

Oct4-Transfection한 중간엽줄기세포 유래 핵이식 배반포의 Oct4 발현 분포 및 세포 자멸사의 변화에 관한 연구

이원재* · 이정현* · 노규진 · 이성림†

경상대학교 수의과대학 수의학과, 경상대학교 생명과학연구원

Study on Distribution of Oct4 Expression and Change of Apoptosis in Nuclear Transfer Blastocyst using Oct4-Transfected Mesenchymal Stem Cells

Won-Jae Lee*, Jeong-Hyeon Lee*, Gyu-Jin Rho and Sung-Lim Lee†

Dept. of Theriogenology and Biotechnology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Research Institute of Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

There are various factors i.e. donor cell type, culture system as well as technical procedures which influence the pre-implantation embryonic development; however, many attempts have been made and still it is under investigation to improve the cloning efficiency using somatic cell nuclear transfer technique. It has been investigated that stem cells like mesenchymal stem cell are able to more efficiently reprogram and reactivate the expression of early embryonic genes to promote nuclear transfer efficiency. In addition, Oct4 expression plays a pivotal role in early embryo development. In the present study, we investigated distribution of Oct4 expression and changes of apoptosis and total cell number in nuclear transfer blastocyst after using Oct4 transfected bone marrow stem cell as donor cells. Although Oct4-RFP expression was observed across blastocyst, more concentrated intensity was shown at hatched region in blastocyst on day 7. Reduction of apoptotic bodies was revealed in Oct4 transfected blastocyst by TUNEL staining, however, there was no significant difference in total cell number between Oct4 transfected and non-transfected nuclear transfer embryos. In conclusion, Oct4 transfected donor cells exhibited higher expression in hatching stage in day 7 blastocyst and were able to prevent apoptosis compared to non-transfected donor cells.

(Key words: mesenchymal stem cells, bone marrow, porcine, Oct4, apoptosis)

서 론

핵이식을 통한 복제돼지 생산 효율을 향상시키기 위하여 많은 시도가 이루어지고 있지만, 여전히 복제효율은 낮은 실정이다. 여러 가지 원인 중 한 가지는 충분하지 못한 공여세포의 리프로그래밍으로 인해 유전자의 발현이 제대로 이루어지지 않음으로써, 초기 수정란 발달 지연 및 증가된 사산의 원인으로 생각되고 있다. 따라서 핵이식 효율을 증가시키기 위한 적절한 공여세포를 찾기 위하여 다양한 세포 종류를 이용한 핵이식에 관한 연구가 이루어졌고(Wakayama 등, 2005; Kumar 등, 2007), 이를 통해 배아줄기세포 및 중간엽줄기세포와 같은

미분화된 세포를 핵이식 공여세포로 이용하였을 경우 그 효율이 높아진다는 것이 보고되었다. 그 중 중간엽줄기세포는 채취 및 배양이 쉬운 미분화된 줄기세포의 하나로써, 이를 공여세포로서 사용한 돼지 복제 수정란은 배아 성장, 세포 자멸사, DNA methylation, histone deacetylation 및 전사인자 유전자의 발현 양상이 *in vivo* 수정란과 비슷하다는 연구결과가 보고되었다(Kumar 등, 2007).

Oct4는 전사인자의 POU(Pit-Oct-Unc) family로 미분화된 배아줄기세포의 중요한 마커 및 미분화능 유지의 주요 인자로 보고되었다(Wuensch 등, 2007; Zuccotti 등, 2012). 즉, Oct4는 포유류의 초기 배아 발달과 세포 분화 과정에서 유전자 전사 조

This study was supported by BioGreen 21, Rural Development Administration (grant No. PJ007969) and National Research Foundation of Korea (grant No. 2015R1D1A1A01056639) of the Republic of Korea.

* 두 저자는 동등하게 본 연구에 공헌하였음

† Correspondence : sllee@gnu.ac.kr

질(Kellner와 Kikyo, 2010), 원시 생식 세포의 세포사멸(Kehler 등, 2004) 및 전능성 세포의 재생능을 조절하는 중요한 역할을 수행하고 있다(Boiani와 Scholer, 2005). Oct4 발현은 특히 embryonic carcinoma cells, embryonic germ cells 및 배아줄기 세포와 같이 배아 발달 관련 세포에서 주요하게 관찰된다(Okamoto 등, 1990; Lee 등, 2006). 이러한 Oct4의 발현은 배발생기에서 inner cell mass(ICM)의 발달에 중요한 역할을 하는데, 이는 Oct4를 knock-out 하였을 경우 ICM이 없는 배아들이 생성되는 결과를 통해 알 수 있다. 또한 배아줄기세포에서 Oct4가 높게 발현이 되면 내배엽과 중배엽 세포 계통으로 분화가 되는 반면, 낮게 발현되면 trophoctoderm으로 분화된다(Nichols 등, 1998; Niwa 등, 2001).

