

## TGF- $\beta$ 첨가가 한우 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

최선호<sup>†</sup> · 이혜현 · 연성흙 · 한만희 · 김현종 · 조상래 · 우제석 · 백광수 · 류일선 · 손동수  
농촌진흥청 축산연구소

### Effect of TGF- $\beta$ Supplementation on *In Vitro* Maturation of Hanwoo COCs (Cumulus Oocytes Complexes)

Sun-Ho Choi<sup>†</sup>, Hye-Hyun Lee, Seong-Heum Yeon, Man-Hye Han, Hyun-Jong Kim, Sang-Rae Cho, Jae-Seok Woo, Kwang-Soo Baek, Il-Sun Ryu and Dong-Soo Son

National Livestock Research Institute, RDA, Namwon, 590-832, Korea

**ABSTRACT** : It is well known that unidentified factors in sera, hormones and growth factors promote the proliferation of granulosa cells and nuclear maturation of bovine COCs *in vitro*. Attempts had been developed the simple composition of culture media and similar system to *in vivo* conditions has been applied. In the present study, we investigated the effect of TGF- $\beta$  on *in vitro* maturation and *in vitro* development of Hanwoo COCs. When the COCs were matured in TCM 199 containing 0.1, 1 or 10 ng/ml TGF- $\beta$  for 24 hrs, metaphase II of COCs were obtained 95.8%, 95.8%, 100% of matured COCs, respectively and there were no differences among the concentrations of TGF- $\beta$ . Matured COCs with TGF- $\beta$  were cultured in maturation medium after *in vitro* fertilization, developmental rate to blastocyst were 0~0.8%. Matured COCs with TGF- $\beta$  were cultured in TCM 199+10% FBS, 0.8% BSA, 0.1% PVA, blastocyst formation were showed in 12.4%, 12.8%, 8.5% of those and cultured in IVMD or IVD without serum were 38.4%, 34.8%, respectively. There were significant differences among the media ( $P<0.05$ ). TGF- $\beta$  is available for *in vitro* maturation of bovine COCs, but further investigation would be need for finding the synergistic autocrine/paracrine fashion of other growth factors in early bovine development.

**Key words** : TGF- $\beta$ , Hanwoo cumulus oocyte complexes, Maturation, *In vitro* development.

**요약** : 소 체외성숙시 난포란에 영향을 주는 과립막세포와 난자의 핵성숙을 촉진하는 물질이 확인되지 않은 혈청내의 물질 뿐만 아니라 호르몬이나 생리활성인자 등에 의해 촉진됨이 밝혀졌다. 이에 따라 체외성숙 및 체외발달에 사용되는 배양액의 조성도 복합배양액에서 단순배양액으로 전환을 시도하고 있으며, 체내의 조건에 보다 더 접근하고자 하는 시도가 수행되고 있다. 본 연구는 한우 난포란의 체외성숙 및 체외수정 후 배발달율을 향상시키기 위하여 TGF- $\beta$ 의 첨가가 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 한우 난포란의 체외성숙시 TGF- $\beta$  0.1, 1, 10 ng/ml를 첨가하였을 때 24시간에 Metaphase II 도달율은 95.8%, 95.8%, 100%를 나타내었으며, 농도간의 유의적인 차이는 없었다. TGF- $\beta$ 로 체외성숙된 난포란을 체외수정 후 TGF- $\beta$ 가 체외성숙 배양액을 동일하게 체외발달을 유도하였으나, 0~0.8%의 배반포율을 보였으며, TGF- $\beta$ 로 체외성숙된 난포란을 체외수정 후 TCM 199+10% FBS, 0.8% BSA, 0.1% PVA에 배양한 결과 12.4%, 12.8%, 8.5%의 배반포 발달율을 보였고, 무혈청 배양액인 IVMD, IVD에 배양한 결과 38.4%, 34.8%의 배반포 발달율을 보였으며, 유의적인 차이를 나타냈다( $P<0.05$ ). 결론적으로 TGF- $\beta$ 는 한우 난포란의 체외성숙시 상당히 유용한 물질이나, 체외발달에는 만족할 수 없어, 이외의 생리활성 인자들간의 상호관계에 대하여 더 많은 연구가 요구된다.

