

## 한우 수정란의 산소 소비량이 수정란이식 수태율에 미치는 영향

최창용<sup>1,\*</sup>, 손준규<sup>1</sup>, 조상래<sup>1</sup>, 강다원<sup>2</sup>, 연성흠<sup>1</sup>, 최선호<sup>1</sup>, 최수호<sup>3</sup>, 김남태<sup>1</sup>, 김재범<sup>4</sup>, 정연섭<sup>1</sup>, 김성재<sup>1</sup>, 정진우<sup>1</sup>, 복난희<sup>1</sup>, 유용희<sup>1</sup>, 손동수<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, <sup>2</sup>경상대학교 의학전문대학원 생리학교실,

<sup>3</sup>경북축산기술연구소, <sup>4</sup>새란산부인과

## Effects of Pregnant Rate after Embryo Transfer in Oxygen Consumption of Embryos in Korean Cattle

Changyong Choe<sup>1,\*</sup>, Jun-Kyu Son<sup>1</sup>, Sang-Rae Cho<sup>1</sup>, Dawon Kang<sup>2</sup>, Seong-Heum Yeon<sup>1</sup>, Sun-Ho Choi<sup>1</sup>, Soo-Ho Choi<sup>3</sup>, Nam-Tae Kim<sup>1</sup>, Jae-Bum Kim<sup>4</sup>, Yeon-Sub Jung<sup>1</sup>, Sung-Jae Kim<sup>1</sup>, Jin-Woo Jung<sup>1</sup>, Nan-Hee Bok<sup>1</sup>, Yong-Hee Yoo<sup>1</sup> and Dong-Soo Son<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

<sup>2</sup>Department of Physiology, Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju 660-751, Korea

<sup>3</sup>Gyoung-buk National Livestock Research Institute

<sup>4</sup>Sae Ran Women's Clinic, Jeonju 560-900, Korea

### ABSTRACT

Oxygen consumption has been regarded as a useful indicator for assessment of mammalian embryo quality. This study was performed to investigate whether oxygen consumption reflects morphological grade of *in vivo* derived bovine blastocyst-stage embryos (blastocyst). The oxygen consumption of *in vitro* produced blastocyst was compared to its total cell number. In addition, pregnant rate was measured after transplantation of *in vivo* blastocysts with different oxygen consumption. The quality of blastocyst collected on day 7 after artificial insemination was categorized as grade I and II (G I and G II) based on microscopic observation of the morphology. Oxygen consumption of blastocyst was measured using a scanning electrochemical microscopy (SECM) and total cell number of *in vitro* blastocyst was enumerated by counting cells stained by propidium iodide. Pregnancy of recipient cow was confirmed with rectal palpation after 60 days of embryo transfer. The oxygen consumptions of G I blastocysts were significantly higher than those of G II blastocysts ( $10.2 \times 10^{15} / \text{mol s}^{-1}$  versus  $6.4 \times 10^{15} / \text{mol s}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ). Total cell numbers of *in vitro* blastocysts were 74.8, 90.7, and 110.2 in the oxygen consumption of below 10.0, 10.0~12.0, and over 12.0~ $10^{15} / \text{mol s}^{-1}$ , respectively. Total cell number was significantly increased in embryos with high oxygen consumption ( $p < 0.05$ ). Pregnant rate in recipient cow was 0, 50, and 85.7% in the transplantation of embryo with the oxygen consumption of below 10.0, 10.0~12.0, and over  $12.0 \times 10^{15} / \text{mol s}$ , respectively. These results suggest that measurement of oxygen consumption may help increase the pregnant rate of bovine embryos.

(Key words : oxygen consumption, Korean cattle, total cell number, pregnancy)

### 서 론

가축 인공수정은 수컷의 우수 형질을 이어 받을 수 있는 제한된 기술인데 비해 암컷과 수컷의 우수한 형질을 동시에 이어 받을 수 있는 수정란이식 기술은 가축의 개량을 위해 활용되고 있다. 그러나 정상적인 번식 주기를 가지는 한우에서 인공수정으로 80% 이상의 수태율을 획득할 수 있는데 반해 수정란이식은 40% 내외(손 등, 2008b)의 상대적으로 낮은 수태

율을 보이고 있다.

