韓國家畜繁殖學會誌 21(2) : 111~116(1997)
Korean J. Animal Reprod.

# 체외배양 기술로 생산된 초기배에 의한 한우 송아지 생산 기술 개발 Ⅰ. 소 난포액의 Fraction이 난모세포의 성숙, 수정 및 배발생에 미치는 효과+

서경덕 · 김호중 · 김광식
연암축산원예전문대학

# Development of Production Techniques for Korean Native Cattles Calves from Early Embryos by *In Vitro* Technology Ⅰ. The Effects of Follicular Fluid Fractions on *In Vitro* Maturation, Fertilization and Development of Bovine Oocytes

**Seo, K. D., H. J. Kim and K. S. Kim**
Yonam Junior College of Animal Husbandry and Horticulture

## SUMMARY

We determined the effects of follicular fluid fractions in the maturation medium on bovine oocyte maturation, fertilization and subsequent development, as well as on number of cells in blastocysts following culture. Follicular fluid and oocytes from bovine follicles less than 5 mm in diameter were collected from the ovaries of slaughtered cows. Follicular fluid was separated into different molecular weight fractions by untrafiltration through a membrane using a centrifuge at 5000×g, for 2h. For the maturation medium, follicular fluid fractions (30%, v/v), whole fluid (30%) or PVP(3mg/ml) were added to TCM 199(0.1μg/ml estradiol-17β, 100IU hCG). After maturation for 24h, oocytes were fertilized *in vitro* with bull frozen-thawed spermatozoa and cultured on a monolayer of granulosa cells for 9 days after fertilization. There were no differences in maturation rates or fertilization rates among any maturation conditions. The rates of development to >2-cell stage of the oocytes were significantly decreased when fraction of follicular fluid below 10,000 MW were added into maturation medium, compared with control and fraction above 10,000 MW(26.0% vs 40.8% to 64.0%, respectively, $p<0.01$). Likewise, the rates of development to blastocysts of fertilized oocytes were significantly decreased in maturation medium containing fraction of follicular fluid (<10,000 MW). The average cell number of blastocysts derived from oocytes that matured in the fraction(>10,000 MW) of follicular fluid was 154.7±13.7. These embryos contained more cells than those matured in whole follicular fluid, or the fraction(<10,000 MW) of follicular fluid or control(107.0±8.4, 91.8±11.8 and 95.8±6.2, respectively). In conclusion, we found that fractions of follicular fluid contained factors stimulating or inhibiting

+ 이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

oocyte cytoplasmic maturation. These suggest that a factor(s) inducing cytoplasmic maturation of oocytes may exist in >10,000 MW fraction of follicular fluid.
(Key words : Bovine follicular fluid fraction, IVM, IVF, IVC, Cell number of blastocysts)

## Ⅰ. 서 론

난자의 수정능과 배 발생능은 난자의 핵성숙과 세포질 성숙에 의존된다(Crister 등, 1986a; Fukushima와 Fukui, 1985). 핵 성숙은 성숙과정중에 일어나는 일련의 염색체 변화에 의하여 판단 가능하지만, 세포질 성숙은 수정후의 분할과 배반포배의 발생에 의하여 판단하고 있다. 그러나, 체외 성숙된 난자가 체내 성숙된 난자에 비하여 수정후의 배발생율이 낮으며, 이러한 원인은 체외에서 성숙된 난자는 체내 성숙난자에 비하여 세포질 성숙이 불충분하기 때문이다(Leibbfried- Rutledge 등, 1987). 따라서 몇몇 연구자들은 체외난자의 세포질 성숙을 개선하기 위하여 성숙배지에 성장인자(Das 등, 1991a; Dekel과 Sherizy, 1985), 혈청(Sanbuissho와 Threlfall, 1989; Younis 등, 1989), 호르몬(Brackett 등, 1989; Younis와 Brackett, 1989) 또는 난포액(Cha 등, 1991; Naito 등, 1989)을 첨가하고 있다. 또한 난자를 난구세포와 과립막세포 같은 난포세포와 공배양을 하기도 하지만(Goto 등, 1988; Sirard 등, 1989; Xu 등, 1987; Fukui와 Ono, 1988), 이러한 체외 배양조건은 체내 조건을 아직도 만족시키지 못하고 있다. 따라서 본 실험에서는 소 난포란의 체외성숙배지에 난포액을 분자량에 따라 분획한 fraction을 첨가하여 성숙시킨 난포란의 수정후 배발생과 배반포배의 세포수를 계산하여, 난포액 fraction이 난포란의 세포질 성숙에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

