

생식보조시술시 단백질원으로서 인간난포액의 적합성 및 효율성에 관한 연구

II. 인간난포액이 생쥐수정란의 체외발달에 미치는 효과

한나여성의원 시험관아기센터, 건국대학교 동물자원연구센터*

김동훈 · 지희준 · 김지연 · 구정진 · 장상식 · 정길생*

Studies on the Suitability and Efficiency of Human Follicular Fluid as Protein Supplement in Assisted Reproductive Technology(ART)

II. Effect of Human Follicular Fluid on Development of Mouse Embryos *In Vitro*

DH Kim, HJ Chi, JY Kim, JJ Koo, SS Chang and KS Chung*

IVF Center, Hanna Women's Clinic and Animal Resources Research Center,
Kon-Kuk University*

= Abstract =

This study was performed to investigate the effect of human follicular fluid (HFF) on development of mouse embryos, for evaluating the suitability of HFF as a substitutive material of human fetal cord serum in ART program. The various concentrations of HFF were added into the culture medium and the effects of HFF concentrations were examined to identify the optimal concentration of HFF for embryo development. The potency of HFF in improving embryo development was compared to that of other protein supplements. Collected HFFs were classified with the maturity of the containing oocytes; mature, immature, atretic, and then the effects of the classified HFFs on embryo development were examined. Also, HFF was separated into the low (<30,000 Da) and high (>30,000 Da) molecular weight fractions and the effects of the fractions on embryo development were investigated. The highest development rate was found in culture medium supplemented with 20% HFF, but this rate was reversely reduced at the concentrations of HFF higher than 20%. The development rates to the blastocyst, hatching blastocyst, attachment and out-growth cultured in mature HFF was significantly higher than those in immature and atretic HFF, and mean cell number in blastocyst was higher in mature HFF than in immature and atretic HFF. The development rates of mouse embryos according to protein sources were significantly higher in HFF than in fetal cord serum (FCS), maternal serum (MS) and bovine serum albumin (BSA), and mean cell number in blastocyst cultured in HFF was higher than that in FCS, MS and BSA. The development rates of embryo and mean cell number in blastocyst cultured in high molecular weight fraction of HFF were higher than those in low molecular weight fraction, but the results of high molecular weight fraction were lower than those of whole HFF. Therefore, these results indicated that human mature follicular fluid was useful for improving the development of mouse embryos, which suggests a possibility that HFF also may be used efficiently for improving the culture condition in human ART program as a protein supplement.

서 론

포유동물 수정란의 체외배양에 있어서 수정란의 체외발달 및 생존력의 향상을 위해 단순배양액은 물론 복합배양액이 사용되어지고 있다 (Wright and Bondioli, 1981; Kane, 1987). 그리고 이러한 배양액에 첨가되는 단백질원으로서는 소태아혈청 (Fetal Calf Serum, FCS) 등이 널리 이용되고 있으며, 또한 생식보조기술시 인간수정란의 체외배양에도 태아제대혈청 (human Fetal Cord Serum, hFCS) 및 모체혈청 (human Maternal Serum, hMS)과 같은 혈청의 이용이 일반화되어 있다. 이러한 혈청은 배양액내 유해중금속이온들의 chelation, 세포막 안정 (Cholewa, 1970), 체외발달 및 부화 등을 촉진시키는 것으로 보고되고 있다 (Kane and Headon, 1980; Allen et al., 1982; Wright et al., 1978; Caro and Trounson, 1984; Shirley et al., 1985). 그러나 에너지원이나 성장촉진인자의 공급원으로서 이용되고 있는 혈청이 초기배의 발달에 유해한 영향을 미친다는 문제점이 있으며 (Ogawa et al., 1987; Shirley et al., 1985), 또한 실험성적의 균일성을 보증하기 위한 정도관리 (Quality Control, Q.C)의 어려움 등이 있다. 이러한 혈청의 문제점을 극복하기 위하여 혈청대체물질로서 복강액, 양수 및 난포액 등과 같은 Biological Fluid의 이용에 대한 연구가 보고되고 있다 (Gianaroli et al., 1986; Richards et al., 1990; Collas et al., 1991; Park et al., 1992; Yoon et al., 1994).