최근의 연구들은 체외 배양 기간 동안 착상 전의 배아의 퇴화에 있어서 세포 자멸사의 역할에 초점을 맞추고 있다(Fahrudin 등, 2002). 세포 자멸사는 배아 발달과 질을 판단하는데 있어서 중요한 기준이 되며(Brison와 Schultz, 1997; Levy 등, 2001), 복제동물 또는 형질전환 배아의 낮은 수태율 및 높은 배아 손실률은 세포 자가 사멸의 증가에 따른 총 세포 수 및 ICM의 감소에 의한 것으로 보고되고 있다(Lee 등, 2007).

종합해 보면, 미분화된 중배엽줄기세포는 배아발달에 있어서 좋은 공여세포라고 알려져 있으며, Oct4의 발현은 수정란의 발달에 결정적인 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 핵이식 효율의 증가를 위한 Oct4를 transfection한 중배엽줄기세포를 공여세포로 이용한 핵이식 연구 결과가 보고되고는 있지만(Lee 등, 2014), Oct4를 발현하는 세포의 배반포 내 분포 및 세포 자멸사에 관한 연구는 여전히 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 Oct4를 transfection한 세포를 핵이식 공여세포로 사용하였을 때 나타나는 수정란에서의 영향을 확인하기 위하여, Red Fluorescent Protein(RFP)을 마커로 이용한 Oct4-RFP를 transfection한 미니돼지 골수 유래 중간엽줄기세포를 이용하여 핵이식을 수행하고, 핵이식 배반포에서 transfection된 Oct4-RFP의 발현위치 및 총 세포 수와 세포 자멸사의 변화를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시약과 배지

별도로 표시된 경우가 아니면, 모든 시약과 배지는 Gibco (Life Technologies, Burlington, ON, Canada)와 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하였다. 모든 배지의 pH와 삼투압은 각각 7.2와 285±5 mOsm/l로 조정하였다.

2. 세포분리, 배양 및 Oct4의 Transfection 방법

골수유래 중간엽줄기세포는 이전에 기술된 방법을 이용하여 1년령의 미니돼지에서 추출된 골수에서 분리하였다(Kumar 등,

2007). Ficoll-Paque™Plus(GEHealthcare BioscienceAB, Sweden)를 15 ml cornical tube에 3 ml 넣고, 추출된 골수 1 ml와 Dulbecco phosphate buffered saline(DPBS) 4 ml를 넣은 희석액을 그 위에 올려준 뒤, 400 ×g에서 40분 동안 원심 분리하였다. 분리된 세포층을 추출한 다음, DPBS와 Advanced-Dulbecco modified Eagle Medium(ADMEM)를 사용하여 500 ×g에서 10분 동안 원심분리로 두 번 세척하였다. 10% FBS가 포함된 ADMEM를 사용하여 35 mm cell culture dish에 1×10⁵개의 세포를 온도 38.5℃에 5% CO₂ 환경의 배양기에서 배양하였다. 세포가 80~90% 정도 배양되면, 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 용액을 사용하여 세포를 소화시키고, 1:4 비율로 계대 배양을 하였다.

Oct4의 중간엽줄기세포 내 transfection은 lentivirus를 이용하여 형광단백질 마커인 RFP 발현이 Oct4와 함께 조절되도록 하였다. 5계대의 1×10⁵개의 골수유래 중간엽줄기세포에 20 MOI hOct3/4-RFP(O^R) (Fig. 1a. ABP-SC-LVIOCT3R, Allele-biotech, San Diego, USA)와 4 µg/ml polybrene을 10% FBS가 포함된 2 ml의 ADMEM에 넣어준 다음, 온도 38.5℃에 5% CO₂ 환경의 배양기에서 배양하였다. 10시간 배양 후, 상층액은 제거하고 10% FBS가 포함된 ADMEM으로 교환 후 배양하였다. Oct4가 transfection된 5~10계대의 골수유래 중간엽줄기세포가 핵이식 공여세포로 사용되었다. Oct4-RFP가 transfection된 골수유래 중간엽줄기세포에서 Oct4 발현은 형광현미경(Leica CTR600, Switzerland)의 red filter(excitation wave length 450~490 nm, dichronic wave length 510 nm와 wave length의 high band pass 515~560 nm)를 통해 RFP 발현을 확인하였다.

3. 난자 준비

돼지 난자는 성 성숙 전 어린 암퇘지의 난소에서 분리하였다. 3~6 mm 직경의 난포에서 10 ml 주사기에 부착된 18-gauge needle을 사용하여 난구-난자 복합체(cumulus-oocyte complexes)를 흡입하였다. Ham's F10에 모은 다음, 일정한 세포질과 3겹 이상의 난구 세포를 가진 난구-난자 복합체를 선택하고, FBS (5% w/v), 10 ng/ml(w/v) epidermal growth factor(EGF), 0.57 mM cysteine, 0.5 µg/ml(w/v), 2.5 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin(10,000 IU and 10,000 µg/ml), 0.5 µg/ml(w/v) follicular stimulating hormone(FSH)와 0.5 µg/ml(w/v) luteinizing hormone(LH)가 포함된 TCM 199 배지에 두 번 세척하였다. 100개의 난구-난자 복합체를 500 µl의 같은 배지에서 22시간 동안 38.5℃, 5% CO₂ 환경의 배양기에서 성숙시킨 다음 FSH와 LH가 첨가되지 않은 같은 조성의 TCM 199 배지에서 19시간 더 성숙시켰다.

