

## 돼지 난자의 체외 수정에 있어서 난구 세포의 존재가 정자 침투율 및 배 발육에 미치는 영향

용 환 울 · 이 은 송<sup>1,†</sup>

서울대학교 치과대학 치학연구소 BK21 치의학생명과학사업단

### Presence of Intact Cumulus Cells during *In Vitro* Fertilization Inhibits Sperm Penetration but Improves Blastocyst Formation *In Vitro*

H. Y. Yong and E. Lee<sup>1,†</sup>

Craniomaxillofacial Life Science BK 21, Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University

#### SUMMARY

This study was conducted to examine the role of intact cumulus cells during *in vitro* fertilization (IVF) on sperm penetration, male pronuclear (MPN) formation and subsequent embryo development of oocytes matured and fertilized *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes obtained from the slaughtered gilt ovaries were matured for 44 h in TCM199 containing 10% porcine follicular fluid, epidermal growth factor and hormones. After maturation culture, denuded oocytes or oocytes with intact cumulus cells were coincubated with frozen-thawed boar semen for 8 h in a modified tris-buffered medium containing 5 mM caffeine and 10 mM calcium chloride. Putative zygotes were fixed and examined for sperm penetration and MPN formation (Experiments 1~3), or cultured in North Carolina State University-23 medium for 156 h (Experiment 3). In Experiment 1, sperm penetration was examined after insemination of denuded oocytes and oocytes with intact cumulus cells at the concentration of  $7.5 \times 10^5$  sperm/ml. Optimal sperm concentration for IVF of cumulus-intact oocytes was determined in Experiment 2 by inseminating intact oocytes with  $2 \sim 5 \times 10^6$  sperm/ml. In Experiment 3, denuded or intact oocytes were inseminated at the concentrations of  $7.5 \times 10^5$  and  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml, respectively, and *in vitro* embryo development was compared. Sperm penetration was significantly ( $p < 0.01$ ) decreased in cumulus-intact oocytes compared to denuded oocytes (35.2% vs. 77.4%). Based on the rates of sperm penetration and normal fertilization, the concentration of  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml was optimal for the IVF of intact oocytes compared to other sperm concentrations. The presence of intact cumulus cells during IVF significantly ( $p < 0.05$ ) improved embryo cleavage (48.8 % vs. 58.9%), blastocyst (BL) formation (11.0% vs. 22.8%) and embryo cell number ( $22 \pm 2$  vs.  $29 \pm 2$  cells) compared to denuded oocytes. In conclusion, these results suggest that intact cumulus cells during IVF inhibit sperm penetration but improve embryo cleavage, BL formation and embryo cell number of porcine embryos produced *in vitro*.

(Key words : cumulus cell, embryo development, *in vitro* fertilization, sperm penetration, pig)

#### 서 론

체외 성숙 및 체외 수정을 통한 돼지 수정란의 체외 생산은 정자 및 난자의 생리에 관한 기초 연구뿐만 아니라 수정란 이식을 통한 돼지의 생산 등 실용적인 측면에서 활발히 연구되

어 왔다(Nakai 등, 2006; Suzuki 등, 2006). 그러나 돼지 난자는 다른 동물에 비해 체외 수정 과정에서 높은 비율로 다정자 수정이 발생하며 또한 사용하는 정액의 종류에 따라 수정률 및 이후의 배 발육능에 많은 편차가 나타난다(Suzuki 등, 2005; Li 등, 2003). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해서 난구

\* This work was supported by the Research Project on the Production of Bio-organs (No. 200506020601), Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

<sup>1</sup> 강원대학교 수의학부대학 및 동물의학종합연구소(School of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University)

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : eslee@kangwon.ac.kr

세포의 제거(Gil 등, 2004; Kikuchi 등, 1993), 체외 수정 배양액의 변형(Abeydeera와 Day, 1997) 및 수정과 관련된 물질의 사용(Han 등, 2006; Hao 등, 2006) 등 높은 정자 침투율 및 정상 수정률을 얻기 위한 광범위한 연구가 수행되었다.

