

생쥐 배아에 미치는 소 수란관 내액의 체외독성

이영희 · 김해권 · 김문규¹

서울여자대학교 자연대 생물학과, 한양대학교 자연대 생물학과¹

In Vitro Toxicity of Bovine Oviductal Fluid to the Mouse Embryos

Younghee Lee, Haekwon Kim, and Moon-Kyoo Kim¹

Department of Biology, Seoul Women's University

Department of Biology, Hanyang University¹

요 약 : 포유류 배아의 초기발생과정에서 수란관이 하는 역할을 알아보기 위하여 소의 수란관내액이 생쥐 2-세포기 배아의 체외발생에 미치는 영향을 조사하였다. 대조군의 경우 5%의 배아만이 체외배양과정 중 퇴화한데 비해 5% 혹은 그 이상의 소의 수란관내액(bOF)이 함유된 배양액 내에서 배양된 배아는 48시간이 지났을 때 모두 퇴화하였다. bOF를 65°C에서 30분간 가열한 후 배양액에 첨가한 결과 bOF의 독성은 변화가 없었으나 90°C에서 30분간 가열하였을 때에는 독성이 거의 사라져 95%의 배아가 정상적으로 발생하였다. bOF를 chymotrypsin으로 1시간 혹은 24시간동안 처리한 후 배양액에 첨가한 경우에도 독성이 사라져 각각 95.5%의 배아가 상실배 혹은 포배로 발생을 진행하였다. 산화방지제인 10mM 농도의 glutathione (GSH)을 bOF와 함께 배양액에 첨가한 결과 마찬가지로 bOF의 독성이 사라져 91.0%의 배아가 상실배 이상으로 발생한 반면 산화 방지능력이 없는 산화형 GSH (GSSG)를 bOF와 함께 배양액에 처리한 경우에는 bOF의 독성은 전혀 제거되지 않았다. 또한 mercaptoethanol, dithiothreitol, cysteamine 등의 다른 산화방지제도 GSSG와 마찬가지로 bOF의 독성을 제거하지 못하였다. 이와 같은 실험 결과로 미루어 소의 수란관내액에는 체외에 노출될 경우 독성을 나타내는 단백질 성분으로 된 물질이 있으며 이 물질의 독성은 대기 중의 산소의 산화작용에 의해 활성화되는 것으로 여겨진다.

ABSTRACT : To investigate the role of oviductal environment in early mammalian development, we examined the effects of bovine oviductal fluid (bOF) on the development of mouse 2-cell embryos *in vitro*. All of the embryos cultured in medium containing 5% or more of bOF underwent degeneration after 48 hr, whereas only 5% of embryos cultured in the absence of bOF degenerated. When bOF was heated at 65°C for 30 min and then added to the culture medium, the embryotoxic effect of bOF was not removed at all such that none of the embryos remained alive after 48 hr. However, when bOF heated at 90°C for 30 min was added to the culture, nearly most (95%) of embryos was alive. Similarly, pretreatment of bOF with 0.1% chymotrypsin for 1 hr or overnight following heating at 65°C resulted in the development of 95.5% of mouse 2-cell embryos to early blastula after 48 hr culture in the presence of treated bOF. Interestingly addition of an anti-oxidant removed the embryotoxic effect of bOF so that 91.0% of 2-cell embryos developed to morulae or blastulae in the presence of both 5% bOF and 10 mM of glutathione (GSH) after 48 hr culture. Neither oxidized form of GSH (GSSG) nor other antioxidants, however, could support the embryonic development in the presence of bOF. From these results, it is suggested that bOF contains a protein-like factor (s) which becomes embryotoxic by exposing *in vitro*, probably via oxidation reaction.

Key words : bovine oviductal fluid (bOF), embryotoxicity, glutathione (GSH).

서 론

포유류의 발생은 암컷의 생식기관인 수란관의 팽대부(ampulla)에서 정자와 난자의 수정에 의해서 시작된다. 교미시 암컷의 질 혹은 자궁 내로 사정된 정자는 자궁 및 수란관을 둘러싸고 있는 근육조직의 연동운동에 의해 자궁을 지나

수란관의 팽대부에 도달하게 되며 이 동안에 수정능력을 획득(capacitation)하게 된다. 한편 배란기 혹은 발정기에 뇌하수체에서 분비된 난포자극 호르몬(follicle stimulating hormone, FSH)에 의해 암컷의 난소 내 난포 중 일부가 성장을 하게 되고 이어서 황체호르몬(luteinizing hormone, LH)이 분비되면 성장한 난포 내의 난자는 수정을 위한 성숙을 일으키게 된다. 성숙이 완료된 난자는 배란 즉, 난소 내 난포로부터 방출되어 수란관내로 진입하고 기다리고 있던 정자와 수정한 후 3~4회에 걸친 난할을 하게 된다. 그 결과 대략 8개

본 연구는 1996년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-96-4437)와 1996년도 서울여자대학교 교내연구비의 보조로 이루어졌음.

이상의 할구로 발생한 상실배는 자궁 내로 들어가서 난할을 계속하여 64-세포기 이상의 포배가 되면 포배를 둘러싸고 있는 투명대 (zona pellucida)로부터 벗어나는 탈각 (hatching) 과정을 거쳐 자궁내막 조직에 착상한 후 발생을 지속하게 된다. 이처럼 포유류의 출생전 개체발생은 전적으로 모체의 생식기관내에서 이루어진다 (Hunter, 1994).

