

Vitamin K₁의 첨가가 돼지 체외 수정란의 발달과 생존율에 미치는 효과

박흥대¹ · 주역진¹ · 박용수^{2,*}

¹대구대학교 생물공학과, ²국립한국농수산대학 말산업학과

Effects of Vitamin K₁ on the Developmental and Survival Rate of Porcine *In Vitro* Fertilized Embryos

Hum-Dai Park¹, Yi-Chen Zhu¹ and Yong-Soo Park^{2,*}

¹Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

²Department of Horse Industry, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Hwaseong 445-760, Korea

ABSTRACT

The *in vitro* production of porcine embryos was essential to increase of blastocyst development rate and select of high quality blastocyst in early stage. There were a lot of reports about *in vitro* porcine embryo development, but there was no report about the selection of high quality embryos. Therefore, in this study, we investigated the effect of vitamin K₁ (vit K₁) on the development and survival rate of porcine *in vitro* fertilized embryos. When vit K₁ was treated for 24 hr at day 1 *in vitro* culture, blastocyst development rate in the control group (35.5 ± 3.2%) was significantly lower compared to 1.0 μM, 3.0 μM, or 6.0 μM groups (14.5 ± 4.3, 0.0, or 0.0%; *p*<0.05). The survival rates of blastocysts at day 8 in 1.0 μM, 3.0 μM or 6.0 μM of vit K₁ treated groups (22.2 ± 2.9, 0.0 or 0.0%) were significantly lower than that of the control group (31.8 ± 2.6%; *p*<0.05). We were added at 1.0 μM, 3.0 μM or 6.0 μM vit K₁ for different durations of time at day 1 *in vitro* culture. The development rate and survival rate in the group of 1.0 μM vit K₁ for 6 hr was 26.5 ± 2.9% and 47.2 ± 2.8%, respectively, which were differed significantly in the group of 12 hr (*p*<0.05). In the group of 3.0 μM vit K₁, the blastocyst development in control group was 36.4 ± 3.1% but, the survival rate 41.7 ± 3.2% in the group of 3.0 hr was significantly higher than that of the control group (*p*<0.05). In the group of 6.0 μM vit K₁, the control group's the blastocyst development was 32.0 ± 2.8% and the 0.5 hr supplement group's survival rates was 42.9 ± 1.8% higher than other groups. We added vit K₁ at day 1, day 2, day 4 and day 6 of *in vitro* culture, on the based the results of supplemented concentration and duration. In the group of 1.0 μM 6.0 hr addition, the blastocyst development rate of day 4 and the survival rate of day 2 were the highest in each group. In the groups of 3.0 μM 3.0 hr addition or 6.0 μM 0.5 hr addition, the blastocyst development (59.5 ± 4.1% and 50.0 ± 3.6%) and survival rates (72.7 ± 5.4% and 79.2 ± 4.0%) on day 4 were significantly higher than that of control and other experiment groups (*p*<0.05). Meanwhile, the number of cells in blastocysts that produced by vit K₁ supplementation was 53.4 ± 5.8, 49.4 ± 3.8 and 51.5 ± 4.5 respectively, which were significantly higher than that of 40.2 ± 2.3 in the control group (*p*<0.05). There was no difference of the number of apoptotic cells between control and experiment groups. In addition, gene expression of survival blastocyst, the Bax mRNA expression was similar between the control and the experiment groups. However, Bcl-xL mRNA expression's in the group of 6.0 μM 0.5 hr on day 4 was highest among control and experiment groups (*p*<0.05). In this study suggested that the control of concentration, duration and time was effective on the survival and cell number of porcine blastocyst derived from *in vitro*. We are not know what the exact reasons of the effect of vit K₁ on embryo development and need to fur ther study. However, vit K₁ might be using the selection of high quality porcine blastocyst.

(Key words : vitamin K₁, porcine, *in vitro* culture, survived blastocyst)

* 본 연구는 2012년도 대구대학교 학술연구지원에 의하여 연구되었습니다.

† Correspondence : E-mail : dvmpys@korea.kr

서 론

수정란이식 기술은 가축의 개량과 생산성을 향상시키고, 나아가 복제 동물 등과 같은 형질 전환 동물의 생산에 이용되고 있다(Prather *et al.*, 2003; Beebe *et al.*, 2007). 특히 돼지의 수정란 생산은 바이오 장기 동물, 질환 모델 동물 등과 같은 형질 전환 동물의 생산에 많이 이용되고 있다(Nauyen *et al.*, 2011). 한편, 수정란 이식의 효율을 높이기 위해서는 우수한 능력을 가진 다수의 수정란을 확보해야 하며, 그 방법 중의 하나는 난소 내에 다량으로 존재하는 미성숙 난포란을 이용하는 것이다 (First and Prather, 1991).

돼지의 경우, 다른 종에 비해 핵 성숙과 더불어 세포질 성숙이 수반되지 못하여, 불안정한 체외 성숙(Motli and Fulka, 1974) 및 체외 수정 시 다정자 침입(Abeydeera and Day, 1997) 등이 발생하고, 체외 배양 시에는 4 세포기에서 발달 지연 및 정지(Camous *et al.*, 1984; Heyman *et al.*, 1987) 현상이 발생하여 양질의 수정란 확보에 어려움이 있다. 체외에서 발생한 배반포를 이식한 경우, 산자 생산 효율이 체내에서 발생한 것보다 저조하다.

이러한 원인은 아마도 부적합한 체외 환경에서 발달한 배반포는 불충분한 성숙, 부족한 세포 수 등이 그 요인일 것이라고 보고되고 있다. 따라서 현재의 여러 종류의 체외 배양 체계에서 발달한 배반포 중에서 태아로의 발달이 가능한 고품질의 것을 선별할 필요성이 있다.

