

돼지 난포란의 체외성숙시 성선자극호르몬의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 배발생에 미치는 영향

이장희 · 김창근 · 정영채
중앙대학교 산업대학

Effect of Gonadotropins added during Maturation of Porcine Oocytes on the *In Vitro* Maturation, *In Vitro* Fertilization and Development of Embryos

J. H. Lee, C. K. Kim and Y. C. Chung
College of Industrial Studies, Chung-Ang University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of gonadotropins added during maturation of porcine oocytes on the *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and developmental potential of embryos. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing different combination of gonadotropins (5 μ g/ml FSH or 10IU/ml PMSG and 10 μ g/ml LH or 10IU/ml hCG), 10% FCS and 10% pFF for 36~48h in a incubator with 5% CO₂ in Air at 39°C and then matured oocytes were again cultured to 120h after IVF for 6~7h with heparin (100 μ g/ml)-treated sperm. When the oocytes were matured for 42hrs in the medium containing FSH+LH, FSH+hCG, PMSG+LH or PMSG+hCG, the IVF rate of each treatment was 50.0%, 52.9%, 66.7% and 70.0%, respectively. The highest CEI (cumulus cell expansion index) was obtained from PMSG+hCG-added medium and the highest polyspermic penetration resulted from FSH+LH-added medium. The cleavage of IVF oocytes derived from hormone added IVM was significantly ($P < 0.05$) promoted by PMSG+hCG and the cleavage rate after 36-h, 42-h and 48-h maturation was 53.0%, 56.7% and 45.6%, respectively. The highest developmental potential resulted from the oocytes derived from PMSG+LH-added IVM.

서 론

도축 개체로부터 채란된 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양기술에 관한 연구는 난자의 성숙 및 수정 등의 생리학적 기작의 규명과 새로운 번식육종기술의 개발을 위해 매우 유용한 연구분야이지만 아직도 연구결과가 만족할 정도의 수준에는 미치지 못하고 있다. 그러나 소에서는 이미 수 년전

부터 수정란의 체외생산체계로부터 송아지 생산이 가능해졌으며 돼지에서도 최근 산자생산이 성공됨에 따라 이 기술개발의 활용가치가 높게 평가되고 있다 (Mattioli 등, 1989).

돼지난포란의 체외성숙시 호르몬 첨가효과에 관해서 Minato와 Toyoda (1982)는 m-KRB 성숙배양액에 PMSG 또는 hCG의 단독첨가에서는 성숙분열의 재개와 난구세포의 팽화에 크게 영향을 미치지 않으나 이들 두가지 호르몬의 병용처리에서는

metaphase II 도달율이 크게 향상됨을 보고하였다. 그러나 Wu 등(1992)은 성숙배양액에 PMSG를 첨가함으로써 성숙율이 현저히 높아졌다고 하였으며 Kim 등(1990)은 PMSG 및 hCG의 첨가수준에 따라 난포란의 체외성숙율과 체외수정율에 차이가 있음을 보고하였다. Mattioli 등(1991)은 LH와 FSH가 성숙분열을 촉진시키며 특히 FSH는 metaphase II 도달율을 높이는 반면 LH는 세포질을 성숙시켜 응성전핵형성을 현저히 높힌다고 하였다. 한편 소에서도 Henseleigh와 Hunter(1985) 및 Yang 등(1993)은 체외성숙시 호르몬 첨가유무에 따라 난구세포의 팽화 정도에 현저한 차이가 있다고 하였다.

돼지난포란의 체외성숙후 체외수정율에서 Polge (1977)는 체외성숙난자는 체외수정시 다정자침입율이 높기 때문에 난관이식후에도 배반포까지 발달하지 못한다고 하였으며 Yoshida 등(1990), Kim 등(1990) 및 Funahashi 등(1993)은 각각 hCG, PMSG 및 hCG+PMSG의 첨가에서 체외수정율이 높아졌다고 하였다. Mattioli 등(1991), Kikuchi와 Nagai(1993) 및 Illera와 Petters(1993)는 LH와 FSH를 첨가하여 체외수정율을 향상시킬 수 있었고 하였다.

