: 31 3 2004
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 31, No. 3, 2004, 9

생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 Melatonin의 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

안 희 진 · 배 인 하

Effects of Melatonin on the Meiotic Maturation of Mouse Oocytes *in vitro*

Hee-Jin Ahn, In-Ha Bae

Department of Biology, Graduated School, Sungshin Women's University

Objective: Melatonin, which is secreted by pineal gland play an important role in the regulation of ovarian function via seasonal rhythm and sleep in most mammals. It also has a role in the protection of cells by removing toxic oxygen free radicals brought about by metabolism. In the present study, effects of melatonin on the mouse oocyte maturation were examined using two different culture conditions provided with 5% or 21% oxygen concentration.

Material and Method: Immature mouse oocytes were obtained from the ovarian follicles of 3~4 weeks old ICR strain mice intraperitoneally injected with 5 I.U. PMSG 44 hour before. Under stereomicroscope, morphologically healthy oocytes with distinct germinal vesicle (GV) were liberated from the graafian follicles and collected using mouth-controlled micropipette. They were then cultured for 17 hour at 37℃, 5% CO_2 and 21% O_2 (95% air) or 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2. New modified Hank's balanced salt solution (New MHBS) was used as a culture medium throughout the experiments. Effects of melatonin were examined at a concentration of 0.0001 μM, 0.01 μM or 1.0 μM. For the prevention of spontaneous maturation of immature oocytes during culture, dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) and/or hypoxanthine were included in the medium.

Results: Under 21% oxygen condition, oocytes cultured in the presence of 0.01 μM melatonin showed a significantly higher maturation rates, in terms of germinal vesicle breakdown (95.0% vs 89.0%) and polar body formation (88.1% vs 75.4%), compared to those cultured with 0.0001 μM or 1.0 μM melatonin. However, no difference was observed in oocytes cultured under 5% oxygen whether they were treated with melatonin or not. In the presence of 0.01 μM melatonin, oocytes either cultured under 21% or 5% oxygen exhibited no difference in the polar body formation (85.6% vs 86.7%). However, in the absence of melatonin, oocytes cultured under 21% oxygen exhibited lower polar body formation (74.7%). When oocytes were cultured in the presence of dbcAMP alone or with varying concentrations of melatonin, those treated with both compounds always showed better maturation, i.e., germinal vesicle breakdown and polar body formation, compared to those cultured with dbcAMP alone. At the same concentration of melatonin, however, oocytes exposed to 21% oxygen showed poor maturation than those to 5% oxygen. Similar results were obtained from the experiments using hypoxanthine instead of dbcAMP.

주관책임자: 배인하, 우) 136-742 서울특별시 성북구 동선동 3가 249-1, 성신여자대학교 자연과학대학 생물학과
Tel: (02) 920-7171, Fax: (02) 927-5565, e-mail: ihbae@sungshin.ac.kr
*본 연구는 2001년도 성신여자대학교 기초과학연구소 특별과제 연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

Conclusion: Based upon these results, it is suggested that melatonin could enhance the meiotic maturation of mouse oocytes under 21% oxygen concentration, and release oocytes from the meiotic arrest by dbcAMP or hypoxanthine regardless of the concentration of oxygen, probably via the removal of oxygen free radicals.

Key Words: Mouse oocyte, Melatonin, dbcAMP, Hypoxanthine, Oxygen

포유류의 뇌의 송과선 (pineal gland)에서 분비되는 호르몬인 melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine)은 낮/밤 시간 주기에 의한 seasonal rhythm을 조절하여 많은 종류의 포유류의 난소 기능 (ovarian function)과 생식 (reproduction)을 조절하고 있다.

