

개 난소 수송온도에 따른 미성숙 난자의 생존율과 핵 성숙율

이효상 · 윤희준 · 이영호 · 공일근[†]
순천대학교 농업생명과학대학 동물자원학과

Effect of Ovary Transport Temperature on Survivability and Maturation Rate of Canine Oocytes

H. S. Lee, X. J. Yin, Y. H. Lee and I. K. Kong[†]

Department of Animal Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences,
Sunchon National University

SUMMARY

This study examined the viability of canine oocytes following storage at 4 or 38°C for 5 h. Cumulus intact oocytes were collected from domestic dog following ovariohysterectomy at local veterinary clinics.

In Exp I, the oocytes that collected from ovary transport different temperatures (4 or 38°C) for 5 h, were cultured for (24 or 48 h). Survivability of oocytes judged by morphological appearance and PI (propidium iodide) staining. The survival rates at 4°C ovary transport group showed significantly lower than control group (0%; 0/129 vs. 72.9%; 129/177) 48 h after culture (P<0.05). In Exp II, to assess nuclear maturation of control group oocytes (ovary transported at 38°C) after *in vitro* cultured for 24, 48 or 96 h. After 24 h and 48 h of culture, the metaphase I to metaphase II stages (MI to MII) was 8.3% (6/72) and 8.9% (9/101), and which was not increased at 96h (9.5%; 8/84).

These results show that canine oocytes remarkably sensitive to low temperature and the percentage of oocytes reaching MI to MII did not increase 96 h after culture.

(Key words : canine, oocyte, transport temperature, survivability, maturation)

서 론

개 난자의 생식생리에 대한 연구는 다른 가축에 비하여 많이 뒤쳐져 있는 실정이다. 그 원인의 일부는 실험에 공시할 난자의 수량 제한 및 성숙 배란생리의 특이성 때문이라고 볼 수 있다. 개 난소의 수송은 동물병원에서 난소를 적출하여 얻을 수 있기 때문에 먼 거리에 떨어져 있는 실험실로 운반이 필요하다. 가축의 경우 38°C의 생리식염수에

서 침지하여 수송되나 수송시간이 길어지면 부패 등을 우려하여 낮은 온도에서 수송된다. 온도에 대한 난자의 민감성은 동물의 종에 따라 차이를 보여, 소에서 Yang 등(1990)은 난소를 37°C에서 8시간 저장 시 체외성숙란의 난할과 배반포 발달율이 대조구에 비해 현저히 낮아진다고 보고하였지만, Solano 등 (1994)은 난소를 25~30°C에서 수송 후 4°C에서 24간 방치하여도 성숙률과 난할률은 영향을 미치지 않는다고 하였다. 또한, 돼지에서 Di-

본 연구는 순천대학교 특성화 및 중점 육성과제 지원 (2002-0187)에 의하여 수행되었음.

[†]Correspondence : E-mail: ikong@sunchon.ac.kr

dion 등 (1990)은 난소를 15°C 이하의 온도에 침지 시 생존 난자가 없었다고 하여 온도에 민감성을 나타냈다. 개 난자의 경우 외관상 세포질 내 지방 과립이 많이 함유되어 있어 돼지 난자와 유사하여, 저온에 민감하리라 추측되나 현재 수송온도에 대한 난자의 생존률에 대한 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 개 난소를 38°C와 4°C의 생리식염수에 침지하여 5시간 내에 수송한 후 난자를 채취하여 체외성숙 24, 48시간 후 생존율을 검사하였고, 대조구에서는 체외배양시간에 의한 난자의 핵성숙률을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 난소 및 난자의 회수

난소는 동물병원에서 발정기 및 비 발정기의 잡종견의 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 4°C와 38°C의 0.9% saline이 들어있는 보온병에 넣어 5시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 난소를 면도날로 세절하여 난자를 회수하였다. 난자의 선택은 Hewitt와 England (1998)의 결과의 따라 난구세포가 2~4층 이상으로 둘러싸여 있고, Corona 세포를 제외한 난자의 크기가 110 µm 이상의 세포질이 균등한 색조를 지닌 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

