

난관체류시간에 따른 생쥐초기배의 체외발생능력

¹대구대학교 농과대학 축산학과 ²고려대학교 자연자원대학 축산학과

송해범¹ · 서병부¹ · 김광식¹ · 박성은² 이상호²

Dependence of Mouse Embryonic Development *in vitro* on the Exposed Period to Oviductal Environment

H.B., Song¹, B.B., Seo¹, K.S., Kim¹, S.E., Park² and S.H., Lee²

¹Department of Animal Science, College of Agriculture, Taegu University

²Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701

= Abstract =

Development *in vitro* of 2-cell mouse embryos was examined after appropriate exposure to oviductal milieu to demonstrate biological activity present in the oviducts. ICR and (C57Bl/6 × Balb/c) F₁ hybrid mice were superovulated and mated for the recovery of early embryos. Embryos were recovered at every 2h intervals from 32h post-hCG (hph) to 56 hph. The proportions of developmental stages were determined in the recovered embryos. Development *in vitro* of 2-cell embryos was more rapid in F₁ hybrid than in ICR, showing high proportions of 4-cell embryo and blastocyst at 120 hph. 100% of blastocyst development was obtained at 38hph in F₁ hybrid and at 50 hph in ICR when 2-cell embryos were cultured upto 120hph *in vitro*. Moreover, *in vitro* culture of oviducts containing 2-cell embryos in ICR mice for 12h from 34hph to 46hph increased developmental capacity of ICR mouse embryo *in vitro*. The results indicate that oviductal environment contains substances having mitogenic activity and overcoming early cell block *in vitro*. The mitogenic activity is effective *in vitro* as well as *in vivo*.

서 론

초기배를 체외배양하는 경우 일부 계통의 생쥐에서 2세포기에 난할이 정지되며 이 같은 현상은 세포분열중지(*in vitro* 2-cell block) 현상이라고 알려져 있다(Cole and Paul, 1965). 다른 동물에서도 이러한 현상이 관찰되어 햄스터에서는 2, 4세포기(Yanagimachi and Chang, 1964; Whittingham and Bavister, 1974), 쥐에서는 2, 4세포기(Whittingham, 1975), 토끼에서는 상실배(Kane, 1987), 돼지 4세포기(Davis and Day, 1984), 소 8, 12세포기(Thibault, 1966), 원숭이에서는 8, 16세포기(Boatman, 1987), 사람은 4, 8세포기(Braude *et al.*, 1988)에 각각 체외배양시 세포분열중지 현상이 일어나는 것으로 알려져 있다. 그러나, 생체내에서는 이같은 발생

중지 현상이 발견이 되지 않기 때문에 현존하는 배양액내에서의 일부 계통의 생쥐가 이같은 현상을 보이는 것은 유전적이라는 것이 여러가지 실험적 증거에 의해 밝혀지고 있다.(Mugleton-Harris *et al.*, 1982). 특히 2세포기중 G₂/M 시기가 발생의 주요결정시기인 것으로 알려져 있어, 생체내에서의 이 시기를 전후하여 난관내의 미세환경이 중요 역할을 하는 것으로 추정할 수 있다.

본 연구는 특정 계통의 생쥐에서 언제 이같은 현상이 일어나는지 명확하게 규명하기 위하여 체외배양 초기배의 세포분열중지현상의 모델로 ICR 생쥐 초기배를 이용하여 이들의 체내 발생능력을 난관의 미세환경과 함께 분석함으로써 타포유동물 초기배의 유사현상 연구에 기초 자료를 제공하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

