

배양기내 GAS 분압의 조성이 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향에 관한 연구

이원유 · 신태영 · 이병천 · 황우석
서울대학교 수의학과

Effect of Gas Atmosphere on *In Vitro* Development of Bovine Embryos Derived from *In Vitro* Fertilization

W. Y. Lee, T. Y. Shin, B. C. Lee and W. S. Hwang

Department of Veterinary Medicine, Seoul National University

SUMMARY

To examine the critical effect of oxygen concentration on embryonic development, *in vitro* fertilized embryos were cultured in media(TCM199 vs. SOF) supplemented sera(10% FCS vs. 10% HS) with and without bovine oviduct epithelial cells under two gas atmosphere(5% CO₂ in air vs. 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂). Oocytes, obtained from abattoir ovaries, were matured in EGF containing TCM199 medium co-cultured with BOEC for 24 hours, followed by exposure to frozen-thawed, heparin-treated spermatozoa in TALP for 30 hours. And then early embryos(1~2 cell) were cultured in both TCM199 and SOF supplemented with 10% FCS or 10% HS under 5% CO₂ in air or 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂. Development to morulae and blastocysts was recorded on days 7, after the start of *in vitro* fertilization. The developmental rates of *in vitro* fertilized embryos to morulae and blastocysts cultured in SOF with BOEC under 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂(24.4%) were significantly(p<0.05) higher than cultured in SOF with BOEC under 5% CO₂ in air(14.1%) at seven days after *in vitro* fertilization. When early bovine embryos were cultured in TCM 199 and SOF under two different gas atmosphere, there were no significant differences in the developmental rates to morulae and blastocysts between supplements of 10% FCS and 10% HS. The rates of development to morulae and blastocysts were significantly(p<0.01) higher in TCM 199 with BOEC(24.7%) than TCM199 without BOEC(10.9%) under 5% CO₂ in air, otherwise SOF without BOEC(36.4%) were significantly (p<0.05) higher than in SOF with BOEC (24.4%) under 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂. In summary, these experiments have proved that the culture system in SOF supplemented 10% HS is effective on *in vitro* development of early bovine embryos under 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂. In addition, it is effective to development of bovine embryos that TCM 199 should be co-cultured with BOEC and SOF should be cultured without somatic cells under two different gas atmosphere.

(Key words : bovine embryos, oxygen concentration, HS, BOEC)

서 론

최근, 산업동물에서 난자의 체외수정 기법의 개발로 체내 혹은 체외유래 난자의 체외성숙 및 배양에 의해 작출된 수정란을 이식하여 수태와 산자 생산에 성공하였다(면양: Cheng 등, 1986; 돼지: Yoshida, 1987; 소: Kajihara 등, 1990). 그러나 소의 경우 체외에서의 성숙, 수정 및 배양과정을 포함하는 체외생산체계에서 비외과적 이식이 가능한 발육단계인 상실배 및 배반포기에 이르는 난자의 비율은 6~20%로 여전히 낮은 실정이다(Fukuda 등, 1990; Fukui와 Ono, 1989). 이렇게 낮은 후기배생산율의 원인은 체내 환경에 비해 수정란의 체외배양조건이 부적절하기 때문인 것으로 여겨지며, 이를 타개하기 위해서는 수정란 배양을 위한 적정조건 확립이 필수조건으로 생각된다.

체외수정란 발육의 단계특이적 불연속성이 소(Wright와 Bondioli, 1981), 양(Gandolfi와 Moor, 1987), 돼지(Davis와 Day, 1978), 마우스(Whittingham, 1975) 랫드(Whittingham, 1975) 및 햄스터(Yanagimachi와 Chang, 1964) 등과 같은 여러 동물들에서 발생한다고 알려져 있으며, 포유류 체외수정란의 이러한 발육 제한에 관한 기전은 명확히 규명되어 있지 않으나, 수정란의 발육 측면에 있어 공배양하는 체세포의 결여와 체외배양환경이 체내에 비하여 산소농도를 높게 유지한다는 점이 제시되고 있다(Umaoka 등, 1992).

