

돼지 난포란 유래 체외수정란 생산에 대한 제요인의 영향  
II. 체외성숙배양시 EGF와 COC의 수가 체외성숙, 체외수정 및  
체외발달에 미치는 영향

연성흠<sup>†</sup> · 손동수 · 한만희 · 위미순 · 최선호 · 이규승<sup>1</sup>  
농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장

**Effects of Some Factors on *In Vitro* Production of Embryos  
from Antral Follicle-Derived Porcine Oocytes**

**II. Effects of EGF and the Number of COCs into Maturation  
Media on *In Vitro* Maturation, Fertilization and Development**

S. H. Yeon<sup>†</sup>, D. S. Son, M. H. Han, M. S. Wee, S. H. Choi and K. S. Lee<sup>1</sup>

*Animal Genetic Resources Station, National Livestock Research Institute, R.D.A.*

**SUMMARY**

This study was carried out to examine the effects of epidermal growth factor (EGF) and the number of cumulus-oocyte complexes (COCs) on *in vitro* maturation (IVM) of porcine immature oocytes, and on subsequent *in vitro* fertilization (IVF) and development (IVD). COCs were collected from antral follicles of porcine ovaries collected from abattoir, and were matured in modified NCSU-23 (mNCSU-23) with 10% pFF, 0.6 mM cysteine, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM dbcAMP, 10 IU/mL PMSG and 10 IU/mL hCG, which was supplemented with or without 10 ng/mL EGF and into which 50 or 15 COCs per droplet was put. Oocytes matured *in vitro*, were fertilized *in vitro* in modified Tris-buffered medium (mTBM) with the final motile sperm concentration of  $1 \times 10^5$  sperm/mL, and subsequently putative embryos were developed *in vitro* in NCSU-23. The results are as follows.

1. In the result of IVM, 10 ng/mL EGF supplement duplicated the percentage of C4 group of COCs(41% vs 81%). But the rate of germinal vesicle breakdown (GVBD) and of nuclear maturation were not significantly different between control and EGF supplemented, or between the number of COCs per culture droplet, and there was not a significant interaction between the two factors, either.
2. In the result of IVF, there was not significantly different between control and EGF supplemented, or between the number of COCs per culture droplet, or was not a significant interaction between the two factors, in the rate of sperm penetration, in the percentage of oocytes with male pronucleus (MPN), and in the rate of polyspermy.

---

본 연구는 농촌진흥청 대형공동연구과제(2000-2002) 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

<sup>1</sup> 충남대학교 동물자원학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University)

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : yeonsu@rda.go.kr

3. In the result of IVD, there was not significantly different between control and EGF supplemented, or between the number of COCs per culture droplet in the percentage of cleaved oocytes. There was not significantly different between the number of COCs per culture droplet, but between control and EGF supplemented ( $p < 0.01$ ) in the percentage of blastocysts, the number of inner cell mass (ICM), trophectoderm (TC) and total cells. There was no significant interaction between the two factors anywhere. These results suggested that 10 ng/mL EGF supplement into mNCSU-23 for IVM was effective in the production of more as well as better blastocysts during IVD through increasing the number of cells in those.

(Key words : porcine oocyte, EGF, IVM, IVF, IVD)

## 서 론

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙에 대해서 Edwards(1965)가 43~46시간 동안 체외배양을 통하여 제2성숙 분열중기(metaphase II; M-II)에 도달했다고 처음으로 보고한 이래, Motlic과 Fulka(1974)는 체외성숙란의 체내수정능력을 확인했고, Iritani 등(1978)은 체외성숙란의 체외수정을 성공시켰으며, Mattioli 등(1989)은 체외성숙란의 체외수정후 추정 수정란을 수란관에 이식하여 처음으로 산자를 생산함으로써 체외성숙/체외수정란의 발달능력을 확인했다. 한편, Yoshida 등(1993), Day 등(1998), 그리고 Marchal 등(2001)이 각각 체외성숙/체외수정 유래의 2~4세포기, 8세포기~상실기, 배반포기의 돼지 수정란을 이식하여 산자를 생산하는데 성공함으로써 체외성숙/체외수정/체외발달 유래의 수정란도 출생까지의 발달능력을 갖고 있다는 것이 확인되었다.

그러나 아직도 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙에 있어서는 핵성숙이나 세포질성숙의 불충분 등은 체외수정이나 체외발달을 저해하는 요인으로 작용하기 때문에, 미성숙 난포란의 핵 및 세포질성숙을 개선시키기 위해 많은 연구자들이 다양한 연구를 시도해 왔다.

돼지 난자의 체외성숙에서 표피성장인자(epidermal growth factor; EGF)가 핵성숙을 자극한다는 Sommer 등(1992)의 보고는 Reed 등(1993)과 Singh 등(1993)에 의해서도 확인되었다. 성선자극호르몬이나 스테로이드호르몬과는 달리, EGF의 핵성숙

촉진은 cAMP(cyclic adenosine monophosphate)에서 중재되는 것이 아니라(Coskun과 Lin, 1995), PKA (protein kinase A)를 통해 일어나는 것으로 밝혀졌다(Sirotkin 등, 2000).

