

Leukemia Inhibitory Factor가 배의 배포형성에 미치는 영향

원광대학교 의과대학 산부인과학교실, 해부학교실*

민부기 · 오수미 · 김기석 · 홍기연 · 김훈영 · 심재량 · 박승택*

The Effect of Leukemia Inhibitory Factor on Embryos to the Blastocyst Formation

Bu-Kie Min, Soo-Mi Oh, Kie-Suk Kim, Gi-Youn Hong, Hun-Young Kim,
Jea-Ryang Sim, Seung-Teak Park*

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Anatomy*, School of Medicine,
Wonkwang University, Iksan, Korea

Objective: To determine the effects of leukemia inhibitory factor (LIF) on embryonal development in in vitro culture.

Methods: This is designed in vitro model using eggs from mouse. The eggs from mouse were assigned 29 for control group, 53 for 20 ng/ml of LIF, 88 for 40 ng/ml of LIF, 68 for 80 ng/ml of LIF respectively for in vitro fertilization. And 26 fertilized eggs at 2 cell stage from mouse also were assigned. The mouse embryos of all groups were cultured in medium supplemented with LIF in different concentrations, whereas the eggs in control group was cultured in medium without supplement of LIF.

Results: At 72 hours culture of eggs from in vitro fertilization, there was a slight increase in rate of embryonal development to morula in both LIF-20 and LIF-40 as results of 64.15% and 75% respectively, while 42.65% in inferior rate of LIF-80, compare with 51.72% in control group. But the difference between these each groups were not significant in statistically ($p \leq 0.05$). And after 96 hours culture of eggs, the rates blastocyst formation was significantly higher in both LIF-20 and LIF-40 as 56.6% and 63.63% than those in control and LIF-80 as 44.83% and 35.29% respectively.

On culturing eggs from in vivo fertilization, the rates of blastocyst formation was significantly not only higher as 85% and 81.81% respectively in medium supplemented with LIF-40 and LIF-80 than 42.3% in LIF-20 but also embryonal cell viability were remarkably improved at 96 hours after culture.

Conclusion: The LIF in low dose is embryotrophic, but LIF in high dose is embryotoxic on eggs from in vitro fertilization. Whereas on culturing eggs from in vivo fertilization, LIF is more beneficial with dose dependent in high concentration.

Key Words: LIF, IVF, Embryo, Blastocyst, Cell Block

체외수정과 배이식을 시술하는 과정에서 배세포를 배포기까지 배양하여 자궁내로 이식하는 경우에 자궁내막에서 착상을 증진시킬 수 있어서 적은 수의 배아를 이식하여 다태임신을 피하는데 유리하다. 따라서 배세포를 장기간 배양하여 질적으로 양호한

배포를 발달시키는 것은 자궁내 착상을 향상시킬 수 있는 중요한 여건이 된다.

포유동물에서 cytokine은 다양한 세포들로부터 생성되어 생식 생리적 기능에 관여하며 IL-1 (interleukin)은 난세포와 난구세포에서 생성되어 수정 후에

본 연구는 2000년도 원광대학교 연구기금 보조로 이루어졌음.

도 배세포에서 분비된다.^{13,22} 또한 배세포의 분할이 4-8세포기에 도달해서 게놈 (genome)의 전사가 일어날 때² IL-1이 관여하며 배의 성장 발달과정에서 cytokine이 분비되는 것을 관찰할 수 있다.^{4,18}

LIF는 면역반응성, 생물학적 활성물질로 세포형에 따라 세포의 증식을 촉진하거나 또는 억제하여 세포분화와 증식을 조절하며 세포형에 따라 서로 다르게 작용하는 다양성을 나타내는 cytokine으로서 배발달에 중요한 역할을 한다고^{1,5,6} 하여 최근에 이에 관한 연구가 활발하다.

