

## 공배양 및 산소농도가 한우 난포란의 체외발생에 미치는 영향

이재관 · 윤준진 · 황성수\* · 윤종택\*\* · 김창근\* · 정영채\*

중앙대학교 생물공학과

### The Effect of Co-culture and Oxygen Concentration on In Vitro Fertilization of Follicular Oocytes in Korean Native Cattle

Lee, J. K., J. Yoon, S. S. Hwang\*, J. T. Yoon\*\*, C. K. Kim\* and Y. C. Chung\*

Department of Biotechnology, Chung Ang University

#### SUMMARY

The effect of oxygen tension on embryonic development in co-culture was evaluated from the standpoint of the reduction of dissolved oxygen concentration by the oxygen consumption of feeder cells. Three co-culture systems using bovine oviductal epithelial cells (BOEC), African green monkey kidney cells (Vero cells) or buffalo rat liver cells (BRLC) have been compared in terms of development of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro*. Among the co-cultured embryos, Vero cells supported the highest developmental rate (29%) and the other two showed the similar rates. When the co-cultures were incubated in three different oxygen tension such as 5, 10, 20% oxygen atmosphere, embryos co-cultured with Vero cells at 10%-O<sub>2</sub> resulted in the highest percentage of development. From the measurement of oxygen consumption of feeder cells, BRLC consumed  $1.37 \times 10^{-10}$  mg-O<sub>2</sub>/min/cell which was higher than  $0.94 \times 10^{-10}$  and  $0.26 \times 10^{-10}$  mg-O<sub>2</sub>/min/cell for Vero cells and BOEC, respectively. Based on the oxygen consumption data, the phenomena of optimum oxygen tension required in embryo development *in vitro* has been analyzed, and we suggested that gas phase oxygen concentration, oxygen consumption rate of feeder cells and the number of feeder cells should be considered for the design of optimal co-culture system for effective fertilization of embryos *in vitro*.

(Key words: *In vitro* fertilization, Bovine, Embryo, Co-culture, Oxygen)

#### I. 서론

수정란의 체외배양은 형질전환 가축을 얻거나, 불임 치료를 위한 핵심 기술로 연구되고 있다. 그러나, 포유 동물의 수정란은 체내 난관에서 발생할 때와는 다르

게, 체외배양시 발생퇴화 혹은 cell-block 현상에 의해 발생률의 저하를 가져온다 (Wright와 Bondioli, 1981). 이 같은 현상을 극복하기 위해서 체외배양 조건에 대해 많은 연구가 이루어졌고, 난관과 유사한 배양 조건을 제공하기 위해 난관에 존재하는 체세포와의 공배양이 시도되었다. 수정란의 체외배양에 공배양으

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원 (과제번호: 951-0609-018-1)으로 수행되었음.

\* 중앙대학교 산업대학 축산학과 (Department of Animal Science, Chung Ang University)

\*\* 국립안성산업대학교 동물생명자원학과 (Department of Animal Life and Resources, National Ansung University)

로 이용된 체세포로는 영양막세포 (Camous 등, 1984), 난관상피세포(Gordon과 Lu, 1990; Behboodi 등, 1992), 과립막세포 (Mochizuki, 1991), 자궁섬유아세포 (Voekle 등, 1985) 및 난구세포 (Goto 등, 1988) 등이 있다. 또한, 이러한 세포들의 conditioned media를 이용한 배양도 시도되었다 (Eyestone과 First, 1989). Eyestone 등 (1987)은 수정란을 배양액만으로 배양하였을 경우 8~16cell 발육 억제 현상을 보이는 것을 난관상피세포와의 공배양에 의해 배반포 단계까지 발생을 성공시켰으며, 유사한 결과가 양수정란의 체외발생을 촉진하는 것으로 나타났다 (Gandolfi와 Moor, 1987). 그러나, 공배양에 이용되는 체세포는 일차세포 (primary cell)이기 때문에 균일하지 않으며, 수정란 배양에 앞서 세포를 채취하여야 하는 번거로운 과정이 있다. 그러나, 확립된 세포주를 이용할 수 있다면 이러한 문제점은 극복될 수 있을 것이다. 최근 rat liver cell을 feeder cell로 이용한 보고도 있으며, buffalo rat liver (BRL) cells의 경우 포유류의 수정란 공배양에 많이 쓰인다 (Rehman 등, 1994). Vero cell은 소 난자의 체외 성숙에 현저한 효과를 나타내었으며 (Grocholova 등, 1995), 사람 수정란의 체외 발생에도 효과를 주는 것으로 보고되어 있다 (Menezes 등, 1990; Menezes 등, 1992). 이러한 공배양 세포들의 작용은 명확하게 밝혀져 있지 않지만, 공배양 세포로부터 수정란의 발생을 도와 주는 cytokine이나 성장인자의 분비에 의한 것으로 추측되고 있다.

