

생쥐난의 체외 배양에서 인간난포액과 표피 성장 인자가 난성숙에 미치는 영향

원광대학교 의과대학 산부인과학교실

민 부 기

The Effect of E.G.F. and Human Follicular fluid on the Maturation of Mouse Oocytes in *in vitro* Culture

Bu-Kie Min, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Wonkwang University, Iri, Korea

= Abstract =

The human follicular fluids(F.F.) may be considered to contribute the maturation of the oocytes on the in vitro culture. To investigate the effects of epidermal growth factor(E.G.F.), which is present in mature and immature follicular fluids, we had experiments of mouse oocytes maturation in vitro.

The endpoints assayed were rated as percentage of oocytes undergoing germinal vesicle breakdown(G.V.B.D.) and polar body(P.B.) formation at 12 hours after in vitro culture.

The rates of G.B.B.D. were 87% in mature F.F. 68% in immature F.F. and 78% in Ham's F-10 medium respectively.

And overall the mature F.F. seem to stimulate on in vitro oocyte maturation compared with either immature F.F. or Ham's F-10 medium.

As the concentration of addition of E.G.F. in immature F.F., the rates of G.V.B.D. and P.B. formation were 82%, 23% in addition with 2ng/ml while 84%, 32% in addition with 4ng/ml respectively. And at the concentration of addition of E.G.F. in Ham's F-10 media as well, the rates of G.V.B.D. and P.B. formation were 84%, 40% and 82%, 44% in addition with each 2ng, 4ng.

Accordingly there was no influence on the oocytes maturation at the addition of E.G.F. to each immature F.F. and Ham's F-10 medium.

In conclusion, the E.G.F. is not able to induce oocyte maturation independent of it's effects in immature F.F. and Ham's F-10 media.

서 론

최근까지는 난세포의 체외배양에서 난포액은 난세포의 성숙에 대해 억제작용을 하고 있는 것으로(Chari et al., 1983; Hillensjo et al., 1978) 알려져 왔고, 생체에서는 L.H. 분비와 난포액에서의 estradiol, progesterone, prolactin 등의 호르몬 농도의 변화가 난포 및 난세포 성숙을 조절하고, 반대로 난세포 감수분열 억제물질(oocyte

meiosis inhibitor), 물러씨관 억제물질(Mullerian inhibiting substance), inhibin 등은 이들의 성숙을 억제하는 것으로 설명되고 있다(Channing et al., 1982; Tsafiriri et al., 1988; Channing et al., 1983).

그러나 최근에 성숙 인간 난포액에서 난세포를 체외 배양한 후 임신율 시키는데 성공하였다는(Cha et al., 1991) 보고가 있으며, 일찌기 Dekel(1985), Scherizily 등(1989)은 체외 배양에서 E.G.F.를 추가시킴으로서 생쥐난의 성숙

을 촉진시킬수 있었다고 보고하였고, 또한 Feng(1988), Feng등(1987)은 성숙 난포액에는 여러가지 성장 요소들이 함유되어 있으며, 실제로 난포주위에 있는 과립세포들에서 E.G.F. 수용체가 다량 출현하는 것으로 관찰되었으므로, E.G.F.가 난세포의 성숙에 관여하는 것으로 보인다고 보고한 바 있다.

이에 본 연구에서는 인간 난포액이 세포 배양액으로서 난세포 성숙에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 인간 성숙 난포액, 미성숙 난포액 & 생쥐의 미성숙난을 각각 배양하여 난포액내의 E.G.F.가 난세포 성숙에 관여하는지의 여부를 규명하고자 실험을 시도하였다.

