



## Stem Cell-Derived Conditioned Medium 첨가가 돼지난자의 체외성숙 및 단위발생란의 초기배 발육에 미치는 영향

권대진 · 황인설 · 광태욱 · 오진봉 · 옥선아 · 정학재 · 임기순 · 황성수<sup>†</sup>

농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오횡학과

## Effect of Stem Cell-Derived Conditioned Medium on the *In Vitro* Maturation and Embryonic Development of Parthenogenetic Embryos in Pigs

Dae-Jin Kwon, In-Sul Hwang, Tae-Uk Kwak, Keon Bong Oh, Sun-A Ock, Hak-Jae Chung, Gi-Sun Im and Seongsoo Hwang<sup>†</sup>

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Jeonbuk 565-851, Korea

### ABSTRACT

The addition of growth factors and cytokines to *in vitro* culture (IVC) media could affect embryo development and the quality of the resulting blastocysts. The present study was performed to investigate the effect of porcine induced pluripotent stem cell (piPSC)-culture conditioned medium (CM) on the *in vitro* maturation (IVM) and development of parthenogenetic embryos (parthenotes) in pigs. Cumulus-oocyte complexes (COCs) or activated oocytes were cultured in IVM or IVC medium supplemented with 0 (control), 25, or 50% of stem cell medium (SM) or CM, respectively. The maturation rate of CM-25% group was significantly improved when compared with control group ( $p < 0.05$ ), but that was not different among SM or CM groups. Blastocyst formation rate was significantly higher in CM-25% group (29.2%) than that of control (20.7%), SM-50% (19.6%) and CM-50% (23.66%,  $p < 0.05$ ). Cell number and the apoptotic cell index in blastocysts was significantly lower in SM-25% than in CM-25% group ( $p < 0.05$ ). The embryo quality related genes, *OCT4*, *KLF4*, *TERT* and *ZFP42*, were significantly increased in CM-25% group compared with control ( $p < 0.05$ ). In conclusion, the addition of 25% of CM to IVM and IVC medium positively influences not only the developmental potential also quality of parthenotes in pig.

(Key words : Induced pluripotent stem cells, Conditioned medium, Pig parthenotes, Apoptosis, Embryo quality)

### 서 론

돼지 난포란의 체외성숙, 수정 및 배양기술은 유전적으로 우수한 개체의 증식 및 형질전환 돼지나 장기이식용 복제돼지의 생산에 효과적으로 이용할 수 있다. 하지만 체외에서 생산된 난자의 질적 수준은 체내에서 생산된 난자에 비해 현저히 낮은 것으로 알려져 있으며(Abeydeera 등, 1998; Kim 등, 2006), 이러한 질적 차이는 불완전한 체외배양체계로부터 기인될 수 있다. 난자는 성숙과정 동안 핵의 성숙뿐만 아니라 세포질의 성숙을 통해 배발달에 필수적인 물질의 축적 및 세포질 환경을 구축하게 된다(Gandolfi와 Gandolfi, 2001; Sirard 등, 2006). 하지만 불

완전한 체외배양체계는 비정상적인 유전자 발현 및 세포질의 미성숙을 야기하여 이후 저조한 배발달 및 배반포의 질적 저하의 원인이 될 수 있다(Carrell 등, 2005; Lonergan 등, 2006; Zheng과 Dean, 2007).

수정된 난자는 난관 및 자궁 내에서 다양한 성장인자(epidermal growth factor, EGF; transforming growth factors alpha/beta, TGF- $\alpha/\beta$ ; platelet-derived growth factor A, PDGF-A; insulin-like growth factors I/II, IGF-I/II 등) 및 사이토카인(interleukin 1b, IL-1b; interleukin-6, IL-6; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF; leukemia inhibitory factor, LIF; interferon-tau, IFN-t) 등 많은 물질들에 의해 정상적인 초기 배발달이 이루어지며, 실제로 이러한 물질들을 체외배양액에 첨가

\* 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ00945701)과 2015년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정 지원사업에 의해 이루어짐.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-63-238-7253, E-mail: hwangss@korea.kr

시 배반포 발육율이 향상되는 것으로 알려져 있다(Watson 등, 1992; Martal 등, 1998; Spanos 등, 2000; Constant 등, 2006; Neira 등, 2010).

