

## Glycosaminoglycan이 생쥐 수정란의 체외 발달에 미치는 영향

김정원 · 서동삼 · 윤산현 \* · 고 용 †

고려대학교 자연자원대학 응용동물과학과

### Effects of Glycosaminoglycan on the Development of *In Vitro* Fertilized Mouse Embryo

Kim, J. W., D. S. Seo, S. H. Yoon \* and Y. Ko †

Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University

#### ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate the effect of glycosaminoglycans added to the culture medium on the mouse embryo development to the blastocyst stage. *In vitro* fertilized mouse oocytes were cultured in Ham's F-10 supplemented with 10% FBS either in the absence or presence of 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml hyaluronic acid, chondroitin sulfate, and dermatan sulfate, respectively. After 4 days in culture, embryos developed to blastocysts were observed in all groups. There was a significant increase in blastocyst yield in the presence of hyaluronic acid and chondroitin sulfate ( $p < 0.05$ ), whereas dermatan sulfate was ineffective. Development to the blastocyst stage was best supported in 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml hyaluronic acid and 0.5 mg/ml chondroitin sulfate. It is concluded that hyaluronic acid and chondroitin sulfate support the development of mouse oocyte fertilized *in vitro* to the blastocyst stage. Furthermore, these results suggest that glycosaminoglycans can be utilized to support embryo development *in vitro* as a nutrient instead of serum.

(Key words: Glycosaminoglycans, Serum-free, Culture media, Mouse embryo)

#### I. 서 론

포유동물의 체외배양체계에 있어 다양한 세포의 발달을 돕기 위해 전통적인 배양액들이 사용되어 왔다. 대부분의 포유동물에서의 생식세포 체외 배양은 완전한 무혈청(*serum free*), 무난포액(*follicular fluid free*)의 배양체계를 확립하지 못했기 때문에 *minimum essential medium* (MEM)과

*tissue culture media* (TCM) 등의 배양액에 태아 제대혈청(*fetal serum*), 난포액(*follicular fluid*) 등의 체액을 첨가하는 한편, 난관 상피세포(*oviduct epithelial cells*), *vero cell* 등의 체세포와 함께 각종 동물의 난자를 공동배양하여 왔다(Liu 등, 1996). 그러나 과학적인 측면에서 볼 때 혈청과 같은 체액에 함유되어 있는 성장인자 이외에 많은 단백질 성분이 현재 밝혀지지 않고 있다. 특히, Gardner 등(1995)의 연구에 의하면 혈청을 첨가함으로써 세

\* 마리아 불임클리닉 (Maria Infertility Clinic, Seoul)

† Corresponding author: Dept. of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea, Tel : (02) 3290-3054, E-mail : yongko@korea.ac.kr

포 발달을 돕는 물질들 외에 혈청에 존재하지만 그 기능이나 구조가 정확하게 밝혀지지 않은 물질들에 의한 기형 발생과 batch간 차이 등의 문제로 인해 혈청인자의 첨가사용에 있어 많은 의문점이 제기되고 있다. 그러므로 현 시점에서 체외배양체계 확립을 위해 나아가야 할 방향은 각 배양체계간의 변이를 최소화하고 단순배양액(defined media) 배양체계 구축을 통해 동일한 조건에서의 생식세포의 배양이 이루어진 후에 수정란이식 등의 활용 방안이 논의되어야 한다. 그러나 혈청이나 난포액 등의 무조건적인 제거는 현 시점의 배양체계에 있어 발달 저하를 가져오기 때문에 많은 어려움이 따른다. 그러므로 단순배양액 배양체계를 확립하기 위해서는 좀더 경제적이고, 이용이 쉬운 혈청 대체물질의 제시가 필요하다고 할 수 있다.

이러한 접근의 일환으로 glycosaminoglycans (GAGs)의 첨가는 주요하게 논의될 수 있다. GAGs는 세포의 구성물질의 하나로서 세포의 이동(migration), 부착(adhesion), 증식(proliferation) 등에 관여하는 물질이다(Noonan 등, 1993). 또한 난포액, 난관액, 자궁액 등의 생식도관에 존재하여 난포의 발달, 배란 및 착상 과정에 이르기까지 생식기관에 관련하여 전반적인 영향을 미치고 있으며(Legge 등, 1996), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor (TGF)와 같은 성장인자와의 결합을 통하여 세포의 신호전달에 관여하고 있다(Erkki 등, 1991). 또한 Koichiro 등(1998)의 연구보고에 의하면 배양액내 GAGs의 첨가가 돼지의 배반포 형성에 효과적이라고 보고한 바 있다. 그러나 생식도관에서의 발달단계에 따른 영향과 혈청 대체효과에 대해서는 규명되지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 생쥐의 체외배양액에 GAGs를 첨가하여 배양함으로써 자궁과 난관액에서의 GAGs의 역할 규명과 수정란 발달단계에 따른 영향을 조사하고자 하였으며, 궁극적으로는 GAGs의 혈청 대체물질로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

광량(명 : 암 = 12 : 12) 및 온도(22°C) 조절과 환풍시설이 갖추어진 사육실에서 사육된 생쥐를 사용하였다. 암컷은 C57BL×CBA에서 태어난 제 1대 잡종(F1 hybrid)으로 4주령 이상의 성숙숙이 이루어진 쥐를 사용하였다. 수컷은 7주령 이상의 성숙숙이 이루어진 CBA 쥐를 사용하였다.