연구재료와 방법

실험을 위해 배양액으로 (1) 50% 성숙 난포액, (2) 50% 미성숙 난포액, (3) 7.5% 인간 혈청 함유한 Ham's F-10 배양액, (4) EGF가 각각 2ng/ml, 4ng/ml농도로 추가된 50% 미성숙 난포액, (5) EGF가 각각 2ng/ml, 4ng/ml 농도로 추가된 Ham's F-10 배양액 등을 준비했으며, 난포액은 난포내에 함유되어 있을 다른 물질들이 난세포 성숙에 영향을 주는 것을 최소화 하기 위해 Ham's F-10 배양액을 50% 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

1. 인간 난포액의 채집

체외수정의 과정에서 난자회수와 함께 난포액을 채취하였는데 20mm이상 크기의 난포와 15mm이하 크기의 난포에서, 각각 성숙 난포액과 미성숙 난포액을 흡입하여 채집하였으며 채집된 난포액들은 2,000×g속도로 10분간 원심

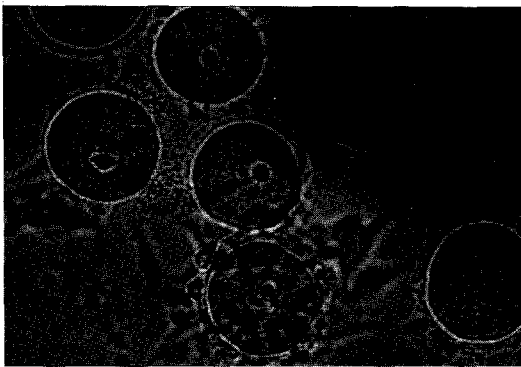


Fig. 1. Expression of germinal vesicles in immature oocytes of the mouse.

분리하여 상층액을 취하고 0.22μ/ml에서 여과한 후 -20°C에서 냉동보관하였다.

2. 생쥐난의 회수

성숙된 생쥐에서 P.M.S.G. (pregnant mare serum gonadotropin) 7.5 IU를 주사하고 10시간이 경과한 후 난소로부터 미성숙 난세포를 회수하였으며 역반사 현미경으로 관찰하여 세포핵이 출현하는 난세포들만 실험에 이용하였다 (그림 1).

회수한 미성숙 생쥐난들은 앞서 준비된 각각의 배양액에서 체외 배양되었는데 배양되는 미성숙 생쥐난들은 37°C 5% CO₂ incubator에서 12시간 동안 경과한후, 세포핵 소멸과 극체 출현을 관찰하여 생쥐난의 성숙도를 분석하였고 (그림 2), 각각의 배양액에서 여러차례에 걸쳐 100개의 미성숙 생쥐난을 실험하여 그 결과를 평가하였다.

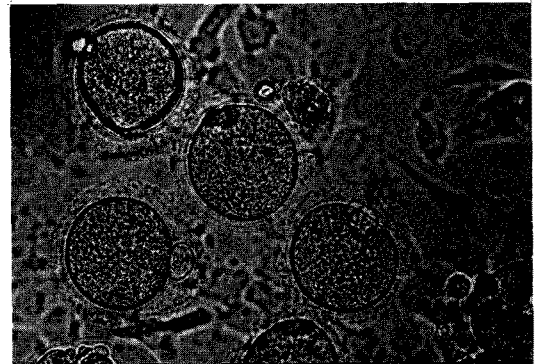


Fig. 2. Oocytes demonstrating maturation to the germinal vesicle breakdown and polar body one formation at 12 hours after media culture.

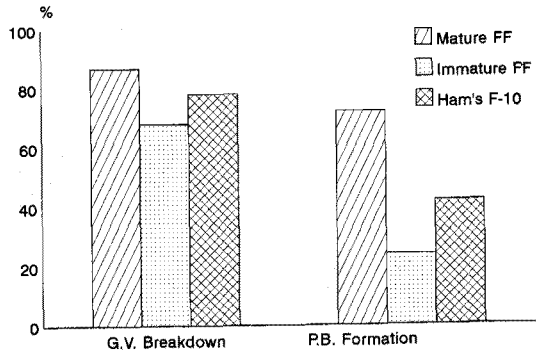


Fig. 3. The percent of mouse oocytes undergoing G.V.B.D. and P.B. formation 12 hours after each media cultured.

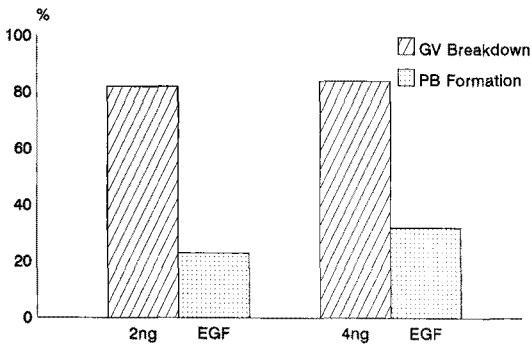


Fig. 4. The percent of oocytes undergoing G. V.B.D. and P.B. formation at 12 hours after immature F.F. media cultured with addition of each concentrations of E.G.F..

