

산소농도 및 배양액이 돼지 난포란의 체외성숙과 배발달에 미치는 영향

한만희[†] · 이경본 · 박병권* · 박창식 · 서길웅 · 이규승
충남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부

Effects of Oxygen Concentrations with Different Media on *In Vitro* Maturation and Development of Porcine Follicular Oocytes

M. H. Han[†], K. B. Lee, B. K. Park*, C. S. Park, K. W. Seo and K. S. Lee
Division of Animal Science & Resources, College of Agriculture Life & Science,
Chungnam National University

SUMMARY

The present study was carried out to examine the effects of O₂ concentrations and culture media on *in vitro* maturation and embryo development of porcine follicular oocytes. The results were summarized as follows :

1. The rates of GVBD and nuclear maturation in NCSU-23 and TCM-199 media with 10% PFF under the conditions of 5% and/or 20% O₂ concentrations were not different among the each treatment groups(P>0.05).
2. The rates of polyspermy and mean numbers of penetrated sperm were significantly lower in NCSU-23 medium than in TCM-199 medium (P>0.05). However, the rates of polyspermy and mean numbers of penetrated sperm were not different between 5% and 20% O₂ concentrations.
3. The rates of blastocyst formation at day 7 after *in vitro* fertilization were significantly higher in NCSU-23 medium under the condition of 20% O₂ concentration than in TCM-199 medium under the condition of 5% or 20% O₂ concentrations. However, the rates of blastocyst formation and total cell numbers in blastocysts were not different between 5% and 20% O₂ concentrations.

In conclusion, the use of NCSU-23 medium under the condition of 20% O₂ concentration was beneficial for porcine oocyte maturation and *in vitro* development.

(Key words : porcine embryo, IVM, oxygen concentration, NCSU-23)

서 론

최근 가축번식학 분야에서는 번식의 효율성을

증진시키거나 인류가 요구하는 형질을 가진 동물을 생산하기 위하여 여러 가지 다양한 첨단 생명공학적인 연구가 수행되고 있다. 특히, 복제유전자의 미세주입에 의한 형질전환동물의 작출, 핵치환 등

* 공주문화대학(Department of Companion Animal, Kongju National Culture College)

[†] Correspondence : Tel : 042) 821-7026, Fax : 042) 823-9754, E-mail : hanmh99@hanmail.net

의 기법을 통한 복제동물의 작출 및 인공장기 생산을 위한 동물의 작성 등의 실험이 활발하게 진행되고 있다. 이러한 연구를 효율적으로 수행하고 보급하기 위해서는 우선적으로 다수의 수정란을 확보하는 것이 필수적이다. 이를 해결하는 하나의 수단으로서 도축된 개체의 난소에서 채취된 다수의 미성숙 난포란을 체외에서 이용하고자 하는 실험이 여러 연구자들에 의하여 다각적으로 검토되고 있다.

포유동물 난자의 체외성숙에 관한 연구는 Pincus와 Enzmann(1935)이 토끼의 미성숙 난포란을 채취하여 체외배양했을 때, 체내에서 일어나는 일련의 핵성숙과정이 자발적으로 일어난다는 것을 최초로 보고한 이래, 여러 연구자에 의해서 다양한 동물을 대상으로 연구가 진행되어 왔다. 특히 돼지에 있어서 미성숙 난포란의 체외성숙은 Edwards 등(1965)에 의하여 체외에서 43~46시간 동안 체외배양함으로써 제2성숙분열 중기(metaphase-II)에 도달한다는 것이 처음으로 보고된 이래, Motlik과 Fulka 등(1974)이 체외성숙과 체외수정을 최초로 시도하였고, Iritani 등(1978)이 체외수정을 처음으로 성공하였고, Cheng 등(1986)에 의하여 성공적인 체외성숙 및 수정에 대한 실험법이 제시되었으며, Mattioli 등(1989)이 최초로 산자를 보고하였다.

그러나 돼지 난포란의 체외배양에 관한 연구는 타가축에 비하여 핵성숙과 세포질성숙을 포함한 난포란의 체외성숙이 불완전하며, 체외수정시 높은 다정자침입률과 불완전한 응성전핵형성 등으로 인한 수정률의 저하, 초기배 발달시 4-세포기에 발달이 지연되거나 정지되는 체외발육능정지현상(*in vitro* cell block)을 초래하는 등 다른 축종 보다 양질의 수정란을 생산하는 것이 어려운 것으로 보고되었다(Prather와 Day, 1998).

