

LIF를 첨가한 배양액을 이용한 할구 유래 생쥐 배아줄기세포주의 확립

조재원 · 임천규 · 고덕성 · 강희정 · 전진현[†]

관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실

Derivation of Mouse ES Cells from Isolated Blastomeres in Culture Media Supplemented with LIF

Jae Won Cho, Chun Kyu Lim, Duck Sung Ko, Hee Jung Kang and Jin Hyun Jun[†]

Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, Cheil General Hospital & Women's Healthcare Center,
Kwandong University of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on the derivation of mouse ES cells from isolated blastomeres. Two-cell stage mouse embryos were obtained from superovulated BDF1 female mice. Collected embryos were cultured to blastocyst stage in culture medium supplemented with 0, 1,000, 2,500 or 5,000 U/mL of LIF. Cultured blastocysts were examined by counting the number of cells in the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) using differential staining method. When 2-cell embryos were cultured with 2,500 U/ml of LIF, the cell numbers of ICM significantly increased in comparing with those of the control (21.0 ± 4.0 vs. 15.9 ± 5.0 , $P < 0.01$) and 1,000 U/mL of LIF-containing group (21.0 ± 4.0 vs. 16.6 ± 4.9 , $P < 0.05$). We used an ES cell establishment medium with 20% Knockout Serum Replacement and 0.01 mg/mL ACTH instead of fetal bovine serum. Establishing efficacy of ES cell lines were the highest in 2,500 U/mL of LIF-containing group as 36.7% (11/30). This culture medium was applied to the culture of isolated blastomeres and to derive ES cell lines. Three ES cell lines (21.4%) from isolated blastomeres of 2-cell stage embryos were established. In further experiments, we could establish one ES cell line (4.0%) from single blastomere of 4-cell stage embryo. The subcultured ES cells and their embryoid bodies were characterized by analyzing gene expression for undifferentiation and differentiation marker gene using immunocytochemistry and RT-PCR. In conclusion, LIF supplementation in culture medium could increase the cell number in ICM of blastocysts and support derivation of ES cell lines from isolated blastomeres.

Key words : LIF, ICM, Mouse ES cells, Isolated blastomere, Gene expressions.

요 약 : 본 연구에서는 LIF의 첨가가 분리된 할구 유래의 생쥐 배아줄기세포 확립에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 과배란 유도된 BDF1 생쥐로부터 2-세포기의 배아를 회수하여 각기 LIF가 첨가되지 않은 배양액과 1,000, 2,500, 5,000 U/mL의 LIF가 첨가된 배양액에서 포배기 배아까지 배양하였다. 배양된 포배기 배아는 차별화 염색 방법을 이용하여 내세포괴와 영양배엽의 수를 계수하였다. 2,500 U/mL의 LIF 첨가 시 대조군(21.0 ± 4.0 vs. 15.9 ± 5.0 , $P < 0.01$)과 1,000 U/mL의 LIF를 처리한 군(21.0 ± 4.0 vs. 16.6 ± 4.9 , $P < 0.05$)에 비해서 내세포괴의 수가 유의하게($P < 0.05$) 증가하였다. 배아줄기세포주 확립 배양액으로는 FBS 대신 20% KSR과 0.01 mg/mL의 ACTH를 사용하였다. 2,500 U/mL의 LIF를 첨가 시 배아줄기세포 확립 효율이 36.7%(11/30)로 가장 높은 효율을 나타내었다. 이러한 배양 조건을 기본으로 하여 2-와 4-세포기 배아의 단일 할구를 분리하여 각기 21.4%(3/14)와 4.0%(1/20)의 효율로 단일 할구 배아줄기세포주를 확립할 수 있었다. 단일 할구로부터 확립된 배아줄기세포주와 이들에게서 분화된 배아체는 세포면역학적 염색 방법과 RT-PCR 방법을 통해 그들의 미분화 특성과 삼배엽성 분화 특성을 확인할 수 있었다. 결론적으로 배양액에 LIF를 첨가하여 포배기 배아의 내세포괴 수를 증가시킬 수 있었으며, 분리된 할구의 배아줄기세포주 확립 효율을 향상시킬 수 있었다.

[†] 교신저자: 경기도 성남시 수정구 양지동 212, 을지대학교 보건과학대학 임상병리학과 (우) 461-713, (전) +82-31-740-7210, (팩) +82-31-740-7354, E-mail: junjh55@hanmail.net

서 론

배아줄기세포(embryonic stem cells, ES cells)는 세포치

료 및 재생의학, 조직공학 등 광범위한 분야에 있어서 이용 가능성이 매우 높다. 특히, 인간 배아줄기세포를 세포 치료에 사용하기 위해서는 이식세포에 대한 면역 거부 반응을 방지할 수 있는 방법의 개발이 필수적이다. 이러한 면역 거부 반응을 방지하는 방법으로 체세포 핵이식 배아줄기세포에 대한 연구가 진행 중이지만 그 효용성에 대한 논란이 많다. 또한, 배아줄기세포를 확립하기 위해서는 배아를 파괴해야 하므로 윤리적인 문제를 피할 수 없기 때문에 인간 배아줄기세포 확립 연구가 제한되고 있는 실정이다. 최근에 이러한 문제점을 극복하기 위한 몇 가지 방안이 제시되었다. 2002년 Cibelli 등은 영장류에서 인위적으로 단위 발생시킨 배아를 이용하여 배아줄기세포주를 확립하였다고 보고한 바 있으며, 2006년 Takahashi 등은 Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 4 종류의 특정 유전자를 바이러스를 이용해 성체섬유아세포에 주입시켜 다분화능을 지닌 줄기세포주를 확립하였다고 보고하였다. 그러나, 위의 방법들은 줄기세포를 만들기 위해 바이러스를 이용하거나 특정 유전자를 조작해야 하는 어려움이 있으며, 이러한 방법들에 대한 안정성의 문제가 제기되고 있다.

