

난자의 형태와 난소의 보존 및 채취시기가 고양이 난자의 체외발생에 미치는 영향에 관한 연구

전연화 · 이명현¹ · 김상근[†]
충남대학교 수의과대학

Study on the Effects of Morphology, Preservation and Reproductive Cycle of *In Vitro* Developmental Rate of Cats Oocytes

Y. H. Jun, M. H. Lee¹ and S. K. Kim[†]

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

The study was carried out to investigate the effects of morphology, preservation and reproductive cycle of oocytes in vitro maturation of cats oocytes and development of IVM embryos.

The results were summarized as follows :

1. Nuclear status of GV and MI of in vitro cultured(24 h) oocytes with and without cumulus cells were 74.3% and 25.7%, 28.6% and 11.4%, 77.1% and 5.7%, respectively. The rate of oocytes with cumulus cells was higher than that of denuded oocytes.
2. Nuclear status of GV and MI of in vitro cultured(24 h) oocytes recovered from ovaries collected at different stages of the reproductive cycle(inactive, follicular and luteal) were 88.6% and 6.5%, 60.0% and 11.4%, 77.1% and 5.7%, respectively.
3. Nuclear status of fresh and salts-stored oocytes with and without cumulus cells were 74.3%, 25.7% and 37.1%, 11.4% and 57.1%, 13.3%, 17.1%, 3.3%, respectively. The rate of oocytes with cumulus cells(13.3%~74.3%) was higher than that of denuded oocytes (3.3%~57.1%).

(Key words : cats, morphology, fresh and salt-stored, reproductive stage)

서 론

최근 고양이 사육이 늘어나면서 번식장애가 종종 발생하게 되는데, 이는 주로 고 단백질 및 고 지방 사료로 실내에서 사육하면서 운동량이 절대적으로 부족하여 번식주기의 교란과 정자수의 감소

등 많은 번식장애와 질병으로 이어지고 있다 (Freistedt 등, 2001; Goodrowe와 Hay, 1993).

동물의 난자의 정자 침입율에 의한 정자의 수정에 관한 연구는 소(Fazeli 등, 1993), 돼지(Ivanova와 Mollova, 1993; Martinez 등, 1993), 양(Codde와 Berger, 1995), 고양이(Goodrowe 등, 1991; Ho-

이 논문은 2003년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

¹ 수의과학검역원(National Veterinary Research and Quarantine Service)

[†] Correspondence : E-mail : kskkim@hanbat.cnu.ac.kr

ward 등, 1991, Otoi 등, 2001), 개(Hay 등, 1997; Hewitt와 England, 1999; Otoi 등, 2001) 등에 이루어졌다. 고양이 난자의 IVM 및 IVF율은 일반적으로 다른 동물에 비해 낮은 편이다(Farstad, 2000). 약 50~60%의 난자만이 성숙이 이루어지고, 60~70% 정도의 난자만이 수정된다(Wood 등, 1995). 약 20~30%의 수정란이 배반포로의 체외발달을 나타낸다고 하였다(Freistedt 등, 2001; Spindler과 Wildt, 1999). 이와 같이 난자의 체외수정에 미치는 영향은 계절(Freistedt 등, 2001; Goodrowe 등, 1991), 배양조건(Johnston 등, 1991), 번식주기(Freistedt 등, 2001) 및 형태적 분류가 집 고양이 난자의 체외발달에 영향을 미친다고 하였다(Wood 등, 1995; Goodrowe 등, 1991; Pope 등, 1997). 불임 개체가 많고 자연수정이 어려운 소형 고양이의 불임치료를 위해서는 체외수정과 수정란 생산이 필수적이다. 그러나 과배란 처리나 불임시술 또는 난소적출을 통해서만 난자를 확보할 수 있으므로 연구에 어려움이 따르게 된다.

