

## 한우 난구 복합체의 체외발생에 있어서 FGF(Fibroblast Growth Factor)가 미치는 영향

최선호<sup>†</sup> · 조상래 · 김현종 · 최창용 · 한만희 · 손동수 · 정연길<sup>1</sup> · 星宏良<sup>2</sup>  
농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장

### Effects of FGF on Embryonic Development *In Vitro* in Hanwoo COCs

S. H. Choi<sup>†</sup>, S. R. Cho, H. J. Kim, C. Y. Choe, M. H. Han, D. S. Son,  
Y. G. Chung<sup>1</sup> and H. Hoshi<sup>2</sup>

Animal Genetic Resources Station, NLRI, RDA

#### SUMMARY

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 (cumulus oocytes complexes) *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 FGF (fibroblast growth factor) on *in vitro* maturation and *in vitro* development of Hanwoo COCs. When the COCs were matured in HPM 199 (Inst. of Functional peptide, Japan) containing 0.1, 1 and 10 ng/ml FGF for 24 hr, maturation rates to metaphase II (70.0~75.0%) were significantly higher ( $p<0.05$ ) than that of control group (0 ng/ml FGF, 37.5%). When matured COCs with FGF were cultured in maturation medium after *in vitro* fertilization, developmental rates to blastocysts were 9.5, 0 and 2.9%, respectively, compared to 25.0% of the control group ( $p<0.05$ ). When the matured COCs with FGF were cultured in HPM 199 (IFP971, Inst. of Functional peptide, Japan) containing 10% FBS, 0.8% BSA or 0.1% PVA (polyvinyl alcohol), the blastocyst formation rates were 12.4, 12.8 and 8.5%, respectively, while the rates of matured COCs with FGF and cultured with IVMD and IVD (Inst. of Functional peptide, Japan) without serum were 38.4% and 34.8%, respectively ( $p<0.05$ ). These results suggested that FGF is available for *in vitro* maturation of bovine COCs and is not suitable for *in vitro* development, but further investigation would be need for finding the synergistic autocrine/paracrine fashion of other growth factors in early bovine embryo development.

(Key words : Hanwoo, COCs, FGF, *in vitro*, maturation, development)

#### 서 론

소의 체외 수정에 있어서 단순 배양액의 이용은 10여년 전부터 성행하기 시작하였으며, 주로 단백질,

아미노산, 비타민 그리고 약간의 growth factor 와 insulin 등을 첨가하거나 혹은 첨가하지 않은 배양액에서 수정란의 발달을 조사하였다. 여러 가지 종류의 growth factor들은 수정란의 발달 과정 중

<sup>1</sup> 이티바이오텍(ET Biotech)

<sup>2</sup> 일본 기능성펩티드연구소(Institute of Functional Peptide, Japan)

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

수정란에서 혹은 자성 생식 기관에서 분비되는 것으로 알려져 있다. 세포 성장 인자가 mouse 수정란의 체외발달에 상호작용을 하고 있다고 보고 (Paria와 Dey, 1990)한 이후 배양액에 다양한 종류의 growth factor의 첨가를 시도하였으며, 이와 함께 growth factor는 autocrine 작용에 의해 수정란이 세포 성장 인자를 생산한다고 믿고 있었다. Growth factor(EGF; epidermal growth factor, TGF- $\alpha$ ; transforming growth factor- $\alpha$ )들은 소 난포의 과립막세포의 분화를 촉진하고 난자의 성숙을 돕는다고 하였으며, 대난포의 경우는 gonadotropin이나 inhibin 등의 steroids에 의해 과립막세포와 협막세포의 분화를 촉진하여 난포의 발달을 촉진한다고 하였다 (Monniaux 등, 1997). 이들은 또한 수정란과 모체와의 신호 전달의 중간 매개체로서 착상전 그리고 착상시 내막에 의해 생산된다고 보고되었다(Nelson 등, 1992; Tamada 등, 1991). 그 중 EGF는 수정란의 세포수를 증가시킨다고 하였으며, 수정란의 단독 배양 시에도 여러 개를 군집으로 배양한 것과 같이 세포수가 증가한다고 하였다. 또한 TGF- $\beta$ 는 내세포피(ICM)의 수를 증가시킨다고 하였으며, 이것은 수정란에 직접 작용하기도 하지만, 자궁이나 난관의 상피세포에 작용함으로써 많은 영향을 미친다고 하였다(Marquand-LeGuinne 등, 1989). TGF- $\beta$  superfamily는 난소를 포함한 여러 조직과 기관의 기능에 많은 영향을 준다고 알려져 있으며, 아주 초기의 난포 및 난모세포의 성장촉진에 중요한 역할을 한다고 하였다. 특히 난포 발달의 마지막 단계에 과립막세포와 협막세포(Skinner와 Coffey, 1988)의 기능을 향상시키는 autocrine/paracrine의 매개물질로서 중요한 역할을 한다고 하였다(Philip과 Claire, 2003). 그리하여 TGF- $\beta$ 와 bFGF의 상승효과를 기대하여 공동첨가 하였을 때, 소 수정란의 *in vitro* block은 극복할 수 있었으나, 배반포의 형성은 극히 저조하였다. 이와 같이 TGF- $\beta$ 를 비롯한 growth factor들은 난포에서 난자의 성숙에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 각각 단독 처리의 결과는 알 수가 없었다. 특히 세포의 분화에 작용하는 FGF는 세포의 조면 소포체의 골지체에 의존하여 분비되거나, mechanism을 형성하고 있는 것으로 알려져 있으며, 조직내 널리 분포되어