돼지수정란의 발생에 있어서 Davis(1985)는 체내에서 채란된 1세포기 수정란의 체외배양은 Polge와 Frederik(1968)가 지적한 바와 같이 4cell block 때문에 초기발생이 어려우나 4cell block를 극복한 수정란은 쉽게 정상적으로 체외발생이 가능함을 보고하였고 Hyttel과 Niemann(1990)은 체외성숙 난포란의 체외수정후 배발생은 발생과정중 여러가지 미세구조의 변화와 세포질 내의 공포형성때문에 산자까지의 도달율이 저하된다고 하였다.

따라서 본 연구는 이러한 체외성숙난포란의 저조한 체외배발생율을 증진시키기 위하여 난포란의 체외성숙시 성선자극호르몬(gonadotropins)의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 배발생에 미치는 영향을 조사하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시난자와 채란

본 실험에 사용된 난포란은 도축장에서 도살직후 난포기의 난소로부터 얻어졌다. 도살직후 분리해 낸 난소는 항생제(황산스트렙토마이신 0.5mg, 페니실린 100만 IU/l)가 첨가된 생리식염수로 2~3회 세척한 후 33~35℃의 보온병에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포내 난자를 채란하기 위해 항온실에서 신선한 생리식염수로 난소표면을 3~4회 세척한 후 19-gauge 10ml 주사기로 2~5mm 크기의 정상난포에서 난소실질을 연속적으로 찢어 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 채란하였다. 흡입된 난포액을 10ml 시험관에 담아 5분간 정치시킨 후 스포이드로 하부액을 흡입하여 배양접시에 성숙배양액과 적당히 혼합하고 inverted microscope(Olympus SZ-PT, Japan)하에서 난구세포층이 충분한 난포란만을 선별하여 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙배양액

기본배양액 TCM 199 Earl's salt에 Yoshida 등(1990, 1992)의 방법에 따라 sodium pyruvate (100mg/l), glucose(550mg/l), dibekacin sulphate(100mg/l, Sigma, USA), 10%(v/v) pFF (pig follicular fluid), 10% FCS(fetal calf serum) 및 estradiol-17 β (1 μ g/ml, Sigma, USA)를 첨가하였고, 처리별 추가된 호르몬은 LH (10 μ g/ml, Sigma, USA) 또는 hCG (10IU/ml, Chorulon, Intervet Co., Holland), FSH (5 μ g/ml, Sigma, USA) 또는 PMSG (10IU/ml, Folligon, Intervet Co., Holland)였으며 micromilipore filter(0.2 μ m)로 여과시킨 후 39℃, 100% 습도, 95% air, 5% CO₂ incubator (Model No. 2300, Sheldon, USA)에서 12시간 전배양시킨 후 pH 7.4로 조정하여 사용하였다.

3. 난포란의 체외성숙 및 성숙판정

체외성숙은 Yoshida 등(1990, 1992)의 방법에 따라 성숙배양액을 4-well dish (Cat. No. 176740, Nunclon, Denmark)에 0.5ml씩 분주한 후 난포란을 well당 10~30개씩 넣고 멸균 파라핀오일로 피복

한 후 39℃, 100% 습도, 95% air, 5% CO₂, incubator에서 36~48시간 배양하였다.

체외성숙판정은 Fagbohun 과 Downs(1990) 및 Fenton 등(1993)의 방법에서 등급기준을 다소 수정하여 난구세포의 팽화정도를 3가지 형태로 분류한 후 3가지 등급(1, 2 및 3)에 따라 성숙정도를 index로 표시하였다. 이때 등급 1을 가진 난포란은 난구세포의 팽화정도가 30% 이하인 난포란이며, 등급 3은 난구세포가 70% 이상 팽화된 난포란으로 하였다.

4. 정자준비

도축장에서 도살직 후 수집한 정소상체미부를 생리식염수로 2~3회 세척후 Niwa 등(1988)의 방법에 따라 채취하였다. 채취된 정자는 정장내 수정능 억제물질들을 제거하기 위해 수정기본배양액으로 5~10배 희석하고 300 × g에서 10분간 2회 반복 원심분리하였다.

5. 체외수정

1) 체외수정 기본 배양액

Yoshida 등(1990)의 방법에 따라 제조된 TCM 199 Earl's salt 배양액을 micromilipore filter(0.2μm)에 여과시키고 pH 7.8 로 조정한 다음 4-well dish에 각 well당 0.5ml씩 분주한 후 12시간 전배양시켰다.

