

## 성숙배양액과 단백질이 개 미성숙난자의 체외성숙에 미치는 영향

이효상 · 윤희준 · 이영호 · 강태영<sup>1</sup> · 공일근<sup>\*</sup>  
순천대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

### Effect of IVM Medium and Protein Source on *In Vitro* Maturation of Canine Oocytes

H. S. Lee, X. J. Yin, Y. H. Lee, T. Y. Kang<sup>1</sup> and I. K. Kong<sup>\*</sup>  
*Department of Animal Science and Technology, College of Agriculture and Suncheon National Life Sciences, University*

#### SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the nuclear progression of canine oocytes. Oocytes were collected from ovaries of bitches at various estrus cycle. The cumulus oocytes complex (COC) of < 110  $\mu$ m diameter were used for *in vitro* maturation. COCs were *in vitro* matured at 39°C, 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere for 72 h. Experiment 1: the oocytes were matured in different culture media to select the optimal maturation medium (basal medium). Experiment 2: the oocytes were matured in basal media in which were added the different protein source to select the optimal one. The rates of meiotic resumption to MI~MII according to different culture media were achieved with TCM-199: 4.0%, DMEM: 5.0%, NCSU37: 5.9% and m-NCSU37: 5.9%, respectively. The rates of meiotic resumption to MI-MII according to addition of protein source were 10% FCS: 13.3%, 10% EDS: 25.0%, 0.3% BSA: 25.0% and 0.1% PVA: 15.4%, respectively.

In conclusion, the results obtained shown that *in vitro* maturation media and protein supplement to m-NCSU37 culture medium tested did not promote the final steps of IVM in canine oocytes.

(Key words : canine, oocyte, *in vitro* maturation, medium, protein source)

#### 서 론

포유동물 난자의 체외성숙에 관한 연구는 토끼의 미성숙 난포란을 채취하여 체외배양하면 체내에서 일어나는 일련의 핵 성숙과정이 자발적으로 일어난다는 것을 최초로 보고한 이래(Pincus와 Enzmann, 1935) 여러 연구자에 의해서 다양한 동물에서 연구 발전되어 왔다.

그러나, 개는 발정주기가 일정한 타 동물과는 달리 단 발정 동물로써 가을에 번식하는 Bsenji 종을 제외하고는 일반적으로 뚜렷한 번식계절이 없다. 또한 대부분의 동물은 난포란이 성숙된 후 배란되어 난관에서 수정을 하지만, 개는 난포란의 성숙과 수정이 난관에서 이루어지고 난관 체류기간도 다른 종에 비해 길기 때문에 체외성숙 및 수정이 타 동물에 비해 어려운 실정이다. 체외성숙배양

<sup>†</sup> 본 연구는 과학재단의 2002년 지역대학우수과학자 연구과제 (R05-2002-000-00917-0)의 지원에 의하여 수행되었음.

<sup>1</sup> Department of Veterinary Medicine, Cheju National University.

<sup>\*</sup> Correspondence : E-mail: ikong@sunchon.ac.kr

에서 개의 미성숙 난포란은 48~72시간 후에 핵 성숙이 일어나지만 핵 성숙을 또한 20% 내외로 타 동물에 비해 낮다 (Otoi 등, 2002; Bogliolo 등, 2002; Songsasen 등, 2002).

현재 개 난포란의 체외성숙 배양액으로는 TCM-199에 20% FCS (Mahi와 Yanagamachi, 1976; Cinone 등, 1992), 10% FCS (Yamada 등, 1992; Hewitt 등, 1995), 10% 발정기 개 혈청 (Nickson 등, 1993)을 사용하고 있으며, Hewitt와 England (1999)는 SOF 배양액에 BSA를 첨가하여 사용을 하였지만 같은 조건하에서 비교 실험한 결과는 미흡하다. 또 개 난자는 형태상 검고 지방이 많아 돼지 미성숙난자와 유사한 외관을 보이거나, 돼지에서 개발된 NCSU-37를 체외성숙 배양액으로 사용한 결과는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 각종 성숙 배양액 및 첨가 단백질이 개의 미성숙 난자의 체외성숙에 미치는 영향을 비교 검토하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 난소 및 난자의 회수

