

## 수정란의 밀도가 소 체외수정란의 체외발달에 미치는 효과

송상현·박충생  
경상대학교 축산과학부

### Effects of Embryo Density on Development of *In Vitro* Produced Bovine Embryos

Song, S. H. and C. S. Park

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

#### ABSTRACT

This study was carried out to improve of effective culture system on development of IVM / IVF / IVC bovine embryos. The cumulus-oocyte-complexes (COCs) collected from Korean cattle ovaries harvested at a local abattoir were matured in 50  $\mu$ l of TCM199 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and hormones (35  $\mu$ g /ml FSH, 10  $\mu$ g /ml LH, 1  $\mu$ g /ml estradiol 17 $\beta$ ) under paraffin oil at 39 $^{\circ}$ C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. At 24 hrs after culture, matured oocytes were fertilized *in vitro* for 22~24 hrs with motile semen in which obtained by centrifugation of a frozen thawed semen on Percoll-density gradients (45% vs. 90%) at 500 g for 20 min. The presumptive zygotes were divided into three experimental groups. Single egg (Group 1), 25 (Group 2) or 50 eggs (Group 3) were cultured on cumulus cell in 50  $\mu$ l TCM199 supplement with 10% FBS for 6~9 days after fertilization. *In vitro* developmental rates into the blastocysts in the groups 2 and 3 were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than those of group 1 (37, 27 vs. 6%, respectively). Cell number of blastocysts obtained in groups 2 and 3 at day 8 were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than those of blastocysts obtained in group 1 (112, 112 vs. 93, respectively). Cumulus cells co-culture enhanced the increase of cell number and the development into blastocyst when cultured in single and multiple embryos. In conclusion, co-culture of 25 and 50 IVP bovine embryos with cumulus cells at a constant media volume (50  $\mu$ l) resulted in higher developmental competence and cell number of bovine blastocysts produced *in vitro* than those the culture of single embryos with cumulus cells.

(Key words : Bovine, Embryo density, Media volume, *In vitro* fertilization, *In vitro* culture)

#### I. 서 론

Brackett 등(1982)이 체외수정된 수정란의 이식으로 송아지 생산을 최초로 보고한 이후, 체외수정란 생산기법은 소의 번식·육종에 많은 영향을 미치게 되었다. 최적배양체계에서 배양을 하고 있지만, 다수의 체

외수정란을 생산·이식하는데는 여러 가지 문제점이 대두되고 있다.

난자 또는 수정란을 체외배양할 경우, 생식도관의 체액에 비해 필요 이상의 많은 배양액을 사용하기 때문에 체세포나 수정란에서 분비되는 유익한 성분들이 배양액에 희석되어 수정란의 발달을 저해하거나 발달을 지연시킨다. 배양액의 양과 수정란 수의 비율은 수

정란의 체외 발달을 결정하는 중요한 요인 중의 하나이다. 따라서, 이러한 비율은 배양액의 구성 성분과 물리적인 배양 조건 등과 같은 여러 가지 요인들에 의해 좌우되기도 한다. 배양액의 양과 같은 물리적 배양 조건들이 최적의 상태가 아니기 때문에 수정란의 발달을 저해할 수가 있다. 여러 연구자들은 배양액의 양과 수정란 수를 조절함으로써 유익한 효과를 입증하였다 (Wiley 등, 1986; Praria와 Dey, 1990; Lane과 Gardner, 1992; Gardner 등, 1994). 적은 양의 배양액을 사용하여 수정란의 상호작용에 의해서 수정란 배양 조건에 영향을 미쳐 수정란의 발달을 촉진하는데 이러한 상호작용은 수정란 자체에서 autocrine 또는 paracrine factor에 의해 조절되며, 이러한 factors는 배양액의 양과 수정란의 수에 의해서 좌우된다(Rexroad와 Powell, 1988) O'Neill(1997)은 수정란의 발달을 결정짓는 요인은 배양액의 양 또는 수정란의 수가 아니라, 수정란의 밀도라고 하였다. Paria와 Dey(1990)는 생쥐 수정란을 배양하여 성장인자 상호간의 작용을 입증하였다. 수정란을 그룹배양했을 경우, 개별배양보다 배반포 수정란의 발달이 향상되었으며, 배반포 수정란의 세포수도 증가하였다. Ferry 등(1994)은 소적에 소 수정란을 체외배양한 결과, 1개의 수정란을 배양하는 것보다 다수의 수정란을 배양하는 것이 수정란의 발달에 유익하다고 하였다. Inzen 등(1993)과 Palma 등(1992)은 그룹으로 소 난자를 체외성숙, 체외수정 후 배양하였을 때 배반포기까지의 발달율이 향상되었다고 하였다. 소 수정란을 개별배양하면 성장인자가 배양액에 지나치게 희석되거나, 분비되지 않기 때문에 수정란의 발달에는 적합하지 않다(Blondin와 Sirard, 1995).

