

# 性腺자극호르몬과 牛胎兒血清첨가가 돼지卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精에 미치는 영향

김규현 · 정범식 · 박수봉\* · 박항균

慶北大學校 農科大學 酪農學科

\*慶北大學校 農業科學技術研究

## Effects of Fetal Calf Serum and Gonadotropins Supplemented to the Medium on Maturation and Fertilization In Vitro of Porcine Follicular Oocytes

Kim, Kyu Hyon · Jung, Bum Sik · Park, Soo Bong\* · Park, Hang Kyun

Dept. of Dairy Science, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

\* Institute of Agric Sci. & Tech., Kyungpook Natl. Univ.

### Summary

This study was carried out to investigate the effects of fetal calf serum (FCS) and gonadotropins supplemented to the medium on maturation and fertilization in vitro of porcine follicular oocytes.

Ovaries were obtained from gilts at local slaughter-house. Oocyte-cumulus complexes were recovered by puncturing the ovarian follicles(3~5 mm in diameter).

The complexes from individual ovaries were pooled in a 0.4ml droplet of medium covered with paraffin oil, then washed twice in fresh droplet and cultured for 36hrs in culture media according to experimental conditions.

Boar epididymal spermatozoa were capacitated by preincubation for 4hrs in m-KRB medium and the preincubated spermatozoa were inseminated in the fertilization medium containing the cultured oocytes.

The results obtained in this study are summarized as follows:

1. The maturation rates of oocytes cultured in m-KRB and m-KRB supplemented to 10% FCS were 82 and 37%, respectively. When PMSG, hCG, and PMSG+hCG(10Iu/ml) were added to the media supplemented to 10% FCS, the maturation rates were 66, 58 and 68%, respectively.

2. Expansion of cumulus cells was not occurred in m-KRB and m-KRB supplemented to 10% FCS. However, when PMSG, hCG and PMSG+hCG(10Iu/ml) were added to m-KRB supplemented to 10% FCS, the expansion rates of cumulus cell layers were 92, 13 and 91%, respectively.

3. When oocytes were cultured in m-KRB, the rates of penetration and formation of male pronuclei were 93 and 7%, respectively. By adding FCS and gonadotropin to m-KRB, the penetration and formation of male pronuclei were 100 and 80%, respectively.

### 緒 論

哺乳動物 胎兒期の 卵巢內에는 수만개의

原始卵胞가 존재하며 이들 각각의 卵胞는 모두 卵子를 생산할 수 있는 잠재적능력을 가지고 있다.

그러나 개체가 모체내에서 성장하고 또한 발생하여 성장함에 따라 原始卵胞의 일부가 발육이 중지되거나 폐쇄되며 또한 발정주기 당 排卵되는 卵子수는 극소수에 불과하다. 따라서 능력이 특히 우수한 哺乳動物 암컷의 卵巢內 卵胞 가운데서 排卵에까지 이르지 못하는 卵胞卵을 보다 효율적으로 또한 산업적으로 이용하고자 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精 및 受精卵移植에 관한 많은 연구가 진행되어지고 있다.<sup>1, 9, 13)</sup>

受精卵移植用 卵子의 확보를 위한 過排卵 처리 방법으로 性腺자극호르몬을 이용하고 있으나 그 처리시기, 지속적처리에 의한 卵巢반응 및 처리횟수의 제한등으로 인해 일시에 다수의 卵子를 확보할 수 없는 기술적 제약이 있다.

그러나 최근 卵巢內의 未成熟卵胞卵을 회수하여 體外에서 成熟 및 受精시키는 體外受精기술의 이용에 의해 많은 수의 成熟卵子를 일시에 경제적으로 확보할 수 있게 되었다.<sup>7, 8, 15)</sup>

따라서 본 연구는 性腺자극호르몬과 牛胎兒血清첨가가 돼지 卵胞卵의 體外成熟率 卵丘細胞의 膨化 및 體外受精率에 미치는 영향을 조사하고자 실시되었다.

## 材料 및 方法

### 1. 供試卵巢

본 실험에 공시된 卵巢는 대구직할시 신홍산업도축장에서 도살된 末經產豚의 卵巢 중에서 黃體나 白體가 없으며 육안으로 형태가 정상적인 卵巢만을 선별하여 供試하였다.

