

약령 마우스에서 분리한 난소의 기관배양에 관한 연구

이현주 · 김지철 · 김기동¹ · 이상호¹ · 송해범
대구대학교 자연자원대학

Organ Culture of Ovary Isolated from Juvenile Mice

H. J. Lee, J. C. Kim, K. D. Kim¹, S. H. Lee¹ and H. B. Song

College of Natural Resources, Daegu University

SUMMARY

This study was to assess the developmental capacity of oocytes matured *in vitro* after 20, 15, 10, 5 and 0 days of organ culture when ovaries were isolated from juvenile mice at 0-, 5-, 10-, 15- and 20-day old, respectively, and to develop *in vitro* culture system that observed a view to morphology of ovaries and nucleus maturation of oocytes.

The size of ovaries decreased 35.9%, 8.7%, 1.2% and 14.4% after 20, 15, 10, 5 days of organ culture when the ovaries were isolated from 0-, 5-, 10 and 15-day old mice, respectively. After organ culture, the recovery rates, diameters of oocytes and the number of oocytes progressed from GV to MII were increased as increasing age of mice.

(Key words : organ culture, juvenile mice, ovary, oocyte)

서 론

Blandau 등(1965)이 태생기의 마우스에서 분리한 난소를 14~20 일 동안 기관배양(organ culture) 하였을 때 난자는 직경 46~56 μm 로 성장하고 또한 구조적으로도 난자 주위에 투명대가 형성된다고 보고함으로써 난소의 체외배양에서 난자의 성장이 가능함을 시사하였다. 그 후 태생기의 마우스에서 분리한 난소의 organ culture 및 원시난포(primary follicle)의 체외배양에 관한 많은 연구 결과가 보고되고 있는데, 특히 Eppig와 O'Brien(1996)은 생후 0 일령 마우스의 난소를 organ culture 한 후 원시난포에서 분리한 난자를 체외배양, 수정해서 이식하여 산자를 얻었다고 보고하였다.

마우스 난소에서 분리한 미성숙난자의 성장과 발달을 추적하기 위하여 난자-난구세포 복합체(oocyte-granulosa cell complex)를 효소처리하여 organ culture로부터 분리하고, 체외에서 배양하여 비록 낮은 비율이지만 산자를 얻음으로서 성공적인 배양체계를 개발하였다는 보고도 있다(Eppig와 Schroeder, 1989; Eppig와 O'Brien, 1996).

포유동물의 경우 난포의 일부(1~5%)만이 배란에 이르고 나머지는 난포폐쇄에 의하여 소실되는 점을 고려하면, 난소의 organ culture를 활용하면 보다 많은 난자를 이용할 수 있을 것이다.

본 연구는 원시난포의 체외배양체계를 확립할 수 있는 가능성을 검토하기 위해 신생 마우스에서 분리한 각 일령별 난소를 organ culture하여 난소의 성장을, 난자의 회수율과 성장을 및 난자의 핵성숙

이 논문은 2002년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

¹ 고려대학교 생명공학원(Graduate School of Biotechnology, Korea University)

[†] Correspondence : E-mail: goatsong@daegu.ac.kr

단계를 조사하여 비교 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 ICR 계통의 마우스로 암컷 마우스는 2.5 IU의 PMSG와 hCG를 48시간 간격으로 복강주사하고, 수컷 마우스와 24시간 동안 합사하여 vaginal plug 확인 후 17일 되었을 때 각 cage에 분리하여 사육하였다. 난소의 기관배양(organ culture)을 위한 실험에는 태어난 날을 0일로 하여 0, 5, 10, 15 및 20일령의 마우스를 이용하였다.

2. 배양액

난소와 난자를 체외배양할 목적으로 사용한 배양액은 Waymouth MB752/1에 0.23 mM pyruvic acid, 50 mg/l streptomycin sulfate, 75 mg/l penicillin G, 3 mg/ml BSA, 5 ng/ml FSH, 1 ng/ml EGF와 10%의 fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 것을 기본배양액으로, 난소배양은 기본배양액을 이용하였고, 난자성숙배양에는 EGF를 첨가하지 않은 기본배양액에 100 ng/ml FSH와 1 ng/ml hCG를 첨가하였다. 각 배양액은 사용직전에 FSH, EGF 및 FSH 등을 첨가하였다.

