

Heat Stress가 소 난자의 체외성숙과 배반포 발달에 미치는 영향

김민수, 김찬란, 성환후, 김남태, 김성우[†]
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터

Effects of Heat Stress on the Developmental Competence of Bovine Cumulus-Oocyte Complex During *in vitro* Maturation

Min-Su Kim, Chan-Lan Kim, Hwan-Hoo Seong, Namtae Kim and Sung Woo Kim[†]

Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 55717, Korea

ABSTRACT

The elevated temperature and high humidity has been known as main reason for heat stress on animals and cause detrimental effects on productivity of organisms and physiological conditions of normal bioactivities. The aims of this study were to evaluate the relationship between time of heat shock simulation during *in vitro* maturation and developmental competence of subsequent embryo after *in vitro* fertilization. Heat shocked cumulus-oocyte complexes (COCs) of Korean native cattle were subjected to normal conditions for 22, 21, 18 and 12 h respectively and transferred to heat stress inducing condition at 40.5 °C in other incubator for 0 (control), 1 and 4 h. After maturation for 22 h, the oocytes were fertilized and cultured in mSOF media for 8 d and examined the developmental capacity of embryos. There were no differences in maturation and cleavage rates between 0, 1 and 4 h heat soaked oocytes, but blastocysts formation were lower in the 4 h heat stressed oocytes. The apoptotic cells of developed blastocysts were also increased in at day 8 with 4 h heat shocked oocytes. These results indicate that heat shock on oocytes during maturation could cause negative effects on the developmental competence of embryos.

(Key words: Blastocyst, Bovine embryo, Heat shock, Maturation, Development)

서론

수정란의 체외생산 및 이식기술은 발생공학의 기초 연구임과 동시에 우수한 유전자원을 가진 종축의 보존과 사람의 불임 치료에 응용되고 있으며 나아가 유용단백질을 생산하는 형질전환가축을 생산하고 증식하는데 활용되고 있다. 난자의 체외성숙, 체외수정 및 수정란의 발달단계 과정에 관한 연구는 체외수정란(*in vitro* embryo)의 생산에 있어서 핵심적인 과정으로 여러 가지 원인에 의해서 체내수정란(*in vivo* embryo)과 질적인 차이가 나타나고 있는 것으로 보고되었다(Farin과 Farin, 1995; Farin 등, 2006). 또한 체외 및 체내 수정란의 생산 능력은 고온 스트레스(Heat Stress, HS)가 발생하는 하절기에는 모두 저하되고 있는데, 이는 소를 포함한 포유동물에 있어 하절기 난자의 질적 저하의 주요 원인으로 추정되고 있다(Ealy 등, 1993; Roth와 Hansen 등, 2004; Schrock 등, 2007). 이러한 heat stress는 수정란 발생에 필요한 세포 내 대사 기능에 혼돈을 주고 있으며, 생화학적 반응을 야기하여 세포 내

스트레스 관련 신호 전달을 유도하여 세포 손상을 일으키는 데 추정된다. 이러한 기작에 관하여 대표적인 인자는 heat shock protein(HSP)라고 명명되어 보고되고 있다(Hendrey와 Kola, 1991; Nover와 Scharf, 1991, Miller 등, 1991; Ealy와 Hansen; 1994; Edward 등, 1995; Riabowol 등, 1998). 그러나, 많은 연구에도 불구하고 HSP의 기능과 수정란 대사 활성도에 관하여 주요 원인 분석과 이를 이용한 배양 방법에 대한 연구는 미진한 상태이며 앞으로 더욱 많은 연구가 필요한 분야라고 할 수 있다(Edwards and Hansen 등, 1996, 1997; Edwards 등, 2001; Rispoli 등, 2013). 특히, 우유 생산용 소로 이용되는 Holstein 품종의 경우, 여름철 고온기의 체온이 41.5°C까지 상승하는 것으로 보고되었다(Takahashi, 2012). 이러한 HS에 대한 난자의 반응도는 번식능력을 저하시키고 비유능력을 감소시켜 생산성이 매우 낮아지는 원인으로 알려져 있다. 한우의 경우, 유우에 비하여 체중과 크기나 작기 때문에, HS에 대한 체온 반응도가 유용종에 비하여 낮다고 기대되고 있으며, 내서성에 관한 능력도 비교적 우수하다고 추정되고 있다. 그러