2. 난소수송온도에 따른 미성숙난자의 생존을 조사

난소의 수송은 34~38°C와 4~9°C의 생리 식염수에 침지하여 5시간 이내로 연구실로 운반하여 체외배양 24, 48시간째 난자의 생존율을 확인 하였다. 체외성숙 배양액으로 DMEM (Gibco, 11995-065), 10% FBS (Gibco, 26140-079)를 첨가하고, 0.6 mM/ml cysteine (C-2529, Sigma), 0.2 mM pyruvic acid (P-4562, Sigma), 1 µg/ml recombinant bovine Somatotropin (rbST) (S-8648, Sigma)을 첨가한 배양액을 4-well dish (Nunc, Denmark)에 500 µl씩 분주한 후 50여개의 난자를 주입하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 24, 48시간 동안 배양한 후

0.2% hyaluronidase (HY)용액에 난자를 침지하여 glass pipette으로 난구세포를 제거하여 PBS- 0.1% PVA (PBS-PVA)에 세척하였다. 그리고, 난구세포가 제거된 난자를 400배 (Olympus IX70) 도립현미경 하에서 난자의 형태상 세포질의 막이 완전하고 뚜렷이 보이는 것을 생존 난자로 판단하였고, 세포막이 거칠거나, 뚜렷하지 못한 것을 죽은 난자로 판단하였다. 육안으로 판단하는 오차를 줄이기 위하여 vital 염색을 실시하였다. Vital 염색은 생존 세포막에 침투성이 없고 죽은 세포막에 침투성이 있는 PI (propidium iodide) (Garner 등, 1986; Neidle와 Cutbush, 1983)의 원리를 이용하여 하였다. 즉, 20 µg/ml PI가 첨가된 PBS-PVA를 배양 dish에 50 µl 소적을 만든 후 mineral oil을 덮어 난구세포가 제거된 난자를 침지하고 15분간 실온에서 어두운 곳에 두어 염색을 실시하였다. 염색 후 PBS-PVA에 2~3회 세척한 후, 내 귀통이가 cover slip에 맞도록 vaseline과 paraffine (30 : 1)이 함유된 물질로 고정된 slide에 난자를 정치시켜 cover slip으로 덮어 형광현미경에서 관찰을 하였다. PI로 염색된 난자 즉, 붉은색으로 발광하는 난자를 죽은 난자, PI에 염색되지 않은 난자를 생존 난자로 판단하였다.

3. 난자의 체외 성숙

38°C에 수송한 난소에서 채취한 미성숙 난자가 체외성숙에 미치는 영향을 검토하기 위하여 미성숙 난자를 상기 체외성숙 배양액에서 24, 48, 96 시간 동안 39°C, 5% CO₂ incubator에서 체외성숙 배양 후 난자의 핵성숙을 확인하였다. 체외성숙 후 핵상의 관찰은 0.2% HY용액에 난자를 침지하여 glass pipette으로 난구세포를 제거한 후 PBS-PVA에 3회 세척 후 400배 도립 현미경 하에서 형태상 세포막이 깨끗한 난자만을 분리하여 고정하고 핵성숙을 평가하였고, 약 10~20%의 난자는 외관상 lysis로 판단되어 실험에서 제외하였다. 난자의 고정은 10 µg/ml의 Hoechst 33342 염색액이 첨가된 2.5%의 paraformaldehyde에 30분간 고정한 후 slide에 정치시켜 cover slip으로 덮고, 형광현미경 하에서 핵상을 관찰하였다. 핵의 형태에 따라 핵막이 뚜렷이 존재하는 것을 GV라 판단을 하였으며, ch-

romosome이 적도판에 배열하거나 동시에 극체가 확인된 난자를 MI-MII라 판단하였으며, 핵상을 알 수 없거나 구분하기 어려운 상태를 unclear로 구분하였다.

4. 통계학적 분석

본 연구의 실험결과는 SAS 8.0 package program (1999)에 의하여 통계분석하였고 유의성 검정은 χ^2 -test에 의하여 실시하였다.

