

## 개 난자의 체외성숙중 핵변화

김수조 · 박성은 · 이상호

고려대학교 자연자원대학 축산학과

### Nuclear Changes Occurring During Canine Oocyte Maturation *In Vitro*

Kim, S. J., S. E. Park and S. H. Lee

Department of Animal Science, College of Natural Resources,  
Korea University, Seoul 136-701

#### SUMMARY

Canine follicular oocytes were used to establish a reliable system for maturation and fertilization *in vitro*. Ovaries were obtained from either slaughter house or hormone-primed bitches of mixed breeds. The oocytes were recovered by mincing the ovaries in M2+BSA. Good quality of oocyte-cumulus complexes (OCCs) were selected and cultured in TCM 199 containing 15 % fetal calf serum(FCS) for 24~56 h in an atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> at 39°C. Maturation rate of follicular oocytes was >87 % showing metaphase I. Unlike other domestic animals the cumulus expansion did not occur fully in canine OCCs although minimum expansion was found between the cumulus cells and corona radiata cells, the clear nuclear morphology was presented for the first time by rapid staining. The IVM system used in this study may be useful to obtain fully matured metaphase I oocyte in dog.

#### I. 서론

개는 인간과의 사회적 관계로 인하여 품종 등도 다양하게 보존되어 기초생물·의학 분야에서도 비교적 폭넓게 이용되는 실험동물 중 하나이지만 각종 번식현상이 일반 가축과 상이하고 독특한 것이 많아, 아직도 상당한 부분은 전혀 그 생리작용의 기작 등이 잘 알려져 있지 않다.

최근 들어, 재래가축의 유전자원 보존의 필요성에서 볼 때, 한우·산양 및 제주마를 제외한 대부분의 재래가축은 전혀 그 형태를 찾아보기 어렵게 되었다. 그러나, 개의 경우 진도개 및 삽살개가 아직도 분리 사육되고 있어 이들의 보존 및 번식기술 개발 등의 차원에서 개에 관한 번식생리의 연구는 중요한 전환점에 있다고 하겠다. 특히 번식·생리 현상의 구명, 체외에서의 생

식 세포 및 초기배세포의 조절 및 이들의 동결보존 등은 이들 재래동물자원의 보존에 응용될 수 있어 보존의 속도 및 효율성을 보다 개선시키는 데 중요한 수단 뿐만 아니라 기초생리의 확립에도 절실히 요구되고 있다. 특히 타가축에서 일반적으로 확립되어 있는 자성생식세포의 체외배양체계 및 이들의 배양 중 변화에 대한 연구가 매우 적어 (Mahi와 Yanagimachi, 1976) 국내외적으로 자세히 확립되어 있지 않고 있다.

본 연구는 개에 있어서 난포란의 호르몬처리에 의한 채취, 난자성숙 중의 핵변화, 체외 성숙배양을 상세히 규명하기 위하여 실시하였다.

#### II. 재료 및 방법

##### 1. 공시 동물 및 호르몬처리

성선자극호르몬 처리구에서 이용한 동물은 잡종

(mixed bred) 의 성숙숙이 된 13~20개월령 자성견 6두와 호르몬 무처리구로 잡종 자성견 6두를 이용하였다. 난소내의 난포발달을 유기하기 위해 250 IU의 pregnant mare's serum gonadotrophin(PMS, Folligon, Intervet Co., Holland)와 250 IU의 human chorionic gonadotrophin(hCG, Chorulon, Intervet.)를 각각 미리 보고한 방법(Kim 등, 1993)에 따라 8일 동안 오전 9시에 복강주사하였다.

## 2. 난소의 채취

호르몬처리 자성견은 희생후 난소, 난관 및 자궁의 생식기를 적출하고 무처리군은 도살장에서 난포를 채취하여 생리식염수에 넣어 39℃의 보온병에 넣어 2시간내에 실험실로 운반하였다. 생식기로부터 난소를 분리하여 생리 식염수로 2~3회 깨끗이 세척하여 4 mg bovine serum albumin/ml 을 포함하는 M2 배양액(M2+BSA; Quinn 등, 1982)에 옮겼다.

