

돼지수정란의 Compaction 양상에 따른 착상전 배발달 양상

구덕본, 민성훈, 박흠대*
 대구대학교 공과대학 생명공학과

Preimplantation Developmental Ability of Pig Embryos according to Embryonic Compaction Patterns

Deog-Bon Koo, Sung-Hun Min and Humdai Park*

Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea,

ABSTRACT

Embryonic compaction is essential for normal preimplantation development in mammals. The present study was to investigate the effects of compaction patterns on developmental competence of pig embryos. The proportion of blastocyst formation derived from compacted morula was higher than those of compacting and pre-compacting morula ($P<0.01$). Nuclei numbers of inner cell mass (ICM), trophoctoderm (TE), and total of blastocysts derived from compacted group were also superior to those of compacting and pre-compacting groups ($P<0.05$). Then, compaction patterns, developmental ability and structural integrity were compared between mono- and poly-spermic embryos. The rate of compacted morula in mono-spermic embryos was higher than that of poly-spermic embryos ($P<0.05$). Especially, the rate of blastocyst formation derived from compacted embryos in mono-spermic embryo group was higher than that of poly-spermic embryo group ($P<0.05$), although no difference was detected between the two groups in the structural integrity. Finally, we confirmed that beta-catenin was differentially expressed according to compaction patterns in morula and blastocyst stage embryos. In conclusion, our results suggest that the compaction patterns during preimplantation development play a direct role in developmetal competence and quality of pig embryos.

(Key words : compaction, polyspermy, embryo development, ICM, TE, pig)

서 론

돼지 수정란을 체외에서 배양하여 착상 전 단계인 배반포까지 발달을 유지할 수 있는 다양한 배양 체계가 구축되어 있지만, 배반포까지의 배발생 및 질적 수준은 여전히 저조한 실정이다(Machaty 등, 1998; Kim 등, 2010). 이러한 원인은 난포란의 불완전한 체외성숙으로 체외수정 시 높은 다정자 침입율과 배발생 과정에서 compaction이 비정상적으로 일어나기 때문이라고 보고되고 있다(Han 등, 1999a).

배발달 과정에 있어서 할구들의 compaction은 포유동물 배발생에 있어서 분화와 밀접한 관련이 있으며, 돼지에서는 8세포기 이후 상실배 단계에서 일어나고, 내세포괴(inner cell mass, ICM)과 영양막세포(trophoctoderm, TE)로의 운명이 결정되는 시기라고 할 수 있다. Compaction 이전의 할구들은 둥근 형태를 이루고 있으며, 각 할구들 사이의 연결복합체(junctional complexes)의 결합이 느슨하다. 그러나 compaction 동안에는 평평한 형태로 바뀌고 세포들간의 결합이 최대화되며, 세포들 간

의 경계가 구분하기 어려울 정도로 변경된다(Butz와 Larue, 1995). Compaction을 위한 세포 구성 성분은 compaction 이전 수정란에 존재하지만 8-16 세포기 수정란 단계까지는 세포 접착을 위한 복합체 형성이 이루어지지 않는다. 또한, compaction 과정에서 일어나는 세포의 접착은 protein kinase C(PKC)에 의하여 활성화된다고 보고하였다(Winkel 등, 1990). 이러한 compaction은 배반포 형성 즉, ICM과 TE 분화에 있어서 중요한 영향을 미친다고 보고되었다(Giles와 Foote, 1995). 결론적으로 compaction의 과정은 할구의 특별한 운명을 시작하는 준비 단계이고, 유사 분열을 한 후 수정란은 두 가지 세포로 분화가 이루어진다(Johnson과 Ziomek, 1981). 즉, 세포의 바깥 부분은 태반의 구조를 형성하는 TE로 발달하게 되며, 안쪽에 있는 할구는 ICM를 형성한다는 “inside- outside”가설이 제기된 바 있다(Tam과 Behringer, 1997).

돼지의 경우, 체외수정 시 다정자 침입 발생율은 일반적으로 20~50% 정도까지 나타난다(Wang 등, 1991). 다정자 침입 수정란의 배반포 발달율은 정상 수정란과 비교하여 보면 유사한

* 본 연구는 2009학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

* Correspondence : E-mail : humdai@daegu.ac.kr

양상을 보여주고 있으나, 착상 전 배반포의 질적 수준의 지표가 되는 ICM과 TE 세포수 비율, 즉, ICM 세포수가 현저히 줄어 든다는 것을 보고하였다(Han 등, 1999a). 따라서 돼지 수정란에서 다정자 침입에 따른 compaction 양상, 배발달 양상 및 배반포의 질적 수준에 대한 연구가 보다 체계적으로 이루어져야 한다.

수정란의 발달 과정에서 상실배 시기에 세포 접착과 관련된 단백질의 발현 양상은 compaction과 밀접한 상관관계를 가지고 있다. 이들 단백질 중 beta-catenin은 세포간의 접착, 신호전달, 발달상의 특정한 운명을 포함하는 다기능 단백질로 알려져 있다(Miller와 McClay, 1997; Moon과 Kimelman, 1998). 이러한 beta-catenin은 세포접착에 있어서 매우 중요하며, 8-16 세포기 이후 수정란의 compaction에 결정적인 역할을 한다. 또한, beta-catenin은 소 난자에 있어서 2-4세포기에 검출되다가 8-16세포기에 사라졌다가 배반포 단계에서 다시 나타나고, 모계의 beta-catenin의 역할은 착상 전 배아 발달 동안 중요한 역할을 한다(Nganvongpanit 등, 2006).

