

분자량에 따라 분획화된 혈청성분이 생쥐 체외수정란의 발생에 미치는 효과

한정호 · 정구민*
서울대학교 의과대학

Effects of Serum Fractions Separated by Molecular Weight on the Development of Mouse Embryos Fertilized *In Vitro*

Jung Ho Han and Ku Min Chung*

College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-744, Korea

SUMMARY

This study was carried out to investigate the inhibiting or promoting effect of fetal bovine serum fractionated by the molecular weight and to examine the effect of reconstruction of serum fractions on the development of 1- and 2-cell mouse embryos fertilized *in vitro*(IVFE). The serum was separated by ultrafiltration or gel filtration methods and added in m-KRB medium for culture of IVFE. The developemntal ability(cavitation and hatching) of embryos following culture of day 4 and 6 was compared among fractions.

Small molecular weight fraction(<3 kDa) significantly inhibited the development of 1- and 2-cell IVFE to the blastocyst stages, compared with other fractions. One-cell IVFE were more sensitively damaged than 2-cell embryos by that fraction and arrested mainly at 2~4 cell stages. Moreover, small amount(<3%, v/v) of the inhibiting fraction acted even with protein rich fraction(100~30 kDa) and arrested the embryonic development. On the other hand, 100~30 kDa fraction promoted the embryonic development and no inhibiting effect was observed at the level of 50%(v/v) in culture medium. In the experiment of gel filtraton, ≈30 kDa fraction showed the highest promoting effect on the embryonic development, but <4 kDa fraction inhibited significantly the development. These results suggest that serum contains not only small molecular weight inhibitory component(s) but also promoting one rather than albumin on embryonic development. And serum can be more effectively used in the IVF program after removal of inhibitory component(s) by one of above separation methods.

서 론

인간과 동물의 체외 수정 또는 수정란 배양시스템에는 생식세포의 성숙과 수정 및 발생 과정을 촉

진시키고자 각종 혈청을 배양첨가제로 폭넓게 이용하고 있다. 혈청은 배양액의 미세환경을 개선시키는 효과와 난자가 필요로 하는 인자를 공급하고, 투명대의 경화를 방지하며, 난자의 성숙, 난자 내 정자의 침투, 발생란의 포배강 형성과 부화를 촉진하

* 한국생명과학연구소 (Hankook Institue of Life Science : 53-9, Hyehwa-dong, Chongno-ku, Seoul, Korea. Zipcode, 110-530)

는 효과가 있다(Wright 등, 1976; Menezo, 1984; George 등, 1992).

그러나 혈청을 배양첨가제로 이용하는 시스템에서도 난자의 체외 발생율은 매우 낮은 실정에 있고, 그 동안의 몇몇 연구에 의하면 혈청의 출처와 첨가 농도에 따라서 초기배(1-2 세포기의 수정란)의 발생을 촉진 또는 억제시킨다는 사실이 보고되었다(Caro와 Trounson, 1984; Menezo, 1984; Ogawa 등, 1987; 문 등, 1989; 정과 임, 1991; Millham 등, 1994; Nakagawa 등, 1994). 특히 생쥐 1 세포배의 체외 배양에 있어서 혈청의 발생억제효과는 매우 심각하였다(정과 임, 1991).

많은 연구자들이 혈청의 상반된 양면성에 대하여 관심을 갖고 있으나 혈청은 그 성분이 다양하고 batch나 채취원에 따라 변이가 크므로, 체외 조건에서 혈청의 어떤 성분이 어떻게 수정란의 발생을 촉진 또는 억제시키는가에 대한 연구가 아직도 미미하다. 또한 혈청의 효과에 대한 상반된 연구결과가 보고되고 있어서 이에 관한 보다 구체적인 연구가 필요하다. 또한 인간과 동물의 체외수정 프로그램에서 체외 발생율이 낮고, 비정상적인 수정란의 출현이 증가하며, 궁극적으로 임신율이 떨어지는 원인이 배양액에 첨가하는 혈청 내 유해인자에 기인하리라는 것을 추정케 한다.

혈청의 이와 같은 문제점을 극복하기 위해서 Quinn과 Whittingham(1982), Menezo 등(1984), Kane(1985) 등은 혈청에서 정제된 알부민을 초기 배의 체외배양에 성공적으로 이용하였지만, Sanyal과 Naftolin(1983), 정 등(1990)은 알부민이 난자의 체외성숙과 배반포의 부화에는 혈청보다 그 효과가 극히 미약한 것으로 보고하였고, Hsu(1980)도 수정란의 부화에는 알부민 이외의 혈청성분이 필요할 것이라고 시사한 바 있다. 이러한 이유로 혈청은 가축이나 인간의 체외수정과 이식 프로그램에서 일반적으로 배양액에 첨가되고 있다.

본 연구는 ultrafiltration과 gel filtration으로 분자량에 따라 나누어진 혈청분획이 수정란의 초기발생에 미치는 효과를 관찰하여 혈청 내 초기배 발생 억제성분에 관한 기존의 상반된 연구결과를 검증하고, 아울러 재조합된 혈청이 수정란의 발생에 미치는 효과를 구명함으로써 체외수정 프로그램을 개선

시키는 길을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

난자와 정자를 생산하기 위해서 F1(C57BL/6×CBA) 잡종의 생쥐 암컷(5~6주령)과 수컷(12~16주령)을 실험동물로 사용하였으며, 3~4주령에 구입하여 적어도 1~2주간 온도(22~24°C), 광량(light:dark = 12hr:12hr) 및 환기 시설이 갖추어진 사육실에서 안정을 시킨 다음 실험에 이용하였다.

