

한우 난포란의 체외수정 및 체외수정란의 동결보존에 관한 연구

최상용 · 공일근* · 주영국* · 노규진 · 김용권** · 박충생*

경상대학교 수의과대학, 농과대학*

삼천포 농촌지도소**

(1993년 10월 13일 접수)

Fertilization *In vitro* of follicular oocytes and cryopreservation of embryo fertilized and developed *In vitro* in Korean native cattle

Sang-yong Choe, Ill-keun Kong*, Young-kuk Joo*, Gyu-jin Rho,

Yong-kweon Kim**, Choong-saeng Park*

College of Veterinary Medicine and Agriculture,*, Gyeongsang National University

Sancheonpo Office of Rural Guidance**

(Received October 13, 1993)

Abstract : The ovaries of Korean Native cows or heifers were obtained from an abattoir and kept on 20 to 25°C and transported to laboratory within 2 hrs. The follicular oocytes were collected from 2~6mm follicles in diameter and classified into 3 grades by the morphology of cumulus cells attached. The oocytes were matured *in vitro* (IVM) for 24 hrs. in TCM-199 supplemented with 23 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH, 1 µg/ml estradio-17β and granulosa cells at 39°C under 5% CO₂ in air. They were fertilized *in vitro* (IVF) by incubation for 12 hrs. of epididymal spermatozoa pretreated with heparin, and then the zygotes were co-cultured *in vitro* (IVC) with oviductal epithelial cells for 7 to 9 days.

Assessment of maturation revealed that 93.0%(147/158) of grade I oocytes had expanded of cumulus cells, which was higher(p<0.05) than the 79.4%(85/107) of grade II oocytes. Compared to epididymal sperm(32.9%), the insemination with frozen and thawed sperm resulted in slightly lower(20.5%), but not significant, development to morulae and blastocysts from grade I oocytes. Co-culture of bovine IVF embryos with oviductal epithelial cells improved the development to transferable embryos significantly(38.1%), compared to co-culture with granulosa cells(20.0%). When VF bovine embryos were vitrified at blastocyst, the post-thaw survival rate was obtained higher result for 1 min. equilibration time(82.6%) or 2 min.(73.9%) than 3 min.(18.2%) in EFS solution.

Key words : *In vitro* fertilization, equilibration time, vitrification.

서 론

체외수정의 실용화는 난포란의 체외성숙, 정자의 수정능 획득, 체외수정 및 체외배양기법들이 다같이 발전

되어야만 가능하게 된다. 체내성숙난자보다 체외성숙난자의 배발생이 저조한 것은 난포란의 핵성숙 및 세포질 성숙이 체내상태에서의 성숙과 같이 정상적으로 일어나지 않을 뿐 아니라 수정 및 배발생의 조건이 적합하

* 이 논문은 1992년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

지 않은데 있으며^{6,18}, Schellander et al²⁰은 난포란을 체외배양시 핵성숙은 정상적으로 일어나 제 2성숙분열 중기에 도달하나, 세포질성숙이 정상적으로 일어나지 않아 이것이 그후의 수정 및 배발생에 영향을 미치기 때문이라고 보고하였다. 체외수정된 소 배의 8~16 cell block 현상은 초기배를 난구세포 또는 난관상피세포와 co-culture 함으로써 일부분 극복할 수 있으며^{4,5,10}, 난관 단층세포가 초기배의 체외발생을 증진시키는 기전은 명확히 밝혀져 있지 않으나 배양액 내로 난관단층세포에 의한 발생촉진인자가 분비되거나 또는 배양액 내의 발생억제물질을 제거함으로써 그 효과를 나타내는 것으로 알려 있다.⁴

체외수정란의 동결·융해시 세포내·외의 결빙형성이 세포구조를 파괴함으로써 생존성에 영향을 미치고 있다.¹⁴ 이러한 세포내·외 결빙형성을 억제할 수 있는 vitrification solution(VS-1: 초자화 용액)을 Rall과 Fahy¹⁶에 의하여 최초로 개발된 이후 Scheffen 등¹⁹이 독성이 약한 vitrification solution(VS-3)을 개발하여 자동세포동결기에 의존하지 않고도 간편하고 신속하게 동결하는 방법이 이용되고 있다.^{1,3,21} 최근에는 EFS solution(ethylene glycol, Ficoll, sucrose)을 개발하여 생쥐 및 토끼^{11,12}, 소²²의 체외수정란을 동결하는데 성공하였다.

