

체외성숙 배양액에 첨가된 eCG 및 돼지 FSH가 돼지 미성숙 난자의 체외성숙과 단위 발생 및 핵이식 난자의 체외발육에 미치는 영향

유진영¹, 정찬우¹, 김진영¹, 이은송^{1,2,*}
¹강원대학교 수의학부대학, ²동물의학종합연구소

Effect of Equine Chorionic Gonadotropin and Porcine Follicle-Stimulating Hormone on Oocyte Maturation and Embryonic Development after Parthenogenesis and Nuclear Transfer in Pigs

Jinyoung You¹, Chanwoo Jeong¹, Jinyoung Kim¹ and Eunsong Lee^{1,2,*}

¹School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to examine the effect of eCG and various concentrations (20, 40, and 80 μ g/ml) of porcine FSH on nuclear maturation and intracellular glutathione (GSH) level of oocytes, and embryonic development after parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT) in pigs. Immature pig oocytes were matured in TCM-199 supplemented with porcine follicular fluid, cysteine, pyruvate, EGF, insulin, and hormones (10 IU/ml hCG and 10 IU/ml eCG or 20~80 μ g/ml FSH) for the first 22 h and then further cultured in hormone-free medium for an additional 22 h. Nuclear maturation of oocytes (85~89%) was not influenced by eCG and various concentrations of FSH. Embryonic development to the cleavage stage (86~94%) and mean number of cells in blastocyst (33~37 cells) after PA were not altered but blastocyst formation significantly ($p < 0.05$) improved for the supplementation with 80 μ g/ml FSH (64%) compared to 47%, 48%, and 47% in oocytes that were treated with eCG, 20, and 40 μ g/ml FSH, respectively. In SCNT, fusion (78~83%) of cell-cytoplasmic couplets and subsequent embryo cleavage (82~88%) were not influenced by different gonadotropins but blastocyst formation tended to increase for the supplementation with 80 μ g/ml FSH (25% vs. 11~18%). Our results demonstrated that oocyte maturation and embryonic development after PA and SCNT were influenced by the type of gonadotropin concentration. In this study, supplementation of maturation medium with 80 μ g/ml FSH improved preimplantation development of PA and SCNT pig embryos, probably by increasing intracellular GSH concentration of matured oocytes.

(Key words : FSH, gonadotropin, oocyte maturation, somatic cell nuclear transfer, pig)

서론

돼지 난자의 체외성숙과 체외수정, 난세포질내 정자주입법 및 체세포 핵이식을 이용한 수정란의 체외생산 기법은 형질 전환 동물의 생산뿐만 아니라 난치병 치료를 위한 줄기세포 수립 등 다양한 측면에서 활발하게 연구되어 왔다(Nakai 등, 2006; Polejaeva 등, 2000). 체외수정이나 체세포 핵이식 기법을 이용한 돼지 수정란의 체외생산을 위해서는 고품질의 난자를 다수 확보하는 것이 필수적이다. 체외성숙 난자의 질을 평가하는 지표로는 제1극체의 방출 여부, 난자의 크기, 투명대

의 두께, perivitelline space의 넓이 및 난자 세포막의 충실도 등 형태학적 특징이 주로 사용되고 있으며, 이와 더불어 세포질 내 glutathione(GSH) 농도 및 maturation promoting factor(MPF) 활성 등 세포질 성숙도가 체외수정 및 핵이식 후의 발육능을 결정하는 중요한 요소로 평가되고 있다. 체외에서 성숙된 돼지 난자에서 세포질 성숙이 불완전할 경우 이는 체외수정이나 핵이식 수정란의 초기 배 발육의 감소로 이어지며 (Niwa, 1993), 핵이식 난자의 리프로그래밍에도 영향을 준다(Takano 등, 1993). 난자의 체외성숙에 영향을 미치는 요인으로는 체외성숙 배양액의 종류 및 조성(Wang 등, 1997; Yoshida 등,

* This work was supported by a grant (#20080401034072) from the BioGreen 21 Program (Rural Development Administration, Republic of Korea).

* Correspondence : E-mail : eslee@kangwon.ac.kr

1993), 체외성숙 배양 시간(Kano 등, 1998; Chian 등, 1992) 등이 있다. 특히 체외성숙 배양액에 첨가되는 성선자극호르몬의 농도 및 종류는 난자의 핵 또는 세포질 성숙과 난구세포의 팽창에 중요한 역할을 미치는 것으로 알려져 있다(Prochazka 등, 1991; Osborn과 Moor, 1983; Meinecke과 Meimecke-Tellmenn, 1979). 또한 미성숙난자가 난핵포 붕괴(germinal vesicle break down; GVBD), 제1 및 제2 핵분열중기로 진행되는 일련의 성숙 과정을 거치는 동안 스테로이드 호르몬의 첨가는 난자의 발달능에 영향을 주는 것으로 보고되었다(Wiesak 등, 1990).

