

무혈청배지에 첨가된 성선자극호르몬 및 항산화제가
소 미성숙난자의 체외성숙능에 미치는 영향

임정목[†] · 박성은¹ · 정형민¹ · 이병천² · 이은송³ · 고정재¹ · 박 찬¹ · 차광렬¹ · 황우석²
서울대학교 농업생명과학대학 농생명공학부

**Effects of Addition of Exogenous Gonadotropins and/or
an Antioxidant to Serum-Free Medium on *in vitro*
Maturation of Bovine Immature Oocytes**

J. M. Lim[†], S. E. Park¹, H. M. Chung¹, B. C. Lee², E. S. Lee³, J. J. Ko¹,
C. Park¹, K. Y. Cha¹ and W. S. Hwang²

Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Life Science,
Seoul National University, Suweon 441-744, Korea

SUMMARY

This study was conducted to examine the effects of exogenous gonadotropins (PMSG+hCG) and an antioxidant (cysteine) on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes.

Cumulus-oocyte complexes (COCs) aspirated from 2 to 5 mm ovarian follicles were cultured for 22 to 24 hours in a modified bovine embryo culture medium (mBECM) supplemented with 3 mg/mL bovine serum albumin, to which PMSG (10 IU/mL) + hCG (10 IU/mL) and/or cysteine (0.6 mM) were added. When examined the expansion of cumulus cells at the end of maturation culture, greater ($p < 0.05$) expansion was found after addition of PMSG+hCG (79 to 96%) to mBECM than after no addition (0%), regardless of the presence or absence of cysteine in the medium. The addition of cysteine did not stimulate cumulus expansion, but a high proportion (92%) of expansion was achieved when COCs were cultured after the addition of PMSG+hCG and cysteine to the medium. No difference in the proportion of oocytes underwent germinal vesicle breakdown (initiation of maturation) was found after the addition of PMSG+hCG and/or cysteine to mBECM. However, nuclear maturation (development to the metaphase-II stage) of oocytes was significantly stimulated by the combined addition of PMSG+hCG and cysteine, compared with no addition.

In conclusion, both exogenous gonadotropins and an antioxidant are important for nuclear maturation of bovine immature oocytes and these factors have a cell-specific stimulatory action.

(Key words : bovine, oocyte maturation, serum-free culture, gonadotropin, antioxidant)

이 연구는 1998년 과학기술부 주관 선도기술개발사업 중 "신기능 생물소재 기술개발사업"(98-G-08-02-A-3)에 의하여 수행되었음.

¹포천중문대학교 의학과 (College of Medicine, Pochon CHA University)

²서울대학교 수의과대학 (College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

³강원대학교 수의학과 (Dept. of Veterinary Medicine, Kangwon National University)

[†]Correspondence

서 론

생식세포 체외배양기법을 이용한 우수형질보유 개체의 대량생산기술이 1980년대 초반에 개발되어 (Brinster와 Palmiter, 1986; Gordon 1983; Palmiter와 Brinster, 1986) 현재 수의축산분야에 활발히 이용되어지고 있다. 최근에는 동 기법을 기반 기술로 이용한 생식세포 미세조작기술이 개발되어, 수정란의 할구, 배아간세포 및 체세포 등을 공여핵 등으로 이용한 복제동물 생산기법이 발달되었다 (Wilmot 등, 1997, 1998; Cibelli 등, 1998; Wakayama 등, 1998). 이는 첨단 축산기술 발전뿐만 아니라 관련 생명공학 분야의 파급발전을 주도하고 있으며, 국내에서도 젖소 및 한우의 복제송아지 생산이 최근 성공하였다. 현재까지의 연구결과를 종합하여 보면 체내에서 회수된 미성숙난자의 80~85% 정도가 체외배양에 의하여 성숙되어지며 이중 70~75%가 정상적인 수정과정을 거쳐 1-세포기까지 발생한다. 이후 5~7 일간의 배양과정을 통하여 체외수정란의 20~30%가 이식 최적단계인 상실기/배반포까지 발생하여 수정란이식에 공여되고 있다 (Lim 등, 1999). 만약 생식세포 배양기술의 개선을 통하여 난자의 체외발생능이 향상된다면, 기존 생명공학기술의 효율성이 현저히 개선될 수 있다고 기대된다.