1. 초기배의 회수

3-4주령의 ICR계통과 F_1 (C57B1/6×Balb/c) hybrid 자성과 12주령 이상된 웅성을 선발하여 14시간 점등, 10시간 소등조건에서 사육, 시험 1주일 전에 웅성 1수, 자성 3-4수씩 동물 개체 차이를 최소화하기 위하여 각각 별개의 cage에 나누어 관리하였다. 오전 12:00에 7.5IU PMS를 복강내 주사하고, 48시간 후에 같은 방법으로 5.0IU hCG를 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG 주사와 동시에 ICR은 ICR, F_1 hybrid는 C57B1/6와 1:1 합사시킨 후 다음날 아침 10:00에 질전(vaginal plug)을 확인하여 교미 여부를 판정하였으며, 질전이 확인된 개체는 임신 1일로 하고 hCG 주사 후 32시간(h post-hCG, hph)부터 56시간까지 2시간 간격으로 회생시켜 난관을 분리하였다. 분리된 난관을 혈액 및 지방을 제거한 후 4mg bovine serum albumin/ml이 첨가된 M2배양액(M2+BSA, Quinn *et al.*, 1982)으로 관류하여 초기배를 회수하였다(Fig. 1).

2. 초기배의 배양

M16용액에 4mg BSA/ml(M17+BSA, Quinn *et al.*, 1982)이 함유된 배양액을 10 μ l씩 배양접시(60×15mm culture dish, Falcon, Becton Dickinson Laware, U.S.A)에 4-5개의 microdrop을 실험 2-3시간 전에 만들어 paraffin oil(BDH Limited, Poole, U.K)을 덮어 CO₂ 배양기내에 준비하였다. 회수된 초기배를 M2+BSA의 용액으로 각각 4-5회 세정하고 준비된 microdrop으로 4-5개씩 각 drop에 옮긴 후, 5% CO₂, 37°C에서 120hph까지 배양하였다.

3. organ culture

실험 2-3시간 전에 배양접시(Falcon, organ tissue dish 60×15mm)의 center well 내부에 1ml의 M16+BSA 배양액을 채우고 그 위에 0.45 μ m membrane filter(Whatman, Maidstone, U.K.)를 공기가 완전히 제거되도록 조심스럽게 부유시켰다. center well 주위에는 5ml의 멸균 생리적 식염수를 첨가하여 수분 농도를 유지시켜 CO₂ 배양기에 평형시켰다.

34hph에 ICR생쥐 난관을 분리하여 혈액과 지방질을 제거 후 M2+BSA 및 M16+BSA 용액으로 4-5회 세정하였으며, 이를 현미경하에서 2세포기배의 존재여부를 확인한 후 membrane filter 위에 올려 5% CO₂, 37°C에서 12시간 동안 배양을 하였다. 12시간 후에 M16+BSA 용액으로 10 μ l microdrop에 4-5개씩 옮겨 120hph까지 배양을 하였다.

4. 초기배의 발생능력 분석

24시간 간격으로 ICR 및 F_1 hybrid의 초기배가 2세포기배에서 4세포기배로의 발달 및 배반포 발생율을 120hph까지 비교, 관찰하였다.

결 과

1. 회수초기배의 발생시기별 분포

2세포기의 적정 발생시간을 명확히 구명하기 위해 과배란 시킨 ICR 및 F_1 hybrid 생쥐에서 32hph부터 매 2시간 간격으로 회수한 초기배의 발생시기를 보면 32-38hph까지도 1세포 수정란이 발견됨을 알 수 있다(Table 1). 또한 전체적인 1세포기배의 비율도 ICR 생쥐에서 높은 경향을 보여주고 있다. 그러나 F_1 에서는 34hph부터 이미 90% 이상의 2세포배기배가 발견됨에 반하여 ICR에서는 38hph가 되어야 동일 수준에 도달하게 된다. 4세포기배에 도달하는 시각은 F_1 에서는 50hph에 100%의 4세포기배가 발견되나 ICR의 경우 52hph에 동일 수