본 연구에서는 돼지수정란의 체외발달 시 분할 단계에 따른 compaction 정도와 compaction 양상에 따른 배반포 발달을 조사하고, 정상과 다정자 침입 수정란에 있어서 compaction 양상, 배발달 및 질적 수준을 비교 조사하였다. 또한, compaction 양상에 따른 beta-catenin 발현 정도를 상실배 및 배반포 단계에서 차이점을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 배양액

본 논문에 언급하지 않은 모든 시약은 Sigma Aldrich Korea(Yongin, Korea)에서 구입하였다. 난자 성숙 배양액은 North Carolina State University(NCSU) 23 배양액(Petters와 Wells, 1993)에 0.6 mM cysteine, 10 ng/ml epidermal growth factor, 10 IU/ml eCG, 10 IU/ml hCG와 10% 난포액(Funahashi와 Day, 1993; Niwa, 1993)을 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 난소에서 직경이 3~6 mm 정도의 난포로부터 채취하였으며, 채취한 난포액은 4°C에서 30분간 1,600×g로 원심분리 후 0.45 μm syringe filters(Gelman Sciences, Ann Arbor, MI)를 이용하여 filter하였으며, 사용시까지 -20°C에서 보관하였다. 체외수정은 113.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂ · 2H₂O, 20 mM Tris(crystallized free base; Fisher Scientific, NJ, USA), 11 mM glucose, 5 mM sodium pyruvate 및 25 μg/ml gentamycin이 함유된 modified Tris-buffered medium(mTBM)을 사용하였다. 수정란의 체외 배양액은 NCSU 23 용액에 4 mg/ml BSA(fatty acid free)가 첨가된 것을 사용하였다.

2. 체외성숙, 수정 및 배양

도축장에서 도살된 경산돈 난소를 회수하여 75 μg/ml pe-

nicillin G와 50 μg/ml streptomycin를 첨가된 생리식염수 용액에 25~30°C의 온도를 유지하여 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 난소는 멸균된 37°C 생리식염수를 가지고 두 번 세척하였다. 난포란은 직경이 3~6 mm의 난포로부터 18 개 이치 주사바늘이 부착된 주사기로 흡입한 후 실체 현미경 하에서 회수하였다. 회수한 난포란은 Tyrode's lactate(TL)-Hepes 용액(Prather 등, 1995)으로 3번 세척한 뒤 체외성숙 배양액으로 3회 세척하였다. 난포란(50개)은 500 μl 체외성숙 배양액이 함유된 4-well multidish(Nunc, Roskilde, Denmark)에서 39°C 온도와 5% CO₂ 조건하에서 22시간 동안 1차 배양하였으며, 2차로 난포란을 세척 후 eCG와 hCG가 첨가되지 않은 배양액에서 추가적으로 22시간 배양하였다. 체외수정을 위하여 냉장정액은 다비육중센터(Anseong, Korea)에서 매주 공급받았으며, 17°C 냉장고에서 최대 4일까지 보관하면서 사용하였다. 정액은 0.1% BSA, 75 μg/ml penicillin G 및 50 μg/ml streptomycin이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS) 용액에 1:1로 혼합한 후 300×g에서 3분간 원심분리를 통하여 3회 세척하였다. 세척이 완료된 정자를 대상으로 swim-up 방법을 통해 활력이 좋은 정자를 회수하여 체외수정에 이용하였다. 체외성숙이 완료된 난포란은 0.1% hyaluronidase가 첨가된 용액에 침지하여 피펫팅을 통해 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난자는 1 mM caffeine과 0.1% BSA가 첨가된 mTBM 용액에 3회 세척하였다. 체외수정용 용액 50 μl 소적에 난자 15개씩 넣은 후 정자의 최종 농도가 1.5×10⁵ 정자/ml가 되도록 정자를 주입하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 동안 체외수정을 유도하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 4 mg/ml BSA가 첨가된 NCSU-23 배양액과 PZM(porcine zygotes medium) 배양액(Yoshioka 등 2002) 50 μl 소적에 39°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 배양 60시간 후 분할율을 확인하였으며, 배양 144 시간 후 배반포 형성을 관찰하였다.

3. 정상 및 다정자 침입 수정란 구분

정상 및 다정자 침입 수정란의 구분은 Han 등(1999a)의 방법에 준하여 수행하였다. 체외수정 후 10시간째 수정란을 1 mg/ml BSA가 첨가된 TL-Hepes 용액에 투입하여 3,500×g 조건 하에서 원심분리를 실시하였다. 정상(2 pronuclei) 및 다정자(3 pronuclei) 침입 수정란은 200배 현미경과 미세조작기(Leitz, Wetzlar, Germany)를 이용하여 선별하였다(Fig. 1). 선별된 수정란은 별도의 군으로 나누어 compaction 양상, 배반포 발달 및 배반포에서 세포수를 비교 조사하였다.

4. 상실배 단계에서 Compaction 양상 구분

먼저 수정 후 4일째(96 h) 완전하게 compaction이 이루어진 군과 그렇지 않은 군으로 분류하여 배발달 양상을 조사하였으며, 이후 실험에서는 상실배 단계에서 좀 더 세분화된 com-

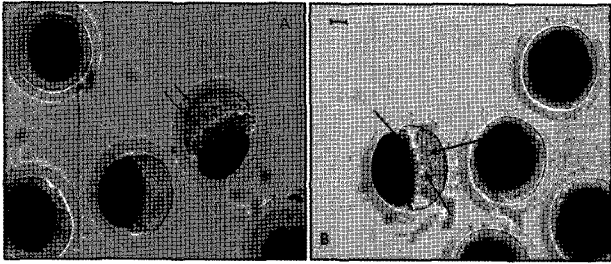


Fig. 1. Zygotes with different pronuclei were showed at 10 h after *in vitro* fertilization. (A) 2PN zygotes, (B) 3PN zygotes. Scale bar=50 μ m.

