

돼지에서 난자의 체외발육 배양액 내 첨가된 거대분자물질이 작은 난포 유래 미성숙 난자의 성장, 성숙 및 배 발육에 미치는 영향

이한나¹ · 이용진¹ · 이주형² · 이근식¹ · 이승태³ · 이은송^{1,2,*}

¹강원대학교 수의과대학, ²강원대학교 동물의학종합연구소, ³강원대학교 동물생명과학대학

Various macromolecules in *in vitro* growth medium influence growth, maturation, and parthenogenetic development of pig oocytes derived from small antral follicles

Hanna Lee¹, Yongjin Lee¹, Joohyeong Lee², Geun-Shik Lee¹, Seung Tae Lee³, Eunsong Lee^{1,2,*}

¹College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

³Division of Applied Animal Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Abstract: This study was performed to examine the effects of various macromolecules in *in vitro* growth (IVG) media on the growth, maturation, and parthenogenesis (PA) of pig oocytes derived from small antral follicles (SAF). Immature oocytes were cultured for two days in IVG medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 10% (v/v) pig follicular fluid (PFF), 0.4% (w/v) bovine serum albumin (BSA), or 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA) and then maintained for 44 h for maturation. After IVG, the mean diameters of the SAF treated with FBS, PVA, and no IVG-MAF (113.0–114.8 μm) were significantly larger than that of no IVG-SAF (111.8 μm). The proportion of metaphase II oocytes was higher in PFF (73.6%) than in BSA (43.5%) and PVA (53.7%) but similar to that in the FBS treatment (61.5%). FBS and PFF increased cumulus expansion significantly compared to PVA and BSA while the intra-oocyte glutathione content was not influenced by the macromolecules. Blastocyst formation of PA oocytes treated with FBS (51.8%), PFF (50.4%), and PVA (45.2%) was significantly higher than that of the BSA-treated oocytes (20.6%). These results show that the PFF and FBS treatments during IVG improved the growth, maturation, and embryonic development of SAF.

Keywords: *in vitro* maturation, macromolecules, oocyte growth, small antral follicles

서 론

최근 동물생명공학 기법이 발달함에 따라 포유동물의 미성숙난자를 체외에서 성숙시킨 후 체외수정 또는 체세포 핵이식을 통하여 특수 목적의 동물을 생산하는 것이 가능해졌으며, 특히 가축에서는 이러한 기법이 실용적으로 이용되고 있다. 가축에서 미성숙 난자의 성숙과 발생 능력은 난자가 채취되는 난포의 크기, 난자의 직경, 난자에 부착되어 있는 난구세포층의 두께 등 형태학적 특징에 따라 다양하게 나타난다 [1,2]. 특히, 다태동물인 돼지의 난소 표면에는 다양한 크기의 난포가 다수 존재하는데, 직경 3 mm 미만의 작은 난포(small antral follicle, SAF)에서 채취된 난자는 직경 3–8 mm의 난포(medium antral follicle, MAF)에서 유래한 난자에 비해 낮은 체외 성숙능과 배아 발육능을 보이는 것으로 알려져 있다 [3,4]. 이러한 이유로 체외수정이나 체세포 핵이식에 사용되는 체외성숙(*in vitro* maturation, IVM) 난자를 생산하기 위해서는 크기가 큰 난포에서 난자를 채취하여 사용하고 있으며, 크기가 작은 난포에 존재하는 난자는 유용한 유전자원임에도 불구하고 낮은 발육능으로 인해 대부분 폐기되고 있다. 따라서, SAF의 낮은 성숙 및 발육능을 향상시킬 수 있는 체외배양 체계가 개발된다면 폐기되는 유전자원을 활용하여 동물생산을 위한 다수의 난자를 확보할 수 있다.

SAF 유래 난자의 낮은 발육능을 향상시키기 위하여 난자의 체외성숙 이전에 미성숙 난자의 발육을 유도하기 위한 체외발육(*in vitro* growth, IVG) 배

*Corresponding author

Eunsong Lee
College of Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, 1 Kangwondaehak-gil, Chuncheon 24341, Korea

Tel: +82-33-250-8670
Fax: +82-33-259-5625
E-mail: eslee@kangwon.ac.kr

ORCID

Hanna Lee
<https://orcid.org/0000-0001-9363-9388>
Yongjin Lee
<https://orcid.org/0000-0002-3723-4869>
Joohyeong Lee
<https://orcid.org/0000-0001-7233-6409>
Geun-Shik Lee
<https://orcid.org/0000-0002-3149-8433>
Seung Tae Lee
<https://orcid.org/0000-0002-8952-3881>
Eunsong Lee
<https://orcid.org/0000-0001-9654-7788>

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Received: February 18, 2019
Revised: April 15, 2019
Accepted: May 17, 2019

