

排卵直前 생쥐 卵胞卵의 體外成熟, 受精 및 胚 發達에 미치는 前培養의 效果에 關한 研究

李相鎭·康元駿·朴世必·張慶權·崔暎文*·鄭吉生

建國大學校 畜產大學

Effect of Preincubation on *In Vitro* Maturation, Fertilization and Development of Preovulatory Oocytes in Mice

Lee S.J., W.J. Kang, S.P. Park, K.H. Chang, K.M. Choi, and K.S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

The effects of preincubation on *in vitro* maturation and fertility were investigated using preovulatory oocytes with and without cumulus cells obtained from superovulated out-bred ICR mice. Oocytes were recovered from fully grown follicle at 10hr after hCG administration. A part of oocytes recovered were treated with the solution of 0.1% hyaluronidase to remove cumulus cells.

Both intact and treated oocytes were then incubated for 0 to 6hr in mT6 medium containing 0.3% BSA. After incubation for various times, a part of oocytes were subjected to the investigation of nuclear maturation and the remaining oocytes were used for the induction of *in vitro* fertilization by adding them into medium containing capacitated mice epididymal spermatozoa.

Above all, the percentage of preovulatory oocytes at the stage of metaphase II after preincubation for 0, 2, 4 and 6hr was 15.8, 36.4, 47.5 and 66.7%, respectively, suggesting the *in vitro* maturation of oocytes during their incubation. On the other hand, fertilization rate of oocytes preincubated for 0, 2, 4 and 6hr with and without cumulus cells were 41.0, 58.7, 68.7 and 75.6%, and 50.0, 45.1, 37.8 and 39.2%, respectively. No significant differences in fertilization rate between preovulatory oocytes preincubated for 6hr with cumulus cells and naturally ovulated oocytes were observed.

These results suggest that cumulus cells take very important role in maturation of oocytes *in vitro*. The percentage of preovulatory oocytes developed to 2-cell stage *in vitro* fertilization following preincubation for 0 to 6hr with and without cumulus cells ranged from 48.5 to 82.4% and 36.9 to 56.1%, respectively. Also, the rates of oocytes developed to blastocyst *in vitro* fertilization after preincubation for 0 to 6hr with and without cumulus cells were 28.1, 39.3, 42.5 and 44.0%, and 12.5, 32.6, 24.4 and 15.5%, respectively.

From these results, it could be said that fertility of preovulatory oocytes with cumulus cells could be improved to the level of that of naturally ovulated oocytes by adequate preincubation *in vitro*. Cumulus cells may, therefore, affect *in vitro* maturation, fertilization and following development of oocytes by influencing zona hardening.

I. 緒 論

成熟을完了한後排卵된생쥐卵子는再現性이높고安定된 높은體外發生率을보이지만卵巢에存在하는未成熟卵을採取하여體外에서成熟시킬때에는不完全한培地의組成때문에아기되는zona hardening과같은現象에의하여受精率이낮고그후의胚發生率도떨어지는것이보통이다(Iwamatsu와Chang, 1971, 1972; Hoppe와Pitts, 1973; Pavlok과McLaren, 1972; Tsafiriri, 1978; Bleil과Wassarman, 1980; Juetten과Bavista, 1983; Canipari 등, 1984; Fleming 등, 1985; Choi 등, 1987; Nakagata와Tanaka, 1988; Vanderhyden 등, 1989).

그러나排卵直前의그라아프卵胞에서採取된卵胞卵의경우는적절한前培養處理에의하여正常的인體外發生을誘導할수있다(Nakagata와Tanaka, 1988).

그렇기때문에,사람에있어서體外受精및胚移植(IVF & ET)을위하여採取된卵子는授精前에一定時間前培養處理하는것이보편화되어있다(Blандаu, 1980; Testart 등, 1982; Trounson 등, 1982; Veeck 등, 1983).

