

단순한정배양액 내의 Sodium Chloride 및 Macromolecules가 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향

노 상 호

한경대학교 동물생명자원학과

Effects of Sodium Chloride and Macromolecules in Chemically Defined Culture Medium on *In Vitro* Development of Bovine Embryos

S. H. Roh

Department of Animal Life and Resources, Hankyong National University,
456-749, Republic of Korea

SUMMARY

The present study was carried out to develop a completely defined culture system and determine if high NaCl concentrations in defined (PVA added) or semi-defined (BSA added) medium is toxic to bovine embryos. Oocytes from slaughterhouse ovaries were matured and fertilized *in vitro*. After 30 h of insemination, only 2-cell stage embryos were selected and cultured for this experiment. The culture media used were as follows : TLP (114 mM of NaCl) + BSA (3 mg/ml), TLP + PVA (1 mg/ml), mTLP (96 mM of NaCl) + BSA, mTLP + PVA. Six to ten embryos were placed into a 30 μ l drop of each medium and the embryos were examined at 10 day post-insemination without medium renewal. The experiment was replicated 4 times. All data were analyzed by chi-square. There were no significant differences among TLP-BSA, mTLP-BSA and mTLP-PVA in blastocyst development (21.6, 17.2 and 20.2%), respectively. Also, no differences were obtained in hatching rates (11.7, 9.9 and 12.2%), respectively. However, there were significant differences between TLP-PVA (1.7% and 0.6%) and other groups in blastocyst formation and hatching rates, respectively ($p < 0.01$).

Development of *in vitro* produced embryos cultured in BSA containing medium was not affected by high NaCl concentration, but in the completely defined medium, embryonic development was highly affected by NaCl. This study shows that reduced NaCl concentration in completely defined medium is beneficial for development of bovine pre-implantation embryos *in vitro*.

(Key words : bovine embryo, *in vitro* culture, defined medium, NaCl)

서 론

포유동물에서 수정란의 체외배양은 수정란이식, 핵이식 및 형질전환동물의 생산 등 산업적인 목적 외에도 불임의 극복 및 수정란의 생리연구 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 토끼난관 내에서 일시적인 배양 (Boland, 1988), 난관상피세포 (Eyestone과 First, 1989), 난구세포 (Goto 등, 1988), 영양막세포 (Camous 등, 1984) 등과의 공배양을 통하여 극복되어 왔다. 그러나 체세포를 이용한 수정란발육의 향상은 공배양하는 세포들이 과연 수정란에 이로운 역할을 수행하는지에 대한 많은 의문이 제기되어 체세포와의 공배양 없이 발육률을 높이기 위한 방법으로 phosphate 농도의 조절 (Kim 등, 1993), glucose 노출시기 조절 (Matsuyama 등, 1993), 삼투압 (Lim 등, 1994) 및 산소분압의 조절 (Voelkel과 Hu, 1992) 등이 시도되어 왔다. 특히 최근에는 단순한 정배양액을 이용하여 소 수정란의 체외생산이 이뤄지고 있으며 (Keskinetpe와 Brackett, 1996) 이는 수정란의 기초생리현상 및 초기배의 유전자발현에 관한 연구에 널리 활용되고 있다. 마우스 수정란은 배양액 내의 NaCl 농도가 75 mM 이상인 경우 유해한 영향을 받는 것으로 보고되어 있다 (Lawitts와 Biggers, 1992) 또한 Lim 등 (1994)은 NaCl의 농도를 89 mM로 낮추어 제조한 배양액을 사용, 무혈청 배양체계에서 우수한 배발육을 보고하였다.

본 실험은 혈청이나 공배양세포가 배제된 단순한 정배양액을 이용, 수정란의 발달에 영향을 미치는 인자의 하나인 배양액 내 NaCl의 농도를 조절하여 삼투압이 소 초기배의 발육에 미치는 영향을 알아보고 이를 통해 한정배양액을 이용한 최적의 수정란 배양조건을 확립하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

1) 미성숙난자의 채취

완충액으로 25 mM의 HEPES가 첨가된 tissue culture medium (TCM) -199 (Gibco BRL, U.S.A.; 이하 세정용 TCM199)을 18 gauge 주사침을 장착

한 10 ml 주사기로 흡인, 주사침과 주사기의 내강을 세정한 후 도축장에서 채취한 난소의 소난포 (직경 2~5 mm)로부터 난포액과 함께 미성숙난자를 흡인, 채취하였다. 난자를 포함한 난포액을 플라스틱 petridish (100×20 mm, Becton Dickinson Labware, U.S.A.)에 5분간 정치시킨 후 상층액을 제거하였다. 미성숙난자는 난구세포가 치밀하며 2층 이상 부착되어 있고 균일한 난자세포질을 갖는 난자를 선발하였다.

