

용해된 Matrigel 첨가 배지에서 착상전 생쥐 배아의 발생

¹경기대학교 자연과학부 생물학과, ²경기대학교 인문예술총괄학부,
³울산대학교 의과대학 산부인과학교실

정병목¹ · 추형식² · 강병문³ · 계명찬^{1*}

Development of Mouse Preimplantation Embryos in Solubilized Matrigel Media

Byung Mok Chung¹, Hyung Sik Choo², Byung Moon Kang³, Myung Chan Gye^{1*}

¹Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyonggi University,

²Faculty of Liberal Arts, Kyonggi University,

³Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ulsan University

Objective: To verify the effect of two forms (growth factor and growthfactor-reduced) of solubilized Matrigel on the development in mouse preimplantation embryos.

Methods: Late 2-cell stage eggs were cultured through the blastocyst stage in the presence of GF- or GFR-Matrigel (0.5%, v/v). Morphological development, cell number and % apoptotic nuclei of blastocyst were measured by Hoechst staining and TUNEL of nuclei.

Results: Morphological development, number of cells per embryo was significantly increased in the presence of GF- or GFR-Matrigel. Culture of the embryos in the GF-Matrigel gave the best result.

Conclusion: Low concentration of solubilized Matrigel improved development of mouse embryos regardless of growth factor content of the Matrigel. Growth factors and extracellular matrix protein included in the Matrigel synergistically potentiated the development of mouse embryos.

Key Words: Matrigel, Mouse embryos, Development

사람을 비롯한 포유동물의 수정 난자를 체외에서 3~4일간 배양한 후 자궁에 이식하여 착상과 임신을 유도하는 과정에서 체내의 조건과 유사한 발생 환경을 조성하는 것은 매우 중요하다. 다양한 조직에서 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM) 단백질이 세포의 성장, 분열과 분화, 사멸에 조절적 역할을 수행한다.¹ 특정 ECM 분자 또는 복합 ECM을 첨가한 배양액에서 착상전 배아 발생의 속도가 향상된다.²⁻⁵ 생쥐에서 laminin-rich ECM 단백질인 Matrigel이 초기배아의 발생을 향상시키고 아폴토시스를 억제하는 것으로 보고되었다.⁶ 선행 연구를 통해 저농도의 용해된 Matrigel (growth factor included

form)에 의해 생쥐 수정난의 난할과 포배로의 발생 촉진 및 사멸 억제효과를 확인하였다.⁶ 그러나 GF-Matrigel내의 ECM protein에 의한 것인지 아니면 성장인자에 의한 것인지 불분명하였다. 본 연구에서는 두 가지 형태의 Matrigel 즉, 성장인자가 들어 있는 GF-Matrigel과 성장인자를 감소시킨 형태의 GFR-Matrigel을 저농도로 용해시킨 배지에서 초기 생쥐 2-세포기 배아의 형태적 발생, 포배의 할구 수 및 apoptotic nuclei의 빈도 및 caspase-3의 활성을 비교하였다.

교신저자: 계명찬, 수원시 팔달구 이의동 산 94-6, 경기대학교 자연과학부 생물학과
Tel: (031) 249-9646, Fax: (031) 253-1165, E-mail: mcgye@kuic.kyonggi.ac.kr

본 연구는 경기대학교 교내연구비 (2000) 및 보건복지부연구비 (MMP-97-M-1-0006) 지원으로 수행되었음.

연구대상 및 방법

1. 배아의 획득 및 배양

본 실험에서는 광주기를 명 14시간, 암 10시간으로 조절되는 사육실에서 사육된 생쥐 (ICR strain)로 암컷은 생후 7~8주된 것을, 수컷은 생후 12주 이상된 것을 사용하였다. 초기배아를 획득하기 위하여 5 IU의 PMSG와 human chorionic gonadotrophin (hCG, Sigma)을 46~48시간 간격으로 암컷 생쥐의 복강내에 주사하여 과배란을 유도한 뒤, 수컷 생쥐와 교미시키고 다음 날 질전을 확인된 암컷을 분리하여 배아를 획득하였다. 후기 2-세포기 배아는 hCG 주사 후 48시간에 생쥐를 경추파괴로 도살한 후, 4 mg/ml bovine serum albumin (BSA)을 함유한 HTF 배양액에서 수란관을 적출하여 배양액을 관류 (flushing)하는 방법으로 수획하였다. HTF에 0.4% BSA를 함유한 배양액을 기본배양액에 GF- 또는 GFR-Matrigel (Irvine, USA)을 0.5% (v/v) 농도로 희석하여 배양에 이용하였다. 배양액을 배양접시 (plastic dishes, 60 x 15 mm, Corning) 위에 20 μ l씩 위치하고 paraffin oil을 덮어 5% CO₂와 95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

