

소 체외수정란의 실용화를 위한 체외배양과 동결보존에 관한 연구†

양부근 · 정희태 · 김정익
강원대학교 축산대학

***In Vitro* Culture and Cryopreservation of Bovine Embryos Derived from Matured and Fertilized *In Vitro* †**

B. K. Yang, H. T. Choung and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

The effects of different protein sources (serum vs bovine serum albumin), growth factors (EGF and PDGF) and co-culture with various type of somatic cells (BOEC, MEF and BRL) on the *in vitro* development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine oocytes were examined, and the viability of frozen / thawed embryos derived from IVM / IVF was examined. Cell numbers of blastocysts were also counted.

In Experiment 1, CR₁aa with serum was superior to CR₁aa with BSA in producing morulae plus blastocysts from IVM / IVF oocytes (24.4% vs 30.4%, $p > 0.05$). In Experiment 2, more morulae plus blastocysts (42.3%) were produced in CR₁aa containing 10ng / ml EGF than in the control CR₁aa (33.3%). In Experiment 3, 2- to 8-cell embryos derived from IVM / IVF oocytes were randomly allotted to one of 4 culture groups : a) CR₁aa ; b) CR₁aa + 1ng / ml PDGF ; CR₁aa + 5ng / ml PDGF ; CR₁aa + 10ng / ml PDGF ; culture resulted in 21.3, 51.2, 41.4 and 45.9% ($p < 0.05$), respectively, developing into morulae and blastocysts. In Experiment 4, 0 and 5ng / ml PDGF added to CR₁aa coculture with BRL or BOEC yielded 47.5, 42.5, 33.8 and 41.6% morulae and blastocysts, respectively. In Experiment 5, the proportion of embryos into morulae and blastocysts was highest in CR₁aa with MEF coculture group (50.9%) compared to any other group (CR₁aa, 22.3%; CR₁aa+BRL, 32.9%; CR₁aa+BOEC, 33.8%, $p > 0.05$). In Experiment 6, survival rate of blastocysts produced by *in vitro* fertilization when cryoprotectant was removed in 0.7M glycerol+0.7M sucrose and 0.7M sucrose solution for 10 min, after thawing at 20°C (Exp. II, 58.8%) was slightly higher than when cryoprotectant was removed 10%, 6.7% and 3.3% glycerol for 10 min, after thawing at 37°C (Exp. I, 54.3%).

These study indicate that growth factors and somatic cell co-culture can increase the proportion of embryos that develop into morulae and blastocysts without an increase in the cell number and frozen / thawed method employed this experiment was not different.

† 이 논문은 1994년도 교육부 학술연구조성비(지역개발연구)에 의하여 연구되었음.

서 론

체외성숙, 체외수정에서 생산된 초기배 수정란의 체외배양은 체외 발육과정중 8~16세포기 발육억제 현상으로 인하여 이식 가능한 상실배기 이상으로 발육이 극히 제한되어 성공하고 있다. (Thibault, 1966; Wright 등, 1981)

체외수정란의 체외배양에는 대부분에 연구자들에 의하여 Defined chemical medium에 소의 혈청이나, 혈청 albumin을 첨가하여 실시하고 있으나, 배반포기 수정란까지의 체외배양에 실패하고 있다. 체외수정란의 체외발육에 영향을 미치는 요인으로는 온도, 가스 및 배양액에 첨가되는 호르몬과 특수한 단백질원에 기인되는 것으로 보고되고 있다. (Fukui 등, 1989 ; Nakao 와 Nakatsuji, 1990 ; Yang 등, 1994)

체외배양시 나타나는 8~16세포기 발육억제 현상을 극복하기 위하여 여러 형태의 "Helper cell" 을 이용한 초기배의 공동 배양 체계(co-culture system)는 체외발육율을 증진시키며, 수정란의 활력도 현저히 증가하는 현상을 보이고 있다. (Camous 등, 1984; Heyman 등, 1987; Goto 등, 1988; Eyestone과 First, 1989; Ellington 등, 1990; Menezes 등, 1990; Voelkel과 Hu, 1990; Rehman 등, 1994) 그러나 초기배 체외수정란의 체외발육시 공동 배양에 이용되는 세포의 monolayer와 수정란의 발육 사이의 상호작용과 생화학적 기작은 잘 알려지지 않고 있다.

체외수정란의 체외배양은 세포의 증식과 분화 등 일련의 기작으로 이루어지는데, 이와 같은 세포의 증식과 분화, 즉 체외수정란의 체외발육에는 몇 종의 알려지지 않는 growth factor 가 중요한 조절역할을 할 것이라고 추측되고 있다. 체외수정란의 Helper cell과의 공동 배양은 공동 배양에 이용되는 세포의 monolayer에서 한 종 이상의 growth factor 가 분비되어 체외발육을 증진시키는 것으로 추측되고 있다. (Thibodeaux 등, 1993)

이와 같은 가설은 최근 Gandolfi 등(1991)이 소 난관 분비물에서 Platelet-derived growth factor (PDGF)가 검출되었고, Larson 등(1992)과 Yang

등(1993)은 배양액에 epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor(TGF α , TGF β), platelet derived growth factor(PDGF) 및 basic fibroblast growth factor(bFGF)을 첨가하여 배양하였을 때, 8~16세포기 이상 발육된 수정란의 체외발육율이 증가되었다고 보고한 것이 이 가설을 입증시키고 있다.