본 연구에서는 최적의 배양체계를 확립하여 다량의 체외수정란을 생산할 수 있는 체계를 확립하기 위하여 수정란의 밀도가 체외수정란의 발달에 미치는 요인을 비교·조사, 수정란의 밀도에 따른 배반포 수정란의 발달능력 및 배반포 수정란의 세포수 비교, 개별 및 그룹 배양시 공동배양의 효과를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채란

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살된 한우의

암소에서 30분 이내에 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 함유된 생리식염수(28~30℃)가 들어 있는 보온병에 담아 2시간내에 실험실로 운반하였다. 미성숙 난포란을 채취하기 전 난소 주위의 불필요한 조직을 제거한 후 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 함유된 생리식염수(28~30℃)로 3~4회 세척하였다. 18 gauge의 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 난포란을 채취하였으며, 난포(직경:2~7 mm)에서 난포액과 난포란을 동시에 흡입하여 채란하였다. 난포란의 채취시 사용한 배양액은 38~39℃의 bovine serum albumin(BSA)이 첨가된 Tyrode's-Hepes을 사용하였다. 흡입된 난포액은 15 ml의 centrifuge tube에 담아 10~15 분간 정치시킨 후, 침전된 하층액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 배양접시에 옮기고 40 배 배율의 도립현미경(Olympus, Japan)에서 난포란을 수집한 후, Tyrode's-Hepes로 4~5회 세척하면서 난포란을 선별하였다. 4~5 층의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 충실한 것을 grade I, 2~3 층의 난구세포층을 가진 것을 grade II, 부분적으로 나화된 것을 grade III로 구분하였으며, grade I, II 난포란만을 본 실험에 공시하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙

체외성숙 배양액은 TCM-199 배양액에 sodium pyruvate(56 µg/ml), streptomycin(100 µg/ml), penicillin G(100 units/ml)와 LH(10 µg/ml), FSH(35 µg/ml), estradiol-17β(1 µg/ml)를 첨가하였으며, 혈청으로 10 % fetal bovine serum(FBS)를 첨가하였다. 이와 같이 준비된 배양액은 50µl의 소적을 만들어 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39℃ incubator에서 4 시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도하였다. FBS는 56℃에서 30 분간 비동화시켜 0.2 µm membrane filter(Gelman Sci., USA)로 여과한 후 1ml씩 Eppendorf tube에 분주하여 -20℃에서 냉동보관하면서 사용하였다.

체외성숙은 50µl의 체외성숙 배양액에 등급별로 20~25 개의 난포란을 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39℃ CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 동안 체외성숙을 유도하였다. 난구세포의 팽창 정도와 세포질의 충실도 등으로 체외성숙도를 판정하여 체외수정에 공시할 난

포란을 결정하였다.

### 3. 정자의 준비 및 체외수정

동결정액은 37°C의 온수에서 15초 동안 용해한 후, 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 Percoll density gradient법으로 정자를 분리·사용하였다. 15ml의 원심분리관의 아래층에는 90% Percoll 2ml을 넣고 그 위층에는 45%의 Percoll 2ml을 조심스럽게 두 층이 섞이지 않도록 처리한 다음, 용해된 정액을 그 위층에 올려 놓는다. 500 g에서 20분 동안 원심분리한 후, 상층액은 버리고 2ml의 Sp-TALP를 첨가하여 350 g에서 5분 동안 원심분리를 하였다. Sp-TALP로 정자를 세척한 다음, 수정능 획득을 유도하기 위하여 BSA (6mg/ml), caffeine(5 mM) 및 heparin(10 $\mu$ g/ml)이 첨가되어 있는 체외수정용 배양액(Fert-TALP)을 첨가하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10~15분 동안 정치하였다.

