

돼지 수정란의 체외수정 및 발생에 미치는 호르몬 및  
Glucose 첨가의 영향에 관한 연구

김 상 근 · 이 명 현  
충남대학교 수의과대학

**Effects of Hormones and Glucose Levels during  
the *In Vitro* Culture in Medium on *In Vitro* Fertilization and  
Developmental Rates of Porcine Oocytes**

**S. K. Kim and M. H. Lee**

*College of Vet. Med., Chungnam National Univ.*

**SUMMARY**

The study was conducted to determine the optimal hormone and glucose levels during the *in vitro* culture of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* for blastocyst development. Oocytes matured in TCM 199 + 10% FCS + hormones and glucose were fertilized *in vitro* in a TALP medium with swim up separated and heparin-treated epididymal cauda spermatozoa. Oocytes were cultured for 2~5 days in synthetic oviduct fluid medium (SOFM) supplemented with 10% FCS and with different hormone and glucose levels, and further cultured 5 days same medium in SOFM. The results are summarized as follows : The *in vitro* maturation and penetration rates of porcine oocytes cultured in TCM 199 media containing PMSG, hCG, PMSG + hCG, hCG +  $\beta$  estradiol, PMSG +  $\beta$  estradiol 0 to 20 hours after insemination were 88.0% and 81.8%, 82.6% and 68.4%, 80.0% and 75.0%, 80.0% and 65.0%, 77.3% and 64.7%, respectively. The *in vitro* maturation and penetration rates of porcine oocytes cultured in TCM 199 media containing PMSG, hCG, PMSG + hCG, hCG +  $\beta$  estradiol, PMSG +  $\beta$  estradiol 20 to 40 hours after insemination were 92.0% and 87.0%, 92.0% and 82.6%, 91.3% and 81.0%, 85.2% and 73.9%, 87.5% and 81.0%, respectively. The cleavage and *in vitro* developmental rates to blastocyst of porcine oocytes cultured in TCM 199 media containing 0.05 mM, 0.10 mM, 0.30 mM, 0.50 mM, 1.00 mM, and 3.00 mM glucose levels 0~3 days after insemination were 31.5~48.1% and 10.0~16.7%, respectively. The cleavage and *in vitro* developmental rates to blastocyst of porcine oocytes cultured in TCM 199 media containing 0.05 mM, 0.10 mM, 0.30 mM, 0.50 mM, 1.00 mM, and 3.00 mM glucose levels 4~8 days after insemination were 30.0~53.8% and 8.7~19.2%, respectively. The cleavage and *in vitro* developmental rates to blastocyst were higher in TCM 199 media containing various glucose levels 0~3 days after insemination than 4~8 days.

## 서 론

수정란의 체외발생에 미치는 요인은 명확하게 구명되지 않았을 뿐만 아니라 해결되어야 할 문제가 많이 남아 있는 실정이다.

Renard 등(1980)은 소 배의 발생에 glucose가 부화과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였으며, Rose와 Bavister(1992) 및 Tiffin 등(1991)은 glucose 대사는 소 수정란의 2 cell로부터 배반포기에 현저히 증가된다고 하였으며, Javed와 Wright(1991)는 소 수정란의 경우 16세포기까지는 배의 glucose 이용율이 낮지만 상실배에서는 급격히 상승하고 배반포, 확장 배반포 및 부화 배반포에서는 glucose 이용효과가 높다고 보고하였다. 한편 Gardner와 Leese(1990)는 소 수정란의 난구세포는 glucose를 소비하여 pyruvic acid를 생산한다고 보고하였으며, Gandolfi와 Moor(1987)는 면양 수정란을 이용하여 난관 상피세포와 공배양 체계를 보고하였다. Lu 등(1988), Goto 등(1988) 및 Fukuda 등(1990)은 소 난포란을 이용하여 난관 상피세포 또는 난구세포와 공배양에 의해 상실배 또는 배반포를 성공적으로 생산하였다고 보고하였으며, Tervit 등(1972)은 체세포의 지원없이 합성배지인 SOFM(synthetic oviduct fluid medium)과 5% CO<sub>2</sub>와 5% O<sub>2</sub> 및 90% N<sub>2</sub>의 기상조건하에서 배양에 의해 소 및 면양 난자를 쉽게 배양할 수 있다고 보고하였으며, Fukui 등(1991)은 혈청을 첨가한 SOFM의 배양액으로 5% O<sub>2</sub>에서 소 난자를 성숙 수정시켰을 때 에너지 기질을 보충할 수 있다고 하였다. 한편 Takahashi와 First(1992)는 TCM-199 배양액에 함유되어 있는 5.56 mM의 glucose농도는 초기배의 발생을 저해한다고 보고하였다.

