

소에 있어서 영양아세포구의 공동 이식이 수정란이식 수태율에 미치는 영향

양보석[†] · 오성종¹ · 임기순¹ · 박성재¹ · 양병철¹ · 김정남¹
농촌진흥청 제주농업시험장

Effect of Trophoblastic Vesicles Co-Transfer on Pregnancy Rate Following Embryo Transfer in Cattle

B. S. Yang[†], S. J. Oh¹, G. S. Im¹, S. J. Park¹, B. C. Yang¹ and K. N. Kim¹

National Cheju Agricultural Experiment Station, RDA

¹National Livestock Research Institute, RDA

SUMMARY

To investigate the effect of co-transfer of trophoblastic vesicle (TV) with frozen-thawed *in vitro* produced (IVP) bovine embryo on pregnancy rate, IVP blastocysts were transferred to synchronized recipients. Elongated blastocysts were recovered at Day 13 to 15, and dissected more than 4 pieces to removed the embryonic disc. Trophoblastic fragments were cultured for 48 hours to make trophoblastic vesicles (TVs). TVs were cryopreserved in ethylene glycol or vitrification solution and frozen-thawed TVs were co-transferred to recipients with frozen-thawed IVP embryos.

1. The recovery rate of elongated blastocyst on Day 13 to 15 was 22.5% (18/80) and the size of recovered elongated blastocysts was 0.2~5.0mm.
2. Eighteen elongated blastocysts were dissected into 88 pieces and 61.4% of those pieces were formed to TV (54/88)
3. The viability of frozen-thawed TV in ethylene glycol was higher than in vitrified solution (92.8% vs. 68.8%)
4. The pregnancy rate in co-transfer with frozen-thawed TV and IVP blastocyst was better than transfer only IVP blastocysts (50.0% vs. 23.1%).

서 론

소 수정란이식기술은 소의 개량을 위하여 선진국에서는 이미 산업화 된 기술이며 우리나라에서도 1980년대 초부터 여러 대학 및 연구기관에서

많은 연구가 진행되어 현재 농가에 적용하여 산자를 생산하고 있으나 아직까지도 수정란이식에 의한 수태율은 인공수정에 비하여 낮은 실정이며, 체외 수정란을 비롯한 체외 조작 수정란 특히 이들의 동결란의 경우 더욱 낮은 실정이다. 따라서 최근 각광을 받고 있는 체세포 복제란 및 인류의 미

이 논문은 1997년 농림기술개발과제 제1차 기획과제의 연구비로 수행되었음.

¹ 농촌진흥청 축산기술연구소(National Livestock Research Institute, RDA)

[†] Correspondence

래를 책임질 수 있는 형질전환 수정란의 이식 수태율 제고를 위하여 수정란이식 수태율 증진 연구가 절실한 실정이다.

수정란이식 수태율을 증진시키기 위한 방법으로 1980년대까지는 수태율에 관여하는 요인들 중 수정란이식 시술자의 기술 숙련도, 이식 수정란의 질과 발육단계 및 조작 유무와 같은 수정란과 관련된 요인, 수정란을 이식 받을 수란우의 품종과 같은 유전적 요인 및 수란우의 연령, 산차, 영양상태 등과 같은 환경적 요인들을 중심으로 연구되었다. 따라서 소에서 수정란이식에 의한 최대의 수태율을 올리기 위하여는 숙련된 시술자에 의하여 건강하고 번식능력이 양호한 수란우에 양질의 수정란을 이식하는 것이 좋다고 하였다 (Hasler 등, 1987; Sreenan과 Diskin, 1987). 그러나 이들 기술적 요인에 의한 수태율 증가에는 한계가 있어 최근에는 인공수정에 비하여 높은 조기 배사망울을 낮추어 줌으로서 수태율을 올리려는 연구가 진행되고 있다.

