

돼지 난자의 체외성숙에 영향을 미치는 요인

박 춘 근

강원대학교 축산대학

Factors Affecting *In-Vitro* Maturation in Porcine Oocytes

C. K. Park

College of Animal Agriculture, Kongwon University

SUMMARY

In-vitro culture has provided new information on mechanisms of oocytes maturation and results obtained *in vitro* have led to new questions. In porcine, follicular and oocyte size have the crucial importance for the oocytes maturation. The addition of hormones to the culture medium was found to accelerate and facilitate meiotic maturation. The presence of some factors in serum trigger the resumption of meiosis and support the maturation of oocytes *in vitro*. The maturation rate of porcine oocytes was also increased by supplementation of porcine follicular fluid to the culture medium. The growth factors can stimulate nuclear maturation and enhances cytoplasmic maturation of oocytes by interaction with gonadotropins. The maturation-promoting factor brings about GVBD and the subsequent maturational events in oocytes. However, cAMP can block the spontaneous meiotic maturation of oocytes in culture. The understanding of these influences is a prerequisite to enhancing *in vitro* maturation of porcine oocytes.

(Key words : *In vitro* culture, Porcine oocytes)

서 론

포유동물에 있어서 난자핵의 성숙에 대한 관찰은 1935년 Pincus와 Enzmann에 의해 이루어졌으며, 돼지에 있어서의 핵성숙은 1965년 Edwards에 의해 체외에서 43~46시간동안 배양하므로써 metaphase-II기에 도달한다는 것이 처음으로 밝혀졌다. 초기의 연구에서 이와 비슷한 결과는 Foot와 Thibault(1969)에 의해 보고되었지만 48시간 배양 후에도 대부분의 많은 난자가 metaphase-I기에서 성숙이 정지되었다. 현재 돼지에 있어서 미성숙난자의 체외성숙배양은 다른 대가축의 난자에 비해 거의 2배의 시간을 요구하고 있다. 이와 같은 원인

은 체내에서 LH surge와 germinal vesicle breakdown(GVBD)사이의 시간이 20~24시간이기 때문에 체외에서의 반응이 늦어지는 것으로 추측되고 있다. 난자의 성숙은 핵과 세포질의 성숙이라고 하는 두 가지 면으로 나눌 수 있는데, Foot와 Thibault(1969)는 체외에서 난자핵이 성숙하는데 요구되는 시간은 배양의 조건에 따라 다르다고 보고했다. 실제로 그동안 보고된 많은 연구에서 돼지 난자의 체외성숙을 위한 배양계는 연구자에 따라 다르며 이로부터 얻어진 성숙율도 매우 큰 차이를 나타내고있다. 본 연구에서는 최근 체외에서 돼지 난자의 성숙배양을 위한 연구동향을 살펴보고 난자의 성숙에 영향을 미치는 요인(Fig. 1)에 대해 검토해 보고자 한다.

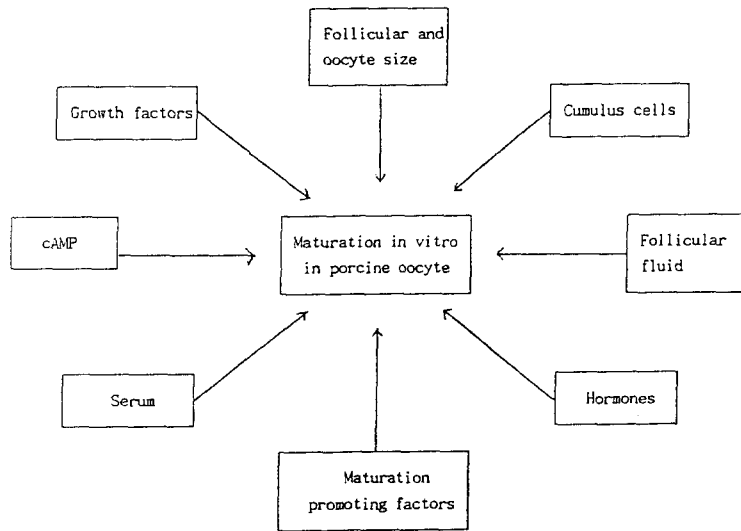


Fig. 1. Factors affecting maturation *in vitro* in porcine follicular oocytes.

난자의 성숙요인

1. 난포와 난자성숙과의 관계

암컷의 돼지는 배란난자의 수나 과배란조건 등 다른 가축과 비교해 매우 다른 유전적 특징을 가지고 있다. 반추동물에서는 배란시 난자를 생산하기 위해 난소에 여러가지 자극이 주어져야 하는데, 특

히 돼지에서는 많은 난자의 배란을 위해 여러 개의 난포성장이 필요하며 난포강들이 이와 같은 역할을 수행하는데 기여하고 있다(Westhof 등, 1991). Motlik 등(1984)의 연구결과에서 0.7mm이하의 난포로부터 회수한 난자는 감수분열에 필요한 능력을 갖고 있으며, 0.8~1.6mm의 난포로부터 회수한 난자는 체외배양시 17%의 성숙율을 나타냈지만 1.7mm이상의 난포로부터 채취한 난자는 체외에서 48

Table 1. Relationship between oocyte diameter and meiotic maturation in pig oocytes grown *in vivo* and *in vitro* (Hirao et al., 1994)

Oocyte growth	Oocyte diameter (μm)	Number of oocytes (%)					
		Examined	Resuming meiosis				Degenerating
			Total	LD	Met I	Met II	
<i>In vivo</i>	70~ 89.5	34	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	90~ 99.5	32	2 (6) ^a	2 (6)	0 (0)	0 (0)	2 (6)
	100~109.5	47	25(53) ^b	8 (17)	15 (32)	2 (4) ^a	0 (0)
	110~120	34	26(77) ^b	7 (21)	5 (15)	14 (41) ^b	1 (3)
<i>In vitro</i>	70~ 89.5	35	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)
	90~ 99.5	51	3 (6) ^a	3 (6)	0 (0)	0 (0)	3 (6)
	100~109.5	50	15 (30) ^c	7 (14)	8 (16)	0 (0)	3 (6)
	110~120	15	9 (60) ^{bc}	1 (7)	2 (13)	6 (40) ^b	1 (7)

LD : late diakinesis ; Met I : metaphase I ; Met II : metaphase II.

