

體外成熟牛卵胞卵의 體外受精과 發達에 關한 研究
VI. Hyaluronic acid 와 Chondroitin sulfate 및 Heparin 이
牛卵胞卵의 體外受精에 미치는 影響

朴世必·鄭炳敏·吳鍾曠·李勳澤·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*

VI. Effect of Hyaluronic acid, Chondroitin Sulfate, and Heparin on
In Vitro Fertilization of Bovine Follicular Oocytes

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

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were undertaken to investigate the rate of *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes treated with glycosaminoglycans(GAGs).

Bovine follicular oocytes were obtained from the ovary of slaughtered animal and matured in media containing the various concentrations of hydluronic acid, chondroitin sulfate or heparin for 26 hours. Epididymal spermatozoa were capacitated and insemination was made by introducing about 10~15 matured oocytes into the suspension of spermatozoa. Six hour after insemination the eggs were transferred to TCM-199 supplemented with FCS(10%) and then examined the embryo development.

After *in vitro* insemination, percentages of ova fertilized were 61.3 or 48.3%, respectively, for the cumulus intact or removed in the percentages of GAGs. However, in case of cumulus-free oocytes treated with GAGs, the fertilization rates were 58.8, 62.1, 58.8, and 61.8%, respectively, showing significant effect compared to 48.3% in cumulus-free oocytes.

Our findings suggest that chondroitin sulfate and heparin are superior to hyaluronic acid in the fertilization and pronuclear formation of bovine oocytes.

I. 緒 論

卵丘細胞塊(cumulus cell mass)가 卵母細胞의 成熟과 胚發達에 작용하는 生理的 機轉은 지금까지 정확히 究明되어 있지 않다. 그러나 卵母細胞를 體外培養했을 때 卵丘細胞로 둘러싸인 卵母細胞가 裸化된 卵母細胞보다 成熟率이 높았으며(Sato 等, 1977; Leibfried 와

First, 1979; Fukui 와 Sakuma, 1980), 前核 形成率(Leibfried-Rutledge 等, 1987) 및 胚發生率도 높았고(Cross 와 Brinster, 1970) 卵丘細胞가 존재함으로써 體外培養時에 일어나는 “透明帶의 硬化” 현상도 抑制된다고 報告되었다(DeFelici 와 Siracusa, 1982).

또한 Ball 等(1983)에 의하여 卵丘細胞를 제거한 卵

본 연구는 건국대학교 동물자원연구소 연구비에 의하여 수행되었음.

母細胞는 精子의 侵入率이 감소했으며 雄性前核 形成率도 저하되었는데, 이것은 卵丘細胞의 卵母細胞에 대한 生理的 作用이 두절되었을 뿐만 아니라 卵丘細胞를 인위적으로 제거하는데 따른 卵母細胞膜 損傷과 acrosome 반응을 감소시켰기 때문이다. 이러한 結果들은 卵丘細胞가 卵胞卵의 體外受精時 야기되는 細胞質 成熟의 결핍을 극복시켜 주며 受精能 및 前核 形成率에 효과적임을 시사한다(Thibault, 1977; Leibfried와 Bavister, 1983; Leibfried-Rutledge 등, 1987). 더욱이 朴等(1992a, b)은 난구세포 分泌物로 看做된 商業用 glycosaminoglycans(GAGs)의 成分을 體外成熟時 첨가했을 때 향상된 卵成熟率을 보였다고 보고한 바 있다.

따라서 本 研究에서는 牛卵胞卵의 體外受精에 미치는 GAGs의 效果를 檢討하기 위하여 앞서 朴等(1992a, b)에 의해 報告된 GAGs의 成分중 hyaluronic acid와 chondroitin sulfate 및 heparin을 처리하여 受精率과 前核形成率을 調査하고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

卵胞卵은 屠畜場(宇星農場)에서 屠殺된 Holstein 成牝牛로부터 回收하였다.

2. 培養液

1) 精子 處理用 培養液

精자를 處理할 때에는 BO液을 基礎培養液으로 使用하였다. 精子 洗滌을 위해서는 基礎 培養液에 5 mM 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) 卵子 處理用 培養液

卵자의 回收, 體外 成熟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 하여 사용목적에 따라 朴等(1992a)의 方法에 準하여 製作된 것을 使用하였다.

3. 卵胞卵의 體外成熟 및 成熟度 判定

卵胞卵의 體外成熟 및 成熟度判定은 朴等(1992b)의 실험방법에 따라 실시하였다.

