

생쥐태아 Fibroblast 세포의 공동배양과 Superoxide Dismutase 항체가 생쥐 초기배의 발달에 미치는 영향

김진호 · 정병현 · 이훈택 · 정길생
건국대학교, 동물자원연구센터

Effect of Co-Culture with Mouse Fetal Fibroblast Cells and Antibody to Superoxide Dismutase on the Development of Mouse Preimplantation Embryos

Kim, J. H., B. H. Chung, H. T. Lee and K. S. Chung
Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

This study was designed to develop the *in vitro* culture system of mammalian preimplantation embryos. We proposed mouse fetal fibroblast cells (MFFC) from 14~15 day mouse fetus. Zygotes from superovulated female ICR mice were cultured 96 hrs in simple defined media (T6) or on the monolayer of MFFC. In addition, to evaluate the action of the co-culture of MFFC, various diluted superoxide dismutase antibody (SOD-Ab) was supplemented into the monolayer of MFFC and zygotes were cultured in presence or absence of SOD-Ab. The developmental rates of zygotes were significantly increased in co-culture with MFFC compared to the control. The rates of zygotes to the 4-cell stage in media treated with EDTA were higher than those cultured in MFFC but the proportions of morula and blastocyst were not differ between EDTA and MFFC. Interestingly blastocysts in co-culture with MFFC possessed as many as blastomere as those developing *in vivo*, but blastocysts cultured with EDTA had significantly fewer blastomeres. In addition, the treatment of SOD-Ab suppressed the beneficial effect of MFFC. Therefore, our findings suggest that co-culture system using MFFC may have an advantage in the development of mouse zygotes as well as embryonic differentiation.

I. 서 론

Whitten (1956)에 의해 생쥐 초기배의 체외배양이 시작된 이래 많은 연구자들이 각종 포유동물의 초기배를 체외에서 성공적으로 배양시키려는 연구가 계속적으로 이루어져 왔다. 그러나 사람을 포함한 영장류와 토끼를 제외한 대부분 포유동물의 초기배를 체외배양시킬 경우 배반포기로 발달하지 못하고 특정 배발달 단계에서 정지되는 시기가 있다고 Auerbarch와

Brinster(1968)가 처음으로 보고하였으며, 이러한 정지현상을 *in vitro* cell block 또는 특정 배발달 단계정지라 한다.

생쥐의 초기배를 체외에서 발달시킬 때 C₅₇BL 등 몇몇 inbred strain 또는 이들 inbred strain간의 F₁ hybrid로부터 얻은 수정란은 배반포까지 정상적으로 발달하지만, 대부분의 outbred strains의 경우에는 2-세포기에서 발달 정지 현상이 나타나 배반포까지 발달하지 못한다 (Auerbarch와 Brinster, 1968; Robl 등, 1988). 그러나 이러한 2 세포기 발달 정지 현상의

원인이나 생리적 기전 등에 대한 정확한 보고는 전무한 실정이다. 일반적으로 생체내에서는 이러한 현상이 나타나지 않기 때문에 배발달 정지현상은 불완전한 체외배양 조건에 기인한 것으로 사료되고 있다.

또한 Goddard 등(1983)은 생쥐 초기배가 2-세포기에서 발달이 정지된 수정란의 세포 소기관의 형태학적인 관찰을 하였을 때 단백질 합성과 에너지 대사에 밀접한 관계가 있는 mitochondria가 미성숙되어 있었고 2-세포기 단계에서 embryonic genome의 전사 과정이 비정상적이었다고 보고하였다.

지금까지 이러한 2-세포기 정지현상을 극복하기 위하여 많은 연구자들에 의해서 여러가지 체외배양 조건에 대한 연구가 시도되었는데, 그중에서도 O₂분압을 조정하거나(Quinn 등, 1978; Pabon 등, 1989), 배양액에 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)를 첨가함으로써 2-세포기 정지현상을 극복시킬 수 있었다는 보고들(Abramczuk 등, 1977; Fissore 등, 1989)이 있다. 또한 체외 배양액에 아미노산을 첨가하거나, 배양액의 성분 중 glucose, pyruvate, phosphate, NaCl, KCl, 또는 NaHCO₃의 조성을 변화시킨 배양액에서는 2세포기 발달 정지현상이 나타나지 않았다고 하였다(Abramczuk 등, 1977; Fissore 등, 1989; Lawitts와 Biggers, 1991).

