

## 소 수란관내액에 의한 생쥐 포배의 외성장 억제 현상

이영희 · 안정원 · 김해권

서울여자대학교 자연과학대학 생물학과

### **Bovine Oviductal Fluid Does Not Support The Outgrowth of Mouse Blastocysts *In Vitro***

Lee, Y. H., J. W. Ahn and H. K. Kim

Department of Biology, Seoul Women's University

#### SUMMARY

While tubal pregnancy is frequently observed in human, it has been reported to rarely occur in other mammals. To investigate the reason of the absence of tubal pregnancy in other mammals, the ability of bovine tubal(oviductal) fluid to support the outgrowth of mouse embryos was examined by using an *in vitro* model system wherein the trophoblast cells of hatched mouse blastocysts attach to and outgrow on tissue culture plates coated with FBS. When mouse blastocysts grown *in vitro* from 2-cell embryos were cultured in the presence of various body fluids, 80.0%, 76.4% and 66.7% of embryos cultured in the dishes coated with FBS, human follicular fluid(hFF) and bovine follicular fluid(bFF), respectively, underwent outgrowth by spreading onto the plastic dishes during 48 hr. In contrast, none of the embryos cultured in the dishes coated with BSA or bovine oviductal fluid(bOF) did outgrow but remained as late blastocysts. Since addition of bOF at 5mg/ml or higher conc. to the culture medium resulted in degeneration of all embryos during 48 hr culture, 10mM conc. of glutathione(GSH) was added to the bOF-containing medium to circumvent the toxicity of bOF. In addition, bOF was heated 65°C for 30 min(hbOF) to get rid of its precipitating properties and then added to the culture medium. When blastocysts were cultured in the presence of both hbOF and GSH, 45.4% of embryos attached to the culture dishes. However, none of these embryos underwent outgrowth. Finally embryos were cultured in the presence of both hbOF and GSH but in the dishes coated with FBS. When they were examined after 48 hr, all of the blastocysts exhibited well-developed outgrowth.

Based upon these results, it is concluded that bovine oviductal fluid is capable of supporting the attachment of mouse blastocysts onto the culture plate whereas it cannot promote the outgrowth of mouse blastocysts *in vitro*, probably due to the lack of outgrowth-inducing factor.

(Key words : Oviduct, Blastocyst, bOF, Outgrowth, Tubal pregnancy)

## I. 서론

포유류의 개체 발생은 암컷의 수란관에서 정자와 난자의 수정에 의해 시작이 되며 수정된 난자는 자궁 내로 진입해 착상을 함으로써 후기발생을 이루게 된다. 대부분의 포유동물의 수정된 난자는 수란관 내에서 3~4회의 난할을 거쳐 대략 8~16개의 할구로 구성되는 상실배가 되면 자궁 내로 이동하여 난할을 계속한다. 그 결과 강소(blastocoel)를 갖는 포배가 되고 이때 자신을 둘러싸고 있는 투명대(zona pellucida)로부터 벗어나는 탈각(hatching)을 일으키면 자궁내막 조직에 착상(implantation)할 준비를 갖추게 된다. 한편 소, 말, 돼지 등의 유제류를 제외한 대부분의 포유류의 자궁조직은 포배로 발생한 배아가 자궁 내에 착상할 수 있도록 자궁내막세포의 수적인 증가, 세포와 세포사이의 extracellular matrix(ECM)의 축적, 그리고 결합조직의 형성을 위한 혈관 및 림프관의 발달 등 구조적으로 배아를 받아들일 환경을 갖추게 되며 이 같은 구조변화를 진행한 자궁만이 자궁내막에 정착(attachment)한 포배의 성공적인 후기발생을 가능하게 한다.

사람의 경우 정상적인 임신이 진행되는 자궁 외에도 난관, 난소, 복강 등에서 배아의 착상이 일어나는 자궁 외 임신 현상이 빈번히 나타나는데 달리 영장류 이하의 포유동물(infraprimates)에서는 이 같은 자궁 외 임신이 거의 나타나지 않는다(Hunter, 1988; Tutton과 Carr, 1984). 비록 이들 동물의 포배를 자궁 이외의 조직에 인위적으로 이식시켜 줄 경우 포배는 자궁 내에서와 유사한 착상현상을 일으키지만 이 경우에도 수란관 내에서는 착상을 일으키지 않는다(Bronson과 Cunnane, 1975). 또한 생쥐 배아를 수란관에 넣어 기관배양을 하거나(Adams, 1973), 교미 직후의 생쥐 암컷의 수란관을 묶어 배아를 자궁 내로 진입하지 못하게 할 경우 수정란은 정상적인 배발생을 하여 포배로까지 발생하나 이들 포배는 결코 수란관에 착상을 하지 않는다(Tutton과 Carr, 1984)고 알려져 있다. 이에 대한 원인은 아직 밝혀지지 않고 있으나 토끼의 수란관을 재료로 하여 연구한 결과에 의하면 수란관이란 환경이 일종의 착상억제와 같은 역할을 하는 것으로 제안된 바 있다(Pauerstein 등, 1990).

