韓國家畜繁殖學會誌 25(2) : 101~111 (2001)
Korean J. Animal Reprod.

소 Preantral Follicle 성숙에 미치는 FSH와 LH의 영향

김대진 · 정학재 · 김동훈[1] · 엄상준 · 이훈택 · 정길생
건국대학교 동물자원연구센터

Effects of FSH and LH on Maturation of Bovine Preantral Follicle

Kim, D. J., H. J. Chung, D. H. Kim[1], S. J. Uhm, H. T. Lee and K. S. Chung
College of Agriculture, Animal and Life Science, Konkuk Uiversity

ABSTRACT

The present study was conducted to develop an *in vitro* culture system that would support bovine follicle growth from preantral to antral stage, oocyte maturation, fertilization, and embryonic development. Bovine preantral follicles (150±1.2 μm) surrounded by theca cell were isolated ezymatically and mechanically from ovarian cortical slides in Leibovitz L-15 medium containing 1 mg/ml collagenase and 0.2 mg/ml DNase I and cultured for 25 days in the presence of different concentrations of bovine FSH and LH in α MEM medium. The survival and growth rates of follicles cultured in the presence of FSH (10~150 ng/ml) were significantly higher than those of control group ($P < 0.001$), but no significant differences were observed in survival and growth rates of follicles between the LH treatment groups (1~125 ng/ml) and the control. The survival (40%) and growth (244 ± 0.5 μm) of follicles cultured with FSH (90 ng/ml) and LH (25 ng/ml) were higher than those of control (25%, 160±1.0 μm). Finally, 50% percent of healthy antral follicles were obtained, and almost 60% of them has complete meiotic division with 1st polar body (18.1%) and 10.0% have developed to the cleaved embryo and blastocyst stage. These results suggest that bovine preantral follicle with intact theca cell can grow to the antral stage using these culture conditions, and that oocytes from *in vitro*-matured bovine preantral follicle may acquire meiotic competence and can undergo fertilization and development.

Ⅰ. 서 론

출생 시 난소 내에 존재하는 난포수는 동물 종에 따라 차이가 있는데, 예를 들면 쥐는 수만 개이고 포유동물이나 사람은 수백 만개에 이른다. 이러한 난포의 대부분은 성장 및 성숙 과정에서 퇴행하고, 정상적인 난포성장과 성숙을 거쳐 배란되는 난자의 수는 단지 1% 이하이다. 즉, 1% 이하의 난자만이 주위 세포와의 연계작용을 통하여 성숙을 할 수 있다. 최근 핵치환이나 체세포 복제 등 많은 생물공학적 기술이 개발되고 있다(Campbell 등, 1996; Wilmut 등, 1997). 이들 기술은 어느 것이나 완전하게 성숙한 난자를 사용하여 개발되고 있다.

† Corresponding author : College of Agriculture, Animal and Life Science, Konkuk University
[1] 을지병원 의과학연구소(Medical Science Institute, Eulji Medical Center)

그러나, 난소에 있는 antral follicle의 수에는 한계가 있기 때문에 이용 가능한 난자를 다수 획득하기가 쉽지 않다. 따라서, 초기단계의 난포를 난소로부터 획득하여 성장 및 성숙을 유도하여 많은 수의 성숙난자를 획득하려는 연구들이 시도되고 있다.

초기 난포의 배양에 대한 연구는 다년간 이루어져 왔지만, 난포발육의 조절에 관한 기전은 거의 알려져 있지 않다(Lussier 등, 1987; Gougeon, 1996). 그간의 연구들은 preantral follicle의 발달과 난포에서 분리된 난자의 granulosa cell complex의 발달을 위한 배양조건 정립에 집중되었다. 그 결과 원시난포나 난포강 형성 이전 난포를 체외에서 난포강이 형성될 때까지 배양할 수 있게 되었고, 그 난포에서 성숙한 난자는 성숙분열을 할 수 있음이 입증되었다(Boland와 Gosden, 1994; Humpherson 등, 1994). 그러나 난포강이 형성되는 시기의 난포란이라도 성숙능력에는 차이가 있는데 난자의 크기가 클수록 성적이 우수하다(Schultz와 Wassarman, 1977). 이에 많은 연구자들은 체외배양의 한계를 극복하기 위하여 *in vivo* 상태와 비슷한 공배양체계의 개발을 시도하였다. 즉, 생쥐에서 원시난포를 granulosa cells과 공배양하여 난모세포의 성장, 수정 및 배발달을 유도하는데 성공하였다(Eppig와 O'Brien, 1996; Wigglesworth 등, 1996). 그 후 미성숙 생쥐난자의 배양액 내에 스테로이드 호르몬, 성장인자, purines이나 pyrimidine 전구체 및 재조합성선 자극 호르몬 등을 첨가하는 연구가 수행되어 왔다(Hartshorne 등, 1994 a,b; Spears 등, 1994; Cotrvrindt, 등, 1998).

