글루코스와 피루브산염의 농도가 조절된 DMEM과 Vero 세포를 이용한 무혈청 적응용 배양액의 개발에 관한 연구

충남대학교 의학전문대학원 산부인과학교실¹, 미즈여성병원 생식의학연구소²,
대구대학교 생명환경대학 동물자원학과³

김주환² · 서영석² · 송해범³ · 양정보¹ · 이경은¹ · 이기환¹

Studies on development of serum-free conditioned media using Vero cells and DMEM with controlled concentration of glucose and pyruvate

Ju-hwan Kim, M.Sc.², Young-seok Seo, M.D.², Hai-bum Song, Ph.D.³,
Jung-Bo Yang, M.D.¹, Kyung-En Lee, M.D.¹, Ki-Hwan Lee, M.D.¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Chungnam National University School of Medicine, Daejeon;

²Institute of Reproductive Medicine, Miz Woman's Hospital, Daejeon;

³Department of Animal Science, Daegu University College of Life and Environment, Daegu, Korea

Objective: The purpose of this study was to examine *in vitro* development of early preimplantation mouse embryos in various kind of serum-free conditioned media (SF-VCM) manufactured from DMEM cultured with Vero Cells.

Methods: A total of 846 two-cell mouse embryos were cultured in different kind of SF-VCM. SF-VCMs were divided into SF-VCM-10, -30 and -50 by media volume using DMEM #1 media, and divided into SF-VCM #1, #2 and #3 by controlled concentration of glucose and pyruvate (manufactured by DMEM #1: mixed three volume of DMEM-G (DMEM with glutamine without glucose and pyruvate) and one volume of DMEM-GGP (DMEM with glutamine, glucose, pyruvate), #2: mixed same volume of DMEM-G and DMEM-GGP and #3: mixed one volume of DMEM-G and three volume of DMEM-GGP, respectively). Experimental groups were mainly added 10% SSS, and 20% hFF was added to only Control group co-cultured with Vero cells. Development of embryos was observed every 24 hours. Results between different groups were analyzed using Chi-square test, and considered statistically significant when *P*-value was less than 0.05.

Results: *In vitro* developmental rate by each cleavage stages of mouse embryos cultured in SF-VCMs with a various volumes were significantly (*P*<0.05) higher in SF-VCM-30 (morula ≤: 97.2%, Blastocyst (BL) ≤: 97.2%, Hatching BL ≤: 82.2%) than other groups. In the rate of development on *in vitro* co-culture vs. a various SF-VCMs manufactured by DMEM controlled concentration of glucose and pyruvate, Group I (SF-VCM #1) was higher than other groups in each cleavage stages (morula ≤: 98.1%, Blastocyst (BL) ≤: 97.1%, hatching BL ≤: 81.7%, respectively). Moreover, specially, in the developmental rate into the hatching blastocyst ≤ after 96 hours *in vitro* culture, Group I (81.7%) was significantly higher than control group (67.6%, *P*<0.05).

Conclusion: SF-VCM #1 manufactured by volume of 30 mL DMEM #1 media cultured *in vitro* for 48 hours in 250 mL flask was the most effective on *in vitro* developmental rate of mouse preimplantation embryos. Therefore, it is expected that SF-VCM #1 has application to human IVF-ET.

Key Words: Serum-free conditioned media, Vero cells, DMEM, *In vitro* co-culture, *In vitro* fertilization

접 수 일 : 2009. 11. 3.
채 택 일 : 2010. 1. 20.
교신저자 : 이기환
E-mail : oldfox@cnuh.co.kr

* 이 논문은 2007년도 충남대학교병원 공모과제연구비에 의하여 수행되었음.

서 론

최근 체외수정 및 배아이식 (IVF-ET)에서 주머니배 배

아이식 기술이 많은 발전을 보이고 있는데, 이 기술 방법은 높은 임신율과 함께 다태임신의 위험을 줄일 수 있다는 장점이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 3일째 배아이식으로도 임신이 가능하다는 점과 주머니배 단계까지의 체외배양이 어렵다는 이유 때문에 아직까지 임상에서 널리 시행되지 못하고 있다. 특히 난자의 수가 적은 불임환자에서는 수정된 배아의 생산도 적어지고 결국 이식할 배아의 수가 적어 임신할 수 있는 확률이 그만큼 낮아지게 되는데 이러한 환자들에게는 착상 전 배아의 발생초기에 질적인 등급을 높여 주어야 하는 것이 무엇보다도 중요하다. 따라서 배아 발생초기에 분할하는데 도움을 주어 할구의 수를 증가시키고 할구의 분절을 줄여주며, 할구가 균일하게 쪼개지도록 할 수 있는 배양액을 개발하는 것이 매우 중요하다.