^{abc} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$, chi-square test).

시간 배양 후에도 metaphase-II 기까지 성숙에는 도달하지 못했다. 한편 3mm이상의 대형난포내에 도란자는 존재하고 있었으나 체외배양시 정상적인 형태까지는 성숙하지는 못하는 것으로 밝혀졌다.

일반적으로 난포강으로부터 채취한 돼지난자는 체외성숙실험을 위하여 이용되고 있으며 (Moor 등, 1990), 48시간 이내에서 체외배양이 실시된다. 돼지의 난포강내에는 직경 70~89.5 μ m의 난자가 내포되어 있으며, 이들 소형의 난자는 난포로부터 분리하여 성숙배양하여도 감수분열이 개시되지 않는다(Hirao 등, 1994). 즉 소형난자는 체외에서 감수분열의 능력이 없으며 성장을 위한 배양 후 감수분열이 시작되며 낮은 비율로 제1차 감수분열이 완성된다(Table 1). 체외에서 돼지난자의 감수분열은 난소내에서 직경이 가장 큰 난자에 도달하는 것처럼 감수분열의 개시와 감수분열의 완성이라는 2단계의 과정을 거치게 된다. 이와 같은 가설은 평균 직경 100 μ m의 난자는 metaphase-I 기를 지나 성숙이 진행되지 않으며, 평균 직경 115 μ m의 난자는 감수분열을 완성한다는 실험결과로도 설명이 가능하다(Hirao 등, 1994). 즉 감수분열의 진행은 직경이 90 μ m이상의 난자에서 일어나며, GVBD의 비율은 난자의 직경이 클수록 높아진다. 또한 제1차 감수분열은 직경이 큰 난자에서 완성되며, 체외배양시 난자의 성장은 체내에서와 같이 비슷한 성장단계를 거치면서 성숙과정이 완성된다.

2. 혈청단백질과 호르몬물질의 영향

일반적으로 돼지난자의 성숙배양시 배양액내에 혈청과 호르몬물질의 첨가는 필수적인 것으로 알려져 있다(Table 2). 지금까지의 연구에서 돼지난자의 체외성숙배양액내에 BSA(Iritani 등, 1978; Na-

gai 등, 1984), FCS(Mattioli 등, 1988; Naito 등, 1988), newborn piglet serum(NPS: Nagai 등, 1988) 등을 단백질원으로 첨가하여 배양을 실시하였다. 그러나 mKRB용액에 FSH, FCS를 첨가하여 사용했을 때 돼지난자의 성숙은 오히려 억제되는 것으로 보고되었다(Naito 등, 1988). 또한 BSA가 FCS에 비해 돼지난자의 성숙과 cumulus cells의 팽창을 억제하는 것으로 알려졌으며(Zheng과 Sirard, 1992), 이와 비슷한 결과는 소(Leibfried-Rutledge 등, 1986), hamster(Leibfried-Rutledge 등, 1986), mouse(Cross와 Brinster, 1970) 및 토끼(Shea 등, 1976)에서 이미 보고된 바 있다. 한편 Hunahashi와 Day(1993)는 성숙배지내에 FCS와 NPS의 첨가는 난자내의 응성전핵형성을 억제하지만 난자의 성숙을 촉진하는 것으로 보고해, 성숙배양액에 첨가한 혈청내에는 체외에서 난자의 감수분열을 촉진하고 성숙을 유지시키는 어떤 인자가 존재하는 것으로 추측할 수 있다.

돼지의 체내에서 난자가 성숙하는 동안 난포내의 내분비변화는 Xie 등(1990)에 의해 밝혀졌으며, 실험실내에서 Reed 등(1991)과 Illera와 Petters(1993)는 난포액과 호르몬의 첨가 또는 무첨가시 돼지난자의 체외성숙에 미치는 영향을 연구하였으며, PMSG, hCG 및 Estradiol을 첨가한 배양액내에서 성숙이 이루어진다(Yoshida 등, 1989). 이들 호르몬물질을 첨가하여 2시간 배양하면 이미 GVBD와 난자의 성숙이 시작된다. Funahashi와 Day(1993)는 20시간이상 이들 호르몬처리에 의해 성숙분열이 일어나는 것을 관찰하였으며, PMSG와 hCG를 공동 또는 단독으로 첨가하여 20시간 배양하여도 GVBD와 성숙분열을 완성하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다(Funahashi 등, 1994). PMSG를 단

Table 2. Effect of hormones and serum supplements on *in vitro* maturation in porcine oocytes

Culture system	Culture time (h)	Maturation rate(%)	Reference
TCM-199, PMSG	48	80.0	Toyoda 등, 1984
TCM-199, FCS, LH	32	70.0	Nagai 등, 1988
mTLP-PVA, FCS, PMSG, hCG	36	70.0	Yoshida 등, 1992
TCM-199+FCS, FSH, LH, E ₂	48	74.0	Zheng과 Sirard, 1992
TCM-199, PMSG	40	89.0	Hunahashi 등, 1994
TCM-199, FCS	48	17.9	Rath 등, 1995

독으로 첨가하거나 hCG와 공동으로 첨가하면 Estradiol의 첨가 유무에 관계없이 난세포질의 성숙이 일어나며, 배양초기 20시간동안 PMSG를 첨가하면 감수분열과 난세포질의 성숙을 촉진하지만 그후의 첨가는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 추측된다. 돼지미성숙난자의 배양시 FSH의 첨가는 난자핵의 성숙과 난구세포의 팽창을 촉진시키는데 효과적인 영향을 미치며(Eppig 등, 1982), 난구세포를 난자로부터 이완 및 팽창을 촉진시키는 것으로 생각된다. 현재 돼지난자의 체외성숙을 위한 대부분의 연구에서 혈청 등 단백질원, 호르몬물질 및 난포액 등을 단독으로 첨가하기 보다는 여러 형태로 조합하여 첨가하므로써 어떤 물질이 난자의 성숙에 실제로 크게 영향을 미치고 있는지 정확히 알 수 없지만 이들 물질을 각각 단독으로 첨가해도 무첨가의 경우에 비해 높은 성숙율을 나타내고 있기 때문에 앞으로 보다 단순배지의 확립을 위해서는 이러한 점에서의 연구가 필요하다.

