

체외수정 돼지 배아의 초기 분할 양상 분석에 의한 발달능 예측

전유별¹, 비샤스 디비엔두¹, 윤기영², 현상환^{1,*}
¹충북대학교 수의과대학, ²신구대학 자원동물학과

Prediction of Developmental Ability of *In Vitro* Fertilized Porcine Embryos by Analysis of Early Cleavage Pattern

Yu-Byeol Jeon¹, Dibyendu Biswas¹, Ki-Young Yoon² and Sang-Hwan Hyun^{1,*}

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

²Department of Animal Science, Shingu College, Seongnam 462-743, Korea

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the cleavage pattern, its developmental ability and apoptosis of porcine embryo *in vitro*. Morphology data on a total of 919 embryos were analyzed retrospectively. Forty-eight hours after insemination, embryos were classified into five groups based on the cleavage state as follows; 1 cell, 2 cell, 4 cell, 5 to 8 cell and fragmentation. These groups were cultured another 120 hours and then evaluated for blastocyst formation. Blastocyst formation rates were significantly higher in 4 cell (42.5%) and 5 to 8 cell (48.6%) cleaving groups than in other groups ($p<0.05$). On the other hand, 2 cell and fragmentation groups produced 4.9% and 3.9% blastocysts, respectively. And we could verify that in the event of 2 cell block and fragmentation of embryo. To analyze the apoptotic frequency in preimplantation development of porcine IVF embryos, all cells of each blastocyst were performed by TUNEL assay. There were no significant differences in the total cell numbers of embryos and apoptotic cell rate in blastocysts among the each classified groups. Data suggest that 4 cell and 5 to 8 cell cleaving embryos at 48 hour after insemination have high developmental competence, and may be an useful parameter to predict the development of preimplantation embryos and to study using preimplantation embryonic research.

(Key words : pig, IVF embryos, cleavage pattern, apoptosis)

서 론

생물공학 분야에 있어서 돼지의 배아는 착상전의 초기 배아 발달, 착상, 임신, 복제 동물 및 형질 전환 동물에 관한 연구 등 여러 분야에서 유용하게 이용되고 있다. 체외성숙, 체외수정 및 체외배양 기법은 배아를 이용한 발생학 분야에 있어 필수적 기법이며, 이는 생물공학을 기초로 발전하는 복제 연구, 줄기세포 연구, 형질 전환 동물의 생산 등과 같은 많은 연구 분야의 초석이 되는 연구기술이다. 하지만 체외 환경에서의 한계로 인해 체내에 비하여 배아의 발달 속도가 느리고 주머니배(blastocyst, 배반포)의 세포 수도 적은 것이 사실이다(Wang 등, 1999). 이러한 체외 환경 실험적 한계를 극복하기 위해 많은 연구자들은 끊임없는 노력을 경주하고 있으며, 그 중에서도 배아의 발달 능력을 예측하고 배아 발달율을 높이는 것은 매우 중요한 과제로 인식되고 있다.

소에서 체외수정 과정에서 배아의 발달 단계와 형태학적인

특성에 따라 발달 능력을 평가하고 이식시기를 결정하는 것은 필수적 과정으로 인식되고 있다(Lonergan 등, 1999a). 수정 후 배아의 첫 분할 시점과 발달 능력 간에는 분명한 연관성이 있다는 증거들이 많은 종에서 보고된 바 있다(Bavister 등, 1983; McKiernan와 Bavister, 1994; Totey 등, 1996; McLaren과 Bowman, 1999; Lonergan 등, 1999). 체외에서 생산되는 돼지 배아는 주머니배의 낮은 형성율과 발달 과정에서의 높은 세포사멸로 인해 연구의 효율성을 저해하는 경향이 있다(Lonergan 등, 1999b). 따라서 분할 초기 배아의 형태학적이고 구조적 특성에 따른 배아 발달 및 주머니배 형성율의 예측은 중요한 연구 과제로 고려된다. 일반적으로 많은 동물에서 초기 배아의 빠른 분할 양상은 배아의 발달 잠재능을 증가시키고, 높은 주머니배 형성률과 출생률의 증가를 가져올 수 있다(McLaren 등, 1973; Grisart 등, 1994; Bavister 등, 1983; Bernardi 등, 1996). 그러나 지나치게 빠른 분할은 부정적 결과를 가져오기도 한다. 사람 체외수정 배아의 경우, 분할 속도가 빠른 초기 배아에서 배