사람이나 가축의 preantral follicle을 *in vitro* 에서 이용하여 성숙시키는 연구도 수행되었다(Cecconi 등, 1999; Hirao 등, 1994; Wu 등, 1998, 2000). 즉, 최근에는 돼지의 preantral follicle을 이용하여 *in vitro* 에서 난자를 성숙시키는데 성공하였고(Wu 등, 2001). 소의 preantral follicle을 *in vitro* 에서 antral follicle까지 성장시켰다(Carlos 등, 2000). 그러나, 소의 경우에는 과립막 세포와 협막 세포의 수가 부족하여 난자를 성숙시키지 못하기 때문에 (Braw-Tal과 Yossefi, 1997) 난포강 형성 이전의 난포를 *in vitro* 에서 성장시키는 데에는 한계가 있다. 최근 김(2000)은 쥐, 소, 및 돼지에서 난포 배양액으로 사용되는 Waymouth, DMEM, F12- DMEM, TCM 199 및 αMEM 배양액 등을 비교 검토하여 αMEM 배양액의 성적이 좋다고 보고하였다.

이에, 본 실험에서는 협막세포가 부착되어 있는 비교적 큰 preantral follicle을 공시하여 αMEM배양액에 FSH와 LH를 첨가하여 *in vitro*에서 배양하면서, preantral follicle의 성장과 난모세포의 성숙과정을 관찰하였다. 또한, 성숙된 난포란의 수정 및 배발달 상태를 검토함으로써 난포란의 성숙을 유도하기 위한 최적 배양조건을 규명하려고 시도하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. Preantral follicles의 분리

도축장에서 회수한 소의 난소로부터, 물리적 방법과 효소적 방법에 의해 preantral follicles을 분리하였다. 즉, 회수된 난소를 1 mg/ml의 collagenase (C~2674, Sigma, U.S.A.)와 0.2 mg/ml DNase Ⅰ (DN-25, Sigma, U.S.A.)이 함유된 Leibovitz L-15배양액 (41300-039, Gibco, U.S.A.)에 침지하고 난소피질층을 1~2 mm로 자르고, 20여분간 실온에 방치한 다음, 25-gauge의 바늘을 사용하여 난소조직으로부터 preantral follicles을 분리, 회수하였다. 회수된 난포는 Leibovitz L-15배양액에서 3회 세척한 다음, 현미경하에서 관찰하여 난모세포가 2~3층의 과립세포로 둘러싸여 있고, 상태가 양호하며, 크기가 약 150 μm 전후인 난포만을 선별하여 공시하였다.

2. Preantral follicles의 체외성장, 난자의 체외성숙, 성장율 및 생존율의 측정

Preantral follicles의 체외성장을 위한 배양액은 αMEM (11900-024, Gibco, U.S.A.)에 10~150 ng/ml의 FSH와 1~125 ng/ml 의 LH를 첨가하여 사용하였으며, 매 12시간마다 배양액을 교체하면서 25일간의 체외성장을 유도하였다. 배양이 끝난 난포를 TCM-199 (Gibco, U.S.A.)에 10%의 FBS

(Gibco)가 첨가된 체외성숙배양액으로 옮겨 현미경하에서 물리적으로 난자를 적출하였다. 이 난자를 같은 배양액 내에서 24시간 배양하여 체외성숙을 유도하였다. 성장율은 현미경의 접안렌즈를 200배율로 고정하고 한 칸이 10 μm인 눈금이 있는 렌즈를 사용하여 측정하였고, 생존율은 염색약인 trypan blue와 hematoxylin을 사용하여 염색하여 염색되지 않는 것을 살아있는 것으로 판정하였다.

3. 성숙난자의 체외수정 및 체외배양

체외성숙이 끝난 난자는 Sp-TALP와 Fert-TALP로 각각 두 번씩 세척한 다음(Rosenkrans 등, 1993), 동결된 소 정자를 사용하여 체외 수정을 유도하였다. 이때의 정자는 2 μl의 heparin과 2 μl의 penicillamine, hypotaurine, epinephrine을 첨가한 Fert-TALP 용액에서 배양하여 수정능력을 획득시켰으며 첨가농도는 1.0×10^6 ml 이었다. 수정을 유도하기 위해서 정자와 난자는 50 μl의 배양 소적에 침지하여 39℃, 5% CO_2 의 조건하에서 24시간 동안 배양했다. 수정이 끝난 난자는 CR1aa배양액으로 옮겨 170시간 배양하면서 배반포 단계까지 발달상태를 조사하였다.

4. 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과는 SAS통계 Package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 처리 평균간 유의성 검정은 Duncan's Multiple Range Test에 의해 실시하였다.

Ⅲ. 결 과

1. FSH 첨가농도별 Preantral follicles의 체외성장 및 생존율

소 preantral follicles의 체외배양을 위한 적정 FSH 농도를 조사하기 위하여, 체외성장 배양액에 10~150 ng/ml의 FSH를 첨가하여 체외성장 및 생존율을 유도한 결과는 Fig. 1에 제시한 바와 같다. 대조군은 FSH 첨가군에 비하여 유의하게 낮은 성숙율과 생존율을 보였다. 즉, FSH 첨가군에 있어서는 90 ng/ml 까지는 첨가 농도가 높아질수록 높은 성숙율과 생존율을 보였으나, 90 ng/ml 이상에서는 성숙율 및 생존율에 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서, preantral follicle의 체외성숙 및 생존에 있어서는 FSH가 중요한 역할을 한다는 사실과 90 ng/ml가 적정 농도인 것으로 판단되었다.