특히 난포벽의 헤파세포에 분포된 혈관에서 유래하여 기저층 (basement lamina)을 통하여 삼출된 혈장물질과 난포벽 세포 (헤파 및 과립막세포)들에서 합성된 분비물질로 구성되어 있는 (Hafez, 1993) 난포액은 높은 수준의 steroids, polypeptide hormones 및 growth factors를 함유하고 있으며 (Artini et al., 1994; Yoon et al., 1994), 난모세포가 성장하는 과정중에 생성되어 생체 내에서 난자의 성장 및 성숙에 이상적인 환경을 제공하기 때문에 난자의 체외배양에 난포액을 단백질원으로 이용한다면 유의한 효과를 나타낼 가능성이 높다.

이에 생식보조기술시 인간수정란의 체외배양에 있어 단백질원으로 이용하는 혈청의 대체물질로서 인간난포액의 적합성을 조사하기 위하여

생쥐수정란을 실험모델로 이용하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 수정란

실험동물은 ICR계통의 생쥐로서 자성생쥐는 5-6주령, 음성생쥐는 12-14주령을 이용하였다. 일조시간은 14시간으로 고정하였으며, 고품사료와 식수는 무제한 급여하였다. 다배란 유도를 위하여 자성생쥐의 복강내에 5 IU의 PMSG를 주사한 다음, 48시간만에 동일한 방법으로 5 IU의 hCG를 주사한 후, 음성생쥐와 1:1의 비율로 합사시켜 다음날 아침에 교미 유.무를 확인하였다. 교미가 확인된 개체에 대하여 hCG를 주사한 후 48시간만에 경추탈골법으로 도살하여 난관관류법을 이용하여 2-세포기의 수정란을 회수하였으며, 형태학적으로 정상적인 것만을 선별하여 실험에 이용하였다.

2. 배양액

수정란의 체외배양을 위한 기본배양액으로는 Modified Whittingham's T₆ 배양액을 사용하였으며, 배양액은 사용전에 0.22 μ m 여과기로 제균한 다음 사용하였다. 단백질원으로는 인간난포액, 제대혈청, 모체혈청을 배양액에 각각 20%(V/V), 혈청알부민(BSA)은 0.3%(W/V)를 첨가하였다.

3. 인간난포액 및 혈청의 준비

본 실험에 사용된 난포액은 생식보조기술시 난자채취과정에서 회수하였으며, Veeck (1986)의 기준에 준하여 채취된 난자의 상태에 따라 성숙, 미성숙, 퇴행성 난포액으로 분류하였다. 회수된 난포액은 원심분리후 (500 \times g/15 min) 상층액을 회수하여, 59 $^{\circ}$ C에서 35분간 불활성화 시킨 후, 0.22 μ m 여과기를 이용하여 제균하였으며, 여과된 난포액은 사용시까지 -82 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 제대혈청과 모체혈청도 동일한 방법으로 준비 및 보관되었다.

4. 수정란의 배양 및 관찰

2-세포기 수정란은 난관관류법을 이용하여 회수한 다음, 기본배양액으로 3회 이상 세척한 후, mineral oil이 피복된 50 μ l의 배양액 소적에 배양하였다. 수정란은 매 24시간 마다 발달상태를 관

찰하였으며, 배양 3일째에 배반포 발달율과 부화율을, 배양 5일째에 배양용기에의 부착율과 신장율을 관찰하였다.

5. 난포액의 분획화

난포액내 고분자량 및 저분자량 물질을 분리하기 위하여 30,000 Da Microconcentrator (Centricon-30, Amicon Co, U.S.A)를 이용하여 원심분리 (5,000 × g/75 min)를 실시하였다. 분획화된 난포액의 고분자량 및 저분자량 물질은 각각 0.22µm 여과기를 이용하여 제균하였으며, 단기간 4℃에서 냉장보관하면서 실험에 이용하였다.

6. 배반포의 세포수 조사

배반포의 세포수는 hCG를 주사한 후 96-100시간 경에 정상적인 배반포 (부화중, 팽창, 초기 배반포)를 Hinrichs 등 (1993)의 방법에 따라, DNA 특이적 형광염색시약인 Hoechst 33342를 이용하여 염색을 실시한 후, 형광현미경하에서 사진촬영을 하여 조사하였다.