## 3. 난자의 회수 및 배양

난소는 M2+BSA 를 넣은 embryological watch glass에 옮겨 watchmaker's forceps과 26 gauge의 주사침을 1 ml 주사기에 연결시켜 난포를 터뜨려 난자를 방출시켜 신선한 M2+BSA에 회수하였다. 회수한 난자 중에서 외부부착 난구세포층이 매우 치밀하고 난자세포질 분포가 균일한 난자-난구세포 복합물(oocyte cumulus complexes, OCCs)만을 선발하여 성숙배양에 이용하였다. 이들 OCCs를 15%(V/V) 농도의 소태아 혈청(fetal calf serum, FCS)이 함유된 TCM 199(TCM 199+FCS)에 3회 세척한 후 50  $\mu$ l의 동일 배양액내에 넣어 액상 paraffin oil을 덮은 후 39℃, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기의 배양기내에서 24~56시간 동안 배양하였다.

## 4. 성숙 중인 난자의 핵분석

성숙 중인 난자의 핵분석을 위해 DNA-특이 형광염료인 Hoechst 33258을 최종농도 40  $\mu$ g/ml로 하여 10분간 반응시킨 다음 M2+BSA로 3회 세정한 후 약 10분간 방치하여 반응하지 않은 염료를 완전히 제거하여 이용하였으며 또한 Byun 등(1991)의 방법에 따라 rapid staining을 실시하여 핵을 시각화하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 호르몬 처리에 따른 발정유기

다수의 난포란을 회수하기 위하여 자성견의 발정주기에 상관없이 PMS 나 hCG 를 Fig. 1에 보인 바와 같이 복강내에 주사하여 난포란의 발육을 유기하였다. 호르몬에 대한 반응은 개체에 따라 변이가 큰 폭으로 나타났다. 예를 들면, 일부 개체에서는 호르몬처리 중에 발정징후를 보이기도 하였으나 적정 성숙에 도달한 개체에 있어서는 호르몬 처리의 종료와 함께 발정징후를 나타냈다. 즉, 호르몬 처리 개시 5~6일 사이에 음순의 팽대와 함께 혈흔의 질 분비물을 보여 발정의 유

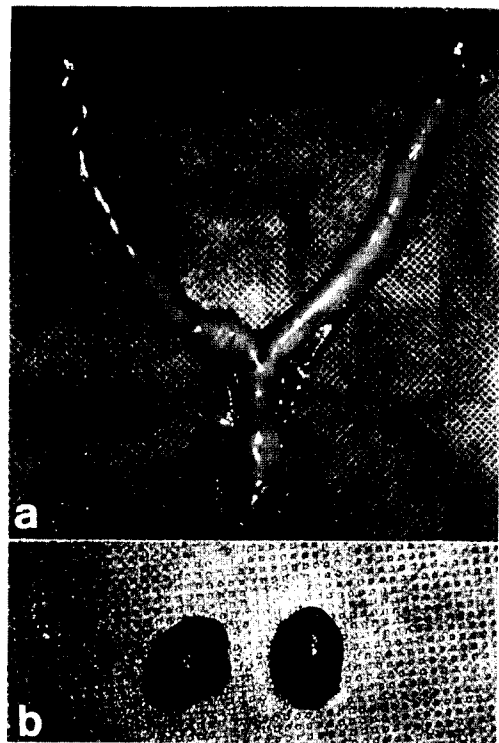


Fig. 1. Representative appearance of reproductive organs(a) in bitch primed with exogenous hormones as described in Material and Methods. Ovaries(b) were dissected out for the oocyte recovery.