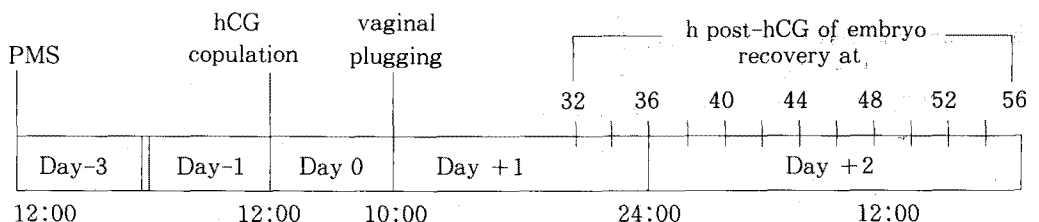


Fig. 1. A schematic schedule of protocol for superovulation and recovery of 2-cell embryos from ICR and(C57B1/6×Balb/c) F_1 hybrid mice.

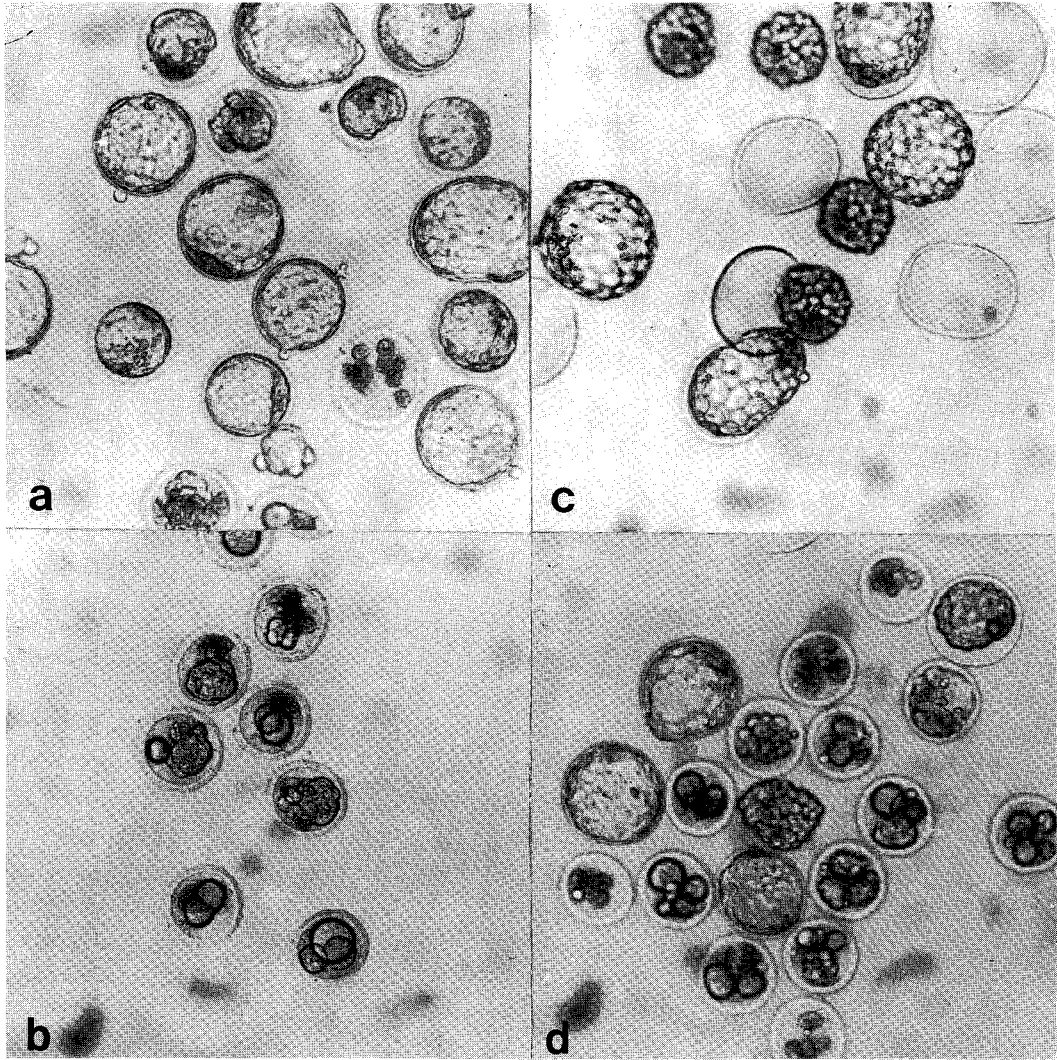


Fig. 2. Development of 2-cell embryos recovered at 38h(a and b) and 44h(c and d) post-hCG. Embryos were cultured in M16+BSA upto 120h post-hCG. The strain difference is clearly seen between ICR(b and d) and (C57Bl/6×Balb/c) F₁ hybrid(a and c). The numbers of blastocysts and hatched blastocysts from 44hph are significantly different from those of the embryos recovered from 38h post-hCG.

준에 도달한다. 한편 F₁의 경우 난관내의 초기 배 발생이 보다 동시성을 나타냄을 보여주고 있다. 실제 F₁의 경우 40-48hph, ICR의 경우 40-46hph에 거의 2세포 초기배를 얻을 수 있었다. 이상과 같이 생체내의 발생속도의 차이가 두 생쥐 계통간에 인정되었다.

2. 초기배의 체외배양

이같이 초기배의 2세포기가 32-48시간 동안 무려 12시간이라는 기간내에서 각각 발생을 하고 있으므로 이들의 세포의 발생주기가 각각

