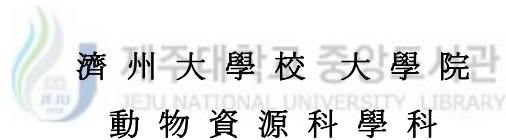


碩 士 學 位 論 文

Tamoxifen (anti-estrogen)이 돼지 未成熟
卵母細胞의 體外成熟 및 受精에 미치는 影響



吳 昌 彦

1 9 9 9 年 6 月

Tamoxifen (anti-estrogen)이 돼지 未成熟
卵母細胞의 體外成熟 및 受精에 미치는 影響

指導教授 金 重 桂

吳 昌 彦

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함



1999年 6月

吳昌彦의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印

濟州大學校 大學院

1999年 6月

The effect of tamoxifen (anti-estrogen) on
the in vitro maturation and fertilization of
immature porcine oocytes

Chang-Eon, Oh

(Under the Supervision of Professor Jung-kye, Kim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOTECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL CHEJU NATIONAL
UNIVERSITY

JUNE. 1999

目 次

Summary	1
I. 緒 論	4
II. 研 究 史	8
1. 배양액 및 배양조건과 난모세포의 체외성숙	
2. 호르몬과 난모세포의 체외성숙 및 전핵형성능력	
3. Tamoxifen과 체세포의 체외배양	
4. 난포세포와 난포액의 체외성숙 및 전핵형성능력	
5. 난모세포의 크기와 체외성숙능력	
6. 성장인자 및 dbcAMP의 난모세포성숙과 전핵형성능력	
7. 체외수정에 있어서 난포액, Ca^{2+} , GSH의 영향	
III. 材 料 및 方 法	19
1. 실험기간 및 장소	
2. 공시재료 및 실험방법	
3. 체외성숙	
4. 체외수정	
5. 17β -estradiol 분석	
6. 통계처리	
IV. 結 果 및 考 察	30
1. Tamoxifen이 난모세포의 체외성숙에 미치는 영향	
2. Tamoxifen이 난모세포의 체외성숙과 수정에 미치는 영향	
V. 摘 要	42
VI. 參 考 文 獻	44

Summary

Effect of tamoxifen (TAM) and E_2 on oocyte maturation, effects of TAM on the level of E_2 in oocyte and effect of TAM added to maturation medium on the in vitro fertilization (IVF) of porcine oocytes matured in vitro were carried out to determine the acting period and necessity of 17β -estradiol (E_2) using the tamoxifen (anti-estrogen).

The basic maturation medium was mTLP-PVA and hormones used for maturation culture were PMSG (10IU/ml), HCG (10IU/ml), and E_2 (1 μ g/ml). The concentration of TAM added to maturation medium was 13 μ M. The oocytes were cultured for 24h (GVBD evaluation) and 48h (M II) at 38.5°C in humidified atmosphere of 5% CO_2 in air and judged as matured when they were attained to the stage of second meiotic division (MII). The level of E_2 in oocytes was measured using 17β -estradiol Assay Kit (RIDASCREEN) in ELISA reader. At the end of maturation of culture, insemination was performed in mTLP-PVA (2mM caffeine + 3mg BSA/ml) medium. At six hours after insemination, oocytes were transferred to TCM-199 medium with 10% FBS and culture was continued for another 12hrs. Finally, sperm penetration, polyspermy, MP formation and normal fertilization of fertilized ova were checked microscopically after appropriate fixation and staining.

In in vitro maturation (IVM), without any relation to TAM addition, the rate of GVBD and MII of oocytes when cultured for 24h and 48h, respectively, were higher ($P < 0.05$) in the groups of PMSG and HCG than in those of control and E_2 treatment. When TAM was added to medium during the 2nd 24h of culture, MII rate was significantly ($P < 0.05$) increased in PMSG and HCG than the other treatments, and when added TAM in the later stage of culture at 24~48h, PMSG and HCG

both promoted the maturation of oocytes.

In assay of E_2 level, E_2 concentration of oocytes cultured for 24h, without any relation to TAM addition, was the highest ($P < 0.05$) in E_2 treatment. However, the E_2 concentration of oocytes cultured for 48h without addition of TAM was the highest in E_2 group and lowest in control ($P < 0.05$). When TAM was added during the 2nd 24h of culture, the E_2 concentration was significantly ($P < 0.05$) the highest in E_2 group, and when it was added during the first 24h of culture, there were no significance among the treatments.

In in vitro fertilization (IVF), there was no significance in the result of IVF (sperm penetration, polyspermy, MP formation and normal fertilization) of oocytes cultured in medium without TAM. However, the rate of monospermy was significantly ($P < 0.05$) increased in the group of PMSG treatment when oocytes were matured for 48h in TAM-containing medium and there were no significance among the treatments in connection with the other items examined. The addition of TAM during the first 24h showed some effect on the results of IVF, but its addition during the 2nd 24h enhanced significantly the normal fertilization of oocytes when matured in PMSG- or E_2 -containing medium than in medium with HCG ($P < 0.05$).

The following results were obtained by this study.

- 1) The progression of oocytes maturation was arrested when they were exposed to TAM for long time during the maturation culture.
- 2) TAM showed competitive action with E_2 and had no anti-action with PMSG and HCG.
- 3) TAM addition to maturation medium improved the rate of MP formation and normal fertilization of oocyte and especially its addition during the 2nd 24h of culture was more effective on IVF.

In conclusion, E₂ and TAM improved effects on IVF by acting at different stages of oocyte maturation and caused beneficial changes for IVM in both cytoplasm and membrane of oocytes. The findings obtained in this study may provide firm bases for the improvement of technology in future for efficient production of porcine embryo by IVM and IVF.



I. 緒 論

1952년 미국 펜실베이니아의 Briggs 와 King의 개구리복제를 필두로, 실험동물, 인간배자복제, 신약개발등 질병의 치료와 식량생산에 있어서 생명공학 (lifetechnology)과 생물공학 (biotechnonlogy)이 강력한 도구로 인식되어지면서 이들을 활용한 연구가 끊임없이 진행되고 있다. 또한 체외수정, 수정난이식, 핵이식, 성감별, 클론등의 번식기술의 진보가 있었으나 여러 가축에 널리 적용되지 않고 있는데 이는 체외에서 다룰 수 있는 적당한 난자가 부족하기 때문이다. 따라서 이들의 기초가 되는 미성숙 난포난의 체외성숙 (IVM)과 체외수정 (IVF) 그리고 수정난의 동결보존 (cryopreservation of embryo) 등 일련의 기초연구와 기술개발 등이 더욱 필요하다.

난포난의 체외성숙에 관한 연구는 1935년 Pincus와 Enzmann이 토끼 미성숙 난포난을 체외에서 배양하여 성숙분열이 재개된다는 보고를 필두로 마우스,绵양, 소 등에서는 체외성숙·수정을 통하여 이미 다수의 산자를 얻고 있다. 그러나, 돼지에 있어서는 타 동물종에 비해 극히 저조한 편이며, 현재 체외성숙·수정 유래의 산자를 생산한 예는 드물다 (Funahashi et al., 1997; Yoshida et al., 1993).

이러한 원인은 돼지 난포난의 체외성숙시 체내성숙에 비해 세포질과 핵성숙의 불균형으로 인한 염색체이상 (Yoshida et al., 1992; Ectors et al., 1995), 체외수정시 다정자수정 (Nagai, 1994, 1996; Funahashi & Day, 1993), 전핵형성과 자웅전핵 발육의 동조성 결여 (Gruppen et al., 1995) 및 cell block (Funahashi et al., 1994)과 같은 장애가 원인이 된다. 이외에도 적정배양시간과 온도 (Eng et al., 1986), 배양액의 종류 (Yoshida et al., 1992), 배양오일 (Funahashi et al., 1994), 배양시 산소와 이산화탄소농도 (Pinyopummintr & Bavister, 1995) 및 난자 조작시 오염 (contamination) 등에 의하여 성숙율의 변이가 크게 나타난다.

배양시 난자의 크기 (Ectors et al., 1995; Motlik et al., 1984; Sato et

al., 1990)와 난포세포의 존재 여부가 성숙과 전핵형성에 영향을 미치며 (Ding & Foxcroft, 1992; Kikuchi et al., 1993; Nagai, 1994; Ding & Foxcroft, 1994), 또한 배양액중의 성장인자의 종류 (Eberhardt et al., 1994; Im & Park, 1995; Lorenzo et al., 1995; Coskun & Lin, 1995), 호르몬의 첨가 및 농도 (Mattioli et al., 1991; Ding & Foxcroft, 1994; Funahashi et al., 1994; Funahashi & Day, 1993) 등도 성숙과 전핵형성에 크게 영향을 미친다고 시사되고 있다. 이들 인자는 체내 조건하에서 난포난의 주위환경, 즉 난구세포, 과립층세포, 난포막세포에서 생성되거나 직접 작용하면서 난포난의 성장 및 성숙에 관여하게 된다. 동물종을 막론하고 난포난의 성숙의 시발점은 뇌하수체로부터 방출되는 성선자극 호르몬 (FSH, LH)에 기인하는데, FSH와 LH의 방출에 의해 과립층세포가 증식하고, 난포막세포에 의해 androgen이 생성된 후, 이 androgen은 estrogen으로 전환된다. estrogen은 난포막세포의 LH-receptor 및 과립층세포의 FSH-receptor를 증가시키면서 난포발육 및 난포난 성숙에 관여하게 된다 (Fig 1).

일반적으로 난자의 성숙은 크게 세포질 성숙과 핵성숙으로 나눌 수 있으며, 체외 배양시 FSH나 LH 등의 gonadotropin (GTH)을 첨가하면 성숙 분열을 촉진하고, 특히 LH는 선택적으로 세포질성숙을 촉진하며, 응성전핵형성을 촉진한다 (Mattioli et al., 1991). 또한 호르몬의 작용시기와 여러 가지 호르몬을 함께 첨가하였을 때와 단일 첨가시 성숙율과 응성전핵형성에 있어서 차이가 난다 (Funahashi et al., 1994). 이들 성선자극호르몬은 결국 난포체세포에 작용하여 steroid호르몬을 생성하는데 그 중 대표적인 것이 E₂이다. 배양시 E₂를 첨가하여 높은 비율의 응성전핵 및 자성전핵형성을 보이고 있으나 (Nagai, 1994), 이 결과와는 반대로 Funahashi 등 (1994)은 E₂의 단독첨가가 GVBD율, 성숙율 및 정자의 침투율을 저하시키고, 배양후기에 E₂를 첨가하면 응성전핵 형성율이 떨어진다고 보고하여 연구자들간에 상이한 견해차를 보이고 있다.

최근 체세포를 이용한 연구에서 estrogen의 작용 및 이 estrogen에 대

한 길항물질인 tamoxifen에 대해 많은 결과가 보고되고 있는데 tamoxifen의 작용은 시험대상 sample인 체세포의 종류 및 동물종에 따라 미치는 영향이 다르다고 시사되고 있다. 더욱이 난포난의 성숙에는 estrogen이 깊게 관여하지만, 이 호르몬의 난포난의 성숙에 관여하는 기전 (mechanism)은 구명되어야 한다고 생각한다. 특히, anti-estrogen인 tamoxifen을 이용한 돼지 난자의 체외성숙에 대한 연구는 전무한 실정이며, 만일 이 물질을 이용하여 estrogen의 명확한 기전이 구명된다면 난포난의 성숙·수정 및 이에 따른 배생산 효율은 크게 증가되리라고 기대된다.

따라서 본 연구는 tamoxifen을 돼지 난자의 체외성숙에 이용하여 체외성숙에 있어서 1) estradiol의 작용시기와 필요성 구명, 2) tamoxifen과 E₂의 상호작용, 3) tamoxifen과 E₂가 난자의 성숙·수정 및 전핵형성에 미치는 영향 등에 대해 연구 조사했다.



II. 研究史

1. 배양액 및 배양조건과 난모세포의 체외성숙

제1성숙분열 전기에서 발생을 중지하고 있던 난자는 성선자극 호르몬의 영향으로 감수분열을 재개하여 제1감수분열을 완성하고 이어서 제2감수분열의 중기로 이행하는데 이를 난자의 성숙이라 한다. 돼지 난자의 체외 배양시 배양액의 조성과 종류는 핵성숙과 응성전핵형성에 중요한 영향을 미친다. Yoshida 등 (1992, 1993)은 돼지 난자의 배양에 mTCM-199, Waymouth MB 752/1, mTLP-PVA를 이용하여 응성전핵형성율이 높게 나타났다고 보고하였다. 또한 배양액에 cysteine이나 glutathione를 첨가해도 응성전핵형성을 크게 촉진한다고 하였으며, Waymouth 배양액에서 배양된 난자가 mTCM-199 또는 TLP배양액에서 배양한 것보다 응성전핵형성에 영향을 미치는 glutathione (GSH)의 농도가 높고, mTLP에 cysteine을 0.04-0.57mM첨가하였을 때 체외에서 배양된 난자의 GSH의 농도와 응성전핵형성율이 높게 나타났다고 하였다. 이러한 농도 증가는 수정 후 감소한다고 하였다. 즉, 성숙배양액에 cysteine의 첨가는 돼지난자의 GSH 합성을 하게 하며, GSH합성은 수정 후 응성전핵형성에 있어서 중요한 요인이 된다. 배양액의 조성은 돼지 난자의 GSH의 농도에 중요한 영향을 미친다고 보고하였다. GSH는 세포내 주요 free thiol기로서 세포증식동안에 아미노산 수송, 단백질과 DNA합성, 세포의 산화를 방지하는 등 중요한 생물학적 기능을 한다. Yoshida (1993)는 GSH합성은 성숙기간 동안 합성되며 이는 중요한 세포질성 인자로서 정자핵의 팽화 (decondensation)와 응성전핵형성을 조절한다고 하였다. Rexroad 와 Powell (1988)는 면양 난자를 M-199에서 배양한 것이 Ham's F10에서 배양한 것보다 높은 난분할율을 보였고, Hirao 등 (1994)은 배양조건이 부적절한 경우 응성전핵 형성능력이 저하되며 이는 세포질 성숙이 불충분하였기 때문이라고 하였다.