Bavister (1988)는 체세포와 공배양된 수정란의 발생률이 증가되는 이유는 공배양된 체세포에 의해 산소 분압이 낮아지기 때문으로 보고하였다. 배양액 중의 용존산소는 고농도에서 다량의 산소라디칼을 형성하므로 생쥐의 초기 수정란의 발생에서 저산소분압은 매우 중요한 것으로 보고되어 있다 (Umaoka 등, 1992). 유사한 보고가 토끼 수정란의 체외배양에서도 보고되어 있다 (Lindenau와 Fischer, 1994). 그러나, 산소분압의 감소가 면양의 체외수정란 발생에 있어서는 효과를 나타내지 못한다고 보고한 바 있다 (Betterbed와 Wright, 1985).

본 연구에서는 공배양에 사용되는 다양한 체세포와 세포주가 체외수정란의 발생에 미치는 영향을 비교하고, 공배양에 사용되는 세포의 산소소모량을 측정하여 공배양 세포에 따른 발생률의 차이와 용존산소 농도

사이의 관계를 조사하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시 동물과 난포란

공시된 난포란은 축협 가락동 도축장에서 도살되는 한우에서 정상적인 생식기를 가진 개체에서 채취하였으며 공시정액은 축협한우개량사업소에서 제조된 한우 동결정액을 사용하였다.

### 2. 난포란의 채란

도살 직후 분리 채취된 난소를 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 후 항생제와 생리식염수가 들어있는 보온병(35℃)에 담아 38℃ 항온실로 운반하였으며 도살 후 채란까지의 소요시간은 2~3시간이었다. 채란은 난소를 생리식염수로 3회 세척하고 10 ml 주사기와 20 gauge 주사침을 직경 2~6mm의 정상 난포로부터 난소 실질을 천자하여 난포액과 동시에 연속흡입 채취하였다. 채취된 난포액은 10 ml의 시험관에 담아 일정 시간 정치한 다음 하단액을 스포이드로 흡입하여 배양액 (10% fetal calf serum을 첨가한 TCM199)이 들어있는 petri dish에 혼합하여 실험현미경하에서 난구 세포층이 치밀하고 난자의 세포질이 양호한 난포란만을 선별 이용하였다.

### 3. 난포란의 체외성숙배양

체외성숙용 기본배양액은 TCM199 (Gibco, USA)를 사용하였으며 여기에 fetal calf serum (FCS, Gibco)과 estrus cow serum (ECS:발정당일 혈청)을 56℃에서 30분간 비동화시켜 각각 10%를 첨가하였고 gentamycin (국제약품) 50 mg/ml을 첨가하였다. 난포란의 체외성숙 배양은 CO<sub>2</sub>배양기에서 4~5시간 평형후 4-well dish (Nunc, USA)에 0.5 ml씩 분주하여 멸균된 파라핀으로 피복하고 각 well당 10~15개의 난포란을 임의 배치하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도인 배양기에서 24~25시간 체외배양을 실시하였다.

난포란을 체외 성숙시키기 위한 과립막세포와의 공배양을 위해, 난포크기 10~15mm인 대난포에서 과립막세포를 채취하여 200 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 침전된 과립막세포를 TCM199 배양

액으로 2~3회 세척한 다음 세포 수를  $1 \times 10^6$  /ml로 조정하여 사용하였다.

