

## 체외성숙된 소 배에서 배양방법과 필수 아미노산 무첨가 배지에서의 온도충격의 영향

김지철 · 김재영<sup>1</sup> · 주재홍<sup>1</sup> · 윤산현<sup>2</sup> · 이상민<sup>2</sup> · 이상진<sup>3</sup> · 김재명<sup>4</sup> ·  
송해범 · 박홍대<sup>†</sup>  
대구대학교 축산학과

## Effect of Heat Shock on Culture Method and Essential Amino Acid Free Medium of IVM-Derived Bovine Embryo

J. C. Kim, J. Y. Kim<sup>1</sup>, J. H. Joo<sup>1</sup>, S. H. Yoon<sup>2</sup>, S. M. Lee<sup>2</sup>,  
S. J. Lee<sup>3</sup>, J. M. Kim<sup>4</sup>, H. B. Song and H. D. Park<sup>†</sup>

Department of Animal Science, Taegu University, Kyungsan 712-714, Republic of Korea

### SUMMARY

This study was carried out to evaluate the effect of culture methods on development of embryos with each developmental stage after heat shock in bovine oocytes. The results obtained were as follows.

1. The culture method after heat shock on development of embryos was better drop-culture than co-culture.
2. The medium without amino acids were not effect of heat sock on development of embryos but it was in need of amino acid during formation of blastocyst.

(Key words : culture method, heat shock, drop-culture, co-culture, blastocyst)

### 서 론

포유동물 난자의 세포내 존재하는 heat shock protein (HSP)은 급격히 변화되는 배양환경으로부터 배를 보호하는 방어물질로써 작용할 뿐만 아니라 정상적인 세포기능, 세포독성물질에 의한 세포 손상을 회복하고 유지시키는 역할을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 체외 배발생에 있어서 고온은

세포질 단백질과 세포질 막구조에 영향을 미치기 때문에 배의 분할 (Alliston 등, 1961; Dutt, 1963; Tompkins 등, 1967; Ealy 등, 1993)과 배반포 형성율이 낮아지며, 후기 배보다 초기 배에서 더 많은 영향을 받는다 (Alliston 등, 1965; Ealy 등, 1992; Gwazdauskas 등, 1992; Ealy and Hansen, 1994; Ealy 등, 1995).

한편 온도충격으로 인한 세포내 생화학적 변화로 생성된 free radical (Loven, 1988)은 항산화제 (glu-

본 연구는 1998년도 학술진흥재단 연구지원에 의해 수행되었음.

<sup>1</sup> 대구대학교 생물공학과(Department of Biotechnology, Taegu University)

<sup>2</sup> 마리아 산부인과(Maria Obstetrics and Gynecology)

<sup>3</sup> 삼육의명대학 동물자원학과(Department of Animal Science, Sahmyook College)

<sup>4</sup> 포천 중문외과대학(Pochon CHA-University)

<sup>†</sup> Correspondence

tathione: Ealy 등, 1992; Aréchiga 등, 1994)와 반응하여 쥐나 소의 착상 전 후기 배에서 온도충격에 대한 저항성을 높이며, 이것은 세포내 존재하는 heat shock protein (HSP)이 세포내에서 빠르게 합성되어 증가함으로써 온도의 내성에 저항성 (Morange 등, 1984; Muller 등, 1985; Hahnel 등, 1986; Heikila 등, 1986)을 가진다고 보고하였으며, vitamin E (Aréchiga 등, 1994)와 taurine (Ealy 등, 1992; Malayer 등, 1992) 등의 첨가도 비슷한 경향이 있다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 체외에서 소 배의 체외발생에 있어서 각 발생단계의 배에 온도충격을 가하여 서로 다른 배양방법 및 amino acid 무첨가 배지에서 배양한 후 이들 배의 배반포로의 배발생을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 배 지

본 연구에 사용된 기초배지로서 난소로부터 난포란 회수용은 25 mM HEPES와 3 mg/ml BSA 첨가 TALP (HEPES-TALP) 용액, 난포란의 체외성숙은 0.2 mg/ml pyruvate, 10% FBS, 1  $\mu$ g/ml FSH 첨가 TCM-199 용액, 체외수정용은 6 mg/ml BSA와 10  $\mu$ g/ml heparin 첨가 TALP (Fer-TALP) 용액, 수정된 난자의 체외배양용액은 YS (허 등, 1996) 용액을 각각 이용하였다.

