

한우에 있어서 숫소 개체, 정자의 형태, 정자와 난자의
전처리 등이 ICSI후 응성전핵 형성과 체외발생에
미치는 영향에 관한 연구

김 상 근[†] · 정 진 호
충남대학교 수의과대학

**Effects of Individual Variance of Bull, Sperm Type and
Pretreatment of Sperm and Oocytes on
Male Pronuclear Formation and Developmental Rates in
Korean Natitive Cattles**

S. K. Kim and J. H. Cheong

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of the bull, sperm type and sperm pretreatment on the pronuclear formation and *in vitro* development after injection of spermatozoa into *in vitro* matured bovine oocytes.

1. Spermatozoa derived from four bulls(A, B, C and D) were used for ICSI. The male pronuclear formation and developmental rates were 73.9~87.0% and 33.3~60.9%, respectively.
2. The effects of sperm type were examined. Male pronuclear formation rates by using fresh- and frozen-sperm, tail-cutting and tail-scoring sperm were 82.0%, 78.0%, 42.2% and 51.1% ($p<0.05$) while development rates were 56.0%, 42.0%, 17.8% and 22.2%, respectively. Fresh sperm achieved a high male pronuclear- and development rates than those of other groups.
3. Chemical pretreatments were tested and compared. When sperm were pretreated with heparin, BFF(bovine follicula fluid), His, Ca Ionophore(I) and I + caffeine, male pronuclear formation and developmental rates were 66.7~82.2% and 33.3~60.6%, respectively, and these values of treatment of I + caffeine were higher than that of other methods.
4. The male pronuclear formation and developmental rates of oocytes obtained by ICSI treated with or without zona pellucida were 80.0%, 72.0% and 46.0%, 36.0%, respectively.

(Key words : ICSI, male pronuclear formation, developmental rates)

서 론

난자의 세포질내 단일정자 주입(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 관한 연구는 불임증

[†] Correspondence : College of Vet. Med., Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea.
E-mail : kskkim@hanbat.cnu.ac.kr

해결을 위해 인간을 대상으로 주로 연구되어 왔다 (Bar Hava 등, 1977; Barros 등, 1997; Gordon 등, 1997; Holden 등, 1977; Hoover 등, 1997; Jimenez 등, 1997; Novero 등, 1997; Turcker 등, 1996).

Lacham Kaplan과 Trounson(1995)은 마우스에 있어서 ICSI전에 정자를 Ca Ionophore로 처리하여 첨체반응을 유기한 후 intact oocytes에 미세주입하였을 때 전핵형성율은 60%(59~62%)였으며, 전핵형성 난자는 수정후 이식하였을 때 배반포까지 발생되었다고 보고하였다. Catt와 Rhodes(1995)는 양, 소, 돼지 난자에 정자 주입 전후에 외인적으로 활성화시키지 않은채 수정시켰을 때 돼지는 배 발생 및 수정시에 온도에 민감하고, 양은 정자 존재 여부에 관계없이 주입후 활성화되는 경향이 있다고 보고하였다. Keskinetepe과 Brackett(2000)는 ICSI법에 의해 얻어진 소 배반포를 zona-intact, zona-free 군으로 나누어 동결하였을 때 생존율은 87.5%(14/16)와 75.0%(12/16)으로서 높은 생존율 ($p < 0.05$)을 나타냈다고 하였다. Martin(2000)은 돼지 난자를 대상으로 ICSI법으로 수정후 48시간에 69%가 생존하였고, 38%가 배반포로 발생하였으며, 1두의 수란돈에 이식하여 3마리의 산자가 출산하였다고 하였다. 그러나 난자의 세포질에 정자주입시 산소 개체, 정자형태, 정자 및 난자의 전처리가 ICSI시 응성전핵 형성과 체외발생율에 미치는 영향에 관한 보고는 보고자에 따라 차이가 있었다. 이에, 본 연구는 수소 개체별, 정자의 형태, 정자와 난자의 전처리가 ICSI시 응성전핵 형성과 체외발생율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수

도살 한우로부터 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 난소난포로부터 배양액이 들어있는 18 G 주사기로 난포액을 흡입하여 실험현미경(20~40 \times)하에서 난포란을 회수하였다.

2. 난포란의 배양

회수한 난포란은 10%(v/v)의 FCS(Sigma, U.S.A.)와 1 μ g/ml의 FSH(Sigma, U.S.A.), 2 IU/ml의 HCG(Sigma, U.S.A.), 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, U.S.A.), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Whittaker, U.S.A.) 배양액으로 배양하였다.

