

체외성숙시 중·대란포의 과립막세포 첨가가 배 발달에 미치는 영향

공일근 · 주영국 · 광대오* · 노규진** · 박충생
경상대학교 농과대학 축산학과

Effect of Addition of Granulosa Cells for Oocyte Maturation on Cleavage and Development of Bovine IVF Embryos

I. K. Kong, Y. K. Joo, D. O. Kwock*, G. J. Rho** and C. S. Park

Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

This experiment was investigated the effect of presence of granulosa cells from follicles of different size on bovine oocyte maturation, cleavage and development to late stage. The nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes in the IVM-IVF system are critical for subsequent embryo development. Granulosa cells when the co-cultured with oocytes may interact with cumulus-oocytes complexes and influence the development competence of the oocytes. Granulosa cells from medium (2~6 mm) and large(>10 mm) size follicles were recovered by aspiration, washed 3 times by centrifugation at 500×g for 5 min, and used for co-culture at a concentration of 2~3 × 10⁶ cells/ml. The oocytes were matured *in vitro* (IVM) for 24 hrs. in TCM-199 supplemented with 35 μg/ml FSH, 10 μg/ml LH, 1 μg/ml estradiol-17β and granulosa cells at 39°C under 5% CO₂ in air. They were fertilized *in vitro* (IVF) by epididymal spermatozoa treated with heparin for 24 hrs., and then the zygotes were co-cultured *in vitro* (IVC) with bovine oviductal epithelial cells for 7 to 9 days. The assessment of maturation revealed that Grade I oocytes showed significantly (P<0.05) more expanded cumulus cell (93.0% of 158 oocytes) than Grade II oocytes (79.4% of 107 oocytes). Following *in vitro* fertilization, the proportion of zygotes cleaved was higher (P<0.05) in Grade I oocytes (84.1%) than in Grade II oocytes (61.5%). The co-culture of Grade I oocytes with granulosa cells for IVM improved significantly (P<0.05) the subsequent development to morulae and blastocysts (33.6%), compared with the control oocytes (19.2%). The effect of co-culture with granulosa cells was similar to the oocytes from the medium (31.6%) or large (33.6%) follicles. It was concluded that the presence of cumulus cells surrounding immature oocytes and the addition of granulosa cells to culture medium might be required to induce both nuclear and cytoplasm maturation of bovine oocytes more effectively.

Key words : bovine, granulosa cells, *in vitro* maturation, fertilization and development

* 경상대학교 사범대학 과학교육과(Department of Science Education, Gyeongsang National University)
** 경상대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

을 미치는지를 규명하고자 실시하였다.

서 론

최근 수정란 이식기술과 유전공학기법의 급속한 발전과 더불어 난자와 수정란의 생산과 이용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 지금까지의 가축 능력개량은 우수한 종모축과의 교배 또는 인공수정에 의존되어 왔으나, 앞으로는 수정란이식과 난자를 이용한 유전공학 및 미세조작기법으로 우수한 수정란을 작출, 이용함으로써 새로운 번식과 육종 기술의 개발이 가능하게 될 것이다. 즉 비교적 염가로 이식 가능한 다수의 수정란을 생산할 수 있게 되면 다양한 기초실험에 응용할 수 있으며, 불임축의 치료는 물론 수정란이식에 의한 급속한 가축의 개량과 종축의 수정능평가, 특정품종의 생산, 쌍자생산, 핵이식에 의한 clone 동물의 생산, chimera 동물의 작출, 유전자이식에 의한 신품종작출 등의 연구와 기술개발에 크게 기여할 것으로 기대된다.

