

제주말에서 난포 크기에 따른 난포란의 체외성숙

류재규* · 강태영¹

*농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통학과, 제주대학교 수의과대학

(게재승인 : 2009년 12월 09일)

Effect of Follicle Size in Jeju Mare on Oocytes Matured *in vitro*

Jae-Gyu Yoo* and Tae-Young Kang¹

*Division of Animal Biotechnology, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon, 441-706, Korea
College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju Special Self-Governing Province, 690-756, Korea

Abstract : In this study, we investigated the number of follicles, oocyte recovery rate and oocyte competence after *in vitro* maturation according to the size of follicle. And equine oocyte competence after *in vitro* maturation was investigated in terms of the diameter of follicle with criteria of maturation: nuclear stage after Hoechst staining. The average number of follicles per ovary with middle size (11-20 mm, 2.68) was higher than those of small (5-10 mm, 0.74) and large size follicle (> 21 mm, 1.63), therefore medium follicle (53.1%) had higher proportion than other size of follicles. The average numbers of follicle per ovary was 5.05. The rate of oocyte recovery in small (54.5%) and middle follicle (50%) was higher than that in large follicle (40.9%). After culture for 48 h in Medium 199, 50%, 45.5%, and 44.4% of oocytes from the follicles with diameters of 5-10, 11-20, >21 mm, respectively reached the metaphase II stage. This is the first report showing number of follicle, oocyte recovery rate according to follicular size, and *in vitro* oocyte maturation in Jeju mare in Korea. To fulfill *in vitro* equine embryo production, further studies such as the seasonal effect, *in vitro* fertilization etc is need.

Key words : oocyte recovery, *in vitro* oocyte maturation, Jeju Mare.

서 론

Fulka와 Okolski에 의해 말 난포란의 체외성숙을 처음으로 보고한 후, 1989년에 도축장유래 난소로부터 채취한 난자를 체외성숙 시켜 정자가 주입된 수란암말의 난관내 난자를 이식 후 7일째 되는 날 수정란을 채취하여 배반포기까지 발달 시키는데 처음으로 성공하였다(21). 말의 경우, 소에 비해서 난소의 확보가 어려워 미국에서도 많은 경비와 인원을 투입하고 있다. 국내에서도 제주도와 같은 극히 제한된 지역에서 말 난소를 사용할 수 있기 때문에 그 연구가 미비한 상황이다.

죽은 말의 난소에서의 난자 수송 및 채취는 새로운 생명체를 생산할 수 있다. 말 난자의 체외성숙 성공 여부는 보통 난자의 핵 성숙 정도와 세포질 내 정자이식 방법(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 이후 분할율로 확인할 수 있다. 전세계적으로도 불과 몇몇 실험실(3,11,16)에서만 말 체외성숙 난자를 이용한 성공적인 임신을 보고 하였을 정도로

아직 말의 난자 체외성숙에 관한 많은 연구가 필요하다. Li 등은 체외 성숙된 난자를 이용하여 ICSI후 산자를 보고하였다(11).

물론 아직까지도 말난자의 체외 성숙율은 높지 않은 실정 이지만, 체외 배아 생산율을 개선하고자 미성숙난자를 정자가 주입된 배란직전의 말의 난포에 주입하거나, 외과적 방법으로 성숙난자를 정자가 주입된 말의 난관에 이식하는 방법 등을 사용하여 높은 성공을 뿐만 아니라, 불임말에서도 배아를 생산하게 되었다(9).

소, 돼지, 양의 난자는 난포의 성숙기 동안에 그 성숙능을 가지게 되며, 그 성숙능은 난포의 직경과 밀접한 관계를 갖는다(8). 하지만 말 난포의 크기와 난성숙능의 관계에 대한 정보는 극히 제한되어 있다. 배란 직전의 말난포의 직경은 대략 40 mm까지 도달한다(13,14). 직경이 10 mm 보다 작은 난포에서 채취된 난자가 10 mm 보다 더 큰 난포에서 채취된 난자보다 체외 성숙율이 낮다고 보고하였다(2,5,7). 하지만 국내 말에서 난포의 크기와 난자의 성숙능에 대한 정보가 부족하며 보다 많은 연구가 필요함을 보여준다.

