소 수정란의 초기 난할 시기에 내부 세포괴와 영양막 세포로의 운명 결정

송봉석[1,2] · 김지수[1] · 김철희[2] · 이경광[1] · 구덕본[1,†]

[1]한국생명공학연구원 재생의학연구센터, [2]충남대학교 생명과학부

Determination of Cell Fate for Inner Cell Mass and Trophectoderm Cells in Bovine Early Cleaving Embryos

Bong-Seok Song[1,2], Ji-Su Kim[1], Cheol-Hee Kim[2], Kyung-Kwang Lee[1] and Deog-Bon Koo[1,†]

[1]*Center for Regenerative Medicine, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea*

[2]*Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

ABSTRACT

The present study was examined the expression patterns of *cdx2* gene, TE lineage marker, in the mouse and bovine developmental stage embryos and whether one blastomere of two- and/or four-cell bovine embryos develop to specific lineage (ICM or TE) of blastocyst by injection of Texas red conjugated dextran as a lineage tracer. It was also investigated the allocation of ICM and TE cells in bovine blastocysts derived from one blastomere of two- and/or four-cell stage embryos. Firstly, it was observed that expression of *cdx2* appeared symmetric and asymmetric distribution at the two-cell stage mouse embryos. From four-cell to morula stage mouse embryos, the expression of *cdx2* gene was observed in almost all blastomeres. In case of bovine embryos, localization of *cdx2* was similar to pattern of mouse embryos. The Dextran-labeled blastomere of two- and/or four-cell embryos contributed to both ICM and TE cells in bovine blastocysts. And also, it was confirmed that a single blastomere derived from two-cell stage bovine embryos could develop to the normal blastocyst with both ICM and TE cells. These results show that two-and/or four-cell stage is not the specific stage to determine the cell fate for ICM and TE, and which is not correlated with the expression of *cdx2* gene.

(Key words : Cell fate, *Cdx2*, ICM, TE, Bovine embryo)

요 약

본 연구는 소의 초기 난할 단계인 2 또는 4세포기 수정란의 특정 분할구가 배반포 단계의 내부 세포괴(Inner Cell Mass)와 영양막 세포(Trophectoderm cells)로의 발달 운명이 미리 정해지는 지를 확인하기 위해 실시되었다. 먼저 생쥐의 체내 수정란과 소의 체외 수정란에서 배반포의 영양막 세포에서만 특이적으로 발현하는 *cdx2* 단백질의 발현 양상을 조사하였다. 또한, 소의 경우 2세포기와 4세포기가 내부 세포괴와 영양막 세포로 나눠지는 시점인지를 조사하기 위해 2 또는 4세포기의 특정 분할구에 Dextran의 주입 실험과 분할구 제거 실험을 통해 ICM과 TE 형성을 확인하였다. *cdx2*의 발현 경향은 생쥐와 소의 2세포기일 때 대칭과 비대칭적으로 발현되는 것을 확인하였다. 생쥐의 4, 8세포기 및 상실배기에서는 분할구 전체에서 발현되었으나, 소 수정란의 분할구에서는 전체 또는 부분적으로 발현되었다. 또한, 생쥐와 소의 배반포기에서는 영양막 세포에서만 발현이 되는 것을 확인하였다. 소 수정란의 2세포기와 4세포기 단계에서 특정 분할구에 주입된 Dextran은 배반포의 내부 세포괴와 영양막 세포의 양쪽에 분포된 것을 관찰할 수 있었다. 2세포기 단계에서 하나의 분할구가 제거된 수정란 역시 ICM 및 TE 세포를 지닌 정상 배반포로 발달함을 확인하였다. 따라서 본 연구 결과는 영양막 세포에서만 특이적으로 발현하는 *cdx2*의 발현이 2 또는 4세포기 단계 소 수정란에서는 특별한 차이를 보이지 않으며, 궁극적으로 난할 초기에는 ICM과 TE 세포로의 운명이 결정되지 않는다는 것을 보여준다.

