

체외에서 성숙시킨 토끼난자의 발생능력에 관한 연구

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

배 인 하

= Abstract =

The Attempts to Prove Normality of the Rabbit Follicular Oocyte Cultured In-Vitro

Bae, In-Ha

Department of Biology, Sung Shin Women's University, College of Natural Sciences

- 1) Rabbit follicular oocytes from preovulatory follicles were cultured for 12 hr in vitro and fertilized in vivo by transferring the oocytes to the first foster-mother.
- 2) Two young were born from transferred embryos from the first foster-mother to the second foster-mother. This demonstrates that in vitro cultured follicular oocytes are normal and they can develop into normal young born when transferred to the foster-mother.
- 3) A simple chemically defined culture medium, salt sol. with glutamine (2mM), which was developed by Bae and Foote (1975) proves fully good enough for rabbit follicular oocyte culture. We call this B-F medium.
- 4) Twelve hours culture in vitro of the rabbit follicular oocyte may be a proper culture time for further development.

서 론

1960년대 이후부터 포유동물의 여포난자를 배양하여 수정직전의 성숙난자로 유도하는 실험이 많이 행해졌다(Tsafiri & Channing, 1975; Sorensen & Wassenman, 1976; Shea et al, 1976; Mahi & Yamagimachi, 1976; Thibault, 1977; Bae & Foote, 1975a & b; Jagiello et al, 1975). 그러나 이렇게 해서 체외에서 성숙한 난자가 정상인지 아니면 퇴화상태에 있는 것인지 또는 결함이 있는 난자인지는 아직 명확하지는 않다. 단지 이렇게 체외에서 성숙시킨 난자가 정상임을 입증하는 방법은 in vitro 혹은 in vivo에서 수정을 시켜 이들이 정상적인 Young born으로 탄생될 수 있음을 증명하는 것이 최상의 입증방법이라 하겠다.

이러한 체외성숙난자의 경우 mouse(생쥐)에서는 여포외에서 성숙시킨 난자를 수정시켜 15일된 태아(Cross & Brinster, 1970) 및 새끼(Mukherjee, 1972)를 낳는 것으로 보아 정상적인 성숙난자임이 밝혀졌으나 그의 포유동물에서는 여포외에서 성숙한 난자가 비정상이거나 결함이 있는 난자라고 생각되어 왔다. 생쥐 Eppig, 1978; 양 Moor & Trounson, 1977; 토끼 및 소 Trounson et al, 1977; Thibault

et al, 1977 등의 실험에서는 난자를 여포에서 적출하기 전 HCG 주사후 8~9시간 정도 여포에서 난자를 꺼내어 성숙시켜야만 정상적인 태아발생이 가능하다는 실험결과로 난자의 정상적인 성숙에는 follicular factor가 존재한다고 알려져왔다. 즉 Trounson et al, (1977)은 소 난자의 경우 여포외에서 성숙시킨 난자가 insemination시킨 fostermother의 oviduct에서 49%가 sperm penetration이 일어났으나 이중 어느 하나도 정상적인 상질기나 포배기에 이른 배는 하나도 없었다. 한편 토끼에서는 수란관에 넣은 난자중 정자와 수정이 일어난 난자는 하나도 없었고, 이중 8%가 parthenogenetic cleavage가 일어났다고 보고하여 여포외에서 성숙시킨 난자는 결함이 있는 난자로 정상적인 발생을 할 수 없다고 하였다.

한편 HCG 주사후 24시간 후에 얻은 난자를 inseminated oviduct에 넣어서는 포배기로 진전한 것도 있었고, 13개는 임신 13~17주된 fetus로 발전하였다. 이러한 점으로부터 여포외에서 성숙시킨 난자는 정상적인 태아로 발생할 수 있음을 나타내고 있으며, 여기에는 follicular environment나 그외 다른 follicular factor가 있을 것으로 생각되어 왔다. 본 실험에서는 이러한 factor의 존재여부가 난자 자신에 있는 것인지 아니면 수란관 내에 있는 것인지

를 한번 더 확인하기 위한 구상으로 토끼난자의 성숙과정을 여포밖에서 유도하여 inseminated oviduct에 넣어서 정상적인 발생 여부를 검토하고자 본 실험을 하였다.