난구 세포는 난포 내에서 난자를 둘러싸고 있는 과립형 세포로서 체내에서는 난자가 배란되기 전 난자 성숙에 관여하는 호르몬의 작용으로 난자는 감수 분열을 개시하고 난구 세포는 hyaluronic acid의 생산과 함께 팽대된다(Salustri 등, 1989). 팽대된 난구 세포는 정자두부에서 분리되는 hyaluronidase에 의한 화학적 작용과 정자의 물리적인 침투력에 의해 난세포질 내 정자의 침입을 허용하는 첫 번째 관문이라고 할 수 있다. 포유 동물 난자의 성숙, 배란 및 수정 과정에 있어서 난구 세포가 담당하는 여러 기능에 관한 연구가 많은 동물 중에서도 진행되어 왔는데, 난구 세포는 배란 전 난자의 성숙에 관여함으로써 양(Staigmiller와 Moor, 1984), 래트(Vanderhyden과 Armstrong, 1989), 소(Chian 등, 1994) 그리고 돼지(Yamauchi와 Nagai, 1999)에서 수정 후 전핵 형성, 단정자 수정 및 수정란의 초기 발육에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 난구 세포는 배란된 난자를 수정 장소까지 운반하는 역할을 하며(Mahi-Brown과 Yanagimachi, 1983), 배란 후에는 난자에 대한 정자의 물리적 접근을 조절하는 기능을 가지고 있다(Tesarik 등, 1990). 대부분의 포유 동물에서 수정 장소에 도착한 배란 난자에는 여전히 일정 부분의 난구 세포가 부착되어 있으며(Niell, 2006; Motta 등, 1995), 난구 세포가 부착된 상태로 난자를 체외 수정할 경우 수정률이 증가한다는 것이 마우스(Fraser, 1985), 햄스터(Bavister, 1982) 및 돼지(Kikuchi 등, 1993)에서 보고되었다. 이러한 결과에도 불구하고 돼지 난자의 체외 수정에 관한 최근 연구에서는 체외 수정 전에 난자에 부착되어 있는 난구 세포를 완전히 또는 부분적으로 제거한 후 정자와 공배양하는 방법이 적용되고 있으며(Park 등, 2005; Gil 등, 2003), 실제로 난구 세포의 제거가 정자의 침투를 증가시켰다는 보고도 있다(Gil 등, 2004). 돼지에서는 난자에 부착되어 있는 팽대된 난구 세포의 존재가 정자의 침투 및 정상 수정 미치는 영향에 대하여 주로 연구가 진행되어 왔으나 체외 수정 후의 발생능에 미치는 영향에 관한 연구 결과는 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 체외 성숙 난자 및 동결 정액을 이용하여 수정 과정 중 난자에 부착되어 있는 난구 세포의 존재 여부에 따른 돼지 난자의 수정, 전핵 형성 및 체외 발육을 조사함으로써 체외 수정 과정 중 난구 세포의 역할에 대하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 정액의 채취 및 동결

인공 수정 및 자연 교배를 통하여 수태 능력이 확인된 웅돈

으로부터 정자가 풍부한 분획을 수압법으로 채취하였다. 정액의 동결은 기 발표된 본 실험실의 방법에 준하여 실시하였다(Yoon 등, 2000). 즉, 채취한 정액을 2시간 이상에 걸쳐 17℃까지 냉각하였다. 그 후 정액을 Hülsenberger VIII 희석액(Richter 등, 1975)으로 정액:희석액 = 1:2의 비율로 희석한 후 300 g에서 15분간 원심 분리하였으며, 상층액을 제거한 후 정자 농도가  $1 \times 10^9$  sperm/ml가 되도록 Beltsville F5(BF-5) 희석액(Pursel과 Johnson, 1975)으로 재부유하였다. 희석 정액을 약 1시간에 걸쳐 5℃까지 냉각시킨 후 2% (v/v) glycerol이 함유된 BF-5 희석액으로 다시 희석한 후 0.25 ml straw에 흡인하였다. 정액 straw를 액체 질소 증기에 30초간 노출시킨 후 액체 질소에 침지하여 동결하였다.

