

배양액 종류가 B6D2F1 마우스 배아발생능력에 미치는 영향

유창석^{1,#} · 박기상^{1,2} · 서병부^{1,3,†}

대구대학교 동물자원학과¹, 경북대학병원 산부인과², 대구대학교 생명환경연구소³

Effect of Type of Culture Media on B6D2F1 Mice Oogenesis

Chang-Seok Yoo^{1,#}, Kee Sang Park^{1,2} and Byoung Boo Seo^{1,3,†}

¹Dept. of Animal Resources, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

²Dept. of Obstetrics and Gynecology, Kyungpook National University Hospital, Daegu 41944, Korea

³Institute of Life and Environment, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of type of culture media (BM, G2, OS, TCM, and MEM) on B6D2F1 mice oogenesis. In the present study, B6D2F1/CrljOri F₁ mice were utilized in order to maximize oogenesis. Also we used TCM-199, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), embryo culture medium (Fertilization medium, Cleavage medium, Blastocyst medium), G series medium and One step medium. *In vitro* maturation was highest in BM followed by the order of OS, MEM, TCM and G2 ($90\pm 2.8\% > 88\pm 3.2\% > 85\pm 4.9\% > 78\pm 10.2\% > 64\pm 7.7\%$, respectively). To note, the G2 group was statistically different compared to other groups ($p < 0.05$). On the other hand the fertilization rate was highest in the G2 group followed by BM, OS, TCM, and MEM ($87\pm 7.2\% > 85\pm 6.9\% > 74\pm 14.0\% > 71\pm 13.8\% > 2\pm 1.4\%$, respectively). The MEM group was significantly lower compared to other groups ($p < 0.05$). The developmental rate was highest in the OS group followed by the G2 group and the BM group albeit no statistical significance was noted ($73\pm 11.6\% > 71\pm 9.2\% > 66\pm 10.4\%$). Of note, all cells of the TCM and MEM groups were died during embryonic development. The zona hatched rate ($51\pm 9.8\%$ vs. $50\pm 9.1\%$ vs. $47\pm 7.2\%$ for BM, G2, and OS respectively) and attached rate ($45\pm 12.3\%$ vs. $38\pm 16.1\%$ vs. $37\pm 11.5\%$ for BM, G2, and OS respectively) were not different amongst groups. No difference was found in total cell numbers (74 ± 13.9 vs. 64 ± 9.2 vs. 76 ± 6.7 for BM, G2, and OS respectively), ICM cell numbers (20 ± 1.9 vs. 14 ± 1.8 vs. 15 ± 2.1), TE cell numbers (55 ± 12.5 vs. 49 ± 10.7 vs. 61 ± 5.9), % ICM ($30\pm 2.8\%$ vs. $24\pm 7.0\%$ vs. $22.8\pm 2.2\%$) and ICM:TE ratio (1.2 ± 0.5 vs. $1.3.1\pm 0.8$ vs. $1.3.1\pm 0.5$) amongst groups. In summary, these results can provide fundamental data to maximize culture condition for *in vitro* fertilization on B6D2F1 mice.

(Key words : B6D2F1 mice, culture media, oogenesis, inner cell mass, trophectoderm)

서론

포유동물에서 체외 수정은 1951년 토끼에서 Chang이 처음으로 성공한 이래 1968년 마우스에서 Whittingham이 난자를 체외에서 수정한 후 정상적인 태아로 발생할 수 있다는 것을 발표하였다. 사람 난자를 이용하여 세계 최초로 체외수정에 성공을 거둔 것은 1969년이었으며, Chang 등(1986)의 보고에 의하면 한국에서 시험관아기 기술을 이용하여 처음으로 아기가 태어났다고 보고하였다. 전 세계적으로 수많은 기관에서 인공 수태기술을 시행하고 있으나, 아직도 체외수정 기술을 이용한

임신 성공률의 향상에는 한계가 있는 것이 사실이다. 이와 같이 임신 성공률에 영향을 미치는 요인을 살펴보면, 여성 환자의 나이, 불임 요인, 시술자의 경험, 배양환경 등 여러 가지가 있을 수 있다(Ashworth 등, 2009). 그 중에서도 환경적 요인은 난자와 정자, 배아 등 생식 세포를 배양하는 동안 직접적인 영향을 주어 난자의 수정과 배아 발달 등 발생 능력에 미치는 주요 원인 중 하나라고 할 수 있다(Lonergan 등, 1999; Ashworth 등, 2009).

환경적 요인으로는 배양실의 온도와 습도, 배양기 등 장비와 소모품의 종류와 상태, 사용 배양액 등이 있으며, 환경적 요인

This research was supported by the Daegu University Research Grant, 2011.

Present address: Mama Papa & Baby, Ulsan, Korea

† Correspondence : duanimal@daum.net

에서 큰 비중을 차지하는 요인으로서는 배양액이 차지하고 있는 것이 일반적이다. 체외 배양에 사용되고 있는 배양액은 TCM-199, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), Fertilization medium(FM), Cleavage medium(CM), Blastocyst medium(BM), G series 배양액, 그리고 Onestep medium(OM) 등 여러 가지가 사용되고 있다(Park 등, 1992, 1994a, 1994b; Izquierdo 등, 1999; Lonerger 등, 1999; Langendonck 등, 2001; Garcia 등, 2007).

