

## Original Article

# 돼지 난포란으로부터 배반포의 체외생산에 있어서 체외성 숙시 기초배양액에 ESCM과 ESM의 첨가효과

김석기<sup>1,2,\*</sup>, 박흠대<sup>1</sup>

<sup>1</sup>대구대학교 공과대학 생명공학과, <sup>2</sup>마마파파&베이비 산부인과 불임연구실

## Effect of Addition of ESCM and ESM during In Vitro Maturation on In Vitro Development of Porcine Follicular Oocytes

Seok-Gi Kim<sup>1,2,\*</sup> and Hum-Dai Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

<sup>2</sup>IVF Center, Mamapapa and Baby Clinic, Ulsan 44707, Korea

Received September 9, 2019

Revised September 17, 2019

Accepted September 23, 2019

### \*Correspondence

Seok-Gi Kim

E-mail: s2k3kim@hanmail.net

### ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-5893-5920>

**ABSTRACT** In this study, we investigated the possibility of using mouse embryonic stem cell conditioned medium (ESCM) and embryonic stem cell medium (ESM) for in vitro maturation in the efficient in vitro production of blastocysts from porcine follicular oocyte. Depending on the concentration of supplement of ESCM added to the NCSU-23 solution did not affect 2-cell development rates and blastocysts development. However, in particular, the survival rate (10 days of culture) of blastocyst was significantly higher than that of the control group as the additive concentration (30%) increased ( $p < 0.05$ ). The survival rate of blastocysts showed a similar tendency even with addition of ESM (30%) alone. On the other hand, the duration of the addition of these additives during IVM (0-44 h) was that the IVM I period (0-22 h) were more effective than the IVM II period (22-44 h). Thus, the effect of these additives is probably due to the combination of the various physiologically active substances of ESCM or the appropriate amino acids and vitamins of ESM. In particular, these additives were more effective during the first half (IVM I) of in vitro maturation. In summary, optimization of ESCM or ESM supplementation may improve in vitro maturation of porcine oocyte and affect developmental competency. Therefore, if more efficient methods of adding ESCM or ESM to basal culture medium can be developed during in vitro maturation of porcine follicle oocytes, high quality blastocysts will be developed from low porcine follicular oocyte compared to other domestic animals.

**Keywords:** blastocyst survival, ESCM, ESM, IVM, porcine

## 서론

최근 돼지 난포란을 이용한 배반포의 체외생산기술은 품종개량과 특히 이종장기 생산을 위한 형질전환동물 생산에 관한 연구들로 활발히 수행되고 있다. 이러한 연구의 효율성과 산업화를 위해서는 양질의 미성숙 난포란의 체외성숙 환경이 중요하다. 이것은 체외성숙 후의 난포란 품질이 체외수정이나 핵 이식 후의 생존성, 체내 이식 후의 발육능 및 태아 생존성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문이다(Kim 등, 2010).

포유동물 미성숙 난자의 체외성숙은 핵 성숙과 세포질 성숙으로 구분한다. 핵 성숙은 멈춰있던 감수분열이 재개되어 meta-phase II 단계로 진행되지만, 핵 성숙이 일어난 난자라도 체외발달능이 완전한 것은 아니다. 한편 세포질 성숙은 수정과 초기 배의 발달을 위한 세포질내 소기관의 수의 증가 및 재배치 등을 의미한다(Larsen 등, 1987). 핵 성숙이 완전히 일어났다 할지라도 세포질 성숙이 제대로 이루어지지 않을 경우 수정 이후의 배 발달이 정상적으로 진행되지 않는다고 알려져 있어 난포란의 체외성숙은 대단히 중요하다(Khurana 등, 2000). 난자는 성숙하는 동안 배 발달에 필수적인 물질의 축적과 세포질 환경을 구축하며(Sirard 등, 2006), 대개는 체외에서 24시간 배양하면 성숙이 완료되지만, 돼지의 경우는 다른 동물과 달리 체내에서 LH surge와 germinal vesicle break down (GVBD) 사이의 시간이 20-24시간으로 길기 때문에 성숙시간이 44시간이상이 소요된다(Mattioli 등, 1988). 만약 체외성숙이 불충분하면 낮은 수정율(Kishida 등, 2004), 다정자 침입(Yoshida, 1989), 융성 전핵 형성 감소(Motlik 등, 1984), 난자 노화에 따른 체외발생능 정지 현상(Hunter와 Greve, 1997) 등이 일어난다.

