

고양이 연령에 따른 발육단계별 난포의 분포와 전동난포의 배양

유일정[†] · S. P. Leibo¹ · B. C. Dresser¹ · 김용준 · 김인식 · 박영재

전북대학교 수의과대학 수의학과

Distribution of Cat Follicles among Varying Ages and Preantral Follicles Maturation

I. Yu[†], S. P. Leibo¹, B. C. Dresser¹, Y. J. Kim, I. S. Kim and Y. J. Park

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Dukjin-Dong, Duckjin-Gu,
Jeonju 561-756, Korea

SUMMARY

This study was conducted to determine the distribution of cat follicles among varying ages and produce oocytes from preantral follicles cultured *in vitro*. We used ovaries from 41 cats ranging in age from 0.3 to 5 years. Ovaries were obtained from cats undergoing routine ovariectomy at local veterinary clinics.

As a prelude to *in vitro* culture of preantral follicles, the length and the width and the weight of ovaries among cats of varying ages were measured. Ovaries were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, cut into 3 μ m-sections, mounted on slides and stained with hematoxylin and eosin. Follicles were evaluated at 200 \times and 400 \times magnification. Distribution of follicles among cats of varying ages were evaluated according to follicle classification: primordial, primary, transitional, preantral and antral follicles.

Preantral follicles were isolated by the simple mechanical procedure. Each follicle was cultured in a well containing 100 μ l of medium 199 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) or polyvinylalcohol (PVA) for 16 days. Follicle diameters were measured under inverted microscope every 4 days.

The length, the width and the weight of ovaries were increased gradually according to ages but there was not significant difference among cats of varying ages. Majority of follicles were primordial follicles (84%) regardless of cat ages ($p < 0.05$). Follicle diameter increased until 4 days of culture. However, period longer than 4 days of culture *in vitro* had a deleterious effect on follicle survival regardless of supplement (FBS or PVA). A few oocytes were collected from preantral follicles cultured *in vitro*.

These basic reproductive techniques in domestic cats can be a useful tool to save endangered feline species.

(Key words : distribution of cat follicles, preantral follicle maturation)

서 론

멸종위기에 처한 고양이과 동물을 보존하기 위

¹Audubon Center for Research of Endangered Species, New Orleans, LA 70131, USA.

[†]Correspondence : E-mail : iyu@chonbuk.ac.kr

하여 짐 고양이를 이용한 assisted reproductive technologies(ART)로서 난자의 체외 배양과 체외 수정에 관한 연구가 주를 이루고 있다(Pope, 2000; Wolfe와 Wildt, 1996; Wood 등, 1995; Goodrowe 등, 1988).

그러나 멸종위기에 처한 동물로부터 난자를 채취하여 동물을 보존하는데는 양적으로 한계성이 있다. 또한 죽은 동물에서 채취된 난자는 중요한 유전적 재료이지만 시간적으로 생존성에 한계성이 있다. 이러한 점을 감안하여 난소내의 배란에 관여되지 않고 남아있는 난포를 이용한다면 더 많은 수의 난자를 채취할 수 있다(Bolama 등, 1998; Durant 등, 1998; Jewgenow 등, 1997; Jewgenow와 Stolte, 1996).

Jewgenow와 Stolte(1996)는 사후 여러 동물의 난소로부터 전동난포(preantral follicles)를 회수하여 난포의 생존성과 전자현미경적 변화를 관찰하였다. Abir 등(1999)은 사람의 초기 난포를 배양할 수 있는 방법으로 collagen gel의 사용 여부를 관찰하였다. Bolamba 등(1997)은 개의 전동난포와 초기 동난포를 이용하여 난자의 체외 배양을 유도하였다. 그 외에도 여러 동물에서 전동난포의 체외 배양에 적합한 배양 배지 성분의 비교, 체외에서 난포의 발육과 그에 따른 난자의 성숙 등, 난포의 체외 배양에 관한 연구는 계속 시도되었다(Shuttleworth 등, 2002; Katska 등, 2000; Cecconi, 등, 1999; Jewgenow, 1998).