### 2. 난자회수

난자회수용 배양액과 난자 세척배양액은 Ham's F-10 (Gibco BRL, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA)를 첨가하여 30 mm<sup>2</sup> 배양접시(Falcon, USA)에서 2시간 이상 전배양(preincubation) 하였다.

난자의 채취를 위하여 PMSG 5 IU를 암컷 쥐의 복강에 주사하고, 48 시간 이후 hCG 5 IU를 주사하여 암컷의 과배란을 유도하였다. hCG를 주사한 후 14~16 시간 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 배측(dorsal)을 절개하여 양측 난관만을 절단하였다. 난자회수용 접시에 난관을 넣고 26 gauge 주사침을 이용하여 난관팽대부를 터뜨려 난자-난구세포층 복합체(oocyte-cumulus complex, OCC)를 회수하였다. 회수된 난자를 Ham's F-10에 10% FBS가 첨가된 세척배양액에서 3번의 세척과정을 거친 후 Ham's F-10에 10% FBS를 첨가한 수정용 배양액이 담긴 배양 접시로 옮긴 후 수정시기까지 배양 접시에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 3. 정자처리

정자처리용 배양액은 Ham's F-10에 10% FBS를 첨가하여 30 mm<sup>2</sup> 배양접시에 50 μl씩 소적을 만들어 3 ml의 mineral oil (Sigma, USA)을 덮어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 시간 이상 전배양하였다.

정자는 7 주령 이상의 CBA 쥐를 이용하여, 경추탈골법으로 도살하여 복부를 절개한 후, 정소상체 미부를 절개하였다. 절개한 정소상체 미부는 정자처리용 배양접시에 옮겨 소적이 깨지지 않게 mineral oil 부분에 침지하였다. 실체현미경하에서

한쪽은 해부용 집게로 잡고 다른 한 부분은 26 gauge 주사침으로 절개하여 누출된 정자괴를 배양 소적으로 유도하여 정자의 부유를 확인하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1~1.5 시간 동안 배양하여 정자의 수정능 획득을 유지하였다.

#### 4. 체외수정

수정용 배양액은 Ham's F-10에 10% FBS를 첨가하여 30 mm<sup>2</sup> 배양접시에 50 µl씩 소적을 만들어 3 ml의 mineral oil을 덮어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 시간 이상 전배양 하였다.

수정능력획득이 유도된 정자를 30~40개의 난자가 들어 있는 수정용 배양접시에 운동성 정자의 농도가 1×10<sup>6</sup>/ml이 되도록 주입한 후 6~7 시간 동안 체외수정시켰다. 수정 후 수정란의 형태나 세포질에 이상이 없는 수정란만을 선별한 후 체외배양용 배양액에 옮겨 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

#### 5. 체외배양

체외배양용 배양액은 Ham's F-10에 10% FBS를 첨가하여 30mm<sup>2</sup> 배양접시에 30 µl씩 소적을 만들어 3ml의 mineral oil을 덮어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 시간 이상 전배양 하였다. 체외수정 후 3번의 세척과정을 실시한 후 수정란을 체외배양액 1 소적당 8~10씩 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 체외수정 후 48시간 간격으로 신선한 배양액으로 교환해 주면서, 수정 후 5일째까지 배양을 계속하였다. 체외수정 후 2, 3, 4, 5일째에 2 세포기에서, 배반포(blastocyst), 부화(hatching) 배반포, 발생울, 배양접시에의 부착율을 매일 관찰하였다.

#### 6. GAGs 첨가조건

대조군은 크게 두 가지로 나누었다. Ham's F-10으로만 배양한 대조군과 Ham's F-10에 10% FBS를 첨가한 배양액으로 배양한 대조군의 수정란을 배반포까지 배양하였다.

실험군에 첨가제로 사용한 GAGs는 hyaluronic acid, chondroitin sulfate 그리고 dermatan sulfate

(Sigma, USA)를 사용하였으며, Ham's F-10에 각각 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml을 첨가하였다. Hyaluronic acid와 chondroitin sulfate의 조합첨가는 각각 0.25, 0.5 mg/ml을 조합하여 첨가하였다.

#### 7. 통계적 분석

통계처리는 Statistical Analysis System 통계 프로그램을 이용하였으며, GAGs를 첨가한 그룹과 첨가하지 않은 그룹간의 수정란 발달율은 one way ANOVA 방법에 의한 Duncan 검정방법에 의해 분석하였다.