있고, 세포의 진화를 통하여 널리 작용을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 더욱이 체내의 생물학적 작용 기전에 대하여는 명확하게 알려져 있지 않은 형편이다. 그러나 체외의 작용 기전에 대하여는 세포의 분화, 기질 형성, 세포 이동 등의 세포 작용에 긴밀히 작용하며, TGF- $\beta$ (Larson 등, 1992)와 더불어 세포의 기질의 steroid 생산(Sordoillet 등, 1992)과 침착 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으므로(Baird와 Klagsbrun, 1991), 이는 난자 형성에 FGF의 역할이 크다는 것을 증명한다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 FGF가 난포란의 체외 성숙에 미치는 영향과 동시에 체외 성숙된 난포란의 체외 발달을 조사하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난소 채취 및 난포란의 체외 성숙

도축 암소의 난소를 25°C의 생리 식염수에 침지하여 실험실로 운반하였고, 난소를 깨끗한 생리식염수로 3회 이상 세정한 후 70% 알코올을 사용하여 난소의 표면을 소독하였다. 난포란의 채취를 위해서 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 직경 2~6 mm 난포의 난소 실질을 주사침으로 삽입하면서 난포를 찢어 난포액과 함께 흡입하여 채취하였으며, 채취된 난포액에서 난구 세포가 충분한 난포란만을 선별하여 본 시험에 공시하였다. 난포란의 배양을 위하여 0.1% PVA-HPM 199(Inst. of Functional peptide, Japan: IFP971) 배양액을 이용하였으며, 난포란의 체외 성숙을 위해서 FGF(Sigma, USA)를 0, 0.1, 1, 10 ng/ml의 농도로 HPM 199 배양액에 첨가하였다. 핵성숙도의 평가는 6, 12, 24시간 후에 관찰하였으며, Basic Fuchsin을 이용한 rapid staining 방법(Byun 등, 1991)을 이용하여 핵상의 변화를 조사하였다.

### 2. 체외 성숙 난자의 체외 수정 및 체외 발달

Caffein과 heparin이 함유된 BO 배양액으로 한 우 동결 정액을 사용하여 체외 수정능 획득 반응을 유도하였다. 체외 수정 정자의 최종 농도는  $1 \times 10^6$  cells/ml로 조정하였으며 체외 성숙된 난포란을 이용한 체외 수정시간은 8시간 이상 실시하였

다. 체외 수정 후 체외 발달율을 조사하기 위하여 50  $\mu$ l 배양액 drop에 체외발달을 유도하였다. 또한 소 난포란의 체외 발달율을 조사하기 위하여 FGF로 체외 성숙된 난자를 체외 수정 후, 0.1% PVA-HPM 199, 10% FBS-HPM 199, 0.8% BSA-HPM 199 배양액과 IVMD(Inst. of Functional peptide, Japan), IVD(Inst. of Functional peptide, Japan)로 체외배양을 실시하여 배발달율을 조사하였다.