암컷 쥐에 melatonin을 투여하면 질구 (vaginal)가 팽창되고, 배란이 저해되어 결국 발정 주기 (estrus cycle)의 교란 현상이 나타난다.[1] 또한 melatonin을 처리한 흰쥐 암컷으로부터 태어난 자손 (offspring)의 난소내 난자의 핵, 인 그리고 세포질의 부피는 대조군에 비해 작은 것으로 나타났으며, 자손의 나이 (age)가 많을수록 대조군과 현저한 차이를 보였다.[2] Melatonin을 햄스터에 처리하면 난자의 괴사 (atresia)를 증가시키며 antral follicle의 수와 크기를 감소시켜 난소의 기능을 저해한다.[3] 체외에서 주사로 melatonon을 주입한 쥐의 실험에서 배란이 억제되며, 이 경우에 luteinizing hormone (LH)을 체외에서 투여하면 배란이 일어남을 확인하였다. 이는 melatonin이 난소 수준에서 작용하는 것이 아니라 LH의 분비를 저해함으로써 배란 과정을 저해한다고 볼 수 있다.[4] Brzezinski 등[5]은 melatonin이 사람의 난소에서 progesterone의 합성과 분비를 조절한다고 밝혔다. 또한 melatonin은 antigonadotropin으로써 gonadotropin-releasing hormone (GnRH)의 합성과 분비를 조절한다.[6]

한편, Romero 등[7]은 개구리 난자의 세포막에는 membrane-bound calmodulin이 존재하는데 이는 melatonin의 binding site로써 작용하여 결과적으로 melatonin이 calmodulin의 antagonist로써 작용한다고 제안한 바 있다.

Melatonin은 흑색소세포 (melanophores)의 세포질내 색소 이동을 조절하는 호르몬으로써 세포막에 있는 melatonin 수용체의 활성화는 세포내 cyclic AMP (cAMP)의 농도를 감소시키는 반면 세포내 Ca^{2+}의 증가를 유도한다.[8]

한편 몇몇 포유류의 수정란을 체외에서 배양할 경우 착상이 일어나기 직전인 포배기로 발달하지 못하고 발생이 정지되거나 퇴화되는 현상이 일어난다. 이에 대한 원인은 아직 명확하게 밝혀진 바가 없지만, 체외 배양 시 배양 조건을 5% 산소로 조절하면 21%의 산소가 공급되는 배양 조건보다 생쥐 2-세포기 배아의 포배로의 발생율이 높아진다.[9] 이는 체외 배양 조건 시 산소의 농도가 영향을 미친다는 사실을 의미하는데,[10] 사람,[11,12] 양 (sheep)[13]과 소 (cattle),[14] 소 (bovine),[15] 토끼,[16] 고양이[17] 그리고 생쥐[18,19] 등의 여러 동물들에서도 확인되었다. 실제로 발생이 정지된 배에서는 H_2O_2의 양이 정지되지 않은 배에서보다 높게 나타났다.[20] 또한 난관액 내에는 super oxide dismutase (SOD) 활성이 있어, 결국 체외 배양 시 나타나는 발생 정지 현상은 활성산소, 혹은 hydroxyl radical, H_2O_2 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 추측된다.[10]

배란 직전 사람의 난포액 (follicular fluid) 내에는 혈액 (serum)보다 3배 높은 농도의 melatonin이 있으며,[21] 이는 melatonin이 난자의 성숙과 배의 초기배 발생에 관여할 가능성을 시사한다. 생쥐 난자의 체외 수정 및 초기 배 발생 시에 melatonin을 처리하면 체외 수정율이 대조군에 비해 높아지고, 초기 발생도 촉진된다.[22] 이는 melatonin이 활성 산소의 제거제로써 glutathione이나 mannitol과 같이 *in vivo* system에서 H_2O_2의 가수 분해로 형성된 ·OH기를 제거하여 수정 및 배 발생을 향상시킨 것으로 추측된다.[25]

위의 여러 가지 보고들을 종합해 볼 때 포유동물에서는 송과선에서 분비되어 circadian rhythm을 가지고 seasonal breeding을 조절하는 호르몬인 melatonin은 세포에서는 강력한 활성 산소 제거제로 작용하는 것으로 추측된다. 따라서 본 연구는 5% 및 21% 농도의 산소가 각각 공급되는 배양 환경에서 melatonin이 생쥐 미성숙 난자의 체외 성숙에 미치

는 영향을 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 실험에 사용한 실험 동물은 광주기를 14시간, 암주기를 10시간으로 조절하고, 물과 먹이가 충분하게 공급된 상태에서 사육된 건강한 생쥐 (ICR strain)로 생후 3~4주된 암컷을 사용하였다.

