

체외배양액과 첨가물질이 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과

박동현 · 황환섭 · 정희태 · 박춘근 · 김정익 · 김종복 · 양부근
강원대학교 축산대학

Effect of Culture Medium and Additive on the Development of Bovine IVM/IVF Embryos

Park, D. H., H. S. Hwang, H. T. Cheong, C. K. Park, C. I. Kim, J. B. Kim and B. K. Yang
College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

The objectives of this study were to investigate the effects of culture media and additives on the development of bovine *in vitro* matured(IVM) and *in vitro* fertilized(IVF) oocytes. In experiment 1, bovine oocytes were cultured in droplets of TC 199 supplemented with 10% fetal bovine serum(FBS) with or without hormones (5 μ g/ml FSH, 5 μ g/ml LH, 1 μ g/ml E₂). Cleavage rates of embryos cultured for 40~44hrs after IVF were higher when embryos were cultured in TC 199 supplemented hormones (68.1%, 921/35) than without hormones (52.7%, 77/146), but the percentages of development beyond morulae stage were not difference (20.7%, 19.4%).

In experiment 2, the effects of various media such as TC 199, synthetic oviduct fluid(SOF), CR_{1aa} with different energy source (fatal bovine serum, FBS; bovine serum albumin, BSA) on developmental capacity of IVM/IVF bovine embryos were investigated. The developmental rates into morulae and blastocysts were 27.1, 10.7, 6.3 and 0%, respectively, in CR_{1aa} plus 3mg/ml BSA, SOF plus 10% FBS, TC 199 plus 10% FBS, SOF plus 3mg/ml BSA. In experiment 3, the comparisons of bovine embryos developed to morulae and blastocysts in different culture media (TC 199, SOF, CR_{1aa}, Menezo's B₂) were investigated. The developmental capacity beyond morulae stage were 32.9, 26.6, 11.1 and 7.1%, respectively, in Menezo's B₂ plus BSA, CR_{1aa} plus BSA, SOF plus BSA, TC 199 plus FBS medium. The cell numbers of the blastocyst were not different in different culture media. In experiment 4, bovine embryos were co-cultured with bovine oviduct epithelial cells(BOEC) in TC 199 plus FBS, SOF plus BSA, CR_{1aa} plus BSA, Menezo's B₂ plus BSA. The morula and blastocyst rates were 44.7, 32.9, 26.0 and 23.3%, respectively, in CR_{1aa}, TC 199, SOF, and Menezo's B₂ medium. The cell numbers of the blastocyst were similar to those of blastocyst developed in different culture media.

I. 서 론

도살장에서 구입한 난소로부터 회수한 난포란을 체

외에서 성숙, 수정시킨 소 체외수정란의 대량생산과 발육관찰 등에 대한 기술의 확립은 소 초기배의 발육 연구와 핵이식, 유전자 조작 등과 같은 유전공학기법에 활용할 수 있고, 수정란 이식을 통하여 우수한 자손

을 다량 생산해낼 수 있지만, 아직까지는 소 난포란에서 배반포기배까지 발육시키는 체외배양기술에 요구되는 여러가지 요인들이 명확하게 밝혀지지 않아 체외수정란을 이용한 기술이 실용화 되지 못하고 있는 실정이다.

소 체외수정란의 체외배양시에는 8~16세포기 발육 억제현상(Thibault, 1966)이 일어나게 되어 발육이 억제되는데, 최근에는 8~16세포기 발육억제현상을 극복하고 체외발육을 향상시키기 위해, Somatic Cells과의 공동배양이 폭 넓게 이용되었다(Camnous 등, 1984 ; Eyestone과 First, 1989 ; Goto 등, 1992 ; Reed 등, 1996). 이들 배양체계는 체외발육율을 증진시키고 수정란의 생존력도 현저히 증가시키는 현상을 보이고 있다. 공동배양에 있어 somatic cells의 효과는 소 초기 수정란의 발육에 적합하지 않은 배양액을 발육조건에 맞게 변형시키거나, 배양액에서 생성되는 유해물질을 해독작용하는 것으로 추정되고 있다(Bavister 등, 1992). 체외수정란이 배반포기상태로 발육하는데 있어 somatic cells의 첨가 유무와 배양액 및 배양체계에 첨가되어지는 단백질원에 따라 체외발육율에 차이가 나타나고 있으며, 최근에는 serum을 첨가하지 않은 배양체계에 대한 실험이 많이 보고되고 있다(Katska 등, 1995).