체외성숙과 체외수정시 난포란의 핵과 세포질의 성숙은 배 발달에 결정적인 역할을 하며 난구세포는 난포란의 체외수정에 있어서 정자의 침체반응유기와 수정, 난자의 분할 및 배 발달에 중요한 영향을 미치므로(Fukui, 1990), 근래에는 난구세포가 치밀하고 두텁게 부착된 난포란의 높은 발생능을 가진다고 보고되고 있다(Yang과 Lu, 1990; Wiemer 등, 1991). 체외성숙난자가 체내성숙난자보다 배발생이 저조한 것은 난포란의 핵성숙 및 세포질의 성숙이 체내성숙과 같이 정상적으로 일어나지 않을 뿐 아니라 수정과 배발생의 조건이 적합하지 않은데 있으며(Sanbuissho와 Threlfall, 1989; Iwasaki와 Nakahara, 1990), Schellander 등(1990)은 난포란의 체외배양시 핵성숙은 정상적으로 일어나 제 2성숙분열 중기에 도달하나, 세포질성숙이 정상적으로 일어나지 않아 그 이후의 수정과 배발생에 영향을 미치기 때문이라고 보고하였다. 이와 같은 문제점을 보완하기 위하여 체외성숙시 난구세포를 난포란과 공배양을 실시함으로써 핵과 세포질의 성숙을 유도하였다(Mochizuki 등, 1991; Suh 등, 1993). 따라서 본 연구는 난포란의 체외성숙시 난포의 크기별로 과립막세포를 채취하여 공배양을 실시함으로써 분할 및 배발달에 어떠한 영향

재료 및 방법

1. 공시난자의 채취

난소는 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(25~28 $^{\circ}$ C)에 넣어 2 시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포란은 중난포(직경 2~6 mm)에서 채취하였으며 4~5 회 기본용액(TCM-199 + 10% FCS)으로 세척하여 난포란의 선발은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 난구세포층과 세포질의 충실도에 따라 실시하였다.

즉, 도립현미경(Olympus, 일본)하에서 4~5 층의 난구세포층이 층만하면서 균일한 세포질을 가진 것을 Grade I, 2~3 층의 난구세포층을 가진 것을 Grade II, 부분적으로 나화된 것을 Grade III으로 구분하였으며, Grade I 과 II의 난포란만을 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙 배양액 과 체외성숙

체외성숙 배양액은 TCM-199 배양액에 sodium pyruvate(56 μ g/ml), streptomycin(100 μ g/ml), penicillin G(100 units/ml)와 hormone으로는 LH(10 μ g/ml), estradiol-17 β (1 μ g/ml), FSH(35 μ g/ml)를 첨가하였고 혈청으로는 10% FCS를 첨가하였다. 이와 같이 준비된 체외성숙 배양액은 4-well dish에 1 ml씩 분주하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 18 시간 이상 전배양을 실시하여 평형을 유도하였다.

체외성숙시 과립막세포도 2~3 \times 10⁶ cells/ml의 농도로 난포란과 같이 약 24~26 시간 동안 공배양을 실시하여 난구세포의 팽창과 세포질의 충실도 등으로 체외성숙을 판정하여 체외수정에 공시여부를 판단하였다.

3. 정자준비와 체외수정

체외수정을 위한 정자의 준비는 정소상체미부 정자로서 caffeine(10 μ M)이 첨가된 세척용 B. O. medium으로 60 분 동안 swimming-up을 유도하여 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500 \times g로 1 회 원

심분리한 후, 수정능획득을 위하여 BSA(5 mg/ml), caffeine(5mM) 및 heparin(10 μ g/ml)이 첨가된 수정용 B. O. medium을 5 ml 첨가하여 다시 500 \times g로 원심분리한 후 약 1 ml의 수정용 B. O. medium을 첨가하여 CO₂ incubator에서 10~15분간 수정능획득을 유도하였다. 체외수정은 성숙된 난포란을 수정용 B. O. medium으로 3~4 회 세척한 다음 수정용 B. O. medium 100 μ l drop 당 10~15 개의 난자를 옮긴 후 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 2~3 \times 10⁶ sperms/ml이 되게 첨가시켜 약 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 수정을 유도하였다.

4. 수정란의 체외배양

체외수정 후 회수된 수정란을 TCM-199 배양액으로 4~5 회 세척하여 잔여 난구세포와 정자를 제거한 후에 단층을 형성하고 있는 난관상피세포와 공배양시키면서 48 시간마다 신선배양액으로 교환하였으며, 5 일이 경과한 monolayer cells은 신선한 monolayer cells로 교환하면서 수정 후 7~9 일까지 후기배로의 배 발달을 조사하였다.

