

사람 난포액의 처리 방법과 Sample이 생쥐 수정란의 체외 발달율에 미치는 영향

진주 가야자모병원 불임·유전연구소, 경상대학교 과학교육학부*

전병균 · 최연희 · 조은정 · 송건호 · 곽대오* · 문진수 · 김광철

Effect of Treatment and Samples of Human Follicular Fluid on Development *In Vitro* of Mouse Embryos

Byeong-Gyun Jeon, Yeon-Hee Choi, Eun-Jung Jo, Gun-Ho Song,
Dae-Oh Kwak*, Jin-Soo Moon, Kwang-Chul Kim

*Institute of Human Infertility and Cytogenetics, Chinju Kaya Mother-Child's Hospital,
Division of Science Education*, Gyeongsang National University, Chinju*

The present study was performed to investigate the effect of treatment and samples of human follicular fluid (hFF) on the development *in vitro* of mouse embryos. The two cell stage embryos collected at 40 h post-hCG injection were cultured in the modified human tubal fluid (m-HTF) containing 15% synthetic serum substitute (SSS) or human tubal fluid (hFF) for up to 3 days at 37°C in 5% CO₂ incubator. Also the composition of hormone, total protein and protein pattern of hFF samples were analyzed. The developmental rate of mouse embryos developed to blastocyst were not significant difference in the m-HTF containing 15% hFF filtered with 0.22 or 0.8 µm syringe filter, however, the embryos cultured in the m-HTF containing inactivated hFF were significantly ($p < 0.05$) developed at the high rate to blastocyst than those containing fresh hFF and SSS. The *in vitro* developmental rate to blastocyst and hatched blastocyst in the m-HTF containing 15% hFF sample A (90.5 and 85.4%, respectively) and SSS (79.4 and 75.3, respectively) were significantly ($p < 0.05$) increased, compared with hFF sample B (64.2 and 54.1%, respectively). The hFF sample A tended to be higher concentration of LH, FSH, total protein and the ratio of progesterone/E₂ and lower concentration of E₂ and progesterone than the hFF sample B, but there were no differences in the protein pattern between the two hFF samples. The results of these study suggest that the addition of hFF to the culture medium enhances the development *in vitro* to blastocyst and hatched blastocyst, but the *in vitro* developmental rate of mouse embryos is different between hFF samples.

Key Words: Human follicular fluid, *In vitro* culture, Embryos, Mouse

체외 수정란의 생산에 있어서 배양액 속에 첨가 되는 혈청이나 albumin은 단백질과 고정 질소의 공급원으로 사용되어지고, 수정란의 발달에 중요한 작용을 한다. 또한 이것들은 수정란을 배양하는 동안 배양액 속의 독성물질을 착화시키고, 수정란이 배양 용기에 부착되는 것을 방지하며, 수정란 투명대의 경화를 방지함으로써 수정란의 체외 발달 및 부화

에 유효하다. 또한 혈청 내에는 LH, FSH, E₂ 및 P₄ 등의 호르몬, 아미노산이나 혹은 수정란의 발달에 유효한 성장촉진인자들이 포함될 수 있고,¹ superoxide의 형성을 억제하는 antioxidant의 작용으로 수정란에 유익하다고 하며,² 배양액 pH의 buffer로서 작용을 하기도 한다. 그러나 한편으로는 이러한 혈청에는 수정란의 발달을 저해하는 물질을 포함하고 있

연구대상 및 방법

1. 연구재료

으며, 비정상적으로 빠른 포배강을 형성하거나,³ 비정상적인 미토콘드리아의 유기,³⁴ 대사의 억제,⁵ 비정상적으로 큰 산자의 생산³ 등을 나타낼 수 있다고 한다. 또한 상용되는 혈청들은 가격 면에서 매우 고가이기 때문에 polyvinylpyrrolidone (PVP), polyvinylalcohol (PVA) 등이 혈청의 대체물질로 사용되기도 있으나,⁶⁷ 이들을 배양액에 첨가하여 사용하였을 경우, 체외 수정란의 생산 성적이 혈청에 비하여 우수하지 않았다고 한다.⁸ 또한 일부에서는 혈청을 첨가하지 않은 배양액을 개발하여 수정란을 배양하고 있으나,^{9,10} 아직까지는 수정란의 체외 배양에 혈청 혹은 albumin을 첨가하고 있는 실정이다.

