

체외수정 유래 소 배반포로부터 유사 배아 줄기 세포의 확립 및 유지

이유연^{1,3} · 김선욱² · 김지수¹ · 송봉석¹ · 조운정¹ · 박정선¹ · 유대열² · 진동일³ · 이경광¹ · 구덕본^{1,*}

¹한국생명공학연구원 재생의학연구센터, ²한국생명공학연구원 질환모델연구센터, ³충남대학교 축산학과

Establishment and Maintenance of Embryonic Stem-like Cell Lines from *In Vitro* Produced Bovine Blastocysts

Yu-Yeon Lee^{1,3}, Sun-Uk Kim², Ji-Su Kim¹, Bong-Seok Song¹, Yoon-Jeong Cho¹, Jung Sun Park¹, Dae-Yeul Yu², Dong-Il Jin³, Kyung-Kwang Lee¹ and Deog-Bon Koo^{1,*}

¹Center for Regenerative Medicine and ²Disease Model Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

³Division of Animal Science and Resources, Research Center for Transgenic and Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to examine the establishment of bovine ES-like cells having pluripotency. The hatched blastocysts derived from culture of *in vitro* fertilized embryos for 10 to 12 days dissociated mechanically into ICM- and trophoblast-rich clumps using needle, and cultured onto mitotically-inactivated MEF feeder layer. The primary colonies originated from ICM cells were detached mechanically 7 days after seeding and subsequent subculture was conducted at intervals of every 5 to 7 days. Two ES-like cell lines were established and maintained over 40 passages. Self-renewal of the established lines was confirmed by examining the alkaline phosphatase activity, stem cell-specific marker profiles including SSEA isotopes, Oct-4 and STAT3. Moreover, the established cell lines could produce anchorage-independent embryoid bodies (EBs) with gradual decrease of Oct-4 transcript level in time-dependent manner.

(Key words : Embryonic stem cell, Whole blastocyst, Bovine, *In vitro*)

요 약

본 연구는 소 배반포의 내부 세포피로부터 다능성(pluripotency)을 지닌 배아 줄기 세포(embryonic stem cell) 또는 그 유사 세포를 분리 및 배양함으로써 줄기 세포 관련 분야의 기반 기술을 확립하고자 하였다. 소 체외수정란을 10~12일간 체외배양하여 생산된 부화 배반포를 세포분열이 불활성화된 생쥐 태아 섬유아 세포(mouse embryonic fibroblast, MEF) 위에서 배양하여 콜로니 형성을 유도하였으며, 이들로부터 내부 세포피 유래의 형태를 지닌 것만을 광학현미경 하에서 물리적으로 분리하여 약 5~7일 간격으로 계대배양을 실시하였다. 이러한 방법을 통하여 배아 줄기 유사 세포의 특성을 40계대 이상 유지하는 2개의 세포주를 확립하였다. 각각의 세포주들은 높은 alkaline phosphatase(AP) 활성을 지니고 있었으며, 형광 면역 염색법과 PCR 기법을 사용하여 Oct-4, Nanog, STAT3, SSEA3 및 SSEA4의 발현을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 본 연구에서는 소 배반포로부터 배아 줄기 세포주를 확립하는 제반 기술이 확립되었다고 판단되며, 향후 관련 분야 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

서 론

배아 줄기 세포(embryonic stem cell)는 착상 전 배반포기 수정란으로부터 분리한 내부 세포피(inner cell ma-

ss, ICM)를 체외에서 배양하여 확립될 수 있으며, 모든 조직으로 분화할 수 있는 다능성(pluripotency)을 가지는 것으로 알려져 있다(Evans와 Kaufmann, 1981; Thomson 등, 1998). 따라서 수정란의 내부 세포피가 가지는 개체 형성 능력을 배아 줄기 세포가 계속적으로 유지하면서

* 본 연구는 과학기술부 한국과학재단 바이오기술개발사업(2006-04082) 연구지원에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-42-860-4418, E-mail: dbkoo@kribb.re.kr

증식하는 것은 매우 중요한 일이라 할 수 있다. 이러한 전능성을 지닌 배아 줄기 세포를 이용하여 기존의 체세포 핵이식을 통한 복제동물의 생산 효율성을 제고할 수 있었으며, 심근세포, 혈액세포, 혈관세포 및 신경세포와 같은 다양한 세포를 생산할 수 있었다(Doetschman 등, 1985; Andressen 등, 2001; Heinrich 등, 2001; Sung 등, 2006). 또한, 특정한 조건 하에서 다양한 세포 형태로 분화가 가능하기 때문에 손상된 조직을 재생하기 위한 세포 치료의 중요한 재료로서도 대단히 주목 받고 있다(Klug 등, 1996; Choi 등, 1998; Brüstle 등, 1999; Reubinoff 등, 2000).

