

牛卵胞卵의 體外受精時 Glucose가 精子侵入에 미치는 影響

박춘근 · 오세훈 · 김정익

강원대학교 축산대학

Effect of Glucose on Fertilization *In Vitro* of Bovine Follicular Oocytes by Frozen-thawed Spermatozoa

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

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

Frozen semen obtained from 5 different Korean Native Cattle were used for *in vitro* fertilization of oocytes. The proportions(3~11%) of oocytes penetrated in the basic medium with 13.9 mM glucose were very low in different semen. However, the penetration rates of oocytes in the presence of caffeine and heparin increased to 68~84%. The proportions(10~52%) of oocytes penetrated in the presence of caffeine alone were low at various glucose concentrations(0~27.8 mM). In the medium with heparin, significantly($P < 0.05$ at least) higher penetration rate was obtained in the absence(94%) than in the presence(28~45%) of 0~27.8 mM glucose concentrations. The medium with caffeine and heparin, however, produced similar penetration rates(84~97%) regardless of the various glucose concentrations.

I. 서 론

포유동물의 수정에 있어서 가장 기본적인 현상으로 간주되고 있는 정자의 수정능력획득(capacitation)과 첨체반응(acrosome reaction)은, 교배후 雌動物의 난관으로 부터 회수된 난자를 관찰하므로써 발견되었지만, 체외수정기술을 이용하게 되면 이와 같은 중요한 현상에 대해서 더 많은 지견을 얻을 수 있다.

현재, 소의 체외수정기술은 체내 또는 체외에서 성숙한 난자를 이용하고 있으며, 정자의 수정능력획득을 위한 여러가지 처리방법에 의해 체외수정율에 큰 영향을 미치고 있다. 즉, 정자의 수정능력획득 및 첨체반응유기를 위한 처리법으로서 bovine follicular fluid(Fukui et al., 1983) 또는 calcium ionophore

(Byrd, 1981) 등을 이용해 오다가 최근에는 caffeine(Niwa et al., 1988) 또는 heparin(Parrish et al., 1988)처리에 의해 그 효과를 얻었지만 아직도 안정된 체외수정율을 얻지 못했다. 그러나 caffeine과 heparin이 동시에 첨가된 배양액내에서 정자를 처리할 경우 체외수정에 상승효과가 있다는 것이 보고되었다(Niwa 와 Ohgoda, 1988). 특히 heparin은 소 정자의 수정능력획득에 관여하고 있지만(Parrish 등, 1988) glucose는 heparin에 의한 정자의 수정능력획득을 억제하는 것으로 알려져있다(Parrish 등, 1989). 한편 caffeine은 정자의 호흡및 운동성을 증가시키는 것으로 보고되었다(Garbers et al., 1971). 따라서 caffeine 또는 heparin이 첨가된 배양액내에서 glucose농도를 조절해 나가면 90% 이상의 안정된 체외수정율과 수정란이식에 필요한 다량의 수정란 확보

“이 논문은 1992년 교육부지원 학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성) 과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음”

및 정자침입의 현상을 또다른 각도에 소 고찰해 나갈 수 있으리라 추측된다. 본 연구에서는 국내에서 제조되는 동결정액을 이용한 체외수정시 caffeine과 heparin을 단독 또는 공동으로 첨가하면서 glucose농도를 조절할 경우 높은 수정율과 정액의 개체에 따른 수정율의 차를 없애는 수단으로 충분히 이용될 수 있는 체외수정계를 확립하기 위한 방법을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 체외배양

도축장에서 쉽게 얻을 수 있는 난소의 난포로부터 채취한 미성숙 난포난자는 25 mM의 N-2-Hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid(Hepes)를 함유 TC-199 배양액내에 10%(V/V)의 牛胎兒血清(fetal calf serum)을 첨가해 배양했다. 배양개시 3시간 전에 100 μ l의 TC-199액의 小滴을 culture dish내에 작성해 유동 paraffin oil로 상면을 덮어, 5% CO₂, 95% air 및 39℃의 기상상태로 있는 탄산가스 배양기내에서 평형시켰다. 개개의 小滴내에는 채취한 난포난자를 상기의 배양액내에서 4회 세척후 10개씩 정착해 22~24시간 성숙배양해 체외수정을 위한 성숙난자로 제공하였다.