이에 본 실험에서는 도축장 유래 제주말의 난소를 이용하여 난소의 난포수를 크기 별로 조사하였고, 난자의 채취율

¹Corresponding author.
E-mail : tykang87@jejunu.ac.kr

및 난포의 크기에 따라 채취된 난자의 체외성숙율을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

난포란의 준비 및 체외성숙

도축장에서 회수한 제주암말의 난소를 penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 식염수에 담긴 상태로 30~33°C의 보온병에 넣어 실험실로 옮겼다. 실험실에서 난소를 세척한 후 물기를 제거하고 외과용 가위과 포셉을 이용하여 외피를 깔끔하게 제거한 후, 외관상 5-10 mm, 11-20 mm, >21 mm 직경인 난포의 수를 각 난소마다 조사하였다.

각 크기 군별로 18 G 주사침이 꽂힌 50 ml 주사기로 난포에서 난포액을 흡입하여 배양 접시에 옮겼다. 실체현미경 아래에서 여러 겹의 난구 세포층이 단단하게 잘 부착된 균일한 색깔의 난구 세포-난모 세포 복합체를 선별하여 Bovine Serum Albumin (BSA, Fatty acid-free)와 gentamycine (5 µL/mL)이 포함되어있는 HEPES Medium 199 (Invitrogen GIBCO)에 세척하였다. 실체현미경에서 찾은 난자는 바로 체외 난자성숙배양액으로 세척한 후 50 µL 미세소적에 5% CO₂, 95% 공기, 38.5°C 조건에서 48시간 배양하였다. 실험에서 사용된 성숙배양액은 Medium 199 (Invitrogen-Gibco)에 Fetal Bovine Serum (10%, Invitrogen-Gibco), Gentamycine (5 µL/mL, Sigma), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1, 100 ng/ml, Invitrogen-Gibco), Epidermal growth factor (EGF, 50 ng/ml, Sigma), LH (5 µg/ml), FSH (10 µg/ml)을 첨가하였다.

난포란의 극체 확인 및 형태 선별

48시간 성숙 배양한 난모 세포-난구 세포 복합체를 hyaluronidase (Sigma) 300 IU가 든 PBS에서 난구 세포를 제거한 난자를 신선한 PBS로 세척 후, 실체 현미경 아래에

서 극체의 방출 유무를 검사하였다. 퇴행하는 난자들은 세포질이 파손되거나 세포질이 검게 응축된 퇴행으로 추정되는 난자들을 분리하였다.

핵상 염색

체외 성숙시킨 난자를 10% formalin solution에 1시간 고정 후, 0.5% triton X-100에 24 시간 동안 처리 후, 난자를 Hoechst 33342 (5 µg/ml, Sigma)에 10분간 염색 후 관찰하였다(X400, Zeiss).

결 과

난소에서 난자의 직경에 따른 분류

도축장 유래 난소를 외과용 가위로 잘 벗겨내어서 난포가 잘 보이게 한 후 직경에 따라 작은 난포 (5-10 mm), 중간난포 (11-20 mm), 그리고 큰 난포 (21 mm 이상)로 구분한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 총 19개의 난소에서 96개의 난포를 관찰하였으며, 난소 한 개당 평균 5.05개의 난포를 가지고 있었다. 큰 크기 난포는 총 31개로 난소 당 평균 1.63개로 나타났으며, 전체 난포의 비율에서 32.3%를 차지하였다. 작은 크기 난포는 총 14개로 난소 당 평균 0.74개로 나타났다. 중간크기 난포가 51개로 난소 당 평균 2.68개로 나타났으며, 전체 난포 중 53.1%로 높은 비율을 보였다.

