

## 한우 수정란의 발달 단계별 산소 소비량 변화

최창용<sup>1</sup>, 조상래<sup>1</sup>, 손준규<sup>1</sup>, 최선호<sup>1</sup>, 조창연<sup>1</sup>, 김재범<sup>1</sup>, 김성재<sup>1</sup>, 강다원<sup>2</sup>, 손동수<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, <sup>2</sup>경상대학교 의학전문대학원 생리학교실

## Changes in Oxygen Consumption Rates of Embryos in Korean Cattle

Changyong Choe<sup>1</sup>, Sang-Rae Cho<sup>1</sup>, Jun-Kyu Son<sup>1</sup>, Sun-Ho Choi<sup>1</sup>, Chang-Yeon Cho<sup>1</sup>, Jae-Bum Kim<sup>1</sup>,  
 Sung-Jae Kim<sup>1</sup>, Dawon Kang<sup>2</sup> and Dong-Soo Son<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Physiology, Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju 660-751, Korea

### ABSTRACT

Oxygen consumption has been regarded as a useful indicator for assessment of mammalian embryo quality. However, there was no standard criterion to measure the oxygen consumption of embryos. Here, we measured oxygen consumption of bovine embryos at various developmental stages was measured using a scanning electrochemical microscopy (SECM). We found that the oxygen consumption significantly increased in blastocyst-stage embryos compared to other stage embryos (from 2-cell-stage to morula-stage), indicating that oxygen consumption reflects the cell number ( $5.2\sim 7.6\times 10^{14}$  /mol s<sup>-1</sup> versus  $1.2\sim 2.4\times 10^{14}$  /mol s<sup>-1</sup>,  $p<0.05$ ). In the morula-stage embryos, the oxygen consumption of *in vivo* derived embryos was significantly higher than that of *in vitro* produced embryos ( $4.0\times 10^{14}$  /mol s<sup>-1</sup> versus  $2.4\times 10^{14}$  /mol s<sup>-1</sup>,  $p<0.05$ ). However, there was no significant difference in consumption of oxygen by *in vivo* and *in vitro*-derived bovine blastocyst-stage embryos ( $p>0.05$ ). In the frozen-thawed blastocyst-stage embryos, live embryos showed significantly higher oxygen consumption than dead embryos ( $4.7\times 10^{14}$  /mol s<sup>-1</sup> versus  $1.0\times 10^{14}$  /mol s<sup>-1</sup>,  $p<0.05$ ). These results indicate that the measuring oxygen consumption by SECM can be used to evaluate bovine embryo quality.

(Key words : oxygen consumption, embryo quality, blastocyst, Korean cattle)

### 서 론

가축의 개량을 주목적으로 활용되는 수정란이식 기술은 미국, 일본 등 축산 선진국을 위주로 널리 산업화되어 이용되고 있다. 2006년 전 세계적으로 121,912두의 소에서 777,747개의 수정란을 회수하여 670,711개의 수정란을 이식하였다(Thibier, 2007). 우리나라에서는 2007년 한우 561두, 젃소 165두로부터 각각 3,098개 및 788개의 체내수정란을 회수하였으며, 도축한 우의 난소로부터 체외수정란도 27,889개를 생산하였다. 생산된 수정란은 한우에서 체내수정란 1,601두, 체외수정란 6,384두, 젃소 체내수정란 380두를 이식하였으며, 이식된 수정란은 신선수정란 7,173두, 동결수정란 1,234두에 이식되었다(손 등, 2008b).

우리나라에서 소 수정란을 생산, 이식하고 있는 곳은 전국의 수의·축산 분야 대학, 국·공립 축산 관련 연구소, 농업기술센터, 생산자 단체, 수정란이식 개인기술소 등의 187개 관

련 기관에서 수정란을 취급하고 있을 정도로 수정란이식이 우리나라에서도 산업화 되어 있다고 할 수 있다. 수정란이식이 산업적으로 성공하기 위해 해결할 당면 과제 중의 하나가 수태율의 향상인데, 우리나라의 수정란이식 수태율이 45% 내외로 축산 선진국에 비해 낮은 편이다.