2. LH 첨가농도별 preantral follicle의 체외성장 및 생존

소의 preantral follicles을 체외에서 배양할 때 적정한 LH의 농도를 파악하기 위하여, 체외성장 배양액에 1~125 ng/ml의 LH를 첨가하여 체외성장

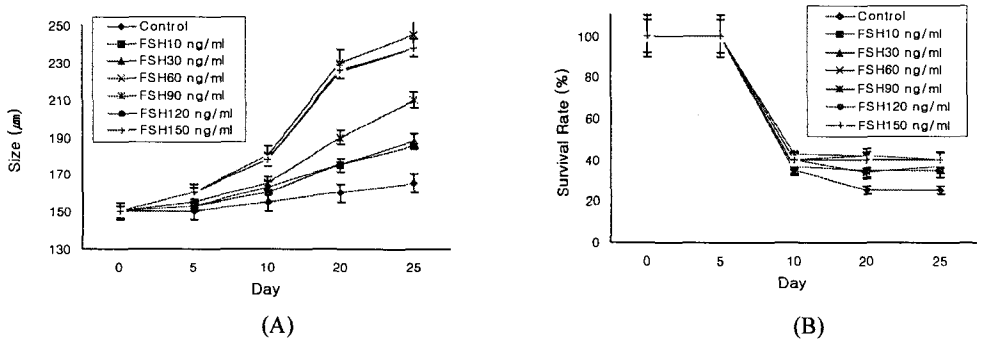
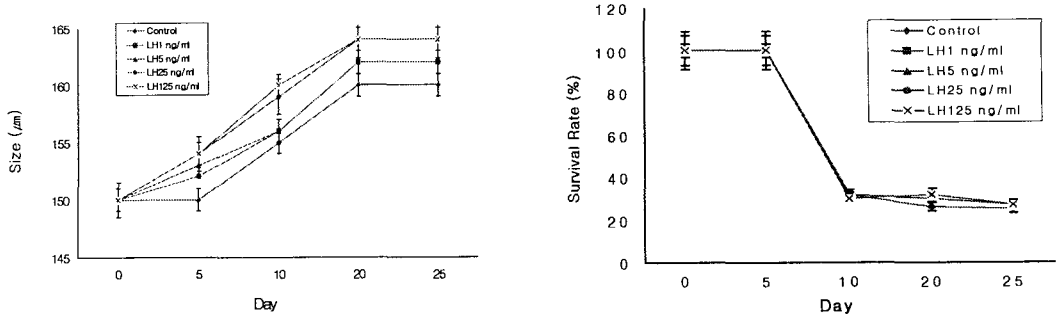


Fig. 1. Effect of various FSH concentrations on the IVM(A) and survival(B) of bovine preantral follicle. Follicle size was graphed as mean and SEM. Follicles cultured with 90~150 ng/ml FSH grew most rapidly.



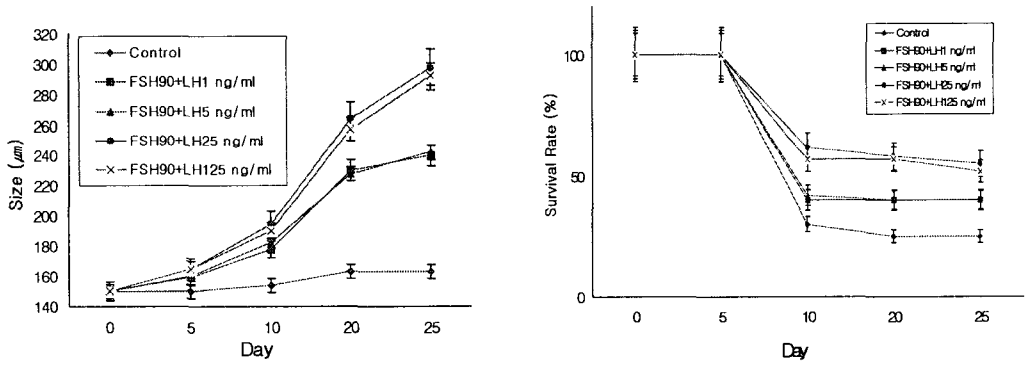
(A) (B)

Fig. 2. Effect of LH concentrations on the IVM(A) and survival(B) of bovine preantral follicles. Follicle size was graphed as mean and SEM. Follicles cultured with LH grew badly.