배양액 내에 난관액 등 생체액을 첨가하여 2-세포기 정지현상을 극복시킨다는 보고도 있으며(Archibong 등, 1989), 체세포와 공동배양 하거나(Tokunaga와 Tsunoda, 1989; Priestley와 Black, 1988) 2-세포기 정지현상이 나타나지 않는 수정란의 세포질을 2-세포기 정지현상이 나타나는 수정란에 주입하였을 때 배반포까지 발달하였다고 보고하였다(Muggleton-Harris 등, 1982; Nakamura 등, 1986; Pratt 등, 1988). 이러한 결과들은 2-세포기 정지현상이 부적절한 배양조건에 기인한 세포질의 미성숙 등의 비정상적인 발달현상이 나타난다는 것을 시사한다.

최근 배발달 정지현상에 관한 연구(Quinn 등, 1978; Pabon 등, 1989; Legge 등, 1991; Noda 등, 1991)에서 수정란의 체외 수정과 체외 배양과정에서 산소 독성이 결정적으로 관여할 가능성을 보고하였다. 특히 포유동물 배를 체외배양할 때 일어나는 발달 정지현상들이 O₂분압을 낮추어줌으로써 다소 극복되었다고 하였다(Auerbarch와 Brinster, 1968; Pabon

등, 1989). 최근 Legge 등(1991)과 Noda 등(1991)은 생쥐 수정란을 체외에서 발달시킬 때 superoxide dismutase(SOD)를 첨가하여 2-세포기 정지현상을 극복시켰다.

이에 본 연구는 생쥐 수정란의 2-세포기 정지현상을 극복하고 성공적인 배발달을 유도하기 위한 체외배양 체계를 확립하고자 생쥐태아의 fibroblast 세포와 공동배양을 시도하였으며, 또한 SOD의 효과를 조사하기 위하여 SOD-Ab를 첨가한 후 생쥐 초기배의 발달을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1) 실험동물과 수정란의 회수

본 실험에 사용된 실험동물은 ICR계통의 생쥐를 사용하였고 자성은 4~5주령, 체중은 15~20g의 것을, 웅성은 8~10주령, 체중은 30~35g의 것을 각각 사용하였다. 다배란 유도를 위하여 마리당 5IU의 PMSG를 복강에 주사하고 48시간 후 동일한 방법으로 5IU의 hCG를 주사한 후 1:1의 비율로 웅성 생쥐와 합사시키고 다음날 아침에 질전의 유무를 확인하였다. 질전이 확인된 개체로부터 hCG주사후 18시간째에 난관관류법으로 수정란을 회수하였고 회수된 수정란중 형태학적으로 정상적인 전핵기 상태의 수정란만을 본 실험에 사용하였다.

2) 배양액

본 연구에 사용된 기초 배양액(basic medium: BM)은 modified tyroide 용액(T6)을 사용하였으며 단백질 공급원으로는 3mg/ml농도의 BSA(bovine serum albumin; Sigma, U.S.A.)를 첨가하여 사용하였다. 배양액의 pH는 7.4~7.6으로 삼투압은 270~290mOsmol/kg으로 조정하였고 사용직전 0.22 μ m의 filter로 여과하여 실험에 공시하였다. 수정란의 난구세포를 제거하기 위해서는 기초배양액에 1mg/ml의 hyaluronidase(Sigma, USA)를 첨가하여 사용하였다.

3) 수정란의 체외배양

본 실험에서 공시된 수정란은 hCG 주사 18시간후 난구세포를 제거하고 기초배양액에서 3회 이상 세척한

후 10~20개씩 50 μ l의 소적에서 96시간 배양하였으며 매 24시간마다 배발달 진행을 관찰하였다.

생쥐태아의 fibroblast 세포는 임신 14~15일째의 자성생쥐의 자궁에서 태아를 적출하여 fetal fibroblast를 채취한 후 cell culture bottle에서 10% FCS가 첨가된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 초대 단층배양을 유도하였다. 계대배양된 fetal fibroblast cell과 수정란을 4-well dish에 10% FCS가 첨가된 기초배양액인 T6 배양액에서 공동배양하였다.