### 2. 卵胞卵의 채취

도살 직후 적출된 卵巢는 항생제(streptomycin sulfate; 0.05 g/l, Penicillin G; 0.063 g/l)가 첨가된 0.9% 생리식염수가 들어있는 37~39°C의 보온병에 담아 1시간이내에 실험실로 운반하였다. 供試卵巢는 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 후 1/30M Phosphate-buffered saline(m-PBS)이 담긴 시

계접시에서 卵胞직경이 3~5mm인 卵胞卵만을 선별하여 해부침으로 찢어 m-PBS에 卵子를 유출시킨 다음 卵胞卵을 채취하였다. 채취된 卵胞卵은 실체현미경(×80) 아래서 卵丘細胞가 透明帶에 치밀하게 둘러싸인 卵胞卵만을 선별하여 m-PBS에서 2회 세척한후 供試하였다.

Table 1. Composition of m-KRB\*

Component	Concentration
NaCl	94.6(mM)
KCl	4.78
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.71
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.19
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
Glucose	5.56
Na-pyruvate	0.50
Na-lactate	21.58
Streptomycin	50 μg/ml
Penicillin G	75 μg/ml
BSA**	4mg/ml
Phenol red	1mg/ml

\* m-KRB: modified Kreh's Ringer bicarbonate solution

\*\* BSA: Bovine serum albumin

### 3. 體外成熟培養液의 제조

基本培養液은 Iritani<sup>6)</sup>이 사용한 modified Kreh's Ringer bicarbonate solution(m-KRB)에 牛血清알부민(Fraction V, sigma, BSA)을 mg/ml 첨가한 것으로서 그 조성은 Table 1.과 같다.

### 4. 卵胞卵의 體外成熟培養

卵胞卵의 배양은 60×15mm petri dish (Falcon, No. 3002, U.S.A)에 기본배양액의 小滴(0.4ml)을 만들고 paraffin 0:1(sigma, U.S.A)로 피복하여 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 3~4시간 미리 CO<sub>2</sub>평형을 시켜놓았다. CO<sub>2</sub>평형된 배양액 小滴내에 卵胞卵을 10~5개씩 분배하

여 넣고 38.5°C, 5%, CO<sub>2</sub>, 습도포화상태의 배양기내에서 36시간 배양하였다.

### 5. 卵子成熟의 판정

體外에서 36시간 배양된 卵胞卵은 0.1% hyaluronidase의 처리로 卵子주위의 卵丘細胞를 제거한 다음 acetic-alcohol(1:3)고정액에서 48시간 동안 고정하였으며 0.1% aceto-orcein으로 염색하여 핵의 성숙정도를 판정하였다. 卵胞卵의 成熟分裂단계는 卵核胞期(germinal vesicle, GV), 제1成熟分裂中期(metaphase I, MI), 後期(anaphase I, AI), 및 終期(telophase I, TI) 및 제2成熟分裂中期(metaphase II, MII)로 구분하였다. 본 실험에서는 體外培養後 MII에 도달한 卵胞卵을 成熟卵子로 판정하였다.

### 6. 精子的 受精能獲得誘起 및 受精

본 실험에 사용된 精子는 도축장에서 도살된 직후의 牡豚(체중130~150kg)에서 精巢와 精巢上體를 적출하여 상온에서 1시간 이내에 실험실로 운반한후 0.9% 멸균생리식염수로 2~3회 세척하고 精巢上體尾部를 떼내어 주사침을 정관에 삽입하여 공기압으로 채취하였다. 채취된 精子는 실온에서 10~12시간 정치시킨 다음 정액 0.5ml에 m-KRB 4.5ml를 가하여 400g에서 10분간 2회 원심세정하였다. 세정후 4×10<sup>8</sup>cell/ml농도의 정액 0.5ml를 paraffin oil이 피복된 culture dish에 넣고 38.5°C, 5%, CO<sub>2</sub> 배양기내에서 4시간 동안 배양하여 受精能獲得을 유기시켜 2×10<sup>6</sup>cells/ml로 體外受精에 이용하였다.

### 7. 受精의 판정

體外受精後 20시간 배양한 다음 전술한 卵子의 體外成熟판정의 검사과정과 동일한 방법으로 고정 염색후 Iritani<sup>6)</sup>과 Park<sup>12)</sup>의 방법에 따라 정자의 卵子내 침입, 前核형성, 세포질내 精子尾部의 유무등으로서 受精여부를 판정하였다.