[†] Correspondence: Sung Woo Kim

Phone: 82-63-620-3524; Fax: 82-63-620-3591

E-mail: sungwoo@korea.kr

나, 최근 기후변화의 영향으로 가을과 겨울철 온도가 상승하고 있으며, 여름철 혹서기에 대한 스트레스도 점차 높아지고 있다고 판단되므로 한우에 있어 혹서기의 인공수정에 관한 성적은 봄 및 가을 철에 비하여 낮게 나타난다. 특히, 한우 가임 암소에 대한 인공수정 후 임신율에 관한 성적을 보고한 자료에 따르면, 인공수정 후 수태율은 과거 80년대 초에는 78%라고 보고 되었으나 2013년도는 63%로 보고되었다(변과 조, 1973, 이와 임, 1982; 김 등, 2002; 박 등, 2013). 그러므로 한우의 번식을 또한 20여년전에 비하여 낮아지고 있는 경향을 보여주고 있음이 분명하다. 최근 지구 온난화에 따른 기후 변화의 경향도를 유추해 보면 2050년의 평균기온은 현재보다 약 3.2도가 상승할 것으로 추정되고 있으며, 여름철 혹서기는 5개월 이상 지속이 될 것으로 예상되고 있다. 그러므로, 한우에 있어서 번식 효율성은 인공수정을 통한 임신율과 체외수정란 생산 효율에서 점차 문제점이 발생할 것으로 예상된다. 또한, 2016년 하절기 도축장 유래 한우 난소를 관찰할 때, 난포수도 작으며, 난소에서 회수된 난구세포난자복합체(cumulus oocyte complex; COCs)의 품질 또한 저하되어 체외수정과 발생율을 낮아지는 문제가 발생하는 것으로 미루어 볼 때, 기후 변화에 따른 번식효율 저하는 명백하게 나타나게 될 것으로 추정된다.

본 연구에서는 HS의 영향을 조사하기 위하여 한우 난소 시료를 도축장에서 얻었으며 회수된 COCs를 활용하여 체외성숙 과정에서 배양 후기에 HS노출되는 시간을 조절하였다. 소 난자의 성숙에는 약 22시간이 소요됨에 따라, 난자의 핵성숙이 완료되는 시점에서 HS를 유도하였으며 배양기의 온도를 설정하여 38.5℃와 40.5℃에 노출되는 시간을 조절하여 성숙시킨 후 난자의 성숙도와 이를 이용한 수정란의 발생율을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약

특별히 언급되지 않은 경우, 모든 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)의 한국 대리점을 통하여 구입하였으며 난자의 성숙 및 수정란 배양액 제조에 이용된 물은 Irvine Scientific (Santa Ana, USA)에서 제조한 체외수정 클리닉 등급(Water for Assisted Reproductive Technology)을 이용하였다.

2. 난자의 이송 및 난자의 회수

도축장에서 한우 암소의 자궁에서 난소를 적출하고 0.85% 생리식염수(saline)에 세척하였으며 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 saline을 23~28 ℃로 맞추어 보

온병에 담고 6시간 이내에 실험실로 운반하였다. 수집한 난소는 생리 식염수로 4-5회 세척후 난포액에서 직경 3.0~6.0 mm 크기의 COCs를 18 G 주사침으로 흡입하여 회수하였으며, TCM-199배양액으로 약 22시간동안 성숙배양을 유도하였다.

3. 난자의 체외성숙

성숙배양액은 TCM-199배양액을 12.5 mM HEPES와 26.2 mM NaHCO₃를 이용하여 5% CO₂ 배양기에서 전 배양을 12 시간 이상(overnight)하였을 때, pH수치가 7.4~7.5로 측정되는 조건으로 조제하였다. 회수된 COCs의 배양은 5% FBS(Gibco, USA)와 0.1 U/ml FSH를 첨가하였으며 Ball 등의 방법(1983)을 변형하여 이용하였다. 성숙이 완료된 난자는 hyaluronidase 300U/ml를 처리하여 난구세포를 제거 하였으며, 0.4 µg/ml 농도의 Hoechst 33342로 20분간 핵을 염색하고10X 형광현미경으로 관찰하여 성숙율을 판단하였다(김 등, 2016).