체외수정란의 동결보존 방법은 동해보호제의 첨가와 제거에 따라 일단계 동결법과 다단계 동결법이 있으며, 동결속도에 따라 완만 동결법, vitrification 및 초고속동결법(ultrarapid freezing) 등이 있다. (Leibo, 1984 ; Franks 등, 1986; Massip 등, 1987 ; Niemann, 1991)

소 수정란의 동결보존에는 동해보호제로 일반적으로 glycerol이 많이 이용되고 있으나, 융해후 수정란의 탈수현상의 피해를 줄이기 위하여 glycerol과 sucrose을 혼합한 동해 보호제의 이용이 최근 많이 보고되고 있다. (Iwasaki, 1994 ; Schellander 등, 1994)

본 연구는 도살장에서 손쉽게 구입한 난소로부터 채취한 미성숙 난포란을 체외성숙, 체외수정시킨 후 얻은 2~8세포기 체외수정란의 체외발육율을 검토하기 위하여, 단순배양액내에 EGF 또는 PDGF의 첨가배양, 소의 난관상피세포, Buffalo rat의 간세포 또는 생쥐의 embryonic fibroblast 세포와의 공동배양하여 체외발육 성적을 조사하였고, 배반포까지 발육된 체외수정란을 동결보존후 융해하여 생존성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 체외 성숙 및 체외 수정

난포란의 체외 성숙 및 체외 수정 방법은 Yang 등(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 도축장에서 회수한 난소를 0.1% polyvinyl alcohol과 antibiotic-antimycotic액이 함유된 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS-PVA)내에 담아 2~3시간 내에 실험실로 운반하여, 난포의 직경이 2~7mm의 난포로부터 미성숙 난자를 채취한 후 DPBS-PVA와 성숙 배양액으로 세척시킨 후, 난구 세포가 2~4층으로 균일하게 둘러쌓인 난포란을 회

수하여 5% CO₂, 95% air와 39℃의 조건의 탄산 가스 배양기내에서 2시간 전에 평형시킨 성숙배양액내에 미성숙난자를 옮겨 20~22시간 배양하여 체외성숙시킨 후 체외수정에 사용하였다. 성숙배양액은 TC-199액(Gibco)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 0.5 µg/ml FSH, 5 µg/ml LH와 1 µg/ml estradiol이 함유된 배양액을 이용하였다. 체외수정을 위한 정자의 처리는 동결정액을 Brackett와 Oliphant 배양액(Brackett와 Oliphant, 1995 ; BO배양액)에 10mM caffeine이 함유된 배양액으로 2회 원심분리(1,500rpm, 10분)하여 정자의 농도가 2.5×10⁶정자/ml가 되도록 조정하여 정자부유액을 준비하였다.

체외수정 배양액은 BO배양액에 20 µg/ml heparin과 20 mg/ml bovine serum albumin(BSA, Sigma)를 첨가하여 사용하였다. 체외수정은 성숙시킨 난포란을 50 µl의 소적 체외수정액에 10개의 성숙난자를 옮긴 후, 상기 방법으로 준비된 50 µl의 정자부유액을 넣어 실시하였다. 체외수정 배양액의 caffeine, heparin 및 정자의 최종농도는 각각 5 mM, 10 µg/ml 및 1.25×10⁶정자/ml였다. 체외수정시킨 후 6~8시간 후에 난자를 체외수정 배양액과 CR₁aa배양액(Rosenkrans와 First, 1991)으로 세척하여 난자 주위에 부착된 정자를 제거한 후 미리 준비한 CR₁aa배양액내(100µl/drop)로 옮겨 40~44시간 배양을 실시하였다.

2. 체외수정란의 체외배양

1) 단순 배양액에 Growth factor 첨가배양

CR₁aa배양액내에 10ng/ml의 EGF(collaborative, USA)를 첨가 또는 1 ng, 5 ng 및 10 ng/ml의 PDGF(R & D, USA)를 첨가한 배양액내에 체외수정 후 40~44시간 배양하여 얻은 2~8세포기 체외수정란을 39℃, 5% CO₂와 고습도의 조건하에서 5~6일간 배양한후, 초기배의 발육 상태를 검토하여 일부의 수정란은 형광 염색법에 의하여 세포수를 조사하였고, 나머지 수정란은 동결 보존하였다.