다르다는 것은 자명한 일이다. 2시간 간격으로 채취된 이들 2세포기만을 회수하여 120hph까지 배양한 결과를 Table 2에 요약하였다. 비록 F₁의 경우 36hph에 4세포기배가, 38hph에 배반포가 각각 100%로 발생되어, 이용된 배양체계가 안정됨을 보여주었으나 ICR 초기배의 경우 F₁에 비하여 46hph에 100% 4세포기배, 50hph에 100% 배반포를 얻을 수 있어 동일조건 하에서 상당한 시간의 차이를 보여주고 있다. 특히 이용된 배양조건하에서 F₁의 경우 32hph보다 4시간 또는 6시간 더 난관환경에

Table 1. Distribution of different embryonic stage in embryos collected 32-56h post-hCG

Strain	h post-hCG	No. of animals	No. of embryos at following stage(%)			Total no. of embryos
			1-cell	2-cell	4-cell	
F ₁	32	1	5(20.0)	20(80.0)		25
	34	1		17(100)		17
	36	1	2(7.5)	25(92.5)		27
	38	1	1(4.2)	23(95.8)		24
	40	1		14(100)		14
	42	1		20(100)		20
	44	1		24(100)		24
	46	1		16(100)		16
	48	1		15(100)		15
	50	1			19(100)	18
	52	1			15(100)	15
	54	1			18(100)	18
56	1			16(100)	16	
ICR	32	2	16(30.8)	32(69.2)		52
	34	2	8(13.3)	52(86.7)		60
	36	2	5(11.1)	40(88.9)		45
	38	2	5(8.6)	53(91.4)		58
	40	2	5(8.6)	56(100)		56
	42	2		57(100)		57
	44	2		55(100)		55
	46	2		53(100)		53
	48	2		19(45.2)	23(54.8)	42
	50	2		8(16.3)	41(83.7)	49
	52	2		8(16.3)	43(100)	43
	54	2			42(100)	42
	56	2			46(100)	46

정치시킴으로써 4세포의 경우 20%의 증가 또는 배반포의 경우 80%의 증가를 얻을 수 있었다(Fig. 2).

