

## Synthetic oviduct fluid(SOF)를 이용한 소 수정란의 배양에 관한 연구

노상호 · 황우석 · 조충호  
서울대학교 수의과대학 산과학교실  
(1994년 11월 22일 접수)

### Studies on the culture of bovine embryos using synthetic oviduct fluid(SOF)

Sang-ho Roh, Woo-suk Hwang, Choong-ho Jo

Department of Theriogenology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
(Received Nov 22, 1994)

**Abstract** : The present study carried out to determine the developmental capacity of bovine oocytes matured in epidermal growth factor(EGF)-containing medium, the developmental competence of bovine embryos using synthetic oviduct fluid(SOF) and the effect of glucose on the development of bovine embryos.

In experiment 1, oocytes, obtained from abattoir ovaries, were matured in EGF-containing medium for 24 hours, followed by exposure to Korean native cattle spermatozoa for 18 hours and cultured by utilizing co-culture system with bovine oviduct epithelial cells(BOEC) in TCM199. In experiment 2, early bovine embryos were cultured in SOF with or without BOEC and compared with those in TCM199 with BOEC. In experiment 3, bovine embryos were cultured in the presence or absence of glucose. Seven and ten days after *in vitro* fertilization, developmental competence of embryos were evaluated.

The rate of cleavage was significantly( $P < 0.05$ ) higher in EGF-containing maturation medium(70.0%) than in control(57.7%). The rates of development to morulae and blastocysts were 30.6% and 23.3%, there was no significant difference between them. The rates of *in vitro* fertilized embryos to morulae and blastocysts cultured in SOF with BOEC(30.4%) and in TCM199 with BOEC(38.0%) were significantly( $P < 0.01$ ) higher than cultured in SOF without BOEC(13.4%) at seven days after *in vitro* fertilization. The rates of embryos to blastocysts cultured in SOF with BOEC(29.4%) and in TCM199 with BOEC(35.9%) were significantly( $P < 0.05$ ) higher than cultured in SOF without BOEC(13.4%) at ten days after *in vitro* fertilization. The rates of early embryos to morulae and blastocysts cultured in the presence or absence of glucose were 12.2% and 17.5% each other, there was no significant difference between them.

The results show that bovine oocytes matured in the presence of EGF can cleave better, SOF with BOEC can replace serum containing complex media, TCM199 with BOEC in bovine embryo culture and glucose have little effect on the culture of early bovine embryos.

**Key words** : bovine embryos, EGF, synthetic oviduct fluid, glucose

## 서 론

포유동물에 있어서 체외수정의 가능성이 Chang<sup>1</sup>에 의해 제시된 이후 최근 10여년간 산업동물인 소에서의 산자생산<sup>2</sup>과 더불어 체외성숙<sup>3</sup>, 정자의 수정능획득<sup>4</sup>, 토끼난관내에서 일시적 배양<sup>5</sup>, 난관상피세포<sup>6</sup> 및 난구세포<sup>7</sup> 등과의 공배양을 통한 *in vitro* block의 극복에 관한 연구등이 활발히 이루어져 왔다. 미성숙난포로부터 회수된 난자의 체외성숙과정중 핵막붕괴, 제 1극체방출 등은 정상적으로 나타나나 수정, 분할, 초기배발달은 상대적으로 성공률이 매우 낮은 상황으로 이러한 발육의 장애는 세포질성숙의 장애로 알려져있으며<sup>8,9</sup> 정상적인 수정과 이후의 발육을 위해 포유류난자의 성숙을 촉진시키는 난포내인자로서 성선자극호르몬과 각종성장인자들이 제시되었다<sup>10-13</sup>. 이중 상피성장인자(epidermal growth factor; 이하 EGF로 약함)는 난포내에서 난구세포로 둘러싸인 설치동물난자의 핵막붕괴를 촉진시킨다고 보고되었으며<sup>11,14</sup> 세포질성숙에 필요한 kinase의 활성화와 peptide잔유물의 이산화를 자극한다고 알려져있다<sup>15</sup>. 또한 최근에 소에서 EGF가 난자의 성숙을 증가시킨다는 견해도 있다<sup>16,17</sup>. 소수정란의 체외배양시 일반적으로 Ham's F10과 tissue culture medium 199(이하 TCM 199으로 약함)등의 상품화된 배양액에 혈청을 첨가한 complex media를 사용하고 있으나<sup>6,18,19</sup> 이러한 배양액으로는 배발달에 영향을 미치는 각종 요인들을 분석하는데 많은 어려움이 따르게 된다. 이러한 이유로 최근 혈청을 첨가하지 않은 단순합성배양액을 이용한 수정란의 체외배양이 제시되고 있다<sup>20-22</sup>. 많은 종류의 합성배양액이 혈청의 이온구성에 그 조성을 근거하고 있으나 난관을 비롯한 생식도관내의 환경은 이와는 상당히 다르다고 알려져 있다<sup>23,24</sup>. Tervit et al<sup>25</sup>은 면양난관내의 이온조성에 근거한 단순합성배양액인 synthetic oviduct fluid(이하 SOF로 약함)를 이용하여 면양의 수정란을 배양시 배반포로의 발육이 가능하다고 하였으며 Fukui et al<sup>26</sup>은 SOF내에서의 난관상피세포와의 공배양이 TCM199을 이용한 공배양보다 후기 배로의 발육성적이 높게 나타났다고 하였다.