이러한 조기배 사망률을 낮추는 방법으로 임신의 성립과 관계가 있는 황체의 기능향진을 위하여 수정란 이식 후 hCG 또는 GnRH를 주사하는 방법과 progesterone 제제 투여에 의한 체내 progesterone 수준 증가 등 여러 방법이 연구되었으나 연구자들간에 수태율 증진 효과는 차이를 보이고 있다 (Van Cleff 등, 1991; Drew와 Peter, 1994; 박 등, 2000). 또한 임신의 성립과 관련하여 수정란으로부터 분비되어 모체가 인식하는 신호를 증가시켜 줌으로서 수태율을 증가시키려는 연구가 수행되어 수태율 증진 효과가 있다는 연구가 보고되었으며 (Heyman 등, 1987) 이러한 수정란유래 신호는 영양아 세포로부터 분비되는 특수한 단백질인 interferon-tau로서 알려졌고 이 물질이 estradiol receptor의 활성을 억제하고 oxytocin receptor 역시 불활성화 시키며, cyclooxygenase inhibitor로 작용하여 결국 자궁내막에서 PGF_{2α}의 합성을 억제하여 모체의 황체세포에서 progesterone 생산을 계속 유지시켜줌으로써 임신을 유지시키는 것으로 밝혀졌다 (Hansen 등, 1999; Mann 등, 1999).

따라서 본 연구는 수정란이식 체외수정란 유래 elongated blastocyst를 이용 trophoblastic vesicle (TV)을 생산하며, 이들의 동결 후 생존성을 조사

하였으며, 수정란 이식시 TV를 같이 이식하여 수태율 증진 효과를 조사하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. Trophoblastic Vesicle의 제조 및 동결

체외수정 후 7~8일된 배반포를 발정주기 7일 인 수란우에 두당 12~20개를 이식한 후 7~8일째에 high efficiency Foley catheter (AgTec, 미국)를 이용하여 비외과적으로 elongated blastocyst를 회수하였다. 회수 elongated blastocyst는 신선 PBS액으로 2회 세척을 한 후 BMOC-3액 (Gibco, 미국)으로 옮긴 후 실체현미경 하에서 biocut blade (FHK, 일본)를 이용하여 배반엽을 제거하고 영양아 세포를 여러 조각으로 분리하였다. 분리한 영양아 세포는 BMOC-3액을 이용하여 48시간 38.5°C 5% CO₂, 95% 기상 하에서 배양하여 구형으로 변화함을 조사하였다.

생산된 TV는 동결 전 20% FCS가 첨가된 동결 배지로 2~3회 세척한 후 1.8M ethylene glycol을 이용한 직접이식법(양 등, 1997)과 ethylene glycol과 glycerol을 투과성 항동해제로 그리고 glucose와 sucrose를 비투과성 항동해제를 이용한 유리화 동결법 (김 등, 1998)의 2가지 방법을 비교하여 동결하였다. 용해 후 생존성은 항동해제를 제거한 후 20%의 FCS가 함유된 TCM-199 배양액으로 3회 이상 세척하여 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 원형 vesicle을 재형성 유무로 생존성을 확인하였다.

수정란과 TV의 공동 이식을 위하여 ethylene glycol을 이용한 방법을 이용하여 스트로내에 수정란과 TV를 같이 넣어 동결하였다.

2. 수정란 이식

이식용 수정란은 동결 수정란을 이용하였으며 동결 수정란은 액체질소에서 꺼내어 공기 중에서 약 5초간 방치한 후 20°C 항온수조에 침지하여 용해하였다. 용해한 스트로는 수정란이식기(cassou gun)에 장착하여 수란우에 비외과적으로 이식하였으며 임신 감정은 임신 90일경에 직장점사법에 의하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1. Trophoblastic Vesicle (TV) 제조

