

ICSI에 의한 돼지 수정란의 발달 I. 난자의 활성화와 정자의 수정능력 획득 유기 효과

문승주 · 안승주 · 강만중 · 김광현[†]
전남대학교 농업생명과학대학 농업과학기술연구소 동물자원학부

Development of Porcine Embryos Following Intracytoplasmic Sperm Injection

I. Effect of Activation and Sperm Capacitation

S. J. Moon, S. J. Ahn, M. J. Kang and K. H. Kim[†]

Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci. and Tech., College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of oocyte activation after ICSI and of capacitation of insemination sperm before ICSI in Swine. There was no significant difference on cleavage rate and blastocyst developmental rate treated with ethanol, cycloheximide, or ethanol and cycloheximide jointly between treatment and control groups. However, significantly difference was found on cleavage rate and blastocyst developmental rate treated with caffeine and Ca-ionophore on capacitation of insemination sperm before ICSI ($p<0.05$). There was no significant difference on pronuclear formation rate and total oocyte activation rate treated with oocyte activation after ICSI between treatment and control groups, but was significant difference on pronuclear formation rate and total oocyte activation rate treated with capacitation treat of sperm ($p<0.05$).

(Key words : porcine, ICSI, activation, sperm capacitation)

서 론

세포질내 정자 직접 주입(Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI)은 성숙난자의 세포질내 정자를 직접 주입하는 기술로 성계 난자내에 정자를 미세주입하여 수정란 발생을 처음 보고한 후(Hiramoto, 1962) 수정과정을 명확하게 이해하고 수정을 향상을 도모하기 위하여 연구되어 왔다. 사람의 경우, 남성에게 기인한 불임치료를 목적으로 많은 연구

(BarHava 등, 1977; Holden 등, 1977; Hoover 등, 1997; Jimeneg 등, 1977; Novero 등, 1977; Palermo 등, 1992; Turcker 등, 1996)가 수행되고 있으며, 햄스터(Mehara와 Yanagimachi, 1996), 토끼(Hosey 등, 1988), 면양(Catt 등, 1996), 말(Cochran 등, 1998), 소(Goto 등, 1990)와 같은 동물에서도 일련의 연구가 보고되고 있다. 돼지의 경우, 체외성숙난자에 정자를 직접 주입하여 60%의 수정율을 최초로 보고(Catt와 Rhodes, 1995)한 후 김 등(1999)은 돼지

* 본 논문은 2004년도 전남대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

[†] Correspondence : E-mail : swine@chonnam.ac.kr

미성숙난자에 정자를 주입하여 배반포배까지 발달할 수 있음을 보고하였다. 신선정자를 체내 성숙난자와 체외 성숙난자에 주입하였을 때 난할율이 13%와 14%, 동결정자를 주입하였을 때 난할율이 16%와 8%로 차이가 없음을 보고하였다(Kolbe와 Holty, 1999). 또한 Martin(2000)은 돼지 난자에 정자를 직접 주입 48시간 후 69% 난자가 생존하였고 1마리의 수란돈에 이식하여 3마리의 산자가 출생하였다고 보고하였다. 한편 수정율과 수정 후 배발달율을 높이기 위하여 정자의 침체반응 유기 후 ICSI 성적은 응성전핵 형성율을 높이고(Perreault 등, 1988; Rho 등, 1998) 난할율과 배반포배 발달율에 영향을 미친다(Lacham Kaplan과 Troussam, 1995; Chen과 Seidel, 1997; Martin, 2000; Cesare Gall, 2003)고 보고되고 있다. 한편 ICSI 후 난자의 활성화 처리는 난할율과 배반포배 발달율에 높은 영향을 미친다(Chen과 Seidel, 1997; Chang 등, 2000; Cesare Galli 등, 2003)고 보고되고 있으나 다른 연구자들(Kolbe와 Holty, 1999; 조 등, 2001)은 영향을 미치지 않았다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 ICSI에 의한 체외수정란의 생산효율을 증진시키기 위하여 돼지 체외 성숙난자의 세포질내 정자주입 후 난자의 활성화 효과와 세포질 주입 전 정자처리 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살된 돼지 중 정상생식기를 가진 암돼지로부터 난소를 적출, 35°C, 0.9%의 생리식염수에 보존하여 실험실로 운반한 후 18-gauge 주사기를 이용 직경 3~6mm 난포로부터 난포액을 흡입하여 난포란을 채취하였다. 채취된 난포란은 실체현미경(Nikon, Japan)하에서 난구세포의 치밀도에 따라 다음과 같이 판정하였다. A등급은 난구세포로 난자의 대부분이 둘러싸여 있으며 난세포질이 균일한 것, B등급은 난세포질이 균일하나 일부분이 적게 보이는 것, 난구세포질이 거의 벗겨져 있고 전체적으로 난세포질이 어두워 보이는 것은 C등급, 난구세포층이 사방으로 퍼져 있고 난세포질이 균일하지 않은 것은 D

