

# 개 난자의 체외성숙에 미치는 호르몬과 Na-Pyruvate의 영향

김 천 호<sup>†</sup>

강원대학교 수의학과

## Effects of Hormone and Na-Pyruvate on the *In Vitro* Maturation of Canine Oocytes

Cheon-Ho Kim<sup>†</sup>

School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to examine the effects of hormone and sodium pyruvate on *in vitro* maturation of canine oocytes. Canine oocytes were collected from the ovaries of dogs and cultured in NCSU-37 medium with hormones and sodium pyruvate for 72 hr. Oocytes matured to the metaphase II (MII) stage were observed only from estradiol 17 $\beta$  (E<sub>2</sub>), and the presence of gonadotropin did not improve the nuclear maturation. No oocytes were developed to the MII stage when E<sub>2</sub> was added to medium during the first 6 and 24 hrs of culture period. The presence of E<sub>2</sub> during the whole culture period enhanced the nuclear maturation to the MII stage (6.0%, P<0.05). High concentration of sodium pyruvate (2.5 mM) slightly enhanced the nuclear maturation to the metaphase I (MI) stage, but not the MII stage. The result of the present study shows that the presence of E<sub>2</sub> during the whole culture period of 72 hr enhances the maturation of canine oocytes to the MII stage, but sodium pyruvate does not affect the nuclear maturation of the canine oocytes.

(Key words : IVM, Hormone, Na-pyruvate, Canine oocyte)

### 요 약

본 연구는 호르몬과 Na-pyruvate의 첨가가 개 미성숙난자의 체외성숙에 미치는 영향을 검토하였다. 개의 발정주기와 관계없이 암캐의 난소에서 회수한 난자를 NCSU-37 배양액에서 72시간 체외 배양하였다. 호르몬의 영향을 검토하기 위하여 배양액 중에 다양한 호르몬을 24~72시간 첨가하여 성숙율을 검사하였으며, Na-pyruvate 첨가 농도의 영향을 검토하였다. E<sub>2</sub> 단독 첨가구에서는 제2감수분열 중기(MII) 단계까지 성숙이 관찰되었으나(5.7%), 타 처리구에서는 MII기까지의 성숙이 이루어지지 않았다(P<0.05). E<sub>2</sub>를 6~24시간만 처리하였을 때는 MII기로 성숙되는 난자가 없었으나 72시간 처리하였을 때는 6.0%로 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05). Na-pyruvate의 농도를 0.25 mM 첨가한 구보다 2.5 mM 첨가한 구에서 제1감수분열 중기(MI) 단계까지의 성숙율이 증가하는 경향을 보였으나, MII 단계까지의 성숙율은 차이가 없었다. 본 실험의 결과는 개 난자의 체외성숙시 E<sub>2</sub>가 첨가된 배양액에서 72시간 배양시에 성숙율을 증진시킬 수 있으나, Na-pyruvate의 농도는 개 체외배양에 있어 큰 영향을 미치지 않는 것을 나타낸다.

### 서 론

개는 기초생물·의학 분야에서도 비교적 폭 넓게 이용되는 실험동물 중 하나이지만 그 생리작용의 기작 등이 잘 알려져 있지 않으며, 특히 타 가축에서 일반적으로 확립되어 있는 자성 생식세포의 체외성숙체계 및 이들의 배양 중 변화에 대한 연구가 매우 미흡한 실정이다(Mahi와 Yanagimachi, 1976; Yamada 등, 1992, 1993; Hewitt와 England, 1997; Songsasen 등, 2002). 개 난자의 성숙과

배란은 다른 포유동물과 달리 GV 단계에서 배란되어 난관의 원위부에서 성숙이 이루어진다고 보고되어 있다(Holst와 Phemister, 1971; Tsutsui, 1989). 배란된 개의 난자는 체내 또는 체외 모두에서 핵의 완전 성숙이 일어나려면 적어도 48시간 이상이 요구된다(Mahi와 Yanagimachi, 1976; Tsutsui, 1989). 그러나 개의 특이한 발정 주기, 배양 조건의 미확립 등으로 인해 미성숙난자의 체외성숙율은 다른 가축에 비해서 매우 낮다(Bolamba 등, 1998; Hewitt와 England, 1999a,b; Farstad, 2000).

