

배양액과 산소농도가 돼지난포란의 체외성숙과 배발달에 미치는 영향

천행수 · 한만희¹ · 김종화 · 박병권² · 이규승 · 서길웅[†]

충남대학교 동물자원학부

초 록

본 실험은 돼지체외수정란을 생산하는데 적합한 배양액과 산소조건을 구명하기 위하여 NCSU(North Carolina State University)-23, PZM(Porcine Zygotes Medium)-3, PZM-4 및 TCM(Tissue Culture Medium)-199 배양액과 5% 산소조건(39, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ 및 포화습도) 및 20% 산소조건(39, 5% CO₂ 및 포화습도)에서 돼지 미성숙난포란의 체외성숙과 체외배발달을 실시하였다. 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다. 1) 돼지 난포란을 5 및 20% 산소조건하에서 NCSU-23, PZM-3, PZM-4 및 TCM-199 배양액에 44시간 동안 성숙을 유도한 결과 난핵포붕괴율과 핵성숙률에 있어서 산소조건 및 배양액간 유의적($p > 0.05$)차이는 없었다. 2) 체외수정을 실시한 결과 정자침투율, 자·웅전핵형성률, 다정자 침입률 및 평균정자수에 있어서 산소조건 및 배양액간에 유의적인 차이가 없었다.

3) 체외수정을 실시한 후, 5 및 20% 산소조건인 NCSU-23, PZM-3, PZM-4 및 TCM-199 배양액에서 배양하여 배발달에 미치는 영향을 조사한 결과, 난할률에 있어서는 유의적($p < 0.05$)인 차이가 없었으며, 배발달 7일째 배반포기 발달률에 있어서 5% 산소조건에서는 PZM-3 배양액이, 20% 산소조건에서는 NCSU-23 배양액이 유의적($p < 0.05$)으로 높은 결과를 나타냈다. 4) 배발달 7일째 배반포기 배의 세포수를 조사한 결과, 내부세포포세포수와 총세포수는 산소조건과 배양액간에 통계적인 유의성이 인정되지는 않았으나, 5% 산소조건에서 PZM-3 배양액(36.8 ± 6.5개)이 다소 높은 총세포수를 나타냈다. 위의 결과를 종합하면 돼지체외수정란의 생산에는 5% 산소조건에서 PZM-3 배양액에서 배발달을 유도하는 것이 배반포기 발달률과 세포수에 있어 효과적이라고 판단된다.

(주제어 : Porcine IVM/IVF embryo, PZM-3, Low O₂ concentration)

서 론

최근 생명공학의 발달과 더불어 난포란을 이용한 체외수정란의 생산, 정자 및 수정란의 성감별, 핵치환 등의 기법을 통한 복제동물의 작출 및 이종장기 이식을 위한 형질전환 복제동물의 생산과 같은 각종 첨단 생명공학적인 연구가 활발히 수행되고 있다. 이러한 연구를 효율적으로 수행하기 위해서는 양질의 수정란을 대량으로 확보하는 것이 필수적이다. 이를 해결하는 하나의 수단으로서 도축된 가축의 난소에서 채취된 다수의 미성숙 난포란을 체외배양으로 성숙시켜 이용하고자 하는 실험이 여러 연구자들에 의하여 다각적으로 수행되고 있다.

돼지 미성숙 난포란의 성숙배양에는 오랫동안 TCM(Tissue Culture Medium)-199이나 Waymouth medium(Waymouth MB 752/1)과 같은 복합배양액이 많이 사용되어 왔으며 이후 Petters와 Wells(1993)가 개발한 NCSU(North Carolina State University)-37 또는 NCSU-23에서 BSA를 제외시킨 mNCSU-37(Funahashi 등, 1997; Long 등, 1999; Kikuchi 등, 1999)나 mNCSU-23(Abeydeera와 Day, 1997;

Boquest 등, 1999; Bolling, 2001)과 같은 단순배양액도 많이 사용되고 있다. 체외수정란의 발달에도 mWM, NCSU-23, ISU(Iowa State University Medium: Youngs 등, 1993), BECM-3(Beltsville Embryo Culture Medium-3: Dobrinsky 등, 1996) 및 PZM(Porcine Zygotes Medium: Yoshioka 등, 2002) 등 여러 가지 배양액이 개발되면서 초기 체외수정란을 배반포까지 발달시킬 수 있게 되었다.