Eng 등 (1986)은 돼지 난자를 39℃에서 배양하였을 때 극체형성율이 37℃에서 배양하였을 때 보다 높게 나타났으며, 면양의 난자를 배양할 때 배양 온도를 20℃로 낮추었을 때 중기 염색체의 배열을 포함한 염색체 이상과 다극성방추체 (multipolar spindles)가 발생되었고 이러한 현상은 난핵포기 단계에서 MII단계에 이르기까지 모든 단계에서 발생되었다고 보고하고 있다. 특히 GVBD가 냉각에 가장 민감하였다고 한다. 즉 배양시 온도변화는 염색체이상과 세포질내의 소포 (vesicle)가 비정상적인 형태를 유발하고, 이러한 온도충격을 받은 난자는 수정 후 정상적인 발달능력이 크게 감소하였다 (Moor & Crosby, 1985).

소 난자의 체외배양시 산소의 양이 20%에서 10%, 5%로 감소함에 따라 MII의 비율이 현저하게 낮아졌고, 수정율도 떨어졌다. 또한 다정자수정도 산소가 감소한 상태에서는 늘어났다. 즉, 소 난자의 IVM-IVF시 적당한 산소와 CO₂조건은 각각 20%와 2.5~5%라고 보고하고 있다 (Pinyopummintr & Bavister, 1995). 돼지 난자의 성숙 완료 시간은 42~44시간으로 소나 양의 24시간에 비해 오래 걸린다. Funahashi 등 (1994)은 체외배양시 파라핀 오일 (paraffin oil)은 지용성 물질을 흡수하는 경향이 있어, 배양액 내의 estradiol이 점차 감소한다고 하였다. 소 난자의 체외배양시 thyroid와 LH를 함께 첨가하였을 때 수정율이 LH단독 첨가 또는 혈청과 thyroid를 함께 첨가한 것보다 높게 나타났고, 난구세포의 확장과 수정 후 상실배나 배반포로 발달한 것이 높게 나타났다고 한다.

2. 호르몬과 난모세포의 체외성숙 및 전핵형성능력

Mattioli 등 (1991)은 돼지 난자의 체외배양시 LH와 FSH를 첨가하였을 때 GV단계의 난자 비율이 감소하였고 MII의 비율이 높게 나타나고, 또한 LH를 첨가하면 난자와 난구세포의 상호작용으로 성숙분열 재개가 무첨가에 비해 빨리 일어났다고 보고하였다. 돼지 난자의 체내성숙시 HCG주사

후 12시간째에 cAMP의 농도가 증가하였다고 보고하였고, Coskun 와 Lin (1995)은 체외배양시 HCG를 첨가하였을 때 세포내 cAMP의 형성뿐만 아니라 난자의 성숙도 촉진한다고 하였다. 즉 cAMP의 일시적 증가는 감수분열 재개를 의미한다. Funahashi 등 (1994)과 Funahashi 와 Day (1993)는 돼지 난자난구 복합체의 배양시 배양후기 즉, 배양 20시간 후에 PMSG나 estradiol을 첨가하였을 때 응성전핵 형성율을 떨어뜨렸고, PMSG나 HCG에 비해 estradiol 단독 첨가는 정자의 침투율 (penetration)을 낮게 하고, 응성전핵형성을 저하를 유발하였다. 즉, 배양초기 20시간 동안에 PMSG첨가, 그리고 배양후기 20시간 이후에는 배양액으로부터 PMSG나 HCG, estradiol등의 호르몬을 제거하였을 때 돼지 난자의 세포질 성숙이 촉진되었다고 하였다. Eppig 와 Schroeder (1986)는 체외배양시 과도한 호르몬 처리는 난자에 해로운 효과를 줄 수 있다고 하였다.



3. Tamoxifen과 체세포의 체외배양

최근 체세포를 이용하여 estrogen의 작용기전 및 이 estrogen에 대한 길항물질인 tamoxifen에 대한 연구가 활발히 진행중이다. tamoxifen은 비스테로이드성 triphenylethylene 유도물질로서, 사람의 유방암 (breast cancer)치료에 널리 쓰이고 있으며, 작용기전은 E₂ receptor의 구조를 변화시켜 수용체가 E₂에 대한 친화력을 잃게 하거나, estrogen의 수용체와의 결합을 막는다 (George et al., 1992). 그러나 Katsumi 등 (1992)은 tamoxifen이 사람의 자궁근암 (endometrial carcinoma)의 성장과 progesterone수용체 농도를 증가시켰고, 17-βestradiol과 마찬가지로 원종양 유전자인 C-fos 발현을 자극하였다고 한다. 즉, 자궁근암 (endometrial carcinoma)에 있어서 tamoxifen의 효과는 사람의 유방암 (breast cancer)에 대한 tamoxifen의 E₂억제효과를 나타낸 것과는 대조가 된다.

Vallet 등 (1995)은 estradiol과 1mg tamoxifen을 자궁세포배양시 첨가하였을 때 자궁선의 발달을 자극한다고 하였다. 또한 tamoxifen은 estrogen의 유사물질 (agonist)로도 작용한다고 했다. Phaneuf 등 (1995)은 estradiol을 steroid-free배양액에 첨가하였을 때 inositol phosphates의 형성을 증가시켰고 이러한 영향은 anti-oestrogen인 tamoxifen처리에 의해 완전히 없어졌다. 이런 까닭에 tamoxifen은 다른 동물종에 있어서는 estrogen agonist이거나, 또는 길항물질 (antagonist)성분으로 반응한다. 즉 tamoxifen의 생물학적인 효과는 아직도 불분명한 점이 많고 종특이적 (species specific)이고 또한 기관특이적 (organ specific)으로 작용하므로 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

4. 난포세포와 난포액의 체외성숙 및 전핵형성능력

Yoshida 등 (1993)은 돼지 난자의 체외배양시 PFF와 cystein를 첨가하여 78%의 수정율을 얻었고 생산된 수정란을 이식하여 자돈을 생산하였으며, PFF는 핵성숙을 촉진하고 polygyny 수정을 막는다고 하였다. Funahashi 등 (1994)은 정자를 1%의 PFF에서 전 배양한 후 수정을 실시한 결과 단정자 침투율과 응성 및 자성전핵 형성율에 있어서 전배양을 하지 않은 것에 비해 높게 나타났다고 보고하였다. 또한 상실배와 배반포 비율도 PFF에서 전처리를 한 것이 높게 나타났다. 따라서 PFF처리를 한 정자를 이용하였을 때 다정자침입이 적었고, 응성전핵형성율이 높게 나타났으며, 체외 성숙 수정된 돼지난자의 체외발육능력을 개선하는 효과가 있었다고 한다. Yoshida 등 (1990)은 돼지난자의 배양시 PFF를 첨가하여 높은 율의 난구세포확장과 핵성숙율을 얻었다. 그러나 Racowsky 와 McGaughey는 (1982)은 돼지 난자 난구복합체의 배양시 난포액성분에 의해 MII단계로의 성숙진행이 억제되었다고 하였다. Yoshida 등 (1992)은 돼지 난포액을 배양액에 첨가하였을 때 핵성숙율과 정상수정 및 정상적인

난분할을 증가 시켰으며 체외배양시 난포액의 첨가는 염색체이상, 다정자 수정등을 막는 역할을 한다고 하였다. Kline (1996)는 FSH를 처리한 난포에서 분비된 난포 분비액이 돼지 난자의 체외배양을 촉진한다고 하였다. Kim 등 (1996)은 소 난자의 체외배양에 있어서 난포액과 E₂를 첨가하여 배반포와 부화배반포의 세포수 증가를 보고하였다. 반면 Ayoub 와 Hunter (1993)는 소 난자의 체외배양시 난포액의 첨가는 난자의 성숙을 억제하는 것으로 나타났고 이러한 효과는 배양 24시간째 난포액을 제거함으로써 억제효과를 멈출 수 있었으며, 특히 작은 난포에서 채취한 난포액은 GVBD를 억제하는 비율이 높게 나타났다.

Archibong 등 (1989)은 돼지 난관액을 1~2 cell 단계의 수정란 배양에 첨가하였을 때 배반포로의 발달을 개선하였다. 그러나 황체초기단계의 난관액은 1~2 cell단계의 수정란 발달을 억제하는 결과를 가져왔다. Eberhardt 등 (1994)은 돼지 1~2, 그리고 4 cell 수정란을 체외배양시에 발정 후 48시간과, 96시간째 채취한 난관액을 첨가하여 배양한 결과 채취 시간에 관계없이 난분할이 거의 이루어지지 않았다. 그러나 여기에 BSA를 첨가하였을 때 90%이상이 상실배와 배반포단계까지 발달하였다. Naito (1996)는 MPF (maturation of promoting factor)가 배양 24시간 동안의 GV단계에서는 활성이 낮고, 1차 및 2차 성숙분열 (MI, MII)단계에서는 증가하고 제1극체 출현시 일시적으로 감소한다고 보고하였다.

Ding 와 Foxcroft (1992)는 돼지 난자 난구 복합체의 배양시 난포세포 (follicular shells)와 공배양 한 결과 핵성숙에는 영향이 없었으나 응성전핵 형성율은 크게 개선되었다고 하였으며, 난포세포는 기능적인 분화를 하여 난자의 각 발달 단계에 있어서 다른 양의 성숙인자를 방출하여 난자의 성숙에 각기 다른 영향을 미친다고 하였다. Kikuchi 등 (1993)은 돼지 난자의 체외배양시 난구세포 (cumulus cells)와 과립세포 (granulosa cells)에 대한 비교 실험에서 난구세포의 존재하에서 수정을 실시하였을 때 침투율과 응성전핵 형성율이 높게 나타났다고 보고하였다. Ding 와 Foxcroft (1994)는 배양시 크기가 다른 난포에서 채취한 난포액을 체외에서 48시간

동안 TCM-199에 FSH를 첨가하여 배양한 후 미성숙 난자의 배양에 사용하였을 때 높은 율의 핵성숙을 유기하였다. 그러나 정자의 침투율은 영향을 받지 않았다. Conley 등 (1994)은 과립세포에 의해 androgen이 cytochrome P450 aromatase의 촉매로 estrogen으로 전환되며, 돼지의 난포막세포 (theca cell)는 과립세포와는 별도로 estrogen을 합성할 수 있다고 하였다. 그러나 체외에서는 난포막세포와 과립세포가 luteinize (황체)화되어 체내에서와 같은 효소 활성반응이 정확하게 일어나지 않는다고 하였다.

5. 난포세포의 크기와 체외성숙능력

Hirao 등 (1994)은 크기가 다른 난포에서 난자를 채취하여 체외에서 배양한 결과 난핵포기 붕괴율은 난자의 직경이 90um가 6%, 100um 30%, 110um 60%로 나타났다. 또한 직경이 110um이상인 난자에서만 MII가 관찰되었다. 즉, 난포의 크기와 성숙분열의 관계는 체내나 체외에서 비슷한 경향을 보인다고 할 수 있다. Motlik 등 (1984)도 돼지 난자의 체외배양시 난포의 크기에 따른 성숙분열재개 능력과 성숙의 정도를 판정하였는데 난포의 크기가 0.3-0.7mm에서 채취한 난자의 80%이상이 난핵포기 단계에 머물러 있었고, 난포의 크기가 3~5mm에서 채취한 난자는 100%가 난핵포기붕괴가 일어났으며, 이중 76%만이 제1극체가 형성되었다. 즉 돼지 난자는 난포의 크기가 1mm이상에서 채취한 난자가 체외에서 성숙분열재개 능력을 획득하였고, 2mm이상 난포에서만 제1성숙분열이 일어났다고 보고하였다. 그러나, Ectors 등 (1995)은 소 난자의 체외배양시 난포의 크기는 핵성숙에 영향을 미치지 않으며, 비정상적인 MII에도 (배수체) 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 즉 난자의 불완전한 성숙은 염색체 이상을 초래하고 이러한 이상은 수정란 및 태아, 신생축의 사망의 한 원인이 된다.