2. 정자의 처리

정자의 처리 및 수정을 위한 기본배양액은 BO 배양액(Brackett and Oliphant, 1975)을 이용했다. 기본배양액에 glucose 첨가(55.6, 27.8, 13.6, 6.8 mM) 또는 무첨가로 하여 정자를 처리했다. 같은 種雄牛로부터 얻은 동결정액(2 straws)은 35~37℃의 온수내에서 1분간 용해한 후 BO액을 7~8 ml첨가해 원심분리(833g, 10분)로 2회 세척후 상등액을 제거해, 정자의 농도가 2~5×10⁶ spermatozoa/ml가 되도록 정자를 재부유시켜 준비하였다.

3. 체외수정용 배양액의 준비

Caffeine과 heparin의 단독첨가 및 공동첨가시 glucose가 정자침입에 미치는 영향을 검토하기 위해, 수정을 위한 BO배양액내에 10 mM caffeine, 20 μ g/ml heparin, caffeine(10 mM) + heparin(20 μ g/ml) 또는 무첨가 배양액을 만들어 culture dish

내에 50 μ l를 작성해 상면을 유동 paraffin oil로 피복한 후 탄산가스 배양기내에서 미리 3시간 정도 평형시켰다. 한편 체외에서 성숙배양한 난포란은 각각의 수정배양액내에서 2~3회 세척후 각 소적당 5개씩 투입했다. 그후 상기의 방법으로 준비한 정액 50 μ l를 각각의 배지내에 첨가해 수정을 실시했다. 결국 최종수정배지는 5 mM caffeine, 10 μ g/ml heparin, caffeine(5 mM) + heparin(10 μ g/ml) 및 무첨가배지로 조정되고, 정자와 glucose농도도 반으로 감소하였다.

4. 수정상황의 검사

수정후 20~22시간에서 조정·염색하여 1) 난자세포질내에 정자미부가 존재하거나 정자두부가 평화해 있는 경우, 2) 정자미부가 관찰되지 않더라도 2개의 전핵과 제 2극체가 관찰된 경우 수정란으로 판정하였으며, 3) 2개 이상의 전핵과 정자의 미부가 관찰된 것은 다정자침입란으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

본 연구를 수행하기 위해 한우 5두의 종우우로부터 채취한 동결정액을 구입해 caffeine(5 mM)과 heparin(10 μ g/ml) 및 glucose(13.9 mM)가 첨가된 기초배지내에서 Park 등(1989)의 방법을 이용해 체외수정을 실시하여 개체차를 확인한 결과를 Table 1에 나타냈다.

수정후 20~22시간에서 정자의 침입율을 조사한 결과, 정액번호 7, 25, 33, 69 및 76번의 정자침입율은 각각 82, 77, 81, 68 및 84%로서 유의차는 인정되지 않았지만 76번 정액으로부터 가장 높은 정자침입율을 얻었다. 이와 같은 결과는 Niwa와 Ohgoda(1988)가 caffeine과 heparin의 동시첨가시 이들 물질의 단독첨가에 비해 높은 정자침입율(68%)을 보고하였는데 본 연구에서는 68~84%로 더 높은 정자침입율을 보였다. 그러나 Niwa 등(1992)은 caffeine과 heparin이 동시에 첨가된 배지내에서 glucose(13.9 mM)의 첨가유무에 관계없이 94~96%의 높은 정자침입율을 보고해, 본 연구결과가 낮은 경향을 보였는데 그 원인은 개체차와 동결정액의 제조방법이 상이한데 기인하는 것으로 추측되었다.

Table 1. Penetration *in vitro* of bovine oocytes inseminated in presence of caffeine(5 mM) and heparin(10 µg/ml) and with glucose(13.9 mM)

Semen number	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated			No. of polyspermic oocytes(%)*
		Total (%)	With enlarged sperm head	With male and female pronuclei	
7	76	62(82)	7	55	4(6)
25	64	49(77)	4	45	2(4)
33	85	69(81)	5	64	6(9)
69	73	50(68)	3	47	6(12)
76	69	58(84)	7	51	3(5)

*Percentage of total number of oocytes penetrated.

Table 2는 위에서 사용한 5종류의 동결정액을 이용하여 체외수정시 caffeine, heparin 및 glucose를 첨가하지 않은 상태에서 얻은 정자침입율을 나타냈다.