배아 줄기 세포는 생쥐에서 최초로 확립되어(Evans와 Kaufman, 1981; Martin, 1981) 줄기 세포에 대한 연구의 기반 기술을 확립하는데 크게 기여하였다. 최근 기타의 다양한 종들에서도 배아 줄기 세포와 관련한 제반 기술을 확립하고자 하는 연구가 매우 활발히 진행되고 있으나, 아직 줄기 세포의 생산 기반 기술 확립 및 분리된 세포의 특성 연구와 관련한 기반 기술은 매우 초보적인 단계로 알려져 있다. 이전의 보고에 따르면 소 배아 줄기 세포의 형태적 특징 및 표지 인자의 발현 패턴이 연구자에 따라 일관되지 못하고 의견이 분분해 오고 있는 실정이다(Cibelli 등, 1998; Mitalipova 등, 2001; Saito 등, 2003; Wang 등, 2005). 따라서, 이러한 문제점을 확인 및 보완할 수 있는 다양한 실험적 접근은 매우 필요하다. 이와 더불어 포유류의 배아 줄기 세포 확립 및 기반 기술은 인간의 배아 줄기 세포를 이용한 기초 분야 및 세포 치료와 관련된 응용 분야뿐만 아니라 생명 윤리 문제를 보다 적극적으로 해결하는데 큰 기여를 할 것으로 기대되고 있다. 특히 인간배아의 이용이 극히 제한적인 현실을 감안할 때 다양한 포유류 배아의 활용을 극대화하는 것은 난치병의 세포 치료를 위한 대안으로 크게 부각되고 있다. 그러나, 생쥐와 인간을 제외한 기타 포유류의 배아 줄기 세포를 확립하기 위한 기반 기술은 아직 초기 단계로서 비교적 그 기반 기술이 많이 확립되어 있는 소의 수정란을 이용하여 배아 줄기 세포를 확립하고 그 효율성을 제고하는 것은 앞서 언급한 문제점을 극복하는 관점에서 매우 중요할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구는 이종 장기 분야에서 극히 취약하면서도 매우 중요한 부분인 대동물 난자로부터 배아 줄기 세포를 확립하는 기술 및 확립된 세포의 특성 연구에 그 목적을 두고 있다.

본 연구에서는 체외에서 배양된 소 배반포로부터 장기간의 배양이 가능한 배아 줄기 세포주 확립 가능성을 검토하고, 배아 줄기 세포 특이적인 유전자의 발현 분석을 통하여 그 미분화 및 분화 능력을 조사하였다.

재료 및 방법

체외성숙과 수정

도축장에서 도살된 소의 난소를 적출하여 25~30°C의 생리식염수가 충만된 보온병에 담아서 실험실까지 운반한 후, 18 G 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2~7 mm의 가시난포로부터 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 실제 현미경 하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별

하였다. 이렇게 선별된 난포란은 TL-Hepes 배양액에서 3회 정도 세척한 후 체외성숙에 공시하였다. 난포란의 체외성숙은 10%(v/v) 소 태아 혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco-BRL, USA)이 함유된 TCM-199(Gibco-BRL)에 10 IU/ml pregnant mare serum gonadotrophin(PMSG, Sigma, St. Louse, USA), 10 IU/ml human chorionic gonadotrophin(hCG Sigma), 0.6 mM cysteine(Sigma), 0.2 mM sodium pyruvate, 10 ng/ml epidermal growth factor(EGF, Sigma, USA), 10 ng/ml β -mercaptoethanol 및 1 μ g/ml estradiol-17 β 를 첨가하여 사용하였다. 미성숙 난자는 60 mm 배양접시(Nunc, Roskilde, Denmark)를 사용해 50 μ l의 소적으로 만들어 mineral oil로 피복하고 각 소적 당 10개의 난포란을 침적하여 38.5°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 20~22시간 동안 체외성숙을 실시하였다.

