

## 顆粒膜細胞가 牛卵胞卵의 體外受精과 發達에 미치는 影響

朴泰均 · 李相鎮 · 朴世必 · 高大煥 · 尹山鉉 · 朴欽大\*\* · 丁泰榮 · 鄭吉生

建國大學校 畜產大學

\*尙志專門大學

\*\*大邱大學校 工科學

### Effects of a Co-culture with Granulosa Cells on *In Vitro* Fertilization and Development of Bovine Follicular Oocytes

Park, T.G, S. J. Lee, S. P. Park, D. H. Ko\*, S. H. Yoon,  
H. D. Park, T. Y. Chung and K. S. Chung

College of Animal Husbandry Kon-Kuk University

\*Sang-Ji Junior College

\*\* College of Engineering, Dae-Gu University

#### SUMMARY

These experiments were carried out to investigate the effect of a co-culture with granulosa cells on in vitro maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes.

The bovine ovaries were obtained at a slaughter house and the follicular oocytes were recovered by aspirating the follicular fluid from the visible follicles of diameter 2-6 mm. Bovine oocytes were matured in vitro for 24-26 hr and then fertilized in vitro using epididymal spermatozoa capacitated by preincubation for 2-3 hr in BO solution containing BSA (5 mg/ml) and caffeine (25 mM). Eight hours after insemination, the oocytes were cultured in a co-culture system with granulosa cells. The rates of maturation of the follicular oocytes cultured in a co-culture system with granulosa cells were 83.1%, the rate of fertilization of the follicular oocytes culture in a co-culture system with granulosa cells were 76.9%, respectively. No significant difference are observed between control and treatment in maturation and fertilization rates. The rates of embryos developed to 2-, 4-, 8-, 16-cell and morula stages after co-cultured with granulosa cells were 65.8, 57.9, 39.5, 34.2 and 34.2%, respectively. The value for 16- and morula stages were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those of the embryos cultured in the basic medium.

#### I. 緒 論

雌畜의 優秀한 遺傳形質을 家畜改良에 活用할 수

있는 유용한 수단인 受精卵 移植技術은 移植에 供與  
할 수 있는 多數의 卵子를 쉽게 確保할 수 있는 方  
法이 개발되어야만 한다는 問題點을 안고 있다. 따

• 尙志專門大學(Sang-Ji Junior College)

• • 大邱大學校 工科學(College of Engineering, Dae-Gu University)

라서 多數의 移植 可能한 卵子를 確保하기 위하여 현재는 多排卵 處理가 이용되고 있지만 多排卵處理에 對한 反應은 個體에 따라 差異가 심해 일정한 效果를 기대하기 어렵다. 그러므로 多數의 移植 可能한 卵子의 확보에 대한 문제점을 근본적으로 해결하기 위하여 최근에는 卵巢에 존재하는 數萬 내지 數十萬個의 卵母細胞를 이용하려는 시도가 많은 研究者들에 의하여 遂行되어 왔다. (Edwards, 1962 ; Shea 等, 1976 ; Leibfried 等, 1979 ; Süss 等, 1988).

性成熟에 到達한 哺乳動物의 경우, 卵巢內 卵母細胞들은 일반적으로 第一減數分裂의 前期에 머물러 있으며 排卵前 LH Surge 에 의하여 GVBD 가 일어나고 동시에 減數分裂이 再開되어 卵母細胞와 卵丘細胞는 각각 核成熟과 細胞質成熟을 완료하고, 形態變化를 거쳐 受精適期인 第二減數分裂의 中期에서 排卵된다. 따라서 이러한 卵巢內 卵母細胞들을 體外에서 培養할 경우에 性腺刺戟호르몬이나 다른 刺戟 Agents 를 培養液에 添加하지 않아도 자연적으로 減數分裂을 再開하고, 正常的인 受精능을 가진 卵子로 발달하여 個體로 發生한다. (Yanagimachi, 1974 ; Seitz 等, 1979 ; Massip 等, 1984)

그러나 Bovine 의 경우는 많은 研究者들의 研究結果에서 卵胞卵의 자연적인 體外成熟과 受精率は 양호하지만 體外受精後 移植 可能한 受精卵으로 發達하여 個體를 생산하는데에는 많은 문제점이 제시되고 있다. 그것이 卵母細胞를 培養하는 培養液의 組成이 雌性生殖器官의 分泌物의 그것과 상당한 차이가 있고, 卵母細胞의 成長과 發育에 필요한 未知因子가 缺如되어 있기 때문이다. (Edwards, 1965 ; Brackett 等, 1982 ; Kajihara 等, 1987 ; Xu 等, 1987 ; Goto 等, 1988 ; Sirard 等, 1988).

