

## 체외성숙 시간이 한우 수정란 생산에 미치는 영향

박용수 · 최수호 · 한진철<sup>1</sup> · 박홍대<sup>1</sup> · 변명대<sup>† 2</sup>

경상북도 축산기술연구소

## Effects of Maturation Time on *In-vitro* Production of Korean Native Cow Embryos

Park, Y. S., S. H. Choi, J. C. Han<sup>1</sup>, H. D. Park<sup>1</sup> and M. D. Byun<sup>† 2</sup>

Kyoungbook Livestock Research Institute

### ABSTRACT

The present study was performed to investigate the first polar body(PB) extrusion during *in-vitro* maturation(IVM) and to examine the effect of different maturation time on the embryo development of Korean Native Cows(KNC) with regard to blastocyst(BL) cell numbers and pregnancy rates. PB extrusion did not take place for the first 12 hours(hr) of IVM, and most of KNC oocytes extruded PB from 14 to 20 hr after the onset of maturation. There was no significant difference in cleavage and 8-cell stage rates among the treatment groups, but BL and BL/8-cell rates were significantly higher( $P<0.05$ ) in 18 hr maturation group( $31.0\pm 5.7$  and  $82.0\pm 5.1\%$ ) than 22 and 24 hr maturation group. The proportion of BL formed on day 7 and 8 was significantly higher( $P<0.05$ ) in 18 hr maturation group(85%) than in 24 hr maturation group(55%). There was a significant difference( $P<0.05$ ) in inner cell mass, trophoctoderm and total cell number between day 7 BL produced by *in-vivo* and IVM 18 hr and day 8 BL produced by IVM 18 hr and 24 hr. Pregnancy rates are also significantly higher( $P<0.05$ ) in *in-vivo*(56.3%) and IVM 18 hr day 7(50.0%) group than day 8 treatment groups(18 hr: 16.7%, 24 hr: 10.5%). These results suggest that KNC oocytes achieve developmental competency within 20 hr of IVM, and "short" IVM (18 hr) is more effective than "long" IVM(24 hr) in embryo development rates, BL cell numbers and pregnancy rates.

(Key words : *In vitro* maturation, Polar body, Cell number, Pregnancy rate)

### I. 서론

체외 성숙 유래의 소 난포란을 이용하여 송아지를 생산(Brackett 등, 1982)한 이후 소 배반포의 체

외 생산에 관하여 많은 연구가 행해졌지만, 그 생산율은 10~30%로 저조할 뿐만 아니라 결과의 재현성도 그다지 높지 않다(Fukui, 1990; Dominko와 First, 1997). 이러한 이유는 체외에서 난포란의 부

<sup>†</sup> Corresponding author : Myung Dae Byun, Ph.D. College of Vet. Med., Kyungbook National University  
Tel : (053)950-5971.

<sup>1</sup> 대구대학교 생물학과 (Department of Biotechnology, Daegu University).

<sup>2</sup> 경북대학교 수의과대학 (College of Vet. Med., Kyungbook National University).

적절한 성숙조건(Ward 등, 2002)이라고 생각하며, 체외생산을 향상시키기 위해서는 체외성숙 조건의 확립과 확실한 체외수정 및 배양 방법의 조건을 설정하지 않으면 안된다(Nagai, 2001).

소 난포란의 핵은 meiosis I 전기에 머물러 있다가 난포로부터의 분리 또는 체외성숙 배양액으로 이동시 자발적으로 감수분열을 개시하여 meiosis II 중기로 진행하며(Eppig 등, 1992), 이러한 현상은 적합한 체외성숙 조건이라면 90% 이상 일어날 수 있지만(Motlik, 1989), 그 조건에 따라서 결과는 상이하다. 특히 도살장으로부터 난소 운반시간 및 온도(Yang 등, 1990), 체외성숙 시간(Dominko와 First, 1997; Ward 등, 2002), 난포의 크기(Blondin과 Sirard, 1995; Pavlok 등, 1992), 난포란의 발육 단계(Hagemann 등, 1999), 배양액 조성(Fukuda 등, 1990), 호르몬(Zuelke와 Brackett, 1990) 및 무혈청 배양액(Gardner, 1994; Avery 등, 1998) 등의 많은 요인들이 영향을 미친다.

한편, 배반포로의 체외 발달을 높이기 위해서는 난자의 수정 후 빠른 난할이 필요하다(Lonergan 등, 1999). 그러나 이러한 난자의 발달 능력에 관한 기전은 아직까지 어떤 종에서도 밝혀지지 않았으나(Dominko와 First, 1997), 난포란이 성숙하는 동안에 일어나는 많은 구조적 또는 분자학적 변화들이 수정 및 배발생 능력과 밀접한 관계가 있을 것이다(Hyttel 등, 1997). 그러므로 체외에서 난포란의 완전한 발달 능력을 획득하고 배반포로의 발달을 높이기 위해서는 적절한 체외성숙 조건이 필수적이다.