그러나 본 실험에서는 Staigmiller & Moor(1984)가 했던 것처럼 gonadotropin treatment도 없었고, 또 estradiol도 처리되지 않았으며, static culture system을 사용했던 것도 다르며 oocyte-cumulus complex에서 cumulus-cell의 수도 2,000 이상을 넘지않았다. 또한 inactivated system도 전혀 포함되지 않았다.

재료 및 방법

본 실험에서 난자공여체로 사용된 토끼는 한번도 교미해 보지않은 4~7개월된 토끼에서 (Dutch belted rabbit) 지름이 1.5mm 이상의 여포에서 난자를 채취하였다. 그리고 난자를 체외성숙시킨 후 난자 이식을 받는 토끼 (first recipient)는 한번 이상의 임신 경험이 있는 것을 사용하였다. 정자 공급원으로 사용된 수컷토끼는 일단 건강한 수정능력이 있는 것이었다. 여포난자채취는 경추골 파열로 죽인후(마취제는 사용되지 않았음) 난소를 적출하여 합성배양액 (simple chemically defined medium, (Bae & Foote, 1975 a & b)에서 두서너번 씻은 다음 embryological watch glass에 배양액과 함께 넣은 다음 파라핀 oil로 덮어 배양액과 공기 접촉을 일단 차단하였다.

해부현미경하에서 지름이 1.5mm 이상의 여포를 미세한 바늘로 찢어서 여포밖으로 oocyte-cumulus complex를 적출하였다. 이렇게 적출된 여포난자는 주위의 mucin layer를 제거하기 위하여 미세한 피펫트를 사용하여 난자를 피펫트 속으로 흡입, 배출하는 방법으로 mucin성분을 제거하였고 이렇게 모인 여포난자중 퇴화 난자를 제거하고 건강하게 보이는 난자만을 골라 배양액에서 12시간 배양하였다. 배양시작 시간을 0 hr로 정하며 배양시 사용된 배양액의 구성성분은 Table 1과 같다(Table 1).

배양시작후 5시간에 2.5mg/ml의 pituitary luteinizing hormone (Amour-Baldwin Lab) (PLH)를 first recipient (7 마리)의 귀정맥에 주사하였으며 second recipient (8 마리)의 경우 수란관 및 자궁의 synchronization 및 가임상태를 유도하기 위해 first recipient처럼 똑같은 hormone 주사를 하였다. 동시에 Bredderman et al(1964)의 방법으로 수정가능한 정자를 인공질울(Cornell type) 사용하여 수집한 다음 capacitation 시키기위해 first recipient의 ut-

erus에 멸균된 유리관을 사용하여 인공사정 (artificial insemination)시켰다. 정자 제공으로 사용된 것은 4마리의 수컷이다. 이때 수집된 정자는 현미경하에서 정상적으로 활발히 움직이는 정자로 판명된 것을 사용하였으며 0.4ml의 정자를 first recipient의 자궁에 주입하였다. 배양시작후 12시간(LH 주사후 7시간)에 first recipient를 에테르로 마취시켜 양쪽 난소중 어느 한쪽의 난소를 제거하여 배란이 일어나지 못하게 하였다.이들 토끼는 7시간 전에 hormone 주사를 하였기 때문에 어느 것도 배란이 일어나지 않았음을 확인하였다. 즉시 12시간 배양된 여포난자를 회수하여 새로운 배양액에서 한번 씻은 후 난소를 제거시킨 난관의 상단끝에서 1.5cm에다 넣어 체내수정 (in vivo fertilization)시켰고, 난소를 제거하지 않은 다른 쪽 난관은 control로 하였다. 배양시작후 35 hr에 first recipient를 다시 에테르에 마취시킨 후 25G, 5ml 주사기에 2ml의 배양액을 넣어서 자궁쪽에서 자궁벽을 통해 넣어 자궁과 수란관을 세척해서 체내수정된 배 (embryo)를 난관의 끝에 40cm 길이의 polyethylene tube (inner diameter, 1.5 mm)를 연결해서 시험관에다 수정배를 받았다. 이때 난소를 제거한 난관에서 받은 쪽을 실험군, 난소를 제거하지 않은 쪽에서 받은 배는 control (대조군)으로 하였다. 이렇게 해서 각각 수집된 실험군 및 대조군의 배를 현미경 하에서 검정하여 발생단계에 따른 배의 수를 count 하였고 또

Table 1. Salt solution with glutamine (2 mM) for rabbit follicular oocyte culture in vitro (B-F medium*)

Components	Concentration	
	g/l	mM
NaCl	6.1215	104.75
KCl	0.356	4.78
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2515	1.71
KH ₂ PO ₄	0.162	1.19
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.294	1.19
NaHCO ₃	2.106	25.07
Glutamine	0.2922	2.0
BSA (bovine serum albumin)	0.4%	
Antibiotics: Penicillin G	100 unit/ml	
Streptomycin sulfate	50 ug/ml	

NaHCO₃, glutamine and BSA were dissolved in that order just before use.