이에, 본 연구는 고양이의 불임 해결을 위한 방안의 하나로써 체외수정란을 생산할 목적으로 난자의 형태, 보존 및 번식주기별 난자의 체외발생에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시험동물

건강하고 성숙한 암고양이 30마리(야생에서 포획한 10마리 포함)와 수고양이 5마리를 구입하여 배합사료로 사육하면서 시험에 이용하였다. 적출한 난소는 50 µg의 streptomycin(Sigma, USA)을 첨가한 35°C의 생리적 식염수에 침지하여 실험실로 옮겨 난자를 회수하기 전까지 보관하였다.

2. 난포란의 회수와 체외성숙

난소를 세절한 후 m-PBS에 부유시켜 난자를 회수한 후 난포란은 2 IU/ml의 hCG(Sigma, U.S.A.)와 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, U.S.A.)과 10% (v/v)의 FCS(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 TCM-199 (Whittaker, U.S.A.) 배양액으로 배양하였다. 난포란의 체외성숙은 배양액 50 µl의 소직을 mineral

oil(Squibb, U.S.A.)로 피복된 소직내에 5개의 난포란을 주입하여 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 24시간 성숙배양을 실시하였다. 신선한 난소와, salt에 보존한 난소로부터 각각 회수한 난구세포부착 난자와 나화난자를 각각 24시간 배양했을 때 체외성숙율과, 난포의 직경이 2mm 이하를 휴지기, 1~2개 이상의 황체가 존재할 때 황체가, 많은 난포가 존재할 때를 발정기로 구분하여 채취한 난포란을 배양하였을 때 체외수정 및 체외발생율을 조사하였다.

3. 정자의 전처리

성숙한 수컷 고양이의 고환을 적출한 다음 정소상체 미부를 세절 후 37°C의 m-PBS에 dish에 부유시켰다. 부유액은 500xg로 5분간 원심분리한 다음 상청액을 제거하고 남은 정자 pellets 정자의 동결은 Kim(2001)의 방법에 따라 extender-1과 2로 희석한 다음 5분간 평형시킨 후 0.25 ml의 straw에 충전하여 Cell Freezer(Forma Co., U.S.A.)로 동결 후 LN₂ container에 보존하면서 시험에 이용하였다. 동결정액의 용해는 straw내 정액을 tris-buffer에 옮겨 2분간 30°C의 항온수조에서 용해하였으며, 정자의 활력이 50% 이상의 정자만을 시험에 이용하였다.

4. IVF

동결정액을 용해 후 500 µl의 BO액에 희석한 다음 CO₂ 배양기에서 15분간 swim-up 시킨 후 500xg로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 정자 pellets을 0.6% BSA와 20 µg의 heparin (Sigma, USA) 액으로 처리한 다음 24시간 성숙 배양한 난자와 12시간 배양에 의해 체외수정 시켰다.

5. 체외성숙 및 체외발생율의 판정

난자를 0.2%의 hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)를 1~5분간 처리에 의하여 난구세포를 제거하고 나화된 난자는 acetic acid : ethanol(1 : 3)액에 24시간 고정하고 1% aceto-orcein 또는 10 µg/ml bis-benzimide(Hoechst 33342, Sigma, U.S.A.) 염색액으로 염색한 다음 세포 및 핵 분열상을 관찰하여 난자의 체외성숙을 판정하거나 배양액 내에서 배

양하면서 응성전핵 형성과 배의 발생상태를 관찰하여 판정하였다.

6. 통계학적 분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 분산분석에 의해 평균치를 구하였으며, 처리간의 차이를 평가하기 위하여 Duncan의 다중검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 난구세포 부착 및 나화 난자의 체외발생을

신선한 난소로부터 회수한 난구세포부착 난자와 나화 난자를 각각 배양했을 때 체외발생율은 Table 1과 같다.

