

돼지 단위생식란의 세포사멸 유전자 발현 양상에 관한 연구

손종윤^{1,a} · 김상환^{1,a} · 정덕원³ · 류준열² · 윤종택^{1,3,*}

¹서울호서직업전문학교 생물자원 · 유전공학연구소, ²서울호서직업전문학교 애완동물학부,
³한경대학교 동물생명환경과학부 동물생명공학전공

Expression Analysis of Programmed Cell Death Genes in Porcine Parthenogenesis

Jong-Yoon Son^{1,a}, Sang-Hwan Kim^{1,a}, Duk-Won Jung³, Chun-Yeol Ryu² and Jong-Taek Yoon^{1,3,*}

¹Institute of Biology Resources & Genetic Engineering, Seoul Hoseo Occupational Training College, Seoul 157-731, Korea

²Dept. of Companion Animal, Seoul Hoseo Occupational Training College, Seoul 157-731, Korea

³Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

ABSTRACT

The nature of molecular mechanisms governing embryonic cell block is largely unknown, but recent reports have demonstrated that proper execution of programmed cell death is crucial for this process. The main objective of this study is to determine effects of programmed cell death on porcine oocytes development *in vitro* after parthenogenesis. Among the blastocysts matured in 3MA, MAP1LC3A and ATG5 RNA gene expression level increased in the order of Cyst < 3MA < RP. However, Casp-3 and TNF- α RNA gene expression level decreased in the order of RP < 3MA < Cyst. Expression of mTOR within the RP-cultured blastocyst was the most highly to the inner cell mass, while 3MA-cultured blastocyst showed very lowest expression in inner cell mass. The expression of mTOR showed a pattern opposite to that of MAP1LC3A. That is, its expression was the lowest in Cyst group. When the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 was assessed in culture, the level of active MMP-9 was higher expression in the medium of each RP treatment group, with the level of another treatment group being relatively higher. Analyses of TIMP-2 and TIMP-3 revealed that their expression was higher in groups that did not receive RP treatment. More specifically, the level of TIMP-2 was not affected by Cyst treatment, while the level of TIMP-3 was higher in 3MA and RP treatment group. There was highly cell division activation efficiency of parthenogenesis on cultured system of RP supplement IVC medium. Therefore, these results suggest that embryo development was significantly increased in conditional culture medium with active autophagy as compared to common cultured condition. Further investigation of this distinction may enable the development of innovative improvements for the production of porcine somatic cell nuclear transfer.

(Key words: parthenogenesis, apoptosis, autophagy, oocyte, porcine)

서 론

단위생식은 수정 시 응성 전핵이 자성 전핵과 융합하지 않아서 할구나 배세포가 자성전핵에서만 유래하는 핵을 갖게 되는 개체발생을 말한다. 자성의 난자성숙에 따른 제1 혹은 제2 극체와 본 핵의 물리화학적 자극으로 이루어지며, 자성의 유전적 특징을 그대로 가질 수 있는 능력이 부여된다(Funahashi 등 1995). 단위생식이란 단성생식, 단위발생, 단성발생이라고도 한다. 포유류에서의 단위생식 난자에 인위적이거나 자연발생적

으로 자극이 일어나게 되면 세포질 내로 free Ca²⁺가 유입되게 되고 Ca²⁺의 증가에 의하여 정자가 침입한 것과 같은 환경을 얻게 됨으로써 난자가 수정을 한 것처럼 인식하게 된다. 이때 MII 상태의 난자는 제 2극체를 방출하게 되고, 제2극체는 하나의 핵으로 인식되어 난자의 핵과 결합하여 배아로 발달하게 된다(Cha, 1997).

단위생식에 대한 연구는 포유류에서 돼지, 소 그리고 양 등에서 많이 연구되고 있으며, 수정란의 발달 및 체세포 복제동물 생산이나 형질전환 동물 생산을 위한 체외 배양 시스템의

^a Jong-Yoon Son and Sang-Hwan Kim contributed equally to this work.

* Correspondence : jtyoon@hknu.ac.kr

이해 그리고 cell block 현상을 규명하는데 활용될 수 있다. 포유류에서는 돼지나 소, 양 등에서 많은 연구가 진행되고 있다. 포유류의 단위생식 연구 중 돼지 체외 성숙 난자에 Ca-EDTA를 처리하였을 경우, 미성숙란도 단위생식을 일으킬 수 있다고 보고하였다(Azuma 등, 2002). 단위생식을 유도하는 방법으로는 크게 화학적 방법과 물리적 방법으로 나누어진다. 화학적 방법은 화학시료를 이용하여 세포질 내의 free Ca^{2+} 을 증가시키는 방법으로 에탄올(EtOH)(Yi 등, 2005), 스트론튬(Sr)(Suofeng 등, 2005), Ca-EDTA, Na-EDTA(Azuma 등, 2002), 6-dimethylaminopyridine(6-DMAP)(Yi 등, 2005), cyclohexamide(CH)(Jilek 등, 2000) 및 calcium ionophore(Jilek 등, 2001) 등을 이용하는 방법이 있고, 물리적 방법으로는 전기 자극 방법이 있다(Collas 등, 1988, 1993; Yinzhong 등, 2003; Lee 등, 2011). 또한 단위생식에 있어서 cytochalasin B(CB)의 유무에 따른 여러 연구가 보고되고 있는데(Fukui, 1992; Presicce와 Yang, 1994), CB는 cytoskeletal inhibitor로 세포질 내 골격을 더욱 조밀하게 만들어 극체가 빠져 나가지 못하게 하여 단위 발생을 유도하는 것으로 알려져 있지만, 아직까지 단위생식란의 배아발달에 대한 기전은 잘 모르고 있다. 세포의 발생 및 성장에 있어 세포사멸 기전은 apoptosis에 의한 세포사멸작용과 자가소식작용을 하는 autophagy의 두 기전이 있는데, 이는 세포의 사멸뿐 아니라, 배아의 형성, 면역반응, 상처치유, 정상 조직의 항상성을 유지하기 위한 과정으로 세포군을 조절하는 것으로 알려져 있다(Faodk 등, 1992; Hengartner와 Horvitz, 1994; Kerr 등, 1994; Levine 등, 2004). 특히 autophagy의 발생은 세포의 발생과 분화 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하며(Levine 등, 2004), 세포생존에 필수적인 대사산물을 만들기 위한 pro-survival mechanism 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Zhang 등, 2009). 이런 세포사멸 기전은 난자의 성숙 및 배반포의 발달에도 깊은 연관을 가지고 있다(Lee 등, 2011). 따라서 본 연구는 돼지의 단위생식란의 유도를 통하여 배아발달 시 세포사멸 조절이 단위생식란 발달에 미치는 영향을 분석하여 체세포복제 수정란의 발달에 세포사멸사 조절이 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

