

소 체외수정란의 발생배양에 적합한 배양환경 조성 연구

Ⅱ. 성장인자가 체외수정란의 발생배양에 미치는 효과

이명식 · 박수봉 · 방명걸* · 류범룡* · 김창근** · 정영채**

축산기술연구소

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

Ⅱ. Effect of Growth Factors on *In Vitro* Development of Bovine Embryos

Lee, M. S., S. B. Park, M. G. Pang*, B. Y. Ryu*, C. K. Kim** and Y. C. Chung**

National Livestock Research Institute

SUMMARY

This study examined the effects of growth factors in TCM199 on bovine 1-cell embryos development *in vitro*.

After 6 day to 11 day in culture, 15.8%(19/120), 15.3%(20/130), 21.8%(35/160), 27.0%(56/207), 26.3%(53/201) and 30.7%(40/130) of the 1-cell embryos developed into expanding blastocysts in supplementing TCM199 with control, insulin, IGF-I, IGF-II, FGF and EGF, respectively. Hatching rate of 1-cell embryos in supplementing TCM199 with FGF, EGF and IGF-II were 21.4%(53/247), 20.3%(42/206) and 16.8%(41/243), respectively. The beneficial effect of growth factors on embryo development *in vitro* could be duplicated. These data indicate that the presence of FGF, EGF or IGF-II in the culture medium is beneficial for embryo development *in vitro* and accelerate cell differentiation.

(Key words : Embryo, *In vitro* development, Growth factor, Hatched blastocyst)

I. 서 론

수정란의 적절한 체외배양체계는 수정란이식, 체외 수정, 핵이식 및 형질전환 가축생산과 같은 생명공학 기술의 발전과 효율증진에 앞서 필수적으로 선행되어야 한다.

난포 내에 존재하는 과립막세포는 체외배양시 epidermal growth factor(EGF)와 fibroblast grow-

th factor(FGF)의 존재 하에 난포세포의 증식이 촉진된다. 또한 insulin-like growth factor-I(IGF-I)은 rat의 과립막세포의 증식에 대한 효과가 명백하지 않으나 소와 돼지의 경우에는 그 작용이 확인되고, 과립막세포의 주요 산물은 oestradiol이며 체내에서 세포분열물질로 작용하나 체외에서는 아직 그 기전이 밝혀지고 있지 않다(Carson 등, 1989). 수정란이 외래성장인자가 부족한 배양액에서도 발달될 수 있으나 총세포수, 생화학적인 구성, 이식후 생존성 등에 있

*서울대학교 산부인과(Department of Obstetrics and Gynecology, Seoul National University)

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

어서 체내수정란에 비해 질이 떨어지는데, 특정 성장 인자가 배양액에 존재하여야 적절하게 발달될 수 있을 것이다(Kane 등, 1992). 한편 자궁에서 성장인자는 착상 및 태아발달에 있어서 세포증식에 작용하는데, EGF와 FGF는 체내 및 체외에서 다양한 종류의 세포에 대해 세포분열물질로 작용하나 IGF- I은 단독으로 세포증식작용이 미미하며 EGF의 존재 하에 그 작용이 활발하다(Brigstock 등, 1989). Rat에 있어서 Insulin을 배양액에 첨가하여 수정란의 체외배양시 배발달을 증진효과는 거의 없었으나, 이식후 착상율은 Insulin 첨가가 63.4%(26/41)로써 무첨가구 26.9%(24/52)와 비교하여 대단히 개선된 성적을 보고하였다(Zhang 등, 1990).

따라서 본 연구는 paracrine경로를 통하여 세포의 성장과 분화 및 증식에 관여하는 성장호르몬 및 성장인자의 첨가효과, 유용성장인자 선발 및 유용성장인자의 작용을 1세포기 소수정란의 체외배양을 통하여 구명하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 1세포기 소수정란 생산

한우 난소를 25~32℃의 생리적 식염수에 담가 3시간 이내에 실험실로 운반한 후, 3% FCS(우태아혈청)가 첨가된 D-PBS액을 무균주사기(Furtuna, Germany)에 1ml 넣은 다음에 매난소의 난포로부터 흡입하였으며 시험기간 동안 난소 300개(150두분)에서 3, 250개의 미성숙 난포란을 현미경 하에서 회수하였다. 5% FCS와 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma, USA)이 첨가된 TCM-199(Gibco, USA)액으로 5회 세척한 후 400 μ l 소적당 70~80개의 난포란을 넣어 38.5℃, 2% 탄산가스 배양기에서 20~22시간 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

체외수정용 정자는 축협에서 생산된 한우 동결정액을 사용하였으며, 정자 세척액은 Brackett 등(1975)의 BO액을 부분적으로 변형하여 사용하였는데 BO액에 caffeine을 5mM을 첨가하여 제조한 후 원심분리하여 정장물질을 제거하였고 체외수정액에는 BSA 5mg/ml, heparin 10 μ g/ml, 및 caffeine 2.5mM을 첨가하여 최종 정자 농도를 5 \times 10⁶ cell/ml로 조정하여 체외수정액 100 μ l 소적당 20개의 난포란을 넣어 6

시간 동안 수정시켜 1세포기 소수정란을 총 2,912개 생산하여 본 시험에 공시하였다.