5. 공배양을 위한 난관상피세포의 준비

도축장에서 수집한 난관을 생리식염수에 담아 오염방지를 위하여 얼음위에서 실험실로 운반하여 항생제가 함유된 생리식염수로 세척하여 멸균된 휴지로 난관표면을 닦고 멸균된 수술기구로 결합조직과 지방덩이를 철저히 제거한 다음 다시 생리식염수로 세척하여 오염 가능성이 있는 양 끝부분의 약 1 cm 정도를 절단한 후에 난관협부에서 누두부 쪽으로 10 ml syringe에 TCM-199 medium으로 약 1 ml을 관류시킨 후 핀셋으로 난관을 압착하면서 난관상피세포를 채취하였다. 채취한 상피세포는 500 \times g에서 5 분간 원심분리시켜 상층액을 제거하고 나머지 pellet 부분을 2회 이상 세척하여 2~3 \times 10⁶cells/ml의 최종농도로 조정하여 48 시간동안 배양시킴으로써 monolayer cells의 형성을 유도하였다.

6. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 χ^2 -test

및 T-test를 이용하여 분산분석과 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 난포란의 등급별 체외성숙, 수정 및 분할율

회수한 난포란을 Grade I, II로 구분하여 TCM-199 배양액에 hormones, FCS 및 granulosa cells을 첨가하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24~26 시간동안 체외성숙 후 정소상체 미부정자와 약 24 시간 동안 체외수정을 유도한 결과는 Table 1, 2에서와 같다.

체외성숙된 난포란은 난구세포의 팽창여부와 세포질의 충실도 등으로 성숙 여부를 판단한 결과 Grade I, II에서 각각 93.0% 와 79.4%의 성숙율을 보였다. 또한 2-cell 이상 분할된 수정란을 수정된 것으로 판단하였을 때 Grade I, II에서 각각 84.1%와 61.5%의 수정율을 나타내었다. Utsumi 등(1988)과 Yang과 Lu(1990)는 나화된 난포란에 비해 치밀한 난구세포를 가진 난포란의 발생율이 유의적으로 높았으며 또한 배반포기까지의 발달율도 치밀하고 완전하게 과립막세포가 부착된 난포란에서 유의적으로 높았다고 보고하였다. Wiemer 등(1991)은 성공적인 체외배양조건은 주로 난포란의 선발기준, 체외성숙조건 및 배발달을 위한 공배양의 조건 등이라고 하였는데 그 중에서 난포란의 선발기준은 배발달능력을 결정하는 가장 중요한 요인이라고 하였다. 또한 Younis 등(1989)은 난구세포층의 부착정도와 난포란에서 세포질의 색소침착정도(세포질의 충실도)등이 배 발달능력을 결정하는 중요한 요인이라고 하였다. 난포란의 체외성숙시 hormone, serum 및 granulosa cells 등의 첨가 체외성숙시 핵과 세포질의 성숙에 많은 영향을 미친다고 Sirard와 Bilodeau(1990)가 보고하였으며, Wiemer 등(1991)의 Grade I, II의 난포란에서 91.3%와 73.3%의 체외성숙율과 86.6%와 64.8%의 수정율을 보고하여 본 실험의 결과와 비슷한 성적을 보였다. 이와 같이 등급간에 성숙율과 수정율에서 유의적(P<0.05)인 차이를 보이는 것은 난포란의 형태학적인 분류에 의한 등급간의 질적인 차이가 그후의 체외성숙, 수정 및 배 발달율에도 영향

Table 1. Effect of quality of bovine follicular oocytes on *in vitro* maturation identified by expansion of cumulus cells

Quality of oocytes	No. of oocytes used	No. and (%) of oocytes expanded	No. of oocytes non-expanded
Grade I	158	147(93.0) ^a	11
Grade II	107	85(79.4) ^b	22

* Values with different superscripts in the same column were significantly ($P < 0.05$) different.

Table 2. Effect of quality of bovine follicular oocytes on *in vitro* maturation and subsequent cleavage rate

Quality of oocytes	No. of oocytes used	No. and (%) of oocytes or embryos		
		Inseminated /used	Cleaved /Inseminated	Cleaved /used
Grade I	126 118(93.7) ^a	106 /118(89.8) ^a	106 /126(84.1) ^a	
Grade II	130	108(83.1) ^b	80 /108(74.1) ^b	80 /130(61.5) ^b

* Values with different superscripts in the same column were significantly ($P < 0.05$) different.

