

소 체외수정란의 발생배양에 적합한 배양환경 조성 연구

I. 체세포, 성장인자 또는 배양액 종류가 난포란의 체외성숙에 미치는 효과

이명식 · 박수봉 · 박진기 · 장원경 · 민관식 · 백광수 · 성환후 · 박용운
축산기술연구소

A Study on Culture Environments of *In Vitro* Matured/ *In Vitro* Fertilized Bovine Embryos

I. Influence of Somatic Cells, Growth Factors or Culture Media on *In Vitro* Maturation of Bovine Oocytes

Lee, M. S., S. B. Park, J. K. Park, W. K. Chang, K. S. Min,
K. S. Baek, H. H. Seong and Y. Y. Park
National Livestock Research Institute

SUMMARY

Three experiments were conducted with follicular oocytes, to compare some somatic cells, growth factors and media for *in vitro* maturation of bovine oocytes.

In the first experiment, the type of somatic cells had no effect on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes. In the second experiment, oocytes were matured in TCM199 supplemented with growth factors on IVM of bovine follicular oocytes, then all were co-cultured with cumulus cells. The proportion of used oocytes that developed to expanding blastocysts was 22.2%, 20.2%, 17.7%, 22.2%, 24.4% and 20.2% after maturation in TCM199 supplemented with control, insulin, IGF- I, IGF- II, FGF and EGF, respectively. In the third experiment, oocytes were matured in BO, Ham's F10 and TCM199, then all were fertilized in BO, and embryos cultured in BO, Ham's F10 and TCM199, respectively. Cleavage rates in BO were 90%, had higher than in Ham's F10 (80%) or in TCM199(64%). But production of expanding blastocysts in TCM199(21%) or Ham's F10(20.6%), had higher than in BO(4.6%).

(Key words : Oocyte, Maturation, Somatic cell, Growth factor, Media)

I. 서 론

미성숙 소 난포란은 난포액내의 성숙억제인자에 의해 세포분열이 정지된 상태에 있다가 스테로이드, 성선자극호르몬 및 난포액내 물질 등의 상호작용으로 성숙분열이 야기된다(Kathleen 등, 1993). 난포란의 성

숙과정에 있어서 난구세포는 난포란에 부착되어 성숙 분열시그널제공 등 중요한 역할을 함으로 (Lizhang 등, 1995), 나화된 난포란은 체외성숙 및 체외발생능이 떨어진다(Shiyoa 등, 1988). 난소의 가시난포란을 이용한 체외수정란 생산과정은 난포란의 체외성숙시 TCM-199, Ham's F10, B₂ 등 다양한 배양액이 이용되고 있으며, 다음 과정인 체외수정단계에 mTALP나

BO액에서 수정이 이루어진 후 최종단계인 수정란 발생배양에서는 난구세포, 난관상피세포, 자궁내막세포, BRL세포, 신장세포 등의 단층세포와 공배양하여 8 cell block 또는 16 cell block 을 극복하거나, 포도당이 첨가되지 않은 CR1aa, CZB, SOF 등 단순배양액을 이용하기도 하며 세포분화에 관여하는 EGF, IGF- I, IGF- II, LIF, TGF, FGF 등 성장촉진인자를 배양액에 첨가하여 체외수정란을 생산하고 있다.

따라서 본 연구는 이러한 복잡한 과정을 단순화하는데 그 목적을 두고 일차적으로 난포란의 성숙배양에 적합한 somatic cell 선정, 유용성장인자 및 배양액을 선별하기 위하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 미성숙난포란의 체외성숙

한우 암소의 난소를 생리적 식염수에 담가 실험실로 옮겨온 후 직경 2~5mm의 난포에서 주사기로 흡입채란하여 D-PBS액에서 5회 세척하였고 난구세포가 잘 부착되고 세포질이 균일한 난포란을 선별하여 공시하였으며, 난구세포 공배양구는 난자 주위의 난구세포를 그대로 이용하였으며 과립막세포, 난관상피세포, 자궁내막세포, 간세포 및 황체세포 공배양구는 난자 주위의 난구세포가 다소 혼입된 상태이고 체외성숙은 21시간 배양한 후 0.5% hyaluronidase(Sigma, H6254, USA)의 처리와 vortexing으로 난구세포를 제거하고 극체형성 여부로 판정하였다.

2. 체외수정

서산 한우개량사업소에서 생산된 한우 동결정액을 37℃ 황은수조에서 15초간 용해한 후 BO액을 5배 희석하고 1,800rpm, 38.5℃ 조건하에서 5분간 원심분리 후 상층액 제거를 2회 반복하였다. Heparin 10 μ g/ml, caffeine 2.5mM을 첨가한 수정용 BO액으로 1~5 \times 10⁶/ml의 농도로 정자수를 조정하여 성숙난포란과 6시간 동안 수정을 실시한 후 발생배양에 공시하였다.

