

가토복수가 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 효과

정형민, 박세필, 오종훈, 이훈택, 정길생

건국대학교 축산대학

Effect of Rabbit Peritoneal Fluid(PF) on *in vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes

Chung, H.M., S.P. Park, J.H. Oh, H.T. Lee, and K.S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

This study was undertaken to evaluate the effect of rabbit peritoneal fluid(rPF) on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. From does 20h after hCG injection, rPF was aspirated aseptically at laparotomy, and then centrifuged, filtrated, and preincubated immediately for 12h. Porcine follicular oocytes isolated from ovaries of slaughtered animals were incubated in TCM-HEPES+10% FCS, TCM-HEPES+rPF(v/v, 50/50), or rPF only and examined the nuclear maturation after aceto-orcein or hochest staining. After identifying the optimal incubation time, this experiment was repeated for 5 times. Under the TCM-HEPES containing hormones and serum condition, the time range of porcine follicular oocyte maturation was 38 to 44 hours and the optimal time of maturation of follicular oocyte *in vitro* was 42 hour cultivation, respectively. The maturation rates (89.4% and 92.7%) of porcine follicular oocytes cultured in the media with 50% rPF or only rPF were significantly higher than that (84.6%) of oocytes cultured with TCM-HEPES, respectively. These results suggest that the unknown component(s) of rPF promoted *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes.

I. 서론

최근 가축 수정란에 대해 유전공학적 기법을 적용하여 가축의 생산성을 증진하고자 하는 연구가 다각적으로 수행되고 있다(First, 1991). 그러나 이들 연구를 수행하기 위한 기본 재료인 다수의 수정란을 확보하는 문제가 대두되고 있어 현재 가축의 난소로부터 회수된 미성숙 난포란을 이용 체외성숙, 수정 및 배발달을 유도하려는 연구도 병행되고 있으나 그 성적은 극히 저조한 실정이다(Cross와 Brinster, 1970; Mooer와 Trounson, 1970). 이러한 이유로는 난포란의 체외성숙과정에 있어서 핵성숙은 이루어지나 이에 수반되는 난세포질 성숙이 일어나지 않는 것이 그 주된 원인으로

지적되고 있다(Leibfried와 Bavister, 1983; Thibault, 1977; Vanderhyden과 Armstrong, 1989). 따라서 가축 난포란을 이용할 경우 체외성숙과정은 무엇보다도 중요한 과정이라고 사료된다. 한편, 일부의 포유동물의 경우에서 자연적 혹은 인위적으로 자궁외 임신을 유도하는 연구가 보고되고 있는데 이는 가축 난자의 경우 자궁 이외의 환경조건에서도 어느 단계까지는 발생이 가능하다는 것을 시사해 주는 자료라 하겠다(McLaren과 Tarkowski, 1963; Buckley와 Caine, 1979; Davis, 1982). 따라서 본 연구는 돼지 난포란의 체외성숙능을 제고시키고자 가토로부터 회수한 복수(peritoneal fluid; PF)를 이용하여 돼지 난포란의 체외성숙에 이용 그 효과를 검토할 목적으로 실시

하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난소의 회수와 운반

본 연구에 사용한 동물은 돼지로서 도축장에서 도살 즉시 회수된 난소를 39°C 조건의 멸균 생리식염수가 충만되어 있는 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 재차 멸균 생리식염수로 세척한 후 난소표면을 alcohol로 세척한 후 실험에 사용하였다.

2. 배양액

기초배양액으로는 25mM HEPES(Gibco, USA)가 첨가된 TCM-199배양액을 사용하였다. 대조군으로서 기초 배양에 FSH(1 μ g/ml), hCG(2IU/ml) 및 Oestradiol-17 β (1 μ g/ml)과 10% FCS를 첨가한 것을 사용하였으며, 복수의 경우 호르몬의 혈청이 함유되지 않은 TCM-HEPES 배양액에 50%, 혹은 100% 복수만을 사용하였다. 이들 모든 배양액은 제작후 0.22 μ m의 milipore filter로 제균한 후 50 μ l의 배양소적용 제작하여 39°C의 CO₂배양기에서 12~24시간 동안 전배양을 실시하였다.

3. 가토 복수의 준비

체중 2.5kg의 자성가토에 0.3mg의 p-FSH(Metrodin, Sereno, USA)를 12시간 간격으로 정맥 주사함으로써 다배란을 유도하였다. 최종 FSH 투여후 12시간째에 75IU의 hCG(Pregnyl, Organon, USA)를 정맥주사한 후 웅성가토와 교미를 유도시켜 배란과 수정을 유도하였다. hCG 투여후 20시간째에 Laparatomy를 실시하여 무균적으로 복수만을 회수하

였으며 회수된 복수는 즉시 15,000 \times g에서 1분간 원심분리를 실시한 후 상등액만을 취해 0.22 μ m의 milipore filter로 여과한 후 사용하였다. 1수당 회수된 복수의 양은 약 0.8ml 정도였다(Collas 등, 1991).