을 미치는 것으로 사료되므로 회수한 난포란의 체외성숙시 난구세포와 세포질의 충실도 등으로 철저한 분류를 실시하여 Grade I의 난포란을 선발하여 이용하는 것이 후기배로의 발달에 좋은 영향을 미칠 것으로 사료된다.

2. 체외성숙시 중 대란포의 과립막세포 첨가가 배발달에 미치는 영향

난포란의 체외성숙시 중 대난포에서 과립막세포를 채취하여 이들의 배양액 내 첨가구와 무첨가구로 구분하여 체외성숙을 유도하였을 때 배발달에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3, 4에서 나타난 바와 같다. Grade I에서 무첨가구, 중난포와 대난포의 과립막세포 첨가구에서 72.1, 88.0 및 88.5%의 분할율을 얻었고 상실배기와 배반포기 배까지의 배 발달율은 19.2, 31.6 및 33.6%를 각각 얻어 첨가구에서 무첨가구 보다 유의적($P < 0.05$)으로 높은 분할율과 배 발달율을 얻었다. Grade II에서는 52.2, 75.0 및 82.1%의 분할율을 얻었고 10.2, 16.7 및 19.2%의 배 발달율을 얻어 분할율에서는 유의차를 보였으나 후기배로의 배 발달율에는 유의차를 보이지 않았다. 그리고 난포의 크기에 따른 중난포와 대난포의 과립막세포 첨가구에서는 유의차를 보이지 않았다.

Dekel 등(1984)은 난포란의 성숙을 위하여는 필

요한 영양물질이 세포질과 난구세포와의 gap junction에 의하여 세포질내로 이송된다고 하였으며, Lawrence 등(1978)은 과립막세포 들간의 gap junction에 의하여 cAMP를 수송할 수 있다고 하였다. Fukui(1990), Sirard 등(1988) 및 Shioya 등(1988)은 미성숙 난포란을 둘러싸고 있는 난구세포는 난포란의 핵성숙과 세포질성숙에 중요한 역할을 한다고 하였다. Ball 등(1982)은 난구세포는 난구세포들 사이의 공간을 넓혀주는 nonsulfated glycosaminoglycan hyaluronic acid를 분비하는데 그것은 아직 팽창되지 않은 난구세포가 정자의 침투를 방해할 수 있기 때문이라고 하였다. 또한 Fukui(1990)은 난구세포의 팽창은 난포란이 정자와 수정을 위한 준비과정이라고 설명하였고, Fukui와 Ono(1989), Sirard와 Bilodeau (1990) 및 Mochizuki 등(1991)은 난구세포의 팽창은 난포란의 성숙을 말하며, 체외성숙시 난구세포와 과립막세포의 첨가는 난포란의 핵성숙과 세포질성숙을 위하여 필요하다 고 하였다. Suh 등(1993)은 무첨가구, 중난포 및 대난포의 과립막세포의 첨가구에서 각각 21.8, 26.5 및 33.8%의 배반포기까지의 배 발달율을 보고하여 본 연구결과에서 과립막세포의 첨가구에서 무첨가구 보다 유의적($P < 0.05$)으로 높은 배 발달율을 얻은 결과와 비슷한 경향을 보였다. 그러나 과립막세포의 첨가구에서도 중난포와 대난포간에 유

Table 3. Effect of addition of granulosa cells on *in vitro* development of IVM-IVF bovine embryos from Grade I oocytes

Size of Follicle (mm)	No. of oocytes used	No. and (%) of oocytes cleaved	No. and (%) of embryos developed to		
			Morula	Blastocyst	Morula & blastocyst
Control	104	75(72.1) ^b	15	5	20(19.2) ^b
Medium(2~6)	117	103(88.0) ^a	24	13	37(31.6) ^a
Large(>10)	122	108(88.5) ^a	22	19	41(33.6) ^a

* Values with same superscripts were not significantly different (P<0.05).