최근 생명과학기술의 발달로 생체 내에서 일어나는 포유류의 수정 및 초기 배아의 발생은 체외에서도 부분적으로 가능하게 되었고 그 결과 포유류의 체외수정은 의학 및 축산분야 등에서 보편적인 기술로 이용되고 있다. 그러나 대부분의 포유류의 수정란은 체외에서 배양할 경우 포배로의 발생을 진행하지 못하고 중도에서 멈추는 이른바 체외발생중지 (in vitro block) 현상을 나타낸다. 즉 수정란의 체외배양시 토끼의 배아는 상실배, 소는 8~16세포기, 돼지는 4세포기, 흰쥐, 햄스터, 생쥐는 2~4세포기에서 발생을 중지한다 (Kane, 1991). 그러나 체외 혹은 체내에서 수정된 난자를 수란관에 이식시켜 체외에서 기관배양을 하면 포배로 정상발생을 하게 되며 (Whittingham, 1968; Papaioannou & Ebert, 1986) 수란관의 조직세포와 함께 배양하여도 소 (Eyestone & First, 1989; Ellington et al., 1990; Xu et al., 1992), 돼지 (White et al., 1989), 양 (Gandolfi & Moor, 1987; Rexroad & Powell, 1988), 생쥐 (Sakkas & Trounson, 1990)에서 보는 바와 같이 체외발생중지현상이 일부 극복되거나 체외에서의 배발생 속도가 생체 내와 유사하게 진전된다. 이외에도 수란관은 정자의 생화학적 변화를 유도하여 capacitation을 일으키게 함으로써 배란된 난자와의 결합시 침체반응을 일으켜 수정을 가능하게 하거나 (Yanagimachi, 1994) 수란관 내액에 존재하는 수많은 Immunoglobulin G (Ig G)의 존재에도 불구하고 수정란에 대한 면역반응을 일으키지 않게끔 한다 (Hunter, 1994). 이러한 연구 결과들로 미루어 수란관이란 환경은 포유류의 착상전 배발생 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지나 그 중요성에 비추어 수란관의 생리학적 기능에 관한 구체적인 연구는 별로 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 포유류 배아의 발생과 관련한 수란관의 구체적인 기능을 조사하기 위해 소의 수란관내액을 재료로 하여 생쥐 배아의 체외배양시 소의 수란관내액이 생쥐 배아의 발생에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과 소의 수란관내액에는 체외에서 생쥐 배아를 퇴화시키는 요인이 있으며 이 요인은 단백질 성분으로서 비교적 열에 약한 물질인 것으로 관찰되었다. 또한 이 요인의 독성은 체외에서의 산화반응에 의해 나타나는 것으로 여겨진다.

재료 및 방법

1. 생쥐 2-세포기 배아의 채취

본 실험에 사용한 실험동물은 서울대학교 실험동물 사육실에서 사육된 생쥐 (ICR strain)로 암컷은 생후 8주 이상 그리고 수컷은 생후 12주 이상 된, 생식능력이 있는 것들을 사용하였다.

생쥐 2-세포기 배아는 다음과 같이 준비하였다. 생후 8주 이상 된 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% polyvinylpyrrolidone이 들어있는 Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)을 넣어 수란관을 씻어 내리는 (flushing) 방법으로 얻었다.

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

서울 마장동에 소재한 우성농역에서 제공되는 소의 수란관을 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mg/ml ethylenediamine tetraacetic acid가 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°C, 20,000g에서 1시간 동안 원심분리한 후 상등액을 취해 -70°C에서 보관하였다가 사용시에는 녹여서 다시 4°C, 20,000g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 수란관내액으로 사용하였다. 배양액에 수란관내액을 처리할 때에는 최종농도가 각각 0.5%, 5%, 20%가 되도록 기본배양액으로 희석하여 사용하였다.

3. 생쥐 배아의 체외배양

본 실험에 사용된 기본배양액으로는 0.4%의 BSA가 첨가된 minimum essential medium (MEM, Gibco)을 사용하였다. 플라스틱 배양접시 (#3002, Falcon)위에 20 µl의 배양액 방울을 만들어 그 속에 생쥐 2-세포기 배아를 넣고 위를 paraffin oil로 덮어 37°C, 5% CO₂와 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하면서 24시간마다 관찰하였다. 배양이 끝난 배아는 도립현미경하에서 관찰하여 건강한 것과 죽은 것으로 구분하였으며 필요에 따라 4-세포기에서 상실배 이전

(<Mor)과 상실배 혹은 포배기 (\geq Mor)의 두 발생단계로 구분하였다.

4. 수란관 내액의 열처리 및 chymotrypsin의 처리

위에서 얻은 수란관내액의 열처리는 다음과 같이 하였다. 수란관내액을 65°C 혹은 90°C가 유지되는 heating block내에서 각각 30분씩 가열처리 한 후 4°C, 20,000g에서 1시간 동안 원심분리하고 이로부터 상등액을 얻어 이를 실험에 사용하였다.

Chymotrypsin은 MEM에 녹여 10×stock solution을 만든 후 4°C에 보관하였다가 최종농도가 0.1%가 되도록 가열처리를 한 수란관내액에 첨가하여 37°C 배양기에서 1시간 혹은 overnight동안 방치하였다. 그런 다음 65°C에서 10분간 가열하여 chymotrypsin을 불활성화시킨 후 10,000g에서 30초간 원심분리하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였다.

