

體外成熟牛卵胞卵의 體外受精과 發達에 關한 研究  
III. 抗卵丘細胞 抗體가 體外成熟牛卵胞卵의 體外受精과  
發達에 미치는 影響

朴世必·金恩永·鄭炯敏·高大煥\*·金鍾培·鄭吉生

建國大學校 畜產大學

Studies on *In Vitro* Fertilization and Development of Bovine  
Follicular Oocytes Matured *In Vitro*

III. Effect of Anti-Cumulus Cell Antibody on *In Vitro* Fertilization and  
Development of Bovine Follicular Oocytes Matured *In Vitro*

Park, S.P., E.Y. Kim, H.M. Chung, D.H. Ko\*, J.B. Kim and K.S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were carried out to investigate the effect of rabbit anti-bovine cumulus cell antibodies on *in vitro* fertilization and following development of bovine follicular oocytes matured *in vitro*. The bovine ovaries were obtained at a slaughter house and the follicular oocytes surrounded by cumulus cells were collected by puncturing follicles with 2~6mm of diameter.

Bovine oocytes were matured *in vitro* for 24~26hrs in a CO<sub>2</sub> incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 39°C and subsequently cultured in medium containing cumulus cell antibody for 1 hour. The medium used for maturation was TCM-199 supplemented with hormones, pyruvate, FCS and antibiotics. Epididymal spermatozoa were capacitated by *in vitro* culture for 2~3 hrs in BO solution containing BSA(5mg/ml) and caffeine(2.5mM). Insemination was made by introducing about 10~15 matured oocytes into the suspension of capacitated spermatozoa. Six hour after insemination the eggs were transferred to TCM-199 supplemented with FCS(10%) and then cultured for 7 days.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. When the follicular oocytes matured *in vitro* were treated with antibody to intact cumulus cells, the fertilization rate of cumulus intact and removed oocytes was ranged 45.0 to 53.7%. These value is slightly lower than that(64.3%) of follicular oocytes not treated with the antibody, and increased frequency of both male and female pronuclear formation was found in cumulus intact oocytes cultured in medium without the antibody ( $p < 0.05$ ).
2. The fertilization rate of cumulus intact and removed oocytes treated with antibody to solubilized cumulus cells was ranged 45.0 to 52.5%, significantly lower than that(62.8%) of

---

\* 尙志專門大學(Sang-Ji Junior College)

oocytes cultured in antibody free medium, and increased frequency of ova with male and female pronuclei was found when cumulus cells were present ( $p < 0.05$ ).

3. The rates of cumulus cell intact and removed oocytes developed to 8-, 16~cell and morula or blastocyst after treatment of intact and solubilized cumulus cell antibody were ranged 7.1 to 14.5, 2.9 to 5.9 and 1.5 to 2.9%, respectively, slightly lower than 18.6, 10.0 and 8.6% of cumulus intact oocytes cultured in medium without the antibody.

The results of this study indicate that cumulus cells promote not only normal fertilization with proper pronuclear formation, but embryo development and that the beneficial effect of cumulus cell to the pronuclear formation and embryo development is blocked by the action of antibody to cumulus cell.

## I. 緒 論

排卵前卵자를 둘러싸고 있는 卵丘細胞로부터 分泌되는 glycoprotein (Ball 등, 1980; Lenz 등, 1982)과 生化學的 特性이 糾明되지 않은 多樣한 非스테로이드系列의 性質들 (Tesarik 등, 1988)은 牛精자의 尖體反應을 誘起할 뿐만 아니라 (Lenz 등, 1982), 卵자에 대한 精子侵入을 容易하게 하여 (Ball 등, 1982), 受精率과 前核形成率을 向上시킨다 (Schroeder와 Eppig, 1984; Fukui와 Sakuma, 1980; Lenz 등, 1983).

또 最近에는 卵丘細胞가 受精卵의 細胞質 成熟에 수반되는 核成熟에도 關與하며 (Vanderhyden과 Armstrong, 1989; 朴 등, 1990) 受精卵의 正常的인 發達에도 影響을 미친다는 사실이 밝혀졌다 (Vanderhyden과 Armstrong, 1989). 따라서 卵丘細胞는 精자의 受精能獲得뿐만 아니라 卵자의 發育과 受精 및 受精卵의 發達에도 重要한 役割을 修行하는 것으로 생각된다.