7. 실험 계획

생쥐수정란의 체외발생에 미치는 인간난포액의 효과를 조사하기 위하여 난포액의 첨가농도

를 달리하여 배양을 실시함으로써 적정첨가농도를 확인하였으며, 적정농도의 난포액을 비롯한 단백질원의 종류(태아제대혈청, 모체혈청, 혈청알부민)와 난자상태 (성숙, 미성숙, 퇴행성)에 따라 분류된 난포액이 배발달율, 배양용기에의 부착율 및 신장율에 미치는 영향을 조사하였으며, 그리고 난포액내 고분자량 물질 (>30,000 Da) 및 저분자량 물질 (<30,000 Da)이 배발달에 미치는 영향을 조사하였다.

8. 통계처리

본 실험에 대한 실험자료의 통계처리는 배발달율에 대해서는 X² 검정을, 세포수의 비교는 Student t-test를 실시하였으며, p값이 0.05보다 작은 경우를 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 난포액의 첨가농도에 따른 생쥐 수정란의 체외발달

생쥐수정란의 체외발달에 있어서 인간난포액의 적정첨가농도를 확인하고자 기본배양액에 10, 20, 30 및 50%의 성숙 인간난포액을 첨가한 군과 100% 난포액군에서 배양한 결과는 Table

Table 1. Development rates of 2-cell mouse embryos cultured in T₆ medium containing the various concentrations of human follicular fluid(HFF)

Concentration	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to			
		Morula	Blastocyst	Hatching-BL*	Hatched-BL*
10% HFF	97	91 (93.8)	89 (91.8) ^a	72 (74.2) ^a	44 (45.4) ^c
20% HFF	97	92 (94.8)	91 (93.8) ^{a,c}	78 (80.4) ^{a,c}	56 (57.7) ^a
30% HFF	97	87 (89.7)	80 (82.5) ^d	65 (67.0) ^d	34 (35.1) ^b
50% HFF	96	85 (88.5)	83 (86.5) ^a	61 (63.5) ^c	37 (38.5) ^b
100% HFF	91	74 (81.3)	63 (64.8) ^b	47 (51.6) ^b	26 (28.6) ^{b,d}

* BL: Blastocyst

^{a,b}: P<0.01, ^{c,d}: P<0.05, ^e: P<0.01

Table 2. Development rates of 2-cell mouse embryos cultured in human follicular fluid containing mature, immature and atretic oocyte

State of follicular fluid	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to				
		Blastocyst	Hatching-BL	Hatched-BL	Attachment	Outgrowth
Mature*	91	84 (92.3) ^a	73 (80.2) ^a	57 (62.6) ^c	54 (59.3)	32 (35.2) ^c
Immature*	89	57 (64.0) ^b	50 (56.2) ^b	43 (48.3)	42 (47.2)	18 (20.2) ^d
Atretic*	90	65 (72.2) ^b	49 (54.4) ^b	41 (45.6) ^d	41 (45.6)	23 (25.6)

* The concentration of human follicular fluid was 20%(v/v) in T₆ medium

^{a,b}: P<0.001, ^{c,d}: P<0.05

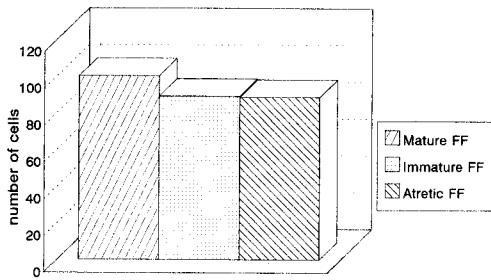


Fig.1. The number of cells in blastocysts cultured in human follicular fluid containing mature, immature and atretic oocyte

에서 보는바와 같다.

배반포기까지의 발달율은 100% 난포액군을 제외한 타 비교군에서는 통계적 유의차는 인정되지 않았지만, 20% 첨가군에서 가장 높은 배발달율을 나타냈다 (94.8%). 또한 부화율도 20% 첨가군이 가장 좋은 성적을 나타냈다 (57.7%). 그러나 30%이상 첨가군에서는 부화율이 급격히 저하되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 20% 난포액 첨가가 생쥐수정란의 체외배양에 적당농도인 것으로 확인되었으며, 이후 실험에서는 난포액의 첨가농도를 20%로 고정하였다.