따라서 본 연구는 한우 배반포의 체외생산에 있어서 난포란의 체외성숙 시간이 핵성숙과 초기배발달에 미치는 효과를 검토하였으며, 또한 체내 및 체외 생산된 배반포를 수란우에 이식함으로써 생산된 배반포의 품질을 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 배양액

본 연구에 사용된 배양액 중 난소로부터 난포란의 세척 및 회수용은 25 mM HEPES와 3 mg/ml

BSA (Sigma, A6003)가 첨가된 Hepes-buffered TALP (HbT)용액, 체외성숙용은 0.2 mg/ml pyruvate (Sigma, P3662), 10% FBS (Sigma, F0643), 1  $\mu$ g/ml FSH (Sigma, F8174), 10  $\mu$ g/ml LH (Sigma, L9773), 1  $\mu$ g/ml Estradiol-17  $\beta$  (Sigma, E2758)가 각각 첨가된 TCM-199 (Gibco, 12340-030)용액, 체외수정용은 6 mg/ml BSA와 10  $\mu$ g/ml heparin (Sigma, H3149)이 첨가된 TALP용액, 체외배양용은 3 mg/ml BSA 그리고/또는 10% FBS가 첨가된 CR1aa용액을 각각 이용하였다. 그리고 실험에 제공되는 배양액의 미세소적은 mineral oil (Sigma, M8410)을 도포하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 최소한 4시간 이상 전 배양하였다.

### 2. 난포란의 회수 및 체외성숙

도축 한우에서 난소를 적출하여 25  $\mu$ g/ml gentamycin (Sigma, G1264)이 첨가된 0.9% 생리식염수 (25~28°C)가 들어있는 보온병에 담아 6~7시간에 실험실로 운반하였다. 수집된 난소는 penicillin G (Sigma, P3032)가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하여, 18 G 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2~8 mm의 가시난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 실험현미경하에서 난구세포의 부착상태가 치밀한 것만을 선별하여, 50  $\mu$ l의 체외성숙용 배지에 15개 난포란을 옮겨 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

### 3. 체외수정

체외수정용 정자의 준비는 Parrish 등(1995)의 방법에 준하여 행하였다. 한우 동결정액 1~2개를 실온에서 10초간, 37°C의 항온수조에서 30초간 처리하여 용해한 후 90% percoll (Sigma, P4937) 2 ml 용액이 담겨져 있는 15 ml 원심분리관(Coming, 4300 52)에 살며시 놓은 후 700 g에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하여, 2 ml의 신선 체외수정용액으로 350 g에서 다시 10분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 정자 농도는  $25 \times 10^6$  sperms/ml가 되도록 조절하여, 난포란이 함유되어져 있는 46  $\mu$ l의 체외수정용액에

heparin 2 $\mu$ l와 정자 2 $\mu$ l를 첨가, 최종 정자농도  $1 \times 10^6$  sperms/ml가 되도록 조정하고 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

#### 4. 체외배양

체외수정 20시간 후 15개의 수정란(배양 1일)을 3mg/ml BSA가 첨가된 CR1aa 용액 50  $\mu$ l에 넣고, 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며, 배양 3일째부터 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액으로 난관상피세포와 공배양을 행하였으며(Pegeraro 등, 1998), 배양 5일 및 7일째에 50%씩 신선 배양액으로 교환하였다.

#### 5. 난관상피세포

도축 한우의 난관을 4 $^{\circ}$ C 상태로 운반한 후 난관 주위의 다른 조직을 제거하여 TCM199용액으로 3회 세척하였다. 그리고 난관의 양쪽 끝 부분을 자른 후 난관 점막조직을 유리관의 끝으로 압착하여 분리하였다. 회수된 점막조직은 5 ml TCM199용액으로 550 g에서 5분간 2회 세척하였다. 침강된 조직을 다시 5 ml의 TCM199용액에 혼합하여 끝이 잘 마모된 20 G 주사침이 부착된 5 ml 주사기를 이용하여 반복 흡입함으로써 세포괴를 단일세포로 분리한 후 4-well dish (Nunc, 176740)에 500  $\mu$ l씩 분주하여 48시간동안 10% FBS가 첨가된 TCM199용액으로 배양하였다. 배양 후 아주 작은 vesicle를 형성한 상피세포를 CR1aa용액으로 세척한 후 40~50개씩 50  $\mu$ l의 신선 배양액에 넣었다.

