

## 체액이 초기배의 발생생리에 미치는 효과에 관한 연구. I. 생쥐 1- 및 2-세포배의 체외발생에서 배양액과 단백질원의 효과

정구민 · 임경순\*

서울대학교 인구의학연구소

\*서울대학교 농과대학

## Studies on the Effects of Body Fluids on the Developmental Physiology of Early Preimplantation Embryos.

### I. Effect of Serum on *In Vitro* Development of 1- and 2-Cell Mouse Embryos

K. M. Chung and K. S. Im\*

*Institute of Reproductive Medicine and Population, Seoul National University*

*\*College of Agriculture, Seoul National University*

#### Summary

*In vitro* developmental ability of early preimplantation mouse embryos was shown to be depend on the embryonic stages, media and supplements and their interaction(Experiment 1). The development of 1-cell embryos were more promoted in the complex medium(Ham's F10) than in the simple one(m-KRB), but that of 2-cell embryos showed the reverse effect. The bovine serum albumin(BSA) as a medium supplement more promoted the development of 1- and 2-cell embryos, compared with human fetal cord serum(HCS). On the other hand, the harmful effect of HCS was especially shown on the early cleavage in the embryonic development of the two stages. The effect of serum, in the respect of interaction between media and supplements, was also more significantly appeared in m-KRB than Ham's F10. In the experiment 2, when the harmful effect of HCS was compared with that of fetal bovine serum(FBS), the former more promoted the development of 1- and 2-cell embryos than the latter. The effect of HCS was more significantly shown in the development of 1-cell than that of 2-cell embryos. Conclusively, as 1- and 2-cell embryos were different in the requirements for the *in vitro* development, the optimal medium and supplement have to be selected for each embryonic stage. It is also respected to the better result if it take into consideration into the kinds of sera when serum is used for culture of early preimplantation embryos.

#### 서 론

여러종류의 체액(body fluid)이 체세포와 생식세포의 체외 배양에 이용되고 있다. 특히, 혈청은 그 대표적인 체액으로써 각종 단백질, 호르몬, 성장인자 및 기타 인자들을 함유하고 있는 이질성 복합혼합물(a complex heterogeneous mixture)이다. 이와같은 혈청의 다양한 구성분은 각종 세포에 대해 다양한 효과를 유발한다. 그 중 성장인자에 의한 세포증식

(cellular proliferation) 효과는 혈청의 중요한 효과로 간주되고 있다. PDGF, EGF 및 기타 mitogens (FGF, MDGF, calcium phosphate)은 이미 밝혀진 성장인자들이다(Leof 등, 1982b; Kohler와 Lipton, 1974; Balk 등, 1971). 이들 성장인자들은 서로간의 상호작용 또는 호르몬(예, somatomedin-C)과의 상호작용으로 DNA 합성작용을 촉진하여 세포증식을 초래한다. 또한 혈청의 기타 성분도 직·간접적으로 세포증식에 관여하며, 아직 밝혀지지 않은 미지인자

(unknown factors)의 효과 등을 고려하여 혈청은 세포 배양에 광범위하게 이용되고 있다.

혈청은 각종 포유동물 난자의 체외성숙(Foote와 Thibault, 1969)과 초기배의 체외발생(Wright 등, 1976)에도 성공적으로 사용되어 왔다. 또한 혈청은 세포의 생리적 작용에 필요한 에너지와 성장인자의 공급원으로써 뿐만아니라 체외 환경조건을 개선시키는 효과가 있음이 밝혀졌다. 즉, 혈청은 배아의 경화(hardness)와 유착을 방지하는 효과(Kane, 1987; Choi 등, 1987)와 배양액의 유독성 대사이온(toxic metabolic ions)을 착염화(chelating)시켜 배양환경을 개선시키는 효과가 있다(정구민, 1991; Cholewa와 Whitten, 1970). 한편 혈청은 배아에 유독한 효과가 있음이 보고되고 있다(문 등, 1989; Caro와 Trounson, 1984). Saito 등(1984)과 Ogawa 등(1987)은 초여과장치를 통해 분자량에 따라서 혈청을 분획하여 배아의 발생 상태를 관찰한 결과 혈청은 배아의 발생을 촉진 및 억제시키는 인자를 모두 함유하고 있음을 밝혔다. 배아에 대한 혈청의 이러한 유해 효과는 배아가 어릴수록 더욱 현저히 나타난다(Quinn 등, 1982).

