

흰쥐의 배자배양에서 배양 온도의 변화에 의해 유도된 apoptosis

I. 발생 9일 흰쥐 배자의 배양

박형우, 이혜정, 설은영, 유병기

연세대학교 의과대학 해부학교실

〈 초 록 〉

기형유발물질 검사에 주로 이용되고 발생 기전의 연구에도 중요한 방법의 하나로 이용되는 배자배양법을 정립하기 위해 발생 9일 흰쥐 배자를 48시간 동안 배양하였다. 배양액은 혈액을 뽑은 즉시 원심분리하고 56°C에서 30분간 열처리한 혈청을 사용하였고, 분리된 배자는 배양액이 담긴 배양병에 넣어 37°C로 유지되는 배양기의 물리회전기 위에서 배양하였다. 배양기체는 처음 24시간 동안에는 5% 이산화탄소, 5% 산소, 90% 질소의 혼합기체를 사용하였고, 이후 24시간 동안에는 5% 이산화탄소, 20% 산소, 75% 질소의 혼합기체를 사용하였다. 24시간 및 48시간의 배양이 끝난 배자는 발생 9일, 10일 및 11일 대조군과 외형 관찰, 총단백질량, 조직표본 관찰 등을 비교해 배양 결과를 판정하였다. 발생 9일 배자는 신경고랑이 관찰되었고 크기는 태반바깥원뿔을 포함하여 $1.8 \pm 0.3 \text{ mm}$ 이었고, 태아막을 제외한 배자의 총단백질량은 $3.4 \pm 1.6 \mu\text{g}$ 이었다. 발생 10일의 경우 배양군이 대조군에 비해 난황주머니의 길이나 머리궁둥길이는 작았으나 몸분절수, 총단백질량에는 큰 차이가 없었다. 그러나, 배자의 회전, 앞신경관구멍의 폐쇄는 느린 발달을 보였다. 발생 11일 배자는 배양군이 대조군과 비교해 아가미환의 수, 팔쌍의 발달 등에서 다소 늦었고, 배자의 회전, 몸분절의 수 등에는 큰 차이가 없었다. 배양이 잘된 배자는 대조군과 비교해 조직표본 관찰에서도 특별한 차이가 없었다. 이상의 결과로 발생 9일 흰쥐 배자의 배양이 성공적으로 이루어졌다고 판단하였다.

찾아보기 낱말 : 흰쥐, 배자배양, 기형유발물질 검사

서 론

발생중인 동물의 연구는 성숙한 동물에서의 구조들을 이해하고 선천성으로 나타날 수 있는 기형을 설명하는데 필수적인 정보를 제공해 준다. 발생의 연구에는 정상 뿐 아니라 비정상적인 표본도 중요하며, 따라서 발생학과 기형학은 동전의 앞면과 뒷면, 즉 서로 다른 분야 같지만 매우 밀접한 관계를 갖는 분야로 생각할 수 있다.

형태학에서의 발생학 연구는 전통적으로 여러 발생 단계의 배자(혹은 태아)가 시기별로 어떻게 발달하는가를 다양한 방법으로 추적해 왔다. 최근 현미경 및 조직학적 방법의 발달로 각 발생 단계의 배자가 갖는 구조의 특징을 보다 정확히 알게 되었지만, 이렇게 얻은 결과는 여러 시기의 결과를 짜깁기한 정도인 경우가 많아 발생 기전을 이해하는데 어려움이 있어 왔다. 또한 배자를 계속 살아 있는 상태로 실험하는 것은 극히 어려웠기 때문에 세포, 조직 혹은 기관을 배양

하는 방법을 이용하였으나 개체의 일부만을 이용한 것에 불과하여 나름대로 한계가 있었다. 따라서 살아있는 배자를 꺼내 조작하고 계속 관찰할 수 있는 방법의 필요성이 대두되어 왔다.

한편 형태학에서의 기형학 연구는 기형유발성을 검사하기 위해 흔히 특정 임신일에 약물을 투여한 후 임신기간이 끝나면 신생 동물에서 기형 등을 검사해 왔다. 이 방법은 선택한 실험동물의 임신 기간에 따라 어떤 물질의 기형유발성을 검증하는데 많은 시간이 걸릴 수 있고, 포유류의 경우에는 어미와 배자 사이에 위치한 태반의 작용 혹은 임신의 진행에 따른 복구(즉 배자의 흡수, 잘 모르는 기전 등에 의한 손상)의 치유 등) 등에 의해 변경될 수 있어 결과의 판정이 쉽지 않다. 따라서 약물의 기형유발성이나 효과를 보다 순수하고 간편하게 알 수 있는 방법이 절실하였다.

이와 같은 필요성에 의해 개발된 방법이 배자배양법(whole embryo culture)이다.

배자배양에는 설치류가 가장 흔히 사용되며, 많은 구조들의 원기가 출현해 기관발생이 활발한 발생 2주 동안에 2~3일간 배양할 수 있다(New, 1971). 이 방법은 배양중인 배자

* 이 연구는 1995년도 교육부 학술조성연구비(기초의학)에 의하여 연구되었음

를 수시로 관찰할 수 있고 원하는 발생 단계의 배자를 선택하거나 다양한 조작을 통해 발생 기전을 연구하는데 큰 도움이 되며, 배양액에 검사하고 싶은 약물을 첨가하면 기형유발성이나 효과를 보다 순수하게 알 수 있어, 특히 기형학 분야의 연구에 중요한 방법의 하나로 활발하게 이용되고 있다 (Copp와 Cockroft, 1990).

그러나, 우리나라에는 이 방법이 아직 제대로 소개되어 있지 않은 실정이다. 본 연구자들은 배자배양에 가장 흔히 사용되고 있는 발생 9일의 흰쥐 배자를 성공적으로 배양하였기에 이를 보고한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 Sprague-Dawley계의 임신 흰쥐를 이용하였다. 저녁에 1~2마리의 수흰쥐와 3~5마리의 암흰쥐를 한 우리에 넣고 다음날 아침 8시에 질도말검사를 통해 정액이 검출되면 발생 0일로 정의하였다.