이러한 돼지 난포란의 체외성숙에 관한 문제점을 해결하기 위하여 많은 연구자들은 체외성숙용 배양액에 난포액(Funahashi와 Day, 1993), 혈청(Kumar 등, 2015), 항산화제(Yoshida, 1993), 성장인자(Ding과 Foxcroft, 1994; Illera, 1998), 성선 자극 호르몬(Mattioli 등, 1991), BSA (Natio 등, 1988) 등 각종 첨가물질에 대하여 연구 하였으며, 그 결과 단순 무기염류에 포도당, 글루타민, 타우린 등을 첨가한 비교적 조성이 간단한 돼지 난포란의 체외성숙용 기초배양액으로서 North Carolina State University (NCSU)-23 용액(Petters와 Wells, 1993)이 개발되었으며, 오늘날에도 많은 연구자들은 이 용액을 이용하고 있다. 그러나 일부의 연구자들은 아직도 기존의 배양액인 TCM 199 용액(Marques 등, 2007), modified Whitten's medium (Beckmann과 Day, 1993), Waymouth MB 752/1 medium (Abeydeera 등, 1998), modified synthetic oviduct fluid supplemented with amino acids (Mtango 등, 2002) 등을 이용하고 있는 실정이다. 다른 동물도 비슷하겠지만, 이와 같이 돼지 난포란의 체외성숙용 기초배양액의 종류가 다양한 것은 아직도 명확하게 확립된 배양액이 없기 때문에 아마도 연구자의 경험적 연구 결과에 의존하여 사용하고 있는 것으로 생각된다.

한편 최근 각종 동물의 embryonic stem cell (ES세포)가 개발되고 있다. 그런데 이들 ES세포 개발용 기초배양액들도 한정되어 있는 것이 아니라 연구자들마다 TeSR1, X-vivo 10, E-8, DMEM-CTS 등 조금씩 다른 용액(Dakhore 등, 2018)들을 이용하고 있지만, 종합적으로는 현재 시판되고 있는 많은 종류의 DMEM, alpha-MEM, RPMI, IMDM 같은 synthetic culture 용액을 단독(Cheng 등, 2003) 또는 DMEM/F-12, IMDM/F-12, DMEM/M-199 같이 두 가지 이상 용액 조합(Chen 등, 2011)으로 이용하고 있다. 특히 조합으로 이용하는 것은 용액들에 함유되어 있는 각종 물질들을 서로 상호의존적으로 보완하고자 하는 목적이다. 그리고 이들 용액에서 ES세포를 배양했던 conditioned medium (ESCM용액)에는 다양한 생리활성물질들이 함유(Ivanova-Todorova 등, 2012)되어져 있으며, 특히 자궁 및 초기 배에서 발현되는 EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IGF-I, VEGF 등 다양한 성장인자와 과립막 세포에서 발견되는 많은 성장 인자들 중 특히 IGF-I (Xia 등, 1994)와 EGF (Ding과 Foxcroft, 1994), 그리고 IL-1b, IL-6 GM-CSF, LIF 등의 cytokine류도 함유(Lee 등, 2011)되어져 있다. 이들 물질들은 난자의 핵 성숙과 세포질 성숙 및 세포기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Neira 등, 2010). 특히 이러한 ESCM을 돼지 수정난자의 체외배양액에 첨가했을 경우 배반포로의 배 발생율이 향상되었다(Kwon 등, 2015).

따라서 본 연구는 돼지 미성숙 난포란으로부터 배반포로의 배 발생과, 특히 배반포의 생존율(배양 10일)에 있어서 체외성숙 시 mouse ES세포 기초배양액의 첨가효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 체외 성숙

도축장에서 난소를 회수하여 25-30°C의 멸균생리 식염수에 넣어 2시간 이내 실험실로 운반하였다. 난포란은 멸균생리식염수로 난소를 3회 세정 후 18G 주사침이 연결된 주사기를 이용하여 직경 3-6 mm의 난포로부터 회수하여 현미경하에서 난구 세포의 부착이 조밀하고 세포질이 균일한 것만을 선별하여 체외성숙에 사용하였다. 체외성숙용 기초 배양액인 NCSU-23 용액에 10% 돼지 난포액(porcine follicular fluid, pFF), 10 IU/mL hCG, 10 IU/mL PMSG 호르몬을 각각 첨가하여 사용하였다. NCSU-23 용액 0.5 mL가 들어있는 4-well dish의 각 well에 50-60개의 미성숙 난모 세포를 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며, 배양 시작 후 22시간(IVM I)에 호르몬이 첨가되지 않은 새로운 배양액으로 교체하여 22시간 추가 배양(IVM II) 하였다.

