

개의 발정주기가 난자의 체외성숙에 미치는 영향

김민규 · 김혜진 · 조종기 · 장 구 · 이규승¹ · 강성근 · 이병천[†] · 황우석
서울대학교 수의과대학

***In Vitro* Nuclear Maturation of Canine Oocytes Obtained from Different Stage of Estrus Cycle**

M. K. Kim, H. J. Kim, J. K. Cho, G. Jang, K. S. Lee¹, S. K. Kang,
B. C. Lee[†] and W. S. Hwang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

SUMMARY

The aim of these experiments was to investigate *in vitro* nuclear maturation of canine oocyte collected from various stages of estrus cycles. Ovaries were obtained from 1 to 4 year-old mongrel bitch and minced for oocyte collection in phosphate buffered saline with 100 iu penicillin-G ml⁻¹, 50 µg streptomycin sulphate ml⁻¹ and 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) were washed in HEPES buffered tissue culture medium (TCM)199 and *in vitro* matured in TCM-199 culture medium supplemented with sodium pyruvate 0.028mg/ml, L-glutamine 0.146mg/ml, penicillin G 10,000IU/ml, streptomycin 0.03mg/ml and 10% (v/v) fetal calf serum. COCs were *in vitro* matured for 48~72 hrs at 39°C in humidified 5% CO₂ in air atmosphere. *In vitro* matured oocytes were remove the cumulus cells using 0.2% (v/v) hyaluronidase. After denuding, oocyte were placed in acetic acid : methanol : chlorform solution (3:6 : 1.5 v/v) for 30 sec and acetic acid: ethanol(1:3 v/v) for 48hrs fixation. Nuclear maturation was classified to GV, GVBD, M I, M II and degenerate oocyte under microscopy after 1% aceto-orcein stain. *In vitro* maturation rates at 48hrs were not significantly difference among the oocytes collected from different stage of estrus at 15.9%, 16.3%, 23.7% and 18.2% for anestrus, proestrus, estrus and diestrus. However, the oocytes maturation(36.6%) of collected from estrus ovaries were significantly different from oocytes derived from proestrus, diestrus and anestrus ovaries(30.8%, 17.5% and 22.1%; p<0.05). The overall *in vitro* maturation rates were significantly higher (p<0.05) in 72hrs culture than 48hrs culture system. In summary, there was a tendency for higher *in vitro* maturation rates with the oocyte collected from estrus ovary than other stages of estrus. Also, for nuclear maturation, *in vitro* culture of oocyte for 72hrs was better than 48hrs culture.

서 론

개 난소에서 채취한 난자의 체외성숙은 다른 포유류에 비해 매우 낮아 체외수정 및 수정란 이식

이 논문은 서울대학교 수의과대학 수의과학연구소의 일부 지원에 의해 수행되었음.

¹ 충남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부(Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University)

[†] Correspondence : E-mail: firstlee@snu.ac.kr

등 관련연구에 효과적으로 이용할 수 없는 실정이다(Fastard, 2000). 개의 미성숙 난자의 체외성숙에 관한 연구에 의하면, 체외배양 48~72시간 후에 핵 성숙이 일어나지만 성숙율은 20% 내외로 매우 낮은 결과를 나타내었다(Nickson 등, 1993; Bolamba 등, 1998; Hewitt 등, 1998; Hewitt와 England, 1999; Saint-Dizier 등, 2001; Songsasen 등, 2002). 현재까지 개의 체외성숙에 관한 보고는 핵의 완전 성숙은 불과 20%에 미치지 못하고 있으며(Fastard, 2000) 체외성숙된 난자의 체외수정에 관한 연구보고도 제한된 실정이다(Yamada 등, 1992; Otoi 등, 2000; England 등, 2001). Yamada 등(1992)은 과배란처리한 개에서 회수한 60개의 난자를 체외수정 한 결과 15개의 초기 embryo를 얻었으며, Otoi 등(2000)은 217개의 체외수정란 중 단지 한 개만이 배반포로 발달하였다고 보고하였다. England 등(2001)은 체외성숙난자를 이용한 90개의 체외수정란을 1 또는 2세포기에 자궁에 이식하여 1두의 대리모에서 임신을 확인하였으나 임신 22일전에 유산되었다고 보고하였다. 개 난자의 성숙과 배란은 다른 포유동물과 달리 GV단계에서 배란되어 난관의 원위부에서 성숙이 이루어진다고 보고되어 있다(Pearson과 Enders, 1943; Holst와 Phemister, 1971; Phemister 등, 1973; Tsutsui, 1989). 배란된 개의 난자는 체내 또는 체외 모두에서 핵의 완전성숙이 일어나려면 적어도 48시간 이상이 요구되어(Mahi와 Yanagimachi, 1976; Tsutsui, 1989; Nickson 등, 1993) 마우스 보다 12~15시간, 소의 핵 성숙보다 24시간 이상이 더 필요하다. 최근 개의 발정주기가 난포란의 체외성숙에 많은 영향을 미친다는 보고(Yamada 등, 1992; Luvoni 등, 2001; Otoi 등, 2001)가 있었지만 개의 발정주기에 따른 체외성숙률의 상관관계는 상반된 보고(Cinone 등, 1992; Hewitt 등, 1998)가 있어 다양한 측면에서 고찰이 필요하다. 본 연구에서는 개의 발정주기에 따른 난포란의 체외성숙률의 차이를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 난소 및 난자의 회수

