

PZM 배양액이 돼지체외수정란의 배발달에 미치는 영향

한만희¹ · 천행수 · 김종화 · 박병권² · 서길웅 · 이규승[†]

충남대학교 동물자원학부

초 록

본 연구는 돼지 난포란을 이용하여 생산된 1-세포기의 체외수정란을 NCSU-23, PZM-3 및 PZM-4의 세 가지 배양액과 서로 다른 산소농도를 부여하여 돼지 체외수정란의 적합한 체외배양조건을 구명하고자 실시하였다. 돼지 난포란의 체외성숙은 BSA가 미첨가된 NCSU-23 배양액에 10% pFF, 0.9 mM cysteine, 25 ug/ml β -mercaptoethanol 및 10 ng/ml epidermal growth factor와 호르몬(10 IU/ml PMSG, hCG)을 첨가하여 20~22시간과 추가로 호르몬을 제거한 배양액에 20~22시간을 배양하여 성숙을 유기하였고, 5~6시간 동안 돼지 액상정액과 공배양함으로써 체외수정을 유기하였다. 체외수정 5~6시간후 각각 5% 및 20%의 산소조건하의 NCSU-23, PZM-3 및 PZM-4 배양액에서 배발달을 유기하였다. 돼지체외수정란을 체외배양하였을 때, 배발달 48시간에 처리구간 난할율에는 차이가 없었으나, 배양 7일째 배반포형성률은 5% 산소조건하의 PZM-3 배양액에서 가장 높게 나타났다(19.9± 2.4 vs. 11.1± 2.0 to 16.0± 2.5%, P<0.05). 그리고, 총세포수에 있어서 5%의 산소조건 하에서 배양하는 것이 20% 산소조건보다 유의적(P<0.05)으로 높았으나, 배양액간 차이는 인정되지 않았다. 따라서, 체외생산된 돼지초기수정란의 체외배발달은 5% 산소조건하의 PZM-3 배양액에서 배양하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

(주제어 : Porcine IVM/IVF embryo, PZM-3, O₂ concentration)

서 론

가축의 체외수정란을 생산하고자 하는 체외배양시스템은 최근 형질전환동물, 복제동물 및 장기이식동물 등을 생산하려는 여러 가지 첨단 생명공학기술 등의 발달과 더불어 더욱 중요성이 증대되고 있다. 따라서, 각 동물의 생식 세포에 따라서 적합한 배양조건을 확립하고자 많은 연구가 수행되어 왔으나, 아직도 돼지와 같은 가축에서는 체내조건과 비교하여 그 결과가 미진한 실정이다.

돼지 수정란의 체외배양에 있어서 1-세포기의 수정란을 배반포기까지 성공적으로 발달시킨 배양액으로서는 modified Whitten medium(Beckmann과 Day, 1993), NCSU-23(Petters와 Wells, 1993), modified CZB medium(Pollard 등, 1995), BECM medium(Dobrinsky 등, 1996) 및 G1/G2 medium(Gandhi 등, 2001) 등이 보고되었다. 이러한 여러 가지 배양액 중에서, 특히 NCSU-23 배양액이 배반포 형성률이나, 이식후 산자율이 높은 것으로 보고되어 가장 보편적으로 사용되어 왔다(Abeydeera 등, 2000; 한 등, 2001). 그러나, 아직도 체내수정란의 배양과 다른 가축의 수정란생산에 비하여 배반포기 발달률이 낮고, 배반포의 총세포수에 있어서 체내 수정란보다 현저히 적으며, 그로 인하여 수정란 이식후 임신률과 평균산자수가 매우 낮다(Prather & Day, 1998). 최근 Yoshioka 등(2002)이 PZM 배양액을 이용하여 체내유래 수정란을 체외배양하였을 때, 기존에 이용되던 배발달 배양액보다 배반포형성률 및 산자수에 있어서 우수한 결과를 보고하였다.

