

Interleukin-2가 소 미성숙난포란의 핵성숙에 미치는 효과

이동복 · 남경수* · 송해범
대구대학교 자연자원대학

Effect of Interleukin-2 on the Nuclear Maturation of Immature Oocytes in Bovine

D. M. Lee, K. S. Nam* and H. B. Song

College of Natural Resources, Taegu University

SUMMARY

In the present study, effects of interleukin-2 (IL-2), a differentiator and proliferator of T-cells, on nuclear maturation and sperm penetration of bovine oocytes was examined in a serum-free or serum-containing medium.

Basic medium was used TCM-199 supplemented with 2.2g / ℓ sodium bicarbonate, 100 i.u. /ml penicillin, 100μg /ml streptomycin, 0.25μg /ml Fungizone, this medium treated with FCS and IL-2.

In experiment 1, we examined the effect of the addition of 0, 1, 5, 10 or 15nM /ml IL-2 to tissue culture medium (TCM-199) on nuclear maturation of oocytes. Development of oocytes to the Metaphase II (M II) stage (%) was significantly ($P < 0.05$) higher at 1, 5, 10 and 15 nM /ml IL-2(54.2, 73.5, 80.0 and 69.6%, respectively) than at 0 nM /ml IL-2(35.7%). In experiment 2, we examined the effect of the addition of 10nM /ml IL-2 or 5% FCS in oocyte maturation. Nuclear maturation rates were significantly($P < 0.05$) higher 10nM /ml IL-2(80%) than non-treatment(35.7%) and 5% FCS(63.6%) treatment. On the other hand, there were no significant difference in the proportion of oocytes developed to the 2-cell stage after addition of IL-2 and /or FCS.

These results suggest that IL-2 supports nuclear maturation of bovine immature oocytes *in vitro*. Serum-free maturation system using IL-2 might be useful for evaluation of various factors on oocyte maturation.

(Key words : *in vitro* maturation, interleukin-2, bovine oocyte)

서 론

생식세포의 체외조작기술, 특히 소 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양 기술은 핵치환 및 외래유전자 주입에 의한 형질전환 동물의 생산과 같

은 첨단 생명공학연구에 필요한 다량의 수정란 확보와 경비절감을 위하여 그 의의가 크므로 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 일반적으로 포유동물의 수정란을 체외배양하는데 있어서 난포액, 복수액, 소 태아혈청과 양수 등이 배양액의 단백질 첨가제로 많이 이용되고 있다 (bovine : Zuelke와

* 동국대학교 의과대학(College of Medicine, Dongguk University)
이 논문은 1998학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

Brackett, 1993; human : Bar-Ami 등, 1993; Gomez 등, 1993; mouse : Eppig, 1991; Das 등, 1992; Park 등, 1994; pig : Funahash와 Day, 1993; sheep : Sun 등, 1994). 이러한 첨가제는 포유동물의 난자성숙, 수정란의 초기발달 및 부화과정에 필요한 영양성분을 다량 함유하고 있는 것으로 알려져 있으나, 최적의 배양체계를 확립하고 발생능력에 미치는 정확한 평가와 분석에는 어려움이 있다. 최근 첨가제로 많이 사용되는 혈청의 유해효과와 면역학적 문제를 감소시키고자 혈청을 대신할 첨가제에 대한 연구가 진행되고 있다.

IL-2는 분자량이 15.5KDa의 당단백질로서 여러 가지 물질의 자극에 의하여 림프구로부터 생성되는 cytokine으로 1976년 Morgan 등에 의해 처음 보고 되었으며 초기에는 T 림프구 증식을 유도하는 주요 기능으로 인하여 T세포 증식인자(T cell growth factor : TCGF)로 명명되었다. 그 후 많은 연구에 의해 T 림프구뿐만 아니라 B 림프구, 자연 살세포(natural killer cell, NK cell) 및 단구(monocyte) 등 여러 면역 담당세포의 활성도 조절한다는 사실이 밝혀졌다(Mingari 등, 1984; Kuribayashi 등, 1981; Wahl 등, 1987). Wang과 Norman(1991)에 의하면 IL-2는 여성 난포액에 다량으로 존재하며 난포 성장을 촉진하는 하나의 인자라고 보고하였다. Lee 등(1998)은 IL-2가 bovine 자궁내막 기질 세포의 증식효과를 MTT assay법과 ^3H -thymidine incorporation에 의해 관찰한 결과 1.25~1.5nM에서 효과적이라고 보고하였다. 그러나 이 물질이 배의 발달에 어떠한 영향을 미칠 것인지에 대해서는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 배양액 첨가제로서의 IL-2의 이용 가능성을 알아보기 위하여 소 미성숙난포란을 IL-2 첨가 배양액에 배양하면서 혈청 첨가 배양액과 비교 조사하고 최적의 배양조건을 개발하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수