서 론

착상 이전의 수정란은 일련의 세포 분열 단계를 통하여 모체의 자궁에 착상이 이루어지기 전 단계인 배반포

* 본 연구는 과학기술부 한국과학재단 바이오 기술개발 사업(2006-04082) 연구지원에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-42-860-4418, E-mail: dbkoo@kribb.re.kr

기까지 발달을 하게 된다. 이렇게 발달한 배반포는 태아로 발생하는 내부 세포괴(inner cell mass)와 태반으로 분화되는 영양막 세포(trophectoderm cells)로 구성된다. 현재까지 배반포를 구성하는 내부 세포괴와 영양막 세포가 나누어지는 시점을 포유류에서는 분명하게 알려져 있지 않은 상태이다. 일반적으로 포유동물에서 2세포기의 수정란은 두 번째 난할이 일어나는 시점이 각 분할구에서 다르다. 따라서 Waksmundzka 등(2006)은 2세포기의 수정란의 두 분할구 중 우선적으로 분열이 일어나는 것과 뒤늦게 분열하는 순서에 의해 분할구의 운명이 정해진다는 가정 하에 하나의 분할구에 형광색소를 주입하고 주입된 분할구의 위치를 확인한 결과, 2세포기의 수정란에서 이들의 운명이 정해지지 않음을 보고하였다. 비록 생쥐의 2세포기 수정란에서 각 분할구가 ICM과 TE 세포로 분화하는 운명이 정해져 있는 것은 아니지만, 초기 수정란의 일부에서 ICM과 TE로 나눠지는 경향을 보인다는 보고도 있었다(Piotrowska와 Zernicka-Goetz, 2005). 그리고 최근 돼지에서 단위발생란을 이용한 세포들의 분화 경향이 보고되기도 하였다(Won 등, 2007). 이렇게 생쥐의 경우 2세포기에서 특정 세포로의 운명이 불분명한 점에 대해 대동물인 소 수정란에서는 어떠한 양상으로 나타나는지 분명하지 않다. 일반적으로 전핵기 수정란에서 배반포로 발달하는 과정 중에는 수많은 단백질들의 상호 작용들이 관여할 것이다. 이러한 단백질들의 정보 교환 및 상호 작용들에 의해 하나의 수정란이 태아와 태반을 이루는 세포로 분화된다고 할 수 있다. 생쥐의 경우, 줄기세포의 표지인자인 *Oct-4* 전사인자는 줄기세포의 전능성을 유지하는데 중요한 인자로 알려져 있다(Nichols 등, 1998). 그러나 생쥐의 배반포에서는 특이적으로 내부 세포괴에서만 발현하는 *Oct-4*가 소의 배반포에서는 내부 세포괴와 영양막 세포에서도 발현이 된다(Kurosaka 등, 2004). 그리고 영양막 세포에서만 특이적으로 발현하는 *cdx2* 유전자는 생쥐의 배반포기에서 TE 세포의 형성에 중요한 역할을 한다고 보고가 되어 있다(Strumpf 등, 2005). *Eomes* 유전자도 *cdx2* 유전자와 마찬가지로 생쥐의 TE 발달에 필수적인 유전자임이 보고되었다(Roberts 등, 2004). 본 연구는 생쥐의 배반포의 TE 세포의 형성에 큰 영향을 미치는 *cdx2* 유전자가 포유류인 소의 수정란에서 발달 단계에 따른 발현 양상이 생쥐 수정란과의 차이점이 있는지를 비교하고, 소 수정란의 2 또는 4세포기 단계에서 각각의 분할구가 배반포를 구성하는 ICM과 TE 세포로의 운명이 결정되는지를 확인하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

생쥐 수정란의 발달 단계별 채취

본 실험에서 언급되지 않은 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사로부터 구매한 것이다. 본 실험은 한국생명공학연구원의 실험동물 관리 및 사용 위원회 규정에 의거하여 수행하였다.

과배란을 유도하기 위하여 8주령의 암컷 생쥐(CBF1)에 5 IU의 eCG와 5 IU hCG를 48시간 간격으로 복강에 주사한 후 수컷과 동숙시켰다. 다음날 질전이 확인된 것을 수정이 되었다고 판단하여 경추 탈구법으로 도살한 다음 난관만을 채취하여 난관 관류에 의해 수정란을 획득한다. 이후 체외 배양액인 M16(Whittingham, 1971)에서 배양을 하여 각 발달 단계별 수정란을 회수하였다.