도축장에서 도축된 돼지의 난소를 채취하여 항생제(Penicillin G 100 IU/ml, Streptomycin 100 µg/ml)가 첨가된 37°C의 생리식염수에 넣어, 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 3회 세척하고, 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 3~5 mm의 난포에서 난포액과 난자를 흡입, 채취하였다. 15 ml round bottom tube(Falcon, USA)에 담아 10분간 정치시켜 상층액을 제거하고, 하층의 침전액에서

난자를 채란하였다. 난자는 난구세포의 부착상태가 전체적으로 치밀하고 균일하게 부착된 난자만을 회수하여 실험에 공시하였다.

2. 난자의 채란 및 체외 성숙

수집된 난자는 HEPES-buffered tissue culture medium 199 (TCM199; Gibco, USA)에 10 µl/ml antibiotic antimiotic(Gibco, USA), 0.3%(w:v) bovine serum albumin(BSA; Sigma, USA)이 첨가된 T-washing으로 3회 세척한 후 Table 1과 같이 체외 성숙 방법을 분리하여 실험하였다. 1-step의 경우, 기본 TCM-199 배양 배지에 10% porcine follicle fluid(pFF)와 15 ng/ml epidermal growth factor(EGF; Sigma, USA) 그리고 0.5 µg/ml의 FSH를 첨가하여 36시간동안 배지의 교환 없이 성숙을 유도하였고, 2-step의 경우, 10% fetal bovine serum(FBS; Sigma, USA)와 2.5 µg/ml gonadotrophic hormone(GTH; Sigma, USA) 그리고 15 ng/ml EGF 첨가한 체외 성숙 배지를 조성하여 22시간 동안 성숙을 유도하고, 체외 성숙 배지에서 GTH를 제거한 배지를 옮겨 22시간 동안 성숙을 완료하였다.

3. 단위생식 유도

난자는 앞선 실험에서 핵 성숙율이 가장 좋은 처리군을 선택하여 단위생식을 유도하였다. 체외 성숙이 끝난 후 0.1% hyaluronidase를 이용하여 난자의 난구세포를 제거하고, PBS (phosphate buffered saline)에 3번 세정하였다. 세정한 난자를 0.3 M mannitol 용액에 30초 동안 정치시켜준 뒤 TCM-199에 7% ethanol에 7분 동안 화학적 자극 이후 2 mM 6-DMAP(6-dimethylaminopurine)에서 4시간 동안 세포 활성화를 유도하였고, 이후 세포 발생 촉진을 위하여 2 mM H-SOF(HEPES-bu-

Table 1. Hormones treated during *in vitro* maturation in medium type

Supplements	1-step	2-step	
	IVM	IVM 1	IVM 2
Base-medium	TCM-199		
FBS	-	10%	10%
pFF	10%	-	-
Cysteine	0.5 mM	0.57 mM	0.57 mM
EGF	10 ng/ml	15 ng/ml	15 ng/ml
GTH	-	2.5 µg/ml	-
FSH	0.5 µg/ml	-	-
Incubation hr.	36 hr	22 hr	22 hr

ffered synthetic oviduct fluid)에서 4시간 동안 배양하여 안정화하였다. 이후 세포사멸 유도 및 억제를 위하여 Table 2와 같은 방법으로 체외배양 배지를 조성하여 각각 배양하였다. 체외배양 배지는 NCSU-23과 15%FBS가 첨가된 NCSU-23(north carolina state university-23)을 각각 기본 배지로 하여 5 IU insulin like growth factor(IGF: nG-1), 2.5 mM 3-methyladenine (3-MA: nG-2), 0.4 mM Cysteamine(Csty: nG-3) 그리고 100 mM Rapamycin(RP: nG-4)을 첨가한 배양액을 각각 사용하였고, 39°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 72시간 동안 배양 후 동일한 새로운 배지로 교환하여 배양 후 3일째에 현미경 하에서 난자의 상태를 관찰하여 2세포기 이상의 발달된 배아가 보이지 않을 경우, 모든 난자를 형광염색하여 전핵 형성을 확인하였고, 배반포 발달 확인 후 높은 출현을 보인 배지에 호르몬 효과를 주기 위하여 5 IU FSH+LH를 첨가하였고, treatment factor로 5 IU IGF를 첨가하여 배양하였다. 이후 출현된 모든 배반포는 mRNA 및 protein 분리를 위하여 동결 보관한 후 실험에 공시하였고, 체외배양배지는 모두 회수하여 분석실험에 공시하였다.

4. 단위생식란의 전핵형성 및 핵성숙

48시간과 72시간의 배양이 끝난 난자들을 0.1% hyaluronidase(Sigma-Aldrich)를 이용하여 난자 주변의 난구세포를 마우스 pipet을 이용하여 제거하였다. 난구세포를 제거한 난자들을 2% formalin과 0.1% polyvinylpyrrolidone(PVP; Sigma-Aldrich, USA) 그리고 0.25% glutaraldehyde(Sigma-Aldrich)를 섞은 용액에서 10분간 38.5°C incubator에서 고정을 시킨 후 기본배지 용액에 1.9 mM의 Hoechst33258(Sigma-Aldrich)를 넣고, 1:1 비율로 glycerol(Sigma-Aldrich)과 섞은 용액에 2시간 동안 염색을 시켜 형광현미경 하에서 200배율 이상에서 핵상을

Table 2. Programmed cell death factor supplemented during *in vitro* culture

Group	Chemical activation	Base-IVC medium	Treatments
Control-n			Non-treatment
G-1	7%EtOH	NCSU-23	3-Methyladenine 2.5 mM
G-2	7 min		Cysteamine 0.4 mM
G-3	+ 6-DMAP 2 mM		Rapamycin 100 nM
Control-nF	4 hr.		Non-treatment
G-4	+ H-SOF 2 mM	NCSU-23 (supplement of 15% FBS)	3-Methyladenine 2.5 mM
G-5	4 hr.		Cysteamine 0.4 mM
G-6			Rapamycin 100 nM

Control-n: NCSU-23+non-treatment, G-2: NCSU-23+15% FBS+non-treatment.