결 과

1. 난소 수송 온도가 난자의 생존율에 미치는 영향
 난소 수송온도가 난자의 생존율에 미치는 영향을 규명하기 위하여 체외성숙 24, 48시간 배양 후 미성숙 난자의 생사를 확인한 결과는 Table 1과 같다. 난소를 각각 38°C와 4°C에 수송하여 5시간 이내로 연구실로 운반하는 과정에서 생리식염수의 온도가 떨어지거나, 올라가는 현상이 발생하였으며, 38°C의 식염수는 최대 4°C 정도 떨어지는 현상이 있었고, 4°C 식염수는 최대 5°C 정도 상승하는 현상이 있었다. 체외성숙 24, 48시간째 난자의 vital 염색을 실시하여 난자의 생존율을 확인한 결과 38°C와 4°C에서 각각 77.8, 13.2%와 72.8, 0.0%로 4°C에 수송한 난소에서 채란한 난자는 성숙배양 24시간에 83%, 48시간에는 100%의 난자가 죽는 것을 알 수 있었다. 난자의 생존 확인은 400배 도립 현미경으로 형태상 난자 세포막의 정상과 비

Table 1. Effect of ovary transport temperature upon the survivability of canine oocytes 24 and 48 h after culture

Culture time (h)	Ovary transport temperature (°C)	No. of oocytes used	No. (%) of surviving (vital staining)
24	4~9	114	15 (13.2) ^a
	34~38	135	105 (77.8) ^b
48	4~9	129	0 (0.0) ^a
	34~38	177	129 (72.9) ^b

^{ab} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

* All of the experiments were replicated at least 5 times.

정상 상태 (Fig. 1, a)를 구분하였고, PI 염색 (Fig. 1, b)을 통하여 난자 세포질내 PI침투 여부로 난자의 생존을 판단하였다.

2. 체외성숙 시간에 따른 핵성숙을

38°C에서 수송한 난소에서 난자를 채취하여 체외성숙 24, 48, 96 시간 체외 배양 후 난자의 핵 성숙율을 확인한 결과는 Table 2와 같다.

체외성숙배양 24, 48 및 96시간 배양 후 0.2% HY에서 난구세포를 제거한 후 형태상 생존한 난자만을 실험에 공시하여 핵염색을 검사한 결과 GV, MI-MII로 핵 성숙율은 24시간째 66.7, 8.3%, 48시간째 73.3, 8.9% 그리고 체외배양 96시간째

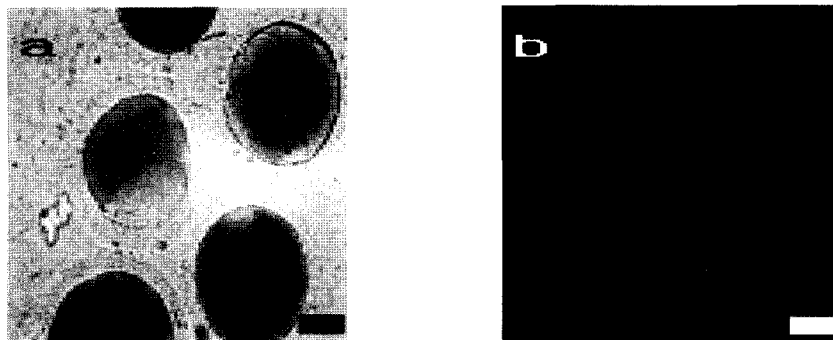


Fig. 1. Photomicrograph of canine oocytes 24 h after IVM (a). Viable and nonviable oocytes were different of appearance of color (b). Canine dead oocytes after fluorescein PI staining were shown red color (bar=50 μ m).

Table 2. *In vitro* nuclear maturation of canine oocytes cultured for 24, 48 and 96 h

Culture time (h)	No. of oocytes used	No. (%) of oocytes developed to		
		GV	MI-MII	Unclear
24h	72	48 (66.7) ^a	6 (8.3) ^a	18 (25.0) ^a
48h	101	74 (73.3) ^a	9 (8.9) ^a	18 (17.8) ^a
96h	84	34 (40.5) ^b	8 (9.5) ^a	42 (50.0) ^b

^{ab} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

* All of the experiments were replicated at least 5 times.