#### 4. 정지처리와 수정능획득

수정능획득은 BO배양액 (Brackett와 Oliphant, 1975)을 기본배양액으로 하여 caffeine (Ohgoda 등, 1988)을 첨가하였으며 이들 배양액은 세척용과 배양용으로 구분하여 제조하였다. Caffeine처리는 기본 BO배양액에 bovine serum albumin (Sigma, USA)를 첨가하지 않고 caffeine (10 mM)을 첨가한 것을 세척용으로 하였고, BSA 5 mg/ml과 caffeine (5 mM)을 첨가한 것을 배양용으로 사용하였다. 서로 다른 두 개체의 동결정액을 38℃ 항온 수조에서 20초간 용해하여 시험관에 넣고 세척용 배양액 4 ml로 희석하여 5분간 배양한 다음 200g에서 5분간씩 2회 원심분리하여 세척한 다음 배양액 4 ml로 재부유시키고 동일한 원심분리방법으로 상층액을 조정하고 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도인 배양기에서 1시간동안 전배양을 실시하여 수정능력을 유지하였다.

#### 5. 체외수정

체의 배양된 정자를 petri-dish에 0.1 ml씩 소적을 만든 후 멸균 paraffin oil로 피복하고 실체현미경하에서 난구 세포가 평화된 난포란을 10~15개씩 넣고 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도의 CO<sub>2</sub>배양기에서 18시간동안 체외수정을 실시하였다.

#### 6. 수정란의 체외배양

##### 1) 난관 상피세포와 공배양

난관 상피세포의 준비는 Gandolfi와 Moor (1987)의 방법에 따라 실시하였다. 도축장에서 도살되는 정상 생식기를 가진 소에서 채취된 소의 난관을 얼음이 채워진 보온병에 담아 실험실로 운반하였다. 난관을 TCM199 2 ml로 관류하여 시험관에서 10분간 정지한 다음 상층액을 제거하였으며 이 과정을 2~3회 반복한 후 Antibiotic-Antimycotic (Gibco, USA)을 0.02 ml/ml로 첨가하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간동안 배양하였으며 매 48시간마다 신선배양액으로 반씩 첨가하여 교환하였다. 체외수정 후 18시간마다 신선배양액 (TCM199,

10% FCS)으로 1/2씩 첨가 교환하였다. 체외수정 후 18시간된 난포란을 난관상피세포층과 함께 144시간 배양하여 배발달 상태를 관찰하였다.

##### 2) Vero cells과 buffalo rat liver cells (BRL)과 공배양

액체질소에 보관되어 있던 Vero cell (ATCC CC-L-81)과 BRL cell (ATCC CRL-1442)을 용해하여 TCM199로 2회 세척한 후, 10% FBS가 첨가된 TCM199 배양액 5 ml에 분산·혼합하고 세포수와 생존도를 측정하였다. 생존도는 trypan blue dye exclusion 법을 이용하여 측정하였다. T-25 flask에  $2 \times 10^5$ 의 세포를 접종하고 TCM199 (10% FCS) 배양액을 5 ml 주입하여 1주일간 배양하였다. 약 80% 정도 증식한 세포를 0.25% trypsin 용액으로 5분간 처리하여 분리하고 수정란 첨가 1일 전에 배양하였다. 수정란의 배양은 microdrop 배양 (40  $\mu$ l/drop) 혹은 4-well dish (0.5 ml/well)를 사용하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 수행하였다. 세포의 접종농도는  $10^5$  cells/microdrop 혹은  $2.3 \times 10^5$  cells/well 농도로 조정하였다. 체외수정 후 18시간마다 신선배양액 (TCM199, 10% FCS)으로 1/2씩 첨가 교환하였다. 체외수정 후 18시간된 난포란을 난관 상피세포층과 함께 144시간 배양하여 배발달 상태를 관찰하였다.