2. 성장인자 및 발생배양

Insulin(Sigma, I-6634), IGF- I (Sigma, I-3769), IGF- II (Sigma, I-2139), FGF(Sigma, F-3133) 및 EGF(Sigma, E-4127)를 5% FCS가 첨가된 TCM 199액으로 1차 희석하여 -20℃에 냉동보관하였고 최종 농도가 10ng/ml이 되게 발생배양액에 첨가하여 공시하였다.

발생배양시 배양액은 TCM199에 5% FCS, 1% antibiotic-antimycotic solution 및 성장인자를 첨가하여 사용하였으며 400 μ l 소적에 70개 내외의 1세포기 소수정란을 넣어 난구세포와 공배양하였고, 배양액은 48시간 간격으로 50%를 교체하였다.

III. 결과 및 고찰

성장인자가 수정란의 체외배양에 미치는 영향은 Table 1과 같다. 무첨가, Insulin, IGF- I, IGF- II, FGF 및 EGF를 10ng/ml 첨가하여 9일간 배양후 배반포 생산율은 각각 15.8%(19/120), 15.3%(20/130), 21.8%(35/160), 27.0%(56/207), 26.3%(53/201) 및 30.7%(40/130)이었다.

Gordon 등(1989)은 Insulin이 수정란의 발생배양에 효과적이며, Herrler 등(1992)은 IGF- I을 수정란의 발생배양시 첨가시험에서 단독첨가의 효과는 없

Table 1. Effect of growth factors on embryo development *in vitro*

Supplements to basal medium*	No. of 1-cell stage embryos cultured	No. (%) of blastocysts
Control	120	19(15.8) ^a
Insulin	130	20(15.3) ^a
IGF- I	160	35(21.8) ^b
IGF- II	207	56(27.0) ^c
FGF	201	53(26.3) ^c
EGF	130	40(30.7) ^c

* Basal medium was TCM-199 with 5% FCS and co-cultured cumulus cells.

^{a,b,c} Values with different superscripts within a column differ ($P < 0.05$).

었으나 과립막세포와 공배양시 발생률이 증가되었음을 보고하였으나 본 시험에서 insulin과 IGF- I의 첨가효과는 거의 없었고 IGF- II, FGF 및 EGF는 배반포 생산율이 배가되어 수정란의 체외배양에 유용한 성장인자로 확인되었다.

Kane 등(1992)에 의하면 IGF- II는 수정란의 성장을 조절하고 이러한 성장인자가 첨가된 배양액에서 발달한 배반포배는 기능적 IGF- II 수용체를 갖고 있다고 보고한 바와 같이 FGF 및 EGF의 첨가에서도 유사하게 작용하여 증가된 단백질이 수정란에 이용되어 배발생율이 증가된 것으로 사료된다.

유용성장인자로 확인된 IGF- II, FGF 및 EGF가 수정란 부화에 미치는 영향은 Table 2와 같다.

FGF, EGF 및 IGF- II를 10ng/ml 첨가하여 11일간 배양한 후 부화된 배반포배는 각각 21.4%(53/247), 20.3%(42/206) 및 16.8%(41/243)였다.

IGF- II는 Insulin과 유사체로 원시난포세포유래 세포들에 대한 분화물질이며 mitogen이고, EGF는 transforming growth factor- α (TGF- α)와 유사한 구조체로 체외에서 결합조직, 난소의 과립막세포 등 다양한 타입의 상피성, 중배엽성 세포의 mitogen으로 작용하며 HCG와 태반성 lactogen의 분비를 촉진

시키는 기능을 한다. 또한 FGF는 acidic과 basic의 형태로 두 종류이며 중배엽성, 내배엽성 세포의 mitogen인데 특히 혈관내피세포의 가장 효과적인 mitogen이다(David, 1989).

배양시간과 유용성장인자 첨가에 따른 1세포기 수정란의 체외발생능은 Table 3에서 보는 바와 같다.