한편, Johson과 Nasr-Esfahani(1994)는 수정란의 체외발달시 산소분압이 난관내의 낮은 압력조건(40~60 mmHg, 1~10%)보다 고분압(150 mmHg, 20%)조건에 노출됨에 따라 과량의 활성산소(reactive oxygen species, ROSs)가 발생되며, 이들 유리산소기(oxygen-free radical)들은 'oxidative stress'를 초래하여 미토콘드리아의 호흡작용 억제, 세포막의 유동성 감소, 각종 효소의 불활성화 및 DNA·RNA의 손상을 초래하는 등 난포란의 성숙 및 체외발달시에 중요한 저해요인으로 작용하여 양질의 수정란을 생산하기 어렵다고 보고하였다. 이와 같이 체외배양조건하에서 난포란의 발달에 나쁜 영향을 미치는 유리산소기를 제거하여 난포란을 이용한 체외배양체계를 개선시키고자 체외성숙·수정·발달 단계에서 각각 5% 및 20% 산소조건을 다

¹ 축산연구소(National Livestock Research Institute, RDA)

² 공주대학교 영상보건대학 특수동물학과(Dept. of Laboratory & Companion Animal, Kong-Ju University)

[†] Corresponding author : Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea, E-mail: kwseo@cnu.ac.kr

르게 하여 체외수정란의 생산 효율을 높이고자 하는 연구가 수행되어 왔다.

따라서, 본 연구는 보다 안정된 돼지 체외수정란 생산시스템을 확립하기 위하여, NCSU-23, PZM-3, PZM-4, TCM-199 배양액과 산소조건이 배양단계별로 미성숙난포란을 이용하여 작출한 체외수정란의 발달에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시 난포란의 채취

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 미경산돈(체중 120 kg내외)으로부터 적출하여 75 ug/ml penicillin G와 50 ug/ml streptomycin sulfate(Sigma, USA)를 첨가한 35~38℃의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 2회 세척한 후, 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 실험실에서 신선한 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 비이커에 넣어 38℃로 조정되어 있는 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

공시난포란의 채란은 18-gauge 주사침이 장착된 10 ml 주사기로 직경이 2~5 mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 15 ml 원심분리관에 옮겨 38℃로 조정된 정온대에 10분간 정치하여 난포란의 침전을 유도한 다음, 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 1.5 cm 간격으로 방안을 표시한 87×15 mm 페트리접시에 넣고 1 mg/ml PVA가 첨가된 TL-Hepes로 희석하여 실험현미경하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질이 균일한 난포란만을 선별하여 회수한 후 체외성숙 실험에 공시하였다.

난포란의 체외성숙

체외성숙용 배양액은 NCSU-23 (Petters 등, 1993), Porcine Zygotes Medium(PZM: Yoshioka 등, 2002), Tissue Culture Medium(TCM)-199을 기본 배양액으로 하여 10%의 pFF, 0.9 mM의 Cysteine, 10 IU/ml의 PMSG, 10 IU/ml hCG과 10 ng/ml의 EGF를 첨가하여 사용하였다. 체외성숙 배양에는 4-well dish(Nunc, Denmark)를 사용하여 각 well당 500 ul의 난자 성숙용 NCSU-23, PZM-3, PZM-4 및 TCM-199 배양액을 넣어 전배양을 실시하였다. 회수한 양질의 미성숙난자는 TL-Hepes-PVA 배양액으로 3회 세정하고, 체외성숙용 배양액으로 3회 세정하였다. 세정된 미성숙난자는 각 well당 40~50개씩 넣어 실험목적에 따라서 5% 산소조건(39℃, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ 및 포화습도)과 20% 산소조건(39℃, 5% CO₂ 및 포화습도)의 배양기 내에서 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양하고, 이후에는 호르몬이 첨가되지 않은 체외성숙용 배양액에서 22시간 배양하여 총 44시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

체외성숙 난포란의 염색 및 성숙판정은 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(Rapid staining method)으로 염색하여 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 핵성숙단계를 비교 판정하였다.

체외수정

난포란의 준비 : 체외수정용 배양액은 2.5 mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 용액을 사용하였고 (Abeydeera 등, 1997), 정액의 세정액으로는 DPBS에 0.1% BSA가 첨가된 배양액을 사용하였다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지 난포란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 NCSU-23 용액에 넣어 연속적인 피펫팅으로 난구세포를 제거하고, mTBM 용액으로 3회 세정하였다. 세정 후 미리 48시간 전배양을 실시한 90 ul 수정용 배양액 소적에 30~40개의 성숙난자를 넣고 수정시까지 배양기 내에서 배양하였다.

