

생식보조기술시 단백질원으로서 인간난포액의 적합성 및 효율성에 관한 연구

I. 인간난포액이 생쥐난포란의 체외성숙에 미치는 효과

한나여성의원 시험관아기센터, 건국대학교 동물자원연구센터*
지희준 · 김동훈 · 김지연 · 구정진 · 장상식 · 정길생*

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

I. Effect of Human Follicular Fluid on Meiotic Maturation of Mouse Follicular Oocytes *In Vitro*

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

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

= Abstract =

For evaluating the suitability of human follicular fluid(HFF) as protein supplement in ART, this preliminary study was performed to examine the maturation promoting activity of HFF on mouse follicular oocytes *in vitro*. Mouse follicular oocytes were collected from ovaries of 21-28 day old ICR mice by puncturing the antral follicles with fine needle at 48 hours after PMSG injection. The oocytes were rinsed and cultured in modified Whittingham's T₆ medium containing purines or dbcAMP to maintain meiotic arrest, and different concentrations of HFF were added into the culture medium to examine the effect of HFF on releasing the oocytes from the suppressive influence of the meiotic inhibitors. As a control for HFF, the maturation promoting activity of human fetal cord serum(HFCS) was investigated and compared with the activity of HFF. While HFF was separated, by molecular weight(M.W), into high M.W. fraction(M.W>30,000) and low M.W. fraction(M.W<30,000) and the effects of the fractions on meiotic resumption were investigated in the presence of the meiotic inhibitors. Also hormone analysis was performed to compare the content of hormones in HFF with that in HFCS. Same concentrations of HFF and HFCS induced similar germinal vesicle break down(GVBD) rates of the oocytes meiotic arrested by purines(4mM hypoxanthine+0.75mM adenosine), but the extrusion rate of 1st polar body(PB) of the oocytes cultured in HFF(65.0%, P<0.05) was significantly higher than that(51.6%) in HFCS. While, in the presence of 200 M dbcAMP, the maturation promoting activity of HFF (GVBD: 70.5%, p<10⁻⁶; 1st PB extrusion: 67.1%, p<10⁻³) was significantly greater than that of HFCS(GVBD: 35.2%; 1st PB extrusion: 41.1%). The oocytes cultured in the fraction of HFF containing high M.W. components showed higher meiotic maturation rates than the oocytes cultured in the low M.W. fraction of HFF. Gonadotropins and E₂ were known to improve the completion of maturation changes, and the levels of these hormones were higher in HFF than in

HFCS. Therefore, HFF was more effective than HFCS to use for promoting meiotic resumption of mouse oocytes *in vitro*.

서 론

단백질원이 첨가되지 않은 배양액에서도 유사한 수정률, 배발달을 및 임신율이 보고됨으로써 단백질원 사용에 대한 부정적인 주장도 제기되었지만 (Caro and Trounson, 1986), 배발달에 필요한 고정질소공급원으로서 첨가되는 단백질원은 배양액이나 배양용기에서 유래된 독성적 중금속이온을 착화시키는 효과와 투명대 경화 방지, 그리고 부화 및 착상 이후의 배발달에 도움이 되며, 난자의 배양용기 바닥에의 부착을 방지하여 3차원적 구조를 유지시켜 배발달을 돕는 효과 (Bavister, 1981) 등 사용시 단점 보다는 장점이 많다고 하겠다. 따라서 첨가하는 단백질원은 체외배양 조건을 결정짓는 가장 중요한 요소라 해도 과언이 아니기에, 단백질원의 선택은 바로 체외배양 성적과 직결이 된다고 할 수 있다. 불임치료를 위한 생식보조기술시 난자 및 수정란의 체외배양에 사용되고 있는 단백질원은 모체혈청, 제대혈청, 혈청알부민 및 합성혈청대용물질등 다양하며 각 병원마다 독자적인 단백질원을 사용하고 있는데 이는 각 단백질원들이 개개의 장단점 및 특성을 갖고 있으며 이들의 사용에 대한 선택이 병원의 상황과 사용하는 배양액 고유의 특성 및 연구자들의 이론적 또는 실험경험적 판단등에 따라 이루어지기 때문이다. 혈청은 배발달에 필요한 다양한 영양물질, 호르몬, 성장인자등을 함유하고 있어서 (Fukui and Ono, 1989) 지금까지도 생식보조기술시 체외배양의 단백질원으로 가장 널리 이용되고 있으나, 혈청내에 중금속 (metal ion), 발열물질 (pyrogen) 등 배발달에 유해한 요소가 함유되어 있고 (Ogawa and Marrs, 1987) AIDS의 감염 위험성이 높다는 단점이 제기됨에 따라 점차 다른 단백질원으로 대체되어가고 있다. 대표적인 혈청대체제로서 인간혈청알부민 (HSA; human serum albumin, Khan et al., 1991; Ashwood et al., 1989)과 소혈청알부민 (BSA; bovine serum albumin, Benadiva et al., 1989) 등이 사용되었고 성공적인 배양성적을 거두었으나, 이들 알부민의 배양성적이 이들의 원료 (Caro and Trounson,

