

마우스 배반포 배의 Differential Staining에서 Propidium Iodide와 Bisbenzimidide의 노출이 미치는 영향

대구대학교 생명자원학부¹, 경북대학교병원 산부인과²
박기상^{1,2} · 박성백¹ · 이택후² · 전상식² · 송해범¹

Effects of Exposure of Propidium Iodide and Bisbenzimidide on Differential Staining of Mouse Blastocysts

Kee Sang Park^{1,2}, Sung Baek Park¹, Taek Hoo Lee², Sang Sik Chun², Hai Bum Song¹

¹Division of Life Resources, Daegu University, Gyungbuk, ²Department of OB/Gyn, Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea

Objective: These experiments were conducted to investigate the optimal expose length of propidium iodide (PI) and bisbenzimidide on differential staining of mouse blastocysts.

Materials and methods: A total 964 blastocysts (early~hatched) was exposed to PI (n=831) (group I: ≤10; II: 11~15; III: 16~20; IV: ≥21 sec) and bisbenzimidide (n=133) (group A: ≤1; B: 1~3; C: ≥4 hr) in several periods for differential staining. Statistical analysis was performed using *t*-test with SigmaPlot-2001. P-values < 0.05 were accepted as statistically significant.

Results: In case of PI exposure, differential staining rates were significantly higher ($p < 0.05$) in group I (89.8%) than in any others (group II: 77.6%; III: 29.6%; IV: 22.2%) and higher ($p < 0.05$) in group II than in group III and IV. In case of bisbenzimidide exposure, differential staining rates were not statistically differences in three groups (group A: 97.4%; B: 87.8%; C: 93.3%).

Conclusion: The differential staining rates of mouse blastocysts are not affected by the exposure length of bisbenzimidide. However, blastocysts were exposed to PI with period of shorter than 15 sec show best outcomes of differential staining rates.

Key Words: Mouse, Blastocyst, Propidium iodide, Bisbenzimidide, Differential staining

포유동물에서 체외에서 배의 발생 능력에 대한 지표로는 주로 배반포 형성율, 배반포기까지 발달 속도, 세포 수 및 내세포피 (ICM)의 비율 등이 주로 인용되고 있는데, 착상과 임신율에 직접적으로 영향을 주는 것으로는 내세포피인 것으로 알려져 있다.^{1,2}

배반포 배는 ICM과 영양배엽세포 (TE)로 이루어져 있는데, 이들 세포를 관찰하기 위해서 형광물질을 이용한 여러 가지 방법들이 사용되고 있다.³⁻⁹ 이들 염색 방법은 공통적으로 propidium iodide (PI)와 bisbenzimidide를 2중 형광 염색으로 TE와 ICM을 각각 특이적으로 반응하게 하여 UV에 반사되는데, PI

주관책임자: 송해범, 우) 712-714 경상북도 경산시 진량면 내리리 산 25번지, 대구대학교 생명자원학부
Tel: (053) 850-6723, Fax: (053) 850-6720, e-mail: goatsong@daegu.ac.kr
연락처: 박기상, 우) 700-721 대구광역시 중구 삼덕동 2가 50번지, 경북대학교병원 산부인과
Tel: (053) 420-5727, Fax: (053) 423-7905, e-mail: keespark@yahoo.com
이 논문은 2001년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

는 TE를 홍색으로, bisbenzimidazole은 ICM을 청색으로 보이게 한다. 그러나 연구자마다 사용하는 염색 방법이나 각각의 염색액에 노출시키는 시간이 다를 뿐만 아니라 이들 염색물질에 노출시키는 시간에 따른 염색 변화에 대한 결과에 대해서 자세하게 제시된 것이 없었고 이들의 연구 방법에 따른 방법으로 염색을 하였을 때, 저자 등은 differential staining에서 많은 실패와 시행착오를 경험하였고 이를 바탕으로 매우 안정적인 염색 방법을 강구하게 되었다.

본 실험은 마우스 2 세포기 배를 배양하여 형성된 배반포 배의 ICM과 TE를 각기 다르게 염색하기 위한 differential staining에서 PI와 bisbenzimidazole에 노출시키는 최적의 시간을 조사하기 위하여 실시하였다.

연구 대상 및 방법

1. 공시 동물

본 연구에 사용된 마우스는 국내에서 사육 중인 ICR 계통 마우스로, 암컷은 생후 4주령, 수컷은 10~15주령인 것을 사용하였다. 마우스는 온도와 명암이 조절되는 곳에서 실험에 사용될 때까지 사육하였으며, 명암의 주기는 10시간:14시간으로 조절하였고, 사료와 물은 무제한으로 급여하였다.