#### 6. 체내 수정란 회수

선발된 공란우의 과배란 처리는 발정 확인일을 0일로 하여 10일째부터 12시간 간격으로 4일간(8회) 50 mg의 FSH (Falltropin-V, Veterpharm, Canada)를 근육주사하였다. 발정은 FSH 주사 후 48시간째에 PGF<sub>2a</sub> (Lutalyse, Upjohn) 25 mg을 근육주사 함으로써 유도하였다. 그리고 인공수정은 발정관찰 없이 PGF<sub>2a</sub> 주사 후 48 및 60시간째에 2회 실시하였다. 인공수정 후 7일째에 비외과적 관류법으로 수정란을 회수하였다. 2% lidocaine (광명약품)을

제 1~3미추 사이에 6~10 ml 주사하여 경막외마취를 행하였고, 자궁각에 foley catheter (FHK, Nipro)를 고정시킨 후 2% FBS가 첨가된 D-PBS (Sigma, D5773)로 자궁관류하여 배반포를 회수하였다.

#### 7. Polar Body(PB) 관찰

체외성숙 0, 6, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24시간째에 확장된 cumulus oocyte complexes (COCs)를 0.03% hyaluronidase (Sigma, H4272)함유 PBS용액으로 5분간 vortex하여 난구세포를 제거하고 first polar body (PB) 출현을 조사하였다.

#### 8. 배반포의 이중형광염색

배양 7, 8일째에 배반포의 세포수를 측정하기 위하여 propidium iodide (Sigma, P4170; PI)와 bisBenzimide (Sigma, B2261)를 사용하여 이중형광염색을 실시하였다 (Giles 등, 1995). 배반포의 투명대를 0.5% pronase (Sigma, P6911) 용액으로 처리하여 용해시킨 후, HbT로 3~5회 세척하였다. 그리고 rabbit anti-bovine whole serum (Sigma, B8270)이 1:5로 희석된 HbT 용액에서 1시간 배양한 후, HbT용액에 1:10으로 희석된 guinea pig complement (Sigma, S-1639; PI와 bisbenzimidate 각각 4  $\mu$ g/ml 첨가)에서 1시간 처리하여 염색을 행하였다. 배반포를 HbT로 5분간 세척한 후, slide glass에 whole mount하여 형광현미경하에서 배반포의 inner cell mass (ICM)와 trophectoderm (TE)의 세포 수를 각각 조사하였다.

#### 9. 수정란이식 및 임신진단

수정란이식은 정상 발정주기의 7일째의 것을 수란우로 선정하여, 일반적인 방법에 준하여 황체가 존재하는 쪽의 자궁각 선단부에 배반포를 주입하였고, 임신진단은 이식 후 60일경에 직장검사법으로 행하였다.

#### 10. 통계처리

실험결과에 대한 통계학적 분석은 SAS (package ver 8.1)를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리

간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였으며, 수태율은  $\chi^2$ -test를 이용하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 체외성숙 시간에 따른 PB 출현율

한우 난포란의 체외성숙 후 PB 출현에 소요되는 시간을 조사한 결과는 Fig. 1에 나타났다. 체외성숙 후 12시간째까지는 PB의 출현이 인정되지 않았다. 그러나 14, 16, 18, 20, 22 및 24시간째에 각각 8.7±1.0%, 37.0±2.5%, 44.8±3.1%, 63.8±6.0%, 68.3±3.5% 및 74.5±3.2%가 출현하였다. 이 결과로부터 PB는 배양 20시간(55.1%) 이전에 대부분이

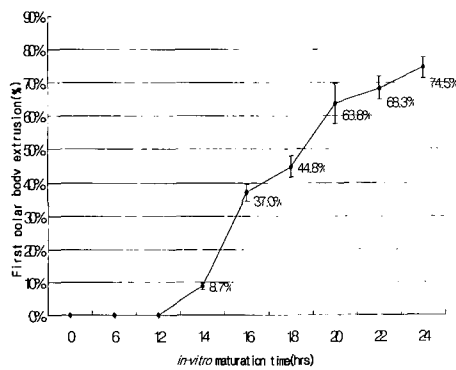


Fig. 1. The percentages of oocytes that had extruded the first polar body at different *in vitro* maturation times of Korean Native Cow oocytes.

출현하였고, 20시간 이후에는 그 출현율이 감소하였다.