2) 성숙배양

성숙배양에는 4-well plate (Nunc, Denmark)를 사용하였으며 배양개시 전 각 well에 500 μ l의 성숙배양용 TCM199을 넣어 전배양하였다. 선발한 미성숙난자는 세정용 TCM199 배양액으로 3회 세정한 후 10%의 FBS, 15 mM sodium bicarbonate, 2.5 μ g/ml FSH (Antrin[®], Denka Pharm., Japan) 및 1 μ g/ml estradiol (Sigma Co., U.S.A.)이 첨가된 성숙배양용 TCM199으로 1회 세정하여 well 당 20~50개를 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator 내에서 24시간 성숙배양하였다.

2. 체외수정

1) 정자의 swim-up 및 수정능획득

정액은 2두의 한우의 종모우로부터 채취한 동결정액 (0.5 ml/straw; 축협한우개량사업소)으로 각 종모우의 정액 straw를 1개씩 37°C의 온수에 약 30초간 용해한 후 5 ml의 폴라스틱 시험관 (Becton Dickinson Labware)에 모아 혼합하였다. 실험마경하에서 용해한 정자의 일부로 운동성을 확인한 후 Pasteur pipette을 이용, 미리 작성한 0.8 ml의 정자배양용 TALP가 들어 있는 8~10개의 폴라스틱 시험관 저부에 0.2 ml의 정액을 분주하여 5% CO₂ incubator 내에 1시간 정치시켜 swim-up 처리하였다. 시험관으로부터 상부 0.6~0.7 ml의 상층액을 흡입하여 15 ml의 원심관 (Becton Dickinson Labware)에 모은 후 2회 원심, 세정하였으며 (600 g, 5분), 혈구계산관으로 정자의 수를 산정하여 정자농도가 50×10⁶ 개/ml가 되도록 정자부유액을 만들고 동량의 200 μ g/ml heparin 용액 (Sigma)을

첨가하여 최종 heparin 농도를 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 맞추고 5% CO_2 incubator내에 15분간 정지함으로써 수정능획득을 유도하였다.

2) 체외수정

정자처리 개시 전 플라스틱 petridish (60×15 mm, Corning Costar Co., U.S.A.)에 수정용 Tyrode's 배양액(이하 IVF-TALP; pH 7.8)으로 43 μl 의 미소적을 만든 후 mineral oil (Sigma)을 도포하여 5% CO_2 incubator내에 정지시켰다. 정자의 swim-up종료와 동시에(체외성숙 23시간째) 4-well plate로부터 체외성숙난자를 회수하여 Hepes (10 mM)-buffered TALP (pH 7.4)로 3회 세정한 후 5~8개의 난자를 3 μl 의 배양액과 함께 흡입하여 미리 작성해 둔 수정용 미소적에 주입하여 수정 시까지 5% CO_2 incubator내에 정지시켰다. 수정능 획득을 위한 heparin 처리를 완료한 정자부유액 4 μl 를 미소적에 각각 주입하여 최종정자농도를 2.0×10^6 개가 되도록 하였으며, 이후 5% CO_2 incubator내에서 30시간 동안 체외수정하여 2세포기로

의 발육을 유도하였다.

3. 체외배양

실험설계에 따라 각종 체외배양액을 30 μl 씩 미소적으로 작성하였으며 최소한 실험 2시간 전에 전배양 하였다. 실험에 이용된 기초배양액은 체외수정에 이용한 IVF-TALP 배양액을 기본으로 한 TLP medium으로서 고분자물질원으로 3 mg/ml의 bovine serum albumin (Sigma, 이하 BSA) 혹은 1 mg/ml의 poly vinyl alcohol (Sigma, 이하 PVA)를 첨가하였으며 NaCl의 농도를 96 mM로 낮춘 배양액을 mTLP로 명명하여 각각 TLP-BSA, TLP-PVA, mTLP-BSA 및 mTLP-PVA의 네 그룹으로 나누어 체외수정란을 배양하였다. 각각의 구성 성분은 Table 1과 같다. 수정한 난자는 수정 미소적으로부터 세정용 배양액으로 옮겨 가볍게 pipetting 하여 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였으며 작성한 체외배양액의 미소적에 각각 6~10개씩 첨가하여 5% CO_2 incubator내에서 배양하였다. 수정당일을 0일로 하여 10일째에 수정