Table 4. Effect of addition of granulosa cells on *in vitro* development of IVM-IVF bovine embryos from Grade II oocytes

Size of Follicle (mm)	No. of oocytes used	No. and (%) of oocytes cleaved	No. and (%) of embryos developed to		
			Morula	Blastocyst	Morula & blastocyst
Control	69	36(52.2) ^b	6	1	7(10.2) ^a
Medium(2~6)	60	45(75.0) ^a	7	3	10(16.7) ^a
Large(>10)	78	64(82.1) ^a	9	6	15(19.2) ^a

* Values with same superscripts were not significantly different (P<0.05).

의차가 없다면 과립막세포의 채취시 오염 등의 방지가 용이한 대난포를 이용하는 것이 유리할 것으로 사료된다.

적 요

한우 난포란을 이용한 체외성숙과 체외수정을 유도하기 위하여 도축우의 난소로부터 채란한 난포란을 Grade I, II 등급으로 구분하여 TCM-199에 10% FCS와 LH(10mg/ml), estradiol-17β(1 mg/ml), FSH(10 mg/ml)가 첨가된 체외성숙 배양액에서 24시간동안 체외성숙시켜 한우 정소상체 미부정자를 B. O.배양액으로 수정능회득시켜 24 시간동안 수정을 유도하였다. 체외수정 후 zygotes를 기본배양액으로 세척 후 난관상과세포와 공배양을 실시하여 이식가능한 후기배로의 배 발달을 유도하였다.

1. 회수된 난포란을 24 시간 동안 체외성숙시킨 결과 Grade I 과 II에서 93.0와 79.4%의 성숙율을 보였으며, 84.1와 61.5%의 분할율을 보여 난포란의 등급간에는 체외성숙과 체외수정에

유의적(P<0.05)인 차이를 보였다.

2. 체외성숙시 중난포와 대난포의 과립막세포를 첨가하거나 첨가하지 않은 상태에서 체외 성숙시킨 결과 Grade I 난포란에서 각각 31.6, 33.6 및 19.2%가 상실기와 배반포기 배로의 배 발달율을 보였고, Grade II에서는 각각 16.7, 19.2 및 10.2%의 후기배로의 배발달율을 얻어 Grade I 난포란에서는 체외성숙시 과립막세포의 첨가가 무첨가보다 후기배로의 발달에 유의적(P<0.05)인 효과를 보였으나 난포의 크기간에는 유의차를 보이지 않았다.

이상의 결과에서 난포란의 체외성숙시 과립막세포와 세포질의 충실도 등으로 등급간의 철저한 분류를 실시하고 과립막세포와 공배양으로 체외성숙을 유도하는것이 이식 가능한 후기배로의 배발달에 좋은 영향을 미칠 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ball GD, Bellin ME, Ax RL and First NL. 1982. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-

- cyte complexes: morphology and chemistry. *Mol. Cell. Endocrinol.* 28:113-122.
- Dekel N, Aberdam E and Sherizly I. 1984. Spontaneous maturation *in vitro* of cumulus enclosed rat oocytes is inhibited by forskolin. *Biol. Reprod.* 31:344-350.
- Fukui Y. 1990. Effects of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 26:4046.
- Fukui Y and Ono H. 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. Fert.* 86:501-506.
- Iwasaki S and Nakahara T. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* rabbit oviducts. *Theriogenology* 33:669-675.
- Lawrence TS, Beers WH and Gilula NB. 1978. Transmission of hormone stimulation by cell-to-cell communication. *Nature* 272:501.
- Mochizuki H, Fukui Y and Ono H. 1991. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 36:973-986.
- Sanbuissho A and Threfall WR. 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology* 31:693-699.
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. *Theriogenology* 30:489-496.
- Sirard MA and Bilodeau S. 1990. Effects of granulosa cell co-culture on *in vitro* meiotic resumption of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 89:459-465.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1988. The culture of oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39:546-552.
- Suh TK, Rehman N, Collins A and Wright RW. 1993. Effects of granulosa cells from different size follicles in co-culture with bovine oocytes on maturation, fertilization and cleavage. *Theriogenology* 39:323(Abstract).
- Utsumi K, Katoh H and Iritani A. 1988. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 29:320(Abstract).
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fickand 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.
- Sanbuissho A and Threfall WR. 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology* 31:693-699.
- Yang YB and Lu KH. 1990. The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*. *Theriogenology* 33:355(Abstract).
- Younis AI, Brackett BG and Fayrer-Hoskon RA. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete. Res.* 23:189-201.