

## 성선자극호르몬과 스테로이드호르몬의 첨가가 韓牛卵胞卵의 體外成熟과 受精能力에 미치는 影響

朴在元 · 金昌根 · 鄭英彩

中央大學校 産業大學 畜産學科

## Effects of Gonadotropins and Steroid Hormones on Follicular Oocyte Maturation In Vitro and Fertilizing Ability In Vivo of Korean Native Cattle

J. W. Park, C. K. Kim and Y. C. Chung

Dept. of Animal Science, Chung-ang University

### Summary

This experiment was carried out to investigate the effects of hormone addition(FSH, HCG, estrogen and progesterone) and composition (BSA and FCS) of mKRB on the in vitro maturation and fertilizability of follicular oocytes of the Korean native cattle. The ovaries were removed at a slaughterhouse, returned to laboratory in a thermostat (30-35°C) within 4 hr, and collected by aspirating normal follicles which had diameters of 1 to 6 mm. The oocytes with cumulus cells were cultured for 8, 16, 24 and 30 hr in a modified KRB solution containing BSA or FCS and hormones. The in vitro matured oocytes in mKRB containing FCS, FSH and steroids were transferred in the rabbit uterus for examination of their in vivo fertilizability with bovine sperm preincubated 4 to 6 hr in the rabbit uterus.

1. The mean number of oocytes collected per cattle was 6.5 from 1-3mm follicles, 1.3 from 4-6mm follicles, and total was 7.7.
2. The meiotic division at 16hr-culture in the oocytes from 1-3mm follicles was slightly stimulated by the addition of FSH in mKRB + BSA solution compared with the control. At 30hr-culture, their maturation rates (% Met II) were also increased by FSH of 1  $\mu\text{g/ml}$  (38.4%) and 5 $\mu\text{g/ml}$ (35.7%) as compared with the control (21.4%). The maturation rate at 30hr-culture in the oocytes from 4-6mm follicles was 53.8% and 57.1% by the FSH addition of 1  $\mu\text{g/ml}$  and 5  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. These rates were similar with the control (57.1%), but higher than those of oocytes from 1-3mm follicles.
3. The meiotic division at 16hr-culture in the oocytes from 1-3mm follicles was stimulated by the HCG addition of 1IU/ml and 5IU/ml. However, the maturation rate at 30hr-culture was greatly decreased by the HCG addition (26.6% and 13.3%) compared with the control (53.3%) and these rates (30.8%) in the oocytes from 4-6mm follicles were also lower than that of the control (58.3%).
4. Low maturation rate (37.5%) of the oocytes cultured in mKRB containing BSA and 5IU/ml HCG was increased (55.0%) when 15% FCS with HCG was added to mKRB instead of BSA.
5. When 16hr-cultured oocytes in mKRB containing BSA and gonadotropins (5 $\mu\text{g/ml}$  FSH and 5IU/ml HCG) were transferred in the medium without gonadotropins and recultured for 16hr,

the maturation rate of HCG-treated oocytes was greatly improved.

6. The maturation rates of oocytes were greatly affected by steroids. The combined addition of FCS+FSH+estrogen or +progesterone to mKRB increased the maturation rate compared with the combination of BSA+FSH or FCS+FSH in mKRB.
7. The fertilization rate, presence of pronuclei, was increased by the combination of FCS+FSH +P in mKRB as compared with that (5.6%) of BSA+FSH and the rates of FCS+FSH+steroids ranged from 12.5 to 17.6%.

## I. 緒 論

소 受精卵移植技術의 산업적 활용에 있어서 해결되어야 할 어려운 문제중에 하나가 良質의 受精卵을 저렴하게 다량으로 採卵하는데 있다. 過排卵處理에 의한 採卵방법에서 採卵率의 심한 개체차이 때문에 수정란이식 준비과정에 있어서 차질이 많이 생기고 있으며 또한 그에 따른 소요경비의 증가가 큰 애로점으로 되어 있기 때문이다. 또한 능력이 우수한 암소이면서도 生殖器의 異常으로 採卵이 불가능한 예도 있다. 이러한 문제해결의 한 방법으로 卵胞卵利用에 관한 관심이 최근 높아져 왔다. 난포란의 이용은 이러한 목적 이외에도 한 암소의 卵子로부터 여러마리 수소의 子畜生産에 의한 家畜改良 効果, 불임우의 자축생산, 體外受精技術과 관련된 여러 繁殖生理分野의 첨단기술개발에도 응용가치가 대단히 높다. 난포란을 이용한 이러한 많은 利點들이 효율적으로 활용되기 위하여는 난포란의 體外成熟과 受精能力이 지금까지의 연구결과보다도 크게 향상되어야 할 것이다.

소 난포란의 採卵數에 관하여 Kanagawa(1979), Shea 등(1983), Dooley(1984), Katsa(1984) 및 Leibfried-Rutledge 등(1984)이 보고하였고 採卵시 난포의 크기와 난자의 體外成熟率간에 관계가 있음이 소(佐藤 등, 1978), 면양(Moor와 Trounson, 1977), 유산양(김 등, 1984), 돼지(Tsafiriri와 Channing, 1975; Motlik 등, 1984) 및 토끼(Bae와 Foote, 1975; 정 등, 1986)에서 보고되었다. 그러나 소에서는 체외성숙율이 난포크기와 관계가 없다는 보고도 있다(Leibfried와 First, 1979; Fukui와 Sakuma, 1980). 卵胞卵의 체외성숙을 또는 受精率을 높이기 위하여 최근 성선자극호르몬 또는 스테로이드 호르몬을 배양액에 첨가한 예들이 많이 보고되고 있는데 이는 체외성숙에서 난자의 核成熟은 가능하나 細胞質成

熟이 빠르지 못하여 난자내 雄性前核形成이 불가능하여 수정후 發生能力이 크게 떨어진다는 여러 哺乳類의 연구결과(Thibault 등, 1976; Ball 등, 1983b)에 근거를 두고 있다.