고품질의 배반포를 선별하는 방법으로는 일반적으로 배반포의 형태, 크기, 포배강의 확장(Zhang *et al.*, 2012; Lloyd *et al.*, 2009; Bauer *et al.*, 2010) 등 현미경적으로 관찰하는 방법과 생산된 배반포의 총 세포 수, 세포 사멸 수(Hao *et al.*, 2003), 유전체지수(Sturmey *et al.*, 2009) 등을 검사하는 조직학적 방법이 있다. 그러나 현미경적 관찰은 연구자의 경험에 의존하기 때문에 명확하지 않다는 단점이 있고, 조직학적 검사는 염색법 등을 이용하기 때문에 배반포가 사멸한다는 단점이 있다. 이러한 단점들을 극복하여 고품질의 배반포를 선별하기 위하여 배양액의 삼투압 처리, HAT 배지 이용 및 온도 충격 등 여러 가지 방법이 시도되었다(Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000). 그러나 이러한 방법들은 체외에서 생산된 배반포 중에서 높은 생존율과 이식 가능한 양질의 배반포를 어느 정도 객관적으로 선별할 수 있지만, 기술과 조작이 복잡하다는 것과 생존 능력이 약한 배반포를 배양 초기에 선별할 수 없다는 단점이 있다.

한편, Vitamin K₁(vit K₁)은 지용성 비타민으로써 뼈의 신진 대사와 혈액 응고의 보조 인자로 알려져 있다(Philipp and Ouweland, 2012). Vit K의 산화-환원 cycle을 통해 생산되는 활성 산소가 암 세포에 독성을 일으켜 정상 세포뿐만 아니라, 암

세포도 사멸시키거나(Bouchard *et al.*, 1998; Nutter *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1985), 세포 내 암 유전자인 c-myc, c-fos, c-jun 등의 전사 단백질 생산을 증가시켜 세포 분열과 관련되어 있는 cyclin dependent kinase(CDK)가 불활성화 됨으로써 세포 주기를 멈추는 기능을 가지고 있다(Cole and McMahon, 1999; Bouzazah *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). 이와 같이 정상 세포를 비롯한 암세포에 관한 vit K₁의 효과에 관한 보고는 있었으나, 포유 동물 배에 대한 vit K₁의 효과에 대한 연구 보고는 없었다.

본 연구에서는 이식 가능한 고품질 배의 객관적 선별 방법 개발의 일환으로써 생화학 물질인 vit K₁을 이용하여 돼지 난포란 유래 수정란의 체외발생에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수

도축 돼지로부터 난소를 적출하여 75 µg/ml penicillin G (Sigma, P-3032)가 첨가된 0.9% 생리식염수(32~35°C)가 들어있는 보온병에 담아 2시간 내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 penicillin G가 첨가된 0.9% 생리식염수로 3~4회 세척하고, 난소의 혈액과 이물질을 제어한 후, 18 gauge-needle syringe를 이용하여 직경 3~6 mm의 가시난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 회수한 난포란을 실체 현미경(× 80, Olympus, Japan) 하에서 난구 세포의 부착이 조밀하며, 세포질이 균일한 것만을 선별하여 실험에 제공하였다.

Porcine follicular fluid(pFF)는 난포란을 회수하고 남은 난포액을 4°C, 8,000 rpm, 30분간 원심분리 후, 상층액을 회수하여 0.8, 0.45, 0.2 µm syringe filter(Sartorius Stedim Biotech, Minisart, Germany)로 여과·분주하여 -20°C에 보관하고, 사용 직전에 56°C에서 30분간 비활성화시켜 제조하였다.

2. 체외 성숙

선별된 난포란을 TL-HEPES 용액으로 2~3회 세척하였다. 10% pFF, 0.57 mM cysteine, 10 IU/ml pregnant mare serum gonadotropin, 10 IU/ml human chorionic gonadotropin, 10 ng/ml epidermal growth factor, 10 ng/ml β-mercaptoethanol이 함유된 NCSU-23 용액이 500 µl 씩 분주된 4-well dish(NUNC, Roskilde, Denmark)에 50~70개의 미성숙 난포란을 넣고, 22 시간동안 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양시킨 후, 재차 10% pFF, 0.57 mM cysteine, 10 ng/ml epidermal growth factor, 10 ng/ml β-mercaptoethanol이 함유된 NCSU-23 용액 체외 성숙 용 IVM II 용액에서 부가적으로 22시간 동안 배양함으로써 체외 성숙을 유도하였다.

3. 체외 수정

본 연구에 사용된 정액은 다비 A·I CENTER에서 제작된 희석 정액을 이용하였으며, 17°C에 보관하여 최대 5일 동안 사용하였다. 정액과 PBS(Sigma, P-3813) 용액을 동일 비율로 희석하여, 14 ml Conical tube(BD Science Falcon, California, USA)에 넣고, 1,500 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 3회 실시하여 세정하였다. 원심분리 후 하층부의 정자괴에 2 ml의 PBS 용액을 넣어 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 15분간 swim-up하였다. 양호한 운동성을 가진 정자를 회수하여 1,500 rpm에서 3분간 원심분리를 실시한 다음, 침전된 정자는 m-TBM 용액으로 희석하였다. 정자 농도는 1×10^6 sperm/ml이 되도록 조절하였다.

