

돼지 난포란의 단위발생에서 Cytochalasin B의 영향

김현종[†] · 손동수 · 최선호 · 조상래 · 최창용 · 김영근 · 한만희 · 류일선 · 김인철 · 김일화¹ · 임경순²
농촌진흥청 축산연구소, ¹충북대학교 수의학과, ²서울대학교 동물자원과학과

Effects of Cytochalasin B on Parthenogenetic Development of Porcine Follicular Oocytes

Hyun-Jong Kim[†], Dong-Soo Son, Sun-Ho Choi, Sang-Rae Cho, Chang-Yong Choe, Young-Gun Kim, Man-Hye Han, Il-Sun Ryu, In-Cheul Kim, Il-Hwa Kim¹ and Kyung-Soon Im²

National Livestock Research Institute, RDA, Namwon, 590-832, Korea

¹Department of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 361-763 Korea

²Department of Animal Biotechnology, Seoul National University, 151-921 Korea

ABSTRACT : The effects of cytochalasin B was studied for the cleavage and development of *in vitro* matured porcine follicular oocytes. The follicular oocytes were collected from slaughtered pig ovaries and matured for 65 hours. The matured oocytes were activated by 7% ethanol(v/v) in DPBS and the activated oocytes were subjected to cytochalasin B concentrations of 2.5, 5.0 and 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3, 5 and 7 hours, and then the treated oocytes were cultured in NCSU23 with 0.4% BSA for 7 days. The cleavage rates were not different significantly in each treatment. However, the oocytes treated with 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 5 hours yielded a significantly higher morula rate(19.7%) than oocytes treated with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3 and 5 hours(9.4%). The sum rate of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration(10.5%) by hour was also significantly lower than those of 5.0(18.0%) and 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration(14.6%). The blastocyst rate in oocytes treated with 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3(9.4%) and 5 hours(9.0%) was significantly higher than the rate in oocytes treated with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3 hours(0%). The sum rate of 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration also significantly higher than those of 2.5 and 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. The results demonstrated that the treatment of oocytes with cytochalasin B of 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3~5 hours was the optimal concentration and duration for parthenogenetic activation and blastocyst formation of *in vitro* matured porcine oocytes.

Key words : Parthenogenetic activation, Cytochalasin B, Porcine, Follicular oocyte, 7% ethanol.

요약 : 도축된 돼지의 난소에서 난포란을 채취하여 체외 성숙시킨 후 인위적으로 활성화시켜 이배체 배발달을 유기하기 위해 cytochalasin B를 2.5, 5.0, 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 3, 5, 7시간 처리한 후 NCSU23 배양액으로 7일간 배양하여 배발달율에 미치는 영향을 검사하였다. 체외 성숙된 돼지 난모세포를 활성화 처리하여 2일째 분할율을 관찰한 결과 각 처리의 분할율은 39.0~48.9%로 나타났으며, 처리별로 유의차가 없었다. 7일간 배양하여 상실배기 이상으로 발달한 난자들의 처리별 발달율 차이를 관찰한 결과는 cytochalasin B를 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 3시간 처리구(19.7%)에서 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 3, 5시간 처리한 구(9.4%)의 배발달율에 비해 유의적으로 높은 결과를 얻었다. 시간별과 농도별로 분석한 결과 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리구가 5.0, 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리구들보다 유의적으로 낮은 배발달율을 보였다. 배반포기까지 발달한 난자들의 처리별 발달율 차이를 관찰한 결과는 cytochalasin B를 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 3시간과 5시간 처리구들의 배반포기 발달율은 9.4%와 9.0%로 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 3시간 처리구의 배발달율인 0%보다 유의적으로 높은 배발달율을 보였다. 시간별과 농도별로 분석한 결과 농도에 따라 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리구가 2.5와 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리구들보다 유의적으로 높은 배반포기 배발달율을 보였으며, 3, 5, 7시간 처리에 따른 유의적인 차이는 없었다. 이상의 결과로 돼지 난모세포를 65시간 체외 성숙 후 활성화 처리할 때 cytochalasin B 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 3~5시간 처리하는 것이 가장 높은 배반포 발달율을 얻을 수 있었으며, 처리 농도가 배발달에 유의적인 영향을 미치는 것을 확인하였다.