따라서, 본 실험은 돼지 난포란을 이용하여 생산된 1-세포기 체외수정란을 5% 및 20%의 산소조건과 NCSU-23과 PZM 배양액에서 배발달을 유도함으로써 돼지체외수정란의 배발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

따라서, 본 실험은 돼지 난포란을 이용하여 생산된 1-세포기 체외수정란을 5% 및 20%의 산소조건과 NCSU-23과 PZM 배양액에서 배발달을 유도함으로써 돼지체외수정란의 배발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

공시 난포란의 채취

난포란의 채취를 위한 난소를 도축 직후의 미경산돈(체중 120 kg 내외)으로부터 적출하여 75 ul/ml penicillin G와 50 ul/ml streptomycin sulfate을 첨가한 38℃의 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 공시 난포란의 채취는 18-gauge 주사침이 장착된 10 ml 주사기로 직경이 2~5 mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 1.5 cm 간격으로 방안을 표시한 87× 15 mm 페트리접시에 넣고 1 mg/ml PVA가 첨가된 TL-HEPES와 희석하여 실체현미경하에 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질의 균일한 난포란

¹ 축산연구소(National Livestock Research Institute, R.D.A.)

² 공주대학교 영상보건대학 특수동물학과(Dept. of Laboratory & Companion Animal, Kong-Ju University)

[†] Corresponding author : Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea, E-mail: leeks@cuvic.cnu.ac.kr

만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

체외성숙

회수한 미성숙난자는 체외성숙용 배양액으로 3회 세정하고 10% 돼지난포액(PFF), 0.9 mM cysteine, 10 ug/ml EGF와 성선자극호르몬(10 IU/ml, PMSG, hCG)이 첨가된 NCSU-23 배양액에 40~50 oocytes/500 ul well이 되도록 적하한 후, 38.8°C, 5% CO₂ 및 포화습도로 조정된 탄산가스배양기 내에서 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양하고, 호르몬이 배제된 배양액에서 22시간 동안 추가로 배양하여 총 44시간 체외성숙을 유도하였다.

체외수정

체외수정용 배양액은 2.5 mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 배양액을 사용하였고, 정액의 세정액으로는 DPBS에 0.1% BSA가 첨가된 배양액을 사용하였다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지 난포란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 NCSU-23으로 난구세포를 제거하고, mTBM 배양액으로 3회 세정하였다. 세정 후 미리 48시간 전배양을 실시한 90 ul의 소적에 30~40개의 성숙난자를 넣고 매정시까지 배양기 내에서 배양하였다.

체외수정에 사용한 정자는 액상정액을 17°C 항온고에서 최대 4일간 보존하면서 사용하였고, 사용직전에 DPBS와 함께 1:1 비율로 15 ml falcon tube에 넣고 450 g에서 3분간 원심분리를 3회 실시하였다. 그리고 체외수정용 배양액으로 희석하여 성숙난자가 들어 있는 소적에 최종농도가 1.2×10^5 sperm/ml이 되도록 주입한 후 38.8°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기 내에서 5~6간 동안 체외수정을 실시하였다.

체외수정란의 체외배양

체외수정이 완료된 수정란은 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대부착정자를 제거한 다음, NCSU-23(4mg/ml BSA), PZM-3(3mg/ml BSA) 및 PZM-4 (3 mg/ml PVA) 배양액으로 제작된 4-well dish에 40~50 putative embryos/500ul well이 되도록 적하하여 20% 산소조건(38.8°C, 5% CO₂ 및 포화습도) 및 5% 산소조건(38.8°C, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ 및 포화습도)의 배양기 내에서 각

각 배양하여 체외배발달을 유도하였다. 체외배양 2일째에 난할률을 조사하였고, 6일 및 7일째 배반포 형성률을 조사하였다.

배반포의 이중형광염색

체외수정을 실시하여 생산한 돼지 수정란은 내부세포괴(inner cell mass, ICM)세포와 영양배엽(trophoblast, TE)세포를 구별하기 위해서는 Machaty(1998)의 이중형광염색방법을 사용하였다. 간단히 요약하면, 수정란의 투명대를 0.5% pronase에 처리하여 용해시킨 후, TL-Hepes-PVA 배양액에서 3회 세척하였다. 이들 수정란은 rabbit anti-pig whole serum이 1 : 5로 희석된 TL-Hepes 용액에서 1시간 처리한 후, TL-Hepes-PVA 용액으로 5분간 3회 세척하였으며, 10 ug/ml Hoechst 33342와 10 ug/ml propidium iodide(1 : 1)이 함유된 Guinea pig complement가 함유된 TL-Hepes(1 : 10)-PVA에서 1시간 처리하였다. 위의 방법에 의해 면역 외과적인 처리가 끝난 수정란은 slide glass 위에 3 ul mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 수정란을 투여한 후, cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 형광현미경(200×) 하에서 세포수를 조사하였다.

