

## 체외성숙 조건이 소 체외수정란의 체외발달에 미치는 영향

최선호 · 류일선 · 김일화 · 박수봉 · 연성훈 · 진현주 · 서상욱 · 이충섭 · 손동수  
농촌진흥청 축산기술연구소

### Effects of *In Vitro* Maturation Condition on Bovine IVF Embryos Development

S. H. Choi, I. S. Ryu, I. H. Kim, S. B. Park, S. H. Yeon,  
H. J. Jin, S. W. Suh, C. S. Lee and D. S. Son

National Livestock Research Institute, RDA, Cheonan, Songhwan, 330-800, Korea

#### SUMMARY

This study was performed to improve the development of the *in vitro* fertilized bovine embryos by the condition of *in vitro* maturation. COCs were matured in TCM 199 supplemented with 0.1% PVA, 10 ng/ml EGF, Hormones (5 µg/ml FSH, 10 IU hCG, 1 µg/ml estradiol 17-β) or granulosa cell+Hormones atmosphere 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air for 24 hrs. Matured oocytes were fertilized with frozen-thawed semen capacitated with 5mM caffeine in BO medium for 20 hrs. IVF embryos were cultured in TCM 199 containing with hormones (same as matured medium), 10% FBS and co-culture with bovine oviduct epithelial cells. Maturation rates of COCs were showed 73.8%, 78.5%, 83.2% and 87.6% respectively, and were significant differences between PVA, EGF and Hormones, GC+Hormones (p<0.05). The cleavage rates of IVF embryos were revealed 72.5%, 78.4%, 82.3% and 84.2% and showed same tendency as maturation rates (p<0.05). The blastocysts matured by above maturation condition and cultured for 7~10 days after fertilization had 34.4, 43.6, 52.3 and 59.3 cells and had no differences among the treatments. These results suggest that high molecules as a substitutes of serum and growth factor may induce a nuclear resumption of COCs but we need more study to produce transferable IVF blastocysts by use of that agents.

(Key words : bovine COCs, IVM, IVF, blastocysts)

#### 서 론

소 난구복합체를 이용한 체외수정과 체외수정란의 체외발달은 생명공학 기술을 응용하기 위한 수단으로 이용되어 체세포복제동물의 작출을 이룰 수 있었으며, 또한 인간의 생명 연장에 관한 연구와 불임의 치료에 널리 이용되어 생명공학 기술 발달의 근간이 되었다.

채취된 난구세포복합체의 난구세포의 유무(Fukui와 Sakuma, 1980)와 그 구조(Lebfried와 First, 1979; Dekel과 Phillips, 1979) 및 역할(Chen 등, 1993)에 대한 연구도 활발히 이루어졌으며, 난소내 감수분열이 일시 정지된 미성숙난자에 있어서 감수분열 재개의 signal inducer로서 성선자극호르몬(Eppig, 1980; Ryan 등, 1999)과 난포내 존재하는 과립막세포와의 공배양(Staigmiller와 Moor, 1984) 등이 이용되었고, 수많은 factor가 내재되어 있

는 혈청의 첨가와 무첨가(Choi 등, 1996; Yamashita와 Hoshi, 1996)에 따른 효과와 혈청의 비동화 여부(Pinyopummintr와 Bavister, 1994) 등에 의해 체외성숙을 유도하였다. 그러나, 혈청들은 채취 경위(개체, 발정기, 연령, 질병 유무 등)에 따라 성분 변화가 현격하므로, 보다 더 단순하고 일정한 자극 효과를 유도하는 경향이 나타나기 시작하여, BSA의 대체효과를 지닌 고분자물질, polyvinyl alcohol(PVA, Biggers 등, 1997, Lee와 Fukui, 1996)와 poly vinyl pyrrolidone(PVP, Cholewa와 Whitten, 1970)가 이용되어 대체물질로서의 역할이 인정되었고, 그 밖에 여러 가지 성장인자(Sakaguchi 등, 1999)가 이용되었으나, 특히 EGF를 체외성숙 유도물질(Dekel과 Sherizly, 1985; Harper와 Brackett, 1993; Im과 Park, 1995; Kobayashi 등, 1994; Park 등, 1997; SanBussiho 등, 1990)로서 그리고 체외수정란의 체외발달(Coskun 등, 1991; Marquardt 등, 1983)의 첨가물로서 좋은 효과를 보고하였다. 그러나 체외성숙 및 체외발달에 이용되어 왔던 이러한 물질과 방법이 각 연구자들에 따라 서로 다른 보고가 많으며, 같은 방법이라도 시기에 따라 많은 차이를 나타내고 있다. 체외성숙 및 체외수정은 보다 많은 양질의 이식 가능 수정란을 다량으로 생산하기 위한 기술이라 하겠다.