체외수정은 젖소의 동결정액을 사용하였다. 성숙 난포란은 0.6% BSA가 첨가된 Fer-TALP 배양액 50 μ l에 2 \times 10⁶ cells/ml 농도의 동결 정액을 첨가하여 38.5°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 20시간 체외수정을 유도한다. 이때, 50 μ l 소적 안에는 2 mg/ml heparin, 20 mM penicillamine, 10 mM hypotaurine, and 1 mM epinephrine (PHE)을 첨가한다. 수정 유린 후 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액에서 48시간 배양하여 분할된 체외수정란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 배양액으로 옮겨 7~9일간 추가 배양하였다.

생쥐 태아 섬유아 세포의 준비

수정 후 임신 13.5일령 생쥐 (129/SvJae)의 태아를 어미의 자궁으로부터 적출한 후 멸균된 PBS로 3~4회 세정하였다. 회수된 태아는 머리와 내장을 제거한 후 작은 조각 (>1 mm³)으로 썰어 피부 세포를 분리해내어 DPBS로 6~8회 충분히 헹구어 원심분리한 다음 60 mm 세포배양 용기로 옮기고, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco-BRL)을 기본 배양액으로 하여 10% FBS, 50 mg/ml gentamicin sulphate를 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 조건하에서 배양시킨다. 이렇게 배양된 생쥐 태아 섬유아 세포를 10 mg/ml mitomycin-C를 처리하여 유사분열을 억제시킨 뒤 동결시켜서 LN₂ 용기 내에 보관하며 사용하였다. 동결 보존된 세포는 사용 하루 전에 용해하여 0.1%의 gelatin으로 코팅된 4-well multidish(Nunc, Roskilde, Denmark)에 1.5 \times 10⁵ cell/ml의 농도로 준비하였다.

부화 배반포와 생쥐 태아 섬유아 세포의 공배양 및 계대

상기한 방법을 통해 생산한 부화 배반포의 상태를 관찰한 후, 생쥐 태아 섬유아 세포 단층배양세포 위에서 DMEM(Gibco-BRL)을 기본배양액으로 하여 20% FBS(Gibco), 1 \times nonessential amino acids(Sigma), 1 \times vitamin solution(Gibco-BRL), 1 \times antibiotics solution(Gibco-BRL) 및 40 ng/ml Leukemia inhibitory factor(LIF, Chemicon, USA)가 첨가된 배양액에서 배양하여 콜로니 형성을 유도하였다(Fig. 1).

배반포 유래 콜로니에서 내부 세포괴 분리 과정 및 지속적 배양

형성된 일부 초기 콜로니로부터 내부 세포괴 유래의 형태를 지닌 세포괴를 광학현미경 하에서 물리적으로 떼

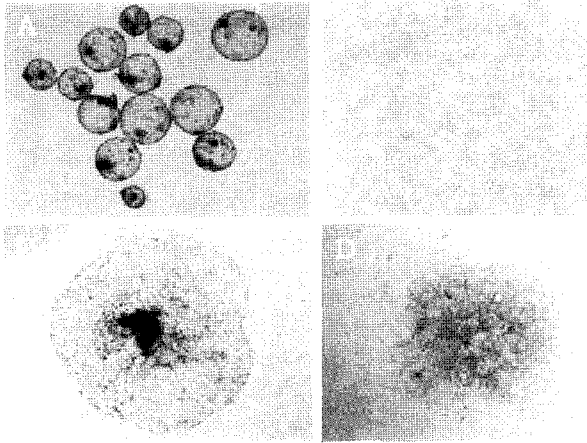


Fig. 1. Outgrowth of bovine blastocysts on MEF feeder cells. A) Hatched blastocysts were produced for 10~12 days after IVF. B) Mitotically inactivated MEF feeder cells by Mitomycin C treatment. C) Formation of the primary ES-like cell colony at 5 days after plating. D) ES like cells at 7 days after plating (Magnification, ×40).