3. 난구세포의 역할

대부분의 포유동물에서 난자는 체내에서 배란과 수정이 이루어지는 동안 난구세포에 의해 둘러싸여 있다. 또한 체외에서 회수된 난자는 난구세포가 부착된 채 성숙과 체외수정에 이용하고 있다. 그러나

어떤 동물종의 난자는 체외수정시 난구세포가 절대적으로 필요하지는 않는 경우도 있다(Park 등, 1989; Ball 등, 1983). 따라서 난구세포가 난자의 성숙, 수정 및 초기배의 발육에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 최근 난포로부터 난자의 회수방법은 난포의 절개법 보다는 18-gage 주사침을 이용하여 흡인채취하므로써 난포로부터 난자의 회수를 손쉽게 할 수 있다(Ding 등, 1992; Zheng과 Sirard, 1992). 돼지의 경우 난포로부터 채취한 난자의 주위에 부착된 난구세포는 난자의 성숙에 매우 중요한 역할을 하고 있다. Nagai 등(1993)은 난자의 성숙배양시 첨가되는 난구세포수를 조절하여 배양했을때 15×10^3 cells의 높은 농도의 첨가가 난자의 성숙과 체외수정 후 응성전핵의 발달에 효과적인 것으로 보고했다. 한편 난구세포를 제거하여 성숙배양시킨 난자를 이용해 체외수정했을 때 정자의 침입율이 매우 낮았는데(Kikuchi 등, 1993), 본 연구실에서도 난구세포제거시(30%) 이들 세포가 부착된 난자(61%)에 비해 낮은 체외성숙율을 나타내고 있으며 또한 정자침입율도 매우 낮은 것을 확인했다. 따라서 현재의 배양조건하에서 여러 층의 난구세포로 조밀하게 둘러싸인 난자를 선택한다는 것은 성공적인 체외성숙 및 수정을 위하여 필수적인 것으로 보여진다.

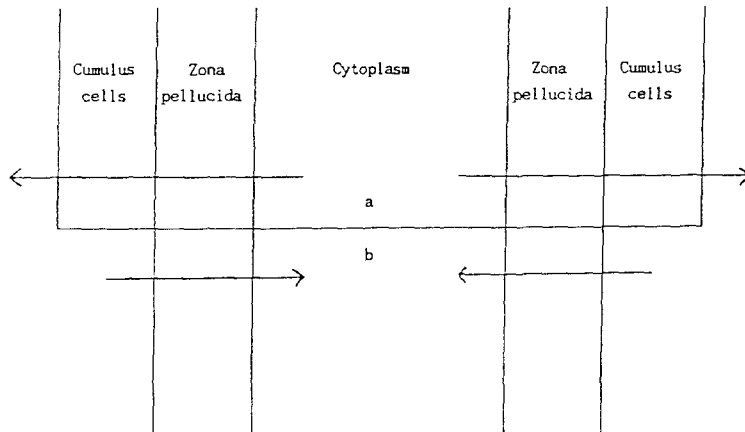


Fig. 2. A diagrammatic representation of possible interaction between oocyte and cumulus cells. a : Oocytes with cumulus cells occur follicle organization, differentiation, cumulus expansion, and proliferation. b : Metabolism growth arrest maturation in oocyte without cumulus cells.

Motlik 등(1986)은 돼지에서 난구세포사이의 결합과 팽창에 대한 연구에서 추측해 볼 때, corona radiata cell은 성숙과정의 말기에만 단지 팽창이 일어나며, 완전한 성숙을 위하여 난자와 corona radiata는 결합한채 남아 있으며 이때 난구세포의 팽창이 일어난다. 또한 체외성숙배양 동안 난구세포의 팽창은 세포형태, 난포세포와 난자사이의 상호작용에 있어서 난구세포의 결합에 변화를 일으킨다(Allworth와 Albertini, 1993). 난구세포가 부착된 난자는 형태적, 기능적으로 세포와 세포사이가 연결되어 있으며, 이들을 연결시키는 연결자들은 난구세포와 난자사이에 영양분을 공급하는 통로로서 작용하기 때문에 체외배양시 난구세포를 제거하면 난자의 성숙 및 발육이 억제된다.

위에서 기술한 것처럼, 난구세포는 난자의 성숙에 매우 중요하다는 것이 많은 연구에 의해 밝혀졌으며, 이들 체세포의 기능과, endocrine, paracrine 및 autocrine과 같은 요인에 의한 촉진적인 반응이 난자의 발육에 큰 영향을 미치고 있는 것으로 알려졌다. 그러나 일부의 동물종에서 이들물질은 난포의 조직을 더욱 발달시키며, 과립막세포의 성장, 난구세포의 분화 및 능력을 촉진시킨다(Fig. 2). 마우스의 경우 난구세포를 팽창시키는 물질이 체외에서 성숙시킨 난자에 의해 분비되며(Eppig 등, 1993), 돼지난자의 경우도 체외성숙중 이와 같은 물질의 분비가 이루어질 것으로 추측된다.