그런데 난포에서 추출한 난포액이 수정란의 발달 성적에 있어서 혈청을 첨가했을 때와 적어도 비슷한 결과를 나타낸다면, 시험관 아기 시술에 있어서 난자와 동시에 난포액을 채집하여 이용할 수 있을 것이다. 배란 전 난포액은 난자의 성숙을 억제한다는 보고도 있었지만, 그 억제기능은 난포내에 있는 과립막 세포에 의한 것이었다고 하며, 과립막 세포가 제거된 난포액은 성숙억제능력을 상실한다고 한다.¹¹ 또한 체외 성숙 난자에서 세포질 성숙을 증진시키기 위하여 난포액을 첨가하기도 한다.¹² 한편으로 난포의 발달 상태에 따라 감수분열 억제 및 자극물질들이 변한다고도 하거나, 난포액의 영양물질과 성장촉진인자, 아미노산과 무기물 그리고 호르몬 등의 함유량은 성주기, 난포의 크기 등과 관련된다는 보고도 있었다.^{13,14} 실제적으로 불임 여성의 혈청은 생쥐^{15,16} 및 사람¹⁷에서 수정란의 발달에 유해한 효과를 가져온다고 보고하고 있고, 혈청의 sample 간에 변이가 있다. 그래서 이러한 변이와 혈청에서 유래하는 유해한 효과를 줄이고, 혈청으로부터 기원하는 질병의 감염을 없애기 위하여 일부에서는 시험관 아기 시술 프로그램에서 고순도의 albumin과 globulin으로 구성된 synthetic serum substitute (SSS)를 이용하기도 한다.^{18,19} 또한 난포액 자체의 성상 뿐만 아니라 배양액에 첨가되는 난포액의 농도²⁰ 및 처리 방법²¹ 등에 따라서도 수정란의 발달에 차이가 난다고 한다.

이에 본 연구는 체외 수정란 혹은 시험관 아기 프로그램에서 SSS 및 난포액을 사용함에 있어, 난포액의 처리 방법과 난포액 sample이 생쥐 수정란의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하여, 난포액의 유용성을 검증하고자 실시되었다.

본 실험에 사용된 생쥐는 본 연구소에서 사육 중인 ICR 계통을 이용하였다. 명 14시간, 암 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이가 자유로이 급식되는 상태에서 사육한 약 6주령의 암컷을 7 IU의 PMSG (Peamax[®], Japan)를 주입한 다음 48시간 후 7 IU의 hCG (Puberogen[®], Japan)를 각각 복강내에 주입하여 과배란을 유도하였고, 수컷과 암컷을 1:1 비율로 교미를 유도하였다. 2-세포기 단계의 수정란은 hCG 주입 후 40시간에 30 guaze 주사침이 부착된 주사기로 난관을 관류하여 회수하였고, 실험현미경 (Nikon, Japan)에서 형태적으로 정상인 수정란을 골라 실험에 공시하였다.

2. 수정란의 체외 배양

기본 배양액은 m-HTF에 15%의 SSS (Irvine Scientific, USA) 및 15% 난포액을 첨가하여 수정란의 배양에 사용하였다. 수정란의 회수에는 5% 난포액이 첨가된 HTF-H를 사용하였다. 채란된 수정란은 20 μ l의 배양액 소적속에서 3일 동안 배양하여 배반포로의 발달율을 조사하였고, 배반포로 발달한 수정란의 일부는 그들의 체외 발달 능력을 조사하기 위하여 Pursel 등²²의 방법에 따라 Bisbenzimidazole (Sigma, USA)로 할구의 핵을 염색하였다. 또한 20 μ l의 소적속에서 5일 동안 배양하여 배반포 및 부화된 배반포로의 발달율도 각각 조사하였다.

3. 난포액의 준비

시험관 아기 시술을 위해 과배란을 유도한 환자에서 hCG (Profaci[®], Switzerland)의 투여 36시간에 질식 초음파 유도 하에 난자와 함께 채취된 난포액 중에서 난자가 분리되고 남은 난포액에서 육안적으로 혈액이 포함되어 있지 않은 것만을 골라 2000 xg로 30분 동안 원심분리하여 부유물질을 제거하였고, 이중의 절반은 56°C에서 30분 동안 inactivation 처리를 하였다. Fresh 및 inactivated 난포액은 0.8 μ m syringe filter (Millipore, USA)로 여과한 다음, 일부는 0.2 μ m syringe filter (Millipore, USA)로 다시 여과를 하여 실험에 사용하거나, -20°C로 냉동 보관 후 해동시켜 사용하였다. 또한 채취한 sample 간의 비교를 위해 두 환자에서 채취된 난포액을 inactivation 처리 및 0.22 μ m syringe filter로 여과하여

사용하였다. Sample A는 male factor, Sample B는 tubal factor에 의한 불임으로 내원하였다.