2. 난자의 수집

체내에서 난자의 성숙 정도를 동일하게 하기 위하여 복강에 5 I.U. (international unit)의 pregnant mare's serum gonadotropin (Sigma)을 주사 후, 44시간 후에 경추골 파열로 도살하여 복강을 열고 양쪽 난소를 적출하였다. 적출한 난소는 난자가 난포로부터 분리될 때 유발되는 자발적 성숙을 막기 위해 0.2 mM의 dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP)가 들어있는 M2 배양액에 넣어 난소의 성숙 난포를 해부현미경 (M5A Wild, Swiss)하에서 26G 바늘로 터뜨려 난포로부터 난자를 분리해 냈다. 분리된 난자를 둘러싸고 있는 난구세포는 mouth-controlled micro-pipette을 이용하여 제거하고 핵막 (germinal vesicle; GV)이 확인된 건강한 미성숙 난자만을 선별하여 실험에 사용하였다.

3. 난자의 배양

수집된 난자는 microdroplet 방법으로 배양하였다. 즉, 배양접시 (60 × 15 mm, Falcon) 위에 melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine)을 농도별로 함유한 40 μl의 New modified hank's balanced salt Solution (New MHBS) 배양액 방울을 만들어 그 위에 고압멸균된 equilibrated mineral oil (light oil)을 덮어 37°C, 5% CO_2와 95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기, 혹은 37°C, 5% CO_2, 5% O_2와 90% N_2가 공급되며 100% 습도가 유지되는 배양기 (Forma Scientific, Model 3130)에서 2시간 이상 평형시킨 후, 그 속에 20~25개의 난자를 넣어 배양하였다.

실험에 사용된 모든 유리 초자 기구는 160°C에서 90분 동안 건열 멸균하였으며 그 외의 다른 기구는 121°C, 15 Lb/inch^{2}으로 15분간 고압 멸균하여 사용하였다.

4. 배양액과 처리물질

실험에 사용한 모든 시약은 특별한 언급이 없는 한 Sigma (St Louis, MO)제품을 사용하였다. 배양액은 MHBS 배양액에서 인산 성분을 줄이고 완충작용을 강화하여 삼투압을 280 mOsm로 조정한 New MHBS 배양액을 사용하였으며 그 조성은 다음과 같다. 98.70 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 0.81 mM $MgSO_4$, 0.34 mM Na_2HPO_4, 0.15 mM KH_2PO_4, 1.71 mM $CaCl_2$, 5.56 mM glucose, 2.50 mM Na-Lactate, 0.30 mM Na-pyruvate, 10 mg/l phenol red, 100 units/ml penicillin-G, 52 mg/l streptomycin, 25.0 mM $NaHCO_3$, 0.4% bovine serum albumin (BSA) 등을 3차 증류수에 녹였으며 배양액의 활성감소를 방지하기 위해 1주일마다 새로 만들어 사용하였다.[23]

난자의 수집 시 사용된 M2 배양액의 조성은 다음과 같다. 20.85 mM N-2-(hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)로 배양액의 pH를 보정하고, 94.66 mM NaCl, 4.78 mM KCl, 1.19 mM $MgSO_4$, 1.19 mM KH_2PO_4, 5.56 mM glucose, 100 units/ml penicillin-G, 52 mg/l streptomycin 등을 3차 증류수에 녹여 10배로 농축된 stock solution을 만들었고, 1.711 mM $CaCl_2$, 23.28 mM Na-Lactate, 0.33 mM Na-pyruvate는 100배로 농축된 stock solution을 만들어 냉장 보관하여 매 실험마다 필요량을 희석하여 사용하였다. 4.15 mM $NaHCO_3$, BSA (0.4%)는 사용 직전에 녹여서 사용하였고 모든 stock solution은 활성감소를 방지하기 위해 1주일마다 새로 만들어 사용하였다.

배양액의 최종 pH는 7.3~7.4로 하고 삼투압은 280~290 mOsm이 되도록 하여 사용하였다.[24] 난자의 자발적 성숙을 억제하는 dbcAMP는 dulbecco's phosphate-buffered salined (PBS)에 녹여 20배 stock solution을 만들어 냉동 (-20°C) 보관 후, 실험 직전에 농도별로 희석하여 사용하였다.

Melatonin은 실험 때마다 기본 배양액에 직접 녹여 농도별 (0.0001 μM, 0.01 μM 그리고 1 μM)로 희석하여 사용하였다. 난자 성숙 억제물질인 hypoxanthine은 10배로 농축된 stock solution을 만든 후 냉

장 보관하여 실험 직전에 기본 배양액에 희석하여 최종 농도가 1 mM이 되도록 사용하였다.