5. 화학물질의 처리

Glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), 2-mer-

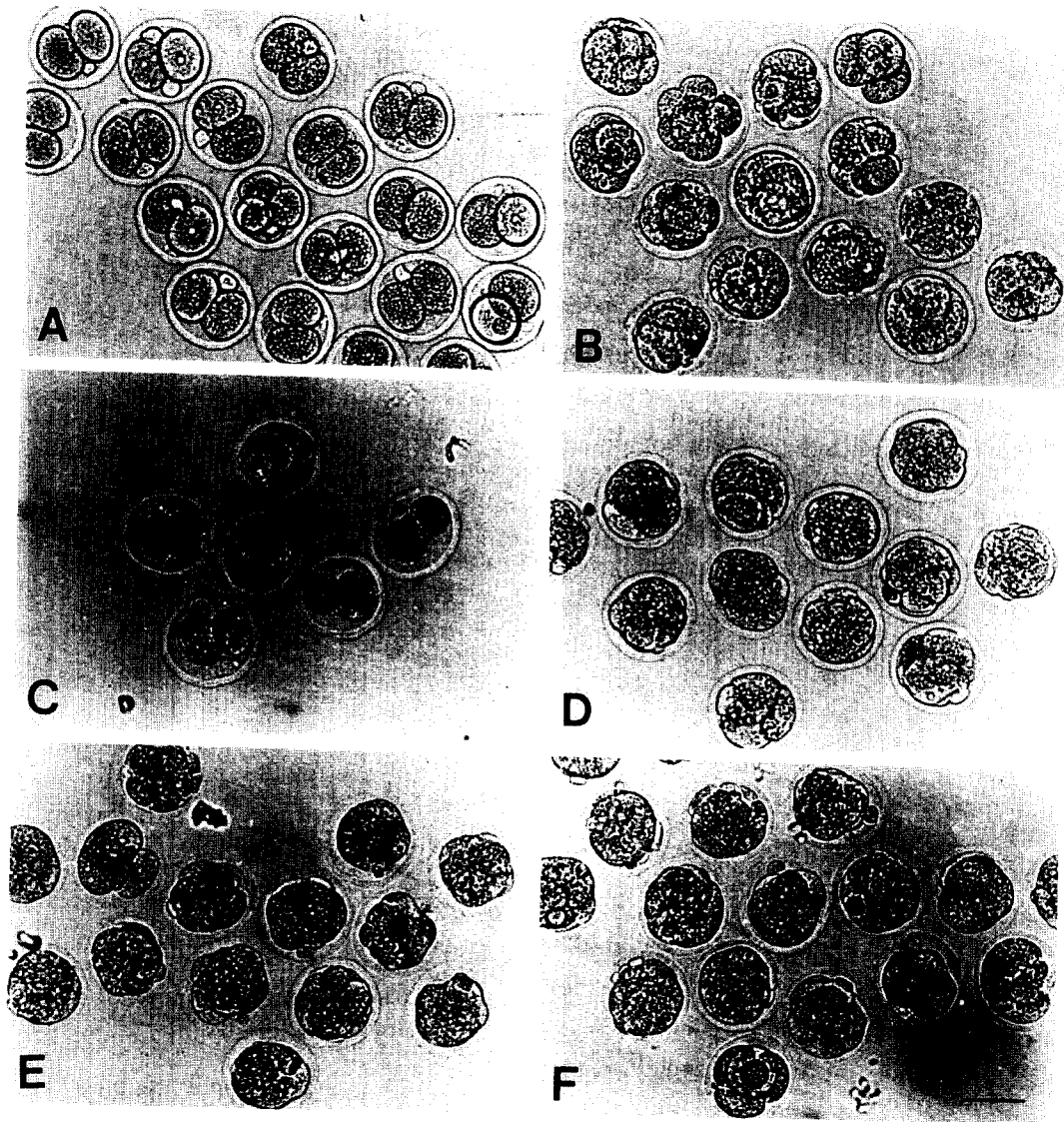


Fig. 1. Photomicrographs of mouse embryos developed *in vivo* or *in vitro*.

A, two-cell embryos freshly collected at 48 hr after hCG injection; B, morulae and early blastulae developed from 2-cell embryos after 48 hr culture; C, degenerated 2- and 4-cell embryos during 48 hr culture in the presence of 5% bOF; D, morulae and early blastulae developed from 2-cell embryos during 48 hr culture in the presence of 5% heat-treated (90°C, 30 min) bOF; E, morulae and early blastulae developed from 2-cell embryos during 48 hr culture in the presence of 5% chymotrypsin-treated bOF; F, morulae and early blastulae developed from 2-cell embryos during 48 hr culture in the presence of both 5% heat-treated (65°C, 30 min) bOF and 10 mM GSH. Scale bar represents 50 μ m.

captoethylamine (cysteamine), DL-dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol (Bio-Rad) 등은 MEM에 녹여 10 × stock solution을 만들어 4℃에 보관하였다가 사용하였으며 최종농도가 0.1 mM, 1 mM 혹은 10 mM이 되도록 배양액에 처리하였다.