3. 공배양용 somatic cells

난구세포는 난자주위의 난구세포를 체외배양하여 monolayers를 형성시켰으며 과립막세포는 대난포에

서 흡입채란한 후 30시간 체외배양하여 준비하였다. 난관상피세포는 난관관류법에 의해 채취하였고, 자궁내막세포는 생식기 질환이 보이지 않는 개체의 자궁에서 회수하였으며 간세포와 황체세포는 소의 간세포 또는 황체세포를 분쇄한 후 5% FCS가 첨가된 TCM 199배양액에서 조직배양하여 단층을 형성한 후 공시하였다.

4. 성장인자

미성숙난포란의 성숙배양에 사용된 성장인자는 IGF- I, IGF- II, EGF 및 FGF 로써 각각 10ng/ml 수준으로 5% FCS가 함유된 TCM199에 첨가하여 21시간 체외성숙배양시에 한하여 사용하였고 발생배양시에는 5% FCS함유 TCM199액에서 blastocysts 생산시기까지 배양하였으며, 배양액교환은 48시간 간격으로 50%를 교체하였고 배양 전기간 동안 난구세포와 공동 배양하였다.

5. 배양액

미성숙 난포란의 성숙배양시에 BO액, Ham's F10 또는 TCM-199액에 각각 5% FCS와 항생제를 첨가하여 21시간 동안 배양하였다. 체외수정은 공히 BO액에서 실시하였으며, 수정란의 발생배양은 성숙배양시 사용하였던 원래의 배양액에서 각각 수행되었고 난구세포와 공동배양하였다.

III. 결과 및 고찰

미성숙 소난포란의 성숙배양시 공배양세포에 따른 체외성숙율은 Table 1과 같다. 난구세포, 과립막세포, 난관상피세포, 간세포 및 황체세포와 공배양한 후 체외성숙율은 각각 52.3%(22/42), 50.0%(21/42), 52.3%(22/42), 47.6%(20/42), 45.2%(19/42) 및 42.8%(18/42)였다.

Leibfried-Rutledge 등(1989)에 의하면 체외배양시 공배양세포가 체외발생능을 증진시키나 난포란-난구세포 복합체의 체외성숙시 과립막세포의 첨가 시험에서 무첨가구 84%(98/116)에 비해 첨가구에서 38%(56/147)로써 오히려 낮은 성숙율을 보고한 바와 같이 본 시험에서 다양한 종류의 공배양세포 첨가구보다 난포란-난구세포 복합체의 난구세포를 이용한

체외성숙구가 52.3%(22/42)로써 다소 나은 성적을 보였으며, 이러한 원인은 난구세포와 첨가된 공배양세포가 과도하게 증가되어 세포분열의 지연이 야기되었던 것으로 사료된다. 또한 花田章(1985)의 경우, 21시간 배양후 체외성숙율은 50%로써 본 시험의 체외성숙율 42.8~52.3%와 유사한 결과를 보였다.

미성숙 소 난포란의 체외성숙배양시 성장인자 첨가가 배반포배 생산에 미치는 효과는 Table 2에서 보는 바와 같이 대조구, insulin, IGF- I, IGF- II, FGF 및 EGF 첨가구에서 각각 22.2%(10/45), 20.2%(9/45), 17.7%(8/45), 22.2%(10/45), 24.4%(11/45) 및 20.2%(9/45)였다.

Kane 등(1993)에 의하면 성장인자와 성장인자수용체는 난관, 자궁 및 수정란에 존재하며 세포분화 및 증식에 관여함을 보고한 바 있고, 체외성숙시 성장인자 첨가효과에 있어서 Kathleen 등(1993)은 FSH 10 μ g/ml 존재하에 EGF 10ng/ml 첨가구에서 배반포배

생산율이 28.2%로써 FSH부재 EGF 동량 첨가구 9.6%보다 월등히 높은 성적을 보고하였듯이 난포란 체외성숙에 EGF단독첨가가 체외성숙율이나 배반포배 생산율에 영향을 미치지 않았으며 본 시험에서도 성장인자를 소 난포란 성숙배양에 첨가했을 때 배반포배 생산율 개선효과를 확인할 수 없었다.

배양액 종류가 난포란의 체외성숙, 난할 및 배반포배 생산에 미치는 효과는 Table 3에서 보는 바와 같이 BO구에서 90.0%(135/150)로써 Ham's F10의 80.0%(121/150)나 TCM-199의 64.0%(128/200) 보다 높은 난할율을 보였으며, 이는 Shuji 등(1988)의 체외배양시험에서 BO구가 40.5%(51/126)로써 Ham's F10의 36.6%(52/142)보다 다소 높았다는 결과와 유사한 경향을 보였다. 그러나 배반포배 생산에 있어서는 오히려 TCM199과 Ham's F10이 각각 21.0%(42/200), 20.6%(31/150)로써 BO구의 4.6%(7/150)보다 월등히 높은 성적을 얻었으며, 또한 BO

Table 1. Bovine oocytes maturation rates after maturing oocytes in 6 different somatic cells^a

Somatic cells	No. of oocytes	No. of oocytes with polar body	Maturation rates, % ^b
Cumulus cells	42	22	52.3 ^c
Granulosa cells	42	21	50.0 ^c
Bovine oviduct epithelial cells	42	22	52.3 ^c
Uterine endometrial cells	42	20	47.6 ^c
Liver cells	42	19	45.2 ^c
Luteal cells	42	18	42.8 ^c

^a Experiments were repeated 3 times.

