

EGF와 IGF-I의 첨가배양이 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙과 배발달에 미치는 영향

백준중¹ · 한만희² · 박병권³ · 서길웅⁴ · 이규승^{4*}

Effect of EGF and IGF-I on *in vitro* Maturation of Porcine Oocytes and Development of Porcine IVM/IVF Embryos

Jun-Jong Baek¹ · Man-Hye Han² · Byung-Kwon Park³ · Kil-Woog Seo⁴ · Kyu-Seung Lee^{4*}

ABSTRACT

The present study was carried out to examine the effect of EGF and IGF-I *in vitro* maturation (IVM) of porcine oocytes and development of porcine IVM/IVF embryos.

The results were summarized as follows :

1. The rates of nuclear maturation, penetrated oocytes, pronuclear formation, polyspermic oocytes and mean numbers of the penetrated sperm were not different in NCSU-23 maturation medium with 0, 1, 5 and 10 ng/ml EGF and IGF-I ($P>0.05$).
2. The rates of blastocyst formation at day 7 after *in vitro* fertilization in 0, 1, 5 and 10 ng/ml EGF groups were 11.2±1.5%, 15.0±8.3%, 16.8±2.8% and 21.4±2.0%, also 0, 1, 5 and 10 ng/ml

¹ 충청남도 축산기술연구소(Livestock Experiment Institute Government of Chung Cheongnam-Do)

² 농촌진흥청 축산과학원(National Institute of Animal Science, R.D.A)

³ 공주대학교 산업과학대학 특수동물학과(Dept. of Companion and Laboratory Animal Science, College of Industrial Sciences, Kongju National University)

⁴ 충남대학교 농업생명과학대학 동물자원과학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

* 교신저자: 이규승(E-mail: leeks@cnu.ac.kr, Tel: 042-821-5773)

IGF- I groups were 11.2±1.5%, 15.0±8.3%, 16.8±2.8% and 21.4±2.0%, respectively. In the total cells case, EGF groups were 22.8±3.7, 25.7±5.5, 26.0±4.2 and 35.1±4.7, also IGF- I groups were 21.5±3.7, 25.2±2.8, 26.2±2.9 and 33.2±3.6, respectively. Both 10 ng/ml EGF group and 10 ng/ml IGF- I group were significantly higher than those of other treatment groups (P<0.05).

3. The rates of blastocyst formation at day 7 in the NCSU23 culture medium of porcine IVF-produced embryos with 0, 1, 5, and 10 ng/ml EGF groups were 14.0±1.7%, 16.2±1.4%, 16.9±1.2% and 23.1±1.6%, also 0, 1, 5, 10 ng/ml IGF- I groups were 13.6±1.7, 15.7±4.5, 16.0±0.2 and 25.0±0.8, respectively. And in the total cells case, EGF groups were 21.8±2.9, 25.2±2.8, 39.7±2.7 and 46.2±3.6, also IGF- I groups were 20.7±2.9, 26.2±2.9, 24.6±2.4 and 46.1±3.5, respectively. Both 10 ng/ml EGF group and 10 ng/ml IGF- I group were significantly higher than those of any other treatment groups (P<0.05).

In conclusion, these results suggested that the addition of 10 ng/ml EGF and IGF- I were effective on the blastocyst formation and total cells of blastocysts.

Key words : Porcine embryo, NCSU23, IVM, IVF, EGF, IGF- I

1. 서 론

최근 가축번식학 분야에서는 생명공학의 발달과 더불어 난포란을 이용한 체외수정란의 생산, 정자 및 수정란의 성감별, 핵치환, 체세포 복제 등의 기법을 통한 복제동물의 작출 및 이종장기 이식을 위한 형질전환 복제동물의 생산과 같은 각종 첨단 생명공학적 연구가 활발히 수행되고 있다. 이러한 연구를 효율적으로 수행하고 산업화하기 위해서는 양질의 수정란을 대량으로 확보하는 것이 필수적이다. 이를 해결하는 하나의 수단으로서 도축된 가축의 난소에서 채취된 다수의 미성숙 난포란을 체외배양으로 성숙시켜 이용하고자 하는 실험이 여러 연구자들에 의하여 다각적으로 검토되고 있다.

포유동물에 있어서 난자의 성숙은 핵성숙과 세

포질성숙으로 구분할 수 있다. 핵성숙에 관하여 Pincus와 Enzman(1935)은 토끼의 미성숙 난포란을 채취하여 적당한 조건하에서 체외배양하면 성숙분열이 재개되어 제2성숙분열 중기에 도달한다고 하여 난자핵의 체외성숙을 최초로 보고하였다. 돼지에 있어서는 Edward(1965)가 난포란을 체외에서 43~46시간 동안 배양하여 제2성숙분열 중기에 도달된다고 보고하여 체외에서의 핵성숙을 최초로 확인하였으며, Foote와 Thibault(1969)도 이와 유사한 결과를 보고하였지만, 48시간 배양 후에도 많은 수의 난자가 제1성숙분열 중기에서 성숙이 정지된다고 하였다. 또한, 돼지 미성숙 난자의 체외성숙배양은 다른 대가축 난자에 비하여 거의 2배에 가까운 시간을 요구하고 있는데, 이것은 체내에서 LH의 급증이 유발된 후 난핵포가 붕괴될 때까지의 시간이 20~24시간으로 길고,

이에 따라 체외에서의 성숙반응이 늦어지기 때문인 것으로 알려져 있다(Tsafrifi & Channing, 1975). 따라서, 돼지 난포란의 체외성숙은 다른 가축에 비하여 늦게 성공되어 1989년에 이르러서야 비로소 미성숙 난포란을 이용한 체외성숙, 체외수정 및 수정란이식에 의한 산자가 보고되었다(Mattioli 등, 1989).

그러나 돼지 미성숙난포란을 체외배양할 경우 타가축에 비하여 핵성숙과 세포질성숙을 포함한 난포란의 체외성숙이 불완전하며, 체외수정시 높은 다정자침입률과 불완전한 응성전핵형성 등으로 인한 수정률의 저하, 초기배 발달시 4-세포기에서 발달이 지연되거나 정지되는 체외발육능정지현상(*in vitro* cell block)을 초래하는 등, 다른 축종 보다 양질의 수정란을 생산하는 것이 어려운 것으로 보고되었다. 체외발육능정지현상은 배양액내에 난관 또는 자궁에서 분비되면서 배발달에 유효하게 작용하는 미지인자가 결여되고, 난관·자궁의 조건과 배양조건이 다를 뿐만 아니라, 배양상태에서는 세포 발육에 유해한 영향을 미치는 요인이 적절히 제거되지 않기 때문에 발생되며, 이로 인하여 체외 발육률이 저하되는 것으로 보고되고 있다(Bigger, 1987; Li 등, 1993).