이와같이 혈청은 배아의 발생생리에 긍정적 효과와 부정적 효과를 동시에 지니고 있다. 그러므로 본 연구는 최근 그 이용 범위가 점차 확대되고 있는 생쥐 전핵기 1-세포배와 후기 2-세포배의 체외 발생에 있어서 배양액과 단백질원의 효과를 비교함으로써 혈청이 초기배에 미치는 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험설계

실험 1은 두 종류의 배양액 (m-KRB, Ham's F10)에 각각 두 종류의 단백질원(알부민, 혈청)을 첨가하여 1- 및 2-세포배를 단기간(각각 2, 3일) 배양함으로써 이들 두 세포배에 대한 배양액 및 단백질원의 효과 뿐만아니라 이들의 상호작용효과를 비교하였다. 실험 2는 소태아혈청(bovine fetal serum)과 인간 태아제대혈청(human fetal cord serum)을 각각 10% 첨가한 Ham's F10 배양액에서 1- 및 2-세포를 장기간(6일) 배양함으로써 이들 혈청이 배아의 발생에 미치는 효과를 비교하였다.

### 2. 실험동물

실험 1에서는 F1(C57BL/6×CBA) hybrid 암컷과 ICR inbred 수컷 생쥐를 실험동물로 사용하였다. 실험 2에서는 암수 모두 F1(C57BL×CBA) hybrid를 사용하였다. 암컷은 3~4주령에 구입하여 1~2주간 적응시킨 후 4~6주령에 실험에 이용하였다. 수컷은 8~12주령의 수정능력이 있는 개체를 교배용으로 이용하였다. 실험동물은 온도(22~24°C)와 광량(light:dark=12:12)이 조절되는 사육실에서 사료와 물을 자유급식시켰다.

### 3. 과배란유도와 1-, 2-세포배의 준비

성선자락호르몬은 생리식염수로 희석(50IU/ml)하여 1ml 일회용주사기에 넣어 냉동실(-20°C)에 보존한 후 이용하였다. 과배란유도는 한 마리당 5IU(희석후 0.1ml)의 임파혈청성성선자락호르몬(pregnant mare serum gonadotropin, 이하 PMSG로 칭함; Sigma, Cat. No. G-4877)을 복강주사하여 난포를 성장시킨후 46~50시간째 역시 5IU(희석 후 0.1 ml)의 임부용보성성선자락호르몬(human chorionic gonadotropin, 이하 HCG로 칭함; Sigma, CG-2)을 복강주사하여 난모세포의 성숙과 배란을 유도하였다. HCG 주사후 암컷을 수컷 우리에 넣어 짝짓기를 시켰다. 전핵기 1-세포배(pronucleate 1-cell embryos)와 후기 2-세포배는 HCG 주사후 각각 22~24 및 44~46시간째 30G 1/2 needle(Becton Dickinson & Co., U.S.A.)을 이용하여 회수액으로 난관을 관류하였다. 회수액은 인산완충액(Dulbecco's phosphate buffered saline, 이하 PBS로 약함; Gibco, Cat. No. 450-1300)에 0.4%(w/v)의 소혈청알부민(이하 BSA로 칭함; Sigma, Cat. No. A-7511)을 첨가하여 미세여과기(Acrodisk, 0.2µm, Gelman)로 통과시킨후 사용하였다. 전핵기의 1-세포배에 부착된 난구세포(cumulus cells)는 hyaluronidase 용액(d-PBS+0.1% BSA+0.1% hyaluronidase)에서 2~3분간 노출시켜 제거하였다. 회수한 배아는 3회 세척 후 배양하였다.

