

## Glucose가 소 초기배의 분할 및 발육에 미치는 영향

노상호 · 이병천 · 황우석  
서울대학교 수의과대학

### Effects of Glucose on the Cleavage and Further Development of Early Bovine Embryos

S. Roh, B. C. Lee and W. S. Hwang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

#### SUMMARY

This study was conducted to compare the insemination time of bovine oocytes and determine the effects of glucose(1.5 mM) on the development of bovine embryos at early cleavage stage. Oocytes were matured for 24 h, followed by exposure to sperm and cultured in modified Tyrode's media drops or with bovine oviduct epithelial cell monolayer prepared in TCM199(BOECM). Insemination time and culture system were varied in each experiment. In experiment 1, to investigate the developmental capacity of bovine embryos after different time of exposure to sperm, bovine ova and sperm were co-incubated for 18, 30 or 54 h, respectively. The development to blastocysts of 30 and 54 h insemination groups were significantly higher( $P < 0.05$ ) than 18 h group, and in case of blastocysts of cleaved embryos, 30 h group were significantly higher( $P < 0.05$ ) than other groups. In experiment 2, we investigated the effect of glucose on early bovine embryos. After 18 h insemination, *in vitro* fertilized oocytes were separated following 3 groups: G+0, G+24 and G+48. Oocytes of G+0 group were cultured in glucose added Tyrode's medium after fertilization, oocytes in G+24 and G+48 groups were cultured in glucose free Tyrode's medium after fertilization. After 24 h culture, G+24 group was moved to glucose added medium. All oocytes of 3 groups were moved to BOECM after 48 h culture. The rates of cleavage and development to blastocysts in G+0 group were significantly lower than other groups. In experiment 3, we determined the effects of glucose exposure from 8 to 20 h after insemination on the cleavage and development of oocytes. The oocytes in glucose added group had high capacity of cleavage and further development. This study shows that in bovine oocytes, the optimal exposure to sperm is 30 h and glucose exposure to bovine one-cell embryos is detrimental to their first cleavage and further development *in vitro*, but there has no evidence of detrimental effect of glucose(1.5 mM) exposure to bovine embryos over the two-cell stage *in vitro*.

(Key words : bovine embryo, insemination time, glucose, *in vitro* development)

## 서 론

포유동물에서 수정란의 체외배양은 수정란이식, 핵이식, 형질전환동물의 생산 등의 산업적인 목적 혹은 불임의 치료 및 수정란의 생리 연구 등에 필수적인 과제이다. 그러나 수정란을 체외에서 배양할 경우 체내와 다른 환경으로 말미암아 일부를 제외한 포유동물에서 수정란의 발육이 정지되는 cell-block 현상을 보인다(Bavister, 1987). 이러한 현상은 토끼난관내에서 일시적인 배양(Boland, 1988), 난관 상피세포(Eyestone과 First, 1989), 난구세포(Goto 등, 1988), 자궁섬유아세포(Voekle, 1985), 영양막세포(Camous 등, 1984) 등과의 공배양을 통하여 극복되어 왔다. 그러나 이러한 공배양을 통하여도 20~40%만이 배반포에 이르는 등 수정란의 발육에 영향을 주는 요인들이 완전히 밝혀지지 않았다.

이 난관상피세포 등 생식도관의 체세포 monolayer와의 공배양이 간편하면서도 효과적인 공배양 방법으로 알려져 있는데 세포의 monolayer 형성시기가 수정 후 체외배양에 도입하는 시기에 비해 늦기 때문에 난소와 동시에 채취한 세포를 이용하여 공배양할 경우 수정 후 1~2일간 별도의 배양액내에서 배양해야 하는 등 번거로운 과정을 거쳐야 한다. 소의 체외수정란의 첫 분할시기는 수정 후 24시간에서 48시간까지 다양하게 나타나는데 최근 체외수정 및 수정 후 첫 분할까지의 소 초기배의 체외발육능을 검토한 결과에서 수정개시 후 30~31시간에 첫 분할을 완료한 2~4세포기 수정란만을 선발해 배양할 경우 배반포로의 발생율이 45~65%로 높게 나타났다는 보고가 있다(Plante와 King, 1992; Lee 등, 1996). 체외수정시간을 연장하여도 발생율에 차이가 없다면 공배양을 위한 monolayer 작성이 완료된 시기에 분할란을 선별하여 난관 상피세포와의 공배양을 실시하는 것이 가능할 것이다.