이러한 체외발육능정지현상을 극복하거나, 체외발육률을 증가시키기 위하여 단백질원의 첨가, 가스농도의 조절, 그리고 각종 호르몬 및 성장인자를 첨가하는 연구가 많은 연구자들에 의해 시행되어져 왔다. 돼지 난포란의 체외성숙에 대한 호르몬의 첨가효과에 관한 연구는 매우 다양한데, McGaughey(1977) 및 Richter와 McGaughey(1979)는 배양액중의 Estradiol-17 β 가 난자성숙의 개시에 유의적인 영향을 미치지 못하지만, 제1성숙분열 중기 성숙률은 steroid를 첨가하는 방법에 따라 차이가 있다고 하였으며, Epig 등(1982)

은 돼지의 미성숙난자를 배양할 때 FSH를 첨가하면 난자핵의 성숙과 난구세포의 팽화를 효과적으로 촉진시킨다고 보고하였다. m-KRB성숙배양액에 PMSG 또는 hCG를 단독첨가할 때는 성숙분열의 재개와 난구세포의 팽화에는 크게 영향을 미치지 않지만, 이들 두 호르몬을 병용처리하면 제2성숙분열 중기 도달률이 향상된다고 보고하였다(Minato와 Toyoda, 1982). Mattioli 등(1991)은 LH와 FSH가 성숙분열을 촉진시키며, 특히 FSH는 제2성숙분열 중기 도달률을 높이는 반면에 LH는 세포질을 성숙시켜 응성전핵의 형성률을 현저히 높인다고 하였다. Funahashi와 Day(1993)는 이들 호르몬은 20시간 이상 처리했을 때 성숙분열이 일어나는 것을 관찰하였으며, Funahashi 등(1994)은 PMSG와 hCG를 공동 또는 단독으로 첨가하여 20시간 배양하여도 난핵포봉괴와 성숙분열을 완성하는데 매우 효과적이라고 보고하였다.

한편, 난소 내 과립막 세포에서 발견되는 많은 성장인자들은 난자의 핵 성숙과 세포질성숙 및 세포의 기능발현에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Funahashi와 Day(1993)는 난포로부터 분비되는 물질에서 이와 같은 성장인자가 존재한다는 것을 확인했지만, 구체적으로 물질의 본태는 밝혀내지 못했으며, Racowsky(1991)도 난자핵의 성숙을 촉진시키는 성장인자가 존재함을 보고하였다. 성장인자 중에서 표피성장인자(EGF: Ueno 등, 1988; Downs, 1989)나 트랜스포밍성장인자(TGF- α : Brucker 등, 1991; TGF- β : feng 등, 1988)는 설치류 난자의 핵성숙을 촉진시키거나 향상시킨다는 사실이 입증되었으며, 또한 EGF는 돼지(Ding과 Foxcroft, 1994; Coskun과 Lin, 1992; Sommer 등, 1992), 소(Illera 등, 1992) 및 사람(Das 등, 1991) 등에서 난자핵의 성숙을 촉진

하는 것으로 밝혀졌다. Coskun 등(1991) 및 Harper와 Brackett(1993)는 이들 성장인자가 체외에서 성숙시킨 소 난자의 세포질성숙을 향상시킨다고 보고하였으며, 이것들은 난자의 핵과 세포질성숙을 연결시켜 주는 요소 중의 하나로서 난포로부터 생성되었을 것으로 추정하였다. 돼지의 난포액은 일정수준의 EGF를 함유하고 있는데, 난포의 성숙함에 따라서 그 농도가 변화되는 것으로 추정되며, 또한 난소내에는 EGF를 결합시키는 수용장소가 존재하는 것으로 보고되었다(Yim, 1994). 난자의 성숙배지에 EGF를 첨가하면 핵성숙과 성숙난자의 수정능력을 촉진시키는데, 이때 EGF 단독으로는 세포질의 성숙을 촉진하지 못한다는 보고(Ding과 Foxcroft, 1994; Boland와 Gosden, 1994; Downs 등, 1988)가 많으며, EGF는 난자를 난포세포와 공배양시키거나 성선자극호르몬(GTH)을 첨가하여 배양할 때, 이들간의 상호작용으로 난세포질의 성숙을 유의적으로 촉진시키는 것으로 밝혀졌다(Ding과 Foxcroft, 1994).

위에서 보는 바와 같이, 난자의 성숙과 발달에는 다양한 호르몬과 성장인자가 관여한다는 사실은 밝혀졌지만, 난자의 체외배양에서 이들 물질의 첨가수준이나 첨가조합은 연구자에 따라 매우 다양한 결과들을 제시하고 있다. 이에 본 연구는 돼지 미성숙난포란의 체외성숙과 초기배발달에 유효하게 작용하는 것으로 알려진 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF)와 인슐린-양 성장인자-I(insulin-like growth factor-I, IGF-I)의 효과를 입증하고, 아울러 이들 성장인자의 적정 첨가수준을 구명하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 난포란의 채취

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 미경산돈(체중 120 kg내외)으로부터 적출하여 75 µg/ml penicillin G와 50 µg/ml streptomycin sulfate(Sigma, USA)를 첨가한 38°C의 멸균생리식염수로 2회 세척한 후, 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 그리고 재차 신선 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 100 ml 비이커에 담아 38°C로 조정되어 있는 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

공시난포란의 채란은 18-gauge 주사침이 장착된 10 ml 주사기로 직경이 2~5 mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 15 ml 원심분리관에 옮겨 38°C로 조정된 정온대(multi-block, USA)에 10분간 정치, 난포란의 침전을 유도한 다음, 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 1.5 cm 간격으로 방안을 표시한 87×15 mm 페트리접시에 넣고 1 mg/ml PVA(Sigma, USA)가 첨가된 TL-Hepes와 희석하여 실험현미경하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙어 있고 세포질이 균일한 난포란만을 선별·회수하여 체외성숙 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

1) 난포란의 체외성숙배양

체외성숙용 배양액은 North Carolina State University(NCSU)-23 (Petters 등, 1993)을 기본 배양액으로 하여 돼지난포액 10%, Pregnant Mare's Serum Gonadotropin(PMSG) 10 IU/ml, Human Chorionic Gonadotropin(hCG) 10 IU/ml를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 6 mm 이

상 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 3,000rpm, 4°C의 저온하에서 30분간 원심분리하고, 0.8 μm 필터로 여과·멸균한 후, -20°C에서 냉동보관하면서, 사용직전에 용해하여 사용하였다. 체외성숙 배양에는 4-well dish를 사용하여 각 well당 500 μl의 난자 성숙용 NCSU-23 배양액을 넣어 전배양을 실시하였다. 회수한 양질의 미성숙난자는 TL-Hepes 배양액으로 3회 세정하고, 곧바로 체외성숙용 배양액으로 3회 세정하였다. 세정된 미성숙 난자는 각 well당 40~50개씩 넣어 39°C, 5% CO₂, 포화습도 조건의 배양기 내에서 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간, 호르몬이 첨가되지 않은 체외성숙용 배양액에서 22시간, 총 44시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