소의 난포란 채취 및 체외성숙

도축장에서 암소의 난소를 적출한 후 25℃, 0.9% 생리식염수가 들어 있는 보온병에 넣어 실험실로 옮긴 다음, 18 gage 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 사용하여 직경 2~6 mm 난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 0.1% 소 혈청 알부민이 함유된 TL-Hepes(Bavister, 1989) 배양액에 희석하여 실체 현미경 하에서 세포질이 균일하고 3겹 이상의 난구세포층이 치밀하게 붙어 있는 미성숙 난포란만을 선별하여 체외 성숙에 공시하였다. 미성숙 난포란의 체외 성숙은 10% 소 태아 혈청이 함유된 TCM-199 배양액에 1 μg/ml E_2(estradiol 17β)과 10 IU eCG, 10 IU hCG, 10 ng/ml EGF, 0.2 mM pyruvate가 첨가된 용액을 사용하였다. 체외 성숙 배양액을 4-well (Nunc, Roskilde, Denmark) 배양접시에 500 μl씩 분주한 다음, well 당 50개씩의 난포란을 투입하여 5% CO_2, 38.5℃ 조건하에서 20시간 동안 배양하였다.

소 난포란의 체외수정 및 배양

소 난포란의 체외수정 방법은 Wee 등(2006)의 방법을 토대로 실시를 하였으며, 구체적인 방법은 다음과 같다. 체외수정을 위해 20시간 동안 체외에서 성숙된 난포란은 0.6% 소 혈청 알부민과 10 μg/ml heparin이 함유된 체외 수정용 배양액(albumin, lactate, pyruvate 함유 Fertilization-Tyrode's 액, Fer-TALP; Bavister와 Yanagimachi, 1977)에 3회 세척 후 미리 준비된 수정용 배양액 44 μl 소적 당 15개씩 준비하였다. 액체질소에서 보관된 소의 동결 정액을 공기 중에서 10초간 방치 후 37℃ 항온수조에서 20초간 융해시켰다. 융해된 정액을 37℃로 데워진 90%와 45%의 농도 구배된 percoll 용액 위에 올려 2,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 정자와 그 외의 부분을 별도로 분리하였다. 분리된 정자는 피펫을 이용하여 percoll에서 회수한 후 정자를 세척할 수 있는 Sp-TALP(sperm-TALP; Parrish 등, 1988) 용액에 넣어 1,000 rpm에서 10분간 원심분리를 실시하였다. 침전된 정자만을 회수하여 난자 15개씩 들어 있는 소적 당 1×10^6 cells/ml 농도로 20시간 동안 공배양에 의해 체외 수정을 유기하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 3 mg/ml BSA가 첨가된 CR-1aa (Rosenkrans 등, 1993) 용액에 5% CO_2, 38.5℃ 조건하에서 배양하였다. 수정 후 3일째 난할된 수정란은 10% FBS가 포함된 CR1aa에서 4일간 추가적인 배양을 실시하였다.

면역화학염색법에 의한 *cdx2* 유전자의 발현 확인

생쥐와 소 수정란에서 각각 발생 단계별 *cdx2* 유전자의 발현 양상을 확인하기 위하여 면역화학염색을 실시하였다. 먼저 각 발달 단계별 수정란을 4% formaldehyde 용액을 이용하여 4℃에서 30분간 고정을 유도하였으며, 0.1% Tween 20이 함유된 PBS(TPBS)로 세척을 실시한 후 0.5% Triton X-100이 함유된 PBS 용액에 1시간 동안 방치를 하였다. 이후 1% BSA가 함유된 TPBS에 12시간 정도 방치하였다. 각 샘플은 *cdx2* 단백질에 특이적으로 반

응하는 1차 항체가 100배 희석된 TPBS 용액으로 4℃에서 3시간 동안 반응을 유기한 후, 0.05% TPBS에서 3시간 동안 세척을 실시하였다. 2차 항체로 Cy3-anti rabbit immunoglobulin G(IgG; Molecular Probes, Eugene, USA)를 이용하여 30분간 37℃에 방치한 후, TPBS로 1시간 세척을 실시하였다. 염색이 완료된 각 발달 단계별의 수정란은 1 fg/ml의 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI; Molecular Probes, CA, USA)이 포함한 90% glycerol-PBS와 함께 슬라이드 글라스 위에 배치시킨 후 형광현미경(Zeiss, Germany) 하에서 발현 여부를 관찰하였다.