난소와 난자의 세척에는 4 mg/ml BSA가 첨가된 M2 배양액(M2+BSA, Whittingham, 1971)을 사용하였고, 난자 분석 등의 목적으로 4 mg/ml BSA가 첨가된 phosphate buffer solution(PBS+BSA, Ninomiya 등, 1989)을 사용하였다. 각 배양액 및 PBS는 stock solution을 조제해 일정량씩 혼합하여 working solution을 만들고 millipore filter(0.22 μ m)로 여과한 후 평형시켜 사용하였다.

3. 난소의 기관배양(organ culture)

생후 0, 5, 10, 15, 20 일령의 마우스를 경추탈골법으로 도살하여, 복부를 절개하고 난소를 적출한 후 주위의 결합조직을 26 G 주사바늘을 사용하여 제거하였다. 분리한 난소는 M2+BSA 배양액으로 3회 세척하고 난소배양액으로 2회 세척하여 난소의 배양에 사용하였다.

Double-well dish의 안쪽 well에는 1.5 ml의 배

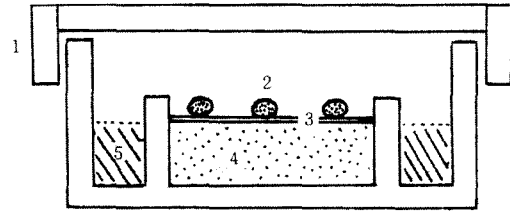


Fig. 1. Organ culture system of ovaries.

1; double-well dish, 2; ovaries, 3; millipore filter, 4; medium, 5; DW.

양액을 담은 후 0.22 μ m millipore filter를 올리고, 밖의 well에는 autoclave된 증류수를 담고 하나의 dish당 난소를 4 개씩 filter 위에 올려 배양하였다. 이때 배양액은 난소의 표면에 얇은 배양액막을 형성할 정도로 조절하여 0, 5, 10, 15일령 마우스의 난소는 20, 15, 10, 5일 동안 20일이 될 때까지 5% CO₂ Incubator에서 배양하였고, 20일령의 난소는 대조구로 이용하였다(Fig. 1). 배양액은 2일마다 1/2씩 교환하였다.

Juvenile mouse에서 분리한 난소의 organ culture가 가능한지를 검토하기 위해 배양한 난소의 크기, 난자의 회수율과 성장을 및 난자의 핵성숙 정도를 다음과 같이 조사하였다.

1) 난소의 크기

난소의 성장 여부를 확인하기 위해 0, 5, 10, 15 일령 마우스의 난소는 20, 15, 10, 5일 동안 각각 배양하여 20일령으로 맞추고, 모든 공시난소는 일령별로 장축과 단축을 7회 반복측정하여 면적을 $4/\pi \times$ 장축 \times 단축으로 계산하였고, 각 일령별로 배양 전과 배양 후의 각 난소의 크기를 비교 분석하였다.

2) 난자의 회수율과 성장률

난소 내의 난자가 어느 정도 성장하였는지를 확인하기 위해 0, 5, 10, 15일령 마우스의 난소를 20, 15, 10, 5일 동안 각각 배양하여 20일령으로 맞추고, organ culture를 완료한 난소에서 난자를 회수하여 난자의 회수율을 조사하고, 모든 공시난자는 현미경하에서 투명대를 제외한 난자의 직경을 6회 반복해서 측정하여 면적을 계산하고 각 일령별

로 난자의 성장율을 비교하였다.

3) 난자의 핵성숙

난소 내의 난자가 어느 정도 성숙하였는지를 확인하기 위해 0, 5, 10, 15일령 마우스의 난소를 20, 15, 10, 5일 동안 각각 배양하여 20일령으로 맞추고, organ culture를 완료한 난소에서 분리한 난자를 18시간동안 체외배양한 후 염색하여 난자의 핵성숙 단계를 Germinal vesicle(GV), Germinal vesicle breakdown(GVBD), Metaphase I (M I), Anaphase I(A I), Metaphase II(M II) 및 Degeneration (Deg)으로 나누어 각 일령별로 난자의 핵성숙 단계를 비교하였다.