24시간 동안 체외성숙 배양액에서 난구세포가 확장된 체외성숙된 난자는 pipette으로 난구세포를 부분적으로 제거하였다. 난구세포가 부분적으로 제거된 난자는 체외수정용 배양액으로 옮기기 전 체외수정용 배양액(Fert-TALP)로 3~4회 세척하였으며, 체외성숙된 난포란을 20~25개가 들어 있는 체외수정용 배양액 소적(50  $\mu$ l)에 정자를 분주하였다. 정자의 최종농도가 1~2 $\times$ 10<sup>6</sup> sperms/ml이 되도록 농도를 조절하여 22~24시간 동안 39°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 체외수정을 유도하였다.

### 4. 수정란의 체외배양

체외수정 22~24시간 후 zygote를 회수하여 BSA가 첨가된 TL-Hepes 배양액으로 3~4회 세척한 후, 50  $\mu$ l의 TCM-199 소적에 1, 25 및 50개의 수정란을 난구세포와 공동배양 또는 7~9일 동안 배반포 수정란으로 발달을 유도하였다. 난구세포의 단층형성은 수정 후 22~24시간째 난자를 세척할 때, 난구세포를 미세소적에서 pipette으로 난구세포를 제거하여 petri dish 바닥에서 단층을 형성하도록 유도하여 체외배양에 이용하였다. 배양액의 교환은 48시간마다 50 $\mu$ l의 소적에서 45 $\mu$ l의 배양액을 제거한 후, 신선한 배양액으로 교환하였다.

### 5. 수정란의 염색

각 처리구의 체외수정란은 수정 후 8일째의 배반포 수정란을 bis-benzimide를 이용하여 염색하였다. 즉, 10 $\mu$ l Hoechst(1mg/ml, Sigma Chem. Co), 750 $\mu$ l의 2.3% sodium citrate(Sigma Chem. Co) 및 250 $\mu$ l의 99% ethanol을 첨가하여 working solution을 제조하여 10~20 $\mu$ l의 0.1% trypan blue를 coating된 slide glass에 소적을 떨어뜨린다. 8일째 배반포 수정란을 slide 위의 trypan blue 소적에 30초~1분 침지시킨 후 trypan blue를 완전히 제거한 다음, working solution을 떨어뜨린다. 수정란이 있는 slide glass는 2~3분 동안 37°C에서 배양한 후 working solution을 완전히 제거하였다. Slide glass위에 permount를 떨어뜨리고 cover glass를 덮어 보관하면서 수정란의 세포수를 형광현미경(Nikon, Japan)하에서 계산하였다.

### 6. 통계학적 분석

실험결과와 통계적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) Procedure를 적용하여 각 요인의 Least square means를 구하여 요인간의 유의성을 검정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 체외배양시 체외수정란의 밀도에 따른 발달율

체외성숙된 성숙 난포란을 동결정액으로 체외수정하여 50 $\mu$ l의 미세소적에서 1, 25, 50개의 수정란을 각각 난구세포와 공동배양하여 체외발달을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 1, 25, 50개의 수정란의 배양했을 때, 4~8세포기까지의 발달율은 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 상실배와 배양 후 9일까지 배반포기 수정란의 발달은 25와 50개의 수정란을 배양하는 것이 1개의 수정란을 배양하는 것보다 유의적으로 높은 발달율을 나타내었다(P<0.05). 특히, 배반포 수정란의 발달율에 있어서 1, 25 및 50개의 수정란을 미세소적에 배양했을 때, 각각 배반포 수정란의 발달율은 6.2, 36.5 및 26.5%로 1개의 수정란을 배양한 군보다 25와, 50개의 수정란을 배양했을 때 발달율은 유의적으로 높았다(P<0.05).