4. 핵이식

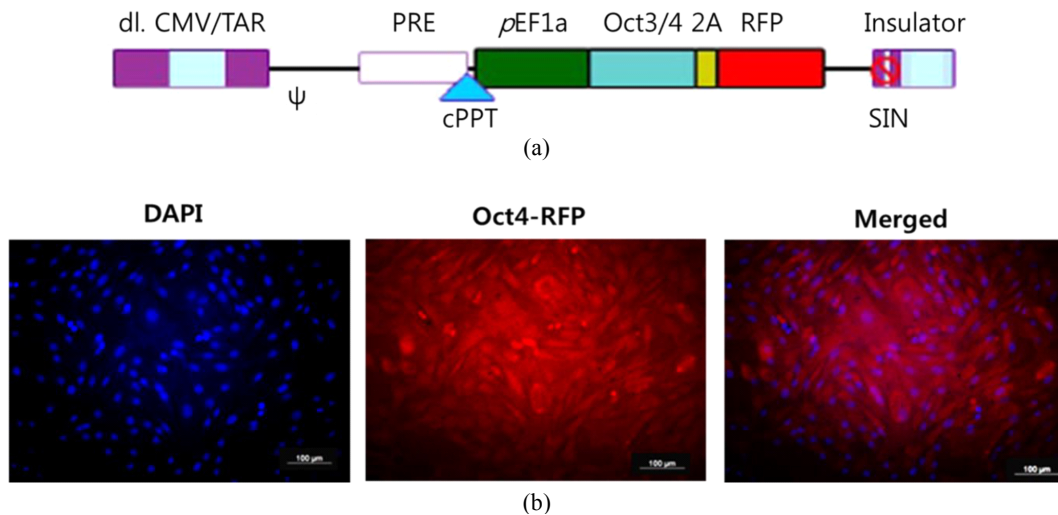


Fig. 1. Vector map of Oct4-RFP and expression of Oct4-RFP fluorescence in bone marrow mesenchymal stem cell (BMSCs). Vector map of MOI hOct3/4-RFP (O^R) (a) and Oct4-RFP fluorescence was found in Oct4 transfected BMSCs (b). White bars indicate 100 μ m.

핵이식은 이전 논문에서 기술된 방법에서 조금 변경하여 수행하였다(Kumar 등, 2012). 체외 성숙 41시간 후, 0.1%(w/v) hyaluronidase가 포함된 DPBS에서 1분 동안 피펫팅하여 난자에서 난구 세포를 제거 후, 7.5 μ g/ml cytochalasin B(CCB), 0.3% BSA와 12 mM sorbitol가 포함된 HEPES-buffered TCM-199에서 미세 조작 기술을 이용하여 난자에서 핵을 제거하였다. 제 1극체와 소량의 세포질을 내경 15~20 μ m의 micropipet을 사용하여 제거하였다. 탈핵란은 상온에서 2분 동안 Hoechst-33342 염색을 한 다음, 형광현미경(wave length 350nm)으로 탈핵 여부를 확인하였다. 미세 조작 기기를 이용하여 형광현미경상에서 RFP 발현이 확인된 공여세포를 탈핵란의 위관강 부분으로 넣어주었다. 모든 미세 조작 과정은 paraffin oil 아래 HEPES-buffered TCM 199 배지에서 수행하였다. 각각의 핵이식 수정란은 0.5 mM HEPES, 0.1 mM $MgSO_4$, 0.05mM $CaCl_2$ 와 0.01% BSA를 포함한 0.28 M mannitol 용액에서 BTX Electro Square porator(ECM 830, BTX, Inc., San Diego, CA)를 사용하여 2.0 KV/cm direct current for 30 μ sec로 두 번 전기 자극 시켜 융합시켰다. 30개의 핵이식 수정란을 paraffin oil 아래에 만들어진 30 μ l의 3 mg/ml BSA, 20 μ g/ml eagle amino acid (EAA), 10 μ g/ml nonessential amino acids(NEAA)가 포함된 체외 배양 배지인 porcine zygote medium 5(PZM5)에 넣어 38.5 $^{\circ}C$, 5% O_2 , 5% CO_2 와 90% N_2 환경에서 배양한 후, 10% FBS가 포함된 체외 배양 배지를 5일 후에 교환하였다(Ock 등, 2007).

