

인체의 난관수종액이 생쥐의 배아발달에 미치는 영향: II. 포배기내의 세포 수에 미치는 영향

성균관 의과대학, 삼성제일병원, 산부인과, 불임연구실¹

궁미경 · 전진현¹ · 송상진¹ · 송지홍 · 홍수정 · 유근재 · 손일표 · 김정욱¹ · 강인수

Adverse Effect of Human Hydrosalpingeal Fluid on the Development of Mouse Embryo (II)

Mi Kyoung Koong, Jin Hyun Jun¹, Sang Jin Song¹, Ji Hong Song, Soo Jeong Hong,
Keun Jae Yoo, Il Pyo Son, Jeong Wook Kim¹ and Inn Soo Kang

*Department of Obstetrics and Gynecology, Infertility Research Laboratory¹,
College of Medicine, Sungkyunkwan University,
Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center, Seoul, Korea*

= Abstract =

In our previous study, we observed that hydrosalpingeal fluid (HSF) adversely effect mouswe embryo development and hatching. The aim of this study was to evaluate the effect of HSF as assessed by the blastocyst development rate (BDR) and by cell counting in vitro. HSF was collected from ninie patients undergoing salpingoneostomy to correct hydrosalpinx. Two-cell embryos were obtained from superovulated ICR mice. T6 medium and T6±0.4% bovine serum albumin were used as control media. T6 medium containing 10% or 50% HSF and 100% HSF from each patient were used as test media. Nine to 15 embryos were cultured in microdrops prepared from each of these media. To assess the total cell number within each blastocyst, the blastocysts were fixed and stained with Hoechst 33342 to facilitate cell counting. The mean BDR in two control media were 88.89% and 85.40%. The mean BDR in media containing 10%, 50%, 100% HSF were 85.87%, 89.58% and 75.57%*, respectively (*: p<0.05). The overall mean cell count (± SEM) in control media were 87.6±9.65 and 90.12±11.38. The BDR was affected adversely only by 100% HSF and not in media containing 10% or 50% HSF. Mean cell counts were decreased significantly only in blastocysts cultured 100% HSF (63.8±13.66; p<0.01) but not in blastocysts cultured in 10% or 50% HSF (91.3±12.44 and 82.9±18.27, respectively). Thus, it is concluded that HSF has no embyotoxic effect but has a mildly negatively effect on embryonic growth and development.

Key Words: Hydrosalpinx, Embryo, Cell count, Development, Mouse

서 론

난관수종이 있는 불임환자에서 체외수정 기술

시 임신율과 착상률이 감소된다는 것이 여러 저자들에게 의해 보고되었다 (Anderson *et al.*, 1994; Kassabji *et al.*, 1994; Vandromme *et al.*, 1995; Flemming *et al.*, 1996). 또한 난관수종을 수술적으로

*이 연구는 1998년도 제일의료장학재단의 연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

교정하였을 경우 착상률과 임신율이 다시 회복되는 것도 보고되었다 (Shelton *et al.*, 1996; 궁미경 외, 1997). 최근 그 기전의 하나로 난관수종액의 영향에 대해 많은 보고가 있었으나 아직 견해의 일치를 보지 못하고 있다. 본 저자들은 지난 연구를 통해 난관수종액이 생쥐배아의 발달, 즉 포배기까지의 발달률을 저하시킨다고 보고하였고 (궁미경 외, 1997), 본 연구는 그의 연장으로 배아발달률 뿐 아니라 포배기내의 세포 수를 관찰함으로써 세포분열에 난관수종액이 어떤 영향을 미치는가를 보고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구 재료

난관수종액 (Hydrosalpingeal fluid, HSF)은 난관수종을 교정하기 위해 수술을 받는 9명의 환자로 부터 채취되었고, 300 rpm에서 10분간 원심분리시킨 후, 상층액을 채취하여 -20℃에서 실험 전까지 보관하였다. 생쥐는 ICR strain을 사용하여 7 IU의 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 주사하고 48시간 후에 7 IU의 human gonadotropin (hCG, Sigma)을 주사하여 교접시켰고, hCG 주사 후 46시간에 교접 흔적 (copulation plug)을 갖는 생쥐의 수란관을 떼어 flushing 함으로써

2-세포기의 생쥐배아를 획득하였다.