소의 난소는 도축장(경주시, 한일유통)에서 도살 직후 채취하여 37°C의 멸균 생리식염수가 충만된

보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반되었다. 난소 표면의 혈액과 이물질을 제거한 후 18 gauge 주사침이 연결된 10ml 주사기를 이용하여 직경 2~6mm 가시난포로부터 난포액을 흡입채취하여 미성숙난포란을 채취하였다. 채취된 난포란은 실제 현미경하에서 난자 주위의 난구세포가 균일하게 둘러쌓여 있는 것만을 선별하여 회수용액(PBS + 3mg/ml BSA)으로 3회 배양용 배지(TCM-199)로 1회 세정한 후 체외성숙 배양에 이용하였다.

2. 체외성숙

기본배양액으로는 TCM-199(Sigma Chem, Co., St. Louis, Mo, U.S.A.)에 2.2g/l sodium bicarbonate(NaHCO_3), 100i.u./ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ul}$ streptomycin, 0.25 $\mu\text{g}/\text{ul}$ Fungizone가 첨가된 배양액을 사용하였으며, fetal calf serum(FCS)의 첨가 유·무에 따른 IL-2를 농도별로 첨가하여 실험을 실시하였다. 난포란의 성숙을 위한 체외배양은 60×15mm의 배양 dish에 100 μl 소적한 후 paraffin oil을 덮고 각 배양액 소적에 10~15개의 난포란을 옮겨 5% CO_2 , 37.5°C 배양기 내에서 22~24시간 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

1) 실험 I : 무혈청 배양에서 IL-2의 농도 변화가 미성숙난포란의 핵성숙에 미치는 영향

회수한 미성숙난포란은 0, 1, 5, 10 및 15nM/ml의 IL-2를 첨가한 TCM-199 배양액에 넣어 22~24시간 동안 체외배양한 후 미성숙난포란의 핵성숙단계를 관찰하여 농도별로 비교하였다.

2) 실험 II : FCS와 IL-2 첨가에 따른 미성숙난포란의 핵성숙에 미치는 영향

TCM-199 배양액에 첨가하는 각기 다른 첨가제에 의한 효과를 비교하기 위하여 무첨가, 5% FCS 및 10nM/ml IL-2를 첨가하여 22~24시간 배양 후 핵성숙을 비교하였다.

3) 실험 III : IL-2와 혈청의 첨가 유·무에 따른 성숙배양 후 배발생에 미치는 영향

IL-2 또는 5% FCS + IL-2를 첨가한 TCM-199에서 미성숙난포란을 성숙시킨 후 배발생에 미치는

효과를 조사하기 위해 무혈청과 혈청이 포함된 배지에 0, 1, 5, 10 및 15nM의 IL-2를 첨가하여 22시간 체외배양한 후 Fer-TALP 배양액에서 6~8시간 동안 수정을 유도하였다. 수정 후 48시간 동안 5% FCS가 포함된 TCM-199 배양액에 배양 후 배 발생을 관찰하였다.