1984) 및 Batch (Kane, 1983)에 따라 변이가 크다는 단점이 나타났다. 이러한 혈청과 알부민의 단점은 합성혈청대체제 (Synthetic serum substitutes)의 개발을 자극하였고, Holst 등 (1990)은 합성혈청대체제 (Medicult)와 인간혈청알부민을 함께 이용하여 혈청사용때와 유사한 수정율, 배발달을 및 임신율을 얻었다고 보고하였다. 그러나 Psalti 등 (1989)은 UltroSer G라는 합성혈청대체제를 사용하였을 경우 정자의 생존율, 수정율 및 수정란의 생존율이 감소되는 상반된 결과를 얻음으로써 합성혈청대체제의 문제점이 제기되었다. 이외에도 이러한 합성혈청대체제의 높은 가격과 미확인된 조성성분이 단점으로 지적되고 있다. 한편 또 다른 단백질원으로서 성숙난포에서 채취한 난포액은 혈청처럼 생리적 체액으로서 그 회수가 용이하고 채취한 시료간 변이가 적으며, 난자성숙 및 배발달에 도움이 되는 높은 농도의 gonadotropin (Dekel, 1988), growth factor (Earp et al., 1991) 등을 함유하고 있을 뿐 아니라, 이러한 난포액을 단백질원으로 이용할 경우, 다른 단백질원들에 비해 난자에게 최적의 배양조건이라 할 수 있는 체내조건과 가장 유사한 체외배양조건을 제공할 수 있다는 유리한 점이 있다. 따라서 본원에서는 인간난포액을 제대혈청의 대체단백질원으로 사용하고자 하였으며, 이를 위해 생쥐난자를 이용한 실험을 통해 간접적으로 난포액의 이용적합성을 검토하고자 하였다. 이에 본 연구에서는 인간난포액이 생쥐난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 인위적으로 난포란의 핵성숙을 억제시킨 후 난포액 및 제대혈청을 첨가시켜 핵성숙을 유도 시킴으로써 난포액의 핵성숙촉진효과를 제대혈청과 비교, 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 난포액 및 제대혈청의 준비

정상분만 환자의 제대로 부터 회수한 제대혈액과 생식보조기술의 난자채취과정에서 회수된 난포액 (Human follicular fluid, HFF), 제왕절개수술시 5mm 이하의 난포에서 채취한 미성숙난포액 (Human immature follicular fluid, HIMFF)은

500X g에서 15분간 원심분리하여 적혈구 및 난구세포등을 배제시킨 상층액만을 회수하였다. 회수된 제대혈청 및 난포액은 59℃에서 35분간 불활성화 시킨 후, 0.22 μ m 여과기로 여과시켜 -82℃에 냉동보관하므로써 변성의 가능성을 최소화하였다.

2. 생쥐난자의 회수 및 체외배양

본 연구에 사용된 생쥐는 3-4주령의 ICR 계통의 비교적 어린생쥐를 이용하였으며, 미성숙 난포란은 PMSG 5 IU를 주사한지 48 시간째에 적출한 난소의 난포를 예리한 바늘로 터뜨려 회수하였다. 회수된 생쥐난포란의 세척 및 체외배양을 위해 Modified Whittingham's T₂ 배양액을 사용하였다.