체세포와의 공배양이 수정란의 발육촉진에 미치는 영향에 관하여 많은 연구보고가 진행되어 있으며, Gandolfi와 Moor(1987)는 난관상피세포가 면양 초기배의 정상발육에 적합한 체외환경을 설정할 수 있다고 하였고, Nakao와 Nakatsuji(1990)는 소 수정란의 높은 후기배로의 발육에 있어 체외배양배지와 배양조건의 가스분압 변화에 관계없이 체세포와의 공배양이 선행되어야 한다고 주장하였다. 공배양하는 체세포의 정확한 역할과 기전은 아직 규명되어 있지 않지만, 난관상피세포와 수정란의 물리적 접촉(Allen과 Wright, 1984), 난관상피세포 배양액(Eyestone과 First, 1989)과 체세포에서 분비되는 유사분열 촉진인자(Heyman과 Menezo,

1987) 등에 의한 수정란의 발육촉진 등이 제시되어 왔다. 한편, Bavister(1988)는 체세포가 수정란 근접부위의 산소분압을 낮추어 수정란의 발육을 향상에 기여한다고 보고하였다.

착상전 소 수정란의 발육과 관련된 또 다른 요인으로, Tervit 등(1972)은 가스분압중의 산소농도가 매우 중요하다고 하였다. 난관액내의 산소 농도는 대기중 산소농도인 20%의 약 1/3 가량 되며(Maas 등, 1976; Mastroianni와 Jones, 1965), 5% 산소농도하의 수정란 배양이 여러 포유류 종에 있어 유효하다고 보고된 바 있다(Wright 등, 1976; Tervit 등, 1972; Auerbach와 Brinster, 1968). Brinster(1967)는 마우스 초기 체외수정란에 의한 대부분의 산소 소비는 pyruvate와 glucose의 산화에 기인한다고 하였고, Whitten(1957)은 마우스 수정란의 체외생존에 필요한 최저 산소요구량과 산소농도가 높을 경우 발생하는 독성에 관하여 보고하였다. 이후 연구자들은 마우스(Quinn과 Harlow, 1978), 햄스터(McKiernan과 Bavister, 1990), 돼지(Wright, 1977), 면양(Thompson 등, 1990; Tervit 등, 1972) 그리고 소(Nakao와 Nakatsuji, 1990; Wright 등, 1976)등에 있어서 배양조건 중의 가스분압내 산소농도의 변화가 수정란의 발육에 미치는 영향을 연구 보고하였다. 일반적으로 5~10%의 산소농도가 수정란의 배양에 적합하다는 연구자들의 공통된 견해가 있으나, 이와는 달리 몇몇 보고자들(Betterbed와 Wright, 1985; Wright 등, 1976)은 산소농도의 감소(5%)가 면양 수정란의 발육에 있어 효과를 나타내지 못했다고 상이하게 보고하였다.

한편, 수정란의 체외배양시 체세포와의 공배양을 실시하지 않고 단순합성배지를 사용한 체외배양체계에 관한 연구(Wright와 Bondioli, 1981)가 제한된 성공만을 거두었으나, Tervit 등(1972)은 modified SOF를 이용하여 다수의 면양 배반포를 얻었으며, Walker 등(1988)은 단백질 공급원으로 사람혈청(human serum)을 첨가한 SOF를 이용, 면양 수정란을 배양하여 높은 후기배로의 발육성적을 얻었다고 보고하였다. 또한 McLaughlin 등(1990)은 사람혈청이 첨가된 SOF를 1세포기 소 수정란의 생존능 유지와 체외발육을 위한 배양체계로 평가할 수 있다고 하였다.

이상과 같이 소 수정란의 체외배양조건에 관하여는 아직 확립된 정설이 없이 보고자마다, 배양체계에 따라 상위한 주장이 제기되고 있다. 이에 체외성숙, 체외수정 유래 소 수정란의 체외발육에 영향을 미치는 배양조건들을 검토하여 적절한 배양체계를 확립하고자 배지, 혈청 및 난관상피세포와의 공배양에 따른 배양조건중 가스분압내 산소농도가 미치는 영향 및 효과를 비교실험하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취

도살된 홀스타인종과 한우 암소로부터 외과용 가위를 이용, 난소를 채취하여 100 IU/mL의 penicillin과 100 μ g/mL의 streptomycin을 첨가한 30~35°C의 생리식염수에 보존하여 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난소표면을 38°C의 생리식염수로 세정한 후 18 gauge 주사침이 부착된 주사기로 5% fetal calf serum(Gibco, USA, 이하 FCS로 약함)을 첨가한 38°C의 tissue culture medium 199(Gibco, USA, 이하 TCM199으로 약함)을 2 mL정도 흡입한 다음 직경 3~8 mm의 소난포로부터 천자흡인하여 난자를 채취하였다. 회수된 난포란은 Wiemer 등(1991)의 기준에 준하여 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균질한 정상난자를 실체현미경(Wild M8, Germany, $\times 50$) 하에서 선별하여 실험에 제공하였다.

