

소 분할배와 호르몬, 난관상피세포, 난구세포와의 공배양이 체외발생율에 미치는 영향에 관한 연구[†]

김상근 · 남윤이 · 이명현 · 이만휘*

충남대학교 수의과대학

Effects of Hormones, Oviduct Epithelial Cells, Cumulus Cells during the *In Vitro* Culture in Medium on *In Vitro* Developmental Rates of Bisected Bovine Embryos

Kim, S. K., Y. Y. Nam, M. H. Lee and M. H. Lee*

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

The study was conducted to investigate on *in vitro* developmental rates of bisected bovine embryos co-cultured in 10% FCS + TCM-199 media containing hormones, oviductal epithelial cells and cumulus cells 0 to 7 days after bisection. *In vitro* developmental rates was defined as development rates on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. *In vitro* developmental rates of bisected bovine embryos co-cultured in 10% FCS + TCM-199 media containing PMSG + hCG, PMSG + β -estradiol, hCG + β -estradiol, PMSG, hCG 0 to 3 days and 4 to 7 days were 16.7~30.0% and 11.1~25.0%, respectively. *In vitro* developmental rates of bisected embryos co-cultured in 10% FCS + TCM-199 media containing hormones significantly higher than that of non co-culture.
2. *In vitro* developmental rates of bisected bovine embryos co-cultured 10% FCS + TCM-199 media containing oviductal epithelial cells 0 to 3 days and 4 to 7 days were 25.0% and 22.2%, respectively.

(Key words : Hormones, Oviduct epithelial cells, Cumulus cells, Co-culture, *In vitro* developmental rates)

I. 서 론

분할배에 관한 연구는 미세조작법에 의해 수정란을 분할하여 일란성 쌍자의 생산 또는 분할배의 한쪽은 동결 보존하면서 다른 쪽은 염색체검사, 유전자조작

및 이식 등에 제공하기 위한 인용이 보고되었다(Nagashima와 Ogawa, 1981; Lehn-Jenson과 Willadsen, 1983; Heyman, 1985; Willadsen, 1979; 오와 김, 1994).

Voelkel 등(1985)은 소 분할배의 배양시에 생존율의 저하를 억제하기 위해서는 자궁섬유아세포와의 공

[†] 이 연구는 과학재단 핵심연구비(961-0607-169-2) 지원에 의하여 수행되었음.

* 웨이즈만 연구소(Weizmann Institute of Science, Israel)

배양이 필요하다고 하였으며, Nibart 등(1988)은 소분할배는 분할직후에는 비분할배의 약 1/2의 세포수를 보유하여 세포분열 속도가 늦으며, 내부 세포피가 영양막세포보다 큰 비율로 변성되며 아울러 배양기간을 연장시키면 분할면의 세포는 회복되어 배세포는 재구축된다고 보고하였다. Tominaga 등(1991)은 소수정란을 분할하여 excellent, good, fair, poor, degeneration 등으로 분류하여 excellent, good 분할배만을 선별하여 난관상피세포와 공배양하였을 때 excellent, good 분할배는 각각 29.2%와 54.2%로서 18~24시간의 무첨가 배양시의 17.6%와 41.2%에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다고 하였으며, Chesne 등(1988)은 소분할배의 단시간 배양이 분할면의 손상회복에 따라 생존성을 향상시킨다고 보고하였다. 체외발생능력이 낮은 소 초기배를 미세조작에 의해 분할시 생존성이 대단히 저조하여 체외발생율을 보다 향상시키기 위해서는 분할기술의 개선 및 분할배의 배양체계의 개선 등이 요구된다 하겠다.

이에, 본 연구는 소 분할 초기배의 공배양에 따른 체외발생율을 구명하기 위하여 분할배의 체외배양시 TCM-199 배양액에 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포를 첨가하여 공배양하였을 때 체외발생율을 구명하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 난포란의 회수

도축장의 도살한우로부터 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실험현미경(20~40 \times)하에서 난포란을 회수하였다.

