

體外成熟, 體外受精 牛 卵胞卵의 Co-culture 에 관한 研究

高光斗 · 梁富根 · 金正翊

江原大學校 畜産大學

Co-culture of *In Vitro* Matured and Fertilized Bovine Oocytes with Oviductal Epithelium

Goh, K.D., B.K. Yang and C.I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangweon National University

SUMMARY

Bovine oocytes obtained from follicles (2~5mm) of ovaries after slaughter were cultured in TCM 199 medium with 10~20% heat-inactivated estrus cow serum (ECS) for 25~27 hr. at 39°C under 5% CO₂ in air. At the end of culture period, some oocytes were stained with 1% aceto-orcein and examined for the evidence of oocyte maturation. The remainder were used to assess the potential of *in vitro* fertilization (IVF) with frozen-thawed spermatozoa and subsequent development in media with or without bovine oviduct epithelial cell (BOEC) co-culture.

The results obtained were summarized as follows ;

1. The maturation rate of oocyte *in vitro* in TCM 199 medium with 15% ECS group (76.3%) was superior to 10% ECS group (68.3%) and 20% ECS group (64.5%).
2. The IVF rates of oocytes matured *in vitro*, and formation rate of male and female pronuclei were 63.6% (77/121) and 93.5% (72/77), respectively. The incidence of polyspermy was very low (2.4%).
3. Of 73 oocytes fertilized *in vitro* and cultured in TCM 199 medium with 10% fetal calf serum for 7 days, 41 (56.3%) were cleaved over 2-cell and only 1 (2.4%) was developed beyond the 16-cell stage.
4. Of 76 oocytes co-cultured with BOEC, 58 (76.3%) were cleaved and 23 (39.7%) were developed to morula and blastocyst stage. The results of this study indicate that co-culture with BOEC deserved a positive effect on the IVF oocyte development through the 16-cell block.

I. 緒 論

소를 포함한 大家畜은 實驗小動物에 비하여 受精의

본 연구는 문교부 유전공학 연구비 지원에 의하여 실시되었음.

成立條件을 검토하는데 필요한 다수의 成熟排卵卵子的
입수가 어려울 뿐 아니라 막대한 실험비를 요하는 制約
때문에 體外受精에 관한 연구가 되어 왔으나, 近年에

성숙배란난자의 代用으로 屠畜場에서 입수가 가능한 卵胞卵의 體外培養(Sato 등, 1977 ; Fukui와 Sakuma, 1980)을 기점으로 이 분야의 연구가 급진전하게 되었다.

소의 경우에 體內(Brackett 등, 1982 ; Sirad와 Lainber, 1986) 또는 體外成熟卵胞卵(Iritani와 Niwa, 1977 ; Niwa와 Ohgada, 1988 ; Kim 등, 1989)을 이용한 體外受精의 성공례가 보고되어 있으나, 受精初期는 體外培養의 一定時期(8-16 cell)에 발육이 정지되는 現象이 있으며(Eyeston 등, 1987), *in vitro* cell block을 극복한 소수의 수정란은 체내에서 정상발육된 난자에 비하여 세포수가 현저하게 감소된다(Kene, 1987).

이와 같은 현상은 同種 또는 異種의 卵管内로 受精初期를 移植하거나(Boland, 1984 ; Eyestone 등, 1985), trophoblastic vesicle(Camous 등, 1984), granulosa cell(Critser 등, 1986)등의 somatic helper cell과 공동배양하면 회복되는 사실이 보고되어 있으나, 16세포기 이상 발육율은 아직 만족할 만한 단계에 이르지 못하고 있다.