등급으로 분류하여 A와 B등급에 해당하는 난포란만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

2. 난포란의 체외 성숙

난포란의 체외성숙은 15%의 fetal bovine serum (FBS, Hyclon, USA)가 함유된 Whitten's 배양액을 사용하였다. 선별된 난포란을 PMSG 10IU/ μ L의 호르몬이 첨가된 배양액을 pH 7.2로 조절, 0.2 μ m syringe filter로 여과한 후 4 well dish에 500 μ L씩 분주, mineral oil(Sigma, USA)로 피복한 다음 각 well당 난포란을 50개씩 옮겨 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22시간동안 배양하였고 이후 호르몬이 첨가되지 않은 15% FBS가 함유된 Whitten's 배양액하에서 22시간 배양함으로써 총 44시간 배양시켜 체외성숙을 유도하였다.

3. 정자의 준비

맨손 채취법으로 채취한 정액은 동량의 BSA-saline과 혼합 200g에서 3분간 원심분리 후 상층액은 동량의 BSA-saline과 혼합 1200g에서 3분간 2~3회 원심분리하에 세정하였다. 세정 후 10mM caffeine과 100 μ m Ca-ionophore가 첨가된 TCM-199 배양액과 혼합 CO₂ 배양기(39°C, 5% CO₂)에서 각각 2시간과 15분 동안 배양 수정능획득을 유기하였다.

4. Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

44시간 체외성숙된 난자는 0.1% hyaluronidase가 첨가된 D-PBS 배양액으로 vortexing후 제 1극체가 선명하고 세포질이 균일한 성숙난자만을 선별 사용하였다. 세포질내 정자 주입은 micromanipulator(Narishige Co, Japan)를 이용하였으며 injection pipette은 내경 6~7 μ m, 외경 8~9 μ m, holding pipette은 내경 10~15 μ m, 외경 100~120 μ m로 제작 사용하였다. 정자주입시 정자 운동성을 저하시키기 위하여 10% PVP가 첨가된 D-PBS drop에서 정자꼬리를 먼저 injection pipette으로 흡인하여 0.4% BSA가 첨가된 난자용 D-PBS drop으로 이동시킨 후 성숙난자의 제 1극체가 6시 또는 12시 방향으로 향하도록 holding pipette으로 고정시킨 후 난자의 적도 부근 약간 아래(4시 방향)에서 난자세

포질내에 injection pipette을 진입 세포질 내용물을 약간 흡인 후 정자를 세포질내로 진입시켰다.

5. 난자의 활성화 처리

ICSI 후에 10% ethanol을 포함하는 15% FBS가 함유된 TCM-199 배양액에서 10분간 처리와 5 µg/mL cycloheximide을 포함하는 배양액에서 6시간 단독 또는 병용처리하였다.

6. 체외배발달

ICSI후 0.4% BSA가 함유된 Whitten's 배양액에 옮겨 CO₂ 배양기(39°C, 5% CO₂)에 배양 체외배발달 성적을 조사하였다.

7. 통계분석

본 연구 결과 얻어진 자료는 SAS package를 이용 분산분석을 실시하였으며 처리간 유의성 검정은 LSD방법으로 검정하였다.