2) 소난관 상피세포(bovine oviduct epithelial cell:BOEC), Buffalo rat의 간세포(buffalo rat liver

cell:BRLC) 및 생쥐의 embryonic fibroblast 세포(mouse embryonic fibroblast cell:MEF)와의 공동 배양

(1) BOEC의 준비

도축장에서 입수한 난관을 실험실 내로 운반하여 주위의 결체조직과 혈액을 제거한 후 PBS-PVA로 2~3회 세척한다. 자궁난관 접합부에 plastic관을 연결하여 15ml 원심분리관에 꽂고, 반대편 난관 누두부 부위에 blunt needle이 부착된 20ml의 주사기를 이용하여 filter된 10~15ml의 PBS-PVA 용액을 관류시켜 난관 상피세포를 회수한다. 회수된 난관 상피세포를 PBS-PVA액과 Ham's F10 용액으로 각각 1회 원심분리(1,000 rpm, 5분)하여 세척한 후 Ham's F10 용액을 주입하여 세포 부유액을 준비한다. 4-well 용기에 각각 0.5ml의 세포 부유액을 담아 체외수정란을 배양하기 2~3일 전에 배양하여 BOEC monolayer을 만든 후 체외수정란의 체외배양에 공용하였다.

(2) BRLC의 준비

냉동보존된 BRLC(America Type Culture Collection, CRL 1442)을 37℃ 항온수조에서 1~2분간 용해하여 15ml의 원심분리관으로 옮긴 후 5ml의 Defined Modified Eagles Media(DMEM, Gibco)에 5% FBS가 함유된 배양액과 혼합시킨 후, 원심분리(1,000 rpm, 5분)로 2회 세척시킨 후 세포부유액을 준비하였다. 체외수정란의 체외배양에 이용하기 2~3일 전에 준비된 세포 부유액을 4-well 용기에 0.5ml씩 분주하여 BRLC monolayer을 형성시킨 후, 체외수정란의 체외배양에 사용하였다. 이때 BRLC의 세포수는 5×10⁴ cell/ml가 되도록 조정하였다.

(3) MEF의 준비

임신 14~16일째에 ICR종의 생쥐를 도살한 후 자궁내의 태아를 PBS 배양액(PBS+)이 담긴 petri dish내로 옮겨 3번 이상 세척시킨 후, 다시 Ca와 Mg이 함유되지 않은 PBS배양액(PBS-)에 0.25% trypsin이 함유된 배양액으로 옮긴 후 태아를 세절시킨다. 세절된 태아가 담긴 배양액을 20~25분

간 교반시킨 후 커다란 조직을 제거하고, PBS(-)을 첨가한 후, 1,500rpm에서 5~10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 DMEM배양액을 주입하여 세포 부유액을 준비한다.

체외수정란의 체외배양에 이용하기 4~5일 전에 4-well 용기에 0.5ml씩 분주하여 MEF monolayer을 형성시켜 체외수정란의 체외배양에 사용하였다.

상기 방법 등에 의하여 준비된 cell monolayer에 체외수정란을 옮겨 5~6일간 배양한 후 초기배의 발육 상태를 조사하였다.

3. 체외수정란의 동결보존

난포란을 체외수정시킨 후 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 일부를 실험 1과 실험 2의 방법에 의하여 동결보존하였다. 실험 1과 실험 2의 방법에 사용된 동결보존액은 D-PBS에 20% FBS를 첨가하여 이용하였다.

1) 실험 1

동해보호제로 glycerol을 이용하여 상기 보존액에 3.3%, 6.7%, 10%의 glycerol을 첨가한 배양액에서 각각 10분간씩 평형시킨 후 0.25 ml plastic straw내로 옮겨 봉입하였다. 수정란이 봉입된 straw는 수정란동결기(Planner, Cryo 10 :England)내로 옮겨 실온에서 -7°C 까지는 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 냉각속도로 하강, -7°C 에서 식빙을 한 후 5분간 정치시킨 후, -30°C 까지는 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 냉각속도, -35°C 까지는 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 냉각속도로 하강시켜 10분간 정치시킨 후에 액체질소내로 옮겨 보존하였다. 동결보존한 체외수정란의 용해는 37°C 의 항온수조내에 30초~1분간 담가 용해를 실시한 후 동결보존시와는 역순으로 10분간씩 평형시켜 glycerol을 제거한 후 세포수를 조사하였다.

2) 실험 2

동해보호제로 glycerol을 이용하여 상기보존액에 0.41M, 0.82M과 1.36M의 glycerol을 첨가한 배양액내에서 각각 5분, 5분과 10분동안 평형시킨 후 0.25 ml plastic straw내로 옮겨 체외수정란을 봉입하였다. 수정란이 봉입된 straw는 수정란동결기내로 옮겨 20°C 에서 -7°C 까지는 분당 1°C 의 냉각속도로

하강시킨 후, -7°C ~ -28°C 까지는 분당 0.3°C 의 냉각속도, -28°C ~ -35°C 까지는 분당 0.1°C 의 냉각속도로 하강시킨 후 액체질소내로 옮겨 보존하였다. 동결보존 수정란의 용해는 20°C 의 항온수조에서 30초~1분간 침지시켜 용해하였다. 동해보호제의 제거는 0.7M glycerol과 0.7M sucrose가 함유된 배양액과, 0.7M sucrose 배양액내에서 각각 10분간 평형시켜 실시하였다.