## Ⅱ. 재료 및 방법

### 1. 난포액의 Fractions 및 성숙배지

도살장에서 채취한 난소의 난포(직경 1~5mm)에서 주사기로 회수한 다음 ultrafilter(Millipore, UFC4TGC25)로 5,000×g, 2시간 원심분리하여 분자량 10,000 이상 또는 이하로 분리하였다. 미분획한 난포액 또는 분자량에 의하여 분리된 난포액을 기초배지에(0.1μg/ml estradiol과 100 IU hCG가 첨가된 TCM-199) 30%씩 첨가하고, 대조구는 3mg/ml의 polyvynylpyrrolidone(PVP, MW; 40,000)를 첨가하여 성숙배지로 사용하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙

도축된 암소의 난소를 생리식염수(0.9% NaCl, 36℃)에 넣어 도살 후 4 시간 이내에 실험실로 운반하여, 39℃의 생리식염수에 보존하였다. 18G의 주사침이 부착된 10ml의 주사기를 이용하여, 직경 1~5mm의 난포로부터 난포액과 난포란을 흡인하여, 65mm petri dish에 옮겼다. 실체현미경하에서 난포란의 세포질이 균질하고 수층의 난구세포로 싸여진 난포란만을 선별하여, PBS(3mg/ml, BSA) 및 성숙배지로 각각 3회 세척하였다. 세척된 난포란을 실험 전일에 준비한 성숙배지(30개/200μl)에 옮겨 5% $CO_2$, 39℃ 95% 공기조건하에서 24시간 성숙배양을 실시하였다.

### 3. 과립막세포의 feeder 준비

난포로부터 난포란을 채취할 때 난포란과 함께 회수된 과립막세포를 채취하여, 100×g, 5분간 PBS(3mg/ml, BSA)로 원심분리하여 세척하고, 모아진 과립막세포를 0.4%의 hyaluronidase를 넣은 PBS(free-BSA)로 38℃에서 7분간 과립막세포를 분산시켰다. 그 후 hyaluronidase의 작용을 PBS(3mg/ml, BSA) 5ml를 첨가하여 정지시키고 원심세척후, TCM-199 + 5% calf serum(CS, Gibco)으로 다시 한 번 세척하였다. 세척된 과립막세포를 TCM-199 + 5% CS로 세포농도가 $5\times10^5$ cells/ml이 되로록 조절하여 60×15mm의 petri dish에 200μl의 소적을 만들어, 5% $CO_2$, 39℃ 95% 공기조건하에서 과립막세포의 단층이 형성되도록 배양하였다.

### 4. 체외수정, 발생 및 배반포배의 세포수 계산

동결-융해한 소정액을 10 mM의 caffeine(C4144, Sigma)를 첨가한 B.O.액으로 2회 원심세척 후 (500×g, 5분), 상층액을 제거하고, 동일 배지와 20mg

/ml BSA가 첨가된 B.O. 액으로 1:1로 희석하여, 정자농도가 $5\times10^6$으로 조절하고 100㎕의 정자현탄액의 소적을 만들어, 5% $CO_2$, 39℃ 95% 공기조건하에서 3시간 전배양을 실시하였다.

24시간 성숙배양시킨 난포란을 10mg /ml BSA가 첨가된 B.O.액으로 3회 세척하여, 정자현탄액 소적(10 oocytes /drop)에 옮겨, 6시간 동안 난포란과 공배양하여 체외수정을 실시하였다. 체외수정후, 난포란에 부착된 정자 및 난구세포는 피펫을 이용하여 제거한 후, 수정란을 30시간 동안 배양하여 준비한 과립막세포의 단층에 옮겨(30 embryos /drop) 공배양을 하였으며, 체외수정후 48시간 간격으로 신선한 TCM-199 + 5% CS로 배양액의 반을 교환해 주면서, 수정후 9일째까지 배양을 계속하였다.

