

TCM-199배양액과 Synthetic Oviduct Fluid(SOF)에서 배양된 소 체외수정란의 체외발육

양부근 · 박춘근 · 김종복 · 정희태 · 김정익
강원대학교 축산대학

Development of Bovine IVM/IVF Embryos Cultured in TCM-199 and Synthetic Oviduct Fluid(SOF) Medium with/without Co-culture System

Yang, B.K., C. K. Park, J. B. Kim, H. T. Cheong and C. I. Kim
College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

Bovine embryos at 2-to 8-cell produced by *in vitro* matured / *in vitro* fertilized(IVM /IVF) were cultured in TCM 199 or Synthetic oviduct fluid(SOF) with 10% fetal bovine serum(FBS) or co-cultured with cumulus or bovine oviduct epithelial cell(BOEC) in TCM-199 or SOF medium.

In experiment 1, the proportions of embryos developed to morula and blastocysts stages in TCM 199 medium were higher when they were co-cultured with cumulus cell(29%) or BOEC (33%) than that of TCM 199 with 10% FBS(12%, $P < 0.01$).

In experiment 2, embryos deived from IVM /IVF were cultured in SOF with 10% FBS or co-cultured with cumulus cell or BOEC in same medium. The higher developmental rates of IVM /IVF embryos developed beyond morula stages were obtained in cumulus cell co-culture group(39%) than those of BOEC group(26%) and SOF with 10% FBS group(17%, $P < 0.01$). The present results indicated that the early development of IVM /IVF embryos can be maintained efficiently in SOF with cumulus cell co-culture.

I. 서 론

초기배의 발육을 위한 배양계의 개발은 체외수정, 핵이식 및 유전자이식과 같은 새로운 기술의 실질적 이용과 배양성적에 미치는 여러 인자들의 연구를 위해서 매우 중요하다. 소에 있어서 8-16세포기 발육억제 현상(Wright 와 Bondioli, 1981)을 해결하기 위하여 많은 연구자들은 체세포를 이용해 초기배와 공동배양 하므로써 많은 성과를 올렸다(Camnous 등, 1984 ; Rexroad, 1989 ; Fukui, 1990 ; Younis 와 Bra-

ckett, 1991). 그러나 최근 Pinyopummintra 와 Bavister(1991)는 체외에서 성숙, 수정된 난자는 단백질원의 첨가 또는 체세포와의 공동배양 없이도 chemically defined media내에서도 발육이 가능하여 8-16세포기의 발육억제현상을 극복할 수 있었다고 보고했으며, 단지 혈청 albumin을 첨가한 chemically semi-defind medium 내에서도 초기배의 발육 가능성이 보고되었다(Takahashi 와 First, 1992). 한편, 난포란의 성숙배양이나 체외수정란의 체외 발육을 위해 TC-199액이 일반적으로 많이 이용되고 있으며, TC-199액에 혈청, 난구세포 및 난관 상피세포 등을

첨가하여 배양하므로써 초기배의 발육을 향상시키고 있다. 또한 Tervit 등(1972)과 McLaughlin 등(1989)은 면양과 소의 초기배를 체세포와 공동배양없이 synthetic oviduct fluid(SOF)내에서 배양하므로써 초기배의 발육을 관찰하였으며, Walker 등(1986)과 McLaughlin 등(1989)은 synthetic oviduct fluid(SOF)에 10%의 human serum을 첨가하여 배반포기배까지의 발육을 보고하였다. 그러나 TC-199액과 SOF를 이용하여 체외수정란을 체외배양하는 경우 배양내에 첨가되는 물질 또는 체세포의 종류에 따라 발육율에 차이가 나타날 것으로 추측되므로 본 연구에서는 fetal bovine serum(FBS), 난구세포 또는 난관상피세포를 이들 배양액내에 각각 첨가하여 소체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하므로써 안정되고 효과적인 배양체계의 개발을 위한 기초실험으로 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 성숙배양