2. 발생률 및 할구 수의 측정

hCG 주사 후 84, 120시간에 배아의 발생 상태를 확인하였다. 할구 수 계수를 위해 0.7% sodium citrate 용액으로 5분간 처리하여 배아를 팽윤시킨 후 슬라이드에 올리고 Carnoy 용액으로 고정하였다. 24시간 후 saline으로 세척하였다. Hoechst 33258 (Sigma)를 0.1 μ g/ml 농도로 함유한 HTF 배양액 (0.4% BSA) 내에서 5~6분간 배양하고 PBS로 1회 세척하고 형광현미경 시야에서 관찰하고 사진기록하였다. 배발생률은 χ^2 -test로, 포배내 할구 수는 Student-t test로 통계처리하여 p<0.05일 때 유의한 것으로 판정하였다.

3. *In situ* visualization of apoptotic nuclei

배양이 끝난 배아를 0.7% sodium citrate 용액에 15분간 정치하여 팽윤시키고 슬라이드 위에 한 개의 배아를 올려놓고 정확한 위치를 표시한 후, Carnoy 용액 (acetic acid : ethanol = 1 : 3)을 배아 위에 떨구어 고정하였다. PBS에 5분간 정치하여 수화시킨 후, endogenous peroxidase를 억제하기 위해 3% H₂O₂에

5분간 정치시킨 후 PBS로 5분간 2회 세척하였다. TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)을 위해 세척한 slide는 Apoptag kit (Intergen)의 equilibration buffer에 5분간 정치시킨 후 TdT enzyme solution을 도포하여 humidity chamber에 넣어 37°C, 1시간 30분간 배양하였다. TdT enzyme 반응의 종료는 슬라이드를 Stop/Wash buffer에 넣어 10분간 세척 후, PBS로 1분간 4회 세척하였다. 세척 후 슬라이드 위에 Anti-digoxigenin peroxidase conjugate 용액을 도포한 후 cover glass를 덮고 상온에서 humidity chamber에 넣어 1시간 배양하였다. 반응 후 PBS에서 2분간 3회 세척하고, peroxidase substrate인 DAB (3,3' diaminobenzidine) 용액으로 1분간 반응시켜 발색하였다. PBS로 수회 세척 후 hematoxylin으로 counter staining 하였다. PBS로 세척 후 70~100%로 ethanol series를 거쳐 xylene에 10분 정치 후 Canada balsam으로 permanent mounting 하였다. 할구의 핵 가운데 갈색으로 발색된 것만을 apoptotic nucleus로 판정하고 전체 할구 수에 대한 apoptotic nuclei의 비율을 계산하였다.

4. Caspase-3 활성 측정

실험군당 40개의 배아 (포배)를 재료로 하였다. 배양이 끝난 배아는 1 mg/ml of PVP를 함유한 HTF에 3회 세척한 후 냉각된 lysis buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, and 0.32 M sucrose)에 옮겨 분쇄하였다. 분쇄액은 microcentrifuge에서 15,000 rpm, 15 min, 4°C로 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액은 caspase-3 assay buffer (100 mM HEPES, 1 mM DTT, 0.1% Chaps [pH 7.5] and 10% sucrose)에 혼합한 후 Caspase-3의 기질을 첨가하여 37°C에서 30 min 배양하였다. Caspase-3 기질로는 Ac-Tyr-Vla-Asp-amino-4-methylcoumarin (AMC)를 이용하였다. 이 기질이 caspase-3에 의해 peptide 부위가 절단되면 AMC가 분리되어 형광을 나타낸다.⁷ Fluorescence spectrophotometer (Perkin Elmer, LS50B)를 이용하여 excitation wavelength 380 nm과 emission wavelength 460 nm에서 형광의 강도를 측정하였다. 기질 이외에 protein source가 들어있지 않은 것을 blank로 하여 각 군에서 검출된 형광의 강도를 산출하였다. 실험군간 caspase-3 활성의 차이는 Student's-t test로 결과의 통계처리하며 p<0.05일 때 유의한 것으로 판정하였다.

