

**β -Mercaptoethanol과 Cysteamine 첨가와
Buffalo Rat 간세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육과
세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 영향**

박동헌 · 양부근 · 황환섭 · 정희태 · 박춘근 · 김종복 · 김정익
강원대학교 축산대학

**Effect of β -Mercaptoethanol and Cysteamine with Buffalo Rat
Liver Cells(BRLC) on Development and Intracellular Glutathione
Concentrations of Bovine IVM/IVF Embryos**

D. H. Park, B. K. Yang, H. S. Hwang, H. T. Choung, C. K. Park, J. B. Kim and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

The purpose of this experiment was to determine the effects of thiol compounds, β -mercaptoethanol(β -ME) and cysteamine, with buffalo rat liver cell(BRLC) co-culture on the development and intracellular glutathione(GSH) concentrations of bovine embryos produced by *in vitro* maturation(IVM) and *in vitro* fertilization(IVF). Bovine IVM /IVF embryos developed to 2~8 cell stage were co-cultured with BRLC in CR_{1aa} with or without thiol compounds. The developmental rate beyond morulae stage in CR_{1aa} containing 0, 10, 25 and 50 μ M β -ME with BRLC were 63.0, 74.0, 72.3 and 77.1%, respectively. And the developmental rate with 0, 25, 50 and 75 μ M cysteamine with BRLC were 69.6, 77.6, 81.0 and 76.8%, respectively. The developmental rate beyond morulae stage of CR_{1aa} containing thiol compound with BRLC group was higher than that of control group. The intracellular GSH concentrations of blastocysts cultured for 5 days in CR_{1aa} containing 0 and 50 μ M β -ME or cysteamine with BRLC were 81.2 and 86.4, 83.2 and 84.2pM, respectively. The intracellular GSH concentrations of blastocysts in CR_{1aa} containing thiol compounds with BRLC was slightly higher than that of control group. The cell numbers of blastocysts were not difference in all experimental groups. These results indicate that thiol compounds with BRLC co-culture was increased the percentage of developed into morulae and blastocysts, and intracellular GSH concentrations of blastocysts embryos.

(Key word : β -Mercaptoethanol, Cysteamine, Glutathione, IVM /IVF embryos, BRLC)

서 론

소 체외수정란을 여러 가지 배양조건, 배양액 및

가스상태하에서 체외배양시 일어나는 8~16세포기 발육억제현상은 유전자 주입, clone 생산 및 수정란 이식 등 모든 유전공학기법의 기본 재료가 되는 체외수정란의 대량확보에 어려움을 주고 있다.

따라서 체외발육억제현상을 극복하기 위하여 여러 가지 방법이 이용되고 있으며, 그중 난관상피세포, 난구세포, 과립막세포, 생쥐 섬유아세포 및 buffalo rat 간세포(BRLC) 등의 체세포를 이용하는 공동배양 방법이 폭넓게 이용되어 좋은 체외발육율을 얻고 있다(Ellington 등, 1990 ; Hawer와 Wall, 1990 ; Reed 등, 1996 ; Takahashi 등, 1995). 이들 체세포 중에서 BRL세포는 백혈병 억제인자, TGF- β 등과 같은 성장인자를 분비하며, free radical을 제거하는 항산화제를 분비하여 수정란의 체외발육율을 향상시키는 것으로 보고되고 있으며, 세포의 조작과 관리, 유지가 다른 체세포보다 간단하여 많이 이용되고 있다(Hernandez-Ledezma, 등 1993 ; Smith와 Hooper, 1987).

본 연구는 소 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 생산된 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 CR_{1aa}와 BRLC 공동배양에 thiol 화합물을 일정량 첨가하여 초기배 수정란의 체외발육에 미치는 영향과 배반포 수정란의 세포내 glutathione농도 변화에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 체외성숙배양, 체외수정, 체외수정란의 세포내 glutathione농도의 조사 및 배반포 수정란의 세포수 조사

난포란의 체외성숙배양, 체외수정, 체외수정란의 세포내 glutathione농도의 조사 및 배반포 수정란의 세포수 조사는 " β -mercaptoethanol과 cysteamine 첨가와 소 난관상피세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 glutathione 농도 변화에 미치는 영향"의 방법에 준하여 실시하였다.

2. BRL세포의 준비

냉동보존한 BRLC(America Type Culture Collection, CRL 1442)를 37°C의 항온수조에서 1~2분간 용해하여 15ml의 원심분리관으로 옮긴 후, 5ml의 Defined Modified Eagles Media(DMEM-low glucose, Gibco)에 10% 자우혈청(fetal bovine serum, Gibco)이 함유된 배양액과 혼합시킨 후 원심분리(1,000rpm, 5분)를 2회 실시하여 세포부유액을

준비하였고, 4-well dish(Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하여 4~5일 동안 배양(37°C, 5% CO₂ in air)하여 BRL세포 monolayer를 준비하여 체외배양 실험에 사용하였다.