체세포와의 공배양을 이용한 배양체계하에서는 수정란의 발육에 영향을 미치는 인자를 분석하기가 매우 어렵기 때문에 최근에는 chemically defined media를 이용한 배양이 활발히 수행되고 있으며(Pinyopummintr와 Bavister, 1991), 이러한 인자

들은 발육단계 및 동물종간에도 현저한 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 glucose는 mouse에서 4~8세포기까지는 단독으로 에너지원으로 사용될 수 없는 것으로 알려져 있으며(Brinster, 1965) Leese와 Barton(1984)은 배반포기에 glucose대사가 증가하기 전까지는 pyruvate를 선호한다고 하였다. Chatot 등(1989)은 CZB배양액내의 glucose를 제거하였을 때 마우스수정란의 2-cell block 현상을 극복하였다고 보고하였고, Schini와 Bavister(1988)는 햄스터에서, Takahashi와 First(1992)는 소에서, Conaghan 등(1993)은 사람에서 유사한 결과를 얻었다. 소 수정란의 발달단계별로 glucose의 효과를 조사한 연구는 8세포기 이하의 초기에서는 0.188 mM 이상에서 유해함을, 상실배이상에서는 1.5 mM에서 유익하다는 Matsuyama 등(1993)의 보고가 있으나 8세포기 이하의 초기 수정란을 발육단계별로 세분하여 glucose의 영향을 조사한 보고는 거의 없는 실정이다. 수정란의 발육능을 극대화하기 위하여 체외수정시간을 분할 후인 24~30시간 정도로 할 경우 수정배양액내의 glucose 첨가가 체외수정과정에 영향을 미치는 것인지 수정 후 전핵형성 또는 초기 분할과정에 영향을 미치는 것인지 분명하지 않다. 따라서 본 연구에서는 적절한 체외수정시간을 조사하고(실험 1) 발생배양액 중에서 수정란에 영향을 미치는 인자인 glucose를 대상으로 분할 및 이후 발육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 glucose(1.5 mM)의 첨가시기에 따른 수정란의 발육 정도를 조사하였다(실험 2, 3).

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험에 사용한 난소는 도축된 Holstein종 및 한우 미경산우 및 경산우로부터 연령, 발정주기 및 산차를 고려하지 않고 난소의 외관상 질병이 없는 것으로 판단되는 것만을 채취하였다. 도체로부터 난소를 적출하여 난소 표면에 부착되어 있는 혈액 및 지방조직을 제거한 후 100 IU/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 처리한 30℃의 생리적 식염수(0.9% NaCl)에서 보온, 운반하였다. 난소는 채취 후 3시간 이내에 실험실로 운반하여 신선한 생리

적 식염수로 2회 이상 세정한 후 미성숙난자를 채취할 때까지 37℃ 항온수조에 정치하였다.

## 2. 체외성숙

### 1) 배양액

체외성숙에 사용한 배양액은 Earle's salts를 함유한 TCM-199(Gibco BRL Inc., USA)으로서 미성숙난자의 채취 및 세정을 위하여 0.3%(W/V) BSA(fatty acid free, fraction V, Sigma Co., USA), 2 mM sodium bicarbonate 및 10 mM HEPES(Sigma Co., USA)를, 체외성숙배양을 위해서는 10%의 가열불활화(56℃, 30분) FBS(Gibco BRL Inc., USA), 15 mM sodium bicarbonate 및 2.5 µg/ml FSH(Antrin<sup>®</sup>, Denka Pharm., Japan)를 첨가하여 사용하였다.