따라서 본 시험은 상기 보고자들의 연구결과를 한우 난구세포복합체에 이용하였을때 체외수정란의 생산성 향상을 재고하고, 체외성숙 조건에 따른 이식 가능, 체외수정란 생산 기술을 확립하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. COCs (난구세포-난자 복합체)의 채취 및 체외성숙

도살되는 암소의 난소를 생리식염수에 침지하여, 실험실로 운반한 후 신선한 식염수로 3회 이상 세정하고, 재차 70% 에틸알코올로 표피를 세척하였다. 20gauge의 주사침이 부착된 10ml 주사기로 난소 실질에 삽입하면서 난포액과 함께 COCs를 채취하여 50ml cornical tube에 모아 10분간 정지한 후 하부의 것만을 채취한 후 washing용 TCM 199 (25mM

HEPES 첨가)으로 관찰이 용이하도록 한 후 COCs를 선별하였다. COCs는 난구세포가 충만하고 세포질이 충실한 것만을 공시하였다.

채취된 COCs는 0.1% PVA(poly vinylalcohol), 과립막세포( $1 \times 10^6$  cells/ml), 호르몬(5  $\mu\text{g/ml}$  FSH, 10 IU/ml hCG와 1 $\mu\text{g/ml}$  estradiol-17 $\beta$ ) 그리고 10 ng/ml EGF를 첨가한 TCM199 배양액에, EGF를 제외한 나머지 첨가배양액은 10% FBS가 되게 조정하여 체외성숙을 실시하였다. 체외성숙 조건은 39 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 95% 공기인 배양기에 24시간 실시하였다.

### 2. 체외성숙 COCs의 핵상 검사

체외성숙 조건에 따른 체외성숙 후의 핵상의 관찰은 0.1% hyaluronidase용액으로 난구세포를 제거하고 acetic acid와 ethyl alcohol이 1:3인 고정액에 72시간 고정하고, 0.1% aceto orcein 용액으로 염색을 실시한 후 200~400배의 광학현미경하에서 관찰을 실시하여 체외성숙율을 판정하였다.

### 3. 정자처리 및 체외수정

체외수정을 위하여 동결 한우 정액을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20초간 용해한 후 10mM caffeine이 첨가된 BO (Brackett & Oliphant, 1975)액 4ml로 희석한 후 1,600 rpm 5분간, 원심분리하고, 같은 방법으로 원심분리한 후 5 mM caffeine이 첨가된 BO액으로 1회 더 원심을 실시하였다. 처리된 정자는 최종농도가  $1 \times 10^6$  sperms/ml되게 하여 200  $\mu\text{l}$  drop에 20개의 체외성숙된 COCs를 넣어 20시간 동안 체외수정을 유도하였다. 체외수정 후 체외성숙 당일 채취하여 배양한 난관상피세포로 옮겨 체외발생을 실시하였다. 배양액은 체외성숙의 호르몬 첨가구의 배양액으로 공배양을 실시하였다.

### 4. 체외수정 배반포의 세포수 판정

체외수정 후 7~10일된 배반포를 5 $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342용액에 10분간 침지하여 염색한 후 phase contrast가 부착된 형광현미경으로 관찰을 실시하여 세포수를 판정하였다.

### 5. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 유의성 분석은 Statview program(Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA)을 이용한 ANOVA test로 실시하였다.

## 결 과

### 1. 체외성숙 조건이 소 난구복합체(COCs)의 체외성숙에 미치는 영향

체외성숙 조건에 따른 소 COCs의 성숙율은 Table 1과 같다. 고분자물질인 0.1% PVA에서는 EGF의 처리와 유사하게 나타났으며, 유의적인 차이는 없었다. 또한 호르몬과 과립막세포+호르몬의 경우에서도 유사한 결과를 나타내었다. 즉 PVA는 소 COCs의 체외성숙을 유도할 수는 있으나 대량생산을 위한 체외성숙 유도물질로서 높은 체외성숙을 유도할 수는 없음을 알 수 있는 결과이다.