정자의 준비 및 수정능획득 : 정액은 인공수정용 액상정액을 이용하였으며, 사용 직전까지 17℃ 항온고에서 최대 4일간 보존하면서 사용하였다. 보존된 정액은 사용직전 정액세정액(DPBS)을 동일비율로 15 ml cornical tube에 넣고 450 g에서 3분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거하는 세정과정을 3회 실시하였다. 마지막으로 하단에 남은 정자 침전물에 정자 세정용 배양액을 넣어 39℃, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 10분간 정치하였다. 운동성을 가진 부유된 정자들을 회수하여 450 g에서 3분간 원심분리를 실시한 다음, 침전된 정자는 체외수정용 배양액으로 재차 희석하였다. 희석된 정자는 성숙난자가 들어 있는 소적에 최종농도가 1.5×10⁵ sperm/ml가 되도록 조정된 정자부유액 10 ul를 주입한 후 39℃의 CO₂ 배양기(5% CO₂, 포화습도) 내에서 5~6시간 동안 체외수정을 실시하였다.

체외수정의 판정 : 각각의 처리구별로 5~6시간 동안 체외수정용 배양액에서 수정을 유기한 후, pipetting과 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 침입과 2-웅성전핵의 형성을 검사하여 수정 여부를 확인하였다.

체외수정된 난포란의 체외배양

돼지 체외수정란의 배양은 0.4% BSA(A0281, Sigma, USA)가 함유된 NCSU-23, 0.3% BSA가 함유된 PZM-3, 0.3% PVA(P8163, Sigma, USA)가 함유된 PZM-4, 0.4% BSA가 함유된 TCM-199을 기본배양액으로 사용하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 pipetting과 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대에 부착된 정자를 제거한 후, 각각의 처리구별로 4-well dish(Nunc, Denmark)에 500 ul/well의 배발달 배양액을 넣고 well당 40~50개의 수정란을 넣어 20% 산소조건(38.8℃, 5% CO₂ 및 포화습도) 및 5% 산소조건(38.8℃, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ 및 포화습도)의 배양기 내에서 각각 배양하여 체외배발달을 유도하였다. 체외배양 2일째에 난할율을 조사하였고, 6일 및 7일째 배반포 발달율을 조사하였다. 이상과 같은 모든 실험은 37℃로 조정된 현미경가온판(Tokat hit, Japan)위에서 실시하였다.

배반포의 이중형광염색

Table 1. Composition of culture media

Component	NCSU-23	PZM-3	PZM-4	TCM-199 ^a
NaCl (mM)	108.73	108.00	108.00	116.36
KCl (mM)	4.78	10.00	10.00	5.36
CaCl ₂ · 2H ₂ O (mM)	1.70	-	-	1.80
KH ₂ PO ₄ (mM)	1.19	0.35	0.35	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O (mM)	1.19	0.40	0.40	0.40
NaHCO ₃ (mM)	25.07	25.07	25.07	26.19
Glucose (mM)	5.55	-	-	5.55
Na-pyruvate (mM)	-	0.20	0.20	-
Ca-(lactate) ₂ · 5H ₂ O (mM)	-	2.00	2.00	-
L-Glutamine (mM)	1.00	1.00	1.00	0.68
Taurine (mM)	7.00	-	-	-
Hypotaurine (mM)	5.00	5.00	5.00	-
Basal Medium Eagle amino acids (ml/L)	-	20.00	20.00	-
Minimum Essential Medium Nonessential amino acids (ml/L)	-	10.00	10.00	-
Penicillin G (mg/ml)	0.075	0.075	0.075	0.075
Streptomycin (mg/ml)	0.05	0.05	0.05	0.05
BSA (mg/ml)	4.00	3.00	-	4.00
Polyvinyl alcohol (mg/ml)	-	-	3.00	-

^a Partial listing of components of TCM-199 purchased from Sigma, M5017.

체외수정을 실시하여 생산한 돼지수정란은 내부세포괴 (inner cell mass, ICM)의 세포와 영양배엽(trophectoderm, TE)의 세포를 구별하기 위해서 Machaty 등(1998)의 이중형광염색방법을 사용하였다. 염색방법을 요약하면, 수정란의 투명대를 0.5% pronase에 처리하여 용해시킨 후, TL-Hepes-PVA 배양액으로 3회 세척하였다. 이들 수정란은 rabbit anti-pig whole serum이 1 : 5로 희석된 TL-Hepes 용액에서 1시간 처리한 후, TL-Hepes-PVA 용액으로 5분간 3회 세척하였으며, 10 ug/ml Hoechst 33342와 10 ug/ml propidium iodide(1 : 1)이 함유된 Guinea pig complement가 함유된 TL-Hepes(1 : 10)-PVA에서 1시간 처리하였다. 위의 방법에 의해 면역 외과적인 처리가 끝난 수정란은 slide glass위에 3 ul의 mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 수정란을 투여한 후, cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 형광현미경(200×) 하에서 세포수를 조사하였다.