어 내 두 개의 1 ml 주사기의 25-gauge 주사침을 이용하여 일정한 크기로 세절하였으며, 약 10~15개의 분리된 세포 덩어리들을 신선하게 준비한 생쥐 태아 섬유아 세포 단층배양세포 위에 옮겨 계대배양을 실시하였다. 배양액은 콜로니 형성을 확인한 후 2일마다 교환하여 주었으며, 약 5~7일 간격으로 계대배양을 실시하였다.

콜로니의 형태학적 관찰

소 배반포 유래 콜로니(Line 1과 Line 2)의 지속적 배양을 실시하였으며, 형태학적 양상을 배양액 교체시에 현미경 하에서 관찰하였다. 계대배양시 분화가 일어나지 않고 세포와 세포 사이가 밀착되어 있는 콜로니를 선별하였다.

RT-PCR을 이용한 배아 줄기 세포 특이 유전자의 발현 확인

확립한 두 세포주로부터 먼저 생쥐의 배아 줄기 세포의 특이 유전자로 잘 알려진 Oct-4(441 bp)와 STAT3 (203 bp)의 발현(Niwa 등, 1998; Matsuda 등, 1999)을 확인하기 위하여 total RNA 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. 배양되고 있는 Line-1과 Line-2 세포와 수정란의 RNA는 RNeasy mini kit(Qiagen)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 Super-ScriptIII reverse transcriptase(Invitrogen)를 이용하여 cDNA로 만들어 미분화 특이 유전자를 증폭시켰다. PCR은 93℃에서 20초, 52℃에서 20초 그리고 72℃에서 40초간씩 45회를 실시하였고, 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에서 ethidium bromide 염색으로 확인하였으며, Gel Doc EQ system(Bio-Rad)에서 조사하였다. 본 실험에 이용된 primer는 Oct4(Gene Bank Number NM174580) (5'- : CGA GTA TCG AGA ACC GAG TG -3', 5'- : CAG GGT TCT CTC CCT AGC TC -3', 441 bp)와 STAT3(Gene Bank Number NM001012671) (5'- : GAC CCG CCA ACA AAT TAA GA -3', 5'- : GGA CAC CGG TCT TGA TGA CT -3', 203 bp)를 이용하였다.

면역 화학적 염색에 의한 콜로니 특성 분석

유사 배아 줄기 세포로 인정된 콜로니(Line 1과 Line 2)에서 배아 줄기 세포 특이 표지인자의 발현 패턴을 확인하기 위해서 면역 화학 염색 방법을 이용하였다. 계대 배양을 통해 일정한 크기로 세포를 배양시킨 뒤 염색을 위해서 4% paraformaldehyde로 고정한 후 0.1% Triton X-100(Sigma)로 침투시키고 2% BSA로 1시간 blocking 하였다. 미분화 상태를 확인하기 위한 일차 항체로는 goat anti-Oct4 antibody(1:300, Santacruz), goat anti-Nanog antibody(1:100, R&D), mouse anti-SSEA1 antibody(1:100, R&D), rat anti-SSEA3 antibody(1:100, R&D), mouse anti-SSEA4 antibody(1:100, R&D)를 이용하여 4℃에서 overnight 하였다. 일차 항체에 대한 반응 정도는 각각의 종과 일치하는 이차 항체를 이용하여 실온에서 45분간 반응시켜 형광 현미경 하에서 표지인자들의 발현 여부를 관찰하였다.

배아체로의 분화 유도

본 실험에서 확립한 유사 배아 줄기 세포를 이용하여 배아체(Embryonic Body)로의 분화를 유도하기 위하여 mouse LIF가 첨가되지 않은 DMEM/F12를 기본 배양액으로 사용하였으며, N-2 supplement와 B-27 supplement를 첨가하였다. 배아체로의 분화 유도를 위해 앞에 상기한 기본 배양액으로 부유 배양을 실시하였으며, 이 후 배아체로 형성이 되는지를 3~5일 간격으로 현미경 하에서 관찰하였다. 배아체 형성을 유도한 후 5주 동안 배양하여, 3주와 5주간 배양된 배아체의 Oct4의 발현 양상을 RT-PCR을 수행하여 확인하였다.