고양이 경우 난소의 난포 형성시 관련 있는 factor에 관한 연구, 난포의 조절에 관한 연구, 그 외 난포의 생존성과 난포-난자의 폐쇄 등에 대한 연구가 진행되었으나 고양이 난포를 이용하기 위한 기본적인 연구가 이루어지지 않고 있다(Bristol과 Woodruff, 2004; Baker와 Spears, 1999; Wood 등, 1997).

그러므로 본 연구에서는 선행적으로 고양이 연령에 따른 난소의 무게와 크기를 비교하고 다양한 연령층의 고양이에서 난포의 종류에 따른 분포를 알아보기로 한다. 또한 전동난포를 회수하여 난포의 체외 배양 및 배양된 난포로부터 난자의 회수 가능성을 알아보기로 한다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 화학약품은 별도의 표기가 없는 한 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A.)와 Gibco(Life Technologies, Grand Island, NY, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

1. 고양이 난소의 준비

본 실험에 사용된 고양이는 0.3세부터 5세까지 총 41 마리였으며 미국, 뉴올린언즈에 위치한 개인 동물병원에서 난소 적출술 후 난소를 penicillin(100 IU/ml)과 streptomycin(0.1mg/ml)이 첨가된 0.9% saline에 담긴 플라스틱 용기에 담아 오두본 희귀동물 연구소(Audubon Center for Research of endangered species)내 실험실로 운반하였다.

총 41마리의 고양이 난소중 36마리로부터 적출된 난소는 고양이 연령별 난포의 분포를 알아보기 위해 사용되었으며, 5마리로부터 적출된 난소는 난포의 배양실험에 사용되었다.

2. 난소의 무게 및 크기 측정

난소의 물기를 제거한 후 각각 저울(sartorius, germany)과 자를 이용하여 난소의 무게와 길이와 너비를 측정하였다.

3. 난소의 조직 슬라이드 준비

난소내 난포의 분포를 알아보기 위해 난소의 조직 슬라이드는 Wood 등(1997) 방법에 준하여 준비하였다. 난소를 10% formalin의 플라스틱 병에 담아 고정하여 파라핀에 포맷한 후 $3\mu\text{m}$ -sections 으로 준비하였다. 슬라이드 위에 봉입한 후 hematoxylin과 eosin으로 염색하였다.

4. 난포의 분포 평가

Oktay 등(1995)의 방법에 준하여 난포를 Table 1과 같이 분류하였다.

각 난소마다 준비된 조직 슬라이드를 200 배율과 400 배율의 현미경(Nikon, Japan)하에서 관찰하여 난포를 분류하고 각 난포의 분포를 산출하였다. 각 난포의 분포율은 총 난포수에 대한 각 난포의 백분율로 계산하였다.

Table 1. Follicle classification

Follicles	Description
Promordial	Oocyte partially or completely encapsulated by squamous pregranulosa cells
Primary	All granulosa cells show enlargement; single layer of granulosa cells
Transitonal	1~2 layer of columnar granulosa cells; zona pellucida distinguishable
Preamstral	Oocyte encapsulated by more than 2 layers of granulosa cells; no antrum formation
Antral	Oocyte encapsulated by more than 2 layers of granulosa cells with antrum formation

5. 난포의 분리

체외 배양에 사용되는 난포는 Figueiredo 등(1994)의 방법에 준하여 효소처리 없이 단순 기계적인 방법에 의해 분리하였다. Blade를 이용하여 난소를 작은 조각으로 자른 후 난소 조각을 medium 199-Hepes에 담아 실체현미경하에서 1ml 주사기에 주사 바늘(25gauge)을 연결하여 난포를 분리하였다. 난포가 부유된 액을 100 μ m cell strainer(Flacon, U.S.A)를 이용하여 여과한 후 난포를 채취하였다.

6. 난포의 배양

분리된 전동난포(preamstral follicles)를 medium 199-Hepes와 배양배지로 세척한 후 각 난포를 배양배지(100ul)가 담긴 96 well microliter plates(Costar, U.S.A)의 각 well내로 옮긴 후 멀균된 mineral oil(100 μ l)로 덮고 배양하였다. 배양배지는 medium 199에 follicular stimulating hormone(2IU/ml), epidermal growth factor(10ng/ml), 1% ITS(insulin, transferrin, selenium)를 첨가하고 10% fetal bovine serum(FBS)나 10% polyvinyl alcohol(PVA)를 첨가하였다. 난포를 5% CO₂, 37.5°C 조건하에서 16일 동안 배양하였으며 3일마다 새 배지로 교환하였다.