3. 체외수정

체외수정은 Kim 등(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. 동결정액(0.5ml)을 39°C 항온수조에서 30초간 용해한 후 90% percoll의 상층부에 분주 후 원심분리(2,000rpm, 30분)를 실시하였다. 원심분리 후 tube 하단의 정액층만을 회수하여 정자농도를 1×10^7 정자/ml가 되도록 준비하였다. 체외수정액은 Fer-TALP 배양액에 6mg/ml BSA, 10 μ g/ml heparin이 함유된 50 μ l 소적 배양액을 만들어 overnight동안 평형시킨 후 체외수정에 이용하였다. 체외수정에 사용된 난포란은 1% hyaluronidase(Sigma)용액으로 난구세포를 제거하여 체외수정액으로 2회 세척 후 10개씩을 체외수정 소적으로 옮긴 후 상기 방법으로 준비한 정액 10 μ l를 수정액 내에 첨가해 수정을 실시하였다. 정자의 최종농도는 2×10^6 정자/ml로 하였다. 난포란은 6~8시간동안 수정을 유도하여 TCM-199 배양액으로 2~3회 세척한 다음 체외배양에 이용하였다.

수정은 2-cell embryo로 확인하였다.

4. 핵성숙의 판정

미성숙난포란에 대한 핵성숙의 판정은 체외배양 22~24시간 후에 급속염색법(Byun 등, 1991)을 이용하여 염색한 후 검경하여 Fig. 1의 a~d와 같은 기준으로 3회 반복하여 분석하였다. 본 처리에서 얻어진 결과의 통계분석은 SAS를 이용하여 Chi-square test 로 유의성을 검정하였다($P < 0.05$).

결 과

1. 무혈청 배양에서 IL-2 농도 변화에 따른 미성숙난포란의 핵성숙

TCM-199 배양액에 0, 1, 5, 10 및 15nM/ml의 IL-2를 배양액에 첨가해서 20~22시간 배양했을 경우 핵성숙율은 Table 1과 같다. IL-2의 첨가 농도 0, 1, 5, 10 및 15nM/ml에서 핵성숙율은 각각 35.7%, 54.2%, 75.5%, 80.0% 및 69.6%로 무첨가군보다 높은 성숙율을 나타내었고, 특히 10nM/ml에서는 가장 높았으며 15nM/ml 이상의 농도를 배양액에 첨가할 경우 핵성숙율에 나쁜 영향을 줄 수 있다고 판단된다 ($P < 0.05$).

2. FCS와 IL-2가 미성숙난포란의 핵성숙에 미치는 효과

TCM-199(control), 5% FCS 및 10nM/ml의 IL-2를 첨가한 배양액에 미성숙난포란을 20~22시간 배양한 후 핵성숙율을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같이 각각 35.7%, 63.6% 및 80.0%로 IL-2군의 핵성숙율이 가장 높았다($P < 0.05$).

Table 1. *In vitro* maturation of bovine immature oocytes according to the addition of interleukin-2 in serum-free maturation medium

Interleukin-2 (nM/ml)	Examined	No.(%) of oocyte			
		Reached at*			
		GVBD	M I	A I ~ T I	M II
0	27	6(21.4)	8(28.5)	3(10.7)	10(35.7) ^c
1	35	4(11.4)	19(54.2)	3(8.5)	19(54.2) ^{bc}
5	34	1(2.9)	5(14.7)	3(8.8)	25(73.5) ^{ab}
10	30	0	3(10.0)	3(10.0)	24(80.0) ^a
15	33	0	3(9.0)	7(21.2)	23(69.6) ^{ab}

^{a-c} ; Different superscripts indicate that percentages were significantly different at $P < 0.05$

* Stage of meiosis ; GVBD(Germinal Vesicle Breakdown), M I (Metaphase I), A I (Anaphase I), T I (Telophase I), M II (Metaphase II)