확립된 배아 줄기 세포의 성판별

배양되고 있는 Line-1과 Line-2 세포와 수정란의 RNA는 RNeasy mini kit(Qiagen)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 Super-ScriptIII reverse transcriptase(Invitrogen)를 이용하여 cDNA로 만들어 증폭시켰다. PCR은 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 그리고 72℃에서 1분간씩 38회를 실시하였고, 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에서 ethidium bromide 염색으로 확인하였으며, Gel Doc EQ system(Bio-Rad)에서 조사하였다. 본 실험에 이용된 primer(Tominaga 등, 2004)는 소 상염색체 특이 유전자(bovine autosomal centromer-specific primer; BSP) (5'-TTT ACC TTA GAA CAA ACC GAG GCA C -3', 5'-ACG GAA AGG AAA GAT GAC CTG ACC -3', 538 bp)와 소 Y-염색체 특이 유전자(bovine Y-chromosome-specific primer; BY) (5'-CTC AGC AAA GCA CAC CAG AC -3', 5'-GAA CTT TCA AGC AGC TGA GGC -3', 300 bp)를 이용하였다.

결 과

소 배반포 유래 유사 배아 줄기 세포주의 확립

소 체외수정란 유래 부화 배반포를 그대로 배양하거나 또는 물리적인 방법으로 내부 세포피를 분리하여 배양하

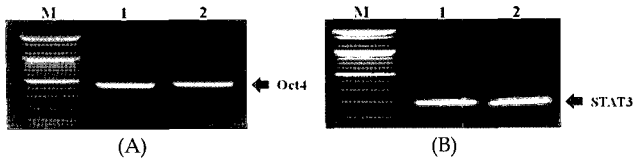


Fig. 2. RT-PCR analysis for expression of the transcription factor in the established bovine ES-like cell lines. A) Oct4, B) STAT3. M, marker; lane 1, Line-1; lane 2 Line-2.

는 방법을 이용하여 콜로니 형성을 유도한 결과, 내부 세포괴를 배양한 경우(7/8, 87.5%)에 비해 배반포 전체를 배양한 경우에서 보다 높은 콜로니 형성율(11/12, 91.7%)을 보이는 것으로 조사되었다(미제시). 따라서 이 후 배반포로부터 배아 줄기 세포주를 확립하는 과정은 부화 배반포를 그대로 배양하는 방법을 이용하였다. 배양된 초기 콜로니 중 배아 줄기 세포와 형태적으로 유사하고, 세포 간 밀착 정도가 우수한 것만을 선별하여 약 5~7일 간격으로 계대배양하며, 40계대까지 유지되는 2개의 세포주를 개발할 수 있었다(미제시).

유사 배아 줄기 세포의 특성 검증

확립한 두 세포주의 total RNA 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과, Line-1과 Line-2에서 모두 양성 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한, 배아 줄기 세포 특이 발현 인자에 대한 발현 양상을 면역화학 염색법으로 조사한 결과, 두 세포주 모두에서 AP, Oct-4, Nanog, SSEA3 및 SSEA4가 발현하는 것으로 확인되었으며, SSEA1의 경우는 발현되지 않음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

유사 배아 줄기 세포에서 분화능 확인

Line-1과 Line-2의 배아체 형성 실험 결과, 두 계통의 줄기 세포로부터 전형적인 배아체 형성을 유도할 수 있었으며, 이들 배아체를 5주까지 유지하였을 때 줄기 세포에서 대표적인 미분화 특이 유전자인 Oct-4의 발현량이 분화 시간과 관련하여 점차 감소하는 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 배아 줄기 세포주의 PCR에 의한 성판별 결과, 두 개의 세포주는 모두 암컷으로 확인되었다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서는 체외수정에 의해 생산된 소 배반포로부터 배아 줄기 세포주의 확립, 줄기 세포주의 특성 및 분화 능력 등을 확인하였다.