### 2. 체외성숙 조건에 따른 소 COCs의 배발생율

체외성숙 조건이 소 COCs의 배발달에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 체외성숙 조건 중 0.1% PVA와 EGF는 72.5%와 78.4%로 유사한 결과를 나타냈으며, 또한 호르몬 첨가구와 과립막세포+호르몬에 있어서 82.3%와 84.2%로 거의 같은 결과를 보여,

Table 1의 체외성숙율과 같은 경향을 나타냈으며, 0.1% PVA와 EGF 그리고, 호르몬과 과립막세포+호르몬간에 약간의 유의차가 인정되었다( $P < 0.05$ ).

### 3. 체외성숙 조건에 따라 생산된 배반포기 배의 세포수

체외성숙 후 체외수정하여 약 7일에서 10일간 배양된 배반포기 배의 평균 세포수는 Table 3과 같다. 0.1% PVA에서 34.4개, EGF에서 43.6개를 나타냈으며, 호르몬첨가구에서 52.3개 그리고, 과립막세포

Table 3. Effects of maturation condition on cell numbers of bovine blastocysts developed *in vitro*

Maturation condition	No. of blastocysts examined	Cell numbers (Mean)
0.1% PVA	12	34.4
EGF	13	43.6
Hormones	10	52.3
GC+Hormones	11	59.3

Blastocysts obtained between 7~10 days from the start of *in vitro* development were examined.

Table 1. Effects of maturation condition on *in vitro* maturation of bovine COCs

Maturation condition	No. of COCs examined	No. of COCs matured to			Maturation rate (%)
		GV	Met I	Met II	
0.1% PVA	97	5	13	59	73.8 <sup>a</sup>
EGF	93	8	16	51	78.5 <sup>a</sup>
Hormones	97	3	18	60	83.2 <sup>b</sup>
GC+Hormones	98	2	20	64	87.6 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> balue with different superscript are different( $p < 0.05$ )

Table 2. Effects of maturation condition on cleavage rate of bovine oocytes matured *in vitro*

Maturation condition	No. of COCs examined	No. of oocytes fertilized	No. of oocytes developed to			Cleavage rate (%)
			Unfertilized & 1 cell	2 Cell-marula	Blastocyst	
0.1% PVA	94	69	19	43	7	72.5 <sup>a</sup>
EGF	92	72	16	48	8	78.4 <sup>a</sup>
Hormones	96	80	14	56	10	82.3 <sup>b</sup>
GC+Hormones	99	87	14	62	11	84.2 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> balue with different superscript are different( $p < 0.05$ )

**Table 4. Mean number of cultivable COCs collected from slaughter house ovary**

Total No. of ovaries obtained	Total No. of COCs collected	Mean No. of cultivable COCs
627	1914	3.11±1.27

±호르몬에서는 59.3개를 나타냈다.

## 고 찰

체의성숙 조건에 있어서, PVA 등의 고분자물질은 초기 mouse의 수정란에서 질소 고정과 단백질 합성을 위한 매개체로서 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, PVA는 한정배지의 조성을 조절하거나 특정 물질에 의한 mechanism의 구명을 위해 사용될 수 있다. 또한 초기 수정란에 요구되는 고정된 질소의 재료이며, 영양소로서의 기능을 가지고 있는 BSA의 대체효과를 지니고 있다고 하였다. 물론 PVA가 에너지의 재료로서 이용되지는 않으나, 고분자를 요구하는 대사기능의 일부분을 매개하는 것으로 알려져 있다. Natitana 등(1997)등도 양의 수정란을 동결시 PVA가 우태아혈청(FCS)의 대체효과를 지니고 있다고 하였다. 본 시험결과에서도 0.1% PVA의 첨가에 의해 73.8%의 metaphase기를 나타냈으며, 배발달율도 72.5%를 보여, PVA가 체외성숙 및 체외수정에 있어서 혈청이나 BSA의 대체효과를 확인할 수 있었다. 그러나 배반포기 수정란의 세포수에 있어서는 다른 처리구에 비해 다소 적었다. 즉 수정란이식시의 착상율과 밀접한 관계를 가지는 세포수에 있어서 미흡한 점이 많아 아직까지는 완전한 에너지물질의 대체효과는 기대하기 어렵다고 보여진다. 또한 BSA 혹은 FBS가 가지고 있는 미지의 factor들에 대한 연구가 명확하지 않으면, PVA의 대체효과는 요원하다고 하겠다.

