

子宮液 및 子宮 上皮細胞와의 共培養이 돼지 卵胞卵의 體外受精 및 發生에 미치는 影響에 관한 研究

金相根·李明憲
忠南大學校 獸醫科大學

Studies on the Effects of the Co-culture with Uterine Fluids and Uterine Epithelial Cells on *in-vitro* Fertilization and Developmental Rate of Porcine Oocytes

S. K. Kim and M. H. Lee

College of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ.

SUMMARY

The studies on the carried out to investigate the effects of co-culture with uterine fluids and uterine epithelial cells on the *in-vitro* fertilization and developmental rate of porcine follicular oocytes. The ovaries were obtained from slaughtered swine. The follicular oocytes surrounded with cumulus cells were recovered by aspirating follicular fluids from the visible follicles of diameter 3~5 mm. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormones and 10% FCS for 46~48 hrs in a incubator with 5% CO₂ in air at 38.5°C and then matured oocytes were again cultured for 12~18 hrs with motile capacitated sperm by preincubation of heparin.

The results obtained in these experiments were summarized as follows;

1. The *in-vitro* maturation and fertilization rate of porcine oocytes co-cultured with uterine fluids in TCM-199 medium were 68.0% and 55.7%, the rates were higher than of control, 56.5% and 38.7%.
2. When the *in-vitro* fertilized oocytes were co-cultured with porcine uterine epithelial cells, the fertilization rate was 60.3%, the rates were higher than that of control, 35.7%.
3. When the *in-vitro* fertilized oocytes were co-cultured with porcine uterine epithelial cells, the development rate to be blastocyst was 12.4%, the rates were higher than that of control, 9.2%($p < 0.05$).

緒 論

돼지 初期胚와 卵丘細胞, 卵管液과 子宮液, 卵管 및 子宮 上皮細胞와의 共培養에 의해 8~16 세포의 block stage 현상의 극복은 물론, 체외수정율의 개선 및 배반포로의 발생율도 향상시킬 수 있다

(Crister 등, 1986; Eyestone 등, 1987; Kajihara 등, 1987; Lu 등, 1987, 1988; Eyestone과 First, 1989; Goto, 1992).

Kajihara 등(1991)은 mouse의 卵丘細胞 또는 子宮 內膜細胞와의 共培養은 卵胞卵의 성숙율과 수정율의 증가 및 胚盤胞로의 발생율의 향상을 가져온다고 하며, 共培養한 胚를 이식했을때 유의하게 수

태율이 높았다고 보고하였으며, Goto 등(1992)은 共培養을 이용한 體外培養系에 子宮 上皮細胞를 첨가하였을 때 mouse의 체외발생율은 대조군(11.3~49.7%)에 비해 29.4~78.9%로 유의한 증가를 나타냈으며 子宮液을 첨가한 경우에서도 유사한 결과를 나타냈다고 보고하였다.

이들의 보고들을 살펴보면, mouse를 대상으로 卵胞卵과 子宮液 또는 子宮 上皮細胞와의 共培養은 체외성숙 및 수정율을 증가시킬 수 있다고 하나, 연구자간에 결과에 있어 큰 차이가 있을 뿐만 아니라 이와 관련된 가축에 대한 연구보문은 접할 수 없었다.

이에, 본 연구는 돼지 卵胞卵과 子宮液 및 子宮 上皮細胞와의 共培養이 體外受精 및 體外發生에 미치는 영향을 구명하고자 배양액에 發情期의 子宮液 및 子宮 上皮細胞를 첨가하여 共培養하였을 때 體外受精 및 體外發生率을 조사하고자 본 시험을 수행하였다.

材料 및 方法

1. 卵胞卵의 回收

屠殺豚의 卵巢로부터 주사기로 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40×)하에서 卵胞卵을 회수하여 배양액으로 3회 세척하였다. 기본배양액은 TCM-199(Whittaker, M. A., Bioproducts Co. USA)로 10%(v/v)의 FCS와 1 μg/ml의 FSH(Sigma, USA), 2 IU/ml의 HCG, 1 μg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μg/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 培養液을 이용하였다.