미성숙난자를 이용한 체외수정술로 많은 출생이 보고되고 있으나, 아직까지 그 성공률은 과배란유도 후 얻은 성숙난자를 이용한 체외수정술에 비하면 많이 낮은 것으로 알려져 있다(De Vos 등, 1999). 미성숙 난자의 성숙을 유도하기 위해서는 외인성 성선자극호르몬(exogenous gonadotropin) (Park 등, 1994c; Greve 등, 1995; Meyer 등, 1999)이나 성장인자(growth factor) (Im 등, 1995; Uhm 등, 2010), 단백질을 투여하여 배양하거나 생식기관의 상피세포(uterine epithelial cell)나 난포에서 얻은 과립막 세포(granulosa cell) 또는 vero cell과 함께 공배양을 하여(Kim 등, 2002; Lee 등, 2002; Moulavi 등, 2006) 성숙을 유도하였다. 또한 성숙 과정에서 불완전한 배양액의 조성때문에 투명대 경화 현상이 일어나 수정이 잘 되지 않거나 수정에 실패하는 경우가 발생하기도 한다(Park 등, 2000). 수정이 된다고 하더라도 이후 배아 발달이 저조할 수 있다. 또한 난자성숙 과정에서 난자 세포질 내에 미토콘드리아의 이상으로 인한 모계유전질환을 물려받게 될 수 있다(Holt 등, 1990). 이와 같은 조건으로 배양과정에서 적절한 배양 조성 환경을 확보하고, 우수한 난자를 체외성숙배양하여 수정을 실시하게 됨으로써 건강한 아이의 출산과 체외수정을 위한 난자의 수를 최대로 확보할 수 있고, 또 경제적인 측면에서 대체적으로 가격이 비싼 배란촉진제의 비용을 줄일 수 있으며, 환자의 난소 과잉 자극증후군의 빈도 또한 줄일 수 있으며, 미성숙 상태의 난자나 수정 후 배아의 동결보존을 함으로써 임신 성공률을 높일 수 있을 것이다(Park 등, 1994b, 1994c; Kim 등, 1995; Han 등, 2006).

산아 제한 정책의 영향과 급격한 사회발달로 인한 사회 인식의 변화로 자녀를 가지지 않으려는 경향과 자녀에게 소요되는 양육비와 교육비 문제로 자녀 기피 현상이 젊은 세대에 있어서 일반화되는 문제점을 가지고 있다. 그리고 점점 늦은 나이에 결혼을 하고 있으며, 또한 이와 같은 원인으로 국가의 전반적인 출산율이 저하됨으로써 노동인구의 감소로 인하여 국가 경쟁력도 저하되는 문제점을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 사육 중인 B6D2F1 마우스를 이용하여 난자 회수율, 체외 성숙·수정을 및 배아 발달에 영향을 미치는 요인을 조사하기 위하여, 암 마우스의 연령, 배양액의 종류 및 배양액 용량에 따른 효과를 비교하여 발생 능

력을 극대화할 수 있는 방안을 모색하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 국내에서 사육 중인 Hybrid 계통의 B6D2F1 마우스(모계: C57BL/6NCrIBR, 부계: DBA/2CrIBR)를 사용하였으며, 암컷은 생후 5~8주령, 수컷은 9~13주령인 것을 사용하였다(오리엔트바이오). 실험동물은 약 일주일동안 동물이 새로운 사육환경에 적응하고, 최소한의 스트레스를 받도록 적응 기간을 두고 실험을 실시하였다. 실험동물 사육을 위해 명과 암주기를 12:12(낮: 7:00~19:00, 밤: 19:00~7:00)로 조절하였고, 습도와 온도는 각각 40~50%, 22~24℃로 유지하였다. 마우스는 실험에 사용하기 전까지 사료와 물을 무제한으로 공급하였으며, 마우스의 사양관리와 동물실험규정은 대구대학교 동물실험윤리위원회의 규정(DUIACC-2014-02-0509-101)에 따라 실시하였다.

2. B6D2F1 마우스 배양액

G1 plus 배양액(Vitrolife, Sweden)과 Cleavage medium(CM) (COOK Medical, Australia)은 2PN~8 세포기 단계까지 사용하였다. 그리고 G2 plus 배양액(Vitrolife, Sweden)과 Blastocyst medium(BM) (COOK Medical, Australia)은 8 세포기에서 포배아 단계까지 사용하였다. 또한 Onestep medium(OS, NAKA IVF medium, Japan), TCM 그리고 MEM은 2PN~포배아 단계까지 배양하는데 사용하였다. 그리고 정자부유 배양액으로 GIVF (Vitrolife, Sweden), 정자의 수정능획득과 체외수정 배양액으로 Fertilization medium(FM, COOK Medical, USA)을 사용하였다.

