

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 Thymidine 처리 효과

민성훈 · 박흠대[†]

대구대학교 생명공학과

Effect of Thymidine on *In Vitro* Maturation of Immature Porcine Follicular Oocytes

Sung-Hun Min and Humdai Park[†]

Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to examine the effect of thymidine treatment during *in vitro* maturation (IVM) of porcine follicular oocytes on blastocyst development. Porcine oocytes were treated with thymidine (10 mM, 20 mM and 30 mM) for 2 or 6 hr in the periods of IVM I and/or II. The survival rates of the blastocysts in the 6 hr treatment groups of 10 mM and 20 mM during IVM I period were significantly higher than those of control group ($p < 0.05$). However, the survival rate of the blastocysts in the 2 hr treatment group of 20 mM during IVM II period was significantly higher than control group ($p < 0.05$). Furthermore, the survival rate of the blastocysts in the 6 hr treatment group of 30 mM during IVM II period was significantly lower than control group ($p < 0.05$). Consistent with the previous result, blastocyst development of both IVM I and II treatment group was also showed as similar pattern. Total and apoptotic cell numbers of blastocysts derived from thymidine treated porcine oocytes were examined by using Tunel assay. The results showed that there was no significant differences in total cell number of blastocysts between thymidine treated and untreated groups. However, apoptosis-positive cells in the thymidine treated group (6 hr IVM I) were significantly lower than those of other groups ($p < 0.05$). Taken together, these results indicate that high quality oocytes were selected by DNA synthesis mechanism according to high concentration thymidine treatment during porcine oocyte maturation. Therefore, we concluded that presumptive selected oocytes by thymidine treatment during maturation periods improved the further embryo development and embryonic quality of IVF embryos by decreasing the incidence of apoptosis in preimplantation porcine embryos.

(Key words : IVM, Thymidine, Tunel assay, Embryonic selection, Pig)

서 론

돼지의 경우, 유전적 개량 기술과 생산성, 번식효율의 향상, 바이오 장기 생산 등을 연구하기 위해서는 미성숙 난포란의 이용이 필수불가결하다. 이들의 이용효율을 향상시키기 위해서는 생화학적 기술을 토대로 미성숙 난포란의 효율적인 배양에 관한 연구는 매우 중요하다. 그러나 다른 동물과 달리 돼지 미성숙 난포란은 체외에서 성숙하는 동안 핵 성숙은 충분하게 진행되지만, 세포질 성숙은 불충분하다는 것이 체외성숙 후 낮은 수정율(Kishida 등, 2004), 체외 수정란의 배반포로의 발생률도 체내 수정란과 비교하여 현저히 낮다(Alm 등, 2005)는 것으로부터 증명되었다. 따라서 미성숙 난포란으로부터 체외 배반포

로의 발생율을 높이기 위해서 질 좋은 난포란을 선별해야 하며, 이것을 위해서 난소의 형태, 난포의 크기, 미성숙 난포란 형태, 난구세포의 부착과 확장, 세포질의 균일도 등 난포란의 형태적인 선별법(Byun 등, 1992; Hulin-ska 등, 2011)을 이용하였지만, 이렇게 선별된 난자의 체외발달능력(De 등, 1992; Gordon, 2003)도 불충분하다는 것이 밝혀졌기 때문에, 돼지 난자의 체외생산에 있어서 난포란의 형태적 선별은 많은 문제점을 가지고 있다.

한편, 체세포에 있어서 단백질 합성은 *de novo* 경로와 salvage 경로에 의해 이루어지고 있다. 단일항체의 생산에 이용되고 있는 HAT(Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine) 배지는 *de novo* 경로를 차단하는 역할을 가지고 있으며, 이 성질을 이용하여 B 림프구와 myeloma 세포가 융합된 hybridoma 배양과정에서 *de novo* 경로만을 가

* 본 연구는 2011학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-850-6554, E-mail: humdai@daegu.ac.kr

