

낮은 농도의 Hypoxanthine과 FSH가 미성숙난자의 체외성숙에 미치는 영향

연세대학교 원주의과대학 산부인과학교실¹, 21세기 산부인과²

한혁동^{1*} · 임창교² · 염현식¹ · 현나영¹ · 이지향¹ · 홍 미¹

The Effect of Low Concentrated Hypoxanthine and FSH in 10% FBS Supplemented Medium on Immature Oocyte in vitro Maturatio

Hyuck Dong Han^{1*}, Chang Kyo Lim², Hyun Sik Youm¹, Naomi Nahyoung Hyon¹, Ji Hyang Lee¹, Me Hong¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea, ²21C OB & GYN Clinic

Objective: We examined the effect of different culture media on oocyte maturation.

Methods: Four groups of media, ① 0.3% BSA mBASAL-XI-HTF, ② 0.3% BSA mBASAL-XI-HTF with FSH, ③ 10% FBS mBASAL-XI-HTF and ④ 10% FBS mBASAL-XI-HTF with FSH were prepared. Mouse cumulus enclosed oocytes (CEOs) were incubated in each group of medium. Hypoxanthine (Hx) was mixed to each group of medium in increasing concentrations of 1 mM, 2 mM and 4 mM. CEOs were incubated and assessed for GVBD and MII development at 3, 6, 18 hours.

Results: CEOs maturation to GVBD was seen in all four groups during 3 hours of culture, however MII stage of oocytes was seen after 6 hours. Complete arrest of GV stage in 4 mM Hx media without FSH and partial arrest in 2 mM Hx media without FSH were seen during 18 hours of culture but development was not suppressed in 1 mM Hx media without FSH. More prominent GVBD suppression was noted at early 3, 6 hours culture in 1 mM, 2 mM Hx media with FSH compared to media without FSH. But the suppression was recovered at 18 hours. This result suggests that low concentrated Hx and FSH supplemented media can suppress CEOs maturation during early culture period but recovery is resumed or even stimulated at late period. 1 mM, 2 mM Hx 10% FBS medium with FSH had significantly higher rates of MII development (71.7%, 66.7%) at 18 hours compared to other media.

Conclusion: Our results show that low concentrated Hx and FSH supplemented 10% FBS media may stimulate MII development after an initial inhibitory effect. [Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(3): 175-186.]

Key Words: Immature oocyte, In vitro maturation, Hypoxanthine, FSH

난자는 포유동물 세포 중 가장 오래 사는 세포로 오랜 기간 동안 1차 감수분열의 중복염색체기 (diploten stage)에서 휴지상태로 유지되고 있다가 월경주기 중 배란기 LH surge 후 감수분열이 재개

된다. 1차 감수분열 휴지기의 난자를 배소낭 (GV; germinal vesicle) 상태의 난자라고 한다. 감수분열이 재개되면 배소낭 파괴 (GVBD; germinal vesicle breakdown)가 일어나고 염색질이 응축 (chromatin condensation)되고 미세소관이 재구성 (microtubule reorganization)되어 중기 방추 (metaphase spindle)를 형성하고 1차 감수분열을 마친 후 2차 감수분열의

주관책임자: 한혁동, 우) 220-701 강원도 원주시 일산동 160번지, 연세대학교 원주의과대학 산부인과학교실
Tel: (033) 741-1272, Fax: (033) 745-5157
e-mail: dong1234@yonsei.ac.kr

중기 난자 (MII stage oocyte; metaphase II stage oocyte)로 성숙되어 정자와 수정될 수 있는 능력을 가진다. 이 과정을 난자의 성숙 (oocyte maturation)이라 한다. 난자의 성숙은 protein kinase와 protein phosphatase에 의한 단백질의 인산화 (phosphorylation), 탈인산화 (dephosphorylation)에 의해 조절되고, 성숙촉진인자 (MPF; maturation promoting factor)가 조절의 중추 역할을 맡고 있다. 또 성숙촉진인자와 함께 최근 MAPK 경로 (mitogen-activated protein kinase cascade)가 난자성숙에 중요한 역할을 함이 알려져 있다.¹⁻³

1935년 Pincus와 Enzmann은 생쥐의 난포에서, 1965년 Edwards는 인간의 난포에서 미성숙난자 (GV stage oocyte)를 채취하고 배양액에서 배소낭 상태 난자가 자연성숙되어 2차 감수분열의 중기 난자로 성숙됨을 발견하였으며 1991년 차 등은 인간의 난포에서 배소낭 상태의 난자를 채취하여 2차 감수분열의 중기 난자로 성숙 후 수정, 배양하여 임신에 성공하였다.⁴⁻⁶ 그러나 아직까지 체외성숙난자의 배 발육은 생체내성숙난자의 배 발육에 비해 낮으며 이것은 미성숙난자의 2차 감수분열의 중기 난자로 성숙하는 핵성숙과 이와 동반되는 원형질 성숙 (cytoplasmic maturation)이 동시에 만족스럽게 일어나지 않았기 때문이고 만족스러운 원형질성숙을 위해서는 배양액 및 배양방법의 개발이 필요하다.^{7,8}

동물실험에서 미성숙난자를 성숙시키는 배양법은 크게 3가지로 나눌 수 있다. 난포로부터 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자를 획득한 후 난구세포를 제거한 미성숙난자 (DO; denuded oocyte)를 배양하는 방법과 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자 (CEO; cumulus cell enclosed oocyte)를 배양하는 방법, 난포 전체를 분리하여 배양하는 방법으로 나누어진다. 이중 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자를 배양하는 방법이 가장 많이 사용되고 있다.

난구세포로 둘러싸인 미성숙난자의 성숙에 관한 연구는 미성숙난자가 성숙억제물질이 있는 난포내에서 배출됨에 따라 자연성숙되는 자연성숙

(spontaneous meiosis)방법과 배양액에 자연성숙 억제물질인 Hypoxanthine (Hx), cAMP 증가물질들을 첨가한 후 자연성숙을 억제하고 난소자극호르몬 (gonadotropin) 혹은 표피성 성장인자 (EGF; epidermal growth factor)를 첨가하여 난자의 성숙을 유도하는 호르몬 유도난자성숙 (induced meiosis)방법이 사용되어 왔다.^{9,10} 많은 연구자들은 이 두 가지 방법을 사용하여 난자성숙 기전을 밝히려는 노력을 하여 왔고 이 연구에서 자연난자성숙과 호르몬 유도에 의한 난자성숙은 그 기전이 다르고 호르몬 유도에 의한 난자성숙이 보다 생리적이라고 지적했다.¹⁰ 그러나 호르몬 유도에 의한 난자성숙이 자연성숙방법에 비해 더 높은 GVBD 발생률이나 MII기 난자 발생을 유도한다는 비교 연구는 거의 없는 실정이다. 지금까지 많이 사용하고 있는 인간 미성숙난자를 이용한 체외수정 및 배아이식에서는 대부분 미성숙난자의 자연성숙을 이용한 배양방법으로 성숙을 촉진하는 물질인 단백질, 아미노산, 호르몬, 성장 촉진제 등을 첨가하여 배양하고 있으며 난포액, 제대혈청 등의 복합물질을 함유하고 있는 체액을 혼합하여 사용하기도 한다. 그러나 이 첨가물질이 난자성숙에 어떻게 영향을 미치는지는 더 많은 연구가 필요하다.¹¹