2) 난포란의 배양

배양액은 10%(v/v)의 FCS(Sigma, USA)와 1 μ g/ml의 FSH(Sigma, USA), 2 IU/ml의 HCG(Sigma, USA), 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의

streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Whittaker, USA) 배양액으로 배양하였다.

2. 방 법

1) 난포란의 체외성숙과 체외수정

난포란의 체외성숙은 배양액 50 μ l 소적을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 drop내에 5개의 난포란을 주입하여 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5 $^{\circ}$ C)에서 24시간 성숙배양하였다. 체외수정은 45 μ l의 수정용 배양액 소적에 5개의 성숙난포란을 주입한 후, 시험관내에서 BO액 1 ml에 용해정액 0.2 ml를 혼합하여 CO₂ 배양기에서 swim-up 처리후, 상층액을 배양액으로 500 rpm, 10분간 2회 원심분리하여 세척하고 정자피를 동량의 100 μ g/ml의 heparin(Sigma, USA)과 희석하여 15분간 CO₂ 배양기에서 수정능 획득을 유기시킨 정자부유액 2 μ l(1.5 \times 10⁶/ml)로 매정하였다.

2) 수정란의 분할과 공배양

초기배의 분할은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 petri dish내에 배양액 drop중에 배를 넣어 보정용 pipette으로 배를 흡인 고정후 반대측에서 투명대로부터 배세포피가 나오지 않을 정도로 15 $^{\circ}$ 각도의 microblade (Feather Co., Japan)로 눌러 배를 분할하거나, 제작한 micropipette을 이용하여 분할하거나, 초기배를 0.03%의 pronase로 처리하여 투명대를 연화시켜 제거한 후 micropipette으로 분할하고 공투명대에 주입후 배양하였다.

분할초기배와 배양액에 호르몬은 10 IU/ml의 PMSG(Sigma, USA), 10 IU/ml의 hCG(Sigma, USA), 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, USA)를, 난관상피세포는 발정후 4~5일의 난관으로부터 채취한 난관상피를 3~4회 계대한 후 공배양 1~3일전에 10 μ g/ml의 streptomycin sulfate로 약 3시간 처리하여 trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨 50 \times 10⁴ 생존세포를, 난구세포는 직경 5~10mm의 난포로부터 난구세포를 회수하여 500 rpm, 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 배양액 2~3 ml를 첨가하여 1,500 rpm, 5분간, 2회 원심분리하여 상층액을 버리고 1 \times

Table 1. Effects of co-culture with hormonal supplements between 0~3 days on *in vitro* developmental rate of bisected bovine embryos

Supple. of hormone	No. of BE* examined	Quality & No.(%) of bisected embryos after culture				No.(%) of blastocyst developed
		Excell.	Fair	Poor	Degeneration	
Control	20	5(25.0)	6	3	6	3(15.0)
PMSG+hCG	20	10(50.0)	3	2	5	5(25.0)
PMSG+E	20	11(55.0)	4	1	4	6(30.0)
hCG+E	18	8(44.4)	2	2	6	4(22.2)
PMSG	18	7(38.9)	2	2	7	3(16.7)
hCG	20	9(45.0)	2	4	5	4(20.0)

*BE : bisected embryos

Table 2. Effects of co-culture with hormonal supplements between 4~7 days on *in vitro* developmental rate of bisected bovine embryos

Supple. of hormone	No. of BE* examined	Quality & No.(%) of bisected embryos after culture				No.(%) of blastocyst developed
		Excell.	Fair	Poor	Degeneration	
Control	20	5(25.0)	2	3	10	2(10.0)
PMSG+hCG	20	9(30.0)	4	1	6	5(25.0)
PMSG+E	20	10(33.3)	2	2	6	4(20.0)
hCG+E	18	9(30.0)	1	3	5	4(22.2)
PMSG	18	8(26.7)	1	2	7	2(11.1)
hCG	20	8(26.7)	2	2	8	3(15.0)

*BE : bisected embryos

10⁵~10⁶의 생존세포를, 각각 배양액에 첨가하여 12~72시간 공배양하였다.

