

돼지난포란의 체외성숙에 있어서 과립막세포의 영향

정법식 · 전익수 · 박수봉 · 최광수*

축산시험장

Effects of Granulosa Cells on *In Vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes

B. S. Chung, I. S. Jeon, S. B. Park and K. S. Choi*

Livestock Experiment Station, R. D. A.

SUMMARY

This study was undertaken to investigate effects of granulosa cells on meiotic maturation of porcine oocytes *in vitro*. The results obtained in this study were summarized as follows: The germinal vesicle breakdown(GVBD) rates were 91.5, 93.3 and 96.6%, respectively, when the cumulus oocyte complexes(COC) in the TCM-199 medium with sodium bicarbonate, Na pyruvate, penicillin G, streptomycin sulfate and 10% FCS were cultured in the condition of FSH(0.02 Au/ml), LH(10 μ g/ml) and FSH + LH added. And when the COC were co-cultured with granulosa cell (5 \times 10⁶ cells/ml) in the condition of FSH, LH and FSH + LH added, GVBD rates were 94.3, 92.9 and 98.9%, respectively. However, when the COC were cultured in the condition of hormone free and co-cultured with granulosa cells in the condition of hormone free, the GVBD rates were 40.4 and 86.3%, respectively. The GVBD rates were 41.0, 62.7, 84.6, 88.1 and 93.6%, respectively, when the COC were co-cultured with granulosa cells that the concentrations are 0 cells/ml, 1 \times 10⁶ cells/ml, 5 \times 10⁶ cells/ml, 1 \times 10⁷ cells/ml and 5 \times 10⁷ cells/ml.

Key words: porcine, oocyte maturation, granulosa cell, co-culture, GVBD rate

서론

포유동물 난포란의 체외성숙에 관한 연구는 Pincus와 Enzman(1935)이 토끼 난포에서 회수한 난포란을 생리적 배양액에서 배양시켰을 때 체내에서 일어나는 감수분열 현상이 체외에서도 일어난다고 보고한 이래로 최근 미성숙 난포란을 이용하여 다량의 배를 얻고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다. 그리고, 실험동물에 있어서 cAMP와 purines의 작용으로 난포란의 핵성숙을 억제할 수 있다(Downs 등, 1989). 따라서, 돼지와 같은 가축에 있어서

난포란을 체외에서 난핵포기단계에 핵성숙을 유도할 수 있을 것이다.

한편, 포유동물 난포란의 핵성숙억제에 관한 연구는 Chang(1955)이 토끼난포란의 핵성숙을 억제시키는 물질이 난포액임을 처음으로 보고한 이래, 돼지에 있어서는 Tasfriri와 Channing(1975)이 15% 돼지혈청이 첨가된 TCM-199과 돼지난포액을 각각 50%로 하여 난포란을 배양했을 때 난포액이 첨가되지 않은 배지에서 배양했을 때보다 성숙율이 저하되어 난포액이 핵성숙 억제인자이며, 또한 과립막세포의 농도가 증가할수록 난포란과의 공배양서 성숙율이 저하되어 과립막세포도 핵성숙억제인

* 경북대학교 농과대학 낙농학과(Department of Dairy Science, College of Agriculture, Kyung Pook National University)

자라고 보고하였다.

그러나, Sato와 Ishibasi(1977)는 100%난포액에서 돼지난포란을 25시간 배양했을 때 난핵포 붕괴율은 90%로서 난포액에 의한 핵성숙 억제작용은 일어나지 않으며, 난포란을 BSA(1 mg/ml)가 첨가된 m-KRB 배지에서 과립막세포와 공배양했을 때 난핵포붕괴율은 67.9%였으며, 난포란이 난포의 과립막세포에 부착된 상태(hemisected follicle)로 배양했을 때 난핵포붕괴율은 3.1%로 나타나 과립막세포에 의해 핵성숙 억제인자를 포함한다고 보고하였다.

또한, Racowsky와 McGaughey(1982)는 돼지난포란을 15% 돼지혈청이 첨가된 배지에서 난핵포붕괴율은 64.1%였으나, 이에 과립막세포를 5×10^6 cells/ml의 농도로 첨가하여 공배양했을 때 난핵포붕괴율은 77.0%로서 유의적으로 증가되어 과립막세포에 의한 난포란의 성숙억제효과는 없다고 보고하였다. 그리고, Park(1989)은 FSH(0.02 Au/ml)와 LH(10 μ g/ml)가 첨가된 배양액에 과립막세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 첨가하여 공배양했을 때 과립막세포가 첨가되지 않은 배지에서보다 성숙율과 수정율 및 수정후 응성전핵형성율이 증가된다고 보고한 바 있다.