5. 핵이식 수정란의 Oct4-RFP 발현과 세포 자멸사 평가

체외 배양 7일째 되는 날 핵이식 수정란을 수집하여 Oct4-RFP의 분포, 총 세포수와 세포 자멸사를 확인하였다. 핵이식

수정란의 Oct4-RFP의 분포를 확인하기 위하여 핵이식 수정란을 4% formaldehyde 용액에 넣어 4 $^{\circ}C$ 에서 1시간 동안 고정시킨 다음, Vecta SheilTM(Vector Laboratories Inc., CA)에 고정시킨 후 형광현미경 하에서 관찰하였다. 세포 자멸사는 *in situ* Cell Death Detection Kit(Roche, Germany) 키트를 사용하여 제조사의 실험방법에 따라 TUNEL 염색을 통해 확인하였다. 핵이식 수정란을 4% formaldehyde 용액에 넣어 4 $^{\circ}C$ 에서 1시간 동안 고정시킨 다음, 0.1%(w/v) sodium citrate가 포함된 0.5% Triton X-100에서 1시간 동안 permeabilization 시킨 후, fluorescein-conjugated dUTP와 terminal deoxynucleotidyl transferase에 넣어 37 $^{\circ}C$ 의 암실에서 1시간 동안 배양하였다. 50 μ g/ml RNase A를 첨가하여 1시간 더 배양하고, 대조 염색으로 10 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole에서 1시간 동안 염색하였다. Vecta SheildTM로 고정시킨 후, 형광현미경을 통해 관찰하였다. 핵은 형광현미경 상에서 UV filter를 통한 파란색으로 관찰되며, 세포 자멸사는 green filter(excitation wave length 512~560 nm, dichronic wave length 580 nm와 wave length의 high band pass 590 nm)를 통하여 녹색으로 관찰된다.

6. 통계

데이터는 SPSS 18.0 프로그램을 사용하여 One-way ANOVA와 Games-Howell 사후 분석을 통해 분석하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 이하를 통계적으로 유의하다고 판단하였다. 데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

결 과

1. Oct4가 Transfection된 중간엽줄기세포의 RFP 발현 확인

Oct4가 transfection된 중간엽줄기세포에서의 Oct4-RFP의 발현은 Fig. 1b에 나타내었다. 대부분의 transfection된 중간엽 줄기세포에서 Oct4-RFP가 발현되는 것을 확인하였다.

2. Oct4-Transfection 중간엽줄기세포 유래 핵이식란에서의 RFP 발현

Oct4-RFP가 transfection된 중간엽줄기세포에서 RFP 발현을 확인한 세포만을 공여세포로 Oct4-RFP 핵이식란을 생산하였으며, 배반포에서 RFP 발현이 확인된 25개의 Oct4-RFP 핵이식 배반포에서 RFP 발현 패턴을 관찰하였다. Fig. 2에서 Oct4가 transfection된 핵이식 배반포의 ICM과 trophectoderm 모두에서 RFP가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 대부분의 RFP 발현은 핵이식 배반포의 할구가 밀집된 부위에서 강하게 나타났지만, trophectoderm 부분에는 약하게 발현되는 것을 확인하였다.

3. 총 세포 수와 세포 자멸사

핵이식 배반포와 RFP 발현이 확인된 Oct4-RFP 핵이식 배반포 각 25개를 실험에 공시하였다. 핵이식 수정란의 총 세포 수와 세포 자멸사는 Fig. 3에 각각 나타내었다. 핵이식란과 Oct4-RFP 핵이식 배반포의 총세포수는 각각 42.29 ± 3.44 개와 40.33 ± 3.28 개였으며, 해당 배반포 내의 apoptotic body는 각각 5.29 ± 1.17 개와 0.5 ± 0.29 개로 확인되었다. Oct4가 transfection된 핵이식 수정란과 transfection하지 않은 핵이식 수정란의 총 세포 수는 유의적인($P < 0.05$) 차이가 없었다. 하지만, Oct4-transfection하지 않은 핵이식 수정란의 세포 자멸사는 Oct4가 transfection된 핵이식 수정란과 비교하였을 때, 유의적으로($P < 0.05$) 높은 개수를 확인할 수 있었다.

고 찰

복제동물 생산을 위한 핵이식 효율을 높이기 위해 다양한

방법들이 이루어지고 있으며, 줄기세포를 공여세포로 이용한 핵이식란과 핵이식 복제동물의 생산효율이 높은 것으로 알려져 있다. 마우스에서 핵이식 공여세포로 배아유래줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)가 체세포보다 복제산자의 생존율을 높이는 것으로 보고(Wakayama 등, 1999; Rideout 등, 2000) 되었으며, 돼지의 핵이식란 생산에서도 공여세포로 중간엽줄기세포가 체세포보다 효율적인 것으로 보고(Colleoni 등, 2005) 되고 있다. 그러나 돼지의 경우 배아유래줄기세포 구축에 대한 연구가 이루어지고 있지만 아직까지 한계가 있으므로, 돼지 배아유래줄기세포를 이용한 효율적인 핵이식 복제란과 복제동물 생산은 현실적으로 어려움이 있다.