3. 생쥐난자의 핵성숙억제

생쥐난포란은 체외배양시 단백질원이 첨가되지 않은 기초배양액에서도 90% 이상의 자발적인 핵성숙을 나타낸다. 따라서 난포액의 생쥐난포란에 대한 핵성숙 촉진효과를 관찰하기 위해서 인위적으로 핵성숙을 억제시킴으로써 자발적인 핵성숙을 감소시켜 대조군으로서 삼았다. 인위적인 생쥐난포란의 핵성숙억제를 위하여 핵성숙억제제인 hypoxanthine, adenosine 등의 purine과 dbcAMP를 사용하였다. Hypoxanthine과 adenosine은 포유동물의 난포액내에 함유되어있는 생체내 생리화학적 핵성숙억제제이며, dbcAMP는 생체내 생화학적 생리활동의 중요한 전달자로서 작용하는, 특히 핵성숙억제에 결정적인 역할을 하는 cAMP의 유사체로서 막투과성이 용이하여 cAMP의 대체제로 사용되고있다.

4. 생쥐난자의 체외발생에 미치는 난포액의 효과

Hypoxanthine, adenosine과 dbcAMP등의 핵성숙억제제를 이용해 생쥐난포란의 자발적인 핵성숙재개를 억제시킨 후, 난포액 또는 제대혈청을

첨가하여 24 시간 동안 체외배양하면서, 배양 후 3, 24 시간째에 각각 이들의 핵막붕괴 (GVBD)와 제 1극체 방출 (1st PB extrusion)을 관찰함으로써 첨가한 난포액과 제대혈청의 생쥐난포란에 대한 체외성숙 촉진효과를 비교, 조사하였다.

5. 난포액의 분자량에 따른 분획화

난포액의 분자량에 따른 분획화를 위해 30,000 Dalton Microconcentrator (Centricon-30, Amicon Co, U.S.A.)를 이용하여 원심분리 (5,000X g, 75 min)를 실시하였으며, 분자량 30,000이상의 분획을 고분자량, 30,000이하의 분획을 저분자량 분획으로 분류하여 이들 분획간의 생쥐난자에 대한 체외성숙에 미치는 영향을 비교, 조사하였다.

6. 난포액과 제대혈청의 호르몬 함량분석

난포액과 제대혈청내에 함유되어 있는 호르몬의 농도를 비교, 조사하기 위하여 효소면역적방법 (EIA; Enzyme immuno assay)을 이용하여 호르몬 분석을 실시하였다.

7. 난포액과 제대혈청의 단백질 함량분석

난포액과 제대혈청내에 함유되어 있는 단백질의 종류 및 함유농도를 비교, 조사하기 위하여 이들 물질에 대해 전기영동을 실시하였으며, 상판화된 gel (Excel gel SDS, gradient 8-18%, Pharmacia Biotech)을 이용한 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행하였다. 전압 100V, 저항 25mA constant에서 gel running을 하였으며 silver stain방법을 이용하여 염색을 하였다.

8. 통계처리

본 연구에 대한 실험자료의 통계처리는 X² 검정을 실시하였다.

결 과

Table 1. Effects of HMFF and HFCS on meiotic maturation in the presence of purines

Treatment	No. of ovum	GVBD(%) 3h	1st PB(%) 24h
Ade.+Hypox.+50% HMFF	120	63 (52.5) ^a	78 (65.0) ^{cc}
Ade.+Hypox.+10% HMFF	126	35 (27.7) ^a	2 (1.5) ^c
Ade.+Hypox.+50% HFCS	124	68 (54.8) ^a	64 (51.6) ^{de}
Ade.+Hypox.+10% HFCS	118	33 (27.9) ^a	2 (1.6) ^d

^a; P<10⁻³, ^b;P<10⁻³, ^c;P<10⁻⁶, ^d;P<10⁻⁶, ^e;P<0.05

1. Purine의 핵성숙 억제작용하에서 난포액의 핵성숙 촉진효과

핵성숙억제 효과가 있는 adenosine과 hypoxanthine의 공동상승적인 핵성숙 억제작용을 이용해 생쥐 난포란의 핵성숙을 억제시킨 후, 단백질원으로 첨가한 난포액 (HFF)과 제대혈청 (HFCS)이 이들 난포란의 핵성숙재개에 미치는 영향을 조사하였다 (Table 1). 핵성숙억제를 위하여 사용된 adenosine과 hypoxanthine의 농도는 각각 0.75, 4 mM로서 조정하였으며, 이 농도는 생쥐난포액 내의 함유농도를 기초로 하였다.