2. 체외성숙

체외성숙은 10% FCS첨가 TCM199을 0.5 mL씩 분주한 4-well dish (Nunc, USA) 각각의 well내에 10 ng/mL의 epidermal growth factor (Boehringer Mannheim, Germany, 이하 EGF로 약함)를 첨가하여 실시하였다. 육안적으로 정상이라고 인정되는 직경 10~15 mm의 난포로부터 채취한 과립막 세포를 5% FCS첨가 TCM199으로 3회 원심분리(700g, 10분)하여 세정한 후 5×10^6 cell/mL의 농도가 되도록 각각의 well에 첨가하여 전배양하였다. 선별된 난자는 각각의 well내에 10~15개씩 첨가하여 39°C, 5% CO₂ in air 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기내에서 24시간 동안 성숙배양하였다.

3. 체외수정

1) 정자의 처리

정액은 0.5 mL straw당 5×10^7 개의 정자가 들어 있는 한우동결정액(축협중앙회 한우개량사업소) 및 유우동결정액(축협중앙회 유우개량사업소)을 이용하였으며 기본배양액은 modified Tyrode-medium(Parrish 등, 1988; 이하 TALP로 약함)을 사용하였다. 동결정액은 38°C 수조에 30초간 침지하여 진탕용해시켰다. 수정능획득용-TALP가 1 mL씩 분주되어 있는 12 \times 75 mm의 plastic tube (Falcon, USA)에 용해된 정액을 가온된 pasteur pipette을 이용하여 0.2 mL씩 분주한 후 CO₂ 배양기내에서 swim-up 과정을 1시간 동안 실시하였다. 각 시험관의 상층액 0.8 mL를 micropipette으로 흡입하여 하나의 원심관에 모아 원심분리(500g, 10분)하고 상층액을 제거한 다음 새로운 수정능획득용-TALP를 2~3 mL 보충해 주는 방법으로 2회 세정을 실시하여 생존성 있는 활력정자를 선별하는 한편, 동결보호제 및 희석액을 제거하였다. 이후 정자의 수정능획득 및 침체반응을 유도하기 위하여 heparin(200 μ g/mL, Gibco, USA)을 포함한 수정능획득용-TALP를 정자의 농도에 따라 계산하여 첨가하고 39°C, 5% CO₂ in air 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기에 15분간 정치하였다.

2) 난자의 준비

정자를 swim-up 시키는 동안 수정용-TALP로 35 mm petri dish(Costar, USA)에 40 μ L의 미소적을 작성한 후 light white oil(Mineral oil, Sigma, USA)을 도포하였으며, 성숙난자는 세정용-TALP로 세정하여 팽대된 난구세포를 1/3 정도 조심스럽게 벗겨 5 μ L의 배지로 5개씩 각 미소적에 첨가하였다.

3) 체외수정

난자가 들어있는 준비된 미소적에 정자를 5 μ L씩 첨가하여 정자의 최종농도가 2.5×10^6 개/mL가 되도록 하여 39°C, 5% CO₂ in air 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기내에서 30시간 동안 배양하여 체외수

정을 실시하였다.

4. TCM199을 이용한 체외배양

1) 난관상피세포와의 공배양

난소 표면에 출혈체를 보이거나 2 g미만의 황체 조직을 나타내는 초기황체의 난관에서 여분의 결체 조직을 제거한 후 관류법에 의해 난관상피세포를 채취하여 5% FCS첨가 TCM199으로 3회 원심분리(700g, 10분)하였다. 난관상피세포는 10% FCS첨가 TCM199을 0.5 mL씩 분주한 24-well plate (Falcon, USA)에서 36~48시간 동안 배양하여 난관상피세포 monolayer를 작성하였다. 형성된 monolayer는 수정란과 공배양하기 1~2시간 이전에 10% FCS 또는 10% human serum(사람혈청, 이하 HS로 약함)을 첨가한 TCM199으로 배양액을 교환하여 부유하고 있는 잔존피사세포를 제거하고 평형시켰다. 수정된 소 초기배(1~2세포기)는 각 배양군의 well당 10~15개씩 첨가하여 39°C, 5% CO₂ in air 또는 39°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하에서 배양하여 수정후 7일째에 후기배(상실배 및 배반포)로의 발육률을 조사하였다.

