

플라보노이드 처리된 체세포 핵이식 배아의 체외 발달 및 제주흑우 복제 소 생산

김은영^{1,2} · 김연옥¹ · 김재연^{1,2} · 박민지^{1,2,3} · 박효영^{1,2} · 한영준^{2,3} · 문성호² · 오창언² ·
김영훈⁴ · 이성수⁵ · 고문석⁵ · 박세필^{1,2,3,*}

¹미래생명공학연구소, ²제주대학교 줄기세포연구센터, ³제주대학교, ⁴제주특별자치도 축산진흥원, ⁵국립축산과학원 난지축산시험장

In Vitro Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Treated with Flavonoid and Production of Cloned Jeju Black Cattle

Eun Young Kim^{1,2}, Yeon Ok Kim¹, Jae Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Hyo Young Park^{1,2},
Young Joon Han^{2,3}, Seong Ho Mun², Chang Eon Oh², Young Hoon Kim⁴,
Sung Soo Lee⁵, Moon Suck Ko⁵ and Se Pill Park^{1,2,3,*}

¹Mirae Biotech, Seoul 143-854, Korea, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, Korea,

³Jeju National University, Jeju 690-756, Korea,

⁴Jeju Special Self-Governing Province, Institute for Livestock Promotion, Jeju 690-180, Korea

⁵National Institute of Subtropical Agriculture, Jeju 690-150, Korea

ABSTRACT

This study was to investigate the effect of flavonoid treatment on *in vitro* development of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos, and their pregnancy and delivery rate after embryo transfer into recipient. In experiment 1, to optimize the flavonoid concentration, parthenogenetic day 2 (\geq 2-cell) embryos were cultured in 0 (control), 1, 10 and 20 μ M flavonoid for 6 days. In the results, *in vitro* development rate was the highest in 10 μ M flavonoid group (57.1%) among treatment groups (control, 49.5%; 1 μ M, 54.2%; 20 μ M, 37.5%), and numbers of total and ICM cells were significantly ($p < 0.05$) higher in 10 μ M flavonoid group than other groups. We found that 10 μ M flavonoid treatment can significantly ($p < 0.05$) decrease the apoptotic index and derive high expression of anti-oxidant, anti-apoptotic, cell growth and development marker genes such as Mn-SOD, Survivin, Bax inhibitor, Glut-5, In-tau, compared to control group. In experiment 2, to produce the cloned Jeju Black Cattle, beef quality index grade 1 bull somatic cells were transferred into enucleated bovine MII oocytes and reconstructed embryos were cultured in 10 μ M flavonoid added medium. When the *in vitro* produced day 7 or 8 SCNT blastocysts were transferred into a number of recipients, 10 μ M flavonoid treatment group presented higher pregnancy rate (10.2%, 6/59) than control group (5.9%, 2/34). Total three cloned Jeju Black calves were born. Also, two cloned calves in 10 μ M flavonoid group were born and both were all healthy at present, while the one cloned calf born in control group was dead one month after birth. In addition, when the result of short tandem repeat marker analysis of each cloned calf was investigated, microsatellite loci of 11 numbers matched genotype between donor cell and cloned calf tissue. These results demonstrated that the flavonoid addition in culture medium may have beneficial effects on *in vitro* and *in vivo* developmental capacity of SCNT embryos and pregnancy rate.

(Key words : Bovine, SCNT, Flavonoid, Jeju Black Cattle, Pregnancy)

서 론

체세포 핵이식 기술은 포유동물의 여러 종에서 성공적으로 이루어져 왔다. 1997년 영국의 Wilmut 등이 면양에서 최초로 체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산에 성공한 이후 쥐(Wakayama 등, 1998), 염소(Baguisi 등, 1999), 돼지

(Polejaeva 등, 2000)와 고양이(Shin 등, 2002) 등 다양한 종의 연구 결과가 보고되었으며, 복제 소 생산의 경우 1998년 Kato 등과 Cibelli 등에 의해 연구 결과가 보고된 바 있고, 우리나라에서도 Im 등(2001) 이 한우 복제 소 생산에 대하여 보고한 바 있다. 그러나 체세포 핵이식에 의한 복제 소 생산 효율은 인공수정이나 체외수정란에 비해 매우 낮아 분만율이 7% 미만 정도인 것으로 보고되고 있다(Heyman

* 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호: 308008-5)의 지원에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-2-457-8758, E-mail: sppark@jejunu.ac.kr

등, 2002; Yang 등, 2008). 복제 소의 생산 효율이 낮은 이유는 체외에서의 장시간 동안 기계적·화학적 여러 과정을 거치는 데에 따른 스트레스, 불안정한 체외 배양 환경, 발생된 배아의 이식 후 착상 실패 또는 불안정한 착상으로 인해 분만까지의 비율이 낮은 데서 찾을 수 있다. 따라서, 체외 수정 배아보다 핵이식 배아의 생산과정이 불안정한 배 발생을 유도할 가능성이 더 높으므로 핵이식으로 생산된 체세포 복제 배아는 체외 수정 배아보다 더 나은 체외 배양 환경이 요구된다.