한편 체외성숙시 NCSU-23 용액에 마우스 ES세포 배양용 용액(DMEM 용액: F-12 용액 = 1:1) (ESM)과 마우스 ES세포를 배양했던 용액(ES conditioned medium: ESCM)을 각각 10-30%를 첨가하였다. 그리고 ESCM은 한국 KAIST 발생분화 연구실로부터 구입하여 0.22  $\mu$ m의 millipore filter로 여과 분주하여 소량으로 냉동 보관하여 사용하였다.

### 체외 수정 및 체외 배양

체외수정용 정자는 액상 정액을 dPBS 용액과 1:1로 혼합하여 원심분리를 통하여 3회 세척하고, swim-up 방법으로 고 활력 정자를 회수하여 mTBM 용액으로 정자 농도는  $2-3 \times 10^6$  sperm/mL이 되도록 희석하여 준비하였다.

체외성숙이 완료된 난포란은 0.1% hyaluronidase으로 난구세포를 제거하고, mTBM 용액으로 3회 세척한 다음 체외수정용 배양액 50  $\mu$ L 소적에 난자를 15개씩 넣은 후 사전 처리된 정자를 주입하여 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6시간 동안 체외수정 하였다.

체외수정 6시간 후 수정란은 PZM-3 용액으로 3회 세척하여 50  $\mu$ L의 PZM-3 용액에 30개씩 넣어 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다(day 1). 수정란의 관찰은 체외 배양 2일째(day 2)에 수정란의 분할율, 체외 배양 6일째(day 6)에 배반포로의 발달율을, 체외 배양 10일째(day 10)에 배반포의 생존율(부화 후 팽대 또는 부화되지는 않았지만 팽대한 배반포)을 관찰하였다.

### 실험 설계

1) 돼지 난포란으로부터 배반포의 체외생산에 있어서 체외성숙 시 NCSU-23용액에 ESCM용액을 10%, 20%, 30% 그리고 ESM 용액을 10%, 20%, 30%를 각각 첨가하였다.

2) 돼지 난포란으로부터 배반포의 체외생산에 있어서 체외성

숙 시기(IVM I과 IVM II)에 따라 NCSU-23용액에 각각 30%의 ESCM용액과 ESM용액을 첨가하였다.

### 통계 처리

본 연구에서 각 처리 구는 최소한 4회 이상 반복 실시하였다. 실험 결과에 대한 통계학적 분석은 ANOVA와  $\chi^2$ -test를 이용하여 실시하였으며, 5% 수준에서 유의차를 검정하였다.

## 결 과

### 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙용 배양액에 ESCM과 ESM의 첨가효과

돼지 미성숙 난포란으로부터 배반포의 체외생산에 있어서 NCSU-23 용액에 각각 ESCM과 ESM의 첨가효과를 검토하였다. 각각의 첨가물의 첨가농도는 각각 10%, 20%, 30%이었으며, 그 결과는 Table 1과 2와 같다.

ESCM의 경우(Table 1), 첨가농도에 따른 2세포기(각각 66.7%, 69.3%, 73.6%) 및 배반포로의 발달율(각각 19.8%, 19.3%, 22.1%)은 대조군과 유의차가 없었다. 그러나 배반포의 생존율은 첨가 농도가 증가함에 따라 대조군 보다 높았으며, 특히 30% 첨가군(81.7%)은 대조군(48.8%)보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ).

한편 ESM의 경우(Table 2), ESCM첨가와 비슷한 경향으로서,

**Table 1.** Effect of addition of ESCM solution during in vitro maturation on in vitro development of porcine follicular oocytes

Conc. of ESCM <sup>1)</sup> sol. (% , v/v)	No. of oocytes matured	No. (%) of fertilized embryos	No. (%) of embryos developed to		No. (%) of survived blastocyst embryos to 10 days
			$\geq 2$ -cell (2 days)	blastocyst (6 days)	
Control <sup>2)</sup>	420	364 (86.7)	257 (61.2)	86 (20.5)	42 (48.8) <sup>a</sup>
10	420	363 (86.4)	280 (66.7)	83 (19.8)	47 (56.6) <sup>a</sup>
20	420	360 (85.7)	291 (69.3)	81 (19.3)	53 (65.4) <sup>a</sup>
30	420	359 (85.5)	309 (73.6)	93 (22.1)	76 (81.7) <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>ESCM: Embryonic stem cell conditioned medium.