3. 마우스 난자의 준비

실험동물에 과배란을 유도하기 위하여 B6D2F1 암컷 마우스에 난자성숙실험 48시간 전 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, SIGMA, USA)를 5~8주령의 마우스에 5~7.5 IU를 투여하여 과배란을 유도하였으며, 실험의 정확성을 높이기 위해 호르몬을 오후 4시에 주사하였다. 호르몬 투여 48시간 후 경추탈골법으로 마우스를 희생한 뒤 난소를 회수하였으며, 회수한 난소 주변의 혈액과 지방은 멸균된 거즈로 최대한 제거한 후 2 ml의 PBS+20% FBS(Fetal Bovine Serum, Sigma) 용액이 들어있는 기관배양접시(Falcon, 3037, USA)로 옮긴 난소는 31gauge가 부착된 1 ml 인슐린 주사기(BD, 328820, Ultra-Fine II, USA)를 사용하여 해부현미경(Leica MZ12.5, Switzerland)이 들어있는 IVF 챔버(Hoffman, C100-2, USA)내에서 난소 내 난포를 터뜨려 미성숙 난자를 채취하였다.

4. 체외 성숙(*In Vitro* Maturation, IVM)

채취한 난자는 다시 20%의 FBS가 함유된 PBS 용액에 세척한 다음 성숙배양에 이용하였다. 난자는 Fig. 1에서 보이는 바와 같이, 난자-난구세포 복합체(COC, cumulus-oocyte complexes), 난자-난구세포 일부 부착(CO, cumulus-oocyte partial contact) 또는 나화난자(O, denuded oocyte)와 같이 3가지로 분류하였다. 1) COC는 난자 주위에 난구세포가 조밀하고 균일하게 덮여 있는 것으로, 2) CO는 난자 주위에 난구세포가 일부 덮여 있는 것으로, 3) O는 난자 주위에 난구세포가 덮여 있지 않은 것으로 하였다. 분류된 난자는 본 실험의 기초배양액으로 이용된 G2군, BM군, OS군, TCM군 또는 MEM군으로 나누어 37°C 배양기에서 배양하였다. 난자의 체외성숙은 미네랄 오일(SAGE, paraffin oil)이 도포된 50 μ l 또는 100 μ l 소적에서 배양하였으며, 배양액 종류에 따라 CO₂ 농도를 다르

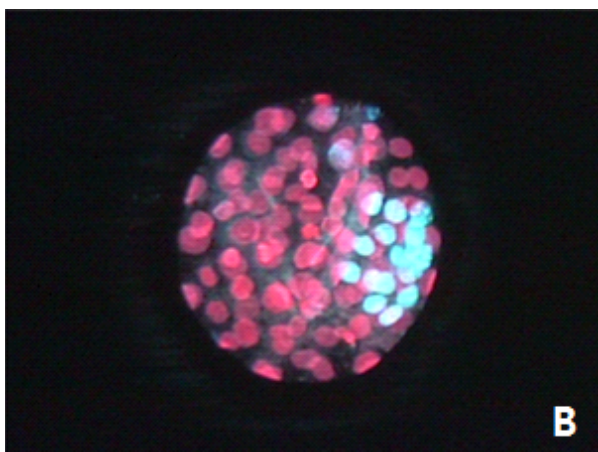
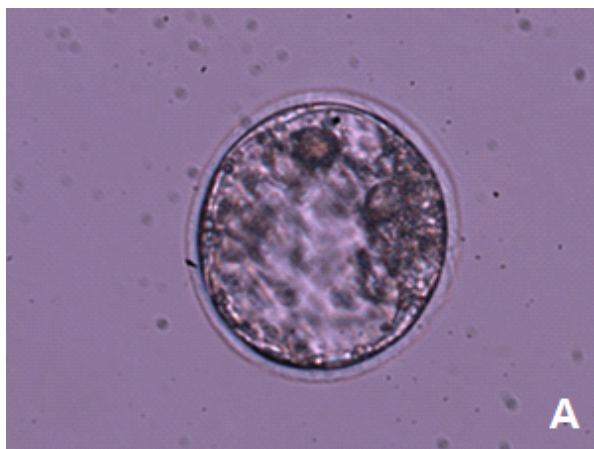


Fig. 1. Differential fluorescence staining of B6D2F1 mouse blastocyst (x200). A: blastocyst from B6D2F1 mouse; B: stained blastocyst by propidium iodide and bisbenzimidazole, TE cells stained by propidium iodide (PI, red), ICM cells stained by bisbenzimidazole (blue).

게 설정하였다. TCM군, DMEM군과 OS군은 5%로 하였고, G2군, BM군은 6%로 설정하였으며, 난자의 성숙 배양은 약 19시간 실시하였다. 난자의 성숙 판단은 제 1극체가 선명하게 보이는 것을 정상 성숙으로 판단하였으며, 극체가 여러 개이거나 거대 극체, 왜소 극체인 경우 또는 극체가 희미하게 보이는 경우에는 비정상 성숙으로 판정하였다.