인간을 포함한 포유동물에서 배란된 난자는 여러 가지 환경에 노출된다. 난관 팽대부에서 수정이 이루어지고 난관을 통하여 자궁으로 들어가는 동안 줄곧 체세포에 둘러싸여 있게 되는 것처럼, 체외배양 과정에서도 체내와 비슷한 환경을 만들어 주어야 한다는 주장이 많이 쏟아졌고, 이러한 환경과 일치시키려는 노력으로 체세포와의 공배양 체계가 개발되었다.¹⁻⁴ Cole과 Paul⁵에 의해 생쥐 배아의 체외배양에서 체내환경에 더 가깝게 조절해 주기 위한 연구가 시작된 이래로 사람의 IVF-ET 시술 시 공급자 세포주(feeder cell lines)를 이용한 공배양에 대한 연구가 진행되었는데, Wiemer 등^{6,7}은 소 자궁상피세포와의 공배양이 일반적인 배양 방법보다 착상률과 임상임신율을 더 향상시켰다고 보고하였다. 또한 Bongso 등⁸은 인간 난관의 팽대부 세포와 인간 배아를 함께 배양하여 69%의 높은 주머니배 발달률을 얻었고, 임신율도 증진시켰다고 보고하였다.¹ 한편 Menezo 등⁴은 인간 수정란을 Vero 세포와 공배양하여 41%의 주머니배 발달률을 얻었다.

최근까지의 연구에서 공배양이 사람의 IVF-ET 시술시 수정란의 체외발달에 도움을 준다는 사실이 지배적이기는 하나, 연구실에서의 실제적인 이용은 잘 이루어지지 않으며, 상업적으로 판매되는 배양액을 주로 사용하는 것이 사실이다. 그 이유는 공배양을 시행할 때 세포를 다뤄야 하는 번거로움과 시간이 많이 소요된다는 단점 때문이다. 또한 지금까지의 체외 공배양 체계에서는 대부분의 배양액에 난포액, 제대혈청, 모체혈청 등의 첨가가 불가피하였지만, 이들 혈청들에 의한 수정란의 체외배양효과에 있어서는 아

직 이견이 많을 뿐만 아니라, 체외수정률이나 수정란의 체외발달률, 임신율 등의 임상결과에 있어서도 변화를 초래하지 않을만한 안정성을 입증하지 못하고 있는 것이 사실이다.

본 연구는 우리의 이전 연구에서 생쥐 배아의 발달에 효과적이고, 사람 배아의 체외 공배양에서 효과적인 것으로 나타난 글루코스와 피부르산염의 농도가 조절된 DMEM 배양액에 혈청을 첨가하지 않고 Vero 세포를 배양한 후 무혈청 적응용 배양액 (Serum-free Vero cell conditioned medium, SF-VCM)을 얻고, 이를 통해 얻어진 SF-VCM이 생쥐의 착상 전 초기 배아의 체외 배양에 미치는 효과를 검토하여, 사람의 IVF-ET 시술 시 양질의 배아를 생산할 수 있는 체외배양액으로서의 가능성 여부를 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

연구대상 및 방법

1. 공시동물

본 연구에 사용된 생쥐는 국내에서 사육중인 ICR 계통의 생쥐로, 암컷은 생후 4~5주령, 수컷은 15~20주령인 것을 사용하였다. 온도 (24℃)와 명암 (12시간: 12시간)이 조절되는 곳에서 실험에 사용될 때까지 사육되었으며, 사료와 물은 제한 없이 공급하였다.

2. 배양액의 준비

생쥐 2-세포기 배아를 회수하기 위한 난관의 관류와 회수 및 세척에는 Ham's F-10 (Gibco, USA)에 10% SSS (serum substitute supplement)를 첨가한 배양액을 사용하였고, Vero 세포의 단층 제작 및 준비에는 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco, USA)가 함유된 DMEM (11885-084, Gibco, USA)을 이용하였다.

회수된 2-세포기 배아를 체외에서 배양하기 위한 배양액은 다음과 같이 제조하였다. 글루타민만 함유되어 있는 DMEM (이하 DMEM-G)과 글루타민, 글루코스 및 피부르산염을 함유하고 있는 DMEM (이하 DMEM-GGP)을 각각 3:1 (대략 glucose: 1,375 mM, pyruvate: 0.25 mM), 1:1 (대략 glucose: 2.75 mM, pyruvate: 0.5 mM) 및 1:3 (대

락 glucose: 4.125 mM, pyruvate: 0.75 mM)의 비율로 혼합하여 제조하였다 (이하 각각 DMEM #1, #2 및 #3). Ham' F-10과 DMEM 배양액에 0.025 g/L streptomycin sulfate (Sigma, USA)와 0.05 g/L penicillin-G (Sigma, USA)를 첨가하고, 삼투압측정기 (Advanced instruments, USA)를 이용하여 삼투압을 280 mOsm/kg으로 보정한 후, 진공펌프가 부착된 0.2 μ m 여과장치 (Corning, USA)로 여과시킨 다음, 4°C에서 보관하면서 사용하였다. 실험에 사용한 모든 배양액은 37°C, 5% CO₂ 배양기 (Forma, USA)에서 6시간 이상 평형시킨 다음 사용하였다.