## 서론

소의 체외수정에 있어서 단순배양액의 이용은 10여년부터 성행하기 시작하였으며, 주로 단백질, 아미노산, 비타민 그리고 약간의 growth factor와 insulin 등이 첨가되거나 혹은 체외된 배양액에서 수정란의 발달을 조사하였다. 여러 가지 종류

의 growth factor들은 수정란의 발달 과정 중 수정란에서 혹은 자생생식기관에서 분비되는 것으로 알려져 있다. 세포성장인자가 mouse 수정란의 체외발달에 상호작용을 하고 있다고 보고(Paria & Dey, 1990)한 이후 배양액에 다양한 종류의 growth factor의 첨가를 시도하여 왔으며, 이와 함께 growth factor는 autocrine 작용에 의해 수정란이 세포 성장인자를 생산한다고 믿고 있었다. Growth factor(EGF, TGF- $\alpha$ )들은 소난포의 과립막세포의 분화를 촉진하여 난자의 성숙을 돕는다고 하였으며, 대난포의 경우는 gonadotropin이나 inhibin 등 steroid에 의해 과립막세포와 협막세포의 분화를 촉진하여 난포의 발달

<sup>†</sup>교신저자: 전북 남원시 운봉읍 용산리 산 4-1, 축산연구소 가축유전 자원시험장. (우) 590-832, (전) 063-620-3520, (팩) 063-620-3594, E-mail: sunho@rda.go.kr

을 촉진한다고 하였다(Monnaux *et al.*, 1997). 이들은 또한 수정란과 모체와의 대화의 중간매개체로서 착상전 그리고 착상시 내막에 의해 생산된다고 하였다(Nelson *et al.*, 1992; Tamada *et al.*, 1991). 그 중 EGF는 수정란의 세포수를 증가한다고 하였으며, 수정란의 단독배양시에도 여러 개를 군집으로 배양한 것과 같이 세포수가 증가하였다고 보고하였다. 또한 TGF- $\beta$ 는 ICM의 수를 증가시킨다고 하였으며, 이것은 수정란에 직접 작용하기도 하지만, 자궁이나 난관의 상피세포의 작용에 의해서도 많은 영향을 미친다고 하였다(Marquante-LeGuinne *et al.*, 1989). TGF- $\beta$  superfamily에 구성되어 있는 요소들은 난소를 포함한 여러 조직과 기관의 시스템에 많은 영향을 준다고 알려져 있으며, 아주 초기의 난포 및 난모세포의 성장촉진에 중요한 역할을 한다고 하였다. 특히 난포발달의 마지막 단계에 과립막세포와 협막세포(Skinner와 Coffey, 1988)의 기능을 향상시키는 autocrine /paracrine의 매개물질로서 중요한 역할을 한다고 하였다(Philip *et al.*, 2003). 그리하여 TGF- $\beta$ 의 단독이 아닌 bFGF의 공동첨가에 의해서 상승효과를 기대하기 위하여 첨가하였을 때, 소 수정란의 *in vitro* block을 극복할 수 있었으나, 배반포의 형성은 극히 저조하였다. 이와 같이 TGF- $\beta$ 을 비롯한 growth factor들은 난포에서 난자의 성숙에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, TGF- $\beta$  단독에 의한 처리의 결과는 알 수가 없었다. 따라서 본 연구에서는 TGF- $\beta$ 가 난포란의 체외성숙에 미치는 영향과 이것으로 체외성숙된 난포란의 체외발달을 조사하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채취 및 체외성숙

도축암소의 난소로부터 25°C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 운반하였고, 난소를 깨끗한 생리식염수로 3회 이상 세정한 후 70% 알콜로 난소의 표면을 소독하였다. 난포란의 채취는 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 직경 2~6 mm의 난포를 난소실질을 주사침으로 삽입하면서 난포를 찢러 난포액과 함께 흡입 채취하였다. 채취된 난포액과 난포란은 0.1% PVA-HPM 199(일본 펩타이드연구소, IFP971) 배양액에 난구세포가 충만한 난포란만을 선별하여 본 시험에 공시하였다.