### 2) 미성숙난자의 채취

세정용 TCM199 배양액을 18 G 주사침을 장착한 10 ml 주사기로 흡인, 주사침과 주사기의 내강을 세정한 후 난소의 소 난포(직경 2~5 mm)로부터 난포액과 함께 미성숙난자를 흡인, 채취하였다. 난자를 포함한 난포액을 플라스틱 petri dish(100×20 mm, Becton Dickinson Labware, USA)에 5분간 정치시킨 후 상층액을 제거하였다. 미성숙난자는 Kastrop(1990)의 분류기준에 준하여 난구세포가 치밀하며 2층 이상 부착되어 있고 균일한 난자세포질을 갖는 난자를 선발하였다.

### 3) 성숙배양

성숙배양에는 4-well dish(Nunclon, Denmark)를 사용하였으며 배양기시전 각 well에 500 µl의 성숙배양용 TCM199을 넣어 배양기내에 정치시켰다. 선발한 미성숙난자는 세정용 TCM199 배양액으로 3회 세정한 후 성숙배양용 TCM199 배양액으로 1회 세정하여 각 well 당 30~40개를 넣어 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 95% 이상의 습도조건을 갖춘 배양기(이하 5% CO<sub>2</sub> incubator)내에서 24시간 성숙배양하였다.

## 3. 체외수정

### 1) 배양액

정자의 swim-up, 원심세정, 난자의 세정 및 수정에 사용한 배양액은 modified Tyrode's액으로서 Fukui(1990)의 방법에 준하여 작성하였다. 모든 배양액은 週단위로 새로 작성하였으며 사용 전날 5% CO<sub>2</sub> incubator내에서 정치시켜 하룻밤 평형시켰다.

### 2) 정자의 swim-up 및 수정능획득

정자의 처리 및 체외수정은 Parrish 등(1986)의 방법에 준하여 체외수정 2시간 전에 다음과 같이 처리하였다. 정액은 2두의 Holstein종(축협유우개량사업소) 또는 한우(축협한우개량사업소)의 종모우로부터 채취한 동결정액(0.5 ml/straw)으로 각 종모우의 정액 straw를 1개씩 37℃의 온수에 약 30초간 용해한 후 5 ml의 플라스틱 시험관(Becton Dickinson Labware, USA)에 모아 혼합하였다. 실체현미경하에서 용해한 정자의 일부를 사용하여 운동성을 확인한 후 Pasteur pipette을 이용, 미리 작성한 0.8 ml의 수정능획득용 Tyrode's 배양액(pH 7.4)이 들어있는 8~10개의 플라스틱 시험관 저부에 0.2 ml의 정액을 천천히 분주하여 5% CO<sub>2</sub> incubator내에 1시간 정치시켜 swim-up 처리하였다. 시험관으로부터 상부 0.6~0.7 ml의 상층액을 흡입하여 15 ml의 원심관(Becton Dickinson Labware, USA)에 모은 후 2회 원심, 세정하였으며(700 g, 5분), 혈구계산판으로 정자의 수를 산정하여 정자농도가 50×10<sup>6</sup>개/ml가 되도록 정자부유액을 작성하고 동량의 200 µg/ml heparin 용액(Sigma Co., USA)을 첨가하여 최종 heparin 농도를 100 µg/ml로 맞추고 5% CO<sub>2</sub> incubator내에 15분간 정치함으로써 수정능획득을 유도하였다.