Table 1. Development of mouse preimplantation embryos in the presence of Matrigel

Stage. (post hCG)	Control	Matrigel	
		GFR	GF
Two-cell Embryos (48 h)	118 (100%)	120 (100%)	119 (100%)
Morula (84 h)	98 (83%)	98 (82%)	102 (86%)
Blastocysts (120 h)	80 (68%)	92 (77%)*	110 (92%)***
Hatching Embryos among the Blastocysts (120 h)	14 (12%)	30 (25%)*	33 (28%)*
Degenerated Embryos (120 h)	13 (11%)	7 (6%)*	7 (6%)*

Embryos were cultured in the presence or absence of 0.5% GF- or GFR-Matrigel from the 2-cell stage to the blastocyst stage. The development to morula, blastocysts and hatched embryos expressed as percentage of total embryos cultured. GF, growth factor included; GFR, growth factor-reduced. Values in parentheses are percentages. * and **, significantly different from control and GFR-Matrigel, respectively (χ^2 -test, $p < 0.05$).

Table 2. The effect of Matrigel on the total cell number per blastocysts developed in vitro

Treatment	Number of Embryos	Cell Number per Blastocyst
Control	43	81±13.10
GFR-Matrigel	45	87±13.70*
GF-Matrigel	43	93±13.95*

Embryos were cultured in the presence or absence of 0.5% GF- or GFR-Matrigel from the 2-cell stage to the blastocyst stage. Number of nuclei was counted after the Hoechst staining. GF, growth factor included; GFR, growth factor-reduced. Data are mean±SD. *, significantly different from control (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

Table 3. The effect of Matrigel on the apoptotic blastomere of the blastocysts

Treatment	Number of Embryos	% Apoptotic Nuclei
Control	18	10.35±7.94
GFR-Matrigel	16	4.30±2.39*
GF-Matrigel	16	3.36±2.72*

Embryos were cultured in the presence or absence of 0.5% GF- or GFR-Matrigel from the 2-cell stage to the blastocyst stage. Number of apoptotic nuclei was counted after TUNEL labeling. GF, growth factor included; GFR, growth factor-reduced. Data are mean±SD. *, significantly different from control (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

Table 4. Caspase-3 activity of the embryos

Treatment	Activity (% of Control)
Control	100
GFR-Matrigel	93.68±3.77*
GF-Matrigel	85.14±4.05*

Blastocysts developed in the presence or absence of Matrigel (GF- and GFR-) from 2-cell stage were subjected to caspase-3 assay 120 h post hCG. Whole lysate of 40 embryos were incubated for 30 min in the presence or absence of caspase-3 substrate (Ac-Tyr-Vla-Asp-amino-4-methylcoumarin). As a blank enzyme-free reaction was used. Data are % of control (HTF). Error bars are SD ($n = 3$). *, significantly different from control (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

결 과

GF 및 GFR Matrigel 모두 초기배아의 형태발생과 할구 수를 증가시킨다

hCG 주사 후 84시간에 ECM이 첨가된 배양액에서 상실배가 관찰되었으며 ECM 비처리군 보다 높은 발생률을 기록하였으나 유의하지 않았다. hCG 주사 후 96시간에 ECM이 첨가된 배양액에서 포배가 관찰되었으며 ECM 비처리군 보다 유의하게 ($p < 0.05$) 높은 발생률을 기록하였다. hCG 주사 후 120시간에 ECM이 첨가된 배양액에서 부화를 진행중이거나 부화된 배아가 ECM 비처리군 보다 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다 (Table 1). 후기 전핵시기 배아를 배양하여 포배가 되었을 때 배아를 고

정하여 핵을 염색한 후 계수한 결과 GF- 및 GFR-Matrigel이 첨가된 배양액에서 ECM 비처리군 보다 할구 수가 유의하게 ($p<0.05$) 증가되었다 (Table 2).