난포란의 체외성숙은 0.1, 1, 10 ng/ml를 HPM199 배양액에 첨가하였으며, TGF- $\beta$ 의 경우도 동일한 농도로 첨가하여 체외성숙을 실시하였고, 성숙시간은 핵성숙도를 관찰하기 위하여, 6, 12, 24시간에 관찰하였으며, 핵염색은 Basic Fuchsin

을 이용한 rapid staining 방법(Byun *et al.*, 1991)을 이용하여 핵상의 변화를 조사하였다.

### 2. 체외성숙 난자의 체외수정 및 체외발달

체외성숙된 난포란은 BO배양액으로 caffein과 heparin이 함유된 것으로 한우 동결정액을 이용하여 체외수정능 획득을 유도하였으며, 체외수정 정자의 최종농도는  $1 \times 10^6$  cells/ml로 조정하여 실시하였고, 체외수정시간은 8시간 이상 실시하였다. 체외수정 후 TGF- $\beta$ 의 체외발달을 조사하기 위하여 50  $\mu$ l drop에 체외발달을 유도하였다. 또한 소 난포란의 체외발달을 조사하기 위하여 TGF- $\beta$ 로 체외성숙된 난자를 체외수정 후 체외발달을 0.1% PVA-HPM199, 10% FBS-HPM199, 0.8% BSA-HPM199 배양액으로 체외발달을 실시하여 발달을 조사하였다.

### 3. 결과에 대한 통계분석

TGF- $\beta$ 를 첨가한 체외성숙 및 체외발달 그리고 배양액에 따른 체외발달은 Statview 통계 program의 ANOVA test를 이용하여 통계분석을 실시하였다.

## 결 과

### 1. TGF- $\beta$ 의 첨가가 한우 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

한우 난포란의 체외성숙시 TGF- $\beta$ 의 첨가에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 1과 같다. 난포란의 체외성숙율은 체외성숙 6시간에 GV, 12시간에 GVBD가 개시되었고, 체외성숙 24시간에 0.1ng/ml시 95.8%, 1ng/ml시 95.8%, 10 ng/ml시 100%의 Metaphase II의 핵성숙율을 나타내었으며, 유의적인 차이는 처리간에 나타나지 않았다.

### 2. TGF- $\beta$ 로 체외성숙된 한우 난포란의 체외수정 및 배반포 발달

TGF- $\beta$ 가 첨가농도에 따른 한우 난포란의 체외성숙 이후 체외수정하여 체외발달한 수정란의 체외발달율은 Table 2와 같다. TGF- $\beta$ 가 첨가되지 않았을 경우는 57%의 수정율을 보였으나, 첨가된 것은 첨가농도에 커다란 차이를 보이지 않았으며, 57.0~72.4%의 수정율을 보였다. 그러나 배반포로의 발달은 거의 관찰되지 않았다.

### 3. TGF- $\beta$ 로 체외성숙된 한우 난포란의 배양액에 따른 체외발달

TGF- $\beta$ 로 체외성숙된 난포란의 체외수정 후 배양액에 따른

**Table 1. Effects of TGF-β and maturation time on *in vitro* maturation of COCs in Korean Native Cow**

TGF-β (ng/ml)	Maturation time (hrs)	No. of COCs	GV	GVBD	Met* I	Met* II (%)
0	6	33	4	29	-	-
	12	18	-	14	4	-
	24	45	-	33	12	15(30.0) <sup>a</sup>
0.1	6	30	8	22	-	-
	12	17	-	2	15	-
	24	48	-	2	-	46(95.8) <sup>b</sup>
1	6	34	4	30	-	-
	12	9	-	1	8	-
	24	48	-	1	1	46(95.8) <sup>b</sup>
10	6	33	7	26	-	-
	12	16	-	1	15	-
	24	42	-	-	-	42(100) <sup>b</sup>

\* Metaphase.

\*\* <sup>a,b,c</sup> in the same column means significant different ( $P < 0.01$ ).