4. 체외 수정

성숙배양이 끝난 난자는 한우개량사업소에서 구매한 한우 후보씨 수소(KPN 999) 동결 정액을 이용하여 수정을 실시하였으며 기본 배양액으로 Brackett과 Oliphant(1975)가 보고한 BO배지를 변형하여 사용하였다. 동결정액은 37 ℃에서 45초간 용해하고 calcium과 magnesium이 없는 PBS 6 ml로 800 g에서 7분간 원심분리하여 글리세롤과 난황을 제거하였다. 정자의 운동성을 증진시키기 위하여 0.45 µg/ml 농도의 theophyllin과 0.4% (w/v)의 fatty acid free BSA를 BO 배양액에 첨가하였다. 수정에 필요한 활성화 정자의 농도는 4~6×10⁶개/ml로 조정하여 정자 pellet을 희석하였다. 체외 성숙된 난자 1개 당 활력이 우수한 정자의 수가 5~10×10³개가 함유되도록 30µl 정자 부유액을 난자가 포함된 30µl 소적에 첨가하였다. 체외 수정시간은 8시간으로 조정하였으며 수정된 난자를 체외 배양하기 위하여 COCs를 난자와 동일한 크기의 미세 유리관으로 흡입 및 배출을 반복하여 난구세포를 제거하였다(김 등, 2016).

5. 체외 배양

체외수정을 실시한 후 난구세포가 제거된 난자는 1% BME amino acid, 2% MEM non-essential amino acid, 0.3% FAF-BSA, 10µg/ml insulin이 첨가된mSOF 소 수정란 발생용 배양액을 이용하여 8일동안 배양하였다. 2일 동안 5% CO₂, 5% O₂ 와 90% N₂로 조정된 배양기에서 초기 발생을 유도하였으며 배양 3일째에 FBS 10%를 첨가하였다(Holm 등, 1999; Takahashi와 First 1992). 배양 3일, 5일 및 8일에 수정란의 발생단계를 난할율, 8세포기, 상실기 및 배반포 형성율을 관찰하였다.

6. 난자의 HS 유도

한우의 경우 젖소에 비하여 혹서기 반응도가 낮다고 판단되므로, 소의 난자 체외성숙 과정에서 대조군은 38.5°C로 조절된 배양기에서 COCs 10~15개를 TCM-199 300 µl의 소적에서 22시간 배양하였으며 실험군은 38.5°C에서 21, 18 및 12시간 동안 전배양하고 HS를 유도하기 위하여 40.5°C로 조절된 배양기에서 1, 4 및 12시간으로 후배양하여 총 배양시간이 소 난자가 성숙에 필요한 22시간을 넘지 않도록 배양하였다.

7. 발생한 배반포의 세포사멸도(TUNEL) 분석

세포사멸의 존재를 확인하기 위하여 TUNEL 분석 키트(In Situ Cell Detection Kit, Roche Applied Science)를 이용하여 발생 8일자 배반포를 염색하였다. 3.7%의 paraformaldehyde로 30분간 고정하고 0.5% Triton X에서 20분간 처리하여 효소와 시약의 침투성을 유도하였다. 각 단계별로 PBS로 배반포를 세정하였고, 단편화 사슬 DNA에 fluorescein-dUTP를 효소적으로 말단에 중합하기 위하여 1시간 동안 37°C에서 반응시켰으며 DAPI로 핵을 염색하여 전체 할구수에 대한 세포사멸 할구의 비율을 조사하였다.

8. 통계 자료 분석

각 실험은 5번을 반복하여 실시하였으며, 난자의 성숙율, 난할율 및 발생율에 대한 분석은 Student's *t*-test로 분석을 실시하였다. *P*-값이 0.05보다 낮은 실험군은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. HS가 난자의 체외성숙에 미치는 영향

한우 난소에서 회수한 COCs를 TCM-199 배양액에서 난자 성숙을 22시간 간 실시할 때, 성숙배양 후기의 HS처리가 난자의 핵 성숙율에 미치는 영향을 조사하였다(Fig 1). 대조군으로서 소 난자의 성숙과정을 정상 배양온도인 38.5°C에서 22시간 성숙시켜 딸세포(polar body)가 방출되어 MII stage 난자의 출현율을 조사하였다(83.7%). 실험군으로 40.5°C로 조절된 배양기에서 1, 4 및 12시간을 처리하였을 때, 성숙율은 각각 84.5%, 84.8% 및 63.0%로 조사되었다. 이러한 결과는 COCs의 HS처리는 1 및 4시간 동안의 비교적 짧은 시간 동안 처리하였을 때, 난자의 핵 성숙율에는 유의적 차이가 없는 것으로 관찰되었고($p > 0.05$), 12시간의 정상온도에서 전배양하고 HS를 12시간 동안 유도하면, MII기의 출현율이 유의적으로 감소하는 것으로 관찰되었다($p < 0.05$).