관찰하였다. 핵상의 상태에 따라 GV(germinal vesicle), GVBD (germinal vesiclebreakdown), MI(metaphase I), MII(metaphase II) 단계로 나누어 각 군의 핵 성숙율을 확인하였고, 배아발달은 세포 분화에 따라 발달률을 확인하였다(Fig. 1).

5. Total RNA 분리

Total RNA을 추출하기 위하여 배반포만을 수집하여 Trizol reagent(Invitrogen, USA)의 실험방법에 따라 total RNA를 분리하였다. 30~50개의 배반포에 Trizol 1 ml를 넣고 실온에서

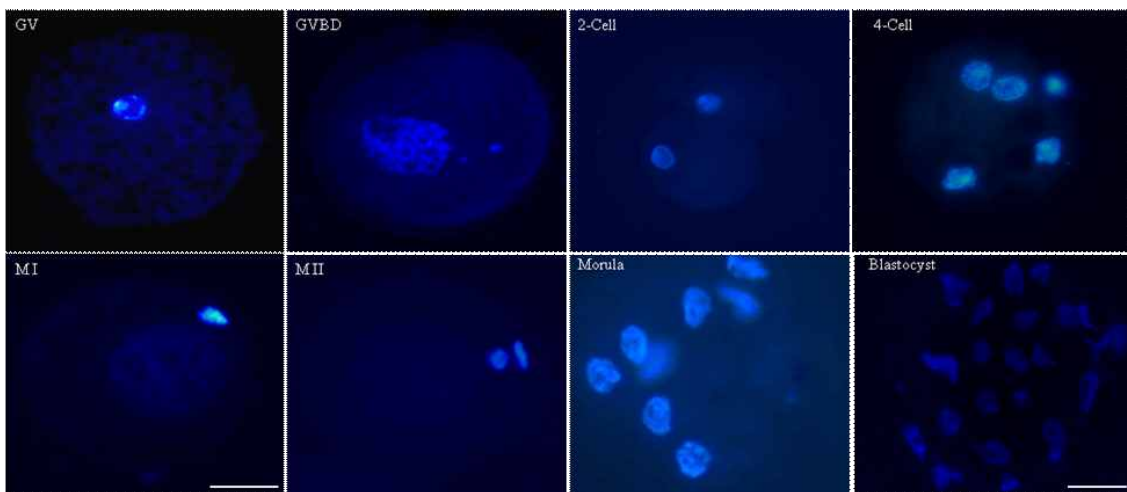


Fig. 1. Morphology and nuclear status (stained with DAPI) of pathenogenesis in porcine oocytes: (GV) prophase I; (GVBD) germinal vesicle breakdown; (MI) metaphase I; (MII) metaphase II. Scale bar = 20 mm.

5분간 정치, 200 μ l chloroform을 첨가한 후 15분 동안 13,000 rpm에서 원심분리를 하여 상층액을 회수한다. 회수한 상층액에 500 μ l의 isopropanol을 넣고, 상온에서 10분간 정치 후 원심분리하였다. 얻어진 RNA pellet은 차가운 70% ethanol로 washing한 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate)-treated water 20 μ l를 넣어 용해시킨 후, 56°C heat block에서 10분간 가온하고, -20°C에서 보관하였다.

6. cDNA 합성

cDNA는 1st Strand Synthesis Using Oligo(Oligo dT primer; Invitrogen, USA)를 이용하여 합성하였다. 합성방법은 Invitrogen사의 방법을 응용하여 5 μ g 이상의 total RNA에 1 \times DEPC를 8 μ l 첨가하고, 1 μ l의 oligo dT와 10 mM dNTP 1 μ l를 혼합하여 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후 1분간 얼음에 냉각시켜 first strand cDNA를 합성을 정지시켰다. 합성된 first strand cDNA 반응액에 10 \times RT buffer 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, RNase Inhibitor 1 μ l를 혼합하여 원심분리한 후 42°C에서 50분간 반응시킨 후 72°C에서 15분간 반응시켜 얼음에 급랭하여 cDNA를 합성하였다. 끝으로 RNase H 1 μ l를 넣은 후 37°C에서 20분간 반응시켜 RNA 단편을 제거하여 cDNA 합성을 완료하였다.

7. Real-Time PCR

Real-time PCR은 One step SYBR RT-PCR kit(TaKaRa, Japan)의 실험방법에 따라 실행되었다. Real-time PCR 반응은 첫 번째로 42°C에서 15분, 95°C에서 2분 동안 1회 실시하고, 두 번째로 95°C에 40초, 58°C에 15초, 60°C에서 30초를 40회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 1회 반응시켜 완료하였다. 유전자 증폭정량은 genomic 지역의 semi-log amplification plot에 기초한 cycle threshold(Ct)값에 준하여 계산하였다.

8. Protein 분리

Protein의 분리는 배반포 30~50개를 사용하여 PRO-PREP™(Intron biotechnology, Korea)을 30 μ l를 혼합한 후 얼음 위에서 20분 동안 반응시킨 후 13,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 추출, 분석하였다.

9. In-Direct ELISA

항체 조직의 단백질과 세포에서 추출한 단백질에서 특정 단백질의 발현량을 분석하기 위하여 96 well ELISA plate에 Bradford 방법으로 정량한 10 mg의 단백질을 ELISA assay buffer로 100배 희석액과 standard(0 pg/ml, 25 pg/ml, 100 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml, 1,000 pg/ml, 2,000 pg/ml)를 100 μ l씩 분주한 후 37°C 인큐베이터에서 3시간 동안 반응시켰다. 이후 모든 well

에서 단백질을 제거한 후, 1% skim milk blocking solution으로 4°C에서 24시간 동안 blocking하였다. Blocking이 끝난 후 washing buffer(1 \times PBS with 2.5% Triton X-100)로 2회 세척하였고, ELISA assay buffer로 1/500 배율로 희석된 primary antibody (P4-r, MMP-2, 9, TIMP-2, 3)를 well당 50 μ l씩 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 washing buffer를 200 μ l씩 각 well에 넣어 3회 세정한 후 ELISA assay buffer로 1/5,000으로 희석된 secondary antibody를 실온에서 2시간 동안 detection하고, 다시 washing buffer를 200 μ l씩 각 well에 넣어 3회 세정하였다. 이후 substrate solution(R&D Systems, USA) 100 μ l씩을 각 well에 넣어 반응시킨 후 1 M H₂SO₄로 반응을 중지시키고, ELISA 분석기(SUNRISE-BASIC, Tecan, AUS)를 이용하여 450 nm로 흡광도를 측정하여 O.D 값을 분석하였다.