양 시스템을 개발하기 위한 연구가 광범위하게 진행되어 왔다. 미발육 난자의 IVG 배양액에는 기본적으로 난자 내 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 농도를 증가시키는 dibutyryl cAMP (dbcAMP)나 cilostamide와 같은 cAMP modulator가 첨가되는데, 이들 물질 첨가에 의해 핵 분열 재개는 억제하면서 난자의 성장을 유도함으로써 난자의 체외 성숙 및 배아 발육능이 개선되었다는 연구결과가 보고되었다 [3,5]. 이전 연구에 의하면 직경 1.2-1.5 mm의 난포 유래 돼지 미성숙 난자를 체외성숙 유도 배양 이전에 1 mM dbcAMP가 첨가된 IVG 배양액에서 5일 간 배양함으로써 핵 성숙은 억제되었으나 난자의 크기가 증가하였다는 결과가 보고되었다 [5]. 소에서는 IVG 동안 isobutyl-1-methylxanthine 처리에 의해 SAF 유래 난자의 발육이 증가되었으며 체외수정 후 배 발육능이 향상되었다는 결과가 제시되었다 [6]. 한편, 돼지에서 SAF 유래 난자를 IVG 동안 cilostamide로 처리할 경우 난자의 직경이 증가하고 체외성숙 및 체세포 핵 이식 이후 배 발육능이 향상되었다 [3]. 그러나 이러한 다양한 선행 연구에도 불구하고 SAF 유래 난자의 IVG-IVM 이후 생존율이나 성숙률은 여전히 MAF에서 채취된 난자에 비해 낮은 낮은 실정으로, 일반적으로 사용되는 체외성숙 체계 보다는 일관성 있는 결과를 얻지 못하고 있다 [3,7].

난자의 성숙 및 수정란 발육을 위한 배양액에는 난포액, 혈청, 소 혈청알부민 또는 polyvinyl alcohol (PVA) 등 다양한 종류의 물질이 첨가되어 사용된다. 혈청은 난자의 체외 성숙과 수정란 배양에 많이 사용되는 단백질원으로 난자 성숙 및 배 발육에 중요한 역할을 한다 [8,9]. 혈청은 난자 및 수정란의 형태학적 변화, 대사, 세포사멸 및 각종 전사인자의 조절에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 [10-14]. 돼지나 소 난자의 성장을 유도하기 위한 IVG 배양액에는 일반적으로 소 태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 첨가되어 사용되고 있는데, FBS에는 단백질, 아미노산, 당, 호르몬 및 성장인자를 비롯하여 세포의 부착과 증식을 돕는 세포 외 기질 물질이 포함되어 있으며, 알부민을 공급하고 삼투압 조절과 유해 분자나 금속 이온과 결합하여 이들의 독성 작용을 억제하는 기능을 한다 [15,16]. 한편, 돼지 난포액(pig follicular fluid, PFF)은 돼지 난자의 체외성숙 배양액에 첨가되어 사용되는데, PFF에는 혈청성분과 함께 호르몬, 당 및 난포세포로부터 생성된 여러 가지 물질들이 포함되어 있다. 이전의 다양한 연구에서 난포액에는 난포세포의 증식과 분화를 조절하는 인자 및 난자의 성숙과 수정에 필요한 필수적인 성분을 포함하고 있다는 것이 보고되었다 [17,18]. Bovine serum albumin (BSA)은 colloid particles로, 배양액에 첨가될 경우 각종 성장인자, 아미노산 및 단백질 공급원으로 작용하여 난자나 수정란의 발육에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 [19,20]. 이와 같은 물질 이외에 조성이 명백한 합성 거대분자 물질로서 PVA가 난자나 수정란의 배양에 많이 사용되고 있다 [21]. PVA는 합성 중합체로서 혈청이나 난포액 대신에 배양액에 첨가되어 단백질 대체물질로 사용된다.

최근까지 MAF 유래 난자의 체외성숙능을 개선하기 위하여 배양액에 FBS, PFF, BSA 및 PVA와 같은 다양한 고분자 물질을 첨가하여 체외성숙에 대한 효과를 조사한 연구결과가 다수 발표되었으나 [22,23], SAF 유래 난자의 체외발육을 위한 배양 과정에서 이들 물질이 난자의 발육, 체외성숙 및 배아 발육능에 미치는 영향에 대하여 비교, 조사한 연구결과는 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 돼지 난소에 존재하는 미성숙난자의 이용 효율을 증가시키기 위하여, 직경 3 mm 미만의 SAF 유래 난자의 체외발육을 위한 IVG 배양액에 FBS, PFF, BSA 또는 PVA와 같은 고분자 물질을 첨가하여 난자를 배양한 후 이들 물질이 난자의 성장과 핵 성숙, 단위발생 이후의 배 발육능에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

배양액 및 시약

본 연구에 사용된 모든 시약은 특별히 표시되어 있지 않는 한 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다. SAF 유래 난자의 체외발육 배양을 위한 기본 배양액으로는 1 mM dbcAMP, 0.91 mM pyruvate, 75 µg/mL kanamycin, 그리고 8 µg/mL follicle stimulating hormone (FSH; Antrin R-10, Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan)이 첨가된 Minimum Essential Medium alpha medium (α-MEM; Invitrogen, Carlsbad, USA)을 사용하였다. IVG 동안 거대분자물질의 효과를 평가하기 위하여 실험설계에 따라 기본 IVG 배양액에 10% (v/v) FBS, 10% (v/v) PFF, 0.1% (w/v) PVA 또는 0.4% (w/v) BSA를 첨가하여 난자를 배양하였다. 체외성숙 배양액으로는 10% (v/v) PFF, 0.91 mM pyruvate, 0.6 mM cysteine, 10 ng/mL epidermal growth factor, 1 µg/mL insulin 및 75 µg/mL kanamycin이 첨가된 Medium-199 (Invitrogen)를 기본 배양액으로 사용하였다. 단위발생 난자의 배양을 위한 체외배양액으로는 0.3% (w/v) BSA가 포함된 porcine zygote medium-3 (PZM-3)에 10 µM β-mercaptoethanol, 2.77 mM myo-inositol 및 0.34 mM trisodium citrate를 첨가하여 사용하였다 [24].