성선자극호르몬의 첨가효과에 관한 예가 소(Onuma와 Foote, 1969; Jagillo 등, 1977; Ball 등, 1980, 1983b, 1984; Hensleigh와 Hunter, 1983, 1985; Dooley, 1984), 면양(Moor와 Trounson, 1977), 토끼(Oh와 Brackett, 1975)에 보고되었고 한편 사람에게서는 효과가 없다는 보고도 있다(Mandelbaum 등, 1982). 그리고 성선자극호르몬의 첨가효과가 배양액의 조성과 관련이 있음이 소(Fukui 등, 1982;菅原 등, 1985), 돼지(Minato와 Toyoda, 1982)에서 보고된 바 있다. 스테로이드첨가에 관한 예로서는 특히 progesterone 첨가로 효과를 보여준 예가 소(Wilde 등, 1984), 돼지(McGaughey, 1977; Richeter와 McGaughey, 1979), 토끼(Bae와 Foote, 1975)에서 발표되었으며 estrogen은 대체로 억제하는 것으로 보고되었다(McGaughey, 1977). 그러나 Fukui 등(1982)은 소에서 estrogen과 progesterone의 동시 첨가에서 성숙율의 향상을 보고한 반면 생쥐에서 Smith와 Tenney(1980)는 효과가 없었다고 하였다. 성선자극호르몬과 스테로이드의 동시 첨가로 효과가 있다는 결과가 소(Fukui 등, 1982, 1983; Fukushima와 Fukui, 1985)와 면양(Moor와 Trounson, 1977)에서 보고되었다.

이상의 여러 연구보고에서 卵胞卵의 체외성숙율의 향상정도와 체외성숙란의 수정능력에는 호르몬의 첨가수준과 배양방법에 따라 報告者간에 차이가 많은 뿐만 아니라 특히 Fulka 등(1982)이 체외성숙소 난자의 투명대를 제거후 수정시험에서 수정란의 약 50%가 응성전핵형성이 가능하다고 보고한 결과는 호르몬 첨가가 난포란의 완전체외성숙에 필요한 것 인가에 대한 의문점을 제시해 주는 결과들이라 하

했다. 따라서 본 실험은 韓牛卵胞卵에 있어서 體外成熟培養液의 조성과 호르몬첨가가 體外성숙율과 수정능력에 미치는 영향을 알고자 시도하였다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 供試動物

본 실험에서 사용된 한우난포란은 축협가락동공판장 도살장에서 도살되는 18개월령 이상의 한우중에서 생식기의 이상이 없는 개체의 난소로부터 채취하였다.

### 2. 卵巢採取와 運搬

도살직후 좌우난소를 채취하여 생리식염수와 항생제가 들어있는 보온병에 담아 4시간 이내에 실험실로 운반하였다.

### 3. 卵胞卵의 採卵

실험실로 운반된 난소는 37°C 항온실에서 난포의 상태가 정상인 것만 선별하여 생리식염수로 2~3회 세척한 다음 난포직경에 따라 1~3mm와 4~6mm 두 區로 구분하여 5ml 주사기와 20케이지 주사침을 이용하여 채취하였다. 주사침을 난소질내로 찌른후 난포액의 흡력으로 난자를 채취하였으며 주사침을 빼지않고 吸引狀態를 유지하면서 난포에서 난포로 연속적으로 난포액을 흡입하였다. 흡입된 난포액을 10ml 시험관에 담아 일정시간 정지한 다음 하단액을 스포이드로 흡입하여 watch glass에 놓고 실험현미경 하에서 난포세포층이 충실하게 투명대에 부착된 난포란만을 선별하여 BSA가 첨가된 m-KRB액에 옮겼으며 같은 액으로 2~3회 세척하여 사용하였다.

### 4. 培養液 製造와 호르몬 첨가

배양액은 Iritani 등(1984)이 사용한 mKRB에 牛血清알부민(Fraction V, 이하 BSA, Sigma Chemical Co.) 또는 牛胎兒血清(이하 FCS, Commonwealth Serum Lab.)을 첨가하고 0.2 $\mu$ m milipore filter(Gelman Sci Inc.)로 여과하여 38°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>, 100% 습도인 CO<sub>2</sub>培養器 내에서 15분간 기포를 형성시키고 4~5시간 평형시킨 후 卵胞培養液으로 사용하였다. 평형시킨 배양액에 실험설계에

따라 성선자극호르몬(FSH와 HCG)과 스테로이드 호르몬(estradiol-17 $\beta$ 와 progesterone)을 첨가하였다. FSH(Buruns Biotic Lab.)의 첨가수준은 1 $\mu$ g/ml와 5 $\mu$ g/ml이었고 HCG(Carter Glogau Lab.)의 수준은 1 IU/ml와 5 IU/ml이었다. Estradiol-17 $\beta$ 와 progesterone(Sigma Chemical Co.)은 배양액에 각각 1 $\mu$ g/ml씩 첨가하였다. 스테로이드호르몬은 ethyl alcohol에 용해시켜 alcohol농도가 배양액중에 1%를 초과하지 않도록 ethyl alcohol에 용해시켜 첨가하였다.

### 5. 卵胞卵의 體外成熟培養

난포란의 배양은 petri dish(Falcon Plastics #1006)에 2~2.5ml의 배양액을 넣고 용융 parafin으로 피복한 후 각 dish마다 선별된 난자 5~10개씩을 배분하여 넣은 다음 38°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%O<sub>2</sub>, 100% 습도 조건을 갖춘 CO<sub>2</sub>배양기에서 8~30시간 배양하였다.