6. 성장인자 및 dbcAMP의 난모세포성숙과 전핵형성능력

Lorenzo 등 (1995)은 미성숙 소 난자의 체외배양시 EGF (epidermal growth factor), IGF-1 (insulin-growth factor), sera (FCS, ECS) 및 난구 세포등을 첨가하여 난구세포의 확장과 핵성숙을 개선하였다. Im 와 Park (1995)은 소 난자의 배양시 TCM-199에 30ng/ml EGF를 첨가하여 97%의 성숙율을 얻었고 EGF에 FCS를 첨가하여 높은 율의 단정자수정과 전핵형성을 증가시켰다. 그는 EGF가 세포질 성숙뿐만 아니라 핵성숙에도 관여한다고 보고하였다. 그러나 Funahashi 와 Day (1993)는 돼지 난자의 배양시 FCS나 NPS (newborn piglet serum)의 첨가는 옹성전핵 형성을 감소시키고 고농도의 FCS는 세포질 성숙에도 부적당하다고 하였다. Grupen 등 (1995)은 돼지 난자의 배양시 cysteamine을 첨가하여 옹성전핵 형성율의 증가와 자성전핵 형성이 높게 동기화 되었고, 수정후 배발달율도 개선하여 체외발달을 증가시켰다고 보고하고 배양시 cysteamine을 첨가하면 cystein이 cystine으로 산화되는 것을 막는다고 하였다. Yoshida 등(1992)도 배양액에 cystein을 첨가하여 옹성전핵 형성을 증가 시켰다. Eppig 와 Schroeder (1986)는 난자의 성숙과 수정시 혈청이 필수적이며, 이는 투명대 경화를 막아 정자의 침투를 용이하게 한다고 하였다.

Yoshida 등 (1993)은 돼지 난자의 피질과립 (cortical granules)을 FITC (fluorescein isothiocyanate)labelled peanut agglutinin을 이용하여 투시와 검사가 가능하다고 하였다. 즉 난자의 성숙이 진행됨에 따른 표층과립의 분포가 변화된다고 하였고 표층과립의 원심성 이동의 시기 및 형태는 난모세포 개체간에 차이가 없으며, 체외수정 후 위란강에 방출된 표층과립은 일정기간 위란강내에 존재한다. 또한 체외수정 후 이러한 표층과립의 방출시기와 형태 등은 단정자와 다정자수정난 간에 차이가 없다고 보고하고 있다. Eberhardt 등 (1994)는 돼지 수정난배양시 IGF-1, EGF 그리고 BSA를 함께 첨가하여 90%이상이 상실배와 배반포 단계까지 발달을 유도하였다.

Funahashi 등 (1997)은 난핵포기 단계의 돼지난자의 배양시 1mM dbcAMP (Dibutyryl Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate)를 첨가하여 20시간 배양하였을 경우 핵성숙이 일치되었고 수정후 배반포로의 발달율이 높았고, 생산된 수정란을 이식하여 19두의 자돈을 생산하였다고 보고하였다. Sato 등 (1990)은 소 난자의 배양시 난자의 직경이 101 μ m에서 120 μ m의 난자를 배양시 dbcAMP를 첨가하여 제1극체 형성과 성숙분열 재개 능력을 개선하였다. 그러나 난자의 크기가 90 μ m이하에서는 성숙분열 재개가 일어나지 않았다. Yoshimura 등 (1992)은 토끼의 난자난구 복합체의 배양시 forskolin 10⁻⁴mol을 첨가하였을 때 성숙분열이 억제되었고, 난자내 cAMP가 forskolin에 노출 후 30분 쯤부터 크게 증가하여 2시간째에 최고에 달하였고 그후 난자내 cAMP 수준이 갑자기 감소하였다. 이러한 난자내 cAMP농도의 감소는 제1차 성숙분열 (meiosis)의 재개가 일어난 후에 나타났다. 즉 성호르몬 (Gonadotrophin)분비 후 일시적 cAMP농도 증가가 난자의 성숙개시에 필요하다. Powers와 Paleos (1982)는 마우스 난자 배양시 dbcAMP를 첨가한 후 calcium ionophore를 첨가하였을 때 dbcAMP의 억제효과가 극복되었다고 하였다. dbcAMP를 41uM첨가시 칼슘 길항물질인 verapamil이 증가되었고, 난핵포기 단계에서 block현상은 200uM verapamil을 첨가했을 때 99%로 나타났다. 즉, 최소한의 세포질내의 칼슘수준은 GVBD의 시작에 필요하며, 세포외 칼슘 상승은 dbcAMP에 의해 억제된 GVBD의 block현상을 극복하였다. Mattioli 등 (1994)은 돼지 난자의 체내 성숙시 cAMP농도를 측정하였는데 PMSG는 cAMP농도에 영향을 미치지 않았고, HCG는 주사 후 12시간째에 일시적으로 cAMP농도를 증가시켰다. 성숙시에도 cAMP농도는 체내 성숙시와 비슷하였고, dbcAMP를 첨가하였을 때 성숙분열 재개를 막았다. 그러나 배양시 최초 12시간 동안 dbcAMP에 노출하였을 때 성숙분열 진행이 가속화되었다. 따라서 cAMP의 농도는 감수분열재개가 일어나기 직전에 일시적으로 10~20시간까지 증가하고, 그후 점차 감소한다 cAMP의 증가는 난자의 adenylyl cyclase의 자극에 의존하며, 또한 성숙시 높은 cAMP의 농도는 성숙분열

정지상태를 유지한다. Racowsky (1985)는 난자난구복합체가 나화 난자보다 forskolin에 대한 민감성이 크며 cAMP는 난구세포층을 통하여 난자로 전이된다고 보고하고 있다.

7. 체외수정에 있어서 난포액, Ca^{2+} , GSH의 영향

돼지 난자의 체내 조건하에서는 배란직후 수정이 일어나며, 단정자 수정율은 95%이상이라고 보고 (Hunter, 1973)하였으나, 이와는 달리 체외수정시에는 다정자수정 (polyspermy)이 높게 나타나고 있으며 (Nagai, 1994, 1996; Yoshida et al., 1990; Funahashi & Day, 1993; Grupen et al., 1995) 낮은 전핵 형성율과 비동시성 등이 수정 후 정상적인 체외발육을 실패하게 한다고 하였다. 일반적으로 높은 침투율 (penetration)은 높은 다정자수정을 나타내며, 이는 ployploidy (다배수성)을 초래한다. 이러한 다정자수정을 막고 또한 동시에 응성전핵 형성율을 높이기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. Nagai (1994, 1996)는 돼지 정자는 caffeine과 고농도의 Ca^{2+} 이 들어있는 수정용액에서 전배양 없이 수정능획득이 가능하다고 하였으나 IVM-IVF 난자에 있어서 다정자수정이 여전히 높게 (60~90%) 나타나고 있다. 이러한 다정자침입을 막기 위해 난관세포와 공 배양하거나, 난포액에서 전 배양하거나, 또는 수정용 배양액에 oligopeptide를 첨가하여 크게 개선되고 있다. Funahashi 등 (1994)은 돼지 난자의 체외수정시 정자를 1% PFF에서 전 배양하여 수정을 실시한 결과 단정자 침투율이 59%이었고 응성 및 자성전핵 형성율은 32%로 나타났다. 또한 상실배와 배반포로의 발달율도 향상되어 정자의 PFF에서 전처리는 다정자침입을 방지하고 응성전핵 형성과 수정란의 체외 발달능력을 개선하는 효과가 있었다고 보고하였다. Yoshida 등 (1993)도 PFF가 핵성숙을 촉진하고 polygyny (다란핵) 수정을 방지한다고 하였다. Kikuchi (1993)는 동결융해 정자를 이용하여 수정을 실시하였는데 이때 난구세포가 존재하는 상태에서 수정시 높은

침투율 (92.5%)과 응성전핵 형성을 (80.2%)을 얻었다. Yoshida 등 (1993)은 GSH (glutathione)을 첨가하여 배양한 난자가 응성전핵 형성이 높게 나타나고 GSH농도가 수정 후 감소하였다고 보고하였다. 즉, GSH는 정자핵의 팽화 (decondensation)을 유기 한다. Niwa 와 Ohgoda (1988)는 소 난자의 체외수정시 caffeine과 heparin을 같이 첨가하였을 때 정자의 수정능 획득과 침체반응을 유기 하여 정자의 침투율을 개선하였고, 높은 율의 응성전핵 형성을 보고하였다. Im 와 Park (1995)는 소 난자의 체외배양시 EGF와 FCS를 함께 첨가하였을 때 단정자 수정율이 높게 나타났다고 하였다. 또한 Yoshida (1993)는 세포질성 인자인 GSH를 첨가하여 응성전핵 형성을 증가시켰는데 GSH는 정자핵의 팽화 (decondensation)와 응성전핵형성을 조절한다고 하였다. Yoshida 등 (1992)은 돼지 난포액을 배양액에 첨가하였을 때 핵성숙율과 염색체이상 및 다정자수정을 막아 정상수정을 증가시키고 난분할율을 증가시킨다고 하였다. Funahashi 와 Day (1993)는 돼지 난자의 체외배양시 정자농도를 1×10^6 cell/ml로 하고 난자가 정자에 노출된 시간이 10~12시간일 때 다정자 수정이 높게 발생하였다고 하였다. Yoshida (1989)는 체외수정시 정자의 농도, 정자와 난자의 작용시간, 배양액과 배양온도가 중요한 역할을 한다고 하였다.

Carroll 등 (1996)은 수정란 형성의 시작은 수정시 난자 세포질내의 세포내 Ca^{2+} 증가로부터 시작되며, 난자가 침입된 정자에 반응하여 Ca^{2+} 을 방출한다. 즉, 일련의 Ca^{2+} 과동 (oscillation)이 수정시 발생되며, 이는 비 포유동물의 Monotonic Ca^{2+} 증가와 비교된다. 또한 Ca^{2+} 방출의 최대 민감성은 난자성숙의 마지막 단계라고 보고하였다. Zoltan 등 (1997)는 체외수정 후 Ca^{2+} 과동 (oscillation)은 수정 후 2.5~3시간째에 발생한다고 하였다. Swann (1996)는 난자는 수정시 세포내 유리 Ca^{2+} 의 증가에 의해 활성화 (activation)되며, 정자가 oscillogen이라 일컬어지는 특이 단백질을 삽입함으로써 포유동물 난자의 세포내 Ca^{2+} 방출을 유기한다고 하였다. 그러나 정자가 어떻게 세포내 Ca^{2+} 방출을 자극하는지에 대해서는 어떤 종에 있어서도 아직 확립되지 않았다. 한가지 가설은 정자가 배우자 세포막과 융합

된 후 세포질내로 Ca^{2+} 방출인자를 삽입하는 것이다. 이것은 정자가 Ca^{2+} 자체를 삽입하거나, 또는 작은 분자량의 어떤 인자로 세포내에 저장된 Ca^{2+} 을 방출하도록 자극하는 두 가지 가정을 할 수 있게 한다. 그러나 이러한 가정은 척추동물 난자를 가지고 많은 실험을 하였으나 일치하지는 않았다.

Kline (1996)는 마우스 난자의 수정시 1,4,5-trisphosphate (IP3) 수용체의 중개에 의해 세포내 저장된 Ca^{2+} 이 방출된다고 하였다. 즉 저장된 Ca^{2+} 의 동원은 InsP3 수용체와 Ryanodine 수용체의 두가지 Ca^{2+} channels에 의해 조절된다.



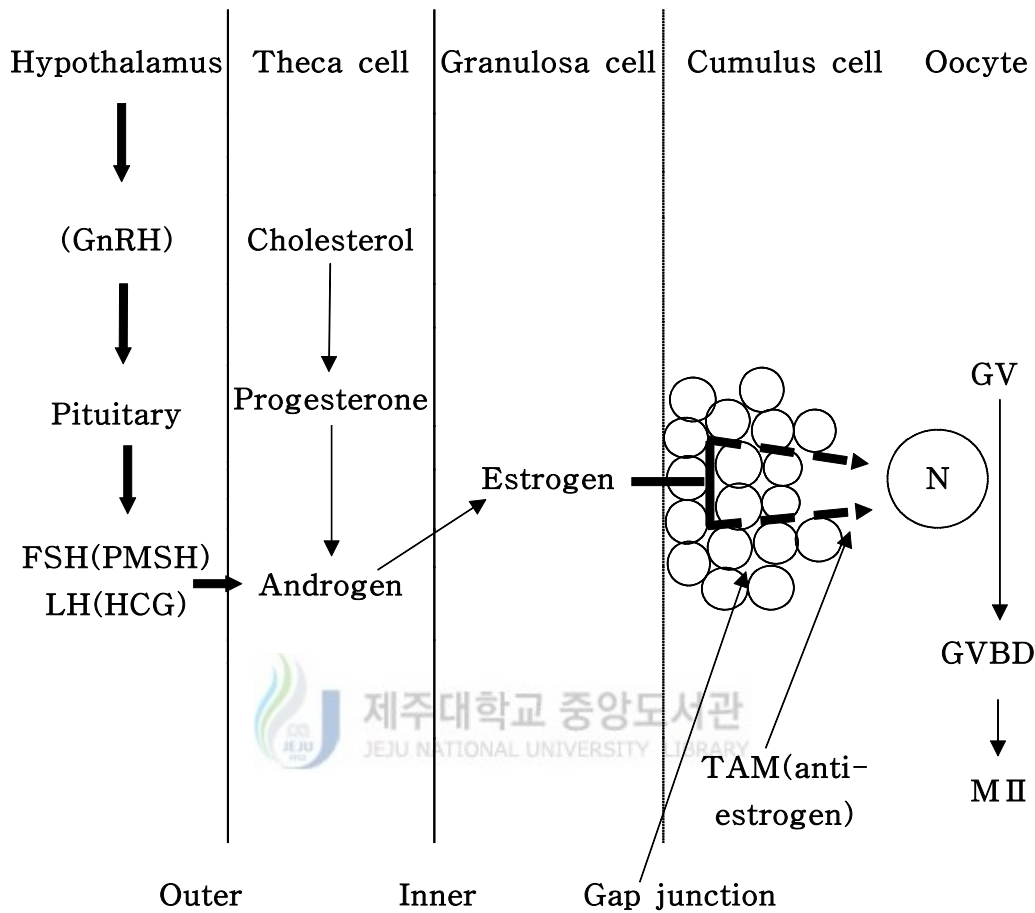


Figure 1. Mechanism of oocytes maturation in vivo.