난소는 1~4년령의 잠종견에서 proestrus, estrus,

diestrus 및 anestrus 등 발정단계별 4군으로 구분 적출하여 실험에 공여하였다. 발정주기의 분류는 외부 생식기의 부종정도, 질 도말 후 세포검사법과 적출된 난소에 난포 및 황체의 존재 유무 그리고 자궁의 색조 등을 관찰하여 판정하였다. 회수된 난소는 38°C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 운반하였으며, 난자의 회수는 100 iu penicillin-G ml⁻¹, 50 µg streptomycin sulphate ml⁻¹과 0.1%(w/v) polyvinyl alcohol를 혼합한 PBS에서 면도날로 얇게 잘라 난포 밖으로 배출된 난자를 회수하였다. 난포란은 cumulus cell이 1~4층으로 둘러싸여 있고, 난포질이 균등한 색조를 지니는 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

2. In Vitro Maturation

회수한 난포란의 배양액으로는 sodium pyruvate 0.028mg/ml, L-glutamine 0.146mg/ml, penicillin G 10,000IU/ml, streptomycin 0.03mg/ml, 10% (v/v) FCS가 첨가된 TCM-199을 사용하였으며, 위의 배양액으로 3회 세정한 후 배양하였다. 배양액은 4-well dish에 500 µl씩 분주한 후 10~15개의 난자를 주입하여 39°C, 5% CO₂, 95% 공기인 배양기 내에서 각각 48시간과 72시간 동안 배양을 실시하였다.

3. 체외성숙 난자의 핵 분열상 평가

체외성숙 후의 핵상의 관찰은 배양후 48시간과 72시간 후에 0.2% hyaluronidase 용액으로 난구세포를 제거한 후 슬라이드에 정착시킨 후 세포질내 지방성분을 제거하기 위하여 acetic acid: methanol: chloroform 고정액(3:6:1.5 v/v/v)으로 약 30초간 처리한 후 acetic acid: ethanol(1:3)액으로 48시간 고정한 후 1% aceto-orcein 염색액으로 염색하여 독립 현미경하에서 관찰하였다. 핵의 형태에 따라 GV, GVBD, MI, MII 그리고 변성된 난자로 구분하여 관찰하였다(Table 1, Fig. 1).

4. 통계학적 분석

각 실험군간의 체외 성숙율의 유의성 검정은 general linear model을 적용한 LSD(least significant difference)를 이용하였다.

Table 1. Definition of meiotic classification of stained canine oocytes after IVM

Classification	Description
GV	Germinal vesicle(nuclear envelope) still intact; scattered chromatin
GVBD	Organization and condensation of chromatin into chromosome
M I	Aligment of chromosomes on meiotic spindle
M II	Meiotic division resulting in chromosome number reduction and expulsion of first polar body
Degenerate/Dead	Abnormal chromosomal configuration/ no visible chromatin material

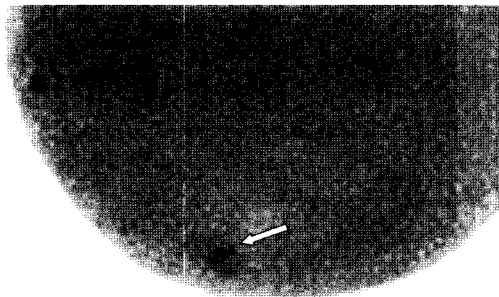


Fig. 1. Photograph of *in vitro* matured canine oocytes after aceto-orcein stain (white arrow: metaphase II plate, black arrow: polar body).

