



돼지 체세포 복제 수정란의 자가 사멸 분석*

류지은¹, 윤종택^{1,2,†}

¹한경대학교 미래융합기술대학원 동물생명공학과, ²한경대학교 동물생명환경과학과

Analysis of Apoptosis on the Somatic Cell Nuclear Transfer embryos in porcine

Ji-Eun Ryu¹ and Jong-Taek Yoon^{1,2,†}

¹Major in the Animal Biotechnology, Graduate School of Future Convergence Technology, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi-do, 456-749, Korea.

²Department of Animal Life Science, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea.

Abstract

The purpose of this study is to examine the electrofusion and activation conditions for the production of porcine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. In this study, immature oocytes were cultured in TCM-199 with and without hormones for 22 hours. Skin fibroblasts cells of porcine were transferred into the perivitelline space of enucleated in vitro matured oocytes. Cell fusion was performed with two different pulses that each one pulse (DC) of 1.1 kV/cm or 1.5 kV/cm for 30 μ sec. After fusion subsequent activation were divided into three groups; non-treatment (control) and treatment with 2 mM 6-DMAP or 7.5 μ g/ml cytochalasin B for 4 hours. Transferred embryos were cultured in PZM-3 (Porcine Zygote Medium-3) in 5% CO₂ and 95% air at 39°C for 7 day. Apoptosis-related genes (Caspase-3, BCL-2, mTOR, and MMP-2) were analyzed by immunofluorescence staining. There was no significant difference between two different electrofusion stimuli in the cleavage rate; 64.9 \pm 4.8% in 1.1 kV/cm and 62.7 \pm 4.0% in 1.5 kV/cm. However, blastocyst formation rate (%) was significantly different among three different activation groups (no treatment, 2 mM 6-DMAP or 7.5 μ g/ml cytochalasin B) combined with electrofusion of 1.1 kV/cm. The blastocyst formation rate was 12.6 \pm 2.5, 20.0 \pm 5.0, and 34.9 \pm 4.3% in control, 2 mM 6-DMAP, and 7.5 μ g/ml cytochalasin B, respectively. Immunofluorescence data showed that expression levels of caspase-3 in SCNT embryos undeveloped to blastocyst stage were higher than those in the blastocyst stage embryos. Expression levels of Bcl-2 in blastocyst stage embryos were higher than those in the arrested SCNT embryos. These results showed that the combination of an electric pulse (1.1 kV/cm for 30 μ sec) and 7.5 μ g/ml cytochalasin B treatment was effective for production of the porcine SCNT embryos.

Received : 19 July 2018

Revised : 31 August 2018

Accepted : 20 September 2018

Key Words : apoptosis, BCL-2, electro fusion, porcine somatic cell nuclear transfer(SCNT)

† Correspondence: Jong Taek Yoon (ORCID: 0000-0002-9408-8239)

Phone: +82-31-670-5094, Fax: +82-31-675-8265

E-mail: jtyoon@hknu.ac.kr

* 본 연구는 2015년도 한경대학교 교비 연구역량 장학생 연구비의 지원에 의한 것임.

서론

체세포 핵이식(SCNT: Somatic cell nuclear transfer)은 형질 전환 동물의 생산과 치료용 복제 동물을 생산하는데 유용한 기술이다. 특히, SCNT에 의한 복제 돼지 생산은 면적이 억제된 조직과 장기를 생산하는 이종이식연구에 활용할 수 있기 때문에 특별한 중요성을 가지고 있다(Prather, 2000; Lai와 Prather, 2003). 그러나 돼지 복제 효율은 1-5%로 다른 가축에 비해 매우 낮다(Walker 등, 2002; Lai와 Prather, 2003). 이는 탈핵, 융합, 활성화 등과 같은 기술적인 요인들(Yang 등, 2003)과 비정상적 메틸화(Park 등, 2001; Jeong 등, 2009), 유전자 발현의 문제(Park 등, 2010; Ko 등, 2011; Park 등, 2011)로 인한 것으로 알려져 있다.

자연적으로 배란된 난자는 제2감수분열 중기에서 멈춰져 있다가 정자침입을 통하여 수정이 이루어지면 난세포질 내로 유리칼슘 유입되고 난자는 감수분열을 재개하여 초기 수정란으로 발생하게 되는데, 복제 수정란은 정자에 의한 활성화 자극이 배제되므로 인위적인 자극이 필요하다(Cha 등, 1997; Park 등, 2015). 핵이식 과정에서 전기융합은 난자와 공여세포의 융합 및 난자의 활성화에 이용되고 있고, simultaneous fusion and activation method (SFA)와 delayed activation after fusion(DA) 방법이 이용된다(Jolliff와 Prather, 1997). 두 방법 모두 성공적으로 복제 동물을 생산했으며(Kubota 등, 2000; Bondioli 등, 2001; Hyun 등, 2003; Yin 등, 2003; Lee 등, 2005), 또한 복제 배아의 발달 능력 향상을 위해 ionomycin, cycloheximide, 6-dimethylaminopurine(6-DMAP) and Cytochalasin B 등을 전기 자극 후 활성화 방법으로 사용한다(Boquest 등, 2002; Beebe 등, 2009).

