

Vero Cell-Conditioned Medium에서의 배양이 생쥐 후기 2-세포기 배아 발생에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생리학교실
강 혜 나 · 하 종 식

= Abstract =

The Effects of Vero Cell-Conditioned Medium on Mouse Late 2-Cell Embryo Development

Hye Na Kang · Jong-Sik Hah

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

This study was conducted to evaluate the ability of Vero cell-conditioned medium for supporting mouse embryo development in vitro.

The mouse late 2-cell embryos were cultured in control media(Ham's F-10 + 10%FBS), media with Vero cell monolayer and Vero cell-conditioned media for 4 days and measured the hatching rate and cell number in the blastocyst stage.

The hatching rate in experimental groups was increased significantly compared with embryos in control group($p < 0.01$). On the other hand, the degree of blastomere fragmentation exhibited a opposite trend to that of the developmental capacity($p < 0.05$). And also the cell numbers of expanded blastocysts in experimental groups were increased significantly compared with the control group($p < 0.001$). There was, however, no difference between experimental groups.

These results indicate that Vero cell-conditioned medium supported the mouse embryo development as a Vero cell monolayer. And the mechanism for enhancement of the development potential of embryos may be releasing the embryotrophic factor during the medium-conditioning period.

KEY WORDS : Vero cell-conditioned medium · Embryotrophic factor.

서 론

IVF program에서의 낮은 성공률(take home baby rate : 13%)¹⁾을 설명하기위한 여러 가지 가정들이 있는데 그 중 대표적인 것들은 다음과 같다. 첫째, 인위적으

로 만들어진 in-vitro system에서 배아가 발달할 때 일어나는 세포분열 및 생존률(viability) 감소와 둘째, 배아 이식시 일어나는 배아와 자궁환경사이의 이질성(asynchrony) 그리고 셋째, 적합하지않은 위치에 배아를 이식함으로써 야기되는 자궁으로부터의 배아 방출(efflux)등이 그것이다²⁾.

이러한 문제의 해결을 위해 다양한 공동배양(co-culture) system이 고안, 사용되어 체외에서 배양되는 배아의 질(quality)을 향상시키고 세포분열정지현상을 극복할 수 있게되었다. 자연임신의 경우 4~8세포기의 배아는 수란관에 위치하여 포배기에 이르기까지 70~75시간을 더 발생한 후 자궁으로 이동하여 20~24시간 뒤 착상하게 된다. 그러나 IVF program의 경우 4~8세포기 배아는 바로 자궁에 이식되어 착상전 90~99시간동안 자궁환경에 계속 노출됨으로써 퇴화와 착상률 감소를 야기시킨다^{3,4}. 공동배양은 체외에서 배아의 포배로의 발생률을 증가시켜 현 IVF program에서의 배아 자궁 이식시기를 4-8 세포기에서 포배기로 바꿈으로써 배아와 자궁사이 이질성을 개선하고 더불어 착상률과 임신률을 증가시킬 수 있다⁵. 이미 생쥐⁵, 원숭이⁶, 양⁷, 소⁸ 등의 중에서 난관세포와 배아의 공동배양으로 배아 발생률을 증가를 관찰할 수 있음이 보고되었고 사람의 경우에도 Vero cell과의 공동배양으로 얻을 수 있는 여러 효과가 보고되고있다⁹. 여러 공동배양 세포군 중 아프리카 초록 원숭이 신장세포(African green monkey kidney cell)인 Vero cell은 초기 배아 발생을 위한 배양액에서 쉽게 증식되고 오랫동안 vaccine 생산을 위해 사용되어 왔으므로 virus나 기타 오염으로부터 안전하게 사용할 수 있으며 구입과 조작이 쉬워 널리 사용되고 있다⁹.

