韓國受精卵移植學會誌(1997) 第 12 卷 第 3 號
Korean J. Emb. Trans. (1997) Vol. 12, No. 3 pp. 247~251

Phytohemagglutinin-M(PHA-M)으로 응집한 마우스 키메라배의 체외발생능력

김 광 식 · 송 해 범
대구대학교 자연자원대학

Developmental Capacity of Chimeric Embryo Aggrigated with Phytohemagglutinin-M(PHA-M) in the Mouse

K. S. Kim and H. B. Song
College of Natural Resources, Taegu University

SUMMARY

This research was conducted to observe developmental capacity of the early embryos aggrigated to phytohemagglutinin-M(PHA-M) in the culture of mouse embryos *in vitro*.

The results showed that the development of blastocyst increased to 2-cell×2-cell : 68.9%, 4-cell×4-cell : 92.5% and 8-cell×8-cell : 97.3% in the aggrigated embryos of ICR mouse, and 2-cell×2-cell : 90.0%, 4-cell×4-cell : 93.9% and 8-cell×8-cell : 100% in the aggrigated embryos of two different strains (ICR × CBA/J mouse).

(Key words : aggrigated embryos, *in vitro* 2-cell block, phytohemagglutinin-M, blastocyst)

서 론

마우스의 초기배를 체외배양하는 경우 일부 계통에서 2세포기에 난할이 정지되는데 이와 같은 현상을 세포분열중지(*in vitro* 2-cell block)현상이라고 보고하였다(Cole 과 Paul, 1965).

다른 포유동물에서도 이러한 현상이 관찰되어 hamster 2, 4세포기(Yanagimachi 와 chang, 1964 ; Whittingham 과 Bavister, 1974), rat 2, 4세포기(Whittingham, 1975), 토끼 상실배(Kane, 1987), 돼지 4세포기(Davis 와 Day, 1984), 소 8, 12세포기(Thibault, 1966), 사람 4, 8세포기(Braude 등, 1988)에 각각 체외배양시 세포분열중지현상이 일어나는 것으로 보고되었다.

Whitten과 Biggers(1968)는 단순배양액으로 C57BL/10J × SJL/J 마우스의 F_1과 SJL와 C57BL/10J 마우스의 초기배를 배양하여 block종과 non-block종의 외형적인 특징을 구분하였고, Muggleton-Harris와 Brown(1982)은 체외발생중지현상이 없는 마우스 계통으로부터 초기배의 세포질 소량을 난할중지가 있는 마우스 계통의 초기배에 이식하여 난할중지를 극복하였다고 보고하였으나 체외배양에서 세포분열중지현상의 극복방법으로는 충분한 결과를 얻지 못하고 있다.

본 연구는 체외배양에서 세포분열중지현상을 극복하기 위한 방법으로 세포질응집에 의한 세포질간의 물질교환 및 발생자극의 효과를 검토하기 위해 ICR계통과 CBA/J계통의 마우스로부터 회수한 초기배의 투명대를 acid tyrode로 처리하여 제거한 후

이 논문은 1997학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

phytohemagglutinin-M(PHA-M)을 이용하여 여러 유형의 응집조합을 만들어 체외배양하여 배발생 능력을 관찰하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 초기배의 회수

3~4주령의 ICR 및 CBA/J계통 마우스 암컷과 12주령 이상된 수컷을 선발하여 14시간 점등, 10시간 소등 조건에서 사육, 시험 1주일 전에 동물개체차이를 최소화하기 위하여 수컷 1마리씩, 암컷 3~4마리씩 각각 별개의 케이지에 나누어 관리하였다. 오전 12:00에 7.5IU PMS를 복강내 주사하고, 48시간 후에 5.0IU hCG를 복강내 주사하여 과배란을 유기하였다.

hCG 주사와 동시에 암·수 1:1로 합사시킨 후 다음날 아침 10:00에 질전(vaginal plug)을 확인하여 교미여부를 판정하였으며, 교미가 확인된 개체는 hCG 주사 후 34시간(34h post-hCG)에 희생시켜 난관을 분리하였다. 분리된 난관은 혈액 및 지방을 제거한 후 4mg bovine serum albumin(BSA)/ml이 첨가된 M16배양액 (Table 1)으로 관류하여 초기배를 회수하였다(송 등., 1992).

