

소 분할 초기배와 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포와의 공배양에 따른 체외발생율에 관한 연구

김 상 근 · 이 종 진
충남대학교 수의과대학

Studies on *in vitro* Developmental Rate of Bisected Bovine Embryos Co-Cultured in TCM-199 Medium Containing Hormones, Oviductal Epithelial Cells and Cumulus Cells

Kim, Sang-Keun and Jong-Jin Lee
Dept. of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ.

SUMMARY

This study was carried out to investigate on the survival rates and *in vitro* developmental rates of bisected bovine embryos were by manipulator and micropipette. Bisected embryos were co-cultured in 20% FCS(v/v)+TCM-199 media containing hormones, oviductal epithelial cells and cumulus cells 0 to 72 hrs after bisection. Survival rate and *in vitro* fertilization rate were defined as development rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The *in vitro* developmental rate of bisection embryos co-cultured in 20% FCS+TCM-199 medium containing PMSG, hCG, PMSG+hCG, hCG+ β -estradiol 0 to 20 hrs and 20 to 40 hrs were 36.7, 26.7, 33.3, 40.0, and 30.0, and 30.0, 33.3, 30.0, 26.7, and 26.7%, respectively. The survival rate of bisection embryos co-cultured in TCM-199 medium containing hormones was significantly higher than that of non co-culture (25.0%).
2. The *in vitro* developmental rates of bisection embryos co-cultured in 20% FCS+TCM-199 medium containing oviductal epithelial cells 4 to 5 hrs and 20 to 24 hrs were 40.0 and 33.3%, respectively. The survival rate of bisection embryos co-cultured in TCM-199 medium containing oviductal epithelial cells was significantly higher than that of non co-culture(25.0%).
3. The *in vitro* developmental rates of bisection embryos co-cultured in 20% FCS+TCM-199 medium containing cumulus cells 4 to 5 hrs and 20 to 24 hrs were 43.3 and 36.7%, respectively. The survival rate of bisection embryos co-cultured in TCM-199 medium containing cumulus cells was significantly higher than that of non co-culture (25.0%).

I. 서 론

일란성 쌍자의 생산 또는 분할배의 한쪽은 동결 보존하면서 다른 쪽은 염색체검사, 유전자조작 및 이식

등에 제공하기 위하여 가축의 초기배를 미세조작에 의해 분할한 분할배의 이용이 보고되었다(Willadsen, 1979; Nagashima와 Ogawa, 1981; Lehn-Jenson과 Willadsen, 1983; Williams 등, 1984; Heyman, 1985; Takeda 등, 1987; Williams와 Moore, 1988;

및와 金, 1994; 김 등, 1995; 김과 이, 1995).

Nibart 등(1988)은 소 분할배는 분할 직후에는 비 분할배의 약 1/2의 세포수를 보유하지만 24시간후에는 1/3로 감소되므로 분할배는 세포분열 속도가 늦으며, 내부세포피가 영양막세포보다 큰 비율로 변성되며 아울러 배양기간을 연장시키면 분할배의 세포는 회복되어 배세포는 재구축되지만 이식하였을 때 분할배의 산자출산으로의 발생능력은 저하되며 분할배의 동결을 위해서는 3~4시간 정도의 단시간 배양이 바람직하다고 보고하였으며, Voelkel 등(1985)은 소 분할배의 배양시에 배양에 의한 생존율의 저하를 억제하기 위해서는 자궁섬유아 세포와의 공배양이 필요하다고 하였다. Chesne 등(1987)은 소 분할배의 단시간 배양이 분할배의 손상회복에 따라 동결후 분할배의 생존성을 향상시킨다고 보고하였다. 한편, Tominaga 등(1991)은 소 수정란을 분할하여 excellent, good, fair, poor, degeneration 등으로 분류하여 excellent, good 분할배만을 선별하여 난관상피 세포와 공배양하였을 때 각각 29.2%와 54.2%로서 18~24시간의 부침가 배양시의 17.6%와 41.2%에 비해 다소 높은 체외 발생율을 나타냈다고 보고하였다.

생쥐의 초기배를 절단한 분할배를 체외배양한 다음 이식하여 개체발생에 대한 보고는 다수의 연구사들에 의해 보고(Tarkowski, 1959a,b; Nagashima 등, 1984; Willadsen 등, 1981; Ozil 등, 1982; Williams 등, 1982; Lehn-Jensen과 Willadsen, 1983) 되었으나, 가축 수정란을 분할한 분할배의 작출은 현재로서는 기술의 확립이 이루어지지 않아 초보적 단계에 지나지 않는 실정이며, 가축 분할배는 체외발생 능력과 생존성이 대단히 저조하여 이의 개선과 분할기술의 확립이 시급한 과제라고 생각된다.