* 본 연구는 2007년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

* Correspondence : E-mail : shhyun@cbu.ac.kr

아의 발달 능력의 감소와 염색체의 이상이나 후생유전적 각인의 비정상 등이 나타났으며, 유전체의 활성화가 일어나지 않았다(Ziebe 등, 1997; Alikani 등, 2000). 따라서, 돼지 배아에서의 초기 배아 발달 과정인 분할 양상에 따른 연구가 요구된다.

배아 분할과 관련하여, 배아의 발달과 성숙에 있어서 중요한 요소 중 초기 배아의 분할 과정에서 나타나는 apoptosis는 유전자에 의해 제어되는 세포자멸사로, 세포의 괴사나 병적인 죽음인 necrosis와는 구별된다. 일반적으로 apoptosis는 하나의 세포에서 일어나고, 염증 반응과는 관련 없이 건강한 조직에서도 일어난다(Wyllie 등, 1980). 생식세포와 초기 배아에서의 apoptosis에 대한 기전 연구는 아직 초기 단계이다(Isom 등, 2007). 특정 세포의 신호에 의해 배아에서 apoptosis가 유발되고 배아의 프로그램 세포사(programed cell death)에 의해 조절되는 기전 정도가 밝혀져 있고, 미성숙 난자에서는 빠른 apoptosis가 수정 이후 배아의 발달에 좋은 영향을 준다는 보고도 있다(Li 등, 2008).

따라서, 본 연구의 목적은 돼지 체외수정 배아의 분할 양상에 따른 수정 배아 발달능을 분석하고, 분할 양상에 따른 주머니배의 세포수 및 apoptosis 발생 빈도를 평가하여 수정후 2일령 배아에서의 발달능 예측 기준을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

도축장에서 버려지는 부산물인 미경산 돼지의 난소를 채취하였으며, 멸균 생리식염수로 난소를 3회 세정한 후 난소의 피질에 존재하는 직경 3~8 mm의 난포로부터 18-gauge 주사침이 연결된 주사기를 이용하여 난포액 및 미성숙 난모세포를 채취하였다. 세 층 이상의 난구세포와 결합된 난모세포만을 선별하여 체외성숙에 사용하였다. 체외성숙배양 배지는 TCM 199에 10%(v/v) 돼지 난포액(porcine follicular fluid, pFF), 15 ng/ml EGF, 5 IU/ml eCG, 5 IU/ml hCG, 0.57 mM cysteine, 0.91 mM sodium pyruvate, 26.2 mM sodium bicarbonate 및 0.075 mg/ml kanamycin을 첨가하여 사용하였다(Wang 등, 1999). 성숙배양 배지 0.5 ml가 들어 있는 4-well dish의 각 well에 50개의 미성숙난모세포를 넣어 39°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였으며, 배양 시작 후 22시간에 호르몬이 첨가되지 않은 새로운 배양액으로 교체하여 22시간 추가 배양하였다.

2. 체외수정 및 체외배양

체외수정에는 modified tris-buffered medium(mTBM)을 사용하였다(Hong 등, 2004). 동결정액을 39°C의 온수에 1분간 침지하여 용해한 후 0.1%(w/v) BSA(Sigma-Aldrich, A-3311)가 첨가된 PBS로 희석하였으며, 350 g에서 3분간 2회 원심 세정하였다. 최종 정자 농도가 2×10^7 sperm/ml이 되도록 2 mM

caffeine이 첨가된 mTBM으로 재부유하였다. 0.1%(w/v) hyaluronidase로 난구세포를 제거한 난모세포 중 제1극체가 보이는 성숙 난모세포를 선별하여 체외수정에 사용하였다. 사전 처리된 정자를 50 ul인 수정-배양액 미소적에 20개의 난자를 넣고 39°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 6시간 동안 체외수정하였다. 체외배양 배지는 North Carolina State University-23(NCSU-23) 배지를 사용하였다. 체외수정 종료 후, 25 ul 용량의 배양액 미소적에 수정배아 10개씩 넣어 5% CO₂, 5% O₂ 및 90% N₂의 인큐베이터에서 배양하였다. 체외수정물은 체외수정 16시간 후의 접합자를 Hoechst(Sigma-Aldrich, B-2265) 염색 처리하여 정자 침투율, 정상 수정률 및 전핵형성을 조사하였다.