Ferry 등(1994)은 소적에 소 수정란을 체외배양하

**Table 1. Effect of embryo density on development *in vitro* of bovine embryos**

No. of embryo /volume of medium( $\mu$ l)	No of replicates	No. of embryos cultured	No (%). of embryos developed to		
			4~8 cell	Morula	Blastocyst
1/50	5	243	213(87.6) <sup>a</sup>	45(18.5) <sup>a</sup>	15( 6.2) <sup>a</sup>
25/50	4	200	172(86.0) <sup>a</sup>	87(43.5) <sup>b</sup>	73(36.5) <sup>b</sup>
50/50	4	200	170(85.0) <sup>a</sup>	88(44.0) <sup>b</sup>	53(26.5) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts in the same column were significantly different ( $P < 0.05$ ).

여 18%의 확장 배반포 수정란을 얻었으며, 1개의 수정란을 배양하는 것보다 다수의 수정란을 배양하는 것이 수정란의 발달에 유익하다고 하여 본 연구의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. Lane과 Gardner (1992)는 소적에 생쥐의 수정란 수를 증가시켰더니 수정란의 착상율과 태아의 발달율이 향상되었으며, 수정란 수를 증가시키으로써, 수정란 자체에서 mitogenic factor가 분비되는데 배양액의 양이 증가하면, mitogenic factor가 배양액내에 희석되어 수정란의 발달이 저해된다고 하였다. Human tubal fluid(HTF) 배양액에 생쥐의 수정란을 증가시켰더니 발달이 촉진되었을 뿐만 아니라, 수정 후 수정란이 부화되는 시간도 단축되었다(Salahuddin 등, 1995). 생쥐와 양에서 수정란의 발달은 소량의 배양액(10 $\mu$ l)에서 수정란의 밀도가 높을 때 발달율이 향상되었으나, hamster의 경우에는 발달율이 향상되지 않았는데, 이것은 배양조건들이 물리·화학적 영향을 받았거나, 수정란의 밀도가 증가함에 따른 종간의 차이라고 하였다(McKieran과 Bavister, 1994). Wiley 등(1986)은 수정란에서 분비되는 성장인자에 의해서 수정란을 그룹으로 배양했을 때가 개별배양보다 높은 발달율을 나타내어 수정란의 발달에 있어서 autocrine factor의 역할을 입증하였다.

## 2. 체외배양시 체외수정란의 밀도에 따른 발달속도

체외성숙/체외수정/체외배양한 소 수정란을 배양액과 수정란의 밀도가 배반포 수정란의 발달에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 배양액의 양이 50 $\mu$ l인 소적에서 수정란의 밀도가 각각 1, 25 및 50개를 배양하면, 수정 후 6 일째의 배반포 수정란의 발달율은 각각 2.5, 3.5 및 1.0%로 유의적인 차이가 없었으나, 수정 후 7, 8 및 9 일째는 소적에 1개의 수정란을 배양한 처리구(2.1, 1.6 및 0%)보다 25와 50개의 수정란을 배양한 처리구(8.5, 13.0 및 11.5% ; 6.5, 12.5 및 6.5%)에서 발달율이 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ).

Kato와 Tsunoda(1994)는 생쥐의 수정란을 10 $\mu$ l에 1개보다는 10개를 배양시 배반포로의 발달율이 개선되었으며, 대리모에 수정란을 이식후 수태율도 향상되었다고 했다. 또한, 배양액  $\mu$ l당 수정란의 비율이 1:1 또는 2:1에서 효과적인 결과를 얻었다. 배양액과 수정란이 1:5 비율에서 소 수정란을 개별배양 또는 그룹배양시 효과적인 결과를 그룹배양에서 얻었다(Keeper 등, 1994).

Gandolfi(1994)는 autocrine/paracrinefactor에서 분비되는 mitogenic factor가 수정란의 발달을 촉진한다고 하였다. 배양액의 양과 배양하는 수정란 수를 줄였을 경우, 내부세포괴(ICM; inner cell mass)의 발달을 촉진하였으며, 영양막세포의 수에는 영향을 미치지 않았다고 한다(Gardner 등, 1997).

