

돼지 분할초기배와 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포와의 공배양이 생존율에 미치는 영향에 관한 연구

김 상 근 · 이 종 진*
충남대학교 수의과대학

Effects of Hormones, Oviductal Epithelial Cell and Cumulus Cell during the *In-Vitro* Culture in Medium on the Survival Rates of Bisected Porcine Embryos

Kim, S. K. and J. J. Lee

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

The study was conducted to investigate on the survival rate of bisected porcine embryos co-cultured in 10% FCS(v/v) + TCM-199 media containing hormones, oviductal epithelial cells and cumulus cells 0 to 72 hrs after bisection. *In vitro* survival rate was defined as development rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The survival rate of bisected porcine embryos cultured in 10% FCS + TCM-199 media containing PMSG, hCG, PMSG + hCG, hCG + β -estradiol 0 to 20 hrs and 20 to 40 hrs were 37.6% and 37.5%, 28.6% and 28.6%, 35.7% and 28.8%, 30.8% and 23.1%, 38.5% and 30.7%, respectively. The survival rate of bisected embryos co-cultured in TCM-199 media containing hormones, oviductal epithelial cells and cumulus cells was significantly higher than that of non co-culture.
2. The survival rate of bisected porcine embryos co-cultured 10% FCS + TCM-199 media containing oviductal epithelial cells 4 to 5 hrs and 20 to 24 hrs were 42.9% and 38.5%, respectively.
3. The survival rate of bisected porcine embryos co-cultured in 10% FCS + TCM-199 media containing cumulus cells 4 to 5 hrs and 20 to 24 hrs were 40.0% and 35.7%, respectively.

I. 서 론

가축 수정란을 이용한 분할배의 착출에 관한 연구는

수정란이식의 실용성을 확대시키기 위한 방안으로 미
세조작법에 의해 수정란을 분할하여 일란성 쌍자의 생
산 또는 분할배의 한쪽은 동결 보존하면서 다른 쪽은
염색체 검사, 유전자조작 및 이식 등에 제공하기 위한

* 충남대학교 대학원(Graduate School, Chungnam Natl. Univ.)

** 이 연구는 1994년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

분할배의 동결 이용이 보고되었다(Nagashima와 Ogawa, 1981; Lehn-Jenson과 Willadsen, 1983; Heyman, 1985; Willadsen, 1979; 윗와 金, 1994).

Voelkel 등(1985)은 소 분할배의 배양시에 생존율이 떨어지고 배양에 의한 생존율의 저하를 억제하기 위해서는 자궁섬유아세포와의 공배양이 필요하다고 하였으며, Baker(1985)는 혈청을 첨가한 수정인산완충액만으로 배양 또는 황체세포와 공배양을 실시하였을 때 4시간 이상의 배양에서는 이식후의 수태율이 저하되는 것을 보고하였으며, Nibart 등(1988)은 소 분할배는 분할 직후에는 비분할배의 약 1/2의 세포수를 보유하지만 24시간 배양후에는 1/3로 감소되므로 분할배는 세포분열 속도가 늦으며, 내부세포피가 영양막 세포보다 큰 비율로 변성되며 아울러 배양기간을 연장시키면 분할면의 세포는 회복되어 배세포는 재구축되지만 이식하였을 때 분할배의 산자 출산으로의 발생능력은 저하되며 분할배의 동결을 위해서는 3~4시간 정도의 단시간 배양이 바람직하다고 보고하였다. Chesne 등(1987)은 소 분할배의 단시간 배양이 분할면의 손상 회복에 따라 동결후 분할배의 생존성을 향상시킨다고 보고하였으며, Tominaga 등(1991)은 소 수정란을 분할하여 excellent, good, fair, poor, degeneration 등으로 분류하여 excellent, good 분할배만을 선별하여 난관 상피세포와 공배양하였을 때 excellent, good 분할배는 각각 29.2%와 54.2%로서 18~24시간의 무첨가 배양시의 17.6%와 41.2%에 비해 다소 높은 체외발생율을 나타냈다고 보고하였다.

가축 수정란을 이용한 분할배의 체외발생율을 보다 향상시키기 위해서는 분할기술의 개선 및 분할배의 배양체계의 개선 등이 요구된다고 하겠다. 또한, 돼지 수정란은 다른 가축 수정란에 비하여 체외발생능력이 떨어질 뿐만 아니라 분할란은 생존성이 대단히 저조하여 이의 개선과 분할기술이 확립이 시급한 과제라고 생각된다.