EGF가 다정자수정을 감소시키는데 대해서는 보고자간에 차이가 있지만, 융성전핵 형성을 촉진하고(Wang과 Niwa, 1995), 단정자수정을 증가시키는(Singh 등, 1997; Illera 등, 1998) 것으로 볼 때, 난자의 세포질 성숙을 자극하는 것으로 추정되었다(Driancourt와 Thuel, 1998). 또 Abeydeera 등(2000)은 EGF의 첨가로 난자내 glutathione(GSH) 농도가 증가했고, 그 결과 난분할율과 배반포 발달율이 높아졌으며, 배반포의 세포수도 늘어났다고 보고했다.

Ding과 Foxcroft(1994)는 EGF가 난구세포의 분해(disaggregation)를 통해 난구난포세포 복합체(COCs)를 팽화시킨다는 점에서 성선자극호르몬과는 다르다고 보고한 바 있으며, Prochazka 등(1997, 2000)과 Kolena 등(2001)도 각각 다른 크기의 큰 난포로부터 채취한 COCs를 공시하여 동일한 결과를 얻었다고 보고했다.

그러나 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙에 사용되는 배양액에는 이미 난구세포의 팽화, 핵성숙 및 세포질 성숙을 촉진하는 여러 가지 물질이 첨가되고 있는데, 이러한 물질이 포함된 배양액에 EGF를 첨가할 때 그 효과는 어떠한지 분명치 않다. 따라서 본 연구는 여러 가지 체외성숙 촉진 물질이 포함되어 있는 배양액에서도 EGF 첨가가 효과적인지 또한 그 효과는 배양소적당 COC의 수에 영향을 받는지를 구명하고자 실시했다.

## 재료 및 방법

### 1. COCs 채취와 pFF 준비

도축장에서 체중 110 kg 전후의 미경산돈 난소를 도축 직후 회수하여 35~38°C의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 2회 세척한 다음, 같은 액으로 채운 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였고 실험실에서 신선한 생리식염수로 다시 2~3회 난소를 세척한 다음 COCs를 채취했다. COCs는 직경이 3~6 mm의 포상난포로부터 19개까지 주사침이 장착된 10 mL 주사기로 난포액과 함께 흡인한 다음, 37°C의 가운 블록에 미리 준비해둔 15 mL 원심분리관(Corning, USA)으로 옮겼다. 이 원심분리관을 10분간 정지시켜 침전된 pellet을 회수하고 35×10 mm petri-dish(FALCON, USA)에서 mTL-Hepes-PVA(Long 등, 1999)로 희석하였다. 실제현미경(Olympus SZH-10, Japan)하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 난자의 세포질이 균일한 COCs만을 선별하여 실험에 공시했다.

돼지난포액(pFF)은 COCs 채취시와 같은 방법으로 회수하여 실험실로 운반한 돼지 난소의 3~6 mm 포상난포에서 채취하여 4°C의 냉수에 미리 준비해둔 15 mL 원심분리관에 옮겼다. 이어서 4°C, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 다음 상층액을 분리하여 2.9  $\mu$ m와 0.45  $\mu$ m의 이중필터(Sigma, USA)로 여과하여 -20°C 냉동고에 보관해 두고 성숙배양액 제조시 용해하여 사용했다.

### 2. 미성숙 난포란의 성숙배양

체외성숙용 배양액은 NCSU-23(Petters와 Wells, 1993)에서 0.4% BSA 대신 10% pFF를 넣고, 0.6 mM cysteine, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 그리고 1 mM dbcAMP를 첨가하여 사용했고, 호르몬은 10 IU/mL PMSG와 10IU/mL hCG를 첨가했다.

체외성숙배양을 위해서는 4-well dish(Nunc, Denmark) 또는 Repro C-1 plate (IFP, Japan)를 사용하여 각 well당 500  $\mu$ L 또는 150  $\mu$ L의 성숙용 배양액을 넣고 mineral oil로 덮은 다음 2시간 이상 전배양을 실시했다. 공시된 COCs는 TL-Hepes-PVA와 성숙용 배양액으로 각각 3회 세정하여 미리 준비된 성숙배양액으로 옮겼다. CO<sub>2</sub> 배양기에서의 배양

조건은 배양 전기간 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 포화습도였다. 세정된 COCs는 실험목적에 따라 각 well당 40~50개(4-well dish) 또는 15개 내외(Repro C-1 plate)씩 넣어 호르몬과 dbcAMP가 첨가된 배양액에서 20~22시간 배양한 다음, 호르몬과 dbcAMP가 첨가되지 않은 배양액에서 22~24시간 배양하여 총 44~46시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도했다.

### 3. 수정배양액 및 난자의 준비

체외수정용 배양액은 2.0 mM caffeine sodium benzoate와 0.1% BSA(Sigma, Fraction V)를 첨가한 mTBM(Abeydeera와 Day, 1997)을 사용했으며, 체외수정에 사용하기 전 48시간 이상 전배양을 실시하여 안정화시킨 다음 이용했다.