돼지 난포란의 체외배양시 많은 연구자들이 일반적으로 체세포배양용으로 개발된 Tissue culture medium(TCM)-199를 사용해왔고(Funahashi 등, 1994; Wang 등, 1991; Yoshida 등, 1990; Mattioli 등, 1989), 이를 사용하여 배반포기까지 배발달을 유지하였다(Funahashi 등, 1994; Yoshida 등, 1990; Mattioli 등, 1989). 그리고 Mattioli 등(1989)은 산

자까지 보고하였으나, 그 효율은 낮은 것으로 알려져 있다. 따라서, 이러한 점을 극복하고자 Petters와 Wells(1993)가 Taurine을 함유한 North Carolina State University(NCSU)-23배양액을 개발하여 초기수정란에 긍정적인 효과를 보고한 이래로 체외성숙배양에 이용하고자 하는 노력이 여러 연구자들에 의하여 보고되었다(Abeydeera 등, 1998a,b; Wang 등, 1997).

한편, Johson과 Nasr-Esfahani(1993)는 난포란을 이용한 체외배양체계의 불완전함을 수정란의 초기배 발달시 산소분압이 난관내의 낮은 농도조건(1~10%)보다 고농도(20%) 조건에 노출됨으로 인하여 과량의 활성산소(reactive oxygen species, ROSs)가 발생되며, 이들 유리산소기(oxygen-free radical)들은 'Oxidative stress'를 초래하여 미토콘드리아의 호흡작용억제, 세포막의 유동성 감소, 각종 효소의 불활성화 및 DNA·RNA의 손상을 초래하는 등 난포란의 성숙 및 체외발달시에 중요한 저해요인으로 작용한다고 보고하였다. 이와 같이 체외배양 조건하에서 발생하는 유리산소기를 제거하여 난포란을 이용한 체외배양체계를 개선시키고자 하는 연구가 저분압 산소조건에서 보고된 바 있다(Lim 등, 1999; Li와 Foote, 1993; Umaoka, 1992; Thompson 등, 1990; Pabon 등, 1989; Gwatkin과 Haidri, 1974).

그러나 돼지난포란을 이용한 체외성숙과 배발달에 이러한 배양액 및 산소농도가 미치는 영향에 관한 연구는 보고자에 따라 서로 다른 결과들을 제시하고 있고, 그 논지도 일치하지 않아서 이에 대한 종합적인 연구가 절실히 필요한 실정이다.

이에 본 연구는 돼지 난포란의 체외성숙에 TCM-199과 NCSU-23배양액을 비교조사하고, 아울러 산소농도가 돼지 난포란을 이용한 체외수정란의 생산에 미치는 영향을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시 난포란의 채취

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 미경산돈(체중 120kg 내외)으로부터 적출하여 75 μ g/

ml penicillin G(Sigma, USA)와 50 μ g/ml streptomycin sulfate(Sigma)를 첨가한 38°C의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 2회 세척한 후 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 그리고 재차 신선 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 38°C로 조정되어 있는 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

공시난포란의 채란은 18-gauge 주사침이 장착된 10ml 주사기로 직경이 2~5mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 15ml 원심분리관에 옮겨 38°C로 조정된 정온대에 10분간 정지, 난포란의 침전을 유도한 다음, 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 1.5 cm 간격으로 방안을 표시한 87×15mm 페트리접시에 넣고 1mg/ml PVA(Sigma, USA)가 첨가된 TL-Hepes와 희석하여 실체현미경(Nikon, Japan)하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질의 균일한 난포란만을 선별하여 난포란을 회수한 후 체외성숙 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

