

번식주기의 단계별로 회수한 고양이 난자의 체외수정과 체외발생에 관한 연구

박상훈 · 이명현* · 김무강 · 김상근†
충남대학교 수의과대학

Study on the Developmental Rate of *In Vitro* Cultured Cats Oocytes Recovered from Ovaries Collected at Different Stages of the Reproductive Cycle

S. H. Park, M. H. Lee*, M. K. Kim and S. K. Kim
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

The study was carried out to investigate the effects of morphology, reproductive cycle, incubation time and activation of oocytes *in vitro* maturation of cats oocytes and development of IVM/IVF embryos.

The results were summarized as follows :

1. The fertilization and developmental rate of fresh and salts-stored oocytes with and without cumulus cells were 65.7%, 17.1% and 28.6%, 8.6% and 57.1%, 13.3%, 23.3%, 3.3%, respectively. The rate of oocytes with cumulus cells(13.3%~65.7%) was higher than that of denuded oocytes(3.3%~28.6%).
2. The fertilization and developmental rate of oocytes recovered from ovaries collected at different stages of the reproductive cycle were 68.9%, 44.4%, 48.9% and 17.8%, 8.9%, 12.8%, respectively.
3. The fertilization and developmental rate of oocytes *in vitro* cultured at different time of incubation(24, 36 and 48 h) were 66.7%, 46.7%, 48.9% and 17.8%, 11.1%, 8.5%, respectively. The rate of oocytes incubated 24 h(66.7%) was higher than that of oocytes incubated 36 and 48 h(46.7%~48.9%).
4. The fertilization and developmental rate of oocytes treated activation and non-activation oocytes were 57.4%, 31.4% and 22.9%, 11.4%, respectively. The rate of oocytes treated activation was higher than that oocyte treat non-activation.

(Key words : cats, reproductive cycle, incubation time, activation of oocytes, developmental rate)

서 론

최근 애완동물 사육인구가 300만을 훨씬 넘어
서면서 애견과 고양이 등에 관한 관심이 증대되고

이 논문은 2003년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의해 연구되었음.

* 수의과학검역원(National Veterinary Research and Quarantine Service, Daejeon, 305-764, Republic of Korea)

† Correspondence : E-mail : kskkim@hanbat.cnu.ac.kr

있다. 고양이 사육이 늘어나면서 주로 고 단백질 및 고 지방 사료로 실내에서 사육면서 운동량이 부족하여 번식주기의 교란 등 많은 번식장애와 질병으로 이어지고 있다(Freistedt 등, 2001; Goodrowe와 Hay, 1993)..

고양이 난자에 관한 연구는 몇몇 연구보고만이 있을 따름이다(Goodrowe와 Hay, 1993; Howard 등, 1991; Otoi 등, 2001). 고양이 난자의 IVM 및 IVF율은 일반적으로 다른 동물에 비해 낮은 편이다(Farstedt, 2000). 약 50~60%의 난자만이 성숙이 이루어지고, 60~70% 정도의 난자만이 수정된다(Wood 등, 1995). 약 20~30%의 수정란이 배반포로의 체외발달율을 나타낸다고 하였다(Freistedt 등, 2001; Spindler과 Wildt, 1999). 이와 같이 난자의 체외수정에 미치는 영향은 계절(Freistedt 등, 2001; Goodrowe 등, 1991), 배양조건(Johnston 등, 1991), 번식주기(Freistedt 등, 1990) 및 형태적 분류가 집 고양이 난자의 체외발달율에 영향을 미친다고 하였다(Wood 등, 1995; Goodrowe 등, 1991; Pope 등, 1997). 불임이나 자연수정이 어려운 소형 고양이의 불임치료를 위해서는 체외수정란의 이식 기술이 필요하나 현재로서는 기술이 부족하고 개선해야 문제점이 많은 게 현실이라 하겠다. 특히, 난자의 확보가 어려워 연구에 많은 어려움이 따르게 된다.