난자의 핵형분석을 위하여 DNA-특이 형광염료인 4,6-diamidino-20phenylindole (DAPI)를 최종농도 100 $\mu\text{m}/\text{ml}$ 로 하여 5분간 37°C에서 반응시켰다. 1 ml의 M2 배양액에서 3회, 5분간씩 세정하여 반응하지 않는 DAPI분자를 제거하였다. 깨끗하게 닦은 slide glass위에 wax:vaseline spot을 만든 후 배양시킨 난자를 올리고 coverslip을 가볍게 누른 후 형광현미경을 사용하여 난자의 핵성숙 단계를 비교·관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 난소의 크기

Table 1에서 보는 바와 같이 0, 5, 10, 15 및 20일령의 마우스에서 분리한 난소의 크기는 배양전의 단축 \times 장축이 각각 53 \times 64 μm , 71 \times 87 μm ,

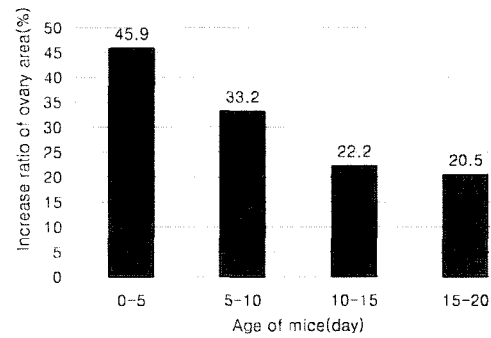


Fig. 2. Increase rate of ovary area isolated from 0-day to 20-day old mice.

84 \times 110 μm , 90 \times 132 μm 및 97 \times 154 μm 였고, 면적은 각각 2,663 μm^2 , 4,849 μm^2 , 7,253 μm^2 , 9,326 μm^2 및 11,726 μm^2 였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 각 일령에 따른 난소의 면적 차이는 0일령과 5일령 45.1%, 5일령과 10일령 33.2%, 10일령과 15일령 22.2% 및 15일령과 20일령 20.5%였다. 따라서 난소는 체내에서 0일에서 10일까지는 급격히 발달되었다가 10일에서 20일까지는 발달의 증가비율이 둔화되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 20일령과 0일령 난소의 면적은 약 2배의 차이가 있었다.

또 Table 1에서 0, 5, 10 및 15일령의 마우스에서 분리한 난소를 출생일로부터 20일이 될 때까지 20, 15, 10 및 5일동안 organ culture한 후 난소의 크기는 단축 \times 장축이 각각 69 \times 79 μm , 76 \times 89 μm , 85 \times 110 μm 및 102 \times 136 μm 였고, 면적은 각각

Table 1. *In vitro* growth of ovaries

Age of neonates ¹ (days)	No. of ovaries used	Duration of organ culture (days)	Size(μm) of cultured ovaries ²	
			Before(μm^2)	After(μm^2)
0	23	20	53 \times 64(2,663)	69 \times 79(4,155)
5	20	15	71 \times 87(4,849)	76 \times 89(5,310)
10	15	10	84 \times 110(7,253)	85 \times 110(7,340)
15	12	5	90 \times 132(9,326)	102 \times 136(10,890)
20	10	0		97 \times 154(11,726)

¹ Day 0 refers to the day of neonates born.

² Apparent area of ovaries were calculated by $4/\pi \times \text{long axis} \times \text{short axis}$.

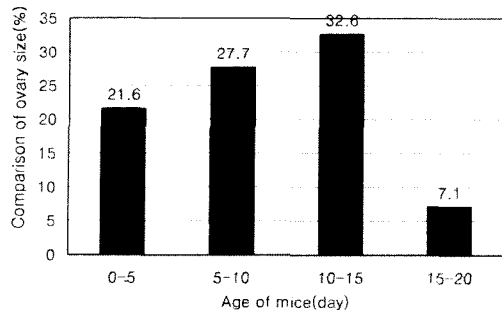


Fig. 3. Comparison of ovary size after culture up to 20-day age *in vitro* of ovary isolated from 0-day to 15-day old time.

