

난관 세포와 공동 배양에 의한 배 세포 발달의 향상

원광대학교 의과대학 산부인과학교실

김정호 · 홍기연 · 김기석 · 최정훈 · 민부기

Improvement of Embryonic Cell development by Coculture with Ampullary cells

Jung-Ho Kim, Gi-Youn Hong, Kie-Sock Kim, Jung-Hoon Choi and Bu-Kie Min

Department of Obstetrics and Gynecology, Wonkwang University, Medical School

= Abstract =

To improve in vitro embryonic cell development, this study was designed to culture in vitro fertilized early embryos of mouse in two different systems; conditioned medium alone and ampullary cells co-culture.

Thirty two of 83 embryos(38.6%) were blocked in the 2 cell stage by co-culture, as compared to forty of 42 embryos(95.2%) in control group for 24hours culture.

And all the embryonic cells cultured for conditioned medium alone were blocked for 48 hours culture.

Twenty seven of 46 embryos(58.7%) which overcome culture block in 2 cell stage by co-cultured were developed morular and expanded blastocyst, and nineteen of 46 embryos(26.1%) underwent hatching for 96 hours culture.

The cellular fragmented rates for embryo were 26.2% in medium alone; 10 fragmented blastomere were graded mild status and 1 fragmented blastomere in severe status.

On the other hand, the fragmented rate for 48 hours co-cultured were 15.7% (13/83); 8 fragmented embryos were graded mild status, moderate status in 3 fragmented embryos and severe in 2 fragmented embryos respectively.

In conclusion, the co-culture of embryos with ampullary cells is good to improve quality of embryos and overcome of culture block as well as development of cell cleavage.

서 론

포유동물의 체외 수정 및 배이식의 과정 중 배세포를 일반배양액에서 체외배양시키는데 문제점은 배세포가 포배기에 도달하기 이전에 배세포 정지상태를 일으키고 퇴화하는 것이다.

이것은 아직 확실히 원인이 밝혀지고 있지 않으나 배양액의 환경적 영향이나 불충분한 조성과 관계가 있을것으로 추정하고 있으며 배양 시간이 길수록 배세포 정지와 배세포 퇴화가 빈번하게 발생할 수 있다고 한다(Bavister 1988).

종류에 따라 다르기는 하지만 포유동물에서 일반배양액에 배세포를 배양할 때 8-16 세포기에서 배의 분할이 멈추지만(Wright et al., 1981) 생쥐에서는 2 세포기에서 더이상 세포 분할이 진행되지 않는 것으로 알려져 있다(Camous et al., 1984).

그리고 최근까지 배세포의 체외배양에서 배양세포의 분할을 지속시키기 위한 노력으로 배양액의 조성과 배양조건을 개선하고자 여러 방법들이 연구 시도되고 있다.

본 연구에서는 생쥐의 배세포를 체외배양시키는데 난관세포와 공동배양하여 세포의 분

Table 1. In vitro embryonic development in each culture systems for 48 hrs

| Cell stage mediym | No. of embryo | 2 cell block No. (%) | 4-8 cell block No. (%) | Frumentation No. (%) |
|---------------------------|---------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| Cenditioned mediym | 42 | 40(95.2%) | 2(4.8%) | 11(26.2%) |
| Ampullary cells coculture | 83 | 32(38.6%) | 5(6.1%) | 13(15.7%) |

Table 2. In vitro embryonic development in co-culture system for 72 hrs. and 96 hrs culture

| Durtation | 72hrs. after culture | | | 96hrs. |
|--------------------------------|----------------------|----------------|----------------------------|------------------|
| Cell stge | No. of 8 cell embryo | morula No. (%) | expanded blastayst No. (%) | hatching No. (%) |
| Co-Cultured in ampullary cells | 46 | 27(58.7%) | 19(41.4%) | 12(26.1%) |

할 과정과 배세포의 질적인 상태를 일반배양액에서 배양된 배세포들과 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 난관 세포계의 배양

생쥐의 난관을 절제하여 Earle's balanced salt 액(GIBCO)에서 1-2시간 완충시킨 후 내상피 세포를 재취하였다.