40.5, 9.5%로 나타내어 체외성숙 시간을 96시간까지 배양하여도 MI-MII까지의 핵성숙율이 증가하지 않았으나, GV단계의 감소와 unclear 난자의 증가에서 유의적 차이를 나타내었다.

고 찰

본 연구에서는 개 난소를 4°C와 38°C에서 5시간 이내에 수송하고 난자를 채란하여 24, 48시간 체외배양 시 각각 13.2, 0.0와 77.8, 72.9%의 생존율을 나타내어 온도에 대한 민감성을 보였다. 현재까지 개 난소를 저온 저장하여 수송 시 난자의 생존률에 미치는 영향에 대하여 보고된 바는 없다. 돼지 난포란의 연구에서 Didion 등(1990)은 15°C 이하의 온도에서 외관상의 생사 판별에 있어 86% (26/30)의 생존률을 보였으나, vital 염색으로 확인 시 공시난자의 100%가 lysis로 확인되어, 본 연구와 유사한 결과를 나타냈으며 이는 돼지난자의 세포질 내에 높은 지질성분과 관련된 것으로 보고하고 있다 (Toner 등, 1986; Mohr과 Trounson, 1981). 소에서는 난소를 채취하여 직접 4°C나 10°C에 4시간 저장한 후 난자를 채취하여 체외성숙, 수정 시 난할율과 배반포 발달율에서 대조구보다 현저히 낮은 결과를 보였으나 (Yang 등, 1990; Shigeki와 Yasuo, 1993), Solano 등(1994)은 25~30°C에서 수송한 난소를 4°C에서 24시간 저장하여도 체외성숙 및 난할율에서 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않는다고 보고하여 저온에 상당한 저항력을 보이고 있으며 이는 본 실험결과와는 대조적인 결과이며 이러한 현상은 세포질의 지방의 함량과 관련된

다고 생각된다. 그리고, Mastro Monaco 등(2002)은 개의 난자를 신선한 난소에서 채취하거나, 혹은 4°C에서 24시간이나 48시간 보관한 난소에서 난자를 채취하여 체외수정을 실시하고 100 ug/ml Hoechst 33258로 정자의 핵을 확인한 결과 난자당 정자수와 침투율에서 차이를 보이지 않았다고 보고하였으나, 난자자체의 생존율에 대해서는 언급하지 않아 개의 미성숙난자를 저온 저장하여 정자의 침투율을 확인하기 위해서는 먼저 난자의 생존성을 검토할 필요가 있다고 판단된다. 또한, Bolla 등(2002)은 난소를 4°C에 24시간 저장한 후 난자를 채란하여 체외성숙 24, 48, 72 시간 후 orcein 염색을 실시하여 MI~MII까지 5.3%, 11.5% 및 9.9%가 성숙한다고 보고하였으나, 난자를 고정하여 염색하기 전 난자 자체의 생존율에 대하여는 언급하지 않아 본 연구 결과와 직접적인 비교는 불가능하다. 본 연구에서는 4°C에서 5시간 수송한 난소에서 채란한 난자를 체외배양하여 48시간 후 PI를 이용하여 vital 염색을 실시한 결과 생존한 난자가 없었으며, 또한, Hoechst를 이용하여 핵 성숙을 확인한 결과(미발표) 90% (36/40)의 난자가 핵이 보이지 않거나 확인하기 어려운 상태로 판단되었다. 개의 난자가 저온에서 생존율이 낮은 것은 개의 난자는 세포질 내 높은 지질을 함유 (Renton 등, 1991)와 관련된다고 생각된다.

본 연구에서 38°C에서 난소를 수송하여 채란한 난자를 이용하여 체외성숙 24, 48, 96시간 시 MI~MII까지의 발달율은 8.3%(6/72), 8.9%(9/101), 9.5%(8/84)로 체외 성숙 배양시간을 96시간까지 연장하여도 핵 성숙률이 증가하지 않음을 알 수 있었

다. Rodrigues와 Rodrigues (2003)는 72시간 동안 체외성숙을 유지한 후 성숙률을 확인하였을 때 5.6%의 핵 성숙을 보였고, Saint-Dizier 등(2001)도 체외성숙 48, 72시간에 각각 9.4%와 10.2% 성숙률을 보였다는 결과와 일치하였다. 개 난자의 체외성숙은 배양시간외에 발정주기 (김 등, 2002), 배양액 및 첨가단백질 (이 등, 2003), 난자의 크기 (Hewitt와 England, 1998) 등이 연구되었으나 아직 만족할 만한 결과가 나오지 않아 많은 기초연구가 필요하다고 생각된다.