최근 개 미성숙난자의 체외성숙 효율을 높이기 위하여

\* 이 논문은 2005년도 강원대학교 기성회 특별연구비 지원에 의하여 연구되었음.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-33-250-8654, E-mail: kichho@kangwon.ac.kr

발정 주기에 따른 영향(Yamada 등, 1992, 1993; Loneragan 등, 1996; Willingham-Rocky 등, 2003, Kim 등, 2005), 난자의 상태 및 크기에 따른 영향(Hewitt and England, 1997, 1998; Otoi 등, 2000), 단백질원의 영향(Hewitt 등, 1998; England 등, 2001; Yoon 등, 2005), 호르몬의 영향(Yamada 등, 1993; Hewitt and England, 1997, 1999a; Songsasen 등, 2002), 에너지 기질의 영향(Songsasen 등, 2002) 등에 관한 연구가 보고되었다. 그러나 개 난자의 체외성숙율은 연구자들에 따라 상이하다.

본 연구에서는 개 미성숙난자의 체외성숙 시에 호르몬과 Na-pyruvate의 첨가가 성숙율에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 난자의 준비

실험에 공시한 난자는 발정주기와 종에 상관없이 암캐로부터 적출한 난소에서 채취하였다. 적출한 난소를 30~35℃의 생리식염수(0.9% NaCl)가 들어 있는 보온병에 담아 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 2~3회 세척한 후 TL-Hepes(114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaHPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 10.0 mM Na-lactate, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10.0 mM Hepes(Quantum, Biotech. INC, USA), 100 IU penicillin G가 들어 있는 petri dish 내에서 면도칼로 세절하여 실험현미경으로 난세포질이 균질하고 난구세포가 균일한 난자를 선별하여 회수하였다.

### 난자의 체외성숙

난자의 체외성숙은 NCSU-37 배양액에 0.25 mM Na-pyruvate, 12.0 mM sorbitol, 20.0 mg/ml streptomycin, 11.2 mg/ml penicillin G, 5 mg/l insulin, 10% FBS 및 호르몬을 첨가하여 100 µl 소적 당 10여 개의 난자를 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 39℃의 배양기 내에서 72 시간 동안 배양하였다.

### 난자의 검사

체외성숙 후 난자의 핵상 관찰을 위하여 배양 후 72시간에 0.3%의 hyaluronidase가 첨가된 TCM-199에 난자를 넣어 5분간 vortexing 하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포를 제거한 난자를 DPBS에 3 mg/ml의 PVP(polyvinylpyrrolidone)가 첨가된 세척액으로 세척한 후, DPBS에 3.7% paraformaldehyde와 4% triton-X100이 첨가된 고정액으로 각각 15분간 고정한 다음, 세척액으로 15분간 세척을 실시하였다. 세척된 난자를 DPBS에 90% glycerol과 0.0012 g/ml Hoechst가 첨가된 염색액을 이용하여 염색을 실시하였고, 형광 현미경 하에서 난자의 핵형을 관찰하였다.

### 실험설계

#### 실험 1) 개 난자의 체외성숙에 대한 호르몬의 영향

기본 배양액 NCSU-37에 호르몬이 첨가되지 않은 처리구, 1 µl/ml hCG, 10 µl/ml PMSG 및 1 µl/ml 17β-estradiol(E<sub>2</sub>)을 각각 첨가한 처리구와 위 세 가지 호르몬이 모두 첨가된 처리구로 나누어 체외성숙율을 검토하였다.

#### 실험 2) 체외성숙시 호르몬 처리 시간의 영향

실험 1에서 가장 좋은 성숙율을 보인 호르몬을 이용하여 6, 24, 48 및 72시간 처리하여 성숙율을 검토하였다.