### III. 결 과

#### 1. Hyaluronic acid 첨가효과

체외배양액(Ham's F-10)에 hyaluronic acid 첨가 결과는 Table 1과 같다. 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml의 hyaluronic acid를 혈청이 있는 체외배양액에 첨가하였을 때, 0.1과 0.5 mg/ml 첨가수준에서 대조군과 비교하여 각각 87%, 84%로 상실배로의 발달이 유의적(P<0.05)으로 증가되었다. 그러나 배반포 형성에 영향을 미치지 않았다.

무혈청 배양액에 hyaluronic acid를 첨가한 결과는 Table 2와 같다. 0.1, 0.5, 1.0mg/ml의 hyaluronic acid를 각각 무혈청 배양액에 첨가하였을 때, 배반포기로의 발달이 0.1, 0.5, 1.0mg/ml의 첨가수준(각각 63%, 64%, 63%)에서 대조군중 혈청을 첨가하여 배양한 대조군(71%)과 비교하여 유의적 차이를 나타내지 않았다. 따라서 hyaluronic acid의 첨가는 0.1, 0.5, 1.0mg/ml의 농도 수준에서 혈청대체효과가 있었으며, 혈청이 없는 배양액에 배양한 대조군(51%)과 비교하였을 때 배반포 발달에 유의적으로 대조군 보다 높은 발달 차이를 나타냄으로써 hyaluronic acid의 첨가가 수정란의 발달에 좋은 효과가 있음을 나타내었다(P<0.05).

#### 2. Chondroitin sulfate 첨가효과

체외배양액에 chondroitin sulfate 첨가결과는 Table 3과 같다. 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml의 chondroitin sulfate를 혈청이 있는 체외배양액에 첨가하여 체

**Table 1. The effects of hyaluronic acid on the mouse embryo development**

Media	Hyaluronic acid (mg/ml)	No. of eggs fertilized	No. of embryos developed to (%)			
			2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
Hams F-10 + FBS	0	55	54±4.6 (98%)	45±11 (81%)	41±4.9 <sup>a</sup> (74%)	36±4.1 (65%)
Hams F-10 + FBS	0.1	48	46±20.2 (95%)	42±3.5 (87%)	42±3.5 <sup>b</sup> (87%)	32±5.5 (66%)
Hams F-10 + FBS	0.5	58	54±8.5 (93%)	50±2.5 (86%)	49±1.5 <sup>b</sup> (84%)	43±8.5 (74%)
Hams F-10 + FBS	1.0	47	47±0 (100%)	38±4.7 (80%)	34±3.0 <sup>a</sup> (72%)	32±3.2 (68%)

<sup>a,b</sup>Means±SEM in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

**Table 2. The effects of hyaluronic acid in the serum-free medium on the mouse embryo development**

Media	Hyaluronic acid (mg/ml)	No. of eggs fertilized	No. of embryos developed to (%)			
			2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
Hams F-10	0	31	31±0 (100%)	26±11.2 (83%)	24±14 (77%)	16±5.4 <sup>a</sup> (51%)
Hams F-10 + FBS	0	49	47±6.7 (95%)	40±6.4 (81%)	37±1.5 (75%)	35±4.6 <sup>b</sup> (71%)
Hams F-10	0.1	38	38±0 (100%)	34±10.1 (89%)	29±5.9 (76%)	24±7.1 <sup>b</sup> (63%)
Hams F-10	0.5	48	44±9.5 (91%)	41±9.7 (85%)	36±6.3 (75%)	31±5.8 <sup>b</sup> (64%)
Hams F-10	1.0	36	36±0 (100%)	31±9.3 (86%)	27±14.2 (75%)	23±6.9 <sup>b</sup> (63%)

<sup>a,b</sup>Means±SEM in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

외배양 하였을 때, 0.1mg/ml의 첨가수준에서(73%) 대조군(66%)과 비교하여 배반포 형성에 있어 유의적인 발달차이를 나타냄으로써 배반포 형성을 촉진시키는 결과를 가져왔다(P<0.05). 그러나 0.5, 1.0 mg/ml의 첨가수준에서는(66%, 67%) 대조군(66%)과 비교하여 유의적인 발달 차이를 나타내지 못했다.

무혈청 배양액에 chondroitin sulfate를 첨가한 결과는 Table 4와 같다. 0.1, 0.5, 1.0mg/ml의 chon-

droitin sulfate를 각각 첨가하였을 때, 배반포 형성에 있어 0.5mg/ml의 첨가수준에서(64%) 혈청을 첨가하여 배양한 대조군(68%)과 비교하여 통계적 유의성을 나타내지 않았으며, 동시에 무혈청 배양액에 채외배양한 대조군(48%)과 비교하였을 때 유의적으로 높은 배반포 형성률(64%)을 나타냄으로써 chondroitin sulfate는 0.5mg/ml에서 혈청 대체효과가 있음을 결과를 통해 알 수 있었다(P<0.05). 그러나 0.1, 1.0mg/ml의 첨가수준에서는 배반포 형