본 연구에서는 생쥐 포배와 소의 수란관내액을 재료로 하여 수란관내에서 착상이 일어나지 않는 원인을 규명하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 생쥐 포배의 채취

본 실험에 사용한 실험동물은 서울대학교 실험동물 사육실에서 사육된 생쥐로 암컷은 생후 8주 이상 그리고 수컷은 생후 12주 이상된, 생식능력이 있는 것들을 사용하였다.

생쥐 포배는 다음과 같이 준비하였다. 생후 8주 이상된 생쥐 암컷에 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Folligon, Intervet)과 human chorionic gonadotropin(hCG; Sigma)을 48시간 간격으로 각각 5 i.u. 씩 복강에 주사하여 과배란을 유도하고 수컷과 합사시켰다. 다음날 아침 vaginal plug가 확인된 것만을 골라서 따로 분리, 사육한 후 hCG 주사 후 48시간째에 수란관을 적출하여 해부현미경(Olympus, SZH) 아래에서 30 gauge 주사침이 달린 주사기내에 0.4% polyvinylpyrrolidone(PVP)이 들어있는 Dulbecco's phosphate buffered saline(PBS)을 넣어 수란관을 씻어 내리는 방법으로 생쥐의 2세포 배아를 수집하였다. 수집된 배아 중 건강한 2-세포 배아만을 골라 0.4% bovine serum albumin(BSA)이 첨가된 T6(Quinn, 1982) 혹은 minimum essential medium(MEM; Gibco)이 들어있는 배지에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 100% 습도가 유지되는 배양기내에서 4일간 배양한 후 배아를 둘러싸고 있는 투명대로부터 완전히 탈각(hatching)을 일으킨 포배들만을 골라 실험에 사용하였다.

### 2. 소의 수란관내액(bovine oviductal fluid, BOF)의 준비

서울 마장동에 소재한 우성농역에서 제공되는 소의 수란관을 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor (SBTI), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mg/ml ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)가 첨가된 PBS로 깨끗이 씻었다. 다음 멸균된 여과지로 조직의 혈액을 제거한 후 이들을 플라스틱 배양접시(#3002, Falcon)에 올려놓고 slide

glass로 짜서 수란관의 내용물이 흘러나오게 했다. 이를 4℃, 20,000 g에서 1시간 동안 원심분리한 후 상등액을 취해 -70℃에 보관하였다. 사용시에는 이를 녹여서 다시 4℃, 20,000 g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻어 이를 수란관내액 (bOF)으로 사용하였다.

bOF를 배양액에 처리할 때에는 수란관 단백질의 최종농도가 0, 1, 2, 5 혹은 10 mg/ml이 되도록 기본배양액으로 희석하여 사용하였다. 또한 배양 중 bOF가 든 배양액의 침전 현상을 방지하기 위하여 필요에 따라 bOF를 65℃에서 30분간 가열한 후 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액 (heated bOF, hb-OF)을 bOF 대신 사용하였다.

### 3. 생쥐 포배의 체외배양

탈각이 일어난 생쥐 포배의 기본배양액으로는 0.4%의 BSA가 첨가된 MEM을 사용하였다. 96-well culture plate(Nunc)에 배양액을 각 well 당 100  $\mu$ l의 배양액을 넣은 후 탈각을 진행한 생쥐 포배를 well당 한 개씩 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub>와 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하면서 24시간마다 관찰하였다.

배양접시의 coating은 다음과 같이 행하였다. 소의 혈청 (fetal bovine serum, FBS; Gibco), 사람의 난포액 (human follicular fluid, hFF), 소의 난포액 (bovine follicular fluid, bFF), 소의 수란관내액 (bovine oviductal fluid, bOF) 등의 체액을 각각 기본배양액으로 희석하여 96-well culture plate의 well에 50  $\mu$ l씩 넣고 37℃ 배양기에서 4시간 동안 방치시킨 후 내용물을 버리고 PBS로 두 번, 기본배양액으로 한 번씩 well을 씻었다. 그런 후 여기에 포배를 넣고 배양하였다.

### 4. 화학물질의 처리

Glutathione(GSH)은 사용하기 2일 전에 MEM에 녹여 10× stock solution을 만들어 4℃에 보관하였다가 사용시 최종농도가 10 mM이 되도록 배양액에 처리하였다.