한편, Chatot et al<sup>27</sup>은 에너지원으로 pyruvate, lactate, glutamine만을 함유한 배양액에서 mouse수정란의 cell-block현상을 극복할 수 있었다고 하였고 Takahashi와 First<sup>28</sup>는 소에서 상설시리기까지는 glucose의 이용률이 매우 낮다고 하였으나, Rieger<sup>29</sup>는 genomic activation이 일어난 후의 수정란에서는 glucose가 필수적이라고 하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 포유동물에서 미성숙난

자의 성숙배양시 EGF의 효과와 SOF와 같은 단순합성 배양액을 이용한 초기배의 배양에 관한 결과들이 보고되고 있으며 glucose가 초기배의 발육에 영향을 미친다는 결과 또한 여러 보문이 나와 있으나 아직까지 소수정란의 연구에 있어서는 그 이론이 확립되어 있지는 않은 실정이다.

이에 저자는 소에 있어서 미성숙난자의 성숙배양시 EGF첨가가 체외수정 및 발육에 미치는 영향을 조사하고, SOF를 이용한 초기배의 배양 및 glucose가 소초기배의 발육에 미치는 영향등을 알아보고자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

난포란의 채취 : 도축장에서 도살된 holstein종과 한우의 암소로부터 외과용 가위를 이용, 난소를 채취하여 100IU/ml의 penicillin과 100µg/ml의 streptomycin이 첨가된 30-35℃의 생리식염수에 보존후 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 난소는 38℃의 멸균된 생리식염수로 1회 세정하였다. 채취된 미성숙난자는 18 gauge 주사침이 부착된 주사기로 5%의 fetal calf serum(Flow laboratories Inc, Australia, 이하 FCS로 약함)이 첨가된 38℃의 TCM199(Gibco, USA)을 2ml정도 흡입한 후 직경 3-5mm의 소난포로부터 천자하여 채취하였다. 회수된 난포란은 Wiemer et al<sup>30</sup>의 기준에 준해 난구세포가 치밀하게 부착된 것만을 선별하여 사용하였다.

체외성숙 : 체외성숙용 배양액은 10% FCS첨가 TCM 199이 분주되어 있는 4-well dish(Nunc, USA)의 각각의 well내에 10ng/ml의 EGF(Boehringer Mannheim, Germany)를 첨가하여 전배양을 실시하였다. 선별된 난자는 각각의 well내에 10-15개씩 첨가하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 24시간동안 성숙배양하였다.

### 체외수정

정자의 처리 : 정액은 straw당 5×10<sup>7</sup>개의 정자가 들어있는 한우동결정액(축협중앙회 한우개량사업소)을 사용하였으며 기본배양액은 modified Tyrode-medium(이하 TALP로 약함)<sup>31</sup>을 사용하였다. 동결정액은 38℃ 수조에 30초간 침지하여 진탕용해시켰다. 수정능획득용 TALP(이하 sp-TALP로 약함)가 1ml씩 분주되어 있는 11×55mm의 plastic tube에 용해된 정액을 pasteur pipette을 이용하여 0.2ml씩 분주한 후 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 swim-up 과정을 1시간 동안 실시하였다. 각 시험

관의 상층액 약 0.8ml를 micropipette으로 흡입하여 정자를 하나의 원심관에 모아 원심분리하여(700g, 5분) 생존성있는 활력정자를 선별하였다. 원심분리후 상층액을 제거한 다음 새로운 sp-TALP를 2-3ml 보충해주는 방법으로 3회 세정을 실시하여 동결보호제 및 희석액을 제거하였다. 정자는 농도를  $1.0 \times 10^6$ 개/ml로 조정된 후 수정능획득을 위해 heparin(200 $\mu$ g/ml)을 포함한 sp-TALP를 동량 첨가하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기에 15분간 정치하였다.