이에, 본 연구는 소 분할 초기배의 공배양에 따른 체외발생율을 구명하기 위하여 소 분할 초기배의 체외배양시 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포 등을 배양액에 첨가하여 공배양하였을 때 체외발생율을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 난포란과 배양액

도살장으로부터 난소를 적출하여 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮겨 주사기로 난포액을 흡입 채취한 후 실제현미경(20~40×) 하에서 형태적으로 우수한 난포란을 회수하였다.

TCM-199(Whittaker Co., USA) 배양액에 20% (v/v)의 FCS(Sigma Co., USA)와 penicillin G 및 100 µg/ml의 streptomycin sulfate (Sigma Co., USA)를 첨가하여 이용하였다.

2) 호르몬, 난관 상피세포 및 난구세포

10 IU/ml의 PMSG 및 hCG(Sigma, USA), 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA) 호르몬과, 발정 후 4~5일째 난관낭대부로부터 채취한 난관상피를 3~4회 계대한 후 공배양 1~3일전에 10 µg/ml의 streptomycin으로 약 3시간 처리하여 trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨 난관상피세포 (50×10⁴)와, 5~10mm의 적출난포 주변의 간질조직을 제거한 후 난구세포를 회수하여 500 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 다시 20% FCS(v/v) +TCM-100액 2~3ml을 첨가하여 2회에 걸쳐 1,500 rpm으로 5분간 원심분리 후 하층액으로부터 난구세포 (1×10⁵~10⁶)를 분리하였다.

2. 방 법

1) 난포란의 체외성숙 및 수정

난포란의 체외성숙은 난포란을 배양 45µl의 배양액 소직당 5개의 난포란을 주입하여 mineral oil로 피복하여 20~24시간동안 38℃, 100% 습도, 95% Air, 5% CO₂로 조정된 CO₂배양기내에서 성숙배양하였다.

난포란의 체외수정은 체외성숙이 끝난 난포란을 수정용 배양액으로 3회 세척한 후, 45µl의 배양액 소직에 5개씩 주입하고 동결정액을 38℃의 온수에서 약 1분간 침지하여 용해한 후, BO액 1ml에 정액 0.2ml를 혼합하여 swim-up시킨 다음, 약 0.5ml의 상층액을 2,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 정자 pellets을 동량의 heparin 용액(100µg/ml, Sigma Co., USA)과 함께 혼합하여 수정능획득을 유지시킨 2µl

(1~5×10⁶ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 38℃의 CO₂ 배양기에서 5~7시간 동안의 매정에 의해 수정시켰다.

2) 초기배의 분할과 공배양

초기배의 분할은 micromanipulator (Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 독립현미경 stage위에 petri dish내에 20% FCS+TCM-199 배양액의 소적 중에 배를 넣어 보정용 pipette으로 배를 흡인 고정한 후 반대측에 15° 각도의 microblade (Feather Co., Japan)로 투명대로부터 배세포가 나오지 않을 정도로 microblade를 눌러 배를 분할하거나, microfuser에 의해 제작한 micropipette으로 할구 1/2 정도를 분할하였다.

분할 초기배와 20%(v/v)의 FCS+TCM-199 배양액에 10 IU/ml의 PMSG (Sigma, USA), 10 IU/ml의 hCG (Sigma, USA), 1 g/ml의 β -estradiol (Sigma, USA) 등의 호르몬과, 50×10⁴생존난관 상피세포와 1×10⁵~10⁶의 생존 난구세포를 첨가하여 12~72시간 공배양하면서 체외발생 상태를 관찰하였다.

3) 생존성의 판정

생존 및 체외발생율의 판정은 용해한 난포란을 배양액으로 2~3회 세척한 다음 FDA (fluorescence diacetate) test에 의해 위상차 현미경하에서 생존 score를 산정하거나, 배양을 통해 발생상태를 관찰하여 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분할초기배와 호르몬과의 공배양에 따른 체외발생율

소 분할 초기배의 공배양에 있어서 호르몬의 첨가에 따른 체외발생율은 Table 1과 2에서 보는 바와 같이, 분할 초기배와 20% FCS+TCM-199 배양액에 PMSG, hCG, PMSG+hCG 및 hCG+ β -estradiol 호르몬을 첨가하여 0~20시간 공배양하였을 때 체외발생율은 36.7, 26.7, 33.3, 40.0 및 30.0%로서 무첨가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으며 또한, 분할초기배의 공배양시 호르몬을

첨가하여 20~40시간 공배양하였을 때 체외발생율은 30.0, 33.3, 30.0, 26.7, 및 26.7로서 무첨가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으나, 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율은 감소경향을 나타냈다.

