

한우 난포란을 이용하여 생산된 체외수정란의 동결 융해후 Gastrulation으로의 체외발생능에 관한 연구

이명식 · 장원경 · 오성종 · 양보석 · 박수봉 · 백광수 · 정진관 · 박용운

축산기술연구소

Developmental Ability of Bovine Embryos Matured and Fertilized *In Vitro* after Freezing and Thawing to Gastrulation

Lee, M. S., W. K. Chang, S. J. Oh, B. S. Yang, S. B. Park, K. S. Baek,

J. K. Jung and Y. Y. Park

National Livestock Research Institute

SUMMARY

This experiment was carried out to investigate the developmental ability of bovine embryos matured and fertilized in vitro to the gastrulation stage. The bovine oocytes were collected from 2~5mm follicles, matured for 20~24hrs in 5% CO₂ incubator and then fertilized with frozen-thawed semen. On day 9 after IVF and after freezing and thawing the hatching abilities of expanding blastocysts were examined. Cleavage rate and production rate to expanding blastocysts were 59.7%(955/1604) and 20.7%(333/1604), respectively. Hatching rate of day-9 expanding blastocysts was 54%(40/74), that after freezing and thawing was 56%(79/141). Also, developmental ability of hatched blastocysts to the primitive streak stage was 26%(6/23).

Key words: Bovine, IVF embryos, frozen-thawed embryos, hatch, primitive streak stage.

I. 서 론

소의 체외수정란 생산이 Voelkel 등(1992)은 uterine cell를, Hawk 등(1994)은 Buffalo rat Liver와 oviduct epithelial 세포를, Goto 등(1988)이 cumulus cells와의 공배양 등 여러가지 종류의 체세포를 이용한 체외수정란 생산체계가 발표되면서 일반화되었고 아울러 생산된 체외수정란을 이용하여 수정란 동결 보존 방법이 개발되기 시작하였다.

가장 먼저 실효를 거둔 동결법은 glycerol을 이용한 다단계 평형법이었고 식빙을 하지 않고 평형 직후 -196℃ 액체질소에 보존하는 초자화 동결법으로도

높은 생존성이 가능하게 되었다(Tackikawa 등, 1993; Takagi 등, 1994). 그러나 이러한 방법들은 수정란 이식시 숙련된 기술자와 복잡한 처리단계로 인하여 커다란 장애요인이 되었으나, 최근에 이르러서는 이식시에 인공수정과 같이 융해후 그대로 이식하는 직접 이식법이 개발되었다(Suzuki 등, 1993; 오 등, 1995). 한편 직접이식법은 융해후 수정란의 관찰없이 이식하므로 질 관장이 불가능한 단점이 있으므로 실험실내 배양을 통하여 생존율과 동결전의 형태로 회복하는데 필요한 시간을 조사하고 계속적 배양을 통하여 탈출배반포 및 착상전 시기로의 발생 가능성을 구명코자 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 확장 배반포배의 생산

한우 암소의 난소 표면에 돌출되어 있는 직경 2~5 mm의 가시난포로부터 흡입 채란하여 난구세포층의 부착 여부에 관계없이 세포질이 균일한 난자들을 공시하였고, 체외성숙 배양액은 TCM199(Gibco, USA)에 5% FCS와 1% antibiotic antimycotic(Sigma, USA) 용액을 넣어 0.22 μ m millipore filter(Gelman, USA)로 여과한 후 400 μ l 소적에 70~80개 난포란을 넣어 20~24시간 동안 5% CO₂배양기에서 배양하여 성숙시켰다.

체외수정액은 B.O.액에 caffeine 2.5mM과 heparin 10 μ g/ml을 첨가하였고 정자농도를 1~2 \times 10⁶/ml로 조절한 후 100 μ l 소적에 15~20개의 성숙 난포란을 넣어 6시간 수정한 후 난포란 성숙에 사용하였던 TCM 199으로 옮겨 36시간 배양하였다. Day-2 수정란을 난포란 유래 난구세포와 공배양하여 TCM 199과 CR1aa에서 각각 Day-9까지 배양하여 확장 배반포를 생산하였다.

