

Myo-inositol이 돼지 난모세포의 체외성숙에 미치는 영향*

조인식 · 한효원 · 이상미 · 박효영 · 정영희 · 문승주 · 강승률¹ · 강만종[†]

전남대학교 농업생명과학대학, 동물자원학부

초 록

본 연구는 미성숙 돼지 난모세포의 체외 성숙에 있어서 myo-inositol의 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 미성숙 돼지 난모세포를 myo-inositol을 포함하는 또는 포함하지 않은 체외 성숙배지에서 44시간 체외 성숙을 유도하였을 때 성숙율은 myo-inositol을 첨가한 성숙배지에서 성숙시킨 실험구에 유의하게 높았다($P<0.05$). Myo-inositol에 의한 성숙율 향상에 있어서 난구세포의 영향을 알아보기 위하여 난구세포의 치밀도에 따라 분류하여 미성숙 난모세포를 myo-inositol을 포함하는 체외 성숙배지에서 배양하였을 때 난구세포가 치밀한 미성숙 난모세포에서가 더 높은 성숙율을 나타내었다($P<0.05$). 그러나 난구세포가 치밀하지 않은 미성숙 난모세포도 myo-inositol을 포함하는 성숙배지에서 배양하면 성숙율은 대조구에 비하여 유의하게 높았다($P<0.05$). 이러한 결과는 돼지 난모세포의 체외 성숙배지에 myo-inositol의 첨가는 체외 성숙율을 향상시킬 수 있음을 나타내고 있다.

(주제어 : Porcine oocyte, Myo-inositol, inositol, 1,4,5-triphosphate, 1,2-diacylglycerol)

서 론

Myo-inositol은 세포내 정보전달과정에 관여하는 phosphatidylinositol (PI)의 구성성분으로서 중요한 세포내 기능을 수행한다. PI는 세포 내에서 특이적 인산화효소에 의하여 PI4-phosphate(PIP), PI4,5-phosphate(PIP₂)로 변환되며 PIP₂는 phospholipase C(PLC)에 의하여 세포내 second messengers인 1,2-diacylglycerol(DAG)과 inositol 1,4,5-triphosphate(IP₃)로 변환된다. 생산된 DAG와 IP₃은 각각 protein kinase C의 활성과 Ca²⁺의 동원에 관여하여 다양한 세포내 신호전달에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Berridge와 Irvine, 1989). 또한 myo-Inositol은 많은 막결합단백질의 anchor로서 glycosylphosphatidylinositol(GPI)의 전구체로 작용하며 신호분자로 작용하는 inositol phosphoglycan을 생산하기도 한다(Low와 Saltiel, 1988; Jones와 Varela-Nieto, 1998).

이러한 myo-inositol의 세포내 도입에 관여하고 있는 수송체는 Madin-Darby canine kidney(MDCK) cell에서 동정되어 sodium inositol co-transporter(SMIT)로 명명되고 있으며(Kwon 등, 1992) 수정란에서도 이와 같은 수송체가 myo-inositol을 세포내로 도입하는 것으로 추측되고 있다(Higgins와 Kane, 2003).

한편 미성숙 난모세포에 있어서 FSH와 같은 호르몬이 난구세포막에 존재하는 수용체에 결합하면 phospholipase C(PLC)가 활성화되어 PI4,5-phosphate(PIP₂)로부터

세포내 second messengers인 1,2-diacylglycerol(DAG)과 inositol 1,4,5-triphosphate(IP₃)를 생산하며 이들은 각각 protein kinase C(PKC)의 활성과 Ca²⁺를 동원하는 것으로 보고되고 있다(Berridge와 Irvine, 1989). 활성화된 PKC는 mitogen-activated protein kinase(MAPK)를 활성화하고 이러한 활성은 단백질합성을 촉진하여 난자의 germinal vesicle(GV)단계를 germinal vesicle breakdown(GVBD)단계로 유도하는 것으로 생각되어지고 있다(Fan 등, 2004). 또한 IP₃에 의하여 활성화된 Ca²⁺은 cAMP 등에 의한 성숙억제를 해제시켜 성숙분열이 재개되도록 하여 제1 성숙분열 중기를 거쳐 제2 성숙분열 중기로 성숙이 진행시킨다고 보고되고 있다(Homa 등, 1991; Peres 등, 1991; Carroll과 Swann, 1992).