### 6. 卵子成熟程度의 判定

난자를 8, 16, 24 또는 30시간 배양후 2% hyaluronidase(Sigma Chemical Co.)의 처리로 난자주위의 난구세포층을 제거시킨 다음 2~3일간 acetic-alcohol(1:3) 고정액에 고정하였으며 고정후 1% acetic-orcein으로 염색하여 위상차현미경하에서 핵의 성숙정도를 관찰하였다. 난자의 體外성숙정도는 Shea 등(1976), Iritani 등(1984), Ball(1983a)의 방법에 준하여 판정하였다. 體外배양난자의 성숙분열시기를 제1성숙분열의 移動期(diakinesis, 이하 Dig), 中期(metaphase I, 이하 Met I), 後期(anaphase I, 이하 Ana I) 및 終期(telophase I, 이하 Tel I) 그리고 제2성숙분열의 中期(metaphase II, 이하 Met II)으로 구분하여 관찰하였고 體外배양후 Met II에 도달된 난자를 성숙난자로 판정하였다.

### 7. 體外成熟卵胞의 受精能力 檢定

#### 1) 소 精子의 受精能獲得

凍結精子의 體外수정능획득을 위하여 토끼자궁을 사용하였으며 뉴질랜드화이트종 암토끼에 HCG 75 IU/ml를 귀정맥에 주사한 다음 10~12시간후에 동결정자를 용해하여 인공수정시켜 토끼자궁내에서 4

~ 6 시간 수정능 획득을 얻도록 하였다.

### 2) 注入精자의 濃度와 卵子移植

동결소정자를 38°C의 항온조에서 용해시킨 후 BSA 1 mg/ml가 함유된 mKRB를 가지고 희석한 다음 500G로 5~10분간 원심분리하고 다시 mKRB로 희석하여 주입정자수가 약  $50 \times 10^6$ /ml로 되게 조정한다. 다음 희석정액 0.5ml를 HCG 주사후 10~12시간 즉 체외배양난자를 이식하기전 4~6시간 전에 토끼에 1회 인공수정하였다. 이식할 난자는 mKRB에 15%FCS와 호르몬을 첨가한 배양액에서 30시간 배양후 개복된 토끼자궁각에 이식하였는데 한자궁각에 7개씩 이식하였다. 난자이식 직전에 일부의 난자는 체외성숙을 검사하였다.

### 3) 受精의 判定

난자이식후 24시간에 도살하여 자궁을 분리 관류하여 이식했던 난자를 다시 회수하였으며 회수된 난자는 체외성숙도를 검사하는 방법과 마찬가지로 고정 염색하여 진행형성과 난할 여부를 조사하였다.

## III. 實驗結果

### 1. 卵胞크기별 採卵數

吸引方法으로 1~3mm와 4~6mm의 可視卵胞로부터 채란된 난포란의 數는 Table 1에서 보는 바와 같다. 한우 1頭當 난포란의 평균채란수는 직경이 1~3mm크기 난포에서 6.5개 4~6mm 크기에서 1.3개 총 7.7개였는데 4~6mm의 난포에서보다 1~3mm 크기의 난포에서 採卵數가 많았다.

### 2. 성선자극호르몬첨가에 따른 卵胞卵의 體外成熟

1) 직경 1~3mm 卵胞卵에 대한 FSH첨가효과 배양액에 FSH를 1  $\mu$ g/ml와 5  $\mu$ g/ml 첨가하여 體外成熟시킨 결과 Table 2와 같은 성적을 얻었다. FSH첨가배양액에서 16시간 체외배양시킨 결과 metaphase I에 도달된 난자가 75.0%, 5  $\mu$ g/ml첨가구에서는 72.7%로 대조구의 58.3%보다 높았다. Metaphase II 즉 成熟卵子는 24시간 배양에서 관찰되었고 FSH 1  $\mu$ g/ml와 5  $\mu$ g/ml첨가구에서 metaphase II에 도달된 卵子는 각각 23.5%와 27.8%로서 대조구의 16.6%보다 역시 다소 높았다. 30시간배양후의 성숙율은 38.4%와 35.7%로서 대조구의 21.4%보다 높았다. 직경 1~3mm크기 난포에서 채란된 난자에 FSH를 첨가할 경우 유의성은 없었으나 16, 24 및 30시간배양에서 모두 성숙분열

Table 1. Number of oocytes recovered by aspiration from follicles of 1-3mm and 4-6mm in diameter

Experiment No.	No. of cattles	Size of follicles (mm)		Total	Mean
		1~3	4~6		
1	11	60	10	70	6.4
2	10	45	9	54	5.4
3	12	62	12	74	6.2
4	12	69	18	87	7.3
5	12	44	13	57	4.8
6	14	100	16	116	8.3
7	9	59	15	74	8.2
8	12	77	8	85	7.1
9	9	85	16	101	11.2
10	11	100	21	121	11.0
11	12	100	18	118	9.8
Total	124	801	156	957	
Oocyte/cattle (Mean $\pm$ SE)		6.5 $\pm$ 1.8	1.3 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 2.0	

**Table 2. Effect of FSH on in vitro maturation of oocytes recovered from follicles of 1 to 3mm**

Treatment	Incubation (hr)	Replication	No. of oocytes	Stage of meiosis								
				GV	Dia	Met I	%Met I	Ana I	Tel I	Met II	Deg	%Met II
Control	0	4	40	38	-	-	-	-	-	-	2	-
	8	2	15	-	4	(11)*	-	-	-	-	-	-
	16	3	12	-	4	7	58.3	-	-	-	-	-
	24	4	18	-	5	6	33.3	1	-	3	3	16.6
	30	3	14	-	2	5	35.7	3	-	3	1	21.4
FSH, 1 $\mu$ g/ml	8	2	17	-	3	(14)	-	-	-	-	-	-
	16	3	16	-	2	12	75.0	-	-	2	-	-
	24	4	17	-	-	10	58.9	1	-	4	2	23.5
	30	3	13	-	-	3	23.1	-	1	5	4	38.4
FSH, 5 $\mu$ g/ml	8	2	14	-	1	(13)	-	-	-	-	-	-
	16	3	11	2	-	8	72.7	-	-	-	1	-
	24	4	18	-	1	7	38.9	-	1	5	4	27.8
	30	3	14	-	-	4	28.6	-	1	5	4	35.7

\*Number in parenthesis shows oocytes of early metaphase I.

