

## 생쥐 내세포괴의 분리방법과 지지세포의 종류와 Mitomycin C 처리 시간이 내세포괴 Colony 형성률에 미치는 영향

부산대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>1</sup>, 부산대학교병원 불임클리닉<sup>2</sup>

장호진<sup>1</sup> · 고경래<sup>2</sup> · 김미경<sup>2</sup> · 나용진<sup>1</sup> · 이규섭<sup>1</sup>

### Effect of the Isolation Method of Mouse Inner Cell Mass, Types of Feeder Cells and Treatment Time of Mitomycin C on the Formation Rate of ICM Colony

Ho-Jin Jang<sup>1</sup>, Kyung-Rae Ko<sup>2</sup>, Mi-Kyung Kim<sup>2</sup>, Yong-Jin Na<sup>1</sup>, Kyu-Sup Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea,

<sup>2</sup>Clinic of Infertility, Pusan National University Hospital, Busan, Korea

**Objective:** This study was carried out to evaluate the effect of the isolation methods of inner cell mass from mouse blastocyst, types of feeder cells and treatment time of mitomycin C on the formation rate of ICM colony.

**Methods:** The inner cells were isolated by conventional immunosurgery, partial trophoblast dissection with syringe needles and whole blastocyst co-culture method. Commercially available STO and primary cultured mouse embryonic fibroblast (pMEF) feeder cells were used, and mitomycin C was treated for 1, 2 or 3 hours, respectively. The formation rate of ICM colony was observed after isolation of ICM and culture of ICM on the feeder cells for 7 days.

**Result:** The ICM colony formation rate on STO were significantly higher in partial trophoblast dissection group (58%) than that in immunosurgery (12%) or whole blastocyst culture (16%) group ( $p < 0.05$ ). The formation rate on pMEF feeder layer was higher in partial trophoblast dissection (88%) and whole blastocyst culture (82%) group than that in immunosurgery (16%) group ( $p < 0.05$ ). When mitomycin C treated to pMEF for 2 hours, the formation rate of 88% was significantly higher than those of other conditions.

**Conclusion:** Above results showed that the efficient isolation method of ICM from blastocyst was the partial trophoblast dissection and the appropriate treatment time of mitomycin C was 2 hours. However, the subculture of ICM colony and characterization of stem cells should be carried out to confirm the efficacy of the partial trophoblast dissection method.

**Key Words:** ICM colony, Feeder layer, Isolation method, Mitomycin C

수정된 배아는 난관을 통과하면서 발달하기 시작하여, 영양막 (trophoblast)과 장차 태아로 발달하는 내세포괴 (ICM; inner cell mass)로 구성된 포배기 배아 (blastocyst) 단계로 자궁에 도달하여 착상하게 된다.<sup>1</sup> 착상 단계의 포배기 배아에서 영양막을 제거하

여 체외에서 내세포괴만을 배양하면 세포수를 무한히 증식시킬 수 있는데, 이를 배아줄기세포 (embryonic stem cell)라 한다. 배아줄기세포는 미분화상태로 무한히 증식, 배양할 수 있으며 동결보존시 정상 핵형을 유지하다가 분화유도물질에 의해 신체를 구

주관책임자: 나용진, 우) 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지, 부산대학교 의과대학 산부인과학교실

Tel: (051) 240-7282, Fax: (051) 248-2384, e-mail: yjna@pusan.ac.kr

주관책임자: 이규섭, 우) 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지, 부산대학교 의과대학 산부인과학교실

