

NCSU-23과 PZM 배양액내 첨가된 Macromolecule이 돼지 체외수정란의 발육에 미치는 영향

김 수 · 이소현 · 김대영 · 강성근 · 이병천[†] · 황우석
서울대학교 수의과대학

Effect of Macromolecules Supplemented to NCSU-23 and PZM Culture Media on *in vitro* Development of Porcine Embryos

S. Kim, S. H. Lee, D. Y. Kim, S. K. Kang, B. C. Lee[†] and W. S. Hwang

Department of Veterinary Medicine, Seoul National University,
Seoul 151-740, Republic of Korea

SUMMARY

Three experiments were performed to develop an optimal culture system of *in-vitro* derived porcine embryos. In experiment 1, embryos were cultured in two different basic culture media (NCSU-23 and PZM) supplemented with BSA (4mg/ml), FBS (10%), PVA (3mg/ml). Although no difference on the percentage of embryos developed to blastocysts was found ($P>0.05$), more 2-cell embryos (59.5% vs. 44.7 to 52.0%) were obtained when embryos were cultured in NCSU-23 added with BSA. In experiment 2, identical treatment was conducted using PZM medium. More ($P<0.05$) 2-cell embryos (54.4% vs. 40.7 to 44.5%) and blastocysts (12.5% vs. 5.8 to 9.0) were produced when embryos were cultured in PZM added with BSA (4mg/ml). In experiment 3, embryos were cultured in media as follows; 1) NCSU-23 without BSA for 192 hours; 2) NCSU-23 with BSA for 192 hours; 3) NCSU-23 with BSA for 96 h and then subsequently injected with FBS into culture drops. Although no difference on the percentage of embryos developed to blastocysts was found ($P>0.05$), more 2-cell embryos (63.8 to 69.2% vs. 52.0%) were obtained when embryos were cultured both in NCSU-23 added with BSA throughout culture duration and in FBS supplemented medium. In conclusion, no difference was found when porcine preimplantation embryos were cultured in NCSU-23 added with various macromolecules. However, when PZM medium was used, PZM medium supplemented with BSA showed more potential to support embryo development. Finally, FBS supplemented into culture drop 96h post-insemination did not show any benefits on embryo development.

서 론

수정란의 배양액은 일반적으로 단순무기염류, 에너지원, 아미노산(Karja 등, 2002; Lee 등, 1996; Beckmann 등, 1993), pH 완충제, 미량원소, 거대분

자(macromolecules), 항생제로 구성되어 있으며, 최근에는 기본 배양매지에 첨가된 성장인자(growth factor) (Abeydeera 등, 1998), 항산화제(antioxidants), 금속킬레이트제(chelator) 등이 배 발달에 미치는 영향에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있

본 연구는 2002년도 서울대학교 발전기금 일반학술연구비 지원(02-02-31-6)에 의해 수행되었음.
[†] Correspondence : E-mail: firstlee@snu.ac.kr

다. 일반적으로 포유류 수정란 배양액에 첨가되는 거대분자로는 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS)와 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA), PVA(polyvinylalcohol), PVP(polyvinylpyrrolidone) 등을 사용한다(Bigger 등, 1997). FBS는 성장인자(growth factor), immunoglobulin, 기타 mitogen 등이 풍부하여 수정란 배양액에 일반적으로 첨가된다(Rizos 등, 2003; Choi 등, 2002). 그러나 그 성분이 아직 100% 밝혀져 있지 않으며, 초기단계 체외 수정란의 배발달을 억제하며, 후기 배발달을 촉진하는 효능(biphasic effect)이 있음이 보고되어(Pinyopummintr and Bavister, 1991) 발달단계에 따라 그 영향이 다르다는 것을 보여주었다.

돼지 수정란 배양에는 Whitten's medium, NCSU-23, modified CZB medium 그리고 BECM-3 등이 사용되고 있으나 그 중에서도 NCSU-23 배지가 가장 보편적으로 사용되고 있고, 다른 medium에 비하여 좋은 결과를 나타내고 있다는 보고가 있다(Wang 등, 1997; Petters 등, 1993). 하지만 아직까지 돼지 수정란 체외배양 조건이나 배지 조건은 다른 동물, 특히 소에 비하여는 확립되어 있지 않은 상태이다. 이러한 체외배양 조건의 확립은 수정란 이식이나 복제 돼지 생산에 기초가 되는 단계이므로 돼지 수정란 배양에 있어서 양질의 배반포와 부화배반포를 생산할 수 있는 배지의 조건 확립이 반드시 필요하다(Rath 등, 1995).