4. 난포란의 회수와 체외성숙

도축장에서부터 회수된 난소를 17 gauge 주사침이 부착된 주사기를 이용하여 3~5mm의 가시난포를 흡인하여 실험현미경하에서 난구세포가 치밀하게 부착된 난포란만을 회수하였다. 회수된 난포란의 생사유무를 확인하기 위하여 0.4% trypan blue액에 10분간 침지한 후 염색되지 않은 난포란만을 선별, 재차 신선 배양액으로 세척한 다음 이미 전배양된 체외성숙용 배양소적으로 옮겨 39°C의 CO₂배양기내에서 42시간동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다(박, 1991).

5. 체외성숙의 판정

난포란의 체외성숙 유무를 확인하기 위하여 0.1% aceto-orcein 염색법과 Hoechst A 33342 염색을 실시하였다. 체외성숙의 판정은 제1극체의 방출과 Metaphase II 단계의 염색상을 나타내는 것만을 최종 성숙이 완료된 난포란으로 판정하였다.

III. 結果 및 考察

1. 돼지 난포란의 체외성숙 조건의 확립

본 연구를 실시하기에 앞서 돼지의 미성숙난포란의 체외성숙 소요시간을 알아보기 위하여 기초배양액에 호르몬과 혈청이 함유된 배양액하에서 체외성숙을 유도하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다.

Table 1. *In vitro* maturation of porcine follicular oocytes in TCM-HEPES

| Hours of culture | No. of oocytes examined | Nuclear stages | | | | | | | Deg. or uniden. (%) |
|------------------|-------------------------|----------------|------|-----|-------|-------|-------|------------|---------------------|
| | | GV | GVBD | N C | Met I | Ana I | Tel I | Met II (%) | |
| 36 | 106 | 14 | | | 40 | | | 42 (39.6) | 6 (5.7) |
| 38 | 72 | | | 8 | 4 | 4 | | 40 (55.6) | 6 (8.3) |
| 40 | 99 | | | | 30 | | | 67 (67.7) | 2 (2.0) |
| 42 | 195 | 4 | 2 | | 11 | 4 | 9 | 165 (84.6) | |
| 44 | 156 | | | | 12 | | | 123 (78.8) | 21 (13.5) |
| 46 | 139 | 3 | | | 15 | | | 89 (64.0) | 30 (23.2) |

상기 Table 1에서 보는 바와 같이 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙은 38시간에서 44시간째에 높은 체외성숙율을 나타내었으며 체외성숙 42시간째에 최종 성숙단계인 Metaphase II로의 발달율은 84.6%로서 가장 높은 성적을 나타내었다. 따라서 본 연구의 체외성숙 조건은 42시간으로 선정하였다.

2. 가토복수 첨가가 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 효과

다배란이 유도된 자성가토로부터 회수된 복수를 난포란의 체외성숙 배양액에 첨가하였을 때의 결과는 Table 2에 제시된 바와 같았다.

상기 Table 2에서 보는 바와 같이 대조구인 호르몬과 혈청이 첨가된 TCM-HEPES에서의 돼지 난포란의 체외성숙의 경우 총 195개중 165개가 최종 성숙단계인 Metaphase II로 발달하여 성숙율은 86.6%이었다. 반면, 호르몬과 혈청이 첨가되지 않은 TCM-HEPES 배양액에 50% 가토복수를 첨가한 경우 180개의 미성숙 난포란을 체외성숙시켰을 때 Metaphase II로의 발달율은 89.4%인 161개였으며, 100% 복수만을 사용하여 체외성숙시켰을 때의 체외성숙율은 92.7%로써 복수를 첨가한 경우 대조구의 성적에 비하여 다소 높거나 유의하게 높은 체외성숙율을 얻을 수 있었다 ($p < 0.05$).

한편, Collas 등(1991)은 발정중기 가토에서 회수된 복수를 전핵기 수정란의 체외배양에 이용했을 때 수정란의 난할율과 배반포로 발생시 할구수가 현저히 증가한다는 사실을 밝히면서 복수 성분중에는 난관액이나 자궁액서 관찰되어지는 것과는 다른 유형의 난성장 촉진인자(embryotrophic factor)가 존재하는 것으로 보고하였다.

