

## 착상 전 돼지 체외수정 배아 발달 단계에서의 세포 자멸사 현상

홍성민, 전유별, 현상환\*  
충북대학교 수의과대학

### Apoptosis Event of Pre-implantation Development Stages in Porcine IVF Embryos

Seong-Min Hong, Yu-Byeol Jeon and Sang-Hwan Hyun\*

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

#### ABSTRACT

In this study, we aimed to determine whether the evaluated markers of cell death could be found at particular developmental stages of normal porcine *in vitro* fertilization (IVF) embryos. We investigated the characteristics of spontaneous and induced apoptosis during preimplantation development stages of porcine IVF embryos. In experiment 1, to induce apoptosis of porcine IVF embryos, porcine IVF embryos at 22h post insemination were treated at different concentration of actinomycin D (0, 5, 50 and 500 ng/ml in NCSU medium). Treated embryos were incubated at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> for 8h, and then washed to NCSU medium and incubated until blastocyst (BL) stage. We examined cleavage rate at 2days and BL development rate at 7days after *in vitro* culture. A significantly lower rate of cleavage was found in the 500 ng/ml group compared to others (500 ng/ml vs. 0, 5, 50 ng/ml; 27.8 % vs. 50.0%, 41.2%, 35.9%), and BL formation rate in 500 ng/ml was lower than that of others (500 ng/ml vs. 0, 5, 50 ng/ml; 8.0% vs. 12.6%, 11.2%, 12.6%). In experiment 2, to evaluate apoptotic cells, we conducted TUNEL assay based on morphological assessment of nuclei and on detection of specific DNA degradation under fluorescence microscope. This result showed that apoptosis is a normal event during preimplantation development in control group (0 ng/ml actinomycin D). A high number of BL derived control group contained at least one apoptotic cell. Actinomycin D treated BLs responded to the presence of apoptotic inductor by significant decrease in the average number of blastomeres and increase in the incidence of apoptotic cell death. In 500 ng/ml group, the incidence of apoptosis increased at 4-cell stage and later. This result suggested that apoptosis is a process of normal embryonic development and actinomycin D is useful tool for the apoptosis study of porcine preimplantation embryos.

(Key words : actinomycin D, apoptosis event, porcine IVF)

#### 서 론

형질전환 기법을 이용한 복제동물 생산 분야 중 돼지 배아를 이용한 연구는 최신 생명공학분야에서의 유용성이 인정된다. 특히, 생체(*in vivo*) 유래 배아 수준과 동일한 배아 발달을 유도하기 위해서 체외성숙, 체외수정 및 체외배양 과정을 통한 시험관내(*in vitro*) 수정배아 생산 기법이 많은 연구자들에게 의해 수행되고 있다. 이러한 배경으로, 최근 착상 전 배아단계에서의 세포자멸사(apoptosis)의 기전연구가 주목되고 있다. 세포자멸사는 발생 단계에서부터 세포가 사멸되는 유전자로 프로그래밍화(Programmed cell death, PCD) 되어 세포가 스스로 사멸하며, 형태학적으로 세포질의 응축(condensation)과 염색

질이 핵막으로부터 재배치되는 특징이 있다. 그리고 생화학적 인 특징은 염색체 기본 단위에서의 DNA의 분열(fragmentation)이 대표적이다. 이러한 세포자멸사는 염색체 수준에서 결합 있는 세포의 일부분을 제거함으로써, 그 후에 배아가 정상적인 발달을 할 수 있도록 도와주는 역할을 한다. 그 예로 배반포 형성 과정에서 내세포외의 세포들 중 영양막세포 능력 있는 일부 비정상적인 세포를 제거하는 것을 포함한다(Pierce 등, 1989). 이렇게 세포자멸사는 발생학적 유용한 기능을 수행 하지만 착상 전 배아를 평가하는 척도인 전체 세포수와 DNA 분열에 부정적인 영향을 주기 때문에 배아 발달에 있어 유해한 요소로 보는 관점이 일반적이다.