#### 실험 3) 개 난자의 체외성숙시 Na-pyruvate 농도의 영향

기본 배양액에 첨가되는 Na-pyruvate의 농도를 0.25 mM과 2.5 mM을 첨가하여 성숙율을 검토하였다.

### 통계처리

실험의 결과는 Duncan의 다중검정에 의해 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 개 난자의 체외성숙에 대한 호르몬의 영향

호르몬의 첨가가 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향을 검토한 결과, E<sub>2</sub> 첨가구에서 MII 단계까지의 성숙이 관찰되었으나(5.7%), 타 처리구에서는 MII기까지의 성숙이 이루어지지 않았다(P<0.05). 특히 PMSG와 hCG 첨가시 대부분의 난자(89.3~91.0%)가 GV기에 정지되어 있었다(Table 1).

### 개 난자의 체외성숙시 호르몬 처리시간의 영향

실험 1에서 가장 좋은 성숙율을 보인 E<sub>2</sub>를 이용하여 처리 시간을 달리하여 성숙율을 검토하였다(Table 2). E<sub>2</sub>를 6~24시간만 처리하였을 때는 MII기로 성숙되는 난자가 없었으나 48시간 처리하였을 때는 MII 단계까지의 성숙율이 2.5%로 나타났으며, 72시간 처리하였을 때는 6.0%로 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05).

### 개 난자의 체외성숙시 Na-Pyruvate 농도의 영향

기본 배양액에 첨가하는 Na-pyruvate의 농도를 달리하여 성숙율을 검토한 결과, Na-pyruvate의 농도를 0.25 mM 첨가한 구보다 2.5 mM 첨가한 구에서 MI 단계까지의 성숙율이 증가하는 경향을 보였으나, MII 단계까지의 성숙율은 각각 3.7%와 3.9%로 유의적인 차이가 없었다(Table 3).

## 고 찰

대부분의 포유동물은 MII기로 성숙한 후 배란이 이루어지지만 개와 여우같은 개과 동물은 GV 상태로 배란된 후 난관 내에서 2~3일 머물면서 MII 단계까지 성숙이

**Table 1. Effect of hormone on *in vitro* maturation of canine oocytes**

Hormone	No. of oocytes	Nuclear status (%) <sup>*</sup>				Degeneration (%)
		GV	CC	M I	M II	
Control	112	28(25.0) <sup>a</sup>	15(13.4) <sup>a</sup>	5( 4.5) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	64(57.1) <sup>a</sup>
E <sub>2</sub>	106	6( 5.7) <sup>b</sup>	20(18.9) <sup>a</sup>	23(21.7) <sup>b</sup>	6(5.7) <sup>a</sup>	51(48.1) <sup>ac</sup>
PMSG	110	100(91.0) <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	2( 1.8) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	4( 7.2) <sup>b</sup>
hCG	112	100(89.3) <sup>c</sup>	1( 0.9) <sup>b</sup>	1( 0.9) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	5( 8.9) <sup>b</sup>
E <sub>2</sub> +PMSG+hCG	128	58(45.3) <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	12(18.7) <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	23(36.0) <sup>c</sup>

<sup>\*</sup> GV : germinal vesicle, CC : condensed chromatin, M I : metaphase I, M II: metaphase II.

<sup>a-c</sup> Values with different superscripts in the same column differ ( $P<0.05$ ).

**Table 2. Effect of estradiol treatment period on *in vitro* maturation of canine**

E <sub>2</sub> treatment period (hr)	No. of oocytes	Nuclear status (%) <sup>*</sup>				Degeneration (%)
		GV	CC	M I	M II	
6	104	81(77.9) <sup>a</sup>	3( 2.9) <sup>a</sup>	5( 4.8) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	15(14.4) <sup>a</sup>
24	100	58(58.0) <sup>ab</sup>	3( 3.0) <sup>a</sup>	2( 2.0) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	37(37.0) <sup>b</sup>
48	108	53(49.1) <sup>b</sup>	11(10.2) <sup>ab</sup>	5( 4.6) <sup>a</sup>	3(2.8) <sup>ab</sup>	36(33.3) <sup>b</sup>
72	100	6( 6.0) <sup>c</sup>	18(18.0) <sup>b</sup>	24(24.0) <sup>b</sup>	6(6.0) <sup>b</sup>	46(46.0) <sup>bc</sup>

<sup>\*</sup> GV : germinal vesicle, CC : condensed chromatin, M I : metaphase I, M II: metaphase II.