2. 난자상태에 따라 분류된 난포액에서 생쥐수정란의 체외발달

난포액의 회수과정중 난포내 내포된 난자상태에 따라 분류된 성숙, 미성숙, 퇴행성 난포액을 배양액에 첨가하여 생쥐수정란을 배양한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

배반포 발달율과 부화율은 성숙난포액 (92.3, 62.6%) 첨가군에서 미성숙 (64.0, 48.3%), 퇴행성

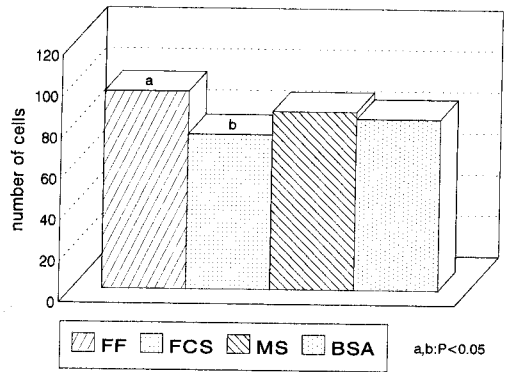


Fig.2. The number of cells in blastocysts cultured in different protein sources.

난포액 (72.2, 45.6%) 첨가군에서 보다 유의하게 높게 나타났으며, 또한 부착율, 신장율도 성숙난포액 (59.3, 35.2%) 첨가군이 타 첨가군보다 높게 나타났다. 한편 각 첨가군에서 발달된 배반포의 세포수를 조사한 결과는 Figure 1에 나타난 바와 같이 성숙난포액 (99.9±30.5) 첨가군이 미성숙 (88.8±32.6), 퇴행성난포액 (88.3±29.3) 첨가군보다 높은 것으로 나타났다.

3. 단백질원에 따른 생쥐수정란의 체외발달

단백질원으로서 인간난포액의 효과를 조사하고자 현재 단백질원으로 많이 사용되고 있는 제대혈청, 모체혈청 그리고 혈청알부민을 첨가한 군과 배발달 성적을 비교한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

단백질원에 따른 배발달은 난포액 (93.7%) 첨가군이 제대혈청 (81.5%), 모체혈청 (83.7%) 및 혈청알부민 (81.7%) 첨가군보다 유의하게 높았으며, 부화율, 부착율 및 신장율도 난포액 (82.1,

Table 3. Development rates of 2-cell mouse embryos cultured in different protein sources

Suppliment	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to				
		Blastocyst	Hatching-BL	Hatched-BL	Attachment	Outgrowth
HFF ¹	95	89 (93.7) ^a	81 (85.3) ^{a,c}	78 (82.1) ^c	78 (82.1) ^c	67 (70.5) ^c
FCS ²	92	75 (81.5) ^b	67 (72.8) ^b	55 (59.8) ^f	54 (58.7) ^f	39 (42.4) ^{e,f}
MS ³	92	77 (83.7) ^b	70 (76.1)	66 (71.7) ^c	66 (71.7) ^c	47 (51.1) ^{e,f}
BSA ⁴	93	76 (81.7) ^b	64 (68.7) ^d	52 (55.9) ^{d,f}	52 (55.9) ^{d,f}	0 (0.0) ^f

¹ Human Follicular Fluid (The concentration was 20%(v/v) in T₆ medium)

² Human Fetal Cord Serum (The concentration was 20%(v/v) in T₆ medium)

³ Human Maternal Serum (The concentration was 20%(v/v) in T₆ medium)

⁴ Bovine Serum Albumin (The concentration was 0%(v/v) in T₆ medium)

^{a,b}: P<0.05, ^{c,d}: P<0.01, ^{e,f}: P<0.001

Table 4. Development rates of 2-cell mouse embryos cultured in fractionated human follicular fluid

Culture condition	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to		
		Morula	Blastocyst	Hatching-BL
Unfractionated FF*	79	73(92.4) ^a	64(81.0) ^c	57(72.2) ^f
>30,000 Da fraction*	82	70(85.4)	62(75.6) ^c	47(57.3) ^c
<30,000 Da fraction*	78	58(74.4) ^b	38(48.7) ^d	17(21.8) ^d