한편, Fukui와 Ono(1989)는 우난포란의 체외성숙과 체외수정에 있어서 10% 우태아혈청(FCS)이 첨가된 TCM-199 배지에서 과립막세포를 5×10^6 cells/ml의 농도로 첨가했으며 성숙율과 수정율이 향상되었으며, 다정자 침입율은 감소되어 과립막세포의 중요성을 보고하였다.

위에서 살펴본 바와 같이 난포란의 체외성숙에 있어서 과립막세포의 영향에 관한 연구는 각 연구자에 따라 일치하지 않는 결과를 나타내고 있으며, 이에 본 연구에서는 성선자극호르몬이 첨가된 배지에 과립막세포를 5×10^6 cells/ml의 농도로 첨가하여 난핵포 붕괴율을 조사하였고, 또한 과립막세포를 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 cells/ml의 농도로 첨가하여 난핵포 붕괴율을 조사함으로써 과립막세포가 난포란의 핵성숙에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시난소

본 시험에 공시된 난소는 대구직할시 소재 신흥산업 도축장에서 도살되는 암돼지의 난소 중에서 황체나 백체가 없으며 육안으로 보아 정상적인 난소만을 선별하여 공시하였다.

2. 난포란의 회수

도살 직후 적출된 난소는 항체가 첨가된 생리식염수가 들어있는 36~37℃ 보온병에 침지하여 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 2~3회 세척후 3~6 mm 크기의 난포로부터 18 gauge의 주사침이 부착된 주사기를 이용하여 난포란을 포함한 난포액을 흡입하였다. 흡입된 난포액은 petri dish(Nunc, Denmark)에 분주하고, 2~3분간 정지한 다음 실체현미경(Olympus, X-Tr, Japan)아래에서 상층액의 일부를 제거한 후 난포란을 회수하였으며, 회수한 난포란은 파라핀유(Sigma, USA)가 피복된 배양액을 옮겨 2회 세척하여 난구세포가 난자 주위에 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 난자만을 선별하여 본 시험에 공시하였다.

3. 난포란의 배양

1) 배양액

난포란의 체외성숙을 위한 배양액은 TCM-199(Earle's salt, Sigma, No.M5017, USA)에 sodium bicarbonate(Sigma), Na pyruvate(Sigma), penicillin G(Sigma), streptomycin sulfate(Sigma) 및 10% FCS를 첨가하여 조제하였고(서 등, 1990), 실험목적에 따라 0.02 Au/ml FSH(Toshiba Pharm. Co., Japan)와 10 μ g/ml LH(Sigma)를 첨가하여 사용하였다.

2) 난포란과 과립막세포의 공배양

공배양에 이용된 과립막세포는 18gauge의 주사침이 부착된 주사기를 이용하여 3~6 mm 크기의 난포를 찌른 후 2~3회 난포액의 흡입 및 배출을 반복 실시한 다음 난포액과 함께 흡입하였다(Chaning Ledwitz-Rigby, 1975).

흡입된 난포액은 petri dish에서 과립막세포 이외의 물질을 제거한 후 10 ml의 멸균 시험관에 넣고 600G에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 5 ml의 성숙배양액으로 재부유시킨 다음, 다시 동일한 방법으로 2회 원심 세정하여 난포란과의 공배양을 실시하였다.

난포란의 배양방법은 CO₂ 평형된 100 µl의 배양액에 소적당 10개의 난포란을 분배하여 38.5°C, 5% CO₂ 그리고 습도포화상태의 배양기에서 24시간 동안 배양을 실시하였다.

4. 체외성숙의 판정

24시간 체외배양된 난포란은 0.1% hyaluronidase(Sigma)처리로 난자 주위의 난구세포를 제거한 다음 1:3의 비율로 된 acetic alcohol에서 3일간 고정하였으며, 고정된 난자는 0.1% acetoorcein(Merk, German)으로 염색하여, 위상차현미경(Olympus, IMT-2, Japan)아래에서 핵성숙도를 판정하였다.

난포란의 핵성숙도는 Iritani등(1984), 김과 박(1988), Park(1989)등의 방법에 준하여 관찰하였는데 난포란의 성숙분열 단계는 난핵포기(germinal

vesicle; GV), 제1성숙분열중기 (metaphase I; MI), 후기(anaphase I; AI), 종기(telophase I; TI), 제2성숙분열 중기 (telophase II; MII)로 구분하여 판정하였고, 이들 난자 가운데 제1성숙분열중기(MI)부터 제2성숙분열 중기(MII)까지 발생한 난포란을 난핵포붕괴난자로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 성선자극호르몬 및 과립막세포의 첨가와 난포란의 핵성숙

TCM-199배지에 10% FCS등을 첨가하여 조제된 배양액에 FSH(0.02 Au/ml) 및 LH(10 µg/ml) 그리고 과립막세포를 5×10⁶ cells/ml의 농도로 첨가하여 배양했을 때 난포란의 난핵포붕괴율은 Table 1과 같다.