3. organ culture에 의한 초기배 배양

앞의 2가지 실험에서 보인 바와 같이 난관내의 노출시간이 초기배의 체외발생에 주요한 영향을 주는 것으로 나타났다. 이같은 난관내 체류시간의 영향을 체외에서 검토하기 위해 34hph와 46hph를 설정하여 각각 ICR 초기배가 들어 있는 난관을 적출하여 세포시기를 검토, 확인한 후 Fig. 3에 보인 바와 같이 organ culture로 12시간 체외에서 난관내에 노출시켜 46hph에 회수한 초기배와 발생능력을 검토하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 난관내에 노출한 경우, 체외에서 55%의 배반포 발생을

보여주어 배양액내에서의 8.3%의 배반포 발생에 비하여 약 47%의 높은 발생을 보였다. 또한 46hph에 회수한 2세포기배의 배양 결과인 64.2%에 비하여 크게 떨어지지 않았다. 이상의 결과로 미루어 보아 난관내의 체류는 생체내의 물론 생체외에서도 효과가 있으며 이같은 것은 난관내의 분비물질 등에 의한 생물학적 활성으로 인한 것으로 추정된다. 비록 난관액을 채취, 희석하여 배양액에 첨가함으로써 그 효과를 보려하였으나, 그 양이 매우 극미하여 반복성있는 결과를 얻지는 못하였다.

고 찰

기존의 보고에 의하면 계통간의 발생속도가 차이가 있는 것은 자연 배란의 경우, 배란의

지연이 일부 계통에서 발견되고 있으나(Whitten and Dagg, 1961), 특히 ICR 계통과 F₁과의 발생속도의 비교는 찾아볼 수 없다. F₁ 초기배의

경우 87.5%의 발생을 얻은 Bavister *et al.*, (1983)의 경우에 비하여 비록 시간이 명시되지 않았지만 본 실험의 36시간에 회수할 경우

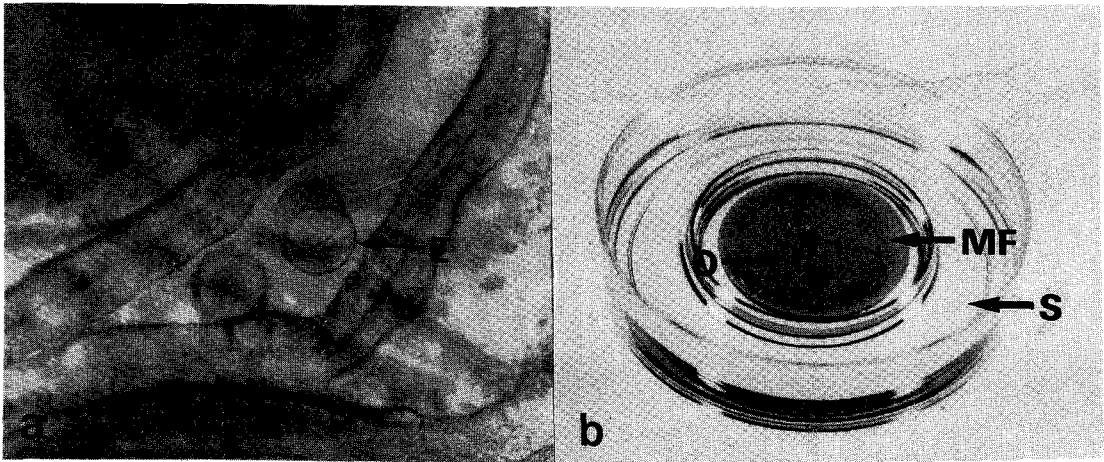


Fig. 3. Culture of oviducts containing 2-cell embryos: The presence of 2-cell embryos was examined under a dissecting microscope before culture. The oviducts containing 2-cell embryos(a) 34h post-hCG were placed on a properly soaked millipore membrane filter in a double well dish(b). They were cultured for 12h before being analysed. Abbreviations are E, egg; O, oviducts; S, saline and MF, millipore filter.

Table 2. In vitro development of recovered 2-cell embryos at various intervals¹.