7. 난포의 직경 측정

100~400 배율의 도립현미경하에서 접안렌즈에 부착된 눈금(microscope ocular scale)을 이용하여 난포의 직경을 4일마다 측정하였다.

8. 통계처리

본 연구에 의해 얻어진 실험결과의 통계처리는

one-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 분석하였으며, $p<0.05$ 일 때 유의적 차이를 인정하였다.

결과 및 고찰

1. 고양이 연령에 따른 난소의 무게와 크기

고양이 연령에 따른 난소 무게의 변화를 알아보기 위해 난소 적출술 후 측정하였을 때 0.3세에서 5세까지 고양이 난소의 무게는 0.1g에서 0.3g으로 증가하는 양상을 보이기는 했으나 유의적인 차이는 없었다(Table 2).

난소의 크기는 고양이의 연령과 관계없이 길이는 9.3cm에서 12.8cm이었으며 너비는 4.5cm에서

Table 2. The weight, the length and the width of ovaries among cats of varying ages
(n=36)

Ages (yrs)	No. of cats	Ovaries (Mean \pm SE)		
		Weight (g)	Length (cm)	Width (cm)
0.3	4	0.2 \pm 0.0	11.3 \pm 0.3	4.5 \pm 0.3
0.5	4	0.1 \pm 0.0	11.8 \pm 0.5	5.3 \pm 0.3
0.6	4	0.1 \pm 0.0	9.3 \pm 0.9	5.5 \pm 0.3
0.7	4	0.2 \pm 0.0	10.5 \pm 0.3	6.0 \pm 0.5
0.8	4	0.2 \pm 0.0	11.5 \pm 0.3	5.5 \pm 0.6
0.9	4	0.2 \pm 0.0	12.0 \pm 1.0	6.5 \pm 0.5
1	4	0.2 \pm 0.0	11.0 \pm 0.6	5.5 \pm 0.5
2	4	0.3 \pm 0.1	12.8 \pm 0.8	7.8 \pm 0.9
5	4	0.3 \pm 0.1	12.5 \pm 1.5	6.5 \pm 0.5

7.8cm이었다(Table 2).

2. 고양이 연령에 따른 난포의 분포

조직학적 관찰에 의해 고양이 연령에 따른 난포의 종류별 분포를 관찰하였을 때 고양이의 연령에 관계없이 원시난포의 분포가 그 외 난포들의 분포 보다 높게 나타났다($p<0.05$, Table 3). 난포 종류별 각 난포의 평균 분포율을 살펴보면 원시난포(primal follicle)의 평균 분포율은 84.0%이었으며, 일차 난포(primary follicle)는 8.2%, 이행성 난포(transitional follicle)는 1.5%, 전동난포(preatratal follicle)는 1.2%, 동난포(antral follicle)는 4.2%로 나타났다. 각 연령별 각 난포의 비율을 비교하였을 때 각 난포의 분포율은 연령과는 관계없이 모든 연령대에서 비슷하게 나타났다.

본 실험에 사용된 고양이는 0.3세에서 5세까지 다양하였으나 실제 고양이의 중성화 수술은 어린 나이에서 행해지기 때문에 고연령의 고양이 난소를 구하기 힘들었다. 5세 이상의 고양이 난소를 포함하여 난포의 분포를 조사할 수 있다면 연령에 따른 전반적인 난포의 분포를 알아보는데 유용할 것으로 생각된다.

고양이 난포의 종류별 특징은 Fig. 1과 같다. 원시난포는 단층의 과립층 세포(granulosa cell)로 둘러싸인 난자를 포함하여 난소의 피질 부분에 산재되어 있다. 일차 난포는 단층의 과립층 세포의 크기가 커져 입방형의 모양을 나타냈다. 그 이후 난포강을 형성하기 전의 전동난포는 과립층 세포의 수가 증가하고 동난포는 난포강이 형성된 모양을 나타냈다.