### 2. 난포란의 채취 및 체외성숙

도축된 한우 암소의 생식기로부터 난소를 적출하여 25  $\mu$ g/ml gentamycin (Sigma, G3632) 함유 30~33°C의 생리식염수가 들어있는 보온병에 담아, 도축 후 2~4시간 이내 실험실로 운반하였다. 수집한 난소는 생리식염수로 3~4회 세척하여, 18 gauge 주사침이 부착된 1회용 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2.0~6.0 mm의 가시 난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 회수한 난포란은 실체현미경하에서 Wiemer 등 (1991)의 기준에 따라 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 것만을 선별하여, 50  $\mu$ l의 체외성숙용 배지에 15개씩의 난포란을 옮겨, 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 난포란의

체외성숙을 유도하였다.

### 3. 체외수정

체외수정을 위한 정자는 축협으로부터 구입한 한우 동결정액을 이용하였다. 동결정액 1~2개 straw를 상온에서 5초간 방치 후, 37°C의 항온수조에서 30초간 흔들면서 용해하여 15 ml 원심분리관에 담겨져 있는 80% percoll 3ml 용액 위에 조심스럽게 놓는다. 2,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하여, 3 ml의 신선 Fer-TALP 용액으로 희석 후 1,000 rpm, 10분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 Fer-TALP 용액으로 정자농도가  $2.5 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 조절하여 체외수정용 정자로서 준비하였다. 한편 난구세포의 확장에 근거하여 체외성숙된 난포란만을 0.03% hyaluronidase 첨가 Fer-TALP 용액으로 난포란 주위의 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난포란을 신선 Fer-TALP 용액으로 2~3회 세척하여 46  $\mu$ l의 Fer-TALP 용액에 15개씩의 난포란을 넣고 2  $\mu$ l의 heparin과 최종정자 농도가  $1 \times 10^5$  cells/ml가 되도록 미리 준비한 정자 2  $\mu$ l를 첨가하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

### 4. 공동배양용 난구세포의 준비

난구세포의 확장에 근거하여 위의 과정에서 얻어진 난구세포를 강력한 pipetting으로 한 개씩으로 분리시켜,  $5 \times 10^4$  cells/ml가 되도록 500  $\mu$ l의 10% FBS 첨가 TCM-199 용액이 담겨져 있는 4-well dish에 분주하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양함으로써 공동배양용 난구세포를 준비하였다.

### 5. 체외배양 및 온도충격

체외수정을 실시한 후 22~24시간째에 형태적으로 정상이라고 판단한 난포란을 회수하여 YS 용액으로 2~3회 세척하여 체외배양에 공시하였다. 20% human follicle fluid (hFF) 함유 YS 용액 50  $\mu$ l에 15개의 수정란을 넣고, 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다 (배양 1일). 그리고 배양 3일째에 4~8세포기 배를 10% hFF와 10% FBS 함유 YS 용액으로 교환하여 실험의 목적에 따라 배양하였

다. 배양방법은 난구세포와의 공동배양과 단순배양이다. 공동배양법(co-culture)은 배양 3일째에 체외수정시 난구세포를 미리 배양한 4-well dish의 용액을 10% hFF와 10% FBS 함유 500  $\mu$ l의 YS 용액으로 완전히 교환하여 배양하고, 배양 5일째에 상기의 신선 YS 용액으로 50%만을 교환하였다. 한편 단순배양법(drop-culture)은 상기의 YS 용액 50  $\mu$ l에 10~15개씩의 난자를 넣어 배양하는 방법으로써 신선 배지와와의 교환은 행하지 않았다.

한편 실험의 목적에 따라 각 발생단계의 배를 41  $^{\circ}$ C의 온도에서 30초간 처리하였다. 온도처리방법은 1 ml 주사기에 연결된 0.25 ml 난자동결용 straw (IVM, France)에 난자를 흡입하여 sealing powder로 봉인한 후 실험의 목적온도로 미리 준비된 증류수가 담겨져 있는 보온병에 침적하여 실시하였다.