1) 난포란의 체외성숙배양

본 연구에 이용되는 시약은 대부분 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 TCM-199과 BSA가 배제된 NCSU-23(Petters와 Wells, 1993)을 기본 배양액으로 하여 10% 돼지난포액, 0.6mM cysteine, 10IU/ml PMSG, 10IU/ml hCG와 10ng/ml의 EGF를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 6mm 이상 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 3,000rpm, -4°C의 저온하에서 30분간 원심분리하고, 0.8 μ m 필터로 여과·멸균한 후, -20°C 냉동고에 냉동보관하며 사용전 용해하여 사용하였다. 체외성숙 배양에는 4-well dish(Nunc, Denmark)를 사용하여 각 well당 500 μ l의 난자성숙용 TCM-199 및 NCSU-23 배양액을 넣어 전배양을 실시하였다. 회수한 양질의 미성숙난자는 TL-Hepes 배양액으로 3회 세정하고, 체외성숙용 배양액으로 3회 세정하였다. 세정된 미성숙 난자는 각 well당 40~50개씩 넣어 실험목적에 따라서 20% O₂ 농도(38.8°C, 5% CO₂ 및 포화습도)와 5% O₂조

건(38.8°C, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ 및 포화습도)의 배양기 내에서 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양하고, 이후에는 호르몬이 첨가되지 않은 체외성숙용 배양액에서 22시간 배양하여 총 44시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

2) 체외성숙 난포란의 염색 및 성숙판정

각각의 처리구별 44시간 동안 성숙배양시킨 난포란의 일부를 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(Rapid Staining Method)으로 염색하여 핵성숙단계를 비교 판정하였다. 염색방법을 요약하면 0.3% hyaluronidase용액에 성숙이 유지된 난자난구세포복합체(oocyte-cumulus complexes)를 옮겨 1분간 vortexing을 통하여 난구세포를 완전히 제거한 다음 1% BSA가 함유된 TL-Hepes로 3회 세척하였다. 그리고 slide glass위에 난포란을 30~40개를 적하한 다음, cover slip으로 덮고, 난포란의 부피로 생긴 cover slip과 slide glass의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol = 1 : 3)을 흘리는 방법으로 5분간 고정하였다. 고정이 끝난 난포란의 염색은 염색액을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(glacial acetic acid : distilled water : glycerol = 1 : 3 : 1)를 흘려 난세포질 이외의 염색액을 제거시킨 다음, 위상차현미경(400~1,000×)으로 난포란의 핵성숙 단계를 판정하였다. 핵성숙단계의 판정은 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 실시하였다.

3. 체외수정

1) 난포란의 준비

체외수정용 배양액은 modified Tris-buffered medium(mTBM)을 기본 배양액으로 2.5mM caffeine과 0.1% BSA(A7888, Sigma)가 함유된 mTBM 용액을 사용하였고, 정액의 세정액으로는 D-PBS에 0.1% BSA가 첨가된 배양액을 사용하였다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지 난포란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 NCSU-23 배양액에 넣어 연속적인 피켓팅으로 난구세포를 제거하고, mTBM 배양액으로 3회 세정하였다. 세정 후 90 μ l 수정용

배양액 소적에 30~40개의 성숙난자를 넣고 매정 시까지 배양기 내에서 배양하였다.

2) 정자의 준비 및 수정능획득

정액은 인공수정용 액상정액으로 사용 직전까지 17°C 항온고에서 최대 4일간 보존하여 사용하였다. 보존된 정액은 사용직전에 정액세정액(DPBS)과 함께 1:1 비율로 15ml falcon tube에 넣고 450g에서 3분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거하는 세정과정을 3회 실시하였다. 마지막으로 하단에 남은 정자 침전물에 정자 세정용배양액을 넣어 38.8°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 10분간 정치하였다. 운동성을 가진 부유된 정자들을 회수하여 450g에서 3분간 원심분리를 실시한 다음, 침전된 정자는 체외수정용 배양액으로 재차 회석하였다. 회석된 정자는 성숙난자가 들어 있는 소적에 최종농도가 1.2×10^5 sperm/ml이 되도록 각각 10 μl씩 주입한 후 38.8°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 5~6시간 동안 체외수정을 실시하였다.

3) 체외수정의 판정

각각의 처리구별 5~6시간 동안 체외수정용 배양액에서 정자와 수정을 유기한 후, pipetting 및 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대 부착정자를 제거하였다. 그리고 배발달 배양액에 옮겨 추가로 배양한 다음, 수정후 10~12시간에 1-세포기의 수정란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로 염색하여 정자의 침입, 자·용전핵형성 등의 수정 여부를 확인하였다.