및 생존율을 조사한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. Fig. 2 (A)에 제시한 결과에서 난포성장은 LH 첨가에 의해 다소 개선되는 경향을 보였으며, 125 ng/ml 첨가군이 특히 뚜렷한 개선 결과를 보였다. 그러나 LH 군간에 유의차가 인정되지 않았다($P > 0.05$). 한편 Fig. 2 (B)에서 보는 바와 같이 LH가 난포의 생존율에 대해서는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

3. FSH와 LH의 공동 첨가에 따른 preantral follicle의 체외성장 및 생존

상이한 농도의 FSH와 LH를 배양액에 동시에 첨가하여 이들 두 호르몬의 상대적 적정 농도를 규명하려고 시도하였다. 상기 실험에서 FSH의 적정농도가 90 ng/ml로 나타났으므로 (Fig. 1), 이 농도에 Fig. 2에 제시한 LH농도를 첨가하여 체외성장 및 생존율을 유도한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 즉, 난포의 크기와 생존율을 보면 대조군은 160 μm와 25%로 FSH 90 ng + LH 1 ng 첨가군의 250 μm와 40%, FSH 90 ng + LH 5 ng의 첨가군 250 μm와 40% 사이에 유의차가 나타나지 않았다. 그러나, 대조군과 FSH 90 ng + LH 25 ng



(A) (B)

Fig. 3. Effect of FSH and LH concentrations on the IVM(A) and survival(B) of bovine preantral follicles. Follicle size was graphed as mean and SEM. Follicles cultured with 90 ng/ml FSH + 25 ng/ml LH, 90 ng/ml + 125 ng/ml grew most rapidly.

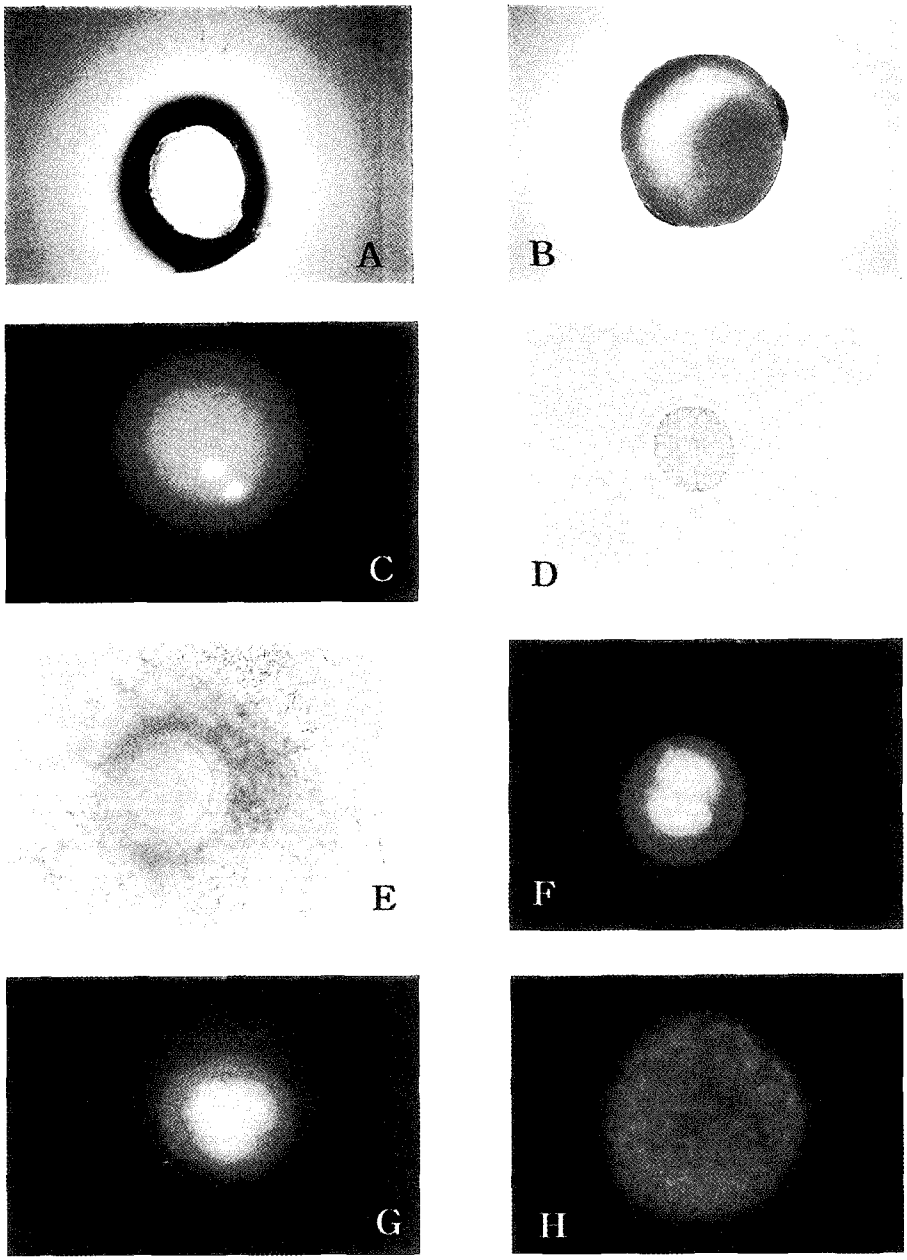


Fig. 4. *In vitro* development and Hoechst stain of bovine oocytes derived from the *in vitro* grown preantral follicles.