4. 신선 및 동결용해 체외수정란의 세포수 검사

체외수정란의 세포수는 Yang(1993)의 형광염색법에 준하여 실시하였다. 형광염색액의 보존액은 Hoechst 33342 1mg을 1ml의 증류수에 희석하여 4°C 냉장고에 보존하고, 실험용액은 500 μl 의 PBS용액에 5 μl 의 보존액을 첨가하여 준비하고, mounting용액은 PBS와 glycerol을 1:1로 혼합하여 사용하였다. slide glass 위에 10~15ml의 mounting용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 mounting용액내에 수정란을 옮긴 후, 10 μl 의 형광염색액을 혼합한 후 cover glass를 덮고 메니큐어로 봉입한 후 형광현미경하에서 세포수를 조사하였다.

5. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 Turkey's hsd test를 실시하여 통계처리 하였다.

결 과

단순 배양액인 CR_{1aa}에 다른 단백질 공급원인 소혈청 albumin과 혈청을 첨가한 배양액내에서 체외수정란을 배양한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 나타난 바와 같이 체외수정후 체외에서 40~44시간 동안 배양된 2~8세포기 수정란의 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적은 BSA첨가와 Serum첨가구에서 각각 24.4% (12/49)와 30.4% (17/56)로서 유의차가 인정되지 않았다($p>0.05$). 또한 배반포기까지 발육된 체외수정란의 세포수를 조사한 결과 82.3 ± 3.0 과 82.5 ± 3.0 으로 두 처리구 간에도 유의차가 인정되지 않았다.

BSA가 함유된 CR_{1aa} 배양액에 EGF를 첨가하여 체외수정란을 배양한 결과는 Table 2와 같다.

Table 1. Development of bovine IVM/ IVF embryos in CR₁aa with different supplements

Supplements	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to;			Morulae plus blastocysts(%)	Blastocysts cell number (Mean ± SEM)
		2~8 cell	Morulae	Blastocysts		
BSA	49	37	6	6	24.4 ^a	82.3±3.0
Serum	56	39	11	6	30.4 ^a	82.5±3.0

^a Values within columns with same superscripts are not different (p>0.05)

Table 2. The effect of EGF on developmental rate of IVM/ IVF bovine embryos in CR₁aa with BSA

EGF (ng /ml)	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to;			Morulae plus blastocysts(%)	Blastocysts cell number (Mean ± SEM)
		2~8 cell	Morulae	Blastocysts		
0	54	36	13	5	33.3 ^a	86.0±4.0
10	52	30	12	10	42.3 ^a	104.6±7.96

^a Values within columns with same superscripts are not different (p>0.05)

BSA가 함유된 CR₁aa 배양액과 BSA가 함유된 CR₁aa 배양액에 10ng/ml의 EGF를 첨가한 배양액 내에서 2~8세포기 체외수정란을 배양한 결과, 상실배기까지 발육된 수정란의 체외발육율은 각각 24.1%(13/54)와 21.4%(12/52)였으며, 배반포기까지 발육된 수정란의 체외발육율은 각각 9.3%(5/54)와 19.2%(10/52)로서 상실배기까지는 커다란 차이가 인정되지 않았으나, 배반포기까지 발육된 수정란의 체외발육율은 다소 차이가 인정되었다.

한편 배반포기까지 발육된 체외수정란의 세포수는 EGF첨가구(104.6±7.96)가 무첨구(86.0±4.0)보다 많은 경향을 나타냈다.

BSA가 함유된 CR₁aa 배양액에 PPGF를 첨가하여 체외수정란을 배양한 결과를 Table 3에 요약하

였다.

Table 3에서 나타난 바와 같이 PDGF를 첨가하지 않은 구에서 상실배기 이상 발육한 체외발육율은 21.3%(19/96)였으며, PDGF 1 ng/ml, 5 ng/ml와 10 ng/ml를 첨가한 구에서는 상실배기이상 발육된 체외발육율은 각각 51.2%(62/121), 41.4%(58/140) 및 45.9%(40/87)로서 PDGF를 첨가하지 않은 구보다 통계적으로 유의한 차가 인정되었다(p<0.05).

CR₁aa 배양액에 PDGF를 첨가한 구간에는 통계적 유의차는 인정되지 않았으나, 1 ng/ml PDGF 첨가구가 여타구보다 높은 체외발육 성적을 나타냈다.