기에 의한 난포의 성장으로 현미경하에서 수많은 난포강을 갖는 난포의 존재를 확인할 수 있었다. 호르몬 처리를 받은 전형적인 자성생식도관을 Fig. 2에 나타내었다. 난소는 전형적으로 지방조직(fat pad)에 의해 완전히 둘러싸여 있었으며, 양측의 뚜렷한 자궁각을 보여 주고 있다(Fig. 2a). 난소는 외형적으로 돼지, 소에서 볼 수 있는 Graafian 난포의 존재를 확인하기 어려웠으며 전혀 배란은 일어나지 않아 혈점 또는 황체를 발견할 수 없었다(Fig. 2b).

호르몬 처리를 하지 않고 도살장으로부터 얻은 난소의 경우에서는 난소표면의 난포의 발육이 뚜렷하지 않았으며, 생식기도 매우 왜소하여 호르몬 처리한 생식기와 매우 대조적이었다. 이들 각 구로부터 난자를 회수, 이용하였다.

## 2. 난포란의 회수

회수된 난자는 다양한 형태의 불균일한 난자군으로 이루어져 있었다. 개체의 호르몬 반응이 다양함에 따라 적출난소로부터 회수된 난자수도 상당한 변이가 있었다. 2 개의 난소로부터 4~99개의 난자를 회수하여 평균 50.5개를 얻을 수 있었다(Table 1). 그러나 체외 배양에 이용할 수 있는 good type의 OCCs는 3~22개로 평균 16.2개 었다. 이들 난자는 방사관층의 세포가 매우 치밀할 뿐만 아니라 이와 부착되어 있는 난구세포도 치밀하게 여러층으로 연결되어 있었다(Fig. 2a). 한편 호르몬처리되지 않은 도축장의 난소로부터 회수된 난포란은 2.3~12 개로 평균 5.8 개로 호르몬

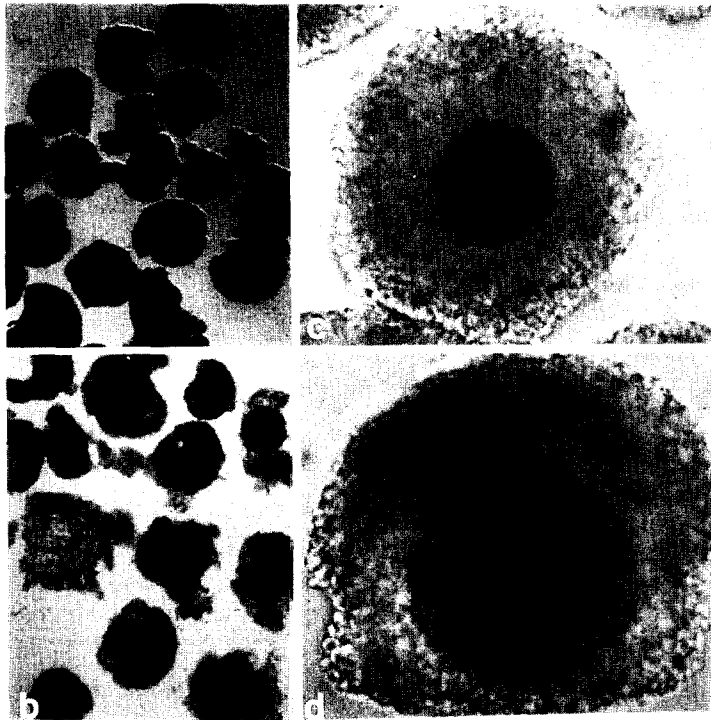


Fig. 2. Normal oocytes-cumulus complexes(OCCs) used for oocytes maturation *in vitro* for 24~72 h. Expanded OCCs(b) were shown after 24 h of culture. Cumulus expansion was not prominent unlike to other domestic animals. Only the slight expansion between corona radiata cells and surrounding cumulus cells can be seen(c and c). Magnifications are X40 in a and b, and X250 in c and d.