배양 후 3시간만에 각 실험군 난포란의 핵막붕괴를 조사한 결과, 10%의 난포액과 제대혈청의 첨가군에서 각각 27.7, 27.9%의 핵막붕괴율을 나타냈으나, 50% 고농도의 난포액과 제대혈청 첨가군에서는 각각 52.5, 54.8%의 핵막붕괴율을 나타냈다. 따라서 난포액과 제대혈청 모두 첨가농도의 증가에 따른 핵막붕괴율 (GVBD %)의 증가를 보였으며, 같은 첨가농도에서의 이들 단백질원간의 핵막붕괴율에는 차이가 없었다. 배양 후 24시간만에 관찰된 제 1극체 방출 역시 단백질원들의 첨가농도에 따라 비례적으로 증가하였고, 특히 50% 난포액 첨가군에서의 제 1극체 방출율 (65.0%)은 같은 농도의 제대혈청 첨가군에

서의 방출율 (51.5%) 보다 유의하게 높은 결과를 나타냈다.

2. Dibutyryl cAMP의 핵성숙 억제작용하에서 난포액의 핵성숙 촉진효과

한편 다른 핵성숙 억제제인 1mM, 200 μ M의 dbcAMP를 이용하여 핵성숙을 억제시킨 후, 난포액과 제대혈청을 첨가하였을 때 핵성숙재개에 미치는 효과를 비교, 조사하였다 (Table 2).

핵성숙을 1mM 농도의 dbcAMP로 억제시켰을 때, 첨가된 50%의 난포액과 제대혈청 모두 핵성숙재개에 아무런 영향을 미치지 못하였다. 이는 1mM dbcAMP의 핵성숙 억제작용이 50%의 난포액 또는 제대혈청의 핵성숙 촉진작용 보다 강해서 나타난 결과라 사료된다. 한편 dbcAMP농도를 200 μ M로 낮추고, 반면 난포액과 제대혈청 농도를 90%로 상향조정하여 첨가하였을 때 난포액 첨가군에서의 핵막붕괴 (70.5%) 및 제 1극체 방출율 (67.1%)이 제대혈청 첨가군의 핵막붕괴 (35.2%) 및 제 1극체 방출율 (41.1%)에 비해 유의하게 높은 결과를 나타냈다.

3. 분자량에 따라 분리된 난포액 분획의 핵성숙 촉진효과

실험을 통해 확인된 난포액의 핵성숙 촉진작

Table 2. Effects of HFCS and HMFF on meiotic maturation of mouse oocytes in the presence of dbcAMP

Treatment	No. of ovum	GVBD(%) 3h	1st PB(%) 24h	GV(%) 24h
Control	98	90 (91.8)	94 (95.9)	0 (0.0)
dbcAMP 1mM	85	0 (0.0)	0 (0.0)	85 (100)
+HMFF 50%	85	1 (1.1)	2 (2.3)	83 (97.6)
+HFCS 50%	80	0 (0.0)	1 (1.2)	79 (98.7)
dbcAMP 200 μ M	118	29 (24.5) ^a	38 (32.2) ^c	75 (63.5)
+HMFF 90%	102	72 (70.5) ^b	69 (67.1) ^d	6 (5.8)
+HFCS 90%	102	36 (35.2) ^c	42 (41.1) ^c	42 (41.1)

^{ab}; P<10⁻⁶, ^{cd};P<10⁻³

Table 3. Effect of fractions of HMFF separated by molecular weight on meiotic maturation inhibited by meiotic inhibitors

