

난자의 형태, 번식주기, 배양시간 및 활성화 처리가 개 난자의  
체외수정후 발생에 미치는 영향에 관한 연구

이 동 수 · 김 상 근<sup>†</sup>  
충남대학교 수의과대학

**Effects of Morphology, Reproductive Cycle, Incubation Time  
and Activation of Oocytes on Developmental Rate of  
Embryos Fertilized *in vitro***

D. S. Lee and S. K. Kim<sup>†</sup>

College of Vet. Med., Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

**SUMMARY**

The study was carried out to investigate the effects of morphology, reproductive cycle, incubation time and activation of oocytes *in vitro* maturation of canine oocytes and development of canine IVM/IVF embryos.

The results were summarized as follows:

1. The developmental rates to 16 cells of fresh, salts and 4°C-stored oocytes with and without cumulus cells were 14.3%, 5.0% and 7.5%, 2.8% and 5.7%, 0.0%, respectively. The rate of oocytes with cumulus cells(5.7%~14.3%) was higher than that of denuded oocytes(0.0%~5.0%).
2. The developmental rate to 16 cells of *in vitro* cultured oocytes recovered from ovaries collected at different stages of the reproductive cycle were 0.0%, 10.7%, 1.5%, respectively.
3. The developmental rate to 16 cells of fresh oocytes with cumulus cell cultured for 24, 32 and 48 hrs in CO<sub>2</sub> incubator were 0.0%, 5.3%, 11.8%, respectively. The rate of oocytes cultured for 48 hrs was higher than that oocytes cultured for 24 and 32 hrs.
4. The development to 16 cells treated activation and non-activation oocytes were 15.0%, 6.7%, respectively. The rate of oocytes treated activation was higher than that oocyte treat non-activation.

(Key words : dogs, morphology, reproductive cycle, incubation time, activation of oocytes, developmental rate)

서 론

최근 주로 고 단백질 및 고 지방 사료로 실내에서 사육하여 운동량이 절대적으로 부족함에 따라 번

식주기의 교란과 정자수의 감소로 많은 번식장애와 질병으로 이어지고 있다(Gunzel, 1986; Kim, 2001).

동물의 난자의 정자 침입율에 의한 정자의 수정

<sup>†</sup> Correspondence : College of Vet. Med., Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea, E-mail : kskkim@hanbat.cnu.ac.kr

에 관한 연구는 사람(Liu와 Baker, 1994), 소(Fazeli 등, 1993), 돼지(Ivanova와 Mollova, 1993; Maertinez 등, 1993), 양(Codde와 Berger, 1995), 고양이(Goodrowe와 Hay, 1993; Howard 등, 1991, Otoi 등, 2001), 개(Hay 등, 1997a; Hay 등, 1997b; Hewitt와 England, 1997; Otoi 등, 2000) 등에 이루어졌다. 정자침입율은 체외수정율과 밀접한 상관관계가 사람(Liu와 Baker, 1994)과 소(Zhang 등, 1998), 돼지(Ivanova와 Mollova, 1993)에서 밝혀졌다. Karja 등(2002)은 고양이를 대상으로 inactive, follicular, luteal의 3 단계의 번식주기로 구분하여 채취 후 배양했을 때 GV율은 각각 98.1%, 81.8%, 94.2%로 번식주기에 따라 차이가 있었다고 하였다. Hewitt와 England(1999)는 개 난자를 이용하여 48시간 배양 후 GVBD 및 MII 기로의 발생율은 각각 33.0%~49.0%와 2.0%~6.0%였다고 하였다.

그러나 불임개체가 많고 자연수정이 어려운 소형 개의 불임치료를 위해 체외수정과 수정란 생산에 관한 연구보고는 접할 수 없었다. 또한, 하절기에 개 난소를 용이하게 구할 수 있는 특수한 환경은 개 불임문제 해결에 난자를 이용한 다양한 연구가 시도될 수 있을 것으로 판단된다.