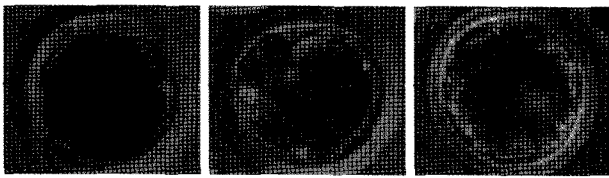


Fig. 2. Classification of compaction in the morula stage porcine embryos. (A) Compacted embryo, (B) Compacting embryo, (C) Pre-compacting embryo.

paction 양상을 Tao 등(2002)이 보고한 기준을 토대로 구분하였다. Table 1과 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이, 체외수정 후 4 일째(96 h) 수정란에서 compacted, compacting 및 pre-compacting 군으로 구분하여 실험에 공시하였다.

5. 배반포에서 이중 형광 염색

체외수정 후 6일째 배반포의 ICM과 TE 세포의 수를 이중 형광염색을 통해 확인하였다(Machaty 등, 1998). 먼저 배반포의 투명대를 0.5% protease 용액에서 1분간 처리하여 제거하였다. 투명대가 제거된 배반포를 1 mg/ml PVA가 포함된 TL-Hepes에서 세척 후 1:5로 희석된 rabbit anti-pig whole serum에 1시간 동안 처리하였다. 처리된 배반포는 TL-Hepes 용액으로 3회 세척 후 10 μ g/ml propidium iodide와 10 μ g/ml bisbenzimidazole가 함유된 guinea pig complement를 배양액과 1:10으로 희석된 용액에 1시간 동안 처리하였다. 최종적으로 TL-Hepes 용액에 3회 정도 세척 후 배반포를 slides glass에

올려놓은 다음 cover glass를 덮고 형광현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 UV하에서 관찰하였다.

6. Beta-Catenin 발현 분석

Compaction 양상에 따라 각각 10개의 상실배 및 배반포 단계의 수정란을 methanol-phosphate buffer를 1:1로 2분간 고정시킨 후, 2:1 비율로 -20°C 에서 2분간 고정시킨다. 고정된 수정란은 mouse beta-catenin 항체(Santa Cruz, CA)를 1:400으로 희석한 용액에 넣어 4°C 에서 24 시간 정도 처리한 후 1% BSA 함유된 PBS 용액에서 30분간 4회 세척을 실시하였다. 수정란은 FITC가 붙어있는 2차 항체 anti-mouse IgG(Santa Cruz, CA)를 1:250으로 희석한 용액에 넣고 30분간 처리한 후 세척용 용액으로 다시 30분간 세척 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

7. 통계학적 분석

본 연구에서 수행된 각각의 실험은 적어도 4회 이상 반복하였다. 수정란의 compaction 양상 및 발달율은 χ^2 검증 및 Student's *t*-test로 분석하였고, 배반포의 세포수는 SAS 프로그램의 General Linear Models을 이용하여 실시하였고, Duncan's multiple test를 이용하여 유의성을 검증하였다. 본 실험에서는 $P < 0.05$ 인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

1. Compaction 양상에 따른 돼지 수정란의 체외발달 및 배반포의 질적 수준 분석

포유동물 수정란의 발달 과정에 있어서 compaction은 세포 분화에 매우 중요한 역할을 한다(Tam과 Behringer, 1997). 돼지 수정란의 체외 발달 시 compaction 양상과 수준에 대한 연구는 미흡한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 체외에서 생산된 수정란에서 compaction 양상과 이에 따른 배발달을 그리고 배반포 단계에서 질적 수준을 조사하였으며, 정상 및 다정자 침입 수정란을 대상으로 상기와 같은 내용을 비교 조사하였다. 먼저 체외배양 체계와 compaction 양상에 따른 돼지 수정란의 발달을 비교한 결과는 Table 2에서 나타난 바와 같다. 배양 체계에 따른 상실배 단계에서 compacted morula와 pre-compacting morula의 비율은 유사한 것으로 나타났으며, 배반포

Table 1. Criteria for compaction patterns in morula stage of pig embryos

| Classification of blastomere undergoing compaction | Morphology of compacted embryo | Blastomere on Days 4 | Fragments |
|--|---|---------------------------------|-----------|
| Compacted | Full size. Close to sphere with smooth profile | Even-sized blastomere | <5% |
| Compacting | 2/3~3/4. Close to sphere with shallow indentation | May have slight size difference | <30% |
| Pre-compacting | <1/3 | May have severe size difference | <60% |

Table 2. *In vitro* development of porcine embryos according to compaction patterns

| Medium | No. of cleaved eggs | Compaction pattern | No. (%) of morula | No.(%) of embryos developed to | |
|---------|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------|
| | | | | Blastocyst (D 6) | Blastocyst (D 7) |
| NCSU-23 | 362 | Compacted | 53 (14.6) | 41 (77.4) ^a | 43 (81.1) ^a |
| | | Pre-compacting | 231 (63.8) | 84 (36.4) ^b | 95 (41.1) ^b |
| PZM-3 | 409 | Compacted | 77 (18.8) | 60 (77.9) ^a | 64 (83.1) ^a |
| | | Pre-compacting | 279 (68.2) | 124 (44.4) ^b | 140 (50.2) ^b |

^{a,b}Different superscripts within a column denote a significant difference ($p < 0.01$).

발달율에 있어서도 두 그룹 간에 유의차는 나타나지 않았다. 그러나, compaction 양상에 따른 각 그룹간에 배반포 발달율에 있어서는 NCSU-23에서 6일째 배반포 생성율에서 77.4%와 36.4%로 나타났으며, 7일째에서는 각각 81.1%와 41.1%로 나타났다. 결국 compaction 양상에 따른 배반포 발달율에 있어서는 상당한 차이가 있음을 확인할 수 있었다($P < 0.01$). PZM-3 배양액에서도 compaction 양상에 따른 6일째와 7일째 배반포 발달율은 각각 77.9%와 44.4% 그리고 83.1%와 50.2%로 NCSU-23 배양액과 유사한 결과를 보여주었다($P < 0.01$). 이러한 결과는 compaction이 비정상적으로 이루어진 수정란들이 배반포로 발달할 수 있는 가능성이 상당히 낮다는 것을 제시한다.

