

소 초기배의 단순배양액에서의 체외발생 및 개선효과⁺

이홍준 · 서승운 · 이상호 · 송해범*

고려대학교 응용동물학과

***In Vitro* Development and the Improving Effects of Bovine Embryos in Simple Media**

H. J. Lee, S. W. Seo, S. H. Lee and H. B. Song*

Dept. of Animal Science, Korea University

SUMMARY

This study was experimented that developmental effects of bovine *in vitro* fertilized embryos by coculture system and supplementation of energy materials into simple media. With the ovaries from slaughter house *in vitro* maturation by 24h, *in vitro* fertilization was performed with sperms collected by Percoll gradient method. Fertilized embryos were cocultured in 15% FCS+CZB medium with BOEC(bovine oviductal epithelial cell), GCM (granulosa cell monolayer) and MEFC(mouse embryonic fibroblast cell). And also in this study, there was trying to improve the early developmental rate of embryos by addition of concentration-controlled Na-pyruvate, D-glucose which were used as energy sources into CZB medium. *In vitro* developmental rate was confirmed by the cleavage rate of 48h post-IVF and the embryo development rate at 240h culture. In the coculture system, BOEC had 20.0% of blastocysts rate, which was higher than that of other coculture systems. To determine the optimum concentration for early embryo developmental rate rapidly, through the gradient of concentrations of Na-pyruvate and D-glucose, we focused on the cleavage rate at 48h and blastocysts rate at 240h. In case of Na-pyruvate, cleavage rate and developmental rate over 3-cell were lower at the concentration of 1.00mM than the other treatment concentrations, otherwise the blastocysts rate was higher as 23.2% than the others. That result showed that as like reported group which had higher developmental rate over 3-cell was also higher to the blastocysts rate. In case of D-glucose, there was no effects through the concentration changes. It was the result of this study for which the use of BOEC coculture system and 1.00mM Na-pyruvate as an energy source had an effect upon embryo development.

서 론

근래들어 난포란의 체외배양에 대한 연구와 수정

초기배와 체세포의 공배양법이 개발되면서 미수정란을 이용한 배반포 생산에 대한 연구가 급진전하게 되었다. 이에 따라 많은 연구자들이 배반포 생산 사례를 발표하고 있지만, 소 초기배 생산시 사용되

⁺ 본 연구는 한국과학재단 핵심진문과제지원에 의해 수행되었음.

* 대구대학교 축산학과(Dept. of Animal Science, Daegu University)

어지는 배양액내의 대사물질의 역할 등을 비롯한 초기배 발생에 대한 심도 있는 연구는 아직 부족한 형편이다. 또한 가축의 경우에 있어서 배반포 생산성적도 생쥐와 같은 실험동물을 대상으로 한 경우에 비해 아직 큰 차이가 있다. 최근 단순배양액의 하나인 CZB 배양액이 생쥐 inbred 계통 초기배 배양시 흔히 발견되는 세포분열 중지현상을 극복함을 보여주었으나(Chatot 등, 1989), 가축의 경우에는 일부 종에서만 zygote로부터 배반포까지의 발달이 가능하며, 이러한 종에 있어서도 체외배양의 경우에 초기배의 발달속도가 생체에 비해 느린 것으로 알려져 있다. 이의 명확한 원인은 아직 완전히 밝혀져 있지 않지만 배양액의 조성(Cross 등, 1973; Kim 등, 1993, Tanu 등, 1991), 배양체계(Carid 등, 1989; Goto 등, 1992) 등이 영향을 미친다고 보여진다. 본 실험은 화학적 단순배양액인 CZB 배양액을 기초로 하여 3가지 체세포, 즉 소 난관상피세포단층(bovine oviductal epithelial cell monolayer, BOEC), 소 난구세포단층(granulosa cell monolayer, GCM) 및 생쥐 태아성 섬유아세포단층(mouse embryonic fibroblast cell monolayer, MEF)과의 공배양체계에서 소 난포란의 체외성숙 및 수정란의 초기배 발생능력을 검토하고 체외배양시 에너지급원으로 사용되는 탄수화물의 농도에 따른 발생효과를 검토하여 배양체계 개선의 기초자료로 활용코저 실시하였다.