2. 배자의 적출

임신 쥐는 발생 9일 오전 9시에 이터(Ether)로 마취해 배를 열고 자궁 전체를 분리하였다. HBSS 용액(Hanks' Balanced Salt Solution) 속에서 안과용 가위로 자궁벽을 긴 축을 따라 절개한 후 착상 부위를 적출해 내었으며, 날카로운 집게(EM forceps)로 탈락막 및 라이케르트막(Reichert's membrane)을 제거하였다. 배자는 Fujinaga 등(1992)의 발생기에 따라 분류하여 사용하였다. 대부분의 경우 손상없이 배자를 적출할 수 있었으며, 착상부의 자궁조직이나 라이케르트막을 제거할 때 손상된 것은 배양에서 제외하였다. 임신 쥐에서 배를 연 후 배양을 시작할 때까지 소요된 시간은 2시간을 넘지 않았다.

3. 배양액

혈액을 뽑은 즉시 원심분리하고 56°C에서 30분간 열처리한 100% 쥐혈청에 항생제(100 µg/ml 스트렙토마이신, 100 IU/ml 페니실린)를 넣은 것을 배양액으로 사용하였다.

한 마리의 쥐에서 7~8 ml 정도의 혈액을 얻었고, 원심분리후 3 ml 정도의 혈청을 얻을 수 있었다. 배양용기는 125 ml 용량의 병에 10 ml의 배양액을 넣어 사용하였으며, 배양 30분전 5분간 배양기체를 흘려 배양용액의 기체가 배양기체와 평형이 되도록 하였다. 배양액은 배자당 1 ml 이상을 사용하였다.

4. 배양법

배양기체는 배양을 시작할 때 5% 이산화탄소, 5% 산소

및 90% 질소의 혼합기체를 사용하였으며, 배양 12시간 후 같은 기체로 다시 채웠다. 발생 10일 오전 9시(배양 24시간 후)에 5% 이산화탄소, 20% 산소 및 75% 질소의 혼합기체로 바꾸었으며, 36시간 후 다시 발생 24시간 후에 사용되었던 기체로 채웠다. 배양병은 얇은 나사실링테이프로 병마개 흡을 감은 후 병마개를 닫아 기체의 누출을 막았다.

배양기는 incubator에 롤러회전기(roller rotator)를 넣고 온도가 37°C를 유지하도록 하였다. 회전기 위에 배양병을 놓고 분당 30번 회전시켰다. 발생 10일 및 발생 11일 오전 8시에 24시간과 48시간의 배양을 끝내었다. 일부의 배자는 72시간 동안 배양하였다. 또한 대조군으로 발생 9일, 10일 및 11일 오전 8시에 임신 쥐의 배를 열고 위와 같은 방습스크 배자를 적출해 사용하였다.

5. 배양 결과의 검증

배양된 배자는 발생 9일, 10일 및 11일의 대조군과 다음의 사항을 비교 분석함으로써 그 결과를 판정하였다.

1) 수술현미경을 이용한 배자의 형태 관찰

발생 9일: 배양을 시도한 배자는 태반바깥원뿔(ectoplacental cone)을 포함한 크기, 원뿔이 손상된 경우 난황주머니의 길이를 측정하였다. 배자의 발생 상태는 Fujinaga 등(1992)의 발생기에 따라 분류하였다. 즉, 신경고랑 및 앞창자주머니의 발생 상태를 관찰하여, 신경고랑이 배쪽에서만 관찰되고 가쪽에서는 신경주름이 관찰되지 않는 발생 11a기, 가쪽에서 신경주름이 확실히 구별되는 발생 11b기, 앞창자주머니가 관찰되지만 몸분절이 형성되어 있지 않은 발생 11c기로 구분하였다.

발생 10일: 대조군 및 24시간 배양군에서 난황주머니의 크기, 배자의 머리궁둥길이, 몸분절의 수, 배자의 회전 시작, 앞신경관구멍의 폐쇄, 아가미활의 수 및 귀오목의 형성 등을 관찰 및 측정하였다.

발생 11일: 대조군 및 48시간 배양군에서 난황주머니의 크기, 배자의 머리궁둥길이, 몸분절의 수, 배자의 회전 완료, 아가미활의 수, 귀오목의 폐쇄, 팔삭의 발달 상태 및 수정체 오목의 형성 등을 관찰하고 측정하였다.

2) 총 단백질량

단백질 정량 시약(Biorad)으로 Bradford법(1976)을 이용해 배자의 총 단백질량을 정량하였다.

3) 조직 단면 표본 제작

대조군과 실험군의 조직 표본을 광학 및 전자현미경으로 관찰하여 차이를 알아보았다. 또한 배자배양이 성공적으로 된 경우 apoptosis의 분포에 특별한 차이가 있는가를 검토하였다.

결 과

1. 발생 9일 배자

암·수 쥐를 한 우리에 넣어 임신을 시도한 경우 대부분 임신되었으며, 임신 쥐 한마리에서 평균 12.4±2.2마리 (범위 8~18)의 배자를 얻었다. 실험에 사용된 배자 (Fig. 1)는 대부분 발생 1b기이었고, 11a기와 11c기도 있었다. 드물게 관찰된 발생 10기 배자는 배양에서 제외하였다. 태반바깥원뿔을 포함한 발생 9일 배자는 길이가 1.8±0.3 mm (범위 1.2~2.9), 원뿔이 조작 과정에서 제거된 경우의 크기는 평균 1.1±0.2 mm (범위 0.7~1.6)이었다. 배양을 시작할 때의 총단백질량은 평균 3.4±1.6 µg (범위 0.8~6.8)이었다.

2. 발생 10일 배자

발생 10일 배자 (대조군 및 24시간 배양군)에 관한 자료는 Table 1에 나타내었다.

배양을 시작하고 첫 몇시간 동안에 난황주머니는 특징적으로 팽창되어 백혈전구모양을 하였다. 이후에는 전체적으로 커져 발생 10일에는 공모양을 하였다 (Fig. 2).

24시간 배양군은 대조군보다 난황주머니의 길이와 머리궁둥길이가 작았으나, 몸분절의 수 및 총단백질량에는 큰 차이가 없었다. 또한 배자의 형태에서 배양군은 배자의 회전 시작, 앞신경관구멍의 폐쇄 및 귀오목 형성 등이 대조군에 비해 다소 늦었으나, 몸분절 및 아가미활의 수는 차이가 없었다.