도축장에서 회수한 소의 난소는 0.1 ppolyvinyl alcohol(PBS-PVA)이 함유된 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS)내에 침적하여 2시간 이내에 연구실로 운반하였다. 직경 2~7mm의 난포로부터 채취한 미성숙 난자중 난구세포가 치밀하게 부착된 난자만을 선택하여 10% FBS(Gibco), 0.5 μ g/ml FSH, 5 μ g/ml LH 및 1 μ g/ml E₂ 와 25mM HEPES(Gibco, Grand Island, NY)를 첨가하여 조성된 100 μ l/ml의 TC-199액 소적내에 옮겨 4회 세척후 소적당 15개의 난자를 같은 소적내에 넣어 20~22시간 동안 탄산가스 배양기(5% CO₂, 95% air, 39°C)내에서 배양한 후 체외수정을 위한 성숙난자로 이용하였다.

2. 정자의 처리 및 체외수정

정자의 처리 및 수정을 위한 기본 배양액은 Brackett 와 Oliphant(BO 배양액, 1975)을 이용했다. 난포란의 성숙배양후 팽화된 난구세포로 둘러싸인 난자는 성숙배양액과 체외수정용 배양액에서 각각 2회 세척후 10개의 난자를 50 μ l를 20 μ g/ml heparin과

난자가 들어있는 수정용 소적내에 첨가하여 수정을 실시하였다. 결국 최종수정배지는 5mM caffeine, 10 μ g/ml heparin, 1.25 \times 10⁶ spermatozoa/ml 및 10mg/ml BSA가 포함된 100 μ l의 BO액으로 조성되었다. 수정 6시간후 난자는 BO액과 실험배양액내에서 각각 1회씩 세척하여 난자에 부착된 정자를 제거하였다.

3. 난관상피세포의 준비

난관상피세포의 monolayer준비는 Ellington 등(1989)의 방법을 수정보완하여 실시하였다. 도살직후에 적출된 소의 난관을 도살장에서 2~3시간내에 얼음으로 채워진 보온병에 넣어 실험실로 운반, 난관주위의 결체조직을 제거한 후 PBS-PVA용액으로 2~3회 세척후 난관을 Ham's-F10배양액(10% FBS)으로 난관을 관류하여 난관상피세포를 15ml의 원심분리관에 회수하였다. 분리된 난관상피세포를 Ham's F10배양액으로 재부유한 후 4-well dish(Nunk, Denmark)에 1ml씩 분주하여 4~5동안 배양(37°C, 5% CO₂ in air)하였다. 24시간 배양후에 상층액을 제거한 새로운 배양액을 첨가하였고, 2일에 한번씩 배양액을 교환하여 monolayer형성된 것만 체외배양에 사용하였다.

4. 초기배의 체외배양

체외배양액내에서 2회 세척된 난자는 10% FBS가 첨가된 TC-100과 SOF배양액에서 40~44시간 배양하여 2~8세포기로 발육한 난자만을 선별하여 체외배양에 이용하였다. 즉, 난구세포를 기계적으로 제거한 후 10% FBS가 첨가된 TC-199액 또는 SOF배양액과 공동배양 전날 실험배양액으로 교환한 BOEC monolayer가 형성된 4-well dish내에 수정란을 투입하여 5~6일 배양한 후 초기배의 발육상태를 검토하였다. 한편, 난구세포와의 공동배양을 수정란의 세척시 난구세포가 부착된 상태로 세척하여 실험배양액내로 옮겨 위의 방법과 같은 방법으로 배양을 실시하였다.

III. 결 과

Table 1은 TC-199배양액내에 10% FBS, 난구세포 또는 난관상피세포를 첨가하여 체외수정란과 공동

Table 1. Development of bovine embryos cultured with different culture system in TC-199 medium

Culture system	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved(%)	No. of oocytes developed (%)*		
			2- to 7-cell	8- to 16-cell	Morula or Blastocyst
TC-199+ 10% FBS	254	137(54)	76(55)	45(33)	8+8**(12) ^a
TC-199+ cumulus cells	222	147(66)	84(57)	19(13)	28+15(29) ^b
TC-199+ oviduct cells	270	161(60)	86(53)	22(14)	28+25(33) ^b

* Percentage of total number of oocytes cleaved.