인간의 생식과정에서 LIF의 역할은 아직 확실치 않았지만 LIF가 첨가된 배양액에서 배를 배양할 때 간세포 (stem cell)의 분화가 억제되고 세포증식이 일어나서 배포의 형성을 현저히 향상시킨다고 하며⁶ 생쥐에서 배포기에 LIF 수용체가 출현하는 것을 관찰할 수 있다고 한다.^{17,20}

초기 배아에서 세포와 세포 사이에 교환되는 성장물질, cytokine, 생물학적, 생화학적인 활성물질들은 배세포의 성장과 발달, 형태학적 변화, 세포의 분화를 조절한다.^{9,10} 그러나 분자 생물학적으로 cytokine의 LIF가 배세포에 대해 작용하는 기전은 아직 확실하지 않으며 단지 조직 세포형에 따라 protein 합성을 촉진하고 lipoprotein lipase의 작용을 억제하여 배세포 분화의 억제를 유도하며 자궁내막의 분비기 후기에 선세포에서 LIF의 합성이 증가하고 배세포 내의 LIF 수용체가 자궁내막에 대해 고감도의 친화력을 나타내어 배세포의 배포형성과 내막에서 배아의 착상이 이루어진다.³

본 연구는 생식과 관련하여 LIF가 배세포의 발달에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양액에 여러 농도의 LIF를 첨가하여 생쥐의 체외수정난과 체내수정난을 배양하여 배의 분할, 배포형성과 세포의 퇴화를 관찰하였다.

연구대상 및 방법

1. 난자 회수와 체외수정

8주령의 ICR계 암컷 생쥐에게 PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) 5 IU를 복강내 주사하고 48시간이 경과한 후에 hCG (human chorionic gonadotropin) 5 IU를 복강내 주사하여 과배란을 유도하였

다. hCG를 투여한 후 15시간이 경과하여 생쥐의 경추를 탈골하여 희생시킨 다음 미세수술 기구로 개봉하여 비대해진 난관 팽대부를 절개하고 난자를 회수하였다.

회수한 난자들은 LIF (leukemia inhibitory factor: Sigma 제조)를 각각의 20 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml의 농도로 첨가한 0.4% BSA (bovine serum albumin)가 함유된 TYH (Toyoda Yokoyama Hosi) 배양액으로 300 μ l씩 소적한 30x30x10 mm 조직 배양접시 (Falcon)로 옮겨 파라핀 oil로 씌운 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 배양하였다.

한편 10주령의 ICR계 수컷 생쥐를 희생시킨 후 개봉하여 정소 미부를 절제하고 정소를 압착하여 정액을 채취하였다. 채취한 정액은 난자들이 들어있는 배양접시의 300 μ l씩 소적한 배양액내로 주입하여 체외수정을 시도하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 내로 옮겨 5시간 동안 배양한 후 MWM (Modified Whitten Medium)에서 수정난을 세척하고 300 μ l 소적한 MWM 배양액에 옮긴 후 파라핀 oil로 덮었다.

2. 체내수정난의 회수

암컷 생쥐에서 과배란을 유도하여 hCG를 투여한 후 수컷 생쥐와 교미하도록 야간 동안 합방시켜 24시간이 경과하여 암컷 생쥐에서 질점액 형성을 관찰하여 임신을 확인하였다. 생쥐의 경추를 탈골하여 희생시켜서 미세수술 기구로 개봉하고 팽대한 난관을 절제한 후 배양액으로 난관을 여러 번 세척하여 2세포기의 수정난을 회수하였다. 회수한 수정난들은 300 μ l씩 소적한 MWM 배양액에서 세척하고 다시 300 μ l 소적한 MWM 배양액내로 옮겨 파라핀 oil로 덮었다.

3. 실험 계획

체외수정난들은 대조군과 실험군으로 분류하여 대조군은 29개의 난을 배양접시 위에 LIF를 첨가하지 않은 MWM으로 300 μ l 소적한 배양액에서 배양하였고 실험군에서는 체외수정난들과 체내수정난들을 각각 20 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml의 LIF가 첨가된 300 μ l 소적한 MWM 배양액에서 배양하였는데 체외수정난들은 각각 60, 88개로 할당하였고 체내수정난들은 각각 26, 20, 22개로 할당하여 실험하