* The concentration of human follicular fluid was 20%(v/v) in T₆ medium

^{a,b}: P<0.005, ^{c,d}: P<0.001

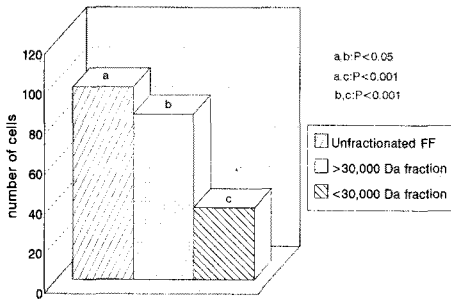


Fig.3. The number of cells in blastocysts cultured in fractionated human follicular fluid

82.1, 70.5%) 첨가군이 타 첨가군보다 높게 나타났다. 그리고 각 실험군에서 수정란이 부화후 배양용기에 부착하는 현상이 나타났지만, 혈청알부민 첨가군에서는 신장이 유기되지 않는 것이 확인되었다. 한편 각 단백질첨가군에서 발달된 배반포의 세포수를 조사한 결과는 Figure 2에 나타난 바와 같이 난포액 (96.5±28.3) 첨가군이 제대혈청 (75.5±28.6), 모체혈청 (86.6±29.6), 혈청알부민 (83.3±14.4) 첨가군보다 세포수가 많은 것으로 나타났다.

4. 분자량에 따른 난포액 분획에서 생쥐수정란의 체외발달

난포액을 고분자량 (>30,000 Da) 및 저분자량 (<30,000 Da) 분획으로 분리하고, 분리된 분획과 원난포액이 배발달에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다.

분자량에 따라 분획화된 난포액에서 배발달율 및 부화율은 고분자량 난포액 (75.6, 57.3%) 첨가군이 저분자량 난포액 (48.7, 21.8%) 첨가군보다 유의하게 높게 나타났다. 또한 배반포의 세포수를 조사한 결과는 Figure 3에 나타난 바와 같이 고분자량 난포액 (83.2±20.6) 첨가군이 저분자량 난포액 (36.3±10.9) 첨가군보다 유의하게 세포수가 많은 것으로 나타났다.

고 찰

포유동물 수정란의 체외배양에 있어서 수정란의 발달율을 향상시키기 위한 단백질 첨가제로서 혈청의 이용이 일반화 되어있다. 그러나 단백질원으로서 혈청을 사용할 경우, 수정란의 발달에 유해하다는 보고나 (Shirly et al., 1985; Caro and Trounson, 1986), 혈청이 proteolytic enzyme activity를 나타내어 수정란을 파괴시킨다는 보고 (Menezo et al., 1984) 및 혈청 성분중 분자량 10,000이하의 저분자 물질들이 수정란 성장을 저해한다는 보고 (Ogawa et al., 1987)가 있다. 그러나 이와같은 문제점이 제기됨에도 불구하고 혈청을 이용하는 이유는 혈청내에 함유되어 있는 cyclic AMP, catecholamines, vitamins, growth factors 및 lipids 등과 같은 유용물질이 함유되어 있고, 특히 FCS은 fetuin 등과 같은 성장촉진인자가 다량으로 함유되어 있고, 성숙에 다량으로 함유되어 있는 배발달을 저해하는 hormone이나 immunoglobulin 등의 함량이 적기 때문이며 (Allen et al., 1982), 또한 혈청을 대신할 적절한 대체물질이 없기 때문에 주로 이용되고 있다. 난포액은 난모세포가 성숙되면서 수정 및 발생능력을 획득하게 되는 물리적, 생리적 환경이 될뿐 아니라 배란후 난관으로 유입되면서 정자의 수정능 획득, 난자와 정자의 수정 및 수정란의 발생에 직접적인 영향을 미친다 (McNatty et al., 1979; Yanagimachi et al., 1970). 인간난포액은 높은 수준의 steroids, polypeptide hormones 및 수정란의 발달에 적합한 growth factors를 함유하고 있으며 (Fakh and Vijayakumar, 1990), 또한 난포액내에 함유되어 있는 progesterone과 lysosy-me은 Gram-positive 미생물에 대하여 증식억제작용을 하는 것으로 보고되고 있다 (Gurgan et al., 1993).

