

난관상피세포와 공배양한 소 정자의 체외수정능

황우석 · 노상호* · 이병천
서울대학교 수의과대학

Fertilizing Ability of Bovine Spermatozoa Following Oviduct Epithelial Cell Co-culture *In Vitro*

W. S. Hwang, S. Roh and B. C. Lee
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

SUMMARY

The aim of these experiments was to investigate the effects of oviduct epithelial cells on bovine *in vitro* fertilization. Oviduct epithelial cell monolayers (OEC) on the 4-well dish were prepared according to general procedures. Monolayers were formed within 5 days. The medium for OEC culture (TCM199 with 10% FBS) was replaced with IVF-TALP 2 h before each experiment. Macromolecules/proteins from oviductal conditioned medium (OM) were recovered by ultrafiltration, which desalted and concentrated macromolecules greater than 5 kDa, and this OM were added to IVF medium (experiment 1). The cleavage rate in OM+OEC group was significantly higher than in OM group ($p<0.01$). In this experiment 2, oocytes were inseminated on OEC with sperm which had been pre-incubated with OEC for 0 or 4 h before insemination. In this experiment, oocytes were exposed to sperm only 8 h for clarifying the effect. After insemination, oocytes were cultured in CR1aa. At 42 h post insemination, oocytes were denuded and examined for evidence of cleavage. The cleavage rates of oocytes which were inseminated with OEC treated sperm for 4 h were significantly higher than those of the other group ($p<0.01$).

In conclusion, sperm released from OEC have more fertilizing ability than those before attachment.

(Key words: bovine, oviduct, epithelial cell, *in vitro* fertilization)

서론

포유동물의 난관은 정자의 수정능획득, 수정 및 초기배의 발육에 적합한 환경을 제공하는 것으로

알려져 있다. 정자가 수정이 가능하려면 두부 원형질막의 변화와 미부운동의 활성화를 보이는 수정능획득이라는 과정이 필요한데 이를 위해 난관상피세포와 정자와의 접촉이 중요한 역할을 하는

* 안성산업대학교 동물생명자원학과(Department of Animal Life Resources, Ansung National University)

것으로 알려져 있다(Ellington 등, 1991). 비록 난관상피세포의 특이적 기능에 대해 알려진 것이 거의 없지만 다수의 동물종에서 난관액 혹은 난관상피세포가 수정능획득을 돕는다는 증거들이 있다(소: Guyader와 Chupin, 1991; 말: Ellington 등, 1993; 돼지: Nagai와 Moor, 1990; 양: Gutiérrez 등, 1993). 이러한 관찰은 난관의 특정한 단백질이 정자와 반응하여 수정능획득이나 생존을 돕는다는 가설을 바탕으로 하고 있다(Lippes 등, 1989). 체외에서 정자와 난관상피세포와의 접촉은 체내에서의 정자상태 변화와 유사한 것으로 알려져 있으며(Guyader와 Chupin, 1991) 최근의 증거들은 정자와 난관상피세포와의 체외에서 접촉이 난관상피세포로부터 수정능획득에 필요한 단백질합성 및 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 햄스터에서 정자는 수정능획득이 이뤄질 때가 협부의 점막에 부착한 채 남아 있으며(Smith와 Yanagimachi, 1991) 소에서는 난관상피세포에 의해 hyperactivation이 유발되고 수정능력도 장시간 유지되는데(Hunter와 Wilmut, 1984), 체외수정 및 배양기법은 이러한 기전을 밝히는데 도움을 주고 있으며 특히 대동물에서 수정의 기전을 분석하는데 있어서 동물실험의 대안으로 제시되고 있다.