수정란이식 수태율에 영향을 미치는 요인으로 수정란의 품질, 수정란이식 시술자의 숙련도, 수란우의 상태 등 크게 3가지로 정리될 수 있는데, 이들 중 가장 중요한 요인을 차지하는 것 중의 하나가 이식할 수정란의 품질이라고 할 수 있다. 아무리 기술이 좋은 시술자가 건강 상태가 좋은 수란우에 이식하더라도 이식될 수정란의 품질이 좋지 않다면, 성공적인 수정란이식 결과를 가져올 수 없으므로 품질 좋은 수정란을

\* Correspondence : E-mail : cychi@korea.kr

선택하는 것이 무엇보다 선행되어야 한다. 수태율을 높이기 위해서는 품질 좋은 수정란을 선택하여 이식하는 기술이 선행되어야 하는데, 지금까지 사용하고 있는 수정란의 등급 판별 기준은 국제수정란이식학회(International Embryo Transfer Society, IETS)에서 규정하고 있는 수정란의 현미경 관찰에 의한 형태학적 등급 판정 기준에 따라 실시하고 있다. 그러나 이와 같은 육안 관찰에 의한 등급 판정은 검사자 개인의 주관에 따라 달리 판정될 수 있으므로 과학적 판단에 근거를 둔 객관적인 등급 판정이 필요하다. 수정란의 객관적인 등급 판정 방법으로 수정란이 소비하는 산소의 소비량을 측정하여 품질 좋은 수정란을 판단하는 기술이 연구되었는데(Magnuson 등, 1986; Houghton 등, 1996; Trimarchi 등, 2000; Shiku 등, 2001; Abe 등, 2004; Lopez 등 2005; Sakagami 등, 2010), 국내에서도 scanning electrochemical microscopy(SECM)를 이용하여 한우 체내·외 수정란의 발달 단계별 산소 소비량을 확인하였다(최 등, 2009).

따라서 본 연구에서는 수정란의 산소 소비량을 측정하여 그 품질을 판정하고, 이를 이식하여 수정란이식 수태율을 향상시키고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 체내수정란의 생산

한우 체내수정란 생산은 손 등(2008a), 최 등(2009)의 방법에 따라 실시하였는데, 난소 및 자궁질환이 없는 건강한 한우 공란우를 선발하여 day 0에 CIDR<sup>®</sup>(InterAg, New Zealand)를 삽입하고 estradiol benzoate(EB) 1 mg(SY Esrone, Samyang, Seoul, Korea) 및 progesterone(SY Ovaron, Samyang) 50 mg을 근육주사한 후 day 4부터 FSH 제제인 Antorin<sup>®</sup>R·10(Kawasaki Pharm, Japan) 28 mg을 4일간 12시간 간격으로 감량 분할(5,5,4,4,3,3,2,2) 주사하였고, day 6 오전과 오후에 dinoprost (Lutalyse<sup>™</sup>, Pharmacia & Upjohn)를 각각 25 mg과 15 mg 주사하고 day 6 오후에 CIDR<sup>®</sup> 제거하여 과배란을 유도하였다. dinoprost 2차 투여 후 36시간에 Gonadorelin 100 µg을 주사하였고, Gonadorelin 주사 후 8시간과 24시간 후에 각각 동결 정액 2 straw씩을 용해하여 2회 인공수정을 실시하였다. 수정란 회수는 2차 인공수정 7일 후 3 way Foley catheter를 이용하여 수정란을 채란하였다.

### 2. 체외수정란의 생산

한우 체외수정란의 생산은 도축장의 도축 난소를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취한 난포란은 체외성숙을 위해서 TCM 199(Sigma) 배양액에 FSH(10 µg/ml), LH(10 µg/ml)와 5% FBS (Gibco)를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 22시간 체외성숙 후 체외수정에 공시하였고, 체외수정은 BO 배양액에서 6시간 동안

체외수정을 실시하였으며, 체외배양은 serum free 배양액에서 배양하여 체외수정 후 7일째까지 수정란을 발달시켰다.