Tel: (051) 240-7285, Fax: (051) 248-2384, e-mail: kuslee@pusan.ac.kr

성하는 어떠한 세포로도 분화할 수 있는 잠재력을 가진 다능성 (pluripotent) 세포이다.<sup>1-3</sup>

배아줄기세포에 대한 최초의 연구는 1981년 Martin<sup>4</sup>이 행한 것으로, 생쥐 수정란에서 배아줄기세포를 성공적으로 분리하였다. 이어서 같은 해 Evans와 Kaufmann 등<sup>5</sup>은 생쥐 배아줄기세포주를 확립하였고, 이후 hamster (1988),<sup>6</sup> rabbit (1993),<sup>7</sup> pig (1994),<sup>8</sup> cow (1998) 등<sup>9</sup>의 다양한 종의 동물에서도 배아줄기세포주의 확립이 보고된 바 있다. 인간 배아줄기세포주에 대한 연구는 1994년 Bongso 등<sup>10,11</sup>이 체외 수정기술로 수정된 난자의 포배기 단계로의 발달을 높일 목적으로 공배양 (co-culture)을 연구하던 중 부화 (hatching)된 포배기 배아가 난관 상피세포에 부착되어 내세포 colony (배아줄기유사세포)를 형성함을 보고하였고, 1998년 Thomson 등<sup>12</sup>은 인간 배아줄기세포주의 확립을 최초로 보고하였다. 현재 인간 배아줄기세포에 대한 연구는 치료제 개발, 재생의학, 난치병의 세포치료에 대한 가능성과 그에 따른 경제적 파급효과가 매우 크기 때문에 세계 각 연구진들이 앞 다투어 연구에 몰두하고 있다.<sup>13-17</sup>

배아줄기세포주 확립을 위한 과정은 지지세포 (feeder cell)준비, 포배기 배아로부터 내세포 분리, 내세포 colony 형성과 계대배양 (sub-culture), 줄기세포 특성분석, 특정세포로의 분화 등으로 나눌 수 있다.<sup>5,18</sup> 내세포 colony 형성을 위해서는 감마선 조사나 mitomycin C 처리를 통해 방추사 (spindle) 형성을 억제하여 성장을 중지시킨 지지세포 단일층 (feeder cell monolayer)을 준비한 후 포배기 배아로부터 분리한 내세포를 공배양한다.<sup>5</sup> 내세포의 분리방법으로는 면역절제술 (immunosurgery)로 영양막 세포를 용해 (lysis)시켜 분리한 내세포를 지지세포와 공배양하거나, 투명대 (zona pellucida)를 제거한 포배기 배아 자체를 지지세포와 공배양한 후 지지세포에 부착된 colony를 분리하는 방법이 주로 사용되어져 왔다.<sup>19-22</sup> 공배양을 위한 지지세포로는 불멸화된 세포인 STO cell (Shimm's Thioguanine Ouabain resistant; ATCC, USA)과 직접 제작한 생쥐 배아섬유아세포 (primary mouse embryonic fibroblast: pMEF)가 주로 이용된다.

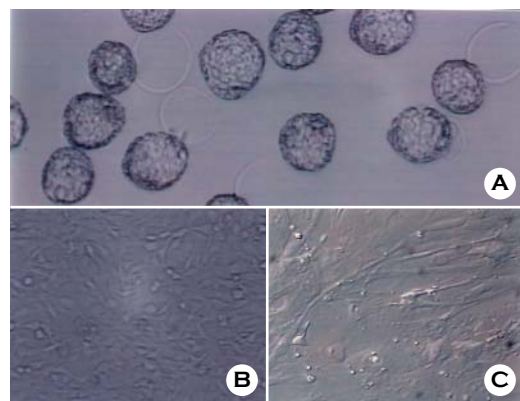
그러나 내세포 colony를 형성하여 생쥐 배아줄기세포를 확립하기까지의 성공률은 10~30% 정도로

매우 저조하고,<sup>23</sup> 인간 배아줄기세포의 확립 성공률은 더욱 낮은 실정이다. 따라서, 본 연구는 생쥐 포배기 배양에서 내세포 분리방법 및 지지세포로 이용되는 상업화된 생쥐 배아섬유아세포 (STO cell)와 직접 제작한 생쥐 배아섬유아세포 (pMEF)의 mitomycin C 처리 시간에 따른 내세포 colony 형성률을 조사하여, 인간 배아줄기세포 확립을 위한 기초자료로 활용하기 위하여 수행되었다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 실험 동물

과배란을 유도하기 위해 6~8주령의 F1 hybrid (C57BL/CBA) 암컷 생쥐에게 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; Sigma, USA) 5 IU를 복강내 주사하고, 48시간 후 human chorionic gonadotropin (hCG; Sigma, USA) 5 IU를 복강내 주사한 후 수컷 생쥐와 합사하여 교배를 유도하였다. 다음날 질전 (vaginal plug)을 확인한 후 48시간째에 경추과열법으로 임신한 생쥐를 희생시키고 양측 난관을 적출한 후, Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)으로 3회 세척하고 해부현미경 하에서 미세 유리관으로 난관을 관류하는 방법으로 4-세포기의 배아를 채취하였다. 채취된 배아는 G1.1 (Vitrolife Inc., Sweden)과 G2.2 (Vitrolife Inc., Sweden) 배양액에서 포배기까



**Figure 1.** Mouse blastocysts and feeder cells.  
**A:** Morphology of mouse blastocysts from in vitro culture of 4-cell stage embryos  
**B:** Morphology of sub-cultured STO cells  
**C:** Morphology of sub-cultured primary mouse embryonic fibroblast (pMEF) cells

지 배양하였다 (Figure 1).