2. 배양 방법

냉동 보관된 난관수종액은 실험 직전에 녹여 0.22 um filter (Millipore)에 통과시켰으며 여과된 난관수종액을 각각의 환자별로 구분하여 사용하였다. 실험군의 배양액은 3 Group으로, T6 배양액을 기본배양액으로 하여 10%와 50%의 비율로 난관수종액을 첨가시켰거나 순수한 100% 난관수종액만을 배양액으로 사용한 경우이었고, 이에 반해 대조군의 배양액은 2 Group으로 단순한 T6 medium과 T6 medium에 0.4% bovine serum albumin (BSA; Gibco)을 첨가한 배양액을 사용한 경우로 하였다. 이와 같이 5가지 종류의 배양액을 배양접시 (culture dish) 위에 microdrop으로 준비하였고 그 위에 mineral oil (Sigma)로 덮었다. 준비된 배양접시를 5% CO₂가 첨가된 공기를 함유한 37℃의 incubator 에서 6시간 이상 보관한 후에 2-세포기의 생쥐배아 9~15개를 각각의 배양액 속에 넣어 72시간 동안 배양하였다.

3. 배아의 발달판정

배아의 발달 정도를 판정하기 위하여 포배기 발달률 (Blastocyst development rate; BDR)과 포배기 배아내의 세포 수를 측정하였다. 포배기 발달률은

Table 1. Comparison of blastocyst development rates (%) using media with and without HSF and HSF alone by patient from which HSF was obtained

Patient	T6	T6+0.4% BSA	10% HSF	50% HSF	100% HSF
1	100 (10)	82 (11)	91 (11)	100 (11)	90 (10)
2	100 (10)	90 (10)	100 (10)	91 (11)	73 (11)
3	67 (12)	92 (12)	92 (13)	92 (13)	77 (13)
4	83 (12)	83 (12)	91 (11)	82 (11)	73 (11)
5	100 (14)	80 (15)	93 (14)	87 (15)	73 (15)
6	100 (9)	91 (11)	80 (10)	100 (10)	80 (10)
7	80 (10)	90 (10)	100 (10)	64 (11)	73 (11)
8	70 (10)	70 (10)	80 (10)	91 (11)	67 (12)
9	100 (10)	91 (11)	82 (11)	100 (11)	75 (12)
Mean	88.89 (97)	85.40 (102)	89.87 (100)	89.58 (104)	75.57 (105)
STD	14	7.35	7.38	11.48	6.42

Data in parentheses indicate the number of mouse embryos used.

The statistical differences are denoted by asterisks (*: p<0.05 compared with all other groups).

현미경하에서 포배기로 보이는 배아의 수를 첨가되었던 2-세포기의 배아 수로 나누어 백분율하였다. 포배기내의 세포 수를 측정하기 위해서 Ebert 등 (1985)이 사용한 방법을 이용하였다. 포배기의 배아를 1% glutaraldehyde 용액에서 고정시켜 Bis-benzimide solution (10 ug/ml; Hoechst 33342, Sigma)으로 염색한 후 slide 옮겨 fluorescent microscope (Optiphot-2, Nikon)으로 관찰하였다. 포배기의 배아내에서 염색된 핵의 수를 세포 수로 간주하여 세었다.

4. 통계 처리

각각의 배양액에서 배양된 배아의 포배기 배아 발달률의 비교는 chi-square test를 사용하였고, 포배기내의 평균 세포 수의 비교는 Duncan's multiple range test를 이용하였다. $p < 0.05$ 일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

채취된 난관수중액의 Osmolarity는 277~297 mOsm이었으며, pH는 7.9~8.4이었으나 incubation 후에는 7.37~7.51로 생리적 범주내에 있었다.

Table 1에서 보는 바와 같이 포배기 발달률은 9명에서 채취된 난관수중액에 따른 개별적인 차이를 보이지 않았다 ($p=0.34$). 따라서 평균 포배기 발달률은 T6, T6+BSA, 10% HSF, 50% HSF, 100% HSF ($n=97, 102, 100, 104, 105$)에서 각각 88.89%, 85.40%, 89.87%, 89.58%, 75.57%*이었다 (*: $p < 0.05$, Table 1). 따라서 포배기까지의 배아발달률은 오직 100%의 HSF에서만 장애를 받는 것으로 나타났다.