### 5. 생쥐 포배의 접착 및 outgrowth 여부의 판정

포배의 접착 여부는 Sherman과 Antienza-Samols (1978)의 방법에 따라 다음과 같이 판정하였다. 즉 배양이 끝난 포배에 모세관으로 배양액을 뽑어주는 기계

적인 자극을 주었을 때 배아가 배양접시 내에서 이동하지 않으면 접착이 일어난 것으로 판단하고, 바닥에 붙은 세포가 섬유아세포의 형태로 모양을 변화시키면 outgrowth가 일어난 것으로 간주하였다.

## 6. 단백질 정량

단백질정량은 bovine serum albumin(Pierce)을 표준단백질로 하여 bicinchoninic acid(BCA, Pierce) 방법(Smith 등, 1985)으로 측정하였다.

## 7. 실험 기구 및 시약의 준비

본 실험에 사용된 시약들은 특별히 언급한 경우 이외에는 Sigma에서 제공된 것들을 사용하였다. 실험에 사용된 기구는 120℃에서 15 lbs의 압력으로 15분간 고압멸균하여 사용하였으며 모든 배양액은 사용하기 전에 Millipore membrane (pore size; 0.2  $\mu$ m)으로 여과 멸균하여 사용하였다.

## III. 결 과

### 1. 여러 가지 체액이 생쥐 포배의 접착 및 outgrowth에 미치는 영향

여러 가지 동물의 체액인 FBS, hFF, bFF, bOF가 2 mg/ml의 단백질 농도로 각각 coating된 culture plate에 기본배양액을 넣은 후 체외에서 탈각을 진행한 시기까지 성장한 생쥐 포배를 배양하였다. 배양한 지 48시간 후 관찰한 결과 FBS, hFF, bFF로 coating된 배지에서 배양한 포배는 Table 1에서 보는 바와 같이 각각 80.0%, 76.4%, 66.7%가 배양접시의 바닥에 접착하였고 또한 접착 후 outgrowth를 일으켰으나 대조군으로 사용된 BSA 혹은 실험군인 bOF로 coating된 배지에서 배양된 포배는 전혀 바닥에 접착하지도 않았고 outgrowth도 일으키지 않았다(Fig. 1).

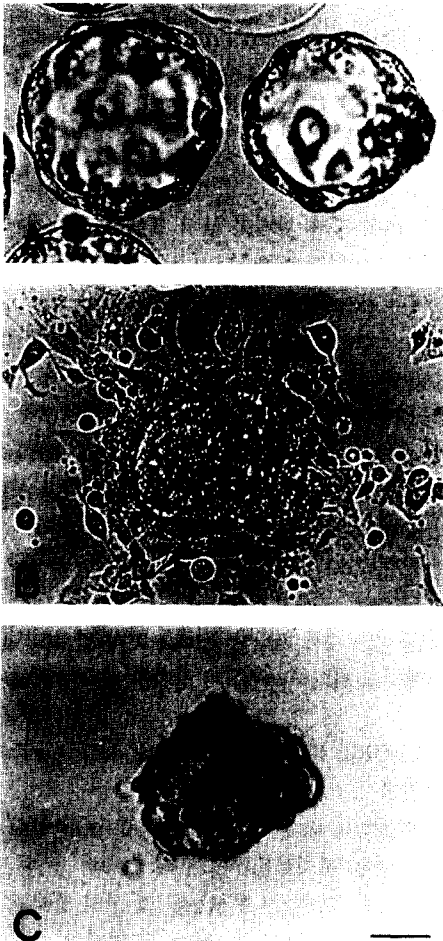
### 2. bOF가 생쥐 포배의 접착 및 outgrowth에 미치는 영향

위 실험의 결과에서 보는 것처럼 bOF가 든 배지에서는 다른 체액성분과는 달리 포배의 접착 및 outgrowth를 유도하지 못했는데 그 원인 중의 하나로써 bOF내에 접착 및 outgrowth를 억제하는 요인이 존재하는가를 조사하기 위하여 2 mg/ml의 FBS로 배

**Table 1. Outgrowth of mouse blastocysts on the culture plates coated with various body fluids**

Coating agent	No. of blastocysts examined	% Development after 48 hr*	
		LB	Outgrowing
BSA	30	100	0
FBS	30	20.0±4.7	80.0±4.7
hFF	30	23.3±2.7	76.4±2.7
bFF	30	33.3±2.7	66.7±2.7
bOF	30	100	0

\* Mouse 2-cell embryos collected at 48 hr post hCG were cultured for 4 days in MEM containing 0.4% BSA. After culture, only hatched blastocysts were harvested and cultured again for additional 2 days in plastic culture plates coated with each MEM containing 2mg/ml of BSA(bovine serum albumin), FBS(fetal bovine serum), hFF(human follicular fluid), bFF(bovine follicular fluid), or bOF(bovine oviductal fluid). At the end of culture, embryos were classified as either outgrowing ones or ones remaining as late blastocyst(LB). Experiments were done three times and the data are expressed as percentage ± SEM.