2) TCM199을 이용한 단독배양

수정란과 체외배양을 실시하기 1~2시간 전, 24-well plate의 well내에 0.5 mL의 10% FCS 또는 10% HS를 첨가한 TCM199을 분주하여 전배양하였다. 이후 공배양군과 같은 방법으로 체외배양하여 후기배로의 발육률을 조사하였다.

5. SOF를 이용한 체외배양

1) 난관상피세포와의 공배양

배양중인 24-well plate내의 난관상피세포 monolayer를 세정용-SOF를 이용, 3회 세정하여 plate내의 TCM199 배양액 성분을 제거하였고, 각각의 well에 0.5 mL의 10% FCS 또는 10% HS를 첨가한 배양용-SOF를 분주하여 1~2시간 전배양하였다. 이후 수정된 소 초기배(1~2세포기)는 각 배양군의 well당 10~15개씩 첨가하여 39°C, 5% CO₂, in air 또는 39°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하에서

배양하여 수정후 7일째에 후기배(상실배 및 배반포)로의 발육률을 조사하였다.

2) SOF를 이용한 단독배양

수정란과 체외배양을 실시하기 1~2시간 전, 24-well plate의 well내에 0.5 mL의 10% FCS 또는 10% HS를 첨가한 배양용-SOF를 분주하여 전배양하였다. 이후 공배양군과 같은 방법으로 체외배양하여 후기배로의 발육률을 조사하였다.

6. 통계학적 분석

모든 실험결과치는 Chi-square test를 실시하여 각 실험군간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 배양기내 산소분압 및 체외배양배지가 소 난관상피세포와 공배양한 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향

가스분압중의 산소농도는 착상전 소 수정란의 발육과 관련된 중요 요인으로 Tervit 등(1972)은 5~10%의 산소농도가 소 수정란의 체외발육에 적절하다고 하였다. 또한 Quinn과 Harlow(1978)는 초기 마우스 수정란의 연구에서 5% 산소농도가 발육에 적절하다고 하였으나, Betterbred와 Wright(1985)는 감소된 산소농도(5%)가 면양 수정란의 발육에 효과가 없다고 하였다.

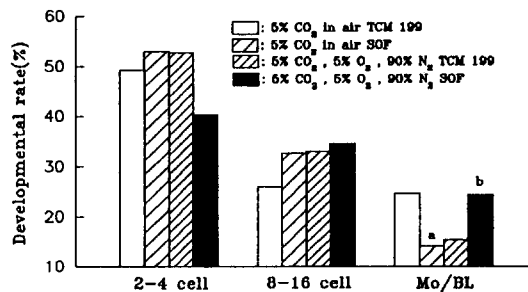


Fig. 1. Effect of gas atmosphere and media on *in vitro* development of bovine embryos co-cultured with bovine oviduct epithelial cells.

^{a,b} Means with different superscripts are different ($p < 0.05$)

소 초기배를 5% CO₂ in air와 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하에서 각각 TCM199과 SOF를 이용하여 배양하고 수정후 7일째 각 배양군에서의 발육률을 초기(2~4세포기), 중기(8~16세포기), 후기(상실배 및 배반포기)의 세포단계별로 나누어 조사한 결과는 Fig. 1에서와 같다. 본 실험에서 초기배를 10% FCS 첨가 TCM199에서 난관상피세포와 공배양하였을 경우, 20 및 5% 산소분압하에서 각각 24.7과 15.4%의 상실배 및 배반포로의 발육률을 보여 각 군간의 유의차가 인정되지 않았다. 이는 Fukui 등(1991)의 20 및 5%의 산소분압하에서 각각 21.9와 2.5%의 배반포로의 발육률을 보인 성적과는 유사하였으나, Nakao와 Nakatsuji (1990)의 20 및 5%의 산소분압하에서 각각 26과 52%의 상실배 및 배반포로의 발육률을 나타낸 성적과는 상반되는 결과였다.

이러한 서로 다른 가스분압하에서의 배양결과가 상반되는 이유를 정확히 설명할 수는 없으나, 실험에 이용된 배양조건들의 차이가 한 요인인 것으로 생각된다(Voelkel과 Hu, 1992). 본 실험에서는 oil의 도포없이 0.5 mL의 배지를 이용한 well내에서 배양하였으나, 상기한 Nakao와 Nakatsuji(1990)는 silicon oil이 도포된 배지의 미소적 내에서 수정란을 배양하였으며, 또한 난관상피세포와의 공배양시 세포수를 세지 않았는데 이것은 서로 다른 세포의 농도와 수가 공배양체계에 사용되었을 가능성을 시사한다.

