

미성숙 돼지 난자가 다른 체외성숙·배양에 의한 배 발달률에 미치는 영향

안미현·홍대욱·석호봉[†]
단국대학교 생명자원과학대학 동물자원과학과

Effect of *In-Vitro* Fertilization of Porcine Matured Oocytes in Different IVM-IVC Culture Media on the Development of the Embryos

M. H. Ahn, D. W. Hong and H. B. Seok[†]

Department of Animal Science, College of Life Science, Dankook University, Cheonan

SUMMARY

This experiment was carried out to investigate the effects of different IVM-IVC culture media factors, such as development rates according to the maturation media, collecting times from slaughter to initiation of incubation and with cumulus cells, on *in vitro* maturation of oocytes collected from 3~5mm diameter follicles of the swine abattoir.

The development rates significantly($p<0.05$) higher when the oocytes were matured TCM-199 media than NCSU-23 media. In comparing with TCM199 medium in presence of Earle's salts and Hank's salt, there were no significantly differences between each salt balance in cleaved rate and in number of morulae plus blastocyst. Among 1,455 immature oocytes, 999(68.6%) of oocytes were cleaved. The number of development to the morulae and blastocysts were 617(61.8%) include 62 blastocysts(6.2%).

(Key words : *in vitro* maturation, TCM199, NCSU23, Earle's solution, Hank's solution, porcine)

서 론

난포란의 체외성숙에 관한 연구는 Pincus와 Enzmann(1935)에 의해 난포에서 채취한 토끼 난포란을 체외에서 배양하면 성숙분열이 재개된다는 보고에서 비롯되었다. 그 이후 실험동물, 대가축의 다수 동물종에서 난포란의 체외성숙, 수정의 연구가 행해져, 배이식에 의한 산자를 얻는데까지 성공하였으며, 이미 소에서는 실용화 단계에까지 진행

되고 있다. 특히 돼지에 있어서 미성숙 난포란의 체외성숙은 Edwards 등(1965)에 의하여 체외에서 43~46시간 동안 체외배양함으로써 제2성숙분열 중기(metaphase-II)에 도달한다는 것이 처음으로 보고된 이래, Motlik과 Fulka 등(1974)이 체외성숙과 체외수정을 최초로 시도하였고, Iritani 등(1978)이 체외수정을 처음으로 성공하였으며, Cheng 등(1986)에 의하여 성공적인 체외성숙 및 수정에 대한 실험법이 제시되었으며, Mattiolo 등(1989)이 최

본 연구는 2003년도 단국대학교 교내 연구비와 한국과학재단 지역대학우수연구과제(과제번호 2002 : R05-2002-000-00388-0)의 일부 지원으로 수행되었음.

[†] Correspondence : E-mail : hobong@dankook.ac.kr

초로 산자를 보고하였다.

그러나 돼지에 있어서는 체외성숙, 수정에 의해 산자를 얻은 예는 타 동물종에 비해 극히 적은 편이다. 돼지의 체외수정에는 소에 비해 다정자수정(polyspermy)이 빈번히 일어나고(Yoshida et al., 1989; Mattioli et al., 1989), 난자 내에서 정자의 응성전핵에의 발달이 불완전하기 때문에 그후의 수정란의 발생단계에서 체외 발육능 정지현상인 4-cell block이 일어나는 등, 난분할도 정상으로 진행되지 않는 어려움이 있다.

돼지의 미성숙 난포란의 성숙을 위한 배지는 일반적으로, modified TCM-199 성숙배지(Mattioli et al., 1989; Yoshida et al., 1990; Wang et al., 1991; 박병권 등, 1996)와 BSA(bovine serum albumin)-free NCSU-23 성숙배지가 많이 사용되고 있다. 초기에 TCM-199 성숙배지를 이용한 연구가 많이 보고되었으나, 그 효율이 낮은 것으로 알려졌으며, 이러한 점을 극복하고자 Petters와 Wells(1993)가 NCSU-23(Abeydeera et al. 2000; Petters와 Well, 1993; Wu et al., 2001; 구자민 등, 2003) 성숙배지를 개발하여 초기 수정란에 긍정적인 효과를 보고하였다.