본 연구에서는 미성숙난자의 배양방법을 개선하기 위하여 단순배양액인 mBASAL-HTF 배양액에서 생쥐 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자 (CEOs)의 자연성숙을 시간별로 관찰하였고 배양액내에 단백질 공급을 위한 BSA (bovine serum albumin), 단백질 외에 다양한 복합물질을 포함하고 있는 FBS (fetal bovine serum), 난포자극호르몬 (FSH; follicle stimulating hormone)을 첨가하여 난자성숙에 미치는 영향을 관찰하였으며, 미성숙난자의 자연성숙을 억제하는 물질인 Hx을 사용하여 농도에 따른 난자성숙 억제양상을 관찰하고 FBS, BSA 배양액에서 난포자극호르몬과 Hx이 미성숙난자의 성숙 (GVBD, MII)에 미치는 영향을 비교 관찰하여 보다 나은 배양방법을 제시하고자 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 생쥐 1대 잡종 B6DBAF1 (C57BL × DBA)의 생후 5~7주령의 암컷을 사용하였으며 사용된 생쥐는 10시간/14시간 광주기를 유지하며 사육하였다.

2. 미성숙난자 획득 및 배양

암컷 생쥐를 임의로 추출하여 발정주기에 관계없이 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 IU를 복강내 주사한 후 48시간 뒤 경추 탈구법으로 도살하여 양측 난소를 회수한 다음 50 mg/ml bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 Dubecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Gibco, Gland Island, NY, USA)이 담긴 배양접시에서 난소를 세척하고 4 mM Hypoxanthine (Hx, Sigma, St. Louis, MO, USA)이 들어있는 Hepes (13 mM)-modified Basal-XI-HTF 배양액에서 28 gauge 주사침으로 난소에 있는 난포를 조심스럽게 천자하여 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자를 회수하였다. 회수된 난자는 modified Basal-XI-HTF (mBASAL XI)에서 세척 후 준비된 난자성숙배양액에 넣어 배양하였다. 실험에 사용된 미성숙난자는 완전히 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자를 선택하여 사용하였고, 난구세포를 제거한 미성숙난자 (DO; denuded oocyte)는 hyaluronidase를 이용하여 미성숙난자의 난구세포를 모두 제거한 후 사용하였다.

미성숙난자 획득 및 성숙배양액은 Quinn 등이 사용한 BASAL-XI-HTF 배양액의 KCl 4.7 mM, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 mM, CaCl₂ · 2H₂O 2.04 mM의 무기염 (inorganic salt)을 기본으로 하고 NaHCO₃ 25 mM, Glucose 2.8 mM, Na pyruvate 0.33 mM, Na lactate 21.4 mM, Glutamine 1.0 mM, Taurine 0.1 mM, EDTA 0.01 mM, Na-citrate 0.0005 mM, 필수아미노산, 비필수아미노산, streptomycin, penicillin 및 phenol red를 첨가

한 modified Basal-XI-HTF를 사용하였다.¹² 미성숙난자의 배양은 ① 0.3% BSA mBASAL-XI-HTF 배양액 (0.3% BSA 배양액), ② 0.3% BSA mBASAL-XI-HTF 배양액에 0.1 IU/ml FSH (Gonal-F[®], Merck Serno, Geneva, Switzerland)를 첨가한 배양액 (FSH 0.3% BSA 배양액), ③ 10% FBS (Gibco, Gland Island, NY, USA) mBASAL-XI-HTF 배양액 (10% FBS 배양액), ④ 10% FBS mBASAL-XI-HTF에 0.1 IU/ml FSH를 첨가한 배양액 (FSH 10% FBS 배양액)의 4개 종류의 배양액에 나누어 배양하였으며 각군의 배양액에서 미성숙난자의 자연성숙을 배양 3시간, 6시간, 18시간에 관찰하였다. 4종류의 각 배양액에 Hx을 섞어 1 mM, 2 mM, 4 mM 농도의 Hx을 함유한 배양액을 만들었고 난자의 성숙억제양상을 3시간, 6시간, 18시간에 관찰하였다. 미성숙난자의 배양은 배양접시 (Falcon[®], Becton Dickinson, NJ, USA)를 사용하였으며 각 배양접시에는 배양액 1 ml를 넣고 그 위에 1 ml의 mineral oil을 덮은 후 하룻밤 동안 5.0% CO₂ 배양기에서 평형시킨 후 사용하였다. 각 배양접시에는 완전히 난구로 둘러싸인 10개의 미성숙난자를 넣어 배양하였고 배양 3, 6, 18시간 후 핵막이 소실된 GVBD와 GVBD 중 극체 (polar body)가 보이는 MII기 발생을 관찰하여 백분율 (%)로 표시하였다. 한 배양접시에서 10개의 미성숙난자를 18시간 배양 관찰한 실험을 1회 배양으로 하였고 각 배양은 5회 이상 (5~10회) 실시하였다.

3. 난자의 체내성숙

생쥐난자의 체내성숙의 유도는 PMSG 5 IU를 복강내 주사한 후 48시간 뒤 hCG 5 IU를 복강내 주입하고 18시간 뒤 도살하여 난관에서 배란된 난자의 난구세포를 hyaluronidase로 처리한 후 GVBD, MII기 발생률 (%)을 관찰하였다.

4. 통계학적 검정

통계학적 검정은 PRISM software (GraphPad)를 이용한 unpaired student T-test로 유의성을 검정하였고 결과는 평균 ± 표준편차 (Mean ± SD)로 표시하였

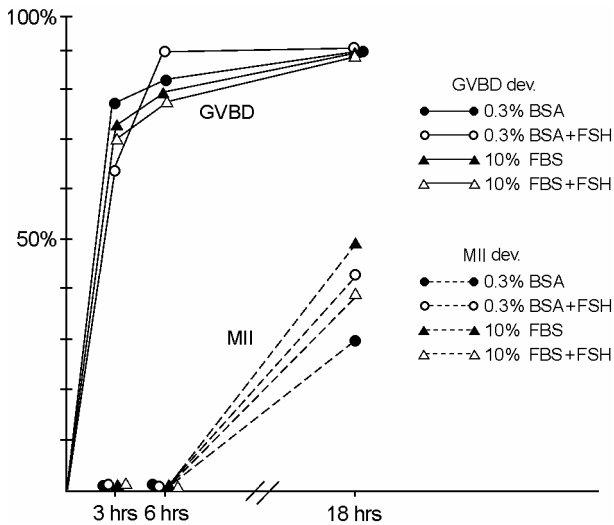


Figure 1. Development of GVBD and MII in 4 groups of media (0.3% BSA medium, 0.3% BSA medium with FSH, 10% FBS medium, 10% FBS medium with FSH)

Hyuck Dong Han. The Effect of Low Concentrated Hx and FSH in 10% FBS Supplemented Medium on Immature Oocyte IVM. Korean J Reprod Med 2009.