따라서 본 연구는 배양액에 첨가된 다양한 종류의 macromolecule이 돼지 수정란의 발달에 미치는 영향과 후기배 단계에 첨가된 혈청이 수정란의 발육에 미치는 영향을 알아보고, 나아가서 돼지 체외 수정란 생산체계를 수립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시 난포란의 채취

도축 직후 (체중 120kg 내외) 난소를 채취하여 75 μ g/ml penicillin G (Sigma, USA)와 50 μ g/ml streptomycin sulfate (Sigma)를 첨가한 38°C의 멸균생리 식염수 (0.9% NaCl) 로 세척한 후 멸균생리식염수가 들어있는 보온병에 보관하여 실험실로 운반하였다. 그리고 다시 신선한 멸균생리식염수

로 2~3회 세척한 후, 38°C로 조정되어 있는 온수조에 넣어서 실험에 공시하였다. 공시난포란의 채란은 18-gauge 주사침이 장착된 5 ml 주사기로 직경이 3~5 mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 50 ml 원심관에 옮겨 38°C로 조정된 온수조에서 침전시키고, 상층액을 제거하여 pellet만을 취하여 1.5 cm 간격으로 방안을 표시한 페트리접시에 넣고 HEPES가 들어간 NCSU-23 세정 배지로 2~3회 세정하고, 회석하여 실체 현미경(Olympus, Japan) 하에서 난구세포가 3층 이상 부착되어 있고 세포질이 균일한 난포란을 선별하여 체외성숙 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙배양

본 실험에서 사용되는 대부분의 시약은 Sigma에서 구입하였다. 체외성숙용 배양액은 TCM199를 기본 배양액으로 하여 10% 돼지난포액, 0.57 mM cycteine, 10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml hCG, 10 ng/ml의 EGF를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 6 mm 이상 직경의 난포에서 난포액을 채취하여 3,000 rpm, -4°C의 저온에서 30분간 원심분리하고, 1.2 μ m 필터로 여과 후 0.45 μ m의 필터로 다시 여과하여 -20°C 냉동고에 보관하여 사용 전에 용해하여 사용하였다. 체외성숙 배양에는 4-well dish (Nunc, Denmark)를 사용하여 각 well 당 500 μ l의 TCM199 배양액을 넣어 배양을 실시하였다. 회수한 미성숙난자는 HEPES가 첨가된 NCSU23 배지로 3회 세정하고 TCM199 배양액으로 1회 세정하였다. 세정된 미성숙 난자는 각 well 당 50개씩 넣어 (39°C, 5% CO₂)의 배양기로 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양하고 이후에는 호르몬이 첨가되지 않은 배양액으로 1회 세정하고 22시간동안 배양하여 총 44시간 동안 체외에서 성숙 배양하였다.

3. 체외수정

1) 성숙란 준비

체외수정용 배양액은 modified Tris-Buffered Medium (mTBM)을 기본 배양액으로 하여 1 mM caffeine과 0.8 % BSA (A 6003, Sigma)가 함유된

mTBM 용액을 사용하였고 정액의 세정액으로는 5.6 mM fructose가 함유된 PBS 를 사용하였다. 44 시간 동안 체외성숙시킨 돼지 성숙란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 HEPES가 첨가된 NCSU-23 세정 배지에 넣어 연속적으로 피펫팅을 하여 난구 세포를 제거하고, mTBM 배양액으로 3회 세정하였다. 세정 후에 50 μ l의 수정용 배양액 소적에 15~20개의 성숙난자를 넣고 배양기 내에서 배양하였다.

