

牛 卵胞卵의 體外成熟時 核의 發達過程

주영국* · 공일근 · 정미경 · 강대진 · 박충생
경상대학교 농과대학

Nuclear Progression through *In Vitro* Meiotic Maturation of Bovine Oocytes

Y. K. Joo*, I. K. Kong, M. K. Jeong, D. J. Kang and C. S. Park
College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

The nuclear changes of bovine oocytes during 24 hrs. of culture for meiotic maturation were examined. Bovine oocytes were collected from small (<2mm), medium (2~6mm) and large (>6mm) follicles and classified into three grades by their morphological characteristics. A total of 242 oocytes collected were obtained from 184 small, 157 medium and 1 large follicles, respectively and were classified into 95 grade I, 155 grade II and 92 grade III oocytes.

All the bovine oocytes collected and graded were washed with a basal medium and incubated in groups of 10 for 24 hrs in 5% CO₂ and 39°C. The basal medium used was composed of TCM-199 supplemented with sodium bicarbonate, sodium pyruvate, streptomycin, penicillin G and 10% FCS. The oocytes were cultured in drops of 50μl basal medium supplemented with 35μg/ml FSH, 10μg/ml LH and 1μg/ml estradiol-17β. The oocytes were fixed and examined on their chromosomal status by 1% acetorcein staining in the interval of 3 hrs. Most of the grade I oocytes developed to germinal vesicle stage at 0 to 3 hrs., germinal vesicle breakdown at 6 hrs., metaphase I at 9 to 15 hrs., anaphase I and telophase I at 18 hrs., and metaphase II and the first polar body at 24 hrs. after culture for meiotic maturation. However, it was found that compared to grade I oocytes, grade II and III oocytes reached earlier to germinal vesicle breakdown and most of them developed earlier to M II stage at 21 hrs. after culture.

서 론

대부분의 포유류의 난포란은 태아시절 동안 초기 감수분열을 시작하여 배란 또는 폐쇄가 될때까지 prophase I의 dictyate stage에서 정지하게 된다.

난포에서 분리된 난포란을 배양하면 성숙분열을 재개한다. 난포란은 과립막세포층으로 싸여져 있고 종에 따라서는 몇년 동안 감수분열 중지 상태로 있다. 난포란의 성숙말기에는 germinal vesicle 상태이다. 난소주기에 의한 LH surge가 일어나면 선택된 난포에서 한정된 수의 난포란이 감수분열을 재

*경상남도 종축장(Gyeongsang Nam Do Provincial Livestock Breeding Station)

개하여 그 결과 핵막의 분해 또는 핵막 파열 (GVBD)이 일어나고, 제1극체가 형성되면서 M II에서 다시 발달 중지하게 된다(Sirard 등, 1989).

많은 포유동물의 난포란은 난포에서 분리되었을 때 자발적으로 감수분열을 재개하며 GVBD를 겪게 된다(Edward, 1965). 체외에서 감수분열을 하는 난포란은 적절한 조건만 주어진다면 정상적인 발달을 할 수 있는 능력을 지니고 있다(Mice : Schroeder와 Eppig, 1984 ; Sheep : Staigmiller와 Moor ; cattle : Crister 등, 1986 ; Sirard 등, 1988). 지난 몇 년 동안 난자의 배양방법이 개선되었으며, 많은 연구팀들에 의하여 체외성숙, 수정 후 산자생산을 보고 하였다(Lu 등, 1987 ; Xu 등, 1987 ; Goto 등, 1988 ; Fayrer-Hosken 등, 1981 ; Brackett 등, 1988). 체외배양의 성공율을 개선하기 위하여 성숙과 수정에 관련된 더많은 기본지식이 필요하다. 일반적으로 체외성숙은 24시간으로 실시하고 있으나 수정적기인 M II까지의 성숙에 필요한 시간은 과연 몇 시간인지를 알아보고, 또한 난포란의 등급에 따른 성숙에 요하는 시간은 얼마나 소요되는지를 알아보고자 한다. 본 연구는 정상적인 발달을 하는 배양조건하에서 제1감수분열 동안 난포란의 핵발달 과정에 요하는 시간을 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취