난포란의 체외성숙은 배양액 50 μ l의 소적을 mineral oil(Squibb, U.S.A.)로 피복하여 배양 2~3 시간전에 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 5~6시간 평형시킨 후 소적내에 5개의 난포란을 주입하여 24~30시간 성숙배양하였다.

3. 난자의 전처리

난자의 전처리는 난자를 0.03%의 pronase(Sigma, U.S.A.)를 처리하여 투명대를 연화시켜 pipetting으로 투명대를 제거한 난자를 배양하면서 시험에 이용하였다.

4. 정자의 전처리

정액은 신선 및 동결정액을 이용하여, 100 μ g/ml의 heparin(Sigma, U.S.A.)에 15분간 배양에 의해, BFF(bovine follicular fluids)법은 비동화처리한 난포액에 4시간 배양에 의해, His(high ionic strength)법은 2 ml의 His액에 5분간 배양에 의해, Ca Ionophore(Sigma, U.S.A.)법은 10 μ M Ca Ionophore액에 10분간의 배양에 의해, I + caffeine(Sigma, U.S.A.)법은 5 mM I + caffeine액에 3시간의 배양 후 시험에 이용하였다.

5. ICSI

체외성숙 난자의 세포질내 정자의 주입은 micro-manipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 petri dish내에 사용 전날 전배양한 polyvinylpyrrolidone(Sigma, U.S.A.)액 소적중에 정자를 넣어 운동성을 저하시킨 다음 micropipette에 정자를 장진시켜 보정용 pipette으로 흡인 고정된 체외성숙 난자내에 현미조작에 의해 주입하였다(Fig. 1).



Fig. 1. Oocytes microinjected single sperm into cytoplasm.

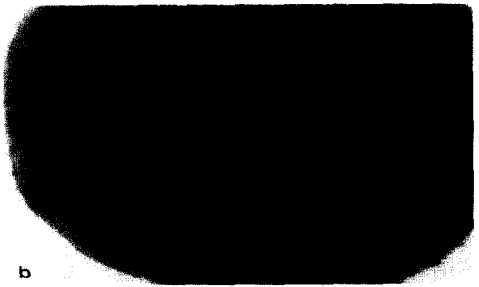


Fig. 2. Embryos fertilized with sperm in TCM-199 solution (male, female pronucleus).

6. 응성전핵 형성을 및 체외발생율

ICSI후 초기배를 배양액으로 3회 세척후 10% FCS + TCM-199 배양액으로 배양하면서 현미경하에서 응성전핵 형성과 배의 발생상태를 관찰하거나, Schilling(1982)법에 의해 판정하였다(Fig. 2).

7. 통계학적 분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 분산분석에 의해 평균치를 구하였으며, 처리간의 차이를 평가하기 위하여 Duncan의 다중검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 숫소 개체별 응성전핵 형성을

숫소 개체별로 채취한 정자를 난자의 세포질내에 주입후 배양하였을 때 응성전핵 형성과 체외발생율은 Table 1과 같다.

난자의 ICSI시 숫소 개체별로 채취한 정자를 세포질내에 주입후 배양하였을 때 응성전핵 형성은 67.4~71.1%였으며 체외발생율은 33.3~58.7%로서 숫소 개체간에 따라 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 숫소 개체별로 ICSI시 36.8~70.9%로서 큰 차이를 나타냈다고 한 Wei와 Fukui (1999)의 보고와 일치하였다. 또한, 체외수정시에도 개체에 따라 수정율과 체외발생율에 차이가 있음을 고려할 때 개체에 따른 정자수, 활력, 기형정자수 등에 따라 차이가 있음을 시사해 주고 있다.

2. 정자의 형태에 따른 응성전핵 형성을

정자의 형태별로 난자의 세포질내에 주입후 배양하였을 때 응성전핵 형성과 체외발생율은 Table 2와 같다.