Strain	h post-hCG	No. of embryos at the beginning of culture	No. of 4-cell embryos(%)	No. of blastocysts(%)
F ₁	32	20	16(80.0)	4(20.0)
	34	17	16(92.1)	11(64.7)
	36	25	25(100)	20(80.0)
	38	23	23(100)	23(100)
	40	14	14(100)	14(100)
	42	20	20(100)	20(100)
	44	24	24(100)	24(100)
	46	16	16(100)	16(100)
	48	15	15(100)	15(100)
ICR	32	36	10(27.7)	0(0.0)
	34	52	24(46.2)	2(3.8)
	36	40	22(55.0)	2(5.0)
	38	53	36(67.9)	4(7.5)
	40	56	43(76.8)	9(16.1)
	42	57	49(87.5)	17(29.8)
	44	55	53(96.4)	24(43.6)
	46	53	53(100)	34(64.2)
	48	19	19(100)	16(84.2)
	50	8	8(100)	8(100)

1. Embryos were recovered at the indicated intervals and analysed at 58h post-hCG for 4-cell and 120h post-hCG for blastocyst, respectively.

Table 3. The effect of oviductal factor on the development of ICR 2-cell embryos culture in oviducts recovered at 34h post-hCG

Treatment of embryos	No. of embryos at beginning of culture	No. of 4-cell embryos(%)	No. of blastocysts(%)
Recovered ¹ at 34h post-hCG	52	24(46.2)	2(8.3)
Recovered ² at 46h post-hCG	53	53(100)	34(64.2)
Recovered at 34h post-hCG and cultured in oviducts for 12h	47	39(82.0)	26(55.0)

1, 2. Embryos were recovered as indicated, cultured and scored as described in Table 1.

80% 이상의 배반포를 얻어 유사한 결과를 보였지만, 본 실험에서 보여준 바와 같이 2세포기배를 언제 회수, 배양하는가에 따라 체외발생능력은 상당히 다양한 것을 알 수 있다. 또한 2세포기에서의 세포분열중지현상 뿐만 아니라 4세포로의 발생중지현상도 발견되어, 난관내에 존재하는 시간에 따라 4세포의 분열중지현상을 극복하는 것을 알 수 있었다. 1세포기배의 inbred 계통의 생쥐초기배를 1세포로부터 배양할 경우 SJL/J, C57B1/10J 및 129/Rr 계통에서 각각 배반포를 3, 18 및 16% 얻고 있어 유사한 계통별 세포분열 중지현상을 보여주고 있다(Whitten and Biggers, 1968).

본 시험의 결과, 흥미로운 것은 실제 2세포기배가 모두 세포분열중지현상을 나타내지 않고 생체내에서 적출한 난관내에서 체외배양하여 난관 환경내에서 12시간을 더 연장한 후 계속적인 배양을 할 경우 46시간에 회수한 2세포기배와 크게 상이한 결과를 보이지 않았다는 사실이다. 이 같은 난관의 이용은 체외배양 중 세포분열중지현상이 있는 초기배를 세포분열중지현상 보이지 않는 계통에 옮겨 배양함으로써 그 현상을 극복할 수 있다(Whittingham and Biggers, 1967)는 초기의 생각을 보다 확장시켜, 동일 계통의 난관이라도 보다 오래 난관내에서 공배양할 경우 세포분열중지현상을 극복할 수 있다는 것을 보여준 것이다. 한편 Chinese hamster에서도 이와 비슷한 결과를 얻고 있어 즉, 후기 2세포기배 및 4세포기배를 배양할 때 60%가 증가된 배발포 발생율을 보여주어 난관내 당단백질의 존재를 관련시켜 그 자극효과를 추론하고 있다(Parkening and Cisneros, 1988; Boice *et al.*, 1990). 이와 함께 동물종간에

일시적인 배양체계로서 이용되고 있는 사실(Krisher *et al.*, 1989)이나 난관과의 공배양(Ball *et al.*, 1991; Sharif *et al.*, 1992) 난관상피세포의 공배양(Clonkowaska *et al.*, 1991)으로 미루어 볼때, 일부 계통의 세포분열중지현상은 체내에서의 고유한 성질이 아니라 세포분열을 촉진하는 물질에 적정시간 노출되어야 한다는 결론을 얻을 수 있다.