**Table 2. Effect of embryo density on bovine blastocyst formation**

No. of embryos /volume of medium( $\mu$ l)	No. of embryos cultured	No(%).of embryos developed to blastocyst			
		Day-6	Day-7	Day-8	Day-9
1/50	243	6(2.5) <sup>a</sup>	5(2.1) <sup>a</sup>	4(1.6) <sup>a</sup>	0( 0) <sup>a</sup>
25/50	200	7(3.5) <sup>a</sup>	17(8.5) <sup>b</sup>	26(13.0) <sup>b</sup>	23(11.5) <sup>b</sup>
50/50	200	2(1.0) <sup>a</sup>	13(6.5) <sup>b</sup>	25(12.5) <sup>b</sup>	13(6.5) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts in the same column were significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 3. 체외배양시 체외수정란의 밀도에 따른 배반포 수정란의 세포수

배반포 수정란을 Hoechst 33342 염색으로 배반포 (수정후 8일)의 세포수를 조사한 결과는 Table 3과 같다. 50 $\mu$ l의 배양액에 1개의 수정란을 배양했을 경우에는 세포수(93.10 $\pm$ 12.11)는 25, 50개의 수정란을 배양했을 때 세포수(112.17 $\pm$ 12.77, 112.86 $\pm$ 11.95)보다 유의적으로 적었다(P<0.01). Gardner 등(1994)은 양의 수정란을 그룹으로 배양했을 경우, 체내수정란과 비슷한 수준의 부화율과 세포수가 증가하였다고 보고했다. 소에서도 1개의 수정란을 배양했을 때보다 수정란의 수를 증가시켰을 경우에 세포수가 증가하였다고 한다(Doherty 등, 1997). 일정한 배양액에 수정란의 수를 줄였을 경우, 수정란의 세포수가 줄었을 뿐만 아니라, apoptosis되는 세포수가 증가하였다(O'Neill, 1997). Kato와 Tsunoda(1994)은 생쥐의 수정란을 다양한 배양조건하에서 배양한 결과 1개의 수정란을 배양하는 것보다 그룹으로 수정란을 배양하면, 배반포 수정란의 세포수가 증가하였다고 하였다. Lane과 Gardner(1992)는 mouse의 수정란을 개별배양하는 것보다 그룹으로 배양하면 배반포 수정란의 세포수가 증가할 뿐만 아니라, 수정란을 이식한 후 수태율도 향상된다고 하였다.

### 4. 난구세포와의 공배양이 체외수정란의 발달에 미치는 효과

체외정숙/수정/배양된 한우 수정란을 50 $\mu$ l의 배양액에서 1개 개별배양 또는 25개 그룹배양의 수정란을 난구세포와 공배양한 결과는 Table 4와 5에서 보는 바와 같다. 10% FBS가 첨가된 TCM-199에서 1개의 체외수정란을 배양했을 경우에는 배반포기로의 발달율은 3.7%, 난구세포와 공배양시에는 15%의 발달율을 얻어 유의적인 차이를 나타내었으나(P<0.01), 체외수정 후 8일째의 배반포 수정란의 세포수는 각각 82개와 96개로 유의적인 차이는 없었다.

50 $\mu$ l의 배양액에 25개의 체외수정란을 그룹배양할 경우에는 10% FBS가 첨가된 TCM-199에서는 9%, 난구세포와 공배양시에는 34.5%의 배반포기로의 발달율을 나타내어 난구세포와의 공배양을 한 처리구에서 유의적으로 높은 배 발달율을 나타내었다(P<0.01). 또한 배반포 수정란의 세포수도 각각 96개와 116개로 난구세포와 공배양에서 세포수가 많아 유의적인 차이를 보였다(P<0.01).