이에, 본 연구는 돼지 분할 초기배의 공배양에 따른 체외발생율을 구명하기 위하여 돼지 분할배의 체외배양시 TCM-199 배양액에 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포를 첨가하여 공배양하였을 때 체외발생율을 구명하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 난포란의 회수

도살 직후의 자돈으로부터 난소를 적출하여 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 19-gauge 주사기로 2~5mm 크기의 정상 난포로부터 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실제현미경(20~40 \times) 하에서 형태적으로 우수한 난포란을 선별하여 회수하였다.

2) 배양액

TCM-199(Whittaker, M.A. Bioproducts Co., USA)를 기본 배양액으로 하여 배양액에 20%(v/v)의 FCS(Sigma Co., USA)와 1 μ g/ml의 FSH(Sigma Co., USA), 2 IU/ml의 hCG(Sigma Co., USA), 1 μ g/ml의 17 β -estradiol(Sigma Co., USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate(Sigma Co., USA)를 첨가하여 이용하였으며 사용하기전 멸균 여과시킨 후 사용하였다.

2. 방 법

1) 난포란의 체외수정

난포란의 체외수정은 40~48시간 배양에 의해 체외 성숙이 끝난 난포란을 수정용 배양액으로 3회 세척한 후 45 μ l의 배양액 소적에 5개의 난포란과, 숫돼지의 정소로부터 정소상체를 적출한 후 세척하여 얻은 정자 부유액 0.01 ml와 BO액 2 ml를 시험관에서 잘 혼합하여 배양기에서 1시간 swim up 시킨 다음 약 0.5 ml의 상층액을 2,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 정자 pellets을 같은 양의 heparin용액(100 μ g/ml, Sigma, USA)과 함께 혼합하여 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유기시킨(Fukui, 1988) 정자부유액 2 μ l(1~5 \times 10⁶ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 다음 6~7시간 동안의 매정으로 수정시켰으며 수정의 판정은 배양을 계속하면서 12~24시간 간격으로 발생상태를 관찰하면서 할구수 또는 형태학적 관찰에 의해 배 발생을 판정하거나, 체외수정후 24~32시간에

Shea 등(1976)과 Ball 등(1983)의 방법에 따라 수정 여부를 판정하였다.

2) 분할배의 생산

초기배의 분할방법은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위에 petri dish내에 20% FCS + TCM-199 배양액의 소적중에 배를 넣어 보정용 pipette으로 배를 흡인 고정후 반대측에 15° 각도의 microblade(Feather Co., Japan)로 투명대로부터 배세포피가 나오지 않을 정도로 microblade를 눌러 배를 분할하였다.

분할배는 배의 크기와 胚輪部의 선명도 등의 형태적 관찰에 의해 발생상태를 관찰하면서 excellent, good, fair, poor, degeneration 등으로 분류한 후 excellent, good 분할배만을 선별하여 시험에 이용하였다.

3) 분할배의 공배양

분할 초기배와 20%(v/v)의 FCS + TCM-199 배양액을 기본으로 호르몬의 첨가는 10 IU/ml의 PMSG(Sigma, USA), 10 IU/ml의 hCG(Sigma, USA), 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA)를, 난관상피세포는 발정후 4~5일 이내의 난관팽대부로부터 채취한 난관상피를 3~4회 계대한 후 공배양 1~3일전에 10 µg/ml의 streptomycin sulfate으로 약 3시간 처리하여 trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨 50 × 10⁴ 생존세포를, 난구세포는 직경 5~10 mm의 난포를 적출하여 난포 주변의 간질조직을 제거한 후 난구세포를 시험관에 회수하여 500 rpm으로 5분간

원심분리하여 상층액을 제거한 후 10% FCS(v/v) + TCM-199액 2~3 ml을 첨가하여 2회에 걸쳐 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 1 × 10⁵~10⁶의 생존세포를 배양액에 첨가하여 12~72 시간 공배양하면서 체외발생 상태를 관찰하였다.

4) 분할배의 생존성 판정

분할배와 호르몬, 난관 상피세포 및 난구세포와 공배양하면서 신선한 배양액으로 2~3회 세척한 다음 FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 생존 여부를 판정하거나(Schilling 등, 1982), 배양을 통해 배의 발생상태를 관찰하면서 체외발생율을 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 호르몬 첨가에 따른 분할초기배의 체외발생율

돼지 분할 초기배의 공배양에 있어서 호르몬의 첨가에 따른 체외발생율은 Table 1 및 2에서 보는 바와 같이, 0~20시간에 TCM-199 배양액에 PMSG, hCG, PMSG + hCG 및 hCG + β-estradiol 호르몬을 첨가하여 분할배와 배양하였을 때 excellent 및 good 분할배의 체외발생율은 37.6, 28.6, 35.7, 30.8 및 38.5%로서 무첨가 대조군의 20.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으며 또한, 분할후 20~40시간에 각각 호르몬을 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 37.5, 28.6, 28.8, 23.1, 30.7%로서 무첨가 대조군의 20.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으나, 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율은 감소 경향을