양접시를 coating한 후 기본배양액에 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml의 단백질 농도가 되도록 bOF를 첨가하여 포배를 배양하였다. 그 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 48시간 후 bOF가 첨가되지 않은 배지의 포배는 65.0%가 바닥에 접촉하여 outgrowth를 일으킨 반면, 1 mg/ml의 bOF가 첨가된 경우는 20.6%의 포배만이 outgrowth를 진행하였고, 5 mg/ml 및 10 mg/ml의 bOF가 첨가된 배양액에서는 모든 포배가 outgrowth를 일으키지 못하고 오히려 퇴화하였다 (Fig. 2). 한편 bOF가 첨가된 모든 배양액에서 침전물이 나타난 것이 관찰되었다.

### 3. 독성이 제거된 bOF가 생쥐 포배의 정착 및 outgrowth에 미치는 영향

bOF에 의한 생쥐 포배의 outgrowth 억제효과의 원인을 규명하기 위해서는 체외배양시에 나타나는

**Fig. 1. Photomicrographs of mouse blastocysts cultured for 48 hr onto the plastic plates coated with various body fluids**

A, two hatched blastocysts grown *in vitro* for 4 day from 2-cell stage; B, a blastocyst outgrowing onto a plastic petri dish coated with 2mg/ml of FBS; C, a blastocyst that failed to attach and thus failed to outgrow onto a dish coated with 2mg/ml of bOF. Scale bar represents 50 $\mu$ m.

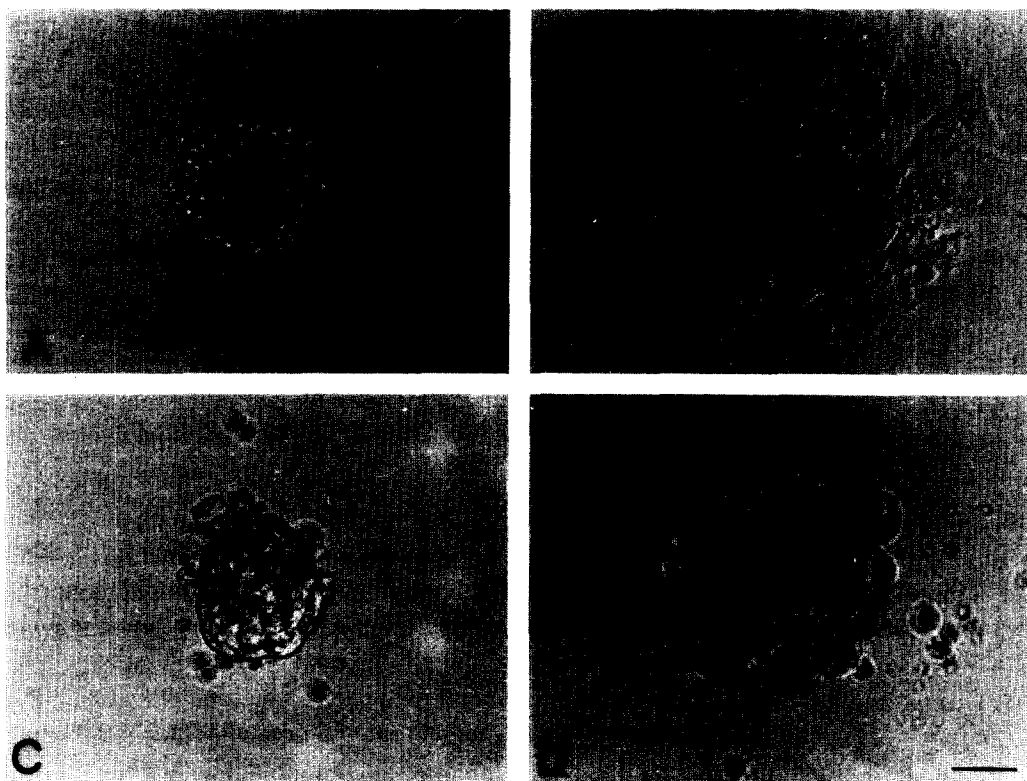
**Table 2. Outgrowth of mouse blastocysts in the presence of bovine oviductal fluid(bOF)**

Conc. of bOF(mg /ml)	No. of blastocysts examined	% Development after 48 hr*		
		LB	Outgrowing	Deg
0	30	4.2±4.2	65.0± 7.6	30.9±11.3
1	32	3.3±3.3	20.6±12.0	76.1±14.8
5	32	0	0	100
10	32	0	0	100

\* See Table 1 for the illustration. Deg, degenerated embryos.