## 2. 지지세포의 준비 및 배양

### 1) 생쥐 배아섬유아세포 (pMEF)의 준비

과배란을 유도한 생쥐 암컷 (F1 hybrid; C57BL/CBA)을 교미시킨 후, 질전 (vaginal plug)을 확인한 날로부터 제 13~14일째에 경추파열법으로 임신한 생쥐의 자궁으로부터 태아를 적출하였다. 적출된 태아의 머리와 간을 제거하고 태아 조직을 잘게 조각내어 (mincing) 0.05% trypsin/0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)로 조직을 풀어준 후, 태아 조직을 20% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT), 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acid, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 KO-DMEM으로 2일간 배양하였다. 이후 5 ml의 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA 용액으로 바닥에 부착된 세포들을 떼어내고, 세포 덩어리는 제거하고 상층액을 획득하여 배양하였다. 이후 배양접시에 단일 세포층이 균일하게 분포하게 되면 3일간격으로 4회 계대배양하여 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, St. Louis, USA) 동결보존액으로  $5 \sim 10 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 cryovial에 1 ml씩 분주한 후 초급속동결법으로 액체질소에서 동결보관하였다.

### 2) STO 섬유아세포의 준비

상업화된 STO fibroblast (ATCC; American Type Culture Collection, USA)를 구입하여 20% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT), 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acid, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 KO-DMEM으로 3일 간격으로 계대배양하여 세포를 증식시킨 후, 이를 PBS에 10% DMSO와 20% FBS가 첨가된 동결보존액과 함께  $5 \sim 10 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 cryovial에 1 ml씩 분주하여 초급속동결법으로 액체질소에서 동결보관하였다.

### 3) Mitomycin C의 처리

분리된 내세포괴 또는 포배기 배아와 공배양하기 2일전, 동결보존하고 있던 STO 섬유아세포와 제작한 생쥐 배아섬유아세포를 각각 37°C water bath에서 3분간 용해한 후, cryovial에 있던 세포 부유액을 5 ml의 배양액으로 현탁하고 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 10 ml의 KO-DMEM

배양액을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 37°C 배양기에서 배양하였다. 다음날 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA 처리로 세포현탁액을 만들어 KO-DMEM 배양액으로  $3 \times 10^5$  cell/ml의 농도가 되도록 하여 지지세포 단일층을 준비하였다. 단일층이 형성된 STO 섬유아세포와 제작한 섬유아세포를 10 ng/ml mitomycin C로 각각 1, 2, 3시간씩 처리한 후 배양액으로 3회 세척하여 지지세포로 사용하였다.

## 3. 내세포괴의 분리 및 배양

### 1) 면역절제술 (immunosurgery)

생쥐 포배기 배아를 0.5% protease에서 3분간 배양하여 투명대를 제거하였다. 영양막세포를 용해시키기 위하여 Solter와 Knowles의 방법을 변형하여 사용하였는데, mineral oil로 도포된 30  $\mu$ l drop의 rabbit anti-human serum antibody (Sigma, St. Louis, USA) 원액에서 5분간 배양하여 항원항체반응을 일으킨 후, 다시 mineral oil로 도포된 30  $\mu$ l drop의 guinea pig complement (Sigma, St. Louis, USA) 원액에서 5분간 처리하여 내세포괴를 분리하였다. 분리된 내세포괴를 배양액으로 3회 세척한 후, 미리 준비해둔 지지세포 단일층에서 7일간 공배양하면서 내세포괴 colony 형성을 관찰하였다 (Figure 2).