이와 같은 연구 결과로 미루어 볼 때, phosphatidylinositol (PI)의 전구체인 myo-inositol을 돼지 미성숙 난모세포의 성숙배지에 첨가하면 PI 대사계가 활성화되어 제2차 정보전달물질인 Inositol 1,4,5-trisphosphate(IP₃)과 1,2-Diacylglycerol(DAG)이 생성될 것으로 생각되며 이를 제2차 정보 전달 물질이 난모세포의 성숙을 촉진하거나 또는 성숙 관련 다른 대사 물질을 활성화 시킬 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구는 돼지 난모세포의 체외성숙에 미치는 myo-inositol의 영향을 조사하기 위하여 1) inositol 농도, 2) 난모세포 등급, 3) 난구세포의 유무에 대해 검토하였다.

재료 및 방법

* 본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 (R11-2002-100-00000-0) 지원으로 수행되었음.

[†] 농촌진흥청 난지농업연구소(National Institute of Subtropical Agriculture, RDA)

[†] Corresponding author : Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci. and Tech., College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University, E-mail: mjkang@chonnam.ac.kr

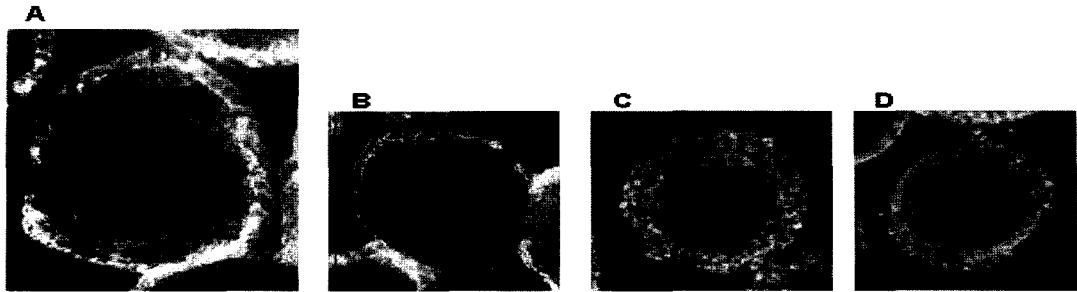


Fig. 1. Photomicrographs of porcine oocytes used in *in vitro* maturation.
(A) A grade, (B) B grade, (C) C grade, (D) D grade.

난모세포 회수 및 등급분류

도축장에 출하되는 체중 약 90 kg 전후의 암퇘지로부터 난소를 적출하여 35°C로 유진한 0.9%의 생리식염수에 보존하여 실험실로 운반한 후, 18-gage 주사기를 이용해 직경 3~6 mm의 난포로부터 흡입한 난포내용물에서 난모세포를 채취 및 선별하였다. 채취된 난모세포는 실체 현미경(Nikon, Japan)에서 난구세포의 치밀도에 따라 다음과 같이 분류하였다(Fig. 1). A등급은 난자의 전체가 4층 이상의 난구세포로 둘러싸여 있으며 난세포질이 균일한 것, B등급은 난세포질이 균일하거나 2층 이상의 난구세포로 둘러싸여 있는 경우, C등급은 난자가 1층의 난구세포로 거의 벗겨져 있고 전체적으로 난세포질이 옅은 경우, D등급은 난구세포 층이 거의 없고 난세포질이 균일하지 않은 것 등으로 분류하여 체외성숙에 공시하였다.