EGF는 난구세포를 매개로 하여 mouse 난자의 GVBD(Downs 등, 1988)와 소 난자의 핵성숙을 유도(Lorenzo 등, 1994)하는 것으로 알려져 있다. 또 돼지에 있어서 수정 후 정자로부터 핵이 세포질내에 응성전핵을 형성시 EGF에 의해 촉진된다고 하였다. 또한 EGF는 protein kinase를 receptor로 가지고 있으며, 단백질의 인산화작용을 촉진하여 체내

에서 혹은 체외에서 세포의 성장을 촉진한다고 하였다. 본 시험의 결과에서도 체외성숙시 78.5%의 성숙율과 78.4%의 배발달율을 보여 Im과 Park (1995)와 유사한 결과를 나타냈으나, 배반포의세포수에 있어서는 본 연구의 결과가 다소 낮은 결과였다.

최근 도살암소의 난소로부터의 체외수정란의 생산을 위하여, 난구세포복합체를 채취한 결과 Table 4와 같으며, 실제로 시험에 사용될 수 있는 것이 너무 적었고, 또한 난소가 난포낭종 등 번식장애의 징후를 나타내는 난소를 많이 발견할 수 있었다. Mer-millod 등(1992)에 의해서도 평균 14.1개/두로서, 본 시험의 결과보다는 다소 많이 채취되었다. 그러나 편차가 10.0개로 큰 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과는 Crister 등(1986)에 의해 보고된 것과 같이 기원이 같은 난소로부터 채취된 난구복합체 간에는 경쟁적으로 성장이 가능할 것으로 여겨지나 본래 채취되는 난자수가 적기 때문에 발생 등도 감소하는 것으로 사료된다. 물론 채취된 난구복합체를 모두 혼합하여 체외성숙·수정을 하기 때문에 지배난포(dominant follicle)로부터 채취된 난자가 어떤 것인지 명확하지는 않다. 또한 사양관리에 있어서도 막대한 영향이 있을 것이다. 농후사료 위주의 한우 사육으로 인한 비만우의 양산도 향후 수정란을 통한 가축의 개량에 있어서 많은 문제를 유발시킬 것으로 사료된다.

이상의 결과에 미루어 PVA와 EGF를 이용한 체외성숙 조건에서도 배반포기 수정란을 생산할 수 있었으나, 공배양에 의해 생산된 것에 비해 세포수가 적어 미흡함으로 더욱 더 체외성숙에 대한 이전의 연구가 요구된다고 하겠다.

## 적 요

본 연구는 체외성숙 조건이 소 체외수정란의 체외발달에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 체외성숙 조건은 0.1% PVA, 10 ng/ml EGF, 호르몬 (5µg/ml FSH, 10 IU hCG, 1µg/ml estradiol 17-β) 혹은, 과립막세포(GC)+호르몬 등이 첨가된 TCM 199배양액에 39°C 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기인 배양기에서 24시간 체외성숙 후, 한우 동결 정액을 5

mM caffein이 첨가된 BO액으로 체외수정능 획득 시켰고, 20시간 체외수정을 실시하였다. 체외수정란의 체외발달은 호르몬이 첨가된 TCM 199배양액에 난관상피세포와의 공배양을 실시하였다. 이상의 시험결과는 다음과 같다.

1. 체외성숙시 0.1% PVA, EGF, 호르몬 혹은 GC+호르몬 등을 첨가한 결과, 체외성숙율은 각각 73.8%, 78.5%, 83.2%, 87.6%였으며, PVA와 EGF 그리고, 호르몬과 GC+호르몬에서 약간의 유의차가 인정되었다( $p < 0.05$ ).
2. 체외성숙시 0.1% PVA, EGF, 호르몬 혹은 GC+호르몬 등을 첨가하여 성숙된 후 체외수정한 결과 난분할율은 각각 72.5%, 78.4%, 82.3%, 84.2%였다. 체외성숙시와 같은 경향이였다.
3. 체외성숙시 0.1% PVA, EGF, 호르몬 혹은 GC+호르몬 등을 첨가하여 성숙되고, 체외수정 후, 체외배양 7~10일째의 배반포기배를 형광염색에 의해 관찰한 세포수는 각각 34.4, 43.6, 52.3, 59.3개였다. 각 처리간에 유의차는 인정되지 않았다.
4. 도살암소의 난소로부터 채취된 난구세포복합체의 수는  $3.11 \pm 1.27$ 개로 채취시기에 따라 다소 차이를 나타냈다.