으며 p 값 0.05 이하를 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 0.3% BSA 배양액, 10% FBS 배양액, FSH 0.3% BSA 배양액, FSH 10% FBS 배양액에서 시간별 미성숙난자의 GVBD, MII기 발생률 (%)

0.3% BSA 배양액, 10% FBS 배양액, FSH 0.3% BSA 배양액, FSH 10% FBS 배양액에서 GVBD 발생은 3시간 배양 후 76.0%, 74.0%, 64.0%, 70.0%, 6시간 배양 후 82.0%, 79.0%, 88.0%, 77.1%, 18시간 배양 후 88.0%, 86.0%, 92.0%, 87.1%의 발생률을 보여 배양 3시간 내에 대부분의 GVBD가 발생하였고 18시간 동안 4군의 배양액간 GVBD 발생률의 차이는 보이지 않았다 (Table 1, Figure 1). MII기로의 발생은 4군 배양액에서 배양 6시간까지 모두 MII기로 발생되지 않았으며 배양 18시간 후 관찰에서 0.3% BSA 배양액, 10% FBS 배양액, FSH 0.3% BSA 배양액, FSH 10% FBS 배양액에서 30.0%, 50.0%, 44.0%, 38.6%를 보여 10% FBS 배양액이 0.3% BSA

배양액보다 유의하게 높은 MII기 발생률을 보였다 (30% vs. 50%, $p < 0.05$). 그러나 0.3% BSA 배양액과 FSH를 첨가한 0.3% BSA 배양액에서 MII기 발생률의 비교와 10% FBS 배양액과 FSH를 첨가한 10% FBS 배양액에서 MII기 발생률의 비교는 모두 유의한 차이가 없었다 (Table 2, Figure 1).

2. 0.3% BSA 배양액과 10% FBS 배양액에서 (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM) Hx이 난자의 GVBD 발생에 미치는 영향

0.3% BSA 배양액에서 Hx 농도가 증가함에 따라 난자의 성숙억제가 뚜렷하게 보였다. 4 mM Hx 0.3% BSA 배양액에서는 전 배양구간에서 Hx을 넣지 않은 0.3% BSA 배양액 (대조군)에 비해 GVBD 발생이 억제됨을 볼 수 있었고, 2 mM Hx 배양액에서도 대조군에 비해 18시간까지 억제되었다. 그러나 4 mM Hx 배양액과 같이 심한 억제의 결과를 보이지는 않았다. 1 mM Hx 배양액에서는 대조군에 비해 난자의 성숙이 억제되지 않았다.

10% FBS 배양액에서도 0.3% BSA 배양액과 유사하게 성숙이 억제되는 결과를 보였다 (Table 1, Figure 2).

3. FSH를 함유한 배양액 (FSH 0.3% BSA 배양액, FSH 10% FBS 배양액)에 Hx 첨가에 의한 GVBD 발생

1) FSH 0.3% BSA 배양액과 FSH 10% FBS 배양액에 4 mM Hx 첨가

FSH를 첨가하지 않은 배양액과 같이 FSH를 첨가한 FSH 0.3% BSA 배양액과 FSH 10% FBS 배양액에 4 mM Hx을 첨가한 배양액에서도 배양 3시간, 6시간 동안 GVBD 발생은 완전히 억제되었으며 (3시간 배양; 4 mM Hx FSH 0.3% BSA 배양액 0% GVBD, 4 mM Hx FSH 10% FBS 배양액 1.7% GVBD, 6시간 배양; 4 mM Hx FSH 0.3% BSA 배양액 0% GVBD, 4 mM Hx FSH 10% FBS 배양액 5.0% GVBD) 배양 18시간 후 FSH 0.3% BSA 배양액에 4 mM Hx을 첨가한 배양액에서는 62.0%의 GVBD

Table 1. GVBD development in different concentrated Hx media

Medium	Hx concentration	Total oocytes	GVBD (%)		
			3 hours	6 hours	18 hours
0.3% BSA - FSH	0 mM Hx	50	76.0±11.4	82.0±11.0	88.0±8.4
	1 mM Hx	60	71.7±7.5*	85.0±10.5	91.7±9.8
	2 mM Hx	50	42.0±16.4‡	58.0±17.9	58.0±17.9
	4 mM Hx	50	2.0±4.5	2.0±4.5	22.0±13.0
0.3% BSA + FSH	0 mM Hx	50	64.0±15.2	88.0±11.0	92.0±8.4
	1 mM Hx	60	28.3±9.8*	80.0±8.9	85.0±5.5
	2 mM Hx	50	4.0±5.5‡	36.0±28.8	84.0±11.4
	4 mM Hx	50	0	0	62.0±16.4
10% FBS - FSH	0 mM Hx	100	74.0±11.7	79.0±9.9	86.0±8.4
	1 mM Hx	100	62.2±9.2†	72.0±13.2	82.0±11.4
	2 mM Hx	90	53.3±18.8 [¶]	64.4±7.3**	64.4±12.1
	4 mM Hx	50	6.0±5.5	6.0±5.5	10.0±12.3
10% FBS + FSH	0 mM Hx	70	70.0±14.1	77.1±7.6	87.1±11.1
	1 mM Hx	60	36.7±12.1†	85.0±12.3	91.7±9.8
	2 mM Hx	60	5.0±8.4 [¶]	33.3±12.1**	73.3±8.2
	4 mM Hx	60	1.7±4.1	5.0±12.3	10.0±11.0

Values are Mean ± SD

Total oocytes: total cultured immature oocytes during 18 hours (Culture times: Total oocytes / 10)

* GVBD (%) at 3 hrs culture in 1 mM Hx 0.3% BSA medium vs. in 1 mM Hx 0.3% BSA medium with FSH (p<0.0001)

† GVBD (%) at 3 hrs culture in 1 mM Hx 10% FBS medium vs. in 1 mM Hx 10% FBS medium with FSH (p=0.01259)

‡ GVBD (%) at 3 hrs culture in 2 mM Hx 0.3% BSA medium vs. in 2 mM Hx 0.3% BSA medium with FSH (p=0.0012)

¶ GVBD (%) at 3 hrs culture in 2 mM Hx 10% FBS medium vs. in 2 mM Hx 10% FBS medium with FSH (p<0.0001)

^{||} GVBD (%) at 6 hrs culture in 2 mM Hx 0.3% BSA medium vs. in 2 mM Hx 0.3% BSA medium with FSH (p=0.1849)

** GVBD (%) at 6 hrs culture in 2 mM Hx 10% FBS medium vs. in 2 mM Hx 10% FBS medium with FSH (p<0.0001)

Hyuck Dong Han. The Effect of Low Concentrated Hx and FSH in 10% FBS Supplemented Medium on Immature Oocyte IVM. Korean J Reprod Med 2009.