서론

최근, 돼지 난모세포를 이용한 체외수정란 및 복제수정란

생산과 복제기법을 이용한 형질전환 수정란 생산 연구가 많은 연구실에서 진행되고 있다. 복제수정란이나 복제기법을 이용한 형질전환 수정란 생산에는 배발달을 유기하기 위하여 필수적으로 인위적인 난자의 활성화 처리가 필요하며, 또한 배아의 성공적인 배양기술의 확보가 요구된다. 단위발생 혹은 단성생식이라고도 표현하는 수정이라는 과정이 없이 생명으로 발달하는 과정은 수정에 따른 옹성의 추가적 요인

[†] 교신저자: 전북 남원시 운봉읍 용산리 산 4-1, 농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장. (우) 590-832, (전) 063-620-3521, (팩) 063-620-3594, E-mail: hyunjong@rda.go.kr

없이 진행되므로 배발달에 미치는 효과를 검토하는 실험 처리에서 결과 해석이 단순해질 수 있다. 이러한 장점과 필요성에 따라 체외수정 연구만큼이나 다양하게 단위발생에 대한 검토가 이루어지고 있다(Cibelli *et al.*, 2002; Probst & Rath, 2003; Kono *et al.*, 2004; Toyokawa *et al.*, 2005). 본 실험에서는 돼지 난포란을 체외 성숙·활성화시켜 이배체 형성을 유도하는 cytochalasin B를 2.5, 5.0, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 3, 5, 7시간 동안 처리하여 NCSU23에서 7일간 배양하여 분할율과 배발달율에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 준비 및 체외 성숙

도축되는 암퇘지에서 회수한 난소를 penicillin G(100IU/mL)와 streptomycin(100 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 식염수에 담근 상태로 보온병의 온도를 30~33 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하여 실험실로 옮겼다. 실험실에서 다시 난소를 세척한 후 물기를 제거하고 18G 주사침이 꽂힌 10mL 주사기로 외관상 2~6mm 직경인 난포들만 골라서 난포액을 흡입하여 페트리 접시에 옮기고 난구세포-난모세포 복합체를 선별하여 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하였다. 성숙배양액으로 세척한 후 약 200개의 난구-난모세포 복합체들을 1mL의 성숙배양액에서 배양하였다. 난포란은 5% CO_2 , 95% 공기, 38.5 $^{\circ}\text{C}$, 높은 습도 조건에서 65시간 배양하였다(김 등, 2005). 성숙배양액은 TCM199에 25mM HEPES buffer, 10% 소 태아 혈청(Gibco, USA), 0.5 $\mu\text{g/mL}$ FSH (Sigma, USA), 100IU/mL penicillin G, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin sulfate를 첨가하여 사용하였다.

2. 난포란의 단위발생

상기 방법으로 성숙배양한 난모세포-난구세포 복합체를 hyaluronidase(Sigma, USA) 300IU가 첨가된 PBS에서 난구세포를 제거한 난자를 신선한 PBS로 세척하고 7% ethanol(v/v)이 첨가된 PBS에서 7분간 활성화시켰다. 활성화된 난모세포를 2.5, 5.0, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ cytochalasin B가 든 TCM199+10% FCS에서 0, 3, 5, 7시간 노출 후, NCSU23+0.4% BSA 소적으로 옮겨 2일째에 분할율을 관찰하고, 7일간 배양하여 상실배기와 배반포기까지의 배발달율을 관찰하였다.