2) 정자의 준비 및 수정능 획득

정액은 0.25 ml straw에 동결 보존되어 있는 정액을 사용하였다. 이 straw 를 39°C에서 1분간 용해하고 8 ml의 PBS로 희석하여 1,500rpm에서 2분간 2번 원심분리한다. 하단에 남은 정자 침전물을 mTBM 배양액을 넣고, 39°C, 5% CO₂ 그리고 포

화습도를 유지하는 배양기에 넣어 10분간 정치시킨다. 이 정치시킨 정자를 최종농도가 1.8×10^6 /ml 이 되도록 희석하고 각각의 수정용 배양액 소적에 5 μ l씩 분주한 후 39°C, 5% CO₂ 그리고 포화습도가 유지되는 배양기에서 6시간 동안 체외수정을 실시하였다.

4. 체외배양

체외배양에 사용한 배양액은 NCSU-23 배양액과 PZM 배양액을 사용하였다. 체외수정 6시간 후 HEPES가 포함된 세정용 NCSU-23 배지로 수정란을 pipetting하고 3회 세정하고, 배발달 배양액으로 1회 세정한 후 각각의 처리군으로 만들어진 30 μ l 소적에 각 소적 당 10개씩 넣어 39°C, 5% CO₂, 5% O₂ 그리고 포화습도가 유지되는 배양기 내에서 배양하여 체외 발달을 유도하였다. 체외배양 48시간 후 분할율을 조사하였고, 168시간 후 배반포 발달률을 조사하였다.

Table 1. Composition of basic used culture media

Components	Concentrations (mM)	
	NCSU-23	PZM
NaCl	108.73	108.00
KCl	4.78	10.00
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.70	-
KH ₂ PO ₄	1.19	0.35
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.19	0.40
NaHCO ₃	25.07	25.07
Glucose	5.55	-
Na-pyruvate	-	0.20
Ca-(lactate) ₂ · 5H ₂ O	-	2.00
L-Glutamine	1.00	1.00
Taurine	7.00	-
Hypotaurine	5.00	5.00
Basal Medium Eggle amino acids (ml/L)	-	20.00
MEM nonessential amino acids	-	1%
Gentamycin	0.05 mg/ml	0.05 mg/ml

실험 1)

체외수정 후 난자를 각각 다음과 같은 배양액에서 배양하였다.

- i) BSA가 첨가되지 않은 NCSU-23, ii) NCSU-23+BSA(4 mg/ml), iii) NCSU-23+10% FBS, iv) NCSU-23+PVA (3 mg/ml).

실험 2)

체외수정 후 난자를 각각 다음과 같은 배양액에서 배양하였다.

- i) BSA가 첨가되지 않은 PZM, ii) PZM+BSA(4 mg/ml), iii) PZM +10% FBS, iv) PZM + PVA (3 mg/ml).

실험 3)

체외수정 후 난자를 다음과 같은 배양액에서 배양하였다.

- i) BSA가 첨가되지 않은 NCSU-23, ii) NCSU-23+BSA(4mg/ml), iii) ii)의 처리군에서 96시간째 10% FBS를 첨가한 배양액

5. 통계학적 검증

본 실험 설계의 model effect를 검증하기 위하여, SAS program(Anon, 1992)에 포함된 log linear model을 이용하였다. 우선 Analysis of Variance (ANOVA) 법을 이용하여, 각 판정지표에서 model effect를 검증하였으며 유의적 효과가 발견되는 경우 least square mean을 이용하여 각 처리군의 효과를 보았다. 유의적 검증의 기준은 $p = 0.05$ 이하로 하였다.

결과 및 고찰

다양한 Macromolecules가 첨가된 NCSU-23을

기본 체외배양액으로 사용하였을 경우 수정란 발달을 표 2와 같다. BSA가 첨가된 배양액에서 2-세포기 발달율이 가장 높았으나(59.5% vs. 44.7 to 52.0%, $P < 0.01$), 배반포수정란 및 부화배반포 발달율에서는 유의적인 차이가 발견되지 않았다. PZM을 기본 체외배양액으로 사용하였을 경우 수정란 발달을 표 3과 같다. 실험 1의 결과와 같이 BSA가 첨가된 배양액에서 2-세포기 발달율이 가장 높았다 (54.4% vs. 40.65 to 44.5%, $P < 0.05$). 또한 배반포 (12.5% vs. 5.8 to 9.0%) 및 부화배반포 (1.88% vs. 0.65%) 발달 역시 BSA를 첨가하였을 경우 가장 높은 배발달율을 나타냈다. 배양소직에 첨가된