이러한 결과는 돼지 분할 초기배와 PMSG, hCG, PMSG+hCG 및 hCG+ β -estradiol 호르몬을 첨가하여 0~20시간 및 20~40시간 공배양하였을 때 excellent 및 good 분할배의 체외발생율은 각각 37.6, 28.6, 35.7, 30.8, 및 38.5%, 그리고 37.5, 28.6, 28.8, 23.1, 및 30.7%로서 무첨가 대조군에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다는 김과 이(1995)의 결과와 유사한 경향이었다. 한편, 분할배의 배양시 혈청을 첨가한 수정 인산완충액만으로 배양 또는 황체세포와 공배양을 실시하였을 때 4시간 이상의 배양에서는 이식 후의 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 배양후에는 1/3로 되므로 분할배는 세포분열 속도가 늦으며, 내부세포가 영양막세포보다 큰 비율로 변성된다. 아울러 배양기간을 연장시키면 분할면의 세포는 회복되어 배세포는 재구축되지만 이식하였을 때 분할배의 산자로의 발생능력은 저하되며 분할배의 동결을 위해서는 3~4시간의 단시간 배양이 바람직하다고 보고하였다.

2. 분할초기배와 난관상피세포와의 공배양에 따른 체외발생율

소 분할 초기배와 난관 상피세포와의 공배양에 따른 체외발생율은 Table 3에서 보는 바와 같이, 분할초기배와 20% FCS+TCM-199 배양액에 난관 상피세포를 첨가하여 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 체외발생율은 40.0, 33.3%로서 무첨가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으며, 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율이 감소하였다.

이러한 결과는 소 수정란을 분할하여 excellent와 good, fair, poor, degeneration 등으로 분류하여 excellent, good 분할배만을 선별하여 난관 상피세포와 공배양하였을 때 excellent, good란은 각각 29.2와 54.2%로서 18~24시간의 무첨가 배양시의 17.6와 41.

Table 1. Effects of co-cultures with hormone between 0~20hrs on the survival rates of bisected bovine embryos

Supplementation of hormones	No. of demi-embryos examined	Quality of bisected embryos after culture				
		Excell.	Good(%)	Fair	Poor	Degeneration
Control	20	5	(25.0)	4	6	5
PMSG+hCG	30	11	(36.7)	4	7	8
PMSG+estradiol	30	8	(26.7)	4	7	11
hCG+estradiol	30	10	(33.3)	2	8	10
PMSG	30	12	(40.0)	5	4	9
hCG	30	9	(30.0)	3	8	10

Table 2. Effects of co-culture with hormones between 20~40hrs on the survival rates of bisected bovine embryos

Supplementation of hormones	No. of demi-embryos examined	Quality of bisected embryos after culture				
		Excell.	Good(%)	Fair	Poor	Degeneration
Control	20	5	(25.0)	4	6	5
PMSG+hCG	30	9	(30.0)	5	8	8
PMSG+estradiol	30	10	(33.3)	5	6	9
hCG+estradiol	30	9	(30.0)	5	5	11
PMSG	30	8	(26.7)	4	8	10
hCG	30	8	(26.7)	5	8	9

Table 3. Effects of co-culture with oviductal epithelial cells on the survival rates of bisected bovine embryos

Co-culture period	No. of DE* examined	Quality of bisected embryos after culture				No. of blastocyst developed(%)	
		Excell.	Good(%)	Fair	Poor		Degeneration
Control	20	5	(25.0)	4	4	7	4(20.0)
4~5 hrs	30	12	(40.0)	7	5	6	5(16.7)
20~24 hrs	30	10	(33.3)	2	6	12	3(10.0)

* DE : Demi-embryos

2%에 비해 다소 높은 체외발생율을 나타냈다고 한 Tominaga 등(1991)의 보고와 비교할 때 약간 저조한 성적이지만 변화경향은 일치하였다. 한편, 돼지 초기배를 분할하여 난관상피세포와 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 체외발생율은 각각 40.0% 및 35.7%로서 무침가 대조군의 25.0%에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다는 김과 이(1995)의 결과와 유사한 경향이였다.