### 3. 실험 결과에 대한 통계 분석

각 생리 활성 물질을 첨가하여 얻어진 체외 성숙율 및 체외 발달율 그리고 배양액에 따른 체외 발달율은 Statview 통계 program의 ANOVA test를 이용하여 통계 분석을 실시하였다.

## 결 과

1. FGF의 첨가에 의한 한우 난포란의 체외 성숙 한우 난포란의 체외성숙 시 FGF의 첨가에 의한 영향은 Table 1과 같다. 난포란의 체외 성숙은 6시

간체에 GV가 개시되었으며, 12시간째부터 Met I의 형태를 보이기 시작하였고, 24시간째에는 Met II까지의 성숙율은 FGF 첨가군이 70.0~75.0%로서 무첨가 대조군의 37.5%에 비해 유의적으로 높았으며( $p < 0.05$ ), FGF 처리 농도에 의한 성숙율의 차이는 인정되지 않았다.

2. FGF에 의해 체외 성숙된 한우 난자의 체외 수정에 의한 배발달율

FGF로 체외 성숙되었던 난자를 체외 수정하여 얻은 수정란의 체외 발달에 미치는 FGF의 효과는 Table 2와 같다. FGF의 첨가 농도(0, 0.1, 1, 10 ng/ml)에 따라 분할율은 56.8~85.7%로 유의적인 차이가 인정되지 않았으나( $p > 0.05$ ), 배반포 발달율은 각각 25.0, 9.5, 0, 2.9%를 나타내어 무첨가 대조군에 비해 FGF 첨가군에서 낮았다( $p < 0.05$ ).

3. FGF로 체외 성숙된 한우 난자의 체외 수정 후 다양한 체외 배양액에 의한 배발달율

FGF로 체외 성숙된 한우 난자의 체외 수

Table 1. Effects of FGF on *in vitro* maturation of Hanwoo COCs

Time	Conc. of FGF (ng/ml)	Matured COCs	No. of*			
			GV	GVBD	Met I	Met II (%)
6 h	0	9	4	5	-	-
	0.1	7	1	3	1	2(28.6)
	1	11	1	5	3	2(18.2)
	10	8	2	3	3	-
12 h	0	11	3	-	6	2(18.2)
	0.1	9	1	-	5	3(30.0)
	1	10	1	-	5	3(33.3)
	10	9	2	-	2	5(55.6)
24 h	0	8	2	-	-	3(37.5) <sup>b</sup>
	0.1	11	-	-	3	8(72.7) <sup>a</sup>
	1	10	-	-	3	7(70.0) <sup>a</sup>
	10	9	1	-	2	6(75.0) <sup>a</sup>

\*GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle break-down, Met I: metaphase I, Met II: metaphase II.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

정 후 다양한 체외 배양액 이용에 의한 배발달율은 Table 3과 같다. HPM 199를 기본 배양액으로 10% FBS, 0.8% BSA, 0.1% PVA를 첨가하였을 때의 수정율은 각각 86.7, 78.7, 84.9%를 나타내었고, 무혈청 배양액인 IVMD와 IVD에서는 각각 92.9, 88.7%의 수정율을 나타내었다( $p>0.05$ ). 그러나 배양액에 따른 배반포 형성율은 HPM 199에 10% FBS, 0.8% BSA, 0.1% PVA를 첨가하였을 때, 각각 12.4, 12.8, 8.5%를 나타내었고, 무혈청 배양액인 IVMD와 IVD에서 각각 38.4, 34.8%의 배반포 발

달율을 나타내어 유의적인 차이를 보였다( $p<0.05$ ).