난자의 준비 : 정자를 swim-up시키는 동안 수정용 TALP(IVF-TALP)로 35mm petri dish(Costar, USA)에 40 $\mu$ 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 $\mu$ l의 배지로 5개씩 각 미소적에 첨가하였다.

체외수정 : 정자는 heparin 처리후 동량의 sp-TALP를 혼합한 다음 준비된 난자의 미소적에 5 $\mu$ l씩 첨가하여 최종농도가  $2.5 \times 10^6$ 개/ml가 되도록 하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 18시간 동안 배양하여 체외수정을 실시하였다.

#### 체외배양

난관상피세포와의 공배양 : 난관상피세포는 난소표면에 출혈체를 보이거나 2g미만의 황체조직을 나타내는 초기황체기의 난관에서 관류법에 의해 난관상피세포를 채취하여 5% FCS첨가 TCM199으로 3회 원심분리(500g, 5분)하였다. 난관상피세포는 10% FCS첨가 TCM199이 0.5ml씩 분주되어 있는 24-well plate에 36-48시간동안 배양하여 난관상피세포의 monolayer를 작성하였다. 형성된 monolayer는 수정란과 함께 배양하기 3시간 이전에 배양액을 교환하여 부유하고 있는 잔존피사체들을 제거하고 평형시켰다. 수정란은 5% FCS첨가 TCM199으로 3회 세정한 후 각 well당 10-15개씩 첨가하여 배양을 실시하였다. 이후 수정란은 수정후 각각 7, 10일째에 후기배로의 발육률을 조사하였다.

SOF를 이용한 체외배양 : 위와 같이 작성된 난관상피세포 monolayer의 일부를 세정용 SOF를 이용, 3회 세정하여 plate내의 TCM199 배양액성분을 제거하였다. 배양용 SOF를 난관상피세포 monolayer가 작성된 well과 SOF단독배양에 사용할 여분의 well내에 0.5ml씩 분주하여 3시간 이상 전배양을 실시하였다. 수정란은 세정용 SOF로 3회 세정한 후 각 well당 10-15개씩 첨가하여 체외배양을 실시하였다. 각각의 실험군은 수정후 7, 10일째에 후기배로의 발육률을 조사하였다.

Glucose를 첨가한 배양액내에서의 초기배의 배양 : Glucose가 포함되지 않은 SOF와 glucose가 1.5mM 첨가된 SOF를 각각 24-well plate에 0.5ml씩 분주하여 소초기배의 배양에 공여하였다. 두 실험군 모두 수정후 7일째에 후기배로의 발육률을 조사하였다.

통계학적 분석 : 모든 실험결과치는 chi-square test를 실시하여 각 군간의 유의성을 검증하였다.

## 결 과

소난포란의 성숙배양시 첨가한 EGF의 효과와 단순 합성배양액인 SOF를 이용한 초기배의 배양, glucose가 후기배로의 발육에 미치는 영향 등을 조사하여 얻은 결과는 다음과 같다.

성숙배양시 첨가한 EGF가 수정후 분할과 발육에 미치는 영향 : 체외성숙시 EGF를 첨가한 군과 첨가하지 않은 대조군으로 나누어 분할율과 후기배로의 발육률을 조사한 결과, 2세포기 이상으로 분할된 수정란이 EGF첨가군에는 70.0%, 대조군에서는 57.7%로 나타나(Table 1), EGF첨가군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 분할율을 보였다(P<0.05). 또한 EGF첨가군과 대조군에서 수정후 7일째 재검사했을 때(Table 2) 배반포이상으로 발육한 수정란은 각각 30.6%, 23.3%로 나타나, 두군사이에 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 배양중인 수정란을 수정 후 10일째 재검사했을 때(Table 2) 배반포이상으로 발육한 수정란은 EGF첨가군과 대조군에서 각각 22.4%, 16.7%였고 부화배반포로는 각각 5.1%, 4.4%가 발육하였으며 두군사이에 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