**Table 3. The effects of chondroitin sulfate on the mouse embryo development**

Media	Chondroitin sulfate(mg/ml)	No. of eggs fertilized	No. of embryos developed to (%)			
			2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
Hams F-10 + FBS	0	51	51±0 (100%)	40±1.0 (78%)	40±1.0 (78%)	34±2.6 <sup>a</sup> (66%)
Hams F-10 + FBS	0.1	57	57±0 (100%)	49±10.5 (85%)	45±7.5 (78%)	42±2.0 <sup>b</sup> (73%)
Hams F-10 + FBS	0.5	49	46±10.3 (93%)	41±2.0 (83%)	36±2.6 (73%)	33±3.5 <sup>a</sup> (67%)
Hams F-10 + FBS	1.0	45	45±0 (100%)	37±5.7 (82%)	36±0 (82%)	30±2.6 <sup>a</sup> (66%)

<sup>a,b</sup>Means±SEM in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

**Table 4. The effects of chondroitin sulfate in the serum-free medium on the mouse embryo development**

Media	Chondroitin sulfate(mg/ml)	No. of eggs fertilized	No. of embryo developed to (%)			
			2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
Hams F-10	0	35	35±0 (100%)	27±5.0 (77%)	25±6.5 (71%)	17±4.0 <sup>a</sup> (48%)
Hams F-10 + FBS	0	50	48±8.5 (96%)	41±2.5 (82%)	37±7.1 (74%)	34±4.9 <sup>b</sup> (68%)
Hams F-10	0.1	52	48±9.3 (92%)	45±4.2 (86%)	42±7.4 (80%)	29±1.8 <sup>a</sup> (55%)
Hams F-10	0.5	45	42±4.8 (93%)	35±4.9 (77%)	35±4.9 (77%)	29±2.8 <sup>b</sup> (64%)
Hams F-10	1.0	41	37±11.2 (90%)	33±9.0 (80%)	30±8.4 (73%)	23±5.1 <sup>a</sup> (56%)

<sup>a,b</sup>Means±SEM in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

성율이 각각 55%, 56%로 혈청이 첨가된 배양액과 혈청이 없는 배양액에서 배양한 두 대조군 모두와 비교해 보았을 때 유의적인 차이가 나타나지 않았으므로 chondroitin sulfate 0.1, 1.0 mg/ml의 첨가로 인한 수정란 발달에 미치는 효과는 없었다.

### 3. Dermatan sulfate 첨가효과

체외배양액에 dermatan sulfate 첨가결과는 Table

5와 같다. 0.1, 0.5, 1.0mg/ml의 dermatan sulfate를 첨가하였을 때, 0.5와 1.0mg/ml 첨가수준에서 상실배 형성(각각 59%, 60%)에 있어 대조군(79%)과 비교하였을 때 유의적인 발달차이를 나타내었다 (P<0.05). 한편, 0.1 mg/ml 첨가수준에서는 대조군과 같은 상실배 형성율(80%)을 나타내었다. 그러나 배반포 형성시기에서 0.1, 0.5, 1.0mg/ml의 모든 첨가수준에서 각각 51%, 59%, 53%를 보여

**Table 5. The effects of dermatan sulfate on the mouse embryo development**

Media	Dermatan sulfate(mg/ml)	No. of eggs fertilized	No. of embryos developed to (%)			
			2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
Hams F-10 + FBS	0	44	44±0 (100%)	39±2.3 (88%)	35±13.8 <sup>a</sup> (79%)	29±3.6 <sup>a</sup> (65%)
Hams F-10 + FBS	0.1	45	45±0 (100%)	41±7.0 (91%)	36±5.8 <sup>a</sup> (80%)	23±6.6 <sup>b</sup> (51%)
Hams F-10 + FBS	0.5	47	47±0 (100%)	36±5.6 (76%)	28±4.0 <sup>b</sup> (59%)	28±4.0 <sup>ab</sup> (59%)
Hams F-10 + FBS	1.0	41	41±0 (100%)	36±2.0 (87%)	25±8.0 <sup>b</sup> (60%)	22±4.0 <sup>b</sup> (53%)

<sup>a,b</sup>Means±SEM in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

**Table 6. The effects of dermatan sulfate in the serum-free medium on the mouse embryo development**

Media	Dermatan sulfate(mg/ml)	No. of eggs fertilized	No. of embryos developed to (%)			
			2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
Hams F-10	0	38	37±5.7 (97%)	33±7.6 <sup>a</sup> (86%)	28±11.5 <sup>ab</sup> (73%)	20±2.5 <sup>a</sup> (52%)
Hams F-10 + FBS	0	51	51±0 (100)	44±10 <sup>ab</sup> (86%)	43±10.2 <sup>a</sup> (84%)	36±10.2 <sup>b</sup> (70%)
Hams F-10	0.1	49	49±0 (100%)	35±3.7 <sup>b</sup> (71%)	29±1.0 <sup>b</sup> (59%)	22±3.6 <sup>b</sup> (44%)
Hams F-10	0.5	42	42±0 (100%)	33±15.3 <sup>ab</sup> (78%)	29±15.0 <sup>ab</sup> (69%)	22±5.2 <sup>b</sup> (52%)
Hams F-10	1.0	45	43±3.4 (95%)	32±6.5 <sup>ab</sup> (71%)	28±6.6 <sup>b</sup> (62%)	24±5.2 <sup>b</sup> (53%)