1) Elongated blastocyst 회수

발정이 동기화된 수란우를 이용하여 동결융해 체외 배반포를 수란우 두당 12~20개 총 80개를 이식한 후 발정주기 Day 13, 14 및 15의 elongated blastocyst를 회수하였다. 예비 실험의 결과 elongated blastocyst는 기존 Foley catheter로는 전혀 회수가 되지 않았으나, 신형 high recovery special catheter를 이용하였을 때만 회수할 수 있어 이를 본 실험에 이용하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 총 80개의 배반포 체외수정을 이식하여 발정주기 13~15일에 회수된 elongated blastocyst는 18개로 22.5%의 회수율을 얻었고 채란일이 발정주기 경과일에 따라 큰 차이는 없었으나 Day 13이 가장 낮은 18.2%의 회수율을 나타내었으며, elongated blastocyst의 크기는 0.2~5.0 mm범위였다. 본 연구에서 얻어진 22.5%의 회수율은 Rexroad와 Powell (1999)이 보고한 Day 7일의 체외수정란을 자궁각당 10개씩 이식하여 발정주기 14일에 회수한 결과 얻어진 회수율 35%보다 저조한 결과였다. 이러한 차이는 elongated blastocyst를 회수하기 위하여 이식한 수정란의 차이, 즉 본 연구에서는 동결융해 체외수정란을 이식한 결과 이식 후 체내 생존성이 신선 수정란에 비하여 저조하였기 때문에 상대적으로 회수율이 낮았던 것으로 사료된다. 또한 회수한 elongated blastocyst의 크기가 소에서 정상적인 발정주기 14일

Table 1. Non-surgical recovery of the elongated blastocysts on Day 13, 14 and 15 of the estrus cycle

Estrus cycle	No. cow transferred	No. recovery (%)	Size (mm)
13	11	2(18.2)	0.3~0.4
14	34	8(23.5)	0.4~5.0
15	35	8(22.9)	0.2~2.6
Total	80	18(22.5)	0.2~5.0

의 크기가 0.4~80 mm 라는 결과 (Ryan 등, 1994)와 비교하여 적었던 결과도 본 연구에서 체외 동결수정란을 이식하여 수정란이 수란우의 자궁에서 적응하는데 시간이 다소 걸렸던 결과로 사료된다.

2) TV 생산

수정란 이식후 Day 13, 14 및 15에 회수된 elongated blastocyst는 TV를 만들기 위하여 세절하였다(Fig. 1).

Table 2에서 보는 바와 같이 회수된 18개의 elongated blastocyst를 세절시 최소 2.5배에서 최고 5.8

Table 2. Formation of TV form sliced elongated blastocysts

Estrus cycle	Elongated blastocysts	No. pieces	TV (%)
13	2	5(250.0%)	3(60.0)
14	8	47(587.5%)	33(70.2)
15	8	36(450.0%)	18(50.0)
Total	18	88(488.9%)	54(61.4)

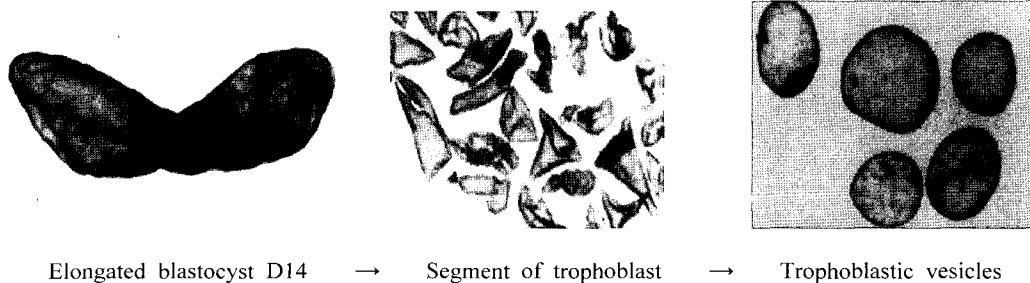


Fig. 1. Formation of trophoblastic vesicles.

배 이상으로 나눌 수 있었으며 전체적으로 18개 수정란에서 88개의 세절단편으로 나뉘었다. 또한 세절된 88개의 TV조각을 BMOC-3 배양액으로 배양한 결과 50% 이상이 정상 TV로 발달하였고, 총 54개가 구를 형성하여 영양아세포구 형성율은 61.4%였다.