세포자멸사는 마우스, 인간 및 소 등을 포함한 많은 동물의

\* 본 연구는 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

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

배반포 형성 단계에서 발생한다고 알려지고 있으며, 형태학적으로 양질의 배반포에서도 세포자멸사 세포(apoptotic cell)가 발견된다고 알려져 있다(El-Shershaby 등, 1974; Copp, 1978; Mohr와 Trounson, 1982; Handyside와 Hunter, 1986; Hardy 등, 1989; Plante와 King, 1994; Hardy, 1999). 또한, 생체유래 배아에서도 세포자멸사가 발생하며, 자궁내의 온도를 높이는 heat stress는 배아 발달에 해로운 효과를 일으킨다고 보고된 바 있다(Thatcher와 Hansen, 1993). 세포자멸사는 배반포의 전체 세포수를 감소시키고 DNA 분열과 관련이 있는 바, 시험관내 및 생체내 돼지수정 배아 발달에서 세포자멸사 조절기전 연구의 필요성이 제기된 바 있다(Juriscova, 1998). 세포자멸사 기전 연구를 위하여, 마우스의 경우, 착상 전 배아 단계에서 actinomycin D 처리 또는 heat stress 처리를 통하여 인위적으로 세포자멸사를 유도한 바 있다(Isom 등, 2007; Fabian 등, 2007b). 따라서, 본 연구의 목적은 돼지의 착상 전 배아 단계에서 actinomycin D 처리를 통하여 인위적 세포자멸사 현상을 유도하여 자연적인 배아 발달에서의 세포자멸사 현상과 비교하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 체외성숙

도축장 유래의 미경산돼지의 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 TCM199에 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. 성숙배양 배지 0.5 ml가 들어있는 4-well dish의 각 well에 50개의 미성숙난모세포를 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 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 세정 하였다. 최종 정자 농도가 2×10<sup>7</sup> sperm/ml가 되도록 2 mM caffeine이 첨가된 mTBM으로 재부유하였다. 0.1%(w/v) hyaluronidase으로 난구세포를 제거한 난모세포 중 제1극체가 보

이는 성숙 난모세포를 선별하여 체외수정에 사용하였다. 사전 처리된 정자를 50 ul인 수정-배양액 미소적에 20개의 난자를 넣고 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 6시간 동안 체외수정 하였다. 체외배양 배지는 North Carolina State University-23 (NCSU-23) 배지를 사용하였다. 체외수정 종료 후, 25 ul 용량의 배양액 미소적에 수정배아 10개씩 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 및 90% N<sub>2</sub>의 인큐베이터에서 배양하였다.

### 3. 세포자멸사 유도

Actinomycin D가 첨가되지 않은 NCSU 배양액과 Actinomycin D가 농도별로 첨가된 5 ng/ml, 50 ng/ml, 500 ng/ml 배양액을 준비하여 처리하였다. 배양 16시간 이후, 배양한 수정 배아를 수집하여, 옮긴 후 8시간 동안 CO<sub>2</sub>, 5%, O<sub>2</sub> 및 5% 배양기에서 추가 배양하였다. 8시간 이후, 3회 세정 후 각 그룹의 수정배아를 NCSU 배지로 옮긴 후 24시간 동안 배양한 후 분할율을 검사하였다. 분할율은 그룹별로 1 cell, 2 cell, 4 cell, 8 cell, fragmentation으로 분류하여 2 cell, 4 cell, 8 cell 수를 총수로 나누어 계산한다. 체외배양 후 4일째에는 각 그룹에 FBS를 3 ul씩 첨가하였다. 체외배양 7일째에는 배반포의 수를 총수로 나누어 배반포 형성율을 계산하였다.

### 4. TUNEL Assay

배반포에서 세포자멸사 발현 정도를 검사하기 위한 전처리로 각 배반포를 0.1% BSA가 함유된 PBS로 3회 세정하였다. 상온에서 돼지 체외수정 배아를 3.7% paraformaldehyde(DC chemical CO. 010817) 포함된 PBS에서 30분간 고정처리 하였다. 배반포에서 세포자멸사 발현 정도는 TUNEL assay(in situ cell death detection kit, TMR red, Roche, 12156792910)를 이용하여 분석하였다.

### 5. 자료 처리 및 분석

본 연구의 각 실험군별 분할율, 배반포 형성율 및 세포자멸사 빈도율을 SPSS program의 ANOVA를 이용하여 통계학적 유의성( $p < 0.05$ )을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

최근 많은 연구자들이 다양한 기법으로 돼지난자를 이용한 수정배아를 생산하고 있다. 공통적인 관심사는 착상 전 배아 발달율이 높은 양질의 수정배아를 얻는 것이며, 관련 기전 연구 분야로서 체외배양 조건에서 착상 전 배아의 세포자멸사 연구가 필요한 배경이다. 또한, 현재 착상 전 돼지배아의 정상적인 발달 과정에서 세포자멸사에 대한 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 돼지 체외수정기법으로 생산된 착상 전 배아의 발달 과정에서 세포자멸사 유도 여부를 관찰