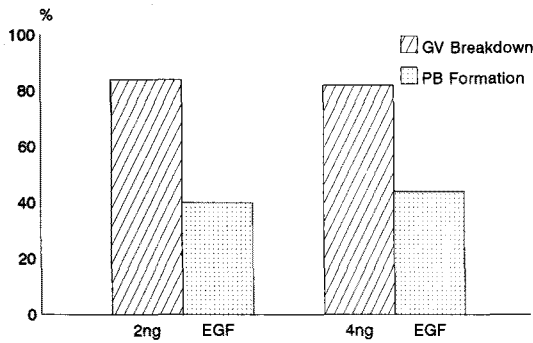


Fig. 5. The percent of oocytes undergoing G. V.B.D. and P.B. formation at 12 hours after Ham's F-10 media cultured with addition of each concentrations of E.G.F..

결 과

각각의 배양액에 생쥐의 미성숙난을 100개씩 배양하여 12시간 경과한 후 난세포핵 소실과 극체 형성을 백분률로 평가하여 각 배양액에 대한 배양율을 분석하였는데, 그 결과 50% 성숙 난포액에서 난세포핵 소멸은 87%이었고, 50% 미성숙 난포액에서는 68%, Ham's F-10 배양액에서는 78%로서 미성숙 난포액이 다른 배양액들에 비해 약간 낮은 비율을 나타냈다. 극체 형성은 성숙 난포액에서 72%의 높은 비율을 나타낸 반면 50% 미성숙 난포액과 Ham's F-10 배양액에서는 각각 24%, 42%로 현저하게 낮은 것으로 관찰되었다(그림 3).

따라서 미성숙 난포액과 Ham's F-10 배양액에서의 난세포핵 소멸과 극체 형성을 촉진시키기 위해서 표피성장인자를 추가하였는데 50%

미성숙 난포액에 2ng/ml의 표피성장인자를 추가 배양했을때 난포핵 소멸율은 82%이고, 극체 형성율은 23%이었고, 4ng/ml을 추가배양했을때는 84%, 32%로 나타났다(그림 4).

한편 Ham's F-10 배양액에 2ng/ml의 표피성장인자를 추가했을때 난포핵 소멸은 84%에서 나타났고, 극체 형성은 40%에서 관찰되었으며, 4ng/ml를 추가배양 했을때는 82%, 44%로, 성장 인자의 추가나 농도 증가가, 미성숙난에서의 난세포핵 소멸율은 약간 상승시킬 수 있으나, 난세포 성숙의 지표가 되는 극체 형성에는 별다른 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰되었다(그림 5).

고 찰

인간의 난포액에는 steroid hormone들을 비롯하여 여러세포 성장물질등이 함유되어 있으며 각각의 물질들은 월경주기에 따라 그 농도의 차이를 나타내므로서 난포세포의 성장속도를 조절한다. 표피성장인자는 인간 난포액에서 난세포의 성숙을 촉진시키며, 0.1ng/ml의 소량 농도에서도 성장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Das et al., 1991).

미성숙 난포액내에는 성숙난포액에 비해 난세포 성숙억제인자들인 mullerian inhibiting substance(M.I.S.), oocyte meiosis inhibitor(O.M.I.), inhibin들의 농도가 높으며 미성숙 난포액과 성숙난포액 내에서의 표피성장인자 농도는 2-15ng/ml로 양측 난포액에서 농도차는 없다고 하며, Hsu등(1987)에 의하면 오히려 미성숙 난포인 소 난포강의 난포액에서 표피성장인자 농도가 더 높으며 표피성장인자의 작용은 대난포강과 소 난포강에서 각각 다양하며 미성숙 난포에서 표피성장인자는 과립세포의 증식과 난포의 팽대에 관여한다고 한다(Franks et al., 1987; Das et al., 1992).