2. 배양액 및 소태아혈청

배양액은 Ham's F10(Gibco, Cat. No. 81200-032)과 Kreb's Ringer bicarbonate 용액(m-KRB)을 정구민(1990)이 제시한 방법에 의해 제조하였다. 배양액은 사용하기 하루 전에 전배양한 다음 각각 정자 처리 및 수정 배양액으로 사용하였으며, 전자는 체외수정용 그리고 후자는 체외수정란의 배양용으로 이용하였다. 혈청은 예비실험을 통하여 수정란의 발생억제효과가 크다고 확인된 불활성화 처리 않은 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco)을 분주하여 냉동보존(-20°C)한 다음 매 실험시 녹여서 이용하였다.

3. 난자와 정자의 준비 및 체외수정

난자의 준비를 위해 한번에 10~12 마리의 암컷을 복강에 7.5IU PMSG를 주사하여 난포를 성장시키고, PMSG 주사 후 48시간째 5.0 IU HCG를 복강주사하여 과배란을 유도하였다. HCG 주사 후 15-16 시간째 난관을 회수액(D-PBS+0.4% BSA)으로 절제하여 실험현미경 하에서 난관팽대부를 찢어 난구세포가 부착된 상태로 회수하였다. 난자-난구세포 복합체(oocyte-cumulus complex)는 배양액으로 2회 세척 후 체외수정배양액(Ham's F10 + 0.4% BSA)으로 옮겼다.

정자는 성숙숙이 완료된 2마리의 수컷 생쥐로부터 각각 한쪽의 정소상체미부(cauda epididymis)와 정관을 절제하여 세척한 후 2ml의 BSA-free medium으로 옮겨 실험현미경 하에서 주사침으로

젤러 정자괴(sperm mass)를 2ml의 1차 정자배양액(Ham's F10)으로 유리하였다. 1차 정자부유액은 10분간 배양 후 0.4 ml을 2ml의 2차 정자배양액(Ham's F10 + 0.4 % BSA)으로 옮겨 10분 간 배양하여 정자의 수정능획득을 유도하였다. 그 다음 2차 정자부유액 0.4 ml을 난자-난구세포 복합체(난자의 수는 80~120)가 들어있는 배양액에 넣어 수정(insemination)을 완료하였다. 정자 배양용 용기는 직경 35mm petri dish(Falcon, Cat. No. 3001)를 사용하였으며, 주정된 정자의 농도는 배양액 1 ml 당 약 $2\sim4\times 10^5$ 마리로 하였다.

4. 체외수정란의 배양

배양 하루 전에 직경 35mm petri dish(Falcon, Cat. No. 3001)에 배양액의 소적(15 μ l)을 형성한 후 그 위에 mineral oil(Squibb & Sons, U.S.A.)을 덮어 탄산가스배양기(36.5°C, 5% CO₂ + 95% air, 100% humidity)에서 전배양시켰다. 수정 3시간 후에 수정 징후(제 2 극체의 존재 및 할구 표면의 변화)가 명확히 나타난 체외수정란을 선별하여 BSA가 함유된 배양액에서 2회 세척하고, 다시 이들 수정란을 protein-free m-KRB에서 3회 세척한 후, 동일한 수로 각 실험군에 배치하였다. 수정란의 발생 관찰은 배양 후 4일째에 초기발생 중지상태와 팽윤배반포의 비율을, 그리고 6일째에는 부화배반포의 비율을 각 실험군 간에 비교하였다. 관찰결과는 백분율로 표시하였고, 각 처리 간에 통계학적 유의성을 확인하기 위하여 χ^2 -test를 실시하였다.

5. Ultrafiltration을 이용한 혈청의 분획화

Centrifugal concentrator(Amicon) Centricon-100(100,000 MW cut-off), Centricon-30, Centricon-10 및 Centricon-3를 차례로 이용하여 소태아혈청을 고속원심분리기로 원심 한외여과하고, 최종 Centricon-3 여과액(분획 3 kD 이하)을 배양액에 10%(V/V)로 첨가하여 실험에 사용하였다. 각각의 retentate(분획 >100 kD, 100~30 kDa, 30~10 kDa, 10~3 kDa, <3 kDa)는 충분한 양의 m-KRB 배양액으로 3회 원심여과, 세척 후 10% 씩 배양액에 첨가하여 실험에 이용하였다.

6. Gel Filtration에 의한 소태아혈청의 분획화

소태아혈청 성분의 분자량에 따른 분획화는 Waters사 Advanced Protein Purification System(Model 650M)을 이용한 high resolution gel filtration 방법으로 수행하였다. 충분한 양의 m-KRB 배양액으로 미리 평형시킨 Protein-Pak 200SW column(0.8×30 cm)에 F로 희석한 소태아혈청 100 μ l를 주입한 후 m-KRB배양액으로 0.8 ml/min의 속도로 용출하였다. 각 분획(0.8 ml)은 pH와 삼투압의 변화가 없음을 확인한 후 그 일부를 생쥐 수정란의 배양액으로 이용하였다. Gel filtration column은 실험조건 아래 단백질 molecular weight markers(Pharmacia)로 calibration하였다.