SOF를 이용한 소초기배의 배양 : 체외수정후의 소초기배를 SOF단독배양 및 SOF와 TCM199에서 난관상피세포와의 공배양을 실시하여 수정후 7일째 발육률을 조사한 결과(Table 3), 상실배이상으로 발육한 수정란이 SOF단독배양군에서 13.4%, SOF에서의 난관상피세포와의 공배양군에서 30.4% 그리고 TCM199에서의 난관상피세포와의 공배양군에서 38.0%로 SOF단독배양군에 비해 다른 두군이 유의적으로 높은 발육률을 보였다(P<0.01). 배양중인 수정란을 수정후 10일째 재검사했을 때(Table 4), 배반포이상으로 발육한 수정란은 SOF단독배양군에서 13.4%, SOF에서의 난관상피세포와의 공배양군에서 29.4% 그리고 TCM199에서의 난관상피세포와의 공배양군에서 35.9%로 SOF단독배양군에 비하여 다른 다른 두군이 유의적으로 높은 발육률을 보였다(P<0.05). 이때 TCM199에서의 난관상피세

포 공배양군에서는 4.4%의 수정란이 부화배반포로 발육하였으나 SOF를 이용한 두군에서는 탈출한 배반포는 없었다.

Glucose가 소초기배의 발육에 미치는 영향 : 소초기배의 배양시 glucose를 첨가하여 배양을 실시하여 수정

후 7일째에 발육률을 조사한 결과(Table 5), 상실배이상으로 발육한 수정란은 glucose를 첨가하지 않은 군에서 17.5%, 첨가한 군에서 12.2%로 나타나 발육률에 있어서 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

Table 1. Development of *in vitro* fertilized oocytes matured in epidermal growth factor containing medium

Treatment	No of immature oocytes	No (%) of embryos cleaved	No (%) of embryos			
			≤16 cells	Mo**	Bl**	Mo≤/cleaved
EGF* +	140	98(70.0) <sup>a</sup>	68	20	10	30/98(30.6)
EGF -	156	90(57.7) <sup>b</sup>	69	12	9	21/90(23.3)

\* EGF=epidermal growth factor, \*\* Mo=morulae, Bl=blastocysts

• *In vitro* fertilized embryos cultured in TCM199 with bovine oviduct epithelial cells.

• Embryos were examined seven days post-insemination.

a,b: Different superscripts in the same column denote significant differences(P<0.05).

Table 2. Development to blastocyst stage of bovine embryos cultured in TCM199 with bovine oviduct epithelial cells

Treatment	No of embryos examined	No (%) of blastocysts			
		Early Bl**	Expanded Bl	Hatching/hatched Bl	Total
EGF* +	98	7	10	5(5.1)	22(22.4)
EGF -	90	5	6	4(4.4)	15(16.7)

\* EGF=epidermal growth factor, \*\* Bl=blastocysts

• Embryos were examined ten days post-insemination.

Table 3. Development of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid with/without bovine oviduct epithelial cells

Culture system	No of embryos examined	No (%) of embryos		
		2-8 cells	9-16 cells	Mo*** ≤
SOF*	82	58	13	11(13.4) <sup>a</sup>
SOF+BOED**	102	52	29	31(30.4) <sup>b</sup>
TCM199+BOEC	92	42	15	35(38.0) <sup>b</sup>

\* SOF=synthetic oviduct fluid, \*\* BOEC=bovine oviduct epithelial cells, \*\*\* Mo=morulae

• Embryos were examined seven days post-insemination.

a,b: Different superscripts in the same column denote significant differences(P<0.01).

**Table 4.** Development to blastocyst stage of bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid with/without bovine oviduct epithelial cells

Culture system	No of embryos examined	No (%) of blastocysts			
		Early BI***	Expanded BI	Hatching/hatched BI	Total
SOF*	82	4	7	0(0.0)	11(13.4) <sup>a</sup>
SOF+BOEC**	102	8	22	0(0.0)	30(29.4) <sup>b</sup>
TCM199+BOEC	92	9	20	4(4.3)	33(35.9) <sup>b</sup>

\* SOF=synthetic oviduct fluid, \* BOEC=bovine oviduct epithelial cells,

\*\*\* BI=blastocysts

• Embryos were examined ten days post-insemination.

a,b: Different superscripts in the same column denote significant differences(P<0.01).