5. 관 찰

미성숙 난자의 배양 4시간 후에 일어나는 핵막붕괴 (germinal vesicle breakdown; GVBD)와 배양 17시간 후에 일어나는 제 1극체 (first polar body; PB) 형성을 위상차 도립 현미경 (inverted phase contrast microscope, Labovert, Leitz, Germany)으로 조사하였다.

미성숙 난자는 명확한 핵막 (germinal vesicle; GV)이 존재하는 난자로 하고, 핵막붕괴 (GVBD)가 일

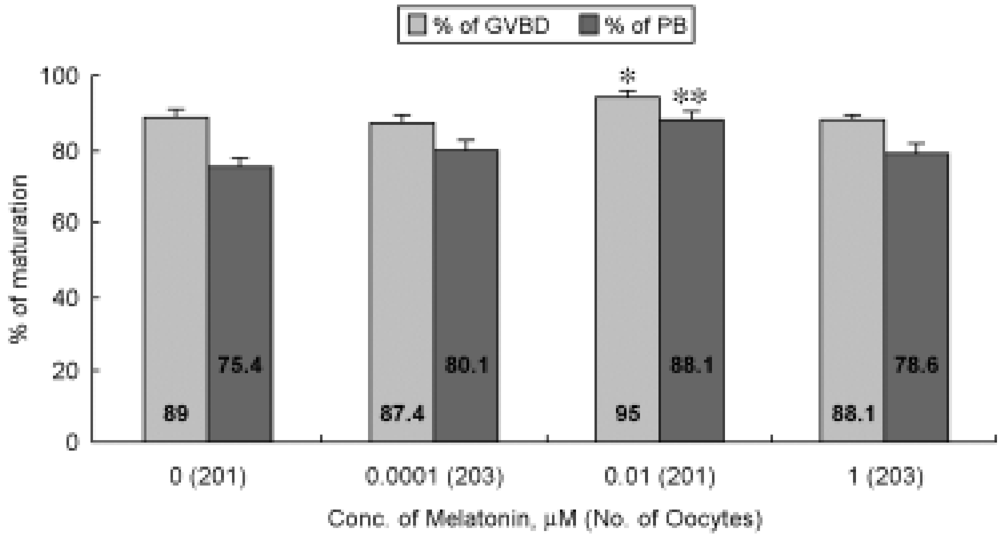

Figure 1. Effects of melatonin on the meiotic maturation of mouse oocytes under 21% O_2 *in vitro*. The above results were obtained by pooling of ten replicates. *p<0.05, **p<0.005

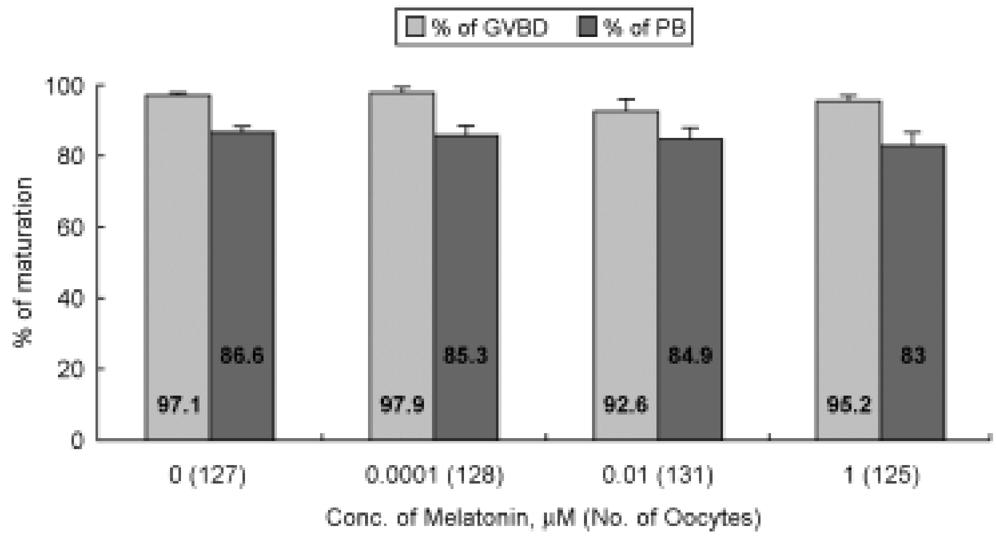

Figure 2. Effects of melatonin on the meiotic maturation of mouse oocytes under 5% O_2 *in vitro*. The above results were obtained by pooling of seven replicates.