**Table 3. Effect of HCG on in vitro maturation of oocytes recovered from follicles of 1 to 3mm**

Treatment	Incubation (hr)	Replication	No. of oocytes	Stage of meiosis								
				GV	Dia	Met I	%Met I	Ana I	Tel I	Met II	Deg	%Met II
Control	0	3	28	28	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	3	10	-	2	(8)*	-	-	-	-	-	-
	16	3	13	-	-	(1)10	76.9	-	-	-	2	-
	24	3	14	-	-	9	64.3	2	1	2	-	14.3
	30	3	15	-	-	5	33.3	-	-	8	2	53.3
HCG, 1IU/ml	8	3	13	-	1	(12)	-	-	-	-	-	-
	16	3	12	-	-	(1)10	83.3	-	-	-	1	-
	24	3	14	-	-	10	71.4	-	-	4	-	28.6
	30	3	15	-	-	8	53.3	1	1	4	1	26.7
HCG, 5IU/ml	8	3	14	-	1	(1)2	-	-	-	-	-	-
	16	3	15	-	1	(2)11	73.3	1	-	-	-	-
	24	3	14	-	-	5	35.7	1	-	6	2	42.9
	30	3	15	-	-	10	66.7	1	1	2	2	13.3

\*Number in parenthesis shows oocytes of the early metaphase I.

이 촉진되는 경향이 있었다.

2) 직경 1~3mm 卵胞卵에 대한 HCG 첨가효과  
HCG 첨가에 따른 난포란의 體外成熟率は Table

3에서 보는 바와 같다. 16시간배양후에 metaphase I에 도달된 난자가 HCG 1IU/ml와 5IU/ml 첨가구에서 각각 83.3%와 73.3%로서 대조구의 76.9

**Table 4. Effect of FSH and HCG on in vitro maturation of oocytes recovered from follicles of 4 to 6mm**

GTH	Incubation (hr)	Repliation	No. of oocytes	Stage of meiosis								
				Dia	Met I	%Met I	Ana I	Tel I	Met II	Deg	%Met II	
FSH, 1 $\mu$ g/ml	16	2	10	1	8	80.0	-	-	1	-	10.0	
	30	2	14	-	4	28.6	-	1	8	1	57.1	
	16	2	10	1	8	80.0	-	-	1	-	10.0	
	30	2	13	-	4	30.8	-	1	7	-	53.8	
	5 $\mu$ g/ml	16	2	9	-	8	88.9	-	-	1	-	11.1
	30	2	14	-	6	40.3	-	-	8	-	57.1	
HCG, 1IU/ml	16	2	9	-	9	100	-	-	-	-	0	
	30	2	12	-	3	25.0	-	2	7	-	58.3	
	16	2	8	-	7	87.5	1	-	-	-	0	
	30	2	13	-	6	46.2	-	2	4	1	30.8	
	5IU/ml	16	2	7	1	6	85.7	-	-	-	-	0
	30	2	13	-	2	15.4	-	1	4	6	30.8	

**Table 5. Effect of HCG on in vitro maturation 1-3mm follicular oocytes incubated m-KRB medium containing 4mg BSA/ml or 15% fetal calf serum**

Medium +GTH	HCG level (5IU/ml)	Incubation (hr)	Repliation	No. of oocytes	Stage of meiosis							
					Dia	Met I	%Met I	Ana I	Tel I	Met II	Deg	%Met II
BSA +HCG	0	16	2	23	1	21	91.3	-	1	-	-	0
		30	2	20	-	8	40.0	2	1	7	2	35.0
	5	16	2	20	-	18	90.0	-	1	1	-	5.0
		30	2	16	-	6	37.5	-	1	6	3	37.5
FCS +HCG	0	16	2	22	-	18	81.8	-	2	2	-	10.0
		30	2	21	-	6	28.6	-	1	11	3	52.4
	5	16	2	15	-	12	80.0	-	1	2	-	13.3
		30	2	20	-	9	45.0	-	-	11	-	55.0

%보다 다소 높았으며 24시간 배양후 metaphase II 에 도달된 난자는 각각 28.6%와 42.8%로서 역시 대조구의 14.3%보다 높았다. 그러나 30시간 배양 에서는 metaphase II 의 난자가 각각 26.7%와 13.3 %로서 대조구의 53.3%보다 낮았다.

3) 직경 4~6mm 卵胞卵에 대한 FSH와 HCG 첨가효과

직경 4~6mm 가시난포로부터 채란된 배양액에 FSH와 HCG 첨가에 따른 체외성숙율은 Table 4

에서 보는 바와 같다. FSH 1 $\mu$ g/ml와 5 $\mu$ g/ml을 첨가한 배양액에서 16시간 배양후에 metaphase I 에 도달된 난자는 각각 80%와 88.9%로서 대조구의 80%와 같았으며 30시간배양에서 metaphase II 의 成熟卵子도 각각 53.8%와 57.1%로서 대조구의 57.1%와 같았다. HCG 1IU/ml와 5IU/ml을 첨 가한 배양액에서 16시간 배양후 metaphase I 에 도달된 난자는 각각 87.5%와 85.7%로서 대조구의 100%보다 다소 낮았고 30시간 배양후 metaphase

II의 성숙난자는 각각 30.8%와 36.8%로서 대조구의 58.3%보다 낮았다.