도축장에서 도축된 한우 암소의 난소를 적출, penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 함유된 생리식염수가 담긴 보온병(20~24℃)에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 직경 2mm이하(소난포), 2~6mm(중난포) 및 6mm이상(대난포) 크기의 정상난포에서 미성숙 난포란을 채취하여 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 3등급으로 분류하였다. 즉, 4~5층의 난구세포층이 충실하면서 균일한 세포질을 가진 것을 Grade I, 2~3층의 난구세포층을 가진 것을 Grade II, 부분적으로 나화된 것을 Grade III으로 구분하였다.

2. 난포란의 체외성숙 배양액

TCM-199(Earle's salt)의 기본배양액에 sodium bicarbonate(2.2mg/ml), sodium pyruvate(56µ

g/ml), streptomycin(100 µg/ml), penicillin G(100 units/ml), LH(10 µg/ml), estradiol-17β(1 µg/ml), FSH(35 µg/ml) 및 calf serum(FCS 10% v/v)을 첨가하였다.

3. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 미리 유동 paraffine oil로 피복한 다음 39℃의 CO₂ incubator에서 12시간 이상 평형시킨 미소적 배양액으로 2~3회 세척한 다음, 과립막세포(1~2×10⁶ cells/ml)를 체외성숙 배양액에 첨가시켜서 난포란의 성숙을 유도하였다. 체외성숙은 24시간까지 3시간 간격으로 성숙 유도한 후 고정을 실시하였다.

4. 난포란의 염색

수정적기인 M II까지의 성숙에 요하는 시간과 시간별 핵성숙 과정을 알아보고자 등급별(Grade I, II, III)로 체외성숙을 유도한 후 24시간까지 3시간 간격으로 고정, 염색하였다. 난포란을 hyaluronidase(300 IU)용액에서 2~3회 세척후 약 5분간 정체시켜서 Fine glass pipette으로 계속적인 pipetting으로 난구세포층을 완전히 제거한 다음, 고정액(glacial acetic acid 1 : ethanol 3)에 24~72시간 고정한 후, 염색액(1% acetocein)으로 염색하여 실체현미경의 400 배율 하에서 시간별 핵의 발달상태를 조사하였으며, 이들을 Fig. 1과 같이 난핵포기(germinal vesicle: GV), 난핵포 붕괴기(germinal vesicle breakdown: GVBD), 1차 성숙분열 중기(metaphase I : M I), 1차 성숙분열 후기 및 말기(anaphase I and telophase I) 및 2차 성숙분열 중기와 제1극체기(metaphase II and the 1st polar body)로 구분하여 각각의 비율을 구하였다.

5. 난포란의 염색방법

Ethanol(95%)로 세척한 slide glass위에 cover glass의 네귀에 맞도록 vaseline 미소적(vaseline 9 : paraffin 1)로 만든 다음, 그 중앙에 난구세포를 완전히 제거한 체외성숙란을 옮겨 cover glass를 덮어서 조심스럽게 눌렀다. 고정은 4℃의 aceto-alcohol(ethanol 3 : glacial acetic acid 1)에 24~72시간 고정한 후, 1% acetocein(45% acetic acid)