체의 성숙 후 형태적으로 난구 세포가 확장된 난포란만을 선별하여 0.1% hyaluronidase(Sigma, H-3506)가 첨가된 TL-HEPES 용액에서 pipetting 함으로써 난구세포를 제거한 후 m-TBM 용액으로 2~3회 세척하였다. 그리고 mineral oil(Sigma, M-8410)로 피복된 48 µl의 m-TBM 용액에 15개씩의 난포란을 넣고, 상기에서 준비된 정자 2 µl(최종 정자 농도 1×10^5 sperm/ml)를 첨가하여 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에 6시간 배양함으로써 체외 수정을 유도하였다.

4. 체외 배양

체의 수정된 수정란을 체외 배양용 용액으로 pipetting 하여 정자를 포함한 불순물을 제거한 후, 다시 PZM-3 용액으로 2~3회 세척하였다. 세척된 수정란은 미리 준비한 50 µl의 0.3% BSA 첨가 PZM-3 용액에 30개씩 넣어 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다(day 1). 체외 배양 2일째(day 2)에 수정을, 체외 배양 6일째(day 6)에 배반포의 배발생율, 체외 배양 8일째(day 8)에 배반포의 생존율을 관찰하였다.

5. 실험 설계

1) Vitamin K₁ 첨가 농도 효과

체의 수정 후 6시간째에 형태적으로 정상적이라고 판단되는 수정란을 각각 1.0 µM, 3.0 µM, 6.0 µM의 vit K₁이 첨가된 PZM-3 용액에서 24시간 배양 후 vit K₁ 미첨가 PZM-3 용액에서 8일째까지 체외 배양하였다.

2) Vitamin K₁ 첨가 농도 및 시간 효과

체의 수정 후 6시간째에 형태적으로 정상적이라고 판단되는 수정란을 1.0 µM vit K₁ 첨가 용액에서 6.0 및 12.0시간, 3.0 µM vit K₁첨가 용액에서 3.0 및 6.0시간 그리고 6.0 µM vit K₁ 첨가 용액에서 0.5 및 1.0시간 처리 후 vit K₁ 미첨가 PZM-3 용액에서 8일째까지 배양하였다. 각각 첨가군에서 대조군은 vit

K₁ 미첨가하였다.

3) Vitamin K₁ 첨가 농도, 시간과 첨가 시기 효과

체의 배양 1일째(수정 후), 2일째(2~8세포기 단계), 4일째(상실배 단계), 6일째(배반포 단계)에 각각 6.0시간 1.0 µM vit K₁, 3.0시간 3.0 µM vit K₁ 그리고 0.5시간 6.0 µM vit K₁ 처리 후 vit K₁ 미첨가 PZM-3 용액에 옮겨 8일째까지 배양하였다. 배반포의 품질 분석을 위하여 총 세포 수 및 세포 사멸과 관련된 유전자를 각각 검사하였다.

6. TUNEL(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) Assay

TUNEL assay kit는 *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescent(Roche, Germany) 1번과 2번을 사용하였으며, 혼합은 1:9의 비율로 희석하였다. 배반포를 0.1% polyvinylpyrrolidone(PVA, Sigma, P-0930)이 첨가된 PBS(PVA-PBS) 용액으로 3회 세척한 후 4% paraformaldehyde(Sigma, P-6148)가 첨가된 PBS 용액에 침지시켜 4°C에서 1시간 고정시켰다. 고정된 배반포를 PVA-PBS 용액으로 3회 세척하여 0.1% Triton X-100(Sigma, T-8787)이 첨가된 PBS 용액에 다시 침지시켜 4°C에서 30분간 냉장 보관하였다. 그리고 PVA-PBS 용액으로 3회 세척하여 TUNEL assay kit를 혼합한 용액에 침지시켜 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양 후 PVA-PBS 용액으로 3회 세척하였다. 그 후 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride(DAPI, Sigma, F-6057)가 첨가된 10 µl mounting 용액으로 고정된 배반포를 형광 현미경(Olympus, Japan)으로 배반포의 총 세포 수와 세포 사멸 수를 조사하였다.

7. RNA 합성과 Real-time PCR

Dynabeads mRNA direct kit(DYNAL: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 제공된 방법에 따라 각 처리군 당 20개의 배반포를 사용하여 RNA를 분리 후, 8 µl RNA, 50 ng/µl Random hexamer, 10 mM dNTP mix, 10 XRT buffer, 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, 40 U/µl RNase OUT, 200 U/µl superscript III RT가 포함된 총 20 µl의 혼합물에서 cDNA를 얻기 위해 각각 65°C에서 5분, 50°C에서 50분, 85°C에서 5분 처리 후 4°C로 유지하였다. 이렇게 확보한 cDNA를 주형으로 PCR을 수행하였다. RT-PCR은 Stratagene MX 3000P QPCR System (San Diego, CA, USA)을 이용하였고, SYBR Green(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)에 합성한 cDNA 2 µl와 primer를 첨가하여 최종량이 20 µl가 되도록 하였다. RT-PCR 증폭 프로그램은 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 먼저 95°C에서 10분의 preincubation, 95°C에서 40초의 denaturation, 60°C

에서 40초의 annealing, 72°C에서 45초의 elongation의 과정을 45 cycle 반복하였다.

8. 통계 처리

본 연구에서 수행된 각각의 실험은 4회 반복하였다. 모든 결과는 mean \pm SE로 나타내었으며, 배반포로의 배 발달율, 배반포의 생존율과 총 세포 수, mRNA의 발현과 관련된 결과는 ANOVA와 χ^2 -test를 이용하여 0.05%의 수준에서 유의차를 검증하였다.

