

여러 가지 배양조건에서 돼지 난포란의 체외수정 및 체외발달에 관한 연구

김재영^{1†} · 박항¹ · 김재명² · 이정형² · 박홍대
대구대학교 식품·생명·화학공학부

Studies on the *In Vitro* Fertilization and *In Vitro* Development of Porcine Embryos in Different Culture System

J. Y. Kim^{1†}, H. Park¹, J. M. Kim², J. H. Lee² and H. D. Park
Division of Food, Biological and Chemical Engineering, Daegu University

SUMMARY

The objective of this study was to optimize the selection of sperm, optimal culture system of *in vitro* derived porcine embryos. The results obtained were summarized as follows:

1. When oocytes were inseminated with liquid sperm and frozen-thaw sperm, the cleavaged rate of liquid sperm (46.2%) was higher than that of frozen-thaw sperm (39.7%), however there were not show significant different each other. The blastocyst rates of liquid sperm (15.8%) was significantly higher than that of frozen-thawed sperm (9.3%)($P < 0.05$).
2. When oocytes were inseminated with epididymal sperm after 1, 2 and 3 day storage, the cleavaged rate of epididymal sperm after 1, 2 and 3 day storage was 60.5, 61.0 and 56.8% respectively. The morulae (17.4, 19.9 or 17.3%) and blastocyst (8.7, 15.4, 11.3%) rate of epididymal sperm after 1, 2 and 3 day storage was no significantly respectively($P < 0.05$).
3. *In vitro* developed to cleavaged rate of G1.3/G2.3 media used for culture was significantly($P < 0.05$) higher as 62.1% compared with the results using the media NCSU23(52.8), however *in vitro* developed to blastocyst rate of NCSU23(11.6%) media was significantly($P < 0.05$) higher than that of G1.3/G2.3(4.7%).
4. When the fertilized oocytes were cultured with NCSU23 in addition to 1 mM glutathione(GSH), the cleavaged rate of treated groups of GSH(62.3%) was significantly higher than that of control(53.5%) respectively($P < 0.05$). And *in vitro* developed to blastocyst rates of treated groups of GSH(15.6%) was higher than that of control(12.6%) however, there was no significant difference($P < 0.05$).

(Key words : porcine embryos, culture system, sperm, glutathione(GSH))

서 론

체외수정기술은 우수형질보유 개체생산, 번식

¹ 차병원 여성의학연구소 불임의학연구소(Infertility Medical Center of CHA General Hospital)

² 포천중문외과대학교 (College of Medicine, Pochon CHA University)

† Correspondence : E-mail : jrf99@hanmail.net

효율의 극대화를 위해서 근래에 와서 널리 이용되고 있지만 효율적으로 수행하고 보급하기 위해서는 다수의 수정란을 확보하는 것이 가능해야 한다.

돼지 수정란의 체외성숙에 관한 연구는 다른 동물에 비해 늦게 성공되어서 Edward 등 (1965)에 의해 돼지 미성숙난포란의 체외성숙은 43~46시간 동안 체외배양함으로써 제2 성숙 분열중기(Metaphase-II, M-II)에 도달한다는 것이 처음 보고되었고 체외수정은 Iritani 등(1978)이 처음으로 성공거둔 이래 1989년에 이르러서 Mattioli 등(1989)에 의해 미성숙난포란을 이용해 체외성숙, 체외수정 및 체외수정란 이식에 의해 산자를 생산하였다. 그러나 돼지에 있어서는 체외성숙, 수정에 의해 산자를 생산하는 것이 타 동물에 비해 극히 적은 편이다. 이는 타 동물에 비해 성숙시간이 길며 이로 인해 불완전한 성숙이 유기된 체외성숙난자를 수정을 하였을 때 소에 비해 다정자수정(Polyspermy)이 높고(Yoshida 등, 1989; Mattioli 등, 1989), 응성전 핵형성율이 낮고, 4-세포기에 발달이 정지되는 체외발생능 정지 현상(Jarrel 등, 1991; Schoenbeck 등, 1992) 등이 체외수정란의 이용성을 감소시키고 있다.