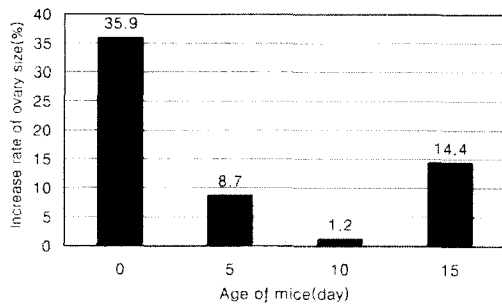


Fig. 4. Increase rate of ovary size between before and after ovary cultured up to 20-day age *in vitro*.

4,155 μm^2 , 5,310 μm^2 , 7,340 μm^2 및 10,890 μm^2 였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 organ culture한 후 각 일령에 따른 난소의 면적 차이는 0일령과 5일령 21.8%, 5일령과 10일령 27.7%, 10일령과 15일령 32.6% 및 15일령과 20일령 7.1%로 나타났다. 난소는 배양 일령이 증가할수록 각 일령 간에 있어서 배양난소 간의 면적 차이는 작은 것으로 나타났다.

Fig. 4는 0, 5, 10 및 15일령의 마우스에서 분리한 난소를 배양하지 않은 것과 난소를 20일령이 될 때까지 organ culture한 것을 비교한 것으로 각 일령별 난소의 면적 차이는 0일령 35.9%, 5일령 8.7%, 10일령 1.2% 및 15일령 14.4%로 나타났다. 배양일령에 따른 면적증가 비율은 감소하였으나, 15일령에서는 5일 및 10일령보다는 증가한 것으로 나타났다.

Plate 1과 2는 0, 5, 10 및 15일령의 마우스에서

분리한 난소를 출생일로부터 20일이 될 때까지 20, 15, 10 및 5일 동안 organ culture한 결과를 나타낸 것이다. Plate 1의 A는 0일령의 배양난소이며, B, C는 5일과 10일령의 배양난소로 둘다 난포강은 관찰되지 않았으나, 다른 일령보다 더 큰 난포가 관찰되었다. 각 일령이 증가할수록 배양 난소의 크기가 커진 것을 알 수가 있었고(Table 1, Fig. 4, Plate 1~2), 또한 배양난소의 표면에서 관찰되어지는 난포가 점점 더 커지는 것을 관찰할 수 있었다.

Odor와 Blandau(1971)는 16일령 마우스의 fetus에서 분리한 난소를 45일간 organ culture하는 동안 난자의 회수율이 증가하였는데 100 μm 이상의 비정상적인 난자와 1~25 μm 의 작은 난자도 회수되었다고 하였다. 또한 배양일령이 증가할수록 난자의 크기가 증가하며 난자의 주위에 투명대가 형성된다고 하였다. 배양 20일에 회수된 난자의 직경은 53 μm 였고, 22일에는 60 μm 였으며, 45일간의 배양에서는 73 μm 로 나타나 본 실험의 결과와 일치하는 경향이 있었다.

2. 난자의 핵성숙

0, 5, 10, 15 및 20일령의 마우스에서 분리한 난소를 organ culture한 후 회수한 난자를 18시간 동안 체외배양시켜 핵성숙 단계를 관찰한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 0일령은 MI 2.6%, 5일령은 GVBD 0.5%와 MI 2.8%, 10일령은 MI 7.8%, AI 1.1%와 MII 0.6%, 15일령은 MI 11.6%, AI 0.9%와 MII 0.6%, 20일령은 MI 14.1%와 MII 9.3%로 일령이 증가할수록 GVBD 이상으로 성숙된 난자가 증가하였으며 MII는 20일령에서 가장 많이 관찰되었다.

Odor와 Blandau(1971)는 16일령 마우스의 fetus에서 분리한 난소를 45일간 organ culture하는 동안 핵막에서 핵응축을 관찰하였으나, 발생능력의 가능성을 보여주는 PAS 염색에서 positive를 관찰할 수 있었다고 하였다. 한편 Eppig(1992)는 20일령과 26일령 마우스에서 같은 크기의 난자성숙과 발달율의 비교 연구에서 같은 크기임에도 불구하고 26일령 마우스에서 성숙, 발달능력이 높았다고 보고하였다. 본 실험에서도 이와 비슷한 결과를 관찰할 수 있었다.