## 고 찰

소에 있어서 체외 수정란의 생산은 첨단 기술 연구의 근간이 되는 수정란 이식의 한 단계이며, 난자의 성숙, 정자의 체외 수정능 획득, 체외수정 등 생식 세포의 생리 작용을 총망라한 종합 기술이라고 할 수 있다. 난포란의 핵성숙은 주로 FSH에 의해 이루어지는 것으로 알려져 체외 수정 기술의 초기에는 호르몬 첨가가 주로 체외 성숙에 이용되었고, 완벽한 난포란의 체외성숙을 이룰 수는 없었으나, 적절한 체외 성숙율을 보였고, PVA, 혈청내 BSA 등의 거대 분자 물질을 첨가하였을 때에도 70% 이상의 체외성숙율을 나타내므로 체외수정란의 생산은 적절히 이루어져 왔다. 그러나 소 수정란의 발달에 있어서 개체에 따른 차이와 실험 실적 기법에 따라 많은 차이를 보이고 있다. 체외 생산 수정란은 부적절한 조건하에서 발생되므로 필수적인 조효소, 수용체 혹은 반응 시스템 등이 부족할 것이다. 그래서 많은 연구자들이 생리 활성 인자들 간의 상호 작용에 대한 연구를 활발히 하고 있는 실정이다(Larson 등, 1992).

본 연구에서는 FGF가 난포의 과립막 세포의 분화를 촉진한다고 알려져 있으나, FGF를 이용한 난포란의 핵성숙에 대한 연구가 없어 실시한 결과

Table 2. Effects of FGF on *in vitro* development of Hanwoo COCs matured in FGF-containing medium

FGF (ng/ml)	COCs	No. of	
		Embryos cleaved (%)	Blastocysts (%) <sup>1</sup>
0	28	20(71.4)	5(25.0) <sup>c</sup>
0.1	37	21(56.8)	2( 9.5) <sup>b</sup>
1	28	24(85.7)	0( 0) <sup>a</sup>
10	50	34(68.0)	1( 2.9) <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Percentage of the number of blastocysts/cleaved embryos.

<sup>a-c</sup> Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $p<0.05$ ).

Table 3. Effects of culture media on the development of Hanwoo COCs matured with FGF and fertilized *in vitro*

Media	No. of			
	COCs	2 cell (%)	Blastocysts (%) <sup>1</sup>	Hatched blastocysts (%) <sup>2</sup>
10% FBS-HPM 199	113	89 (86.7)	14 (12.4) <sup>b</sup>	6 ( 5.3)
10% BSA-HPM 199	94	74 (78.7)	12 (12.8) <sup>b</sup>	3 ( 3.2)
0.1% PVA-HPM 199	106	90 (84.9)	9 ( 8.5) <sup>a</sup>	3 ( 2.8)
IVMD	112	104 (92.9)	43 (38.4) <sup>c</sup>	38 (33.9)
IVD	115	102 (88.7)	40 (34.8) <sup>c</sup>	38 (37.3)

<sup>1</sup> Percentage of the number of blastocysts/COCs.

<sup>2</sup> Percentage of the number of hatched blastocysts/COCs.

<sup>abc</sup> Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $p<0.05$ ).

Table 1과 같이 FGF 첨가군이 무첨가 대조군에 비해 유의적으로 높은 성숙율을 보였으며, 첨가 농도에 따른 차이가 없이 체외 성숙이 개시됨을 나타내었으며, 이와 같은 결과는 Keefter 등(1994)과 같은 결과이었다. 그러나 체외 배양 결과 분할율은 처리군 간에 차이가 없었으나, 배반포 발달율은 대조군에 비해 FGF 첨가군이 낮았다. TCM 199 base의 배양액인 HPM 199에 혈청, BSA, PVA를 첨가한 것은 macromolecule의 효과를 기대할 수 있었으나, 체외 수정란의 생산은 거대 분자에만 의존되는 것이 아님을 보여주듯이 BSA를 위주로 한 IVMD와 IVD에서 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 이는 Yamashita 등(1999)이 배반포 생산에 동일 배양액을 이용한 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 즉 생리 활성 물질이 수정란의 배발달에 중요한 역할을 하고 있음을 나타낸다고 할 수 있다(Heyner 등, 1993; Vaughan 등, 1992; Werb, 1990). 본 연구의 결과와 같이 FGF는 체외에서 세포의 분화와 난자 형성 등에 중요한 역할을 하는 것으로 Table 1과 같이 알 수 있었으나, Sordollet 등(1992)과 같이 steroid를 체외에서 생산함으로써 난자의 분할에 영향을 미칠 것으로 기대하였으나, Leydig 세포의 배양시 steroid를 분비하나 공배양 세포가 난구 세포인 경우는 FGF의 영향에 의해 steroid가 형성되지 않는 것으로 사료된다. 결론적으로 FGF는 한우 난포란의 체외성숙에 중요한 요소이나, 체외 수정란의 배발달에는 거의 역할을 하지 못하는 것으로 나타났다. 그러나 TGF- $\beta$ 와 함께 steroid 형성을 유도한다고 함으로 공동 배양을 통한 synergy 효과에 대하여 더욱 많은 연구가 요구되며, 이와 같은 생리 활성 인자와의 autocrine/ paracrine 유형에 대한 난자의 핵성숙과 발달에 관한 연구가 더욱 더 요구된다고 하겠다.