### 2. 난자의 채취 및 체외 성숙

도축장으로부터 미성숙돼지의 난소를 채취하였다. 난소를 멸균 생리식염수로 3회 세정한 후 난소 표면에 존재하는 직경 3~8 mm의 난포로부터 18-gauge 주사침이 연결된 주사기를 이용하여 난자 및 난포액을 채취하였다. 난구 세포가 3층 이상으로 치밀한 난자를 선별하여 체외 성숙에 공여하였다. 체외 성숙 배양액으로는 TCM199에 10% (v/v) 돼지 난포액(pFF), 15 ng/ml EGF, 5 IU/ml eCG, 5 IU/ml hCG, 0.57 mM cysteine, 0.91 mM sodium pyruvate, 26.2 mM sodium bicarbonate 및 0.075 mg/ml kanamycin을 첨가하여 사용하였다. 성숙 배양액 0.5 ml가 들어있는 4-well dish의 각 well에 50~70개의 미성숙 난자를 넣어 39℃, 5% 탄산가스 인큐베이터 내에 배양하였으며, 배양 시작 후 22시간에 호르몬이 첨가되지 않은 새로운 배양액으로 난자를 옮겨 22시간 추가 배양하였다.

### 3. 체외 수정

체외 수정을 위한 정자 처리에는 마그네슘 및 칼슘이 들어 있지 않은 phosphate-buffered saline(PBS)을, 체외 수정에는 modified tris-buffered medium(mTBM; Hong 등, 2004)을 사용하였다. 동결 정액을 39℃의 온수에 1분간 침지하여 용해한 후 0.1% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich, A-3311)가 첨가된 PBS로 희석하였으며, 350 g에서 3분간 2회 원심세정하였다. 상층액을 모두 제거한 후 최종 정자 농도가  $1 \times 10^7$  sperm/ml가 되도록 caffeine이 첨가된 mTBM으로 재부유하였다. 나화난자의 경우 체외 성숙 종료 후 난자를 0.1% (w/v) hyaluronidase 용액에 넣어 부드럽게 피펫팅함으로써 난구 세포를 제거하였다. 최종 용량이 50 ul인 수정용 배양액 미소적에 20~30개의 난자를 넣고 실험 설계에 따라  $7.5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$  또는  $5 \times 10^6$  sperm/ml의 정자 농도로 하여 39℃, 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 8시간 동안 체외 수정하였다.

### 4. 수정란의 체외 배양

수정란의 체외 배양액으로는 North Carolina State University-23 (NCSU-23) medium을 이용하였다(Petters와 Wells, 1993). 체외 수정 종료 후 난자를 새로운 체외 수정 배양액으로 3회 세정하였으며, 체외 배양액으로 1회 세정한 후 30  $\mu$ l 용량의 배양액 미소적에 15~20개의 난자를 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 및 90% N<sub>2</sub>의 기상 조건 하에서 배양하였다. 체외 수정 48시간 및 156시간 후에 수정란을 관찰하여 각각 분할 여부 및 배반포로의 발육을 관찰하였다. 분할률은 할구가 균일한 크기로 분할된 난자만을 선별하여 산정하였다.

#### 5. 체외 성숙률, 수정률 및 배반포 수정란의 세포수 관찰

체외 수정 16시간 후 난자를 검사하여 정자 침투율, 정상 수정률 및 응성전핵형성률을 조사하였으며, 체외 수정 156시간 후에 배반포 수정란을 검사하여 수정란의 세포수를 관찰하였다. 난자 및 수정란을 whole mount 방법으로 glass slide에 위치시킨 후 25% (v/v) acetic acid in ethanol 용액에 침지하여 10분간 고정하였으며, 1% (w/v) orcein 용액으로 염색한 후 위상차 현미경 하에서 관찰하였다. 하나 또는 그 이상의 정자두부 또는 응성 전핵 및 미부가 관찰되는 난자를 수정된 것으로, 하나의 정자가 침투한 난자를 정상 수정된 것으로 판정하였다. 배반포의 세포수는 orcein으로 염색된 핵의 수를 관찰하여 산정하였다.