돼지 난자의 체외성숙 배양액에 첨가되는 호르몬의 종류에는 말 혈청성 성선자극호르몬(equine chorionic gonadotrophin; eCG), 임신한 부인의 융모성 성선자극호르몬(human chorionic gonadotropin; hCG), estradiol, FSH, LH 및 prolactin 등이 있다(Zheng과 Sirard, 1992; Mattioli 등, 1991). FSH, LH 및 prolactin(Nagai와 Moor, 1990) 또는 FSH, LH 및 estradiol(Zheng과 Sirard, 1992) 또는 eCG, hCG 및 estradiol(Yoshida 등, 1990) 등과 첨가되는 호르몬의 종류, 호르몬 첨가 시간(Funahashi와 Day, 1993) 및 호르몬 농도 등이 난자의 체외성숙 및 발육능에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. FSH는 약 30,000 Da 정도의 당 단백질로서 LH와의 협동 작용을 통하여 난포의 발육과 성숙 및 난자의 성숙을 일으키며, 난구세포의 팽창을 유도한다(Naito 등, 1988; Hillensjo와 Channing, 1980). 체외배양액에 첨가된 FSH는 난자의 감수분열 재개, 수정 및 과립막세포의 황체화를 촉진하는 것으로 보고되었다(Zelinski-Wooten 등, 1998). 또한, FSH는 초기 난포의 체외발달에서 세포의 사멸을 막고 과립막세포의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Cortvrint 등, 1997). 돼지 미성숙난자의 체외성숙 과정에서 배양액에 첨가되는 FSH는 핵 성숙과 세포질 성숙에 영향을 미치며, 농도가 증가할수록 체외성숙률 및 정상적인 spindle 배열과 염색체 정렬이 증가되는 것으로 보고되었다(Sha 등, 2009). 한편, eCG는 임신한 말의 융모막에서 생산되며, 난포의 발육과 성숙을 촉진하여 배란을 유도한다(Christenson 등, 1985). 돼지 미성숙 난자의 체외성숙 배지에 eCG를 첨가하여 배양할 경우 체내에서와 거의 같은 시기에 정상적인 핵상 변화가 유도되는 것으로 알려져 있다(Naito 등, 1992). 또한, 체외성숙 배지에 eCG를 첨가할 경우 자발적 활성화(spontaneous activation)가 감소하고 수정 후 2세포기까지 정상적으로 발육하였다고 보고되었다(Naito 등, 1992).

돼지 미성숙난자의 체외성숙에서 FSH가 첨가된 배양액에서 전기 22시간 동안 배양하였을 때 성숙률이 증가하였으며 난구세포 팽창이 유도되었고, 체외수정 후 분할율과 발생능이 증가한다고 보고되었다(Schoevers 등, 2003). 또한, eCG를 돼지 미성숙 난자의 체외성숙에 사용하였을 때 성숙률과 체외수정 후의 발육능이 증가하였다(Funahashi 등, 1994). 소 미성숙 난포의 체내성숙에서 각각 FSH와 eCG를 처리를 비교하였을 때

FSH 처리군에 비해 eCG 처리군에서 난포 크기 및 난자의 감수분열 재개율이 증가하는 양상을 보였으며(Foote 등, 1978), 돼지 미성숙 난자의 체외성숙에서 돼지 FSH와 면양의 FSH의 난자성숙에 미치는 영향을 비교한 결과, 돼지 FSH가 면양 FSH에 비해 돼지 미성숙난자의 성숙을 촉진하는 효과가 높은 것으로 나타났다(Samartzi 등, 2008). 마우스에서 다수의 난자를 얻기 위한 과배란 처리에서는 eCG에 비해 FSH 처리군에서 더 많은 난자가 배란되었고, 체외수정란의 비정상적 분할이 감소되었다고 보고되었다(Munoz 등, 1995). Silvestre 등(2006)은 돼지 미성숙 난자의 체외성숙에 FSH와 eCG를 각각 처리하였을 때 성숙률에는 차이가 없었으며, 체외수정 및 단위 발생, 난세포질내 정자 주입법 후의 체외발육과 배란포의 평균 세포수에서 처리군간에 차이가 없었다고 보고하였다. 이와 같이 FSH와 eCG는 난포 및 난자의 성숙에 대한 작용이 유사한 것으로 알려져 있으나, 미성숙 난자의 체외성숙 및 체외발육능에 미치는 영향은 호르몬의 유래, 동물의 종 또는 호르몬의 농도 등에 따라 달라질 수 있다. 본 연구에서는 돼지 미성숙 난자의 체외성숙 배양액에 첨가된 돼지 뇌하수체 유래 FSH와 말 융모막 유래 eCG가 난자의 성숙, 난자내 GSH 농도에 미치는 효과를 비교, 검토하였고 또한 각각의 호르몬 처리에 의해 유도된 성숙난자로부터 단위 발생 및 체세포 핵이식 난자를 작성하여 체외발육능을 조사함으로써 발육능이 높은 양질의 돼지 난자를 체외생산할 수 있는 방법을 모색하였다.