지고 있는 myeloma 세포를 선택적으로 제거할 수 있다 (Toyama 등, 1987). 이와 같은 성질을 이용하여 Han 등 (2000)은 소 수정란을 배양하는 동안 HAT 배지를 첨가하여 배반포 발생에는 효과가 없었지만, 배반포 부화율을 촉진시켰다고 보고하였다. 또한, Snow(1973)는 배지 속에 과잉의 thymidine 첨가는 체외에서 생산된 mouse 배반포의 생산과 품질에 나쁜 영향을 주지만, 낮은 농도에서의 배반포 생존율에는 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 이러한 과잉의 thymidine의 역할은 세포증식 저해 및 세포주기 중 maturation promoting factor와 maturation activated protein의 활성을 억제(Opitz 등, 1975; Evans 등, 1976; Ebeling 등, 2011)하며, 배 발달 과정 동안 *de novo* 경로에서 차단된 DNA 합성 과정을 salvage 경로의 thymidine kinase를 활성화시켜 정상세포에서만 선택적으로 DNA 합성을 조절해줌으로써 목적세포를 선별(Kwong 등, 2010)할 수 있다. 이와 같이 난자의 체외생산에 있어서 형태적 선별이 아니라, 고품질의 난자를 선별하기 위하여 생화학적 방법도 이용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 체외성숙 배지에 thymidine을 첨가하여 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 과정 동안 고품질의 미성숙 난포란을 선별하고, 배반포로의 배 발달을, 배반포의 생존율 및 체외생산된 배반포의 품질을 세포사멸지수로서 검토하였다.

재료 및 방법

배양액

난소로부터 미성숙 난포란 회수 및 세척용 배지는 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfoic acid (Hepes)에 3 mg/ml BSA를 첨가한 Tyrode's lactate(TL)-Hepes 용액(Prather 등, 1995)을 사용하였다. 돼지 미성숙 난포란 체외성숙 배지는 North Carolina State University (NCSU) 23 용액(Petters와 Wells, 1993)에 0.6 mM cysteine, 10 ng/ml EGF, 10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml hCG와 10% 난포액(Funahashi 등, 1993; Niwa, 1993)을 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 난소에서 직경이 3~6 mm 정도의 난포로부터 채취하여 4°C에서 30분간 1,600×g로 원심분리 후 0.45 μm filters로 여과하여 -20°C에 보관 후 사용하였다. 체외수정용 배지는 1 mg/ml BSA와 2.5 mM caffeine을 첨가한 modified Tris-buffered medium (mTBM) 용액(Abeydeera와 Day, 1997)을 사용하였고, 정자 처리용 배지는 1 mg/ml BSA, 75 mg/ml penicillin G, 25 mg/ml gentamycin이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(dPBS) 용액을 사용하였다. 체외배양용 배지는 0.3% BSA를 첨가한 porcine zygotes medium(PZM) 3 용액(Yoshioka, 2002)을 사용하였다.

체외 성숙, 수정 및 배양

도축장에서 난소를 회수하여 75 μg/ml penicillin G와 50 μg/ml streptomycin이 첨가된 생리식염수 용액에 옮겨 25~30°C의 온도를 유지하여 실험실로 운반하였다. 난포란은 직경 3~6 mm의 난포로부터 18 g 주사바늘이 부착된 주사기로 흡입한 후 실험 현미경 하에서 회수하였

다. 회수한 난포란은 TL-Hepes 용액으로 3번 세척한 뒤 NCSU-23에서 3회 세척하였다. 난포란은 체외성숙용 배지에서 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22시간 동안 배양(IVM I)한 후, 다시 PMSG와 hCG가 첨가되지 않은 배지에서 추가적으로 22시간 배양(IVM II)하여 체외성숙을 유도하였다. 체외수정용 정액은 다비육중회사로부터 돼지 액상 정액을 구입하였으며, 체외수정용 정자는 dPBS 용액과 1:1로 혼합한 후 300×g에서 3분간 원심분리를 통하여 3회 세척하고, swim-up 방법으로 고회력 정자를 회수하여 준비하였다. 체외성숙이 완료된 난포란은 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TL-Hepes 용액에 5분간 침지하여 pipetting을 통해 난구세포를 제거하고, mTBM 용액으로 3회 세척한 다음 체외수정용 배지 50 μl 소적에 난자를 15개씩 넣은 후 정자의 최종 농도가 1.5×10⁵ spermatozoa/ml 이 되도록 정자를 주입하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 동안 배양함으로써 체외수정을 유도하였다. 체외수정 6시간 후 수정란은 PZM-3 용액으로 3회 세척하여 50 μl의 PZM-3 용액에 30개씩 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 수정란의 관찰은 배양 2.5일째에 난할을 확인하였으며, 배양 6일째 배반포 형성을 관찰하였다. 한편, 배반포의 품질은 배양 7.5일째에 배반포 생존율로서 확인하였다. 그리고 실험의 목적에 따라 체외생산된 배반포의 총 세포수와 세포사멸 수를 TUNEL 분석 방법에 의해 조사하였다.