통계분석

본 연구에서는 각 처리구에 대하여 4회 반복실험을 실시하였으며, 얻어진 모든 실험결과의 통계처리는 SAS/STAT 6.03 package를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후, Duncan's 다중검정(DMRT)에 의하여 처리구간 유의성을 검정하였으며, $P < 0.05$ 이하의 유의성만을 통계학적 차이가 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

돼지 미성숙난포란을 NCSU-23 배양액에서 체외성숙후 체외수정된 1-세포기의 수정란을 5% O₂ 및 20% O₂ 조건하에서 배발달 배양액인 NCSU-23, PZM-3 및 PZM-4 배양액에 각각 7일간 배양을 실시하여 난할률과 배반포기 발달률

Table 1. Effects of O₂ concentrations and media on *in vitro* development of porcine IVM/IVF derived embryos

Culture condition		No. of embryos examined	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% (Mean±SE) of embryo developed to blastocysts	
O ₂ (%)	Media			Day 6	Day 7
5	NCSU-23	158	79.9±6.2 ^a	8.3±1.4 ^b	11.1±2.0 ^b
	PZM-3	159	76.4±7.7 ^a	16.9±1.7 ^b	19.9±2.4 ^a
	PZM-4	171	76.4±8.1 ^a	13.4±4.3 ^b	15.7±5.2 ^{ab}
20	NCSU-23	165	76.9±7.4 ^a	9.6±2.8 ^b	11.9±2.9 ^b
	PZM-3	188	69.4±7.1 ^a	13.4±2.4 ^{ab}	16.0±2.5 ^{ab}
	PZM-4	179	74.6±5.9 ^a	9.7±1.9 ^b	12.8±2.0 ^b

^{ab} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ($P < 0.05$).

을 조사한 결과는 Table 1 및 2와 같다. 수정 후 48시간째에 조사한 난할률(69.4~79.9%)은 5 및 20% 산소조건과 배양액간에 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 체외배양 7일째에 조사한 배반포기 발달률은 산소조건이 5%일 때, 각각 11.1±2.0, 19.9±2.4 및 15±5.2, 산소조건이 20%일 때, 각각 11.9±2.9, 16.0±2.5 및 12.8±2.0으로서 5% 산소조건하의 PZM-3 배양액 조합에서 유의적으로 높은 결과를 나타냈다 ($P<0.05$). 배반포의 세포수에 있어서는 내부세포외세포수는 5% 산소조건에서 각각 19.0±2.3, 26.2±2.4 및 23.7±2.7개로서 PZM-3과 PZM-4 배양액이 NCSU-23 배양액보다 유의적으로 높았고, 20% 산소조건에서는 각각 10.1±1.8, 14.3±1.6 및 11.6±1.9개로서 PZM-3 배양액이 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 산소농도간 차이를 보면 5% 산소조건에서 내부세포외 세포수가 유의적으로 높게 나타났다 ($P<0.05$). 또한, 배반포의 총세포수에 있어서는 산소조건이 5%일 때, 각각 41.5±3.5, 46.2±3.6 및 39.7±2.7, 산소조건이 20%일 때, 각각 20.7±2.9, 26.2±2.9 및 25.2±2.8개로서 배양액에 관계없이 5% 산소조건 하에서 배양된 배반포가 세포수가 많은 것으로 나타났다. 각 산소조건에서 배양액간 유의적인 차이는 없었으나, 5 및 20% 산소조건간에는 5% 산소조건이 유의적으로 높은 총세포수를 나타냈다($P<0.05$).

각종 배양액이 돼지수정란의 배발달에 미치는 영향에 관한 연구를 보면 Machaty 등(1998)은 1~2세포기의 체내 수정란을 이용하여 NCSU-23 배양액과, KSOM에 필수 및 비필수아미노산을 첨가한 KSOM/AA 배양액에서 배발달을 유도한 결과, 배반포기 발달률은 NCSU-23과 KSOM/AA 배양액에서 각각 47.7%와 45.2%로 서로 비슷했지만, 배반포의 내부세포외세포수, 영양배엽세포수 및 총세포수는 NCSU-23 배양액이 각각 5.7, 25.0 및 30.5개로 KSOM/AA 배양액의 3.8, 17.5 및 21.4개보다 많았기 때문에 NCSU-23 배양액이 초기배발달에 더 적합하고, 또한 체내 수정란을 채취하여 5 및 20% 산소조건인 NCSU-23 배양액에서 배발달을 유도하였을 때, 영양배엽세포수가 5 및 20% 산소조건에서 17.9±0.94 및 21.1±0.9개이고, 총세포수가 각각 20.0±1.1 및 24.1±1.1개로서 20% 산소조건에서 배발달을 유도하는 것이 좋다고 보고하였다. 한 등(2001)은 체외 배발달배양과 산소조건보다는 체외성숙과정의 배양액이