3. 발생 11일 배자

발생 11일 배자 (대조군 및 48시간 배양군)에 관한 자료는 Table 1에 나타내었다.

발생 10일 이후 활발한 성장이 일어나 머리궁둥길이는 2배 이상, 몸분절의 수는 15개, 아가미활의 수는 약 2개, 총단백질량은 7배 정도 증가하였다 (Fig. 3). 또한 앞신경관구멍이 폐쇄되고 많은 경우 귀오목이 닫혔으며, 팔뺝이 출현하였다.

48시간 배양군은 대조군보다 난황주머니 크기나 머리궁둥길이는 작았고, 총단백질량도 적었으나, 몸분절의 수는 큰 차이가 없었다. 배자의 형태에서는 배양군이 아가미활의 수, 귀오목의 폐쇄, 팔뺝의 발달 등이 대조군에 비해 다소 늦었고 배자의 회전 및 수정체오목의 형성은 차이가 없었다.

4. 조직 표본 및 apoptosis

배양이 제대로 된 배자는 대조군과 비교해 조직학적 소견 및 apoptosis의 분포에 큰 차이를 나타내지 않았으나, 배양에 실패한 경우에는 퇴행 변화를 관찰할 수 있었다.

고 찰

착상 이전의 배자 (preimplantation embryo)는 19세기말 한 토끼에서 다른 토끼로 살아있는 난자를 성공적으로 이식한 이래 (Heape, 1890) 난자와 난포배의 배양법이 개발되어 착상 전 배자에서 대사 및 형태발생의 기전에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다. 또한 최근에는 분자생물학 및 첨단기술의 발달로 인간에서 체외수정법 등을 이용한 소위 '시험관 아기'가 보편화되기에 이르렀다. 그러나 착상 이후 배자의 배양은

Table 1. Morphological characteristics of control and cultured rat embryos (mean ± S.D.).

| | day 10 | | day 11 | |
|--------------------------|--------------|-------------|----------------|---------------|
| | control | culture | control | culture |
| diameter of yolk sac | 2.5±0.3 mm* | 1.8±0.3 mm | 4.3±0.4 mm* | 3.3±0.6 mm |
| crown rump length | 1.5±0.2 mm* | 1.3±0.2 mm | 3.3±0.3 mm* | 2.9±0.4 mm |
| number of somite | 8.6±1.7 | 8.0±1.7 | 23.3±1.4 | 23.1±1.8 |
| total protein | 27.0±13.7 µg | 29.0±9.6 µg | 214.9±78.1 µg* | 157.8±56.9 µg |
| rotation start | 86% | 11% | - | - |
| completion | - | - | 86% | 93% |
| closure of anterior | | | | |
| neuropore | 20% | 0% | - | - |
| neural fold - upright | 36% | 52% | - | - |
| wide open | 44% | 48% | - | - |
| number of branchial arch | | | | |
| 0 | 5% | 0% | - | - |
| 1 | 95% | 100% | 0% | 1% |
| 2 | - | - | 14% | 56% |
| 3 | - | - | 86% | 43% |
| otic pit - open | 50% | 35% | - | - |
| closed | - | - | 81% | 44% |
| upper limb bud - low | - | - | 0% | 4% |
| crest | - | - | 70% | 88% |
| semilunar | - | - | 30% | 8% |

* P<0.001

배자를 안전하게 자궁으로 분리시킬 방법이 개발되지 않았고 태반이 있다는 점 등의 이유로 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다.

착상 이후의 배자를 처음으로 의의있게 배양한 것은 1930년대 프랑스의 Jolly와 Lieure (1938), 미국의 Nicholas와 Rudnick (1934, 1938) 등이었다. Jolly와 Lieure (1938)는 혈청이 담긴 작은 접시에 쥐와 기니피그 배자를 배양하여 원시선조와 약간의 몸분절을 가진 쥐배자의 37%에서 규칙적인 심장박동을 관찰하였고 일부에서는 순환도 관찰할 수 있었지만, 팔삭이나 요막순환 등에는 도달하지 못하였다. 한편 Nicholas와 Rudnick (1934, 1938)도 헤파린을 첨가한 쥐 혈장 및 배자 추출물로 흐름배양을 시도하여 약 10쌍의 몸분절까지 배양하였다. 이 두 실험의 결과는 현재 기준에 비해 형편없는 것이었지만 보다 개량된 방법의 발달을 자극하는 중요한 시발점이 되었다. 이후 1950년대까지는 거의 진전이 이루어지지 않다가 thalidomide 참사가 발생하여 기형유발에 관심이 많아지면서 기관형성 및 착상 후 배자의 연구를 위한 배양에 관심을 갖게 되었다 (New, 1966a).

1960년대에 영국 Cambridge대학의 New 등은 설치류 배자를 혈장용고물 (New와 Stein, 1964) 혹은 혈청 (New, 1966b)으로 시계유리에 배양하는 시계유리배양법 (watch-glass culture)을 고안하였다. New (1966b), Steele과 New (1974)는 위의 방법을 이용할 때, 즉시 원심분리시킨 쥐의 혈청을 열로 단백질을 비활성화시키고, 60~95% 산소 및 3~5% 이산화탄소를 포함하는 기체에 배양해 가장 좋은 결과를 얻었다. 그들은 이와 같은 조건으로 발생 9일 배자를 36시간 정도 배양하였고, 90%의 배자에서 혈액순환이 발달하고 기관이 정상적으로 형성되었다. 이 방법은 기구 및 조작이 단순하다는 장점이 있었다.

그러나 배자를 더 오래, 효율적으로 발달시키기 위해서는 위와 같은 정적인 방법보다는 배양액을 순환시키는 방법이 필요했으며, 이에 따라 순환배양법 (circulation culture)이 고안되었다 (New, 1967; New와 Cockroft, 1978). 이 방법은 배양액과 적당히 산화된 혼합기체가 섞인 거품을 가압해 순환시키며, 배자가 배양액과 함께 순환하는 것을 막기 위해 아교질로 칠한 거즈로 배자를 고정시킨다. 이 방법에서는 배자의 위치가 고정되어 있기 때문에 배자의 관찰이 용이하며, 지속적인 관찰이 필요한 경우 매우 중요한 방법이다. Robkin과 Shepard (1972)는 레이저를 이용해 발생중인 배자의 심박동을 자동으로 기록하는 순환배양법을 개발하였으나, 기계가 너무 복잡한데 비해 특별한 장점은 없어 실용화되지 못하였다. 이와 같이 순환배양법에 사용되는 배양기는 구조가 복잡해 단순하면서도 보다 좋은 결과를 얻을 수 있는 배양법의 필요성이 대두되었다.