따라서 본 연구는 체외수정기법을 응용하여 저렴하게 다량으로 배의 생산체계 및 동결보존기법을 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

난포란의 체외성숙: 수집한 난소를 20~22°C의 saline에 보관하여 2시간 이내에 실험실로 운반하여 2~6mm(중난포)의 정상난포에서 난포란을 채취하였다. 채취한 난포란의 선발은 Wiemer 등²⁴의 방법에 준하였으며 Grade I, II(Fig 1)를 체외성숙에 공시하였다. 체외성숙 배양액은 TCM-199(Earle's salt)의 기본배양액에 sodium pyruvate(56 µg/ml), streptomycin(100 µg/ml), penicillin G(100 units/ml), LH(10 µg/ml), estradiol-17β(1 µg/ml), FSH(35 µg/ml) 및 FBS(10% v/v; Fetal Bovine Serum, Gibco)를 첨가하였다. 난구세포층이 방사선으로 확장되고 세포질이 균일한 것을 성숙한 것으로 판정하여 체외수정에 공시하였다(Fig 2).

체외수정 및 정자처리: 정자처리를 위하여 B.O. medium(Brackett와 Oliphant²)에 caffeine(sodium caffeine benzonate, gigma) 10 µM을 첨가한 배양액을 세척용으로 60분동안 swim-up을 유도하여 부유된 정자만을 채취한 후 BSA(5 mg/ml), caffeine(5 mM) 및 heparin(10 µg/ml)을 첨가한 배양액을 이용하여 수정능이 획득된 산

정자를 1~2×10⁶ cells/ml의 농도로 수정을 시켰다. 성숙된 난포란을 수정용 medium으로 3~4회 세척하여 전처리가 끝난 정자와 18시간 CO₂ 배양기에서 수정시켰다.

수정란의 체외배양: 수정후 수정란을 granulosa cells 및 epithelium cells과 co-culture 시키면서 48시간마다 신선배양액을 교환하였으며, 5일이 경과한 monolayer cells은 신선한 monolayer cells로 교환하였다. 수정후 7~9일까지 배발달을 위한 체외배양은 계속시키면서 후기배로의 발달을 조사하였다.

배의 동결보존 및 융해: 동결보존액은 10% FBS를 포함한 D-PBS를 기본배양액으로 Kasai et al¹²의 방법에 준하여 EFS solution을 제조하였다. 40% ethylene glycol, 18% (w/v) Ficoll 70(average Mr, 70,000) 및 0.3M sucrose를 기본배양액에 혼합하여 제조하였다. Straw내에 동결보호제 및 수정란의 주입방법은 Kong et al¹³의 방법에 준하여 Fig 4와 같이 실시하였다. 배의 동결은 체외수정 후 배반포기까지 발달한 배를 실온에서 1, 2 및 3분간 EFS solution에 평형하여 polyvinylalcohol(powder)로 straw 끝부분을 봉입한 다음 액체 질소(-196°C)에 침적하였다. 동결보존한 배는 straw를 액체 질소에서 꺼낸 즉시 20°C의 물에 침적시켜서 약 10초간 흔들면서 융해하였다. 희석은 배와 동결보존액을 0.5M sucrose용액이 1ml 정도 있는 petri dish에 유출시켜 약 5분간 정치시킨 후 기본용액을 3~4회 세척하면서 다시 5분간 정치시킨 후 배양하였다. 배의 생존성판정은 TCM-199배양액에서 24~48시간 배양하여 확장배반포기배까지 발달한 것을 생존한 것으로 판정하였다(Fig 3).