4. 난포액내 호르몬의 농도, 단백질의 분석

두 난포액 sample 사이의 LH, FSH는 ACS: 180 (Ciba coming, USA)를 이용하여 분석하였고, estradiol 및 progesterone은 RIA를 이용하여 분석하였으며, 총 단백질 양은 DADE (Dimension, USA)를 이용하여 측정하였다. 또한 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 12% polyacrylamide 로 Laemmli²³의 방법에 의해 수행하였다. Gel은 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색하여 두 sample의 단백질의 양상을 조사하였다.

5. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 발달율은 Chi-square test를 실시하였고, 할구수는 Student T-test를 실시하여 처리군 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 생쥐 수정란의 체외 발달율

2-세포기에 채란된 생쥐 수정란을 0.8 혹은 0.22 μ m filter로써 여과한 사람의 fresh 혹은 inactivated 난포액이 15%의 농도로 첨가된 m-HTF에서 3일 동안 배양하여 배반포로의 발달율을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

0.22 및 0.8 μ m로 여과된 fresh 난포액에서 배반포로의 발달율은 26.6 및 28.0%를 나타내었고, 0.22 및 0.8 μ m로 여과된 inactivated 난포액에서 배반포로의 발달율은 78.3 및 73.8%를 나타내어 fersh 난

포액보다 보다 inactivated 난포액에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 배반포로의 발달율을 보였으며, fersh 혹은 inactivated 난포액에서 filter 크기에 따른 발달율의 차이는 관찰할 수 없었다. 또한 SSS를 첨가한 경우 배반포로의 발달율이 71.4%를 나타내어, inactivated 난포액보다 배반포로의 발달율이 낮았지만 서로 간에 유의적인 차이가 없었다.

소에서 0.8 μ m로 filter된 fresh 및 inactivated 난포액을 Ham's F-10에 첨가하였을 경우, 배반포로의 발달율이 난포액의 첨가 농도에 따라 차이가 있었으나, 대체로 fresh 및 inactivated 난포액에서 차이를 보여 주지 않았다.²⁴ 그러나 본 실험에서 난포액을 0.22 혹은 0.8 μ m로 여과한 후 첨가한 경우에 발달율 및 발달 능력 면에서 차이를 나타내지 않았으나, fresh 및 inactivated 난포액간에 차이를 나타내었다. 소의 난포액을 사용하여 소의 수정란을 배양한 경우 0.22 μ m로 여과하거나 불활성화 처리는 하는 경우보다 원심분리만 할 경우 배반포로의 발달율이 높았다고 한다.²¹ 그 이유는 여과 장치에 의한 독성물질의 오염과 수정란의 발달에 유익한 물질의 제거와 열처리에 의한 유익한 단백질의 변성을 지적하기도 하였으나 그 근거는 정확하지 않다. 역시 소의 fresh 난포액이 불활성화 처리를 한 것보다 소의 체외 수정란 발달에 우수하다고 하였다.²⁰ 그 이유로서는 난포액에 포함된 성장물질의 효과일 것이라고 하였다. 실제로 난포액의 성상이 채취 당시의 온도, 저장 온도 및 저장 기간에 민감하다고 하며,²⁵ 난포액의 동결 후 성상이 변할 수도 있다고 하였다.²⁶

본 실험에서 fresh 난포액을 사용한 경우에 생쥐 수정란과 난포액 간에 일종의 응집반응을 관찰할 수 있었다. 특히, 8-세포기에서 morula 단계에 특히

Table 1. Development *in vitro* of mouse embryos in m-HTF containing 15% fresh or inactivated hFF filtered with 0.22 or 0.8 μ m syringe filter

Protein sources	Filter size (μ m)	No. of embryos used*	No. (%) of embryos developed to				
			4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst [†]	
hFF	Fresh	0.22	45	42 (93.3)	23 (51.1)	16 (35.6)	12 (26.6) ^a
		0.8	75	72 (96.0)	35 (46.7)	24 (32.0)	21 (28.0) ^a
	Inactivated	0.22	92	90 (97.8)	89 (96.7)	83 (90.2)	72 (78.3) ^b
		0.8	42	42 (97.6)	38 (90.4)	37 (88.1)	31 (73.8) ^b
SSS		98	97 (98.9)	97 (98.9)	85 (86.7)	70 (71.4) ^b	

*The 2-cell stage embryos collected at 40 hrs post-hCG were cultured *in vitro* for 3 days. Total of five replicates.