Table 2. Development of porcine *in-vitro* produced embryos cultured in NCSU-23 supplemented with various macromolecules

Macromolecules supplemented	No. of Oocytes cultured	No(%) ^a of oocytes developed to		
		2-cell	BL	HBL
Control	148	77 (52.02) ^{bd}	18 (12.16)	1 (0.76)
BSA (4mg/ml)	158	94 (59.49) ^{bc}	22 (13.32)	5 (3.16)
FBS (10%)	164	79 (48.17) ^d	16 (9.76)	2 (1.22)
PVA (3mg/ml)	152	68 (44.73) ^d	12 (7.89)	1 (0.66)

^a Number of the percentage of oocytes cultured.

^{bcd} $p < 0.01$.

Control: no supplementation of BSA, FBS and PVA.

BL: Blastocyst.

HBL: Hatched Blastocyst.

Table 3. Development of porcine *in-vitro* produced embryos cultured in PZM medium supplemented with various macromolecules

Macromolecules supplemented	No. of oocytes cultured	No(%) ^a of oocytes developed to		
		2-cell	BL	HBL
Control	155	69 (44.52) ^{bc}	9 (5.81) ^b	0 (0) ^b
BSA (4mg/ml)	160	87 (54.38) ^b	20 (12.5) ^c	3 (1.88) ^c
FBS (10%)	155	63 (40.65) ^c	14 (9.03) ^{bc}	1 (0.65)
PVA (3mg/ml)	161	71 (44.10) ^{bc}	11 (6.83) ^{bc}	0 (0) ^b

^a Number of the percentage of oocytes cultured.

^{bc} < 0.05 .

Control: no supplementation of BSA, FBS and PVA.

BL: Blastocyst.

HBL: Hatched Blastocyst.

FBS가 후기배 발달을 촉진하는지 알아보기 위하여 수행된 실험결과는 표 4와 같다. BSA 혹은 PVA의 첨가시 2-세포기 발달율이 가장 높았으며 (69.2 vs. 63.8% vs. 52.0%), 배반포기수정란 혹은 부화배반포 발달율은 차이를 보이지 않았다.

본 연구에서 사용한 배양액은 에너지원으로 쓰이는 6탄당의 조성에서 큰 차이를 보인다. NCSU-23은 Glucose (5.5 mM)를, 그리고 PZM은 pyruvate (0.2 mM)와 lactate (2 mM)를 에너지원으로 사용하며, 많은 연구보고에 의하면 pyruvate와 lactate는 초기배의 발육을 촉진하는데 반하여, glucose는 후기 배발달을 촉진한다고 밝혀져 있다(Gandhi 등, 2001; Lane 등, 2000; Thomson 등, 1993; Takahashi 등, 1992). NCSU-23을 사용하였을 때 첨가된 macromolecule에 따른 배반포 발생률 상에 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, PZM을 사용하였을 경우는 4 mg/ml의 BSA를 첨가한 실험군에서 가장 높은 배반포발달율 (12.5% vs. 5.8 to 9.0%)을 보인 것으로 보아, pyruvate와 lactate가 포함된 PZM 배양액은 후기배발달에 요구되는 에너지를 BSA로부터 얻는다는 것으로 판단된다. NCSU-23을 사용하여 배양 중 수정 후 96시간 쯤에 FBS를 첨가하였을 경우 배반포 발달율은 BSA가 첨가되어 있는 군 (12.16%)이 첨가되지 않은 군 (15.60%)보다 다소 높은 결과를 나타냈으나 유의적 차이는 나타나지 않았다. 소의 경우 후기배 단계 (5일)에 FBS를 첨가하였을 경우 배반포 발달율을 높인다는 보고가 있으나 (Dobrinsky 등, 1996),