줄기세포는 배양과정에서 다양한 성장인자 및 사이토카인들을 분비하며, 단백질 분석을 통해 줄기세포의 조정 배지(conditioned medium, CM) 내에 다양한 성장인자 및 사이토카인이 함유되어 있음을 확인하였다(Spanos 등, 2000; Parekkadan 등, 2007; Ivanova-Todorova 등, 2012; Kim 등, 2013). 이러한 줄기세포 유래 CM의 경우 손상된 조직 및 장기의 치료 등 다양한 분야에 활용이 가능하기 때문에 재생의학 분야에서 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 줄기세포 유래 CM의 경우 자궁 및 초기배에서 발현되는 다양한 성장인자와 사이토카인들이 포함되어 있는 것으로 보고되고 있다(Park 등, 2010; Lee 등, 2011; Ho 등, 2012).

따라서, 본 연구에서는 돼지 유도만능줄기세포(porcine induced pluripotent stem cell, piPSC)의 CM을 생산하고, 돼지 체외성숙 및 체외배양 배양액에 첨가하여 단위 발생 난자의 질적·양적 생산 효율에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 줄기세포 배양액(Stem Cell Medium; SM) 및 Conditioned Medium(CM) 생산

줄기세포 배양액은 DMEM/F12를 기본 배양액으로 하여 20% FBS(Invitrogen), 50 units/ml penicillin(GIBCO), 50  $\mu$ g/ml streptomycin(GIBCO), 2 mM L-glutamine(GIBCO), 0.1 mM NEAA(GIBCO), 1  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 20 ng/ml bFGF(R&D Systems) 및 20 ng/ml LIF(Sigma)를 첨가하여 사용하였다. CM의 경우 돼지 유도만능 줄기세포(porcine induced pluripotent stem cell, piPSC)를 이용하여 생산하였다(Kwon 등, 2013). 신선한 SM으로 교체 후 24시간 동안 배양하였으며, 회수 후 필터하여 실험에 사용하였다.

### 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장(농협목우촌 김제육가공공장)에서 도살된 암퇘지의 난소를 실험실로 운반하여 난소 내 난포로부터 채취한 후, 채취된 난자를 0.1%(w/v) polyvinyl alcohol(PVA)이 첨가된 Tyrode's lactate(TL)-Hepes액으로 3번 세척한 뒤 실제 현미경하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 난자성숙에 공시하였다. 난포란의 성숙배양을 위해 0.6 mM cysteine, 10 ng/ml EGF, 10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml hCG, 10%(v/v) porcine follicular fluid(PFF)가 첨가된 TCM-199 배양액 500  $\mu$ l의 drop을 만들어 mineral oil로 피복하고 성숙배양 2~3시간 전에 5% CO<sub>2</sub>, 39°C 온도조건하에서 평형시킨 후, 각 drop당 100개의 난포란을 넣어 22시간 배양하였으며, 이후 호르몬이 첨가되지 않은 배양액으로 옮겨 20시간 동안 배양하였다.

일부 난자는 성숙배양 전 기간에 걸쳐 각각 25, 50%의 SM 또는 CM을 첨가하였다.

### 단위발생 난자의 생산 및 체외배양

체외성숙시킨 난포란을 0.1% hyaluronidase가 들어 있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 4분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 성숙된 난자로 판단하여 실험에 공시하였다. 난자의 활성화를 유도하기 위하여 Electro-Cell fusion(Fujihira Industry, Japan)을 이용하여 성숙된 난자를 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM HEPES가 첨가된 0.3 M mannitol 용액을 넣은 1.0 mm 폭의 wire chamber의 양 전극 사이로 옮긴 후, 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30  $\mu$ sec간 1회 통전하였다. 활성화 처리한 난자를 체외 배양액 50  $\mu$ l의 소적에 10~15개씩 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 7일간 배양하였다. 체외 배양액으로는 PZM-3를 이용하였으며, 일부는 전 기간에 걸쳐 각각 25, 50%의 SM 또는 CM을 첨가하였다.