한편, 소 초기배를 10% HS 첨가 SOF에서 난관상피세포와 공배양하였을 경우 5 및 20%의 산소분압하에서 각각 24.4와 14.1%의 후기배로 발육하여, 낮은 산소분압하의 배양이 유의적으로 높은 후기배로의 발육률을 보여(p<0.05), 5~10%의 산소농도가 난관상피세포와 공배양한 소 수정란의 배양에 적합하다는 Voelkel과 Hu(1992)의 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

가스분압중의 산소농도가 체외발육에 미치는 영향에 관한 기전은 아직 명확히 성립되어 있지 않으나, 체외배양중의 발육제한이 산소농도에 따른 대사과정과 관련이 있을 수 있다는 사실을 Schini와 Bavister(1988)가 배양액으로부터 glucose와 inorganic phosphate ions을 제거하였을 때, 햄스터에

서 2세포기의 발육제한이 극복되며, 8세포기 수정란이 증진된 배반포로의 발육률로 주장하였다. 이들은 부적절한 에너지 발생이 발육저하의 원인이라고 하였으며, 인산이온이 해당을 자극하여 미토콘드리아의 호흡작용과 경쟁하게 되어, 산소 소비를 억제시키는 "Crabtree effect"에 기인한다고 설명하였다. 또한 Khurana와 Wales(1989)는 감소된 산소분압(1~5%)이 배양되는 마우스 상실배에서 내인성 당원저조(endogenous glycogen pools)의 이용을 촉진하는데 필수적이라고 하여, 산소농도가 수정란의 에너지 기질이용에 영향을 미친다고 하였다. 한편, Joenje(1989)는 무산기(oxygen-free radical)에 의한 자가산화(auto-oxydation)와 지방기(lipid radical)가 체세포의 손상과 배양중의 발육 지연의 주 원인이라고 하였으며, Hornsby와 Gill(1981)은 지방기가 대사경로를 변화시켜 체세포의 증식을 억제할 수 있다고 하였다.

이러한 효과는 산소농도를 낮추거나 항산화제를 첨가하여 줄일 수 있는데(Hornsby, 1982), 수정란의 배양시 이와 비슷한 과정이 성립될 것이라 사료되며, 낮은 산소분압에서의 소 수정란 배양이 산화적 손상에 특히 민감한 8세포기 수정란(태아유전자 전사가 활성화되는 시기)의 자가산화적 손상을 줄이며 적절한 에너지 생산을 제공하여 후기배로의 발육을 지지할 것으로 생각한다.

또한, 본 실험에서 TCM199 배양군과는 달리 SOF 배양군에서 낮은 산소분압하의 배양이 높은 후기배로의 발육률을 나타낸 이유를 명확히 설명할 수는 없으나, SOF와 Human Tubal Fluid(Quinn 등, 1984)와 같은 난관액 이온 조성에 근거한 배지가 낮은 산소분압하에서 소 수정란의 체외발육에 적합한 배양체계가 될 수 있다고 생각한다.

2. 배양액내의 혈청이 소 난관상피세포와 공배양한 소 초기배의 발육에 미치는 영향

Walker 등(1986)은 BSA에 비해 HS가 면양수정란의 배양에 적합하다고 하였으며, McLaughlin 등(1989)은 20% HS가 첨가된 SOF에서 면양과 소 수정란의 배양이 성공적으로 이루어졌다고 하였다.

배양액내에 첨가한 혈청에 따른 소 수정란의 후기배로의 발육률을 알아보기 위하여 5% CO₂ in air

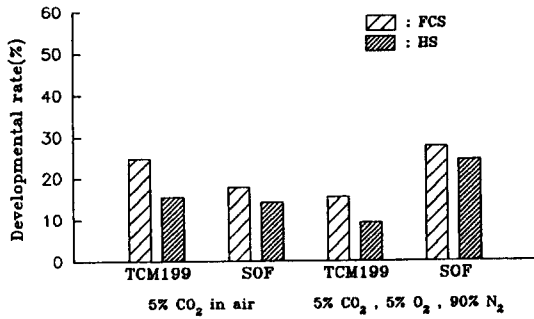


Fig. 2. Proportion of bovine embryos supplemented 10% FCS or 10% HS to morula and blastocyst stage during culture for 7 days in TCM 199 and SOF under two different oxygen concentration

