

체외성숙·체외수정된 소 난자의 발육에 미치는 배양액의 영향

김 종 흥

울산 모자병원 불임연구소

I. 서 론

체외수정과 수정란 이식(In Vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)의 결과인 수태율에 영향을 미치는 예후인자에는 개체의 연령, 과배란 유도제의 종류 및 개체반응, 시술자의 숙련도 및 이식되는 배아의 질(quality)등 여러 요인을 들 수 있겠으나 그 중에서도 배아의 질 즉, 생체내 배아 발달 단계상 자궁 내막의 배아 수용능력에 알맞는 발달 단계(상실배~포배기)까지 체외에서 발육시키는 문제가 동물에 있어서는 큰 문제로 대두되어 왔다. 실험동물 뿐만 아니라 소에 있어서도 8세포기 이전의 배아를 자궁에 이식했을 경우 거의 착상이 이루어지지 않는다(Camous등, 1984). 이때문에 소에 있어서는 8세포기 체외 발육억제현상(8-cell block)을 극복하기 위해 많은 연구자들 (Rexroad, 1989; Fukui, 1990)이 체세포를 이용하여 초기배와 공배양(co-culture)함으로써 체외에서 포배기까지의 발육을 가능케하여 큰 성과를 올렸다.

그러나 이러한 공배양 체계에 있어서는 체세포로부터 분비되는 미지성분(unknown factor)이 많이 포함되어 있을 것으로 추측되어 체외에서 포배기까지의 발육에 미치는 여러 요인을 연구 분석하기는 곤란하였다. 또한 공배양 체계에서는 생식세포의 배양외에도 체세포의 처리 및 배양액의 오염문제 그리고 정기적인 배양액 교환등 실로 수반되는 여러가지 난점이 많았다. 따라서 포유동물 난자의 체외 성숙 및 체외 수정을 포함한 초기배의 발육을 위한 새로운 배양계(culture system)의 개발은 배양 성적에 미치는 여러 인자들의 연구를 위해 매우 중요한 문제라 할 수 있겠다. 이러한 문제점을 타개하기 위해 필자등은 기존의 체세포와의 공배양에 의존하지 않는 배양액만 사용한 배양 방법으로써 소의 8세포기 발육억제 현상을 극복하여 몇가지 문헌적 고찰(Kim등, 1993a; Kim등, 1993b; Lim등, 1993)을 한 바 있으므로 그 주된 내용을 요약 소개하기로 한다.

II. 재료 및 방법

1. 공시난자 및 정자

일본 오카야마현내의 도축장에서 회수한 Holstein종 난소의 난포로부터 선발한 미성숙 난포란을 체외 성숙시켜 이용하였고 체외 수정에 도입된 정자는 Holstein종 동결정액(Bull number: 일본 P-121)을 사용하였다.

2. 배양액

1) 난포란의 체외 성숙을 위한 배양액은 주문 생산된 modified(m) TCM-199(GIBCO社:

formula NO. 90-5051EA)에 glucose(G) 5.56mM, hemicalcium lactate(L) 5mM, sodium pyruvate(P) 0.4mM과 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum:FBS)을 첨가하여 사용하였다.

2)체외수정에 이용된 배양액은 G가 포함되지 않은 BO액(Brackett와 Oliphant,1975)에 caffeine과 heparin을 첨가하여 사용하였다.

3)수정란의 배양은 실험의 전개상 다음 2가지 배양액을 사용하였다.

①복합 배양액(complex medium)

mTCM-199(glucose free)+bovine serum albumin(BSA) 3mg/ml을 기본 배양액으로 하고 실험구에 따라 G, L 및 P 를 첨가하였다.

②단순 배양액(simple medium)

Tyrode용액(mTLP-PVA)에 단백원을 첨가하지 않고 실험 목적에 따라 각각의 성분을 변화시켜 사용하였다.

모든 배양액은 50 ~ 100 μ l 용적의 micro-drop을 만든 후 mineral oil로 피복하여 배양전에 CO₂ 배양기(5% CO₂, 95% air, 39 $^{\circ}$ C)내에서 5시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

3. 난포란의 체외성숙

18G 주사기로 난포액과 함께 흡입된 난포란을 실체 현미경($\times 50$)하에서 난구세포가 치밀하게 부착된 것만을 선별하여 성숙 배양액으로 4회 세척 후 CO₂ 배양기 내에서 24 \pm 2시간 성숙 배양시켰다.

4. 체외수정

체외성숙이 이루어진 난포란은 BO액으로 4회 세척 후 caffeine-heparin方法(Niwa와 Ohgoda, 1988)에 준하여 정자 농도 1~2 $\times 10^6$ /ml가 되도록 조정된 뒤 정자와 난자를 100 μ l용적의 BO액내에서 8시간 공존시켰다. - 설명 참고 -

5. 수정란의 배양

수정(insemination) 8시간후 부착된 난구 세포는 배양중의 공배양 효과를 없애기 위해 pipetting에 의하여 제거시켰다. 그 후 완전 나화된 수정란을 실험구에 따라 조성 성분이 각각 다른 배양액에 넣고 배양액의 교환없이 수정 후 192시간(8일간)까지 정기적으로 분할과정을 관찰하였다.

III. 결 과

1. mTCM-199 배양액

1) Caffeine-Heparin system하에서 G의 존재가 수정율에 아무런 영향을 미치지 못했다. (이하 모든 실험에서 BO액에 G는 첨가하지 않음).

2) G첨가구(G구, L+P+G구)가 타구에 비해 8세포기 이후의 발육이 현저히 저하되었다 (P < 0.05). (G가 체외 cell block의 주된 요인으로 작용함).