### 2) 부분 영양막세포 절개 (partial trophoblast dissection)

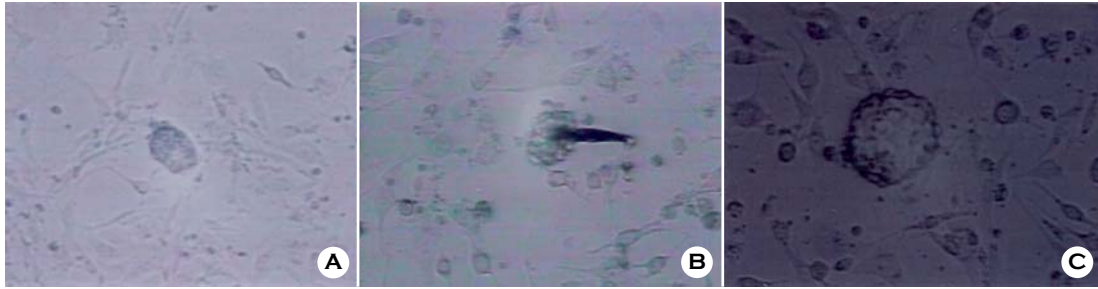
투명대를 제거한 포배기 배아의 내세포괴 부분을 12시 방향으로 위치하도록 한 후, 30G 주사침으로 9시에서 3시 방향으로 포배강 (blastocoele)을 절개하였다. 내세포괴가 있는 부분을 분리하여 3회 세척한 후 준비한 지지세포 단일층에서 7일간 공배양하면서 내세포괴 colony 형성을 관찰하였다 (Figure 2).

### 3) 포배기 배아 공배양 (whole blastocyst co-culture)

영양막세포와 지지세포가 부착하여 내세포괴 colony를 형성하도록 유도하기 위하여 0.5% protease로 투명대를 제거한 포배기 배아를 지지세포 단일층에서 7일간 공배양하면서 내세포괴 colony 형성을 관찰하였다 (Figure 2).

## 4. 통계처리

통계처리는 SPSS PC version 10 프로그램을 이용



**Figure 2.** ICM isolated from mouse blastocyst by three different isolation methods for ICM colony formation.

**A:** ICM isolated by immunosurgery

**B:** ICM isolated by partial trophoblast dissection

**C:** Whole blastocyst co-culture

**Table 1.** ICM colony formation rate on STO and pMEF feeder layers by three different isolation methods of ICM from mouse blastocysts

Feeder layers	ICM* colony formation rate (%)		
	Immunosurgery (n=50)	Partial trophoblast dissection (n=50)	Whole blastocyst co-culture (n=50)
STO <sup>†</sup>	6 <sup>a</sup> (12%)	29 <sup>b</sup> (58%)	8 <sup>a</sup> (16%)
pMEF <sup>‡</sup>	8 <sup>a</sup> (16%)	44 <sup>c</sup> (88%)	41 <sup>c</sup> (82%)

\*ICM : inner cell mass.

<sup>†</sup>STO : commercial mouse embryonic fibroblast.

<sup>‡</sup>pMEF: primary mouse embryonic fibroblast.

Different superscripts are significantly different (p<0.05)

한 Chi-square test 및 Fisher's exact test를 사용하였으며, p값은 0.05 이하인 경우를 통계학적 의의가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 내세포괴 분리방법에 따른 내세포괴 colony 형성률