Donnay 등(1997)은 소 수정란을 개별배양을 할 경우에 Buffalow Rat Liver세포와 공배양을 함으로서 배반포 수정란의 세포수를 증가시킬 수 있었다. 따라서, 체세포는 수정란의 발달도 촉진하지만, 세포수를 증가시키는 효과도 있다고 하였다. 따라서 수정란의 발달율과 질은 수정란 수를 증가시킴으로써 가능하다

**Table 3. Comparison of cell number of day-8 blastocysts produced by different density**

No. of embryos / volume of medium( $\mu$ l)	No. of blastocysts stained	Cell number of blastocyst	
		Mean $\pm$ SD	Range
1 / 50	10	93.10 $\pm$ 12.11 <sup>a</sup>	67~107
25 / 50	14	112.17 $\pm$ 12.77 <sup>b</sup>	89~130
50 / 50	14	112.86 $\pm$ 11.95 <sup>b</sup>	95~132

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts in the same column were significantly different (P<0.01).

**Table 4. Effect of co-culture of individual embryos with cumulus cells on development and cell number**

Co-culture with cumulus cells	No. of replicates	No. of cultured embryos	No. (%) of blastocyst	Cell number of blastocysts (Range)
without	4	189	7(3.7) <sup>a</sup>	82.00 $\pm$ 13.51(65~100)
with	4	200	30(15) <sup>b</sup>	96.45 $\pm$ 15.88(67~125)

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts in the same column were significantly different (P<0.01).

**Table 5. Effect of co-culture of group embryos with cumulus cells on development and cell number**

Co-culture with cumulus cells	No. of replicates	No. of cultured embryos	No. (%) of blastocyst	Cell number of blastocysts (Range)
without	4	200	18( 9.0) <sup>a</sup>	96.10±11.58(85~112)
with	4	200	69(34.5) <sup>b</sup>	116.40±12.31(93~134)

<sup>a,b</sup>Values with different superscripts in the same column were significantly different (P<0.01).

고 하였다(Ferry 등, 1994; Blondin과 Sirard, 1995; Lane과, Gardner, 1994; Paria와 Dey, 1990; Salahuddin 등, 1995). 체세포는 embryotrophic factor를 분비하는데 특히, BRL세포는 수정란의 발달에 영향을 미치는 Transforming Growth Factor- $\alpha$ , Leukemia Inhibiting Factor를 분비한다(Fukui 등, 1994; Kurzrock 등, 1991; Massague 등, 1985; Zesebo 등, 1990). 수정란을 체세포와의 공배양은 배양액이나 배양조건에서 발생하는 독성물질을 중화시키며, 수정란 발달에 유익한 영양물질을 분비한다(Bavister, 1992, 1995; Bongso 등, 1993; Kane 등, 1992). 체세포와 수정란에 의해 성장인자, cytokine, 항산화제 또는 킬레이트 등 특이적, 비특이적인 인자들이 분비되는데, 이런 인자들은 paracrine-autocrine 작용을 한다고 한다(Gandolfi 등, 1994).

수정란을 체세포와 공동배양했을 경우, 수정란의 세포수가 증가하며 수정란의 발달율이 개선되는 것은 배양액내의 독성물질을 감소시키고, 배양액내에 유익한 성분들을 분비하기 때문이라고 한다(Gandolfi 등, 1989). Doherty 등(1997)은 과립막세포와 공배양에서 개별배양 또는 그룹배양을 한 수정란이 배반포기로의 발달율과 배반포 수정란의 세포수가 많았다고 하며, 본 연구결과보다 발달율은 높았으나 세포수는 적은 경향을 나타내었다.

본 연구결과는 여러 연구자들의 연구결과와 비슷한 경향을 보였으며, 수정란의 체외배양시 다수의 수정란을 배양액에서 배양하거나 일정한 수정란에 배양액의 양을 줄여서 소 수정란을 배양하며, 배반포 수정란의 발달율도 향상될 뿐만 아니라, 발달속도도 빠르다. 또한, 질이 우수한 체외수정란을 생산하기 위해서는 난구세포와 같은 체세포와 수정란을 공배양하는 것이 질이 우수한 수정란을 생산하는데 효과적일 것으로 사료된다.