본 연구는 소에서 체외수정에 공용되는 成熟卵자의 入手難을 克服하기 위하여 未成熟卵胞卵의 體外成熟과 체외성숙란의 受精法을 검토하고, 체외수정란의 *in vitro* cell block의 극복수단으로 卵管上皮細胞의 共同培養이 수정란의 체외발육에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 材料 및 方法

1. 卵胞卵의 採取와 體外成熟

1) 卵胞卵의 採取

도축장에서 도살된 屠殺牛의 卵巢를 적출, 2시간내에 실험실로 운반(생리식염수, 35~36°C)하여 직경이 2~5 mm 내의 난포에서 未成熟 卵胞卵을 채취하여 卵丘細胞가 균일한 난포란만을 선별하여 體外成熟에 공용하였다(Fig. 1).

난포란의 採取는 TCM 199(Earle's salt : 25 mM Hepes : Sigma)에 非動化 發情牛血清(Estrus Cow Serum : ECS)이 10~20% 첨가된 배양액을 사용하였다.

2) 卵胞卵의 體外成熟

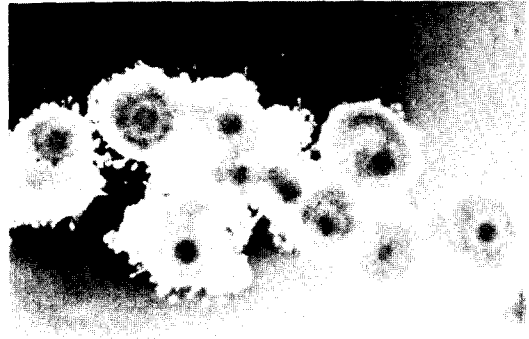


Fig. 1. Bovine oocytes with compact cumulus cells obtained from follicles of ovaies after slaughter

卵胞卵의 培養은 TCM 199(Earle's Salt : 25 mM Hepes)에 ECS를 10%, 15%와 20% 첨가한 배양액을 0.2 μ m milipore filter(Toyo Roshi, Japan)로 여과시켜 4-well dish(Nunc, Denmark)에 1ml씩 주입, 滅菌된 Paraffin oil로 피복하여 2시간 이상 平衡(39°C, 5% CO₂ in air)시킨 후 각 well당 10~15개의 未成熟卵胞卵을 옮겨 넣은 후 25~27시간 배양(39°C, 5% CO₂ in air), 일부는 1% aceto-orcein으로 染色하여 體外成熟象을 관찰하고 잔여 난포란은 體外受精에 공용하였다.

3) 成熟卵胞卵의 判定

난포란을 25~27시간 배양후 0.2% hyaluronidase (Sigma)액으로 卵丘細胞層을 제거한 다음 固定液

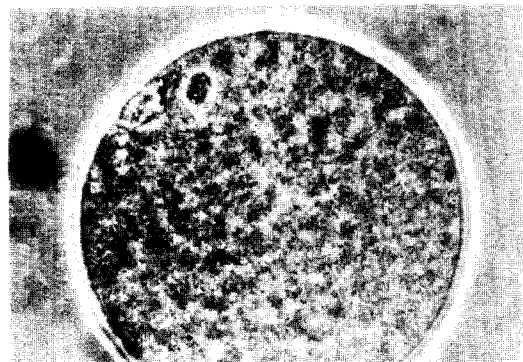


Fig. 2. Matured oocyte(inetaphase II), showing first polar body and metaphase chromosome.

(acetic acid 1 : ethanol 3)으로 24~48시간 고정후 1% aceto-orcein으로 染色하여 핵의 成熟狀態를 검토하여 第2成熟分裂 中期(Metaphase II)에 도달한 난자를 成熟卵子로 판정하였다(Fig. 2)

2. 精子的 準備와 體外受精

1) 精子的 準備

凍結保存(-196°C)된 정액 straw(0.5 ml)를 37°C의 恒溫水槽에서 0.5~1분간 침지하여 融解하였다. 용해된 정액 1ml에 Ca^{2+} free TALP 배양액 10 ml를 점진적으로 첨가하여 再浮遊, 1,500 rpm에서 10분간 遠心分離하여 정자를 세척한 후에 Ca^{2+} free TALP 배양액 10 ml를 첨가, 30분~1시간 배양(39°C, 5% CO_2 in air)하여 정액을 상층분리(swim up separation)하였다(Kim 등, 1990).

