

인간 난관세포와의 체외 공동배양과정에서 혈소판 활성요소가 생쥐배의 발달에 미치는 영향

원광대학교 의과대학 산부인과학교실

민부기 · 김기석 · 이희섭 · 홍기연 · 김흥곤 · 신무철 · 이찬근 · 최은하

The Effect of Platelet Activating Factor on Development of Embryonic Cells at Co-culture in vitro with Human Salpingeal Cell in Mouse.

Bukie Min, Kieseok Kim, Heesup Lee, Kieyoun Hong, Heunggon Kim, Mucheol Shin, Chankun Lee and Eunha Choi

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

= Abstract =

There are a number of problems during the process of culture in vitro on fertilization and embryo development compared to those on in vivo counterparts. And the platelet activating factor (PAF), which is found not only in mammalian spermatozoa but also preembryos, is implicated on reproductive process.

To improve the environment of culture on in vitro fertilization and embryo development, co-culture using salpingeal epithelial cells has been considered to accept the better result on pregnancy rate.

This study was designed to determine if two different culture systems, coculture alone and PAF treated coculture, are positive or negative influence on process of in vitro fertilization and embryo culture in mouse.

The cell cleavage rate reached to 2-4 cell stage at 24 hours of culture is 56.81% (50/88) and 48.21%(54/112) respectively, in PAF treated group which is added PAF on coculture and in co-culture group. But the rate of cells cleavage was similar in both group after 48 hours of culture. The rate of unfertilization after insemination of oocytes was higher in coculture group(55.53%) than in PAF treated group(42.37%). And in assessment of undeveloped embryos, the rate of equalized cell block was similar on both, coculture alone (35.3%)and PAF treated coculture(35.5%). while unequalized cell block was higher rate in PAF treated coculture(19.4%) than coculture alone (11.8%). But the rate of cytoplasmic degeneration of undeveloped embryos was significantly higher in PAF treated coculture than coculture alone.

In conclusion, we have observed that PAF treated coculture is superior in the rates of in vitro fertilization and early embryo cell cleavage compared to those in coculture alone, but there is no difference on the rates of embryo developments, cell degeneration, cell quality in both PAF treated coculture and coculture alone when the embryo cells were continuously cultured for 48 hours or more.

Key Words: In vitro fertilization, Embryo development, Coculture, Addition of PAF at coculture.

서 론

보조생식술에서 체외수정과 배아 이식과정중에 배세포의 체외배양은 부적합한 배양환경과 일반배양액 자체의 불충분한 조성으로 배양시간이 길어질수록 배세포 발달의 정지와 퇴화가 빈번히 발생하여 임신성공률을 높이는데 많은 어려움이 따르고 있다.

최근에 배양액의 조성성분을 보강시키므로써 배양조건을 개선하기위한 연구가 활발하게 이루어지고있는데 그중에서 생물학적 화학물질인 혈소판 활성요소(Platelet activating factor:PAF)는 포유동물에서 정자의 운동성을 향상시켜 난자와의 수정율을 높이고 배세포의 체외배양과정에서도 배세포의 분할, 발달 및 배세포의 질적 향상 등 생식과정에 관여하는것으로 알려져있다 (Abisogum et al., 1989 ; 민부기 등, 1995 ; Haper, 1989 ; Zhu et al., 1991). 또한 Collier(1988) 등과 O'Neill (1989)등은 생쥐배를 체외배양시켰을때 혈소판 활성요소가 배세포자체에서 생성되는것을 관찰하였고 이러한 활성물질이 배세포의 발달에 직접적으로 영향을주어 자궁내에 착상하는데 관여할것이라고 제안한 바 있다. 한편으로 배양 환경조건을 개선하기위해서 배세포를 난관세포와 공동 배양하는 방법이 시도되었는데 체외배양 과정에서 난관세포와의 공동배양은 생체내에서 이루어지는 생식 생리과정에 접근된 방법으로서 배세포 분할을 향상시키고 할구들의 분절율을 저하시켜 배세포의 발달을 개선시킬뿐만 아니라 상실배와 포배형성률을 높일수있다고 보고되었다 (김정호 등, 1994 ; Rexroad et al., 1962 ; Sakhas et al., 1988 ; Bongso et al., 1990).