본 연구에서는 난관상피세포와 그 배양액에서 분리된 고분자 단백질분획이 소정자의 수정능력에 어떠한 영향을 미치는지 또한 난관상피세포와의 전배양이 정자의 수정능력에 어떤 영향을 미치는지를 체외수정기법을 이용해 알아보고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난관상피세포 monolayer의 작성 및 고분자분획의 추출

1) 난관상피세포의 준비

난관상피세포는 Chian과 Sirard(1995)의 방법에 준하여 준비하였다. 난관은 배란 1~2일 후의 것을 도축장에서 채취하였으며 얼음에 채워 실험실까지 운반하였다. 별도의 언급이 없으면 이후 모

든 과정은 4°C에서 실시하였다. 난관을 멸균생리 식염수로 3회 세정하고 마지막으로 2mM sodium bicarbonate, 10 mM의 HEPES(Sigma Co., U.S.A.) 및 0.3% bovine serum albumin(이하 BSA; W/V, Sigma Co., U.S.A.) 첨가 TCM 199 배양액(이하 세정용 TCM 199; Gibco BRL Inc., U.S.A.)으로 세정하였다. 세정한 조직의 수분을 filter paper로 제거해낸 후 21 gauge 주사침이 달린 주사기로 세정용 TCM 199을 10ml 정도 주입하고 forcep을 사용하여 난관 좁은 부분에서 난관팽대부쪽으로 가볍게 눌러 상피세포를 분리했다. 분리해 낸 세포는 세정 및 원심분리(1,000g, 10분)후 세포 pellet과 배양액이 1:50~1:100의 비율이 되도록 조정하여 10% fetal bovine serum(이하 FBS; Gibco BRL Inc., U.S.A.)가 함유된 TCM 199에서 배양하였다. 난관상피세포의 배양은 4-well plate(Nunclon, Denmark)를 사용하여 각 well (1.7 cm²)당 0.5ml씩 분주하여 사용하였으며, 실험 1의 고분자 분획추출을 위해서는 25 cm²의 조직배양용 plate에 7.5 ml씩 분주하여 사용하였다. 모든 배양은 5% CO₂, 95% 공기 및 포화습도 조건을 갖춘 배양기(이하 5% CO₂ incubator)에서 실시하였다.

2) 난관상피세포 배양액으로부터 고분자분획의 추출

난관상피세포 monolayer(oviduct epithelial cell monolayer; 이하 OEC)가 형성된 다수의 25 cm² plate로부터 FBS첨가 TCM 199을 제거하고 혈청을 첨가하지 않은 TCM 199으로 3회 세정한 후 동일한 배양액을 OEC에 재부유하여 3일간 배양, conditioned medium를 작성하였다. 작성한 배양액에 최종농도가 10mM이 되도록 HEPES를 첨가한 후 4,000g로 10분간 원심분리하여 상층액만을 사용하였다. 분리한 상층액은 MW 5 kDa cut-off filtration membrane bucket(Millipore US, U.S.A.)에 분주, 2,000 g에서 50분간 원심분리하여 난관상피세포 유래 고분자분획을 획득하였다. 농축에 사용한 membrane bucket은 사용 직전에 BSA가 첨가되지 않은 15 ml의 세정용 TCM 199으로 2,000 g에서 3회 원심분리하여 buffer 충전 후 사

용하였다. 이 방법에 의하여 난관상피세포 유래 고분자물질을 포함한 500배 농축액(약 30 μ l)을 획득하였다. 농축액의 탈염 및 buffer 교환을 위하여 단백질을 첨가하지 않은 10 mM의 HEPES buffered-TALP를 bucket에 15 ml씩 부유하여 동일한 방법으로 3회 원심분리하여 총 단백질 측정 및 배양액에의 첨가에 사용하였다.

3) 단백질 정량 분석

난관상피세포로부터 획득한 고분자분획의 총 단백질량은 BCA protein assay kit (Pierce Co., U.S.A.)를 사용하여 측정하였다. 시약 B와 시약 A를 1:50으로 혼합하여 측정액을 만들고 이를 시료와 표준액이 각각 0.1 ml씩 분주된 5 ml 시험관에 2 ml씩 분주하였다. 표준곡선의 작성을 위한 standard로는 BSA 희석액을 사용하였다. 모든 시험관을 37°C에서 30분간 정치시키고 상온에서 식힌 후 spectrophotometer를 사용, 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 희석액으로 측정된 값을 함수화 하고 측정시료의 흡광도를 함수값에 적용하여 총 단백질을 측정하였다.