6. 실험 기구 및 시약의 준비

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

결 과

1. 생쥐 2-세포기 배아의 발생에 미치는 소의 수란관내액의 영향

소의 수란관내액을 각각 0.5%, 5%, 20%의 농도로 첨가한 배양액 내에서 생쥐 2-세포기 배아를 48시간 동안 배양하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 bOF가 들어 있지 않은 배양액에서 배양된 배아는 48시간 후 상실배 혹은 포배로 발생한 반면 배양액에 bOF가 첨가된 경우에는 2-세포기 혹은 4-세포기에서 퇴화하는 것이 관찰되었다. 즉 Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군과 0.5%의 수란관내액이 들어있는 배양액에서는 대부분의 배아가 정상발생을 하고 단지 5.0% 및 6.7%의 배아가 각각 퇴화한 반면, 5% 및 20%의 수란관내액이 첨가된 배양액내의 배아는 48시간 내에 모두 퇴화하였다.

2. 열처리한 소의 수란관내액이 생쥐 2-세포기 배아의 발생에 미치는 영향

생쥐 배아에 대해 독성을 나타내는 소의 수란관내액 성분의 특성을 알아보기 위하여 수란관내액을 65℃ 혹은 90℃에서 30분간 열처리한 후 각각 최종농도가 5%가 되도록 기본 배양액으로 희석하고 이 배지에서 생쥐 2-세포기 배아를 배양하였다. 그 결과 65℃ 열처리군 (65h)의 경우에는 열처리하지 않은 수란관내액 (nh)과 마찬가지로 48시간 이내에 모든 배아가 퇴화하였으나 90℃ 열처리군 (90h)의 경우 기본 배양액의 대조군 (Cont, 10.8%)과 유사하게 단지 5.2%의 생쥐 배아만이 퇴화하였다 (Figs. 1D and 3).

3. Chymotrypsin을 처리한 소의 수란관내액이 생쥐 2-세포기 배아의 발생에 미치는 영향

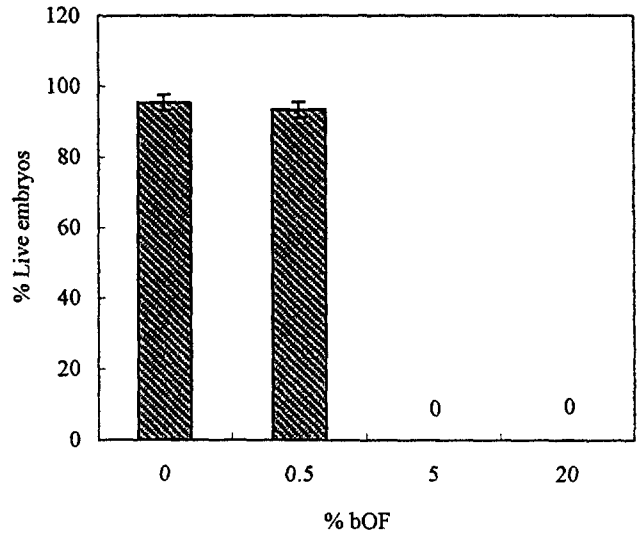


Fig. 2. Effect of bovine oviductal fluid on the development of mouse 2-cell embryos *in vitro*.

Each sixty embryos were used for the determination of each group. After 48 hr culture, embryonic development was examined under the light microscope and assessed as live or degenerate ones. Experiments were done three times and the data are expressed as percentage ± SEM.

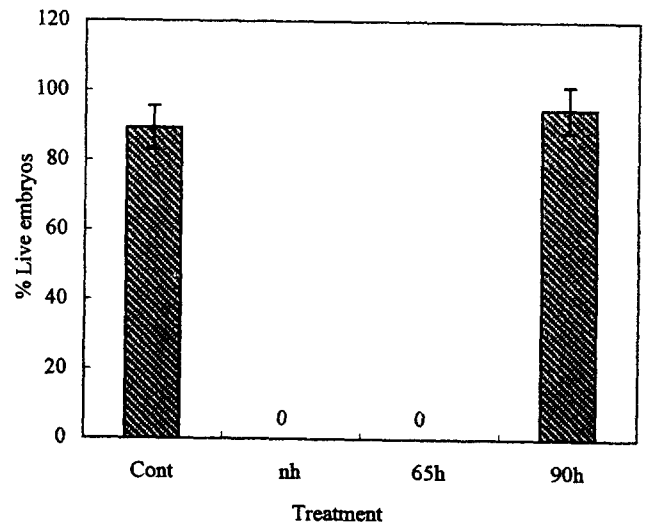


Fig. 3. Effect of heat-treated bovine oviductal fluid on the development of mouse 2-cell embryos *in vitro*.

Groups (69~84 embryos per group) of mouse 2-cell embryos were cultured for 48 hr in the absence (Control) or presence of 5% bOF which was not treated (nh) or heated at 65℃ (65h) or 90℃ (90h) for 30 min before adding to the culture medium. Experiments were done three times and the data are expressed percentage ± SEM.