미성숙 난자의 핵성숙 (nuclear maturation)은 기존의 체외배양 system 하에서 용이하게 이루어지기 때문에 지금까지는 주로 체외수정란의 배양법 개발에 연구가 집중되었다 (Lee와 Fukui, 1996). 그러나, 전핵형성, 수정란 유래의 유전자 활성화 및 초기분화 등이 일어나는 수정란의 착상 전 발생에는 미성숙난자의 세포질 성숙 (cytoplasmic maturation)이 중요하기 때문에 (Kikuchi 등, 1999), 성숙배양법의 개선을 통하여 체외수정란의 발생능을 향상시킬 수 있다. 동 기법을 보다 효율적으로 발전시키기 위하여 단순합성배양액 (chemically-defined medium)을 이용한 난자배양방법이 최근 정립되었다 (Lim 등, 1999). 상기배지는 serum 및 hormone 등이 전혀 첨가되지 않은 배양액이며 탄수화물 및 아미노산 첨가량의 조절을 통하여 미성

숙난자의 성숙율을 70% 정도로 지지할 수 있다. 이러한 배양액을 이용하면 난자의 체외발생능에 미치는 각종 배양액 첨가물질의 효과를 보다 정확하게 규명할 수 있기 때문에, 본 연구에서는 동 배양액을 이용하여 소 난포란의 성숙에 미치는 성선 자극 호르몬 (PMSG 및 hCG) 및 항산화제 (cysteine) 의 영향을 검토하였다. 실험대상물질들의 효과를 분석하기 위하여 난자성숙 개시, 성숙과정의 완료 및 난구세포의 팽화 (expansion) 등을 판별기준으로 이용하였으며, 효과적인 체외성숙 기초배양액 개발을 위한 배양액 첨가물질의 설정을 도모하였다.

재료 및 방법

1. 성숙배양배지

소 미성숙 난자의 성숙배양을 위한 기초배지로서 89 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.35 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 5.6 mM glucose, 1% (v/v) Basal Medium Eagle's essential 및 nonessential amino acids solutions, 그리고 3 mg/mL fatty acid-free bovine serum albumin (Cat no. A-6003, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 함유하고 있는 modified bovine embryo culture medium (mBECM; Lim et al., 1994)이 이용되었다.

2. 난자의 채취 및 준비

병리학적 이상소견이 없는 난소를 항생제가 첨가된 30~35°C의 NaCl (0.9%, v/v) 용액에 침적시켜 채취 2시간 이내에 연구실로 운반하였다. Cumulus oocyte-complexes (COCs)의 채집은 18-G의 needle이 부착된 10-ml의 disposable syringe를 이용하였으며, 성숙배양액을 이용하여 직경 3~6 mm의 antral follicle로부터 COCs를 흡인하였다. 채집된 COCs는 성숙배양액을 이용하여 4회 세정 후 난핵포가 선명히 존재하고, 균질한 세포질을 가지며, 긴밀한 난구세포피가 난자를 둘러싸고 있는 형태적 정상난자를 선별하여 각각의 실험에 공여하였다. 각각에 실험구에 공여한 난자는 성숙배양액에서 22~24시간 동안 39°C, 5% CO₂ in air의 기

상조건 하에 배양하였다. 입체현미경을 이용하여 배양한 난구세포괴의 팽화여부를 판독한 후 acetic-ethanol (25%, v/v)을 이용하여 5~7 일간 난자를 고정하였으며, 이후 1% (v/v) acetic orcein에 염색하여 성숙의 개시 및 완료 여부를 판독하였다. 난구세포괴 팽화의 판정은 세포괴 전층이 팽화되지 않은 경우 (poor expansion), 최외부 3층만이 팽화된 경우 (moderate expansion) 및 corona radiata 전층이 팽화된 경우 (full expansion)로 나누어 판독하였다. 난자의 성숙개시는 난핵포붕괴 (germinal vesicle breakdown)가 확인되는 시기로 판정하였고, 성숙완료는 제1 극체의 방출과 난구세포괴의 팽화, 그리고 metaphase-II plate의 존재를 확인함으로써 각각 판정하였다.