4. Growth factor의 효과

난포내에서 분비되는 물질들은 돼지난자의 성숙에 관여하는 하나의 전달자로서 촉진인자를 함유하고 있는 것으로 여겨져 왔다(Mattioli 등, 1988; Naito 등, 1988; Ding과 Foxcroft, 1992, 1993; Yoshida 등, 1992; Funashi와 Day, 1993)는 난포로부터 분비되는 물질에서 이와같은 촉진인자가 존재한다는 것을 확인했으나 구체적으로 어떤 물질인지는 밝혀내지 못했다. Racowsky(1991)의 연구에서도 난자핵의 성숙을 촉진시키는 성장인자가 존재함을 보고했는데, epidermal growth factors(EGF, Ueno 등, 1988; Downs, 1989)나 transforming growth factors(TGF- β , Feng 등, 1988; TGF- α , Brucker 등, 1991)와 같은 성장인자는 설치류난자

의 핵성숙을 촉진시키거나 향상시킨다는 사실을 입증했으며, EGF에 의해 돼지(Ding과 Foxcroft, 1994; Coskun과 Lin, 1992; Sommer 등, 1992), 소(Illera 등, 1992) 및 사람(Das 등, 1991)에 있어서 난자핵의 성숙을 촉진시키는 것으로 알려졌다. Coskun 등(1991)과 Harper와 Brackett(1993)는 이들 성장인자가 체외에서 성숙시킨 소 난자의 세포질성숙을 향상시킨다고 보고하였으며, 난자의 핵과 세포질성숙을 연결시켜 주는 요소 중의 하나로 난포로부터 생성되었을 것으로 생각한다. 돼지의 난포액은 일정수준의 EGF를 함유하고 있으며 난소내에는 EGF를 결합시키는 장소가 존재하며, 난포의 성숙상태와 연관되어 변하는 것으로 추측된다. Mattioli 등(1991)은 EGF를 첨가하지 않고 성숙배양한 난자의 핵성숙율이 18%로 매우 낮고 47시간 배양후에도 62.9%가 GV단계에서 성숙이 정지된 것으로 보고했다. 그러나 Kubelka 등(1988)은 비슷한 배양액내에서 EGF를 첨가하지 않고 난구세포가 부착된 난자를 24시간 배양했을 때 80%이상이 GVBD를 지나 발육했다고 보고했는데 이와 같은 차이는 배양을 위해 선택한 난자의 질적 차이에 의해 기인된 것으로 추측될 뿐 정확한 원인은 밝혀지지 못하고 있다.

난자의 성숙배지내에 EGF의 첨가는 핵성숙과 성숙난자의 수정능력을 촉진시키는데, 이때 EGF 단독으로 세포질 성숙을 촉진하지는 않는다. 즉, EGF는 세포질성숙을 촉진하는 동안 gonadotropins과의 상호작용으로 난세포질의 성숙을 유의적으로 촉진시키는 것으로 알려졌다(Ding과 Foxcroft, 1994). 그러나 Coskun 등(1991)은 체외에서 성숙시킨 소 난자의 체외발육능력을 EGF가 단독으로 향상시킨다고 보고했는데, 난자에서 이와 같은 EGF의 영향은 난구세포에 의해 부분적으로 전달되며 난구세포를 제거한 돼지난자는 EGF를 가지고 처리했을 때 GVBD의 향상에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(Coskun과 Lin, 1992; Downs 등, 1988). 따라서 체외에서 돼지난자의 성숙은 EGF와 gonadotropin의 동시첨가에 의해 향상되며 follicular shell의 첨가는 난자의 성숙에 보다 효과적으로 작용할 것으로 추측된다.

TGF- α 는 rat와 mouse에서 난자성숙을 촉진하는 것으로 밝혀졌으며(Bruker 등, 1991; Tsafirri 등

, 1991), 구조적 또는 기능적으로 EGF와 관련되어 있으며, 돼지난자의 체외성숙을 촉진시킨다(Coskun과 Lin, 1993; Reed 등, 1993). 체외배양을 위한 여러조건 하에서 TGF- α 와 EGF가 비슷한 효과를 발휘하지만 이들 물질의 생물학적 활성은 주어진 조건에 따라 다르게 나타나며 실제로 두개의 서로 다른 분자를 가지고 있다(Bruker 등, 1991). 암컷(Kennedy 등, 1993)과 수컷(Mullaney와 Skinner, 1992)의 생식선에서 TGF- α 유전인자의 발현과 관련하여 생식세포(Skinner와 Coffey, 1988; Skinner 등, 1989)에서 이들 물질의 분비와 작용에 대해 이미 연구가 이루어져 왔다.

난소에서 TGF- α 는 estrogen의 생산을 촉진하고(Gangrade 등, 1991), 체외에서 과립막세포와 theca cell의 성숙을 촉진시킨다. 한편 TGF- β 는 mouse와 rat난자의 성숙에는 영향을 미치지 않지만(Downs, 1989; Tsafirri 등, 1989), rat의 난포내에서 난구세포로 둘러싸인 난자의 감수분열에 강력한 촉진인자로서 작용하기도 한다(Feng 등, 1988). 현재까지의 연구에서 난자의 체외성숙배양액내에 EGF 또는 TGF의 첨가가 효과적이라는 것이 입증되었으며, 배양액내에 호르몬 물질이나 난포액을 첨가하지 않아도 growth factor가 단독으로 난자의 성숙을 촉진시킬 수 있을 것으로 추측된다.

5. 난포액(follicular fluid)의 작용

포유동물에서 난포발육의 여러 단계에서 원시난자는 난포내의 액체에 의해 성장과 성숙이 이루어진다고 볼 수 있는데, 이 액체를 난포액(follicular fluid)이라고 부르는데, 사람의 난포액은 세포의 감수분열을 유지시키는 물질을 함유하고 있으며, 성숙배양액내에 돼지난포액의 첨가는 mouse(Eppig

와 Schroeder, 1986)와 돼지(Naito 등, 1988)난자의 성숙과 수정을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이와같이 세포의 감수분열을 촉진시키는 물질은 분자량 5,000이상의 지질로된 특성을 갖고 있으며, mouse태아의 germ cell에서 감수분열의 개시를 촉진한다. 이와같은 물질의 특성과 분자량의 측면에서 볼 때 돼지의 난포액에서 발견된 물질과 사람의 난포액에서 발견된 물질과는 차이가 있는 것처럼 보인다. 한편 체외수정 후 응성전핵의 형성에 미치는 돼지난포액의 효과는 배양조건에 따라 다르게 나타나는데 응성전핵의 형성보다는 난자의 성숙에 더 효과적인 것으로 나타났다(Yoshida 등, 1992). 그 이유는 분명하지 않지만 배양기간 및 배양액의 종류등의 배양조건과, 배양액에 첨가하는 난포액의 농도에 의해 기인되는 것으로 추측된다.