이러한 점을 確認하기 위한 研究의 일환으로서 本 研究에서는 體外에서 成熟된 牛卵胞卵에 대하여 抗卵丘細胞抗體 (Rabbit anti-bovine cumulus cell antibody)를 處理하여 卵丘細胞가 受精과 胚發達에 미치는 影響을 구체적으로 檢討하였는 바 그 結果를 報告한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物

供試卵胞卵은 屠畜場 (宇星農場)에서 屠殺된 Holstein 成牝牛로부터 回收하였으며, 抗卵丘細胞抗體를 生産할 때에는 Japanese Giant 種의 雌性토끼를 供試하였다.

### 2. 培養液

#### (1) 精子 處理用 培養液

精子를 處理할 때에는 BO液 (Brackett와 Oliphant, 1975)을 基礎培養液으로 使用하였다. 精子洗滌을 위해서는 基礎培養液에 5mM caffeine을 添加한 것을, 受精能獲得과 體外受精을 위해서는 基礎培養液에 5mg/ml의 BSA와 2.5mM의 caffeine을 添加한 培養液을 使用하였다.

#### 2) 卵자 處理用 培養液

卵자의 回收, 體外成熟 및 受精後의 體外培養을 위해서는 TCM 199 (Gibco Co.)에 Na-Pyruvate (0.11g/l)와 Gentamycin (0.2mg/ml)을 添加한 것을 基礎培養液으로 使用하였다.

이 基礎培養液을 基本으로 하여 卵자回收을 위해서는 25mM HEPES (Gigma Co.)를, 體外成熟을 위해서는 1 $\mu$ g/ml의 FSH (Sigma Co.), 2 IU/ml의 HCG (Sigma Co.) 및 1 $\mu$ g/ml의 Oestradiol-17 $\beta$  (Sigma Co.)를, 體外培養을 위해서는 25mM HEPES와 10% Fetal Calf Serum (FCS; Sigma Co.)를 添加한 것을 使用하였다.

이들 모든 培養液은 pH 7.2~7.4, 삼투압 285~290 mOsmol/kg으로 調整하였으며 使用直前に 0.22 $\mu$ m의 membrane filter를 使用하여 除菌한 다음 10ml씩 分注하여 4°C에서 保管하면서 使用하였다.

### 3. 卵胞卵의 回收

Holstein 成牝牛의 卵巢를 屠殺直後에 切取하여 100 IU/ml의 penicillin G와 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate를 含有한 38~39°C의 生理食鹽水가 들어 있는 保溫瓶으로 옮겨 2時間이내에 實驗室까지 운반하

었다. 이어 20gauge의 注射針이 부착된 10ml 注射器를 사용하여 2~6mm의 可視卵胞로부터 卵丘細胞가 密集된 卵胞卵을 回收하였다.

#### 4. 抗卵丘細胞抗體의 生産

抗卵丘細胞抗體는 朴(1990)의 方法에 準하여 製造하고 또 精製된 것을 使用하였다.

#### 5. 卵胞卵의 體外成熟 및 成熟度 調査

Petri dish(Falcon, Co.)내에 體外成熟用 培養液 100 $\mu$ l 小滴을 滴下하여 流動 paraffin oil로 被覆한 다음 39 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 培養器내에서 5~6時間 平衡시킨 후 이 培養液 小滴에 回收된 卵胞卵을 침지하여 24~26時間 培養하였다.

培養이 끝난 卵子는 0.1% aceto-orcein(1mg/ml orcein in 45% acetic acid)으로 染色을 實施하여 卵胞卵의 核成熟度を 判別하였다(Toyoda와 Chang, 1974; Park 등, 1989).

#### 6. 體外受精

##### (1) 精子的 受精能獲得

精巢上體 尾部로부터 採取된 精子를 遠心分離(1,000 rpm $\times$ 5min)에 의하여 BSA 非含有 5mM caffeine-BO液으로 2~3회 洗滌하였다. 이때 最終 遠心分離에 의하여 上層液을 제거한 다음 25mM caffeine과 5mg/ml BSA를 含有한 培養液을 添加하여 20分동안 CO<sub>2</sub>培養器내에서 培養함으로써 精子浮遊를 誘導하였다.