통계분석

본 연구에서는 각 처리구에 대하여 4회 이상 반복실험을 실시하였으며, 얻어진 모든 실험결과와 통계처리는 SAS/STAT 6.03 package(SAS, 1996)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후, Duncan's 다중검정(DMRT)에 의하여 처리구간 유의성을 검정하였으며, P값이 0.05 이하의 결과만 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

배양액과 산소농도가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향

미성숙 돼지난포란을 5 및 20% 산소조건에서의 배양기내에서 체외성숙 기본배양액인 NCSU-23, PZM-3, PZM-4 및 TCM-199 배양액에서 44시간동안 체외성숙을 유도한 결과는 Table 2와 같다. 난핵포붕괴율의 산소조건별 배양액간

Table 2. Effects of O₂ with four different media on *in vitro* maturation of porcine immature oocytes

O ₂ (%)	IVM condition Media	Total no. of oocytes examined	No. of oocytes at the stage of ¹			Percentage of GVBD ² (Mean± SE)	Maturation rate (Mean± SE)
			GV	ProM-I~T-I	M-II		
5	NCSU-23	136	5	9	122	95.6± 2.06	88.7± 3.10
	PZM-3	114	6	7	101	94.5± 1.02	88.20± 1.15
	PZM-4	113	6	8	99	94.6± 0.74	87.3± 0.95
	TCM-199	115	6	7	102	94.9± 0.57	88.8± 1.24
20	NCSU-23	151	3	11	137	97.7± 1.13	90.2± 2.50
	PZM-3	155	3	11	141	97.0± 2.44	89.6± 3.14
	PZM-4	130	6	8	116	95.1± 0.97	88.2± 2.74
	TCM-199	127	4	7	116	96.1± 2.66	90.5± 2.51

¹ GV : germinal vesicle stage, ProM-I : first prometaphase, T-I : first telophase, M-II : second metaphase.

² GVBD : germinal vesicle breakdown.

차이를 보면 5% 산소조건에서는 95.6, 94.5, 94.6 및 94.9%이고, 20% 산소조건에서는 97.7, 97.0, 95.1 및 96.1%로서 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 또한, 핵성숙률에 있어서도 산소조건 및 배양액별로 88.3%에서 90.5%까지의 범위내에서 있었으나, 유의성은 인정되지 않았다.

배양액과 산소농도가 돼지난포란의 체외수정에 미치는 영향

미성숙 돼지난포란을 44시간동안 체외성숙한 후 수정배양액인 mTBM에서 6시간 동안 체외수정을 실시한 결과는 Table 3과 같다. 5% 산소조건에서는 핵성숙률, 정자침투율 및 자·웅성전핵형성률이 각각 89.9~92.7, 83.1~85.6 및 92.4~94.3%이고, 20% 산소조건에서 90.2~93.2, 80.4~81.6 및 90.8~93.1%로서 유의성이 없었으며, 다정자침투율은 5% 산소조건에서 43.0, 38.7, 40.6 및 46.5%이고, 20% 산소조건에서 39.3, 38.5, 40.8 및 43.1%로서 유의적인 차이가 없었다. 또한, 평균정자수에서는 5% 산소조건에서 1.8, 1.7, 1.5 및 2.0개이고, 20% 산소조건에서 1.8, 1.7, 1.8 및 1.9개로서 유의적인 차이가 없었다.

배양액과 산소농도가 돼지체외수정란의 발달에 미치는 영향

돼지난포란을 NCSU-23, PZM-3, PZM-4 및 TCM-199 배양액에 5 및 20% 산소조건에서 각각 성숙·수정시킨 다음, 같은 배양액에서 각각 7일간 배양을 하면서 난할률과 배반포기 발달률을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 수정 후 48시간째에 조사한 난할률은 5% 산소조건에서 54.1, 59.0, 57.6 및 54.2%이고, 20% 산소조건에서는 56.6, 58.5, 57.6 및 56.6%로서 유의적인 차이는 없었다. 전체평균으로도 5 및 20% 산소조건에서 각 56.2 및 57.3%로서 산소농도간에 유의적인 차이가 없었으며, 배양액간에서도 55.4, 58.7, 57.6 및 55.5%로서 배양액간에 유의적인 차이는 없었다.