### 3) 체외수정

정자처리 개시전 플라스틱 petri dish(60×15 mm, Corning Costar Co., USA)에 수정용 Tyrode's 배양액(pH 7.8)으로 43 µl의 미소적을 만든 후 mineral oil(E.R. Squibb & Sons Inc., USA)을 도포하여 5% CO<sub>2</sub> incubator내에 정치시켰다. Swim-up종료와 동시에(체외성숙 23시간째) 4-well dish로부터 체외성숙난자를 회수하여 세정용 Ty-

rode's 배양액(pH 7.4)으로 3회 세정한 후 5~8개의 난자를 3  $\mu$ l의 배양액과 함께 흡입하여 미리 작성해 둔 수정용 미소적에 주입하여 수정시까지 5% CO<sub>2</sub> incubator내에 정치시켰다. 수정능획득을 위한 heparin처리를 완료한 정자 부유액 4  $\mu$ l를 Holstein種의 정액은 Holstein種 난자의 미소적에, 한우정액은 한우난자의 미소적에 각각 주입하여 최종정자 농도를 2.0×10<sup>6</sup>개가 되도록 하였으며 5% CO<sub>2</sub> incubator내에서 실험설계에 따라 8, 18, 30, 54시간 동안 체외수정하였다.

#### 4. 체외배양

##### 1) 배양액

실험설계에 따라 두 종류의 배양액을 준비하였다. 미소적내 배양의 경우 수정용 Tyrode's 배양액을 사용 전날 5% CO<sub>2</sub> incubator내에서 가스평형한 후 30  $\mu$ l의 미소적을 작성하고 mineral oil을 도포하여 사용하였다. 난관 상피세포 공배양은 다음과 같은 방법으로 monolayer를 작성하여 실시하였다. 도축장에서 초기 황체기의 난관을 채취하여 여분의 결제직을 제거하고 생리식염수로 세정한 후 세정용 TCM199 배양액으로 관류, 채취한 난관 상피세포를 3회 원심분리(1,000 g, 10분)하고 기계적 pipetting 후 1×10<sup>6</sup>개의 농도로 4-well plate에 첨가하여 48~72시간 동안 배양하였다. 이후 공배양하기 2시간 전에 배양액을 교환하여 부유하고 있는 잔존 과사세포를 제거하고 가스평형 후 체외배양에 사용하였다.

##### 2) 체외배양

실험 1에서는 체외에서 18, 30, 54시간, 실험 2에서는 18시간, 실험 3에서는 8시간 동안 수정한 후 난자를 수정 미소적으로부터 세정용 배양액으로 옮겨 가볍게 pipetting하여 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였으며 세포질이 균질하여 구형인 난자를 선별하여 세정용 배양액으로 3회, 발생용 배양액으로 1회 세정하였으며 실험설계에 따라 각각의 배양액에 30  $\mu$ l의 미소적의 경우 각 미소적당 6~8개, 4-well plate내 난관 상피세포 공배양의 경우 well 당 20~30개씩 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> in-

cubator내에서 배양하였으며 난관 상피세포 monolayer는 매 48시간 간격으로 50%의 배양액을 교환하여 주었다. 수정 당일을 0일로 하여 7일째에 수정란을 관찰하여 분할율, 상실배 및 배반포로의 발생율을 산정하였다.

##### 5. 실험 1: 수정시간에 따른 소초기배의 발달율

체외성숙난자를 18시간 수정군, 30시간 수정군 및 54시간 수정군으로 나누어 체외수정한 후 난구세포를 제거하고 수정용 Tyrode's media에서 각각 48, 36 및 12시간(수정 후 66시간) 배양한 후 난관 상피세포와 공배양을 실시하였다.

##### 6. 실험 2: Glucose가 소초기배의 발육에 미치는 영향

체외수정 18시간 후 난자를 세 군으로 나누어 1군은 glucose를 포함하지 않은 수정용 Tyrode's 배양액으로 작성한 30  $\mu$ l의 미소적에서 48시간 동안 배양하였고 2군은 glucose를 포함하지 않은 미소적에서 24시간 동안 배양한 후 glucose를 첨가한 미소적으로 옮겨 24시간 동안 배양하였으며 3군은 glucose(1.5 mM)를 포함한 미소적에서 48시간 동안 배양하였다(수정 후 66시간). 이후 수정란은 난관 상피세포와 공배양을 실시하였다.