[†]The values with different superscripts in the column are significantly different ($p < 0.05$)

심하게 나타나 이 단계 이후의 발달에 영향을 주어, inactivated 난포액에 비해 상당히 발달율이 저조함을 보여 주었다. 이 응집반응이 이중간 항원-항체반응이라고 사료되나, 어떤 환자에서 난자와 동시에 채취된 난포액을 원심분리 후, 0.8 μm filter로 여과하여 배양액에 첨가한 다음 그 환자의 수정란과 배양하였을 경우에도 역시 응집반응을 나타내어 이러한 현상이 이중간에 나타나는 항원-항체반응이라고 단정하지는 못 할 것 같다.

2 평균 할구수 및 세포분열 주기

2-세포기에 채란된 생쥐 수정란을 0.8 혹은 0.22 μm filter로써 여과한 사람의 fresh 혹은 inactivated 난포액이 15%의 농도로 첨가된 m-HTF에서 3일 동안 배양하여 배반포로 발달한 수정란을 할구의 핵을 염색하여 그들의 체외 발달 능력을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

0.22 및 0.8 μm 로 여과된 난포액에서 배반포로 발달한 수정란의 평균 할구수는 13.0 ± 0.0 및 19.2 ± 7.6 개 이었고, 그들의 하루 평균 세포분열 주기는 0.09 ± 0.0 및 1.09 ± 0.97 회를 나타냈으며, 0.22 및 0.8 μm 로 여과된 inactivated 난포액에서 평균 할구수는 28.8 ± 8.4 및 36.3 ± 6.6 개 이었고, 세포분열 주기는 1.28 ± 1.02 및 1.39 ± 0.90 회로 inactivated 난포액을 첨가한 경우 fresh 난포액보다 보다 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 할구수를 나타내었고, 세포분열 주기도 더 빨랐다. 또한, fresh 혹은 inactivated 난포액에서 filter 크기에 따른 발달 능력의 차이는 관찰할 수 없었으나, SSS를 첨가한 경우 그들의 평균 할구수 및 세포분열 주기는 24.2 ± 5.2 개 및 1.20 ± 0.79 회를 나타내어 inactivated 난포액을 첨가한 경우보다 할구수가 적었고 세포분열 주기도 느렸지만, 두 처리간에 유의

적인 차이는 없었다.

Fresh 난포액을 첨가한 경우, 배반포에서 할구수는 inactivated 혹은 SSS를 첨가한 경우보다 할구수가 현저히 감소함을 보여, 역시 난포액과 수정란의 응집 현상에 의한 발달 능력의 감소로 인한 결과일 것으로 사료된다. Kim 등²⁷은 난포액을 10%에서 30% 정도 첨가한 경우 할구수가 증가됨을 보여 주었고, Yoshida 등²⁸은 소난포에서 채취된 난포액에는 수정란의 발달 능력을 증진시킬 수 있는 물질들이 포함되어 있다고 하였다. 또한 수정란의 발달을 자극할 수 있는 혈청은 56°C 에서 30분 동안의 inactivated 처리가 필요한 것은 아니라고 하였으나,²⁸ 이상의 결과에서 본 실험에서와 같이 난포액을 단백질원으로 첨가하여 수정란을 배양하는 경우 inactivation 처리 과정이 필요할 것으로 사료된다.

3. Sample 간에 생쥐 수정란의 체외 발달율

Tubal factor (sample A) 및 male factor (sample B)의 원인으로 본 병원에 시술한 아기 시술을 위해 내원한 환자에서 채취한 난포액을 inactivation 처리를 한 다음 0.22 μm 의 filter로 여과한 15%의 난포액을 m-HTF 배양액에 첨가하여 생쥐 수정란을 5일 동안 배양하여 배반포로의 발달율과 부화로의 발달율을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

배반포 및 부화된 배반포로의 발달율이 sample A의 경우 각각 90.0 및 85.4%이었고, sample B의 경우 64.2 및 54.1%를 나타내어 male factor로 내원한 환자에서 채취한 sample B의 난포액보다 tubal factor로 내원한 환자에서 채취한 sample A의 난포액을 m-HTF에 첨가하였을 경우, 배반포 및 부화된 배반포로의 발달율이 유의적으로 ($p < 0.05$) 높게 나타났다. 또한 SSS를 첨가한 경우, 배반포 및 부화

Table 2. Number of nuclei and daily cell cycles of mouse embryos developed to blastocyst after *in vitro* culture in m-HTF containing 15% fresh or inactivated hFF filtered with 0.22 or 0.8 μm syringe filter

Protein sources	Filter size (μm)	No. of embryos of used*	No. of cell nuclei [†]	Mean no. cycle/day
Fresh	0.22	5	13.0 ± 3.3^a	0.09 ± 0.57
	0.8	5	19.2 ± 7.6^a	1.09 ± 0.97
hFF	0.22	13	28.8 ± 8.4^b	1.28 ± 1.02
	0.8	12	36.3 ± 6.6^b	1.39 ± 0.90
SSS		10	24.2 ± 5.2^{ab}	1.20 ± 0.79

*The 2-cell stage embryos collected at 40 hrs post-hCG were cultured *in vitro* for 3 days.