재료 및 방법

1. 배양액 및 시약

본 연구에 사용된 모든 시약은 특별한 설명이 없는 한 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 체외성숙에는 10%(v/v) 돼지 난포액, 0.6 mM cysteine, 0.91 mM pyruvate, 10 ng/ml epidermal growth factor, 75 µg/ml kanamycin 및 1 µg/ml insulin이 첨가된 TCM-199(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)을 기본 배양액으로 사용하였다. 실험 설계에 따라 체외성숙 초액으로 사용하였다. hCG(Intervet International BV, Boxmeer, The Netherlands)가 포함된 체외성숙 배지에 eCG(G-4877)와 또는 FSH(Antrin R-10, Kawasaki pharmaceutical, Kawasaki, Japan)를 첨가하여 난자의 체외성숙을 유도하였다. 단위 발생 난자 및 체세포 핵이식 난자의 체외배양에는 0.3%(w/v) BSA가 포함된 Porcine Zygote Medium-3(PZM-3) 배양액을 사용하였다(Yoshioka 등, 2002).

2. 난자의 채취 및 체외성숙

도축된 미성숙 암돼지로부터 난소를 채취한 후 37°C의 멸균 생리식염수에 넣어 실험실로 운반하였다. 일회용 주사기에 18-G의 주사침을 부착하여 3~8 mm 직경의 난포에서 난포 내

용물을 흡인하였다. 실체현미경 하에서 다층의 치밀한 난구세포층으로 둘러싸인 cumulus-oocyte complex(COC)를 선별하여 HEPES-buffer가 포함된 Tyrode's medium(TLH-PVA)(Bavister 등, 1983)으로 3회 세정한 후 체외성숙 배양액으로 1회 세정하였다. 그 후 실험 설계에 따라 10 IU/ml hCG와 10 IU/ml eCG(G-4877) 또는 20~80 $\mu\text{g/ml}$ FSH가 포함된 500 μl 의 체외성숙 배양액이 들어 있는 4-well multi-dish(Nunc, Roskilde, Denmark)의 각 well에 50~80 개의 COC를 넣어 39°C, 5% CO₂의 조건하에서 22시간 배양하였다. 그 후 COC를 호르몬이 포함되지 않은 배양액으로 3회 세정한 후 호르몬 무첨가 체외성숙 배양액에서 추가로 18~22시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

3. 공여핵 세포의 준비

미니돼지의 귀에서 채취한 피부 섬유아세포를 15%(v/v) 소태아 혈청(fetal bovine serum)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)에서 완전한 monolayer를 형성할 때까지 배양하였다. Monolayer를 형성한 공여핵 세포를 추가로 72~96시간 동안 배양하여 contact inhibition에 의한 방법으로 세포주기가 G0/G1기에 동기화되도록 유도하였다. 공여핵 세포는 각 반복 실험마다 동일한 passage(3~7 passages)를 사용하였다. 배양세포는 트립신으로 처리하여 단일세포 부유액을 만든 후 0.4%(w/v) BSA가 포함된 TLH(TLH-BSA)에 재부유하여 핵이식에 사용하였다.

4. 체세포 핵이식과 단위 발생

체외성숙 40시간 후에 난구세포를 제거한 난자를 5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342가 포함된 미세 조작 배지(calcium-free TLH-BSA)에 넣어 15분간 정치하였다. 난자를 신선한 미세조작 배지로 2회 이상 세정한 후 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B(CB)가 첨가된 미세조작용 미소적으로 옮겼다. 형광현미경(TE300; Nikon, Tokyo, Japan)하에서 17- μm beveled glass pipette(Humagen, Charlottesville, VA, USA)을 사용하여 난자로부터 metaphase II(MII) 염색체와 polar body(PB)를 흡입하여 탈핵하였다. 탈핵 후 공여핵세포를 탈핵난자의 perivitelline space에 주입하였다. Cytoplasm-cell couplets를 0.001 mM CaCl₂와 0.05 mM MgCl₂가 포함된 280 mM mannitol solution으로 옮겨 1분간 정치시킨 다음 세포융합장치(LF101; NepaGene, China, Japan)를 이용하여 1 MHz, 2 V의 교류 전압으로 2초간 그리고 170 V/mm 직류 전압으로 50 μsec 동안 2회 통전하여 세포융합을 유도하였다(Walker 등, 2002; Song 등, 2009). 전기융합 1시간 후 난자를 관찰하여 융합 여부를 확인하였다. 재구축된 난자는 0.01 mM CaCl₂와 0.05 mM MgCl₂가 포함된 280 mM mannitol solution에서 120 V/mm의 직류 전압으로 60 μsec 동안 2회 통전하여 활성화를 유도하였다. 단위 발생의 경우는 체외

성숙 44시간 후에 PB가 있는 난자를 선별하여 체세포핵 이식 난자와 동일한 조건의 전기자극으로 활성화를 유도하였다.