신선 난소로부터 회수한 난구세포부착 및 나화 난자를 각각 배양했을 때 GV 및 MI으로의 체외성숙율은 74.3%와 25.7%와 및 28.61%와 11.4%로써 난구세포 부착 난자가 나화 난자의 비해 높은 체외성숙율을 나타냈다. 이러한 결과는 형태적으로 우수하며, 난구세포가 치밀하게 부착된 신선 난자만을 선별하여 배양했을 때 높은 체외발생율을 나타냈다. 고양이 난자를 대상으로 한 연구보고는 없지만, 개 난자를 이용하여 salt 및 4℃에 48시간 배양했을 때 GV 및 MI기로의 체외발생율은 각각 33.0%~49.0%와 2.0%~6.0%였다고 한 Hewitt와 England(1997)의 보고에 비하여 약간 높은 체외발생율을 나타냈다.

2. 번식주기별 난자의 체외발생을

휴지기, 발정기 및 황체기별로 채취한 난소로부터 회수한 난포란을 배양했을 때 체외발생율은

Table 2와 같다.

휴지기, 발정기 및 황체기 단계로 구분하여 채취한 난구세포 부착 난포란을 배양하였을 때 GV 및 MI기로의 체외성숙율은 각각 88.6%와 6.5%, 60.0%와 11.4%, 77.1%와 5.7%를 나타냈다. 이러한 결과는, 고양이 난자를 휴지기, 발정기 및 황체기의 3 단계의 번식주기로 구분하여 채취 후 배양했을 때 GV율은 각각 98.1%, 81.8%, 94.2%로 번식주기에 따라 차이가 있었다고 한 Karja 등(2002)의 보고와 비교할 때 GV율은 낮지만 번식주기별로 채취한 난자의 체외성숙율은 차이가 있는 점은 일치하였다.

3. 보존방법에 따른 난자의 체외발생을

신선한 난소 및 salt에 보존한 난소로부터 회수한 난구세포부착 난자와 나화 난자를 배양했을 때 GV 및 MI으로의 체외발생율은 Table 1과 같다.

신선 및 salt에 보존한 난소로부터 회수한 난구세포부착 및 나화 난자를 각각 배양했을 때 GV 및 MI으로의 체외성숙율은 각각 74.3%와 25.7%, 37.1%와 11.4% 및 57.1%와 13.3%, 17.1%와 3.3%로써 난구세포 부착 신선난자가 나화 난자의 체외발생률에 비해 높은 체외성숙율을 나타냈다. 이러한 결과는 형태적으로 우수하며, 난구세포가 치밀하게 부착된 신선 난자만을 선별하여 배양했을 때 높은 체외발생율을 나타냈다. 고양이 난자를 대상으로 한 연구보고는 없지만, 개 난자를 이용하여 salt 및 4℃에 48시간 배양했을 때 GVBD 및 MI기로의 체외발생율은 각각 33.0%~49.0%와 2.0%~6.0%였다고 한 Hewitt와 England(1997)의 보고에 비하여 약간 높거나 거의 유사한 체외발생율을 나

Table 1. Developmental rate of *in vitro* cultured fresh oocytes with and without cumulus cells

Type of oocytes	Examined oocytes	Developmental stage of oocytes		
		GV	D	MI
Fresh				
Intact	35	26(74.3)	1(2.9)	9(25.7) ^a
Denuded	35	10(28.6)	3(8.6)	4(11.4) ^b

* GV : germinal vesicle, D : diakinesis, MI : metaphase I.

^{ab}: Values within column with different superscript differ(p<0.05)

Table. 2. Developmental rate of *in vitro* cultured oocytes recovered from ovaries collected at different stages of the reproductive cycle

Type of oocytes	Cultured oocytes	Developmental stage of oocytes		
		GV	D	MI
Inactive	35	31(88.6)	0(0.0)	2(6.5)
Follicular	35	21(60.0)	1(2.9)	4(11.4)
Luteal	35	27(77.1)	0(0.0)	2(5.7)

Table 3. Developmental rate of fresh and salt-stored oocytes with and without cumulus cells

Type of oocytes	Examined oocytes	Developmental stage of oocytes		
		GV	D	MI
Fresh				
Intact	35	26(74.3)	1(2.9)	9(25.7) ^a
Denuded	35	13(37.1)	3(8.6)	4(11.4)
Salt-stored				
Intact	30	20(57.1)	2(6.7)	4(13.3) ^b
Denuded	30	6(17.1)	4(13.3)	1(3.3)

^{ab}: Values within column with different superscript differ(p<0.05).