이에, 본 연구는 소형 개의 불임 해결을 위한 방안의 하나로써 난자의 형태, 번식주기, 배양시간 및 활성화 처리가 난포란의 체외성숙 및 체외발생에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 회수와 체외성숙

개 난소를 적출하여, 38°C의 생리식염수에 침지한 후 실험실로 옮겨 난소 난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수한 난포란은 2 IU/ml의 hCG(Sigma, U.S.A.)와 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, U.S.A.)과 10%(v/v)의 FCS(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 TCM-199(Whittaker, U.S.A.) 배양액으로 배양하였다. 난포란의 체외성숙은 배양액 50 µl의 소적을 mineral oil(Squibb, U.S.A.)로 피복된 소적내에 5개의 난포란을 주입하여 CO<sub>2</sub> 배양기내(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5°C)에서 48시간 성숙배양을 실

시하였다.

신선한 난소와, salt 및 4°C에 보존한 난소로부터 각각 회수한 난구세포부착 난자와 나화난자를 각각 48시간 배양하면서 체외발생율을 조사하였고, 또한 발정주기를 휴지기(inactive), 발정기(follicular), 황체기(luteal)로 구분하여 각각 채취한 난포란을 배양하였을 때 GVBD 및 MII 또는 16 세포기 및 상살배로의 체외발생율을 조사하였다.

### 2. IVF

체외성숙 배양한 난포란과 동결 용해한 난포란을 각각 50 µl의 배양액 소적 내에 5개의 난포란을 주입한 후, 사출 정액 0.01 ml와 BO액 2.0 ml를 잘 혼합하여 배양기에서 30 분간 swim-up시킨 다음 약 0.5 ml의 상층액을 1,000 rpm으로 원심 분리하여 침전된 정자 pellets을 20 µl의 heparin(Sigma, U.S.A.)과 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정능 획득을 유지시킨 정자 부유액을 주입하여 7~10시간 매정에 의해 수정시켰다.

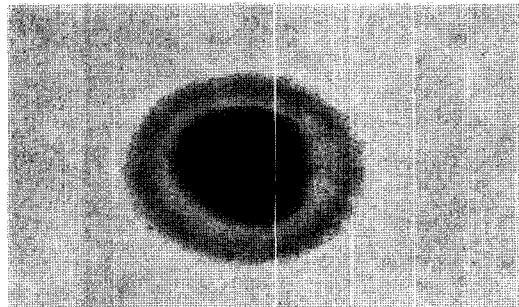


Fig. 1. Canine oocytes collected ovarian follicles.

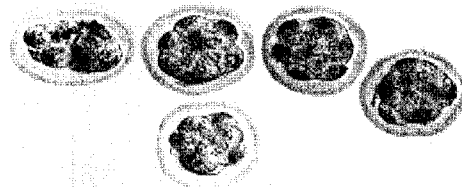


Fig. 2. Development to beyond 16 cells after *in vitro* fertilization of canine oocytes.

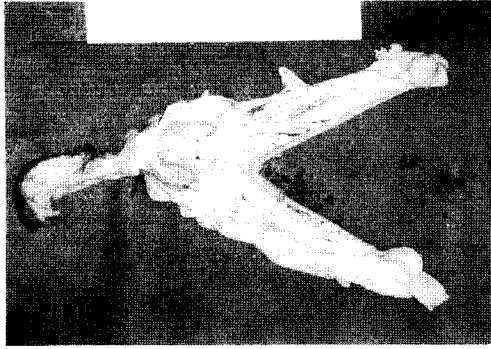


Fig. 3. Ovary collected from slaughtering dogs.

### 3. 난자의 활성화 처리

난구세포를 제거하기 위하여 0.2% hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 PBS 배지에서 난구세포를 제거하였으며, 난구세포가 제거된 난자중 제1 극체가 방출된 난자만을 선별하여 7% ethanol에서 5분간 처리 후 2.0 mM dimethylamino-purine (Sigma, U.S.A.)에서 1시간 활성화 처리후 시험에 이용하였다.