**Table 5.** Development of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid with/without glucose

Culture system	No of embryos examined	No (%) of embryos				
		2-8 cells	9-16 cells	Mo**	BI***	Mo≤/examined
SOF*	80	52	14	8	6	14/80(17.5)
SOF+ glucose	82	66	4	7	3	10/82(12.2)

\* SOF=synthetic oviduct fluid, \*\* Mo=morulae, \*\*\* BI=blastocysts

• Embryos were examined seven days post-insemination.

• Glucose concentration : 1.5mM

## 고 찰

설치류에서 여러 성장인자 중 EGF가 난자의 성숙에 영향을 미친다는 보고<sup>14</sup> 이후 Downs<sup>11</sup>는 특히 EGF가 난구세포에 둘러싸인 마우스난자에서 완전한 핵막붕괴를 유발시키는 유일한 성장인자라고 하였으며 Schultz<sup>15</sup>는 제1극체탈출을 포함한 세포질성숙에 EGF가 관여한다고 하였다. 또한 Coskun et al<sup>16</sup>은 소난포란의 체외성숙시 첨가한 EGF가 체외성숙을 유도하여 이후 수정 및 발육에 영향을 미친다고 하였다. 본 실험에서 난포란의 체외성숙시 EGF를 첨가하여 분할 및 발육률을 조사한 결과 성숙배양시 EGF를 첨가한 군(70.0%)이 첨가하지 않은 군(57.7%)에 비하여 유의적으로 높은 분할률을 나타내었다

(P<0.05).

이와 같은 결과는 동량(10ng/ml)의 EGF를 첨가하여 체외수정을 및 발육률을 조사한 Coskun et al<sup>16</sup>의 68%와 유사한 성적이었으며 단순합성배양액내에서 체외성숙을 실시한 Park과 Lin<sup>17</sup>의 보고와도 동일한 경향을 나타내었다. 체외수정후 7일째 분할란의 상실배이 후로의 발육률은 EGF첨가군과 첨가하지 않은 군이 각각 30.6%, 23.3%로 두군간의 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 이와 같은 발육성적은 같은 배양액인 10% FCS첨가 TCM199을 사용한 Fukui와 Ono<sup>32</sup>의 16.5% 보다는 높은 수준이었으나 역시 동일한 조건에서 실시한 Xu et al<sup>33</sup>의 54.8%에 비해서는 낮은 수준이었다. Coskun et al<sup>16</sup>의 경우 체외성숙시 첨가한 EGF가 수정

및 분할과 그 이후의 발육에 영향을 미친다고 하였으나 이 때 사용한 체외성숙용 배양액은 혈청을 첨가하지 않은 합성배양액으로 본 실험에서 사용한 혈청이 첨가된 complex media는 혈청내에 EGF를 포함한 여러 성장인자들이 미량씩 존재하고 있기 때문에 이러한 효과가 뚜렷이 나타나지 않은 것으로 생각된다. EGF의 뚜렷한 효과를 보기 위해서는 혈청을 배제한 합성배양액을 이용하여 배양하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 수정후 10일째 재검사한 결과 부화배반포로의 발육률은 EGF를 첨가한 군에서 5.1%, EGF를 첨가하지 않은 군에서 4.4%로 나타나 상실배이후로 발육한 수정란의 대부분이 본 실험과 동일한 시기에 부화배반포로 발육한 Xu et al<sup>33</sup>에 비하여 현저히 낮은 결과를 보여 배반포이후 수정란을 배양하기 위해서는 배양방법의 개선이 있어야 할 것으로 생각된다.