타냈다.

적 요

본 연구는 고양이의 불임 해결을 위한 방안의 하나로써 체외수정란을 생산할 목적으로 난자의 형태, 보존 및 번식주기별 난자의 체외발생에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 신선 난소로부터 회수한 난구세포부착 및 나화 난자를 각각 배양했을 때 GV 및 MI으로의 체외성숙율은 74.3%와 25.7%와 및 28.6%와 11.4%,로써 난구세포 부착 난자가 나화 난자의 비해 높은 체외성숙율을 나타냈다.
2. 휴지기, 난포기 및 황체기 단계로 구분하여 채취한 난구세포 부착 난포란을 배양하였을 때 GV 및 MI기로의 체외성숙율은 각각 88.6%와 6.5%, 60.0%와 11.4%, 77.1%와 5.7%였다.

3. 신선 및 salt에 보존한 난소로부터 회수한 난구세포부착 및 나화 난자를 각각 배양했을 때 GV 및 MI으로의 체외성숙율은 74.3%와 25.7%, 37.1%와 11.4% 및 57.1%와 13.3%, 17.1%와 3.3%으로서 난구세포 부착 신선난자가 나화 또는 salt 보존 난자에 비해 높은 체외성숙율을 나타냈다.

참고문헌

- Codde JM and Berger T. 1995. *In vivo* fertility of rams in relation to sperm zona pellucida binding and sperm zona pellucida penetration of ovine oocytes. *Theriogenology*, 44:901-906.
- Farstad W. 2000. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 61:375-387.

- Fazeli AR, Steenweg W, Bevers MM, de Loos F AM, van den Broek J and Colenbrander B. 1993. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet. Rec.*, 132: 397-410.
- Freistedt P, Stojkovic M and Wolf E. 2001. Efficient *in vitro* production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium : effect of season and ovarian status. *Biol. Reprod.*, 65:9-13.
- Goodrowe KL and Hay M. 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 40:967-975.
- Goodrowe KL, Hay M and King WA. 1991. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 45:466-470.
- Hay MA, King WA., Gartley CJ, Leibo SP and Goodrowe KL. 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil.*, 51:99-108.
- Hewitt DA and England GCW. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocytes maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 55(1):63-75.
- Howard JG, Bush M and Wildt DE. 1991. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J. Androl.*, 12:36-45.
- Ivanova M and Mollova M. 1993. Zona- penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*, 40:397-410.
- 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 the domestic cat. *J. Reprod. Fertil.*, 92:377-382.
- Karja NWK, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M. and Suzuki T. 2002. *In vitro* maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered form ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*, 57(9):2289-2.
- Kim SK. 2001. Studies on the viability of frozen removed seminal plasma by saline (RSP-S) and tris-buffer(RSP-T) semen of small species dogs. *Korean J. Anim. Reprod.*, 25(3):269-275.
- Maertinez E, Vazquez JM., Matas C, Roca J, Coy P and Gadea J. 1993. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 44:901-906.
- Otoi TM., Murakami A, Ooka NWK, Karja and Suzuki T. 2001. Effects of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes. *Vet. Rec.*, 148: 350-355.
- Pope CE, McRae MA, Plair BL, Keller GL and Dresser BL. 1997. *In vitro* and *in vivo* development of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gam. Res.*, 24: 343-356.
- Spindler RE and Wildt DE. 1999. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *biol. Reprod.*, 61:188-194.
- Wood TC, Byers AP, Jennette BE. and Wildt DE. 1995. Influence of protein and hormone supplementation on *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 104:315-323.

(접수일: 2003. 7. 3/ 채택일: 2003. 8. 13)