결 과

소태아혈청(FBS)이 생쥐 수정란의 체외발생에 미치는 효과를 알아보기 위하여 배양액에 혈청의 첨가 수준을 각각 0, 5, 20 및 50%로 하여 수정란의 배양을 실시한 결과는 Table 1과 같다. 혈청의 첨가 농도가 높아질수록 배반포로 발생한 수정란의 비율은 점차 낮아졌고, 첨가된 혈청농도에 관계없이 대조군에 비교하여 유의적인 차이를 보였다. 이와 같이 혈청의 첨가 농도가 높아질수록 발생율이 낮아진 것은 2~4세포기에서 수정란의 발생이 중지된 비율이 유의하게 높아진데서 기인하는 것으로 나타났다. 이러한 결과에서 혈청이 수정란의 초기 분할기에 치명적인 영향을 미치며, 혈청에는 1 세포 수정란의 발생에 유해한 인자가 함유되어 있음을 알 수 있었다.

1. Ultrafiltration에 의해 분리된 혈청 분획이 1, 2 세포 수정란의 체외발생에 미치는 효과

Ultrafiltration으로 분자량에 따라서 분획된 혈청 성분(>100, 100~30, 30~10, 10~3, <3 kDa)을 배양액에 각각 첨가하여 1- 및 2-세포 수정란을 체외배양한 결과는 Fig. 1과 같다. 1 세포 수정란이 팽윤배반포까지 발생한 비율은 "30 kDa 이상의 분획"들에서 "30 kDa이하의 분획"이나 비분리혈청이 첨

Table 1. Inhibitory effect of fetal bovine serum added in medium at various concentrations on the development of mouse 1-cell embryos fertilized *in vitro*¹

Embryonic stages at day 4 culture (%)	% Concentration of FBS added			
	0	5	20	50
2-4 cell	2 ^a	34 ^b	33 ^b	42 ^b
Morula	16 ^a	25 ^a	30 ^b	29 ^a
Expanded-blastocyst	43 ^a	14 ^b	10 ^b	8 ^b

¹, The number of the embryos in each treatment is 61 to 66

^{ab} : Percentages within a row with superscripts not in common are significantly different ($P < 0.05$)

가된 경우보다 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.$

05). 수정란의 부화율(부화배반포의 수/배양된 수정란의 수 $\times 100$)은 이들 분획들 간에 더욱 현저히 나타났다. 특히, 100~30 kDa 분획에서 가장 높은 발생율을 보인 반면에 3 kDa 이하의 분획에서 가장 낮은 발생율을 나타내었다. 3 kDa 이하의 분획에서의 수정란의 발생율이 “비분리혈청 첨가군”에서와 거의 유사한 양상을 보임으로써 수정란에 대한 혈청의 발생억제효과가 3 kDa 이하의 분획에 기인하고 있음을 알 수 있었다. 더우기 “3 kDa 이하의 분획 첨가군”에서의 발생율이 “혈청 무첨가군”보다도 낮은 관찰 결과가 이러한 사실을 뒷받침하고 있다.

한편, 혈청분획이 2 세포 수정란의 체외발생에 미치는 효과는 1 세포 수정란과는 다소 다른 경향을 보여주고 있다(Fig. 1). 30 kDa 이상의 분획들에서는 팽윤배반포의 비율이 1 및 2 세포 간에 비슷한

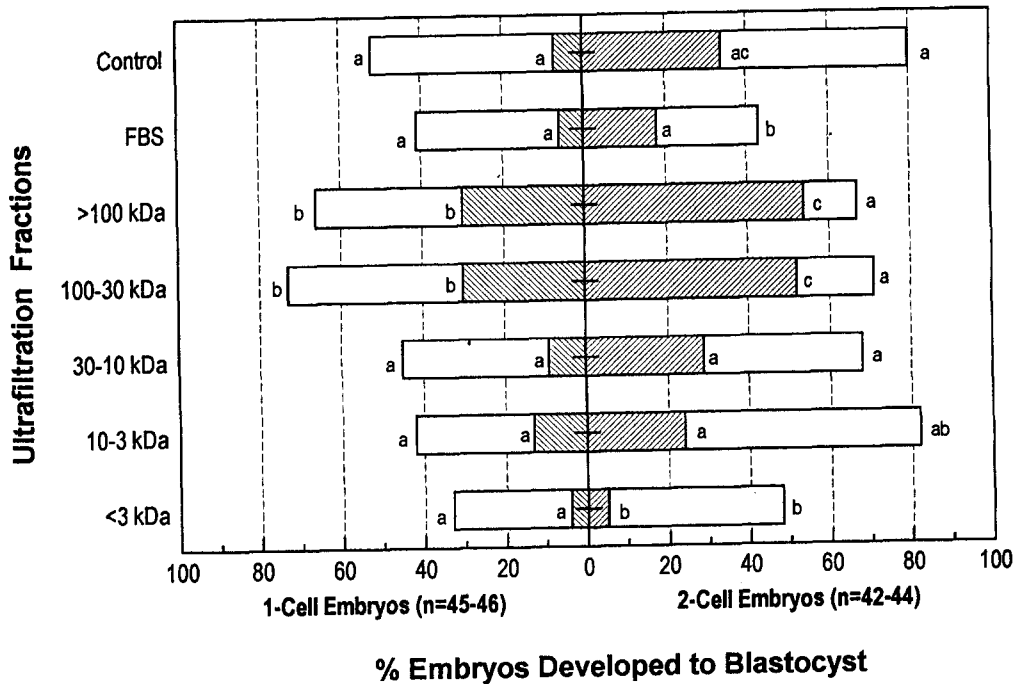


Fig. 1. Effect of FBS of fractions separated by ultrafiltration on the development of mouse 1- and 2-cell embryos fertilized *in vitro*. Each fraction was added as 10% in culture medium (ab or abc : percentages within each experiment with superscripts not in common are significantly different, $p < 0.05$; □ & ▨ : % expanded blastocyst at the day 4; ▩ : % hatched blastocyst at the day 6; Control : m-KRB medium only.