초기전사 인자 중 Oct4는 가장 잘 알려진 전능성과 리프로그래밍 조절인자로(Ji 등, 2014) 세포의 증식, 세포주기 및 세포 자멸사를 조절하는 핵심인자로 보고되고 있다. 마우스 배아줄기세포에서 Oct4 knock-down에 의한 Survivin 단백질의 발현 감소로 인해 세포 자멸사율이 유의적으로 증가하였으며, 이를 통해 Oct4가 STAT3/Survivin 경로의 핵심 조절인자임이 규명되었다(Ying 등, 2008). 또한 Oct4 knock-down된 마우스 배아줄기세포에서 종양 억제 유전자인 Trp53 및 이의 하위 유전자들의 발현이 증가됨으로 인해 배아줄기세포의 증식억제 및 세포 자멸사가 일어난다고 보고되었다(Tianji 등, 2012).

따라서 줄기세포 핵심 초기전사인자인 Oct4를 transfection한 세포를 핵이식 공여세포로 사용하여 핵이식의 효율을 높이고자 하는 연구들이 진행되고 있다. Oct4를 과발현시킨 돼지 섬유아세포를 이용하여 핵이식을 수행한 결과, 배반포 생성률이 높아졌다는 연구결과가 있었으며(Kim 등, 2014), Nanog를 과발현시킨 돼지 섬유아세포를 이용하여 핵이식을 한 경우 배반포 생성률 및 총 세포 수는 유의적인 차이가 없다는 연구결과가 있었다(Zhang 등, 2011). 또한 본 실험실의 이전 논문에서는 Oct4 발현량이 낮은 후기 계대의 돼지 골수 유래 중간엽 줄기세포를 핵이식 공여세포로 사용한 경우, 배반포 발달율이 5.6%로 초기 계대 공여세포의 17.2%에 비하여 배반포 발달율이 낮은 것을 확인하고, 후기 계대의 중간엽줄기세포에 Oct4

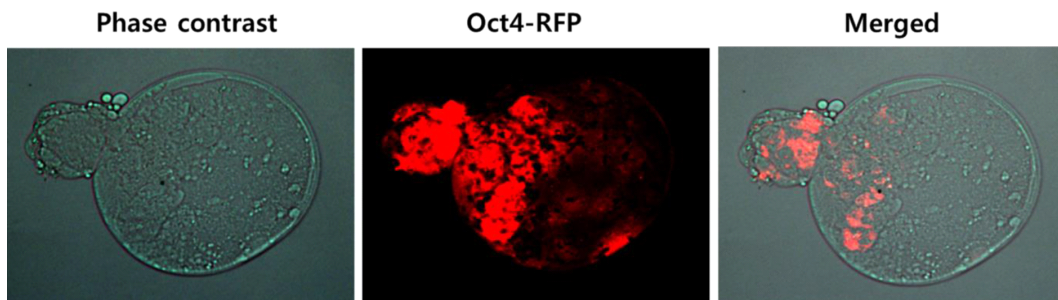


Fig. 2. Expression of Oct4-RFP fluorescence in porcine day 7 blastocysts cloned with Oct4-RFP transfected BMSCs. Despite RFP expression was observed across blastocyst, most expression was concentrated in hatching sight. Magnification X 200.