이에, 본 연구는 고양이의 불임해결과 체외수정란을 생산 할 목적으로 번식주기의 단계별로 난소로부터 회수한 고양이 난자의 체외수정 및 체외발생에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수와 체외성숙

암코양이로부터 적출한 난소를 세절한 후 m-PBS에 부유시켜 난자를 회수한 후 난포란은 2 IU/ml의 hCG(Sigma, U.S.A.)와 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, U.S.A.)과 10%(v/v)의 FCS(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 TCM-199(Whittaker, U.S.A.) 배양액으로 배양하였다. 난포란의 체외성숙은 배양액 50 µl의 소적을 mineral oil(Squibb, U.S.A.)로 피복된 소적내에 5개의 난포란을 주입하여 CO₂ 배양기내

(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 배양하였다. 신선한 난소와 salt에 보존한 난소로부터 회수한 난구세포부착 난자와 나화 난자를 각각 24시간 또는 36 및 48시간 배양에 따른 체외성숙율과 난포의 직경이 2mm 이하를 휴지기, 1~2개 이상의 황체가 존재할 때 황체기, 많은 난포가 존재할 때를 발정기로 구분하여 채취한 난포란을 배양하였을 때 체외수정율 및 체외발생율을 조사하였다.

2. 정자의 전처리

성숙한 수컷 고양이로부터 고환을 적출한 후 고환으로부터 정소상체를 분리하여 미부를 세절한 다음 37°C의 m-PBS에 dish에 부유시켰다. 부유액은 500×g로 5분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 남은 정자 pellets에 대해 활력검사 후 50% 이상의 정자만을 동결 보존하였다. 정자의 동결은 Kim(2001)의 방법에 따라 수행하였는데, 정자부유액은 extender-1과 2로 희석한 다음 5분간 평형시킨 후 0.25 ml의 스트로에 충전하여 자동 세포동결기 (Forma Co., U.S.A.)로 동결 후 LN₂ container에 보존하면서 시험에 이용하였다. 동결정액의 용해는 straw내 정액을 tris-buffer에 옮겨 2분간 30°C의 항온수조에서 용해하였으며, 정자의 활력이 50% 이상의 정자만을 시험에 이용하였다.

3. 난자의 활성화 처리

난구세포를 제거하기 위하여 0.2% hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 PBS 배지에서 난구세포를 제거하였으며, 난구세포가 제거된 난자중 제1 극체가 방출된 난자만을 선별하여 7% ethanol에서 5 분간 처리 후 2.0 mM dimethylamino-purine(Sigma, U.S.A.)에서 1시간 활성화 처리후 시험에 이용하였다.

4. IVF

동결정액을 용해 후 500 µl의 BO액에 희석한 다음 CO₂ 배양기에서 15분간 swim-up 시킨 후 500×g로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 정자 pellets을 0.6% BSA와 20 µg의 heparin (Sigma, USA) 액으로 처리한 다음 24시간 성숙 배양한 난자와 12시간 배양에 의해 체외수정시켰다.

5. 체외성숙 및 체외발생율의 판정

난자를 0.2%의 hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)를 1~5분간 처리에 의하여 난구세포를 제거하고 나화된 난자는 acetic acid : ethanol(1 : 3)액에 24시간 고정하고 1% aceto-orcein 또는 10 µg/ml bis-benzimide(Hoechst 33342, Sigma, U.S.A.) 염색액으로 염색한 다음 세포 및 핵 분열상을 관찰하여 난자의 체외성숙을 판정하거나 배양액 내에서 배양하면서 응성전핵 형성과 배의 발생상태를 관찰하여 판정하였다.

6. 통계학적 분석

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

결과 및 고찰

1. 난자의 형태가 체외수정 및 체외발생에 미치는 영향

신선한 난소 및 salt에 보존한 난소로부터 회수한 난구세포부착 난자와 나화 난자를 배양했을 때 GV 및 MI으로의 체외발생율은 Table 1과 같다.

