

## 돼지의 체외수정시 난관상피세포가 정자의 침입에 미치는 영향

박춘근 · 정희태 · 양부근 · 김정익  
강원대학교 축산대학

### Effect of Oviductal Epithelial Cell Monolayer on Sperm Penetration *In Vitro* in Porcine

C. K. Park, H. T. Cheong, B. K. Yang and C. I. Kim  
*College of Animal Agriculture, Kangwon National University*

#### SUMMARY

Porcine follicular oocytes matured in culture were inseminated with frozen-thawed spermatozoa. When the oocytes were inseminated in the medium with oviductal epithelial cell monolayer, the penetration rates higher in those with (4.1, 31.7, 45.1, 54.5 and 69.4%) than without cells (0, 17.1, 34.8, 45.2 and 58.9%) at 4, 8, 12, 16 and 20 h after insemination. The proportions of polyspermy in penetrated oocytes in medium with or without cells increased with time of examine. In another experiment, the penetration rate was higher without (57.6%) than with (19.6~24.1%) preincubation of spermatozoa for 1~4 h in medium. However, when the oocytes were inseminated with spermatozoa preincubated for 1~2 h, the penetration rates significantly higher ( $P<0.05$ ) in those with (65.6 and 55.9% for 1 and 2 h) than without (24.1 and 20.6% for 1 and 2 h) oviductal epithelial cell monolayer. On the other hand, the proportions of polyspermy decreased with time of spermatozoa preincubation. These results indicate the significant advantages of the spermatozoa preincubation with oviductal epithelial cell monolayer for 1 and 2 h to maintain penetration potential during *in vitro* fertilization in the porcine.

(Key words : *in vitro* penetration, oviductal epithelial cell monolayer, porcine)

#### 서 론

최근 돼지의 체외수정에 관한 연구는 수정율의 안정과 다정자침입(polyspermy)의 억제를 위한 부분에 초점이 맞추어지고 있다. 그러나 신선정액(Kano 등, 1994) 또는 동결정액(Zheng과 Sirard, 1992)을 이용하는 경우 수정기술의 향상에 의해 비교적 높은 수정율을 얻을 수 있음에도 불구하고 polyspermy는 아직까지 해결하지 못하고 있는 중요한 문제로 남아 있다.

체내에서 자성생식기내에 사출된 정자는 수정장

소인 난관팽대부까지 이동해야 하며, 이 기간 동안 정자의 두부는 기능적, 형태적 변화와 함께 난자에 침입할 수 있는 능력을 갖게 된다(Austin, 1951). Nagai 등(1984)은 자성생식기내에서 전배양한 정자를 이용해 체외수정에 성공했으나, 정자를 단순 배양액내에서 전배양했을 때 수정율이 매우 낮다고 보고했다. 한편 Nagai와 Moor(1990)는 체외수정시 정자와 난관세포와의 공동배양은 높은 수정율을 유지하면서 polyspermy를 억제시킬 수 있다고 보고했다. 이 보고에서 그들은 공동배양시 난관세포로부터 분비된 물질이 난자에 작용해 polyspermy를 감소시키는 것으로 추측하고 있으나 아직 자

제한 원인은 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 또한 Kano 등(1994)은 난관상피세포에서 분비되는 soluble factor(s)가 높은 체외수정율을 유지하면서 난자내에 침입하는 정자의 수를 감소시킨다고 보고했다. 그러나 난관상피세포와 전배양한 돼지정자가 수정율과 polyspermy에 어떤 영향을 미치는지 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 동결정액을 이용한 체외수정시 난관상피세포의 존재가 정자의 침입시기에 미치는 영향과, 정자와 난관상피세포와의 전배양이 체외수정에 미치는 영향을 검토했다.

## 재료 및 방법

### 1. 난자의 준비

도축장으로 부터 회수한 돼지의 난소는 30~37°C의 생리식염수(NaCl, 0.9% w/v; penicillin 100, 000IU/L; streptomycin 100mg/L, amphotericin B 250 $\mu$ g/L)내에 넣어 실험실까지 운반하였다. 난자는 직경 1~5mm의 난포로부터 18-G의 바늘을 장착한 주사기로 흡인 채취하였다. 난포로부터 채취한 난자는 HEPES가 첨가된 Tyrode액 내에서 3회 세척후 성숙배양액내에서 1회 세척하여 난구세포로 충분히 둘러쌓이고 세포질이 잘 발달된 난자만을 선택하여 체외성숙용 배지에 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 39°C에서 40~44시간 배양하였다. 체외에서 난자의 성숙을 위한 배양액은 3.05mM glucose, 0.32mM Ca-lactate, 2.5mM HEPES, 10% fetal calf serum (FCS), 0.2mM Na-pyruvate, 50  $\mu$ g/ml gentamycin과 10%(v/v) 돼지난포액을 첨가한 TCM-199이 이용되었다. 난자의 성숙배양중 처음 20~22시간은 1  $\mu$ g/ml FSH, 5  $\mu$ g/ml LH 및 1  $\mu$ g/ml estradiol 17 $\beta$ 를 첨가했으나, 후반 20~22시간은 이들 hormone을 첨가하지 않고 배양하였다.