Programmed Cell Death(PCD) 과정 중 하나인 apoptosis는 손상된 세포나 불필요한 세포의 제거를 위한 생리과정으로(Ranganathan와 Rangnekar, 2005; Ji 등, 2013), 자연적으로 발생하는 apoptosis는 배아 분화와 관련하여, 배아의 발달과 성숙에 있어서 중요한 요소이다(Jeon 등, 2009). 그러나 체내에서 생성된 배아보다 체외수정란이나 복제 배아에서 apoptosis의 발현 비율이 높고 발달 정지의 비율이 높은 것으로 보고되고 있으며(Feugang 등, 2002; Gjorret 등, 2002; Hardy, 1999), 체외에서 미세 조작되는 과정 중 활성화소나 전기자극 같은 인위적인 외부 자극에 의해 생성된 Apoptosis는(Pang 등, 2013) 배아의 발달 정지에 영향을 미쳐 체외 생산된 배아의 점진적인 손실에 기여할 수 있다.

본 연구는 돼지 체세포 복제 수정란의 효율 향상을 위해 적절한 전기자극과 활성화 방법을 찾고, 체세포 복제 수정란의 apoptosis를 분석하여 체세포 복제 수정란의 낮은 효율의 원인에 대한 자료를 제공하고자 시행되었다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채란 및 성숙배양

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도축된 돼지의 난소를 채취하여 항생제(Penicillin G 100IU/ml, Streptomycin 100µg/ml)를 첨가한 생리식염수 용액에 37°C의 온도를 유지하여, 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 3회 세척하고 18gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기로 3-5mm의 난포에서 난포액과 미성숙 난자를 채취하였다. 수집된 미성숙 난자는 HEPES-buffered tissue culture medium 199(TCM199; Gibco, Rockville, MD, USA)에 10µl/ml antibiotic(Gibco, Rockville, MD, USA), 0.3%(w:v) bovine serum albumin(BSA; Sigma, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 배지로 3회 세척한 후 2.5µg/ml gonadotrophic hormone(GTH; Sigma, St. Louis, MO, USA), 15ng/ml epidermal growth factor(EGF; Sigma, St. Louis, MO, USA) 및 30µg/ml kanamycin(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가한 TCM199 성숙배양액에 미성숙 난자를 옮겨, 5% CO₂, 95% 공기 그리고 39°C 조건의 배양기 내에서 22시간 동안 1차 체외성숙을 유도하였다. 그 후 동일한 체외성숙배지에서 GTH를 제거한 배지를 사용하여 22시간을 배양하여 2차 체외성숙을 유도하였다.

2. 공여세포준비

피부 유래 공여세포(skin cell)는 Landrace 중 돼지의 코를 절제하여 채취하였으며, 조직을 미세하게 세절하여 0.05% trypsin과 EDTA가 첨가된 D-PBS로 3분간 vertexing을 실시하였다. 10% FBS가 첨가된 Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium(DMEM : Gibco, Rockville, MD, USA) 배양액으로 원심분리를 실시하여 trypsin과 EDTA를 제거한 다음 신선한 DMEM배양액에 재부유시켜 25cm² flask에 분주하여 5% CO₂, 95% 공기 그리고 39°C 조건의 배양기내에서 배양을 실시하여, 배양 12시간 후 바닥에 붙지 않은 세포는 제거하고, 10% FBS가 첨가된 DMEM배양액으로 48시간마다 교체하면서 6-8일간 배양을 실시하였다. 계대배양은 공여세포가 flask에서 90% 이상 confluence 상태가 되었을 때, 0.05% trypsin과 EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1/2정도씩 나누어

15회 이상 반복해서 배양을 실시하였다. 계대배양한 공여세포는 10% DMSO가 첨가된 DMEM 배양액으로 동결 보존해 두고 핵이식에 사용할 때는 39°C 온수에 용해하여 동결보호제를 제거한 다음, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액을 첨가하여 4 well dish에 분주하여 배양을 실시하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액으로 배양한 세포가 dish 바닥에 monolayer 형성이 충분히 되었을 때, 0.5% FBS가 첨가된 DMEM 배양액으로 3일 이상 기아배양을 실시하여 세포주기를 G0 또는 G1기로 유도한 다음 공여세포로 사용하였다.

3. 제핵 및 핵이식

핵이식에 사용된 Pipette은 직경이 100mm인 Capillary tube를 사용하여 탈핵용 및 주입용 Pipette을 제작하였다. 탈핵용과 주입용 Pipette의 외경은 20~30μm가 되도록 하였다. 보정용 Pipette은 외경이 120~150μm, 각도는 15°인 Pipette(RIGIO Inc, USA)을 사용하였다. 제작이 완료된 Pipette은 H₂SO₄와 증류수로 세척한 다음 멸균시켜 사용하였다. 체외성숙이 유도된 난자는 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TCM199에 침적하여 4분간 vortex를 실시하여 난구세포를 제거하고, 신선한 미세조작 배지로 세정한 후 7.5μg/ml Cytochalasin B가 첨가된 미세조작용 미소적으로 옮겨 형광현미경 하에서 Metaphase II(MII) 염색체와 Polar body(PB)를 흡입하여 탈핵하였다. 탈핵난자의 위란강에 공여세포를 주입하여 체세포 핵이식을 완료하였다.