5. 체외수정(*In Vitro* Fertilization, IVF)

체외수정은 난자 성숙이 시작된 이후 20시간 이전에 시작하였으며, 체외수정을 시작하기 전 B6D2F1 마우스 수컷을 경추 탈골법으로 도살 후 정소상체 미부만을 회수하였다. 회수한 정소상체 미부는 멸균된 거즈로 최대한 지방조직과 혈액을 제거한 후, 0.5 ml 단백질원이 첨가되어 있지 않은 GIVF가 든 기관배양접시(Falcon, 3037 USA)에 옮긴 후 기관배양접시에 PBS가 담겨있는 out-well에서 한번 세척한 다음, IVF 챔버 내에서 해부현미경하에 해부용 핀셋과 31gauge가 부착되어진 1 ml 인슐린주사기를 이용하여 정소상체 미부 내에 있는 정자괴를 방출시키고, 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에 15분간 멎쳐있는 정자괴가 풀리도록 배양하였다. 15분 후 정자괴가 풀린 배양액을 0.5 ml의 단백질원이 첨가된 배양액에서 다시 37°C, 5% 또는 6% CO₂ 배양기 내에서 약 90분간 배양하여 수정능획득을 유도하였다. 수정능획득을 유도하는 동안 마클러 카운팅 챔버(Markler counting Chamber, Sefi medical instruments, Israel)를 이용하여 정자의 농도와 생존율을 평가하였다. 수정능획득이 이루어지는 동안 성숙배양 된 난자를 피펫팅 또는 1% hyaluronidase를 이용하여 난구세포를 벗겨낸 후 극체가 선명하고 뚜렷하게 보이는 난자를 수정에 이용하였다. 성숙된 난자는 1 ml 수정용 배양액이 든 배양접시에서 세척한 뒤, 미네랄 오일이 도포된 50 μ l 또는 100 μ l의 수정용 배양액 소적에 옮겨졌다. 그리고 수정능획득을 유도한 정자를 수정용 배양액 소적에 주입하였으며, 주입량은 생존정자 기준으로 2×10^6 /ml를 주입하였다.

6. 배아 배양(*In Vitro* Culture, IVC) 및 포배아의 이중형광염색

체외수정 확인은 수정 후 약 4~6시간 뒤에 실시하였다. 수정 확인을 위해 난자를 세척하였으며, 세척용 배양액이 든 기관배양 접시에서 난자 주위에 붙은 정자와 난구 세포 등 이물질을 제거하였다. 이 물질이 제거된 난자는 체외배양용 배양액(G1, CM, OS, TCM, MEM)으로 옮긴 다음, 도립 미분간섭 현미경(BX-71, Olympus, Japan)을 이용하여 응성진행과 자성진행의 유무를 보고 수정을 확인하였다. 정확한 수정을 확인은 수정 후 약 24시간 뒤에 실시하였으며, 2-세포 배아로 발달하면 수정이 된 것으로 확정하였다. 2세포기 배아는 배양 후 5일 또는 7일간 배양하였다. 5일째는 포배아 단계에서 이중형

광염색(Park 등, 2014)을 실시하여 내세포괴(inner cell mass, ICM)와 영양배엽세포(trophectoderm, TE)를 확인하였다. 이중형광 염색 방법에 관하여 간단히 설명드리면 1차 염색액은 PBS에 1% Triton X-100(T-9254, Sigma USA)과 100 µg/ml의 Propidium Iodide(PI, P-4170, Sigma, USA)를 혼합하여 제조하였다(TE를 붉은색으로 염색, 2차 염색 후에는 분홍색으로 변화). 2차 염색액은 무수 알코올(Ethanol, K45611583 424, Merck, Germany)에 25 µg의 Bisbenzimidazole(B-2883, Sigma, USA)를 혼합하여 제조하였다(ICM을 청색으로 염색). 제조한 염색액은 빛 차단을 위해 상자에 넣고 4°C에서 30분간 냉장시켰다. 30분 후 포배아를 1차 염색액에 짧게(약 10~15초) 노출시킨 다음 2차 염색액으로 옮겨 1시간 30분 이상, 4°C에 방치하여 염색을 유도하였다. 염색액의 제조와 포배아 염색 과정은 빛이 차단된 암실에서 실시하였다. 염색이 완료된 포배아는 글리세롤에서 세척하고 나서 슬라이드 글라스에 만들어 놓은 글리세롤 소적으로 옮긴 다음 커버 글라스를 덮고, 형광현미경(BX-50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 자외선이 통과되어 분홍색으로 나타나는 것은 TE, 청색으로 나타난 것은 ICM으로 판단하였다. 성공적으로 이중형광 염색이 된 포배아의 모습은 Fig. 1에 나타내었다. 또한 7일간 배양한 경우에는 포배아의 투명대 탈출율과 투명대 탈출 포배아의 부착 유무를 확인하여 착상율을 간접적으로 측정하였다(Fig. 2).