Table 1. The effect of LIF in various concentrations on the embryonal development at 72 hours of culture for in vitro fertilized ova

| Medium cell cleavage | Control no. of em/oc (%) | LIF-20 no. of em/oc (%) | LIF-40 no. of em/oc (%) | LIF-80 no. of em/oc (%) |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Cell block | 8/29 (27.59) | 11/53 (20.75) | 8/88 (9.09)* | 25/68 (36.76) |
| ≤ morula | 6/29 (20.69) | 8/53 (15.09) | 14/88 (15.90) | 14/68 (20.58) |
| > morula | 15/29 (51.72) | 34/53 (64.15) | 66/88 (75.00)* | 29/68 (42.65) |

§ no. of em/oc: number of embryo / oocyte. * p>0.05 compared with control

Table 2. The effect of LIF in various concentrations on the embryonal development to blastocyst at 96 hours of culture for in vitro fertilized ova

| Medium cell cleavage | Control em./oc. (%) | LIF-20 em./oc. (%) | LIF-40 em./oc. (%) | LIF-80 em./oc. (%) |
|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Cell block | 11/29 (37.93) | 14/53 (26.41) | 18/88 (20.45) | 31/68 (45.59) |
| > morula | 5/29 (17.24) | 9/53 (16.98) | 14/88 (15.91) | 13/68 (14.23) |
| Blastocyst | 13/29 (44.83) | 30/53 (56.60) | 56/88 (63.63) | 24/68 (35.29) |

em./oc: embryo / oocyte

Table 3. The effect of LIF in various concentrations on the embryonal development to blastocyst at 96 hours of culture for 2 cell from in vivo fertilization

| Medium cell cleavage | LIF-20 em./ fe. (%) | LIF-40 em./ fe. (%) | LIF-80 em./ fe. (%) |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Cell block | 9/26 (34.61) | 1/20 (5.0)* | 1/22 (4.55)* |
| > morular | 6/26 (23.07) | 2/20 (10.0) | 3/22 (13.64) |
| Blastocyst | 11/26 (42.30) | 17/20 (85.0)* | 18/22 (81.81)* |

em./ fe.: embryo / fertilization. *: p<0.05 LIF-20 vs LIF-40 and LIF-80

였다.

수정난들은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 96시간 이상 배양하였으며 매 24시간마다 배의 세포분할과 세포정지를 관찰하였고 실험결과의 신뢰성을 위해 두 번에 걸쳐 반복 실험하였다.

4. 통계 처리

실험 결과에 대한 통계적 신빙도를 알아내기 위해 student t-test를 이용하여 p>0.05일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

각각의 농도로 LIF가 첨가된 배양액에서 체외수정 난들을 72시간 배양하여 세포분할과 세포정지

가 일어난 배들의 비율을 각각 대조군과 비교하였는데 80 ng/ml LIF를 첨가한 배양액에서 세포정지는 36.76%이고 상실배로 분할은 42.65%로 다른 군들에 비해 배의 상태가 가장 불량하였고 반면 40 ng/ml LIF를 첨가한 배양액에서 배양한 배세포들은 9.09%, 75%로 가장 우수하였으며 이러한 결과는 대조군과 비교하여 통계적 유의성을 나타냈다 (Table 1).

또한 체외수정 난 배들을 96시간 이상 배양하여 세포정지와 배포형성을 관찰하였는데 80 ng/ml LIF 배양액에서 각각의 비율은 36.76%, 42.65%로 역시 다른 군의 배양액보다 불량한 결과를 나타냈으며 40 ng/ml LIF 배양액에서는 20.45%, 63.63%로 다른 배양군에 비해 가장 우수하였으나 대조군과 비교하여 통계적 유의성은 없었다 (Table 2).

체내에서 수정한 난들을 채취하여 각각의 농도로

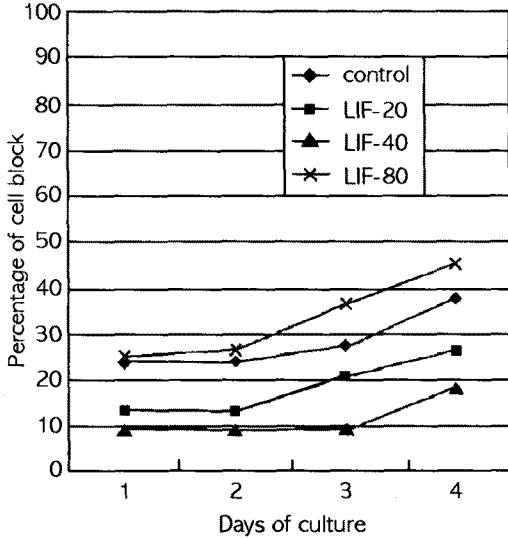


Figure 1. The effect of LIF in different concentrations on cell block of embryos during in vitro culture.