4. 체외수정된 난포란의 체외배양

돼지 체외수정란의 배양에는 0.4% BSA(A0281, Sigma)가 함유된 NCSU-23을 기본배양액으로 사용하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 pipetting 및 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대 부착정자를 제거한 다음 0.4% BSA가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 각각의 처리구별로 작성된 배양액을 4-well dish에 각 well당 500 μl의 배발달 배양액을 넣고 well당 40~50개씩 넣

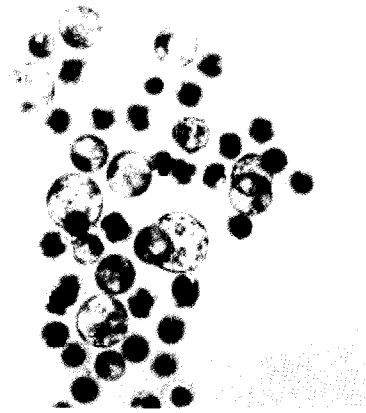


Fig. 1. IVM/IVF-derived porcine blastocysts at day 7 (40X).

어 20% 산소조건(38.8°C, 5% CO₂ 및 포화습도) 및 5% 산소조건(38.8°C, 5% O₂, 5% CO₂ 90% N₂ 및 포화습도)의 배양기 내에서 각각 배양하여 체외배발달을 유도하였다. 체외배양 2일째에 난할률을 조사하였고, 6일 및 7일째 배반포 발달률을 조사하였다(Fig. 1). 이상과 같은 모든 실험은 37°C로 조정된 현미경가온판에서 실시하였다.

5. 세포수 검사

체외수정을 실시하여 생산한 돼지 수정란은 Hinrichs 등(1993)의 방법에 준하여 체외배양 7일째 배반포 단계에서 Hoechst 염색을 실시하여 그 세포수를 조사하였다. 간단히 요약하면 Hoechst 염

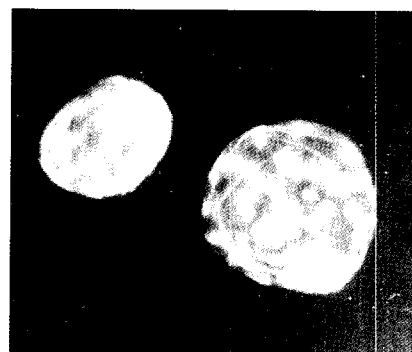


Fig. 2. Hoechst stained IVM/IVF-derived porcine blastocysts(100X).

색을 실시하기에 앞서 수정란을 1% formalin 용액에 1분간 정치시켜 고정하고, 고정된 수정란을 유리 슬라이드 위에 올려놓았다. 이 위에 유리 커버를 덮은 다음 이 수정란이 움직이지 않을 정도로 누르고 유리 슬라이드와 유리 커버사이에 2.5 μ g/ml 농도의 Hoechst 염색액을 흘려 보내 염색을 실시하였다. 염색 후 2~3시간 후에 형광현미경하에서 각각의 배반포기 수정란으로부터 세포수를 조사하였다(Fig. 2).

6. 통계분석

본 연구에서는 각 처리구에 대하여 4회 이상 반복실험을 실시하였으며, 얻어진 모든 실험결과와 통계처리는 SAS/STAT 6.03 package를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후, Duncan's 다중검정(DMRT)에 의하여 처리구간 유의성을 검정하였으며, $P < 0.05$ 이하의 유의성만을 통계학적 차이가 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

돼지 난포란을 NCSU-23과 TCM-199 배양액에 10% PFF와 0.6mM cysteine을 첨가하여 5% 및 20% O_2 조건하에서 체외성숙을 유기한 결과는

Table 1과 같다. NCSU-23 및 TCM-199 배양액, 5%와 20% O_2 조건은 난핵포방괴률과 핵성숙률에 있어서 유의성이 인정되지 않는 높은 성적을 나타냈다.