4) BSA와 FCS 첨가 mKRB에서의 HCG 첨가 효과

앞의 실험에서 BSA 첨가 mKRB 배양액에 HCG의 첨가효과가 저조한 결과를 재확인함과 동시에 HCG 첨가조건에서의 體外成熟率을 개선할 목적으로 mKRS에 BSA 대신에 FCS를 첨가한 결과 Table 5와 같은 성적을 얻었다. BSA와 HCG 5 IU/ml을 첨가한 배양액에서 30시간후 metaphase II에 도달된 난자가 37.5%로서 대조구의 35%와 같았으며 BSA 대신에 FCS를 15% 첨가하고 HCG 5 IU/ml를 첨가한 배양액에서 metaphase II에 도달된 난자는 55%로서 대조구의 52.3%와 같았다. 그러나 BSA 첨가보다는 FCS 첨가에서 체외성숙율이 향상되었다.

5) 성선자극호르몬 첨가시간의 단축효과

특히 HCG 첨가에서 30시간배양후 metaphase II에 도달된 난자가 적었던 결과를 근거로 하여 FSH와 HCG 첨가배양시간을 30시간에서 16시간으로 단축하고 그 다음 16시간배양을 GTH가 없는 조건에서 실시한 결과 Table 6과 같은 성적을 얻었다.

16시간 FSH 첨가배양액에서 metaphase I에 도달된 난자는 77.8%, HCG 첨가의 경우는 76.0%로 대조구의 76.0%와 같았고 30시간배양에서 metaphase II의 난자는 FSH 첨가구에서 34.4%로서 대조구의 44.1%보다 다소 낮았고 HCG의 첨가구에서는 50.0%로서 대조구보다 높았다.

3. Steroid 호르몬첨가에 따른 卵胞卵의 體外成熟

직경 1~3mm 크기 卵胞卵에서 스테로이드 호르몬의 첨가에 따른 體外成熟率은 Table 7과 같다. 15% FCS와 5μg/ml의 FSH를 첨가한 mKRS 배

Table 6. Effect of FSH and HCG during 16hr incubation on in vitro maturation of oocytes recovered from follicles of 1 to 3mm

GTH	Treatment		Time (hr) of investigation	Repl- cation	No. of oocytes	Stage of meiosis							
	Incubation time (hr) 0-16	17-30				Dia	Met I	%Met I	Ana I	Tel I	Met II	Deg	%Met II
Control	-		16	2	25	1	19	76.0	-	2	3	-	12.0
	-	-	30	2	34	-	16	47.1	1	1	15	1	44.1
FSH, 5μg/ml	+		16	2	27	-	21	77.8	-	3	3	-	11.1
	+	-	30	2	32	-	17	53.1	5		11	1	34.4
HCG, 5IU/ml	+		16	2	25	-	19	76.0	-	1	5	-	20.0
	+	-	30	2	30	-	12	40.0	-	2	15	-	50.0

Table 7. Effect of FSH and steroid hormones on in vitro maturation of oocytes recovered from follicles of 1 to 3mm

Treatment	Replication	No. of oocytes	Stage of meiosis						
			Met I	Ana I	Tel I	Met II	Deg	%Met II	
mKRB, BSA	8	63	26	1	4	26	4	41.2	
mKRB, FCS	3	36	7	2	1	25	1	69.4	
mKRB, FCS, FSH	3	39	7	1	4	27	-	69.2	
mKRB, FCS, FSH, E	3	38	10	-	2	28	-	68.4	
mKRB, FCS, FSH, P	3	25	2	-	2	20	1	80.0	
mKRB, FCS, FSH, E, P	3	40	6	1	2	30	1	75.0	

BSA:4mg/ml, FCS:15%/medium, FSH:5μg/ml, E(estradiol-17β):1μg/ml, P(progesterone):1μg/ml.

양액에 estradiol 1 µg/ml와 progesterone 1 µg/ml을 동시에 첨가하여 배양한 결과 metaphase II까지 성숙된 난자가 각각 68.4%와 80.6%로 대조구의 41.2%보다 월등히 높았다. Progesterone의 첨가로 體外成熟率이 향상되는 경향을 알 수 있었다. 대체로 FSH만의 첨가보다는 모든 처리가 높은 體外成熟率을 보여주었다.

#### 4. 體外成熟卵자의 受精能力

앞의 실험에서 얻어진 체외성숙율에 근거하여 비교적 양호한 체외성숙을 보인 배양조건중 4가지 방법에 의한 體外成熟卵자를 토끼의 子宮에 이식하여 수정능 획득정자와 受精시킨 결과 얻어진 受精率은 Table 8과 같다. mKRB + FCS, mKRB + FCS + E 및 mKRB + FCS + P 조건에서 체외배양한 卵자의 前核形成率은 14.3%, 12.5% 및 17.6%로서 대조구인 mKRB + BSA의 5.6%보다 높았고 체외성숙시 FSH와 progesterone의 첨가에서 다소 수정율이 높아진 것으로 나타났다.

### IV. 考 察

#### 1. 卵胞크기별 採卵數와 卵자의 體外成熟率

본 실험에서 頭當 채란수가 7.7개였고 그중 약 80%가 3mm 이하 卵胞에서 채란된 것은 Leibfried-Rutledge 등(1985)이 1~3mm 난포에서 5.2~7.9개 3~20mm 크기 난포에서 2.3~3.2라고 한 것과 유사하였으며 Shea 등(1983)과 Dooley(1984)가 채란한 數보다는 작은 수였다. 卵胞크기별 난자의 體外成熟率이 본 실험에서 1~3mm 卵胞卵보다 4~6mm 크기의 난포로부터 채란된 卵자의 成熟率이 높았던 결과는 羊(Moor와 Trounson, 1977), 돼지(Motilk

등, 1984), 토끼(Bae와 Foote, 1975) 및 소(佐藤 등, 1978)에서 보고된 것과 유사한 결과였으나 소에서 Thibault 등(1976), Fukui와 Sakuma(1980) 및 Leibfried-Rutledge 등(1985)이 卵胞 크기에 영향이 없었다는 것과는 차이가 있었다.