채취된 난관 내상피 세포를 300×g에서 5분간 원심 분리시킨 후 상층액을 버리고 Ham's F-10(GIBCO) 배양액으로 세포들을 부유시켜 조직 배양 접시(Nunc 25cm²)로 옮겨서 37°C, 5% CO₂ ari가 공급되는 배양기에서 6-7일간 배양하였으며 이때 배양액을 3일 간격으로 교체하였다.

난관 세포의 1차 배양후 6-7일에서 조직 배양 접시 바닥에 단층 융합 세포가 형성되면 0.05% trypsin이 함유된 0.53 mM E.D.T.A. 5ml로 trypsin 처리하여 배양접시에 부착된 세포들을 분리시켜서 원심 시험관으로 옮겨 300×g로 5분간 원심 분리시키고 나서 상층액을 버리고 Ham's F-10 배양액으로 세포들을 부유시키는 조작을 2회 반복하면서 난관 세포들을 세척하고 최종적으로 15% fetal bovine serum(FBS)를 함유하는 Ham's F-10 성장 배양액으로 세포들을 부유시킨다음 다시 조직 배양 접시로 옮겨서 계대 배양하였다.

2. 생쥐의 수정란 수집

ICR계의 암컷 생쥐 복강내에 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG) 5 IU를 주사하고 48시간후 HCG 5 IU를 다시 복강내 주

사하여 과배란을 유도하고 수컷 생쥐와 교접시켰다.

HCG주사 24시간후 질 점액을 검사하여 임신을 확인하고 경추골 파열로 도살한 다음 절개부위를 무균 상태로 개봉하여 난관을 세척하면서 수정란들을 회수하였다.

3. 생쥐 수정란의 배양

회수된 수정란들은 5×10⁴/ml의 난관 세포가 포함된 배양액과 Ham's F-10 성장 배양액을 조직 배양 접시 위에 100μl씩 소적하고 5ml의 paraffin oil로 포매한 다음 paraffin oil 층 밑에 소적된 각각의 배양액내로 회수된 수정란들을 옮겨서 5% CO₂ air가 공급되는 37°C 배양기내에서 배양하였다.

결 과

체외배양에서 2세포기 발생정지가 가장 빈번한 일어나는 I.C.R.계 생쥐배를 각기 다른 방법으로 배양하여 그 결과를 분석하였다.

표 1에서 보는 바와 같이 대조군으로 일반 배양액에서 42개의 수정란을 배양하였는데 24시간 배양후 95.2%(40/42)에서 2세포기에 세포분할이 정지되었고 나머지 세포들은 48시간 배양후 4세포기에 도달한 후 세포분할이 정지된 것을 관찰할 수 있었다.

단층 난관 세포에서 공동 배양한 83개의 수정란들은 24시간 후에 38.6%(32/83)에서 2세포기에 세포 분할이 멈추었고 6.1%(5/83)는 4-8 세포기에 세포 분할이 정지 되었으며 나머지 46개의 배는 세포 분할이 계속 진행되었다.

할구들의 질적인 불량도를 관찰하는 세포

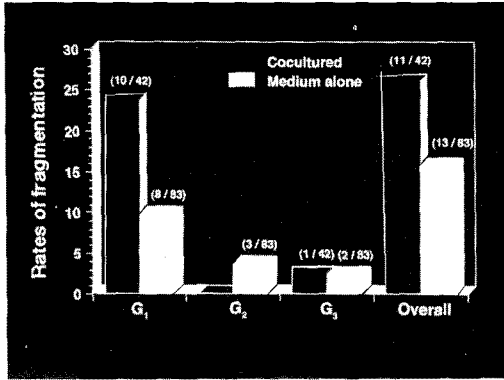


Fig. 1. Rates according to fragmented grade of embryonic cells at 48hrs. of culturing in two different culture system. No. of fragmented embryos are shown on top each bar.