TUNEL Assay

TUNEL kit는 *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescent(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 1번과 2번을 사용하였으며, 혼합은 1:9의 비율로 희석하였다. 체외수정 후 배양 7.5일째 생산된 배반포를 0.1% polyvinylpyrrolidone(PVA)이 첨가된 dPBS 용액으로 3회 세척한 후 4% paraformaldehyde가 첨가된 dPBS 용액에 침지시켜 4°C에서 1시간 고정시켰다. 고정된 배반포를 PVA-dPBS 용액으로 3회 세척하여 0.1% Triton X-100이 첨가된 dPBS 용액에 다시 침지시켜 4°C에서 30분간 냉장 보관한다. 그리고 PVA-dPBS 용액으로 3회 세척하여 TUNEL kit를 혼합한 용액에 침지시켜 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양 후 PVA-dPBS 용액으로 3회 세척한 후 DAPI가 첨가된 10 μl mounting medium으로 고정된 배반포를 옮겨 형광현미경(Olympus, Japan)으로 배반포의 전체 세포수와 세포사멸 수를 조사하였다.

실험 설계

실험 1

체외성숙 시 IVM I 시기에 thymidine의 처리 시간은 2시간과 6시간이었으며, 처리농도는 10 mM, 20 mM 그리고 30 mM이었다. 그리고 IVM II 시기에는 thymidine을 첨가하지 않은 배지에 옮겨서 22시간 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

실험 2

체외성숙 시 IVM I 시기에는 thymidine을 처리하지 않고 기본 배지에 배양하여 IVM II 시기에 thymidine을

처리하여 체외성숙을 유도하였다. 처리 시간과 농도는 실험 1과 같다.

실험 3

체외성숙 시 IVM I과 IVM II 시기에 thymidine을 처리하여 체외성숙을 유도하였으며, 처리 시간과 농도는 실험 1과 실험 2의 결과를 토대로 하였다.

통계처리

본 실험에서의 각 처리 구는 최소한 4회 이상 반복 실시하였다. 실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test를 이용하여 실시하였으며, SigmaPlot 2001 program을 이용하여 유의차를 검정하였다.

결 과

체외성숙 기간 동안 Thymidine 처리 효과

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시 IVM I 시기에 thymidine 처리효과는 Table 1과 같다. 처리 시간 2시간의 경우, 10 mM, 20 mM 그리고 30 mM 처리군에서의 난 분할율, 배반포로의 발생률 및 배반포 생존율의 각각은 대조군과 비슷하였다. 한편, 처리 시간 6시간의 경우, 10 mM과 20 mM 처리군에서의 배반포 생존율은 각각 85.3%와 85.0%로서 대조군의 46.6%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시 IVM II 시기에 thymidine 처리효과는 Table 2와 같다. 처리 시간 2시간의 경우, 10 mM과 30 mM 처리군에서의 난 분할율, 배반포로의 발생률은 대조군과 비슷하였지만, 배반포 생존율은 대조군보다 약간 높았다. 그러나 20 mM 처리군에서의 각각의 발생률 중 특히 배반포 생존율 90.5%는 대조군의 60.7%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편, 처리 시간 6시간의 경우, 10 mM과 20 mM 처리군에서의 난할율, 배반포로의 발생률 및 배반포 생존율은 대조군과 유사하였으나, 30 mM 처리군에서는 배반포의 생존율이 33.3%로서 대조군보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

그리고 Table 1과 Table 2를 종합하여, 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시 IVM I과 IVM II 각각의 시기에 thymidine 처리효과는 Table 3과 같다. 처리 시간 2시간의 경우, 10 mM과 30 mM 처리군에서의 난 분할율과 배반포로의 발생률은 대조군과 비슷하였고, 그리고 각각의 배반포의 생존율은 약간 높은 경향이였지만, 유의차는 없었다. 그러나 20 mM 처리군에서의 난 분할율과 배반포로의 발생률은 대조군과 비슷하였지만, 특히 배반포 생존율은 80.8%로서 대조군의 58.3%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편, 처리 시간 6시간 경우, 10 mM, 20 mM 그리고 30 mM 처리군에서의 난 분할율과 배반포로의 배발생율은 대조군과 비슷하였다. 그러나 특히 배반포 생존율은 10 mM과 20 mM 처리군에서의 91.3%와 82.1%는 대조군의 58.3%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

Thymidine 처리에 의해 체외생산된 배반포의 질적 분석

Table 1에서 thymidine 6시간, 처리농도는 각각 10 mM

과 20 mM에서 생산된 배반포의 품질을 평가한 결과는 Table 4와 같다. 각각의 처리군에서 생산된 배반포의 총 세포수는 대조군에서 생산된 배반포의 그것과 비슷하였다. 그러나 배반포의 사멸된 세포수는 각각의 처리군에서 2.4 ± 1.2 개와 3.4 ± 1.7 개로 대조군의 5.1 ± 1.3 개보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

그리고 Table 2에서 thymidine 2시간, 처리농도 20 mM에서 생산된 배반포의 품질을 평가한 결과는 Table 4와 같다. 처리군에서 배반포의 총 세포수와 세포사멸 수는 대조군과 비슷하였다.