체외수정 후 60시간째 분할 단계에 있는 수정란을 조사한 결과, 주로 4 또는 8 세포기가 대부분을 차지하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 따라서 돼지 수정란의 분할 단계에 따른 compaction 양상 및 배발달 양상을 확인한 결과, 각각의 분할 단계의 수정란으로부터 compaction 양상이 4 또는 8 세포기 수정란에서는 유사한 비율로 나타났으며, 2 세포기에서는 pre-compacting의 비율이 compacted 또는 compacting 비율에 비해 현저히 높다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B, 72.8 vs 13.1, 14.1%, $P < 0.01$). 분할 단계의 수정란에서 배반포 발달율에 있어서 compaction 양상에 따른 결과는 2 세포기에서는 유사한 양상을 관찰하였으나, 4 세포기(24.1 vs 18.6, 9.6%) 또는 8 세포기(20.9 vs 12.3, 7.5%)에서는 compaction 양상에 따라 배반포 발달율에 현저한 차이가 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C, $P < 0.05$). 그러나 2 세포기(54.2 vs 50, 6.5%), 4 세포기(76.8 vs 58.6, 28.6%), 8 세포기(67.3 vs 48.9, 18.7%)에서 보여주는 것처럼 각 단계의 수정란에서 compaction 양상에 따른 배반포 발달율에 있어서는 현저한 차이가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3D, $P < 0.05$). 돼지 수정란에서 compaction 양상에 따라 발달한 배반포에서 ICM, TE 및 전체 세포수를 비교한 결과, compaction 양상에 따라 배반포의 세포수에 분명한 차이점을 확인할 수 있었다(ICM - 10.4 vs 6.8, 4.3; TE - 37.1 vs 30.4, 22.5; Total - 46.8 vs 36.7, 26.8; Fig. 3, $P < 0.05$). 이러한 결과는 완전한 compaction이 이루어진 수정란이 배반포로

의 발생율이 현저히 높고 세포수도 향상된다는 것을 직접적으로 제시하고 있다. 특히, 배반포에서 질적 수준의 판단 기준인 세포수에 있어서도 유의차가 나타남으로써 양질의 배반포를 생산하기 위해서는 우선적으로 compaction이 어느 정도의 수준으로 일어나야 한다는 것을 입증하고 있다. 비록 수정란의 발육이 각각의 수정란에 따라 차이가 있고, compaction이 일어나지 않은 수정란도 시간이 경과하면서 compaction이 일어날 수 있기 때문에 특정 시기에 한정해서 상관관계를 구체화하기는 어렵지만, 발달 과정에서 일반적으로 compaction이 가장 많이 일어나는 특정 시기에서 조사한 결과는 배반포로의 발달율과 질적 수준에 있어서는 연관성이 있는 것으로 판단된다. 따라서 각각의 수정란을 대상으로 compaction에 대한 구체적인 연구가 향후 이루어져야 할 것으로 판단된다.

2. 정상 및 다정자 침입 돼지 수정란의 분할 단계에 따른 compaction 양상, 배발달 및 배반포에서 질적 수준 분석

돼지 체외수정란의 배반포 발달율과 질적 수준이 저조한 원인 중 하나로 다정자 침입을 들 수 있다. 이러한 다정자 침입은 체외에서 수정된 돼지 수정란에서 최대 50%까지 나타나고 있다(Abeydeera와 Day, 1997). 정상 및 다정자 침입에 의한 수정란의 확인을 위한 원심분리와 현미경에서의 관찰 그리고 미세조작기 이용은 배반포 발달율에 있어서는 영향이 없음을 보여 주고 있다(Han 등, 1999a). 하지만 배반포에서의 ICM과 TE의 세포수 비율에 있어서 정상 수정된 수정란의 배반포에 비해 ICM의 세포수가 적다는 것이 보고되었다(Giles와 Foote, 1995). 본 연구에서는 정상 및 다정자 침입 돼지 수정란의 분할 단계에 따른 compaction 양상 및 배발달 양상을 조사하였고, 정상 및 다정자 침입 수정란 확인을 위한 원심분리와 현미경에서의 관찰 그리고 미세조작기 이용은 수정란 분할과 배반포 발생에 영향을 미치지 않았다(Fig. 5). 정상 및 다정자 침입 돼지 수정란에 있어서 60시간째에 분할 양상은 차이가 나타나지 않았다(Fig. 5A). 그러나 다정자 침입 돼지 수정란에 비해 정상 수정된 돼지 수정란에서 수정 후 4일째 4 세포기 단계에서 compacted 수정란의 비율이 높게 나타남