<sup>a,b</sup> Means±SEM in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

대조군(66%)보다 유의적으로 낮은 배반포 형성을 나타냄으로써(P<0.05) dermatan sulfate는 수정란의 발달을 저해하는 결과를 가져왔다.

혈청이 없는 배양액에 dermatan sulfate를 첨가한 결과는 Table 6과 같다. 배양액에 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml의 dermatan sulfate를 첨가하였을 때, 0.1 mg/ml 첨가수준에서 4-세포기 형성(71%)에 있어 대조군(각각 86%)과 다른 첨가수준에서 보다 유의

적으로 낮은 4-세포기 형성을 나타내었으며 (P<0.05), 상실배 형성은 0.1, 1.0 mg/ml의 첨가 수준에서 각각 59%, 62%로써 대조군(84%)과 다른 첨가수준보다 유의적으로 낮은 발달 차이를 나타내었다(P<0.05). 배반포 형성에 있어서는 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml 모든 첨가수준에서 혈청을 첨가한 대조군(70%)보다 낮은 발달차이를 보였으며(P<0.05), 혈청이 없는 배양액에서 배양한 대조군(52%)

**Table 7. The effects of GAGs combined on the mouse embryo development**

Media	Hyaluronic acid and chondroitin sulfate(mg/ml)	No. of eggs fertilized	No. of embryos developed to (%)			
			2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
Hams F-10	0 & 0	55	54±4.6 (98%)	45±11.0 <sup>a</sup> (81%)	41±4.9 <sup>a</sup> (74%)	36±4.1 <sup>a</sup> (65%)
Hams F-10	0.25 & 0.25	57	51±10 (89%)	32±10 <sup>b</sup> (56%)	31±13 <sup>b</sup> (54%)	20±1.5 <sup>b</sup> (35%)
Hams F-10	0.5 & 0.5	73	63±4.4 (86%)	41±5.0 <sup>b</sup> (56%)	38±3.4 <sup>b</sup> (52%)	35±2.5 <sup>c</sup> (47%)

<sup>a,b,c</sup>Means±SEM in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

과는 유의적인 차이를 나타내지 않음으로 dermatan sulfate는 첨가효과가 없었다.

#### 4. Hyaluronic acid와 Chondroitin sulfate 조합첨가

위의 결과들을 바탕으로 무혈청 배양액에 첨가한 GAGs 중 대조군과 비교하였을 때 유의적으로 높은 발달차이를 나타낸 hyaluronic acid와 chondroitin sulfate를 각각 0.25mg/ml 수준과 각각 0.5 mg/ml 수준을 조합한 결과는 Table 7과 같다. Hyaluronic acid와 chondroitin sulfate를 각각 0.5 mg/ml의 첨가수준으로 조합하였을 때 대조군(65%)에 비해 유의적으로 낮은 4-세포기, 상실배, 배반포 형성율을 나타내었으며(P<0.05), 0.25 mg/ml 첨가 수준에서도 4-세포기, 상실배, 배반포 형성에 있어 각각 56%, 54%, 35%를 보임으로써 대조군과 비교하여 유의적으로 낮은 발달 차이를 보였다 (P<0.05). 따라서 hyaluronic acid와 chondroitin sulfate 조합 첨가는 수정란의 발달을 저해함을 알 수 있었다.

#### IV. 고 찰

무혈청 배양체계는 각 배양환경의 변이를 줄이는데 있어 중요한 부분을 차지한다. 따라서 본 연구는 난포, 난관, 자궁에 존재하는 GAGs를 체외배양액에 첨가함으로써 수정란의 체외발달율과 혈청 대체효과를 조사하기 위하여 실시하였다.

본 실험에서는 GAGs 물질 중 hyaluronic acid,

chondroitin sulfate와 dermatan sulfate를 실험에 사용하였다. 이 물질들은 수정란의 공배양(co-culture)에 사용하는 난구세포층과 체액과 난포액에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 (Eriksen 등, 1994), 또한 본 실험 결과에서도 세포체외발달에 있어 중요한 영향을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. Hyaluronic acid를 혈청이 있는 배양액에 첨가한 결과 0.1 mg/ml 수준에서 상실배 발달에 있어 유의적으로 높은 발달 차이를 보여 주었으며, 혈청이 없는 배양액에 hyaluronic acid를 첨가한 결과 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml 모든 수준에서 배반포로의 발달이 유의적으로 증가하였다. 이 결과는 hyaluronic acid가 수정란의 발달을 촉진시켰을 뿐 아니라 혈청 대체 물질로서의 가능성이 있음을 시사해 주고 있으며, Koichiro 등(1998)이 보고한 돼지 체외배양액에 hyaluronic acid 첨가가 돼지 수정란의 배반포 형성에 효과적이었던 결과와 비슷한 양상을 보여 주고 있다. 또한 Stojkovic 등(1999)이 보고한 소 수정란의 체외배양액에 hyaluronic acid를 첨가하였을 때 Day 5 이후 수정란의 배반포 발달에 효과적이었다는 결과와 유사한 양상을 나타내었다.