#### 2. 체외성숙 시간에 따른 배발달율

체외성숙 시간이 배발달율에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 1에 나타났다. 체외성숙 16, 18, 20, 22 및 24시간에 따른 수정율( $\geq 2$ -cell)과 8세포기까지의 배 발달율은 각 군간에 유의적인 차이는 없었으나, 수정율은 체외성숙 20시간군(71.0±1.6%), 8세포기까지 배 발달율은 체외성숙 18시간군에서 37.3±5.3%로 높은 경향을 보였다. 한편 배반포까지 및 8세포기 배부터 배반포까지의 배 발달율은 체외성숙 18시간군에서 각각 31.0±5.7% 및 82.0±5.1%로 가장 높았으며, 특히 체외성숙 22시간(17.3±2.3% 및 67.8±8.6%)과 24시간군(16.5±1.7% 및 59.5±8.1%)에 비하여 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았다.

#### 3. 체외성숙 시간에 따른 배반포 형성시기

체외성숙 시간이 배반포 형성시기에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 2에 나타났다. 체외성숙 18시간군에서 배양 7, 8 및 9일째에 각각 33.8±10.0, 51.5±10.6 및 14.5±9.5%의 배반포가 형성되었으며, 24시간군에서는 각각 19.3±11.4, 35.3±11.0 및 45.3±7.7%가 형성되었다. 특히 체외성숙 18시간군은 배양 8일째, 체외성숙 24시간군은 배양 9일째에 유의적( $P < 0.05$ )으로 많은 배반포가 형성되었다. 즉 18시간군이 배양 7일과 8일에 86%의 배반포가 형성되었으며, 이것은 24시간군(55%)의

Table 1. Effect of maturation time on *in vitro* development of Korean Native Cow oocytes

Maturation time(hr)	No. of examined oocytes	No. (%) of embryos developed to			
		$\geq 2$ -cell	8-cell	Blastocyst	Blastocyst/8-cell
16	200	135(68.0±4.7)	55(29.8±7.4)	40(20.7±6.3) <sup>ab</sup>	40/55(62.5±12.8) <sup>a</sup>
18	230	156(66.5±9.3)	88(37.3±5.3)	72(31.0±5.7) <sup>b</sup>	72/88(82.0±5.1) <sup>b</sup>
20	261	180(71.0±1.6)	76(29.5±2.4)	54(20.5±0.3) <sup>ab</sup>	54/76(71.3±5.7) <sup>ab</sup>
22	217	137(63.8±1.9)	53(25.3±1.0)	33(17.3±2.3) <sup>a</sup>	33/53(67.8±8.6) <sup>a</sup>
24	235	160(69.3±4.5)	53(28.5±3.4)	33(16.5±1.7) <sup>a</sup>	33/53(59.5±8.1) <sup>a</sup>

<sup>ab</sup>Values in the same column with different superscripts are significantly different( $P < 0.05$ ).

**Table 2. Effect of maturation time on blastocyst formation of Korean Native Cow oocytes**

Maturation time(hr)	No. (%) of examined blastocysts	No. (%) of blastocyst produced on		
		Day 7	Day 8	Day 9
18	72	24(33.8±10.0) <sup>z</sup>	37(51.5±10.6) <sup>z</sup>	11(14.5±9.5) <sup>al</sup>
24	33	6(19.3±11.4) <sup>l</sup>	12(35.3±11.0) <sup>lz</sup>	15(45.3±7.7) <sup>bz</sup>

<sup>ab</sup> Values in the same column with different superscripts are significantly different(P<0.05).

<sup>123</sup> Values in the same row with different superscripts are significantly different(P<0.05).

**Table 3. Inner cell mass(ICM), trophoctoderm(TE) and total cell numbers and proportion of Korean Native Cow blastocyst obtained from *in-vivo* and *in-vitro* matured 18hr or 24hr**

Type of development	Maturation time(hr)	Blastocyst formation (day)	No. of examined blastocyst	No. (%) of cells		
				Total	ICM	TE
<i>in-vivo</i>		7	12	127.5±1.6(100) <sup>d</sup>	40.0±3.8(31) <sup>c</sup>	87.5±3.5(69) <sup>cd</sup>
<i>in-vitro</i>	18	7	20	129.8±7.3(100) <sup>d</sup>	33.4±2.7(26) <sup>bc</sup>	96.5±6.4(74) <sup>d</sup>
		8	16	96.5±4.9(100) <sup>b</sup>	25.8±3.4(27) <sup>ab</sup>	70.7±3.8(73) <sup>ab</sup>
	24	7	19	112.2±4.0(100) <sup>c</sup>	32.1±2.8(29) <sup>b</sup>	80.1±3.6(71) <sup>bc</sup>
		8	9	82.4±3.4(100) <sup>a</sup>	21.5±2.1(26) <sup>a</sup>	60.9±3.2(74) <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Values in the same column with different superscripts are significantly different(P<0.05).