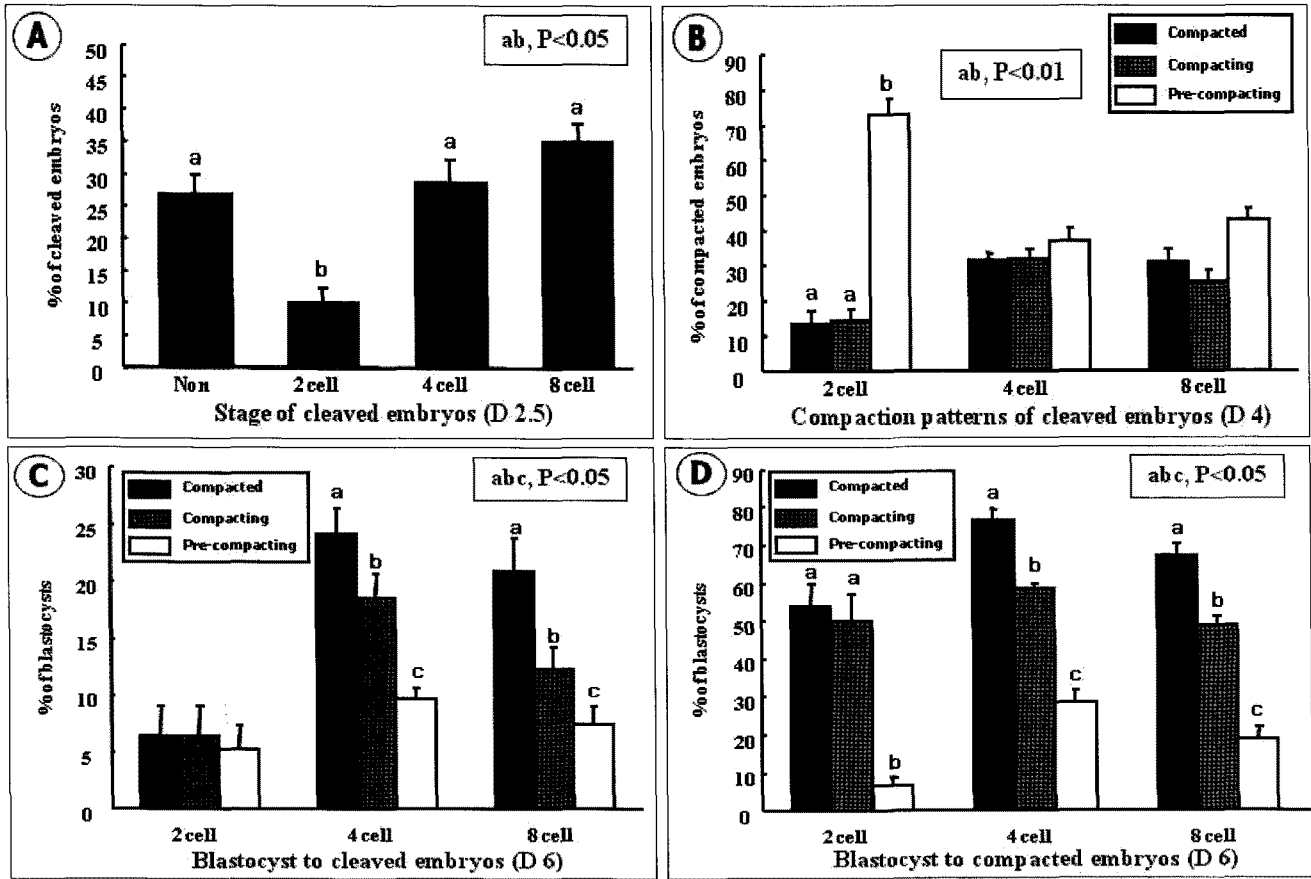


Fig. 3. Compaction patterns and embryonic development according to cleavage stage of porcine embryos. (A) Proportion of each cleaved embryos at Days 2.5 after *in vitro* fertilization. (B) Compaction patterns of cleaved embryos at Days 4 after *in vitro* fertilization. (C) Blastocyst formation derived from cleaved embryos according to compaction patterns. (D) The rate of blastocyst formation derived from compacted embryos in each cleavage stages.

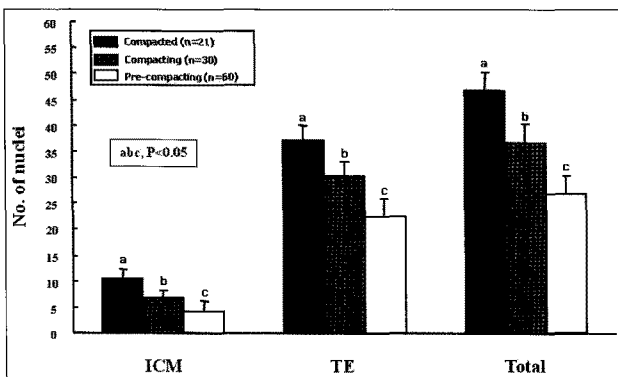


Fig. 4. Structural composition of porcine blastocysts derived from various compaction patterns.

을 확인할 수 있었다(Fig. 5B, 47.5 vs 22.9%, $P < 0.05$). 정상 수정란에서 compaction 양상에 따른 배반포 발달을 조사한 결과, 다정자 침입 수정란보다 현저히 높게 나타난다는 것을

알 수 있었다(Fig. 5C, 2 세포기-17.2 vs 2.5%; 4 세포기-35.4 vs 16.6%; 8 세포기-17.9 vs 2.5%, $P < 0.05$). 또한, compaction 양상에 따른 정상 및 다정자 침입 돼지 수정란에서의 배반포 발달을 확인한 결과, compacted 군에서 정상 수정란에서 배반포 발달이 다정자 침입 수정란의 배반포 발달보다 현저히 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 5D, 2 세포기-64.3 vs 25.0%; 4 세포기-73.2 vs 44.4%; 8 세포기-81.3 vs 25.0%, $P < 0.05$). 본 연구를 통해 다정자 침입 수정란과 정상 수정란으로부터 compaction 정도와 compaction이 완전하게 일어난 군 간에도 배반포의 차이점을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 다정자 침입이 수정란의 발생과정에서 compaction 양상에 영향을 미친다는 것을 제시한다. 즉, 다정자 침입에 따른 비정상적인 분할 (Han 등, 1999b)과 상관관계가 있을 것으로 판단된다.