일반적인 체외 배양 환경에서는 산소 농도 포화도가 매우 높아($\approx 20\%$) 배아의 세포질 내에 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)이 체내 환경보다 많이 축적됨으로써 배 발달 저해의 원인이 된다. 활성산소종은 세포질 내의 단백질, 지질과 DNA와 같은 거대분자와 반응하여 효소 활성 저해, 미토콘드리아 기능 이상과 같은 중요한 기능 이상을 일으키고 DNA 파편화를 야기한다(Halliwell 등, 1989; Guerin 등, 2001). 살아 있는 유기체는 이러한 ROS를 청소하는 항산화 물질이 세포질 내에 존재하나, 체외 배양 환경에 노출된 난자나 배아는 과도한 산소 농도를 막아낼 방법이 없으므로 항산화제를 배양액에 첨가하여 사용하게 되면 배 발달능을 개선시킬 수 있다는 연구가 보고된 바 있다. 그 예로 superoxide dismutases나 catalase는 생쥐와 소 배아에서, cysteine이나 β -mercaptoethanol은 소 배아 배양에서 glutathione 합성을 증가시켜 환원 환경을 조절하여 배 발달을 개선시키는 것으로 알려져 있고, vitamin E는 활성산소종에 의해 야기된 세포막 상해를 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다(Takahashi 등, 1993; Lim 등, 1996; Caamano 등, 1998). 결과적으로 체외 배양 환경에서 배양액 내에 항산화제의 첨가는 매우 중요하다. 따라서, 난자나 수정란 배양을 위한 새로운 항산화제 개발이 계속적으로 이루어지고 있다. 새로이 개발된 항산화제인 플라보노이드는 플라보놀, 플라본, 플라바놀과 플라바논과 같은 단량체가 공유 구조로 이루어져 있으며, 일부의 플라보노이드는 강력한 항산화 기능도 있는 것으로 알려져 있고, 세포 사멸, 세포 주기와 분화 등을 조절하는 항산화 기능을 나타낸다고 알려져 있다. 또한, 플라보노이드의 직접적인 역할로는 산소 래디칼 초기 발생을 막아 산화 연쇄 반응을 차단하고 전이 금속 이온 등과 염을 형성하여 산화를 억제하는 것으로 알려져 있다(Afanas'ev 등, 1989).

지금까지, 소 배아의 체외 배양에 있어서 green tea polyphenol과 같은 유산 성분에 대한 연구 결과가 보고된 바는 있지만(Wang 등, 2007a, b), 합성 플라보노이드 사용에 따른 직접적인 이용 효과에 대한 연구 보고는 이루어진 바 없다. 본 연구에서는 멸종 위기 제주흑우의 대량 증식을 위한 연구 목적으로 우량 종모우의 체세포를 이용하여 핵이식을 실시하고 여기에서 발생된 배아를 합성 플라보노이드(3,4-dihydroxyflavone)가 첨가된 배양액에서 배양하여, 플라보노이드가 체외 배 발달에 미치는 영향 및 여기에서 생산된 7~8일째 배아를 이식한 후 임신과 분만에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, 플라보노이드의 농도 적정화를 위해 단위 발생 배아에서 그 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

소 난자의 회수 및 체외성숙

본 실험에 공시될 소 난자는 도축장에서 채취한 난소를 2~4시간 이내에 32~37°C 생리 식염수에 유지하여 실험실로 운반한 뒤 직경이 2~6 mm의 난포로부터 채취하여 사용하였다. 실제 현미경하에서 획득된 미성숙난자는 난구세포가 부착되어 있고, 세포질이 균일한 난자만을 선별하였으며, TL-HEPES로 세척하여 10% FBS(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)가 첨가된 TCM-199(Gibco-BRL) 배양액에 0.2 mM Na-pyruvate(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 μ g/ml FSH(Sigma), 1 μ g/ml estradiol-17 β (Sigma)와 50 μ g/ml gentamycin(Sigma)를 넣어 38.8°C, 5% CO₂ 조건하에서 20시간 동안 체외 배양하여 성숙을 유도하였다.

단위 발생 유도와 체외 배양

단위 발생을 위해 체외 성숙된 난자를 1mg/ml hyaluronidase(Sigma)를 이용하여 난구세포를 제거하고 충분히 세척한 다음 5 μ M Ca-ionophore(Sigma)에 5분 노출시키고, 이어서 2.0 mM 6-dimethylaminopurine(DMAP)에 3시간 배양하여 활성화를 유도하였으며, 3 mg/ml FAF-BSA(Sigma)가 들어 있는 CR1a 배양액에 넣어 배양하고 배양 4일 째에 10% FBS가 들어 있는 CR1a 배양액에 옮겨 4일간 추가 배양하였다. 이때에 실험군은 대조군과 플라보노이드 [3',4'-dihydroxyflavone(ICC, INDOFINE Chemical Company, Inc, NJ, USA)]를 1, 10과 20 μ M 처리한 군으로 나누어 배 발달을 조사하였고, 플라보노이드는 2일 간격으로 배양액에 첨가하였다.

이중 형광 염색

배반포기배의 세포수 조사는 다음과 같은 간편 이중 염색 방법을 통해 실시하였다. 1% triton X-100(Sigma)과 100 μ g/ml propidium iodide(PI, Sigma)가 첨가된 TL-HEPES 용액에서 30초간 처리한 후 바로 25 μ g/ml Hoechst 33258(Sigma)가 첨가된 100% ethanol 용액에 넣어 4°C에서 다음날까지 정지시켰다. 염색된 배반포기배는 글리세롤로 세척하여 여분의 형광물질을 제거한 다음 슬라이드 글라스에 올려 형광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)의 blue 필터(excitation, 330~385 nm; emission, ≥ 420 nm) 하에서 관찰하여 내부 세포피와 영양 외배엽 세포수를 분석하였다. 이때에 배반포의 내부 세포피는 파랗게, 영양 배엽 세포는 빨강계 염색되어 구분된다.

세포 사멸(Terminal Deoxynucleotide Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling; TUNEL) 분석

배반포기배는 3.7% paraformaldehyde(Sigma)에 1시간 고정을 실시하고 PBS로 세척하여 0.3% Triton X-100으로 1시간 침투를 유도하였다. 배아는 다시 세척한 다음, 광이 차단된 37°C 배양기에서 형광물질이 부착된 dUTP와 terminal deoxynucleotide transferase 효소(Roche, Mannheim, Germany)에 1시간 반응시키고, 40 mg/ml PI와 50 mg/ml RNase A(Takara, Shiga, Japan) 용액에 넣어 1시간 핵 염색을 실시하였다. 반응이 끝난 배아는 충분히 세척하고 슬라이드 글라스에 옮겨 형광현미경의 green 필터(excitation, 460~495 nm; emission, 510~550 nm)와 red 필터(excitation, 510~550 nm; emission, ≥ 590 nm) 하에서 관찰하였다. 배아 내 살아 있는 세포 핵은 붉게 염색되는 반면, 사멸 핵은 녹색으로 염색되면서 파편화되는 양상을 나타내므로 두 가지 색을 합쳐 조사함으로써 총세포핵수에서 사멸핵수

를 백분율로 나타내어 세포 사멸 정도를 계산하였다.