2. HS가 수정란의 난할(cleave)에 미치는 영향

COCs의 성숙배양 후기에 HS를 유도하였을 때, 난자의 성숙도에 미치는 영향이 없는 조건(1 및 4시간)으로 생산된 성숙난자를 체외수정을 실시하였다(Fig. 2) 대조군으로 난자를 정상 배양 온도인 38.5°C에서 22시간 배양하여 체외수정을 실시하였으며 실험군으로 후 배양을 40.5°C에서 1 및 4시간 동안 실시하여 체외수정을 실시하였다. mSOF 배양액에서 2일을 배양하고 수정란의 할구분열을 관찰하였을 때, 대조군은 64.4%의 난자가 정상적인 2세포기로 난할을 시작하였으며, 40.5°C에서 후 배양을 1 및 4시간 처리한 실험군에서는 각각 73.6% 및 70.4%의 난할율을 관찰하였다. 1시간 동안 40.5°C에서 후 배양된 실험군에서 높은 난할율을 관찰되었으나 대조군과 유의적 차이가 관찰되지 않았으며 4시간의 HS처리도 난할에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다($p > 0.05$).

3. HS가 수정란의 발생에 미치는 영향

COCs의 성숙배양 후기에 HS를 1시간 또는 4시간 유도하고 체외수정을 실시하고 수정란을 배양하였을 때, 8세포기와 배반포 발생율을 조사하였다(Fig. 3). 수정란의 8세포기 출현율은 대조군에서는 43.8%로 나타났으며 실험군에서 1시간 및 4시간 동안 후배양에서 HS를 처리하였을 때, 45.8% 및 36.6%로 관찰되었다. 8세포기 발생율은 처리간 유의적 차이가 없었으며, 오히려 1시간 40.5°C 배양이 약간 높은 경향을 나타내었고, 4시간 배양 처리군에서는 낮은 경향을 관찰되었다($p > 0.05$). 또한, 배반포 형성에 있어서 대조군은 31.5%로, 1시간 및 4시간 동안 HS를 유도한 실험군은 29.2%와 21.1%로 관찰되어 HS유도를 4시간 동안 실시한 실험군은 대조군과 비교할 때 차이가 존재하는 것을 알 수 있었다($p < 0.05$). 1시간 동안 HS를 유도할 때, 난자의 성숙율과 난할율에 영향이 없는 것으로 판단되었으나 8세포기와 배반포기의 출현이 낮아지는 경향을 관찰 할 수 있었다.

4. HS가 수정란의 배반포기 세포사멸 할구수에 미치는 영향

HS처리에 의한 수정란에 있어 질적인 차이를 조사하고자 생산된 수정란의 세포사멸 현상을 TUNEL assay 방법을 이용하여 관찰하였다(Fig 4). TUNEL assay 염색에 의하여 positive로 판별되는 할구의 수를 전체 세포수에 대한 비율을 조사하였을 때, 대조군에서는 3.4%의 비율로 존재하는 반면 1시간 처리군은 2.9%로 유의적 차이가 존재하지 않았으나, 4시간 처리군의 경우 5.5%의 세포사멸 할구수 증가로 유의적 차이가 있는 것을 관찰 할 수 있었다 ($p < 0.05$).