현재 배자배양에는 병을 회전시켜 배양하는 병회전배양법 (rotation bottle culture)이 주로 사용되고 있다. 이 방법에서

배자배양용기는 실린더 모양의 유리 혹은 작은 유리병이며, 용적의 10% 정도는 배양액 및 배자가 차지한다. 나머지 부분은 적당한 배합의 배양기체로 채우며, 기체 누출을 막기 위해 뚜껑을 단단히 잠근다. 배양용기는 수평으로 롤러 위에 놓거나 (New 등, 1973), 회전원반 (Kochhar, 1975) 혹은 속이 빈 드럼 (New와 Cockroft, 1978)에 부착시키며, 분당 30~60회 회전시킨다. 이 방법을 이용하면 배양액이 계속 신선한 기체에 노출되어 산화가 증진되며, 배양액이 배자를 계속 부드럽게 움직이게 하기에 배자의 호흡을 돕는다. 용기속의 기체는 주기적으로 다시 채우거나 계속 기체를 공급한다. 이 방법은 단순하고 결과가 확실하기 때문에 특히 많은 배자를 배양할 경우 가장 널리 사용되고 있다 (Shepard 등, 1987).

배자배양법은 발생 시기에 따라 착상 이전, 난원통기와 요막태반이 형성되기 전 사이, 요막태반이 형성된 이후의 배양 등으로 나눌 수 있다. 최근 발생 14~15일 배자의 성공적인 배양이 보고되었다 (Barber 등, 1993).

착상 이후 배자의 배양에는 쥐와 생쥐가 가장 적합하며, 현재 거의 이 동물들이 사용되고 있다 (New, 1990). 이외에 햄스터, 기니피그, 토끼, opossum의 배양도 시도되었으나 현재로서는 결과가 만족스럽지 못하다. 쥐와 생쥐는 기관형성기 (발생 2주)에 배양이 잘 되는데, 이것은 이 시기에 역위된 난황주머니태반 (inverted yolk sac placenta)이 존재하고 난황주머니와 자궁의 관계가 비교적 단순해 배양액에 쉽게 적응되기 때문으로 알려져 있다. 그러나 배자가 성장하면서 모체와 태아의 교환이 증가하고 점차 융모막요막태반에 의존하게 되면 배양이 힘들어진다. 쥐는 생쥐보다 크고 한 배의 새끼의 수가 더 일정하며, 착상 이후 배자의 경우에는 더 잘 배양되는 것으로 알려져 있다. 쥐 배자의 배양에는 혈액을 뽑은 즉시 원심분리한 후 56°C에서 30분간 비활성화시켜 만든 쥐 혈청을 이용하며, 이것은 원시선조기 이후의 쥐 배자를 배양했을 때 나타나는 이중심장의 형성을 막는다 (Steele, 1972; Steele과 New, 1974).

배자배양이 성공하기 위해서는 모든 단계에서 주의가 필요하며, 다음과 같은 사항이 중요하다. 우선 배양할 배자 (이 실험의 경우 발생 9일)의 발달 상태이다. 잘 알려진 바와 같이 같은 발생일이어도 임신 쥐에 따라, 또한 한 배의 새끼에서도 상당한 변이가 있을 수 있다 (Allen과 MacDowell, 1940; Fujinaga 등, 1990). 따라서 시작점이 다른 배자들은 최종 배양 결과가 다를 수 있다. 많은 실험동물에는 배자의 발달 상태를 객관화시키는 발생기가 있으며, 설치류에는 Theiler (1972)의 발생기가 가장 보편적으로 사용되고 있다. 이 실험에서는 이 발생기를 개량한 Fujinaga 등 (1992)의 분류를 따랐다. 발생 9일 오전 9시에 적출해 낸 배자의 대부분은 발생 11b기이었으며, 11a기와 11c기도 있었다. 기형학 연구에서 가장 흔히 사용되는 발생 11c기 (머리주름기)는 발생 9일 오후에 해당하여, 새벽에 배양기체를 교환해야 하므로

이 실험에서는 발생 11b기 배자를 주로 이용하였다. 발생 9일 배자의 총단백질량은 5 µg 이하로 매우 적으므로, 배자 이외의 조직이 포함되지 않도록 하는 것이 매우 중요하다.

배자의 적출 과정에서는 라이케르트막의 제거가 가장 중요하다. 벽측난황주머니 바로 외부에 놓여 있는 이 막은 비세포성의 용모막 잔유물이며, 태반박원뿔 반대편에 작은 공간을 형성한다. 이 막을 제거하지 않으면 배자 배양이 잘 되지 않는다 (Nicholas와 Rudnick, 1938), 그 이유로 생체에서 이 막은 난황주머니와 같은 비율로 성장하지만, 배양중에는 거의 혹은 전혀 팽창하지 않아 난황주머니의 성장을 막기 때문인 것으로 알려져 있다 (New와 Stein, 1964). 이 막을 제거하려면 이 공간이 있는 부위에서 2개의 미세한 휘셋으로 막을 잡고 양쪽으로 당겨 찢어야 하는데, 특히 머리주름기 이전에는 기술적으로 어렵다. Fujinaga와 Baden (1991)은 배자 반대편의 태반박원뿔에서 이 막을 쉽게 제거할 수 있음을 보고하였고, 이 실험에서도 벽측난황주머니와 라이케르트막 사이의 공간이 너무 좁은 경우 위와 같은 방법을 이용하였다. 국립보건안전연구원 (1990)은 태반바깥원뿔을 온전하게 하였으며, Fujinaga와 Baden (1991)은 원뿔을 제거했으나 최종 결과는 별 영향이 없었다.