Real time-PCR을 이용한 유전자 발현 분석

mRNA는 마그네틱 비드(Dynabeads mRNA purification kit; Dynal, Oslo, Norway)를 이용하여 추출하였다. 동일한 수의 배아(대략 15개)를 100 μ l 용해/결합용 버퍼 [100 mM Tris-HCl(pH 7.5), 500 mM LiCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% LiDS, 5 mM DTT]에 넣어 실온에서 5분간 교반하면서 반응을 유도하고, 여기에 50 μ l oligo(dT)25 마그네틱 비드 용액을 넣어 다시 5분간 반응시켰다. 마그네틱 비드에 결합된 mRNA는 세척용 버퍼 A [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% LiD]로 2회 세척하고, 버퍼 B [10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.15 M LiCl and 1 mM EDTA]로 1회 세척한 다음 DEPC water 15 μ l에 pellet을 녹여 마그네틱 비드로부터 mRNA 시료를 획득하였다. cDNA 합성은 추출한 mRNA로부터 oligo(dT) 12-18 프라이머와 superscript reverse transcriptase(Invitrogen)를 이용하여 이루어졌다. Real-time PCR(Bio-Rad, Chromo4)에 사용된 프라이머는 Table 1에 나타난 바와 같다. 모든 실험에서 히스톤 2a mRNA를 기준으로 사용하였다. 결과는 DyNamo SYBR green qPCR 키트를 사용하였다. PCR 과정은 95°C에서 15분간 변성 과정을 거친 다음, 증폭과 정량을 위해 94°C에서 30초간, 50~56°C 1분간, 72°C 1분으로 40회수를 반복하였고, 형광 측정을 했다. 이때의 melting curve는 65~95°C, heating rate는 0.2°C/sec이다. SYBR green 형광 결과는 PCR 과정의 extension 단계 후에 측정되었다.

소 체세포 핵이식 배아의 생산 및 체외 배양

체외성숙된 소 수핵 난자는 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TL-HEPES 배양액에서 난구세포를 제거한 뒤 제 1극체가 방출된 난자만을 선별하여 사용하였다. 탈핵될 난자는 0.5 μ g/ml Hoechst 33258과 7.5 μ g/ml cytochalasin B (Sigma)가 첨가된 TCM-HEPES 용액에서 10분간 염색한 뒤 형광현미경 하에서 제 1극체와 핵을 제거하였다. 공여 체세포는 2008년 제주특별자치도 축산진흥원 소재 제주흑우 종모우(BK01-10과 BK94-13)의 귀세포를 채취하여 체외에서 배양하여 동결 보관하였던 것으로 필요 시 용해하여 5~15 개대의 세포를 사용하였다. 핵이식 시 공여 체세포는 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 단일세포로 분리한 후 10% FBS가 첨가된 체세포 배양액으로 한번 세척한 후 다시 PBS로 세척하여 준비하였고, 10~15 μ m 크기만을 골라 체세포 주입용 피펫으로 핵이 제거된 수핵난자의 투명대와 세포질 사이의 공간으로 주입하였다. 체세포가 주입된 난자는 0.3M mannitol(Sigma) 용액 내에서 LF101 Electro Cell Fusion Generator(NEPA GENE, Shioyaki, Japan)을 사용하여 직류(DC)로 20 volt에서 1 pulse로 세포 융합을 실시하였으며, 세포 융합 여부는 30분 후에 관찰하였다. 융합이 확인된 핵이식란은 5 μ M Ca-ionophore에 5분 노출시키고 2.0 mM DMAP에서 3시간 동안 배양하여 난활성을 유도하였다. 핵이식 후 활성화 처리된 난자는 3 mg/ml FAF-BSA가 들어 있는 CR1aa 용액에 옮겨 배양하고, 배양 24시간째 분열된 분할구가 보이는 핵이식 배아는 10% FBS가 들어 있는 CR1aa 배양액으로 체세포와 공동 배양을 실시하였으며, 배양 2일째부터 플라보노이드 처리군과 무처리군으로 나누어 배양하였다.

핵이식 배아의 이식 및 체세포 복제 소 생산

수란우는 CIDR-PLUS를 질내 7일간 삽입하고 제거하는 당일 PGF₂ α 25mg을 투여하는 방법으로 발정동기화를 유도하였다. 플라보노이드 처리군 또는 무처리군으로 부터 발달된 체외 배양 7~8일째 복제 배반포기 배아는 발정 동기화 처리된 수란 대상우중 정상적인 발정을 보이고 수정란 이식 당일(발정 발현 7~8일째) 직장 검사를 통하여 황체 상태가 양호한 개체를 선발하여 황체가 존재하는 자궁각에 각각 1~2개 이식하였다. 이때에 이식된 체세포 핵이식 배아는 서울에서 비행기로 제주까지 공수하였고, 배양기에서 꺼내어 대리모 소에 이식하기까지 대략 4시간 소요되었다. 수란우의 임신 진단은 수정란 이식 후 2개월에 직장 검사법에 의하여 임신 여부를 진단하였다. 분만 시기가 가까이 올 10~20일 전부터 수란우의 분만 징후를 관찰하고 적절한 시기에 정상적인 분만이 이루어지도록 유도하였다.