어난 난자는 핵막이 소실되고 세포질이 균일한 난자로 하였으며, 성숙 난자는 제 1극체 (PB)를 방출하고 위난강 (perivitelline space)이 형성된 난자로 하였다.

6. 통계처리

대조군과 실험군의 통계적 유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

결　과

1. 생쥐 미성숙 난자의 체외 성숙에 미치는 melatonin의 영향

각각 21%와 5%의 산소가 공급되는 배양 조건에

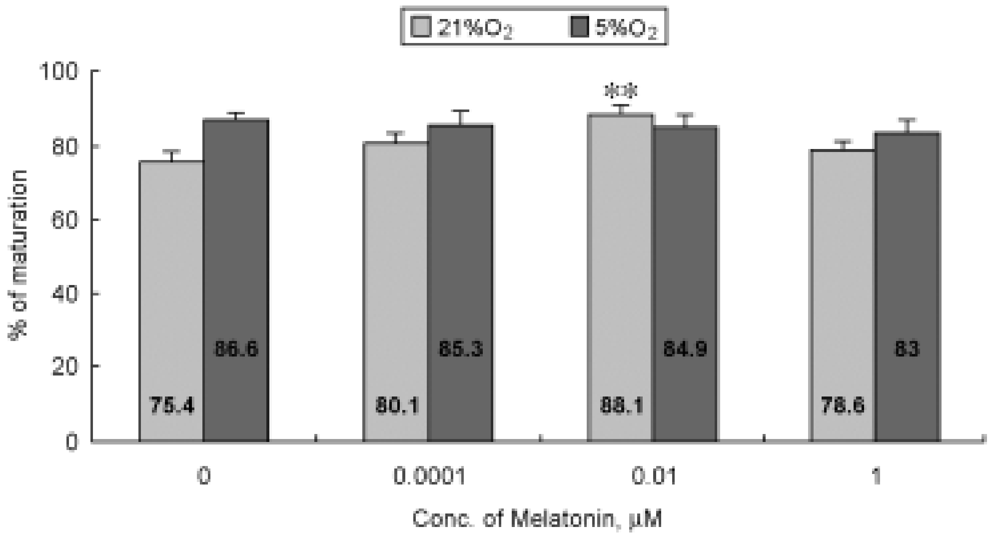

Figure 3. Effects of melatonin on the polar body formation of mouse oocytes cultured for 17 hours under 21% O_2 or 5% O_2 *in vitro*. **p<0.005

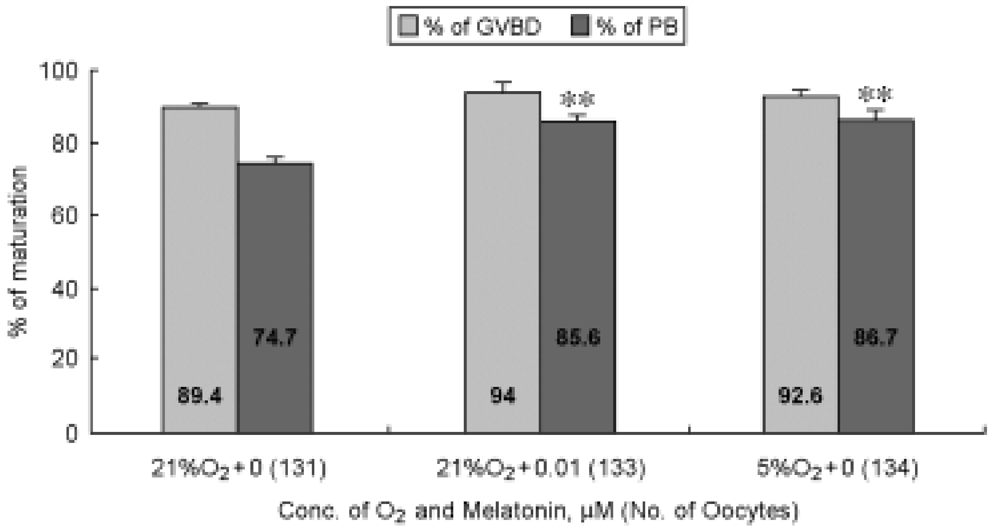

Figure 4. Effects of melatonin on the meiotic maturation of mouse oocytes under 21% O_2 or 5% O_2 *in vitro*. **p<0.005