##### 3) 산소분압에 따른 수정란의 체외배양

여러 산소분압에서 체외수정란발생을 비교하기 위해 4-well dish를 사용하여 공배양하거나, 단독배양하였다. 산소분압은 gas-tight chamber를 사용하여 5%, 10% 및 20%로 유지하였다. 각각의 가스는 5% 이산화탄소를 포함하였고 나머지는 질소로 되어 있는 premixed gas이었고, 매일 1회 가스를 충전한 후 밀폐한 후 39℃ incubator에서 배양하였다. 가스밀폐용기는 젖은 솜을 이용하여 습도를 유지하였다. 공배양을 위해 1일 전에 BOEC, BRL cell, Vero cell을 4-well dish에 먼저 배양하고 체외 수정란을 배양하였다. 대조구는 TCM199 (10% FCS)에서 단독 배양한 수정란이었다. 둘 이상의 세포와 공배양 (dual co-culture)하였을 때 체외수정란의 발생률을 조사하기 위해 4-well에서 체외수정란을 배양하였다. 공배양에 사

용된 세포의 전체 농도는  $2.3 \times 10^5$  /well로 일정하게 유지하였다. 또한, 두 개의 세포주를 공배양할 경우는 각각 반 ( $1.15 \times 10^5$  /well)의 농도로 1일전에 접종하였다.

### 7. 산소소모량 (OCR)의 측정

FCS로 1일간 코팅한 slide glass의 표면에  $10^6$ 의 공배양세포를 배양하여 배양기에 위치시키고 perfusion 배양을 수행하였다 (Fig. 1). 배양기의 출구쪽에 flow cell을 연결하고 산소전극을 설치하여 용존산소농도를 측정하여 아래의 식으로부터 산소소모량을 측정하였다.

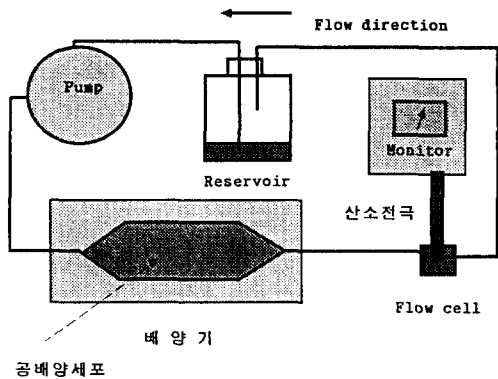


Fig. 1. Schematic diagram of perfusion system used for the measurement of oxygen consumption rate

$$OCR = (C_{in} - C_{out}) Q / N$$

$C_{in}$  : 배양기 입구에서의 산소농도 (배양액 reservoir에서 포화됨).

$C_{out}$  : 배양기 출구의 산소농도 (산소전극에서 측정되는 용존산소).

$Q$  : 연동펌프에 의해 배양기로 전달되는 유량 (ml/min).

$N$  : 배양기 내에서의 세포의 숫자.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 공배양 세포가 체외 수정란 발생에 미치는 영향

체외수정된 난포란을 TCM199 배양액에서 여러 세포들과 공배양하였을 때 난포란의 발생률이 Table 1에 나타나 있다. 소 초기배를 단독배양, 난관상피세포, Vero cell 및 BRL cell과 39℃, 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 7일간 배양한 후 초기 (2~4세포기), 중기 (8~16세포기), 후기 (상실배 및 배반포)의 세포 단계별로 나누어 조사하였다. 공배양하여 대조구로 사용한 TCM199 (10% FCS) 배양액에서 단독배양하였을 때 난포란의 발생률은 63.9%로 공배양에 비하여 다소 낮았다. 공배양 세포에 따른 발생률은 BOEC, Vero cell, BRL cell에서 각각 78.9, 66.3, 70.0%로서 비슷하였으나, 후기세포로의 발생률을 비교하면 Vero cell과 공배양하였을 때 최대 발생률 (43.4%)

Table 1. Development of bovine oocytes following IVM/ IVF and cocultures with various feeder cells in 7 days

Coculture	No. of oocytes	Stages of embryo development			
		<4 (%) <sup>a</sup>	8~16 (%) <sup>b</sup>	Morula (%) <sup>b</sup>	Blastocyst (%) <sup>b</sup>
Control	72	46 (63.9)	32 (70)	6 (13)	2 (4)
BOEC	76	60 (79)	44 (73)	17 (28)	9 (15)
Vero	80	53 (66)	44 (83)	23 (43)	5 (9)
BRL	80	56 (70)	45 (80)	19 (40)	6 (11)

<sup>a</sup>: Percentage relative to initial number of oocytes.