## 적 요

소 난포란의 체외 성숙은 과립막 세포, 난자의 핵성숙을 촉진하는 미지의 혈청내의 물질뿐만 아니라, 호르몬이나 생리 활성 인자 등에 의해 촉진됨이 밝혀졌다. 이에 따라 체외 성숙 및 체외 발달에 사용되는 배양액의 조성도 복합 배양액에서 단

순 배양액으로 전환을 시도하고 있으며, 체내의 조건에 보다 더 접근하고자 하는 시도들이 수행되고 있다. 본 연구는 한우 난포란의 성숙 시 FGF의 첨가가 체외 성숙을 및 체외 수정 후 배발달에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 한우 난포란의 체외 성숙시 FGF를 0.1, 1, 10 ng/ml를 첨가하였을 때 24시간째에 Metaphase II 도달율은 각각 72.7, 70.0, 75.0%로서 무첨가 대조군의 37.5%에 유의적으로 높은 성숙율을 보였다( $p < 0.05$ ). 그러나 FGF 첨가 농도간에는 차이가 인정되지 않았다. FGF로 체외 성숙된 난포란의 체외 수정 후 배발달율은 0, 0.1, 1, 10 ng/ml FGF 첨가군에서 각각 25.0, 9.5, 0, 2.9%를 보여, 무첨가 대조군에 비해 FGF 첨가군에서 낮았다( $p < 0.05$ ). FGF로 체외 성숙된 난포란을 체외 수정 후 10% FBS-HPM 199, 0.8% BSA-HPM 199 및 0.1% PVA-HPM에 배양한 결과 12.4, 12.8, 8.5%의 배반포 발달율을 보였으며, 무혈청 배양액인 IVMD, IVD에 배양한 결과 38.4 및 34.8%의 배반포 발달율로 유의적인 차이를 나타냈다( $p < 0.05$ ). 결론적으로 FGF는 한우 난포란의 체외 성숙시 유용한 물질이나, 한우 난자의 체외 발달에는 단독의 효과를 기대할 수 없었으며, 다른 생리 활성 인자들 간의 상호 관계에 대하여 더 많은 연구가 요구된다.

## 참고문헌

- Baird A and Klagsbrun M. 1991. The fibroblast growth factor family. *Cancer Cells*, 3:239-243.
- Byun TH, Lee SH and Song HH. 1991. Development of a rapid staining method for nucleus of the oocyte from domestic animal. *Korean J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
- Flood MR, Gage TL and 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 and Schultz GA. 1993. The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology*, 39:151-161.

- Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM and 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 and 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 and Thibault C. 1989. *In vitro* culture of bovine egg fertilized either *in vivo* or *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.*, 29:559-568.
- Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C and Pisselet C. 1997. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*, 47:3-12.
- Nelson KG, Takahashi T, Lee DC, Luetke NC, Bossert NL, Ross K, Eitzman BE and McLachlan JA. 1992. Transforming growth factor- $\alpha$  is a potent mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology*, 131:1657-1664.
- Paria BC and Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interaction among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4756-4760.
- Philip GK and 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 and Coffey RJ. 1988. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor- $\alpha$  by thecal cell. *Endocrinology*, 123:2632-2638.
- Sordoillet C, Savona C, Chauvin MA, dePeretti E, Feige JJ, Morera AM and Benahmed M. 1992. Basic fibroblast growth factor enhances testosterone secretion in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. *Mol. Cell Endocrinol.*, 89:163-171.
- Tamada H, Das SK, Andrew GK and 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 and Brown KD. 1992. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *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 and 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.

---

(접수일: 2006. 6. 19 / 채택일: 2006. 6. 26)