생쥐수정란의 체외발생에 있어서 인간난포액 첨가 효과는 Table 3에서 보는 바와 같이 난포액

첨가군이 제대혈청, 모체혈청 및 혈청알부민 첨가군보다 배발달 성적이 양호하게 나타났다. 일반적으로 제대혈청이 다른 혈청보다 배발달에 유효한 것으로 알려져 있으나, 본 연구에서는 정도관리 (Quality Control, Q.C)를 실시하지 않은 난포액, 모체혈청 그리고 제대혈청을 무작위로 선택해 실험에 이용한 결과, 제대혈청 첨가군이 가장 낮은 성적을 나타냈다. 이러한 결과는 제대혈청은 채취된 샘플간에 변이가 크며, 따라서 단백질 첨가제로서 이용하려면 정도관리가 반드시 필요하다는 것을 시사한다. 한편 혈액이 포함된 난포액은 난자에 유해한 성분이 증가될지도 모른다는 보고 (Fakih and Vijayakumar, 1990)가 있지만, 본 연구에서는 배발달과 무관한 것으로 확인되었다. 부화이후 체외발달을 유도한 결과, 난포액 첨가군이 타 첨가군보다 체외신장율이 높은 것으로 나타났으며, 이러한 사실로 미루어볼 때, 난포액 내에는 fibronectin, vitronectin 등과 같은 배 부착 및 spreading factor들이 혈청보다 다량 함유되어 있으며, 따라서 수정란의 착상 및 착상 이후 발달에 유효하게 작용하는 것으로 추측된다. 그리고 배양 3일째 (hCG 주사후 96-100시간경)에 정상적으로 발달된 배반포 (부화중, 팽창, 초기 배반포)의 세포수를 조사한 결과 난포액 첨가군이 타 첨가군보다 수정란 생존력의 중요한 지표인 세포수가 많은 것으로 나타났다 (Figure 2). 따라서 상기의 결과들을 종합해 볼 때, 난포액의 첨가가 타 단백질 첨가제보다 효과적이라 생각된다. 한편 난포액을 고농도로 첨가할 때에는 배발달 성적이 오히려 저하되는 것을 관찰할 수 있었는데 (Table 1), 이는 배발달 촉진인자의 과다로 인한 역효과이거나 아니면 발달억제물질에 의한 것이 아닌가 추측된다. 난포내 내포된 난자상태에 따라 분류된 난포액을 첨가하여 배발달 성적을 비교한 결과 Table 2와 Figure 1에서 보는바와 같이 성숙 난자를 내포한 난포액을 첨가한 군에서 배발달 성적 및 세포수가 높은 것으로 나타났는데, 이것은 인간난포액의 생쥐수정란 발달 억제정도는 미성숙난포에서 성숙난포로 발달됨에 따라 감소하며 (Richards et al., 1990), 또한 성숙 난자를 내포한 난포액이 미성숙 난자를 내포한 난포액보다 총단백질, albumin 및 E₂의 농도가, 퇴행성 난자를 포함한 난포액보다는 GH, IGF-1 농도가 유의하게 높은 것 (Yoon et al., 1994; Artini et al., 1994)과 밀접한 관계가 있는 것

으로 생각된다. 따라서 인간난포액 내에는 난자 발달억제물질을 함유하고 있으며, 이러한 억제물질의 활성은 난포가 성숙됨에 따라 감소하며, 또한 성숙난포액 내에는 난자 발달에 유효한 steroid hormone 및 growth factor의 함량이 미성숙 및 퇴행성 난포액보다 상대적으로 높은 것이 배발달에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 추측된다.

난포액 구성성분중 고분자량 및 저분자량 물질이 배발달에 있어서 효과를 조사한 결과, 고분자량 물질이 저분자량 물질보다 배발달 촉진 효과가 있는 것으로 확인되었으며 (Table 4, Figure 3), 복강액을 이용하였을 때도 이와 유사한 결과가 보고되었는데 (Collas et al., 1991), 이는 저분자량 물질에 함유하고 있는 수정란유해인자 (embryotoxic factor)에 기인한 것으로 추정된다 (Guilbert-Blanchette and Lambert, 1978). 그러나 고분자량 물질은 원난포액에 비해서는 낮은 배발달을 나타내는 것을 관찰할 수 있었는데, 이 사실은 수정란의 발달은 난포액내 저분자량 물질보다는 고분자량 물질에 의존적이지만, 수정란의 적정발달은 고분자량 및 저분자량 물질성분의 상호작용에 의해서 이루어 진다는 것을 추정할 수 있다. 또한 이러한 추정은 수정란 발달에 유용한 다양한 분자량의 growth factor가 존재하며, 그리고 고분자량 물질 분획은 저분자량의 수정란성장촉진인자 (embryotrophic factor)의 운반체로서 역할을 수행하는 거대분자를 함유하고 있다는 가설 (Collas et al., 1991)이 이를 뒷받침하고 있다.