한편, Table 3에서 thymidine 2시간, 처리농도 20 mM (A 처리군) 및 6시간, 처리농도 10 mM(B 처리군)에서 각각 생산된 배반포의 품질을 평가한 결과는 Fig. 1과 Table 4에 나타난 바와 같다. 각각의 처리군에서 생산된 배반포의 총 세포수는 대조군과 비슷하였다. 그러나 생산된 배반포의 세포사멸 수는 A 처리군에서는 대조군과 비슷하였지만, B 처리군에서의 3.6 ± 1.4 는 대조군의 5.1 ± 1.3 보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

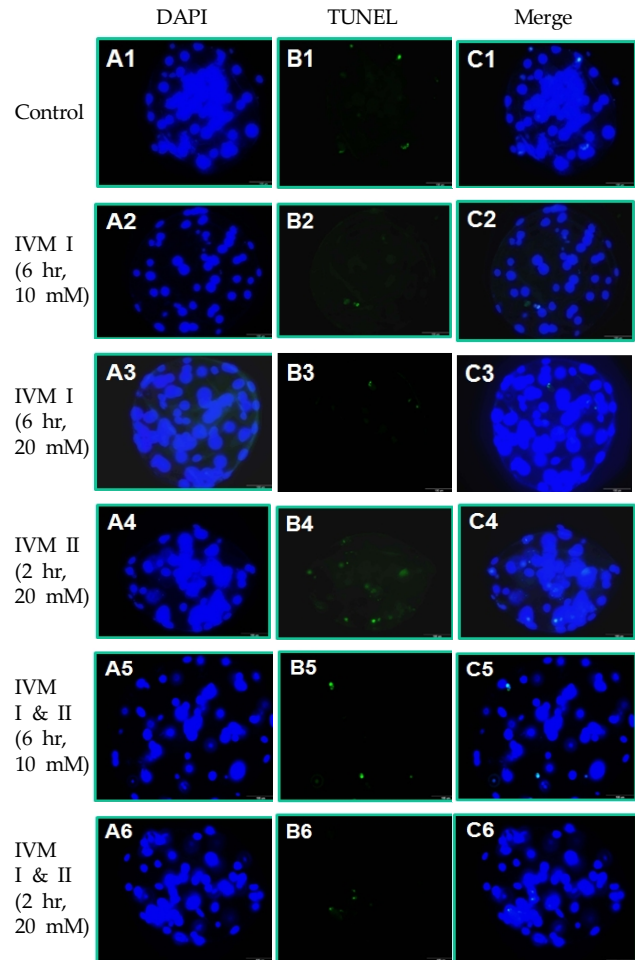


Fig. 1. Apoptosis scanning image of pig blastocyst *in vitro*. A1~A6) The chromatin content is stained by DAPI (blue), B1~B6) Fragmented DNA is labeled by the TUNEL reaction (green), and C1~C6) Colocalization with DAPI is indicated as blue-green, scale bar=100 μ m.

Table 1. Effects of various time and concentration of thymidine during IVM I period on development to blastocysts of porcine oocytes

Treated-time (hr)	Concentration (mM)	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos cleaved	No.(%) of blastocysts on Day-6	No.(%) of blastocysts on Day-7.5
Control	0	160	115 (71.9)	37 (32.2)	18 (48.6) ^a
	10	158	104 (65.8)	43 (41.3)	29 (67.4) ^a
	20	162	110 (67.9)	49 (44.5)	28 (57.1) ^a
2	30	150	106 (70.7)	33 (31.1)	22 (66.7) ^a
	10	158	109 (69.0)	34 (31.2)	29 (85.3) ^b
	20	153	103 (67.3)	40 (38.8)	34 (85.0) ^b
6	30	138	96 (69.6)	32 (33.3)	14 (43.8) ^a

Values with different superscripts letters within a column differ significantly ($p<0.05$).