Texas Red가 부착된 Dextran의 주입

소의 2 또는 4세포기의 수정란에 주입된 Dextran(molecular probe, CA, USA)은 Texas red가 부착된 것이다. Dextran 용액의 주입은 자동 미세주입기(Eppendorf AG, Germany)가 부착된 미세 조작 현미경을 사용하였으며, 2 또는 4세포기 수정란의 하나의 분할구에 주입하였다. 이때 25 mg/ml의 농도로 농축된 용액을 10 mM Tris가 포함된 T/E buffer(pH 7.4)를 이용해 희석하여 최종 농도를 0.4 μg/ml로 조정하여 각각의 분할구에 주입하였다. 주입되는 용액의 양은 약 2 pl 정도이다. 체외수정 28시간 후 2세포기의 수정란만을 회수하여 두 개의 분할구중 하나의 분할구에 Dextran을 주입하였다. 회수된 4세포기의 수정란도 상기의 방법과 동일하게 Dextran을 하나의 임의의 분할구에 주입을 하였다. Dextran이 주입된 수정란은 3 mg/ml BSA가 첨가된 CR1aa에서 배양을 실시하였으며, 수정 후 3일째 Dextran이 주입된 수정란 중 8세포기 이상인 수정란은 10% FBS가 포함된 CR1aa 용액에서 배양하였다. 체외배양 후 배반포로 발달한 난자를 대상으로 Dextran의 분포를 confocal microscope(Zeiss, Germany) 및 형광현미경 하에서 관찰하였다.

분할구 제거 및 수정란의 배양

체외수정을 유기한 후 28시간째 2세포기인 수정란만을 회수하여 하나의 분할구를 제거하기 위하여 7.5 μg/ml cytochalasin B가 포함된 TL-Hepes 용액에서 구경이 20~30 μm인 피펫이 장착된 미세 조작기를 이용하였다. 한 개의 분할구가 제거된 수정란은 상기에서 제시된 방법과 동일하게 체외배양을 유도하였다. 체외배양 후 배반포로 발달한 난자를 대상으로 이중염색을 통하여 ICM 및 TE 세포의 분포 양상을 확인하였다.

이중형광 염색법에 의한 내부 괴세포와 영양막 세포의 형성 확인

본 실험에서 배반포 단계에서 ICM 및 TE 세포의 분포 양상을 확인하기 위한 이중형광염색법은 Koo 등(2002)의 방법을 토대로 수행하였으며, 구체적인 방법은 다음과 같다. 체외에서 수정된 2세포기의 수정란에서 임의의 분할구 1개가 제거된 수정란을 체외배양을 통하여 배반포를 회수하여 이중형광염색을 실시하였다. 먼저 배반포의 투명대를 0.5% proteanase 용액을 이용하여 용해시킨 후, 0.1% PVA가 함유된 PBS(Gibco-BRL, CA, USA) 용액으로 3회 이상 세척을 실시하였다. 그리고 anti-pig whole serum이 1:4로 희석된 0.1% PVA가 함유된 TL-Hepes 용액에서 1시간 배양한 후, 상기 용액에 guinea pig complement(calbiochem, 234395)가 10배 희석된 용액(PI와 Hoechst가 각각 4 μg/ml 포함)에 1시간 처리하였다. 염색이 완료된 배반포를 0.1% PBS-PVA에 3회 세척한 후, 슬라이드 글라스 위에 올린 후 커버글라스로 배반포를 덮은 후 형광현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 UV 하에서 배반포의 ICM과 TE 세포의 분포 양상을 조사하였다.