체외발생 7일째에 조사한 NCSU-23, PZM-3, PZM-4 및 TCM-199 배양액 각각의 배반포기 발달률은 5% 산소조건에서 각각 12.8, 14.1, 10.7 및 8.1%로서 PZM-3 배양액이 유의적으로 높게 나타났으며, 20% 산소조건에서는 각각 13.5, 11.4, 10.0 및 7.7%로서 NCSU-23 배양액이 유의적으로 높은 결과를 나타냈다($p<0.05$). 전체평균으로 보면 5 및 20% 산소조건에서는 유의적인 차이는 없었고, 배양액간에서는 각각 13.1, 12.6, 10.3 및 7.9%로서 NCSU-23과 PZM-3 배양액이 유의적으로 높은 배발달률을 나타냈다($p<0.05$).

배양액과 산소농도가 돼지체외수정란의 배발달에 따른 세포수에 미치는 영향

체외배양 7일째의 배반포기 배를 이중형광염색하여 세포수를 조사한 결과는 Table 5와 같다. 내부세포피세포(ICM)수는 5% 산소조건에서 11.4, 13.3, 10.9 및 11.0개이고, 20% 산소조건에서는 13.1, 11.3, 10.8 및 10.8개로서 유의성이 없었다. 전체평균으로 보면 5 및 20% 산소조건과 배양액간 유의성은 없었으나, 5% 산소조건에서는 PZM-3 배양액이, 20% 산소조건에서는 NCSU-23 배양액이 다소 높게 나타났다. 또한, 총세포수를 보면 5% 산소조건에서 31.9, 36.8, 32.7 및 32.6개이고, 20% 산소조건에서 35.8, 35.5, 31.6 및 32.6개로서 유의성이 없었으며, 전체평균으로도 5 및 20% 산소조건과 배양액간 유의적인 차이가 없었으나 배양액간 비교에서 PZM-3 배양액(36.1개)이 다소 높게

나타났다.

각종 배양액이 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 관한 연구로서 Wang 등(1997)이 NCSU-23, TCM-199 및 mWM 배양액으로 배양하였을 때, 체외성숙률 및 수정률에 있어서 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 보고한 결과와는 비교적 합치점을 발견할 수 있는 결과였다고 고찰된다. 그러나 Abeydeera 등(1998)은 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 보고한 결과와 본 실험의 결과를 비교해 보면 비록 배양액 등에서는 차이가 있었지만 그 원인에 대해서는 좀더 규명해야 할 것으로 판단된다.

돼지체외수정란의 체외발달에 관한 연구를 보면, Abeydeera 등(2001)은 mWM, NCSU-23, ISU액 및 BECM-3 배양액을 사용하여 체외발달을 비교한 결과, 배반포기 발달률이 NCSU-23 배양액에서 가장 좋았고(30%), mWM 배양액에서 가장 낮았다(5%)고 보고하였다. Swain 등(2001)은 체외 유래 수정란을 NCSU-23, G1.2/G2.2 배양액에서 배양했을 때, 난할률은 각각 74%와 68%로 비슷했지만 배반포기 발달률은 15%와 8%로 NCSU-23 배양액이 더 우수했다고 보고하였다.

Long 등(1999)은 BECM-3을 변경시킨 BECM-6과 여기에 taurine과 hypotaurine을 추가시킨 BECM-7, 그리고 NCSU-23과 여기에 MEM amino acids와 BME amino acids를 추가시킨 NCSU-23aa 등 4종류의 배양액에 체외수정란의 배발달을 유도시켜 배반포기 배의 세포수를 조사했을 때, taurine과 hypotaurine이 들어있지 않은 BECM-6 배양액은 44.4개의 세포수를 나타내어 taurine과 hypotaurine이 들어있는 다른 3종의 배양액에서 나타난 61.3~65.1개에 비하여 세포수가 적었다고 보고하였다. 한편, Im 등(2003)이 20% 산소조건하에 NCSU-23, PZM-3 및 BECM-3 배양액에서 성숙을 유도하고 20% 산소조건하에서 체외 배발달을 하였을 때, 난할률(각각 75.1, 76.5 및 68.8%)은 NCSU-23과 PZM-3 배양액이 높았고, 배발달률(각각 9.6, 15.2 및 3.7%)은 PZM-3 배양액이 유의적($p<0.05$)으로 높았다고 보고하였다. 총세포수(각각 21.4, 23.6 및 14.2%)는 NCSU-23과 PZM-3 배양액이 유의적($p<0.05$)으로 높았다고 보고하였다. 이러한 연구 보고들과 본 실험의 결과를 비교해 보면 부분적인 차이는 있지만, Im 등(2003)의 결과와는 대체로 일치하는 경향을 보였다.