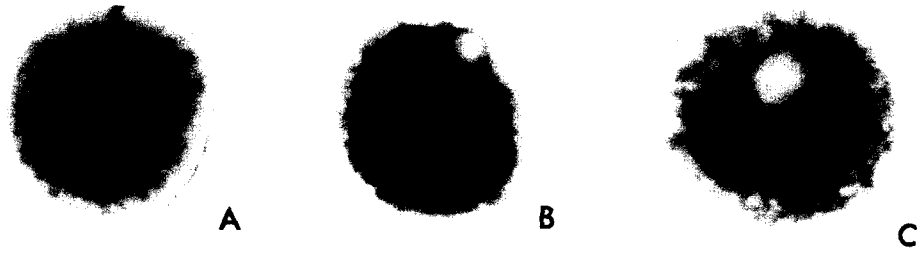


Plate 1. Morphology of cultured ovaries *in vitro* for up to 20 days. Ovaries were cultured for 20(A; 0-day ovary), 15(B; 5-day ovary) and 10(C; 10-day ovary) days. Even after long-term culture ovaries did not show integral degradation. The size of ovaries gradually increased as they get older.



Plate 2. Morphology of cultured ovaries *in vitro* for up to 20 days. Ovaries were cultured for 5 days (A; 15-day ovary) and collected without subsequent culture (B; 20-day ovary). Even after long-term culture ovaries did not show intergral degradation. The size of ovaries gradually increased as they get older.

원시난포는 태생기부터 난소에 있는 가장 초기 단계의 난포형태로서 난포과립막세포(follicular granulosa cell)의 전구체인 단일층의 편편형 체세포와 이들 세포에 둘러 쌓인 원시난자로 구성되어 있다. 체내에서 원시난포는 난포와 난자의 크기가 70~80 μm 까지 성장하고, 4~8 층의 난구세포로 둘러 쌓일 때까지 발달하며, 이렇게 성장된 난포주위에 모세혈관이 침투하게 되고, 외측에 난포세포막층이 발달하여 난포강 형성 전의 난포(preantral follicle)로 급격히 성장한다(Carroll 등, 1991). 그러나 이들 원시난포의 대부분은 감수분열 I기(meiosis I)의 상태로 난소 내에 존재하는데, 체내에서도 계속 성장하지 못하고 대부분 폐쇄난포(atretic follicle)로 퇴화되며, 성성숙기가 되면 그중 극소수만이 협막세포(theca cell)에서 내측의 granulosa cell에 영양분을 공급하고, 혈액의 침출 현상으로 난포액(follicular fluid)이 난포강(antrum)에 채워져서 포상난포(vesicular follicle)를 형성하고, 최종적으로 그라프난포(Graafian follicle)로 발달하여 배란된 후 수정을 하게 된다(Eppig와 O'Brien, 1996). Granulosa cell은 성장하는 난자를 둘러

Table 2. Size and number of oocytes recovered after organ culture of ovaries for up to 20 days

Age of neonates (days)	No. of ovaries used	No. of oocytes recovered from ovaries (mean)	Oocyte diameter (m)
0	6	78 (13.0)	59.0
5	8	110 (13.8)	64.9
10	14	210 (15.0)	62.5
15	10	307 (30.7)	67.1
20	6	219 (36.5)	69.0

Table 3. Analysis of nuclear maturation of oocytes recovered after organ culture of ovaries for up to 20 days¹

Age of neonates (days)	No. of oocytes		No. (%) of oocytes showing the following nucleic stages ²					
	Used	Analysed	GV	GVBD	M I	A I	M II	Deg
0	80	77	67(87.0)	-	2(2.6)	-	-	8
5	292	179	171(95.5)	1(0.5)	5(2.8)	-	-	2
10	228	179	119(66.5)	-	14(7.8)	2(1.1)	1(0.6)	43
15	208	112	89(79.5)	-	13(11.6)	1(0.9)	3(2.7)	6
20	492	298	202(67.8)	-	42(14.1)	-	28(9.3)	26

¹ Oocytes were matured *in vitro* for 18h and analysed by staining with DAPI.