#### 2. 성선자극호르몬 첨가에 따른 卵胞卵의 體外成熟

직경 1~3mm 卵胞卵에 대한 FSH 첨가효과에서 대조구보다 體外成熟率이 다소 높았던 본 실험 결과는 Hensleigh와 Hunter(1983) 및 Ball 등(1983b)이 체외성숙배양액에 FSH 첨가로 난구세포의 膨化가 현저히 증가되었다고 한 결과로 보아 FSH가 체외성숙에 영향을 준 탓으로 생각된다. 또한 Hensleigh와 Hunter(1985)가 소에서 1 µg/ml의 FSH 그리고 Moor와 Trounson(1977)이 양에서 2 µg/ml의 FSH 첨가에서 가장 양호한 결과였다고 한 보고와도 유사한 결과였다. HCG 첨가에서 난자성숙율이 다소 낮았던 결과는 LH를 이용한 Jagillo 등(1977), Moor와 Trounson(1977)의 결과에서 성숙율이 향상된 결과와는 차이가 있었다. 그러나 Mandelbaum 등(1982)이 LH 첨가에서 성숙율의 향상이 없었던 결과 및 Hensleigh와 Hunter(1985)의 결과에서 FSH보다 HCG에서 난구세포의 팽화가 다소 낮았던 결과와는 유사한 점이 있었다. 본 실험에서 Gwatkin과 Andersen(1976) 및 Ball 등(1983b)의 주장에 근거하여 GTH가 배양액에 첨가되었으나 기대한 만큼의 결과를 얻지 못하였다. HCG 5 IU/ml 첨가시 體外成熟率이 저하된 결과를 재확인하고 또한 성숙율을 높일 목적으로 배양액중에 BSA 대신 FCS를 첨가한 결과에서 크게 향상된 결과는菅原 등(1985)이 소난포란성숙을 위하여 HamF-12에 BSA와 F

Table 8. In vivo fertilization of oocytes matured in vitro

Treatment	Maturation rate (%)	Transferred oocytes	Recovered oocytes (%)	Fertilized oocytes (%)
mKRB, BSA, FSH	13/20 (65.0)	28	18 (64.0)	1 (5.6)
mKRB, FCS, FSH	12/18 (66.7)	28	14 (50.0)	2 (14.3)
mKRB, FCS, FSH, E	12/17 (70.5)	28	16 (57.1)	2 (12.5)
mKRB, FCS, FSH, P	12/16 (75.0)	28	17 (60.7)	3 (17.6)
Total, mean	49/71 (69.0)	112	65 (58.0)	8 (12.3)

BSA:4mg/ml, FCS:15%/medium, FSH:5µg/ml, E:1µg/ml, P:1µg/ml.



CS를 첨가한 조건에서의 HCG 첨가에서 FCS의 경우 성숙율이 높았던 결과와 유사하였고 Tsafiriri 등(1972)이 흰쥐에서 20%FCS와 5  $\mu\text{g/ml}$  LH 첨가에서 얻은 성숙율에 미치지지는 못하였으나 역시 유사한 결과였다. 한편 Fukui 등(1982)이 성선자극호르몬의 첨가효과가 배양액의 조성 및 첨가되는 에너지원에 따라 다르게 나타난다고 한 보고와 본 실험에서 BSA와 FCS 간에 차이가 확인된 결과를 고려하여 볼 때 GTH에 의한 난포란의 體外成熟率을 개선하는데 있어서 배양액의 조성이 중요한 고려사항이 됨을 알 수 있었다. 이러한 점에 대하여 Minato와 Toyoda(1982)도 돼지 卵胞卵成熟에 있어서 FCS의 첨가수준에 따라 GTH 첨가효과에 차이가 있음을 보고한 바 있다. 특히 본 실험에서 HCG와 FSH하에서의 배양시간을 30시간에서 16시간으로 단축할 경우 HCG 첨가에서 成熟率이 높아졌던 결과는 이와 유사한 보고예가 없기 때문에 비교할 수는 없겠으나 GTH가 성숙분열의 시작과 관련이 있으며 성숙분열의 再開가 LH의 급증과 관련이 있다는 Ball 등(1983)의 주장을 뒷받침하는 결과로 생각된다.

### 3. Steroid 호르몬첨가에 따른 卵胞卵의 體外成熟

본 실험에서 mKRB+BSA보다 mKRB+FCS+FSH에 estradiol-17 $\beta$  또는 progesterone의 첨가구에서 체외성숙율이 높게 나타난 결과는 Bae와 Fote(1975)가 토끼에서 LH와 progesterone 첨가에서 성숙율이 높았다는 보고와 유사하였고 Oh와 Brackett(1975)가 역시 토끼에서 LH와 FSH를 첨가한 조건에서 성숙율이 증가됨과 동시에 배양액내에 progesterone 수준이 높아졌다고 하였다. 그러나 estrogen을 첨가할 경우 돼지에서 Mcgaughey(1977), Richeter와 Mcgaughey(1979), Racowsky와 Mcgaughey 및 소에서 Wilde 등(1984)에 의하여 성숙율이 억제되었다고 보고한 것과는 차이가 있었다. 이러한 차이의 원인은 본 실험에서 estrogen 처리가 이들이 이용한 BSA 대신에 FCS와 FSH의 첨가에 기인된 것으로 생각되며 Fukui(1985)도 소에서 estrogen이 LH 또는 FSH와 같이 첨가될 때 성숙율이 본 실험의 성숙율과 같은 수준으로 보고한 바 있다.