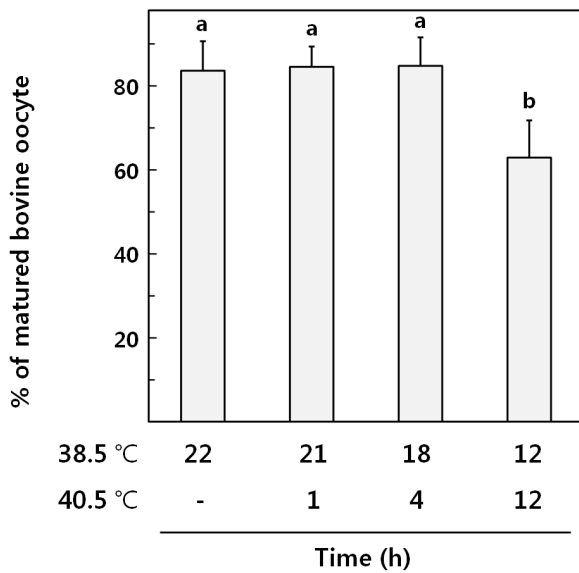


Fig. 1. The effects of heat stress on the maturation of bovine oocytes. The matured oocytes were confirmed by extrusion of polar body and the nucleus state was examined with epifluorescence microscope with manipulator. As a control, 104 cumulus oocyte complexes were cultured for 22 h at 38.5°C, 110 for 1 h HS treatment, 105 for 4h and 108 for 12 h with 5 repetitions.

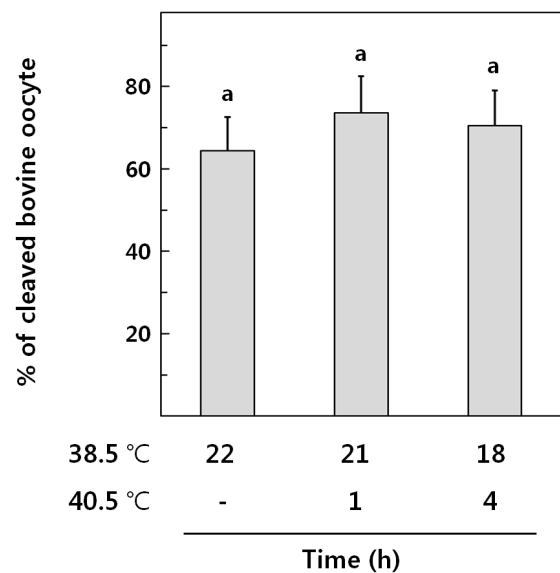


Fig. 2. The effects of heat stress on the cleavage of fertilized bovine oocytes.

The cleaved embryo was examined at 3 day of culture in mSOF media. As a control, 73 cumulus oocyte complexes were fertilized 8 h at 38.5°C, 72 for 1 h HS treatment and 71 for 4h with 5 repetitions.

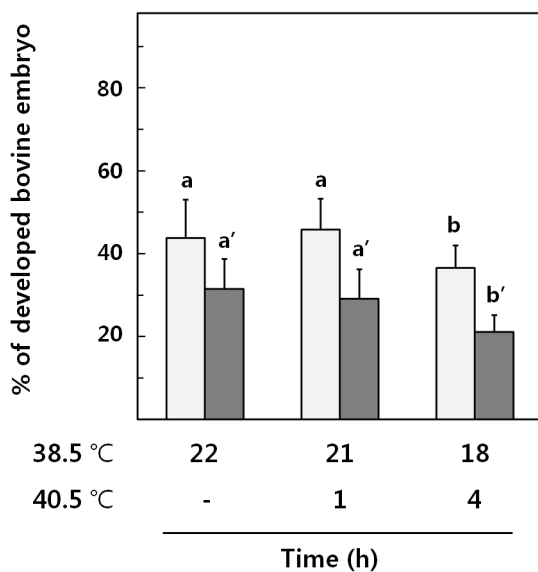


Fig. 3. The effects of heat stress on the development of embryos. The 8 cell to morula stage embryos were examined at day 5 of culture and blastocysts were at day 8 in mSOF media (white bars show percentage of morula stage embryos; black depict blastocysts).