GnRH : Gonadotropin releasing hormone, N: Nucleus,
 GV: Germinal vesicle, GVBD: Germinal vesicle breakdown,
 MII: Metaphase II.

Ⅲ. 材料 및 方法

1. 실험기간 및 장소

본 실험은 '97. 10 ~ '99. 4까지 농진청 제주농업시험장과 제주대학교 농과대학 동물자원과학과 번식학 실험실에서 진행되었다.

2. 공시재료 및 실험방법

본 실험에 공시된 돼지 난포난은 도축장 (북제주군 애월읍 어음리 축산물 공판장)에서 도축되는 돼지에서 채취하였다.

도축된 돼지로부터 30분 이내에 난소를 채취하여 35~38℃ 생리식염수 (0.9% NaCl + penicillin G 0.075g/l + streptomycin sulfate 0.05g/l)가 들어있는 보온병에 넣어 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 다시 멸균 생리식염수로 2~3회 세척하여 이 물질과 혈액을 깨끗이 제거한 후 20 gauge needle 이 부착된 10ml 주사기로 2~6mm 정도의 크기의 난포에서 난포액과 난포난을 흡인하였다. 15ml 원심분리관에 수집된 난자와 난포액은 38℃의 배양기내에서 5분간 정치시킨 후 부유물을 제거하고 mTLP-HEPES-PVA로 세척을 하였으며, 난포액 (PFF)은 1500×g에서 5분간 원심분리하여 0.45 μ l filter로 여과한 후 -20℃에 보관하면서 난자의 배양시 사용하였다. 세척과정을 3회 반복한 후 난구세포가 치밀하게 부착된 난자를 선별하여 배양접시에서 mTLP-HEPES-PVA로 2회 세척하고 다시 mTLP maturation medium에서 세척 후 실험에 공시하였다 (Table 1).

본 실험에 사용된 정액은 농진청 제주농업시험장에서 사육하고 있는 종모돈 Landrace 78 (Landrace 8176 × Landrace 97105, 170kg, 10개월령)

에서 채취한 원정액을 15℃에 보관하면서 사용하였다.

3. 체외성숙

돼지 미성숙 난포난의 체외성숙은 강 (1996)의 방법을 인용하였고 성숙 배양액은 mTLP-PVA에 glutamine 1.0mM, isoeucine 0.20mM, methionine 0.05mM, phenylalanine 0.10mM, cysteine 0.57mM, NaHCO₃ 25mM과 kanamycin 100 μ g/ml를 첨가하였으며, 사용된 시약은 Sigma에서 구입하였다 (Table 1).

Anti-estrogen인 4-Hydroxytamoxifen (Sigma, H6278)을 95% ethanol에 녹이고 -20℃에 보관하면서 사용하였다. 준비된 배양액은 사용 전에 0.20 μ m membrane filter (MFS, 25CS 020AS)로 여과하여 사용하였다.

선별된 미성숙 난포난은 배양접시에 소적을 만들고 mineral oil로 피복한 후 2시간 이상 5% CO₂ 배양기내 (99% humidity, 5% CO₂, 38.5℃)에서 전 배양된 배양 소적에서 처리별로 난포난을 배양하였다.

1) 실험구

① Tamoxifen 적정 농도구명: 배양시 tamoxifen의 적정농도를 구명하기 위해 성숙배양액에 tamoxifen 13, 26, 39, 52 μ M을 첨가하여 48시간 배양 후 고정하여 성숙을 판정하였다. 성숙판정은 0.1% hyaluronidase 노출하여 fine narrow pasture pipete으로 난자의 난구세포를 제거한 다음 현미경하(Nikon X-2, Japan)에서 slide glass에 옮겨 cover glass를 덮고 난자를 고정한 후 고정액 (acetic acid 1 : ethyl alcohol 3)을 흘려 완전히 탈지시킨 후 1% aceto-orcein으로 염색을 하여 위상차 현미경 (Olympus BH-2,400배)에서 난자의 핵상을 판정하였으며, Hunter 와 Polage (1966)의 방법에 따라 제2감수분열 중기 (metaphase II)의 형태를 성숙된 난포난으로 판정하였다.

Table1. Basic compositions of Hepes mTALP-PVA washing media and maturation and fertilization media

(mM)

Component	Washing HepesTALP-PVA	Maturation mTLP-PVA	Fertilization mTLP-PVA
NaCl	127.00	114.00	114.00
KCl	3.16	3.16	3.16
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.00	2.00	4.72
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.50	0.50	0.50
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0.35	0.35	0.35
NaHCO ₃	2.00	25.00	25.00
Na Pyruvate	0.10	0.10	0.10
Na lactate	10.00	10.00	10.00
Glucose	5.00	5.00	5.00
Glutamine	-	1.00	-
Isoleucine	-	0.20	-
Methionine	-	0.05	-
Phenylalanine	-	0.10	-
Cysteine	-	0.57	-
Hepes(Na salt)	5.00	-	-
Hepes(free acid)	5.00	-	-
Polyvinylalcohol	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml
BSA	1mg/ml	-	3mg/ml
Caffeine	-	-	2.00
Kanamycin	100μg/ml	100μg/ml	100μg/ml
Phenol red	10μg/ml	10μg/ml	10μg/ml

② PMSG (10 IU/ml), HCG (10 IU/ml) 및 E₂ (1μg/ml)첨가배지 각각에 tamoxifen을 13μM첨가 또는 무첨가 하여 24시간째 GVBD을 및 48시간 배양 후 성숙을 판정과 각시 간별 17β-estradiol 측정을 실시하고, 체외수정을 하여 정자침입율 (penetration rate), 다정자수정 (polyspermy), MP형성을, 정상수정을 (normal fertilization)을 조사하였다. 성숙판정은 실험 ①과 동일하게 실시하였다.

③ PMSG (10 IU/ml), HCG (10 IU/ml) 및 E₂ (1μg/ml)첨가배지 각각에 tamoxifen 13μM을 배양 초기 (0~24시간) 또는 배양 후기 (24~48시간)에 첨가하였을 때 48시간 배양 후 성숙을 판정과 17β-estradiol 측정을 실시하고, 체외수정을 하여 정자침입율 (penetration rate), 다정자수정 (polyspermy), MP형성을 (male pronucleus formation), 정상수정을 (normal fertilization)을 조사하였다. 성숙판정은 실험 ①과 동일하게 실시하였다.



4. 체외수정

체외수정에 사용하기 위해 채취한 원정액은 생리식염수에 BSA를 첨가한 세척액으로 1500×g에서 5분간 2회 세척한 후 최종 정자농도를 2.5×10⁴ cell/ml로 조정하였다.

체외수정용 배지는 mTLP-PVA액 (BSA 3mg/ml, caffeine 2mM, Kanamycin sulfate)을 사용하였고 pH 7.8로 조정하였다 (Table 1). 준비된 수정용 배지는 CO₂ 배양기 내에서 2시간 전 배양을 실시하였다. 성숙이 완료된 돼지 난포난을 0.1% hyaluronidase에서 난구세포를 제거한 후 수정용 배지로 2회 세척하고 수정용 배지 drop (100μl)에 10~12개씩 옮겨 넣고 미리 준비된 정자를 가지고 수정을 실시하였다. 수정 후 성숙배양과 같은 기상조건에서 6시간 난자와 정자를 공 배양한

후 난자표면에 부착된 정자를 제거하기 위해 발생배지 (mTCM-199 + 10% FBS)로 2회 세척한 후, 계속해서 동 발생 배지에서 12시간 추가 배양하였다.

수정의 판정은 수정 후 18시간에 수정란을 0.1% hyaluronidase 노출하여 fine narrow pasture pipete으로 난자의 난구세포를 제거한 다음 실체 현미경 (Nikon X-2, Japan)하에서 slide glass에 옮겨 cover glass를 덮고 난자를 고정 후 고정액 (acetic acid 1 : ethyl alcohol 3)으로 탈지한 후 1% orcein염색이나, PI (propidium iodide)염색을 실시하여 형광현미경 (Olympus BH-2, Japan)하에서 관찰하였다. 성숙된 난자 중에서 정자두부 또는 응성전핵 (미부일치)이 관찰된 경우, 정자침입 난으로 하고, 난자 내에 침입한 정자가 1개인 경우 단정자 수정란으로 하였고, 미부가 일치하는 전핵을 응성전핵 형성 난으로 판정하였다.



5. 17β -estradiol 분석

PMSG (10 IU/ml), HCG (10 IU/ml) 및 E_2 (1 μ g/ml)첨가배지 각각에 tamoxifen을 13 μ M첨가 또는 무첨가 하여 24시간째 및 48시간째 그리고, 배양초기 (0~24시간) 또는 배양 후기(24~48시간)에 첨가하였을 때 17β -estradiol 측정을 실시하였다.

E_2 는 RIDASCREEN 17β -estradiol Kit (R-Biopharm GmbH, Germany)을 사용하여 측정하였으며, sample의 준비와 E_2 측정의 두 단계로 나누어 다음과 같이 실시하였다.

Sample 준비는 각 처리에 따라 배양된 난자를 배양액 (10개/배양소적)과 함께 냉동보관 한 후 배양액100 μ l (10 oocytes)에 400 μ l 에테르 (tert. butylmethylether 30 : petroleum ether 70)를 첨가하여 실온에서 20분간 배양하였다. 배양 후 -25 $^{\circ}$ C에서 60분간 동결하여 에테르층을 분리하였다. 분리된 에테르용액은 60 $^{\circ}$ C에서 증발시킨 후 400 μ l buffer 에 용해시켜 E_2

측정을 위해 준비하였다.

E₂ 측정은 50 μ l의 enzyme conjugate를 각각의 microwell에 넣고 이어서 20 μ l의 standard나 준비된 sample을 넣고 여기에 50 μ l의 17 β -estradiol antibody를 첨가하고 2시간 동안 실온에서 배양하였다.

배양 후 well 내부의 용액을 제거하고 200 μ l의 증류수로 3회 세척을 한 후 substrate 와 chromogen을 각각 50 μ l씩 첨가하여 암(暗)조건 하의 실온에서 30분간 배양하고 이어서 100 μ l의 stop solution을 첨가하여 ELISA Reader로 450nm에서 흡광도 (absorbanc)를 측정하였다.

6. 통계처리

본 실험결과는 Chi-square 검정을 하여 처리간 유의성을 검정하였으며, hormone assay 결과에 대한 통계분석은 pc-SAS package를 이용하여 ANOVA 통계분석을 하였고, 유의성이 인정된 경우 각 처리 평균간 비교는 Duncan검정으로 검정하였다.

IV. 結果 및 考察

1. Tamoxifen이 난모세포의 체외성숙에 미치는 영향

돼지 난모세포의 체외배양에 있어서 tamoxifen 농도가 감수분열재개 (GVBD)에 미치는 영향을 조사하기 위해 성숙배양액 (PMSG, HCG 각각 10 IU/ml + E₂ 1μg/ml + PFF (porcine follicular fluid) + FBS (fetal bovine serum)에 tamoxifen 13, 26, 39, 52μM을 첨가하여 배양 24시간째 와 48시간째에 난자를 0.1% hyaluronidase에서 난구세포를 제거하고 slide glass에 옮겨 고정한 후 고정액을 흘려 완전히 탈지시키고 1% aceto-orcein 염색을 하여 핵상 (Fig. 2, 3)을 조사한 결과를 Table 2에 제시하였다.