2) 정자의 전처리

정소상체미부정자를 수정 기본 배양액에 5배로 희석하여 300 × g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 수정기본배양액에 heparin(100μg/ml)이 첨가된 수정 배양액으로 재부유하였다. 양호한 활력을 갖는 정자를 얻기 위하여 1,000 rpm에서 0.5~1분간 원심분리하는 강제 swimp up법으로 죽은 정자 또는 이물질을 침전시켰다. 상층액만을 1,500 rpm에서 5분간 다시 원심분리한 후 상층액을 제거하여 운동 정자의 농도가 5×10⁸/ml 되게 재부유시켜 Kim 등(1990)의 방법에 따라 0.5~1시간 전배양하였다.

3) 체외수정

체외성숙이 끝난 신선 또는 동결난포란을 수정 배양액이 들어 있는 4-well dish의 well 당 10~30개씩 옮긴 후 수정능획득 전처리가 끝난 정자를 5×10⁵/ml 되게 주입하고 멸균 파라핀오일로 피복한 다음 39℃, CO₂ incubator에서 6~7시간동안 수정시켰다. 수정판정을 위해 일부의 난포란은 18~20 시간동안 연장하여수정시킨 후 수정판정에 공시하였다.

4) 수정판정

수정이 끝난 난포란을 0.3% hyaluronidase (Sigma, USA)용액에서 pipetting으로 난구세포와 부착정자를 제거하고 slide glass 위에 옮긴 다음 cover glass를 덮어 난자를 최대한 넓게 정치하였다. 난자의 표본제작이 끝난 slide는 고정액(ethanol:acetic acid=1:3)에 침지하여 24~48시간 동안 상온에서 고정하였다. 고정후 slide상의 난자를 1% aceto orcein으로 염색하여 정자두부의 팽화와 정자미부의 유무 및 응성 또는 자성전핵의 형성여부로서 수정을 판정하였다.

6. 수정란의 체외배양 및 발생능 판정

수정란을 sodium pyruvate(40μg/ml), glucose(1.0mg/ml), sodium lactate(60% syrup:3.7ul/ml), dibekacin sulphate(100μg/ml), glutamine(0.146μg/ml) 및 10%(v/v) FCS가 포함된 TCM 199 Earl's salt(발생배양액)에 옮겨 수정후 120시간까지 배양하였으며 매 24시간마다 신선배양액으로 1/2씩 교환하였다. 처리별 수정란의 발생능은 분할지수로 표시하였다. 분할지수는 Wright(1977)의 방법에서와 같이 처음 공시 수정란의 2, 4, 8, 16 및 32배로 발생할때 점수를 각각 1(2-세포기), 2(4-세포기까지 발생한 수정란), 3(8-세포기까지 발생한 수정란), 4(8-세포기까지 발생한 수정란) 및 5점(상실배까지 발생한 수정란)으로 구분하고 이들 발생정도의 점수와 각 점수에서 조사된 수정란 수를 곱한 총합을 처리별 난화된 수정란의 총수로 나누었을 때의 값으로 하였다.

Table 1. Effect of gonadotropins added during maturation on cumulus cells expansion of oocytes

Hormones		No. of oocytes ¹⁾ examined	Degree of cumulus cells expansion			
			1	2	3	CEI ²⁾ (\bar{x} SD)
FSH	LH	71	7	17	47	2.57±0.32
	hCG	75	7	16	52	2.58±0.18
PMSG	LH	76	6	13	57	2.66±0.10
	hCG	76	5	18	53	2.64±0.05

¹⁾ Oocytes were cultured for 42hrs in maturation medium containing different combination of gonadotropins(5 μ g/ml FSH or 10IU/ml PMSG and 10 μ g/ml LH or 10IU/ml hCG).

²⁾ CEI(cumulus cells expansion index) was defined as :

$$CEI = \frac{\sum Di Fi}{\sum Fi}$$

Where,

Di : ith value for degree of cumulus cells expansion, i = 1, 2 and 3.

Fi : frequency corresponding to Di.

^{a,b} Values in same column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

7. 통계분석

실험결과의 통계분석은 Minitab statistical software(Minitab, New York, 1985)의 일반선형모델을 사용하여 student's t-test로 유의성 검정을 하였으며 수정란의 난할율은 χ_2 -test로 유의성 검정하였다.