### 2. 난관 상피세포의 배양

난관 상피세포는 Eyeston과 First(1989)의 방법에 따라 준비하였다. 간략하게 그 방법을 기술하면, 도축장에서 회수한 돼지의 난관을 얼음속에 넣어 연구실로 운반하였으며, 생리식염수내에서 난소와 결체조직을 제거하였다. 난관은 생리식염수로 2회

세척후 양끝을 0.5cm 정도 제거하였으며, 마지막 세척은 calcium과 magnesium을 함유하지 않은 Hank's액내에서 실시하였다. 난관상피세포는 slide glass를 이용하여 추출해 냈으며, 회수된 세포들은 15ml의 Hank's액으로 2회 세척후 27-G주사기로 반복흡인에 의해 잘게 부순 후 미리 배양기내의 4-well dish에서 평형시킨 1ml의 TCM-199액에 세포함 유액 50  $\mu$ l를 분주해 배양하였다. 배양액은 2일마다 교환해 주었으며, 9일간 배양후 dish 내의 바닥에 단층세포가 잘 형성된 것을 선택하여 정자의 전배양과 체외수정에 이용하였다.

### 3. 정자의 처리 및 수정

동결정액 straw는 60°C water bath내에서 7~8초간 용해한 후(Almid와 Johnson, 1988), 정자는 2ml의 BTS(Beltsville Thawing Solution)로 희석하여 10분간 37°C에서 평형시켰다. 그후 2ml의 정액을 65%와 70%의 percoll을 이용하여 20°C에서 2,000  $\times$  g으로 15분간 원심분리시켜 회수한 후 10% FCS와 0.2mM Na-pyruvate가 첨가된 preincubation(TCM-199)액으로 250  $\times$  g으로 10분간 2회 원심분리로 세척하였다. 체외수정을 위한 배지는 3mM glucose, 3mM Ca-lactate, 0.2mM Na-pyruvate 및 10% FCS가 첨가된 TCM-199을 이용하였으며, 수정시 난관상피세포가 존재하거나 또는 존재하지않는 dish내에서 정자의 농도를 1  $\times$  10<sup>6</sup> cell/ml로 조정하여 수정한 후 4, 8, 12, 16 및 20시간에서 정자의 침입시기를 검토하였다. 한편, 정자의 전배양을 위하여 미리 배양하여 준비해 둔 난관상피세포액내에 위와 같은 농도의 정자를 첨가하여 0, 1, 2, 3 및 4시간 전배양후 난자를 투입하여 체외수정을 실시한 후 20~22시간에서 난자를 고정·염색하여 정자의 침입상황을 검토하였다.

## 결 과

Table 1은 체외수정시 난관 상피세포의 유무가 정자의 침입시기에 미치는 영향을 검토한 결과를 나타냈다. 난관상피세포의 존재하에서 수정 4, 8, 12, 16 및 20시간 후 정자의 침입율은 4.1, 31.7, 45.1, 54.5 및 69.4%였으며, 상피세포가 존재하지 않는

Table 1. Time of penetration *in vitro* of porcine oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the medium with or without oviductal epithelial cell monolayer

Hour after insemination	Presence of oviductal cells	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated(%)	No. of polyspermic oocytes(%) §
4	+	73	3( 4.1)	0( 0.0)
	-	65	0( 0.0)	0( 0.0)
8	+	63	20(31.7)	2(10.0)
	-	70	12(17.1)	2(16.7)
12	+	71	32(45.1)	7(21.9)
	-	66	23(34.8)	6(26.1)
16	+	77	42(54.5)	10(23.8)
	-	62	28(45.2)	10(35.7)
20	+	72	50(69.4)	18(36.0)
	-	73	43(58.9)	21(48.8)

§ Percentage of total number of oocytes penetrated.

경우 수정후 8시간에서 17.1%의 정자침입율을 나타냈으며 수정시간이 길어짐에 따라 수정율이 증가하였다. 한편, 다정자침입은 수정후 4시간에서는 발견되지 않았으나, 난관상피세포의 존재시 수정후 8시간에서 10.0%로 이들 세포가 존재하지 않을 경우의 16.7%보다 낮았으나 유의적인 차이는 없었으며, 수정후 시간이 경과함에 따라 난관상피세포의 유무에 관계없이 증가되는 현상을 나타냈다.