Petri dish(Falcon Co.)내에 100 $\mu$ l(15 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml)의 精子 浮遊液 小滴을 滴下한 다음 流動 paraffin oil로 被覆하여 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 培養器내에서 2~3時間 前培養을 實施함으로써 受精能을 獲得시켰다(Goto 등, 1988).

##### (2) 體外受精

前述한 方法에 의하여 體外成熟이 이루어진 卵胞卵을 精製된 5.0~20%의 抗體로 1時間동안 處理한 후, 5mg/ml의 BSA가 含有된 BO液으로 2회 洗滌하고 이어 受精能을 獲得한 精子가 含有된 精子 浮遊液 小滴(10~15개/drop)으로 옮겨 體外受精을 誘導하였다.

培養 6時間째에는 胚發生用 培養液인 10%FCS와 25mM HEPES가 含有된 TCM 199 培養液으로 옮겨, 體外受精의 與否는 第2極體의 放出與否, 細胞質

內에 侵入한 精子頭部의 膨化와 尾部의 觀察 및 雌雄前核의 確認등을 기준으로 判定하였다(Toyoda와 Chang, 1974; Park 등, 1989).

#### 7. 體外培養

體外受精된 卵胞卵을 10% FCS와 25mM HEPES를 含有한 TCM 199 培養液으로 옮겨 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 CO<sub>2</sub>培養器내에서 培養하였다. 培養 24時間째마다 新鮮한 培養液으로 交替했으며, 12時間 間隔으로 位相差顯微鏡(Leitz, West Germany)下에서 形態學的 特性을 調査하였다.

### III. 結果 및 考察

#### 1. 抗卵丘細胞抗體의 處理가 牛卵胞卵의 體外受精에 미치는 影響

體外成熟이 이루어진 卵胞卵을 5.0~20%의 精製된 抗體로 1時間 處理한 후 體外受精을 實施한 結果는 Table 1과 2에서 보는 바와 같았다.

Table 1에서 보는 바와 같이 體外成熟된 卵胞卵에 대하여 無處理卵丘細胞에 대한 抗體 5.0~20%를 1時間동안 處理한 후 受精을 誘導한 結果, 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵의 경우 對照區의 受精率은 64.3%로서 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 成績인 45.0~53.7%에 비해 다소 높았다.

한편 雌性 및 雄性前核이 동시에 形成된 卵子의 比率은 卵丘細胞 附着卵胞卵의 對照區는 51.9%로서, 卵丘細胞 除去卵胞卵의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 18.2~38.9%에 비해 有意하게 높았다( $p < 0.05$ ).

한편, Table 2에서 보는 바와 같이 體外成熟이 이루어진 卵胞卵에 대해 5.0~20%의 溶解卵丘細胞에 대한 抗體를 1時間동안 處理한 후 受精시킨 結果, 卵丘細胞 附着卵胞卵의 對照區의 受精率은 62.8%로서, 卵丘細胞 除去卵胞卵의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 45.0~52.5%에 비해 다소 높았다. 또한 雌性 및 雄性前核이 동시에 形成된 卵子의 比率은 卵丘細胞 附着卵胞卵에 있어서는 對照區가 55.6%로, 卵丘細胞 除去卵胞卵에 있어서의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 成績

Table 1. Effect of rabbit anti-bovine intact cumulus cell antibody on *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes

Oocytes	Antibody (%)	No. of ova fertilized/ Total no. (%)	Stage of fertilization		
			I	II	III
With cumulus cell	0	27/42(64.3)	8(29.6)	5(18.5)	14(51.9)*
	5	21/41(51.2)	7(33.3)	6(28.6)	8(38.1)
	10	18/40(45.0)	9(50.0)	2(11.1)	7(38.9)
	20	19/42(45.2)	11(57.9)	2(10.5)	6(31.6)
Without <sup>a)</sup> cumulus cell	0	21/42(50.0)	5(23.8)	9(42.9)	7(33.3)
	5	21/40(52.5)	9(42.9)	6(28.6)	6(28.6)
	10	22/41(53.7)	9(40.9)	9(40.9)	4(18.2)
	20	20/43(46.5)	6(30.0)	9(45.0)	5(25.0)

<sup>a)</sup> Oocytes removed with 0.1% hyaluronidase

\* p<0.05

Table 2. Effect of rabbit anti-bovine solubilized cumulus cell antibody on *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes

Oocytes	Antibody (%)	No. of ova fertilized/ Total no. (%)	Stage of fertilization		
			I	II	III
With cumulus cell	0	27/43(62.8)	9(33.3)	3(11.1)	15(55.6*)
	5	21/40(52.5)	8(38.1)	5(23.8)	8(38.1)
	10	19/41(46.3)	7(36.8)	5(26.3)	7(36.8)
	20	18/40(45.0)	10(55.6)	2(11.1)	6(33.3)
Without <sup>a)</sup> cumulus cell	0	21/40(52.5)	8(38.1)	7(33.3)	6(28.6)
	5	21/43(48.8)	9(42.9)	5(23.8)	7(33.3)
	10	19/42(45.2)	9(47.4)	5(26.3)	5(26.3)
	20	21/44(47.7)	10(47.6)	5(23.8)	6(28.6)

<sup>a)</sup> Oocytes removed with 0.1% hyaluronidase

\* p<0.05

인 26.3~38.1%에 비해 有意하게 높았다(p<0.05).

이상의 成績을 綜合하여 考察할 때, 本 實驗에서 使用된 精製된 抗體는 排卵前卵子(pre-ovulatory oocytes)를 둘러싸고 있는 卵丘細胞로부터 分泌되는 glycoprotein(Ball 등, 1980; Lenz 등, 1982) 및 生化學的 役割이 아직 糾明되지 않은 多様な non-steroid substances(Tesařik 등, 1988)의 分泌를 遮斷하여 精子의 尖體反應(Lenz 등, 1982) 및 前核形成(Ball 등, 1983)등을 抑制하는 것으로 생각된다. 그리고 이러한 結果는 卵丘細胞가 생체에 있어서 受精率을 向上

시키고(Schroeder와 Eppig, 1984), 소에 있어서 受精率과 前核形成率을 向上시키며(Fukui와 Sakuma, 1980; Lenz 등, 1983), 精子侵入와 細胞質成熟을 促進한다는 지금까지의 報告(Vanderhyden과 Armstrong, 1989)와 一致하는 것이다.

## 2. 體外培養

抗卵丘細胞抗體의 處理가 牛卵細胞의 體外發生에 미치는 影響을 調査한 結果는 Table 3에서 보는

Table 3. Effect of rabbit anti-bovine cumulus cell antibody on *in vitro* development of bovine embryos

Embryos	Antibody (%)	No. of embryos examined <sup>a)</sup>	No. of embryos developed to				
			2-cell (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	16-cell (%)	Mor. or Bla. (%)
With cumulus cell	— solubilized (20%) intact (20%)	70 68 65	40 (57.1) 29 (42.6) 28 (43.1)	31 (44.3) 21 (30.9) 19 (29.2)	13 (18.6) 7 (10.3) 6 (9.2)	7 (10.0) 4 (5.9) 3 (4.6)	6 (8.6) 2 (2.9) 1 (1.5)
without cumulus cell	— solubilized (10%) intact (10%)	69 70 66	34 (49.3) 29 (41.4) 26 (39.4)	22 (31.9) 19 (27.1) 15 (22.7)	10 (14.5) 5 (7.1) 7 (10.6)	4 (5.8) 2 (2.9) 3 (4.5)	2 (2.9) — 1 (1.5)

<sup>a)</sup> Ova with 2 polar bodies

바와 같았다.

이 Table 에 의하여 알 수 있는 바와 같이 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵의 경우 受精된 후 8-細胞期, 16-細胞期 및 桑實胚期 혹은 胚盤胞期까지 發達한 비율은 각각 18.6, 10.0 및 8.2%로서 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵에 있어서의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 7.1~14.5, 2.9~5.9 및 1.5~2.9%에 비해 다소 높았다. 이러한 結果는 受精卵의 卵丘細胞가 受精卵의 細胞質 成熟에 수반되는 核成熟에 關與하며 (Vanderhyden 과 Armstrong, 1989), 精子의 尖體反應을 誘起하고 (Lenz 등, 1982), 卵子에 대한 精子의 侵入을 助長할 뿐만 아니라 (Ball 등, 1982), 受精卵의 正常的인 發達에도 좋은 影響을 미친다는 (Vanderhyden 과 Armstrong, 1989), 지금까지의 報告들과 一致하는 것으로, 卵丘細胞가 受精卵의 胚發生에 重要한 役割을 遂行하고 있음을 示唆한다.