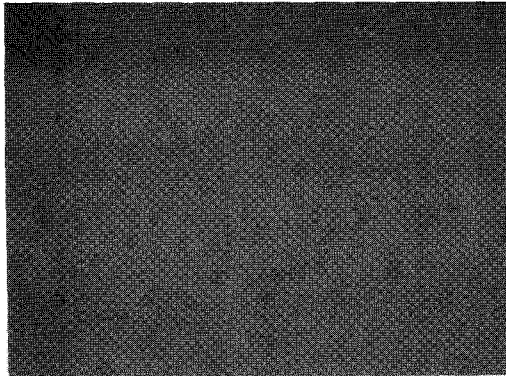


Fig. 2. Fresh ampullary cells of monolayer for coculture (x 300).

분절 현상은 배양 48시간 후 대조군에서는 26.2% (11/42) 이었고 공동 배양군에서는 15.7% (13/82) 로서 대조군에서 높은 세포 분절률을 나타냈다.

표 2에서 나타난 바와같이 난관 세포와의 공동 배양하여 조기 배세포 정지를 극복한 46개의 배들은 72시간 배양 후 세포 분할이 계속되어 58.7% (27/46) 에서 상실배에 도달하였고 41.3% (19/46) 는 팽윤 포배기까지 발달하였으며 96시간 배양 후 26.1% (12/46) 에서 부화란으로 성장하였다.

할구들의 분절 정도는 배에 대한 할구세포들의 세포 분절량을 백분율로 하여 <10% 일때 grade 1, 10-25% 일때 grade 2, >25% 일때 grade 3로하여 분절도의 빈도를 관찰하였는데, 그림 1에서 나타난 바와 같이 대조군에서 grade 1이 23.8%, grade 2는 없었고, grade 3

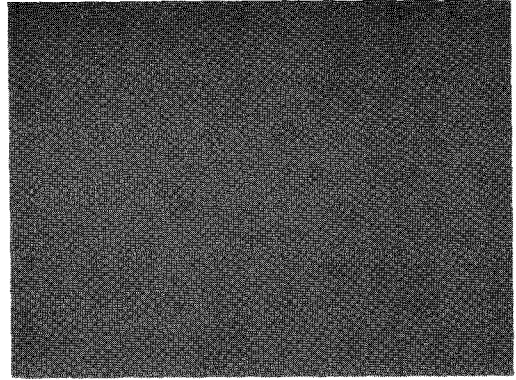


Fig. 3. The trypsinized ampullary monolayer, subcultured (x 300).

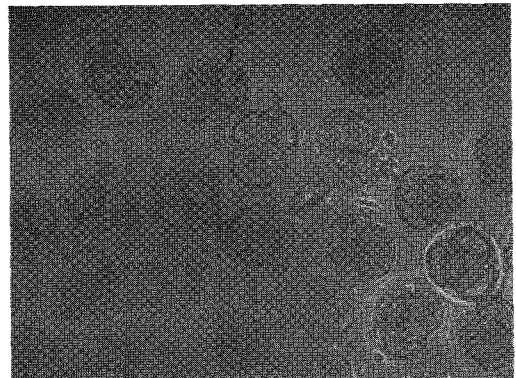


Fig. 4. Cleaved embryonic cells cocultured with ampullary cells for 48 hrs (x 300).

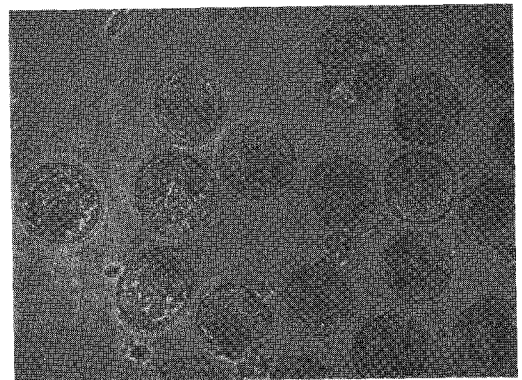


Fig. 5 Blastocysts and hatched embryos cocultured with ampullary cells for 96 hrs (x 300)

는 2.4% 이었으며 공동 배양군에서는 grade 1이 9.6%, grade 2는 2.4%, grade 3가 3.6% 로서 grade 2이상의 세포 분절은 공동 배양군이 나 대조군에서 별 다른 차이가 없었다.