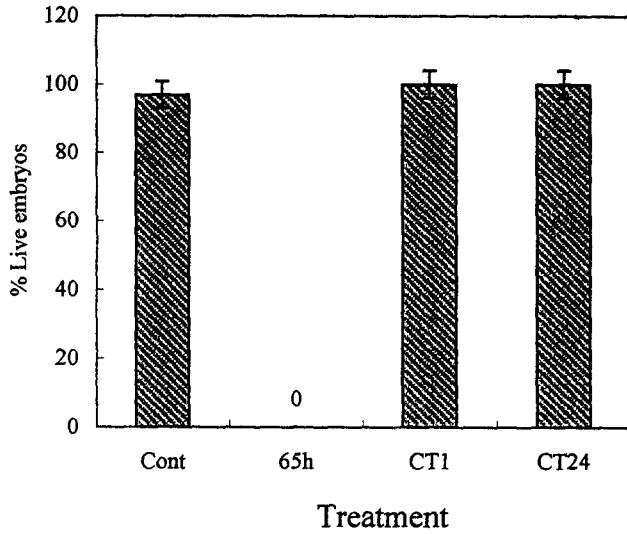


Fig. 4. Effect of chymotrypsin-treated bovine oviductal fluid on the development of mouse 2-cell embryos *in vitro*. Groups (63~69 embryos per group) of mouse 2-cell embryos were cultured for 48 hr in the absence (Control) or presence of 5% bOF which was heated at 65°C for 30 min (65h) and then treated with 0.1% chymotrypsin for 1 hr (CT1) or overnight (CT24) before adding to the culture medium. Experiments were done three times and the data are expressed as percentage ± SEM.

소의 수란관내액을 0.1%의 chymotrypsin으로 1시간 혹은 overnight 처리한 후 이를 5% 농도가 되도록 기본배양액에 섞고 여기에 생쥐 2-세포기 배아를 배양하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 chymotrypsin을 1시간 (CT1) 혹은 overnight 처리 (CT24)한 수란관내액의 경우 48시간이 지나도 모든 배아가 생존하였으며 이들 중 각각 95.5% 및 95.5%가 상실배 혹은 포배로 발생하였다 (Fig. 1E). 반면에 chymotrypsin을 처리하지 않은 수란관내액 (65h)의 경우 48시간이 지났을 때 모든 배아가 퇴화하였다. 한편 수란관내액이 들어 있지 않은

대조군 (Cont)의 경우 거의 모든 (96.8%) 배아가 살아 있었으며 그 중 53.7%의 배아가 상실배 혹은 포배로 발생하였다.

4. Glutathione이 소의 수란관내액의 체외독성에 미치는 효과

수란관의 산소농도는 대기 중의 산소농도의 대략 3분의 1 정도로 매우 낮기 때문에 (Maas et al., 1976) 생쥐 배아에 대한 수란관내액의 체외독성은 높은 농도의 대기 중의 산소로 인한 산화반응에 의해 나타날 수도 있다. 이같은 가능성을 알아보기 위해 세포내에서 산화방지제 (antioxidant)로 작용하는 것으로 알려진 glutathione (GSH, reduced glutathione)을 소의 수란관내액이 들어 있는 배양액에 농도별로 첨가한

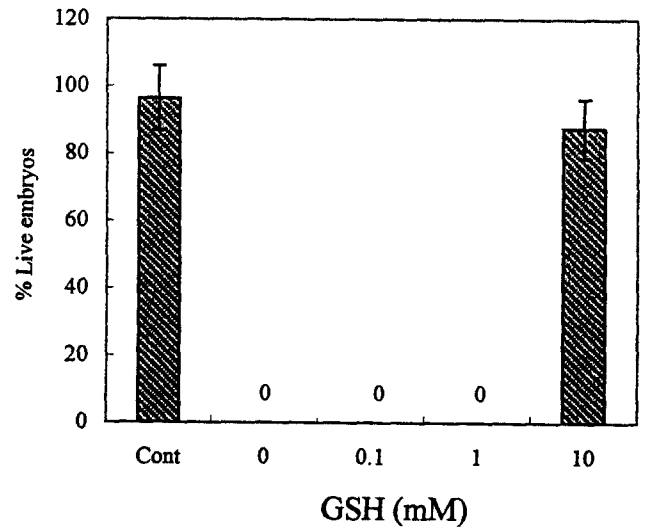


Fig. 5. Effect of glutathione on the embryotoxicity of bovine oviductal fluid to the mouse 2-cell embryos *in vitro*. Groups (33~35 embryos per group) of mouse 2-cell embryos were cultured for 48 hr in the absence (Control) or presence of bOF, which was heated at 65°C for 30 min, with 0, 0.1, 1 or 10 mM GSH. Experiments were done three time and the data are expressed as percentage ± SEM.

Table 1. Effect of oxidized glutathione (GSSG) on the embryotoxicity of bovine oviductal fluid to the mouse 2-cell embryos *in vitro*

Treatment	No. of embryos examined	% Development after 48 hr*		
		< Mor	≥ Mor	Deg
None	77	14.9 ± 6.5	84.0 ± 5.9	1.1 ± 0.9
bOF	76	0	0	100
bOF + GSH	77	0	91.0 ± 5.9	9.0 ± 5.9
bOF + GSSG	78	0	0	100

* : < Mor, embryos developed to pre-morula stage ; ≥ Mor, embryos developed to morula or blastula stage ; Deg, degenerated embryos. bOF was heated at 65°C for 30 min before adding to the culture medium. Both reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were added to the bOF-containing medium to give a final conc. of 10 mM. Experiments were done three times and the data are expressed as percentage ± SEM.

Table 2. Effect of various antioxidants on the embryotoxicity of bovine oviductal fluid to the mouse 2-cell embryos *in vitro*

Treatment	No. of embryos examined	% Development after 48 hr*		
		< Mor	≥ Mor	Deg
None	76	28.8 ± 2.0	65.4 ± 1.5	5.8 ± 1.7
bOF	76	0	0	100
bOF + Cysteamine	77	0	0	100
bOF + DTT	74	0	0	100
bOF + ME	74	0	0	100

* : < Mor, embryos developed to pre-morula stage ; ≥ Mor, embryos developed to morula or blastula stage ; Deg, degenerated embryos.