이상에서 기술한 卵胞卵의 體外成熟 및 體外修正과정을 圖示하면 Fig.1과 같다.

### Treatment of pig spermatozoa

### Maturation of pig oocyte

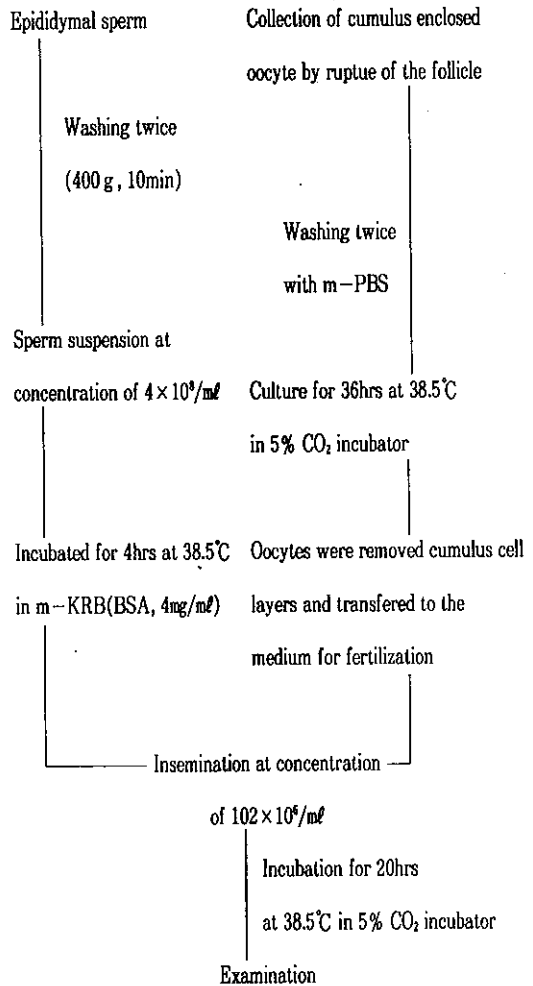


Fig. 1. Experimental procedure

### 結果 및 考察

1. 卵胞卵의 體外成熟에 있어서 性腺자극호르몬과 FCS 첨가효과  
m-KRB와 m-KRB에 FCS 및 性腺자극호르몬을 첨가한 배양액에서 卵胞卵의 성숙은 Table2.와 같다.

Table2. Effect fo fetal calf serum(FCS) and gonadotropins on maturation of cumulus—oocyte complexes cultured in vitro

Culture condition			No. of trials	No. of oocytes examined	No. of oocytes at stage of				
FCS (%)	PMSG (IU/ml)	hCG			GV	MI	AI	TI	MII(%)
0	0	0	3	39	2	4	1	0	32(82)
10	0	0	6	83	15	34	2	1	31(37)
10	10	0	6	79	4	19	4	0	52(66)
10	0	10	6	84	7	24	4	0	49(58)
10	10	10	6	80	0	21	3	2	54(68)

m-KRB에 10% FCS를 첨가하였을 때 成熟率은 82.37%로서 10% FCS첨가시 成熟率이 저하되었다. 10% FCS를 첨가한 m-KRB 배양액에 PMSG10IU/ml를 첨가했을 때 成熟率은 66%이며 hCG10IU/ml 첨가시 58%, 그리고 PMSG와 hCG를 각각 10IU/ml 첨가시 68%로서 FCS가 첨가된 m-KRB 배양액에 性腺자극호르몬을 첨가한 경우 成熟率이 향상되었다. 본 실험에서 性腺자극호르몬을 첨가한 成熟率은 Minato와 Toyoda<sup>11)</sup>가 돼지에서 5%, FCS가 첨가된 m-KRB 배양액에서 PMSG 10IU/ml 첨가한 경우 48.3% hCG 10IU/ml를 첨가한 경우 28.9%의 成熟率을 보고한 결과보다 우수하였다. 性腺자극호르몬 첨가에 따른 卵胞卵의 成熟率에 관한 결과들이 연구자들간에 일치하지 않음

나, 卵胞卵의 成熟分裂재개와 관련이 있는 것으로 보고되고 있으며<sup>10)</sup> 본 실험에서 FCS가 첨가된 배양액에 性腺자극호르몬을 첨가하여 成熟率이 향상된 결과는 性腺자극호르몬과 FCS가 卵胞卵의 核成熟에 기인한 것으로 보인다. 아직까지 卵胞卵의 완전 體外成熟을 위한 배양조건이 확립되어 있지 않으므로 많은 연구가 진행되어야 한다고 사료된다.