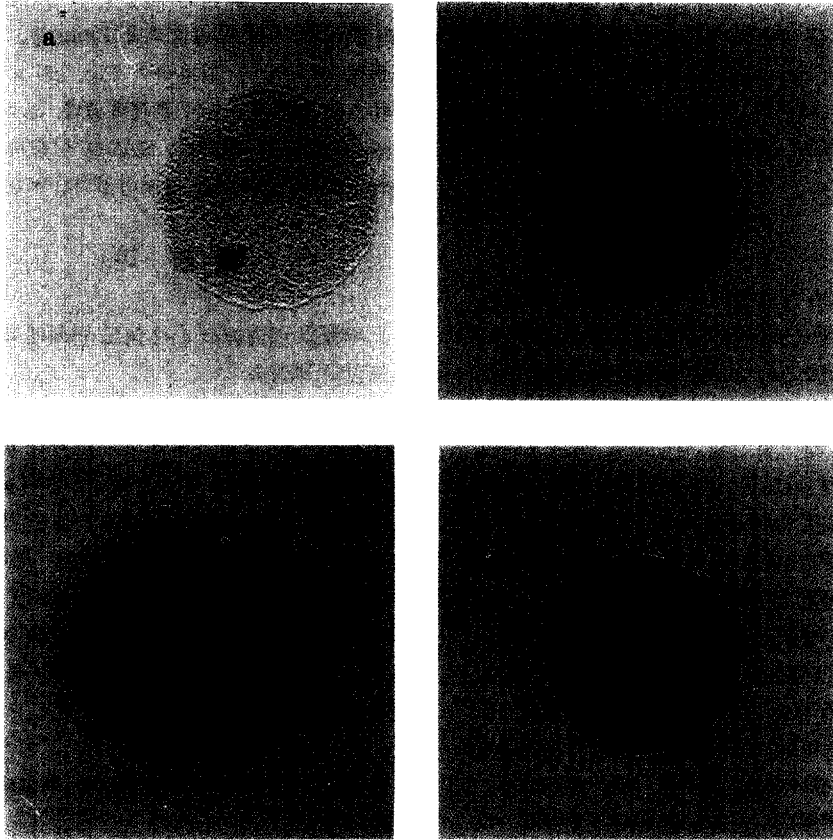


Fig. 1. Stage of meiosis($\times 200$).

Evaluation of nuclear was carried out by rapid staining using fuchin

(a : germinal vesicle break down, b : metaphase I, c : anaphase I, d : metaphase II).

Table 2. Effect of IL-2 added in maturation medium during *in vitro* maturation on the fertilizability of matured oocytes *in vitro*

Concentration of IL-2(nM)	5% FCS	No.(%) of oocytes		No.(%) of 2-cell embryos
		Examined	Matured	
0	-	48	17(35.4)	12(70.6)
	+	58	37(63.8)	28(75.7)
1	-	60	33(55.0)	22(66.7)
	+	54	43(79.6)	28(65.1)
5	-	54	40(74.1)	30(75.0)
	+	61	49(80.3)	35(71.4)
10	-	54	43(79.6)	34(79.1)
	+	55	46(83.6)	39(82.6)
15	-	57	40(70.1)	29(72.5)
	+	61	42(68.9)	34(81.0)

고 찰

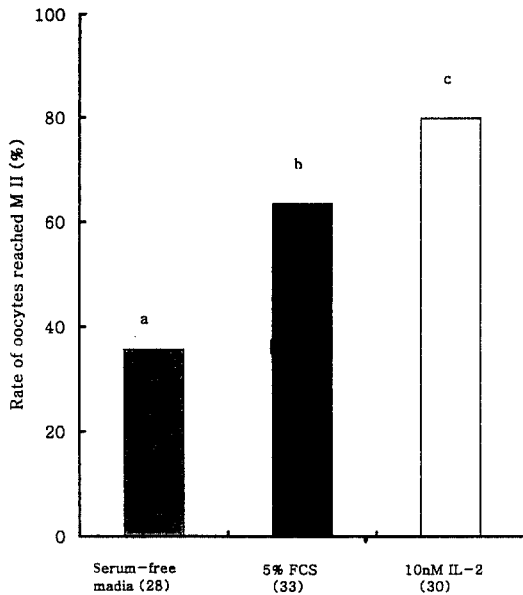


Fig. 2. Effect of FCS or IL-2 on maturation medium for oocytes maturation *in vitro*.

These oocytes were fixed in 20~22h after culture.

The number of examined oocytes was showed in parenthesis .

a, b, c ; Values with different superscripts were significantly different ($P < 0.05$).