한편, 포유류의 착상 전 초기 배아의 할구를 이용하여 배아줄기세포를 확립하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다. 초기 배아에서 분리된 할구는 전분화능(totipotency)을 가지고 있어 일란성 쌍둥이로 발생할 수 있으며, 이러한 할구의 발생 능력은 생쥐, 토끼, 양, 돼지뿐만 아니라 영장류에서도 명확하게 확인되었다(Tarkowski et al., 1967; Moore et al., 1968; Rossant et al., 1976; Willadsen et al., 1981; Menino et al., 1983; Chan et al., 2000; Tao et al., 2000). 초기 배아에서 분리한 할구를 이용한 배아줄기세포주 확립 기술은 착상전 유전 진단(preimplantation genetic diagnosis: PGD)에서 사용되고 있는 할구 생검(blastomere biopsy) 방법의 발달로 인해 접근이 용이해졌으며, 성공적으로 적용되어 그 효용성이 입증되었다(Handyside et al., 1990; Geber et al., 1995; Staessen et al., 2004). 또한, 초기 배아의 발생에 영향을 주지 않고 배아줄기세포주를 확립할 수 있기 때문에 배아줄기세포 확립 시 배아를 파괴해야 하는 윤리적 문제를 극복할 수 있고 다양한 배아줄기세포주를 확립할 수 있는 방안이 될 수 있다.

분리한 할구를 이용한 배아줄기세포 확립에 관한 연구는 Delhaise 등(1996)에 의해 생쥐 8-세포기 배아를 이용한 연구에서 최초로 보고된 바 있다. 또한, 2006년 Chung 등은 생쥐 초기 배아에서 분리한 단일 할구에서 기존의 배아줄기세

포와 공배양함으로써 배아줄기세포와 배외줄기세포주(extraembryonic stem cell line)를 성공적으로 확립하였다고 보고하였으며, Klimanskaya 등(2006)이 동일한 방법으로 8~10-세포기의 인간 배아를 이용하여 단일 할구 유래의 배아줄기세포주를 확립하였다고 보고하였다. 최근에 Wakayama 등(2007)은 배아줄기세포주를 확립하기 위한 배양액에 일반적으로 사용하고 있는 fetal bovine serum (FBS) 대신 20%의 Knockout serum replacement와 0.1 mg/mL의 adrenocorticotropic hormone (ACTH)을 첨가하여 높은 단일 할구 배아줄기세포 확립 성공률을 보고하였다. 그러나, 배아의 발생이 진행됨에 따라 할구 유래 배아줄기세포 확립 효율이 유의하게 감소하여 발생 단계에 따른 단일 할구 유래의 배아줄기세포 확립에 관한 추가적인 연구가 필요함을 보고하였다. 또한, Tao 등(2000)은 배아 발생 단계가 진행됨에 따라 할구 유래의 포배기 배아에 있어서 내세포피의 비율이 점차적으로 감소한다고 보고하였으며, 이로 인해 분리된 할구의 배아 이식 후 태아의 생존 능력이 떨어지는 것으로 추측하였다. 초기 배아의 체외 배양액에 LIF를 첨가한 다양한 연구들에서 Dunghison 등(1996)은 인간 초기 배아의 배양 시 LIF (leukemia inhibitory factor)를 첨가함으로써 포배기 형성을 유의하게 향상시킬 수 있었다고 보고한 바 있으며, Fry 등(1992)은 양의 초기 배아의 배양 시 LIF를 첨가해줌으로써 생존률을 향상시킬 수 있다고 보고하였다. 근래에 Cheung 등(2003)은 생쥐 초기 배아의 배양 시 배양액에 1,000 U/mL의 LIF를 첨가해주었을 때 배아 전체의 세포수가 유의하게 증가한다고 보고하여 배양액에 LIF를 첨가해줌으로써 세포수를 증가시킬 수 있음을 시사하였다.

본 연구에서는 초기 배아의 체외 배양과 배아줄기세포 확립에서 사용하는 배양액에 첨가한 LIF의 영향을 조사하였으며, 그 결과를 토대로 초기 배아의 단일 할구를 이용하여 배아줄기세포주를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 생쥐 초기 배아의 체외 배양액에 첨가된 LIF의 영향
과배란을 유도한 BDF1 (C57BL×DBA) 생쥐로부터 2-세포기의 배아를 회수하였다. 회수된 배아는 G2.3 (Vitrolife, Sweden) 배양액에서 2~3회 수세한 후, LIF가 첨가되지 않은 G2.3 배양액과 각각 1,000, 2,500, 5,000 U/mL의 LIF가 첨

가된 G2.3 배양액에서 포배기 배아까지 배양되었다. 각 실험군에서 포배기의 배아를 회수하여 내세포괴(inner cell mass, ICM)와 영양외배엽(trophectoderm)을 각각 염색하여 각 부위의 수를 계수하였다. 포배기의 배아를 phosphate buffered saline (PBS)로 2~3회 수세한 후 1% Triton X-100과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (PI)가 첨가된 PBS를 이용하여 영양외배엽을 염색하였다. PI 염색 직후, 포배기 배아를 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 bisbenzimidazole (Hoechst 33258)가 첨가된 ethanol에서 고정하면서 배아 전체를 염색하였다. 염색된 시료는 냉장 상태로 12시간 이상 보관한 후 100% glycerol로 mounting하였으며, image analyzer를 이용하여 세포수를 계수하였다.