결 과

1. Vitamin K₁의 첨가 농도

돼지 체의 수정란의 발생에 미치는 vit K₁의 첨가 농도의 효과를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 대조군의 2-cell 발달율, 배반포 발달율이 각각 87.1%, 35.5%이었으며, 이들 배반포의 생존율은 31.8%(14/44)이었다. 한편, 1.0 μ M 처리군에서의 2-

cell 발달율은 74.2%였고, 배반포 발달율과 생존율은 각각 14.5% 및 22.2%로써 대조군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 한편 3.0 μ M 첨가군과 6.0 μ M 첨가군에서는 2-cell 단계로의 발달은 가능하였으나, 배반포로의 발생은 불가능하였다.

2. Vitamin K₁의 첨가 농도와 처리 시간

돼지 체의 수정란의 발생에 미치는 vit K₁의 첨가 농도와 처리 시간의 효과를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 1.0 μ M 첨가군의 대조군에서 2세포기 및 배반포 발달율은 각각 80.7% 및 23.7%였으며, 6시간 처리군은 77.9% 및 26.5%로 비슷하였으나, 12시간 처리군은 각각 61.0% 및 3.7%로써 대조군과 6시간 처리군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 한편, 생존율은 대조군과 6시간 처리군이 각각 43.8% 및 47.2%로써 12시간 처리군의 20.0%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

3.0 μ M 첨가군의 대조군과 3시간 처리군에서 2세포기 발달율이 비슷하였으나, 6시간 처리군은 51.5%로 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 배반포 발달율은 대조군, 3시간 처리군 및 6시간 처

Table 1. Effect of the concentrations of vitamin K₁ on the development and survival rate of porcine embryos

Concentrations of vitamin K ₁ (μ M)	No. of embryos	No. (%) of developed embryos to		Survival rate of blastocyst (%)
		≥ 2 cell	Blastocyst	
Control	124	108(87.1 \pm 2.5) ^c	44(35.5 \pm 3.2) ^b	31.8 \pm 2.6 ^b
1.0	124	92(74.2 \pm 3.8) ^{bc}	18(14.5 \pm 4.3) ^a	22.2 \pm 2.9 ^a
3.0	124	72(58.1 \pm 4.2) ^b	0(0.0)	0.0
6.0	124	30(24.2 \pm 2.5) ^a	0(0.0)	0.0

^{a~c} Different superscripts within the same column indicate significant difference($p < 0.05$).

Table 2. Effect of concentrations and treatment durations of vitamin K₁ on the development and survival rate of porcine embryos

Concentration of vitamin K ₁ (μ M)	Durations (hr)	No. of embryos	No. (%) of developed embryos to		Survival rate of blastocyst (%)
			≥ 2 cell	Blastocyst	
1.0	Control	135	109(80.7 \pm 2.5) ^b	32(23.7 \pm 2.8) ^b	43.8 \pm 2.1 ^b
	6.0	136	106(77.9 \pm 3.8) ^b	36(26.5 \pm 2.9) ^b	47.2 \pm 2.8 ^b
	12.0	136	83(61.0 \pm 2.4) ^a	5(3.7 \pm 1.2) ^a	20.0 \pm 1.3 ^a
3.0	Control	132	112(84.8 \pm 2.1) ^b	48(36.4 \pm 3.1) ^c	37.5 \pm 2.4 ^a
	3.0	132	112(84.8 \pm 3.6) ^b	36(27.3 \pm 2.8) ^b	41.7 \pm 3.2 ^b
	6.0	132	68(51.5 \pm 3.8) ^a	8(6.1 \pm 2.0) ^a	0.0
6.0	Control	120	94(78.3 \pm 3.0) ^c	30(32.0 \pm 2.8) ^c	40.0 \pm 2.8 ^a
	0.5	120	76(63.3 \pm 2.9) ^b	14(11.7 \pm 1.5) ^b	42.9 \pm 1.8 ^a
	1.0	120	46(38.3 \pm 3.3) ^a	4(3.3 \pm 0.7) ^a	0.0

^{a~c} Different superscripts within the same column in each group indicate significant difference($p < 0.05$).

리군에서 각각 36.4%, 27.3% 및 6.1%로써 대조군이 처리군에 비하여 유의하게 높았다. 그러나 배반포 생존율은 3시간 처리군이 41.7%로써 대조군의 37.5%에 비하여 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).

6.0 μM 첨가군의 2세포기 발달율은 대조군이 78.3%, 0.5시간 처리군이 63.3% 및 1.0시간 처리군이 38.3%로써 대조군이 처리군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 배반포 발달율도 대조군이 32.0%로써 처리군의 11.7% 및 3.3%에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 하지만 배반포 생존율은 대조군과 0.5시간 처리군이 각각 40.0% 및 42.9%로써 유사한 경향이었고, 1.0시간 처리군은 생존한 배반포가 없었다.

3. Vitamin K₁의 첨가 농도, 처리 시간 및 처리 시기 효과

체외 수정된 돼지 난포란의 체외 발생에 미치는 vit K₁의 첨가 농도와 첨가 시간을 조합하여 배발달 단계에 따른 첨가 시기의 효과를 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 1.0 μM 6.0시간 첨가 대조군의 배반포 발달율과 생존율이 각각 21.4% 및 39.4%였다. 배반포 발달율은 대조군에 비하여 1일째 첨가군이 14.3%로 유의하게 낮았고, 2일째 첨가군은 비슷하였으나, 4일째 첨가군은 45.5%로 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편, 생존율은 대조군과 비교하여 1일째 및 4일째 첨가군은 45.5% 및 37.0%로 차이가 없었으나, 2일째 첨가군은 57.7%로 유의하게 높았다($p < 0.05$).