체외성숙이 완료된 COCs를 0.1% hyaluronidase가 포함되고 pFF가 들어가지 않은 성숙배양액에서 난구세포를 제거한 다음, 난자를 체외수정용 배양액으로 3회 세정하여 35×10 mm petri-dish에 mineral oil로 덮은 90  $\mu$ L 또는 45  $\mu$ L 수정용 배양소적에 30~40개 또는 15개 내외의 난자를 넣고 매정할 때까지 배양기 내에서 배양했다.

### 4. 정자의 준비와 체외수정

정액은 수압법으로 채취하여 Modena 희석액(SGI, USA)으로 생존정자수로 3×10<sup>7</sup> sperm/mL의 농도가 되도록 액상정액을 만들어 3일 이내에 사용했고, 정자 세정액은 0.1% BSA와 75 $\mu$ g/mL penicillin G 및 50  $\mu$ g/mL streptomycin sulfate를 첨가한 D-PBS를 사용했다.

체외수정용 정액을 준비하기 위하여 액상정액 1 mL를 취한 다음 세정액 2 mL과 혼합하여 15 mL 원심분리관에 넣고 700×g에서 5분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거했다. 그 다음 침전된 정자에 세정액 3 mL을 더하여 같은 방법으로 원심분리하고 상층액을 제거하는 세정과정을 2회 더 실시했다. 최종적으로 원심분리관 하단에 남은 정자 침전물에 체외수정용 배양액을 3 mL를 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 포화습도의 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 15분간 정지했다. 부유된 정자들을 회수하여 Makler counting chamber(Sefi-Medical Instruments, Israel)로 운동정자

수를 계산한 다음, 운동정자의 최종동도가  $1 \times 10^6$  sperm/mL가 되도록 체외수정용 배양액으로 다시 희석했다. 이 정액을 난자가 들어있는 90  $\mu$ L 소적에 10  $\mu$ L씩 주입하거나 45  $\mu$ L 소적에 5  $\mu$ L씩 주입한 다음, 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 포화습도의 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 5~6시간 동안 난자와 함께 배양하는 방법으로 체외수정을 실시했다.

#### 5. 체외수정란의 발달배양

체외성숙/체외수정란의 발달배양에는 0.4% BSA (Sigma, Fraction V)가 함유된 NCSU-23(Petters and Wells, 1993)을 사용했다. 체외수정이 완료된 추정 수정란은 체외발달배양액으로 3회 세척한 다음, 500  $\mu$ L 또는 150  $\mu$ L의 배양액을 넣은 각 well에 추정수정란을 well당 30~40개씩(4-well dish) 또는 15개 내외씩(Repro C-1 plate) 넣고 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 포화습도의 배양기 내에서 배양하여 체외발달시켰다. 체외배양 개시후 약 44시간에 난할율과 약 144시간에 배반포 발달율을 조사했다.

#### 6. 염색 및 판정

##### 1) COCs의 난구세포 팽화 판정

성숙배양이 끝난 COCs를 실체현미경하에서 Abeydeera 등(2000)의 기준에 의거하여 팽화 정도에 따라 다음과 같이 5 가지로 분류하여 판정했다. 즉 C0는 가시적인 확장이 거의 없거나 전혀 없는 것, C1은 난구세포층의 약 25% 정도가 팽화된 것, C2는 약 50% 정도가 팽화된 것, C3는 약 75% 정도가 팽화된 것, C4는 거의 100% 팽화된 것 등이다.

##### 2) 체외성숙란의 염색 및 성숙판정

성숙배양이 끝난 난자의 일부(반복당 6개 또는 9개)를 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로 염색하고 위상차현미경(Olympus AX70, 400~800)하에서 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 핵성숙 단계를 판정했다.

##### 3) 체외수정란의 염색 및 판정

체외수정이 종료된 추정수정란(putative embryos)을 반복당 9개씩 취하여 잔류 난구세포와 투명대에

부착된 정자를 제거하고 체외발달 배양액에 옮겨 10시간 동안 추가로 배양한 다음, Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로 염색하고 위상차현미경(Olympus AX70, 400×)하에서 정자의 침입, 다정자수정, 응성전핵 형성 등 수정 여부를 확인했다.