하고, 자연발생적 세포자멸사와 actinomycin D를 이용한 인위적 세포자멸사 현상의 특징을 조사하였다. 돼지체외수정의 경우, 다정자수정되는 경우가 많기 때문에, 기본적인 돼지체외수정의 수정율에 대한 고찰이 우선되어야 한다. 따라서, 본 실험에 수행된 돼지체외수정의 수정 및 전핵형성 결과로서, 총 수정율은 72.1%이며, 그 중 정상 수정율(2PN)은 59%이며, 다정자수정율(3PN과 4PN)은 41%의 결과를 보였다(Table 1). 이러한 결과는 다른 연구자의 돼지체외수정배아의 수정을 보고 (Yamanaka 등, 2009)와 동일한 결과로서, 본 실험의 비교군으로서 적합하다는 것을 시사한다.

Actinomycin D는 DNA 이중나선에 결합하여 RNA 합성을 억제하는 항생제이다. 이러한 기전으로, 마우스 및 소의 착상 전 배아에서 세포자멸사를 인위적으로 유도한 바 있다(Pivko 등, 2002; Fabian 등, 2007a). 인위적 세포자멸사 유도 실험을 위하여 actinomycin D가 첨가되지 않은 NCSU 배양액과 actinomycin D가 농도별로 첨가된 5 ng/ml, 50 ng/ml 및 500 ng/ml을 각 처리한 결과, 체외배양 48시간째, 500 ng/ml actinomycin D 처리군의 배아 분할율(27.8%)이 다른 처리군에 비하여 유의적( $p < 0.05$ )으로 낮은 결과를 보였다(Table 2). 체외배양 7일째, 배반포 형성율에서는 유의적 차이는 없었으나, 500 ng/ml actinomycin D 처리군에서의 배반포 형성율(8.0%)

이 다른 처리군에 비하여 평균값이 낮음을 보였다. 따라서, 인위적 세포자멸사 유도 분석을 위하여, 500 ng/ml actinomycin D 처리군에서의 TUNEL 분석을 시도하였다(Fig. 1과 Table 3).

본 연구를 통해 정상적인 배아 발달 과정에서의 세포자멸사 현상과 자연발생적 세포자멸사 현상에 대한 비교분석도 세포자멸사의 발생 양상을 분석하는데 목적이 있다. 체외배양 7일째, 배반포 형성 결과(Table 3.), 500 ng/ml actinomycin D 처리군이 0 ng/ml 처리군보다 전체 세포수는 현저하게 적었고 세포자멸사 세포수는 비교적 증가하여 전체적으로 세포자멸사 비율이 높았다. 착상 전 배아 발달과정 중, 자연발생

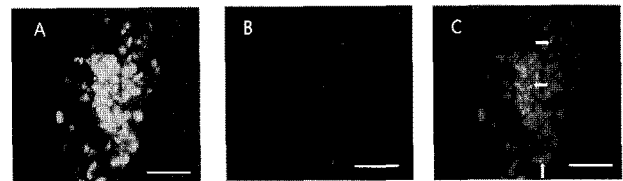


Fig. 1. TUNEL assay of porcine IVF blastocyst. A: Nuclear labeling with Hoechst (X 200). B: TUNEL labeling with TMR red showing apoptotic cells (X 200) C: Merged image of A and B. apoptotic nuclei are marked by arrows (X 200). Bars=100  $\mu$ m.

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

Rep.	Total examined	Penetrated (% $\pm$ SEM)	PN (% $\pm$ SEM)			No.spermatozoa in penetrated oocyte (mean $\pm$ SEM)
			2PN	3PN	4PN	
6	250	72.14 $\pm$ 13.3	59.2 $\pm$ 2.88	29 $\pm$ 2.4	11.9 $\pm$ 2.0	1.52 $\pm$ 0.05

Table 2. Cleavage assessment at day 2 and blastocyst development at day 7 after treated with actinomycin D

Concentration of actinomycin D (ng/ml)	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved (% $\pm$ SEM)	No. of blastocysts (% $\pm$ SEM)
0	254	127 (50.0 $\pm$ 5.0) <sup>a</sup>	32 (12.6 $\pm$ 6.0)
5	170	70 (41.2 $\pm$ 6.9) <sup>a</sup>	19 (11.2 $\pm$ 9.4)
50	167	60 (35.9 $\pm$ 10.7) <sup>a,b</sup>	21 (12.6 $\pm$ 8.2)
500	212	59 (27.8 $\pm$ 3.8) <sup>b</sup>	17 ( 8.0 $\pm$ 4.2)