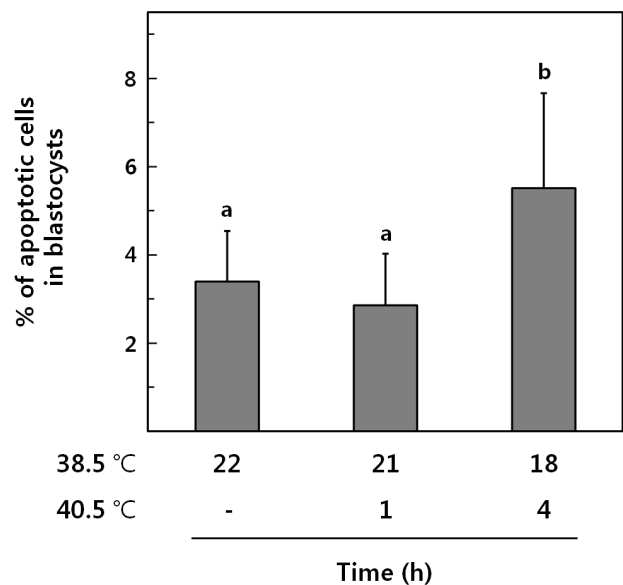


Fig. 4. The effects of heat stress on apoptosis of developed blastocysts. The apoptotic cells were stained with TUNEL assay kit. As control, 9 blastocyst were examined at day 8, 10 for 1h heat stress treated group and 10 for 4 h heat stress treated group with 3 repetitions.

고 찰

본 연구에서는 도축장에서 채취한 난소에서 난자를 확보하여 체외 성숙을 실시하고 HS를 유도하였다. HS유도에 따른 난자 성숙율과 수정란 발생율을 비교하였으며, 생산된 배반포의 배반포의 세포사멸도를 비교 검토하였다. 우리나라의 체외 수정기법을 이용한 소 수정란의 생산은 지구 온난화 현상으로 점차 고온기가 증가할 것으로 예상되므로 질적인 저하현상이 예상되고 있으며 이는 체내 수정란의 경우에도 적용될 것으로 판단된다. 또한 수정란의 발생저하와 수태율은 서로 상관관계가 있어 결국 한우의 번식과 생산성에 나쁜 영향을 줄 것으로 짐작된다. 특히, 기후변화로 인한 고온기가 길어짐에 따라 물리적, 생리적으로 생물에 많은 악영향이 나타날 것으로 예상하고 있으며 이는 식량자원의 생산과 직결되는 문제라고 판단된다. 한우의 경우도 예외가 아니며 증체율과 대사 효율을 떨어뜨려 경제적 손실을 야기하는 것으로 판단되며 더 많은 에너지를 소비하는 젖소의 경우, 산유량 감소 등 그 파급효과는 훨씬 클 것으로 판단된다. 무엇보다 번식 효율의 감소가 수정란의 발생부터 시작되면 대가축의 생산성에 직접적인 타격을 줄 것으로 예상되기에 본 연구에서 혹서기의 체온 상승도와 동일한 조건을 난자의 체외성숙과정에 실시하여 HS의 영향을 조사하였으며 추후 수정란 배양체계 개선 연구를 위한 기본 기술을 확립하고자 실험을 실시하였다. 한우의 경우, 본 연구소의 축군을 대상으로 혹서기 체온 상승도를 직장내 온도로 측정된 결과에 따르면 혹서기의 체온 상승도는 젖소에 비하여 다소 낮은 것으로 조사되었으며(미 발표자료) 그 이유는 젖소의 경우 평균 체중이 더 높고 표면적이 한우보다 상대적으로 작은 특징에 기인할 것으로 추정되었다.

본 연구에서 도축장 유래 난소에서 채취한 COCs를 정상적인 온도로 전배양을 실시하고 후 배양으로 40.5℃에서 각각 1, 4 및 12시간 HS를 유도하였을 때, HS 4시간 처리는 체외성숙에 영향을 주지 않는 것으로 판단되나, 12시간 가까이 지속적으로 고온에 노출될 경우, 난자의 핵성숙율이 감소하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 한우에 있어서 난포란이 고온의 체온에 일부 저항성을 가지고 있으나 4시간이상 지속된 HS는 난자의 세포 미세기관의 기능에 생리적 문제를 일으킬 수 있음을 알 수 있다. HS에 대한 난자의 반응은 투명대 손상과 및 난황표면의 미세소기관의 변화에 의한 난자의 노화에 기인하는 것으로 추정된다(Suzuki 등, 1998). 이러한 변화는 후배양의 체외성숙 시간이 길어질수록 HS에 대한 영향을 더 많이 받았기 때문으로 추정되었다. 본 연구에서는 성숙한 난자는 체외수정 후 난할율은 HS로 인한 손실이 나타나지 않으나 흥미롭게도 1시간의 고온 처리군에서는 대조군에 비해 약