<sup>2)</sup>Control: NCSU-23 solution only.

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

**Table 2.** Effect of addition of ESM solution during in vitro maturation on in vitro development of porcine follicular oocytes

Conc. of ESM <sup>1)</sup> sol. (% , v/v)	No. of oocytes matured	No. (%) of fertilized embryos	No. (%) of embryos developed to		No. (%) of survived blastocyst embryos to 10 days
			$\geq 2$ -cell (2 days)	blastocyst (6 days)	
Control <sup>2)</sup>	120	103 (85.8)	63 (52.5)	28 (23.3)	5 (17.9) <sup>a</sup>
10%	120	98 (81.7)	61 (50.8)	27 (22.5)	6 (22.2) <sup>a,b</sup>
20%	120	95 (79.2)	58 (48.3)	23 (19.2)	11 (47.8) <sup>b,c</sup>
30%	120	94 (78.3)	62 (51.7)	19 (15.8)	12 (63.2) <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>ESM: Embryonic stem cell medium.

<sup>2)</sup>Control: NCSU-23 solution only.

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

2세포기(각각 50.8%, 48.3%, 51.7%) 및 배반포로의 발달율(각각 22.5%, 19.1%, 15.8%)은 대조군과 유의차가 없었다. 그러나 배반포의 생존율은 첨가농도가 증가함에 따라 대조군보다 높았으며, 특히 20%, 30% 첨가군(47.8%, 63.2%)에서 대조군(17.9%)보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ).

### 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙용 배양액에 ESCM과 ESM의 첨가의 비교 검토

Table 1과 2를 토대로 하여 돼지 미성숙 난포란으로부터 배반포의 체외생산에 있어서 NCSU-23용액에 ESCM과 ESM의 첨가 효과를 비교 검토하였다. 각각의 첨가물의 첨가농도는 30%이었으며, 그 결과는 Table 3과 같다.

**Table 3.** Comparison of the addition of ESCM and ESM during in vitro maturation on in vitro development of porcine follicular oocytes

Kind of additives	No. of oocytes matured	No. (%) of fertilized embryos	No. (%) of embryos developed to		No. (%) of survived blastocyst embryos to 10 days
			≥2-cell (2 days)	blastocyst (6 days)	
Control <sup>1)</sup>	199	172 (86.4)	112 (56.3)	23 (20.5)	4 (17.4) <sup>a</sup>
30% ESCM <sup>2)</sup>	199	166 (83.4)	96 (48.2)	16 (16.7)	11 (68.8) <sup>b</sup>
30% ESM <sup>3)</sup>	199	168 (84.4)	100 (50.3)	13 (13.0)	7 (53.8) <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Control: NCSU-23 solution only.

<sup>2)</sup>ESCM: Embryonic stem cell conditioned medium.

<sup>3)</sup>ESM: Embryonic stem cell medium.

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

**Table 4.** Effect of addition period of 30% ESCM<sup>1)</sup> solution during in vitro maturation on in vitro development of porcine follicular oocytes

Addition period during IVM <sup>2)</sup>		No. of oocytes matured	No. (%) of fertilized embryos	No. (%) of embryos developed to		No. (%) of survived blastocyst embryos to 10 days
IVM I	IVM II			≥2-cell (2 days)	blastocyst (6 days)	
- <sup>3)</sup>	-	220	185 (84.1)	113 (51.4)	49 (22.3)	7 (14.3) <sup>a</sup>
+ <sup>4)</sup>	-	220	183 (83.2)	109 (49.5)	42 (19.1)	27 (64.3) <sup>b</sup>
-	+	220	184 (83.6)	106 (48.2)	46 (20.9)	2 ( 4.3) <sup>a</sup>
+	+	220	179 (81.4)	88 (40.0)	41 (18.6)	19 (46.3) <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>ESCM: Embryonic stem cell conditioned medium.

<sup>2)</sup>IVM: In vitro maturation.

<sup>3)</sup>-: without (30% ESCM solution).

<sup>4)</sup>+: with (30% ESCM solution).