이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근에는 顆粒膜細胞와 같은 다른 細胞들과 함께 卵母細胞를 co-culture 함으로써 양호한 胚發達과 産子를 얻고 있다. (Motlik, 等 1981 ; Salustri 等, 1985 ; Xu 等, 1988 ; Sirard 等, 1988 ; Caird 等, 1989)

本 研究에서는 顆粒膜細胞와 卵母細胞를 co-culture 하였을 때 顆粒膜細胞가 卵母細胞의 體外成熟, 受精 및 發達에 미치는 影響을 檢討하였는 바 다스의 結果를 얻었기에 그 結果를 報告한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物

屠畜場(宇成農場)에서 屠殺된 Holstein 牝牛을 供試動物로 사용하였다.

### 2. 培養液

#### 1) 精子 處理用 培養液

精子處理는 BO 液(Brackett 와 Oliphant, 1975)을 基礎培養液으로 사용하였다. 먼저 精子의 洗滌用 培養液에는 基礎培養液에 5 mM Caffeine 만을 添加하였고, 受精能獲得과 體外受精用 培養液은 5 mg/ml 의 BSA 와 2.5 mM 의 Caffeine 을 基礎培養液에 添加한 것이었다.

#### 2) 卵子 處理用 培養液

卵子의 回收, 體外成熟 및 體外發達을 위해서는 TCM-199(Gibco)에 Na-Pyruvate ; 0.11 g/l, Ca-lactate ; 50.96 g/l, Gentamycin ; 0.2 mg/ml 를 添加한 것을 基礎培養液으로 사용하였다.

이 基礎培養液을 기본으로 하여 卵子回收를 위해서는 25 mM Hepes(Sigma. Co)를 添加하여 사용하였고, 體外成熟과 胚發達을 위해서는 1 µg/ml 의 FSH(Sigma.Co), 2 IU/ml 의 HCG(Sigma.Co) 및 1 µg/ml 의 Estradiol-17 β(Sigma.Co)를 사용하였으며 體外受精을 위해서는 2.5 mM Caffeine 과 5 mg/ml BSA 가 添加된 BO 液을 사용하였고, 顆粒膜細胞의 培養을 위해서는 10% Fetal Calf Serum(FCS ; Sigma.Co)과 FSH 1 µg/ml, HCG 2 IU/ml 및 E<sub>2</sub> 1 µg/ml 를 添加한 것을 사용하였다.

이들 培養液은 pH 7.2~7.4, 滲透壓 285~290 mOsm 로 조정하였으며 사용 직전에 0.22 µm 의 milipore filter 를 사용하여 濾過 除菌한 後 少量으로 분주하여 4°C 냉장고에 2주일 동안 보관하면서 사용하였다.

### 3. 卵胞卵의 回收

#### 1) 卵胞卵의 回收

屠畜場에서 剔出하여 實驗室로 운반된 卵巢에 존재하는 2~6 mm 의 卵胞를 20 gauge 注射器로 둘러싸인 卵母細胞를 回收하였다.

#### 2) 卵胞卵의 生死鑑別

卵丘細胞에 둘러싸인 卵母細胞의 활성을 확인하

기 위하여 卵子 回收用 培養液에서 同量의 0.4% Trypan blue 液(Gibco Co.)을 혼합한 溶液에 卵母細胞를 15分間 培養한 후 실체현미경(Kyowa Co. Japan)下에서 50% 以上 染色이 된 卵母細胞와 細胞質이 凝縮 또는 破片化된 異狀卵母細胞 등을 除去하고 染色이 되지 않은 것과 細胞質의 狀態가 正常的인 卵母細胞만을 골라서 體外成熟에 供試하였다.

#### 4. 卵胞卵의 體外成熟

核狀檢査 結果 正常的인 것으로 확인된 卵母細胞를 Paraffin oil 이 被覆된 0.1 ml 의 體外成熟用 培養液 小滴 즉 顆粒膜細胞가 單層培養된 小滴에 각각 5~10 個씩 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養器內에서 24~26 時間동안 培養하면서 體外成熟을 유도하였다.