10. 통계처리

실험 결과는 SAS package(version 9.1)를 이용하여 ANOVA와 GLM(Generalized linear model)를 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 통계적 유의성($p < 0.05$)을 분석하였다.

결 과

1. 돼지 난포란의 체외 성숙

돼지의 난자의 최적화된 성숙을 위하여 기존 배양액에 GTH 호르몬의 첨가하고, 22시간 체외 성숙한 다음 이후 GTH를 제거한 후 22시간을 더 성숙 배양하여 난자를 성숙시키는 방법을 기본으로 하여 새로운 방법을 모색하였다. 개선된 방법으로는 FSH 및 FBS를 제외한 돼지 난포액에서 유래된 pFF를 첨가하여 총 36시간 동안 배지 교체 없이 난자의 성숙을 유도하였다. 난자의 성숙 이후 세포질의 정상성을 분석하기 위하여 난구세포 부착 및 팽화율을 분석하였고, 최종 MII기 단계의 발달을 관찰한 결과, 36시간 성숙 유도로 개선시킨 방법에서 최종 MII기의 출현이 62%로 가장 높았으며, 난구세포의 적정 팽화 및 난포질의 견고성이 높아짐을 확인할 수 있었다(Table 3, Fig. 2).

2. 체외배양에 따른 단위생식란의 발달률

단위생식란의 배발달 향상에 세포사멸인자의 조절이 배아발달 향상에 미치는 영향을 분석한 결과는 Table 4 및 Table 5와 같다. 동일한 핵융합 조건하에 기본 돼지 체외배양배지와 15% FBS가 첨가된 배지에 0.4 mM Cysteamine(CYST)을 첨가하여 세포의 성장 및 항산화 조절을 실시하였고, 2.5 mM 3-Methyladenine(3-MA)와 100 nM Rapamycin(RP)을 세포사멸을 조절한 결과 CYST 첨가된 배지를 제외한 세포사멸 조절 첨가군에서 배반포의 발달을 확인할 수 있었다(Table 4). NCSU-23만

Table 3. Effect of culture method on the *in-vitro* maturation of porcine oocytes

Culture hr.	No. of oocytes	No. of oocytes maturation stage (after IVM (%))				
		GV	GVBD	M I	M II	Degenerate
G-1	441	44(9)	32(7)	79(17)	274(62)	11(2)
G-2	505	78(15)	29(5)	113(22)	258(51)	25(4)

G-1: 36 hr (1-step) , G-2: 44 hr (2-step).

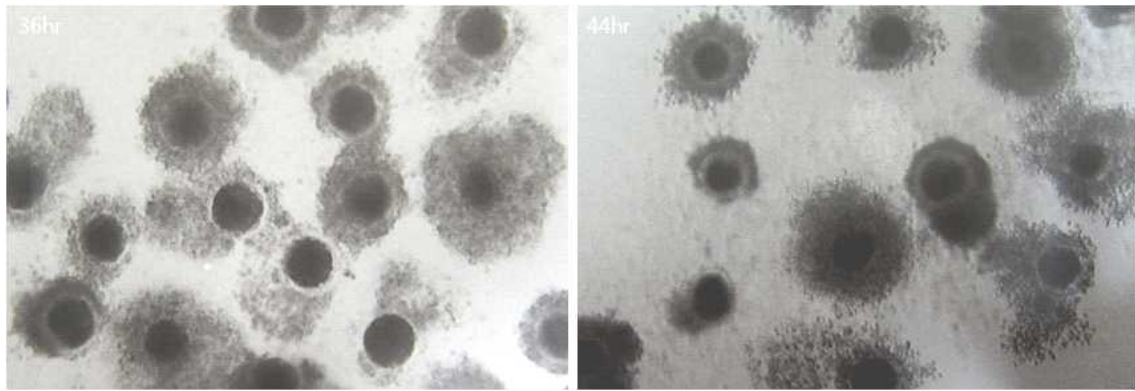


Fig. 2. Quality of *in-vitro* matured in porcine oocytes. 36 hr (1-step), 44 hr (2-step).

Table 4. Parthenogenetic development of porcine oocytes matured *in-vitro*.

Group	No. of oocytes	No. of parthenogenetic developed to (%)		
		Total cleaved rate (%)	4~8 cell (%)	Blastocyst (%)
Control-n	90	39(43)	20(51)	1(5) ^c
G-1	91	55(60)	29(53)	13(24) ^b
G-2	91	30(33)	7(23)	-
G-3	91	57(63)	39(68)	18(32) ^a
Control-nF	90	42(47)	24(57)	1(4) ^c
G-4	92	40(43)	12(30)	10(25) ^b
G-5	92	32(35)	2(6)	-
G-6	93	60(65)	29(48)	19(32) ^a

Control-n: NCSU-23+non-treatment, G-2: NCSU-23+15% FBS+ non-treatment, G-1: NCSU-23+3MA, G-2: NCSU-23+Cyst, G-3: NCSU-23+RP, G-4: NCSU-23 (supplement of 15% FBS)+3MA, G-5: NCSU-23 (supplement of 15% FBS)+Cyst, G-6: NCSU-23 (supplement of 15% FBS)+RP.

Different letters represents significant differences at ^{a-c} ($P<0.05$).