소 난자의 ICSI시 정자의 형태별로 신선정자와 동결정자 및 미부절단 정자와 두부, 미부이상 정자를 세포질내에 주입후 배양하였을 때 응성전핵 형성은 각각 82.0%, 78.0%, 42.2%, 51.1%였고 체외발생율은 56.0%, 42.0%, 17.8%, 22.2%로서 신선정자의 처리가 다른 처리군에 비해 높은 응성전핵 형성과 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 미부절단 정자와 두부, 미부손상 정자를 이용하여 ICSI를 하였을 때 응성전핵 형성은 31.5%와

Table 1. Effects of sperm derived from different kinds of bulls on the male pronuclear formation and developmental rates after ICSI

Bull	No. of oocytes injected	No. of oocytes cultured(%)	Formation of male pronucleus(%)	Rate do developmental (%)
A	45	45	39(86.7)	23(51.1) ^a
B	45	45	34(73.9)	20(44.4)
C	48	44	36(75.0)	16(33.3) ^a
D	46	45	40(87.0)	28(60.9) ^b

* Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

Table 2. Effects of mechanical pretreatment of sperm on the male pronuclear formation and developmental rates after ICSI

Types of sperm	No. of oocytes injected	No. of oocytes cultured(%)	Formation of male pronucleus(%)	Rates of development(%)
Fresh	50	50	41(82.0)	28(56.0) ^a
Frozen	50	49	39(78.0)	21(42.0) ^b
Tail-cutting	45	44	19(42.2)	8(17.8) ^b
Tail-scoring	45	43	23(51.1)	10(22.2) ^b

* Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

47.3%였다고 한 Wei와 Fukui(1999)의 보고와 비교할 때 유사한 성적이었다. 한편, Yoo 등(1998)은 체외수정시 신선정자를 이용한 체외수정이 동결정자를 이용할 때보다 높은 체외수정율과 분할율을 나타낸다고 하였다.

3. 정자의 전처리에 따른 응성전핵 형성을

정자의 전처리별로 각각 난자의 세포질내에 주입후 배양하였을 때 응성전핵 형성과 체외발생율은 Table 3과 같다.

소 정자를 heparin, BFF, His, Ca Ionophore, I + caffeine법으로 전처리 후 ICSI법으로 수정시켰을 때 응성전핵 형성은 각각 66.7~82.2%였고, 체외발생율은 33.3~60.0%로서 I + caffeine법이 다른 처리군에 비해 높은 응성전핵 형성과 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 소 난포란의 ICSI시 정자의 heparin처리가 체외수정율과 분할율이 높게 나타났다고 보고한 Trounson 등(1994)의 보고와는 차이가 있었으나, I + caffeine 처리가 가장 높은 응성전핵 형성을 나타냈다는 Wei와 Fukui

(1999)의 보고와는 일치하였다. 한편, Lacham Kaplan과 Trounson(1995)은 마우스에 있어서 ICSI전에 정자를 Ca Ionophore로 처리하여 침체반응을 유지한 intact oocytes의 전핵형성율은 60% (59~62%)였으며, 전핵형성 난자는 수정후 이식하였을 때 배반포까지 발생되었다고 보고하였다.

4. 난자의 투명대 부착과 미부착별 응성전핵 형성을

투명대 부착 난자와 미부착 난자에 ICSI후 배양하였을 때 응성전핵 형성과 체외발생율은 Table 4와 같다.

소 난자의 수정시 투명대 부착과 미부착별로 ICSI후 배양하였을 때 응성전핵 형성은 각각 72.0%, 64.0%였고 체외발생율은 42.0%, 36.0%였다. 이러한 결과는 ICSI법에 의해 얻어진 소 배반포를 zona-intact, zona-free 군으로 나누어 동결후 생존율은 87.5%(14/16)와 75.0%(12/16)으로서 높은 생존율(p<0.05)을 나타냈다고 한 Keskindepe와 Brackett(2000)의 결과에 비해 낮은 생존율을 나

Table 3. Effects of chemical pretreatment of sperm on the male pronuclear formation and developmental rates after ICSI

Pretreatment of sperm	No. of oocytes examined	No of oocytes cultured(%)	Formation of male pronucleus.(%)	Rates of development(%)
Heparin	45	45	36(80.0)	24(53.3) ^{ac}
BFF	46	45	34(73.9)	18(39.1) ^{ab}
His	45	44	30(66.7)	15(33.3) ^{ac}
Ionophore	45	45	34(75.6)	20(44.4) ^{de}
I + Caffeine	45	45	37(82.2)	27(60.0) ^{ce}

* Values with different superscripts within column were significantly different(p < 0.05).

Table 4. Effect of intact and free-zona oocytes on the pronuclear formation and developmental rates after ICSI

Pretreatment of oocytes	No. of oocytes examined	No. of oocytes cultured	Formation of male pronucleus(%)	Rates of development(%)
Intact-zona	50	50	40(80.0)	23(46.0) ^a
Free-zona	50	48	36(72.0)	18(36.0) ^b

* Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

타냈다. 한편, Martin(2000)은 돼지 난자를 대상으로 ICSI법으로 수정후 48시간에 69%가 생존, 38%가 배반포로 발생하였고, 1두의 수란돈에 이식하여 3마리의 산자가 출산하였다고 하였다.