발생을 보여 GVBD 발생억제가 회복됨을 알 수 있었다. 그러나 FSH 10% FBS 배양액에 4 mM Hx을 첨가한 배양액에서는 배양 18시간 후에도 10.0%의 GVBD 발생을 보여 GVBD 발생이 계속 억제되고

있음을 알 수 있었다 (Table 1).

2) FSH 0.3% BSA 배양액과 FSH 10% FBS 배양액에 2 mM Hx 첨가

FSH 0.3% BSA 배양액에 2 mM Hx을 첨가한 배

Table 2. MII development during 18 hours culture period in different media

Hx concentration	0.3% BSA		10% FBS	
	Total oocytes	MI development (%)	Total oocytes	MI development (%)
0 mM Hx	50	30.0±7.0	100	50.0±12.5
1 mM Hx	60	33.3±5.2	100	41.0±12.9
2 mM Hx	50	26.0±5.5	90	38.9±13.6
4 mM Hx	50	14.0±8.9*	50	6.2±5.5*
0 mM Hx + FSH	50	44.0±15.2	70	38.6±12.2
1 mM Hx + FSH	60	45.0±12.2	60	71.7±18.4 [†]
2 mM Hx + FSH	50	34.0±13.4	60	66.7±5.2 [†]
4 mM Hx + FSH	50	12.0±11.0*	60	10.0±11.0*

Values are Mean ± SD

Total oocytes: total cultured immature oocytes during 18 hours (Culture times: Total oocytes / 10)

* Significantly lower rates of MII development in 4 mM Hx medium compared to other media (p<0.05)

[†] Significantly higher rates of MII development in 1 mM Hx in 10% FBS medium with FSH and in 2 mM Hx in 10% FBS medium with FSH compared to other media (p<0.05)

Hyuck Dong Han. The Effect of Low Concentrated Hx and FSH in 10% FBS Supplemented Medium on Immature Oocyte IVM. Korean J Reprod Med 2009.

양액에서도 FSH를 첨가하지 않은 0.3% BSA 배양액에 2 mM Hx을 첨가한 배양액과 같이 초기 3시간, 6시간 배양에서 대조군 (0.3% BSA 배양액)에 비해 난자성숙이 억제됨을 알 수 있었다 (3시간 배양; 76.0% vs. 4.0%, p<0.0001, 6시간 배양; 82.0% vs. 36.0%, p=0.0103). 또 FSH를 첨가하지 않은 0.3% BSA 배양액에 2 mM Hx을 첨가한 배양액 (2 mM Hx 0.3% BSA)보다 더 미성숙난자의 배양초기 3시간까지 GVBD 발생이 억제되었다 (3시간 배양, 2 mM Hx 0.3% BSA 배양액 vs. 2 mM Hx FSH 0.3% BSA 배양액; 42.0% vs. 4.0%, p=0.0012). 6시간 배양에서는 FSH 0.3% BSA 배양액에 2 mM Hx을 첨가한 배양액 (2 mM Hx FSH 0.3% BSA 배양액)에서 36.0%의 GVBD 발생률을 보여 FSH를 첨가하지 않은 0.3% BSA 배양액에 2 mM Hx을 첨가한 배양액 (2 mM Hx 0.3% BSA 배양액)에서 보인 58.0%의 GVBD 발생률보다 낮았으나 통계학적인 유의한 차이는 없었다 (p=0.1849). 그러나 18시간 배양 후 84.0%의 GVBD 발생률을 보여 초기배양기간 동안에는 GVBD 발생이 억제되었지만 배양후기에서는

GVBD 발생이 촉진(회복)됨을 알 수 있었다 (Table 1, Figure 3-C).

FSH 10% FBS 배양액에 2 mM Hx 첨가한 배양액에서는 대조군 (10% FBS 배양액)과 FSH를 첨가하지 않은 2 mM Hx 10% FBS 배양액에 비해 초기 3시간, 6시간 배양에서 유의하게 GVBD가 억제되는 것을 확인하였다 (3시간 배양 10% FBS 배양액 vs. 2 mM Hx FSH 10% FBS 배양액; 74.0% vs. 5.0%, p<0.0001, 3시간 배양 2 mM Hx 10% FBS 배양액 vs. 2 mM Hx FSH 10% FBS 배양액; 53.3% vs. 5.0%, p<0.0001, 6시간 배양 10% FBS 배양액 vs. 2 mM Hx FSH 10% FBS 배양액; 79.0% vs. 33.3%, p<0.0001, 6시간 배양 2 mM Hx 10% FBS 배양액 vs. 2 mM Hx FSH 10% FBS 배양액; 64.4% vs. 33.3%, p<0.0001) (Table 1, Figure 3-D).

FSH 10% FBS 배양액에 2 mM Hx을 첨가한 배양액 (2 mM Hx FSH 10% FBS 배양액)에서 난구세포를 제거한 미성숙난자 (DO)의 배양에서는 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자와 같은 초기 3, 6시간 배양 동안 성숙이 억제되지 않았다 (10개의 미성숙