한편 배반포기 체외수정란의 세포수를 조사한 결과 무첨가구, 1 ng/ml PDGF첨가구, 5 ng/ml

Table 3. Effect of PDGF on developmental rate of IVM/ IVF bovine embryos in CR₁aa with BSA

PDGF (ng/ml)	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to;			Morulae plus blastocysts(%)	Blastocysts cell number (Mean ± SEM)
		2~8 cell	Morulae	Blastocysts		
0	96	77	15	4	21.3 ^a	84.0±2.0
1	121	59	42	20	51.2 ^b	88.6±3.1
5	140	82	36	22	41.4 ^b	85.1±2.5
10	87	47	23	17	45.9 ^b	86.0±2.4

^{a, b} Values within columns with different superscripts are not different (p<0.05)

PDGF첨가구 및 10 ng/ml PDGF첨가구에서 각각 84.0 ± 2.0 , 88.6 ± 3.1 , 85.1 ± 2.5 및 86.0 ± 2.4 로서 커다란 차이는 인정되지 않았다.

Heper-cell로서 Buffalo rat의 간 세포와 소난관 상피세포의 monolayer에 PDGF를 첨가한 배양액과 PDGF를 첨가하지 않은 배양액에서 체외수정란을 배양한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서 나타난 바와 같이 BRL세포 monolayer에서 배양한 구, BRL세포 monolayer에 PDGF (5ng/ml)을 첨가한 배양액 내에서의 상실배기 이상 발육된 체외 발육율은 47.5%와 42.5%로서 PDGF가 첨가되지 않은 BRL세포 monolayer에서 배양한 구가 다소 높은 성적을 나타냈으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다($p > 0.05$).

한편 BOEC monolayer에서 배양한 구와 BOEC monolayer에 PDGF (5mg/ml)을 첨가한 배양액 내에서의 상실배기이상 발육된 체외 발육율은 각각 33.8%와 41.6%로서 BOEC monolayer에 PDGF를 첨가한 구에서 다소 높아 BRL 세포 공동배양시와는 다른 성적을 나타냈다. 배반포기 수정란의 세포수는 BRL공동배양, BRL+PDGF(5ng/ml)공동

배양, BOEC 공동배양 및 BOEC+PDGF(5 ng/ml) 공동배양구에서 각각 88.3 ± 3.7 , 85.6 ± 2.3 , 87.3 ± 2.8 및 84.0 ± 3.4 로서 커다란 차이가 인정되지 않았다.

여러 종류의 helper-cell을 이용하여 체외수정란을 배양시킨 후 얻은 체외 발육율에 대한 성적을 Table 5에 요약하였다.

체외수정후 40~44시간 후에 얻은 2~8세포기 체외수정란을 CR₁aa배양액, BRL 공동배양, MEF 공동배양 및 BOEC 공동배양한 후 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 각각 22.3%, 32.9%, 50.9% 및 33.8%로서 MEF 공동배양구가 여타구보다 높은 성적을 나타냈으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다($p > 0.05$).

한편 배반포기 수정란의 세포수에서도 MEF 공동배양구(91.3 ± 4.44)가 여타구(85.0 ± 3.49 , 89.0 ± 3.82 및 87.3 ± 2.82)보다 다소 높은 경향을 보였다.

체외수정후 여러가지 조건에서 배양하여 얻은 배반포기 수정란을 실험 I 과 실험 II 방법으로 동결 보존한 후 융해하여 생존성을 조사한 결과를 Table 6에 요약하였다.

Table 4. Effect of PDGF in CR₁aa medium with BOEC or BRL co-culture

Cell	PDGF (ng/ml)	No. of IVM/IVF embryos	No. of embryos developed to;			Morulae plus blastocysts(%)	Blastocysts cell number (Mean ± SEM)
			2~8 cell	Morulae	Blastocysts		
BRL	0	40	21	9	10	47.5 ^a	88.3±3.7
BRL	5	40	23	10	7	42.5 ^a	85.6±2.3
BOEC	0	68	45	15	8	33.8 ^a	87.3±2.8
BOE	5	65	38	15	12	41.6 ^a	84.0±3.4

^a Values within columns with same superscripts are not different ($p > 0.05$).

Table 5. Effect of BRLC, MEF and BOEC co-culture of bovine embryos derived from IVM/ IVF in CR₁aa with serum

Cells	No. of IVM/IVF embryos	No. of embryos developed to;			Morulae plus blastocysts(%)	Blastocysts cell number (Mean ± SEM)
		2~8 cell	Morulae	Blastocysts		
-	67	52	7	8	22.3 ^a	85.0±3.49
BRL	82	56	18	9	32.9 ^a	89.0±3.82
MEF	53	26	17	10	50.9 ^a	91.3±4.44
BOEC	68	45	15	8	33.8 ^a	87.3±2.82

^a Values within columns with same superscripts are not different ($p > 0.05$).

Table 6. Development of frozen-thawed bovine embryos derived from IVM/ IVF

Freezing method	Freezing stage	No. of embryos frozen/thawed	No. of embryos(%)			Blastocyst cell number (Mean±SEM)
			Excellent	Good	Degenerated	
Exp. I	Blastocysts	35	9	10	16	79.5±3.0
Exp. II	Blastocysts	34	9	11	14	82.3±2.7
Total		69	18(26.1)	21(30.4)	30(43.5)	81.0±2.0

실험 I의 방법으로 동결한 35개의 배반포기 수정란중 19개(54.3%)가 형태적으로 정상이었으며, 실험 II의 방법으로 동결한 34개의 수정란중 20개(58.8%)가 형태적으로 정상으로 나타나 실험II의 방법이 다소 좋은 성적을 나타냈으나, 커다란 차이는 인정되지 않았다.