배반포 형성률에 비하여 유의적(P<0.05)으로 높았다.

(P<0.05)으로 높았다.

#### 4. 배반포의 세포수

형성된 배반포의 품질을 평가하기 위하여 이중형광염색으로 배반포의 세포수를 측정된 결과는 Table 3에 나타났다. 총 세포수는 체내 생산군(127.5±1.6)과 체외성숙 18시간, 배양 7일째군(129.8±7.3)의 것이 비슷하였으며, 이것은 다른 처리군에 비하여 총 세포수가 유의적(P<0.05)으로 많았다. 한편, ICM 세포수는 체내 생산군(40.0±3.8)이 다른 처리군에 비하여 많았으며, 체외성숙 18시간, 배양 8일째군(25.8±3.4)과 체외성숙 24시간, 배양 7일째군(32.1±2.8)과 8일째군(21.5±2.1)에 비하여 유의적(P<0.05)으로 많았다. 그리고 TE 세포수는 체외성숙 18시간, 배양 7일째군(97.6±29.6)에 생산된 것과 체내 생산된(87.5±3.5)것이 비슷했으며, 특히 배양 8일째군(체외성숙 18시간 70.7±3.8 및 24시간 60.9±3.2)의 것과 비교하여 유의적

#### 5. 수태율

여러 조건하에서 생산된 한우 배반포를 젖소 수란우에 이식하여 수태율을 검토한 결과는 Table 4에 나타났다. 체내에서 생산된 배반포에서 수태율(56.3%)이 가장 높았지만, 체외성숙 18시간, 배양 7일째군(50.0%)과는 비슷하였다. 그러나 배양 8일째군(체외성숙 18시간 16.7% 및 24시간 10.5%)의 수태율과 유의적(P<0.05)인 차이가 있었다. 즉 체내·외 배양 7 또는 8일째에 형성된 배반포의 수태율은 처리군 간에 유의적인 차이가 없었으나, 체외성숙 처리군 내에서는 배양 7일째 것이 8일째 것보다 유의적(P<0.05)으로 높았다.

#### IV. 고찰

본 실험은 체외에서 한우 난포란의 핵성숙과 그 후의 초기 배발달에 있어서 체외성숙시간이 PB 출

**Table 4. Pregnancy rates of Holstein cows following transfer of *in-vivo* and *in-vitro* produced KNC embryos**

Type of development	Maturation time (hr)	Blastocyst formation (day)	No. of recipients	No. (%) of pregnancy
<i>in-vivo</i>		7	16	9(56.3) <sup>b</sup>
<i>in-vitro</i>	18	7	18	9(50.0) <sup>b</sup>
		8	18	3(16.7) <sup>a</sup>
	24	7	30	9(30.0) <sup>ab</sup>
		8	19	2(10.5) <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Values in the same column with different superscripts are significantly different(P<0.05).

현을, 배 발달을, 배반포의 세포수와 수태율에 미치는 영향을 검토하였다.

체내에서 PB 출현 시간은 Kruij등 (1983)이 LH surge 후 19~25시간이라고 하였으며, 체외에서는 Greve 등(1983)과 Suss 등 (1988)이 체외성숙 12~48시간째까지 PB가 출현한다고 하였다. Dominko와 First (1997)는 체외성숙 16시간째 37%, 20시간째 76% 및 24시간째 90%, 즉 체외성숙 시간의 경과와 더불어 PB 출현율도 상승한다고 보고하였다. 그리고 Westerlaken 등(1994)은 체외성숙 12시간에는 PB의 출현이 없었으나, 12시간에서 16시간에 PB의 출현이 급격히 증가하였고, Lonergan 등 (1997)은 체외성숙 16시간째 50%, 20시간째 80%의 PB 출현율을 보고하였다. 한편, Khatir 등(1998)은 소의 연령에 따라 PB 출현율에 차이가 있었고, Dominko와 First(1997) 및 Suss 등(1988)은 체외성숙 배양액에 호르몬의 첨가에 따라 PB 출현율에 차이가 있다고 하였다. 본 실험(Fig. 1) 결과도 전체 PB 출현율은 75% 정도로 상기의 연구들과 비슷하였으며, 체외성숙 시간의 증가와 함께 PB 출현율이 증가하였고, 본 실험의 배양조건에서 핵성숙에 소요되는 시간은 체외성숙 18~20시간 전후인 것으로 판단된다.