##### 7. 실험 3: Glucose가 1세포기 소수정란의 발육에 미치는 영향

체외성숙난자를 8시간 동안 체외수정한 후 두 군으로 나누어 1군은 glucose를 첨가하지 않은 수정용 Tyrode's 배양액으로 작성한 30  $\mu$ l의 미소적내에서 12시간 동안 배양하였고 2군은 glucose(1.5 mM)를 첨가한 미소적내에서 12시간 동안 배양한 후 두 군 공히 glucose를 포함하지 않은 미소적내로 옮겨 36시간 동안 배양하였다(수정 후 66시간). 이후 수정란은 난관 상피세포와의 공배양을 실시하였다.

#### 8. 통계학적 분석

본 실험에서 얻은 결과치는 Chi-square test를 통해 각 실험군간의 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 1. 수정시간에 따른 소 체외성숙난자의 체외발육률

체외수정을 18, 30 및 54시간 실시하여 수정시간에 따른 소 체외성숙난자의 체외발육률을 산정한 결과는 Table 1과 같다. 체외수정을 18, 30 및 54시간 한 후 난관 상피세포와의 공배양을 실시한 결과 78.0, 86.7 및 98.7%가 분할하여 각 군간에 유의적인 차이를 나타내었고 11.9, 30 및 22.8%의 배반포로의 발육률을 보여 30, 54시간 수정군이 18시간 수정군에 비하여 유의적으로 높은 체외발육능을 보였으나( $P<0.05$ ), 분할란의 발육률은 30시간 수정군이 34.6%로 18시간 수정군(17.6%) 및 54시간 수정군(23.1%)에 비하여 유의적으로 높은 체외발육률을 보였다( $P<0.05$ ).

### 2. Glucose첨가시기에 따른 소수정란의 체외발육률

체외성숙난자를 18시간 동안 체외수정한 후 glucose를 첨가한 군(G+0군), 24시간 후에 첨가한 군(G+24군), 48시간까지 첨가하지 않은 군(G+48군)으로 나누어 배양한 후 난관 상피세포와의 공배양을 실시하여 glucose 첨가시기에 따른 소수정란의 체외발육률을 산정한 결과 G+0군의 분할 및 배반포로의 발육률이 64.6 및 8.2%로 G+24군의 78.8 및 23.8%, G+48군의 77.5 및 19.2%에 비해 유의적으로 낮은 발육률을 보였으며 G+24군과 G+48군 사이에는 유의적인 차이가 없었다( $P<0.05$ ). 분할란의 배반포로의 발육률은 G+0군이 12.7%로 G+24군(30.3%) 및 G+48군(24.8%)에 비해 유의적으로 낮은 발육률을 보였으며 G+24군과 G+48군 사이에는 유의적인 차이가 없었다( $P<0.05$ ).

### 3. 체외수정 8시간 후 glucose에 노출된 소수정란의 체외발육률

체외성숙난자를 8시간 체외수정한 후 glucose첨

Table 1. The developmental rates of bovine embryos after *in vitro* fertilization with different durations of fertilization

Duration of IVF (hours)	No. of embryos cultured	No(%) of embryos developed to**			% of BI / cleaved embryos
		2 to 8 cell	6c ell to Mo*	Bl*	
18	168	131(78.0) <sup>a</sup>	34(20.2) <sup>a</sup>	23(11.9) <sup>a</sup>	17.6 <sup>a</sup>
30	150	130(86.7) <sup>b</sup>	50(33.3) <sup>b</sup>	45(30.0) <sup>b</sup>	34.6 <sup>b</sup>
54	158	156(98.7) <sup>c</sup>	50(31.6) <sup>b</sup>	36(22.8) <sup>b</sup>	23.1 <sup>a</sup>

\* Mo=morulae, Bl=blastocysts.

\*\* Embryos were examined 168h post insemination.