#### 5. 體外受精

##### 1) 精子의 準備

屠畜場에서 剔出한 精巢의 精巢上體 尾部를 BO 液으로 灌流하여 精子를 採取한 다음 1,000 rpm 에서 5分間 2~3回 遠心分離하여 洗滌한 후, 2.5 mM Caffeine 과 5 mg/ml 의 BSA 가 함유된 BO 液으로 Swim up 을 시킨 후 上層液을 採取하여 petri dish (Falcon, U.S.A.)내의 培養液 小滴(0.1 ml)으로 옮겨 2~3 時間동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 培養器內에서 前培養함으로써 精子의 受精能獲得을 유지하였다.

##### 2) 卵子의 準備

CO<sub>2</sub> 培養器內에서 24~26 時間 成熟시킨 正常的인 卵母細胞만을 體外受精에 供試하였다.

##### 3) 授精

受精能을 獲得시킨 精子浮遊液 小滴에 體外成熟 卵子를 5~10 個씩 넣어 5% CO<sub>2</sub> 培養器內에서 培養하여 受精을 誘導하였다. 이때 사용된 精子의 最終濃度는  $1.5 \sim 2 \times 10^6 / ml$  이었으며 授精後 20 時間에 卵子를 回收하여 일부는 受精率을 調査하기 위하여 回定한 다음, 染色을 하였고 나머지 일부는 胚發達의 정도를 調査하기 위하여 계속 배양하였다.

#### 6. 受精卵의 培養

體外에서 受精된 卵子의 일부는 體外受精卵 8 時間에 回收하여 신선한 培養液으로 3回 洗滌한 후 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養器內에서 8日間 培養하면서 24 時間 간격으로 胚發達狀態를 觀察하였다.

#### 7. 未受精 및 受精卵子의 固定과 染色

##### 1) 卵丘細胞의 除去

卵子의 核成熟度를 調査하기 위하여 卵母細胞를 0.1% hyaluronidase 溶液에서 5~10 分間 處理함으로써, 卵丘細胞를 除去하였다. 이때 완전히 제거되지 않은 卵丘細胞는 가볍게 pipetting 을 실시함으로써 완전히 除去하였다.

##### 2) 固定 및 染色

卵丘細胞를 除去하고 卵子에 부착된 精子와 不純物을 깨끗이 除去한 다음, 먼저 2.5% glutaldehyde 로 透明帶를 固定한 후 Acetoalcohol(ethanol : acetate=3 : 1) 溶液에 沈澱하여 4°C에서 24~48 時間동안 細胞質을 固定시키고 1% orcein 溶液으로 5~10 分間 染色하여 位相差 顯微鏡下에서 核成熟狀態와 受精與否를 判別하였다.

#### 8. 核狀과 受精의 判別

卵子의 核成熟度는 Donahue(1968)의 方法에 準하여 第一減數分裂前期(GV 段階), 中期(Metaphase), 後期(Anaphase), 終期(Telophase) 및 第二減數分裂中期로 分類하였고, 體外受精의 判定은 精子의 細胞質內 侵入, 第二極體 放出, 細胞質內에 있어서 精子頭部の 膨化, 雌雄前核 및 精子尾部의 觀察 등을 기준으로 하여 실시하였다.

### III. 結果 및 考察

#### 1. 顆粒膜細胞가 牛卵胞卵의 體外成熟에 미치는 影響

牛卵胞卵을 單層培養된 顆粒膜細胞와 24~26 時間 동안 共同培養한 다음 核成熟度를 觀察한 結果는 Fig. 1 과 Table 1 에 提示한 바와 같다.

이 表에서 보는 바와 같이 共同培養區나 對照區에서 觀察된 卵子의 成熟度는 Meta. I, Ana. I, Telo. I 및 Meta. II 段階 등으로 다양했으며 그 중에서도 受精適期인 第二減數分裂 中期의 卵子가 가장 많이 觀察되었는데 그 比率는 共同培養區와 對照區에서 각각 83.1% 와 80.3% 였으며 Metaphase I 段階의 卵子는 각각 15.6% 와 18.3% 였고, Anaphase I 과 Telophase I 段階의 卵子는 다같이 10% 미만이었다.

