

소와 돼지의 卵管上皮細胞와의 共培養이 마우스 初期胚의 體外發達에 미치는 영향

이 성 · 허의중* · 석호봉
단국대학교 농과대학 축산학과

Early Mouse Embryonic Development *In Vitro* by Co-culture with Bovine and Porcine Oviductal Epithelial Cells

S. Lee, E. J. Hur* and H. B. Seok

Department of Animal Science, College of Agriculture, Dankook University

SUMMARY

This experiment was carried out to evaluate the effect of early mouse embryonic development *in vitro* by co-culture with bovine and porcine oviductal epithelial cells (BOEC and POEC). The 2-cell embryos were collected from the oviducts of the superovulated and mated cultured in D-PBS /15% FCS at 48 hours after hCG injection. The *in vitro* developmental rate of blastocyst formation in the embryos were examined under the following treatments: 1) TCM 199 added 15% HCS, 2) Ham's F-10 added 15% HCS, 3) MediCult IVF medium, 4) TCM 199 added 15% HCS + BOEC, 5) TCM 199 added 15% HCS + POEC, 6) Ham's F-10 added 15% HCS + BOEC, 7) Ham's F-10 added 15% HCS + POEC, 8) MediCult IVF medium + BOEC, 9) MediCult IVF medium + POEC.

For a comparative study of *in vitro* development for 96 hours after hCG injection, were cultured with oviductal epithelial cell and media only.

The obtained results were 2-cell embryos developed to the blastocyst stage in TCM 199, Ham's F-10 and MediCult IVF medium at the rates of 84.4, 83.2 and 81.6%, respectively. The higher developmental rates(91~97%) of blastocyst formation was appeared when the embryos were co-cultured with a monolayer of bovine or porcine oviductal epithelial cells in TCM 199 or Ham's F-10 and MediCult IVF media. No significant difference in developmental rates was shown between bovine and porcine oviductal epithelial cells but significant difference in co-culture system in comparison between media only system and co-cultures.

In conclusions, oviductal epithelial cells, BOEC and POEC, when co-culture with mouse early embryos improved the rates of development, blastocyst and hatching. Therefore, it is suggested that co-culture system using oviductal epithelial cells improve early embryonic development in mouse.

(Key words : co-culture, oviductal epithelial cells, embryo, mouse)

* 단국대학교 의과대학 산부인과학교실 (Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Dankook University)

서 론

최근 수정란 이식기술의 급속한 발달로 난자와 수정란의 생산과 이용에 관한 많은 연구가 진행되고 있으나 현재까지는 체외수정 및 배아이식을 통한 임신율의 향상에 큰 진전이 없는 상태이다. 이는 부적절한 체외배양 환경이 큰 요인으로 작용하며 이러한 문제점을 극복하기 위한 기초 연구로 적합한 체외배양 조건과 초기배 발달을 좌우하는 요소들에 대한 다양한 연구가 이루어져 오고 있다. 그러나 아직까지 체내와 유사한 배양조건의 확립에 대해서는 미비한 실정이다.

배양조건에 관한 연구로는 배양액의 조성을 변화시키거나 구성 성분을 난관액과 비슷하게 제조하고 (Eyestone 등, 1991; Gardner 등, 1990; Borland 등, 1980), 단백질원으로는 albumin (Ashwood-Smith 등, 1989; Caro와 Trounson, 1984)이나 혈청을 첨가 (Kane, 1987)하여 배아의 체외 발생율과 임신율을 증가시키고자 하는 (Shirley 등, 1985; Leung 등, 1984) 많은 연구가 있었다. 이러한 배양액의 개발과 함께 배아의 발생을 향상시키기 위한 다른 방법으로는 초기배를 난관에 이식하여 배양 (Whittingham과 Bigger, 1967)하거나 생식기관으로부터 얻은 세포와 공배양하여 체내와 유사한 체외배양환경을 만들어 줌으로써 배발달을 증진시키는 배양방법이 연구되었다.

공배양에는 자궁 (Goodeaux 등, 1989), 난관 또는 trophoblastic cell (Camous 등, 1984)과 Vero cell과 같은 세포주를 이용한 방법 (Menezo 등, 1990) 등이 사용되고 있으며 특히, 난관상피세포가 채취와 배양이 용이하고 발생능의 향상 효과도 높아 인간을 포함한 여러 동물의 배발달에 좋은 영향을 미친다 (Katska 등, 1995; Kano 등, 1994; Wiemer 등, 1991)고 하였다. 공배양의 효과에 대한 기전은 명확히 밝혀져 있지 않지만 수정란과 상피세포와의 공배양시 배양액내에 존재하는 독성물질을 중화시키거나 성장인자, 호르몬 등이 분비되어 배아의 성숙과 발달을 향상시키며 발생을 저해하는 물질을 제거하는 효과를 얻을 수 있다 (Bavister, 1988). 다른 종의 난관 상피세포와의 공배양 효과에

대한 연구에서도 배발달율과 특히 배반포로의 발달율에 좋은 효과를 나타내며 (Sparks 등, 1992; Xu 등, 1992; Minami 등, 1988; Eyestone 등, 1985) 사용되는 세포의 종이나 조직에 대한 특이성이 없는 것으로 알려져 있다.