**Table 1. Number of follicular oocytes recovered from the ovaries of bitches primed with gonadotropins**

No. of bitches	Total no. of the OCCs	No. of good OCCs (%)	No. of poor OCCs (%)
1	4	3	1
2	74	22	52
3	28	20	8
4	70	18	52
5	99	20	79
6	28	14	14
Total	303	97(32.1)	206(67.9)

**Table 2. Number of follicular oocytes recovered from ovaries obtained at abattoir**

No. of bitches	Total no. of the OCCs	No. of good OCCs	No. of poor OCCs
1			
2	10	3	7
3			
4	15	3	12
5			
6	10	1	9
Total	35	7	28

처리한 구에 비하여 떨어지는 결과를 보여주었다 (Table 2).

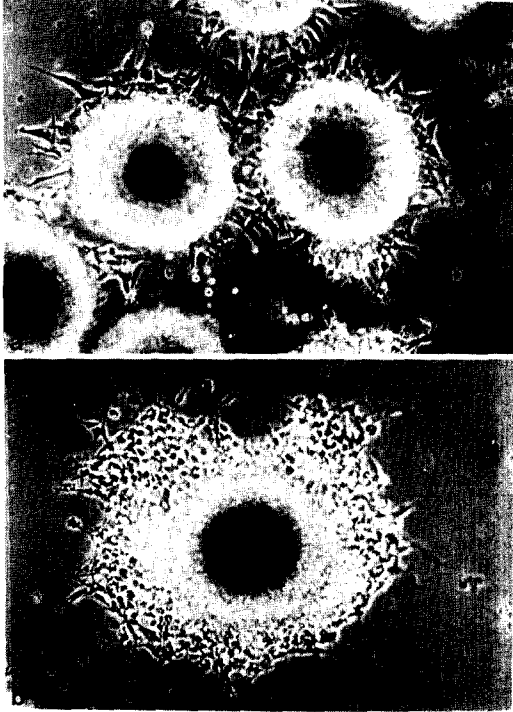
회수된 대부분의 난자는 난구세포층이 치밀하였지만 난자들이 수축되어 있거나 용해된(lysed) 난자세포질을 가지고 있었다. 그러나 이들 난포란 중에서도 good OCCs로 분류된 것들을 호르몬 처리에 의해 회수한 OCCs와 함께 성숙배양에 공시하였다. 개의 난소로부터 회수한 난자에 대한 보고자료는 많지 않아 그 상세한 비교는 어렵지만 Mahi와 Yanagimachi (1976)에 의하면 발정기에 상관없이 회수한 난자를 75두의 자성견으로부터 조사한 결과 65%가 퇴화난자라고 보고하고 있어 본 실험의 67.9%(Table 1)와 유사하였다. 이들 난자는 배양에서 제외하였다.

### 3. 난포란의 난구세포 확장과 체외성숙

난구세포층이 치밀하고 세포질이 균일한 난포란 (Fig. 2a and c)을 24시간동안 체외배양하여 난구세포층의 일부 확장(expansion)을 확인할 수 있었다 (Fig. 2b and d). 이들 난구세포확장은 소나 돼지에서 볼 수 있는 완전한 확장과는 큰 차이가 있었다. 즉

방사관세포(corona radiata cells)는 그대로 투명대에 부착되어 여전히 치밀하게 부착된 형태를 유지하고 있었으며 일부 외부층의 난구세포는 확장되어 OCCs로 부터 이탈되어 나오는 세포도 발견할 수 있었다 (Fig. 2b). 난구세포는 난자에 부착되지 않은 상태에서도 일부 난구세포확장이 일어남을 보여주었다. 한편 일부 난자는 황체화된 난구세포들에 의해 배양 dish의 바닥에 섬유아세포(fibroblast)와 유사한 형태로 부착을 보였다(Fig. 3a). 특히 난구세포의 부착현상은 각 회수된 OCCs의 상태에 따라 상당한 차이를 보여 각 난자세포들의 황체화 현상을 볼 수 있었다(Fig. 3b). 이들 부착된 OCCs는 난자의 핵분석에 이용하지 않았다.