결 과

생쥐 및 소 수정란의 발달 단계에서 *cdx2*의 발현 양상

먼저 생쥐의 경우, 2세포기 수정란(n=22)의 경우, *cdx2*가 대칭적 또는 비대칭적으로 발현하는 수정란이 혼재되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 따라서 이러한 *cdx2*의 발현이 수정란의 발달 단계에 따라 어떠한 양상을 나타내는지를 조사한 결과, 4세포기(n=6) 수정란의 경우는 모든 분할구에서 발현됨을 확인하였으며, 각각의 분할구에서 발현의 강도가 차이가 있다는 것을 확인하였다. 또한, 8세포기와 상실배 단계에서는 거의 모든 분할구에서 발현되고, 배반포 단계에서는 영양막 세포에서만 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2A-E). 소 수정란의 경우 2세포기(n=11) 수정란의 경우, 생쥐 수정란의 경우와 같은 양상으로 발현됨을 확인할 수 있었으며, 생쥐 수정란에 비교하여 *cdx2*의 발현 강도가 다소 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 4세포기(n=9)와 8세포기(n=10)의 경우는 전체의

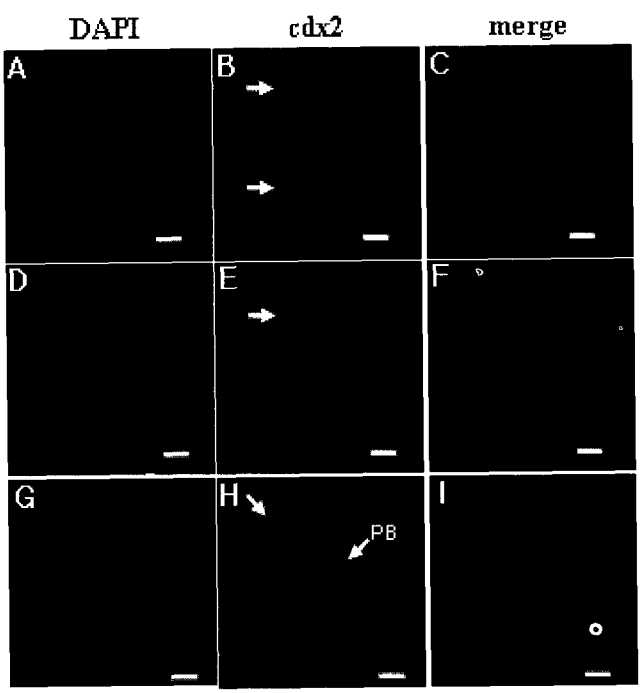

Fig. 1. Localization of *cdx2* in mouse 2-cell stage embryos by using immunocytochemical staining. White arrows indicate expression of *cdx2* gene in 2-cell embryos. Bar is 20 μm.