이에 본 연구에서는 마우스 초기배를 소 및 돼지의 난관 상피세포와 공배양하여 배양액 단독으로 배양된 경우와 비교하여 체외 발달율이 향상될 수 있는지를 평가하여 안정되고 효과적인 배양체계를 마련하기 위한 기초연구로 본 실험에 착수하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험에 사용된 실험동물은 본교 실험동물사육실에서 사육된 ICR 계통의 생쥐를 사용하였다. 자성은 4~6주령, 체중은 20~30g의 것을, 웅성(교배용)은 12~16주령, 체중은 30~45g으로 한 우리에 한마리씩 사육하면서 번식능력이 확인된 것을 실험에 사용하였다. 사육실 환경은 온도(22~25℃), 일조(light : dark = 11 : 13) 및 환풍은 자동조절하였으며, 사료(삼양사)와 물은 자유급식시켰다.

2. 배양액의 제조

본 실험에 사용된 배양액은 배아 및 난관세포의 회수에는 heat-inactivated된 7.5% FCS (Gibco, Life Technologies, Inc. USA)이 함유된 D-PBS (Gibco)를 이용하였고 배아 및 난관세포의 배양에는 복합배양액으로서 Ham's F-10 (Gibco), TCM 199 (Gibco)과 MediCult IVF 배양액 (Medicult, Medi-Cult a/s, Denmark)을 사용하였다.

각 배양액에는 모두 75mg의 penicillin G (Sigma, Sigma Chemical Co., USA)와 streptomycin sulfate (Sigma)를 첨가하였고 Ham's F-10에는 Ca-lactate (Calbiochem, Calbiochem-NovaBiochem Co., USA) 245.2mg과 sodium bicarbonate (Sigma) 2,106mg을, TCM 199에는 Ca-lactate 245.2mg과 sodium bicarbonate 2,200mg을 추가로 첨가하여 제조하였고 0.1N의 HCl과 NaOH를 사용하여 pH는 7.4~7.6으로, 삼투압은 280~285mOsm/kg으로 보정하여 사용하였다.

Ham's F-10 및 TCM 199의 단백질원으로는 태아제대혈청을 15%의 농도로 첨가하여 사용하였다. 배양액제조에 사용된 물은 역삼투압 초순수 정수기에 의해 여과된 정제수를 사용하였고 제조직전에 정수하여 사용하였다.

3. 혈청의 제조

본교병원의 산부인과에서 정상분만 또는 제왕절개시의 제대혈액(HCS)을 채취하여 사용하였다. 혈액의 채취는 태아에 문제가 없고 달을 다 채운 건강한 경우에만 하였으며 용혈이 일어난 혈액은 제외하였다.

무균적으로 채취한 혈액을 멸균된 50ml 원심분리관(Nunc Inc., Denmark)에 담고 labelling을 하여 환자의 혈액이 서로 섞이지 않도록 한 후 4℃ 냉장고에서 6~12시간 보존하여 응고시킨 후 상층부분을 분리하여 1차 원심분리(3,000rpm, 10분)한 후 다시 상층액을 모아 2차 원심분리(3,000rpm, 10분)하여 혈청만을 분리하였다. 분리된 혈청은 56℃의 항온수조에서 45분간 heat-inactivated 한 후 0.22 μ m syringe filter(Syrfil-MF, Costar Co., USA)로 여과 후 -20℃ 냉동실에 보관하여 사용하였다.

실험성적에 대한 균일성을 위하여 사용전에 마우스 초기배를 이용한 정도관리(quality control)를 실시하였다. 실험시에는 각 처리구마다 동일한 혈청을 사용하였다.