이상과 같이 hyaluronic acid가 수정란 발달의 촉진작용을 하는 것은 세포배양액에 첨가된 hyaluronic acid가 ligand로 세포외에 존재하면서 세포의 신호전달에 관여하였음을 시사하고 있다. 이에 추측되는 기작을 살펴보면 hyaluronic acid는 세포의

기질에 존재하며 hyaluronic acid의 대표적인 수용체로 알려진 CD44 proteoglycan에 결합하게 되는데, Culty 등(1990)의 연구에 의하면 CD44 proteoglycan의 amino-terminal domain은 hyaluronic acid의 six-sugar sequence를 인식하여 hyaluronic acid와 결합한다고 보고하였다. 세포외기질에 존재하는 CD44 proteoglycan에 hyaluronic acid가 결합하게 되면 인산화(phosphorylation)가 일어남으로써 신호전달이 이루어지고 hyaluronic acid의 합성이 증가한다. 합성된 hyaluronic acid는 translational modification의 과정을 거친 후 GAGs와 단백질의 복합체인 proteoglycan의 형태로 세포외기질로 분출된다. 이로써 분출된 hyaluronic acid는 배양액에 첨가 전보다 더욱 많은 비율로 세포외기질에 존재하며 여러 세포의 단백질과 기타 성장인자와 결합하여 세포발달을 도울 것으로 사료된다.

Hyaluronic acid는 첨가 GAGs 물질 중 가장 좋은 혈청 대체효과를 나타내었는데, 이러한 결과가 나타나게 된 것은 합성과정을 살펴볼 때 hyaluronic acid의 합성만 이루어지는 것이 아니라 chondroitin sulfate를 포함하여 다른 GAGs 사슬들과 core protein이라는 단백질이 결합하여 복합적으로 완성된 proteoglycans의 형태를 가지고 세포외기질로 분출되기 때문에 다른 GAGs들보다 세포외 물질들의 신호전달에 많이 관여할 것으로 사료된다. 또한 혈청이 있는 상태와 없는 상태에서 첨가수준에 따라 발달율이 차이를 보인 이유는 혈청이 있는 상태에서 첨가된 hyaluronic acid는 ionic strength에 의해 배양액 내에 존재하는 혈청에 있는 알부민을 포함한 여러 성장인자들과 결합함으로써 세포의 발달에 관여하는 신호전달에 장애가 생김으로 인해 혈청이 없는 상태와 다른 발달상의 차이를 보인 것으로 사료된다.

Chondroitin sulfate를 혈청이 있는 배양액에 첨가한 결과 0.1mg/ml 수준에서 배반포 형성에 유의적인 발달차이를 보여 주었다. 또한 혈청이 없는 상태에서 chondroitin sulfate 첨가는 0.5mg/ml 수준에서 배반포 형성에 있어 대조군에 비해 유의적인 발달차이를 보여 주었다. 이 결과는 chondroitin sulfate가 수정란의 발달을 촉진시킴을 시사해 주

고 있으며 Koichiro 등(1998)이 보고한 돼지 체외 배양액에 chondroitin sulfate 첨가결과와 비슷한 양상을 보여 주었다.

Chondroitin sulfate의 수정란 발달 촉진 기작은 다음과 같이 사료된다. 배양액에 첨가된 chondroitin sulfate가 ligand로 세포외에 존재하면서 CD44 proteoglycan은 hyaluronic acid와 함께 chondroitin sulfate의 수용체 역할도 한다는 Larson 등(1992)의 연구보고에 의해 CD44 proteoglycan에 결합하게 된다. Hyaluronic acid와 마찬가지로 chondroitin sulfate가 CD44 proteoglycan에 결합하게 되면 세포신호전달이 이루어지고, chondroitin sulfate의 합성이 증가하여 세포외기질로 분출되게 된다. Chondroitin sulfate는 성장인자를 포함한 세포외기질 단백질과 많은 연관성을 가지고 있는데, Moyano 등(1999)의 연구에 의하면 chondroitin sulfate는 fibronectin과 결합하여 세포의 성장과 분화에 관여한다고 보고하였고, Milev 등(1998)의 보고에 의하면 chondroitin sulfate는 bFGF와도 결합하여 세포의 분화를 촉진한다고 보고하였다. 이에 세포외기질로 분출된 chondroitin sulfate는 세포의 단백질과 성장인자의 수용체 역할을 함으로써 결합을 통하여 세포발달을 촉진시킬 것으로 사료된다.