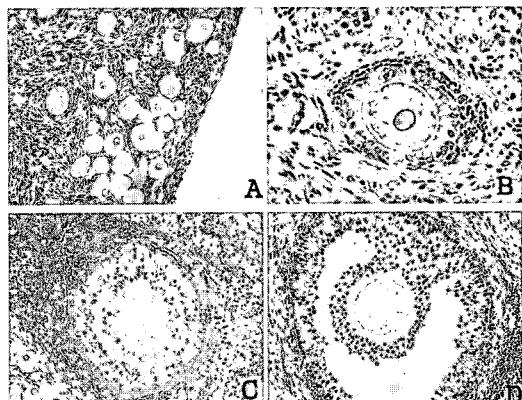


Fig. 1. Cat follicles. A: Primordial follicles (200x), B: Primary follicle (400x), C: Preatratal follicle (200x), D: Antral follicle (200x).

Table 3. Distribution of ovarian follicles among cats of varying ages (n=36)

Ages (yrs)	No. of cats	Distribution of follicles (%), Mean±SE)				
		Primordial	Primary	Transitional	Preatratal	Antral
0.3	4	81.6±2.9 ^a	9.1±1.8 ^b	3.2±0.6 ^b	1.7±1.2 ^b	4.7±1.1 ^b
0.5	4	87.2±3.1 ^a	6.5±1.4 ^b	1.9±0.6 ^b	1.9±0.6 ^b	2.8±1.0 ^b
0.6	4	85.0±1.6 ^a	8.8±0.2 ^b	0.8±0.5 ^b	0.9±0.6 ^b	4.5±1.1 ^b
0.7	4	82.3±3.8 ^a	6.5±1.5 ^b	0.4±0.1 ^b	0.9±0.2 ^b	3.1±2.1 ^b
0.8	4	74.9±3.8 ^a	15.5±1.2 ^c	1.2±0.3 ^b	1.0±0.2 ^b	7.4±2.8 ^{b,c}
0.9	4	92.0±1.2 ^a	6.4±1.3 ^b	0.3±0.2 ^b	0.3±0.0 ^b	1.2±0.4 ^b
1	4	87.2±0.9 ^a	8.4±0.6 ^b	0.7±0.1 ^b	0.5±0.0 ^b	3.4±0.4 ^b
2	4	81.5±4.3 ^a	7.1±0.8 ^b	3.7±2.1 ^b	1.9±0.8 ^b	5.8±1.1 ^b
5	4	85.1±3.2 ^a	6.2±0.5 ^b	1.8±1.2 ^b	2.2±0.7 ^b	5.5±1.3 ^b
Mean±SE		84.0±1.6	8.2±0.9	1.5±0.4	1.2±0.2	4.2±0.6

^{a~c} Different superscripts within the same column and row are significantly different ($p<0.05$).

3. 난포의 배양과 난포 크기의 측정

배양시간에 따른 난포의 직경을 4일마다 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 난포를 4일 이상 배양하였을 때 배양액의 조성성분과 관계없이 난포의 직경은 급격히 감소하였다. 난포를 체외에서 4일 이상 배양하는 것은 난포의 발달에 해로운 영향을 끼치는 것으로 생각된다. Cecconi 등(1999)도 양의 전동난포를 채취하여 6일 이상 배양하였을 때 난포의 생존성에 해로운 영향이 있음을 시사했다. Abir 등(1999)도 사람의 난포를 collagen gels에 배양하였을 때 24시간 배양 후에 난포가 자라지 않았음을 발표했다.

난소로부터 분리된 난포의 크기는 약 $70\text{ }\mu\text{m}$ 이었으며, 난포를 10% FBS가 첨가된 배지에 4일간 배양하였을 때 난포의 크기는 $120\text{ }\mu\text{m}$ 로 증가한 반면 10% PVA가 첨가된 배양액에 배양된 난포는 $100\text{ }\mu\text{m}$ 로 증가하였다. 그러나 4일 이후에는 배지에 관계없이 난포의 직경은 급격히 감소하여 난포가 변성되고 있는 것으로 생각된다.

난포가 배양됨에 따라 일정한 시기까지는 난포의 직경이 커짐으로 난포의 성숙을 간접적으로 확인하였으나 일부의 난포만이 실제적인 성숙, 즉 난포강을 형성하여 난포로부터 난자를 회수할 수 있었다(Fig. 3). 그러나 회수된 난자는 난핵포(Germlinal Vesicle)상태였다.