경향을 보여주고 있지만, 그 이하의 분획에서는 1 세포 수정란에 비하여 2 세포 수정란의 발생이 현저히 높게 나타났다. 즉, 2 세포 수정란이 팽윤배반포로 발생한 비율은 30 kDa 이상 분획들과 30~3 kDa 분획에서 차이를 보이지 않았으며, 이러한 점이 1 세포 수정란의 경우와는 다르게 나타났다. 따라서 혈청 내의 발생억제인자는 2 세포 수정란보다 1 세포 수정란에서 더욱 민감한 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 그러나 2 세포 수정란의 경우도 부화배반포로 발생한 비율은 3 kDa 이상의 분획들과 그 이하의 분획들 간에 유의적인 차이가 있었다. 특히, 30 kDa 이하 분획들에서의 발생율이 대조군(혈청무첨가군)보다도 유의적으로 낮게 나타남으로써 혈청 내 발생억제인자의 존재와, 그 인자의 분자량이 3 kDa 이하라는 사실을 다시 확인시켜 주었다.

2. Ultrafiltration에 의해 분리된 혈청 분획의 발생학적 검정

혈청분획 중 가장 높은 발생율을 보인 분획(100~30 kDa; 10%, V/V)과, 이 분획(10%, V/V)에 30 kDa 이하의 분획들을 각각 1%씩 첨가하여 재조합하였을 때 1 세포 수정란의 발생에 미치는 효과는 Table 2와 같았다. 재조합 혈청에서의 발생율(팽윤배반포의 비율)이 유의적으로 감소하였는데, 그 원인은 발생과정 중 2~4세포기에서 발생이 중지된 데서 기인하였다. 따라서 배양액에 30 kDa 이하의 분획을 소량 첨가하여도 1 세포 수정란의 체외발생을 억제시키므로 혈청내 발생억제인자는 소량으로도 수정란의 초기 분화에 영향을 미칠 수 있는 특성이 있었다. 또한 이러한 인자(들)는 알부민 등의 30 kDa 이상의 성분과는 무관하게 수정란에 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었다.

한편, 혈청분획 중 가장 높은 수정란의 발생율을 보인 100~30 kDa 분획을 높은 농도로 첨가하였을 때 수정란에 대한 유독성을 알아보기 위하여, 배양액에 그 첨가 농도를 0%, 5%, 20% 및 50%로 하여 생쥐 1 세포 수정란을 배양한 결과는 Table 3과 같다. 첨가 수준을 50%까지 점차 증가시켰을 때 수정란의 발생율(팽윤배반포까지 발생율)이 전혀 감소하지 않았다. 이러한 사실은 100~30 kDa 분획에는 1 세포 수정란에 대한 유독성 인자가 거의 함유되어

있지 않으며, 아울러 혈청의 유독성 인자는 ultrafiltration법으로 분리가 가능함을 시사하고 있다.

Table 2. Effect of reconstructed FBS-fractions on the development of mouse 1-cell embryos fertilized *in vitro*¹

Embryonic stages at day 4 culture (%)	Fractions added	
	100-30 kDa(10%)	100-30kDa(10%) + kDa(10%) others(1% each)
Expanded blastocyst*	46	16
2-4 cell*	10	38
Morula	16	18

¹, The number of the embryos in each treatment is 60.

*: Significantly different between two group(p<0.05)

Table 3. Effect of 100-30 kDa fraction on the development of mouse 1-cell embryos fertilized *in vitro*¹

Embryonic stages at day 4 culture (%)	% 100-30 kDa fraction added			
	0	5	20	50
Expanded blastocyst	32 ^a	44 ^a	48 ^a	56 ^b
2-4 cell	2	4	8	8
Morula	8	6	4	6

¹, The number of the embryos in each treatment is 50.

^{ab}: Percentages within a row with superscripts not in common are significantly different(P<0.05)

3. Gel filtration으로 분리한 혈청분획이 1, 2세포 수정란의 체외발생에 미치는 효과

Gel filtration에 의해 분리된 혈청분획(Fig. 2)을 배양액으로 하여 생쥐 1, 2 세포 수정란을 배양하여 비교한 결과는 Fig. 3과 같으며, 몇가지 분획에서의 1 세포 수정란의 발생양상은 Fig. 4와 같았다. 1 세포 수정란이 팽윤배반포와 부화배반포로 발생한 비율을 분획들 간에 비교할 때 단백질 용출 초기의 분획 8 이전에서는 대조군(혈청무첨가군)과 비슷하게 나타났으며(Fig. 3, 4A 및 4B), 분리가 진행될수록