Table 2. Effects of various time and concentration of thymidine during IVM II period on development to blastocysts of porcine oocytes

Treated-time (hr)	Concentration (mM)	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos cleaved	No.(%) of blastocysts on Day-6	No.(%) of blastocysts on Day-7.5
Control	0	127	90 (70.9)	28 (31.1)	17 (60.7) ^a
	10	125	66 (52.8)	28 (42.4)	18 (64.3) ^{ab}
	20	110	68 (61.8)	21 (30.9)	19 (90.5) ^a
2	30	103	52 (50.5)	26 (50.0)	19 (73.1) ^{ab}
	10	121	56 (46.3)	24 (42.9)	13 (54.2) ^a
	20	101	55 (54.5)	21 (38.2)	13 (61.9) ^a
6	30	97	59 (60.8)	18 (30.5)	6 (33.3) ^b

Values with different superscripts letters within a column differ significantly ($p<0.05$).

Table 3. Effects of various time and concentration of thymidine during IVM I & II periods on development to blastocysts of porcine oocytes

Treated-time (hr)	Concentration (mM)	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos cleaved	No.(%) of blastocysts on Day-6	No.(%) of blastocysts on Day-7.5
Control	0	173	131 (75.7)	46 (35.1)	27 (58.7) ^a
	10	167	108 (64.7)	33 (30.6)	20 (60.6) ^{ab}
	20	154	99 (64.3)	26 (26.3)	21 (80.8) ^b
2	30	144	93 (64.6)	30 (32.3)	23 (76.7) ^{ab}
	10	148	100 (67.6)	23 (23.0)	21 (91.3) ^b
	20	151	101 (66.9)	39 (38.6)	32 (82.1) ^b
6	30	137	76 (55.5)	24 (31.6)	14 (58.3) ^{ab}

Values with different superscripts letters within a column differ significantly ($p<0.05$).

Table 4. Effect of thymidine treatment during IVM I, II and I & II periods on apoptotic patterns of porcine blastocysts

Treated period (hr)	Concentration (mM)	No. of blastocysts	Apoptosis(nuclei)	
			DAPI	TUNEL
Control	0	18	38.9±5.8	5.1±1.3 ^a
IVM I (6)	10	18	45.7±7.7	2.4±1.2 ^b
	20	18	42.3±7.0	3.4±1.7 ^b
IVM II (2)	20	19	39.8±7.1	5.9±3.7 ^a
IVM I & II (2)	20	21	35.9±2.9	5.2±1.9 ^a
IVM I & II (6)	10	20	37.9±3.7	3.6±1.4 ^b

Values with different superscripts letters within a column differ significantly ($p<0.05$).

고 찰

일반적으로 체외에서 포유동물 난포란으로부터 생산된 이식 가능한 배반포는 태아로의 발달이 체내에서 생산된 것보다 발생율이 낮다(Khurana 등, 2000). 그 이유로 생각되는 것은 먼저 배반포의 체외생산 환경이 체내보다 미흡(Kitagawa 등, 2004)하다고 알려져 있으며, 또한 도축된 동물의 난소로부터 회수되어 체외성숙에 제공되는 난포란은 거의 형태적 선별(Ebner 등, 2003; Gordon 등, 2003)에 의존하고 있으며, 이러한 난포란의 형태적 선별은 많은 연구자의 주관과 경험에 의존하고 있는 등 많은 문제점을 가지고 있다. 따라서 효율적인 배반포의 체외생산을 위하여 배양환경을 개선하는 것이 시급하지만, 여기에는 많은 조건들을 해결하지 않으면 안된다. 또한, 배양에 제공되는 난포란의 선별에 있어서 기존의 형태적 방법으로는 한계가 있기 때문에, 생화학적 방법을 이용하여 보다 객관적 선별법이 필요하다. 이와 같은 것을 토대로 Han 등(2000)은 소 난포란의 선별에 있어서 HAT 배지를 이용하기도 하였다.

한편, 돼지 미성숙 난포란은 체외성숙이 되는 동안 핵과 세포질 성숙을 하며, 이 중 핵 성숙은 배지 속에 첨가되는 성장인자와 호르몬의 작용(Ebeling 등, 2007), 난구세포의 mitogen activated protein kinase(MAPK) 활성화에 의해 일어날 것이다(Shimada 등, 2001; Fan 등, 2003; Liang 등, 2005). 그러나 핵 성숙이 일어나는 시간(~24시간)은 소(~8시간)와 양(~8시간)보다 오랜 시간을 필요로 한다(Fan 등, 2004). 또한, 세포질 성숙은 난구세포에서 생산된 성숙촉진물질이 gap junction을 통해 난자로 이동하여 일어나며(Mori 등, 2000), 핵 성숙과 마찬가지로 세포질 성숙이 일어나는 시간(24~32시간)도 다른 종보다 2배 정도의 시간을 필요로 한다(Mori 등, 2000). 따라서 돼지 미성숙 난포란을 이용한 체외성숙기술은 고품질의 배반포 생산을 위한 가장 기초적이면서 중요한 과정이며, 특히 불완전한 배반포의 발생을 나타내는 돼지의 경우가 기술의 향상은 다른 동물에 비해 더욱 필요하다.