7. 통계처리

실험에 대한 주관적인 관점을 배제하기 위해 실험 배치와 관찰은 완전임의 배치법을 실시하였다. 실험 결과는 백분율로 나타내었고, 불연속 변수에 대한 표준 오차(±SD)와 유의성 검정은 SAS 프로그램(Statistics Analytical System, version 9.4, USA)을 이용하여 처리하였다. 각 처리군간 유의성은 LSD와 Duncan 다중검정을 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

결 과



Fig. 2. The hatching process of B6D2F1 mice blastocysts after *in vitro* fertilization (X200). A: hatching blastocyst, B: zona hatched blastocyst, C: attached blastocyst.

1. 서로 다른 배양액(BM, G2, OS, TCM과 MEM)이 B6D2F1 마우스 난자의 성숙·수정을, 포배아 형성에 미치는 영향
본 실험은 서로 다른 배양액인 BM, G2, OS, TCM과 MEM이 B6D2F1 마우스 난자의 성숙, 수정을 그리고 포배아 형성에 미치는 영향을 조사하였으며, 실험의 결과는 Table 1에 제시하였다. 배양액 종류에 따른 B6D2F1 마우스 난자의 체외 성숙율은 BM > OS > MEM > TCM > G2군 순서로 높은 체외 성숙율을 보였지만(90.1±2.8% > 88.0±3.2% > 84.7±4.9% > 77.7±10.2% > 63.9±7.7%), G2 군은 다른 네 군에 비하여 유의적으로 낮은 성숙율을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 성숙한 난자를 체외수정에 이용하여 수정율을 확인한 결과, 수정율은 G2 > BM > OS > TCM > MEM 군 순서로 체외 수정율이 높은 것을 확인(87.1±7.2% > 84.5±6.9% > 74.0±14.0% > 71.4±13.8% > 2.2±1.4%) 하였으며, MEM 군을 제외한 나머지 네 군에서는 유의차가 나타나지 않았다. 그리고 MEM군은 수정 약 4~6시간 뒤 응성전핵 및 자성전핵을 확인할 수 있었지만, 수정 후 24시간 후 2세포기로의 발달은 진행되지 않고 사멸하여 수정율에서 유의적으로 낮은 것을 확인하였다($p < 0.05$). 또한 B6D2F1

Table 1. Effects of different medium on developmental rate of B6D2F1 mice oocytes

Media	No. of used oocytes (n)	Maturation rate (%)	Fertilization rate (%)	Blastulation rate (%)
BM	122	90.1± 2.8 ^a	84.5± 6.9 ^a	65.5±10.4 ^a
G2	122	63.9± 7.7 ^b	87.1± 7.2 ^a	70.5± 9.2 ^a
OS	92	88.0± 3.2 ^a	74.0±14.0 ^a	73.3±11.6 ^a
TCM	90	77.7±10.2 ^{ab}	71.4± 13.8 ^a	0 ^b
MEM	105	84.7± 4.9 ^a	2.2± 1.4 ^b	0 ^b

Each value is mean±standard error.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p < 0.05$).

마우스 2-세포기 배아에서 포배아까지의 발달을 나타낸 포배아 형성율에서는 OS > G2 > BM군 순서로(73.3±11.6% > 70.5±9.2% > 65.5±10.4%) 세 군간 포배아 형성율에서는 유의적인 차이가 나지 않았고, TCM군과 MEM군은 세포분화 그리고 발달과정이 점점 늦어지다 사멸하는 것을 확인할 수 있었다. 이번 실험을 통해 MEM군은 다른 배양액과 달리 초기 배아 발달에 좋지 않은 결과를 보였다.

2. 서로 다른 배양액 종류가 B6D2F1 마우스 포배아의 세포수에 미치는 영향

B6D2F1 마우스 포배아의 세포수를 확인하기 위해 수정 후 배양 5일째 되는 날 이중형광염색을 실시하였으며, 그 결과는 Table 2에 제시하였다. B6D2F1 마우스 포배아의 세포수를 조사하기 위해 BM군은 29개, G2군은 15개 그리고 OS군은 25개의 포배아를 사용하였다. TCM군과 MEM군은 배아 발달과정에서 전부 사멸하여 이번 실험에서는 제외하였다. 총 세포 수는 BM군, G2군 그리고 OS군에서 각각 74±13.9개, 64±9.2개, 76±6.7개로 OS군 > BM군 > G2군의 순서로 OS군에서 가장 많은 세포수를 나타내었다. 그리고 ICM 세포 수는 각각 20±1.9개, 14±1.8개, 15±2.1개로 BM군 > OS군 > G2군의 순서로 BM군에서 가장 많은 세포수를 나타내었다. 그리고 TE 세포는 각각 55±12.5개, 49±10.7개, 61±5.9개로 OS군 > BM군 > G2군 순으로 OS가 가장 많은 세포수를 나타내었다. 또한 %ICM는 각각 30±2.8%, 24±7.0%, 22.8±2.2개로 BM군 > G2군 > OS군 순서로 BM군이 가장 많은 세포수를 나타내었다. 그리고 ICM:TE ratio는 각각 1:2±0.5, 1:3.1±0.8, 1:3.1±0.5개의 결과를 얻었으며, 사용하는 배양액에 따른 통계적인 차이는 없었다(Table 3). 그렇지만 전체적으로 BM군과 OS군이 G2군보다 약간 더 좋은 결과를 보인다는 것을 확인할 수 있었다.