일반적으로 난포란 및 소수정란을 배양할 때 TCM 199과 같은 상품화된 세포배양액을 사용하여 왔으나 대부분 고농도의 amino acids, vitamin, 각종 보조인자들을 함유하여 그 조성이 복잡하고 또한 혈청을 첨가하여 사용하기 때문에 난자의 성숙, 수정란의 발육 등에 영향을 미치는 인자들을 조사하는 데에는 많은 어려움이 있게 된다<sup>17</sup>. 특히 각종 체세포와의 공배양시 혈청이 첨가된 배양액에서는 혈청내에 존재하는 미량의 각종 성장인자들로 인하여 공배양에 공여한 체세포로부터 분비되는 미확인 성장인자 및 배양과정시 생기는 중간산물을 검출해 내기가 쉽지 않다<sup>20</sup>. 본 실험에서는 면양의 난관내 이온조성에 근거하여 pyruvate, lactate 등 최소한의 에너지원과 혈청을 대신하여 bovine serum albumin(이하 BSA로 약함)을 포함한 단순합성배양액인 SOF<sup>25</sup>를 이용하여 난관상피세포와의 공배양 및 SOF 단독배양을 실시하였다. BSA 또한 미량의 성장인자들을 함유하고 있으나 혈청에 비하여는 비교적 순수하다고 알려져 있다.

체외수정후의 초조기배를 SOF 및 SOF에서 난관상피세포의 공배양을 실시하여 수정후 7일째에 상실배이후로의 발육률을 조사한 결과 각각 17.1%, 29.4%의 발육률을 나타내어 공배양을 실시한 군에서 유의적으로 높은 발육률을 보였다( $P < 0.01$ ). 대조군으로 사용한 TMC199에서의 난관상피세포 공배양군은 SOF 단독배양군에 비하여 유의적으로 높은 발육률을 보였으나 ( $P < 0.01$ ). SOF에서의 공배양군과는 발육률에 있어서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 5% CO<sub>2</sub> 배양기 환경하에서 10% FCS 첨가 SOF 및 TCM199 내에서의 난관상피세포 공배양군이 공배양을 실시하지 않은 군에 비하여 높은 배반포로의 발육을 보였다는 Fukui et

al<sup>26</sup>의 보고와 유사하였으나 Fukui et al<sup>26</sup>의 경우 SOF에서의 공배양군이 유의적으로 가장 높은 발육성적을 보여 본 실험과는 일치하지 않는 결과였다. 본 실험에서는 단백질원으로 혈청 대신 BSA를 사용하였기 때문에 혈청내에 존재하는 것으로 알려진 각종 미확인 성장인자들이 결여되어 있어 수정란 및 공배양한 세포들의 성장이 제한을 받아 일어난 결과라고 여겨진다. 한편 SOF에 BSA를 첨가하여 단독배양을 실시한 Takahashi와 First<sup>26</sup>의 보고에서는 수정후 5일째 1세포기에서 상실배로의 발육률이 24.5%로 나타나 수정후 7일째 17.15의 후기배로의 발육률을 나타낸 본 실험에 비하여 상대적으로 높은 경향을 보였다. Fukui et al<sup>26</sup>은 5% CO<sub>2</sub>의 혼합gas 및 human serum(이하 HS로 약함)을 사용, 배양하여 각종 체세포와 공배양을 실시하지 않고도 높은 후기배로의 발육성적을 보였는데 이러한 결과는 초조기배의 활발한 혐기성 대사와 HS 내의 각종 미확인 성장인자에 기인한다고 하였다. 본 실험에서는 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기하에서 실험을 실시하여 O<sub>2</sub>의 수준이 높았고 HS를 대신하여 BSA를 사용하였기 때문에 SOF단독배양의 경우 성적이 현저히 떨어진 것으로 생각되어 산소분압을 낮추어 배양을 실시해야 할 것으로 생각된다. Ellington et al<sup>30</sup>은 체내에서 회수한 1-2세포기의 소수정란을 이용하여 혈청 대신 BSA를 함유한 단순합성배양액인 Chatot, Ziomek, Bavister medium(이하 CZB로 약함)내에서 난관상피세포와 공배양을 실시하여 높은 후기배로의 발육성적을 얻었다. 그러나 수정란의 발육과는 관계없이 이 때 작성된 난관상피세포 monolayer는 약 72시간후에 급격히 변성되었는데 이것은 CZB내에 혈청 또는 glucose가 존재하지 않기 때문이라고 하였다. 유사한 합성배양액인 SOF에 BSA를 첨가하여 실시한 본 실험에서는 난관상피세포 monolayer 작성후 96시간 전후로 세포들이 괴사되기 시작하여 시간상의 차이는 있으나 동일한 현상을 보였다. 수정후 10일째 후기배로의 발육률을 조사한 결과 배반포로의 발육률은 SOF 단독배양군과 난관상피세포 공배양을 이용한 군에서 각각 17.1%, 29.4%를 나타내어 난관상피세포 공배양을 이용한 군이 유의적으로 높았으나 이 시기에 정상적으로 나타나야 할 부화배반포는 SOF를 이용한 두 군에서는 존재하지 않았다. 이는 glucose 및 혈청의 부재에 의한 배반포시기의 에너지원 부족 및 난관상피세포의 조기변성에 의한 것으로 생각된다<sup>20,34</sup>.