4. 體外受精

1) 精巢上體 尾部 精子의 回收

屠畜場에서 入手한 精巢를 前記의 生理的 食鹽水로 洗滌한 다음, 精巢上體 尾部만을 잘라내어 3ml의 注射器에 附着된 22gauge의 注射針을 精巢上體管 內腔에 挿入한 다음, BSA 非含有 5mM caffeine-BO液을 注入하여 精자를 灌流하였다. 受精能 獲得에 대한 個體差를 없애기 위하여 2~3頭의 相異한 個體로부터 얻어진 精液을 混合하여 供試하였다.

2) 精子의 受精能 獲得

精巢上體 尾部로부터 採取된 精자를 遠心分離(1,000 rpm×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 除去한 다음 2.5mM caffeine과 5mg/ml BSA를 含有한 培養液을 添加하여 20분 동안 培養器內에서 培養함으로써 精子浮遊를 誘導하였다.

Petri dish(Falcon Co.)內에 100 μ l(15×10⁶ cells/ml)의 精子浮遊液 小滴을 製作한 다음 流動 paraffin oil로 被覆하여 39°C, 5% CO₂ 및 95% 空氣條件의 培養器內에서 2~3時間 및 前培養을 實施함으로써 受精能을 獲得시켰다.

3) 體外受精

前述한 方法에 의하여 體外成熟이 이루어진 卵胞卵을 5mg/ml의 BSA를 含有한 BO液으로 2회 洗滌한 다음 受精能을 獲得한 精자가 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에는 胚發生用 培養液인 10% FCS와 25 mM HEPES를 含有한 TCM-199培養液으로 옮겼다.

4) 受精 與否 判定

體外受精의 與否는 受精後 20시간째에 固定, 染色(0.1% aceto-orcein)을 實施함으로써 細胞質內에 侵入한 精子頭部의 膨化(Stage I), 精子侵入과 雌性前核(Stage II) 및 雌雄前核(Stage III)의 狀態 등을 기준으로 判定하였다.

III. 結果 및 考察

1. Glycosaminoglycans(GAGs)의 添加가 牛 卵胞 卵의 體外受精과 前核形成에 미치는 影響

體外成熟이 이루어진 卵胞卵을 受精能이 獲得된 精巢 上體 精子로 受精시킨 後 20時間에 固定, 染色(0.1% aceto-orcein)을 實施하여 受精率과 前核形成率을 調査한 結果는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 3段階로 區分하였고, 종합한 結果는 Table 1에 提示하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 卵丘細胞가 정상적으로 존재한 경우 受精率은 61.3%로써 卵丘細胞를 除去한 경우 對照區의 受精率 48.3%에 비해 다소 높은 受精 率을 나타내 卵丘細胞가 受精에도 重要한 役割을 遂行 하고 있음을 再次 確認할 수 있었다. 그러나 卵丘細胞 除去 卵胞卵에 各各의 添加劑를 併用했을 때의 受精率은 58.8, 62.1, 58.8 및 61.8%로써 卵丘細胞 附着 卵胞卵의 受精率과 비슷한 成績을 보여 添加된 새가지 添加劑 모두가 受精에 影響을 미치는 것으로 判斷되며, 특히 chondroitin sulfate와 heparin을 併用했을 때 61.8%로써 가장 높은 受精率을 나타내었다.

한편, 受精의 形態를 I, II, III로 區分했을 때

(Fig. 1) 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵의 경우 雌性 및 雄性前核이 出現한 Stage III는 對照區에서 34.5%였고 各各의 添加劑를 併用했을 때 50.0~56.1%였다. 특히 chondroitin sulfate와 heparin을 併用했을 때 가장 높았는데 이러한 成績은 卵丘細胞가 存在하는 경우의 그것의 成績 55.3%보다도 높은 것이었다. 이러한 結果는 Parrish 等(1988)이 處女牛의 發情時 卵 管液中 heparin-like glycosaminoglycans가 牛精子의 受精能을 獲得시켰다는 報告와 Niwa와 Ohgoda (1988)가 heparin과 caffeine을 添加하여 68%의 受精 率을 報告했다는 報告 및 Lenz 等(1983)이 牛精巢 上體 精子의 경우 商業用的 chondroitin sulfate-A를 添加했을 때 높은 尖體反應을 誘起할 수 있었다는 報告와 一致되는 것이라 하겠다. 또한 앞서 朴 等(1992b)에 의해 提示된 成績과 比較해 볼 때 이들 두 添加劑가 卵胞卵의 成熟에 關與하기 보다는 受精率 및 前核 形成 率에 影響을 미치는 것으로 생각되며 이러한 結果로 미루어 보아 卵丘細胞로부터 分泌되는 物質로 간주된 chondroitin sulfate와 heparin-like glycosaminoglycans은 卵胞卵 보다는 精子에 影響을 미치는 것으로 判斷된다.