### 4. 體外成熟 卵胞卵의 受精能力

mKRB+FCS+FSH에 estrogen과 progesterone을 첨가할 경우 수정율이 12.5%와 17.6%였고 mKRB+BSA+FSH에서 5.6%로 가장 낮았던 본 실험결과는 Moor와 Trounson(1977)이 양에서 LH와 estrogen 첨가에서, Fukui 등(1984)이 소에서 FCS+LH+estrogen의 첨가, 그리고 Fukushima와 Fukui(1985)가 LH+FSH+estrogen 첨가에서 비교적 양호한 결과를 얻었다는 보고와 유사하나 수정율은 이들보다 낮았다. 한편 Bondioli와 Wright(1983)가 mKRB와 BSA 배양액에서 성숙시킨 난자의 수정율이 30~45%였고 분할란이 7~10%였던 성적 보다는 본 실험에서 같은 배양액이지만 FSH를 추가한 성적이 불량하였다. 본 실험에서 난자이식후 24시간때에 토끼를 도살한 탓으로 Hensleigh와 Hunter(1985)의 보고에서 MEM+FCS+FSH로 배양시킨 成熟卵胞卵중에서 15%의 난자가 2세포기까지 발달하였다는 결과를 확인하지는 못하였다.

### V. 摘要

본 실험은 한우 卵胞卵에 있어서 체외성숙배양액의 조성과 첨가호르몬이 體外成熟率과 受精能力에 미치는 영향을 알고자 시도하였다. 한우 난포란은 도살직후 채취한 卵巢를 보온병(33~35 $^{\circ}\text{C}$ )에 담아서 4시간 이내에 실험실로 운반하여 20케이지 주사기로 吸引採卵하였다. 卵胞卵은 mKRB액에 BSA 또는 FCS과 호르몬을 첨가한 培養液에서 0, 8, 16, 24, 30시간 배양후 체외성숙의 정도를 위상차 현미경하에서 조사하였고, 체외성숙된 난자는 토끼의 子宮內에 移植하여 受精能獲得精子와의 수정능력을 조사하였다.

1. 한우 두당 채취된 卵胞卵은 직경 1~3mm 크기 난포에서 평균 6.5개, 4~6mm 난포에서 평균 1.3개 총평균 7.7개였다.

2. 1~3mm 卵胞卵의 경우 FSH 1  $\mu\text{g/ml}$ 와 5  $\mu\text{g/ml}$  첨가배양후 16시간에서 성숙분열이 다소 빨랐고, 30시간에서의 體外成熟率은 각각 38.4%와 35.7%로서 다소 대조구보다 높았다. 한편 직경이 4~6mm의 卵胞卵은 30시간 배양에서의 體外成熟率이 각각 53.8%와 57.1%로서 FSH 첨가효과가 나타나지는 않았으나 1~3mm 난포란보다는 높았

다.

3. HCG 1 IU/ml와 5 IU/ml 첨가에서 1~3 mm 난포란의 경우 16시간에서 成熟分厘이 촉진되었으나 30시간에서의 體外成熟率은 각각 26.6%와 13.3%로서 대조구의 53.3%보다 오히려 낮았다. 4~6 mm 난포란은 30시간 배양에서도 體外成熟율이 모두 30.8%로서 대조구의 58.3%보다 역시 낮았다.

4. HCG 5 IU/ml의 처리후 낮았던 體外成熟率이 BSA 대신에 15% FCS 첨가배양에서 55%까지 크게 향상되었다.

5. BSA 첨가 mKRB에 FSH 5  $\mu$ g/ml와 HCG 5 IU/ml를 16시간 첨가배양후 난자를 무첨가 배양액으로 옮긴 경우 HCG 첨가에 따른 體外成熟率이 특히 크게 향상되었다.

6. 난자의 體外成熟率이 스테로이드호르몬에 의해 향상되었으며 FCS + FSH + estrogen 혹은 progesterone의 첨가가 BSA + FCS + FSH 첨가보다 成熟율이 높았다.

7. 體外成熟 난자의 수정능력을 BSA (5.6%) 보다는 FCS 첨가 (12.5~17.6%)에서, 그리고 FSH와 progesterone 혼합첨가 (17.6%) 배양 조건에서 높았다.

## VI. 引用文獻

1. Bae, I. H. and R. H. Foote. 1975. Effects of hormones on the maturation of rabbit oocytes recovered from follicles of various sizes. *J. Reprod. Fert.*, 42: 357-360.
2. Ball, G. D., Ax, R.L. and N.L. First. 1980. Mucopolysaccharide synthesis accompanies expansion of bovine cumulus-oocyte complexes in vitro. Pages 561-563 in *Functional correlates of hormone receptors in reproduction*. V. Mahesh, T. Muldoon, B.Saxena, and W.Sadler. Elsevier/North-Holland, New York, pp. 561-563.
3. Ball, G.D., R.W., Lenz, R.L. Ax and N.L. First. 1983a. Effects of cAMP on bovine oocytes maturation and cumulus expansion. In: *Factors Regulating Ovarian Function* (G. S. Greenwald and P.F. Terranova, eds) Raven Press, New York, pp. 61-64.
4. Ball, G.D., M.L. Leibfried., R.W. Lenz, R.L. Ax and M.L. First 1983b. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 19:112.
5. Ball, G.D., M.L.Leibfried., R.L. Ax and N.L. First. 1984. Symposium: embryo development and manipulation. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *J. Dairy Sci.*, 67: 2775-2785.
6. Bondioli, K.R. and R.W. Wright. 1983. In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitation in vitro. *J. Anim Sci.*, 57: 1001-1012.
7. Dooley, V.D. 1984. Follicular oocyte maturation for use in bovine xenogenous and in vitro fertilization. *Diss. Abst. Int.*, B(Sci. and Eng.) 44: 3582.
8. Fukui, Y. and Y. Sakuma. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 22: 669.
9. Fukui, Y., M. Fukushima, Y. Terawaki and H. Ono. 1982. Effects of gonadotropins, steroid and culture media on bovine oocytes maturation in vitro. *Theriogenology*, 18: 161-175.
10. Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono. 1983. Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation in vitro. *J. Exp. Zool.*, 226: 137-142.
11. Fukushima. M. and Y. Fukui. 1985. Effects of gonadotrophins and steroids on the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes cultured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 9: 323-332.
12. Fulka, J., A. Pavlok, Jr and J. Fulka. 1982.