*In vitro* grown hatched blastocysts prepared as in Table 1 were further cultured on FBS-coated dishes in the presence of 0, 1, 5 or 10 mg protein /ml of bOF. Experiments were done three times and the data are expressed as percentage ± SEM.

bOF의 독성을 제거할 필요가 있으므로 10 mM 농도의 GSH를 bOF와 함께 배양액에 첨가하였고 대조군



**Fig. 2. Photomicrographs of mouse blastocysts developed *in vitro***

A, a blastocyst cultured for 48 hr in the presence of 5mg/ml bOF; B, an outgrowing blastocyst during 48 hr culture in the presence of both 2mg/ml FBS and 10mM GSH. C, a blastocyst that failed to attach during 48 hr culture in the presence of both 4mg/ml BSA and 10mM GSH; D, a blastocyst that attached to the bottom of plastic petri dishes during 48 hr culture in the presence of both 5mg/ml bOF and 10mM GSH. Scale bar represents 50 $\mu$ m.

에도 같은 처리를 하였다(Lee 등, 1998). 또한 배양 중에 나타나는 bOF의 침전 현상을 방지하기 위하여 65°C에서 30분간 bOF를 가열하여 얻은 상등액(hbOF)을 사용하였다. 5 mg/ml 단백질 농도의 bOF와 10 mM GSH가 첨가된 기본배양액에서 포배를 배양 하면서 이들의 접착과 outgrowth 여부를 관찰한 결과 (Table 3) 48시간 후 bOF와 GSH가 같이 첨가된 배양액에서 배양한 포배들 중에서 퇴화가 일어난 것은 하나도 없었다. 또한 배양된 포배 중 45.4%가 배양접시의 바닥에 접착한 것이 관찰되었다. 그러나 이들 중 outgrowth를 일으킨 것은 하나도 없었다(Fig. 2). 반면 FBS 처리군의 경우 100%의 포배가 outgrowth를 일으켰으며 BSA 처리군의 경우 outgrowth를 일으킨 배이는 하나도 없었다.

#### 4. 독성이 제거된 bOF가 혈청에 의한 생쥐 포배의 outgrowth에 미치는 영향

앞서의 실험의 결과 bOF는 생쥐 포배의 접착은 유도하지만 outgrowth는 유도하지 못하는 것으로 나타

났다. 이의 원인이 bOF 내의 outgrowth 억제요인으로 인한 것인지를 알아보기 위해 2 mg/ml FBS로 coating된 culture plate에 5 mg/ml 농도의 hbOF와 10 mM GSH가 첨가된 배양액을 넣고 포배를 배양하면서 outgrowth 여부를 조사하였다. 그 결과 hbOF의 존재에도 불구하고 FBS로 coating된 배지에서 배양된 모든 포배가 outgrowth를 일으켰으며, BSA와 GSH가 같이 첨가된 대조군의 경우에도 85.2%의 포배가 FBS로 coating된 배지에서 outgrowth를 일으킨 것이 관찰되었다(Table 4).

## IV. 고 찰

본 실험의 결과 FBS, hFF, bFF로 coating된 배지에서 배양된 생쥐의 탈각한 포배는 접착 및 outgrowth를 일으킨 반면 bOF로 coating된 경우에는 포배의 접착 및 outgrowth가 전혀 일어나지 않았다. 또한 bOF를 배양액에 직접 첨가하더라도 접착 및 outgrowth는 일어나지 않았고 다만 FBS로 coating한

**Table 3. Effect of glutathione on the outgrowth of mouse blastocysts in the presence of heat-treated bOF**

Types of culture	No. of blastocysts examined	% Development after 48 hr*		
		Unattached	Attached	Outgrowing
FBS	24	0	0	100
BSA	24	100	0	0
hbOF	26	54.6±13.4	45.4±13.4	0

\* Unattached, unattached blastocyst; Attached, attached blastocyst; Outgrowing, outgrowing blastocyst.

*In vitro* grown hatched blastocysts were cultured in MEM containing 5 mg protein/ml of FBS, BSA or bOF. bOF was heated at 65°C for 30 min(hbOF) before adding to the MEM. All culture media contain 10mM GSH each and culture dishes were not coated. Experiments were done three times and the data are expressed as percentage ± SEM.

**Table 4. Effect of bOF on the outgrowth of mouse blastocysts onto FBS-coated dishes**

Types of culture	No. of blastocysts examined	% Development after 48 hr*	
		Attached	Outgrowing
BSA	37	14.8±2.4	85.2±2.4
hbOF	40	0	100

\* *In vitro* grown hatched blastocysts were cultured for 2 days onto the plastic petri dishes that had been coated with FBS. Each culture medium contained 10mM GSH. Experiments were done three times and the data are expressed as percentage ± SEM.

