하며 사용하였다. Donor세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위관강 내로 주입하였다.

6. 핵이식배의 전기융합 및 활성화

핵이식란의 전기융합은 BTX200 세포융합장치 (BTX, San Diego, USA) 및 0.5 mm 폭의 wire chamber를 사용하여 실시하였다. 핵이식란은 0.1 mM MgSO_4 , 0.05 mM CaCl_2 , 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양전극사이로 옮겨, pipette을 이용하여 분할구와 세포질의 접촉면이 양전극에 수평이 되도록 유도한 후, 2.0 kV/cm의 직류 (DC)전류를 20 μsec 간 2회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3 mg/ml BSA액 내에서 수회 세척 후 배지 내에서 세포의 융합여부를 관찰하였다. 핵이식란은 융합 1시간 후에 10 $\mu\text{M/ml}$ 의 Ca^{2+} -ionophore (A23187; Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 cycloheximide (CHXM; Sigma)를 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 6시간 배양하여 세포질의 활성화를 유기하고 일부는 CHXM처리 2.5시간 경에 whole-mount에 공시하였다.

7. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA, Na-pyruvate, gentamycin을 함유한 TCM-199의 50 μl

drop으로 옮겨 5% CO_2 및 39°C의 조건하에서 40~42시간 배양하며, 극체방출 유무 및 분할율을 검사하였다. 핵이식란의 분할 후 10% FBS를 함유한 CR1aa내에서 BRL 세포의 단층세포와 5~7일간 공동 배양하여 배반포 형성을 검사하였으며, 배양액은 매 2일마다 신선배양액으로 교체하였다.

8. Whole-mount 표본의 제작

핵이식란은 CHXM처리 2.5시간에 고정표본을 제작하였다. 핵이식란을 vaseline과 paraffin 혼합물 (9:1)로 사각에 소적을 배치한 slide glass 위에 소량의 배양액과 함께 옮겨 놓고 cover glass로 가볍게 압착하였다. 그 후 acetic acid와 ethanol을 1:3로 혼합한 고정액으로 24~72시간 고정한 후 aceto-orcein으로 5분간 염색하고 25% aceto-glycerol로 세척하여 위상차 현미경 ($\times 400$)으로 핵의 형태를 관찰하였다.

9. 통계 처리

실험의 결과는 Chi-square test에 의하여 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 세포의 휴면처리가 극체방출에 미치는 영향

태아세포를 혈청기아처리 또는 confluency 상태를 만든 후 핵이식하여 복제란의 극체 방출 여부를 검토한 결과, 혈청기아처리구 (SS)와 confluency 구에서 각각 24.5% (13/53)와 20.3% (12/59)로, 무처리구 (NQ; 36.0%)에 비해 다소 낮게 나타났다 (Table 1).

2. 휴면처리에 따른 복제란의 염색질 구조

핵이식란의 활성화 유기 후 2.5시간에 whole-mount를 실시하여 염색질의 구조를 관찰한 결과, 혈청기아처리구와 confluency구에서 염색체 응축 후 1개의 염색질 구조를 갖는 핵이식란은 각각 50.9% (27/53)와 49.2% (29/59)인 반면, 무처리구에서는 40.0% (20/50)로 다소 낮은 경향을 보였으나 유의차는 인정되지 않았다. 2개 이상의 염색질

Table 1. Effect of quiescent treatment on morphologies of nuclear transfer embryos*

Treatment	No. of embryos fused	Morphology of embryos(%)	
		NPB	PB
SS	53	40(75.5)	13(24.5)
Confluenc	59	47(79.7)	12(20.3)
NQ	50	32(64.0)	18(36.0)

*SS: Serum starvation; NQ: Non-quiescent; PB: Polar body; NPB: Non-PB

괴를 갖는 핵이식란은 혈청기아차리구에서 26.4%

(14/53)와 confluency구에서 23.8% (14/59)로 무처리 구 (40.0%)에 비해 다소 낮게 나타났다 (Table 2).

3. 극체방출 유무에 따른 핵이식란의 염색질 구조

염색체 응축 후 1개의 염색질괴를 갖는 핵이식란은 극체 미방출구에서 60.5% (72/119)로, 극체 방출구 (4.7%, 2/43)에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($P<0.01$). 2개 및 3개 이상의 염색질괴를 갖는 핵이식란은 극체 미방출구에서 각각 3.4% (4/119)와 5.0% (6/119)로 극체방출 핵이식란의 34.9% (15/43)와 60.5% (26/43)에 비해 낮았다 (Table 3).