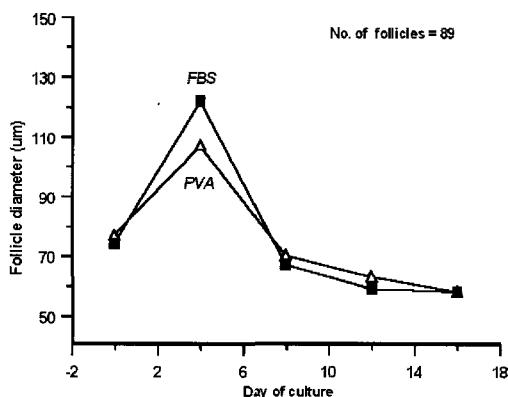


Fig. 2. Follicle growth in culture of Medium 199 supplemented with 10% FBS or PVA. The mean diameter of follicle is shown according to culture periods.

본 실험의 궁극적인 목적은 난소로부터 난포를 분리하여 난포를 체외에서 성숙시켜 난포내의 난자의 사용 가능성을 알아보기자 하는데 있다. 그러나 난포의 분리시 높은 분포율을 보인 원시 난포의 분리가 어려웠으며 상대적으로 분리가 용이한 전동난포의 분포율은 낮아 충분한 수의 전동난포의 회수가 어려웠다. 실험에 사용될 수 있는 전동난포의 수가 제한적이다. 그러므로 원시 난포를 분리하는 방법에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Abir 등(1999)은 난포의 체외 배양은 중간 또는 난포의 성숙 단계(stage)의 특이성에 따라 결과가 다르게 나타날 수 있음을 시사했다. 그러므로 난포의 성장에 필요한 요인들의 평가와 배양배지 성분과 배양조건도 중간이나 난포 성숙 단계에 따라 연구되어야 한다고 생각된다.

Cortvriendt와 Smith(2001)는 난포의 체외 배양은 미래 사람의 수태성 보존뿐만 아니라 희귀동물종의 보존, 연구를 위한 난자은행의 건립에 응용될 수 있음을 시사했다. 또한, Netwon과 Illingworth(2001)는 난자의 동결과 융해시 난자의 손상을 완화시키는 방법의 하나로 난소 조직을 동결보존하

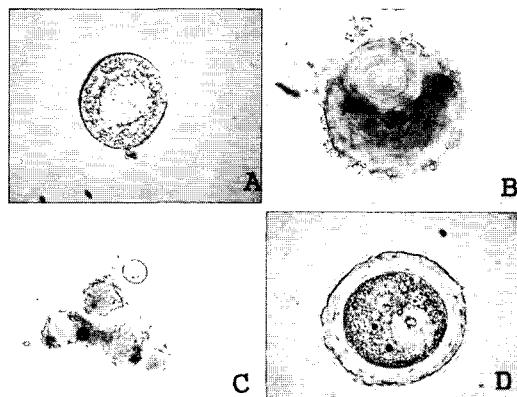


Fig. 3. *In-vitro* growth of cat preantral follicle. A: Isolated cat preantral follicle (200x), B: Follicle cultured for 4 days in medium 199 supplemented with 10% FBS (200x), C: Oocytes freed from the follicle on day 4 of *in vitro* culture (100x), D: Oocyte at the germinal vesicle stage on day 4 of *in vitro* follicle culture (400x).

고 용해하여 난소의 조직내 난포를 이용하는 것도 유용할 것으로 생각했다.

적 요

고양이의 연령에 따른 난포의 분포를 알아보고 난포의 배양과 난자 생산의 가능성을 알아보기자 0.3세부터 5세까지의 총 41 마리 고양이를 난소 적출술 후 사용하였다.

고양이 난소의 무게와 크기를 측정하고 난포의 분포를 알아보기 위해 난소를 10% formalin에 보관한 후 고정된 난소를 $3 \mu\text{m}$ -sections으로 자른 후 조직 슬라이드를 준비하여 hematoxylin과 eosin으로 염색하였다. 난포의 분포를 200 배율과 400 배율 현미경 하에서 평가하였으며 난포를 원시 난포(primordial), 일차 난포(primary), 이행성 난포(transitional), 전동난포(preantral), 동난포(antral)로 분류하여 관찰하였다.