정상 및 다정자 침입 돼지 수정란의 분할 단계 및 compaction 양상에 따른 배반포에서 ICM 및 TE-세포수를 비교 분석한 결과, 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 정상 및 다정자

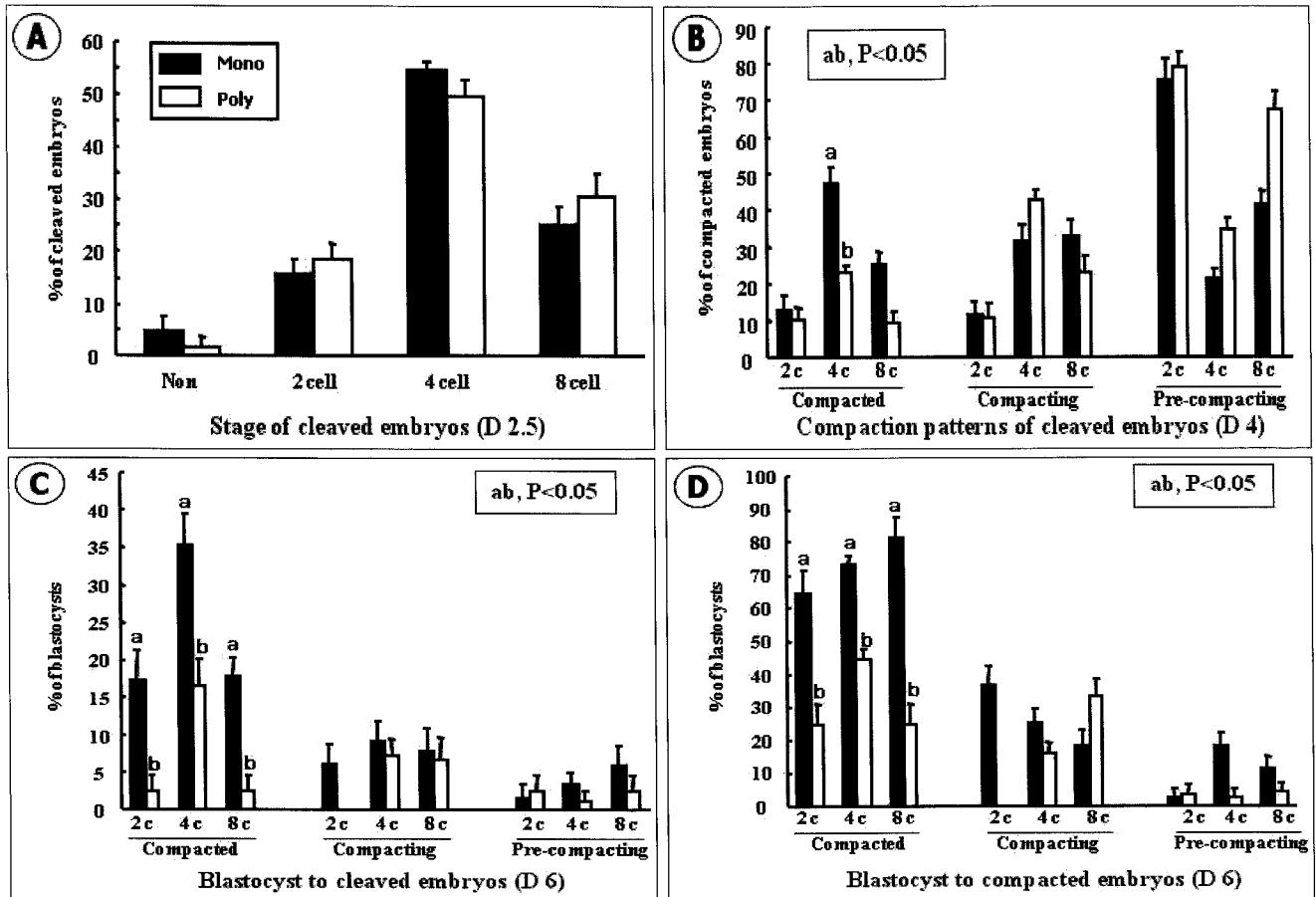


Fig. 5. Compaction patterns and embryonic development of mono- and poly-spermic porcine embryos according to cleavage stages. (A) Proportion of each cleaved embryos at Days 2.5 after *in vitro* fertilization. (B) Compaction patterns of cleaved embryos at Days 4 after *in vitro* fertilization. (C) Blastocyst formation derived from cleaved embryos according to compaction patterns. (D) The rate of blastocyst formation derived from compacted embryos in each cleavage stages.

침입 돼지 수정란의 분할 단계 및 compaction 양상에 따른 배반포에서의 전체 세포수 비교 분석 결과도 마찬가지로 차이가 없음을 알 수 있었다(Fig. 6). 비록 다정자 침입 수정란 유래 배반포에서 compaction 양상에 따른 질적인 측면에서의 차이는 나타나지 않았으나, 다정자 침입 돼지 수정란에서 완전한 compaction의 비율이 저조하며, 배반포 발달에도 상당한 영향을 주는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 돼지 체외수정 시 빈번히 일어나는 다정자 침입에 의해 수정란이 난할하는 과정에서 비정상적인 양상에 의해 compaction의 비율도 감소시킬 수 있다는 것을 제시한다.

3. 상실배 및 배반포 단계에서 Compaction 양상에 따른 Beta-catenin 발현 양상 분석

Beta-Catenin은 E-cadherin과 함께 포유동물에 있어서 세포 간 결합과 관련된 기능을 하는 단백질이다. 마우스에 있어서 세린/스레오닌 잔기에 인산화되어 compaction이 유도되고 정

상적인 배아로 발달할 수 있다고 보고하였다(Pauken과 Capco, 1999). 또한, beta-catenin은 Wnt 신호 전달 과정에서 중요한 인자로서의 역할을 한다고 보고되었다(Stow 등, 2004). 최근에는 RT-PCR을 이용한 소 수정란 실험에서 beta-catenin 유전자의 발현이 4 세포기에서 높게 나타나다가 이후 단계에서는 발현이 줄어들다가 배반포기에 다시 증가한다고 보고하였다(Ngan-vongpanit 등, 2006). 이러한 beta-catenin의 발현이 compaction 양상에 따라 어떻게 변화되는지에 대해 조사하였다. 먼저 상실배 단계에서 compaction 양상에 따른 beta-catenin 발현 양상을 비교한 결과, compacted된 상실배에서 많이 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 또한, 각각의 compaction 양상에 따라 배반포 단계에서 beta-catenin 발현을 비교한 결과, 마찬가지로 beta-catenin이 compacted 유래 배반포에서 균일하고 높게 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 8). 특히, compacting과 pre-compacting 단계의 수정란에서의 beta-catenin의 발현은 상당히 불규칙적이라는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 포유동물 수정