고 찰

인간을 포함한 포유동물의 생체내 생식 과정은 난관의 팽대부위에서 수정된 배세포가 계속적으로 세포분할을 일으키면서 이동하여 상실배 또는 조기 포배기에 자궁내로 도달하여 착상하는 것이다.

체외 생식 과정은 배양액 내에서 배세포를 배양하여 발달된 배를 다시 자궁내에 착상시키는 것인데, 일반적으로 48시간 이상 체외 배양할 때 배세포 분할과 질적 양호도가 현저히 저하되고 배세포 발생 정지 또는 퇴화 현상이 나타나서 체외수정과 배이식의 성공률을 저하시키는 요인이 된다.

이런 현상은 부적합한 배양조건이 배세포 염색체 조합(genome)의 활성화를 방해하여 분할이 정지되기 때문이라고 한다(Biggers et al., 1962).

난관세포와 배세포의 공동배양은 생체내의 생식 생리 과정에 접근된 방법으로서 단독 배양액에서만 배양할 때 발생하는 배세포 분할 정지 및 배세포의 질이 저하되는 것을 현저히 개선시킬 수 있다고 한다(Rexroad et al., 1988; Sakhas et al., 1988).

일반적으로 공동배양에 사용되는 난관세포는 1차 배양 또는 2차 계대 배양된 섬유아세포계(forbblast cell line)로서 1차 배양세포는 섬모세포와 분비세포(ciliated and secretory cell)로 혼합되어 있으며 2차 계대 배양된 세포는 분비세포로만 구성되어 있어서 세포 분할 및 발달에 필요한 영양소를 공급한다고 하며(Bongso et al., 1990) 또한 취급하기가 용이하여 본 연구에서도 2차 계대 배양세포들을 이용하여 배 세포를 공동배양하였다.

Gandolfi 등(1987)은 양의 배세포를 난관 세포와 공동 배양하여 상실배와 포배 형성률에서 각각 53%, 42%의 결과를 보고하였고, Eystone 등(1989)은 일반배양액과 1차 배양 난관세포에서 소의 배세포를 배양하여 각각 3%와 43%의 상실배 형성률을 관찰하여 난관세포와의 공동배양에서 배발달이 현저히 우수했다고 보고하였다.

Bongso 등(1992)은 쥐의 배세포 배양에서 포배 형성률은 공동배양군에서 71-80%이고 일반 단독 배양액에서는 67%로서 공동 배양군에서 약간 우수한 것으로 보고하고 있으나,

이때 실험에 사용한 murine계의 쥐는 번식력이 강하여 어떤 조건의 배양에서도 배 발달이 잘 되는 것으로 알려져 있다.

동물의 종류에 따라서 배세포 발달에 차이가 나타나지만 본 연구에서는 I.C.R.계 생쥐를 이용하여 실험하였는데 일반 배양액에서는 모든 배들이 조기에 배세포 정지를 일으켰으나 공동 배양에서는 55.3%가 상실배 또는 팽윤포배로 발달하였는데 이러한 결과는 다른 저자들의 연구 결과와 일치하였다.

할구의 분절률이 높을수록 배는 질적으로 불량하며 공동 배양에 비해 일반 배양액에서 더 높은 할구 분절률을 나타낸다고 하며(Wiener et al., 1989; Plachot et al., 1987) Eligton 등(1990)은 소 배의 질적 열등도를 평가하는 할구세포 분절의 빈도를 공동배양군과 단독 배양액군에서 각각 13%와 23%라고 보고하였는데 본 연구에서 둘 배양 방법과 할구세포 분절률에서 차이가 있었으며 세포 분절도의 빈도는 grade 1에서만 차이가 있었고 grade 2 이상에서는 별 차이가 없는 것으로 결과가 나타났는데, 그 이유는 설명하기 어려우나 아마도 동물의 종 특이성에 따라 세포 정지가 조기에 발생하고 또한 배세포 분절이 배양 초기에 흔히 일어나기 때문으로 추정하고 있다.