Chondroitin sulfate를 체외 배양액에 첨가하였을 때 배양액 내 혈청의 유무에 따라 발달상에 큰 차이를 나타내지 않은 것은, Obrink 등(1975)의 연구보고에 따라 chondroitin sulfate가 다른 GAGs를 포함한 기타 배양액에 존재하는 물질보다 상대적으로 약한 ionic charge를 띄고 있기 때문에 혈청내에 있는 다른 단백질들과 결합력이 떨어져 혈청이 없는 배양액에서와 비슷한 결과가 나온 것으로 사료된다. 또한 혈청이 들어 있는 실험군에서 발달율이 크게 다르지 않은 양상으로 나타난 것은 chondroitin sulfate의 성분들은 혈청인자들과의 상승효과(synergy effect)는 없음을 시사해 주고 있다. 현재까지 보고된 연구에 의하면 chondroitin sulfate는 폐쇄난포의 주요 물질이며(Bellin 등, 1984), 생식세포의 수정율을 저하시킨다고 보고되었다(Gitte 등, 1994). 그러나 이번 결과에서의 chondroitin sulfate는 배반포 발달을 촉진시킨다는 결과를 중



합해 보았을 때 chondroitin sulfate는 생식세포 발달에 있어 각 시기별로 다양한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Dermatan sulfate를 혈청이 있는 배양액에 첨가한 결과 0.1, 1.0 mg/ml 수준에서 상실패와 배반포 발달이 대조군에 비해 유의적으로 낮은 발달 차이를 보여 주었다. 이 결과는 dermatan sulfate가 수정란의 발달을 저해하였음을 시사해 주고 있으며, Koichiro 등(1998)이 보고한 돼지 체외배양액에 dermatan sulfate를 첨가하였을 때 수정란의 발달상에 차이가 없었던 것과는 다른 양상을 보여 주었다. 따라서 dermatan sulfate는 세포발달에 있어 종 특이적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Dermatan sulfate의 수정란 발달 저해기작은 다음과 같이 추측된다. Stanford 등(1999)의 보고에 따르면 dermatan sulfate의 수용체는 dermatan sulfate 자기 자신으로서, 세포배양액에 첨가된 dermatan sulfate는 ligand로서 세포외에 존재하며 dermatan sulfate에 결합함을 추측할 수 있다. 또한 dermatan sulfate는 강한 음이온을 띄고 있기 때문에 다른 세포의 단백질들과 강한 결합력을 가지는 특성이 있다(Lyon 등, 1998). 그러므로 배양액에 존재하며 세포의 발달을 돕는 단백질들과 강한 ionic charge에 의해 결합함으로써 세포의 단백질에 대한 blocking 작용으로 세포 발달이 저해된 것으로 사료된다. 또한 혈청이 있는 실험군에서 더 좋은 발달상의 차이를 나타내지 못하였으므로 dermatan sulfate는 혈청인자와의 상승효과는 없는 것으로 사료된다.

세포발달에 가장 효과적인 영향을 준 hyaluronic acid와 chondroitin sulfate를 0.25 mg/ml과 0.5 mg/ml 수준에서 각각 혼합첨가한 결과, 첨가하지 않은 대조군과 비교하였을 때 유의적으로 낮은 발달 차이를 보여 주었다(Table 7). 이 결과는 hyaluronic acid와 chondroitin sulfate의 조합이 수정란의 발달을 저해하였음을 나타냈는데, 가능한 작용기전은 다음과 같이 생각할 수 있다. Lyon 등(1998)의 보고에 의하면 세포배양액에 recombinant GAGs를 첨가하였을 때 GAGs 간의 강한 친화력으로 인해 성장인자를 포함한 세포외 단백질들과의 결합

이 저해되었다고 보고하였다. 이에 따라 세포 배양액에 첨가된 chondroitin sulfate와 hyaluronic acid는 두 GAGs 물질 사이의 강한 친화적 작용을 보이며, 또 다른 한편으로는 배양액 내에 존재하는 단백질들과의 결합을 통해 세포내 신호전달을 하지 못하여 세포발달을 저해한 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합하면, 여러 종류의 GAGs 중 hyaluronic acid와 chondroitin sulfate는 생쥐 수정란의 체외배양에 있어 혈청 대체효과를 나타냄으로써 궁극적으로 단순배양액 배양체계를 확립하는데 있어 기초자료로서 의의가 있다. 그러나, 더 나아가 다른 종류의 GAGs를 첨가하였을 때 수정란 발달에 미치는 영향 그리고 GAGs를 농도별로 다양한 조합을 하였을 때 수정란발달에 미치는 영향 등을 각각도로 조사함으로써, GAGs에 의한 혈청의 대체효과를 극대화하여 무혈청 배양체계 확립과 단순배양액 배양체계를 구축하는 방향으로 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 요약