Table 1에 나타난 바와 같이 난포란을 FSH와 LH를 첨가하지 않은 대조구와 이에 과립막세포를 5×10⁶ cells/ml의 농도로 첨가한 대조구에서 난핵포 붕괴율은 각각 40.4%와 83.6%로 나타나 과립막세포가 첨가된 대조구에서 높은 난핵포붕괴율을 나타내었다. 그러나, FSH가 첨가된 처리구와 이에 과

Table 1. Number of oocytes matured to GVBD, which cultured *in vitro* in TCM-199¹⁾ added with FSH(0.02Au/ml) and/ or LH(10µg/ml) and/ or GC(5×10⁶cells/ml)

Treatment	Culture medium condition			No. of oocytes cultured(A)	No. of oocytes at GV ²⁾	No. of oocytes matured to GVBD				
	FSH	LH	GC			MI ³⁾	AI-MI ⁴⁾	M II ⁵⁾	Total(B)	GVBD(%) ⁶⁾
Control	-	-	-	57	34	18	3	5	23	40.4
	-	-	+	102	14	85	1	2	88	86.3
FSH added	+	-	-	47	4	43	-	-	43	91.5
	+	-	+	87	5	82	-	-	82	94.3
LH added	-	+	-	60	4	55	-	1	56	93.3
	-	+	+	84	6	78	-	-	78	92.9
FSH+LH added	+	+	-	59	2	57	-	-	57	96.6
	+	+	+	81	1	78	-	2	80	98.9

¹⁾ Modified TCM-199: TCM-199 was modified with sodium bicarbonate, Na pyruvate, antibiotics and FCS.

²⁾ GV: germinal vesicle

³⁾ MI: metaphase I

⁴⁾ AI-MI: anaphase I - telophase I

⁵⁾ M II: metaphase II

⁶⁾ Rate of GVBD = B/A × 100

립막세포를 5×10^6 cells/ml의 농도로 첨가한 처리구에서 난핵포 봉피율은 각각 91.5%와 94.3%로 나타났으며, LH가 첨가된 처리구와 이에 과립막세포를 5×10^6 cells의 농도로 첨가한 처리구에서 난핵포 봉피율은 각각 96.6%와 98.9%를 나타내었다.

성선자극호르몬이 첨가된 배지에서 과립막세포를 5×10^6 cells/ml의 농도로 첨가하여 배양했을 때 난핵포 봉피율에는 차이가 없었으나 대조구보다는 월등히 향상된 결과를 얻었으며, 최근 성선자극호르몬이 난포란의 성숙을 촉진시키는 결과가 보고되고 있는 가운데(Minato와 Toyoda, 1982a,b; Ball등, 1985; Leibfried-Rutledge와 First, 1986), Park(1989)은 돼지에 있어서 10% FCS가 첨가되고 FSH(0.02 Au/ml)와 LH(10 μ g/ml)가 첨가된 TCM-199배양액에 2~5 mm와 6~12 mm 크기의 난포로부터 채취된 과립막세포를 난포란과 42시간 동안 공배양했을 때 제2성숙분열 중기(M II)까지 성숙한 난포란은 각각 83%와 94%로 나타났으며 과립막세포가 첨가되지 않은 대조구의 80%보다 높게 나타나, 과립막세포는 난포란의 핵성숙억제작용에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 또한, Fukui와 Ono(1989)는 소에 있어서 성선자극호르몬이 첨가된 배지에 과립막세포와 공배양했을 때 난포란의 성숙율이 과립막세포와 성선자극호르몬이 첨가되지 않은 배지에서보다 높게 나타나 우난포란의

체외성숙에 있어서 과립막세포의 필요성을 보고한 바 있다.

이상의 결과와 위의 보고들을 종합하여 고찰해 볼 때, 대조구에서 보다 성선자극호르몬과 과립막세포를 첨가한 처리구에서 높은 난핵포 봉피율을 나타내어 성선자극호르몬과 과립막세포는 난포란의 핵성숙을 촉진시키는 것으로 사료되어지며, 또한 성선자극호르몬과 과립막세포가 첨가된 각각의 처리구에서 난핵포 봉피율에 큰 차이가 없었으므로 성선자극호르몬이 첨가된 상태에서 과립막세포는 난포란의 핵성숙을 억제시키지 않음을 확인할 수 있었다.