배지에 bOF를 첨가할 경우 상당수의 생쥐 포배는 접착 현상을 나타내었다. 그러나 이 경우에도 outgrowth를 일으킨 포배는 전혀 관찰되지 않았다.

포유류에서 공통적으로 나타나는 착상현상의 궁극적인 목적은 태반의 형성에 있다. 할구세포의 수가 수십개 이하에 불과한 착상이전 시기와는 달리 착상시기 이후의 배아는 배반세포의 수가 급격히 증가하는 시기이므로, 이를 위해서는 매우 많은 양의 영양물질의 공급을 필요로 하며 또한 대사과정의 결과 많은 양의 노폐물질이 생성된다. 따라서 효율적인 공급과 배설을 위해서 배아는 모체와 직접 혈관을 연결시키는 태반을 형성함으로써 모체의 순환계를 이용하여 발생을 지속할 수 있다(Pedersen과 Burdsal, 1994; Kaufman과 Burton, 1994).

포유류 배아의 착상은 포배의 바깥층을 구성하고 있는 배반세포(trophectodermal cell)와 자궁내막 상피세포(uterine luminal epithelial cell)간의 상호간의 접착(attachment)에 의해서 시작되며 이는 각각의 세포표면에 있는 cell-cell adhesion molecule간의 특이결합에 의해 이루어진다. 체외에서 생쥐 포배를 배양할 경우 혈청성분이나 collagen, fibronectin, laminin 등과 같은 extracellular matrix(ECM) 성분이 배양액 내에 존재하거나 배양접시에 coating되어 있으면 포배는 배양접시에 접착하여 outgrowth를 일으키고(Armant 등, 1986; Farach 등, 1987; Carson 등, 1988; O'Shea 등, 1990; Armant, 1991), 또한 생체 내에서도 간, 신장, 지라, 정소 등의 다양한 조직세포와도 결합하여 비록 정상적인 배발생은 이루지 못하지만, 세포가 분열하여 증식하는 사실(Kirby, 1960; Kirby, 1963a; Kirby, 1963b)로 미루어 자궁내막세포와는 달리 포배의 할구세포표면에는 다양한 물질과 결합할 수 있는 여러 종류의 adhesive molecule들이 존재하는 것으로 제안되고 있다(Campbell 등, 1995; Carson 등, 1993). 본 연구의 결과 FBS 외에 사람이나 소의 난포액 성분도 생쥐 포배의 접착 및 outgrowth를 유도하는 것으로 미루어 이들의 난포액 내에도 생쥐 포배와 특이결합을 할 수 있는 adhesive molecule 혹은 이에 대한 receptor molecule이 있는 것으로 추측된다. 또한 소의 수란관내액을 배양액에 첨가하였을 때에도 약 반수의 생쥐 포배가 접착한 결과로 보아 bOF 내에도 접착을 유도하는 물질이 있을

것으로 여겨진다. 그러나 생쥐 포배의 접착을 유도하는 이들 체액의 성분이 서로 동일한 물질인지의 여부는 알 수 없다. 다만 자궁에 대해 invasive implantation을 일으키는 생쥐 포배와는 달리 소의 포배는 noninvasive implantation을 나타내므로 두 종의 포배와 자궁내막조직간의 접착 기작이 서로 다를 가능성이 있으며 따라서 접착유도물질의 종류도 동물의 종에 따라 다를 수 있다.

한편 접착 및 outgrowth 모두를 유도하는 FBS나 난포액과는 달리 bOF는 생쥐 포배의 접착을 유도할 수는 있었지만 outgrowth를 유도하지는 못하였다. Tutton과 Carr(1984)에 의하면 생쥐의 수란관내에 가두어진 생쥐 포배는 탈각 후 수란관에 접착은 하나 결코 invasion은 일으키지 않는다. 이로 미루어 대체로 포유류의 수란관조직은 포배의 접착에 필요한 환경은 제공하나 접착한 포배의 invasion에는 적절한 환경이 아닌 것으로 보인다.