2. LIF와 ACTH가 첨가된 체외 배양액을 이용한 배아줄기세포주 확립

과배란을 유도한 BDF1 생쥐로부터 2-세포기의 배아를 회수하여 LIF가 첨가되지 않은 G2.3 배양액과 LIF가 각각 1,000, 2,500, 5,000 U/mL 첨가된 G2.3 배양액에서 포배기까지 배양하였다. 배아줄기세포주를 확립하기 위하여 각 처리군별로 30개의 포배기를 획득하여 Acidified Tyrodes solution (Mediatec Inc., Denmark)에서 투명대를 제거하였다. 투명대를 제거한 포배기 배아는 G2.3 배양액으로 2~3회 수세하여 20% Knockout Tyrodes solution (Mediatec Inc., Denmark)에서 투명대를 제거하였다. 투명대를 제거한 포배기 배아는 G2.3 배양액으로 2~3회 수세하여 20% Knockout Serum replacement (KSR), 2,000 U/mL LIF와 0.01 mg/mL ACTH fragment 1~24 (Sigma, USA)가 첨가된 Knockout DMEM (Invitrogen Inc., USA) 배양액에서 유사분열적으로 불활성화 된 STO 지지 세포주와 공배양하였다. 5일간 공배양한 후 내세포괴를 영양외배엽과 물리적으로 분리시킨 후 새로운 지지 세포와 공배양하였다. 배아줄기세포의 계대배양은 2세대까지는 물리적인 방법을 이용하여 실시하였으며, 2세대 이후에는 trypsin/EDTA (0.25%/0.02%)를 이용하여 4~5일 간격으로 반복적으로 실시하면서 배아줄기세포 확립을 시도하였다.

3. 단일 할구 유래의 배아줄기 세포주 확립

초기 생쥐 배아의 할구를 분리하여 포배기까지 배양하기 위하여 과배란을 유도한 BDF1 생쥐로부터 2~4세포기의 배아를 회수하였다. 회수한 배아는 G2.3 배양액에서 2~3회 수세한 후, 2- 또는 4-세포기의 동일한 배아로부터 획득된 각

각의 할구들을 대상으로 배아줄기세포주 확립을 시도하였다. 할구의 분리는 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 이 첨가되지 않은 biopsy medium (Mediatec, Denmark)을 이용하였으며, 20 μm 직경의 biopsy pipet을 이용하여 Acidified Tyrodes solution으로 투명대를 일부 제거한 후 배아로부터 각 할구를 분리하였다. 분리된 각 할구는 G2.3 배양액으로 2~3회 수세한 후 LIF 2,500 U/mL가 첨가된 G2.3 배양액에서 3일간 배양하여 포배기까지 배양하였다. 형성된 단일 할구 유래의 포배기 배아를 이용한 배아줄기세포주 확립 과정은 위에서 기술한 방법과 동일하게 실시하였다.

4. Alkaline Phosphatase 활성의 조직화학적 관찰

계대배양 중인 배아줄기세포에서 배양 4일째에 배양액을 제거하고 PBS로 수세한 후, 70% ethanol로 2분간 고정하였다. 고정액을 제거하고 PBS로 수세하였고, alkaline phosphatase의 활성은 Vector[®] Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III (Vector laboratories, Burlingame, USA)를 이용하여 실시하였다.

5. 배아줄기세포 특이 항체에 대한 면역세포학적 염색

계대배양 중인 배아줄기세포를 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 이 첨가되지 않은 PBS로 2~3회 수세한 후 4% paraformaldehyde 용액으로 상온에서 20분간 고정하였다. TBS buffer로 10분간 2회 수세한 후 0.1% Triton X-100/PBS 용액으로 상온에서 10분간 permeabilization을 실시하였다. 그리고 TBS buffer로 10분간 2회 수세하고, 1% bovine serum albumin이 첨가된 PBS로 상온에서 30분간 blocking을 실시하였다. 1차 항체인 SSEA-1 (Chemicon, USA), Oct-4 (SantaCruz, USA) antibody를 각각 1:100으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBS buffer로 상온에서 10분간 3회 수세하였다. 2차 항체인 Rhodamine-labelled anti-mouse IgM과 FITC-labelled anti-rabbit IgG를 각각 1:100과 1:50으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS buffer로 상온에서 10분간 3회 수세하였다. TBS buffer를 제거하고 PBS로 수세한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

6. 배아줄기세포의 단독배양과 배아체(Embryoid Body) 형성

배아체를 형성하기 위해 배아줄기세포를 지지세포가 없는

배양 용기에서 반복적으로 계대배양하여 지지 세포를 제거하였다. 배아줄기세포의 단독배양은 0.1% 젤라틴으로 코팅된 plate를 사용하여 4~5일 간격으로 실시하였으며, 단독배양된 배아줄기세포에 trypsin/EDTA (0.25%/0.02%)를 처리하여 수확한 후, 박테리아 배양 용기에서 1.2×10^5 cells/mL의 세포를 접종한 후 10% serum replacement가 첨가된 Knock-out-DMEM 배양액을 2일 간격으로 교체하였으며, 6일 동안 부유 배양하여 배아체 형성을 유도하였다.

7. 배아줄기세포 특이 유전자, 삼배엽 및 생식세포 특이 유전자 발현에 대한 RT-PCR

배아줄기세포와 배아체로부터 RNeasy mini kit 250 (Qiagen, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 MMLV, 5X MMLV RT buffer, RNasin, 10 mM dNTP, 10 pM Oligo-dT, 3차 증류수를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 역전사(reverse transcription)반응을 시행하였다. 역전사 반응 후 cDNA, 10X PCR buffer, 5 U/ μ L Taq polymerase (Boehringer Mannheim, Germany), 2 mM dNTP (Boehringer Mannheim, Germany), 3차 증류수와 각각의 유전자에 대한 primer를 혼합하여 PCR을 수행하였다. 배아줄기세포에서는 배아줄기세포 특이 유전자인 Oct4, Nanog, Sox2, Rex1의 발현을 분석하였으며, 배아체에서는 외배엽 특이 유전자인 nestin, FGF-5, Pax6, 중배엽 특이 유전자인 enolase, α -globin, brachyury, Mix11, 내배엽 특이 유전자인 gata-4, AFP, Sox-17, 생식세포 특이 유전자인 Mvh, c-kit, Dazl, stella,

Gdf3의 발현을 RT-PCR로 분석하였다. 이들 primer에 관한 정보는 Table 1에 나타내었다.