본 실험은 Vero cell과 ICR계 생쥐 후기 2-세포기 배아를 공동 배양하거나 Vero cell-conditioned medium에서 배양하여 발생률을 관찰하고 배아의 질을 평가할 수 있는 팽윤 배반포(expanded blastocyst)시기에 세포수와 세포분화율(fragmentation rate)을 비교하여 수정란의 정상적인 세포발생에 미치는 공동배양의 영향을 알아보고 앞으로 이를 인체에 적용하여 IVF program에서의 임신 성공률을 높이기 위하여 실시하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

명 14시간, 암 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육한 Swiss Albino인 ICR계통의 5~6주된 암컷을 실험에 사용하였다. 먼저 5IU Pregnant mares' serum gonadotropin(PMSG, Sigma, St. Louis, USA)을 복강주사하고 48시간 후 5IU human corionic gonadotropin(hCG)를 주사하

여 과배란(superovulation)을 유도한 후 수컷과 교배시켰다. 다음 날 아침 질전(vaginal plug)이 관찰된 암컷을 골라 hCG주사 후 50시간에 후기 2-세포기 배아를 수란관에서 얻었다.

2. 방 법

냉동보존된 Vero cell을 37°C 수조에서 녹여 Ham's F-10+10% fetal bovine serum(FBS)로 세척한 후 $2-3 \times 10^6$ cells을 tissue culture flask(75cm², Falcon, Becton, Dickinson, CA, USA)에 넣어 37°C에서 5% CO₂+95%공기가 공급되고 100%습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 4~5일 후 증식된 세포들(8×10^6 cells)을 트립신으로 처리하여 4-well multidish에 실험 26시간전에 10⁴ cells/well의 농도로 배양하였으며 24시간 후 monolayer가 형성되면 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후 다시 배양액을 넣어 2시간 전배양(preincubation)한 후 배아를 넣고 그 발생률을 관찰하였다^{10,11}. 이때 배양액 종류에 따라 monolayer형성을 위해 배양되는 Vero cell의 농도는 달라지는데 자라는 속도를 고려한 적절한 농도의 결정은 Vero cell의 과성장(overgrowth)으로 인한 배양액의 산화 등을 방지하기위해 매우 중요하다. 본 실험에 사용되는 모든 배양액은 Ham's F-10+10%FBS로 하였다.

Vero cell-conditioned medium은 Vero cell을 75cm² flask에 4~5일 배양하여 전체적으로 monolayer가 형성되면 2시간 전배양된 새로운 배양액 10ml을 넣고 24시간 더 배양한 후 배양액을 원심분리(200xg, 5min)하여 실험에 사용하였다¹². Vero cell의 증식을 위한 계대배양(subculture)에서 실험에 사용하는 Vero cell은 4계대를 넘지않도록 하였다¹¹.

팽윤 배반포 발달 후 세포수 관찰을 위해서는 hCG주사 120시간 후 팽윤 배반포를 선택하여 0.075M KCl에서 2분간 상온 처리한 후 slide glass에 올려놓고 고정액(methanol : acetic acid=3 : 1)을 이용하여 고정하였다. 상온에서 건조시킨 후 10% Giemsa solution (Merck)으로 20분간 염색하여 inverted microscope에서 염색된 핵의 수를 세었다(×400).

대조군은 Vero cell없이 배양액만으로 배아를 배양한 군으로하여 실험군과 발생률 및 팽윤 배반포시 세포수 비교에 사용되었다.

통계적인 분석은 ANOVA와 Duncan & Turkey법

Table 1. Development of late 2-cell stage embryos in co-culture with Vero cell or in conditioned medium*

Culture condition(n)	No of embryos at each stage(%)			
	Morulae	Blastocyst	Hatching	Frag
Control 144	112(77.8)	89(61.8)	72(50.0) ^{ab}	12(8.3) ^{cd}
C-M 151	139(92.1)	124(82.1)	112(74.2) ^a	4(2.6) ^c
Co-culture** 132	119(90.2)	107(81.1)	99(75.0) ^b	3(2.3) ^d

^{ab}p < 0.01, ^{cd}p < 0.05

* Data from 7 replicates **Embryos were cultured on Vero cell monolayer
C-M : cell-conditioned medium in which Vero cells were grown

Table 2. Cell number of mouse blastocyst

Culture	No. of determination	Cell number per embryo
Control	9	64.1 ± 7.47 ^{ab}
C-M	9	97.89 ± 12.98 ^a
Co-culture	7	101.71 ± 11.74 ^b