사람이나 원숭이와 같은 영장류(primates)와는 달리 소, 말, 돼지, 쥐 등의 대부분의 포유류에서는 난관임신(tubal pregnancy) 현상이 나타나지 않는다(Hunter, 1988). 비록 이들 동물의 포배를 자궁 이외의 조직에 인위적으로 이식시켜 체내 혹은 체외에서 배양할 경우 포배는 자궁 내에서의 유사한 착상현상을 일으키지만, 이 경우에도 결코 수란관에는 착상하지 않는다(Tutton과 Carr, 1984; Pauerstein 등, 1990). 이의 원인 중의 하나로 수란관의 독성물질의 존재를 들 수 있는데 토끼(Stone 등, 1977; Richardson 등, 1980) 및 소(Lee 등, 1998)의 수란관내액에는 생쥐의 초기배아, 난자 및 사람이나 소의 여러 종류의 체세포에 대해 독성을 나타내는 물질이 있으며 이 독성물질의 존재로 인해 수란관의 착상이 억제될 수 있다. 그러나 본 실험 결과에서 나타난 것처럼 glutathione을 사용하여 bOF의 독성을 제거(Lee 등, 1998)하더라도 FBS에 의한 생쥐 포배의 outgrowth를 bOF가 억제하지 못하는 것으로 보아 난관의 착상결여 현상이 독성물질의 존재에 기인하는 것 같지는 않다. 특히 난관임신 현상이 빈번한 사람 종의 경우에도 수란관내액(hydrosalpinx fluid)에 생쥐 배아에 대해 독성을 나타내는 성분이 들어있다는 보고(Mukherjee 등 1996)로 미루어 볼 때 수란관내액의 독성물질과 난관착상 결여 현상과는 직접적인 관계가 없는

것으로 사료된다. 또한 본 연구 결과에 의하면 배아의 착상을 억제하는 물질이 소의 수란관내액에 존재할 가능성이 없는 것으로 사료된다. FBS로 coating된 배지에서 생쥐 포배를 배양한 결과 bOF의 유무에 상관없이 모든 포배가 outgrowth를 일으켰다는 사실은 bOF 내에 FBS가 유도하는 outgrowth를 억제하는 물질이 없다는 것을 의미한다. 따라서 생쥐 포배가 소의 수란관내액이 들어있는 배지에서 outgrowth를 일으키지 못하는 것은 bOF 성분 중의 독성물질이나 억제물질의 존재에 의한 것이 아니라 포배의 outgrowth를 유도할 수 있는 요인이 bOF에는 결핍되어 있기 때문인 것으로 추측된다.

이 같은 결과들을 종합해 볼 때, 소의 수란관내액에는 생쥐 포배의 접착을 유도하는 물질은 존재하나 접착이 일어난 포배의 outgrowth를 유도하는 능력은 없는데, 이는 outgrowth를 억제하는 물질이 bOF 내에 들어있기 때문이 아니라 outgrowth를 유도할 수 있는 물질이 bOF 내에는 없기 때문으로 사료된다.

## V. 적 요

본 실험에서는 생쥐 포배와 소의 수란관내액을 재료로 하여 영양류를 제외한 대부분의 포유동물에서 난관임신이 일어나지 않는 원인을 규명하고자 하였다.

체외에서 포배로 발생한 생쥐 배아 중 탈각이 일어난 것들만을 골라 각각 FBS, hFF, bFF로 coating된 배양접시에서 BSA가 첨가된 MEM으로 48시간 동안 배양한 결과 각각 80.0%, 76.4%, 66.7%의 포배가 outgrowth를 나타낸 반면, BSA나 bOF로 coating한 경우에는 전혀 outgrowth가 일어나지 않았다. 배양액에 bOF를 농도별로 첨가하여 coating되지 않은 배지에서 배양한 결과, 단백질 농도 5 mg/ml 이상의 bOF가 첨가된 배지의 경우 bOF의 특성으로 인해 대부분의 배아가 퇴화하는 것이 관찰되었고 또한 많은 침전물이 나타나는 것이 관찰되었다. 따라서 bOF를 65°C에서 30분간 가열하여 침전물을 제거하고(hbOF) 여기에 10 mM glutathione(GSH)을 첨가하여 독성을 제거한 후 포배를 배양하였다. 그 결과 5 mg/ml의 hbOF가 든 배지에서 54.4%의 생쥐 포배가 접착하였으며 이중 outgrowth를 일으킨 배아는 하나도 없었다. 이의 원인이 bOF 내의 outgrowth 억제요인의 존

재에 의한 것인지를 알아보기 위해 배양접시를 FBS로 coating한 후 hbOF가 첨가된 배양액에서 포배를 배양한 결과 모든 포배가 outgrowth를 일으킨 것이 관찰되었다.

이 연구 결과들로 미루어 소의 수란관내액에는 체외에서 생쥐 포배의 접착을 유도하는 물질은 존재하나 접착한 포배의 outgrowth를 유도하는 물질은 결여되어 있는 것으로 여겨진다.