*B-F medium was developed for the rabbit follicular oocyte culture by Bae and Foote, 1975.

Table 2. In vivo fertilization and the cleavage

Group						
Control: cleavage from in vivo fertilization of ovulated oocytes						
Ovulation point	No. of ova recovered	Number and stages of the cleaved ova				
		1-cell	2-cell	4-cell	Non-identified but cleaved (non-fragmented*)	
44	27(61.3%)	8	4	7	8	
Experimental: cleavage from in vivo fertilization of the cultured oocytes						
No. of oocytes cultured and transferred to 1st recipients	No. of ova recovered	Number and stages of the cleaved ova				
		1-cell	2-cell	4-cell	4-cell	Fragmentation over
85	47(55.3%)	9	15	3	4	16

*These ova seem to be not fragmented. These were lost during the transfer before identification from a washing dish to the microscope.

Table 3. Transferred embryos and the number of young born

Group			
Control: ovulation, in vivo fertilization and transfer to the 2nd recipients			
	No. of total transferred	No. of the 2nd recipients	No. of young born
	19	4	8
Experiment: Matured in vitro, in vivo fertilization and transfer to the 2nd recipients			
	No. of total transferred	No. of the 2nd recipients	No. of young born
	27	4	2

배의 상태로 점검하였다. 이 결과는 table 2와 같다.

수정된 1-cell 배로 염색하지 않은 상태에서도 쉽게 전핵을 관찰할 수 있어 수정이 일어났음을 확인할 수 있었다. 이렇게 해서 최수된 배는 실험군과 대조군으로 나누어 각각 다른 개체의 second recipient의 난관상부에다 transfer (이식)하였다. second recipient로는 8마리가 사용되었으며(대조군 4마리, 실험군 4마리) 이렇게 second recipient의 난관에 넣은 후 복강을 봉합하고 새끼를 낳을 때까지 기다렸다(Table 3에 표시).

각 대조군 실험군으로부터 19 및 27개의 배를 이식한 결과 각각 2마리, 8마리씩의 총 10마리의 새끼를 얻었고 이들 새끼들은 성체로까지 성장하였다. 본 실험의 전 과정을 시간별로 다음과 같은 순

서로 하였다.

결과 및 논의

여포 난자를 배양하여 first recipient에 이식하여, 체내수정 시킨 것과 자연배란으로 수정된 배는 Table 2에 표시하였고 이들 수정된 배를 2nd recipient에 각각 이식하여 얻은 결과는 Table 3에 표시하였다. 6마리의 토끼에서 얻은 여포 난자의 총수는 85개였으며 12시간 배양후 85개의 난자를 1st recipient 7마리에서 한쪽 난관을 제거한 난관에다 각 12개의 난자를 넣었고 나머지 한 마리에는 13개의 난자를 넣었다. 한편 1st recipient에서 난소를 제거하지 않은 난소에서 배란점은 44였다. 35시간 후 이들 1st recipient를 다시 복개하여 수정배

- 0 hr : oocyte collection from 6 animals and in vitro culture
- 5 hr : 1) LH injection to the 1st recipients (7 animals) and 2nd recipients (8 animals: 4 for control and 4 for experimental group)
- 2) collections of sperms from 4 bucks and artificial insemination to the 1st recipients
- 12 hr : 1) ovariectomy on one side of the 1st recipients (7 animals)
- 2) In vitro matured oocytes were transferred to the ovariectomized oviduct of the 1st recipients
- 35 hr : 1) flushing fertilized embryos from non-ovariectomized oviducts and transferring the recovered embryos to the 2nd recipients (4 animals) (control)
- 2) Keep each of the 2nd recipients in 4 cases and let them term.
- 3) flushing fertilized embryos from the ovariectomized oviducts and transferring the recovered embryos to another 2nd recipients (4 animals) (experimental)
- 4) Keep each of the 2nd recipients in 4 cases and let them term.