이 첨가된 mBECM에서 배양하였다. 1) 무첨가, 2) cysteine (0.6 mM; Cat no. C-8152, Sigma Co.), 3) PMSG (10 i.u./mL; Intervet Co., Netherlands) + hCG (10 i.u./mL; Intervet Co., Netherlands), 4) cysteine+PMSG+hCG. 본 실험 design의 model effect 를 검증하기 위하여, SAS program (Anon, 1992)에 포함된 log linear model을 이용하였다. 우선 analysis of variance (ANOVA) 법을 이용하여, 각 판정지표에서 main effect를 검증하였으며 유의적 효과가 발견되는 경우 least square method 를 이용하여 각 처리구의 효과를 비교하였다. 유의적 검증의 기준은 p=0.05 이하로 하였다.

결 과

3. 실험설계 및 통계학적 검증

실험의 진행을 위하여 COCs를 여러 가지 물질

Table 1에 배양액의 성선자극호르몬 및 항산화제의 첨가가 COCs의 난구세포괴 팽화에 미치는

Table 1. Effects of the addition of gonadotropins and an antioxidant on expansion of cumulus cell enclosing bovine oocytes cultured in modified bovine embryo culture medium

Treatments	No. of oocytes cultured	No. (%) of oocytes with		
		Poorly expanded CC	Moderately expanded CC	Fully expanded CC
No addition	48	8(17) ^a	40(83) ^a	0(0) ^a
Cysteine	61	7(11) ^a	54(89) ^a	0(0) ^a
PMSG+hCG	75	0(0) ^b	16(21) ^b	59(79) ^b
Cysteine+PMSG+hCG	71	0(0) ^b	3(4) ^b	68(92) ^b

CC: cumulus cells, PMSG: pregnant mare serum gonadotropin, hCG: human chorionic gonadotropin

^{a-b}: p<0.05

Table 2. Effects of the addition of gonadotropins and an antioxidant on maturation of bovine oocytes cultured in modified bovine embryo culture medium.

Treatments	Cultured	No. (%) of oocytes	
		With germinal vesicle breakdown	Developed to the metaphase-II stage
No addition	33	30(91)	18(55) ^a
Cysteine	31	30(97)	22(71) ^{ab}
PMSG+hCG	41	38(93)	31(76) ^{ab}
Cysteine+PMSG+hCG	37	35(95)	34(92) ^b

PMSG: pregnant mare serum gonadotropin, hCG: human chorionic gonadotropin

^{a-c}: p<0.05

영향을 나타내었다. 각각의 판정지표에 대한 유의적인 model effect가 검증되었다. 난구세포괴 전층이 팽화된 COCs의 수를 검증한 결과 PMSG + hCG의 첨가는 cysteine의 첨가와 관계없이 유의적으로 팽화를 촉진하였다 (0% vs. 79~92%). Cysteine의 첨가는 난구세포괴의 팽화를 촉진시키지는 않았으나, cysteine과 PMSG+hCG 동시첨가구에서 가장 높은 난구세포괴 팽화율이 관찰되었다. 부분적 팽화 및 전층이 팽화되지 않은 경우, 전층이 팽화된 경우와 동일한 유의적 경향성을 나타내었으며 난구세포괴 전층의 팽화정도가 높을수록 부분 팽화도가 저하되었다.

Table 2에서와 같이 난자성숙개시 및 완료에 미치는 실험물질의 효과를 알아보았다. 난자성숙개시의 경우 model effect는 검증되지 않았으며 실험처리와 관계없이 91~97%의 공시란이 난자성숙을 개시하였다. 그럼에도 불구하고 각 실험처리가 난자성숙 완결에 미치는 model effect가 검증되었다. PMSG + hCG 혹은 cysteine의 단독첨가는 무첨가군에 비교하여 성숙율을 16~21% 증가시켰으나 유의적 차는 나타나지 않았다. 그러나 PMSG+hCG와 cysteine의 동시첨가는 난자성숙능에 영향을 미치며 대조구에 비하여 유의적인 성숙율의 증가가 관찰되었다 (55% vs. 92%).