### 4. 배양액과 첨가제의 준비

단순배양액 modified Krebs-Ringer bicarbonate solution(이하 m-KRB로 약함)은 각 시약들을 구입하여 제조하였으며, 복합배양액 Ham's F10은 그 혼합

분말(Gibco, Cat. No. 430-1200)을 구입하여 제조하였다(정구민, 1990). 배양액 제조용 물은 초순수-정제수(Baxter, Burdick & Jackson, Cat. No. 365-4)를 사용하였다. 각 배양액은 제조 후 삼투압을 280 mOsm/kg · H<sub>2</sub>O 및 수소이온농도를 7.3~7.4(탄산가스배양기에서 평형된 최종 pH)로 조절하였으며, 1주일 이내에 사용하는 것을 기본원칙으로 하였다. 또한 각 배양액은 정구민(1990)의 방법에 의해 품질 검사에서 통과된 것을 사용하였다. 배양액에 첨가된 단백질원은 소형청알부민(Sigma, Cat. No. A-7511)과 인간태아재대혈청(human fetal cord serum, 이하 HCS로 칭함) 및 소태아혈청(bovine fetal serum, 이하 FBS로 약함; Sigma)을 사용하였다. HCS는 서울대학교병원 산부인과연구실에서 제조(정구민, 1990) 및 품질검사(문 등, 1989)된 것을 제공받았다.

### 5. 1- 및 2-세포배의 배양 및 발생관찰

실험 1에서는 배아를 0.4%(w/v) BSA와 10%(v/v) HCS가 각각 첨가된 두 배양액(m-KRB, Ham's F10)에 넣어 탄산가스배양기(5% CO<sub>2</sub>+95% air, 37°C, ~100% moisture)에서 1- 및 2-세포배를 각각 2일 및 3일간 배양하였다(정, 1990). 1-세포배는 상실배 또는 초기배반포, 2-세포배는 팽윤배반포 또는 부화중(hatching) 배반포까지의 발달상태를 역반사현미경(inverted microscope)하에서 200-400배로 관찰하였다. 실험 2에서는 1- 및 2-세포배를 탄산가스배양기(10% CO<sub>2</sub>+90% air, 36.5°C, ~100% moisture)에서 6일간 배양함으로써 부화배반포(특히, 부화 후 접시 바닥에 부착성 여부)를 관찰하였다. 배양용기는 두 실험에서 모두 organ-tissue

culture dish (Falcon, Cat. No. 3037)를 이용하여 paraffin oil을 이용하지 않는 open-culture를 실시하였다.

### 6. 통계분석

각 처리군에서 배아의 발생 상태를 백분율로써 표시하였고, 통계분석은 Chi square analysis로 실시하였다.

## 결 과

### 실험 1. 배양액과 단백질원이 1-, 2-세포배의 체외발생에 미치는 효과.

F1(C57BL/6×CBA) hybrid 암컷과 ICR-inbred 수컷에 의해 생산된 친핵기 1-세포배를 두 종류의 단백질원(0.4% BSA, 10% HCS)이 각각 첨가된 두 종류의 배양액(m-KRB, Ham's F10)에서 3일간 배양한 결과는 Table 1과 같다. 1-세포배의 발생율(상실배 이상 발달한 배아의 비율)은 Ham's F10이 m-KRB보다 더욱 높았으며, 두 배양액에서 모두 알부민이 혈청보다 배아의 발생을 더욱 촉진시켰다. 특히, "Ham's F10+albumin"처리군(70.0%)은 가장 높은 발생률을 보였으며, "m-KRB+serum"처리군(27.5%)은 가장 낮은 발생율을 나타냈다. 이들 사이에는 통계적인 유의차가 있었다(P<0.05). 그러므로 1 세포배의 체외 발생에 있어서 Ham's F10은 m-KRB 보다 더욱 좋은 환경을 제공한 반면에 혈청은 알부민보다 더욱 나쁜 영향을 미쳤다. 혈청의 이러한 유해 효과는 Ham's F10보다 m-KRB에서 더욱 명확히 나타났다.