적 요

본 연구는 스포스 개체별, 정자의 형태, 정자의 전처리 및 난자의 투명대부착과 미부착별로 현미작에 의해 난자의 세포질내 단일정자를 주입했을 때 응성전핵 형성율과 체외발생율을 조사하였다.

1. 스포스 개체별 정자를 이용하여 ICSI를 하였을 때 응성전핵 형성율은 각각 73.9~87.0%였고 체외발생율은 33.3~60.9%를 나타냈다.
2. 신선 및 동결정자와 미부착 단 정자와 두부, 미부손상 정자를 이용하여 ICSI를 하였을 때 응성전핵 형성율은 각각 82.0%, 78.0%, 42.2%, 51.1%였고, 체외발생율은 56.0%, 42.0%, 17.8%, 22.2%로서 신선정자를 이용했을 때가 다른 처리군에 비해 높은 전핵형성율과 체외발생율을 나타냈다.
3. 정자를 heparin, BFF, His, Ca Ionophore, I + caffeine액으로 처리후 ICSI를 하였을 때 전핵형성율은 66.7~82.2%였고, 체외발생율은 33.3~60.6%로서 I + caffeine 처리법이 다른 처리군에 비해 높게 나타났다.
4. 투명대 부착 난자 및 미부착 난자로 ICSI를 하였을 때 전핵형성율은 각각 80.0%, 72.0%였고, 체외발생율은 46.0%, 36.0%로서, 투명대부착 난자가 투명대 미부착 난자에 비해 높은 응성전핵 형성율과 체외발생율을 나타냈다.

참고문헌

- Bar Hava I., Ashkenazi J., Shelef M., Schwartz A., Brengauz M., Feldberg D., Orvieto R and Ben Raael Z. 1977. Morphology and clinical outcome of embryos after *in vitro* fertilization are superior to those after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 68(4): 653-657.
- Barros A., Sousa M., Oliveira C., Silva J., Almeida V and Beires J. 1997. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm recovered from the ejaculate. *Fertil. Steril.*, 67(6):1091-1094.
- Catt JW and Rhodes SL. 1995. Comparative intracytoplasmic sperm injection(ICSI) in human and domestic species. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7(2):161-166.
- Gordon AC, Harrison RF, McMahon A and Fawzy M. 1997. Establishing an intracytoplasmic injection(ICSI) programme for the treatment of male factor infertility in Ireland. *Ir. J. Med. Sci.*, 166(2): 65-69.
- Holden CA, Fuscaldo GF, Jackson P, Cato A, Southwick GJ, Hauser R, Temple Smith, P.D. and McLachlan, R.I. 1977. Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 67(1):81-87.
- Hoover L, Baker A, Check JH, Lurie D and Summers D. 1997. Clinical outcome of cryopreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 67(4):621-624.
- Jimenez C, Grizard G, Pouly JL and Boucher D. 1997. Birth after combination of cryopreservation of sperm recovered from urine and intracy-

- toplasmic sperm injection in a case of complete retrograde ejaculation. *Fertil. Steril.*, 68(3): 542-544.
- Keskintepe L and Bracckett BG. 2000. Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 53(5):1041-1052.
- Lacham Kaplan O and Trounson A. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in mice : increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. *Hum. Reprod.*, 10(10): 2642-2649.
- Martin MJ. 2000. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.*, 63(1):109-112.
- Novero V, Camus M, Tourmaye H, Smitz J, Verheyen G, Joris H, Derde MP, Van Steirteghem AC and Devroey P. 1997. Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 12(1):59-63.
- Schilling E, Niemann H and Schmidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15: 245-248.
- Trouson A, Wood C and Kausche A. 1994. *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *J. of Fert. and Steril.*, 82(2):353-362.
- Turcker MJ, Morton PC, Wright G, Ingargiola PE, Sweitzer CL, Mitchell CW, eef DE and Massey JB. 1996. Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection does co-culture or assisted hatching improve implantation rates. *Hum. Reprod.*, 11(11):2434-2437.
- Wei H and Fukui Y. 1999. Effects of bull, sperm type and sperm pretreatment on male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 11:59-65.
- Yoo SS, Kim YS, Lee BK and Kim SK. 1998. Studies on the improvement of fertilization rates using intracytoplasmic sperm injection with *in vitro* matured oocytes. *Korean J. Anim. Reprod.*, 22(3):213-219.

(접수일: 2001. 5. 7 / 채택일: 2001. 7. 28)