이 첨가된 Control-n의 경우 전체적 발달율이 43%였으며, 15%

FBS가 첨가된 Control-nF의 경우 47%의 총 발달율을 보였다. 특히 15% FBS가 첨가된 군의 경우, 기본배지에 비하여 4~8 cell 에서의 cell block 현상이 낮았음을 알 수 있었으며, RP의 첨가 군이 대체적으로 높은 배반포 발달율이 형성됨을 확인하였다. Table 4의 배발달 결과를 토대로 15% FBA가 첨가된 기본 배양 배지에 5 IU insulin like growth factor(IGF; nG-1)와 0.4 mM Cysteamine(CYST; nG-2)을 첨가하여 세포의 성장 및 항산화 조절을 실시하였고, 2.5 mM 3-Methyladenine(3-MA; nG-3)과 100 nM Rapamycin(RP; nG-4)을 첨가하여 세포사멸사를 조절 한 결과는 Table 5와 같다. 먼저 Control 군에서 단위생식란의 발달은 총 120개(60%)이었으며, 배반포로의 발달은 2개(2%)였다. 이에 비하여 처리군의 경우 nG-1는 총 163개(82%)의 배분화율 과 12개(8%)의 배반포 출현하였고, nG-2의 경우 총 13개(6.5%)의 배분화율 중 3개(22%)의 배반포 출현을 확인하였다. 세포사 멸 조절 인자가 첨가된 nG-3(181개(91%)의 발달과17(10%)의 배반포 출현)와 nG-4(161개(82%)의 발달과15개(9%)의 배반포 출현)의 경우, 높은 배분화율과 배반포 출현을 확인할 수 있었 으며, 특히 nG-4의 경우 Table 4의 결과에 비하여 배반포 출현율 이 약간의 차이를 보였으나, 전체적인 배분화율이 높아짐을 확 인하였다. 각 배양배지에서 출현된 배반포를 형광염색하여 세 포수 및 배반포 형성 상태를 분석한 결과, FSH+LH가 첨가되어 다른 처리를 하지 않은 Control의 경우 매우 적은 세포수로 분화 되었으며, 배반포의 형태를 가지고 있었다. nG-1과 nG-2의 경우

Table 5. Effect of treatment medium with FSH+LH hormones on cell cleaved in 6 day developmental parthenogenesis

	No. of oocytes	No. of embryo cleaved (%)	Embryo development (%)			
			2 cell	4 cell	8 cell <	Blastocyst
Control-FL	200	120(60)	95(79)	16(13)	7(6)	2(2)
nG-1	198	163(82)	55(34)	50(31)	46(28)	12(8) ^b
nG-2	200	13(7)	0(0)	0(0)	10(12)	3(22) ^c
nG-3	200	181(91)	40(22)	56(31)	68(38)	17(10) ^a
nG-4	197	161(82)	58(36)	40(25)	48(30)	15(9) ^a

Control-FL: NCSU-23 (supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH), nG-1: NCSU-23 (supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH)+IGF, nG-2: NCSU-23 (supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH)+3MA, nG-3: NCSU-23 (supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH)+Cyst, nG-4: NCSU-23(supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH)+RP.

Different letters represents significant differences at ^{a-c} ($P<0.05$).

적은 세포수를 보였으며, nG-3와 nG-4의 경우 높은 세포수를 확인할 수 있었다. 특히 nG-4의 경우, nG-3에 비하여 세포분화율이 높은 것으로 확인되었다. 본 결과는 체외수정란의 배양 결과와 약간의 차이를 보였는데, 호르몬 및 세포사멸 조절인자의 첨가가 상호 작용하여 단위생식란의 배발달률에 영향을 미치는 것으로 사료된다(Fig. 3).

3. 생존신호 발현과 기저막분해 효소의 작용

각 첨가군에서 발달된 단위발생 수정란의 체외배양 이후 배지에서 mTOR의 유출 정도를 분석한 결과는 Fig. 4와 같다. mTOR의 유출 정도는 배발달률과는 다른 양상을 확인할 수 있었다. mTOR의 유출은 RP군과 Cyst에서 가장 높게 발현되고 있었으며, IGF와 3MA에서 낮은 발현을 보였다. 배양배지에서 기저막 분해효소 활성을 분석하기 위하여 MMPs와 TIMPs의 발현을 분석한 결과는 MMP-2, 9 모두 RP군에서 상대적으로 높은 발현을 보이고 있었으며, Cyst와 3MA는 다소 낮았다. 그러나 MMPs를 억제하는 것으로 알려진 TIMPs의 경우 Cyst를 제외한 모든 첨가군에서 다소 높게 발현되고 있을 확인하였다.

4. 세포사멸 조절인자 첨가에 따른 세포사멸 관련 유전자의

발현 양상

각 첨가군 및 control 군에서 배양된 배반포의 내부세포괴로부터 추출된 total RNA에서 세포사멸관련 유전자의 발현양상을 Real-time PCR를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 5와 같다. Control의 경우, 세포 생존의 관련된 유전자의 발현은 처리군에 비하여 매우 낮았으며, apoptosis 유발관련인자인 Casp-3의 발현이 처리군에 비하여 매우 높게 발현되었다. IGF의 Casp-3 유전자의 발현이 타 처리군에 비하여 가장 높았으며, autophagy를 형성시키는 MAP1LC3A의 발현은 가장 낮았다. 특히 생존 신호전달 물질인 mTOR과 세포 분열시 높게 형성되는 기저막 분해 효소인 MMP-9의 발현은 낮았다. Cyst의 경우, 모든 인자가 비슷한 발현양상을 보이고 있었으며, 3MA의 경우 MMP-9과 MAP1LC3A의 인자가 약간 높은 발현을 보였고, RP의 경우 mTOR, MMP-9 그리고 MAP1LC3A의 발현이 다른 군에 비하여 높았으며, 상대적으로 Casp-3의 발현은 매우 낮았다.

5. 세포사멸 관련 단백질의 발현 양상

각 첨가군에 따른 세포사멸관련 유전자의 단백질의 발현양상을 In-direct ELISA 방법을 이용하여 분석한 결과, Fig. 6과 같았다. 세포 S시기에 DNA 중합효소 촉진 인자로 알려져 있는

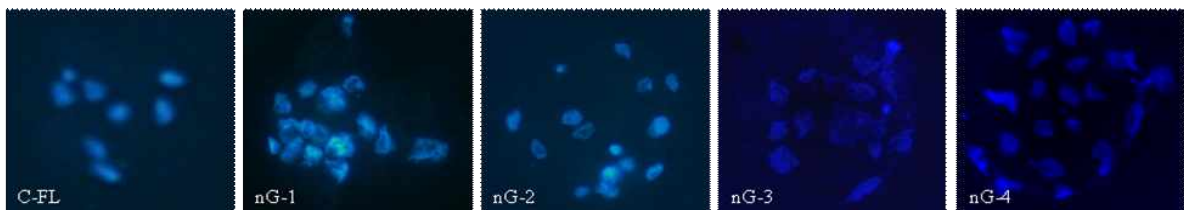


Fig. 3. Development rate of embryonic cell. C-FL: NCSU-23 (supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH), nG-1: NCSU-23 (supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH)+IGF, nG-2: NCSU-23 (supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH)+3MA, nG-3: NCSU-23 (supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH)+Cyst, nG-4: NCSU-23 (supplement of 15% FBS and 5 IU FSH+LH)+RP.