본 실험은 소 난포란의 성숙과 초기배 수정란의 체외배양에서 hormone의 효과와 소 체외수정란의 체외배양에 배양액이 미치는 효과 및 소 난관 상피세포와 공동배양시 배양액이 체외발육율에 미치는 효과를 검토하고자 실시하였다.

II 재료 및 방법

1. 난포란의 회수 및 성숙배양

난포란의 회수 및 성숙배양은 Yang 등(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. 간단히 요약하면, 도축장에서 회수한 소의 난소는 2시간 이내에 멸균 생리식염수(25~28℃)에 침적하여 실험실로 운반한 후, 직경 2~7mm의 난포로부터 채취한 미성숙 난자중 난구세포가 치밀하고 균질한 세포질을 가진 난포란만을 선별하여, TC 199배양액에 10% FBS (Gibco), 0.5µg/ml FSH, 5µg/ml LH 및 1µg/ml E₂를 첨가하여 조성된 100µl의 소적내에 옮겨 20~22시간 동안

5% CO₂와 고습도의 조건에서 배양후 체외수정을 위한 성숙난자로 이용하였다.

2. 정자의 처리와 체외수정

동결정액(0.5ml)을 37℃의 항온 수조에서 1분간 용해한 후 Brackett와 Oliphant배양액(BO배양액, 1975)에 10mM caffeine이 함유된 배양액과 혼합, 원심분리(1,500rpm, 10분)로 2회 세척후 정자농도가 2.5×10⁶ 정자/ml 되도록 준비한다. 체외수정액은 BO배양액에 20µg/ml heparin이 함유된 50µl의 소적 배양액을 만들어 2~3시간 평형시킨 후 체외수정에 이용하였다. 난구세포가 확장된 난포란을 선별하여 성숙배양액과 체외수정 배양액으로 각각 2회 세척후 10개의 난자를 체외배양 소적으로 옮긴 후, 정액 50µl를 수정 배양액내에 첨가하여 수정을 실시하였다. 수정배양액의 최종농도는 5mM caffeine, 10µg/ml heparin, 1.25×10⁶ 정자/ml 및 10mg/ml BSA이었다. 수정 6~8시간 후에 난자는 BO배양액과 실험배양액내에서 각각 1회씩 세척하여 난자에 부착된 정자 및 이물질을 제거하였다.

3. 난관 상피세포의 준비

난관 상피세포의 monolayer준비는 Yang 등(1993)의 방법을 수정 보완하여 실시하였다. 도살 직후 적출된 소의 난관은 얼음으로 채워진 보온병에 넣어 2~3시간내에 실험실로 운반하여 주위의 결체조직과 혈액을 제거한 후, PBS-PVA로 2~3회 세척 후 난관을 Ham's F-10 배양액으로 관류하여 난관 상피세포를 15ml의 원심분리관에 회수하였다. PBS-PVA 용액과 Ham's F-10 용액으로 각각 1회씩 원심분리(1,000rpm, 5분)하여 세척한 후, 4-Well dish (Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하여 4~5일 동안 배양(37℃, 5% CO₂ in air)하였다. 24시간 배양후에 상층액을 제거하고 새로운 배양액을 첨가하여 체외배양실험에 이용하였다.

4. 체외수정란의 체외배양

체외배양액내에서 2회 세척된 난자는 각각의 실험 배양액에서 40~44시간 배양하여, 난구세포를 기계적으로 제거한 후, 2~8세포기로 발육한 수정란만을 선별하여 체외배양에 이용하였다.