#### 1) 실험 1

체외성숙 유래 수정난자, 배양 3일째의 4~8세포기 배 및 배양 5일째의 상실배를 각각 온도충격을 가한 후 공동배양 또는 단순배양하여 이들 배의 배반포로의 배발생을 관찰하였다.

#### 2) 실험 2

비필수 및 필수 아미노산이 함유된 YS 용액과 단순배양에 의해 형성된 배양 3일째의 4~8세포기 배와 배양 5일째의 상실배를 각각 온도충격을 가한

후 필수 아미노산이 제거된 YS 용액으로 단순배양하여 이들 배의 배반포로의 배발생을 관찰하였다.

#### 6. 통계처리

실험결과에 대한 통계학적인 분석은  $\chi^2$ -test를 이용하여 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 각 발생단계별 배의 온도충격 후 체외발생에 미치는 배양방법의 효과

체외성숙 유래 각 발생단계별 배에 대해서 온도충격을 가한 후 배반포로의 배발생에 미치는 배양방법의 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다.

온도 무처리구(대조구)와 수정난자구에서의 4~8세포기까지 배발생율은 공동배양구인 경우는 각각 43.2%와 46.6%로서 비슷하였지만, 단순배양구인 경우는 각각 50.7%와 52.2%로서 각각의 공동배양구보다 증가하였으며, 특히 온도충격 후의 단순배양구는 대조구의 공동배양구보다 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ). 한편 4~8세포기 배에서 배반포로의 배발생율은 대조구의 공동배양구는 33.7%로서 단순배양구의 22.1%보다 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 각 발생단계에서 온도충격을 가하면 각각의 단순 배양구에서의 발생율은 각각의 공동배양구보다 높았다. 그런데 각 발생단

Table 1. Effect of culture method on *in vitro* development after heat shock (41  $^{\circ}$ C, 30sec) at bovine each developmental stage embryos

Developmental stage embryo	Culture method	No. of embryos examined	No. (%) of embryos developed to	
			4~8cell	Blastocyst(/4~8cell)
Control	Co-culture	234	101(43.2) <sup>a</sup>	34(33.7) <sup>ab</sup>
	Drop-culture	134	68(50.7) <sup>ab</sup>	15(22.1) <sup>a</sup>
Fertilized	Co-culture	221	103(46.6) <sup>ab</sup>	29(28.2) <sup>a</sup>
	Drop-culture	134	74(52.2) <sup>b</sup>	25(33.8) <sup>ab1</sup>
4~8 cell	Co-culture	97		35(36.1) <sup>ab</sup>
	Drop-culture	77		26(33.8) <sup>ab</sup>
Morulae	Co-culture	98		28(28.6) <sup>a</sup>
	Drop-culture	75		35(46.7) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> : The values with different superscripts in the same column are significantly different,  $p < 0.05$ .

계별 배에 대한 온도충격 후 배양방법에 따른 배 발생율은 공동배양인 경우는 각각의 구 (28.2%~36.1%)에서 큰 차이는 없었으며, 대조구와도 큰 차이는 없었다. 그러나 각각의 단순배양구 (33.8%~46.7%)에서는 대조구의 22.1%보다 높았다. 특히 상실배 처리구에서의 단순배양구는 가장 높은 발생율 (46.7%)을 나타내었으며, 대조구의 그것보다 유의하게 높았다 ( $p<0.05$ ).

Edward 등 (1995)은 소에서 배발달이 진행된 후기 배일수록 높은 온도에 대한 저항성이 높아진다고 보고하였으며, Ealy 등 (1995)도 온도충격시 소의 초기 발생단계 배보다 후기 배에서 배발달의 감소율이 낮다고 보고하였다. 한편 본 실험에서는 공동배양인 경우 배반포로의 배 발생율은 온도처리와 처리시기는 그다지 관계가 없었지만, 단순배양인 경우는 후기 배일수록 배양방법과는 밀접한 관계를 나타내었다. 이것으로부터 온도충격시 배는 열에 저항하기 위하여 세포내 생화학적 변화에서 생성된 어떤 물질, 예를 들면 HSP의 분해로 인한 아미노산 (Duncan 등, 1989; Nover 등, 1991) 등이 세포 밖으로 분비되어 적은 배양액량에서 그다지 희석되지 않음으로써, 이 물질을 이용한 배의 대사능력이 향상되었을 가능성과, 난자의 세포질내 Hsp 70s (Hendrey 등, 1991)는 온도충격으로 활성화됨으로써 다른 단백질합성 (Riabowol 등, 1988)을 돕고, 혹은 막투과성을 증진시켰을 가능성이 있다고 사료된다.