발생 9일 배자는 크기가 1.5 mm 정도로 매우 작기에 수술 현미경하에서 실험하며, 사용되는 휘셋도 끝이 뾰족해야 한다. 따라서 주의를 하지 않으면 적출중 배자가 손상될 수 있으며, 이 경우 배양이 되지 않는다. 배양에 중요한 또 하나의 요인은 임신 쥐를 잡아 배양을 시작할 때까지 소요되는 시간이다. 이 실험에서는 한 사람이 2마리의 임신 쥐를 조작할 때 2시간 이상을 넘지 않았다. Kachilele와 New (1988)는 적출한 배자를 여러 온도에 여러 시간 놔둔 후 배양했을 때 실온 및 적출후 2~3시간 이내에 배양을 시작해야 함을 보고하였다. 이 실험에서도 한 번에 6마리의 임신 쥐를 처리한 경우, 배양 결과가 좋지 않았다.

배양액은 쥐 혈청을 주로 이용하며, 혈액은 뽑은 즉시 원심분리하고 30분간 56°C에서 열처리하여 사용한다 (New, 1966b; Steele와 New, 1974). 대부분의 경우 일부의 라이케르트막이 태반박원뿔 부위에 붙어 있는데, 이 막이 매우 끈끈해 문제를 일으킬 수 있다. 배양을 시작한 배자들은 대부분의 경우 처음에는 이 막에 의해 서로 모여 있으나, 수 시간 동안 난황주머니가 팽창되어 백열 전구 모양이 되면서 서로 분리된다. 이 실험에서는 처음 시도한 배양이 성공하지 못하였는데, 모든 배자가 병의 입구 및 내면에 달라 붙어 있었다. 이러한 실패는 배자를 배양액에 넣은 후 신경을 쓰지 않아 끈끈한 라이케르트막에 의해 병 내면에 붙은 결과로 생각하였으며, 이후의 배양에서는 배양액을 흔들어 벽에서 떼어냄으로써 배양에 성공할 수 있었다. 배자 배양에는 배양기체도 중요하다. 특히 산소는 발생 시기에 따라 다른 농도를 써야 하는데, 발생 9일에는 배자가 고산소에 예민하여 5% 산소를

이용한다. 배양이 계속되면 배양액의 산소가 적어지고, pH가 낮아지기 때문에 주기적으로 기체를 교환해 주어야 한다. 시간표에 따라 배양기체를 적절하게 교환해 주지 않는 경우 배자의 발달이 상당히 저하되어 있었다.

배양이 끝나면 객관적으로 결과를 분석해야 하며, 이 실험에 사용된 기준 지표는 다음과 같다. 발생 9일 배자는 태반박원뿔을 포함한 크기, 원뿔이 손상된 경우 난황주머니의 크기, 배자의 발생기 및 총단백질량 등을 관찰 및 측정하였다. 발생 10일 배자(대조군 및 24시간 배양군)는 위의 특성 이외에, 머리궁둥길이, 몸분절의 수, 배자의 회전 시작, 앞신경관의 폐쇄, 아가미활의 수, 귀오목의 형성 등을 관찰 및 측정하였다. 발생 11일 배자(대조군 및 48시간 배양군)는 발생 9일 배자에서 관찰 및 측정된 특성 이외에, 머리궁둥길이, 몸분절의 수, 배자의 회전 완료, 아가미활의 수, 귀오목의 폐쇄, 팔삭의 발달 상태 및 수정체오목의 형성 등을 관찰 및 측정하였다. 이러한 여러 특성은 발생 9일 배자를 48시간 동안 배양했을 때 배양 성공 여부의 판단에 가장 적절한 것으로 알려져 있다 (Brown과 Fabro, 1981).

이러한 방법이 잘 정립된 외국의 경우, 배양 첫 24시간 동안에는 생체에서와 구분하기 힘들 정도로 단백질의 합성 및 분화가 이루어지고 (Berry, 1968; New 등, 1976), 다음 24시간 동안에도 계속 분화하지만 단백질합성율이 생체보다 감소하며, 72시간 이후에는 많은 배자의 혈액순환이 중지되고 96시간까지는 거의 살지 못한다고 한다. 이 실험에서도 단백질 합성량이 24시간 배양했을 때에는 생체에서와 같았지만, 48시간 후에는 생체의 70% 정도 형성되었다. 배양 성공률은 배자의 분리 기술이 숙달되고, 마지막 4시간 동안 40% 산소를 배양기체 (Cockroft, 1990)로 사용하며, 지속적인 기체 공급 (New와 Cockroft, 1978)을 하면 높아질 것으로 생각된다.

한 실험실에서의 결과를 다른 실험실에서의 결과와 직접 비교하기는 어렵기 때문에 대조군과 배양군의 비교가 가장 중요한 기준이라 할 수 있다. 일반적으로 배양된 배자는 대조군보다 다소 작지만, 여러 구조의 발달은 거의 유사하다고 알려져 있다 (Copp와 Cockroft, 1990). 이 실험에서는 배양군에서 난황주머니의 크기 및 머리궁둥길이가 대조군에 비해 작았으나, 몸분절의 수, 아가미활의 수 등의 특성은 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 배자의 회전, 앞신경관구멍의 폐쇄 등은 약간 느린 발달을 나타내었다. 대조군과 실험군의 조직 표본을 광학 및 전자현미경으로 관찰하고 apoptosis의 발현을 분석한 결과, 배양이 잘 된 경우에는 두 군에서 특별한 차이가 없었다. 이상의 결과로 발생 9일 흰쥐 배자배양이 성공적으로 이루어졌다고 판단하였다.