<sup>b</sup>: Percentage relative to initial number of 4-cell.

을 보였다. 이는 primary cell인 BOEC의 경우인 28.3%에 비하여 높은 수준이었다. 또한, BRL cell과 BOEC는 유사한 수준의 발생률을 나타냈다. 이는 Rehman 등 (1994)이 보고한 것과 유사한 성적이었다. Vero cell은 normal adult African green monkey의 신장으로부터 얻어진 섬유아세포로서 인간의 체외수정란 배양시 사용되어 체외 발생률을 증가시킨다. 이 세포는 생식도관과 신장이 같은 발생기원을 갖고 있으므로 사용되었다. 또한, 인간 백신의 생산에도 이용되어 왔기 때문에 안전성에서도 우수한 것으로 입증되어 있다 (Menezo 등, 1990). Grocholova 등 (1995)은 Vero cell이 소 체외수정란의 성숙 및 발생에 유효한 효과를 주는 것으로 보고하고 있지만, Vero cell이 체외수정란의 발생률을 증가시키는 이유에 대해서는 아직까지 모호하다. BRL cell에서부터 배출되는 multiplication-stimulating factor (MSA)가 Dulak과 Temin (1973)에 의해서 밝혀졌지만, 체외 수정란의 공배양시 BOEC에 유사한 발생률이라는 보고가 많이 있다 (Hawk와 Wall, 1994; Rehman 등, 1994; Inzen 등, 1995). 그러나, BRL cell은 세포주기 때문에 일차세포인 BOEC나 granulosa cell 등에 비하여 실험상에서 나타날 수 있는 오차를 상당히 줄일 수 있을 것으로 생각된다 (Inzen 등, 1995). Fig. 2에서 보듯이 초기배의 발생률은 dual co-culture의 경우가 약간 높았으나 후기세포로의 발생은 비슷한 것으로 보였다. 이로부터 dual co-culture은 체외수정란 발생에서 single co-culture과 유사한 것으로 나타났다.

## 2. 산소 분압이 공배양한 수정란의 발생에 미치는 영향

공배양한 체외수정란의 발생률을 산소농도에 따라 조사하였다. 배양기내 산소분압에 따라 다양한 공배양 세포와 10 일간 공배양한 소수정란의 후기세포 (상실배와 배란포)로의 발생률이 Fig. 3에 나타나 있다. 대조구의 수정란 발생률은 5% 산소분압에서 제일 높았고, 분압이 증가하면서 감소하는 경향을 보였다. 이 같은 결과는 Quinn과 Harlow (1978)의 마우스 수정란에 대한 발생률이 5% 산소분압에서 최적인 결과와 일치한다. 또한, Lindenau와 Fisher (1994)는 토끼의 체외수정란 발생이 5% 이하의 산소분압에서 잘 일어

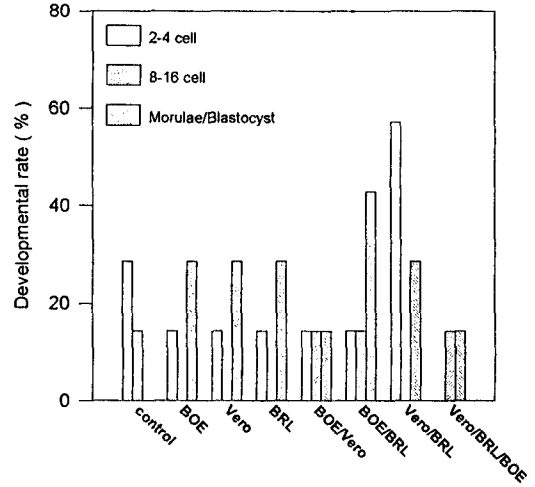


Fig. 2. Effect of dual co-culture on *in vitro* development of bovine embryos. Culture were performed in 4-well dish for 9 days