## 2. 性腺자극호르몬과 FCS첨가가 卵胞卵의 膨化에 미치는 영향

m-KRB와 m-KRB에 FCS 및 PMSG, hCG가 첨가된 배양액에서 卵丘細胞의 膨化率은 Table.3과 같다.

Table3. Effect of fetal calf serum (FCS) and gonadotropins on the expansion of cumulus cell layers of cumulus—oocyte complexes cultured in vitro

Culture condition			No. of trials	No. of oocytes examined	No. of oocytes at stage of	
FCS (%)	PMSG (IU/ml)	hCG			CME*	MF**
0	0	0	6	80	0(0)	4(5)
10	0	0	6	74	0(0)	74(100)
10	10	0	6	82	75(92)	7(8)
10	0	10	6	78	10(13)	68(87)
10	10	10	6	81	74(91)	7(9)

\* CME: cumulus mass expansion

\*\* MF: monolayer formation

m-KRB와 m-KRB에 10% FCS가 첨가된 배양액에서 卵丘細胞의 膨化는 일어나지 않았으나 10% FCS에 PMSG, hCG 및 PMSG와 hCG를 각각 10IU/ml 첨가한 배양액에서는 92, 13 및 91%로서 膨化率이 크게 향상되었다. 이 결과는 Minato와 Toyoda<sup>11)</sup>가 돼지에서 FCS첨가시나 Eppig<sup>12)</sup>가 쥐에서 FBS 첨가만으로는 膨化가 일어나지 않았다는 결과와 유사하다.

한편 hCG첨가구보다 PMSG 첨가구에서 膨化率이 높게 나타난 결과는 Minato와 Toyoda<sup>11)</sup>가 돼지에서 PMSG, hCG를 각각 10IM/ml 첨가하였을 때 89.5, 62.2%였다는 보고와 Hunter등<sup>5)</sup>이 소에서 MEM+14%

FCS 배양액에 0.1~100  $\mu$ l/mlFSH 및 0.1~10IU/ml hCG 첨가에서 각각 56, 39%로서 FSH의 효과가 크다는 결과와 유사하다. Ball등<sup>2)</sup>도 소에서 FSH의 첨가없이는 膨化가 일어나지 않았다고 보고하였는데 이는 본 실험의 돼지의 경우에서와 유사한 경향을 나타내었다.

### 3. 體外成熟된 卵胞卵의 體外受精

m-KRB와 m-KRB에 FCS 및 性腺자극 호르몬을 첨가한 배양액에서 卵胞卵을 體外成熟시켜 體外受精한 결과는 Table4.와 같다.

Table4. In vitro fertilization of the oocyte cultured in vitro

Culture condition			No. of trials	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes		No.(%) of oocytes with	
FCS (%)	PMSG (IU/ml)	hCG			penetrated	A	B	
0	0	0	5	60	56(93)	52(93)	4(7)	
10	10	10	5	60	60(100)	12(20)	48(80)	

A:unenlarged sperm head

B:male pronuclei

m-KRB배양액에서의 정자침입율과 雄性前核 형성율은 각각 93.7%였다.

m-KRB배양액에 10% FCS와 PMSG, hCG를 각각 10IU/ml 첨가한 후 배양된 卵胞卵은 각각 100, 80%로서 雄性前核 형성율이 크게 향상되었다.

호르몬 무첨가의 경우 Shea<sup>14)</sup>등은 소에서 10% FCS가 첨가된 Hams F-10 배양액에서 성숙된 卵胞卵을 수정시킨 결과 雄性前核 형성율이 20%라고 보고하였다. 본 실험에서 性腺자극호르몬과 FCS의 첨가로 雄性前核 형성율이 높아진 결과는 卵胞卵의 體外成熟에 있어서 性腺자극호르몬과 FCS가 核成熟, 細胞質成熟에 기인한 것으로 사료된다.