#### 4) 확장 배반포의 염색과 세포 구분

확장 배반포의 ICM 세포수와 TE 세포수를 조사하기 위해서 Machaty 등(1998)의 방법에 준하여 이중형광염색을 실시하였다. 발달배양 개시후 약 144시간부터 168시간 사이에 충분히 확장된 배반포의 투명대를 0.5% pronase로 약 30초간에 처리하여 용해시킨 다음, TL-Hepes-PVA 배양액으로 5분간 세척했다. Rabbit anti-pig whole serum이 1:5로 희석된 TL-Hepes-PVA 액에 투명대가 제거된 배반포를 1시간 노출시킨 다음, TL-Hepes-PVA 액으로 5분간 가볍게 세척했다. 계속해서 Guinea pig complement가 1:10으로 희석된 TL-Hepes-PVA 액에 두가지 형광염색제 즉, bis-benzimide(Hoechst 33342)와 propidium iodide를 각각 10  $\mu$ g/mL 씩 함께 용해시켜 염색액을 준비하고, 여기에 앞서 처리된 배반포를 1시간 정치한 다음, TL-Hepes-PVA 액으로 다시 가볍게 세척했다. 이렇게 형광염색된 배반포를, slide glass 위의 3  $\mu$ L 내외의 mounting 소적에 넣어 cover slip으로 덮고 매니큐어로 봉입한 다음, 형광현미경(200×)하에서 관찰했으며, 청색 형광을 내는 것은 ICM 세포로, 그리고 밝은 적색 또는 핑크색 형광을 내는 것은 TE 세포로 판정했다(Fig. 1).

#### 7. 실험 구성

미성숙 난포란의 체외성숙배양시 EGF 첨가와



Fig. 1. A differential stained IVM/IVF-derived porcine blastocyst (200×).

배양소적당 COC의 수가 체외성숙, 체외수정 및 체외발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여 10 ng/mL EGF 첨가 유무 및 배양소적당 COC 수를 15개(150  $\mu$ L) 및 50개(500  $\mu$ L)로 조합한 2 $\times$ 2 요인시험을 수행했다. 해당 처리에서 체외성숙을 유도한 다음, 정해진 절차와 방법으로 체외수정과 체외발달 배양을 실시하여 각 단계별로 각 처리의 영향을 조사하였다.

### 8. 통계처리

본 연구에서는 각 실험별로 처리당 4회 이상 반복 시험을 수행했으며, 조사된 성적은 실험계획에 따라 *t*-검정 또는 분산분석(ANOVA)을 실시한 다음, 유의성이 인정된 것에 대해서는 LSD에 의하여 처리간 차이를 구분했다.

## 결과 및 고찰

체외성숙 배양액에서 COC의 난구세포 팽화에 미치는 10 ng/mL EGF 첨가의 효과는 Table 1과 같다. 대조구와 EGF 첨가구에서 C3 이상의 COCs가

각각 85%와 96%, C4의 COCs가 각각 41%와 82%로써 EGF 첨가에 의해 C4의 COCs가 크게 증가하였다.

또 체외성숙 배양액에 10 ng/mL EGF의 첨가하거나 첨가하지 않은 처리와 배양소적당 COC 수를 50개 또는 15개로 구분한 처리를 조합하여 미성숙 난포란을 성숙배양한 결과는 Table 2와 같다. 난핵포봉괴율은 87.3~91.5%, 핵성숙율은 77.2~84.1%로 나타남으로써 EGF 첨가 여부나 COC 수에 따른 차이를 보이지 않았고 EGF와 COC 수의 상호작용도 없었다.

이러한 체외성숙란을 mTBM에서 체외수정시킨 결과는 Table 3과 같다. 정자침투율은 EGF 첨가구에서 88.9%, 대조구에서 78.8%로 EGF 첨가구에서 다소 높았으나 유의적인 차이는 아니었으며, 배양소적당 COC 50개구에서 85.6%, 15개구에서 77.1%로 50개구가 다소 높았으나 이것 역시 유의적인 차이는 아니었다. 또 응성전핵 형성율과 다정자수정 발생율도 각각 80.0~86.7%와 28.3~37.9%로 처리간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. EGF와 COC 수의 상호작용 역시 어떤 조사항목에서도 인정되

Table 1. Effects of EGF on cumulus expansion of COCs derived porcine antral follicles

	No. of oocytes examined	Degree of cumulus expansion <sup>1</sup>				
		C4	C3	C2	C1	C0
Control	303	125	133	31	7	7
EGF	301	247	41	7	2	4

<sup>1</sup> C0 : none or little expansion, C1 : about 25 % expansion, C2 : about 50 % expansion, C3 : about 75% expansion, C4 : almost all expansion.

Table 2. Effects of EGF for COC number on the nucleic maturation of immature oocytes derived porcine antral follicles

No. of COCs	No. of oocytes examined	No. of oocytes at the stage of <sup>1</sup>			Percentage of Maturation rate (%)	
		GV	ProM-I ~ T-I	M-II	GVBD <sup>1</sup> (Mean $\pm$ SE)	(Mean $\pm$ SE)
Control	77	8	7	62	89.7 $\pm$ 2.3	79.9 $\pm$ 4.8
EGF	35	4	2	29	88.5 $\pm$ 0.3	83.0 $\pm$ 3.0
50	57	5	4	48	91.5 $\pm$ 3.5	84.1 $\pm$ 3.5
15	55	7	5	43	87.3 $\pm$ 6.4	77.2 $\pm$ 6.4

<sup>1</sup> GV : germinal vesicle stage, ProM-I : first prometaphase, T-I : first telophase, M-II : second metaphase, GVBD : germinal vesicle breakdown.