고 찰

본 실험의 결과 성선자극호르몬 및 항산화제는 소 난포란의 성숙능에 현저한 영향을 미치며 상기 물질을 첨가한 단순합성배지는 혈청비존재 하에서도 난자의 성숙 및 이에 수반된 내부세포괴의 팽화를 효율적으로 지지한다는 사실이 밝혀졌다. 공시된 미성숙난자 중 92%의 난자가 성숙하였으며 동일한 비율의 난자에서 전층이 팽화된 내부세포괴가 확인되었다.

기존의 체외성숙 system에서는 다양한 탄수화물, 단백질 및 기타 미네랄 등이 첨가된 배양액을 이용하고 있다. 이러한 배양액은 난자의 핵성숙을 효과적으로 지지하는 이점은 있으나 세포질 성숙에 대한 지지효과는 규명되어 있지 않다. 따라서 이러한 체외성숙 배양액은 기존의 난자배양 system

이 갖고 있는 체외수정 및 발생율의 점진적 저하라는 한계성의 주요한 원인으로 사려되고 있으며, 배양액 성분의 복잡성 및 첨가물질의 batch effect에 의하여 추가적인 성분개선도 불가능하다. 최근 Lim 등 (1999)은 소 미성숙난자의 체외성숙은 적절한 농도의 탄수화물 및 아미노산이 존재할 경우 호르몬 및 혈청단백질이 첨가되지 않은 배양액을 이용하여도 난성숙을 지지할 수 있다는 사실을 보고하였다. 이러한 실험을 통하여 난자의 체외발생을 촉진하는 물질의 선별첨가 및 이를 토대로 한 배양액 개발이 가능하여졌다. 본 실험의 결과를 토대로 하여 소 미성숙란에 성숙을 위한 보다 효과적인 배양액의 발전이 기대되어진다.

일반적으로 소 미성숙란을 위한 성숙배지는 FSH, LH 그리고 estradiol 등이 일반적으로 이용되고 있으며 본 실험에서 이용된 PMSG나 hCG는 돼지의 체외성숙 배양액에 주로 이용되고 있다. 최근 PMSG+hCG를 첨가한 성숙배양액이 인간난자의 성숙배지로 이용되고 있으며 이에 대한 안정성 및 다낭성난포증후군을 포함한 불임증의 치료를 위한 보조생식술에 적극적으로 응용되고 있다. 본 실험의 결과 PMSG+hCG는 소 미성숙난자의 체외성숙도 지지할 수 있다는 사실이 추가적으로 밝혀졌으며 이러한 결과는 향후 동 호르몬이 첨가된 배양액의 안정성 및 효용성 검증에 기여할 수 있다고 사료된다.

세포내 항산화제의 생성 및 이의 이용은 난자 및 수정란의 발생에 중요하다고 보고되어져 있다 (Takahashi et al., 1993; Lim et al., 1996). 그럼에도 불구하고 본 실험에서는 cysteine 단독 첨가에 의한 난구세포팽화 및 난자성숙 촉진효과가 관찰되지 않았다. Cysteine은 성숙배양액에 첨가되었을 때 돼지의 체외발생을 유의적으로 촉진한다는 사실이 보고되었으며 (Abeydeera 등, 1999), 이를 토대로 한 배양액이 돼지 미성숙난자 성숙을 위하여 개발되어졌다. 이러한 cysteine의 발생촉진 효과는 세포내 항산화제 농도의 증가에 기인하며 특히 돼지의 경우 cysteine 비 첨가시 항산화제의 세포내 자체합성이 불가능하기 때문에 cysteine의 첨가에 의한 유의적 발생촉진 효과가 나타났다고 사료되어진다. 소의 경우 난자내 항산화제 자체합성능력