#### IV. 요약

수정란이식에 필요한 다량의 수정란을 생산하는 수단인 배양액과 적정 수정란의 수는 수정란의 체외발달에 많은 영향을 미치므로 이들 관계를 조사하여 수정란의 체외배양체계를 확립하고자 본 연구를 실시하였다.

도축장에서 채취한 난소에서 미성숙 난자를 채란하여 10% FBS가 첨가된 TCM-199에 LH(10  $\mu$ g/ml), FSH(35  $\mu$ g/ml), estradiol-17 $\beta$ (1  $\mu$ g/ml)가 첨가된 체외성숙배양액에서 24시간 동안 배양후, 동결정액은 Percoll-density gradients(45 vs. 90%)을 이용하여 700 g에서 30분 동안 처리한 다음, 체외수정배양액(IVF-Fert)에서 체외수정을 유도하였다. 수정이 확인된 수정란은 50 $\mu$ l 배양액에 1, 25 또는 50개의 수정란을 난구세포와 공배양을 하여 9일 동안 배양하였다.

일정한 배양액에서 수정란의 수가 체외수정란의 발달에 미치는 요인을 분석하고, 개별배양 또는 그룹배양시 난구세포와의 공동배양 효과를 조사한 결과는 다음과 같다.

- 50 $\mu$ l 배양액에 1개, 25 또는 50개의 수정란을 수정 후 9일 동안 배양한 결과, 25와 50개의 수정란을 배양했을 경우에는 발달율이 36.5와 26.5%를 보여 1개의 수정란을 배양했을 경우에서의 발달율 6.2%보다 유의적으로 높은 발달율을 얻었다 (P<0.05).
- 1, 25, 50개의 수정란을 배양시 수정 후 6일째의 발달율은 1.0~3.5%였으나, 수정 후 7, 8, 9일째의 발달율은 1개의 수정란을 배양하는 것보다 25, 50개의 수정란을 배양한 처리구에서 유의적으로 높은 발달율을 얻었다(P<0.05).
- 일정한 배양액에서 1, 25 및 50개의 수정란을 배

양시 수정 후 8일째의 배반포 수정란의 세포수를 조사한 결과, 1개의 수정란을 배양시 배반포 수정란의 수는 93.0개였으나, 25, 50개의 수정란을 배양시는 각각 112개의 세포수를 얻어 유의적으로 높은 세포수를 나타내었다( $P < 0.01$ ).

4. 일정한 배양액에 1개 또는 25개의 수정란을 난구 세포와 공배양을 하거나, 하지 않았을 때의 발달율은 각각 15.0와 3.7% 또는 34.5와 9.0%로서 난구세포와 공배양을 하는 것이 유의적으로 높은 발달율을 나타내었다( $P < 0.01$ ). 수정 후 8일째의 배반포 수정란의 세포수도 각각 96.1와 82.0개 또는 116.4와 96.5개로서 난구세포와 공배양을 한 처리구에서 유의적으로 높은 세포수를 나타내었다( $P < 0.01$ ).

이상의 결과를 요약하면, 수정란의 수가 체외수정란의 체외발달에 중요한 영향을 미친다는 것을 알 수 있었으며, 다량의 체외수정란을 생산하여 수정란 이식에 이용하기 위해서는 체외성숙/수정된 체외수정란을 일정한 배양액(50  $\mu$ )에 25, 50개의 수정란을 난구세포와 공배양하는 것이 높은 배 발달율과 세포 수를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 인용문헌