A: 150 μm Day 0 preantral follicle (×20)
B: 260 μm Day 25 preantral follicle (×20)
C: Meta phase-Ⅱ stage oocyte (×100)
D: 1 PN oocyte (×100)
E: Fertilized oocyte (×100)
F: 2-Cell embryo (×100)
G: 3-Cell embryo (×100)
H: Blastocyst (×200)

첨가군의 300 μm 와 60% 및 FSH 90 ng + LH 125 ng 첨가군의 295 μm 와 60% 사이에는 유의차가 인정되었다. LH 1 및 5 ng 첨가군보다 LH 25 및 125 ng 첨가한 군이 유의하게 높은 생존율을 나타냈으며, 난포의 크기도 LH 25 및 125 ng 첨가군이 LH 1 및 5 ng 첨가군보다 다소 큰 결과를 보였다. 이상의 결과는 preantral follicles의 체외 성장 및 생존에는 FSH와 LH가 중요한 역할을 수행한다는 점과 FSH나 LH의 단독작용보다는 공동작용이 보다 효과적임을 시사한다. 한편, Fig. 4는 배양전후의 preantral follicle과 25일간 배양한 후, 소 preantral follicle에서의 난자의 조직상을 보여주고 있다.

4. 난자의 성숙, 수정, 및 배발달

Table 1에서 보는 바와 같이 난포 배양시, FSH의 첨가에 의해 난모세포의 생존율이 개선되었다. 이 개선 효과는 FSH 90 ng/ml 이상에서 분명하게 나타났으며 FSH 첨가량이 60 ng/ml 이하에서는 난모세포의 성숙에 긍정적인 영향을 미치지 못하였다. 또 FSH 농도가 90~150 ng/ml 일때 제 1극체를 방출하는 난포세포의 비율이 17.6~43.8%로 대조군의 그것에 비해 유의하게 높았다. FSH 첨가농도가 60 ng/ml 이하일 때에는 수정도 이루어지지 않았다. 또 FSH 투여가 8-cell 이후의 배발달에는 전혀 긍정적 영향을 미치지 못하는 것으로 판명되었다. 한편 Table 2에 제시된 바와 같이 LH 단독투여의 경우는, 그 농도에 관계없이, 난모세포의 생존율, 성숙율 및 수정에 대해 전혀 긍정적인 효과를 보이지 않았다. 그러나 Table 3에서 나타난 것처럼, FSH와 LH를 동시에 첨가했을 때에는 FSH와 LH 단독으로 투여했을 때보다 긍정적인 효과가 인정되었다. 즉, FSH 90 ng과 LH 25 ng를 동시에 첨가한 경우는 난포세포의 생존율, 성숙율등이 현저하게 개선되었으며, 수정된 난자의 50%는 배반포로 발달하였다. Fig. 4는 소 난모세포의 *in vitro* 성숙, 수정 및 배발달 과정을 보여주고 있다. *In vivo* 상태에서 분리해낸 난포 (A)를 체외에서 25일간 배양한 후 (B), 인위적으로 적출해 낸 난자에 체외 성숙 (C), 수정 (D)을 시켰고 170시간 후에 배발달 (H) 되었다.

Ⅳ. 고 찰

본 연구는 적절한 체외배양 시스템을 사용하여 체외에서 소의 preantral follicle을 antral follicle단계까지 발달시키는데 중점을 두고 실시하였다. 매 12시간마다 배양액을 교체하면서 25일간 체외에

Table 1. Effect of various FSH concentrations on *in vitro* growth, maturation, fertilization and development of bovine preantral follicles

FSH concentration (ng/ml)	No. of follicles cultured	No. (%) of oocytes survived	No. (%) of oocytes with 1st PB	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of 8 cells	No. (%) of BL*
0	40	10(25.0)[b]	—	—	—	—
10	40	14(35.0)[a]	—	—	—	—
30	40	14(35.0)[a]	—	—	—	—
60	40	15(37.5)[a]	3(17.6)[b]	—	—	—
90	40	16(40.0)[a]	6(37.5)[a]	2(12.5)	—	—
120	40	16(40.0)[a]	7(43.8)[a]	1(6.3)	—	—
150	40	16(40.0)[a]	6(37.5)[a]	2(12.5)	—	—

Control: αMEM alone, Treatment: αMEM + FSH

[a, b] Values with different superscripts in the same column were significantly different ($P<0.001$).

* Blastocyst (BL)

Table 2. Effect of various LH concentrations on *in vitro* growth, maturation, fertilization and development of bovine preantral follicles

LH concentration (ng/ml)	No. of follicles cultured	No. (%) of oocytes survived	No. (%) of oocytes with 1st PB	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of 8 cells	No.(%) of BL*
0	40	10(25.0)	—	—	—	—
1	40	11(27.5)	—	—	—	—
5	40	11(27.5)	—	—	—	—
25	40	11(27.5)	—	—	—	—
125	40	11(27.5)	—	—	—	—

Control: αMEM alone, Treatment: αMEM + LH

Note: No significant differences were observed among the groups.