### 4. 체외성숙 및 체외발생율의 판정

난자를 0.2%의 hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)를 1~5분간 처리에 의하여 난구세포를 제거하고 나화된 난자는 acetic acid : ethanol(1 : 3)액에 24시간 고정하고 1% aceto-orcein 또는 10  $\mu$  g/ml bis-benzimide(Hoechst 33342, Sigma, U.S.A.) 염색액으로 염색한 다음 세포 및 핵 분열상을 관찰하여

난자의 체외성숙을 판정하거나 배양액 내에서 배양하면서 응성전핵 형성과 배의 발생상태를 관찰하여 판정하였다.

### 5. 통계학적 분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 분산분석에 의해 평균치를 구하였으며, 처리간의 차이를 평가하기 위하여 Duncan의 다중검증을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 난자의 체외발생에 미치는 영향

#### 1) 보존방법에 따른 난자의 체외발생을

난소의 보존방법에 따른 체외발생율을 구명하고자 신선한 난소, salt 및 4°C에 보존한 난소로부터 회수한 난구세포부착 난자와 나화난자를 각각 48시간 배양하면서 Hochest 염색을 통해 판정한 GV, MII 및 16세포기로의 체외발생율은 Table 1과 같다.

신선, salt 및 4°C에 보존한 난소로부터 회수한 난구세포부착 및 나화 난자를 각각 체외수정시켰을 때 체외발생율은 14.3%, 5.0% 및 7.5%, 2.8% 및 5.7%, 0.0%로써 난구세포 부착 난자가 나화난자의 체외발생율에 비해 높은 성적이었다. 한편, 배반포로 분할하는 난자도 보였으나 발생이 중지되거나 퇴행을 나타냈다. 이러한 결과는 가장 활발한 난포기의 난소로부터 회수한 형태적으로 우수

Table 1. Sperm penetration of fresh and salt-stored oocytes with and without cumulus cells

Type of oocytes	No. of oocytes	Developmental stage of oocytes		Development to 16 cells(%)
		GV	MI I	
Fresh				
Intact	35	18(51.4)	12(34.3)	5(14.3)
Denuded	40	11(27.5)	8(20.0)	2( 5.0)
Salt-stored				
Intact	40	10(25.0)	9(22.5)	3( 7.5)
Denuded	36	6(16.7)	6(15.0)	1( 2.8)
Cooled				
Intact	35	7(20.0)	7(20.0)	2( 5.7)
Denuded	36	5(13.9)	4(11.1)	0( 0.0)

하며 난구세포가 치밀하게 부착된 난자만을 선별하여 수정했을 때의 체외발생율이 발정주기 전체의 난소 난자를 체외수정 한 군에 비해 높은 체외발생율을 나타냈으며 본 표에서는 우수한 난자만의 체외발생 결과만을 제시하였다. 개 난자를 이용하여 48시간 배양 후 GVBD 및 MII기의 발생율은 각각 33.0%~49.0%와 2.0%~6.0%였다고 한 Hewitt와 England(1999)의 보고에 비하여 약간 낮은 체외발생율을 나타냈다. 높은 체외발생율을 얻기 위해서는 우수한 신선 난자의 형태적 분류를 통해 난구세포부착 난자만을 선별하여 배양할 때 보다 높은 체외발생율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

## 2) 번식주기에 따른 난자의 체외발생

번식주기에 따른 체외발생율을 조사하고자 번식주기를 휴지기(inactive), 난포기(follicular), 황체기(luteal) 단계로 구분하여 각각 채취한 난포란을 배양하였을 때 GVBD, MII 및 16 세포기로의 체외발생율은 Table 2와 같다.

Inactive, follicular, luteal 단계로 구분하여 채취한 난포란을 배양하였을 때 GV 및 MII로의 체외성숙율은 각각 11.3%와 9.4%, 50.7%와 26.7%, 16.9%와 13.8%로 나타났으며, 16 세포기로의 체