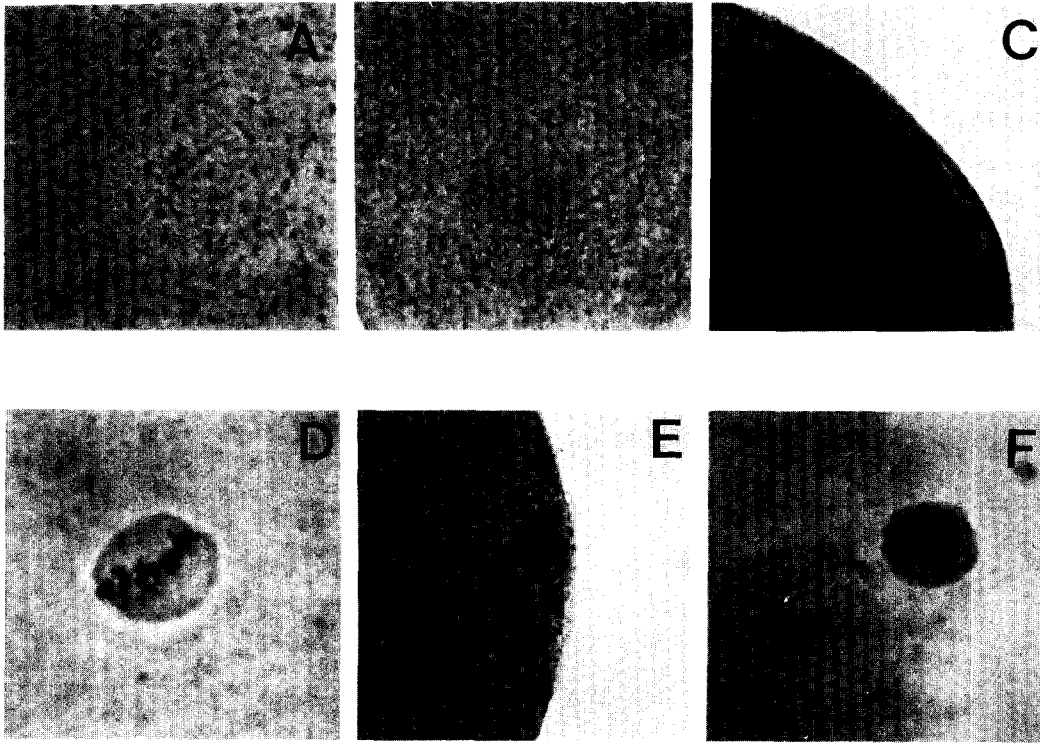


Fig. 1 Photomicrographs of the various nuclear configuration of *in vitro* developed bovine follicular oocytes stained with acetocein. (A) Germinal vesicle, (B) Germinal vesicle breakdown, (C) Metaphase I and, (D, E) Anaphase I and Telophase I and (F) Metaphase II and 1st polar body.

으로 염색을 실시하였다(Toyoda and Chang, 1974). 염색 20분후에 25% aceto-glycerol로 염색액을 깨끗이 제거하고 cover glass주위에 manicure로 봉입한 다음 위상차현미경 하에서 난포란의 핵 발달과정을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 난포란의 채취

Table 1에서와 같이 41개의 난소에서 820개의 난포를 aspirating하여 총 342개의 난포란을 채취하였는데 소난포, 중난포 및 대난포에서 각각 184(53.8%), 157(45.9%) 및 1(0.0%)개의 난포란을 회수하였고, 이들을 형태적으로 등급화하였을때 Grade I, II 및 III에 각각 95(27.8%), 155(45.3%) 및 92(26.9%)개의 난포란으로 분류되었고, 또한 난소

1개 당 평균 8.3개의 난포란을 채취한 결과였다. 난포의 크기별 Grade I의 회수율을 살펴보면 소난포가 중난포보다 유의적으로 높았다. Grade II는 중난포에서 소난포보다 높은 경향이였다.

전체적으로 소난포와 중난포에서 대부분 회수되었으며, 대난포는 거의 난포란이 회수되지 않았다. 체외수정에 적합한 Grade I의 회수율은 소난포에서 유의적으로 높았다. 본 실험에서 회수된 난자수는 Leibfried-Rutledge 등(1985)의 6.6개보다 약간 상회하는 성적이었다.