상층정자 부유액을 heparin(100 μ g/ml)이 첨가된 BO 배양액(Brackett & Oliphant, 1975)에 옮겨서 1~2회 遠心分離(1500 rpm, 10분), 침전층의 1ml와 동량의 BO 배양액(100 μ g/ml heparin)을 첨가하여 15~20분간 배양(39°C, 5% CO_2 in air), 精子的 受精能獲得을 유지하여 體外受精에 이용할 生存精子 부유액을 준비하였다.

2) 體外受精

Heparin(10 μ g/ml)과 caffeine(5 mM)이 첨가된 BO 배양액을 滅菌된 paraffin oil로 피복하여 體外受精用 소적배양액(0.5 ml)을 만들고 CO_2 배양기내에서 2시간 이상 平衡하였다. 체외수정용 소적배양액에 상기의 준비된 체외성숙 난포란(5~10개)과 생존정자부유

액 10~20 μ l를 첨가하여 체외수정하였다. 체외수정후 24~25시간 배양(39°C 5% CO_2 in air)하여 일부를 1% aceto-orcein 염색액으로 염색하여 체외수정란을 조사하였고(Fig. 3) 여분의 체외수정란을 난관상피세포와 共同培養(Co-culture)하여 體外發育能을 검토하였다.

3. 卵管上皮細胞의 準備와 體外受精卵의 共同培養

1) 卵管上皮細胞의 準備

屠殺直後에 摘出된 난관은 난관 표면의 血液과 結體組織을 제거후, PBS溶液(1% polyvinyl alcohol) 10~20 ml를 관류시켜 난관상피세포를 분리하였다.

분리된 난관상피세포를 PBS 용액으로 2~3회 세척후 Ham's F-10배양액(10% FCS)으로 재부유한 후 4 well dish에 1ml씩 분주하여 배양(37°C, 5% CO_2 in air)하였다. 24시간 배양후에 上層液을 버리고 새로운 배양액을 첨가하였고, 2일에 한번씩 배양액을 교환하여 monolayer층이 형성된 것만 체외배양에 공용하였다.

2) 體外受精卵의 卵管上皮細胞와 共同培養

체외수정된 수정란의 발육능을 조사하기 위하여 일부 수정란을 체외수정후 TCM 199(10% FCS)배양액으로 세척, TCM 199에 10% FCS가 첨가된 배양액(대조구) 또는 Ham's F-10액에 난관상피세포를 배양시킨 배양액내에서 5일간 배양(39°C 5% CO_2 in air)하여 체외수정란의 체외발육능을 검토하였다.(Fig. 4)

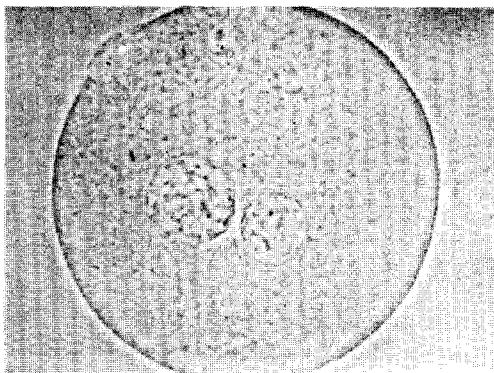


Fig. 3. Fertilized ovum, shown a male and female pronucleus

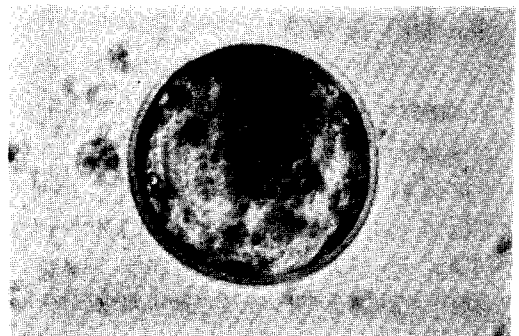


Fig. 4. A blastocyst cultured for 7 days in Ham's F-10 medium with bovine oviduct epithelial cell(BOEC) Co-culture.