수정란 체외배양시 단백질 첨가제로서 인간난포액의 효과에 대해, 수정란의 발생을 억제하므로 첨가제로서 부적당하다는 부정적인 견해 (Hung and Millard, 1985; Richards et al., 1990)와 난포액내 배발달에 유효한 성분을 다량 함유하고 있으며, 혈청보다 배발달이 우수하여 유용한 단백질 첨가제로서 이용될 수 있다는 긍정적인 견해 (Cha et al., 1991; Park et al., 1992; Yoon et al., 1994)가 제시되어 왔다. 본 연구결과는 생쥐 수정란 체외배양시 단백질원으로서 인간난포액이 혈청 및 혈청단백질보다 배발달을 및 부화 이후 발달율이 높고, 착상전 수정란의 생존력에 대한 중요한 지표인 세포수가 많은 것으로 나타났으며, 또한 성숙난포액에서는 수정란 발달 억제작용을 관찰할 수 없었다. 따라서 성숙인간난

포액은 생쥐수정란 체외배양시 혈청을 대체할수 있는 유용한 단백질원인 것으로 입증되었으며, 더 나아가 인간수정란의 배양에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 생쥐수정란을 실험모델로 이용하여, 수정란 체외배양시 단백질원으로 주로 이용되고 있는 혈청의 대체물질로서 인간난포액의 적합성과 이용가능성을 조사할 목적으로 실시하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생쥐수정란의 체외발달율은 20%의 난포액 (94.8%)첨가군에서 가장 높았으며, 그 이상의 농도가 되면 오히려 발달율이 저하되었다.

2. 내포된 난자상태에 따라 분류된 난포액에서의 배발달율, 부착율 및 신장율은 성숙난포액 (92.3, 59.3, 35.2%)첨가군이 미성숙 (64.0, 47.2, 20.2%) 혹은 퇴행성 난포액 (72.2, 45.6, 25.6%)첨가군보다 유의하게 높았으며 ($P<0.001$), 또한 배반포의 세포수도 통계적 유의차는 인정되지 않았지만 성숙난포액 (99.9 ± 30.5)첨가군이 높게 나타났다.

3. 단백질원에 따른 배발달율은 난포액 (93.7%) 첨가군이 제대혈청 (81.5%), 모체혈청 (83.7%) 및 혈청알부민 (81.7%)첨가군보다 유의하게 높았으며 ($P<0.05$), 부착율 및 신장율도 난포액 (82.1, 70.5%) 첨가군이 유의하게 높게 나타났다($P<0.001$). 또한 배반포의 세포수는 난포액 (96.5 ± 28.3)첨가군이 제대혈청 (75.5 ± 28.6) 모체혈청 (86.6 ± 29.6) 및 혈청알부민 (83.3 ± 14.4)첨가군에 비해서는 높게 나타났다.

4. 분자량에 따라 분획화된 난포액에서의 배발달율 및 부착율은 고분자량 난포액 (75.6, 57.3%) 첨가군이 저분자량 난포액 (48.7, 21.8%)첨가군보다 유의하게 높게 나타났으며 ($P<0.001$), 그리고 배반포의 세포수도 고분자량 난포액 (83.2 ± 20.6)첨가군이 저분자량 난포액 (36.3 ± 10.9)첨가군보다 유의하게 높게 나타났다($P<0.001$).