^b Percentage of number of oocytes with polar body.

Values with different superscripts are significantly different from each other (P<0.05).

Table 2. Effect of the kinds of growth factors on IVM of bovine follicular oocytes^{*}

Growth factors	No. of oocytes	No. of cleaved oocytes (%)	No. of morulae (%)	No. of expanding blastocysts (%)
Control	45	32(71.1) ^a	15(46.8) ^a	10(22.2) ^a
Insulin	45	30(66.6) ^a	14(46.6) ^a	9(20.2) ^a
IGF- I	45	30(66.6) ^a	15(50.0) ^a	8(17.7) ^a
IGF- II	45	33(73.3) ^a	17(51.5) ^a	10(22.2) ^a
FGF	45	36(80.0) ^a	19(52.7) ^a	11(24.4) ^a
EGF	45	34(75.5) ^a	17(51.5) ^a	9(20.2) ^a

^{*} Experiments were repeated 3 times.

Values with different superscripts are significantly different from each other (P<0.05).

Table 3. Effect of the kind of medium on IVM of bovine follicular oocytes^a

Medium	No. of oocytes	No. (%) of cleaved oocytes	No. (%) of expanding blastocysts
BO ^b	150	135(90.0) ^c	7(4.6) ^c
Ham's F10	150	121(80.0) ^c	31(20.6) ^d
TCM-199	200	128(64.0) ^d	42(21.0) ^d

^a Experiments were repeated 3 times.

^b BO is the chemically defined medium as described in Brackett and Oliphant (1975).

Values with different superscripts are significantly different from each other (P<0.05).

구에서 생산한 배반포배의 경우에는 형태학적으로 매우 불량하였다.

따라서 BO액은 소 난포란의 체외성숙 및 수정에는 유용하였으나 수정란의 체외발생배양에는 부적합하여 개선해야 할 필요가 많은 것으로 금후 보완이 된다면 소 체외수정란 생산체계의 단순화 및 간편화를 꾀할 수 있는 적합한 배양액이라 사료된다.

IV. 적 요

체외수정란 생산효율 증진 및 생산체계 단순화를 위하여 난포란의 체외성숙시 다양한 종류의 체세포, 성장인자 또는 배양액 종류가 미치는 영향은 다음과 같다.

1. 난포란의 체외성숙배양시 공배양세포 종류별로 체외성숙율의 차이는 뚜렷하지 않았으며 난구세포 공배양구가 가장 적합하였다.
2. 난포란 성숙시 성장인자의 첨가효과는 상실패까지 발생율은 IGF- I, IGF- II, EGF, FGF에서 다소 높은 경향이었으나 확장배반포까지의 발생에서는 단지 FGF첨가구(24.4%)에서만 대조구(22.2%)에 비해 배생산율이 다소 높은 경향을 보였다.
3. 배양액 종류별 체외성숙 및 발생배양에 있어서 BO액이 난할율 90%로 특이하게 높았으나 배반포배 발생이 거의 불가능했고, TCM199에서 수정율은 다소 낮았으나 배반포배 생산율이 21.0%로써 가장 우수하였다.

V. 인용문헌

1. Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biology of Reproduction, 12:260-274.
2. Kane, M. T., E. W. Carney and J. E. Ellington. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. Theriogenology, 38:297-313
3. Kathleen, M. H. and B. G. Brackett. 1993. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. Biology of Reproduction, 48: 409-416.
4. Leibfried-Rutledge, M. L, E. S. Critser, J. J. Parrish and N. L. First. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology, 31(1):66-74.
5. Li, Z., S. Jiang, P. J. Wozniak, X. Yang and R. A. Godke. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development *In vitro*. Molecular Reproduction and Development, 40: 338-344.
6. Shioya, Y., M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki. 1988. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. Theriogenology, 30:489-494.
7. Shuji, U., K. Masashige, S. Yasuo and H. Akira. 1988. Culture of *in vitro* fertilized bo-

- vine embryos in a chemically defined medium. Jpn. J. Anim. Reprod., Vol 34(1):56-60.
8. 花田 章. 1985. ウシにおける 外受精. 日本家畜繁殖學會誌 31卷 5號 (別刷 24號):56-61.
9. 박재원, 김창근, 정영채, 1987. 성선자극호르몬과 스테로이드호르몬의 첨가가 한우난포란의 체외성숙과 수정능력에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 11(1):73-84.
(접수일자 : 1998. 2. 23. /채택일자 : 1998. 3. 22.)