체외수정후 2, 3, 8, 9일째에 2-cell, 8~16-cell, 배반포배, 부화 배반포배의 발생율을 관찰하고, 각 실험구간의 통계적인 분석은 5회 반복실험하여 $\chi^2$-test를 이용하여 검정하였다. 체외수정후 9일째에 배반포배 및 부화배반포배로 발생한 배의 세포수를 Byun 등(1991)의 방법을 이용하여 염색하고, 도립현미경하에서 세포수를 계산하였으며, 통계적인 분석은 SAS를 이용하여 검정하였다.

## Ⅲ. 결과 및 고찰

체외성숙율 및 수정율에 있어서는 실험구간의 유의차는 인정되지 않았다(Table 1). 그러나, 수정후의 2일째의 2-cell으로의 배발생율은, 난포액이 분자량 10,000 MW 이하로 분획된 fraction이 첨가된 성숙배지에서 성숙된 난포란이, 미분획구, 10,000 MW 이상으로 분획된 fraction 또는 대조구에 비하여 유의하게 감소되었다(26.0% vs 40.8~64.0%, $p<0.01$. Table 2). 이와 비슷하게 8~16-cell, 배반포배로의 발생율도 10,000 MW 이하로 분리된 난포액 fraction을 첨가한 성숙배지에서 성숙시킨 난포란이 수정후의 배발생에 있어서 유의하게 저하되었다($p<0.01$). 근년, 난포액을 첨가한 성숙배지 중에서 성숙시킨 돼지 난포란의 수정후 배발생율은 난포액을 첨가하지 않은 성숙배지에서 성숙시킨 난포란에 비하여 증가되었다고 보고하였다 (Naito 등, 1989, 1988). 그러나 Tsafriri와 Chaning(1975a)은 난포액 중에는 난포란의 성숙을 억제하는 인자가 포함되어 있다고 보고한 이래 mouse에 있어서도 소 난포액 중에서 성숙배양시킨 난포란의 성숙재개가 억제되었다고 보고하였으며 (Sato와 Koike, 1984), Sirard(1990)도 100%의 소 난포액 중에서 소 난포란을 성숙배양시킬 경우, 난포란의 핵성숙이 억제되었다고 보고하였다. Sluss 등(1987)이 난포액 중에 포함되어 있는 난포란의 성숙 또는 억제인자에 대하여 연구한 결과, 난포액의 분획중에 포함된 인자가 난포자극호르몬에 대하여 agonistic 또는 antagonistic인 작용이 있는 것을 관찰하였다. 다시 말하자면, 난포액중에 있는 어떠한 인자가 호르몬적인 영향에 의하여 난자성숙의 재개를 촉진하거나 또는 억제하는 기능을 갖고 있다는 것을 의미하는 것으로 추측된다. 본 실험에 있어서도 난포액을 분자량에 의하여 분획하여 난포란의 체외성숙배지에 첨가한 경우, 10,000MW 이상의 fraction에서 성숙시킨 난포란의 수정 후의 체외배발생율이 유의하게 증가되었다. Romero 등(1992)은 LH-surge 후 20시간된 대난포의 난포액을 분자량으로 분획한 후, 100,000MW 이상의 fraction을 성숙배지에 40% 첨가하여 소 난포란을 성숙배양할 경우, hypoxanthine(성숙분열 재개 억제인

**Table 1. Effect of bovine follicular fluid fractions in a protein-free maturation medium on *in vitro* maturation of bovine oocytes and their ability to be fertilized**

| Supplements to maturation medium | No. of oocytes examined | No. (%) of oocytes matured | No. of oocytes examined | No. (%) of oocytes fertilized |
|---|---|---|---|---|
| PVP | 36 | 30(83.3) | 22 | 19(86.4) |
| Non fraction | 41 | 35(85.4) | 22 | 22(100) |
| <10,000 MW | 36 | 30(83.3) | 21 | 15(71.4) |
| >10,000 MW | 38 | 30(78.9) | 22 | 16(72.7) |

**Table 2. Effect of bovine follicular fluid fractions in a protein-free maturation medium on development of fertilized bovine oocytes**

| Supplements to maturation medium | No. of oocytes cultured | No. (%) of embryos develop to | | |
|---|---|---|---|---|
| | | >2-cell | 8 to 16-cell | Blastocyst |
| PVP | 98 | 49(50.0)[a] | 42(42.9)[a] | 20(20.4)[a] |
| Non fraction | 125 | 80(64.0)[a] | 64(51.2)[a] | 32(25.6)[a] |
| <10,000 MW | 100 | 26(26.0)[b] | 19(19.0)[b] | 9( 9.0)[b] |
| >10,000 MW | 122 | 72(59.0)[a] | 55(45.0)[a] | 27(22.1)[a] |

[ab] Different superscripts within same column were significantly different ($P<0.01$).

