

## 체외성숙배양 조건이 마우스 난자의 체외수정 및 다정자침입에 미치는 영향

고려대학교 자연자원대학 응용동물과학과<sup>1</sup>, 대구대학교 농과대학 축산학과<sup>2</sup>

박기상<sup>1</sup> · 이상호<sup>1</sup> · 송해범<sup>2</sup>

### *In Vitro* Fertilization and Polyspermy in Follicular Oocytes Matured in Various Culture Conditions

Kee Sang Park<sup>1</sup>, Sang Ho Lee<sup>1</sup> and Hai Bum Song<sup>2</sup>

*Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University, Seoul<sup>1</sup>*

*Department of Animal Science, College of Agriculture, Teagu University, Taegu<sup>2</sup>*

#### = Abstract =

ICR female mice aged 3 to 4 weeks, were stimulated with 7.5 IU PMS injection. At 48-52h post-PMS injection, ovaries were dissected out and oocytes-cumulus complexes(OCCs) were divided into three groups, cumulus-free oocytes(O), cumulus-free oocyte cocultured with cumulus cells(O+C) and OCC. The oocyte were cultured in TCM199 containing various protein sources, FCS, BSA or PVP with gonadotropins(Gns) for 24h. Spermatozoa were collected from cauda epididymis and capacitated in T6+BSA for 2h. After oocyte maturation in vitro(IVM) in different experimental groups, matured oocytes were inseminated with the capacitated spermatozoa in T6+BSA for 6h. In the groups of IVM in TCM+BSA or PVP, fertilization(IVF) did not occur efficiently. However, increased fertilization was found in TCM+FCS group. The oocytes groups, with cumulus cells showed decreased polyspermy in FCS group(O;31.8%, O+C;12.2%, OCC;16%), the addition of Gns did not prevent polyspermy in all three groups. The rates of fertilization increased in zona-free oocytes in PVP group. This results showed that culture system for IVM and IVF could be improved. Furthermore, PVP can be used for the substitution of protein source during maturation, and its low rate of fertilization has been found due to zona hardening which occurred in FCS-free medium.

#### 서 론

다양한 체외배양체계에 의한 난포란의 성숙은 핵성숙 및 난구세포확장 뿐만아니라 초기 배 발생에도 영향을 주는 것으로 보고되고 있지만 그 결과는 동물에 따라 매우 다양하다. 비록 체외수정 및 발생의 영향에 대해 단백질원(Zhang et al., 1991), 난구세포의 효과(Gilula et al., 1978; Ouhibi et al., 1990; Dandekar et al., 1991; Salustri et al., 1992) 등이 비교되어 있지만 특히 각종 배양체계에 의한 복합적인 과정, 즉 체외수정 및 초기발생에 대한 분석과

그 원인의 구명이 용이하지 않다. 본 실험은 이같은 점을 감안하여 난자 성숙배양체계에 따라 체외수정에 미치는 안정된 배양체계를 포괄적으로 검토하기 위하여 배양액, 단백질의 종류, 성선자극호르몬의 첨가 그리고 난구세포의 부착상태등이 핵 성숙된 난자의 수정능력 및 수정과 관련된 여러가지 현상에 어떠한 영향을 주는지를 구명하기 위하여 실시하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 배양액의 준비

난자의 세정은 M2 배양액, CO<sub>2</sub> 배양기 내

에서의 배양은 M16 및 TCM 199(TCM) 배양액을 이용하였으며 이들은 매주 stock 용액으로 부터 준비하여 BSA를 첨가 후 0.2 $\mu$ m millipore 여과를 통하여 멸균시키고 M16 및 TCM은 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 6시간 이상 평형시켜 이용하고 M2 용액은 37°C hot plate에 넣어 이용하였다.

## 2. 난자의 준비

ICR 자성생쥐(20-25일령)를 오후 7시에 7.5IU의 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG, Intervert, Holland)을 복강주사 후 48-52시간에 경추탈구법으로 생쥐를 희생시킨 후 난소를 채취하여 혈액과 지방을 제거하여 2mg/ml의 bovine serum albumin(BSA)이 포함된 M2 배양액(M2+BSA, Quinn et al., 1982)에서 난포를 해부침으로 터뜨려 난자를 회수하였으며, 이렇게 회수된 난자 중 난자-난구세포 복합체(oocyte-cumulus complex:OCCs)만을 M2+BSA에서 3-4회 세척한 후 TCM에서 또한 3-4회 세척한 후 배양에 사용하였으며, 약 3,000여 개의 난포란을 사용하였다.