난자의 채취 및 체외발육 배양

도축된 미성숙 돼지로부터 난소를 채취하여 가운 생리식 염수에 넣어 실험실로 운반하였다. 돼지 난소의 표면에 존재하는 3 mm 미만의 SAF 및 직경 3-8 mm의 MAF로부터 주사기를 이용하여 난자-난구세포복합체(cumulus-oocyte-complex, COC)를 포함하는 난포 내용물을 흡인, 채취한 후 15 mL 용량의 원심관에 넣어 10분간 정치하였다. 팽창되지 않은 다중의 COCs를 선별하여 0.05% (w/v) PVA가 첨가된 HEPES-buffered Tyrode's medium (TLH-PVA)에서 3회 이상 세정하였다. 체외발육용 배양액 0.5 mL가 들어 있는 4-well dish (Nunc, Roskilde, Denmark)의 각 well에 40-50 개의 COCs를 넣은 후 39°C, 5% 탄산가스 인큐베이터에서 2일간 배양하였다.

난자의 체외성숙

IVG 종료 후 난자를 80 µg/mL FSH와 10 IU/mL human chorionic gonadotropin (Intervet International BV, Boxmeer, Holland)이 첨가된 0.5 mL의 체외성숙 배양액이 들어 있는 4-well dish의 각 well에 40-50개씩 넣어 39°C, 5% 탄산가스 인큐베이터에서 22시간 배양하였다. 그 후 호르몬이 첨가되지 않은 신선한 성숙배양액으로 옮겨 추가로 22시간 배양함으로써 난자의 체외성숙을 유도하였다.

난자의 직경 측정

IVG 및 IVM 배양 종료 후 난자로부터 난구세포를 제거하였다. 도립현미경(TE-300; Nikon, Tokyo, Japan)에 부착되어 있는 디지털카메라(DS-L3; Nikon)를 이용하여 난자를 촬영한 후 ImageJ software (version 1.46r; National Institutes of Health, Bethesda, USA)를 이용하여 난자의 직경을 측정하였다 [25].

난자 내 glutathione (GSH) 함량 측정

체외성숙 난자 내 GSH 함량은 이전 보고된 방법에 준하여 측정하였다 [26,27]. GSH를 청색 형광으로 측정하는 Cell-Tracker Blue (4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin; Invitrogen)를 사용하였다. 체외성숙 후 난구세포를 제거한 10-12개의 난자를 10 µM Cell-Tracker가 포함된 TLH-PVA에 넣어 39°C에서 30분간 배양하였고, 그 후 난자를 0.3% (w/v) BSA가 첨가된 PZM-3 배양액으로 세정한 후 30분간 추가 배양하였다. 배양이 끝난 난자를 0.1% (w/v) PVA가 첨가된 Dulbecco's phosphate-buffered saline (Invitrogen)으로 3회 세정 후 2 µL의 미소적으로 옮겨 UV filter (370 nm)가 부착된 형광현미경(TE-300; Nikon) 하에서 형광이미지를 촬영하였다. 촬영된 난자의 영상을 ImageJ software를 이용하여 형광의 강도를 측정함으로써 GSH 함량을 분석하였다.

난구세포 팽창 정도의 평가

체외성숙 종료 후 이전에 보고된 방법 [28]에 준하여 난자에 부착되어 있는 난구세포의 팽창 정도를 평가하였다. 간략히 설명하면, 난구세포 팽창이 전혀 관찰되지 않는 경우 0, 가장 바깥 쪽 세포층이 둥글고 반짝이는 것처럼 최소한의 변화가 관찰되는 상태를 1, 난구세포의 바깥 층만이 팽창된 경우를 2, 방선관을 제외한 모든 난구세포층이 팽창된 경우를 3, 방선관을 포함한 모든 난구세포층이 팽창된 경우를 4로 판정하였다.

단위발생 유도, 체외배양 및 배반포 세포수 산정

체외성숙 후 난자를 0.1% (w/v) hyaluronidase와 0.4% (w/v) BSA가 첨가된 TLH 배양액으로 옮겨 부드럽게 피펫팅 함으로써 난구세포를 제거하였다. 제1극체를 배출한 난자를 성숙난자로 판정하여 선별한 후 0.1 mM 염화칼슘과 0.05 mM 염화마그네슘이 포함된 280 mM mannitol 내에서 120 V/mm 직류 조건으로 60 µsec간 2회 통전하여 난자의

단위발생을 유도하였다. 전기자극 후 난자를 7.5 µg/mL의 cytochalasin B가 첨가된 체외배양액 내에서 4시간 동안 배양함으로써 후활성화 처치를 하였다.

후활성화 처치 후 단위발생 배아를 신선한 배양액으로 세정한 후 30 µL의 체외배양액 미소적 내에 20-30개를 넣어 39°C, 5% 탄산가스, 5% 산소 및 90% 질소가스가 들어 있는 인큐베이터에서 7일동안 배양하였다. 체외배양 2일 및 7일째에 각각 분할과 배반포로의 발육여부를 관찰하였다. 체외배양 7일째에 배반포 단계로 발육한 배아를 bisbenzimidazole로 염색한 후 형광현미경 하에서 관찰하여 배반포의 세포수를 산정하였다.