### 배반포의 Apoptotic cell 검사

배반포의 정상성을 알아보기 위하여 DNA fragmentation을 검사하였다. 배양 6일째에 생산된 배반포를 실온에서 3.7%(w/v) paraformaldehyde가 첨가된 PBS로 40분간 처리하여 고정하였다. 이후 0.5% Triton X-100과 3%(w/v) BSA가 첨가된 PBS로 37°C에서 30분간 처리하였다. Apoptotic cell를 검사하기 위해 TUNEL(In Situ Cell Death Detection Kit; Roche, Germany) 반응을 유도한 후, DAPI로 전체 세포의 핵을 염색하였다. TUNEL 반응이 유도된 배반포를 slide glass로 옮겨 antifluorescence-fade액으로 피복하고 cover glass로 덮어 표본을 제작하였다. 제작된 표본은 Leica 형광현미경(Leica Microsystems, Germany)을 이용하여 전체 세포수와 apoptotic cell 수를 판단하였다.

### Real-Time RT-PCR 분석

배반포의 cDNA는 FastLane Cell cDNA Kit(Qiagen, Valencia, USA)을 이용하여 제공된 방법에 따라 준비하였다. Real-Time RT-PCR은 Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit(Qiagen, USA) 및 7500 Fast Real-Time PCR System(Life Technologies, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 primer는 Table 1에 제시하였다. Real-Time RT-PCR의 증폭조건은 95°C에서 1분간 pre-incubation 과정을 거친 후 95°C에서 15초 동안 denaturation 후 60°C에서 1분간 annealing의 과정을 40 사이클 반복하도록 조작하였다.

### 통계 처리

모든 처리에 대한 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며, 모든 결과에 대해 Statistical Analysis System(SAS Institute, Inc., USA)의 General Linear Models 절차를 이용한 Duncan's multiple range test로 유의성을 검토하였다. 유의차는  $p < 0.05$  일 때 통계적 차이가 있는 것으로 판단하였다.

Table 1. Primer sets for Real Time RT-PCR

Gene	Primer sequences (5' to 3')	Product size (bps)	References
OCT4	F- AGCGCTTCAGAAAGATCTCG	157	NM_001113060.1
	R- GAGCTGCAAAGCCTCAAAAC		
KLF4	F- GCCCTTAGAGGCCCACTT	158	DQ000310.1
	R- GCAGGGCAGGATGACAGT		
ZFP42	F- ACTTTTGAAGGATGCGGAAA	179	AM410991.1
	R- CACTGATTGTATTGGCCTTTG		
TERT	F- CGCTCCTGAAAGCCAGAAAC	182	AY785158.1
	R- CTGGCACAATCGCTCTCTG		
BAX	F- CCTTTTGCTTCAGGGTTTCA	165	XM_003127290.2
	R- ATCCTCTGCAGCTCCATGTT		
BCL-XL	F- CTGAATCAGAAGCGGAAACC	188	AF216205.1
	R- CCTCCGGTACCTCAGTTCAA		
GAPDH	F- CTGCGCTCTCTGCTCCTC	161	NM_001206359.1
	R- ACAATGTCCACTTTGCCAGA		

## 결 과

### SM 및 CM 첨가에 따른 돼지 난포란의 체외성숙

SM 또는 CM 등의 첨가가 돼지 난포란의 체외 성숙에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 1과 같다. SM 및 CM 첨가 농도에 따른 체외 성숙율에서는 차이가 없었으나 (75.4~88.7%), CM-25%(88.7%) 처리구에서는 대조구(74.1%) 보다 유의적으로 높은 성숙율을 보였다( $p<0.05$ ).

### SM 및 CM 첨가에 따른 돼지 단위발생 난자의 체외발달을

활성화 자극 후 배양 7일째 배반포로 발달한 단위발생 난자의 비율은 CM-25% 구에서 29.2%로 나타났으며, 대조구의 20.7%, SM-50%의 19.6%보다 유의적으로 높았다 (Table 2,  $p<0.05$ ). Fragment 비율은 SM-50% 구에서 17.6%로 가장 높게 나타났으나, 다른 처리구간에는 차이가 없었다. 배반포의 세포수는 SM-25% 구에서 가장 적게 나타났으며, CM-25% 구와 비교 시 유의적인 차이를 보였다