돼지체외수정란의 발달에 영향을 미치는 것으로 보고하였고, Yoshioka 등(2002)은 체내수정란을 채취하여 NCSU-23과 PZM-3 배양액에 각각 5% 및 20% 산소조건에서 배발달을 유도하였을 때, 배발달 6일에서 8일째에 PZM-3 배양액(97% 및 83%)이 NCSU-23 배양액(69% 및 78%)보다 5 및 20% 산소조건에서 모두 높은 배발달률을 나타냈고, PZM-3 배양액 중에서도 5% 산소조건이 20% 산소조건보다 유의적(97% vs. 83%, $P<0.05$)으로 높은 배발달률을 나타냈다고 보고하였는데, 이는 내부세포외 세포수와 총세포수에 있어서도 PZM-3 배양액이 5% 산소조건에서 유의적 ($P<0.05$)으로 높게 나타난 본 실험의 결과와 일치되는 결과였다.

본 연구에서 사용한 NCSU-23 배양액과 PZM 배양액 조성의 큰 차이점은 에너지원으로 첨가한 glucose, pyruvate 및 lactate와 아미노산의 첨가 유무에 있다. PZM에 첨가한 pyruvate(0.2 mM)와 lactate(2.0 mM)는 세포내 미토콘드리아에서 호기적 산화과정을 통하여 바로 ATP를 생산할 수 있는 형태의 에너지원으로서 각종 포유동물의 초기배 발육을 촉진하는 반면에 NCSU-23 배양액의 에너지원인 glucose는 초기배보다는 후기배 발달을 촉진하는 것으로 보고 (Gandhi 등, 2001; Lane 등, 2000; Tompson 등, 1993)되어 있으며, 아미노산과 관련하여 비필수아미노산은 난할 초기에 좋은 조건과 돼지 배반포의 팽창을 촉진하고, 필수아미노산은 총세포수와 내부세포외세포수를 증가시킨다고 보고되었다(Thuan 등, 2002). 따라서, 본 실험에서 도출된 결과에서 보듯이 포유동물의 초기배 발달에 적합한 탄수화물과 아미노산이 첨가된 PZM 배양액이 NCSU-23 배양액보다 돼지 체외수정란의 생산에 더욱 적합한 것으로 사료되며, PZM 배양액간에도 산소농도와 첨가한 macromolecule에 따라 배발달률이 다른 점의 원인구명은 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Abeydeera, L.R. and Day, B.N. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. Therio-

Table 2. Effect of O₂ concentrations and media during *in vitro* development on mean cell number of porcine IVM/IVF derived embryos

Culture condition		No. of blastocysts	No. of cells ¹ (Mean±SE)		
O ₂ (%)	Media		ICM	TE	Total
5	NCSU-23	15	19.0±2.3 ^a	22.4±3.4 ^a	41.5±3.5 ^a
	PZM-3	24	26.2±2.4 ^a	20.0±3.5 ^a	46.2±3.6 ^a
	PZM-4	22	23.7±2.7 ^a	16.0±2.2 ^{ab}	39.7±2.7 ^a
20	NCSU-23	17	10.1±1.8 ^c	10.5±2.4 ^c	20.7±2.9 ^b
	PZM-3	21	14.3±1.6 ^{bc}	11.9±2.4 ^c	26.2±2.9 ^b
	PZM-4	13	11.6±1.9 ^c	13.5±2.8 ^{bc}	25.2±2.8 ^b

^{a,b,c} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ($P<0.05$).

¹ ICM : Inner cell mass, TE : Trophectoderm.