실험설계

실험1에서는 IVG 배양액에 첨가된 FBS, PFF, PVA 및 BSA가 SAF유래 난자의 성장에 따른 직경변화에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 2에서는 체외발육이 유도된 난자를 체외성숙 배양 후 난자의 핵 성숙, 난구세포의 팽창정도 및 체외성숙 난자 내 GSH 함량에 대한 효과를 검토하였으며, 실험 3에서는 이들 물질이 단위발생 배아의 분할, 배반포 발육능 및 배반포의 평균 세포수에 미치는 영향을 조사하였다. MAF 및 SAF 난자로서 체외발육을 유도하지 않고 체외성숙 배양한 난자를 대조군으로 설정하여 다른 처리군과 비교하였다. 실험 4에서는 체외발육 배양에서 MAF 및 SAF 유래 PFF(각각 MPFF와 SPFF로 명명)가 SAF 유래 난자의 성숙 및 단위발생 후 배 발육에 미치는 효과를 검토하였다.

통계분석

실험결과의 유의성을 검정을 위한 통계분석에는 Statistical Analysis System (version 9.3; SAS Institute, Cary, USA)을 사용하였다. 퍼센트 결과는 분석 전 아크사인(arc sine) 변환을 실시하였으며, 각 결과는 일반선형모델(general linear model)을 이용하여 분석하였고, least significant difference test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 처리군 간의 통계학적 유의성을 검정하였다. 실험결과는 평균 ± 표준오차(standard error of the mean; SEM)로 표시하였다.

결 과

IVG 배양액에 첨가된 FBS, PFF, PVA 및 BSA가 SAF 유래 난자의 직경 변화에 미치는 영향(실험 1)

IVG 배양 종료 후 난자의 직경을 조사한 결과는 Table 1과 같다. IVG 배양 동안 FBS, PFF 및 PVA (각각 114.1 ± 0.4 , 112.7 ± 0.4 및 113.0 ± 0.4 µm) 처치는 BSA (111.2 ± 0.4 µm) 난자 및 IVG 배양을 하지 않은 SAF유래 난자 (111.8 ± 0.4 µm)에 비해 난자의 직경을 유의적으로 증가시켰다. 특히 FBS와 PVA는 MAF 유래 난자(114.8 ± 0.5 µm)에 필적하는 크기를 보였다. 한편, IVG-IVM 후 난자의 직경은 FBS, BSA 및 PVA 처리군(각각 112.8 ± 0.5 , 112.9 ± 0.5 및 112.6 ± 0.4 µm)이 MAF와 SAF 무처리 및 PFF 처리군(각각

Table 1. Effect of various macromolecules in IVG medium on diameter of oocytes derived from small and medium antral follicles

Origin of COCs*	Treatment during IVG	IVG culture (day)	Oocyte diameter (µm) after	
			IVG (N** = 140)	<i>In vitro</i> maturation (N** = 76)
MAF	-	0	114.8 ± 0.5 ^a	110.4 ± 0.4 ^a
SAF	-	0	111.8 ± 0.4 ^c	109.6 ± 0.5 ^a
SAF	10% FBS	2	114.1 ± 0.4 ^a	112.8 ± 0.5 ^b
SAF	10% PFF	2	112.7 ± 0.4 ^{b,d}	109.8 ± 0.6 ^a
SAF	0.4% BSA	2	111.2 ± 0.4 ^c	112.9 ± 0.5 ^b
SAF	0.1% PVA	2	113.0 ± 0.4 ^{a,d}	112.6 ± 0.4 ^b

IVG, *in vitro* growth; COCs, cumulus-oocyte-complexes; MAF, medium antral follicle; SAF, small antral follicle; FBS, fetal bovine serum; PFF, pig follicular fluid; BSA, bovine serum albumin; PVA, polyvinyl alcohol.

^{a-d}Values in the same column with different superscript letters are different ($P < 0.01$).

*Oocytes were collected from medium antral follicles (MAF, 3–8 mm in diameter) and small antral follicles (SAF, < 3 mm in diameter), respectively.

**Number of oocytes examined.

110.4 ± 0.4, 109.6 ± 0.5 및 109.8 ± 0.6 µm)에 비해 유의적으로 큰 결과를 보였다.

IVG 배양액에 첨가된 FBS, PFF, PVA 및 BSA가 SAF 유래 난자의 성숙, 난구세포 팽창 및 난자 내 GSH 함량에 미치는 영향(실험 2)

IVG 동안 PFF 처리(73.6 ± 3.5%)는 BSA 및 PVA 처리군(각각 43.5 ± 2.3 및 53.7 ± 5.3%)에 비해 유의적으로 높은 핵 성숙률을 보였으며, SAF 무처리 및 FBS 처리군(각각 67.2 ± 5.0 및 61.5 ± 6.2%)과는 차이가 없었으나, MAF 난자(93.9 ± 1.1%)에 비해 유의적으로 낮은 성숙률을 보였다(Table 2). 체외성숙 후 난구세포의 팽창 정도는 PFF 처리군(2.94 ± 0.14)이 MAF 난자(3.22 ± 0.08)만큼 유의적으로 증가하였으며, FBS, BSA 및 PVA 처리군(각각 2.24 ± 0.14, 1.38 ± 0.13 및 1.84 ± 0.10)에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다(Fig. 1). 한편, 체외성숙 난자 내 GSH 함량은 SAF 무처리군(0.69 ± 0.06 pixels/oocyte)에 비해 모든 처리군(FBS, PFF, BSA 및 PVA 처리군에서 각각 0.92 ± 0.07, 0.93 ± 0.07, 1.05 ± 0.09 및 1.12 ± 0.09 pixels/oocyte)에서 유의적으로 증가하였으며, MAF 난자의 GSH 함량(1.00 ± 0.10 pixels/oocyte)과는 유사한 결과를 보였다.