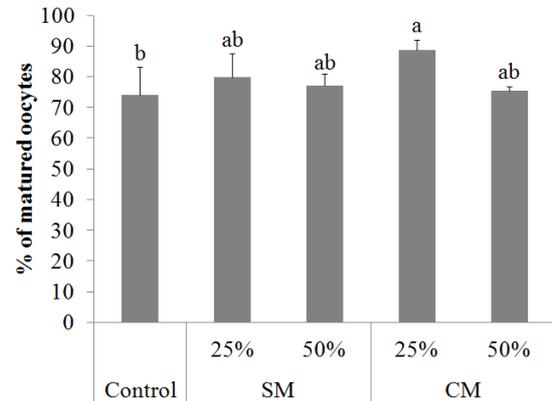


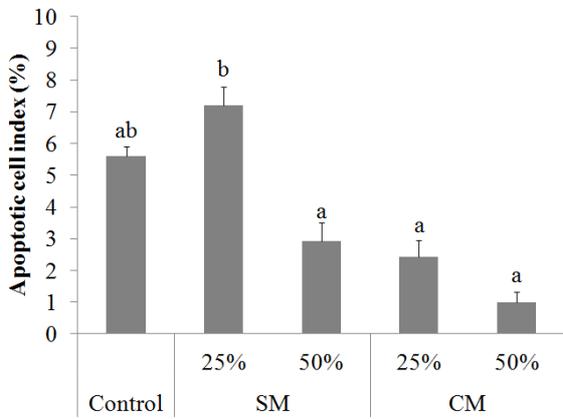
Fig. 1. Effect of conditioned medium on maturation of porcine oocytes *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured in a 500  $\mu$ l drop of maturation medium supplemented with 0, 25 or 50% of SM or CM, respectively. Metaphase II oocytes were referred to as matured one. Error bars indicate  $\pm$  SD. <sup>a,b</sup> Different letters indicate significant differences ( $p<0.05$ ).

Table 2. Effect of conditioned medium on embryonic development of parthenotes

Treatments	No. of oocytes cultured	No. (%) of embryos			Cell No. in blastocysts (Mean $\pm$ SD)	
		Cleaved	Fragment	Blastocyst		
Control	150	93 (62.0)	12 (8.0) <sup>a</sup>	31 (20.7) <sup>b</sup>	40.4 $\pm$ 12.9 <sup>ab</sup>	
SM	25%	116	67 (57.8)	14 (12.1) <sup>ab</sup>	29 (25.0) <sup>ab</sup>	26.0 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>
	50%	102	58 (56.9)	18 (17.6) <sup>b</sup>	20 (19.6) <sup>b</sup>	41.0 $\pm$ 16.3 <sup>ab</sup>
CM	25%	154	90 (58.4)	13 (8.4) <sup>a</sup>	45 (29.2) <sup>a</sup>	45.6 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>
	50%	110	110 (60.0)	14 (12.7) <sup>ab</sup>	26 (23.6) <sup>ab</sup>	33.7 $\pm$ 12.2 <sup>b</sup>

SM; stem cell medium, CM; conditioned medium, Parthenotes were cultured in IVC medium supplemented with 0, 25 or 50% of SM or CM, respectively.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts are significantly different ( $p<0.05$ ).



**Fig. 2. Apoptotic cell index in blastocysts derived from parthenotes.** The apoptotic cell index (TUNEL-positive cells/total cells in blastocysts) at Day 7 of IVC. Error bars indicate ± SD. <sup>ab</sup> Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

( $26.0 \pm 7.6$  vs.  $45.6 \pm 8.0$ ,  $p < 0.05$ ). Apoptotic cell index의 경우 SM-25% 구에서  $7.2 \pm 0.8$ 로 가장 높게 나타났으며(Fig. 2), 다른 처리구 간에는 차이가 없었다( $1.0 \pm 0.6 \sim 5.6 \pm 1.4$ ).