본 연구에서 실시한 결과에서는 가토복수가 수정란의 성장이외에도 난포란의 체외성숙도 촉진시키는 것으로 확인되었다. 따라서 향후 가토 복수에 대한 보다 구체적인 생화학적 분석과 아울러 종간의 차이성 등이 검토되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 종합하여 고찰하여 볼 때 돼지 난포란의 체외성숙시 기존의 체외성숙 조건인 TCM-HEPES 배양조건보다 가토 복수를 이용하는 것이 보다 효과적인 방법이라고 생각되며 특히 100% 복수만을 사용할 경우 상당히 양호한 성적을 얻을 수 있었다. 따라서 가토복수의 첨가는 기존의 체외성숙조건에 비하여 유용한 체외성숙조건이 될 수 있으리라 생각되며 이는 가토 복수중에 미성숙 난포란의 체외성숙을 촉진시키는 물질이 존재할 것으로 생각된다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지 미성숙난포란의 체외성숙율을 제고시키기 위한 방법으로서 가토복수의 효과를 검토하였다. 가토 복수의 준비는 다배란 유도후 hCG 투여후 20시간째에 개복술을 실시하여 무균적으로 복수만을 회수한 다음 즉시 원심분리 및 여과를 실시한 다음 12시간 동안 전배양을 실시하였다.

돼지 난포란의 회수는 도축장에서 회수된 난소로부터 회수하였으며, 회수된 미성숙 난포란은 10% FCS가 함유된 TCM-HEPES 배양액 혹은 50% 복수가 함유된 TCM-HEPES 배양액이나 100% 복수액에 침치하여 체외성숙을 유도하였다. 체외성숙 유무의 확인은 aceto-orcein 혹은 Hochest 염색액을 이용하여 핵성숙도를 조사하였다. 그 결과, 돼지 난포란의 체외성숙

Table 2. In vitro maturation of porcine oocytes cultured for 42hr in PF or TCM-HEPES

| Medium | Supplement | No. of oocytes examined | Nuclear stages | | | | | |
|-----------|------------|-------------------------|----------------|------|-------|-------|-------|------------------------|
| | | | G V | GVBD | Met I | Ana I | Tel I | Met II (%) |
| TCM-HEPES | 10% FCS | 195 | 4 | 2 | 11 | 4 | 9 | 165(84.6) ^a |
| TCM-HEPES | 50% PF | 180 | 1 | - | 14 | 2 | 2 | 161(89.4) ^a |
| PF | None | 206 | - | - | 3 | 5 | 2 | 196(92.7) ^b |

a, b; $p < 0.05$

에 소요되는 시간은 호르몬과 혈청이 함유된 TCM-HEPES 배양액하에서는 38시간에서 44시간 정도였으며 42시간째의 경우가 가장 높은 체외성숙율을 나타내었다. 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙시 가토복수를 첨가할 경우, 대조구인 호르몬과 혈청이 함유된 TCM-HEPES 배양액에서의 체외성숙율은 84.6%였으며 처리구인 TCM-HEPES에 50% 복수와 100% 복수만을 사용했을 때의 체외성숙율은 각각 89.4%와 92.7%로서 공히 대조구의 성적에 대해 다소 높거나 유의하게 높은 체외성숙율을 나타내었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 가토복수는 돼지 난포란의 체외성숙을 촉진하는 것으로 판명되었으며 이는 복수중에 난포란의 체외성숙을 촉진시키는 물질이 존재하는 것을 시사한다고 하겠다.

V. 引用文獻

1. Buckley, P., A. Caine. 1979. High incidence of abnormal pregnancy in the Djungaraian hamster. J. Reprod. Fert., 56: 679-682.
2. Collas, P., R.T. Duby, and J.M. Robl. 1991. *In vitro* development of rabbit pronuclear embryos in rabbit peritoneal fluid. Biol. Reprod., 44: 1100-1107.
3. Cross, P.C. and R.L. Brinster. 1970. *In vitro* development of mouse oocytes. Biol. Reprod., 3: 297-307.
4. Davis, P.T. 1982. Extrauterine pregnancy in a ewe. Vet. Rec., 110: 475.
5. First, N.L. 1991. New advances in reproductive biology of gametes and embryos. Animal applications of research in mammalian development. pp. 1-22. CSHL Press.
6. Leibfried, M.L. and B.D. Bavister. 1983. Fertilizability of *in vitro* matutred oocytes from golden hamster. J. Exp. Zoo., 226: 481-485.
7. McLaren, A., A. Tarkowski. 1963. Implantation of mouse eggs in the peritoneal cavity. J. Reprod. Fert., 6: 385-388.
8. Moor, R.M. and A.O. Truoston. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert., 49: 101-109.
9. Thibault, C. 1977. Are follicular maturation and oocytes maturation independant processes? J. Reprod. Fert., 51: 1-15.
10. 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.
11. 박세필. 1991. 난구세포가 우난포란의 체외성숙과 수정 및 배발달에 미치는 영향. 박사학위 논문. 건국대학교.