3) 생존성 및 체외발생율

분할 초기배를 배양액으로 3회 세척후 TCM-199 배양액으로 배양하면서 배의 발생상태를 관찰하거나, FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 생사 여부를 판정하였다(Schilling, 1982).

III. 결과 및 고찰

1. 호르몬 첨가에 따른 분할초기배의 체외발생율

소 분할 초기배의 공배양에 있어서 호르몬의 첨가에 따른 체외발생율은 Table 1과 2에서 보는 바와 같이, 10% FCS+TCM-199 배양액에 PMSG+hCG, PMSG+ β -estradiol, hCG+ β -estradiol, PMSG 및 hCG를 첨가하여 분할배와 0~3일 및 4~7일간 각각 배양하였을 때 체외발생율은 16.7~30.0% 및

11.1~25.0%로서 대조군의 10.0~15.0%에 비해 다소 높은 성적을 나타냈으나, 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율은 감소 경향을 나타냈다.

이러한 결과는 분할 초기배와 0~20시간 및 20~40시간 PMSG+hCG, PMSG+ β -estradiol, hCG+ β -estradiol, PMSG, hCG와 공배양하였을 때 체외발생율은 각각 28.6~38.5%와 23.1~37.5%를 나타냈다는 김 등(1996)의 보고와 유사한 결과이었다. 한편, Nibart 등(1988)은 소 분할배와 비분할배의 세포를 비교할 때 분할배는 분할직후 비분할배의 약 1/2의 세포수를 가지고 있지만 24시간 배양후에는 1/3로 되므로 분할배는 세포분열 속도가 늦으며, 내부세포피가 영양막세포보다 큰 비율로 변성되나, 배양기간을 연장시키면 분할면의 세포는 회복되어 배세포는 재구축되는데 3~4시간 정도의 단시간 배양이 바람직하다고 보고하였다.

Table 3. Effects of co-culture with oviductal cells on *in vitro* developmental rate of bisected bovine embryos

Co-culture period	No. of BE* examined	Quality & No. (%) of bisected embryos after culture				No. (%) of blastocyst developed
		Excell.	Fair	Poor	Degeneration	
Control	20	5(25.0)	2	4	9	3(15.0)
0~3 days	20	9(45.0)	3	2	6	5(25.0)
4~7 days	18	5(27.8)	2	6	7	4(22.2)

*BE : bisected embryos

Table 4. Effects of co-culture with cumulus cells on *in vitro* developmental rate of bisected bovine embryos

Co-culture period	No. of BE* examined	Quality & No. (%) of bisected embryos after culture				No. (%) of blastocyst developed
		Excell.	Fair	Poor	Degeneration	
Control	20	6(30.0)	2	2	10	3(15.0)
0~3 days	20	11(55.0)	3	2	4	6(30.0)
4~7 days	18	8(44.4)	2	3	7	5(27.8)

*BE : bisected embryos

2. 난관 상피세포와의 공배양에 따른 체외발생율

소 분할배와 난관 상피세포와의 공배양에 따른 체외발생율은 Table 3에서 보는 바와 같이, 분할후 0~3일간 및 4~7일간 10% FCS+TCM-199 배양액에 난관 상피세포를 첨가하여 공배양하였을 때 분할배의 체외발생율은 25.0%, 22.2%로서 대조군의 15.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으며, 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율이 감소하였다.

이러한 결과는, 소 excellent, good 분할배만을 선별하여 난관 상피세포와 공배양하였을 때 각각 29.2%와 54.2%로서 무첨가 대조군의 17.6%와 41.2%에 비해 다소 높은 체외발생율을 나타냈다고 한 Tominaga 등(1991)의 보고와, 돼지 분할배를 난관 상피세포와 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 각각 40.0% 및 35.7%로서 대조군의 25.0%에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다는 김 등(1996)의 결과와 거의 일치된 결과이었다.