실험방법 및 재료

1. 체외성숙

도살장에서 채취한 난소를 37℃의 생리적 식염수가 들어있는 보온병에 담아 실험실로 운반하여 세정한 후, 18G 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 직경 3~5mm의 난포로부터 난자를 흡입, 회수하였다. 난구세포가 균일하게 부착되어 있는 난자만을 골라 wash 배양액으로 3회, 20% 소 태아혈청이 첨가된 TCM199 배양액으로 3회 세정하여 난자배양시 우려되는 미생물에 의한 오염을 최소화하였다. 세정이 끝난 난자는 20% 소 태아혈청, 10 IU의 PMSG 및 hCG가 들어있는 TCM199 배양액에서 22~24시간 체외배양하였다.

2. 체외수정

난구세포가 확장된 난자만을 선별하여 hyaluronidase를 이용하여 난구세포를 제거한 후, 다시 3% sodium citrate로 처리하여 잔여 난구세포를 완전히 제거하였다. 처리가 끝난 난자를 Fert 배양액으로 3회 세정한 후, Fert 배양액 5 μ l당 난자 1개의 비율로 수정된 난자를 준비하였다.

체외수정을 위하여 동결정액을 37℃의 온수에 침지시켜 용해한 후, 45 및 90% Percoll 용액을 첨가하여 2,000 rpm에서 30분간 원심분리시켜, 90% Percoll용액층에 모아진 정자만을 회수하여 5~7ml의 Fert 배양액에 넣어 재부유시킨 후 800rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거하여 정자피막을 회수하였다. 2.5 μ l의 정자회석액을 난자가 들어있는 배양액적에 첨가하여 수정을 유도하였다(Florance 등, 1992).

3. 체외배양

체외수정 후 18~20시간 후에 투명대에 부착되어 있는 정자를 3% sodium citrate 처리로 제거한 후, wash 배양액으로 3회 세정하였다. 처리가 끝난 난자는 15% 소 태아혈청이 함유된 CZB 배양액을 이용하여 각각 BOEC, GCM 및 MEF와 공배양하였다.(수정 48시간 후에 난할율을, 240시간 후에 배발생율을 검토하였다.)

4. 공배양세포의 준비

1) 소 난관상피세포단층(BOEC)의 준비

부착되어 있는 지방 및 기타 결체조직을 모두 제거한 소 난관을 생리적 식염수로 5회 세정한 후 생리적 식염수가 들어있는 90mm Petri dish에 넣고 slide glass를 이용하여 smear하여 난관 내부의 상피세포를 추출하였다. 추출된 상피세포를 원심분리하여 세포피를 얻은 후, 미생물 오염을 방지하기 위해 wash 및 TCM199 배양액을 사용하여 각각 3회 및 2회 원심분리 방법으로 세정하였다. 세정이 끝난 소 난관 상피세포를 15% 소 태아혈청이 함유된 TCM199 배양액을 이용하여 50 μ l 배양액적을 만들

어 배양하였으며 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였다.

2) 소 과립막세포단층(GCM)의 준비

난자채취시 함께 채취된 과립막세포를 원심분리하여 세포괴를 얻은 후, wash 및 TCM199 배양액을 사용하여 각각 3회 및 2회 원심분리 방법으로 세정하였다. 세정이 끝난 과립막세포를 15% 소 태아혈청이 함유된 TCM199 배양액을 이용하여 50 μ l 배양액적을 만들어 배양하였으며 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였다.

3) 생쥐 태아성섬유아세포단층(MEFC)의 준비

수정 13.5일 된 생쥐 태아를 회수하여 이를 미세가위로 잘게 세절한 후, trypsin-EDTA용액이 담긴 flask에 넣고 이를 교반하여 생쥐 태아성섬유아세포를 회수하였다. 회수된 세포를 10% 소 태아혈청이 포함된 DMEM 배양액으로 3회 원심분리한 후, 동일한 배양액으로 50 μ l 배양액적을 만들어 배양하였다. 배양 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였다.