**SM 및 CM 첨가에 따른 돼지 난포발생 난자 유래 배반포에서의 유전자 발현양상**

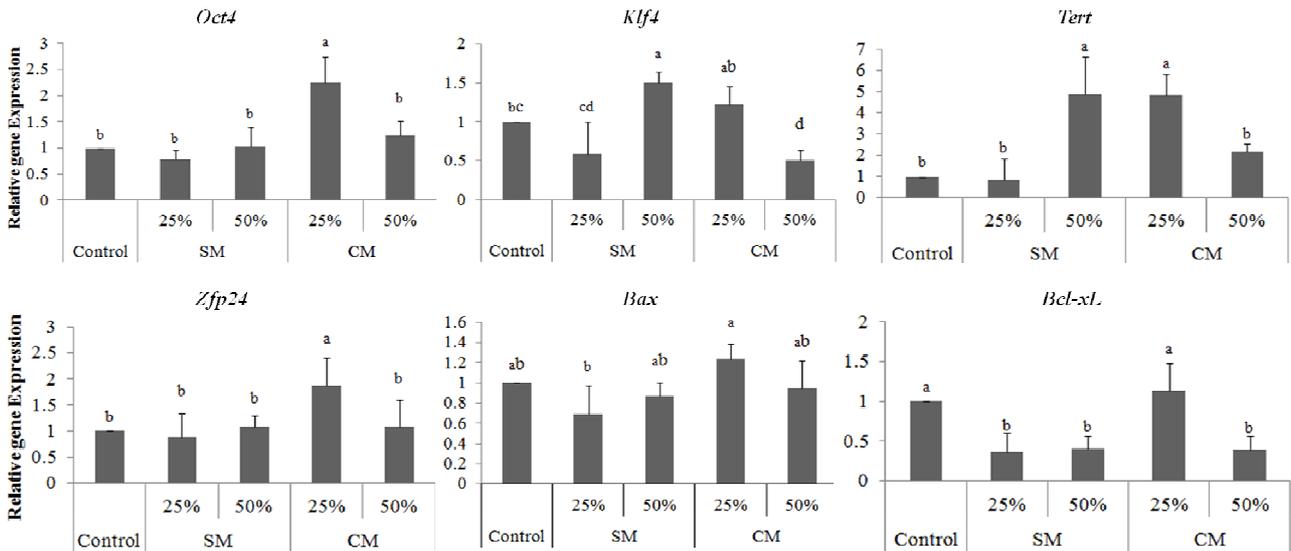
돼지 배반포의 질적인 비교를 위해 Oct4, Klf4, Tert 및 Zfp24 유전자의 발현을 검토하였으며, apoptosis와 연관되어있는 Bax(pro-apoptotic gene) 및 Bcl-XL(anti-apoptotic gene) 발현을 검토하였다(Fig. 3). Oct4와 Zfp24의 경우 CM-25% 구에서 가장 높게 발현되었으며, 타 처리구 간

에는 유의적 차이가 없었다( $p < 0.05$ ). Klf4의 경우에는 SM-50% 구에서 가장 높게 나타났으며, 다음으로 CM-25%, 대조구, SM-25%, CM-50% 순으로 낮게 나타났다. Tert의 경우는 SM-50%와 CM-25%에서 타 처리구에서 보다 유의적으로 높게 발현되었다( $p < 0.05$ ). 세포사멸 관련 유전자인 Bax 및 Bcl-XL mRNA 발현수준을 분석한 결과, Bax의 경우 대조구와 비교 시 모든 처리구에서 차이가 없었으나, Bcl-XL의 경우 CM-25%를 제외한 모든 처리구에서 대조구보다 유의적으로 낮게 발현되었다( $p < 0.05$ ).

**고찰**

줄기세포 유래 CM의 경우 줄기세포에서 분비한 다양한 성장인자 및 사이토카인들이 함유되어 있으며, 특히 자궁 및 초기배에서 발현되는 EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF-A, IGF-I, IGF-II, vascular endothelial growth factor(VEGF), hepatocyte growth factor(HGF), fibroblast growth factor(FGF) 등 다양한 성장인자와 IL-1b, IL-6 GM-CSF, LIF, IFN-t 등의 사이토카인들을 포함하고 있다(Park 등, 2010; Lee 등, 2011; Ho 등, 2012). 따라서 줄기세포 유래 CM이 돼지 미성숙란의 성숙에 미치는 영향을 검토하고, 이후 배발달에 대한 효과 및 배반포에서의 유전자 발현 양상을 검토하였다.