이와 같은 배자배양법은 현재 주로 기형물질의 검사에 이용되고 있다. 최근 일부 학자들은 인간 혈청을 흰쥐 배자배양에 사용할 수 있는 가능성을 연구 (Chatot 등, 1980; Steele, 1985)하고 있으나 아직 만족할만한 결과를 얻지 못하고 있

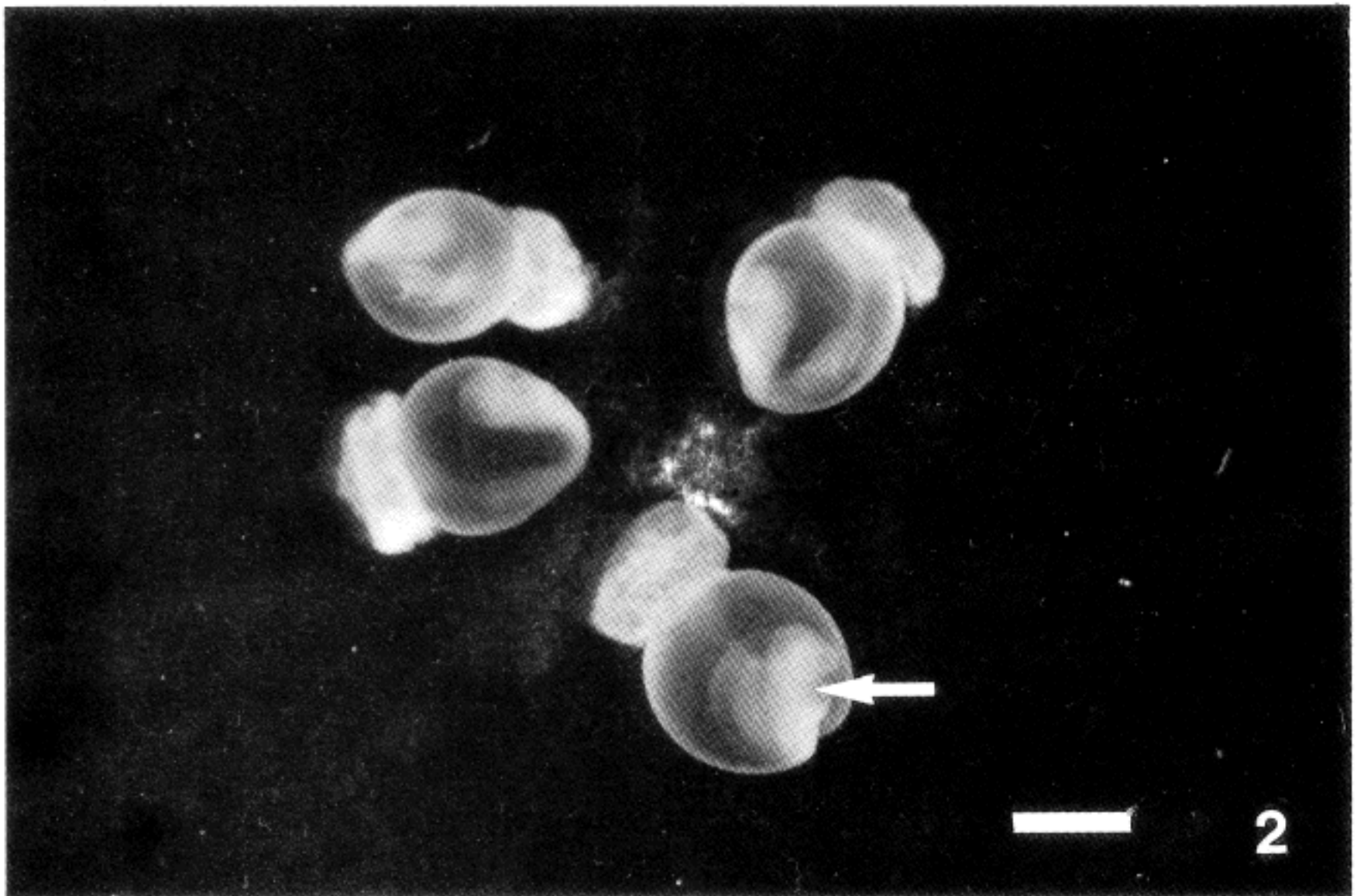
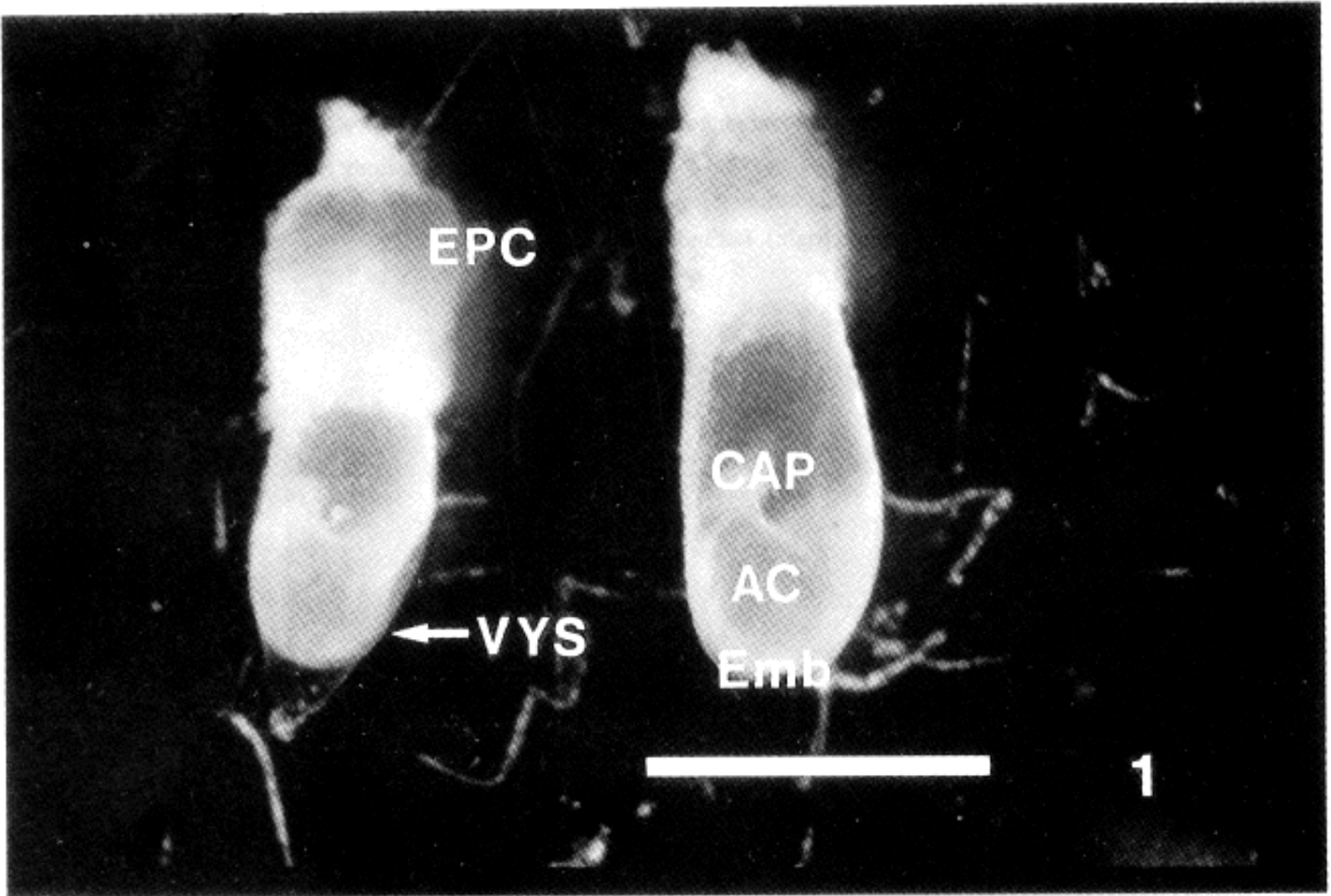
다. 이 방법이 성공되면 기형아를 가진 산모의 혈액을 배양액으로 사용하여 실험 동물에서 기형유발을 검사함으로써 인간에서 선천성 기형을 일으키는 요인을 보다 잘 이해할 수 있고, 조기 진단 등에 사용될 수 있다. 또한 아직은 발생의 기전을 이해하는데 이 방법이 활발히 이용되고 있지는 않지만, 이 분야에서도 중요한 방법의 하나로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