돼지난포란을 NCSU-23과 TCM-199 배양액으로 체외성숙을 유기한 후 체외수정용 배양액인 mTBM에 5~6시간 동안 체외수정을 유기한 결과는 Table 2와 같다. 각 처리구별로 정자침투율(77.6에서 89.4%)과 응성전핵형성률(87.9에서 95.8%)에 있어서는 유의적($P < 0.05$)인 차이가 인정되지 않았다. 그러나 20% O_2 조건 및 NCSU-23 배양액 처리구에서 다른 처리구에 비하여 다정자침투율과 평균침입정자수에서 각각 30.5%와 1.4개로서 유의적($P < 0.05$)인 차이가 인정되었다. 또한, 전체평균 측면에서 살펴보면 산소농도에 따른 차이는 인정되지 않았으며, 다정자침투율에 있어서 NCSU-23과 TCM-199 배양액간에는 각각 43.5%와 75.0%로서 NCSU-23 배양액에서 유의적($P < 0.05$)인 결과를 나타냈고, 평균 침입정자수에 있어서도 1.9개와 3.3개로서 NCSU-23 배양액이 유의적($P < 0.05$)으로 낮은 결과를 나타냈다. 따라서, 돼지 난포란의 성숙시 산소조건 및 체외 성숙용배양액으로는 산소 조건에 관계없이 NCSU-23 배양액이 적합한 것으로 생각된다.

Table 1. Effects of O_2 with different media on *in vitro* maturation of porcine immature oocytes

Culture conditions		Total no. of oocytes examined	No. of oocytes at the stage of ¹					Percentage of GVBD (Mean \pm SE)	Maturation rate (%) (Mean \pm SE)
O_2 (%)	Medium		GV	Pro I	Met I	A&T-I	M-II		
5	TCM-199	65	4	1	1	3	56	93.0 \pm 3.4	84.9 \pm 6.4
	NCSU-23	58	4	1	-	2	51	93.8 \pm 4.0	88.5 \pm 3.4
20	TCM-199	75	2	-	2	1	70	96.2 \pm 3.7	92.8 \pm 2.1
	NCSU-23	68	3	-	2	1	62	95.3 \pm 2.6	91.4 \pm 1.9
Overall total or means									
5		123	8	2	1	5	107	93.4 \pm 2.3	86.7 \pm 3.3
20		143	5	-	4	2	132	95.8 \pm 2.0	92.1 \pm 1.3
	TCM-199	140	6	1	3	4	126	94.7 \pm 2.3	88.9 \pm 3.4
	NCSU-23	126	7	1	2	3	113	94.5 \pm 2.1	90.0 \pm 1.8

¹ GV : germinal vesicle stage, Pro I : first prometaphase, Met I : first metaphase, Ana I : first anaphase, Tel I : first telophase, Met II : second metaphase.

Table 2. Effects of O₂ with different media during IVM on *in vitro* fertilization of porcine oocytes in mTBM

Culture conditions		No. of examined oocytes	% (mean±SE) of oocytes		Percentage of polyspermic oocytes (Mean±SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean±SE)
O ₂ (%)	Medium		penetrated	with male and female pronuclei		
5	TCM-199	54	89.4±5.2	93.2±0.4	74.0±5.2 ^a	3.8±0.6 ^a
	NCSU-23	50	88.3±0.4	95.8±2.1	56.5±0.3 ^{ab}	2.3±0.1 ^{ab}
20	TCM-199	49	84.5±7.9	87.9±7.2	76.0±7.1 ^a	2.7±0.4 ^{ab}
	NCSU-23	73	77.6±11.7	92.6±5.5	30.5±3.4 ^b	1.4±0.1 ^b
Overall total or means						
5		104	88.9±2.3	94.5±1.1	65.2±4.5 ^A	3.1±0.4 ^A
20		122	81.0±6.5	90.2±4.2	53.2±10.7 ^A	2.1±0.3 ^A
	TCM-199	103	87.0±4.4	90.5±3.4	75.0±3.9 ^A	3.3±0.4 ^A
	NCSU-23	123	83.0±5.7	94.2±2.7	43.5±6.0 ^B	1.9±0.2 ^B

^{a,b} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ (P<0.05).

^{A,B} Main effect means within columns with different superscripts differ (P<0.05).