Table 1. Effect of media and protein sources on the *in vitro* development of pronucleate 1-cell mouse embryos

Media	Source of proteins	No. of embryos cultured	Percent of embryos at day 3 culture			
			1-cell	2 cell	3- to 8-cell	Morula+blastocyst
m-KRB	Albumin*	80	2.5	25.0	25.0 <sup>b</sup>	47.5 <sup>b</sup>
	Serum**	80	2.5	27.5	42.5 <sup>a</sup>	27.5 <sup>a</sup>
Ham's F10	Albumin	80	0.0	15.0 <sup>a</sup>	15.0 <sup>b</sup>	70.0 <sup>b</sup>
	Serum	80	5.0	30.0 <sup>b</sup>	5.0 <sup>b</sup>	60.0 <sup>b</sup>

\* Bovine serum albumin(0.4%, w/v). \*\* Human fetal cord serum(10%, v/v).

<sup>a,b</sup> Significant within the same column(P<0.05).

이와같이 배양액과 단백질원에 따른 발생율의 차이는 2 또는 3~8세포기에서 발생중지율의 차이에서 기인하였다. 즉 "m-KRB+serum"처리군은 3~8세포기에서의 발생중지율(42.5%)이 다른 모든 처리군보다 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ). 반면에 Ham's F10+serum"처리군은 2세포기에서의 발생중지율(30%)이 동일한 배양액에 알부민을 첨가한 처리군(15.0%)보다 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ).

전핵기 1 세포배와 동일한 방법으로 후기 2 세포배를 2일간 배양한 결과는 Table 2와 같다. 배양액의 효과에 있어서 2 세포배는 1 세포배(Table 1)와 상반된 결과를 보였다. 2 세포배의 체외발생에서 m-KRB가 Ham's F10보다 더욱 좋은 환경을 제공하였다. 이러한 효과는 알부민을 첨가한 경우에 더욱 명확히 나타났다. 즉, "m-KRB+albumin"처리군(92.0%)이 다른 세 처리군보다 유의적으로 높은 발생율(총 배반포 또는 팽윤- 및 부화-배반포의 비율)을 보였다( $P < 0.05$ ).

또한 배양액과 단백질원의 상호효과도 명확히 나타났다. 즉, m-KRB에서는 알부민이 혈청보다 유의적으로 높은 발생율(92% vs. 76.0%)을 보였지만( $P < 0.05$ ), Ham's F10에서는 발생율은 두 첨가제 간에 차이가 없었다(70.1% vs. 73.9%). 이와같이 2 세포배에 대한 배양액과 단백질원의 상호효과는 1 세포배에서도 유사하게 나타났다. 즉, 1- 및 2-세포배의 발생율에서 혈청은 m-KRB에서 더욱 나쁜 영향을 미쳤지만, Ham's F10에서 비슷한 경향을 보였다.

Ham's F10배양액에 첨가된 알부민 또는 혈청이 2 세포배를 배반포까지 발달을 촉진시킨 비율은 양자간에 차이가 없었지만, 발생중지(지연)율에서는 그

양상이 다르게 나타났다. 즉, 2-8세포기에서의 발생중지(지연)율은 혈청-첨가군(17.1%)이 알부민-첨가군(7.9%)보다 유의하게 높았지만( $P < 0.05$ ), 상설배기에서의 이 비율은 반대로 알부민-첨가군(22.1%)이 혈청-첨가군(9.1%)보다 유의하게 높았다( $P < 0.05$ ). 이와같이 초기배의 체외 배양에 있어서 난황초기의 발생 지체 효과는 알부민보다는 혈청을 첨가한 경우에 더욱 명확히 나타났다. 이러한 현상은 2-세포배 뿐만아니라 1-세포배에서도 비슷한 양상을 보였다.

Table 3은 재료 및 방법에서 기인할 수 있는 오차를 배제하기 위하여 Table 1과 Table 2의 실험을 동일한 조건하에서 동시에 수행한 결과이다.

1- 및 2-세포배의 체외 발생율은 Table 1과 Table 2에서와 거의 유사하게 나타났다. 1-세포배의 체외 발생은 m-KRB보다 Ham's F10 배양액에서 더욱 촉진되었으며, 두 배양액에서 모두 혈청이 알부민보다 발생능력을 저해하는 효과가 더욱 높았다. 한편, 체외에서 2-세포배의 발생은 Ham's F10보다 m-KRB에서 더욱 촉진되었으며, 혈청의 저해효과는 Ham's F10보다 m-KRB에서 더욱 현저히 나타났다.