IVG 배양액에 첨가된 FBS, PFF, PVA 및 BSA가 SAF 유래 단위발생 배아의 체외발육에 미치는 영향(실험 3)

IVG-IVM 배양 종료 후 제1극체를 배출한 난자를 대상으로 단위발생을 유도한 결과는 Table 3과 같다. 배아의 분할률은 BSA 처리군(65.8 ± 4.8%)이 다른 모든 처리군에 비해 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 한편, PFF와 PVA 처리군(각각 89.7 ± 2.3 및 95.3 ± 3.6%)은 MAF 유래 배아(97.1 ± 1.0%)와 유사한 분할률을 나타내었다. 배반포 발육률은 MAF, FBS, PFF 및 PVA 처리군에서 각각 54.8 ± 5.9%, 51.8 ± 4.5%, 50.4 ± 2.1% 및 45.2 ± 5.9%로 IVG를 하지 않은 SAF 및 BSA 처리군의 24.3 ± 4.6% 및 20.6 ± 2.4%에 비해 유의적으로 높은 배 발육을 보였다.

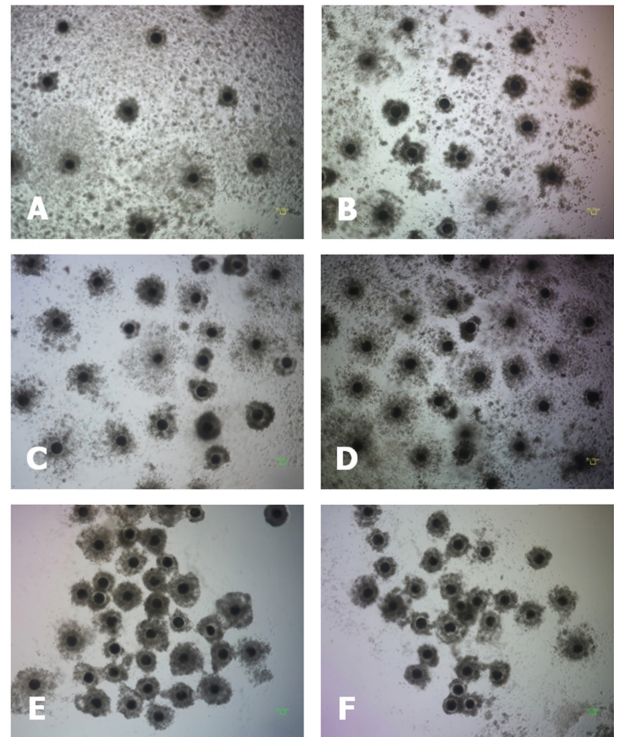


Fig. 1. Morphology of COCs derived from SAF and MAF after IVM. COCs from MAF (A) and SAF (B) without IVG culture and SAF-COCs that had been cultured for two days in IVG medium containing fetal bovine serum (C), pig follicular fluid (D), bovine serum albumin (E), and polyvinyl alcohol (F) were cultured for 44 h for IVM.

COCs, cumulus-oocyte-complexes; SAF, small antral follicle; MAF, medium antral follicle; IVM, *in vitro* maturation; IVG, *in vitro* growth.

IVG 배양액에 첨가된 FBS 및 PFF의 종류에 따른 SAF 유래 난자의 체외성숙 및 단위발생 후 배아 발육에 미치는 영향(실험 4)

MPFF 및 SPFF가 SAF 유래 난자의 성숙 및 단위발생 후 배 발육에 미치는 영향을 검토한 결과, FBS 및 PFF의

Table 2. Effect of various macromolecules in IVG medium on nuclear maturation, cumulus cell expansion, and intra-oocyte GSH contents of oocytes after IVM

Origin of COCs*	Treatment during IVG	IVG culture (day)	No. oocytes cultured for IVM	% of oocytes reached MII	Cumulus expansion score after IVM (N** = 50)	Relative level (pixels/oocyte) of GSH (N** = 50)
MAF	-	0	117	93.9 ± 1.1 ^a	3.22 ± 0.08 ^a	1.00 ± 0.10 ^a
SAF	-	0	156	67.2 ± 5.0 ^b	2.75 ± 0.12 ^b	0.69 ± 0.06 ^b
SAF	10% FBS	2	138	61.5 ± 6.2 ^{b,c}	2.24 ± 0.14 ^c	0.92 ± 0.07 ^a
SAF	10% PFF	2	144	73.6 ± 3.5 ^b	2.94 ± 0.14 ^{a,b}	0.93 ± 0.07 ^a
SAF	0.4% BSA	2	137	43.5 ± 2.3 ^d	1.38 ± 0.13 ^d	1.05 ± 0.09 ^a
SAF	0.1% PVA	2	145	53.7 ± 5.3 ^{c,d}	1.84 ± 0.10 ^e	1.12 ± 0.09 ^a

IVG, *in vitro* growth; GSH, glutathione; IVM, *in vitro* maturation; COCs, cumulus-oocyte-complexes; MII, metaphase II; MAF, medium antral follicle; SAF, small antral follicle; FBS, fetal bovine serum; PFF, pig follicular fluid; BSA, bovine serum albumin; PVA, polyvinyl alcohol.

^{a-c}Values in the same column with different superscript letters are different ($P < 0.01$).