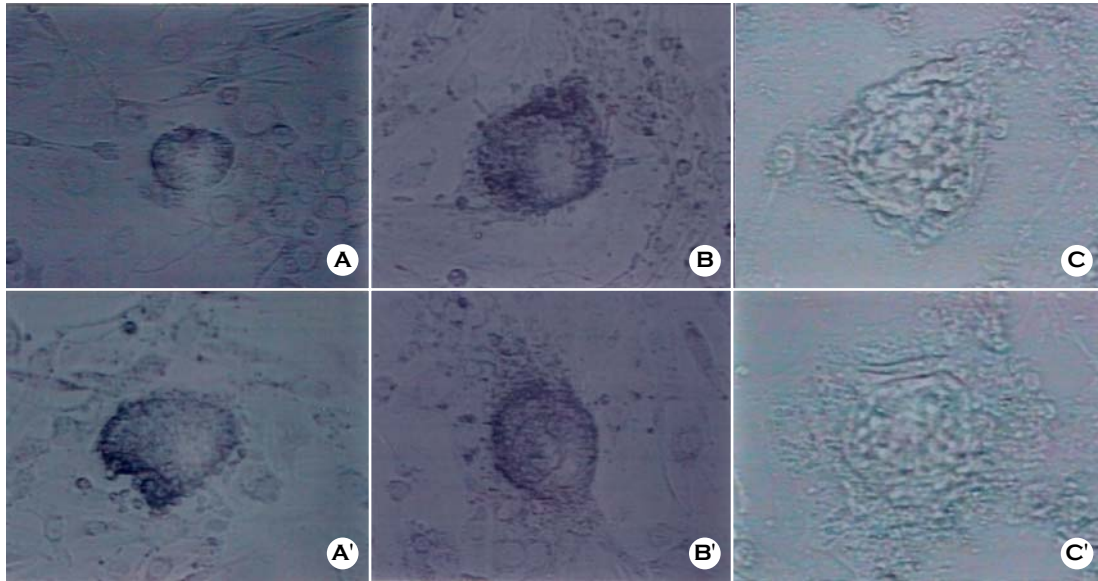
면역절제술, 부분 영양막세포 절개, 포배기 배아 공배양 등의 세 가지 방법으로 각각 50개씩의 포배기 배아에서 내세포괴를 분리하여 2시간 동안 mitomycin C를 처리하여 준비한 지지세포와 공배양하여 내세포괴 colony 형성을 관찰하였다. STO 세포층에서의 내세포괴 colony 형성률은 부분 영양막세포 절개법이 58%로 면역절제술의 12%, 포배기 배아 공배양법의 16%보다 유의하게 높았으며 (p<0.05), pMEF 세포층에서의 내세포괴 colony 형성률은 부분 영양막세포 절개법과 포배기 배아 공배양법이 각각 88%

와 82%로 면역절제술의 16%보다 유의하게 높게 나타났다 (p<0.05; Table 1).

면역절제술후 colony 형성률은 pMEF층과 STO cell층이 각각 16%와 12%로 비슷하였으나, 부분 영양막세포 절개법과 포배기 배아 공배양법에서는 pMEF층에서의 내세포괴 colony 형성률이 STO cell층에 비해 유의하게 높았다 (p<0.05). 또한, pMEF층에서 부분 영양막세포 절개법과 포배기 배아 공배양법 사이의 colony 형성률의 유의한 차이는 없었으나, 형성된 colony의 모양을 관찰하였을 때 포배기 배아 공배양법의 경우는 외곽 경계선이 흐려지면서 분화되는 세포들이 관찰되었다 (Figure 3).

### 2. Mitomycin C 처리 시간에 따른 내세포괴 colony 형성률

STO와 pMEF 세포단일층을 만든 후 mitomycin C를 1시간, 2시간, 3시간씩 각각 처리하였으며, 내세포괴는 colony 형성률이 높은 부분 영양막세포



**Figure 3.** ICM colony formed on STO and pMEF feeder layer after 5 days of culture by three different ICM isolation methods.

**A and A' :** ICM isolated by immunosurgery on STO (A) and pMEF (A')

**B and B' :** ICM isolated by partial trophoblast dissection on STO (B) and pMEF (B')

**C and C' :** Whole blastocyst co-culture on STO (C) and pMEF (C')

절개법으로 분리하여 배양하였다. 이들을 배양하여 colony 형성률을 조사한 결과, STO cell층에서는 2시간 처리군 (52%)이 1시간 처리군 (9%)에 비해 내세포외 colony 형성률이 유의하게 높았으나 ( $p < 0.05$ ), 3시간 처리군 (48%)과는 유의한 차이가 없었으며, pMEF층에서도 1시간 처리군 (42%)보다 2시간 처리군 (88%)에서 내세포외 colony 형성률이 유의하게 높았으나 ( $p < 0.05$ ), 3시간 처리군 (76%)과는 유의한 차이가 없었다 (Table 2). 그러나 두 세포층 모두에서 2시간 처리군에서 형성된 colony는 크기는 커지면서 미분화상태를 유지하고 있었으나, 3시간 처리군에서 형성된 colony는 크기가 커지면서 분화되는 양상을 보였다 (Figure 4).