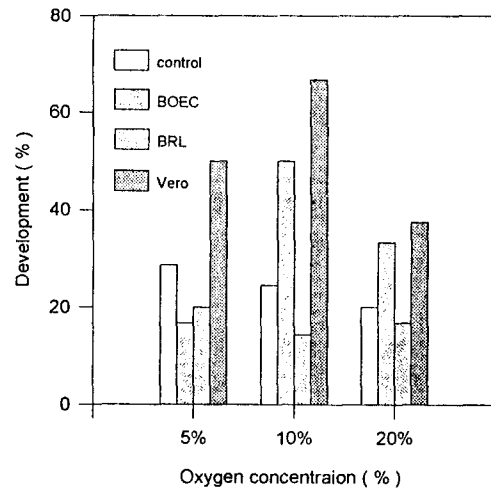


Fig. 3. Proportion of bovine embryo developed to morula and blastocyst. Cultures were maintained in various oxygen concentrations and cocultured with various somatic cells for 10 days

난다고 보고하였고, 저산소분압은 체외 수정란 발생시 발견되는 cell-block 현상을 극복하는데 유효한 것이

보고되어 있다 (Thompson 등, 1990). 또한, 고산소 분압 (20% 산소분압)에서는 산소라디칼의 발생으로 인해 마우스 수정란의 발생이 저해되었고, 이는 superoxide dismutase에 의해 상쇄될 수 있는 것이 보고되었다 (Umaoka 등, 1992). 이에 비하여 BRL cell과 공배양한 수정란은 후기세포로의 발생률이 산소분압에 상관 없이 유사한 경향을 보였다. 이는 Voelkel과 Hu (1992)의 microdrop culture에서 BRL cell과 공배양한 수정란의 발생은 20% 산소분압이 5% 산소분압보다 우수하다는 보고와는 상반된 결과였다. BRL cell과는 대조적으로 BOEC나 Vero cell의 공배양에서는 10% 산소분압에서 최적 발생률을 보여주었다. 이는 Voelkel과 Hu (1992)의 BOEC와 공배양한 수정란이 저산소분압에서 후기세포로의 발생률이 높다는 보고와 일치한다. Vero cell이 수정란의 발생에 작용하는 역할은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나, Menezo 등 (1990)은 체외에서 인간 수정란의 조기 발생을 Vero cell과의 공배양이 향상시킨다고 하였으며, 수정란과 공배양에서 Vero cell은 바이러스의 오염을 억제하므로 수정란의 발생률을 향상시킨다고 보고하였다. 체내 난관의 환경은 산소분압이 5% 정도를 유지하므로, 배양에서도 유사한 산소분압이 요구될 것으로 예상되었다 (Mass 등, 1976).

### 3. 공배양세포의 산소소모량과 체외수정란의 발생률

본 실험에서 이용된 공배양 세포의 산소소모량을 측정된 결과가 Table 2에 나타나 있다. BRL cell은 BOEC나 Vero cell에 비하여 상대적으로 높은 양의 산소를 소모한다. BRL cell은 BOEC에 비하여 5배 이상의 산소를 소모하고 Vero cell에 비하여 46% 정도 높게 측정되었다. BRL cell로 공배양한 수정란은