이상의 결과로 볼 때, 개 난소수송시 4°C의 생리 식염수에 침지하여 5시간 내 수송은 체외성숙 48시간째 생존난자가 없었으며, 체외성숙시 성숙 시간을 96시간까지 연장하여도 성숙율이 증가되지 않음을 알 수 있다.

적 요

본 연구는 개 난소의 수송온도가 난자의 생존률에 미치는 영향과 체외성숙 배양시 성숙률에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

1. 개 난소를 4°C와 38°C에 저장 후 5시간 내로 연구실로 운반한 난소에서 채취한 난자를 체외배양 하여 생존율을 조사한 결과 체외배양 24시간째 13.2%(15/114), 77.8%(105/135)의 생존율을 보였으며, 48시간째는 0% (0/129), 72.9% (129/177) 의 생존율을 나타내어 38°C에 수송한 난소에서 채취한 난자가 4°C에 수송한 난소에서 채취한 난자보다 유의적으로 높은 생존율을 보였다.
2. 체외성숙 배양 24, 48, 96 시간 체외배양하여 핵 성숙율을 확인한 결과 MI~MII까지의 성숙율이 8.3% (6/72), 8.9% (9/101), 9.5% (8/84)로 체외배양 시간을 96시간까지 연장하여도 성숙률이 증가하지 않았다.

참고문헌

- Bolamba D, Russ KD, Olson MA, Sandler JL and Durrant BS. 2002. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology*, 58:1689-1703.
- Didion BA, Pomp D, Martin MJ, Homanics GE and Markert CL. 1990. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.*, 68: 2803-2810.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA and Pace MM. 1986. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.*, 34:127-138.
- Hewitt DA and England GC. 1998. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. 1998. *Theriogenology*, 49: 957-966.
- Mastromonaco GF, Hay MA and Goodrowe KL. 2002. The effects of oocyte storage and cumulus cell presence on canine zona penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriogenology*, 57:1123-1134.
- Mohr LR and Trounson AO. 1981. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 25:1009-1025.
- Neidle S and Cutbush SD. 1983. X-ray crystallographic analysis of (+/-) -7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 beta, 10 beta-epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene: molecular structure of a 'syn' diol epoxide. *Carcinogenesis*, 4:415-418.
- Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Mullaney J and Perry B. 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.*, 93:221-231.
- Rodrigues BA and Rodrigues JL. 2003. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reprod. Domest. Anim.*, 38:58-62.
- Saint-Dizier M, Renard JP and Chastant-Maillard S. 2001. Induction of final maturation by

- sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction*, 121:97-105.
- SAS. 1999. *User's Guide : Statics*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shigeki A and Yasuo S. 1993. Effect of temperature during transportation of ovaries on the development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Anim. Sci. Technol.*, 64: 32-37.
- Solano R, de Armas R, Pupo CA and Castro FO. 1994. Short-term preservation of intrafollicular oocytes at 4 °C. *Theriogenology*, 41:299 (abstract).
- Toner M, Cravalho EG, Ebert KM and Overstrom EW. 1986. Cryobiophysical properties of porcine embryos. *Biol. Reprod. (suppl 1)*, 34:98 (abstract).
- Yang NS and Lu KH. 1990. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*, 33:352 (abstract).
- 김민규, 김혜진, 조종기, 장구, 이규승, 강성근, 이병천, 황우석. 2002. 개의 발정주기가 난자의 체외성숙에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 17:219-225
- 이효상, 윤희준, 이영호, 강태영, 공일근. 2003. 성숙배양액과 단백질이 개 미성숙 난자의 체외성숙에 미치는 영향. *한국 수정란 이식학회지*, 18:75-80.
-
- (접수일: 2003. 6. 2/ 채택일: 2003. 8. 16)