5. 체외수정란의 세포수 검사

체외수정란의 세포수는 Pursel 등(1985)의 형광염색법을 수정 보완하여 실시하였다. 형광염색액은 1mg/ml Hoechst 33342를 희석하여 4℃에서 보존하며, 실험용액은 5 μ l 형광염색액을 500 μ l PBS에 첨가하여 준비하고, Mounting용액은 PBS와 glycerol를 1:1로 혼합하여 사용하였다. Slide glass위에 10~15 μ l의 mounting용액으로 소적을 만들고 수정란의 옮긴 후, 10 μ l의 염색액을 혼합하여 형광현미경하에서 세포수를 조사하였다.

III 결과 및 고찰

난포란의 체외성숙 배양액인 10% FBS가 함유된 TC 199배양액에 호르몬(FSH 0.5 μ g/ml, LH 5 μ g/ml, E₂ 1 μ g/ml)의 첨가 유무가 난포란의 분할율과 체외수정란의 체외발달성적을 Table 1에 요약하였다.

소 난포란의 분할율은 배양액에 hormones를 첨가한 구가 68.1%로서 hormones를 첨가하지 않은 구의 52.7%보다 다소 높은 성적을 얻었다. 이와 같은 성적은 체외에서 소 난포란의 체외성숙동안 hormone이 중요하며, 수정율에도 영향을 미친다고 보고한 Younis등(1989)와 Saeki등(1990)과도 일치하는 결과를

얻었다. 한편 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 각각 20.7%, 19.4%로 차이가 없었으며, 배반포기 이상의 발육율은 각각 14.1%, 10.4%로서 호르몬을 첨가한 구에서 다소 높은 성적을 얻었다.

이러한 결과는 배양액에 10% FBS를 첨가한 체외 배양액에 hormones의 첨가 유무시에 각각 1.3, 1.6%의 배반포 발육율을 보였다고 보고한 Fukui 등(1989)보다는 좋은 성적을 나타냈지만, Saeki 등(1990)이 보고한 31, 3%와는 다른 결과를 나타낸다. 이와 같은 결과는 난포란의 선발방법과 실험실마다 상이한 배양 체계를 가지고 있기 때문인 것으로 사료된다.

일반적으로 체외배양에 많이 이용되는 TC 199, SOF, CR_{1aa}배양액에 다른 단백질원인 FBS, BSA를 첨가하여 체외수정란을 발육시킨 체외발육 성적을 Table 2에 요약하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이 CR_{1aa}에 BSA를 첨가하여 체외배양 시킨 구에서 상실배 이상 발육된 체외 발육 성적이 27.1%로서 TC 199에 FBS 첨가구, SOF에 FBS 첨가구 및 SOF에 BSA를 첨가구보다 높은 체외발육 성적을 얻었다(6.3, 10.7 및 0%). 한편 SOF에 BSA를 첨가하였을 때 상실배 이상 발육된 수정란을 얻지 못한 본 실험의 결과는 Lonergan 등(1994)이 SOF에 BSA를 첨가하여 체외발육하는 경우 BSA는 수정란의 발육에 유익한 효과가 없었다고

Table 1. Developmental capacity of IVF bovine embryos matured in Medium 199 with or without hormone

Hormone	No. of oocytes	Cleavage rate (%)	No. of embryos developed to:			Morulae plus blastocysts (%)
			Premorulae	Morulae	Blastocysts	
+	135	68.1(92/135)	73	6	13	20.7
-	146	52.7(77/146)	62	7	8	19.4

Table 2. Effect of media with different energy source on developmental capacity of IVM/IVF bovine embryos

Media	Additive	No. of IVM/IVF embryos	No. of embryos developed to:			Morulae plus blastocyst (%)
			Premorulae	Morulae	Blastocyst	
TC-199	FBS	48	45	1	2	6.3
SOF ¹	FBS	56	50	5	1	10.7
SOF	BSA	39	39	0	0	0
CA _{1aa}	BSA	81	98	5	17	27.1

1. SOF: synthetic oviduct fluid

보고한 결과와 일치하였다.

배양액성분이 다르고 일반적으로 체외수정란의 체외배양에 많이 이용되는 TC 199 (10% FBS), SOF (32mg/ml BSA), CR_{1aa} (3mg/ml BSA) 및 Menezo's B₂ (10mg/ml)에서 체외수정란을 체외발육시킨 체외배양 성적은 Table 3에 요약하였다.