**Table 2. Developmental rate of COCs matured with TGF-β**

TGF-β (ng/ml)	No. of		
	COCs	COCs fertilized	Blastocyst (%)
0	86	49(57.0)	-
0.1	170	123(72.4)	-
1	167	121(72.5)	2(0.8)
10	172	115(66.9)	-

배발달율은 Table 3과 같다. 배양액에 따른 2세포기로의 발생은 78.7%에서 92.9%로 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 배

반포로의 배발달율은 TCM199에서 배양한 것이 8.5%-12.8%를 보인 반면 IVMD(일본 웨타이드연구소, IFP9641) 혹은 IVD(일본 웨타이드연구소, IFP9651)로 배발달한 것은 34.8%에서 38.4%를 보여 유의적인 차이를 보였다. 배반포의 부화율은 TCM 199에서는 극히 낮아 2.8%에서 5.3%를 나타냈으나, IVMD에서는 33.9%를, IVD에서는 37.3%를 나타내어 높은 부화율을 보였다.

### 고찰

소에 있어서 체외수정란의 생산은 첨단기술연구의 근간이 되는 수정란이식의 한 단계이며, 난자의 성숙, 정자의 체외수정능, 수정 등 생식세포의 생리작용을 총망라한 종합기술이라고 할 수 있다. 난포란의 핵성숙은 주로 FSH에 의해 이루어지는 것으로 알려져 체외수정 기술의 초기에는 호르몬 첨가를 위주로 체외성숙에 이용되었고, 완벽한 난포란의 체외성숙을 이룰 수는 없었으나, 적절한 체외성숙율을 보였고, PVA, 혈청내 BSA 등의 거대 분자물질을 첨가하였을 때에도 70% 이상의 체외성숙율을 나타내므로 체외수정란의 생산은 적절히 이루어져 왔다. 그러나 소 수정란의 발달에 있어서 개체에 따른 차이와 실험실적 기법에 따라 많은 차이를 보이고 있다. 체외생산 수정란은 부적절한 조건하에서 발생되므로 필수적인 조효소, 수용체 혹은 반응시스템 등이 부족할 것이다. 그래서 많은 연구자들이 생리활성 인자들간의 상호작용에 대한 연구를 활발히 하고 있는 실정이다(Larson *et al.*, 1992).

본 연구에서는 TGF-α가 난포의 과립막세포의 분화를 촉진한다고 알려져 있으나, TGF-β를 이용한 난포란의 핵성숙에 대한 연구가 없어 실시한 결과 Table 1과 같이 첨가에 농도에 따른 영향이 없이 월등한 체외성숙을 나타내므로 TGF-α의 효과와 같은 결과를 얻을 수 있었다. Keefer *et al.*(1994)은 2세포기의 체외수정란을 EGF와 TGF-β1을 첨가하여 체외발달

**Table 3. Effects of media on development of COCs matured with TGF-β and fertilized *in vitro* in Hanwoo**

Media	No. of				
	COCs	2 cell (%)	Blastocyst(%)	Hatched blastocyst(%)	
TCM 199	10% FBS	113	89 (86.7)	14 (12.4) <sup>b</sup>	6 ( 5.3)
	10% BSA	94	74 (78.7)	12 (12.8) <sup>b</sup>	3 ( 3.2)
	0.1% PVA	106	90 (84.9)	9 ( 8.5) <sup>a</sup>	3 ( 2.8)
IVMD 101		112	104 (92.9)	43 (38.4) <sup>c</sup>	38 (33.9)
IVD 101		115	102 (88.7)	40 (34.8) <sup>c</sup>	38 (37.3)

\* <sup>a,b,c</sup> in the same column means significant different ( $P < 0.05$ ).