- In vitro fertilization of zona free bovine oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 64: 495-499.
13. Gwatkin, R.B.L. and O.F. Andersen. 1976. Hamster oocyte maturation in vitro inhibition by follicular componets. *Life Sci.* 19: 527.
  14. Hensleigh, M.A. and A.G. Hunter. 1983. Influence of FSH and HCG upon the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 19: 133.
  15. Hensleigh, H.C. and A.G. Hunter. 1985. In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. *J. Dairy Sci.*, 68: 1456-1462.
  16. Iritani, A, M. Kasai, K. Niwa and H. B. Song. 1984. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatoza capacitated in a chemically defined medium *J. Reprod. Fert.*, 70: 487-492.
  17. Jagillo, M.D., J. Graffeo., M. Ducayen and R. Prosser. 1977. Further studies of inhibitors of in vitro mammalian oocyte maturation. *Fertil. Steril.* 28: 476-481.
  18. Kanagawa, H. 1979. Recovery of unfertilized ova from slaughtered cattle. *Jpn J. Vet. Res.*, 27: 72-76.
  19. Katska, L. 1984. Comparison of the methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 7: 461-463.
  20. Leibfried, L. and N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.*, 48: 76-86.
  21. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser and N.L. First. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology*, 23: 753-759.
  22. Mandelbaum, J., M. Plachot and J. Cohen. 1982. In vitro maturation and fertilization of human preovulatory oocytes. In: *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, ed. Hafez, E.S.E. and K. Semm., MTP Press Limited falcon House Lancaster, England. M. 137-144.
  23. Mcgaughey, R.W. 1977. The culture of pig oocytes in minimal medium and the influence of progesterone and oestradiol-17 $\beta$  on meiotic maturation. *Endocrinol.*, 100: 39-45.
  24. Minato. Y. and Y. Toyoda. 1982. Induction of cumulus cell expansion and maturation division of porcine oocyte cumulus complexes in vitro. *Jpn J. Zootech. Sci.*, 53: 480-487.
  25. Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72: 323-328.
  26. Moor, R.M. and A.O. Trounson. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent development capacity. *J. Reprod. Fert.*, 49: 101-109.
  27. Oh, Y.K. and B.G. Brackett. 1975. Ultrastructure of rabbit ova recovered from ovarian follicles and inseminated in vitro. *Fertil. Steril.*, 26: 665.
  28. Onuma, H. and R.H. Foote. 1969. In vitro development of ova from prepuberal cattle. *J. Dairy Sci.*, 52: 1085.
  29. Racowsky, C. and R.W. Mcgaughey. 1982. In the absence of protein, estradiol, suppresses meiosis of porcine oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.*, 224: 103-110.
  30. Richeter. J.D. and R.W. Mcgaughey. 1979. Specificity of steroids porcine oocytes

- maturation in vitro. *J. Exp. Zool.*, 209: 81-90.
31. Shea, B.F., J.P.A. Latour., K.N. Bedrin and R.D. Baker. 1976. Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.*, 43: 809-815.
  32. Shea, B.F. R.E. Janzen and R. Mcalister. 1983. Recovery and fertilization of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 19: 385-390.
  33. Smith, D.M. and D.Y. Tenney. 1980. Effects of steroids on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 60: 331-338.
  34. Thibault, C., M. Gerard and Y. Menezo. 1976. Nuclear and cytoplasmic aspects of mammalian oocyte maturation in vitro in relation to follicle size and fertilization. In: *Sperm action. Prog. Reprod. Biol.*, 1: 233-240.
  35. Tsafiriri, A. and C. Channing. 1975. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 43: 149-152.
  36. Tsafiriri, A. H.R. Linder, U. Zor and A. Lamprecht. 1972. In vitro induction of meiotic division in follicular rat oocytes by LH, cyclic AMP and Prostaglandine F<sub>2α</sub>. *J. Reprod. Fert.*, 31: 39-50.
  37. Wilde, O., R. Marcolongo, G. Algel and G. Castro. 1984. Effect of oestradiol-17β and progesterone on the in vitro maturation of bovine follicular oocytes. *Veterinaria Argentina*, 1: 752-758.
  38. 菅原七郎, 浜野光市, 亀山賢次, 橋本伸二, 正木停二. 1985. ウシ卵胞液(BFF)処理によるウシ凍結精子の受精能獲得. *家畜繁殖誌*, 31(輯別24號): 62-67.
  39. 金正翔, 今井裕, 丹羽皓二, 入谷明. 1984. 山羊卵胞卵の體外成熟分裂. *韓畜誌*, 26: 435-439.
  40. 佐藤英明, 入谷明, 西川義正. 1978. ウシ卵胞卵の體外成熟および活性化現象について. *日畜會報*, 49: 236-242.
  41. 鄭英彩, 金昌根, 尹鍾澤, 朴在元. 1986. 家畜의 改良 및 繁殖効率 增進에 關한 研究. Ⅲ. 過排卵處理 토끼에 있어서 卵胞卵의 體外成熟과 受精能力에 關한 研究. *韓國家畜繁殖學會誌*, 10: 211-217.