4. 난관 상피세포의 준비

1) 소 및 돼지 난관 상피세포의 준비

천안 근교의 도축장에서 도살직후에 적출된 난관을 penicillin G(75mg/L), streptomycin sulfate(75mg/L)와 amphotericin B(0.25mg/L, Sigma)가 포함된 D-PBS로 세척 후 알루미늄호일로 잘 포장하여 얼음을 채운 보온상자에 넣어 1시간내에 실험실로 운반하였다. 난관주위의 결체조직과 혈액 등을 깨끗이 제거한 후 70% isopropyl alcohol에 약 15초간 담근 후 다시 항생제가 포함된 D-PBS로 3회 세척하였다. 멸균된 거어자로 난관 표면을 깨끗이 닦아낸 후 오염의 가능성이 있는 양 끝부분을 약 1cm 정도 잘라낸 뒤에 멸균된 petri dish(100mm,

녹십자)내에서 난관협부 끝부분에서 누두부 방향으로 slide glass를 이용하여 난관 표면을 부드럽게 scrapping 후(Eyestone 등, 1989) 일회용 주사기(5ml)를 이용하여 D-PBS(7.5% FCS) 2ml씩을 관류시켜 난관 상피세포를 15ml의 원심분리관(Nunc 335165)에 회수하였다. 채취된 상피세포를 300×G에서 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 다시 D-PBS로 부유시켜 같은 방법으로 세척하였다. 세척 후 상층액은 버리고 침전된 상피세포 덩어리(pellet)에 1ml의 D-PBS를 첨가하여 일회용 주사기(1ml)를 이용하여 서서히 흡입하고 부유시키는 과정을 약 3회정도 되풀이하여 세포덩어리를 잘게 부수고 최종적으로 2ml의 D-PBS를 첨가하여 동일한 방법으로 세척하여 상피세포를 획득하였다.

2) 난관 세포계의 배양

분리된 난관상피세포의 초기배양을 위하여 각각의 배양액(15% HCS가 첨가된 Ham's F-10, TCM 199과 MediCult IVF 배양액)을 1ml씩 첨가하여 잘 혼합한다. 혈구계측기(Superior, Germany)를 사용하여 세포수를 세고(Dawson, 1992) 4ml의 배양액에 최종 농도가 10⁶ cells/ml이 되도록 세포수를 조절한 뒤 배양플라스크(Nunclon)에 넣어 CO₂ 배양기(Forma, Forma Scientific Inc., USA)에서 37℃, 5% CO₂, 100% humidity 상태에서 배양하였다. 배양의 확인은 배양을 시작하여 3일 경과후 역반사현미경하에서 하였고 부착된 단일층의 정도를 확인한 후 배양액을 교체하였으며 이후 2일 간격으로 배양액을 교체하였다. 세포들의 증식양상은 처음 3일간은 상피세포 덩어리 주변에서 소용돌이모양으로 퍼져 나가며 완전한 상피세포 단일층(epitheloid monolayer)이 형성 될 때까지는 약 7~10일이 소요되었다(Fig. 1).

계대배양은 완전한 단일층이 형성된 상피세포에 0.25% trypsin-0.53mM EDTA를 4ml 첨가하여 15분간 배양하여 세포들을 분리시킨 후 초기의 세포 회수시와 동일한 방법으로 2회 세척하였다. 세척 후 세포수를 10⁵ cells/ml로 조절하여 4-well 조직배양 접시(Nunc)에 분주하여 계대배양을 시작하였다. 계대배양시 살아있는 상피세포는 조직배양접시에 잘 부착되어 증식을 시작하고 죽은 세포는 부유되