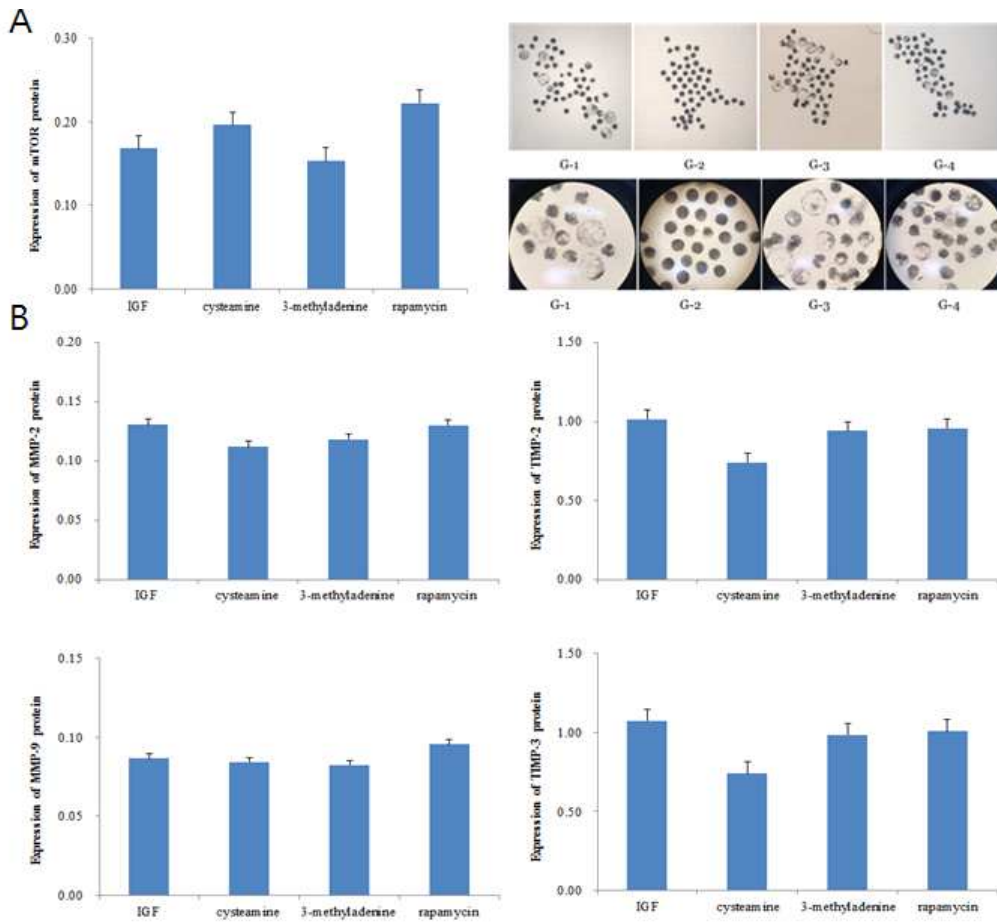


Fig. 4. ELISA analysis of mTOR, MMPs and TIMPs protein detection of IVC medium during treatment cultured in parthenogenesis. A: mTOR, B: MMPs and TIMPs. G-1: IGF, G-2: Cyst, G-3: 3MA, G-4: RP.

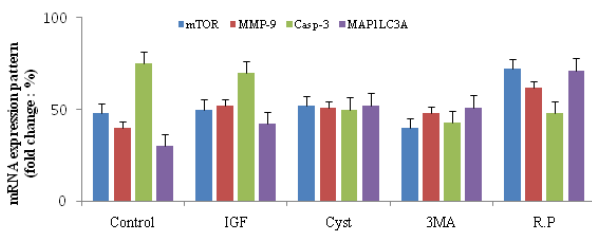


Fig. 5. Real-Time PCR analysis of cell death associated gene expression in parthenogenesis.

PCNA(proliferating cell nuclear antigen)의 발현양상을 통하여 세포 주기 활성을 추정한 결과는 3MA와 RP 첨가에서 발현이 높았으며, IGF와 Cyst에서는 가장 낮은 발현을 보였다. Apoptosis에 연관된 단백질의 발현양상에서는 대식작용 감지 수용체인 TNF-r의 경우, 배아 발달률이 현저하게 낮은 Cyst에서 가장 높게 발현했으며, 3MA에서는 낮은 발현을 보였다. 그러나 배 발달률이 다소 높게 형성된 IGF와 RP에서도 일정 수준의 발현양상을 확인할 수 있었다. Apoptosis의 marker 인자인 Casp-3의

경우, 배 발달 결과와는 다르게 IGF에서 가장 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, Cyst와 RP에서도 확인할 수 있었고, 3MA에서의 발현은 현저하게 낮아지는 것을 확인하였다. Autophagy의 발현양상을 확인하기 위하여 ATG5와 MAP1LC3A의 발현양상을 비교 분석한 결과, ATG5의 경우 유의적 차이를 보이지 않았지만, IGF에서 가장 높게 발현되어 Cyst, 3MA 그리고 RP순으로 점차 줄어드는 경향을 보였으나, autophagy membrane에 작용하는 MAP1LC3A의 경우 RP에서 가장 높게 형성되는 것을 확인하였다.

고찰

Autophagy의 발생은 세포의 발생과 분화 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하며(Levine 등, 2004), 세포생존에 필수적인 대사산물을 만들기 위한 pro-survival mechanism 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Zhang 등, 2009). 이런 세포사멸 기전은 난자의 성숙 및 배반포의 발달에도 깊은 연관을 가지고 있어, 자