Table 3에서 나타난 바와 같이 체외수정란의 상실배기와 배반포기 이상까지 발육된 체외발육율은 TC 199, SOF, CR_{1aa} 및 Menezo's B₂ 배양액이 각각 7.1, 11.1, 26.6 및 32.9%로서 Menezo's B₂ 배양액이 가장 높은 성적을 나타냈으나, 커다란 차이는 인정되지 않았다. 그러나 배반포까지 발육된 체외발육성적만을 볼 때는 CR_{1aa}배양액이 20.1%로서 TC 199배양액 5.1%, SOF 1.9%, Menezo's B₂ 배양액이 11.8%로서 다소 상반된 결과를 나타냈다. 한편 배반포기 수정란의 세포수는 배양액의 종류에 따라 커다란 차이는 인정되지 않았다. 이상의 결과를 볼 때 각 실험실에서 사용되는 배양액의 종류보다는 배양액에 첨가되는 불

질에 따라 체외발육 성적의 차이가 있는 것으로 생각된다.

배양액 종류에 따라 난관상피세포와 공동배양하여 체외수정란의 체외발육율을 조사한 결과를 Table 4에 요약하였다.

소 난관 상피세포와 다른 배양액에 따른 체외수정란의 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 CR_{1aa}배양액이 44.7%(67/150)로서 TC 199 32.9%(53/161), SOF 26%(26/100) 및 Menezo's B₂배양액의 23.3%(28/120)보다 높은 성적을 나타내 소 난관 상피세포와 공동배양하지 않은 실험3의 결과와 일치하는 경향을 보였고, 배반포기 수정란의 세포수는 차이가 없는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면, 소 난포란의 발육에 있어 hormone은 수정율과 분할율을 향상시키는 것으로 나타났으며, 난포란의 성숙에 중요한 한가지 요인임을 알 수 있었다. 소 초기배 수정란의 8~16세포기 발육 억제현상을 극복하기 위해서는 배양액의 종류보다는

Table 3. Comparison to the development capacity of IVM/IVF bovine embryos in different culture media

Media	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to:			Morulae plus blastocyst(%)	Average cell no. of blastocyst (Mean±S.E)
		Premorulae	Morulae	Blastocyst		
TC-199	98	91	2	5	7.1	82.4±2.1
SOF ¹	108	96	10	2	11.1	84.7±4.0
CR _{1aa}	139	102	9	29	26.6	87.2±3.4
B ₂ ²	153	103	32	18	32.9	81.5±2.6

1. SOF: synthetic oviduct fluid

2. B₂: Menezo's B₂

Table 4. Development of bovine IVM/IVF embryos *in vitro* co-cultured with bovine oviduct epithelial cell in different culture media

Media	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to:			Morulae plus blastocyst(%)	Average cell no. of blastocyst (Mean±S.E)
		Premorulae	Morulae	Blastocyst		
TC-199	161	108	28	25	32.9	86.4±2.4
SOF ¹	100	64	20	6	26.0	84.1±5.2
CR _{1aa}	150	83	15	52	44.7	88.3±2.6
B ₂ ²	120	92	12	16	23.3	83.6±4.3

1. SOF: synthetic oviduct fluid

2. B₂: Menezo's B₂

somatic cells인 BOEC와의 공동배양이 효과적인 것으로 나타났다.

Jeremy 등(1996)이 최근 5년간 국제 수정란 이식 학회에 보고된 체외배양 성적을 분석한 결과에 의하면, 배반포까지의 평균 발육율은 26.0%였으며, conditioned와 unconditioned medium에서의 성적은 각각 27.8 ± 5 와 $30.4 \pm 3\%$ 로 유의차가 없었고, 서로 다른 배양액들의 비교와 serum의 첨가 여부에도 유의차가 없는 것으로 분석되었으며, 다만 somatic cells과 공동배양시에 배양액을 단독처리보다 높은 발육율을 보였다고 보고했는데, 이러한 결과는 본 연구와 비슷한 결과로서 초기수정란의 체외 배양체계에 대한 많은 연구가 앞으로 보다 많이 수행되어야 할 것으로 생각된다.