한편 소 난자의 체외발달에 있어서 Semple 등 (1993)과 Dominko와 First (1997)는 14~16시간의 체외성숙이 수정을 및 배반포까지의 발달이 24시간보다 높았다고 보고하여 본 실험(Table 1)과 거의 비슷한 경향이였다. 그러나 Ward 등(2002)과 Monghan 등(1993)은 체외성숙 24시간에서 가장

높았고, Prokofiev 등(1992)은 체외성숙 시간에 따른 배 발달율의 차이가 없었다. 이와 같은 원인은 불분명하지만, 본 실험과 Dminko와 First (1997)는 LH와 FSH 등의 호르몬을 첨가하였으나, Ward 등 (2002)과 Monghan 등(1993)의 실험에서는 미첨가하였다. 따라서 체외성숙용 배지에 호르몬의 첨가는 난포란의 핵성숙과 배발달에 결정적인 영향을 미치고(Brackett 등, 1989), 난자의 체외성숙과정이 길어질 경우(17hr 이후)에 수정된 난자에서 chromatin decondensation과 sperm aster 형성이 지연된다는 보고(Long 등, 1994)와 같이 체외성숙 시간이 길어지면 난자의 노화 가능성을 조래하며, 이것은 난자의 배발달에 악영향을 미친다는 Long 등 (1994)과 Hunter와 Greve (1997)의 견해를 본 실험 결과(체외성숙 18시간군)에서 확인하였다.

이상의 결과에서 난포란의 체외성숙 및 발달에는 많은 조건들이 영향을 미치고 특히, PB 출현이 높을수록 난포란의 성숙 및 발달율이 높은 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구 결과 체외성숙 과정에서 총 PB 출현율보다는 PB 출현 시간대와 발달 능력 사이에 관련이 있는 것으로 판단된다. 이것은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 체외성숙 20시간 이후부터는 PB의 출현이 거의 없었다. 따라서 이 시간 이후부터 체외성숙 배양액에서 난포란은 노화현상을 일으키며, 체외성숙 시간의 경과와 더불어 난구 세포로부터 생산된 물질 중 유해물질이 축적되거나 난자 내부로 재 흡수되고, 이들의 영향으로 난자에 스트레스가 가해져 배 발달율이 저하되는 것으로 사료된다.

한편, 체외에서 빠른 발달을 나타내는 난자가 상실배나 배반포로 발달율이 높다는 것을 많은 연구에서 확인되었으며(Van Soom 등, 1992; Kubisch 등, 1998), 특히 체외에서 빨리 형성된 배반포의 품질이 체내 생산 배반포의 품질과 비슷하다(Lone-rgan 등, 1999)고 하였고, 본 실험 결과에서도 체외 성숙 시간에 따른 배반포 형성시기는 체외성숙 18 시간군이 유의적( $P < 0.05$ )으로 빨랐으며(Table 2), 빨리 형성된 배반포에서 많은 세포수(Table 3)와 높은 수태율(Table 4)을 기록하였다.

배반포의 세포수는 배반포 품질과 배양체계에 대한 유용한 판단 지표로 이용되어져 왔다(Papaio-annou와 Ebert, 1988). Du 등(1996)은 체내·외에서 생산된 부화배반포의 총세포수(체외  $224 \pm 12$  및 체내  $255 \pm 14$ )는 차이가 없었으나, ICM 세포수는 체내의 것이 더 많았고(체외  $84 \pm 8$ ; 37% 및 체내  $118 \pm 8$ ; 46%), Jurisicova 등(1998)과 Brison과 Schultz (1997)는 체내 배반포가 체외 배반포에 비하여 많은 세포수를 가지고 있음을 보고하였다. Pegeraro 등(1998) 및 Van Soom 등(1997)은 체외배양 7일째에 생산된 배반포의 ICM, TE와 총세포수가 배양 8일째의 것보다 많았다고 하였다. 한편, 본 실험 결과 세포수 측면에서 체내 배반포와 체외성숙 18 시간, 배양 7일째에 형성된 배반포가 비슷한 품질을 보였으며, 이들 배반포의 이식 후 높은 수태율(Table 4)을 기록하여 체외성숙 및 배양시간과 생산된 배반포의 세포수와 수태율 사이에 밀접한 관계가 있음을 확인하였다.