8. 통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과는 SPSS Package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, Bonferroni 방법을 이용하여 통계처리를 실시하였다.

결 과

1. 생쥐 초기 배아의 체외 배양액에 첨가한 LIF의 영향
초기 배아의 체외 배양액에 첨가한 LIF의 영향을 조사하기 위하여, LIF를 첨가하지 않은 배양액과 1,000, 2,500, 5,000 U/mL의 LIF가 첨가된 배양액에서 2-세포기의 배아를 포배기까지 배양한 후 세포의 수를 계수하였다(Fig. 1). 배아 전체의 평균 세포수는 각 실험군별로 각각 96.8 ± 14.7 , 98.6 ± 14.6 , 98.9 ± 15.2 , 97.5 ± 15.6 개로 유의한 차이를 보이지 않았다. 내세포의 수는 각 실험군별로 각각 15.9 ± 5.0 , 16.6 ± 4.9 , 21.0 ± 4.0 , 18.0 ± 5.8 개로 2,500 U/mL의 LIF를 처리한 군에서 LIF를 처리하지 않은 군과 1,000 U/mL의 LIF를 처리한 군에 비해서 유의하게($P < 0.05$) 높았다(Table 2).

2. 체외 배양액에 LIF의 첨가와 배아줄기세포주의 확립
체외 배양액에 첨가한 LIF의 농도에 따른 배아줄기세포의 확립 효율을 비교하였다. LIF가 첨가되지 않은 배양액과

Table 1. Primer sequences and reaction condition of RT-PCR analyses for the expression of pluripotency markers, three germ layers markers and primitive germ cell markers

Genes	Forward primer Reverse primer	Annealing temp. (°C)	Product size (bp)	Accession number
Pluripotency genes				
Oct4	5'-TTGGGCTAGAGAAGGATGTG-3' 5'-CCTCAGCAAAAGGGACTGAG-3'	58	221	NM_013633
Nanog	5'-TACCTCAGCCTCCAGCAGAT-3' 5'-GCAATGGATGCTGGGATACT-3'	60	186	AY278951
Sox2	5'-CACAACCTCGGAGATCAGCAA-3' 5'-CTCCGGGAAGCGTGTACTTA-3'	58	190	AB108673
Rex1	5'-GGCCAGTCCAGAATACCAGA-3' 5'-GAACTCGCTTCCAGAACCTG-3'	66	232	NM_009556

Table 1. Continued

Genes	Forward primer Reverse primer	Annealing temp. (°C)	Product size (bp)	Accession number
Genes specific for ectoderm				
Nestin	5'-CCAAAGAGGTGTCCGATCAT-3' 5'-TGACATCCTGGACCTTGACA-3'	62	213	NM_016701
FGF5	5'-TGTACTGCAGAGTGGGCATC-3' 5'-TCATCCGTAAATTTGGCACT-3'	58	215	NM_010203
Pax6	5'-ATGGCAAACAACCTGCCTAT-3' 5'-TCCAGGTGAAATGAGTCCTG-3'	66	192	NM_013627
Genes specific for mesoderm				
Enolase	5'-CAGGCCTGTAAACTTGCACA-3' 5'-CAAGAGCCTCCTCAATCCTC-3'	62	190	BC013460
α -globin	5'-GCTGAAGCCCTGGAAAGGAT-3' 5'-GGCTCAGGAGCTTGAAGTTG-3'	62	232	L75940
Brachyury	5'-CATCGGAACAGCTCTCCAACCTAT-3' 5'-GTGGGCTGGCGTTATGACTCA-3'	62	136	NM_009309
Mix11	5'-AAGCACGCTCACAGTCAATG-3' 5'-GTCCAACCCAGAAAGGAATG-3'	62	109	NM_013729
Genes specific for endoderm				
Gata4	5'-CGCCGCCTGTCCGCTTCC-3' 5'-TTGGGCTTCCGTTTTCTGGTTTGA-3'	65	193	NM_008092
AFP	5'-CGAAACCTCCAGGCAACAAC-3' 5'-TCATGACTTTTTCCCATCC-3'	62	160	NM_007423
Sox17	5'-CTCGGGATGTAAAGGTGAA-3' 5'-GCTTCTCTGCCAAGGTCAAC-3'	66	229	NM_011441
Genes specific for primitive germ cell				
Mvh	5'-ACCACCGGCAATTTTGACTT-3' 5'-GCGACTGGCAGTTATTCCAT-3'	62	229	NM_010021
c-kit	5'-CGTGGTCAAAGGAAATGCAC-3' 5'-GAAGCCTTCCTTGATCATCTTG-3'	62	193	Y00864
Dazl	5'-CTGGTGTGTCGAAGGGCTAT-3' 5'-CGTGGCTGCACATGATAAGT-3'	62	154	NM_010029
Stella	5'-CTTTCCCAAAGAAGGGTCC-3' 5'-TGCAGAGACATCTGAATGGC-3'	62	129	NM_139218
Gdf3	5'-TGGGGCCAGACATCCGAGTTT-3' 5'-TAAGACGCGAGGCACAGGTTGG-3'	62	102	NM_008108
Internal control				
β -Actin	5'-CCGCGAGCACAGCTTCTT-3' 5'-CCCACGATGCAGGGGAATAC-3'	60	183	NM_007393