## VI. 인용문헌

1. Adams, C. E. 1973. The development of rabbit eggs in the ligated oviduct and their viability after re-transfer to recipient rabbits. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 29:133-137.
2. Armant, D. R. 1991. Cell interactions with laminin and its proteolytic fragments during outgrowth of mouse primary trophoblast cells. *Biol. Reprod.*, 45:664-672.
3. Armant, D. R., H. A. Kaplan and W. J. Lenarz. 1986. Fibronectin and laminin promote *in vitro* attachment and outgrowth of mouse blastocysts. *Dev. Biol.*, 116:519-523.
4. Bronson, R. and M. Cunnane. 1975. Transfer of uterine implantation blastocysts to the oviduct in mice. *Fertil. Steril.*, 26:455-459.
5. Campbell, S., H. R. Swann, M. W. Sief, S. J. Kimber and J. D. Aplin. 1995. Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Hum. Reprod.*, 10:1571-1578.
6. Carson, D. D., J. P. Tang and S. Gay. 1988. Collagens support embryo attachment and outgrowth *in vitro*: effects of the Arg-Gly-Asp sequence. *Dev. Biol.*, 127:368-375.
7. Carson, D. D., J. P. Tang and J. Julian. 1993. Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Dev. Biol.*, 155:97-106.
8. Denker, H. W. 1993. Implantation : A cell



- biological paradox. *J. Exp. Zool.*, 266: 541-558.
9. Farach, M. C., J. P. Tang, G. L. Decker and D. D. Carson. 1987. Heparin/heparan sulfate is involved in attachment and spreading of mouse embryos *in vitro*. *Dev. Biol.*, 123:401-410.
  10. Hunter, R. H. F. 1988. Their Role in Fertility and Infertility. In: *The Fallopian Tubes*. Springer-Verlag, New York.
  11. Kaufman, P. and G. Burton. 1994. Anatomy and genetics of the placenta. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed, Raven Press, New York, pp. 441-484.
  12. Kirby, D. R. S. 1960. The development of mouse eggs beneath the kidney capsule. *Nature*, 187:707-708.
  13. Kirby, D. R. S. 1963a. The development of mouse blastocysts transplanted to the spleen. *J. Reprod. Fert.*, 5:1-12.
  14. Kirby, D. R. S. 1963b. The development of mouse blastocysts transplanted to the cryptorchid and scrotal testis. *J. Anat.*, 97:119-130.
  15. Lee, Y., H. Kim and M. K. Kim. 1998. *In vitro* toxicity of bovine oviductal fluid to the mouse embryos. *Dev. Reprod.* (in press)
  16. Mukherjee, T., A. B. Copperman, C. McCaffrey, C. A. Cook, M. Bustillo and M. F. Obasaju. 1996. Hydrosalpinx fluid has embryotoxic effects on murine embryogenesis: a case for prophylactic salpingectomy. *Fertil. Steril.*, 66:851-853.
  17. O'Shea, K. S., H. J. L. Liu, L. H. Kinnunen and V. M. Dixit. 1990. Role of the extracellular matrix protein thrombospondin in the early development of the mouse embryo. *J. Cell Biol.*, 111:2713-2723.
  18. Papaioannou, V. E. and K. M. Ebert. 1986. Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. *J. Reprod. Fert.*, 76: 603-608.
  19. Pauerstein, C. J., C. A. Eddy, M. K. Koong and G. D. Moore. 1990. Rabbit endosalpinx suppresses ectopic implantation. *Fertil. Steril.*, 54:522-526.
  20. Pedersen, R. A. and C. A. Burdsal. 1994. Mammalian embryogenesis. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed, Raven Press, New York, pp. 319-390.
  21. Psychoyos, A. 1986. Uterine receptivity for nidation. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 476:36-42.
  22. Quinn, P. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilization capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66:161-168.
  23. Richardson, L. L., C. E. Hamner and G. Oliphant. 1980. Some characteristics of an inhibitor of embryonic development from rabbit oviductal fluid. *Biol. Reprod.*, 22:553-559.
  24. Sherman, M. I. and S. B. Atienza-Samols. 1978. *In vitro* studies on the surface adhesiveness of mouse blastocysts. In: Ludiwig H & Tauber P, eds. *Human Fertilization*, Mass, Boston, pp. 179-183.
  25. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Malia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Funjimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150:76-85.
  26. Stone, S. L., L. L. Richardson, C. E. Hamner and G. Oliphant. 1977. Partial characterization of hormone-mediated inhibition of embryo development in rabbit oviduct fluid. *Biol. Reprod.*, 16:647-653.
  27. Tabibzadeh, S. and A. Babaknia. 1995. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving

- adhesion and tissue invasion, *Mol. Hum. Reprod.*, 1:1579-1602.
28. Tutton, D. A. and D. H. Carr. 1984. The fate of trophoblast retained within the oviduct in the mouse. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 17:18-24.
- (접수일자 : 1998. 5. 15. / 채택일자 : 1998. 6. 15.)