재료 및 고찰

1. 호르몬 첨가와 체외성숙

기본배양액에 성선자극호르몬의 조합을 달리하여 첨가한 성숙배양액에서 난포란을 42시간동안 성숙시킨 후 난구세포팽화지수(CEI)를 보면, Table 1과 같이 PMSG+LH를 첨가하였을 때가 다른 조합 처리구에 비하여 성숙도가 다소 높았으며 난구세포가 거의 팽화되지 않은 난포란의 비율도 다소 낮았다. 또한 난포란의 성숙에 미치는 각 호르몬의 효과를 살펴보면 FSH, hCG 및 LH보다는 PMSG, FSH 및 hCG보다는 LH, FSH보다는 hCG에서 각각 난구세포의 팽화율이 높은 경향을 나타냈다.

이와 같은 성적은 Minato와 Toyoda(1982)가

m-KRB배양액에 또는 hCG를 첨가 후 48~54시간의 성숙에서 hCG보다 PMSG첨가에서 난구세포의 팽화와 핵성숙이 높았다는 결과와 Yoshida 등(1989)이 TCM-199배양액에 PMSG, hCG, PMSG+hCG의 첨가 후 42시간 성숙에서 hCG보다 PMSG가 난구세포의 팽화와 핵성숙율은 현저하게 촉진시켰다는 결과와 일치된 결과였다. 또한 Wu 등(1992)도 성숙배양액에 PMSG를 첨가함으로써 metaphase II 도달율이 67.6%로 무첨가에서 보다 현저히 증가시켰다는 결과와도 같은 경향이었으며 Kim 등(1990)도 체외성숙시 PMSG와 hCG의 첨가로 성숙율의 향상을 보고한 바 있다. 그러나 Mattioli 등(1991)이 LH 또는 FSH가 첨가된 TCM-199배양액에서 성숙시켰을 때 metaphase II 도달율이 LH보다 FSH첨가에서 더 높았던 결과와 소의 경우 Hensleigh와 Hunter(1985)는 난포란의 체외성숙시 FSH 또는 hCG를 첨가하였을 때 난구세포의 팽화비율이 hCG보다는 FSH에서 더 높았다고 보고한 결과와는 다소 차이가 있었다.

본 실험에서 LH 또는 hCG를, FSH보다는 PMSG와 함께 첨가할 때 성숙에 더 유리한 것으로 나타나 있으나 그 원인과 최적의 첨가수준에 대해

Table 2. Effect of gonadotropins added during maturation on *in vitro* fertilization of oocytes

Hormones	No. of oocytes matured	No. of oocytes penetrated				Fertilization rate(%)*	
		1 PN + Swollen head	2 PN	>2 PN(%)	Total(%)		
FSH	LH	28	6	8	4(14.3)	8(64.3)	14(50.0)
	hCG	34	12	6	2(5.9)	20(58.8)	18(52.9)
PMSG	LH	27	9	9	3(11.1)	21(77.8)	18(66.7)
	hCG	30	9	12	3(10.0)	24(80.0)	21(70.0)

*Normal fertilization rate : No. (%) of oocytes with 1 PN plus swollen-head or 2 PN at 20h after insemination.

Table 3. Effect of gonadotropins during maturation on early cleavage of oocytes cultured for 48hrs after *in vitro* fertiliz

Maturation (Hormone)	No. of oocytes ¹⁾ matured	No. of oocytes cleaved to			Cleavage index ²⁾
		2-cell	4-cell	Total (%)	
FSH + LH	29	5	1	6(20.7)	1.21
FSH +hCG	31	5	-	5(16.1)	1.16
PMSG+ LH	32	4	2	6(18.8)	1.19
PMSG+hCG	28	7	-	7(25.0)	1.25

¹⁾ Oocytes were matured for 42hrs in maturation medium containing different combination of gonadotropins(5ug/ml FSH or 10IU/ml PMSG and 10ug/ml LH or 10IU/ml hCG).

²⁾ Cleavage index(CI) was assessed according to scores "1"(two-cell) to "5"(developed to morula stage:M) described by Wright ~s method(1977).