서 배양액에 다양한 농도 (0.0001 μM, 0.01 μM 그리고 1 μM)의 melatonin을 처리하여 4시간 후 핵막붕괴 (germinal vesicle breakdown; GVBD) 여부와 17시간 후 제 1 극체 (first polar body; PB)의 형성 여부를 관찰하였다. 그 결과 21% 산소를 함유한 배양조건에서는 melatonin을 처리한 모든 실험군이 대조군에 비해 유의하게 높은 난자 성숙율을 보였으며 특히, 0.01 μM의 농도를 처리한 실험군의 핵막붕괴율과 제 1 극체 형성율이 대조군에 비해 유의하게 높게 나타났다 (Figure 1). 그러나 5%의 산소를 공급한 배양 조건에서는 실험군과 대조군 사이에 별다른 차이가 나타나지 않았다 (Figure 2, 3).

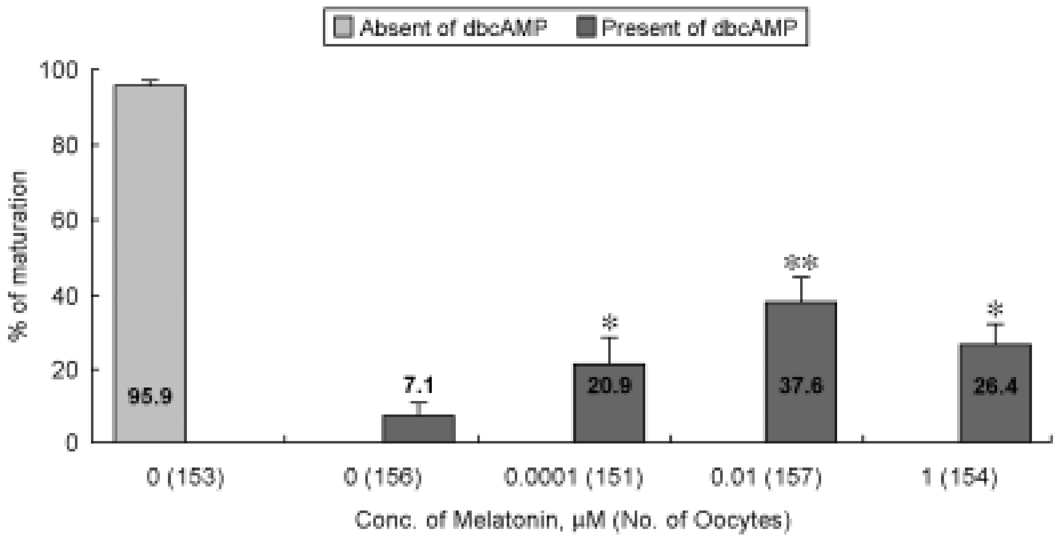

Figure 5. Effects of melatonin on the germinal vesicle breakdown of mouse oocytes in the presence of dbcAMP cultured for 4 hours under 21% O_2. The above results were obtained by pooling of nine replicates. *p<0.05, **p<0.005