이러한 결과에 대하여 Im 등(2003)은 NCSU-23과 PZM 배양액 속에는 들어 있고 BECM-3 배양액에는 들어있지 않은 (hypo)taurine에 의하여 돼지 수정란의 초기배 발달에 영향을 미친다고 보고하였는바, 본 실험에서도 NCSU-23과 PZM 배양액 속에는 (hypo)taurine이 들어 있고 TCM-199 배양액에는 들어있지 않아 TCM-199 배양액보다 NCSU-23과 PZM 배양액이 초기배 발달에 있어 유의적($p<0.05$)으로 높은 결과를 나타냈다고 사료된다. 한편, pyruvate와 lactate는 초기배의 발육을 촉진하는 반면에 glucose는 후기배 발달을 촉진한다는 보고(Gandhi 등, 2001; Lane 등,

Table 3. Effects of O₂ with four different media on *in vitro* fertilization of porcine oocytes in mTBM

Culture conditions		Total no. of oocytes examined	% (Mean±SE) of oocytes			Percentage of polyspermy oocytes (Mean± SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean± SE)
O ₂ (%)	Media		Matured	Penetrated	With male and female proulei		
5	NCSU-23	63	90.7± 2.7 (57)	85.60± 3.8 (54)	94.3± 4.9 (51)	43.0± 2.9 (24)	1.8± 0.1
	PZM-3	62	92.7± 4.2 (57)	85.5± 2.6 (52)	93.2± 5.9 (49)	38.7± 3.8 (21)	1.7± 0.1
	PZM-4	64	89.9± 3.6 (57)	83.1± 3.3 (51)	92.4± 4.4 (49))	40.6± 4.4 (21)	1.5± 0.1
	TCM-199	67	91.3± 2.7 (61)	84.0± 3.5 (58)	93.0± 4.0 (52)	46.5± 3.6 (26)	2.0± 0.1
20	NCSU-23	84	91.4± 2.8 (74)	80.6± 4.3 (68)	92.6± 3.7 (63)	39.3± 4.3 (26)	1.8± 0.2
	PZM-3	84	90.6± 3.8 (76)	80.5± 3.9 (68)	90.8± 2.8 (62)	38.5± 3.3 (26)	1.7± 0.1
	PZM-4	82	90.2± 1.8 (74)	80.4± 2.5 (65)	93.0± 3.5 (61)	40.8± 4.0 (27)	1.8± 0.1
	TCM-199	86	93.2± 3.4 (80)	81.6± 3.6 (69)	93.1± 4.4 (65)	43.1± 4.4 (31)	1.9± 0.1

Table 4. Effects of O₂ with four different media 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	
O ₂ (%)	IVM-IVF-IVC ¹			Day 6	Day 7
5	NC-TB-NC	168	54.1± 3.4 (92)	10.9± 1.7 (18) ^{ab}	12.8± 2.8 (21) ^{ab}
	P3-TB-P3	178	59.0± 2.4 (107)	12.3± 1.1 (23) ^a	14.1± 1.6 (25) ^a
	P4-TB-P4	162	57.6± 3.0 (93)	9.4± 2.4 (15) ^{ab}	10.7± 1.6 (17) ^{abc}
	TC-TB-TC	168	54.2± 3.2 (87)	7.3± 1.6 (13) ^b	8.1± 1.1 (14) ^{bc}
20	NC-TB-NC	214	56.6± 2.9 (122)	11.4± 2.4 (23) ^{ab}	13.5± 1.4 (28) ^a
	P3-TB-P3	212	58.5± 2.9 (124)	10.6± 1.6 (22) ^{ab}	11.4± 2.3 (24) ^{abc}
	P4-TB-P4	201	57.6± 3.1 (115)	8.5± 0.8 (17) ^{ab}	10.0± 1.2 (20) ^{abc}
	TC-TB-TC	225	56.6± 3.7 (128)	7.3± 1.3 (18) ^b	7.7± 1.1 (19) ^c
Overall total or means					
5		676	56.2± 3.4 (379)	10.1± 2.3 (69) ^A	11.6± 2.7 (77) ^A
20		852	57.3± 3.6 (489)	9.5± 1.9 (80) ^A	10.7± 2.4 (91) ^A
	NC-TB-NC	382	55.4± 2.9 (214)	11.1± 2.2 (41) ^{AB}	13.1± 2.2 (49) ^A
	P3-TB-P3	390	58.7± 2.8 (231)	11.4± 1.7 (45) ^A	12.6± 2.4 (49) ^A
	P4-TB-P4	363	57.6± 3.3 (208)	8.9± 1.7 (32) ^{AB}	10.3± 1.6 (37) ^{AB}
	TC-TB-TC	393	55.5± 3.7 (215)	7.3± 1.6 (31) ^B	7.9± 1.2 (33) ^B