3) 영양아세포구 동결융해 후 생존율

제조된 영양아세포구를 동결보존하기 위하여 직접이식법 및 유리화법을 이용하여 동결하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 ethylene glycol을 이용한 직접이식법에 의하여 14개의 TV를 동결융해하여 배양한 결과 92.8%가 생존하였으나 초자화법을 사용하였을 때는 16개의 영양아세포구 중 68.8%만 생존하였다.

본 연구에서 얻어진 TV의 동결융해후 생존율은 Isachenko 등(1993)이 보고한 다배란 처리 발정후 13~17일에 채란하여 0.3~0.5 mm의 크기로 세절된 다음 세절된 trophoblast를 급속 또는 유리화 동결·융해후 얻어진 0.5~2 mm 직경의 TV를 다시 유리화 동결후 얻어진 생존성 10.0%보다 높은 결과였다. 이러한 연구자간의 차이는 본 연구에서는 채란 직후 trophoblast를 세절하여 제조한 TV를 이용하였으므로 동결융해 세절 trophoblast를 이용한 경우에 비하여 TV의 손상이 적었기 때문이라고 사료된다. 또한 ethylene glycol을 이용한 직접이식법이 유리화 동결법에 비하여 TV의 생존율이 높았던 결과는 TV의 크기가 상대적으로 발정주기 7일에 회수된 배란포보다 크며 또한 vesicle 내의 액체가 많아 완전 동결법에 의한 탈수가 생존에 유리하게 작용한 것으로 사료된다. 이와 같은 결과로 볼 때 TV의 동결에는 ethylene glycol을 이용한 직

접이식법을 사용하여 온도의 하강을 완만하게 하는 것이 바람직하다고 사료된다.

4) 영양아세포구와의 공동이식

Table 4에서 보는 바와 같이 영양아세포구를 수정란 동결시 straw에 같이 넣어 동결하여 융해후 10두의 수란우에 이식한 결과, 5두가 임신하여 50%의 수태율을 나타내어 수정란만 이식한 경우의 수태율 23.1%보다 높았다.

본 연구에서 얻어진 TV의 공동이식이 수정란 이식 수태율 증진 효과는 Heyman (1984)과 Heyman 등(1987)의 결과와 일치하는 경향이었으나 Ryan 등(1994)이 보고한 수태율 증진효과는 분만후 55일 이내의 경산우에서는 유의적으로 인정되나 55일 이상 경과된 경산우에서는 다소의 증진효과는 있으나 유의적인 차이는 없었다는 보고와는 다소 차이가 있는 결과였다. 그러나 분만후 경과일에 따라 수태율 증진효과에 다소의 차이는 있으나 증진된다는 결과는 Hansen 등(1999)이 보고한 임신초기 태아유래 interferon-tau가 자궁내막에 작용하여 estradiol 및 oxytocin receptor의 작용을 억제시켜 cyclooxygenase inhibitor로 작용함으로써 결국 PGF_{2α} 합성을 억제하여 모체의 progesterone 분비를 유도시킨다는 이론적 근거가 초기 임신유지를 가능케 하였다는 결과와 태아유래 interferon-tau는 hatched blastocyst 단계의 trophoblast에서 가장 많이 분비된다는 보고(Wrenzycki 등, 1999; Talbot 등, 2000)로 유추하여 볼 때 수정란 이식시 공동 이식한 TV는 interferon-tau를 분비하여 수란우의 자궁 환경이 초기 임신유지에 유리하게 작용함으로써 수태율 증진 효과가 나타났던 것으로 사료된다.