4. 융합 및 활성화 처리

핵이식이 완료된 난자의 전기 융합은 0.1mM CaCl₂, 0.1mM MgCl₂, 0.5mM HEPES가 포함된 280mM mannitol에서 1.1kV/cm나 1.5kV/cm의 직류를 30μsec 동안 1회 통전하여 세포융합을 유도하였다(Table 1). 융합된 핵이식란의 활성화를 유도하기 위하여 2mM 6-dimethylaminopurine(6-DMAP; Sigma, St. Louis, MO, USA), 및 7.5μg/ml Cytochalasin B가 각각 첨가된 체외 배양액에서 4시간 동안 배양하였다.

Table 1. Developmental competence of porcine SCNT embryos in vitro following different electrofusion and activation method

Electro fusion	Activation	No. of embryo cultured	No. of oocytes developed to (%)	
			≥2 cell	Blastocyst
1.1kV/cm	Non	91	64.9 ± 4.8	12.6 ± 2.5
	2mM 6-DMAP	92	75.1 ± 9.0	20.0 ± 5.0
	7.5μg/ml Cytochalasin B	92	71.7 ± 7.3	34.9 ± 4.3*
1.5kV/cm	Non	99	62.7 ± 4.0	6.7 ± 1.3
	2mM 6-DMAP	100	64.5 ± 8.7	12.8 ± 4.9
	7.5μg/ml Cytochalasin B	102	67.0 ± 2.7	22.4 ± 3.1*

* Values with different letter superscripts are significant difference (p<0.05).

5. 체외 배양

활성화 처리된 핵이식란을 PZM-3 배양액으로 3-4회 세척한 다음 PZM-3 배양액을 4 well dish에 분주하여 배양을 실시하였다. 각 well에 500μl의 배양액과 핵이식란을 20~30개씩 넣어 5% CO₂, 95% 공기 그리고 39°C의 배양조건에서 7일간 배양을 실시하였다.

6. Annexin V 염색과 Immunofluorescence

Annexin V 염색은 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I(BD Biosciences, San Jose, CA)을 이용하였다. 체세포 복제 수정란의 발육 단계별 Apoptosis 비율을 측정하기 위해 체외배양 24시간 마다 복제 수정란을 회수하여 염색을 실시하였다. 회수한 복제 수정란은 1×PBS에 3회 세정 후, 1X binding Buffer 100μl에 Annexin V와 7-AAD를 각각 5μl씩 주입하여 실온에서 1시간 30분 염색을 실시하여 분석하였다.

Immunofluorescence는 체세포 복제 수정란을 1×PBS로 3분씩 2회 세척 후 10% normal horse serum으로 20분간 상온에서 blocking을 실시하였다. Primary antibody(Caspase-3, Bcl-2, MMP-2, mTOR: Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였다. Primary antibody를 blocking solution에 1:100으로 희석하여 4°C에서 18시간동안 항원항체 반응을 유도하였다. 이후 1×PBS로 5분씩 3회 세척하고 secondary antibody는 (anti-rabbit 또는 anti-mouse: Santa Cruz, CA, USA) 1:500으로 희석하여 상온에서 3시간동안 반응하고 다시 1×PBS로 5분씩 3회 세척한 후 DAPI가 포함된 H-1200으로 mount 하였다.

7. 통계처리

본 연구를 통하여 획득된 결과에 대한 통계 분석은 GraphPad Instat을 이용하여 Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test를 사용하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 일 때 유의적 차이를 보이는 것으로 분석하였다.

결 과

1. 전기융합과 활성화 조건에 따라 핵이식란의 발달율

체세포 복제 수정란의 배발달율 향상을 위해 전기융합(1.1kV/cm, 1.5kV/cm)과 활성화(6-DMAP, cytochlasin B) 조건을 각각 진행하여 체세포 복제 수정란의 배발달율을 분석하였다(Table 1). 전기융합 조건인 1.1kV/cm와 1.5kV/cm를 비교하였을 때 1.1kV/cm의 난할율($64.9 \pm 4.8\%$)과 배반포율($12.6 \pm 2.5\%$)이 1.5kV/cm의 난할율($62.7 \pm 4.0\%$)과 배반포율($6.7 \pm 1.3\%$)보다 높았고, 활성화 방법에 관계없이 1.1kV/cm의 융합조건인 난할율과 배반포율이 1.5kV/cm의 융합조건보다 높았다. 활성화 조건에 따른 난할율과 배반포율은 1.1kV/cm의 전기융합 조건 일 때, 무처리군($64.9 \pm 4.8\%$, $12.6 \pm 2.5\%$)보다 6-DMAP처리군($75.1 \pm 9.0\%$, $20.0 \pm 5.0\%$)과 cytochlasin B처리군($71.7 \pm 7.3\%$, $34.9 \pm 4.3\%$)에서 난할율과 배반포율이 높았다. 또한 1.5kV/cm의 전기융합 조건일 때도 무처리군($62.7 \pm 4.0\%$, $6.7 \pm 1.3\%$)보다 6-DMAP처리군($64.5 \pm 8.7\%$, $12.8 \pm 4.9\%$)과 cytochlasin B처리군($67.0 \pm 2.7\%$, $22.4 \pm 3.1\%$)에서 난할율과 배반포율이 높았다. 전기융합 조건과 상관없이 무처리군보다 처리군에서 난할율과 배반포율이 높은 것을 확인 할 수 있었다. 1.1kV/cm와 1.5kV/cm의 전기융합 조건 모두 무처리군($12.6 \pm 2.5\%$, $6.7 \pm 1.3\%$)보다 Cytochalasin B처리군($34.9 \pm 4.3\%$, $22.4 \pm 3.1\%$)이 유의적으로 높은 배반포율을 보였다. 실험 결과를 종합하였을 때, 1.1kV/cm의 전기융합 후 Cytochalasin B의 활성화 처리가 높은 배반포율을 보였다.