본 연구에서는 돼지 미성숙 난포란의 IVM I과 IVM II 기간 동안 thymidine을 배지에 처리하여 난 분할율, 배반포로의 발생률 및 배반포 생존율을 검토하였다(Table 1~3). IVM I 시기에 thymidine을 처리한 결과, 처리 시간이 짧은 경우(2시간)에는 thymidine 처리농도와 배 발생 능력과는 관계가 없었다. 그러나 처리 시간(6시간)이 길어지며, 배반포 생존율이 높아진다는 것을 확인하였다(Table 1). 이것은 도축 난소로부터 회수한 돼지 미성숙 난포란의 발생단계는 여러 종류가 있기 때문에, 배양초기에는 배양환경의 적응 후 일정한 시간이 경과해야 핵 성숙이 시작된다는 것을 의미한다. 한편, 과잉의 thymidine 처리는 세포배양 과정 중 thymidine을 mM 단위로 첨가 시 세포내 항 증식성 효과가 나타나기 때문에 세포증식을 저해시키고(Opitz 등, 1975; Evans와 Booth, 1976), 또한 과잉의 thymidine은 세포주기 중 S기에서 DNA 합성을 정지시키는 것을 이용하여 Blumenreich 등(1984)은 백혈병과 림프종에 걸린 환자의 골수에 과잉의 thymidine을 지속적으로 주입한 결과, 항상 S기 상태로 정지된 세포가 증가한다는 것을 보고하였다. 한편, 돼지 미성숙 난포란의 GVBD 현상은 배지에 첨가하는 호르몬의 영향(Ebeling

등, 2007)으로 일어나고, 난구세포의 MAPK 활성화는 시간의 경과(배양 ~13시간)와 더불어 일어난다는 것은 본 연구에서도 thymidine의 처리 시간이 길어질수록 효과적(Table 1)이었다는 것과 일치한다. 이것은 과잉의 thymidine 처리는 체세포에서 나타나는 항 증식성 효과(Opitz 등, 1995)와는 달리 생식세포인 난포란에서는 이 외부의 물질 흡수를 일시적으로 억제시켜 품질 저하 돼지 미성숙 난포란을 선별할 수 있는 중요한 작용을 할 수 있다는 것을 제시하였다.

한편, IVM II 시기에 thymidine을 처리한 결과, 처리 시간과 농도에 따른 배 발달 능력은 비록 2시간, 20 mM 처리농도군에서 배반포의 생존율이 높다고 할지라도 전반적으로 IVM I 시기에 처리하는 만큼의 효과는 없었다(Table 2). 이것은 핵 성숙 시기에는 주로 gap junction을 통해 호르몬과 각종 성장인자들이 난자로 전달되지만, 세포질 성숙시기에는 호르몬의 필요성이 점차 감소하게 되고, 난구세포가 확장하게 되면서 난구세포간의 gap junction을 통한 물질 전달 장애가 진행되어 오히려 호르몬이 첨가된 배지에서 26시간 이상 배양하면 체외성숙율이 감소한다고 보고(Ebeling 등, 2007)와 일치하는 경향이였다. 따라서 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시 DNA 합성 시기는 핵 성숙과 세포질 성숙 시기 간에 차이가 있으며, 세포질 성숙 기간 동안인 IVM II 시기에 thymidine 처리는 배 발달 능력에는 큰 효과가 없는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Table 1과 Table 2의 결과를 종합하여 검토한 Table 3에서도 같은 현상이 확인되었다. 돼지 난포란이 체외성숙하는 동안 핵 성숙과 세포질 성숙 기간 각각의 시기에 thymidine을 처리한 결과, 2시간보다 6시간 처리군에서 전반적으로 배반포 생존율은 높았다. 이러한 결과를 종합하면 thymidine은 비록 형태적으로 판정은 알 수 없지만, 고품질이라고 생각되는 난포란에 부착되어져 있는 난구세포에도 영향을 미쳐, gap junction을 통한 물질전달(Suzuki 등, 2000)과 그 후 호르몬의 영향으로 배양 ~10시간 사이에 미성숙 난포란의 GVBD 및 단백질 합성(Fulka 등, 1986)은 더욱 활성화하였을 것이라고 사료된다.