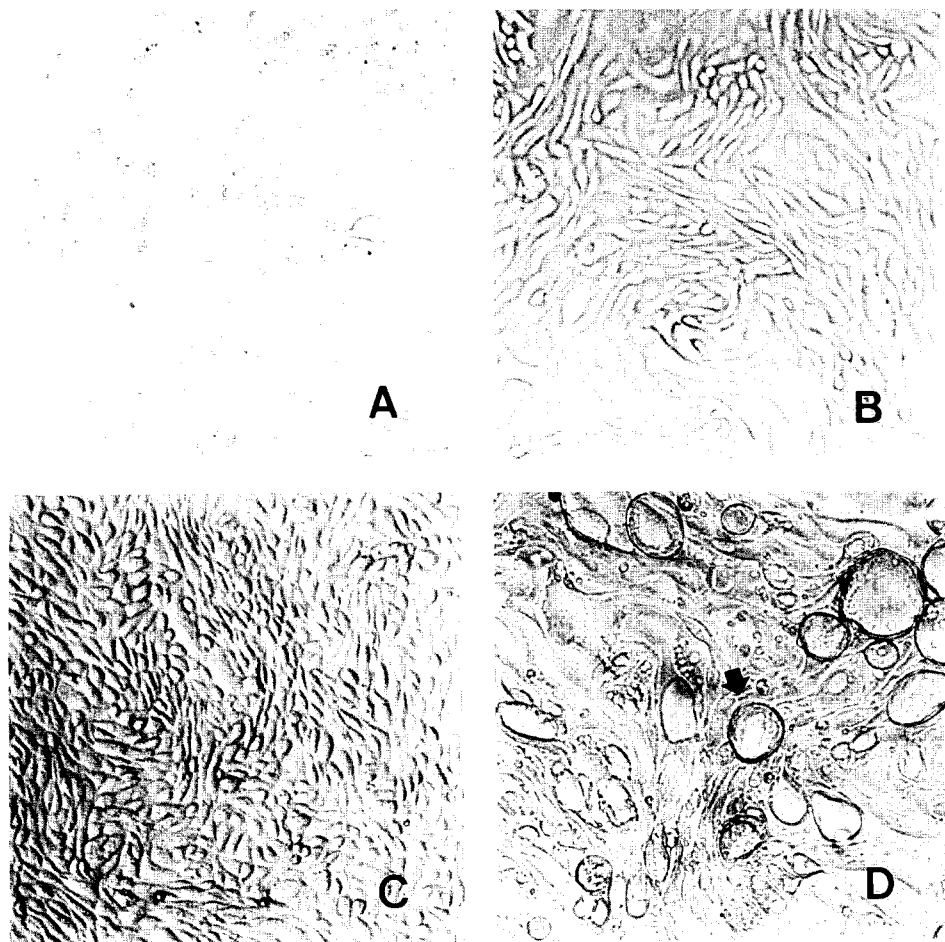


Fig. 1. Microphotographs of oviductal epithelial cells forming confluent monolayer.

A, BOEC cells in monolayer culture are polygonal in shape and form round colonies. Primary culture after 4 days (X100). B, a larger round colony of BOEC becoming confluent. Primary culture after 10 days (X100). C, POEC becoming confluent. Primary culture after 10 days (X100). D, in secondary cultures, morphology of the individual cells is also similar to those in the primary culture and showing spherical vacuolated structure(arrow) lying over the surface of BOEC in monolayer. Secondary culture after 7 days (X100).

어 위로 떠오르게 되며 부유된 상피세포는 배양액 교체시에 제거하였다. 배양액의 교체는 48시간마다 하였고 배양접시 표면에 약 70% 정도로 단일층이 형성되었을 때 공동배양에 이용하였다.

5. 다배란 유도 및 배아의 회수

1) 다배란유도

암컷 생쥐의 복강에 7.5 I.U.의 PMSG(Sigma)과 7.5 I.U.의 hCG(Sigma)를 각각 48시간 간격으로 주사하여 다배란 유도를 하였다. hCG 주사후 즉시 암컷을 수컷 우리에 넣어 자연교미를 유도하였으며 교미의 여부는 hCG 주사 후 12~14 시간에 암컷의 질전 유무를 관찰하여 질전이 확인되면 교미가 이루어진 것으로 간주하였다.

2) 2-세포기 배아의 회수

2-세포후기 배아의 회수를 위해 hCG 주사 44~48시간 경과 후 경추탈구로 도살하고 복부를 절개하여 양 난관을 무균적으로 채취하였다. 채취된 난관을 D-PBS 1ml 이 들어있는 배양접시(Nunc)에 옮긴 후 3회 세척하였다. 다시 1ml의 D-PBS(7.5% FCS)가 들어있는 배양접시에 옮긴 후 실체현미경(Olympus, Japan)하에서 30-gauge needle이 부착된 일회용 주사기(1ml)로 누두부에서 난관협부쪽으로 D-PBS 0.2ml을 관류하여 후기 2-세포기 수정란을 회수하였다. 회수된 수정란은 다시 D-PBS에서 3회 정도 세척하여 cell debris를 제거하였다. 세척 후 형태적으로 정상적인 수정란만을 실험에 공시하여 공동배양하는 군과 배양액 단독으로 배양하는 군으로 무작위로 나누어 배양하였다.

6. 배아의 배양 및 발생관찰

1) 배양액에서의 배양

기본 배양으로는 사람의 체외수정에 많이 이용되는 Ham's F-10, MediCult IVF 배양액과 동물실험에서 많이 사용되는 TCM 199을 사용하였다. Ham's F-10과 TCM 199의 난백질원으로는 태아제대혈청을 15% 혼합하여 사용하였고 MediCult IVF 배양액은 별다른 첨가없이 그대로 사용하였으며 paraffin oil drop method(Brinster, 1963)로 배양하였다. 각 배양액을 20 μ l씩 배양접시에 5~6개의 microdrop을 만든 후 paraffin oil(Sigma)로 피복시킨 후 micropipette 을 이용하여 30 μ l의 배양액을 추가하여 총 volume이 50 μ l인 drop을 만들고 여기

에 회수된 초기배를 10개씩 각 drop에 옮겨 배양하였다. 발생관찰은 초기배 회수시부터 96시간까지 매 24시간마다 하여 발달율을 조사하였다.