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

**Table 5.** Effect of addition period of 30% ESM<sup>1)</sup> solution during in vitro maturation on in vitro development of porcine follicular oocytes

Addition period during IVM <sup>2)</sup>		No. of oocytes matured	No. (%) of fertilized embryos	No. (%) of embryos developed to		No. (%) of survived blastocyst embryos to 10 days
IVM I	IVM II			≥2-cell (2 days)	blastocyst (6 days)	
- <sup>3)</sup>	-	150	134 (89.3)	96 (64.0)	28 (18.7)	6 (21.4) <sup>a</sup>
+ <sup>4)</sup>	-	150	131 (87.3)	87 (58.0)	31 (20.7)	17 (54.8) <sup>b</sup>
-	+	150	129 (86.0)	85 (56.7)	15 (10.0)	4 (26.7) <sup>a</sup>
+	+	150	130 (86.7)	76 (50.7)	18 (12.0)	14 (77.8) <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>ESM: Embryonic stem cell medium.

<sup>2)</sup>IVM: In vitro maturation.

<sup>3)</sup>-: without (30% ESM solution).

<sup>4)</sup>+: with (30% ESM solution).

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



각각의 첨가군에서 2세포기로의 발달율은 대조군과 유사하였고, 배반포로의 발달율은 대조군 보다 다소 낮았지만 유의차가 없었다. 그러나 배반포의 생존율은 ESCM 첨가군(68.8%)과 ESM 첨가군(53.8%)은 대조군(17.4%)보다 각각 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ).

### 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙용 배양액에 ESCM과 ESM의 첨가시기

돼지 미성숙 난포란으로부터 배반포의 체외생산에 있어서 체외성숙시 NCSU-23용액에 각각 ESCM과 ESM의 첨가시기를 검토하였다. 각각의 첨가물의 첨가농도는 30%, 첨가시기는 각각 IVM I (0-22 hr), IVM II (22-44 hr) 및 IVM I&II (0-44 hr)이었으며, 그 결과는 Table 4와 5와 같다.

ESCM의 경우(Table 4), 첨가시기에 따른 각 군에서의 2세포기 및 배반포로의 발달율은 대조군과 비슷한 경향이였다. 그러나 배반포의 생존율은 IVM I 첨가군(64.3%)과 IVM I&II 첨가군(46.3%)이 대조군(14.3%)보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 그러나 IVM II 첨가군(4.3%)은 비록 대조군보다 낮았지만 유의차는 인정되지 않았다( $p = 0.192$ ).

한편 ESM의 경우(Table 5), 첨가시기에 따른 각 군에서의 2세포기 및 배반포로의 발달율은 대조군과 비슷한 경향이였다. 그러나 배반포의 생존율은 IVM I 첨가군(54.8%)과 IVM I&II 첨가군(77.8%)이 대조군(21.4%)보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 특히 IVM I&II 첨가군은 IVM I 첨가군 보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

본 연구는 돼지 난포란으로부터 배반포의 효율적인 체외생산에 있어서 체외성숙용 기초배양액의 개발을 위하여 ESCM 또는 ESM의 이용 가능성을 검토하였다. 현재 배성줄기세포(embryonic stem cells)가 마우스에서 처음 유도되어 확립(Evans와 Kaufman, 1981)된 이래로 돼지에서도 많은 연구(Notarianni 등, 1990; Kim 등, 2013)에도 불구하고 돼지 배성줄기세포가 존재하지 않아서 mouse의 ESCM을 이용하여 그 가능성을 검토하였다. 또한 여러 조건하에서 체외 생산된 배반포의 품질평가는 배반포의 현미경적 관찰, 배반포의 분화, 배반포의 세포수, 배반포의 대리모에 이식후 수태율 등으로 판정하고 있다. 하지만 가장 객관적인 방법은 배반포의 세포수(총 세포수와 사멸 세포수)로 확인한다. 대부분 고품질의 배반포는 세포수가 많고 사멸 세포수가 적은 배반포로 정의(Papaioannou와 Ebert, 1988)되고 있으나 세포수의 많고 적음만으로 고품질의 배반포가 결정되는 것은 아니다(Park 등, 2004). 그래서 우리는 고품질의 배반포의 기준으로 만약 배반포의 세포수로서 배양 6-8일째에 고품질의 배반포라면 배양 10일까지 생존할 것이라고 가정하였다.