3. TUNEL Assay

주머니배에서 apoptosis 발현 빈도를 검사하기 위한 전처리로 각 주머니배를 0.1% BSA가 함유된 PBS로 3회 세정하였다. 상온에서 돼지 체외수정 배아를 3.7% paraformaldehyde (DC chemical CO. 010817) 포함된 PBS에서 30분간 고정처리하였다. 고정하는 동안 Enzyme solution 20 μ l(*in situ* cell death detection kit, TMR red, Roche, 12156792910)과 Label solution 180 μ l(*in situ* cell death detection kit, TMR red, Roche, 12156792910)을 혼합하고, 고정된 샘플을 0.1% BSA가 함유된 PBS로 3회 세정하였다. 세척한 샘플을 혼합된 solution이 180 μ l 들어있는 4well dish로 옮긴다. 샘플을 39°C 배양기에서 1시간 동안 반응시킨다. 다시 3회 세척하고 10 μ g/ml Hoechst 염색약으로 30분 동안 어둠에서 염색한다. 염색 후 세척하여 슬라이드 글라스 위에 올린 후 UV 장치(C-HGF1, Nikon, Japan)가 설치된 현미경(TE2000-U, Nikon, Japan)으로 관찰하였다(Fig. 1).

4. 실험설계

1) 체외수정 48시간째 분할 양상 분석 및 주머니배 형성
체외수정 48시간에 분할율을 관찰하고 2세포기, 4세포기, 5~8세포기, fragmentation 군으로 분류하여 독립적 배양 미소적에 나누어 배양하였다. 분할율은 할구가 균일한 크기로 분할된 배아만을 선별하여 산정하였다. 이후 120시간째 각 군별 주머니배 형성을 관찰 기록하였다.

2) 상기 1)에서 기술한 실험군에 따라, 각 군별 유래의 주머니배를 수집 후 apoptosis 빈도를 분석하였다.

5. 자료 처리 및 분석

본 연구의 각 실험군별 분할율, 주머니배 형성율 및 apoptosis 빈도를 SPSS program의 ANOVA를 이용하여 통계학적 유의성($p < 0.05$)을 검정하였다.

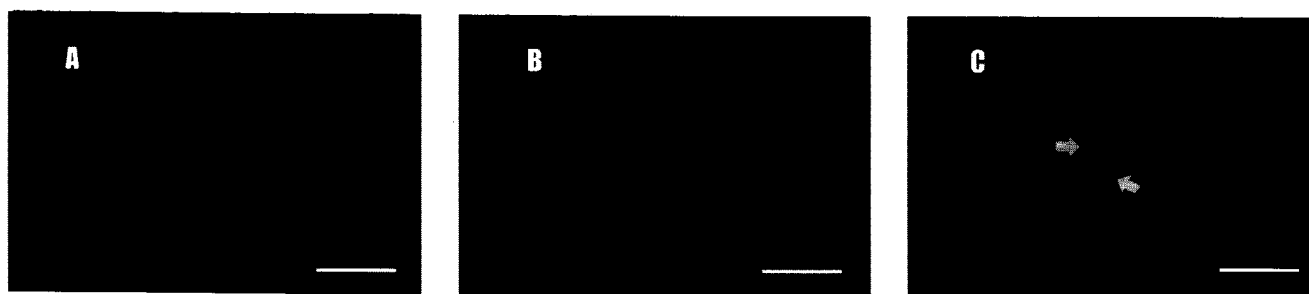


Fig. 1. Apoptosis in porcine IVF blastocyst. A: Nuclei (blue) are stained with Hoechst (X200). B: TUNEL labeling with TMR Red showing apoptotic cells (X200). C: Merged image of A and B, apoptotic nuclei are marked by arrows (X200). Bars=100 μ m.