2) 난관 상피세포와 공배양

회수된 2세포후기 배아를 계대배양된 상피세포와 공배양하여 발생율을 조사하였다. 각 난관 상피세포의 monolayer가 형성된 4-well 배양접시내에 수정란을 투입, 공배양하여 후기배로의 발달상태를 관찰하였다. 발달관찰은 매 24시간 간격으로 96시간까지 하였고 배양액은 48시간마다 교체하였다.

7. 통계처리

통계학적 분석은 T-test를 실시하였으며, p값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 배양액간의 체외발달율

hCG 투여 후 48시간만에 회수한 마우스 후기 2-세포후기배를 96시간 동안 체외배양시켜 그 발달율을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

각 배양액간의 배반포 발달율은 TCM 199에서 84.4%, Ham's F-10에서 83.1% 및 MediCult IVF 배양액에서 81.5%로 TCM 199에서 가장 높은 배반포 형성율을 보였으나 통계적인 유의차는 보이지 않았고 부화율은 각각 50.3, 51.5, 49.9%로서 Ham's F-10에서 배양한 군에서 높은 부화율을 나타냈으나 역시 통계적인 유의차는 보이지 않았다.

본 실험에서 사용된 3종류의 복합배양액은 여러 종류의 무기염류외에 아미노산, 비타민 및 여러 영

Table 1. *In vitro* development of 2-cell mouse embryos culture in different media

Media	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		Blastocyst	Hatching	Degeneration
TCM 199/HCS	250	211 (84.4 \pm 2.35) ^{NS}	126 (50.3 \pm 6.72) ^{NS}	39 (15.6 \pm 2.35) ^{NS}
Ham's F-10/HCS	250	208 (83.1 \pm 3.39) ^{NS}	129 (51.5 \pm 3.03) ^{NS}	42 (16.9 \pm 3.39) ^{NS}
MediCult IVF	250	204 (81.5 \pm 5.45) ^{NS}	125 (49.9 \pm 6.11) ^{NS}	46 (18.5 \pm 5.45) ^{NS}

양소가 포함되어 있으며 이중 TCM 199, Ham's F-10은 소, 돼지 등 여러 포유동물의 난자 및 배아의 배양과 상피세포 등의 세포배양에 주로 이용되며 MediCult IVF 배양액은 주로 사람 배아의 배양과 세포배양 등에 주로 사용되고 있는 배양액이다. 이들 3종류의 배양액에서 마우스 초기배를 배양한 결과 배반포 형성과 부화율에서 모두 커다란 차이가 나타나지 않았지만 배반포 형성이 MediCult IVF 배양액보다 TCM 199과 Ham's F-10에서 조금 높게 나타난 것은 이들 배양액에 단백질원으로 첨가된 혈청에 의한 효과로 생각된다.

혈청은 배아의 발생을 촉진시키는 에너지원과 성장촉진인자 외에도 배아의 발달에 유해하거나 성장을 저해하는 인자를 동시에 함유하고 있다(Ogawa 등, 1987)는 보고가 있다. 이러한 문제점이 있음에도 혈청을 사용하는 이유는 세포의 생리작용에 필요한 에너지나 growth factor, vitamin 등의 공급과 배아의 유착과 경화를 방지하는 효과(Kane, 1987)와 같은 배양환경을 개선시키는 효과가 있기 때문이다. 본 실험에서도 이러한 혈청의 효과로 인해 미약하지만 단백질원으로 혈청을 첨가한 배양에서 발생율이 높아진 것으로 사료된다.

2. 난관 상피세포와의 공배양 효과

난관 상피세포와 마우스 초기배를 공배양하여 얻은 배발달율은 Table 2, 3과 같다(Fig. 2). BOEC에서 공배양한 경우 배반포로의 배발달율은 TCM 199에서 96.5%, Ham's F-10에서 95.5%, MediCult IVF 배양액에서 94%를 나타냈으며 부화율은 각각의 배양액에서 90.5, 89.5, 85.5%를 나타내었다.

POEC과의 공배양에서도 배반포로의 배발달율은 TCM 199에서 97%, Ham's F-10에서 94.5%, MediCult IVF 배양액에서 91%를 나타냈으며 부화율은 각각 89, 90, 84.5%를 나타내었다. BOEC에서 배양한 경우에 부화율에서 TCM 199, Ham's F-10 두 배양액과 MediCult IVF 배양액간의 유의차가 인정되었고 POEC에서 배양한 경우에는 전 발달단계에 걸쳐 TCM 199, Ham's F-10 두 배양액과 MediCult IVF 배양액 간의 유의차가 인정되었다($P < 0.05$).