이러한報告들을基礎로하여本研究에서는排卵直前에採取한卵胞卵을前培養處理함에있어서卵丘細胞의有·無가卵胞卵의核成熟,受精및胚發達到 미치는影響을檢討하였는바그結果를報告한다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

供試動物로는ICR系統의생쥐를使用하였는데雌性생쥐는4~6주령,體重은15~25g이었고,雄性생쥐는12~14주령,體重은30~45g이었다.

飼育條件으로서,日照時間은14時間(午前7時~午後9時)으로調節하였으며,固型飼料와물은無制限

給與하였다.

2. 過排卵誘起와 卵子回收

PMSG(Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Intervet, Holland)와 hCG(human Chorionic Gonadotropin, Sigma, U.S.A.) 5IU를 48時間間隔으로雌性생쥐의腹腔에各各注射하여過排卵을誘導하였다.

hCG注射後10時間째에생쥐를屠殺하여卵巢를剔出한後,卵巢에存在하는排卵直前의그라아프卵胞로부터卵子를採取하였다.

3. 卵胞卵의 前培養 處理

採取된卵胞卵의一部는卵丘細胞가附着된狀態로,다른一部는0.1% hyaluronidase 溶液으로卵丘細胞를除去한다음,BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma, U.S.A.) 3mg/ml가 함유된修正Tyrode 溶液(李와鄭, 1989)에 옮겨서 각각 0, 2, 4 및 6時間 동안前培養處理를實施하였다.

4. 前培養處理된 卵胞卵의 核成熟度와 體外發生

前培養處理가 끝난一部의卵胞卵은回收하여新鮮한培養液으로3回洗滌한다음,2.5% glutaraldehyde와10%中性formalin 溶液으로固定하고0.25% Lacmoid 溶液으로染色한다음Donahue(1968)의方法에따라卵胞卵의核成熟度を觀察하였다.그리고나머지一部의卵胞卵은1.5~2時間 동안前培養處理를實施하여受精能을獲得한精巢上體尾部の精子로授精시켰다. 이때使用된精子의濃度は $1\sim 2 \times 10^6$ /ml이었다.

授精後6時間째에卵子를回收하여一部는上述한方法으로固定·染色하여體外受精率을觀察하고다른一部는新鮮한培養液으로3回洗滌하여100 μ M의EDTA(Junsei Co. Japan)가 함유된修正Tyrode 培養液小滴(10~20 μ l)으로 옮겨5% CO₂, 95% 空氣條件下的CO₂培養器內에서培養하면서그發達狀

態를 觀察하였다.

III. 結果 및 考察

1. 前培養 處理된 卵胞卵의 核成熟

hCG 注射後 10時間째에 卵巢에서 採取한 卵胞卵을 0, 2, 4 및 6時間 동안 培養한 다음, 0.1% hyaluronidase 溶液으로 卵丘細胞를 除去한 後, 固定·染色하여 核成熟度를 觀察한 結果는 Table 1에 提示된 바와 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 0, 2, 4 및 6時間 동안 前培養 處理를 實施한 다음 觀察한 卵胞卵의 核成熟度는 GV(Germinal Vesicle)段階에서 Metaphase II 段階까지 다양하였는데 각 시간대에 있어서 受精適期인 M II 段階에 까지 成熟한 卵子の 比率는 各各 15.8, 36.4, 47.5 및 66.7%였다.

특히 CM(Chromatin Mass)段階의 卵子是 0時間 째에 41.1%로 가장 많이 觀察되었으나 그 후 점차 감소하여 前培養時間이 6時間째에는 1.2%까지 감소하였다. 이러한 結果는 M II 段階 이전의 未成熟卵子が 體外에서 계속 成熟하였다는 것을 示唆하고 있다. 실제로 *in vitro* 에서 6時間 동안 前培養 處理를 實施하였을 때, M II 段階에 까지 成熟한 卵子是 排卵된 卵子の 그

것과 一致하는 것이었다.