Table 1. Composition of culture media for bovine embryo development *in vitro*

Component	Units	TLP-BSA	TLP-PVA	mTLP-BSA	mTLP-PVA
NaCl	mM	114.0	114.0	96.0	96.0
KCl	mM	3.2	3.2	3.2	3.2
NaHCO ₃	mM	25.0	25.0	25.0	25.0
NaH ₂ PO ₄	mM	0.4	0.4	0.4	0.4
Na-lactate (60% syrup)	mM	10.0	10.0	10.0	10.0
Na-pyruvate	mM	0.5	0.5	0.5	0.5
CaCl ₂	mM	2.0	2.0	2.0	2.0
MgCl ₂	mM	0.5	0.5	0.5	0.5
Glucose	mM	1.5	1.5	1.5	1.5
Phenol red	$\mu\text{g/ml}$	5.0	5.0	5.0	5.0
BSA ^a	mg/ml	3.0	-	3.0	-
PVA ^b	mg/ml	-	1.0	-	1.0
EAA ^c	%	2.0	2.0	2.0	2.0
NEAA ^d	%	1.0	1.0	1.0	1.0
ITS ^e	%	1.0	1.0	1.0	1.0

^aBovine serum albumin (fatty acid free, fraction V)

^bPoly vinyl alcohol

^cEssential amino acids

^dNon-essential amino acids

^eInsulin (10 $\mu\text{g/ml}$), transferrin (5.5 $\mu\text{g/ml}$) and selenium (5 ng/ml) complex.

Table 2. Effects of NaCl concentration and macromolecules in embryo culture medium on *in vitro* development of bovine embryos

NaCl concentration	Macromolecules	No. of 2-cell embryos used (r)	No. of embryos developed to (%)	
			Blastocysts	Hatched blastocysts
114 mM (TLP)	BSA (3 mg/ml)	120 (4)	26 (21.6) ^a	14 (11.7) ^a
	PVA (1 mg/ml)	172 (4)	3 (1.7) ^b	1 (0.6) ^b
96 mM (mTLP)	BSA (3 mg/ml)	262 (4)	45 (17.2) ^a	26 (9.9) ^a
	PVA (1 mg/ml)	188 (4)	38 (20.2) ^a	23 (12.2) ^a

^{a,b}Values with different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.01$)

란을 관찰하여 분할율, 배반포 및 부화배반포로의 발육률을 산정하였다.

4. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 유의성 검정에는 Chi-square test를 이용하였다.

결 과

배양액 내의 NaCl 농도를 114 mM (TLP)과 96 mM (mTLP)로 나누고 각각의 배양액 내의 고분자물질원을 BSA 및 PVA로 나누어 소 체외수정란을 배양한 결과 TLP-PVA 군의 배반포 및 부화배반포로의 발육률이 나머지 실험군에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.01$, Table 2).

고 찰

본 실험은 배양액 내의 NaCl 농도를 변화시킴으로써 삼투압을 조절하고 고분자물질원으로 PVA를 첨가하여 혈청이 배제된 한정배양액을 작성, 소 체외수정란의 적절한 배양체계를 확립하고자 실시되었다.

소 수정란의 배양에 한정배양액을 이용할 경우 NaCl의 농도를 89 mM 정도로 낮추는 것이 발육에 효과적이라는 보고가 있으며 (Lim 등, 1994), 마우스에서 높은 삼투압은 수정란의 발육에 유해하다고 알려져 있다 (Lawitts와 Biggers, 1992) 본 실험에서 기초배양액으로 1% ITS를 첨가한 TLP를 이용하고 배양액내의 NaCl 농도를 114 mM 및

96 mM로 낮추어 수정란을 배양한 결과 고분자물질원으로 PVA를 이용할 경우 NaCl의 농도를 낮추어 주는 것이 후기배로의 발육을 증진시키는 것으로 나타났다. 이는 한정배양액의 경우 삼투압을 낮추는 것이 소 초기배의 발육에 유효하다는 Lim 등 (1994)의 연구와 일치하는 결과였으나 고분자물질원으로 BSA를 이용할 경우 이러한 효과는 나타나지 않았다. 이는 BSA가 고삼투압 하에서의 발육저하현상을 상쇄시킨 것으로 설명할 수 있다.