간 높은 성적으로 나타나는 경향이 관찰되었다. HS처리는 난할 분할기작에 일시적인 효과가 작용하는 것으로, 이 효과는 고온에 저항하기 위한 세포내에서 여러 가지 생화학적 반응들 중에서 HSP과 같은 분자들의 작용에 의해 부수적으로 생산된 어떤 물질들이 배발달에 영향을 주고 있을 가능성이 보고된 바 있다(Nover와 Scharf, 1991). 뿐만 아니라, 본 연구 결과에서 HS 유도시간이 길어질수록 배발생의 저하 현상이 8 세포기와 배반포기 형성율이 저하되었고 배반포에는 세포사가 일어난 할구의 수가 증가하는 결과를 관찰 할 수 있었다. 이러한 연구 결과는 젖소의 초기 발생단계의 배에 있어서 42℃의 고온 스트레스를 받았을 때 상실배의 배발생율이 감소하는 연구 결과(Putney 등, 1989; Ealy 등, 1993)와 동일한 결과를 보여주고 있으며, 수정란의 초기 발생과정에서 직접적인 온도 충격은 없더라도 난자의 성숙과 발육과정에서 온도 충격을 받게되면 영향이 잔존할 수 있음을 보여주고 있다. HS 처리에 대한 반응은 난자부터 시작되고 있음을 알 수 있으며 4시간 가까이 지속적으로 고온에 노출된 난자는 발생과정에서 문제가 생기며 이는 세포의 생물학적 기능이 저하될 수 있음을 보여주고 있다. 고온에 노출된 난자는 수정율의 저하뿐만 아니라, 후기 배로 발달을 이어간다 해도 최종적으로 배반포의 세포 사멸의 수의 증가에 의하여 생산성이 낮아지며 생산된 수정란의 질적 저하는 모태에서 착상기작에 문제를 야기할 수 있음을 간접적으로 보여주고 있다. Ju 등(2005)에 의한 연구 결과에 따르면, 20 h동안 정상조건에서 전배양을 실시하고 42℃에서 4시간동안 HS를 후배양 방법으로 부가하였을 때 난할율이 88%로 유의적차이가 없음을 보고하였으나 배반포의 형성율은 44%에서 27%로 낮아짐을 보고하였다. 이러한 결과는 40.5℃의 HS유도와 유사한 결과로 본 연구의 난할 결과와 동일한 경향으로 체외 성숙 난자의 HS유도 방법의 차이에도 불구하고 난자의 성숙도에는 큰 영향을 미치지 않을 수 있음을 보여주고 있다. 또한, 생체 내 난자에서는 HS에 대한 방어기작이 존재할 수 있기 때문에 이와 같은 결과가 생체내의 수정란 생산을 위하여 극복할 수 있는 방법을 강구하는 것도 중요한 연구영역으로 판단되며, 점차 난자의 체외 배양과 체외수정기법이 생검된 난자의 이용성 증진에 활용되고 있으므로 HS에 대한 적절한 방어기작 개발에 중요한 정보라고 여겨진다.

한우의 수정란 생산효율을 증진시키기 위하여 난자의 성숙 단계에 있어서 HS노출로 인한 세포 내 특이적으로 영향은 HSP과 이에 상응하는 여러 인자들과 상호작용에 의한 것으로 추정되며 난자의 HS 반응을 이해하기 위하여 세포소기관의 반응에 관한 연구를 지속적으로 추진할 필요성이 존재한다.