본 연구는 난세포의 체외수정과 배세포의 체외배양시 난관세포와 공동배양과정에서 혈소판 활성요소를 첨가하는경우 수정율, 배세포의 정지, 분할, 배세포의 질적향상에 미치는영향을 평가분석하였다.

재료 및 방법

1. 난관 세포계의 배양

인간에서 자궁절제술에 의해 얻어진 난관을 Earl's balanced salt 배양액(GIBCO)이 담겨있는 조직배양접시(Falcon 65mm×10mm)에 2시간동안

완충시킨후 Ham' F-10 배양액이 담긴 조직배양 접시로 옮겨 미세 수술가위로 난관의 점막층에 있는 섬모들을 절단하여 난관 내상피세포를 채취하였다. 채취한 난관세포는 전에 발표한바있는 연구논문(김정호 등.,1994)에서 시행했던 방법과 동일하게 배양했다.

난관세포는 60×15mm 배양접시(FALCON)에서 2일마다 배양액을 교환해 주면서 1차배양하여 6-7일이후에 배양접시 바닥에 단층융합세포가 형성되었을때 상층 배양액을 버리고 0.53mM EDTA, 0.05% trypsin(DIFCO)용액 5ml를 넣고 배양접시 바닥에 착상한 세포들을 분리시켜 원추형 시험관으로 옮겨서 300× g의 속도로 5분간 원심 분리시킨후 Ham's F-10배양액을 넣고 세포를 부유시키고 2회 반복하여 원심 분리시키며 세포를 세척하였다.

최종적으로 세척한 난관 세포들은 $5 \times 10^4 / \text{ml}$ 의 농도로 15% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Ham's F-10 성장 배양액이 들어있는 조직배양접시로 옮겨 5% CO₂ 배양기에서 계대배양하였다.

2. Chemicals

혈소판 활성요소인 DL- α -phosphatidylcholine, β -acetyl- γ -*o*-hexadecil(SIGMA)를 10^6 mM의 농도로 absolute ethanol에 용해시켜 영하 20℃에 냉동 보관하였고 실험하기 직전에 저장액 PAF를 공기중에 휘발 건조시켜 10^6 mM 농도로 배양액에서 재용해시켰다.

3. 난자 회수

생후 6-8주 된 ICR 계의 암생쥐에게 7.5IU의 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)를 복강내주사하고 48시간후에 7.5 IU HCG를 복강주사하고 14시간이 경과한후 경추골 파열로 희생시켜 난자를 회수하였다. 회수한 난자는 hyaluronidase (450U/ml: SIGMA)로 처리하고 cumulus cell을 제거한후 배양액으로 세척한후 Ham's F-10 배양액에 넣어 수정시킬때까지 배양기내에서 보존하였다.

4. 정자채취

성숙한 ICR계 숫생쥐의 부고환을 절개하여 미세 수술 핀셋으로 잘게 조각을 내서 Earl's balanced salt 배양액에서 부유시켜 정액을 채취한후 원추형 시험관으로 옮겨 800 r.p.m.으로 5분

Table 1. Comparison of Embryo Development in Coculture and PAF. Coculture

Treatment (n)	Developmental stage after hours on culture in vitro			
	24h (2-4cell)	48h (morular)	72h (blastocyst)	96h (hatching)
Coculture(112)	54 (48.21%)	49 (43.75%)	43 (38.39%)	39 (34.82%)
PAF. Coculture (88)	50 ‡ (56.81%)	46 ‡ (52.27%)	36 (40.90%)	30 (304.09%)

‡ p< 0.01 ,difference from PAF traeted coculture

Table 2. Comparison of undeveloped embryos in Coculture and PAF.Coculture

Treatment (n)	Stage in undeveloped cells on culture in vitro			
	Unfertilized	2 cell block	8 cell block	degeneration
Coculture(73)	42 (57.53%)	16 (21.91%)	5 (6.84%)	10 (13.69%)
PAF. Coculture (58)	24 # (41.37%)	14 ‡ (24.13%)	4 (6.89%)	16 ‡(27.58%)

‡ p< 0.01 difference from coculture alone

p< 0.005 difference from coculture alone

Table 3. Comparison of abnormal embryos in Coculture and PAF. Coculture

embryo status Treatment (n)	equalized cell block	unequalized cell block	fragmentation(+)	dark, cytoplasm fragmentation
Coculture (31)	11 (35.5%)	6 (19.4%)	8 (25.8%)	6 (19.4%)
PAF. Coculture (34)	12 (35.3%)	4 (11.8%)	7 (20.6%)	‡ 11 (32.4%)