본 연구를 통해 확립된 두 세포주에서 배아 줄기 세포의 특이 유전자로 잘 알려진 Oct-4(441 bp)와 STAT3(203 bp)의 발현(Niwa 등, 1998; Matsuda 등, 1999)이 확인되었다. 이러한 결과는 확립된 두 개의 세포주가 배아 줄기 세포의 특성을 유지하는데 필요한 전사인자를 모두 보유하고 있음을 시사한다. 또한, 본 연구에서 배아 줄기 세포로 판단되고 미분화 상태로 유지되고 있는 두 개의 세포주 모두에서 AP, Oct-4, Nanog, SSEA3 및 SSEA4가 발현하는 것으로 확인되었으며, SSEA1는 발현되지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 Wang 등(2005)이 개발한 소 배아

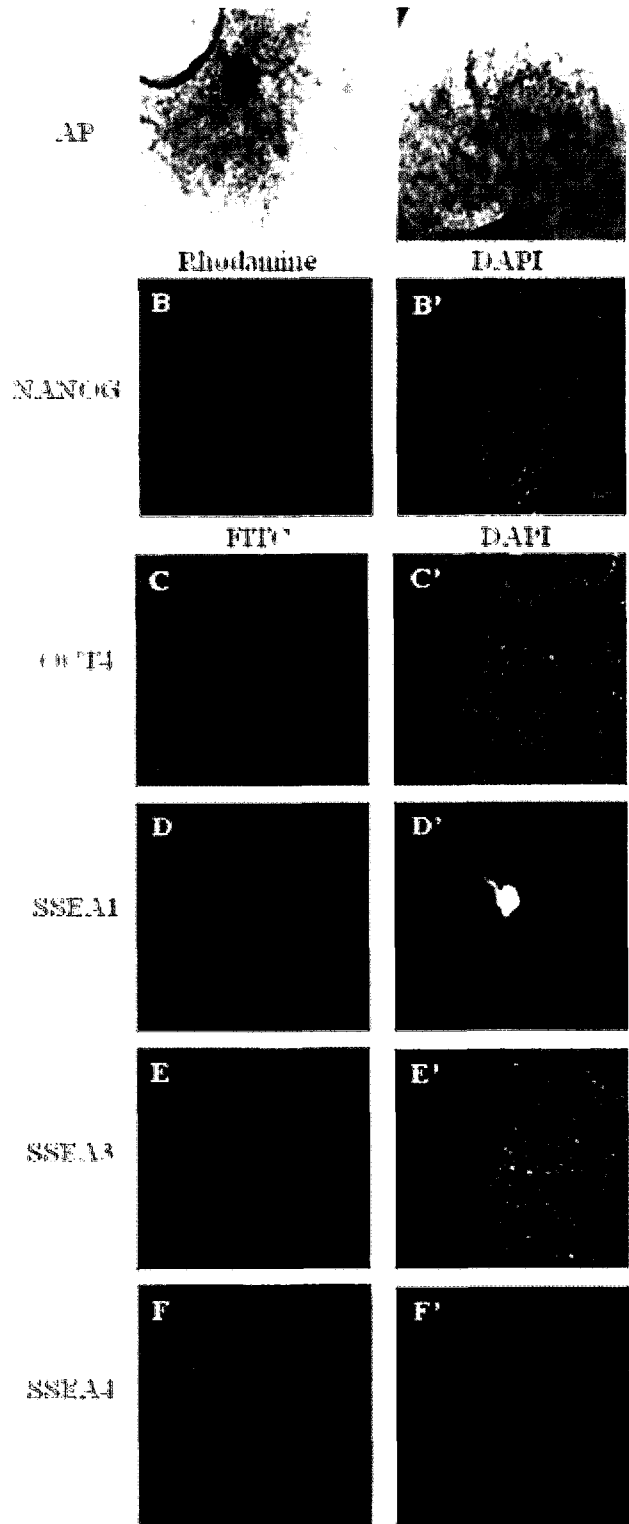


Fig. 3. Expression profiles for ES cell specific markers in the established bovine ES-like cell lines. AP activity (A and A') and expression of ES cell specific markers including Nanog (B and B'), Oct4 (C and C'), SSEA1 (D and D'), SSEA3 (E and E'), and SSEA4 (F and F') were analyzed using 20th-passaged ES-like cells. (Magnifications are $\times 40$, A D; $\times 100$, B C E; $\times 200$, F).