IV. 요약

본 연구는 소 난포란을 체외에서 성숙·수정시킨 후 여러 가지 배양액과 첨가물질이 체외발육에 미치는 영향을 조사한 것으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 소 난포란의 체외분할율은 hormone을 첨가한 TC 199(68.1%)배양액이 hormone을 첨가하지 않은 TC 199(52.7%)배양액보다 높았으며, 상실배기 이상 체외발육율은 각각 20.7%, 19.4%로 차이가 없었다.
2. 서로 다른 배양액에 다른 단백질원인 FBS와 BSA를 첨가시, 상실배기이상 체외발육율은, CR_{1aa}에 BSA첨가구(27.1%)가 SOF에 FBS첨가구(10.7%)와 TC 199에 FBS첨가구(6.3%), 및 SOF에 BSA첨가구(0%)보다 우수하였다.
3. 서로 다른 배양액에서 상실배기 이상의 체외발육율은 Menezzo's B₂(32.9%)가, CR_{1aa} (26.6%), SOF (11.1%), TC 199 (7.1%)보다 좋았으나, 세포수에 있어서는 처리간에 차이가 없었다.
4. 서로 다른 배양액과 BOEC와의 공동배양에 있어서는 CR_{1aa} 배양액이 44.7%로 가장 좋은 발육율을 나타냈으며, TC 199 (32.9%), SOF (26.0%), Meenzo's B₂ (23.3%)순으로 나타났으나, 세포수에 있어서는 처리간에 차이가 없었다.

V. 인용문헌

1. Bavister, B. D., T. A. Rose-Hellekant and T. Pinyopummintr. 1992. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morulea and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37:127-146.
2. Camnous, S., Y. Heyman and Y. Memezo. 1984. *In vitro* culture of early bovine embryos with trophoblastic vesicle : Cleavage through the block stage, followed by pregnancy after transfer. *Theriogenology*, 21(abstr.) : 226.
3. Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Repro. Fertil.*, 85:715-720.
4. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effects of sera, hormone and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 86:501-506.
5. Goto, K., N. Iwai, Y. Takuma and Y. Nakanishi. 1992 Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1149-1153.
6. Thomson J. G. and D. Duganzich. 1996. Analysis of culture system for bovine *in vitro* embryo production reported in abstracts of the proceedings of the International Embryo Transfer Society. *Theriogenology*, 45(1) :195.
7. Katska, L., B. Rynska and Z. Smorag. 1995. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes. *Theriogenology*, 42:859-870.
8. Lonergan, P., C. Carolan and P. Mermillod. 1994. Development of bovine embryos *in vitro* following oocyte maturation under defined condition. *Reprod. Nutr. Dev.* 34(4) :329-339.
9. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount

- staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 24:687-694.
10. Reed, W. A. , T. K. Suh, T. D. Bunch and K. L. White. 1996. Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver(BRL) cells, BRL-cell-conditioned medium. *Theriogenology*, 45:439-449.
 11. Saeki, K. , Leibfried-Rutledge and N. L. First. 1990. Are fetal calf serum and hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent development?. *Theriogenology*, 33(abstr.) : 316.
 12. Saeki, K. , M. Hoshi, M. L. Leibfried-Rutledge and N. L. First. 1990. *In vitro* fertilization and development of bovine Oocytes matured with commercially available follicle stimulating hormone. *Theriogenology*, 34: 1035-1039.
 13. Thibault, C. 1966. *In vitro* culture of cow egg. *Annls. Biol. Anim. Biophys.* , 6:159-164.
 14. Yang, B. K., C. K. Park, J. B. Kim, H. T. Cheong and C. I. Kim. 1993. Development of bovine IVM /IVF embryos cultured in TCM-199 and synthetic oviduct fluid(SOF) medium with, without co-culture system. *Korean. J. Animal Reprod.* 17(3):243-248.
 15. Yang, B. K., X. Yang and R. H. Foote. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 40:521-530.
 16. Younis, A. I., B. G. Brackett and R. A. Frayer-Hosken. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gametes Res.* 23:189-201.