3.0 μM 3.0시간 첨가 대조군의 배반포 발달율은 17.9%로 1일째 첨가군의 16.9%와 차이가 없었으나, 2일째 첨가군은 27.4%, 4일째 첨가군은 59.5%로 대조군과 1일째 첨가군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 배반포 생존율은 대조군과 1일째

첨가군 및 2일째 첨가군이 각각 38.1%, 42.9% 및 42.2%로 비슷하였으나, 4일째 첨가군은 72.7%로써 유의하게 높았다($p < 0.05$).

6.0 μM 0.5시간 첨가 대조군의 배반포 발달율은 21.3%로써 2일째 첨가군의 22.1%와 비슷하였으나, 1일째 첨가군은 10.5%로 유의하게 낮았고($p < 0.05$), 4일째 첨가군은 50.0%로 대조군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편, 배반포 생존율은 대조군이 40.6%였고, 처리군은 각각 40.6%, 40.8% 및 79.2%로 대조군에 비하여 유의하게 높은 경향이였으며($p < 0.05$), 특히 4일째 처리군이 가장 높았다.

한편, 각 처리군에서 6일째 첨가군에서 6일째 배반포로 발달이 없었으나, 7일째에 배반포가 형성되었다.

4. 배반포 세포 수 및 분석 결과

각각 vit K₁ 농도, 처리 시간 및 처리 일자의 처리에서 배반포 생존율이 가장 높은 각각 처리군의 세포 수를 조사한 결과는 Table 3과 같다. 배반포의 총 세포 수는 대조군이 40.2개였고, 처리군에서는 각각 53.4개, 49.4개 및 51.5개로서 대조군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 또한 사멸된 세포 수는 대조군이 평균 4.2개로써 처리군의 평균 3.2~3.7개보다 많았으나, 유의차는 없었다.

한편, 배반포의 세포 사멸 유도 유전자인 Bax mRNA 발현은 처리군이 대조군에 비해 낮았지만, 유의차는 없었다. 그러나 세포 사멸 억제 유전자인 Bcl-xL mRNA 발현은 모든 처리군이 대조군에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$).

고 찰

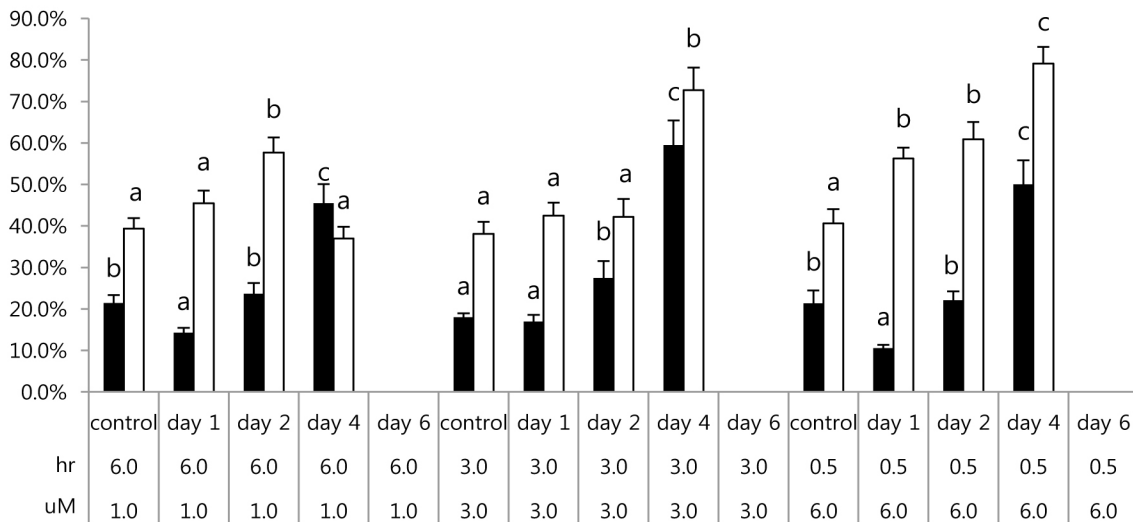


Fig. 1. Effect of concentrations, treatment duration and developmental stages of vitamin K₁ on the development (■) and survival rate (□) of porcine embryos. ^{a-c} Different superscripts within the same column in each group indicate significant difference ($p < 0.05$).

Table 3. Total and apoptotic cell number of porcine blastocyst embryos developed in three different vitamin K₁ experiment groups

Concentration of vitamin K ₁ (μM)	Durations (hr)	Treated developmental stage (day)	No. of examined blastocyst	TUNEL assay	
				DAPI ¹⁾	TUNEL ²⁾
Control	-	-	15	40.2 ± 2.3 ^a	4.2 ± 1.2
1.0	6.0	2	14	53.4 ± 5.8 ^b	3.7 ± 2.1
3.0	3.0	4	14	49.4 ± 3.8 ^b	3.2 ± 0.9
6.0	0.5	4	12	51.5 ± 4.5 ^b	3.5 ± 1.5

¹⁾ Nuclei in blastocyst can be observed by DAPI staining.

²⁾ Apoptotic cells were labeled by the TUNEL staining.