그러나 돼지 난포란을 이용한 체외성숙과 배발달에 영향을 미치는 배양액에 관한 연구는 보고자에 따라 서로 다른 결과들을 제시하고 있으며, 그 논지도 일치하지 않아서 이에 대한 종합적인 연구가 절실히 필요한 실정이다.

이에 따라, 본 연구는 돼지 체외 수정란의 체외 배양체계의 확립에 대한 기초 자료를 확립하기 위하여 미성숙 돼지 난포란의 체외배양액 TCM-199와 NCSU-23을 달리하여 돼지 체외수정란의 체외 발육에 미치는 영향과 TCM-199의 두 조성 Hank's와 Earle's의 각각의 영향력에 대해서도 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난소 및 난포란의 채취

본 실험에 사용된 난소는 충남 (주) 사조산업 도축장에서 도축되는 암돼지로부터 채취하였다. 도살 직후 적출한 난소는 0.9% NaCl(30~35℃)에 담아 1~2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 그리고

재차 0.9% NaCl로 2회 세척한 다음, 38℃로 조정되어 있는 항온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

난포란의 채란은 20gauge 주사침이 장착된 10ml 주사기로 3~5mm 직경의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 15ml 원심분리관에 옮겨 38℃로 조정된 정온대에 10분간 정치, 난포란의 침전을 유도한 다음, 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 60×15mm petri dish 에 넣고 TL-Hepes와 희석하여 실제 현미경(20~40×)하에서 난세포질이 균일하고 난구세포의 부착 상태가 양호한 것만을 체외성숙에 이용하였다.

2. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란의 체외성숙은 TCM-199와 NCSU-23 각각의 배지에 첨가제를 첨부하였고, TCM-199 조성 중에서도 Hank's와 Earle's를 구분하여 사용하였다. 성숙 배양액은 4-well culture dish(Nunc, Denmark)에 0.6ml씩 분주하고 mineral oil로 피복한 후 2~3시간 동안 38.5℃, 5% CO₂로 조절된 CO₂ 배양기내에서 평형시킨 후 well당 40~0개의 미성숙 난포란을 적하하고 44시간 배양하여 성숙을 유도하였다. 체외 성숙 배양액들은 pH 7.4, 삼투압은 280~310 mOsmol로 조정하여 사용하였으며, 체외성숙 배양액에 첨가하였던 돼지 난포액(porcine follicular fluid; pFF)은 직경이 3~5mm의 포상난포에서 난포액을 흡인한 다음 15ml 원심분리관에 주입, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 0.45µm millipore filter로 여과한 후 분주하여 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

3. 정자의 준비 및 체외수정

각각의 성숙 배지에서 체외배양시킨 난포란들은 0.1% hyaluronidase가 포함되어 NaCl 113.1mM, KCl 3.0mM, CaCl₂ 10.0mM, Tris 20.0mM, Glucose 11.0mM, Na-pyruvate 5.0mM, Gentamycin 50 µg/ml, 0.4% BSA(fatty acid free, Sigma), Caffeine 5mM이 함유되고 pH 7.8, 삼투압 260~280 mOsmol로 조정된 modified Tris-buffered medium(mTBM)에 노출시켜 cumulus cells를 제거한 뒤, 0.1% hyaluronidase가 함유되지 않은 mTBM배지에 세 번 세척하였다. 그리고 4-well culture dish에 mTBM

배지를 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 2~3시간동안 39°C, 5% CO₂로 조절된 CO₂ 배양기 내에서 하루 전부터 충분히 평형시킨 수정배지에 well당 40~50개의 성숙 난포란을 적하하고 수정전 약 30분간 CO₂ 배양기에서 평형시켰다. 체외수정을 위한 정자는 동결 정액을 Percoll 처리를 한 후에 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유지시킨 정자 부유액을 성숙 난포란에 주입하여 6시간 매정시켰다.