체외수정시 Nagai 등(1988)은 사출된 정자보다 정소상체미부 정액이 체외수정율이 높다는 보고가 있고 Zheng 등(1992)은 동결정액이 신선정액보다 수정율이 높고 다정자침입율이 낮다고 하여 여러 연구자들 간에 많은 견해가 있다. 그리고 체외발달에 있어서 돼지의 체외배양을 위한 배지는 일반적으로 NCSU23을 사용하지만 G1.3/G2.3은 Human embryos를 배양하기 위한 배지로 사용되지만 다른 종, 즉 bovine(Krisher RL 등, 1993), caprine(Borrmann CL 등, 2000; Ongeri EM 등, 2000)에서도 배 발달을 향상시킨다는 보고가 있다. 한편 체외배양 조건에서 발생하는 유리기(free radical)를 제거하여 난포란의 배 발달을 높이기 위한 수단으로 비효소계 항산화제인 황화합물(thiol compounds)인 glutathione(GSH)을 첨가 배양하는 방법 등이 연구되어지고 있다(Meister 등, 1983; Lafleur 등, 1994). 이와 같은 것들이 보고되어지고 있지만 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙, 수정 및 체외발달에 관한

연구 결과가 만족할 수준에 이르지 못하고 있다.

따라서 본 연구는 돼지 체외수정란의 생산에 있어 체외배양체계 확립하기 위한 기초 자료로서 정액에 따른 차이, 체외배양액의 종류 그리고 체외배양시 항산화제 첨가 등에 따른 체외수정율과 체외발달율을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 배지

본 실험에 사용된 기초배지로서 난소로부터 난포란 회수용은 25 mM HEPES와 3 mg/ml BSA(Sigma, A6003)가 첨가된 TALP(HEPES-TALP)용액, 미 성숙난자의 체외성숙용 배지는 TCM-199(Gibco, 12340-030)를 기본 배양액으로 하여 10% porcine follicular fluid(pFF), 0.2 mg/ml pyruvate, 0.6 mM cysteine, 10 ng/ml epidermal growth factor(EGF), 1 µg/ml β-estradiol, 1 µg/ml FSH를 첨가하여 사용하였다. 체외수정용 배양액은 1 mg/ml BSA와 2.5 mM caffeine sodium benzonate를 첨가한 modified tris-buffered medium(mTBM)을 사용하였다(Abeydeera 등, 1997). 한편 체외배양에 사용한 기초배양액은 0.4% BSA(Sigma, A6003)를 첨가한 NCSU23(North Caroline State University 23)배양액을 사용하였다.

2. 공시 난포란의 회수 및 체외성숙

본 실험에 공시된 난포란은 도축장에서 도축된 돼지의 난소로부터 회수하였다. 난소는 25 µg/ml gentamycin(Sigma, G3632)이 함유된 25~30°C의 생리 식염수(0.9% NaCl)가 담긴 보온병에 보관하여 2~3시간 내에 실험실로 운반하였다. 난소의 표면을 생리 식염수로 2~3회 세척한 다음, 18-gauge가 부착된 10 ml 주사기로 직경 3~6 mm 난포로부터 난포란을 채취하였다. 채취된 난포란 중 실체 현미경하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 난포란을 선별하여 체외성숙 실험에 공시하였다.

난포란의 체외성숙용 배양액은 0.2 µm syringe filter로 여과시킨 후 4-well dish(Nunc, Denmark)에 500 µl씩 분주하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 12~

16시간 평형시켰으며, 성숙배양시 각 소적당 50개의 난포란을 넣어 42~44시간 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

3. 체외수정

1) 성숙란 준비

체외수정용 배양액은 mTBM을 사용하였다. 44시간동안 체외성숙시킨 돼지 성숙란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 TALP 용액에 넣어 연속적으로 피펫팅을 하여 난구세포를 제거하고, mTBM 배양액으로 3회 세정한 후 수정에 제공하였다. 체외수정은 35 mm petri dish에 mineral oil로 피복된 50 μ l의 mTBM 용액 소적에 25~30개씩의 성숙난자를 넣고 배양기 내에서 배양하였다.