대부분의 연구자들이 사용한 배양액은 3~5 mM 농도의 glucose 수준과 1.5 mM만의 SOFM으로 배양한 성격이었다(Flood와 Wiebold, 1988; Seshagiri와 Bavister, 1989). 그러나 glucose의 첨가는 배반포의 발생을 증가(Betterbed와 Wright, 1985) 또는 억제(Seshagiri와 Bavister, 1989; Schini와 Bavister, 1988; Ellington 등, 1990)한다고 보고하였다. 한편, 소 수정란의 8세포기 이후는 glucose가

요구되며 다른 여러 종의 포유동물에서 발생단계 의존성을 나타낸다고 보고하였다(Flood와 Wiebold, 1988; Seshagiri와 Bavister, 1989; Thompson 등, 1989).

이에 본 연구는 돼지 수정란의 체외수정과 체외발생에 미치는 영향을 구명하기 위하여 SOFM 배양액에 적정 호르몬 및 glucose 첨가 수준을 구명하고자 본 시험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 난포란의 회수

도살 직후의 자돈으로부터 난소를 적출하여, penicillin G(100 IU/ml)와 streptomycin sulfate(100 mg/ml)를 첨가한 후 38℃로 조정된 생리적 식염수가 들어 있는 보온병에 침지하여 1 시간 이내에 실험실로 옮겨 난소 표면을 멸균한 생리적 식염수로 세척하고 여과지로 난소 표면의 습기를 제거한 다음 직경 3~5 mm의 난포만을 18 gauge 주사기로 난포액을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 실험현미경(20~40×) 하에서 난구 세포가 조밀하게 부착되고 세포질이 균일한 난포란을 회수하여 배양액으로 2회 세척 하였다.

#### 2) 배양액

체외성숙을 위한 기본 배양액은 10%(V/V)의 FCS와 10 IU/ml의 PMSG(Sigma, USA), 10 IU/ml의 hCG, 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 µg/ml streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Whittaker M. A. Bioproducts Co., USA) 배양액을 이용하였으며, 사용전 0.2 µm millipore filter로 여과 멸균후 사용하였다. 또한 glucose는 TCM-199 배양액에 0.10 mM, 0.30 mM, 0.50 mM, 1.00 mM 및 3.00 mM을 첨가하여 사용하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 체외성숙용 배양액 10  $\mu$ l 소적을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3 시간전에 CO<sub>2</sub> 배양기내(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5℃)에서 5~6 시간 평형시킨 후 소적당 5개의 난포란을 침지하여 24시간 배양하였다.

### 2) 정자의 수정능획득

정소상체를 세절하여 얻은 정자부유액 0.01 ml와 수정능획득 배양액 TCF(Tyrode calcium-free) 2 ml를 시험관내에서 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 swim-up 처리후, 약 0.5 ml의 상층액을 2,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 침전된 정자괴를 동량의 heparin(100  $\mu$ g/ml)과 함께 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 15분간 수정능획득을 유지하였다.

### 3) 체외수정

체외수정은 성숙 배양한 난포란을 수정용 배양액으로 3회 세척한 후 주위의 난구 세포를 pipetting에 의하여 일부 제거한 다음 mineral oil로 피복한 45  $\mu$ l의 수정용 배양액 소적에 5개의 난포란을 주입한 후 수정능획득을 유지시킨 정자 부유액 2  $\mu$ l ( $1.5 \times 10^6$ /ml)로 매정하였다.

### 4) 체외성숙 및 수정의 판정

난포란의 체외성숙 및 수정의 판정은 회수한 난포란을 배양후 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)에 의해 난구세포를 제거한 후 slide glass에 적하하여 25% acetic acid에 24~48시간 고정한 다음 1% acetic-orcein으로 염색하여 Shea 등(1976)과 Ball 등 (1984)의 판정기준에 준하여 성숙도와 수정 여부를 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 호르몬 첨가에 따른 체외성숙율과 정자침입율

#### 1) 체외성숙 0~20시간에 호르몬 첨가의 영향

체외성숙 0~20시간에 각 호르몬을 첨가하였을 때 돼지 난포란의 체외성숙율과 정자 침입율은 Table 1과 같다.