2. 핵이식란의 발육 단계별 Apoptosis 분석

핵이식란의 체외 발육 단계별로 apoptosis가 일어나는 비율을 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, USA)를 이용하여 분석하였다. 체세포 복제수정란을 체외배양 후 24시간마다 회수하여 분석을 시행하고, 결과는 발달 초기인 2cell과 4cell 단계부터 이미 전체 배아의 54.2%와 47.6%에서 Apoptosis가 진행 중이거나 사멸한 것으로 나타났다. 8cell과 morula단계에서도 80%와 87.5%가 apoptosis가 진행 중이거나 사멸한 것으로 나타났다. 배반포까지 성장하였더라도 33.3%의 배아에서 apoptosis가 진행되는 중이라는 것을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. Analysis of apoptosis of porcine SCNT embryo development stages

	Number of apoptotic cells (%)				
	2cell (24h)	4cell (48h)	8cell (72h)	Morula (96h)	Blastocyst (120h)
Alive	9/24 (37.5%)	8/21 (38.1%)	1/25 (4.0%)	1/8 (12.5%)	3/6 (50.0%)
Early Apoptosis	3/24 (12.5%)	2/21 (9.5%)	3/25 (12.0%)	3/8 (37.5%)	2/6 (33.3%)
Late Apoptosis or Dead	12/24 (50.0%)	11/21 (52.4%)	21/25 (84.0%)	4/8 (50.0%)	1/6 (16.7%)

3. 면역학적 분석방법을 통한 Apoptosis 분석

체외배양 7일차에 핵이식란을 회수하여 각 단계별 apoptosis관련 단백질을 Immunofluorescence로 분석하였다. Apoptosis marker인 Caspase-3의 발현은 발달이 정지한 2cell, 4cell, 8cell 단계에서 배반포 단계보다 높은 발현을 보였다. 2cell 단계에서 가장 높은 발현을 보였고, 배반포로 진행되면서 점차 감소하는 발현 양상을 보였다(Fig 1). Anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2의 경우 발달이 정지한 2cell, 4cell, 8cell 단계보다 배반포 단계에서 점차 증가하는 발현 양상을 보였고, 배반포 단계에서 가장 높은 발현을 보였지만 유의적인 차이

는 보이지 않았다(Fig 2). MMP-2의 발현 양상은 배반포 단계보다 발달이 정지한 다른 단계에서 발현이 낮게 나타났지만 모든 단계에서 비슷한 발현을 보였고, 배반포 단계와의 유의적인 차이는 없었다(Fig 3). mTOR의 발현 양상은 배반포 단계에서 발달이 정지한 다른 단계보다 발현이 높게 나타났지만 유의적인 차이를 보이지 않았고, 모든 단계에서 비슷한 발현을 보였다(Fig 4).

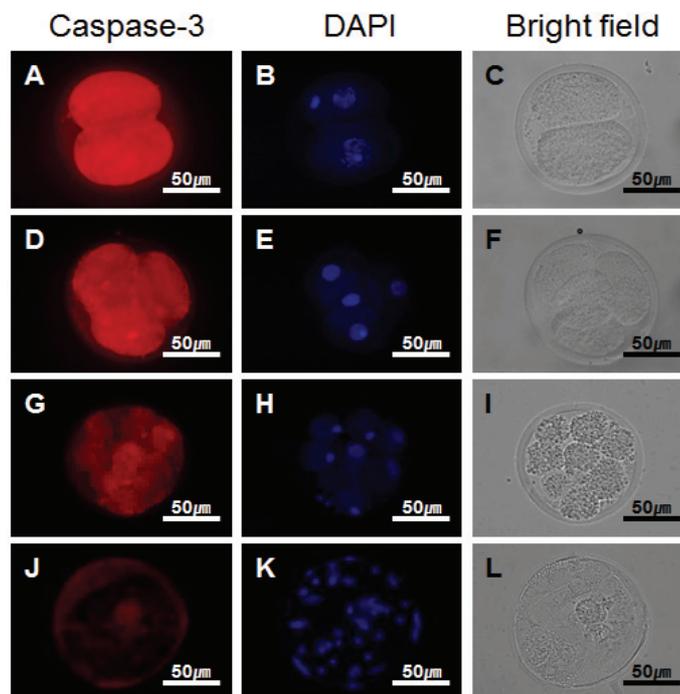


Figure 1. Expression of Caspase-3 protein in different development stage of porcine SCNT embryo. (A~C) 2cell stage, (D~F) 4cell stage, (G~I) 8cell stage, (J~L) blastocyst. Red. Casp-3, blue. Nuclei.