소수정란의 배양시 사용하는 배양액은 대부분 glucose를 함유하고 있으며 일반적으로 에너지원으로서 유용할 것으로 생각되어 왔다. 그러나 최근 설치류에서 초기배의 배양시 glucose가 *in vitro* block에 관여하는 등 좋은 영향을 미치지 못한다는 보고<sup>27</sup> 및 유전자의 활

성화가 시작되어야 glucose가 필수적으로 이용된다는 보고<sup>29</sup>등 수정란의 에너지원 중 glucose의 역할에 대한 다양한 견해들이 제시되고 있다.

단순합성배양액인 SOF와 SOF에 glucose를 첨가하여 체외수정유래 소초기배를 배양, 수정후 7일째에 후기배로의 발육률을 조사한 본 실험에서는 glucose를 첨가하지 않은 군이 17.5%, glucose를 첨가한 군이 12.2%로 나타나 두군사이에 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 이는 상실배까지의 배발육에 glucose가 관여하지 않는다는 Takahashi와 First<sup>28</sup> 및 8세포기이전의 소초기배의 경우 glucose가 첨가되지 않은 배양액이 효과적이라는 Ellington et al<sup>20</sup>의 결과와는 유사하였으나 초기배의 발육에 glucose가 필수적이라고 한 Matsuyama<sup>34</sup>와는 차이를 보였다. 수정란의 체외배양시 일반적으로 사용하는 5.56mM의 glucose는 FCS내의 glucose농도에 그 근거를 두고 있다<sup>28</sup>. 그러나 이러한 고농도의 glucose는 소수정란의 배양시 8-16세포기의 *in vitro* block을 유발하는 주요원인의 하나로 알려져 있어 SOF와 같은 합성배양액에서는 면양난관내의 glucose 농도에 근접한 1.5mM 정도로 그 수준을 낮추어 사용하고 있다<sup>34</sup>. 본 실험에서도 위의 사실들에 근거하여 1.5mM의 glucose를 첨가하여 배양을 실시하였으나 에너지원으로 pyruvate 및 lactate만을 사용한 군과 발육률에 있어서의 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과로 보아 EGF는 체외성숙을 유도하여 이후의 체외수정 및 분할에는 영향을 끼치나 체외성숙시 첨가한 EGF가 분할란의 후기배까지의 발육에는 영향을 미치지 못하는 것으로 생각되며 소수정란의 난관상피세포에 단순합성배양액인 SOF가 혈청이 첨가된 complex media인 TCM199를 대신하여 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 이러한 단순합성배양액을 사용하여 최적배양환경을 규명하거나 혈청이 첨가되지 않은 배양액내에서 공배양에 사용되는 각종 체세포의 미확인 성장인자를 분석하는 등 심도깊은 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다. 소수정란의 초기배양시에는 glucose를 제외한 pyruvate 및 lactate만으로도 배양이 가능한 것으로 생각되나 소수정란의 각각의 발육단계에 미치는 영향을 알아보기 위해서는 첨가농도 및 첨가시기를 달리하는 등의 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

미성숙난자의 성숙배양시 첨가한 EGF가 체외수정

및 발육에 미치는 영향을 조사하고 단순합성배양액인 SOF를 이용한 초기배의 배양 및 glucose가 소초기배의 발육에 미치는 영향을 조사하기 위해 실시한 실험결과는 다음과 같았다.

1. 성숙배양시 EGF를 첨가한 군의 난자가 첨가하지 않은 군에서보다 수정후 유의적으로 높은 분할률을 나타냈으나, 이후 발육에 있어서의 유의성은 인정되지 않았다( $P<0.05$ ).