#### 6. 실험 설계 및 통계학적 분석

실험 1에서는 체외 성숙 후 난구 세포를 제거한 나화난자와 난구 세포가 부착되어 있는 난자를 0.75 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml의 정자 농도로 체외 수정한 후 정자 침투율, 정상 수정률 및 응성전핵형성률을 조사하였다. 실험 2에서는 난구 세포가 부착된 난자에 적합한 체외 수정 정자 농도를 결정하기 위하여 2~5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml의 정자 농도로 난구 세포가 부착된 난자를 체외 수정한 후 수정률, 정상 수정률 및 응성전핵형성률을 조사하였다. 실험 3에서는 실험 1 및 2의 결과를 바탕으로 나화 난자 및 난구 세포 부착 난자를 각각 0.75 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml 및 4 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml의 정자 농도로 체외 수정한 후 정자 침투율, 정상 수정률, 응성전핵형성률을

조사하였고, 일부의 난자를 체외 배양하여 분할 및 배반포로의 체외 발육률을 산정함으로써 체외 수정 과정에서 난구 세포의 존재가 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구의 실험 결과는 SAS 통계프로그램의 categorical data modeling (CATMOD) procedure를 이용하여 통계학적 유의성을 검정하였다.

## 결 과

체외 수정에 공여되는 난자를 난구 세포의 존재 여부에 따라 분류하여 정자 침투율, 정상 수정률 그리고 응성전핵형성률을 검사한 결과는 Table 1과 같다. 정자 침투율과 정상 수정률의 경우 난구 세포를 제거한 군과 난구 세포가 부착되어 있는 군에서 각각 77.4%와 35.2%, 40.7%와 60.8%의 성적을 보여 난구 세포의 존재 여부에 의해 유의적인( $p<0.01$ ) 차이가 나타났으나 응성전핵형성률에서는 각각 88.5%와 90.2%의 성적을 보여 유의적인 차이를 보이지 않았다.

난구 세포가 부착된 난자에 적합한 체외 수정 정자 농도를 결정하기 위한 실험 결과는 Table 2에 나타내었다. 정자 농도를 각각 2, 3, 4 및 5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml로 하여 체외 수정한 결과 정자 농도가 증가할수록 정자 침투율(37.2~79.0%)은 유의적으로 증가하였으나 정상 수정률은 3 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml 및 4 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml 군에서 각각 50.9%와 57.6%로 다른 군에 비해 높은 결과를 나타내었다. 실험에서 조사된 정자 농도 중에 4 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml의 농도군이 정자 침투율, 정상 수정률 그리고 응성전핵형성률에서 각각 68.5%, 57.6% 및 61.2%로 나화난자군의 수정 결과와 유사한 결과를 보였다.

실험 1 및 2의 결과를 바탕으로 각각 0.75 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml 및 4 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml의 정자 농도로 나화 난자 및 난구 세포 부착 난자를 체외 수정하고 그 중 일부의 난자를 체외 배양한 결과 정자 침투율(83.6% vs. 85.1%), 정상 수정률(37.7% vs. 35.7%) 및 응성전핵형성률(87.0% vs. 90.9%)에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나(Table 3), 체외 수정란의 분할률, 배반포형성률 및 세포수는 각각 나화 난자군과 난구 세포 부착 난자군에서 각각 48.8%와 58.9%, 11.0%와 22.8% 및 22 $\pm$ 2와 29 $\pm$ 2로

Table 1. Effect of cumulus cells during *in vitro* fertilization on sperm penetration and male pronuclear formation of pig oocytes matured *in vitro*

Presence of cumulus cells during IVF	No. oocytes inseminated*	No. (%) oocytes		
		Penetrated	Normally fertilized	Formed MPN
No	146	113 (77.4) <sup>a</sup>	46 (40.7) <sup>a</sup>	100 (88.5)
Yes	145	51 (35.2) <sup>b</sup>	31 (60.8) <sup>b</sup>	46 (90.2)

\* Three replicates.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within each column are significantly different ( $p<0.01$ ).