와 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하에서 각각 TCM199과 SOF를 이용한 4 배양군으로 나누어, 각각의 군에 10% FCS 또는 10% HS를 첨가, 체외배양한 결과는 Fig. 2에서와 같다. 수정후 7일째 상실배 및 배반포기로의 발육률은, 5% CO₂ in air의 조건하에서 FCS 혹은 HS를 첨가한 TCM199 배양군이 24.7과 15.4%, SOF 배양군은 14.9와 14.1%, 그리고 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하에서 FCS 혹은 HS를 첨가한 TCM199 배양군이 15.4와 9.2%, SOF 배양군은 27.8과 24.4%의 발육률을 나타내어, 각 배양조건에서 FCS와 HS 첨가에 따른 유의차가 나타나지 않았다.

본 실험에서는 각 배양조건에서 FCS와 HS 첨가에 따른 유의차를 보이지 않았으나, 전반적으로 FCS 첨가군이 HS 첨가군보다 높은 발육률을 보여 단백질 공급원으로서 FCS의 우월성을 나타내었는데, 이는 Heyman과 Menezo(1987)가 보고한 바와 같이 FCS에 체세포 발육촉진인자가 포함되어 있거나 FCS가 배발육 촉진신호를 효과적으로 가능하게 하였기 때문으로 추측된다. 그러나 단백질 공급원으로서 FCS(Takahashi와 First, 1993)와 BSA(Tervit 등, 1972)를 사용한 것에 비해, HS는 소 수정란의 배양에 널리 이용되고 있지 않다(McLaughlin 등, 1990).

본 실험에서 HS가 FCS에 비해 비록 효과가 낮았으나, 적절한 배양조건을 위한 단백질 공급원은 될 수 있다고 생각하며, 이러한 단백질 공급원이 소 수

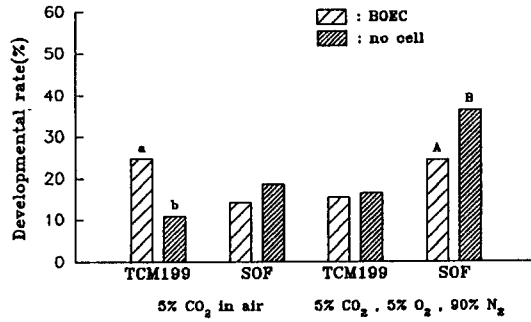


Fig. 3. Proportion of bovine embryos with and without bovine oviduct epithelial cells to morula and blastocyst stage during culture for 7 days in TCM199 and SOF under two different oxygen concentration.

^{ab,AB} Means with different superscripts are different (a,b : p<0.01, A,B : p<0.05, respectively)

정란의 발육에 최적효과를 나타낼 수 있는 배양체계에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3. 소 난관상피세포와의 공배양이 소 초기배의 발육에 미치는 영향

공배양에 이용되는 체세포들의 수정란 발육촉진에 관하여 Gandolfi와 Moor(1987)는 난관상피세포가 변양 초기배의 정상발육에 적합한 체외환경을 설정할 수 있다고 하였으며, Nakao와 Nakatsuji(1990)는 배지와 가스분압이 바뀌어도 소 수정란의 높은 후기배로의 발육에 체세포와의 공배양이 선행되어야 한다고 하였다.

소 난관상피세포와의 공배양 실시 유무에 따른 소 수정란의 후기배로의 발육률을 알아보기 위하여 5% CO₂ in air와 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하에서 TCM199과 SOF를 사용한 4 배양군으로 나누어, 각각의 군에 있어 공배양군과 공배양을 실시하지 않은 군간의 체외발육률을 검토한 결과는 Fig. 3에서와 같다. 수정후 7일째 상실배 및 배반포기로의 발육률은, 5% CO₂ in air 조건하의 SOF 배양군에서 14.1과 18.6%를, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하의 TCM199 배양군에서 15.4와 16.4%를 나타내어 공배양 실시 유무에 따른 유의차가 인정되지 않았다. 그러나 5% CO₂ in air 조건하의 10% FCS 첨가 TCM199 배양군에서는 공배양을 실시한 군(24.7