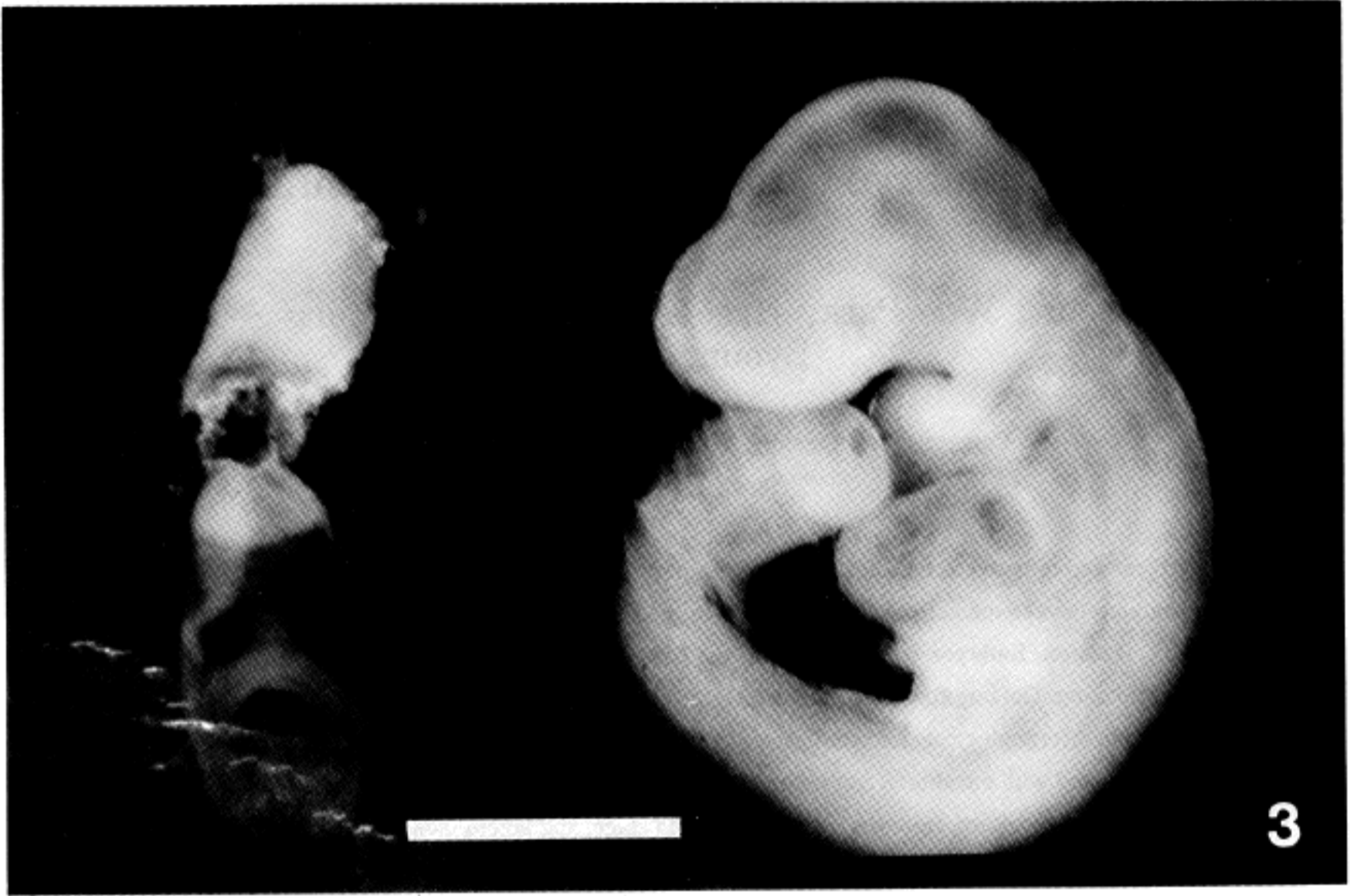
참 고 문 헌

- 국립보건안전연구원 : *In Vitro* 모델에 의한 단기 최기형 시험법 개발에 관한 연구 (I). 과학기술처, pp. 1-93, 1990.
- Allen E, MacDowell EC : Variation in mouse embryos of 8 days gestation. *Anat Rec* 77: 165-173, 1940.
- Barber CV, Carda MB, Fantel AG : A new technique for culturing rat embryos between gestation days 14 and 15. *Toxicol Vitro* 7: 695-700, 1993.
- Berry CL : Comparison of in vivo and in vitro growth of the rat foetus. *Nature* 219: 92-93, 1968.
- Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anat Biochem* 72: 248-254, 1976.
- Brown NA, Fabro S : Quantitation of rat embryonic development in vitro: A morphological scoring system. *Teratology* 24: 65-78, 1981.
- Chatot CL, Klein NW, Piatek J, Pietto LJ : Successful culture of rat embryos on human serum: Use in the detection of teratogens. *Science* 207: 1471-1473, 1980.
- Cockroft DL : Dissection and culture of postimplantation embryos. In: Post-implantation Mammalian Embryos. A Practical Approach. Copp AJ, Cockroft DL, eds. IRL Press, Oxford, pp. 15-40, 1990.
- Copp AJ, Cockroft DL : Postimplantation Mammalian Embryos. A Practical Approach. IRL Press, New York, 1990.
- Fujinaga M, Baden JM : A new method for explanting early postimplantation rat embryos for culture. *Teratology* 43: 95-100, 1991.
- Fujinaga M, Brown NA, Baden JM : Comparison of staging systems for the gastrulation and early neurulation period in rodents : a proposed new system. *Teratology* 46: 183-190, 1992.
- Fujinaga M, Jackson EC, Baden JM : Interlitter variability and developmental stage of day 11 rat embryos produced by overnight and morning short-period breeding regimens. *Teratology* 42: 535-540, 1990.
- Heape W : Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc Roy Soc (London)* 48: 457-458, 1890.
- Jolly J, Lieure C : Recherches sur la Culture des Oeufs des mammiferes. *Arch Anat Microsk* 34: 307-374, 1938.
- Kachilele SG, New DAT : Effects of temporary cooling, and of different explantation and storage conditions, on the subsequent development of post-implantation rat embryos in vitro. *Teratology* 38: 381-387, 1988.
- Kochhar DM : The use of in vitro procedures in teratology. *Teratology* 11: 273-288, 1975.
- New DAT : The Culture of Vertebrate Embryos. Logos Press, London, 1966a.
- New DAT : Development of rat embryos cultured in blood sera. *J Reprod Fertil* 12: 509-524, 1966b.
- New DAT : Development of explanted rat embryos in circulating medium. *J Embryol Exp Morphol* 17: 513-525, 1967.
- New DAT : Methods for the culture of post-implantation rodents. In: Daniel JC, ed. Methods in Mammalian Embryology. WH Freeman and Co, San Francisco, pp. 305-319, 1971.
- New DAT : Introduction. In : Postimplantation Mammalian Embryos. A Practical Approach. Copp AJ, Cockroft DL, eds. IRL Press, Oxford, pp. 1-14, 1990.
- New DAT, Cockroft DL : A rotating bottle culture method with continuous replacement of the gas phase. *Experientia* 35: 138-140, 1978.
- New DAT, Coppola PT, Cockroft DL : Comparison of growth in vitro and in vivo of post-implantation rat embryos. *J Embryol Exp Morphol* 36: 133-144, 1976.
- New DAT, Coppola PT, Terry S : Culture of explanted rat embryos in rotating tubes. *J Reprod Fertil* 35: 135-138, 1973.
- New DAT, Stein KF : Cultivation of post-implantation mouse and rat embryos on plasma clots. *J Embryol Exp Morphol* 12: 101-111, 1964.