## 3. 난자의 배양

체외성숙에 사용한 난자와 난구세포의 부착상태는 난구세포 분리난자(O), 난구세포와 난자의 공배양(O+C) 및 난자-난구세포 복합체(OCC)의 3개구로 나누어 배양액은 TCM을 사용하여 단백질원으로 4mg BSA/ml, 15%(v/v) 소태아혈청(fetal calf serum, FCS) 및 4mg polyvinylpyrrolidone(PVP)/ml을 이용하였으며, 성선자극호르몬(gonadotropin;Gn)으로는 10IU PMS/ml, 10IU hCG/ml을 첨가하였다. 난자성숙을 위한 체외배양은 각각 18 또는 24시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 실시하였다.

**실험 1:** 성숙배양액인 TCM에 첨가하는 각기 다른 단백질원에 의한 효과를 검토하기 위하여 BSA, PVP 및 FCS를 각각 TCM 배양액에 첨가한 후 단백질원과 3가지 조작된 난구세포가 체외수정에 미치는 영향을 조사하였다.

**실험 2:** 생쥐 미성숙난자의 체외성숙 중 호르몬을 첨가하여 성숙시킨 난자를 체외수정에 이용하여 효과를 조사하였다. 즉 TCM+BSA, FCS 및 PVP에 용해시켜 제조한 Gn stock 용액으로 부터 10IU PMS/ml와 10IU hCG/ml을

TCM+BSA, FCS 및 PVP 배양액에 각각 첨가하여 난자성숙을 유도한 후 체외수정을 검토하였다.

## 4. 체외수정

체외수정용 난자를 성숙배양 후 난구세포를 hyaluronidase(150IU/ml)용액에서 반복된 pipetting으로 제거한 난자를 3회 M2+BSA로 세정한 후 제 1극체가 명확히 보이며, 그 크기가 이상 분열에 의한 정상크기 이상의 것은 모두 제외시키고 MII 난자형태의 특성을 보이는 난자만을 선별하여 T6 배양액으로 3회 세정하고 수정에 이용하였으며, PVP군에서 회수한 성숙난자 중 일부는 acid Tyrode's 용액(표 1)에서 투명대를 제거한 후 수정에 이용하였다.

ICR 음성 생쥐(6-8개월령)를 희생시켜 음성생식기를 적출한 후 정소상체미부만을 회수하여 500 $\mu$ l의 BSA를 함유하지 않은 T6 배양액에 옮겨 정자괴를 15-20분동안 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 배양하여 정자를 부유시켰으며 정자 drop 내에 있는 응집된 정자를 제거한 후 15mg BSA(fraction V)/ml를 포함한 500 $\mu$ l의 T6 배양액(T6+BSA)으로 운동정자만을 옮겼다. 옮긴 정자 부유액은 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 시 1.5-2시간동안 수정능획득이 일어나도록 유기한 후 체외수정에 이용하였다(Lee et al., 1988). 수정능획득을 유기한 정자의 농도는 1-2 $\times 10^6$ /ml이 되도록 조절하여 10-15개의 난자가 포함된 50 $\mu$ l의 T6+BSA 배양액을 옮긴다음 2 또는 6시간동안 공배양함으로써 수정을 유기하였다.

## 5. 난자의 분석

정자 침입의 판정은 rapid staining 법(Byun et al., 1991)을 이용하여 적정간격 후에 분석

**Table 1.** Composition of acid Tyrode's solution

Components	Concentration (g/100ml)
NaCl	0.800
KCl	0.020
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.024
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.010
Glucose	0.100
PVP(dialized)	0.400

The solution was adjusted to pH 1.8.

하였으며, 수정의 여부는 난자 내에 정자두부의 팽화와 정자미부에 해당하는 부분이 발견되는 것과 아울러 난자의 정자에 대한 반응, 즉 난자의 활성화의 증거로 핵분열을 보이거나 전핵이 형성된 난자를 수정된 것으로 판정하였다. 또한 정자가 발견되지 않은 난자는 활성화 난자로 취급하였으며 침입 정자수를 확인하여 다정자 침입율을 산정하였다. 실험 결과에 대한 유의성 여부는  $\chi^2$  검정을 이용하여 실시하였다.