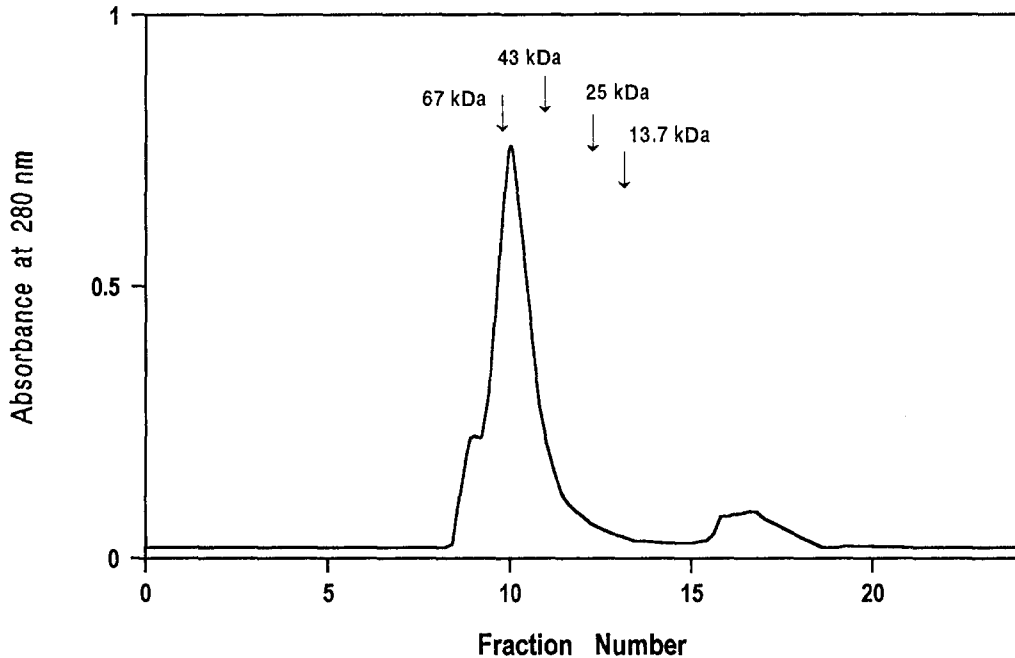


Fig. 2. Fractionation of FBS on Protein-Park 200SW gel filtration. 100 μ l of 1/2-diluted FBS were applied to a column(0.8 \times 30 cm)pre-equilibrated with m-KRB culture medium and eluted at a flow rate of 0.8ml/min. Fractions (0.8ml)were collected and subjected to culture of mouse embryos fertilized *in vitro*. The elution volumes of protein molecular weight markers are indicated by arrows(albumin : 67 kDa, ovalbumin : 43 kDa, chymotrypsinogen A : 25 kDa and PNase A : 13.7 kDa).

그 비율이 점차 증가하여 분획 14(Fig. 3 및 4C)에서 가장 높은 발생율을 나타내었다. 그 다음 다시 이 비율이 점차 감소하여 분획 20(Fig. 3 및 4D)에서 현저히 낮은 발생율을 보였고, 그리고 마지막 분획(Fig. 3)에서는 대조군과 비슷한 수준으로 다시 회복되었다.

이러한 경향은 Fig. 2의 크로마토그램을 근거로 살펴 볼 때 분획 8에서 단백질 용출이 시작되면서 이 분획에서 발생율(Fig. 3)이 증가하기 시작한 것과 일치하고 있으나, 분획 10(알부민 분획, 67kDa)에서 14번 분획으로 진행할수록 단백질 함량은 현저히 감소함에도 불구하고 수정란의 발생율은 점차적으로 증가하여 분자량 30~10 kDa 정도의 단백질이 소량 존재하리라 생각되는 분획 14에서 발생율이 유의적으로 증가됨을 보여(Fig. 3 및 4C), 특정

혈청성분에 의한 수정란 발생 촉진효과의 가능성을 나타냈다. 한편, 단백질 성분의 농도가 매우 낮고, 그 분자량도 10 kDa 이하로 생각되는 분획 16부터는 수정란의 발생율이 점차 감소하고 있으며, 분획 18에서 20으로 진행되면서 발생율이 현저히 감소하였다.

이러한 경향은 다소 정도의 차이가 있지만 2 세포 수정란의 발생율에서도 비슷하게 나타나고 있다. 특히, 분자량이 4 kDa 이하로 추정되는 분획 20에서 발생율(부화배반포의 비율)이 현저히 낮은 것은 1 세포와 2 세포 수정란에서 완전히 일치하고 있고, 이러한 관찰결과는 앞서 실험한 ultrafiltration 분획에서 3 kDa 이하의 분획에서 발생율이 가장 낮은 것과도 일치하고 있다. 따라서 다양한 이질성 성분을 함유하고 있는 혈청 내에는 1 및 2 세포 수정란