3. 난포액의 준비

인간 난포액은 체외수정시술을 하고 있는 환자에서 성숙난자를 가지고 있는 난포로부터 흡인한 난포액에서 혈액이 거의 섞이지 않은 것을 1~2시간 정제하여 상층액을 회수한 후 3,500 rpm으로 2회 (각각 30분, 10분) 원심분리를 실시하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액은 56°C 항온수조에서 35분간 불활성화시킨 후 0.2 μ m 여과기로 여과하여 제균한 다음 5 mL 시험관에 분주하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

4. Vero 세포의 계대배양

Vero 세포 (African green monkey kidney cells)의 계대배양은 동결보관되어 있는 세포를 용해하여 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 세척하고 원심분리한 후 깨끗한 배양액으로 희석하여 50 mL 배양 플라스크 (Falcon, USA)에서 4~5일 동안 배양하였다. Vero 세포가 플라스크 바닥에 단층으로 완전히 형성되기 전까지 매 2일마다 10% FBS가 함유된 DMEM 신선배양액으로 교체해 주었다. 세포의 단층이 완전히 형성되면 TrypLE (Gibco, USA)로 처리하여 세포부유를 유도한 후 세포주걱 (cell scraper; Costar, USA)으로 배양접시 바닥에서 분리해 내고 900 rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 밑에 가라앉은 침전물은 동결배양액 (Gibco, USA)으로 희석한 후 세포 수를 $2 \sim 3 \times 10^6$ /mL 농도로 조절하여 동결시키고 액체질소에 보관하였다가 사용하였다.

5. Vero 세포를 이용한 SF-VCM의 제조

액체질소에 동결보관되어 있는 Vero 세포를 꺼내어 용해한 후 50 mL 플라스크에서 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액으로 배양하였다. Vero 세포가 플라스크 바닥에 완전하게 단층을 형성하면 플라스크 내의 배양액을 제거하고 미리 배양기에서 6시간 이상 평형시킨 DMEM으로 세척한 다음, 2 mL TrypLE로 처리하여 세포를 부유시켰다. 현미경 하에서 Vero 세포가 단일세포로 유리되는 것이 확인되면 모든 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리시키고, 분리된 Vero 세포가 들어 있는 플라스크에 동량의 FBS를 첨가하여 트립신을 중화시켰다. 분리된 세포들은 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액과 희석하여 900 rpm에서 30분간 원심분리 하였다.

1) 배양액 용량에 따른 Vero 세포 적응용 배양액의 제조

각각의 50 mL 플라스크에서 회수하여 원심분리한 Vero 세포의 침전물은 10% 난포액이 함유된 DMEM으로 희석하여 두 개씩의 250 mL 배양 플라스크에 나누어 다시 배양하였다. 플라스크 바닥에 약 90% 이상 단층이 형성되면, 이전 연구¹⁷⁾에서 생쥐 배아의 체외배양에서 가장 효과적이었던 혈청이 섞이지 않은 DMEM-G $\frac{1}{4}$ GP (이하 DMEM #1) 배양액을 이용하여 각각 3회에 걸쳐 세척한 후 다시 깨끗한 동일 배양액을 10 mL, 30 mL, 및 50 mL의 용량으로 각각의 플라스크에 넣어 48시간 동안 배양한 후 배양액을 회수하였다 (각각 SF-VCM-10, SF-VCM-30 및 SF-VCM-50). 회수된 각각의 배양액은 0.2 μ m 여과기로 제균한 다음, 4°C에서 보관하며 사용하였다.

2) 글루코스과 피루브산염의 농도가 조절된 DMEM을 사용한 3가지 Vero 세포 적응용 배양액의 제조

위와 동일한 방법으로 Vero 세포를 3개의 250 mL 배양 플라스크에 파종한 후 플라스크 바닥에 약 90% 이상 단층이 형성되면, 두 가지 DMEM (DMEM-G와 DMEM-GGP)의 희석비율에 따라 3가지 배양액 (각각 DMEM #1, DMEM #2 및 DMEM #3)을 제조하고, 혈청이 섞이지 않은 각각의 배양액으로 3회에 걸쳐 세척한 후 다시 깨끗한 동일 배양액을 30 mL 용량으로 넣어 48시간 동안 배양한 후 배양액을 회수하였다 (각각 SF-VCM #1, SF-VCM #2 및

SF-VCM #3). 회수된 각각의 배양액은 0.2 μ m 여과기로 제균한 다음, 4°C에서 보관하며 사용하였다.

3) 생쥐 배아의 체외 공배양을 위한 Vero 세포 단층 제작 및 배양접시 준비

동결-용해된 Vero 세포를 배양 플라스크에 $2-3 \times 10^6$ /mL 농도로 파종한 후 5% CO₂ 배양기에서 체외 배양하였다. 배양 2일 후 플라스크 내의 배양액을 제거하고 미리 배양기에서 6시간 이상 평형시킨 DMEM으로 세척한 다음, 2 mL의 TrypLE로 처리하여 세포를 부유시켰다. 현미경 하에서 Vero 세포가 단일세포로 유리되는 것이 확인되면 모든 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리시키고, 분리된 Vero 세포가 들어 있는 플라스크에 동량의 FBS를 첨가하여 트립신을 중화시켰다. 분리된 세포들은 배양액과 희석하여 900 rpm에서 30분간 원심분리한 다음, 두 부분으로 나누어 신선배양액으로 희석하였다. 희석된 세포들 중 한 부분은 2 well 접시 (Falcon, USA)에 well당 $2-3 \times 10^4$ /mL 농도로 파종하였고, 나머지 한 부분은 배양 48시간 후 교체해 줄 Vero 세포 단층 배양접시를 준비하기 위해 배양 플라스크에 파종하였으며, 배양 48시간 후 배아를 옮겨주기 위한 Vero 세포 배양접시는 앞에서의 과정과 동일한 절차로 준비하였다.