난관 상피세포와 배아와의 공배양은 배양액만으로 단독 배양하는 경우에 빈번히 발생하는 배세포의 분할정지, 퇴화 및 배세포의 질이 저하되는 것을 현저히 감소, 개선시킬 수 있으며 생체내의 환경과 가장 근접한 배양방법으로서 난관 내부와 유사한 환경을 조성하여 배아 발달율을 높일 수 있다고 여러 연구자들에 의해 이미 알려져 왔다. 또한 현재까지의 연구보고에 의하면 난관 상피세포를 포함한 여러 종류의 체세포와 수정란을 공배양할 경우 수정란의 체외발달을 촉진시키고 배반포 발달율과 부화율의 증가와 더불어 세포수의 증가가 나타난다고 알려져 있다.

공배양에 사용되는 난관 상피세포는 일반적으로 1차 배양 또는 2차 이상 계대배양된 세포를 사용하나 섬모세포와 분비세포가 서로 혼합되어 있는 1차 배양세포보다는 분비세포로만 구성되어 세포 분할 및 발달에 필요한 영양소를 공급하는 계대배양세포를 주로 사용하며 본 실험에서도 2차 계대 배양된 세포를 사용하여 발달율과 부화율을 조사하였다.

마우스(Minami 등, 1992), 돼지(White 등, 19

Table 2. *In vitro* development of 2-cell mouse embryos when co-cultured with bovine oviductal epithelial cells in different media

Media	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		Blastocyst	Hatching	Degeneration
TCM 199/HCS	200	193 (96.5±2.56) ^{NS}	181 (90.5±3.66) ^a	7 (3.5±2.56) ^{NS}
Ham's F-10/HCS	200	191 (95.5±2.56) ^{NS}	179 (89.5±2.07) ^a	9 (4.5±2.56) ^{NS}
MediCult IVF	200	188 (94.0±3.02) ^{NS}	171 (85.5±3.66) ^b	12 (6.0±3.02) ^{NS}

^{a, b} Table with different superscripts in the same column was significantly different at $P < 0.05$.

Table 3. *In vitro* development of 2-cell mouse embryos when co-cultured with porcine oviductal epithelial cells in different media

Media	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		Blastocyst	Hatching	Degeneration
TCM 199/HCS	200	194 (97.0±1.85) ^a	178 (89.0±4.14) ^a	6 (3.0±1.85) ^a
Ham's F-10/HCS	200	189 (94.5±2.98) ^a	180 (90.0±4.7) ^a	11 (5.5±2.98) ^a
MediCult IVF	200	182 (91.0±3.55) ^b	169 (84.5±3.96) ^b	18 (9.0±3.55) ^b

^{a, b} Table with different superscripts in the same column was significantly different at P<0.05.

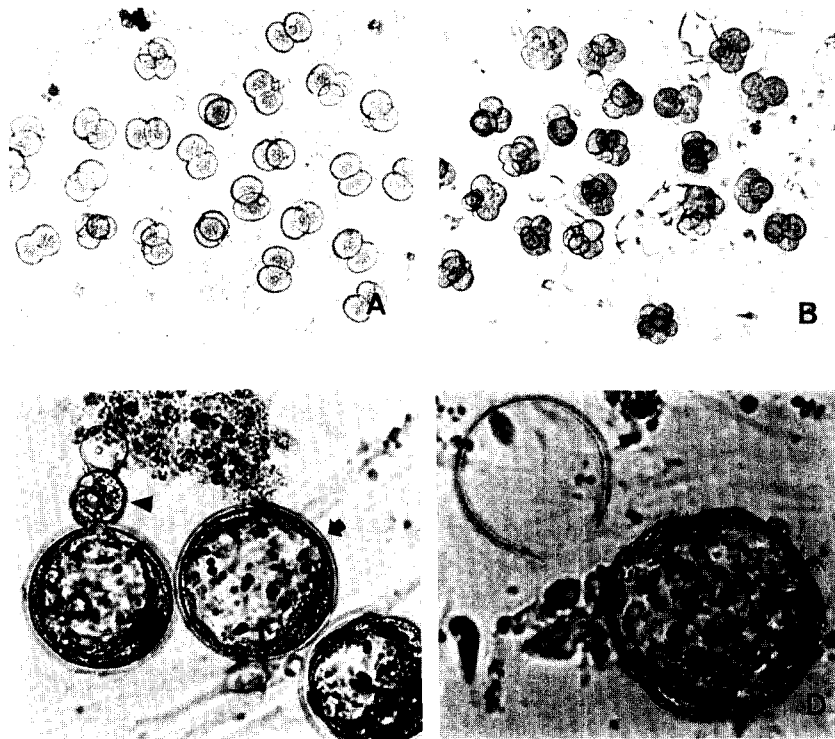


Fig. 2. Microphotographs of mouse embryos co-cultured with oviductal epithelial cells *in vitro*. Note epithelial cells in background.