^{a~c} Different superscripts within the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

가축의 개량과 더불어 여러 종류의 형질 전환 동물 생산 효율의 증대를 위해서는 수정란의 체외 생산 기술의 향상이 무엇보다 시급하지만, 체외에서 생산되는 이식 가능한 포유 동물 배는 체내에서 생산된 것과 비교하면, 태아로의 발달율이 현저하게 낮다(Khurana and Niemann, 2000). 그 이유로는 특히 돼지의 경우, 미성숙 난포란의 핵 성숙과 더불어 세포질 성숙이 수반되지 못하여 불안정한 체외 성숙(Motli and Fulka, 1974) 및 체외 수정 시 다정자 침입(Abeydeera and Day, 1997), 체외 배양 시에는 4 세포기에서 발달 지연 및 정지(Camous *et al.*, 1984; Heyman *et al.*, 1987) 등 배반포로의 발달에 있어서 체외와 체내 생산 환경의 차이 때문이라 한다(Kitagawa *et al.*, 2004).

그러나 불완전한 체외 환경에서 생산된 배일지라도 고품질의 배반포를 선별하여 이식한다면, 효율성 향상에 효과적일 것으로 생각한다. 일반적으로 다수의 고품질 돼지 배를 생산하기 위해서는 수정 후 2일째에 4세포기에서 8세포기까지 발달한 배를 엄격하게 선별하여야 하고, 6일째에 배반포로의 발달이 정상적이어야 한다(Ulloa *et al.*, 2008). 정상적으로 발달한 배반포일지라도 이식 후 태아로의 발생이 가능한 배반포를 경험과 주관적 판단에 의존하는 선별법은 문제점이 많다. 따라서 이러한 문제점을 극복하고, 보다 객관적으로 고품질의 배반포를 선별하기 위하여 배양액의 삼투압 처리, HAT 배지 이용, 온도 충격 등 여러 가지 방법이 시도되었지만, 그 효과는 낮았다(Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000). 본 연구는 돼지 배반포의 선별에 있어서 주관적 또는 객관적인 기존 선별법의 한계를 극복하기 위해 체세포 또는 암세포 배양에 특수 목적으로 첨가하는 생화학적 물질인 vit K₁을 이용하였다.

Vit K는 혈액 응고 보조인자로서 일반적으로 인체의 지혈제와 세포의 독성 실험에 이용되고 있으며, vit K₁과 K₂는 세포 핵 내 암 유전자 단백질의 전사 인자에 작용하여 암세포를 사멸시키거나, 세포 주기를 정지시켜 항암 효과(Wu *et al.*, 1993; Bouchard *et al.*, 1998, Cole *et al.*, 1999)를 나타내기도 하고,

vit K₃의 세포 내 활성 산소의 산화 능력을 통해 암세포의 분화와 주기를 억제시켜 암세포를 사멸(Ross *et al.*, 1985; Gant *et al.*, 1988; Bouchard *et al.*, 1998)시키는 등 항암제로도 알려져 있다. 일반적으로 vit K를 암세포에서는 고농도(50~100 μM)에서 48시간 또는 72시간 처리하면 90% 이상의 세포가 사멸하지만, 저농도(15~20 μM)로 24시간 처리하면 암세포뿐만 아니라, 정상 세포도 50% 이상 생존한다고 한다(Akiyoshi *et al.*, 2009). 본 연구에서도 돼지 난포란 유래 수정란의 체외 배양에 있어서 vit K₁의 효과를 검토했던 결과(Table 1과 Table 2), 고농도(3~6 μM)에서 장시간(24시간)의 처리는 효과가 없었지만, 처리 농도가 높을수록 비교적 짧은 처리 시간(1.0 μM에서 6시간, 3.0 μM에서는 3시간, 6.0 μM에서 0.5시간)은 비록 배반포로의 발생에는 효과가 없었지만, 배반포의 생존율에는 효과적이었다. 그리고 처리 시기, 특히 배양 4일째에 처리하는 것은 배반포 발달을 및 생존율 증가와 더불어 배반포의 총 세포 수도 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1, Table 3). 세포의 종류에 따라 다르겠지만, 이와 같이 vit K₁은 고농도로 장시간 처리하면 어떤 종류의 세포라도 죽게 된다. 그러나 vit K₁을 처리 방법을 개선한다면, 배반포 배의 경우는 오히려 배의 할구수가 증가하면서 배반포의 생존율이 상승하였다.

Vit K₁의 처리에 의해 생산된 배반포에서 세포 사멸 유도 유전자인 Bax mRNA의 발현은 차이가 없었으나, 세포 사멸 억제 유전자인 Bcl-xL mRNA 발현은 모든 처리군에서 높았다(Fig. 2). Vit K₁ 처리에 따른 Bcl-xL mRNA 발현 증가의 원인을 알 수는 없으나, vit K₁ 처리는 세포사멸 억제 유전자의 발현을 증가시키므로, 세포 주기와 관련된 유전자에도 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. Davis와 Steven(2003)은 vit K₁을 세포 주기의 G₁/S기에서 작용하는 물질로써 p21의 전사 단백질을 활성화시켜 G₁기에서 cyclin-dependent kinase(CDK)의 인산화를 억제하여 세포 분열을 정지시킨다는 보고하였다. 이와 같이 vit K₁과 세포 주기를 고려할 때 적절한 농도, 시간, 시기에 vit K₁의 처리에 따른 세포 수 증가는 분열 정지된 배반포