5. 에너지급원의 첨가

1) D-glucose의 첨가

Glucose가 첨가되지 않은 CZB 배양액을 대조구로 하여 여기에 D-glucose(Cat. No. 10117, BDH, U. K.)를 각각 5.55mM, 11.1mM 농도로 첨가한 실험구를 이용하여 D-glucose 농도에 의한 수정란의 초기배 발생을 검토하였다.

2) Na-pyruvate의 첨가

CZB 배양액에 기본적으로 함유되어 있는 Na-pyruvate 농도인 0.27mM을 대조구로 하여 여기에 Na-pyruvate(Cat. No. 44094, BDH, U.K.)를 최종 농도가 각각 0.5mM 및 1.0mM이 되도록 첨가하여 Na-pyruvate의 농도에 따른 수정란의 초기배 발생을 검토하였다.

6. 초기발생의 분석

수정후 48시간째에 2세포기 이상의 난자를 관찰하여 난할율을 계산하였으며, 배발달율은 수정후

240시간째에 상실배 이상의 난자로 계산하였다. 사진은 Nikon phase contrast microscope을 이용하여 기록하였다.

결과 및 고찰

1. 공배양 세포에 따른 발생능력 검토

많은 종의 동물에 있어서 체외발생 중 특정시기에 세포분열 중지현상이 일어난다고 보고되고 있는데, 생쥐 근교계에서는 2세포기, 돼지에서는 4세포기, 소에서는 8~16세포기에 이러한 현상이 발견되어진다. 이러한 세포분열 중지현상은 보조세포인 체세포를 이용하여 공배양하면 극복되어진다는 보고가 많은 연구자들의 실험결과에 의해 발표되었는데, 본 실험에서는 이러한 현상을 극복하기 위해서 BOEC(Eyestone 등, 1987; Goto 등, 1992), GCM(Goto 등, 1988), MEFC(Suemori 등, 1987)를 사용하였다.

위의 3가지 공배양세포를 사용하여 초기배의 발생율을 조사한 결과, 수정후 48시간째 조사한 난할율은 BOEC, GCM, MEFC와의 공배양의 경우, 각각 71.3, 56.7 및 38.8% 였으며, 수정후 120시간에 상실배 이상으로 발달한 초기배를 조사한 초기배 발달율은 각각 38.0, 0.0 및 37.5%로 나타났다(Table 1).

GCM과 공배양한 실험구의 경우 초기배발달율이 다른 실험구보다 저조하게 나타났는데, 이 결과는 기 보고된 논문(Aoyagi 등, 1990; Joanna 등, 1990)의 결과와 일치한다. GCM과 공배양한 경우, 초기 난할율은 타 실험구보다 높았음에도 불구하고 상실배 시기 이상의 초기배 발달율이 저조한 이유는 CZB 배양액내에서의 난구세포의 생존 적응성이 낮아, 공배양세포가 난자에 생리적 활성물질을 공급하지 못하였을 뿐만 아니라 오히려 해를 끼친 것으로 추정된다. 그러나 다른 실험구로부터 상대적으로 높은 수준의 상실배 및 배반포를 얻음으로써(Fig. 1), CZB 배양액을 기초 배양액으로 하여 탄수화물, 완충제, 단백질 및 성장인자와 같은 생리적 활성물질 등과 같은 구성분의 농도를 조절함으로써 이러한 물질의 첨가에 대한 효과를 검토할 수 있을 뿐만 아니라 배양액의 개선을 추구할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 1. Early development of bovine oocytes matured, fertilized *in vitro* in CZB medium

Co-culture system	No. of oocytes used	No. of embryos cleaved at 48h	No. of embryos developed to following stages at			
			48hpi ¹ (%)		240hpi ¹ (%)	
			2-cell	≥3-cell	Morula	Blastocyst
BOEC	645	460 (71.3)	159 (34.6)	301 (65.4)	83 (18.0)	92 (20.0)
GCM	141	80 (56.7)	60 (75.0)	20 (25.0)	—	—
MEFC	103	40 (38.8)	30 (75.0)	10 (25.0)	15 (37.5)	—

¹ hpi, hour postinsemination.