대부분의 포유동물 난소에서 회수한 미성숙 난포란은 체외에서

의 배양조건 중 특히 적당한 배양액을 이용한다면 체외성숙 시킬 수 있다. 그러나 동물 종에 따라 사용하는 배양액은 연구자의 경험에 의해 다양하다. 돼지의 경우, 체외성숙용 기초배양액의 관한 많은 연구자의 연구 결과를 토대로 1993년에 Petters와 Wells에 의해 NCSU-23이라는 용액이 개발되었으며, 오늘날에도 이 용액을 많이 이용하고 있지만, 아직도 TCM 199 용액(Marques 등, 2007), modified Whitten's medium (Beckmann과 Day, 1993), Waymouth MB 752/1 medium (Abeydeera 등, 1998) 같은 용액들도 연구의 목적에 따라 이용되고 있는 실정이다. 이것은 현재까지도 돼지 난포란의 체외성숙용 기초배양액이 확립되지 않았다는 것을 의미한다.

최근 각종 동물의 ES세포가 개발되고 있으며, 이 세포의 condition 배양액(ESCM)에는 EGF, IGF-I, TGF- $\alpha$  등과 같은 다양한 성장인자, 호르몬 그리고 IL-1b, IL-6 GM-CSF, LIF 등과 같은 사이토카인 등이 포함되어 있다는 것이 밝혀졌다(Ho 등, 2012). 그리고 이들 물질들은 포유동물 난포란의 체외성숙에 영향을 미칠 것이라고 기대하여 Kwon 등(2015)은 돼지 체외성숙 및 체외발생용 기초배양액에 돼지 유도만능줄기세포(piPSC) 배양액(stem cell medium, SM) 또는 조정배양액(conditioned medium, CM)을 0-50% 첨가했을 경우 CM-25% 그룹에서 난포란의 성숙뿐만 아니라 7일째 고품질의 배반포를 유의적으로 높게 생산하였다고 보고하였다.

본 연구의 예비 실험에서 ESCM의 첨가농도를 검토했던 결과 ESCM의 30%이상의 첨가시는 농도 의존적으로 배반포의 생존율(배양 10일)은 특히 저하하였다. 따라서 ESCM의 적정 농도를 검토한 결과(Table 1)는 배양 6일의 배반포까지의 발달율은 각 군 간의 차이는 없었지만, 배반포의 생존율(배양 10일)은 30% ESCM 첨가군이 대조군에 비해 유의하게 높았다. 그리고 ESM만 첨가하더라도 비슷한 경향이였다(Table 2). 이러한 결과를 토대로 ESCM과 ESM의 효과를 비교 검토하였던 결과(Table 3)는 배반포의 생존율은 ESCM 첨가군이 ESM 첨가군보다 높았으나 유의차는 없었다. 이러한 것은 ESCM에는 각종의 생리활성물질이 포함되어 있지만, 이 물질들이 난포란의 성숙에는 많은 영향을 미치는 것보다는 오히려 ESM에 함유되어 있는 적당한 아미노산의 종류와 농도 혹은 비타민들의 효과일 것이라고 생각하기 때문에 난포란의 체외성숙에는 현재까지도 TCM 199 (Marques 등, 2007) 등과 같은 종합적인 용액이 이용되고 있는 것은 아닌가라고 사료된다.

한편 체외에서 난포란을 배양하면 체내의 경우보다 난포란과 난구세포와의 gap junction 수의 감소가 빨라져 물질의 이동에 장애가 발생되어 난포란의 세포질 성숙에 불완전성(Motlik 등, 1984)을 가져오게 되어 체외 난포란으로부터 생산되는 배반포가 체내에서 생산되는 것보다 태아로의 발생율이 낮기(Khurana 등, 2000) 때문에 난포란의 체외성숙은 대단히 중요하다. 돼지의 경우 난포란의 체외성숙 시간은 다른 동물종과 비교하면 길다. 특히 핵 성숙(IVM I) 후 ribosome 수의 증가, 세포 소기관들의 재배치 등과 세포질 성숙(IVM II)시간이 길다. 따라서 많은 연구자들은