### 摘 要

본 실험은 性腺자극호르몬과 牛胎兒血清

첨가가 돼지 卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 未經産豚(체중 80~90kg)의 卵巢를 도살된 직후에 절취하여 37~39°C의 보온병에 담아 실험실로 운반하여 卵胞직경이 3~5mm되는 것만을 골라 卵胞를 절라서 卵胞卵을 채취하였다. 成熟杜豚(체중 130~150kg)의 精巢上體尾部精子를  $4 \times 10^8$  cells/ml 농도로 회석하여 體外受精에 이용하였다. 본 실험의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. m-KRB와 10% FCS를 m-KRB에 첨가한 경우 成熟率은 82.37%이며, 10% FCS가 첨가된 배양액에 PMSG, hCG 그리고 PMSG와 hCG를 각각 10IU/ml 첨가한 경우 66, 58, 68%로서 成熟率이 향상되었다.

2. 卵丘細胞의 膨化는 m-KRB와 10% FCS가 첨가된 배양액에서 일어나지 않았으나 10% FCS가 첨가된 배양액에 PMSG,

hCG 그리고 PMSG와 hCG를 각각 10IU/ml 첨가시 92, 13, 91%로서 膨化率이 향상되었다.

3. m-KRB에서 성숙된 卵胞卵의 體外受

精에서 정자침입율과 雄性前核 형성율은 각각 93.7%였으나 FCS와 性腺자극호르몬을 첨가한 경우 각각 100, 80%로서 雄性前核 형성율이 향상되었다.

### 引用文獻

1. Anderson, L. D., L. S. Stone and C. P. Channing. 1985. Influences of hormone on the inhibitory activity of oocyte maturation present in conditioned media of porcine granulosa cells. *Gamete Res.* 12: 119-130.
2. Ball, G. D., E. D. Wieben and A. P. Byers. 1985. DNA, RNA and protein synthesis by porcine oocyte-cumulus complexes during expansion. *Biol. Reprod.* 33:739-744.
3. Epping J. J. and A. C. Schroeder. 1986. Culture system for mammalian oocyte development: Progress and Prospects. *Theriogenology.* 25(1):97-106.
4. Goodrowe, K. L., R. J. Wall and D. E. Wildt. 1988. Influence of gonadotropins on and developmental competence of in vitro fertilized feline follicular oocytes. *Theriogenology.* 29(1):250(Abstr.).
5. Hensleigh, M. A. and A. G. Hunter:1985. In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. *J. Dairy Sci.*, 68:1456-1462.
6. Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa and H. B. Song. 1984. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.* 70:487-492.
7. Kim. C. K., Y. C. Chung. J. W. Park and H. B. Song. 1988. Studies on maturation in vitro and fertilizing ability of bovine follicular oocytes. *Korean J. Anim. Sci.* 30(4):224-232.
8. Koh. T. H., K. S. Shim. T. H. Byun and J. K. Lee. 1988. In vitro maturation of porcine follicular oocytes. *Korean J. Anim. Sci.* 30(3):144-150.
9. Leibfried, M. L. E. S. Crister. J. J. Parrish and N. L. First. 1989. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology.* 31:62-74.
10. Miller, J. G. O. and H. R. Behrman. 1986. Oocyte maturation is inhibited by adenosine in the presence of follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 35:835-837.
11. Minato, Y. and Y. Toyoda, 1982. Induction of cumulus expansion and maturation on division of porcine oocyte-cumulus complexes in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 53(7):480-487.
12. Park. S. B. 1989. Studies on fertilization in vitro in the pig. Ph. D. Thesis, Kyoto. Univ. Kyoto.
13. Sanbuissho, A. and W. R. Threlfall. 1988. The influence of serum and gonadotropins on bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology.* 29(1):301 (Abstr).
14. Shea, B. F., R. E. Janzen and R. Mcalister. 1983. Recovery and fertilization of bovine follicular oocytes. *Theriogenology.* 19:385-390.
15. Yoon, S. H., D. H. Ko., S. P. Park and K. S. Chung. 1989. Studies on in vitro maturation of bovine follicular oocytes: Collection and in vitro culture of follicular oocytes. *Korea J. Anim. Sci.* 31:201-209.