[†]The values with different superscripts in the column are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3. Effect between samples of follicular fluid on *in vitro* development of mouse embryos

Protein sources	No. of embryos of used*	No. (%) of embryos developed to					
		4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst†	Hatched Blastocyst†	
hFF	sample A	116	114 (98.2)	113 (97.4)	112 (96.5)	105 (90.5) ^a	99 (85.4) ^a
	sample B	109	106 (97.2)	105 (96.3)	95 (87.1)	70 (64.2) ^{bc}	59 (54.1) ^b
SSS	73	70 (95.9)	69 (94.5)	62 (84.9)	58 (79.4) ^{ab}	55 (75.3) ^a	
m-HTF only	107	93 (86.9)	90 (84.1)	74 (69.1)	58 (54.2) ^c	29 (27.1) ^c	

*The 2-cell stage embryos collected at 40 hrs post-hCG were cultured *in vitro* for 5 days. Total of five replicates.

†The values with different superscripts in the column are significantly different ($p < 0.05$)

Table 4. Hormone and total protein contents of samples of follicular fluid originated from patients treated with short protocol method

hFF	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	E ₂ (ng/ml)	Progesterone (ng/ml)	Progesterone/E ₂	Total protein (pg/dl)
Sample A	1.6	14.8	444.5	6500	14.63	5.7
Sample B	1.2	13.7	815.5	9700	11.90	4.9

*Sample A : tubal factor, Sample B : male factor

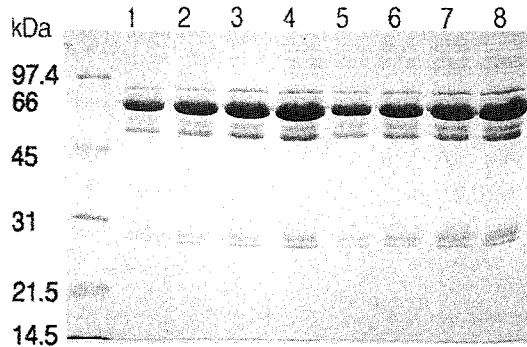


Figure 1. Comparison of protein pattern between hFF samples by SDS-PAGE. Lane 1,2,3,4: sample A, lane 5,6,7,8: sample B.

된 배반포로의 발달율이 79.4 및 75.3% 이어, sample A를 첨가한 경우보다 배반포 및 부화된 배반포로의 발달율이 낮았으나 유의적인 차이는 없었고, sample B보다 배반포로의 발달율에 유의적인 차이를 보여주지 않았으나 부화된 배반포로의 발달율이 유의적으로 ($p < 0.05$) 높았다. 또한 m-HTF에 단백질원으로 아무것도 첨가하지 않은 경우 배반포 및 부화된 배반포로의 발달율이 54.2 및 27.1%를 나타내어, 단백질원으로 난포액 혹은 SSS를 첨가한 경우보다 발달율이 유의적으로 ($p < 0.05$) 낮았다.

또한 다른 난포액의 sample 간에 포함된 호르몬 및 전 단백질은 Table 4와 같다. 두 sample 간에 LH, FSH 및 전 단백질은 tubal factor로 내원한 환자에서 채취한 sample A에서 높은 경향을 보였고, E₂ 및 progesterone은 male factor로 내원한 환자에서 채취한 sample B에서 높은 경향을 보였다. 또한 E₂에 대한 progesterone의 비율은 sample A 및 sample B에서 각각 14.63 및 11.90이었다.

또한 각 난포액 sample 속에 존재하는 단백질 양상을 분석한 결과는 Figure 1에 나타난 바와 같다. 그러나 두 sample 간에서 단백질의 양상이 서로 다른 특이한 차이점을 발견할 수 없었으며, 두 sample의 단백질 양상은 분자량 66 kDa인 albumin 성분이 가장 많이 포함되어 있었다.