6. 생쥐 2-세포기 배아의 회수

과배란 유도를 위해 암컷 생쥐에게 pregnant mare's serum gonadotropin (Sigma, USA) 7.5 IU와 human chorionic gonadotropin (hCG; Sigma, USA) 7.5 IU를 48시간 간격으로 복강주사하고 암컷과 수컷을 1대 1로 동숙시킨 다음, 15시간 후에 질전을 확인하여 질전이 형성된 것만을 이용하였다.

2-세포기 배아의 회수는 hCG를 주사한 후 42~44시간 사이에 경추탈골법으로 생쥐를 희생시킨 후 난관을 적출하였다. 난관은 관류액인 10% SSS가 포함된 Ham's F-10이 들어있는 2 well 접시에 넣고, 실체현미경 하에서 31게이지 바늘이 부착된 1 mL 주사기에 관류액을 채워 난관누두부를 통해 관류시켰다. 관류액은 조심스럽게 내보내고 관류가 끝나면 신속하게 배아를 회수한 후 세척배양액에서 수회 세척하였다. 세척배양액에서 세척된 2-세포기 배아

는 체외에서 배양할 배양액과 동일한 배양액에서 3회 세척한 후 실험에 사용하였다.

7. 생쥐 배아의 체외배양 및 관찰

배양액 용량별로 제조된 VCM (SF-VCM-10, SF-VCM-30 및 SF-VCM-50)의 체외배양에 대한 효과 비교에서 대조군으로는 DMEM #1 배양액에 20% hFF를 첨가한 배양액을 사용하였다. 또한 DMEM #1, DMEM #2 및 DMEM #3으로 제조된 무혈청 적응용 배양액 (각각 SF-VCM #1, #2 및 #3)을 이용하여 생쥐 배아의 체외 발달률을 비교한 실험에서 대조군은 DMEM #2 배양액을 사용한 Vero 세포 공배양군이였다. 체외 공배양군을 제외한 모든 실험군 배양액은 각각의 2-well 접시에 1 mL씩 넣어 37°C, CO₂ 배양기에서 96시간 동안 배양하면서 발달을 관찰하였으며, 48시간 후에는 신선 배양액이 들어 있는 접시로 옮겨 배양하였다. 각각의 배양접시에는 10개 이내의 배아를 배양하였고, 각 실험군에 대한 배아의 발달은 24시간 간격으로 현미경 하에서 관찰하여 기록하였다.

8. 생쥐 배아의 체외 공배양

Vero 세포를 2 well 배양접시에 파종하고 24시간 후 단층을 형성하는 것이 확인되면, 이전의 연구⁹에서 생쥐 배아의 공배양에 가장 효과적이었던 20% 난포액을 함유하고 있는 DMEM-G $\frac{1}{2}$ GP (DMEM #2) 배양액을 이용하여 2회 세척한 후 신선배양액을 1 mL씩 넣어 두었으며, 24시간이 지난 후에 생쥐 2-세포기 배아를 넣어 48시간 동안 공배양하였다. 배양 48시간 후 교체할 배양접시도 위의 과정과 동일한 방법으로 만들었다. Vero 세포와 생쥐배아의 체외 공배양 체계는 각 배양접시에는 10개 이내의 배아만을 배양하였으며, 각 실험군에 대한 배아의 발달 단계는 24시간 간격으로 현미경 하에서 관찰하고 기록하였다.

9. 통계분석

실험군 간에 나타난 생쥐 배아의 발달에 대한 실험 결과는 백분율로 나타내었다. 배양시기에 따른 발달률에 대한 유의성 검증은 Chi-square test 이용하였고, P값이 0.05

이하일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

본 연구는 DMEM을 사용해 제조된 SF-VCM이 생쥐의 착상전 초기 배아의 체외 배양에 미치는 효과를 검토하여, 사람의 체외수정 및 배아이식 시술 시 양질의 배아를 생산할 수 있는 체외배양액으로서의 가능성 여부를 검증하고자 본 연구를 수행하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. SF-VCM의 제조시 배양액의 용량에 따른 생쥐 배아의 체외배양 효과 비교

DMEM #1 배양액을 사용해 제조된 다양한 용량의 무혈청 적응용 배양액들에 의한 2-세포기 생쥐 배아의 체외배양 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 배양 48시간 후 생쥐 배아의 상실배아 이상 발달률은 실험군 II (97.2%)가 대조군 및 실험군 I, III (각각 77.9%, 56.1% 및 83.2%)에 비해 유의하게 높은 발달률을 보였으며 ($P<0.05$), 실험군 I은 대조군에 비해 유의하게 낮은 발달률을 보였다 ($P<0.05$). 배양 96시간 후 주머니배 이상으로의 발달률에서도 역시 실험군 II (97.2%)가 대조군 및 실험군 I, III (각각 78.8%, 57.9% 및 88.8%)에 비해 유의하게 높은 발달률을 나타내었으며 ($P<0.05$), 실험군 I은 다른 모든 실험군들에 비해 유의하게 낮은 발달률을 나타내었다 ($P<0.05$). 또한 배양 96시간 후 탈출 주머니배 이상으로의 발달률에서도 실험군 II (82.2%)가 대조군 및 실험군 I, III

(각각 46.2%, 30.0% 및 61.7%)에 비해 유의하게 높은 발달률을 나타내었으며 ($P<0.05$), 실험군 I은 다른 실험군들에 비해 모두 유의하게 낮은 발달률을 나타내었다 ($P<0.05$).