2. 난포란의 배양시간별 핵발달 단계

난포란을 회수하여 수정적이인 MII까지의 배양시간을 알아보고 성숙 배양시키면서 3시간 간격으로 핵의 발달과정을 염색하여 조사하였다. Grade I 난포란의 핵발달 경과를 Table 2와 Fig. 2 및 3

Table 1. Recovery of follicular oocytes by follicular size

Follicle size(mm)	No. of ovaries used	No. of follicles punctured	No. and (%) of oocytes recovered				No. of oocytes recovered per ovary
			Grade I	Grade II	Grade III	Total	
Small(<2)	41	392	64(34.8) ^c	74(40.2)	46(25.0)	184	4.1
Medium(2~6)	41	414	31(19.7) ^b	81(51.6)	45(28.7)	157	3.8
Large(>6)	41	14	0(0.0) ^a	0(0.0)	1(100)	1	0.0
Total	41	820	95(27.8)	155(45.3)	92(26.9)	342	8.3

* Values with different letters are significantly different (p<0.05).

Table 2. Nuclear changes in grade I bovine oocytes during 24 hours of culture

Nuclear configuration	Culture period(hrs)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Germinal vesicle	36	31	12	—	—	—	—	—	—
Germinal vesicle breakdown	3	8	24	7	—	—	—	—	—
Metaphase I	—	—	6	30	28	27	6	4	—
Anaphase I & telophase I	—	—	—	—	9	12	28	15	5
Metaphase II & 1st polar body	—	—	—	3	—	1	5	21	34
Total	39	39	42	40	37	40	39	40	39

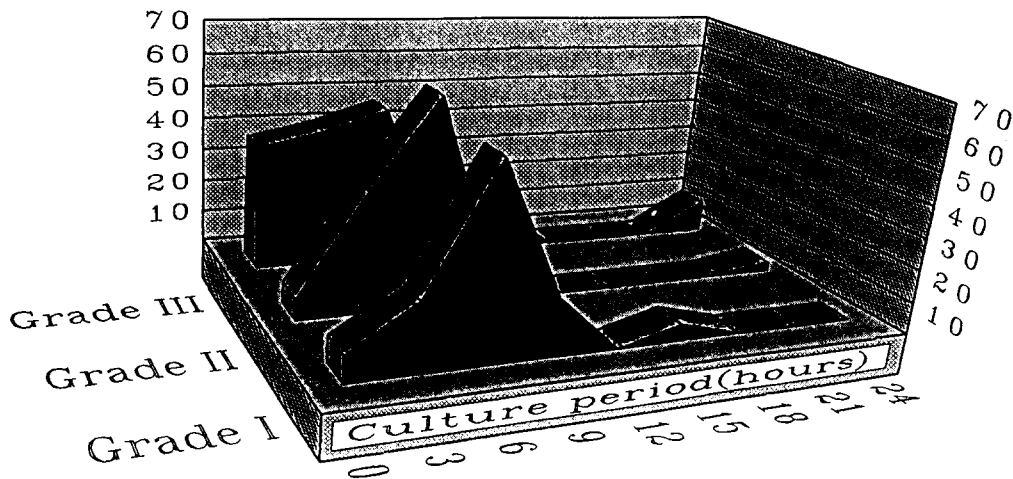


Fig. 2. Relative *in vitro* development(%) to germinal vesicle breakdown stage of bovine follicular oocytes by morphological grades

에서와 보는 바와 같다. 즉, germinal vesicle은 배양 3시간까지는 79.5% 이상이었으나 6시간에 급격히 사라지면서 GVBD가 57.1%로 높아졌다. MI은 9~15시간 까지 75~67%정도로 장기간 나타났고,

AI 및 TI은 18시간대에 71.8%로 높아졌다. 수정적기인 MII는 21, 24시간에 각각 52.5%와 87.2%로 나타나 이 결과로 보면 24시간 성숙배양이 최적한 것으로 사료된다. Goto 등(1988) 및 Rose와