본 실험에서 sample 간에 수정란의 체외 발달에 영향을 미친다는 것은 알 수 있었으나, sample 간에 호르몬의 수준이나 전 단백질의 차이가 곧 수정란의 체외 발달에 직접적으로 영향을 미치는지는 알 수 없었으며, 난포액내의 어떤 성분이 수정란의 체외 배양에 유리한지는 아직 불분명하다. 그러나 Rhesus monkey에서 E₂에 대한 progesterone의 비율을 비교하였을 때, 빠른 난황을 보이는 수정란에서는 난포액의 P/E₂의 비율이 느린 난황을 보이는 수정란보다 높게 나타나 난포액내 호르몬의 농도가 발

달에 관련된다고 보고하고 있다.²⁹ 이에 본 실험의 결과로 볼 때, 단백질의 양상이 서로 차이가 나지 않아, 이러한 hormone의 차이가 수정란의 발달에 영향을 미치는 요인이라고 사료된다. Sluss 등³⁰도 난포액내 호르몬에 따라서 난자의 성숙에 음 혹은 양의 효과를 가져올 수 있다고 보고하고 있다. 또한, 난포의 크기에 따라 steroid 호르몬이나 단백질의 조성이 변할 수 있다고 보고하였고,³¹ 사람의 성숙 난포와 미성숙 난포에서 채취된 난포액의 단백질 구성 성분과 농도 등이 차이난다고 보고하고 있다.³² 또한 대난포³³ 혹은 소난포²⁶에서 채취된 난포액을 수정란의 배양에 이용하는 것이 서로 유리하다고 보고하고 있고, 시험관 아기 시술에서 임신과 비임신 환자로부터 기원한 난포액이 생쥐 수정란이 체의 발달을 촉진 혹은 저해할 수 있다고 하며,^{15,16} 환자 혹은 과배란 처리 등의 방법에 따라 호르몬 및 단백질의 농도는 서로 상이하리라 생각된다.

난포액에는 호르몬 뿐만 아니라, IGF, EGF, TGF 및 cytokine 등 많은 종류의 단백질을 포함하고 있으며, 그들은 수정란의 체의 발달에 유익하다고 한다. EGF와 TGF는 생쥐에서 포배강의 팽창을 자극하고,³³ IGF는 수정란의 대사와 발달에 유익하다고 한다.³⁴ 또한 Chi 등³⁵은 fetal cord serum과 난포액을 첨가하여 생쥐 수정란을 배양하였을 때, 배반포 및 부화된 배반포로의 발달율은 유의적으로 높았고 SDS-PAGE로 단백질의 양상을 분석한 결과, 분자량 21 kDa의 물질을 발견하여 이러한 물질이 수정란의 발달에 유익한 효과를 준다고 한다. 그러나 본 실험에서 두 sample의 단백질의 양상을 볼 때, 분자량 21 kDa 인 근의 물질은 두 sample에서 다 검출이 되지 않았으나 두 sample 간에 발달율의 차이를 보여 이 물질이 궁극적으로 수정란의 발달을 유익한지는 더욱 더 연구되어야 할 부분인 것 같다. 역시 본 실험의 결과에는 역시 검출되지 않았으나, 혈청 성분 중에는 분자량 17 kDa의 물질이 수정란에 독성의 효과를 가져온다고 보고하고 있으며,³⁶ 다른 연구자들은 사람의 난포액에 존재하는 분자량 20과 50 kDa의 물질이 생쥐 수정란의 체의 발달을 억제하는 것으로 보고하고 있어,³⁷ 난포액에서 수정란의 발달에 유익한 인자 혹은 저해인자 등은 더욱 더 연구되어야 할 부분인 것 같다.

이에 난포액을 체외 수정란이나 시험관 아기 프로그램에서 단백질의 공급원으로 사용하는 경우, 단백질의 성상이나 hormone의 농도 등을 측정하여 사용하거나, 생쥐 수정란을 이용한 정도 관리를 실시

한 후, 그들을 배양액에 첨가되는 단백질의 공급원으로 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

결 론

체외 수정란의 생산이나 시험관 아기 프로그램에서 배양액에 첨가되는 SSS 및 난포액을 사용함에 있어, 그들의 처리 방법과 다른 환자간에 채취된 난포액이 생쥐 수정란의 체의 발달에 미치는 영향을 조사하고자, 과배란 처리된 생쥐로부터 채란한 2-세포기 단계의 생쥐 수정란을 SSS 혹은 난포액이 15% 수준으로 첨가된 m-HTF 배양액에 3~5일 동안 배양하여 배반포 및 부화된 배반포로의 발달율을 조사하였으며, 다른 환자에서 채취한 난포액의 sample 간에 생쥐 수정란의 발달율의 차이를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생쥐 수정란을 3일 동안 체외 배양한 결과, 0.22 혹은 0.8 μm 의 필터 크기에 따른 난포액의 처리 방법에서 배반포로의 발달율에 유의적인 ($p < 0.05$) 차이가 없었으나, fresh, inactivated 난포액이나 SSS를 첨가한 m-HTF에서 fresh 난포액보다 inactivated 난포액 및 SSS가 첨가된 m-HTF에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 배반포로의 발달율을 보였다.