‡ p< 0.01 difference from coculture alone

동안 원심 분리시킨후 상층액을 버리고 다시 Ham's F-10 배양액을 1ml를 넣어 37°C, 5%CO₂ 배양기내에서 30분동안 swim-up시켰다. swim-up한 정충이 함유된 상층액을 채취하여 다른 원추형 시험관으로 옮긴다음 800r.p.m.으로 5분동안 원심분리하여 상층액을 버리고 Ham's F-10 배양액을 넣어 원심분리하는 과정을 2회 반복하여 정충을 세척한후 배양기내에 보관하였다.

5. 실험계획

회수된 성숙 생쥐난들을 5×10⁴/ml의 난관 단층세포가 함유된 Ham's F-10 성장 배양액이 들어 있는 조직 배양접시로 옮겨 공동 배양하였다.

대조군으로 112개의 성숙한 생쥐난을 공동 배양했고 실험군으로는 88개의 성숙 생쥐난들을 10⁻⁶ mM농도의 PAF가 첨가된 공동 배양액에서 배양했으며 각 군의 생쥐난들을 채취 수정시킬 때 정충의 수는 5×10⁴/ml 이었다. 각 군에서 생쥐난들을 채취수정 시킨 다음 24, 48, 72시간에

서 각각 수정률, 세포정지, 세포분할, 배세포 분절율, 배세포의 퇴화율 등을 관찰하여 비교분석하였고 초기 배에서 세포막의 분절이 25%이상 나타났거나 또는 세포질이 과립, 검은색으로 변질된것은 세포퇴화로 판정하였다.

실험결과에 대한 신뢰도는 t-test로 통계처리하였다.

결 과

배세포를 난관 세포와 공동배양한 대조군과 공동배양과정에서 혈소판 활성 요소를 첨가한 실험군에서 수정란의 세포분할 과정을 서로 비교하였는데 표 1에서 보는 바와같이 24시간 배양후 2-4세포기의 분할율은 대조군과 실험군에서 각각48.21%(54/112), 56.81%(50/88)이였고 48시간 배양에서는 43.75%(49/112)와 52.27%(46/88)로 실험군에서 양호했으나 배양48시간 이후의 세포분할율은 양 군에서 유사한 비율을 나타

냈다.

배양 과정중에 난세포의 비수정, 세포 발생정지, 세포의 퇴화 등이 일어난 배세포들은 대조군에서 73개였고 실험군은 58개였는데 표 2는 각군에서 미발달된 배세포들의 상태를 비교하여 나타냈는데 난세포의 비수정율은 실험군에서 42.37%(24/58)이었고 대조군은 55.53%(42/73)로서 실험군이 우수한 수정율을 나타냈으나 배양과정에서의 배세포 발생정지 또는 세포퇴화는 양군에서 유사한 비율을 나타냈다.

실험군과 대조군에서 배양된 배들의 질을 판정하기 위해 배세포의 균형상, 세포막 분절, 세포질의 음영과 과립변형 등을 관찰하였는데 각군에서 비정상적으로 발달한 배세포들을 분석한 결과 표 3에서 보는 바와 같이 균형 배세포 발생정지는 실험군과 대조군에서 각각 35.3%(12/34)와 35.5%(11/31)로 거의 동일한 비율을 나타냈고 불균형 세포 발생정지는 실험군(11.8%)보다 대조군(19.4%)이 약간 높았으나 세포질 변질은 실험군이 32.4%였고 대조군이 19.4%로서 실험군이 훨씬 높은 세포 변질율을 나타냈다.