또한 공동배양이 수정란의 배발달에 미치는 효과가 SOD에 의한 간접적인 작용인지를 규명하기 위하여 SOD-Ab (Sigma, U.S.A)를 각 농도별로 첨가하여 배양하였다. 일정시간 수정란을 배양한 후 정상적으로 배반포로까지 발달한 것을 골라 Hoechst 33342 (Sigma, U.S.A)로 염색한 후 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 할구수를 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

생쥐의 수정란을 MFFC와 공동 배양을 실시한 다음 그 발달율을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 기초배양액에서 배양한 수정란들은 2세포기에서 거의 발달이 정지되었으나 EDTA를 처리한 배양액이나 생쥐태아 fibroblast 세포와 공동배양을 실시한 것은 각각 80%와 65%의 수정란이 2세포기 발달 정지현상을 극복하여, EDTA처리군이 공동배양군보다 유의하게 높은 성적을 보였다. 그러나, 배반포까지의 배발달율을 비교해 볼 때 EDTA처리군과 공동배양군의 발달율이 각각 49%와 41%로 유의한 차이가 없었다. 이와 같은 결과는 Priestley와 Black(1988)이 생쥐 난관 상피세포와 공동배양에서 생쥐 수정란의 배반포

까지 발달을 69%보다는 저조하지만, Tokunaga와 Tsunoda(1989)가 생쥐태아 fibroblast 세포와 공동 배양한 CD1 생쥐의 초기배 발달율이 42%로 보고한 연구결과와 차이가 없었다. 따라서 생쥐태아 세포와 공동배양은 발달 정지현상 극복율은 다소 저조하지만 배반포까지의 발달성적은 매우 양호하므로 생쥐배의 체외발생에 유의한 효과가 있다고 사료된다.

공동 배양군은 생쥐태아 fibroblast 세포의 유용한 효과를 좀더 구체적으로 구명하기 위하여 배반포까지 발달된 수정란의 세포수를 생체내에서 발달된 배반포의 세포수와 EDTA처리구에서 발달된 배반포의 세포수를 조사하여 얻어진 결과를 종합하여 Fig. 1에 제시하였다. 또한 MFFC와 공동 배양한 수정란과 EDTA를 첨가하여 배반포까지 발달시킨 수정란의 핵수와 체내에서 발달한 정상적인 배반포의 핵수를 비교 조사한 결과는 Fig. 1에 제시하였다.

체내에서 발달한 정상적인 배반포와 MFFC와 공동 배양으로 발달시킨 배반포의 핵수는 각각 65~90, 60~85개로 유의한 차이가 인정되지 않았다. 그러나 EDTA가 첨가된 배양액에서 배반포로 발달한 수정란의 핵수는 30~55개로 체내에서 발달한 배반포와 공동배양에서 발달한 배반포와 비교하여 불배 유의하게 적은 세포로 구성되어 있었다. 따라서 이러한 embryonic tropic factor를 구명하기 위한 실험을 시도하였다.

생쥐 태아의 fibroblast 세포와 공동배양시 MFFC에서 SOD가 분비되어 Noda 등(1991)과 전 등(1992)이 보고한 바와 같이 이들 SOD가 embryonic tropic factor로 작용하는지 여부를 조사하기 위하여 MFFC 공동배양액에 여러 농도의 SOD-Ab를 첨가하여 생쥐 수정란을 배양한 결과, 그 발달율들을 Table 2에 요약하였다. 공동배양액에 SOD-Ab를 첨가하지

Table 1. Effect of mouse fetal fibroblast cells (MFFC) co-culture on the development of murine zygotes.

Conditions	Total embryos	Percent of zygotes developed to			
		2 cell	4 cell	8 cell	Blastocyst
Control	117	108(92)	6(5)	4(3)	2(2)
EDTA(100uM)	105	96(91)	84(80)*	69(66)*	51(49)*
MFFC co-culture	128	122(95)	83(65)*	76(59)*	52(41)*

* : Significantly different from the control (P<0.01)