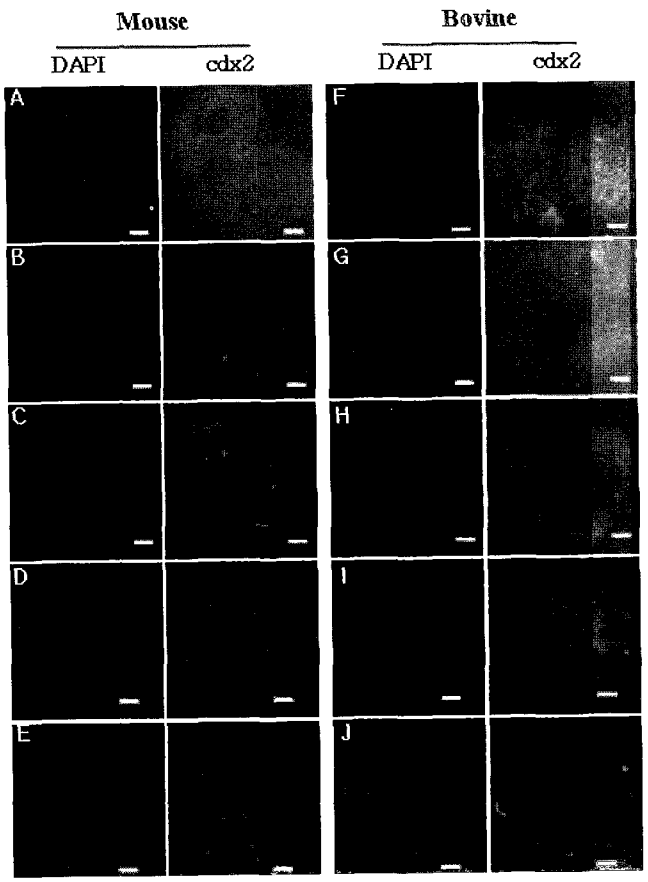

Fig. 2. Pattern of *cdx2* expression in mouse and bovine embryos. Immunostaining of *cdx2* in mouse (A~E) and bovine (F~J) embryos (A, F: 2-cell, B, G: 4-cell; C, H : 8-cell, D, I : morula; E, J : blastocyst). Bar is 20 μm. (Mouse) and 50 μm (Bovine).

분할구에서 *cdx2*가 발현되는 되는 수정란과 일부의 분할구에서만 발현되는 수정란이 존재함을 확인할 수 있었다. 이러한 양상은 생쥐의 수정란에서 나타난 결과와 마찬가지로 상실배 단계의 수정란은 거의 대부분의 분할구에서 발현되었으며, 배반포 단계에서는 영양막 세포에서만 특이적으로 발현되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2F-J).

배반포 단계에서 Dextran의 분포 양상

소의 2 또는 4세포기 수정란에 임의의 하나의 분할구를 선택한 뒤 소량의 Dextran을 미세주입기를 이용하여 주입한 후 배양하여 배반포 단계에서 Dextran의 분포를 확인한 결과, 배반포를 구성하는 내부 세포괴와 영양막 세포의 양쪽 모두에서 Dextran이 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

단일 분할구 유래 배반포에서 ICM과 TE 세포의 분포 양상

소의 2세포기의 수정란(n=15)에서 하나의 분할구를 제거한 후 배양을 실시하여 배반포가 형성된 수정란만을 획득하여 이중형광염색을 실시한 결과, 모든 배반포에서 ICM과 TE 세포가 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

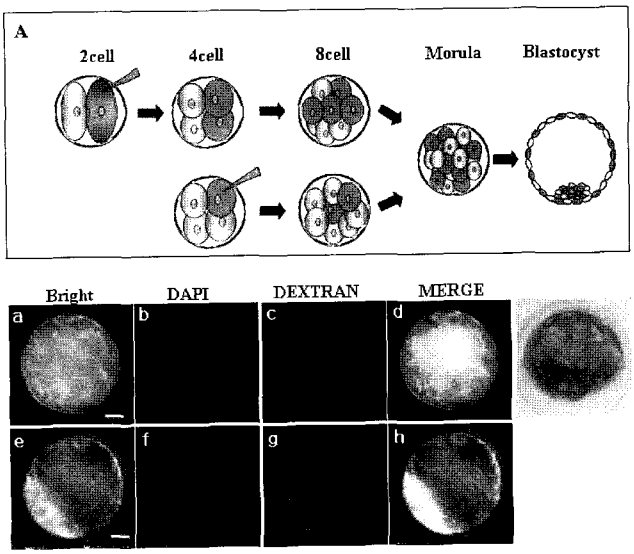

Fig. 3. Fluorescence image of Dextran-injected bovine blastocysts. Schematic illustration of dextran-injection experiment (A). A red triangle indicates dextran-injected blastomere in 2-cell and 4-cell embryo. Fluorescence image of bovine blastocyst in which one blastomere at the 2-cell stage (a~d) and 4-cell stage (e~h) was injected with dextran. Confocal scanning image of blastocyst which was injected with dextran at 2-cell stage (i). In both case, the distribution of dextran was observed in both ICM and TE cells. Bar is 50 μm.