이상의 결과로 체외성숙 조건에 따라 체외성숙율과 배발달율에 약간의 차이를 보였으며, 기존의 체외성숙 방법 이외에 고분자물질이나 세포성장인자에 의해서도 체외성숙을 유도할 수 있었으나, 수정란이식 가능 배반포기배에서는 세포수가 약간의 미비함을 나타내어 향후 세포성장인자 등의 체외성숙 유도물질에 대한 연구가 더욱 요구된다고 하겠다.

## 참고문헌

Biggers JD, Summers MC and McGinnis LK. 1997. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. Human Reprod. Update 3(2):125-135.  
 Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod.

12:260-274

Chen L, Russel PT and Larsen WJ. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. Mol. Reprod. Dev. 34:87-93  
 Choi SH, Yang BC, Kim IH, Son DS, Lee HJ, Lee KW, Park MK, Kim KN and Chung YC. 1997. Effects of serum on *in vitro* maturation of Korean native cattle oocytes. Theriogenology 47(1):187.  
 Cholewa JA and Whitten WK. 1970. Development of two-cell mouse embryos in the absence of a fixed-nitrogen source. J. Reprod. Fert. 22:553-555.  
 Crister ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH and Northey DL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology 25:150 (abstract).  
 Coskun S, Sanbussho A, Lin YC, Pikihisu Y. 1991. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). Theriogenology 36:485-494.  
 Dekel N and Phillips DM. 1979. Maturation of the rat cumulus oophorus: a scanning microscopic study. Biol. Reprod. 21:9-18.  
 Dekel N and Sherizly I, 1985. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. Endocrinology, 116:406-409.  
 Downs SM, Daniel SAJ and Eppig JJ. 1988. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor. Evidence for a stimulus of somatic cell origin. J. Exp. Zool. 245:86-96.  
 Eppig JJ. 1980. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotrophins *in vivo* and *in vitro*. Biol. Reprod. 23:545-552.

- Fukui Y and Sakuma Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*:relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod. 22:669-673.
- Harper KM and Brackett BG. 1993, Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and concentrations of gonadotrophins. Biol. Reprod. 48:409-416.
- Im KS and Park KW. 1995. Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. Theriogenology 44:209-216.
- Kobayashi K, Yamashita S and Hoshi H. 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on *in vitro* maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. J Reprod. Fert. 100 :439-446.
- Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanin and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro*-produced bovine morulae and blastocyst. Biol. Reprod. 55(6): 1383-1389.
- Leibfried ML and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sci. 48 :76-86.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC and Illera M. 1994. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocytes maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. J. Reprod. Fert. 101:697-701.
- Marquardt H, Hunkapillar MW, Hood LE, Twardzik DR, De Larco JE, Stephenson JR and Todaro GJ. 1983. Transforming growth factors produced by retrovirus-rodent fibroblasts and human melanoma cells:amino acid sequence homology with epidermal growth factor. Proc. Nat. Aca. Sci. 80 :4684-4688.
- Mermillod P, Wils C, Massip A and Dessy F. 1992. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. J. Reprod. Fert. 96 :717-723.
- Naitana S, Ledda S, Loi P, Leoni G, Bogliolo L, Dattena M and Cappai P. 1997. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. Anim. Reprod. Sci. 48(2-4) :247-256.
- Park KW, Iga K and Niwa K. 1997. Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to development to blastocysts in a chemically defined medium. Theriogenology 48:1127-1135.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium:Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. Theriogenology 41:1241-1249.
- SanBuissho A, Cokun S and Lin YC. 1990. Stimulatory action of epidermal growth factor (EGF) on *in vitro* bovine oocytes maturation. Assist Reprod. Tech. Androl. 1:143-153.
- Ryan GJ, Waddinton D and Campbell KHS. 1999. Addition of progesteron during bovine oocytes maturation in the presence of gonadotrophnis improves developmental competence. Theriogenology 51(1); 392 abstract.
- Sakaguchi M, Yamaguchi N, Dominko T, Nagai T and First NL. 1999. Kinase activities in small follicle-derived bovine oocytes during maturation culture with growth factors. Theriogenology 51(1); 393 abstract.
- Staigmiller RN and Moor RM. 1984. Effect of follicle cells on the maturatiion and develop-

mental competence of ovine oocytes matured outside the follicle Gamete Research 9:221-229.

Yamashita S and Hoshi H. 1996. Bovine blastocyst formation from IVM/IVF produced

zygotes in serum and serum free medium, Theriogenology 46(1):197 abstract.

---

(접수일:1999. 5. 6 / 채택일자:1999. 8. 12)