지 않았다.

계속해서 이들 추정수정란을 NCSU-23에서 체외 발달시킨 결과는 Table 4 및 Table 5와 같다. 난분할율은 EGF 첨가구에서 57.2%, 대조구에서 49.3%로 EGF 첨가구가 다소 높았으나 유의적인 차이는 아

니었고, COC 수 사이에서는 서로 비슷한 결과를 나타냈다. 그러나 추정수정란대 및 분할란대 배반포 발달율, 배반포의 ICM 세포수, TE 세포수 및 총 세포수는 EGF 첨가구가 각각 18.4%, 31.3%, 4.7개, 36.0개, 40.7개로 대조구의 21.3%, 10.7%, 3.7개,

Table 3. Effects of EGF for COC number on *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes derived porcine antral follicles

No. of COCs	No. of oocytes examined	% (mean±SE) of oocytes			Rate of polyspermy (Mean±SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean±SE)	
		Penetrated	with MPN	with PPN			
Control	104	78.8±2.7	83.5±2.6	27.8±2.6	36.9±3.1	1.9±0.1	
EGF	36	88.9±4.5	84.3±3.2	21.7±3.0	28.3±3.3	2.0±0.2	
	50	70	85.6±2.4	86.7±2.4	24.7±2.2	31.5±1.6	1.8±0.2
	15	70	77.1±3.1	80.8±3.1	27.9±3.8	37.9±4.8	2.0±0.2

<sup>1</sup> MPN: Male pronucleus, PPN: Polypronucleus.

Table 4. Effects of EGF for COC/embryo number on *in vitro* development of *in vitro* fertilized embryos derived porcine antral follicles

No. of COCs/ embryos	No. of oocytes inseminated	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% of blastocysts at day 6 (mean±SE)		
			/ cleaved	/ inseminated	
Control	423	49.3±2.4	21.3±1.4 <sup>A</sup>	10.7±1.1 <sup>A</sup>	
EGF	229	57.2±3.2	31.3±3.0 <sup>B</sup>	18.4±2.5 <sup>B</sup>	
	50	474	53.0±2.6	25.0±2.0	13.7±1.6
	15	178	50.6±3.2	24.2±2.7	12.9±2.1

<sup>A,B</sup> Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ( $p < 0.01$ ).

Table 5. Effects of EGF for COC/embryo number on cell number of blastocysts developed from *in vitro* fertilized embryos derived porcine antral follicles

No. of COCs/ embryos	No. of blastocysts tested	No. of cells <sup>1</sup> (mean±SE)			% of ICM cells (mean±SE)	
		ICM	TE	Total		
Control	17	3.7±0.3 <sup>A</sup>	27.7±1.6 <sup>A</sup>	31.4±1.9 <sup>A</sup>	11.5±0.4	
EGF	23	4.7±0.3 <sup>B</sup>	36.0±1.7 <sup>B</sup>	40.7±2.0 <sup>B</sup>	11.4±0.3	
	50	24	4.3±0.3	31.4±1.5	35.7±1.8	11.7±0.3
	15	16	4.1±0.4	32.3±2.5	36.4±2.9	11.1±0.4

<sup>1</sup> ICM : inner cell mass, TE : Trophectoderm.

<sup>A,B</sup> Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ( $p < 0.01$ ).

27.7개, 31.4개보다 유의적( $P<0.01$ )으로 높았다. 한편 COC 수 사이에는 어느 것에서도 유의적인 차이를 나타내지 않았고, EGF와 COC 수의 상호작용 역시 모든 조사항목에서 인정되지 않았다.

난구세포의 팽화에 관한 본 실험의 결과는 3~7 mm 난포에서 유래한 COCs를 이용하여 EGF로 97%의 팽화를 유도했다는 Ding과 Foxcroft(1994)의 보고와 일치된 것이었다. 한편, Prochazka 등(1997)은 6~7 mm의 난포에서 채취한 COCs만이 EGF에 의한 팽화율이 높았다고 하였고, Kolena 등(2001)도 5~8 mm의 난포에서 유래한 COCs를 이용했을 때, 약 71%가 팽화되었다고 하여 본 시험과 다소 다른 결과를 보고했다. 그러나 그들 실험에 사용된 배양액이 모두 10% FBS가 첨가된 TCM-199였는데 비해 본 실험에서는 10% pFF가 첨가된 mNCSU-23을 사용했다. pFF가 난구세포의 팽화율을 증가시킨다는 것은 이미 Yoshida 등(1990)과 Abeydeera 등(1998)의 보고로 밝혀진 바 있다. 또 본 실험에서는 성숙배양 초기 약 20~22시간 동안 PMSG를 첨가시켰기 때문에 EGF를 첨가하지 않은 대조구에서도 비교적 높은 팽화율(C3 이상 85%)을 나타냈다. 이러한 결과는 성선자극호르몬 첨가시 COCs의 팽화율은 100%였다는 Ding과 Foxcroft(1994)의 보고, FSH에 의한 3~6 mm 난포 유래 COCs의 팽화율이 약 93%였다는 Prochazka 등(1997)의 보고, eCG가 첨가된 성숙배지에서 3~6 mm 난포 유래 COCs의 팽화율은 85.4~90.5%였다는 Qian 등(2001)의 보고 및 FSH에 의한 COCs의 팽화율이 약 81%였다는 Kolena 등(2001)의 보고와 일치하는 것이었다. 또 Abeydeera 등(1998)은 mouse나 hamster와는 달리 가축의 경우 혈청이 첨가된 배양액에서 성선자극호르몬이 난구세포를 팽화시켰다고 보고한 바 있다.

