

난관상피세포 Conditioned Medium이 체외수정된 소 수정란의 체외 발달에 미치는 영향

오종훈 · 김동훈 · 정형민 · 이훈택 · 정길생

건국대학교 동물자원연구센터

Effect of Bovine Oviductal Epithelial Cell(BOEC) Conditioned Medium on *In Vitro* Development of Bovine Embryos Fertilized *In Vitro*

Oh, J. H., D. H. Kim, H. M. Chung, H. T. Lee, and K. S. Chung

Animal Resources Research Center, Kun-Kuk University

SUMMARY

This study was investigated to examine the effect of conditioned medium from bovine oviductal cell(BOEC) in the co-culture system with BOEC on *in vitro* development of *in vitro* produced bovine embryos. Oocyte-cumulus complexes were cultured for 24 hrs in TCM-199 supplemented with 10% fetal calf serum, 1 μ g/ml FSH and 2IU hCG, 1 μ g/ml oestradiol-17 β at 39°C under 5% CO₂ in air. *In vitro* fertilization was performed with epididymal sperm and heparin (10 μ g/ml, 15 min.) or caffeine(2.5mM)-treated spermatozoa. Oocytes were incubated with 1 \times 10⁶ spermatozoa/ml for 18 hrs and then cultured in various culture system for 7 days. The development rates to 16-cell or blastocyst stages were recorded on 4, 7 days, respectively, after incubating. The proportions of embryonic development into molulae and blastocysts were higher in cumulus cell co-culture(23.4%) and BOEC co-culture(34.3%) than in M199-FCS(6.1%). Similarly, the development rates into molulae and blastocysts were significantly higher in BOEC-conditioned medium than those in M199-FCS. Therefore, it is suggested that BOEC co-culture and BOEC conditioned medium increase significantly the development of *in vitro* produced bovine embryos in *in vitro* system.

I. 緒 論

가축난포란을 이용하려는 연구는 생식세포의 발생에 관한 기초적인 지식을 제공할 뿐만 아니라 형질전환 동물의 생산등과 같은 발생공학적 첨단연구에 필요로 하는 다수의 수정란을 공급할 수 있다는 점에서 그 의의가 크다고 하겠다.

지금까지 보고된 바에 의하면 가축난포란을 체외수정 및 체외수정과정을 통하여 생산한 수정란을 체외에

서 배양할 경우 특정 배발달 단계에서 그 발생이 정지되는 현상이 나타나고 있다. 따라서 이러한 발달정지 현상은 산자생산까지 체외생산 수정란을 이용하는 데 큰 장애가 되고 있다.

이러한 문제를 극복하기 위한 방법으로 배양액의 성분과 성분의 변화, 성장촉진인자의 첨가(Carney 등, 1986), 난포액이나 복수액등과 같은 체액의 이용(Collas 등, 1991), 영양배엽(Camous 등, 1984), 난관상피세포(Eyestone 등, 1989), 난구세포(Goto 등, 1988; Fukuda 등, 1990)등과 같은 체세포와의 공

동배양을 실시하기도 하며, 자궁 혹은 난관을 이용하여 난포란의 체내배양(Parrish 등, 1989)등을 이용하는 방법이 제시되고 있다.

그 중에서도 체세포를 이용한 공동배양이 가장 활발하게 이루어지고 있는 실정이다. 체세포와의 공동배양의 효과에 대한 정확한 기전은 아직까지는 명확하게 밝혀져 있지 않지만 체세포와의 공동배양이 배양액 내에 존재하는 독성물질을 중화시키거나, 체세포와 수정란과의 새로운 projection system의 형성에 의한 유용물질의 전달 및 체세포에서 분비되는 미지 수정란 성장촉진인자의 생산등이 보고되어 왔다(McCa-ffrey 등, 1991).

그러나 체세포를 사용할 경우 과도한 세포증식에 의한 형태변형, 계대배양에 따른 세포유지의 어려움과 감염등의 문제점들이 제기되었다(Xu 등, 1992). 최근 Eyestone등(1989)은 소 난관상피세포를 이용하여 단층세포를 작성한 다음 이들 배양액 상층액을 이용하여 수정란의 체외배양을 실시할 경우 체세포와의 공동배양 효과와 유사한 결과를 나타내었다고 보고한 바 있다.