2. 배양액 및 염색 용액의 준비

1) 배양액

마우스 2 세포기 배의 난관 관류는 Ham's F-10 (F-10, 11550-043, Gibco, USA)을 사용하였다. 2 세포기 배의 배양에는 MEM (119660-025, Gibco, USA)을 이용하였다. 배양액은 0.0125 g/l의 Streptomycin sulfate (S-9137, Sigma, USA)와 0.01375 g/l의 Penicillin-G (P-3032, Sigma, USA)를 첨가한 다음 삼투압 측정기를 이용하여 삼투압을 280 mOsmol/kg으로 보정하고 나서, 0.2 µm 여과기 (Millex-GV, Millipore, USA)로 제균하면서 14 ml tube (2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4°C 냉장고 (3682, Forma, USA)에서 보관하였다. 2 세포기 배를 배양할 때에는 20% hFF를 첨가한 다음 37°C를 유지하고 있는 5% CO₂ 배양기에서 6시간 이상 평형시킨 다음 사용하였다.

2) 형광 염색 용액

배반포기에 도달한 배의 형광 염색은 염색액 1과

2에서 실시하였다.

(1) 염색액 1

Ham's F-10 (BSA free) + 1% Triton X-100 (T-9254, Sigma, USA) + 100 µg/ml propidium iodide (PI, P-4170, Sigma, USA)

(2) 염색액 2

EtOH (Absolute Ethanol, Duksan, Korea) + 25 µg/ml bisbenzimidazole (B-2883, Sigma, USA)

3. 난포액 (hFF, human follicular fluid)의 준비

hFF는 체외수정 시술을 하고 있는 환자 중에서 성숙난자를 갖고 있는 난포에서 회수한 난포액에 혈액이 거의 섞이지 않은 것을 5명 이상의 환자로부터 회수한 다음 회색하여 이용하였다. 회수한 hFF는 원심분리 (3,500 rpm)를 30분간 실시하여 상층액만을 회수한 후 0.2 µm 여과기로 제균하고 나서 56°C의 질탕기에서 35분간 불활성화시킨 다음 -20°C에 보관하다가 용해하여 사용하였다. 용해 후 2일이 경과한 것은 실험에서 제외하였다.

4. 난자의 준비

과배란을 유도하기 위하여 암 마우스에게 7.5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, G-4877, Sigma, USA)과 5 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, CG-10, Sigma, USA)을 48시간 간격으로 복강 주사하고 나서 수컷과 동숙시켰다. hCG 주사 후 48시간째에 경추탈골법으로 암 마우스를 희생시킨 다음 난관을 적출하여 실험현미경 (MZ 12.5, Leica, Switzerland)으로 보면서 2-well 배양접시 (3037, Falcon, USA)에서 난관을 관류하고 나서 정상적으로 보이는 2 세포기 배만을 회수하여 배양에 이용하였다.

5. 배반포 배의 형광 염색

배반포기 배는 Thouas 등⁹⁾의 differential staining법을 변형한 방법으로 ICM과 TE를 염색하여 관찰하였다.

배반포 배를 염색액 1에서 노출하고 나서 즉시 염색액 2로 옮긴 다음 4°C에서 실험 설계에 따라 각각 방치하여 염색을 유도하였다. 염색이 완료된 배반포 배는 glycerol (G-2025, Sigma, USA)에서 과다한 양의 염색액을 제거하고 나서 slide glass에 올려놓은