Each 10 mM of cysteamine, dithiothreitol (DTT) or mercaptoethanol (ME) was added to the culture medium. Experiments were done three times and the data are expressed as percentage ± SEM.

후 생쥐 2-세포기 배아를 배양하였다. 그 결과 GSH가 0.1mM 및 1mM 농도로 첨가된 배양액에서는 48시간이 경과하였을 때 모든 배아들이 퇴화 하였으나 10mM 농도에서는 12.4%의 배아만이 퇴화하였으며 대부분의 배아 (84.5%)가 상실배 또는 포배로 발생하였다 (Figs. 1F and 5).

한편 GSH가 산화방지제로 작용했는지를 알아보기 위해 10 mM 농도의 산화형 glutathione (GSSG, oxidized glutathione)을 위와 같은 방법으로 처리한 결과 배양 후 48시간이 지났을 때 모든 배아가 퇴화하였다. 반면에 환원형 GSH가 첨가된 배지 내 배아의 91%가 상실배 또는 포배로 발생하였다 (Table 1).

5. 여러 가지 산화방지제가 소의 수란관내액의 체외독성에 미치는 효과

다른 산화방지제들도 GSH와 같은 효과를 가지는지의 여부를 알아보기 위해서 각각 10mM 농도의 cysteamine, DTT 혹은 2-mercaptoethanol을 소의 수란관내액이 들어있는 배양액에 첨가한 후 생쥐 2-세포기 배아를 배양하였다. 그 결과 GSH와는 달리 48시간 후 실험군의 모든 배아가 퇴화하였다 (Table 2).

고 찰

본 연구의 결과 소의 수란관내액은 생쥐 배아의 체외배양액에 5% 이상의 농도로 첨가될 경우 48시간 이내에 독성을 나타내어 모든 배아를 퇴화시키는 것으로 관찰되었다. 그러나 이러한 독성은 수란관내액을 가열하거나 chymotrypsin처리에 의해서 사라지는 것으로 미루어 체외에서 나타나는 소의 수란관내액의 독성은 비교적 열에 약한 단백질에 의해서 나타나는 것으로 여겨진다.

생쥐를 포함한 거의 대부분의 포유동물의 수정란은 체외

에서의 배양시 종에 따라 2-, 4-세포기 혹은 상실배 시기에서 멈추는 체외발생중지 현상을 나타내는데 (Kane, 1991), 생쥐 (Quinn & Harlow, 1978), 염소 (Batt et al., 1991), 소 (Kobayashi et al., 1994) 그리고 양 (Thompson et al., 1990; Bernardi et al., 1996) 등의 초기배아의 체외배양 시 산소의 농도를 5%로 낮춤으로써 발생중지 현상이 상당히 극복되는 것으로 미루어 그 원인은 수란관내의 산소의 농도보다도 3 배 이상 높은 대기 중의 산소의 농도 (Maas et al., 1976)로 인해 배아의 세포질 내에 유해산소의 농도가 높아지기 때문으로 알려져 있다 (Nasr-esfahani et al., 1990; Goto et al., 1992; Umaoka et al., 1992).

일반적으로 산소는 생체세포 내에서 aldehyde oxidase와 xanthine oxidase등의 산화효소에 의해 대사과정 중의 중간생성물인 O_2^- (superoxide anion)로 전환되며 이는 다시 superoxide dismutase (SOD)에 의해 H_2O_2 와 O_2 가 되고 이 H_2O_2 와 위의 O_2^- 에 의해 $HO\cdot$ 가 생성된다 (Fridovich, 1972; McCord & Day, 1978). 이 과정에서 중간산물인 O_2^- 와 $HO\cdot$ 는 유해산소 (reactive oxygen species, ROS)로써 세포내에서 lipid의 peroxidation과 여러 효소의 불활성화를 촉진하고 그 결과 세포에 손상을 주게 된다 (Ding & Chan, 1984). 그러나 포유류의 체세포내에는 tripeptide thiol인 GSH가 0.5~10mM의 농도로 존재하는데 (Irvine, 1996), 이 GSH는 단백질 및 DNA의 합성과 같은 대사과정에 중요한 역할을 담당할 뿐만 아니라 특히 GSH의 SH group은 강력한 nucleophile로써 세포내의 여러 가지 oxidant, electrophile, free radical 등에 의한 영향 즉, 산화적 환경으로부터 세포를 보호하는 기능을 가지고 있다 (Yoshida et al., 1993; Gardiner & Reed, 1994). 따라서 본 실험에서 나타난 소의 수란관내액의 체외독성 효과는 체내에 비해 고농도의 산소가 있는 환경에서 수란관 단백질에 의해 광량의 유해산소가 세포내로 유입되거나 발생하여 결국 배아가 치명적인 손상