동결융해후 정상란으로 판정된 배반포기 수정란의 세포수를 조사한 결과, 실험 I (79.5±3.0)과 실험 II (82.3±2.7)는 커다란 차이가 인정되지 않았다.

고 찰

본 연구는 소의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 혈청이 함유되지 않은 배양액에 EGF와 PDGF를 첨가하여 배양 또는 helper cell로서 소 난관 상피세포, Buffalo rat의 간세포 및 생쥐 embryonic fibroblast 세포와의 공동배양 체계가 체외 수정란의 체외발육에 어떠한 영향을 미치는가를 검토하였고, 체외수정후 생산된 배반포기 수정란을 동결 보존후 융해하여 생존성을 검토하였다.

일반적으로 체외에서 성숙, 수정된 체외수정란은 일정기간 동안 체외배양을 실시하는데, 이 기간 동안 체외배양할 경우 많은 연구자들은 배양액에 혈청이 첨가된 배양액을 이용하는데, 이때 첨가되는 혈청의 종류와 등급에 따라 체외발육율에 많은 영향을 미치며(Zheng and Sirard, 1992), 혈청은 이 중효과를 가지고 있어 초기분할을 억제시키지만, 상실배기 compaction을 증가시킨다 (Bavister 등, 1992). 한편 사람의 체외수정란의 체외배양시 혈청의 첨가가 체외발육율에 유해하다는 보고가 있어(Menezo 등,1984), 혈청이 함유되지 않은(serum-free medium) 체외 배양체계의 확립이 필요하다.

본 연구에서는 배양액에 다른 단백질원인 소의 혈청 albumin과 혈청을 첨가하여 배양한 결과, 상

실배기 이상의 체외 발육율은 각각 24.4%와 30.4%로서 커다란 차이가 인정되지 않았다. 이 결과는 소 체외 수정란의 상실배기 이상까지 체외 발육에 혈청이 함유되지 않은 배양액의 사용 가능성을 나타내고 있다.

최근에는 혈청이 함유되지 않은 배양액내에 체외 발육을 증가시키는 여러 인자의 첨가배양과 체세포와의 공동배양으로 체외 발육율을 증가시키고 있다. 단백질의 일종인 EGF, PDGF, TGFβ 및 bFGF와 같은 growth factor는 세포 표면에 존재하는 receptor와 결합하여 생물학적 효과를 발휘하는데, 이들 growth factor는 단백질 합성과 핵산 합성을 증가시키는 second messenger들을 활성화하여 수정란의 체외발육을 증가시킨다(Hill, 1989). 생쥐 2세포기 수정란의 표면에서 EGF의 receptor가 확인되었고(Wood와 Kaye, 1989), 소 수정란에서는 PDGF receptor가 확인되었다(Watson 등, 1992). Wood와 Kaye(1989) 및 Paria와 Dey(1990)는 생쥐 수정란의 체외발육에 EGF가 효과적임을 보고하고 있다. 또한 Yang 등(1993)과 Thibodeaux 등(1993)은 소 체외수정란의 체외발육에 PDGF가 체외발육율을 증가시키는 것으로 보고하고 있다. 그러나 growth factor가 체외수정란의 체외발육을 증가시키는 기작은 아직 정확하게 규명되지 않고 있다.

본 실험의 결과 혈청이 함유되지 않은 단순배양액(CR₁aa+BSA)에 EGF 첨가(10ng/ml)가 수정란의 체외발육율에 다소 증가시키는 경향을 나타냈으며(33.3%, 42.3%), 또한 PDGF 첨가(1 ng/ml, 5 ng/ml 및 10 ng/ml)가 상실배기 이상 발육된 체외수정란의 체외발육율 현저히 증가시키는 것으로 나타났다(21.3%, 51.2%, 41.4% 및 45.9%; P<0.05). 그러나 이들 growth factor의 첨가배양이 배반포기 수정란의 세포수에는 아무런 영향을 미치지

않는 것으로 나타났다.

체외성숙, 체외수정에 의하여 생산된 체외수정란의 체외발육증진과 8~16세포기 발육억제 현상을 해제시키기 위하여 여러 종류의 체세포와 공동배양이 많이 이용되며 좋은 결과를 얻고 있다.

이들 체세포와 공동배양이 체외발육을 증진시키는 기작은 아직까지는 정확하게 규명되고 있지는 않지만, 이들 체세포가 mitogenic인자를 분비하고 (Gandolfi 등, 1989), 또한 체외 수정란의 체외배양시 수정란의 발육을 자극하는 유익한 인자와 혹은 수정란의 발육을 억제시키는 인자를 제거하는 것으로 추측하고 있다(Bavister 등, 1992). 특히 이들 체세포와의 공동배양은 배양액내의 산소조건을 낮게 해주거나, 배양액에 free-radical을 제거할 수 있는 antioxidant을 생산하는 것으로 추측하고 있다(Fukui 등, 1991).