5. 후활성화 처리와 체외배양

전기적 활성화 유도후 단위 발생 난자 및 체세포 핵이식 난자를 각각 5 $\mu\text{g/ml}$ CB와 0.4 $\mu\text{g/ml}$ demecolcine이 포함된 체외배양액에 넣어 4시간 동안 배양하였다. 후활성화 처리 종료 후 난자를 체외배양액으로 3회 이상 세정한 후 mineral oil을 도포한 30 μl 용량의 체외배양액 미소적으로 옮겨 39°C, 5% CO₂, 5% O₂와 90% N₂의 조건하에서 7일간 체외 배양하였다. 체외배양 2일 및 7일째에 각각 분할을 및 배반포로의 발육률을 조사하였다. 또한, 배반포 수정란을 Hoechst 33342로 염색한 후 형광현미경 하에서 관찰하여 세포수를 산정하였다.

6. 체외성숙 난자의 GSH 농도 측정

CellTracker Blue CMF₂HC(4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin; Invitrogen)을 사용하여 난자의 intracellular GSH level을 측정하였다(Sakatani 등, 2007). 체외성숙 44시간 후에 각 처리군으로부터 난구세포를 제거한 30개씩의 MII기 난자를 선별하여 10 μM CellTracker가 포함된 TLH-PVA에서 차광한 상태에서 30분간 배양하였다. 그 후 난자를 0.1%(w/v) PVA가 포함된 D-PBS(Invitrogen)에서 세정한 후 10 μl 의 미소적으로 옮겨 형광현미경(TE300; Nikon, Tokyo, Japan) 하에서 370 nm의 UV filter를 사용하여 난자를 관찰하였다. 난자의 영상을 디지털카메라를 이용하여 TIFF format으로 저장한 후 난자의 형광 강도를 ImageJ software(ver. 1.41o; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 분석하였다. 체외성숙 배지에 eCG를 첨가하여 배양한 난자를 1로 하여 다른 군의 상대적인 GSH 농도를 산정하였다.

7. 실험 설계

실험 1에서는 체외성숙 배지에 초기 22시간 동안 10 IU/ml eCG 또는 FSH(20~80 $\mu\text{g/ml}$) 첨가에 따른 난자의 체외성숙 및 단위 발생 난자의 체외발육률을 조사하였다. 실험 2에서는 실험 1에서와 동일한 방법으로 난자를 성숙시킨 다음 체세포 핵이식란을 작성하여 체외발육률을 검토함으로써 체외성숙 배지에 첨가된 eCG와 FSH의 영향을 조사하였다. 실험 3에서는 성선자극호르몬의 종류 및 농도에 따른 체외성숙 난자의 세포질 성숙도를 평가하기 위해서 각 처리군의 성숙난자를 회수하여 세포내 GSH 농도를 측정하였다.

8. 통계 분석

실험 결과는 Statistical Analysis System(SAS, version 9.1; Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA)을 이용한 일반 선형 모델(general linear model)로 분석하였다. 처리 평

군간의 차이는 least significant difference(LSD)를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다. 결과는 $\text{mean} \pm \text{standard error of the mean(SEM)}$ 으로 나타내었다.

결 과

실험 1: 체외성숙 배양액에 첨가된 eCG 또는 FSH가 돼지 난자의 성숙 및 단위 발생 후의 체외발육능에 미치는 영향

돼지 체외성숙 배양 초기 22시간 동안 성숙 배양액에 10 IU/ml eCG와 20, 40 및 80 $\mu\text{g/ml}$ FSH를 첨가하여 난자를 배양한 결과 난자의 성숙률 각각 89%, 88%, 89% 및 85%로 호르몬의 종류 또는 FSH 농도간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이렇게 성숙된 난자를 전기적 활성화를 통해 단위 발생을 유도한 결과 분할율은 86%, 88%, 89% 및 94%로 유의적인 차이가 없었으나, 배반포 단계로의 발생률은 각각 47%, 38%, 47% 및 64%로 80 $\mu\text{g/ml}$ FSH 첨가군이 eCG 및 20 및 40 $\mu\text{g/ml}$ FSH 첨가군에 비해 유의적으로 높은 발생능을 나타내었다($p < 0.05$). 배반포의 평균 세포수는 33~37개로 처리군

간에 유의적인 차이가 없었다(Table 1).