2. 수정란의 동결 및 융해

Embryo transfer freezing medium(Gibco, USA)에 20% FCS를 첨가하였고, 항동해제는 ethylene glycol(Sigma, USA)을 1.8M 농도로 하여

20~25 $^{\circ}$ C의 상온에서 10분간 평형한 후 0.25ml의 straw당 1개의 확장배반포배를 주입하였으며 -7 $^{\circ}$ C의 에틸알콜 수조에 넣고 2분 정치한 후 straw 상단에 식빙을 시켰으며 5분 후에 식빙 형성 여부를 확인하여 수정란 부위까지 ice formation이 이루어졌을 때 -31 $^{\circ}$ C까지 분당 0.3 $^{\circ}$ C씩 하강시켰고 이어서 -196 $^{\circ}$ C 액체질소에 보존하였다.

한편 동결보존된 수정란의 융해는 -196 $^{\circ}$ C 액체질소에서 꺼내어 공기 중에서 7~10초 동안 기화시킨 후 20 $^{\circ}$ C의 수조에 넣어 10~15초 동안 융해하였다.

3. 융해된 확장배반포의 체외배양

융해된 확장배반포는 이식시 자궁에서 항동해제가 희석되었듯이 체외에서도 sucrose액을 써서 직접적인 항동해제 제거를 하지 않았고 1.5ml-TCM 199액에서 3회 세척한 후 동 배양액으로 미리 준비된 cumulus monolayers 및 embryos 유래 fibroblast monolayers와 공배양하여 blastocoel의 재형성, 탈출배반포 및 primitive streak stage로의 발생을 유도하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 확장배반포 및 부화 배반포배의 발생

확장배반포배의 생산성적 및 부화배반포배의 발생율을 Table 1과 Table 2에서 보는 바와 같다.

TCM 199에서 확장배반포배 생산율은 19.1%로써

Table 1. Percentage of transferable expanding blastocysts cultured under different media

Treatment	No. of oocytes examined	Trials	No. of oocytes cleaved(%)	No. of expanding blastocysts(%)
M-199	861	8	494(57.3)	165(19.1)
CR1aa	743	8	461(62.0)	168(22.6)
Total	1,604	8	955(59.5)	333(20.7)

Table 2. Hatching rate of day-9 expanding blastocysts cultured under different media

Treatment	No. of Ex-BL used	Replicates	No. of hatched embryos(%)
M-199	38	3	25(65.7)
CR1aa	36	3	15(41.6)
Total	74	3	40(54.0)

* Ex-BL : expanding blastocyst

Glucose free-CR1aa에서의 22.6%보다 낮은 반면에 탈출배반포로서의 발생은 65.7%로써 CR1aa의 41.6% 보다 높은 경향이 나타났다.

Chatot 등(1989)은 Mouse에서 배양액내 Glucose의 존재는 초기배의 발달에 유해하며 "2-cell block"를 야기한다고 하였으며, Hernandez 등(1993)이 소에서 TCM199과 Glucose free-CZB를 비교시험하였을 때 입증한 바와 같이 TCM199에 존재하는 glucose의 대사장애요인으로 다소 성적이 낮은 것으로 사료된다.

2. 확장 배반포배를 동결융해한 후 탈출 배반포로의 발생

Day-9 확장배반포배를 동결보존한 후 융해하여 생존율과 발생능을 조사한 결과는 Table 3과 Table 4에서 보는 바와 같다.

동결융해후 생존율과 탈출배반포율은 75.1%(106/141)와 56%(79/141)로써 Han 등(1994)이 같은 TCM199 배양액에서 생산한 A급과 B급의 수정란의 생존율 88.2%(30/34)와 73.5%(25/34)보다 다소

낮은 성적을 얻었는데 이는 본 시험에서 Day 7, Day 8에 생산한 수정란은 이식에 사용하였고 Fig. 1에서 보는 바와 같이 Day 9에 생산된 수정란을 공시하였으므로 수정란 질에 따른 영향으로 사료된다.