A, 2 cell embryo (X 50)

B, 4 cell embryo (X 50)

C, fully expanded(arrow) and hatching blastocyst(arrow head)(X 100)

D, hatched blastocyst (X 100)

89), 소(McCaffrey 등, 1991), 양(Watson 등, 1994) 등 여러 포유동물의 수정란 혹은 2세포 배아를 난관 상피세포와 공배양하였을 경우 대조군에

비하여 매우 높은 배반포로의 발달율을 볼 수 있다. 다른 종의 난관 상피세포와의 공배양 효과에 대한 연구에서도 배발달율에 좋은 효과를 나타내며(Sp-

Table 4. *In vitro* development of 2-cell mouse embryos when co-cultured and cultured media only

Media	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		Blastocyst	Hatching	Degeneration
Media only	750	623 (83.0±3.96) ^a	380 (50.6±5.33) ^a	127 (17.0±3.96) ^a
Co-culture	1,200	1,137 (94.8±2.69) ^b	1,058 (88.2±3.33) ^b	63 (5.3±2.69) ^b

^{a, b} Table with different superscripts in the same column was significantly different at $P < 0.05$.

arks 등, 1992) 사용되는 세포의 종이나 조직에 대한 특이성이 없는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서도 난관 상피세포와 마우스 배아를 공배양하였을 때 배양액에서만 배양된 배아와의 비교시 높은 배반포 발달율과 부화율을 나타내었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 난관 상피세포에서 분비된 물질이 배아의 후기발생에 작용하여 세포의 증식을 촉진시키고 배아의 발달을 억제하는 물질들이 제거됨으로서 발달율과 부화율이 높게 나타난다고 사료되며 (Bongso 등, 1989b), 특히 난관상피세포에서 분비되는 배아 성장촉진인자에 의한 효과가 주된 원인인 것으로 생각된다.

3. 배양액과 공배양간의 발달율 비교

배양액에서 배양한 군과 공배양한 군과의 체외 발달율 비교는 Table 4와 같다. 배양액군에서의 전체 발달율의 경우 배반포로의 배발달율은 83.0%, 부화율은 50.6%, 퇴화율은 17.0%로 나타났으며 공배양한 군에서는 배반포 94.8%, 부화 88.2%, 퇴화 5.3%로서 두 군간의 체외발달율에는 전 발달단계에 걸쳐 배양액군과 공배양군 간의 고도의 유의차가 인정되었다 ($P < 0.05$).

본 연구에서는 배양액 단독배양군에서 보다는 공배양군에서 훨씬 높은 배발달율을 나타냈다. 이러한 결과는 난관 상피세포와 공배양시 체내와 유사한 환경을 조성해 체외발달율에 있어서 상당한 효과를 나타내는 것으로 보인다. 현재까지의 연구보고로는 다양한 종류의 체세포와 수정란을 공배양할 경우 일반적으로 수정란의 체외 발달율을 촉진시켜 배반포로의 발달율 향상, 부화율의 증가와 더불어 세포수의 증가가 이루어진다고 알려져 있으나 이러한 공배양이 배아의 발달에 어떠한 작용을 하는지

는 분명하지 않다. 그러나 공배양시 배양액내의 세포 독성물질 제거 (Flood와 Shirley, 1991), growth factor의 방출 (Simmen 등, 1993) 및 glycine, glutathione 등과 같은 산화 방지 물질의 방출 (Rieger, 1992) 등과 같은 효과로 인해 발달율이 향상되는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 소와 돼지의 난관 상피세포가 마우스 초기배의 체외발달에 미치는 영향과 체외배양에 있어 최적의 배양조건을 알아보기 위하여 실시하였다. ICR 계통의 마우스에 PMSG와 hCG를 주사하여 나배란을 시킴과 동시에 자연교미를 실시하였고 48시간 후에 경추탈구로 도살하여 난관에서 2-세포 기배를 회수하였다. 회수된 배아는 TCM 199, Ham's F-10 및 MediCult IVF 배양액에서 96시간 체외배양하여 배 발달능력에 대한 이들 배양액간의 차이를 조사하였다. 아울러 이들 초기배를 소 또는 돼지의 난관 상피세포와 공배양을 실시하여 공배양의 효과를 조사하였다.

마우스 초기배는 TCM 199, Ham's F-10 및 MediCult IVF 배양액에서 각각 84.4, 83.1 및 81.5%의 배반포 발달률을 보였다. TCM 199 또는 Ham's F-10 배양액에서 소 난관상피세포 또는 돼지 난관상피세포와 공배양할 경우 91~97%의 매우 높은 배반포 발달률을 보였으며 난관 상피세포간의 배반포 발달률의 차이는 나타나지 않았다. 또한 배양액에서 배양한 군과 공배양한 군과의 체외발달율 비교에서는 공배양군에서 고도의 유의차가 인정되었다 ($P < 0.05$).