*Oocytes were collected from medium antral follicles (MAF, 3–8 mm in diameter) and small antral follicles (SAF, <3 mm in diameter), respectively.

**Number of oocytes examined.

Table 3. Effect of various macromolecules in IVG medium on parthenogenetic development of pig oocytes

Origin of COCs*	Treatment during IVG	IVG culture (day)	No. of embryos cultured	% of embryos developed to		No. cells in blastocyst
				≥ 2-cell	Blastocyst	
MAF	-	0	110	97.1 ± 1.0 ^a	54.8 ± 5.9 ^a	42.5 ± 2.1
SAF	-	0	115	86.5 ± 4.4 ^b	24.3 ± 4.6 ^b	35.5 ± 2.8
SAF	10% FBS	2	86	83.5 ± 4.6 ^b	51.8 ± 4.5 ^a	40.9 ± 2.4
SAF	10% PFF	2	106	89.7 ± 2.3 ^{a,b}	50.4 ± 2.1 ^a	41.4 ± 2.3
SAF	0.4% BSA	2	58	65.8 ± 4.8 ^c	20.6 ± 2.4 ^b	41.8 ± 6.5
SAF	0.1% PVA	2	78	95.3 ± 3.6 ^a	45.2 ± 5.9 ^a	42.6 ± 2.6

IVG, *in vitro* growth; COCs, cumulus-oocyte-complexes; MAF, medium antral follicle; SAF, small antral follicle; FBS, fetal bovine serum; PFF, pig follicular fluid; BSA, bovine serum albumin; PVA, polyvinyl alcohol.

^{a-c}Values in the same column with different superscript letters are different ($P < 0.01$).

*Oocytes were collected from medium antral follicles (MAF, 3–8 mm in diameter) and small antral follicles (SAF, <3 mm in diameter), respectively.

Table 4. Effect of FBS, PFF derived from medium and small antral follicles supplemented to IVG medium on parthenogenetic development of pig oocytes

Origin of COCs*	Treatment during IVG	IVG culture (day)	No. of oocytes cultured	% of oocytes reached MII	No. of embryos cultured	% of embryos developed to		No. cells in blastocyst
						≥ 2-cell	Blastocyst	
MAF	-	0	136	93.9 ± 1.5 ^a	101	95.8 ± 0.7	40.4 ± 3.8 ^a	37.3 ± 2.3
SAF	-	0	170	71.6 ± 3.3 ^b	89	89.8 ± 4.1	11.2 ± 3.6 ^b	38.9 ± 6.6
SAF	10% FBS	2	141	78.5 ± 1.4 ^b	111	90.9 ± 5.2	39.9 ± 3.7 ^a	41.2 ± 2.3
SAF	10% MPFF	2	144	73.6 ± 3.5 ^b	106	89.7 ± 2.3	50.4 ± 2.1 ^a	41.4 ± 2.3
SAF	10% SPFF	2	173	78.2 ± 1.9 ^b	133	95.6 ± 2.0	48.0 ± 4.1 ^a	41.6 ± 2.1
SAF	SPFF-MPFF [†]	2	144	79.0 ± 1.8 ^b	111	92.5 ± 2.6	50.7 ± 2.7 ^a	43.5 ± 2.2

FBS, fetal bovine serum; PFF, pig follicular fluid; IVG, *in vitro* growth; COCs, cumulus-oocyte-complexes; MII, metaphase II; MAF, medium antral follicle; SAF, small antral follicle; MPFF, PFF from MAF; SPFF, PFF from SAF.

^{a,b}Values in the same column with different superscript letters are different ($P < 0.01$).

*Oocytes were collected from medium antral follicles (MAF, 3–8 mm in diameter) and small antral follicles (SAF, <3 mm in diameter), respectively; [†]Oocytes were cultured for a day in IVG medium supplemented with SPFF and then further cultured for a day in MPFF-supplemented medium.

종류에 따른 난자의 핵 성숙률(73.6–79.0%)사이에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나, MAF난자의 핵 성숙률($93.9 \pm 1.5\%$)보다는 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 단위발생 배아의 분할율 및 배반포 발육능도 IVG 배양액에 첨가된 FBS, MPFF, SPFF 및 SPFF-MPFF 병용처리에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나 MAF 난자($40.4 \pm 3.8\%$)와 2일 동안 체외발육을 유도한 SAF 난자(39.9%–50.7%)는 IVG 배양을 하지 않은 SAF 난자($11.2 \pm 3.6\%$)에 비해 유의적으로 높은 배반포 발육능을 보였다(Table 4).

고 찰

돼지에서 SAF 유래 난자는 MAF 유래 난자보다 현저하게 낮은 배 발달능력을 보이는데, 이는 미성숙 난자가 채취되는 난포의 크기 및 채취된 난자의 크기가 이후의 발생과 매우 밀접한 관련이 있다는 것을 나타낸다 [4,29]. 본 연구에서는 SAF 유래 난자의 배 발육능을 향상시키기 위하여 IVG 배양액에 FBS, BSA와 같은 다양한 종류의 고분자물질을 첨가하여 배양한 후 이들 물질이 난자의 발육, 체외성숙 및 단위발생 배아의 발육능에 미치는 영향을 검토하였다. BSA를 제외하고 IVG 배양액에 첨가된 FBS, PFF, PVA는 IVG 후 난자의 크기를 증가시켰고, IVM 후 난구세포의 팽창을 자극하고 난자 내 GSH 함량을 증가시켰으며, 단위 발생 배아의 체외발육능을 개선하는 것이 관찰되었다.