Table 2. Effect of tamoxifen on the meiotic resumption and the second meiotic division of porcine oocytes

Treatment (μM)	24h culture	48h culture
	> GVBD (%)	MII (%)
Control	67/72(93.0) ^a	59/72(81.9) ^c
TAM 13	90/98(91.8) ^a	77/98(78.5) ^c
TAM 26	61/64(95.3) ^a	49/64(76.3) ^c
TAM 39	68/71(95.7) ^a	52/71(73.2) ^c
TAM 52	33/45(73.3) ^b	24/45(53.3) ^d

Oocytes were cultured in medium containing a various tamoxifen(TAM) concentration for 24h or 48h and evaluated for nuclear status.

GVBD : germinal vesicle brekdown, MII : second metaphase.

^{a, b & c, d} Means with different letters in the same column are different from each other ($p < 0.05$).

24시간째에 tamoxifen농도별 GVBD율은 각각 91.8, 95.3, 95.7, 73.3%로



Figure 2. Processes of nuclear maturation of immature porcine oocytes.

A: Germinal vesicle (GV).

Arrow shows the nuclear membrane.

B: First metaphase stage 48h after culture.

Arrow shows the metaphase chromosome plate.

이는 Funahash 등 (1997)이 1mM dbcAMP를 첨가하여 28시간 배양하였을 때 난핵포기 붕괴율이 $75.0 \pm 5.4\%$ 보다 높은 성적을 보여 주었다. 그러나 성숙배양액에 tamoxifen 52 μ M 첨가시 GVBD율이 73.3%로 감수분열재개에 해로운 효과를 보였다. 48시간째의 tamoxifen 농도별 MII비율은 각각 78.5, 76.3, 73.2, 53.3%로 나타났으며, tamoxifen을 52 μ M을 첨가하였을 때에는 GVBD와 MII율이 다른 처리에 비해 유의하게 낮은 결과를 보여주었다. 배양 초기 24시간까지는 tamoxifen의 첨가가 감수분열재개에 크게 영향을 끼치지 않았으나, 48시간째 MII의 비율은 낮은 결과를 보였다. 이는 tamoxifen에 장시간 노출은 핵성숙을 저해하며 이러한 원인은 세포질 성숙을 촉진하는 17 β -estradiol이 tamoxifen에 의해 억제되었다고 사료되며, 특히 시간과 농도가 높을수록 이러한 현상이 나타나는 것은 Phaneuf 등 (1995)이 tamoxifen을 이용하여 사람의 자궁근세포를 대상으로 한 실험에서 oxytocin-induced phospholipase C activation 억제효과가 tamoxifen의 작용시간과 농도에 따라 좌우된다는 주장과 비슷한 결과이다. tamoxifen을 13 μ M을 첨가하였을 때 MII의 비율이 대조구 (81.9%)보다는 낮게 나타났지만, 78.5%로 다른 농도에 비해 높은 성숙율을 보여주었다. 따라서 본 실험에서는 13 μ M 농도의 tamoxifen을 사용하기로 결정하였다.

돼지 난모세포의 체외배양에 있어서 tamoxifen 이 감수분열재개 (GVBD)에 미치는 영향을 조사하기 위해 PFF (porcine follicular fluid) 및 FBS (fetal bovine serum)를 첨가하지 않은 성숙배양액에 PMSG (10 IU/ml), HCG (10 IU/ml) 및 E₂ (1 μ g/ml) 단독 첨가배지 각각에 tamoxifen을 13 μ M첨가 또는 무첨가하여 24시간째 17 β -estradiol 측정과 GVBD율을 판정하고, 실험결과는 Table 3과 같다. tamoxifen을 첨가하여 24시간 배양시 17 β -estradiol 측정결과 absorbance는 PMSG가 0.95 ± 0.37 , HCG가 1.05 ± 0.19 였고 (Table 4), absorbance수치가 낮을수록 17 β -estradiol이 높게 존재한다는 것을 의미한다. GVBD율은 각각 91.7 과 76.0%로 대조구와 E₂처리보다 높게 나타나 Mattioli 등 (1991)이 FSH나 LH가 성숙분열 진행을 더욱 가속화하고 촉진한다는 보고와 비슷한 결과를 보여 주었다.

대조구와 E₂의 17β-estradiol 측정결과 absorbance는 각각 1.00±0.08, 0.18±0.06이었고 GVBD의 비율은 57.4 와 47.8%로 GVBD의 비율에 있어서는 유의성이 없었다. tamoxifen을 첨가하지 않고 24시간 배양하였을 때 GVBD의 비율은 tamoxifen을 첨가하였을 때보다 다소 낮은 성적을 보였고, 역시 PMSG와 HCG에서 각각 88.1 와 70.7% (absorbance는 0.66 ±0.15와 1.12±0.21)로 대조구 40.8 와 E₂ 41.0% (absorbance는 0.97±0.22 와 0.19±0.05)보다 높게 나타났다.

Table 3. Effect of tamoxifen on the meiotic resumption of porcine oocytes 24h after incubation

Treatment	>GVBD (%)	
	TAM(-)	TAM(+)
Control	31/76(40.8) ^a	39/68(57.4) ^d
PMSG	74/84(88.1) ^c	77/84(91.7) ^f
HCG	58/82(70.7) ^b	57/75(76.0) ^e
E ₂	32/78(41.0) ^a	32/67(47.8) ^d

Oocytes were cultured in medium with or without TAM(12.9μM) for 24h.

GVBD : Germinal vesicle breakdown

^{a, b, c & d, e, f} Means with different letters in the same column are different from each other (p<0.05).

그러나, 유의성은 없었지만 tamoxifen을 첨가하여 24시간 배양하였을 때 무 첨가에 비해 다소 높게 나타났다. 이러한 결과는 사람의 자궁근의 배양시 estradiol과 tamoxifen이 [³H]inositol을 증가시키며, 협동적으로 세포내 지질속으로 들어가 세포증식을 유발한다는 agonist (작동물질)효과와 유사한 것으로 사료된다 (Phaneuf et al., 1995; Vallet et al., 1995). full 처리구 즉, PMSG, HCG 각각 10 IU/ml, E₂ 1μg/ml, PFF (porcine follicular fluid), FBS (fetal bovine serum)가 첨가된 성숙배양액에 tamoxifen을 첨

가하지 않고 배양하였을 때 absorbance는 0.12 ± 0.01 로 나타났으며 Table 4에서 보는 바와 같다.

Table 4. Concentration of 17β -estradiol in porcine oocytes 24h after maturation culture

Treatment	Absorbance	
	TAM(-)	TAM(+)
Control	0.97 ± 0.22 ^a	1.00 ± 0.08 ^d
PMSG	0.66 ± 0.15 ^b	0.95 ± 0.37 ^d
HCG	1.12 ± 0.21 ^a	1.05 ± 0.19 ^d
E ₂	0.19 ± 0.05 ^c	0.18 ± 0.06 ^e
Full [†]	0.12 ± 0.01 ^c	

Porcine oocytes were cultured for 24h in medium with or without TAM and then assayed for their 17β -estradiol level using RIDASCREEN 17β -estradiol Kit for ELISA reader.

[†] ; Porcine oocytes were cultured in medium containing PMSG, HCG, E₂ and PFF (porcine follicular fluid) and FBS (fetal bovine serum).

^{a, b, c & d, e} Means with different letters in the same column are different from each other ($p < 0.05$).

2. Tamoxifen이 난모세포의 체외성숙과 수정에 미치는 영향

돼지 난자의 체외배양에 있어서 tamoxifen 이 체외성숙과 수정에 미치는 영향을 조사하기 위해 PFF (porcine follicular fluid) 및 FBS (fetal bovine serum)를 첨가하지 않은 성숙배양액에 PMSG (10 IU/ml), HCG (10 IU/ml) 및 E₂ (1 μ g/ml) 단독 첨가배지 각각에 tamoxifen을 13 μ M첨가 또는 무첨가하여 48시간 배양 후 핵상을 판정하고 (Fig. 3), 17β -estradiol 측정과 FDA (3',6'-diacetyl fluoresceine)염색을 실시하여 생존성과 난구세포를

관찰하였다 (Fig. 4, 5). 또한 성숙난자는 체외수정을 실시하여 정자침입 (penetration rate), 다정자수정 (polyspermy), MP형성율, 정상수정율을 조사하였다. 48시간 배양시 Table 5에서 보는 바와 같이 MII비율의 범위는 0~27.3%로 나타났고, PMSG와 HCG에서 tamoxifen첨가 유무와 상관없이 모두 다른 처리에 비해 높았다 (18.6, 17.9% vs 21.8, 27.3% : absorbance 0.50±0.11, 0.54±0.14 vs 0.42±0.07, 0.65±0.09). E₂ 단독 배양시 MII의 비율은 0% (absorbance 0.15±0.01)이었고, E₂에 tamoxifen을 첨가하였을 때 4.4% (absorbance 0.18±0.04)로 무 첨가에 비해 높은 결과를 보였다.

Table 5. Effect of tamoxifen on the second meiotic division of porcine oocytes 48h after culture

Treatment	Percentage of MII	
	TAM(-)	TAM(+)
Control	5/47(10.6) ^{ab}	1/53(1.9) ^c
PMSG	12/55(21.8) ^b	11/59(18.6) ^d
HCG	18/66(27.3) ^b	12/67(17.9) ^d
E ₂	0/50(0.0) ^a	3/68(4.4) ^c

Porcine oocytes cultured for 48h were fixed and stained with 1% aceto-orcein.

a, b & c, d Means with different letters in the same column are different from each other ($p < 0.05$).

Funahashi (1994)등도 E₂의 단독첨가 배양은 GVBD율과 성숙율을 저하시키며 동시에 정자침투율도 매우 낮은 결과를 보였다고 하였다. 또한 돼지 난자난구복합체의 배양시 배양 후기 즉, 배양 20시간 후에 PMSG나 estradiol을 첨가하였을 때 낮은 응성전핵 형성율을 보여 체외배양시 배양 초기 20시간 동안에 PMSG첨가, 그리고 배양 후기 20시간 동안은 배양액에

- Figure 3. Processes of nuclear maturation of immature porcine oocytes.
- A: First anaphase stage indicating separated chromosome plate.
Arrow shows the chromosome .
 - B: Second metaphase stage showing the expulsion of first polarbody (Pb1).

서 이들 PMSG나 estradiol을 제거하였을 때 세포질 성숙이 촉진된다고 보고하였다. 대조구에 tamoxifen을 첨가하였을 때 MII의 비율이 1.9%이었고, 첨가하지 않았을 때는 10.6%로 나타났으며, tamoxifen을 첨가하여 48시간 배양하였을 때 MII의 비율이 E₂를 제외한 모든 처리에서 무 첨가 보다 다소 낮게 나타나 배양시 tamoxifen에 장시간 노출은 체외성숙을 억제하는 효과를 보였다 (Table 5). 이러한 결과는 1988년 Gottardis등이 tamoxifen이 사람의 유방암에 있어서 E₂ receptor의 구조를 변화시켜 수용체가 E₂에

Table 6. Concentration of 17 β -estradiol in porcine oocytes 48h after maturation culture

Treatment	Absorbance	
	TAM(-)	TAM(+)
Control	0.79±0.22 ^a	0.82±0.24 ^d
PMSG	0.42±0.07 ^b	0.50±0.11 ^e
HCG	0.65±0.09 ^a	0.54±0.14 ^e
E ₂	0.15±0.01 ^c	0.18±0.04 ^f
Full [†]	0.12±0.01 ^c	

Porcine oocytes were cultured for 48h in medium with or without TAM and then assayed for their 17 β -estradiol level using RIDASCREEN Kit for ELISA reader.

[†] ; Porcine oocytes were cultured in medium containing with PMSG, HCG, E₂ and PFF(porcine follicular fluid) and FBS (fetal bovine serum).

^{a, b, c & d, e, f} Means with different letters in the same column are different from each other (p < 0.05).

대한 친화력을 잃게 하여 E₂억제 효과를 나타낸 것과 같이 본 실험에서도 배양전기간 (48시간)동안에 tamoxifen을 첨가하였을 때 배양액내의 17 β -estradiol의 세포질 수용체와의 결합을 방해함으로써 결과적으로 세포질

성숙을 억제하여 성숙율이 저조한 것으로 사료된다.

Table 6은 tamoxifen을 13 μ M을 첨가 또는 무 첨가하여 48시간 배양 후 17 β -estradiol을 분석한 결과를 제시하였으며 24시간 배양시보다 전반적으로 absorbance가 낮아져 체세포에 의해 17 β -estradiol 이 다소 생성된 것으로 생각되며, tamoxifen 첨가시 E₂ 처리구에 대한 absorbance는 0.18 \pm 0.04로 24시간째 (0.18 \pm 0.06)와 같은 수준이었고, 무첨가시 absorbance는 0.15 \pm 0.01로 24시간째 (0.19 \pm 0.05)보다 다소 낮아졌다. 또한 PMSG나 HCG처리구는 각각 0.50 \pm 0.11, 0.54 \pm 0.14로 비슷하게 나타났으며, tamoxifen 무첨가시 HCG를 제외한 다른 처리에서는 전반적으로 absorbance가 첨가한 것보다 다소 낮게 나타났다. HCG 처리구에서는 absorbance가 24시간째와 48시간째 모두 tamoxifen을 첨가하지 않았을 때가 첨가시보다 다소 높게 나타났다. 배양 48시간째에 FDA (3',6'-diacetyl fluoresceine)염색을 실시하여 생존성을 관찰하였을 때 각 처리구간 차이는 없었고, PMSG, HCG처리구가 다른 처리에 비해 난구세포확장이 (cumulus cell expansion) 잘 일어나는 반면 대조구와 E₂ 처리구는 배양 24시간까지 확장이 잘되었으나 24시간 이후에는 난구세포의 확장이 더 이상 일어나지 않는 현상을 보였다 (Fig. 4, 5).