이러한 結果를 綜合하여 볼 때 卵丘細胞 分泌物에 대

Table 1. Effect of glycosaminoglycans(GAGs) on *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes

Oocytes	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of ova fertilized/ Total no. (%)	Stage of fertilization		
			I	II	III
With cumulus cell	0	38/62 (61.3)	7 (18.4)	10 (26.3)	21 (55.3)
	0	29/60 (48.3)	15 (51.7)	4 (13.8)	10 (34.5)
Without ^{a)} cumulus cell	Hy+Ch	40/68 (58.8)	9 (22.5)	10 (25.0)	21 (52.5)
	Ch+He	41/66 (62.1)	3 (7.3)	15 (36.6)	23 (56.1)
	Hy+He	40/68 (58.8)	10 (25.0)	10 (25.0)	20 (50.0)
	Hy+Ch+He	42/68 (61.8)	5 (11.9)	14 (33.3)	23 (54.8)

^{a)} : Cumulus cell removed with pipetting

Hy : Hyaluronic acid (800 $\mu\text{g/ml}$)

Ch : Chondroitin sulfate (400 $\mu\text{g/ml}$)

He : Heparin (200 $\mu\text{g/ml}$)

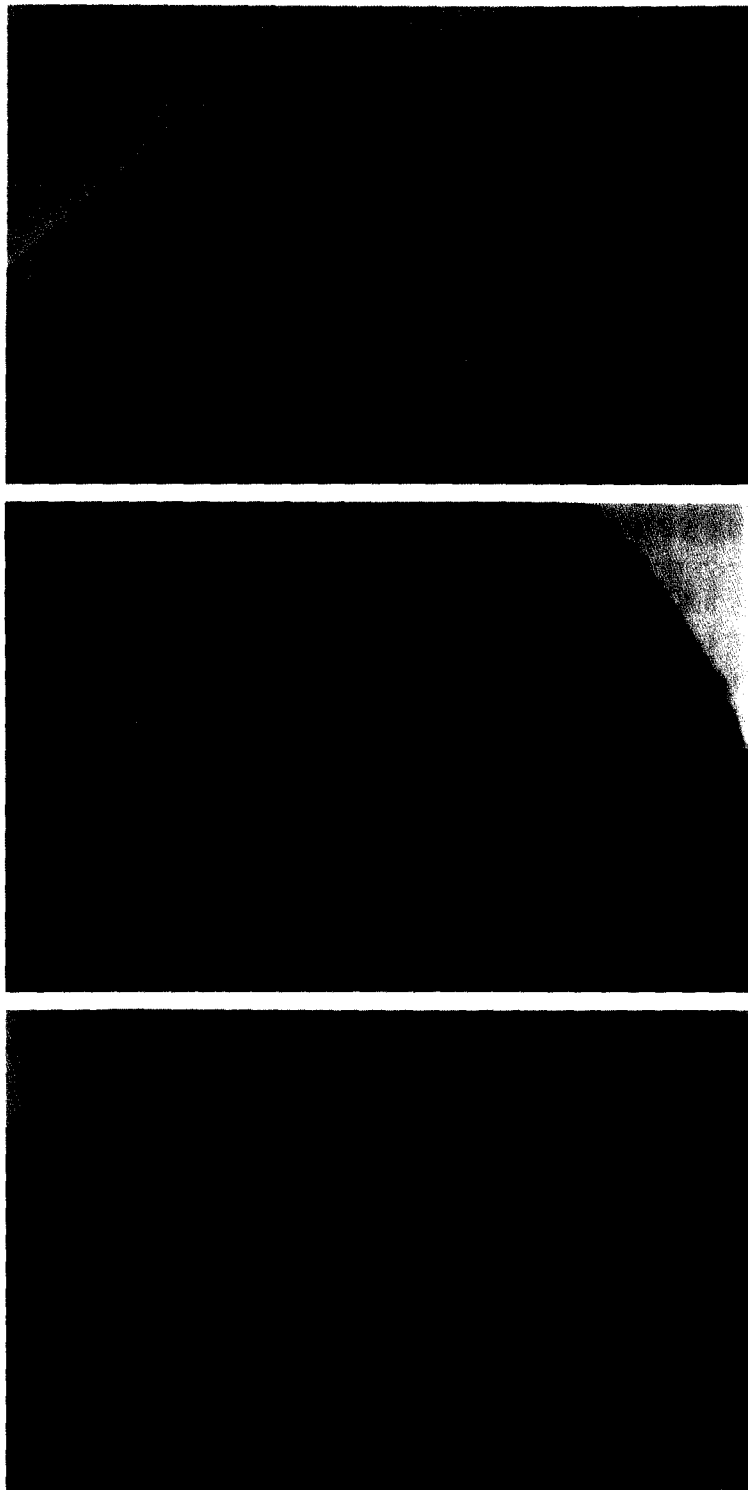


Fig. 1. Pronuclear development following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured bovine oocytes