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

Table 2. The developmental rates of bovine embryos with different time of glucose addition in culture media after *in vitro* fertilization

Glucose addition time	No. of embryos cultured	No(%) of embryos developed to**			% of BI / cleaved embryos
		2 to 8 cell	16 cell to Mo*	Bl*	
0	158	102(64.6) <sup>a</sup>	31(19.6) <sup>a</sup>	13(8.2) <sup>a</sup>	12.7 <sup>a</sup>
24	151	119(78.8) <sup>b</sup>	50(33.1) <sup>b</sup>	36(23.8) <sup>b</sup>	30.3 <sup>b</sup>
48	151	117(77.5) <sup>b</sup>	46(30.5) <sup>b</sup>	29(19.2) <sup>b</sup>	24.8 <sup>b</sup>

· *In vitro* fertilized embryos were cultured in modified Tyrode's medium 48h with different exposure to glucose and moved to TCM199 with bovine oviduct epithelial cell monolayer.

\* Mo=morulae, Bl=blastocysts.

\*\* Embryos were examined 168h post insemination.

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

Table 3. The developmental rates of bovine embryos exposed to glucose in culture media after 8 h insemination

Group	No. of embryos cultured	No(%) of embryos developed to**			% of BI / cleaved embryos
		2 to 8 cell	16 cell to Mo*	BI*	
Glucose+	107	43(40.2) <sup>a</sup>	14(13.1) <sup>a</sup>	7( 6.5) <sup>a</sup>	16.3
control	101	56(55.4) <sup>b</sup>	26(25.7) <sup>b</sup>	17(16.8) <sup>b</sup>	30.4

· *In vitro* fertilized embryos were cultured in modified Tyrode's medium 12 h with different exposure to glucose and moved to TCM199 with bovine oviductal epithelial cell monolayer.

\* Mo=morulae, BI=blastocysts.

\*\* Embryos were examined 168h post insemination.

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

가군과 비첨가군으로 나누어 분할율을 관찰한 결과 비첨가군이 55.4%로 첨가군의 40.2%에 비해 유의적으로 높은 분할율을 보였다(P<0.05). 배반포로의 발육률은 비첨가군이 16.8%로 첨가군의 6.5%에 비해 유의적 높았으며(P<0.05) 분할란의 배반포로의 발육률은 비첨가군이 30.4%로 첨가군의 16.3%에 비해 높은 발육률을 보였으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

## 고찰

소 난자의 체외수정시간은 수정방법 및 배양액에 따라 8시간에서 30시간까지 다양하게 보고되어 있다(Kim 등, 1993; Lee 등, 1996). 본 실험에서는 30 및 54시간 수정군이 18시간 수정군에 비해 높은 분할률 및 발생율을 보여 수정시간이 길어지면 수정율이 향상되고 따라서 분할 및 이후 발육률이 증가한다는 Lee 등(1996)의 견해와 일치하였다. Pinyopummintr와 Bavister(1991)는 배양액내의 혈청이 수정 후 소 난자의 첫 분할을 억제한다고 하였는데 18시간 수정군의 경우 첫 분할단계에 이르기 전에 혈청에 노출되기 때문에 본 실험에서도 혈청의 분할억제 가능성을 생각할 수 있다. 수정란의 분할 이후인 30 및 54시간 수정군에서는 분할란과 1세포기 난자를 구분하여 배양했기 때문에 18시간 수정군이 미수정란 및 사멸, 변성수정란의 영향을 받아 발육에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 54시간 수정군의 분할율이 다른 두 군에 비해 높은 것은 체외 수정용 배양액내의 생존정자에 의해 30시간 이후에도 수정이 이뤄진 증거로 볼 수 있으나 분할란의 후

기배로의 발육률은 30시간 수정군에 비해 낮아 첫 분할이 30시간 이후로 지연된 난자의 후기배로의 발육능이 떨어지거나 정자가 배양액내에 54시간까지 노출될 경우 사멸하는 과정에서 난자에 좋지 못한 영향을 주는 것으로 생각된다.