Table 3. Effects of O₂ with different media during IVM on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Culture conditions		No. of oocytes inseminated	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% (mean±SE) of embryos developing to blastocysts		Total cell no. of blastocysts (Mean±SE)
O ₂ (%)	Medium			Day 6	Day 7	
5	TCM-199	185	52.6±7.3	6.5±1.4 ^{ab}	7.3±0.9 ^b	35.3±6.5 ^{ab}
	NCSU-23	216	52.0±6.0	11.7±1.1 ^a	12.0±1.3 ^{ab}	35.8±3.4 ^{ab}
20	TCM-199	195	58.2±7.7	4.4±0.6 ^b	7.2±0.7 ^b	28.7±5.1 ^b
	NCSU-23	222	55.4±6.8	11.9±1.4 ^a	13.2±1.3 ^a	37.7±3.6 ^a
Overall total or means						
5		401	52.3±4.3	9.1±1.2 ^A	9.6±1.1 ^A	35.6±3.0
20		417	56.8±4.8	8.1±1.5 ^A	10.2±1.3 ^A	34.4±3.0
	TCM-199	380	55.4±5.0	5.5±0.8 ^B	7.3±0.5 ^B	31.0±4.0
	NCSU-23	438	53.7±4.2	11.8±0.8 ^A	12.6±0.9 ^A	36.8±2.4

^{a,b} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ (P<0.05).

^{A,B} Main effect means within columns with different superscripts differ (P<0.05).

체외성숙사 산소조건과 배양액이 돼지 수정란의 배발달에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 처리구간 수정후 48시간에 조사한 난황률(52.0~58.2%)에는 유의적인 차이가 인정되지 않

았으나, 체외배발달 7일째 배반포기의 발달률에 있어서는 전체적으로 볼 때, 산소농도에 따른 차이는 없었으나, TCM-199과 NCSU-23 배양액에 따라서는 각각 7.3%와 12.6%로서 NCSU-23 처리구가

유의적($P < 0.05$)으로 높은 배반포기 도달률을 나타냈다. 또한, 처리구별 배반포기의 총세포수를 조사한 결과 전체적으로 산소조건 및 배양액간에는 유의적인 차이가 인정되지 않았으나, 20% O_2 및 NCSU-23 배양액 처리구에서 37.7 ± 3.6 개로서 유의적($P < 0.05$)으로 높은 세포수를 나타냈다.

따라서, 효과적으로 체외배발달을 유기하기 위한 체외성숙 조건은 20% O_2 조건 및 NCSU-23 배양액이 가장 적합한 것으로 사료된다.

체외성숙배양액이 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 관한 연구로서는 Wang 등(1997)이 NCSU-23, TCM-199 및 mWM 배양액으로 배양하였을 때, 체외성숙률 및 수정률에 있어서는 유의성이 인정되지 않았고, 배반포기 발달률(각각 30, 19 및 6%)과 총세포수(각각 36.8, 30.7 및 29.4개)에 있어서 NCSU-23 배양액이 유의적($P < 0.05$)으로 높은 것으로 보고하였다. Abeydeera 등(1998a)은 단백질급원이 배제된 PF-NCSU, PF-TCM 및 PF-WM 배양액에 체외성숙을 유도하였을 때, 체외성숙률이 45, 86 및 80%로서 다른 처리구에 비하여 PF-NCSU 배양액이 유의적으로 낮은 성숙률을, 체외수정후 정자침투율에 있어서도 각각 59.2, 70.1 및 70.9%로서 PF-NCSU 배양액이 유의적으로 낮은 침투율을 보고하여 연구자간에 상반된 실험결과를 보고하고 있다. 난포란의 이용에 있어서 체외성숙의 중요성은 핵성숙과 세포질성숙이 동시에 완성되어야 하고, 이어서 정상적인 체외수정과 배발달을 통하여 양호한 체외수정란을 생산하게 되는데, 돼지난포란의 체외성숙에 있어서는 세포질성숙이 불완전하여 낮은 응성전핵(MPN)형성률로 인하여 양호한 체외수정란의 생산에 저해요인이 되어 왔다(Nagai, 2001; Prather와 Day, 1998). 따라서, 성숙배양액에서 우혈청(FCS)의 배제(Funahashi와 Day, 1993; Naito 등, 1988), 난포액(PFF)의 첨가(Naito 등, 1988), cysteine 등과 같은 황화합물(thiol compound)의 첨가(Yoshida 등, 1993a), sorbitol과 taurine 등과 같은 organic osmolytes의 첨가(Funahashi 등, 1996) 및 NaCl의 농도 저하(Funahashi 등, 1994c) 등을 통하여 세포질 성숙을 유기하고자 하였다. 특히, 성숙배양액에 cysteine의 첨가는 세포내 glutathione(GSH)의 함량