를 수집하였다. 난소 제거된 난관에서는 총 47개의 난자 및 수정배를 회수하였는데(47/85) 이 중 16은 fragmentation을 일으킨 것이었다. 한편 자연 배란으로 수정된 배는 27을 회수하였다(회수율: 27/44)

이들 회수된 배를 다시 2nd recipient에 이식시 자연배란으로부터 얻은 27개의 수정배 중 8개는 회수검경시 실수로 잃어버려 19개의 배를 3마리의 2nd recipient의 양쪽 난관에다 2개씩 배를 이식하였고 나머지 한 마리에는 한 쪽 난관에다 2개의 배를 다른 쪽에는 3개의 배를 이식하였다.

이들 대조군 및 실험군에서 회수된 수정배는 각각 61.3% 및 55.3%로 회수율에는 현저한 차이가 없었다. 그러나 실험군에서의 회수율은 55.3%였으나 16/85(34%)는 fragmentation을 일으킨 것으로 fragmentation 비율은 높은 것 같다. 물론 이렇게 배양해서 이식한 후 fragmentation 비율을 관찰한 연구가 전혀 없어 비교키는 어려우나 이들 fragmentation의 발생에 대해서는 본 실험연구 결과로는 그 원인을 알 수 없다. 본 실험에서 배란된 난자를 in vivo fertilization시킨 것과 hormonal treatment 전 없이 in vitro cultured oocytes를 in vivo fertilization시킨 결과의 cleavage rate에는 별다른 차이가 없고 단지 in vitro cultured oocyte에서 fragmentation이 현저하게 높게 나타나고 있다(34%).

Thibault(1977)는 in vitro에서 성숙시킨 난자에서는 세포질 성숙(cytoplasmic maturation)이 일어나지 않았다고 보고하고 있다. 즉 성체토끼에다 HCG 주사후 2, 3, 5시간 경과후 여포에서 꺼낸 난자를 12시간 더 in vitro에서 배양후 in vitro fertilization시켜 보았으나 sperm nucleus decondensation 현상은 일어나지 않았으나(0%) HCG 주사 후 7시간 후에 여포에서 꺼낸 난자는 5시간 더 배양후 in vitro fertilization을 시도한 난자에서는 80%가 sp-

erm nucleus decondensation의 과정이 일어났고 나머지 20%는 abnormal type였다고 한다. 즉 HCG 주사후 어느 일정시간(토끼에서는 7시간) 이상을 여포안에서 머물렀던 난자만이 세포질 성숙과 막 성숙(membrane maturation)이 일어났으며 sperm nucleus decondensation factor가 생겨난 것으로 해석하였다. 이러한 세포질 성숙과 막 성숙 현상은 난자가 여포내에 있을때 난구세포(cumulus cell)와 여포액등과 상호작용하에 얻어지는 것으로 생각하였고 또 이것은 LH 홀몬에 의한 효과라고 추정한 바 있다.

한편 이와는 달리 Staigmiller & Moor(1984)는 양의 여포난자를 꺼내어 denuded oocyte 및 corona enclosed oocyte을 24시간 배양 후 난자의 핵 성숙 과정은 일어났으나 inseminated female에 이식 후 포배기(Blastocyst)까지 도달한 배는 1.9% 및 1.8%였으나 corona-enclosed oocyte에다 follicle cell 5×10^6 /ml로 넣어준 난자에서는 37.2%가 포배기까지 가는 발생율을 나타내었다. 한편 cumulus complex(cumulus enclosed oocyte)와 cumulus complex plus follicular cell 5×10^6 /ml로 넣어준 그룹에서는 포배기까지 도달한 것이 각각 42.6% 및 55.3%였었다. Cumulus complex plus follicle cell 5×10^6 /ml로 넣어주어 포배기까지 도달한 55.3%중의 19개의 배를 다시 synchronized 2nd recipient의 자궁에 이식시켜 12마리의 새끼양을 탄생시켰다. Staigmiller & Moor(1984)의 결과는 Thibault(1977)의 결과와 아주 판이하게 다르다. 즉 in vitro matured rabbit oocyte의 발생능력에 대해 Thibault(1977)는 세포질 성숙, 막성숙 및 sperm nucleus decondensation factor가 난자, 난구세포, 여포액과의 상호작용에 의해서 생성되는 것이라 하였고 이들의 발생능력(developmental competence)은 없는 것으로