통계학적 분석: 체외수정란의 배발달 및 동결·융해한 배의 생존율은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 χ²-test를 실시하였다.

결 과

한우 난포란의 체외성숙, 수정 및 배발달의 최적 조건을 조사하고 배반포기배까지 발달한 배를 동결·융해하여 생존율을 조사한 결과는 다음과 같다.

난포란의 등급이 체외성숙에 미치는 영향: 최수한 난포란을 grade I, II로 구분하여 체외성숙을 유도하여 25시간후에 과립막세포의 팽창여부로 성숙율을 판단한 결과는 Table 1과 같다. grade I, II에서 각각 158, 107개의 난포란을 성숙시킨 결과 147(93.0%) 및 85(79.4%)개의 난포란이 성숙하였다.

Co-culture system에 의한 배발달: 체외수정후 배반포까지의 발달을 유도하기 위하여 난관상피세포와 과립막세포를 공배양시킨 결과는 Table 2에서와 같다. grad-

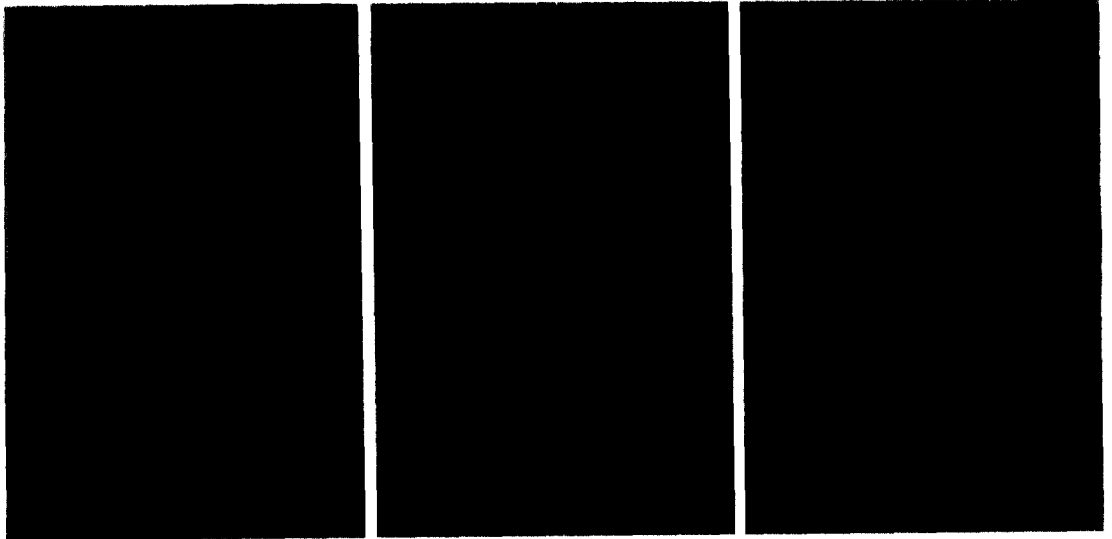


Fig 1. An oocyte of grade I classified by morphology.

Fig 2. An oocyte of grade I matured in TCM-199 for 24 hours.

Fig 3. The blastocysts developed in TCM-199 with BOEC(day 7 after IVF).

Table 1. Effect of grade of bovine oocytes on *in vitro* maturation rate by cumulus cell expansion

Grade of oocytes	No. of oocytes used	No. and(%) of oocytes expanded	No. of oocytes non-expanded
Grade I	158	147(93.0) ^a	11
Grade II	107	85(79.4) ^b	12

* Values with different superscripts were significantly different($p < 0.05$).