수태율을 높이기 위해서는 품질 좋은 수정란을 선택하여 이식하는 기술이 선행되어야 하는데, 지금까지 일반적으로 사용하고 있는 수정란의 등급 판별 기준은 국제수정란이식학회(International Embryo Transfer Society, IETS)에서 규정하고 있는 수정란의 형태학적 등급 판정 기준에 따라 실시하고 있다. 그러나 이와 같은 형태학적인 등급 판정은 그 결과가 검사자에 따라 주관적으로 이루어질 수 있으므로, 수정란의 생리학적인 근거에 기반을 둔 객관적인 등급 판정 기준의 마련이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 한우 수정란의 발달 단계에 따라 수정란이 소비하는 산소 소비량을 측정하여 수정란의 품질을 객관적으로 판정할 수 있는 방법을 개발하고자 수행

\* Correspondence : E-mail : sonds@korea.kr

하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 체내수정란의 생산

한우 체내수정란의 생산은 손 등(2008a)의 방법에 따라 실시하였는데, 난소 및 자궁질환이 없는 건강한 한우 공란우를 선발하여 day 0에 CIDR®(InterAg, New Zealand)를 삽입하고 estradiol benzoate(EB) 1 mg(SY Esrone, Samyang, Seoul, Korea) 및 progesterone(SY Ovaron, Samyang) 50 mg을 근육주사한 후 Day 4부터 FSH 제제인 Antorin®R·10(Kawasaki Pharm, Japan) 28 mg을 4일간 12시간 간격으로 감량 분할(5,5,4,4,3,3,2,2) 주사하였고, day 6 오전과 오후에 dinoprost(Lutalyse™, Pharmacia & Upjohn)를 각각 25 mg과 15 mg 주사하고 day 6 오후에 CIDR® 제거하여 과배란을 유도하였다. dinoprost 2차 투여 후 36시간에 gonadorelin 100 µg을 주사하였고, gonadorelin 주사 후 8시간과 24시간 후에 각각 동결정액 2 straws씩을 용해하여 2회 인공수정을 실시하였다. 수정란회수는 1차 인공수정 7~8일 후 3 way Foley catheter를 이용하여 수정란을 채란하였다.

#### 2. 체외수정란의 생산

한우 체외수정란의 생산은 도축장의 도축난소를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취한 난포란은 체외성숙을 위해서 TCM 199(Sigma) 배양액에 FSH(10 µg/ml), LH(10 µg/ml)와 5% FBS(Gibco)를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 22시간 체외성숙 후 체외수정에 공시하였고, 체외수정은 BO 배양액에서 6시간 동안 체외수정을 실시하였으며, 체외배양은 serum free 배양액에서 배양하여 7, 8일째까지 수정란을 발달시켰다.

#### 3. 수정란의 산소 소비량 측정

생산된 수정란의 산소 소비량 측정은 수정란 호흡 장치(FHK, HV-405, Japan)를 이용하였다. 수정란 호흡 장치는 주사형 전

기화학현미경(Scanning Electrochemical Microscopy, SECM)을 이용하여 전극 표면에 용존 산소의 환원 반응을 조사하여 수정란 부근의 산소 농도 분포를 측정하였다(Fig. 1). 측정 순서는 먼저 산소 소비량을 측정하기 위한 배양액(ERAM-2, IFP, Japan)이 들어있는 6개의 역원추형 plate(RAP-1, IFP, Japan)에 수정란을 주입한 후 주사속도 10 µm/s의 속도로 미세 전극이 160 µm 범위로 수정란 주변을 3반복 왕복하여 수정란 주변의 산소 소비량을 측정하였다. 측정된 산소 소비량은 구면 확산 방법으로 자동해석 program에 의해 자동으로 산출되었다.

#### 4. 통계 분석

실험 결과의 통계학적 분석을 위해 처리군의 유의성 검정( $p < 0.05$ )은 *F*-test를 실시하였고, 처리군간의 유의성 검정( $p < 0.05$ )은 ANOVA test를 실시하였다.