2) 체외성숙 난포란의 염색 및 성숙판정

각각의 첨가군별로 44시간 동안 성숙배양시킨 난포란의 일부를 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(Rapid Staining Method)으로 염색하여 핵성숙단계를 비교 판정하였다. 염색방법을 요약하면 0.3% hyaluronidase(Sigma, USA)용액에 성숙이 유기된 난자난구세포복합체(Oocyte-cumulus complexes)를 옮겨 1분간 vortexing하여 난구세포를 완전히 제거한 다음 1% BSA가 함유된 TL-Hepes로 3회 세척하였다. 그리고 slide glass위에 난포란 30~40개를 적당한 다음, cover slip으로 덮고, 난포란의 부피로 생긴 cover slip과 slide glass의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol = 1 : 3)을 흘리는 방법으로 5분간 고정하였다. 고정이 끝난 난포란의 염색은 염색액을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(glacial acetic acid : distilled water : glycerol = 1 : 3 : 1)를 흘려 난세포질 이외의 염색액을 제거시킨

다음, 위상차현미경(400~1,000×)으로 난포란의 핵성숙 단계를 판정하였다. 핵성숙단계의 판정은 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 실시하였다.

3. 체외수정

1) 난포란의 준비

체외수정용 배양액은 modified Tris-buffered medium(mTBM)을 기본 배양액으로 2.5 mM caffeine(Sigma, USA)과 0.1% BSA(A7888, Sigma, USA)가 함유된 mTBM용액을 사용하였고(Abeydeera와 Day, 1997), 정액의 세정액으로는 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS; Gibco, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)에 0.1% BSA가 첨가된 배양액을 사용하였다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지 난포란은 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)가 함유된 NCSU-23 용액에 넣어 연속적인 피펫팅으로 난구세포를 제거하고, 2.5 mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 용액으로 3회 세정하였다. 세정 후 미리 48시간 전배양을 실시한 90 μl 수정용 배양액 소적에 30~40개의 성숙난자를 넣고 매정시까지 배양기 내에서 배양하였다.

2) 정자의 준비 및 수정능획득

정액은 인공수정용 액상정액으로 사용 직전까지 17°C 항온고에서 최대 4일간 보존하면서 사용하였다. 보존된 정액은 사용직전에 정액세정액(DPBS)과 함께 1 : 1 비율로 15 ml falcon tube에 넣고 450g에서 3분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거하는 세정과정을 3회 실시하였다. 마지막으로 하단에 남은 정자 침전물에 정자 세정용배양액을 넣어 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 10분간 정치하였다. 운동성

을 가진 부유된 정자들을 회수하여 450g에서 3분간 원심분리를 실시한 다음, 침전된 정자를 체외수정용 배양액으로 재차 회석하였다. 회석된 정자는 성숙난자가 들어 있는 소적에 최종농도가 1.5×10^5 sperm/ml이 되도록 각각 10 μ 씩 주입한 후 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 5~6시간 동안 체외수정을 실시하였다.

3) 체외수정의 판정

각각의 첨가군별 5~6시간 동안 체외수정용 배양액에서 정자와 수정을 유기한 후, pipetting 및 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대부착정자를 제거하였다. 그리고 배발달 배양액에 옮겨 추가로 배양한 다음, 수정후 10~12시간에 1-세포기의 수정란을 Byun 등 (1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로 염색하여 정자의 침입과 자·웅전핵형성을 확인하여 수정여부를 판정하였다.

4. 체외수정된 난포란의 체외배양

돼지 체외수정란의 배양은 0.4% BSA(A0281, Sigma)가 함유된 NCSU-23을 기본배양액으로 사용하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 pipetting 및 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대부착정자를 제거한 후, 각각의 첨가군별로 4-well dish(Nunc, Denmark)에 500 μ /well의 배발달 배양액을 넣고 well당 40~50개의 수정란을 넣어 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기 내에서 각각 배양하여 체외배발달을 유도하였다. 체외배양 2일째에 난할률을 조사하였고, 6일 및 7일째 배반포 발달률을 조사하였다. 이상과 같은 모든 실험은 37°C로 조정된 현미경가온판 위에서 실시하였다.

5. 배반포의 이중형광염색

체외수정을 실시하여 생산한 돼지 수정란은 Machaty 등(1998)의 이중형광염색방법으로 내부세포괴(inner cell mass, ICM)세포와 영양배엽(trophectoderm, TE)세포를 구별하였다. 간단히 요약하면, 수정란의 투명대를 0.5% pronase에 처리하여 용해시킨 후, TL-Hepes-PVA 배양액에서 3회 세척하였다. 이들 수정란은 rabbit anti-pig whole serum이 1 : 5로 희석된 TL-Hepes용액에서 1시간 처리한 후, TL-Hepes-PVA 용액으로 5분간 3회 세척하였으며, 10 μ g/ml Hoechst 33342와 10 μ g/ml propidium iodide(1 : 1)이 함유된 Guinea pig complement가 함유된 TL-Hepes(1 : 10)-PVA에서 1시간 처리하였다. 위의 방법에 의해 면역 외과적인 처리가 끝난 수정란을 slide glass위에 3 μ l mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만들고, 이곳에 수정란을 넣은 다음, cover glass를 덮고 매니큐어로 밀봉하여 형광현미경하(200 \times)에서 세포수를 조사하였다.

6. 실험 구성

EGF와 IGF- I의 첨가배양이 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 구명하기 위하여 체외성숙 기본배양액인 NCSU-23에 10%의 돼지난포액(pFF), 0.9 mM의 cysteine, 10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml hCG을 첨가하고 EGF와 IGF-1을 각각 0, 1, 5 및 10 ng/ml을 첨가하여 체외성숙에 미치는 영향을 핵성숙률, 자웅전핵형성률 및 배발달에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 EGF와 IGF- I이 초기배발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 체외성숙 기본배양액인 NCSU-23에 성숙을 유기한 후 체외수정용 배양액인 mTBM배양액에 정자와 같이 6시간동안 공배양을 통하여 체외수정을 유도한 후, 생산된 수



Fig. 1. A Rapid stained porcine zygote after 12 hours postinsemination *in vitro* (400x).

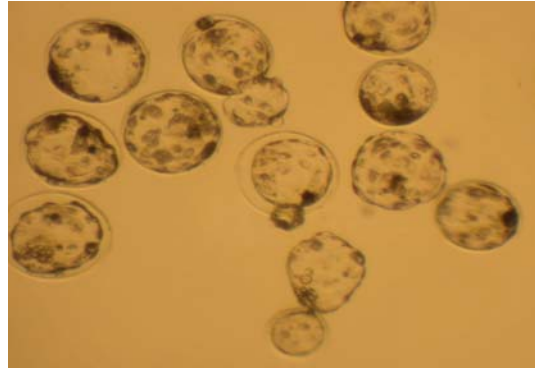


Fig. 2. IVM/IVF-derived porcine blastocysts at day 7 (200x).