그러나 前培養 處理가 끝난 卵胞卵의 核狀은 GV 段階에서 M II 段階까지 多樣하였으며, 前培養 處理를 받은 모든 卵胞卵이 M II 段階에 까지 成熟하는 試驗區는 觀察되지 않았다.

本 實驗의 이러한 結果는 Donahue(1968), Iwamatsu와 Chang(1970) 및 Nakagata와 Tanaka(1988)의 報告와 有似한 傾向이었다.

2. 前培養 處理된 卵子の 體外受精

採取된 卵胞卵을 卵丘細胞의 有·無에 따라 구분하여 각각 0, 2, 4 및 6時間동안 前培養 處理를 實施한 다음 受精能을 獲得한 精巢上體尾部 精子로 授精을 試圖하였다.

授精後 6時間째에 卵子を 回收하여 固定, 染色한 다음, 體外受精의 여부를 調査한 結果를 Table 2에 提示하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 0, 2, 4 및 6時間 동안 前培養 處理를 實施한 다음, 授精에 供試한 卵胞卵의 受精率은 卵丘細胞를 除去하지 않은 卵子の 경우, 前培養 處理 時間別(0, 2, 4, 및 6時間) 體外受精率은 各各 41.0, 58.7, 68.7 및 75.6%였으며 卵丘細胞를 除去한 裸化卵子の 그것은 각각 50.0, 45.1, 37.8 및

Table 1. Nuclear maturation of preovulatory oocytes preincubated for various times *in vitro*.

Preincubation time(hr)	No. of oocytes examined	Nuclear maturation (%)							Abnormal (%)
		GV ¹⁾	MI ²⁾	AI ³⁾	TI ⁴⁾	CM ⁵⁾	pro MII ⁶⁾	MII	
Control (ovulated eggs)	106	—	32 (30.2)	2 (1.9)	2 (1.9)	2 (1.9)	—	66 (62.3)	2 (1.9)
0	95	10 (10.5)	5 (5.3)	—	—	39 (41.1)	4 (4.2)	15 (15.8)	22 (23.2)
2	88	3 (3.4)	10 (11.4)	1 (1.1)	—	9 (10.2)	31 (35.2)	32 (36.4)	2 (2.3)
4	80	6 (7.5)	12 (15.0)	—	—	2 (2.5)	19 (23.8)	38 (47.5)	3 (3.8)
6	84	4 (4.8)	8 (9.5)	—	—	1 (1.2)	14 (16.7)	56 (66.7)	1 (1.2)

1) GV: Germinal Vesicle

2) MI: Metaphase I

3) AI: Anaphase I

4) TI: Telophase I

5) CM: Chromatin Mass

6) MII: Metaphase II

Table 2. *In vitro* fertilization of preovulatory oocytes preincubated for various times *in vitro*.

Hours for pre-incubation	Treatment	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized (%)			No. of unfertilized	Abnormal (%)
			Total	Monospermic	Polyspermic		
Control (ovulated eggs)		94	72 (76.6)	68 (72.3)	4 (4.3)	16 (17.0)	6 (6.4)
0	W/ Cu. ¹⁾	105	43 (41.0)	40 (38.1)	3 (2.9)	62 (59.0)	—
	W/o Cu. ²⁾	108	54 (50.0)	51 (47.2)	3 (2.8)	24 (22.2)	30 (27.8)
2	W/ Cu.	172	101 (58.7)	94 (54.7)	7 (4.1)	64 (37.2)	7 (4.1)
	W/o Cu.	153	69 (45.1)	69 (45.1)	—	30 (19.6)	39 (25.5)
4	W/ Cu.	163	112 (68.7)	101 (62.0)	11 (6.7)	42 (25.8)	9 (5.5)
	W/o Cu.	122	46 (37.8)	44 (36.1)	2 (1.6)	36 (29.5)	22 (18.1)
6	W/ Cu.	168	127 (75.6)	113 (67.3)	14 (8.3)	37 (22.0)	5 (3.0)
	W/o Cu.	148	58 (39.2)	54 (36.5)	4 (2.7)	42 (28.4)	42 (28.4)