체외수정시 다정자수정을 제외한 정자침입 (penetration rate), MP형성율, 정상수정율은 tamoxifen을 첨가하였을 때 각 처리간 유의차가 없었으며, Table 7에서 보는 바와 같이 tamoxifen을 첨가하였을 때 다정자수정율은 32.1%~76.9%이었고, PMSG에서 32.1%로 다른 처리에 비해 낮았다. 이는 돼지 IVM-IVF난자에 있어서 다정자수정율이 32~58%로 나타났다는 Nagai (1994)등의 보고와 유사한 결과였다. 그러나, 다정자수정율이 87~100%로 나타났다는 Funahash (1993)등의 보고와는 달리 본 실험에서는 낮은 성적을 보였다. 정상수정율은 다른 처리와 유의성은 없었으나 PMSG와 HCG처리구가 높게 나타났으며, E₂처리구에서 20.0%로 다소 높았다. 이는 Mattioli (1991)등이 FSH나 LH를 첨가했을 때 높은 비율의 GVBD와 MII 및 응성전핵형성을 증가시킨다는 주장과 유사한 경향을 보였다.

Figure 4. Fluorescing oocytes by FDA (3',6'-diacetyl fluoresceine) staining after culture for 24h.

A: Oocyte enclosed not fully expanding cumulus cells.

Arrow shows the cumulus cells.

B: Oocytes removed cumulus cells.

Figure 5. Fluorescing oocytes by FDA (3',6'-diacetyl fluoresceine) staining after culture for 48h.

A: Oocyte enclosed fully expanding cumulus cells.

Arrow shows the cumulus cells.

B: Oocytes removed cumulus cells.

Table 7. Effect of TAM added to maturation medium on the rate of in vitro fertilization of porcine oocytes cultured in vitro

Treatment	No. of oocytes matured	No. of oocytes (%) with			
		Sperm penetration	Polyspermy	MP [†] foramtion	Noraml fertilization
Control	11(38)	11(100.0) ^a	5(45.5) ^{ab}	2(18.2) ^a	1(9.1) ^a
Control+TAM	14(55)	13(92.9) ^a	10(76.9) ^a	8(61.5) ^a	0(0.0) ^a
PMSG+TAM	41(116)	28(68.3) ^a	9(32.1) ^b	13(46.4) ^a	5(17.9) ^a
HCG+TAM	27(87)	21(77.8) ^a	13(61.9) ^{ab}	10(47.6) ^a	4(19.0) ^a
E ₂ +TAM	16(52)	10(62.5) ^a	7(70.0) ^{ab}	7(70.0) ^a	2(20.0) ^a

Porcine oocytes matured for 48h were inseminated with boar sperm for 6h, sbsequently further cultured for 12h, fixed and stained with 1% aceto-orcein.

[†] ; Male pronucleus.

^{a, b} Means with different letters in the same column are different from each other ($p < 0.05$).

Table 8은 tamoxifen 무첨가시 체외수정에 대한 결과이며 처리별 정자 침입율, 다정자수정, MP형성율, 정상수정율에는 유의차가 없었다. 그러나 정상수정율은 E₂처리구가 22.2%로 높았고, PMSG와 HCG처리구가 높게 나타나 tamoxifen 첨가시와 유사한 경향을 보였다. Yoshida (1993)등은 배양액의 조성은 돼지난자의 GSH (glutathione)의 농도에 영향을 미치고, 성숙시 난자의 GSH의 합성은 수정 후 응성전핵 형성에 있어서 중요하다고 하였다. 또한 Waymouth 배양액에서 배양된 난자가 mTCM-199 또는 mTLP에서 배양하였을 때보다 GSH 의 농도가 높고, mTLP 배양액에 cysteine을 0.04~0.57mM 첨가하였을 때 GSH 농도와 응성전핵 형성율이 mTLP 배양액에서 단독 배양한 난자들보다 높았다고 하였다.

Table 8. The result of the in vitro fertilization of porcine oocytes cultured in vitro

Treatment	No. of oocytes matured	No. of oocytes (%) with			
		Sperm penetration	Polyspermy	MP [†] formation	Normal fertilization
Control	11(38)	11(100.0)	5(45.5)	2(18.2)	1(9.1)
PMSG	33(104)	26(78.8)	15(57.7)	11(42.3)	3(11.5)
HCG	25(74)	19(76.0)	6(31.6)	8(42.1)	3(15.8)
E ₂	14(41)	9(64.3)	4(44.4)	5(55.6)	2(22.2)

Porcine oocytes matured for 48h were inseminated with boar sperm for 6h, subsequently further cultured for 12h, fixed and stained with 1% aceto-orcein. Parentheses indicate the number of oocytes cultured for maturation.

There were no significant differences.

또한 tamoxifen 첨가 또는 무 첨가하여 배양 후 체외수정을 실시하여 비교한 결과를 Table 9에 제시하였고 유의성은 없게 나타났다. 그러나 PMSG와 HCG의 MP형성율과 정상수정율의 경우 tamoxifen을 첨가한 것이 무 첨가 보다 다소 높게 나타나 tamoxifen첨가가 체외수정 후 MP형성율과 정상수정율을 개선하는 효과를 보였다 (Table 9). 이는 배양 후기에 PMSG나 E₂를 첨가하면 응성전핵 형성율이 떨어지므로 배양 후기에는 PMSG, HCG, E₂등의 호르몬을 배양액에서 제거하였을 때 세포질 성숙과 전핵형성율을 높일 수 있다는 Funahashi (1994)등의 주장과 비슷한 결과로 배양액 또는 체세포에서 생산되는 E₂를 tamoxifen을 첨가함으로써 E₂에 대한 친화력을 잃게 하여 E₂억제 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

Table 9. Effects of maturation condition with or without TAM on IVF results of porcine oocytes matured for 48h

Treatment	No. of oocytes (%) with							
	Sperm penetration		Polyspermy		MP [†] formation		Normal fertilization	
	TAM(+)	TAM(-)	TAM(+)	TAM(-)	TAM(+)	TAM(-)	TAM(+)	TAM(-)
Control	92.9	100	76.9	45.5	61.5	18.2	0.0	9.1
PMSG	68.3	78.8	32.1	57.7	46.4	42.3	17.9	11.5
HCG	77.8	76.0	61.9	31.6	47.6	42.1	19.0	15.8
E ₂	62.5	64.3	70.0	44.4	70.0	55.6	20.0	22.2

Porcine oocytes cultured in medium with or without TAM for 48h were inseminated for 6h, further cultured for 12h, fixed and stained with 1% aceto-orcein.

[†] ; Male pronucleus.

돼지 난자의 체외배양에 있어서 tamoxifen 첨가시기가 체외성숙과 수정에 미치는 영향을 조사하기 위해 PFF (porcine follicular fluid) 및 FBS (fetal bovine serum)를 첨가하지 않은 신선 성숙배양액에 PMSG (10 IU/ml), HCG (10 IU/ml) 및 E₂ (1μg/ml) 단독 첨가배지 각각에 tamoxifen 13 μM을 배양 초기 (0~24시간) 또는 배양 후기 (24~48시간)에 첨가하여 배양한 후 성숙정도를 판정하고 (Fig. 3), 17β-estradiol 측정과 체외수정을 실시하였다.

실험 결과는 Table 10에서 보는 바와 같이 tamoxifen 첨가시기와 관계 없이 MII의 비율은 PMSG와 HCG처리에서 31.5%~50.7%로 다른 처리에 비해 높았다. 또한 17β-estradiol 측정결과 absorbance는 각각 0.61±0.41 ~

0.91±0.54로 나타났으며 (Table 11), 이는 Mattioli 등 (1991)이 FSH나 LH가 성숙분열 진행을 더욱 가속화하고 세포질 성숙과 응성전핵형성을 촉진한다는 보고와 비슷한 결과를 보여 주었다.

Table 10. The action period of TAM added during the maturation culture

Treatment	Percentage of MII	
	TAM(-) ⇒ (+)	TAM(+) ⇒ (-)
Control	10/65(15.4) ^a	9/70(12.9) ^c
PMSG	26/65(40.0) ^b	25/75(33.3) ^d
HCG	34/67(50.7) ^b	17/54(31.5) ^d
E ₂	8/72(11.1) ^a	16/75(21.3) ^{cd}

Porcine oocytes were cultured in medium with or without TAM for the first 24h and then in medium with or without TAM for the second 24h.

^{a, b & c, d} Means with different letters in the same column are different from each other ($p < 0.05$).

Table 11은 배양 초기 (24시간까지)에 tamoxifen첨가 없이 배양한 후 후기에 tamoxifen을 첨가하였을 때 17β-estradiol 측정결과를 제시한 것으로서 absorbance가 PMSG 0.78±0.21, HCG 0.91±0.54이었고, 성숙율은 PMSG 40.0%, HCG 50.7%로 배양 초기에 첨가한 것보다 MII 비율이 (PMSG 33.3%, HCG 31.5% : absorbance PMSG 0.63±0.10, HCG 0.61±0.41) 높게 나타났다 (Table 10). Funahashi (1994)등이 배양 후기에 PMSG나 E₂를 첨가하면 응성전핵형성을 저하시킴으로 배양 후기에는

PMSG, HCG, E₂ 등의 호르몬을 배양액에서 제거하였을 때 세포질 성숙과 전핵형성율이 높게 나타났다는 보고와 유사하였고, 본 실험에서 배양 후기에 tamoxifen 첨가로 인하여 배양액내의 호르몬들과 세포질 수용체와의 결합을 방해한 것으로 사료된다. 그러나 E₂ 단독배양시 배양 초기에 tamoxifen을 첨가하고 배양 후기에 제거하였을 때의 17β-estradiol 측정 결과 absorbance는 0.73±1.00이었고 MII의 비율이 21.3%로 배양 후기에 첨가한 것에 비해 유의성 있게 높게 (11.1% : absorbance 0.16±0.05) 나타나 PMSG와 HCG에 비해 반대의 결과를 보였다 (Table 10).

Table 11. Effect of TAM added during the first or second culture period on the concentration of 17β-estradiol in porcine oocytes cultured for 48h

Treatment	Absorbance	
	TAM(-) ⇒ (+)	TAM(+) ⇒ (-)
Control	0.86±0.11 ^a	0.94±0.21 ^c
PMSG	0.78±0.21 ^a	0.63±0.10 ^c
HCG	0.91±0.54 ^a	0.61±0.41 ^c
E ₂	0.16±0.05 ^b	0.73±1.00 ^c

Porine oocytes were cultured in medium with or without TAM for the first 24h and then in medium with or without TAM for the second 24h.

Oocytes cultured for 48h were assayed for their 17β-estradiol level using RIDASCREEN Kit for ELISA reader.

^{a, b & c} Means with different letters in the same column are different from each other (p < 0.05).

Tamoxifen을 배양 초기에 첨가하여 배양한 후 체외수정을 실시하고 비교한 결과는 Table 12에서 보는 바와 같고 각 처리별 정자침입율, 다정자수정, MP형성률, 정상수정율에 있어서는 유의차가 없었다. 그러나 정상수정율은 PMSG와 HCG가 23.5%와 29.4%로 높게 나타났다.

Table 12. Effect of TAM supplement between 0 and 24h for maturation on IVF result of porcine oocytes

Treatment	No. of oocytes matured	No. of oocytes (%) with			
		Sperm penetration	Polyspermy	MP [†] formation	Normal fertilization
Control	18(45)	11(61.1)	4(36.4)	4(36.4)	2(18.2)
PMSG	28(77)	17(60.7)	10(58.8)	9(52.9)	4(23.5)
HCG	24(75)	17(70.8)	9(52.9)	8(47.1)	5(29.4)
E ₂	18(40)	9(50.0)	3(33.3)	3(33.3)	1(11.1)

Porcine oocytes were cultured in TAM-containing medium for the first 24h and then in medium without TAM for the second 24h. subsequently, oocytes matured for 48h were inseminated.

[†] ; Male pronucleus.

There were no significant differences.

Table 13은 배양 후기에 tamoxifen을 첨가하여 체외수정을 실시한 결과를 제시한 것으로서, 처리별 정자침입율, 다정자수정율, MP형성율은 유의성이 없었다. 정상수정율에 있어서는 PMSG와 E₂가 각각 46.7%와 41.7%로 대조구와 HCG에 비해 유의성 있게 높은 결과를 보였다. 그러나

tamoxifen을 배양 초기에 첨가하거나, 또는 배양 후기에 첨가한 것을 비교하였을 때는 유사한 성적을 보였다.