Table 2는 각각의 난관수중액이 각기 다른 농도에서 포배기의 배아 세포 수에 미치는 영향을 나타낸 표이다. 세포 수가 측정된 포배기의 배아 수는 T6, T6+BSA, 10% HSF, 50% HSF, 100% HSF에서 각각 81, 86, 88, 81, 79이었으며, 포배기내의 평균 세포 수 (\pm SEM)는 각각 87.6 ± 9.65 , 90.12 ± 11.38 , 91.3 ± 12.44 , 82.9 ± 18.27 , 63.8 ± 13.66 *이었다 (*: $p < 0.01$, Table 2). 역시 100%의 난관수중액에서 배양된 포배기 배아에서 그 세포 수가 현저히 감소됨을 알 수 있었다.

고 찰

난관수중액이 배아에 미치는 영향에 관해서는 여러 저자들에 의해 결과가 보고되고 있으나 그

Table 2. Comparison of mean cell counts for a blastocyst cultured in each media by patient from which HSF was obtained

Patient	T6	T6+0.4% BSA	10% HSF	50% HSF	100% HSF
1	75 (10)	83 (9)	80 (10)	58 (11)	45 (9)
2	99 (10)	99 (10)	92 (10)	84 (10)	70 (18)
3	87 (9)	106 (7)	113 (12)	118 (11)	70 (11)
4	95 (11)	99 (8)	101 (7)	89 (10)	46 (8)
5	95 (14)	87 (15)	94 (14)	81 (14)	82 (11)
6	89 (7)	83 (8)	80 (7)	76 (7)	73 (6)
7	86 (8)	99 (8)	99 (8)	61 (7)	56 (8)
8	69 (9)	73 (10)	84 (10)	74 (10)	52 (9)
9	92 (10)	87 (11)	73 (10)	97 (11)	70 (9)
Mean	87.6 (88)	90.12 (86)	91.3 (88)	82.9 (90)	63.8 (79)*
STD	9.65	11.38	12.44	18.27	13.66

Data in parentheses indicate the number of mouse embryos used.

The mean cell counts at each media were expressed as the average cell counts for all of the blastocysts cultured in a single microdrop.

The statistical differences are denoted by asterisks (*: $p < 0.01$ compared with two control groups).