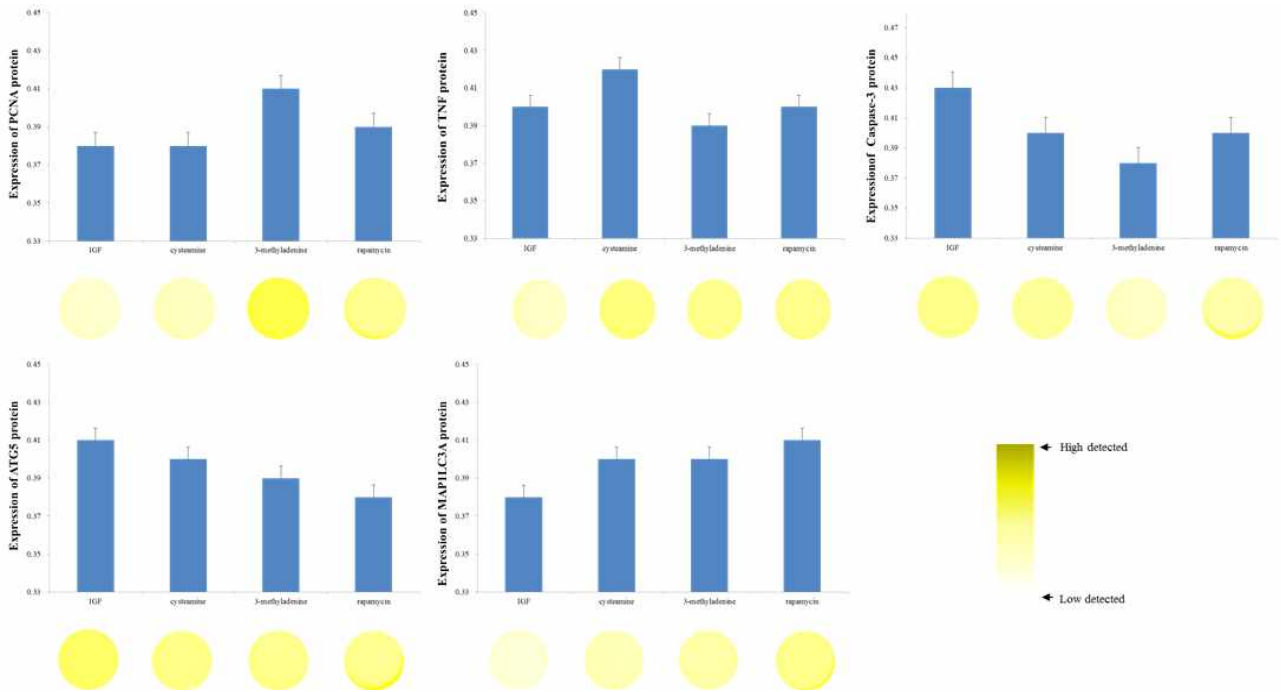


Fig. 6. In-direct ELISA analysis of programmed cell death associated marker proteins in parthenogenesis.

가소식 작용으로 인한 세포 내 공간 확보와 세포분화 작용에도 깊은 연관성을 가지는 것으로 볼 수 있다(Lee 등, 2011).

수정란의 배아 발달에 있어서 난자의 성숙은 배반포 형성에 있어 매우 중요한 역할을 하며, 특히 난자의 질적 향상은 난구세포의 팽윤과 난자핵의 성숙에 있다(Cohen, 1997).

Fukui 등(1992)의 연구 결과에 따르면 난자의 성숙에 따른 cytoplasmic 성숙이 체외수정 및 배아 발달에 영향을 미치며, 정상적인 난자와 노화 난자의 구별에 척도가 될 수 있다. 본 연구에서 단위생식란의 안전한 발달을 유도하기 위하여 난자의 질적 성숙을 높이기 위하여 혈청 및 호르몬을 병행 사용하여 체외 성숙을 유도하였다. Leibfried-Rutledge 등(1986)의 연구에 따르면 혈청의 사용이 난자 세포질 성숙을 유지시키는 것으로 보고되어 있는데, 이와 비슷하게 FBS 첨가(Naito 등, 1988)가 pFF 첨가에 비하여 약간 높은 난자성숙 발달률을 보이는 것으로 사료되며, 돼지의 난자가 성숙되는 과정에서 난구세포와 난자 간에 활발하게 이루어지는 세포활성 및 여러 유전적인 작용이 성공적인 체외 성숙을 가져올 수 있다는 것과 같이 체외 성숙의 시간과 FSH의 활성이 난자 성숙에 중요한 역할을 할 수 있다고 생각된다(Kim 등, 2014). 즉, 36시간 동안 배지의 교환 없이 FSH가 첨가하여 1-step으로 성숙시킨 난자가 22시간 동안 GTH에 노출시킨 후, 다시 무호르몬 상태에서 22시간 동안 성숙완료를 유도한 난자보다 성숙율이 향상되었다. 본 연구에서는 36시간의 성숙시킨 난자를 사용하여 ethanol을 이용한 단위생식란을 발생시켰고, 이로 인하여 세포외질막의 free Ca⁺⁺

의 증가를 유도하였고, 활성화 방법으로 6-DMAP 이후 15% FBS 및 H-SOF에서 세포분화 촉진(Azuma 등, 2002)을 유도하여 NCSU-23의 체외배양 배지를 이용하여 배양하였다. 포유류의 경우, 현재까지의 연구 결과는 15% FBS의 첨가가 세포질의 활성도를 높여 주는 것으로 알려져 있지만(Yi 등, 2005), 본 연구결과에서는 H-SOF의 사용이 돼지 난자의 활성을 유도하는 것으로 확인되었으며, Yi 등(2005)의 연구 결과와 같이 돼지의 단위생식란의 배아 발달의 증가를 촉진시키는 것으로 사료되었고, cytoskeletal inhibitor(CB)의 첨가가 세포질 내 골격을 더욱 조밀하게 만들어서 극체가 빠져 나가지 못하게 하여 돼지 단위생식란의 발달에 영향을 미칠 것으로 보인다(Fukui, 1992; Presicce and Yang, 1994).

세포사멸에 관련한 연구결과에서 돼지난자에서 단위생식란의 발달이 Rapamycin(RP) 첨가군에서 가장 높은 배반포 발달률을 보이고 있었으나, 항산화제를 이용한 cyst 첨가군에서는 반대로 낮은 발달률을 보이고 있었으며, apoptosis의 형성이 높았다. 이 결과는 항산화제의 첨가가 배아발달의 영향을 미친다는 연구(Naito 등, 1988)와 다르게 오히려 발달을 저해하는 것으로 보이며, Kim 등(2014)의 연구 보고에서처럼 RP를 이용한 autophagy의 발달 유도가 배아발달 향상에 중요한 역할을 할 것이라 사료된다. 특히 세포사멸의 발생에 따른 세포기저막 효소들의 작용 결과에서도 체외수정 이후 호르몬 첨가 체외배양 시 배반포 발달률은 Cyst 및 3MA 첨가보다 RP 첨가군에서 모두 높았으며, 이는 autophagy의 발생이 세포기저