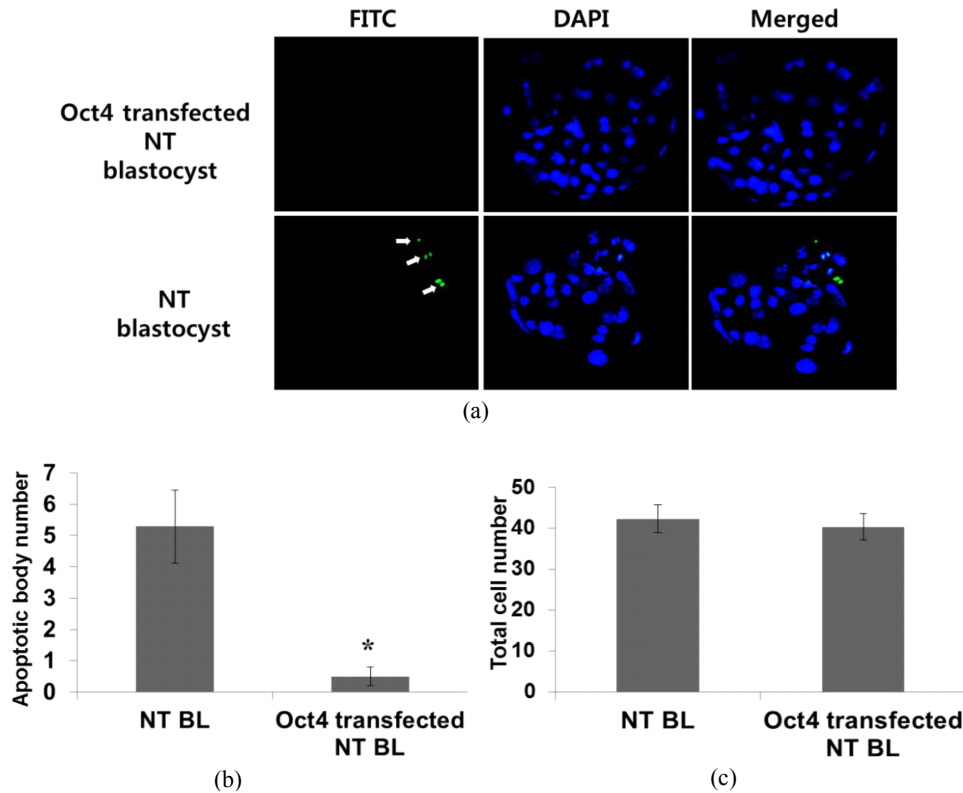


Fig. 3. TUNEL assay (a), apoptotic body (b) and total cell number (c) in porcine day 7 blastocysts. (a) Decreased apoptotic bodies were presented in Oct4 transfected NT blastocyst than NT blastocyst. (b) Reduction of apoptotic bodies were revealed significantly in Oct4 transfected NT blastocyst (c). There was no significant difference in total cell number. NT BL, NT blastocysts derived from BMSCs; Oct4 transfected NT BL, NT blastocysts derived from Oct4-RFP transfected BMSCs. White arrows indicate apoptotic bodies by TUNEL staining. Data is presented as the mean±SEM, Asterisk indicates significant difference ($P<0.05$). 5 replicates. Magnification X 200.

를 transfection하여 핵이식을 수행하였다. 그 결과, 핵이식 효율이 초기 계대의 중간엽줄기세포를 공여세포로 사용한 수준만큼 개선되진 않았지만 배반포 발달율이 13.6%까지 유의적으로 증가함을 확인하였고, 세포 자멸사도 감소함을 확인하였다(Lee 등, 2014). 그러나 형광단백질 마커인 RFP의 관찰에 의하여 배반포 내 Oct4의 발현 패턴과 세포 자멸사 발현의 위치 등에 대한 확인은 이뤄지지 못했다. 따라서 본 연구에서는 Oct4-RFP를 transfection한 중간엽줄기세포를 이용하여 핵이식하였을 경우 수정란에서의 Oct4 발현 위치, 총 세포 수와 배반포 내의 세포 자멸사 조각을 측정하였다.

세포 자멸사의 존재가 착상 전의 수정란이 발달하는 동안 총 세포 수에 영향을 미친다는 것은 잘 알려져 있다. 따라서 자가 사멸사와 총 세포 수를 통해 착상과 뒤이은 성장을 위한 수정란 평가를 할 수 있다(Machaty 등, 1998; Hao 등, 2003; Fabian 등, 2005). 본 실험에서는 Oct4를 transfection한 중간엽줄기세포를 이용하여 핵이식하였을 경우 총 세포 수는 차이가 없었지만, 세포 자멸사는 Oct4를 transfection한 핵이식 수정란에서 유의적으로 적게 나타나는 것을 확인하였다. 본 실험

결과와 유사하게 Oct4를 transfection한 공여 세포를 이용하여 핵이식을 수행한 결과, 유의적으로 높은 배반포 생성률과 낮은 배반포 세포 자멸사를 확인하였다(Ji 등, 2014).

배반포에서의 Oct4 발현 양상은 종마다 다르게 보고되고 있다. 예를 들어, *in vivo*에서 회수된 마우스 수정란의 ICM에서는 Oct4 발현을 확인하였지만, trophectoderm에서는 발현이 되지 않았다. 반대로, *in vivo*와 *in vitro*에서 생산된 돼지와 소 수정란에서는 ICM과 trophectoderm 모두에서 Oct4 발현을 확인하였다(Kirchhof 등, 2000). 또한, Oct4-promoter-enhanced green fluorescent protein(EGFP)가 transfection된 토끼 수정란에서는 ICM과 trophectoderm 모두에서 Oct4-EGFP 발현을 확인하였다. 돼지 난자에서의 Oct4 전사체는 착상 전부터 epiblast로 될 때까지의 과정 동안 발현이 확인되었다(Magnani와 Cabot, 2008; Hall 등, 2009). Oct4 단백질은 해칭 전의 돼지 배반포에서는 ICM과 trophectoderm에서 위치하는 반면(Kirchhof 등, 2000; Kuijk 등, 2008), 해칭 후에는 ICM에서만 제한적으로 위치하였다(Vejlsted 등, 2006). 나중에는 epiblast에 제한적으로 위치하고, 장배 형성(gastrulation) 과정 동안 중배엽에서 낮은