III. 結果 및 考察

1) 牛 卵胞卵의 體外成熟

도살 직후 도살장에서 실험실로 운반해온 난소중 직경이 2~5mm 난포에서 채취한 난포란을 발정우 혈청이 첨가된 TCM 199배양액에서 25~27시간 배양하여 체외성숙율을 조사한 결과를 표 1에 요약하였다.

표 1에 나타난 바와 같이 TCM 199배양액에 발정우 혈청(ECS)을 첨가하여 배양한 결과 총 182개의 미성숙난자중 125개가 Metaphase-II期까지 발달되어 68.7%의 체외성숙율을 나타냈으며, 발정우 혈청의 첨가수준에 따른 성적에서는 10%, 15%와 20%첨가구에서 각각 68.9%(42/61), 76.3%(45/59)와 64.5%(40/62)였으며, ECS 15%첨가구가 76.3%로서 10%첨가구(68.9%)와 20%첨가구(64.5%)보다 우수하였다.

이상의 성적은 Sanbuissho와 Threlfall(1989)가 발정우 혈청 10%가 첨가된 Ham's F-10 배양액에 우 난포란을 24시간 배양하여 53.4%(77/144)의 체외성숙율을 얻는 결과보다는 다소 높은 경향을 보였으나, 호르몬(FSH, LH 및 estradiol)을 첨가한 Ham's F-10, mKRB 및 BMOC-3배양액에 난포란을 28시간 배양하여 74.5~77.5%의 제1극체 방출율을 보고한尹

등(1989)의 성적과 대체로 일치하였다. 이러한 결과는 난포란의 체외수정에 공용된 배양액의 종류와 배양시간 등의 배양조건이 상이한데 기인된 것으로 보인다.

2) 體外培養 卵胞卵의 體外受精

체외성숙이 이루어진 성숙난포란을 동결 용해한 정액과 체외수정하여 자웅전핵의 형성 유무에 따라 체외수정율을 조사한 결과는 표2와 같다.

총 121개의 난포란중 체외수정을 실시한 결과 72개(59.5%)가 자웅전핵이 형성되었으며, 5개(4%)는 팽윤된 정자 두부가 관찰되어 64.0%(77/121)의 체외수정율을 얻었다. 한편 polyspermy의 발생빈도는 2.4%로서 매우 낮았다.

이와 같은 성적은 박 등(1989)이 68.8% 체외수정율을 얻은 성적과 Kim 등(1989)이 125개의 난포란중 69개(55.0%)가 자웅전핵이 형성되고 polyspermy 發生頻도가 3%(2/69)였다는 성적과는 대체로 일치하고 있으나, Parrish 등(1986)의 79% 체외수정율과 Niwa와 Ohgoda(1988) 등이 94%의 체외수정율을 얻은 성적보다는 다소 낮은 경향을 보였다.

3) 體外成熟後 體外受精 牛 卵胞卵의 發育

체외수정된 수정란의 체외발육능을 증진시키기 위하여 TCM 199(10% FCS)배양액 또는 Ham's F-10 배양액에 우 난관상피세포와 공동배양하여 얻은 결과를 표 3에 요약하였다.

Table 1. In vitro maturation of bovine oocytes cultured in vitro

Medium	Number of trials	Number of oocytes		% of Metaphase II
		Examined	Metaphase II	
TCM 199 + 10% ECS	3	61	42	68.9
TCM 199 + 15% ECS	3	59	45	76.3
TCM 199 + 20% ECS	3	62	40	64.5

Table 2. In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro.