융해후 TCM199 배양에서 생존율과 탈출배반포율이 각각 78.3%(58/74)과 58.1%(43/47)로써 glu-

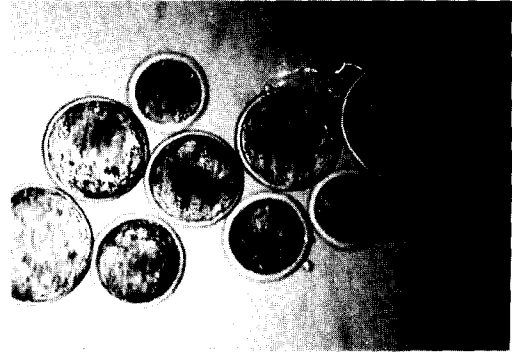


Fig. 1. Day-9 expanding blastocysts before freezing. $\times 100$

Table 3. Survival rate of day-9 expanding blastocysts produced under different media after cryopreservation

Treatment	No. of used Ex-BL	Replicates	No. of Ex-BL reforming blastocoel(%)	No. of hatched embryos(%)
M-199	74	7	58(78.3)	43(58.1)
CR1aa	67	7	48(71.6)	36(53.3)
Total	141	7	106(75.1)	79(56.0)

* Ex-BL : expanding blastocyst

Table 4. *In vitro* Reforming times of blastocoel after cryopreservation by 1.8M ethylene glycol and thawing as Day-9 expanding blastocysts

Stage and No. of embryos used	Culture after thawing (hrs)	No. of reformed embryos with blastocoel				No. of reformed embryos completely(%)	No. of hatched embryos(%)
		to 25% (%)	to 50% (%)	to 75% (%)	to 100% (%)		
Expanding blastocysts	12	4(11.4)	1(2.8)	-	-		
	24	7(20.0)	9(25.7)	4(11.4)	6(17.1)	26(74.2)	23(65.7)
	36	3(8.5)	7(20.0)	10(28.5)	6(17.1)		
35	48	4(11.4)	2(5.71)	3(8.5)	26(74.2)		

cose-free CRLaa의 71.6(48/67)과 53.3%(36/67)보다 다소 높았던 것은 Kim 등(1993)의 실험에서 glucose 5.56mM 첨가구에서 후기배의 발생이 27%(18/67)로써 가장 높았듯이 후기 배발달에 있어서, 특히 탈출배반포배 발생에 glucose가 함유된 TCM 199이 적합하였다. 배반포강 회복에 있어서 Fig. 2와 같이 용해후 48시간이 경과했을때 동결전의 형태로 원상회복되는 결과는 직접이식 동결법의 문제점으로 생각되며, 따라서 이식시 recipients의 발정동기화를 1~2일 앞당겨 주어야 바람직할 것으로 사료된다.

3. 탈출 배반포배의 착상전시기로의 발생

탈출배반포배의 체외배양결과는 Table 5에서 보는 바와 같이 3일 이상 발생율은 82.6%(19/23), 6일 이상 발생율은 69.5%(16/23)로써 시간이 경과함에 따라 생존율이 떨어졌으며 생존한 수정란 Fig. 3과 같이 blastocoel이 급속히 증가되면서 육안으로 식별이 가능했으나, 사멸한 탈출배반포배는 trophoctoderm이 위축되면서 급속히 퇴화되었다.

Gastrulation stage로의 발생율은 26%(6/23)로써 Fig. 4에서 보는 바와 같으며 Tam 등(1980)이

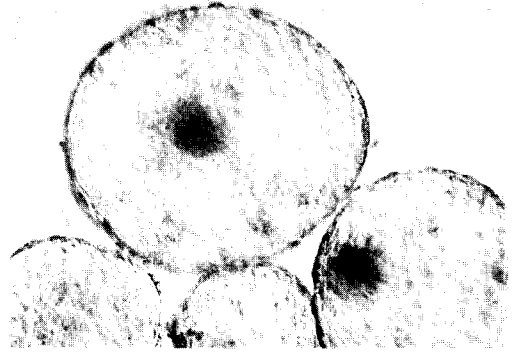


Fig. 3. Hatched blastocyst 3 days of culture after hatching. $\times 100$

mouse에서 체외배양을 했을때 체내시기보다 발생이 지연되었고 glucose함량이 높은 waymouth's나 DMEM에서 발생이 가능하다고 했듯이, 본 연구에서도 glucose-free CRLaa보다 TCCM199에서 발생이 가능하였다(Unpublish data).