고 찰

혈소판 활성화요소는 혈액의 증성구와 혈소판, 양수세포, 조직의 내상피세포 등에서 발견된다(O'Neill et al., 1989; Billah et al., 1985; Sengoku et al., 1993)고 하며 포유동물의 정자에서도 확인되었으나 정자의 세포내에서 혈소판 활성화요소의 작용기전은 현재 확립되어 있지 않다고 한다(Pinckard et al., 1989; Parks et al., 1990). 그러나 혈소판 활성화 요소는 정자의 운동성과 acrosomal reaction을 향상시켜 난자와의 수정능력을 현저히 증가시킨다고(민부기 등, 1995; D'Cruz et al., 1989; Ricker et al., 1989; Kuzan et al., 1990)하며 배세포의 발달에도 관여하여 일반 배양액에 비해 배세포 분할을 향상시켰다(O'Neill et al., 1989; D'Cruz et al., 1989)고 하였다. 그러나 Shi(1993) 등에 의하면 일반 배양액으로 체외 배양하는 과정에서 혈소판 활성화요소의 첨가는 배세포의 분할과 성장에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다.

한편으로 배세포의 체외배양과정에서 배양환경을 개선시키기 위한 노력으로 난관세포와 배세포를 공동 배양하는 것은 생체내에서의 생식과

정과 접근하는 방법으로 일반 배양액의 배양과정에서 흔히 발생하는 배세포의 발생정지와 세포 분절 상태를 개선시켜 배세포의 생존능력을 향상시킨다(김정호 등, 1994; Rexroad et al., 1962; Sakhas et al., 1988; Bongso et al., 1990)고 한다. 일반적으로 공동 배양에 이용되는 난관세포들은 1차배양 또는 2차 계대배양된 섬유아 세포계이고 Bongso등(1990)에 의하면 2차 계대배양의 섬유아 세포계는 대부분 분비세포로만 구성되어서 배세포 발달에 필요한 영양소를 공급하고 또한 섬유아세포를 취급하기가 편리하다고 했다. 그러나 Melanic등(1993)은 공동 배양에 이용되는 공급세포(feeder cell)는 유래조직이 난관, 자궁내막, 난소등 조직의 종류나 세포형태 즉 상피세포 또는 섬유아 세포등 관계없이 배세포의 발달을 향상 시켰다고 보고하였다.

난관 체세포가 배세포의 발달에 관여하는 역할은 아직 확실히 규명되지 않았지만 배세포 성장에 필요한 specific glycoprotein이라는 영양소를 분비하고 한편으로 배세포에서 생성되는 대사물질과 배양액내에 함유된 불순물질을 제거하는 해독작용을 할 것으로 추정하는 보고(Gerena et al., 1990; Menezo et al., 1990)들이 있다.

본연구에서 공동배양 과정중 혈소판 활성화요소를 첨가한 경우 수정률이 대조군에서 42.5%이고 실험군에서 58.6%($p < 0.005$)로 대조군에 비해 높게 나타난 것은 혈소판 활성화요소가 정자의 운동성을 향상시켰기 때문이며 배양 48시간 이후의 배세포 발달은 실험군과 대조군에서 서로 유사한 비율을 나타냈으며 배양되는 배세포의 질적인 상태도 실험군과 대조군에서 별차이가 없었으나 배의 퇴화 현상은 실험군에서 현저히 높았다. 따라서 배양 48시간 이후에 혈소판 활성화요소는 배세포성장을 촉진시키지 않을뿐 만 아니라 배세포의 질적 향상에도 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 판단되며 이런 결과는 배세포에서 생성되는 혈소판 활성화요소와 체외 배양과정에서 합성 혈소판 활성화요소가 배세포내에서 작용하는 기전이 아직 확립되지 않아 지속적인 연구가 되어야 할 것이다.

결 론

포유동물의 생성되는 혈소판 활성화요소가 생식 과정에 미치는 영향을 관찰하기 위해 생쥐난을

난관상피세포와 공동 배양하는 과정에서 혈소판 활성요소를 첨가한 실험군과 단독 공동 배양한 대조군으로 나누어 체외수정율, 배세포 분할, 배세포의 질적 상태등을 비교하여 다음과 같은 결론을 지었다.

1. 난세포의 체외수정율은 대조군에 비해 실험군에서 우수했으며 배의 조기 세포 분할율도 대조군이 약간 높았다.

2. 48시간 배양에서 배의 발달상태는 실험군과 대조군에서 유사하였다.

3. 미발달 배세포들에서 균형 배세포 발생정지율은 실험군과 대조군에서 유사한 비율을 나타냈고, 불균형 배세포 발생정지율은 대조군에서 약간 높았으며 세포질의 변질은 실험군에서 현저히 높은 비율을 나타냈다.