이에 본 연구에서는 소 난관상피세포를 회수, 단층세포를 작성하여 체외에서 생산된 소 수정란을 체외배양하고, 또한 난관상피세포의 배양액을 작성하여 이들 수정란의 체외배양을 실시하여 수정란의 발달을 조사하여 각기 다른 배양조건들의 발달 촉진 효과를 검토하고자 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 난포란의 체외성숙

도축장(우성농장)에서 도살된 소의 난소를 37℃의 멸균 생리식염수가 충만된 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 세척 후 19 gauge 주사침이 부착된 주사기를 이용하여 2~6mm 가시난포로부터 난포액을 흡인한 후, 실체현미경하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고, 난세포질이 균일한 난자만을 골라서 체외성숙용 배양액에 소적당 5~6개씩 난포란을 침적하여 24시간동안 CO₂배양기내에서 배양하였다.

체외성숙용 배양액은 25mM HEPES와 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액에 hormone(1μg/ml FSH, 2IU hCG, 1μg/ml oestradiol-17β)을

첨가하여 paraffin oil이 피복된 100μl 소적을 제작한 후 4시간 이상 전배양함으로써 평형을 유지시켜 사용하였다.

2. 정자의 수정능 획득과 체외배양

정소상체 정자를 회수하여 원심분리를 통하여 3-4회 세척하였으며 최종 원심분리 후 약 10분동안 swim-up 시킨 후 상층부의 정자만을 취하여 10μg/ml heparin 혹은 2.5mM caffeine이 첨가된 m-TALP 배양액에 각각 15분과 3시간동안 배양하여 수정능 획득을 유기한 후 100μl 소적(1×10⁶ 정자/ml)을 제작하여 소적당 5~6개의 체외성숙된 난자와 공동배양함으로써 수정을 유도하였다.

3. 소 난관상피세포의 준비

도살된 자축의 난관을 적출한 후 즉시 멸균 생리식염수로 표면을 세척하고, 얼음에 침지하여 실험실로 운반하였다. 운반된 난관을 생리식염수로 3~4회 세척한 후 난관을 slide glass로 부드럽게 scrapping하여 난관 상피세포를 회수하였다.

회수된 세포는 TALP-HEPES 배양액으로 4~5회 세척하였고 200 unit/ml collagenase(type V: Sigma, USA)로 처리한 후 percoll로 세포를 분리하였다. 분리된 세포는 신선한 TALP-HEPES 배양액으로 2~3회 세척한 후 TCM-199(10% FCS) 배양액이 함유된 4-well dish(Nunc, Denmark)에서 1×10⁶cell/ml농도의 세포를 적하하여 7일간 배양함으로써 단층배양을 유도하였다.

단층배양된 세포는 계대배양을 실시하면서 배양 후 3일, 6일째로 분류하여 상층액을 회수하였고 농도별로 첨가한 conditioned medium을 제작하여 체외배양에 사용하였다.

4. 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과들의 통계분석은 χ²검정으로 실시하였다.

III. 結果 및 考察

1. 수정능 획득 방법에 따른 수정을 비교

본 연구를 수행하기 위해 heparin과 caffeine을 수

Table 1. Fertilization rates of *in vitro* matured bovine follicular oocytes on different sperm treatment with m-TALP

Treatment	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes fertilized	No.(%) of oocytes polyspermy
Caffeine(2.5 mM)	130	81(62.5) ^a	13(16.1)
Heparin(10 μ g /ml)	130	98(75.4) ^b	11(11.2)

a,b : P<0.05

Table 2. Effect of co-culture systems on *in vitro* development of bovine embryos fertilized *in vitro*

Treatment	No. of oocytes examined	No.(%) of embryos cleaved	No.(%)* of development	
			16-32-cell	Morula + Blasto.
M199FCS	194	120(61.9)	17(14.2) ^a	8(6.9) ^c
Cumulus cell co-culture	210	145(69.1)	59(40.7) ^b	34(23.4) ^d
BOEC co-culture	210	140(66.7)	56(40.0) ^b	48(34.3) ^e

* : No. of embryos /No. of embryos cleaved

a,b : P<0.001 : c,d,e : P<0.001 : d,e : P<0.05

정능 획득인자로 사용하여 조사한 바, heparin의 경우 수정율이 75.4%인 반면 caffeine의 경우 62.5%로 heparin 처리군에서 유의하게 좋은 성적을 얻었으며, 전배양 시간을 단축시킬 수 있는 장점이 있어 본 연구에서는 heparin을 사용한 수정능 획득 방법을 사용하였다.