2. 체외성숙

1) 미성숙난자의 채취

완충액으로 25mM의 HEPES가 첨가된 세정용 TCM199을 18 gauge 주사침을 장착한 10 ml 주사기로 흡인, 주사침과 주사기의 내강을 세정한 후 도축장에서 채취한 난소의 소 난포(직경 2~5 mm)로부터 난포액과 함께 미성숙난자를 흡인, 채취하였다. 난자를 포함한 난포액을 플라스틱 petridish (100×20 mm, Becton Dickinson Labware, U.S.A.)에 5분간 정치시킨 후 상층액을 제거하였다. 미성숙난자는 난구세포가 치밀하며 2층 이상 부착되어 있고 균일한 난자세포질을 갖는 난자를 선발하였다.

2) 성숙배양

성숙배양에는 4-well plate를 사용하였으며 배양기시 전 각 well에 500 μ l의 성숙배양용 TCM 199을 넣어 전배양하였다. 선발한 미성숙난자는

세정용 TCM 199 배양액으로 3회 세정한 후 10%의 FBS, 15 mM sodium bicarbonate, 2.5 μ g/ml FSH (Antrin[®], Denka Pharm., Japan) 및 1 μ g/ml estradiol (Sigma Co., U.S.A.)가 첨가된 성숙배양용 TCM 199으로 1회 세정하여 well 당 20~50개를 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator 내에서 24 시간 성숙배양하였다.

3. 체외수정

전술한 방법으로 작성한 OEC를 세정용-TALP로 3회 세정한 후 well 당 0.5ml의 IVF-TALP를 첨가하고 swim-up 처리 후의 정자를 최종농도가 1×10^6 /ml가 되도록 조정된 후 각 well당 난자 20~30개와 함께 첨가하여 실험설계에 따라 실험 1에서는 18시간, 실험 2에서는 8시간동안 체외수정하였다. 대조군에서는 Fukui 등(1990)의 방법에 준하여 100 μ g/ml의 heparin을 이용, 15분간 정자의 수정능획득 과정을 거친 후 체외수정하였다.

4. 체외배양

배양액으로는 CR1_{aa}를 이용하였으며 30 μ l 씩 미소적을 작성하고 미세탈오일을 도포하여 최소한 실험 2시간 전에 전배양 하였다. 수정한 난자는 수정 미소적으로부터 세정용 배양액으로 옮겨 가볍게 pipetting하여 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였으며 작성한 체외배양액의 미소적에 각각 6~10개씩 첨가하여 5% CO₂ incubator내에서 배양하였다. 수정당일을 0일로 하여 7일째에 수정란을 관찰하여 분할율, 상심배 및 배반포로의 발육률을 산정하였다.

5. 실험 1: 난관상피세포 및 배양액 내 고분자분획이 체외수정에 미치는 영향

난관상피세포 배양액으로부터 획득한 고분자분획 농축액(high molecular weight fraction; MW 5 kDa 이상의 oviductal macromolecule concentrate, 이하 OM)을 500 μ g/ml로 첨가한 수정용 TALP (BSA 7.5 mg/ml) 및 OM을 첨가하지 않은 수정용 TALP (BSA 8 mg/ml)를 난관상피세포 monolayer가 부착된 4-well plate에 0.5 ml씩 분주하고 이를 10분간 전배양한 후 체외성숙난자

와 18시간동안 체외수정하였다.

6. 실험 2: 난관상피세포와 전배양한 정자의 체외수정능

난관상피세포와 전배양한 정자의 수정능획득 여부를 체외수정을 통하여 알아보기 위하여 난관상피세포와 정자, 난자의 동시배양군(0 h 군)과 난관상피세포와 4시간 전배양한 정자부유액에 난자를 첨가한 군(4 h 군)으로 나누어 8시간동안 체외수정을 실시하였다. 난자난구복합체에 붙어있는 정자를 제거하기 위하여 세정용 TALP 내에서 난구세포를 완전히 제거시킨 다음 전술한 방법으로 체외배양을 실시하였다.

7. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 유의성 검정에는 Chi-square test를 이용하였다.

결 과

실험 1. 난관상피세포 및 배양액 내 고분자분획이 체외수정에 미치는 영향

난관상피세포 배양액으로부터 MW 5 kDa cut-off bucket을 사용하여 탈염 및 농축을 실시한 결과 총단백 기준으로 42.0%의 고분자분획(OM)이 회수되었다(Tale 1). 이를 체외수정용 배양액에 500 µg/ml의 농도로 첨가하고 OEC와 공배양을 통해 체외수정을 실시한 결과 OM+OEC 군(60.6%)이 OM 군(42.8%)에 비하여 유의적으로 높은 분할율을 나타내었으며, OEC (52.9%) 및 OM 군은 대조군(28.5%)에 비해 유의적으로 높은 분할율을 나타내었다(Table 2, p<0.01). 후기배로의 발육율은 OM+OEC (13.1%), OEC (10.3%) 및

OM 군(8.7%)에서 유의적인 차이가 없었다.

실험 2: 난관상피세포와 전배양한 정자의 체외수정능

난관상피세포와 전배양한 정자의 체외수정능을 조사한 결과 정자와 OEC를 4시간 동안 전배양한 후 체외수정한 군(4 h 군; 55.0%)이 난자와 정자를 동시에 배양한 군(0 h 군; 32.5%)에 비하여 유의적으로 높은 분할율을 나타내었다(Table 3, p<0.01).

고 찰

수정능획득이란 첨체반응을 준비하기 위한 정자원형질막의 변화 및 hyperactivation으로 명명되는 운동성의 변화이다(Yanagimachi, 1989). 난관상피세포와 접촉한 정자는 수정능획득이 유도되는 것으로 알려져 있으며 이는 체내에서와 유사한 것으로 알려져 있고(Guyader와 Chupin, 1991), 정자와 난관상피세포와의 접촉은 난관상피세포로부터의 특정단백질합성 및 분비를 자극하는 것으로 알려져 있다(Ellington 등, 1993).

실험 1에서는 수정능획득을 유도하는 미확인인자 중 단백질 및 glycoprotein 등 고분자분획을 추출하기 위해 MW 5 kDa 이상을 분리하여 체외수정용 배양액에 첨가하였다. 이러한 배양액 유래 단백질/고분자분획은 50 ml tube에 장착하여 사용하는 MW 5 kDa cut-off bucket으로 탈염 및 분리하였다. 총 단백질기준 회수율이 42.0%로 Satoh 등(1994)이 사용한 MW 10 kDa cut-off ultrafiltration membrane의 56%에 비하면 다소 낮은 수준이나 후자의 방법이 1~2 ml의 배양액을 초원심분리하여 사용하는데 반하여 본 실험에

Table 1. Recovery of protein from protein free conditioned medium of OEC^a

	Volume (ml)	Protein conc. (µg/ml)	Total protein (µg)	Recovery of protein (%)
Conditioned media	75	24	1,800	100.0
Concentrate ^b	0.15	5,040	756	42.0

^a Oviduct epithelial cell monolayer.

^b After desalted and concentrated.

Table 2. Development of bovine oocytes fertilized by spermatozoa co-cultured with OEC and/or OM^a

Group	Replicates	No. of oocyte	No.(%) of cleaved oocytes	No(%) of cMo, BI ^b	% of cMo, BI/cleaved
OM+OEC	8	137	83(60.6) ^A	18(13.1) ^D	21.7
OEC	8	136	72(52.9) ^{AB}	14(10.3) ^{DE}	19.4
OM	8	138	59(42.8) ^B	12(8.7) ^{DE}	20.3
TALP	8	130	37(28.5) ^C	7(5.4) ^E	18.9
TALP+heparin ^c	8	185	113(61.1) ^A	24(13.0) ^D	21.2

^a OM: oviductal macromolecule concentrate; OEC: oviduct epithelial cell monolayer.