후기세포로의 낮은 발생률을 보였고 산소농도에 따른 영향이 적었는데, 그 이유는 BRL cell의 산소소모량이 다른 세포들에 비하여 높기 때문에 수정란 주위의 국소산소농도 (local oxygen concentration)가 낮기 때문으로 추측된다. BOEC와 Vero cell의 산소소모량은 BRL cell에 비하여 낮기 때문에 공배양 시에 수정란 주위의 국소산소농도가 상대적으로 높을 것이지만, 고산소농도는 산소라디칼의 발생을 촉진시키므로 발생에 저해가 된다 (Umaoka 등, 1992). 이러한 이유로 BOEC나 Vero cell과 공배양한 수정란의 발생률을 최적화시키는 산소분압이 존재할 것이 예상된다. Voelkel과 Hu (1992)는 소 수정란의 체외 발생을 BOEC와 BRL cell의 공배양 조건에서 비교하였다. 그들은 BOEC 공배양의 경우 산소분압 5%가 20%에 비하여 높은 발생률을 보이지만, BRL cell 공배양에서는 반대 결과를 보이는 것으로 보고하였다. 이 결과는 본 실험에서 측정된 공배양세포의 산소소모량이 BRL cell이 BOEC에 비하여 5배 이상 큰 것을 감안하면 설명된다. 체외수정란의 발생률은 배양액 중의 용존산소의 농도에 따라 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 배양액의 산소농도에 영향을 주는 인자는 산소 가스분압, 배양액의 양, 공배양 세포의 산소소모량 및 공배양 세포의 농도 등이 있다. 또한, 산소농도의 증가는 배양액 중의 라디칼의 양을 증가시키므로 수정란의 발생을 저해하는 효과를 주게 되므로 최소산소농도에서 수정란을 배양하는 것이 바람직하다 (Lindenau와 Fisher, 1994; Umaoka 등, 1992).

이상의 결과로부터, 공배양한 수정란배양의 경우 산소농도를 조절하기 위해 가스중의 산소분압뿐만 아니라 공배양세포의 산소소모량 및 공배양 세포의 농도가 주의깊게 고려되어야 할 것으로 생각된다.

**Table 2. Oxygen consumption rates of various feeder cells used for embryo co-culture**

Cell	Oxygen consumption rate (mg-O <sub>2</sub> /min/cell)
Bovine oviductal epithelial cell	2.57 ± 0.65 (×10 <sup>-11</sup> )
Vero cell	0.94 × 10 <sup>-10</sup>
Buffalo rat liver cell	1.37 ± 0.62 (×10 <sup>-10</sup> )

## IV. 적 요

소 수정란의 체외배양시 발생률에 영향을 주는 요인인 공배양 세포의 종류 및 산소가스의 분압에 따른 수정란의 체외 발생률의 차이를 비교하였다. 공배양 세포로는 소난관상피세포, buffalo rat liver cell, Vero cell를 5% CO<sub>2</sub> in air의 조건으로 TCM199 (10% FCS)에서 9~10일간 배양하여 초기, 중기 및 후기 세포로의 발생률을 비교하였다. 또한, 산소가스분압에

다른 공배양한 체외 수정란의 발생률을 비교하였고, 이 차이를 해석하기 위해 공배양 세포의 산소소모량을 측정하였다. 이로부터 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 소 체외성숙란을 microdrop 배양법으로 TCM 199 (10% FCS) 배지에서 공배양하였을 경우, 초기배의 발생은 공배양의 경우가 단독배양에 비하여 다소 높았으나, 후기배로의 발생은 Vero cell (29%)의 경우가 제일 높았고 난관상피세포 (23%) 및 buffalo rat liver cell (24%)은 유사하게 약간 낮았다. 이중 공배양 (dual co-culture)한 수정란의 경우 단독 공배양과 유사한 결과를 보여 주었다.
2. 산소분압에 따른 공배양한 수정란의 발생률의 비교에서 10% 산소분압이 5%나 20%에 비하여 후기세포로의 발생률이 높은 것으로 나타났다. 그러나, buffalo rat liver cell의 경우는 산소분압의 변화에 따라 발생률의 차이가 보이지 않았다.
3. 산소분압에 따른 공배양 수정란의 발생률의 차이를 설명하기 위해 공배양세포의 산소소모량을 측정하였고, buffalo rat liver cell이 다른 세포에 비하여 높은 소모량을 보여 주었다.

이상의 결과로부터 공배양에 의한 소 수정란의 체외 발생의 경우에 Vero cell을 이용한 10% 산소분압의 환경이 적합한 배양조건이 될 수 있을 것으로 평가된다. 또한, 공배양에 의한 체외수정란발생의 경우 수정란 주위 국소산소분압을 조절하는 것이 필요할 것으로 생각되며, 이에 연관되는 인자로는 산소가스의 분압 외에도 공배양세포의 산소소모량 및 세포의 농도가 중요한 인자로 고려되어야 할 것으로 사려된다.

