

## Glucose, Lactate 및 Pyruvate가 돼지 체외수정란의 초기발생능에 미치는 영향

오건봉 · 박병권 · 서길웅 · 이규승  
충남대학교 농과대학

### Effects of Glucose, Lactate and Pyruvate on Development of *In Vitro* Matured and Fertilized Porcine Embryos

Oh, K. B., B. K. Park, G. W. Seo and K. S. Lee

College of Agriculture, Chungnam National University

#### SUMMARY

This study was conducted to investigate the effect of energy source on development of *in vitro* development of *in vitro* matured and fertilized porcine 2-cell embryos. The relative preferences of glucose, lactate and pyruvate for *in vitro* development of porcine 2-cell embryos were determined. The results obtained are as follows.

1. 33.3, 20.8 and 29.2% of porcine embryos reached morula stage in addition to lactate, glucose, and both glucose and lactate in the culture medium as energy source, respectively.
2. 38.5, 15.4 and 26.9% of porcine embryos reached morula stage in addition to pyruvate, glucose, and both glucose and pyruvate in culture medium as energy source, respectively.
3. 42.9, 21.4 and 28.6% of porcine embryos reached morula stage in addition to pyruvate and lactate, glucose alone, and glucose, lactate and pyruvate in culture medium as energy source, respectively.

#### I. 서 론

수정란이식, 클로닝, 그리고 미세조작 등과 같이 수정란을 학술적 또는 산업적인 목적으로 이용하기 위해서는 체외에서 수정란의 생존성을 보존하고 발육시키는 것이 필수적이라 할 수 있다. 그러나, 체외에서 수정란을 발육시키고자 할 때, 몇 종을 제외한 대부분의 포유동물에서는 수정란의 발육이 지연되거나 정지되어 이용성을 감소시키고 있다(Wright, Jr.와 Bondiali, 1981). 돼지의 경우 체내에서 4-세포기가 지속되는 시간은 24시간 정도로 다른 세포기 때보다 상당히 길고, 4-세포기 이전부터 배양된 수정란은 체외에서 4-세포기 이상까지 발육되기가 어려우나, 4-세포기

이상부터 배양된 수정란은 단순배양조건에서도 체내에서 배양된 것과 같은 배반포 도달율을 나타내는 것으로 볼 때, 4-세포기에서 발육능정지현상이 발생한다고 생각된다(Davis & Day, 1978). 그러나, 이의 정확한 생화학적 및 발생학적인 원인은 밝혀지지 않았지만, 체외에서의 부적당한 배양조건에 의하여 발생되는 것이라고 추정된다(Seshagiri와 Bavister, 1991). 따라서, 체외에서 수정란이 발육하는데 있어서 적당한 환경을 제공하기 위한 많은 연구가 수행되어 왔다. 수정란의 초기 발육이 진행되는 곳은 난관이므로, 이 환경을 제공하기 위하여 난관에서의 기관배양, 난관상피 세포와의 공배양, 그리고 난관액을 첨가하는 배양방법 등이 실시되었는데, 이와 같은 배양법으로 높은 수정란의 발달율을 획득하였다(Biggers 등, 1962; Min-

ami 등, 1988 ; Eyeston과 First, 1989 ; Mermillod 등, 1992). 돼지의 경우, Krisher 등(1989)과 Prather 등(1991)은 각각 마우스와 양의 난관을 이용한 기관배양으로, White 등(1989)은 난관상피세포와의 공배양으로, 그리고 Archibong 등(1989)은 난관액을 배양액에 첨가하는 방법으로 초기의 수정란을 발육시켜 높은 성적의 배란포 도달비율을 획득하였다고 보고하였다. 이와 같은 방법은 체외에서 수정란의 발육능정지현상을 극복하는데 매우 효과적이고 단순해서 반복적으로 사용이 가능하므로 산업적인 목적으로 이용하기 위한 수정란의 대량생산 체계로는 적합하지만, 수정란 생리의 이해와 화학적으로 입증된 배양액으로 개선하기에는 한계가 있다.