2. Vero 세포와의 공배양과 SF-VCM을 이용한 체외배양 효과 비교

DMEM #2 배양액을 이용한 Vero 세포 공배양을 대조군으로 하여 DMEM #1, DMEM #2 및 DMEM #3 배양액으로 제조된 무혈청 적응용 배양액 (각각 SF-VCM #1, #2 및 #3)을 이용한 생쥐 배아의 체외 발달률에 대한 결과는 Table 2와 같다. 무혈청 적응용 배양액을 제조하기 전 플라스크의 바닥에 단층을 형성한 Vero 세포와 각각의 실험군에서 48시간 동안 배양 후 Vero 세포의 형태 및 증식 변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

배양 48시간 후 상실배아 단계 이상으로의 발달률은 대조군 (97.1%)과 실험군 I (98.1%)에서 실험군 II (90.6%)와 III (78.3%)에 비해 유의하게 높게 나타났으며 ($P<0.05$), 실험군 III은 대조군 및 다른 실험군에 비해 유의하게 낮은 발달률을 보였다 ($P<0.05$). 배양 96시간 후 주머니배로의 발달률에서도 실험군 III (75.5%)는 대조군 및 실험군 I, II (각각 97.1%, 98.1% 및 92.5%)보다 유의하게 낮은 발달률을 나타내었다 ($P<0.05$). 그러나 대조군과 실험군 I 및 II 사이에서의 발달률은 차이가 없었다. 배양 96시간 후 탈출 주머니배로의 발달률은 실험군 I (81.7%)에서 가장 높게 나타났고, 대조군 (67.6%)과 실험군 III (60.4%)에 비해 유의하게 높은 발달률을 나타내었다 ($P<0.05$). 실험군 I과

Table 1. The developmental rates on mouse embryos cultured *in vitro* during 96 hours in three different SF-VCMs by various volume of DMEM #1

Groups	No. of examined embryos	No. (%) of cleaved embryos during culture time		
		48 hour (Morula $\leq$)	96 hours (BL $\leq$)	96 hours (Hatching BL $\leq$)
Control	104	81 (77.9)*	82 (78.8)*	55 (52.9)*
I (SF-VCM-10)	107	60 (56.1)	62 (57.9)	32 (30.0)
II (SF-VCM-30)	107	104 (97.2)*,†,‡	104 (97.2)*,†,‡	88 (82.2)*,†,‡
III (SF-VCM-50)	107	89 (83.2)*	95 (88.8)*,†	66 (61.7)*

BL: blastocyst. Control: DMEM #1 media (contained with 10% SSS); mixed three volume of DMEM-G (DMEM with glutamine without glucose and pyruvate) and one volume of DMEM-GGP (DMEM with glutamine, glucose, pyruvate). All experimental groups added to 10% SSS.

* $P<0.05$ vs group I, † $P<0.05$ vs control, ‡ $P<0.05$ vs group III within same column.

Table 2. The developmental rates on mouse embryos cultured *in vitro* during 96 hours in three different SF-VCMs manufactured by DMEM #1, #2 and #3

Group	No. of examined embryos	No. (%) of cleaved embryos during culture time		
		48 hours (Morula ≤)	96 hours (BL ≤)	96 hours (Hatching BL ≤)
Control	105	102 (97.1) ^{*‡}	100 (95.2) [‡]	71 (67.6)
I (SF-VCM #1)	104	102 (98.1) ^{*‡}	101 (97.1) [‡]	85 (81.7) ^{†‡}
II (SF-VCM #2)	106	96 (90.6) [‡]	98 (92.5) [‡]	80 (75.5) [‡]
III (SF-VCM #3)	106	83 (78.3)	80 (75.5)	64 (60.4)

BL: blastocyst. Control: 2 cell embryos were co-cultured with vero cells in DMEM #2 media contained 20% hFF. Group I (manufactured by DMEM #1: mixed three volume of DMEM-G (DMEM with glutamine without glucose and pyruvate) and one volume of DMEM-GGP (DMEM with glutamine, glucose, pyruvate)), II (by DMEM #2: mixed same volume of DMEM-G and DMEM-GGP), III (by DMEM #3: mixed one volume of DMEM-G and three volume of DMEM-GGP) media added to 10% SSS.

^{*} $P < 0.05$ vs group II, [†] $P < 0.05$ vs control, [‡] $P < 0.05$ vs group III within same column.

Fig. 1. Comparison between an various SF-VCMs (#1, #2 and #3) on morphology of Vero cells monolayer after 0 hour and 48 hours *in vitro* culture.

II (75.5%) 사이에는 차이가 없었으며, 실험군 II는 실험군 III에 비하여 유의하게 높은 발달률을 나타내었다 ($P < 0.05$).

글루코스와 피부르산염의 농도가 조절된 DMEM을 이용해 세 가지의 적응용 배양액제조시 배양 전과 배양 48시간 후 Vero 세포의 증식변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같이, 세포수를 측정하지는 않았지만 SF-VCM #1, #2 및 #3 사이에 증식에 대한 큰 차이는 없었다. 그러나 배양액 내 에너지원의 농도 차이에 의해 Vero 세포의 증식에서 농도가 높아지면서 조금 더 증식되는 듯한 모습을 보여주었다.