COCs의 난구세포간에 그리고 난구세포와 난자 사이에 존재하는 광범위한 세극결합(gap junction)을 통해서 난자는 성장과 성숙분열 억제제를 조절하는 여러 가지 인자에 노출될 수 있는 것으로 알려졌다. Chen 등(1994a)은 성선자극호르몬에 의해 세극결합의 대부분이 없어지면 난자는 그동안 억제되어 있던 성숙분열을 재개하게 되고, 난구세포 사이에는 점성 기질이 침적되는데, 그 결과 난구세포

덩어리의 부피가 20~40배 증가함으로써 난구세포가 팽화된다고 보고했다. 또 Chen 등(1994b)은 이러한 난구세포의 팽화에는 혈청이나 난포액에 존재하는 ITI(inter- $\alpha$ -trypsin inhibitors)가 필요하며, ITI는 난구세포의 세포의 기질에 포함되어 있는 hyaluronic acid와 직접 결합함으로써 난구세포를 안정화시킨다고 하였다. 그러나 Ding과 Foxcroft (1994)는, 성선자극호르몬에 의한 난구세포의 팽화와는 달리 EGF에 의한 팽화는 난구세포의 분해(disaggregation) 때문이라고 보고했고, Prochazka 등(1997, 2000)과 Kolena 등(2001)은 각각 다른 크기의 큰 난포에서 채취한 COCs에서 이를 확인했다. 본 실험의 EGF 첨가구는 일반적으로 난구세포의 팽화율을 평가하는 C3 수준 이상의 팽화는 물론 C4 수준의 팽화가 크게 증가했는데, 이런 현상은 난포액이 첨가된 배양액에서 성선자극호르몬에 의한 팽화(난구세포 사이의 세포의 기질 침적으로 인한 팽화)와 함께 EGF에 의한 팽화(난구세포의 분해로 나타난 팽화)가 반영된 결과인 것 같다.

본 실험의 결과에서 핵성숙율, 정자침투율, 응성전핵형성을 등에서 EGF 첨가효과가 인정되지 않았다. 이러한 결과는 성선자극호르몬 존재시 EGF 첨가가 핵성숙에 영향을 주지 않았다는 Coskun과 Lin(1994) 및 Ding과 Foxcroft(1994)의 보고와 일치하는 것이었다. 그러나 응성전핵 형성에 성선자극호르몬과 정의 상호작용 나타냈다는 Ding과 Foxcroft(1994)의 보고나 monospermy를 증가시켰다는 Illera 등(1998)의 보고와는 일치하지 않는 결과였다. 본 실험에서는 대조구와 EGF처리구에 모두 성선자극호르몬과 난포액을 첨가했으므로, 이러한 결과는, FSH나 EGF가 각각 난자의 핵성숙과 세포질 성숙에 효과적이지만 FSH와 EGF를 동시에 첨가할 때 상승효과는 없었다는 Sommer 등(1992)과 Singh 등(1993, 1997)의 보고나 난포액이 들어있는 배양액에서 FSH가 핵성숙, 응성전핵 형성 및 난분할율을 증가시키는 효과가 더 커진다는 많은 보고(Naito 등, 1988; Yoshida 등, 1992; Rath 등, 1995; Tao 등, 1995; Wang과 Niwa, 1995)와 일치하는 것이었다. 또한 체외발달 배양한 결과, 난분할율에서는 유의적인 차이를 보이지 않았지만 EGF 첨가가 체외발달을 확실히 개선시키는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 EGF의 첨가로 난분할율과 배반포 발달율이 각각 52%에서 60%, 22%에서 37%로 높아졌으며 배반포의 세포수도 25.5개에서 40.8개로 늘어났다는 Abeydeera 등(2000)의 보고와 일치하는 것이었다.