3. 통계분석

분할율, 상실배기 이상, 배반포기까지 발달율의 차이를 SAS program의 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. Cytochalasin B의 농도와 처리 시간이 활성화된 돼지 난모세포의 분할율에 미치는 영향

체외 성숙된 돼지 난모세포를 활성화 처리하여 2일째 분할율을 관찰한 결과는 Table 1과 같다. cytochalasin B를 2.5, 5.0, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 3, 5, 7시간 처리한 결과 각 처리의 분할율은 39.0~48.9% 범위 내에서 일어났으며, 처리별로 유의차가 없었다. 시간별과 농도별로 분석한 결과에서는 농도에 따라서 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약간 분할율이 떨어졌으나 유의차는 없었고, 처리 시간에 따른 분할율도 유의차가 없었다.

2. Cytochalasin B의 농도와 처리 시간이 활성화된 돼지 난모세포의 발달율에 미치는 영향

돼지 난모세포의 활성화 처리 후 NCSU23 배양액에서 7일간 배양하여 상실배기 이상으로 발달한 난자들의 처리별 발달율 차이를 관찰한 결과는 Table 2와 같다. Cytochalasin B를 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 3시간 처리한 시험구의 발달율 19.7%는 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 3, 5시간 처리한 구의 발달율 9.4%에 비해 유의적으로 높은 배발달율을 보였다. 시간별, 농도별로 묶어서 분석한 결과 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 시험구들이 5.0, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 시험구들보다 유의적으로 낮은 상실배기 배발달율을 보였다. 3, 5, 7시간 처리에 따른 유의한 차이는 없었다. 한편 배반포기까지 발달한 난자들의 처리별 발달율 차이를 관찰한 결과는 Table 3과 같다. Cytochalasin B를 5.0 $\mu\text{g/mL}$

Table 1. Effects of treatment duration and concentration of cytochalasin B on cleavage of porcine *in vitro* matured and activated oocytes

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Duration(hours)			Sum
	3	5	7	
2.5	26/65	26/65	28/65	80/195
	(39.0 \pm 6.9) ^a	(39.0 \pm 6.9) ^a	(41.7 \pm 9.6) ^a	(40.0 \pm 3.6) ¹
5.0	32/65	31/65	28/65	91/195
	(48.9 \pm 2.5) ^a	(47.1 \pm 4.2) ^a	(41.7 \pm 9.6) ^a	(46.0 \pm 3.1) ¹
7.5	26/65	30/65	32/65	88/195
	(41.2 \pm 8.8) ^a	(46.2 \pm 0.2) ^a	(48.9 \pm 2.5) ^a	(45.4 \pm 2.8) ¹
Sum	84/195	87/195	88/195	259/585
	(43.1 \pm 3.5) ^x	(44.1 \pm 2.6) ^x	(44.1 \pm 3.9) ^x	(43.8 \pm 1.8)

* Mean \pm S. E.

* The same superscripts in same column and row mean not significantly different.

Table 2. Effects of treatment duration and concentration of cytochalasin B on morula stage development of porcine *in vitro* matured and activated oocytes

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Duration(hours)			Sum
	3	5	7	
2.5	6/65 (9.4 \pm 1.3) ^a	6/65 (9.4 \pm 1.3) ^a	8/65 (12.5 \pm 1.7) ^{ab}	20/195 (10.5 \pm 0.9) ^l
5.0	13/65 (19.7 \pm 1.9) ^b	12/65 (18.0 \pm 3.7) ^{ab}	11/65 (16.2 \pm 5.5) ^{ab}	36/195 (18.0 \pm 1.9) ^m
7.5	10/65 (15.7 \pm 2.2) ^{ab}	8/65 (12.5 \pm 1.7) ^{ab}	10/65 (15.7 \pm 2.2) ^{ab}	28/195 (14.6 \pm 1.1) ^m
Sum	29/195 (14.9 \pm 2.1) ^x	26/195 (13.3 \pm 1.9) ^x	29/195 (14.8 \pm 1.7) ^x	84/585 (14.4 \pm 1.1)

* Mean \pm S. E.^{a,b} in the each cell means significant different ($P < 0.05$).^{l,m} in the same column means significant different ($P < 0.05$).^x in the same row means not significant different.**Table 3. Effects of treatment duration and concentration of cytochalasin B on blastocyst stage development of porcine *in vitro* matured and activated oocytes**