Table 2. Fertilization parameters of pig oocytes inseminated *in vitro* at various sperm concentrations

Presence of cumulus cells during IVF	Sperm concentration ( $\times 10^6$ /ml)	No. oocytes inseminated*	No. (%) oocytes		
			Penetrated	Normally fertilized	Formed MPN
No	0.75	138	104 (75.4) <sup>a</sup>	67 (64.4) <sup>a</sup>	64 (61.5) <sup>a</sup>
Yes	2	113	42 (37.2) <sup>b</sup>	19 (45.2) <sup>b</sup>	36 (85.7) <sup>b</sup>
Yes	3	121	57 (47.1) <sup>b</sup>	29 (50.9) <sup>ab</sup>	43 (75.4) <sup>ab</sup>
Yes	4	124	85 (68.5) <sup>a</sup>	49 (57.6) <sup>ab</sup>	52 (61.2) <sup>a</sup>
Yes	5	124	98 (79.0) <sup>a</sup>	27 (27.6) <sup>c</sup>	85 (86.7) <sup>b</sup>

\* Four replicates.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within each column are significantly different ( $p < 0.05$ ).Table 3. Sperm penetration and male pronuclear formation in oocytes after *in vitro* fertilization of denuded or intact oocytes with different sperm concentrations

Presence of cumulus cells during IVF	No. oocytes inseminated*	No. (%) oocytes		
		Penetrated	Normally fertilized	MPN formed
No	165	138 (83.6)	52 (37.7)	120 (87.0)
Yes	181	154 (85.1)	55 (35.7)	140 (90.9)

\* Four replicates.

Denuded and intact oocytes were inseminated at the concentration of 0.75 and  $4 \times 10^6$  sperm/ml, respectively.Table 4. *In vitro* development of pig embryos derived from oocytes fertilized *in vitro* in the absence or presence of cumulus cells

Presence of cumulus cells during IVF	No. embryos cultured*	No. (%) embryos developed to		Cell number/blastocyst
		$\geq$ 2-cell	Blastocyst	
No	209	102 (48.8) <sup>a</sup>	23 (11.0) <sup>a</sup>	22 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
Yes	197	116 (58.9) <sup>b</sup>	45 (22.8) <sup>b</sup>	29 $\pm$ 2 <sup>b</sup>

\* Five replicates.

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

난구 세포가 부착된 상태로 수정한 난자가 나화 난자에 비해 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높은 체외 발육능을 보였다(Table 4).

## 고 찰

본 연구에서 돼지 체외 수정 과정 중 난자에 부착되어 있는 난구 세포의 존재가 정자의 난자 내 침투 및 수정란의 체외 발육에 미치는 영향을 조사한 결과 난구 세포의 존재가 정자의 침투를 억제하였으나 정자 농도를 증가시켜 수정할 경우, 일정 수준 이상의 정자 침투율, 정상 수정률 및 음성전핵 형

성률을 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 또한 수정 과정 중 난구 세포의 존재는 체외 수정 후 수정란의 체외 발육을 개선하고 세포수를 증가시키는 것으로 나타났다.

난구 세포는 체내에서 난자의 성숙과 수정 과정에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는데(Tanghe 등, 2002; Kikuchi 등, 1993), 본 연구에서 난구 세포가 부착되어 있는 난자를  $0.75 \times 10^6$ /ml의 정자 농도로 수정한 경우, 난구 세포 제거 후 수정한 난자에 비해 낮은 정자 침투율을 보였으나 정상 수정률은 나화 난자군보다 높았다. 이 결과는 동일한 정자 농도로 체외 수정하였을 경우, 난구 세포 부착 난자보다 나화 난자에서 정

자 침투율이 높았다는 Gil 등(2004)의 결과와 일치하였으나, 나화 난자보다 난구 세포 부착 난자에서 정자 침투율이 높았다는 돼지(Kikuchi 등, 1993) 및 소(Zhang 등, 1995)에서의 결과 및 수정 과정에서 난구 세포의 부착 여부에 따라 정자 침투율 및 정상 수정률에는 차이가 없었다는 Wongsrikeao 등(2005)의 결과와는 일치하지 않았다. 난구 세포 부착 난자에서 정자의 침투가 억제된 정확한 이유는 알 수 없으나 난자를 둘러싸고 있는 난구 세포들 사이에 존재하는 hyaluronic acid에 의한 견고한 결합이 정자 침투에 대한 장애물로 작용하여 수정에 부적당한 정자를 선별하는 장벽의 역할을 하고 난자에 도달되는 정자의 수를 감소시킴으로써(Bedford와 Kim, 1993; Lavy 등, 1988) 정자 침투율이 저하되고 정상 수정률이 증가한 것으로 생각된다.