3. BRL세포의 monolayer에 thiol compound의 첨가배양

상기 방법으로 준비된 BRL세포의 monolayer에 체외 배양액인 CR_{1aa}에 β -mercaptoethanol(β -ME) 0, 10, 25 및 50 μ M과 cysteamine 0, 25, 50 및 75 μ M을 첨가하여 39°C, 5% CO₂ 및 고습도의 조건에서 체외 수정란을 5~6일간 배양하여 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외 발육 성적을 조사하였고, 일부의 배반포기 수정란은 이중형광염색법에 의하여 세포수를 조사하고 나머지 수정란은 세포내 glutathione 농도를 조사하였다.

4. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 최소 유의차 검정(Least Significant Difference test: LSD test)을 실시하여 통계처리를 하였다.

결과 및 고찰

소 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후, 40~44시간에 생산된 2~8세포기 체외수정란을 체외배양액인 CR_{1aa} 배양액과 BRL세포 공동배양에 각각 다른 농도의 β -mercaptoethanol(β -ME)을 첨가하여 5~6일간 체외배양한 후 얻은 체외발육성과 배반포기 수정란의 세포수를 Table 1과 Table 2에 요약하였다.

CR_{1aa}배양액과 BRL세포 공동배양에 0, 10, 25 및 50 μ M의 β -ME를 첨가하여 체외발육율을 조사한 결과 상실배이상 발육된 체외발육율은 각각 63.0, 74.0, 72.3 및 77.1%로서 50 μ M β -ME 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 높게 나타났으며(P<0.05), β -ME 첨가구간에는 통계적 유의차가 없었다(P>0.05). 한편, 2~8세포기 체외수정란을 5~6일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수는 각각 85 \pm 4.3, 95 \pm 2.5, 88 \pm 2.9 및 90 \pm 1.9로서 처리구간에 차이는 인정되지 않았다(Table 2).

Table 1. Effect of β -mercaptoethanol on development of bovine IVM/ IVF embryos in CR_{1aa} with BRL cells

β -ME (μ M)	No. of IVM /IVF embryos	No. of developed to ;			Morulae plus blastocysts (%, M \pm S.E)
		Pre-morulae	Morulae	Blastocysts	
0	46	17	19	10	63.0 ^a \pm 8.9
10	50	13	32	5	74.0 ^{ab} \pm 5.8
25	47	13	20	14	72.3 ^{ab} \pm 7.9
50	48	11	28	9	77.1 ^b \pm 7.3
Overall means					
CR _{1aa}	46	17	19	10	63.0 \pm 8.9
β -ME	145	37	80	28	74.5 \pm 1.4

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 2. Number of inner cell mass and trophectoderm cell of bovine embryos obtained from IVM/ IVF in CR_{1aa} with or without β -mercaptoethanol with BRL cells

β -ME (μ M)	No. of blastocysts	No. of ICM cell (M \pm S.E)	No. of TE cell (M \pm S.E)	Total cell no. of blastocysts (M \pm S.E)
0	5	21 \pm 1.9	64 \pm 4.2	85 \pm 4.3
10	5	21 \pm 1.7	74 \pm 1.8	95 \pm 2.5
25	5	22 \pm 1.9	66 \pm 3.4	88 \pm 2.9
50	5	18 \pm 1.7	72 \pm 2.8	90 \pm 1.9

체외수정란의 체외배양에 있어 β -ME의 첨가효과는 glutathione(GSH) 합성에 기질로서 작용하는 cysteine의 이용성을 증가시켜 세포내 GSH의 농도를 증가시키므로써, 배양액내의 높은 산소 농도에 의해 생성되어 체외수정란에 유해한 영향을 미치는 free radical을 제거하여 체외수정란의 체외

발육율을 향상시키며, 세포의 성장을 자극하는 것으로 알려져 있다.(Takahashi 등, 1993 : Tetsuro 등, 1981) 본 실험의 결과도, β -ME 첨가구가 무첨가구보다 높은 체외발육율을 나타내어 이들의 결과와 일치하는 경향을 보였다.