친자 감별 마커를 이용한 복제유무 검정

체세포 핵이식으로 복제되고 이식되어 태어난 소의 복제 유무를 검정하기 위해 핵이식에 이용된 체세포, 수란우의 근육세포와 복제 송아지의 귀세포의 유전자 검정을 실시하였다. 각각의 검사 샘플에서 유전물질인 DNA를 추출하고, 특정 유전자를 동시에 증폭하여, 여러 유전자 좌위에서 체세포와 복제 송아지가 일치하는지와 대리모 소와 복제 송아지가 일치하지 않은지의 여부를 조사하였다. ISAG (International Society of Animal Genetics, 국제동물유전학회) 11개의 친자 감별 표지인자들을 사용하여 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824) 각 primer의 forward에 형광 dye를 labeling하고 PCR을 실시하였다. 검체의 PCR 산물은 형광을 분석하는 3100 genetic analyzer 기기를 이용하여 샘플 별로 peak 크기를 계산하여 각각의 표지인자들의 반복성을 조사하였다. 검사 결과는 검사한 모든 유전자 좌위에서 일치할 경우 친자라고 판명하고, 3개 이상의 유전자 좌위에서 불일치할 경우 친자가 아니라고 판명하였다.

통계처리

단위발생란과 핵이식 배아의 체외 배발달율, 세포수 조사, apoptotic index와 유전자 발현을 비교에 대한 결과는 SAS program을 이용하여 분석하였으며, 처리 간 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였다.

결 과

플라보노이드 처리가 소 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향

체외 배양 2일째부터 소 단위발생 2~4 세포기 배아의 체외배양액에 플라보노이드의 농도별 처리 결과는 Table 2와 같다. 체외배양액에 플라보노이드를 0, 1, 10과 20 μ M을 첨가하였을 때 배양 8일째 배반포기 발달율이 각각 49.5%, 54.2%, 57.1% 및 37.5%로 대조군에 비해 10 μ M 플라보노이드 처리군의 배반포기배 발달율에서 유의한 차이

Table 1. Primer sequences and cycling conditions used in real-time PCR

| Genes | Primer sequence (5'~3') | Annealing temp. | Product size |
|----------------|--------------------------------------------------|-----------------|--------------|
| H2A | F-GTCTGGAGTACCTGACCGC R-ACAACGAGGGCTTCTCTGA | 56°C | 201 bp |
| Sox | F-GCTGCTCTGGACTGTGCTGA R-ATCCAGTAATCTCCTCCAGC | 56°C | 247 bp |
| MnSOD | F-AGCACGAGCAGGAGACTGGT R-GTCCAGAAGATGCTGTGA | 56°C | 287 bp |
| Caspase-3 | F-CGATCTGGTACAGACGTG R-GCCATGTCATCCTCA | 50°C | 359 bp |
| Survivin | F-CCTGGCAGCTCTACCTCAAG' R-TAAGTAGCCAACACGAAAG | 56°C | 233 bp |
| Bax | F-GCTCTGAGCAGATCAAG' R-AGCCGCTCTCGAAGGAAGTC | 56°C | 400 bp |
| Bax inhibitor | F-GCTCTGGACTTGTGCATT R-GCCAAGATCATCATGAGC | 56°C | 374 bp |
| Glut-5 | F-TTGAGAGCCAGTGAACAGT R-TGCTGATAACTGTCTGCGCT | 60°C | 292 bp |
| Interferon-tau | F-ATGGCCTTCGGTCTCTCTCT R-AGGTCCTCCAGCTGCTGTTG | 55°C | 356 bp |

를 볼 수 없었다. 한편, 10 μM 처리군과 비교하여 1 μM 처리군에서는 유사한 발달율을 나타낸 반면 20 μM 처리군은 유의하게 낮은 발달율을 나타내었다. 또한, 이중 형광 염색을 통한 세포수 조사에서도 대조군, 1 μM과 20 μM 처리군의 총세포수와 내부 세포괴수는 유의한 차이가 없었던 반면 10 μM 처리군의 총세포수와 내부 세포괴수는 대조군과 다른 처리군에 비해 유의적으로 ($p < 0.05$) 높게 나타났다(Table 2와 Fig. 1). 따라서, 체외발달율과 세포수 조사 결과를 바탕으로 플라보노이드 처리의 최적 농도로 10 μM을 선택하였다.

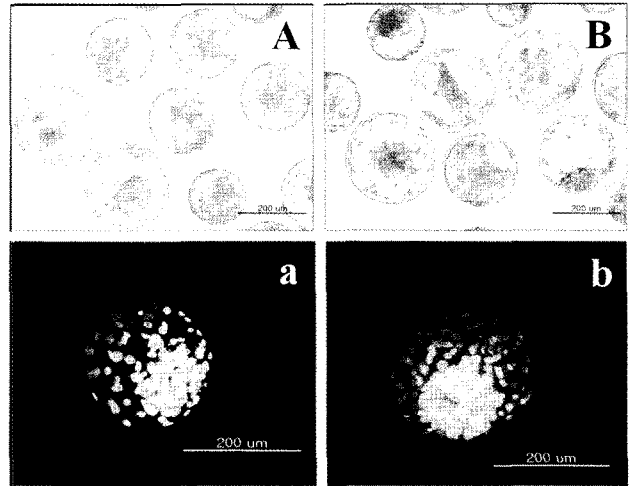


Fig. 1. In vitro development of bovine parthenogenetic day 8 blastocysts and differential stained inner cell mass and trophectoderm cells. A-a; control group, B-b; 10 μM flavonoid treatment group.