2. 응집 키메라배의 체외배양

Table 1. Composition of M16 medium*

Compound	mM	Mol. wt.	g/l
NaCl	97.84	58.45	5.719
KCl	1.42	74.557	0.106
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.47	203.33	0.096
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.36	358.16	0.129
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.78	147.2	0.262
$NaHCO_3$	25.0	84.02	2.101
Na lactate	24.9	112.1	4.652 (60%syrup)
Na pyruvate	0.47	110.0	0.052
Glucose	5.56	179.86	1.0
Penicillin G, K salt			0.06
Streptomycin			0.05
Phenol red			0.01

* Quinn *et al.*, 1982.

Table 2. Composition of Tyrode solution

Compound	g/100ml
NaCl	0.8
KCl	0.2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.024
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.01
Glucose	0.1
PVP	0.4

투명대를 제거하는데 사용한 용액은 먼저 비이커에 일정량의 NaCl을 넣은 후 여기에 약 50ml의 2차 증류수를 첨가하고, 0.2N의 HCl로 pH를 1.8~2.0으로 조절하면서 2차 증류수를 첨가하여 100ml로 맞추어 Tyrode solution(Table 2)을 만들고 0.45 μm millipore filter로 여과한 다음 5ml씩 분주하여 −20℃에 보존하였다. 초기배의 투명대를 제거하기 위하여 acid tyrode 100 μl drop을 culture dish (60×15mm, Falcon Becton Dikinson Laware, U.S.A)의 중앙에 만들고 그 주변에 M16 및 M16+BSA 용액으로 30~50 μl drop 을 4~5개 만들어 paraffin oil을 덮어 5% CO_2, 37℃ incubator에 준비했다가 회수된 초기배를 pasteurize pipet을 이용하여 acid tyrode용액 drop으로 옮겨 현미경 하에서 투명대가 제거되는 것부터 순서대로 M16 및 M16+BSA drop으로 옮겨 세척하였다.

Acid tyrode로 투명대를 제거한 zona free상태의 초기배를 500 μg/ml phytohemagglutinin-M(PHA-M ; 송과 김, 1994) drop으로 옮겨 ICR×ICR 마우스는 2-cell:2-cell, 4-cell:4-cell 및 8-cell:8-cell, ICR×CBA/J 마우스는 2-cell:2-cell, 4-cell:4-cell 및 8-cell:8-cell로 서로 붙여 1.5~2분 동안 처리하여 응집시킨 후 M16 및 M16+BSA 용액으로 세척하여 M16+BSA 5 μl drop 1개에 응집배 1개씩을 옮겨 hCG주사 후 120시간까지 5% CO_2, 37℃ incubator에 배양하면서 58시간, 82시간 및 120시간에 체외발생능력을 각각 관찰하였다.

결과 및 고찰

ICR과 CBA/J 계통의 마우스에서 hCG주사후 34, 58 및 82시간에 회수한 2, 4 및 8세포기배의 투명대를 제거한 후, phytohemagglutinin-M으로 응

Table 3. *In vitro* development of aggrigated chimeric mouse embryos

Condition of aggrigation		No.of embryos aggrigated	No(%). of developed*		
			4-cell	8-cell~morula	Blastocyst
control		56	19(33.9)	8(14.3)	4(7.1)
ICR	2-cell × 2-cell	45	40(88.9)	35(84.4)	31(68.9)
×	4-cell × 4-cell	40		37(92.5)	37(92.5)
ICR	8-cell × 8-cell	37			36(97.3)
ICR	2-cell × 2-cell	30	28(93.3)	27(90.0)	27(90.0)
×	4-cell × 4-cell	33		31(93.9)	31(93.9)
CBA/J	8-cell × 8-cell	29			29(100)

* The 4-cell, 8-cell~morula and blastocyst were observed at 58h, 82h and 120h post-hCG.