그리고 체외생산된 돼지 수정란으로부터 이식 가능한 고품질의 수정란을 선별하는 것은 필수적이다. 현재까지는 연구자의 경험에 의해 형태적(Byun 등, 1992; Hulin-ska 등, 2011; Ishizaki 등, 2009)으로 판단했던 방법은 개인적인 차이에 따라 일관적이지 못하다는 단점이 있기 때문에, 보다 객관적으로 평가할 수 있는 방법이 연구되어져 왔다. 그 중 배반포의 세포수(Kidson 등, 2004; Lee 등, 2007), 배반포의 세포사멸 수(Kidson 등, 2004; Ock 등, 2007)가 바로 그것이다. 특히 세포사멸 수는 세포사멸 과정 동안 endogenous DNase 활성화에 의해 생성된 DNA fragmentation을 표시하여 배의 품질을 확인하였다(Mat-wee 등, 2000). 본 실험에서는 IVM I 시기에 6시간 동안 10 mM과 20 mM의 thymidine 처리군, IVM II 시기 2시간 동안 20 mM 처리군, IVM I과 IVM II 시기에 2시간 20 mM 및 6시간 10 mM 처리군에서 배반포의 총 세포수와 세포사멸 수를 비교하였다(Table 4, Fig. 1). 배반포의 총 세포수는 유의차가 없었지만, 세포사멸 수는 IVM I 시기에 thymidine을 처리한 군에서 유의한 효과가 나타났다($p<0.05$). 이러한 결과는 돼지 미성숙 난포란이 IVM I 시기와 IVM II 시기를 거치는 동안 핵 성숙과 세포질 성

숙 과정에서 호르몬의 유·무에 따라 세포 내 또는 세포 외에서 서로 주고받는 전달 물질 및 생합성의 차이(Beers 등, 1978)라고 생각할 수도 있다. 그리고 미성숙 난포란은 IVM I 시기에 호르몬의 영향으로 감수분열 재개가 시작되면서 purine계의 생합성이 유도되며(Downs, 1997), thymidine은 생식세포의 자발적인 감수분열 재개와 더불어 pyrimidine계의 생합성을 유도하였을지도 모른다. 따라서 핵 성숙(IVM I) 시기에 thymidine을 처리하는 것이 세포질 성숙(IVM II) 시기에 처리하는 것보다 효과적인 것으로 사료된다. 그리고 thymidine의 효과는 체세포와는 달리 고품질이라고 생각되는 난포란과 난구세포에 영향을 미쳐 부적절한 체외환경에 그 생존력을 높였던 것으로 생각한다.

본 연구는 돼지 난포란으로부터 고품질의 배반포를 생산하기 위하여 체외성숙 시 thymidine의 첨가가 난포란의 선별과 그 후 배 발달에 미치는 효과를 검토하였다. 그 결과, 고농도의 thymidine은 난포란의 형태적 선별과는 관계없이 특히 IVM I 시기에 적절한 처리 시간과 농도에서 발생한 난포란으로부터 생산된 배반포의 품질은 상승하였다. 이것은 아마도 고품질이라고 생각되는 난포란의 생존을 위하여 고농도의 thymidine은 체세포에 작용하는 것과 달리 생식세포에서는 오히려 효율적으로 DNA 합성 유도하였을 것으로 사료된다. 따라서 포유동물 난자의 선별에 있어서 형태적인 방법에 의존하기보다는 배지에 첨가하는 여러 가지 생화학 물질을 이용하여 선별할 수 있다는 것을 암시하기 때문에, 앞으로 난자의 보다 객관적인 선별과 더불어 난자의 발생율도 상승시킬 수 있는 배양방법의 개선이 필요하다고 생각한다.