** The first figure denotes the number of embryos at morular stage and the second one denotes the number of embryos at blastocyst stage.

a-b $P < 0.01$ (χ^2 - test).

Table 2. Development of bovine embryos cultured with different culture system in synthetic oviduct fluid(SOF)

Culture system	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved(%)	No. of oocytes developed (%)*		
			2- to 7-cell	8- to 16-cell	Morula or Blastocyst
SOF+10% FBS	163	99(61)	60(61)	22(22)	15+2**(17) ^a
SOF+ cumulus cells	151	101(67)	43(43)	19(19)	22+17(39) ^b
SOF+ oviduct cells	159	100(63)	53(53)	21(21)	20+6(26) ^{ab}

* Percentage of total number of oocytes cleaved.

** The first figure denotes the number of embryos at morular stage and the second one denotes the number of embryos at blastocyst stage.

a-b $P < 0.01$ (χ^2 - test).

배양하여 얻은 결과를 나타낸 성적이다. 실험에 공시된 난자의 분할율은 난구세포와의 공동 배양시 66%(147/222)로 난관상피세포(60%, 161/270) 또는 TC199 10% FBS(54%, 137/254) 첨가 배양액에 비해 높게 나타났나 유의적인 차는 인정되지 않았다. 그러나 분할된 난자중 상실배 또는 배반포기

배로 발육한 초기배의 비율은 난구세포 또는 난관상피세포와의 공동배양시 29 및 33%로 TC199 액에 10% FBS가 첨가된 배양액내에서의 체외발육율 12%에 비해 유의적으로 높은 발육율을 나타냈다 ($P < 0.01$).

한편, 체외수정란을 SOF배양액에서 배양한 경우

10% FBS, 난구세포 또는 난관상피세포를 첨가시 분할율 61%(99/163), 67%(101/151) 및 63%(100/159)로 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 그러나 분할된 난자를 난구세포와 공동배양한 경우 상실배 및 배반포기배로 발육한 초기배의 비율이 39%로 10% FBS 첨가시 17%에 비해 유의적으로 높은 발육율을 나타냈다($P < 0.01$). 또한 난구세포와의 공동배양이 난관상피세포와의 공동배양시 26%에 비해서도 높은 발육율을 나타냈으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

IV. 고 찰

본 연구의 결과는 소의 미성숙 난포난자를 체외에서 성숙·수정시킨 후 TC-199액과 SOF 배양액에 10% FBS, 난구세포 또는 난관상피세포를 각각 첨가하여 배양후 상실배와 배반포기배까지의 발육율을 제시한 것이다.

일반적으로 TC-199배양액은 소의 미성숙 난포난자의 성숙배양(Leibfried 등, 1987)과 체외수정란의 체외발육(Fukui 등, 1991)을 위한 배양액으로 많은 연구자들에 의해 이용되어왔다. 특히 수정란의 체외배양시 TC-199배양액내에 일반적으로 첨가되는 FCS는 매우 효과적인 것으로 알려져 있다(Freshney, 1983). 그러나 Fukui와 Ono(1989)는 FCS와 estrus calf serum(ECS)은 수정란의 분할이나 분할된 난자가 배반포기배까지의 발육에는 별다른 영향을 미치지 않았다고 보고했다. 본 연구에서는 FBS를 TC-199액에 첨가한 경우 54%(137/254)의 분할율을 나타내 그다지 높은 편은 아니었으나 불할된 난자중 12%가 상실배 이상 발육해 Park 등(1990)이 보고한 15%와 거의 비슷한 수준을 나타냈다. 한편, SOF에 10% FBS를 첨가한 경우 난자의 분할율(61%)과 발육율(17%)이 TC-199액 보다 약간 증가하는 경향을 보였으나 큰 차이는 인정되지 않았다. 이와 같이 초기배의 발육율이 한계성을 보인 것은 체외에서 단순배양액을 이용한 배양체계하에서는 8~16 cell block현상(Thibault, 1966)의 극복이 어렵다는 것을 보여주고 있다. 그러나 Takahashi와 First(1992)는 소와 면양의 초기배를 난관액과 비슷하게 단순조정으로 제조한 SOF