Table 2. Effect of co-culture cell types *in vitro* development of IVM-IVF bovine embryos

Quality of oocytes	Cell types of co-culture	No. of oocytes inseminated	No. &(%) of embryos cleaved	No. &(%) of embryos developed to		
				Morula	Blastocyst	Mor. & blast.
Grade I	Oviduct	97	79(81.4) ^a	24	13	37(38.1) ^a
	Granulosa	50	40(80.0) ^a	9	1	10(20.0) ^b
Sub-total		147	119(81.0) ^A	33	14	47(32.0) ^A
Grade II	Oviduct	43	32(74.4) ^a	7	2	9(20.9) ^a
	Granulosa	42	28(66.7) ^a	3	2	5(11.9) ^a
Sub-total		85	60(70.5) ^A	10	4	14(16.5) ^B

* Values with different small or capital superscripts in the same column were Significantly different($p < 0.05$).

Table 3. Effect of equilibration time for cryopreservation on post-thaw survival of IVM-IVF bovine embryos

Equilibration time(min.)	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. &(%) of post-thaw embryos developed to		
			Normal expanded Blastocyst	False Blastocyst	Degenerated
1	23	23	19(82.6) ^a	1(4.4)	3(13.0)
2	27	23	17(73.9) ^a	1(4.4)	5(21.7)
3	22	22	4(18.2) ^b	2(9.1)	16(72.7)

* Values with different superscripts were significantly different($p < 0.05$).

e I에서 난관상피세포와 과립막세포간에 분할율에는 81.4%(79/97)와 80.0%(40/50)로서 유의차가 없었고 상질기 및 배반포기까지의 발달율에는 38.1%(37/97)와

20.0%(10/40)로써 난관상피세포가 유의적($p < 0.05$)으로 높은 발달율을 보였으나, grade II에서는 공배양시 세포종류에 따른 분할율(74.4vs 66.7%)과 배발달율

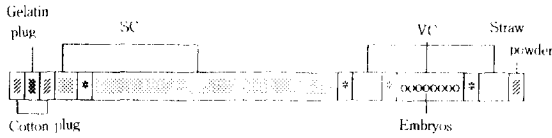


Fig 4. Diagrammatic representation of 0.25ml plastic straw loaded with vitrification solution and embryos for vitrification : (SC) 1.0 M sucrose solution column, (VC) vitrification solution Medium-2 column(*) air bubble column, and (o) embryos in Medium-2 column.

(20.9% vs 11.9%)에서 유의차를 보이지 않았다. 그러나 공배양시 세포종류에 따른 동급간에는 유의차($p < 0.05$)를 보였다.

체외수정란의 동결보존 : 체외수정란의 배발달을 유도하여 배반포기배까지 발달한 배를 EFS solution에 평형시간을 1, 2 및 3분간 실시하여 동결·융해한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 평형시간이 1, 2 및 3분간 실시한 결과 각각 82.6, 73.9 및 18.2%의 생존율을 보여 1, 2분의 평형시간 간에는 유의차 없이 높은 생존율을 보인 반면, 3분동안 평형을 실시한 결과 생존율에 치명적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

고 찰

한우 난포란을 체외성숙시키기 위하여 회수한 난포란을 grade I, II로 구분하여 24 시간동안 체외성숙을 유도하여 과립막세포의 팽창여부도 성숙율을 판단한 결과는 각각 158, 107개의 난포란을 성숙시켜 147(93.0%) 및 85(79.4%)개의 난포란이 과립막세포의 팽창과 세포질의 균질화 등으로 성숙판정을 받았다. 이러한 결과는 Utsumi et al²³이 75~98%의 성숙율을 보였고, Yang과 Lu²⁵는 노화된 난포란에 비해 치밀한 난구세포를 가진 난포란의 발생율이 유의적으로 높았다고 보고하였으며, Wiemer et al²⁴의 grade I에서 91.2%의 체외성숙을 보인 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 이와같이 등급간에 성숙율에서 유의적($p < 0.05$)인 차이를 보이는 것은 난포란의 형태학적인 분류에 의한 등급간의 질적인 차이가 그 후의 모든 성적에 영향을 미치는 것으로 사료되므로 난포란의 분류를 철저히 실시하여야만 체외성숙 및 수정율이 향상될 것으로 사료된다.