## 실험 2. 인간태아제대혈청과 소태아혈청이 1-, 2-세포배의 체외발생에 미치는 효과

Table 4는 생쥐 암수를 모두 F1(C57BL/6×CBA) hybrid를 사용하였으며, 배양기의 탄산가스분압을 10%로 상향조정된 후 인간태아제대혈청과 소태아혈청을 각각 10% 첨가한 Ham's F10 배양액에서 생쥐 1- 및 2-세포배를 6일간 배양한 결과이다.

Table 2. Effect of media and protein sources on the *in vitro* development of late 2-cell mouse embryos

Media	Source of proteins	No. of embryos cultured	Percent of embryos at day 2 culture				
			2- to 8-cell	Morula	Blastocyst <sup>3</sup>		
					Ea-Mi	Ex-Hg	Total
m-KRB	Albumin <sup>1</sup>	125	0.8 <sup>a</sup>	7.2 <sup>a</sup>	26.4	73.6 <sup>a</sup>	92.0 <sup>a</sup>
	Serum <sup>2</sup>	225	4.0 <sup>b</sup>	20.0 <sup>b</sup>	32.9	43.1 <sup>b</sup>	76.0 <sup>b</sup>
Ham's F10	Albumin	127	7.9 <sup>b</sup>	22.1 <sup>b</sup>	19.7	59.4 <sup>b</sup>	70.1 <sup>b</sup>
	Serum	264	17.1 <sup>bc</sup>	9.1 <sup>a</sup>	38.6	35.2 <sup>bc</sup>	73.9 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Bovine serum albumin(0.4%, w/v). <sup>2</sup> Human fetal cord serum(10%, v/v).

<sup>3</sup> Ea-Mi(Early-Middle), Ex-Hg(Expanded Hatching). <sup>a, b, c</sup> Significant within the same column( $P < 0.05$ ).

Table 3. Effect of media and supplements on the *in vitro* development of 1- and 2-cell mouse embryos in the same culture condition at the same time

Percent of embryos	Stage of embryos at day 3 culture	1 cell embryos*				2-cell embryos*			
		m KRB		Ham's F10		m KRB		Ham's F10	
		+BSA	+HCS	+BSA	+HCS	+BSA	+HCS	+BSA	+HCS
of embryos	>Morula	40	33	67	47	100	73	87	80
	>Blastocyst	13	7	40	27	100	60	67	73

\* The same number of embryos from each mouse were arranged to each culture dish(n=15).

Table 4. Effects of fetal bovine serum and human fetal cord serum on the *in vitro* development of 1- and 2-cell mouse embryos

Stage of embryos	Sera*	No. of embryos cultured	% Blastocyst (Day 4)			% Blastocysts (Day 6)		
			Expanded	Hatching	Total	Hatching & ATD**	Hatched & ATD**	Total
1-cell	FBS	44	18.2	31.8	50.0 <sup>a</sup>	20.5	25.0 <sup>a</sup>	45.5 <sup>a</sup>
	HCS	44	29.6	47.7	77.3 <sup>b</sup>	15.9	61.4 <sup>b</sup>	77.3 <sup>b</sup>
2-cell	FBS	26	11.5	88.5	100.0	34.6 <sup>a</sup>	61.5	96.2
	HCS	26	0.0	100.0	100.0	15.4 <sup>b</sup>	76.9	92.3

\* Two batches of each serum were tested. \*\* Attached on culture dish.

<sup>a,b</sup> Significant with the same column(P<0.05).