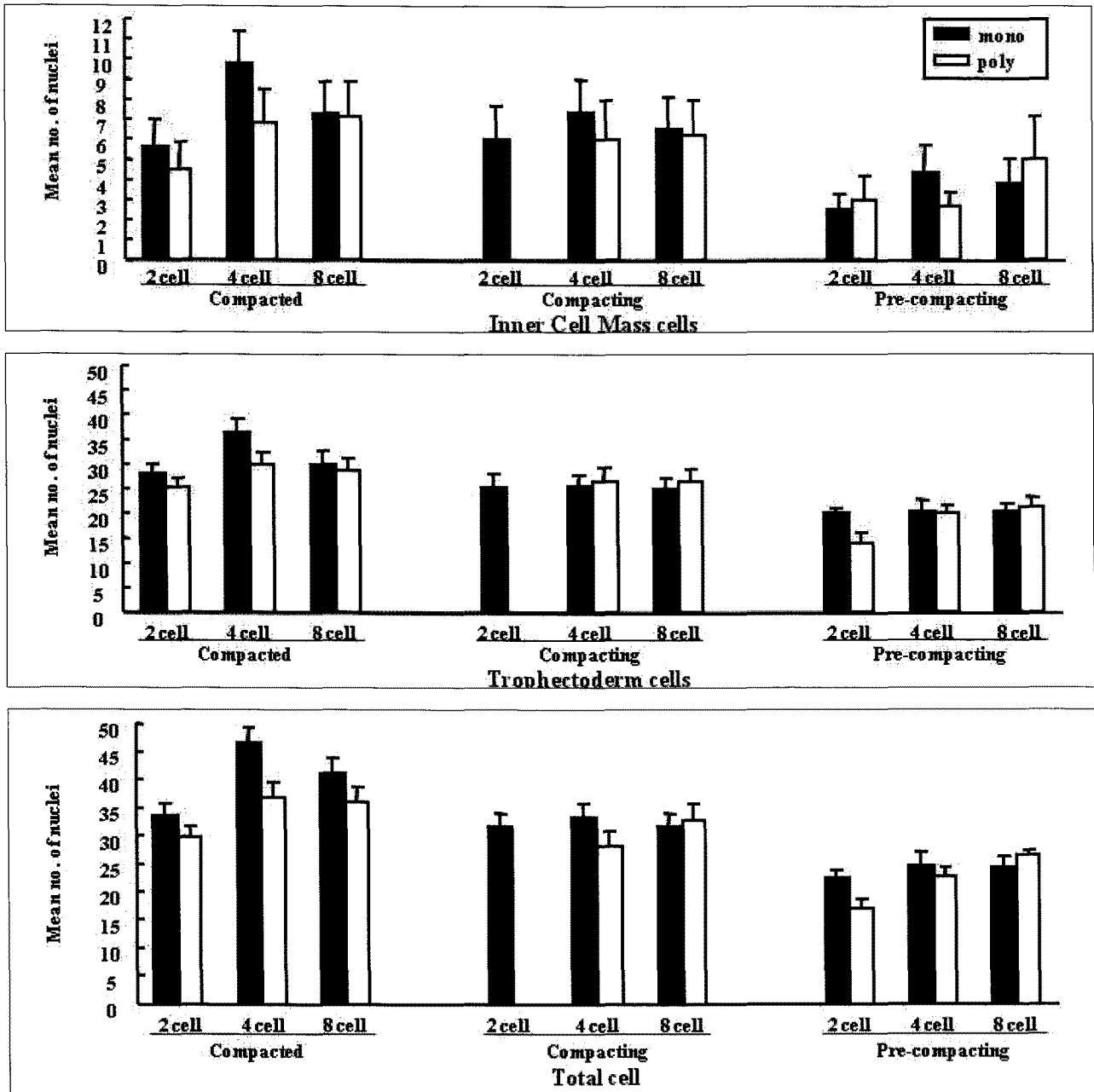


Fig. 6. Structural composition of blastocysts derived from mono- and poly-spermic porcine embryos according to cleavage stages and compaction patterns.

란의 배발달에 있어서 compaction 정도는 beta-catenin과 같은 세포 접착 유전자의 발현 양상과 밀접한 상관관계가 있다는 것을 제시한다.

결론

본 연구에서 돼지 수정란의 체외발달 시 분할 단계에 따른 compaction 정도와 compaction 양상에 따른 배반포 발달율의

차이점을 확인하였으며, 정상과 다정자 침입 수정란에 있어서 compaction 양상, 배발달 및 질적 수준의 차이점도 확인할 수 있었다. 또한, compaction 양상에 따른 beta-catenin의 발현이 상당히 차별적으로 나타난다는 사실을 확인하였다. 결론적으로 본 연구 결과들은 돼지 수정란의 착상 전 발달상의 지표로 compaction이 완전하게 이루어져야 정상적으로 발달하고, 질적 수준을 향상시킬 수 있다는 것을 제시하고 있다. 또한, 다정자 침입 수정란은 비정상적인 난할로 인해 완전한 compac-