적 요

혹서기에 있어 고온 다습한 환경은 동물의 생산성과 생리적 반응에 영향을 주어 HS를 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 HS처리 효과가 도축장 유래 난소에서 채취한 난자의 체외 성숙율, 난할율 및 수정란의 발생능력에 미치는 영향을 비교 검토하였다. 대조군으로서 COCs를 38.5 °C에서 22시간 배양하였으며 실험군은 전배양을 동일하게 21, 18 및 12시간 배양 후 40.5 °C에서 각각 1, 4 및 12시간 동안 후배양하여 HS를 유도하였다. 22시간 숙성시킨 후, COCs를 체외수정하여 mSOF 배지에서 8일 동안 배양하였을 때 난자의 성숙율과 수정란의 발생 능력을 조사 하였다. 대조군과 1 및 4시간 동안 HS처리된 난자에서 성숙율과 난할율에는 차이가 없었으나($p > 0.05$), 4시간 HS처리군에서 배반포 형성율이 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 또한, 4시간 이상의 지속적인 HS에 대한 노출은 배반포 형성율과 세포사멸도에 영향을 주는 것으로 관찰되었다($p < 0.05$). 이러한 결과는 HS가 난자의 성숙 과정에서 유도되면 수정란의 발생 능력에 부정적인 영향을 줄 수 있음을 시사하며 HS에 의한 소 배반포에서 세포사멸현상이 나타나고 있음을 보여주고 있다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 2017년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 기후변화대응 소 생식조절인자에 관한 연구, 세부과제번호: PJ01223801)과 2017년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 연수과정 지원사업에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 28:717-725.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod. Dev.* 40:5-11.
- Ealy AD, Drost M and Hansen PJ. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 76:2899-2905.
- Ealy AD and Hansen PJ. 1994. Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. *J. Cell Physiol.* 160:463.
- Edwards JL, Ealy AD and Hansen PJ. 1995. Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology* 44:329-337.
- Edwards JL and Hansen PJ. 1996. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. Reprod.* 55:341-346.
- Edwards JL and Hansen PJ. 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 46:138-145.
- Edwards JL, King WA, Kawarsky SJ and Ealy AD. 2001. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology* 55:209-223.
- Farin PW and Farin CE. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol. Reprod.* 52:676-682.
- Farin PW, Piedrahita JA and Farin CE. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65:178-191.
- Hendrey J and Kola I. 1991. Thermolability of mouse oocytes is due to the lack of expression and/or inducibility of HSP70. *Mol. Reprod. Dev.* 28:1-8.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T and Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serumproteins. *Theriogenology* 52:683-700.
- Ju J-C, Jiang S, Tseng J-K, Parks JE and Yang X. 2005. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* 64:1167-1689.
- Miller EK, Raese JD and Morrison-Bogorad M. 1991. Expression of heat shock protein 70 and heat shock cognate 70 messenger RNAs in rat cortex and cerebellum after heat shock or amphetamine treatment. *J. Neurochem.* 56:2060-2071.
- Nover L and Scharf KD. 1991. Heat shock proteins In: Nover L (ed.), Heat shock Response. Boca Raton Florida: CRC press, pp. 41-128.
- Putney DJ, Mullins S, Thatcher WW, Drost M and Gross TS. 1989. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 19:37.

- Rispoli LA, Payton RR, Gondro C, Saxton AM, Nagle KA, Jenkins BW, Schrick FN and Edwards JL. 2013. Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Reproduction* 146:193-207.
- Riabowol KT, Mizzen LA and Welch WJ. 1998. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against Hsp70. *Science* 242:433-436.
- Roth Z and Hansen PJ. 2004. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 71:1898-1906.
- Schrock GE, Saxton AM, Schrick FN and Edwards JL. 2007. Early in vitro fertilization improves development of bovine ova heat stressed during in vitro maturation. *J. Dairy Sci.* 90:4297-4303.
- Suzuki H, JU JC, Parks JE and Yang X. 1998. Surface ultrastructure characteristics of bovine oocytes following heat shock. *J. Reprod. Dev.* 44:345-351.
- Takahashi M. 2012. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. *Reprod. Med. Biol.* 11:37-47.
- Takahashi Y and First NL. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963-978.
- 김성우, 김민수, 김찬란, 김동교, 김남태, 성환후. 2016. Cysteamine 첨가가 희소한우 OPU 및 도축 난소 유래 난자의 발생에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 31:191-197
- 김학영, 송상현, 조현조. 2002. 한우 번식우 농가의 번식실태 및 번식장애 치료에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 26:291-298.
- 박새롬, 김훈, 이영섭, 김진우, 김종복, 송영한, 이학교, 이성진. 2013. 한우 암소의 인공수정 실패율에 관한 조사연구. *한국동물번식학회지* 37:23-27.
- 변명대, 조현조. 1973. 한우 번식장애의 실태에 관한 연구. *한국축산학회지*. 15:114-118.
- 이용빈, 임경순. 1982. 도살우의 번식장애 사례 조사 연구. *한국번식학회지*. 6:19-30.

Received February 10 2017, Revised May 10 2017,
Accepted May 17, 2017