난소는 순천시 모 동물병원에서 1.5~5연령의 잡종견 및 애견에서 발정주기에 상관없이 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 38°C의 physiological saline [0.9% (w/v) NaCl]이 들어있는 보온병에 넣어 2시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 다음 난소를 면도날로 세절하여 난포란을 회수하였다. 난포란은 난구세포가 2~4층으로 둘러싸여 있고, 110 µm 크기 이상의 세포질이 균등한 색조를 지니는 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

### 2. 체외 성숙

실험 1) 체외 성숙 배양액에 따른 난포란의 체외 성숙

체외성숙 배양액으로 TCM-199 (Earle's salt, Sigma, 7528), DMEM (Gibco, 11995-065), NCSU-

37 (Yin 등, 2002), m-NCSU37에 각각 10% FBS (Gibco, 26140-079)를 첨가하고, 1 mg/ml cysteine (C-2529, Sigma), 0.2 mM pyruvic acid (P-4562, Sigma), 20 ng/ml E2 (E-8875, Sigma), 1 µg/ml recombinant bovine Somatotropin (rbST) (S-8648, Sigma)을 첨가하였다. 배양액은 4-well dish (Nunc, Denmark)에 500 µl씩 분주한 후 10~15개의 난자를 주입하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 배양 후 난포란의 성숙을 확인하였다. 발정기의 개 혈청을 채취하여 -70°C에 보관하여 체외성숙배양 시 사용하였다.

실험 2) 첨가 단백질에 따른 난포란의 체외성숙

실험 1의 결과로부터 72시간 체외성숙 후 가장 선명한 난구세포 확장을 보인 m-NCSU37을 기본 배양액으로 하고 단백질 첨가제로서 10% FBS, 10% estrus dog serum (EDS), 0.3% BSA (A-6003, Sigma) 및 대조구로 0.1% PVA를 각각 첨가한 후 1 mg/ml cysteine, 0.2 mM pyruvic acid, 20 ng/ml E<sub>2</sub>, 1 µg/ml rbST를 첨가하여, 4-well dish에 500 µl씩 분주한 후 10~15개의 난자를 주입하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 배양 후 단백질 첨가종류에 따른 난포란의 성숙을 비교 검토하였다.

### 3. 체외성숙 난자의 핵 분열상 평가

체외성숙 72시간 후 핵상의 관찰은 0.2% hyluronidase 용액에 난포란을 침지하여 glass pipette로 난구세포를 제거한 후 세포막이 생존한 난자만 고정하여 핵분열상을 평가하였다. 고정은 10 µg/ml의 Hoechst 33342 염색액이 첨가된 2.5%의 paraformaldehyde에 30분간 고정 후 slide에 정치시켜 형광현미경 하에서 핵상을 관찰하였다. 핵의 형태에 따라 핵막이 뚜렷이 존재하는 것을 GV라 판단을 하였으며, chromosome이 적도판에 배열하거나 동시에 극체가 확인된 난자를 MI-MII라 판단하였으며, 핵상을 알 수 없거나 구분하기 어려운 상태를 unclear로 구분하여 관찰하였다.

### 4. 통계학적 분석

본 연구의 실험결과의 통계학적 분석은 Gener-

alized Linear Model technique (SAS 8.0 package, 1999)에 의하여 실시하였다.

## 결 과

### 1. 성숙 배양액에 따른 난포란의 체외 성숙

각기 다른 체외성숙 배양액에 10% FBS를 첨가하여 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 규명하기 위하여 난포란을 72시간 배양 후 성숙율을 확인한 결과는 Table 1과 같다. 72시간 배양 후 배양액에 따라 GV, MI-MII로 핵 성숙율은 TCM-199 (64.0, 4.0%), DMEM (60.0, 5.0%), NCSU37 (64.7, 5.9%), m-NCSU37 (47.1, 5.9%)로 배양액에 따라 성숙율에 차이를 보이지 않았다.

### 2. 첨가 단백질이 개 난포란의 체외 성숙에 미치는 영향

Mouse 난관액 의 조성을 참조하여 Na, K 등 이온을 조절하여 m-NCSU37 배양액을 조정한 성숙

배양액에 첨가 단백질이 개 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 확인한 결과는 Table 2와 같다. 72시간 성숙배양 후 배양액에 따라 GV, MI-MII로 핵 성숙율은 10% FBS (26.7, 13.3%), 10% EDS (50.0, 25.0%), 0.3% BSA (58.3, 25.0%) 및 0.1% PVA (61.5, 15.4%)로 발정기의 개 혈청 (EDS)을 첨가한 배양액과, 0.3%의 BSA가 첨가된 배양액에서 다소 높은 핵 성숙율을 보였다. 그리고, 타 첨가 단백질보다 10% FCS가 첨가된 배양액에서 핵 발달 상태를 확인하기 어려운 난포란이 많았다.