Within the same column, values with different letters (<sup>a,b</sup>) were significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 3. Cell numbers and apoptotic cell rate in blastocysts after treated with actinomycin D

Concentration of actinomycin D (ng/ml)	No. of blastocyst	No. of nuclei	No. of apoptotic cell	Apoptotic cell rate (%)
0	4	307	11	2.9
500	4	222	14	6.3

적으로 나타나는 세포자멸사는 배반포에서 쉽게 관찰할 수 있었으며, 배반포에서는 내세포괴로부터 영양막세포를 포함하고 있는 일부 비정상적 세포를 제거하는 과정이 일어나므로 TUNEL assay를 통해 세포자멸사를 관찰할 수 있었다(Pierce 등, 1989). 또한, 개코원숭이의 배아의 경우에도 착상 전 배아 발생 과정 중 배반포 단계에서 내세포괴 및 영양막세포 분화 과정 중 내세포괴의 일부 세포는 영양막세포의 변형 과정임을 보고한 바 있다(Enders 등, 1990).

하나의 배반포에서 최소 하나의 세포자멸사 세포가 발견되었으며, 세포자멸성 할구에서는 핵이 분할되고 수축된 형태로, 핵막에서는 DNA가 분해된 물질들의 존재를 TUNEL assay를 통해 확인할 수 있었다(Fig. 1C). 자연 상태에서 유발되는 세포자멸사의 양상과 비교하기 위하여, 착상 전 배아 발달 단계중 1세포기와 2세포기로 분화하는 초기 단계가 외부 자극에 민감하게 영향을 받을 것으로 사료되어, 수정 후 22시간째 8시간 동안 actinomycin D를 처리하였다. 수정 후 48시간째 분할율을 관찰한 결과, 500 ng/ml actinomycin D 처리군에서 분할율이 유의적으로 낮았는데, 이는 2세포기, 4세포기 및 8세포기로 분화한 배아들의 비율이 낮고, DNA 분열의 빈도가 증가하였음을 의미한다. 수정 후 168시간째, 배반포 형성율을 관찰한 결과, 4개의 그룹 간에 유의차는 없었지만, 500 ng/ml actinomycin D 처리군의 배반포의 형성 비율이 다른 처리군에 비해 낮았다. TUNEL assay는 0 ng/ml actinomycin D 처리군과 500 ng/ml actinomycin D 처리군의 2세포기, 4세포기, 8세포기 및 배반포 단계에서 실시하였으며, 2세포기, 4세포기 및 8세포기에서는 두 처리군, 모두 세포자멸사가 일어난 세포들이 관찰되지 않았다. 이는 돼지 체외수정 배아에서 세포자멸사의 발현은 수정 후 5일째에 나타나며, 4세포기에서 8세포기 단계에서 세포자멸사의 억제가 일어난다는 보고와 일치한다(Hao 등, 2003). 그리고 포유동물의 배아에서는 생식세포가 수정되어 재조합된 유전자의 활성화 단계(embryonic genome activation, EGA)가 발생한 후에 세포자멸사의 발현이 나타난다고 알려져 있는데, 각 동물마다 EGA의 발생 시기는 다양하고 사람과 돼지의 경우는 4세포기에서 8세포기 단계로 알려져 있다(Braude 등, 1988).

위의 결과를 종합해 보면 actinomycin D는 돼지의 초기 배아 발달 과정에서 인위적으로 세포자멸사를 유발할 수 있으며, 배아의 분할이 정상적으로 일어나는 것을 방해하고 배반포 단계까지 발달하여도, 세포자멸사가 유발된 세포들이 보다 많이 포함되어, 착상 전 배아의 발달 단계에서의 세포자멸사 연구 모델로 가능성을 시사한다. 앞으로 보다 심도있는 세포자멸사 연구를 수행하기 위해서는 우수한 난자의 수를 보다 많이 확보하여 통계적 분석이 용이하도록 해야 하며, 더 나아가서는 세포자멸사의 발생 기전 관련 기초 기전 연구를 진행하여야 할 것이다.