3. IL-2와 혈청의 첨가 유·무에 따른 성숙배양 후 난포란의 배발달

체외성숙 배양액에 첨가된 IL-2농도 및 혈청 유·무가 미성숙난포란의 핵성숙 후 배 발생에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). 그 결과 IL-2농도에 따른 2-cell embryos는 무혈청에서 IL-2 농도 0nM/ml 70.6%(12/17), 1nM/ml 68.8%(22/32), 5nM/ml 78.0%(32/41), 10nmol/ml 79.1%(34/43) 및 15nmol/ml 71.8%(28/39)이고, 5% FCS에서 IL-2 농도 0nM/ml 75%(27/36), 1nM/ml 65.1(28/43), 5nM/ml 75.0%(36/48), 10 nM/ml 82.6%(38/46) 및 15nM/ml 88.4%(38/43)로 나타났으며, IL-2가 10, 15nM/ml 첨가되었을 때 다소 높으나 통계적인 유의성은 없었다 ($P < 0.05$).

본 연구에서는 IL-2를 미성숙 난포란의 체외배양에 있어 첨가제로서 가장 많이 사용되고 있는 제대혈청과 비교하기 위하여 소 미성숙 난포란을 이용하여 핵성숙 및 배 발생을 비교해 보았다.

무혈청 배양액에 IL-2를 첨가제로 사용하여 핵성숙을 비교한 결과 무처리군보다 유의하게 높았다. ($P < 0.05$) 특히 10nM/ml에서 가장 높았으며 15 nM/ml이상의 농도를 첨가한 경우 핵 성숙율에 나쁜 영향을 줄 수 있다고 사료된다. 또한 제대혈청과 비교한 결과 유의하게 높은 핵성숙율을 나타내었다 ($P < 0.05$).

IL-2가 IVF에 미치는 영향에 대해서는 명확하지 않다. 하지만 Oppenheim 등(1991)은 IL-2가 난관에 침투하거나 세포질 밖에 축적되어 배란시 난포파열에 중요한 역할을 한다고 제시하였다.

Adashi 등(1989)은 T세포는 백혈구를 통해서 난소내로 침투한다고 제안했고, Wang과 Norman (1991)에 의하면 IL-2는 여성 난포액에 3.5fmol/l 그리고 plasma에 6.1fmol/l 을 함유하고 있으며 난포성장을 촉진하는 하나의 인자이며 배란시 T-cell이 포함되어 있다고 제안했다.

IL-2와 FCS를 첨가제로 사용하여 미성숙난포란을 성숙시킨 후 체외수정하여 2세포기 까지 발달한 수정란을 비교한 결과 첨가군과 무첨가군에서 유의적인 차이는 없었으며($P < 0.05$), IL-2를 첨가제로 사용하여 체외성숙 후 배 발달이 가능하다는 것을 확인하였다.

이상의 결과로 보아 IL-2는 소 미성숙난포란의 성숙을 촉진하며, 이와 유사한 연구결과는 아직까지 보고된 바가 없으나 투명대와 난구과립막세포에서 IL-2 수용체와 IL-2 자극에 의해 생성되는 여러 물질 등에 대한 조사가 이루어지면 미성숙난포란의 성숙 기전과 인자의 연구에 유용할 것으로 생각된다. 아울러 IVF에서 IL-2가 수정과 수정란의 분할을 및 발육에 미치는 영향에 대해 추후 계속적으로 연구해 볼 계획이다.

적 요

본 연구는 소 미성숙난포란의 체외성숙에 있어서 IL-2를 첨가제로 사용하여 핵성숙과 배발생에 미치는 효과를 조사하고, 최적의 배양조건을 마련하고자 실시하였다.

1. 무혈청 배양에서 IL-2 첨가 농도에 따른 미성숙난포란의 핵성숙은 무처리군과 비교하여 각 처리간에 있어서 유의한 차이가 인정되었고 특히 10nM에서는 높은 성숙율을 나타내었다. 그러나 15nM 이상의 농도를 첨가한 경우 핵성숙에 해로움을 준다고 예측된다.
2. 미성숙난포란의 체외성숙에 있어서 5% FCS와 10nM IL-2를 첨가하여 핵성숙율을 관찰한 결과 10nM IL-2에서 다소 높은 성숙율을 확인하였다.
3. IL-2와 IL-2 + FCS에서 미성숙난포란을 성숙한 후 배발생에 미치는 영향을 관찰한 결과 10, 15nM에서 다소 높았으나 유의성은 인정되지 않았다.