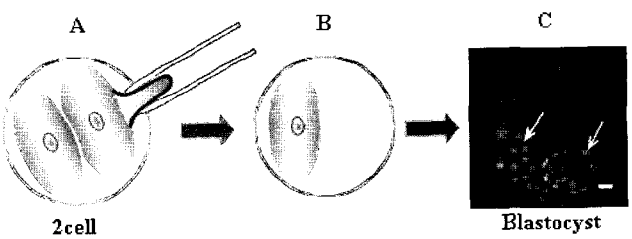

Fig. 4. Differential staining image of blastocyst produced by single blastomere of 2-cell stage embryo. IVF derived 2-cell embryo (A), 2-cell stage embryo removed one blastomere (B). Blue and red color indicates ICM and TE cells, respectively (C). Bar is 50 μm.

고 찰

본 실험은 배반포에서 특정 부위에서만 발현하는 유전자를 초기부터 관찰한다면 세포가 어느 시점에서 특정 계통으로 분화되는지에 대한 작용 기전을 정확하게 확인할 수 있을 것이란 가정 하에 소의 초기 난할 수정란의 특정 분할구가 배반포를 형성하는 특정 세포로 분화되는지를 확인하기 위해 수행되었다.

본 실험에서 확인된 생쥐 수정란의 *cdx2*의 발현 양상을 통해 *cdx2*의 발현 양상과 특정 세포로의 분화와의 상관 관계는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다. 상실배 이후의 수정란은 *cdx2*의 발현이 바깥쪽 세포들 핵에서 나타난다는 보고가 있었다(Strumpf 등, 2005). 본 연

구 결과에 나타난 바와 같이 소 수정란에서도 생쥐의 경우와 유사한 발현 양상을 보였다. 특히, *cdx2* 유전자의 이러한 발현 양상이 각각의 수정란 발달 단계에서 공통적으로 나타나는 특성이 없으므로, 소 수정란에서도 초기 단계인 2세포기에서 세포의 운명이 결정되지 않음을 알 수 있다.

한편, 포유동물 각 종에서 특이적인 부분에 발현하는 유전자들이 있다. 생쥐의 경우, ICM에서만 특이적으로 발현이 되는 *Oct-4* 유전자가 소의 배반포기에서는 ICM과 TE 양쪽에서 발현이 된다고 보고되었다(Kirchhof 등, 2000). 이렇게 특이적인 발현 경향을 보이는 유전자가 수정란에서 처음으로 분할구 분할이 이루어지는 시점에서 특정 세포로의 운명에 결정적인 역할을 한다고 판단하기는 어려운 상황이다. 본 실험에서 *cdx2* 유전자의 발현 양상을 각 발달 단계별로 조사한 결과, 2 또는 4세포기 수정란에서 *cdx2*가 발현되는 분할구들의 혼재로 인해 초기 난할 수정란에서 *cdx2* 유전자의 발현이 특정 세포로의 분화에 대한 분할구의 운명을 결정짓는 것이 아니란 것을 확인할 수 있었다.

수정란에서 각각의 분할구들이 어떠한 세포로 발달하는지에 대한 경로를 추적하기 위한 연구들이 수행되어 왔다(Piotrowska 등, 2001; Piotrowska와 Zernicka-Goetz, 2001). 본 실험에서 하나의 분할구가 특정 세포로 분화되는 운명을 추적한 결과, 초기 난할 수정란 단계에서 분할구들의 운명이 결정되지 않는다는 것을 제시한다. 또한, 이러한 결과에 대한 부가 실험으로 2세포기의 분할구 중 하나의 분할구를 제거하여 배양하여 발달한 배반포를 대상으로 이중형광염색으로 ICM 및 TE 세포의 구성을 확인한 결과, 정상 배반포와 마찬가지로 ICM과 TE 세포 모두를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 상기의 형광색소 주입 실험과 동일한 의미를 가지는 것을 제시한다. 그러나 발달 단계에 있는 수정란에서 하나의 분할구가 어떠한 시기에 특정 세포로의 운명이 결정되는지는 불분명하지만, 발달 과정 중 특정 시기에는 결정될 것이다. 생쥐의 경우, 4 세포기 수정란의 분할구에 형광색소를 주입한 후 배반포로 발달을 유기하였을 때, 모든 수정란에서 나타나는 현상은 아니지만 일부의 수정란에서 배반포 단계에서 특정한 부분으로 공간적인 배열이 이루어짐을 보고하였다(Piotrowska와 Zernicka-Goetz, 2005). 그러나 소 수정란의 4세포기 분할구를 대상으로 실험한 결과, 모든 수정란에서 특정 세포로 발달하지 않고 ICM 및 TE 세포로 분산되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합해볼 때, 생쥐의 경우 2세포기에서 접합체 활성화(zygotic genome activation; Latham 등, 1992)가 일어나고, 소 수정란의 경우는 8세포기(Telford 등, 1990)에서 일어나기 때문에 이러한 접합체 활성화가 일어난 이후에 배반포의 구성세포인 ICM과 TE 세포로의 운명이 정해질 수 있을 것이라고 판단된다.