을 증가시키고, 증가된 GSH는 난세포질내에서 'Redox state' 유지 및 난자내로 침입한 정자의 핵 단백질인 Protamine을 Histone으로 치환하여 응성 전핵을 형성하는데 관여한다. 또한, 이어지는 초기 배발달에도 긍정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Yoshida 등, 1993a).

한편, 산소농도가 체외배양체계에 미치는 영향에 관한 연구로서는 저분압의 산소조건이 양(Betterbed와 Wright, 1985; Wright 등, 1976)과 고양(Johnston 등, 1991)에서 초기배발달시 통계적인 배발달 차이가 인정되지 않았다는 보고와, 소에서 5 및 20%의 산소조건과 BRL세포와 공배양시에는 배반포기 발달률이 5 및 29%로서 20% 산소조건이 유의적으로 높아 산소농도는 체세포와 공동배양할 경우 영향을 미치지 않는다는 보고(Voelkel과 Hu, 1992)와는 일치하는 결과였다. 그러나 햄스터의 난자를 성숙시킬 때 5%의 산소농도가 유리하다는 Gwatkin과 Haidri(1974)의 보고와 마우스(Umaoka, 등, 1992; Pabon 등, 1989) 및 햄스터(Nakayama 등, 1994; Mckiernan과 Bavister, 1990)의 초기배발달시 저농도의 산소조건이 효율적이라는 보고와는 상반되는 결과였다. 또한, 산소분압과 체세포와의 공배양실험을 한 결과, 난관세포와 공배양시 배반포 발달률에 있어서 각각 31 및 12%로서 5% 산소조건이 유의적으로 높았으며, 산소조건을 5% 및 20%로 배양하였을 때 1mg/ml의 PVA 처리구에서는 5% 산소조건이 각각 23%와 2%로서 유의적으로 높은 배반포 발달률을 나타냈고, 5% 산소 및 10% FBS 병용첨가구가 37%로서 가장 높은 배반포 발달률을 보고하여 5% 산소조건이 소 초기배의 발달에 효과적이며, 또한 FBS와의 상승작용을 나타낸다고 하였고, 그리고 배반포기의 총세포수가 5% 산소조건이 20% 산소조건보다 평균 83.7 ~ 91.3개보다 107.6 ~ 113.1개로서 유의적으로 높은 성적을 보고하여 소에서 5% 산소조건은 배발달률 및 총세포수를 유의적으로 증가시켜준다고 한 보고(Lim 등, 1999) 등과도 합치점이 없는 결과였다. 그 외에 많은 연구자들이 대기중의 산소분압보다는 저분압 산소조건이 소 체외수정란의 배발달에 유리하다고 보고하여 본 실험과는 상반되는 결과를 나타냈다(Nakao와 Na-

katsuji, 1990; Wright 등, 1976; Tervit 등, 1972). 이상의 결과를 종합하여볼 때, 돼지난포란의 체외 성숙에 있어서는 NCSU-23배양액에 10% 돼지난포액 및 일정량의 cysteine을 첨가하여 20%의 산소조건하에서 성숙을 유도하고, 초기배발달은 5% CO₂ 및 20%의 O₂ 조건하에서 배양하는 것이 양호한 체외수정란을 생산하는 방법으로 사료된다.