3. 소 분할초기배와 난구세포와의 공배양에 따른 체외발생율

소 분할 초기배와 난구세포와의 공배양에 따른 체외발생율은 Table 4에서 보는 바와 같이, 분할초기배와 20% FCS+TCM-199 배양액에 난구세포를 첨가하여 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 체외발생율은 43.3, 36.7%로서 무침가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다.

이러한 결과는 대상동물은 다르지만, 돼지 초기배를 분할한 후 난구세포와 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 excellent 및 good 분할배의 체외발생율은 40.0% 및 35.7%로서 무침가 대조군의 25.0%에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다는 김과 이(1995)의

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

Co-culture period	No. of DE* examined	Quality of bisected embryos after culture				No. of blastocyst developed(%)	
		Excell.	Good(%)	Fair	Poor		Degeneration
Control	20	5(25.0)		3	6	6	4(20.0)
4~5 hrs	15	13(43.3)		5	6	6	6(20.0)
20~24 hrs	14	11(36.7)		3	7	9	4(13.3)

* DE : Demi-embryos

결과와 유사한 성적이었다. Voelkel 등(1985)은 소 분할배는 배양후에 생존율이 떨어져 배양에 의한 생존율의 저하를 억제하기 위해서는 자궁섭유아세포와의 공배양이 필요하다고 하였으며, 또한 Chesne 등(1987)은 소 분할배의 단시간 배양이 분할면의 손상회복에 따라 동결후에 분할배의 생존성을 향상시킨다고 보고하였다.

IV. 적 요

본 연구는 소 분할 초기배의 공배양시의 체외발생율을 구명하기 위하여 초기배를 미세조작에 의해 분할한 분할 초기배의 체외배양시 배양액에 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포를 첨가하여 공배양하였을 때 체외발생율을 조사하였다.

1. 소 분할 초기배의 공배양시 20% FCS+TCM-199 배양액에 PMSG, hCG, PMSG+hCG 및 hCG+ β -estradiol 호르몬을 첨가하여 0~20시간 및 20~40시간 배양하였을 때 체외발생율은 36.7, 26.7, 33.3, 40.0, 30.0% 및 30.0, 33.3, 30.0, 26.7, 26.7%로서 무첨가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으나, 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율은 감소경향을 나타냈다.
2. 소 분할 초기배와 20% FCS+TCM-199 배양액에 난관상피세포를 첨가하여 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 체외발생율은 40.0, 33.3%로서 무첨가 대조군의 25.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으며, 배양시간이 경과함에 따라 체외발생율이 감소하였다.
3. 소 분할 초기배와 20% FCS+TCM-199 배양액에 난구세포를 첨가하여 4~5시간 및 20~24시간 공배양하였을 때 체외발생율은 43.3, 36.7%

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 and 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. Heyman, Y. 1985. Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 23:63-75.
5. Lehn-Jenson, H. and S. M. Willadsen. 1983. Deep-freezing of cow "half and quarter" embryos. *Theriogenology*, 19:49-54.
6. 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.
7. Nagashima, H. and S. Ogawa. 1981. Studies on the developmental potential and survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 27:12-19.
8. Niebart, N., S. Sripongpun, F. Mechekour, B. Le Guienne and M. Thibier. 1988. Histo-

- logical study of bovine intact and demi-embryos. *Theriogenology*, 29(1): 283.
9. Ozil, J. P., Y. Heyman and J. P. Renard. 1982. Production of monozygotic twins by micro-manipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Med.*, 110:126-127.
 10. 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.
 11. 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).
 12. Tarkowski, A. K. 1959a. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature*, 184:1286-1287.
 13. Tarkowski, A. K. 1959b. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse egg. *Acto. Theriogenology*, 3:181-267.
 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. Elsdon and G. E. Seidel, Jr. 1982. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theriogenology*, 17:114.
 19. Williams, T. J., R. P. Elsdon and G. E. Seidel, Jr. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 22(5):521-531.
 20. Williams, T. J. and L. Moore. 1988. Quick-splitting of bovine embryos. *Theriogenology*, 29(2):477-484.
 21. 오원진, 김상근. 1994. 돼지 분할 수정란의 급속동결 용해후 생존율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 18(1): 31-37.
 22. 김상근, 이명현, 서길웅. 1995. 돼지 분할 수정란과 미숙란의 생존율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 19(2):129-134.
 23. 김상근, 이종진. 1995. 돼지 분할 초기배와 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포와의 공배양이 생존율에 미치는 영향에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 19(2):135-140.