Treatment	No. of ovum	GVBD(%) 3h	1st PB(%) 24h	GV(%) 24h
Hypoxanthine 3mM	97	51 (52.5)	55 (56.7) ^c	38 (39.1)
+High M.W (25%)	98	59 (60.2)	70 (71.4) ^{cd}	10 (10.2)
+Low M.W (25%)	126	64 (50.7)	55 (43.6) ^d	48 (38.0)
dbcAMP 200 μ M	90	24 (26.6) ^a	22 (24.4) ^c	68 (75.5)
+High M.W (25%)	108	57 (52.7) ^{ab}	72 (66.6) ^c	0 (0.0)
+Low M.W (25%)	120	54 (45.0) ^b	24 (20.0) ^e	54 (45.0)

^a; P<10⁻³, ^b;P<0.01, ^c;P<0.05, ^d;P<10⁻⁴, ^e;P<10⁻⁶

용이 난포액내 고분자량 또는 저분자량 물질에 의존적인지를 확인하기 위해 난포액을 분자량 3만 이상과 이하의 분획으로 분리한 후, 25%의 농도로 첨가하였을 때 이들 분획이 핵성숙이 억제된 생쥐난포란의 핵성숙억제에 미치는 효과를 비교, 조사하였다 (Table 3).

3mM hypoxanthine의 핵성숙 억제작용하에서 저분자량 분획첨가군에서의 핵성숙을 (GVBD: 50.7%, 1st PB: 43.6%)에 비해 고분자량 분획첨가군에서의 핵성숙을 (GVBD: 60.2%, 1st PB: 71.4%)이 높은 결과를 나타냈다. 또한 200 μ M dbcAMP의 핵성숙 억제작용하에서도 고분자량 분획첨가군과 저분자량 분획첨가군에서의 핵막 붕괴 및 제 1극체 방출율이 각각 52.7, 66.6%와 45.0, 20.0%를 나타냄으로써 고분자량 분획첨가군에서의 핵성숙율이 유의하게 높게 나타났다.

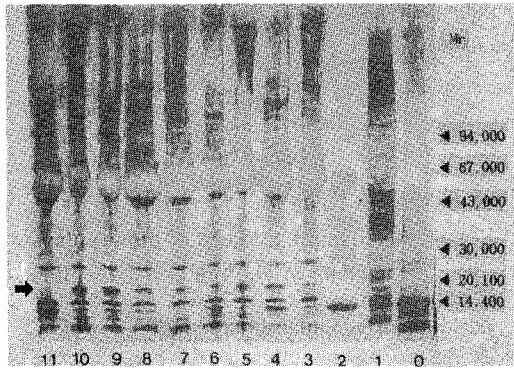


Fig. 1. Gel electrophoresis of HFCS and HFF. SDS-PAGE was runned at 100V, 25mA constant and the gel was stained with silver. The arrow indicates absence of the band having 20,100 dalton in HFCS. Line 0: Marker, 1: PDE, 2:L Catalase, 3: HIMFF-1, 4: HIMFF-2, 5: HFF-1, 6: HFF-2, 7: HFF-3, 8: HFF-4, 9: HFF-5, 10: HFF-6, 11: HFCS.

4. 난포액과 제대혈청의 호르몬 함유농도 분석

난포액과 제대혈청내에 함유되어 있는 호르몬의 농도를 비교, 조사하기 위하여 호르몬 분석을 실시하였다 (Table 4).

난포액과 제대혈청내의 호르몬 함량을 조사한 결과, prolactin을 제외한 Gonadotropin과 steroids hormone이 제대혈청 보다 난포액내에 유의하게 높은 농도로 함유되어 있음을 확인하였다.

5. 난포액과 제대혈청의 단백질 함량분석

난포액과 제대혈청내의 단백질 함량을 비교, 조사하기 위하여 이 두 물질에 대해 전기영동을 실시하였다 (Fig. 1).

난포액과 제대혈청에 대한 전기영동을 실시한 결과, 전체적인 단백질의 종류 및 함량에서 두 물질이 유사한 함유농도를 나타냈다. 그러나 제대혈청에서는 발견되지않는 분자량 약 20,100의 band가 난포액에서만 특이적으로 나타났다. 비록 이 band에 나타난 물질이 어떤 물질인지는 아직 규명되지 않았지만 제대혈청과 난포액간의 핵성숙촉진효과의 차이를 나타내게한 원인물질의 하나일 가능성은 높다고 사료된다.