인용문헌

1. Abeydeera LR, Day BN (1997): *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48(4):537-544.
2. Alm H, Torner H, Lohrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W (2005): Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63:2194-2205.
3. Blumenreich MS, Woodcock TM, Andreeff M, Hiddemann W, Chou TC, Vale K (1984): Effect of very high-dose thymidine infusions on leukemia and lymphoma patients. *Cancer Res* 44(5):2203-2207.
4. Byun TH, Lee SH (1992): Morphological and cellular criteria ovaries, follicles and oocytes for *in vitro* maturation in the pig. *Kor J Emb Tran* 7:97-110.
5. De LF, Van MP, Van BT, Kruip T (1992): Structural aspects of bovine oocytes maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 31:208-214.
6. Downs SM (1997): Involvement of purine nucleotide synthetic pathways in gonadotropin-induced meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes. *Mol Reprod Dev* 46(2):155-167.
7. Ebeling S, Schuon C, Meinecke B (2007): Mitogen-activated protein kinase phosphorylation patterns in pig oocytes and cumulus cells during gonadotrophin-induced resumption of meiosis *in vitro*. *Zygote* 15(2):139-147.
8. Ebeling S, Topfer D, Meinecke B (2011): Steroidogenesis and the influence of MAPK activity during *in vitro* maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Reprod Domest Anim* 46(3):513-519.
9. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G (2003): Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development. *Hum Reprod Update*. 9:251-262.
10. Evans R, Booth CG (1976): Inhibition of 125IUdR incorporation by supernatants from macrophage and lymphocyte cultures: a cautionary note. *Cell Immunol* 26(1):120-126.
11. Fan HY, Tong C, Lian L, Li SW, Gao WX, Cheng Y (2003): Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biol Reprod* 68(3):968-977.
12. Fan HY, Sun QY (2004): Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 70(3):535-547.
13. Fulka J, Motlik J, Jilek, F (1986): Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 77(1):281-285.
14. Funahashi H, Day BN (1993): Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 98:179-185.
15. Gordon I (2003): Recovering the bovine oocytes In : *Laboratory Production of Cattle Embryos (Biotechnology in Agriculture No. 27)*. 2nd Ed. Cambridge UK P:79-111.
16. Han JC, Park KS, Park HD (2000): Effects of hypoxanthin, aminopterin and thymidine(HAT) Added to media at day 5 on hatching of blastocyst in Korean native cattle ESHRE P:158.
17. Hulinska P, Martecikova S, Jeseta M, Machatkova M (2011): Efficiency of *in vitro* fertilization is influenced by the meiotic competence of porcine oocytes and time of their maturation. *Anim Reprod Sci* 124: 112-117.
18. Ishizaki C, Watanabe H, Bhuiyan MM, Fukui Y (2009): Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium. *Theriogenology* 72(1):72-80.
19. Khurana NK, Niemann H (2000): Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in*

- vitro* or *in vivo*. Biol Reprod 62:847-856.
20. Kidson A, Rubio-Pomar FJ, Van Kneegsel A, Van Tol HT, Hazeleger W, Ducro-Steverink DW, Colenbrander B, Dieleman Sj, Bevers MM (2004): Quality of porcine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of GH. Reproduction 127(2):165-177.
 21. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T (2004): Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology 62(7):1186-1197.
 22. Kwong WY, Adamiak SJ, Gwynn A, Singh R, Sinclair KD (2010): Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle, oocyte and pre-implantation embryo. Reproduction 139(4):705-715.
 23. Lee SL, Kumar BM, Kim JG, Ock SA, Jeon BG, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ (2007): Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene-transfected somatic cells. Reprod Domest Anim 42(1):44-52.
 24. Liang CG, Huo LJ, Zhong ZS, Chen DY, Schatten H, Sun QY (2005): Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. Endocrinology 146(10):4437-4444.
 25. Matwee C, Betts DH, King WA (2000): Apoptosis in the early bovine embryo. Zygote 8(1):57-68.
 26. Mori T, Amano T, Shimizu H (2000): Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured *in vitro*. Biol Reprod 62(4):913-919.
 27. Niwa K (1993): Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. J Reprod Fertil Suppl 48:49-59.
 28. Ock SA, Lee SL, Kim JG, Kumar BM, Balasubramanian S, Choe SY (2007): Development and quality of porcine embryos in different culture system and embryo-producing methods. Zygote 15(1):1-8.
 29. Opitz HG, Niethammer D, Jackson RC, Lemke H, Huget R, Flad HD (1975): Biochemical characterization of a factor released by macrophages. Cell Immunol 18(1):70-75.
 30. Petters RM, Wells, KD (1993): Culture of pig embryos. J Reprod Fertil Suppl 48:61-73.
 31. Prather RS, Boice ML, Gibson J, Hoffman KE, Parry TW (1995): *In vitro* development of embryos from sinclair miniature pigs: A preliminary report. Theriogenology 43:1001-1007.
 32. Shimada M, Maeda T, Terada T (2001): Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. Biol Reprod 64(4):1255-1263.
 33. Snow MHL (1973): Abnormal development of pre-implantation mouse embryos grown *in vitro* with thymidine. J Embryo Exp Morphol. 29:601-615.
 34. Sun QY, Nagai T (2003): Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. J Reprod Dev 49(5):347-359.
 35. Suzuki H, Jeong BS, Yang X (2000): Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during *in vitro* maturation of porcine oocytes. Biol Reprod 63(3):723-729.
 36. Toyama S, Ando T (1987): 単クローン抗體實驗マニュアル. pp 64-65.
 37. Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S (2002): Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. Biol Reprod 66(1):112-119.
- (접수일자: 2012. 3. 20 / 채택일자: 2012. 3. 26)