LIF를 첨가한 배양액에서 96시간 동안 배양하여 세포정지와 배포형성을 관찰하였는데 80 ng/ml LIF를 첨가한 배양액에서 세포정지율은 4.55%, 배포형성률은 81.81%이었다. 40ng/ml LIF를 첨가한 배양액에서는 각각 5.0%, 85.5%의 결과를 나타내어 고농도의 LIF 첨가 배양액이 20 ng/ml LIF 첨가 배양액과 비교하여 매우 우수하였으며 통계적으로 유의성이 있었다 (Table 3).

한편 체외에서 수정한 배세포를 배양하는 과정에서 96시간 후에 세포정지를 관찰하였는데 80 ng/ml 농도의 LIF는 45.59%로 가장 불량하였고 20 ng/ml에서는 26.42%, 40 ng/ml에서는 18.08%로 40 ng/ml 농도의 LIF에서 세포생존율이 가장 우수하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Figure 1).

고 찰

LIF는 포유동물의 여러 조직 세포에서 생성되고 세포형에 따라서 다양한 작용을 나타내는 glyco-protein 성분의 생물학적 활성물질이다. LIF가 M1 myeloid leukemia cell에서 유래되며 세포의 분화를 유도하고 세포의 증식을 억제하며^{7,8} 인간 생식과 관련하여 배의 간세포의 분화를 억제하여 배포형성과 배의 부화를 촉진하고 배발달을 조정하는 중요 역

할을 한다.^{16,21}

LIF는 estrogen 수용체가 풍부한 유방암에서 암세포를 자극하며 10~200 ng/ml의 농도로 용량 의존성항에 의해 암세포를 현저하게 증식시키는 작용을 하지만 성장요소, cytokines, estrogen 등에 의존하지 않고 직접적으로 세포에 영향을 주고 세포의 LIF 수용체가 LIF에 대한 친화력의 고감도로 반응하여 세포증식이 자극된다. 그리고 내인성 LIF가 세포증식을 촉진시키는 반면 배양액에 LIF를 첨가하여 세포를 배양할 때 세포성장을 자극하지 않는다고 한다.¹²

생쥐의 초기 배세포로부터 성장물질, cytokines 등의 수용체를 관찰하는 것은 매우 곤란하고 또한 발달시기에 따라 필수적으로 필요한 생물학적, 생화학적 물질에 관해 아직 확실히 알려진 바 없으며^{15,19,21} 자궁에서 세포내에 LIF의 수용체 분포는 정확히 밝혀지지 않았지만 면역학적 혈액학적으로 중요한 작용을 하는 cytokine은 포유동물에서 생식기능의 내분비적 변화에 중요한 영향을 미치고 자궁내막에서 estrogen과 progesterone은 LIF의 생성을 조절하여¹³ 분비의 후기에 LIF의 생성은 증식기 내막에 비해 6배 이상 증가하며³ 배의 섬유 모세포에서도 LIF를 생성하여 배의 배포형성과 배의 자궁내 착상에 LIF가 관여할 것이라고 한다.¹⁴ 그러나 Jurisicova 등¹¹은 인간의 배를 체외배양하는 과정에서 5~20 ng/ml 농도의 LIF를 배양액에 첨가하였을 때 배포형성을 촉진시키지 않았으므로 LIF가 배포형성에 영향을 주지 않는다고 보고하였는데 본 연구에서는 LIF를 40~80 ng/ml로 첨가하였을 때 현저하게 배포형성을 향상시켰으며 이러한 견해의 차이는 LIF의 농도와 관계가 있을 것으로 생각한다. 또한 본 연구에서는 80 ng/ml 농도의 LIF를 첨가한 배양액에서 체내수정된 배들을 96시간 이상 배양하였을 때 세포정지와 배포형성률이 각각 4.5%, 81.81%를 나타내어 배양상태가 매우 우수하였으나 반면 체외수정된 배에서는 45.59%, 35.29%로 다른 배양군들에 비해 가장 불량한 배양상태를 나타냈는데 이러한 결과는 체내수정난이 배양액에 노출된 시기가 체외수정난에 비해 적어도 12~24시간 정도 늦을 뿐만 아니라 LIF에 예민하기 시작하는 8세포기에서 96시간 동안 배양할 때 LIF의 영향을 받는 기간이 길었기 때문이라고 추정된다.