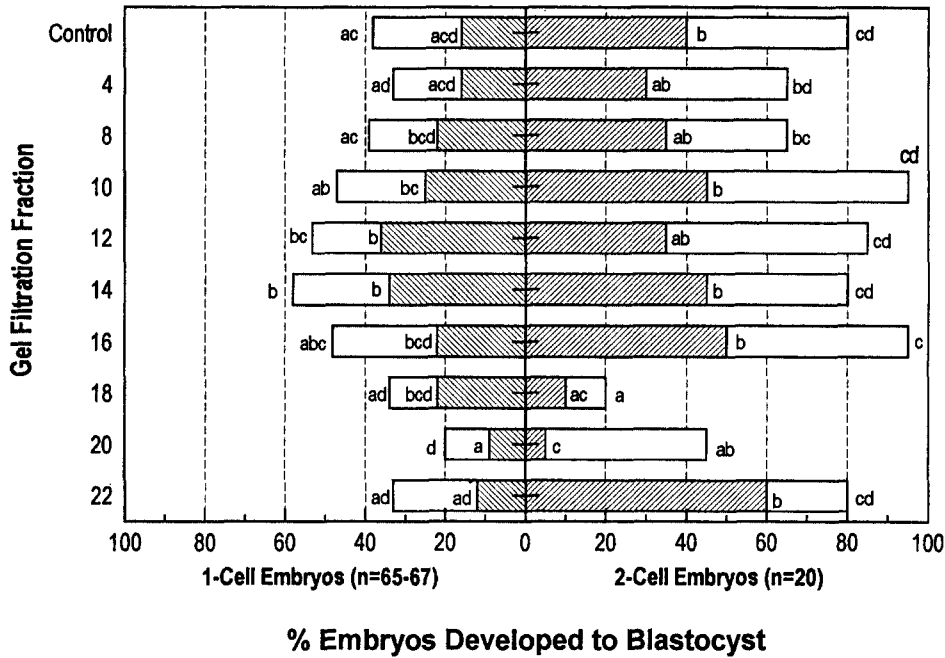


Fig. 3. Effect of FBS fractions separated by gel filtration on the development of mouse 1- and 2-cell embryos fertilized *in vitro*. The eluted fractions were used as culture medium(abc or abcd : percentages within each experiment with superscripts not in common are significantly different, $p < 0.05$; □ & ▨ : % expanded blastocyst at the day 4; ▩ : % hatched blastocyst at the day 6; Control : m-KRB medium only).

의 체외발생을 억제시키는 물질이 함유되어 있다는 사실을 확인할 수 있으며, 이 물질은 분자량이 매우 작은 것(3 kDa 이하)임을 알 수 있었다.

결론적으로 ultrafiltration과 gel filtration방법으로 분리된 분획들이 생쥐 1 세포 및 2 세포 수정란의 체외발생에 미치는 효과를 관찰한 결과, 혈청에는 1, 2 세포 수정란의 체외발생을 억제하는 성분이 함유되어 있음을 확인할 수 있었으며, 이 성분의 분자량은 3 kDa 이하라는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 이 성분은 소량으로도 1 세포 수정란의 발생을 억제시키는 효과가 있으며, 이 성분은 주로 2-4세포로의 발생과정에서 수정란에 영향을 미치는 특성을 가지고 있었다. 그리고 이 성분이 수정란의 발생을 억제하는 작용은 일반적으로 수정란의 배양환경을 개선시키는 것으로 알려진 혈청 단백질, 특히 알부

민이 존재하여도 가능하였으므로 이 성분은 단백질과는 다른 메카니즘으로 수정란에 영향을 미친다고 볼 수 있다. 또한 gel filtration 분획의 실험에서 분획 14 부위에서 알부민 분획(분획 10)보다도 수정란의 발생율이 유의적으로 높게 나타난 결과는 알부민 이외에 분자량 30 kDa 내외의 인자가 수정란의 초기발생과 부화에 촉진효과를 줄 수 있다는 가능성을 시사하고 있다.

고 찰

포유동물의 체세포와 난자(또는 수정란) 체외배양에서 혈청은 가장 오랫동안 가장 일반적으로 사용되고 있는 배양액 첨가제이다. 혈청을 배양액에 첨가하는 주된 이유는 첫째, 단백질(protein sour-

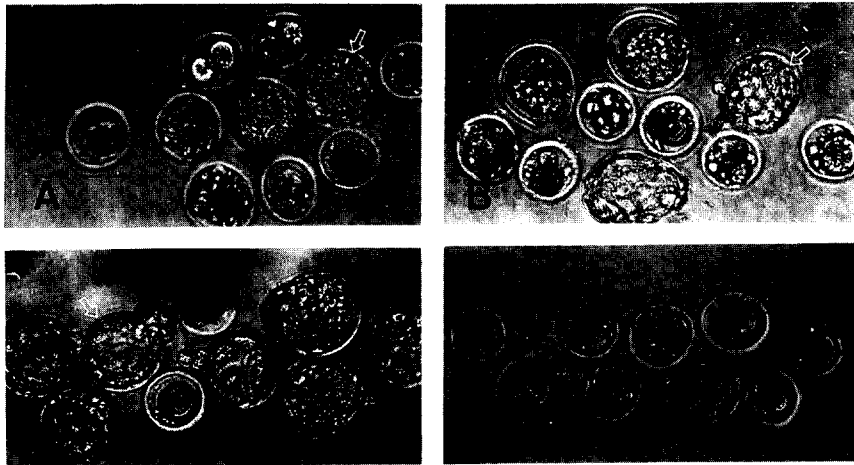


Fig. 4. *In vitro* development of mouse 1-cell embryos cultured in m-KRB medium with gel filtration fractions of FBS(A: control, B: Fraction 8, C: Fraction 14, D: Fraction 20).

ce)의 공급이며, 둘째, 미지인자(unknown factor)의 역할 때문이다.