Table 2에서는 정자의 전배양이 난자내 침입에 미치는 결과를 나타냈다. 즉, 정자를 전배양하지 않고 난관상피세포가 존재하는 배지내에서 수정하는 경우, 정자침입율은 68.6%로 이들 세포가 존재하지 않는 경우의 57.6%보다 높았으나 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 그러나 정자를 난관상피세포와 1 또는 2시간 전배양시 수정율이 65.6 및 55.9%로 난관상피세포가 존재하지 않을 경우의 24.1 및 20.6%

Table 2. Effect of spermatozoa preincubated with or without oviductal epithelial cell monolayer on *in vitro* fertilization of porcine oocytes

Periods spermatozoa preincubation(h)	Presence of oviductal cells	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated(%)	No. of polyspermic oocytes(%) §
0	+	51	35(68.6)	15(42.9)
	-	59	34(57.6)	18(52.9)
1	+	61	40(65.6)*	18(45.0)
	-	58	14(24.1)	4(28.6)
2	+	59	33(55.9)*	12(36.4)
	-	63	13(20.6)	2(15.4)
3	+	59	20(33.9)	6(30.0)
	-	56	11(19.6)	1( 9.1)
4	+	62	18(29.0)	5(27.8)
	-	71	14(19.7)	0( 0.0)

§ Percentage of total number of oocytes penetrated.

\* P<0.05, difference between with and without oviductal epithelial cell monolayer.

보다 유의적으로 높은 수정율을 나타냈다( $P < 0.05$ ). 한편 다정자침입율은 정자와 난관상피세포를 0, 1, 2, 3 및 4시간 전배양시 42.9, 45.0, 36.4, 30.0 및 27.8%로 정자의 전배양시간이 길어질수록 감소하는 경향을 나타냈으며, 난관상피세포가 존재하지 않는 경우에도 수정율과 함께 감소되었다.

## 고 찰

난관은 정자와 난자의 수정 및 초기배의 발육이 진행되는 장소이며, 특히 수정전 정자의 수정능력 획득이 유기되는 장소라는 것이 여러 연구자들에 의해 이미 밝혀졌다. 돼지에 있어서 동결정액을 이용하여 체외수정을 실시하는 경우 신선정액에 비해 수정율과 선핵형성율이 낮다는 것이 문제점으로 지적되고 있으며, 동결정액 또는 신선정액 이용시 높은 polyspermy의 문제는 앞으로 해결해야 할 주요한 과제로 남아 있다. 따라서 체외수정시 난관상피세포를 이용한 공동배양법은 체내와 유사한 환경을 제공해 줌으로써 이론적인 면에서는 가장 합리적인 방법으로 이용될 수 있다. 본 연구에서는 수정후 정자의 침입시기와 정자의 전배양시 난관 상피세포가 정자의 난자내 침입에 미치는 영향이 검토되었는데, 난관 상피세포의 존재하에서 수정 4시간후 이미 정자의 침입이 개시되어 난순배지내에서 정자의 침입이 발견되지 않은데 비해 정자의 침입이 빠르게 일어났으며(Table 1), 정자의 전배양을 실시하지 않은 경우 수정후 20시간에서 난관 상피세포의 유무에 관계없이 높은 수정율을 나타냈다. 이와 같은 결과는 돼지의 체외수정시 난관상피세포가 정자의 수정능력에 영향을 주며, 정자의 난자내 침입을 위한 활성화에 관여하고 있는 것으로 추측된다. Heyner 등(1989)과 Fukui 등(1991)은 난관 상피세포로부터 분비되는 호르몬과 여러가지 성장인자에 의해 세포의 증식 및 활성화가 이루어진다고 보고했으며, Pollard 등(1991)은 정자의 수정능력획득과 활력은 난관 세포와의 물리적 접촉에 의하여 유지된다고 제시했다. 본 연구에서 정자를 1~2시간 난관 상피세포와 전배양했을 때 정자침입율이 55.9~65.6%로 세포가 존재하지 않는 경우의 20.6~24.1%에 비해 높게 나타났으며, 정자의 전배양시간이 3~4

시간으로 연장되어도 같은 경향을 나타냈다. 이와 같은 결과에서 정자와 난관 상피세포와의 물리적 접촉이 정자의 수정능력뿐만 아니라 정자의 생존능력을 연장시키는데 중요한 역할을 하고 있으며(Smith와 Yanagimachi, 1990; Raychoudhury와 Suarez, 1991), 실제로 본 연구에서 수정후 20시간이 경과되어도 난관 상피세포와 함께 수정된 정자 중 현미경하에서 생존정자가 다수 존재하는 것이 발견되어 이와 같은 이론을 뒷받침하고 있다.