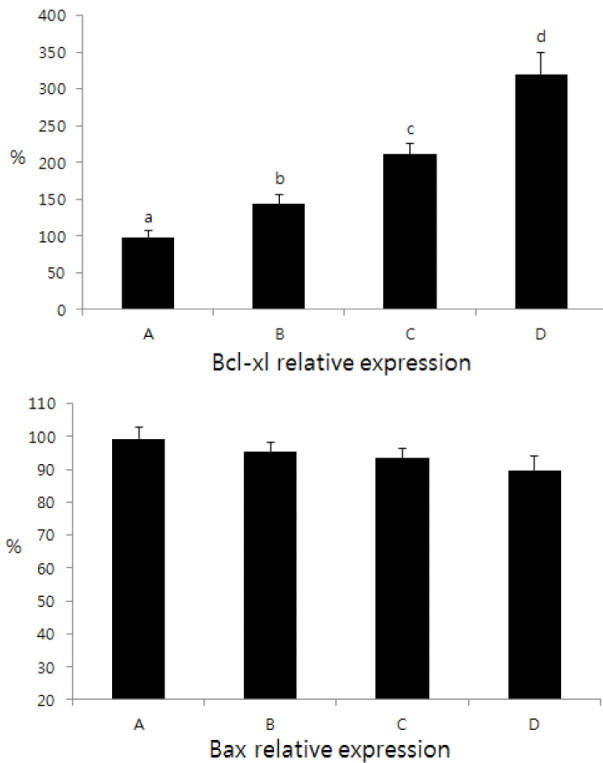


Fig. 2. Relative expression of Bcl-xL and Bax in porcine blastocysts derived from control (A), 1.0 μ M vitamin K₁ for 6.0 hr at day 2 (B), 3.0 μ M vitamin K₁ for 3.0 hr at day 4 (C), and 6.0 μ M vitamin K₁ for 0.5 hr at day 4 (D) groups. ^{a-d} Different superscripts within the same column in each group indicate significant difference ($p < 0.05$).

의 할구들이 사멸되지 않고, G₁/S기에서 머물러 있으면서 vit K₁의 작용에 의하여 S기로 진행되었기 때문으로 생각된다.

이상의 결과로부터 돼지 미성숙 난포란 유래 수정란의 체외 배양에 vit K₁의 첨가는 배반포 발달율, 생존율 및 세포 수를 증가시키므로, 고품질 배반포의 생산과 선별에 효과적이었다. 그 이유에 대해서는 아직 많은 부분이 밝혀져야 하며, 이러한 방법으로 생산된 배반포를 이식하여 태아로의 발생 가능성도 검토할 필요가 있다.

요 약

돼지 수정란의 체외 생산 효율성 향상을 위해서는 배발생율과 더불어 고품질의 배를 조기에 선별해야 한다. 체외 배 발생율에 대한 보고는 많지만, 고품질의 배를 선별할 수 있는 기술에 대한 연구는 거의 없었다. 본 연구에서는 돼지 난포란 유래 수정란의 체외배양에 있어서 배반포로의 배 발달과 생존에 미치는 Vitamin K₁(vit K₁) 첨가 농도, 시기 및 시간의 효과를 검

토하였다. 1.0 μ M, 3.0 μ M 및 6.0 μ M vit K₁을 배양 1일째 24시간 첨가한 결과, 배반포 발달율이 시험군이 14.5 \pm 4.3, 0.0 및 0.0%로써 대조군의 35.5 \pm 3.2%에 비하여 유의하게 낮았고 ($p < 0.05$), 배반포의 생존율도 대조군이 31.8 \pm 2.6%로써 시험군의 22.2 \pm 2.9, 0.0 및 0.0%에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 상기 첨가 농도에서 첨가 시간을 달리한 결과, 1.0 μ M 농도에서 6시간 처리군의 배반포 발달율과 생존율이 각각 26.5 \pm 2.9% 및 47.2 \pm 2.8%로써 가장 높았고 특히, 12시간 처리군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 3.0 μ M 농도에서는 대조군의 배발달율이 36.4 \pm 3.1%로 가장 높았으나, 생존율은 3.0시간 첨가군이 41.7 \pm 3.2%로 대조군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 6.0 μ M 농도에서도 배발달율은 대조군(32.0 \pm 2.8%), 생존율은 0.5시간 첨가군(42.9 \pm 1.8%)이 가장 높았다. 각각의 vit K₁ 첨가 농도와 시간을 기준으로 서로 다른 배양 시기에 첨가한 결과, 1.0 μ M 6시간 첨가군에서는 배반포 발달율은 배양 4일째 첨가군, 생존율은 배양 2일째 첨가군이 가장 높았다. 한편, 3.0 μ M 3.0시간 및 6.0 μ M 0.5시간 첨가군에서는 배양 4일째 첨가군의 배반포 발달율(59.5 \pm 4.1% 및 50.0 \pm 3.6%)과 생존율(72.7 \pm 5.4% 및 79.2 \pm 4.0%)이 대조군과 다른 시험군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편, vit K₁ 첨가에 따른 배반포의 세포 수를 조사한 결과, 첨가군(1.0 μ M 6시간 배양 2일째, 3.0 μ M 3.0시간 배양 4일째 및 6.0 μ M 0.5시간 배양 6일째)이 53.4 \pm 5.8, 49.4 \pm 3.8 및 51.5 \pm 4.5개로써 대조군의 40.2 \pm 2.3개에 비하여 유의하게 많았다($p < 0.05$). 그러나 사멸 세포 수는 시험군이 3.2 \pm 0.9~3.7 \pm 2.1개로써 대조군의 4.2 \pm 1.2개보다 적었으나, 유의차는 없었다. 세포 사멸 유도 유전자인 Bax mRNA 발현은 처리군과 대조군은 비슷하였으나, 세포 사멸 억제 유전자인 Bcl-xL mRNA 발현은 처리군이 대조군보다 높았고 특히, 6.0 μ M 0.5시간 배양 4일째 첨가군이 가장 높았다. 이상의 결과로부터 돼지 미성숙 난포란 유래 수정란의 체외 배양에 vit K₁의 첨가는 배반포의 생존율과 세포 수 증가에 효과적이었다. 그 이유에 대해서는 아직 많은 부분이 밝혀져야 되겠지만, 고품질의 배반포 조기 선별에는 활용이 가능할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48: 537-544.
- Akiyoshi T, Matzno S, Sakai M, Okamura N and Matsuyama K. 2009. The potential of vitamin K₃ as an anticancer agent breast cancer that acts via the mitochondria-related apoptotic pathway. *Cancer Chemother Pharmacol.* 65: 143-150.