* Blastocyst (BL)

Table 3. Effect of FSH 90ng and various LH concentrations on *in vitro* growth, maturation, fertilization and development of bovine preantral follicles

Treatment (ng/ml)	No. of follicles cultured	No. (%) of oocytes survived	No. (%) of oocytes with 1st PB	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of 8 cells	No. (%) of BL*
Control	40	10(25.0)^{c}	—	—	—	—
FSH90+LH1	40	16(40.0)^{b}	7(43.8)^{b}	2(12.5)	—	—
FSH90+LH5	40	16(40.0)^{b}	7(43.8)^{b}	2(12.5)	—	—
FSH90+LH25	40	22(55.0)^{a}	13(59.1)^{a}	4(18.1)	2(9.0)	2(9.0)
FSH90+LH125	40	21(52.5)^{a}	12(57.1)^{a}	4(19.0)	1(4.8)	—

Control: αMEM, Treatment: αMEM + FSH + LH

$^{a, b, c}$ Values with different superscripts in the same column were significantly different ($P<0.001$).

* Blastocyst (BL)

서 배양한 후, 난포내의 난자를 인위적으로 적출하였다. 그리고 난구세포에 의해 싸여있는 난자를 선택하였는데, 이들 난자는 2/3정도가 110 μm이상의 크기였으며, 제 2성숙 분열의 metaphase Ⅱ단계에까지 성숙해 있었다. 일반적으로 난자의 크기가 110 μm 이상이면 성숙분열이 가능한 것으로 알려져 있으며 실제로 110 μm 이상의 난모세포의 30%에서 수정이 이루어졌으며, 수정된 난자 중 12%는 배반포 단계까지 발달한다(Fair 등, 1996). *In vivo* 에서 난포란이 성장을 하려면 40개 이상의 과립세포와 약간의 협막세포가 필요하고 이 단계의 난포직경은 대략 131~250 μm 정도이다(Braw-Tal과 Yossefi, 1997). 본 연구에서는 *in vivo*의 상황을 감안하여 협막세포가 있는 대형 preantral follicle을 대상으로 선택하였다. 협막세포는 원시난포가 성장하는 동안, FSH와 LH의 자극을 받아서 estradiol을 분비하는데, 이때 협막세포는 endogenous mediator로 작용하여 적정량의 estradiol분비를 조절한다(Yada, 등, 1999; Nilsson과 Skinner, 2001). FSH 수용체는 preantral, antral follicle의 협막세포와 과립막세포에 존재한다(Row와 Treacy, 1993; Braw-Tal과 Yossefi, 1997). FSH는 과립막세포에 작용하여 성장인자의 발현을 자극하고(Spears, 등, 1994), 협막세포를 성숙시킬 뿐 아니라, LH re-

ceptor의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Fair 등, 1996; Telfer, 1998; Vitt 등, 1998).

지금까지, LH는 난포발육의 마지막 단계에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있으나, 초기난포의 성장에도 중요한 역할을 한다(Wu 등, 2000). 실제 LH는 초기단계의 난포가 성장할 때, 협막세포에 의한 androgen 생성에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되어 있다(Vitt 등, 1998). 또한, 면역조직학적 연구에 의하면 난포가 발달하는 동안에 LH 수용체가 협막세포에서 발현되는데 이는 LH가 난자 성장에도 관여한다는 것을 시사한다(Richards 등, 1987). 이러한 점으로 보아 미성숙 난포를 체외에서 배양할 때, LH를 적절한 시기에 첨가하는 것이 난포의 건강한 성장에 중요하며(Yong 등, 1992), 첨가된 LH는 난포강 형성 및 estradiol의 생산에 관여하여(Qvist 등, 1990), 난포내 난자의 생존율과 성숙율을 향상시키는 것으로 보고되어 있다 (Cortvrindt 등, 1997). 그러므로, FSH와 LH는 preantral follicle의 체외성장 및 성숙에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다. 그러나, Early follicle 단계에서 난구세포로 둘러쌓인 난자를 체외 배양하는데에는 FSH나 LH가 필수적인 것은 아니라는 보고도 있어(Eppig와 Schroeder, 1989) 추가적인 검토가 필요하다.

본 실험의 결과 FSH가 난포의 성장에 미치는 긍정적인 효과는 90 ng/ml 수준에서 최고치를 나타내었고, 생존율은 배양 5일부터 10일 사이에 급격히 감소하여 10일째에는 30%까지 감소함을 확인하였다 (Fig. 1). 즉, FSH는 난포의 성장에는 뚜렷한 촉진효과를 보였으나, 생존율에 미치는 영향은 미미한 것으로 나타났다. 소의 preantral follicle은 FSH가 있는 배양 조건하에서 효과적으로 성장한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 FSH가 preantral follicles의 성장에 필요하다는 기존의 결과와 일치하였다(Richards 등, 1987; Ritzhautp와 Bahr, 1987; Qvist 등, 1990; Parrot 과 Skinner, 1998). 또한, 본 연구에서 LH를 1, 5, 25 및 125 ng/ml 씩 단독으로 투여한 실험에서도 난포의 성장률이나 생존율에 미치는 영향은 미미한 것으로 나타났다. 즉, 난포성장율에 미치는 LH의 영향은 25 및 125 ng/ml 투여구에서는 긍정적인 효과가 인정되었으나 그 이외의 농도에서는 유의차가 없었다(Fig. 2). 또 생존율에 미치는 영향은 상기 유효 농도에서조차 효과가 인정되지 않았다.