^{ab}p < 0.001, Values are mean ± SE

C-M : cell-conditioned medium in which Vero cells were grown

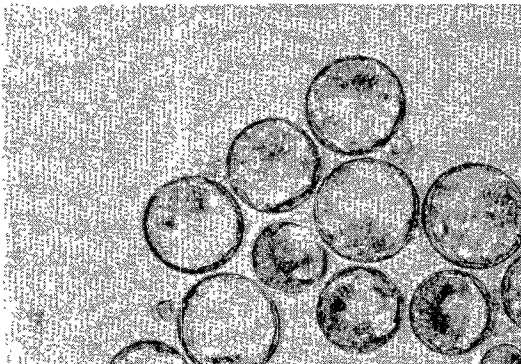


Fig. 1. Photograph of mouse late 2-cell embryos cocultured with Vero cell(×100).
Hatching blastocysts developed from late 2-cell embryo cocultured with Vero cell for 96hr.

을 이용하여 p값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

생쥐 후기 2-세포기 배아 발달에 미치는 Vero cell의 영향을 조사하였을 때 부화율은 대조군이 50.0%로 가장 낮았으며 실험군인 Vero cell-conditioned medium군과 공동배양군은 각각 74.2%와 75%로 유의하게 높았다(p < 0.01, Table 1).

배아의 질적인 평가를 위해 세편화와 팽윤 배반포시

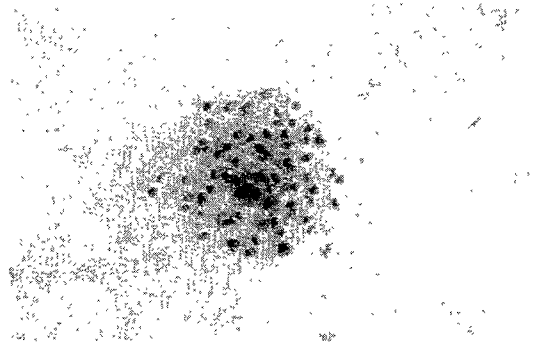


Fig. 2. Expanded blastocyst in control group was stained with 10% Giemsa solution(×400).

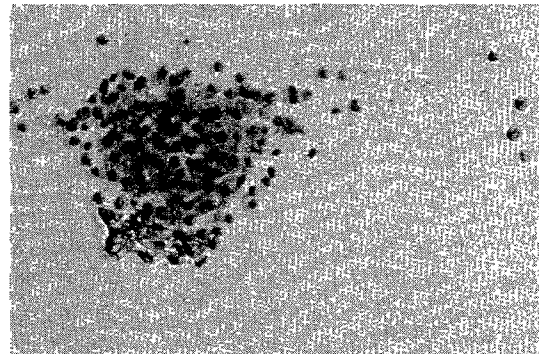


Fig. 3. Expanded blastocyst in conditioned medium group was stained with 10% Giemsa solution(×400).

세포수를 조사하였다. 먼저 할구들의 질적인 불량도를 나타내는 세편화는 대조군의 경우 8.3%이고 실험군인 Vero cell-conditioned medium군과 공동배양군은 각각 2.6%와 2.3%로 나타나 대조군에 비하여 유의하게 낮은 세편화를 나타냈다(p < 0.05, Table 1).

Table 2는 팽윤 배반포 상태에서의 할구수를 보여주는 것으로 대조군이 64.1 ± 7.47, 실험군인 Vero cell-conditioned medium군이 97.89 ± 12.98, 공동배양군이 101.71 ± 11.74로 대조군에 비해 실험군에서 유의하게

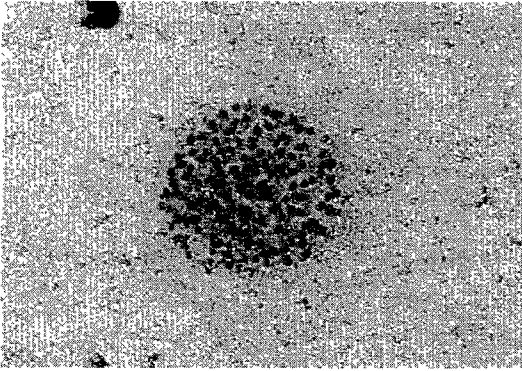


Fig. 4. Expanded blastocyst in co-culture group was stained with 10% Giemsa solution($\times 400$).