난구세포층의 확장은 다른 가축에 있어서는 난자의 체외성숙에 중요한 형태적 기준의 하나가 되고 있다. 즉 소와 돼지에서는 각각 24 및 35 시간 체외배양에 의해 난구세포층이 완전히 확장되고 난구세포의 분비물에 의해 매우 점성이 높은 OCCs로 느슨한 세포상호작용으로 전환된다. 그러나 개의 난포란의 배양에서는 배양시간을 48~56시간으로 연장시키거나 성선자극호



**Fig. 3. Luteinization of cumulus cells of the OCCs occurring during oocyte maturation *in vitro* for 24 h. The extent of fibroblast-like attachment was various, thus showing less luteinized cells(a) and extensively luteinized cells(b). Magnification =  $\times 100$ .**

르몬인 PMS 및 hCG의 첨가 여부에 관계없이 더 이상의 난구세포층의 확장은 관찰되지 않았다. 이같은 상이한 세포현상은 사람의 난포란을 위시하여 배란직전 난자를 체외배양한 경우에도 유사하게 관찰된다.

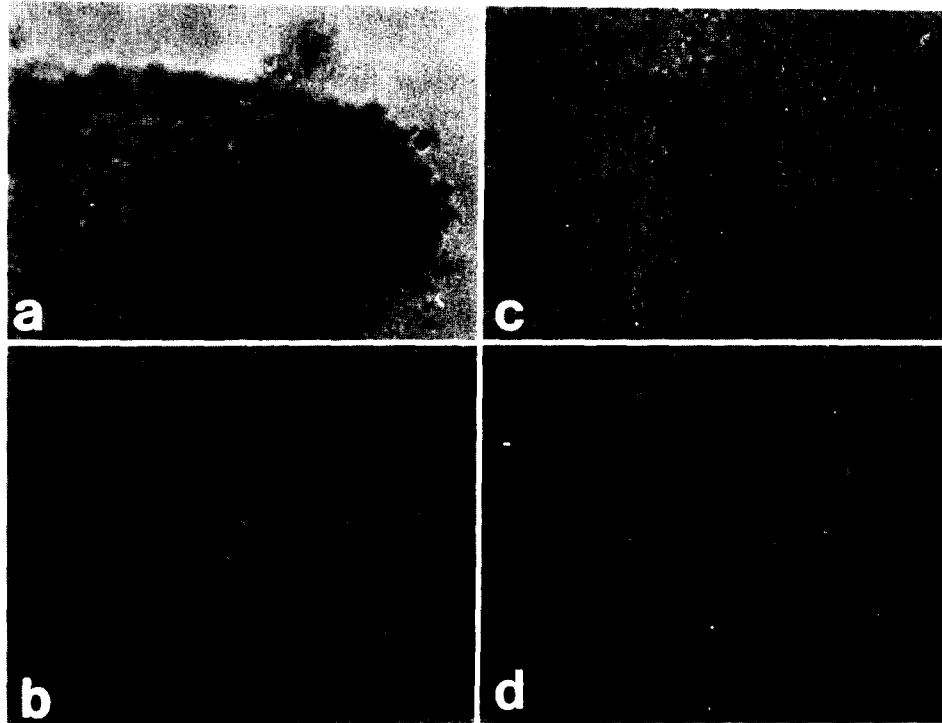
그러나 개를 포함한 동물의 난자에서는 실제로 배란시에 난관내에서 발견된 경우 난구세포가 수정이후 초기배 시기까지도 치밀하게 부착되어 있는가는 자세히 알려져 있지 않지만 난자가 미성숙상태 즉 난핵포 및 제1차 감수분열 중기(metaphase I)에 배란되며 정자가 침입하게 되면 난자가 난관내에서 감수분열이 더욱 빨리 진행된다고 알려져 있다(Baker, 1982). 그러

므로 난구세포층의 확장은 아마도 정자침입이 일어나고 난자가 핵성숙을 완성하게 되는 시기, 즉 난관내에서 난구세포층이 확장될 것으로 추정된다. 이같은 추정은 기존의 조직학적 방법에 의해 수정란이 포함된 난관을 조사한 연구에서 제시한 수정난자가 이같은 사실을 뒷받침 하고 있다(Holst와 Phemister, 1976). 현재까지 보고된 여러가지 다른 동물과 비교해 볼때, 사람, 개, 마우스에서는 아직 체외성숙중 난구세포층의 완전한 확장이 일어나지 않는 것으로 추정된다.