지난 10년간 체외에서 생산된 배반포의 수태율이 평균  $30 \pm 10\%$  정도라고 하였다(Peterson과 Lee, 2003). Hasler 등(1995)은 체내 배반포 66%, 체외 배양 7일째 56% 및 8일째 43%의 수태율을 보고하였고, Enright 등(2000)은 체내 45.3%와 체외배양 7일째 37.5%의 수태율을 보고하였다. 그러나 Lonergan 등(1999)의 실험에서는 수태율 차이가 없었다. 본 실험 결과도 Hasler 등(1995)의 보고와 같이 체내 배반포가 수태율이 가장 높았으며, 체외 성숙과 체외배양 시간이 길어질수록 수태율이 낮았다(Table 4). 따라서 수태율은 배반포의 생산 방법(체외 및 체내)과 체외생산 조건에 모두 영향을

받으며, 체외성숙과 배양시간이 길어짐에 따라 수태율이 낮은 원인은 난자의 체외성숙 시간증가로 인하여 난자에 가해진 유해물질과 배반포 단계에서 적은 세포수 등이 복합적으로 작용한 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약하면 한우 수정란의 체외생산에 있어서 짧은 체외성숙(18시간)이 배 발달을, 세포수 그리고 수태율 측면에서 효과적이었다. 이것은 체외성숙 시간의 증가에 따라 체외성숙배양액 중에 세포 대사산물의 축적에 따른 유해 작용과 PB 방출 후 난자 노화과정이 진행되어 난자의 발달능력 손실이 발생하므로 조기에 체외성숙을 완료하는 것이 한우 배반포의 체외생산에 있어서 효율적일 것으로 사료된다.

## V. 요약

본 실험은 체외에서 한우 난포란의 핵성숙과 그 후의 초기 발달에 있어서 체외성숙시간이 Polar Body(PB) 출현율, 배 발달율, 배반포의 세포수와 수태율에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과, PB 출현이 체외성숙 시작 후 12시간째까지는 없었고, 14시간부터 20시간째까지 대부분의 난자에서 PB가 출현되었다. 체외성숙 시간에 따른 난할율 및 8세포기 발달율에서는 차이가 없었으나, 체외성숙 18시간군에서 배반포( $31.0 \pm 5.7\%$ ) 및 8세포기에서 배반포( $82.0 \pm 5.1\%$ ) 발달율이 체외성숙 22시간과 24시간군에 비하여 유의적( $P < 0.05$ )로 높았다. 배반포기 수정란의 형성 시기는 체외성숙 18시간군의 배반포는 체외배양 7일과 8일째에 85%가 형성되어 24시간군의 55%에 비하여 유의적( $P < 0.05$ )으로 빨랐다. 생산된 배반포의 ICM, TE 및 총세포수는 체내와 체외성숙 18시간 배양 7일째군에서 비슷한 경향을 보였으며, 배양 8일째 처리군들에 비하여 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았다. 이식 후 수태율은 체내 배반포(56.3%)와 체외성숙 18시간 배양 7일째군(50%)이 비슷했으며, 배양 8일째군(체외성숙 18시간 16.7% 및 24시간 10.5%)에 비하여 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았다. 따라서 한우 난자의 핵성숙

은 체외성숙 20시간 이전에 대부분이 완료되고, 짧은 체외성숙(18시간)이 배 발달을, 세포수 그리고 수태율 측면에서 효과적이었다.

## VI. 인용문헌

1. Avery, B., Bavister, B. D. and Greve, T. 1998. Development of bovine oocytes, *in vitro* matured in a chemically defined protein-free medium, supplemented with different amino acid formulations. *Theriogenology*, 49:306 (abstr).
2. Blondin, P. and Sirard, M. A. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 41:54-62.
3. Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F. and Dressel, M. A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27:147-158.
4. Brackett, B. G., Younis, A. I. and Fayer Hosken, R. A. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in-vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. *Fert. Steril.*, 52:319-324.
5. Brions, D. and Schultz, R. M. 1997. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for role for survival factors including transforming growth factor  $\alpha$ . *Biol. Reprod.*, 56: 1088-1096.
6. Dominko, T. and First, N. L. 1997. Timing of Meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.*, 47:456-467.
7. Du, F., Looney, C. R. and Yang, X. 1996. Evaluation of bovine embryos produced *in vitro* vs. *in vivo* by differential staining of inner cell mass and trophoctoderm cells. *Theriogenology*, 45:211.
8. Enright, B. P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F. A., Yang, X. and Boland, M. P. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 54:659-673.
9. Eppig, J. J., Schroeder, A. C. and O'Brien, M. J. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured *in vitro*: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J. Reprod. Fertil.*, 95:119-127.
10. Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42:114-119.
11. Fukui, Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:40-46.
12. Gardner, D. K. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol. Int.*, 18:1163-1179.
13. Giles, J. R. and Foote, R. H. 1995. Rabbit blastocyst: Allocation of cells to the inner cell mass and trophoctoderm. *Mol. Reprod. Dev.*, 41:204-211.
14. Greve, T., King, W. A., Bousquet, D. and Betteridge, K. J. 1983. Chromosomes of the bovine oocyte *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 66: 245(abstract).
15. Hagemann, L. J., Beaumont, S. E., Berg, M., Donnison, M. J., Ledgard, A., Peterson, A. J., Schurmann, A. and Tervit, H. R. 1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: Interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.*, 53:451-458.
16. Hasler, J. F., Henderson, W. B. and Hurtgen, P. J. 1995. Production, freezing and transfer of