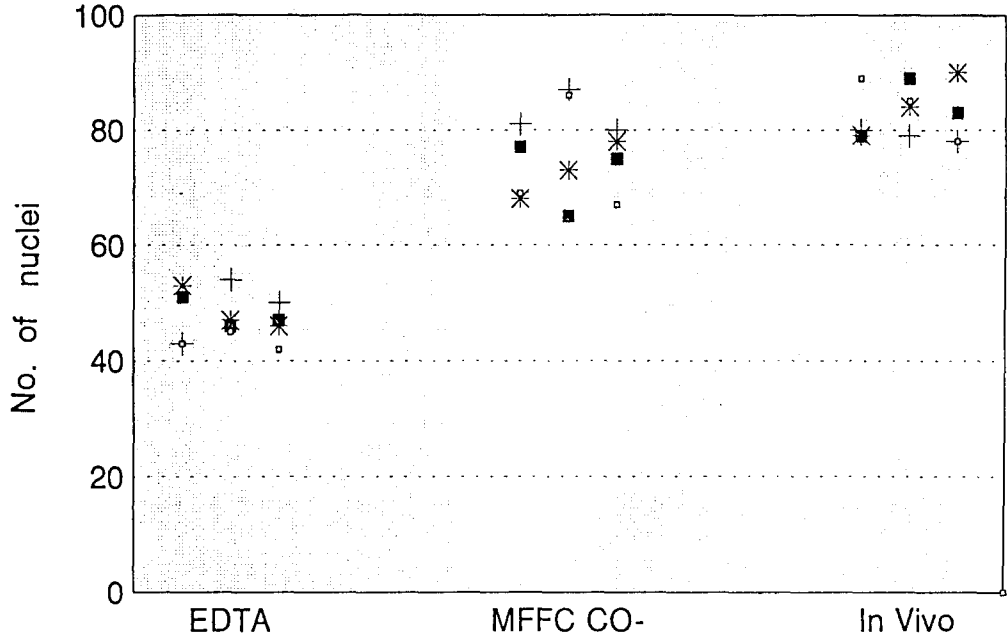


Fig. 1. Cell numbers per expanded blastocyst developed from zygotes cultured with MFFC or EDTA(100 μ m) *in vitro* and blastocyst developed *in vivo*. Each point represents the number of blastomeres in a blastocyst.

Table 2. Effect of superoxide dismutase antibody (SOD-Ab) on the development of mouse preimplantation embryos cultured for 72 hrs on the monolayer of mouse fetal fibroblast cells (MFFC).

Treatment	Total embryos	No. (%) of embryos that developed to			
		2 cell	4 cell	8 cell	Blastocyst
MFFC					
Co-culture	84	77(92)	54(61)	41(49)	30(36)
+ Ab 1:20	62	—	—	—	—
+ Ab 1:100	85	10(12)*	—	—	—
+ Ab 1:200	61	28(46)*	—	—	—
+ Ab 1:400	55	41(75)*	4(7)*	—	—
+ Ab 1:600	53	45(85)	5(9)*	—	—
+ Ab 1:800	55	46(84)	4(7)*	—	—

* Significantly different from the control treatment with MFFC co-culture (P<0.01)

않았을 때는 61%의 수정란들이 2세포기 발달 정지현상을 극복하였으며 36%의 수정란이 배반포까지 발달하였으나 SOD-Ab가 첨가된 공동배양에서는 첨가농

도가 높을수록 4세포기로의 발달율이 감소하였다. 특히 고농도인 1:20~200에서는 4세포기로 발달된 수정란은 전무하였다.

또한 저농도에서도 8세포기까지 발달된 수정란이 없었다. 따라서 이러한 결과는 전 등(1992)이 보고한 SOD의 발달 정지현상 극복효과는 SOD-Ab에 의하여 전적으로 억제된다는 것과 일치하는 것으로 MFFC는 SOD를 분비하여 생쥐 수정란의 체외 배발달을 촉진시킨다는 것을 시사한다.

이상의 결과를 종합하여 고찰해 볼 때, 생쥐 태아의 fibroblast 세포와의 공동배양은 효율적으로 생쥐의 초기배를 배반포까지 발달시킬 수 있는 조건을 갖추었다고 보며, 이러한 공동배양 체계는 배발달을뿐만 아니라 배의 분화를 촉진시킨다고 사료된다. 그리고 이들 생체세포는 SOD를 분비함으로써 생쥐 초기배의 체외발달을 촉진한다는 것은 간접적인 실험에서 확인되었다고 본다. 그러나 이들 배발달 촉진 등의 구명은 앞으로 보다 집중적인 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 포유동물의 초기배를 성공적으로 체외에서 배양시킬 수 있는 배양조건을 개발하고자 실시하였다. 공동배양을 위하여 14~15일된 생쥐태아 fibroblast 세포를 이용하였으며, 호르몬을 처리하여 다배란을 유기시킨 ICR 자성생쥐로부터 수정란을 채란한 후 단순배양액(T6) 또는 생쥐태아 fibroblast 세포(MFFC)와 96시간동안 배양을 실시하였다. MFFC와 공동배양의 효과를 조사하기 위하여 여러 농도의 superoxide dismutase 항체(SOD-Ab)를 MFFC 단층에 첨가하였으며, 수정란은 SOD-Ab가 첨가된 군과 첨가되지 않은 군에서 배양을 하였다.