난자의 성숙능과 발육능을 평가하는 지표로는 여러 가지가 있지만 일반적으로 난자가 채취되는 난포의 크기와 난자의 형태학적 특징으로 난자의 품질을 평가한다. 성숙 난자의 품질을 평가하는 형태학적인 특징으로는 난자의 직경, 체외성숙 후 난구세포의 팽창 정도 등이 있으며, 이는 난자의 발달능력과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 [30,31]. 본 연구에서 SAF에서 채취한 난자를 다양한 고분자 물질을 처리하여 IVG 배양한 후 IVM 전후의 난자 직경을 측정하였다. IVG 종료 후의 난자 직경은 BSA를 제외한 나머지 처리군에서 유의적으로 증가하였으며, IVM 이후의 난자 직경도 MAF 유래 난자에 필적하는 크기를 보였다. 이와 함께 단위 발생 후의 배반포 발육능 역시 MAF 유래 난자와 유사한 결과를 보였다. 본 연구 결과는 돼지에서 체외성숙 전후 난자의 크기가 클수록 단위발생이나 핵 이식 이후의 배 발육능이 유의적으로 높았다는 선행연구 결과와 일치하였으며 [3,29], 난자를 채취하는 난포의 크기와 난자의 직경이 난자의 성숙 및 배 발육능에 매우 중요한 지표로서 높은 배 발육능을 위해서는 일정 크기 이상의 난포 및 난자로의 발육이 필요하다는 것이 재확인 되었다.

난자에 부착되어 있는 난구세포는 난자를 유해한 환경으로부터 보호하고, 난자에 영양분을 공급하며 수정 과정에서 정자의 수정능 획득에도 영향을 미친다 [32,33]. 또한 난구세포와 난자 사이에는 투명대를 통과하는 trans-zonal projection을 통해 난자의 성장과 발육에 필요한 영양 물질들이 이동하며, 이것이 gap junctional communication을 통하여

난자에 전달되어 난자의 성숙과 추가적인 배아의 발달에도 도움을 준다 [34,35]. 포유동물 난자의 난구세포는 난자의 성숙이 진행됨에 따라 팽창하게 되는데, 따라서 난구세포의 팽창 정도는 난자의 성숙도를 평가하는 지표로 사용되어 왔다. 본 연구에서 IVG 배양액에 첨가된 다양한 고분자물질이 체외성숙 난자의 난구세포 팽창에 미치는 영향을 조사한 결과, FBS와 PFF는 PVA 및 BSA에 비해 난구세포의 팽창을 증가시켰다. 본 결과는 혈청이나 난포액이 소 및 돼지 난자의 난구세포 팽창을 증가시켰다는 이전 보고와 일치하였는데, 아마도 혈청이나 난포액에 존재하는 각종 성장인자 또는 고분자물질이 체외성숙 과정에서 난구세포 팽창을 자극한 것으로 생각된다 [36,37]. 난구세포의 팽창 정도가 클수록 단위 발생 배아의 배반포 발육능도 증가하는 것으로 나타났는데 이는 성숙난자의 난구세포 팽창 정도가 배 발육능과 밀접한 관련이 있다는 것을 보여준다. 한편 성숙 난자 내 GSH 함량은 난자 세포질 성숙의 지표로 사용되며 배아의 발달능력 과도 관련되어 있는 것으로 보고되었다 [38]. 본 연구에서 난자 내 GSH 함량은 배반포 발육능에 대한 영향과 달리 IVG 배양액에 첨가된 고분자 물질의 종류에 의해 영향을 받지 않았다. 이는 난자 내 GSH 함량이 높을수록 배반포 발육능이 향상되었다는 기존 연구결과와는 일치하지 않았는데, 그 원인은 확실하지 않지만 아마도 GSH 합성이 주로 난자의 성숙 과정에서 일어나기 때문에 난자의 성숙과정이 아닌 체외발육 배양 동안의 고분자물질 처치 효과는 미미했던 것으로 추측된다.

포유동물 난자는 난포 내에 위치하면서 난포가 발육하여 크기가 증가함에 따라 난자도 함께 성장, 성숙한다. 난포강은 난포액으로 충만되어 있는데 난포액의 성분은 난포의 크기에 따라 그 성분이 변화하는 것으로 조사되어 있다 [39,40]. 본 연구에서 MAF와 SAF에서 채취한 PFF를 IVG 배양액에 첨가하여 SAF유래 난자의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다. IVG 난자의 성숙 및 배 발육은 MAF 및 SAF 난포액의 종류에 따라 영향을 받지 않고 FBS와 유사한 효과를 보였다. 특히 모든 처리군에서 MAF유래 단위발생 난자의 배반포 발육능에 필적하는 효과를 보여 SAF유래 미발육 난자의 배양에 유효한 것으로 나타났다. 이 결과는 SAF 및 MAF에서 채취한 PFF를 돼지 난자의 체외성숙배양액에 첨가하여 성숙시켰을 때 체외수정란의 배 발육에 영향을 미치지 않았다는 기존의 연구결과 [4]와 유사하였다. 본 실험 결과는 난포의 크기에 따라 변화되는 난포액 내 각종 아미노산이나 호르몬의 농도차이에 의한 효과보다는 난포액의 주 성분인 혈청의 역할이 SAF 난자의 발육에 더 큰 영향을 미쳤기 때문인 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구결과 BSA를 제외한 FBS와 PFF, PVA를 첨가한 체외성장 배양액에서의 난자의 배양은 SAF유래 미성숙 난자의 성장과 IVM 이후 세포질 성숙을 유도함으로써 MAF 유래 난자에 필적하는 정도까지 배 발달능력을 향상시킬 수 있다는 것이 확인되었다. 그러나 아직까지 SAF 유래 난자의 체외성숙능은 MAF난자의 그것보다 낮은 상태