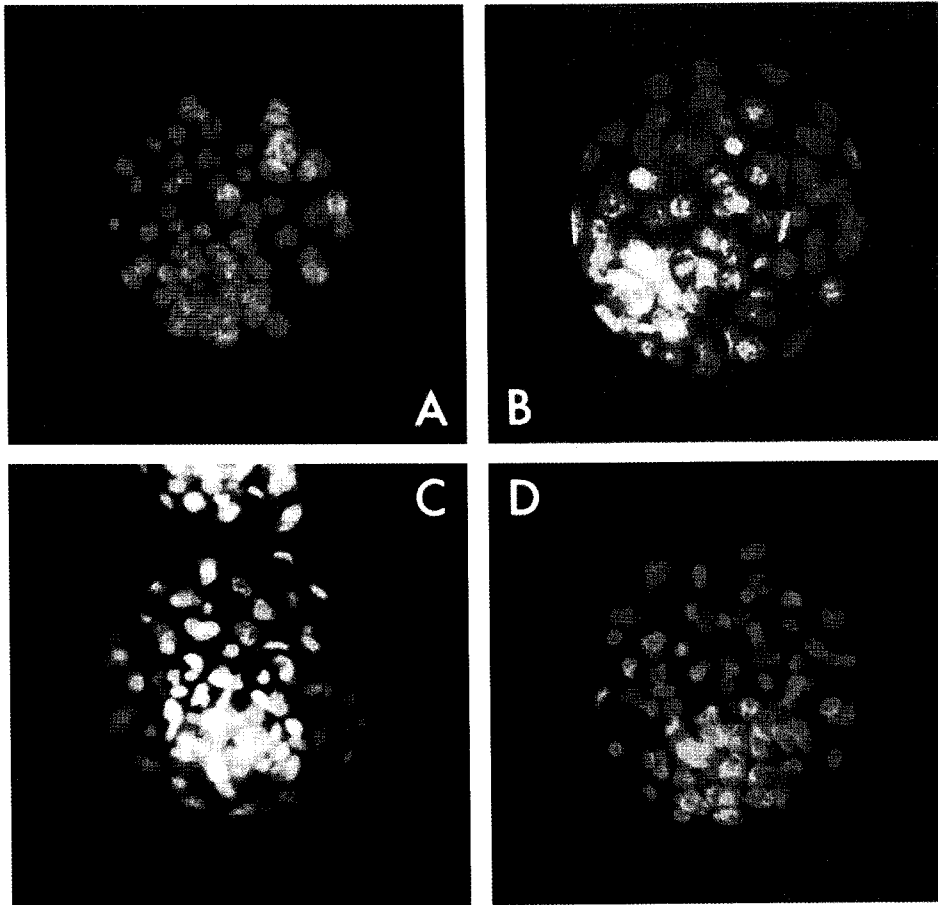


Figure 1. Differential staining of mouse blastocysts ($\times 400$): (A) propidium iodide (PI), (B) bisbenzimidide, (C) unspecific labelled and (D) differentially stained. Note that the intense pink color represents the chromatin in nuclei of lysed trophoblast (TE) cells that had been both red (PI) and blue (bisbenzimidide). ICM nuclei remain blue, because these cells were not permeabilized (D).

다음 cover glass를 덮었다. 형광현미경 (BX 50, Olympus, Japan)에 부착된 형광 여과기에 UV를 통과시켜 염색이 완료된 배반포기 배를 관찰하였다. 염색액 1에 포함된 PI는 적색 (Figure 1A)으로, 염색액 2에 포함된 bisbenzimidide는 청색 (Figure 1B)으로 발광한다. TE는 적색 (PI)과 청색 (bisbenzimidide)이 혼합되어 분홍색으로 나타내고 ICM은 여전히 청색으로 나타나서 각각의 색으로 TE와 ICM을 구분할 수 있었다 (Figure 1D). 비특이적으로 염색 (Figure 1C)이 유도되는 것은 염색이 실패한 것으로 하였다.

1) 실험 1

PI 노출 시간 (초): ≤ 10 (group I), 11~15 (group II), 16~20 (group III) 또는 ≥ 21 초 (group IV) 노출시켜,

PI에 대한 최적의 노출 시간을 산정하였다. 이때 bisbenzimidide에 대한 노출 시간은 2시간 이상으로 고정하였다.

2) 실험 2

Bisbenzimidide 노출 시간 (시간): ≤ 1 (group A, n=39), 1~3 (group B, n=49) 또는 ≥ 4 시간 (group C, n=45) 노출시켜 bisbenzimidide에 대한 최적의 노출 시간을 산정하였다. 이때 PI에 대한 노출 시간은 15초 이내로 고정하였다.

6. 관찰 및 분석

배반포기 배를 염색하여 TE/ICM이 특이적으로 PI/bisbenzimidide에 반응한 것만을 대상으로 하여 염

Table 1. Effects of exposure of propidium iodide on differential staining of mouse blastocysts in several periods

No. (%) of	Periods of exposure (sec)			
	Group I	Group II	Group III	Group IV
	≤10	11~15	16~20	≥21
Examination	73	100	24	5
Blastocysts used	225	401	169	36
Blastocysts differentially stained	202 (89.8)	311 (77.6)	50 (29.6)	8 (22.2)

p<0.001 (group I, II vs. III, IV), p<0.05 (group I vs. II)

Table 2. Effects of exposure of bisbenzimidazole on differential staining of mouse blastocysts in several periods