1) W/Cu. : With cumulus 2) W/o Cu. : Without cumulus

39.2%였다. 즉 卵丘細胞를 除去하지 않은 卵胞卵은 前培養 時間이 延長될수록 受精率이 增加하는 경향을 보인 반면, 卵丘細胞를 除去한 裸化 卵자의 경우는 前培養 時間이 延長될수록 受精率이 低下하는 경향을 보였다.

한편, 排卵된 卵자의 體外受精率은 76.6%였는데 이는 卵丘細胞가 除去되지 않은 卵胞卵을 6時間 前培養 處理를 實施하였을 때의 成績과는 有似한 것이었으나 0, 2 및 4時間 前培養區의 受精率보다는 높은 것이었다. 또 卵丘細胞를 除去한 卵胞卵의 경우는 前培養 處理 時間에 관계없이 排卵된 卵胞卵보다 體外受精率이 낮았다. 이러한 結果는 다같이 Iwamatsu와 Chang (1972) 및 Nakagata와 Tanaka(1988)의 成績과 유사한 것이었다.

이러한 結果들을 綜合하여 考察할 때 排卵 直前の 卵胞卵도 卵丘細胞가 存在할 때에 比로소 前培養 處理의 效果가 있다는 것을 알 수 있다. 다시 말해서, 裸化 卵

胞卵은 前培養 處理의 效果가 나타나지 않았다. 이러한 現象은 卵丘細胞를 除去한 狀態의 卵자를 體外에서 培養하면 spontaneous zona hardening 現象이 나타나기 때문인 것으로 사료된다(De Felici 과 Siracusa, 1982; Gianfortoni와 Gulyas, 1985; Vanderhyden 등, 1988).

3. 前培養 處理된 卵자의 胚發生率

受精된 卵胞卵을 回收하여 100 μM의 EDTA가 함유된 培養液 小滴에서 培養하면서 胚發達率을 調査한 結果는 Table 3에 提示된 바와 같다.

Table 3에서 보는 바와 같이 0, 2, 4 및 6時間 동안 前培養 處理後 受精된 卵胞卵이 2細胞期까지 發達하는 比率은 卵丘細胞를 除去하지 않은 경우는 각각 48.5, 76.4, 70.2 및 82.4%였고 卵丘細胞를 除去한 경우는 각각 50.3, 45.1, 36.5 및 38.1%였다.

또한 이들 受精卵이 桑實胚와 胚盤階段에 까지 發

Table 2. In vitro development of preovulatory oocytes fertilized following preincubation for various hours in vitro.

Hours for preincubation (hr)	Treatment	No. of oocytes examined	No. of embryos developed to :		
			2-cell	Morula	Blastocyst
Control (Ovulated eggs)		130	117(90.0)	86(73.5)	63(53.8)
0	W/ Cu. ¹⁾	132	64(48.5)	31(48.4)	18(28.1)
	W/o Cu. ²⁾	114	64(56.1)	15(23.4)	8(12.5)
2	W/ Cu.	110	84(76.4)	48(57.1)	33(39.3)
	W/o Cu.	102	46(45.1)	15(32.6)	15(32.6)
4	W/ Cu.	114	80(70.2)	46(57.5)	34(42.5)
	W/o Cu.	122	45(36.9)	16(35.6)	11(24.4)
6	W/ Cu.	102	84(82.4)	55(65.5)	37(44.0)
	W/o Cu.	148	58(39.2)	20(34.5)	9(15.5)

1) W/Cu. : With cumulus 2) W/o Cu. : Without cumulus

달한 比率은 卵丘細胞를 除去하지 않은 경우는 각각 48.4, 57.1, 57.5 및 65.5%와 28.1, 39.3, 42.5 및 44.0%였고 卵丘細胞를 除去한 경우는 각각 23.4, 32.6, 35.6 및 34.5%와 12.5, 32.6, 24.4 및 15.5%로 卵丘細胞를 除去하지 않은 경우의 胚發生率이 높았고, 또 卵丘細胞를 除去하지 않은 경우에 있어서는 前培養 時間이 길어질수록 胚發生率이 개선되는 경향을 보였다. 그러나 卵丘細胞를 除去한 경우는 이와는 반대의 경향을 보였다.