<sup>a-c</sup> Values with different superscripts in the same column differ ( $P<0.05$ ).

**Table 3. Effect of Na-pyruvate concentration on *in vitro* maturation of canine oocytes<sup>\*</sup>**

Concentration of Na-pyruvate (mM)	No. of oocytes	Nuclear status(%)				Degeneration (%)
		GV	CC	M I	M II	
0.25	112	9(8.0)	22(19.6)	21(18.8)	5(4.5)	55(49.1)
2.5	130	7(5.4)	21(16.2)	34(26.2)	9(6.9)	59(45.4)

<sup>\*</sup> Oocytes were cultured in medium with E<sub>2</sub> for 72 h.

GV : germinal vesicle, CC : condensed chromatin, M I : metaphase I, M II: metaphase II.

이루어진다(Mahi와 Yanagimachi, 1976; Farstad 등, 1989; Yamada 등, 1993). 배란 시 난구세포들은 난자 주위에 견고하게 몇 겹으로 부착되어 있으며, 정상적인 난세포질은 다량의 지방을 함유하고 있어 매우 검고 균질하게 보인다. 현재까지 소나 돼지의 체외성숙 체계를 바탕으로 개에 적용한 실험이 대부분이며 GV에서 MI으로의 성숙은 순조롭게 진행되나 MII로의 성숙은 현저히 낮아지는 경향을 보인다. 최근 개의 난포란 체외성숙 비율을 보고한 바에 의하면 0~58%가 GV기에 머물러 있었으며, 20% 내외의 난자만이 성숙되었다고 보고되었다(Farstad, 2000).

개 난자의 성숙에 영향을 미칠 수 있는 요인들을 검토한 연구에서, 발정 주기는 난자의 체외성숙율에는 영향을

미치지 않았다는 보고(Hewitt과 England, 1997)에 대하여 유의적인 영향을 미쳤다는 상반된 보고(Yamada 등, 1993; Luvoni 등, 2001; Kim 등 2004)가 있다. 난자의 크기는 112  $\mu$ m 이상의 난자에서 MI, MII까지 발달 능력이 100  $\mu$ m 이하의 난자보다 유의적으로 높았다고 보고되어(Hewitt와 England, 1997), 체외성숙에 직접적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 본 실험에서는 앞선 연구들을 기초로 하여 발정 주기에 관계없이 균질한 난구세포와 일정한 크기 이상의 난자를 회수하여 난자의 체외성숙율을 검토하였다.

본 연구의 결과, E<sub>2</sub>를 첨가한 구가 PMSG나 hCG를 첨가한 구보다 높은 성숙율을 보였다. Kim 등(2005)은 E<sub>2</sub>가

follicular기 난자의 MII기 성숙율을 증가시켰으나 비발정기의 난자에는 효과가 없었던 것으로 보고하였다. Hewitt과 England(1997)도 1 µg/ml E<sub>2</sub>의 첨가는 황체기나 비발정기 난자의 성숙을 증진시키지 않은 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 발정 주기에 관계없이 난자를 회수하여 배양하였으므로 이들 결과와 직접적인 비교는 어렵다. 한편, PMSG와 hCG는 개 난자의 성숙에 영향을 미치지 않았는데 이러한 이유는 다른 자연배란동물의 경우 혈중 progesterone 농도가 최하 수준이 되고, estradiol이 최고 수준에 도달했을 때 배란 전 LH peak가 일어나는 것과는 반대로, 개에서는 progesterone 농도가 높은 수준에 도달하고 배란 전 난포 환경은 estrogen의 지배를 받기 때문이라고 사료된다(Luvoni 등, 2005). Yamada 등(1993)과 Songsasen 등(2002)은 체외성숙 전 기간 동안 FSH와 LH를 첨가할 경우 개 난자의 성숙에 부정적 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고하였다. E<sub>2</sub> 처리시간별 성숙율을 검토한 결과는 72시간 이상 처리 시 높은 성숙율을 보여, Yamada 등(1992)의 결과와 유사하였으나 MII까지의 성숙율은 매우 저조하였다.