외발생율은 각각 0.0%, 10.7%, 1.5%로 나타났다. 이러한 결과는 개 난자를 이용하여 48시간 SOF + 3% BSA와 SOF + 4% BSA액에서 배양하였을 때 GVBD 및 MII로의 체외성숙율은 각각 20/44 (45.0%), 2/33(6.0%)와 15/44(36.0%), 3/42(7.0%)였다고 한 Hewitt와 England(1999)의 결과와 유사한 성적이었다. 개 난자의 IVF후 체외발생율은 Otoi 등(2000)의 결과에 비해 유사하거나 높은 결과를 나타냈다. 한편, Karja 등(2002)은 고양이를 대상으로 inactive, follicular, luteal의 3 단계의 번식주기로 구분하여 채취 후 배양했을 때 GV율은 각각 98.1%, 81.8%, 94.2%로 번식주기에 따라 차이가 있었다고 하였다. 한편, 개 난자의 배양 시 SOF 배양액에 3%의 BSA를 첨가하여 배양했을 때 다른 배양액에 비해 약간 높은 체외성숙율을 나타냈다고 한다(Hewitt와 England, 1999; Bolamba 등, 1998).

## 3) 배양시간에 따른 체외발생율

난자의 배양시간 따른 체외발생율을 조사하고자 난소로부터 회수한 형태적으로 우수한 난구세포 부착 난자를 선별하여 각각 24, 32, 48시간 성숙배양 후 체외수정시켰을 때 16 세포기로의 체외발생율은 Table 3과 같다.

Table 2. Nuclear status of freshly recovered oocytes from dog ovaries collected at different stages of the reproductive cycle

Stage of reproductive cycle	No. of oocytes examined	Developmental stage of oocytes		Development to 16 cells(%)
		GV	MI	
Inactive	53	6(11.3)	5( 9.4)	0( 0.0) <sup>b</sup>
Follicular	75	38(50.7)	20(26.7)	8(10.7) <sup>a</sup>
Luteal	65	11(16.9)	9(13.8)	1( 1.5) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> : Values within column with different superscript differ (p<0.05).

Table 3. Developmental rate of *in vitro* cultured dog oocytes incubated at different incubation time

Incubation time( h)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes cleaved	Embryos developed to 16 cells(%)
24	35	3( 8.6)	0( 0.0) <sup>b</sup>
32	38	6(15.8)	2( 5.3) <sup>a</sup>
48	34	8(23.5)	4(11.8) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> : Values within column with different superscript differ (p<0.05).

신선한 난구세포 부착 난자를 각각 24, 32, 48시간 성숙배양 후 체외수정시켰을 때 분할율은 8.6%, 15.8%, 23.5%였으며 체외발생율은 각각 0.0%, 5.3%, 11.8%로써 48시간 성숙배양하였을 때 가장 높은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 소, 돼지 미숙난포란을 20~24시간 및 43~46시간 성숙 배양하였을 때 MII에 도달한다고 한 Edwards (1965)의 보고와 비교할 때 개 난자의 체외성숙 배양은 40~48시간이 적합한 것으로 사료되었다.

#### 4) 활성화 처리에 따른 난자의 체외발생율

난자의 활성화 처리가 체외발생율에 미치는 영향을 구명하고자 활성화 처리를 난자를 체외수정시켰을 때 16 세포기로의 체외발생율은 Table 4와 같다.

활성화 처리 및 비활성화 처리 난자를 각각 체외수정시켰을 때 분할율은 각각 42.5%, 22.2%였고 16세포기로의 체외발생율은 각각 15.0%, 6.7%로써 활성화 처리를 한 난자가 높은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 개 난자의 활성화 처리가 IVF에 미치는 보고를 접할 수 없어 정확하게 비교할 수는 없었다. 한편, Bogliolo 등(2001)은 고양이 의 활성화 처리 난자를 이용하여 ICSI(intracytoplasmic sperm injection)를 하였을 때 배반포로의 체외발생율은 6.6%였다고 하였다.

### 적 요

본 연구는 소형 개의 불임 해결과 체외수정란을 생산하기 위한 방안의 하나로써 난자의 형태, 번식 주기, 배양시간 및 활성화 처리가 난포란의 체외성숙 및 체외발생에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 신선, salt 및 4°C에 보존한 난소로부터 채취

한 난구세포부착 난자와 나화 난자로 각각 체외수정시켰을 때 16세포기로의 발생율은 14.3%, 5.0% 및 7.5%, 2.8%, 5.7% 및 0.0%로써 난구세포 부착난자군의 체외발생율이 나화 난자군에 비해 높게 나타났다.