2) 정자의 준비 및 체외수정

본 실험에 사용된 정액은 액상정액과 동결정액 그리고 정소상체미부 정액을 사용하였다. 액상정액은 동부 A·I CENTER(대구 달성군 구지면 소재)에서 제작된 희석정액을 사용하였으며 17°C에 보관되어 3일 이내에 사용되었다. 동결정액은 39°C에서 1분간 용해후 사용하였으며 정소상체 미부 정액은 도살되는 성숙한 수퇘지를 도살 직후 2~3개의 다른 개체의 정소상체 미부를 2시간 내에 실험실로 운반하여 항생제가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척한 다음 정소상체미부의 표피를 절개하여 정액을 얻었다. 각각의 정액은 15 ml 원심분리관(Falcon, 2097)에 담겨져 있는 2 ml의 90% percoll, 45% percoll위에 조심스럽게 놓고 500 \times g에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하였다. 회수한 정자괴를 1 mg/ml BSA(Sigma A6003), 100 μ g/ml penicillin(Sigma, P3032) 그리고 75 μ g/ml streptomycin(Sigma, S9137)이 함유된 DPBS(Gibco. Cat. No. 14287-080)에 2회 정도 반복하여 500 \times g로 5분간 원심분리하여 세척 후 상층액을 제거하고 회수한 정자괴를 수정용 배양액인 mTBM으로 정자의 최종농도를 5 \times 10⁵/ml이 되도록 희석하고, 각각의 mTBM 용액 소적에 50 μ 씩 분주한 후 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 동안 체외수정을 실시하였다.

4. 체외배양

6시간 동안 체외수정이 유도된 난자는 TALP 용액으로 3회 정도 pipetting하고, NCSU23 배양액으로 2~3회 세척한 후 35 mm petri dish에 mineral oil로 피복된 50 μ l의 체외배양액에 25~30개 정도의 난자를 넣은 후 체외배양 48시간 후 분할율을 조사하였고, 168시간 후 배반포율을 조사하였다.

5. 실험설계

1) 실험 1

액상 정액과 동결 용해된 정액을 가지고 체외수정을 유도시 분할율과 배반포 발달율을 비교하였다.

2) 실험 2

부고환 유래의 정액을 보관하는 시간에 따른 분할율과 배반포 발달율을 비교하였다.

3) 실험 3

체외배양시 기초배양액인 NCSU23과 처리군인 G1.3/G2.3용액을 이용하여 배양시 그에 따른 분할율과 배반포 발달율을 비교하였다.

4) 실험 4

체외배양시 1 mM Glutathione의 첨가시 분할율과 배반포 발달율을 비교하였다.

6. 통계처리

실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 정액에 따른 체외수정율과 배발달율

체외성숙란을 액상정액과 동결정액을 사용하여 정액에 따른 체외수정율과 체외발달율은 Table 1과 같다.

분할란을 기준으로 수정능력을 판단하였을 때 액상정액과 동결정액과의 수정율은 각각 46.2 및 39.7%로써 액상정액을 이용한 것이 수정율이 높았

지만 유의적($P < 0.05$)인 차이는 없었다. 한편 배반포의 배발달율은 액상정액이 동결정액보다 유의적($P < 0.05$)인 차이는 존재하였다.

Zheng 등(1992)은 동결정액을 이용하여 체외수정을 실시하였을 때 68%의 수정율을 얻었지만, 이중 20~50%가 다정자 침입에 의한 것이라고 보고하였다. 따라서 본 결과를 볼 때 정액이 체외수정율에 있어서는 영향을 미치지 않는 것으로 보이지만 체외발달율에서는 영향을 미치는 것으로 사료된다.

2. 정소상체 미부 정액의 보관시간에 따른 체외수정율과 배발달율

정소상체 미부에서 회수한 정액을 17°C에서 보관후 보관시간에 따른 수정율과 배발달율은 Table 2와 같다.

분할란을 기준으로 수정능력을 판단하였을 때 정소상체 미부 정액을 day 1, 2, 3 보관후 체외수정율은 각각 60.5, 61.0 및 56.8%로서 2일째 보관했을 때가 높았지만 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없

었다. 또한 상실배와 배반포기까지의 배발달율에서도 2일째 보관했을 때가 높았지만 유의적($P < 0.05$)인 차이는 없었다.

따라서 본 연구에서는 정액을 3일째까지 보관후 사용하더라도 수정율과 배발달율에 대해서는 별 차이가 존재하지 않는다는 것을 알 수 있다.

3. 체외수정란의 생산을 위한 체외배양액의 비교
체외수정을 유도한 수정란을 NCSU-23와 G1.3/G2.3으로 각각 배양액을 달리하여 체외발달을 유도하였을 때 결과는 Table 3과 같다.