인간태아재대혈청(HCS)은 소태아재대혈청(FBS)보다 초기배의 발생을 더욱 촉진시켰다. 두 혈청이 각각 첨가된 배양액에서 1-세포배의 발생율은 배양 4일째 팽윤배반포(expanded blastocyst)와 부화중배반포(hatching blastocyst)의 비율(50.0% vs. 77.3%) 뿐만 아니라, 배양 6일째 부화배반포(hatched blastocyst)의 비율(25.0% vs. 61.4%)에 있어서도 HCS가 FBS보다 유의적으로 높았다(P<0.05). 동일한 처리에서 2-세포배의 발생율은 배양 4일째 팽윤 및 부화중 배반포의 비율(100% vs. 100%)에 있어서 두 혈청간에 차이를 보이지 않았지만, 배양 6일째 부화배반포의 비율(61.5% vs. 76.9%)은 HCS가 FBS보다 높았다. 특히, 투명대에서 완전히 벗어날 수 없는 부화과정에서 배양집시에 부착된 배반포(hatching & attached blastocyst)의 비율이 FBS-첨가군(34.6%)이 HCS첨가군(15.4%)보다 높게 나타났다. 이러한 사실은 FBS가 2-세포의 체외발생에 있어서도 HCS보다 더욱 부적합함을 의미한다. 그러므로 인간태아재대혈청은 소태아재대혈청보다 생쥐 초기배의 체외 발생을 더욱 촉진시킨다는 사실을 알 수 있었다.

## 고 찰

인간을 비롯한 각종 포유동물배를 체외 배양하기 위하여 많은 연구자들은 각종 배양액을 개발하여 왔다. Krebs와 Henseleit(1932)가 Krebs-Ringer bicarbonate solution(KRB)을 개발한 후 이 배양액은 생쥐배의 생리에 적합한 방향으로 끊임없이 수정되었다. 이 용액은 modified KRB(또는 "BWW" 용액)로 명명되었으며, 최근에 이르기까지 많이 이용되고 있으며, 여러 형태로 수정되고 있는 대표적인 단순배양액(simple medium)이다. 한편, Ham(1963)에 의해 개발된 Ham's F10 배양액도 상실패와 배반포의 체외 배양과 인간의 체외수정에서 광범위하게 이용되고 있는 대표적인 복합배양액(complex medium)이다.

초기배의 체외발생에서 배양액(m-KRB, Ham's F10)과 단백질원(HCS, FBS) 및 이들의 상호효과를 검토하였다. 본 연구를 통하여 1- 및 2-세포배의 체외발생에 적합한 조건은 상이하다는 사실을 확인할 수 있었다. 1-세포배는 Ham's F10, 2-세포배는 m KRB 에서 발생이 더욱 촉진되었다. 그러나

Bastiaans 등(1985)과 Dandekar와 Glass(1987)는 1- 및 2-세포 모두 복합배양액(Ham's F10)보다 단순배양액(T6, Earle's medium, Hoppe & Pitt's medium, Spindle's medium)에서 높은 발생율을 보고하였다. 이들의 연구와 본 연구의 결과는 2-세포배의 발생에서는 동일한 효과를 보였지만, 1-세포배에 대해서는 반대 효과가 있었다. 이러한 차이점은 실험 재료의 차이에서 비롯되지 않았나 생각된다. 이들의 연구와 본 연구에서 단순배양액의 종류에서 차이가 있었지만 생쥐의 계통에서도 다소 차이가 있었다. 본 연구에 사용한 생쥐는 암컷은 2-cell block 현상이 없는 F1 hybrid를 이용하였지만, 수컷은 2 cell block이 있는 ICR 계통을 이용하였다. 본 연구 결과에서 2-세포 또는 3~8세포기에서 발생중지율이 높은 것이 수컷의 계통에서 기인하였다고 생각된다. 이러한 사실은 실험 2에서 암수를 모두 F1 hybrid를 이용하였을 때 이러한 발생중지율이 현저히 감소한 결과가 뒷받침 해주고 있다. 그러나 본 연구에서 2 cell block이 있는 계통의 수컷을 이용함으로써 복합배양액이 단순배양액보다 1 세포배의 발생을 더욱 촉진시켰는지는 명확하지 않다. 만약 이러한 현상이 있다면 대부분 동물의 초기배는 *in vitro* cell-block이 있으므로 cell-block을 전후한 체외배양에서는 단순배양액보다는 복합배양액을 이용하는 것이 바람직할 것이다. 그러나 이 부분에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