체외성숙 0~20시간에 TCM 199 배양액에 PMSG, hCG, PMSG + hCG 및 hCG +  $\beta$  estradiol 호르몬을 첨가하였을 때 체외성숙율과 정자침입율은 각각 88.0%와 81.8%, 82.6%와 68.4%, 80.0%와 75.0%, 80.0%와 65.0% 및 77.3%와 64.7%로서 무첨가 대조군의 81.8%와 72.2%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다. 이러한 결과는 시험동물은 다르지만 소 난포란의 체외수정에 있어서 FSH 및 hCG의 첨가는 체외성숙율의 증가를 FCS와 FSH 및 hCG의 첨가는 체외수정율의 증가를 가져왔다는 Shalgi 등(1979), Ball 등(1983) 및 Hensleigh과 Hunter(1985)등의 보고와 일치하였으나 FSH나 hCG가 성성숙에 절대적이 아니라는 Fukui 등(1983)의 보고와는 차이가 있었다.

#### 2) 체외성숙 20~40 시간 호르몬 첨가의 영향

체외성숙 20~40시간에 각종 호르몬을 첨가하였을 때 돼지 난포란의 체외성숙율과 정자침입율은 Table 2와 같다.

체외성숙 20시간부터 40시간에 TCM-199 배양액에 PMSG, hCG 호르몬을 첨가하였을 때 체외성숙율과 정자침입율은 각각 92.0%와 87.0%, 92.0%

Table 1. Effects of hormonal supplements between 0 and 20 h *in vitro* maturation on sperm penetration in porcine oocytes 18 h after *in vitro* insemination

Supplementation of hormone	Number of			Number of polyspermic oocytes
	Examined	Matured	Penetrated	
Control	22	18(81.8)	13(72.2)	8(61.5)
PMSG	25	22(88.0)	18(81.8)	13(72.2)
hCG	23	19(82.6)	13(68.4)	8(61.5)
PMSG + hCG	25	20(80.0)	15(75.0)	9(60.0)
hCG + $\beta$ estradiol	24	20(80.0)	13(65.0)	7(53.8)
PMSG + $\beta$ estradiol	22	17(77.3)	11(64.7)	6(54.5)

Table 2. Effects of hormonal supplements between 20 and 40 h *in vitro* maturation on sperm penetration in porcine oocytes 18 h after *in vitro* insemination

Supplementation of hormone	Number of			Number of polyspermic oocytes
	Examined	Matured	Penetrated	
Control	22	22(88.0)	17(77.3)	12(66.7)
PMSG	25	23(92.0)	20(87.0)	17(85.0)
hCG	25	23(92.0)	19(82.6)	15(75.0)
PMSG + hCG	23	21(91.3)	17(81.0)	13(72.2)
hCG + $\beta$ estradiol	27	23(85.2)	17(73.9)	13(68.4)
PMSG + $\beta$ estradiol	24	21(87.5)	17(81.0)	14(77.8)

와 82.6%였으며 한편, 배양액에 PMSG + hCG, hCG +  $\beta$  estradiol 및 PMSG +  $\beta$  estradiol 호르몬을 첨가하였을 때 체외성숙율과 정자 침입율은 각각 91.3%와 81.0%, 85.2%와 73.9% 및 87.5%와 81.0%로서 무첨가군의 88.0%와 77.3%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다. 체외배양 0~20시간의 호르몬 첨가보다 20~40시간에 호르몬을 첨가하는 것이 보다 높은 성숙율과 정자침입율을 나타냈다.

이러한 결과는 Funahashi 등(1994)이 돼지 난포란을 이용하여 난구세포 및 호르몬과 공배양하였을 때 체외성숙율에는 유의한 차이가 인정되지 않았으나 정자침입 및 전핵형성율에는 유의한( $P < 0.01$ ) 차이가 인정되었다고 보고한 결과와 대체로 일치하였다. 또한,  $\beta$  estradiol의 첨가(61%)는 PMSG와 hCG의 첨가(86~99%)보다 낮은 체외성숙율을 나타냈다는 보고와도 일치하였다.