신선 및 salt에 보존한 난소로부터 회수한 난구세포부착 및 나화 난자를 각각 배양했을 때 체외수정율 및 분할율은 65.7%와 17.1%, 28.6%와 8.6% 및 57.1%와 13.3%, 23.3%와 3.3%로서 난구세포 부착 신선난자가 나화 난자의 체외발생률에

비해 높은 체외성숙률을 나타냈다. 이러한 결과는 형태적으로 우수하며, 난구세포가 치밀하게 부착된 신선 난자만을 선별하여 배양했을 때 높은 체외발생율을 나타냈다. 고양이 난자를 대상으로 한 연구보고는 없지만, 개 난자를 이용하여 salt 및 4℃에 48시간 배양했을 때 GVBD 및 MI기로의 체외발생율은 각각 33.0%~49.0%와 2.0%~6.0%, 분할율은 22.4~32.2%였다고 한 Hewitt와 England (1997)의 보고에 비하여 약간 높거나 거의 유사한 체외발생율을 나타냈다.

2. 번식주기별 채취난자의 체외수정율

번식주기별로 구분하여 각각 채취한 난포란을 성숙 배양한 후 체외수정시켰을 때 수정율과 체외발생율은 Table 2와 같다.

휴지기, 발정기 및 황체기 단계로 구분하여 채취한 난포란을 성숙배양 후 수정시켰을 때 체외수정율은 각각 68.9%, 44.4%, 48.9%였으며, 분할율은 각각 17.8%, 8.9%, 12.8%로 나타났다. 이러한 결과는 고양이 난포란을 24시간 성숙배양 후 체외수정시켰을 때 수정율이 55.3%~57.9%, 배반포기로의 체외발생율은 20.6%~38.1%라고 한 Karja 등(2002)의 결과에 비해 낮은 체외수정율과 체외발생율을 나타냈다. 그러나 휴지기 단계의 난소로부터 채취한 난구세포부착 난자가 높은 체외수정율과 체외발생율을 나타냈다는 결과와는 일치하였다.

3. 배양시간에 따른 체외수정율

Table 1. Developmental rate of fresh and salt-stored oocytes with and without cumulus cells

Type of oocytes	Examined oocytes	Fertilized oocytes(%)	Cleaved oocytes(%)
Fresh			
Intact	35	23(65.7) ^a	6(17.1) ^a
Denuded	35	10(28.6)	3(8.6) ^b
Salt-stored			
Intact	30	20(57.1) ^b	4(13.3)
Denuded	30	7(23.3)	1(3.3)

^{ab}: Values within column with different superscript differ(p<0.05).

Table 2. Fertilization rates of *in vitro* cultured oocytes recovered from ovaries collected at different stages of the reproductive cycle

Stage of reproductive cycle	Cultured oocytes	Fertilized oocytes(%)	Cleaved oocytes(%)
Inactive	45	31(68.9)	8(17.8)
Follicular	45	20(44.4)	4(8.9)
Luteal	47	23(48.9)	6(12.8)

Table 3. Fertilization rates of oocytes *in vitro* cultured at different time of the incubation

Time of incubation(h)	Cultured oocytes	Fertilized oocytes(%)	Cleaved oocytes(%)
24	45	30(66.7)	8(17.8)
36	45	21(46.7)	5(11.1)
48	47	23(48.9)	4(8.5)

Table 4. Developmental rate of *in vitro* cultured oocytes treated activation and non-activation

Medium	Cultured oocytes	Cleaved oocytes(%)	Developed morula(%)
Activated	35	20(57.4)	8(22.9) ^a
Non-activated	35	11(31.4)	4(11.4) ^b

^{ab}: Values within column with different superscript differ(p<0.05).

고양이 난자의 배양시간별로 구분하여 각각 성숙 배양 후 체외수정 시켰을 때 수정율과 체외발생율은 Table 3과 같다.

24, 36 및 48시간 각각 배양한 난포란을 성숙배양 후 수정시켰을 때 체외수정율은 각각 66.7%, 46.7%, 48.9%였으며, 분할율은 각각 17.8%, 11.1%, 8.5%로 나타났다. 이러한 결과는 고양이 난포란을 24시간 성숙배양 후 체외수정시켰을 때 수정율이 55.3%~57.9%, 배반포기로의 체외발생율은 20.6%~38.1%라고 한 Karja 등(2002)의 결과에 비해 낮은 체외수정율과 체외발생율을 나타냈다.