Table 2. Effect of quiescent treatment on chromatin structures of nuclear transfer embryos*

Treatment	No. of embryos fused	Chromatin clump(%)			1PN (%)
		1	2	≥ 3	
SS	53	27(50.9)	6(11.3)	8(15.1)	12(22.6)
Confluence	59	29(49.2)	5(8.5)	9(15.3)	16(27.1)
NQ	50	20(40.0)	6(12.0)	14(28.0)	10(20.0)

*SS: Serum starvation; NQ: Non-quiescent; PN: Pronucleus

Table 3. Effect of remodeling type on chromatin structure of nuclear transfer embryos*

Treatment	No. of embryos fused	Chromatin clump(%)			1PN (%)
		1	2	≥ 3	
NPB	119	72(60.5) ^a	4(3.4) ^a	6(5.0) ^a	37(31.1) ^a
PB	43	2(4.7) ^b	15(34.9) ^b	26(60.5) ^b	0 ^b

*PB: Polar body; NPB: Non-PB; PN: Pronucleus

^{a,b}Values with different superscripts in the same column differ($P<0.01$).

Table 4. Effect of quiescent treatment on *in vitro* development of nuclear transfer embryos*

Treatment	No. of embryos fused	No.(%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
SS	69	54(78.3) ^a	16(23.2)	15(21.7)
Confluence	67	55(82.1) ^a	15(22.4)	14(20.9)
NQ	64	39(60.9) ^b	9(14.1)	9(14.1)

*SS: Serum starvation; NQ: Non-quiescent

^{a,b}Values with different superscripts differ($P<0.05$).

4. 휴면처리에 따른 핵이식란의 발육능

2세포기 분할율은 혈청기아처리구가 78.3% (54/69)와 confluency구가 82.1% (55/67)로, 무처리구 (60.9%, 39/64)에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 배반포기 발육율은 혈청기아처리구와 confluency구에서 각각 21.7% (15/69)와 20.9% (14/67)개로, 무처리구 (14.1%, 9/64)에 비하여 높았으나 유의적인 차이는 없었다 (Table 4).

IV. 고찰

생쥐 수정란 세포의 핵이식의 경우 핵의 세포주 기단계가 G1기에 동조되지 않은 경우는 핵이식란의 활성화 후 극체상의 방출이 확인되었는데 (Cheong 등, 1993), 소 수정란의 핵이식에서도 생쥐에서와 같은 극체상 방출이 확인되었다 (Cheong 등, 1999). 생쥐 핵이식란의 극체상 방출은 donor 세포의 세포주기단계가 DNA 합성기인 S기나 G2기 등에 속하여 나타나는데, 즉, DNA 복제 중 또는 복제가 완료된 핵을 이식함으로써 인해 이들 핵이 염색체응축 (PCC) 후 분열되어 그 한편이 극체상으로 방출되었다 (Cheong 등, 1993). 본 연구의 결과는 핵이식란의 극체상 방출이 수정란의 핵이식뿐 아니라 체세포 핵이식에서도 비교적 높은 비율로 나타날 수 있음을 보여 준다. 극체상의 방출이 생쥐 수정란의 핵이식에서와 같이 S기나 G2기에 속한 세포의 핵이식에 의해 방출된 것인지는 명확하지 않으나, 혈청기아처리구 (24.5%)와 confluency구 (20.3%)에서는 무처리구 (36.0%)에 비해 비교적 낮게 나타나, 휴면처리에 의해 세포의 세포주기가 G0나 G1기에 효과적으로 동조되었을 가능성을 보여준다.

토끼 (Collas 등, 1992a)와 생쥐 (Cheong 등, 1993)의 경우 G1기의 핵을 이식하였을 때 PCC 이후 하나의 염색질 덩어리를 형성하고 활성화 후 2배체의 염색체 구성을 가진 IPN의 전핵 구조를 보이고, 배반포까지의 발육율도 향상되었으나, S기의 핵을 이식한 경우에는 PCC 이후 비정상적인 염색체 구성을 보여 발육능이 현저하게 저하되었다.