## 2. 필수 아미노산 무첨가 배지에서 온도충격의 영향

체외성숙 유래 4~8세포기 배와 상실배를 온도

충격 후 필수 아미노산 무첨가 배지로서 단순배양했을 때 이들 각각의 배들이 배반포로의 배발생에 미치는 효과를 검토했던 결과는 Table 2와 같다.

필수 아미노산의 효과에 있어서는 4~8세포기 배에서 필수 아미노산을 제거하였을 경우의 배반포로의 배발생율, 23.1%는 상실배시기에 제거하였을 경우의 35.3%보다 유의하게 낮았다 ( $p<0.05$ ). 한편 온도충격의 효과에 있어서는 4~8세포기 배를 이용하였을 경우 배반포로의 배발생율은 무처리구와 처리구에서는 각각 23.1%와 22.5%로서, 각 구간의 차이는 없었다. 상실배를 이용하였을 경우 무처리구와 처리구에서는 각각 35.3%와 29.7%로서 처리구에서 다소 낮았지만, 유의차는 없었다.

Glutathione (Ealy 등, 1992; Aréchiga 등, 1994), vitamin E (Aréchiga 등, 1994), taurine (Ealy 등, 1992; Malayer 등, 1992) 등의 첨가 배지에서 쥐 또는 소 상실배는 온도충격에 대한 저항성이 높다는 보고가 있다. 이것은 온도의 내성에 저항성을 가지는 시기가 후기 배일수록 높으며, 그 효과는 항산화제 때문일 것으로 추정하고 있다. 본 연구에 이용된 YS 용액에도 이와 같은 물질이 첨가되어져 있지만, 각 발생단계별 처리구에서는 그다지 효과가 없었다. 한편 배발생에 아미노산의 첨가는 온도충격에 의한 세포내 HSP로부터 생성되는 물질(아마도 아미노산)과는 관계없이 배반포 형성시기에 필요하다는 것을 알 수 있다. 이것은 필수 아미노산 첨가 배지에서 4~8세포기보다 상실배 시기에 아미노산을 제거하였을 경우 배반포 형성율이 높다(미발표)는 것으로부터도 짐작할 수 있다. 그리고 각 발생단계 배를 이용한 것과 관계없이 온도처리 후 필수 아미노산 무첨가 배지에서의 배발생

Table 2. Effect of heat shock (41°C, 30sec.) on *in vitro* development in medium without amino acids with drop culture method of each developmental stage embryos

Developmental stage embryo	Heat shock	No. of embryos examined	No.(%) of embryos developed to blastocyst
4~8 cell	Not-treated	130	30(23.1) <sup>a</sup>
	Treated	129	29(22.5) <sup>a</sup>
Morulae	Not-treated	156	55(35.3) <sup>b</sup>
	Treated	155	46(29.7) <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup>: The values with different superscripts in the same column are significantly different,  $p<0.05$ .

울은 온도처리를 하지 않았던 각각의 구와 비교하면 개선되지 않았다. 이것은 HSP가 열에 의해 아미노산으로 변환되지 않고, 다른 어떤 형태로 변형되어 배의 발생에 영향을 미쳤을 가능성이 있다고 사료된다.

이상의 결과로부터 배의 체외발생에 있어서 온도충격의 영향은 특정시기에 한하여 필수아미노산의 첨가와 더불어 체외배양방법과도 밀접한 관계가 있다고 사료된다.

### 적 요

본 연구는 소 배의 체외발생에 있어서 각 발생 단계의 배에 41°C, 30초간 온도충격을 가한 후, 서로 다른 배양방법(공동배양과 단순배양)으로, 그리고 필수 아미노산 무첨가 YS 용액에 배양하여, 이들 배의 배반포로의 배발생을 관찰하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 배의 체외발생에 있어서 온도충격의 영향은 배의 발생단계와 관계없이 공동배양보다 단순배양이 효과적이었으며, 특히 상실배구에서 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ).
2. 배반포로의 발생에는 온도충격 및 배양방법과 관계없이 필수 아미노산은 필요하며, 또 한 필수 아미노산 무첨가 용액에서 온도충격의 효과는 없었기 때문에 열에 의해 세포내 HSP는 아미노산 등으로 분해되지 않고 다른 어떤 형태로 변형되어 배발생에 영향을 미치는 것 같다.