² Abbreviations are GV; germinal vesical, GVBD; GV breakdown, M I, II; metaphase I, II. A I; anaphase I and Deg; degenerated.

싸고 있고, 난자의 성장발달에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Eppig와 Schroeder, 1989).

본 실험에서 난소의 organ culture 후 난자를 회수하였을 때 소수의 난자를 제외한 대부분의 난자가 GV기인 것을 확인하였는데, 본 실험의 배양체계에서는 meiosis-arresting 물질을 첨가하지 않았으므로 난소를 구성하고 있는 물질의 endogenous한 생리적인 기작에 의해 meiotic arrest를 유지한 것으로 추정된다. 아직까지 meiotic arrest를 유지시키는 생화학적 경로는 규명되지 않았으나, Tsafiriri 등(1982)은 granulosa cell에서 분비되는 purine 또는 oocyte maturation inhibitor(DHI) 등의 형태인 물질로 추측된다고 하였고, 많은 연구자들이 난포벽과 난자와의 관계에서 볼 때 난포벽에서 meiotic arrest factor가 분비되는 것으로 생각된다고 보고하였다(Tsafiriri와 Channing, 1975; Leibfried와 First, 1980; Racowsky와 Baldwin, 1989).

적 요

본 실험은 원시난포의 체외배양 체계를 확립할 수 있는 가능성을 검토하기 위해 0, 5, 10, 15 및 20일령 마우스에서 분리한 난소를 20, 15, 10, 5 및 0일동안 organ culture 하여 난소의 성장률, 난자의 회수율과 성장률 및 난자의 핵성숙 단계를 조사하여, 비교·검토하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Organ culture 전과 후의 각 일령에 따른 난소

의 면적 차이는 0일령 35.9%, 5일령 8.7%, 10일령 1.2% 및 15일령 14.4%로 15일령을 제외하고는 배양일령이 증가할수록 면적 차이는 감소하였다.

2. Organ culture 후 난자의 회수율과 난자의 직경은 배양일령이 증가할수록 증대되었다.
3. GV기 이상의 핵성숙은 organ culture 후 배양일령이 증가할수록 진행되는 단계에 있는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Blandau R, Warrick E and Rumery RE. 1965. *In vitro* cultivation of fetal mouse ovaries. *Fertil. Steril.*, 16:705-715.
- Caroll J, Whittingham DG and Wood MJ. 1991. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. *J. Reprod. Fert.*, 93:71-79.
- Chapekar TN, Nayak GV and Ranadive KJ. 1996. Studies on the functional activity of organotypically cultured mouse ovary. *J. Embr. Exp. Morph.*, 15:133-141.
- Eppig JJ. 1992. Growth and development of mammalian oocytes *in vitro*. *Arch Pathol Lab. Med.*, 116:379-382.
- Eppig JJ and O'Brien MJ. 1996. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial folli-

- cles. Biol. Reprod., 54:197-207.
- Eppig JJ and Schroeder AC. 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.
- Fainstat T. 1968. Organ culture of postnatal rat ovaries in chemically defined medium. Fertil. Steril., 19:317-338.
- Leibfried L and First NL. 1980. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. Biol. Reprod., 23:705-709.
- Ninomiya T, Hoshi M, Mizuno A, Nagao M and Yuki A. 1989. Selection of mouse preimplantation embryos carrying exogenous DNA by polymerase chain reaction. Mol. Reprod. Dev., 1:242-248.
- Odor DL and Blandau RJ. 1971. Organ cultures of fetal mouse ovaries. I. Light microscopic structure. Am. J. Anat., 131:387-414.
- Racowsky C and Baldwin KV. 1989. *In vitro* and *in vivo* studies reveal that hamster oocyte meiotic arrest is maintained only transiently by follicular fluid, but persistently by membrane/cumulus granulosa cell contact. Dev. Biol., 134:297-306.
- Tsafriri A and Channing CP. 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. Endocrinology, 96:922-927.
- Tsafriri A, Dekel N and Bar-Ami S. 1982. Role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. J. Reprod. Fert., 64:541-551.
- Whittingham DG. 1971. Culture of mouse ova. J. Reprod. Fert. Suppl., 14:7-12.
-
- (접수일: 2002. 10. 1/ 채택일: 2002. 12. 15)