A : Sperm penetration only ($\times 800$)

B : Sperm penetration and female pronucleus ($\times 800$)

C : Male and female pronucleus ($\times 800$)

한 生化學的 檢討 結果 確認된 GAGs의 3가지 成分中 hyaluronic acid는 卵成熟에 關與한 반면 chondroitin sulfate와 heparin은 卵成熟 보다는 오히려 受精率 및 前核 形成率에 影響을 미쳐 精子의 受精能 獲得을 誘起시키는 物質로 判斷된다. 따라서 卵丘細胞는 卵胞卵의 成熟, 受精 및 胚發達에 效果的인 作用을 遂行하고, 특히 chondroitin sulfate와 heparin-like glycosaminoglycans는 體外受精時 精子에 影響을 미쳐 受精率 및 前核形成率을 向上시킨다는 것을 確認할 수 있었다.

IV. 摘 要

本 研究에서는 牛卵胞卵의 體外受精에 미치는 GAGs의 效果를 검토하기 위하여 앞서 朴 等 (1992a, b)에 의해 확인된 GAGs의 成分中 hyaluronic acid, chondroitin sulfate 및 heparin을 난포란에 처리한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

成熟 牛卵胞卵을 受精能이 獲得된 精巢上體 精子로 授精시킨 후 受精率과 前核 形成率을 조사한 결과, 卵丘細胞가 정상적으로 존재한 경우의 受精은 61.3%로써 卵丘細胞를 除去한 경우 對照區의 受精率 48.3%에 비해 다소 높았다. 그러나 卵丘細胞 除去群에 있어서 각각의 GAGs를 併用했을 때의 受精率은 58.8, 62.1, 58.8 및 61.8%로써 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵의 受精率과 비슷한 성적을 보여 첨가된 세가지 添加劑 모두가 수정에 影響을 미치는 것으로 判斷되며, 특히 chondroitin sulfate와 heparin을 병용했을 때 61.8%로써 가장 높은 受精率을 보였고 또한 前核 形成率에 있어서도 效果的인 作用을 나타냈다.

V. 引用文獻

1. 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.
2. Cross, P.C. and R.L. Brinster. 1970. *In vitro* development of mouse oocytes. Biol. Reprod., 3 : 297-307.
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. Fukui, Y. and Y. Sakuma. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* : relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod., 22 : 669-673.
5. Leibfried, M.L. and B.D. Bavister. 1983. Fertilizability of *in vitro* matured oocytes from golden hamster. J. Exp. Zool., 226 : 481-485.
6. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser, W. H. Eyestone, D.L. Northey, and N.L. First. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. Biol. Reprod., 36 : 276-383.
7. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser, and N.L. First. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus oocyte complexes. Biol. Reprod., 35 : 850-857.
8. Leibfried-Rutledge, M.L. and N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sci., 48 : 76-86.
9. Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K. Lohse, N.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. Biol. Reprod., 28 : 683-690.
10. Niwa, K and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology, 30(4) : 733-741.

11. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.A. Winer, and N.L. First 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38: 1171-1180.
12. Sato, E., A. Iritani, and Y. Nishikawa. 1977. Factors involved in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jpn. J. Anim.*, 23: 12-21.
13. Thibault, C. 1977. Are follicular maturation and oocytes maturation independent processes? *J. Reprod. Fert.*, 51: 1-15.
14. 朴世必, 鄭炯敏, 李勳澤, 鄭吉生. 1992a. 體外成熟牛卵細胞의 體外受精과 發達에 관한 研究. IV. 卵丘細胞의 生化學的 特性檢討. 韓國家畜繁殖學會誌. 16(1):1-6.
15. 朴世必, 鄭炯敏, 吳鐘燾, 李勳澤, 鄭吉生. 1992b. 體外成熟牛卵細胞의 體外受精과 發達에 관한 研究. V. Hyaluronic acid와 Chondroitin sulfate 및 Heparin 이 牛卵細胞의 體外成熟에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會誌. 16(1):7-14.