LH와 FSH를 적정한 비율로 혼합하여 동시에 배양액에 첨가했을 때, 난포의 생존율과 성장률, 및 난자의 성숙율은 단독첨가시 보다 양호한 결과를 보였다(Fig. 3). LH는 협막세포의 분화에 영향을 주어서, 협막세포의 성숙을 돕고, 난포세포의 생존율을 높이는 역할을 하지만, FSH없이 LH와 고농도의 serum만을 투여했을 경우, 난포는 구조적으로 정상이 아니며, 난구세포와 난자의 퇴화가 발생한다는 보고가 있다(Cortvrindt 등, 1998). FSH는 과립막세포를 통해서 협막세포의 분화를 돕고, 아직 밝혀지지 않은 협막세포 분화유도 peptides를 분비시킨다는 보고도 있어서(Magarelli와 Magoffin, 1996) 초기난포의 성장에는 FSH와 LH가 동시에 필요한 것으로 생각된다. 본 실험에서도 FSH와 LH를 동시에 첨가했을 때, FSH나 LH 단독첨가보다 높은 생존율과 성숙율을 나타냈으며, 또한 FSH와 LH의 농도가 각각 90와 25 ng/ml (4:1)일 때 최선의 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 FSH와 LH는 난포의 성장과 생존 및 난모세포의 핵성숙에 중요한 역할을 수행한다는 기존의 연구결과를 재확인하는 것으로 생각된다.

마지막으로, *in vitro* 배양이 끝난 난포에서 회수된 난모세포의 성숙과 수정 및 배발달 상태를 조사한 결과, FSH나 LH 단독 투여보다는 FSH와 LH의 공동 투여가 더 양호한 결과를 보였다(Table 1, 2, 3). 즉, FSH 90 ng/ml와 LH 25 ng/ml 첨가군에 있어서 난모세포의 성숙율, 수정율 및 배반포로의 발달율은, FSH 단독 첨가군이나 LH 단독 첨가군보다 양호하였다. 따라서, 소의 preantral 난포의 체외성장 및 성숙을 위해서는 체외배양액에 FSH과 LH를 공동으로 투여하는 것이 단독처리보다 효과적이라고 사료된다.

V. 요 약

본 실험은 preantral 난포를 antral 단계까지 성숙

시 비교, 또 난포 성숙, 수정 및 배발달을 유도할 수 있는 체외배양체계를 개발하고자 시행되었다. 협막세포로 둘러쌓인 소 preantral 난포 (150 ± 1.2 μm)를 1 mg/ml collagenase와 0.2 mg/ml DNase I가 포함된 Leibovitz L-15 배양액에서 효소적 방법과 물리적 방법으로 난소조직으로부터 분리하였고, 체외난포 성숙 배양액인 αMEM을 기본 배양액으로 여러 농도의 FSH와 LH를 첨가하여 25일간 배양하였다. FSH (10～150 ng/ml) 첨가군의 성숙율과 생존율은 대조군의 그것보다 유의하게 높았으나($P < 0.001$), LH (1～125 ng/ml) 첨가군들과 대조군 사이에서는 유의차가 없었다. FSH (90 ng/ml)와 LH (25 ng/ml)를 공동첨가군의 생존율 (40%)과 성숙율 (244±0.5 μm)은 대조군의 그것 (25%, 160±0.5 μm)보다 양호하였다. 결과적으로, preantral 난포를 25일간 체외배양한 후, 50%의 건강한 antral 난포를 획득할 수 있었고, 이들 난포중 60%가 제 1극체가 있는 완전한 감수분열을 이루었고 (18.1%), 10.0%가 배발달을 하여 배반포 단계에 이르렀다. 이런 결과는 협막세포가 있는 소 preantral 난포는 상기의 체외배양체계에 의해 antral 단계까지 성장할 수 있고, 체외에서 성숙된 소 preantral 난포의 난자는 분열능을 획득하고 수정 및 배발달이 가능하다는 것을 보여주었다.

Ⅵ. 인용문헌

1. Boland, N. I. and Gosden, R. G. 1994. Effects of epidermal growth factors on the growth and differentiation of cultured ovarian follicles. J. Reprod. Fertil., 101:369-374.
2. Boland, N. I., Humpherson, P. G., Leese, H. J. and Gosden, R. G. 1994. The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis *in vitro*. Hum. Reprod., 9(suppl 4):617-623.
3. Braw-Tal R. and Yossefi. S. 1997. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. J. Reprod. Fertil., 109:165-171.
4. Campbell, K. H. S., McWhir, J. and Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature, 380:64-66.
5. Carlos, G. Gutierrez., John, H. Ralph., Evelyn, E. Telfer., Ian, Wilmut. and Robert Webb. 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. Biol. Reprod., 62:1322-1328.
6. Cecconi, S., Barboni, B., Coccia, M. and Mattioli, M. 1999. *In vitro* development of sheep preantral follicles. Biol Reprod., 60:594-601.
7. Cotrvrindt, R., Hu, Y. and Smitz, J. 1998. Recombinant luteinizing hormones as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. Hum. Reprod., 13:1292-1302.
8. Cortvrindt, R., Smitz, J. and Van Steirteghem, A. C. 1997. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. Hum. Reprod., 12:759-768.
9. Eppig, J. J. and O'Brien, M. J. 1996. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. Biol. Reprod., 54:197-207.
10. Eppig, J. J., O'Brien, M. and Wigglesworth, K. 1996. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 44:260-273.
11. Eppig, J. J. and Schroeder, A. C. 1989. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. Biol. Reprod., 41:268-276.
12. Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. and Boland, M. 1996. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte dimeter in cattle. Mol. Reprod. Dev., 43:503-512.
13. Gougeon, A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and