최근 수정란의 에너지대사 및 축적이 발육에 미치는 영향에 관한 연구가 정립되어 가고 있으나(Barnett과 Bavister, 1996) 특정한 기질의 필요유무에 관하여는 학자들마다 다양한 견해가 존재하며 이러한 견해들은 종특이적일 뿐 아니라 동종내의 각기 다른 품종간에도 차이가 존재하는 것으로 보인다(Martin과 Leese, 1995; Chatot 등, 1989). 수정란의 체외배양시 사용되는 glucose의 농도는 배양액 및 학자들간에 차이가 있으며 최근 많이 사용하는 난관합성배양액(SOF; Fukui 등, 1991)이나 TLP(Tyrode-lactate-pyruvate; Kim 등, 1993) 등의 defined media내에는 1.5 mM 정도로 TCM-199과 같은 일반적인 세포배양액내의 5.56 mM에 비하여 적은 농도가 첨가되고 있다. 본 실험에서는 배반포로의 발육효율을 높이기 위해 8세포기까지는 defined media인 Tyrode's medium을 사용하였고 이후에는 난관 상피세포와의 공배양을 실시하는 2단계 배양법(Pinyopummintr와 Bavister, 1996)을 사용하였다. 난관 상피세포와의 공배양시 사용한 TCM199내에도 5.56 mM의 glucose가 함유되어 있으나 난관상피세포의 glucose 대사율은 조사하지 않았으므로 2단계 배양시(8세포기 이후) glucose의 효과는 검토하지 않았다. 18시간 수정 후 첨가한 1.5 mM의 glucose가 수정란의 발육률을 떨어뜨린 것은 첫 분할율이 낮은 것에 기인하나 분할한 수정란

이 후기배로 발달하는 비율 또한 첨가유무에 따라 발생률에 차이를 보여 분할이 이뤄진 수정란에서도 glucose에 의한 발육억제가 나타난 것으로 생각된다. 이러한 결과는 수정 후 0~3일간 배양시 3.0~5.0 mM 농도로 첨가한 glucose가 분할율보다 후기배로의 발육에 더 영향을 미쳤다는 Matsuyama 등 (1993)의 결과와 유사하였다. 발생률에 있어서 glucose를 24 및 48시간에 첨가한 군간의 유의적인 차이는 없었으며 본 실험과 같이 24시간 간격으로 첨가유무에 따른 영향을 관찰한 보문을 발견할 수 없어 다른 연구자와의 정확한 비교는 할 수 없었다. 마우스수정란의 경우 glucose가 1세포기 수정란의 첫 분할에 필수적인 역할을 하여 배반포로의 발육률에 영향을 미친다는 보고가 있으며 (Martin과 Leese, 1995) 이는 마우스 초기배와 소 초기배가 그 대사기능이 서로 다를 가능성을 시사한다. Takahashi와 First (1992)는 소태아혈청(FBS)내의 glucose 농도에 기초한 일반적인 세포배양액내의 농도인 5.56 mM의 glucose하에서 상질배로의 발육능이 현저히 떨어짐을 보고하였으나 분할율에는 비첨가군과 5.56 mM 첨가군사이에 차이를 보이지 않아 분할율에 있어 1.5 mM 농도에서도 차이를 보인 본 실험결과와 다소 상반된 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 배양액의 종류 및 배양환경의 차이에 기인하는 것으로 보이나 정확한 원인은 판단할 수 없었다. 1세포기 수정란의 첫 분할에 미치는 glucose의 영향을 확인하고 수정 후 체외수정 배양환경에서의 영향을 배제하기 위하여 수정시간을 8시간으로 제한하고 12시간 동안 glucose를 노출시킨 결과 또한 동일한 양상을 보여 glucose가 전핵형성시기로부터 첫 분할에 이르는 단계까지 유해한 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그러나 본 실험결과로 보아 첫 분할 후 8세포기까지는 glucose의 유무가 발육에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다. 실험 1과 3을 비교해 보면 8시간 수정군이 18~54시간 수정군에 비해 현저히 낮은 발생률을 보여 수정 직후 일정시간이 지나기까지는 난구세포 denuding 혹은 난자세정을 통해 정자를 제거할 경우 수정이 완전히 이뤄지지 않는 것으로 생각된다.