Table 1. Effects of co-culture with hormonal supplements between 0~20hrs on the survival rate of bisected porcine embryos

Supplementation of hormone	No. of BE* examined	Quality of bisected embryos after culture				
		Excell.	Good	Fair	Poor	Degeneration
Control	15	3(20.0)		3	4	5
PMSG + hCG	16	6(37.6)		2	3	5
PMSG + estradiol	14	4(28.6)		3	4	3
hCG + estradiol	14	5(35.7)		2	4	3
PMSG	13	4(30.8)		3	3	3
hCG	13	5(38.5)		3	3	2

* BE : bisected embryos

Table 2. Effects of hormonal supplements between 20~40hrs on the survival rate of bisected porcine embryos

Supplementation of hormone	No. of BE* examined	Quality of bisected embryos after culture			
		Excell. Good	Fair	Poor	Degeneration
Control	15	3(20.0)	3	4	5
PMSG + hCG	16	6(37.5)	3	3	4
PMSG + estradiol	14	4(28.6)	2	3	5
hCG + estradiol	14	4(28.8)	1	4	5
PMSG	13	3(23.1)	3	3	4
hCG	13	4(30.7)	1	4	4

나타냈다.

이러한 결과는 분할배의 배양시 혈청을 첨가한 수정인산완충액만으로 배양 또는 황체세포와 공배양을 실시했을 때 4시간 이상의 배양에서는 이식후의 수태율이 저하된다고 한 Baker(1985)의 결과와 유사한 성적이었다. 한편, Nibart 등(1988)은 소 분할배와 비분할배의 세포를 비교할 때 분할배는 분할 직후 비분할배의 약 1/2의 세포수를 가지고 있지만 24시간 배양 후에는 1/3로 되므로 분할배는 세포분열 속도가 늦으며, 내부세포가 영양막세포보다 큰 비율로 변성된다. 아울러 배양기간을 연장시키면 분할면의 세포는 회복되어 배세포는 재구축되지만 이식했을 때 분할배의 산자로의 발생능력은 저하되며 분할배의 동결을 위해서는 3~4시간 정도의 단시간 배양이 바람직하다고 보고하였다.

2. 난관 상피세포와의 공배양에 따른 체외발생율

돼지 분할 초기배의 배양에 있어서 난관 상피세포와의 공배양에 따른 체외발생율은 Table 3에서 보는 바와 같이, 분할후 4~5시간 및 20~24시간동안 TCM-199 배양액에 난관 상피세포를 첨가하여 공배양하였을 때 excellent 및 good 분할배의 체외발생율은 42.9%, 38.5%로서 무첨가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으

로 높은 성적을 나타냈으며, 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율이 감소하였다.

이러한 결과는 실험동물은 다르지만, 소 수정란을 분할하여 excellent와 good, fair, poor, degeneration 등으로 분류하여 excellent, good 분할배만을 선별하여 난관 상피세포와 공배양하였을 때 excellent, good란은 각각 29.2%와 54.2%로서 18~24시간의 무첨가 배양시의 17.6%와 41.2%에 비해 다소 높은 체외발생율을 나타냈다고 한 Tominaga 등(1991)의 보고와 비교할 때 약간 저조한 성적이지만 변화 경향은 일치하였다.

3. 난구세포와의 공배양에 따른 체외발생율

돼지 분할 초기배와 난구 세포와의 공배양에 따른 체외발생율은 Table 4에서 보는 바와 같이, 분할후 4~5시간 및 20~24시간동안 20% FCS + TCM-199 배양액에 난구세포를 첨가하여 공배양하였을 때 excellent 및 good 분할배의 체외발생율은 40.0%, 35.7%로서 무첨가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다.

이러한 결과는 이와 유사한 연구보고를 접할 수 없어 정확히 비교하기는 어렵지만, 소 분할배는 배양 후에 생존율이 떨어져 배양에 의한 생존율의 저하를 역

Table 3. Effects of co-culture with oviductal cells on the survival rate of bisected porcine embryos

Co-culture period	No. of BE examined	Quality of bisected embryos after culture			
		Excell. Good	Fair	Poor	Degeneration
Control	16	4(25.0)	4	3	5
4~5 hrs	14	6(42.9)	2	2	4
20~24 hrs	13	5(38.5)	1	2	5

Table 4. Effects of co-culture with cumulus cells on the survival rate of bisected porcine embryos

Co-culture period	No. of BE examined	Quality of bisected embryos after culture			
		Excell. Good	Fair	Poor	Degeneration
Control	13	4(25.0)	3	3	3
4~5 hrs	15	6(40.0)	3	2	4
20~24 hrs	14	5(35.7)	2	2	5