Number of trials	Number of oocytes examined	Number of oocytes penetrated			Number of polyspermic oocytes(%)
		with enlarged sperm head	with two pronuclei	total (%)	
5	121	5	72	77 (64)	3(2.4)

1 : Oocytes matured in TCM 199 medium with 15% ECS

Table 3. Development of *in vitro* fertilized oocytes matured *in vitro*

Culture system	No. of trials	No. of egg examined	No. of embryos developed to:				Total (%)	No. of Mor. & Blast/eggs cleaved (%)
			2~8 cells	9~16 cells	17~32 cells	Blast.		
TCM 199 + 10% FCS	3	73	37	3	1	-	41 (56)	1/41 (2)
Ham's F 10 + BOEC	3	76	30	5	13	10	58 (76)	23/58 (40)

FCS : fetal calf serum, Mor. & Blast. : morulae and blastocyst

대조구인 TCM 199용액에 10% FCS가 첨가된 배양액내에는 73개의 수정란중 41개 (56%)가 2세포기~16세포기 까지 발육되었으나, 상실배까지 발육된 수정란은 1개로서 2%의 낮은 성적을 나타냈다.

수정란의 체외발육을 증진시키고 8~16 cell block을 극복하기 위하여 Ham's F-10배양액에 난관상피세포와 Co-culture한 결과 76개의 수정란중 58개가 세포분열하여 76.3%의 체외발육 성적을 얻었고, 그중 2~8세포기까지 발육된 수정란은 30개 (39.5%), 9~16세포기의 수정란은 5개 (6.6%), 상실배 수정란 13개 (17.1%) 및 배반포까지 발육된 수정란은 10개 (13.2%)였다.

분할된 수정란중 23개 (39.7%)가 상실배와 배반포기까지 발육되어 TCM 199 (10% ECS) 배양액으로 단독 배양하는 것보다 Ham's F-10배양액과 난관상피세포와 Co-culture한 결과가 우수하였다.

이상의 성적은 Kim 등 (1990)이 체외수정란을 TCM 199 (10% ECS) 배양액에 122개의 수정란을 배양한 결과 65개 (53.3%)가 세포분열되었으나 그중 1개만이 발육된데 반하여, CZB 배양액 (Chatot et al, 1989)에 우 난관상피세포와 우 체외수정란을 공동배양한 결과 37.5% (39/104)가 상실배와 배반포로 발육된 성적 및 Aoyagi 등 (1989)이 TCM 199 배양액 (10% FCS)에 난관상피세포와 체외수정란을 공동배양한 결과 39% (23/59)의 난자가 cell block 현상을 극복하였으며, Eyestone 과 First (1989) 등도 42.9% (15/35)의 배반포의 발육성적을 얻어 난관상피세포의 공동배양이 牛受精卵의 體外發育能을 증진시켰다는 결과의 보고와 대체로 일치하는 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 수정초기배의 배양시 발현되는 *in vitro* cell block의 현상을 난관상피세포

와 같은 somatic helper cell과 수정초기배를 공동배양하면 체외발육능이 회복되는 것이 확실하나 회복율은 30~40% 선에 머물고, 앞으로 somatic helper cell에서 생산 분비되는 것으로 추정되는 embryo tropic factor의 분리와 체외배양계의 개선에 관한 계속적인 연구가 요망된다.

IV. 摘要

本 研究는 牛 卵胞卵의 體外受精과 體外受精後 細胞의 發育能을 검토하기 위하여 도살 직후에 도살장에서 회수한 난포란을 非動化 發情牛血清 (ECS)이 첨가된 배양액에서 25~27시간 배양하여 성숙한 난자와 凍結 融解한 정액으로 체외수정한 후에 受精卵의 발육정지 현상을 극복하기 위하여 난관상피세포와 공동배양 (Co-culture)하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 난포란의 체외성숙율은 TCM 199배양액에 ECS를 15%첨가구 (76.3%)가 10% (68.9%)와 20%첨가구 (64.5%)보다 우수하였다.
2. 체외배양 (15% ECS 첨가) 牛卵胞卵의 체외수정율은 63.6% (77/121), 체외수정란중 자웅전력의 형성율은 93.5% (72/77)였으며, 다정자 침입 (polyspermy)의 발생빈도는 2.4%로서 매우 낮았다.
3. TCM 199배양액에 우태야혈청 (FCS)을 10%첨가한 대조구에서는 56.2% (41/73)가 2세포기 이상으로 발육되었으나 16세포기를 통과한 수정란은 1개 (2.4%)에 불과하였다.
4. 체외수정란을 난관상피세포와 공동배양한 결과 76.3% (58/76)가 세포분열되었으며, 이중 39.7% (23/58)가 16세포기를 통과하여 상실배와 배반포기로 발육되어