이러한 胚發生의 結果는 Nakagata 와 Tanaka (1988)의 研究結果와 대체로 一致하는 것이었으며, 卵丘細胞가 附着된 狀態가 胚發生率이 훨씬 良好하다고 한 De Felici 등(1982)과 Vanderhyden 등(1988)의 研究結果와도 一致하는 것이었다.

以上の 結果를 綜合하여 考察할 때, 排卵直前に 採取한 卵丘卵을 體外에서 成熟시키고, 授精시키며, 受精된 胚를 培養함에 있어서 一定期間의 前培養 處理가 效果的이라는 것을 알 수 있었으며 이러한 效果는 卵丘細胞가 存在할 때에만 나타난다는 것을 알 수 있었다. 이와는 반대로 卵丘細胞가 除去된 卵丘卵의 경우는 前培養 處理에 의해 體外發生率이 오히려 저하하는 경향을 보

였는데 이러한 저하현상의 구체적인 원인은 알 수 없으나 卵丘細胞의 除去가 zona hardening 을 촉진하기 때문일 것으로 생각된다.

IV. 摘要

ICR 系統의 생쥐에 hCG 를 處理한 後 10時間에 回收한 排卵直前 卵丘卵을 卵丘細胞를 그대로 둔 群과 除去한 群으로 나누어 각각 0, 2, 4 및 6時間 동안 前培養 處理를 實施한 다음, 核成熟度, 體外에 있어서의 受精率과 胚發達率 등을 調査하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 排卵直前 卵丘卵을 回收하여 卵丘細胞가 存在하는 條件下에서 0, 2, 4 및 6時間 동안 前培養 處理를 실시한 결과, 受精適期인 M II 段階에 까지 成熟한 卵子の 比率은 각각 15.8, 36.4, 47.5 및 66.7%였다.

2. 採卵後, 0, 2, 4 및 6時間 동안 前培養 處理를 실시한 卵丘卵의 受精率은 卵丘細胞가 除去되지 않은 卵子の 경우는 각각 41.0, 58.7, 68.7 및 75.6%였고, 卵丘細胞가 除去된 裸化 卵子の 경우는 각각 50,

0, 45.1, 37.8 및 39.2%였다.

3. 自然排卵된 卵子和 採取後 卵丘細胞의 存在下에서 6時間 동안 前培養 處理를 받은 卵자의 體外受精率은 각각 76.6%와 75.6%로써 有意差가 認定되지 않았다 ($P < 0.05$).

4. 採卵後 각각 0, 2, 4 및 6時間 동안 前培養 處理 되어 受精된 卵자가 2細胞期 卵자로 發達한 比率은 卵丘細胞를 除去하지 않은 卵자의 경우는 각각 48.5, 76.4, 70.2 및 82.4%였고, 卵丘細胞가 除去된 裸化 卵자의 경우는 50.3, 45.1, 36.5 및 38.1%였다.

5. 採卵後, 0, 2, 4 및 6時間 동안 前培養 處理된 卵자中 體外에서 受精이 이루어진 卵자가 桑實胚와 胚盤 胞로 發達하는 比率은 卵丘細胞를 除去하지 않은 경우, 각각 48.4, 57.1, 57.5 및 65.5%와 28.1, 39.3, 42.5 및 44.0%였고, 裸化 卵자의 경우는 각각 23.4, 32.6, 35.6 및 34.5%와 12.5, 32.6, 24.4 및 15.5%였다.