4. 활성화 처리에 따른 난자의 체외발생율

고양이 난자의 활성화 처리가 체외발생율에 미치는 영향을 구명하고자 활성화 처리를 난자를 체외수정시켰을 때 분할율과 상질배기로의 체외발생율은 Table 4와 같다.

난자를 활성화 처리 및 비활성화 처리 후 각각 체외수정시켰을 때 체외수정율은 각각 57.4%와 31.4%였고, 체외분할율은 22.9%와 11.4%로서 활성화 처리를 한 난자가 높은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 고양이 난자의 활성화처리가 IVF에 미치는 보고를 접할 수 없어 정확하게 비교할 수는 없었다. 한편, Bogliolo 등(2001)은 고양이의 활성화 처리 난자를 이용하여 ICSI(intracytoplasmic sperm injection)를 하였을 때 배반포로의 체외발생율은 26.6%였다고 하였다.

적 요

본 연구는 소형 고양이의 불임 해결과 체외수정란을 생산하기 위한 방안으로서 난자의 형태, 번식주기, 배양시간 및 활성화 처리가 난포란의 체외수정 및 체외발생에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 신선 및 salt에 보존한 난소로부터 회수한 난

구세포부착 및 나화 난자를 각각 배양했을 때 체외수정율 및 분할율은 65.7%와 17.1%, 28.6%와 8.6% 및 57.1%와 13.3%, 23.3 %와 3.3%로서 난구세포 부착 신선난자가 나화 난자에 비해 높은 체외발생률을 나타냈다.

2. 휴지기, 발정기 및 황체기 단계로 구분하여 채취한 난포란을 성숙배양 후 수정시켰을 때 체외수정율은 각각 68.9%, 44.4%, 48.9%였으며, 분할율은 각각 17.8%, 8.9%, 12.8%로 나타났다
3. 24, 36 및 48시간 각각 배양한 난포란을 성숙배양 후 수정시켰을 때 체외수정율은 각각 66.7%, 46.7%, 48.9%였으며, 분할율은 각각 17.8%, 11.1%, 8.5%로 나타났다.
4. 난자를 활성화처리 및 비활성화처리 후 각각 체외수정시켰을 때 체외수정율은 각각 57.4%와 31.4%였고, 체외분할율은 22.9%와 11.4%로서 활성화 처리를 한 난자가 높은 체외발생율을 나타냈다.

참고문헌

- Bogliolo L, Leoni G, Ledda S, Naitana S, Zedda M, Carluccio A and Pau S. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 56: 955-967.
- Farstad W. 2000. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 61:375-387.
- Freistedt P, Stojkovic M and Wolf E. 2001. Efficient *in vitro* production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium : effect of season and ovarian status. *Biol. Reprod.*, 65:9-13.
- Goodrowe KL and Hay M 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 40:967-975.
- Goodowe KL, Hay M and King WA. 1991. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 45:466-470.
- Hewitt DA and England GCW. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocytes maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 55(1):63-75.
- Howard JG, Bush M and Wildt DE. 1991. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J. Androl.*, 12: 36-45.
- Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ and Wildt DE. 1991. Influence of temperature and gas atmosphere on *in vitro* fertilization and embryo development in the domestic cat. *J. Reprod. Fertil.*, 92:377-382.
- Karja NWK, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M and Suzuki T. 2002. *In vitro* maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*, 57(9):2289-2.
- Kim SK. 2001. Studies on the viability of frozen removed seminal plasma by saline (RSP-S) and tris-buffer(RSP-T) semen of small species dogs. *Korean J. Anim. Reprod.*, 25(3):269- 275.
- Otoi TM, Murakami A, Ooka NWK, Karja and Suzuki T. 2001. Effects of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes. *Vet. Rec.*, 148:350-355.
- Pope CE, McRae MA, Plair BL, Keller GL and Dresser BL. 1997. *In vitro* and *in vivo* development of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gam. Res.*, 24:343-356.
- Spindler RE and Wildt DE. 1999. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *biol. Reprod.*, 61:188-194.
- Wood TC, Byers AP, Jennette BE and Wildt DE 1995. Influence of protein and hormone supplementation on *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 104:315-323.

(접수일: 2003. 6. 15/ 채택일: 2003. 8. 3)