2. 난관 상피세포와의 공동배양 효과

난구세포와 난관상피세포를 공동배양하여 소 수정란의 체외 발달율을 비교한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이, 16세포기와 상실기 혹은 배반포기까지 소 수정란의 체외발달에 있어 난관상피세포와의 공동배양군에서는 각각 56개(40.0%)와 48개(34.3%)였고, 난구세포와의 공동배양군에서는 각각 59개(40.7%)와 34개(23.4%)로 대조군의 경우 16세포기까지 7개(14.2%)와 상실기나 배반포기까지 8개(6.9%)의 성적에 비해 공동배양군 모두 유의하게 높은 성적을 나타내었다(P<0.001). 또한 공동배양군내에 있어서도 난관상피세포 공동배양군에서 유의하게 높은 성적을 보였다(p<0.05).

이러한 결과는 Xu 등(1992)이 난관상피세포와의 공동배양에서 배반포기까지 66%의 발달율을 얻은 것

에 비하면 저조한 결과이지만, Eyestone 등(1989)이 보고한 35%의 배발달율과는 유사한 결과이다. 따라서 체세포와의 공동배양이 *in vitro* cell block현상을 어느 정도 극복한다는 것을 확인하였고, 난구세포보다는 난관상피세포가 소 수정란의 체외배양에 더 좋은 효과가 있음을 확인하였다.

3. Conditioned medium의 효과

난관 상피세포를 배양한 상층액을 소 수정란의 체외 배양에 이용한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이, 상실기 혹은 배반포기까지 대조군의 경우 7.6%의 성적을 보인 반면, conditioned medium의 경우 난관상피세포를 배양한 기간이나 농도에 관계없이 31.4~38.6%의 체외배발생율을 보임으로써 대조군에 비해 유의하게 높은 성적을 얻었다(P<0.001). 또한 conditioned medium처리군내에서의 유의성은 없었으나 3일과 6일 배양군 모두 100%처리군에서 다소 높은 성적을 보였다.

이러한 결과는 Eyestone 등(1991)이 보고한 성적에 비해 conditioned medium 처리군 모두 높은 결과를 보였다. 그러나 Eyestone 등(1991)은 상층액의 농도가 증가함에 따라 다소 높은 배발달율을 보고하였지

Table 3. Effect of BOEC conditioned medium on *in vitro* development of bovine embryos fertilized *in vitro*

Treatment	Day of BOEC culture	Conc. of BOEC(%) medium	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) [*] of development	
					16-32-cell	Mor. + Blasto.
M199FCS			184	115(62.5)	19(16.5) ^a	9(7.6) ^c
conditioned medium	3days	10	125	85(68.0)	36(42.4) ^b	30(35.3) ^d
		50	120	84(70.0)	36(42.7) ^b	27(32.1) ^d
		100	125	76(60.8)	35(46.1) ^b	28(36.8) ^d
	6days	10	165	105(63.6)	45(42.7) ^b	33(31.4) ^d
		50	185	121(65.4)	49(40.5) ^b	39(32.2) ^d
		100	135	93(68.9)	37(39.8) ^b	32(34.4) ^d

* : No. of embryos /No. of embryos cleaved

a, b : P<0.001 ; c, d : P<0.001

만, 본 연구에서는 상등액의 농도에 따른 차이는 보이지 않았다. 이러한 차이는 conditioned medium을 제조하는 방법의 차이 때문인 것으로 생각된다.

Table 2의 난관상피세포와 공동배양한 결과와 Table 3의 conditioned medium에서의 배발달율이 유사한 것은 체세포와 수정란간의 직접 접촉이 체외배발달율에 영향을 미치지 않는다는 McCaffrey 등 (1992)의 연구와 일치하는 결과라 생각되며, 체세포와의 공동배양은 체세포에서 분비되는 수정란 성장촉진인자에 의한 효과가 주된 요인인 것으로 생각된다.

IV. 摘 要

본 연구는 소 난관상피 세포를 이용한 conditioned medium이 소 수정란의 체외발달에 미치는 효과를 검토하고자 실시한 바, 그 결과를 종합하면 다음과 같다.

1. 본 연구에 사용될 수정란의 작성을 위해 caffeine과 heparin을 수정능 획득 인자로 사용하여 수정을 유도한 결과 caffeine처리군에서는 62.5%인 반면, heparin처리군에서는 75.4%로 유의하게 좋은 결과를 나타내었으며(P<0.05), 전배양처리 시간 또한 짧아서 수정조건을 용이하게 하였다.
2. 16-세포기까지 소 수정란의 체외배양에 있어 대조군(14.2%)에 비해 난관상피세포 공동배양군(40.0%)이 유의한 차이를 보였으나(P<0.001), 난구세포 공동배양군(40.7%)과는 차이가 없었다. 그러나 16-세포기 이후의 후기 배발달율에 있어서는 대

조군 뿐만 아니라, 난구세포 공동배양군과도 유의한 차이(P<0.05)를 보임으로써 난관상피세포와의 공동배양이 소 수정란의 체외배양에 좋은 효과가 있다는 것을 확인하였다.