## 고 찰

배아줄기세포는 미분화상태로 계대배양 하여 무한정으로 증식시킬 수 있으며, 다양한 종류의 세포로 분화될 수 있는 특성을 가지고 있다. 이러한 특성을 잘 이용하면 신체를 구성하는 모든 세포로 분

**Table 2.** Effect of mitomycin C treated time to STO and pMEF feeder cells on the formation of ICM colony

Feeder layers	Treated time (hour)	Rate (%) of ICM* colony formation
STO <sup>†</sup>	1	4 <sup>a</sup> (8%)
	2	26 <sup>b</sup> (52%)
	3	24 <sup>b</sup> (48%)
pMEF <sup>‡</sup>	1	21 <sup>b</sup> (42%)
	2	44 <sup>c</sup> (88%)
	3	38 <sup>c</sup> (76%)

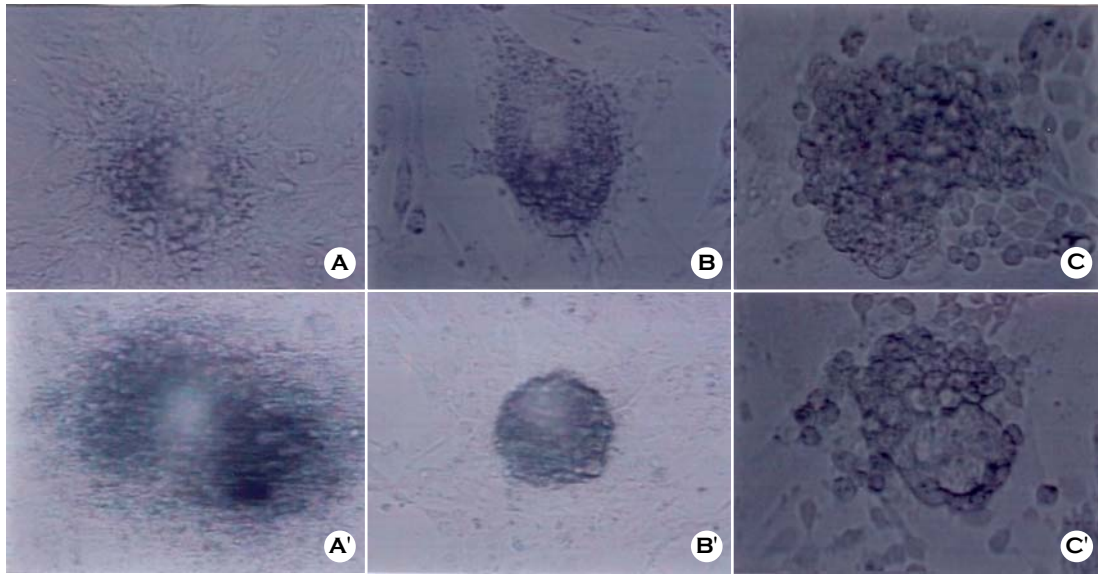
\*ICM : inner cell mass.

<sup>†</sup>STO : commercial mouse embryonic fibroblast.

<sup>‡</sup>pMEF: primary mouse embryonic fibroblast.

Different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ )

화시켜 당뇨병, 심장병, 파킨슨씨병 등과 같은 난치병의 치료에서 적용이 가능하다.<sup>1-3,13-17</sup> 이러한 배아줄기 세포주를 확립하기 위해서는 공여 배아의 확보, 내세포외 colony 형성, 미분화상태에서의 계대배양, 줄기세포의 특성 규명, 분화유도물질에 의한 특정세포로의 분화 등의 과정을 거치게 된다.<sup>5</sup>



**Figure 4.** ICM colony formed on STO and pMEF feeder layer after 5 days of culture.

**A and A' :** 1 hr mitomycin C treated STO (A) and pMEF (A') feeder

**B and B' :** 2 hr mitomycin C treated STO (B) and pMEF (B') feeder

**C and C' :** 3 hr mitomycin C treated STO (C) and pMEF (C') feeder

각 연구자들이 연구에 사용한 배아의 수를 제대로 밝히지 않아 인간 배아줄기세포 확립의 성공률을 정확히 알 수는 없지만, 대체로 10% 미만일 것으로 추정된다. 따라서 인간 배아줄기세포 확립 과정 중 내세포괴 colony 형성률을 높이는 것이 무엇보다 중요하다고 사료된다.