2. 소초기배를 SOF, SOF+BOEC 및 TCM199+BOEC로 배양하여 수정후 7일째에 발육률을 조사한 결과, SOF+BOEC와 TCM199+BOEC 배양군이 SOF 단독배양군에 비해서 유의적으로 높은 후기배로의 발육률을 보였다( $P<0.01$ ).

3. 수정후 10일째에 배반포이상으로 발육한 수정란을 조사한 결과, SOF+BOEC와 TCM199+BOEC 배양군이 SOF 단독배양군에 비해 유의적으로 높은 발육률을 보였다( $P<0.01$ ).

4. 배양액내의 glucose가 초기배의 발육에 미치는 영향을 조사한 결과 두군사이에 유의적인 차이는 인정되지 않았다( $P<0.05$ ).

이상의 결과로 보아 EGF가 소난자의 체외성숙을 유도하여 이후 수정 및 초기분할에 영향을 미치는 것으로 생각되며 단순합성배양액인 SOF에서의 난관상피세포와의 공배양은 혈청을 첨가한 complex media인 TCM199에서의 난관상피세포와의 공배양을 대신하여 소수정란의 체외배양에 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 glucose는 소초기배의 발육에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Chang MC. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature* 1959; 184: 466-467.
2. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, et al Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982; 27: 147-158.
3. Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, et al. First NL. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod*. 1986; 35: 850-857.
4. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25: 591-600.

5. Boland MP. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 1988; 21: 126-137.
6. Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert* 1989; 85: 715-720.
7. Goto K, Kajihara S, Kosaka M, et al. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes *J Reprod Fert* 1988; 83: 753-758.
8. Leibfried-Rutledge ML, Bavister BD. Fertilizability of *in vitro* matured oocyte from golden hamster. *J Exp Zool* 1986; 226: 481-485.
9. Fleming AD, Evans G, Walton EA, et al. Developmental capability of rat oocytes matured *in vitro* defined medium. *Gamete Res* 1985; 12: 255-263.
10. Herrler A, Lucas-Hahn A, Nieman H. Effects of insulin-like growth factor-I on *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 1992; 37: 1213-1224.
11. Downs SM. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol Reprod* 1989; 41: 371-379.
12. Fukushima M, Fukui Y. Effect of gonadotrophins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 1985; 9: 323-332.
13. Shalgi R, Dekel N, Kraicer PF. The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*. *J Reprod Fert* 1979; 55: 429-435.
14. Dekel N, Sherizly I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 1985; 116: 406-409.
15. Schultz RM. Role of protein phosphorylation in meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*. *ANN NY Acad Sci* 1988; 541: 219.
16. Coskun S, Sanbuissho A, Lin YC, et al. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor(EGF). *Theriogenology* 1991; 36: 485-494.
17. Park YS, Lin YC. Effect of epidermal growth factor(EGF) and defined simple media on *in vitro* bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology* 1993; 39: 475-484.
18. Goto K, Kajihara Y, Koba M, et al. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. *J Anim Sci* 1989; 67: 2181-2185.
19. Wright RW, Bondoli KR. Aspect of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J Anim Sci* 1981; 53: 702-729.
20. Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, et al. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol Reprod* 1990; 43: 97-104.
21. McLaughlin KJ, McLean DM, Stevens G, et al. Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. *Theriogenology* 1990; 33: 1191-1199.
22. Walker SK, Heard TM, Seamark RF. *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture: success and perspectives. *Theriogenology* 1992; 37: 111-126.
23. Bavister BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 1988; 29: 143-154.
24. Gandolfi F, Brevini, TAL, Moor RM. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fert Suppl* 1989; 38: 107-115.
25. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fert* 1972; 30: 493-497.
26. Fukui Y, McGowan LT, James RW, et al. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fert* 92: 125-131.
27. Chatot CL, Ziomek, CA, Bavister BD, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro* *J Reprod Fert* 1989; 86: 679-688.
28. Takahashi Y, First NL. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins.



- Theriogenology* 1992; 37: 963-978.
29. Rieger D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology* 1992; 37: 75-94.
  30. Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, et al. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol Reprod* 1991; 30: 330-338.
  31. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171-1180.
  32. Fukui Y, Ono H. 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* 1989; 86: 501-506.
  33. Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, et al. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J Reprod Fert* 1992; 94: 33-43.
  34. Matsuyama K, Miyakoshi H, Fukui Y. 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* 1993; 40: 595-605.