2. 배양 후 3일째에 배반포로 발달한 수정란의 핵을 염색하여 할구수 및 세포분열 주기를 조사한 결과, filter 크기에 따라 할구수 및 세포분열 주기가 유의적인 차이가 없었으며, 역시 fresh 난포액보다 inactivated 난포액 및 SSS를 사용한 경우 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 체외 발달 능력을 보였다.

3. 생쥐 수정란을 5일 동안 배양한 결과, sample A에서 배반포 및 부화된 배반포로의 발달율이 각각 90.5 및 85.4%이었고, sample B에서는 64.2 및 54.1%를 나타내어, sample 간에 유의적인 ($p < 0.05$) 차이를 보였으며, SSS를 첨가한 경우에 79.4 및 75.3%의 발달율을 보여 sample A보다는 낮았으나 유의적인 ($p < 0.05$) 차이는 없었으며, sample B보다 부화된 배반포로의 발달율이 유의적으로 ($p < 0.05$) 높았다. 또한, m-HTF에 난포액 혹은 SSS를 첨가하지 않은 경우 배반포 및 부화된 배반포로의 발달율이 54.2 및 27.1%를 나타내어, 단백질 원을 첨가한 경우보다 유의적으로 ($p < 0.05$) 낮은 체외 발달율을 보였다.

4. 높은 배반포로의 발달율을 보인 난포액 sample A에는 LH, FSH 및 전 단백질의 농도가 높았으며, 낮은 발달율을 보인 난포액 sample B에서는 E₂ 및

progesterone의 농도가 높았으나, 그들의 단백질 양상을 조사한 결과 서로 어떤 차이점도 발견할 수 없었다.

이상의 결과로 보아, filter 크기에 따른 난포액의 처리간의 발달을 차이는 없었으나, 난포액을 단백질 공급원으로 사용하는 경우, inactivation의 처리 과정이 필요하다고 판단된다. 또한 채취된 난포액의 sample 간에는 생쥐 수정란의 체외 발달 능력이 차이가 있었고, 난포액을 체외 수정란의 생산이나 시험관 아기 프로그램에서 단백질의 공급원으로 사용하는 경우, 단백질의 성장, hormone의 농도 및 생쥐 수정란을 이용한 정도 관리를 실시한 후, 그들을 배양액에 첨가되는 단백질의 공급원으로 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Takahashi Y, First NL. *In vitro* culture of bovine one-cell embryos fertilized *in vitro* using synthetic oviduct fluid medium with and without glucose and supplemented with fetal calf serum. Elsevier Science Publishers BV Amsterdam. Anim Reprod Sci 1993; 31: 33-47.
2. Kane M, Yamane I. Oxygen-dependent growth declining and effect of vitamin E for human dopliod fibroblast in serum-free BSA-containing culture. Tohoku J Exp Med 1993; 139: 389-98.
3. Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMiilan WH, Tervit HR. Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. Biol Reprod 1995; 53: 1385-91.
4. Dornald M, Gardner DK, Trounson A. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in the ovine embryos. J Reprod Fertil (Abstr Ser) 1994; 13: 70.
5. Gardner DK. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. Cell Int 1994; 18: 1163-79.
6. Funahashi H, Day BN. Effects of differnet serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. Theriogenology 1993; 39: 965-73.
7. Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H, Rodriguez-Martinez H. A serum free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. Theriogenology 1994; 41: 1033-43.
8. Gorden I. Bovine serum and other protein sources. In: Gordon I, editord. Laboratory Production of Cattle Embryos. Cambridge Univ Press; 1994. pp.108-14.
9. Li J, Foote RH, Liu Z, Giles JR. Development of rabbit zygotes into blastocyst in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. Theriogenology 1997; 47: 1103-13.
10. Liu Z, Foote RH. Sodium chloride, osmolyte and osmolarity effects on blastocyst formation in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF) and cultured in simple serum-free media. J Assisted Rprod Gen 1996; 13: 562-8.
11. Sirard MA. Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. Theriogenology 1990; 33: 757-67.
12. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. Fertil Steril 1991; 55: 109-13.
13. Romero A, Seidel GE Jr. Effect of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. Theriogenol 1995; 41: 383-94.
14. Lonergan P. Factors affecting *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes. M Agr Ac Thesis, Univ. of Ireland; 1990.
15. Damewood MD, Hesla JS, Schlaff WD, Hubbard M, Rock JA. Effect of serum from patients with minimal to mild endometriosis on mouse embryos development in vitro. Fertil Steril 1990; 50: 917-20.
16. Abusa-Musa A, Takahashi K, Okada S, Sakoda R, Kaito M. Serum from patients with threatened abortion: Effect of *in vitro* development of mouse embryos. J Reprod Med 1994; 39: 10-2.
17. Holst N, Bertheussen K, Forsdahl F, Hakonse MB, Hansen LJ, Nielsen HI. Optimization and simplification of culture conditions in human *in vitro* fertilization (IVF) and preembryo replacement by serum-free media. J In Vitro Fertil Embryo Transfer 1990; 7: 47-53.
18. Desai N, Kinzer D, Loeb A, Goldfarb J. Use of