Hogan 등(1994)은 mouse에서 gastrulation은

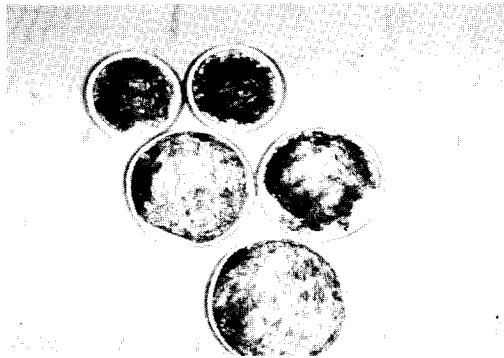


Fig. 2. Expanding blastocysts after 24h of culture after thawing. $\times 100$

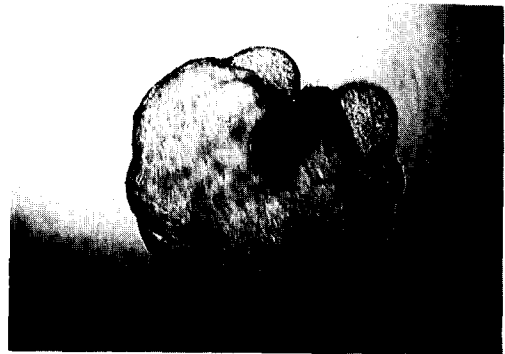


Fig. 4. Primitive-streak stage 8 days of culture after hatching. $\times 40$

Table 5. Developmental ability of hatched blastocysts to gastrulation stage

No. of hatched embryos	Trials	No. and(%) of embryos develop to		
		>3-days	>6-days	Gastrulation stage
23	3	19(82.6)	16(69.5)	6(26.0)

embryonic-extraembryonic junction에 위치한 epiblast 부분에 primitive streak forms이 나타날때 개시된다고 하였으며 Day 6.5라고 하였다. 그러나 본 시험에서와 같이 소의 체외수정 유래 수정란의 동결융해 후 발생연구는 거의 시도되지 않았고 문헌적인 근거 또한 찾아보기 어려웠으므로 조직학적, 전자현미경적으로 좀더 세밀하게 연구를 추진해야 할 것으로 사료된다.

IV. 적 요

한우 체외수정란의 동결융해후 gastrulation stage로의 체외발생능을 조사하고자 수행하였다. 한우 난포란을 20~24시간 체외성숙시킨 후 동결정액으로 체외수정 하였으며 Day-9 확장배반포의 탈출배반포로의 발생을 및 동결융해후의 발생시험을 한 결과, 난할율은 59.7%(955/1604)였으며 확장배반포율은 20.7%(333/1604)였다. Day-9 확장배반포의 부화율은 54%(40/74)였으며, 동결융해후의 부화율은 56%(79/141)였다. 한편 탈출배반포의 primitive streak stage로의 발생율은 26%로써 동결체외수정란의 체외 발달 가능성이 입증되었다.

V. 인용문헌

1. Brigid Hogan, Rosa Beddington, Frank Costantini and Elizabeth Lacy. 1994. Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second edition. 51-74.
2. Chatot, C. L., C. A. Ziomek, B. D. Bavister, J. L. Lewis and I. Torres. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert. 86:679-688.
3. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 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.
4. Han, Y. M., H. Yamashina, N. Koyama, K.

- K. Lee and Y. Fukui. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. Therio. 42:645-654.
5. Hawk, H. W. and R. J. Wall. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. II. Media and co-culture cells. Therio. 41:1585-1594.
6. Hernandez-Ledezma, J. J., C. Villanueva, J. P. Sikes and R. M. Roberts. 1993. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation-*in vitro* fertilization procedures. Therio. 39:1267-1277.
7. Kim, J. H., H. Funahashi, K. Niwa and K. Okuda. Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. Therio. 39:875-886.
8. Suzuki, T., M. Takagi, M. Yamamoto, A. Boediono, S. Saha, H. Sakakibara and M. Oe. 1993. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. Therio. 40:651-659.
9. Tachikawa, S., T. Otoi, Kondo, T. Machida and M. Kasai. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, devired by *in vitro* maturation and fertilization. Mol. Rep. Dev. 34:266-271.
10. Takagi, M., T. Otoi, A. Boediono, S. Saha and T. Suzuki. 1994. Viability of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to aging using various cryoprotectants. Therio. 41:915-921.
11. Tam, P. P. L and M. H. L. Snow. 1980. The *in vitro* culture of primitive-streak-stage mouse embryos. J. Embryol. Exp. Morph.

- 59:131-143.
12. Voelkel, S. A and Y. X. Hu. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Therio*. 37:1117-1131.
13. 오성종, 양보석, 이명식, 백광수, 성환후, 정진관, 임경순. 1995. 직접이식을 위한 소 체외수정란의 동결융해후 생존성 및 수태율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*. 19(1):49-54.