돼지 난포란의 체외성숙 동안 어느 시기에 어떤 물질들이 필요한가를 검토했던 결과 IVM I 시기와 성장인자들이 효과적이었다고 보고하고 있다. 또한 많은 연구자들에 의해 실험실내에서 돼지 난자의 체외성숙에 호르몬의 첨가가 미치는 영향을 연구되었으며, 특히, PMSG, hCG 및 Estradiol을 첨가하여 2시간 배양하면 이미 GVBD와 난자의 성숙이 시작된다(Park, 1996). Funashashi와 Day (1993)는 배양 초기 20시간 동안 이들 호르몬 첨가하면 감수분열과 난세포질의 성숙을 촉진하지만 그 후의 첨가는 큰 영향을 미치지 않는다고 하였고, Ebeling 등(2007)은 오히려 호르몬이 첨가된 배지에서 26시간이상 배양하면 체외성숙율이 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서도 돼지 난포란의 체외성숙 동안 ESCM와 ESM의 첨가시기를 검토했던 결과(Table 4와 5), 두 물질 모두 체외성숙 전반기인 IVM I과 IVM I&II에 첨가했을 때 배반포의 생존율은 대조군보다 유의하게 높았다는 것은 다른 연구자들의 보고와 일치하였다. 그러나 첨가하는 물질에 따라 약간의 차이는 있었다. 즉 ESCM의 경우(Table 4)는 IVM I&II 시기보다 IVM I이 효과적이었고, ESM의 경우(Table 5)는 반대로 IVM I보다 IVM I&II가 효과적이었다. 이와 같은 현상은 ESCM내에 함유되어 있는 여러 종류의 생리활성물질은 돼지 난포란의 체외성숙 후반기에는 오히려 비효과적이라는 것을 알 수 있다. 이것은 현재 돼지 난포란의 체외성숙 방법에 있어서 일반적으로 IVM I에는 호르몬을 첨가하지만, IVM II에는 호르몬을 첨가하지 않는 것을 간접적으로 증명할 수 있다는 것을 암시한다.

이상의 결과를 종합한다면 돼지 난포란의 체외성숙에 있어서 기초배양액에 첨가물질로서 ESCM 또는 ESM을 보다 효과적으로 이용할 수 있는 방법을 더욱 개발한다면 다른 가축에 비해 낮은 돼지 난포란으로부터 고품질 배반포의 체외생산을 위한 배양체계를 확립할 수 있을 것이다.

## 결론

본 연구는 돼지 난포란으로부터 배반포의 효율적인 체외생산에 있어서 체외성숙용 기초배양액의 개발을 위하여 ESCM 또는 ESM의 이용 가능성을 검토하였다. 현재 돼지 난포란의 체외성숙용 기초 배양액으로 많이 이용되고 있는 NCSU-23 용액에 ESCM의 경우 첨가농도에 따라 2세포기 및 배반포로의 발달율은 대조군과 유의차가 없었지만, 특히 배반포의 생존율(배양 10일)은 첨가농도(30%)가 증가함에 따라 대조군보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 그리고 ESM (30%)만 첨가하더라도 비슷한 경향이였다. 한편 이들 첨가물은 체외성숙시 IVM I에 첨가하는 것이 IVM II보다 효과적이었다. 이와 같이 체외성숙 전반기(IVM I)에 이들 첨가물의 효과(배반포의 생존율)는 아마도 ESCM내의 생리활성물질들 혹은 ESM의 적당한 아미노산과 비타민의 조합 때문일 것으로 사료된다. 요약하면, ESCM 또는 ESM의 최적 첨가는 돼지 난포란의 체외성숙을 개선시키고 배발달 능력에 영향을 미칠수 있다. 따라서 돼지 난포란의 체외성숙시 기초배양액에 ESCM 또는 ESM을 보다

효과적으로 첨가하는 방법을 개발한다면 다른 가축에 비해 낮은 돼지 난포란으로부터 고품질 배반포의 체외생산을 위한 배양체계를 확립할 수 있을 것이다.

## CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## ACKNOWLEDGEMENTS

이 논문은 2018학년도 대구대학교 학술연구비지원에 의한 논문임. 마우스 ES 세포의 conditioned medium을 제공해주신 한국 KAIST 발생분화 연구실에 감사드립니다.

## ORCID

Seok-Gi Kim: <https://orcid.org/0000-0002-5893-5920>

Hum-Dai Park: <https://orcid.org/0000-0002-3721-9167>

## REFERENCES

- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, and Day BN. 1998. Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: Fertilization and Subsequent Embryo Development in Vitro. *Biol. Reprod.* 58:1316-1320.
- Beckmann LS and Day BN. 1993. Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology* 39:611-622.
- Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-otto K, Howden SE, Diol NR, Propson NE, Wagner R, Lee GO, Antosiewicz-Bourquet J, Teng JM and Tomson JA. 2011. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature Methods* 8(5):424-429.
- Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X and Dravid G. 2003. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* 21(2):131-142.
- Dakhore S, Nayer B and Hasegawa K. 2018. Human Pluripotent Stem Cell Culture: Current Status, Challenges, and Advancement. *Stem Cells International* 2018:1-17.
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* 39:30-40.
- Ebeling S, Schuon C and 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.
- Evans MJ and Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-