을 입게 된 것으로 사료된다. 이를 뒷받침하는 사실로써 소의 수란관내액이 첨가된 배양액에 산화방지제인 환원형 GSH를 10mM 농도로 처리한 결과 수란관내액의 체외독성이 제거되어 생쥐 2-세포기 배아들이 상실배 혹은 포배로 발생한 반면, 같은 농도의 산화된 형태의 glutathione (GSSG)을 처리하였을 때에는 모든 배아가 퇴화하였다. 즉 수란관의 독성은 산화방지 효과가 있는 환원형 GSH에 의해서만 제거되었다. 이같은 사실로 미루어 볼 때 GSH는 배양액 내 혹은 배아의 세포질 내에서 과량의 유해산소가 발생하는 것을 억제함으로써 체외발생을 가능하게 하는 것으로 사료된다. 체외배양 시 GSH에 의해 발생이 현저히 증가한 예는 소 (Luvoni et al., 1996), 생쥐 (Legge & Sellens, 1991; Gardiner & Reed, 1994) 등에서 볼 수 있으며, 소의 경우 2-mercaptoethanol, cysteamine 등의 산화방지제를 첨가하여도 배발생이 증가한다 (Takahashi et al., 1993; De Matos et al., 1995; Grupen et al., 1995; Caamano et al., 1996). 그러나 본 실험의 결과 cysteamine, DTT, 2-mercaptoethanol을 소의 수란관내액이 첨가된 배양액에 각각 10mM씩 처리한 결과 GSH와는 달리 이들 산화방지제들은 수란관내액의 독성을 제거하지 못하였는데 이는 각각의 물질의 산화방지 효과가 서로 다르고 또한 종에 따라 화학물질에 대한 배아의 반응성이 같지 않기 때문으로 여겨진다. 생쥐의 경우 strain이 서로 다르면 SOD에 의한 배발생증가 효과에 차이가 나타난다 (Payne et al., 1992).

포유류 수란관내액의 체외독성 효과는 소 뿐만이 아니라 토끼의 경우에도 알려져 있는데 (Kille & Hamner, 1973) 토끼의 독성요인은 생식호르몬에 의해 발현이 조절되는 저분자량의 단백질일 것으로 추측되고 있다 (Stone et al., 1977; Richardson et al., 1980). 그러나 토끼 수란관내액의 독성 단백질은 100°C의 고열에도 활성을 잃지 않는 안정된 물질임에 비해 소의 단백질은 90°C의 열에 의해 쉽게 독성이 제거되며 또한 전자의 경우 수란관내액에 4%의 protease를 overnight 처리하여도 28.9%의 배아만이 생존하여 정상발생을 하는 반면 소의 경우 0.1%의 chymotrypsin을 한시간만 처리하여도 거의 모든 독성이 제거되는 점으로 미루어 소의 수란관내액의 독성 단백질은 토끼의 수란관 단백질과 같은 기능을 하지만 구조적으로 서로 다른 단백질이거나 혹은 전혀 다른 단백질일 가능성도 있다.

사람을 포함한 포유동물의 수란관 조직세포로부터 합성, 분비되는 수란관특이 단백질 중 현재까지 알려진 종류는 많지 않다 (Malette et al., 1995; O'Day-Bowman et al., 1996). 또한 대부분의 종에서 이들 단백질들은 배란된 난자가 수란

관을 통과할 때 난자의 투명대나 위난강에 결합하지만 이들의 생리학적 기능에 관해서는 자세히 밝혀지지 않고 있다. 다만 수정을 전후하여 수란관특이 단백질들은 정자의 운동능력을 증가시키거나 (Abe et al., 1995), 침체반응 (King et al., 1994) 또는 투명대의 침투를 용이하게 하거나 (Boatman & Magnoni, 1995; O'Day-Bowman et al., 1996), 혹은 종특이 수정 (Schmidt et al., 1997)에 관여하는 것으로 제안되어 있다. 이외에도 수란관내에서의 면역 억제기능 (Hunter, 1994) 이나 수정된 난자의 자궁에의 착상에 관여 (Schmidt et al., 1997)할 것으로 추측되는 데 이는 수란관특이 단백질에 의해 난자의 생화학적 특성에 변화 (Kim et al., 1996)가 일어나는 현상으로 뒷받침된다. 그러나 본 실험에서 관찰된 바와 같은 포유류 수란관의 독성 단백질의 생리적 기능에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

포유류의 수란관은 포유류 초기배아의 발생을 위한 가장 적합한 환경이다. 특히 생쥐 (Minami et al., 1988) 혹은 토끼 (Boland, 1984)의 예에서도 보듯이 수란관은 서로 다른 종의 배아에 대해서도 훌륭한 발생환경을 제공해 준다. 이러한 점에서 소의 수란관내액이 생쥐 배아에 대해 나타낸 독성이 이종간의 거부반응 때문인 것으로 보기는 어렵다. 오히려 최근 저자들은 소의 수란관내액의 독성효과가 생쥐 배아뿐만이 아니라 소의 난포세포와 수란관 상피세포의 체외배양시에도 나타나는 것을 관찰한 바 있다 (발표예정).

한편 발정기 혹은 배란기에 난포로부터 수란관내로 배란된 난자들 중 수정에 실패한 난자와 수란관내로 진입한 정자 중 수정에 실패한 정자, 그리고 난자와 함께 배란된 모든 난구세포들은 퇴화하지만 이들의 퇴화과정에 관해서는 전혀 알려진 바가 없으며 또한 수란관은 다음 주기에서의 수정을 위해 생존여부에 관계없이 이들을 제거해야 할 필요가 있으나 그 기작은 아직 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 연구의 결과 관찰된 소의 수란관 단백질의 생쥐 배아에 대한 독성 현상이 단순히 체외환경에 의한 인위적인 현상인지 혹은 불필요한 세포를 제거하기 위한 수란관의 정상적인 생리적 기능을 반영한 것인지 등의 여부는 소의 수란관내액의 독성요인을 분리하여 그 실체를 파악함으로써 규명될 수 있 것이다.