## 결 과

### 1. 체외성숙 배양액내 다른 단백질원 첨가 효과

난자의 배양전 후에 난자의 선별에 의해 보

다 의미있는 정확한 자료를 얻고자 전 실험을 통하여(그림 1) 엄격한 선별과정을 반복하여 약 3,000여개의 난자를 이용하였다.

난포란의 체외성숙에 첨가하는 단백질원이 체외수정에 미치는 효과를 그림 2에 보여주었다. 체외성숙 중 BSA 또는 PVP 첨가구에서 24시간 배양한 난자의 수정율은 그 범위가 0-3.6%인데 비하여 FCS에서는 60.3-71.0%로 높은 수정율을 보였다. 이 같은 차이는 미성숙난자 및 이상난자로 부터 기인되는 것은 아니다. 왜냐하면, 성숙난자를 극체의 이상분열 및 크기가 배란 난자에 비하여 큰 모든 난자를 제외하는 엄격한 선별작업을 했기 때문이다. 그러므로 난자세포내로의 정자침입을 저하시키는 것을 첫째 투명대의 정자 수용상태의 변화에 의한 정자침입의 저하를 들 수 있을

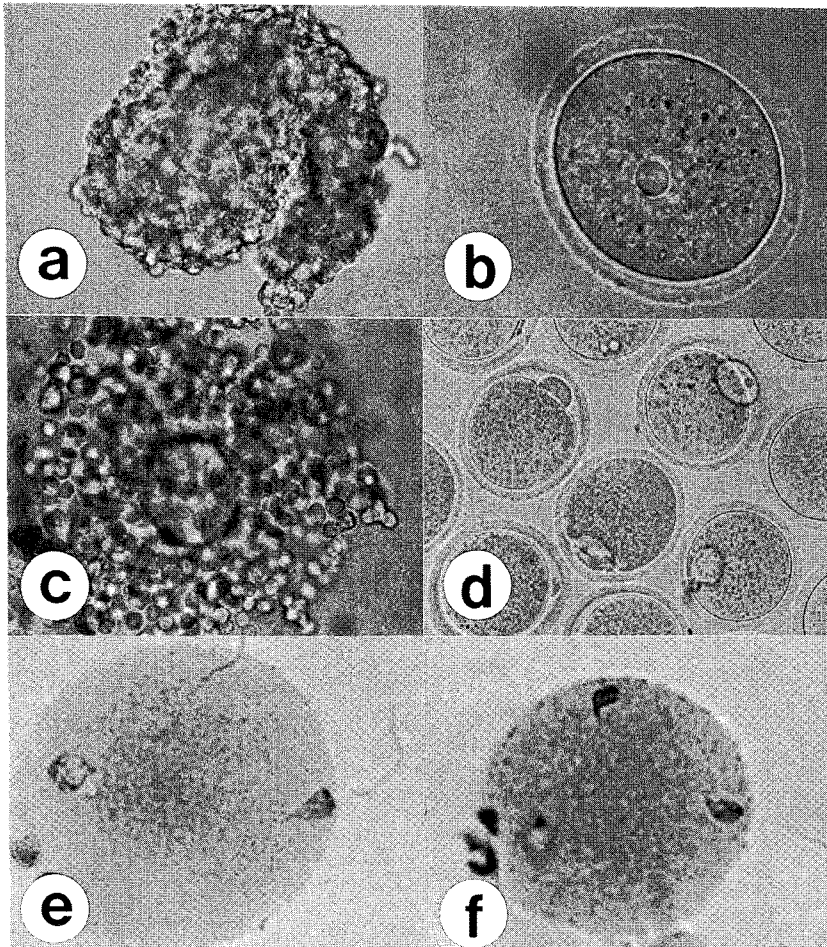
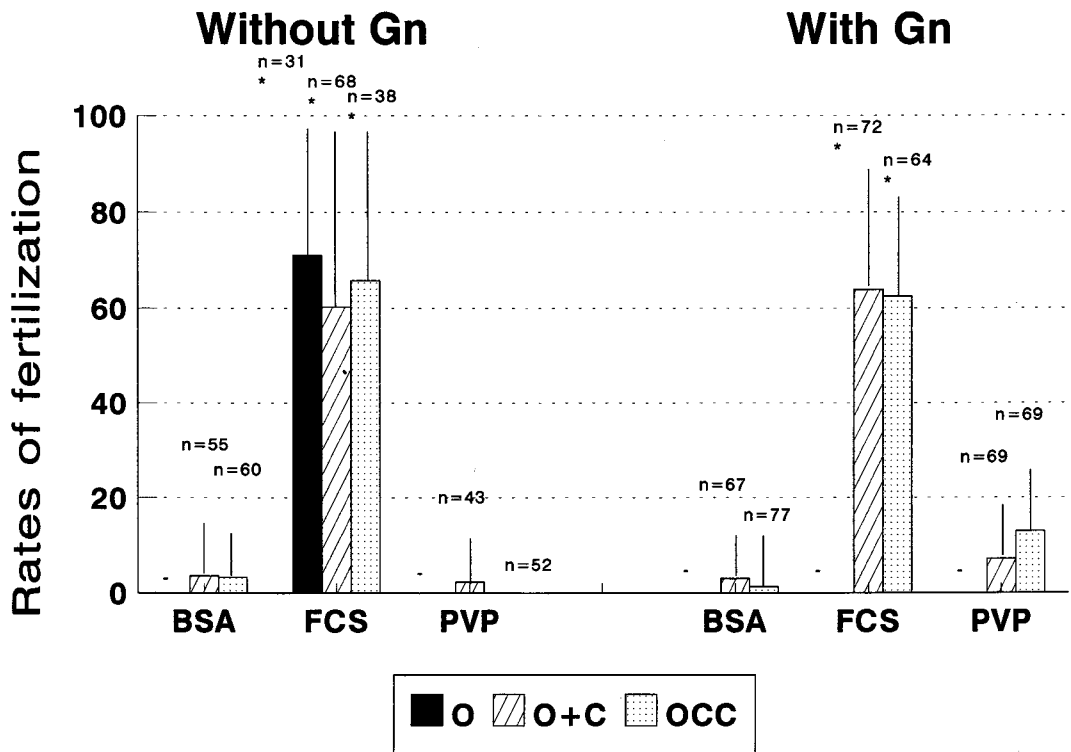