#### IV. 摘 要

本 研究에서는 牛卵丘細胞에 대한 抗卵丘細胞抗體를 體外에서 성숙된 牛卵胞卵 (follicle size; 2~6mm)에 處理하여 卵丘細胞가 牛卵胞卵의 受精과 體外發生에 미치는 影響을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 卵丘細胞가 附着되었거나 또는 除去된 成熟牛卵胞卵에 無處理卵丘細胞에 대한 抗體를 處理한 다음 體外

受精을 實施한 結果, 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵에 있어서 對照區의 受精率은 64.3%로서 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵에 있어서 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 受精率 45.0~53.7%에 비해 다소 높았다. 한편 雌性 및 雄性前核이 동시에 形成된 牛卵胞卵의 比率은 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵에 있어서의 對照區는 51.9%로서 卵丘細胞를 除去한 卵胞卵의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 18.2~38.9%보다 有意하게 높았다 ( $p < 0.05$ ).

2. 卵丘細胞가 附着되었거나 또는 除去된 成熟牛卵胞卵에 溶解卵丘細胞에 대한 抗體를 處理한 다음 體外受精을 實施한 結果, 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵에 있어서 對照區의 受精率은 62.8%로서 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵에 있어서 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 受精率 45.0~52.5%에 비해 다소 높았다. 또한 雌性 및 雄性前核이 동시에 形成된 卵子的 比率은 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵에 있어서의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 26.3~38.3%보다 有意하게 높았다 ( $p < 0.05$ ).

3. 抗體處理를 받은 牛卵胞卵의 體外發生을 調査하였던 바, 卵丘細胞가 附着된 受精卵에 있어서 對照區의 受精卵이 8-細胞期, 16-細胞期 및 桑實胚期 혹은 胚盤胞期까지 發達한 비율은 각각 18.6, 10.0 및 8.6%로서 卵丘細胞가 除去된 卵子에 있어서 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 7.1~14.5, 2.9~5.9 및 1.5~2.9%에 비해 다소 높았다.

이상의 結果로 보아 卵丘細胞는 牛卵胞卵의 體外受精

과 體外發達을 促進하는 것으로 判斷된다.

## V. 引用文獻

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.V. Lenz, R.L. Ax and N.L. First. 1983b. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 19: 112.
2. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28: 717-725.
3. DeFelici, M. and G. Siracusa. 1982. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. Gamete Res., 6: 107-113.
4. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 42: 114-119.
5. Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono. 1983. Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation *in vitro*. J. Exp. Zool., 226: 137-141.
6. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ohawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* maturation follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83: 753-758.
7. Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K. Lohse, M.L. First and R.L. Ax. 1983. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. Bio. Reprod., 28: 683-690.
8. Lenz, R.W., G.D. Ball, M.L. Leibfried, R.L. Ax and N.L. First. 1982. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependant processes. Biol. Reprod., 29: 173-179.
9. Schroeder A.C. and J.J. Eppig. 1984. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. Dew. Biol., 102: 493-497.
10. Tesarik, J., L. Pilka, J. Drahorad, D. Cechova and L. Veselsky. 1988. The role of cumulus cell-secreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability: implication in IVF. Human Reprod., Vol. 3 no. 1 pp. 129-132.
11. Toyoda, Y. and M.C. Chang. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. J. Reprod. Fert., 36: 9-22.
12. Vanderhyden, B.C. and D.T. Armstrong. 1989. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. Biol. Reprod., 40: 720-728.
13. 박세필, 김은영, 정형민, 정길생. 1990. 체외성숙 우난포란의 체외수정과 발달에 관한 연구. I. 난구세포가 체외성숙 우난포란의 체외수정과 발달에 미치는 영향. 한국가축번식학회지. 14(1): 1-8.
14. 박세필, 김은영, 정형민, 박홍대, 김종배, 정길생. 1990. 체외성숙 우난포란의 체외수정과 발달에 관한 연구. II. 난구세포 항체가 우난포란의 체외성숙에 미치는 영향. 한국가축번식학회지. 14(2): 93-100.
15. 박세필, 박태균, 윤산현, 고대환, 정길생. 1989. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구. III. 체외성숙 우난포란의 체외수정과 발달. 한국가축번식학회지. 13(2): 105-112.