일반적으로 배양액내의 단백질 (BSA)은 독성물질과 chelation을 통해 detoxication하는 것이 주된 역할로 알려져 있다 (Flood와 Shirley, 1991). 본 실험결과로 볼 때 고삼투압 하에서도 BSA 첨가군의 발육률이 저하되지 않은 것은 배양액 내의 BSA가 Na 이온과의 반응을 통하여 수정란의 발육에 영향을 미친 것으로 판단할 수 있다. 한편, 배양액 내의 BSA는 금속이온 및 독소와의 chelation에 의한 해독작용 뿐만 아니라 수정란에 의해 흡수된 후 분해되어 에너지원 및 아미노산으로 활용된다 (Pemble과 Kaye, 1986). 이러한 BSA의 복합적인 작용이 PVA를 이용한 한정배양액에 비하여 수정란의 발육에 유효한 역할을 할 수 있는 것으로 판단된다. 그러나 BSA 혹은 혈청의 경우 체외배양시 수정란의 유전자발현양상이 체내회수란 및 PVA 첨가 한정배양액에서 생산된 체외수정란과는 상이하게 나타난다는 보고가 있다 (Wrenzycki 등, 1999). 이는 체외생산 수정란의 착상 후 이상, 유산 및 비정상 산자의 생산 등을 유발하는 요인이 될 수 있다. 또한 고분자물질원으로 PVA 등 비단백 합성물질을 이용할 경우 수정란의 대사능, 착

상 전 수정란의 단백질 발현양상 등의 분석이 가능하며 혈청 및 BSA에 극미량 함유되어 있는 각종 성장인자가 수정란에 미치는 영향을 정량적으로 분석하는 것이 가능하게 된다.

결과는 제시하지 않았으나 본 배양체계 하에서는 삼투압이 280 mOsm 이상이면 배반포로의 발육률이 저하되는 현상을 보였다 그러나, synthetic oviduct fluid (SOF) 등 일반적으로 소 초기배의 배양에 이용하는 배양액의 삼투압수준이 290~300 mOsm 내외인 것을 감안하면 삼투압에 의한 유해성이 배양액 내의 다른 이온화합물 혹은 환경적 요인에 의해서 영향을 받았을 가능성도 있다. 특히 본 실험은 NaCl의 농도를 조절하여 삼투압을 조정하였기 때문에 저자는 NaCl의 농도를 고정한 후 다른 이온화합물을 이용하여 삼투압을 조정하거나 삼투압을 고정시킨 후 NaCl 농도의 비율을 조정하는 등, NaCl 농도와 삼투압을 독립적인 변수로 지정, 각각의 영향을 비교하는 실험을 준비 중에 있다. 전술한 논문에서 Lim 등(1994)은 본 실험에서와 동일한 공기 및 5% CO₂ 환경 하에서 수정란을 배양하였으나 Keskinetepe와 Brackett (1996)은 5% CO₂, 5% O₂ 및 90% N₂의 환경 하에서 PVA가 첨가된 SOF를 이용하여 배양, 후기배로의 높은 발육성적을 보고하였다. 따라서 삼투압과 다른 배양환경요인들과의 관계에 관한 추가적인 실험을 비롯하여 배반포의 세포수 산정 등 한정배양액 내 수정란의 질적인 분석에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

배양액 내의 NaCl 농도를 114 mM (TLP)과 96 mM (mTLP)로 나누고 각각의 배양액 내의 고분자 물질원을 BSA 및 PVA로 나누어 소 체외수정란을 배양한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

실험결과, TLP-BSA, mTLP-BSA 및 mTLP-PVA 실험군에서의 배반포 및 부화배반포로의 발육률이 TLP-PVA 군에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.01$).

이상의 결과로 보아 단순한정배양액을 이용할 경우 배양액 내의 NaCl 농도를 낮추는 것이 소 수

정란의 체외생산에 효율적일 것으로 사료되며 BSA는 배양액 내에 고농도로 함유된 NaCl의 유해성을 상쇄시키는 역할을 하는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bavister BD. 1987. Studies on the developmental 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.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W and Menezo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. J. Reprod. Fertil., 72:479-485
- 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.
- Flood LP and Shirley B. 1991. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. 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. Fertil., 83:753-758.
- Keskinetepe L and Brackett BG. 1996. *in vivo* developmental competence of *in vivo*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. Biol. Reprod., 55:333-339.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vivo*-matured, *in vivo* fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture med-

- ium. Biol. Reprod., 48:1320-1325.
- Lawitts JA and Biggers JD. 1992 Joint effects of sodium chloride, glutamine and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. Mol. Reprod. Dev., 46:470-474.
- Lim JM, Okitsu O, Okuda K and Niwa K. 1994. Effects of calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vivo*. Theriogenology, 41:1091-1098.
- Matsuyama K, Miyakoshi H and Fukui Y. 1993. Effect of glucose levels during the *in vivo* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vivo* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vivo*. Theriogenology, 40:595-605.
- Pemble LB and Kaye PL. 1986. Whole protein uptake by mouse blastocysts J. Reprod. Fertil, 78:149-157.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. Theriogenology, 37:1117-1131.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW and Niemann H. 1999. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. Mol. Reprod. Dev., 53:8-18.
-

(접수일: 2000. 7. 31 / 채택일: 2000. 8. 15)