Oct4 발현이 남아있었다. 후기의 장배 형성과 신경관 형성(neurulation) 과정 동안 Oct4 발현은 점진적으로 사라지는 것을 보였고, 최종적으로 원시 생식 세포(primordial germ cells)에서만 발현되는 것을 확인하였다(Vejlsted 등, 2006). 하지만, 다른 연구에서는 Oct4 단백질뿐만 아니라, Oct4의 mRNA가 11일이 되어서도 elongating 돼지 수정란의 extra-embryonic tissue에서 발현이 확인되었다고 보고하였다(Keefer 등, 2007). 본 연구에서는 Oct4-RFP를 transfection한 돼지 골수유래 중간엽줄기세포를 공여세포로 핵이식하였을 때, 핵이식 수정란에서의 Oct4의 발현위치를 확인하였다. 그 결과, Oct4를 transfection한 핵이식 수정란의 ICM과 trophectoderm 모두에서 RFP 발현을 확인할 수 있었다. 특히 유전자를 transfection한 공여세포 이식에 의한 형질전환 핵이식란의 경우, 형광단백질 마커의 발현에 mosaicism이 나타날 수도 있는 것으로 알려져 있다. EGFP를 transfection한 소 체세포를 돼지 난자 내에 이식한 이종간 형질전환 핵이식란에서 mosaicism이 관찰되지 않았다고 보고(Uhm 등, 2007)하지만, 돼지의 경우 EGFP를 transfection한 귀섬유아세포 유래 돼지 형질전환 핵이식란의 경우 59%에서 mosaicism이 관찰되었다고 보고(Park 등, 2002)하는 등 형질전환 핵이식란의 mosaicism 발생은 불분명한 상황이며, 본 연구에서는 Oct4-RFP를 transfection한 핵이식 배반포의 세포 밀집 정도에 따라서 형광발현 정도의 차이는 관찰되었지만, 명확한 mosaicism은 관찰되지 않았다. 특히 배반포의 해칭된 부분에서 높은 발현을 확인되었는데, 이는 할구가 비교적 밀집되어 있기 때문에 관찰되는 결과이며, 돼지 체외배양란의 경우 배반포 내 ICM과 trophectoderm의 경계가 비교적 불분명하기 때문에 배반포 내 명확한 부위를 판별이 어려운 편이지만, Oct4-RFP의 trophectoderm에서의 발현은 확인할 수 있었다.

본 실험을 통하여 Oct4를 transfection한 세포를 핵이식 공여세포를 사용했을 때, 배반포에서 전체적으로 Oct4 발현이 나타났으며, Oct4 transfection이 핵이식 수정란의 총 세포 수에는 영향을 끼치지 않았으나, 세포 자멸사가 대조군보다 적게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- Boiani M and Schöler HR. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:872-884.
- Brison DR and Schultz RM. 1997. Apoptosis during mouse blastocyst formation: Evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol. Reprod.* 56:1088-1096.
- Colleoni S, Donofrio G, Lagutina I, Duchi R, Galli C and Lazzari G. 2005. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 7:154-166.
- Fabian D, Koppel J and Maddox-Hyttel P. 2005. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 64:221-231.
- Fahrudin M, Otoi T, Karja NW, Mori M, Murakami M and Suzuki T. 2002. Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction* 124:813-819.
- Hall VJ, Christensen J, Gao Y, Schmidt MH and Hyttel P. 2009. Porcine pluripotency cell signaling develops from the inner cell mass to the epiblast during early development. *Dev. Dyn.* 238:2014-2024.
- Hao Y, Lai L, Mao J, Im GS, Bonk A, Randall S 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.
- Ji Q, Cong P, Zhao H, Song Z, Zhao G, Gao J, Nie Y and Chen Y. 2014. Exogenous expression of OCT4 facilitates oocyte-mediated reprogramming in cloned porcine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 81:820-832.
- Keefer CL, Pant D, Blomberg L and Talbot NC. 2007. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim. Reprod. Sci.* 98:147-168.
- Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomeli H, Nagy A, McLaughlin KJ, Schöler HR and Tomilin A. 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* 5:1078-1083.
- Kellner S and Kikyo N. 2010. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol. Histo-pathol.* 25:405-412.
- Kim SJ, Koo OJ, Park HJ, Moon JH, da Torre BR, Javaregowda PK, Kang JT, Park SJ, Saadeldin IM, Choi JY, Lee BC and Jang G. 2014. Oct4 overexpression facilitates proliferation of porcine fibroblasts and development of cloned embryos. *Zygote* 2:1-8.
- Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Schöler H and Niemann H. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol. Reprod.* 63:1698-1705.
- Kuijk EW, Du Puy L, Van Tol HT, Oei CH, Haagsman HP,