3. 서로 다른 배양액 종류가 B6D2F1 마우스 포배아의 투명대 탈출과 착상율에 미치는 영향

Table 2. Effect of different medium on cell number of B6D2F1 mice blastocysts after 5 days *in vitro* fertilization

Media	No. of stained blastocysts	Cell No.		
		ICM (n)	TE (n)	Total (n)
BM	29	19.8±1.9	54.5±12.5	74.4±13.9
G2	15	14.5±1.8	49.1±10.7	63.6± 9.2
OS	25	15.0±2.1	61.2± 5.9	76.2± 6.7

Each value is mean±standard error.

B6D2F1 마우스 포배아의 투명대 탈출율을 조사하기 위해 BM, G2 그리고 OS군을 실험에 사용하였으며, TCM군과 MEM군은 배아 발달 과정에서 전부 발달이 중지 또는 사멸하여 이번 실험에서는 제외하였으며, 결과는 Fig. 3에 제시하였다. B6D2F1 마우스 포배아의 투명대 탈출율은 BM, G2, 그리고 OS군에서 각각 51±9.8%, 50±9.1% 그리고 47±7.2%로 BM > G2 > OS군 순서로 투명대 탈출율이 높았으며, 세 군간의 유의적 차이는 확인할 수 없었다. 또한 B6D2F1 마우스 포배아의 착상율을 확인하였으며, 먼저 실험한 방법과 동일한 방법으로 배양 7일째 배아가 투명대를 탈출해 배양접시에 완전 착상한 것만을 착상율에 포함시켰으며, 그 결과는 Fig. 4에 제시하였다. B6D2F1 마우스 포배아의 착상율은 BM, G2, 그리고 OS군에서 각각 45±12.3%, 38±16.1% 그리고 37±11.5%로 투명대 탈출율과 동일하게 BM > G2 > OS군 순서로 높았으며, 세 배양액간 유의차는 없었으나, BM 배양액에서보다 높은 착상율을 확인할 수 있었다.

고찰

본 실험을 통하여 서로 다른 배양액(BM, G2, OS, TCM과

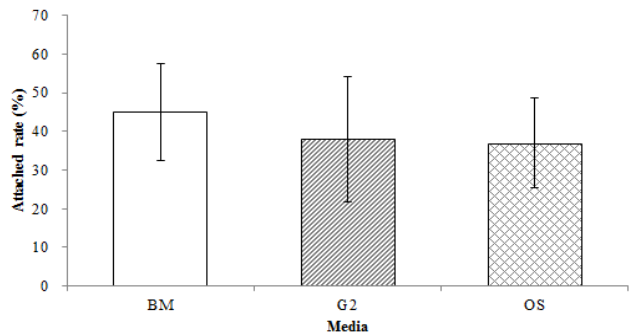


Fig. 3. Effect of different medium on zona hatched rate of B6D2F1 mice blastocysts. Value is mean±standard error.

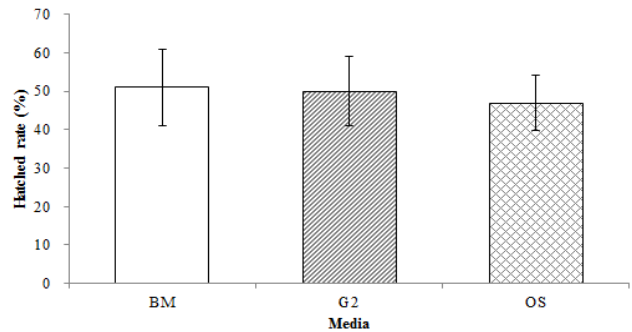


Fig. 4. Effect of different medium on attached rate of B6D2F1 mice blastocysts. Value is mean±standard error.

MEM)이 B6D2F1 마우스 난자의 성숙·수정율, 포배아 형성율에 미치는 영향에 있어서 우선 B6D2F1 마우스 난자의 체외 성숙율은 BM > OS > MEM > TCM > G2군 순서로 높은 체외 성숙율을 보였지만, G2 군은 다른 네 군에 비하여 유의적으로 낮은 성숙율을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 그리고 성숙한 난자를 체외수정에 이용하여 수정율을 확인한 결과, 수정율은 G2 > BM > OS > TCM > MEM군 순서로 체외 수정율이 높은 것을 확인할 수 있었다. 이번 실험을 통해 TCM, MEM 배양액은 미성숙 난자를 체외 성숙과 체외수정에서 응성전핵과 자성전핵까지 확인을 하였지만, 이후 초기 배아 발달과정에서 전부 사멸을 하였으며, TCM 배양액은 미성숙난자의 체외성숙 뒤 체외수정 과정에서 수정이 되지 않는 것을 확인하였으나, 이후 후기 배아 발달과정에서 TCM 배양액을 첨가하였을 때 높은 투명대 탈출율과 배아 착상율을 확인할 수 있었는데, 이 결과를 근거로 MEM과 TCM배양액은 초기 배아발달에 좋지 않은 결과를 보인다고 생각되어진다. 이러한 결과는 White 등(1989)이 주장한 MEM 배양액은 초기 배아발달에 좋지 않은 영향을 주는 것과 동일한 결과를 확인하였으며, 그리고 Kim 등(2011)은 TCM 배양액을 배아 발달을 위한 배양액으로 이용하였을 때 포배아 형성율이 2.7%로 본 실험과 비슷한 결과를 보여 TCM은 후기 배아발달에 좋지 않은 영향을 미친다고 판단된다.