단순 기계적인 방법에 의해 전동난포(preatratal follicles)를 분리하여 배양배지가 담긴 96 micro-liter plates well로 옮겨 배양하였다. 난포의 배양액은 Medium 199에 1% ITS(insulin, transferrin, selenium)를 첨가하고 10% FBS나 10% PVA를 첨가하여 사용하였으며 배양배지 위에 mineral oil를 덮고 16일 동안 난포를 배양하였다. 난포의 크기는 4일마다 측정하였다.

0.3세부터 5세까지 고양이 난소의 무게는 0.1g에서 0.3g으로 증가하는 양상을 보이기는 했으나 유의적인 차이가 없었다. 난포의 분포는 고양이의 연령에 관계없이 원시난포의 분포가 그 외 난포들의 분포보다 높게 나타났다($p<0.05$). 난포를 4일 이상 배양하였을 때 배양액의 조성성분과 관계없이 난포의 크기가 감소하였으며, 체외 배양된 난포로부터 적은 수의 난자만을 회수할 수 있었다.

많은 수의 원시 난포 등을 분리하기 위한 유용한 난포 분리법과 난포의 배양에 필요한 기타 성분들의 비교 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되며 이러한 점 고양이를 이용한 기초 번식 기술은 미래에 멸종위기에 처한 고양이 과 동물을 보존하기 위한 중요한 방법이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구에 도움주신 Ms. Melissa Johnston에 감사하며 고양이 난소를 제공해 주신 New Orleans 지역의 수의사: Drs. Joe Dalgo, Carol Duplechain, Stephen Hebert, Jack Johnson, Susan Oliver, Gerard salles에 감사합니다.

참고문헌

- Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E, Orvieto R and Ben Rafael Z. 1999. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Hum. Reprod.*, 14: 1299-1301.
- Baker SJ and Spears N. 1999. The role of intraovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Hum. Reprod. Update*, 5:153-165.
- Bolamba D, Borden-Russ KD and Durrant BS. 1997. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in and advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49:933-942.
- Bristol Sk and Woodruff TK. 2004. Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor beta superfamily ligands in the feline ovary. *Biol. Reprod.*, 70:846-859.
- Cecconi S, Barboni B, Coccia M and Mattioli M. 1999. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol. Reprod.*, 60:594-601.
- Cortvrindt R and Smithz J. 2001. *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod. Dom. Anim.*, 36:3-9.
- Durant BS, Pratt NC, Russ KD and Bolamba D. 1998. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49:917-932.
- Figueiredo JR, Hulshof SCJ and Van den Hurk R. 1994. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1333-1346.
- Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmitz PM

- and Wildt DE. 1988. Developmental cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 39:355-372.
- Jewgenow K. 1998. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology*, 49:1567-1577.
- Jewgenow K and Stolte M. 1996. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats-viability and ultrastructural investigations. *Anim. Reprod. Sci.*, 44:183-193.
- Jewgenow K, Blottner S, Lengwinat T and Meyer HHD. 1997. New method for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 51:33-39.
- katska L, Alm H and Rynska B. 2000. Nuclear configuration of bovine oocytes derived fresh and *in vitro*-cultured preantral and early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, 54:247-260.
- Newton H and Illingworth P. 2001. *In-vitro* growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. *Hum. Reprod.*, 16:423-429.
- Oktay K, Schenken RS and Nelson JF. 1995. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol. Reprod.*, 53:295-301.
- Pope CE. 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, 53:163-174.
- Shuttleworth G, Broughton Pipkin F and Hunter MG. 2002. *In vitro* development of pig preantral follicles cultured in a serum-free medium and the effect of angiotensin II. *Reproduction*, 123: 807-818.
- Wolfe BA and Wildt DE. 1996. Development to blastocysts from *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat oocytes following prolonged cold storage ex situ. *J. Reprod. Fertil.*, 106:135-141.
- 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.
- Wood TC, Montali RJ and Wildt DE. 1997. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:190-200.

(접수일: 2005. 12. 19 / 채택일: 2006. 2. 25)