난포크기에 따른 난포에서의 난자 회수율

난포 크기 군을 직경에 따라 각각 작은 난포 (5-10 mm), 중간난포 (11-20 mm), 그리고 큰 난포 (21 mm 이상)로 나누어 50 ml 주사위를 이용하여 난포액을 회수한 후 실체현미경에서 난자 수 조사하였다. 전체적으로 12개 난소의 55개 난포에서 26개 난자를 회수하여 47.3%의 회수율을 보였다 (Table 2). 난포의 크기 별 회수율은 작은 크기 난포, 중간크기 난포에서 각각 54.5%, 50%로, 21 mm 이상크기의 큰 난

Table 1. Number of follicles according to different the size of follicles

	No. of Follicles	Average Number of follicles per ovary	Proportion of follicle (%)
Small follicle 5-10 mm	14	0.74	14.6
Medium follicle 11-20 mm	51	2.68	53.1
Large follicle > 21 mm	31	1.63	32.3
No. of Total follicles	96	5.05	100

*Number of follicles in 19 ovaries was investigated

Table 2. Recovery rate of oocytes in terms of the size of follicles

	No. of follicles	No. of oocytes recovered	Rate of oocyte recovery (%)
Small follicle (5-10 mm)	11	6	54.5
Medium follicle (11-20 mm)	22	11	50
Large follicle (> 21 mm)	22	9	40.9
Total	55	26	47.3

12 ovaries were used for oocyte collection

Table 3. Effect of Follicle Size on Equine Oocyte *In Vitro* Maturation

	No. of oocytes	Nuclear status of in vitro Matured oocytes (%)		
		UK	MI	MII
Small follicle (5-10 mm)	6	1(16.7)	2 (33.3)	3 (50)
Medium follicle (11-20 mm)	11	2(18.2)	4 (36.4)	5 (45.5)
Large follicle (> 21 mm)	9	1(11.2)	4 (44.4)	4 (44.4)

MI: Metaphase I, MII: Metaphase II, UK:unknown

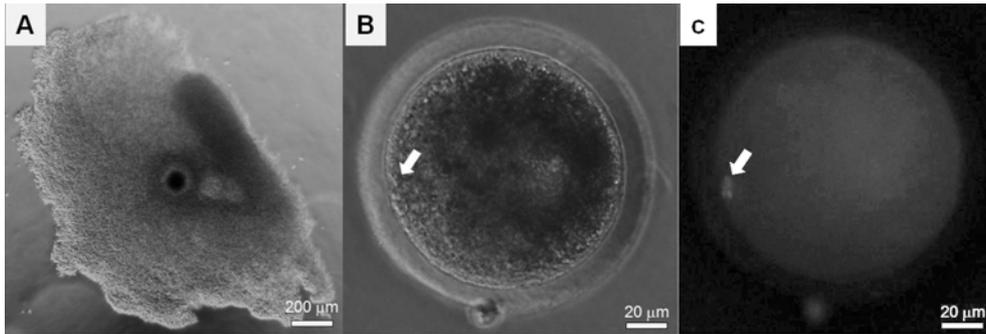


Fig 1. Equine COCs and chromatin configurations of equine oocyte. The arrow on B and C points to Metaphase II plate. A) An oocyte with expanded cumulus after *in vitro* maturation B) *In vitro* matured oocyte after denudation C) Metaphase II stage oocyte after Hoechst staining.

포(40.9%)보다 높은 회수율을 나타냈다.

난포크기에 따른 회수된 난자의 체외성숙

총 12개의 난소에서 난포의 크기에 따른 회수된 난자를 48시간 체외성숙 시킨 후 실체현미경에서 제1극체의 유무로 성숙을 확인하였으며, 고정처리 후 Hoechst로 핵 염색하여 핵 성숙상태를 관찰하였다. 작은 난포유래 난자의 체외 성숙율은 50%, 중간크기, 큰 난포유래 난자의 체외 성숙율은 각각 45.5, 44.4%로 나타났다.