## 고 찰

최근 개 미성숙 난자의 체외성숙을 위한 여러 가지 배양조건이 연구되고 있으나, 특이한 번식 생리현상 때문에 개 미성숙 난포란의 체외배양은 다른 가축에 비해 매우 낮다(Robertson 등, 1992; Hewitt와 England, 1997; Hewitt 등, 1998). 타 동물은 자연배란 시 혈중 progesterone 농도가 최하수

Table 1. Effect of culture medium on the nuclear progression in canine oocytes 72 h after culture

Culture media	No. of cultured oocyte	No. (%) of oocytes		
		GV	MI~MII	Unclear
TCM-199+10% FBS	50	32 (64.0)	2 (4.0) <sup>a</sup>	16 (32.0)
DMEM+10% FBS	40	24 (60.0)	2 (5.0) <sup>a</sup>	14 (35.0)
NCSU37+10% FBS	34	22 (64.7)	2 (5.9) <sup>a</sup>	10 (29.4)
m-NCSU37+10% FBS	34	16 (47.1)	2 (5.9) <sup>a</sup>	16 (47.1)

<sup>a</sup> Values with same superscripts were not significantly different( $p < 0.05$ ).

\* All of the experiments were replicated 3 times.

Table 2. Nuclear progression rates of canine oocytes according to different culture media

Kind of protein source	No. of cultured oocyte	No. (%) of oocytes		
		GV	MI~MII	Unclear
m-NCSU37+10% FBS	30	8 (26.7)	4 (13.3) <sup>a</sup>	18 (60.0)
m-NCSU37+10% EDS	16	8 (50.0)	4 (25.0) <sup>a</sup>	4 (25.0)
m-NCSU37+0.3% BSA	24	14 (58.3)	6 (25.0) <sup>a</sup>	4 (16.7)
m-NCSU37+0.1% PVA	26	16 (61.5)	4 (15.4) <sup>a</sup>	6 (23.1)

<sup>a</sup> Values with same superscripts mean not significantly different( $p < 0.05$ ).

\* All of the experiments were replicated 3 times.

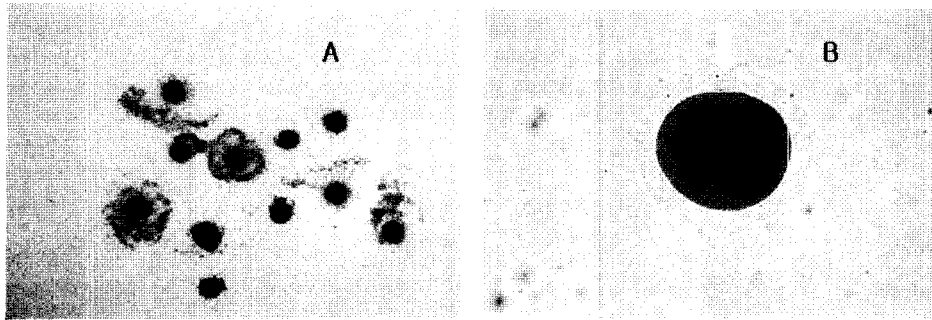


Fig. 1. Morphology of canine oocytes 72 h after IVM.  
(A) cumulus expansion, and (B) 1<sup>st</sup> polar body(white arrow).