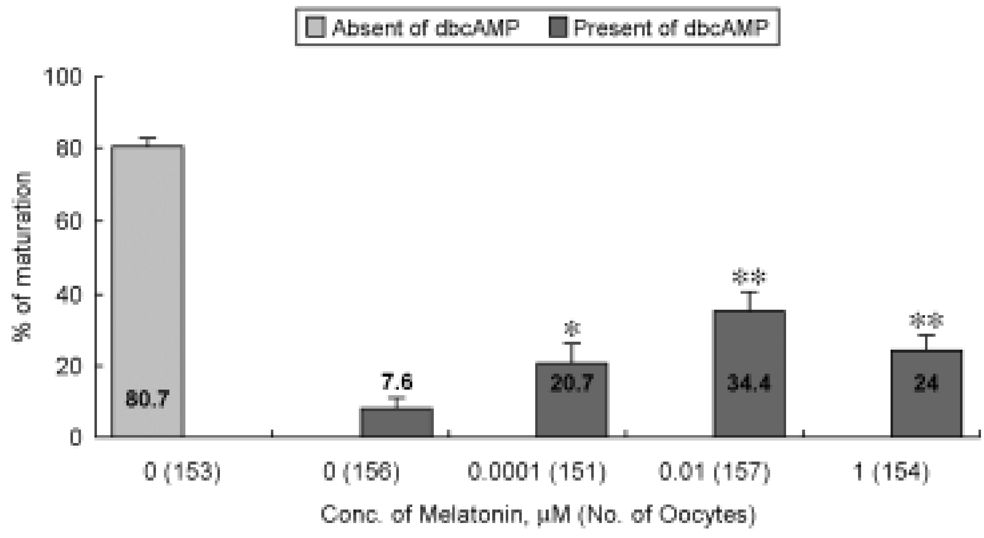

Figure 6. Effects of melatonin on the polar body formation of mouse oocytes in the presence of dbcAMP cultured for 17 hours under 21% O_2 *in vitro*. The above results were obtained by pooling of nine replicates. *p<0.05, **p<0.005

2. 공기 중 산소 농도에 따른 생쥐 미성숙 난자의 체외 성숙에 미치는 melatonin의 영향

21% 산소가 공급되는 배양 조건에서 대조군과 Figure 1에서 가장 유의한 성숙율을 보인 0.01 μM의 melatonin을 처리한 실험군, 그리고 5% 산소가 공급되는 배양 조건에서 melatonin을 처리하지 않은 실험군으로 나누어 생쥐 난자의 성숙율을 비교하였다.

그 결과, 21% 산소와 melatonin 0.01 μM이 처리된 실험군의 생쥐 난자의 제 1극체 형성율과 5% 산소가 공급되는 배양 조건에서 melatonin을 처리하지

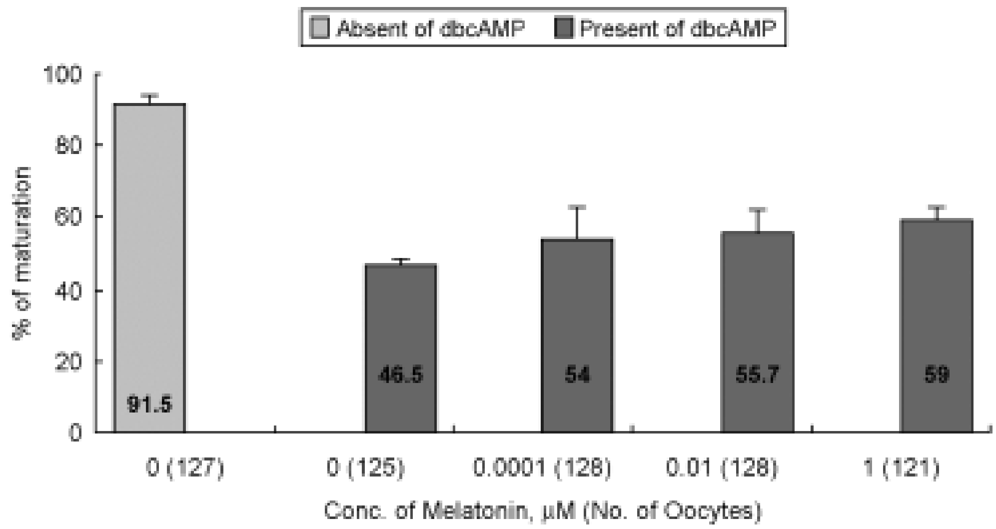

Figure 7. Effects of melatonin on the germinal vesicle breakdown of mouse oocytes in the presence of dbcAMP cultured for 4 hours under 5% O_2 *in vitro*. The above results were obtained by pooling of seven replicates.