### 3. 수정란의 산소 소비량 측정

생산된 수정란의 산소 소비량 측정은 수정란 호흡 장치(FHK, HV-405, Japan)를 이용하였다. 수정란 호흡 장치는 주사형 전기화학현미경(Scanning Electrochemical Microscopy, SECM)을 이용하여 전극 표면에 용존 산소의 환원 반응을 조사하여 수정란 부근의 산소 농도 분포를 측정하였다. 측정 순서는 먼저 산소 소비량을 측정하기 위한 배양액(ERAM-2, IFP, Japan)이 들어있는 6개의 역원추형 plate(RAP-1, IFP, Japan)에 수정란을 주입한 후 주사 속도 10 µm/s의 속도로 미세 전극이 160 µm 범위로 수정란 주변을 3반복 왕복하여 수정란 주변의 산소 소비량을 측정하였다. 측정된 산소 소비량은 구면 확산 방법으로 자동 해석 program에 의해 자동으로 산출되었다.

### 4. 수정란의 총세포수 조사

체외배양 7일째 생산된 배반포 수정란은 propidium iodide (PI)로 염색을 하여 총세포수를 조사하였다. 염색법을 간단히 정리하면, PI 염색을 실시하기 전, 배반포를 4% paraformaldehyde에 30분간 정치시켜 고정시킨 후, 고정된 배반포를 유리 슬라이드에 올려놓고 PBS로 배반포를 세정한 후 PI와 RNase를 함께 처리하여 30분간 배양하였다. PBS로 수정란을 세정한 후 커버를 덮어 배반포가 움직이지 않도록 눌러서 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 총세포수를 계산하였다.

### 5. 수란우 임신 진단

수정란이식 수란우의 임신 진단은 이식 후 2개월째에 직장 검사를 통하여 임신 여부를 확인하였다.

### 6. 통계 분석

실험 결과의 통계학적 분석을 위해 처리군의 유의성 검정 ( $p < 0.05$ )은 *F*-test를 실시하였고, 처리군간의 유의성 검정 ( $p < 0.05$ )은 ANOVA test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 체내수정란의 등급별 산소 소비량 비교

체내수정란의 형태학적 등급별 산소 소비량을 비교한 결과, Table 1과 같이 조사되었다. 초기 배반포 수정란의 경우 1등급 수정란에서  $8.2 \times 10^{15} / \text{mol s}^{-1}$ 을 나타낸 반면, 2등급 수정란에서  $7.2 \times 10^{15} / \text{mol s}^{-1}$ 을 나타내어 유의적인 차이는 없었으나, 1등급 수정란에서 높은 경향을 보였으며, 배반포 단계에서는 1등급 수정란  $10.2 \times 10^{15} / \text{mol s}^{-1}$ , 2등급 수정란  $6.4 \times 10^{15} / \text{mol s}^{-1}$ 로 1등급 수정란의 산소 소비량이 2등급 수정란에 비해 유

Table 1. Oxygen consumption rates of *in vivo* derived bovine embryos according to the morphological quality

Embryo quality	Oxygen consumption( $\times 10^{15}/\text{mol s}^{-1}$ )			
	No. of embryos	Early blastocyst	No. of embryos	Blastocyst
Grade I	15	8.2 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	24	10.2 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
Grade II	4	7.2 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	3	6.4 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>

Data are represented as mean $\pm$ S.D.

<sup>a,b</sup>Different superscripts indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

의적으로 높게 나타났다.

수정 후 7일째 생산된 초기 배반포 수정란은 산소 소비량이 형태학적 1등급 수정란이 약간 높은 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 보이지 않은 반면, 배반포 수정란은 1등급 수정란이 2등급 수정란에 비해 산소 소비량이 유의적으로 높게 나타났는데, 이는 Agung 등(2005)이 수정 후 7일째의 소 체외 수정란에서 rank A 수정란이 rank B 수정란에 비해 산소 소비량이 유의적으로 높은 것으로 보고한 것과 유사한 경향을 나타내었으나, Lopez 등(2007)이 1등급과 2등급 수정란의 산소 소비량은 유의적인 차이가 없고, 3등급 수정란은 낮은 수치를 나타내었다는 보고와, Overstrom(1992)이 형태학적 등급이 다른 수정란에서 산소 소비량이 달리 나타나지 않았다는 보고와는 배반포 수정란에서 상이한 결과를 나타내었다.