Table 13. Effect of TAM supplement between 24 and 48h of maturation culture on IVF result of porcine oocytes

Treatment	No. of oocytes matured	No. of oocytes (%) with			
		Sperm penetration	Polyspermy	MP [†] formation	Normal fertilization
Control	14(42)	10(71.4) ^a	5(50.0) ^a	4(40.0) ^a	2(20.0) ^{ab}
PMSG	23(76)	15(65.2) ^a	8(53.3) ^a	10(66.7) ^a	7(46.7) ^b
HCG	32(99)	26(81.3) ^a	12(46.2) ^a	10(38.5) ^a	2(7.7) ^a
E ₂	20(60)	12(60.0) ^a	4(33.3) ^a	9(75.0) ^a	5(41.7) ^b

Porcine oocytes were cultured in medium without TAM for the first 24h and then in TAM-containing medium for the second 24h. subsequently, oocytes maturation for 48h were inseminated.

^{a, b} Means with different letters in the same column are different from each other ($p < 0.05$).

[†] ; Male pronucleus.

본 실험에서 난구세포의 존재하에서 수정을 실시하였을 때 정자의 침투율 (sperm penetration rate)은 tamoxifen 첨가시기와 관계없이 50.0~81.3%로 나타나 Kikuchi (1993)등이 난구세포가 존재하는 상태에서 수정을 실시하였을 때 89.5~92.5%로 난구세포 없이 수정한 것에 (66.8%)비해 높았다는 보고보다 다소 낮은 성적을 얻었다.

Eppig 와 Schroeder (1986)는 혈청은 난자의 성숙과 수정에 필수적이며 이는 투명대 경화를 막아 정자의 침투를 용이하게 한다고 하였다. 또한 그는 배양시 난구세포와 공배양 할 경우 수정율이 높게 나타난다고 하였다. 그러나 체외배양시 과도한 호르몬 처리는 난자에 해로운 효과를 줄 수 있

다고 하였으며, Yoshida (1989)는 체외수정시 정자의 농도, 정자와 난자의 작용시간, 그리고 배양액과 배양온도가 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

다정자수정율은 Table 9에서 tamoxifen을 첨가 또는 무첨가하여 48시간 배양 후 체외수정을 실시하였을 때 32.1~76.9%로 나타났으나, 첨가시기를 달리한 실험 즉, 배양 초기나, 후기에 첨가하였을 때 다정자수정율이 33.3~58.8%로 다소 낮은 경향을 보였다 (Table 14). 이는 Nagai (1994)등이 32~58%로 나타났다는 보고와 유사한 경향을 보였다.

Table 14. Influence of the periodic addition of TAM for maturation on IVF results of porcine oocytes

Treatment	No. of oocytes (%) with							
	Sperm penetration		Polyspermy		MP [†] formation		Normal fertilization	
	TAM (+)→(-)	TAM (-)→(+)	TAM (+)→(-)	TAM (-)→(+)	TAM (+)→(-)	TAM (-)→(+)	TAM (+)→(-)	TAM (-)→(+)
Control	61.6	71.4	36.4	50.0	36.4	40.0	18.2	20.0
PMSG	60.7	65.2	58.8	53.3	52.9	66.7	23.5	46.7
HCG	70.8	81.3	52.9	46.2	47.1	38.5	29.4	7.7
E ₂	50.0	60.0	33.3	33.3	33.3	75.0	11.1	41.7

[†] ; Male pronucleus.

There were no significant differences.

웅성전핵형성율은 배양 후기에 tamoxifen을 첨가하였을 때 38.5~75.0%로 배양 초기에 첨가한 것에 비해 높은 결과를 보였다. Nagai (1996)는 돼지난자의 체외성숙과 수정에 있어서 문제가 되는 것은 높은 다정자수정율과 낮은 전핵형성율이라고 하였다.

MP형성율과 정상수정율은 HCG를 제외한 모든 처리에서 배양 후기에 tamoxifen을 첨가하였을 때 다소 높은 결과를 보여주었다. 그러나 웅성전

핵 형성과 정상수정에 있어서 HCG처리가 다른 처리구에 비해서 배양 후기에 tamoxifen을 첨가하였을 때 배양 초기에 첨가한 것보다 성적이 낮게 나타났는지에 대해서는 추가적인 접근이 필요하고, tamoxifen이 돼지 난자의 체외성숙 수정 후 배발생에 있어서는 어떠한 영향을 미치는가에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.



V. 摘 要

본 연구는 anti-estrogen인 tamoxifen (TAM)을 이용하여 돼지 난자의 체외 성숙에 있어서 17β -estradiol (E_2)의 작용시기와 필요성을 구명하기 위해 1) TAM 및 E_2 가 성숙에 미치는 영향, 2) TAM이 난자의 E_2 수준에 미치는 영향 그리고 3) TAM첨가 배지에서 성숙된 난자의 체외수정에 대하여 검토하였다.

난자의 성숙배양은 mTLP-PVA 배양액을 기본으로 하였으며, 호르몬은 PMSG (10 IU/ml), HCG (10 IU/ml) 및 E_2 (1 μ g/ml)를 사용하였다. 시험구에 사용한 TAM 농도는 13 μ M이었으며, 성숙판정은 배양 24시간째의 GVBD율과 48시간째의 MII율을 조사하였다. 난자내 E_2 농도는 17β -estradiol assay Kit (RIDASCREEN)를 이용하여 측정하였다. 체외수정은 mTALP-PVA배양액에서 난자와 신선 정자를 6시간 공 배양하여 실시하였으며, 수정완료 난자는 발생배지 (TCM-199 + 10% FCS)에 옮겨 12시간 추가 배양한 후 고정 및 염색하여 체외수정율을 조사하였다. 실험 결과는 다음과 같다.

체외성숙에 있어서 TAM첨가 유무에 관계없이, 배양 24시간 후에 난자의 GVBD율은 PMSG 및 HCG처리구가 대조구와 E_2 처리구보다 양호하였다 ($p < 0.05$). 배양 48시간 후에 난자의 MII율도 PMSG 및 HCG처리구에서 가장 높았고 ($p < 0.05$), TAM을 배양 24~48시간에 첨가시 MII율은 타 처리구에 비해 PMSG 및 HCG처리구에서 높은 결과를 보였다 ($p < 0.05$). 배양 0~24시간에 TAM을 첨가하였을 때는 대조구보다 PMSG 및 HCG처리구에서 유의하게 높은 성적을 보여주었으나 ($p < 0.05$), 이들 처리구는 E_2 처리구와는 유의차가 인정되지 않았다.

E_2 농도측정에 있어서는 배양 24시간 후에 난자의 E_2 농도는 TAM첨가 유무에 관계없이, E_2 처리구가 타 처리구보다 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 그러나 TAM을 첨가하지 않고 48시간 배양했을 때는 E_2 , PMSG, HCG 및 대조구 순으로 높게 나타났다. TAM을 배양 24~48시간에 첨가시 E_2 농도는 E_2 처리구가 타 처리구보다 유의하게 높았으나 ($p < 0.05$), 배양 0~24시간에 TAM을 첨가

하였을 때는 처리구간에 유의차가 없었다.

체외수정에 있어서 TAM을 첨가하지 않고 PMSG, HCG 및 E₂첨가배지 단독에서 성숙 배양한 난자를 체외수정한 결과 정자침입율, 다정자수정, MP형성율, 정상수정율에 있어서 처리구간에 유의차가 없었다. 그러나 TAM을 첨가하여 성숙 배양한 후 체외수정 하였을 때는 PMSG처리구가 타 처리구보다 단정자수정율이 높았으며 ($P<0.05$), 정자침입율, MP형성율 및 정상수정율은 처리구간 유의차가 없었다. TAM을 배양 초기 (0~24시간)에 처리하였을 경우 난자의 체외수정 결과에는 영향이 없었다. 그러나 TAM을 배양 후기 (24~48시간)에 첨가하였을 때, 정자침입율, 다정자수정율 및 MP형성율은 각 처리구간에 유의성이 인정되지 않았으나 정상수정율은 PMSG와 E₂처리에서 HCG처리구보다 유의성 있게 양호한 결과를 보여주었다 ($P<0.05$).

본 연구의 결과로부터 1) 폐지난자의 체외배양시 TAM에 장시간 노출은 체외성숙을 억제하였고, 2) TAM과 estrogen은 경쟁적으로 작용하였으나, PMSG와 HCG와는 길항작용이 나타나지 않았다. 3) TAM첨가에 의해 MP형성율 및 정상수정율이 개선되었고, 폐지난자의 체외배양시 TAM의 첨가시기는 배양 후기에 첨가하였을 때 유효한 것으로 사료된다.

VI. 參 考 文 獻

- Archibong, A. E., R. M. Petters and B. H. Johnson. 1989. Development of porcine embryos from one-land two-cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biol. of Reprod.*, 41:1076-1083.
- Ayoub, M. A. and A. G. Hunter. 1993. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. *J. Dairy Sci.*, 76:95-100.
- Ayoub, M. A. and A. G. Hunter. 1993. Parthenogenetic activation of in vitro matured bovine oocytes. *J. Dairy Sci.*, 76:421-429.
- Branham, W. S., D. R. Zehr and D. M. Sheehan. 1993. Differential sensitivity of rat uterine growth and epithelium hypertrophy to estrogens and antiestrogens. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 203:297-303.
- Carroll, J., K. T. Jones and D. G. Whittingham. 1996. Ca^{2+} release and the development of Ca^{2+} release mechanisms during oocytes maturation: a prelude to fertilization. *Rev. of Reprod.*, 1:137-143.
- Conley, A. J., H. J. Howard, W. D. Slanger and J. J. Ford. 1994. Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle. *Biol. of Reprod.*, 51:655-661.
- Coskun, S. and Y. C. Lin. 1995. Mechanism of action of epidermal growth factor-induced porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. and Dev.*, 42:311-317.

- Ding, J. and G. R. Foxcroft. 1992. Follicular heterogeneity and oocyte maturation in vitro in pigs. *Biol. of Reprod.*, 47:648-655.
- Ding, J. and G. R. Foxcroft. 1994. FSH-stimulated follicular secretions enhance oocyte maturation in pigs. *Theriogenology*, 41:1473-1481.
- Ding, J. and G. R. Foxcroft. 1994. Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes. *Biol. of Reprod.*, 50:1377-1384
- Eberhardt, D. M., D. M. Henricks, J. F. Dickey and J. R. Diehi. 1994. Oviductal fluid and growth factors failed to enhance development of porcine embryos. *Theriogenology*, 41:1163-1172.
- Ectors, F. J., L. Koulisher, M. Jamar, C. Herens, A. Verloes, B. Remy and J. F. Beckers. 1995. Cytogenetic study of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 44:445-450.
- Eng, L. A., E. T. Kornegay, J. Huntington and T. Wellman. 1986. Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 76:657-662.
- Eppig J. J. and A. C. Schroeder. 1986. Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospects. *Theriogenology*, 25:97-106.
- Funahashi, H. and B. N. Day. 1993. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 39:965-973.

- Funahashi, H. and B. N. Day. 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 98:179-185.
- Funahashi, H., T. C. Cantley, and B. N. Day. 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to Dibutyryl Cyclic Adenosine Monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol. of Reprod.*, 57:49-53.
- Funahashi, H., T. Cantley and B. N. Day. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 101:159-165.
- Funahashi, H., T. T. Stumpf, S. L. Terlouw, T. C. Cantley, A. Rike and B. N. Day. 1994. Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology.*, 41:1425-1433.
- Funahashi, H., T. C. Cantley and B. N. Day. 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to Dibutyryl Cyclic Adenosine Monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol. of Reprod.*, 57:49-53.
- Gorodeski, G. I., R. Beery, B. Lunenfeld and A. Geier. 1992. Tamoxifen increases plasma estrogen-binding equivalents and has an estradiol agonistic effect on histologically normal premenopausal and postmenopausal endometrium. *Fert. Steri.*, 57:320-327.
- Goto, K., N. Iwai, Y. Takuma and Y. Nakanishi. 1992. Co-Culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.

- Gregoraszczyk, E., S. Stokłowska, M. Tarnawska and J. Rżasa. 1988. The effect of oxytocin on steroid hormone secretion by isolated porcine follicular cells in tissue culture. *Anim. Reprod. Sci.*, 17:141-154.
- Gruppen, C. G., H. Nagashima and M. B. Nottle. 1995. Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol. of Reprod.*, 53:173-178.
- Hirao, Y., T. Nagai, M. Kubo, T. Miyano, M. Miyake and S. Kato. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 100:333-339.
- Homa, S. T., C. Racowsky and R. W. McGaughey. 1986. Lipid analysis of immature pig oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 77:425-434.
- Hyttel, P., K. P. Xu, S. Smith and T. Greve. 1986. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 78:615-625.
- Im, K. S. and K. W. Park. 1995. Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *Theriogenology.*, 44:209-216.
- Katsumi, S., N. C. Kan. and P. G. Satyaswaroop. 1992. Both 17 β -estradiol and tamoxifen induce c-fos messenger ribonucleic acid expression in human endometrial carcinoma grown in nude mice. *Am. J. of Obs. and Gyn.*, 166:206-212.
- Kikuchi, K., T. Nagai, J. Motlik, Y. Shioya and Y. Izaike. 1993. Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology.*, 39:593-599.