플라보노이드 처리가 소 단위발생 배아의 세포사멸에 미치는 영향

10 μM 플라보노이드 처리 유무에 따른 체외 배양 환경이 배아의 사멸에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 군의 배반포기 배를 TUNEL 분석을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. 대조군과 처리군 간의 총세포수는 유의한 차이를 나타내지 않으나, 세포 사멸율(apoptotic index)은 대조군(12±3.2)에 비해 10 μM 플라보노이드 처리군(4±2.5)에서 유의하게 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

플라보노이드 처리가 소 단위발생 배아의 유전자 발현에 미치는 영향

플라보노이드 처리가 소 단위발생란의 체외 배양 시 유전자 발현에 미치는 영향을 real-time PCR 분석을 통해 조사하였다. 대조군과 비교하여 10 μM 플라보노이드 처리군에서 산화 유전자인 Sox 발현의 감소와 항산화 유전자인

Table 2. Effect of flavonoid treatment on in vitro development of bovine parthenogenetic embryos

| Flavonoid treatment (μM) | No.(%)* of embryos developed to | | | | No. of total cells (ICM)* |
|--------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------|-------------------------|------------------------------------------------------|
| | Day 2 ≥2~4 cell | Day 4 ≥4~8 cell | Day 6 ≥morula | Day 8 ≥blastocysts | |
| 0 | 107 | 98 (91.5) | 89 (83.1) | 53 (49.5) ^{ab} | 112.3±13.7 ^a (29.3±2.5) ^a |
| 1 | 103 | 91 (88.3) | 75 (72.8) | 56 (54.2) ^a | 117.0±14.2 ^a (34.3±7.6) ^a |
| 10 | 112 | 105 (93.7) | 98 (87.5) | 64 (57.1) ^a | 139.2±9.0 ^b (47.8±7.8) ^b |
| 20 | 112 | 102 (91.0) | 96 (85.7) | 42 (37.5) ^b | 133.2±10.5 ^{ab} (26.8±11.0) ^a |

* ($p < 0.05$)^{a-b}.

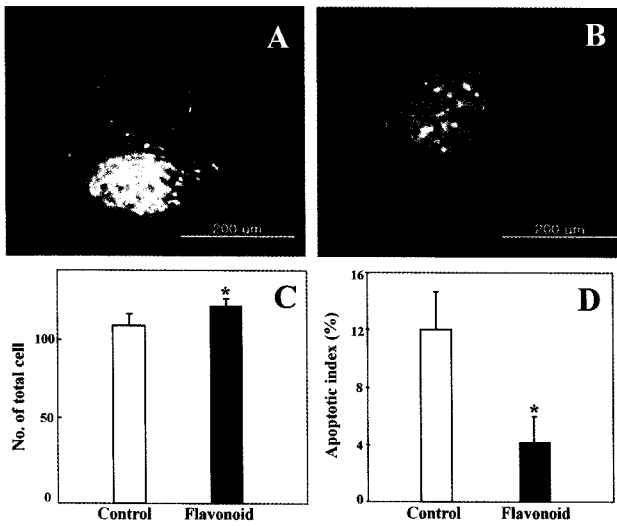


Fig. 2. Fluorescence microscopy images of nuclei of bovine parthenogenetic day 8 blastocysts by TUNEL staining. (A) Control group; (B) 10 uM flavonoid treatment group; Green: fragmented DNA, red: chromatin. The total cell number of cells (C) and apoptotic index (D) of bovine day 8 blastocysts cells. Star indicate statistically significant differences between two groups ($p < 0.05$).

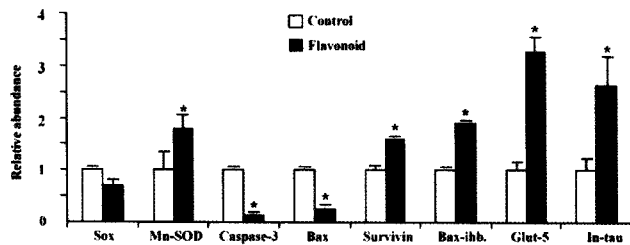


Fig. 3. Relative abundance of oxidant, apoptotic and growth mRNA expression in control or 10 uM flavonoid treated bovine parthenogenetic day 8 blastocysts. Significant differences are indicated by * ($p < 0.05$). Values are mean \pm SEM of three separate experiments.

Mn-SOD 발현이 증가되어 항산화 효과가 있음을 알 수 있었고, 사멸유전자인 Caspase-3와 Bax의 발현을 감소, 항사멸유전자인 Survivin과 Bax inhibitor의 발현이 유의하게 증가되어 세포 사멸 감소 효과가 있음을 예측할 수 있었다. 또한, 대사와 관련된 Glut-5와 착상 유전자인 In-tau의 발현이 플라보노이드 처리군에서 유의하게($p < 0.05$) 증가하는

것을 확인하였다(Fig. 3).

소 체세포 복제 배아의 체외발달에 플라보노이드 처리가 미치는 영향

체세포 핵이식 후 난할된 복제 배아를 배양 2일째부터 나누어 10 μ M 플라보노이드 처리 후, 체외 배 발달율과 이중 형광 염색을 이용한 세포수 분석을 실시하였다. Table 3에 나타난 바와 같이, 체외 배양 8일째 배반포기배 발달율은 플라보노이드 처리군이 30.7%로 대조군 26.0%보다 더 높았으며, 총 세포 수(164.3 \pm 13.5)와 내부 세포괴수(50.0 \pm 5.8)도 대조군의 결과(135.6 \pm 6.3, 35.6 \pm 6.9)와 비교하여 유의적으로($p < 0.05$) 높은 것을 확인하였다.

플라보노이드 처리 환경으로부터 생산된 체세포 복제 배아의 임신 결과

소 체세포 핵이식 배아를 플라보노이드 첨가 유무에 따라 나누어 배양한 후 체외배양 8일째 생산된 배반포기배를 대리모에 이식하였다. Table 4에 나타난 바와 같이, 대조군의 경우 34두에서 2두(5.9%)가 임신된 반면 플라보노이드 처리군의 경우 59두에서 6두(10.2%)가 임신되었다. 이식 후 10개월째 대조군에서는 2두 중 1두가 분만되었으나, 생후 30일경에 죽어 살아 있는 복제 소를 기대하기 어려웠던 반면, 플라보노이드 처리군의 경우 임신 소 6두 중 4두는 임신 6개월에 유산되고, 나머지 2두에서 2두의 복제 소(♂)가 태어나[2009. 3. 11(생시 체중; 28kg, BK01-10, Fig. 4)과 2009. 9. 9(생시 체중; 27kg, BK94-13)], 현재까지 건강하게 자라고 있다.