CI based on number of normal blastomeres as measured by the formula for a geometric progression and was defined as :

$$CI = \frac{\sum Di Fi}{\sum Fi}$$

Where,

Di : ith score for developmental potential of embryos, i = 1, 2, 3, 4 and 5.

Fi : frequency corresponding to Di.

서는 더 규명되어야 할 부분으로 사료되었다.

2. 체외성숙시 호르몬 첨가와 체외수정

성선자극호르몬(gonadotropins)을 LH+FSH, LH+PMSG, hCG+PMSG 및 hCG+FSH로 조합하여 첨가된 성숙배양액에서 42시간 성숙시킨 다음 수정배양액에서 caffeine으로 처리된 정자와 20시간 수정시킨 후의 체외수정율을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

hCG+PMSG의 성숙조건에서 70.0%로 가장 높

은 수정율을 나타냈다. 이미 Table 3에서 나타난 본 바와같이 체외성숙율이 LH+PMSG 첨가구에서 가장 높게 나타났기 때문에 성숙율과 수정율간에 다소 차이가 있으나 역시 PMSG가 난포란의 체외 성숙 및 수정에 가장 유효하게 작용함을 알 수 있었다. 각 성선자극호르몬에 대한 체외수정율은 hCG, LH, FSH순으로 점점 낮게 나타났다. 다정자침입은 LH 첨가에서 다소 높게 나타났다.

이상의 결과는 Mattioli 등(1991)이 LH와 FSH의 효과에 관한 연구에서 무첨가구와 FSH 단독 첨

Table 4. Developmental potential after *in vitro* fertilization of oocytes matured under various hormone combinations and maturation times

Maturation		No. of oocytes ¹⁾ examined	No. of oocytes cleaved					Total (%) [*]	Cleavage index ²⁾ ($\bar{x} \pm SD$)
Hormone	Time(h)		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	Morula		
LH+FSH	36	32	4	6	—	—	—	7(33.4 ± 5.8)	1.62 ± .07
	42	32	3	8	1	1		13(40.4 ± 12.2)	2.28 ± .67
	48	125	17	18	8	5	4	52(41.1 ± 8.6)	1.97 ± .60
								38.9 ± 9.0 ^a	
LH+PMSG	36	31	6	4	—	—	—	10(35.9 ± 12.1)	1.38 ± 0.18
	42	41	4		4	7	2	17(44.8 ± 11.2)	3.06 ± 1.14
	48	120	17	11	7	4	1	40(32.8 ± 9.0)	2.10 ± 0.27
								37.5 ± 10.6 ^a	
hCG+ FSH	36	47	10	3	2	—	3	18(40.8 ± 6.6)	2.04 ± .06
	42	43	3	4	4	1		40(29.7 ± 4.2)	1.92 ± .64
	48	72	13	7	5	4	7	52(50.6 ± 5.0)	2.39 ± .56
								40.3 ± 10.6 ^a	
hCG+PMSG	36	76	18	10	3	3	4	38(53.0 ± 8.5)	2.07 ± .13
	42	205	30	25	29	9	21	114(56.7 ± 5.3)	2.70 ± .17
	48	91	17	11	9	3	3	43(45.6 ± 6.8)	2.20 ± .20
								53.0 ± 7.5 ^b	

¹⁾ Oocytes were cultured to 120h after *in vitro* fertilization with heparin(100 μ g/ml)-treated sperm

²⁾ CI : refer to Table 3.

^{a,b} Values in same column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

가구에서 응성전핵형성율은 비슷한 수준이었으나 LH 단독첨가구와 LH 및 FSH병용첨가구에서 FSH 단독첨가구보다 유의적으로 높게 나타나 LH가 FSH보다 수정에 효과적이었다고 보고한 것과 같은 경향을 나타내었다. 그러나 Kown 등(1990)이 FSH, LH 및 FSH+LH를 첨가한 성숙배양액에서 성숙시켰을 때 정자침입율이 FSH첨가에서 더 높았다는 결과와는 상반된 경향이었다. 또한 본 연구에서 얻어진 수정율을 보면 Yoshida 등(1990)이 PMSG와 hCG를 첨가한 배양액에 체외성숙시킨 난포란의 정상수정율보다는 높았으며, Illera와 Petters(1993)가 성숙배양액에 LH, FSH 및 pPRL을 첨가하여 성숙시키고 체외수정시켰을 때의 수정율과 Kikuchi와 Nagai(1993)가 LH와 FSH의 첨가에서 46시간 성숙시킨 후 정소상체미부 동결정자와 수정시킬 때의 정자침입율과 수정율을 보고한 결과와는 유사한 성적이었다. 그러나 Fun-