돼지의 체외수정시 야기되는 높은 다정자침입율은 아직도 해결되지 않은 주요한 문제점으로 남아 있는데, 그 이유 중의 하나가 수정배지내의 높은 정자농도에 의해 기인되는 것으로 알려졌으며(Nagai 등, 1984), 이에 반해 낮은 정자농도는 체외수정율을 저하시키는 것으로 보고되었다(Miyano 등, 1990). 따라서 수정시 체내와 비슷한 환경을 제공해주는 것이 무엇보다 필요한데, 그 방법중의 하나로 Hunter(1991)는 수정전 정자의 저장을 위한 난관의 중요성을 주장했다. 특히 돼지의 경우, 난관은 수정장소까지 도달하는 정자의 수를 제한하여 다정자침입을 억제하는 것으로 알려졌으며, 본 연구에서도 수정시간 및 정자의 전배양기간에 관계없이 난관 상피세포의 존재가 이들 세포가 존재하지 않는 경우에 비해 다정자침입율이 낮은 것으로 나타났다. 한편, 정자를 전배양하지 않은 경우 난관 상피세포의 유무에 관계없이 정자와 난자의 수정시간이 길어질수록 수정율과 다정자침입율이 증가한 반면, 정자의 전배양기간이 길어지면 수정율과 함께 다정자침입율이 감소되었다. 이와 같은 결과는 정자의 전배양기간이 길어짐으로써 생존능력과 활력이 약한 정자가 사멸하여 난자와 접촉할 수 있는 정자의 수가 급격히 감소하기 때문인 것으로 추측되며, 실제로 현미경하에서 전배양 3~4시간 후 생존 정자의 수가 급격히 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

본 연구의 결과에서, 체외수정시간이 진행함에 따라 난관 상피세포의 유무에 관계없이 수정율과 다정자침입율이 증가했으며, 정자를 난관 상피세포와 전배양하는 경우 1~2시간 동안 수정능력과 함께 생존성과 활력이 유지되는 것으로 나타났다.

## 적 요

체외에서 성숙시킨 돼지의 난포난자를 동결정액에 의해 수정할 경우 난관 상피세포가 정자의 침입에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과, 수정후 4, 8, 12, 16 및 20시간에서 정자 침입율은 난관 상피세포 존재시 4.1, 31.7, 45.1, 54.5 및 69.4%로 이들 세포가 존재하지 않는 경우의 0, 17.1, 34.8, 45.2 및 58.9%보다 더 높았으며, 다정자 침입율도 수정시간이 길어짐에 따라 난관 상피세포의 존재 유무에 관계없이 증가하였다. 한편, 단순배양액내에서 정자의 전배양없이 수정했을 때 57.6%의 정자침입율을 나타냈으나, 1~4시간 전배양하면 19.6~24.1%의 낮은 결과를 보였다. 그러나 정자를 난관 상피세포와 1~2시간 전배양했을 때의 수정율이 65.6과 55.9%로 이들 세포가 존재하지 않는 경우의 24.1과 20.6%보다 유의적으로 높은 수정율을 나타냈다 ( $P < 0.05$ ). 이때 다정자 침입율은 정자의 전배양기간이 길어질수록 감소하였다. 본 연구의 결과에서 돼지의 체외수정시 난관 상피세포는 정자의 전배양시 1~2시간 동안 정자의 수정능력을 유지시키는데 효과적인 것으로 나타났다.

## 참고문헌

- Almlid T and Johnson LA. 1988. Effects of glycerol concentration equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. J. Anim. Sci., 66:2899-2905.
- Austin CR. 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sec. Res., 581-596.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 92:125-131.
- Heyner S, Rao LV, Jarett L and Smith RM. 1989. Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis : pattern of uptake and functional correlations. Develop. Biol., 134: 48-58.
- Hunter RHF. 1991. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. Mol. Reprod. Dev., 29:385-391.
- Kano K, Miyano T and Kato S. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. Theriogenology, 42: 1061-1068.
- Miyano T, Yoshikawa K, Kato S, Harayama H, Nanjo I and Kanda S. 1990. *In vitro* fertilization of *in vitro* and *in vivo* matured oocytes from prepubertal Meishan gilts. Jpn. J. Zotech. Sci., 61:1011-1016.
- Nagai T, Niwa K and Iritani A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 70:271-275.
- Nagai T and Moor RM. 1990. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pigs eggs fertilized *in vitro*. Mol. Reprod., 26:377-382.
- Pollard JW, Planet C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ and Suarez SS. 1991. Fertilizing capacity of bovine sperm maybe maintained by binding to oviductal epithelial cells. Bio. Reprod., 44:102-107.
- Rachoudhury SS and Suarez SS. 1991. Porcine sperm binding to oviductal explants in culture. Theriogenology, 36:1059-1069.
- Smith TT and Yanagimachi R. 1990. The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct : the importance of

sperm-epithelium contact for sperm survival. Biol. Reprod., 42:450-457.

Zheng YS and Sirard MA. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular

cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. Theriogenology, 37:779-790.