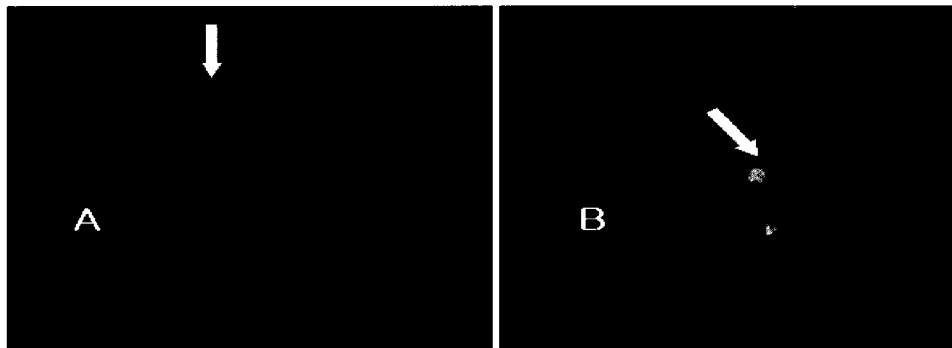


Fig. 2. *In vitro* matured canine oocytes stained with Hoechst33342. (A) GV (white arrow),  
(B) Metaphase II plate (white arrow: MII plate, and black arrow: 1<sup>st</sup> polar body).

준이 되고 estradiol이 최고 수준에 도달했을 때 배란전 LH peak가 일어나는 것과는 반대로 개와 여우는 progesterone 농도가 높은 수준에 도달하였을 때 배란전 LH peak가 일어나고, 1~2일 후 배란이 일어나며 배란된 난포란 또한 타 동물과 다르게 GV 단계인 미성숙 난포란이 배란되어 난관에서 난포란의 성숙이 일어난다(Renton 등, 1991; Mahi 등, 1976; Yamada 등, 1993). Fig. 1에서 보는 바와 같이 72시간 체외성숙 후 과립막세포의 확장은 완전하게 일어나지만 투명대와 접해있는 corona cell은 완전하게 확장되지 못한 상태로 확인되었다. 이는 corona cell과 세포질간의 cell communication이 계속 유지되고 있을 뿐만 아니라 이러한 접촉 때문에 핵의 발달을 억제하는 것으로 판단된다. 즉, 이러한 corona cell의 완전한 확장을 유도할 수 있는 체외성숙 조건들의 개발될 필요성이 있다. Fig.

2에서와 같이 대부분의 핵들은 A) GV 단계로서 핵막붕괴가 일어나지 못하였다. 그러나 소수의 난자는 1<sup>st</sup> polar body가 출현하여 MII까지 발달하였다. 이들 1<sup>st</sup> polar body가 출현한 난자일지라도 Hoechst 33342로 핵염색 후 관찰하면 1<sup>st</sup> polar body에 핵이 염색되지 않는 형태의 것도 상당수 발견되었다. 이러한 결과들은 형태적으로 1<sup>st</sup> polar body의 출현만으로 체외성숙을 판단하는 것에는 많은 오류가 있을 가능성을 제시하는 것으로 판단된다.

체외성숙 배양에 관한 연구에서 Rodrigues와 Rodrigues (2003)은 개 미성숙 난포란을 TCM-199에 10%의 발정기 소혈청을 첨가하여 2.1%가 MII 성숙하였다는 보고와 본 연구결과는 유사하였으며, 김 등(2002)이 발정기의 난포란을 이용하여 36.6%의 성숙률을 얻은 결과와는 차이가 있었으

나, 최 등 (2001)이 발정기의 난소에서 110  $\mu\text{m}$  이상의 난포란을 채취하여 얻은 성숙률과는 차이가 없었다. 또한, Bolamba 등(1998)은 DMEM과 Ham's F-12를 희석한 성숙배양액을 사용하여 early antral follicle에서 채취한 난포란의 핵성숙률 (7.5%)과 비슷한 결과를 얻었다. 또한, Songsasen 등(2002)이 보고한 무혈청 성숙 배양액으로 TCM-199에 48 시간 배양하여 5% O<sub>2</sub>에서는 성숙률이 7.7%로 본 연구와 비슷하였지만, 20% O<sub>2</sub>에서는 16.1%로 차이가 있었다. 그리고 Yamada 등(1992)은 배란을 유도한 개의 난소에서 얻은 배란전 난포란을 체외 성숙시킨 결과 72시간 배양후 32%가 MII로 성숙하였다는 보고를 보면 개 난포란의 체외성숙에 있어 배양액이 난포란의 성숙에 크게 관여치 않음을 의미하며 개의 발정주기에 따라 난포란의 성숙률이 달라질 수 있다 생각된다.