ahashi 등(1993)이 PMSG, hCG 및 estradiol-17 β 의 첨가에서 20시간 성숙시키고 호르몬 무첨가에서 20시간 추가 배양후의 정자침입율 및 응성전핵형성율과, Yoshida 등(1992)이 hCG, PMSG 및 estradiol-17 β 의 첨가에서 성숙된 난포란의 정자침투율 및 응성전핵형성율을 보고한 것보다는 다소 낮은 결과였다.

이와 같이 성선자극호르몬의 종류와 용량이 체외성숙 또는 체외수정에 미치는 영향에 대해서는 연구자들마다 다소 차이가 있으나 수정에는 LH와 hCG가 크게 영향을 미치는 것으로 나타나고 있다 (Kim 등, 1990). 한편 본 실험에서의 체외수정시 다정자침입율은 Kwon 등(1990), Yoshida 등(1990), Park 등(1990)의 결과보다 현저하게 낮게 나타났다. 특히 돼지에서 다정자침입율이 높은 원인으로서 난자의 노화 및 정자 농도와 깊은 관계가 있으며 (Hunter, 1991) 수정시 정자의 수정능 획득

조건 및 수정시간(Seizo와 Toyoda, 1986) 등 여러 가지 조건에 영향을 받는 것으로 보고되어 있기 때문에 이러한 문제점들에 대한 연구결과에 따라 다정자침입율을 현저히 줄일 수 있을 것으로 사료된다. 최근 Nagai와 Moor(1990)는 난포상피세포의 존재하에서 체외수정시 다정자침입율을 줄일 수 있다고 제시한 바도 있다.

3. 성숙시 호르몬 첨가가 초기배발생에 미치는 영향

LH+FSH, LH+PMSG, hCG+PMSG 및 hCG+FSH가 첨가된 성숙배양액에서 42시간 성숙된 난포란의 수정후 48시간때의 초기 난할율은 Table 3과 같다.

hCG+PMSG의 첨가 성숙배양에서 난할율이 가장 높았으며 FSH보다는 PMSG의 첨가에서 난할율이 다소 높았다. Yoshida 등(1990)이 hCG+PMSG의 첨가에서 성숙후 체외수정시킨 난포란에서 수정후 36시간까지의 정상 난할율이 24%였던 결과와 Naito 등(1989)이 FSH가 첨가된 난포액에 체외성숙시킨 난포란의 체외수정후 48시간까지의 정상 난할율과 유사한 결과였다. 그러나 Cheng 등(1986)이 보고한 배란된 난자의 체외수정후 48시간까지의 난할율보다 현저히 낮았고 Yoshida(1987)가 과배란유기로 채란한 난자의 체외수정후 27~28시간 배양하였을 때의 난할율보다도 낮았다. 이로써 자연배란 또는 과배란된 난자와의 체외수정에서 나타난 난할율보다 아직도 체외성숙 및 체외수정된 난포란의 난할율이 현저히 낮을 뿐만 아니라 발생속도도 다소 지연됨을 확인할 수 있었다. 한편 Table 2에서 본 바와 같이 hCG+PMSG첨가구에서 수정율이 가장 높았던 결과와 비교하여 볼 때 역시 초기난할율은 수정율과 거의 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

4. 체외성숙시 호르몬 첨가와 성숙시간에 따른 배발생

체외성숙시 호르몬 첨가 형태와 배양시간에 따른 난포란의 체외수정후 120시간까지의 분할율 및 분할지수는 Table 4와 같다.