GF 및 GFR Matrigel 모두 초기배아 세포의 apoptosis를 억제한다

2-세포기 배아를 배양하여 포배가 되었을 때 배아를 고정하여 TUNEL을 시행한 결과 Matrigel이 첨가된 배양액에서 전체 할구 가운데 TUNEL positive 핵의 수 및 비율이 유의하게 적음을 확인하였다 (Table 3). TUNEL-positive nuclei의 비율은 GF-Matrigel 배지에서 가장 낮았고, 다음으로 GFR-Matrigel, HTF 순으로 낮게 나타났으며 3군 사이에 유의한 ($p<0.05$) 차이가 확인되었다. 2-세포기 배아를 배양하여 포배가 되었을 때 lysis시켜 caspase-3 활성을 조사한 결과 GF-Matrigel 및 GFR-Matrigel이 첨가된 배양액에서 caspase-3 활성은 비첨가군의 배아내 caspase-3 활성 보다 유의하게 낮았다 ($p<0.05$) (Table 4). GF-Matrigel 처리군의 배아의 caspase-3 활성은 GFR-Matrigel 처리군의 배아의 caspase-3 활성 보다 낮았으나 유의하지 않았다.

고 찰

본 연구 결과 용해된 상태의 ECM 복합체인 Matrigel이 첨가된 배양액에서 배아의 형태적 발생과 세포 수가 증가하였다. 이와 유사하게 생쥐 초기배아에서 Matrigel에 의한 부화촉진⁸ 및 laminin, fibronectin 등과 같은 특정 ECM이 첨가된 배양액에서 발생 속도의 향상이 보고되었다.²⁻⁵ 이러한 효과는 Matrigel이 배아내 할구세포 활동의 2가지 측면, 즉 세포분열 및 분화를 촉진하였음을 의미한다. Matrigel내에는 laminin, collagen IV, heparansulfate proteoglycan, entactin, nidogen 등의 ECM protein이 존재하며,⁹ TGF- β , FGF, tPA 등의 성장인자가 소량 존재한다.¹⁰ 이들 성장인자 및 단백질분해효소들은 초기배아 발생을 촉진한다.¹¹ GFR-Matrigel에 첨가된 배양액에서도 배아의 형태적 발생 및 할구 수의 유의한 증가가 관찰되어 Matrigel에 의한 발생의 촉진효과는 ECM만으로도 가능함을 알 수 있다. 배아 자체에서도 미량의 성장인자와 cytokine들이 생성되어 배아 자신의 발생에 영향을 미치며 이들의 효과가 ECM의 존재에 의해 더욱 증폭되는 것이 보통이다.¹² 따라서 배양액에 첨가된 ECM에 의한 직접적 효과와 함께 부가적으로 성장인자,

cytokine 및 단백질분해효소들의 작용이 상승적으로 작용하였을 가능성이 있다. 난할중인 초기배아 및 배아 주변에는 다양한 ECM들이 존재하며,^{2,13,14} 외부에서 첨가한 ECM은 투명대를 통과해 배아와 접촉할 수 있다.¹⁵ 고품의 integrin ligand 뿐 아니라 용해된 상태의 ECM 분자는 세포의 생존을 촉진하며 apoptosis를 억제한다.¹⁶ 따라서 이와 유사하게 배아 주위에 존재하는 용해된 상태의 Matrigel내의 ECM protein (주로 laminin)에 의해 배아내 할구세포의 증식과 분화신호가 전달될 가능성이 있다. 배아의 형태발생적 측면은 주로 배아 자체에 존재하는 발생 시간표에 의존적으로 진행되며 난할과 할구의 분화가 독립적으로 일어난다.^{17,18} 그러나 체외에서 발생하는 발생정지현상 및 성장인자 등이 포함된 배양액에서 형태발생의 속도 및 할구 수의 증가현상은 배아외적인 조건이 배아의 발생을 가변적으로 조절할 수 있음을 암시한다. 본 실험 결과 Matrigel이 첨가된 배양액에서 배아의 형태발생이 빠르게 진행되고 할구 수가 증가한 것은 배아내 존재하는 발생프로그램의 진행이 Matrigel내에 존재하는 ECM에 의해 촉진될 수 있음을 의미한다. Matrigel에 의해 포배시기의 할구 수가 유의하게 증가한 결과에서 수용성 ECM ligand가 초기배아의 세포분열을 촉진하는 것으로 사료된다. 일반적으로 integrin 하부의 ECM 신호의 전달자는 세포의 생존과 분화조절에 관여하며 성장인자 수용체를 통한 신호와 부가적으로 작동한다. 본 실험 결과 GF-Matrigel 배양액에서 가장 높은 발생률을 보이고 이를 뒤이어 GFR-Matrigel, 기본배양액 순으로 나타나 Matrigel내의 ECM 단백질과 성장인자들이 부가적으로 작용하여 배아의 발생 및 생존을 촉진한 것으로 사료된다. 사람의 보조생식술 분야에서 본 연구 결과에 대한 확인과 함께 실험동물 모델에서 신호전달 수준에서 ECM과 성장인자들에 의한 초기배아 발생을 조절 기작에 대한 연구가 요망된다.

Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma의 세포외 기질로부터 추출한 ECM 복합체인 GF- 및 GFR-Matrigel이 생쥐 초기배아의 발생과 할구 수, apoptosis에 미치는 영향을 조사하였다. GF- 및 GFR-Matrigel을 0.5% (v/v) 첨가한 배양액에서 생쥐 초기배아의 형태적 발생과 할구 수가 유의하게 증가되었으며, apoptosis는 억제되었다. GF-Matrigel은 GFR-Matrigel 보다 좋은 결과를 보여 Matrigel내의 ECM 단백질과 성장인자들이 부가적으로 작용하여 배아의 발생 및 생존을 촉진한 것으로 사료된다.

사람의 보조생식술 분야에서 Matrigel을 첨가한 배양액의 활용을 권고된다. 차후 신호전달 수준에서 ECM과 성장인자들에 의한 초기배아 발생 조절 기작에 대한 연구가 요망된다.

참 고 문 헌

1. Beattie GM, Rubin JS, Mally MI, Otonkoski T, Hayek A. Regulation of proliferation and differentiation of human fetal pancreatic islet cells by extracellular matrix, hepatocyte growth factor, and cell-cell contact. *Diabetes* 1996; 45: 1223-8.
2. Turpeenniemi-Hujanen T, Feinberg RF, Kauppila A, Puistola U. Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertil Steril* 1995; 64: 132-8.
3. Saito S, Niemann H. Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol Reprod* 1991; 44: 927-36.
4. Desai N, Scarrow M, Lawson J, Kinzer D, Goldfarb J. Evaluation of the effect of interleukin-6 and human extracellular matrix on embryonic development. *Hum Reprod* 1999; 14: 1588-92.
5. Lazzaroni L, Fusi FM, Doldi N, Ferrari A. The use of Matrigel at low concentration enhances *in vitro* blastocyst formation and hatching in a mouse embryo model. *Fertil Steril* 1999; 71: 1133-7.
6. Kang BM, Son IP, Chung BM, Choi KW, Gye MC. Preimplantation development and apoptosis of mouse embryos in the medium containing extracellular matrix. *Kor J Fertil Steril* 2000; 27: 253-9.
7. Thornberry NA. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol* 1994; 244: 615-31.
8. Carnegie J, Claman P, Lawrence C, Cabaca O. Can Matrigel substitute for Vero cells in promoting the *in-vitro* development of mouse embryos? *Hum Reprod* 1995; 10: 636-41.
9. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982; 21: 6188-93.
10. McGuire PG, Seeds NW. The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J Cell Biochem* 1989; 40: 215-27.
11. Kaye PL, Harvey MB. The role of growth factors in preimplantation development. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6: 1-24.
12. Camejo EH, Rosengren B, Camejo G, Sartipy P, Fager G, Bondjers G. Interferon gamma binds to extracellular matrix chondroitin-sulfate proteoglycans, thus enhancing its cellular response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1456-65.
13. O'Shea KS, Liu LH, Kinnunen LH, Dixit VM. Role of the extracellular matrix protein thrombospondin in the early development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 1990; 111: 2713-23.
14. Yanagishita M. Proteoglycans and hyaluronan in female reproductive organs. *EXS* 1994; 70: 179-90.
15. Larson RC, Ignatz GG, Currie WB. Effect of fibronectin on early embryo development in cows. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 289-97.
16. Bozzo C, Bellomo G, Silengo L, Tarone G, Altruda F. Soluble integrin ligands and growth factors independently rescue neuroblastoma cells from apoptosis under nonadherent conditions. *Exp Cell Res* 1997; 237: 326-37.
17. Wiekowski M, Miranda M, DePamphilis ML. Regulation of gene expression in preimplantation mouse embryos: effects of the zygotic clock and the first mitosis on promoter and enhancer activities. *Dev Biol* 1991; 147: 403-14.
18. Dean WL, Rossant J. Effect of delaying DNA replication on blastocyst formation in the mouse. *Differentiation* 1984; 26: 134-7.