체외수정란의 cell-block을 극복하고 후기배로의 배발달을 유도하기 위하여 난관상피세포와 과립막세포를 이용하여 co-culture를 실시한 결과, grade I에서 분할율에는 81.4%와 80.0%로 유의차가 없었으나 상실기 및 배반포기까지의 발달율에는 38.1%와 20.0%로 난관상피세포가 유의적($p < 0.05$)으로 높은 발달율을 보였다.

나, grade II에서는 공배양시 세포종류에 따른 분할율과 배발달율에서 유의차를 보이지 않았다. Rexroad¹⁷는 공배양시 monolayer cell의 역할은 분명하지 않지만 필요한 대사물질, 성장촉진 인자의 제공 및 배양액 내의 독성물질의 제거 등과 같은 역할의 가능성이 있다고 하였고, Gandolfi et al¹⁸은 면양의 난관상피세포의 배양액에서 단백질(배아 영양인자)을 분비한다고 하였다. 그리고 Wiemer et al²⁴이 난관상피세포와 과립막세포와의 공배양시 상실배 및 배반포기배까지의 발달율이 61.9%와 38.1%로 본 실험의 결과보다는 높은 성적이지만 난관상피와의 공배양이 유의적으로 높은 발달율을 보여 비슷한 경향을 보였다. 그러나 Jiang 등(1991)은 난관상피세포와 과립막세포와의 공배양시 31.7%와 37.2%의 배반포기배까지의 발달율을 보고하였고 또한 Nakao와 Nakatsuji¹⁵는 과립막세포와의 공배양시 29.5%의 배발달율을 보고하여 공배양시 세포의 종류에 따른 유의차를 보이지 않았다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 체외수정란의 배발달을 위한 공배양은 과립막세포보다는 난관상피세포를 이용하는 것이 더 효과적이었다.

체외수정란의 동결보존을 위하여 EFS solution에 평형시간을 1, 2 및 3분간 실시한 결과 각각 82.6, 73.9 및 18.2%의 생존율을 보여 1, 2분의 평형시간 간에는 유의차 없이 높은 생존율을 보인 반면 3분동안 평형을 실시한 결과 생존율에 치명적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. Tachikawa et al²²이 체외수정란의 배반포기배로 2분간 평형시켜 90%의 생존율을 보고한 것과 비슷한 결과를 보이고 있다. 이와같이 EFS solution에 ficoll은 거대분자로 안정적인 초자화 형성을 촉진하며⁶, 반면에 sucrose는 수정란의 삼투현상을 수정란의 탈수를 촉진함으로써 침투성 동결보호제의 독성을 줄여주는 경향이 있다고 보고한 바 있다.¹¹ 그리하여 고농도의 EFS solution에 짧은 노출에 의하여 세포내 동결보호제의 독성을 줄여줌으로써 소 체외수정란의 배반포기배의 동결이 성공될 수 있다고 하였다. 이와같이 1, 2분동안의 평형시간은 동결융해후 생존성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되나, 3분간의 평형시간은 동결융해배에 치명적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 그러므로 체외수정란의 동결을 실시할 경우에는 절대적으로 평형시간을 1~2분 이내로 조정하여야 할 것으로 사료된다.

결 론

한우 난포란의 체외성숙, 수정 및 배발달을 유도하기 위하여 채취한 난포란을 grade I, II등급으로 구분하여 성숙시키고, 난관상피 및 과립막세포와 공배양을 실시하여 배발달을 유도하였다. 배반포기배까지 발달한

배를 EFS solution으로 동결·융해한 실험결과는 다음과 같다.