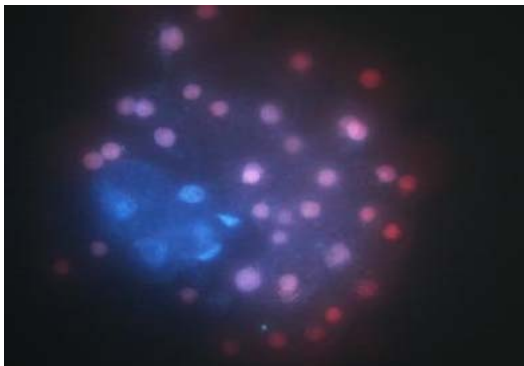


Fig. 3. A differentially stained IVM/IVF-derived porcine blastocyst. The blue objects are the nuclei of the inner cell mass cells and the pink objects are the nuclei of the trophoblast (200x).

정란을 EGF와 IGF- I 이 각각 0, 1, 5 및 10 ng/ml이 첨가된 배발달배양액에 넣어 5% 탄산가스배양기에 배양하면서 배양 2일후에 난할률을, 6일 및 7일에 배발달률 및 이중형광염색을 통한 ICM세포 및 TE세포수를 조사하였다.

7. 통계분석

본 연구에서는 각 첨가군에 대하여 4회이상 반복실험을 실시하였으며, 얻어진 모든 실험결과의 통계처리는 SAS/STAT 6.03 package를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후, Duncan's 다중검정(DMRT)에 의하여 첨가군간 유의성을 검정하였으며, $P < 0.05$ 이하의 유의성만을 통계학적 차이가 있는 것으로 인정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. EGF가 체외성숙과 배발달에 미치는 영향

1) 체외성숙과 체외수정에 EGF가 미치는 영향
 체외성숙 기본배양액인 NCSU-23에 EGF를 각각 1, 5 및 10 ng/ml을 첨가한 배양액에 돼지 난포란을 44시간동안 배양한 후에 체외성숙률을 조사하였고, 이어서 수정배양액인 mTBM에 6시간동안 정자와 함께 배양하여 체외수정을 유도하고, 이에 따른 핵성숙률, 자웅진핵형성률, 다정자 침입률 및 난자당 침투정자수를 조사한 결과는 Table 1과 같다.

EGF처리에 따른 돼지난포란의 체외성숙률은 10 ng/ml 첨가군에서 97.2±3.4%로 가장 높은 수치를 나타냈지만, 무첨가 대조군이 93.5±3.2%에 비하여 유의성이 인정되지 않았으며, 첨가군 상호간에도 유의성이 인정되지 않았다.

EGF첨가에 따른 돼지 난포란의 정자침투율은 무첨가 대조군 83.7±2.0%에 대하여 1, 5, 및 10 ng/ml 첨가군은 각각 84.6±4.3%, 84.4±2.5% 및 85.6±3.6%를 나타내어 별다른 차이가 없었다. 또한, 체외수정란의 자웅전핵형성률도 96.6±3.7%에서 97.1±4.4% 범위내에 있어서 무첨가 대조군 95.6±3.5%에 비하여 유의성이 인정되지 않았다. 그러나 다정자침입률은 1, 5, 및 10 ng/ml EGF를 첨가한 시험구에서 각각 43.3±4.3%, 44.8±4.0% 및 47.1±4.4%를 나타내어 무첨가 대조군 50.0±4.3%에 비하여 낮은 비율을 나타냈지만, 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. 난모세포에 침투하는 평균정자수는 무첨가 대조군을 포함하여 모든 첨가군에서 1.8±0.1마리에서 1.9±0.4마리의 범위내에 있어 차이가 없었다.

이러한 결과는 EGF가 난포란의 성숙분열 촉진인자로서 작용하지 못한다는 Boland와 Gosden (1994)의 보고와 돼지에서 EGF를 단독 첨가한

경우에 난포란의 성숙에 영향을 주지 못한다는 Ding과 Foxcroft(1994)의 보고와는 합치점을 발견할 수 있었다. 그러나 소에서 혈청이 첨가된 성숙배양액에 EGF를 첨가하였을 때 난포란의 성숙률이 증가되었다는 Coskun 등(1991) 보고와는 일치하지 않았는데, 이것은 동물종에 따른 난모세포의 생리적 특성이 다르기 때문인 것으로 생각된다. 한편, 체외수정률은 상당히 높았지만, 50%에 가까운 다정자 침입률을 나타낸 것은 돼지의 경우 다른 동물에 비하여 다정자수정이 빈번하게 일어난다는 기존의 보고를 확인한 결과라고 고찰된다.

2) 체외성숙배양액에 EGF를 첨가한 경우의 배발달률

NCSU-23을 기본배양액으로 EGF를 각각 0, 1, 5 및 10 ng/ml을 첨가하여 성숙·수정 시킨 다음, 배발달 배양액인 0.4 mg/ml BSA가 첨가된 NCSU-23에 7일간 배발달을 유기한 결과는 Table 2 및 Table 3과 같다.

수정후 48시간째 난할률은 첨가군간 68.2±5.3%에서 71.4±6.8%로서 유의성이 인정되지 않았으나, 배반포기 도달률에 있어서는 배발달 6일째

Table 1. Effects of EGF concentrations during IVM on *in vitro* fertilization of porcine follicular oocytes

Concentrations (ng/ml)	Total no. of oocytes examined	% (Mean±SE) of oocytes			No. (%) of polyspermic oocytes (Mean±SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean±SE)
		matured	penetrated	with male and female prouclei		
0	81	93.5±3.2	83.7±2.0	95.6±3.5	50.0±4.3	1.9±0.4
1	90	95.4±2.8	84.6±4.3	96.6±3.7	43.3±4.3	1.8±0.2
5	92	94.2±1.8	84.4±2.5	97.0±3.5	44.8±4.0	1.8±0.1
10	96	97.2±3.4	85.6±3.6	97.1±4.4	47.1±4.4	1.9±0.1

Table 2. Effects of EGF concentrations during IVM on *in vitro* development of porcine IVM/IVF derived embryos

Concentrations (ng/ml)	No. of embryos examined	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% (Mean±SE) of embryo developed to blastocysts	
			Day 6	Day 7
0	153	68.2±5.3	8.9±1.2 ^b	11.2±1.5 ^b
1	152	67.3±4.2	12.9±0.9 ^b	15.0±0.8 ^b
5	206	65.8±8.6	14.3±2.6 ^b	16.8±2.8 ^b
10	197	71.4±6.8	20.3±1.3 ^a	21.4±2.0 ^a

^{a,b} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

Table 3. Effects of EGF concentrations during IVM on mean cell number of porcine IVM/IVF derived embryos

Concentrations (ng/ml)	No. of blastocysts	No. of ICM cells (M±SE)	No. of TE cells (M±SE)	Total cell no. of blastocysts (M±SE)
0	12	11.0±1.6	11.3±2.2 ^b	22.8±3.7 ^b
1	14	12.6±1.8	13.1±4.5 ^b	25.7±5.5 ^b
5	16	13.3±2.7	12.6±3.9 ^b	26.0±4.2 ^b
10	21	13.8±1.6	21.3±4.0 ^a	35.1±4.7 ^a