높았다($p < 0.001$, Fig. 1, 2, 3, 4).

위의 모든 결과에서 두 실험군 사이에서는 유의한 차이가 없었다.

고 찰

자궁세포¹³⁾, 난관세포⁷⁾, Vero cell⁴⁾ 등 다양한 type의 세포들이 배아와의 공동배양에 이용되어 수정란의 질을 향상시키고, 배아의 발생률을 증가시키고 임신률과 착상률을 증가시키며 냉동-해동과정 후의 생존률 또한 증가시키는 것으로 알려져있다²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾. 그리고 이러한 효과를 나타내는 monolayer system의 작용기작은 다음 두 가지로 설명되고 있다²⁾¹⁷⁾. 첫째, 배양액으로부터 유해물질을 제거하고 둘째, 배아발생에 직접, 간접으로 영향을 주는 embryotrophic factor를 세포분열동안 분비한다. 전자의 예로서 가장 대표적인 것은 일반적인 IVF 배양액으로 사용되고 있는 Ham's F-10내의 hypoxanthine을 들 수 있다. 생쥐의 경우 hypoxanthine은 xanthine oxidase pathway에 의하거나 phosphodiesterase작용을 저해함으로써 cAMP의 증가로 배아발생을 억제한다¹⁴⁾. 세포주에 따라 차이는 있으나 배아를 Vero cell과 DMEM/Ham's F-12배양액에서 공동배양하였을 때 초기발생률이 대조군과 비교하여 증가한 Lai등¹⁰⁾의 보고로 볼 때 Vero cell이 배양액내 hypoxanthine을 어느 정도 제거할 수 있는 것으로 추정된다. 또 다른 예로 돼지의 경우 배양액의 pyruvate는 초기 배아발생을 억제하나 공동배양 세포군에 의해 pyruvate는 lactate로 전환되어 배아발생에 긍정적인 영향을 나타낸 보고도 있다¹⁰⁾¹⁵⁾. 한편 후자의 예로는 growth factor 등의 당단백질

을 들 수 있는데 공동배양 세포군으로 사용되는 난관세포의 경우 다양한 중에서 36~215kd 분자량의 당단백질들을 분비함이 보고되어졌다. 또한 이들의 작용기작은 공동배양 세포에 의해 당단백질이 배양액으로 분비되면 이들이 단순 확산에 의해 투명대를 통해 배아로 들어가는 방법과 배아와 monolayer사이 직접적인 접촉에 의해 들어가는 방법 등 두 가지가 있으며 두 방법은 각각, 혹은 함께 작용할 것으로 추측되고있다¹⁵⁾.

생쥐 후기 2-세포기배아의 발생에서 공동배양과 conditioned medium에서의 배양은 부화율(hatching rate)의 증가를 가져왔는데(Table 1) 그 원인 또한 Vero cell이 단백질 분해효소 즉 chymotrypsin 등을 분비하여 peptide성분의 발생억제물질을 파괴하고 부화를 유도한 것으로 사료된다¹⁰⁾. 그리고 conditioned medium에서의 발생과 부화율의 증가는 Vero cell로부터 분비된 embryotrophic factor가 그 배양액내 존재하여 야기된 것으로 보이며 이를 뒷받침하는 여러 보고가 있다. Eyestone과 First¹⁷⁾는 소의 난관 세포와의 배양으로 얻은 conditioned medium에서의 배아 발생률 증가를 보고하였으며 Gandolfi와 Moor⁷⁾는 양의 난관 상피세포와의 공동배양이 양의 초기 배아발생을 증진시키며 투명대와 할구에 결합할 것으로 보이는 난관 단백질의 존재를 보고하였다. 한편 Lai등¹⁰⁾의 보고에 따르면 ICR과 CBF1계통의 생쥐에서 부화율은 Vero cell공동배양군에서는 높게 나타났으나($p < 0.01$) conditioned medium과 대조군에서의 부화율은 유의차가 없는 것으로 나타나 공동 배양군과 동일하게 부화율이 증가한 본 실험결과와 차이를 보였는데 이는 배양을 시작하는 배아의 발생시기 차이에 그 원인이 있는 것으로 보인다. 또 소의 경우 2~4세포기 배아를 다양한 체세포 즉, 소 난관상피세포, 버팔로쥐 간세포, Madin Darby 소 신장세포 및 Vero cell과 공동배양하거나 그 체세포의 conditioned medium에서 배양하였을 때 포배로의 발생률은 두 실험군 모두에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었으나 두 실험군사이에도 차이가 있어 공동배양군에서 더욱 증가되었다. 이것은 conditioned medium군은 그 배양액을 만드는 48시간 동안만 체세포에 노출된 반면 공동배양군은 배아 배양동안 계속 노출되어 배양액의 detoxification, 낮은 산소압유지 및 한개 혹은 그 이상의 성장인자(platelet-derived growth factor)들이 지속적으로 작용했기 때문으로 사료된다¹⁸⁾. 그러므로 conditioned