첫번째 이유로서 혈청에 함유된 단백질은 수정란에 직접적으로 작용(대사기질 공급)하여 발생을 촉진시키거나, 간접적으로 배양환경으로부터 수정란을 보호(완충, 미세환경 microenvironment 개선)함으로써 수정란의 고유한 능력을 촉진시키는 것으로 간주되고 있다. 혈청의 이러한 역할은 혈청으로부터 정제된 알부민(예, serum albumin)으로 대체될 수도 있으며, 실제로 수정란의 체외배양에서 알부민이 많이 이용되고 있다. 최근에는 인간의 체외수정과 동물의 체외수정 프로그램에서 혈청을 탈피하려는 경향이 높아지고 있다(Menezo 등, 1984; Shirley 등, 1985; Leveille 등, 1992). 이러한 경향은 혈청이 수정란의 체외발생을 억제시키는 물질을 함유하고 있으리라는 일부 연구 결과(Menezo 등, 1984; Saito 등, 1984)에 큰 영향을 받고 있다. 그러나 체외에서 난자의 성숙이나 배반포의 부화에는 알부민이 혈청으로 대체되기에는 한계가 있으며(Hsu, 1980; 정 등, 1990; Pinyopummintr와 Bayister, 1991; Harper와 Brackett, 1993; Kim 등, 1993), 아직까지도 동물과 인간의 체외수정 프로그램(난자의 체외성숙과 발생이 필요한 프로그

램)에서는 혈청이 필수적인 첨가제로 이용되고 있다(Yeung 등, 1992). 이와 같이 배양액에 혈청을 첨가하지 않을 수 없는 것은 혈청 내에 난자 성숙과 수정란 발생을 촉진시키는 어떤 인자(미지인자)가 함유되어 있기 때문이다. 이것이 배양액에 혈청을 첨가하는 두번째 이유이다.

이상의 사실들을 근거로 할 때 혈청에는 난자(또는 수정란)의 발생을 억제시키는 인자(들)와 촉진시키는 인자(들)가 병존하고 있음을 알 수 있다. 따라서 혈청은 이질성 물질들의 복합체(complex of heterogeneous materials)로 간주할 수 있으며, 이 복합체를 효율적으로 이용하기란 쉬운 일이 아님을 알 수 있다. 그러나 본 연구자들은 혈청 내에 함유된 발생억제인자(들)를 제거함으로써 혈청을 매우 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 판단을 내렸다.

발생억제인자(들)를 효율적으로 제거하기 위한 수단으로 한외여과법(ultrafiltration)과 gel filtration법을 동시에 이용하였다. 두 분리방법에 의한 결과는 상당히 일치하였으며, 발생억제인자는 분자량이 극히 작은 물질(3 KDa 이하)이라는 사실을 확인할 수 있었다. 특히, 본 연구에서는 발생과정에서 가장 민감한 단계로 간주할 수 있는 초기 전핵기 1 세포 수정란(early pronuclear 1-cell em-

bryo)을 이용하였으며, 더욱 체외수정이 아니라 체외수정된 수정란을 이용하였기에 혈청의 발생억제 효과는 명확히 나타났다. 그리고 두 분리방법에서 모두 발생억제인자가 함유된 것으로 판정된 분획은 수정란의 발생을 근원적으로 억제시킨 것으로 보아 Saito 등(1984)과 Millham 등(1994)보다도 더욱 명확히 이 인자(들)의 존재를 입증할 수 있었다.

발생억제인자는 소량으로도 1 세포 수정란의 체외발생을 억제시키는 효과가 있었으며, 혈청 내의 단백질에 의해 그 억제효과가 약화되거나 무능화되지 않는 특성을 가지고 있었다. 그러나 이 물질의 생화학적 특성을 밝히기 위해서는 또 다른 연구가 필요하다고 생각된다. 본 연구에서 주목할 만한 관찰결과는 억제인자가 함유된 분획을 제외한 다른 분획에서는 그 첨가 농도를 50%까지 높여도 발생억제효과가 일어나지 않았다는 것으로, 사용한 두 가지 분리방법 중 어느 방법으로도 이 억제인자의 효율적인 분리가 가능하다는 점이다. 또 하나의 흥미로운 결과는 gel filtration 분획 중 분자량이 30~10 kDa 정도인 분획 14 주변에서 1 세포의 팽윤배반포로의 발생이 유의하게 증가하고 있다는 점이다. 이 결과는 알부민 이외에도 30 kDa 내외의 인자가 수정란의 초기발생을 촉진할 것이라는 가능성을 시사하는 것으로서, Hsu(1980)가 알부민 이외의 혈청성분이 수정란의 부화에 필요할 것이라는 제안을 뒷받침하는 것이었다. 그러므로 본 연구에서 사용한 방법으로 혈청을 분리하고 억제효과가 있는 분획을 제외한 재조합혈청을 동물과 인간의 체외수정과 이식 프로그램에 사용할 경우, 수정란의 발생에 촉진효과가 있는 혈청 내 각종 미지인자의 효율적인 이용이 가능하리라 생각되며, 특히 동물(젖소) 체외수정 프로그램에서 morula stage에서의 발생 중단율이 높은 long term culture의 문제점을 개선하는데도 도움이 될 수 있으리라고 생각된다.

적 요

본 연구는 체외수정 프로그램에서 많이 이용하고 있는 혈청을 분자량에 따라서 분획화하여, 각 분획이 생쥐 체외수정란의 발생에 미치는 억제, 또는 촉진효과를 구명함으로써, 재조합된 혈청이 수정란의

체외배양에 효율적으로 이용될 수 있는 방법을 모색하는데 그 목적이 있었다. 이를 위하여 FBS를 두 가지 방법(ultrafiltration 및 gel filtration)으로 각각 분획화하였으며, 그 분획물을 m-KRB 배양액에 첨가하여 생쥐 1, 2 세포 체외수정란을 배양하고 발생율(팽윤배반포, 부화배반포 비율)을 각 처리군간에 비교하였다.