4. 체외배양 및 수정란의 관찰

체외수정시킨 수정란들은 수정 6시간 후 난자에 붙어있는 cumulus cell을 0.1% hyaluronidase을 이용해서 완전히 제거 후 0.5% BSA가 함유하고, pH 7.4, 280~300 mOsmol로 조절된 NCSU-23 media에 세 번 세척하고 4-well culture dish에 NCSU-23 media를 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 2~3시간 동안 39°C, 5% CO₂로 조절된 CO₂ 배양기 내에서 평형시킨 배지에 수정란들을 48시간 동안 배양시켰다. 그 후 48시간째 배발달이 시작된 난자들만 따로 모아 0.1mg/ml cysteine, 10IU/ml eCG, 10IU/ml hCG, 10ng/ml EGF, 0.4% BSA, 10% FBS, 10% pFF가 첨가된 NCSU-23에 옮겨서 체외 배발달을 유도하였다. 배발달이 시작된 이래 매일 같은 시간에 수정란의 할구 분할율을 육안으로 검정하여 조사하였으며, Hinrichs 등(1993)의 방법에

따라 난자급속염색법으로 염색하여 정자의 침입, 자·응전핵형성, cell cleavage, morulae 와 blastocyte 등의 수정과 배 발달 여부를 각각 확인하였다.

5. 통계분석

본 연구에서는 각 처리구에 대하여 4회 이상 반복실험을 실시하였으며, 얻어진 모든 실험결과와 통계처리는 SAS package(1996)를 이용하여 분산 분석을 하였으며, 처리간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

돼지 미성숙 난포란을 TCM-199 과 NCSU-23 배양액에 각각의 supplement를 첨가하여 5% CO₂의 조건 하에서 체외성숙을 유지한 후 체외 수정용 배양액인 mTBM에 6시간 동안 체외 수정을 유지하여 NCSU-23 culture media에 배양한 결과는 Table 1과 같다.

TCM-199과 NCSU-23에 각각 배양한 결과 morulae와 blastocyte의 배발달률이 TCM-199배양에서 유의성(P<0.05)이 검증되었다. 또한 전체평균에서 수정란 배발달은 TCM-199와 NCSU-23 배양간에 각각 73%와 61%로서 유의적(P<0.05)인 결과를 나타냈고, 그중 morulae는 58.6%와 37.8%였으며, blastocysts는 6.7%와 4.4%로 TCM-199 배양액

Table 1. Effect of two different IVM-IVC culture systems on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Medium (IVM/IVC)	No. of oocytes examine	No. of oocytes cleaved (%)	No. of embryos(%)				Morulae plus blastocysts (%)
			2~4 cells	8~16 cells	Morulae	Blastocysts	
TCM199-NCSU23	304	222±8.8 (73.0)	44 (19.8)	33 (14.9)	130 (58.6)	15 (6.7)	145 ^a ±14.5 (65.3)
NCSU23-NCSU23	295	180±15.7 (61.0)	39 (21.7)	65 (36.1)	68 (37.8)	8 (4.4)	76 ^b ±3.8 (42.2)
Total	599	402 (67.1)	83 (20.6)	98 (24.4)	198 (49.3)	23 (5.7)	221 (55.0)

^{ab} : Values with different superscripts with columns are significantly different(p<0.05).

Mean± standard error.

Experiments were repeated twelve times.

에서 배양한 수정란이 높은 성적을 나타내었다. Morulae와 blastocyst의 배발달을 합해서 비교해보면, TCM-199 배양액에서 65.3%, NCSU-23 배양액에서 42.2%로, TCM-199 배양액에서 유의적인 차이를 나타내었다. 또한, 전체평균 측면에서 살펴보면, 다정자침입률에 있어서 TCM-199와 NCSU-23배양 간에는 각각 27%와 39%로서 TCM-199 배양액에서 유의적($P<0.05$)인 결과를 나타내었다. 따라서 돼지 난포란의 성숙시 체외 성숙용 배양액으로는 TCM-199 배양액이 적합한 것으로 생각된다.