2. 卵胞卵의 體外受精

배양액 50 μl 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5℃)에서 5~6시간 平衡시킨 배양액내 卵胞卵을 浸漬하여 48시간 성숙시킨 卵胞卵 5개를 45 μl의 受精用 培養液 小滴에 주입한 후, 受精用 배양액 1ml에 精液 0.2 ml를 혼합하여 CO₂ 배양기에서 swim-up 처리후, 上層液을 2,000 rpm으로 10분간 2회 遠心分離하여 세척하고 精子塊를 동량의 100 μ

g/ml의 heparin(Sigma, USA)이 첨가된 BO액으로 희석하여 15분간 CO₂ 培養器에서 受精能獲得을 誘起시킨 精子浮遊液 2 μl(1.5 × 10⁶/ml)로 媒精하였다.

3. 子宮液 및 子宮 上皮細胞와의 共培養

發情期의 子宮液을 채취하여 배양액으로 세척한 다음, 10 ml의 Bovine pancreatic trypsin(Sigma, USA)을 첨가한 37℃의 Ca, Mg-free PBS액에서 45분간 배양후 가볍게 흔들어 上清液을 피펫으로 채취한 후 Percoll용액으로 원심분리하여 上皮細胞를 분리하였다. 배양은 TCM-199와 DMEM(Sigma Co., USA)을 각각 1 : 1로 혼합한 후 FCS 10%를 첨가하여 배양에 이용하였다.

4. 受精 및 發生의 判定

卵胞卵은 媒精후 24시간에 일부의 난자는 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)에 의해 卵丘細胞를 제거한 후 slide glass에 滴下하여 25% acetic acid에 24~48시간 固定한 다음 1% acetic-orcein으로 染色하여 成熟과 受精與否를 判定하였으며, 또한 受精卵를 12~24시간 간격으로 割球數 또는 形態學的 관찰에 의해 胚發生을 判定하였다 (Shea 등, 1976; Ball 등, 1984).

結果 및 考察

1. 子宮液의 添加에 따른 體外成熟 및 受精率

발정기의 子宮液을 첨가한 TCM-199 培養液에서 돼지 卵胞卵과 共培養하였을 때 體外成熟率 및 受精率은 Table 1과 같다.

10% FSH와 子宮液을 TCM-199 배양액에 첨가하여 共培養하였을 때 體外成熟率과 受精率은 각각 68.0%와 55.7%로서 대조군의 56.5%와 38.7%에 비해 높은 결과를 나타냈다.

卵胞卵과 子宮液을 첨가한 培養液에서 共培養하였을 때 體外成熟率과 受精率은 대조군에 비해 높은 증가를 나타냈다. 이러한 결과는 共培養을 이용한 體外培養系에 子宮 上皮細胞를 첨가하였을 때 mouse의 체외발생율은 대조군(11.3~49.7%)에 비해 29.4~78.9%로 유의한 증가를 나타냈으며, 또한

子宮液을 첨가한 경우에서도 유사한 결과를 나타냈다고 한 Koto 등(1992)의 보고와 일치하였다.

2. 子宮 上皮細胞의 첨가에 따른 體外成熟 및 受精率

10% FSH와 子宮 上皮細胞를 첨가한 TCM-199 培養液에서 돼지 卵胞卵과 共培養하였을 때 體外成熟率 및 受精率은 Table 2와 같다.

10%의 FSH와 子宮 上皮細胞를 TCM-199 배양액에 첨가하여 共培養하였을 때 體外成熟 및 受精率은 각각 72.1%와 60.3%로서 대조군의 57.1%와 35.7%에 비해 높은 체외성숙율과 수정율을 나타냈다.

卵胞卵과 子宮 上皮細胞를 첨가한 培養液에서 共培養하였을 때 體外成熟 및 受精率은 대조군에 높은 증가를 나타냈으며, 共培養의 효과가 인정되었다. Koto 등(1992)은 共培養을 이용한 體外培養系에 子宮 上皮細胞를 첨가하였을 때 mouse의 체외발생율은 대조군(11.3~49.7%)에 비해 29.4~78.9%로 유의한 증가를 나타냈다고 보고하였으며, Kajihara 등(1991)은 卵丘細胞를 이용한 體外培養系에 子宮 內膜細胞를 첨가한 경우 체외수정후 2일째에 첨가하는 것이 체외발생율에 유효하다고 보고하였는데

이러한 결과는 본 시험결과와 일치되는 경향이였다.

3. 子宮 上皮細胞의 첨가에 따른 體外發生率

初期胚와 子宮 上皮細胞를 첨가한 배양액에서 共培養하였을 때 胚盤胞로의 體外發生率은 Table 3에 나타난 바와 같다.

