

소 체외수정란의 초기발생에 있어서 수정후 발생배지로 옮기는 시기와 난관상피세포의 영향*

김정익 · 박춘근 · 오세훈

강원대학교 축산대학

Effects of Co-Culture with Oviductal Cells, Time of Transfer into Culture Medium after Insemination on Early Development of *In Vitro* Fertilized Bovine Oocytes

Kim, C.I., C.K. Park and S.H. Oh

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

Early development of bovine oocytes fertilized *in vitro* in the medium with caffeine and heparin was examined in different culture systems. When the oocytes were transferred into culture medium 8 h after insemination, 12%(7/60) of penetrated oocytes cleaved to 4-cell stage 24 h after insemination. The proportions of oocytes cleaved to 8- to 16-cell stage 48 h after insemination had also a to be higher in oocytes transferred into culture medium 8 h(29%) than 16 h(10%) or 24 h(4%) after insemination. 52% of the 4-cell embryos developed to morula and blastocyst stages when they were co-cultured with oviductal epithelia, whereas only 5% of embryos cultured without the epithelial cells(P<0.001). In another experiment, embryos were co-cultured with ampulla, isthmus or utero-tubal junction of oviducts. There are no significant differences in the proportions of embryos developed to morula and blastocyst stage.

I. 緒 論

소의 초기배는 혈청이 첨가된 배양액내에서 8세포기 또는 상실배기에서 배반포기배까지 매우 빠른 속도로 발육한다(Wright 와 Bondioli, 1981). 이들 초기배는 1세포기 단계의 초기배에서 8~16세포기까지도 단순배양액내에서 발육이 가능하지만(Brackett 등, 1982; Sirard와 Lambert, 1985), 일반적으로 배양액내에서 1-2세포기의 초기배가 수정란이식에 이용될 수 있는 배반포기배까지 발육한다는 것은 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 돼지의 경우, 4-8세포기의 초기배가

제조된 단순배양액내에서 배반포기배까지의 발육은 가능했지만 1-2세포기의 초기배가 배반포기배까지 발육하는 것은 매우 제한적이었다(Davis와 Day, 1978). 한편 소의 경우, 체외수정란을 TC-199배양액내에서 체외배양하는 경우 상실배기 이상으로 발육한 초기배가 3%로 매우 낮은 비율을 보였다(Eyestone 과 First, 1989). 따라서 초기배의 초기발육에 영향을 미치는 요인의 분석이 요구되고 있다.

한편 수정란의 생산을 위해 체외수정시 이용하는 동결-융해정자의 수정능력획득 및 침체반응의 유기는 caffeine과 heparin이 첨가된 배양액내에서 1시간이내에 유기되고, 매정후 8시간후 난자내에 정자의 침입

*이 논문은 1992년도 강원대학교 기성회 학술연구비에 의하여 연구되었음.

이 거의 완료되는 것으로 보고되었다(Park 등, 1989). 그러나 이와 같은 조건으로부터 얻은 수정란의 체외발육 능력은 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구의 목적은 체외수정후 가능한 빠른 시기에 수정란을 발생배지로 옮기는 것이 그후의 발생에 어떤 영향을 미치는지 검토하고, 배양시 배양액중에 첨가하는 난관상피세포와 수정란의 공동배양이 초기배의 발육에 미치는 영향을 검토하였다.

II. 材料 및 方法

1. 난자의 준비

도축장에서 회수한 난소의 난포로부터 채취한 미성숙난포란을 25 mM의 HEPES를 함유한 TC-199배양액내에 10%의 소의 태아혈청(fetal calf serum: FCS)을 첨가해 배양하였다. 배양개시 3시간전에 100 μ l의 TC-199액의 소적을 culture dish내에 작성해 유동 paraffin oil로 상면을 덮어, 5% CO₂, 95% air 및 39°C의 탄산가스 배양기내에서 평형시켰다. 채취한 미성숙 난포란은 배양액내에서 4회 세척후 각각의 소적에 10개씩 넣어 22~24시간 배양후 체외수정을 위한 성숙난자로 이용되었다.

2. 정자의 처리 및 체외수정

정자의 처리 및 수정을 위한 기본 배양액은 BO배양액(Brackett와 Oliphant, 1975)을 이용하였다. 동일한 종모우로부터 채취한 동결정액(2 straws)은 35~37°C의 온수내에서 1분간 용해한 후 10 mM caffeine이 첨가된 BO액을 7~8 ml 첨가해 원심분리(833g, 10분)로 2회 세척후 상등액을 제거해, 정자농도가 2~5 \times 10⁶ spermatozoa/ml가 되도록 정자를 재부유시켜 체외수정을 위해 준비하였다. 한편, BO배양액내에 20 μ g/ml heparin을 첨가해 culture dish내에 50 μ l의 소적을 작성해 상면을 유동 paraffin oil로 피복한 후 탄산가스 배양기내에서 2~3시간 평형시켰다. 그후 체외에서 성숙배양한 난포란은 수정배양액내에서 2~3회 세척후 1개의 소적당 5개씩 넣어, 상기의 방법으로 준비한 정액 50 μ l를 각각의 소적내에 첨가해 체외수정을 실시하였다.