- Bauer BK, Isom SC, Spate LD, Whitworth KM, Spollen WG, Blake SM, Springer GK, Murphy CN and Prather RS. 2010. Transcriptional profiling by deep sequencing identifies differences in mRNA transcript abundance in *in vivo*-derived versus *in vitro*-cultured porcine blastocyst stage embryos. *Biol. Reprod.* 83: 791-798.
- Beebe LF, McFactrick S and Nottle MB. 2007. The effect of energy substrate concentration and amino acids on the *in vitro* development of preimplantation porcine embryos. *Clone Stem Cells* 9: 206-215.
- Bouchard C, Staller P and Eilers M. 1998. Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol.* 8: 202-206.
- Bouzahzah B, Nishikawa Y, Simon D and Carr BI. 1995. Growth control and gene expression in a new hepatocellular carcinoma cell line, Hep4 inhibitory actions of vitamin K. *J. Cell Physiol.* 165: 459-467.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W and Menezo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after of early bovine embryo cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fertil.* 72: 479-485.
- Cole MD, McMahon SB. 1999. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* 18: 2916-2924.
- Davis LW, Steven PM. 2003. The anticancer effects of vitamin K. *Alternative Med. Review.* 8: 303-318.
- First NL, Prather RS. 1991. Production of embryos by oocyte cytoplasm-blastomere fusion in domestic animals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 43: 245-254.
- Hao Y, Lai L, Mao J, Im GS, Bonk A and Prather RS. 2003. Apoptosis and *in vitro* development of preimplantation porcine embryos derived *in vitro* or by nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 69: 501-507.
- Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S and Gamier V. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: Improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27: 59-68.
- Gant TW, Rao DN, Mason RP and Cohen GM. 1998. Redox cycling and sulphhydryl arylation; their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 65: 157-173.
- Khurana NK, Niemann H. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* 62: 847-856.
- Kim JC, Kim JY, Joo JH, Yoon SH, Lee SJ, Lee SJ, Kim JM, Song HB and Park HD. 2000. Effect of heat shock on *in vitro* development of IVM-derived bovine embryo. *Korea J. Animal Reprod.* 24: 311-317.
- Kim JY, Park H, Kim JM, Lee JH and Park HD. 2004. Studies on the *in vitro* fertilization and *in vitro* development of porcine embryos in different culture system. *Korean J. Emb. Trans.* 19: 19-25.
- Kitagawa Y, Suzuki k, Yoneda A and Watanabe T. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62: 1186-1197.
- Lloyd RE, Romar R, Matas C, Gutiérrez-Adán A, Holt WV and Coy P. 2009. Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced *in vitro*. *Reproduction.* 137: 679-687.
- Motli J, Fulka J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 36: 235-237.
- Nguyen NT, Lo NW, Chuang SP, Jian YL and Ju JC. 2011. Sonic hedgehog supplementation of oocyte and embryo culture media enhances development of IVF porcine embryos. *Reproduction.* 142: 87-97.
- Nutter LM, Ngo EO, Fisher GR and Gutierrez PL. 1992. DNA strand scission and free radical production in menadione-treated cells. Correlation with cytotoxicity and role of NADPH quinone acceptor oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 267: 2474-2479.
- Philipp S and Ouwehand AC. 2012. Vitamin K: essential for healthy bones. *Nutrafoods* 11: 111-116.
- Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L and Greenstein JL. 2003. Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 59: 115-123.
- Ross D, Thor H, Orrenius S and Moldeus P. 1985. Interaction of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) with glutathione. *Chem. Biol. Interact.* 55: 177-184.
- Ross D, Thor H, Threadgill MD, Sandy MS, Smith MT, Moldeus P and Orrenius S. 1986. The role of oxidative processes in the cytotoxicity of substituted 1,4-naphthoquinones in isolated hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 248: 460-466.
- Sturmey RG, Hawkhead JA, Barker EA and Leese HJ. 2009. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod.* 24:81-91.
- Ulloa CM, Yoshizawa M, Komoriya E, Mitsui A, Nagai T and Kikuchi K. 2008. The blastocyst production rate and inci-

- dence of chromosomal abnormalities by developmental stage *in vitro* produced porcine embryos. J. Reprod. Dev. 54: 22-29.
- Wang Z, Wang M, Finn F and Carr BI. 1995. The growth inhibitory effects of vitamins K and their actions on gene expression. Hepatology 22: 876-882.
- Wu FY, Chang NT, Chen WJ and Juan CC. 1993. Vitamin K₃-induced cell cycle arrest and apoptotic cell death are accompanied by altered expression of *c-fos* and *c-myc* in nasopharyngeal carcinoma cells. Oncogene 8: 2237-2244.
- Zhang JY, Diao YF, Oqani RK, Han RX and Jin DI. 2012. Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development *in vitro*. Biol. Reprod. 86:128: 1-9.
-
- (접수: 2014. 2. 25/ 심사: 2014. 2. 25/ 채택: 2014. 3. 25)