Fig. 1. Type of immature oocytes at the beginning of maturation in vitro(a:used oocytes, and b: eliminated oocytes), matured(c, d) and fertilized(e, f) oocytes.

**Table 2.** Effects of cumulus cell, FCS and gonadotropin during maturation on polyspermy<sup>1</sup>

Groups of cell association	Gonadotropins	No. of fertilized oocytes	
		Total	Polyspermy (%)
O	Free	22	7(31.8)
O+C	Free	41	5(12.2)
	With	46	8(17.4)
OCC	Free	25	4(16.0)
	With	40	8(20.0)

<sup>1</sup>The results were obtained from 4 experiments. O; cumulus-free oocyte, O+C; cumulus cell with oocyte, OCC; oocyte-cumulus complexes.



**Fig. 2.** Effects of protein sources, cumulus cells and Gn during maturation on fertilization in vitro (mean + SEM) \* (p < 0.01).

것이며, 둘째로는 세포질성숙이 제대로 이루어지지 않아 수정율이 저하될 수 있을 것이나, 표 3에서 보는 바와 같이 PVP군에서 투명대를 제거하여 100%의 수정율을 유도하므로써 성숙배양을 하는 기간에 투명대가 정자에 대한 수정능력이 상실되거나 저하됨으로써 수정율이 낮게 나타나는 것으로 사료된다. 특히 체외성숙이 BSA 및 PVP가 FCS와 거의 유사하였지만, 수정에서는 현저한 차이를 보여 줌으로써 세포질이 아닌 투명대의 변화에 의해 성숙과 수정율 사이에 이 같은 차이가 있

는 것으로 생각된다. 한편 난구세포의 존재는 이 같은 수정율에는 큰 영향을 주는 것으로 나타나지 않았으나 결국 성숙된 난자는 FCS의 존재하에서 난구세포의 부착여부 및 난구세포가 없는 상태에서 성숙된 난자라도 서로 간에 유사한 결과를 보이고 있다.