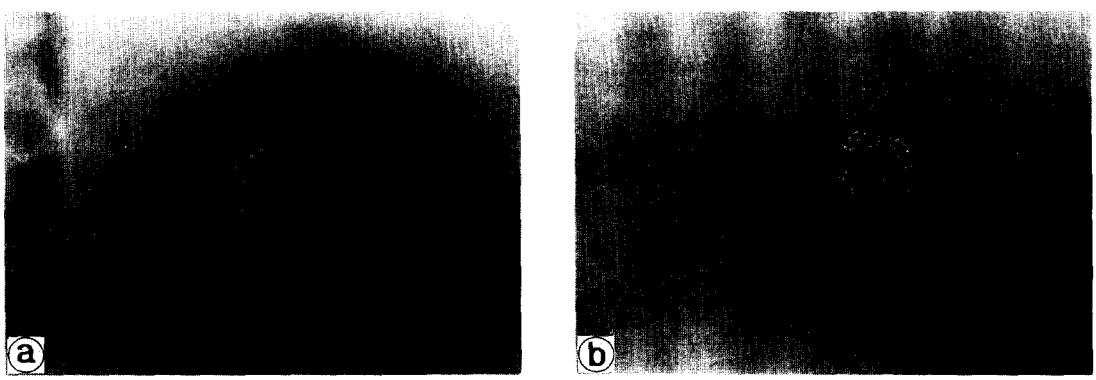

Fig. 1. Development of the early embryo aggrigated before *in vitro* culture
a : A blastocyst developed in culture of embryo aggrigated to 4-cell × 4-cell ICR mouse
b : A blastocyst developed in culture of embryo aggrigated to 8-cell ICR × 8-cell CBA/J mouse.

집시킨 다음 M16+BSA배양액으로 post-hCG 120시간까지 배양한 결과는 Table 3과 같다.

ICR 마우스의 2세포기배를 PHA-M으로 처리하지 않고 응집시켜 배양한 결과는 56개중 겨우 4(7.1%)개가 배반포를 형성하였으나, ICR 마우스의 초기배를 PHA-M으로 처리하여 응집시켜 배양한 결과는 2세포기배끼리 응집된 초기배 45개중 31(68.9%)개, 4세포기배끼리 응집된 초기배 40개중 37(92.5%)개(Fig. 1a), 8세포기배끼리 응집된 초기배 37개중 36(97.3%)개가 배반포배를 형성하였다. 또, ICR과 CBA/J 마우스의 초기배를 PHA-M으로 처리하여 응집시켜 배양한 결과는 2세포기배끼리 응집된 초기배 30개중 27(90.0%)개, 4세포기배끼리 응집된 초기배 33개중 31(93.9%)개, 8세포기배끼리 응집된 초기배 29(100%)개 모두가 배반포배를 각각 형성하였다(Fig. 1b).

응집에 의한 배발생을 관찰하기 위하여 초기배를 PHA-M으로 처리하여 쌍으로 만든 다음 M16 배양액을 이용하여 배양한 결과 대부분의 응집배가 배반포배까지 발생이 가능하였다. Muggleton-Harris와 Brown (1982)에 의하면 체외발생이 중지되는 초기배에 세포분열중지현상이 없는 종의 초기배의 세포질을 주입한 체외배양에서 발생율을 향상시켰다고 하였다. 이것은 block종인 ICR 마우스 배의

세포질에 non-block종인 CBA/J 마우스 배의 세포질이 자극함으로써 배발생이 촉진된 것으로 생각된다(송 등,1992). 또한 동일한 상태인 block 종간에 쌍으로 이루어진 응집배를 발생시켜도 70%이상의 배반포배 발생율을 보여 똑 같은 조건의 배일지라도 응집되면 서로의 발생에 도움을 주는 것으로 생각된다. 최종 발생된 배반포배의 세포수에 변화가 없어 발생중에 세포간에 조절된다는 것을 알 수 있었으며, 이식한다고 하여도 정상적인 산자의 생산이 가능할 것으로 사료된다(송과 김, 1994).