이에 본 연구는 돼지의 체외수정란 발육에 있어서 적절한 에너지 급원을 구명하기 위하여 수행하였던 바, 해당과정을 통하여 에너지를 생산하는 glucose와 호기적 대사과정을 통하여 에너지를 생산하는 pyruvate와 lactate 등을 실험설계에 따라 첨가한 배양액에 체외에서 발생된 돼지의 수정란을 배양하여 수정란의 발육에 미치는 에너지 급원의 영향을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 회수

도살 직후의 자돈으로부터 적출된 난소를 100 IU/ml의 penicillin G 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수에 침지하여 60분 이내에 실험실로 옮겨 19-gauge의 주사침이 장착된 10ml 주사기로 2~5mm 크기의 정상난포로부터 난포액을 흡입하여 난포란을 채취하였다. 채취된 난포란중 난구세포가 충실하게 부착된 것만을 선별하여 4mg/ml BSA가 첨가된 PBS에서 3번 세척한 후 성숙 배양액으로 옮겨 성숙을 유도하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 10% FCS와 90% Earle's salt TCM-199(Gibco, USA)를 기본배양액으로 하여, 5.05mM glucose, 0.9mM Na-pyruvate, 2.92mM Na-lactate와 10 IU의 FSH 및 hCG가 첨가된 성숙 배양액(Yoshida 등, 1990)으로 3번 세척한 후, mineral oil로 피복된 같은 배양액을 CO<sub>2</sub> 배양기내에서

12~16시간 동안 평형시킨 50 $\mu$ l 배양액 소적에 5~10개의 난포란을 주입하여, 44~48시간 동안 배양하여 성숙을 유도하였다.

### 3. 정자의 준비

성숙 용돈으로부터 도살 직후 적출된 정소를 60분 이내에 실험실로 옮겨 정소로부터 정소상체를 적출한 후, 정소상체 미부의 장막을 절개하고 세절하여 18-gauge의 주사침이 장착된 주사기로 정소상체액과 정자혼합액을 회수하여 얻은 정자부유액을 체외수정의 기본 배양액인 BO액 4ml이 들어있는 시험관에 침지하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 동안 swim-up을 시킨 다음, 약 2ml의 상층액을 2,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 BO액에 부유시킨 후 15~30분간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 수정능획득을 유지하였다.

### 4. 난포란의 체외수정

44~48시간 동안 체외수정이 유도된 난포란은 형태적으로 난구세포가 팽화된 것만을 선별하여 12~16시간 전에 CO<sub>2</sub> 배양기에서 평형시킨 수정액으로 3번 세척한 후 mineral oil로 피복시킨 같은 배양액에 주입하였다. 수정능획득 반응이 유지된 정자는 최종농도가 5 $\times$ 10<sup>5</sup> sperm/ml 이 되도록 난자가 주입되어 있는 수정액에 매정한 후 38 $^{\circ}$ C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정을 유도하였다.

### 5. 수정란의 체외배양 및 발생능 판정

매정후 16시간 동안 수정액으로 배양된 난포란은 회수하여 수정란 배양액을 옮겨 3번 세척한 후, 배양전 12~16시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 평형시킨 각 처리구의 배양액 소적으로 옮겨 약 24시간 동안 추가로 배양하여 2-세포기에 도달한 난란을 선별하여 공시하였는 바, 수정란의 배양은 KRB액을 변형시킨 mBMO-C-II액에서 실시하였다.

공시된 체외수정란은 각각 48시간과 72시간 배양후 난할된 정도를 관찰하여 4-세포기의 발육능정지를 극복한 배율과 상실배의 판정은 Patten(1948), Davis와 Day(1978) 그리고 Wiley(1987)에 의한 방법에 따라 형태적으로 각 할구간의 compaction이 완료되는 시기인 16-세포기 이상으로 하였다.

실험 1은 수정란 배양액에 5mM의 glucose와 25m-

**Table 1. Effect of glucose and lactate on *in vitro* development of porcine 2-cell embryos\***

Treatment**		No. of 2-cell embryos	No. of embryos developed(%)		
G	L		≤4-cell	>4-cell	Morula
-	-	24	15 (62.5)	9 (37.5) <sup>b</sup>	2 ( 8.3) <sup>c</sup>
+	-	24	11 (45.8)	13 (54.2) <sup>a</sup>	5 (20.8) <sup>b</sup>
-	+	24	9 (37.5)	15 (62.5) <sup>a</sup>	8 (33.3) <sup>a</sup>
+	+	24	11 (45.8)	13 (54.2) <sup>a</sup>	7 (29.2) <sup>ab</sup>

\*Modified BMOC- II medium containing 1.2mM phosphate(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) was used.

\*\*G = 5mM glucose : L = 25mM Na-lactate

<sup>a,b,c</sup>Means in the same column with different superscripts differ (p<0.05)

M와 lactate를 각각 첨가 또는 무첨가하여 돼지 체외 수정란 발육에 미치는 영향을 조사하였다.

실험 2는 돼지 체외수정란 발육에 glucose와 pyruvate가 미치는 영향을 비교하기 위하여 수정란 배양액에 각각 5mM glucose와 0.25mM pyruvate를 첨가 또는 무첨가하여 그 발육능력을 조사하였다.