Mouse의 난자는 난포세포의 기능을 광범위하게 변화시키는 다양한 인자를 분비하는 것으로 알려졌다(Vanderhyden 등, 1992, 1993; Joyce 등, 1999; Vanderhyden과 Tonary 1995), 소(Li 등, 2000)와 돼지(Coskun 등, 1995)의 난자도 난구세포의 스테로이드 호르몬 분비를 조절하는 인자를 생산하는 것으로 밝혀졌다. Dode와 Graves(2002)는 돼지의 COCs를 배양하는 동안 난구세포가 배양액에 충분한 양의 스테로이드 호르몬을 분비했다고 보고했고, Moor 등(1998)은 이러한 스테로이드 호르몬이 성숙과정에 관여할 것이라고 하였다. 그러나 체외 성숙배양 동안 COC 수를 조정했음에도 불구하고 COC 수 사이에는 모든 조사항목에서 차이가 없는 것으로 나타났다. COC 수에 따라 각각의 COC가 배양소적 내에 분비하는 물질의 양이 달라지지 않는다면, 이러한 결과는 배양소적 내에 COCs에 의해 분비된 스테로이드 호르몬 등의 농도가 배양소적의 크기에 의해 바뀌지 않도록 COC 수에 비례하여 배양소적의 크기를 조절했기 때문인 것으로 추정된다.

한편, 체외발달배양의 결과에서도 COC 수 사이에 차이가 없는 것으로 나타났다. 이것은 소 수정란을 배양소적당 1개, 5개 및 25개씩 체외발달배양한 결과 난분할율에는 차이가 없었지만 배반포 발달율은 1개씩 배양한 것이 5개 또는 25개씩 배양한 것보다 저조한 반면 5개와 25개 사이에는 차이가 없었다는 Yuan 등(2000)의 보고나 소 수정란을 10  $\mu$ L 배양소적에 1개씩 배양한 것(1개/10  $\mu$ L)은 50  $\mu$ L에 5개씩 배양한 것(5개/50  $\mu$ L)이나 100  $\mu$ L에 10개씩 배양한 것(10개/100  $\mu$ L)에 비해 난분할율, 배반포발달율이 떨어졌으나 5개/50  $\mu$ L와 10개/100  $\mu$ L사이에는 차이가 없었다는 Ward 등(2000)의 보고와 일치하는 것이었다. Yuan 등(2000)은 autocrine 및 paracrine 인자가 수정란 발달에 매우 중요한 역할을 하며, 성분이 제한된 배양액에서 배양할 때 더욱 그러하다고 보고했다. 그럼에도 불구하고 본

실험에서 COC 또는 추정수정란 수에 따른 차이가 나타나지 않았던 것은, COC나 수정란에 의해 분비된 endocrin, autocrine 및 paracrine 인자의 농도가 각각의 COC나 수정란의 분비능력 차이가 아닌 배양소적의 크기 차이에 따라 달라지지 않도록 COC나 추정수정란 수에 비례하여 배양소적의 크기를 조절했기 때문인 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 pFF, cysteine,  $\beta$ -mercaptoethanol, 성선 자극호르몬 등 여러 가지 체외성숙 촉진 물질이 첨가된 성숙배양액에 EGF 첨가가 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙에 효과적인지 또한 그 효과는 배양소적당 COC의 수에 영향을 받는지를 구명하고자 EGF의 첨가 유무와 배양소적당 COC수 (50개 또는 15개)를 조합한 2x2 요인실험을 실시했다. 도축돼지의 난소에서 채취한 COCs를 각 처리별로 mNCSU-23에서 성숙배양하고 mTBM에서 운동정자의 최종동도가  $1 \times 10^5$  sperm/mL의 농도로 체외수정된 다음 NCSU-23에서 체외발달을 유도한 결과는 다음과 같다.

1. 대조구와 EGF 첨가구에서 C4군의 COC 비율이 각각 41%와 82%로써 EGF 첨가가 난구세포의 팽화 정도를 크게 향상시키는 것으로 나타났다으나, 난핵포 붕괴율과 핵성숙율에서는 EGF 첨가 여부나 배양소적당 COC수에 따른 차이가 나타나지 않았고 두 요인간 상호작용도 없었다.
2. 정자 침투율, 응성전핵 형성률 및 다정자수정 발생율에서도 EGF 첨가 여부나 배양소적당 COC수에 따른 차이가 유의적인 것이 아니었고, 두 요인간 상호작용 역시 유의적이지 않았다.
3. 난분할율에서는 처리간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 배반포 발달율, 배반포의 ICM 세포수, TE 세포수 및 총세포수에서는 EGF 첨가구가 모두 유의적으로 높았다( $p < 0.01$ ). COC수에 따른 차이나 두 요인간 상호작용에서는 유의성이 인정되지 않았다. 결과적으로 돼지 미성숙 난포란을 mNCSU-23에