돼지 난포란의 체외성숙율은 CM-25% 처리구에서 대조구보다 유의적으로 높게 나타났으나, 줄기세포유래 CM에는 다양한 인자들이 포함되어 있어 높은 성숙율의 원인을 판단하기가 쉽지 않다. 돼지 난자의 성숙은 난구세포 및 과립막세포에 크게 의존적이므로 일반적으로 체외 성숙배양 시 이들 세포를 함께 배양한다. 돼지 난자에는



**Fig. 3. Relative gene expression in porcine blastocysts derived from parthenotes.** Activated oocytes were cultured in IVC medium supplemented with 0, 25 or 50% of SM or CM for 7 days, respectively. Error bars indicate ± SD. <sup>a-c</sup> Within each gene, bars with different letters differ ( $p < 0.05$ ).

EGF mRNA 및 EGF 수용체가 존재하며, 난구세포 및 과립막세포에서는 EGF를 분비하는 것으로 알려져 있어, 체외성숙 배양액에 첨가 시 난자의 세포질 성숙을 향상시킬 수 있다(Abeydeera 등, 1998). LIF는 Kit ligand mRNA의 발현을 증가시켜 과립막세포의 증식을 유도하며(Nilsson 등, 2002), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )는 난구세포 내 Tumor necrosis factor-inducible gene 6(TNFAIP6) mRNA의 발현을 증가시켜 난구세포의 확장을 유도한다고 보고되었다(Yuan 등, 2011). 따라서 줄기세포유래 CM에 존재하는 이러한 인자들에 의해 난구세포의 기능이 향상되어 난자의 성숙을 유도한 것으로 사료된다.

다양한 종류의 성장인자 및 사이토카인들을 체외배양액에 첨가함으로써 체외발육율을 향상시킬 수 있다(Kim 등, 2002; Neira 등, 2010). IGF-I의 경우 상실배 형성 시기에 RNA 및 DNA 합성을 증가시켜 배반포 형성율을 향상시키며(Young 등, 2001), 배반포의 세포수를 증가시킬 수 있다(Jousan과 Hansen, 2004). 한편 TGF- $\beta$ 의 경우 체외배양액에 첨가 시 배반포 생산 효율을 증진시킬 수 있으며, bFGF와 공동 첨가에 의해 그 효과를 향상시킬 수 있다(Kurzawa 등, 2004). 줄기세포 배양액 및 줄기세포 유래 CM의 경우 bFGF와 LIF가 첨가되어 있으며, 20%의 혈청도 포함되어 있다. 체외배양 시 혈청의 첨가는 배반포내 Mn-SOD, SOX, Bax, LIF, LIF-R와 같은 유전자의 발현을 증가시키지만, 발육속도 또한 증가시켜 배반포의 세포수를 감소시킬 수 있다(Rizos 등, 2003). SM-25% 구의 경우 배반포 발육율은 크게 차이가 없었으나 세포수는 현저히 저하된 반면 CM-25% 처리구의 경우 배반포 발육을 뿐만 아니라 배반포의 세포수도 증가하였다. 따라서 SM-25% 구의 경우 배양액 내 혈청에 의한 영향이 큰 것으로 여겨지며, CM의 경우 다른 다양한 성장인자 및 사이토카인에 의해 혈청이 가지고 있는 해로운 효과로부터 보호되는 것으로 사료된다.