난모세포의 체외 성숙 및 판정

난모세포의 체외성숙은 10%의 FBS(fetal bovine serum)가 함유된 Witten's 배양액을 사용하였다. 선별된 난모세포는 PMSG 10 IU/ml와 HCG 10 IU/ml의 호르몬(Intervet 사)이 첨가된 배양액을 pH 7.2로 조절하고 0.2 μm syringe filter로 여과한 후, 4-well dish에 500 μl씩 분주하여, mineral oil(Sigma)로 피복한 다음 각 well당 50개씩 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22시간(0~22h)을 배양하였다. 나머지 22시간(22~44h)은 호르몬을 첨가하지 않은 10%의 FBS(fetal bovine serum)가 함유된 Witten's 배양액에서 배양하여 체외성숙을 유도하였다. 성숙 중 myo-inositol (Sigma I5125) 농도의 영향을 알아보기 위해서 0 μmol, 150 μmol, 250 μmol, 350 μmol을 처리하였으며, 그 외 실험에서는 250 μmol의 Inositol을 사용하였다. 성숙이 완료된 난모세포는 0.2% hyaluronidase액에서 5분간 voltexing한 후 PBS로 3회 세척하여 난구세포를 완전히 제거한 다음 성숙판정을 위한 고정에 이용하였다.

또한 난구세포 제거 난모세포(cumulus-denuded oocytes)의 배양은 미성숙 난모세포를 2% citric acid를 포함하는 Witten's 배양액에서 7분간 배양한 다음 5분간 voltexing하여 난구세포를 완전히 제거한 후 Witten's 배양액으로 3회 세척하여 난구세포가 존재하지 않은 조건에서 체외성숙을 실시하였다.

난모세포의 성숙판정

체외 성숙배양이 완료된 난모세포는 고정액(ethanol :

acetic acid=3:1)으로 48시간 고정한 다음 1% aceto-orcein 염색액으로 염색한 후 위상차현미경으로 핵상을 관찰하였다. 성숙판정은 제1극체와 염색체가 관찰이 되는 제2성숙 분열중기(MII: Second Metaphase)에 있는 것을 성숙난자로 판정하였다.

통계처리

각 처리구간의 유의차를 검증을 위하여 통계처리는 SAS GLM(generalized linear model)의 Duncan 다중검정법(multiple range test)을 이용하여 5%(P<0.05) 신뢰구간에서 실시하였다.

결 과

Myo-inositol의 농도가 돼지 미성숙 난모세포의 성숙에 미치는 영향을 알아보기 위하여 난자의 전체가 4층 이상의 난구세포로 둘러싸여 있으며 난세포질이 균일한 A등급, 난세포질이 균일하거나 2층 이상의 난구세포로 둘러싸여 있는 B등급의 난모세포를 이용하여 0 μmol, 150 μmol, 250 μmol, 350 μmol의 myo-inositol을 포함하는 성숙배지에서 44시간 배양하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 myo-inositol을 포함하지 않은 대조구에서는 전체 354개의 미성숙 난모세포 중 308개가 성숙하여 87.1%의 성숙율을 보였으나 myo-inositol을 각각 150 μmol, 250 μmol, 350 μmol을 처리한 실험군에서는 각각 383개의 난모세포 중 358개(93.6%), 378개의 난모세포 중 354개(93.7%), 378개 난모세포 중 352개(93.0%)가 성숙 발달하여 각 처리구가 전체적으로 비슷한 성숙율을 보였다. 그러나 myo-inositol을 처리한 실험구 모두는 대조구에 비하여 성숙율이 유의하게 높았다(P<0.05).

난구세포의 치밀도에 따라 myo-inositol이 성숙에 미치는 영향을 알아보기 위하여 A, B 등급과 C, D 등급의 난모세포를 250 μmol의 myo-Inositol을 처리하였을 때의 성숙율을 조사하였다(Table 2). 난구세포가 치밀한 A, B 등급에서는 myo-inositol을 처리한 경우 94.5±1.5%로 myo-inositol을 처리하지 않은 대조구의 87.4±2.2%에 비하여 성숙율이 높았으며 두 처리구간에 유의차가 인정되었다(P<0.05). 한편 난구세포가 치밀하지 않은 C, D 등급에서는 myo-inositol을 처리하지 않은 경우 194개의 미성숙난포란 중 99개의 난모세포가 성숙하여 50.9±7.9%의 낮은 성숙율을 보였으나 myo-inositol을 처리한 실험구에서는 209개의 미

Table 1. Effect of different myo-inositol concentration during *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes

Concentration of myo-inositol(μmol)	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured
0	354	308(87.1±4.2) ^a
150	383	358(93.6±4.3) ^b
250	378	354(93.7±2.7) ^b
350	378	352(93.0±3.5) ^b

Values with different superscripts within column were significantly different ($P<0.05$).