실험 2: 체외성숙 배양액에 첨가된 eCG 또는 FSH가 돼지 핵이식 난자의 체외발육능에 미치는 영향

체외성숙 과정에서 초기 22시간 동안 각각 10 IU/ml eCG와 20, 40 및 80 $\mu\text{g/ml}$ FSH가 첨가된 배양액에서 배양하여 성숙된 난자를 이용하여 체세포 핵이식 난자를 작성한 후 체외에서 배양하였다. 수핵난자와 공여핵세포의 융합율은 각각 79%, 83%, 79% 및 78%로 군간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 핵이식 난자의 분할율은 82~88%로 유의적인 차이가 없었으나, 배반포 단계로의 발육률은 각각 17%, 11%, 18% 및 25%로 나타나 eCG와 FSH 사이에는 유의적인 차이가 없었으나, 80 $\mu\text{g/ml}$ FSH 첨가군이 20 $\mu\text{g/ml}$ FSH 첨가군에 비해 유의적으로 높은 배반포 형성률을 나타내었다($p < 0.05$)(Table 2).

실험 3: 체외성숙 배양액에 첨가된 eCG 또는 FSH가 체외성숙 난자의 세포내 GSH 농도에 미치는 영향

난자의 세포내 GSH 농도는 체외성숙 배양액에 첨가된 호

Table 1. Effect of eCG and various concentrations of FSH in maturation medium on oocyte maturation and subsequent development of parthenogenetic pig embryos

Gonadrophin (concentration)	No. of oocytes matured ^a	% of oocytes that reached MII	No. of oocytes cultured ^a	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
				≥ 2-cell	Blastocyst	
eCG (10 IU/ml)	146	89 ± 3	126	86 ± 1	47 ± 1 ^b	35 ± 2
FSH (20 $\mu\text{g/ml}$)	154	88 ± 8	133	88 ± 3	38 ± 3 ^c	37 ± 2
FSH (40 $\mu\text{g/ml}$)	155	89 ± 5	137	89 ± 1	47 ± 2 ^b	33 ± 2
FSH (80 $\mu\text{g/ml}$)	157	85 ± 9	133	94 ± 2	64 ± 3 ^d	34 ± 1

II, metaphase II.

^a Three replicates.

^{b-d} Within a column, values with different superscripts are different ($p < 0.05$).

Table 2. Effect of eCG and various concentrations of FSH in maturation on *in vitro* development of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs

Gonadrophin (concentration)	No. of oocytes reconstructed ^a	% of oocytes fused	No. of oocytes cultured ^a	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
				≥ 2-cell	Blastocyst	
eCG (10 IU/ml)	159	79 ± 3	105	88 ± 2	17 ± 2 ^{bc}	33 ± 3
FSH (20 $\mu\text{g/ml}$)	158	83 ± 6	111	82 ± 3	11 ± 2 ^c	34 ± 3
FSH (40 $\mu\text{g/ml}$)	161	79 ± 5	105	84 ± 4	18 ± 2 ^{bc}	35 ± 4
FSH (80 $\mu\text{g/ml}$)	160	78 ± 4	103	87 ± 2	25 ± 3 ^b	40 ± 4

^a Three replicates.

^{b,c} Within a column, values with different superscripts are different ($p < 0.05$).

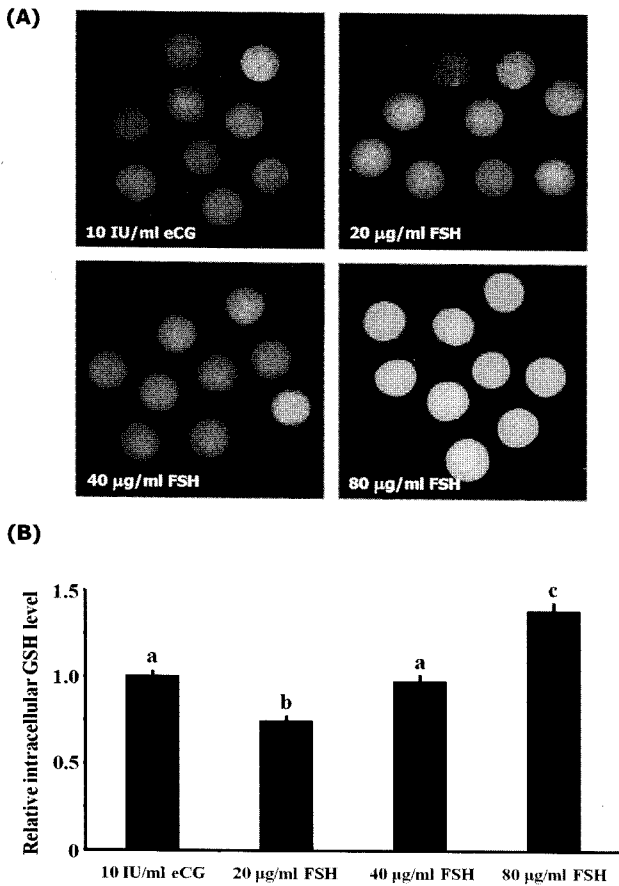


Fig. 1. Intracellular glutathione (GSH) levels of oocytes that were matured in medium supplemented with 10 IU/ml eCG and 20, 40 and, 80 μ g/ml FSH. (A) Epifluorescent photomicrographic images of oocytes detected by Cell Tracker Blue. (B) Relative level of intracellular GSH in oocytes calculated from the analysis of fluorescence intensity. Bars with different letters (a~c) are significantly different ($p < 0.05$).