추정하였으나 본 실험에서는 처음부터 HCG 나 LH 처리하지 않은 처녀토끼의 난소에서 난자를 채취하였고 배양시에도 이들 hormone 을 처리하지 않고 배양하였으며 배양이 끝난 난자를 inseminated female에서 수정시켰다. 즉 Thibault(1977)가 HCG 처리한 후 7시간 후 난소에서 난자를 채취하였고 in vitro fertilization 을 시도한 반면 본 실험에서는 HCG의 처리를 하지 않았던 난소에서 난자를 채취하여 배양후 inseminated female의 oviduct에 이식하여 in vivo fertilization 시켰던 점에서 비교한다면 sperm nucleus decondensation factor가 in vivo에서만 생성되는 것이 아니라 in vitro에서도 cumulus cell의 존재하에 형성되는 것으로 나타나고 있다. 이러한 점은 Staigmiller & Moor(1984)의 실험에서도 cumulus enclosed oocyte를 in vitro fertilization 시켜본 결과 포배기까지 갈 수 있었던 점으로 보아 적어도 토끼 및 양에서의 sperm nucleus decondensation factor, 세포질 성숙 및 막성숙 과정이 in vitro에서 일어난다는 증거가 되겠다. 또한 Moor & Warnes (1978)도 Thibault(1977)와 비슷한 주장을 하였으나 Staigmiller & Moor(1984)의 결과로 in vitro matured oocyte도 cumulus cell layer가 많거나 follicular cell을 보충하여 넣어서 성숙시킨 난자일 경우 충분한 developmental competence를 얻고 있음이 증명되고 있다.

REFERENCES

- Bredderman, P.J., Foote, R.H. and Yassen, M.: *An improved artificial vagina for collecting rabbit semen. J. Reprod. and Fert.* 7:401, 1964.
- Bae, I.-H. and Foote, R.H.: *Effects of hormone on the maturation of rabbit oocytes recovered from follicles of various sizes. J. Reprod. and Fert.* 42:357, 1975.
- Bae, I.-H. and Foote, R.H.: *Carbohydrate and amino acid requirements and ammonia production of rabbit follicular oocytes matured in vitro. Exp. Cell Res.* 91:113, 1975.
- Cross, P.C. and Brinster, R.L.: *In vitro development of mouse oocytes. Biol. Reprod.* 3:298, 1970.
- Eppig, J.J.: *FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. Nature* 281:483-484, 1979.
- Jagiello, G., Ducayen, M., Miller, W., Graffeo, J., and Fang, J.S.: *Stimulation and inhibition with LH and other hormones of female mammalian meiosis in vitro. J. Reprod. and Fert.* 43:9, 1975.
- Mukherjee, A.B.: *Normal progeny from fertilization in vitro of mouse oocytes matured in culture and spermatozoa capacitated in vitro. Nature* 237:397, 1972.
- Mahi, C.A. and Yanagimachi, R.: *Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. J. exp. Zool.* 196:189, 1976.
- Moor, R.M. and Trounson, A.O.: *Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. and Fert.* 49:101, 1977.
- Moor, R.M. and Warnes, G.M.: *Regulation of meiosis in mammalian oocytes. Br. med. Bull.* 35:99, 1979.
- Sorensen, R.A. and Wasserman, P.M.: *Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. Devl. Biol.* 50:531, 1976.
- Shea, B.F., Baker, R.D. and Latour, J.P.A.: *Maturation in vitro of rabbit follicular oocytes. Can. J. Anim. Sci.* 56:377, 1976.
- Staigmiller, R.B. and Moor, R.M.: *Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Res.* 9:221, 1984.
- Tsafiriri, A. and Channing, C.P.: *Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. J. Reprod. and Fert.* 43L149, 1975.
- Thibault, C.: *Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? J. Reprod. and Fert.* 51:1, 1977.
- Trounson, A.O., Willadsen, S.M. and Rowson, L.E.A.: *Fertilization and developmental capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transfer to the oviducts of rabbit and cows. J. Reprod. and Fert.* 51:321, 1977.