CR_{1aa} 배양액과 BRLC 공동배양에 각각 다른 농

Table 3. Effect of cysteamine on development of bovine IVM/ IVF embryos in CR_{1aa} with BRL cells

Cysteamine (μ M)	No. of IVM /IVF embryos	No. of developed to ;			Morulae plus blastocysts (%, M \pm S.E)
		Pre-morulae	Morulae	Blastocysts	
0	56	17	21	18	69.6 ^a \pm 8.1
25	58	13	39	6	77.6 ^b \pm 3.5
50	58	11	38	9	81.0 ^b \pm 7.3
75	56	13	37	6	76.8 ^b \pm 2.5
Overall means					
CR _{1aa}	56	17	21	18	69.6 ^A \pm 8.1
Cysteamine	172	37	114	21	78.5 ^B \pm 1.3

^{a,b}; ^{A,B} Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 4. Number of inner cell mass and trophectoderm cell of bovine embryos obtained from IVM/ IVF in CR_{1aa} with or without cysteamine with BRL cells

Cysteamine (μ M)	No. of blastocysts	No. of ICM cell (M \pm S.E)	No. of TE cell (M \pm S.E)	Total cell no. of blastocysts (M \pm S.E)
0	5	23 \pm 1.3	61 \pm 5.3	84 \pm 6.2
25	5	21 \pm 1.8	65 \pm 2.8	86 \pm 2.4
50	5	19 \pm 1.1	65 \pm 4.3	84 \pm 4.6
75	5	21 \pm 1.2	62 \pm 5.5	83 \pm 5.7

도의 cysteamine을 첨가하여, 5~6일간 체외배양 후 얻은 체외발육성과 배반포 수정란의 세포수를 Table 3과 4에 요약하였다.

CR_{1aa}배양액과 BRL세포와의 공동배양액에 0, 25, 50 및 75 μ M의 cysteamine을 첨가하여 체외발육율을 조사한 결과 상실배이상 발육된 체외발육율은 각각 69.6, 77.6, 81.0 및 76.8%로서 cysteamine 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다(P<0.05). 배반포기 수정란의 세포수는 각각 84 \pm 6.2, 86 \pm 2.4, 84 \pm 4.6 및 83 \pm 5.7로서 처리간에 차이는 인정되지 않았으며, β -ME 첨가 배양과 비슷한 세포수를 나타내었다.

이상의 결과는, 체외배양액에 cysteamine의 첨가는 세포내 GSH 농도를 증가시키므로써 체외수

정란의 체외발육율을 향상시킨다고 보고한 Daniel 등(1995)과 일치하는 결과로서, cysteamine은 난포란이 체외에서 성숙되는 동안 세포질내의 thiol 화합물인 GSH을 축적시켜 free radical에 의한 손상으로부터 체외수정란을 보호하며(Tetsuro 등, 1981), 또한 돼지 난포란을 체외성숙시 cysteamine의 첨가는 옹성 전핵의 발육을 향상시켜 자웅성 전핵을 동시에 형성시킨다고 보고했다(Crupen 등, 1995).

BRL세포는 백혈병 억제인자, IGF-1, TGF- β 등과 같은 체외수정란에 유익한 lactate로 변환시켜주고, free radical을 제거하는 항산화제를 분비하며(Hernandez-Ledezma 등, 1993 ; Smith와 Hooper, 1987), 또한 BRL세포는 배양액으로부터 수정란 독성물질을 중화시켜 주며, 수정란의 성장촉진 성분을 분비한다고 보고하였는데, 본 실험의 결과도 thiol 화합물의 단독처리구보다 BRL공동배양구에서 높은 체외발육 성적을 나타내 일치하는 경향을 보였다(Thibodeaux 등, 1993).

CR_{1aa}배양액과 BRL세포 공동배양에 β -ME와 cysteamine을 첨가한 구에서, 5일 동안 체외배양한 후 얻은 배반포 수정란의 세포내 glutathione농도를 Table 5와 6에 요약하였다.

CR_{1aa}배양액과 BRL세포 공동배양에 0, 50 μ M의 β -ME을 첨가한 구에서 5~6일 동안 배양하여 얻은 배반포 수정란의 glutathione 농도는 각각 81.2pM과 86.4pM로서 통계적 유의차는 없었으며(P>0.05), CR_{1aa}배양액과 BRL세포 공동배양에 cysteamine을 0, 50 μ M을 첨가한 구에서 5~6일동안 배양하여 얻은 배반포에서의 glutathione의 농도는 각각 83.2pM과 84.2pM로서 통계적 유의차는 없었다.