이다. 추후 다양한 연구를 통하여 SAF유래 난자의 성숙능을 개선할 수 있는 배양체계의 개발은 현재까지 낮은 발육능으로 인해 사용되지 않고 폐기되어 왔던 유용한 유전자원을 더욱 효율적으로 활용할 수 있는 대안이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and Future Planning (Grant No. 2015R1A2A2A01005490)와 2017 Research Grant from Kangwon National University (No. 520170382)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. Bagg MA, Vassena R, Papasso-Brambilla E, Grupen CG, Armstrong DT, Gandolfi F. Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. *Theriogenology* 2004;62:1003-1011.
2. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 1995;42:437-442.
3. Lee H, Elahi F, Lee J, Lee ST, Hyun SH, Lee E. Supplement of cilostamide in growth medium improves oocyte maturation and developmental competence of embryos derived from small antral follicles in pigs. *Theriogenology* 2017;91:1-8.
4. Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM, Lee BC, Hwang WS, Lee ES. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev* 2000;12:133-139.
5. Kubo N, Cayo-Colca IS, Miyano T. Effect of estradiol-17 β during *in vitro* growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. *Anim Sci J* 2015;86:251-259.
6. Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol* 2002;244:215-225.
7. Wu D, Cheung QC, Wen L, Li J. A growth-maturation system that enhances the meiotic and developmental competence of porcine oocytes isolated from small follicles. *Biol Reprod* 2006;75:547-554.
8. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995;1:91-148.
9. Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Lee SH, Hwang WS, Lee BC, Kang SK. Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* 2007;67:293-302.
10. Abe H, Hoshi H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J Reprod Dev* 2003;49:193-202.
11. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* 1999;117:97-105.
12. Calder MD, Caveney AN, Sirard MA, Watson AJ. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*. *Fertil Steril* 2005;83 Suppl 1:1077-1085.
13. Gardner DK. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int* 1994;18:1163-1179.
14. Krisher RL, Lane M, Bavister BD. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod* 1999;60:1345-1352.
15. Mingoti GZ, Castro VS, M \acute{e} o SC, S \acute{a} Barretto LS, Garcia JM. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine *in vitro* procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011;47:361-367.
16. Pinyopummintr T, Bavister BD. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 1994;41:1241-1249.
17. Grupen CG, Armstrong DT. Relationship between cumulus cell apoptosis, progesterone production and porcine oocyte developmental competence: temporal effects of follicular fluid during IVM. *Reprod Fertil Dev* 2010;22:1100-1109.
18. Pi \tilde{n} ero-Sagredo E, Nunes S, de los Santos MJ, Celda B, Esteve V. NMR metabolic profile of human follicular fluid. *NMR Biomed* 2010;23:485-495.
19. Webster HL. Colloid osmotic pressure: theoretical aspects and background. *Clin Perinatol* 1982;9:505-521.
20. Zuelke KA, Brackett BG. Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol Reprod* 1990;43:784-787.
21. Bavister BD. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool* 1981;217:45-51.
22. Shirazi A, Ardali MA, Ahmadi E, Nazari H, Mamuee M, Heidari B. The effect of macromolecule source and type of media during *in vitro* maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. *J Reprod Infertil* 2012;13:13-19.
23. Yoshioka K. Development and application of a chemically defined medium for the *in vitro* production of porcine embryos. *J Reprod Dev* 2011;57:9-16.
24. You J, Lee J, Hyun SH, Lee E. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves *in vitro* development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* 2012;78:235-243.
25. Lee J, You J, Lee GS, Hyun SH, Lee E. Pig oocytes with a large perivitelline space matured *in vitro* show greater developmental competence after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 2013;80:753-762.
26. Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Effect of beta-mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *J Vet Sci* 2004;5:253-258.
27. Sakatani M, Suda I, Oki T, Kobayashi S, Kobayashi S, Takahashi M. Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock. *J Reprod Dev* 2007;53:605-614.

28. Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R, Eppig JJ. Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Dev Biol* 1990;140:307-317.
29. Kim J, You J, Hyun SH, Lee G, Lim J, Lee E. Developmental competence of morphologically poor oocytes in relation to follicular size and oocyte diameter in the pig. *Mol Reprod Dev* 2010;77:330-339.
30. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 1997;48:769-774.
31. Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1995;40:338-344.
32. Brower PT, Schultz RM. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev Biol* 1982;90:144-153.
33. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 1968;17:555-557.
34. Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* 2001;76:943-949.
35. Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 2007;67:6-15.
36. Lopes JS, Canha-Gouveia A, Paris-Oller E, Coy P. Supplementation of bovine follicular fluid during *in vitro* maturation increases oocyte cumulus expansion, blastocyst developmental kinetics, and blastocyst cell number. *Theriogenology* 2019;126:222-229.
37. Singh B, Armstrong DT. Insulin-like growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Biol Reprod* 1997;56:1370-1375.
38. de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000;53:761-771.
39. Hong J, Lee E. Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. *Theriogenology* 2007;68:728-735.
40. Orsi NM, Gopichandran N, Leese HJ, Picton HM, Harris SE. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction* 2005;129:219-228.