이 돼지난자에 비하여 높다고 알려져 있기 때문에 (Blondin 등, 1997), 본 실험과 같이 cysteine 첨가가 난자의 성숙을 촉진하지 않았을 수 있다. 따라서 각종 항산화제의 첨가효과는 동물 종 및 난자의 항산화제 합성능력에 영향을 받는다고 사려된다. 또한 cysteine을 PMSG+hCG와 동시첨가 시 성숙능이 유의적으로 증가된 사실로부터 난자의 대사율에 따른 cysteine 효용성의 증감도 고려될 수 있다.

본 실험의 결과 실험에서 이용한 각각의 첨가물질은 난구세포 및 난자성숙에 상이한 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 이를 토대로 실험적 특성 및 회수된 난자의 세포학적 특징에 따라 치료적 개념의 배양액을 제조할 수 있는 가능성이 제시되었다. 이러한 기능성은 비단 동물난자의 배양법 발전뿐만 아니라 인간의 불임치료를 위한 보조 생식술의 발전에도 기여할 것으로 사료되며 이러한 배양액 개발을 토대로 향후 동물생명공학 및 불임치료를 발전에 크게 기여할 것으로 판단된다.

적 요

본 실험에서는 성숙배지에 첨가된 성선자극 호르몬과 항산화제가 소 미성숙 난포란의 성숙에 미치는 영향을 알아보았다. 직경 2~5 mm의 난포에서 회수한 난자난구복합체를 PMSG+hCG 및 cysteine이 단독 혹은 복합첨가된 성숙배양액(modified bovine embryo culture medium)에 22~24 시간 배양한 후 난구세포의 팽화도 및 핵 성숙 정도를 판별하였다. 난구팽화도의 경우 cysteine의 첨가 여부에 관계없이 PMSG+hCG 첨가에 의하여 유의적으로 증가되었다. 핵 성숙의 경우 무첨가구와 비교하여 cysteine 및 PMSG+hCG 첨가구에서 유의적으로 증가하였으며 복합첨가구에서 가장 높은 성숙율을 나타내었다. 본 실험의 결과 성선자극 호르몬 및 항산화제는 소 미성숙난자의 체외성숙을 촉진하나 세포특이적 작용을 하는 것이 밝혀졌다.

참고문헌

Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather

RS and Day BN. 1999. Glutathione content and embryo development after *in vitro* fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. *Zygote*, 7:203-10.

Anon. SAS Users Guide. Statistics. 1992; Cary: NC: Statistical Analysis System Institute.

Blondin P, Coenen K and Sirard MA. 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J. Androl.*, 18:454-60.

Brinster RL and Palmiter RD. 1986. Introduction of genes into the germ line of animals. *Harvey Lect.*, 80:1-38.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 22: 1256-8.

Gordon JW. 1983. Transgenic mice: A new and powerful experimental tool in mammalian developmental genetics. *Dev. Genet.*, 4:1-20.

Kikuchi K, Nagai T, Ding J, Yamauchi N, Noguchi J and Lzaika Y. 1999. Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase I. *J. Reprod. Fertil.*, 116:143-56.

Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by vitro-produced bovine morulae and blastocysts. *Biol. Reprod.*, 55: 1383-9.

Lim JM and Hansel W. 1996. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized *in vitro* and cultured singly in a defined medium. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8:1199-1205.

Lim JM, Lee BC, Lee ES, Chung HM, Ko JJ, Park SE, Cha KY and Hwang WS. 1999. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine

- oocytes cultured in chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. *Reprod. Fertil. Dev.*, 11:127-132.
- Palmiter RD and Brinster RL. 1986. Germ-line transformation of mice. *Annu. Rev. Genet.*, 20:465-499.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N and Okano A. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 49:228-232.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 23:369-74.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, and Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 27:810-3.
- Wilmut I, Young L and Campbell KH. 1998. Embryonic and somatic cell cloning. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:639-43.
-

(접수일: 2000. 4. 20 / 채택일: 2000. 12. 1)