Table 2. Effect of myo-inositol on oocytes grade during *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes

Oocyte grade	Treatment of myo-inositol	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured
A and B grade	-	271	237(87.4±2.2) ^c
	+	263	249(94.5±1.5) ^d
C and D grade	-	194	99(50.9±7.9) ^a
	+	209	150(65.8±8.1) ^b

Values with different superscripts within column were significantly different ($P<0.05$).

성숙 난모세포 중 150개의 난모세포가 성숙 발달하여 65.8±8.1%의 성숙율을 보여 두 처리구간에 유의차가 있었다($P<0.05$). 그러나 난구세포가 치밀하지 않은 미성숙 난모세포에 myo-inositol의 처리는 성숙율(-inositol, 50.9±7.9%; +inositol, 65.8±8.1%)을 향상시킬 수 있었으나 난구세포가 치밀한 미성숙 난모세포의 성숙율(-inositol, 87.4±2.2%; +inositol, 94.5±1.5%)에 비하여 낮은 성숙율을 나타내어 유의적 차이가 있었다($P<0.05$).

Myo-inositol 처리에 의한 체외성숙에 있어서 난구세포의 영향을 알아보기 위하여 난구세포가 치밀한 A, B 등급 미성숙 난모세포와 치밀하지 않은 C, D 등급 미성숙 난모세포에 2%의 Citric acid를 처리하여 난구세포를 인위적으로 제거한 후 체외 성숙율을 조사하였다(Table 3). 난구세포를 제거한 A, B 등급 난모세포에 myo-inositol을 처리하지 않은 경우 173개의 미성숙 난모세포 중 73개가 성숙하여 44.9±8.8% 성숙율을 나타내었으며 myo-inositol을 처리한 경우는 163개의 미성숙 난모세포 중 105개가 성숙하여 65.1±5.7%의 성숙율을 나타내어 두 처리간에는 유의적인 차이를 보였다($P<0.05$). 또한 난구세포를 제거한 C, D 등급 난모세포에서도 myo-inositol을 처리하지 않은 경우에는 23.9±3.1%, myo-inositol을 처리한 경우에는 41.1±1.7%의 성숙율로 myo-inositol을 처리하지 않은 실험구 보다 다소 높은 성숙율을 나타내었다. 이 실험에서 전체적인 성숙율은 난구세포를 제거한 A, B 등급미성숙 난모세포에서 높은 성숙율을 나타내었다.

Table 3. Effect of myo-inositol during *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes that cumulus cell is removed with 2% citric acid

Oocyte grade	Treatment of myo-inositol	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured
A and B grade	-	173	73(44.9±8.8) ^b
	+	163	105(65.1±5.7) ^c
C and D grade	-	130	31(23.9±3.1) ^a
	+	127	52(41.1±1.7) ^b

Values with different superscripts within column were significantly different ($P<0.05$).

고 칠

Myo-Inositol은 phosphatidylinositol (PI) 합성에 있어서 전구체로 이용이 되고 진핵세포의 생장에 있어서 필수적인 기질이다(Downes, 1989). Phosphoinositides의 대사가 포유동물 난자의 감수분열에 의한 성숙을 유도할 수 있다는 보고(Homa, 1991; Chiu 등, 1993)가 있지만 돼지 난모세포의 체외성숙에 미치는 myo-inositol의 영향에 대하여 구체적으로 보고된 바는 없다.