### 2. 체외수정란의 산소 소비량과 총세포수 비교

배반포 체외수정란의 산소 소비량( $10^{15}/\text{mol s}^{-1}$ )에 따른 총세포수를 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 산소 소비량이 10.0 미만, 10.0~12.0 미만 및 12.0 이상에서 총세포수는 각각 74.8개, 90.7개 및 110.2개를 나타내어 산소 소비량이 높을수록 총세포수도 증가하는 것이 확인되었다.

Abe 등(2006)은 수정란의 할구수가 많아질수록 산소 소비

Table 2. Relationship of oxygen consumption and total cell number of *in vitro* produced bovine embryos

Embryo Stage	No. of embryos	Oxygen consumption ( $\times 10^{15}/\text{mol s}^{-1}$ )	Total cell number
	9	Below 10.0	74.8 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>
Blastocyst	3	10.0~12.0	90.7 $\pm$ 31.6 <sup>a,b</sup>
	5	Over 12.0	110.2 $\pm$ 15.2 <sup>b</sup>

Data are represented as mean $\pm$ S.D.

<sup>a,b</sup>Different superscripts indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

Table 3. Pregnant rates according to oxygen consumption of bovine *in vivo* derived embryos

Oxygen consumption ( $\times 10^{15}/\text{mol s}^{-1}$ )	No. of	
	Recipient	Pregnant (%)
Below 10.0	3	0(0.0)
10.0~12.0	8	4(50.0)
Over 12.0	7	6(85.7)

량도 증가한다고 하였고, Lopez 등(2007)은 수정란이 체외에서 발달함에 따라 산소 소비량도 높아지며, 체외수정란의 형태학적 등급이 좋을수록 산소 소비량도 높다고 보고하였다. 즉 산소 소비량이 높다는 것은 그만큼 세포의 수도 많은 것으로 추측되는데, 본 실험에서는 산소 소비량이 높을수록 수정란의 총세포수도 증가하는 것으로 확인되었다. 이식하는 수정란의 총세포수가 많을수록 수정란이식 수태율이 높아지므로 본 실험은 수정란의 산소 소비량 측정으로 수정란이식의 수태율을 높일 수 있는 기반이 될 것으로 사료된다.

### 3. 체내수정란의 산소 소비량에 따른 수정란이식 수태율

한우 체내수정란의 산소 소비량( $10^{15}/\text{mol s}^{-1}$ )을 측정하고 이를 수란우에 이식한 후 수태율을 조사하여 Table 3과 같은 결과를 나타내었다. 산소 소비량이 10.0 미만에서 임신된 두 수가 없는 반면, 10.0~12.0 미만에서 50.0%의 수태율을 나타내었고, 산소 소비량이 가장 높은 12.0 이상에서는 85.7%의 높은 수태율을 나타내었다.

Abe 등(2006), Lopez 등(2007), Sakagami 등(2007)은 수정란의 산소 소비량이 높을수록 수정란이식 수태율이 높아진다고 하였는데, 본 실험에서도 산소 소비량이 높은 수정란을 이식할수록 수정란이식 수태율이 높은 것으로 확인되었다. 즉, 수정란이식 시술자의 기술과 수란우의 상태가 일정한 상태에서 산소 소비량이 높은 수정란을 이식할 경우 수태율을 향상시킬 수 있을 것이다.