^{a,b} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

대조군의 경우에는 8.9±1.2%, EGF의 첨가군은 각각 12.9±0.9, 14.3±2.6% 및 20.3±1.3%이었고, 배발달 7일째에는 대조군 11.2±1.5%에 비하여 EGF첨가군은 각각 15.0±0.8%, 16.8±2.8% 및 21.4±2.0%로서 높은 배반포도달률을 나타냈는데, 10 ng/ml 첨가군에서는 유의성(P<0.05)이 인정되었다. 또한, 배발달 7일째의 배반포기 수정란의 내부세포괴(inner cell mass, ICM)세포, 영양배엽(trophctoderm, TE)세포 및 총세포수를 조사한 결과, 내부세포괴세포는 모든 첨가군간 12.6±1.8개부터 13.8±1.6개의 범위내에 있으면서 유의성이 인정되지 않았으나, 영양배엽세포는 대조군 11.3±2.2개에 대하여 첨가군은 각각 13.1±4.5개, 12.6±3.9개, 21.3±4.0개로서, 10 ng/ml 첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높은 수를 나타냈다. 또한

총세포수에 있어서 첨가군이 각각 25.7±5.5개, 26.0±4.2개, 35.1±4.7개로서 대조군(22.8±3.7개)에 비하여 높은 수치를 나타냈지만, 10 ng/ml 첨가군만이 유의성(P<0.05)이 인정되었다.

이러한 결과를 종합하면, 돼지 난포란을 체외 성숙시킬 때 EGF의 첨가배양은 핵성숙률이나 자·웅전핵 형성률에는 영향을 미치지 않았으나, 6~7일동안 배발달을 유지한 결과 10 ng/ml 첨가군에서 배반포 도달률 및 총세포수에서 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타내어 체외성숙시에 EGF를 첨가배양하는 것이 배발달에 효과적인 것으로 확인되었는데, 이러한 결과는 사람 미성숙 난포란의 체외배양에서 EGF를 첨가한 첨가군이 무첨가군에 비하여 높은 배발달률을 나타냈다고 한 보고(Gomez 등, 1993)나 돼지에서

EGF에 의하여 난자핵 성숙이 촉진된다는 보고 (Sommer, 1992)와 합치점을 찾을 수 있는 결과라고 생각된다.

3) 배발달 배양액에 EGF를 첨가한 경우의 배발달률

돼지 미성숙난포란을 체외성숙 기본 배양액인 NCSU-23 배양액에서 성숙·수정시킨후 배발달 배양액인 0.4 mg/ml BSA가 함유된 NCSU-23 배양액에 EGF를 1, 5 및 10 ng/ml 첨가하여 배발달을 유기한 결과는 Table 4 및 Table 5와 같다.

체외수정 후 48시간째에 난할률을 조사한 결과 대조군을 포함한 모든 처리군에서 73.0±7.2%로부터 79.0±2.4%의 범위에 있어 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 그러나 초기배발달에 있어서는 체외배발달 6일째 배반포기 도달률은 대조군이 13.8±0.6% 처리군은 각각 14.4±2.4%, 15.5±0.8% 및 20.3±1.1%를 나타냈는데 10 ng/ml 첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높았으며, 배발달 7일째에도 대조군 14.0±1.7%에 대하여 EGF첨가군은 각각 16.2±1.4%, 16.9±1.2%, 23.1±1.6%로서 6일째와 마찬가지로 10 ng/ml 첨가군에서 유의성(P<0.05)이 인정되었다.

첨가군별 ICM세포는 대조군 11.1±1.9개에 대하여 EGF첨가군은 각각 11.6±1.9개, 19.0±2.3개, 26.2±2.4개였고, TE세포는 EGF첨가군이 각각 13.5±2.8개, 16.0±2.2개, 20.0±3.5개였으며(대조군: 10.7±2.5개), 총세포수에서도 같은 경향을 보여서 대조군 21.8±2.9개에 대하여 첨가군은 각각 25.2±2.8개, 39.7±2.7개, 46.2±3.6개를 나타냈다. 이러한 결과들을 통계분석한 결과는 ICM세포, TE세포 및 총세포수 모두에서 EGF 10 ng/ml첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높은 세포수를 갖는 것으로 나타났다.

따라서, 돼지의 체외수정란을 체외배양할 때에는 EGF 10 ng/ml 첨가배양하는 것이 배반포에 이르는 초기배발달 및 세포수에 효과적인 것으로 조사되었다.

이러한 결과를 체외성숙시 10 ng/ml의 EGF를 첨가하면 MII기 까지의 높은 성숙률을 나타내고, 결과적으로 배양액 내 10 ng/ml의 EGF 첨가가 난자의 체외성숙과 수정란의 배발육에 영향을 미친다고 보고(Abeydeera 등, 1998), 사람 미성숙난포란의 체외배양에서 EGF를 첨가한 첨가군이 무첨가군에 비하여 유의적으로 높은 GVBD 및 MII도달률을 나타냈다고 한 보고(Gomez 등, 1993), 돼지에서 EGF의 단독첨가는 난포란의 성숙에 영향을 주지 못하였으나, 성선자극호르몬과의 병용투여시에는 난포란의 성숙에 효과적으로 작용하였다는 보고(Ding과 Foxcroft, 1994), EGF가 세포질성숙에 필요한 kinase의 활성화와 peptide 잔유물의 이산화를 자극하여 세포질 성숙을 촉진한다는 보고(Schultz, 1988)등과 비교 검토해보면 부분적인 차이는 있지만, EGF가 체외성숙 난포란의 배발달에 자극적으로 작용한다는 사실만은 합치되는 결과였다고 생각된다.

2. IGF- I 이 돼지난포란의 체외성숙과 배발달에 미치는 영향

1) 체외성숙과 체외수정에 IGF- I 이 미치는 영향
체외성숙 기본배양액인 NCSU-23에 IGF- I 을 각각 1, 5 및 10 ng/ml을 첨가한 배양액에 돼지 난포란을 44시간동안 배양한 후에 체외성숙률을 조사하였고, 이어서 수정배양액인 mTBM에 6시간동안 정자와 함께 배양하여 체외수정을 유도하고, 이에 따른 핵성숙률, 자웅전핵형성률, 다정자 침입률 및 침투정자수를 조사한 결과는 Table 6과 같다.