3. 체외수정란의 배양

매정후 8, 16 및 24시간 후 물리적으로 난구세포를 제거한 난자는 10% FCS가 첨가된 TC-199배양액내에서 2~3회 세척후 같은 배양액내로 옮겨 매정후 24 및 48시간이 되는 시점에서 불활을 및 초기발생실태를 검토하였다.

4. 난관 상피세포와의 공동배양

도축장에서 회수한 난관을 35~37°C의 생리식염수의 보존하여 실험실로 운반한 후 생리적 식염수내에서 세척하여 난관팽대부, 난관 협부 및 자궁·난관 접속부로 구분하여 약 2 cm의 길이로 절단해 EDTA-4Na(7.6 mg/ml)를 첨가한 PBS(-)액에서 2시간 배양한 후 상피세포를 박리하여, TC-199(10% FCS첨가)액에서 6일간 배양하여 monolayer형성후 수정란을 투입해 7일간 공동배양후 체외발육상황을 검토하고, 또한 난관의 각 부위별 상피세포와 초기배의 공동배양이 상실태 및 배반포기배까지의 발달에 미치는 영향을 검토하였다.

III. 結果 및 考察

Table 1은 매정후 8 및 16 시간에서 발생배지로 옮긴 후 매정 24시간에서 정자의 침입률 및 난자의 초기분할율을 검토했다. 그 결과 매정후 발생배지에 난자를 옮기는 시기에 관계없이 정자침입율은 91~97%로 차이는 없었으며, 매정후 16시간에서 발생배지로 옮긴 것과 수정배지에서 24시간동안 배양한 경우 분할된 난자는 관찰되지 않았으나, 매정후 8시간에서 발생배지로 옮긴 경우 정자침입률중 12%(7/60)가 분할되어 가급적 빠른 시기에 수정배지에서 발생배지로 옮기는 것이 수정란의 초기발생에 효과적인 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Park 등(1989)이 caffeine과 heparin이 첨가된 수정배지에서 정자의 전처리에 관계없이 매정후 8시간에서 90%에 가까운 정자침입율을 보고한 것과 같이 본 실험에서도 정자침입은 매정후 8시간에서 거의 완료되는 것으로 인정되었다.

매정후 8, 16 및 24시간에서 발생배지인 TC-199배양액으로 옮겨 각각 계속배양하여 매정후 48시간에서 난자의 초기발생상황을 검토한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 분할율은 80(48/60), 83(73/88) 및 79(55/70)%로 큰 차이는 나타내지 않았다. 그러나

Table 1. Penetration and early cleavage of oocytes transferred into culture medium various times after insemination and examined 24h after insemination

Time of oocytes transfer into culture medium(h. after insemin.)	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated		
		Total (%)	1-cell*	2- to 4-cell (%)**
8	66	60(91)	53	7(12)
16	69	67(97)	67	0(0)
24 [†]	72	70(97)	70	0(0)

* Oocytes penetrated with enlarged sperm head or male pronucleus.

** Percentage of total number of oocytes penetrated.

[†] Oocytes were cultured with spermatozoa in fertilization medium for 24h after insemination.

8-16세포기로 발육한 초기배는 29(14/48), 10(7.73) 및 4(2/55)%로 배정후 8시간에 발생배지로 옮기는 것이 16 및 24시간에서 옮기는 것에 비해 매우 효과적이었다. 이와 같은 결과는 Table 1에서 나타난 결과를 뒷받침해 줄 수 있으나, 다른 연구보고가 없어 직접 비교는 곤란한 실정이나 caffeine과 heparin이 첨가된 수정배지에서는 정자침입란의 분할이 억제되다가 배정후 빠른 시기에 혈청이 첨가된 발생배지로 옮기므로서 늦게 옮긴 난자에 비해 난할이 촉진되는 것으로 추측되었다.

체외수정란의 체외발생능력을 검토하기 위하여 매

정후 8시간에서 발생배지로 옮긴 난자를 48시간 배양 후 얻은 4세포기의 초기배를 난관상피세포와 공동배양하여 얻은 결과는 Table 3과 같다. 난관상피세포의 첨가없이 혈청만 첨가된 단순배양액내에서 7일간 배양한 55개의 4세포기배중 상실배기 이상으로 발육한 초기배는 5%(3개)로 매우 낮은 발육율을 보인데 비해 난관상피세포와 공동배양한 경우 5%(32/62)로 유의적으로 높은 발육율을 보였다($P < 0.001$). 이와 같은 결과는, Eyestone 등(1987)이 난관상피세포와 공동배양한 5-8세포기의 초기배는 후기상실배 또는 배반포기배로의 발육율을 높일 수 있음을 시사했고, Eyestone과

Table 2. Early cleavage of oocytes transferred into culture medium various times after insemination and 48h after insemination

Time of oocytes transfer into culture medium(h. after insemin.)	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved		
		Total (%)	2- to 7-cell*	8- to 16-cell (%)*
8	60	48(80)	34(71)	14(29)
16	88	73(83)	66(90)	7(10)
24	70	55(79)	53(96)	2(4)

* Penetrated of total number of oocytes cleaved.