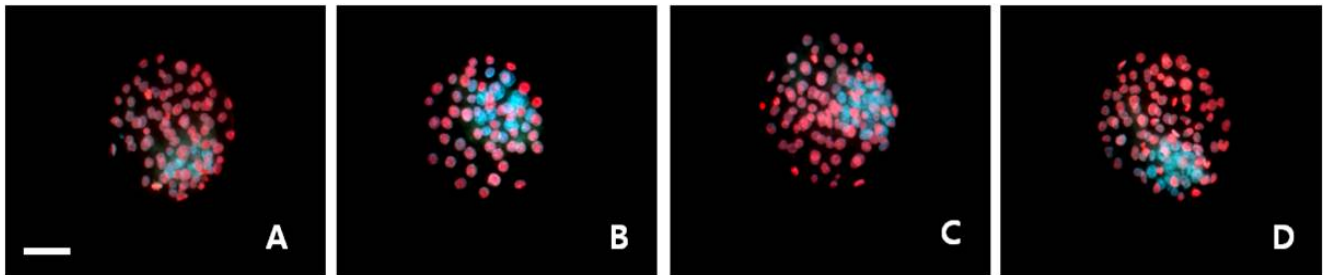


Fig. 1. Differential staining of mouse blastocysts with Hoechst (blue, inner cell mass) and propidium iodide (red, trophectoderm).
(A) Control, (B) LIF 1,000 U/mL, (C) LIF 2,500 U/mL, (D) LIF 5,000 U/mL. Scale bar = 50 μ m.

Table 2. Effects of LIF concentration on cell counts of blastocysts and establishment of ES cells from blastocysts

LIF concentration	Cell counts of blastocysts					Establishment of ES cells	
	No.	ICM*	TE**	Total	ICM:TE ratio	Blastocysts	No. of ES cell lines
Control	27	15.9 \pm 5.0 ^a	80.9 \pm 14.4	96.8 \pm 14.7	1:5.08	30	3(10.0%)
1,000 U/mL	22	16.6 \pm 4.9 ^b	82.0 \pm 12.7	98.6 \pm 14.6	1:4.95	30	2(6.7%)
2,500 U/mL	30	21.0 \pm 4.0 ^{ab}	77.8 \pm 14.6	98.9 \pm 15.2	1:3.70	30	11(36.7%)
5,000 U/mL	28	18.0 \pm 5.8	79.5 \pm 14.9	97.5 \pm 15.6	1:4.42	30	7(23.3%)

Note: Data from 3 replicates. a $P=$.0006; b $P=$.007 Post-hoc multiple group comparison with Bonferroni correction.

* ICM : inner cell mass.

** TE : trophectoderm.

1,000, 2,500, 5,000 U/mL의 LIF가 첨가된 배양액에서 배양된 포배기의 배아를 이용하여 배아줄기세포 확립을 시도하였다. 각 실험군별로 30개의 배아를 이용하여 각 실험군별로 3개(10.0%), 2개(6.7%), 11개(36.7%), 그리고 7개(23.3%)의 배아줄기세포주를 확립하였다(Table 2).

3. 초기 배아에서 분리한 할구를 이용한 배아줄기세포주의 확립

동일한 배아로부터 유래된 2- 또는 4-세포기의 배아로부터 획득된 모든 할구를 분리하여 배아줄기세포주 확립을 유도하였다(Fig. 2). 2-세포기의 배아 7개로부터 14개의 할구를 획득하였으며, 14개의 할구 모두 포배기까지 발생하였다. 14개의 할구 유래 포배기 배아로부터 3개(21.4%)의 배아줄기세포주를 확립하였다. 4-세포기의 배아 5개로부터 20개의 할구를 획득하였으며, 모두 포배기까지 발생하였다. 20개의 할구 유래 포배기 배아로부터 1개(5.0%)의 배아줄기세포주를 확립하였다.

4. Alkaline Phosphatase의 활성과 배아줄기세포 특이 항체 발현에 대한 분석

초기 배아에서 분리된 할구와 배아로부터 확립된 배아줄기세포주에서 alkaline phosphatase의 활성에 의한 발색 반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한, 배아줄기세포의 특이적 표지 인자인 SSEA-1과 Oct4에 대한 면역세포학적 염색에서도 세 종류의 배아줄기세포주에서 모두 양성 반응을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 위의 결과를 통해 분리된 할구로부터 확립된 세포주는 기존에 보고되었던 배아줄기세포와 유사한 특성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

5. RT-PCR을 이용한 유전자 발현 양상 분석

초기 배아의 할구와 배아로부터 확립된 배아줄기세포주에서 배아줄기세포 특이 유전자인 Oct4, Nanog, Sox2, Rex1의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한, 각각의 세포주에서 형성된 배아체에서 외배엽 특이 유전자인 nestin, FGF-5, Pax6, 중배엽 특이 유전자인 enolase, α -globin, brachyury,