고 찰

체세포와의 공배양은 사람의 체내와 비슷한 환경을 조성해주어 배아의 분화률을 높이고 할구들의 파편화가 줄어들어 수정란이 배반포 단계로 진행할 수 있는 적절한 환경을 만들어 줌으로써 배아의 질적 향상과 임신율 상승에 기여하는 바가 크다고 알려져 있다. 그러나 공배양 체계를 운영하는 과정이 복잡하고 많은 시간을 요하기 때문에 대부분의 배아생성의료기관에서는 고전적 방법으로 체외배

양을 하고 있는 실정이다.

최근 Kattal 등¹⁰이 광범위한 문헌조사를 통해 사람의 IVF-ET에서 체외 공배양법이 배아의 할구수 증가, 착상률 및 임상적 임신율의 향상에서 통계학적으로 우수한 것으로 보고하였다. 사람의 IVF-ET에서 공급자 세포주를 이용한 공배양 체계는 1989년^{1,7,11}에 시도가 되었으며, 이들은 공배양 체계가 전통적인 배양액에 비해 착상률과 임상적 임신율을 향상시킬 수 있었다고 보고하였다. 공배양의 작용으로는 배아의 체외배양에서 배아성장인자를 분비하고,^{12,13} 증감속 이온이나 활성산소 또는 대사억제제를 제거하여 배양액 내의 독소제거 작용을 수행하며,^{14,15} 체외배양시 발생하는 투명대 경화 현상을 방지하여 배아의 부화를 도와주는 것으로 사료된다.¹⁶

우리는 본 연구에서 배아의 공급자 세포로서 Vero 세포를 사용하였다. Vero 세포는 주로 백신을 생산하는데 사용되어 왔으며, 동결보관이 용이하고 잘 정립된 세포주로서 바이러스나 기타 오염물질이 없고, 지속적인 배양에도 안전하게 사용할 수 있어 공배양세포로 도입되어 사용되고 있는 세포이다. Vero 세포와 같은 체세포의 경우에는 배양액 내에서 부유하지 않고 배양접시나 플라스크 바닥에 부착하여 분열 및 증식하는 특징이 있어 반드시 배양액 내에 혈청의 첨가가 고려되어야 한다. 이들 체세포와 수정란을 공배양하는 경우 체세포들의 단층이 제작되면 신선배양액으로 갈아주고 1~2일 정도 단독으로 배양한 다음 수정란을 함께 넣어 공동배양을 시작하게 되는데, 이 경우에는 반드시 배양액 내에 에너지원으로 작용하는 글루코스, 피부르산염 등이 함께 함유되어 있어야만 한다. 그 이유는 만일 에너지원이 없거나 너무 적으면 공배양 시 에너지원의 부족현상으로 인해 부착세포의 부유현상이 발생하고, 에너지원을 필요로 하는 수정란에게는 치명적인 악영향을 끼칠 수도 있기 때문이다. 또한 체외 공배양 체계가 포유동물 수정란의 체외발달에 유용한 방법이지만, 사실상 공배양이 진행 중인 상황에서는 공급자 세포에 의해 변화되는 배양조건을 수시로 조절해 줄 수 없기 때문에 체외 공배양 과정 중 배아 발달에 약간의 좋지 못한 영향을 끼치는 상황이 있다고 하더라도 어떠한 조치를 할 수 없는 어려움도 있다. 그래서 본 연구가 그러한 어려움을 해소할 수 있는 방법이 될 수 있을 것이라는 데 기대하는 바가 크다. 실제로 Table 2에서 보는 바와 같이, DMEM #1 배

양액으로 제조된 SF-VCM #1 (81.7%)에서 배양 96시간 후 탈출 주머니배 이상으로의 발달률이 대조군인 공배양군 (67.6%) 보다 유의하게 높은 발달률을 보임으로써, SF-VCM 자체가 공배양의 장점들을 잘 활용하면서 단점을 보완해 주고 있는 듯한 생각을 가능케 한다.

글루코스와 피부르산염의 농도가 조절된 DMEM을 이용해 세 가지의 적응용 배양액 제조 시 배양 전과 배양 48시간 후 Vero 세포의 증식변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같은데, SF-VCM #1, #2 그리고 #3 사이에 증식에 대한 큰 차이는 없었다. 그러나 배양액 내 에너지원의 농도 차이에 의해 Vero 세포의 증식에서 농도가 높아지면서 조금 더 증식되는 것과 같은 모습을 보여주었는데, 배양액 내의 에너지원의 농도에 따라 Vero 세포의 증식수가 약간의 영향을 받는 것 것으로 유추할 수 있다. 또한 여기에는 나타내지 않았지만 모든 실험군의 Vero 세포는 배양 24시간 후 250 mL 플라스크 바닥에 완전하게 단층을 형성하였으며, 48시간 후에는 아주 약간의 증식만이 일어나는 모습을 보였는데, 이것은 아마도 SF-VCM 배양액을 제조하기 전에 신선배양액으로 교체해주는 과정에서 FBS에 함유되어 있던 세포 증식인자 (proliferation factor)의 작용에 의해 세포분열이 진행 중인 세포들이 배양액 교체 후에 증식되었기 때문인 것으로 생각된다. 배양액 내 에너지원이 중요한 것은 우리의 이전 연구^{9,16}에서도 보았듯이 배양액 내에 초기 수정란 발달에 효과적인 에너지원의 농도를 공급해줌으로써 수정란의 체외 발달률을 최상으로 끌어 올릴 수 있을 것이기 때문이다. DMEM 배양액에 대한 에너지원의 농도 조절만으로도 단순배양에서는 DMEM #1 배양액에서 높은 체외 발달률을 보였으며,¹⁷ Vero 세포와의 공배양 시에는 DMEM #2 배양액에서 더 높은 체외 발달률을 보였다.⁹ 본 연구의 결과에서도 Table 2에서 보는 바와 같이 SF-VCM #1과 #2는 생쥐 배아의 체외배양 96시간 후 탈출 주머니배로의 발달률에서 Vero 세포와의 공배양군에 비해 더 높은 배아 발달률을 나타내었고 (각각 81.7%, 75.5% 및 67.6%), SF-VCM #1의 경우에는 유의하게 높은 발달률을 보여 ($P=0.0145$), 사람의 배아 발달에도 유용할 것으로 보인다. 그러나 사람과 생쥐의 배아는 배양액 내 에너지원의 활용에 있어서 다소 차이가 있으므로 앞으로 사람의 배아에 대한 SF-VCM의 체외배양 효과가 검증되어야 할 것으로 사료된다. 또한 아직까지 제조된 무혈청 배양액과 Vero 세포