**Table 3. Effect of bovine follicular fluid fractions in a protein-free maturation medium on the cell numbers of blastocysts *in vitro* 9 days after fertilization**

| Supplements to maturation medium | No. of embryos tested | Number of cells in blastocyst at 9 days | | Relative cell numbers |
|---|---|---|---|---|
| | | Mean no ± SE | Range cell | |
| PVP | 18 | 95.8± 6.2[a] | 60~165 | 100.0 |
| Non fraction | 20 | 107.0± 8.4[a] | 56~205 | 111.7 |
| <10,000 MW | 9 | 91.8±11.8[a] | 30~153 | 95.8 |
| >10,000 MW | 20 | 154.7±13.7[b] | 68~276 | 161.5 |

[ab] Different superscripts within same column were significantly different ($P<0.01$).

자)의 존재 하에서도 성숙분열의 재개가 관찰되었다고 보고하였다. 또한 대난포에서 채취한 난포액을 성숙배지에 첨가할 경우, 소 난포란의 핵성숙과 세포질 성숙이 촉진되어 수정후의 배반포배의 발생율이 증가되었다고 보고하였다(Larocca 등, 1993).

체외수정후 9일째에 발생한 배반포배를 염색하여 그 세포수를 계산한 결과가 Table 3에서 보는 바와 같다. 10,000 MW 이상으로 분획된 난포액을 첨가한 성숙배양액에서 성숙시킨 난포란의 수정후에 발생된 배반포배의 세포수가 154.7±13.7이었다. 이러한 세포수는 미분획한 난포액, 10,000 MW 이하로 분획된 난포액 그리고 대조구의 세포수보다 많았다(107.0±8.4, 91.8.±118, 95.8.±2). 또한 체내에서 회수된 8일째 배반포배보다도 높았다(113.±9.3, Duby 등, 1992). 이상의 결과에 따라, 난포액중 분자량 10,000 MW 이상의 분획에는 난포란의 충분한 세포질 성숙을 촉진하는 인자가 포함되어 있으며, 이러한 인자에 의해, 발생된 배반포배의 세포수가 증가되었을 것이라고 생각된다. 한편, Yoshida 등(1993)도, 1~5mm의 돼지난포로부터 회수한 난포액을 분자량에 따라 분획하고, 난포란의 체외성숙배지에 첨가한 경우, 고분자량으로 분획된 난포액 중에서 성숙시킨 난포란이 충분히 성숙되었으며, 그 후의 발달이 촉진되었다고 보고하였다.

이상의 결과로써, 난포액 중에 포함된 고분자물질은 난포란이 체외성숙 및 수정후의 정상적인 배발생에 요구되는 난포란의 세포질 성숙을 촉진하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

## Ⅳ. 적 요

본 실험은 소 난포(1~5mm)로부터 회수한 난포액을 분자량에 따라 분획한 난포액이 소 난포란의 수정후의 체외발생 및 발생된 배반포배의 세포수에 미치는 영향을 규명하기 위하여 실시하였다. 소 난포액을 분자량에 따라 10,000 MW 이상 또는 이하로 분획하여 체외성숙배지에 30%씩 첨가하였다. 10,000 MW 이상으로 분획된 난포액이 포함된 성숙배지에서 성숙시킨 난포란이 10,000 MW 이하로 분획된 난포액 중에

서 성숙시킨 난포란에 비하여 체외수정후의 배반포배의 발생율에서 유의하게 높았다($p<0.01$). 체외수정후 9일째에 배반포배로 발생된 배의 세포수를 계산한 결과, 10,000 MW 이상으로 분획된 난포액 중에서 성숙시킨 난포란이 미분획된 난포액, 10,000 MW 이하로 분획된 난포액 또는 대조구에 비하여 유의하게 높았다($p<0.01$). 이상의 결과를 종합해 보면, 소 난포액 중에는 난포란의 성숙을 촉진하는 인자가 포함되어 있으며, 이러한 인자의 작용에 의하여 수정후 배반포 발생 및 배반포배의 세포수가 증가되었으며, 이러한 인자는 분자량 10,000 MW 이상의 물질에 존재하는 것으로 추측된다.