체외에서 난자가 성숙하는 동안 성숙을 위해 요구되는 시간은 난자의 개체에 따라 매우 다르며(Yoshida 등, 1989), 2배수핵과 같은 비정상적인 염색체의 발현율이 높다. 또한 다핵란(polygyny)의 발생은 미성숙란이나 노화난자로부터 기인되며, 제1 또는 제2극체의 출현이 방해를 받음으로서 발생하게 된다(Xu와 Greve, 1988). 그런데 돼지난포액은 체외에서 난자가 성숙하는 동안 이와 같은 결점들을 효과적으로 막아주며, 체외에서 정상적인 수정과 발육을 위한 질높은 난자의 공급을 위하여 이용되고 있다. 즉 돼지난포액의 첨가는 극체의 출현시기를 촉진하므로서 정자침입 후 2~4세포기로의 발육율을 향상시킨다. 또한 소 또는 돼지의 난포액으로부터 분리된 glycosaminoglycans는 mouse 또는 돼지난자의 활력을 증가시킨다. Glycosaminoglycans는 24시간 동안 60°C의 열에 매우 안정적이지만 돼지난포액의 효과는 열처리 후 활력이 소

Table 3. The effect of pig follicular fluid(PFF) on maturation of pig oocytes *in vitro*

Culture system	Culture time	Oocytes maturation(%)	Reference
TCM-199	36 h	66	Yoshida et al., 1992
TCM-199, PFF	36 h	90	"
TCM-199, PFF, LH, FSH, E ₂	48 h	74	Zheng과 Sirard, 1992
TCM-199, PFF, PMSG, hCG, E ₂	40 h	92	Funahashi et al., 1994
TCM-199, PFF	48 h	47	Rath et al., 1995
" +FSH	48 h	60	"

실되어(Yoshida 등, 1992) 동물종 또는 실험조건에 따라 차이가 있는 것으로 추측된다. 한편 난구세포의 팽창은 돼지난포액의 열처리 후 그 효과가 발현되었으며, 200,000이상의 분자량을 가진 fraction에서 관찰되지만 핵성숙은 오히려 열처리 후 그 효과가 감소되는 것으로 나타났다. 돼지 난포액은 돼지난자의 난구세포를 팽창시키는데 필요한 여러 가지 물질을 함유하고 있다. 그러나 돼지의 난포액이 돼지난자의 활력성과 핵성숙을 증진시키지만 난구세포의 팽창과 핵성숙의 증진사이에는 관련성이 없는 것으로 보여진다. 따라서 돼지의 난포액은 체외에서 난자의 성숙과 수정 후 초기배의 생산에는 매우 효과적이지만 난자성숙에 있어서 어떤 물질이 어떻게 작용하는지에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다.

Cyclic monophosphate(cAMP)는 난자의 체외 배양시 성숙을 위해 자연적으로 일어나는 감수분열을 억제한다는 사실이 설치류의 실험에서 입증되었다. cAMP 유사물질 또는 phosphodiesterase(PDE)와 같은 억제인자들은 세포사이에서 cAMP의 감소를 억제하고 체외에서는 GVBD를 억제한다. 또한 forskolin이나 FSH와 같은 adenylate cyclase의 활성화에 의한 cAMP의 증가는 감수분열을 정지시킨다(Schultz, 1983). 만약 난자가 dbcAMP 또는 PDE억제인자를 가지고 GV기가 지속되거나, protein kinase(PK-A)에 의존하는 cAMP의 억제인자를 미세주입하면 감수분열이 시작된다. cAMP 길항물질, Rp-cAMPs는 성숙을 위한 감수분열시외인성 억제인자의 영향과 체외성장시 난구세포의 자연적인 휴지작용을 억제하므로써 난자의 감수분열능력과 GVBD를 일으키게 한다(Eppig, 1991).

6. 난자의 성숙시 cAMP의 변화

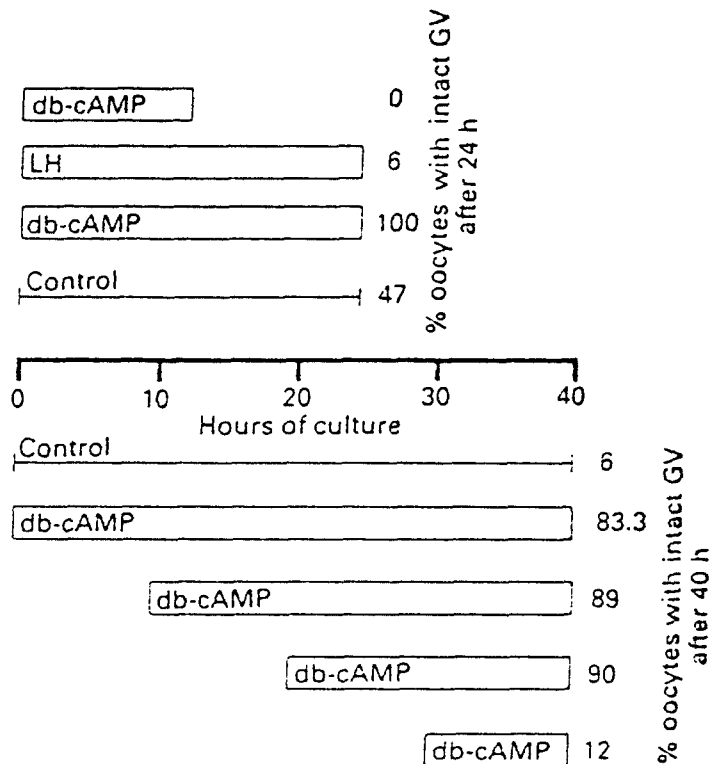


Fig. 3. Effect of dibutryl(db-cAMP)during various periods on the meiotic maturation of porcine follicular oocytes evaluated after 24 and 40 h of culture. (Mattioli et al., 1994)