결과 및 고찰

1. ICSI 후 난자의 활성화 처리 효과

돼지 체외성숙 난자에 정자 주입 후 ethanol과 cycloheximide 단독처리와 ethanol과 cycloheximide를 병용 처리, 그리고 정자 주입 없이 활성화 처리한 후 난할율과 체외배양 7일째의 체외배발달 성적은 Table 1과 같다. ICSI 후 활성화 처리하지

않은 경우 난할율은 57.3%를 보였고 ethanol, cycloheximide 단독 및 병용처리 시 58.0%에서 61.8% 그리고 정자 주입 없이 활성화 처리시 난할율이 56.1%로 통계적인 유의차가 없었다($p < 0.05$). 또한 7일째 조사된 체외배 발달 성적은 활성화 처리 시 배반포 발달율이 22.0%, 20.7% 그리고 25.5%로 처리하지 않을 경우의 20.3%와 비교할 때 통계적인 유의차가 없었다($p < 0.05$). 이러한 결과는 Chung 등(2000)이 ionomycin 단독처리와 ionomycin과 DMAP 병용 처리 시 병용 처리구에서 난할율과 배 발달율이 유의적으로 높았다($p < 0.05$)는 보고와 Chen과 Seidel(1997)이 50mM A23187과 7% ethanol로 ICSI 후 활성화 처리 시 처리하지 않은 구에 비하여 유의적으로 높았다($p < 0.05$)는 보고와는 상이한 결과를 보였다. 그러나 Klobe와 Holz(1999)는 ICSI 후 돼지 난자를 Ca-ionophore로 활성화 처리 시 무처리구에 비하여 오히려 낮은 성적을 보였다고 하였고, Galli 등(2003)은 ICSI 후 소 난자에 ionomycin과 cycloheximide를 단독 및 병용 처리 시 난할율과 배반포배 발달율에 유의적인 차이가 없었다($p < 0.05$)는 보고와는 다소 다른 결과를 나타내었다. 이러한 차이는 동물종간의 차이와 함께, 활성화 유기 방법, 사용한 배양액의 차이 그리고 ICSI의 기술적인 차이에 기인한 것으로 생각된다.

2. 세포질 내 주입 정자의 전처리 효과

난자의 세포질내 주입할 정자를 caffeine과 Ca-

Table 1. Development of ICSI and pathenogenic embryos activated by ethanol and cycloheximide or ethanol and cycloheximide

ICSI (+/-)	Activation	No. of oocyte examined	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of oocytes fragmented	No. (%) of blastocyst at day 7
+	-	103	59(57.3)	44(42.7)	12(20.3) ^b
+	ethanol	100	59(59.0)	41(41.0)	13(22.0) ^b
+	cycloheximide	100	58(58.0)	42(42.0)	12(20.7) ^b
+	ethanol+cycloheximide	110	68(61.8)	42(38.2)	17(25.0) ^b
-	ethanol+cycloheximide	132	74(56.1)	58(43.9)	0(0.0) ^a

^{a,b} : within column, values with different superscripts are different, ($p < 0.05$).

Table 2. Development of ICSI embryo injected with sperm capacitated with caffeine and Ca-ionophore

Group	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of oocytes fragmented	No. (%) of blastocyste at day 7
Control	80	37(46.2) ^a	43(53.8) ^a	8(21.6) ^a
Caffeine	80	48(60.0) ^b	32(40.0) ^b	16(33.3) ^b
Ca-ionophore	80	51(63.8) ^b	20(36.3) ^b	19(37.3) ^b

^{a,b} : within column, values with different superscripts are different, ($p < 0.05$).

ionophore로 수정능력 획득을 유기한 후 ICSI 결과는 Table 2와 같다. 정자 주입 후 48시간째 난황율은 caffeine 처리시 60.0%, Ca-ionophore 처리시 63.8%로 대조구의 46.2%에 비하여 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 또한 배발달율은 caffeine 처리와 Ca-ionophore 처리에서 각각 33.3%와 37.3%로 대조구의 21.6%보다 유의적으로 높았다. Galli 등(2003)은 체외수정된 소 난자의 세포질 내 2mM DTT로 전처리된 정자를 주입한 결과 배반포 발달율이 배양 7일째 21.7%로 처리하지 않은 경우의 4.9%보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$)고 보고하였다. 또한 Perreault 등(1998), Rho 등(1998)도 5mM DTT로 주입전 정자를 전처리했을 때 응성전핵 형성율이 높아진다고 보고하였고, Calvine 등(1971) Olson 등(1976), Sutovsky 등(1997), Martin(2000)과 같은 연구자들도 DTT 처리 후 정자의 형태학적 변화와 정자막 단백질의 변화가 응성전핵 형성에 영향을 미치고 수정율과 배반포배 발달율에도 영향을 미

친다고 보고하였다. 또한 Trounsom 등(1994)도 ICSI 전 정자를 Ca-ionophore로 전처리 후 난세포질내 주입시 전핵형성과 배반포 발달율이 높았다는 보고 등 일련의 연구 결과들과 비교할 때 본 연구 결과 또한 일치하는 경향을 보였다.