### 참고문헌

Alliston CW, Howarth B and Ulberg LC. 1965. Embryonic mortality following culture *in vitro* of one- and two-cell rabbit eggs at elevated temperatures. J. Reprod. Fert., 9:337.

Alliston CW and Ulberg LC. 1961. Early pregnancy loss in sheep at ambient temperatures of 70 and 90°F as determined by embryo transfer. J. Anim. Sci., 20:608-613.

Aréchiga CF, Ealy AD and Hansen PJ. 1994. Efficiency of vitamin E and glutathione for the

thermoprotection of murine morulae. Theriogenology, 41:1545.

Duncan RF and Hershey JWB. 1989. Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. J. Cell Biol., 109:1467-1481.

Dutt RH. 1963. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. J. Anim. Sci., 22:713-719.

Ealy AD, Drost M, Barros CM and Hansen PJ. 1992. Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. Cell Biol. Int Rep., 16:125.

Ealy AD, Drost M and Hansen PJ. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. J. Dairy Sci., 76:2899-2905.

Ealy AD and Hansen PJ. 1994. Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. J. Cell Physiol., 160:463.

Ealy AD, Howell JL, Monterroso VH, Aréchiga CF and Hansen PJ. 1995. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. J. Anim. Sci., 73:1401-1407.

Edwards JL, Ealy AD and Hansen PJ. 1995. Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. Theriogenology, 44:329-337.

Gwazdauskas FC, McCaffrey C, McEvoy TG and Sreenan JM. 1992. *In vitro* preimplantation mouse embryo development with incubation temperatures of 37°C and 39°C. J. Assist. Reprod. Genet., 9:149.

Hahnel AC, Gifford DJ, Heikkila JJ and Schultz GA. 1986. Expression of the major heat shock protein(hsp70) family during early mouse embryo development. Teratogen Carcinogen Mutagen, 6:493-510.

Heikkila JJ, Browder LW, Gedamu L, Nickells RW and Schultz GA. 1986. Heat-shock gene expres-

- ssion in animal embryonic systems. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28:1093-1105.
- Hendrey J and Kola I. 1991. Thermolability of mouse oocytes is due to the lack of expression and/or inducibility of Hsp70. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:1-8.
- Loven DP. 1988. A role for reduced oxygen species in heat induced cell killing and the induction of thermotolerance. *Med. Hypotheses.*, 26: 39.
- Malayer JR, Pollard JW and Hansen PJ. 1992. Modulation by alanine and taurine of thermal killing of lymphocytes and preimplantation embryos. *Am. J. Vet. Res.*, 53:689.
- Morange M, Diu A, Bensaude O and Babinet C. 1984. Altered expression of heat shock proteins in embryonal carcinoma and mouse early embryonic cells. *Mol. Cell Biol.*, 4:703-735.
- Muller WA, Li GC and Goldstein LS. 1985. Heat does not induce synthesis of heat shock proteins or thermotolerance in the earliest stage of mouse embryo development. *Int. J. Hyperthermia*, 1:97-102.
- Nover L and Scharf KD. 1991. Heat shock proteins  
In: Nove L(ed), *Heat shock Response*. Boca Raton Florida:CRC Press, 41-128.
- Riabowol KT, Mizzen LA and Welch WJ. 1988. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science*, 242: 433-436.
- Tompkins EC, Heidenreich CJ and Stob M. 1967. Effects of post-breeding thermal stress on embryonic mortality. *J. Anim. Sci.*, 26:377-380.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Shultz GA. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- 허용수, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 윤혜진, 이석원, 김은영, 박세필, 이성구, 이원돈, 임진호. 1996. IVF-ET Program에서 blastocyst 수정란 발생에 관한 연구. 1. Glucose와 Phosphate를 함유하지 않은 배양액에서 blastocyst 수정란의 발생. *대한불임학회지*, 23:155-161.

---

(접수일: 2001. 1. 30 / 채택일: 2001. 2. 25)