^b cMo: compacted morulae; BI: blastocysts.

^c Sperm were capacitated by heparin.

^{A-E} Different superscripts in the same column differ significantly (^{A-C}p<0.01, ^{DE}p<0.05).

Table 3. Development of oocytes fertilized by spermatozoa pre-incubated with OEC^a

Group	Replicates	No. of oocyte	No.(%) of cleaved oocytes	No(%) of cMo, BI ^b	% of cMo, BI/cleaved
0 h	6	320	104(32.5) ^A	15(4.7)	14.4
4 h	6	340	187(55.0) ^B	33(9.7)	17.7
TALP	6	180	48(26.7) ^A	9(5.0)	18.8
TALP+heparin ^c	6	260	161(61.9) ^B	34(13.1)	21.1

^a Oviduct epithelial cell monolayer.

^b cMo: compacted morulae; BI: blastocysts.

^c Sperm were capacitated by heparin.

^{AB} Different superscripts in the same column differ significantly (p<0.01).

서 사용한 bucket은 15 ml를 원심분리할 수 있어 다량의 단백질을 신속하게 회수할 수 있는 방법으로 판단된다. 예비실험결과 500 µg/ml 이상의 농도에서 유효한 효과를 나타내었으므로 최종 첨가농도를 500 µg/ml로 정하였다. 난관상피세포 및 conditioned medium 유래의 고분자분획첨가 배양액(OM+OEC 군)에서의 체외수정 후 분할율이 OM 첨가 배양액에서보다 높았는 바 이는 난관상피세포와 정자의 결합이 정자의 수정능획득에 중요한 요인될 수 있다는 사실을 시사한다고 하겠다. 또한 OEC 공배양군의 분할율이 OM 군에서 보다 다소 높게 나타난 것은 정자가 난관상피세포와 접촉하면서 수정능획득을 촉진하는 어떠한 인자의 분비를 유도하거나 혹은 물리적인 접촉으로 인해 정자원형질막의 변화가 일어났을 것으로 추정된다. 일반적으로 난관에서 분비하는 고분자분획의 주된 성분은 단백질 및 glycoprotein으로

정자의 생존유지(Ijaz 등, 1994) 및 수정능획득 유도(Anderson과 Killian, 1994)에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 도관 내로 분비되는 glycosaminoglycan (GAG)이 발정기의 소 생식도관 내에 분비되어 수정능획득을 유도한다는 의견도 있다(Parrish 등, 1989). 체외수정 시 인위적인 수정능획득을 위하여 heparin 등 GAG 계열물질을 정자 처리에 이용하기도 하는데(Parrish 등, 1988) 이러한 물질도 체내에서는 단백질 혹은 glycoprotein 과 결합한 proteoglycan의 형태로 존재하게 된다. 본 실험에서도 수정능획득을 위해 heparin으로 정자를 처리한 경우 OM+OEC 군과 유사한 정도의 분할율을 나타내어(61.1%) 인위적으로 수정능획득처리가 가능하였다. 추후 분획 내의 수정능획득을 유도하는 특정인자를 확인할 수 있는 후속 연구가 요망된다. 체외수정 기법을 이용하여 OEC와 전배양한 정자의 수정능획득 여부를 조사한 결과

(실험 2), 배양 4시간째 난자를 첨가한 군의 분할율(4 h 군; 55.0%)이 정자배양과 동시에 난자를 첨가한 군(0 h 군; 32.5%)에 비하여 높게 나타나 OEC와 전배양한 정자의 수정능력이 높은 것으로 판단된다. 본 실험에서는 체외수정시간을 8시간으로 제한하였기 때문에 0 h 군의 경우 OEC와의 배양을 통해 수정능획득이 유도된다고 해도 체외수정에 필요한 충분한 시간이 확보되지 않았기 때문에 정상적인 수정이 이뤄지지 않았을 것으로 추정된다.