을 유도하였는데, TGF- $\beta$ 1의 단독배양에서 배반포를 형성하였으며, 생산일자가 9일에 생산된 것으로 미루어 TGF- $\beta$ 1은 배발달에 있어서는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다. 또한 배반포의 세포수에 있어서도 EGF를 첨가한 처리구에 비하여 세포수가 상당히 적은 것을 알 수가 있다. 따라서 TGF- $\beta$ 1의 단독으로는 수정란의 배발달에 영향을 미치지 못하는 것을 알 수 있었다. TCM 199 base의 배양액인 HPM199에 혈청, BSA, PVA를 첨가한 것은 macromolecule의 효과를 기대할 수 있었으나, 체외수정란의 생산은 거대분자에만 의존되는 것이 아님을 보여주듯이 BSA를 위주로는 IVMD와 IVD에서 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 이는 Yamashita *et al.*(1999)이 배반포 생산에 동일 배양액을 이용한 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 즉 생리활성 물질이 수정란의 배발달에 중요한 역할을 하고 있음을 나타낸다고 할 수 있다 (Heyner *et al.*, 1993; Vaughan *et al.*, 1992; Werb, 1990) 결론적으로 TGF- $\beta$ 는 한우 난포란의 체외성숙에 중요한 요소나, 체외수정란의 배발달에는 큰 영향을 미치지 못하였으며, 더욱 더 많은 생리활성 인자와의 autocrine/ paracrine 유형에 대한 연구가 더욱 더 요구된다고 하겠다.

## 인용문헌

- Byun TH, Lee SH, Song HH (1991) Development of a rapid staining method for nucleus of the oocyte from domestic animal. Korean. J. Anim. Sci. 33:25-31.
- Feng P, Catt KJ, Knecht M (1988) Transforming growth factor-beta stimulates meiotic maturation of rat oocytes. Endocrinology 122(1):181-6.
- Fisher B, Rose-Hillekant TA, Scheffield LG, Bertics PJ, Bavister BD (1994) Binding of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  in mammalian preimplantation embryos. Theriogenology 41:879-887.
- Flood MR, Gage TL, Bunch TD (1993) Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro*. Theriogenology 39:823-833.
- Heyner S, Shah N, Smith RM, Watson AJ, Schultz GA (1993) The role of growth factors in embryo production. Theriogenology 39:151-161.
- Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM, Golueke P (1994) *In vitro* culture of bovine IVM-IVF embryos: Cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. Theriogenology 41:1323-1331.
- Larson RC, Ignatz GG, Currie WB (1992) Transforming growth factor- $\beta$  and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. Mol Reprod Dev 33:432-435.
- Marquant-Le Guinne B, Gerard M, Solari A, Thibault C (1989) *In vitro* culture of bovine egg fertilized either *in vivo* or *in vitro*. Reproduction Nutrition Development 29:559-568.
- Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C (1997) Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. Theriogenology 47:3-12.
- Nelson KG, Takahashi T, Lee DC, Luetkeke NC, Bossert NL, Ross K, Eitzman BE, McLachlan JA (1992) Transforming growth factor- $\alpha$  is a potent mediator of estrogen action in the mouse uterus. Endocrinology 131:1657-1664.
- Paria BC, Dey SK (1990) Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:4756-4760.
- Philip GK, Claire G (2003) Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicle development. Anim. Reprod. Sci. 78:165-183.
- Skinner MK, Coffey RJ (1988) Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor- $\alpha$  by thecal cell. Endocrinology 123:2632-2638.
- Tamada H, Das SK, Andrew GK, Dey SK (1991) Cell-type-specific expression of transforming growth factor- $\alpha$  in the mouse uterus during the peri-implantation period. Biol. Reprod. 45:365-372.
- Vaughan TJ, James PS, Pascall JC, Brown KD (1992) Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. Mol Reprod Dev 31:87-95.
- Watson AJ, Hogan A, Wiemer KE, Schultz GA (1992) Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryos. Mol Reprod Dev 31:87-95.
- Werb Z (1990) Expression of EGF and TGF- $\alpha$  genes in early mammalian development. Mol Reprod Dev 27:10-15.
- Yamashita S, Abe H, Itoh T, Satoh T, Hoshi H (1999) A serum-free culture system for efficient *in vitro* production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. Cytotechnology 31:1-9.
- Yang BK, Yang X, Foote RH (1993) Effect of growth factors on morulae and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. Theriogenology 40:521-530.