No. (%) of	Periods of exposure (hr)*		
	Group A	Group B	Group C
	≤1	1~3	≥4
Examination	4	4	3
Blastocysts used	39	49	45
Blastocysts differentially stained	38 (97.4)	43 (87.8)	50 (93.3)

* No significant differences among groups

Table 3. Inner cell mass (ICM), trophectoderm (TE) and total cell number of mouse blastocysts differentially stained after *in vitro* culture of 2-cell embryos

No. of blastocysts differentially stained	Cell number			%ICM of total cells	ICM : TE ratio
	Total	ICM	TE		
702	36127	6890	29237	19.07±41.4	4.24±8.3
	51.46±26.83	9.81±6.57	41.65±24.31	1.01~86.36	0.16~98
	5~137	1~39	3~126		

Values are mean±SD

색 성공률을 나타내었다. 처리군간 결과에 대한 유의성은 t-test를 실시하여 5% 유의 수준에서 검정하였다. 통계 처리는 SigmaPlot-2001 (v7.0)을 이용하였다.

결 과

마우스 배반포기 배 (n=964)에서 differential staining을 유도할 때 PI와 bisbenzimidazole에 대한 최적의 노출 시간을 산정하기 위하여 PI (n=831)는 ≤10 (group I, n=225), 11~15 (group II, n=401), 16~20 (group III, n=

169) 또는 ≥20초 (group IV, n=36) 노출시켰고, bisbenzimidazole (n=133)는 ≤1 (group A, n=39), 1~3 (group B, n=49) 또는 ≥4시간 (group C, n=45) 노출시켜 염색 성공률에 미치는 영향과 염색이 완료된 배에서 총 세포 수와 ICM과 TE 세포의 구성비율을 조사한 결과는 Table 1, 2 및 3에 각각 나타내었다.

PI에 노출하는 시간이 ≤10초에서는 89.8%, 11~15초에서는 77.6%, 16~20초에서는 29.6%, ≥21초에서는 22.2%의 배반포 배에서 differential staining이 성공하여, 노출 시간이 증가할수록 염색 성공률은 급격히 떨어지는데, 15초를 경과하면서 그 결과가 현저하게

저하되었고 10초 이내에서 염색 성공률이 가장 높았다 ($p < 0.001$: group I, II vs. III, IV; $p < 0.05$: group I vs. II).

Bisbenzimidazole에 노출하는 시간이 ≤ 1 시간에서는 97.4%, 1~3시간에서는 87.8%, ≥ 4 시간에서는 93.3%의 배반포에서 differential staining이 성공하여, 노출 시간에 따른 염색 성공률의 차이는 나타나지 않았다.

Differential staining이 된 702개의 배반포 배에서 평균 세포 수와 ICM과 TE 세포의 구성비율을 보았을 때, 평균 세포 수는 51.46 ± 26.83 (total: 36,127, range: 5~137), ICM 세포 수는 9.81 ± 6.57 (total: 6,890, range: 1~39), TE 세포 수는 41.65 ± 24.31 (total: 29,237, range: 3~126), 총 세포 수에 대한 ICM의 비율인 %ICM은 19.07 ± 41.4 (1.01~86.36), ICM에 대한 TE의 비율인 ICM:TE ratio는 4.24 ± 8.3 (0.16~98)을 각각 나타내었다.

고 찰

Differential staining에서, Thouas 등⁹은 마우스와 소 blastocyst의 약 20%에서 uneven comparison이나 non-specific staining이 나타나서 염색 성공률은 80% 정도이고, 마우스 배반포 배에서 총 세포 수는 75.3 ± 3 , %ICM (/total cell number)은 27.8%, ICM:TE ratio는 1:2.63이라고 하였다. Mishra와 Seshagiri⁷는 hamster 8 세포기 배를 체외에서 배양하여 배반포 배를 유도하였을 때 %ICM은 26.6~28.4%, ICM:TE ratio는 1:2.6~2.7이었고, 체내 배양하여 나타난 hatched blastocyst에서 %ICM은 36.4%, ICM:TE ratio는 1:1.9로 나타난다고 하였다. 마우스 배반포의 염색에서 Fleming³은 Rh-Con A를 이용한 염색으로 ICM 세포 수는 39.3 ± 7.6 , TE 세포 수는 60.7 ± 7.6 이라고 하였고, Handyside와 Hunter⁴는 differential labelling을 이용한 염색으로 총 세포 수는 39.58 ± 9.42 , ICM은 14.96 ± 3.75 , TE는 24.62 ± 6.59 라고 하였다. Iwasaki 등⁶은 소 배반포 배를 differential staining을 이용한 염색으로 총 세포 수는 44~113, ICM은 8~23 ± 7 , %ICM은 12.8~27.2 ± 7.2 라고 하였다. Hardy 등⁵은 인간 배반포 배아에서 5~7일 사이에 세포 수는 58.3~125.5 ± 19 , ICM 세포 수는 20.4~45.6 ± 10.2 라고 하여 연구자, 염색 방법, 연구 대상, 또는 염색 시기에 따라 많은 차이를 나타내었다. 본 실험에서 나타난 결과