고 찰

본 연구에 핵성숙억제제로 사용된 hypoxanthine은 purine중에서 대표적인 핵성숙억제제로서 (Downs et al., 1985) 인정되고 있으며, cAMP를 가수분해시키는 효소인 phosphodiesterase의 작용을 방해하여 세포내 cAMP수준을 유지시킴으로써 핵성숙억제에 관여하며, adenosine은 cAMP의 생산에 관여하는 adenylate cyclase의 전구물질로서 작용

Table 4. Concentrations of hormones in HMFF and HFCS

Sample (ml)	E ₂ (ng)	LH (mIU)	FSH (mIU)	Testo. (ng)	P ₄ (ng)	PRL (ng)
HFCS 1	7.2	15.8	<2.5 *	1.5	546.7	71.0
HFCS 2	11.9	19.5	<2.5 *	1.9	448.4	45.3
HFCS 3	10.3	24.4	<2.5 *	1.7	>800 *	50.6
Mean	9.8	19.9	<2.5 *	1.7	>598.3 *	55.6
HMFF 1	598.4	40.0	4.53	9.8	>800 *	39.8
HMFF 2	>1000 *	24.1	4.24	15.3	>800 *	42.4
HMFF 3	771.2	44.0	3.61	14.6	>800 *	42.2
Mean	789.8	36.0	4.12	13.2	>800 *	41.4

E₂; estradiol, LH; luteinizing hormone, FSH; follicle stimulating hormone, Testo.; testosterone, P₄; progesterone, PRL; prolactin, *; Unidentified

한다고 알려져 있다(Eppig et al., 1985). 한편 dbcAMP는 cAMP의 유사체로서 막투과성이 용이하여 cAMP의 대체제로 널리 사용되고있다(Cho et al., 1974). 이와 같이 서로 밀접한 연관성을 지닌 핵성숙 억제제들을 이용하여 핵성숙의 억제를 유지시킨 후 첨가한 난포액과 제대혈청이 이들 난자의 핵성숙재개에 미치는 영향을 비교, 조사함으로써 난포액의 단백질원으로서의 적합성을 검토하고자 하였다. Table 1,2에 제시한 바와 같이 난포액, 제대혈청 모두 핵성숙억제제의 억제작용하에서도 생쥐난포란의 핵성숙을 일으키는 핵성숙 촉진효과를 나타냈다. 이러한 결과는 본 연구에 사용된 난포액이 LH surge의 영향을 받아 성숙된 수정적기의 metaphase II 단계의 난자를 함유하고 있었던 배란직전의 난포로부터 회수한 난포액이므로, Tsafiri와 Channing(1975)이 보고한 성숙난포의 난포액내에는 핵성숙 촉진물질이 함유되어 있으며 이들의 함유농도는 LH surge후에 정점에 이른다는 연구결과와 일치한다고 하겠다. 또한 혈청내에도 난자의 핵성숙을 조절하는데 관여하는 다양한 영양물질, 호르몬, 성장인자를 함유하고 있다는 보고(Vanderhyden and Armstrong, 1989; Fukui and Ono, 1989; Ramasharma et al., 1986)들 역시 제대혈청의 핵성숙촉진작용을 뒷받침 해주고있다. 한편 purine의 핵성숙 억제작용을 감소시키는데 있어서 난포액과 제대혈청간에 차이가 나타나지 않았으나, dbcAMP의 핵성숙 억제작용을 감소시키는데 있어서는 난포액이 제대혈청에 비해 유의한 효과를 나타냈다 (Table 2). 또한 이러한 난포액의 핵성숙 촉진효과가 난포액의 구성성분중 저분자량의 물질 보다는 고분자량의 물질에 의존적이라는 결과 (Table 3)를 얻었는데, 이는 난포액내 분자량 10,000 이하의 저분자량 물질은 핵성숙억제작용을 나타내며, 특히 분자량 3,000이하의 물질들이 결정적인 역할을 한다는 보고(Downs et al., 1985)와 일치한다고 하겠다. 또한 이러한 결과들은 dbcAMP의 작용을 방해하거나 감소시키는 물질이 제대혈청에 비해 난포액내에 높은 농도로 함유되어 있다는 가능성을 제시하는 것이며, 이러한 가능성은 gonadotropin(Dekel and Beers, 1978), phosphodiesterase (Bornslaeger et al., 1984; not-published our data) 및 growth factor (Downs,1989; Kalmalini et al., 1991; Guidice et al., 1990)등 핵성숙촉진작용을 나타내는 물질들이