고 찰

말은 계절 번식을 하는 동물로서 봄, 여름 그리고 초가을에만 배란이 가능하다. 본 실험은 난포의 크기와 수를 확인하기 위해서, 5월과 6월 중에 제주도 도축장유래 난소를 관찰하였다. 결과에서 본 것과 같이 총 19개의 난소를 관찰하였고, 난소 당 평균 난포수는 5.05개였으며, 중간크기의 난포가 난소 당 평균 2.68개로 가장 많이 차지했다. 이는 다른 보고에서의 난소 당 평균 7.7개(8)와 15개(19)보다 적은 난자회수율을 보였지만, Vogelsang 등의 보고와는 비슷한 난자회수율을 보였다(18). 하지만 그 수의 차이는 많은 요소 중에서 계절적인 요소, 말 품종, 북미 그리고 유럽과 제주도와와의 기후 차이 그리고 북미 유럽말과 제주말 간의 차이에 따른 수치라고 생각된다.

해부학적으로 말의 난자는 난포벽에 붙어있기 때문에 이것이 난소에서 난자를 채취할 때 장애요소로 작용하게 된다. 소, 돼지에서와 같이 주사기 바늘을 이용한 흡입(aspiration)

방법은 말에서는 상대적으로 낮은 채취율을 보인다. 이에 외과용 메스(scalpel) 또는 큐레트(curette)로 긁어 냈을 때가 71%의 회수율로 주사기바늘 흡입방법(31%) 보다 높은 채취율을 보였다고 보고 하였다(1). 하지만, 많은 수의 난자에서 난구세포가 탈락 된 것을 확인하였다고 보고 하였다(1). 물론 외과용 메스를 이용하여 난자의 피질부위를 제거하고 큐레트를 이용하여 분리시킨 후 난자를 채취할 경우에 높은 확률의 조밀한 난구세포를 가지고 있는 난자 회수율을 보이지만, 채취하는 시간 면에서 비효율적이라 할 수 있다(1,8). Preis 등은 6월과 7월에 난소 하나당 평균 3.6에서 4.2개를 채취하였다고 보고 하였다(15). 본 연구에서는 총 55개의 난포에서 26개의 난자를 채취하여 47.3%의 채취율을 보였고, 큰 난포에서의 난자 채취율이 다른 작은 크기와 중간크기의 난포에서의 난자 채취율에 비해 낮게 나타났다. 이것은 난포가 클수록 그 난포벽에 붙어있는 난자를 주사기로 회수하는데 어려움이 있는 것을 보여준다. 이에 보다 더 심세한 반복적인 채취를 시도하여야 할 것으로 생각된다.

일반적으로 말의 난자의 성숙은 24-48시간 동안 체외배양하고 있다(3,12). 본 연구에서의 난자의 핵성숙은 기본적으로 48시간 체외배양 후 제 1극체의 존재 및 핵상의 상태를 관찰하여 그 성숙 정도를 결정하였다. 말의 경우는 아직까지도 실험실마다 각기 다른 난포 선택 및 구분방법을 택하고 있어서 표준화가 되지 않았으며, 체외성숙을 또한 많은 차이를 보이고 있다(2,4,6,17,20). 말에서 10 mm 보다 작은 난포에서 채취된 난자의 배 발달율이 낮게 나타났다고 보고하였다(5,7). 본 연구에서는 물론 그 수가 작아 통계적인 처리를 할 수 없었지만, 난포의 크기에 따른 난자 체외 성숙율의 차이

를 확인 할 수 없었고, 소, 돼지 양과 같은 종에 비해 난자 체외 성숙율도 미비하다 할 수 있다. 이에 보다 높은 배 발달율을 위해서 난자의 체외성숙, 정자의 침체반응 등과 같은 많은 요소들이 더 연구되어야 할 것으로 본다.