본 연구에서는 생쥐 및 소 배반포의 TE 세포에서 특이적으로 발현을 하고 이의 형성에 영향을 주는 *cdx2* 유전자가 2 또는 4세포기 수정란의 분할구에서 특이적인 발현 양상의 차이점을 확인할 수 없었으며, 배반포기에는 ICM 세포를 제외한 TE 세포에서만 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 2세포기 수정란의 각 분할구에서 세포의 운명이 결정되지 않는다는 것을 본 연구 결과를 토대로 확인할 수 있었다. 하나의 수정란이 발달하면서 두 가지의 세포로 분화하는 시기는 분명히 정해져 있을 것이고, 이러한 시기에 필수적인 유전자의 발현 여부와의 상관 관계를 규명하는 연구가 향후 수행되어야 할 것이다.

인용문헌

1. Bavister BD (1989): A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. Gamete research 23:139-158.
2. Bavister BD, Yanagimachi R (1977): The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. Biol Reprod 16:228-237.
3. Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Scholer H, Niemann H (2000): Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. Biol Reprod 63:1698-1705.
4. Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, Son DS, Park H, Lee KK, Han YM (2002): Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. Biol Reprod 67:487-492.
5. Kurosaka S, Eckardt S, McLaughlin KJ (2004): Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. Biol Reprod 71:1578-1582.
6. Latham KE, Solter D, Schultz RM (1992): Acquisition of a transcriptionally permissive state during the 1-cell stage of mouse embryogenesis. Dev Biol 149: 457-462.
7. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell 95:379-391.
8. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J (2005): Interaction between Oct3/4 and *Cdx2* determines trophectoderm differentiation. Cell 123:917-929.
9. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL (1988): Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod 38:1171-1180.
10. Piotrowska K, Wianny F, Pedersen RA, Zernicka-Goetz M (2001): Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development. Development 128:3739-3748.
11. Piotrowska K, Zernicka-Goetz M (2001): Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. Nature 409:517-521.
12. Piotrowska K, Zernicka-Goetz M (2005): Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate

with blastocyst pattern in the mouse embryo. Mech Dev 122:487-500.
13. Roberts RM, Ezashi T, Das P (2004): Trophoblast gene expression: transcription factors in the specification of early trophoblast. Reprod Biol Endocrinol 2:47.
14. Rosenkrans CF, Jr., Zeng GQ, MCNamara GT, Schoff PK, First NL (1993): Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. Biol Reprod 49:459-462.
15. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J (2005): *Cdx2* is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. Development 132:2093-2102.
16. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA (1990): Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. Mol Reprod Dev 26:90-100.
17. Waksmundzka M, Wisniewska A, Maleszewski M (2006): Allocation of cells in mouse blastocyst is not determined by the order of cleavage of the first two blastomeres. Biol Reprod 75:582-587.
18. Wee G, Koo DB, Song BS, Kim JS, Kang MJ, Moon SJ, Kang YK, Lee KK, Han YM (2006): Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatins in cloned embryos. J Biol Chem 281:6048-6057.
19. Whittingham DG (1971): Culture of mouse ova. J Reprod Fertil 14:7-21.
20. Won C, Park SK, Choi YJ, Kang H, Roh S (2007): Leading blastomere of 2-cell-stage porcine parthenogenetic embryo contributes to trophectoderm first. Reprod Fertil Dev 19:196.

(접수일자: 2007. 8. 20 / 채택일자: 2007. 9. 15)