- Colenbrander B and Roelen BA. 2008. Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev. Dyn.* 237:918-927.
- Kumar BM, Jin HF, Kim JG, Ock SA, Hong Y, Balasubramanian S, Choe SY and Rho GJ. 2007. Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells. *Dev. Dyn.* 236:435-446.
- Lee E, Lee SH, Kim S, Jeong YW, Kim JH, Koo OJ, Park SM, Hashem MA, Hossein MS, Son HY, Lee CK, Hwang WS, Kang SK and Lee BC. 2006. Analysis of nuclear reprogramming in cloned miniature pig embryos by expression of Oct-4 and Oct-4 related genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348:1419-1428.
- Lee JH, Lee WJ, Jeon RH, Lee YM, Jang SJ, Lee SL, Jeon BG, Ock SA, King WA and Rho GJ. 2014. Development and gene expression of porcine cloned embryos derived from bone marrow stem cells with overexpressing Oct4 and Sox2. *Cell Reprogram.* 16:428-438.
- Lee SL, Kumar BM, Kim JG, Ock SA, Jeon BG, Balasubramanian S, Choe SY and Rho GJ. 2007. Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene-transfected somatic cells. *Reprod. Domest. Anim.* 42:44-52.
- Levy RR, Cordonier H, Czyba JC and Guerin JF. 2001. Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. *Ital J. Anat. Embryol.* 106(Suppl 2):101-108.
- Machaty Z, Day BN and Prather RS. 1998. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.* 59:451-455.
- Magnani L and Cabot RA. 2008. *In vitro* and *in vivo* derived porcine embryos possess similar, but not identical, patterns of Oct4, Nanog, and Sox2 mRNA expression during cleavage development. *Mol. Reprod. Dev.* 75:1726-1735.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H and Smith A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.
- Niwa H. 2001. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct. Funct.* 26:137-148.
- Ock SA, Lee SL, Kim JG, Kumar BM, Balasubramanian S, Choe SY and Rho GJ. 2007. Development and quality of porcine embryos in different culture system and embryo-producing methods. *Zygote* 15:1-8.
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M and Hamada H. 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60:461-472.
- Park KW, Lai L, Cheong HT, Cabot R, Sun QY, Wu G, Rucker EB, Durtschi D, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB and Prather RS. 2002. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol. Reprod.* 66:1001-1005.
- Rideout WM, Wakayama T, Wutz A, Eggan K, Jackson-Grusby L, Dausman J, Yanagimachi R and Jaenisch R. 2000. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat. Genet.* 24: 109-110.
- Tianji C, Juan D and Guangxiu L. 2012. Cell growth arrest and apoptosis induced by Oct4 or Nanog knockdown in mouse embryonic stem cells: A possible role of Trp53. *Mol. Biol. Rep.* 39:1855-1861.
- Uhm SJ, Gupta MK, Kim T and Lee HT. 2007. Expression of enhanced green fluorescent protein in porcine- and bovine-cloned embryos following interspecies somatic cell nuclear transfer of fibroblasts transfected by retrovirus vector. *Mol. Reprod. Dev.* 74:1538-1547.
- Vejlsted M, Offenberg H, Thorup F and Maddox-Hyttel P. 2006. Confinement and clearance of OCT4 in the porcine embryo at stereomicroscopically defined stages around gastrulation. *Mol. Reprod. Dev.* 73:709-718.
- Wakayama S, Mizutani E, Kishigami S, Thuan NV, Ohta H, Hikichi T, Bui HT, Miyake M and Wakayama T. 2005. Mice cloned by nuclear transfer from somatic and ntES cells derived from the same individuals. *J. Reprod. Dev.* 51:765-772.
- Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R and Mombaerts P. 1999. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 14984-14989.
- Wuensch A, Habermann FA, Kurosaka S, Klose R, Zakharchenko V, Reichenbach HD, Sinowatz F, McLaughlin KJ and Wolf E. 2007. Quantitative monitoring of pluripotency gene activation after somatic cloning in cattle. *Biol. Reprod.* 76:983-991.
- Ying G, Charlie M, Robert AH and Hal EB. 2008. Oct 4 is critical for survival/antiapoptosis of murine embryonic stem cells subjected to stress. Effects Associated with STAT3/Survivin. *Stem Cells* 26:30-34.
- Zhang L, Luo YB, Bou G, Kong QR, Huan YJ, Zhu J, Wang

- JY, Li H, Wang F, Shi YQ, Wei YC and Liu ZH. 2011. Overexpression Nanog activates pluripotent genes in porcine fetal fibroblasts and nuclear transfer embryos. *Anat. Rec (Hoboken)*. 294:1809-1817.
- Zuccotti M, Merico V, Belli M, Mulas F, Sacchi L, Zupan B, Redi CA, Prigione A, Adjaye J, Bellazzi R and Garagna S. 2012. OCT4 and the acquisition of oocyte developmental competence during folliculogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 853-858.

Received December 3, 2015, Revised March 14, 2016, Accepted March 29, 2016