정액번호 7, 25, 33, 69 및 76번의 정자침입율이 각각, 8, 11, 3, 8 및 10%로 나타났는데, 이와 같이 침입율이 낮은 이유는 현재까지 많은 보고(Fukui 등, 1983; Fraser 등, 1979)에서 보여주듯이 체외수정시 가장 문제가 되는 정자의 수정능력획득과 첨체반응을 유지하기 위해서 정자의 처리시 caffeine 또는 heparin을 이용하는 방법이 요구되고 있는데, 본 연구에서도 이들 물질을 첨가하지 않아 기초배양액내에 애너지원인 glucose를 첨가해도 정자침입율이 매우 낮았다. 따라서 Table 1에서도 나타냈듯이 caffeine과 heparin을 동시에 첨가하는 것이 효과적이긴 하지만 이들 물질을 단독 또는 공동으로 첨가하면서 glucose 농도를 변화시키면 여러 각도에서 정자침입 상황의 검토는 물론이고 더욱 높은 정자침입율이 기대된다.

Table 1의 연구결과로 부터 가장 높은 정자침입율을 얻은 76번의 동결정액을 이용하여 caffeine 단독첨가시 수정배지내에 첨가하는 glucose의 농도가 정자침입에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 3에 나타냈다.

수정배지에 glucose 무첨가시 정자침입율이 10%로 매우 낮는데 비해 glucose 농도 3.4, 6.8, 13.9 및 27.8 mM 첨가시 정자침입율이 각각 44, 43, 52 및 34%로 무첨가에 비해 유의적으로 높은 정자침입율을 얻었다 ($P < 0.05$). 한편 13.9 mM의 glucose농도하에서 가장 높은 성적을 얻은데 비해 glucose를 대량(27.8 mM)으로 첨가할 경우 오히려 정자침입율이 저하되는 경향을 보였다. Niwa 등(1992)은 caffeine 단독첨가시 13.9 mM glucose농도에서 62%의 정자침입율을 보고해 본 연구결과보다 높은 경향을 보였으며, 본 연구결과의 경우 낮은 glucose농도에서도 체외수정의 가능성을 보여주었다. 그러나 Niwa 등(1992)은

Table 2. Penetration *in vitro* of bovine oocytes in medium containing glucose (13.9 mM) without caffeine and heparin

Semen number	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated			No. of polyspermic oocytes(%)*
		Total (%)	With enlarged sperm head	With male and female pronuclei	
7	83	7(8)	2	5	0(0)
25	80	9(11)	2	7	1(11)
33	77	2(3)	0	2	0(0)
69	85	7(8)	1	6	1(14)
76	79	8(10)	3	5	1(13)

*Percentage of total number of oocytes penetrated

Table 3. Penetration *in vitro* of bovine oocytes in medium containing various concentration glucose and caffeine(5 mM)

Concentration of glucose(mM)	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated			No. of polyspermic oocytes(%)*
		Total (%)	With enlarged sperm head	With male and female pronuclei	
0	79	8(10) ^a	3	5	1(13)
3.4	70	31(44) ^b	3	28	3(10)
6.8	69	30(43) ^b	5	25	2(7)
13.9	71	37(52) ^b	7	30	4(11)
27.8	82	33(40) ^b	5	28	2(6)

*Percentage of total number of oocytes penetrated

a-b : P<0.05

glucose무첨가시에도 55%의 정자침입율을 보고해 본 연구의 10%에 비해 매우 높은 수치를 보였는데 이 점에 관해서는 앞으로 더욱 연구가 진행되면 정자가 난자내에 침입시 caffeine과 glucose와의 관계를 해명할 수 있으리라 생각된다.

한편, 10 µg/ml의 heparin을 첨가한 배지에 여러 glucose농도로 첨가하면서 체외수정을 실시한 결과, glucose 무첨가시 94%의 높은 정자침입율을 나타냈으나(Table 4), 3.4, 6.8, 13.9 및 27.8 mM glucose 농도에서의 정자침입율은 45, 33, 32 및 28%로 무첨가에 비해 유의적으로 낮은 정자침입율을 나타냈다(P<0.01). 본 연구의 결과로 부터 heparin단독첨가시 glucose는 오히려 정자침입의 저해요인으로 작용하면서 heparin의 효과를 억제시키는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 결과는 Parrish 등(1988)의 보고에서도 보여주듯이 heparin이 소정자의 수정능력획득 유

기에는 효과적이었지만 glucose존재하에서 그 효과가 저해되며, 본 연구결과에서도 나타났듯이 낮은 glucose농도에서도 정자침입이 억제되는 것을 알 수 있었다. 그러나 glucose무첨가시 94%의 높은 정자침입율을 얻은 것은 Niwa 등(1992)의 88%보다 높은 수치를 보여 앞으로 heparin만을 이용한 체외수정계의 개발도 가능해졌다.