1. 세포질과 난구세포층이 충실한 grade I 이 grade II의 난포란 보다 체외성숙율이 유의적($p < 0.05$)으로 높았다.

2. 체외수정란의 배발달을 위하여 공배양을 실시한 결과 난관상피세포가 과립막세포 보다 유의적($p < 0.04$)으로 높은 배발달율을 보였으며, 난포란의 등급간에도 유의적($p < 0.05$)인 배발달율에 차이를 보였다.

3. 배반포기배까지 발달한 배를 동결·융해하여 생존율을 조사한 결과, 평형시간이 1, 2분간의 평형시간은 유의차 없이 양호한 결과를 보였으나, 3분동안의 평형시간은 생존율에 결정적인 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

이상의 결과로 보아 한우 난포란의 체외수정에 의한 배발달은 난관상피세포와 공배양을 실시하는 것이 후기 배로의 발달을 향상에 도움이 되는 것으로 판단되며 또한 배반포기배의 동결보존을 위하여는 EFS solution으로 1~2분간의 평형시간이 적당한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Bike Z, Wang Guangya Ma, Baohua, Wang, Jianchem. One-step freezing of rabbit embryo. *Theriogenology* 1990 ; 33 : 196(Abstr.).
2. Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1975 ; 12 : 260~274.
3. Douchir O, Takakura H, Imai K. Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification. *Jpn J Anim Reprod* 1990 ; 36(1) : 69~72.
4. Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert* 1989 ; 85 : 715~720.
5. Eyestone WH, Vignieri J, First NL. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology* 1987 ; 27 : 228(Abstr.).
6. Fahy GM, Macfarlane DR, Angell CA, et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984 ; 21 : 407~426.
7. Gandolfi FT, Brevini AL, Richardson L, et al. Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 1989 ; 106 : 303~312.
8. Iwasaki S, Nakahara T. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. *Theriogenology* 1990 ; 33 : 669 ~ 675.
9. Jiang HS, Wang WL, Lu KH, L. Gorden and C. Polge Roles of different cell monolayers in the co-culture of IVF bovine embryos. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 216(Abstr.).
10. Kajihara Y, Goto K, Kosaka S, et al. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. *Jpn J Anim Reprod* 1987 ; 33 : 173~180.
11. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fert* 1990 ; 89 : 91~97.
12. Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, et al. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method *Biol Reprod* 1992 ; 46 : 1042~1046.
13. Kong IK, Lee EB, Kang DJ, et al. Effects of equilibration time, precooling and straw loading method on survival of mouse embryos frozen by vitrification. *Korean J Reprod.* 1991 ; 15 : 49~57.
14. Mazur P. Limits to life at low temperature and at reduced water contents and water activities. *Orig Life* 1980 ; 10 : 137.
15. Nakao H, Nakatsuji N. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 1990 ; 33 : 591~600.
16. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -190°C by vitrification. *Nature* 1985 ; 313 : 573~575.
17. Rexroad CE. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 1989 ; 31 : 105~114.
18. Sandbuissho A, Threlfall WR. The effect of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 1989 ; 31 : 693~699.
19. Scheffen B, Van Der Zwalmen P, Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification *Cryo-Letter* 1986 ; 7 : 260~269.
20. Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, et al. *In vitro*

- fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 1990 ; 33 : 477~485.
21. Suzuki T, Guo, A, Ghen J, et al. Removal examination of cryoprotectants from frozen-thawed bovine embryos with glycerol and 1, 2-propanediol. *Jpn J Anim Reprod* 1990 ; 36 : 105~109.
 22. Tachikawa S Otoi T, Kondo S, et al. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol Reprod Develop* 1993 ; 34 : 266~271.
 23. Utsumi K, Katoh H, Iritani A. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1988 ; 29 : 320 (Abstr.).
 24. Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, et al. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol Reprod Develop* 1991 ; 30 : 330~338.
 25. Yang YB, Lu KH. The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*. *Theriogenology* 1990 ; 33 : 355(Abstr.).
-