난구 세포가 부착된 상태로 체외 수정한 난자에서 정자 침투율이 저하되는 문제는 난자와 공배양되는 정자의 농도를 증가시킴으로써 해결이 가능하였다. 본 연구실에서 제작한 동결용해 정액을 이용하여 2, 3, 4 및  $5 \times 10^6/\text{ml}$ 의 정자 농도로 수정하였을 때  $4 \times 10^6/\text{ml}$ 의 농도가 정자 침투율 및 정상 수정률에서 나화 난자에 필적하는 결과를 보임으로써 난구 세포 부착난자의 체외 수정에 가장 적절한 것으로 나타났다. 돼지 체외 수정에 이용되는 정자 농도는 수정 배양액이나 사용되는 정액의 종류에 따라 다양하게 보고되고 있다(Suzuki 등, 2005; Wongsrikeao 등, 2005; Hong 등, 2004; Wang 등, 1994). 따라서 일정 수준 이상의 체외 수정률 및 높은 정상 수정률을 얻기 위해서는 난구 세포의 부착 여부, 사용되는 정자의 활력 및 첨체의 정상성 등 실험 조건에 따라 적절한 정자 농도, 공배양 시간 및 수정 방법을 검토하여 적용하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 난구 세포가 부착된 상태로 수정된 난자에서 분할 및 배반포로의 체외 발육이 증가하였으며 세포수도 증가하였다. 이는 난자가 정자와 함께 공배양되는 과정에서 난구 세포가 중요한 역할을 한다는 것을 의미하는 것으로서, 난구 세포가 부착된 상태에서 수정된 난자가 나화 난자 상태로 수정된 수정란에 비해 분할률 및 배반포 발생률이 유의적으로 증가하였다는 소(Fatehi 등, 2005) 및 돼지(Wongsrikeao 등, 2005)에서의 보고와 유사한 결과였으나, 난구 세포가 부착된 상태로 수정된 난자에서 배 발육능이 개선되지 않았다는 결과(Gil 등, 2004)와는 대조적이었다. 체외 수정 과정에서 난자는 정자로부터 유리된 각종 단백질 분해 효소 및 활성 산소 등 해로운 환경에 노출될 수 있으며(Tatemoto 등, 2000) 이로 인해 수정 난자의 체외 발육능이 억제될 수 있다(Aitken 등, 1999). 난구 세포 부착 난자에서는 외부에 존재하는 난구 세포로 인해 난자가 해로운 환경에 직접 노출되지 않는다. 따라서 본 연구에서도 난구 세포의 이러한 난자 보호 작용으로 인해 난구 세포가 부착된 상태로 수정된 난자의 체외 발육능이