## 2. Gn 처리효과

핵성숙 시 단백질원을 3가지로 각기 구별하여 Gn을 첨가한 후 미성숙난자에 부착한 난구세포의 형태를 2가지(O+C와 OCC)로 변화

Table 3. Effects of PVP during maturation on zona hardning of oocytes<sup>1</sup>

Groups Zona-pellucida	No. the oocytes used	No. of fertilized oocytes	
		Total(%)	Polyspermy(%)
With	45	3( 6.7)	0
Free	52	52(100)	40(76.8)

<sup>1</sup>The results were obtained from 4 experiments. Oocyte-cumulus complexes were used for *in vitro* maturation.

하여 성숙배양 후 체외수정 결과(그림 2)를 보면, Gn 존재하에서 단백질원에 따른 체외수정율의 변화는 BSA;1.3%-3.0%, FCS;62.5-63.9% 그리고 PVP;7.2-13.0%를 보여줌으로써 Gn에 의한 효과보다는 단백질급원에 따른 영향을 가장 크게 받고 있는 것을 알 수 있다.

### 3. 다정자 침입

단백질급원이 FCS이고 미성숙 난자에 부착된 난구세포의 상태에 따라 각각 체외배양한 난자를 체외수정에 이용했을 때(표 3), 다정자 침입은 O;31.8%, O+C;12.2% 그리고 OCC;16.0%였으며 Gn을 첨가할시 O+C;17/4% 그리고 OCC;20.0%로서 Gn에 의한 영향보다는 난구세포와의 공배양에 의해 다정자 침입이 억제되는 효과가 크게 나타났다.

## 고 찰

혈청이 첨가되지 않은 배양액에서 rat 난자를 성숙배양시킬 경우 투명대경화현상이 유발되지만 FCS를 첨가할 경우 이를 억제할 수 있으며(Bavister, 1981;Zhang et al., 1991) 생쥐에서도 혈청첨가를 0%에서 10%로 증가시키면 따라 이들 성숙난자의 정자 침입율이 12%에서 79%로 증가(Choi et al., 1987)하여 BSA 또는 PVP 첨가구에서 배양한 난자의 수정율은 그 범위가 0-36%인데 비하여 FCS에서는 60.3-71.0%인 본 실험의 결과와 유사하였다.

생쥐 미성숙난자를 성숙배양시킬 때 배양액에 maturation inhibitor를 첨가하여 수정 후 2세포까지의 성숙율이 6%이던 것이 FSH를 첨가함으로써 71%까지 증가시키므로써 FCS에는 배양액 내에 있을 수 있는 억제제의 형성을 저하시켜 개선된 수정율과 배발달율을 보였으며(Downs et al., 1986), 사람난자를 배양시킬 때 배양액 내에 hMG 150mIU를 첨가해서 수정율을 23%에서 49% 그리고 배발달율도 40%에서 76%까지 증가시켜 호르몬의 첨

가가 수정에 효과가 있었지만(Zhang et al., 1993) 본 실험에서는 Gn 존재하에서 체외수정율의 변화는 BSA;1.3-3.05, FCS;62.5-63.9% 그리고 PVP;7.2-13.0%로서 Gn에 의한 효과보다는 단백질급원에 따른 영향을 가장 크게 받고 있는 것을 볼 수 있다. 이 같은 이유는 실험 대상의 차이에 기인하는 것으로 투명대 제거 난자를 이용 수정을 실시하여 정자 침입이 100%가 되는 것으로 미루어 보아, 투명대의 변화에 의한 것으로 사료된다.

난구세포에는 FSH, estrogen 그리고 testosterone에 수용체가 있어서(Masui, 1981) 난구세포와의 공배양으로 핵성숙과 아울러 세포질 성숙에도 영향을 미칠뿐만 아니라 난자세포막의 성숙에 의해 효과적인 다정자침입 반응을 수행할 능력을 제대로 갖추고 있는 것(Zhang et al., 1991)으로 생각된다. 한편 난구세포의 확장은 수정이나 배발달과는 무관(Schroeder and Eppig, 1984)한 배양액에 첨가하는 단백질원이 FCS였을 경우 BSA에서 성숙시킨 것보다 다정자 침입을 억제시켰고, 난구세포의 확장과 난자의 성숙에 주었고(Zheng and Sirard, 1992) 본 실험에서도 배양 중 배양액에 Gn이 첨가되지 않고 단백질원이 FCS였을 때 다정자 침입은 O;31.8%, O+C;12.2% 그리고 OCC;16.0%로서 난구세포에 의해 다정자 침입이 억제되는 효과가 있어 연구자마다 다소 상이한 결과를 발표하였으나 이는 공시한 실험의 대상과 실험 방법의 차이에 의한 것으로 생각된다.