소, 돼지의 체외배양 시 에너지 기질로 많이 사용되는 Na-pyruvate의 영향을 검토한 결과, 본 실험에서 사용한 0.25 mM과 2.5 mM 농도의 Na-pyruvate 첨가는 개 난자의 성숙율에 영향을 미치지 않았다. 일반적인 개의 체외성숙 배양액에서는 0.25 mM의 Na-pyruvate를 사용하지만 단백질 free 배양액에서 2.5 mM의 Na-pyruvate를 첨가한 경우 48시간 이후에 7~33%가 MI까지 성숙되었다는 보고도 있다(Willingham-Rocky 등, 2003).

본 실험의 결과는 개 난자의 체외성숙시 E<sub>2</sub>가 첨가된 배양액에서 72시간 배양 시에 성숙율을 증진시킬 수 있으나, Na-pyruvate의 농도는 개 체외배양에 있어 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 금후 개 난자의 성숙배양체계에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 인용문헌

- Bolamba D, Borden-Russ KD, Durrant BS (1998): *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 49:933-942.
- England GCW, Verstegen JP, Hewitt DA (2001): Pregnancy following *in vitro* fertilization of canine oocytes. *The Vet Record* 148:20-22.
- Farstad W (2000): Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53:175-186.
- Farstad W, Mondain-Monval M, Hyttel P, Smith AJ, Markeng D (1989): Periovarian endocrinology and oocytes maturation in unmaturing, matured blue fox vixens (*Alopex lagopus*). *Acta Vet Scand* 20:313-319.
- Hewitt DA, England GCW (1997): Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J Reprod Fertil* 51:83-91.
- Hewitt DA, England GCW (1998): The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology* 49:957-966.
- Hewitt DA, England GCW (1999a): Influence of gonadotropin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. *Vet Rec* 144:237-239.
- Hewitt DA, England GCW (1999b): Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 55:63-75.
- Hewitt DA, Watson PF, England GCW (1998): Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology* 49:1083-1101.
- Holst PA, Phemister RD (1971): The prenatal development of the dog. *Biol Reprod* 5:771-779.
- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS (2005): Effects of estradiol-17β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63:1342-1353.
- Lonerger P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P (1996): Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* 54:1420-1429.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D (2005): Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63:41-59.
- Luvoni GC, Luciano AM, Modena S, 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. *J Reprod Fertil* 57(Suppl) 141-146.
- Mahi CA, Yanagimachi R (1976): Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J Exp Zool* 196:189-196.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T (2000) Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 54:535-542.
- Songsasen N, Yu I, Leibo SP (2002): Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol Reprod Dev* 62:407-415.
- Tsutsi T (1989): Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil* (Suppl) 39:629-275.
- Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME, kraemer DC (2003): Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. *Reprod* 126:501-508.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K, Toyoda, Y (1992): Maturation, fertilization and development of dog oocytes *in vitro*. *Biol Reprod* 46:853-858.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M.

- Naito K, Toyoda Y (1993): *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. J Reprod Fertil (Suppl) 47:227-229.
22. Yoon JT, Choi, EJ, Lee HJ, Kim CH, Min KS, Hwang SS (2005): Effects of estrus, oocyte diameter and supplementation on *in vitro* maturation of canine immature oocytes. Reprod Dev Biol 29:121-125. (접수일자: 2005. 2. 2 / 채택일자: 2006. 3. 3)