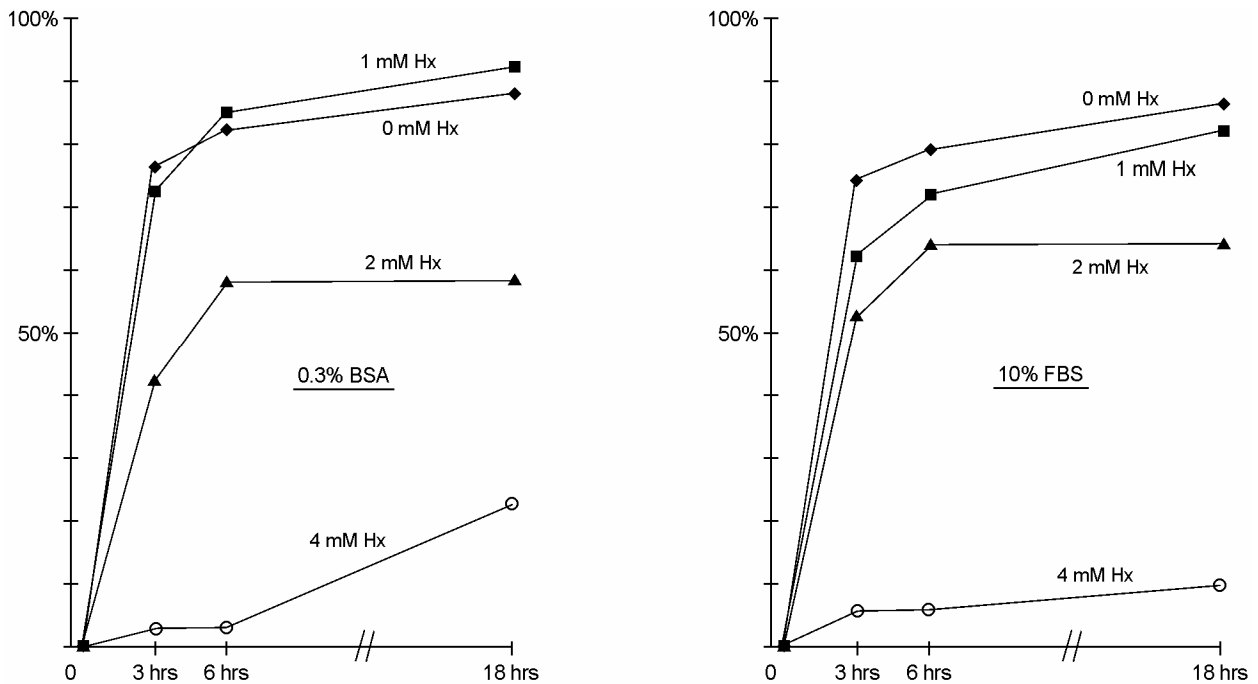


Figure 2. GVBD development of CEO in different concentrated Hx media (0.3% BSA and 10% FBS medium)

Hyuck Dong Han. The Effect of Low Concentrated Hx and FSH in 10% FBS Supplemented Medium on Immature Oocyte IVM. Korean J Reprod Med 2009.

난자를 5회 배양하여 총 50개의 미성숙난자를 배양, 3시간 배양; 80±11.0%, 6시간 배양; 82±9.8%, 18시간 배양; 82±9.8% GVBD 발생률) (Figure 3-D).

3) FSH 0.3% BSA 배양액과 FSH 10% FBS 배양액에 1 mM Hx 첨가

FSH 0.3% BSA 배양액과 FSH 10% FBS 배양액에 1 mM Hx을 첨가한 배양액에서는 Hx을 첨가하지 않은 대조군 (0.3% BSA, 10% FBS 배양액)에 비해 초기 3시간 배양 동안 GVBD 발생이 억제되었고 (0.3% BSA 배양액 vs. 1 mM Hx FSH 0.3% BSA 배양액; 76.0% vs. 28.3%, p<0.0001, 10% FBS 배양액 vs. 1 mM Hx FSH 10% FBS 배양액; 74.0% vs. 36.7%, p<0.0001) 또한 FSH를 첨가하지 않은 배양액에 1 mM Hx을 첨가한 배양액보다 더 GVBD 발생이 억제되었다 (1 mM Hx 0.3% BSA 배양액 vs. 1 mM Hx FSH 0.3% BSA 배양액; 71.7% vs. 28.3%, p<0.0001, 1 mM Hx 10% FBS 배양액 vs. 1 mM Hx FSH 10% FBS 배양액; 62.2% vs. 36.7%, p=0.0006). 그러나 3시간 배양 후 GVBD 발생이 촉진되어 배양 6시간, 18시

간 후 GVBD 발생률은 대조군과 유사한 발생률을 보였다 (Table 1, Figure 3-A, B).

4. 18시간 배양 후 0.3% BSA 배양액, FSH 0.3% BSA 배양액, 10% FBS 배양액, FSH 10% FBS 배양액에서 Hx 농도에 따른 난자의 MII기 성숙

18시간 배양 후 MII기 성숙은 4 mM Hx을 함유한 0.3% BSA 배양액, FSH 0.3% BSA 배양액, 10% FBS 배양액, FSH 10% FBS 배양액의 4종류 배양액에서 모두 Hx을 포함하지 않은 대조군에 비해 유의하게 낮은 MII기 성숙을 보였다 (0.3% BSA 배양액 vs. 4 mM Hx 0.3% BSA 배양액; 30.0% vs. 14.0%, FSH 0.3% BSA 배양액 vs. 4 mM Hx FSH 0.3% BSA 배양액; 44.0% vs. 12.0%, 10% FBS 배양액 vs. 4 mM Hx 10% FBS 배양액; 50.0% vs. 6.2%, FSH 10% FBS 배양액 vs. 4 mM FSH 10% FBS 배양액; 38.6% vs. 10.0%, p<0.05). 그러나 1 mM, 2 mM 농도의 Hx과 FSH를 첨가한 10% FBS 배양액 (1 mM Hx FSH