그 결과 분자량이 3 kDa 이하의 분획에서 1, 2 세포 수정란 모두에 대해 유의한 발생억제 효과가 나타났다. 특히 이 분획은 1 세포 수정란에 대하여 보다 강력한 억제효과가 있었으며, 주로 2~4세포로의 발생과정을 억제하는 특성을 보였다. 더우기 이 억제인자는 혈청성분 중 30 kDa 이상의 다른 단백질성분의 존재와는 무관하게, 그리고 소량으로도 수정란 발생을 억제하였다. 반면에 100~30 kDa 분획은 수정란의 발생을 촉진시키는 효과가 있었으며, 그 첨가 농도를 50%까지 증가시켰을 경우에도 수정란의 발생율은 전혀 감소하지 않았다. 한편 gel filtration분획을 사용한 실험에서는 알부민 분획과는 다른 분자량 30 kDa 내외의 혈청성분이 수정란의 발생을 촉진하는 것으로 관찰되었다. 이와 같은 연구결과로 FBS에는 수정란의 체외발생을 억제시키는 인자와 촉진시키는 인자가 병존해 있다는 사실을 확인할 수 있었으며, 분자량에 따른 분리법으로 혈청의 발생억제인자를 제거한다면 체외수정 프로그램에서 혈청을 더욱 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 기대되었다.

참고문헌

- 문신용, 신창재, 정구민, 오선경, 방명걸, 장윤석. 1989. 생쥐 2-세포배아에 의한 시험관아기 배양용 태아제대혈청의 질적평가에 관한 연구. 대한불임학회지 16(2): 139-146.
- 정구민. 1990. 시험관아기 기술을 위한 배양시스템의 정도관리. Proceeding of The First Annual Review Course on Assisted Reproductive Technology, Seoul, 1990, pp 52-96.
- 정구민, 문신용, 오선경, 임경순, 장윤석. 1990. 배양액과 첨가제의 효율적인 품질검사에 관한 연구. 한국수정란이식연구회지 5(1): 28-41.

- 정구민, 임경순. 1991. 체액이 초기배의 발생생리에 미치는 효과에 관한 연구. I. 생쥐 1- 및 2-세포 배의 체외발생에서 배양액과 단백질원의 효과. 한국수정란이식연구회지 6(1): 33-40.
- Caro CM and Trounson A. 1984. The effect of protein on preimplantation mouse embryo development *in vitro*. J. *In Vitro* Fertil. Embryo Transfer 1(3): 183-187.
- George MA, Johnson MH and Vincent C. 1992. Use of fetal bovine serum to protect against zona hardening during preparation of mouse oocytes for cryopreservation. Human Reproduction 7(3): 408-412.
- Harper KM and Brackett BG. 1993. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. Biol. Reprod. 48: 409-416.
- Hsu Y. 1980. Embryo growth and differentiation factor in embryonic sera of mammals. Dev. Biol. 76(2): 465-474.
- Kane MT. 1985. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 73: 147-150.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture media. Biol. Reprod. 48: 1320-1325.
- Leveille MC, Carnegie J and Tanphichitr N. 1992. Effects of human sera and human serum albumin on mouse embryo culture. J. Assisted Reprod. Genet. 9(1): 45-52.
- Menezo Y. 1984. Culture media and embryo metabolism: the influence of serum addition. In *In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer, Edited by W. Feichtinger, P. Kemeter. Palermo, Cofese, 1984, pp 159.
- Menezo Y, Testart J and Perrone D. 1984. Serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture, and transfer. Fertil. Steril. 42(5): 750-755.
- Millham CN, Tornesi MB, Palasz AT and Archer J. 1994. Effect of donor bovine serum fractionation on preimplantation mouse embryos in culture. Theriogenology 41(1): 257(Abst).
- Nakagawa A, Swmple E and Leibo SP. 1994. Influence of serum sources on kinetics of nuclear maturation of bovine oocytes. Theriogenology 41(1): 264(Abst).
- Ogawa T, Ono T and Marrs RP. 1987. The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos *in vitro*. J. *In Vitro* Fert. Embryo Transfer 4(3): 153-158.
- Pinyopummintr T and Baviser BD. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro* fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. Biol. Reprod. 45: 736-742.
- Quinn P and Whittingham DG. 1982. Effect of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos *in vitro*. J. Androl. 3: 440-444.
- Saito H, Berger T, Mishell DR Jr and Marrs RP. 1984. The effect of serum fractions on embryo growth. Fertil. Steril. 41(5): 761-765.
- Sanyal NK and Naftolin F. 1983. *In vitro* development of mammalian embryo. J. Exp. Zool. 228(2): 235-251.
- Shirley B, Wortham JWE, Witmyer J, Condon-Mahoney M and Fort G. 1985. Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture media. Fertil. Steril. 43(1): 129-134.
- Wright RW Jr, Anderson GB, Cupps PT and Drost M. 1976. Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage.

Biol. Reprod. 14: 157-162.

Yeung WSB, Ho PC, Lau EYL and Chan STH.
1992. Improved development of human embryos *in vitro* by a human oviductal co-culture system. Hum. Reprod. 7: 1144-1149.