NCSU-23와 G1.3/G2.3으로 나눠 배양시 분할율과 상실배기까지의 배발달율은 각각 52.8, 62.1%와 16.0, 28.9%로서 G1.3/G2.3에서 유의적($P < 0.05$)인 차이로 높았다. 그러나 배반포기로의 배발달율은 각각 11.6와 4.7%로서 NCSU-23에서 유의적($P < 0.05$)인 차이로 높았다.

Swain 등(2001)은 NCSU-23와 G1.3/G2.3으로 나눠 체외발달을 유도하였을 때 분할율(74%)과 배반포율(14.6%)이 G1.3/G2.2(67.8%와 7.8% 각각)보

Table 1. The rate of fertilization and embryonic development of porcine oocytes fertilized with liquid semen and frozen-thawed semen

Kind of sperm	No. of oocytes examined	No. of embryos cleaved(%)	No. of embryos developed to	
			Morulae(%)	Blastocyst(%)
Liquid sperm	219	101(46.2) ^a	17(16.8) ^a	16(15.8) ^a
Frozen-thawed sperm	136	54(39.7) ^a	12(22.2) ^a	5(9.3) ^b

^{ab} With columns, values with different superscripts differ at $p < 0.05$.

Table 2. The rate of fertilization and embryonic development of porcine oocytes by epididymal sperm storage period

Epididymal sperm storage period(day)	No. of oocytes examined	No. of embryos cleaved(%)	No. of embryos developed to	
			Morulae(%)	Blastocyst(%)
1	190	115(60.5) ^a	20(17.4) ^a	10(8.7) ^a
2	223	136(61.0) ^a	27(19.9) ^a	21(15.4) ^a
3	234	133(56.8) ^a	23(17.3) ^a	15(11.3) ^a

^a Values with same superscripts were not significantly different ($p < 0.05$).

Table 3. Comparison of developmental ability of porcine oocytes cultured in NCSU23 vs G1.3/G2.3

Culture system	No. of oocytes examined	No. of embryos cleaved(%)	No. of embryos developed to	
			Morulae(%)	Blastocyst(%)
NCSU23	343	181(52.8) ^a	29(16.0) ^a	21(11.6) ^a
G1.3/G2.3	441	274(62.1) ^b	79(28.9) ^b	13(4.7) ^b

^{ab} With columns, values with different superscripts differ at $p < 0.05$.

다 높았다고 보고하였다. 본 연구결과와는 다소 차이를 보였으나 배반포기까지의 배발달은 NCSU-23이 G1.3/G2.3보다 효율적이라는 것은 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 상실배까지는 G1.3/G2.3가 NCSU-23배양액을 대체할 수 있을 것으로 사료된다.

4. Glutathione(GSH)의 첨가배양이 체외배양에 미치는 영향

체외수정을 유도한 수정란을 1 mM의 GSH가 첨가된 배양액인 NCSU-23에서 배양시 분할율과 배발달율은 Table 4와 같다.

분할율에서는 GSH가 첨가된 군에서 유의한 차로 GSH가 첨가되지 않은 군보다 유의적($P < 0.05$) 인차로 높았지만, 상실배나 배반포기까지의 배발달율은 GSH가 첨가되지 않은 군보다 높았지만 유의적($P < 0.05$)인 차는 존재하지 않았다.

Glutathione(GSH)은 포유동물의 세포에서 주된 thiol화합물로서 세포의 증식, 아미노산의 수송, 여러 화합물의 이황화결합의 환원 및 oxidative stress로부터 세포를 보호한다고 Kosower(1978), Meister 등(1983) 및 Lafleur 등(1994)이 보고하였고 더욱

이 Calvin 등(1986)은 미성숙난포란의 성숙시 합성되어 수정시 응성전핵 형성을 촉진한다는 마우스를 가지고 실험한 결과를 보고한 것이 있고 Luvoni 등(1996)은 소수정란의 미성숙난자를 체외성숙시 1 mM GSH를 첨가해서 배양한 군이 무첨가군에 비하여 수정율이 증가(66.2, 57%)하였고 배반포율에서도 첨가군이 무첨가군보다 높았다고 보고하였다(18.2, 9%). 따라서 본 연구에서는 체외배양시 GSH첨가가 난 분할율과 배발달율을 향상시킨다고 사료된다.