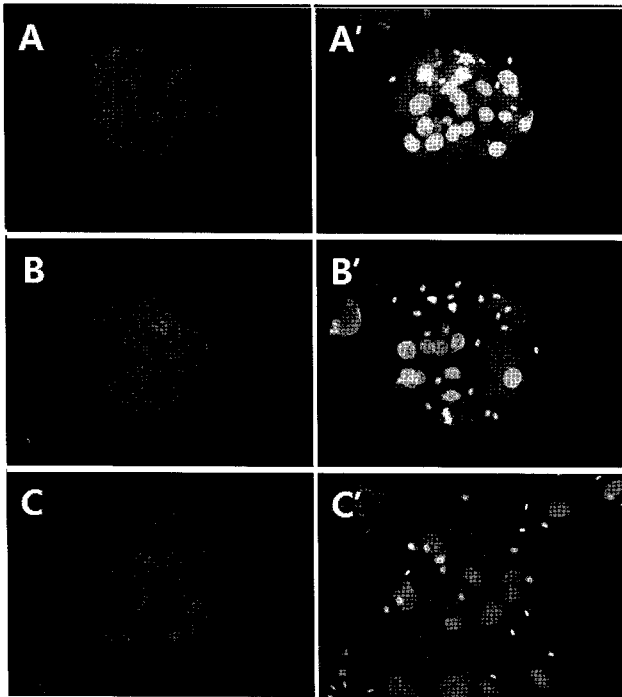


Fig. 7. Expression patterns of beta-catenin in morula stage embryos according to compaction patterns. (A, A') compacted morula, (B, B') compacting morula, (C, C') pre-compacting morula.

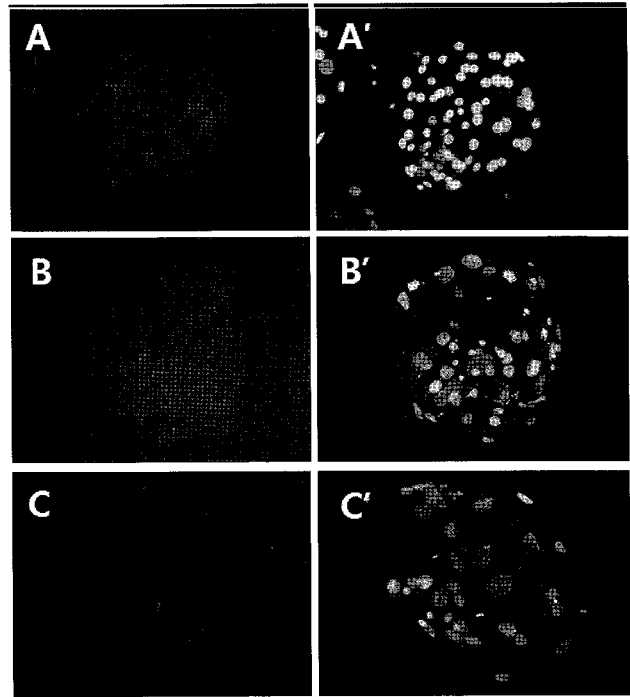


Fig. 8. Expression patterns of beta-catenin in blastocyst stage embryos according to compaction patterns. Blastocysts derived from compacted morula (A, A'), compacting morula (B, B'), and pre-compacting morula (C, C').

tion이 일어나는 비율이 감소되어 궁극적으로 배발달 및 질적 수준에 영향을 미친다는 것을 제시한다.

참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57:729-734.
- Butz S and Larue L. 1995. Expression of catenins during mouse embryonic development and in adult tissues. *Cell. Adhes. Commun.* 3:337-352.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 98:179-185.
- Giles JR and Foote RH. 1995. Rabbit blastocyst: Allocation of cells to the inner cell mass and trophectoderm. *Mol. Reprod. Dev.* 41:204-211.
- Han YM, Abeydeera LR, Kim JH, Moon HB, Cabot RA, Day BN and Prather RS. 1999a. Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced *in vitro*. *Biol. Reprod.* 60:1110-1113.
- Han YM, Wang WH, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim JH, Murphy C, Day BN and Prather RS. 1999b. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol. Reprod.* 61:1340-1346.
- Johnson MH and Ziomek CA. 1981. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24:71-80.
- Jun T, Robert T, Katharine F, Brenda W, Tresa NW and Randall C. 2002. The neglected morula/compaction stage embryo transfer. *Hum. Reprod.* 17:1513-1518.
- Kim JS, Chae JI, Song BS, Lee KS, Choo YK, Chang KT, Park HD and Koo DB. 2010. Iloprost, a prostacyclin analogue, stimulates meiotic maturation and early embryonic development in pigs. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:437-447.
- Machaty Z, Day BN and Prather RS. 1998. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.* 59:451-455.
- Miller JR and McClay DR. 1997. Characterization of the role of cadherin in regulating cell adhesion during sea urchin development. *Dev. Biol.* 192:323-339.
- Moon RT and Kimelman D. 1998. From cortical rotation to organizer gene expression: toward a molecular explanation of axis specification in *Xenopus*. *Bioessays* 20:536-545.

- Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, Gilles M, Jennen D, Holker M, Tholen E, Schellander K and Tesfaye D. 2006. Targeted suppression of E-cadherin gene expression in bovine preimplantation embryo by RNA interference technology using double-stranded RNA. *Mol. Reprod. Dev.* 73:153-163.
- Niwa K. 1993. Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48:49-59.
- Pauken CM and Capco DG. 1999. Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: Roles for PKC and beta-catenin. *Mol. Reprod. Dev.* 54:135-144.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48:61-73.
- Prather RS, Boice ML, Gibson J, Hoffman KE and Parry TW. 1995. *In vitro* development of embryos from sinclair miniature pigs: A preliminary report. *Theriogenology* 43:1001-1007.
- Tam PP and Behringer RR. 1997. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech. Dev.* 68:3-25.
- Wang WH, Okuda K, Niwa K. 1991. *In vitro* penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 93:491-499.
- Winkel GK, Ferguson JE, Takeichi M and Nuccitelli R. 1990. Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo. *Dev. Biol.* 138: 1-15.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM and Iwamura S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 66:112-119.

(접수: 2010. 6. 15 / 심사: 2010. 6. 22 / 채택: 2010. 8. 11)