배반포에서의 apoptotic cell은 난자의 질을 판단하는 지표로 이용 할 수 있으므로 본 연구에서 생산된 배반포의 질적 양상을 평가하기 위하여 TUNEL 분석을 통한 배반포의 apoptotic cell 수를 확인하였다. 농도에 상관없이 CM을 첨가한 구에서 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 산화 스트레스(oxidative stress)는 reactive oxygen species(ROS)에 의해 주로 유발되며, 세포 내 DNA Fragmentation의 주 원인으로 알려져 있다(Yang 등, 1998). 특히 돼지 체외성숙란 및 배반포에서의 apoptosis를 유발할 수 있으며 단위발생란의 체외 발육을 저해 할 수 있다(Sa 등, 2011; Bae 등, 2013). 이러한 산화 스트레스는 IGF, HGF, IL-6와 같은 인자들에 의해 억제 될 수 있으며(Shibuki 등, 2002; Kida 등, 2005; Baregamian 등, 2006), 줄기세포 유래 CM 내에 포함되어 있는 물질들의 항산화 작용에 의해 배반포에서의 apoptosis가 억제된 것으로 사료된다. 배반포의 내부세포괴(inner cell mass, ICM)에서 발현되며(Xu 와 Yang, 2001), 전능성 인자로 알려져 있는 Oct4 및 Klf4와 다양한 만능세포주(pluripotent cell line)에서 발현되는 것으로 알려져 있는 telomerase reverse transcriptase(Tert) 및 zinc finger protein 42(Zfp42) mRNA 발현 정도를 검토하여 배반포의 질을 판단하는 지표로 활용하였다(Rogers 등, 1991). 모든 유전자 발현에 있어서 CM-25% 구에서

높게 발현되는 것으로 나타나, 줄기세포유래 CM의 첨가가 배반포에서의 전능성 관련 유전자의 발현을 유도하는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면, 돼지체외성숙 및 발육 배양액에 25%의 CM을 첨가할 경우 난자의 성숙뿐만 아니라 질적으로 우수한 배반포를 효과적으로 생산할 수 있어, 체외수정란 및 복제기술을 통한 유용한 산자 생산에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

체외 배양액에 성장호르몬 및 사이토카인의 첨가는 초기배 발육 및 생산된 배반포의 질에 영향을 미칠 수 있다. 본 연구는 돼지 유도만능줄기세포(porcine induced pluripotent stem cell, piPSC)의 조정배지(conditioned medium, CM)가 돼지 난자의 체외성숙 및 단위발생 후 초기배 발육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 수행하였다. 난자-난구세포 복합체(cumulus-oocyte complex, COC)는 0(control), 25, or 50%의 줄기세포 배양액(stem cell medium, SM) 또는 CM이 첨가된 체외성숙 배양액으로 배양하였으며, 성숙된 난자는 활성화 유도 후 같은 농도의 SM 또는 CM을 첨가한 체외배양액에서 배양하였다. 체외 성숙율은 CM-25% 그룹에서 대조구보다 유의적으로 높았으나( $p<0.05$ ), 다른 SM 또는 CM 처리구와는 차이가 없었다. 배반포 형성율은 CM-25% 그룹(29.2%)에서 대조구(20.7%), SM-50%(19.6%) 및 CM-50%(23.66%) 처리구보다 유의적으로 높았다( $p<0.05$ ). 배반포에서의 세포수 및 세포사 비율은 SM-25% 그룹이 대조구에 비하여 유의적인 차이가 나타났다( $p<0.05$ ). 난자의 질과 연관되어 있는 유전자들(Oct4, Klf4, Tert 및 Zfp42)의 발현은 CM-25% 그룹에서 대조구보다 유의적으로 증가되었다( $p<0.05$ ). 따라서 본 실험의 결과 체외성숙(IVM) 및 체외발달(IVC) 배양액에 25% 수준의 CM의 첨가는 돼지 단위발생 난자의 배발달과 난자의 질적 향상에 기여하는 것으로 사료된다.

## REFERENCES

1. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN (1998): Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev* 51:395-401.
2. Bae HK, Kim SH, Lee SY, Hwang IS, Park CK, Yang BK, Cheong HT (2013): Effect of antioxidant treatment during parthenogenetic activation procedure on the reactive oxygen species levels and development of the porcine parthenogenetic embryos. *Reprod Dev Biol* 37(1):51-55.
3. Baregamian N, Song J, Jeschke MG, Evers BM, Chung