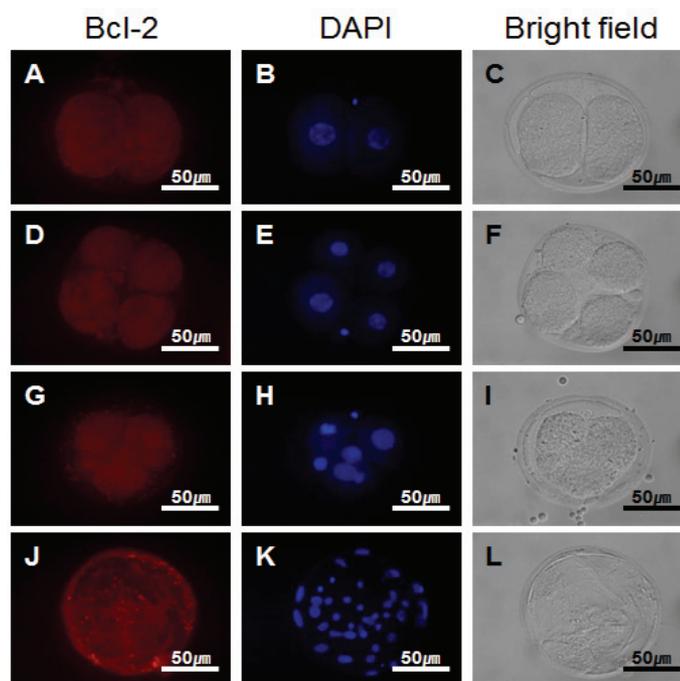


Figure 2. Expression Bcl-2 in the development stage of porcine SCNT embryo. (A~C) 2cell stage, (D~F) 4cell stage, (G~I) 8cell stage, (J~L) blastocyst. Red. Bcl-2, blue. Nuclei.

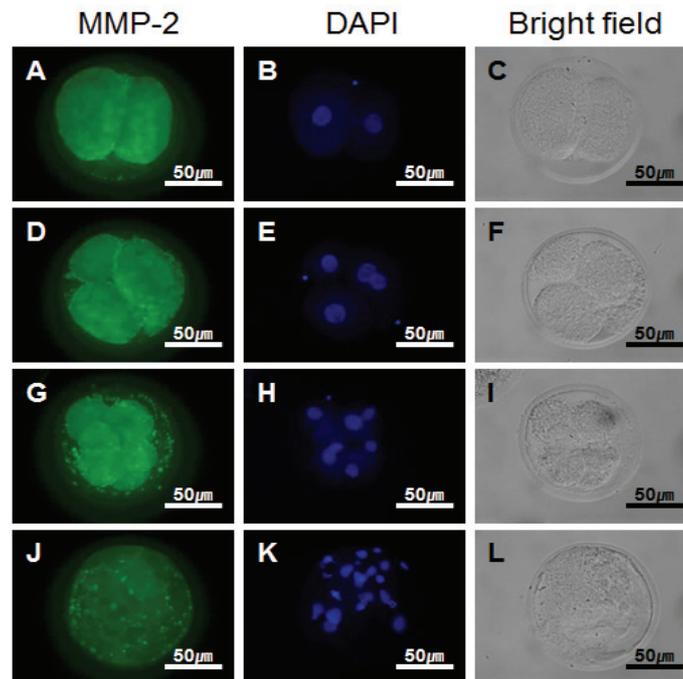


Figure 3. Expression MMP-2 in the development stage of porcine SCNT embryo. (A~C) 2cell stage, (D~F) 4cell stage, (G~I) 8cell stage, (J~L) blastocyst. Green. MMP-2, blue. Nuclei.