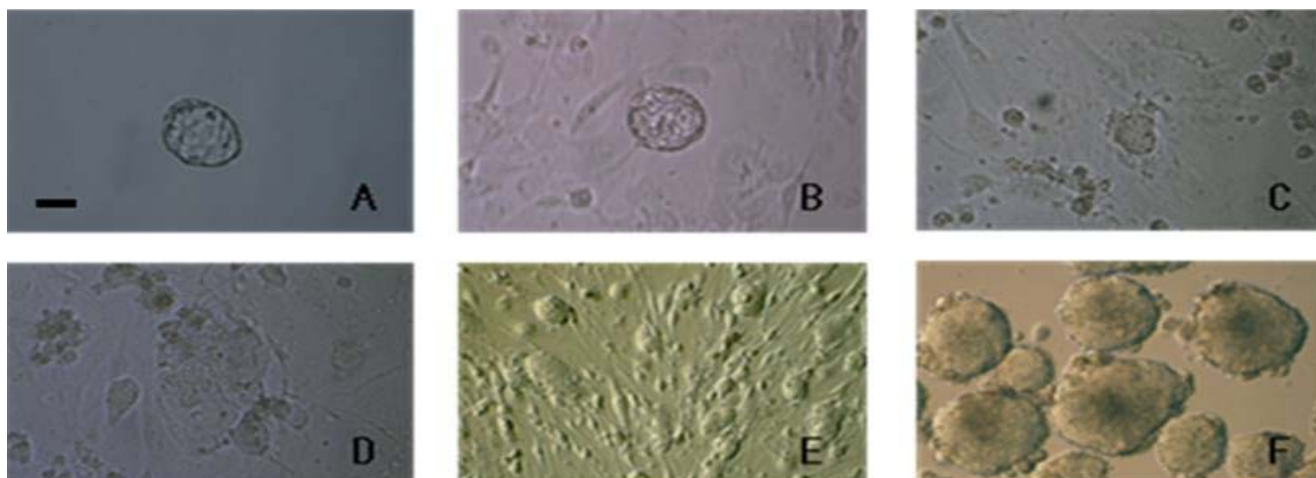


Fig. 2. Establishment of ES cell lines from single blastomere. (A) Blastocyst developed from single blastomere of mouse 2-cell embryo, (B) Blastocyst developed from single blastomere of mouse 4-cell embryo, (C) Blastocyst developed from single blastomere of mouse 4-cell embryo was cultured with STO cells for 3 days, (D) Blastocyst developed from single blastomere of mouse 4-cell embryo was cultured with STO cells for 6 days, (E) Mouse ES cell line established from single blastomere of 4-cell embryo, (F) Embryoid bodies generated from blastomere (4-cell)-derived ES cells. Scale bar=50 μm.

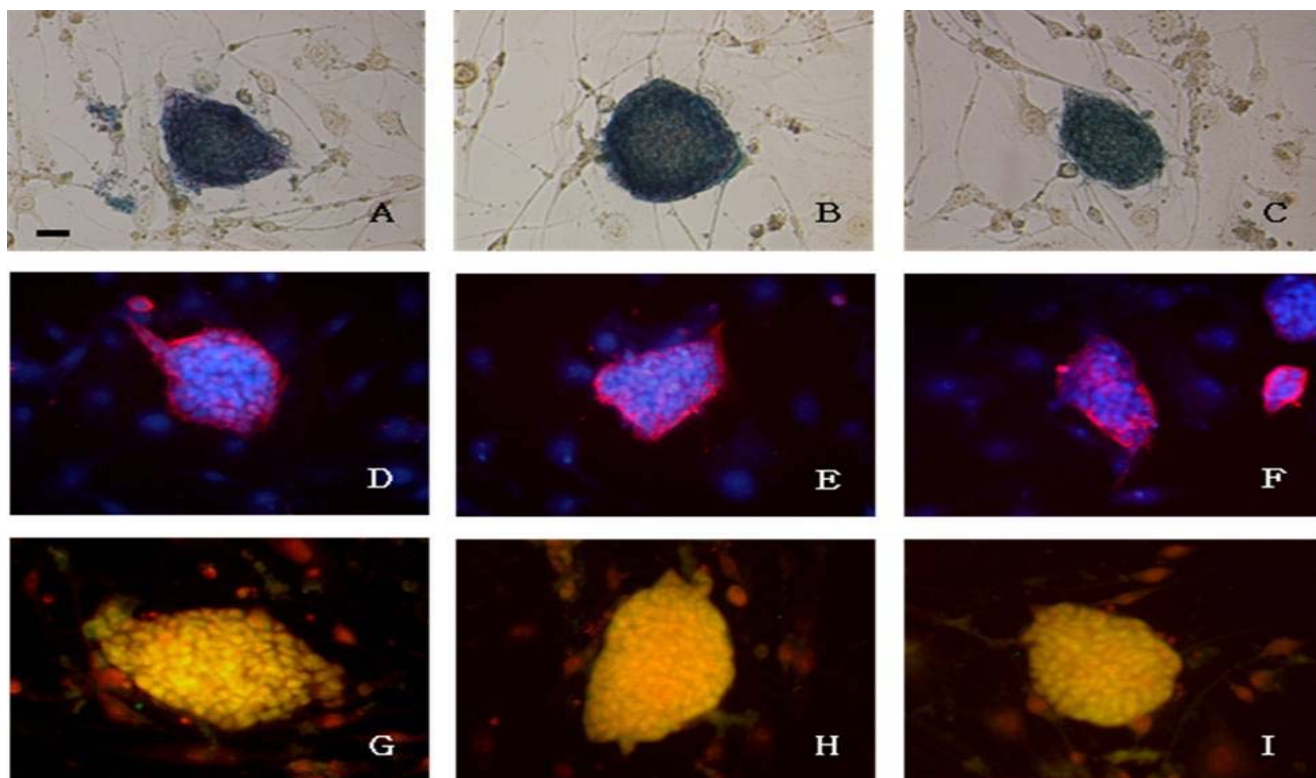


Fig. 3. Expression of alkaline phosphatase (A~C) and immunocytochemistry for SSEA-1 (D~F) and Oct4 (G~I). (A, D, G), ES cell colonies derived from whole embryo; (B, E, H), ES cell colonies derived from isolated blastomere of 2-cell embryo and (C, F, I), ES cell colonies derived from isolated blastomere of 4-cell embryo. Magnification ×200; Scale bar=50 μm.