### 결 과

#### 1. 체외수정란의 발달 단계별 산소 소비량 변화

도축장 회수 난소에서 채취한 난자를 이용한 체외수정란의 발달 단계별 산소 소비량의 변화는 Table 1에서 보는 바와 같다. 난자의 산소 소비량은 채란 직후 난자와 체외성숙 후 난자에서 각각  $2.3 \times 10^{14}$  /mol s<sup>-1</sup>과  $3.1 \times 10^{14}$  /mol s<sup>-1</sup>을 나타내어 체외성숙된 난자가 미성숙난자에 비해 산소 소비량이 증가하였다. 체외성숙된 난자를 체외수정한 후 발육 단계별 산소 소비량을 측정된 결과 4세포, 8세포, 상실배, 배반포, 확장 배반포 및 부화 배반포에서 각각 1.9, 1.2, 2.4, 5.4, 5.2 및  $7.6 \times 10^{14}$  /mol s<sup>-1</sup>을 나타내었는데, 초기배 수정란은 난자의 산소 소비량과 별 차이를 나타내지 않았으나, 배반포 수정란의 경우 산소 소비량이 급격하게 상승하는 것을 확인하였다.

#### 2. 체내·외 수정란의 산소 소비량 비교

후기배 단계의 한우 체내수정란과 체외수정란의 산소 소비

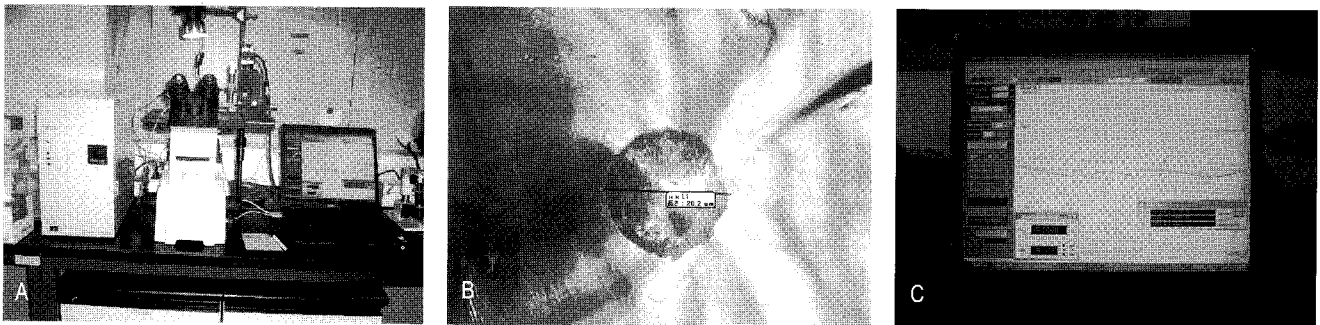


Fig. 1. Scanning electrochemical microscopy (SECM) system for measuring respiration activity of embryos. (A) SECM includes a measuring instrument on the inverted optical microscope. (B) Measurement of oxygen consumption rates by repeated practice. (C) Approach the microelectrode to the blastocyst stage embryo.

Table 1. Oxygen consumption rates of embryos at various developmental stages in Korean cattle

Embryonic stage	No. of embryos measured	Oxygen consumption rate ( $10^{14}/\text{mols}^{-1}$ )
Oocyte (Immatured)	5	2.3±0.3 <sup>a</sup>
Oocyte (Matured)	5	3.1±0.7 <sup>a</sup>
4 cell	5	1.9±0.3 <sup>a</sup>
8 cell	6	1.2±0.2 <sup>a</sup>
Morulae	8	2.4±0.3 <sup>a</sup>
Blastocyst	10	5.4±1.6 <sup>b</sup>
Expanded blastocyst	8	5.2±0.7 <sup>b</sup>
Hatched blastocyst	8	7.6±1.6 <sup>b</sup>

Data are represented as mean ± SD.