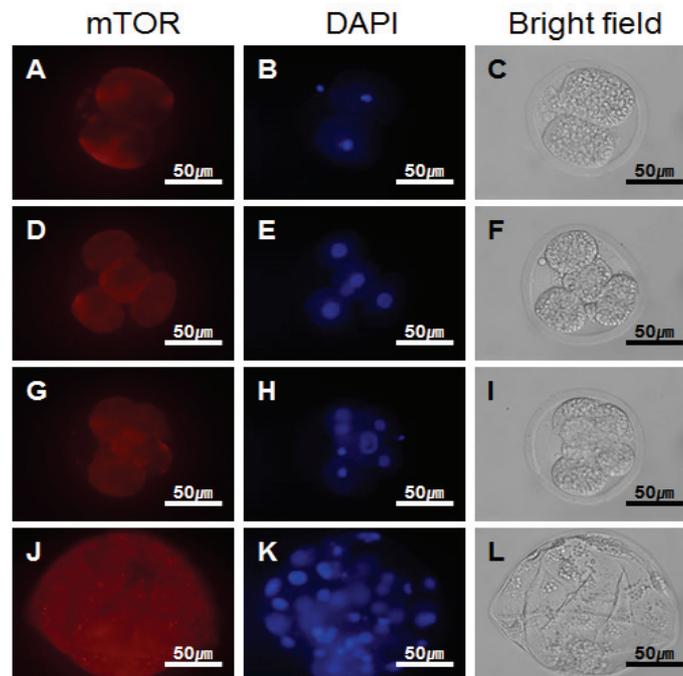


Figure 4. Expression mTOR in the development stage of porcine SCNT embryo. (A~C) 2cell stage, (D~F) 4cell stage, (G~I) 8cell stage, (J~L) blastocyst. Red. mTOR, blue. Nuclei.

고 찰

SCNT 과정 중 전기융합과 활성화는 수핵난자와 공여세포간의 재구축에 관여하고, 정자에 의한 자연적인 수정과정 없이 난자가 분열할 수 있도록 인위적인 자극을 주는 중요한 과정이다(Cha 등, 1997; Yang 등, 2003). 일반적으로 많은 연구진들이 각각 다른 융합 및 활성화 조건을 사용하고 있으며, 1.1~2.0kV/cm의 강도로 10-60 μ s, 1 또는 2 DC pulses를 가장 많이 사용한다. 본 연구에서 전기융합 조건의 경우 1 DC pulses 30 μ s일 때, 1.1kV/cm 조건이 1.5kV/cm의 조건보다 높은 발달율과 배반포율을 보이며, Cong 등(2008)의 연구에서 1.2kV/cm 조건일 때 배발달율과 배반포율이 (63.3 \pm 3.0%, 18.4 \pm 2.3%) 1.6kV/cm 조건의 배발달율과 배반포율(46.7 \pm 7.5%, 10.3 \pm 3.9%)보다 높다는 보고와 유사한 결과를 보여, 높은 전기 자극보다 낮은 전기자극이 배반포율이나 난자 활성화 향상에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 본 연구 결과에서 활성화조건의 경우 무처리군보다 6-DMAP처리군과 Cytochalasin B처리군에서 높은 발달율과 배반포율을 나타냈다. Protein serine/threonine kinase 억제제로 화학 합성물인 6-DMAP는 maturation-promoting factor(MPF) 활성을 억제하여 수정란을 발달 단계로 넘어갈 수 있도록 하며, 포유동물 난자를 성공적으로 활성화하는 것으로 나타났다(Alexander 등, 2006). Cytochalasin B는 microfilament 중합 억제제이며, 세포질 분열을 억제하고 SCNT 배아에서 공여세포와 염색체의 손실을 막기 위해 활성화 직후 사용된다(Beebe 등, 2009). 따라서 SCNT 과정 중 6-DMAP나 Cytochalasin B의 처리는 복제 수정란의 발달에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한 본 실험 결과에서 1.1kV/cm 조건과 1.5kV/cm 조건 모두 무처리군에 비해 Cytochalasin B의 처리군에서 유의적으로 높은 배반포율을 보여, 1.1kV/cm 전기융합 후 Cytochalasin B 처리가 복제 수정란의 발달율과 배반포율에 향상에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Apoptosis의 활성화는 DNA 손상 등으로 미토콘드리아에서 Cytochrome C가 방출되어 apoptosome이 형성되고 apoptosome에 의해 Caspase-3가 활성화되어 이루어진다(Chae 등, 2006). Annexin V는 세포에서 apoptosis가 진행되면 phosphatidylserine이 cell membrane으로 노출되는데 이 노출된 phosphatidylserine에 결합하여 apoptosis를 표지하는 염색 방법이다(Levy 등, 1998). 본 연구에서 복제 수정란의 발육 단계별로 apoptosis가 일어나는 비율을 Annexin V염색을 통하여 분석했는데, 발달 초기인 2cell 단계에서 전체 배아의 54.2%가 apoptosis가 진행 중이거나 사멸하였고, 배반포까지 성장하여도 약 33.3%의 배아에서 apoptosis가 진행되고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 체외 배양된 인간 배아에서 체외 배양 초기에 높은 수준의 apoptosis와 높은 비율의 발달 정지를 보인다는 연구(Hardy 등, 1999)와 배아의 체외배양 시 생산되는 활성산소종(ROS)은 배아의 발달과 성장을 저해하는 요소로 세포막과 DNA에 손상을 주며 apoptosis를 유발하고, 이는 착상 능력의 제한과 수정 결과의 저해를 불러온다(Jeon 등, 2009)는 보고와 같이 체세포 복제 수정란의 경우 생산하는 과정중의 인위적인 외부자극과 체외배양조건에 의해 발달 초기부터 높은 apoptosis가 발생하고 나아가 복제 수정란의 효율의 낮은 원인이 되는 것으로 사료된다. 체세포 복제수정란을 배양 7일차에 회수하여 apoptosis의 발현양상을 immunofluorescence로 분석한 결과, apoptosis marker인 Caspase-3의 발현양상은 발달이 정지한 2cell, 4cell, 8cell 단계에서 배반포 단계보다 높은 발현을 보였고, 2cell 단계에서 배반포 단계로 진행되면서 점차 발현이 감소하는 패턴을 나타냈다. 발달이 정지한 2cell, 4cell, 8cell 단계에서 Caspase-3의 높은 발현으로 볼 때, Apoptosis가 배아의 발달 정지와 세포 사멸에 영향을 미치는 것으로 사료된다. Anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2의 발현양상은 배반포 단계에서 발달이 정지한 2cell, 4cell, 8cell 단계보다 높은 발현을 보였다. Bcl-2의 발현이 정상적으로 발달한 배반포 단계에서 높게 발현한다는 보고(Hao 등, 2003)와 같은 결과로 볼 때 이는 Caspase-3의 발현 결과와 같이 apoptosis가 초기 배아의 발달 정지와 세포 사멸에 영향을 미치는 것으로 사료된다. Matrix Metalloproteinase (MMP)는 세포 외 기질 성분 분해 효소로 MMP-2는 세포 외 기질에 분포하며 세포기질의 항상성유지를 위해 세포의 재구성 등에 관여하고(Kim 등, 2010), apoptosis의 활성화가 높고 세포의 발달이 저해될 때 활성도가 높아지는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 MMP-2의 경우 배반포 단계보다 정지된 2cell, 4cell, 8cell 단계에서 발현이 높게 나타났지만 모든 단계에서 비슷한 발현을 보였으며 유의적인 차이는 없었다. 이는 MMP-2가 배아발달 시 세포 재구성에 관여하여 모든 단계에서 발현이 나타나는 것으로 사료된다. Mammalian target of rapamycin(mTOR)은 분자량이 289-kDa인 세린-트레오닌 인산화효소(serine-threonine kinase)이며, 성장인자, 에너지 상태 등 세포 내외의 환경에 따라 세포 분열, 생존 등에 관여한다(Park 등, 2015). 본 연구에서 mTOR의 발현은 배반포 단계에서 정지된 2cell, 4cell, 8cell 단계보다 발현이 높게 나타났지만 모든 단계에서 비슷한 발현을 나타내고, 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 mTOR이 Bcl family 군과 복합적으로 작용(Castedo 등, 2002; Park 등, 2015)하며 apoptosis가 많이 일어난 단계에서는 Pro-apoptotic유전자들과 관련되어 apoptosis를 유발하고, 배반포 단계에서는 Anti-apoptotic 유전자들과 관여하는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구결과는 SCNT란의 활성화과정에서 전기자극의 방법과 세포활성인자(Cytochalasin B)의 적절한 사용이 초기 발달에 영향을 주는 것으로 사료되며, 미토콘드리아에서 발생하는 internal-apoptosis 신호체계에 영향을 주어 anti-apoptosis로 작용하는 것으로 사료된다. 즉 본 연구를 활용하여 SCNT란의 발달율을 증가시킬 수 있을 것이라 본다.