核成熟에 있어서 共同培養區와 對照區 사이에 有意差는 없었지만 Meta II 段階에 까지 成熟한 卵子

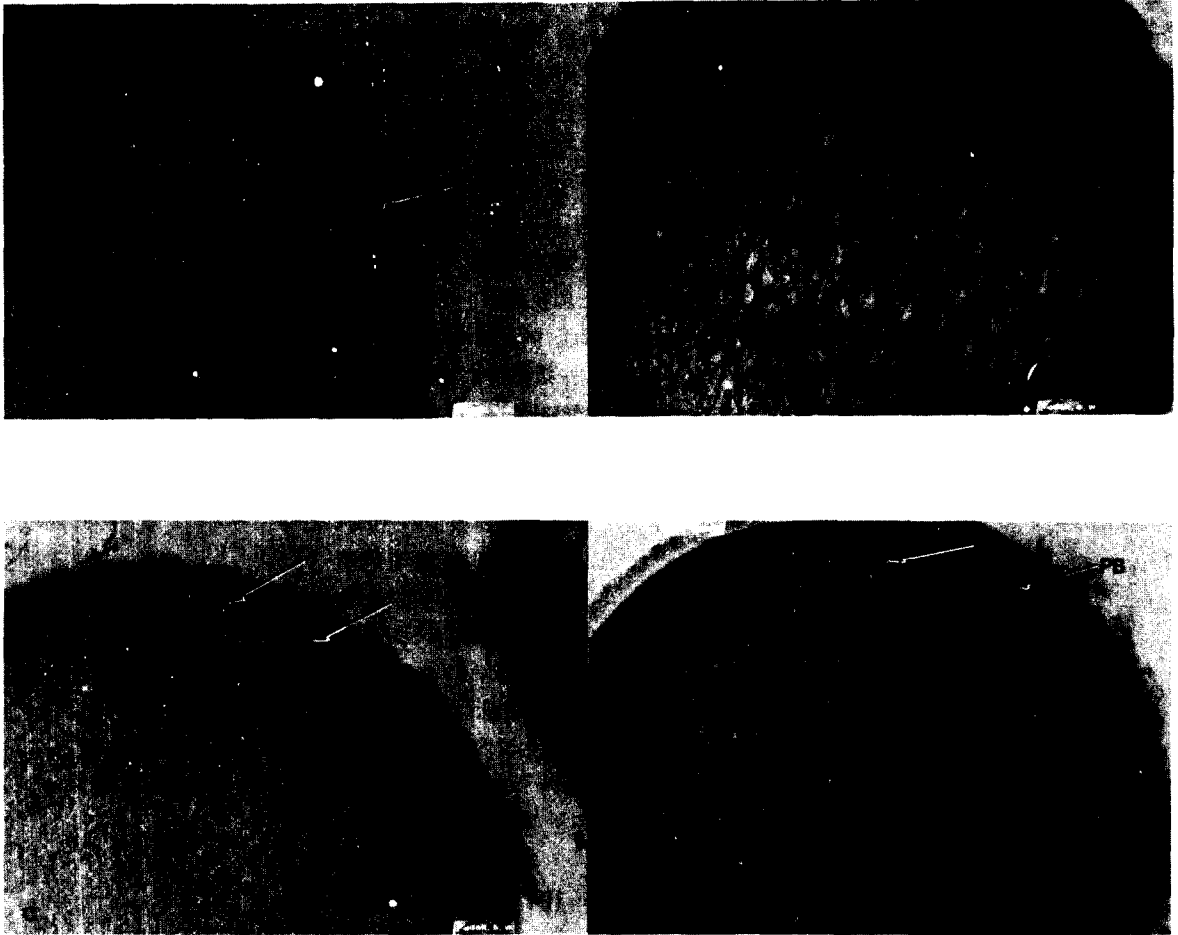


Fig 1. Sequence of nuclear maturation of bovine follicular oocytes in CO<sub>2</sub> incubator for 24–26 hr.

A ; Metaphase I      B ; Anaphase I  
 C ; Telophase I      D ; Metaphase II

Table 1. Effect of co-culture with granulosa cells on in vitro maturation of bovine follicular oocytes.

Granulosa cells	No. of oocytes examined	Stage of Nuclear maturation <sup>ab</sup>			
		Meta. I (%)	Ana. I (%)	Telo. I (%)	Meta. II (%)
without	71	13 (18.3)	1 (1.4)	-	57 (80.3)
with	77	12 (15.6)	-	1 (1.3)	62 (83.1)

Notes : Basic medium was used TCM 199 added hormones and fetal calf serum (10%)

<sup>a</sup>GV : Germinal Vesicle, Meta. : Metaphase, Ana. : Anaphase, Telo. : Telophase.