난포액내에 높은 농도로 함유되어 있으며 (Artini et al., 1994; Kubota et al., 1993) 이들 물질 모두 고분자량의 단백질이라는 보고에 의해 뒷받침되고있다. 이러한 가능성에 더욱 접근하기 위해 난포액과 제대혈청의 호르몬 농도를 분석, 비교한 결과 prolactin을 제외한 gonadotropin, steroid 호르몬 모두 난포액내 함유농도가 높은 것으로 나타났으며 특히 난자의 성숙완성에 필수적인 gonadotropin과 E₂ (Lindsey and channing, 1979)등의 난포액내 농도가 현저하게 높았다. 또한 전기영동을 통해 난포액과 제대혈청간 단백질의 종류 및 농도를 비교한 결과, 분자량 약 20, 100에서 난포액에서만 특이적으로 함유되어 있는 단백질을 확인하였으며 이러한 물질이 핵성숙촉진작용에 있어서 제대혈청과 난포액 사이에 나타나는 차이의 원인물질일 가능성은 높다고 생각된다.

결 론

본 연구는 인간의 생식보조술시 단백질원으로서 사용하였던 제대혈청의 대체물질로서 난포액의 적합성을 검토하기 위한 실험으로서 난포액이 생쥐난포란의 체외성숙에 미치는 효과를 조사하고자 수행하였다. 제대혈청과 난포액의 핵성숙촉진효과를 비교, 조사한 결과는 다음과 같다.

1. Purine의 핵성숙 억제작용하에서 같은 농도(50%)의 제대혈청, 난포액은 서로 유사한 핵막붕괴율(54.8, 52.5%)을 나타내었으나, 제 1극체 방출에 있어서는 제대혈청(51.6%)에 비해 난포액이 유의하게 높은 결과(65.0%, $p < 0.05$)를 나타내었다.

2. 200 μ M dbcAMP의 핵성숙 억제작용하에서는 난포액 첨가군에서의 핵막붕괴(70.5%, $p < 10^{-6}$) 및 제 1극체 방출율(67.1%, $p < 10^{-3}$)이 제대혈청 첨가군에서의 핵막붕괴(35.2%) 및 제 1극체 방출율(41.1%) 보다 유의하게 높은 결과를 나타냈다.

3. 200 μ M dbcAMP의 핵성숙억제작용하에서, 난포액의 핵성숙촉진효과는 분자량 30,000이상의 고분자물질분획첨가군(핵막붕괴율; 52.7%, $p < 0.01$, 제 1극체 방출율; 66.6%, $p < 10^{-6}$)에서 30,000 이하의 저분자물질첨가군(핵막붕괴율; 45.0%, 제 1극체 방출율; 20.0%)에 비해 유의하게 높은 결과를 나타냄으로써 난포액의 핵성숙촉진

효과가 난포액내 고분자함유물질등에 의존적이라는 것을 확인하였다.

4. 난포액내에는 제대혈청에 비해 난자의 체외 성숙 및 발달에 도움이 된다고 알려진 gonadotropin과 E₂등의 호르몬들이 보다 높은 농도로 함유되어있음이 관찰되었다.

5. 난포액내에는 제대혈청에는 존재하지 않는 특이적인 단백질이 함유되어 있음이 확인되었으며, 이 물질은 분자량 약 20,100의 Band상에서 관찰되었다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 인간난포액은 생쥐난자의 체외성숙 있어서 제대혈청 보다 유용한 단백질원이라는 것이 확인되었으며 제대혈청에 비해 난자의 체외발달 및 착상에 도움이 되는 많은 유용한 물질들이 보다 높은 농도로 함유되어 있다는 점에서, 제대혈청의 대체물질로서의 이용가능성을 확인하였다.