결 론

결론적으로 LIF는 배아가 배포기로 발달하는데 영향을 미치며 20~40 ng/ml의 농도로 첨가한 배양액에서 체외수정난을 배양하였을 때 배포의 형성을 향상시킨 반면 80 ng/ml의 고농도에서는 배아에 독성으로 작용하여 배포형성률이 불량할 뿐만 아니라 세포정지, 세포사의 비율이 다른 배양군에 비해 현저히 높았다.

한편 40~80 ng/ml 농도의 LIF를 첨가한 배양액에서 체내수정난을 배양하였을 때 용량 의존 성향으로 배포의 형성과 세포의 생존율이 현저하게 양호하였다.

참 고 문 헌

1. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart LS. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11408-12.
2. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 459-61.
3. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 421-6.
4. De los Santos MJ, Mercader A, Frances A, Portoles E, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Immunoreactive human embryonic interleukin-1 system and endometrial factors regulating their secretion during embryonic development. *Biol Reprod* 1995; in press.
5. Estrov Z, Samal B, Lapushin R, Kellokumpu-Lehtinen P, Sahin AA, Kurzrock R, Talpaz M, Aggarwal BB. Leukemia inhibitory factor binds to human breast cancer cells and stimulates their proliferation. *J Interferon Cytokine Research* 1995; 15: 905-13.
6. Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA. Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biol Reprod* 1992; 46: 470-4.
7. Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor. *EMBO J* 1987; 6: 3995-4002.
8. Gough NH, Gearig DP, King JA, Wilson TA, Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding for myeloid leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 2623-7.
9. Gurdon JB. The regulation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 1992; 68: 185-99.
10. Jessell TM, Melton DA. Diffusible factors in vertebrate embryonic induction. *Cell* 1992; 68: 257-70.
11. Jurisicova A, Ben-Chetrit A, Varmuza SL, Casper RF. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not enhance in vitro human blastocyst formation. *Fertil Steril* 1995; 64: 999-1002.
12. Kellokumpu-Lehtinen P, Talpaz M, Harris D, Van Q, Kurzrock R, Estrov Z. Leukemia inhibitory factor stimulates breast, kidney and prostate cancer cell proliferation by paracrine and autocrine pathways. *Int J Cancer* 1996; 66: 515-9.
13. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Fujita J, Mori T. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 1994; 50: 882-7.
14. Kurzrock R, Estrov Z, Wetzler M, Gutterman JU, Talpaz M. LIF: not just a leukemia inhibitory factor. *Endocrinol Rev* 1991; 12: 208-17.
15. Mann GB, Fowler KJ, Gabriel A, Nice EC, Williams RL, Dunn AR. Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 1993; 73: 249-61.
16. Mitchel MH, Swanson RJ, Hodgen GD, Oehninger

- S. Enhancement of in vitro murine embryo development by recombinant leukemia inhibitory factor. *J Soc Gynecol Invest* 1994; 1: 215-9.
17. Murray R, Lee F, Chiu CP. The genes for leukemia inhibitory factor and interleukin-6 are expressed in mouse blastocyst prior to the onset of hemopoiesis. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1953-6.
 18. Sheth KV, Roca GL, Al-Sedairy ST, Parhar RS, Hamilton CJCM, Al-Abdul Jabbar F. Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1 α and immunosuppressive factors in preimplantation embryo culture fluid. *Fertil Steril* 1991; 55: 952-7.
 19. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Doetschman T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-9.
 20. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359: 76-9.
 21. Stewart CL. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of preimplantation development of the mammalian embryo. *Mole Reprod and Develop* 1994; 39: 233-8.
 22. Zolti M, Ben-Rafael Z, Meirum R, Shemesh M, Bider D, Mashiach S, Apte R. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertil Steril* 1991; 56: 265-72.
-