에서는 마우스 배반포 배를 PI와 bisbenzimidazole에 적정 시간 노출하면 거의 대부분 (90% 이상)에서 성공적으로 differential staining을 할 수 있었는데, 특히 PI의 노출 시간이 염색 성공률과 직결되는 것을 알 수 있었으나, 이와 같은 내용이 언급된 보고 내용은 찾아볼 수 없어서, 저자 등은 초기 differential staining에서 매우 많은 시행착오를 경험하였다. 또한 differential staining이 된 702개의 배반포 배에서 평균 세포 수는 51.46 ± 26.83 , %ICM은 19.07 ± 41.4 , ICM:TE ratio는 4.24 ± 8.3 으로 나타나서 위에 언급된 연구자들과는 다소 차이가 나타났는데, Thouas 등⁹은 F1 hybrid에서 체외 배양된 배반포 배 중에서 팽창이 이루어진 것만을 대상으로 한 반면, 본 연구에서는 ICR 마우스에서 배반포가 형성한 모든 배를 대상으로 실험을 실시하였기 때문이기도 할 것이나 실험 조건에 따른 차이도 배제할 수 없을 것이다.

마우스 배반포 배에서 differential staining을 성공적으로 수행하기 위해서는 배반포 배를 PI에 15초 이내 노출 (10초 이내로 노출하면 더 효과적)시키는 것이 중요한데, 너무 많은 배를 한꺼번에 염색시키면 시간이 많이 소요되므로 염색하는 배의 수를 3~4개 이내로 제한하면 많은 도움이 될 것이다. 또한 bisbenzimidazole에 노출시키는 시간에 따라서는 염색 성공률에서 차이가 없었으나, 노출 시간에 따른 염색 선명도는 약간의 차이가 있었다. Bisbenzimidazole에 약 30분간 노출하였을 때에는 ICM이 불명확하거나 어렵게 보이는 것이 많았고, 1시간 노출하였을 때에도 ICM이 불명확하게 염색되는 것이 다소 있었다. 1.5시간 이상 노출하였을 때에는 전체적으로 ICM과 TE가 매우 명확하게 염색되어 현미경 상에서 쉽게 구별할 수 있었다. 따라서 bisbenzimidazole에 노출시키는 시간은 연구자나 연구 상황에 따라 결정할 수 있겠으나, 1.5시간 이상 노출시켜 염색하면 관찰이 용이할 것이다. Bisbenzimidazole에서 6시간 이상 overnight시킨 것에서는 PI에 염색된 세포 주위에 청색 띠가 나타나는 과염색이 관찰되기도 하여 ICM과 TE의 판별이 불편할 수 있으나 크게 문제가 되지는 않을 것으로 사료된다.

결론적으로, 마우스 배반포 배를 differential staining할 때 bisbenzimidazole의 노출 시간에 따른 염색 성공률의 차이는 없었다. 그러나 PI에 노출시키는 시

간은 15초 이내로 최소화하는 것이 염색 성공률을 높일 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Beddington R. Analysis of tissues fate and prospective potency in the egg cylinder. In Rossant J and Pederson RA (eds): Experimental approaches to mammalian embryonic development. Cambridge University Press, 1986; 121-47.
2. Lawson KA, Meneses JJ, Pederson RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 1991; 113: 891-911.
3. Fleming TP. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 1987; 119: 520-31.
4. Handyside AH, Hunter S. A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts *in situ* using polynucleotide-specific fluorochromes. *J Exp Zool* 1984; 231: 429-34.
5. Hardy K, Handyside AH, Winston RM. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation *in vitro*. *Development* 1989; 107: 597-604.
6. Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fert* 1990; 90: 279-84.
7. Mishra A, Seshagiri PB. Successful development *in vitro* of hamster 8-cell embryos to 'zona-escape' and attached blastocysts: assessment of quality and trophoblast outgrowth. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 413-20.
8. Papaioannou VE, Ebert KM. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* 1988; 102: 793-803.
9. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified techniques for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod BioMed Online Webpap* 2001; 3: 25-9.