결과 및 고찰

본 실험을 통하여 돼지 체외수정 배아의 분할 양상에 따른 수정배아 발달능을 분석하고, 분할 양상에 따른 주머니배의 세포수 및 apoptosis 발생 빈도를 평가하여 수정 후 2일령 배아에서의 발달능 예측 기준을 제시하고자 하였다. 본 실험에 수행된 체외수정의 수정 및 전핵 형성 결과는 Table 1과 같다. 정자 침투율은 70.5%를 보이며, 정상 수정율인 두 개의 전핵을 형성한 비율(2PN)은 58.7%의 결과를 보였다. 평균적으로 난모세포당 1.35개의 정자가 수정된 결과를 보였다.

Table 2에서는 수정 후 2일째 배아의 분할 양상과 7일째 주머니배의 발달을 나타내고 있다. 정자 주입 후 48시간 동안 배양을 하고 분할 양상에 따라 분리해 본 결과, 1 세포기 122개(13.5%), 2세포기 80개(8.7%), 4세포기 197개(21.4%), 5~8 세포기 214개(23.3%), fragmentation 배아가 306개(33.3%)였다. 4세포기와 5~8세포기의 비율은 각각 21.4%와 23.3%로 1 세포기 및 2세포기의 비율보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 7일째의 주머니배의 발달 양상은 4세포기와 5~8세포기군 유래가 다른 군에 비하여 유의적으로 높은 형성율을 보였다. 각각의 비율은 42.5%와 48.6%로 전체의 90% 이상의 주머니배가 4세포기와 5~8세포기 군에서 유래되었다.

배아의 분할 양상 분포를 보면 fragmentation 배아의 비율이 33.3%로 다른 단계의 배아보다 유의적으로 높음을 알 수 있다($p < 0.05$). 이러한 비율은 Table 1의 3PN과 4PN의 결과를 합친 다정자 침입률(41%)과 비슷한 양상을 나타낸다. 일반적으로 fragmentation 현상은 체내 수정 환경과 달리 체외수정시 두드러지게 나타나는 경향이 있다. 이러한 결과는 동물뿐 만 아니라 사람 배아의 경우도 마찬가지로 체외수정에서의 배아

Table 2. Comparison of blastocyst formations at day 7 classified by cleavage pattern at day 2

Classified group at day 2	No. cleavage assessment at day 2 (% \pm SEM)	No. of BL at day 7 (% \pm SEM)
1-cell	122 (13.5 \pm 6.0) ^a	0 (0) ^a
2-cell	80 (8.7 \pm 1.5) ^a	6 (3.9 \pm 1.5) ^a
4-cell	197 (21.4 \pm 2.3) ^b	75 (42.5 \pm 3.7) ^b
5- to 8-cell	214 (23.3 \pm 2.4) ^b	87 (48.6 \pm 3.2) ^b
Fragmentation	306 (33.3 \pm 2.9) ^c	9 (4.9 \pm 1.9) ^a

Within the same column, values with different superscripts letters (a~c) were different ($p < 0.05$)

발달 시 fragmentation이 많이 나타나며, 체외 환경의 한계로부터 기인되는 것으로 사료된다(Yang 등, 1998). 체외수정의 환경이 체내수정 과정과 비교했을 때 가장 큰 차이를 나타내는 부분은 산소의 농도다. 체외의 산소 농도는 매우 높으며, 이로 인해 활성산소종(ROS)이 대량으로 발생하게 된다(Yoo 등, 1998). 활성산소종(ROS)은 배아 발달을 저해하는 요소에 포함되고, 이러한 ROS의 발생은 배아 발달을 정지시키는 것으로 알려져 있다. 활성산소종(ROS)은 배아 자체에서 유래하기도 하고 또는 그 이외의 요인에 의해서 발생하기도 한다. 체외수정시, 이러한 활성산소종(ROS)의 발생을 줄이기 위한 전략으로 free radical scavenger나 활성산소종을 줄이기 위한 물질의 첨가가 이루어지는데, 이는 보조생식술(Assisted Reproductive Technologies)에 있어서 수정 능력 향상에 매우 중요