## 결론

수정란의 산소 소비량은 세포의 생리화학적 대사를 바탕으로 수정란 각각의 품질을 판정할 수 있는 기준으로 사용될 수 있다. 본 연구는 한우 체내수정란의 형태학적 등급에 따른 산소 소비량을 비교하고, 체외수정란의 산소 소비량과 총세포수의 상관관계를 확인하며, 이를 바탕으로 체내수정란의 산소 소비량이 수태율에 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다. 체내 수정란의 형태학적 등급별 산소 소비량을 비교한 결과, 배반포 단계의 1등급 수정란  $10.2 \times 10^{15}/\text{mol s}^{-1}$ , 2등급 수정란

$6.4 \times 10^{15} / \text{mol s}^{-1}$ 을 나타내어 형태학적 등급이 좋을수록 수정란의 산소 소비량도 높아지는 것으로 조사되었다. 체외수정란의 산소 소비량에 따른 총세포수는 산소 소비량이 10.0 미만, 10.0~12.0 미만 및 12.0 이상에서 각각 74.8개, 90.7개 및 110.2개의 총세포수를 나타내어 산소 비량이 높을수록 총세포수도 증가하였다. 체내수정란의 산소 소비량을 측정하고 이를 수란우에 이식한 후 수태율을 확인한 결과, 산소 소비량이 10.0 미만에서 임신된 두수가 없는 반면 10.0~12.0 미만에서 50.0%의 수태율을 나타내었고, 산소 소비량이 가장 높은 12.0 이상에서는 85.7%의 높은 수태율을 나타내었다.

참고문헌

Abe H, Shiku H, Aoyagi S and Hoshi H. 2004. *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J. Mamm. Ova. Res.* 21:22-30.

Abe H, Shiku H, Yokoo M, Aoyagi S, Moriyasu S, Minamihashi A, Matsue T and Hoshi H. 2006. Evaluating the quality of individual embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J. Reprod. Dev.* 52:S55-S64.

Agung B, Otoi T, Abe H, Hoshi H, Murakami M, Karja NWK, Murakami MK, Wongsrikeao P, Wateri H and Suzuki T. 2005. Relationship between oxygen consumption and sex of bovine *in vitro* fertilized embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 40:51-56.

Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ and Leese HJ. 1996. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 44:476-485.

Lopez AS, Greve T and Callesen H. 2007. Quantification of embryo quality by respirometry. 2007a. *Theriogenology* 67: 21-31.

Lopez AS, Larsen LH, Ramsing N, Lovendahl P, Raty M, Peippo J, Greve T and Callesen H. 2005. Respiration rates

of individual bovine *in vitro*-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction* 130:669-679.

Magnuson C, Hillensjo T, Hamberger L and Nilsson L. 1986. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown *in vitro*. *Hum. Reprod.* 1:183-184.

Overstrom EW. 1992. Manipulation of early embryonic development. *Anim. Reprod. Sci.* 28:277-285.

Sakagami N, Akiyama K and Nakazawa Y. 2007. The relationship between oxygen consumption rate and pregnancy rate of bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 19:225(abstract).

Sakagami N, Yamamoto Y, Akiyama K, Nakazawa Y, Kojima N, Nishida K, Yokomizo S, Takagi Y, Abe H, Suzuki C and Yoshioka K. 2010. Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films. *J. Reprod. Dev.* 56:279-284.

Shiku H, Shiraiishi T, Ohya H, Matsue T, Abe H, Hoshi H and Kobayashi M. 2001. Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. *Anal. Chem.* 73:3751-3758.

Trimarchi JR, Liu L, Smith PJS and Keefe DL. 2000. Noninvasive measurement of potassium efflux as an early indicator of cell death in mouse embryos. *Biol. Reprod.* 63:851-857.

손동수, 최창용, 조상래, 최선호, 김현중, 김일화. 2008a. 한우 공란우의 1차 과배란처리 반응 불량개체의 2차 반응. *한국수정란이식학회 춘계학술대회.* p. 75.

손동수, 최창용, 조상래, 최선호, 김현중. 2008b. 2007년도 한우 및 젖소에서 수정란 생산 및 이식 실태. 제8회 발생공학 국제심포지엄 및 학술대회. pp. 46-47.

최창용, 조상래, 손준규, 최선호, 조창연, 김재범, 김성재, 강다원, 손동수. 2009. 한우 수정란의 발달 단계별 산소 소비량 변화. *한국수정란이식학회지* 24:231-235.

(접수: 2010. 8. 16 / 심사: 2010. 8. 19 / 채택: 2010. 8. 26)