#### 4. 난포란의 체외성숙 중 난자핵의 변화

24시간 배양 후 핵형을 rapid staining(Byun 등, 1991)으로 분석한 결과 각 대표적인 시기의 핵형을 Fig. 4에 나타내었다. 핵막, 분산된 염색질 및 핵인이 뚜렷한 난핵포 시기(Fig. 4a)와 같은 난핵포 시기이지만 염색사가 뚜렷하게 보이는 핵인을 중심으로 세사기(lepetotene stage, Fig. 4b)를 명확히 보여주었다. 난핵포 분리된 후에 핵막이 사라지고 염색체가 농축되고(Fig. 4c), 완전한 성숙이 되어 중기 I의 염색체를 보여주었다(Fig. 4d). 개의 난자는 그 세포질이 지금까지 보고된 포유동물종 중에서 색소물질 및 지방구과립이 가장 풍부하여 불투명한 난자로 알려져 있다(Mahi와 Yanagimachi, 1976). 본 실험의 난핵포 시기의 핵형은 개의 난자에서는 처음으로 그 자세한 경시적인 변화를 보여준 것으로 특히 rapid staining 방법에 의해서도 난자세포질의 투명화가 용이하게 되고 있음을 알 수 있다.

형광염료인 Hoechst 33258 을 이용한 방법에 의해서도 성숙중인 난자의 핵 및 염색체를 명확히 관찰할 수 있었다(Fig. 5) 비록 형광에 의한 핵의 가시화의 경우 난핵포 및 난핵포 붕괴시기의 핵은 염색이 뚜렷하게 뒀에도 불구하고 가시화하여 기록하기가 어려운 데 비하여 중기 I의 염색체는 용이하게 식별이 가능하였다. 이같이 핵을 판정하여 총 54개의 난포란의 성숙에 대한 실험결과는 Table 3에 요약하였다. 일부 개체에서 특히 호르몬의 처리가 적절한 경우 거의 모든 난자가 중기 I의 핵을 보였으나 평균 87%의 난자가 중기 I에 도달하여 본 배양체계의 안정성을 보여주고 있다. 그러나 일부 개체에서는 난핵포시기 난자도 20% 이상이 발견되어 개체차가 매우 큰 것을 알 수 있다.



**Fig. 4. Nuclear configuration of canine oocytes undergoing *in vitro* maturation. Germinal vesicle which is showing nuclear membrane and clear nucleoli(a). More condensed chromatin fibers undergoing maturation(b). Breakdown of germinal vesicle stage(c). Marked metaphase I chromosomes(d). Magnification =  $\times 400$ .**

**Table 3. *In vitro* maturation of canine oocytes<sup>1</sup>**

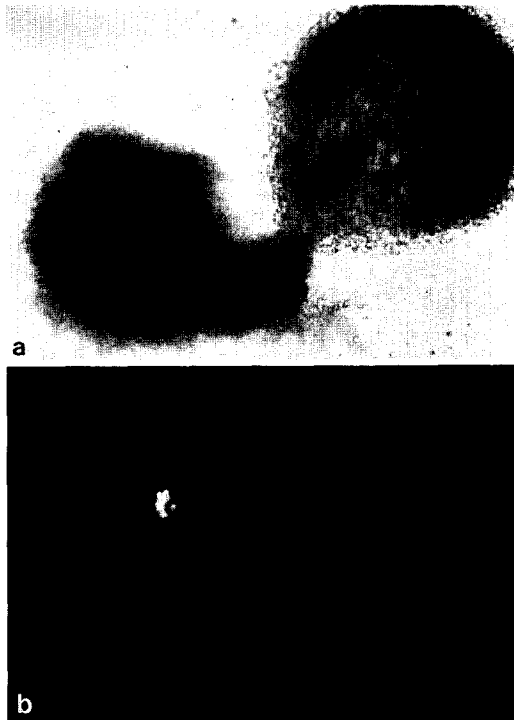
No. of the oocytes	No. of the oocytes	No. of experiments at the following stage <sup>2</sup>		
		GV	GVBD	M I
1	5	0		5 (100)
2	22	0		22 (100)
3	27	6 (22.2)	1 (3.7)	20 (74.1)
Total	54	6 (11.1)	1 (1.9)	47 (87.0)