또한 Langendonck 등(2001)은 G2보다 BM에서 인간 난자의 성숙율(12.9 ± 5.2 와 14.0 ± 4.9)이 높은 경향을 보인다고 하여 본 실험과 비슷한 결과를 나타내었다. Kim 등(2011)은 마우스 난자를 TCM에서 배양할 때 체외 성숙과 2-세포기의 발달까지는 이루어졌으나, 포배아 형성율은 매우 낮게 나타난다고 보고하였다. Kim 등(2011)은 인간 난자와 배아 발달을 측정하기 위해 동물 모델을 사용하는 것은 제한이 있지만, 임상적으로 포배아 단계까지의 체외성숙단계에 사용되는 것은 대안이 가능하다고 제시하여 본 실험에서도 동일하게 사용되었던 단계적 배양액인 G2(8-세포기~포배아), BM(8-세포기~포배아)는 동일한 결과를 보였지만, OS는 단일배양액으로서 G2와 BM과 비슷하거나 우수한 결과를 보여 위의 주장과 상반되는 결과를 보였다. Swain 등(2001)은 단계적인 배양 시스템이 단일 배양 시스템보다 배아 발달율은 낮지만, 포배아 형성율은 높다고 하였다. 또한 이번 실험에 이용된 BM, G2, OS, TCM 그리고 MEM 배양액은 난자의 체외성숙에 이용할 수 있었고, BM, G2와 OS 배양액은 체외수정 및 배아발달 과정에서는 큰 차이가 없었으나, TCM과 MEM 배양액은 MEM이 초기 배아 발달에 좋지 않은 영향을 미친다고 사료되고, 또한 TCM도 후기 배아 발달에 좋지 않은 영향을 미친다고 사료된다. 또한 추후에 BM 또는 G2군과 같은 단계적 배양액과 OS와 같은 단일 배양액인 난자 또는 배아 발달에 미치는 영향에 대하여 조사해보는 것

이 체외수정 배양조건 개선에 도움이 될 것이라 생각된다.

결론

본 연구는 배양액(G2군, BM군, OS군, TCM군 또는 MEM군)이 B6D2F1 마우스 배아의 발생능력에 미치는 영향에 관하여 실험을 실시하였다. B6D2F1 마우스 난자의 체외성숙율은 BM > OS > MEM > TCM > G2군 순서로 높았으며($90 \pm 2.8\% > 88 \pm 3.2\% > 85 \pm 4.9\% > 78 \pm 10.2\% > 64 \pm 7.7\%$), G2군은 다른 네 군에 비하여 통계적 유의차가 있었다($p > 0.05$). 수정율은 $87 \pm 7.2\% > 85 \pm 6.9\% > 74 \pm 14.0\% > 71 \pm 13.8\% > 2 \pm 1.4\%$ 로 G2 > BM > OS > TCM > MEM군 순서로 수정율이 높았고, MEM은 유의적으로 수정율이 낮았다($p > 0.05$). B6D2F1 마우스 포배아 발달율은 OS > G2 > BM군 순서($73 \pm 11.6\% > 71 \pm 9.2\% > 66 \pm 10.4\%$)로 세 구간 포배아 형성율에서는 유의적인 차이가 없었지만, TCM과 MEM군은 B6D2F1 마우스 배아 발달과정 중 발달이 중지되었다. B6D2F1 마우스 투명대 탈출율($51 \pm 9.8\% > 50 \pm 9.1\% > 47 \pm 7.2\%$)과 B6D2F1 마우스 착상률($45 \pm 12.3\% > 38 \pm 16.1\% > 37 \pm 11.5\%$)은 BM > G2 > OS군으로 세 구간 유의차는 없었다. B6D2F1 마우스 포배아의 총 세포 수($74 \pm 13.9, 64 \pm 9.2, 76 \pm 6.7$), ICM 세포 수($20 \pm 1.9, 14 \pm 1.8, 15 \pm 2.1$), TE세포 수($55 \pm 12.5, 49 \pm 10.7, 61 \pm 5.9$), %ICM($30 \pm 2.8\%, 24 \pm 7.0\%, 22.8 \pm 2.2$) 그리고 ICM:TE ratio($1.2 \pm 0.5, 1.3.1 \pm 0.8, 1.3.1 \pm 0.5$)는 사용하는 배양액에 따른 세 그룹 간 유의차는 없었다.