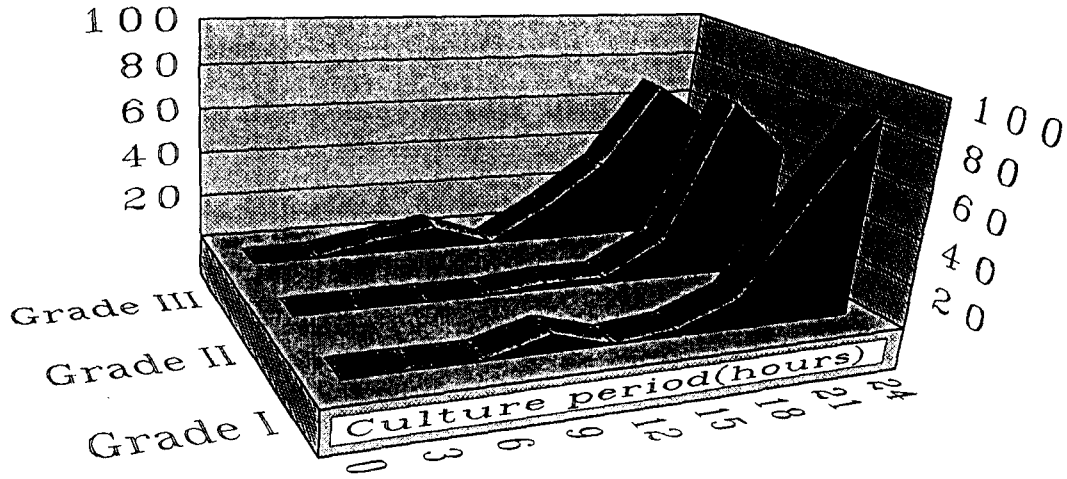


Fig. 3. Relative *in vitro* development(%) to metaphase II stage of bovine follicular oocytes by morphological grades

Bavister(1992)도 24시간이 적정 성숙배양 시간이 라고 하였는데, Wiemer 등(1991)은 24~26시간 성숙배양을 실시하였고 Kajihara 등(1987)은 20~24시간, Utsumi 등(1988)은 28시간 성숙배양을 유도한 바 있다.

Table 3과 Fig. 2 및 3에서는 Grade II의 난포란의 핵 발달 경과를 나타내고 있다. GV는 0~3시간에서, GVBD는 6시간에서 급격히 나타나고 있다. MI은 9, 12, 15시간대에 각각 86.1, 60.9, 53.7%를 보이고 있고, AI~TI은 12, 15 및 18시간대에 각각 36.6, 43.9 및 57.1%로 나타나고 있다. MII는 Grade I과 달리 21시간대에 79.5%로 높게 나타나고 있는 것은 Grade II가 채취 직전부터 핵성숙이 Grade I보다 진전되어 있었던 것으로 사료된다.

Table 4와 Fig. 2 및 3은 Grade III의 난포란의 핵 발달 경과를 나타낸 것이다. GV는 0~3시간에 60.4~56.3%를, GVBD는 0, 3, 6시간대에 각각 37.7, 41.7, 47.5%로서 0시간에서 부터 높게 나타나고 있으며, MI은 9 및 12시간에서 각각 80.0 및 75.0%로서 가장 높은 빈도를 보였고, AI~TI은 15, 18, 21시간에 각각 33.3, 37.8, 15.2%로 나타나고 있다. 그러나, MII는 24시간에 71.7%로서 역시 Grade II와 비슷한 경향을 보이고 있다.

이상의 결과에서 Grade I은 24시간 이상 성숙배양을 유도해야 하며, Grade II와 Grade III은 21시간 만으로도 M II까지 발달할 수 있음을 알 수 있었다.

Table 3. Nuclear changes in grade II bovine oocytes during 24 hours of culture

Nuclear configuration	Culture period(hrs)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Germinal vesicle	45	30	12	1	-	-	-	-	2
Germinal vesicle breakdown	3	17	25	2	-	-	-	-	2
Metaphase I	-	-	3	31	25	22	11	-	12
Anaphase I & telophase I	-	-	-	2	15	18	24	8	14
Metaphase II & 1st polar body	-	-	-	-	1	1	7	31	40
Total	48	47	40	36	41	41	42	39	70