내세포괴 colony를 형성하기 위해서는 mitomycin C를 처리하거나 감마선을 조사하여 성장을 억제시킨 지지세포층과 영양막세포를 제거한 내세포괴를 공배양해야 한다. 지지세포는 내세포괴가 부착하여 colony를 형성할 수 있는 기회를 제공하고, 형성된 colony가 분화하지 않고 증식할 수 있는 cytokine과 growth factor를 분비하는 역할을 하게 된다. 본 연구는 내세포괴 분리방법과 colony 형성률과의 관계, STO cell과 pMEF (primary mouse embryonic fibroblast)에서의 colony 형성률 비교, mitomycin C 처리 시간에 따른 colony 형성률 비교를 통하여 가장 효율적인 내세포괴 colony 형성방법을 찾기 위하여 시행되었다.

투명대를 제거한 포배기 배아 공배양법<sup>10,11</sup>과 면역절제술<sup>21</sup>로 분리하는 방법으로 각각의 colony 형

성을 관찰한 결과 STO 지지세포층에서는 15% 전후의 낮은 colony 형성률을 보였고, pMEF층에서는 포배기 배아 공배양법 (82%)이 면역절제술 (16%) 보다 높은 colony 형성률을 나타내었다. 면역절제술로 분리한 내세포괴는 pMEF 지지세포층에 부착하지 않고 대부분 퇴화하는 양상을 나타내었지만, 포배기 배아 공배양법에서는 높은 colony 형성률을 보여주었다 (16% vs 82%). 그러나 포배기 배아 공배양법에서 관찰된 내세포괴 colony는 가장자리 경계선이 뚜렷하지 않고 배양 시간이 길어질수록 전체 윤곽이 사라지는 양상이 관찰되었다. 이러한 양상은 영양막세포의 증식 및 분화에 의해 나타나는 것으로,<sup>20</sup> 비록 colony 형성률은 높았지만 영양막세포의 증식으로 인하여 결국에는 내세포괴가 분화되는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 영양막세포의 일부분을 30G 주사침으로 제거한 후 STO와 pMEF 지지세포층에서 공배양하였을 경우에 다른 방법들 보다 유의하게 높은 colony 형성률을 나타내었으며, 특히 STO (52%) 보다 pMEF 지지세포 (88%)에서 유의하게 높은 colony 형성률을 나타내었고, 형성된 colony도 pMEF 지지

세포에서 성장이 잘 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다.

내세포괴 또는 배아줄기세포주의 배양에는 다양한 종류의 지지세포가 사용되고 있다. 이러한 지지세포는 세포성장을 중지시키기 위해 세포 독성을 갖는 mitomycin C를 2~3시간 정도 처리하여 사용하고 있으며, 가장 적절한 처리 시간에 대한 연구는 미진한 상태이다. 본 연구에서는 mitomycin C의 적절한 처리 시간을 알아보기 위하여 많은 연구자들이 기준으로 삼았던 2시간을 대조군으로 하고, 1시간과 3시간을 실험군으로 각각의 지지세포에 처리하여 내세포괴 colony 형성률을 관찰하였다. 그 결과 2시간 처리군에서는 지지세포의 형태 변화 또는 증식이 없으면서 colony의 형성과 성장이 잘 이루어졌으나, 1시간 처리군에서는 colony 형성률의 높고 낮음에 관계없이 지지세포가 증식하여 colony의 형태가 점점 사라지는 현상을 나타내었고, 3시간 처리군에서는 2시간 처리군과 비슷한 colony 형성률을 보였으나 형성된 colony의 성장이 잘 이루어지지 않고 지지세포의 윤곽이 흐려지고 배양접시에 부착된 세포가 떠오르는 현상이 나타났다. 이러한 결과는 현재 일반적으로 사용되고 있는 지지세포에 대한 mitomycin C의 처리 시간인 2시간이 적절함을 보여 주고 있다.