실험 3은 lactate와 pyruvate 그리고 glucose가 돼지 체외수정란 발육에 미치는 영향을 조사하기 위해 수정란 배양액에 각각 5mM glucose를 첨가 또는 무첨가하고, 25mM lactate와 0.25mM pyruvate를 함께 첨가 또는 무첨가하여 발육능을 조사하였다.

## 6. 배양 조건

모든 배양액은 사용하기 전에 0.2μm millipore filter로 여과·멸균하여 1주일 이내에 사용하였고, 각 배양액 소량은 배양에 들어가기전 12~16시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 평형시킨 후 사용하였다. 난포란, 수정 그리고 수정란의 배양은 100% 습도, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>로 조정된 CO<sub>2</sub>로 조정된 CO<sub>2</sub> 배양기(The Northern Media Supply Ltd., England)내에서 수행되었다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. Glucose와 lactate의 영향

돼지의 체외수정란 발육능력에 glucose와 lactate가 미치는 영향은 Table 1과 같다. Glucose가 단독 첨가되었을 때의 상실배 도달율은 20.8%로서, lactate가 단독 첨가되었을 때의 33.3%보다는 낮은 성적이었다. 그리고, glucose와 lactate를 함께 첨가하

였을 때는 상실배로 발육된 비율이 29.2%로서 glucose를 단독으로 첨가했을 때보다는 약간 감소하였다.

이러한 결과는 햄스터 8-세포란을 lactate만 첨가하여 배양하였을 때는 65.5%가 배반포로 발달되었지만, glucose와 함께 첨가했을 때는 배반포 도달비율이 7.5%로서 발육이 억제되었다는 Seshagiri와 Bavister(1989b, 1991)의 보고와 경향이 일치한다. 그러나, 본 실험에서 lactate를 단독으로 첨가했을 때 33.3%의 상실배 도달율을 나타낸 데 대하여 glucose를 함께 첨가했을 경우에 29.2%로 약간 감소된 점은 감소폭에 있어서는 Seshagiri와 Bavister(1989b, 1991)의 결과와 차이가 인정되는데, 이러한 결과로 볼 때 돼지와 햄스터 8-세포란은 glucose와 lactate의 대사능력에 차이가 있고, 돼지 2-세포란의 체외발육을 위하여 제공되는 에너지 급원은 glucose보다 lactate가 적당하다고 사료된다.

### 2. Glucose와 pyruvate의 영향

돼지의 체외수정란 발육능력에 glucose와 pyruvate가 미치는 영향은 Table 2와 같다. 배양액에 pyruvate만 단독으로 첨가했을 때는 38.5%가 상실배에 도달하여 glucose와 pyruvate가 함께 첨가되었을 때의 26.9%와 glucose만 단독으로 첨가했을 때의 15.4%보다 그 발생이 비율이 높았다.

이러한 결과는 햄스터 8-세포란 발육에 있어서 pyruvate는 glucose의 첨가에 관계없이 배반포 발달 비율을 유의하게 증가시킨다는 Seshagiri와 Bavister(1989b, 1991)의 보고와 경향이 일치하였으며, 이 결과와 본 실험의 결과를 미루어 볼 때 돼지의 수정란 발육에 필요한 에너지 급원은 glucose보다 pyruvate가

**Table 2. Effect of glucose and pyruvate on *in vitro* development of porcine 2-cell embryos\***

Treatment**		No. of 2-cell embryos	No. of embryos developed(%)		
G	P		≤4-cell	>4-cell	Morula
-	-	26	15 (57.7)	11 (42.3) <sup>c</sup>	1 (3.8) <sup>c</sup>
+	-	26	12 (46.2)	14 (53.8) <sup>b</sup>	4 (15.4) <sup>bc</sup>
-	+	26	9 (34.6)	17 (65.4) <sup>a</sup>	10 (38.5) <sup>a</sup>
+	+	24	11 (38.5)	16 (61.5) <sup>ab</sup>	7 (26.9) <sup>ab</sup>

\*Modified BMOC- II medium containing 1.2mM phosphate(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) was used.

\*\*G = 5mM glucose ; P = 0.25mM Na-pyruvate

<sup>a,b,c</sup>Means in the same column with different superscripts differ (p<0.05).