친자 감별 유전자 분석에 의한 복제 소의 검정

플라보노이드 처리군에서 태어난 복제 송아지 2두의 귀

Table 4. Jeju Black Cattle SCNT embryo transfer and their pregnancy

| Flavonoid treatment (μ M) | No. of transfer. surrogate mother | No. of pregnancy | No. of birth calf | No. of living calf |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| 0 | 34 | 2 (5.9%) | 1 | - |
| 10 | 59 | 6 (10.2%) | 2 | 2 |

* $p < 0.05$.

Table 3. Effect of flavonoid treatment on *in vitro* development of Jeju Black Cattle SCNT embryo

| Flavonoid treatment (μ M) | No.(%) [*] of embryos developed to | | | | No. of total cells (ICM) [*] |
|--------------------------------|---------------------------------------------|------------------------|---------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------|
| | Day 2 \geq 4 cells | Day 4 \geq 4-8 cells | Day 6 \geq morula | Day 8 \geq blastocysts | |
| 0 | 119 | 82 (68.9) | 69 (57.9) | 31 (26.0) | 135.6 \pm 6.3 ^a (35.6 \pm 6.9) ^a |
| 10 | 114 | 80 (70.1) | 59 (51.7) | 35 (30.7) | 164.3 \pm 13.5 ^b (50.0 \pm 5.8) ^b |

* ($p < 0.05$)^{a-b}.

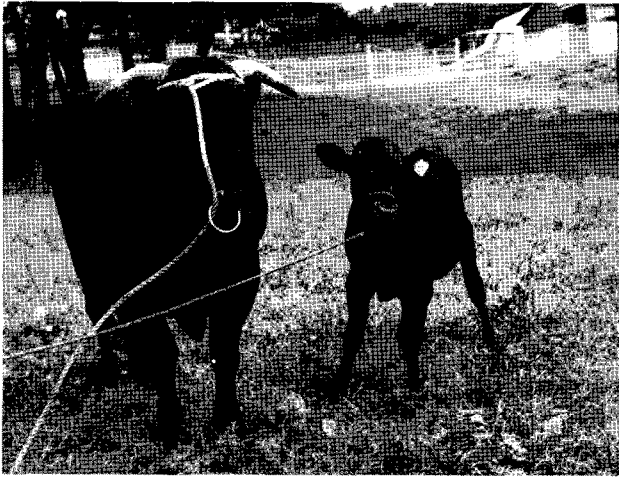


Fig. 4. Breeding bull provided somatic cell (left, BK 01-10) and five month old somatic cell nuclear transfer Jeju Black Cattle male calf "Heuk Young Dolee" (Aug 31, 2009).

세포와 복제용 제주흑우 체세포 및 대리모 소의 근육세포를 11개의 STR 마커로 각각 분석한 결과, 대리모와는 달리 복제 송아지와 공여된 제주흑우 체세포 간에 11개의 microsatellite loci에서 모두 완벽하게 일치하는 유전자형을 보이고, 성별도 동일한 수컷으로 확인된 바 있으며, Fig. 5에서는 그 중 [2009. 3. 11, BK01-10]의 친자 감별 유전자 분석이 제시되었다.

고 찰

본 연구는 제주 흑우 체세포 핵이식 배아를 체외 배양함에 있어서 배양액 내에 항산화제인 합성 플라보노이드 (3,4-dihydroxyflavone)를 처리하였을 때, 체외 배발달율의 개선과 배반포기배의 총 세포수 및 내부 세포피수가 증가하였고, 핵이식 배아의 이식 후 임신율 및 산자 생산율도 유의

하게 개선되었던 바, 플라보노이드는 체세포 핵이식 배아의 배양첨가제로 유용하게 이용될 수 있음을 나타낸다. 또한, 본 실험에서는 플라보노이드의 적정 농도와 처리 효과를 조사하기 위하여 체세포 핵이식 배아에 적용하기 앞서 단위 발생 배아에 그 사용 여부를 조사하였다. 플라보노이드를 1, 10과 20 μM 농도로 나누어 대조군과 비교 조사하였던 바, 10 μM 농도에서 발달율 및 총 세포수 증가를 확인하였으며, 특히 내부 세포피수 증가를 확인하였다. 한편, 10 μM 이하의 농도는 효과에 있어서 차이가 없었으나, 20 μM 농도는 유의하게 낮은 발달율을 나타내었던 바, 낮은 농도에서는 항산화 작용을 나타내지만, 이와는 반대로 적정 수준 이상의 높은 농도에서는 산화 작용을 나타낸다는 다른 연구자의 연구 결과와 유사한 결과를 나타내었다 (Wang 등, 2007a).

또한, 본 연구에서 플라보노이드 처리된 단위 발생 배아의 세포 사멸율을 조사하였던 바, 유의하게 감소되는 경향을 TUNEL 분석 방법을 통하여 확인하였다. 플라보노이드는 앞서 언급한대로 산소 래디컬이나 질소 유리 래디컬을 감소시키는 항산화 작용을 하고 산소 래디컬이 생성되는 일차 단계를 막아 연쇄 산화 반응을 억제시키는 것으로 알려져 있으며, 종양 형성 억제 및 사멸, 분화와 세포 주기 조절 등의 항산화 기능이 있는 것으로 알려져 있다(Afanas'ev 등, 1989). 이러한 기능은 플라보노이드 처리에 따른 유전자 발현 조사에서도 확인되고 있다. Real-time PCR을 이용하여 발현 정도를 무처리군과 비교하였을 때, 플라보노이드 처리군에서 내인성 항산화 유전자인 Mn-SOD의 발현이 유의하게 증가되었으며, Survivin, Bax inhibitor 1과 같은 항 사멸 유전자의 발현도 유의하게 증가됨을 확인하였다. 또한 본 실험에서 사용된 플라보노이드는 사멸인자의 발현 억제와 더불어 항산화 및 항사멸 효과로 성장과 관련된 대사유전자인 Glut-5와 착상유전자인 In-tau 등의 유의한 발현 증가를 가져오게 함으로써 건강한 배아 발생으로 체세포 핵이식 배아의 발생을 가능하게 했을 것으로 사료된다. 체세포 핵이식 기술은 유전적으로 동일한 복제동물을 대량 생산하기 위한 기술로서 이미 분화가 이루어진 체세포를 탈핵된 미수정란에 이식하여 핵을 초기화(reprogra-