Table 2. Effect of co-culture with granulosa cells on in vitro fertilization of bovine follicular oocytes.

Granulosa cells	No. of oocytes examined	Fertilized eggs (%)	Unfertilized eggs (%)
without	75	50 (66.7)	25 (33.3)
with	78	60 (76.9)	18 (23.1)

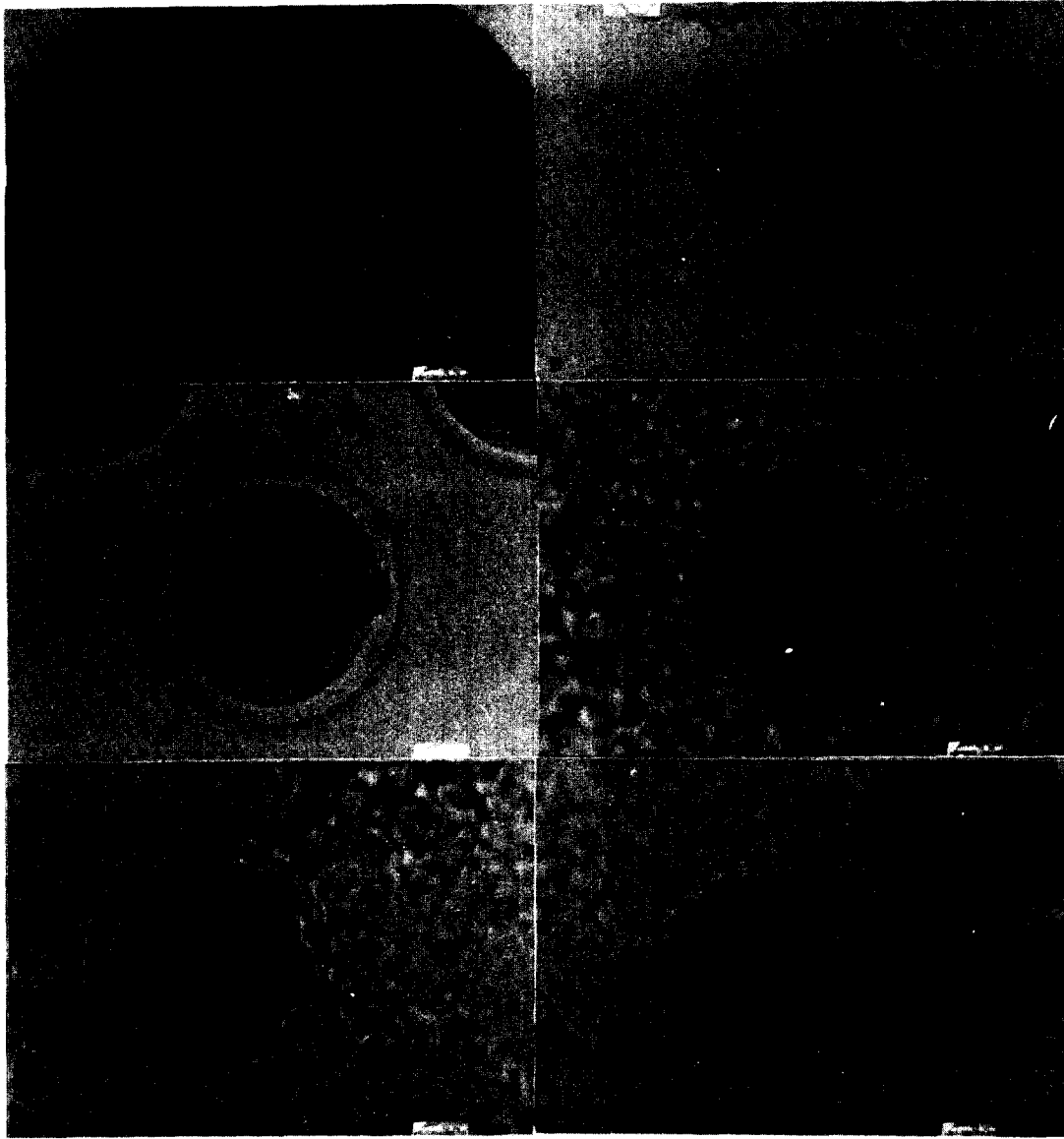


Fig 2. Development of bovine follicular oocytes fertilized in vitro after in vitro maturation with granulosa cells