그러나 caffeine과 heparin을 동시에 첨가했을 경우 glucose무첨가 또는 여러 농도로 첨가해도 정자침입율은 84~97%로 높은 수치를 보였으나(Table 5), 본 연구에서는 glucose농도의 한계가 어느 정도인지는 실험되지 않았다. 이상의 결과로 부터 기본 배양액(13.9 mM glucose)내에서 caffeine과 heparin 무첨가시 개체로 부터 얻은 동결정액의 정자침입율은 10% 내외로 매우 낮은 수치를 나타냈으나 caffeine과 heparin을 첨가하므로써 68~84%로 상승되었다. 그러나

Table 4. Penetration *in vitro* of bovine oocytes in medium containing various concentration glucose with heparin

Concentration of glucose	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated			No. of polyspermic oocytes(%)*
		Total (%)	With enlarged sperm head	With male and female pronuclei	
0	62	58(94) ^a	5	53	5(9)
3.4	66	30(45) ^b	2	28	2(7)
6.8	78	26(33) ^b	1	25	2(8)
13.9	75	24(32) ^b	2	22	1(4)
27.8	72	20(28) ^b	2	18	2(10)

*Percentage of total number of oocytes penetrated

a-b : P<0.05 at least

Table 5. *In-vitro* penetration of bobine oocytes in medium containing caffeine and heparin with various glucose concentrations

Concentration of glucose	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated			No. of polyspermic oocytes(%)*
		Total (%)	With enlarged sperm head	With male and female pronuclei	
0	66	64(97)	3	61	2(3)
3.4	73	70(96)	4	66	5(7)
6.8	59	53(90)	3	50	4(8)
13.9	68	66(97)	1	67	5(8)
27.8	65	55(84)	3	52	3(5)

* Percentage of total number of oocytes penetrated

caffeine만 단독으로 첨가된 경우 glucose농도의 변화에도 불구하고 10~52%로 낮은 정자 침입율을 보였으나 heparin이 단독으로 존재하는 경우 glucose무첨가 (94%)가 여러 농도에서 첨가(28~45%)했을 때 보다 오히려 높은 정자침입율을 나타냈으며, caffeine과 heparin이 동시에 존재하는 경우 glucose농도의 변화에도 불구하고 안정된 침입율을 나타냈다. 앞으로 이와 같은 결과를 바탕으로 caffeine과 heparin의 동시첨가 또는 heparin단독 첨가의 경우 glucose 농도조절에 의한 체외수정제의 확립으로 동결정액의 개체차를 없애고 보다 우수한 양질의 수정란 확보가 가능하리라 생각된다.

IV. 적 요

5두의 한우로 부터 얻은 동결정액을 이용하여 기초배양액(13.9 mM glucose)내에서 체외수정을 실시한 결과 caffeine과 heparin무첨가시 정자침입율이 3~11%로 매우 낮았는데, caffeine과 heparin을 첨가하브로서 침입율이 64~84%로 증가되었다. 한편, caffeine단독첨가시 glucose농도 (0~27.8 mM)의 변화에 따라 10~52%의 낮은 정자침입율을 보였으나, heparin단독첨가의 경우 glucose무첨가시(94%) 여러 농도에서 첨가(28~45%)했을 때보다 오히려 높은 침입율을 나타냈다($P < 0.05$). 그러나 caffeine과 heparin이 공존하는 경우 glucose의 농도변화에도 불구하고 84~97%의 높은 침입율을 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
2. Byrd, W. 1981. *In vitro* capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. J. Exp. Reprod., 215:35-46.
3. Fraser, L.R. 1979. Accelerated mouse sperm penetration *in vitro* in the presence of caffeine. J. Reprod. Fert., 57:377-384.
4. Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono. 1983. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedures. Theriogenology, 20:651-660.
5. Garvers, D.L., N.L. First, J.J. Sullivan and H.A. Lardy. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. Biol. Reprod., 5:336-339.
6. 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.
7. Niwa, K., O. Ohgoda and M. Yuhara. 1988. Effect of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on *in vitro* penetration of cattle oocytes. Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Dublin 3, abstr. No. 346(3 pages).

8. Niwa, K., O. Ohgoda and C.K. Park. 1992. Effect of glucose in medium with caffeine and/or heparin on *in vitro* penetration of bovine oocytes matured in culture. Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod., Hague, Vol. 2:671-673.
9. 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.
10. Parrish, J.J., J. Susko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod., 38: 1171-1180.
11. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N.L. First. 1989. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. Biol. Reprod., 41:683-699.