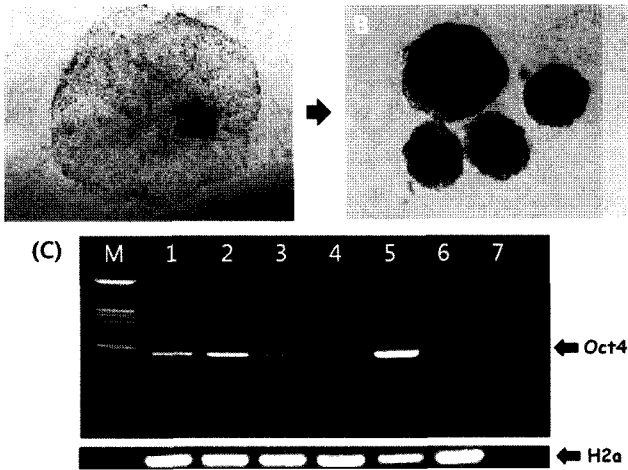


Fig. 4. The expression kinetics of Oct-4 during differentiation of bovine ES-like cells. A) undifferentiation colony, B) embryoid body, C) RT-PCR. Lane 1, undifferentiation; Lane 2, 3 weeks; lane 3, 5 weeks; lane 4, spontaneous differentiated cells; lane 5, positive control; lane 6, negative control (bovine embryonic fibroblast, bEF); lane 7, negative control (distilled water).

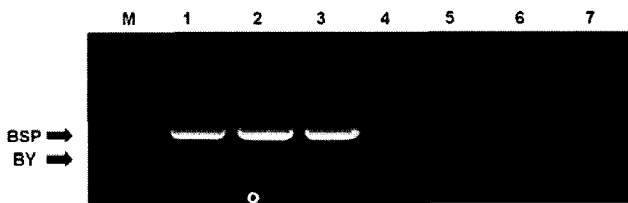


Fig. 5. The verification of SRY region in the established bovine ES-like cell lines. BSP, bovine autosomal centrome-specific primer (538 bp); BY, bovine Y-chromosome specific primer (300 bp); M, marker; lane 1, blastocysts; lane 2 Line-1; lane 3 Line-2; lane 4 mouse embryonic stem cells, MEF; lane 5, mouse embryonic body, mEB; lane 6, human embryonic stem cells, hES; lane 7, distilled water.

줄기 세포에서 SSEA1 발현이 음성인 것과 SSEA3 및 SSEA4 발현이 관찰된 Mitalipova 등(2001)의 결과와 일치하고 있었다. 그러나 이러한 발현 분포와 상반되는 결과 (Mitalipova 등, 2001; Saito 등, 2003) 뿐만 아니라 보다 복합적으로 결과의 차이를 보이는 연구도 종종 보고되고 있다(Saito 등, 2003). 따라서, 현재까지 소 배아 줄기 세포의 특성과 관련된 전사 인자 및 표면 항원의 발현 분포는 확정된 바 없지만, 본 연구에서 개발한 유사 줄기 세포주가 이러한 선행 연구들의 경향과 많은 부분 일치하고 있는 것은 개발된 2개의 세포주가 배아 줄기 세포의 특성을 갖고 있음을 시사한다. 흥미롭게도 본 연구에서 관찰된 결과는 인간 배아 줄기 세포에서의 미분화 표지 인자들의 발현 양상과 거의 일치함을 확인할 수 있었다 (Klimanskaya 등, 2006). 이러한 결과들을 토대로 향후에는 소 배아 줄기 세포에서 발현되는 유전자들의 분포와 그 세포의 특성과의 관련성을 보다 많은 세포주로부터 검증하여 명확한 검증 기준을 제시하는 것이 중요할 것으로 판단된다.