%)이 공배양을 하지 않은 군(10.9%)에 비해 유의적으로 높은 후기배로의 발육률을 나타내어($p < 0.01$), Fukui 등(1991)의 동일한 조건에서 배양에 의한 21.9와 3.5%의 배반포로의 발육률을 얻은 결과와 유사하였다. 이러한 결과는 공배양한 난관상피세포가 배지내의 산소농도를 감소시키며(Bavister, 1988), 항산화제를 생산하여 높은 산소농도의 유해한 작용을 완화시켰기 때문(Hornsby, 1982)으로 생각된다. 공배양에 이용되는 체세포의 정확한 역할은 아직 규명되어 있지 않지만, 난관상피세포와 수정란의 물리적 접촉(Allen과 Wright, 1984), 난관상피세포 배양액(Eyestone과 First, 1989)과 세포에서 분비되는 유사분열 촉진인자(Heyman과 Menezo, 1987) 등에 의한 수정란의 발육촉진이 제시되어 왔다. 또한, Bavister(1988)는 체세포가 수정란 근접부위의 산소분압을 낮추어 수정란의 발육률 향상에 기여한다고 하였다.

한편, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하의 10% HS 첨가 SOF 배양군에서는 난관상피세포와 공배양하지 않은 군(36.4%)이 공배양군(24.4%)에 비해 유의적으로 높은 후기배로의 발육률을 나타내어($p < 0.05$), 체세포와 공배양을 하지 않고 낮은 가스분압(4~8%)에서 소 초기배를 배양하여 상실배로의 높은 발육률(28.4~54.1%)을 얻었다고 보고한 Thompson 등(1990)과 유사한 결과를 보였다.

본 실험에서 낮은 산소분압(5%)하의 10% HS 첨가 SOF 배양군에서 난관상피세포와의 공배양을 하지 않은 군이 높은 발육률을 나타낸 이유를 명확히 설명할 수 없으며, 공배양에 이용되는 체세포의 기능과 공배양을 하지 않고 생산된 후기배의 생존능을 확인하기 위해서는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 본 실험의 결과로 보아, 10% FCS 첨가 TCM199 배양군에서는 난관상피세포와의 공배양 군이, 10% HS 첨가 SOF 배양군에서는 난관상피세포와의 공배양을 실시하지 않은 군이 높은 후기배로의 발육을 위한 적합한 배양체제라고 생각한다.

적 요

소 초기수정란의 체외발육에 있어 배지, 혈청 및

난관상피세포와의 공배양에 따른 가스분압내 산소농도의 효과를 비교하기 위하여 5% CO₂ in air와 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하의 TCM199과 SOF의 배지, FCS와 HS의 단백질 공급원, 난관상피세포와의 공배양 유무 등을 통하여 얻은 실험결과는 다음과 같다.

1. 소 초기배를 10% HS첨가 SOF 배양군에서 배양하였을 경우, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하의 배양군(24.4%)이 5% CO₂ in air 조건하의 배양군(14.1%)에 비해 유의적으로 높은 후기배로의 발육률을 나타내었다($p < 0.05$).
2. 배양액내에 첨가된 10%의 FCS 및 10%의 HS에 따른 후기배로의 발육률의 차이는 인정되지 않았다.
3. 소 초기배를 5% CO₂ in air 조건하의 TCM199에서는 공배양군(24.7%)이 공배양을 하지 않은 군(10.9%)에 비해 유의적으로 높은 후기배로의 발육률을 나타내었으며($p < 0.01$), 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 조건하의 SOF에서는 공배양을 하지 않은 군(36.4%)이 공배양군(24.4%)에 비해 유의적으로 높은 후기배로의 발육률을 나타내었다($p < 0.05$).

이로 미루어, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 가스분압하의 10% HS첨가 SOF가 소 수정란의 체외발육에 적합한 배양조건으로 평가될 수 있으며, 각 가스분압 조건하에서 TCM199을 사용할 경우에는 난관상피세포와의 공배양을 하는 것이, SOF를 사용할 경우에는 난관상피세포와의 공배양을 하지 않는 것이 후기배로의 발육에 유효한 것으로 생각된다.

참고문헌

- Allen RL and Wright RW. 1984. *In vitro* development of porcine embryos in co-culture with endometrial cell monolayers or culture supernatants. J. Anim. Sci., 59:1657-1661.
- Auerbach J and Brinster RL. 1968. Effect of oxygen concentration on the development of the two-cell mouse embryos. Nature, 217:465-466.
- Bavister BD. 1988. Role of oviductal secretions