배양시간에 관계없이 성선자극호르몬의 첨가 형태별 따라 체외수정 난포란의 난할율은 LH+FSH, LH+PMSG, hCG+FSH 및 hCG+PMSG처리구가 각각 평균 38.9, 37.5, 40.3 및 53.0%로서 hCG+PMSG의 처리구가 유의적($P < 0.05$)으로 가장 높았다. 또한 42시간 체외성숙된 난포란의 경우에서도 역시 hCG+PMSG처리구가 가장 높은 난할율을 나타냈다. 이때 분할지수에 근거한 발생성적은 호르몬처리간에 유의적인 차이가 인정되지 않았으나 LH+PMSG와 hCG+PMSG처리구에서 각각 3.09 및 2.70으로 다른 처리구에 비해 다소 높았다. 발생성적에 미치는 개별 호르몬의 영향으로는 PMSG, hCG, LH, FSH순으로 PMSG와 hCG가 첨가된 배양액에서 성숙된 난포란이 수정후 배발생에 다소 유리한 것으로 나타났다. 즉 분할된 수정란중 4세포기 이상까지의 발생이 가장 많은 처리구는 hCG+PMSG 처리구로 정상적인 초기 발생에 hCG가 다른 호르몬보다 다소 효과적이며 PMSG는 난포란의 성숙 및 발생에 지속적으로 유리하게 작용한 것으로 보였다. 성숙배양시간별의 발생성적은 모든 호르몬처리구에서 42시간 성숙배양이 우수한 경향을 보였다. 특히 hCG+PMSG 첨가에서 36, 42 및 48시간동안 체외성숙된 난포란을 체외수정후 120시간까지의 발생을 보면 36시간보다 42~48시간 체외성숙된 높았으나, 분할율은 36-42시간 성숙된 난포란에서 높았다. 대체적으로 높은 분할율과 발생율을 얻기 위해서는 42시간 성숙이 유리한 것으로 나타났다.

이와 같은 결과는 Kwon 등(1990)이 LH+FSH 첨가에서 42시간 성숙시킨 난포란의 체외수정후 72시간 배양하였을 때 44%의 난할율을 보고한 것과 유사한 수준이었으며 Naito 등(1989)이 FSH가 첨가된 100% 돼지난포액에서 48시간 성숙시킨 난포란을 체외수정후 96시간때 53.3%의 난할율과 4세포기 이상의 발생율이 10.9%를 얻은 수준보다는 본 실험의 hCG+PMSG처리구의 성적이 현저히 높았다. 그러나 Kwon 등(1990)이 FSH만의 첨가에서도 48.7%의 분할율을 보여 LH가 배발생에 크게 영향하지 않았던 결과는 본 실험과 다소 차이가 있었으나, Brackett와 Zuelke(1993)가 성숙배양액에 성

선자극호르몬을 첨가하였을 때 LH는 난포란내의 glycolysis를 증진시켜 에너지이용을 높임으로써 난포란의 성숙을 촉진시키지만 FSH는 이러한 대사에 다소 무관하여 체외수정과 배발생에 LH가 더 효과적이었던 것과 같은 결과와는 차이가 없었다. 또한 Wu 등(1992)이 PMSG가 첨가된 성숙배양액에서 42~45시간 체외성숙후의 체외수정에서 10.5%의 8~16세포기에 도달과 2.0%의 초기상실배의 발생 성적을 보고한 것보다는 다소 높은 수준이었다. 본 실험에서 4세포기 이상까지의 발생성적이 수정을과 난할율에 비해 높지 못한 것은 Davis와 Day(1978)와 Bavister(1988)가 지적한 바와같이 4세포기에서의 cell block현상 때문인 것으로 사료되었다. 돼지의 이러한 현상은 Wright(1977)가 분할지수를 이용하여 보고한 바, 체외배양 개시때의 발달단계가 1~2세포기의 경우 분할지수가 0.81, 3~4세포기의 경우에는 0.80로 낮았으나 5~8세포기의 경우에는 1.77로 4-cell block의 극복이 중요한 과제임을 시사해 주었다.

적 요

본 연구는 돼지 난포란의 체외성숙시 성선자극호르몬의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 배발생능에 미치는 영향을 검토하고자 실시한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

FSH+LH, FHS+hCG, PMSG+LH 또는 PMSG+hCG를 첨가한 성숙배양액에서 42시간 체외성숙 하였을 때 각 처리별 체외수정율은 50.0%, 52.9%, 66.7% 및 70.0%였다. 난구세포팽화지수는 PMSG+hCG에서 가장 높았다. 가장 높은 다정자 침입율은 FSH+LH에서 나타났다. 체외성숙시 첨가된 호르몬에 따른 수정난포란의 난할율은 hCG+PMSG첨가에서 유의적($P < 0.05$)으로 높았으며, 이때 36, 42 및 48시간 성숙후 난할율은 53.0%, 56.7% 및 45.6%였다. 가장 높은 발생능은 LH+PMSG에서 얻어졌다.