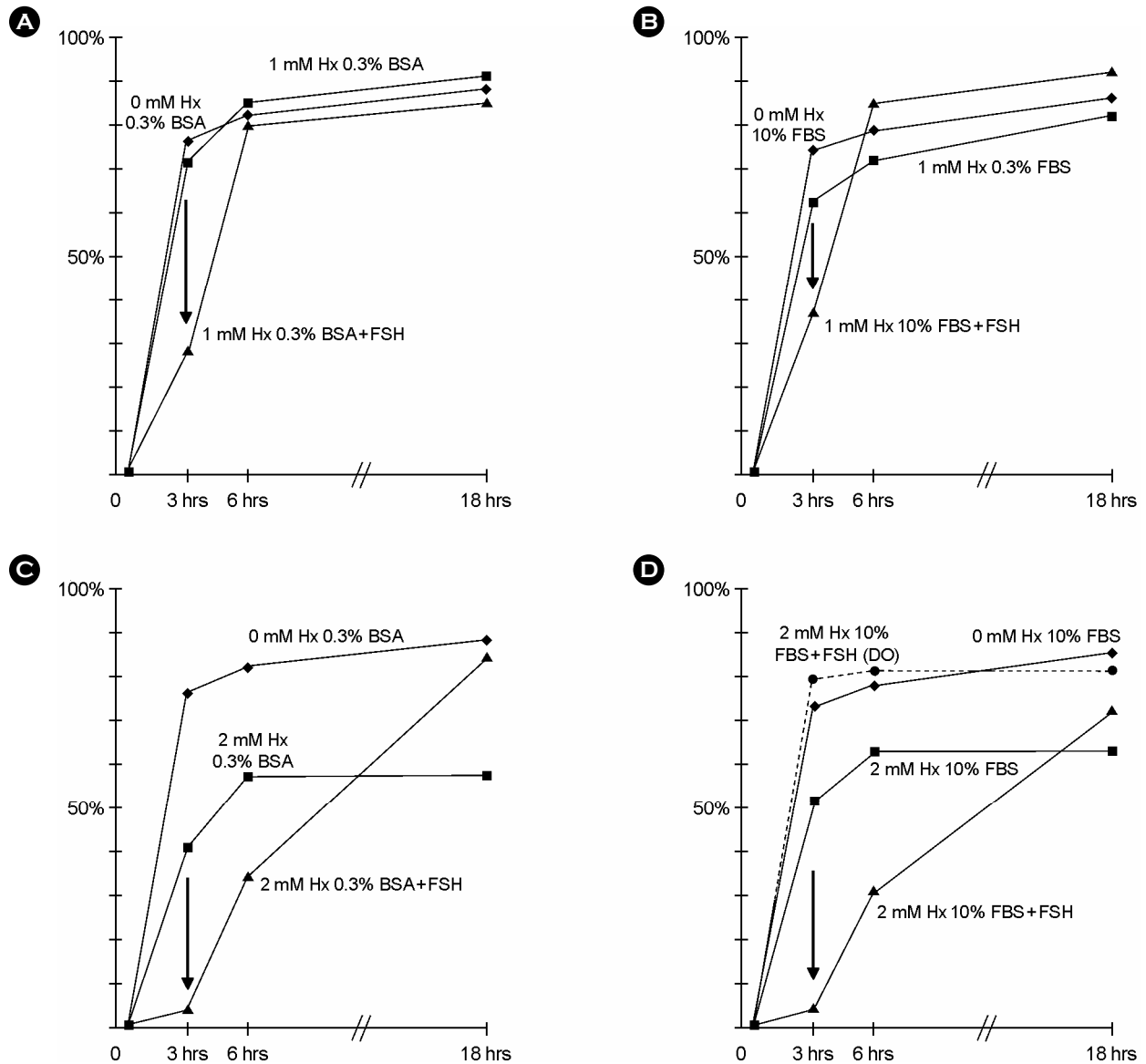


Figure 3. GVBD development of CEO in 1, 2 mM concentrated Hx media with FSH.

A) 1 mM Hx 0.3% BSA medium with FSH **B)** 1 mM Hx 10% FBS medium with FSH **C)** 2 mM Hx 0.3% BSA medium with FSH **D)** 2 mM Hx 10% FBS medium with FSH and GVBD development of denuded oocyte (DO) in 2 mM Hx 10% FBS medium with FSH

Hyuck Dong Han. The Effect of Low Concentrated Hx and FSH in 10% FBS Supplemented Medium on Immature Oocyte IVM. Korean J Reprod Med 2009.

10% FBS 배양액, 2 mM Hx FSH 10% FBS 배양액)에서는 71.7%, 66.7%의 발생률을 보여 다른 모든 배양액보다 오히려 유의하게 높은 MII기 발생률을 보였다 ($p < 0.05$) (Table 2). 난구세포를 제거한 미성숙난자 (10개의 미성숙난자를 5회 배양하여 총 50개의 미성숙난자를 배양)의 2 mM Hx을 첨가한

FSH 10% FBS 배양액에서 MII기 발생률은 18시간 배양 후 $48.0 \pm 8.39\%$ 의 발생률을 보여 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자와 같이 높은 MII기 발생률의 증가양상은 보이지 않았다.

5. 생체에서 난자의 성숙

5마리 생쥐의 복강내 hCG를 주입한 후 18시간 뒤 난관에서 획득한 난자 (총 119개 난자, 한 마리 당 13~39개, 평균 24개)의 GVBD, MII기를 관찰한 결과 100% GVBD, $76.8 \pm 11.4\%$ 의 MII기 발생률을 보였으며 이것은 1 mM, 2 mM 농도의 Hx과 FSH를 첨가한 10% FBS 배양액 (1 mM Hx FSH 10% FBS 배양액, 2 mM Hx FSH 10% FBS 배양액)에서 보인 71.7%, 66.7%의 MII기 발생률과 유사한 발생률을 보임을 알 수 있었고 0.3% BSA, FSH 0.3% BSA, 10% FBS, FSH 10% FBS 배양액의 MII기 발생률과 비교할 때 유의하게 높은 발생률을 보임을 알 수 있었다.

고 찰

난자의 성숙 (감수분열의 재개)은 LH surge 후 발생되며 그 기전은 정확히 알려져 있지 않지만 난포의 난자성숙억제환경에서 유리되고, 과립막 세포 (granulosa cell) 즉 난포벽 과립막세포 (mural granulosa cell)와 난구세포에서 생산된 난자성숙촉진물질 (positive factors)에 의해 난자성숙이 재개된다. 난자성숙억제는 난자성숙억제물질 cAMP에 의해 유지되는데 난자내 cAMP양은 난소자극호르몬에 의해 과립막세포에서 만들어져 난자와 난구세포 사이의 Gap junction을 통해 난자로 이동된 cAMP와 난자의 Gs G-Protein과 Gs-coupled G-protein receptor, GPR3에 의해 생긴 cAMP 등으로 이루어진다. 이 cAMP는 PKA를 활성화하고 활성화된 PKA는 MPF를 인산화 (불활성 MPF)하여 난자성숙을 억제한다.¹³ 난포액에 있는 난자성숙억제물질 (OMI; oocyte maturation inhibitor)로 purine계의 물질인 Hx은 가장 높은 농도로 난포액내에 존재하며 난자성숙억제에 중요한 역할을 한다. Hx은 난자내에 cAMP가 AMP로 대사되는 phosphodiesterase 작용을 억제하여 cAMP의 농도를 높이고 PKA를 활성화하여 난자성숙을 억제한다. 또 Hx은 hypoxanthine

phosphoriboxyltransferase pathway를 통해 inosinic acid를 만들고 이것은 guanosine과 같은 purine을 생산하여 감수분열을 억제시킨다.¹⁴

본 연구에서 난포로부터 획득한 미성숙난자를 Hx이 없는 배양액에 배양함으로써 미성숙난자의 자연성숙을 발생시켰다. 실험에 사용된 4종류의 배양액 0.3% BSA 배양액, FSH를 첨가한 0.3% BSA 배양액, 10% FBS 배양액, FSH를 첨가한 10% FBS 배양액 모두에서 3시간 내에 대부분 GVBD가 발생하였다. MII기의 발생은 6시간 이후에 발생되었으며 배양 18시간 후 각 배양액에서 GVBD 발생률이 88.0%, 92.0%, 86.0%, 87.1%, MII기 발생률이 30.0%, 44.0%, 50.0%, 38.6%로 나왔다. 이 결과는 GVBD 중 65.9%, 52.2%, 41.9%, 55.1%의 많은 난자가 MI기 상태로 있음을 보이고 있다. 또 이 결과는 본 실험에서 생쥐 복강 내 PMSG를 주사한 후 48시간 뒤 hCG로 배란 유도한 생쥐의 18시간 뒤 난관에서 획득한 CEOs 중 76.8%가 MI기 상태이고 23.2%가 MII기 상태의 난자임과 비교할 때 생체내 성숙에 비해 난자성숙배양액에서 난자의 자연성숙은 더 많은 난자가 MI기 상태로 발육이 정지 혹은 지연되어 있음을 알 수 있었다.