(Tervit 등, 1972)를 수정한 배양액을 이용한 경우 배반포기배까지의 발생율은 혈청을 첨가한 TC-199액에 난관상피세포를 첨가해 공동배양했을때와 차이는 없었지만 배반포의 세포수가 유의적으로 적었기 때문에 배반포로 발육하는데 필요한 알려지지 않은 성분이 부족하다는 것을 제시했다. 그러나 본 연구에서는 TC-199액에 난관상피세포를 첨가해 공동배양하는 경우 상실배기 이상으로 발육한 비율이 33%로 단지 SOF내에서 단순배양한 17%보다 높은 발육율을 나타내 위해서 보고한 경우와 다른 결과를 보였다.

수정란과 난구세포와의 공동배양시 난구세포로부터 초기배의 발육에 필요한 물질이 생산되는 것으로 알려졌다(Fukuda 등, 1990). Goto 등(1988)은 소의 체외수정란을 난구세포와 공동배양하므로써 비공동배양에 비해 효과적임을 나타냈으며 이로 부터 얻은 초기배를 이식하여 태아의 생산에 성공했다. 본 연구에서도 이와 같이 TC-199 또는 SOF 배양액을 이용하는 경우 난구세포의 첨가가 체외수정란의 발육에 효과적이었지만 TC-199(29%)보다 SOF(39%)에 첨가하는 것이 더 높은 발육을 나타냈다.

또한 체외수정란의 체외발육을 증진시키는 방법으로 배양액내에 난관상피세포를 첨가한 후 수정란과 공동배양하는 방법이 여러 연구자들에 의하여 보고되었다(Eyestone과 First, 1988; Ellington 등, 1990). Eyestone과 First(1988)는 체외에서 성숙, 수정시킨후 분할된 소의 초기배를 TC-199액에서 난관상피세포와 공동배양에 의해 분할난자의 약 50%가 상실배 이상으로 발육했다고 보고하였는데 본 연구결과에서는 33%(Table 1) 낮은 발육율을 나타냈다. 또한 SOF에 난관상피세포를 첨가해 수정란의 공동배양한 경우에도 26%(Table 2)의 낮은 발육율을 보였는데 이와 같은 원인은 본 실험과 Eyestone과 First의 실험의 난관상피세포 준비의 차이에 기인되는 것으로 사료된다. 한편 본 연구결과에서 흥미로운 사실은 SOF에 난관상피세포(26%)의 첨가가 난구세포(39%)의 첨가에 비해 오히려 초기배의 발육이 낮았던 것은 난구세포로부터 초기배의 발육에 더 유효한 물질의 분비가 이루어진 것으로 생각되지만, 일반적으로 체내에서 난

관내의 난관액과 난관상피세포로부터 분비되는 물질들이 초기배의 발육에 가장 큰 영향을 미치는 사실에 비추어 볼 때 앞으로 이와 같은 결과를 해결하기 위한 분석이 요구되고 있다.

본 연구결과를 종합해 볼 때 SOF액에 난구세포를 첨가해 체외수정란을 상실배기에서 배반포기까지 발육시킬 수 있는 가장 효과적인 배양계로서 이용이 가능하나 8세포기를 극복하지 못한 2~7세포기의 초기배가 43%로서 매우 높은 비율을 차지하고 있다. 즉, Minamihashi 등(1986)은 분할한 2 또는 4세포기 난자의 핵에는 이상이 많지만 8세포기에 도달한 초기배의 90%는 거의 정상난자로 판명되었으며 8세포기의 난자는 대부분 상실배기 이상으로 발육했다는 보고에 따라 앞으로 8세포기배의 비율을 높이는 배양계의 개선이 필요한 것으로 생각된다.