체외 수정란의 체외 발육을 증진시키기 위하여 이용되는 체세포 중에서 소난관 상피세포의 준비는 매번 실험할 때마다 신선한 세포를 이용하여 monolayer를 형성해야 하기 때문에 다소의 실험적 오차가 발생할 수 있으나, Buffalo rat의 간세포는 cell line이 확립되어 있어 손쉽게 구입이 가능하고, 여러번 passage가 가능하여 실험적 오차를 줄일 수 있을 뿐 아니라 손쉽게 monolayer를 형성할 수 있는 장점이 있다(Yang 등, 1994). 한편 생쥐 embryonic fibroblast세포는 동결보존은 가능하나 passage가 불가능한 단점을 가지고 있다.

본 실험의 결과 체외수정란의 공동배양에 이용된 체세포중 생쥐의 embryonic fibroblast세포가 체외 수정란의 상실배기 이상 발육된 체외발육율이 높은 경향을 나타냈으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다(무처리구 22.3%, BRL 32.9%, MEF 50.9% 및 BOEC 33.8%).

이상의 결과로 볼 때 체외수정란의 체외배양에 체세포의 공동배양이 체외발육율을 증가시키며, 체세포로는 준비하기가 편리하고, 몇 세대 passage가 가능하며, 동결보존이 가능한 Buffalo rat의 간세포의 이용의 가능성을 보여주고 있다. 그러나 배반포기 수정란의 세포수에는 체세포 공동배양이 아무 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 본실험에서 체외수정란의 체외배양시 소 난관 상피세포와 buf-

falo rat의 간세포와의 공동배양액에 PDGF(5ng/ml)을 첨가하였을 때, 즉 BRL, BRL + 5ng/ml PDGF와 BOEC, BOEC + 5ng/ml PDGF첨가구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육율(47.5%, 42.5%, 33.8%, 41.6%)과 배반포기 수정란의 세포수(88.3±3.7, 85.6±2.3, 87.3±2.8, 84.0±3.4)에는 커다란 차이가 인정되지 않았다.

이와 같은 영향에 대하여는 정확히 규명할 수도 없지만, 실험에 이용된 체외수정란수가 적고, PDGF 첨가량의 조절에 대한 실험이 계속되어야 할 것으로 사료된다.

수정란의 동결보존후 생존성에 미치는 영향으로는 동해보호제의 첨가와 제거방법, 동결과 용해속도 및 식빙 등이 있다. 그중 동해보호제의 첨가와 제거 방법은 동결보존액내에 높은 농도의 동해보호제를 첨가 또는 제거에 따라 삼투압의 급격한 변화에 의하여 수정란의 생존성에 커다란 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 동해보호제는 glycerol, 1, 2-propanediol 및 ethanol과 같은 침투성 동해보호제와 polyvinylpyrrolidone, sucrose 및 glucose와 같은 비침투성 동해보호제로 구분할 수 있는데, 최근에는 용해시 급속한 삼투압의 변화에 의한 수정란의 피해를 줄이기 위하여 glucose와 sucrose의 혼합한 배양액 내에서 동결수정란을 용해하여 높은 생존성을 얻고 있다(Niemann, 1985).

본 실험에서는 동해보호제로 glycerol을 3단계 첨가(3.3%, 6.7% 및 10%)하고 glycerol의 제거는 3단계 역순으로 실시한 후, 37℃에서 용해하는 방법과 동결시에는 glycerol을 3단계 첨가한 후(0.41M, 0.82M 및 1.36M), 동해보호제 제거시에는 0.7M glycerol + 0.7M sucrose와 0.7M sucrose액내에서 각각 10분간 평형시켜 20℃에서 용해하는 방법으로 실험한 결과, 동결용해 수정란의 생존성에는 커다란 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(54.3% : 58.8%).

본 실험의 결과로 볼 때 다소 실험수 및 동결에 이용된 수정란의 수가 적어 결론을 내리기에는 다소 미흡한 점이 있지만, 동해보호제를 제거할 때 sucrose와 glycerol을 병용하여 사용하는 방법이 다소 좋은 경향을 나타냈다.

적 요

본 연구는 소의 난포란을 체외성숙, 체외 수정시킨 후 체외 발육율을 향상시키고, 체외수정후 생산된 배반포기 수정란의 동결융해후 생존성을 검토하기 위하여 실시되었다.