소에서 체외수정란이 동결보존이나 이식에 적합한 발생단계는 수정일을 0일로 기준하여 8일까지 확장중 배반포로 발달한 것이 생존성이 높으며(Han 등, 1994), 본 시험에서 8일까지 확장배반포로의 발생률은 무첨가구 72.1%에 비해 IGF- II 첨가구 80.2%, EGF 첨가구 80.7%, FGF첨가구 82.7%로써 10% 정도 발육촉진효과가 있었다. 또한 EGF와 FGF첨가구에서는 Day 6에 이미 2.9%와 3.8%의 확장중 배반포가 발생되어 발육촉진효과가 특히 좋았던 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로, 수정란의 체외배양시 성장인자를 첨가하면 확장배반포 생산율을 증가시킬 수 있으며 이러한 효과가 우수하였던 유용성장인자는 FGF, EGF 및 IGF- II였다. 더욱이 FGF와 EGF는 이식 가능한 수정란 생산에 효과적인 성장인자로서 적정 첨가 수준에 대한 추가시험이 필요하다.

Table 2. Effect of valuable growth factors on embryo hatching *in vitro**

Supplements to basal medium ^a	No. of 1-cell stage embryos cultured	No. (%) of blastocysts	No. (%) of hatched blastocysts
FGF	247	78(31.5) ^b	53(21.4) ^a
EGF	206	62(30.1) ^a	42(20.3) ^a
IGF- II	243	65(26.7) ^a	41(16.8) ^a

*Basal medium was TCM-199 with 5% FCS and co-cultured cumulus cells.

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different from each other.

Table 3. Developmental ability of 1-cell stage embryos develop to expanding blastocysts according to growth factors and period of incubation

Growth factors	Total no. of 1-cell stage embryos cultured	No. (%) of expanding blastocysts at						No. (%) of expanding blastocysts
		day-6	day-7	day-8	day-9	day-10	day-11	
Control	480	—	24(26.6)	41(45.5)	19(21.1)	4(4.4)	2(2.2)	90(18.7)
IGF- II	230	—	25(37.8)	28(42.4)	6(9.0)	5(7.5)	2(3.3)	66(28.6)
EGF	230	2(2.9)	22(32.3)	31(45.5)	6(8.8)	5(7.3)	2(2.9)	68(29.5)
FGF	330	4(3.8)	40(38.0)	43(40.9)	9(8.5)	5(4.7)	4(3.8)	105(31.8)

IV. 적 요

수정란의 발생배양에 적합한 유용성장인자 및 유용성장인자의 첨가효과는 다음과 같다.

1. 수정란 발생배양시 성장인자 첨가효과는 확장배반포율에 있어서 대조구인 무첨가구의 15.8%에 비해 IGF-II, FGF, EGF에서 각각 27.0%, 26.3% 및 30.7%로써 수정란 생산율이 크게 향상되었다.
2. 유용성장인자로 확인된 IGF-II, EGF, FGF의 비교시험에서 각각 26.7%, 30.1%, 31.5%의 높은 확장배반포 생산율을 얻었으며 부화된 배반포까지의 발생율은 16.8%, 20.3%, 21.4%였다.
3. 유용성장인자인 FGF 첨가시 확장배반포배의 발생일은 Day 6에 3.8%, Day 7에 38.0%, Day 8에 40.9%, Day 9에 8.5%, Day 10에 4.7%, Day 11에 3.8%로 나타났으며 EGF첨가구에서도 Day 6에 이미 확장배반포배가 출현하여 성장 촉진효과가 우수했던 것으로 확인되었다.

V. 인용문헌

1. Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biology of Reproduction, 12:260-274.
 2. Brigstock, D. R., R. B. Heap and K. D. Brown. 1989. Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. J. Reprod. Fert., 85:747-758.
 3. Carson, R. S., Z. Zhang, L. A. Hutchinson, A. C. Herington and J. K. Findlay. 1989. Growth factors in ovarian function. J. Reprod. Fert., 85:735-746.
 4. David, J. H. 1989. Growth factors and their cellular actions. J. Reprod. Fert., 85:723-734.
 5. Gordon, I. and K. H. Lu. 1989. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. Theriogenology, 33:77.
 6. Han, Y. M., H. Yamashina, N. Koyama, K. K. Lee and Y. Fukui. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. Theriogenology, 42:645-654.
 7. Herrler, A., A. Lucas-Hahn and H. Niemann. 1992. Effects of insulin like growth factor-I on *in-vitro* production of bovine embryos. Theriogenology, 37:1213-1224.
 8. 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.
 9. Zhang, X. and D. T. Armstrong. 1990. Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improves development of 8-cell rat embryos *in vitro* and subsequent implantation *in vivo*. Biology of Reproduction, 42:662-668.
- (접수일자 :1998. 2. 23. /채택일자 :1998. 3. 22.)