medium에서의 배양 결과는 배양액제조에 사용된 세포 주의 종류와 공동배양된 배아의 종(species) 그리고 배아의 발생시기에 따라 다르게 나타나며 어떤 종은 배아와 monolayer를 직접 배양한 결과와 conditioned medium에서 배양한 결과 또한 다르게 나타났다¹⁵⁾. 이 원인을 embryotrophic factor 산물이 기관특이적(organ-specific)이거나 배양액내에서 짧은 기간내에 소실되어버리는데 두는 보고도 있다¹⁶⁾. 이러한 embryotrophic factor 산물을 양 배아가 난관에 존재하는 oestrus 4~5일에 존재하여 투명대-할구에 결합한 후 배아발생에 관여하는 secretory polypeptide의 두 종류, SOP(sheep oviduct protein) 92와 SOP 46이라는 보고도 있으며⁹⁾ 공동 배양시에 어떤 factor가 투명대 경화를 막아 투명대 thinning현상을 일으켜 공동배양된 포배시기 배아의 부화와 착상률을 증가시킨다는 보고도 있다¹⁹⁾. 또 다른 예로 인체 난관의 팽대부(ampullary)세포들은 전자현미경 구조에서 표면에 많은 미세융모를 가지고 있고 세포내 조면소포체(rough endoplasmic reticulum)의 수가 많아 세포외분비(exocytosis)의 가능성이 있는데 그 conditioned medium을 single PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)할 경우 Vero cell conditioned medium에서보다 더 여러개의 band가 나타나 더 많은 glycoprotein성분의 factor를 분비하는 것으로 나타났다¹⁶⁾.

한편 본 실험에서 공동배양 혹은 conditioned medium에서 배양된 배아는 세편화율이 감소하고(Table 1) 후기 세포증식이 빠르게 일어나 팽윤 배반포시 더 많은 수의 할구를 포함(Table 2)하는 등 더욱 양질의 배아가 되는 것으로 나타났다. 불규칙한 분열시간으로 불균등한 할구 분포를 보이는 세편화현상은 IVF 실험실에서 배아의 질적인 불량도 판정의 척도가 되는데 25% 이상의 세편을 가지면 착상이 억제되게된다. 이는 양의 초기배아 발생에서 양의 수관관 상피세포를 이용한 공동배양 결과나⁷⁾ 인체난관세포²⁰⁾ 또는 Vero cell⁴⁾을 이용한 인간 배아의 공동배양 결과와도 일치하는 것이다. 세편화현상이 일어나면 할구들은 퇴화되어가며 이 원인을 외부환경에 대한 stress라고 볼 때 공동배양은 환경과 배아사이에서 간접적으로 작용하여 배아의 stress에대한 민감도를 어느 정도 낮춰준 것으로 추정된다. 공동배양된 배아는 세포분열 후에도 할구 모양이 균등하고 발생속도도 체내와 비슷하게 빠르게 발생되어¹⁶⁾ 팽윤 배반포시 할구수가 공

동배양 혹은 conditioned medium에서 배양된 실험군에서 많게 나타났다(Fig. 1, 2, 3, 4).