적 요

본 연구는 돼지 체외수정란의 생산에 있어서 체외배양체계를 확립하기위해 정액의 차이와 보관시간에 따른 체외수정란자의 체외수정 및 체외발달율을 조사하였고, NCSU23와 G1.3/G2.3 배양액으로 체외배양시 분할율과 체외발달율을 조사하였고, 체외배양액에 GSH를 첨가시 배발달율을 조사하였다. 본 연구에서 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 액상정액과 동결정액을 사용하여 정액에 따른 체외수정율은 각각 46.2 및 39.7%로써 액

Table 4. Effect of the addition glutathione(GSH) on *in vitro* development of porcine oocytes

Addition of GSH	No. of oocytes examined	No. of embryos cleaved(%)	No. of embryos developed to	
			Morulae(%)	Blastocyst(%)
-	357	191(53.5) ^a	40(20.9) ^a	24(12.6) ^a
+	472	294(62.3) ^b	59(20.1) ^a	46(15.6) ^a

^{ab} With columns, values with different superscripts differ at $p < 0.05$.

- 상정액을 이용한 것이 수정율이 높았지만 유의적($P < 0.05$)인 차이는 없었다. 한편 배반포로의 발달율은 액상정액이 동결정액보다 유의적으로 높았다. ($P < 0.05$)
2. 정소상체미부 정액을 day 1, 2, 3 보관후 체외 수정을 유도하였을 때 수정율은 각각 60.5, 61.0 및 56.8%로서 2일 동안 보관후 사용하였을 때가 높았지만 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다. 또한 상실배와 배반포기까지의 배 발달율에서도 2일 동안 보관후 사용하였을 때가 높았지만 유의적($P < 0.05$)인 차이는 없었다.
 3. NCSU-23와 G1.3/G2.3으로 나뉜 배양시 분할율과 상실배기까지의 배 발달율은 각각 52.8, 62.1%와 16.0, 28.9%로서 G1.3/G2.3에서 유의적($P < 0.05$)인 차이로 높았다. 그러나 배반포기까지의 배 발달율은 각각 11.6와 4.7%로서 NCSU-23에서 유의적으로 높았다. ($P < 0.05$)
 4. NCSU-23을 기본 배양액으로 하여 1 mM GSH가 첨가된 군의 분할율은 62.3%로서 GSH가 첨가되지 않은 군 53.5%보다 유의적($P < 0.05$)인 차로 높았지만, 상실배나 배반포기까지의 배 발달율은 GSH가 첨가되지 않은 군보다 높았지만 유의적($P < 0.05$)인 차는 존재하지 않았다.

참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 57:729-734.
- Bormann CL, Ongeri EM and Krister RL. 2000. Effects of vitamins on maturation of caprine oocytes and their subsequent developmental capacity *in vitro*. *Biol. Reprod. Abst.*, 62(Suppl 1):166.
- Calvin HI, Grosshans K and Blake EJ. 1986. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Research*, 6:107-114.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 54:379-383.
- Jarrell VI, Day BN and Prather RS. 1991. The transition from maternal to Zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Suscrofa*: Quantitative aspects of protein synthesis. *Biol. Reprod.*, 44:62-68.
- Krisner RL, Lane M and Bavister BD. 1993. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi defined and defined culture media, *Biol. Reprod.*, 60:1345-1352.
- Kosower NS and Kosower EM. 1978. The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.*, 54:109-160.
- Lafleur MVM, Hoorweg JJ, Westmijze EJ and Retel J. 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free. Radic. Res.*, 21:9-17.
- Luvoni GC, Keskinetepe L and Brakett BG. 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:437-443.
- Mattioli M, Ealeati ML and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocyte mature on fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1207.
- Meister A and Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52:711-760.
- Nagai T, Takahasi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fulushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 84:585-591.
- Ongeri EM, Bormann CL, Butler R, Mellican D,

- Schaller E, Blash S, Behboodi E, Krisher RL. 2000. Biol. Reprod. Abst., 62(Suppl 1):322.
- Schoenback RA, Peters MS, Rickords LF, Stumpf TT and Prather RS. 1992. Characterization of deoxyribonucleic acid synthesis and the transition from maternal to embryonic control in the 4-cell porcine embryos. Biol. Reprod., 47:1118-1125.
- Swain JE, Bormann CL and Krisher RL. 2001. Development and viability of *in vitro* derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. Theriogenology, 56:459-469.
- 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.
- Zheng YS, Fiser SP and Sirard MA. 1992. The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for *in vitro* fertilization of porcine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 38: 1065-1075.
-
- (접수일: 2004. 1. 16/ 채택일: 2004. 4. 16)