3. 난자의 활성화와 정자의 전처리가 전핵 형성에 미치는 효과

난자의 활성화 처리와 세포질내 주입전 정자의 전처리가 ICSI후 전핵 형성율에 미치는 효과는 Table 3과 4에 제시하였다. ICSI 후 2개의 전핵 형성과 2개의 극체가 형성되었을 때 정상적인 수정으로 판단하는 데, Table 3에 제시한 바와 같이 정자 주입없이 난자를 활성화 처리했을 때 2PN 형성율이 13.3%인 반면 ICSI 후 난자의 활성화 처리구에서 50.0%에서 58.5%의 2PN 형성율을 보여 통계적인 유의차($p < 0.05$)가 인정되었으나 무처리구에서 50.8%의 형성율을 보여 ICSI후 난자의 활성화

Table 3. Pronuclear formation in porcine oocytes at 20 to 24hr following intracytoplasmic sperm injection and activation with ethanol and cycloheximide of ethanol and cycloheximide

ISCI (+/-)	Activation	No. of oocyte examined	No. of pronucleio(%)			Total activation
			1PN	2PN	3PN	
+	-	65	5(7.7) ^a	33(50.8) ^a	6(9.2) ^a	44(67.7)
+	ethanol	60	4(6.7) ^a	32(53.3) ^a	6(10.0) ^a	42(70.0)
+	cycloheximide	62	6(9.7) ^a	31(50.0) ^a	5(8.1) ^a	42(67.7)
+	ethanol+cycloheximide	65	6(9.2) ^a	38(58.5) ^a	3(4.6) ^a	47(72.3)
-	ethanol+cycloheximide	60	30(50.0) ^b	8(13.3) ^b	0(0.0) ^b	38(63.3)

^{a,b} : within column, values with different superscripts are different, ($p < 0.05$).

Table 4. Pronuclear formation in porcine oocytes at 20 to 24hr following intracytoplasmic sperm injection and sperm capacitation with caffeine and Ca-ionophore

Group	No. of oocytes examined	No. of pronucleio(%)			Total activation
		1PN	2PN	3PN	
Control	40	2(5.0)	21(52.5) ^a	3(7.5)	26(25.5) ^a
Caffeine	40	3(7.5)	25(62.5) ^b	3(7.5)	31(77.5) ^b
Ca-ionophore	40	2(5.0)	28(70.0) ^b	0(0.0)	30(75.7) ^b

^{ab} : within column, values with different superscripts are different, ($p < 0.05$).

처리구와 무처리 구간에는 유의차가 없었으며 ($p < 0.05$) 총 활성난자를 또한 63.3%에서 72.3%로 유의차가 없었다($p < 0.05$). 이러한 결과는 정자 주입 없이 난자를 활성화 처리했을 때 배반포배발달율이 0%로 ICSI 후 활성화 처리구보다 무처리구에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 낮게 나타난 Table 1의 결과를 뒷받침하고 있다고 생각된다. 이와는 달리 주입전 정자의 전처리 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 2PN 형성율이 무처리구에서 52.5%인 반면 caffeine과 Ca-ionophore 처리구에서 각각 62.5%와 70.0%로 유의차 ($p < 0.05$)를 보였으며, 총 난자의 활성화율에서도 유의차를 보였다 ($p < 0.05$). 이러한 본 연구의 결과는 김 등(1998)의 ICSI 정상 수정율이 52~56% 정도였다고 보고한 결과와 유사한 경향을 보였으며 Galli 등(2003)이 ICSI 후 난자 활성화 처리 시 총 난자 활성화율이 처리 간에 차이가 없었다고 한 결과와 일치하는 경향을 보였다. 그러나 Chung 등(2000)은 ionomycin으로 ICSI후 난자 활성화 처리 결과 처리하지 않은 경우보다 2PN 형성율과 총 난자 활성화율 모두 유의적으로 높게 나타났다고 한 보고와는 다른 결과를 보였다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때, ICSI후 체외 배 발달 효율을 높이기 위하여 난자의 활성화 처리는 큰 효과를 기대할 수 없으리라 사료되며 주입 전 정자의 처리는 정상 수정율이 높아지고, 난할율과 배반포배 발달율의 향상을 가져올 수 있으리라 생각된다.