Table 3. Development of bovine embryos co-cultured with oviductal cells

Oviductal cells	No. of embryos examined*	No. of embryos developed		
		Total (%)	Morula	Blastocyst (%)
+	62	32(52) ^a	18	14(23)
-	55	3(5) ^b	3	0(0)

* The embryos cleaved to 4-cell stage 48 h after insemination were further culture 7 days.

a, b ; $P < 0.001$ (χ^2 -test).

Table 4. Development of bovine 4-cell embryos co-cultured with oviductal epithelium for 7 days.

Epithelium from	No. of embryos examined*	No. of embryos developed		
		Total(%)	Morula	Blastocyst(%)
None	55	3(5) ^a	3	0(0)
Ampulla	45	22(49) ^b	12	10(22)
Isthmus	47	24(51) ^b	13	11(23)
UTJ ⁺	44	23(52) ^b	12	11(25)

* The embryos cleaved to 4-cell stage 48h after insemination.

⁺ UTJ : utero-tubal junction.

a,b. : P<0.001(χ^2 -test).

First(1988)는 체외에서 성숙, 수정, 분할된 난자중 약 50%가 난관상피세포와 공동배양하므로써 상실배기 이상으로 발육했음을 보고해 본 연구의 결과도 이들 결과와 일치됨을 보여주고 있다.

일반적으로 수정란을 난관상피세포와 공동배양하는 경우 난관의 부위를 고려하지 않고 상피세포를 채취하여 이용되어왔다. 그러나 소의 경우 배란후 수정 및 분할이 진행되는 과정에서 난관의 각 부위로 부터 분비되는 물질의 조성이 다를 것으로 추측된다. 본 연구에서는 이와 같은 점에 착안하여 난관을 팽대부, 협부 및 자궁-난관접속부로 분류하여 채취한 난관상피세포를 매정후 8시간에 발생배지로 옮겨 배양하여 얻은 4세포기와 공동배양하여 초기배의 발육율을 검토하였다. Table 4에서 보여주는 바와 같이 난관팽대부, 난관협부 및 자궁-난관접속부로 부터 얻은 상피세포와 7일간 공동배양한 경우 상실배와 배반포기배로의 발육율은 49(22/45), 51(24/47) 및 52%(23/44)로 난관부위에 의한 차이는 인정되지 않았으나 비공동배양에 비해서는 유의적으로 높은 발육율을 보였다(P<0.001). 이와 같은 결과는 다른 보고가 없기 때문에 직접적인 비교는 할 수 없지만 체내와는 달리 체외에서 초기배를 배양하는 경우 상피세포를 채취하는 난관부위는 고려할 필요가 없는 것으로 사료되었다.

이상의 연구결과로 부터 체외수정란의 체외배양은 매정후 가급적 빠른 시기인 8시간에서 발생배지로 옮겨 난관상피세포와 공동배양하는 것이 체외발육을 위해 효과적이었으나 난관의 부위에 구분의 의한 상피세포의 채취는 고려할 필요가 없는 것으로 추측되었다.

IV. 摘要

소의 체외성숙난자에 동결·융해정자를 매정한 후 서로 다른 시기에 발생배지로 옮긴 후 배양을 계속하여 체외발육율을 검토한 결과, 매정후 8시간에서 발생배지로 옮겨 매정 24시간에서 난자의 분할율(12%)은 매정후 16시간에서 옮긴 경우(0%)와 수정배지에서 24시간 배양한 경우(0%)에 비해 높았으며, 매정후 48시간에서의 초기발육율도 같은 경향을 보였다. 한편, 매정후 48시간에서 얻은 4세포기배를 난관상피세포와 공동배양한 경우(52%) 비공동배양(5%)에 비해 유의적으로 높은 발육율을 보였으나(P<0.001), 난관의 서로 다른 부위에서 채취한 상피세포의 영향은 인정되지 않았다. 이상의 결과로 부터, 체외수정난자는 매정후 가급적 빠른 시기에 발생배지로 옮겨 난관상피세포와 공동배양하는 것이 초기발육에 효과적이었음이 시사되었다.

V. 引用文獻

1. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
2. Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A. Dressel. 1982. Normal development following *in-vitro* fertilization in the cow. Boil. Reprod., 27:147-158.
3. Davis, D.L. and B.N. Day. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs

- in-vitro*. J. Anim. Sci., 46:1043-1053.
4. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1988. Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue. Proc. 11th Intl. Cong. Anim. Reprod. A.I. No. 4:471(3 pages).
 5. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1989. Co-culture of cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
 6. Eyestone, W.H., M.L. Leibfried-Rutledge, D.L. Northey, B.G. Gilligan and N.L. First. 1987. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. Theriogenology, 28:1-7.
 7. Park, C.K., O. Ohgoda and K. Niwa. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. J. Reprod. Fert., 86:577-582.
 8. Sirard, M.A. and R.D. Lambert. 1985. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. Boil. Reprod., 33:487-494
 9. Wright, R.W. and K.R. Bondioli. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci., 53:709-729.