체외성숙, 체외수정란을 난관상피세포와 공동배양은 8~16 cell block의 극복에 효과적임이 확인되었다.

V. 引用文獻

1. Aoyagi, A., Y. Fukui, Y. Iwazumi, M. Uradawa, Y. Miengishi and H. Ohno. 1989. Effect of culture system on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 31 : 168.
2. Boland, M.P. 1984. The use of rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21 : 126-137.
3. Brackett, B.G., D.Bousquest, M.C.Boice, W.T.Donawick, J.F. Evans and M.A. Dressel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27 : 147-158.
4. Brackett, B.G. and G.Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12 : 260-274.
5. Camous, S., Y.Heyman, W.Meziou and Y. Menezo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J.Reprod. Fert.* 72 : 479-485.
6. Chatot, C.L., C.A. Ziomek, B.D. Bavister, J.L. Lewis and I.Torries. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *Theriogenology* 86 : 679-688.
7. Critser, E.S., M.L.Leibfried-Rutledge, W. H.Eyestone, D.L.Northey and M.L.First. 1986. Acquisition of development competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 25 : 150(Abstr.).
8. Eyestone, W.H. and N.C.First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J.Reprod. Fert.* 85 : 715-720.
9. Eyestone, W.H., D.L.Northey and M.L. Leibfried-Rutledge. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.* 32(Suppl.) : 100(Abstr.).
10. Eyestone, W.H., J.Vignierri and N.L. First. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviduct epithelium. *Theriogenology* 27 : 228.
11. Fukui, Y. and Y.Sakuma. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* : Relation to ovarian activity, follicular size and the presence of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 22 : 669-672.
12. Iritani, I. and K.Niwa. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J.Reprod. Fertil.* 50 : 119-121.
13. Kene, M.T. 1987. *in vitro* growth of pre-implantation rabbit embryos. In ; Bavister, B.D.(ed). *The mammalian preimplantation embryo : Regulation of growth and differentiation in vitro*. Plenum Press, New York. pp.139-217.
14. Kim, C. I., J. Ellington and R.H. Foote. 1989. *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 31 : 210.
15. Kim, C.I., J.E. Ellington and R.H. Foote. 1990. Maturation, Fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*(Submitted).
16. Niwa, K. and O.Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30 : 733-741.
17. Parrish, J.J., H.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone and N.L.First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25 : 591-600.

18. Sanbuissho and W.R.Threlfall. 1989. The effect of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology* 31 : 693-699.
19. Sato, E., I. Iritani and M. Nishikawa. 1977. Factors involving maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap. Anim. Reprod.* 23 : 12-18.
20. Sirard, M.A. and R.D. Lambert. 1986. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet. Res.* 119 : 167-169.
21. 박세필, 박태균, 윤산현, 고대환, 정길생. 1989. 牛 卵胞卵의 體外成熟에 관한 研究. III. 體外成熟 牛 卵胞卵의 體外受精과 發達. *韓國家畜繁殖學會誌* 13(2) ; 105-112.
22. 尹山鉉, 高大煥, 朴世必, 朴泰均, 鄭吉生. 1989. 牛 卵胞卵의 體外成熟에 관한 研究. I. 卵胞卵의 回收와 體外培養. *韓畜誌* 31 : 201-209.