hypotheses. Endocr. Rev., 17:121-155.

14. Hartshorne, G. M., Sargent, I. L. and Barlow, D.H. 1994 a. Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles *in vitro* in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. Hum. Reprod., 9:1003-1012.
15. Hartshorne, G. M., Sargent, I. L. and Barlow, D.H. 1994 b. Meiotic progession of mouse oocytes throughout follicle growth and ovulation *in vitro*. Hum. Reprod., 9:352-359.
16. Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyake, M. and Kato, S. 1994. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. J. Reprod. Feril., 100:333 -339.
17. Kim, D. H. 2000. Studies on *in vitro* growth and development of mouse preantral follicles. PhD Thesis, Konkuk University.
18. Lussier, J. G., Matton, P. and Dufour, J. J. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. J. Reprod. Fertil., 81:301-307.
19. Magarelli, P. C. and Magoffin, D. A. 1996. Development and hormonal regulation of theca -cell differentiation factor secretion in ovarian follicles. Biol. Reprod., 55:416-420.
20. Nilsson, E., Skinner, M. K. 2001. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. J. Soc. Gynecol. Investig. 8(suppl proceedings):S17-20.
21. Parrot, J. A. and Skinner, M. K. 1998. Theca cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among ketatinomycyte growth factor, hepatycyte growth factor, and kit ligand during ovarian follicular development. Endocrinology, 39:2240 -2245.
22. Qvist, R., Blackwell, L. F. Bourne, H. and Brown, J. B. 1990. Development of mouse ovarian follicles from primary to preovulatory stages *in vitro*. J. Reprod. Fert., 89:169-180.
23. Richards, J. S., Jagnsen, T., Hedin, I., Lifka, J., Ratoosh, S., Drica, J. M. and Goldring, N. B. 1987. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. Resent. Prog. Horm. Res., 43:231-270.
24. Ritzhaupt, L. K. and Bahr, J. M. 1987. A decrease in FSH receptors of granulosa cells during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). J. Endocrinol., 115: 303-310.
25. Rosenkranks, C. F. Jr., Zeng, G. Q., MCN-amara, G. T., Schoff, P. K., and First, N. L. 1993. Development of bovine embryo *in vitro* as affected by energy substrates. Biol. Reprod., 49:459-62.
26. Row, S. K. and Treacy, B. J. 1993. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. Fertil. Steril., 59:783-790.
27. Spears, N., Boland, N. I. and Murray, A. A. 1994. Mouse oocytes derived from *in vitro* grown primary ovarian follicles are fertile. Hum. Reprod., 9:527-532.
28. Schultz, R. M. and Wassarman, P. M. 1977. Specific changes in the pattern of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 74:538-41.
29. Telfer, E. E. 1998. *In vitro* models for oocyte development. Theriogenology, 49:451-460.
30. Vitt, V. A., Kloosterboer, H. J., Rose, U. M., Mulders, J. W. M., Kiesel, P. S., Bete, S. and Nayudu, P. L. 1998. Isoforms of human recobinant follicle-stimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *in vitro*. Biol. Reprod., 59:854-861.
31. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Klind, A. J. and Campbel, K. H. S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammaliam cells. Nature, 385:810-813.
32. Wu, J., Benjamin, R., Emery and Douglas, T. Carrell. 2001. *In vitro* growth, maturation,

fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. Biol. Reprod., 64:375-381.

33. Wu, J., Nayudu, P. L., Kiesel, P. S. and Michelmann, H. W. 2000. Luteinizing hormone has a stage limited effect on preantral follicle development *in vitro*. Biol. Reprod., 63:320-327.
34. Wu, J., Zhang, L. and Liu, P. 1998. A new source of human oocytes: preliminary report on the identification and maturation of human preantral follicles from follicuar aspirates. Hum. Reprod., 13:2561-2563.
35. Yada, H., Hosokawa, K., Tajima, K., Hasegawa, Y. and Kotsuji, F. 1999. Role of ovarian theca and granulosa cell interaction in hormone production and cell growth during the bovine follicular maturation process. Biol. Reprod., 61:1480-1486.
36. Yong, E. L., Baird, D. T., Yates, R., Reichert, L. E. Jr. and Hillier, S. G. 1992. Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. J. Clin. Endocrinol. Metab., 74:842-849.

(접수일자 : 2001. 3. 22. / 채택일자 : 2000. 4. 16.)