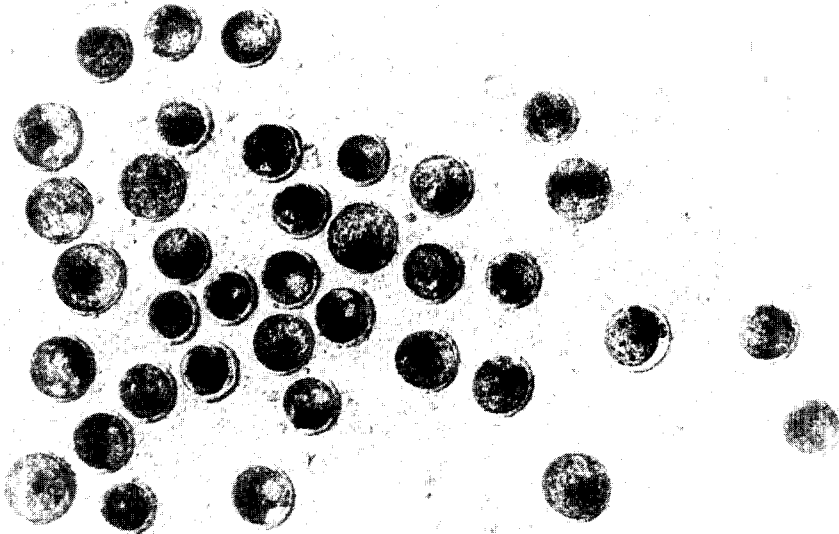


Fig. 1. Blastocysts produced *in vitro* using CZB medium.

2. 에너지 급원 첨가에 따른 발생능력 검토

첨가된 에너지 급원의 농도에 따른 체외발생을 검토한 결과 Na-pyruvate 첨가구의 경우 0.50mM 첨가구에서 제일 높은 난할율을 보였지만, 0.27mM 첨가구와 유의적인 차이는 없었다(Table 2). 한편, 기존에 보고된 바와 같이 상실배 이상의 배 발달율과 밀접한 관계가 있는 3세포 이상의 초기배 발달 비율은 0.50mM 첨가구의 경우가 57.5%로 가장 높은 발달율을 보였으며, 1.00mM 첨가구는 0.50mM 첨가구에 비해 약 2배 정도 낮은 초기배 발달율을 보였지만, 수정후 10일째 조사한 상실배 이상 발달율에 있어서는 44.6%로 다른 구에 비해 높은 발달

율을 보였다. 결과적으로 단순배양액에 첨가되는 Na-pyruvate의 농도는 비록 3세포 이상의 배발달율은 낮았지만, 상실배 이상 발달율의 경우 제일 높은 결과를 보이는 1.00mM이 적절한 것으로 나타났다.

CZB 배양액의 경우 glucose가 포함되어 있지 않지만, 혈청에 약 1.8mg/ml 농도의 glucose가 포함되어 있어 본 실험에 사용되어진 CZB + 15% FCS 배양액의 경우 약 0.24mg/ml의 glucose가 포함되어 있다고 추정할 수 있다. 또한 체세포와의 공배양시는 체세포의 생리대사를 위해 더 높은 농도의 glucose가 필요하므로 최종농도가 5.55 및 11.1mg/ml가 되도록 D-glucose를 첨가하여 효과를 검토하였다. 수정후 48시간째 관찰한 난할율의 경우 대

Table 2. The effects of Na-pyruvate and D-glucose on the early cleavage of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*