## 결론

본 실험에서는 체외수정 기법으로 생산한 정상적인 돼지 배아의 발달 과정에서 발생하는 세포자멸사를 관찰하기 위하여, 자연발생적 세포자멸사와 인위적으로 유도한 세포자멸사의 양상을 조사하였다. 세포자멸사를 유도하기 위해 수정 후 22시간째 서로 다른 농도의 actinomycin D를 처리하였다. 2일째 분할율과 7일째 배반포 형성율을 각각 관찰한 결과, 2일째에 500 ng/ml actinomycin D 처리군이 다른 처리군보다 분할율이 유의적으로 낮음을 보였다. 7일째 배반포 형성율에서는 500 ng/ml actinomycin D 처리군이 다른 처리군에 비하여, 배반포 형성율이 저조한 결과로 평가되었다. 2세포기, 4세포기, 8세포기 및 배반포 단계에서의 세포자멸사를 평가하기 위해 TUNEL assay를 시행하였으며, 0 ng/ml 처리군의 배반포에서도 최소한 하나 이상의 세포자멸사 세포를 보임으로 세포자멸사는 착상 전 배아의 단계에서 나타나는 정상적인 과정으로 이해할 수 있었다. 또한, 500 ng/ml actinomycin D 처리군의 배반포는 세포수의 감소와 세포자멸사 비율이 증가하였다. 위의 결과를 종합하여 보면 체외수정 기법으로 생산된 돼지 배아의 착상 전 발달 단계에서 세포자멸사는 정상적으로 발생하는 과정 중 하나이며, actinomycin D는 세포자멸사 현상을 연구하기 위한 유용한 도구임을 시사한다.

## 참고문헌

- Braude P, Bolton V and Moore S. 1988. Human gene expression first occurs between the four and eight cell stages of preimplantation development. *Nature* 332:459-461.
- Copp AJ. 1978. Interaction between inner cell mass and trophoblast of the mouse blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 48:109-125.
- El-Shershaby AM and Hinchliffe JR. 1974. Cell redundancy in the zonaintact preimplantation mouse blastocyst: A light and electron microscope study of dead cells and their fate. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 31:643-654.
- Enders AC, Lantz KC and Schlafke S. 1990. Differentiation of the inner cell mass of the baboon blastocyst. *Anat. Rec.* 226:237-248.
- Fabian D, Juhás S, Il'ková G and Koppel J. 2007a. Dose- and time-dependent effects of TNF $\alpha$  and actinomycin D on cell death incidence and embryo growth in mouse blastocysts. *Zygote* 15:241-249.
- Fabian D, Makarevich AV, Chrenek P, Bukovska A and Koppel J. 2007b. Chronological appearance of spontaneous and induced apoptosis during preimplantation development of

- rabbit and mouse embryos. *Theriogenology* 68:1271-1281
- Handyside AH and Hunter S. 1986. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roux's Arch Dev. Biol.* 195:519-526.
- Hao Y, Lai L, Mao J, Im G-S, Bonk A and Prather RS. 2003. Apoptosis and *in vitro* development of preimplantation porcine embryos derived *in vitro* or by nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 69:501-507.
- Hardy K, Handyside AH and Winston RML. 1989. The human blastocyst: Cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. *Development* 107: 597-604.
- Hardy K. 1999. Apoptosis in the human embryo. *Rev. Reprod.* 4:125-134.
- 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.
- Isom SC, Prather RS and Rucker EB 3rd. 2007. Heat stress-induced apoptosis in porcine *in vitro* fertilized and parthenogenetic preimplantation-stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 74:574-581.
- Juriscicova A, Latham KE, Casper RF and Varmuza SL. 1998. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 51:243-253.
- Mohr LR and Trounson AO. 1982. Comparative ultrastructure of hatched human, mouse and bovine blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* 66:499-504.
- Pierce GB, Lewellyn AL and Parchment RE. 1989. Mechanism of programmed cell death in the blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3654-3658.
- Pivko J, Grafanau P and Kubovicová E. 2002. Bovine abnormal preimplantation embryos: analysis of segregated cells occurring in the subzonal space and/or blastocoele cavity for their nuclear morphology and persistence of RNA synthesis. *Zygote* 10:141-147.
- Plante L and King WA. 1994. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 11:515-529.
- Thatcher WW and Hansen PJ. 1993. Environment and reproduction. In King GJ, editor. *Reproduction in Domesticated Animals*. Amsterdam: Elsevier World Animal Science Series. pp 433-457.
- Yamanaka K, Sugimura S, Wakai T, Kawahara M and Sato E. 2009. Difference in sensitivity to culture condition between *in vitro* fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos in pigs. *J Reprod Dev.* 55:299-304.

---

(접수일: 2009. 8. 28 / 채택일: 2009. 9. 8)