본 연구에서는 그러한 경향을 나타내지 않은 것으로 보아 NCSU-23을 사용할 경우 수정 후 96시간 쯤에 첨가된 FBS의 배발달 촉진효과는 실험 1의 결과와 마찬가지로 glucose (5.5 mM)와 BSA에 의하여 상쇄되는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서 배양액 내 첨가된 macromolecule이 돼지 체외수정란의 체외 발달율에 미치는 영향과 배양소적 내 첨가된 FBS가 후기배발달에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 이에 대한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. NCSU-23을 기본 배양액으로 사용시 BSA (4 mg/ml), FBS (10%), PVA (3 mg/ml)가 각각 첨가되었을 경우 배발달에 큰 차이를 보이지 않았다.
2. PZM을 기본 배양액으로 사용시 BSA (4 mg/ml)가 첨가하였을 경우 2-세포 수정란 발달율과 배반포 발달율이 가장 높았으며, 이것은 NCSU-23에 비하여 PZM 배양액에는 후기배의 에너지원으로 사용하는 글루코스가 포함되어 있지 않기 때문으로 사료된다.

본 연구를 통하여 돼지 수정란의 체외배양에 사용되는 배양액은 종류와 조성에 따라 적절한 macromolecule이 첨가되어 초기배와 후기배의 발달을 모두 촉진시킬 수 있어야 함을 알 수 있었다.

Table 4. Effects of fetal bovine serum addition on development of porcine embryos

Macromolecules in NCSU-23 during (hours post insemination)		No. of oocytes cultured	No(%) ^a . of oocytes developed to		
0~96h	96~192h		2-cell	BL	HBL
No supplementation		148	77 (52.02)	18 (12.16)	1 (0.68)
BSA (4mg/ml)		250	173 (69.20)	39 (15.60)	5 (2.00)
BSA(4mg/ml)	BSA(4mg/ml) + FBS(10%)	672	429 (63.83)	125 (18.60)	21 (3.13)

^a Number of the percentage of oocytes cultured.

BL: Blastocyst.

HBL: Hatched Blastocyst.

참고문헌

- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS and Day BN. 1998. Maturation of *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol. Reprod., 58:1316-20.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS and Day BN. 1998. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. Mol. Reprod. Dev., 51:395-401.
- Beckmann LS and Day BN. 1993. Effect of medium NaCl concentration and osmolarity on culture of the early stage porcine embryo and viability of embryos cultured in a selected superior medium. Theriogenology, 39:611-622.
- Biggers JD, Summers MC and McGinnis LK. 1997. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. Hum. Reprod. Update., 3:125-135.
- Choi YH, Lee BC, Lim JM, Kang SK and Hwang WS. 2002. Optimization of culture medium for cloned bovine embryos and its influence on pregnancy and delivery outcome. Theriogenology, 58:1187-1197.
- Dobrinsky JR, Johnson LA and Rath D. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. Biol. Reprod., 55:1069-1074.
- Gandhi AP, Lane M, Gardner DK and Krisher RL. 2001. Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. Mol. Reprod. Dev., 58:269-275.
- Karja NW, Otoi T, Murakami M, Yuge M, Fahrudin M and Suzuki T. 2002. Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat IVF embryos. Reprod. Fertil. Dev., 14: 291-296.
- Lane M and Gardner DK. 2000. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryos. Biol. Reprod., 62: 16-22.
- Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro*-produced bovine morulae and blastocysts. Biol. Reprod., 55: 1383-1389.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. J. Reprod. Fertil. Suppl., 48:61-73.
- Pollard JW, Plante C and Leibi SP. 1995. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media. J. Fertil., 103:331-337.
- Rath D, Niemann H and Torres CRL. 1995. *In vitro* development to blastocysts of early porcine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. Theriogenology, 43:913-926.
- Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP and Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. Biol. Reprod., 68:236-243.
- Takahashi Y and First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology, 37:963-978.
- Thompson JG, Bell ACS, Pugh PA and Tervit HR. 1993. Metabolism of pyruvate by pre-elongation sheep embryos and effect of pyruvate and lactate concentrations during culture *in vitro*. Reprod. Fertil. Dev., 5:417-423.
- Wang S, Liu Y, Holyoak GR and Bunch TD. 1997. The effects of bovine serum albumin and fetal

bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. Anim. Repr-

od. Sci., 48:37-45.

(접수일 : 2003. 1. 10/ 채택일 : 2003. 4. 30)