따라서 난세포의 체외수정 및 조기 배세포 분할은 대조군에 비해 실험군에서 양호한 결과를 나타내지만 48시간 이상 배를 배양할경우 실험군에서 배세포의 퇴화율이 현저히 높았다.

인 용 문 헌

- Abisogun AO, Braquet T, Tsafri A: The involvement of platelet activating factor in ovulation. *Science* 1989, 243, 381-383.
- 민부기, 김기석, 최기욱, 이희섭, 김홍곤, 홍기연: 혈소판 활성요소가 생쥐의 정자운동, 체외수정 및 세포분할에 미치는 영향. 대한 불임학회잡지 1995, 22, 11-15.
- Haper MJK. : Platelet activating factor : a paracrin factor in preimplantation stage of reproduction. *Biol Reprod* 1989, 40, 907-913.
- Zhu YP, Hoffman DR, Hwang SB, Miyaura S, Johnston JM. : Prolongation parturition in the pregnant rate following treatment with a platelet activating factor receptor antagonist. *Biol Reprod* 1991, 44, 9-42.
- Collier M, O'Neill C, Ammit et al. : Biochemical and pharmacological characterization of human embryo derived platelet activating factors. *Human Reproduction* 1988, 3, 841-850.
- O'Neill C, Ryan JP, Collier M, Sounders DM, Ammit AJ, Pike IL.: Supplementation of in vitro fertilization culture medium with platelet activating factor. *Lancet* 1989, 769-772.
- 김정호, 홍기연, 김기석, 최정훈, 민부기. : 난관 세포와 공동배양에 의한 배세포 발달의 향상. 대한 불임학회잡지 1994, 21, 77-81
- Rexroad CE, Jr., Powell AM. : Coculture of ovine ova with oviductal cells in medium. *Nature Lond* 1962, 194, 747.
- Sakhas D, Trounsen AO, Kola I. : In vitro cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in cocultur with oviductal cells. *Reprod Fertil Devel* 1988, 1, 127-136.
- Bongso A, NgChye S, Ratnam S. : Coculture; their relevance to assisted reproduction. *Human Reproduction* 1990, 5, 893-900.
- Billah MM, DiRenzo GC, Ban C, Truong CT, Hoffman R, Ancesch MM, Bleasdale JE, Johnston JM. : Platelet activating factor metabolism in human amnion and the response of this tissue to extracellular platelet activating factor. *Prostaglandins* 1985, 30, 841-850.
- Sengoku K, Tamate K, Takaoka Y, Ishikawa M. : Effects of platelet activating factor on human sperm function in vitro. *Human Reproduction* 1993, 8, 1443-1447.
- Pinckard RN, Ludwig JC, McManus LM. : Platelet activating factor: In Gallin JI, Goldstein IM, Synerman R(EDS); Inflammation, basic principles and clinical correlates. Raven Press, New York. 1989, 139-167.
- Parks JE. Hough S, Erlor C. : Platelet activating factor activity in the phospholipids of bovine spermatozoa. *Biol of Reprod* 1990, 43, 806-811.
- D'Cruz OJ, Haas GG, : Platelet activating factor induces acrosome reactions in human sperm. In proceedings of the Sero Symposium on fertilization in mammals, Boston, MA. 1989, 53, abstract II-6.
- Ricker DD, Minhas BS, Kumar R, Robertson JL, Dodson MG. : The effect of platelet activating factor on the human spermatozoa. *Fertility Sterility* 1989, 52, 655-665.
- Kuzan FB, Geissler FT, Handerson JWR, : Role of spermatozoal platelet activating factor in fertilization. *Prostaglandins* 1990, 39, 61-74.
- Shi H, Miller F, Miller K, Kim MH. : The effect of platelet activating factor on different phases of

- murine in vitro fertilization. *J Assist Gen* 1993, 9, 373-177.
- Melanie RF, Cristina B, George AH, Kevin GO. : Coculture of mouse embryos with cells isolated from the human ovarian follicle, oviduct, and uterine endometrium. *Ferti Steril* 1993, 59, 138-142.
- Gerena RL, Killian GJ. : Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *J Exper Zool* 1990, 256, 113-120.
- Menezo YJR, Guerin JF, Czyba JC. : Improvement of human embryo development in vitro by culture on monolayers of vero cells. *Biol of Reprod* 1990, 42, 301-306.
-