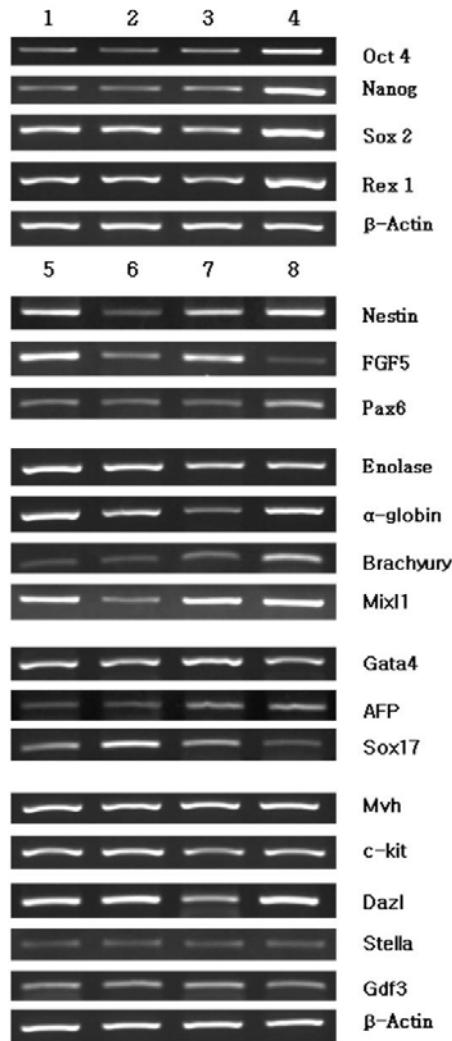


Fig. 4. RT-PCR analysis for specific gene expressions, pluripotency marker genes in mouse ES cells and three germ layers markers in mouse embryoid bodies cultured for 6 days. Lane 1: ES cells derived from blastomere of 2-cell embryo, Lane 2: ES cells derived from blastomere of 4-cell embryo, Lane 3: ES cells derived from whole embryo, Lane 4: Positive control. Lane 5: Embryoid bodies of ES cells derived from blastomere of 2-cell embryo, Lane 6: Embryoid bodies of ES cells derived from blastomere of 4-cell embryo, Lane 7: Embryoid bodies of ES cells derived from whole embryo, Lane 8: Positive control. Pluripotency markers: Oct 4, Nanog, Sox 2, Rex 1, Ectodermal markers: Nestin, FGF-5, Pax6, Mesodermal markers: Enolase, α -globin, Brachyury, Mixl1, Endodermal markers: Gata-4, AFP, Sox17, Primitive germ cell markers: Mvh, c-kit, Dazl, Stella, Gdf3.

Mixl1, 내배엽 특이 유전자인 *gata-4*, AFP, Sox-17, 생식세포 특이 유전자인 *Mvh*, *c-kit*, *Dazl*, *stella*, *Gdf3*의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 위의 결과에서 분리된 할구와 배아 전체를 이용하여 확립된 세포주는 배아체를 형성하고 삼배엽성 세포들로 분화될 수 있음을 확인할 수 있었다.

고찰

본 연구에서는 생쥐의 2-또는 4-세포기 배아에서 분리된 할구를 이용하여 단일 할구 유래의 배아줄기세포주를 확립하였다. 확립된 배아줄기 세포주는 alkaline phosphatase 활성에 양성 반응을 보였으며, 생쥐 배아줄기세포 특이적 표지 단백질인 SSEA-1과 Oct4에 대한 세포면역학적 염색에서 양성 반응을 보였다. 또한, RT-PCR 방법을 통해 미분화세포에서 특이적인 Oct4, Nanog, Sox-2, Rex-1이 발현되는 것을 확인하였으며, 배아체 형성 후 삼배엽성 표지유전자들의 발현을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 생쥐 초기 배아의 할구로부터 확립한 세포주는 배아 전체를 이용하여 확립한 배아줄기 세포주와 동일한 특성을 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 현재 이들의 특성을 *in vivo* 시스템에서 확인하기 위해 nude mice에 배아줄기세포를 주입하여 teratoma를 형성하기 위한 실험을 진행 중에 있다.

2006년 Chung 등은 8-세포기의 생쥐 배아로부터 획득된 단일 할구로부터 5개의 배아줄기세포주와 7개의 배외줄기세포주를 확립하였다고 보고하였으며, 동일한 그룹에서 8~10 세포기의 인간 배아로부터 획득된 할구를 이용하여 단일 할구 유래의 배아줄기세포주를 확립하였다고 보고한 바가 있다. 상기의 논문에서는 green fluorescent protein (GFP)으로 표지된 기존의 생쥐 배아줄기세포주와 할구를 접합시켜 배양한 후 GFP가 발현되지 않는 세포괴를 물리적으로 분리하여 단일 할구 배아줄기세포주를 확립하는 방법을 사용하였다. 이는 배아로부터 분리된 할구 단독으로는 배아줄기세포주 확립이 어렵기 때문인 것으로 생각된다.

본 연구의 예비 연구에서 2-, 4- 또는 8-세포기의 배아로부터 분리한 할구가 형태적으로는 포배기를 형성할 수 있으나, 배아 전체에서 형성된 포배기에 비해서 세포수가 적음을 관찰할 수 있었으며, 특히, 발생이 진행될수록 분리된 할구로부터 형성된 포배기 배아의 세포수는 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. Cheung 등(2003)은 생쥐 초기 배아의 배양

시 단계적 배양액(IVF 50-S2)에 LIF를 1,000 U/mL 첨가했을 시 단독 배양액(IVF50)에서 배양한 포배기 배아와 비교하여 세포수가 유의하게 증가한다고 보고한 바 있다. 따라서, 본 연구에서는 생쥐 초기 배아의 배양 시 LIF를 농도별로 첨가하여 세포수의 증가 효과를 확인하고자 하였다. 본 연구에서는 Cheung 등의 결과와는 다르게 생쥐 초기 배아의 배양액에 LIF를 농도별(대조군, 1,000, 2,500, 5,000 U/mL)로 처리했을 시 배아 전체의 세포수는 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 내세포괴의 세포수는 2,500 U/mL의 LIF를 첨가해서 배양한 배아에서 LIF를 첨가하지 않거나 1,000 U/mL의 LIF를 첨가하여 배양한 배아보다 유의하게 증가하였다. 이러한 차이는 Cheung 등이 사용한 배양액과 본 연구에서 사용한 배양액이 상이하기 때문으로 사료된다. 본 연구에서 사용한 G-series 배양액은 이전의 배양액에 비해 많은 부분에서 개선되어 인간의 체외 배양 및 배아 이식술에서 높은 발생률과 임신 성공률을 제공하는 것으로 보고되고 있다 (Van Langendonck et al., 2001; Vincent Aoki et al., 2005). 또한, 배아 전체를 이용한 배아줄기세포주 확립 실험에 있어서도 대조군과 LIF 1,000 U/mL 처리군과 비교하여 2,500, 5,000 U/mL 처리군에 있어서 배아줄기세포주 확립 효율이 더 높았다. 이러한 결과를 통하여 내세포괴의 세포수가 배아줄기세포주 확립 효율에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