- synthetic serum substitute and α -minimum essential medium for the extended culture of human embryos to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 1997; 12: 328-35.
19. Dugan KJ, Sharika S, Smith RD, Padilla SL. Comparison of synthetic serum substitute and fetal cord serum as media supplements for *in vitro* fertilization: A prospective, randomized study. *Fertil Steril* 1997; 67: 166-8.
 20. Kato H, Iritani A. *In vitro* fertilization in cattle. *Mol Reprod Fertil* 1987; 36: 229-31.
 21. Collins AR, Wright RW Jr. Effects on embryos development of heat treatment and filtration of bovine follicular fluid used to supplement IVM medium. *Theriogenology* 1995; 43: 189.
 22. Pursel VG, Wall RJ, Rexroad Jr CE, Hammer RE, Brinster RL. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 1985; 24: 687-91.
 23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
 24. Choi YS. Effects of follicular fluid and hormones on *in vitro* oocyte fertilization and development of bovine embryos. *Gyeongsang Univ.*; 1997.
 25. Breuel KF, Spitzer JC, Gimenez T, Henricks DM, Gray SL. Effect of holding time and temperature of bovine whole blood on concentration of progesterone, estradiol-17 β and estrone in plasma and serum samples. *Theriogenology* 1988; 30: 613-27.
 26. Sirard MA, Roy F, Mermillod P, Guilbault LA. The origin of follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. *Theriogenology* 1994; 41: 296.
 27. Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K, Utsumi K. The effect of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. *Theriogenology* 1996; 45: 787-99.
 28. Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishikaki K, Kojima T, Nagai T. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured. *Theriogenology* 1993; 39: 1301-11.
 29. Morgan PM, Boatman DE, Bavister BD. Relationships between follicular fluid steroid hormone concentrations, oocyte maturity, *in vitro* fertilization and embryonic development in the rhesus monkey. *Mol Reprod Dev* 1990; 27: 145-51.
 30. Sluss PM, Schneyer AL, Franke MA, Reichert LE Jr. Porcine follicular fluid contains both follicle stimulating hormone agonist and antagonist activities. *Endocrinology* 1987; 120: 1477-81.
 31. Hazleger NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 1995; 43: 509-22.
 32. Spitzer D, Murach KF, Lottspeich F, Staudach A, Illmensee K. Different protein patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles. *Hum Reprod* 1996; 11: 798-807.
 33. Dardik A, Doherty AS, Schultz RM. Protein secretion by the mouse blastocyst: Stimulatory effect on secretion into the blastocoel by transforming growth factor. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 396-401.
 34. Heyner S, Shi CZ, Jarett L, Smith RM. Functions of the IGFs in early mammalian development. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 421-6.
 35. Chi HJ, Kim DH, Koo JJ, Chang SS. The suitability and efficiency of human follicular fluid as a protein supplemented in human *in vitro* fertilization programs. *Fertil Steril* 1998; 70: 871-7.
 36. Hemmings R, Lachapelle MH, Falcone T, Miron P, Ward L, Guyda H. Effect of follicular fluid supplementation on the *in vitro* development of human pre-embryos. *Fertil Steril* 1994; 62: 1018-21.
 37. Hung TT, Millard MM. Inhibition of mouse embryo cleavage by a factor present in the human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 61: 899-904.