르몬의 종류 또는 농도에 의해 유의적으로 증가 또는 감소되었다. FSH가 첨가 농도가 증가할수록 세포내 GSH 농도가 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 또한 80 μ g/ml FSH를 첨가한 경우 10 IU/ml eCG 첨가군에 비해서도 세포내 GSH level을 유의적으로 증가시켰다($p < 0.05$)(Fig. 1).

고 찰

체외성숙 과정에서 배양액에 첨가된 호르몬의 종류 및 농도가 돼지 미성숙 난자의 체외성숙과 단위 발생난자 및 핵이식 난자의 체외발육에 미치는 영향을 조사한 결과, 80 μ g/ml FSH를 체외성숙 배양액에 첨가하여 난자를 성숙시킬 경우 10 IU/ml eCG 첨가군에 비해 난자의 세포내 GSH level이 증가하고, 단위발생 및 체세포 핵이식 후의 체외발육이 향상되는

것으로 나타났다.

체외성숙 배양액에 첨가되는 호르몬의 종류와 농도는 난자의 체외성숙 및 발생에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 소에 투여된 eCG는 체내에서 긴 반감기를 가져 배란 후에도 잔존함으로써 에스트로겐을 과다하게 증가시켜 초기 배 발달에 좋지 못한 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Samande 등, 1981). 한편, FSH는 농도에 비례하여 난자의 체외성숙을 향상시키고 정상적인 발달을 유도하는 것으로 보고되었다(Sha 등, 2009). 또한, 난포의 발육 및 난자의 성숙은 FSH 또는 eCG 단독 투여보다 hCG를 병용 투여함으로써 더 효과적으로 이루어지며(Zelinski-Wooten 등, 1995), 체외성숙률 및 수정율의 증가를 가져온다(Funahashi 등, 1994). 본 연구에서 20~80 μ g/ml 농도의 FSH와 eCG를 체외성숙 배양액에 첨가하였을 때 난자의 성숙률에는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 단위 발생난자의 체외발육은 호르몬 종류 및 농도에 의해 유의적으로 영향을 받았다. 이는 eCG와 FSH에 의해 핵 성숙은 영향을 받지 않았으나 아마도 세포질 성숙에 영향을 미침으로써 이로 인해 배 발육에 차이가 나타난 것으로 생각된다. 성숙배양액에 첨가된 호르몬의 영향은 체세포 핵이식 난자의 체외발육에도 유사한 경향을 보였다. 즉, FSH의 농도가 20 μ g/ml에서 80 μ g/ml로 증가함에 따라 배반포 단계로의 체외발육이 증가하는 경향을 보였다. 이는 돼지 난자의 체외성숙 과정에서 FSH를 첨가하였을 때 FSH가 핵과 세포질 성숙에 영향을 미치며, FSH 농도가 5 IU/ml에서 20 IU/ml로 증가할 경우 체외성숙률이 개선되고 정상적인 spindle 배열과 염색체 정렬이 증가되어(Sha 등, 2009), 결과적으로 난자의 체외발달에 직접적 또는 간접적으로 영향을 미친다는 보고와 일치하였다. 하지만 이와는 반대로 고농도의 FSH는 핵 성숙을 저하시키며 spindle과 염색체의 비정상적인 정렬을 유도하여 결과적으로 비정상적인 난자 발달을 일으킨다는 보고도 있다(Hassold 등, 2001). 돼지 미성숙 난자의 체외성숙에는 FSH 제조회사 및 제품에 따라 다양한 농도가 사용되고 있다(Samartzi 등, 2008; Ye 등, 2007). 본 연구에서는 80 μ g/ml를 최대 농도로 하여 FSH의 효과를 검토하였다. 본 연구에서 사용된 FSH의 농도(20~80 μ g/ml)는 다른 연구에서의 50 ng/ml(Ye 등, 2007)이나 0.5 mg/ml(Samartzi 등, 2008)와 매우 큰 차이가 나기 때문에 FSH 농도에 따른 효과를 직접적으로 적용하는 것은 불가능하다. 따라서, 난자 성숙에 사용되는 성선자극호르몬의 종류(eCG와 FSH), 유래(태반 또는 뇌하수체) 및 제품에 따라 최적 농도를 조사하여 사용할 필요가 있을 것으로 생각된다.