또한, 2- 또는 4-세포기의 동일 배아로부터 분리한 각 할구를 대상으로한 단일 할구 배아줄기 세포주 확립 효율은 2-세포기의 배아에서 분리된 할구의 경우 7개의 배아에서 14개의 할구를 획득하여 3개의 배아줄기세포주를 확립하여 21.4%의 효율로 나타났으며, 4-세포기의 배아에서 분리된 할구의 경우 5개의 배아에서 20개의 할구를 획득하여 1개의 배아줄기세포주를 확립하여 5%의 효율을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 Wakayama 등(2007)이 발표한 2-세포기, 4-세포기, 8-세포기의 동일 배아로부터 유래한 단일 할구 배아줄기 세포주 확립 효율이 각기 33%, 8%, 8%의 성공률에 비해 상대적으로 낮은 수치를 나타내었다. 이는 Wakayama 등이 단일 할구 배양 시 0.1 mg/mL의 ACTH가 첨가된 배아줄기세포 배양액에 유사 분열이 불활성화 된 MEF (mouse embryonic fibroblast)와 공배양함으로써 포배기를 형성시키고 동일한 배양액에서 배아줄기세포주를 확립하는 방법을 이용한 반면, 본 연구에서는 LIF 2,500 U/mL가 첨가된 G2.3 배

양액에서 포배기의 형성을 유도한 후 0.01 mg/mL의 ACTH가 첨가된 배아줄기세포 배양액에서 배아줄기세포를 확립한 차이에서 비롯된 것으로 생각된다. 배아 전체를 이용한 경우, LIF 2,500 U/mL를 처리한 군에서의 배아줄기 세포주 확립 효율이 36.7%인데 비해 분리된 할구를 이용할 경우 배아 전체를 이용한 경우보다는 그 효율이 다소 저조하였다. 이는 분리된 할구의 발생 능력은 완전한 배아보다는 약하고 투명대를 제거하고 할구를 분리하는 과정이 할구의 발생능력에 영향을 주었기 때문인 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 효율은 다소 낮았지만 배아에서 분리된 할구를 이용하여 배아줄기세포를 확립할 수 있음을 확인하였다. 분리한 할구의 배양 조건이 향상된다면 8-세포기 유래의 단일 할구 배아줄기 세포도 확립할 수 있을 것으로 생각되며, 기존의 보고된 단일 할구 배아줄기 세포 확립 효율보다 높은 성공율을 기대할 수 있을 것이다. 이러한 연구들은 인간의 체외 수정 및 배아 이식술에서 배아의 파괴 또는 생명력에 손상을 주지 않고 자가 유래의 배아줄기 세포주를 생산할 수 있는 유용한 방법이 될 것으로 생각된다.

이용문헌

- Aoki VW, Wilcox AL, Peterson CM, Parker-Jones K, Hatasaka HH, Gibson M, Huang I, Carrell DT (2005) Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *Reprod Biomed Online* 10:600-606.
- Chan AW, Dominko T, Luetjens CM, Neuber E, Martinovich C, Hewitson L, Simerly CR, GP Schatten (2000) Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 287:317-319.
- Cheung LP, Leung HY, Bongso A (2003) Effect of supplementation of leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor on murine embryonic development in vitro, implantation, and outcome of offspring. *Fertil Steril* 80 Suppl 2:727-35.
- Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, Meisner L, Lanza R (2006) Embryonic and extra-embryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439:216-219.
- Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T,

- Green HL, Walker SJ, Gutin PH, Vilner L, Tabar V, Dominko T, Kane J, Wettstein PJ, Lanza R, Studer L, Vrana KE, West MD (2002) Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 295:819.
- Delhaise F, Bralio V, Schuurbiens N, Dessy F (1996) Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. *Eur J Morphol* 34:237-243.
- Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL (1996) Leukemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Human Reproduction* 11:191-196.
- Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA (1992) Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biol Reprod* 46:470-474.
- Geber S, Winston RM, Handyside AH (1995) Proliferation of blastomeres from biopsied cleavage stage human embryos *in vitro*: an alternative to blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis. *Human Reproduction* 10:1492-1496.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344:768-770.
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R (2006) Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444:481-485.
- Menino AR, Wright RW (1983) Effect of pronase treatment, microdissection, and zona pellucida removal on the development of porcine embryos and blastomeres *in vitro*. *Biol Reprod* 28:433-446.
- Moore NW, Adams CE, Rowson LE (1968) Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J Reprod Fertil* 17:527-531.
- Rossant J (1976) Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* 36:283-290.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (2004) Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: A prospective randomized controlled trial. *Human Reproduction* 19:2849-2858.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Tao T, Niemann H (2000) Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured *in vitro*. *Hum Reprod* 15:881-889.
- Tarkowski AK, Wroblewska J (1967) Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 18:155-180.
- Van Langendonck A, Demylle D, Wyns C, Nisolle M, Donnez J (2001) Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *Fertil Steril* 76:1023-1031.
- Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Sakaide Y, Bui H, Mizutani E, Wakayama T (2007) Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem cells* 25:986-993.
- Willadsen SM (1981) The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J Embryol Exp Morphol* 15:165-172.