적 요

본 연구는 ICSI후 돼지 난자의 활성화 처리와 ICSI전 주입정자의 수정능력 획득 유기효과를 구명하기 위하여 실시하였다. ICSI후 ethanol, cycloheximide 그리고 ethanol과 cycloheximide를 병용처리 시 난할율과 배반포배 발달율이 대조구와 처리구간에 유의적인 차이가 없었다($p < 0.05$). 그러나 ICSI전 caffeine과 Ca-ionophore로 주입정자의 수정능력 획득 유기 처리 시 난할율과 배반포배 발달율 모두 처리구에서 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 한편 ICSI후 난자활성화처리 시 전핵형성율과 총 난자 활성화율은 대조구와 처리구간에 유의차가 없었지만($p < 0.05$) 정자의 수정능력 획득 유기 처리 시 전핵형성율과 총 난자 활성화율은 처리구에서 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$).

참고문헌

- Ahmadi A, Bongso A and Ng SC. 1996. Intracytoplasmic injection of human sperm into the hamster oocyte(hamster ICSI as-say) as a test for fertilizing capacity of the male-factor sperm. J. Assist. Reprod. Genet., 13:647-651.
- Barros A, Sousa M, Olivera C, Silva J, Almeida V and Beires J. 1997. Pregnancy and birrh after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm recovered from the ejaculate. Fert. Steril., 61(6):1091-1094.
- Calvin HI and Bedford JM. 1971. Formation of disulfied bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during

- maturation in the epididymis. J. Reprod. Fertil. Supple., 13:65-75.
- Catt JW and Rhodes SL. 1995. Comparative intracytoplasmic injection(ICSI) in human and domestic species. Reprod. Fertil. Dev., 7:161-167.
- Catt SI, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WMC and Evans G. 1996. The birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilized by intra-cytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. Vet. Rec., 139:494-495.
- Goneg MC, Catt JW, Evans G and Maxwell WMC. 1998. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilized. Theriogenology., 49:1143-1154.
- Grondahl G, Hansen TH, Hossaini A, Heinze I, Gvet and Hyttel P. 1997. Intracytoplasmic sperm injection of *in-vitro* matured equine oocytes. Biol. Reprod., 57:1495-1501.
- Hamano KLX, Fuauchi K, Furudata M and Yoshiaki M. 1999. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically stored sperm heads. Biol. Reprod., 60: 1194-1197.
- Hoover L, Baker A, Check JH, Lurie D and Summers D. 1997. Clinical outcome of cryopreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 67(4):621-624.
- Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT and Chung KS. 1998. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. Mol. Reprod. Dev., 51:436-444.
- Kim NH, Shin JS, Kim C, Jun SH, Lee HT and Chung KS. 1999. Fertilization and *in vitro* development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermatid nuclei. Theriogenology, 51:1441-1449.
- Kimura Y and Yanagimachi R. Intracyto-plasmic sperm injection in the mouse. Biol. Reprod., 52:709-720.
- Lacham Kaplan O and Triunson A. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in mice : increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. Hum. Reprod., 10 (10):2642-2649.
- Martin MJ. 2000. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracyto-plasmic sperm injection. Biol. Reprod., 63:109-112.
- Motoshi M, Koto K, Tomita K, Ookutsu S and Nakanishi Y. 1996. Examination of the safety of intracytoplasmic injection procedures by using bovine zygotes. Hum. Reprod., 11(3):618-320.
- Olson GE, Hamilton DW and Fawcett DW. 1976. Isolation and characterization of the perforatorium of rat spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 47: 293-297.

(접수일: 2005. 9. 15 / 채택일: 2005. 11. 15)