수정란의 발달율은 대조군과 비교해 MFFC와 공동배양시 유의하게 높은 발달율을 나타내었다. 4-세포기까지의 발달율은 공동배양군보다 EDTA가 첨가된 군에서 높았으나 상실배, 배반포기까지의 발달율은 EDTA처리군과 MFFC와의 공동배양군간의 차이가 없었다. MFFC와 공동배양한 배반포에서는 체내에서 발달한 배반포의 할구수와 같은 할구수를 나타내었으나 EDTA첨가군에서는 매우 낮은 할구수를 나타내었다.

또한 MFFC와 공동배양의 효과를 조사하기 위해

SOD-Ab를 첨가한 결과 SOD-Ab는 MFFC의 효과를 완전히 차단시켰다. 따라서 본 연구에 있어서의 결과는 MFFC와의 공동배양이 생쥐 초기배의 발달과 분화에 효과적인 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

V. 참고문헌

1. Abramczuk, J., D. Solter and H. Koprowski. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one cell embryos in chemically defined medium. *Dev. Biol.*, 61:378-383.
2. Archibong, A. E., R. M. Petters and B. H. Johnson. 1989. Development of porcine embryos from one- and two-cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biol. Reprod.*, 41:1076-1083.
3. Auerbach, S. and R. L. Brinster. 1968. Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos. *Nature*, 217:465-466.
4. Chun, Y. S., J. H. Kim, H. T. Lee and K. S. Chung. 1992. Effect of superoxide dismutase on the development or preimplantation mouse embryos. *Proceedings of 12th International Congress on Animal Reproduction. The Hague, The Netherlands*, 3:1298-1300.
5. Fissore, R. A., K. V. Jackson and A. A. Kiessling. 1989. Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of EDTA. *Biol. Reprod.*, 41:835-841.
6. Goddard, M. J. and H. P. M. Pratt. 1983. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: An analysis of the '2-cell block'. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 73:111-133.
7. Lawitts, A. J. and J. D. Briggers. 1991. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. *Biol. Reprod.*, 45:245-251.

8. Legge, M. and M. H. Sellens. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum. Reprod.*, 6:867-871
9. Muggleton-Harris, A. L., D. G. Whittingham and L. Wilson. 1982. Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse. *Nature*, 299:460-462.
10. Nakamura, K., Y. Tsunoda and T. Sugie. 1986. An analysis of *in vitro* 2-cell block by using nuclear transplantation technique. *Teratology*, 34:443-447.
11. Noda, Y., H. Matsumoto, Y. Umaoka, K. Tatsumi, J. Kishi and T. Mori. 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:356-360.
12. Pabon, W. E., W. E. Findley and W. E. Gibbons. 1989. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil. Steril.*, 51:896-900.
13. Pratt, H.P.M. and A.L. Muggleton-Harris. 1988. Cycling cytoplasmic factors that promote mitosis in the cultured 2-cell mouse embryos. *Development*, 104:115-120.
14. Priestley, J. B., D. L. Blagk. 1988. Co-culture of preimplantation mouse embryos with oviduct epithelial cells. *Biol. Reprod.*, Suppl. 38:52.
15. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad, Jr., R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryo. *Theriogenology*, 24:687-691.
16. Quinn, P. and G. M. Harlow. 1978. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 206:73-80.
17. Robl, J. M., J. K. Lohse-Heideman and N. L. First. 1988. Strain Differences in early mouse embryo development *in vitro*: Role of the nucleus. *J. Exp. Zool.*, 247:251-256.
18. Tokunaga, T. and Y. Tsunoda. 1989. An overcoming of "*in vitro* 2-cell block" by co-culture with embryonal fibroblast cells in the mouse. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35:119-124.
19. Whitten, W. K. 1957. Culture of tuval ova. *Nature*, 179:1081-1082.