결론적으로 난관 상피세포인 BOEC와 POEC는

마우스 초기배아와의 공배양시 배아의 발달률과 부화율을 향상시켰다. 따라서 난관 상피세포를 이용한 공배양 방법은 초기배아의 발달에 이로운 영향을 주어 배의 발달과 포배발달을 향상시키는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ashwood-Smith MJ, Hollands P and Edwards RG. 1989. The use of Albuminar(TM) as a medium supplement in clinical IVF. *Hum. Reprod.*, 4:702-705.
- Bavister BD. 1988. Role of the oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 29:113-154.
- Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M and Ratnam SS. 1989b. Improved quality of human embryos with co-cultured with human ampullary cells. *Hum. Reprod.*, 4:706-713.
- Borland RM, Biggers JD, Lechene CP and Taylor ML. 1980. Elemental composition of fluid in the human fallopian tube. *J. Reprod. Fert.*, 58:479-482.
- Brinster RL. 1963. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp. Cell Res.*, 30:205-208.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W and Menezo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fertil.*, 72:479-485.
- Caro CM and Trounson AO. 1984. The effect of protein on preimplantation mouse embryo development *in vitro*. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.*, 1:183-187.
- Dawson M. 1992. Initiation and maintenance of cultures, CELL CULTURE LABFAX, Butler M, and Dawson M, BIOS Scientific Publishers Ltd, St. Thomas House, Becket Street, Oxford, 25-42.
- Eyestone WH, Jones JM and First NL. 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, 92:59-64.
- Eyestone WH, Northey DL and Leibfried-Rutledge ML. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.*, 32(Suppl. 1), 100a(Abstr.).
- Flood LP and Shirley B. 1991. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:226-231.
- Gardner DK and Leese HJ. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 88:361-368.
- Goodeaux LL, Voelkel SA, Anzalone CA, Menezo Y and Craves KH. 1989. The effect of rhesus uterine epithelial cell monolayer on *in vitro* growth of rehesus embryos. *Theriogenology*, 31:197.
- Kane MT. 1987. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 37:775-778.
- Kano K, Miyano T and Kato S. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42:1061-1068.
- Katska L, Rynska B and Smorag Z. 1995. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocyte. *Theriogenology*, 43:859-870.
- Leung PCS, Gronow MJ, Kellow GN, Lopata A, Speris AL, McBain JC, duPlessis YP and Johnston I. 1984. Serum supplement in human *in vitro* fertilization of embryo development. *Fertil. Steril.*, 41:36.
- McCaffrey C, McEvoy TG, DisKin MG, Gwazdauska FC, Kane MT and Sreenan JM. 1991. Successful co-culture of 1-4-cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. *J.*

- Reprod. Fert., 91:119-124.
- Menezo YJR, Guerin JF and Czyba JC. 1990. Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of vero cells. Biol. Reprod., 42:301-306.
- Minami N, Bavister BD and Iritani A. 1988. Development of hamster two-cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system. Gamete Research., 19:235-240.
- Minami N, Utsumi K and Iritani A. 1992. Effects of low molecular weight oviductal factors on the development of mouse one-cell embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 96:735-745.
- Ogawa T, Ono T and Marrs RP. 1987. The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos. J. *In Vitro* Fert. Embryo Transfer., 4:153-158.
- Riger D, Loskutoff NM and Betteridge KJ. 1992. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-culture *in vitro*. J. Reprod. Fert., 95:585-595.
- Shirley B, Wortham JW Jr., Witmyer J, Condon-Mahony M and Fort G. 1985. Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture media. Fertil. Steril., 43(1):129-134.
- Simmen RCM, Ko Y and Simmen FA. 1993. Insulin-like growth factors and blastocyst development. Theriogenology, 39:163-175.
- Sparks AET, Gwazdauskas FC and McGilliard ML. 1992. Culture of one-cell bovine embryos in explanted mouse oviduct and bovine oviductal epithelial cells. Theriogenology, 37:587-594.
- Watson AJ, Watson PH, Warnes D Walker SK, Armstrong DT and Seamark RF. 1994. Preimplantation development of *in vitro*-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. Biol. Reprod., 50:715-724.
- White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DL Jr. and Wood TC. 1989. Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. Biol. Reprod., 41:425-430.
- Whittingham DG and Bigger JD. 1967. Fallopian tubes and early cleavage in the mouse. Nature., 213:942-943.
- Wimer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Develop., 30:330-338.
- Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ and King WA. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocyte matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. J. Reprod. Fert., 94:33-43.