<sup>a,b</sup> Different superscripts indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

량을 측정된 결과 Table 2와 같이 조사되었다. 상실배 단계에서 체내수정란이  $4.0 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 을 나타낸 반면, 체외수정란은  $2.4 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 을 나타내어 체내수정란의 산소 소비량이 체외수정란에 비해 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높게 나타나는 것이 확인되었으며, 배반포 단계에서 체내수정란  $4.3 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ , 체외수정란  $5.4 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 을 나타내어 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나 체외수정란의 산소 소비량이 체내수정란에 비해 높게 나타났고, 확장 배반포 단계에서는 체내수정란  $5.5 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ , 체외수정란  $5.2 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 을 나타내어 체내수정란의 산소 소비량이 더 높을 것이라는 예상과는 달리 배반포 단계에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 2. Oxygen consumption rates of *in vivo* derived or *in vitro* developed embryos in Korean cattle

Embryonic stage		No. of embryos measured	Oxygen consumption rate ( $10^{14} / \text{mols}^{-1}$ )
Morulae	<i>In vivo</i>	2	4.0±0.3 <sup>a</sup>
	<i>In vitro</i>	8	2.4±0.3 <sup>b</sup>
Blastocyst	<i>In vivo</i>	13	4.2±0.6
	<i>In vitro</i>	10	5.3±1.5
Expanded BL	<i>In vivo</i>	5	5.5±0.5
	<i>In vitro</i>	8	5.2±0.7

Data are represented as mean ± SD.

<sup>a,b</sup> Different superscripts indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

3. 동결·융해 수정란의 생존 여부에 따른 산소 소비량 비교  
한우 체외수정란의 동결·융해 후 산소 소비량을 측정된 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 융해후 생존한 수정란의 산소 소비량은  $4.7 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 을 나타낸 반면 퇴축된 수정란은  $1.0 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 를 나타내어 퇴축 수정란은 산소 소비량도 낮아지는 것이 확인되었다( $p < 0.05$ ). 이는 수정란이 살아 있고, 세포수가 많다면 산소 소비량도 증가할 것이라는 추측을 객관적인 수치로 확인시켜 주었다.

### 고찰

FTA 대응 방안으로 고능력 한우 증식을 위한 수정란이식 기술의 접목이 요구되고 있으며, 한우의 능력 개량 및 브랜드 추진을 위한 우수 한우 수정란의 수요가 급증하고 있다. 그러나 이식 가능 체내수정란 회수율, 수정란이식 수태율 등과 같은 국내 소 수정란이식 기술 성적이 선진국에 비하여 저조한 실정이다. 수정란의 질을 판단하는 등급 판정의 기준은 국제 수정란이식학회(IETS)의 형태학적인 등급 판정에 의하여 이루어지고 있으나, 그 판정이 검사자에 따라 주관적으로 이루어질 수 있다. 수정란이 배반포까지 발달하면서 세포수가 증가함에 따라 수정란의 산소 소비량도 증가하게 되므로 수정란의 산소 소비량을 측정할 수 있다면 과학적이고, 객관적인 수정란의 질을 판정할 수 있을 것이다.

수정란을 검사하는 방법으로 수정란을 직접 염색(Kardymowicz, 1972; Schilling 등, 1979)하거나, 효소 활성도 측정(Schilling 등, 1979), glucose 소비량을 측정(Renard 등, 1980)하는 방법을 이용하여 왔으나, 위의 방법들은 대부분 수정란에 직접 손상을 줄 수 있으며, 단일 수정란에 대한 평가가 어려운 편이다.

수정란의 생리화학적 대사 활성에 기반을 두면서 수정란 자체에 손상을 주지 않는 객관적인 등급 판정이 요구되는데, Overstrom 등(1989, 1992)은 수정란의 호흡율(산소 소비량)이 생존성과 밀접한 상관관계가 있다고 하였다. 따라서 살아 있는 수정란과 죽은 수정란, 품질이 좋은 수정란과 좋지 않은 수정란은 대사 활성에 따른 세포의 산소 소비량도 차이가 있는 것이

Table 3. Oxygen consumption rates of frozen-thawed *in vitro* developed embryos in Korean cattle

Status of frozen-thawed embryos	No. of embryos measured	Oxygen consumption rate ( $10^{14} / \text{mols}^{-1}$ )
Live	6	4.7±0.3 <sup>a</sup>
Dead	5	1.0±0.2 <sup>b</sup>

Data are represented as mean ± SD.