한편, 초기배에 대한 혈청의 유해효과에 대해서는 연구자 간에 상이한 결과를 보고하고 있다. Caro와 Trounson(1984)은 소태아혈청 또는 여성의 preovulatory serum에서 체외 배양된 생쥐배는 다른 첨가제(BSA-첨가제 또는 nitrogen-free medium)에서 배양된 배아보다 이식 후 생존성이 유의적으로 낮았으며, 그 원인을 혈청의 유해효과로 간주하였다. 또한 Ogawa 등(1987)은 생쥐 1-세포배의 체외발생에서 태아혈청은 혈청알부민보다 더욱 유해한 효과(toxic effect)가 있음을 보고하였다. 반면에 Kruger 등(1987)은 혈청-무첨가제와 혈청(10%)-첨가제 간에는 1- 및 2-세포배의 체외발생에서 유의적인 차이가 없다고 보고하였다. 또한 Naz 등(1986)은 생쥐 2-세포배의 체외발생에 있어서 혈청-무첨가제와 각종 단백질-첨가제(0.5% BSA, 15% FBS 또는 15% maternal serum) 간에 유의적인 차이가 없다고 보고

하였다. 더욱 Saito 등(1984)은 human fetal cord serum은 생쥐 2-세포배의 체외 발생에 있어서 발생을 뿐만 아니라 염색체의 정상도에 있어서 유익한 효과(beneficial effect)가 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 1- 및 2-세포배의 체외 발생에 있어서 혈청의 유해효과를 인정할 수 있었다. 이러한 혈청의 유해 효과는 난분할 초기에 더욱 현저히 나타났으며, 혈청의 유해효과는 배아의 발생단계와 배양액의 종류에 따라서 다르게 나타났다. 혈청의 유해효과는 2-세포배보다는 1-세포배에서 더욱 현저히 나타났는데 이는 혈청의 유독 성분에 대해 1-세포배가 더욱 민감하게 반응한데 그 원인이 있는듯하다. 또한 복합배양액보다는 단순배양액에서 혈청의 유해효과가 더욱 현저히 나타났다. 이는 혈청의 유독성분이 복합배양액의 아미노산에 의해 어느 정도 *kelating*됨으로써 그 유독성이 완화된데 그 원인이 있는듯하다.

마지막으로 본 연구에서 생쥐 1- 및 2-세포배의 체외 발생에 있어서 인간태아제대혈청(HCS)이 소태아혈청(FBS)보다 더욱 유익한 효과가 있었다. 혈청의 batch-to-batch variation (문 등, 1989)을 고려하여 두 종류의 혈청을 각각 2 batch씩 이용하였으며 동일한 종류의 혈청에서 batch간에는 거의 차이가 없었다. 또한 실험 2에 사용한 HCS는 서울대학교 산부인과연구소에서 quality test 결과 제 2등급으로 판정된 혈청을 사용하였음에도 불구하고 FBS보다 초기배의 발생을 더욱 촉진시켰다. 따라서 생쥐 초기배 뿐만 아니라 다른 실험동물의 배아를 체외 배양할 때도 현재 많이 이용되고 있는 FBS 대신에 HCS를 이용한다면 더욱 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 이와같이 HCS의 긍정적인 효과와 FBS의 부정적인 효과 및 이들의 효율적인 이용에 관해 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

## 적 요

생쥐 초기배의 체외 발생능력은 발생단계, 배양액의 첨가제 및 이들의 상호작용에 따라서 다르게 나타났다(실험 1). 1-세포배의 발생은 단순배양액(m-KRB)보다 복합배양액(Ham's F10)에서 더욱 촉진되었지만, 2-세포배는 그 반대 효과가 있었다. 또한 첨가제로써 알부민은 혈청보다 1, 2-세포배에서 유익한 효과를 보였다. 이러한 효과는 Ham's F10보다

m-KRB에서 더욱 현저히 나타났다. 혈청의 유해효과는 두 세포배에서 모두 난분할 초기에 명확히 나타났다. 배양액과 첨가제의 상호작용 효과의 측면에서 혈청의 유해효과는 복합배양액보다 단순배양액에서 더욱 현저히 나타났다.