- genology 48:537-544.
2. Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Canteley, T.C., Rieke, A., Murphy, C.N., Prather, R.S. and Day, B.N. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 54:787-797.
 3. Beckmann, L.S. and Day, B.N. 1993. Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology* 39:611-622.
 4. Berthelot, F. and Terqui, M. 1996. Effects of oxygen, CO₂/pH and medium on the *in vitro* development of individually cultured porcine one- and two-cell embryos. *Reprod. Nutr. Dev.* 36:241-51.
 5. Bishop, D.W. 1956. Oxygen concentrations in the rabbit genital tract. In *Proceeding of the 3rd International Congress fo Animal reprod.* Cambridge pp: 53-58.
 6. Carney, E.W. and Foote, R.H. 1990. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryo *in vivo* and *in vitro* *J. Reprod. Fert.* 89:543-551.
 7. Czapski, G. and Goldstei, S. 1988. The uniqueness of superoxide dismutase (SOD) -why cannot must copper compound substitute SOD *in vivo*? *Free Rad Res. Commun.* pp:4:225.
 8. Devreker, F., Hardy, K., Van den Bergh, M., Vannin, A.S., Emiliani, S. and Englert, Y. 2001. Amino acids promote human blastocyst development *in vitro*. *Human Reproduction* 16:749-756.
 9. Dobrinsky, J.R., Johnson, L.A. and Rath, D. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol. Reprod.* 55:1069-1074.
 10. Gandhi, A.P., Lane, M., Gardner, D.K. and Krisher, R.L. 2001. Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 58:269-275.
 11. Lane, M. and Gardner, D.K. 2000. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse. *Biol. Reprod.* 62:16-22.
 12. Long, C.R., Dobrinsky, J.R. and Johnson, L.A. 1999. *In vitro* production of pig embryos: Comparisons of culture media and boars. *Theriogenology* 51:1375-1390.
 13. Machaty, Z., Day, B.N. and Prather, R.S. 1998. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.* 59:451-455.
 14. Papaioannou, V.E. and Ebert, K.M. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* 102: 793-803.
 15. Petters, R.M. and Wells, K.D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 48:61-73.
 16. Pollard, J.W., Plante, C. and Leibi, S.P. 1995. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media. *J. Reprod. Fertil.* 103:331-337.
 17. Steeves, T.E. and Gardner, D.K. 1999. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol. Reprod.* 61:731-740.
 18. Thompson, J.G., Bell, A.C.S., Pugh, P.A. and Tervit, H. R. 1993. Metabolism of pyruvate by pre-elongation sheep embryos and effect of pyruvate and lactate concentrations during culture *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:417-423.
 19. Thuan, N.V., Harayama, H. and Miyake, M. 2002. Characteristics of preimplantational development of porcine parthenogenetic diploids relative to the existence of amino acids *in vitro*. *Biol. Reprod.* 67: 1688-1698.
 20. Yoshioka, K., Suzuki, C., Tanaka, A., Anas, I.M.-K. and Iwamura, S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 66:112-119.
 21. 한만희, 이경분, 박병권, 박창식, 서길웅, 이규승. 2001. 산소농도 및 배양액이 돼지 난포란의 체외성숙과 배발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 16(3): 163-172.
- (접수일자: 2004. 5. 27. / 채택일자: 2004. 6. 18.)

Effects of PZM Media on *In Vitro* Development of Porcine IVM/IVF Embryos

Han, M. H., H. S. Cheon, J. H. Kim, B. K. Park, K. W. Seo and K. S. Lee

Division of Animal Science & Resources, College of Agriculture Life & Science, Chungnam National University

ABSTRACT

The present study was carried out to examine the effects of O₂ concentrations and culture media (North Carolina State University (NCSU)-23, porcine zygote medium(PZM)-3 or PZM-4) on *in vitro* development of porcine IVM/ IVF embryos. Porcine oocyte-cumulus complexes were cultured in BSA-free NCSU-23 medium containing porcine follicular fluid (10%), cysteine (0.9 mM), β -mercaptoethanol (25 ug/ml), epidermal growth factor (10 ng/ml) and hormonal supplements (PMSG and hCG: 10 IU/ml) for 20~22 h. They were then cultured in the same medium but without hormonal supplements for an additional 20~22 h. After culture, cumulus-free oocyte were coincubated with liquid boar spermatozoa for 5~6h. Putative zygotes were transferred to NCSU-23, PZM-3 and PZM-4 medium under the condition of 5% O₂ or 20% O₂ concentrations. At 48 h, no mean differences were found in cleavage rates. However, the rates of blastocyst formation at day 7 after *in vitro* fertilization were significantly higher in PZM-3 medium under the condition of 5% O₂ concentration than other treatments (19.9± 2.4 vs. 11.1± 2.0 to 16.0± 2.5%, $P<0.05$). The total cell numbers of blastocysts were significantly higher in 5% O₂ than in 20% O₂ ($P<0.05$). However, no differences was found among the culture media within each O₂ concentrations. In conclusion, the use of PZM-3 medium in 5% O₂ concentration was effective on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos.

(Key words : Porcine IVM/IVF embryo, PZM-3, O₂ concentration)