그러나 소 난포강이나 미성숙 난포에서의 난포액내에서 표피성장인자는 고농도로 존재하는데도 불구하고 난세포의 성숙이 억제되는 것은 아마도 난세포 성숙억제인자들인 M.I.S., O.M.I.의 고농도 때문이라고 추정되며 반대로 배란전 난포액에서는 O.M.I.의 농도가 감소하며, 표피성장인자가 난세포의 감수분열에 직접적으로 작용하여 난세포 성숙을 촉진시키는데(Channing et al., 1983), O.M.I.의 농도가 어느 한계치 이하로 하강할 때에만 표피성장인자의 난세포

성숙에 대한 영향력이 나타난다고 볼 수 있다.

그러나 Kamelini 등(1992)에 의하면, 미성숙 난포액으로 부터 표피성장인자를 추출한 후 난세포를 배양한 경우 polar body의 출현율이 더욱 낮은 것으로 관찰되었으며, 반대로 표피성장인자를 추가한 경우에도 난세포의 성숙을 촉진하진 않았다고 보고한 바 있다. 그러나 본 실험에서 난세포 성숙 억제인자가 함유되어 있지 않은 Ham's F-10 배양액에 표피성장인자를 추가해서 배양한 경우에도 난세포 성숙에는 별다른 영향이 없는 것으로 보아, 난세포 성장은 표피성장인자 이외에 다른 성장 인자들의 영향을 받는 것으로 생각된다.

결 론

1. 50% 성숙 난포액, 50% 미성숙 난포액 & Ham's F-10 배양액 중에서 생쥐 미성숙난의 성장을 위한 배양에서 50% 성숙 난포액이 다른 배양액들에 비해 훨씬 우수했다.

2. 50% 미성숙 난포액의 농도에 따른 추가 배양은, 미성숙난에서 난세포핵 소멸율은 다소 호전시키지만 극체 형성에는 아무런 영향을 미치지 않았으며 따라서 미성숙난의 성숙에는 관여하지 않았다.

3. 미성숙 난포액과 Ham's F-10 배양액 내에서 E.G.F.는 단독적으로 난세포 성숙에 영향을 미치지 않는다.

인 용 문 헌

Chari S, Hillensjo T, Magnusson C, Sturm G, Daume E: In vitro inhibition of rat oocyte meiosis by human follicular fluid fractions. *Arch Gynec* 1983, 233, 155-164.

Hillensjo T, Batta SK, Schwartz-Kripner A, Wentz AC, Sulewski J, Channing CP: Inhibitory effect of human follicular fluid upon the maturation of porcine oocytes in culture. *J Clin Endocr Metab* 1978, 47, 1332-1335.

Channing CP, Anderson LD, Hoover DF, Kolena J, Osteen KG, Pomerantz SH, et al.: The role of nonsteroidal regulators in control of oocyte and follicular maturation. *Recent Prog Horm Res* 1982, 38, 331-408.

Tsafri A: The physiology of reproduction, Vol. 2 New York: Raven press, 1988, 527-565.

Channing CP, Liu CQ, Jones GS, Jones H: Decline of follicular oocyte maturation inhibitor coincident with maturation and achievement of fertilizability of oocytes recovered at midcycle of gonadotropin-treated Women. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1983, 80, 4184-4188.

Cha KY, Koo JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK: Pregnancy after I.V.F. of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991, 55, 109-113.

Dekel N, Sherizly I: Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle. Enclosed oocytes. *Endocri* 1985, 116, 406-412.

Downs SM: Specificity of E.G.F. action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biol Reprod* 1989, 41, 371-379.

Feng P, Catt KJ, Knecht M: Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocri* 1988, 122, 181-186.

Feng P, Knecht M, Catt KJ: Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropin during granulosa cell differentiation. *Endocri* 1987, 120, 1121-1126.

Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR, Leung BS: Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* 1991, 55, 1000-1004.

hsu CJ, Holmes SD, Hammond JM: Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem Biophys Res Comm* 1987, 147, 242-247.

Franks F, Neagle G, Leake R, Mason H, Harlow C, Winston R, et al.: Epidermal growth factor concentrations in follicular fluid from normal or polycystic ovaries. *J Endocri* 1987, 147, 242-247.

Das K, Phipps WR, Hensleigh HC, Tagatz GE: Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation in vitro. *Fertil Steril* 1992, 57, 895-901.