소 수정란이 발생초기에 glucose를 이용하지 못하기 때문에 발육에 좋지 못한 영향을 미치는지, 흡

수한 glucose가 단백질이나 아미노산 등 다른 에너지원의 대사를 경쟁적으로 방해하기 때문인지를 알기 위해서는 한정배양액을 이용하여 각각의 에너지원이 단독, 혹은 상호작용을 어떻게 일으키는지에 대한 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 적 요

소의 미성숙난자를 체외에서 성숙시킨 후 18, 30 및 54시간 체외수정하여 수정시간에 따른 소 수정란의 체외발육능을 검토하고 glucose가 소 초기배의 발육단계에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 체외수정을 30 및 54시간 실시한 후 배양한 군이 18시간 실시한 군에 비해 유의적으로 높은 발육능을 보였으며 분할란의 후기배로의 발육률은 30시간 수정군이 다른 두 군에 비하여 유의적으로 높게 나타났다.
2. 체외수정을 18시간 실시한 후 glucose 첨가군(G+0군), 24시간 후 glucose 첨가군(G+24군) 및 비첨가군(G+48군)으로 나누어 48시간 배양한 후 TCM199내에서 난란 상피세포와의 공배양을 실시한 결과 G+0군의 분할 및 발육률이 유의적으로 낮았으며 분할란의 배반포로의 발육률도 G+0군이 다른 두 군에 비해 유의적으로 낮은 발육률을 나타내었다.
3. 체외수정을 8시간 실시한 후 glucose 첨가군 및 비첨가군으로 나누어 12시간 배양하고 수정 후 44시간에 분할률을 관찰한 결과 비첨가군에서 유의적으로 높은 발육률을 보였으며 분할란의 후기배로의 발육률도 비첨가군에서 높게 나타났다으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

## 참고문헌

- Barnett DK and Bavister BD. 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence?. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:105-133.
- Bavister BD. 1987. Studies on the developmen-

- tal blocks in cultured hamster embryos. In "The Mammalian Preimplantation Embryo." New York Plenum Press, pp. 219-249.
- Boland MP. 1988. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*, 21:126-137.
- Brinster RL. 1965. Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. IV. Interaction of energy sources. *J. Reprod. Fert.*, 10:227-240.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W and Menezo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer or early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:479-485.
- Chatot C, 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.
- Conaghan J, Handyside AH, Winston RML and Leese HJ. 1993. Effects of pyruvate and glucose on the development human preimplantation embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 99:87-95.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 92:125-131.
- Fukui Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:40-46.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi 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.*, 83:753-758.
- Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ and Kruip TAM. 1990. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:222-226.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro* fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48:1320-1325.
- Lee ES, Fujii Y and Fukui Y. 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 45:1151-1162.
- Leese HJ and Barton AM. 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J. Reprod. Fert.*, 72:9-13.
- Martin KL and Leese HJ. 1995. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:436-443.
- Matsutama K, Miyakoshi H and Fukui Y. 1993. 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*, 40:595-605.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1996. Energy substrate requirements for *in vitro* development of early cleavage-stage bovine em-



- bryos. Mol. Reprod. Dev., 44:193-199.
- Pinyopummintr T and 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.
- Plante L and King WA. 1992. Effect of time to first cleavage on hatching rate of bovine embryos *in vitro*. Theriogenology, 37:274 (Abst).
- Schini SA and Bavister BD. 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. Biol. Reprod., 39:1183-1192.
- Takahashi Y and First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology, 37:963-978.
- Voekle SA, Amborsk GF, Hill KG and Godke RA. 1985. Use of uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. Theriogenology, 24:271-281.
- 
- (접수일자 : 97. 7. 28 / 채택일자 : 1997. 8. 20)