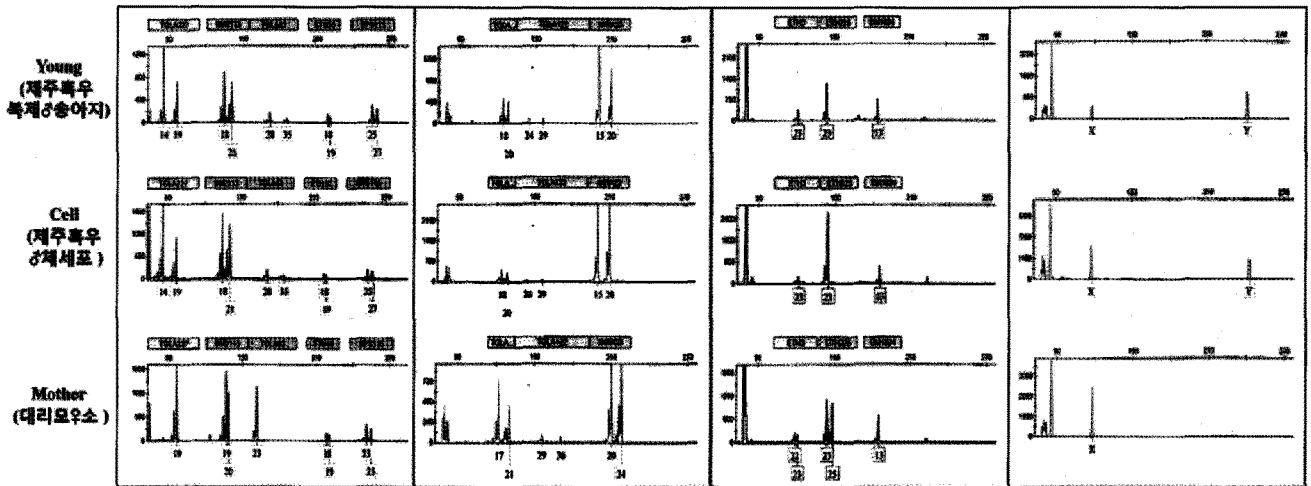


Fig. 5. STR (short tandem repeat) profile investigated full DNA fingerprint of cloned calf (Heuk Young Dolee, BK01-10), somatic cell and surrogate mother using STR marker.

mming)시킴으로써 새로운 수정란으로 발생시키는 기법이다. 지금까지 많은 연구자들에 의해 체세포 핵이식과 복제 수정란의 발달에 대한 다양한 연구들이 계속되어 왔다 (Kato 등 1998: Wells 등, 1999: Kubota 등, 2000). 본 연구에서는 제주특별자치도 축산진흥원에서 보유하고 있던 제주흑우 우량 종모우 2두의 귀 세포를 2007년에 채취하여 배양 증식한 후 냉동 보관하였다가, 융해하여 5계대에서 15계대에 해당하는 건강한 체세포를 이용하여 핵이식을 실시하였다. 또한, 플라보노이드 처리와 무처리군으로 나누어 체외배양된 7~8일째 배반포기배는 서울에서 비행기로 제주까지 공수하였고, 배양기에서 꺼내어 대리모 소에 이식하기까지 대략 4시간 소요되었다. 이때에 핵이식 배아는 플라보노이드가 들어 있는 배양액과 들어 있지 않은 배양액으로 각각의 보관용 스트로에 담아 보온병에 적정 온도를 유지하여 운반하였다. 이와 같은 배아 이식 시스템은 이미 본 연구소에서 확립되어 엘리트 체외수정란을 생산하고 이식하여 44%(18/44)의 분만율을 얻은 바 있으며, 체외 발생된 배반포기배를 서울에서 제주까지 공수할 때에 배아 운반용 배양액 내에 플라보노이드를 넣고 4시간 이내에 운반하면 배아의 건강도를 유지할 수 있고 임신율도 감소되지 않는다는 것을 보고한 바 있다(Park 등, 2009). 또한, 본 연구에서는 플라보노이드 처리는 체세포 핵이식 배아의 항산화, 항사멸 효과와 더불어 대사 관련 유전자 발현의 증가 그리고 착상 유전자의 발현 증가를 유의하게 가져올 수 있음을 알 수 있었다. 항사멸 효과는 수정란의 세포분열을 돕고 발달을 돕는다. 그 결과, 본 연구에서 체세포 핵이식으로 발달된 배아의 세포 수를 살펴보면 총 세포수뿐만 아니라 내부 세포괴수에서도 대조군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다. 이와 더불어 플라보노이드를 처리한 배양 환경에서 자란 체세포 복제 배아는 이식 후 10개월 후에 형태 이상이나 신체 기관 이상 없이 정상적으로 태어났으며, 병적 소인 없이 잘 성장하였다.