이상의 결과에서 소 정자의 체외수정능은 난관상피세포와 정자의 접촉 및 분비액에서 유래한 단백질/고분자분획의 공동효과에 의한 것으로 판단되며 난관상피세포와의 전배양이 수정능획득의 한 방법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

난관상피세포와 그 배양액에서 분비된 고분자분획이 소정자의 수정능력에 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 실시한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 난관상피세포배양액으로부터 MW 5 kDa cut-off bucket을 사용하여 탈염 및 농축을 실시, 단백질/고분자분획을 회수하고 이를 체외수정용 배양액에 첨가하고 난관상피세포 monolayer와 공배양을 통해 체외수정을 실시한 결과 고분자분획첨가 및 난관상피세포 공배양(OM+OEC)군이 고분자분획첨가(OM) 군에 비하여 유의적으로 높은 분할율을 나타내었으며 난관상피세포 공배양(OEC) 군 및 OM 군 모두 대조군에 비해서는 유의적으로 높은 분할율을 나타내었다($p < 0.01$).
2. 난관상피세포와 전배양한 정자의 체외수정능을 조사한 결과 정자와 OEC를 4시간 동안 전배양한 후 체외수정한 군이 난자와 정자를 동시에 배양한 군에 비하여 유의적으로 높은 분할율을 나타내었다($p < 0.01$).

이상의 결과에서 소 정자의 체외수정능은 난관상피세포와의 접촉 및 분비액유래 고분자단백분획의 공동효과에 의한 것으로, 난관상피세포와의

전배양은 체외에서 수정능획득을 유도하는 것으로 판단된다.

참고문헌

- Anderson SH and Killian GJ. 1994. Effect of macromolecules from oviductal conditioned medium on bovine sperm motion and capacitation. *Biol. Reprod.*, 51:795-799.
- Chian RC and Sirard MA. 1995. Fertilizing ability of spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biol. Reprod.*, 52: 156-162.
- Ellington JE, Ball BA and Yang X. 1993. Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after coculture with oviductal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 98:203-208.
- Ellington JE, Padilla AW, Vredenburg WL, Dougherty EP and Foote RH. 1991. Behavior of bull spermatozoa in bovine uterine tube epithelial cell coculture: an *in vitro* model for studying the cell interactions of reproduction. *Theriogenology*, 35:977-989.
- Fukui Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:40-46.
- Gutiérrez A, Garde J, Garcia-Artiga C and Vazquez I. 1993. Ram spermatozoa cocultured with epithelial cell monolayers: an *in vitro* model for the study of capacitation and the acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:338-345.
- Guyader C and Chupin D. 1991. Capacitation of fresh bovine spermatozoa on bovine epithelial oviduct cell monolayers. *Theriogenology*, 36:505-512.
- Hunter RHF and Wilmut I. 1984. Sperm

- transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24:597-608.
- Ijaz A, Lambert RD and Sirard MA. 1994. *In vitro* cultured granulosa cell and oviductal cell secrete motility maintaining factor (s). *Mol. Reprod. Dev.*, 37:54-60.
- Lippes J and Wagh PV. 1989. Human oviductal fluid (hOF) proteins. IV. Evidence for hOF proteins binding to human sperm. *Fert. Steril.*, 51:89-94.
- Nagai T and Moor RM. 1990. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:377-382.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM and First NL. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.*, 40:1020-1025.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Weiner MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38: 1171-1180.
- Satoh T, Kobayashi K, Yamashita S, Kikuchi M, Sendai Y and Hoshi H. 1994. Tissue inhibitor of Metalloproteinases(TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances *in vitro* development of bovine embryo. *Biol. Reprod.*, 50: 835-844.
- Smith TT and Yanagimachi R. 1991. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J. Reprod. Fert.*, 91:567-573.
- Yanagimachi R. 1989. Sperm capacitation and gamete interaction. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 38:27-33.

(접수일자 : 1998. 9. 8/채택일자 : 1998. 12. 4)