본 연구에서도 체세포 핵이식 후 고정 표본을 제작하여 관찰한 결과, PCC 이후 하나의 염색질괴를 갖는 핵이식란의 발현율이 휴면처리구에 비해 무처리구에서 비교적 낮은 경향을 보였고, 2개 이상의 비정상적인 염색질 구조를 갖는 핵이식란의 발현율은 무처리구에서 높게 나타났다. 따라서 핵이식란의 다양한 염색질구조는 donor세포의 세포주기에 기인되는 것으로 사료된다. 그러나, 혈청기아처리 또는 confluency배양에 의해 세포의 대부분이 G0/G1기에 동조되는 것으로 알려져 있음에도 불구하고 (Boquest 등, 1999) 본 연구에서는 20%가 넘는 핵이식란이 극체상의 방출을 보였고, 2개 이상의 염색질괴를 가지는 것으로 나타나, G0/G1기의 세포라 할지라도 이식 후 세포질 환경에 따라 PCC 이후의 핵형이 영향을 받을 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 혈청기아처리 또는 confluency 방법에 따른 G0기 동조여부를 확인하지는 않았으나, 핵이식란의 배반포 발육율이 혈청기아처리에 의한 물리적인 G0기 유도방법뿐 아니라, 세포 confluency에 의한 생리적인 방법으로도 무처리구에 비해 높게 나타나는 경향을 보여, donor 세포의 휴면처리가 핵이식란의 비정상적인 핵형변화를 감소시켜 체외발육능을 향상시키는 것으로 사료된다.

V. 요약

본 연구는 세포의 휴면처리가 소 태아섬유아세포 유래 핵이식란의 핵형변화와 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다. 임신 3~4개월령 한우 음성 태아의 피부세포를 채취하여 계대배양 후 동결하였다가 핵이식 전에 혈청기아처리 또는 confluency 방법으로 휴면처리를 하여 미수정란의 탈핵세포질에 이식하였다. 전기융합과 활성화처리 후 7~9일간 체외배양하여 발육능을 검토하였으며, 일부는 whole-mount법으로 고정하여 염색질 구조를 관찰하였다. 복제란의 극체방출율은 혈청기아처리구와 confluency구에서 각각 24.5%와 20.3%로 무처리구 (36.0%)에 비해 낮은 경향을 보였다. 활성화 후 1개의 염색질괴를 갖는 복제란은 혈청기아처리구 (50.9%)와 confluency구 (49.2%)가 무처리구 (40.

0%)보다 높은 경향을 보였다. 극체방출에 따른 염색질의 구조는 극체 미방출구에서 정상적인 1개의 염색질괴를 갖는 핵이식란이 60.5%로, 극체 방출구 (4.7%)에 비하여 유의적으로 높았다 ($P<0.01$). 배반포기 발육율은 혈청기아처리구 (21.7%)와 confluence (20.9%)가 무처리구 (14.1%)에 비하여 비교적 높게 나타났다. 본 연구의 결과 혈청기아처리나 confluency 방법에 의한 donor 세포의 휴면처리는 태아섬유아세포 유래 핵이식란의 비정상적인 핵형변화를 감소시켜 체외발육능을 향상시키는 것으로 사료된다.

VI. 인용문헌

- Boquest, A.C., Day, B.N. and Prather, R.S. 1999. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.*, 60:1013-1019.
- Campbell, K.H.S., McWhir, J., Ritchie, W.A. and Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380: 64-66.
- Cheong, H.T., Kwon, D.J., Park, Y.S., Hwang, H.S., Park, C.K., Yang, B.K. and Kim, C.I. 2000. Developmental potentials of clone embryos derived from bovine fetal fibroblast cells. *Korean J. Anim. Reprod.*, 24:49-57.
- Cheong, H.T., Park, C.K., Yang, B.K. and Kim, C.I. 1999. Cytogenetic properties of bovine reconstituted embryos by cell cycle-controlled nuclear transfer. *Korean J. Anim. Reprod.*, 23:271-278.
- Cheong, H.T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.*, 48:958-963.
- Cheong, H.T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:138-145.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A. and Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280:1256-1258.
- Collas, P., Balise, J.J. and Robl, J.M. 1992a. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:492-500.
- Collas, P., Pinto-Correia, C., Ponce de Leon, F.A. and Robl, J.M. 1992b. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 46:510-511.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282: 2095-2098.
- Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scoot, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A. and Campbell, K.H.S. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278:2130-2133.
- Wakayama, T., Perry, A.C.F., Zuccotti, M., Johnson, K.R. and Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
- Wells, D.N., Misica, P.M. and Tervit, H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 60:996-1005.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.H.S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.

(접수일자: 2000. 5. 20. / 채택일자: 2000. 6. 15.)