Table 4. Effects of different EGF concentrations on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Concentration (ng/ml)	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes cleaved	% (mean±SE) of embryos developing to blastocysts	
			Day 6	Day 7
0	220	73.0±7.2	13.8±0.6 ^b	14.0±1.7 ^b
1	214	76.6±2.9	14.4±2.4 ^b	16.2±1.4 ^b
5	201	77.6±3.1	15.5±0.8 ^b	16.9±1.2 ^b
10	178	79.0±2.4	20.3±1.1 ^a	23.1±1.6 ^a

^{a,b} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

Table 5. Effects of different EGF concentrations on mean cell number of porcine IVM/IVF derived embryos

Concentrations (ng/ml)	No. of blastocysts	No. of ICM cells (M±SE)	No. of TE cells (M±SE)	Total cell no. of blastocysts (M±SE)
0	12	11.1±1.9 ^b	10.7±2.5 ^b	21.8±2.9 ^b
1	18	11.6±1.9 ^b	13.5±2.8 ^{bc}	25.2±2.8 ^b
5	17	19.0±2.3 ^{ab}	16.0±2.2 ^{ab}	39.7±2.7 ^a
10	24	26.2±2.4 ^a	20.0±3.5 ^a	46.2±3.6 ^a

^{a,b,c} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

IGF- I 처리에 따른 돼지 난포란의 체외성숙률은 10 ng/ml 첨가군에서 95.3±2.7%로 가장 높은 수치를 나타냈지만, 무첨가 대조군이 93.0±3.9%에 비하여 유의성이 인정되지 않았으며, 첨가군 상호간에도 유의성이 인정되지 않았다.

IGF- I 첨가에 따른 돼지 난포란의 정자침투율은 무첨가 대조군 83.4±2.1%에 대하여 1, 5, 및 10 ng/ml 첨가군은 각각 89.6±3.8%, 89.5±2.6% 및 88.0±3.5%를 나타내어 별다른 차이가 없었다. 또한, 체외수정란의 자웅전핵형성률도 97.0±4.0%에서 98.3±4.9% 범위내에 있어 무첨가 대조군 95.3±3.9%에 비하여 유의성이 인정되지 않았다. 그러나 다정자침입률은 1, 5, 및 10 ng/ml IGF- I 을 첨가한 시험구에서 각각 47.0±2.9%, 45.7±3.8% 및 50.5±3.6%를 나타내어 무첨가 대

조군 51.0±4.1%에 비하여 낮은 비율을 나타냈지만, 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. 난포세포에 침투하는 평균정자수는 무첨가 대조군을 포함하여 모든 첨가군에서 1.7±0.1마리에서 2.0±0.1마리로 차이가 없었다.

이러한 결과는 Grupen 등(1995)이 IGF-1의 첨가가 수정란의 발달을 촉진한다고 한 보고, Lorenzo 등(1994)이 소 수정란의 체외배양시 IGF- I 첨가에 의해 높은 핵 성숙률을 나타내었다는 기존의 보고들을 확인한 결과라고 사료된다.

2) 체외성숙배양액에 IGF- I 을 첨가한 경우의 배발달률

NCSU-23을 기본배양액으로 IGF- I 을 1각각 0, 1, 5 및 10 ng/ml을 첨가하여 성숙·수정 시

Table 6. Effects of IGF- I concentrations during IVM on *in vitro* fertilization of porcine follicular oocytes

Concen- trations (ng/ml)	Total no. of oocytes examined	% (Mean±SE) of oocytes			No. (%) of polyspermic oocytes (Mean±SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean±SE)
		matured	penetrated	with male and female prouclei		
0	71	93.0±3.9	83.4±2.1	95.3±3.9	51.0±4.1	1.9±0.2
1	73	94.7±2.7	89.6±3.8	98.3±4.9	47.0±2.9	1.8±0.1
5	75	96.7±4.2	89.5±2.6	97.2±5.9	45.7±3.8	1.7±0.1
10	77	95.3±2.7	88.0±3.5	97.0±4.0	50.5±3.6	2.0±0.1

Table 7. Effects of IGF- I concentrations during IVM on *in vitro* development of porcine IVM/IVF derived embryos

Concentrations (ng/ml)	No. of embryos examined	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% (Mean±SE) of embryo developed to blastocysts	
			Day 6	Day 7
0	155	69.2±5.4	8.6±0.4 ^b	10.7±1.4 ^b
1	179	74.6±5.9	9.7±1.9 ^b	12.8±2.0 ^b
5	188	69.4±7.1	13.4±2.4 ^b	16.0±2.5 ^b
10	159	72.4±7.7	19.9±1.7 ^a	21.9±2.4 ^a

^{a,b} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

Table 8. Effects of IGF- I concentrations during IVM on mean cell number of porcine IVM/IVF derived embryos

Concentrations (ng/ml)	No. of blastocysts	No. of ICM cells (M±SE)	No. of TE cells (M±SE)	Total cell no. of blastocysts (M±SE)
0	12	10.0±5.0	11.5±2.5 ^b	21.5±3.7 ^b
1	13	11.6±1.9	13.5±2.8 ^b	25.2±2.8 ^b
5	21	14.3±1.6	11.9±2.4 ^b	26.2±2.9 ^b
10	24	13.2±2.4	20.0±3.5 ^a	33.2±3.6 ^a

^{a,b} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

킨 다음, 배발달 배양액인 0.4 mg/ml BSA가 첨가된 NCSU-23에 7일간 배발달을 유기한 결과는 Table 7 및 Table 8과 같다.

수정후 48시간째 난할률은 첨가군간 69.2±5.4%에서 72.4±7.7%로서 유의성이 인정되지 않았으

나, 배반포기 도달률에 있어서는 배발달 6일째 대조군의 경우에는 8.6±0.4%, 첨가군이 각각 9.7±1.9%, 13.4±0.9%, 및 19.9±1.7%, 배발달 7일째에는 대조군의 경우에는 10.7±1.4%으로 나타났고, 첨가군은 각각 12.8±2.0%, 16.8±2.5% 및

21.9±2.4%으로서 모두 10 ng/ml 첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높은 배반포 도달률을 나타냈다. 또한, 배발달 7일째의 배반포기 수정란의 내부세포괴(inner cell mass, ICM)세포, 영양배엽(trophctoderm, TE)세포 및 총세포수를 조사한 결과, 내부세포괴세포는 10.0±5.0개에서 13.2±2.4개로서 유의성이 인정되지 않았으나, 영양배엽세포는 대조군 11.5±2.5개에 대하여 첨가군은 각각 13.5±2.8개, 11.9±2.4개, 20.0±3.5개로서 10ng/ml 첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높은 수를 나타냈다. 또한 총세포수에 있어서도 첨가군이 각각 25.2±2.8개, 26.2±2.9개, 33.2±3.6개로서 대조군(21.5±3.7)에 비하여 높은 수치를 나타냈지만, 10 ng/ml 첨가군만이 유의성(P<0.05)이 인정되었다.

이러한 결과를 보면, 돼지 난포란을 체외성숙시 IGF- I 의 첨가배양은 핵성숙물이나 자·웅진핵 형성술에는 영향을 미치지 않았으나, 6~7일 동안 배발달을 유기한 결과 10 ng/ml 첨가군에서 배반포 도달률 및 총세포수에서 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타내어 체외성숙시에 첨가배양하는 것이 적합한 것으로 조사되었는데, 이러한 결과는 Rieger 등(1998)이 소 체외성숙 배양액에 IGF- I 을 첨가시 높은 배발육을 보였다는 보고와 합치점을 찾을수 있는 결과라고 사료된다.