한편 난자에서 cAMP의 감소는 mouse와 rat에서 GVBD보다 먼저 일어나는데(Racowsky, 1984; Schultz 등, 1983), 이와같은 결과는 cAMP 의존경로가 포유동물의 난자에서 성숙분열을 조절하는 메카니즘에 중요한 역할을 하고 있다는 이론을 뒷받침해준다.

체내에서 돼지난자의 성숙은 세포사이의 cAMP 농도를 증가시키며, GVBD가 일어나면 cAMP의 농도는 기본적인 수준으로 되돌아간다. 이와같은 cAMP의 변화는 이들 농도의 증가가 약간 있더라도 체외에서 난포난자의 성숙시와 비슷한 형태로 나타난다. cAMP농도의 증가는 난자의 체내 또는 체외성숙의 초기에 일어나며, 이와 같은 현상은 nucleotide의 생리적인 차이에 의해 두드러지게 나타난다. 또한 cAMP농도의 일시적인 증가는 세포질의 성숙에 효과적인 영향을 미치는데, 실제로 Mattioli 등(1991)은 배양액내에 LH를 첨가하면 난자의 체외성숙을 증가시키며 수정 후 응성전핵의 형성을 유지시킨다고 하였다. 즉 난구세포와 난자의 연결은 이들 세포와 세포간전달을 자극하는데 LH가 영향을 미친다는 것을 시사한다. 따라서 cAMP농도의 증가는 서로 다른 세포의 연결을 촉진하기 위해 반응하는 LH유기인자와 비슷한 것으로 추측된다(Mattioli 등, 1994). 한편 nucleotide는 세포사이의 연결에 있어서 투과성과 그수를 증가시키며, forskolin으로 처리한 돼지의 난자는 난구세포의 세포간연결을 일시적으로 증가시키는 작용을 하며 cAMP의 세포내 농도를 유지시킨다. 따라서 cAMP농도는 감수분열을 재개하기전의 난자에서 일시적으로 증가되며, cAMP농도의 증가는 난자의 adeny cyclase의 자극에 의존하며 LH의 영향을 받은 난포세포에 의해 생산된 수용성인자에 의해 일어난다. 또한 돼지난자의 체외성숙배양시 초기 10~20시간에 cAMP의 농도가 증가하며 높은 농도의 cAMP는 감수분열을 정지시키지만 일시적인 증가는 난자의 성숙에 효과적이다(Fig. 3).

7. Maturation-promoting factor의 영향

성숙분열중에 있거나 metaphase기 난자의 somatic cells의 추출물을 미성숙난자내에 미세주입했을 때 GVBD를 자극하며 감수분열의 능력을 갖

게 한다. 이들 추출물이 갖고 있는 활성화 능력을 maturation-promoting factor(MPF)라고 하는데 세포를 강력하게 분열시키는 물질로 알려져 있다. MPF는 cyclin B와 p^{34cdc2}라는 2개의 단백질로 구성되어 있으며, 불활성인 형태로 존재하며, 미성숙난자에서는 pre-MPF로 존재한다. 이들 단백질은 세포주기의 단계에 따라 cyclic 방법으로 생산된다. 세포주기 사이에서의 단백질 생산은 MPF의 활성화에 요구되는 것 이상은 축적되며, anaphase동안의 감소는 난자의 불활성화를 초래한다. pre-MPF에서 MPF로의 전환은 tyrosine과 threonine 잔류물에서 p^{34cdc2}의 dephosphorylation이 요구된다(millar와 Russell, 1992). Cyclin B는 MPF를 규칙적으로 결합시킬뿐만 아니라 cdc25 tyrosine phosphatase를 직접활성화시키는 여러 가지 기능을 가진 단백질이다. MPF활성의 증거는 p^{34cdc2}에 대한 serine/threonine kinase기능에 의한 세포단백질의 phosphorylation을 증가시키는데 있다.

한편 MPF는 GVBD를 유도하며, 양서류(Smith와 Ecker, 1971), 불가사리(Kishimoto와 Kanatani, 1976) 및 마우스(Hashimoto와 Kishimoto, 1988)의 난자에서는 성숙에 관여하고 있다. 따라서 MPF는 세포주기에서 규칙적으로 작용하는데, 돼지의 난자는 체외에서 성숙하는 동안 난세포질내에서 MPF가 증가하며, MPF의 증가는 활발한 단백질 합성에 의해 일어나는 것으로 알려졌다(Mattioli 등, 1991). MPF의 조절은 kinase와 phosphatase활성의 연결에 의해 일어나며, 많은 물질들이 이들 효소를 위해 존재하며 G2기에서 M기로 전환시키는 원동력은 이들 물질의 phosphorylation에 의해 세밀하게 조절되는 것으로 추측된다. 앞으로의 연구에서 감수분열을 유도하는 호르몬자극이 MPF를 생산해 내는데 있어서 난포내에서 어떻게 전환되며, 이러한 과정이 일어나는 동안 무엇이 phosphorylation과 dephosphorylation을 연결시켜 주는지 밝혀져야 할 것이다.