- Nicholas JS, Rudnick D : The development of rat embryos in tissue culture. *Proc Nat Acad Sci* 20: 656-658, 1934.
- Nicholas JS, Rudnick D : Development of rat embryos of egg cylinder to head-fold stages in plasma cultures. *J Exp Zool* 78: 205-232, 1938.
- Robkin MA, Shepard TH : In vitro culture of somite stage rat embryos : a new technique for maintaining growth and continuously monitoring heart rate. *In Vitro* 8: 151-160, 1972.
- Shepard TH, Fantel AG, Mirkes PE : Somite-stage mammalian embryo culture-use in study of normal physiology and mechanisms of teratogenesis. In : Developmental Toxicology : Mechanisms and Risk. Markert C, McLachlan J, eds. pp. 29-44, 1987.
- Steele CE : Improvement development of 'rat egg-cylinders' in vitro as a result of fusion of the heart primordia. *Nature* 237: 150-151, 1972.
- Steele CE : Human serum as a culture medium for rat embryos. *Experientia* 41: 1601-1603, 1985.
- Steele CE, New DAT : Serum variants cause the formation of double hearts and other abnormalities in explanted rat embryos. *J Embryol Exp Morphol* 31: 707-719, 1974.
- Theiler K : The House Mouse. Development and Normal Stages from Fertilization to 4 Weeks of Age. Springer Verlag, New York, 1972.

Legends for Figures

- Fig. 1.** Day 9 rat embryos of head fold stage. Reichert's membrane has been opened to expose the visceral yolk sac (VYS), and the embryo is ready for culture. Bar indicates 1 mm. AC: amniotic cavity, CAP; chorioallantoic placenta, Emb: embryo, EPC: ectoplacental cone.
- Fig. 2.** Rat embryos cultured for 24 hours. Embryos are in turning process (arrow). Bar indicates 1 mm.
- Fig. 3.** Embryos before (left) and after 48 hours culture (right). Bar indicates 1 mm.





— Abstract —

Whole Embryo Culture of Day 9 Rat Embryos

Hyoung Woo Park, Hye Jeong Lee, Eun Young Seol
Byoung Ki Yoo

Department of Anatomy, Yonsei University College of Medicine,
Seoul, 120-752, Korea

Using day 9 rat embryos, we established the whole embryo culture technique which is widely used for teratogen testing and studying developmental mechanisms. Culture medium was immediately centrifuged and heat-inactivated (56°C, 30 min) rat serum. Embryos were cultured in the bottle with 125 ml capacity on the rollers and rotated at 30 r.p.m. during incubation. Gassing formula was 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ for first 24 hours, and 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂ for next 24 hours. Morphological characteristics, total proteins, histological findings of embryos cultured for 24 and 48 hours were compared with uncultured control embryos.

At the beginning of the culture, embryos were in head fold stage, and length including ectoplacental cone was 1.8 ± 0.3 mm and total protein of the embryo was 3.4 ± 1.6 μ g. After 24 hours culture, total proteins and number of somites was similar between cultured and control embryos. But, cultured embryos showed slight difference in diameter of yolk sac, crown-rump length, closure of anterior neuropore and beginning of rotation with control. After 48 hours culture, number of somites and completion of rotation was similar between cultured and control embryos. But, cultured embryos showed slight difference in number of branchial arches and limb bud development with control.

Key words : Rat, Whole embryo culture, Teratogen testing