결 과

난자 공여에 사용한 13두에서 얻은 247개 oocyte의 48시간 체외배양 후 M II 기로의 체외성숙율은 결과는 발정주기 anestrus, proestrus, estrus, 및 diestrus로 구분하였을 때 각각 15.9%, 16.3%, 23.7%와 18.2%를 나타내어 발정단계에 따른 체외성숙율의 차이는 인정되지 않았다. 또한 14두의 개에서 얻은 278개의 oocyte를 72시간 배양한 후 각 번식주기별, anestrus, proestrus, estrus 및 diestrus의 M II 기 체외성숙율을 조사한 결과 각각 22.1%, 30.8%, 36.6%와 17.5%로 나타났다 (Table 2). 체외배양 72시간 후의 성숙율은 proestrus와 estrus기에

Table 2. *In vitro* nuclear maturation of canine oocytes collected from bitches at different stage of the estrous cycle and cultured for 48h or 72h

IVM	Stage of cycle	No. of dogs	No. of oocytes (%)					
			Examined	Germinal vesicle	Germinal vesicle breakdown	Meta-phase I	Meta-phase II	De-generated
48h	Anestrus	3	82	20 (24.4)	25 (30.5)	10 (12.1)	13 (15.9)	14 (17.1)
	Proestrus	4	67	14 (20.9)	32 (47.8)	6 (9.0)	11 (16.3)	4 (6.0)
	Estrus	2	76	12 (15.8)	30 (39.5)	10 (13.1)	18 (23.7)	6 (7.9)
	Diestrus	4	22	3 (13.6)	8 (36.4)	4 (18.2)	4 (18.2)	3 (13.6)
72h	Anestrus	2	104	19 (18.3)	39 (37.5)	12 (11.5)	23 (22.1) ^b	11 (10.6)
	Proestrus	4	52	6 (11.5)	12 (23.1)	12 (23.1)	16 (30.8) ^{ab}	6 (11.5)
	Estrus	3	82	10 (12.2)	18 (22.0)	14 (17.0)	30 (36.6) ^a	10 (12.2)
	Diestrus	5	40	6 (15.0)	17 (42.5)	5 (12.5)	7 (17.5) ^b	5 (12.5)

^{ab} Different superscripts in the same column differ significantly(p<0.05).

Table 3. Overall data of *in vitro* maturation of canine oocytes collected from bitches at different stage of the estrous cycle and cultured for 48h or 72h

IVM	No. of dogs	No. (%) of oocytes					
		Examined	Germinal vesicle	Germinal vesicle breakdown	Meta-phase I	Meta-phase II	Degenerated
48h	13	247	49 (19.8)	95 (38.5)	30 (12.1)	46 (18.6) ^a	27 (10.9)
72h	14	278	41 (14.7)	86 (30.9)	43 (15.5)	76 (27.3) ^b	32 (11.5)

^{ab} Different superscripts in the same column differ significantly($p < 0.05$).

anestrus와 diestrus에 비해 유의적으로 높은 성숙율을 나타내었다($p < 0.05$). 배양시간별 체외성숙율은 48시간 배양 후 보다 72시간 배양이 보다 좋은 결과를 나타낸 것으로($p < 0.05$) 보아 개의 체외성숙시간은 48시간 이상 실시하여야 한다고 판단되었다 (Table 3).

고찰

대부분의 포유동물은 M II로 성숙한 후 배란이 이루어지지만 개나 여우와 같은 개과 동물은 GV 상태로 배란된 후 GVBD, M I 단계까지는 짧은 기간에 성숙되지만 M II로의 성숙은 난관내에서 2~3일이 지난 후에 이루어진다(Holst 등, 1971; Mahi 등, 1976; Farstad 등, 1989; Yamada 등, 1993). 배란시 난구세포들은 oocyte 주위에 견고하게 몇 겹으로 부착되어 있으며, 정상적인 난포질은 다량의 지방을 함유하고 있어 매우 검고 균질하게 보인다. 개의 난구세포확장은 난자의 성숙이 완전히 이루어진 후에도 관찰되며, 난구세포는 수정 후 상실배에 이를 때까지 몇 겹으로 부착되어 있다(Renton, 1991). 개 난자의 체외성숙은 현재까지 매우 낮으며, 성숙율에 대한 보고도 매우 다양하게 알려져 있다. 최근 개의 난포란 체외성숙 비율을 보고한 바에 의하면 0~58%가 GV상태로 성숙하였고, 20% 내외의 체외성숙율을 나타내었다(Farstad, 2000). 현재까지 소나 돼지의 체외성숙 체계를 바탕으로 체외성숙율을 보고한 문헌들이 대부분이나 GV에서 M I으로의 성숙은 순조롭게 진행되나 M II의 발달은 대부분 정지되었다(Farstad, 2000).