3) 배발달 배양액에 IGF- I 을 첨가한 경우의 배발달률

돼지 미성숙난포란을 체외성숙 기본 배양액인 NCSU-23 배양액에 성숙·수정 후 배발달 배양액인 0.4 mg/ml BSA가 함유된 NCSU-23 배양액에 IGF- I 을 1, 5 및 10 ng/ml 첨가하여 배발달을 유기한 결과는 Table 9, 및 Table 10과 같다.

체외수정 후 48시간 쯤 난할률을 조사한 결과

대조군을 포함한 모든 처리군에서 74.0±7.8%에서 78.9±2.2%로서 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 그러나, 초기배발달에 있어서는 체외배발달 6일째 배반포기 도달률은 대조군이 8.6±0.4% 처리군은 각각 9.7±1.9%, 13.4±2.4% 및 19.9±1.7%를 나타냈는데 10 ng/ml 첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높았으며, 배발달 7일째에도 대조군 10.7±1.4%에 대하여 IGF- I 첨가군은 각각 12.8±2.0%, 16.0±2.5%, 21.9±2.4%로서 6일째와 마찬가지로 10 ng/ml 첨가군에서 유의성(P<0.05)이 인정되었다.

첨가군별 ICM세포는 대조군 10.1±1.8개에 대하여 IGF- I 첨가군은 각각 14.3±1.6개, 11.2±2.1개, 23.7±2.7개였고, TE세포는 IGF- I 첨가군이 각각 11.9±2.4개, 13.4±2.3개, 22.4±3.4개였으며(대조군 10.5±2.4개), 총세포수에서도 같은경향을 보여서 대조군 20.7±2.9개에 대하여 첨가군은 각각 26.2±2.9개, 24.6±2.4개, 46.1±3.5개를 나타냈다. 이러한 결과들을 통계분석한 결과는 ICM세포, TE 세포 및 총세포수 모두에서 IGF- I 10 ng/ml 첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높은 세포수를 갖는 것으로 나타났다.

따라서 돼지 체외수정란을 체외배양할 때 IGF- I 10 ng/ml첨가배양은 배반포에 이르는 초기배발달 및 세포수에 효과적으로 작용하는 것으로 조사되었다.

이러한 결과는 Purohit 등(2005)이 Indian water buffalo 미성숙 난자를 TCM-199배양액으로 IGF- I 을 각각 0, 1, 5, 10 ng/ml 첨가하여 성숙·수정시킨후 배반포기 도달률을 조사하였을 때 63.2, 64.7, 74.7 및 81%로 10 ng/ml 첨가시 유의적으로 높은 배발달률을 나타냈다는 보고, Guler 등(2000) Sheep에서 TCM-199배양액에 IGF- I 10 ng/ml과 EGF 10 ng/ml씩 첨가하여

Table 9. Effects of different IGF- I concentrations on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Concentration (ng/ml)	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes cleaved	% (mean±SE) of embryos developing to blastocysts	
			Day 6	Day 7
0	221	74.0±7.8	13.8±0.3 ^b	13.6±1.7 ^b
1	203	75.6±5.2	14.7±5.0 ^b	15.7±4.5 ^b
5	212	80.1±0.1	15.0±0.7 ^b	16.0±0.2 ^b
10	195	78.9±2.2	20.8±0. ^a	25.0±0.8 ^a

^{a,b} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

Table 10. Effects of different IGF- I concentrations on mean cell number of porcine IVM/IVF derived embryos

Concentrations (ng/ml)	No. of blastocysts	No. of ICM cells (M±SE)	No. of TE cells (M±SE)	Total cell no. of blastocysts (M±SE)
0	15	10.1±1.8 ^b	10.5±2.4 ^b	20.7±2.9 ^b
1	21	14.3±1.6 ^{bc}	11.9±2.4 ^b	26.2±2.9 ^b
5	22	11.2±2.1 ^b	13.4±2.3 ^b	24.6±2.4 ^b
10	15	23.7±2.7 ^a	22.4±3.4 ^a	46.1±3.5 ^a

^{a,b,c} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

체외배양 하였을때 ProM I/MII도달률이 대조군이 59%인 반면, IGF첨가군은 86%이고 EGF첨가군은 84%라고 보고한 결과와 IGF- I의 첨가가 수정란의 발달을 촉진한다고 한 Grupen 등 (1995)의 보고등과 비교 검토해보면 부분적인 차이는 있지만 IGF- I이 배발달에 자극적으로 작용한다는 사실만은 합치되는 결과였다고 생각된다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지 난포란의 체외배양액과 배발달 배양액에 성장인자인 EGF와 IGF- I을 각각 0, 1, 5 및 10 ng/ml 첨가배양함으로써 돼지 난포란의 체외성숙과 체외배발달에 미치는 영향을 구명

하고자 실시하였다. 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 돼지 난포란을 체외성숙배양액인 NCSU-23 배양액에 EGF와 IGF- I을 각각 0, 1, 5 및 10 ng/ml 첨가배양하여 성숙을 유기한 다음, 체외수정을 실시한 결과, 모든 처리구에서 핵성숙률, 정자침투율, 응성전핵형성률, 다정자 침입률 및 평균침입정자수에서 유의적인 차이가 인정되지 않았다.
2. 체외수정을 실시한 후, 배발달 배양액인 NCSU-23에 7일간 배양한 결과, 배반포형성률은 EGF첨가군이 각각 11.2±1.5%, 15.0±0.8%, 16.8±2.8% 및 21.4±2.0%로서 10 ng/ml의 첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타

냈으며, IGF- I 첨가군도 10.7±1.4%, 12.8±2.0%, 16.0±2.5% 및 21.9±2.4%로서 10 ng/ml의 첨가군이 유의적으로 높은 결과를 나타냈다. 또한, 총세포수에 있어서도 EGF첨가군이 22.8±3.7개, 25.7±5.5개, 26.0±4.2개 및 35.1±4.7개, IGF- I 첨가군은 21.5±3.7개, 25.2±2.8개, 26.2±2.9개 및 33.2±3.6개로서 각각 10 ng/ml 첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타냈다.

3. 돼지 난포란을 체외성숙 기본배양액인 함유된 NCSU-23 배양액에 44시간동안 체외성숙을 유기한 다음, 체외 수정용배양액인 mTBM에 정자와 같이 6시간동안 공배양함으로써 체외 수정을 유기한 후, 배발달배양액인 NCSU-23에 EGF와 IGF- I을 각각 0, 1, 5 및 10 ng/ml 첨가하여 7일간 배양한 결과, 배반포기 도달률은 EGF첨가군에서 각각 14.0±1.7개, 16.2±1.4개, 16.9±1.2개, 23.1±1.6개로서 10 ng/ml 첨가군이 유의적으로 높은결과를 나타냈고, IGF- I 첨가군도 각각 13.6±1.7개, 15.7±4.5개, 16.0±0.2개 및 25.0±0.8개로 10 ng/ml군이 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타냈으며, 총세포수에 있어서는 EGF첨가군이 각각 21.8±2.9개, 25.2±2.8개, 39.7±2.7개 및 46.2±3.6개로 10 ng/ml첨가군이 유의적으로 높은 결과를 나타냈고, IGF- I 첨가군도 20.7±2.9개, 26.2±2.9개, 24.6±2.4개 및 46.1±3.5개로 10 ng/ml 첨가군이 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타냈다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, EGF와 IGF- I은 돼지 난포란의 체외성숙과 배발달과정에 영향을 미치며 특히, 10 ng/ml의 농도에서 효과적인 것으로 조사되었다.