결 론

본 실험에서는 제주말의 난소 내 난포의 크기에 따른 난자 회수율을 조사하였고, 각기 다른 크기의 난포에서 회수된 난자의 체외 성숙능을 조사하였다. 중간 크기(11-20 mm)난포의 수는 평균 2.68개 (53.1%)로 작은 크기(5-10 mm, 0.74)난포와 큰 크기(> 21 mm, 1.63)난포에 비해 높게 나타났으며, 난소 한 개 당 평균 5.05개의 난포를 가지고 있었다.

난자의 회수율은 작은 크기와 중간 크기 난포에서 각각 54.5%와 50%로 큰 난포에서의 40.9%보다 높게 나타났다. 각기 다른 크기의 난포에서 회수한 난자의 체외 성숙율을 조사한 결과, 큰 난포에서 44.4%, 중간 크기 난포는 45.5%, 그리고 작은 크기 난포에서는 50%를 나타내었다. 본 연구는 국내 최초로 제주마의 난자 회수 및 체외성숙 연구로서 성공적인 산자 생산을 위해서 보다 많은 연구가 필요할 것으로 본다.

참 고 문 헌

1. Alm H, Torner H, Kanitz W, Becker F, Hinrichs K. Comparison of different methods for recovery of horse oocytes. *Equine Vet J Suppl* 1997; 25: 47-50.
2. Brinsko SP, Ball BA, Ellington JE. In vitro maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. *Theriogenology* 1995; 44: 461-469.
3. Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, Ball B, Anderson G, Liu I. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biol Reprod*. 2001; 65: 899-905.
4. Choi YH, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N. In vitro maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. *Theriogenology* 1993; 40: 959-966.
5. Del Campo MR, Donoso X, Parrish JJ, Ginther OJ. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. *Theriogenology*. 1995; 43: 1141-1153.
6. Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F. In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology* 1996; 45: 547-560.
7. Goudet G, Bezard J, Duchamp G, Gerard N, Palmer E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol Reprod* 1997; 57: 232-245.
8. Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgrath JP, Martin MG. In vitro maturation of horse oocytes: Characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Reprod* 1993; 48: 363-370.
9. Hinrichs K. Production of embryos by assisted reproduction in the horse. *Theriogenology* 1998; 49: 13-21.
10. Hinrichs K, Schmidt AL. Meiotic Competence in Horse Oocytes: Interactions Among Chromatin Configuration, Follicle Size, Cumulus Morphology, and Season. *Biol of Reprod*. 2000; 62: 1402-1408.
11. Li X, Morris LH, Allen WR. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction* 2001; 121: 925-932.
12. Love LB, Choi YH, Love CC, Varner DD, Hinrichs K. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology*. 2003; 59: 765-774.
13. Palmer E, Driancourt MA. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology* 1980; 14: 203-216.
14. Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. *Theriogenology* 1985; 24: 359-368.
15. Preis KA, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Caracciolo di Brienza V, Gomes GM, Maclellan LJ, Squires EL. In vitro maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22°C. *Theriogenology* 2004; 62: 1215-1223.
16. Scott TJ, Carnevale EM, Maclellan LJ, Scoggin CF, Squires EL. Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro, or within oviducts of mares. *Theriogenology*. 2001; 56: 705-715.
17. Shabpareh V, Squires E, Seidel GE, Jasko DJ. Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. *Theriogenology* 1993; 40: 1161-1175.
18. Vogelsang MM, Kreider JL, Bowen MJ, Potter GD, Forrest DW, Kraemer DC. Methods for collecting follicular oocytes from mares. *Theriogenology* 1988; 29: 1007-1018.
19. Wesson JA, Ginther OJ. Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of a slaughterhouse survey. *J Anim Sci* 1981; 52: 119-129.
20. Willis P, Caudle AB, Fayer-Hosken RA. Equine oocyte in vitro maturation: Influences of sera, time and hormones. *Mol Reprod Dev* 1991; 30: 360-368.
21. Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR, Galli C. Recent studies on in vivo fertilization of in vitro matured horse oocytes. *Equine Vet J Suppl* 1989; 7: 101-104.