1. Bavister, B. D. 1992. Co-culture for embryo development: is it really necessary? Hum. Reprod., 7:1339-1341.
2. Blodin, P. and M. A. Sirad. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev., 41:54-62.
3. Bongso, A., C. Y. Fong, S. C. Ng and S. Ratnam. 1993. The search for improved *in vitro* systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. Hum. Reprod., 8:1155-1162.
4. Brackett, B. G., D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans and M. A. Dresel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization of the cow. Biol. Reprod., 27:147-158.
5. Doherty, E. M., M. G. Wade, J. L. Hill and M. P. Boland. 1997. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. Theriogenology, 48:161-169.
6. Donnay, A., P. Van Langendonck, B. Auquier, A. Grisart, A. Vansteenbrugge, A. Massip and F. Dessy. 1997. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. Theriogenology, 47:1549-1561.
7. Ferry, L., P. Mermillod, A. Massip and F. Dessy. 1994. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperative to reach the blastocyst stage. Theriogenology, 42:445-453.
8. Fukui, Y. and K. Matsuyama. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos cultured in media containing human leukemia inhibitory factor. Theriogenology, 42:663-674.
9. Gandolfi, F., T. A. L. Brevini and R. M. Moor. 1989. The effect of oviduct environment on embryonic development. J. Reprod. Fertil., 38(Suppl.):715-720.
10. Gandolfi, F. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. Theriogenology, 41:95-100.
11. Gardner, D. K., M. Lane, A. Spitzer and P. A. Batt. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cell: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. Biol. Reprod., 50:390-400.
12. Gardner, D. K., M. W. Lane and M. Lane. 1997. Development of inner cell mass in mouse blastocysts is stimulated by reducing

- the embryo:incubation volume ratio. Hum. Reprod., 12(Abstr.).
13. Kane, M. T., E. W. Carney and J. E. Ellington. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. Theriogenology, 38:297-313.
  14. Kato, Y. and Y. Tsunoda. 1994. Effects of the culture density mouse zygotes on the development *in vitro* and *in vivo*. Theriogenology, 41:1315-1322.
  15. Keefer, C. L., S. L. Stice, A. M. Paprocki and P. Golueke. 1994. *In vitro* culture of bovine IVM-IVF embryos: cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. Theriogenology, 41:1323-1331.
  16. Kuzrock, R., Z. Estrov, M. Wetzler, J. V. Gutterman and M. Talpoz. 1991. LIF: not just a leukemia inhibitory factor. Endocr. Rev., 12:208-217.
  17. Lane, M. and D. K. Gardner. 1992. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro*. Hum. Reprod., 7:558-562.
  18. Lane, M. and D. K. Gardner. 1994. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. J. Reprod. Fertil., 102: 305-312.
  19. Massague, J., B. Kelly and C. Mottola. 1985. Stimulation by insulin-like growth factor is required for cellular transformation by type  $\beta$  transforming growth factor. J. Biol. Chem., 260:4551-4554.
  20. McKieran, S. H. and B. D. Bavister. 1994. Timing of development is a crucial parameter for predicting successful embryogenesis. Hum. Reprod., 9:2123-2129.
  21. O' Neill, C. 1997. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. Biol. Reprod., 59: 229-237.
  22. Parria, B. C. and S. K. Dey. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:4756-4760.
  23. Palma, G. A., A. Clement-Sengewald, U. Berg and G. Brem. 1992. Role of the embryo number in the development of *in vitro* produced bovine embryos. Theriogenology, 37:271(Abstr.).
  24. Rexroad, C. E. Jr. and A. M. Powell. 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. J. Anim. Sci., 66:947-953.
  25. Salahuddin, S., S. Ookutsu, K. Goto, Y. Nakanishi and Y. Nagata. 1995. Effects of embryo density and co-culture of unfertilized oocytes on embryonic development of *in vitro* fertilized mouse embryos. Hum. Reprod., 10:2382-2385.
  26. Van Inzen, W. G., T. A. M. Kruip and S. M. Weima. 1993. Use of conditioned medium for IVM-IVF bovine embryos *in vitro* culture systems. Theriogenology, 39:236(Abstr.).
  27. Wiley, L. M., S. Yamami and D. Van Muijden. 1986. Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development *in vitro*. Fertil. Steril., 45:111-119.
  28. Zesebo, K. M., J. Wypych, I. K. McNiece, H. S. Lu, K. A. Smith, S. B. Karkare, R. K. Sachdev, V. N. Yusxhenkoff, N. C. Birkett, L. R. Williams, V. N. Satyagla, W. Tung, R. A. Bossiama, E. A. Mendiaz and K. E. Langley. 1990. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. Cell, 63:195-201.
- (접수일자 : 2000. 1. 28. / 채택일자 : 2000. 3. 15.)