생쥐 난포액의 Hx 농도는 2~4 mM로 알려져 있고 생쥐난자의 체외성숙억제는 적은 농도의 포도당을 함유한 배양액에서 4 mM의 Hx으로 CEOs의 자연성숙을 억제하고 FSH로 난자의 성숙 (GVBD)을 유도할 수 있다고 했다 (난자성숙유도; induced oocyte maturation).^{14,15} 본 실험에서도 4 mM Hx 첨가는 난자의 자연성숙을 모든 배양액에서 완전히 억제함을 알 수 있었다. 4 mM Hx 배양액에서 FSH의 첨가에 의한 난자성숙유도는 0.3% BSA 배양액에서만 배양 18시간 후 62.0%의 GVBD가 유도되었고 10% FBS군에 FSH 첨가는 GVBD를 유도하지 못했다. 또 4 mM Hx을 함유한 0.3% BSA, 10% FBS 배양액 모두에서 낮은 MII기의 발생률을 보였다. 이것은 4 mM 농도의 Hx은 난자에 유해할 수 있고¹⁶ 4 mM의 Hx 배양액에 FSH를 첨가하여 난자성숙을 유도하는 체외성숙 배양방법은 사용하기에 부

적합함을 시사한다.

낮은 농도 (1, 2 mM)의 Hx을 함유한 배양액에서 난자성숙억제는, 2 mM Hx 0.3% BSA 배양액과 2 mM Hx 10% FBS 배양액에서는 난자성숙억제를 보였으나 1 mM Hx의 첨가는 0.3% BSA 배양액과 10% FBS 배양액에서 미성숙난자의 성숙을 억제하지 못했다. 그러나 FSH를 첨가한 배양액의 경우 0.3% BSA 배양액과 10% FBS 배양액 모두에서 2 mM Hx이 초기배양 3시간, 6시간에서 GVBD를 억제할 뿐 아니라 FSH를 첨가한 배양액에서는 1 mM 농도의 Hx 배양액에서도 초기 3시간 배양에서 GVBD 발생을 억제함을 볼 수 있었다. 또 같은 농도의 Hx을 함유한 배양액과의 비교에서 FSH를 첨가한 배양액에서 FSH를 첨가하지 않은 배양액에 비해 초기배양기간 동안 미성숙난자의 성숙이 더 많이 억제되었다. 이것으로 FSH가 미성숙난자의 초기배양기간 동안 Hx의 성숙억제를 항진시킴을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 Down 등 (2008년)이 낮은 농도의 dbcAMP로 난자성숙을 정지시킨 후 FSH로 난자를 성숙을 유도할 때 FSH가 초기에 난자성숙을 억제하고 후기에 난자성숙을 촉진함과 유사한 결과라고 할 수 있다.¹⁷

각 배양액에서 MII기로의 발생은 난자성숙이 완전히 이루어져 정자의 수정이 가능한 난자로 성숙됨을 나타내고 정자와 수정될 때까지 난자는 MII기 상태로 정지된다. Eppig 등 (1994년)은 생쥐에서 MI기 상태로 정지되어 있는 난자에서도 정자의 수정에 의해 난자를 MII기로 성숙시키고 2세포기, 포배기로 발생시킬 수 있으나 포배기로 발생된 대부분의 배아 (76%)는 염색체 이상인 삼배수체임을 발표했다.⁷ 본 실험에서 각 배양액 중 FSH를 함유한 10% FBS 배양액에 1 mM, 2 mM Hx을 첨가한 배양액에서 18시간 배양 후 GVBD로 91.7%, 73.3%가 발생되고 GVBD로 발생된 난자 중 78%, 91% (전체미성숙난자의 71.7%, 66.7%)가 MII기로 발육되어 다른 배양액에 비해 유의하게 높은 MII기 발생률을 보였다. 이 결과는 생체내 난자 MII기 발생률 76.8%와 유사하며 낮은 농도의 Hx과 FSH를 첨

가한 10% FBS 배양액이 미성숙난자의 체외성숙배양액으로 적합함을 말하고 있다.

체내난자성숙은 난자성숙억제물질의 감소에 의한 기전과 난자성숙억제를 극복하는 촉진물질에 의한 성숙기전, 두 기전이 작용될 수 있다고 생각된다. 난자 난구세포 과립막세포는 Gap junction에 의해 서로 연결되어 있고 난자성숙억제물질 cAMP를 Gap junction을 통해 난자로 이동시킨다. LH surge 후 Gap junction이 파괴되고 억제물질의 이동을 정지시킨다. 난포액내의 난자성숙억제물질인 Hx 농도는 LH surge 후 난포액의 양이 급격히 증가함에 따라 달라질 수 있다. 생쥐 난포내 Hx 농도는 hCG에 의한 배란 유도 후 2시간까지 변화가 없지만 복강내 hCG 주사 5시간 후에는 Hx 농도가 유의하게 감소된다고 했다.¹⁴ 또 배란된 난자가 난관으로 이동되면 난포액내의 성숙억제물질인 Hx으로부터 분리될 수 있다. 본 실험에서 생쥐 복강내 hCG 주입 후 난자 난구세포의 성숙 관찰에서 hCG 복강내 주입 후 6~9시간 사이에 난자가 난관으로 배란되었으며 미성숙난자는 배란되기 전 난포액내 Hx 농도의 감소가 있고 배란 후에는 난포액과 다른 농도의 난관액에서 발생되고 있음을 알 수 있었다. 이러한 현상은 체내난자성숙은 유도성숙기전과 함께 난자성숙억제물질의 감소가 함께 작용할 수 있음을 말하고 있다.