일반적으로 복제 소는 거대산자증후군(large offspring syndrome)을 보인다고 알려져 Lee 등(2004)은 임신 150일령에 복제 소의 체중은 체외 수정란과 인공수정의 경우보다 11~17% 정도 무겁다고 한 반면, Garry 등(1996)은 체세포가 아닌 수정란의 활구를 이용하여 복제한 소에서도 거대산자와 기형 송아지가 출생하는 것으로 보아 이는 체세포 복제만의 문제는 아니며, 체외배양 또는 복제과정 중에서 발생하는 여러 가지 원인인 것으로 보고한 바 있다. 또한, 복제 소의 생산은 체세포 핵이식 배아로부터 대략 7% 미만이 산자로 태어나는 것으로 알려져 있으며(Heyman 등, 2002), 임신 초기 착상의 실패에 따른 임신율 저하로 인해 이식 후 90일경에 임신으로 진단된 소의 80% 이상이 유산되는 것으로 알려져 있다(Wakayama 등, 1999). 본 연구에서 임신율은 대조군과 플라보노이드 처리군에서 각각 5.9%(2/34)와 10.2%(6/59)로 나타났고, 대조군에서 2두 중 1두가 분만되어 생후 30일 만에 조기 사망한 반면, 플라보노이드 처리군에서는 임신 소 6두 중 2두의 복제 소(33.3%)는 임신 282일(7일 배아+이식 후 275일, BK01-10)과 292일(7일 배아+이식 후 285일, BK94-13)에 각각 태어나 건강하게 성장하였다.

본 연구에서 분만된 소 중 2009년 3월 11일에 태어난 첫 번째 제주흑우 복제 씨수소("흑영돌이" 명명, ♂, Fig. 4)는 현존하는 흑우 중 육량 형질이 제일 우수한 종모우(BK 01~10)가 복제된 것이며, 2009년 9월 9일에 태어난 두 번째

복제 소("흑제돌이" 명명, ♂)는 육질 형질이 우수하여 근내 지방도가 높고 1등급 이상이 95% 이상 출현율을 보이는 종모우(BK 94-13)가 복제되었다. 특히, 두 번째 복제 소는 이미 2008년 도축된 씨수소의 냉동보관된 체세포가 핵이식 기술에 이용된 것으로 공시된 체세포와 핵이식 배아의 유전자가 일치하는지를 첫 번째 복제 소에서 사용된 STR(short tandem repeat) 분석으로 조사한 결과, 11개의 국제 공인 마커와 성별까지 모두 일치함으로써 체세포만 확보되면 언제든지 우수종 복원이 가능함을 확인할 수 있었다.

기타 유산된 무처리군에서 임신 1마리와 처리군 4마리는 제주도 내 여러 목장에 이식됨으로써 방목된 대리모의 건강 및 사양 관리 상태의 차이 혹은 태아의 자궁 내 부정 위치상이 원인으로 지적되고 있다. 하지만 체세포 핵이식 배아의 산자 발생을 개선할 위해서는 장시간 동안 다수의 기계적 처리과정과 화학물 노출에 의해 약해져 있으므로 핵이식 후 기능을 빠르게 회복할 수 있는 항산화제인 플라보노이드의 처리 이외에도 좀 더 효율적인 체외 배양 시스템 개발에 따른 배아 발달의 최적화, 대리모 선정 및 이식 후 사양관리 등 다양한 해결책이 더욱 요구된다고 하겠다.

인용문헌

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
2. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 23;394(6691):369-374.
3. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P et al. (1999): Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 17:456-461.
4. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL et al. (2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
5. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M (2002): A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415:859.
6. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1998): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
7. Cibelli JB, Stice SL, Goleuke PJ, Kane JK, Jerry J, Balackwell C, de Leon A, Robl JM (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
8. Im GS, Yang BS, Park SJ, Im SK, Yang BC, Yi YJ, Park CS (2001): Effect of protein supplementation, O₂ concentration and co-culture on the development of embryos produced by nuclear transfer using cultured cumulus cells in Hanwoo(Korean cattle). *Asian-Aust*

- J Anim Sci 14(9):1260-1266.
9. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBoitris D, Camous S, Vignon X, Renard JP (2002): Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. Biol Reprod 66:6-13.
 10. Yang BC, Im GS, Kim DH, Ko YG, Hwang SS, Nho WG, Kim MJ, Yang BS, Lee SJ, Seong HH (2008): Effects of gestation length and birth weight on survival rate in cloned Korean Native Calves. Reprod Dev Biol 32(1): 51-58.
 11. Halliwell B, Gutteridge JMC (1989): The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In Free radicals in Biology and Medicine 2nd edition. J Oxford: Clarendon Press 22-85.
 12. Guerin PEL, Mouatassim S, Menezo Y (2001): Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update 7:175-189.
 13. Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A (1993): Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol Reprod 49 (2):228-32.
 14. Lim JM, Liou SS, Hansel W (1996): Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. Theriogenology 46:429-439.
 15. Caamano JN, Ryoo ZY, Youngs CR (1998): Promotion of development of bovine embryos produced *in vitro* by addition of cysteine and beta-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. J Dairy Sci 81:369-374.
 16. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI (1989): Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochem Pharmacol 38:1763-1769.
 17. Wang ZG, Yu SD, Xu ZR (2007a): Improvement in bovine embryo production *in vitro* by treatment with green tea polyphenols during *in vitro* maturation of oocytes. Anim Reprod Sci 100:22-31.
 18. Wang ZG, Yu SD, Xu ZR (2007b): Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. Braz J Med Biol Res 40(8):1079-1085.
 19. Wells DN, Misica PM, Tervit HR (1999): Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biol Reprod 60(4): 996-1005.
 20. Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X (2000): Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. Proc Natl Acad Sci 97:990-995.
 21. Park HY, Kim EY, Kim YH, Mun SH, Oh CH, Han YJ, Kim NH, Lee SS, Ko MS, Riu KZ, Park SP (2009): Pregnancy of *in vitro* produced Korean cattle embryos according to transport time course. Reprod Dev Biol 33(4):257-262.
 22. Lee RS, Peterson AJ, Donnison MJ, Ravelich S, Ledger AM, Li N, Oliver JE, Miller AL, Tucker FC, Breier B, Wells DN (2004): Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. Biol Reprod 70 (1):1-11.
 23. Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG (1996): Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. Theriogenology 41:141-152.
- (접수일자: 2010. 5. 30 / 채택일자: 2010. 8. 18)