- A ; Pronucleate oocytes
- B ; Two-cells bovine embryos
- C ; Four-cells bovine embryos
- D ; Eight-cells bovine embryos
- E ; Sixteen-cells bovine embryos
- F ; Bovine morula (over 20 cells)

Table 3. Effect of co-culture with granulosa cells on in vitro development of bovine follicular oocytes

Granulosa cells	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos developed to.				
		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	Morula
without	72	42(58.2)	36(50.0)	22(30.6)	15(20.8) <sup>a</sup>	12(16.7) <sup>a</sup>
with	76	50(65.8)	44(57.9)	30(39.5)	26(34.2) <sup>b</sup>	26(34.2) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup>: significantly different from control, P<0.05.

의 比率은 共同培養區가 좋았다. 이러한 結果는 Ball 等(1984)과 Goto 等(1988) 및 Sirard 等(1988)의 報告와 유사하였으나 Iritani 等(1984)의 成績보다는 양호한 것이었다.

### 2. 顆粒膜細胞가 牛卵胞卵의 體外受精에 미치는 影響

顆粒膜細胞와 共同培養하여 體外成熟된 卵胞卵을 精巢上體 精子로 授精시킨 후 20 時間째에 卵子를 回收하여 受精與否를 관찰한 結果는 Table 2 에 提示하였다.

Table 2 에서 보는 바와 같이 共同培養된 卵子의 體外受精率은 總 78 個의 卵子中 60 個가 受精되어 平均 76.9% 였으며 對照區의 그것은 66.7% 였다. 共同培養區와 對照區의 體外受精率 사이에는 有意差가 인정되지 않았으나 共同培養區가 對照區보다 양호한 成績을 나타내었다.

한정된 本 實驗에서 얻어진 受精率은 Lu 等(1987)의 成績보다는 낮은 것이었으나 Ball 等(1984), Parrish 等(1986) 및 Xu 等(1987)의 成績과는 대체로 일치하는 것이었으며 Lentz(1983)等과 Goto(1988) 등의 成績보다는 높은 것이었다.

### 3. 顆粒膜細胞가 牛受精卵의 體外發達에 미치는 影響

한편 體外에서 受精된 卵子를 8 日동안 顆粒膜細胞와 함께 培養한 후 그 發達狀態를 位相差 顯微鏡下에서 觀察한 結果는 Fig. 2 와 Table 3 에 提示하였다.

共同培養區에서 2-, 4- 및 8 細胞期까지 發達한 卵子의 比率이 각각 65.8%, 57.9% 및 39.5% 였으며 對照區의 그것은 각각 58.3%, 50.0% 및 30.6% 로

두 구간에는 有意差가 認定되지 않았다. 그러나, 16 細胞期와 Morula 段階까지 發達한 卵子의 比率은 共同培養區는 각각 34.2% 와 34.2% 인데 대하여 對照區의 그것은 각각 20.8% 와 16.7% 로서 두 구간에는 有意差가 認定되었다(P<0.05).

한편 本 實驗에 있어서 受精後 桑實胚까지의 發達率은 Lu 等(1987)과 Goto(1988) 등의 成績보다는 양호하였으며, 또 胚發達이 進行될수록 發達하는 embryo 의 比率이 두 구 다같이 떨어졌으나 16 細胞期 以後에는 共同培養區가 對照區에 비해 發達率이 유의하게 높은 것으로 보아 胚發達이 進行될수록 顆粒膜細胞 添加의 效果가 나타나는 것으로 생각된다. 그러나 桑實胚의 卵子를 계속 培養하였으나 胚盤胞 段階에까지 發達하는 것은 觀察되지 않았다.

## IV. 摘 要

本 研究에서는 顆粒膜細胞가 牛卵胞卵의 體外成熟, 體外受精 및 體外胚發達에 미치는 影響을 調査하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 牛卵胞卵을 粒胞細胞와 共同培養하였을 때의 核成熟 즉, 第二減數分裂 中期까지 成熟한 卵子의 比率은 83.1% 였으며 對照區의 그것은 80.3% 로서 두 區間에 有意差는 認定되지 않았다.