결론

초기배의 분할을 조절하는 난관내에 존재한다는 증거를 보여주었으며, 난관은 생체내에서의 유지뿐만 아니라 적출하여 초기배와 함께 organ culture할 경우에도 그 생물학적 활성을 탐지할 수 있음을 보여준 것이다. 한편, F₁초기배의 경우 이 같은 난관내의 활성물질의 작용 시간 또는 농도가 보다 이른 시기에 또는 보다 높게 효과적으로 작용하여 체외에서의 세포분열중지현상을 극복할 수 있다는 것을 암시해 준다.

인용문헌

- Ball BA, Thoma PGA, Briusko SP, Miller PS, Ellington JE: Development of 1- to 2-cell equine embryos cultured with oviductal epithelial cells. *Theriogenology* 1992, 37, 181 (Abstr.).
- Boatman DE: *in vitro* growth of non-human primate pre- and periimplantation embryos. In: *The mammalian preimplantation embryos*. Bavister, B.D.(ed.) Plenum Press. New

- York, NY, U.S.A., 1987, pp 273-308.
- Boice ML, Geisert RD, Blair RM, Verhage HG: Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol Reprod* 1990, 43, 457-465.
- Braude PR, Bolton, VN, Moore S: Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stage of preimplantation development. *Nature* 1988, 332, 459-461.
- Clonkowska M, Eysymont U, Guskiewicz A, Kossakowski, M, Dziak J: Birth of lambs after *in vitro* maturation, fertilization, and culture with oviductal cells. *Mol Reprod Devel* 1991, 30, 34-38.
- Cole RJ, Paul J: Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos and cell strains derived from them. In: Preimplantation stage of pregnancy Wolstenholme, G.E.W. and O'Connor, M.(eds.) Churchill, London, U.K. 1965, pp. 82-123.
- Davis DL, Day BN: Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J Anim Sci* 1984, 46, 1043-1053.
- Kane MT: *in vitro* growth of preimplantation of rabbit embryos. In: The mammalian preimplantation embryos. Bavister, B.D.(ed.) Plenum Press. New York, NY, U.S.A., 1987, pp 193-217.
- Krisner RC, Retlers RM, Johnson BH: Effect of oviductal condition on the development of one-cell porcine embryos in mouse or rat oviduct maintained in organ culture. *Theriogenology* 1989, 32, 885-892.
- Muggleton-Harris A, Whittingham DG, Wilson L: Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse. *Nature* 1982, 299, 460-462.
- Parkening TA, Cisneros PL: Fertilization of Chinese hamster ova *in vitro* and *in vivo* and their subsequent development in culture. *Biol Reprod* 1988, 39, 409-418.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG: Preservation of hamster oocyte to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1982, 66, 161-168.
- Sharif H, Lonergan P, Managhan P, Wahid H, Gallagher M, Gordon I: Development of early bovine embryos in isolated mouse oviducts maintained in organ culture under two gas atmospheres. *Theriogenology* 1992, 37, 297(Abstr.).
- Thibault C: La culture *in vitro* de l'oeuf de vache. *Annls Biol Anim Biochem Biophys* 1966, 6, 159-164.
- Whitten WK, Biggers, JD: Complete development *in vitro* of the preimplantation stage of the mouse in a single chemically defined medium. *J Reprod Fert* 1968, 17, 399.
- Whitten WK, Dagg CP: Influence of spermatozoa on the cleavage rate of mouse eggs. *J Exp Zool* 1961, 148, 173-183.
- Whittingham DG, Bavister BD: Development of hamster eggs fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fert* 1974, 38, 489-492.
- Whittingham DG, Biggers JD: Fallopian tube and early cleavage in the mouse. *Nature* 1967, 213, 942-943.
- Yanagimachi R, Chang MC: *in vitro* fertilization of golden hamster ova. *J Exp Zool* 1964, 156, 361-376.