최근 많은 연구자들에 의해 무혈청 배양 체계에 대한 관심이 증가해가고 있다. 이러한 연구 동향에 대한 접근의 일환으로 GAGs의 첨가는 무혈청 배양 체계 확립의 가능성을 제시해 주었을 뿐만 아니라 수정란 이식에 있어서도 동질의 수정란을 공급할 수 있는 배양 체계 확립으로의 접근이 가능해졌다. 특히, 배양액에 혈청인자의 대체물질로 hyaluronic acid 0.1, 0.5, 1.0mg/ml의 첨가와 chondroitin sulfate 0.5mg/ml을 첨가하였을 때 혈청의 대체효과가 나타났는데, 이러한 결과를 통해 혈청인자 대신 GAGs를 첨가함으로써 기존의 포유동물의 체외배양에 있어 혈청 첨가에 의해 발생하는 세포 이상과 기형을 줄이고, 각 혈청 인자간에서 생기는 조성분의 차이를 줄이므로 생명 공학 연구의 기초적인 연구 자료가 될 뿐 아니라 수정란 이식에 있어 더욱 체계적이고 보편적인 배양 효과를 가져올 것으로 사료된다. 그러므로 더 나아가 GAGs의 다양한 조합을 통한 배양액 첨가와 시기별로 다른 순차적 (sequential) 첨가에 의한 수정란의 발

달에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## VI. 인용문헌

1. Bellin, M.E. and Ax, R.L. 1984. Chondroitin sulfate : An indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinology* 114:428-434.
2. Culty, M., Miyake, K., Kincade, P.W., Sikorski, E., Butcher, E.C. and Underhill, C.B. 1990. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 111:2765-2774.
3. Erkki, R. and Yamaguchi, Y. 1991. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64:867-869.
4. Eriksen, G.V., Malmstrom, A., Uldbjerg, N. and Huszar, G.A. 1994. Follicular fluid chondroitin sulfate proteoglycan improves the retention of motility and velocity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 62:618-623.
5. Gardner, D.K., Barnes, F.L., Crombie, A., Kausche, A., Lacham-Kaplan, O., Tiglias, J., Wood, C. and Trounson, A.O. 1995. Blastocyst development and birth after *in-vitro* maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum. Reprod.* 10:3243-3247.
6. Gitte, V., Eriksen, A.M., Niels, U. and Gabor, H. 1994. A follicular fluid chondroitin sulfate proteoglycan improves the retention of motility and velocity of human spermatozoa. *Fertil. and steril.* 62:618-623.
7. Koichiro, K., Takashi, M. and Seichiro, K. 1998. Effect of glycosaminoglycans on the development of *in vitro*-matured and fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage *in vitro*. *Biol. Reprod.* 58:1226-1232.
8. Larson, R.C., Ignatz, G.G. and Currie, W.B. 1992. Effect of fibronectin on early embryo development in cows. *J. Reprod. Fertil.* 96: 289-297.
9. Legge, M., Hill, B.L., Shackell, G.H. and Mcleod, B.J. 1996. Glycosaminoglycans of the uterine and vaginal cul-de-sac tissue in the brushtail possum. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:819-823.
10. Liu, Z. and Foote, R.H. 1996. 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. Assist. Reprod. Genet.* 13:562-568.
11. Lyon, M., Deakin, J.A., Rahmoune, H., Fernig, D.G., Nakamura, T. and Gallagher, J.T. 1998. Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* 273:271-278.
12. Milev, P., Monnerie, H., Popp, S., Margolis, R.K. and Margolis, R.U. 1998. The core protein of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan is a high-affinity ligand of fibroblast growth factor-2 and potentiates its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* 273:21439-21442.
13. Moyano, J.V., Carnemolla, B., Albar, J.P., Leprini, A., Gaggero, B., Zardi, L. and Garcia-Pardo, A. 1999. Cooperative role for activated alpha4 beta1 integrin and chondroitin sulfate proteoglycans in cell adhesion to the heparin III domain of fibronectin. *J. Biol. Chem.* 274:135-142.
14. Noonan, D.M. and Hassel, J.R. 1993. Proteoglycans of basement membranes. Academic Press Inc. New York, U.S.A. p189-210.
15. Obrink, B., Laurent, T.C. and Carlsson, B. 1975. The binding of chondroitin sulfate to collagen. *FEBS Lett.* 56:166-169.
16. Stanford, C.M., Solorsh, M. and Keller, J.C. 1999. Significant role of adhesion properties of primary osteoblast-like cells in early adhesion

- events for chondroitin sulfate and dermatan sulfate surface molecules. J. Biomed. Mater. Res. 47:345-352.
17. Stojkovic, M., Thompson, J.G. and Tervit, H.R. 1999. Effects of hyaluronic acid supplementation on *in vitro* development of bovine embryos in a two-step culture system. Theriogenology (suppl.) 254.  
(접수일자: 2000. 8. 21. / 채택일자: 2000. 9. 20.)