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Duration(hours)			Sum
	3	5	7	
2.5	0/65 (0.0 \pm 0.0) ^a	1/65 (1.4 \pm 1.4) ^{ab}	2/65 (3.6 \pm 3.6) ^{ab}	3/195 (1.6 \pm 1.2) ^l
5.0	6/65 (9.4 \pm 1.3) ^b	6/65 (9.0 \pm 1.8) ^b	3/65 (4.1 \pm 4.1) ^{ab}	15/195 (7.5 \pm 1.6) ^m
7.5	1/65 (1.8 \pm 1.8) ^{ab}	3/65 (4.5 \pm 0.9) ^{ab}	2/65 (3.6 \pm 3.6) ^{ab}	6/195 (3.3 \pm 1.2) ^l
Sum	7/195 (3.7 \pm 1.9) ^x	10/195 (4.9 \pm 1.5) ^x	7/195 (3.7 \pm 1.7) ^x	24/585 (4.1 \pm 0.9)

* Mean \pm S. E.^{a,b} in the each cell means significant different ($P < 0.05$).^{l,m} in the same column means significant different ($P < 0.05$).^x in the same row means not significant different.

mL 농도로 3시간과 5시간 처리한 시험구의 배반포기 발달율은 각각 9.4%와 9.0%로 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 3시간 처리한 시험구의 배반포기 발달율 0%보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다. 시간별, 농도별로 묶어서 분석한 결과 역시 농도에 따라 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 시험구가 2.5와 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 구들보다 유의적으로 높은 배반포기 발달율을 보였으며, 3, 5, 7시간 처리에 따른 유의적인 차이는 없었다.

고찰

본 실험에서 돼지 난포란을 65시간 체외 성숙시킨 후 PBS에 7% ethanol(v/v)를 섞은 활성화 처리액으로 난자의 활성화를 유기하고 cytochalasin B로 극체의 방출을 저해하여 이배체 단위발생란으로 발생하게 할 때, 분할율과 배발달율에 최적인 cytochalasin B의 처리 농도와 처리 시간을 알아보고, 처리 농도와 처리 시간간의 상호작용이 있는지를 알아보고 하였다. 그 결과 분할율에서는 처리 농도와 처리 시간의 유의적인 차이가 없었으며, 배발달율에서는 농도에 의한 효과에 따라 상실배 이상 발달율은 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 와 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 가 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 보다 유의하게 높았으며, 배반포기 발달율은 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 처리가 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 와 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 처리보다 유의하게 높은 배반포기 발달율을 보였다. 특히 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 3시간 처리했을 때 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 3시간 및 5시간 처리한 결과보다 유의하게 높은 상실배 이상의 배발달율을 얻을 수 있었으며, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 3시간과 5시간 처리했을 때 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 3시간 처리한 결과보다 유의하게 높은 배반포기 발달율을 보였다.

난자의 활성화 처리 후 배발달이 잘 유기되는 체외 성숙시간으로 65시간이 적합하여 체외 성숙 65시간제에 활성화 처리를 하였으며, 이는 난모세포의 세포질 노화에 따른 자발적 감수분열 유지 활성의 저하 때문인 것으로 사료된다(김 등, 2005). Balakier와 Tarkowski(1976)는 생쥐 난자를 활성화 처리 후 microfilament polymerization inhibitor인 cytochalasin B로 활성화된 난모세포의 제 2극체의 방출을 억제하고, 일정 시간 후 이를 제거하면 두 개의 전핵으로 발달한다고 보고하였다. Presicce와 Yang(1994)은 소의 난자에서 cytochalasin B는 분할에는 영향이 없었으나, 활성화된 난모세포의 배발달율을 유의적으로 증진시키며, 이는 활성화된 난자를 이배체로 만들어주는 역할을 하기 때문일 것으로 추정하였다. 이러한 배발달율을 증진시키는 결과는 소(Fukui *et al.*, 1992), 토끼(Collas & Robl, 1990), 양(Smith & Wilmut, 1989), 돼지(Cha *et al.*, 1997; Jeong *et al.*, 2005)에서 관찰되었다. 임과 김(1995)은 소의 체외 성숙된 난모세포를 활성화시켜 cytochalasin D로 이배체를 만들어 단위발생을 유기하였을 때, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 0, 5, 10, 15시간 처리하여 유의적인 차이는 없었으나 5시간 처리가 약간 높은 배발달율을 보였으며, 0, 2.5, 5.0, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 7시간 처리하였을 때 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리구가 0 $\mu\text{g/mL}$ 처리구보다 유의적으로 높은 배발달율을 보였다고 보고하였다. 본 실험에서는 cytochalasin B를 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 처리구가 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 보다 유의적으로 높은 배발달율을