Treatment	mM	Exp.	No. of oocytes used	No. of embryos cleaved at 48h (%)	No. of embryos developed to following stages at			
					48hpi ¹ (%)		240hpi ¹ (%)	
					2-cell	≥3-cell	Morula	Blastocyst
Na-pyruvate	0.27	3	108	66 (61.1)	50 (75.8)	16 (24.2)	10 (15.2)	3 (18.7)
	0.50	3	70	45 (64.3)	19 (42.2)	26 (57.8)	7 (15.6)	8 (17.8)
	1.00	3	104	56 (53.9)	42 (75.0)	14 (25.0)	12 (21.4)	13 (23.2)
D-glucose	0.00	4	145	103 (71.0)	55 (53.4)	46 (46.6)	15 (14.6)	22 (21.4)
	5.55	4	147	93 (63.3)	52 (55.9)	36 (44.1)	12 (12.9)	21 (22.6)
	11.1	4	151	104 (68.9)	61 (58.7)	38 (41.3)	13 (12.5)	23 (22.1)

¹ hpi, hour postinsemination.

조구가 첨가구보다 높은 효과를 얻었지만, 유의적인 차이는 없었다. 상실배 이상까지의 배 발달율은 첨가구가 약간 높았으나 이 또한 유의적인 차이는 없었다(Table 2). 이 결과로 배 발생에 있어서 glucose농도는 크게 영향을 미치지 않음을 추측할 수 있다.

Kim 등(1993)은 pyruvate 농도가 1.0mM 보다 높을수록 배발생율이 감소하며 0.00~0.04mM 사이에서는 배발생율에 효과를 미치지 않는다고 보고하여, 본 실험의 결과와 유사하였다. Corss 등(1973)이 생쥐 난자를 대상으로 한 실험에서도 유사한 결과를 보여주었다.

Ellington 등(1990)은 CZB 배양액에 glucose를 첨가하지 않았을 경우, 첨가한 경우에 비해 높은 배반포 발생율을 보였다고 보고하였으며, Kim 등(1993)은 5.56mM 첨가시에 가장 높은 배 발달율을 얻었다고 보고하고 있어 본 실험의 결과와 유사하였다.

결론적으로 소 초기배와 체세포의 공배양시 BOEC와의 공배양이 가장 적절하였으며, 에너지원으로 첨가한 Na-pyruvate의 경우는 1.00mM이 가장 효과적이었고, D-glucose의 경우는 5.55mM의 첨가시 가장 좋은 결과를 얻기는 하였지만, 다른 실험구와 유의적인 차이는 없었다.

적 요

본 실험은 CZB와 같은 단순배양액내에서 배반포

의 발생을 보여 주어 이를 기초배양액으로한 개선된 배양액 체계를 선발하는 것이 가능함을 시사해 주었다.

1. 공배양체계에 있어서는 BOEC가 GCM, ME-FC 보다 높은 비율의 배발생율을 보였다.
2. Na-pyruvate 첨가구의 경우, 1.00mM 농도에서 배 발달율이 가장 높았다.
3. D-glucose 첨가구의 경우, 대조구 및 실험구간의 유의적인 차이가 없었다.

참고문헌

- Aoyagi Y, Fukuni Y, Iwazumi Y, Urakawa M and Ono H. 1990. Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, 34: 749-759.
- Carid E, Rexroad Jr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31: 105-113.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL and Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 86:679-688.
- Cross PC, Brinster RL. 1973. The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. *Exp. Cell. Res.*, 77:57-62.

- Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE and McGrath AB. 1990. 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.
- Eyestone WH, Vignieri J and First NL. 1987. Co-culture in early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology*, 27: 228 (Abstr.).
- Goto K, Kajihara S, Kosaka M, Koba 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.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y and Nakanishi Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
- Florence LH, Liu DY and Baker HWG. 1992. Comparison of percoll, mini-percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen sample. *Human Reprod.*, 7:261-266.
- Joanna EE, Edward WC, Pau, BF, Michael ES and Roberts HF. 1990. Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.*, 43:97-104.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates and amino acid on development of *in vitro* matured *in vitro* fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48:1320-1325.
- Suemori H and Nakasuji N. 1987. Establishment of the embryo-derived stem(ES) cell lines from mouse blastocyst : Effect of the feeder cell layer. *Dev. Growth & Differ.*, 29:133-137.
- Tanu P, Bavister BD. 1991. *In vitro*-matured / *in vitro* fertilized bovine oocytes can develop into morula / blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.