이러한 결과들을 종합해 볼때, 인간난포액은 생쥐수정란의 체외배양에 있어 혈청의 대체물질로서 그 가치가 인정되며, 오히려 혈청 및 혈청알부민보다 유용한 단백질원인 것으로 나타났다. 따라서 이상의 결과를 근거로 하여, 혈청대체물질로서 선별된 인간난포액을 생식보조기술

시 인간수정란의 체외배양에 이용한다면 유의한 효과를 나타낼수 있을 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Artini PG, C Battaglia, GD Ambrogio, A Barreca, F Droghini, A Volpe and AR Genazzani: Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Human Reprod* 1994, 9,902-906.
- Allen RL, KR Bondioli and RWJr Wright: The ability of fetal calf serum, new-born calf serum and normal steer serum to promote the in vitro development of bovine morulae. *Theriogenology* 1982, 18,185-189.
- Caro CM and A Trounson: The effect of protein on preimplantation mouse embryos development in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1984, 1,183.
- Caro CM and A Trounson: Successful fertilization, embryo development and pregnancy in human in vitro fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1986, 3,215-217.
- Cha KY, DH Choi, JJ Koo, SY Han, JJ Ko and TK Yoon: Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from non-stimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991, 51,109-113.
- Cholewa JA and WK Whitten: Development of 2-cell mouse embryos in the absence of a fixed nitrogen source. *J Reprod Fert* 1970, 22,553-555.
- Collas P, RT DUBY and JM Robl: In vitro development of rabbit pronuclear embryos in rabbit peritoneal fluid. *Biol Reprod* 1991, 44,1100-1107.
- Fakih H and R Vijayakumar: Improved pregnancy rates and outcome with gameteintrafallopian transfer when follicular fluid is used as a sperm capacitation and gamete transfer medium. *Fertil Steril* 53,515-520.
- Gianaroli L, R Seracchioli, AP Ferraretti, A Troun-

- son, C Flamigni and L Bovicelli: The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* 1986, 46,907-913.
- Guilbert-Blanchette L and RD Lambert: Analysis of the rabbit uterine fluid collected by a continuous collecting technique: evidence of an embryotoxic component. *Biol Reprod* 1978, 19, 1125-1134.
- Grgan T, B Urman, KS Diker, L Delilbasi and HA Kisinisci: Human follicular fluid from pre-ovulatory follicles in patients undergoing in-vitro fertilization inhibits the in-vitro growth of Gram-positive micro-organisms. *Human Reprod* 1993, 8,508-510.
- Hafez ESE: Rproduction in farm animals: folliculogenesis, egg maturation and ovulation. 6th Ed. Lea & Febiger 1993.
- Hinrichs K, AL Schmildt, PP Friedman, JP Selgrath and MG Martin: In vitro maturation of horse oocytes: Characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Reprod* 1993, 48,363-370.
- Hung TT and MM Millard: Identification of mouse embryo inhibiting factor in the human pre-ovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1985, 61,899-905.
- Kane MT: Culture media and culture of early embryos. *Theriogenology* 1987, 27,49-57.
- Kane MT and DR Headon: The role of commercial bovine serum albumin preparation in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. *J Reprod Fert* 1980, 60,469-475.
- McNatty KP, DM Smith, A Markris, R Osathanonch and KJ Ryan: The microenvironment of the human antral follicle : Interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1979, 49,851-860.
- Menezes Y, J Testart, and D Perrone: Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* 1984, 42,750-755.
- Ogawa T, T Ono and RP Marrs: The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987, 4,153-158.
- 박세영, 이정재, 김선행, 구병삼: 성숙난포액을 이용한 생쥐배아의 발달에 관한 연구. 대한불임학회지 1992, 19,125-131.
- Richards DW, P Quinn, BA Stone and RP Marrs: Effect of human follicular fluids from pregnant and nonpregnant patients on the development of mouse zygotes in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1990, 7,22-27.
- Shirly B, JWJr Wortham, J Witmyer, M Condon-Mahony and G Fort: Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture media. *Fert Steril* 1985, 43,129-134.
- Veeck LL: Atlas of the human oocyte and early conceptus. Williams & Wilkins 1986.
- Wright RWJr, JG Watson and S Chaykin: Factors influencing the in vitro hatching of mouse blastocysts. *Anim Reprod Sci* 1987, 1,181-188.
- Wright RWJr and KR Bondioli: Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J Anim Sci* 1981, 53,702-729.
- Yanagimachi R: The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fert* 1970, 23,193-196.
- 윤혜균, 윤산현, 임진호, 이훈택, 정길생: 난포액이 생쥐 및 인간수정란의 체외발생에 미치는 영향. 한국가축번식학회지 1994, 18(1),71-81.