개선된 것으로 생각된다. 소에서도 난구 세포가 oxidative stress로부터 난자를 보호하여 배 발육을 개선하였다는 연구 결과가 보고되었다(Fatehi 등, 2005). 또한 난구 세포가 응성 전핵 형성뿐만 아니라 그 이후 정상적인 수정란 발육을 유도할 수 있는 정상적인 정자를 선별해 주는 중요한 역할을 함으로써 배 발육이 증가했을 가능성도 있다(Tanghe 등, 2002). 체외 수정 과정에서 난자에 부착되어 있는 난구 세포의 이러한 영향을 구체적으로 규명하기 위해서는 수정란 이식을 통한 돼지 산자의 생산에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구 결과로부터 돼지의 체외 수정 과정에서 난구 세포의 존재는 정자의 침투를 저해하지만 체외 수정 난자의 분할률, 배반포 형성률 및 배반포의 세포수를 증가시키는 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 체외 성숙된 난자와 동결 용해 정자를 이용한 돼지의 체외 수정 과정에서 난구 세포의 존재가 정자 침투율, 응성전핵 형성률 그리고 후기배로의 체외 발육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행되었다. 돼지 난소로부터 난자-난구 세포 복합체를 채취하여 eCG/hCG, 10% 돼지 난포액, epidermal growth factor 등이 첨가된 TCM 199 배양액에서 44시간 배양하여 체외 성숙을 유도하였다. 성숙 배양 후 난구 세포를 제거한 난자와 난구 세포가 부착되어 있는 난자를 돼지 동결 용해정액을 이용하여 5 mM caffeine과 10 mM calcium chloride를 함유한 mTBM 배양액에서 8시간 체외 수정하였다. 체외 수정 후 난자를 고정, 염색하여 정자 침투율과 응성전핵 형성률을 조사하였고(실험 1~3) 일부 수정란을 North Carolina State University-23 배양액에서 체외 수정 후 156시간 배양하여 후기배로의 발육능을 검토하였다(실험 3). 실험 1에서는 정자 농도를  $7.5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 조정하여 나화 난자와 난구 세포 부착난자에서 정자 침투율 및 응성전핵 형성률을 조사하였다. 실험 2에서는 난구 세포 부착 난자의 체외 수정에 적합한 정자 농도를 구하기 위해 2, 3, 4, 및  $5 \times 10^6/\text{ml}$ 의 농도로 난자를 수정한 후 정자 침투율 및 응성전핵 형성률을 조사하였다. 실험 3에서는 나화 난자 및 난구 세포 부착 난자를 각각  $7.5 \times 10^5/\text{ml}$ 와  $4.0 \times 10^6/\text{ml}$ 의 정자 농도로 체외 수정한 후 후기배로의 발육률을 조사하였다. 실험 1의 결과 정자 침투율은 나화 난자에 비해 난구 세포 부착 난자에서 유의적으로 감소되었다(35.2% vs. 77.4%;  $p < 0.01$ ). 실험 2에서 다양한 정자 농도에 의한 정자 침투율과 정상 수정률을 바탕으로 판단했을 때  $4.0 \times 10^6/\text{ml}$ 의 정자 농도가 다른 정자 농도에 비해 난구 세포 부착 난자의 체외 수정에 적합한 것으로 나타났다. 체외 수정 과정에서 난구 세포 부착된 상태로 수정된 난자는 나화 난자에 비해 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높은 분할률(48.8% vs. 58.9%),