와의 공배양 시 얼마나 많은 유용 시토카인 (GM-CSF, LIF, PDGF, IL-6 등)을 분비 할 것인가에 대해서는 알지 못하므로 이 부분도 우리의 다음 연구에서 선행되어야 할 과제로 남아 있다.

이전 연구들에서 체세포와의 공배양에는 주로 TCM-199,¹⁸ Ham' F-10,¹⁹ HTF^{20,21} 등을 사용하였는데, 이들 모두 배양액 내에 5.5 mM 농도의 글루코스가 에너지원으로 함유되어 있고, 박 등¹⁸은 Vero 세포와의 공배양 체계에서 TCM-199와 DMEM을 이용하여 인간의 수정란을 체외배양하였을 때 에너지원으로 글루타민만을 함유한 DMEM에서 주머니배의 등급이 매우 좋은 것으로 나타나, 5.5 mM의 글루코스를 함유하고 있는 TCM-199보다는 DMEM 배양액이 사람의 시험관 아기 시술 시 주머니배 배아이식을 위한 효과적인 배양액이라고 하였다. 우리의 이전 연구⁹에서도 유사하게 5.5 mM의 글루코스를 함유하고 있는 DMEM 배양액은 배양액만 사용했을 때와 Vero 세포와의 공배양으로 사용했을 때, 두 경우 모두 배아의 체외발달이 다른 실험군에 비해 낮아 효과적이지 못했다. 그러므로 우리는 이전 연구에서 생쥐 배아의 체외배양에 좋지 못한 영향을 끼쳤던 글루코스만을 함유하고 있는 DMEM 배양액

은 본 연구에서도 제외하였다.

Vero 세포를 이용한 적응용 배양액은 상업적으로 판매되는 배양액에 비해 수정란의 체외발달에 도움이 되는 많은 시토카인을 포함하고 있을 것으로 예상되며, 더 높은 배아 발달률과 자궁 내 착상률 그리고 임신율의 증가를 조장할 것으로 보인다. 실제로 본 연구 결과에서 보듯이 체외배양 96시간 후 탈출 주머니배로의 발달률은 SF-VCM 실험군 중 실험군 I (81.7%, $P<0.05$)과 II (75.5%)에서 Vero 세포와의 공배양체계 (대조군: 67.6%) 보다 더 높은 배아의 발달률을 나타내어 SF-VCM이 생쥐 배아의 체외배양 시 효과적인 배양액이라고 여겨지며, 사람을 비롯한 포유동물의 배아를 배양하는데 응용할 수 있을 것이라 생각된다. 우리는 본 연구를 통해 무혈청 적응용 배양액의 효과를 검증하였지만, 아직 이들 배양액의 사용을 위한 여러 가지 연구가 더 진행되어야 할 것이며, 이들 연구의 최종 단계로서 사람의 보조생식술에 적용하여 생존 능력이 뛰어난 양질의 수정란을 만들어 내어 배아 이식 후 높은 착상률을 유도하고 임신율을 향상시키는데 더 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Bongso A, Soon-Chye N, Sathananthan H, Lian NP, Rauff M, Ratnam S. Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989; 4: 706-13.
- Plachot M, Antoine JM, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandelbaum J, et al. Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993; 8: 2133-40.
- 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: 301-6.
- Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B. Coculture of embryos in vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Human Reprod* 1992; 7: 101-6.
- Cole RJ, Paul J. Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit and cell strains developed from them. In: O'Conner M, Wolstenhouse GWE, editors. *Preimplantation stages of pregnancy*. London : J. & A. Churchill; 1965. p.82-155.
- 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: 503-8.
- 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.
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam SS. Coculture techniques for blastocyst transfer and embryonic stem cell production. *Assist Reprod Rev* 1995; 5: 106-14.
- 김주환, 이기환, 손성경, 송해범, 강길전. Glucose와 pyruvate의 농도가 조절된 DMEM 배양액에서 vero 세포를 이용한 공배양체계가 생쥐 착상전 초기배아의 체외발달에 미치는 효과. *대한산부회지* 2005; 48: 1271-81.
- Kattal N, Cohen J, Barmat LI. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2008; 90: 1069-76.
- Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA. Co-culture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989; 52: 503-8.
- Pampfer S, Arceci RJ, Pollard JW. Role of colony stimulating factor-1 (CSF-1) and other lympho-hematopoietic growth factors in mouse pre-implantation development. *Bioessays* 1991; 13: 535-40.
- Barmat LI, Worrlow KC, Paynton BV. Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. *Fertil Steril* 1997; 67: 775-9.
- Loutradis D, Jhon D, Kiessling AA. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. *Bio Reprod* 1987; 37: 311-6.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. Factor affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Reprod Ferti* 1991; 92: 125-31.
- Lai YM, Stein DE, Soong YK, Tang YX, Grifo J, Malter HE, et al. Evaluation of vero cell co-culture system for mouse embryos in various media. *Hum Reprod* 1992; 7: 276-80.