- 156.
- Funahashi H and 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.
- Hunter RHF and Greve T. 1997. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod. Dom. Anim.* 32:137-141.
- Illera MJ, Loren PL, Illera JC and Petters RM. 1998. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of IVM-IVF processes. *Int. J. Dev. Bio.* 42:1169-1172.
- Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belezmezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I and Kyurkchiev D. 2012. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *BioMed Res. Int.* 2012:1-8.
- Khurana NK and Niemann H. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 62:847-856.
- Kim EH, Cheong SA, Yoon JC, Jeon YB and Hyun SH. 2013. Optimal Derivation Timing for Establishment of Porcine Embryonic Stem Cells. *J. Emb. Trans.* 28:1-6.
- Kim J, You J, Hyun SH, Lee G, Lim J and Lee E. 2010. Developmental competence of morphologically poor oocytes in relation to follicular size and oocyte diameter in the pig. *Mol. Reprod. Dev.* 77:330-339.
- Kishida R, Lee ES and Fukui Y. 2004. In vitro maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 62:1663-1676.
- Kumar S, Gedam S, Biswas RK, Purkayastha A, Devi B, Bharti PK, Doley S and Kadirvel G. 2015. Effect of hormones, follicular fluid, serum and media on in vitro maturation of porcine oocyte. *Indian J. Ani. Sci.* 85(9):958-961.
- Kwon DJ, Hwang IS, Kwak TU, Oh KB, Ock SA, Chung HJ, Im GS and Hwang SS. 2015. Effect of Stem Cell-Derived Conditioned Medium on the In Vitro Maturation and Embryonic Development of Parthenogenetic Embryos in Pigs. *Reprod. Dev. Biol.* 39(3):89-95.
- Larsen WJ, Wert SE and Brunner GD. 1987. Differential modulation of rat follicle cell gap junction populations at ovulation. *Dev. Biol.* 122:61-71.
- Lee MJ, Kim J, Lee KI, Shin JM, Chae JI and Chung HM. 2011. Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Cytotherapy* 13:165-178.
- Marques MG, Nicacio AC, de Oliveira VP, Nascimento AB, Caetano HV, Mendes CM, Mello MR, Milazzotto MP, Assumpção MEOA and Visintin JA. 2007. In vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Ani. Reprod. Sci.* 97(3-4):375-381.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1991. Effect of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 36:95-105.
- Mattioli M, Ealeati ML and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocyte mature on fertilized in vitro. *Theriogenology* 31:1201-1207.
- Motlik J, Grozet N and Fulka J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertile.* 72:323-328.
- Mtango NR, Varisanga MD, Juan DY, Wongrisekeao P and Suzuki T. 2002. Development to Blastocyst Stage of Pig Oocytes Matured, Fertilized and Electroactivated In Vitro. *Arch. Tierz. Dummerstorf.* 6:547-556.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete. Res.* 21:289-295.
- Neira JA, Tainturier D, Pe-a MA and Martal J. 2010. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- $\beta$ 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 73:595-604.
- Notarianni E, Laurie S, Moor R and Evans M. 1990. Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* 41:51-56.
- Papaioannou VE and Ebert KM. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development* 102:793-803.
- Park CK. 1996. Factors Affecting In Vitro Maturation in Porcine Oocytes. *Korean J. Emb. Trans.* 11:179-191.
- Park YS, Kim JM and Park HD. 2004. Effects of Serum and Gonadotropins in In vitro Maturation Medium on Nuclear Maturation, Development and Cell Numbers of Korean Native Cow Embryos. *Korean J. Emb. Trans.* 19:229-237.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48:61-73.
- Picton G, Briggs D and Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145:27-37.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P and Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65:126-136.
- Xia P, Francis R, Tekpetey FR, David T and Armstrong DT. 1994. Effect of IGF-I on Pig Oocyte Maturation, Fertilization, and Early Embryonic Development in Vitro, and on Granulosa and Cumulus Cell Biosynthetic Activity. *Mol. Reprod. Devel.* 38:373-379.
- Yoshida M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vivo. *J. Anim. Reprod.* 35:34-37.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Koojima T and Naga T. 1993. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 39:1303-1311.