6. 前培養 處理된 卵胞卵中 體外에서 受精이 이루어진 卵胞卵의 發生에는 4~6時間의 前培養 處理가 效果의 이었으며, 이러한 效果는 卵丘細胞의 存在하에서만 나타났다.

V. 引用文獻

1. Blandau, R.J. 1980. *In vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 33: 3-11.
2. Bleil, J.D. and P.M. Wassarman. 1980. Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 1029-1033.
3. Canipari, R., F. Palombi, M. Ruminucci and F. Mangia. 1984. Early programming of maturation competence in mouse oogenesis. *Dev. Biol.*, 102: 519-524.
4. Choi, T.S., M. Mori, K. Kohmoto and Y. Shoda. 1987. Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 79: 565-568.
5. De Felici, M. and G. Siracusa. 1982. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. *Gamete Research.*, 6: 107-113.
6. De Felici, M., A. Salustri and G. Siracusa. 1985. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycan. *Gamete Research.*, 12: 227-235.
7. Donahue, R.P. 1968. Maturation of the mouse oocytes *in vitro*. : I. Sequence and timing of nuclear progression. *J. Exp. Zool.*, 169: 237-280.
8. Fleming, A.D., G. Evans, E.A. Walton, and D.T. Armstrong. 1985. Developmental capability of rat oocytes matured *in vitro* in defined medium. *Gamete Research.*, 12: 255-263.
9. Gianfortoni, J.G. and B.J. Gulyas. 1985. The effects of short-term incubation (aging) of mouse oocytes on *in vitro* fertilization, zona solubility and embryonic development. *Gamete Research.*, 11: 59-68.
10. Gulyas, B.J. and L.C. Yuan. 1985. Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *J. Exp. Zool.*, 233: 269-276.
11. Hoppe, P.C. and S. Pitts. 1973. Fertilization *in vitro* and development of mouse ova. *Biol. Reprod.*, 8: 420-426.
12. Iwamatsu, T. and M.C. Chang. 1971. Factors involved in the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 26: 197.
13. Iwamatsu, T. and M.C. Chang. 1972. Sperm penetration *in vitro* of mouse oocytes at various times during maturation. *J. Reprod. Fertil.*, 31: 237.
14. Juetten, J. and B.D. Bavista. 1982. Effects of egg aging on *in vitro* fertilization and first cleavage division in the hamster. *Gamete Research.*, 8: 219-230.

15. Nakagata, N. and A. Tanaka. 1988. Effect of preincubation on fertilization capability and preimplantation development of preovulatory oocytes in mice. *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 33(1): 160-168.
16. Pavlok, A. and A. McLaren. 1972. The role of cumulus cells and the zona pellucida in fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 29: 91-97.
17. Testart, J., B. Lassalle and R. Frydman. 1982. Apparatus for the *in vitro* fertilization and culture of human oocytes. *Fertil. Steril.*, 38: 372-375.
18. Trounson, A.O., L.R. Mohr, C. Wood, and J.F. Leeton. 1982. Effects of delayed insemination on *in vitro* fertilization, culture and transfer of human embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 64: 285.
19. Tsafriiri, A. 1978. Oocytes maturation in mammals. Eds. Johns, R.E. "The vertebrate ovary", pp. 409-442.
20. Vanderhyden, B.C., K.J. Laughlin, J.M. Rutledge and D.T. Armstrong. 1989. Zona drilling increase the penetrability of rat oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 40: 953-960.
21. Veek, L.L., Jr. J.W.E. Wortham, J. Witmyer, B.A. Sandow, A.A. Acosta, J. E. Garcia, G.S. Johnes and Jr. H.W. Jones. 1983. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 39: 594-602.
22. 李相眞, 鄭吉生. 1989. 過排卵 處理後의 經過時間이 생쥐 卵子的 核成熟과 體外受精에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會誌., 13(2): 70-79.