<sup>a,b</sup> Different superscripts indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

확인되었다. 수정란의 산소 소비량 측정은 spectrophotometer (Magnusson 등, 1986), fluorescence(Houghton 등, 1986), electrochemical(Trimarchi 등, 2000)을 이용하는 등 여러 가지 기술을 이용하다가 Shiku 등(2001)이 scanning electrochemical microscopy(SECM)를 이용하여 수정란의 산소 소비량을 측정하는데 활용하기 시작하여 Abe 등(2004, 2006), Agung 등(2005), Lopez 등(2005, 2007a, b)이 수정란에 응용하고 있다.

Abe 등(2006)은 수정란의 산소 소비량이 높을수록 배반포 수정란의 발달률이 증가한다고 하였으며, Abe 등(2006)과 Lopez 등(2007)은 수정란의 산소 소비량이 높을수록 수태율이 높아진다고 보고하였다. 또한, 수정란이 발달하면서 할구의 수도 많아지고, 대사 활성도 증가함에 따라 산소 소비량도 증가하는 것이 여러 연구자들에 의해 보고되고 있는데(Abe 등, 2006; Lopez 등, 2007), 본 연구에서도 배반포 이후의 후기배 수정란으로 발달될수록 수정란의 산소 소비량이 월등히 높아지는 것을 확인하였다. Abe 등(2006)은 수정란의 형태학적 등급이 국제수정란이식학회의 등급 판정 기준 3등급(fair), 4등급(poor)의 경우 1등급(excellent)과 2등급(good)에 비해 산소 소비량이 낮다고 하였다. Lopez 등(2007)은 형태학적 등급이 동일한 체내수정란과 체외수정란 사이에는 산소 소비량의 차이가 없다고 하였는데, 본 연구에서는 상실배 단계의 수정란에서는 체내수정란이 체외수정란보다 산소 소비량이 유의적으로 높은 반면, 배반포 단계 이상의 후기배 수정란에서는 체내·외 수정란 사이에 산소 소비량의 유의적인 차이가 없어 Lopez 등(2007)의 연구와 유사한 결과를 확인하였다.

본 연구에서 동결·융해 후 퇴축된 수정란의 산소 소비량이 생존 수정란에 비해 현격하게 떨어졌는데, 이는 퇴축 수정란은 생리학적으로도 그 기능이 정지되었다는 것이 수치상으로 확인되었다.

본 연구를 통해 수정란이 살아 있고, 세포수가 많다면 산소 소비량도 증가할 것이라는 추측을 객관적인 수치로 확인하게 되었는데, 이를 바탕으로 지속적이고, 다양한 연구를 수행하여 품질이 좋은 수정란을 선택하고 이를 이식하여 수정란이식 수태율을 향상시킴으로써 축산 농가의 경제성을 높일 수 있는 좋은 활용 방안이 될 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구는 한우 수정란의 발달 단계별 산소 소비량을 확인하고, 이를 바탕으로 수정란의 객관적인 등급 판정 기준을 마련하고자 수행하였다. 체외성숙된 난자를 체외수정란 후 발육 단계별 산소 소비량을 측정된 결과, 미성숙 난자, 성숙난자, 4세포, 8세포, 상실배, 배반포, 확장 배반포 및 부화 배반포에서 각각 2.3, 3.1, 1.9, 1.2, 2.4, 5.4, 5.2 및  $7.6 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 을 나타내었는데, 초기배 수정란은 난자의 산소 소비량과 별 차이

를 나타내지 않았으나, 배반포 단계 이상 수정란의 경우 산소 소비량이 급격하게 상승하는 것을 확인하였다. 한우 체내수정란과 체외수정란의 산소 소비량을 측정된 결과, 상실배 단계에서는 체내수정란이  $4.0 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 로서 체외수정란의  $2.4 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 에 비해 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높은 반면 배반포 이상의 단계에서는 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다. 한우 체외수정란의 동결·융해 후 생존 여부에 따른 산소 소비량을 측정된 결과 융해후 생존한 수정란은  $4.7 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 을 나타낸 반면 퇴축된 수정란은  $1.0 \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ 을 나타내어 퇴축 수정란의 산소 소비량이 급격히 떨어지는 것을 확인하였다.