난구세포는 난자의 성숙과 수정에 관여하는 중요한 요소 중 하나로 알려져 있으며(Kikuchi 등, 1993), 소에서 난구세포가 oxidative stress로부터 난자를 보호하여 체외 발생율을 증가시켰다는 보고가 있다(Fatechi 등, 2005). 본 연구에서 체외성숙 22시간 후와 40시간째의 호르몬의 종류와 농도에 따른

난구세포의 팽창 정도를 육안적으로 관찰한 결과 모든 군에서 난구세포층의 현저한 팽창이 나타났으며, 팽창 정도는 처리군간에 차이가 나타나지 않았다(결과 미제시). 이는 난구세포 팽창 정도가 난자의 성숙능과 단위 발생 또는 핵이식 후의 발육능을 명확히 예측할 수 있는 지표가 아니라는 것을 의미한다.

GSH는 thiol 복합체의 저분자 물질로 활성 산소(reactive oxygen species; ROS)의 활성을 저해함으로써 세포를 보호한다. 체외성숙 과정에서 난구세포의 대사에 의해 증가되는 세포내 GSH level은 난자의 세포질 성숙도를 판정하는 중요한 지표 중의 하나이며, 체외 발육능과 밀접한 연관이 있다(Takahashi 등, 2002; de Matos와 Furnus, 2000). 본 실험에서 80 $\mu\text{g/ml}$ FSH를 체외성숙 배양액에 첨가하였을 때 성숙난자의 세포내 GSH level은 eCG 그리고 다른 농도의 FSH 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다. 또한 20 $\mu\text{g/ml}$ FSH를 첨가한 그룹은 다른 그룹에 비해 유의적으로 낮은 세포내 GSH level을 나타내었다. 이는 체외성숙 과정에서 배양액에 첨가되는 FSH 농도가 돼지 미성숙 난자의 세포질 성숙과 매우 밀접한 관계가 있으며 중요한 영향을 미친다는 것을 의미하는 결과로서, 이러한 세포질 성숙의 개선에 의해 80 $\mu\text{g/ml}$ FSH 처리군에서 난자의 발달능이 개선된 것으로 생각된다.

결론

본 연구의 목적은 돼지 미성숙난자의 체외성숙 및 체세포 핵이식 후의 체외발육률을 향상시킬 수 있는 체외성숙 배양액 내 성선자극호르몬의 종류 및 농도를 조사하는 것이다. 체외성숙 배양액에 10 IU/ml eCG와 20, 40 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 FSH를 첨가하여 성숙배양 초기 22시간 동안 난자를 배양한 후 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서 추가로 배양하여 체외성숙을 유도하였다. 실험 결과, 돼지 미성숙 난자의 핵 성숙률은 성선자극호르몬의 종류와 농도에 의해 영향을 받지 않았으나, 단위 발생 및 체세포 핵이식 이후의 체외발육률은 80 $\mu\text{g/ml}$ FSH 첨가군에서 가장 높게 나타났다. 또한, 성숙난자의 세포내 GSH level 또한 다른 처리군에 비해 80 $\mu\text{g/ml}$ FSH 첨가군에서 가장 높게 나타났다. 결론적으로 돼지 미성숙난자의 체외성숙 과정에서 체외성숙 배양액에 80 $\mu\text{g/ml}$ FSH의 첨가는 난자의 세포질 성숙을 개선함으로써 돼지 단위 발생 및 체세포 핵이식 난자의 체외 발육능을 촉진하는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Bavister BD, Leibfried ML and Lieberman G. 1993. Development of preimplantation embryos of the Golden Hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.* 28:235-247.
- Chian RC, Nakahara H, Niwa K and Funahashi H. 1992. Fertilization and early cleavage *in vitro* of ageing bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology* 37:665-672.
- Christenson RK, Ford JJ and Readmer DA. 1985. Maturation of ovarian follicles in the prepubertal gilt. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 33:21-36.
- Cortvrintdt R, Smits J and Van Steriteghem AC. 1997. Assessment of the need for follicular stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. *Hum. Reprod.* 12:759-768.
- de Matos DG and Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53:761-771.
- Fatechi AN, Roelen BA, Colenbrander B, Schoevers EJ, Gaddella BM, Bevers MM and van den Hurk R. 2005. Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocytes against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote* 13:177-185.
- Footo WD, Mills CD, Phelps DA and Tibbitts FD. 1978. Oocyte maturation within stimulated immature bovine follicles *in vivo*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18:435-440.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 98:179-185.
- Funahashi H, Cantley T and Day BN. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 101:159-165.
- Hassold T and Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2:280-291.
- Hillensjo T and Channing CP. 1980. Gonadotropin stimulation of steroidogenesis and cellular dispersion in cultured porcine cumuli oophori. *Gamete Res.* 3:233-240.
- Kano K, Miyano T and Kato S. 1998. Effects of glycosaminoglycans on the development of *in vitro*-matured and-fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage *in vitro*. *Biol. Reprod.* 58:1226-1232.
- Kikuchi K, Nagai T, Motilik J, Shiuoya Y and Izaike Y. 1993. Effect of follicle cells *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* 39:593-599.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1991. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*.