¹ NC-TB-NC: NCSU23-mTBM-NCSU23, P3-TB-P3: PZM3-mTBM-PZM3, P4-TB-P4: PZM4-mTBM-PZM4, TC-TB-TC: TCM199-mTBM-TCM199

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

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

2000; Tomson 등, 1993)가 많은데, 본 실험에서도 NCSU-23과 TCM-199 배양액에는 glucose(5.5 mM)가 들어있고, PZM 배양액에는 pyruvate(0.2 mM)와 lactate(2.0 mM)가 들어 있어 PZM-3 배양액이 다른 배양액보다 초기배 발달률이 높았다고 사료된다. 또한, Thuan 등(2002)에 의하면 비필수아미노산은 난할 초기에 좋은 조건과 돼지 배반포의

팽창을 촉진하는 반면 필수아미노산은 총세포수와 내부세포세포수를 증가시킨다고 보고하였는데, 본 실험에서도 필수아미노산과 비필수아미노산이 들어있는 PZM-3 배양액이 NCSU-23나 TCM-199 배양액보다 glucose의 결여에도 불구하고 배반포기 발달률과 세포수에 있어 좋은 결과를 나타냈다고 사료된다.

Table 5. Effects of O₂ with four different media on mean cell number of porcine oocytes IVM/IVF derived embryos

O ₂ (%)	Culture conditions	No. of blastocysts	No. of cells ² (Mean±SE)		
			ICM	TE	Total
5	NC-TB-NC	18	11.4± 5.4	20.5± 6.1	31.9± 6.5
	P3-TB-P3	18	13.3± 4.0	23.5± 6.0	36.8± 6.5
	P4-TB-P4	15	10.9± 3.9	21.7± 3.9	32.7± 5.6
	TC-TB-TC	14	11.0± 4.5	21.6± 5.9	32.6± 5.5
20	NC-TB-NC	22	13.1± 4.6	22.7± 6.8	35.8± 8.5
	P3-TB-P3	19	11.3± 3.3	24.2± 9.8	35.5± 8.7
	P4-TB-P4	17	10.8± 4.8	20.8± 7.4	31.6± 7.9
	TC-TB-TC	16	10.8± 4.4	21.8± 6.7	32.6± 5.7
Overall total or means					
5		65	11.7± 4.9	21.9± 5.7	33.6± 6.3
20		74	11.6± 4.5	22.5± 8.0	34.0± 8.2
	NCSU-23	40	12.4± 5.2	21.7± 6.6	34.1± 7.8
	PZM-3	37	12.3± 4.0	23.8± 8.1	36.1± 7.8
	PZM-4	32	10.8± 4.5	21.3± 5.9	32.1± 7.1
	TCM-199	30	10.9± 4.6	21.7± 6.5	32.6± 5.8

¹ NC-TB-NC: NCSU23-mTBM-NCSU23, P3-TB-P3: PZM3-mTBM-PZM3, P4-TB-P4: PZM4-mTBM-PZM4, TC-TB-TC: TCM199-mTBM-TCM199.

² ICM : Inner cell mass, TE : Trophectoderm.

인용문헌

- Abeydeera, L.R. and Day, B.N. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48:537-544.
- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Canteley, T.C., Rieke, A., Murphy, C.N., Prather, R.S. and Day, B.N. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 54:787-797.
- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Prather, R.S. and Day, B.N. 1998. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 58:1316-1320.
- Bolling, L.C. 2001. The effect of growth hormone on pig embryo development *in vitro* and an evaluation of sperm-mediated gene transfer in the pig. Thesis presented to Graduate school of Virginia Polytechnic Institute and State Univ. for degree of MS.
- Boquest, A.C., Abeydeera, L.R., Wang, W.H. and Day, B.N. 1999. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology* 51: 1311-1319.
- Byun, T.H., Lee, S.H. and Song, H.B. 1991. Development of a rapid staining method of the oocytes from domestic animal. *Kor. J. Anim. Sci.* 33:25-31.
- Coy, P., Ruiz, S., Romar, R., Campos, I. and Gadea, J. 1999. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology* 51:799-812.
- Dobrinsky, J.R., Johnson, L.A. and Rath, D. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol. Reprod.* 55:1069-1074.
- Funahashi, H., Cantley, T.C. and Day, B.N. 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 57:49-53.
- Funahashi, H. and Day, B.N. 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 98:179-185.
- Gandhi, A.P., Lane, M., Gardner, D.K. and Krisher, R.L. 2001. Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 58:269-275.
- Hunter, R.H.F. and Polge, C. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.* 12:525-531.
- Im, G.S., Lai, L., Liu, Z., Hao, Y., Wax, D., Bonk, A. and Prather, R.S. 2004. *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology* 61:1125-1135.
- Iwasaki, T., Kimura, E. and Totsukawa, K. 1999. Studies on a chemically defined medium for *in vitro* culture of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology* 51:709-720.
- Johnson, M.H. and Nasr-Esfahani, M.H. 1994. 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.
- Kikuchi, K., Kashiwazaki, N., Noguchi, J., Shimada, A., Takahashi, R., Hirabayashi, M., Shino, M., Ueda, M. and Kaneko, H. 1999. Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured *in vitro*. *Biol. Reprod.* 60:336-340.
- Lane, M. and Gardner, D.K. 2000. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplan-