Table 1. Penetration and polyspermy rates after porcine *in vitro* fertilization

Rep.	No. of total examined	Penetrated (% \pm SEM)	PN (% \pm SEM)			Spermatozoa in penetrated oocyte (mean \pm SEM)
			2PN	3PN	4PN	
7	156	70.48 \pm 1.87	58.70 \pm 1.88	23.87 \pm 3.90	17.07 \pm 3.30	1.35 \pm 0.14

한 요소로 인식되고 있다. 활성산소종(ROS)은 배아의 발달과 성장을 저해하는 요소로써 세포막과 DNA에 손상을 주며 apoptosis를 유발한다. 이러한 apoptosis는 결국 fragmentation으로 이어지고 이는 착상 능력의 제한과 수정 결과의 저해를 불러오게 된다. 본 실험을 통하여 생산된 배아의 apoptosis 발생빈도는 Table 3과 같다. 각 군에서 유래한 주머니배의 핵 개수는 평균값이 각각 56.0, 69.54, 64.36, 65.14로 나타났고, apoptosis가 일어난 세포의 비율은 각각 3.8%, 2.45%, 3.08%, 2.3%로 보이며, 각 그룹 사이에서 세포의 숫자와 apoptosis 빈도는 유의적 차이가 없음을 알 수 있다($p>0.05$).

세포분열이 빠른 배아가 착상률이 높고 착상 후 산자로 정상 발달하는 비율이 높다는 사실에 대해서 많은 연구자들이 보고하였다. 사람에서는 수정 후 55시간째에 8 세포기 상태로 발달하는 배아의 임신 성공률이 이보다 55시간을 더 배양한 후에야 8 세포기 상태에 도달하는 배아들에 비해서 거의 두배나 높게 나타난다(Shapiro 등, 2000). 또한, 이는 동물에서의 배아 발달 속도에 따른 발달 능력의 평가에도 많은 영향을 주고 있다. 우리는 이번 실험을 통하여 8 세포기뿐만 아니라 4 세포기의 배아도 높은 발달 잠재력을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 빠른 분할 속도와 높은 주머니배 형성률의 역학적인 관계는 DNA replication의 충실도(fidelity)로 설명이 가능하다. 첫 번째 세포주기의 S phase가 주머니배 형성에 영향을 미친다는 보고가 있다. 이는 많은 종에서 각기 다른 형태로 나타나는데, 소의 경우는 S phase가 길고 G1 phase가 짧을때(Comizzoli 등, 2000), mouse에서는 S phase가 길고 G2 phase가 짧을수록(Scharbronath와 Gartner, 1998), 주머니배의 형성률이 높아진다고 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 접합자의 S phase가 짧을수록 불완전하며 비정상적인 DNA replication을 일으키고 이것이 곧 주머니배로의 발달률을 저해함을 시사한다. 결론적으로, 돼지 체외수정 기법을 이용한 배아의 생산과 주머니배 형성률의 향상에 있어서 수정 후 48 시간째 4세포기에서 8세포기 단계의 빠른 분할 속도를 보이는 배아를 선택하는 것이 적절한 선택 기준이며 연구 결과의

신뢰도를 가져다 줄 수 있는 중요한 척도로 사료된다.