## V. 인용문헌


1. Brackett, B. G., A. I. Younis and A. R. Fayrer-Husked. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. Fertil. Steril., 52:319-324.
2. Byun, T. H., S. H. Lee and H. B. Song. 1991. Development of a rapid staining method for nucleus of the oocyte from domestic animals. Korean. J. Anim. Sci., 33:25-31.
3. Cha, K. Y., J. J. Koo, J. J. Ko, D. H. Choi, Y. S. Han and T. K. Yoon. 1991. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and thier transfer in a donor oocyte program. Fertil. Steril., 55: 109-113.
4. Crister, E. S., M. L. Leibfried-Rutledge and N. L. First. 1986a. Influence of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryonic development. Biol. Reprod., 34:286(suppl. 1).
5. Das, K., L. E. Stout, H. C. Hensteigh, G. E. Tagatz, W. R. Phipps and B. S. Leung. 1991a. Direct possitive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation *in vitro*. Theriogenology, 25:150(abstr).
6. Dekel, N and I. Sherizly. 1985. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. Endocrinology, 116: 406-409.
7. Duby, R. T., J. R. Dobrinsky, J. M. Robl, E. W. Overstrom, M. P. Boland, A. Baguisi, P. Lonergan and J. F. Roche. 1992. Development rate, estrase activity and death of cells *in vitro* and in vivo produced bovine embryos. Theriogenology, 39:210(abstr).
8. Fukui, Y. and H. Ono. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. Vet. Res,, 122:282.
9. Fukushima, H. and Y. Fukui. 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the sebsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*. Anim. Reprod. Sci., 9:323-332.
10. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakahashi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fertil., 83:753-758.
11. Larocca, C., S. Kmaid and J. Calvo. 1993. Effect of follicular fluid and estrus cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocyte *in vitro*. Theriogenology, 39:253(abstr).
12. Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Crister, W. H. Eyestone, D. L. Northey and N. L. First 1987. Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. Biol. Reprod., 36:376-383.
13. Naito, K., Y. Fukuda and I. Ishibashi. 1989. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid *in vitro* and fertilized *in vitro*. Theriogenology, 31:1049-1057.
14. Naito, K., Y. Fukuda and Y. Toyoda. 1988. Effect of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes mat-

ured *in vitro*. Gamete. Res., 21:289-295.

15. Romero, A., W. Nauta and JR. G. E. Seidel. 1992. A meiotic stimulator in bovine follicular fluid is retained in a fraction larger than 100, 000 daltons. Theriogenology, 37:286(abstr).
16. Sanbuissho, A. and W. R. Threlfall. 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocytes. Theriogenology, 31: 693-699.
17. Sato, E. and S. S. Koike. 1984. A factor from bovine granulosa cells preventing oocyte maturation. Differentiation, 26:59-62.
18. Sirard, M. A. 1990. Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocyte. Theriogenology, 33:757-767.
19. Sirard, M. A., H. M. Florman, M. L. Leibfried-Lutledge, F. L. Barnes, M. L Sims and N. L. First. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biol. Reprod., 40:1257-1263.
20. Sluss, P. M., A. L. Schneyer, M. A. Franke and JR. L. E. Reichert. 1987. Porcine follicular fluid contains both follicle stimulating hormone agonist and antigonist activities. Endocrinology, 120:1477-1481.
21. Tsafriri, A. and C. P. Channing. 1975a. Inhibition influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. Endocrinology, 96:922-927.
22. Xu. K. P., T. Greve, H. Callesen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 81:501-504.
23. Yoshida, M., Y. Mizoguchi, K. Ishigaki, T. Kojima and T. Nagai. 1993. Birth of piglet derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 39: 1301-1311.
24. Younis, A. I., B. G. Brackett and R. A. Fayrer-Hosken. 1989b. Influence of serum and hormones on the bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Gamete. Res., 23:189-201.

(접수일자 : 1997. 4. 20. / 채택일자 : 1997. 5. 23)