## 결 론

호르몬의 투여로 난포발달을 유기시켜 미성숙난을 회수하여 3가지 형태의 난자(O, O+C, OCC)로 구별하여 배양액에 첨가하는 단백질원(BSA, FCS, PVP)과 성선자극호르몬(PMSG, hCG)이 수정직전의 상태인 제 2성숙분열중기의 상태까지 성숙시킨 후 체외수정에 이용할

경우 적절한 배양체제를 확립하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

성선자극호르몬을 첨가한 후 단백질원에 따른 체외수정율의 변화는 BSA;1.3-3.0%, FCS;62.5-63.9% 그리고 PVP;7.2-13.0%를 보여주었다. 단백질원이 BSA와 PVP에서 24 시간 동안 배양한 난자의 수정율은 그 범위가 0-3.6%인데 비하여 FCS에서는 60.3-71.0%로 높은 성적을 얻어 투명대의 경화와 같은 물리, 화학적인 변화를 억제할 수 있어 정자 침입에 의한 난자의 정상적인 반응을 할 수 있게 함으로써 체외성숙과는 달리 FCS가 BSA나 PVP에 비하여 높은 수정율을 얻을 수 있었다. 한편 FCS에서 다정자 침입은 난구세포의 부착과 존재에 영향을 받아 O;31.8%, O+C;12.2% 그리고 OCC;16.0%였으며 Gn을 첨가할 경우 O+C;17.4% 그리고 OCC;20.0%를 나타내어 Gn의 첨가보다는 난구세포와의 공배양에 의해 다정자 침입이 억제되는 효과가 크게 나타남으로써 난구세포와의 공배양으로 핵성숙과 아울러 세포질 성숙에도 영향을 미칠뿐만 아니라 투명대가 정자의 침입에 대한 반응에 정상적으로 수행할 능력을 제대로 갖추고 있는 것으로 생각된다.

## 인 용 문 헌

- Bavister BD: Distribution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool* 1981, 217, 45-51.
- Byun TH, Lee SH, Song HB: Development of a rapid staining method for nucleus of the from domestic animals. *Korean J Anim Sci* 1991, 33, 25-31.
- Choi TS, Mori M, Kohomoto K, Shoda Y: Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes fertilized *in vitro*. *J Reprod Fert* 1987, 79, 565-568.
- Dandekar PV, Martin MC, Glass RH: Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. *Fertil Steril* 1991, 55, 95-99.
- Downs SM, Schroeder Ac, Eppig JJ: Developmental capacity of mouse oocytes following maintenance of meiotic arrest *in vitro*. *Gamete Res* 1986, 15, 305-316.
- Gilula NB: Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* 1978, 78, 58-75.
- Lee SH, Ahuja KK, Gilbert DJ, Whittingham DG: The appearance of glycoconjugates associated with cortical granule release during mouse fertilization. *Development* 1988, 102, 595-604.
- Masui H: Functional ovarian cells in culture. *Funct Different Cell Lines* 1981, 109-116.
- Ouhibi N, Hamidi J, Guilaud J, Menezo Y: Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. *Human Reprod* 1990, 5, 737-743.
- Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC: Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 1992, 151, 541-551.
- Schroeder AC, Eppig JJ: The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Dev Biol* 1984, 102, 493-497.
- Zhang X, Armstrong DT, Zerafa A, Khamsi F, Wong J: Woman menopausal gonadotropin during *in vitro* maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances *in vitro* fertilization and cleavage rates. *Fertil Steril* 1993, 59, 850-853.
- Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT: Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. *Mol Reprod Dev* 1991, 28, 292-296.
- Zheng YS, Sirard MA: The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 1992, 37, 779-790.