- Kikuchi, K., Y. Izaike, J. Noguchi, T. Furukawa, F. P. Daen, K. Naito and Y. Toyoda. 1995. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 105:325-330.
- Kim, K. S., N. Mitsumizo, K. Fujita and K. Utsumi. 1996. The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. *Theriogenology.*, 45:787-799
- Kline, D. 1996. Activation of the mouse egg. *Theriogenology.*, 45:81-90.
- Klinge, C. M., A. L. Studinski-Jones, Kulakosky, P. C., R. A. Bambara R. Hilf. 1998. Comparison of tamoxifen ligands on estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Molecular and Cellular Endocrinology.*, 143:79-90.
- Lorenzo, P. L., M. J. Illera, J. C. Illera and M. Illera. 1995. Role of EGF, IGF-1, Sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology.*, 44:109-118.
- Mattioli, M., G. Galeati, B. Barboni and E. Seren. 1994. Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 100:403-409.
- Mattioli, M., M. L. Bacci, G. Galeati and E. Seren. 1991. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology.*, 36:95-105.

- Moor, R. M. and I. M. Crosby. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *J. Reprod. Fert.*, 75:467-473.
- Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:323-328.
- Nagai, T. 1996. In vitro fertilization of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 42:82-84.
- Nagai, T. 1994. Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology.*, 41:73-78.
- Naito, K. 1996. Maturation promoting factor in porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 42:79-81.
- Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology.*, 30:733-741.
- Phaneuf, S., G. N. Europe-Finner, I. Z. Mackenzie, S. P. Watson and A. Lopez Bernal. 1995. Effects of oestradiol and tamoxifen on oxytocin-induced phospholipase C activation in human myometrial cells. *J. Reprod. Fert.*, 103:121-126.
- Pinyopummintr, T. and B. D. Bavister. 1995. Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology.*, 44:471-477.

- Powers, R. D. and G. A. Paleos. 1982. Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *J. Reprod. Fert.*, 66:1-8.
- Racowsky, C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J. Reprod. Fert.*, 74:9-21.
- Racowsky, C. and R. W. McGaughey. 1982. Further studies of the effects of follicular fluid and membrana granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 66:505-512.
- Rexroad, C. E. and A. M. Powell. 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. *J. Anim. Sci.*, 66:947-953.
- Sato, E., M. Matsuo and H. Miyamoto. 1990. Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: Improvement of meiotic competence by Dibutyryl Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate. *J. Anim. Sci.*, 68:1182-1187.
- Swann, K. 1996. Soluble sperm factors and Ca^{2+} release in eggs at fertilization. *Rev. of Reprod.*, 1:33-39.
- Telfer, E. E. 1996. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology.*, 45:101-110.

- Thibodeaux, J. K., R. P. DeVecchio and W. Hansel. 1993. Role of platelet-derived growth factor in development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, 98:61-66.
- Thibodeaux, J. K., Y. Menezo, J. D. Roussel, W. Hansel, L. L. Goodeaux, D. L. Thompson, J. R. and R. A. Godke. 1992. Coculture of in vitro fertilized bovine embryo with oviductal epithelial cells originating from different stages of the estrous cycle. *J. Dairy Sci.*, 75:1448-1455.
- Trounson. A., D. K. Gardner. 1993. Handbook of in vitro fertilization. CRC Press. London. UK.
- Vallet, J. L., R. K. Christenson, F. F. Bartol and A. A. Wiley. 1995. Effect of treatment with retinyl palmitate, progesterone, oestradiol and tamoxifen on secretion of a protein similar to retinol-binding protein during uterine gland development in neonatal pigs. *J. Reprod. Fert.*, 103:189-197.
- White, K. L., K. Hehnke, L. F. Rickords, L. L. Southern. 1989. Early embryonic development in vitro by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol. of Reprod.*, 41:425-430
- Woo. C. and A. Trounson, 1984. Clinical in vitro fertilization. Springer-Verlag. New York. USA.
- Yoshida, M. 1987. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49(4):711-718.

- Yoshida, M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vivo. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35:34-37.
- Yoshida, M. 1993. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol. Reprod. and Dev.*, 35:76-81.
- Yoshida, M., K. Ishigaki and V. G. Pursel. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. and Dev.*, 31:68-71.
- Yoshida, M., Y. Mizoguchi, K. Ishigaki, T. Kojima and T. Nagai. 1993. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology.*, 39:1303-1311.
- Yoshida, M., Y. Ishizaki, H. Kawagishi, K. Bamba and Y. Kojima. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 95:481-488.
- Yoshida, M. Y. Ishizaki and H. Kawagishi. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 88:1-8.
- Yoshimura, Y., Y. Nakamura, T. Oda, M. Ando, Y. Ubukata, M. Karube, N. Koyama and H. Yamada. 1992. Induction of meiotic maturation of follicle-enclosed oocytes of rabbits by a transient increase followed by an abrupt decrease in cyclic AMP concentration. *J. Reprod. Fert.*, 95:803-812

- Yoshida, M., K. Ishigaki, T. Nagai, M. Chikyu and V. G. Pursel. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. of Reprod.*, 49:89-94.
- Younis, A. I. and B. G. Brackett. 1992. Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol. Reprod. and Dev.*, 31:144-151.
- Zoltan M., H. Funahashi, B. N. Day, and R. S. Prather. 1997. Developmental changes in the intracellular Ca^{2+} release mechanisms in porcine oocytes. *Biol. of Reprod.* 56:921-930.
- 강승률. 1996. 돼지 난모세포의 체외성숙에 대한 연구. 일본 信州大 박사학위논문.
- 고혁진. 돼지 미성숙 난포난의 유리화동결·융해시 제요인이 체외성숙에 미치는 영향. 제주대학교 석사학위논문.
- 김기홍. 1998. 돼지 난모세포의 체외성숙 및 생존성에 미치는 항산화제의 영향. 제주대학교 석사학위논문.
- 김영훈, 김중계. 1996. 돼지 미성숙 난포난의 유리화동결 융해 후 FDA처리가 체외수정과 배발육에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*. 11(3);233-240.
- 김중계, 양병철, 강민수, 고경래, 고혁진, 장덕지. 1995. 소·돼지 미성숙 난포난의 유리화동결 융해 후 FDA처리가 체외수정과 배발육에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*. 10(3);183-191.

감사의 글

본 연구 수행에 있어 시종일관 격려와 가르침으로 지도하여 주신 지도 교수 김중계 박사님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다.

바쁘신 가운데에도 본 논문을 심사하여 주신 강민수 교수님, 김문철 교수님께도 감사드리오며, 김규일 교수님을 비롯한 동물자원과학과 여러 교수님들의 격려와 조언에 감사드립니다.

본 논문이 완성될 수 있도록 모든 실험여건을 마련해주신 제주농업시험장 송창훈 장장님께 감사 드리오며, 용기와 자신감을 북돋아주신 한국낙농진흥회 정선부 전무이사님께도 감사한 마음 금할 길이 없습니다.

아낌없는 조언과 배려를 주신 고서봉 축산과장님과 여러 연구관님을 비롯한 제주농업시험장 전직원 여러분께 진심으로 감사드립니다. 또한 격려와 조언을 주신 축산진흥원 양승주 전문위원님께도 감사드립니다.

실험 수행에서부터 논문 작성에 이르기까지 도움과 조언을 주신 강승률 박사님께 감사드립니다. 원고 정리에 도움을 준 변식실험실 한영준 후배에게 고마움을 전하며 고희진, 이재익 학형에게 고마움을 전합니다. 실험 수행과 자료 정리에 도움을 준 조인철 연구사님, 양성룡 선배님, 원예과 고미라양께도 사의를 포함합니다.

언제나 용기와 사랑으로 감싸주신 부모님과 장인 장모님의 깊은 은혜에 진심으로 감사드리며, 여러 형님과 형수님, 동생, 그리고 매형과 누님에게도 감사드립니다.

끝으로 인내와 정성으로 늘 함께 하는 사랑하는 아내와 아들 성욱과 함께 작은 기쁨을 나누고자 합니다.

Table 1. Growth characteristics of potato cultivars used for three experiments.

Cultivar	Experiment			Primary uses	Maturity	Leaf size	Stem length	Stolon length	Tuber		
	1	2	3						Shape	Size	Eye depth
Attantic (大西)			○	Chip processing	Medium-late		Medium	Medium	Round	Medium	Shallow
Bakdoo (白頭)			○	Chip processing	Medium-late	Medium	Medium	Medium	Round	Large	Shallow
Chilsung (七星)			○	Chip processing	Medium-late	Medium	Medium	Medium	Round	Medium	Shallow
Chungsim (清心)			○	Chip processing	Medium-late	Medium	Medium	Medium	Round	Medium	Shallow
Dejima (大地)	○	○	○	Fresh market	Early	Medium	Tall	Tall	Round	Large	Medium
H89006-6 (고시1호)	○	○		Fresh market	Early	Medium	Medium	long	Round	Large	Shallow
H89006-14 (고시5호)	○	○		Fresh market	Early	Medium	Medium	Medium	Round	Medium	Shallow
Jopung (早豊)	○			Fresh market	Early	Large	long	Short	Round	Medium	Medium
Namsuh (南瑞)	○			Fresh market	Early	Medium	long	Short	Round	Large	Shallow
Superior (秀美)	○			Fresh market chip processing	Early	Medium	Medium	Medium	Round	Medium	Shallow
Taepyong (太平)			○	Chip processing	Medium-late	Medium	Medium	Medium	Round	Medium	Shallow

Table 5. Growth characteristics of six potato cultivars grown as spring cropping in 1996 and 1997.

Cultivar	Days to emergence			Ratio of emergence (%)			Plant height (cm)			No. of stems per plant			Fresh weight (g/plant)			Dry weight (g/plant)			SPAD reading value		
	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean
Dajima	33.0	35.0	34.0	100.0	97.4	98.7	46.0	44.6	45.3	3.7	3.9	3.8	270.2	267.2	268.7	41.2	37.4	39.3	41.0	40.0	40.5
Gosi #1	34.0	35.4	34.7	97.4	100.0	98.7	43.0	41.2	42.1	3.8	4.0	3.9	280.1	290.3	285.2	44.8	48.6	46.7	40.9	42.7	41.8
Gosi #5	33.5	35.9	34.7	100.0	98.6	99.3	41.5	41.9	41.7	3.9	3.7	3.8	236.6	235.8	236.2	39.0	37.4	38.2	40.4	41.4	40.9
Jopung	37.0	39.6	38.3	98.0	96.0	97.0	33.4	35.4	34.4	3.5	3.1	3.3	254.8	265.6	260.2	41.4	43.4	42.4	43.0	41.6	42.3
Namsuh	35.5	38.5	37.0	97.4	100.0	98.7	39.0	40.8	39.9	3.6	4.0	3.8	274.6	299.8	287.2	41.2	43.6	42.4	40.2	42.2	41.2
Superior	36.2	38.4	37.3	98.5	96.9	97.7	41.2	39.4	40.3	4.1	4.5	4.3	269.8	266.8	268.3	39.8	36.4	38.1	41.2	41.8	41.5
LSD _{0.05}	0.79			NS			3.32			0.57			17.6			NS			-		

Table 6. Growth characteristics of six potato cultivars grown as fall cropping in 1996 and 1997.

Cultivar	Days to emergence			Ratio of emergence (%)			Plant height (cm)			No. of stems per plant			Fresh weight (g/plant)			Dry weight (g/plant)			SPAD reading value		
	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean	1996	1997	Mean
Dajima	8.0	10.0	9.0	99.0	98.4	98.7	66.0	68.0	67.0	3.3	3.1	3.2	340.2	345.2	342.7	27.5	28.1	27.8	40.0	46.8	43.4
Gosi #1	12.0	10.6	11.3	98.0	98.0	98.0	59.0	57.6	58.3	3.2	3.0	3.1	326.0	322.0	324.0	25.5	25.3	25.4	42.6	43.0	42.8
Gosi #5	10.0	10.0	10.0	99.2	98.2	98.7	66.5	66.9	66.7	3.2	3.4	3.3	340.0	344.7	342.7	28.4	29.0	28.7	39.0	39.6	39.3
Jopung	18.2	19.2	18.7	85.3	86.1	85.7	46.0	45.4	45.7	1.9	1.7	1.8	342.0	338.0	340.0	26.3	26.1	26.2	42.0	40.0	41.0
Namsuh	14.0	14.6	14.3	98.2	96.4	97.3	57.2	56.2	56.7	2.5	2.7	2.6	365.0	367.0	366.0	28.1	28.3	28.2	45.0	41.8	43.4
Superior	15.2	15.4	15.3	95.0	93.0	94.0	53.0	53.6	53.3	2.3	2.1	2.2	305.5	321.3	313.4	26.1	27.3	26.7	42.9	44.1	43.5
LSD _{0.05}			1.18			2.26			3.07			0.42			18.8			1.34			1.98