2. 발정주기를 inactive, follicular, luteal 단계로 구분하여 채취한 난포란을 각각 체외배양시켰을 때 GV 및 MII로의 발생율은 11.3%와 9.4%, 50.7%와 26.7%, 16.9%와 13.8%였고, 16세포기로의 체외발생율은 0.0%, 10.7%, 1.5%였다.
3. 신선한 난구세포 부착 난자를 각각 24, 32, 48시간 성숙배양 후 체외수정시켰을 때 분할율은 8.6%, 15.8%, 23.5%였으며, 16세포기로의 체외발생율은 각각 0.0%, 5.3%, 11.8%로써 48시간 배양군이 가장 높은 발생율을 나타냈다.
4. 활성화 처리 및 비활성화 처리 난자를 각각 체외수정시켰을 때 분할율은 각각 42.5%, 22.2%였고 16세포기로의 체외발생율은 각각 15.0%, 6.7%로써 활성화 처리 난자군이 비활성처리 난자군에 비해 높은 발생율을 나타냈다.

### 참고문헌

- Bogliolo L, Leoni G, Ledda S, Naitana S, Zedda M, Carluccio A and Pau S. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 56: 955-967.
- Bolamba D, Borden-Russ KD and Durrant BS.

Table 4. Developmental rate of *in vitro* cultured dog oocytes treated activation and non-activation

Medium	No. of oocytes cultured	No. of oocytes cleaved	Embryos developed to 16 cells(%)
Activated	40	17(42.5)	6(15.0) <sup>a</sup>
Non-activated	45	10(22.2)	3( 6.7) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> : Values within column with different superscript differ (p<0.05).

1998. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49:933-942.
- Codde JM and Berger T. 1995. *In vivo* fertility of rams in relation to sperm zona pellucida binding and sperm zona pellucida penetration of ovine oocytes. *Theriogenology*, 44:901-906.
- Edwards RG 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-352.
- Fazeli AR, Steenweg W, Bevers MM, de Loos FAM, van den Broek J and Colenbrander B. 1993. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet. Rec.*, 132: 397-410.
- Goodrowe KL and Hay M. 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 40:967-975.
- Gunzel AR. 1986. Semen collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarzti Prax.*, 14:275-282.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP and Goodrowe KL. 1997a. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil.*, 51:99-108.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP and Goodrowe KL. 1997b. Canine spermatozoa: cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, 48:1329- 1342.
- Hewitt DA and England GCW. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocytes maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 55(1):63-75.
- Hewitt DA and England GCW. 1997. The canine oocyte penetration assay : its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 50:123-139.
- Howard JG, Bush M and Wildt DE. 1991. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J. Androl.*, 12: 36-45.
- Ivanova M and Mollova M. 1993. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*, 40:397-410.
- Karja NWK, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M and Suzuki T. 2002. *In vitro* maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*, 57(9):2289-2.
- Kim SK. 2001. Studies on the viability of frozen removed seminal plasma by saline(RSP-S) and tris-buffer(RSP-T) semen of small species dogs. *Korean J. Anim. Reprod.*, 25(3):269-275.
- Liu DY and Baker HWG. 1994. A new test for the assessment of sperm zona pellucida penetration: relationship with results of other sperm tests and fertilization *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 9:489-496.
- Maertinez E, Vazquez JM, Matas C, Roca J, Coy P and Gadea J. 1993. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 44:901-906.
- Otoi TM, Murakami A, Ooka NWK, Karja and Suzuki T. 2001. Effects of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes. *Vet. Rec.*, 148:350-355.
- Otoi T, Murakami M, Fujii A, Tanaka M, Ooka A, Une S and Suzuki T. 2000. Development of canine oocytes matured and fertilised *in vitro*. *Vet. Rec.*, 146:52-53.
- Schilling E, Niemann H and Schmidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15: 245-248.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N and Rodriguez-Martinez H. 1998. Sperm characteristics

and zone pellucida binding in relation to field  
fertility of frozen-thawed semen from dairy Ai  
bulls. Int. J. Androl., 21:207-216.

---

(접수일 : 2002. 7. 1/ 채택일 : 2003. 3. 20)