본 연구의 Table 1에 나타낸 바와 같이 myo-inositol을 첨가한 성숙배지에서 체외성숙시킨 돼지 미성숙 난모세포의 성숙율은 대조구에 비하여 상대적으로 높았다. 이와 같은 결과는 Pesty 등(1994)이 마우스 난모세포의 성숙배양에 myo-inositol을 첨가하면 성숙율이 대조구에 비하여 높았다는 보고와 일치하는 결과였다. 또한 Chiu 등(2003)도 myo-inositol을 mouse 성숙배지에 첨가를 하면 GV 단계에서 GVBD 단계로의 성숙이 향상됨을 보고와도 일치하는 경향이었다. 이와 같은 myo-inositol의 세포내 도입에 관여하는 myo-inositol 수송체가 Kwon 등(1992)에 의하여 그 유전자가 cloning되었으며 마우스 난모세포에도 myo-inositol의 수송체가 존재한다고 보고되고 있다(Pesty 등, 1994; Higgins와 Kane, 2003).

난모세포에 있어서 phosphatidylinositol (PI)의 대사계는 protein kinase C(PKC)의 활성과 Ca^{2+} 을 동원하는 것으로 보고되고 있다(Berridge와 Irvine, 1989). 활성화된 PKC는 mitogene-activated protein kinase(MAPK)을 활성화하고 이러한 활성을 단백질합성을 촉진하여 germinal vesicle(GV)단계의 난자를 germinal vesicle breakdown (GV-BD)로 유도한다(Fan 등, 2004). 또한 IP_3 에 의하여 활성화된 Ca^{2+} 은 cAMP 등에 의한 성숙억제를 해제시켜 성숙분열이 재개되도록 하여 제 1 성숙분열 중기를 거쳐 제 2 성숙분열 중기로 성숙과정을 진행시킨다(Homa 등, 1991; Peres 등, 1991; Carroll과 Swann, 1992). 위와 같은 결과를 종합하여 볼 때 난구세포는 phosphatidylinositol (PI) 대사를 통한 미성숙 난모세포의 성숙에 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 난구세포의 존재가 myo-inositol에 의한 미성숙 돼지 난포란의 체외 성숙을 촉진시키는지 알아보기 위하여 실험을 실시한 결과 Table

2와 3에서 제시한 바와 같이 myo-inositol의 첨가는 난구세포가 치밀하지 않은 미성숙 난모세포 또는 난구세포를 제거한 미성숙 난모세포의 체외 성숙을 향상시키는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 난구세포의 치밀한 정도가 myo-inositol 처리에 의한 성숙에 어느 정도의 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 난구세포가 치밀하지 않은 미성숙 난모세포의 성숙을 myo-inositol이 향상시키는 것으로 보아 난구세포로부터의 phosphatidylinositol (PI)의 대사계 뿐만 아니라 난세포막을 통한 PI 대사계도 존재할 가능성을 제시하고 있다. 또한 이러한 결과는 난구세포가 치밀하지 않은 낮은 등급의 미성숙 난모세포(C, D 등급)의 체외 성숙에 있어서 myo-inositol의 첨가는 성숙율을 향상시킬 수 있음을 나타내고 있다.

그리고 마우스에 있어서 myo-inositol의 첨가는 성숙율, 수정 후 발달율, 착상을 등을 향상시키는 것으로 보고되고 있으며(Chiu 등, 2003), 토끼 상실배 수정란의 배반포기로의 발달도 향상시키는 것으로 보고하고 있다(Kane, 1989). 그러므로 myo-inositol이 미성숙 난모세포뿐만 아니라 수정란의 발달에도 여러 세포내 신호전달에 관여하고 있는 것으로 생각되어진다. 그러므로 본 연구에서 실시된 돼지 미성숙 난모세포의 성숙에 있어서 myo-inositol의 첨가가 체외 수정, 체외발달에도 영향을 주는지에 대해서는 앞으로 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다. 또한 돼지 난모세포에 있어서 myo-inositol에 의한 정보전달에 관여하는 유전자들의 발현도 차후에 검토가 이루어져야 한다.

이와 같은 연구 결과로 미루어 볼 때, phosphatidylinositol (PI)의 전구체인 myo-inositol을 돼지 미성숙 난모세포의 성숙배양시 첨가하면 돼지 난모세포의 성숙을 촉진시키는 것으로 사료된다.