요 약

본 실험결과 Vero cell과의 공동배양과 Vero cell-conditioned medium에서의 배양은 생쥐 후기 2-세포기 배아의 부화율을 높이고 세편이 적은 양질의 배아 획득을 돕고 세포 증식을 빠르게 해 팽윤 배반포시 할구수를 증가시키는 것으로 나타났다. 그러나 앞으로 공동배양 기작에 작용할 것으로 보이는 embryotrophic factor나 배양액에서 공동배양 세포주에 의해 제거되는 발생저해 물질 등의 분자생물학적 연구가 진행되어야하고, 수정시 정자등이 공동배양 세포주의 monolayer에 결합하여 수정 기회를 감소시켜 여러 장점에도 불구하고 오히려 수정률을 감소시킬 수 있는 직접적인 공동배양보다 conditioned medium에서의 배양에 관심을 가져야할 것으로 본다.

References

- 1) Boyer P, Janny L, Menezo Y : *Embryo culture : the future. Human Reprod Abstracts of the 2nd International Meeting of the BFS, Glasgow 1994 ; S6 : 8*
- 2) Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E : *Vero cell effect on in-vitro human blastocyst development : preliminary results. Hum Reprod 1994 ; 9 : 1131-1135*
- 3) Bongso A, Ng SC, Ratnam S : *Coculture : their relevance to assisted reproduction. Hum Reprod 1990 ; 5 : 893-900*
- 4) Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC : *Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. Biol Reprod 1990 ; 42 : 301-306*
- 5) Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, Menezo Y : *Coculture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. Hum Reprod 1990 ; 5 : 737-743*
- 6) Goodeaux LL, Voelkel SA, Anzalone CA, Menezo Y, Graves KH : *The effect of rhesus epithelial cell monolayers on in vitro growth of rhesus embryo. Theriogenology 1989 ; 39 : 197-201*
- 7) Gandolfi F, Moor RM : *Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with*

- oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 1987 ; 81 : 23-28
- 8) Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH : *Bovine 1-2cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. Biol Reprod* 1990 ; 43 : 97-104
 - 9) Pearlstone AC, Chan SYW, Tucker MJ, Wiker SR, Wang C : *The effects of Vero(Green monkey kidney) cell coculture on the motility patterns of cryopreserved human spermatozoa. Fertil Steril* 1993 ; 59 : 1105-1111
 - 10) Lai YM, Stein DE, Soong YK, Tang YX, Grifo J, Malter HE, Talansky BE, Cohen J, Liu HC, Rosenwaks Z : *Evaluation of Vero cell co-culture system for mouse embryos in various media. Hum Reprod* 1992 ; 7 : 276-280
 - 11) Menezo Y, Hazout A, Dumout M, Herbaut N, Nicollet B : *Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. Hum Reprod* 1992 ; 7 : 101-106
 - 12) Wetzels AMM, Bastiaans BA, Goverde HJM, Janssen HJG, Rolland R : *Vero cells stimulate human sperm motility in vitro. Fertil Steril* 1991 ; 56 : 535-539
 - 13) Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA : *Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts : embryonic morphology and implantation. Fertil Steril* 1989 ; 52 : 503-508
 - 14) Loutradis D, John D, Kiessling AA : *Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. Biol Reprod* 1987 ; 7 : 311-316
 - 15) Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S : *Co-culture : a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil Steril* 1991 ; 56 : 179-191
 - 16) Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S : *Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. Fertil Steril* 1992 ; 58 : 569-574
 - 17) Eyestone WE, First NL : *Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. J Reprod Fert* 1989 ; 85 : 715-720
 - 18) Meyers MW, Broussard JR, Menezo Y, Prough SG, Blackwell J, Godke RA, Thibodeaux JK : *Established cell lines and their conditioned media support bovine embryo development during in-vitro culture. Hum Reprod* 1994 ; 9 : 1927-1931
 - 19) Wiemer KE, Cohen J, Amborski GF, Wright G, Wiker S, Munyakazi L, et al : *In vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. Hum Reprod* 1989 ; 4 : 595-600
 - 20) Yeung WSB, Ho PC, Lau EYL, Chan STH : *Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. Hum Reprod* 1992 ; 7 : 1144-1149