Table 3. Effect of the cryopreservation method on the viability of frozen-thaw TV

Method	No. TV	Reforming to the vesicle	
		24hr	48hr
Ethylene glycol	14	12	13(92.8)
Vitrification	16	11	11(68.8)

Table 4. Effect of co-transfer of TV with frozen-thawed *in vitro* produced embryos on the pregnancy rate

Co-transfer	No. recipients	No. pregnant (%)
Control	13	3 (23.1)
TV	10	5 (50.0)

적 요

소의 수정란이식 수태율 향상을 위하여 동결융해 체외 배반포를 Day 7의 수란우에 이식하고 Day 13~17에 비외과적으로 elongated blastocyst를 회수하였다. 회수된 elongated blastocyst는 실제현미경하에서 세절 배양하여 trophoblastic vesicle (TV)를 제조하였으며 동결융해하여 생존율을 확인하였으며 동결융해 체외 배반포 이식시 TV의 공동이식이 수태율 증진에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 총 80개의 체외수정란을 이식하여 Day 13~15에 채란한 결과 18개의 trophoblast vesicle을 회수하여 22.5%의 회수율을 얻었으며 크기는 0.2~5.0 mm였다
2. 회수된 elongated blastocyst 18개를 88개로 세절하여 배양한 결과 54개가 정상형태의 TV로 발달하여 평균 61.4%의 생존율을 나타냈다.
3. 직접이식법을 사용하여 14개의 TV를 동결융해하여 배양한 결과 92.8%가 생존하였으나 초자화법을 사용하였을 때는 16개의 영양아세포구 중 68.8%만 생존하였다
4. TV를 수정란 동결시 straw에 같이 넣어 동결하여 융해후 10두의 수란우에 이식한 결과, 5두가 임신하여 50%의 수태율을 나타내어 수정란만 이식한 경우의 수태율 23.1% 보다 높았다

참고문헌

- Drew SB and Peter AR. 1994. Effect of buselerin on pregnancy rates in dairy cows. *Vet. Rec.*, 134:267-269.
- Hansen TR, Austin KJ, Perry DJ, Pru JK, Teixeira MG and Johnson GA. 1999. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54:329 -339.
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Foote RH. 1987. Effect of donorembryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27:139-168.
- Heyman Y. 1984. Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 23:63-75.
- Heyman Y, Chesne P, Chupin D and Menezo Y. 1987. Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with throphoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27:477-484.
- Isachenko VV, Ostashko FI, Grishchenko VI and Isachenko EF. 1993. Survival of trophoblastic fragments and vesicles after vitrification, ultrarapid freezing, and storage at 4 degrees C. *Cryobiology*, 30:432-437.
- Mann GE, Lamming GE, Robinson RS and Wathes DC. 1999. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54: 317-328.
- Rexroad CE and Powell AM. 1999. The ovine uterus as a host for *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 52:351-364.
- Ryan DP, D'Hoore D, Snijders S and O'Farrell KJ. 1994. Intrauterine transfer of bovine trophoblast vesicles during dioestrus after breeding to increase pregnancy rates in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 36:175-185.
- Sreenan JM and Diskin MG. 1987. Factors affecting pregnancy rates following embryo transfer in the cow. *Theriogenology*, 27:99-113.
- Talbot NC, Caperna TJ, Edwards JL, Garrett W, Wells KD and Ealy AD. 2000. Bovine blastocyst -drived trophoblast and endoferm cell cultures: Interferon tau and transferrin expression as respective *in vitro* markers. *Biol. Reprod.*, 62:235-247.
- Van Cleeff J, Drost M and Thatcher WW. 1991. Effect of postinsemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrus responses of dairy heifers. *Theriogenology*, 36:

795-807.

Wrenzycki C, Herrmann D, Carnqath JW and Niemann H. 1999. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol. Reprod. Dev.*, 53(1):8-18.

金炯澈, 梁甫錫, 任石基, 柳一善, 崔在寬, 羅基準, 趙炳大. 1998. 韓牛改良을 위한 受精卵의 生産과 移植에 關한 研究. *畜産論文集*. 40(1):1-5.

양보석, 오성중, 박원종. 1997. 한우 체외 동결수정란의 용해후 생존성과 적접이식후 수태률에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 12: 67-74.

박수봉, 임석기, 우제석, 김일화, 최선호, 이장희, 김인철, 손동수. 2000. 한우 수란우의 임신율에 대한 hCG 영향과 혈장 요소태질소 수준과의 관계. *한국수정란이식학회지*, 15:115-120.

(접수일: 2001. 1. 23 / 채택일: 2001. 2. 15)