- Theriogenology 36:95-105.
- Meinecke B and Meinecke-Tillmenn S. 1979. Effects of gonadotropins on oocyte maturation and progesterone production by porcine ovarian follicles cultured *in vitro*. Theriogenology 11:351-365.
- Munoz J, Del Nino Jesus A, Josa A, Espinosa E and Gil I. 1995. Use of follicle-stimulating hormone (FSH) to increase the *in vitro* fertilization (IVF) efficiency of mice. J. Ass. Reprod. Genet. 12:738-743.
- Nagai T and Moor RM. 1990. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 26:377-382.
- Naito K, Daen FO and Toyoda Y. 1992. Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in different media *in vitro*. Biol. Reprod. 47:43-47.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. Gamete Res. 21:289-295.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Shino M and Kikuchi K. 2006. Morphologic changes in boar sperm nuclei with reduced disulfide bonds in electrostimulated porcine oocytes. Reproduction 131:603-611.
- Niwa K. 1993. Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. J. Reprod. Fert. Suppl. 48:49-59.
- Osborn JC and Moor RM. 1983. The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes. J. Steroid Biochem. 19:133-137.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KH. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature 407:86-90.
- Prochazaka R, Nagyova E, Rimkevicova Z, Nagai T, Kikuchi K and Motlik J. 1991. Lack of effect of oocyctomy on expansion of the porcine cumulus. J. Reprod. Fert. 93:569-576.
- Sakatani M, Suda I, Oki T, Kobayashi S, Kobayashi S and Takahashi M. 2007. Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock. J. Reprod. Dev. 53:605-614.
- Samande J and Chupin D. 1981. Production of PMSG antiserum in cattle: assay of inhibitory and use in superovulated heifers. Theriogenology 15:108.
- Samartzi F, Tsakmakidis I, Theodosiadou E and Vainas E. 2008. Effect of porcine and ovine FSH on nuclear maturation of pig oocytes *in vitro*. Reprod. Domest. Anim. 43:153-156.
- Schoevers EJ, Kidson A, Verheijden JHM and Bevers MM. 2003. Effect of follicle-stimulating hormone on nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes *in vitro*. Theriogenology 59:2017-2028.
- Sha W, Xu BZ, Li M, Liu D, Feng HL and Sun QY. 2009. Effect of gonadotropins on oocyte maturation *in vitro*: an animal model. Fertil. Steril. (in press).
- Silvestre MA, Alfonso J, García-Mengual E, Salvador I, Duque CC and Molina I. 2006. Effect of recombinant human FSH and LH on *in vitro* maturation of porcine oocyte evaluated by the subsequent *in vitro* development of embryos obtained by *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection or parthenogenetic activation. J. Anim. Sci. 85:1156-1160.
- Song K and Lee E. 2007. Modification of maturation condition improves oocyte maturation and *in vitro* development of somatic cell nuclear transfer pig embryos. J. Vet. Sci. 8:81-87.
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H and Okano A. 2002. Promoting effect of β -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cysteine uptake of bovine embryos. Biol. Reprod. 66:562-567.
- Takano H, Koyama K, Kozai C, Kato Y and Tsunoda Y. 1993. Effects of aging of recipient oocytes on the development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. Theriogenology 39:909-917.
- Walker SC, Shin T, Zaunbrecher GM, Romano JE, Johnson GA, Bazer FW and Piedrahita JA. 2002. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using *in vitro*-matured oocytes. Cloning Stem Cells. 4:105-112.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC and Day BN. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. J. Reprod. Fert. 111:101-108.
- Wiesak T, Hunter MG and Foxcroft GR. 1990. Differences in follicular morphology, steroidogenesis and oocyte maturation in naturally cyclic and eCG/hCG-treated prepubertal gilts. J. Reprod. Fert. 89:633-641.
- Ye J, Coleman J, Hunter MG, Craigon J, Campbell KH and Luck MR. 2007. Physiological temperature variants and culture media modify meiotic progression and develop-

- mental potential of pig oocytes *in vitro*. *Reproduction* 133: 877-886.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M and Pursel VG. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocyte: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. Reprod.* 49:89-94.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in-vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 88:1-8.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM and Iwamura S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygote cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 66:112-119.
- Zelinski-Wooten MB, Hutchison JS, Hess DL, Wolf DP and Stouffer RL. 1998. A bolus of recombinant human follicle stimulating hormone at midcycle induces periovulatory events following multiple follicular development in macaques. *Hum. Reprod.* 13:554-560.
- Zelinski-Wooten, MB, Hutchison JS, Hess DL, Wolf DP, Stouffer RL. 1995. Follicle stimulating hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotropin releasing hormone antagonist-treated monkeys. *Hum. Reprod.* 7: 1658-1666.
- Zheng YS and Sirard MA. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 37: 779-790.
-

(접수일: 2009. 9. 1 / 채택일: 2009. 9. 10)