2. 과립막세포와 난포란의 핵성숙

TCM-199배지에 10% FCS 등을 첨가하여 조제된 배양액에 성선자극호르몬을 첨가하지 않은 상태에서, 난포란을 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 cells/ml의 농도로 첨가된 과립막세포와 공배양했을 때 난포란의 난핵포봉피율은 Table 2와 같다.

Table 2에 나타난 바와 같이 난포란을 성선자극호르몬과 과립막세포가 첨가되지 않은 배지에서 배양한 대조구에서는 난핵포 봉피율이 41.0%였다. 그러나, 과립막세포가 1×10^6 cells/ml의 농도로 첨가된 처리구에서는 84.6%, 1×10^7 cells/ml의 농도로 첨가된 처리구에서는 88.1%, 5×10^7 cells/ml의

Table 2. Number of oocytes to the GVBD, which co-cultured *in vitro* in TCM-199¹⁾ added with 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 cells/ml of granulosa cells

Granulosa cells concentration (cells/ml)	No. of oocytes cultured(A)	No. of oocytes at GV ²⁾ stage	No. of oocytes matured to GVBD				
			MI ³⁾	AI-MI ⁴⁾	M II ⁵⁾	Total	GVBD(%) ⁶⁾
0	61	36	18	5	2	25	41.0 ^a
1×10^6	67	25	39	1	2	42	62.7 ^b
5×10^6	78	12	59	5	1	65	84.6 ^c
1×10^7	59	7	48	3	1	52	88.1 ^c
5×10^7	78	5	65	8	—	73	93.6 ^c

¹⁾ Modified TCM-199: TCM-199 was modified with sodium bicarbonate, Na-pyruvate antibiotics and FCS.

²⁾ GV: germinal vesicle

³⁾ MI: metaphase I

⁴⁾ AI-MI: anaphase I - telophase I

⁵⁾ M II: metaphase II

⁶⁾ Rate of GVBD = B/A \times 100

a,b,c: Different letters in the same column show significant difference at the level of P < .05.

농도로 첨가된 처리구에서는 93.6%로 나타났다.

이와 같이 10% FCS가 첨가된 TCM-199배양액에서 과립막세포가 첨가되지 않은 대조구에서 난핵포 붕괴율은 41.8%였으나, 과립막세포가 5×10^6 cells/ml의 농도까지는 유의적으로 증가하였으며, 5×10^6 cells/ml이상의 농도에 난핵포 붕괴율은 증가하였으나 유의차는 인정되지 않았다($P < 0.05$).

Leibfried-Rutledge와 First(1980)는 과립막세포의 억제효과 여부를 확인하기 위하여 3~6 mm 크기의 난포에서 채취한 난포란과 과립막세포를 1×10^7 cells/ml의 농도로 44~48시간 동안 공배양했을 때 제1성숙분열 후기(AI)부터 제2성숙분열 중기(MII)까지 성숙을 75%, 난핵포 붕괴(GVBD)부터 제1성숙분열 중기(MII)까지 성숙율은 2%, 성숙이 일어나지 않고 난핵포단계에 머무른 것은 8%로 나타났다. 비장으로부터 채취한 임색세포를 1×10^7 cells/ml의 농도로 44~48시간 동안 공배양했을 때 제1성숙분열 후기(AI)부터 제2성숙분열 중기(MII)까지 성숙율은 66%, 난핵포 붕괴부터 제1성숙분열 후기까지 성숙율 7%, 성숙이 일어나지 않고 난핵포단계에 머무른 것은 25%로 나타나 과립막세포는 난포란의 성숙을 억제하지 않는다고 보고하였다. 또한 Racowsky와 McGaughey(1982)는 3~6 mm 크기의 난포로부터 채취한 난포란을 성선자극 호르몬이 첨가되지 않은 TCM-199배지에 3~6 mm 크기의 난포로부터 채취한 과립막세포를 5×10^6 cells/ml의 농도로 24시간 동안 공배양했을 때 난핵포 붕괴율은 77%였으며, 과립막세포를 첨가하지 않은 대조구에서 64.1%보다 유의적으로 높게 나타나 과립막세포는 난포란의 핵성숙을 억제하지 않는다고 보고하였다.

이상의 결과와 위의 보고들을 고찰해 볼 때, 공배양에 이용된 과립막세포의 농도가 증가할수록 난포란의 난핵포붕괴율이 증가되었던 바, 이러한 결과는 난포란의 핵성숙에 있어서 과립막세포가 난핵포 붕괴억제작용을 하지 않으며 난포란의 핵성숙을 촉진하는 것으로 사료된다. 따라서 과립막세포의 공배양이 난핵포 붕괴율을 촉진시킨 원인 규명과 과립막세포가 포함하고 있는 물질의 생화학적 분리 및 동정에 대하여는 앞으로 연구되어야 할 과제로 사료된다.