## 2. Glucose 첨가에 따른 체외발생율

### 1) 수정 0~3일째 glucose첨가에 따른 체외발생율

수정 0~3일째에 각 수준의 glucose를 첨가한 SOFM 배양액에서 배양하였을 때 돼지 수정란의 분할율과 배반포로의 체외발생율은 Table 3과 같다.

수정일로부터 3일에 배양액내 0.05 mM, 0.10 mM 및 0.30 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 분할율과 배반포로의 발생율은 각각 31.5%와 11.8%, 42.9%와 12.5% 및 42.1%와 16.7%였다. 한

편, 배양액내 0.50 mM, 1.00 mM 및 3.00 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 각각 39.3%와 13.6%, 48.1%와 11.5% 및 38.5%와 10.0%였다. 0.30 mM의 glucose 첨가가 다른 glucose 농도의 첨가보다 높은 분할율과 배반포로의 발생율을 나타냈다.

이러한 결과는 시험동물은 다르지만 Matsuyama 등(1993)이 소 난포란을 이용하여 SOFM 배양액에 0.188 mM의 glucose를 배양일부터 3일에 첨가하였을 때 가장 높은 분할율과 배반포로의 발생율을 나타냈다는 보고와 거의 일치하였다. 한편, Javed와 Wright (1991)는 소 배에서 16세포기까지는 배의 glucose 이용은 낮지만 상실배에서는 급격히 상승하고 배반포, 확장배반포 및 부화 배반포에서 glucose 효과가 높다고 하였으며, Takahashi와 First (1992)는 TCM-199 배양액에 첨가한 5.56 mM의 glucose 농도는 초기배의 발생을 저해한다고 하였다.

### 2) 수정 4~8일째 glucose첨가에 영향

수정 4~8일째에 각 수준의 glucose를 첨가한 SOFM 배양액에서 배양하였을 때 돼지 수정란의 분할율과 배반포로의 체외발생율은 Table 4와 같다.

수정 4일로부터 8일에 배양액내 0.05 mM, 0.10 mM 및 0.30 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 분할율과 배반포로의 발생율은 각각 30.0%와 13.3%, 50.0%와 19.27% 및 47.3%와 23.1%였다. 한편, 배양액내 0.50 mM, 1.00 mM 및 3.00 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 각각 50.9%와

Table 3. Effects of glucose levels in SOFM(days 0 to 3) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes

Concent. of glucose(mM)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes cleaved	No. of oocytes developed to blastocyst
0.05	54	17(31.5)	2(11.8)
0.10	56	24(42.9)	3(12.5)
0.30	57	24(42.1)	4(16.7)
0.50	56	22(39.3)	3(13.6)
1.00	54	26(48.1)	3(11.5)
3.00	52	20(38.5)	2(10.0)

Table 4. Effects of glucose levels in SOFM(days 4 to 8) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes

Concent. of glucose(mM)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes cleaved	No. of oocytes developed to blastocyst
0.05	50	15(30.0)	2(13.3)
0.10	52	26(50.0)	4(15.4)
0.30	55	26(47.3)	5(19.2)
0.50	53	27(50.9)	5(18.5)
1.00	52	28(53.8)	5(17.9)
3.00	50	23(46.0)	2( 8.7)

22.2%, 53.8%와 21.4% 및 46.0%와 8.7%였다. Glucose의 첨가는 수정일로부터 3일보다는 수정후 4일부터 8일에 첨가하는 것이 분할율과 배반포로의 발생율이 높게 나타났다.

이러한 결과는 시험동물은 다르지만 Matsuyama 등(1993)은 소 난포란을 이용하여 SOFM배양액에 0.188 mM의 glucose를 배양일로부터 3일에 첨가하였을 때 가장 높은 분할율과 배반포로의 발생율을 나타냈으나, 수정후 0~3일에 높은 glucose 농도(3.0~5.0 mM)의 첨가는 배반포로의 발생율을 나타냈다는 보고와 대체로 일치하였다.