보인 결과와는 차이가 있는데, cytochalasin D가 B보다 micro-filament에 작용하는 특이성이 더 높아서 나타나는 결과로 보인다(Siracusa *et al.*, 1980). 이는 Fukui 등(1992)과 Nagai(1992)의 보고에서 소의 난모세포를 활성화 처리 후 cytochalasin B로 최적 배발달 촉진 농도는 각각 체외 성숙 30시간 후 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 5시간과 6~10시간 동안 처리였다는 보고들과 유사한 결과이다. 본 실험에서 얻은 결론은 돼지 난모세포를 65시간 체외 성숙한 후 활성화 처리할 때 cytochalasin B 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 3~5시간 처리하는 것이 가장 높은 배반포 발달을 얻을 수 있었으며, 처리 농도가 배발달에 유의적인 영향을 미치는 것을 확인하였다.

인용문헌

- Balakier H, Tarkowski AK (1976) Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat shock and cytochalasin B. *J Embryol Exp Morph* 35:25-39.
- Cha SK, Kim NH, Lee SM, Baik CS, Lee HT, Chung KS (1997) Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and *in vitro* development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. *Reprod Fertil Dev* 9:441-446.
- Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, Walker S, Gutin PH, Vilner L, Tabar V, Dominko T, Kane J, Wettstein PJ, Lanza RP, Studer L, Vrana KE, West MD (2002) Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 295:819.
- Collas P, Robl JM (1990) Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryos. *Bio Reprod* 3:877-884.
- Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N, Iwazumi Y, Ohasaki K (1992) Parthenogenetic development of bovine oocytes treated ethanol and cytochalasin B after *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev* 28:405-409.
- Jeong YJ, Cui XS, Kim BK, Kim IH, Kim T, Chung YB, Kim NH (2005) Haploidy influences Bak and Bcl-xL mRNA expression and increases incidence of apoptosis in porcine embryos. *Zygote* 13:17-21.
- Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo JS, Ogawa H (2004) Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* 428:860-864.
- Nagai T (1992) Development of bovine *in vitro* matured follicular oocytes activated with ethanol. *Theriogenology* 37:869-875.
- Presicce GA, Yang X (1994) Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol Reprod Dev* 40:1027-1036.
- Probst S, Rath D (2003) Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. *Theriogenology* 59:961-973.
- Siracusa G, Whittingham DG, De Felici M (1980) The effect of microtubule and microfilament disrupting drugs on preimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* 60:71-82.
- Smith LC, Wilmut I (1989) Influence of nuclear and cytoplasmic activity of the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 40:1027-1036.
- Toyokawa K, Harayama H, Miyake M (2005) Exogenous hyaluronic acid enhances porcine parthenogenetic embryo development *in vitro* possibly mediated by CD44. *Theriogenology* 64:378-392.
- 김현중, 최선호, 한만희, 손동수, 류일선, 김인철, 이장희, 김일화, 임경순, 조상래 (2005) 돼지 난모세포의 단위발생에 있어서 성숙시간과 활성화 처리가 활성화와 발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 20:25-33.
- 임경순, 김현중 (1995) Cytochalasin D의 처리 시간과 농도가 소 난포란의 단위발생의 활성화와 발달에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 19:191-195.