- DH (2006): IGF-1 protects intestinal epithelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. *J Surg Res* 136:31-37.
4. Carrell DT, Liu L, Huang I, Peterson CM (2005): Comparison of maturation, meiotic competence, and chromosome aneuploidy of oocytes derived from two protocols for *in vitro* culture of mouse secondary follicles. *J Assist Reprod Gen* 22:347-354.
  5. Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P (2006): Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* 75:122-130.
  6. Ho JC, Lai WH, Li MF, Au KW, Yip MC, Wong NL, Ng ES, Lam FF, Siu CW, Tse HF (2012): Reversal of endothelial progenitor cell dysfunction in patients with type 2 diabetes using a conditioned medium of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Diabetes Metab Res* 28:462-473.
  7. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemzova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I, Kyurkchiev D (2012): Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *BioMed Res Int (J Biomed Biotechnol)* 295167.
  8. Jousan F, Hansen P (2004): Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol Reprod* 71:1665-1670.
  9. Kida H, Yoshida M, Hoshino S, Inoue K, Yano Y, Yanagita M, Kumagai T, Osaki T, Tachibana I, Saeki Y (2005): Protective effect of IL-6 on alveolar epithelial cell death induced by hydrogen peroxide. *Am J Physiol-Lung C* 288:L342-L349.
  10. Kim CH, Park EJ, Hwang JY, Hong SH, Kim SH, Chae HD, Kang BM (2002): The effect of granulocyte colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor on the preimplantation development and implantation in mouse embryos. *Korean J Obstet Gynecol* 45:126-132.
  11. Kim HO, Choi SM, Kim HS (2013): Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. *Tissue Eng Regen Med* 10:93-101.
  12. Kim S, Lee SH, Kim JH, Jeong YW, Hashem MA, Koo OJ, Park SM, Lee EG, Hossein MS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS (2006): Anti-apoptotic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor in porcine preimplantation embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 73:1523-1530.
  13. Kurzawa R, Glabowski W, Baczkowski T, Wiszniewska B, Marchlewicz M (2004): Growth factors protect *in vitro* cultured embryos from the consequences of oxidative stress. *Zygote* 12:231-240.
  14. Kwon D, Jeon H, Oh KB, Ock SA, Im GS, Lee SS, Im SK, Lee JW, Oh SJ, Park JK, Hwang S (2013): Generation of leukemia inhibitory factor-dependent induced pluripotent stem cells from the massachusetts general hospital miniature pig. *BioMed Res Int (J Biomed Biotechnol)* 140639.
  15. Lee MJ, Kim J, Lee KI, Shin JM, Chae JI, Chung HM (2011): Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Cytotherapy* 13:165-178.
  16. Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC (2006): Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65:137-152.
  17. Martal JL, Chene NM, Huynh LP, L'Haridon RM, Reinaud PB, Guillomot MW, Charlier MA, Charpigny SY (1998): IFN-tau: a novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal and cross-species therapeutic potentialities. *Biochimie* 80:755-777.
  18. Neira JA, Tainturier D, Peña MA, Martal J (2010): Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- $\beta$ 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* 73:595-604.
  19. Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK (2002): Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 188:65-73.
  20. Parekkadan B, Van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML (2007): Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2:e941.
  21. Park BS, Kim WS, Choi JS, Kim HK, Won JH, Ohkubo F, Fukuoka H (2010): Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *BioMed Res* 31:27-34.
  22. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland M, Lonergan P (2003): Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 68:236-243.
  23. Sa SJ, Park CK, Cheong HT, Son JH, Kim MJ, Cho KH, Kim DW, So KM, Kim IC (2011): Relationship between *in vitro* maturation and plasminogen activator activity on porcine cumulus-oocytes complexes exposed to oxidative stress. *Reprod Dev Biol* 35(3):221-225.
  24. Shibuki H, Katai N, Kuroiwa S, Kurokawa T, Arai J, Matsumoto K, Nakamura T, Yoshimura N (2002): Expression and neuroprotective effect of hepatocyte

- growth factor in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:528-536.
25. Spanos S, Becker DL, Winston RM, Hardy K (2000): Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 63:1413-1420.
  26. Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GA (1992): Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 31:87-95.
  27. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998): Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 13:998-1002.
  28. Young L, Fernandes K, McEvoy T, Butterwith S, Gutierrez C, Carolan C, Broadbent P, Robinson J, Wilmut I, Sinclair K (2001): Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27:153-154.
  29. Yuan Y, Ida JM, Paczkowski M, Krisher RL (2011): Identification of developmental competence-related genes in mature porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 78:565-575.
  30. Zheng P, Dean J (2007): Oocyte-specific genes affect folliculogenesis, fertilization, and early development. *Semin Reprod Med* 25:243-251.

(Received: August 13 2015/ Accepted: August 26 2015)