REFERENCES

- Alexander B, Coppola G, Di Berardino D, Rho GJ, St John E, Betts DH. and King WA. 2006. The Effect of 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP) and Cycloheximide (CHX) on the Development and Chromosomal Complement of Sheep Parthenogenetic and Nuclear Transfer Embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 73:20-30.
- Beebe LF, McIlpatrick S.J. and Nottle MB. 2009. Cytochalasin B and Trichostatin A Treatment Postactivation Improves In Vitro Development of Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cloning and Stem Cells* 11:477-482.
- Bondioli K, Ramsoondar J, Williams B, Costa C and Fodor W. 2001. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar. *Molecular Reproduction and Development* 60:189-195.
- Boquest AC, Grupen CG, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ and d'Apice AJ. 2002. Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells. *Biology of Reproduction* 66:1283-1287.
- Castedo M, Ferri KF and Kroemer G. 2002. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ* 9:99-100.
- Cha SK, Kim NH, Lee SM, Baik CS, Lee HT and Chung KS. 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.* 9:441-446.
- Chae JI, Cho SK, Seo JW, Yoon TS, Lee KS, Kim JH, Lee KK, Han YM and Yu K. 2006. Proteomic Analysis of the Extraembryonic Tissue from Cloned Porcine Embryos. *Mol. Cell Proteomics.* 5:1559-1566.
- Cong PQ, Kim ES, Song ES, Yi YJ and Park CS. 2008. Effects of fusion/activation methods on development of embryos produced by nuclear transfer of porcine fetal fibroblast. *Animal Reproduction Science* 103:304-311.
- Feugang JM, Roover DE, Leonard S, Dessy F and Donnay I. 2002. Kinetics of Apoptosis in preimplantation bovine embryos produced in vitro and in vivo. *Theriogenology* 57:494.
- Gjorret J, Wengle J, King WA, Schellander K and Hyttel P. 2002. Occurrence of Apoptosis in bovine embryos reconstructed by nuclear transfer or derived in vivo. *Theriogenology* 57:495.
- 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.
- Hardy K. 1999. Apoptosis in the human embryo. *Rev. Reprod.* 4:125-134.
- Hyun SH, Lee GS, Kim DY, Kim HS, Lee SH, Kim S, Lee ES, Lim JM, Kang SK, Lee BC and Hwang WS. 2003. Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology* 59:1641-1649
- Jeon YB, Biswas D, Yoon KY and Hyun SH. 2009 Prediction of Developmental Ability of In Vitro Fertilized Porcine Embryos by Analysis of Early Cleavage Pattern. *Journal of embryo transfer* 24:65-69.
- Jeong YS, Oh KB, Park JS, Kim JS and Kang YK. 2009. Cytoplasmic localixation of oocyte-specific variant of porcine DNA methyltransferase-1 during early development. *Dev. Dyn.* 238:1666-1673
- Ji Q, Zhu K, Liu Z, Song Z, Huang Y, Zhao H, Chen Y, He Z, Mo D and Cong P. 2013. Improvement of porcine cloning efficiency by trichostatin A through early-stage induction of embryo Apoptosis. *Theriogenology* 79:815-23.
- Jolliff WJ and Prather RS. 1997. Parthenogenic development of in vitro-matured, in vivo-cultured porcine oocytes beyond blastocyst. *Biology of Reproduction* 56:544-548.
- Kim SH, Kang HA, Kim DS, Lee MS, Seo KS, Min KS and Yoon JT. 2010. Expression Analysis of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases from In Vitro Maturation Oocytes Complexes in Porcine. *Reproductive & developmental biology* 34:55-62.
- Ko YG, Im GS, Lee HC, Cho SR, Choi SH, Choi CY, Lee PY, Cho JH and Yoo YH. 2011. Non-CPC methylation of Pre-1 sequence in pig SCNT blastocyst. *Reprod. Dev. Biol.* 35:93-97.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M and Yang X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:990-995.