## V. 인용문헌

1. Ball, G. D., M. L. Leibfreid, R. L. Ax and N. L. First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. J. Dairy Sci., 67:2775-2785.
2. Bavister, B. D. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* or *in vitro*. Theriogenology, 29:143-154.
3. Behboodi, E., G. B. Anderson and R. H. Bondurant. 1992. Development of *in vitro* fertilized oocytes from pregnant and nonpregnant cows in oviductal epithelial and cumulus cell co-culture systems. Theriogenology, 38:1077-1084.
4. Betterbed, B., R. W. Wright Jr. 1985. Development of one-cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. Theriogenology, 23:547-553.
5. Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
6. Camous, S., Y. Heyman, W. Meziou and Y. Menezo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos co-cultured with trophoblastic vesicles. J. Reprod. Fert., 72:479-485.
7. Dulak, N. C. and H. M. Temin. 1973. A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity for embryo fibroblast. J. Cell Physiol., 81:153-160.
8. Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
9. Eyestone, W. H., J. Vignien and N. L. First. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. Theriogenology, 27:228.
10. Gandolfi, F. and R. M. Moor. 1987. Stimulation of early development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert., 81:23-28.
11. Gordon, I. and K. H. Lu. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. Theriogenology, 33:77-87.
12. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kasaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertil-

- ization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83:753-758.
13. Grocholova, R., J. Petr, J. Marek, O. Tepla. 1995. Beneficial influence of vero cells on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology, 44:199-207.
  14. Hawk, H. W. and R.J. Wall. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. II. Media and co-culture cells. Theriogenology, 41:1585-1594.
  15. Inzen, van W. G., van A. E. P. Stekelenburg-Hamers, S. M. Weima, T. A. M. Kruij, M. M. Bevers and C. L. Mummery. 1995. Culture of bovine embryos to blastocyst stage using buffalo rat liver (BRL) cells. Theriogenology, 43:723-738.
  16. Lindenau, A. and B. Fisher. 1994. Effect of oxygen concentration in the incubator's gas phase on the development of cultured preimplantation rabbit embryos. Theriogenology, 41:889-898.
  17. Mass, D. H., B. T. Storey and L. Mastroianni. 1976. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey. Fertil. Steril., 27:1312-1317.
  18. Menezo, Y., A. Hazout, M. Pumont, N. Herbaut and B. Nicollet. 1992. Co-culture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. Human Reprod. 7 (suppl.1) :101-106.
  19. Menezo, Y., J.-F. Guerin and J.-C. Czyba. 1990. Improvement of human embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of Vero cells. Biol. Reprod., 42:301-306.
  20. Mochizuki, H., Y. Fukui and H. Ono. 1991. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. Theriogenology, 36:973-986.
  21. Ohgoda, O., K. Niwa, M. Yuhara, S. Takemashi and K. Kanoya. 1988. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. Theriogenology, 29:1375-1381.
  22. Quinn, P. and G. M. Harlow. 1978. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. J. Exp. Zool., 206:73-80.
  23. Rehman, N., A. R. Collins, T. K. Suh and R. W. Wright Jr. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes co-cultured with buffalo rat liver cells. Theriogenology, 41:1453-1462.
  24. Thompson, J. G. E, A. C. Simpson, P. A. Pugh, P. E. Donnelly and H. R. Tervit. 1990. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. J. Reprod. Fert., 89:573-578.
  25. Umaoka, Y., Y. Noda, K. Norimoto and T. Mori. 1992. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. Mol. Reprod. Dev., 31:28-33.
  26. Voelkel, S. A. and Y. X. Hu. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. Theriogenology, 37:1117-1131.
  27. Voelkel, S. A., G. F. Amborski, K. G. Hill and R. A. Godke. 1985. Use of uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. Theriogenology, 24:271-281.
  28. Wright, R. W. Jr and K. B. Bondioli. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci., 53:702-728.
- (접수일자 : 1998. 2. 16. / 채택일자 : 1998. 3. 16.)