배아 줄기 세포의 가장 큰 특징은 모든 계통의 세포들

로 분화할 수 있는 능력을 지니고 있다는 것이다. 즉, 배아 줄기 세포로부터 배아체를 형성하여 특정 세포로 분화를 유도하였을 때, 줄기 세포의 특성을 유지하는 유전자의 발현이 감소됨과 동시에 그 내부에는 내배엽, 외배엽 및 중배엽 유래의 세포가 나타나게 된다. 따라서 본 연구에서 소 체외수정란 유래 배아 줄기 세포로 판단되는 두 개의 세포주로부터 분화능을 확인한 결과, 두 계통의 줄기 세포로부터 전형적인 배아체 형성을 확인할 수 있었으며, 이들 배아체를 5주까지 유지가 가능하였다. 특히, 줄기 세포에서 대표적인 미분화 특이 유전자인 Oct-4의 발현량이 분화 시간과 관련하여 점차 감소하는 양상을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 최근 물소의 단위 발생 난자로부터 유도된 배아 줄기 세포의 분화 실험에서 배아체 형성 이후에 Oct-4의 발현이 감소된다는 보고(Sritanaudomchai 등, 2007)와 일치하는 것으로서 본 연구에서 개발한 세포주가 배아 줄기 세포의 일반적인 분화양상을 재현할 수 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 확립된 2개의 유사 배아 줄기 세포주는 현재 44 및 45 계대까지 배양되고 있으며, 형태학적으로도 미분화된 상태를 유지하고 있다. 아울러 유사 배아 줄기 세포주를 보다 효율적으로 양산하기 위해 배양액의 조성 및 첨가물의 종류에 대한 영향을 조사하고 있으며, 또한 기 개발된 세포가 진정한 배아 줄기 세포의 능력을 지니고 있는가에 대해 테라토마 형성과 관련된 추가적인 연구도 준비 중이다.

결론적으로 본 연구에서 개발된 소 배아 줄기 세포의 확립 기술 및 특성 분석은 향후 관련 분야의 연구를 위한 기초 자료로서 이용가치가 높을 것으로 기대되며, 형질 전환 동물의 효율적 생산 및 인간의 난치병을 치료하기 위한 이종간 핵이식 분야에서 소 난자의 이용성을 극대화하는데 결정적인 역할을 할 것으로 생각된다.

인용문헌

1. Andressen C, Stocker E, Klinz FJ, Lenka N, Heschler J, Fleischmann B, Arnhold S, Addicks K (2001): Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. *Stem Cells* 19:419-424.
2. Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Kanam K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, MacKay RD (1999): Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285:754-756.
3. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G (1998): A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125:725-732.
4. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM (1998): Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell derived stem like cells. *Nat Biotechnol* 16:642-646.
5. Christine AI, Lisa JR (2000): NBN defined medium supports the development of O4+/O1- immunopanned pro-oligodendroglia. *Brain Res Dev Brain Res*

- 29:125:1-8.
6. Doetschman TC, Eistetter H, Kata M, Schmidt W, Kemler R (1985): The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27-45.
 7. Evans MJ, Kaufmann MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
 8. Heinrich S, Theben T, Hescheler J, Lindner M, Brandt MC, Wartenberg M (2001): Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H411-H421.
 9. Klug MG, Soompao MM, Koh GY, Field LJ (1996): Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98:216-224.
 10. Tominaga K, Hamada Y (2004): Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine *in-vitro* produced blastocysts. *Theriogenology* 61:1181-1191.
 11. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R (2006): Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444:481-5.
 12. Martin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7634-8.
 13. Matsuda T, Nakamyra T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T (1999): STAT-3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18:4261-4269.
 14. Mitalipova M, Beyhan Z, First NL (2001): Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. *Cloning* 3:59-67.
 15. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A (1998): Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT-3. *Genes Dev* 12:2048-2060.
 16. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CH, Trounson A, Bongso A (2000): Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 18:399-404.
 17. Saito S, Sawai K, Ugai H, Moriyasu S, Minamihashi A, Yamamoto Y, Hirayama H, Kageyama S, Pan J, Murata T, Kobayashi Y, Obata Y, Yokoyama KK (2003): Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 309:104-113.
 18. Sritanaudomchai H, Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y, Kupradinun P, Mitalipov S, Kusamran T (2007): Characterization and multilineage differentiation of embryonic stem cells derived from a buffalo parthenogenetic embryo. *Mol Reprod Dev* 74:1295-1302.
 19. Sung LY, Gao S, Shen H, Yu H, Song Y, Smith SL, Chang CC, Inoue K, Kuo L, Lian J, Li A, Tian XC, Tuck DP, Weissman SM, Yang X, Cheng T (2006): Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Genetics* 38:1323-1328.
 20. Thomson JA, Itskovitz-Elder J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
 21. Tominaga K, Hamada Y (2004): Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine *in-vitro* produced blastocysts. *Theriogenology* 61:1181-1191.
 22. Wang L, Duan E, Sung LY, Jeong BS, Yang X, Tian XC (2005): Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol Reprod* 73:149-155.

(접수일자: 2007. 8. 20 / 채택일자: 2007. 9. 19)