제하기 위해서는 자궁섬유아세포와의 공배양이 필요하다고 한 Voelkel 등(1985)의 보고와 일치하였다. 또한, Chesne 등(1987)은 소 분할배의 단시간 배양이 분할면의 손상 회복에 따라 동결 후에 분할배의 생존성을 향상시킨다고 보고하였다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지 분할배와 10% FCS + TCM-199 배양액에 호르몬, 난관 상피세포 및 난구세포를 각각 첨가하여 공배양하였을 때 생존율을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 돼지 분할 초기배의 공배양에 있어서 호르몬의 첨가에 따른 생존율은 분할후 0~20시간 및 20~40시간에 TCM-199 배양액에 PMSG, hCG, PMSG + hCG 및 hCG + β -estradiol 호르몬을 각각 첨가하여 배양하였을 때 excellent 및 good 분할배의 체외발생율은 각각 37.6 및 37.5, 28.6 및 28.6, 35.7 및 28.8, 30.8 및 23.1, 38.5 및 30.7%로서 무첨가 대조군의 20.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다.
2. 돼지 분할 초기배와 난관상피세포를 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 생존율은 42.9%, 38.5%로서 무첨가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으며, 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율이 감소하였다.
3. 돼지 분할 초기배와 난구세포를 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 생존율은 40.0%, 35.7%로서 무첨가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Baker, R.D. 1985. Commercial splitting of

- bovine embryos. Theriogenology, 23(1):3-12.
2. Ball, G.D., M.L. Leibfried, W. Lenz. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28:717-725.
3. Chesne, P., Y. Heyman, D. Chupin, R., Procureur and Y. Menezo. 1988. Freezing cattle demi-embryos: Influence of a period of culture between splitting and freezing on survival. Theriogenology, 27(1):218(abstract)
4. Fukui, Y and H. Ono. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in-vitro* matured and fertilized bovine oocytes. Vet. Rec., 122:282.
5. Heyman, Y. 1985. Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. Theriogenology, 23:63-75.
6. Lehn-Jenson, H. and S.M. Willadsen. 1983. Deep-freezing of cow "half and quarter" embryos. Theriogenology, 19:49-54.
7. Nagashima, H.K, Matsui, T. Sawasaki and Y. Kano. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected molurae. J. Reprod. Fert., 70:357-362.
8. Niebart, N., S. Sripongpun, F. Mechekour, B. Le Guienne and M. Thibier. 1988. Histological study of bovine intact and demi-embryos. Theriogenology, 29(1): 283.
9. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15:245-248.
10. Seike, N., M. Saeki, K. Utaka, M., Sakai, R. Takakura, Y. Nagao and H. Kanakawa. 1989. Production of bovine identical twins

- via transfer of demi-embryos without zona pellucidae. *Theriogenology*, 32(2):211-220.
11. Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Berdin and R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. *J. Anim. Sci.*, 43:809-815.
 12. Suzuki T., Y. Sakai, T. Ishida, S. Mastuda, H. Miura and K. Itoh. 1989. Induction of twinning in crossbred heifers by ipsilateral frozen embryo transfer. *Theriogenology*, 31(4):917-926.
 13. Takeda, T., T. Takedomi and T. Onihara. 1987. Development blastomeres isolated at the 4-cell or 8-cell stage and embryos after bisection at the morulae and blastocyst stage in the mouse. *Theriogenology*, 31(1):262 (Abstracts).
 14. Tominaga, K., M. Fukushima and Y. Hataya. 1991. Influence of culture condition before freezing on developmental capacity *in vitro* and *in vivo* of bovine frozen-thawed split embryos. *Jap. J. Reprod. Tech.*, 13(2):65-74.
 15. Voelkel, S.A., G.F. Amkorski, K.G. Hill and R.A. Godke. 1985. Use of a uteral-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. *Theriogenology*, 24(3):271-281.
 16. Willadsen, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277:298-300.
 17. Willadsen, S.M., H. Lehn-Jensen, C.B. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology*, 15:23-29.
 18. Williams, T.J., R.P. Elsdén and G.E. Seidel, Jr. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 22(5):521-531.
 19. Williams, T.J. and L. Moore. 1988. Quick-splitting of bovine embryos. *Theriogenology*, 29(2):477-484.
 20. Williams, T.J., R.P. Elsdén and G.E. Seidel, Jr. 1982. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theriogenology*, 17:114.
 21. 오원진, 김상근. 1994. 돼지 분할 수정란의 급속동결 용해후 생존율에 관한 연구. *한국가축 번식학회지*, 18(1): 31-37.