참고문헌

1. Abeydeera, L.R. and B.N. Day. 1997. *in vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48:537-544.
2. Abeydeera, L.R., W.H. Wang, T.C. Cantley, A. Rieke, R.S. Prather, and B.N. Day. 1998. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol. Repro. Dev.* 51:395-401.
3. Bigger, J.D. 1987. Pioneering mammalian embryo culture. In: *The mamalian preimplantation embryo*. Bavister B. C(ed): Plenum Press New York: 1-22.
4. Boland, N.I. and R.G. Gosden. 1994. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J. Reprod. Fertil.* 101:369-374.
5. Brucker, C., N.J. Alexander, G.D. Hodgen, and B.A. Andow. 1991. Transforming growth factor- α augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 28:94-98.
6. Byun, T.H., S.H. Lee, and H.B. Song. 1991. Development of a rapid staining method of the oocytes from domestics animal. *Kor. J. Anim. Sci.* 33:25-31.
7. Coskun, S., A. Sanbuissho, Y. Lin, and Rikihisa. 1991. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology* 25:485-494.
8. Coskun, S. and Y.C. Lin. 1992. Site of action of epidermal growth factor(EGF) on *in vitro* porcine oocyte maturation in chemically defined medium. *Biol. Rprod.* 46:138.

9. Das, K., L.E. Hensleigh, G.E. Tagatz, W.R. Phipps, and B.S. Leung. 1991. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fert. Ster.* 55:1000-1004.
10. Ding, J. and G.R. Foxcroft. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* 39:30-40.
11. Downs, S.M. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biol.Reprod.* 41:371-379.
12. Downs, S.M., S.A. Daniel, and J.J. Eppig. 1988. Induction of maturation in cumuration in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulation hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J. Exp. Zool.* 245:86-96.
13. Edward, R.G. 1965. Maturation *in vivo* of mouse, shepp, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208:349-351.
14. Feng, P., K.J. Catt, and M. Knecht. 1988. Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* 122:181-188.
15. Eppig, J. J. 1982. The relationship between parthenogenetic embryonic development and cumulus cell-oocyte intercellular coupling during oocyte meiotic maturation. *Gamete Res.* 5:229-237.
16. Foote, W.D. and C. Thibault. 1969. REcherches experimentales lur la maturation *in vitro* des ovocytes de truie et de veau. *Annales de Biologie animal, de Biochimie et de Biophysique* 3:329-349.
17. Funahashi, H. and B.N. Day. 1993. Effects of follicular at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fert.* 99:97-103.
18. Funahashi, H., T. Cantley, and B.N. Day. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 101:159-165.
19. Gomez, E., J.J. Tarin, and A. Pellicer. 1993. Oocyte maturation in human: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil. Steril.* 122:181-186.
20. Grupen, C.G., H. Nagashima, and M.B. Nottle. 1995. Cysteamine enhances in vitro developmental ability of bovine oocytes matured-in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology* 36: 485-493.
21. Guler, A., N. Poulin, P. Mermillod, M. Terqui, and Y. Cognie. 2000. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 15:54(2):209-18.
22. Harper, K.M. and B.G. Brackett. 1993. Bovine blastocyst development after follicle-stimulating hormone and platelet-derived growth factor treatment for oocyte maturation in vitro. *Zygote* 1(1):27-34.
23. Hunter, R.H.F. and C. Polge. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.* 12:525-531.
24. Illera, M.J., P. Lorenzo, J.C. Illera, J. Sanchez, G. Silvan, and M. Illera. 1992. Epidermal growth factor increase the bovine oocyte maturation *in vitro*. *Proceeding of the 12th International Congress on Animal Reproduction* 1:339-341.
25. Li, J., R.H. Foote, and M. Simkin. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.* 49:33-37.
26. Lorenzo, P., M.J. Illera, J.C. Illera, and M. Illera. 1994. Enhancement of cumulus expansion and

- nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. J. Reprod. Fert. 101:697-701.
27. Machaty, Z., B.N. Day, and R.S. Prather. 1998. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. Biol. Reprod. 59:451-455.
 28. Mattioli, M., M.L. Bacci, G. Galeati and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology 31:1201-1209.
 29. Mattioli, M., G. Galeati, M.L. Bacci, and B. Barboni. 1991. Changes in maturation promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. Mol. Reprod. Dev. 30:119-125.
 30. McGaughey, R.W. 1977. the culturi of pig oocytes in minimal medium and the influence of progesterone and estradiol-17 β and meiotic maturation. Endocrinology 100:39-45.
 31. Minato, Y. and Y. Toyoda. 1982. Effect of homologous serum and follicular fluid on the cumulus expansion and maturation division of poverine oocytes. J. Reprod. Fert. 70:271-275.
 32. Pincus, G. and E.V. Enzmann. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. 1. The activation of ovarian eggs. J. Exp. Med. 62:665-675.
 33. Racowsky, C. 1991. Gamete resources: Origin and production of oocytes. In R. A. Pedersen, A. McLaren, N. FirstIeds): "Animal Application of Research in Mammalian Development." Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, p.22-82.
 34. Richter, J.D. and R.W. McGaughey, 1979. Specificity of inhibition by steroids of porcine oocyte maturation *in vitro*. J. Exp. Zool. 209(1):81-90.
 35. Rieger, D., A.M. Luciano, S. Modena, D. Pocar, A. Lauria, and F. Gandolfi. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert. 112: 123-130.
 36. SAS Insitute. 1996. SAS/STAT[®] user's guide, release 6.12 edition. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
 37. Schultz, R.M. 1988. Role of protein phosphorylation in meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*. ANN. NY. Sci. 541:219.
 38. Sommer, P., D. Rath, and H. Niemann. 1992. *In vitro* maturation of porcine oocytes in the presence of follicular granulosa cells., FSH and/or EGF. Proceeding of the 12th International Congress on Animal Reproduction vol. 1, p.378-380.
 39. Tsafriiri, A. and C.P. Channing. 1975. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 43(1):149-52.
 40. Ueno, S., T.F. Manganaro, and P.K. Donahoe. 1988. Human recombinant Mullerian inhibiting substance of rat oocyte meiosis is reversed by epidermal growth factor *in vitro*. Endocrinology 123:1652-1659.
 41. Yim, D.L., L.K. Opresko, H.S. Wiley, and R. Nuccitelli. 1994. Highly polarized EGF receptor tyrosine kinase activity initiates egg activation in *Xenopus*.