Fulton 등(1998)은 OHE한 개의 난소에서 late preantral과 early antral follicle에서 얻은 213개의 난자 중 82개의 M II를 얻어 38.5%의 성숙율을 보고하였다. Luvoni 등(2001)은 late-proestrus에 얻은 난포란이 anestrus에 비해 높은 성숙율을 보였다고 보고하였으며, Hweitt(1998) 등은 96시간에서 48시간보다 체외성숙율이 높았다는 보고를 하였으며, Yamada 등(1992)도 배란을 유도한 개의 난소에서 얻은 배란전 난포란을 체외성숙 시킨결과 72시간 배양후 32%가 M II로 성숙하였다는 보고를 하여 본 연구의 esturs기의 난자를 72시간 체외배양한 결과와 유사하였다.

최근에는 난포란 회수시에 GVBD상태의 난자가 체외성숙율이 우수하다는 보고가 있었으며, 이는 난포가 형성된 난소를 주사침으로 채취하거나 blade로 난소를 얇게 자를 때 회수되어진다고 보고하였다(Luvoni 등, 2001). 본 연구에 이용된 proestrus와 esturs 상태의 난소 역시 육안으로 배란전 난포가 다수 관찰되었으며, 이들 발육단계의 난자는 모든 호르몬 상태가 기저상태인 anestrus기나 progesterone이 지배하는 diestrus기의 난자에 비해 이미 난소로부터 분비된 혹은 내분비 물질로부터 성숙에 필요한 자극을 받아 체외성숙시 높은 성숙율을 나타내었다고 사료된다.

적요

본 연구는 개 난자의 체외성숙을 높이기 위해 개의 발정주기가 체외성숙에 미치는 영향과 체외성숙율의 효율적 향상을 위해 실험을 실시하였

며, 다음의 결과를 얻었다.

1. Anestrus, proestrus, estrus와 diestrus의 발정주기로 구분하여 M II 로의 체외성숙율을 48시간과 72시간 배양후 관찰한 결과 각각 15.9%, 16.3%, 23.7%와 18.2%와 22.1%, 30.8%, 36.6%와 17.5%로 나타났다.
2. 각 발정주기별로 72시간 배양한 후의 성숙율은 estrus 및 proestrus기의 난자가 anestrus 난자보다 유의적으로 높은 값을 보였다($p < 0.05$).
3. 배양시간에 따른 체외성숙율은 72시간 배양한 성숙율이 48시간 배양 후보다 높은 결과를 나타내었다($p < 0.05$).

참고문헌

- Andersen AC and Simpson ME. 1973. Reproduction in the Beagle. In The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle). p 8 Geron-X, Inc., Los Altos, California.
- Archbald LF, Baker BA, Clooney LL and Godke RA. 1980. A surgical method for collecting canine embryos after induction of oestrus and ovulation with exogenous gonadotropins. Veterinary Medicine, Small Animal Clinician, 75: 228-238.
- Bolamba D, Borden-Russ KD and Durrant BS. 1998. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. Theriogenology, 49(5):933-942.
- Carolan C, Lonergan P, Monget P, Monniaux D and Mermillod P. 1996. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. Molecular Reproduction and Development, 43:477-483.
- Carson RS, Zhang Z, Hutchinson LA, Herington AC and Findlay JK. 1989. Growth factors in ovarian function. Journal of Reproduction and Fertility, 85:735-746.
- Concannon PW, McCann JP and Temple M. 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. Journal of Reproduction and Fertility Supplement, 39:3-25.
- Concannon, PW. 1993. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. Journal of Reproduction and Fertility, Supplement, 47:3-27.
- Concannon PW, Lasley B and Vanderlip S. 1997. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. Journal of Reproduction and Fertility Supplement, 51:41-54.
- England GCW, Verstegen JP and Hewitt DA. 2001. Pregnancy following *in vitro* fertilization of canine oocytes. The Veterinary Record., 148:20-22.
- Farstad W. 2000. Assisted Reproductive Technology in Canid Species. Theriogenology, 53:175-186.
- Feldman E and Nelson R. 1996. Canine female reproduction. In canine and feline endocrinology and reproduction pp 526-546 WB Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Forsberg M, Linde-Forsberg C, Karlsson A and Carlsson MA. 1993. Progesterone and oestradiol in canine plasma monitored by enhanced luminescence immunoassays. Journal of Reproduction and Fertility Supplement, 47:127-132.
- Frank-Vaillant M, Haccard O, Ozon R and Jessus C. 2001. Interplay between cdc2 kinase and the c-mos/MAPK pathway between metaphase I and metaphase II in *Xenopus* oocytes. Developmental Biology, 231:279-288.
- Fulton RM, Keskinetepe L, Durrant BS and Fayrer-Hosken RA. 1998. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for the treatment of canine infertility. Theriogenology, 48:366.
- Furnus CC, DeMatos DG and Moses DF. 1998. Cumulus expansion during *in vitro* maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent

- embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 51:76-83.
- Hewitt DA. 1997. Oocyte maturation and fertilization in the bitch; the use of *in vitro* culture. Ph.D. thesis. University of London.
- Hewitt DA and England GCW. 1998. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 49:957-996.
- Hewitt DA and England GCW. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 55:63-75.
- Holst PA and Phemister RD. 1971. The Prenatal Development of the Dog: Preimplantation Events. *Biology of Reproduction*, 5:194-206.
- Jalkanen L and Lindeberg H. 1998. Successful embryo transfer in the silver fox. *Animal Reproduction Science*, 54:139-147.
- Kalab P, Srsen V, Farstad W, Krogenaes A, Motlik J, Hafne A-L. 1997. MAP Kinase activation and RAF-1 synthesis in Blue fox oocytes is controlled by cumulus granulosa cells. *Theriogenology*, 47:400 abstract.
- Kraemer DC, Kinney GM and Schriver MD. 1982. Embryo transfer in dogs and cats. 2nd International Congress of Embryo Transfer in Mammals proceedings, pp 223-233.
- Kraemer DC, Flow BL, Schriver MD, Kinney GM and Pennycook JW. 1979. Embryo Transfer in the non-human primate, feline and canine. *Theriogenology*, 11:51-62.
- Liu L, Willingham LA, Williams J, Hanna C, Rugila JN, Kraemer, DC, Westhusin ME. Parthenogenetic activation of canine oocytes matured *in vivo* and *in vitro* (unpublished data (a)) Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas.
- Luvoni GC, Luciano AM, Modina S and Gandolfi F. 2001. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 57:141-146.
- Mahi CA and Yanagimachi R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*, 196:189-196.
- Metcalf SS. 1999. Assisted reproduction in the bitch. Masters thesis, Monash University, Victoria, Australia.
- Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJA and Renton JP. 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47:231-240.
- Olson PN, Bowen RA, Behrendg MD, Olson JD and Nett TM. 1982. Concentrations of Reproductive Hormones in Canine Serum Throughout Late Anestrus, Proestrus and Estrus. *Biology of Reproduction*, 27:1196-1206.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A and Suzuki T. 1999. Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 11:387-390.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A and Suzuki T. 2000. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*, 54:535-542.
- Otoi T, Murakami M, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Une S and Suzuki T. 2000. Development of canine oocytes matured and fertilised *in vitro*. *Vet. Rec.*, 146:52-53.
- Songsasen N, Yu I and Leibo SP. 2002. Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media Department of Biological Sciences, University of New Orleans; Audubon Center for Research of Endangered Species, New Orleans, Louisiana.
- Szabo PC. 1967. Ultrastructure of Developing Dog

- Oocytes. *Anatomical Record*, 157:330.
- Tesoriero JV. 1981. Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *Journal of Morphology*, 168:171-179.
- Tian J, Kim S, Heilig E and Ruderman J. 2000. Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97 (26):14358-14363.
- Verstegen JP, Onclin K, Silva LDM and Concannon PW. 1999. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology*, 51:597-611.
- Westhusin ME, Burghardt RC, Rugila JN, Willingham LA, Liu L, Shin T, Howe LM and Kraemer DC. 2001. Potential for cloning dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57:287-293.
- Whitaker M. 1996. Control of meiotic arrest. *Reviews of Reproduction*, 1:127-135.
- Wildt DE, Panko, WB, Charkraborty, PK and Seager SWJ. 1979. Relationship of Serum Estrone, Estradiol-17 and Progesterone to LH, Sexual Behavior and Time of Ovulation in the Bitch. *Biology of Reproduction*, 20:648-658.
- Willingham LA and Kraemer DC. 2000. Effects of progesterone supplementation on the resumption of meiosis of canine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 55(1):498 abstract.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawaji M, Nakazawa M, Naito K & Toyoda Y. 1992. Maturation, fertilization and development of dog oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 46:853-858.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K and Toyoda Y. 1993. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47:227-229.

(접수일: 2002. 8. 1/ 채택일: 2002. 8. 20)