체외 성숙용 배양액 TCM-199의 Earle's salt와 Hank's salt의 조성 성분에 따른 미성숙 돼지 난포란의 배발달률은 Table 2와 같다.

처리구간 수정 후 8~16 cell의 세포분할율은 (17.5~16.5%)에는 별 차이를 나타내지 않았고, morulae와 blastocyst의 전체적 배발달률은 Earle's와 Hank's 배양액이 각각 72.1%와 58.7%로서 Earle's 처리구가 Hank's에 비하여 큰 수치의 차이가 있었으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 이 차이는

각 배양액의 염 성분의 차이로 인한 배발달률에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

전체적인 미성숙 돼지 난포란의 세포분할률과 배발달률은 Table3과 같다. 총 1,455개의 미성숙 난포란 중에서 999(68.6%)개가 분화되었고, 그중 blastocyst의 62개(6.2%)를 포함한 morulae와 blastocyst의 전체 배발달은 617개로 61.8%의 배발달률을 보였다.

이상의 결과로 돼지 미성숙 난포란으로 부터 효과적인 체외 배발달을 얻기 위한 배양조건은 TCM-199의 체외성숙과 NCSU-23의 체외배양이 NCSU-23의 체외성숙과 NCSU-23의 체외배양보다 유리하였다. 또한 TCM-199의 체외성숙에 필요한 salt solution은 Hank's보다 Earle's salt의 구성성분에 의한 배양조건이 더욱 적합한 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 미성숙 돼지난자가 체외성숙·배양

Table 2. Effect of TCM199 medium in presence of Earle's salt and Hank's salt on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Salts balance supplement	No. of oocytes examine	No. of oocytes cleaved (%)	No. of embryos(%)				Morulaes plus blastocysts (%)
			2~4 cells	8~16 cells	Morulaes	Blastocysts	
Earle's	492	338±13.7 (68.7)	35 (10.4)	59 (17.5)	220 (65.1)	24 (7.0)	244±9.4 (72.1)
Hank's	364	259±4.3 (71.2)	47 (13.0)	60 (16.5)	137 (52.9)	15 (5.8)	152±5.4 (58.7)
Total	856	597 (69.7)	82 (13.7)	119 (19.9)	357 (59.8)	39 (6.5)	396 (66.3)

* No significantly differences between Earle's and Hank's salt balance statistically.

Mean± standard error. experiments were repeated twelve times.

Table 3. Summary of *in vitro* maturation and development rates of porcine IVM/IVF embryos

Total No. of medium contained	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos(%)				Morulae and blastocyst(%)
		2~4cells	8~16cells	Morulae	Blastocysts	
1,455	999 (68.6)	165 (16.5)	217 (21.7)	555 (55.6)	62 (6.2)	617 (61.8)

액인 TCM-199과 NCSU-23배지에서의 배양상태를 비교하였고, 체외성숙용 TCM-199배지에 Earle's salt와 Hank's salt의 첨가에 의한 세포분화와 배발달 상태를 각각 조사하였다.

1. TCM-199와 NCSU-23 배양액에 각각의 supplement를 첨가하여 5% CO₂ 조건하에서 체외성숙을 유기한 결과, TCM-199 배양액에서 유의성(p<0.05)이 검증되었다.
2. 체외성숙용 TCM-199배지의 Earle's salt와 Hank's salt의 조성 성분에 따른 미성숙 돼지 난포란의 배발달률은 Earle's가 Hank's보다 약간 높았으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.
3. 총1,455개의 미성숙 난포란 중에서 999(68.6%)개가 세포분화를 나타내었고, 그중blastocyst의 62개(6.2%)를 포함한 617개(61.8%)의 morulae와 blastocyst의 배발달을 보였다.