결론

본 연구에서는 돼지 체외수정배아에서 2일째 분할 양상, 착상전 배아 발달능 및 apoptosis에 관하여 알아보았다. 배아의 형태학적 분석을 위하여 총 919개의 돼지 체외 수정란이 사용되었으며, 정자 주입 후 48시간째에 분할 양상에 따라 그룹을 나누어 배양한 결과, 4세포기 군과 5~8세포기 군에서 주머니배의 형성이 유의적으로 높음을 나타냈다($p<0.05$). 정자 주입 후 7일째 주머니배가 형성된 배아에서는 2일째의 분할 양상과 관련 없이 세포의 수가 비슷했으며, apoptosis의 빈도도 비슷하게 나타났다. 위의 결과를 종합하여 보면, 돼지 체외 수정 배아에서는 초기의 분할 양상이 빠른 배아의 주머니배로의 발달률이 높다. 그리고 초기의 분할 양상은 정상 발달된 주머니배에서 일어나는 apoptosis에는 영향을 주지 않았다. 그러나 보다 정확한 배아의 발달과 분할 양상의 관계를 알아보기 위해서는 발생 초기부터 배아의 분할 양상을 관찰하고 배아의 성장 단계를 추적 조사해야 할 것으로 사료되며, 정상 발달 주머니배뿐만 아니라 발달이 정지된 배아의 apoptosis의 양상과 빈도를 파악해야 할 것이다.

참고문헌

- Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokott M and Cohen J. 2000. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture *in vitro*. Hum. Reprod. 15:2634-2643.
- Bavister B, Boatman D and Leibfried M. 1983. Fertilization and cleavage of rhesus monkey oocytes *in vitro*. Biol. Reprod. 28:983-999.
- Bernardi ML and Delouis C. 1996. Sex related differences in the developmental rate of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized ovine embryos. Hum. Reprod. 11:621-626.
- Comizzoli P, Marquant-Le Guienne B, Heyman Y and Renard JP. 2000. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1 phase in bovine zygotes. Biol. Reprod. 62:1677-1684.
- Grisart B, Massip A and Dessy F. 1994. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum free oviduct conditioned medium. J. Reprod. Fertil. 101:257-264.
- Hong JY, Yong HY, Lee BC, Hwang WS, Lim JM and Lee ES. 2004. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. Theriogenology 62:1473-1482.

Table 3. Cell numbers and apoptotic cell rate in blastocysts derived from each classified groups

Cleavage assessment at day 2	No. of blastocysts	No. of nuclei (mean±SEM)	Apoptotic cell rate (%±SEM)
2-cell	2	56.00±6.00	3.80±2.19
4-cell	11	69.54±4.12	2.45±0.74
5- to 8-cell	11	64.36±4.54	3.08±0.92
Fragmentation	4	65.14±1.65	2.30±1.15

- Isom SC, Prather RS and Rucker EB. 2007. Heat stress-induced apoptosis in porcine *in vivo* fertilized and parthenogenetic preimplantation-stage embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 74:574-581.
- Li HJ, Liu DJ, Cang M, Wang LM, Jin MZ, Ma YZ and Shorqan B. 2008. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* In press.
- Loneragan P, Khatir H and Piumi F. 1999a. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117:159-167.
- Loneragan P, O'Kearney-Flynn M and Boland M. 1999b. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology* 51:1565-1576.
- McKiernan S and Bavister B. 1994. Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum. Reprod.* 9:2123-2129.
- McLaren A and Bowman P. 1973. Genetic effects on the timing of early development in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30:491-498.
- Scharbronath J and Gartner K. 1998. Paternal influence on timing of pronuclear DNA synthesis in naturally ovulated and fertilized mouse eggs. *Biol. Reprod.* 38:744-749.
- Shapiro B, Richter K and Harris D. 2000. Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of a subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil. Steril.* 73:582-586.
- Totey S, Daliri M and Rao K. 1996. Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell numbers and sex ratios in buffalo embryos generated *in vitro*. *Theriogenology* 45:521-533.
- Wang WH, Abeydeera LR, Han YM, Prather RS and Day BN. 1999. Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.* 60:1020-1028.
- Wyllie AH, Kerr JF and Currie AR. 1980. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW and Oh KS. 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* 13:998-1002.
- Yoo JH, Kim MS, Yang HW, Choi KW, Hwang KJ, Kwon HC and Oh KS. 1998. Effects of low oxygen condition on the development of mouse embryos cultured *in vitro*. *Biol. Reprod.* 58(suppl):94.
- Ziebe S, Peterson K, Lindenberg S, Anderson AG, Gabrielsen A and Andersen A. 1997. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after *in vitro* fertilization. *Hum. Reprod.* 12:1545-1549.

(접수일: 2009. 2. 22 / 채택일: 2009. 3. 10)