3. 난구세포와의 공배양에 따른 체외발생율

소 분할배와 난구세포와의 공배양에 따른 체외발생율은 Table 4에서 보는 바와 같이, 분할후 0~3일간 및 4~7일간 10% FCS+TCM-199 배양액에 난구세

포를 첨가하여 공배양하였을 때 분할배의 체외발생율은 30.0, 27.8%로서 대조군의 15.0%에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다.

이러한 결과는 대상동물은 다르지만, 돼지 초기배를 분할한 후 난구세포와 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 분할배의 체외발생율은 40.0% 및 35.7%로서 대조군의 25.0%에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다는 김 등(1996)의 결과와 유사한 결과이었다. 한편, Voelkel 등(1985)은 분할배는 배양에 의한 생존율의 저하를 막기 위해서는 자궁섬유아세포와의 공배양이 필요하다고 하였으며, Chesne 등(1988)은 소 분할배의 단시간 배양이 분할면의 손상회복에 따라 생존성을 향상시킨다고 보고하였다.

IV. 적 요

본 연구는 소 분할배의 체외발생율을 향상시키기 위하여 10% FCS+TCM-199 배양액에 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포를 각각 첨가하여 공배양하였을 때 체외발생율을 조사하였다.

1. 소 분할배와 배양액에 PMSG+hCG, PMSG+ β -estradiol, hCG+ β -estradiol, PMSG, hCG 호르몬을 각각 첨가하여 0~3일 및 4~7일간 공

배양하였을 때 체외발생율은 각각 16.7~30.0% 및 11.1~25.0%로서 대조군의 15.0%에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다.

2. 소 분할배를 난관 상피세포와 0~3일간 및 4~7일간 공배양하였을 때 체외발생율은 각각 25.0, 22.2%로서 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율이 감소하였다.
3. 소 분할배를 난구세포와 0~3일간 및 4~7일간 공배양하였을 때 체외발생율은 각각 30.0%, 22.2%로서 대조군의 15.0%에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Chesne, P., Y. Heyman, D. Chupin, R. Procureur and Y. Menezo. 1988. Freezing cattle demi-embryos : Influence of a period of culture between splitting and freezing on survival. *Theriogenology*, 27(1):218(Abstracts).
 2. Heyman, Y. 1985. Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 23:63-75.
 3. Lehn-Jenson, H. and S.M. Willadsen. 1983. Deep-freezing of cow "half and quarter" embryos. *Theriogenology*, 19:49-54.
 4. Nagashima, H. and S. Ogawa. 1981. Studies on the developmental potential and survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morulae embryos in rats and rabbits. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 27:12-19.
 5. Nibart, N., S. Sripongpun, F. Mechekour, B. Le Guienne and M. Thibier. 1988. Histological study of bovine intact and demi-embryos. *Theriogenology*, 19(1):283.
 6. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15:245-248.
 7. Tominaga, K., M. Fukushima and Y. Hataya. 1991. Influence of culture condition before freezing on developmental capacity *in vitro* and *in vivo* of bovine frozen-thawed split embryos. *Jap. J. Reprod. Tech.* 13(2):65-74.
 8. Voekel, S. A., G. F. Amkorski, K. G. Hill and R. A. Godke. 1985. Use of a uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. *Theriogenology*, 24(3):271-281.
 9. Willadsen, S. M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277:298-300.
 10. Wilton, L. J. and A. O. Trounson. 1989. Biopsy of preimplantation mouse embryos : Development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 40:145-152.
 11. 김상근, 이종진, 이명현. 1996. 소 초기배의 분할 후 생존율과 체외발생율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 19(4):265-270.
 12. 오원진, 김상근. 1994. 돼지 분할 수정란의 급속동결 융해후 생존율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 18(1):31-37.
- (접수일자 : 1997. 8. 15. / 채택일자 : 1997. 9. 26.)