CR_{1aa} 배양액에 다른 단백질 첨가원인 소 혈청 albumin과 혈청을 첨가하여 체외 수정란을 배양한 결과 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 24.4%와 30.4%로서 커다란 차이는 인정되지 않았다. 체외수정후 40~44 시간에 얻은 2~8세포기의 체외수정란을 혈청이 첨가되지 않은 CR_{1aa}배양액에 EGF 10 ng/ml을 첨가하여 배양한 결과 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 42.3%로서 무첨가구의 33.3%보다 다소 높은 경향을 나타냈다. CR_{1aa} 배양액에 PDGF 1 ng/ml, 5 ng/ml 및 10 ng/ml을 첨가하였을 때 상실배기이상 발육된 체외발육율은 무첨가구에 비해 PDGF첨가구에서 유의하게 높은 성적을 얻었다(21.3%, 51.2%, 41.4% 및 45.9%; p<0.05). 체세포를 이용하여 공동배양을 한 경우 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 MEF공동배양구가 50.9%로서 CR_{1aa}(22.3%), BRL(32.9%) 및 BOEC(33.8%)공동배양구보다 높은 성적을 나타냈다. 한편, BRL, BOEC 공동배양구와 BRL + PDGF 5 ng/ml, BOEC + PDGF 5 ng/ml 첨가구에서는 BRL 공동배양구가 47.5%로서 가장 높은 성적을 나타냈다. 실험 I 과 실험 II의 방법에 의하여 동결보존후 생존성을 검토한 결과, 융해시 동해보호제를 glycerol과 sucrose 용액에서 제거시킨 실험 II의 방법이 융해후 정상수정란의 생존율이 58.8%로서 glycerol 용액내에서 동해보호제를 제거시킨 실험 I의 방법(54.3%)보다 다소 높은 성적을 얻었다. 한편 배반포기 체외수정란의 세포수에서는 모든 실험에서 차이가 인정되지 않았다.

참고문헌

- Bavister BO, Rose-Hellekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37 : 127-146.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12 : 260-274.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W and Menezo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.* 72 : 479-485.
- Ellington JE, Farrel PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE and McGrath AB. 1990. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1~2 cells morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 89 : 293-299.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 89 : 293-299.
- Franks GC, Coley SL, Betterbed B and Page RD. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology* 26 : 135-144.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh A and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* *Theriogenology* 92 : 125-131.
- Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S and Lauria A. 1991. Detection and characterization of a growth factor in bovine oviduct secretions. *J. Reprod. Fert. Abstract Series 7, Abstract 6.*
- Goto K, 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.
- Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S and Garnier V. 1987 *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos : improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27 : 59-68.
- Hill DJ. 1989. Growth factor and their cellular actions. *J. Reprod. Fertil.* 85 : 723-734.
- Iwasaki S, Yoshikane Y, Watanabe S and Nakahara T. 1994. Effect of freezing of bovine preimplantation embryos derived from oocytes fertilized *in vitro* on survival of their inner cell mass cells. *Mol. Reprod. Dev.* 37 : 272-275.
- Larson RC, Igotz GG and Currie WB. 1992. Platelet derived growth factor (PDGF). stimulates development of bovine embryos during the growth cell cycle. *Development* 115 : 821-826.
- Leibo SP. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21 : 767-790.
- Massip A, Van Der Zwalman P and Ectors F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27 : 69-79.
- Menezo Y, Guerin JF and Czyba JC. 1990. Improvement of human early embryo development *in vitro* by co-culture on monolayers of vero cells. *Biol. Reprod.* 42 : 301-306.
- Nakao H and Nakatsuji N. 1990. Effect of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 33 : 591-600.
- Niemann H. 1985. Freezing of bovine embryos : Effect of a one-step addition of 1.4M glycerol. *Theriogenology* 23 : 369-379.
- Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from live stock : current status and research needs. *Theriogenology* 35 : 109-123.
- Paria BC and Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro* : cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 : 4756-4760.
- Rehman N, Collins AR, Suh TK and Wright RW, JR. 1994. Development of IVM-IVF produced 8-cell bovine embryos in simple, serum-free medium after conditioning or co-culture with buffalo rat liver cells. *Mol. Reprod. Dev.* 38 : 251-255.
- Schellander K, Peli J, Schmoll F and Brem G. 1994. Effect of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmatred bovine oocytes. *Theriogenology* 42 : 909-915.
- Thibault C. 1966. La culture *in vitro* de l'oeuf de vache. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 6 : 159-164.
- Thibodeaux JK, Del Vecchio RP and Hansel W. 1993. Role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 98 : 61-66.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 37 : 1117-1131.
- Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE and Schultz GA. 1992. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 31 : 87-95.
- Wood SA and Kaye PL. 1989. Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 85 : 575-582.
- Wright RW, Jr. and Bondioli KR. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.* 53 : 702-729.
- Yang BK, Yang X and Foote RH. 1993. Effect

- of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 40 : 521-530.
- Yang BK, Yang X and Foote RH. 1994. Early development of IVM/IVF bovine embryos cultured with or without somatic cells in a simple serum-free medium with different concentrations of CO₂ and O₂. *J. Reprod. Dev.* 40 : 197-205.
- Zheng YS and Sirard MA. 1992. The effect of sera and bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 37 : 779-790.