배반포 형성률(11.0% vs. 22.8%)과 배반포 세포수(22±2 vs. 29±2)를 나타내었다. 본 연구의 결과로부터 돼지의 체외 수정 과정에서 난구 세포의 존재는 정자 침투를 저해하지만 분할률, 배반포 형성률 및 배반포의 세포수를 증가시키는 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48:537-544.
- Aitken RJ. 1999. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? *J. Reprod. Fertil.*, 115:1-7.
- Bavister BD. 1982. Evidence for a role of post-ovulatory cumulus components in supporting fertilizing ability of hamster spermatozoa. *J. Androl.*, 3:365-372.
- Bedford JM and Kim HH. 1993. Cumulus oophorus as a sperm sequestering device, *in vivo*. *J. Exp. Zool.*, 265:321-328.
- Chian RC, Niwa K and Sirard MA. 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1499-1508.
- Fatehi AN, Roelen BA, Colenbrander B, Schoevers EJ, Gaddella BM, Bevers MM and van den Hurk R. 2005. Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote*, 13:177-185.
- Fraser LR. 1985. Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 74:185-196.
- Gil MA, Abeydeera LR, Day BN, Vazquez JM, Roca J and Martinez EA. 2003. Effect of the volume of medium and number of oocytes during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology*, 60:767-776.
- Gil MA, Ruiz M, Cuello C, Vazquez JM, Roca J and Martinez EA. 2004. Influence of sperm:oocyte ratio during *in vitro* fertilization of *in vitro* matured cumulus-intact pig oocytes on fertilization parameters and embryo development. *Theriogenology*, 61:551-560.
- Han YJ, Miah AG, Yoshida M, Sasada H, Hamano K, Kohsaka T and Tsujii H. 2006. Effect of relaxin on *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 52:657-662.
- Hao Y, Mathialagan N, Walters E, Mao J, Lai L, Becker D, Li W, Critser J and Prather RS. 2006. Osteopontin reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 75:726-733.
- Hong JY, Yong HY, Lee BC, Hwang WS, Lim JM and Lee ES. 2004. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Theriogenology*, 62:1473-1482.
- Kikuchi K, Nagai T, Motilik J, Shiuoya Y and Izaike Y. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology*, 39:593-599.
- Lavy G, Boyers SP and De Cherney AH. 1988. Hyaluronidase removal of the cumulus oophorus increases *in vitro* fertilization. *J. In Vitro. Fertil. Embryol. Trans.*, 5:257-260.
- Li YH, Ma W, Li M, Hou Y, Jiao LH and Wang WH. 2003. Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new *in vitro* fertilization (IVF) system: straw IVF. *Biol. Reprod.*, 69:1580-1585.
- Mahi-Brown CA and Yanagimachi R. 1983. Parameters influencing ovum pickup by the oviductal fimbria in the golden hamster. *Gamete Res.*, 8:1-10.
- Motta PM, Nottola SA, Pereda J, Croxatto HB and Familiari G. 1995. Ultrastructure of human cumulus oophorus: a transmission electron microscope study on oviductal oocytes and fertilized egg. *Hum. Reprod.*, 10:2361-2367.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Shino M and Kikuchi K. 2006. Morphologic changes in boar sperm nuclei with reduced disulfide bonds in electrostimulated porcine oocytes. *Reproduction*, 131:603-611.
- Neill JD. 2006. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 65-67.
- Park YE, Hong JY, Yong HY, Lim JM and Lee ES. 2005. Effect of exogenous energy substrates in a serum-free culture medium on the development of *in vitro* matured and fertilized porcine embryos. *Zygote*, 13: 269-275.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 48:61-73.
- Pursel VG and Johnson LA. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40:99-102.
- Richter L, Romeny E, Weitze KF and Zimmermann F. 1975. Deep freezing of boar semen. VII. Communication: Laboratory and Field experiments using extender Hülsenberg VIII. *Dt. Tierarztl. Wschr.*, 82:155-162.
- Salustri A, Yanagishita M and Hascall V. 1989. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the

- mouse cumulus cell oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J. Biol. Chem.*, 264: 13840-13847.
- Staigmiller RB and Moor RM. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res.*, 9:221-229.
- Suzuki M, Misumi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Fuchimoto D, Onishi A, Iwamoto M, Saito N, Nagai T and Kikuchi K. 2006. Successful piglet production by IVF of oocytes matured *in vitro* using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. *Theriogenology*, 65:374-386.
- Suzuki C, Yoshioka K, Itoh S, Kawarasaki T and Kikuchi K. 2005. *In vitro* fertilization and subsequent development of porcine oocytes using cryopreserved and liquid-stored spermatozoa from various boars. *Theriogenology*, 64:1287-1296.
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M and De Kruif A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 61:414-424.
- Tesarik J, Mendoza Oltras C and Testart J. 1990. Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 88:665-675.
- Tatemoto H, Sakurai N and Muto N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: Role of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 63:805-810.
- Vanderhyden BC and Armstrong DT. 1989. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol. Reprod.*, 40: 720-728.
- Wang WH, Abeydeera LR, Okuda K and Niwa K. 1994. Penetration of porcine oocytes during maturation *in vitro* by cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 50:510-515.
- Wongsrikeao P, Kaneshige Y, Ooki R, Taniguchi M, Agung B, Nii M and Otoi T. 2005. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.*, 40:166-170.
- Yamauchi N and Nagai T. 1999. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. *Biol. Reprod.*, 61:828-833.
- Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM, Lee BC, Hwang WS and Lee ES. 2000. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12:133-139.
- Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X and Godke RA. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:338-344.

---

(접수일: 2007. 2. 13 / 채택일: 2007. 3. 2)