- bovine IVF-embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-152.
17. Hunter, R. H. F. and Greve, T. 1997. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod. Dom. Anim.*, 32:137-41.
  18. Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H. and Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47:23-32.
  19. Jurisicova, A., Rogers, I., Fasciani, A., Casper, R. F. and Varmuza, S. 1998. Effect of maternal age and conditions of fertilization on programmed cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol. Hum. Reprod.*, 4(2):139-145.
  20. Khatir, H., Lonergan, P. and Mermillod, P. 1998. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 50:917-929.
  21. Kruip, T. A. M., Cran, D. G., van Beneden, T. H. and Dieleman, S. J. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Res.*, 8:29-47.
  22. Kubisch, H. M., Larson, M. A. and Roberts, R. M. 1998. Relationship between age of blastocyst formation and interferon- $\tau$  secretion by *in vitro*-derived bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 49:254-260.
  23. Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P. and Boland, M. P. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 117:159-167.
  24. Lonergan, P., Khatir, H., Carolan, C. and Mermillod, P. 1997. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24h. *J. Reprod. Fertil.*, 109: 355-65.
  25. Long, C. R., Damiani, P., Pinto-Correia, C., MacLean, R. A., Duby, R. T. and Robl, J. M. 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured *in vitro* under various conditions of fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 102:361-9.
  26. Monghan, P., Carolan, C., Longergan, P., Sharif, H., Wahid, H. and Gordon, I. 1993. The effect of maturation time on the subsequent *in vitro* development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 39:270.
  27. Motlik, J. 1989. Cytoplasmic aspects of oocytes growth and maturation in mammals. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 38:17-25.
  28. Nagai, T. 2001. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55:1291-1301.
  29. Papaioannou, V. E. and Ebert, K. M. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development*, 102:793-803.
  30. Parrish, J. J., Krogenaes, A. and Susko-Parrish, J. L. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44:859-869.
  31. Pavlok, A., Lucas-Hahn, A. and Niemann, H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:63-67.
  32. Pegeraro, L. M. C., Thuard, J. M., Delalleau, N., Guerin, B., Deschamps, J. C., Marquant-Le Guienne, B. and Humblot, P. 1998. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-culture with bovine oviduct epithelial cells or with vero cells. *Theriogenology*, 49:1579-1590.

33. Peterson, A. J. and Lee, R. S. F. 2003. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology*, 59:687-697.
34. Prokofiev, M. I., Ernst, L. K., Sureava, N. M., Lagutina, I. S., Udavlennikova, N. N., Kesyan, A. Z. and Dolgohatskiy, A. I. 1992. Bovine oocyte maturation, fertilization and further development *in vitro* after transfer into recipients. *Theriogenology*, 38:461(abstr).
35. Semple, E., Loskutoff, N., Leibo, S.P. and Betteridge, K. J. 1993. Effects of culture medium and maturation time on *in-vitro* development of oocytes into blastocysts. *Theriogenology*, 39:307(abstr).
36. Suss, U., Wuthrich, K. and Stranzinger, G. 1988. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 38:871-880.
37. van Soom, A., van Vlaenderen, I., Mahmudzadeh, A. R., Deluyker, H. and De Kruif, A. 1992. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, 38:905-919.
38. van Soom, A., Ysebaert, M. T. and Kruif, A. D. 1997. Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 47:47-56.
39. Ward, F., Enright, B., Riaos, D., Boland, M. and Lonergan, P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, 57:2105-2117.
40. Westerlaken, L. A. J., van der Schans, A., Eyestone, W. H. and de Boer, H. A. 1994. Kinetics of first polar body extrusion and the effect of time of stripping of the cumulus and time of insemination on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 42: 361-370.
41. Yang, N. S., Lu, K. H. and Gordon, I. 1990. *In vitro* fertilization(IVF) and culture(IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*, 33:352.
42. Zuelke, K. A. and Brackett, B. G. 1990. Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol. Reprod.*, 43:784-787.
- (접수일자: 2003. 1. 13. / 채택일자: 2003. 2. 7.)