3. 난관상피세포를 배양한 상등액을 이용하여 소 수정란의 체외발달율을 조사한 결과, 대조군(7.6%)에 비해 상등액 처리군 모두에서 유의하게 높은 성적을 보였다(P<0.001). 그러나 난관상피세포의 배양기간이나 상등액의 농도에 따른 배발달율의 차이는 보이지 않았지만 3일과 6일 배양한 군 모두 100% 상등액 처리군에서 약간 높은 발달율을 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 난관상피세포가 소 수정란의 체외발생에 좀 더 유효하다고 생각되며 그 상등액 역시 공동배양한 결과와 차이를 보이지 않음으로써 확실하지는 않지만 체세포와의 공동배양은 체세포에서 분비되는 수정란 성장촉진인자에 의한 효과라고 생각된다. 또한 그 상등액을 이용함으로써 체세포와의 공동배양할 때의 문제점을 어느 정도 극복할 수 있으며 간편한 배양조건이라고 생각된다.

V. 引用文獻

1. Bavister, B. D., and T. Arlotto. 1990. Influence of single amino acids on the development of hamster one-cell embryos *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 25:45-51.

2. 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.
3. Collas, P., R. T. Duby, and J. M. Robl. 1991. *In vitro* development of rabbit pronuclear embryos in rabbit peritoneal fluid. *Biol. Reprod.*, 44:1100-1107.
4. Coskun, S., A. Sanbuissho, Y. C. Lin, and Y. Rikihisa. 1991. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor(EGF). *Theriogenology*, 36(3):485-493
5. Ellington, J. E., E. W. Carney, P. B. Farrell, M. E. Simkin, and R. H. Foote. 1990. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod.*, 43:97-104.
6. Ellington, J. E., P. B. Farrell, M. E. Simkin, R. H. Foote, E. E. Goldman, and A. B. McGrath. 1991. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2-cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 89:293-299.
7. Eyestone W. H., and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
8. Eyestone, W. H., J. M. Jones, and N. L. First. 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, 92:59-64.
9. Fukuda, Y., M. Ichikaw, K. Naito, and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42:114-119.
10. Fukui, Y., L. T. McGowan, R. W. James, P. A. Pugh, and H. R. Tervit. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 92:125-131.
11. Gandolfi, F., and R. M. Moor. 1987. Stimulation of early development in sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 81:23-28.
12. Goto, K., N. Iwai, Y. Takuma, and Y. Nakanishi. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
13. Heyman, Y., Y. Menezo, P. Chesne, S. Camous, and V. Garnier. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improvement using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27:59-68.
14. Kane, M. T., E. W. Carney, and J. E. Ellington. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 38:297-313.
15. McCaffrey, C., T. G. McEvoy, M. G. Diskin, F. C. Gwazdauskas, M. T. Kane, and J. M. Sreenan. 1991. Successful co-culture of 1-4-cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.*, 91:119-124.
16. Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, M. A. Winer, and N. L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38: 1171-1180.
17. Rexroad, C. E., and A. M. Powell. 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium-199. *J. Anim. Sci.*, 66:947-953.
18. Rexroad, C. E. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31:105-114.

19. Sakkas, D., P. A. Batt, and A. W. N. Cameron. 1989. Development of preimplantation goat (*Capra hircus*) embryos *in vivo* and *in vitro*. J. Reprod. Fert., 87:359-365.
20. Thibault, C., M. Gerard, and Y. Menezo. 1975. Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. J. Reprod. Fert., 45:605-610.
21. White, K. L., K. Hehnke, L. F. Rickords, L. L. Southern, D. L. Thompson, and T. C. Wood. 1989. Early embryonic development *in vitro* by co-culture with oviducal epithelial cells in pigs. Biol. Reprod., 41:425-430.
22. Xu, K. P., and T. Greve. 1988. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 82:127-134.
23. Xu, K. P., B. R. Yadav, R. W. Rorie, L. Plante, K. J. Betteridge, and W. A. King. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. J. Reprod. Fert., 94:33-43.