이종의 초기배를 응집한 ICR × CBA/J 마우스의 2세포기배, 4세포기배 및 8세포기배의 배반포배 발생율은 90.0, 93.9 및 100%로 동일한 배의 응집배인 ICR × ICR 마우스의 2세포기배, 4세포기배 및 8세포기배의 배반포배 발생율 68.9, 92.5 및 97.3%보다 높은 발생율을 보여 이종간에 의한 초기배의 발생자극효과가 높은 것으로 생각된다(Muggleton-Harris와 Brown, 1982).

적 요

본 실험은 가축 초기배의 체외배양중 발생되는 *in vitro* 2-cell block을 극복하기 위한 기초자료를 얻고자 hCG주사 후 34시간(34h post-hCG)에 회수한 ICR 마우스 초기배를 model로 하여 phytohemagglutinin-M(PHA-M)으로 동일조건의 배를 쌍으로 응집하여 체외발생 효과를 관찰하기 위하여 수행한 바 그 결과는 다음과 같다.

hCG주사 후 34, 58, 82시간에 회수한 ICR 마우스의 2, 4, 8세포기배를 2개씩 응집하여 체외배양한 결과 배반포배 발생율이 68.9, 92.5, 97.3%로 증가되었으며, 이종의 배와 응집된 ICR×CBA/J 마우스의 배에서는 배반포배 발생율이 90.0, 93.9, 100%로 높게 발생되어 세포질간에 자극효과에 의한 배발생 자극이 인정되었으며, 2세포기배 보다 4 및 8세포기배를 응집한 배에서 배반포배 발생이 많았다.

참고문헌

Braude PR, Bolton VN and Moore S. 1988. Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stage of preimplantation development. Nature, 332: 459-461.

Cole RJ and Paul J. 1965. Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos and cell strains derived from them. In: Preimplantation Stage of Pregnancy (Wolstenholme GEW and O'Connor M, eds.). Churchill, London, U.K., pp. 82-123.

Davis DL and Day BN. 1984. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. J. Anim. Sci., 46: 1043-1053.

Kane MT. 1987. *In vitro* growth of preimplantation of rabbit embryos. In: The Mammalian Preimplantation Embryos. (Bavister BD ed.) Plenum Press. U.S.A., pp. 193-217.

Muggleton-Harris A and Brown JJG. 1982. Cytoplasmic factors influence mitochondrial reorganization an resumption of cleavage during culture of early mouse embryos. Human Reproduction, 3(8):1020-1028.

Quinn P, Barros C and Whittingham DG. 1982. Preservation of hamster oocyte to assay the fertilization capacity of human spermatozoa. J. Reprod. Fert., 66:161-168.

Thibault C. 1966. La culture *in vitro* del'oeuf de vache. Anuls Biol. Anim. Biochem. Biophys., 6:159-164.

Witten WK and Biggers JD. 1968. Complete development *in vitro* of the preimplantation stage of the mouse in a simple chemically defined medium. J.Reprod. Fert., 17:399-401.

Whittingham DG. 1975. Fertilization, early development and storage of mammalian ova. In: The Early Development of Mammals (Balls M and Wilds AE, eds.), Cambridge University Press, London, pp.1-24.

Whittingham DG and Bavister BD. 1974. Development of hamster eggs fertilization *in vitro* and *in vivo*. J. Reprod. Fert., 38:489

-492.

Yanagimachi R and Chang MC. 1964. *In vitro* fertilization of golden hamster ova. J. Exp. Zool., 156:361-376.

송해범, 서병부, 김광식, 박성은, 이상호. 1992. 난관체류시간에 따른 생쥐 초기배의 체외발생능력. 대한불임학회지, 19:117-123.

송해범, 김광식. 1994. 생쥐 초기배 체외발생중 세포분열중지현상에 미치는 첨가물질의 효과. 한국수정란이식학회지, 9:181-188.

(접수일자 : 1997. 11. 12 / 채택일자 : 1997. 12. 20)