아미노산 유도체인 GSH은 세포가 증식되는 동

Table 5. Intracellular glutathione levels of bovine IVM/ IVF embryos in CR_{1aa} with or without β -mercaptoethanol with BRL cells

β -ME (μ M)	No. of replicates	No. of blastocysts	Intracellular glutathione con., pM (Mean \pm S.E)
0	3	30	81.2 \pm 4.5
50	3	29	86.4 \pm 4.0

Table 6. Intracellular glutathione levels of bovine IVM/ IVF embryos in CR_{1aa} with or without cysteamine with BRL cells

Cysteamine (μ M)	No. of replicates	No. of blastocysts	Intracellular glutathione con., pM (Mean \pm S.E)
0	3	26	83.2 \pm 2.2
50	3	27	84.2 \pm 2.0

안 아미노산의 수송, 효소 활성화, disulfide의 환원 및 단백질과 DNA합성 등 여러가지 중요한 역할을 수행한다(Lafleur 등 1994; Meister와 Anderson, 1983). 또한 단백질, 핵산 및 지방 등과 같은 세포 구성물에 유해한 영향을 미치는 과산화수소와 같은 free radical로부터 세포를 보호하며, 체외수정란의 체외배양시 생존율과 발육율을 감소시키는 heat shock로부터 체외수정란을 보호하여 발육억제 현상을 극복하고 체외발육율을 증진시킨다고 보고되고 있다(Arechiga 등, 1995; Ealy 등, 1992).

본 실험의 결과에서는 thiol 화합물의 첨가구가 무첨가구보다 다소 높은 GSH 농도를 나타내어 체외발육율과는 차이가 있었는데, 이것은 소 체외수정란이 16세포기부터 유전자 활성을 시작하여 적당한 양의 GSH를 합성하기 때문인 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 소 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 2~8세포기 수정란을 CR_{1aa} 배양액과 BRL세포와의 공동배양에 thiol 화합물인 β -mercaptoethanol과 cysteamine을 첨가하여 체외수정란의 체외 발육율에 미치는 영향과 배반포기 수정란의 세포내 glutathione 농도 변화에 미치는 영향을 검토하였다.

1. CR_{1aa} 배양액에 buffalo rat의 간세포(BR-LC)와 공동배양에 0, 10, 25 및 50 μ M의 β -ME를 첨가하여 체외 발육율을 조사한 결과 상실배이상 발육된 체외발육율은 각각 63.0, 74.0, 72.3 및 77.1%로서 50 μ M β -ME 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 높게 나타났으며 ($P < 0.05$), β -ME 첨가구간에는 통계적 유의차가 없었다($P > 0.05$).
2. CR_{1aa} 배양액에 buffalo rat의 간세포(BRLC)와 공동배양에 0, 25, 50 및 75 μ M의 cysteamine을 첨가하여 체외발육율을 조사한 결과 상실배 이상 발육된 체외발육율은 각각 69.6, 77.6, 81.0 및 76.8%로서 cysteamine첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$).
3. BRLC와 공동배양에 β -ME를 0, 50 μ M을 첨가

한 구에서 5~6일 동안 배양한 후 얻은 배반포 수정란의 세포내 glutathione 농도는 각각 81.2pM 및 86.4pM로서 통계적 유의차는 없었으며 ($P > 0.05$), cysteamine을 0, 50 μ M을 첨가한 구에서는 각각 83.2pM 및 84.2pM로서 통계적 유의차는 없었다.

4. 모든 처리구에서 배반포까지 발육된 체외수정란의 세포수는 처리간 커다란 차이가 없었다.

참고문헌

- Arechiga CF, Ealy AD and Hansen PJ. 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol. Reprod.* 52:1296-1301.
- Crupen CG, Nagashima H and Nottle MB. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.* 52:1296-1301.
- Daniel G, Matos DE, Cecilia C, Daniel F and Baldassarre H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Develop.* 42:432-436.
- Ealy AD, Drost M, Barros CM and Hansen PJ. 1992. Thermoprotection of preimplantationbovine embryos from heat shock by glutathione andtaurine. *Cell. Biol. Inter. Reports*, 16(2):125-131.
- Ellington TE, Farrell B, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE and McGrath AB. 1990. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morulae or blastocysts in rabbit oviduct or in a simple medium with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 89:293-299.
- Hawker HW and Wall RJ. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. I. selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41:1585-1594
- Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD

- and Roberts RM. 1993. Effect of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with ether bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation / *in vitro* fertilization procedures. *Theriogenology*, 39:1267-1277.
- Lafleur MVM, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ and Retel J. 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Rad. Res.* 21:9-17.
- Meister A and Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-760.
- Reed WA, Suh TK, Bunch TD and White KL. 1996. Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cell, buffalo rat liver cells, BRL-cell-conditioned medium. *Theriogenology*. 45:439-449.
- Smith AG and Hooper ML. 1987. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Devel. Biol.* 121:1-9.
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N and Okano A. 1995. Effect of co-culture cells on the uptake of cystine into bovine embryos. *Theriogenology*, 43(abstr.) : 332.
- Tetsuro I, Bannai S and Sugita Y. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by β -mercaptoethanol *in vitro*. *J. Biol. Chemistry*, 256(23):12387-12392.
- Thibodeaux JK, Del Vecchio RP and Hansel W. 1993. The role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 98:61-66.

(접수일자 : 1997. 10. 27 / 채택일자 : 1997. 12. 15)