3) 발생 단계별(시간별)로 G를 첨가한 결과 수정(insemination)후 96시간이전 (상실배기 이전)에는 G가 저해요소로 작용하고 있으나 수정후 120시간째 첨가한구에서는 무첨가구보다 포배기로의 발육율이 유의적으로 높았다(P < 0.05).

4) 수정 120시간째에 각각의 농도로 G를 첨가한 결과 적정 G농도는 5.56mM이었으나 2.78mM농도와 유의차는 없었으며 11.12mM 농도에서는 무첨가구보다 오히려 포배기까지의 발

육율이 저하되었다(유의차 없음).

2. Tyrode's 배양액

1) Phosphate(PO) 1.05mM과 G의 병용 및 단독첨가의 결과 19가지의 아미노산 무첨가 조건하에서는 PO나 G의 존재에 관계없이 전실험구에서 포배기까지의 관찰은 이루어지지 않았다. (아미노산이 포배기 형성에 큰 영향을 미침).

2) 1)과 같은 배양액 조건에 19가지의 아미노산을 첨가한 결과 PO단독 첨가구에서 포배기를 포함한 전단계별로 발육율이 가장 높았으며 G단독 및 G와 PO병용 첨가구에서는 발생율이 현저히 감소하였다.

3) 2)에서 가장 발육율이 높았던 PO단독 첨가구를 Rat에 적용한 결과 소와는 대조적으로 100% 2-cell block이 발생하였으며 오히려 G단독 첨가구에서 포배기까지의 발육율(49%)이 가장 높았다(동물종간에 있어서 배양액의 조건이 크게 다를 수 있다).

4) 2)에서 포배기까지의 발육율이 가장 양호했던 PO단독 첨가구를 선정하여 PO의 농도에 기인하는 효과를 각각의 농도로 실험 한 결과 기존의 1.05mM보다 낮은 0.35mM 농도에서 8세포 이후의 발생율이 타 실험구에 비해 높았으나($P < 0.05$) 0.1mM 농도와 유의차는 없었다. 또한 고농도(2.10mM)에서는 2세포기부터 발생율이 현저히 저하되었다 ($P < 0.05$).

5) P와L의 첨가 효과는 각각의 단독 첨가보다 병용(L+P)첨가구에서 포배기로의 발생율이 높았으며($P < 0.05$) 양자 무첨가구에서는 분할이 전혀 이루어지지 않았다.

6) G-free 배양액에서는 삼투압 265 mOsm하에서 포배기의 발육율이 가장 높았으며 (290 mOsm과는 유의차 없음) 315 mOsm이상에서는 현저히 저하되었다($P < 0.05$).

7) 6)과 같은 배양액의 조건하에서 수정 후 120시간째에 G를 첨가한 결과 오히려 265 mOsm에서는 포배기 발생율이 감소되었고 290 mOsm에서 현저히 증가되었다($P < 0.05$). (G 첨가 효과는 265 ~ 290 mOsm에서 민감하였다.)

IV. 맺음 말

이상의 결과로부터 소 난포란의 체외 배양에 있어서 8-cell block 현상은 배양액내에 함유된 glucose가 큰 요인으로 작용하였음을 알 수 있고 그외에 인산이나 아미노산 및 삼투압등의 배양액 조성이 영향을 미치는 것으로 나타났다.

또한 소에 있어서 유효한 배양액을 Rat에 적용한 결과 100% 2-cell block 현상이 일어나는 것으로 미루어 볼 때 특정 동물에 아무리 유효한 배양액이라도 다른 동물종에 있어서는 그 효과가 상당히 다르다는 것을 알 수 있다. 최근 Rat(Miyoshi 등, 1994)에 있어서 2-cell block의 가장 큰 요인은 배양액속의 인산에 기인하는 것으로 보고되었으며 또한 인간(Conaghan 등, 1993)에 있어서는 수정란의 에너지 대사가 소와 유사한 점이 많이 나타나고 있다.

특히 인간은 환자와 시술자간에 의사 소통이 가능하여 환자가 안정을 취할 수 있다는 점과 자궁구조가 타 동물과 달리 자궁각(horn of uterus)이 없는 단자궁 구조를 가진다는 점의 착상 window가 넓다는 잇점을 갖고 있다. 따라서 인간에 있어서도 IVF-ET의 성공율을 높이기 위한 하나의 방편으로서 배양액의 Q.C. 나 기초 실험에 있어서 인간의 수정란 대사와 공통점이 많은 동물종을 실험 동물로 선정하여 생체내의 배아 발육 단계상 자궁 내막의 수용 능력에 알맞는 발육 단계(상실배 ~ 포배기)까지 체외에서 안정된 비율로 발육시킬 수 있는 문제등의 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 참고 문헌

1. Brackett B G and Oliphant G: Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 1975, 12, 260-274.
2. Camous S et al: In vitro culture of early bovine embryos with trophoblastic vesicle cleavage through the block stage, followed by pregnancy after transfer. *Theriogenology* 21(abstr. 226), 1984.
3. Conaghan J et al: Effect of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil.* 1993, 99, 87-95.
4. Fukui Y: Effects of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 1990, 26, 40-46.
5. Kim J H et al: Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology*, 1993a, 39, 875-886.
6. Kim J H et al: Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol Reprod* 1993b, 48, 1320-1325.
7. Lim J M et al: Effect of the presence of glucose during fertilization and/or culture in a chemically semi-defined medium on the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Dev* 1993, 39, 237-242.
8. Miyoshi K et al: Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity. *J Reprod Fertil* 1994, 100, 21-26.
9. Niwa K and O Ohgoda: Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology.* 1988, 30, 733-741.
10. Rexroad C E: Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 1989, 31, 105-112(1989).