서 성숙배양할 때 10 ng/mL EGF 첨가는 성숙배양 단계에서 난구세포의 팽화를 더욱 심화시키고, 발달배양단계에서 배반포의 세포수와 배반포발달을 증가시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 57:729-734.
- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS and Day BN. 1998. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 58:1316-1320.
- Abeydeera, LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN, Prather RS and Day BN. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*, 54:787-797.
- Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Development of a rapid staining method of the oocytes from domestic animal. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
- Chen L, Russell PT and Larsen WJ. 1994a. Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 51:290-295.
- Chen L, Mao SJT, McLean LR, Powers RW and Larsen WJ. 1994b. Proteins of the inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.*, 269: 28282-28287.
- Coskun S and Lin YC. 1994. Effect of transforming growth factor and activin-A on *in vitro* porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 38: 153-159.
- Coskun, S and Lin YC. 1995. Mechanism of action of epidermal growth factor-induced porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 42:311-317.
- Coskun S, Uzumcu M, Lin YC, Friedman CI and Alak BM. 1995. Regulation of cumulus cells steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte produced factor(s). *Biol. Reprod.*, 53: 670-675.
- Day BN, Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Cantley TC and Rieke A. 1998. Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa stored by high speed flow cytometry. *Theriogenology*, 49:360 (abstr.).
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:30-40.
- Dode MA and Graves C. 2002. Involvement of steroid hormones on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 57:811-821.
- Driancourt MA and Thuel B. 1998. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38:345-362.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:347-351.
- Hunter RHF and Polge C. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.*, 12:525-531.
- Illera MJ, Lorenzo PL, Illera JC and Petters RM. 1998. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-I, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. *Int. J. Dev. Biol.*, 42(8):1169-1172.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 54: 379-383.
- Joyce IM, Pendola FL, Wigglesworth K, Eppig JJ. 1999. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Dev. Biol.*, 214: 342-353.

- Kolena J, Vrsanska S, Nagyova E and Jezova M. 2001. Gossypol inhibits follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor-stimulated expanding of oocyte-cumulus complexes from porcine preovulatory follicles. *Physiol. Res.*, 50: 627- 630.
- Li R, Norman RJ, Armstrong DT and Gilchrist RB. 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 63:839-845.
- Long CR, Dobrinsky JR and Johnson LA. 1999. *In vitro* production of pig embryos: Comparisons of culture media and boars. *Theriogenology*, 51: 1375-1390.
- Machaty Z, Day BN and Prather RS. 1998. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 59:451-455.
- Marchal, R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M and Mermillod P. 2001. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*, 56:17-29.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 46: 1201-1207.
- Moor RM, Dai Y, Lee C and Fulka J. 1998. Oocyte maturation and embryonic failure. *Human Reprod. Update*, 4:223-236.
- Motlik J and Fulka J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fertility.*, 36:235-237.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete. Res.*, 21:289-295.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 48:61-73.
- Prochazka R, Kalab P and Miyano T. 1997. EGF stimulated expansion of porcine oocyte-cumulus complexes is affected by the size of the donor follicle. *Theriogenology*, 47:199(abstr.).
- Prochazka R, Srsen V, Nagyova E, Miyano T and Flechon JE. 2000. Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol. Reprod. Dev.*, 56:63-73.
- Qiann Y, Shi WQ, Ding JT, Fan BQ and Y Fukui. 2001. Effect of follicle size on cumulus- expansion, *in vitro* fertilization and development of porcine follicular oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 47: 155-152.
- Rath D, Niemann H and Tao T. 1995. *In vitro* maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo yield *in vitro*. *Theriogenology*, 44:529-538.
- Reed ML, Estrada JL, Illera MJ and Petters RM. 1993. Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 266:74-78.
- Singh, B, Barbe GJ and Armstrong DT. 1993. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:113-119.
- Singh B, Meng L, Rutledge JM and Armstrong DT. 1997. Effects of epidermal growth factor and follicle-stimulating hormone during *in vitro* maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:401-407.
- Sirotkin AV, Dukesova J and Makarevich AV. 2000. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40:559-569.
- Sommer P, Rath D and Niemann H. 1992. *In vitro* maturation of porcine oocytes in the presence of follicular granulosa cells, FSH and/or EGF. *Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod.*, 1:378-380.
- Tao T, Rath D and Niemann H. 1995. *In vitro*

- maturation of porcine cumulus- oocyte-complexes in the presence of follicular fluid, and IVF and culture to blastocyst stages. *Theriogenology*, 43: 334.
- Vanderhyden BC and Tonary AM. 1995. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by a factor(s) secreted by the oocyte. *Biol. Reprod.*, 53:1243-1250.
- Vanderhyden BC, Telfer EE and Eppig JJ. 1992. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 46:1196-1204.
- Vanderhyden BC, Cohen JN and Morley P. 1993. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology*, 133:423-426.
- Wang W and Niwa K. 1995. Effects of epidermal growth factor (EGF) and gonadotropins on cumulus expansion and nuclear maturation of pig oocytes in serum-free medium. *Assist. Reprod. Technol. Androl.*, 7:41-55.
- Ward FA, Enright BP and Boland MP. 2000. Effect of group size and oocyte to medium volume post-fertilization on the development of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 53:306(abstr.).
- Yoshida M, Ishigaki K and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 88:1-8.
- Yoshida M, Ishigaki K and Pursel VG. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:68-71.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T and Nagai T. 1993. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 39:1303-1311.
- Yuan YQ, Soom AV, Laevens H, Coopman F, Peelman L and Kruif A. 2000. Single embryo culture affects hatching rate in bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology*, 53:307 (abstr.).

---

(접수일: 2004. 4. 20/ 채택일: 2004. 7. 15)