**Table 3. Effect of glucose and lactate on *in vitro* development of porcine 2-cell embryos\***

Treatment**			No. of 2-cell embryos	No. of embryos developed(%)		
G	P	L		≤4-cell	>4-cell	Morula
-	-	-	28	18 (64.3)	10 (35.7) <sup>c</sup>	1 (3.6) <sup>c</sup>
+	-	-	28	15 (53.6)	13 (46.4) <sup>bc</sup>	6 (21.4) <sup>b</sup>
-	+	+	28	9 (32.1)	19 (67.9) <sup>a</sup>	12 (42.9) <sup>a</sup>
+	+	+	28	12 (42.9)	16 (57.1) <sup>ab</sup>	8 (28.6) <sup>b</sup>

\*Modified BMOC- II medium containing 1.2mM phosphate(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) was used.

\*\*G = 5mM glucose ; P = 0.25mM Na-pyruvate ; L = 25mM Na-lactate

<sup>a,b,c</sup>Means in the same column with different superscripts differ (p<0.05)

적당하다고 사료된다.

### 3. Glucose, lactate 및 pyruvate의 영향

돼지의 체외수정란 발육능력에 glucose와 lactate 및 pyruvate가 미치는 영향은 Table 3과 같다. Glucose, lactate 및 pyruvate를 함께 첨가하였을 때 상실배로 발육된 비율은 28.6%로서 glucose만 단독으로 첨가하였을 때 21.4%와는 유의한 차가 없었으나, lactate, pyruvate만 첨가하였을 때의 42.9% 보다는 그 발육 비율이 저조하였다.

이와 같은 결과는 lactate와 pyruvate는 1 또는 2-세포기 마우스 수정란 발육에 유의한 효과를 나타내지만, glucose는 억제효과를 나타낸다는 Biggers(1987)의 보고 및 glucose와 lactate, pyruvate를 함께 첨가했을 때 래트의 1-세포란은 상실배 이상으로 전혀 발육되지 못했지만, lactate와 pyruvate만 첨가했을 때는 57%가 상실배 이상으로 발육되었다는 Miyoshi 등(1994)의 보고, 그리고 햄스터 8-세포란 발육에 있어서도 glucose가 첨가되지 않은 배양조건에서 lac-

tate와 pyruvate는 높은 비율로 배반포까지 발육시켜 햄스터 8-세포란은 에너지를 TCA회로를 통하여 생산한다는 Seshagiri와 Bavister(1989a, b)의 보고와 실험동물은 다르지만, 본 실험의 결과를 비교하면 그 경향에서는 유사점을 찾을 수 있었다. 한편, 돼지에 있어서, glucose, lactate, 그리고 pyruvate같은 상반된 결과들이 보고되었다. Davis와 Day(1978)는 4-세포란의 발육은 lactate와 pyruvate를 glucose와 함께 첨가했을 때 배반포 도달 비율이 13%로서, glucose를 단독첨가했을 때의 66%보다 유의하게 억제된다고 보고하였는데, 이러한 결과와는 일치하지 않았다. Pinkerte 등(1989)도 lactate와 pyruvate는 돼지의 1-세포란 발육에 억제효과를 나타낸다고 보고하였다. 그러나, Misener 등(1991)의 zygote를 glucose가 함유된 CZB 배양액에서 lactate와 pyruvate를 함께 첨가했을 때 glucose의 함유에 관계없이 4-세포기 발생능정지를 극복하였다는 보고와, Beckman 등(1990)의 glucose와 lactate, pyruvate를 배양액에 함께 첨가하여 1- 또는 2-세포란의 48.1%가 상실배

와 배반포로 발육되었다는 보고와, glucose 없이 lactate와 pyruvate만 첨가하여 돼지 1-세포란을 배양하여 65.3%가 상실배와 배반포에 도달하였다고 보고한 Hagen 등(1991)의 결과와는 일치한다. 이러한 관점에서 돼지 수정란의 초기 발육에 대한 lactate와 pyruvate의 효과는 좀더 광범위한 연구가 필요하다고 사료된다.

#### IV. 적 요

본 연구는 돼지의 체외수정란 발육에 있어서 적절한 에너지 급원을 구명하기 위하여 수행하였는 바, 해당 과정을 통하여 에너지를 생산하는 glucose와 호기적 대사과정을 통하여 에너지를 생산하는 pyruvate와 lactate 등을 실험설계에 따라 첨가한 배양액에 체외에서 발생된 돼지의 수정란을 배양하여 수정란의 발육에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 배양액에 에너지 급원으로 lactate를 단독으로 첨가하였을 때는 33.3%가 상실배로 발육되어 glucose가 단독으로 첨가되었을 때의 20.8%와 glucose와 함께 첨가되었을 때의 29.2% 보다 그 발생 비율이 높았다.
2. 배양액에 pyruvate만 단독으로 첨가했을 때는 38.5%가 상실배에 도달하여 glucose와 pyruvate가 함께 첨가되었을 때의 26.9%와 glucose만 단독으로 첨가했을 때의 15.4%보다 높은 발생 비율을 나타냈다.
3. 배양액에 glucose, lactate 및 pyruvate를 함께 첨가하였 때 상실배로 발육된 비율은 28.6%로서 glucose만 단독으로 첨가하였을 때 21.4%와 유의한 차가 없었으나, lactate와 pyruvate만 첨가하였을 때의 42.9%보다는 그 발육비율이 저조하였다.