막에 반응하여 성장촉진인자와 같은 기능으로 체외 성숙률을 증가시킨다는 연구와 같았다(Kim 등, 2014). 그러나 cyst 첨가가 수정란 발달에 긍정적인 효과를 준다는 Naito 등(1992)의 연구 결과와 다르게, 항산화제가 제거된 첨가군에서 세포기저막 분해효소의 작용이 적었으며, 이는 세포의 발생을 억제하는 결과를 나타낸다고 사료된다. 이에 대한 세포사멸 인자의 발현 양상 분석 결과, apoptosis maker로 알려진 caspase-3의 발현이 높게 나타나, 대사작용의 억제로 인한 세포사멸이 진행되는 것으로 볼 수 있었다(Chen 등, 1995). 따라서 본 연구 결과, FBS와 rapamycin이 첨가된 배지를 이용한 돼지 단위생식란의 체외 배양에서 호르몬 첨가가 programmed cell death의 발현을 유도하여 원활한 수정을 이룰 수 있을 것이라 볼 수 있으며, autophagy의 발현이 배반포 발달에 효과적인 역할을 한다는 연구보고(Lee 등, 2011)과 같이 호르몬으로 유도된 적절한 세포사멸인자의 발현 및 autophagy의 출현이 배반포 발달에 좋은 효과를 줄 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구 결과를 통하여 배아세포의 생존 및 사멸과정에서 autophagy로 인한 세포사멸 과정의 유도는 생존 세포들의 활발한 세포발달에 영향을 줄 것으로 보이며, 본 연구를 통하여 체세포 복제 수정란의 안정적인 배아발달 유도의 기초 연구로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

결 론

본 연구결과, 난자의 성장에 관련된 유전자의 발현 및 세포사멸사의 양상을 분석할 수 있었다. 특히 세포사멸사의 조절 방법을 이용하여 난자세포의 최적 성숙 조건을 확립할 수 있었으며, 기존의 방법과 다르게 비교적 짧은 시간에 성숙이 이루어질 수 있음을 확인하였다.

체세포의 배양에 있어서 체세포의 위치 및 성격에 따라 서로 다른 세포성장점을 나타내는 것으로 사료되며, 이에 따른 세포사멸의 방법도 다르다는 것을 확인하였다. 특히 세포사멸 조절인자와 호르몬을 첨가하여 배양 방법은 세포사멸사를 선택적으로 조절할 수 있을 것이라 사료되었고, 단위생식란 배발달에 미치는 영향을 분석한 결과, 강제적 autophagy의 발생은 apoptosis의 발생보다 배 발달률이 향상되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구를 토대로 복제 수정란 생산에 응용한다면 복제 수정란의 배발달 향상에 도움이 될 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Azuma T, Kondo T, Ikeda S, Imai H and Yamada M. 2002. Effects of EDTA saturated with Ca^{2+} (Ca-EDTA) on pig, bovine and mouse oocytes at the germinal vesicle stage during maturation culture and the involvement of chelation of Zn^{2+} in pronuclear formation induction by Ca-EDTA. *Reproduction*. 124(2):235-240.
- Cha SK. 1997. Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and *in vitro* development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:441-446.
- Chen YR, Christian FM and TSE-Hua Tan. 1995. Persistent activation of JNK1 in γ -radiation induced apoptosis. *J. Biological Chem.* 271:631-634.
- Cohen GM. 1997. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochim. J.* 326:1-16.
- Collas P and Baise JJ. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology*. 32:835-844.
- Collas P. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 34:212-223.
- Faodk VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL and Henson PM. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148:2207-2212.
- Fukui Y. 1992. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated ethanol and cytochalasin B after *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 33:357-362.
- Funahashi H, Stumpf TT, Cantley TC, Kim NH and Day BN. 1995. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro* matured porcine oocytes following *in vitro* fertilization and/or electrical activation. *Zygotes*. 3:273-281.
- Hengartner MO and Horvitz HR. 1994. Programmed cell death elegans. *Curr. Opin. Dev.* 4:581-588.
- Jilek F, Hutteleva R, Petr J, Holubova M and Rozinek J. 2000. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: Effect of protein synthesis inhibitor cyclohexamide. *Animal Reproduction Science*. 63:101-111.
- Jilek F, Hutteleva R, Petr J, Holubova M and Rozinek J. 2001. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: Effect of the protein kinase inhibitor 6-dimethyl aminopurine. *Reprod. Dom. Anim.* 36:139-145.
- Kerr JFR, Winterford CM and Harmon BV. 1994. Apoptosis : Is significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 73: 2013-2018.
- Kim SH and Yoon JT. 2014. Expression of autophagy and

- apoptosis in the *in-vitro* cultured granulosa cells of normal and miniature pigs. SYLWAN. 158(7):551-569.
- Lee SE, Hwang KC, Sun SC, Xu YN and Kim NH. 2011. Modulation of autophagy influences development and apoptosis in mouse embryos developing *in vitro*. Molecular Reproduction & Development. 78:498-509.
- Leibfried-Rutledge ML, Crister ES and First NL. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus oocyte complexes. Biol. Reprod. 35:850-857.
- Levine B and Klionsky DJ. 2004. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev. Cell. 6:463-477.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 84:585-591.
- Naito K and Toyoda Y. 1992. Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of pig oocytes matured in different media *in vitro*. Biol. Reprod. 47:43-47.
- Presicce GA and Yang X. 1994. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. Mol. Reprod. Dev. 38:380-385.
- Ma S-F, Liu X-Y, Miao D-Q, Han Z-B, Zhang X, Miao Y-L, Yanagimachi R and Tan J-H. 2005. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: A search for the best conditions. Theriogenology. 64:1242-1257.
- Yi YJ and Park CS. 2005. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. Anim Reprod. Sci. 86(3-4):297-304.
- Bing YZ, Che L, Hirao Y, Takenouchi N, Heriberto R-M and Nagai T. 2003. Parthenogenetic activation and subsequent development of porcine oocytes activated by combined electric pulse and butyrolactone I treatment. J. Reprod. Develop. 49:159-66.
- Zhang Y, Wu T, Tashiro S, Onda S and Ikejima T. 2009. Involvement of PKC signal pathway in oridonin-induced autophagy in HeLa cells: A protective mechanism against apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 378:273-279.

Received August 30, 2015, Revised September 22, 2015,
Accepted September 23, 2015