## 참고문헌

- Abe H, Shiku H, Aoyagi S and Hoshi H. 2004. *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. J. Mamm. Ova. Res. 21:22-30.
- Abe H, Shiku H, Yokoo M, Aoyagi S, Moriyasu S, Minamihashi A, Matsue T and Hoshi H. 2006. Evaluating the quality of individual embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. J. Reprod. Dev. 52:S55-S64.
- Agung B, Otoi T, Abe H, Hoshi H, Murakami M, Karja NWK, Murakami MK, Wongsrikeao P, Wateri H and Suzuki T. 2005. Relationship between oxygen consumption and sex of bovine *in vitro* fertilized embryos. Reprod. Dom. Anim. 40:51-56.
- Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ and Leese HJ. 1996. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. Mol. Reprod. Dev. 44:476-485.
- Kardymowicz O. 1972. A method of vital staining for determining the viability of fertilized sheep ova stored *in vitro*. Proc. 7th International Congress on Animal Reproduction & AI, Munich. 1:503-506.
- Lopez AS, Greve T and Callesen H. 2007. Quantification of embryo quality by respirometry. 2007a. Theriogenology 67: 21-31.
- Lopez AS, Larsen LH, Ramsing N, Lovendahl P, Raty M, Peippo J, Greve T and Callesen H. 2005. Respiration rates of individual bovine *in vitro*-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. Reproduction 130:669-679.
- Lopez AS, Madsen SE, Ramsing NB, Lovendahl P, Greve T and Callesen H. 2007b. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* and

- correlation with viability following transfer. Hum. Reprod. 22:558-566.
- Magnusson C, Hillensjo T, Hamberger L and Nilsson L. 1986. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown *in vitro*. Hum. Reprod. 1:183-184.
- Overstrom EW, Burke PA, Hagopian SS and Selgraph JP. 1989. Blastocyst oxidative metabolism and embryo viability. J. Cell Biol. 107:607(Abstract).
- Overstrom EW, Doby RT, Dobrinsky J, Roche JF and Boland MP. 1992. Viability and oxidative metabolism of the bovine blastocyst. Theriogenology 37:269(Abstract).
- Renard JP, Philippon A and Menezo Y. 1980. *In vitro* uptake of glucose by bovine blastocysts. J. Reprod. Fertil. 58:161-164.
- Schilling E, Niemann H, Cheng SP and Duepke HH. 1979. DAPI-a further fluorescence test for diagnosing the viability of early cow and rabbit embryos. Zuchthyg, 14:170-172.
- Shiku H, Shiraishi T, Aoyagi S, Utsumi Y, Matsudaira M, Abe H, Hoshi H, Kasai S, Ohya H and Matsue T. 2004. Respiration activity of single bovine embryos entrapped in a cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy. Analytica Chimica Acta 522:51-58.
- Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, Matsue T, Abe H, Hoshi H and Kobayashi M. 2001. Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. Anal. Chem. 73:3751-3758.
- Thimier M. 2007. New records in the numbers of both *in vivo*-derived and *in vitro*-produced bovine embryos around the world in 2006. IETS Newsletter 25:15-20.
- Trimarchi JR, Liu L, Smith PJS and Keefe DL. 2000. Noninvasive measurement of potassium efflux as an early indicator of cell death in mouse embryos. Biol. Reprod. 63:851-857.
- 손동수, 최창용, 조상래, 최선희, 김현중, 김일화. 2008a. 한우 공란우의 1차 과배란처리 반응 불량개체의 2차 반응. 한국 수정란이식학회 춘계학술대회 p 75.
- 손동수, 최창용, 조상래, 최선희, 김현중. 2008b. 2007년도 한우 및 젖소에서 수정란 생산 및 이식 실태. 제8회 발생공학 국제심포지엄 및 학술대회 p 46-47.

---

(접수일: 2009. 8. 29 / 채택일: 2009. 9. 11)