1 mM, 2 mM Hx과 FSH를 함유한 10% FBS 배양액에서 유의하게 높은 MII기 발생률을 보이는 이유는 확실히 알 수는 없지만 첫째로 낮은 농도의 Hx과 FSH로 난자의 유해함이 없이 초기 난자성숙을 억제하고 난자 핵성숙 (nuclear maturation) 시작 전, 즉 GVBD 개시 전 많은 양의 난자성숙유도물질을 과립막세포에서 만들어 난자로 보낼 수 있게 되기 때문으로 생각된다. 또 Hx은 생쥐난자-과립막세포 복합체 (oocyte-granula cell complexes) 배양에서 난자와 과립세포의 분리를 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁸ 둘째로 FBS에는 난자의 성숙을 촉진하는 많은 종류의 성장인자가 존재한다.¹¹ 특히 표피성장인자와 표피성장인자 유사인자 (EGF like

factor)는 과립막세포에서 난자의 성숙을 촉진하는 세포신호전달체계를 활성화시켜 FSH, cAMP, PKC 등과 같이 난자감수분열에 영향을 미칠 것으로 생각된다.^{17,19} 그러나 정확한 기전을 알기 위해 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론으로 본 실험에서 낮은 농도의 Hx과 FSH가 함유된 10% FBS 배양액은 초기배양에서는 미성숙 난자의 발생을 억제하나 후기에서는 GVBD 발생을 촉진하고 미성숙난자를 수정가능한 MII기로의 성숙을 촉진함을 알 수 있었고 이것은 미성숙난자의 초기배양 중 GVBD 발생이 억제되고 핵막이 소실되기 전 FSH와 FBS의해 난구세포에서 만들어진 감수분열에 영향을 주는 물질을 난자에 공급하여 보다 나은 난자성숙을 유도하기 때문으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Eppig JJ, Viveros MM, Bivens CM, Fuente RDL. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung PCK, Adashi EY, editors. The ovary. 2nd ed. Burlington: Elsevier Academic Press; 2004. p.113-29.
- Dekel N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. Rev Reprod 1996; 1: 82-8.
- Wehrend A, Meinecke B. The meiotic cell cycle in oocytes of domestic animals Reprod Domest anim 1998; 33: 289-97.
- Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. J Exp Med 1935; 62: 665-75.
- Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. Lancet 1965; 6: 926-9.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. Fertil Steril 1991; 55: 109-13.
- Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. Dev Biol 1994; 164: 1-9.
- Jee BC, Chen HY, Chian RC. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. Fert Steril 2009; 91(Suppl 5): 2037-42.
- Faerge I, Terry B, Kalous J, Wahl P, Lessl M, Ottesen JL, et al. Resumption of meiosis induced by meiosis-activating sterol has a different signal transduction pathway than spontaneous resumption of meiosis in denuded mouse oocytes culture in vitro. Biol Reprod 2001; 65: 1751-8.
- Fan HY, Sun QY. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. Bio Repro 2004; 70: 535-47.
- Chian RC. Laboratory aspects of IVM treatment. In: Tan LT, Chian RC, Buckett WM, editors. In-vitro maturation of human oocytes: basic science to clinical applications. London: Informa Healthcare; 2007. 273-93.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril 1985; 44: 493-8.
- Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. Reproduction 2005; 130: 791-9.
- Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF, Eppig JJ. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82: 454-8.
- 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 1983; 33: 1041-9.
- 지희준, 황영희, 이훈택, 정길생. Purine이 생쥐 미성숙 난자의 핵성숙에 미치는 영향 II. 미성숙난자의 제1극체 방출과 생존성에 미치는 Purine의 효과. 한국동물번식학회지 1993; 17: 85-92.
- Downs SM, Chen J. EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. Mol Reprod Dev 2008; 75: 105-14.
- Eppig JJ, Downs SM. The effect of Hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin induced oocyte maturation Dev Biol 1987; 119: 313-21.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like

growth factors as mediators of LH action in the ovulatory

follicle. Science 2004; 303: 682-4.

= 국문초록 =

목적: Hypoxanthine (Hx)과 FSH가 미성숙난자의 배양에 미치는 영향을 관찰하기 위해 미성숙난자를 배양하여 GVBD, MII기 발생률을 비교 관찰하였다.

연구방법: 단순배양액인 BSAL-XI-HTF 배양액을 사용하여 ① 0.3% BSA mBASAL-XI-HTF (0.3% BSA 배양액), ② 0.1 IU/ml FSH를 첨가한 0.3% BSA mBASAL-XI-HTF (FSH 0.3% BSA 배양액), ③ 10% FBS mBASAL-XI-HTF (10% FBS 배양액), ④ 0.1 IU/ml FSH를 첨가한 10% FBS mBASAL-XI-HTF (FSH 10% FBS 배양액)의 4종류의 배양액을 만들었고, 각 종류의 배양액에서 생쥐 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자의 성숙을 3, 6, 18시간별로 비교 관찰하였다. 각 배양액에 1 mM, 2 mM, 4 mM 농도의 미성숙난자성숙억제제인 Hx을 섞어 난자의 성숙억제양상을 관찰하였고 GVBD와 MII기 발생률을 비교 관찰하였다.

결과: Hx을 첨가하지 않은 4종류의 배양액에서 미성숙난자의 자연성숙은 3시간 내에 대부분 GVBD가 발생하였고 MII기로의 발육은 6시간 이후 발생하였다. 18시간 후 각 군의 배양에서 모두 유사한 GVBD 발생률을 보였다. 1 mM, 2 mM, 4 mM Hx 농도의 0.3% BSA 배양액과 10% FBS 배양액에서 난자의 성숙억제양상을 비교해 보면 4 mM 농도의 Hx 배양액에서 18시간 동안 완전한 성숙억제를 보였다. 2 mM 농도의 Hx 배양액에서도 18시간 배양까지 억제를 보였으나 4 mM 농도의 Hx 배양액보다 작은 난자성숙억제양상을 보였다. 1 mM 농도의 Hx 배양액에서는 모두 난자성숙억제를 보이지 못했다. FSH를 첨가한 배양액에서는 2 mM 농도의 Hx 뿐만 아니라 1 mM 농도의 Hx 첨가에서도 초기 3시간까지 GVBD 성숙이 억제되었다. 또 같은 농도의 Hx을 함유하고 FSH를 첨가하지 않은 배양액에 비해 FSH를 첨가한 배양액에서 3시간, 6시간 동안 GVBD 발생을 더 억제하였다. 그러나 18시간 배양 후 난자성숙이 회복됨을 보였다. 이 결과로 FSH가 배양초기에 난자성숙을 억제하나 후기에는 성숙을 촉진함을 알 수 있었다. 18시간 후 MII기 발육은 4 mM 농도의 Hx을 함유한 모든 배양액에서 낮은 발생률을 보였고, FSH를 함유한 10% FBS 배양액에 1 mM, 2 mM의 낮은 농도의 Hx을 첨가한 배양액은 다른 배양액에 비해 통계학적으로 높은 MII기 발생률을 보였다.

결론: 본 실험에서 낮은 농도의 Hx과 FSH는 FBS를 함유한 배양액에서 미성숙난자의 초기배양 동안 성숙을 억제한 후 MII기 성숙을 촉진함을 알 수 있었다.

중심단어 미성숙난자, 체외성숙, Hypoxanthine, 난포자극호르몬