앞으로의 연구방향

돼지난자의 체외성숙에 관한 정보는 많은 연구자들에 의해 수행되어오면서 축적되었지만 아직도 연

구자와 배양조건에 따라 성숙율이 큰 차이를 보이고 있으며, 타 동물종에 비해 낮은 성숙율로 인해 정자의 침입을 및 수정란의 체외발육을 역시 낮은 실정이다. 따라서 체외에서 미성숙난자의 효과적인 배양을 위하여 앞으로 몇가지 점에서 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

현재 대부분의 연구에서 성숙배양에 이용되는 난자는 도축장에서 회수된 난소의 난포로부터 채취한 뒤 몇 단계의 형태적 분류로부터 일정수준 이상의 난자를 이용하고 있다. 그러나 난자의 회수시 형태적으로 우수하다고 하더라도 채취된 난자의 유전적 능력은 물론 앞으로의 성숙 및 발생능력을 파악하기란 매우 곤란한 일이다. 이와 같은 면에서 Hirao 등(1994)은 preantral follicle로부터 회수한 난자의 직경크기에 따라 체외성숙에 미치는 영향을 검토하였는데 성숙율이 40%로 낮은 결과를 나타냈다. 따라서 체외성숙에 적당한 난포 및 난자의 크기에 관한 연구가 보다 구체적으로 이루어져야 할 것이다.

돼지난자의 체외성숙배양을 위하여 대부분의 연구자들은 TC-199액을 이용하고 있으며, 혈청을 비롯한 단백질원, 난포액, hormone물질, growth factor 및 각종 에너지를 첨가하고 있다. 그러나 첨가된 물질의 종류와 첨가수준이 서로 다른 배양조건하에서 어떻게 작용을 하며 난자의 성숙에 실제로 어느 정도의 효과가 있는지는 밝혀지지 않았으며 각 연구실의 배양체계에 따라 연구결과도 매우 천차만별로 보고되고 있다. 특히 체내와 체외에서의 배양조건은 다른 점이 많기 때문에 이 부분에서의 검토가 필요하다. 소의 경우 호르몬물질의 첨가 없이도 높은 성숙율을 얻고 있는데 비하여 돼지의 경우는 대부분의 연구에서 필수적으로 호르몬 물질을 첨가하고 있다. 그러나 호르몬 물질은 물론 배양액에 첨가되는 여러가지 물질들이 체외에서 난자의 성숙에 어떤 역할과 효과를 하고 있는지 검토되어야 할 것이며, 이들 물질의 과잉첨가에 의해 오히려 난자의 성숙에 억제적인 영향을 없는지 밝혀져야 할 것이다.

체내에서 난자는 난소의 난포내에서 호르몬의 작용 등 여러 가지의 생리적인 영향을 받으면서 성숙한다. 또한 난포세포와 난자 주위를 둘러싸고 있는 난구세포의 영향을 받고 있으며 체외에서도 이들

세포가 난자의 성숙에 효과적으로 작용하고 있다. 즉 체내에서 난포세포로부터 어떠한 물질이 분비되며, 분비된 이들 물질이 난구세포와 난자 사이에서 어떠한 역할을 하고 있는지 밝혀져야 할 것이다. 또한 난포세포 및 난구세포로부터 분비된 물질이 체외에서 난자의 성숙배양시 첨가된 다른 물질과 어떠한 작용을 하며 돼지난자의 정상적인 성숙을 위하여 체외에서 이들 물질이 난자로 운반되는 mechanism에 대하여 구체적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

참고문헌

- Allworth AE and Albertini DF. 1993. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev. Biol.*, 158:101-112.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28:717-725.
- Brucker C, Alexander NJ, Hodgen GD and andow BA. 1991. Transforming growth factor-alpha augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:94-98.
- Coskun S and Lin YC. 1992. Site of action of epidermal growth factor(EGF) on *in vitro* porcine oocyte maturation in chemically defined medium. *Biol. Reprod.*, 46:138(abstract 350).
- Coskun S and Lin YC. 1993. Site of action of epidermal growth factor(EGF) on *in vitro* porcine oocyte maturation. *Endocrine J.*, 1:87-91.
- Coskun S, Sanbuissho A, Lin YC and Rikihisa Y. 1991. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor(EGF). *Theriogenology*, 36:485-494.
- Cross PC and Brinster RL. 1970. *In vitro* devel-

- opment of mouse oocytes. *Bio. Reprod.*, 3:298-307.
- Das K, Tagatz GE, Stout LE, Phipps WR, Hensleigh HC and Leung BS. 1991. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil. Steril.*, 55:1000-1004.
- Ding J and Foxcroft GR. 1992. Follicular heterogeneity and oocyte maturation *in vitro* in pigs. *Biol. Reprod.*, 47:648-655.
- Ding J and Foxcroft GR. 1993. Conditioned media produced by follicular shells with different maturity affect oocyte maturation in the pig. *Biol. Reprod.*, 156:1377-1384.
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:30-40.
- Downs SM. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 41:371-379.
- Edward RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
- Eppig JJ. 1982. The relationship between parthenogenetic embryonic development and cumulus cell-oocyte intercellular coupling during oocyte meiotic maturation. *Gamete Res.*, 5:229-237.
- Eppig JJ. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed *in vitro* from preantral follicles. *Biol. Reprod.*, 45:824-830.
- Eppig JJ and Schroeder AC. 1986. Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospects. *Theriogenology*, 25:87-96.
- Eppig JJ, Peters AHFM, Telfer EE and Wigglesworth K. 1993. Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown *in vitro*: preliminary characterization of the factor. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:450-456.
- Feng P, Catt KJ and Knecht M. 1988. Transforming growth factor-B stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology*, 122:181-188.
- Foote WD and Thibault C. 1969. Recherches expérimentales sur la maturation *in vitro* des ovocytes de truie et de veau. *Annales de Biologie animale, de Biochimie et de Biophysique*, 3:329-349.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 98:177-185.
- Funahashi H, Cantley T and Day BN. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 101:159-165.
- Gangrade BK, Davis JS and May JV. 1991. A novel mechanism for the induction of aromatase in ovarian cells *in vitro*. Role of transforming growth factor alpha-induced protein kinase. *Endocrinology*, 129:2790-2792.
- Haper KM and Brackett BG. 1993. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Reprod.*, 48:409-416.
- Hashimoto N and Kishimoto T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during mouse oocytes maturation. *Dev. Biol.*, 126:242-252.
- Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M and Kato S. 1994. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 100:333-339.
- Illera MJ, Lorenzo P, Illera JC, Sanchez J, Silvan G and Illera M. 1992. Epidermal growth factor increase the bovine oocyte maturation