이상의 결과를 종합해 보면, 부분 영양막세포 절개법으로 포배기 배아에서 내세포괴를 분리한 후, mitomycin C로 2시간 동안 처리한 pMEF를 지지세포로 이용하는 것이 내세포괴 colony 형성률을 높이는 방법으로 생각된다. 그러나 이와 같은 부분 영양막세포 절개법의 효용성을 보다 명확하게 확인하기 위해서는 분리한 내세포괴를 계대배양하여 줄기세포주로서의 특성을 확인하는 실험이 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87: 27-45.
2. Pera MF, Reubinoff B, Trouson A. Human embryonic stem cell. *J Cell Sci* 2000; 113: 5-10.
3. Smith AG, Heath JK, Donaldson BD, Wong GG, Moreu J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336: 688-90.
4. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-8.
5. Evans MJ, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cell from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
6. Graves KH, Moreadith RW. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 424-33.
7. Wheeler MB. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 563-8.
8. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell derived stem-like cells. *Nature Biotechnol* 1998; 16: 42-6.
9. Doetschman TC, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst derived embryonic stem cells. *Dev Biol* 1988 May; 127(1): 224-7.
10. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam SS. The growth of inner cell mass cells from human blastocysts. *Theriogenology* 1994; 41: 161.
11. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam SS. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 1994; 9: 2110-7.
12. Thomson JA, Itskovitz Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
13. Geron. 1999. <http://www.geron.com>
14. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural

- and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Invest 2001; 108: 407-4.
15. Fishel SB, Edwards RG, Evans CJ. Human chorionic gonadotropin secreted by preimplantation embryos cultured in vitro. Science 1984; 223: 816-8.
  16. Edwards RG. IVF and history of stem cells. Nature 2001; 413: 349-51.
  17. Edwards RG. Personal pathways to embryonic stem cells. Reprod Biomed Online 2002; 4: 236-8.
  18. Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. Nature Biotechnol 2002; 20: 933-6.
  19. Axelrod HR. Embryonic stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique. Dev Biol 1984; 101: 225-8.
  20. Abbondanzo SJ, Gadi I, Stewart CL. Derivation of embryonic stem cell lines. Methods Enzymol 1993; 225: 803-23.
  21. Solter D, Knowles BB. Immunosurgery of mouse blastocyst. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 5099-102.
  22. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. Proc Natl acad Sci USA 1997; 94: 5709-12.
  23. Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams RL. Isolation of embryonic stem cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). Dev Biol 1990; 141: 344-52.
  24. Williams, RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stems. Nature 1988; 336: 684-7.

= 국문초록 =

**목적:** 본 연구는 생쥐 포배기 배아로부터 내세포괴를 분리하는 방법과 지지세포의 종류와 mitomycin C 처리 시간이 내세포괴 colony 형성률에 미치는 영향을 관찰하기 위해 시행되었다.

**연구방법:** 일반적인 면역절제술, 주사바늘을 이용한 부분 영양막세포 절개법, 포배기 배아 공배양법으로 내세포괴를 분리한 후, 상업적으로 구입이 가능한 STO 또는 직접 제조한 생쥐 배아섬유아세포 (pMEF)를 지지세포로 이용하여 배양하였다. 또한, mitomycin C를 1, 2, 3시간 동안 처리한 각각의 지지세포에서 7일 동안 배양한 후, 내세포괴 colony 형성률을 살펴보았다.

**결과:** STO 지지세포에서는 부분 영양막세포 절개법을 사용한 경우 (52%)가 면역절제술 (12%)이나 포배기 배아 공배양법 (16%)을 사용한 경우보다 내세포괴 colony 형성률이 유의하게 높았다 ( $p<0.05$ ). pMEF 지지세포에서의 형성률은 부분 영양막세포 절개법을 사용한 경우 (88%)와 포배기 배아 공배양법 (82%)을 사용한 경우가 면역절제술 (16%)을 사용한 경우보다 높았다 ( $p<0.05$ ). STO와 pMEF 모두에서, 2시간 mitomycin C 처리군 (52%, 88%)이 1시간 처리군 (9%, 42%)과 3시간 처리군 (18%, 76%)보다 높은 내세포괴 colony 형성률을 보여주었다 ( $p<0.05$ ).

**결론:** 이상의 결과는 부분 영양막세포 절개법이 생쥐 포배기 배아로부터 내세포괴를 분리하는 가장 효과적인 방법이며, 가장 적절한 mitomycin C 처리 시간은 2시간이라는 것을 보여준다. 그러나 이와 같은 부분 영양막세포 절개법의 효용성을 보다 명확하게 확인하기 위해서는 분리한 내세포괴를 계대배양하여 줄기세포주로서의 특성을 확인하는 실험이 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

**중심단어:** 내세포괴 colony, 지지세포, 내세포괴 분리방법, Mitomycin C