첨가 단백질에 관한 연구에서 Hewitt와 England (1999)는 성숙배양액에 0.3%의 BSA를 첨가하였을 때 GVBD와 성숙률이 증가한다고 보고하였고, Rodrigues와 Rodrigues (2003)의 보고에서 성숙 배양액에 0.4%의 BSA 첨가하여 21.3% 성숙률을 보였다는 보고와 본 연구의 결과는 비슷하였으며, 10%의 발정기의 개 혈청을 사용하여 보고한 결과 (10.4%)와 Nickson 등(1993)이 발정기의 개 혈청을 사용하여 체외성숙을 확인한 결과 (40%)와는 차이가 있었다.

이상의 결과로 볼 때 개 미성숙 난자의 체외 성숙은 기존의 성숙 배양액뿐만 아니라 첨가 단백질도 난포란의 성숙에 크게 관여하지 않는다 생각된다.

## 적 요

본 연구는 개 미성숙 난자의 체외성숙에 있어 기존의 다양한 성숙 배양액과 첨가 단백질이 난포란의 성숙에 영향이 있지를 검토하였다.

1. 기존의 각기 다른 체외 성숙 배양액을 이용하여 난포란의 체외 성숙을 확인한 결과 난포란의 성숙(MI-MII)율이 TCM-199: 4.0%, DMEM: 5.0%, NCSU37: 5.9%와 m-NCSU37: 5.9%의 성숙률을 나타냈다.
2. M-NCSU37 배양액에 단백질을 첨가하여 성

숙을 확인한 결과 난포란의 성숙 (MI-MII)율이 10% FCS: 13.3%, 10% EDS: 25.0%, 0.3% BSA: 25.0%와 0.1% PVA: 15.4%의 성숙율을 나타냈다.

이상의 연구결과 체외성숙 배양액과 첨가단백질의 종류가 개 미성숙난자의 체외성숙 시 MII까지의 핵발달을 촉진하지 못하는 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Bogliolo L, Zedda MT, Ledda S, Leoni G, Naitana S and Pau S. 2002. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42:265-273.
- Bolamba D, Borden-Russ KD and Durrant BS. 1998. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49:933-942.
- Cinone M, Ghneim A, Caira M, Dell'Aquila, ME and Minoia P. 1992. Collection and maturation of oocytes in the bitch. *Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod.*, 4:1767-1769.
- Hewitt DA and England GCW. 1997. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 51:83-91.
- Hewitt DA and England GCW. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 55:63-75.
- Hewitt DA, Watson PE and England GCW. 1995. Effect of concentration of serum on *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, Abstract Series 15. Abstract 196, pp. 66-67.
- Hewitt DA, Watson PF and England GCW. 1998. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, 49:1083-1101.

- Mahi CA and Yanagimachi R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. J. Exp. Zool., 196:189-196.
- Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ and Renton JP. 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. J. Reprod. Fertil. Suppl., 47:231-240.
- Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer DC and Westhusin M. 2002. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. Reproduction, 124:775-781.
- Pincus G and Enzmann EV. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro* : I. The activation of mammalian eggs. J. Exp. Med., 62:665-675.
- Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Mullaney J and Perry B. 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). J. Reprod. Fertil., 93:221-231.
- Rodrigues BA and Rodrigues JL. 2003. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. Reprod. Domest. Anim., 38:58-62.
- Robertson JB, Sersen V and King WA. 1992. Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured *in vitro*. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. The Hague. The Netherlands, 4:1808-1810.
- Songsasen N, Yu I and Leibo SP. 2002. Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. Mol. Reprod. Dev., 62:407-415.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K and Toyoda Y. 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. Biol. Reprod., 46:853-858.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K and Toyoda Y. 1993. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. J. Reprod. Fertil. Suppl., 47:227-229.
- Xi Jun Yin, Tetsuys Tani, Issu Yonemura, Masahiro Kawakami, Kazunori Miyamoto, Rie Hasegawa, Yoko Kato and Yukio Tsunoda. 2002. The production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically-assisted removal of maternal chromosomes. Biology of Reproduction, 67: 442-446.
- 김민규, 김혜진, 조종기, 장구, 이규승, 강성근, 이병천, 황우석. 2002. 개의 발정주기가 난자의 체외성숙에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지, 17:219-225.
- 최정립, 조성근, 공일근. 2001. 개 발정주기가 미성숙 난자의 핵발달에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 25:93-100.

---

(접수일: 2003. 3. 2/ 채택일 2003. 4. 6)