참고문헌

- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Cantley A and Murphy CN. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*, 54:787-797.
- Byun TH and Shim KS. 1989. The effect of culture media on the *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. *Korean J. Anim. Sci.*, 31(6): 363-372.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
- Foote WD and Thibault C. 1969. Investigations on *in vitro* maturation of cow and pig oocytes. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 9:329.
- Fukui Y and Sakuma Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* : Relation to ovarian activity, follicular size and presence of cumulus cells. *Biol. Rep.*, 22:669-672.
- Hillensjo T, Channing CP, Promerantz SH and Kripner AS. 1979. Intrafollicular control of oocyte maturation in the pig. *In vitro*, 15(1): 32-39.
- Hunter RHF and Polge C. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fert.*, 12:525-531.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:379-383.
- Leibfried L and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
- Mattioli M, Ealeati ML and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocyte mature on fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1207.
- McGaughey RW. 1978. *In vitro* oocyte maturation. In *Methods in Mammalian reproduction*(eds., Daniel, J. C. Jr.). Academic press, New York, pp. 1-20.
- McGaughey RW and Polge C. 1971. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *In vitro*. *J. Exp. Zool.*, 176:383-396.
- Minato Y and Toyoda Y. 1982. Effects of homologous serum and follicular fluid on the cumulus expansion and maturation division of porcine oocyte-cumulus complexes *in vitro*. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 53:515-520.
- Motlik J and Fulka J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 36:235-237.
- Motlik J and Fulka J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 198:155-162.
- Motlik J, Fulka J and Flecton JE. 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 76:31-37.
- Nagai T, Niwa K and Iritani A. 1984. Effect of sperm concentration during preinucubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig

- follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 70:271-275.
- Petters, Wells RM and KD. 1993. Culture of pig embryos. Journal of reproduction and fertility, 48:61-73.
- Pincus G and Enzmann EV. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. J. Exp. Med., 62:655-657.
- Sato E, Iritani A and Nishikawa Y. 1977. Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. Jap. J. Anim. Reprod., 23:12-18.
- Sato E, Iritani A and Nishikawa Y. 1978a. Rate of maturation division of pig follicular oocytes cultured *in vitro*. Jap. J. Zootech. Sci., 49:400-405.
- Sato E, Iritani A and Nishikawa Y. 1978b. Maturation and activation of cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. Jap. J. Zootech. Sci., 49:236-242.
- Shea BF, Latour JPA, Bedrin KN and Baker RD. 1976. Maturation *in vitro* and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
- Song HB and Iritani A. 1987. Studies on *in vitro* maturation of follicular oocytes in the immature goats. Korean J. Anim. Sci., 29:303-309.
- Staigmiller RB and Moor RM. 1984. Effect of follicular cells on the maturation and developmental competence of bovine oocyte matured outside the follicle. Gamete Res., 9:221-229.
- Toyoda Y and Chang MC. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of such eggs following transfer. J. Reprod. Fert., 36:9-22.
- Tsafriri A and Channing CP. 1975. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert., 43:149-152.
- Yoshida M and Kojima Y. 1989. Male pronuclear formation by boar spermatozoon with hairpin-curved tail in zona-free hamster egg. Jpn. J. Vet. Sci., 51(2):428-430.
- Wang ZK, Wei PH, Wang JZ, Lei C and Kou MQ. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. Theril., 37:733-739.
- Wu Emery J and Carrell R DT. 2001. *In vitro* growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. Theriogenology, 64:375-381.
- 박병권, 이규승, 박창식, 서길웅. 1996. 배양액 및 난포액이 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 20(3):289-297.
- 구자민, 류영준, 이유진, 김대영, 김순웅, 강성근, 이병천, 황우석. 2003. 다양한 배지에서 장시간 배양에 의한 돼지 난자의 단위발생 유도. 한국수정란이식학회지, 18:69-73.

(접수일: 2003. 12. 2/ 채택일: 2003. 12. 24)