- tion *in vitro*. Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, Vol. 1, pp 339-341.
- Illera MJ and Petters RM. 1993. Effect of EGF and IGF-I on porcine oocyte fertilization *in vitro* in the absence of follicular fluid or hormones. *Theriogenology*, 39:235.
- Kennedy TG, Brown KD and Vaughan TJ. 1993. Expression of the genes for the epidermal growth factor receptor and its ligand in porcine corpora lutea. *Endocrinology*, 132:1857-1859.
- Kikuchi K., Nagai T, Motlik J, Shioya Y and Izaike Y. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology*, 39:593-599.
- Kishimoto T and Kanatani H. 1976. Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocyte. *Nature*, 200:321-322.
- Kishimoto T, Kuriyama R, Kondo H and Kanatani H. 1982. Generality of the action of various maturation-promoting factors. *Exp. Cell Res.*, 137:121-126.
- Kubelka M, Motlik J, Fulka JJr, Prochazka R, Rimkevicova Z and Fulka Z. 1988. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and P-aminobenzamide block. *Gamete Res.*, 19:423-431.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES and First NL. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus oocyte complexes. *Biol. Reprod.*, 35:850-857.
- Mattioli M, Galeati G and Seren E. 1988. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res.*, 20:177-183.
- Mattioli M, Galeati G, Bacci ML and Barboni B. 1991. Changes in maturation promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:119-125.
- Mattioli M, Galeati G, Barboni B and Seren E. 1994. Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 100:403-409.
- Millar AW and Russell P. 1992. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, 68:407-410.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J and Nagai T. 1990. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 40:197-210.
- Motlik J, Crozet N and Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:323-328.
- Motlik J, Fulka J and Flechon JE. 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 76:31-37.
- Mullaney BP and Skinner MK. 1992. Transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule. *Mol. Endocrinol.*, 6:2103-2113.
- Murray AW, Solomon JJ and Kirschner MW. 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*, 339:280-286.
- Nagai T, Niwa K and Iritani A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 70:271-275.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In-vitro* fertilization of

- pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J. Reprod. Fert., 84:585-591.
- Nagai T, Ding J and Moor RM. 1993. Effect of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. J. Exp. Zool., 266:146-151.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. Gamete Res., 21:289-295.
- Park CK, Ohgoda O and Niwa K. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. J. Reprod. Fert., 86:577-582.
- Rath D, Niemann H and Tao T. 1995. *In vitro* maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effect on fertilization and embryo yield *in vitro*. Theriogenology, 44:529-538.
- Racowsky C. 1984. Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of rat oocyte-cumulus complex. J. Reprod. Fert., 72:107-116.
- Racowsky C. 1991. Gamete resources: Origin and production of oocytes. In R. A. Pedersen, A. McLaren, N. First(eds): "Animal Application of Research in Mammalian Development." Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, pp 22-82.
- Reed ML, Estrada JL, Illera MJ and Petters RM. 1993. Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-1, and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation *in vitro*. J. Exp. Zool., 266:74-78.
- Schultz RM, Montgomery RR and Belanoff JR. 1983. Regulation of mouse oocyte maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. Dev. Biol., 97:264-273.
- Shea BF, Baker RD and Latour TPA. 1976. Maturation *in vitro* rabbit follicular oocytes. Can. J. Anim. Sci., 56:377-381.
- Skinner MK and Coffey Jr RJ. 1988. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor- α by theca cells. Endocrinology, 123:2632-2638.
- Skinner MK, Takacs K and Coffey Jr RJ. 1989. Transforming growth factor- α gene expression and action in the seminiferous tubule: Peritubular cell-Sertoli cell interactions. Endocrinology, 124:845-854.
- Smith LD and Ecker RE. 1971. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. Dev. Biol., 25:232-247.
- Sommer P, Rath D and Niemann H. 1992. *In vitro* maturation of porcine oocytes in the presence of follicular granulosa cells, FSH and/or EGF. Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, Vol. 1, pp 378-380.
- Toyoda Y, Itagaki Y, Minato Y and Fukuda Y. 1984. Fertilization *in vitro* of pig eggs matured *in vivo* and *in vitro*. Proceeding 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. 3:395.
- Tsafiriri A, Vale W and Hsueh AJW. 1989. Effects of transforming growth factors and inhibin related proteins on rat preovulatory Graafian follicles *in vitro*. Endocrinology, 125:1857-1862.
- Ueno S, Manganaro TF and Donahoe PK. 1988. Human recombinant Mullerian inhibiting substance of rat oocyte meiosis is reversed by epidermal growth factor *in vitro*. Endocrinology, 123:1652-1659.
- Westhof G, Westhof K, Braendle WL and diZerega GS. 1991. Differential secretion and gonadotropin response by individual tertiary

- porcine follicles *in vitro*. Possible physiologic role of atretic follicles. Biol. Reprod., 44:461-468.
- Xie S, Broermann DM, Nephew KP, Bishop MD and Pope WF. 1990. Relationship between oocyte maturation and fertilization of zygotic diversity in swine. J. Anim. Sci., 68: 2027-2033.
- Xu KP and Greve T. 1988. A detailed analysis of early events during *in-vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 82:127-134.
- gonadotrophins and estradiol-17 β on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured *in vitro*. Japanese J. Anim. Reprod., 35:86-91.
- Yoshida M, Isigaki Y, Kawagishi H, Bamba K and Kojima Y. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. J. Reprod. Fert., 95:481-488.
- Zheng YS and Sirard MA. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular fluid on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. Theriogenology, 37:779-790.