

생쥐 체외수정과 배아 발달에 미치는 Insulin, Transferrin, Selenite 및 EDTA의 영향

합춘 여성 클리닉 · 합춘 불임유전 연구소

김충현 · 장은주 · 정경순 · 황도영
김기철 · 민응기

포유류 난자의 체외수정과 배양에서는 혈청, 난포액 및 albumin등이 첨가제로 사용되고 있다. Albumin의 경우에는 혈청과 난포액등의 체액에 비해 그 효과가 적으며, 이는 체액에 포함되어 있는 각종 성장인자(growth factor), 아미노산, 비타민 및 미량금속에 의한 것으로 사료되고 있다. 그러나 이들 체액의 경우 감염의 가능성이 존재하여 이를 대체할 첨가제에 대한 연구가 계속되고 있는 실정이다.

현재 널리 이용되고 있는 대체 첨가제로는 Irvine 사의 synthetic serum substitute(SSS)와 Medi-Cult사의 synthetic serum replacement (SSR)-2가 있다. SSS는 albumin이외에 소량의 α - & β -globulin 이 포함되어 있고 첨가제만을 구입하여 사용할 수 있으나, SSR-2의 경우에는 첨가제만을 구입할 수 없고, 정확한 조성에 대하여 제조사에서 밝히지 않고 있으나 insulin, transferrin 및 각종 미량금속등이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다.

Insulin은 세포의 생존력을 증가시키고, 세포의 대사활동을 증진시키며, 여러 성장인자들과 유사한 작용을 하는 것으로 알려져 있고, transferrin은 iron의 독성을 안정화하여, 안전한 형태로 세포가 필요한 iron을 공급할 수 있다.

한편, chelating agent인 EDTA는 developmental block을 극복시켜 주며, 배아에서의 단백질 합성에 도움을 주는 것으로 보고되고 있다. 그러나 배아 배양에서 EDTA작용은 그 기작이 명확하지 않으나, 배양조건에서 중금속 오염원을 chelation하여 금속의 독성을 중화시키는 것으로 사료된다. 따라서 비록 EDTA가 배아 미세환경의 정상적인 component가 아니지만, toxic한 금속의 노출로부터 배아를 보호해주는 natural maternal filtration의 역할을 대체할 수 있을 것으로 보여진다.

Insulin, transferrin, selenite(ITS) mixture는 배양액 첨가제로 상용화 되어 있으나, 배아 발달에 미치는 이의 영향이나, 개개의 성분들에 의한 영향에 대한 보고는 드문 형편이며, EDTA는 metal chelator로의 성질 때문에 그 장점에도 불구하고 ITS mixture와의 공동 사용이 불가능할 것으로 예상된다. 이에 본 연구자들은 ITS mixture에서의 각 구성분 농도로 insulin, transferrin 및 selenite를 각각 첨가한 군과 ITS mixture 첨가군 및 EDTA 첨가군에서의 체외수정과 배발달을 비교하여 그 영향을 알아보고, EDTA와 ITS mixture의 공동 사용 가능성을 확인하여 불가능한 경우 각각의 효율성 점검을 통해 보다 유용한 첨가제를 선별코자 하였다.

각 군에서 체외 수정율은 70%내외, 수정 후 4일에 확인한 배반포 형성율은 80%내외로 통계적으로 유의한 차이가 없었으나, 수정 후 5일에 배반포이상으로 발달한 배아의 할구수는 유의한 차이를 나타내었다($P<0.05$). Transferrin과 EDTA동시 첨가군에서 할구의 수가 93.9개로 가장 많았으며, insulin단독 첨가군에서 가장 적었다. EDTA의 첨가 여부에 따른 차이는 통계적으로 유의하지 않았으며, Duncan검정을 시행한 결과 일부 군 사이의 차이는 유의하지 않는 것으로 나타났다. 따라서, EDTA의 첨가는 배양액의 중금속 오염원을 중화시킨다는 의미에서 유용할 것으로 판단된다.

그러나, 본 실험의 결과로 각 첨가제의 효율성을 정확히 평가하는 것은 다소 무리가 있을 것으로 사료된다. 또한 생쥐에 있어 preimplantation embryo의 발달에 대한 성적을 통해 postimplantation embryo의 발달을 예측하는 것은 여타의 보고로 미루어 보아 다소 미흡한 점이 있고, 특히 insulin이나 EDTA의 영향은 postimplantation stage에서 나타난다는 보고들이 있어, 향후 배아이식 등을 통한 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

Effects of Three Different Types of Superoxide Dismutases (SOD) on the In Vitro Development of the

Mouse Embryo and Their Expression in the Mouse Oviduct

Department of Animal Sciences,
Kon-Kuk University

M.H. Kim, N.H. Kim, J.H. Kim, H.T.
Lee and K.S. Chung

The objectives of this study were to determine effects of three different types of SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD and Fe-SOD), which appeared to be the potent scavengers of superoxide anion, on the *in vitro* development of the mouse embryo and to assay these antioxidant enzymes in the mouse oviduct by western blotting method. Mouse zygotes were cultured in CZB medium containing different types of SOD at 37°C under atmosphere of 5% CO₂ in air. Mouse oviductal fluid and tissues at all stages (from ovulation time to the blastocysts) were collected from the mouse oviducts and at -70°C for the western blotting assay. Addition Cu/Zn-SOD to the culture medium significantly ($P < 0.05$) increased the incidence of blastocyst formation of mouse zygote developing *in vitro*. In contrast, neither Mn- nor Fe-SOD did not enhance *in vitro* development of mouse zygotes. Western blotting analysis revealed both Cu/Zn type and Mn type SOD in the all stage of oviductal fluids and tissues. In the oviductal tissue, Mn-SOD particularly displayed the pattern of expression of two subunits at 40 and 96 kD. These results suggest that Cu/Zn-SOD is probably associated with the two-cell block phenomenon in the mouse embryos during *in vitro* culture, and that SOD in the both oviductal fluid and tissue may play an important role in the protection of embryos against reactive oxygen radicals.

- 4 -

Effect of Human Cord Serum

on the Hormone Production by Mouse Oocyte Cumulus Complexes *In Vitro*

전남대학교 의과대학 산부인과학교실

이여일, 박현정, 권영숙

In our previous study, it was shown that human cord serum stimulated cumulus expansion *in vitro* by cumuli oophori isolated from mice primed with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG), and suggested that there were some gonadotropin-like components stimulating cumulus expansion in human cord serum. In this paper we assess whether there are gonadotropin stimulating cumulus expansion in human cord serum and sex steroid hormone production from oocyte cumulus complexes (OCCs). The contents of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were measured in human cord serum; follicle stimulating hormone level was basal, but luteinizing hormone was as high as 142.4mIU/ml even in inactivated serum. After short term culture (4hr), with or without OCCs, medium containing 0.4% bovine serum albumin (BSA) as control or 10% human cord serum (HCS) was collected and analyzed for its content of estradiol, progesterone, and testosterone. Little or no sex steroid contents were detected in any control media with or without OCCs. In contrast, a moderate or small amount of sex steroid contents was detected in culture medium containing cord serum. OCCs secreted minute but not significant amounts of estradiol, progesterone, and testosterone when cultured in media containing cord serum. After 4, 8, and 22hr culture with OCCs, similar patterns of cumulus expansion were observed in media containing cord serum, human chorionic gonadotropin (HCG) instead of luteinizing hormone (LH), and HCS plus HCG. However, no cumulus expansion was observed in any control media.

It is suggested that luteinizing hormone in