적 요

본 연구는 돼지난포란의 체외성숙에 있어서 과립막세포의 첨가가 난포란의 핵성숙 억제작용 여부를 확인하고 나아가 난포란의 핵성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였던 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 난포란을 FSH(0.02 Au/ml), LH($10 \mu\text{g/ml}$) 그리고 FSH와 LH가 동시에 첨가된 배양액에서 배양했을 때 난포란의 난핵포 붕괴율은 각각 91.5%, 93.3% 그리고 96.6%였으며, 과립막세포가 5×10^6 cells/ml의 농도로 첨가되고 FSH, LH 그리고 FSH와 LH가 동시에 첨가된 배지에서 배양했을 때 난포란의 난핵포 붕괴율은 각각 94.3%, 92.9% 그리고 98.9%로 나타났다. 그러나, 호르몬과 과립막세포가 첨가되지 않은 배지에서 난핵포 붕괴율은 40.4%였고, 호르몬은 첨가되지 않고 과립막세포만 5×10^6 cells/ml의 농도로 첨가된 배지에서 난핵포붕괴율은 86.3%였다. 난포란을 과립막세포와 공배양하지 않은 배지에서 난핵포 붕괴율은 41.4%였으나, 과립막세포의 농도를 1×10^6 cells/ml, 5×10^6 cells/ml, 1×10^7 cells/ml 및 5×10^7 cells/ml로 하여 공배양한 경우 난핵포붕괴율은 각각 62.7%, 84.6%, 88.1% 및 93.6%로 나타났다. 이상의 연구결과로 미루어 볼 때 돼지난포란의 체외성숙에 있어서 과립막세포는 난포란의 핵성숙을 억제시키지 않으며, 난포란의 핵성숙을 촉진시키는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ball GD, Wieben ED, and Byer AP. 1985. DNA, RNA and protein synthesis by porcine oocyte-cumulus complexes by expansion. *Biol. Reprod.* 33:739-744
- Chang MC. 1955. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in fallopian tube. *J. Exp. Zool.* 128:378-399.
- Channing CP. and Ledwitz-Rigby F. 1975. Met-

- hods for assessing hormone-mediated differentiation of ovarian cells in culture and short-term incubations. in-methods in enzymology. Vol. 39. hormone action part D. isolated cells, tissue, and organ systems(eds., Hardman, J. G. and B. W. O' Malley). Academic Press, London, pp. 183-230.
- Downs SM, Daniel SAJ, Bomslagerm EA, Hoppe PC, Eppig JJ. 1989. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. Gamete. Res. 23:323-334.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effects 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.
- Iritani A, Kasai M, Niwa K and Song HB. 1984. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in chemically defined medium. J. Reprod. Fert. 70:487-492.
- Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1980. Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes *in vitro*. Biol. Reprod. 23:699-704.
- Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocytes complexes. Biol. Reprod. 35:850-857.
- Minato Y and Toyoda Y. 1982a. Induction of cumulus expansion and maturation on division of oocyte-cumulus expansion *in vitro*. Jap. J. Zootech. Sci. 53:480-487.
- Minato Y and Toyoda Y. 1982b. Effect of homologous serum and follicular fluid on cumulus expansion and maturation division of porcine oocyte-cumulus complexes *in vitro*. Jap. J. Zootech. Sci. 53:425-429.
- Park SB. 1989. Studies on fertilization *in vitro* in the pig. Ph. D. Thesis, Kyoto. Univ. Kyoto.
- Pincus G and Enzaman EV. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. J. Exp. Med. 62:655-657.
- Racowsky C and McGaughey RW. 1982. Further studies of the effect of follicular fluid and membrana granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocyte. J. Reprod. Fert. 66:505-512.
- Sato E and Ishibashi T. 1977. Meiotic arresting action of the substance obtained from cell surface of porcine granulosa cells. Jap. J. Zootech. Sci. 48:22-26.
- Tsafriiri A and Channing CP. 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. Endocrinology 96:922-927.
- 김상근, 박향균. 1988. 소 난포란의 체외성숙, 체외 수정에 관한 연구. 한국가축번식학회지 14: 50-56.
- 서태광, 정범식, 김규현, 전익수, 박수봉, 박향균. 1990. 한우에 있어서 난포란의 체외성숙에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. 한국가축번식학회지 14:263-272.