인용문헌

- Abe H, Sendai Y, Satoh T, Hoshi H (1995) Bovine oviduct-specific glycoprotein: A potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa *in vitro*. Mol Reprod Dev 42:226-232.

- Batt PA, Gardner GK, Cameron WA (1991) Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos *in vitro*. *Reprod Fert Dev* 3:601-607.
- Bernardi ML, Flechon J-E, Delouis C (1996) Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fert* 106:161-167.
- Boatman DE, Magnoni GE (1995) Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of golden hamster. *Biol Reprod* 52:199-207.
- Boland MP (1984) Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21:126-137.
- Caamano JN, Ryou ZY, Thomas JA, Youngs CR (1996) β -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. *Biol Reprod* 55:1179-1184.
- De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H (1995) Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 42:432-436.
- Ding A, Chan PC (1984) Singlet oxygen in copper-catalyzed lipid peroxidation in erythrocyte membranes. *Lipids* 19:278-284.
- Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE, McGrath AB (1990) Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2-cell to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 89:293-299.
- Eyestone WH, First NL (1989) Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert* 85:715-720.
- Fridovich I (1972) Superoxide radical and superoxide dismutase. *Acta Chem Res* 5:321-326.
- Gandolfi F, Moor RM (1987) Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 81:23-28.
- Gardiner CS, Reed DJ (1994) Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 51:1307-1314.
- Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M (1992) Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free Radical Biol Med* 15:69-75.
- Gruppen CG, Nagashima H, Nottle MB (1995) Cysteamine enhanced *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol Reprod* 53:173-178.
- Hunter RHF (1994) Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 39:176-181.
- Irvine DS (1996) Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev Reprod* 1:6-12.
- Kane MT (1991) Control of growth in preimplantation embryos. *Ir J Med Sci* 169:17-22.
- Kille JW, Hamner CE (1973) The influence of oviductal fluid on the development of one-cell rabbit embryos *in vitro*. *J Reprod Fert* 35:415-423.
- Kim H, Kim H, Kim SR, Kim MK, Shuetz AW (1996) Oviductal protein produces fluorescence staining of the perivitelline space in mouse oocytes. *J Exp Zool* 274:351-357.
- King RS, Anderson SH, Killian GJ (1994) Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 15:468-478.
- Kobayashi K, Satoh T, Yamashita S, Hoshi H (1994) Low oxygen and glucose improve the development of fertilized bovine oocytes in defined medium without somatic cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 30:556-558.
- Legge M, Sellens MH (1991) Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum Reprod* 6:867-871.
- Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG (1996) Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing media. *Mol Reprod Dev* 43:437-443.
- Maas DHA, Storey BT, Mastroianni LJr (1976) Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* 27:1312-1317.
- Malette B, Pasquett Y, Merlen Y, Bleau G (1995) Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: A lead in the search for the biological function of these oviduct specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 41:384-397.

- McCord JM, Day ED (1978) Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalysed by iron · EDTA complex. FEBS Lett 86:139-142
- Minami N, Bavister BD, Iritani A (1988) Development of hamster two-cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system. Gamete Res 19:235-240.
- Nasr-esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH (1990) Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. Development 109:501-507.
- O'Day-Bowman MB, Mavrogianis PA, Reuter LM, Johnson DE, Fazleabas AT, Verhage HG (1996) Association of oviduct specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following *in vitro* incubation. Biol Reprod 54:60-69.
- Papaioannou VE, Ebert KM (1986) Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. J Reprod Fert 76:603-608.
- Payne SR, Munday R, Thompson JG (1992) Addition of superoxide dismutase and catalase does not necessarily overcome developmental retardation of one-cell mouse embryos during *in vitro* culture. Reprod Fertil Dev 4:167-174.
- Quinn P, Harlow GM (1978) The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. J Exp Zool 206:73-80
- Rexroad CE Jr, Powell AM (1988) Co-culture of ova with oviductal cells in Medium 199. J Anim Sci 66:947-953.
- Richardson LL, Hamner CE, Oliphant G (1980) Some characteristics of an inhibitor of embryonic development from rabbit oviductal fluid. Biol Reprod 22:553-559.
- Sakkas D, Trounson AO (1990) Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. J Biol Chem 258:13243-13249.
- Schmidt A, Mavrogianis PA, O'Day-Bowman MB, Verhage HG (1997) Species-specific effect of oviductal glycoproteins on hamster sperm binding to hamster oocytes. Mol Reprod Dev 46:201-207.
- Stone SL, Richardson LL, Hamner CE, Oliphant G (1977) Partial characterization of hormone-mediated inhibition of embryo development in rabbit oviduct fluid. Biol Reprod 16:647-653.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A (1993) Effect of thiol compounds *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol Reprod 49:228-232.
- Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR (1990) Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. J Reprod Fert 89:573-578.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T (1992) Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. Mol Reprod Dev 31:28-33.
- White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson Jr DL, Wood TC (1989) Early embryonic development *in vitro* by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs. Biol Reprod 41:425-430.
- Whittingham DG (1968) Development of zygotes in cultured mouse oviducts: The effect of varying oviductal conditions. J Exp Zool 169:390-398.
- Xu KP, Yadov BR, Rorie RW, Plaute L, Betteridge KJ, King WA (1992) Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. J Reprod Fert 94:33-43.
- Yanagimachi R (1994) Mammalian fertilization. In : Knobil E, Neill JD (eds.) The Physiology of Reproduction. 2nd ed. Raven Press, New York, pp 189-317.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG (1993) Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biol Reprod 49:89-94.