<sup>1</sup> The oocytes were cultured for 26 h in M16 + 15% fetal calf serum (M16 + FCS).

<sup>2</sup> Abbreviations are GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown and M I, metaphase I.

이같은 결과를 종합하여 볼 때, 본 실험에 이용된 호르몬처리에 의한 다수의 난포란의 회수와 이간이 회수된 난자가 24시간 배양에 의해 중기 I 시기까지 성숙이 가능하며 이때 일어나는 난자핵의 변화를 확립하였으며

정자의 침입이 없으면 더 이상의 난자성숙은 일어나지 않음을 확인하여 초기배의 생산을 위한 체외수정 및 후기배 배양에 본 배양체계를 이용할 수 있을 것이다.



**Fig. 5. Visualization of metaphase I chromosomes in a matured oocyte *in vitro* by fluorescent dye, Hoechst 33258. The oocyte was slightly pressed to obtain a clear view of chromosomes. Bright(a) and fluorescent fields(b) of an identical oocyte. ZP, zona pellucida and MI, metaphase I chromosomes. Magnification =  $\times 250$ .**

#### IV. 적 요

초기배의 체외생산 기술을 확립하기 위한 일환으로 개 난포란을 이용하여 체외배양 및 체외수정을 실시하였다. 성선자극호르몬 처리된 난소와 무처리된 도살장 난소로부터 난포란을 회수하여, 이들 중 체외배양 가능한 good type 의 난포란만을 골라 TCM 199 + 15% FCS 배양액으로 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 도하에서 24~56 시간동안 체외배양하였다. 체외성숙된 난포란과 정소

상체 내부정자를 mTALP + BSA 배양액으로 체외 수정시킨 다음 16~18 시간 동안 배양하면서 수정여부를 조사하였으며 또한 수정란의 배발생 여부를 조사하였다. 24시간동안 성숙시킨 난자의 87%가 제1차 감수분열 중기까지 성숙하였으며, 배양시간을 56시간까지 증가시켜도 성숙은 더 이상 진행되지 않았다. 또한 다가축의 난포란과 달리 개에서는 체외성숙에 따른 난구세포 확장 현상은 뚜렷하게 일어나지 않았다. 이같은 결과는 hormone 처리에 의한 난포란의 회수를 극대화하여 체외성숙 배양체계를 이용함으로써 성숙중 핵변화를 명백히 보여준 것이며, 난포란의 체외배양 및 체외수정을 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

#### V. 인용문헌

1. Baker, T.G. 1982. Oogenesis and ovulation. In : Germ cells and fertilization. Austin, C.R. and Short, R.V. eds. pp. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
2. Byun, T.H., S.H. Lee and H.B. 1991. Development of a rapid staining method for nuclear of the oocyte from domestic animals. Korean J. Anim. Sci. 33, 25-31.
3. Holst, P.A. and R.D. Phemister. 1974. The prenatal development of the dog : Preimplantation events. Biol. Reprod. 5, 194-206.
4. Kim, S.J., S.E. Park and S.H. Lee. 1993. Nuclear changes and sperm penetration in matured canine oocytes *in vitro*. Proc. 7th World Conf. Anim. Prod. vol.2, 270-271.
5. Mahi and R. Yanagimachi. 1976. Maturations and sperm penetrations of canine ovarian oocytes *in vitro*. J. Exp. Zool. 196, 189-196.