Table 4. Nuclear changes in grade III bovine oocytes during 24 hours of culture

Nucleaer configuration	Culture period(hrs)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Germinal vesicle	32	27	3	—	—	—	—	—	—
Germinal vesicle breakdown	20	20	19	1	3	2	—	—	6
Metaphase I	1	—	15	32	30	18	10	6	7
Anaphase I & telophase I	—	1	1	3	7	13	14	7	14
Metaphase II & 1st polar body	—	—	2	4	—	6	13	33	33
total	53	49	40	40	40	39	37	46	60

결 론

본 연구에서는 소 난포란의 성숙분열을 위하여 24시간동안 배양하면서 핵의 변화를 조사하였다. 소 난포란은 소난포(<2mm), 중난포(2~6mm) 및 대난포(>6mm)에서 채취하여 형태학적으로 3등급으로 분류하였다. 소난포(184개), 중난포(157개) 및 대난포(1개)에서 총 242개의 난포란을 채취하였으며, 등급별로는 grade I(95개), grade II(155개), grade III(92개)에서 각각 채취하였다.

채취, 분류된 모든 난포란은 기본배양액으로 세척하여 39℃의 5% CO₂ 조건하에서 24시간동안 배양하면서 3시간 간격으로 고정, 염색하였다. 기본배양액은 TCM-199에 Na-carbonate, Na-pyruvate, streptomycin, penicillin G 및 10% FCS를 첨가하였다. 난포란은 기본배양액에 35 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH 및 1 µg/ml estradiol-17β를 첨가하여 배양하였다. 난포란은 고정후 1% acetorkein으로 염색하여 핵의 상태를 조사하였다. 대부분은 grade I의 난포란은 0~3시간에 germinal vesicle, 6시간에 germinal vesicle breakdown, 9~15시간에 metaphase I, 18시간에 anaphase I 과 telophase I 그리고 24시간에 metaphase II 와 first polar body stage로 발달하였다. 그러나, grade II 와 grade III의 난포란은 grade I보다 germinal vesicle breakdown이 더 빨리 일어났으며 그들 중 대부분은 21시간에 M II 까지 발달하였다. 이러한 결과로 미루어 grade II 및 III 난포란은 grade I보다 3시간 정도 핵의 발달이 빠른 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- Crister ES, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1986. Influence of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryonic development. Biol. Reprod. 34(suppl. 1):192.
- Edward RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature(Lond). 208:349~351.
- Fayrer-Hosken RA, Younis AI, Brackett BG, McBride CG, Harper KM, Keefer CL and Cabaniss DC. 1988. Pregnancy after laparoscopic oviductal transfer of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. Biol. Reprod. 38(suppl. 1):72.
- Goto K., Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanish Y and Ogawa K. 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.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanish Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incunation *in vitro* and their transfer to the cow uterus. Theriogenology. 29:251.
- Kajihara Y, Goto K, Kosaka S, Nakanish Y and Ogawa K. 1987. *In vitro* fertilization of bov-

- ine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. J. Anim. Reprod. 32:173~180.
- Leibfried-Rutledge ML, Crister ES and First NL. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by steps of cycle and size of follicle. Theriogenology. 23:753~759.
- Lu KH, Boland MP, Crosby TF and Gordon I. 1987. *In vitro* fertilization of cattle oocytes matured *in vitro*. Theriogenology. 27:251.
- Rose TA and Bavister BD. 1992. Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 31:72~77.
- Schroeder AC and Eppig JJ. 1984. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. Dev. Biol. 102:393~397.
- Sirard MA and First NL. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. Biol. Reprod. 39:229~234.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML and First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biol. Reprod. 40:1257~1263.
- Staigmiller RB and Moor RM. 1984. Effect of follicle cells on for maturation and developmental competence of ovine oocyte matured outside the follicle. Gamete Res. 9:221~229.
- Toyoda Y and Chang MC. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development fo eggs following transfer. J. Reprod. Fert. 36:9~22.
- Utsumi K, Katoh H and Iritani A. 1988. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. Theriogenology. 29:320.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AJ, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 30:330~338.
- Xu KP, Greve T, Callesen H and Hyttel P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert. 81:501~504.