이상의 결과에서 IL-2가 첨가된 배양액에서 소 미성숙난포란의 핵성숙이 가능하다는 것을 확인하였고, IL-2는 미성숙난포란의 체외성숙에 있어서 최적의 배양체계 및 핵성숙을 조절하는 기전과 인자의 연구에 유용할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Adashi EY. 1989. Cytokine mediated regulation of ovarian function : encounters of a third kind. *Endocrinology*, 124:2043-2045.
- Aussel C, Mary D, Peyron JF, Pelassy C, Ferrua B and Fehlmann M. 1988. Inhibition and activation of interleukin-2 synthesis by direct modification of guanosine triphosphate-binding proteins. *J. Immunol.*, 140:215.
- Bar-Ami S, Khoury C, Zlotkin E and Brandes JM. 1993. Increasing progesterone secretion in human granulosa luteal cells induced by human follicular fluid. *Hum. Reprod.*, 8(1):46-52.
- Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Development of a rapid staining method for nucleus of the domestic animals. *Korean J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
- Das K, Phipps ER, Hensleigh HC and Tagatz GE. 1992. Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation *in vitro*. *Fertil. Steril.*, 57(4):895-901.
- Eppig JJ. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed *in vitro* from preantral follicles. *Biol. Reprod.*, 45:824-830.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of different supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 39:965-973.
- Gomez E, Tarin JJ and Pellicer A. 1993. Oocyte maturation in human: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil. Steril.*, 60(1):40-46.
- Kim DH, Chung HM, Park SP, Lee HT and Chung KS. 1993. Effects of bovine cumulus cell co-culture and CRLaa medium on *in vitro* development of *in vitro* produced, bovine embryo. *Korea J. Animal Reprod.* 17(4):271-278.
- Kuribayashi K, Gillis S, Kern DE and Henny CS. 1981. Murine NK cell cultures. Effect of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reativity. *J. Immunol.*, 126:2321-2327.
- Lee DM, Song HB and Nam KS. 1998. Cultivation of isolated bovine endometrial stromal cells and the effect of interleukin-2 on its proliferation. *Korean J. Immunology*, 20(1):55-59.
- Mingari MC, Gerosa F, Carra G, Accolls RS, Moretta A, Zabler RH, Waldman TA and

- Moretta L. 1984. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature*, 312:641-643
- Morgan DA, Ruscett FW and Gallo R. 1976. Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrow. *Science*, 193:1007-1008
- Oppenheim JJ, Ruscetti FW and Faltynek C. 1991 Cytokines. In Stites DP and Terr AI. *Basic and clinical Immunology*, Chapter 7, 7th edn. Appleton and Lange, East Norwalk CT, p. 78.
- Park KS, Son WY, Kim JH, Lee KA, Han SY, Ko J and Cha KY. 1994. Influences of human body fluids and gonadotropins supplemented in the maturation medium on the nuclear maturation and fertilizability of mouse immature oocytes. *Kor. J. Fertil. Steril.*, 21(2):183-190.
- Sun FJ, Holm P, Irvane B and Seamar RF. 1994. Effect of sheep and human follicular fluid on the maturation of sheep oocytes *in vitro*. *Theriogenolgy*, 41:981-988
- Wang LJ and Norman RJ. 1991. Tumor necrosis factor α immunoactivity in human follicular fluid and its effects on human granulosa-lutein cells. 34th Annual Scientific Meeting, The Endocrine Society of Australia Proceedings, Sydney, Australia, p.91.
- Wahl SM, Mccarttney-Francis N, Hunt DA, Smith PD, Wahl LM and Katona IM. 1987. Monocyte interleukin-2 receptor gene expression and interleukin-2 augmentation of microbial activity. *J. Immunol.*, 139:1342-1347
- Zuelke KA and Brackett BG. 1993. Increased glutamin metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, 48:815-820.

(접수일자 : 1998. 6. 15 / 채택일자 : 1998. 8. 14)