실험 1에서 인간태아제대혈청의 유해효과의 정도를 소태아혈청과 비교한 결과 전자가 후자보다 1, 2-세포배의 발생을 더욱 촉진시켰다. 이러한 효과는 2 세포배보다 1-세포배에서 더욱 명확히 나타났다. 결론적으로 1- 및 2-세포는 체외발생에서 그 요구조건이 다르므로 각 세포에 적합한 배양액과 첨가제를 선택하여야 한다. 초기배의 체외배양에서 혈청을 사용할 때는 혈청의 종류를 고려한다면 더욱 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다.

### 참고문헌

- Balk SD. 1971. Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not transformed chicken fibroblasts in a plasma-containing media. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68:271.
- Bastiaans B, Vermer H and Rolland R. 1985. Development of mouse embryos in different culture media. in: Gamete quality and fertility regulation(Rolland R, eds), Elsevier Sci. Publishers B. V, pp.100-113.
- Caro CM and Trounson A. 1984. The effect of protein on preimplantation mouse embryo development *in vitro*. J. In Vitro Fertil, Embryo Transfer, 1:183-187.
- Choi TS, Mori M, Kohmoto K and Shoda Y. 1986. Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes maturity *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 79(2):565-568.
- Cholewa JA and Whitten WK. 1970. Development of two-cell mouse embryos in the absence of a fixed-nitrogen sources. J. Reprod. Fertil., 22:553-555.
- Dandekar PV and Glass RH. 1987. Development of mouse embryos *in vitro* affected by strain and culture medium. Gamete Res., 17:279-285.
- Foote WD and Thibault C. 1969. Recherches experimentales sur la maturation *in vitro* des oocytes de trui et de veau. Ann. Biol. Anim. Biochem., Biophys. 9:329.
- Ham RG. 1963. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. Exp. Cell Res., 29:515.
- Kane MT. 1987. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. Biol. Reprod., 37:775-778.
- Kohler N and Lipton A. 1974. Platelets as a fibroblasts growth-promoting activity. Exp. Cell Res., 87:297.
- Kruger TF, Stander FS, Smith K, Vander Merwe JP and Lombard CJ. 1987. The Effect of serum supplementation on the cleavage of human embryos. J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer, 4(1):10-12.
- Loef EB, Wharton W, VanWyk JJ and Pledger WJ. 1982b. Epidermal growth factor(EGF) and somatomedin C regulate G1 progression in competent BAKB/c-3T3 cells. Exp. Cell Res., 141:107.
- Naz RK, Janousek JT, Moody T and Stillman RJ. 1986. Factors influencing murine embryo assay: effects of proteins, aging of medium and syngical glove coatings. Fertil. Steril., 46(5):914-919.
- Ogawa T, Ono T and Marrs RP. 1987. The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos. J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer, 4(3):153-158.
- Quinn P and Whittingham DG. 1982. Effect of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos *in vitro*. J. Androl., 3:440-444.
- Saito H and Berger T, Mishell DR, Jr and Marrs RP. 1984. The effect of serum fractions on embryo growth. Fertil. Steril., 41(5):761-765.
- Wright RW Jr, Anderson GB, Cupps PT and Drost M. 1976. Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 14:157-162.
- 분신용, 신창재, 정구빈, 오선경, 방명걸, 장윤석. 1989. 생쥐 2-세포 배아에 의한 시험관아기 배양용 태아제대혈청의 질적평가에 관한 연구. 대한불임학회잡지, 16(2):139-146.
- 정구빈, 분신용, 오선경, 임경순, 장윤석. 1990. 배양액과 첨가제의 효율적인 품질검사에 관한 연구. 한국수정란이식연구회지, 5(1):28-41.
- 정구빈. 1990. 시험관아기기술을 위한 배양시스템의 정도관리. Proceeding of The first Annual Review Course on Assisted Reproductive Technology, Seoul, pp.

52-96.

정구민, 1990. 소와 생쥐 초기 난자의 체외발생능과 초급속 동결에 영향을 미치는 생리적, 물리적 요인에 관한 연구.

서울대학교 박사학위논문.

정구민, 1991. 생쥐 초기배에 대한 일회용주사기의 유효성과 그 개선책, 미출판 자료.