이 실험의 결과들을 바탕으로 B6D2F1 마우스의 체외 수정을 위한 배양 조건을 극대화하는 기초 연구 자료로 활용되어질 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168:697-698.
- Chang YS, Lee JY, Moon SY and Kim JK. 1986. Pregnancy and its outcome by *in vitro* fertilization of human oocytes and embryo transfer: A report of the first test tube babe in Korea. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* 29(3):345-361.
- De Vos A, Van de Velde H, Joris H and Van Steirteghem A. 1999. *In-vitro* matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 14(7):1859-1863.
- Garcia RM, Ward F, Fair S, O'Meara CM, Wade M, Duffy P and Lonergan P. 2007. Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media,

- Anim. Reprod. Sci. 98(3-4):233-240.
- Greve T, Callesen H, Hyttel P, Hoier R and Assey R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41-50.
- Han SH, Kim HJ, Moon JH, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Kim JK and Moon SY. 2006. Comparison of two culture media on *in vitro* maturation and fertilization of immature oocytes obtained from stimulated cycles. *Kor. J. Obstet. Gynaecol.* 49(7):1492-1500.
- Holt IJ, Harding AE, Petty RKH, Morgan-Hughes A. 1990. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.* 46:428-433.
- Im KS and Park KW. 1995. Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 44(2) :209-216.
- Izquierdo D, Villamediana P and Paramio MT. 1999. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 52:847-861.
- Kim KR, Moon SY and Chang YS. 1995. *In vitro* maturation immature mouse oocytes using co-culture with human uterine epithelial cells. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* 38(6):1014-1029.
- Kim M, Hong SJ, Lee JH, Min CK, Hwang KJ and Park RW. 2011. Comparison of *in vitro* maturation media of immature oocytes: the effectiveness of blastocyst culture media. *Fertil. Steril.* 95(2):554-557.
- Kim SK, Park JW and Hur EJ. 2002. Effect of human oviduct epithelial cells and vero cell on early mouse embryonal development *in vitro*. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* 45(6):978-989.
- Langendonck AV, Demylle D, Wyns C, Nisolle M and Donnez J. 2001. Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: A prospective, randomized, comparative study. *Fertil. Steril.* 76(5):1023-1031.
- Lee YS, Lee CH, Go HJ, Lee KS, Rheu CH and Kim JD. 2002. Comparative study on development of mouse embryos in conventional medium versus vero cell co-culture. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* 45(6):1026-1032.
- Loneragan P, Fair T, Corcoran D and Evans ACO. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65: 137-152.
- Meyer WR, Novotny DB, Fritz MA, Beyler SA, Wolf Lynda J and Lessey BA. 1999. Effect of exogenous gonadotropins on endometrial maturation in oocyte donors. *Ferti. Steril.* 71(1):109-114.
- Moulavi F, Hosseini SM, Ashahverdi A and Nasr-Esfahani MH. 2006. Can Vero cell co-culture improve *in-vitro* maturation of bovine oocytes? *Reprod. Biomed. Online.* 13(3):404-411
- Park KS, Kim KS, Seo BB and Song HB. 1992a. Influences of hormone treatment on the ovulation rates, mutation and *in vitro* fertilization of mouse. *Kor. J. Emb. Trans.* 7(2): 89-96.
- Park KS, Lee SH and Song HB. 1994a. Influences of different culture conditions on nuclear maturation and cumulus cell layers of mouse follicular oocytes *in vitro*. *J. Anim. Sci. Technol.* 36(6):613-622.
- Park KS, Lee SH and Song HB. 1994b. *In vitro* fertilization and polyspermy in follicular oocytes matured in various culture conditions. *Kor. J. Fertil. Steril.* 21(2):177-182.
- Park KS, Lee TH, Song HB and Chun SK. 2000. Human amniotic fluid induces spontaneous hardening of the zona pellucida of mouse immature oocytes during maturation *in vitro*. *Kor. J. Fertil. Steril.* 27(1):23-29.
- Park KS, Seo BB and Song HB. 1992b. Effects of age and body weight of mice on the ovulation rates, mutation and *in vitro* fertilization. *Kor. J. Agr. Sci., Taegu University* 6:27-32.
- Park KS, Son WY, Kim JH, Lee KA, Han SY, Ko JJ and Cha KY. 1994c. Influences of human body fluids and gonadotropins supplemented in the maturation medium on the nuclear maturation and fertilizability of mouse immature oocytes. *Kor. J. Fertil. Steril.* 21(2):183-190.
- Park SB, Kim HJ, Choi YB, Ahn KH, Lee KH, Yang JB, Yu CS and Seo BB. 2014. The effect of various assisted hatching techniques on the mouse early embryo development. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 41(2): 68-74.
- Uhm SJ, Gupta MK, Yang JH, Chung HJ, Min TS and Lee HT. 2010. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 73(8):1024-1036.
- White KL, Henke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DL and Wood TC. 1989. Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol. Reprod.* 41:425-430.
- Whittingham DG. 1968. Fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Nature* 220:592-593.