V. 적 요

본 연구는 소의 난포난자를 체외에서 성숙·수정 후 상실배와 배반포기배까지 발육을 지지해 주는 난구세포와 난관상피세포와의 공동배양에 있어서 TC-199액과 SOF배양액의 영향을 검토했다. TC-199배양액의 경우 10%의 FBS만을 첨가했을 때 12%의 낮은 발육율을 나타냈지만 난구세포(29%) 또는 난관상피세포(33%)를 첨가해 공동배양하므로서 유의적으로 높은 발육율을 얻었다($P < 0.01$). 한편, SOF에 10% FBS를 첨가해 배양했을 경우 17%의 발육율을 얻었으며, 난관상피세포를 첨가한 경우 26%로 약간 높은 경향을 나타냈으나 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 난구세포를 첨가해 배양했을 때 39%의 발육율이 관찰되어 혈청만 첨가된 배양액에 비하여 유의적으로 높은 발육율이 관찰되었다($P < 0.01$). 이상의 결과로부터 소의 체외수정란은 두 종류의 배양액 모두 난구세포 또는 난관상피세포와의 공동배양이 초기배의 발육에 효과적이었으며, TC-199액에서는 난관상피세포가, SOF배양액에서는 난구세포가 더 효과적이었다.

VI. 인용문헌

1. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
2. Camous, S., Y. Heyman and Y. Memezo. 1984. *In-vitro* culture of early bovine embryos with trophoblastic vesicle : cleavage through the block stage, followed by pregnancy after transfer. Theriogenology, 21 (abstr. 226).
3. Ellington, J.E., P.B. Farrel, M.E. Simkin, R. H. Goldman and A. B. McGrath. 1989. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1~2 cells to morula or blastocysts in rabbit oviducts in simple medium with bovine oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert., 289:293-299.
4. Ellington, J.E., P.B. Farrell and R. H. Foote. 1990. Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube(oviduct) cell co-culture versus *in vivo* development in the cow. Theriogenology. 34:837-844.
5. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1988. Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue. Proc. 11th Intl. Cong. Anim. Reprod. A. I. No. 4:471(3 pages).
6. Eyestone, W.H. and N.L. 1989. Co-culture of cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
7. Freshney, R. I. 1983. Culture of Animals Cells. Alan R. Liss Inc. New york.
8. 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.
9. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effect of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in-vitro* maturation.

- fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 86:501-506.
10. Fukui, Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and development competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:40-46.
 11. Fukui, Y., L.T. McGowan, R.W. James, A. Pugh and H.R. Tervit. 1991. Factors affecting the *in-vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 92:125-131.
 12. 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.*, 36:376-383.
 13. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 83:753-758.
 14. McLaughlin, K.J., R.J. Ashman, D.M. McLean, G. Stevens, B.D Bartsch and R.F. Seamark. 1989. Viability of one cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. *Proc. Aust. Soc., Reprod. Biol.*, 21 (abstr. 36).
 15. Minamihashi, A., Y. Minato, Y. Sioya and A. Hanada. 1986. Examination of morphological normality 2~8 cell from IVF of bovine *in vitro* matured eggs. *Jpn J. Ani. Reprod.* 15(in Japanese, abstr.).
 16. Park. C.K., K. Okuda and K. Niwa. 1990. Early development of bovine oocytes co-cultured with cumulus cells after *in-vitro* fertilization. *Proc. 5th AAAP Anim. Sci. Congr. Taipei*, 3:280.
 17. Pinyopummintr, T. and B.D. Bavister. 1991. *in vitro*-matured /*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae /blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.
 18. Rexxroad, C.E. 1989. Co-cultured of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31:105-112.
 19. Takahashi, Y. and N.L. First. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos : influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963-978.
 20. Tervit, H.R., D.G. Whittingham and L.E.A. Rowson. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.*, 30:493-497.
 21. Thibault, C. 1966. *In vitro* culture of cow egg. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 6:159-164.
 22. Walker, S.K., P. Quinn, R.J. Ashman, D.H. Smith and R.F. Seamark. 1986. Protein supplementation for the culture of one-cell embryos sheep. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 18(abstr. 9).
 23. Wright, R.W. and K.R. Bondioli. 1981. Aspects of *in-vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.*, 53:709-729.
 24. Younis, A.I. and B.G. Brackett. 1991. Importance of cumulus cells and onsemination intervals for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts *in vitro*. *Theriogenology*, 35:11-21.