- in embryonic growth *in vivo* or *in vitro*. Theriogenology, 29:143-154.
- Betterbed B and Wright Jr. RW. 1985. Development of one-cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. Theriogenology, 23:547-553.
- Brinster RL. 1967. Carbon dioxide production from lactate and pyruvate by the preimplantation mouse embryo. Exp. Cell Res., 47:634-637.
- Cheng WTK, Moor RM and Polge C. 1987. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology, 25:146. (Abstr.).
- Davis DL and Day BN. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. J. Anim. Sci., 46:1043-1053.
- 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., 85:715-720.
- 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* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 42:114-119.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effect of sera, hormones, and granulosa cells added to culture medium for *in-vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert., 86:501-506.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 92:125-131.
- Gandolfi F and Moor RM. 1987. Stimulation of early embryonic development in sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert., 81:23-28.
- Heyman Y and Menezes Y. 1987. Interaction of trophoblastic vesicles with bovine embryos developing *in vitro*. In ; The Mammalian Preimplantation Embryo (Bavister BO ed.), Plenum Press, New York, pp. 175-191.
- Hornsby PJ. 1982. The role of vitamin E in cellular energy metabolism in cultured adrenocortical cells. J. Cell. Physiol., 112:207-216.
- Hornsby PJ and Gill GN. 1981. Regulation of glutamine and pyruvate oxidation in cultured adrenocortical cells by cortisol, antioxidants, and oxygen : Effects on cell proliferation. J. Cell. Physiol., 109:111-120.
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y, Koshiba Y, Hishiyama K, Shiraiwa K and Goto K. 1990. Pregnancy rates and birth after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. Theriogenology, 32:264 (Abstr.).
- Khurana NK and Wales RG. 1989. Effects of oxygen concentration on the metabolism of [14 C]glucose by mouse morulae and early blastocysts. Reprod. Fert. Dev., 1:99-106.
- Maas DHA, Storey BT and Mastroianni Jr. L. 1976. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey. Fert. Steril., 27:1312-1317.
- Mastroianni Jr. L and Jones R. 1965. Oxygen concentration within the rabbit fallopian tube. J. Reprod. Fert., 9:99-102.
- McKienen SH and Bavister BD. 1990. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 43:404-413.
- McLaughlin KJ, McLean DM, Steven G, Ashman RA, Lewis PA, Bartsch BD and Seaman RF. 1990. Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. Theriogenology, 33:1191-1199.
- Nakao H and Nakatsuji N. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas ph-

- ase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos, *Theriogenology*, 33:591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38:1171-1180.
- Quinn P and Harlow GM. 1978. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 206:73-80.
- Quinn P, Warnes GM, Walker SK and Seamark RF. 1984. Culture of preimplantation sheep and goat embryos. In: *Reproduction in sheep* (Lindsay DR and Pearce DT eds.), Australian Academy of Science and Australian Wool Corporation, Canberra, pp. 289-290.
- 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.
- Takahashi Y and First NL. 1993. *In vitro* culture of bovine one-cell embryos fertilized *in vitro* using synthetic oviduct fluid medium with and without glucose supplemented with fetal calf serum. *Anim. Reprod., Sci.*, 31:33-47.
- Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 30:493-497.
- Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly DE and Tervit HR. 1990. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.*, 89:573-578.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K and Mori T. 1992. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:28-33.
- 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.
- Walker SK, Quinn P, Ashman RJ, Smith DH and Seamark RF. 1986. Protein supplement for the culture of one-cell embryos of sheep. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 18:19(Abstr.).
- Walker SK, Seamark RF, Quinn P, Warnes GM, Ashman RJ, Smith DK and Acell P. 1988. Culture of pronuclear embryos of sheep in simple medium. *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. and A. I.*, Dublin, 4:483(Abstr.).
- Whitten WK. 1957. Culture of tubal ova. *Nature*, 179:1081-1087.
- Whittingham DG. 1975. Fertilization, early development and storage of mammalian ova *in vitro*. In: *The early Development of Mammals*(Balls M and Wild AE eds), Cambridge University Press, U. S. A., pp. 1-24.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, Mckenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the development capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- Wright RW, Anderson GB, Cupps PT, Drost M and Bradford GE. 1976. *In vitro* culture of embryos adult and prepuberal ewes. *J. Anim. Sci.*, 42:912-917.
- Wright Jr. R. W. 1977. Successful culture *in vitro* of swine embryos to the blastocyst stage. *J. Anim. Sci.*, 44:854-858.
- Wright Jr. RW and Bondioli KR. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.*, 53:702-729.
- Yanagimachi R and Chang MC. 1964. *In vitro* development of golden hamster ova. *J. Exp. Zool.*, 156:361-376.
- Yoshida M. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. *Jap. J. Vet. Sci.*, 49:711-718.