子宮 上皮細胞를 첨가한 배양액에서 初期 胚와 共培養하였을 때 胚盤胞로의 발달율은 12.4%로서 대조구의 9.2%에 비해 유의적으로 높았다($p < 0.05$).

이러한 결과는 mouse 卵胞卵을 체외수정후 子宮 上皮細胞와 共培養하였을 때 확장 胚盤胞 및 부화된 胚盤胞로의 발생율이 각각 29.4%와 56.7~78.9%라고 한 Goto 등(1988)의 결과에 비해 비교적 낮은 성적이었다. 한편 Shi 등(1990)은 胚의 體外受精 및 發生率은 精子를 제공한 숫소의 個體差가 크다고 하였으며, Fukuda 등(1990)은 수정후 96시간 이후에 卵丘細胞나 卵管 上皮細胞의 존재가 필수적이지 않으나 卵丘細胞가 初期 胚 발생에 필요한 인자를 생산한다고 보고하였다.

Table 1. Effects of uterine fluids to culture media on *in-vitro* maturation and fertilization rate of porcine oocytes

	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized(%)**
Control	62	35(56.5)	24(38.7)
Co-culture	97	66(68.0)	54(55.7)

*:The number of oocytes matured to the second metaphase

** :The number of oocytes fertilized

Table 2. Effects of uterine epithelial cells added to culture media on *in-vitro* maturation and fertilization rate of porcine oocytes

	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized(%)**
Control	42	24(57.1)	15(35.7)
Co-culture	68	49(72.1)	41(60.3)

*:The number of oocytes matured to the second metaphase

** :The number of oocytes fertilized

Table 3. Effects of co-culture with uterine epithelial cells on development rate of *in-vitro* fertilized porcine oocytes

	No. of oocytes	No. of oocytes developed to		
		2-4 cells	9-16 cells	Blastocyst(%)
Control	65	5	13	6(9.2) ^a
Co-culture	89	13	19	11(12.4) ^b

** : Uterine epithelial cells

a, b: Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ($p < 0.05$)

摘 要

본 研究는 돼지 卵胞卵과 子宮液 및 子宮 上皮細胞와의 共培養이 體外受精 및 胚盤胞로의 발생에 미치는 영향을 구명하고자 TCM-199 배양액에 子宮液 및 子宮 上皮細胞를 첨가하여 共培養하였을 때 체외수정율과 체외발생율은 다음과 같다.

1. 돼지 卵胞卵과 TCM-199 배양액에 子宮液을 첨가하여 共培養하였을 때 체외수정율과 수정율은 각각 68.0%와 55.7%로서 대조군의 56.5%와 38.7%에 비해 높은 체외수정율과 수정율을 나타냈다.
2. 돼지 卵胞卵과 TCM-199 배양액에 子宮 上皮細胞를 첨가하여 共培養하였을 때 체외수정율은 60.3%로서 대조군의 35.7%에 비해 높은 체외수정율을 나타냈다.
3. 돼지 初期胚와 子宮 上皮細胞를 첨가한 培養液에서 共培養하였을 때 胚盤胞로의 체외발생율은 12.4%로서 대조군의 9.2%에 비해 유의적으로 높았다($p < 0.05$).

參考文獻

Ball GD, Leibfried ML, Ax RL and First NL. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. J. Dairy Sci., 67:2775-2785.

Crister ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WE, Northey DL and First NL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology, 25:150 (abstr.)

Eyestone WH, Vignieri J and First NL. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. Theriogenology, 27:228 (abstr.)

Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.

Fukuda Y, Ichikawa M, Naito N and Toyada Y. 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.

Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi 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 Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y and Mori T. 1992. Estrous cycle independent embryo growth promoting activity of mouse uterus. J. of Reprod. and Dev., 38(3):211-217.

Kajihara Y, Goto K, Kosaka S, Nakanishi Y and Ogawa Y. 1987. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. Japan J. of Anim. Reprod., 33:173-180.

Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y and Goto K. 1991. Pregnancy by bovine blastocysts developed in co-culture

- co-culture with cumulus/uterine endometrial cells after *in vitro* fertilization. Japan J. of Anim. Reprod., 37:177-184.
- Lu KH, Gordon I, Gallagher M and McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Vet. Res., 121:259-260.
- Lu KH, Gordon I, Chen BH, Gallagher M and McGovern H. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. Vet. Res., 122:539-540.
- Shea BF, Latour JPA, Berdin KN and Baker RD. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
- Shi DS, Lu KH and Gordon I. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. Theriogenology, 33:24(abstr.)