#### V. 인용문헌

1. Archibong, A.E., R.M. Tettters and B.H. Johnson. 1989. Development of porcine embryos from one- and two-cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biol. Reprod.*,

41:1076-1083.

2. Beckmann, L.S., T.C. Cantley, A.R. Rieke, B.N. Day. 1990. Development and viability of one- and two-cell porcine embryos cultured through the "four cell block". *Therio.*, 33: 193(Abstr.).
3. Biggeers, J.D., R.B.L Gwatkin and R.L. Brinster. 1962. Development of mouse embryos in organ culture of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature, London*, 194:747-749.
4. Biggers, B.D. 1987. Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. *In The mammalian preimplantation embryo*, Bavister, B.D. plinum press, pp. 219-249.
5. Davis, D.L. and B.N. Day. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46:1043-1053.
6. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
7. Hagen, D.R., R.S. Prather, M.M. Sims and N.L. First. 1991 Development of one-cell porcine embryos to the blastocyst stage in simple media. *J. Anim. Sci.*, 69:1147-1150.
8. Krisher, R.L., R.M. Petters, B.N. Johnson, B.D. Bavister and A.E. Archibong. 1989. Development of porcine embryos from the one-cell stage to blastocyst in mouse oviducts maintained in organ culture. *J. Exp. Zool.*, 249:235-239.
9. Mermollod, M., J.L. Mourmeaux, C. Wils, A. Massip and F. Dessy. 1992. Protein-free oviduct-conditioned medium for complete bovine embryo development. *The veterinaty record*, 130:13.
10. Minami, N., B.D. Bavister and I. Iritant. 1988. Development of hamster two-cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ

- culture system. Ganete Res., 19:235-240.
11. Misener, M., J.W. Pollard and K. Metzger. 1991. *In vitro* culture of porcine embryos in CZB medium. Therio., 35:244(Abstr.).
  12. Miyoshi, K., H. Funahashi, K. Okuda and K. Niwa. 1994. Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium : effects of glucose, phosphate and osmolarity. J. Reprod. Fert., 100:21-26.
  13. Patten, B.M. 1948. The process of cleavage and the formation and early differentiation of the germ layers. In Embryology of the pig. New York, McGraw Hill Book Co., Inc., pp.37-59.
  14. Prather, R.S., M.M. Sims and N.L. First. 1991. Culture of porcine embryos from the one- and two-cell stage to the blastocyst stage in sheep oviducts. Therio., 35:1147-1151.
  15. Pinkert, C.A., K.A. Baumgartner and D.H. Keisler. 1989. *In-vitro* development of zygotes from superovulated prepubertal and mature gilts. J. Reprod. Fert., 87:63-66.
  16. Seshagiri, P.B. and B.D. Bavister. 1989a. Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos *in vitro*. Biol. Reprod., 40: 599-606.
  17. Seshagiri, P.B. and B.D. Bavister. 1989b. Phosphate is required for by glucose of development of hamster 8-cell embryos *in vitro*. Biol. Reprod., 40:607-614.
  18. Seshagiri, P.B. and B.D. Bavister. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos : Evidence for the "Crabtree effect". Molec. Reprod. Develop., 30:105-111.
  19. Seshagiri, P.B. and B.D. Bavister. 1991. Relative developmental abilities of hamster 2- and 8-cell embryos cultured in Hamster Embryo Culture Medium-1 and -2. J. Exp. Zool., 257:51-57.
  20. White, K.L., K. Hehnke, L.F. Rickords, L. L. Southern, D.L. Thompson, Jr. and T.C. Wood. 1989. Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. Biol. Reprod., 41:425-430.
  21. Wiley, L.M. 1987. Development of the blastocyst : Role of cell polarity in cavitation and cell differentiation. In The mammalian preimplantation embryo, Bavister, B.D. Plenum Press. pp. 65-93.
  22. Wright, R.J. Jr. and K.R. Bondiali. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci., 53:702-728.
  23. Yoshida, M., Y. Ishizaki and H. Kawagishi. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in-vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert., 88: 1-8.