인용문헌

- Berridge, M.J. and Irvine, R.F. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. 341:197-205.
- Chiu, T.T., Rogers, M.S., Britton-Jones, C. and Haines, C. 2003. Effects of myo-inositol on the *in-vitro* maturation and subsequent development of mouse oocytes. *Hum. Reprod.* 18:408-416.
- Carroll, J. and Swann, K. 1992. Spontaneous cytosolic calcium oscillation driven by inositol triphosphate occur during *in vitro* maturation of mouse oocytes. *J. Biol. Chem.*, 267:11196-11201.
- Downes, C.P. 1989. The cellular function of myo-inositol. *Biochem. Soc. Trans.* 17:259-268.
- Fan, H., Huo, L., Chen, D., Schatten, H. and Sun, Q. 2004. Protein kinase C and mitogene-activated protein kinase cascade in mouse cumulus cells: Cross talk and effect on meiotic resumption of oocyte. *Biol. Reprod.* 70:1178-1187.
- Homa, S.T., Webster, S.D. and Russell, R.K. 1991. Phospholipid turnover and ultrastructural correlates during spontaneous germinal vesicle break-down of the bovine oocytes: Effects of cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor. *Dev. Biol.* 146: 461-472.
- Higgins, B.D. and Kane, M.T. 2003. Inositol transport in mouse oocytes and preimplantation embryos: effects of mouse strain, embryo stage, sodium and the hexose transport inhibitor, phloridizin. *Reproduction*. 125:111-118.
- Jones, D.R. and Varela-Nieto I. 1998. The role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:313-326.
- Kwon, H.M. Yamauchi, A., Uchida, S., Preston, A.S., Garcia-Perez, A., Burg, M.B. and Handler, J.S. 1992. Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-Inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J. Biol. Chem.* 267:6297-6301.
- Low, M.G. and Saltiel, A.R. 1988. Structural and functional roles of glycosyphosphatidylinositol in membranes. *Science* 239:268-275.
- Peres, A., Bertolini, L. and Racca, C. 1991. Characterization of Ca²⁺ transients induced by intracellular photorelease of InsP3 in mouse ovarian oocytes. *Cell Calcium*. 12:457-465.
- Pesty, A., Lefevre, B., Kubiak, J., Geraud, G., Tesarid, J. and Maro, B. 1994. Mouse oocyte maturation is affected by lithium via the polyphosphoinositide metabolism and the microtubule network. *Mol. Reprod. Dev.* 38:187-199.

(접수일자: 2004. 4. 20. / 채택일자: 2004. 6. 18.)

Effect of Myo-Inositol on *In Vitro* Maturation of Porcine Oocytes

Cho, I. S., H. W. Han, S. M. Lee, H. Y. Park, Y. H. Jeoung, S. J. Moon, S. Y. Kang and M. J. Kang

Department of Animal Science, Institute of Agricultural Science and Technology., College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University

ABSTRACT

This study was carried out to assess whether the addition of myo-inositol to maturation medium could improve porcine oocyte maturation *in vitro*. Oocytes were cultured for the first 22 h in Witten's medium containing 10IU/ml PMSG, 10 IU/ml HCG supplemented with or without myo-inositol. Subsequently, they were cultured for additional 22 h in Witten's medium without hormone supplemented with or without myo-inositol. When the porcine oocytes were cultured in maturation medium containing myo-inositol, the proportion of metaphase II oocytes 44h after culture was higher in the myo-inositol group($P<0.05$). To study effects of cumulus cell on the maturation induced by myo-inositol, we examined the maturation status of cumulus-enclosed or cumulus-denuded porcine follicular oocytes. The rates of maturation were significantly higher in the cumulus-enclosed oocytes($P<0.05$). However, the maturation rates of cumulus-denuded oocytes cultured in medium containing myo-inositol were higher than those of control group($P<0.05$). Our results suggest that myo-inositol may affect meiotic progression of porcine follicular oocytes and supplementation of myo-inositol in maturation medium may be useful for the *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes.

(Key words : Porcine oocyte, Myo-inositol, Inositol 1,4,5-triphosphate(IP3), 1,2-diacylglycerol(DAG))