참고문헌

Davis DL. 1985. Culture and storage of pig em-

- bryos. J. Reprod. Fertil. 33:115-124.
- Fagbohun CF, and Downs SM 1990. Maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex: stimulation by lectins. Biol. Reprod. 42:413-423.
- Fenton SE, Dentine MR and Ax RL 1993. Modulation of bovine oocyte-cumulus cell complex maturation and fertilization *in vitro* by glycosaminoglycans. J. Dairy Sci. 76:701-712.
- Funahashi HT, Stumpf T, Terlouw SL and Day BN. 1993. Effects of artificial activation before *in vitro* fertilization on sperm penetration and pronuclear formation in pig oocytes. Theriogenology 39:222.
- Hensleigh HC and Hunter AG 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization. J. Dairy Sci. 68:1456-1462.
- Hunter RHF. 1991. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. Mol. Reprod. Dev. 29:385-391.
- Hyttel P and Niemann H. 1990. Ultrastructure of porcine embryos following development *in vitro* versus *in vivo*. Mol. Reprod. Dev. 27:136-144.
- Illera MJ and Petters RM. 1993. Effects of EGF and IGF-I on porcine oocyte fertilization *in vitro* in the absence of follicular fluid or hormones. Theriogenology 38:235.
- Kikuchi K, Nagai T, Motlik J, Shioya Y and Izaike Y. 1993. Effect of follicle cell on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. Theriogenol. 39:593-599.
- Kim CK, Chung YC, Lee MS, Yoon JT, Pang MG and Chung KS. 1990. Studies on *in vitro* maturation of pig follicular oocytes. Korean J. Anim. Reprod. 14:84-91.
- Kim SK, Lee MH, Lee MH and Shin YH. 1990. Studies on *in vitro* maturation and fertili-

- zation of porcine follicular oocytes. Korean J. Anim. Reprod. 14:23-30.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL and First NL. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. Biol. Reprod. 36:376-383.
- Mattioli M, Bacci ML, Geleati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenol. 31:1201-1207.
- Mattioli M, Bacci ML, Geleati G and Seren E. 1991. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. Theriogenology. 36:95-105.
- Minato Y and Toyoda Y. 1982. Induction of cumulus expansion and maturation division of porcine oocyte-cumulus complexes *in vitro*. Jpn. J. Zootech. Sci. 53:480-487.
- Nagai T and Moor. 1990. Effect of oviduct cell on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 26:377-382.
- Naito K, Fukuda Y and Ishibashi I. 1989. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid *in vitro* and fertilized *in vitro*. Theriogenology 31:1049-1057.
- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology 30:733-741.
- Park SB, Park HK and Iritani A. 1990. *In vitro* fertilization in the pig. Korean J. Anim. Sci., 32:20-26.
- Polge C. 1977. How does embryo manipulation fit into present and future pig reproduction ? J. Reprod. Fert. 33(Suppl.) :93-100.
- Polge C and Frederick CL. 1968. Culture and storage of fertilized pig eggs. VI. Congr. Int. Anim. Reprod. Artificial Inse. Paris 1:211(abstr.)
- Seizo H and Toyoda Y. 1986. *In vitro* fertilization of pig eggs with ejaculated spermatozoa preincubated at high sperm concentration. Jpn. J. Anim. Reprod. 32:177-183.
- Wright RW. 1977. Successful culture *in vitro* of swine embryos to blastocyst stage. J. Animal Sci. 44:844-858.
- Wu GM, Qin PC, Tan JH and Wang LA. 1992. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes. Theriogenology 37:323.
- Yang X, Jiang S and Foote RH. 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. Mol. Reprod. Dev. 34:94-100.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Pursel VG. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 31:68-71.
- Yoshida M, Bamba K and Kojima Y. 1989. Effects of gonadotropins and estradiol-17 β on the timing of the nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes culture *in vitro*. Jpn. J. Anim. Reprod. 35:86-91.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert. 88:1-8.