들의 결과들이 서로 일치하고 있지 않다. Mukherjee *et al.* (1996)은 10%의 난관수종액이 포함된 배양액에서는 5%의 생쥐배아만이 포배기로 발달할 수 있었고 100%의 난관수종액에서는 모든 배아가 포배기까지 발달하지 못하였다 (0%)고 보고하면서, 따라서 난관수종액은 생쥐배아에 대해 독성 (toxicity)을 갖는다고 보고하였다. Sachdev *et al.* (1997)은 1%의 난관수종액이 배양액에 포함되어 있어도 배아가 생존하지 못하였다고 하였으며, Murray *et al.* (1996)은 100%의 난관수종액에서도 배아의 61%가 포배기로 발달하였다고 보고하였다. 저자들 (궁미경 외, 1997)도 지난번의 실험을 통해 100%의 난관수종액에서 75%의 배아가 포배기로 발달하였으나 이는 대조군에 비해 유의하게 배아발달률이 감소된 것으로 보고하였다. 그 외에도 Schats *et al.* (1997)은 정자를 사용하여, Sawin *et al.* (1997)은 human trophoblast를 이용하여 각각을 난관수종액에서 배양시켜 보았을 때, 그들에 대해 난관수종액이 toxicity를 갖지 않는 것으로 보고하였다. 이번의 실험 결과 역시 100%의 난관수종액에서도 생쥐배아는 포배기까지 발달할 수는 있었지만 그의 비율이 현저히 감소되었고 특히 포배기내의 세포 수가 현저히 감소되었음을 알 수 있었다. 이는 난관수종액이 배아발달에 대해 독성은 가지지는 않지만 배아발달을 저해하는 것으로 나타났고 그 기전은 아직 불분명하다. Gott *et al.* (1990)은 난관수종액에는 protein과 glucose가 현저히 낮은 수치를 나타낸다고 보고하였고, Murray *et al.* (1997)은 난관수종액에 lactate를 첨가시켰더니 난관수종액의 배아발달 저해효과가 현저히 감소되었다고 보고하였다. 따라서 난관수종액에는 배아발달에 필요한 물질이 부족되거나 배아발달을 저해하는 요소가 존재할 가능성이 있는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구를 통해 난관수종액은 생쥐배아가 포배기까지의 발달을 저해하는 것으로 나타났으며 또한 포배기까지 발달하였을 지라도 그의 세포 수가 현저히 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 난관수종액은 비록 배아발달에 toxicity를 갖지는 않을 지라도 배아발달을 저해하는 요소 (inhibitory factor)가 있거나 발달에 필요한 물질이 결여 (deficiency of metabolites) 되어 있을 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- 궁미경, 전진현: 인간의 난관수종액이 생쥐 배아 발달에 미치는 영향. *대한산부인과학회지* 1997, 40, 514.
- 궁미경, 송인옥: 난관수종과 그의 수술적 교정이 체외수정 시술시 임신율 및 착상률에 미치는 영향. *대한산부인과학회지* 1997, 40, 510.
- Anderson, AN, Yue Z, Meng FJ and Peterson K: Low implantation rate after in-vitro fertilization with hydrosalpinges diagnosed by ultrasonography. *Hum Reprod* 1994, 9, 1935.
- Ebert KM, Hammer RE and Papaioannou VE: A simple method for counting nuclei in the preimplantation mouse embryo. *Experientia* 1985, 41, 1207.
- Fleming C and Hull MGR: Impaired implantation after in vitro fertilization treatment associated with hydrosalpinx. *Br J Obstet Gynecol* 1996, 193, 268.
- Gott AL, Hardy K, Winston RML and Leese HJ: The nutrition and environment of the early human embryo. *Proc Nutr Soc* 1990, 49, 2A.
- Kassabji M, Sims JA, Butler L and Muasher SJ: Reduced pregnancy outcome in patient with unilateral or bilateral hydrosalpinx after in vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol* 1994, 56, 129.
- Murray CA, Clarke HJ and Tulandi T: Effects of human hydrosalpinx fluid on mouse embryo development (Abstr.) In: the 52nd. Annual Meeting of the American Society of Reproductive Medicine, Boston, MA, USA, 1996, Nov. 2-6, 1996. Abstr. No. P-050.
- Murray CA, Clarke HJ, Tulandi T and Tan SL: Inhibitory effect of human hydrosalpingeal fluid on mouse preimplantation embryonic development is significantly reduced by the addition of lactate. *Hum Reprod* 1997, 12, 2504.
- Mukherjee T, Cook CA, Copperman AB, Bustillo M, McCaffrey C and Obasaju MF: Hydrosalpinx fluid has embryotoxic effects on murine embryogenesis: a case for prophylactic salpingectomy. *Fertil Steril* 1996, 66, 851.
- Sachdev R, Kemmann E, Bohrer M and El-Dana-

- souri I: Detrimental effect of hydrosalpinx fluid on the development and blastulation of mice embryos in vitro. *Fertil Steril* 1997, 68, 531.
- Schats R, Lens JW and Wit de W: Survival of spermatozoa in hydrosalpinx fluid are not impaired. (Abstr.) In: 13th. Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Edinburgh, Scotland, UK., June 22-25, 1997, Abstr. No. O-226.
- Shelton KE, Butler L, Toner JP, Oehniger S and Muasher SJ: Salpingectomy improves the pregnancy rate in in-vitro fertilization patients with hydrosalpinx. *Hum Reprod* 1996, 11, 523.
- Sawin SW, Wang CL, Mola JRL, Feinberg RF and Monzon-Bordonaba: Hydrosalpinx fluid enhances human trophoblast viability and function in vitro: implications for embryonic implantation in assisted reproduction. *Fertil Steril* 1997, 68, 65.
- Vandromme J, Chasse E, Lejeune B, Rysselberge MV, Delvigne A and Leroy F: Hydrosalpinges in in-vitro fertilization: an unfavorable prognostic feature. *Hum Reprod* 1995, 10, 576.
-