인 용 문 헌

- Artini PG, Battaglia C, Ambrogio GD, Barreca A, Droghini F, Volpe A, Genazzani AR: Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Hum Reprod* 1994, 9-5, 902-906.
- Ashwood-Smith MJ, Hollands P, Edwards RG: The use of albumin 5(TM) as a medium supplement in clinical IVF. *Hum Reprod* 1989, 4, 702-707
- Bavister BD: Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool* 1981, 217, 45-51.
- Benadiva CA, Kuczynski-Brown B, Maguire TG, Mastroianni L Jr, Flickinger GL: Bovine serum albumin(BSA) can replace patient serum as a protein source in an in vitro fertilization(IVF) program. *JIVET* 1989, 6, 164-168.
- Bornslaeger EA, Wilde MW, Schultz RM: Regulation of mouse oocyte maturation: involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev Biol* 1984, 105, 488-499.
- Caro CM, Trounson A: The effect of protein on preimplantation mouse embryos development in vitro. *JIVET* 1984, 1, 183-188.
- Caro CM, Trounson AO: Successful fertilization, embryo development and pregnancy in human in vitro fertilization(IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. *JIVET* 1986, 3, 215-222.
- Cho WK, Stern S, Biggers JD: Inhibitory effect of dibutyryl cyclic AMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool* 1974, 187, 383-386.
- Dekel N, Beers WH: Rat oocyte maturation in vitro: Relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75, 4369-4373.
- Downs SM, Colaman DL, Ward-Baily PF, Eppig JJ: Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation: A low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82, 454-458.
- Downs SM: Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biol Reprod* 1989, 41, 371-379.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL: Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: Concentration and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod* 1985, 33, 1041-1049.
- Fukui Y, Ono H: Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1989, 86, 501-506.
- Guidice LA, Farrell EM, Pham H, Rosenfeld RG: Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3(IGFBP-3) and IGFBP-2 in human follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 71, 1330-1338.
- Holst N, Bertheussen K, Forsdahl F, Hakonsen M, Hansen LJ, Nielsen HI: Optimization and simplification of culture conditions in human in vitro fertilization(IVF) and preembryo replacement by serum-free media. *JIVET* 1990, 7, 47-55.
- Kalmalini D, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR, Leung BS: Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic

- maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* 1991, 55, 1000-1004.
- Kane MT: Variability in different lots of commercial bovine serum albumin affects cell multiplication and hatching of rabbit blastocyst in culture. *J Reprod Fertil* 1983, 69, 555-601.
- Khan I, Staessen C, Devroey P, Van Steirteghem AC: Human serum albumin versus serum: a comparative study on embryo transfer medium. *Fertil Steril* 1991, 56, 98-103.
- Kubota T, Kamada S, Ohara M, Taguchi M, Sakamoto S, Shimizu Y, Aso T: Insulin-like growth factor II in follicular fluid of the patients with in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1993, 59-4, 844-849.
- Lindsey AM, Channing CP: Influence of follicular maturation upon the effects of ovine follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclicAMP accumulation of porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1979, 20, 473-482.
- Ogawa T, Marrs RP: The effect of protein supplement on single-cell mouse embryos in vitro. *Fertil Steril* 1987, 47, 156-162.
- Psalti I, Loumaye E, Pensis M, Depreester S, Thomas K: Evaluation of a synthetic serum substitute to replace fetal cord serum for human oocyte fertilization and embryo growth in vitro. *Fertil Steril* 1989, 52, 807-812.
- Ralt D, Godenberg M, Fetterolf P, Thompson D, Dor J, Mashiach S: Sperm attraction to a follicular factors correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88, 2840-2844.
- Ramasharma K, Cabrera CM, Li CH: Identification of insulin like growth factor II in human seminal and follicular fluids. *Biochem Biophys Res Commun* 1986, 140, 536-542.
- Tsafiri A, Channing CP: An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. *Endocrinology* 1975, 96, 922-927.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT: Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod* 1989, 40, 720-728.
-