배세포의 체외 배양에서 난관 세포와 공동 배양은 배양조건을 향상시켜서 배세포 발생정지를 극복할 수 있다고 인정되지만 아직 난관 세포의 정확한 역할이 규명되지 않고 있는데 난관세포가 배 영양소로서 specific glycoprotein을 방출하고(Gerena et al., 1990) 배양액에 함유된 불순물들을 제거하는 해독 작용을 한다는 보고가 있다(Menezo et al., 1990).

결 론

체외 배양에서 2 세포기 발생정지가 가장 빈번히 일어나는 I.C.R.계 생쥐의 수정란을 난관 세포에서 배양한 공동 배양군과 일반 배양액에서 단독배양한 대조군으로 나누어 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 체외 배양 48시간 후 대조군에서는 모든 배들이 8세포기 이전에 세포 발생정지를 일으켰고 배세포 분절현상도 26.2%에서 나타났으며 공동배양군에서는 44.7%의 배세포 발생정지와 15.7%의 배세포 분절을 나타내서 대조

군에 비해 조기 배세포 발생 정지와 배세포 분절률이 현저히 낮았음을 관찰하였다.

2. 배세포 분절도의 빈도는 대조군에서 grade 1이 23.8%, grade 2는 0%, grade 3는 2.4%였으며 공동배양군에서 grade 1이 9.6%, grade 2가 2.4%, grade 3는 3.6%로 각각 나타났다.

3. 공동 배양군에서 46개의 배는 계속적으로 세폴 분할을 일으켰으며 72시간과 96시간 배양 후에 포배와 부화란 까지 계속발달 되었다.

따라서 배세포의 체외 배양에서 난간 세포와의 공동배양은 조기 배세포 발생정지를 극복하여 배세포 분할을 진전시키는데 유리하며 질적으로 양호한 배를 자궁내로 이식시킬 수 있어서 자궁내 착상률을 호전시킬 것으로 기대된다.

인용문헌

- Bavister BD : Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology* 1988, 29, 143-154.
- Wright RW, Bondioli KR : Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J Anim Sci* 1981, 53, 702.
- Camous S, Heyman Y, Menezo Y : Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryo cultured with trophoblastic vesicle. *J Reprod Fertil* 1984, 72, 479-485.
- Biggers JD, Gwatkin RBL, Brinster RL : Development of mouse embryos in organ culture of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature Lond* 1962, 194, 747.
- Rexroad CE, Jr. Powell AM : Coculture of ovine ova with oviductal cells in medium. *J Anim Sci* 1988, 66, 947-953.
- Sakhas D, Trounsen AO, Kola I : In vitro cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in coculture with oviductal cells. *Reprd Fertil Devel* 1988, 1, 127-136.
- Bongso A, Ng Chye S, Ratnam S : Coculture : their relevance to assisted reproduction. *Human Reprod* 1990, 5, 893-900.
- Gandolfi F, Moor RM : Stimulation of early embryonic development in the sheep by coculture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 1987, 81, 23-28.
- Eyestone WH, First NL : Coculture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned media. *J Reprod Fertil* 1989, 85, 715-720.
- Bongso A, Marshall B, Ng Chye S, Edirisinghe R, Fong CY, Ratnam S, Anandakumar C : Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992, 58, 569-574.
- Wiemer KE, Cohen J, Amborski GF, Wright G, Wiker S, Munyakazi L, Godke RA : In vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Human Reproduction* 1989, 4, 595-600.
- Plachot M, Mandelbaum J, Junca M, Cohen J, Salat-Baroux J, De Loge C : Morphologic and cytologic study of human embryos obtained by in vitro fertilization. In : Feichtinger W, Kemeter P, editors. Future aspects in human in vitro fertilization. *Heidelberg Springer-Verlag* 1987, 267, 275.
- Elington JE, Carney EW, Ferrel PB, Shinkin ME, Foote RH : Bovine 1-2 cells embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biology of Reproduction* 1990, 43, 97-104.
- Gerena RL, Killian GJ : Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *J Exp Zool* 1990, 256, 113-120.
- Menezo YJR, Guerin JF, Czyba JC : Improvement of human early embryo development in vitro by culture on monolayers of vero cells. *Biology of Reproduction* 1990, 42, 301-306.