적 요

본 연구는 돼지 난포란의 체외성숙에 적합한 배양액을 조사하고, 아울러 산소농도가 돼지 난포란을 이용한 체외수정란의 생산에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다. 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. NCSU-23과 TCM-199 배양액에 10% PFF를 첨가하여 5% 및 20% 산소조건하에서 체외 성숙을 유기한 결과, 배양액 및 산소조건에 따른 난핵포공비를 및 핵성숙률에는 유의적(P>0.05)인 차이가 없었다.
2. NCSU-23이 TCM-199 배양액보다 다정자침입률 및 평균정자침입률에 있어서 유의적으로 낮은 결과를 나타냈고(P>0.05), 5% 및 20% 산소농도에 따른 차이는 인정되지 않았다.
3. 체외수정을 실시한 후, 5% 및 20% 산소조건하에서 NCSU-23 배양액에서 배양하여 배발달에 미치는 영향을 조사한 결과, 배발달 7일째 배반포형성률에 있어서는 NCSU-23 처리구가 TCM-199 처리구에 비해서 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타냈다. 또한, 처리구별 배반포기의 총세포수를 조사한 결과 5% 및 20% 산소농도 사이에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 따라서, 효과적으로 돼지 난포란을 이용하여 체외배발달을 유기하기 위한 체외성숙조건은 20% 산소조건하의 NCSU-23 배양액이 적합한 것으로 사료된다.

참고문헌

Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS and Day

BN. 1998a. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol. Reprod., 58:1316-1320.

Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS and Day BN. 1998b. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. Mol. Reprod. Develop., 51:395-401.

Betterbed B and Wright RW Jr. 1985. Development of one-cell bovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. Theriogenology, 23:547-553.

Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Development of a rapid staining method of the oocytes from domestic animal. Kor. J. Anim. Sci., 33:25-31.

Cheng WTK, Polge C and Moor RM. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes. Theriogenology, 25:146(abstr.).

Edwards RG. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. Nature, 208:349-352.

Funahashi F, Kim NH, Stumpf TT, Cantley TC and Day BN. 1996. Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. Biol. Reprod., 54:1412-1419.

Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. Theriogenology, 39:965-973.

Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL and Day BN. 1994. Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. Biol. Reprod., 51:633-639.

- Gwatkin RBL and Haidri AA. 1974. Oxygen requirements for the maturation of hamster oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 37:127-129.
- Hinrichs K, Schmidl AL, Friedmann PP, Selgath JP and Martin MG. 1993. *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol. reprod.*, 48:363-370.
- Hunter RH and Polge C. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fert.*, 12:525-531.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:379-383.
- Johnson MH. and Nasr-Esfahani MH. 1993. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian-embryos *in vitro*? *BioEssays*, 16(1) 31-38.
- Johnston, LA, Donoghue AM, O'Brien SJ and Wildt DE. 1991. Influence of temperature and gas atmosphere on in-vitro fertilization and embryo development in domestic cats. *J. Reprod. Fert.*, 92:377-392.
- Li J and Foote RH. 1993. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. *J. Reprod. Fert.*, 98:163-167.
- Lim JM, Reggio BC, Godke RA and Hansel W. 1999. Development of *in-vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Human Reprod.*, 14(2):458-464.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1209.
- Mckiernan SH and Bavister BD. 1990. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 43:404-413.
- Motlik J and Fulka J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 36:235-237.
- Nagai T. 2001. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55:1291-1301.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1988. Effect of pig follicular fluid on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Gamete Research*, 21:289-295.
- Nakao H and Nakatsuji N. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 33:591-600.
- Nakayama T, Noda Y, Goto Y and Mori T. 1994. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology*, 41:499-510.
- Pabon JE, Findly WE and Gibbons WE. 1989. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fert. Steril.*, 51:896-900.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fert.*,(suppl.) 48:61-73.
- Pincus G and Enzmann EV. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 62:655-657.
- Prather RS and Day BN. 1998. Practical considerations for the *in vitro* production of pig embryos. *Theriogenology*, 49:23-32.
- SAS Institute. 1996. SAS/STAT[®] user's guide, release 6.12 edition. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. fert.*, 30:493-497.

- Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE and Tervit HR. 1990. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.*, 89:573-578.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K and Mori T. 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:28-33.
- Voelkel SA and Hu YX . 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology*, 37:1117-1131.
- Wang WH, Niwa K and Okuda K. 1991. *In-vitro* penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 84:585-591.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC and Day BN. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos or produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fert.*, 111: 101-108.
- Wright RW Jr, Anderson GB, Cupps PT and Drost M. 1976. Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst state. *Biol. Reprod.*, 14:157-162.
- Yoshida M, Ishigaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 88:1-8.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyū M and Pursel VG. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. Reprod.*, 49:89-94.
-
- (접수일: 2001. 8. 27/ 채택일: 2001. 11. 15)