## 적 요

본 연구는 돼지 수정란의 체외 발생에 미치는 영향을 구명하기 위하여 SOFM 배양액에서 적정 호르몬 및 glucose 첨가 수준을 구명하고자 본 시험을 실시하였다. 체외수정 0~20시간에 TCM-199배양액내 PMSG, hCG, PMSG + hCG 및 hCG +  $\beta$

estradiol 및 PMSG +  $\beta$  estradiol 호르몬을 첨가하였을 때 체외성숙율과 정자침입율은 각각 88.0%와 81.8%, 82.6%와 68.4%, 80.0%와 75.0%, 80.0%와 65.0% 및 77.3%와 64.7%였다. 체외수정 20~40시간에 TCM-199배양액내 PMSG, hCG, PMSG + hCG, hCG +  $\beta$  estradiol 및 PMSG +  $\beta$  estradiol호르몬을 첨가하였을 때 체외성숙율과 정자침입율은 각각 92.0%와 87.0%, 92.0%와 82.6%, 91.3%와 81.0%, 85.2%와 73.9% 및 87.5%와 81.0%였다. 체외수정 0~3일에 TCM-199 배양액내 0.05 mM, 0.10 mM, 0.30 mM, 0.50 mM, 1.00 mM 및 3.00 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 분할율과 배반포로의 발생율은 각각 31.5~48.1%와 10.0~16.7%였다. 체외수정 4~8일에 TCM-199배양액내 0.05 mM, 0.10 mM, 0.30 mM, 0.50 mM, 1.00 mM 및 3.00 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 분할율과 배반포로의 발생율은 각각 30.0~53.8%과 8.7~19.2%였다. Glucose의 첨가는 수정일로부터 3일보다는 수정후 4~8일에

첨가하는 것이 분할율과 배반포로의 발생율이 높게 나타났다.

### 참고문헌

- Ball GD, Leibfried ML, Ax RL and First NL. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. J. Dairy Sci. 67:2775-2785.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28: 717-725.
- Betterbed B and Wright RW Jr. 1985. Development of one cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. Theriogenology 23:547-553.
- Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME and Footh RH. 1990. Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct systems. Biol. Reprod. 43:97-104.
- Flood MR and Wiebold JL. 1988. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. J. Reprod. Fert. 84: 7-12.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K and Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* on to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 42: 114-119.
- Fukui Y, Fukushima M and Ono H. 1983. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedure. Theriogenology 20 (6):651-660.
- Fukui Y, McGown LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocyst of bovine oocytes matured fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert. 92:125-131.
- Funahashi H, Cantley T. and Day BN. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. J. Reprod. Fert. 81: 23-28.
- Gandolfi F and Moor RM. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert. 81:23-28.
- Gardner DK and Leese HJ. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. J. Reprod. Fert. 88:361-368.
- Goto Y, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 83:753-758.
- Hensleigh HC and Hunter AG. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. J. Dairy Sci. 68:1456-1562.
- Javed MH and Wright RW Jr. 1991. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. Theriogenology 35:1029-1037.
- Lu KH, Gordon L, Chen HB, Gallagher M and McGovern H. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in-vitro* techniques. Vet. Rec. 122:539-540.
- Matsuyama K, Miyakoshi H and Fukui Y. 1993. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology 40:595-605.
- Renard JP, Philippon A and Menezo Y. 1980. *In vitro* uptake of glucose by bovine blastocysts. J. Reprod. Fert. 58:161-164.
- Rose TA and Bavister BD. 1992. Effect of oocyte maturation on *in vitro* fertilized bovine embryos. Mol. Reprod. 31:72-77.

- Schini SA and Bavister BD. 1988. Two cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.* 39: 1183-1192.
- Sesahgiri PB and Bavister B. 1989. Glucose inhibits development of hamster 8 cell embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.* 40:599-616.
- Shalgi R, Dekel N and Kraicer PF. 1979. The effects of LH on the fertilizability and subsequent development capacity of rat oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 55: 429-435.
- Shea BF, Latour JPA, Berdin KN and Baker RD. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. *J. Anim. Sci.* 43:809-815.
- Takahashi Y and First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963-978.
- Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.* 30:493-497.
- Thomson JGE, Parton GA, Cruickshank GW, Smith JF and Wales RG. 1989. Development of sheep preimplantation embryos in media supplemented with glucose and acetate. *Theriogenology* 25:591-60.
- Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR and King WA. 1991. Glucose and glutamic metabolism in pre-attachment cattle embryos in reaction to sex and stage of development. *J. Reprod. Fert.* 93:1125-132.