2. 顆粒膜細胞와 共同培養된 卵子의 體外受精率은 76.9% 로서 對照區의 66.7% 보다 다소 양호하였다. 그러나 양 구간의 有意差는 認定되지 않았다.

3. 顆粒膜細胞와 共同培養한 受精卵의 發達은 2~8 細胞期の 初期胚에서는 對照區와 有意差가 없었지만 16 細胞期와 桑實胚期까지 發達한 比率은 共同培養區는 각각 34.2% 와 34.2% 였으며 對照區는 각각 20.8% 와 16.7% 로 양 구간에는 有意差(P<0.05)가 認定되었다.

## V. 引用文献

1. Ball, G. D., M. L. Liebfried., R. L. Ax., N. L. First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *J. Dairy. Sci.* 67 : 2775-2785.
2. Brackett, Benjamin G., D. B. Melinda, L. B. William, J. Donawick., J. F. Evans., M. A. Dressel. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27 : 147-158.
3. Caird, E., Jr. Rexroad. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology.* 31 : 105-114.
4. Edwards, R. G. 1962. Meiosis in ovarian oocyte of adult mammals. *Nature.* 208. 349-351.
5. Edwards, R. G. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and Human ovarian oocytes in vitro. *Nature.* 208 : 349-351.
6. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi, K. Ogawa, 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 83 : 753-758.
7. Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa, H. B. Song. 1984. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.* 70 : 487-492.
8. Kajihara, Y., K. Goto, S. Kosaka, Y. Nakaniishi, K. Ogawa. 1987. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33 : 173-180.
9. Leibfried, L., N. L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48. (1) : 76-86.
10. Lenz, R. W., G. D. Ball, J. K. Lohse, N. L. First, R. L. Ax. 1983. Chondroitin sulfate facilitated on acrosomes reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 28 : 683-690.
11. Lu, K. H., M. P. Boland, T. F. Crosby, and I. Gordon. 1987. In vitro fertilization of cattle oocytes matured in vitro. *Theriogenology.* 27. (1) : 251 (Abstrat).
12. Massip, A., P. Van der Zwalmen, F. Puissant, M. Camous and Leroy. 1984. Effect of in vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. *J. Reprod. Fert.* 71 : 199-204.
13. Motlik, J., J. Fulka, 1981. Fertilization of rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. *J. Reprod. Fert.* 63 : 425-429.
14. Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried-Rutledge, E. S. Crister, W. H. Eyestone, N. L. Firster. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology.* 25. (4) : 591-600.
15. Salustri, A., S. Petrungaro, G. Sirausa. 1985. Granulosa cells stimulates in vitro the expansion of isolated mouse cumuli oophori : involvement of prostaglandin E<sub>2</sub>. *Biol. Reprod.* 33 : 229-234.
16. Seitz, H. M., Jr, Benjamin, G. Brackett and Luigi Mastroianni, Jr. 1970. In vitro fertilization of ovulated rabbit ova recovered from the ovary. *Biol. Reprod.* 2 : 262-267.
17. Shea, B. F., J. P. A. Latour, K. N. Bedirian, R. D. Baker. 1976. Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *H. Anim. Sci.* 43. (4) : 809-815.
18. Sirard, M. A., J. T. Parrish, C. B. Leibfried-Rutledge, N. L. First. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39 : 546-552.
19. Suss, U., K. Wuthrich, G. Stranzinger. 1988. Chromosome configurations and times sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.*

- 38 ; 871-880.
20. Xu, K.P., T.Greve, H.Callesen, P.Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 81 ; 501-504.
21. Xu, K.P., Y.Greve. 1988. A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. J.Reprod. Fert. 81 ; 501-504.
22. Yanagimachi, R., 1974. Maturation and fertilization in vitro of guinea-pig ovarian oocytes. 38 ; 485-488.
23. 윤산현, 고대환, 박세필, 박태균, 정길생. 1989. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구 : I. 난포란의 회수 및 체외배양. 한축지. 31(4) ; 201-209.
24. 윤산현, 박세필, 박태균, 고대환, 정길생, 1989. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구 : II. 발정우 현청, 우난포액 및 난구세포가 난포란의 체외성숙과 체외수정에 미치는 영향. 한국낙농학회지. 11(3) ; 139-146.
25. 박세필, 박태균, 윤산현, 고대환, 정길생. 1989. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구 : III. 체외성숙 우난포란의 체외수정과 발달. 한국가축번식학회지. 13(2) ; 105-112.