17. 김주환, 서영석, 최송기, 이오성, 송해범, 강길전 등. Glutamine 함유 배양액에서 glucose와 pyruvate의 조성이 착상전 생쥐 배아의 체외발달에 미치는 영향. 대한산부회지 2004; 47: 117-25.
18. 박기상, 최인경, 이진식, 송해범. 체세포의 공배양 체계에서 단일 에너지원이 인간 배반포기 배의 형성에 미치는 영향. 대한불임학회지 1998; 25: 65-70.
19. Sakkas D, Jaquenoud N, Leppens G, Campana A. Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium and co-culture on vero cells: a randomized study. Fertil Steril 1994; 61: 521-25.
20. 이규섭, 고희권, 신병섭, 이영아, 김상우, 나용진. 인간 난관상피세포의 공배양이 생쥐 초기 배아의 체외성장에 미치는 영향. 대한산부회지 2000; 43: 1029-36.
21. 이규섭, 김상우, 나용진, 이영아, 김상정, 장성규. 공배양이 초기배아 발달에 미치는 효과에 있어 Leukemia Inhibitory Factor의 역할 규명에 관한 연구. 대한산부회지 2000; 43: 1216-22.

= 국문초록 =

목적: 본 연구는 글루코스와 피부르산염이 조절된 DMEM을 이용해 Vero 세포를 배양한 후 무혈청 적응용 배양액 (Serum-free Vero cell conditioned medium, SF-VCM)을 얻어 생쥐의 착상 전 생쥐 배아의 체외발달에 미치는 효과를 보기 위해 수행되었다.

연구 방법: 총 846개의 2-세포기 배아를 4~5주령의 ICR 계통 생쥐로부터 얻었다. 글루타민만 함유되어 있는 DMEM (DMEM-G)과 글루타민, 글루코스 및 피부르산염을 함유하고 있는 DMEM (DMEM-GGP)을 각각 3:1 (#1), 1:1 (#2) 및 1:3 (#3)의 비율로 혼합한 배양액을 제조하였다. Vero 세포 단층이 형성된 배양용기에 DMEM #1 배양액을 각각 10 mL, 30 mL 및 50 mL 씩 넣어 48시간 배양 후 회수하여 보관하였다가 사용하였으며, 각각의 배양액에 생쥐배아를 배양하여 48시간 및 96시간에 발달을 비교하였다. 또한 20% 난포액을 함유하고 있는 DMEM #2 배양액을 Vero 세포와 공배양한 군을 대조군으로 하여 각각 DMEM #1, #2 및 #3 배양액으로 제조된 3가지 SF-VCM에도 생쥐배아를 배양하여 발달을 서로 비교하였다. Vero 세포와의 공배양군을 제외하고 모든 실험군에는 10% SSS를 첨가하여 사용하였다. 결과에 대한 유의성 검증은 Chi-square test를 이용하였고, P 값이 0.05 이하일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결과: DMEM #1 배양액 30 mL를 넣은 군에서 각 단계 발달률 (상실배아≤: 97.2%, 주머니배≤: 97.2%, 탈출 주머니배≤: 82.2%)이 다른 실험군들에 비해 유의하게 높게 나타났다 ($P<0.05$). Vero 세포와의 공배양과 다양한 SF-VCM에서 생쥐 배아의 체외배양 효과를 비교한 결과에서는 DMEM #1 배양액으로 제조된 SF-VCM #1 실험군 (Group I)에서 각 단계별 발달률 (상실배아≤: 98.1%, 주머니배≤: 97.1%, 탈출 주머니배≤: 81.7%)이 다른 실험군들에 비해 높게 나타났으며, 배양 96시간 후 탈출 주머니배 이상으로의 발달에서는 대조군 (67.6%)보다 유의하게 높은 발달률을 나타내었다 ($P<0.05$).

결론: Vero 세포 단층이 형성된 배양용기에 DMEM #1 배양액을 사용하여 SF-VCM을 제조하는 경우 250 mL 플라스크에 30 mL의 용량으로 배양하는 것이 가장 효과적이며, 이는 다른 농도의 배양액에 비해 더 높은 체외 발달률을 유도 할 수 있어 사람의 시험관 아기 기술에서 응용해 볼 만한 가치가 있을 것이라 사료된다.

중심단어: 무혈청 적응용 배양액, Vero 세포, DMEM, 체외 공배양, 체외수정