- tation mouse. *Biol. Reprod.* 62:16-22.
18. Long, C.R., Dobrinsky, J.R. and Johnson, L.A. 1999. *In vitro* production of pig embryos: Comparisons of culture media and boars. *Theriogenology* 51:1375-1390.
 19. Machaty, Z., Day, B.N. and Prather, R.S. 1998. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.* 59:451-455.
 20. 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.
 21. Petters, R.M. and Wells, K.D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 48:61-73.
 22. Reed, M.L., Illera, M.J. and Petters, R.M. 1992. *In vitro* culture of pig embryos. *Theriogenology* 37:95-109.
 23. Suzuki, K., Mori, T. and Shimizu, H. 1994. *In vitro* fertilization of porcine oocytes in chemically defined medium. *Theriogenology* 42:1357-1368.
 24. Swain, J.E., Bormann, C.L. and Krisher, R.L. 2001. Development and viability of *in vitro* derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. *Theriogenology* 56:459-469.
 25. Thompson, J.G., Bell, A.C.S., Pugh, P.A. and Tervit, H.R. 1993. Metabolism of pyruvate by pre-elongation sheep embryos and effect of pyruvate and lactate concentrations during culture *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:417-423.
 26. Thuan, N.V., Harayama, H. and Miyake, M. 2002. Characteristics of preimplantational development of porcine parthenogenetic diploids relative to the existence of amino acids *in vitro*. *Biol. Reprod.* 67:1688-1698.
 27. Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Cantley, T.C. and Day, B.N. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos or produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 111:101-108.
 28. Yoshioka, K., Suzuki, C., Tanaka, A., Anas, I.M.-K. and Iwamura, S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 66:112-119.
 29. Youngs, C.R., Ford, S.P., McGinnis, L.K. and Anderson, L.H. 1993. Investigations into the control of litter size in swine: I. Comparative studies on *in vitro* development of Meishan and Yorkshire preimplantation embryos. *J. Anim. Sci.* 71:1561-1565.
 30. 김수, 이소현, 김대영, 강성근, 이병천, 황우석. 2003. NCSU-23과 PZM 배양액내 첨가된 Macromolecule이 돼지 체외수정란의 발육에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 18:35-41.
- (접수일자: 2004. 5. 27. / 채택일자: 2004. 6. 18.)

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

Cheon, H. S., M. H. Han¹, J. H. Kim, B. K. Park², K. S. Lee and K. W. Seo

Division of Animal Science & Resources, College of Agriculture Life & Science, Chungnam National University

ABSTRACT

The present study was carried out to examine the effect of four different media (NCSU (North Carolina State University)-23, PZM (Porcine Zygotes Medium)-3, PZM-4 and TCM (Tissue Culture Medium)-199) and two oxygen concentrations (39 , 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂, 5% CO₂ in air) on *in vitro* production of porcine IVM/IVF embryos. The results were summarized as follows: The rates of GVBD and nuclear maturations were not significantly different ($p>0.05$) for 44 hours of culture with four media in two oxygen concentrations. The rates of polyspermy, penetrated sperm(s) and male and female pronuclei formation were not significantly different ($p>0.05$) among four media in two oxygen concentrations. The cleavage rates were not significantly different ($p>0.05$) among four media in two oxygen concentrations. At day 7 under gas atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂, the blastocyst formation was significantly higher ($p<0.05$) in PZM-3 (19.9± 2.4) than other media. Also, NCSU-23 medium gave high rate of blastocyst formation at day 7 under gas atmosphere of 5% CO₂ in air ($p<0.05$). Based on the result of differential staining of porcine blastocyst at day 7, inner cell mass cell and total cell numbers were not significantly different ($p>0.05$) among four media in two oxygen concentrations. However, the observed total cell number was higher in PZM-3 medium (36.8± 6.5) than other media. In conclusion, these results suggested that *in vitro* production of porcine embryos in PZM-3 medium under a gas atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ was effective on the blastocyst formation rate and total blastocyst cell number.

(Key words : Porcine IVM/IVF embryo, PZM-3, Low O₂ concentration)