- Lai L and Prather RS. 2003. Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning Stem Cells* 5:233-241.
- Lee GS, Kim HS, Hyun SH, Lee SH, Jeon HY, Nam DH, Jeong YW, Kim S, Kim JH, Han JY, Ahn C, Kang SK, Lee BC and Hwang WS. 2005. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology* 63:973-991.
- Levy R, Benchaib M, Cordonier H, Souchier C and Guerin JF. 1998. Annexin V labelling and terminal transferase-mediated DNA end labelling (TUNEL) assay in human arrested embryos. *Molecular Human Reproduction* 4:775-783.
- Pang YW, An L, Wang P, Yu Y, Yin QD, Wang XH, Xin-Zhang, Qian-Zhang, Yang ML, Min-Guo, Wu ZH and Tian JH. 2013. Treatment of porcine donor cells and reconstructed embryos with the antioxidant melatonin enhances cloning efficiency. *J. Pineal. Res.* 54:389-397.
- Park CH, Uh KJ, Mulligan BP, Jeung EB, Hyun SH, Shin T, Ka H and Lee CK. 2001 Analysis of imprinted gene expression in normal fertilized and uniparental preimplantation porcine embryos. *PLoS One* 6:e22216.
- Park JY, Park MR, Hwang KC, Chung JS, Bui HT, Kim T, Cho SK, Kim JH, Hwang S, Park SB, Nguyen VT and Kim JH. 2011. Comparative gene expression analysis of somatic cell nuclear transfer-derived cloned pigs with normal and abnormal umbilical cords. *Biol. Reprod.* 84:189-199.
- Park MR, Kim BK, Lee HC, Lee P, Hwang S, Im GS, Woo JS, Cho C, Choi SH, Kim SW and Ko YG. 2010. The imprinted messenger RNA expression in cloned porcine pre-implantation embryos. *J. Emb. Trans.* 25:127-131.
- Park YG, Lee SE, Kim EY, Hyun H, Shin MY, Son YJ, Kim SY and Park SP. 2015. Effects of Feeder Cell Types on Culture of Mouse Embryonic Stem Cell In Vitro. *Development & Reproduction* 19:119-126.
- Park, S.J, Ryu, J, Kim, I.H, Choi, Y.H, Nam, T.J. 2015. Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer MCF-7 cells by a peptide derived from porphyra yezoensis. *Oncol Rep.* 33:19-24.
- Prather RS. 2000. Cloning. Pigs is pigs. *Science.* 289:1886-1887.
- Ranganathan P and Rangnekar VM. 2005. Exploiting the TSA connections to overcome Apoptosis-resistance. *Cancer Biol. Ther.* 4:391-392.
- Walker SC, Shin TY, Zaunbrecher GM, Romano JE, Johnson GA and Bazer FW. 2002. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using in vitro-matured oocytes. *Cloning Stem Cells* 4:105-112.
- Yang YH, Choi SY, Lee SY, Park CK, Yang BK, Kim CI and Cheong HT. 2003. Study on the improvement of bovine somatic cell nuclear transfer technique. *Korean J. Animal Reprod.* 27:233-240.
- Yin XJ, Cho SK, Park MR, Im YJ, Park JJ, Bhak JS, Kwon DN, Jun SH, Kim NH and Kim JH. 2003 Nuclear remodelling and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes under delayed-activated conditions. *Zygote* 11:167-174.