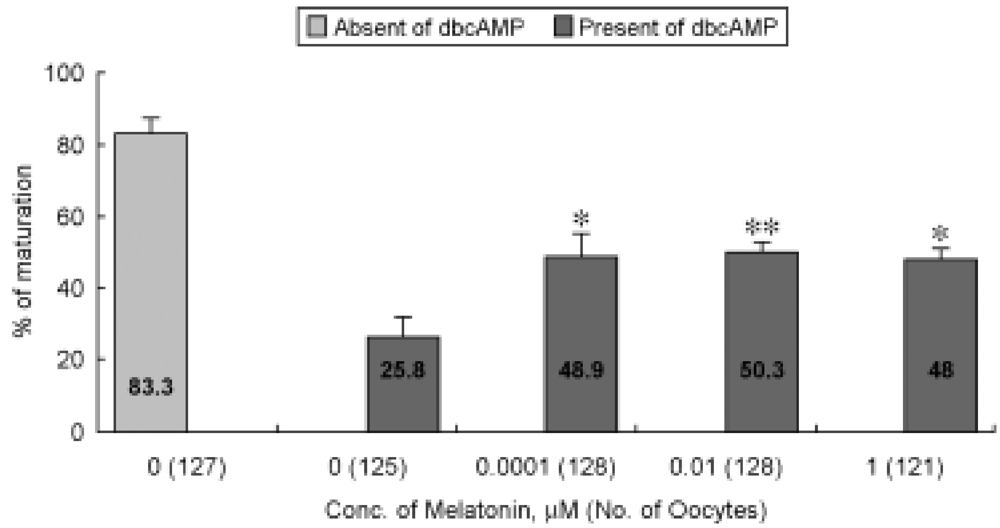

Figure 8. Effects of melatonin on the polar body formation of mouse oocytes in the presence of dbcAMP cultured for 17 hours under 5% O_2 *in vitro*. The above results were obtained by pooling of seven replicates. *$p<0.05$, **$p<0.005$

않은 실험군의 제 1극체 형성율은 대조군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났으며 ($p<0.005$), 두 실험군 사이에는 별다른 차이가 없었다 (Figure 4).

3. dbcAMP를 함유한 배양액에서의 생쥐 미성숙 난자의 체외 성숙에 미치는 melatonin의 영향

미성숙 난자의 체외 배양 시 나타나는 자발적인 성숙을 억제하는 물질인 dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP)를 처리하여 난자의 핵막붕괴를 저해시킨 상태에서 melatonin이 미성숙 난자의 성숙 과정에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보고자 하였다.

21% 산소를 함유한 배양 조건에서 0.1 mM의 dbcAMP를 함유한 배양액에서 배양한 생쥐 난자의 경우 대조군에 비해 농도별 melatonin을 처리한 실

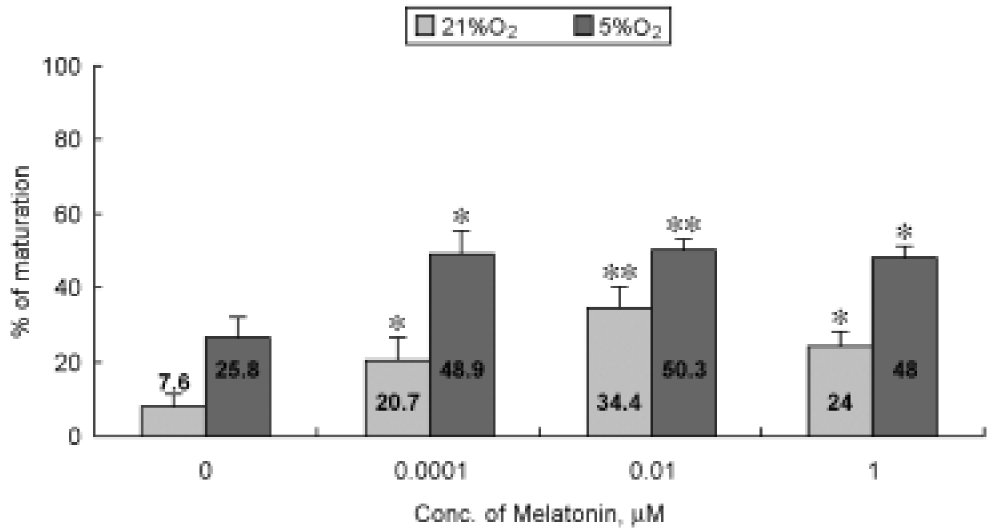

Figure 9. Effects of melatonin on the polar body formation of mouse oocytes in the presence of dbcAMP cultured for 17 hours under 21% O_2 or 5% *in vitro*. *$p<0.05$, **$p<0.005$

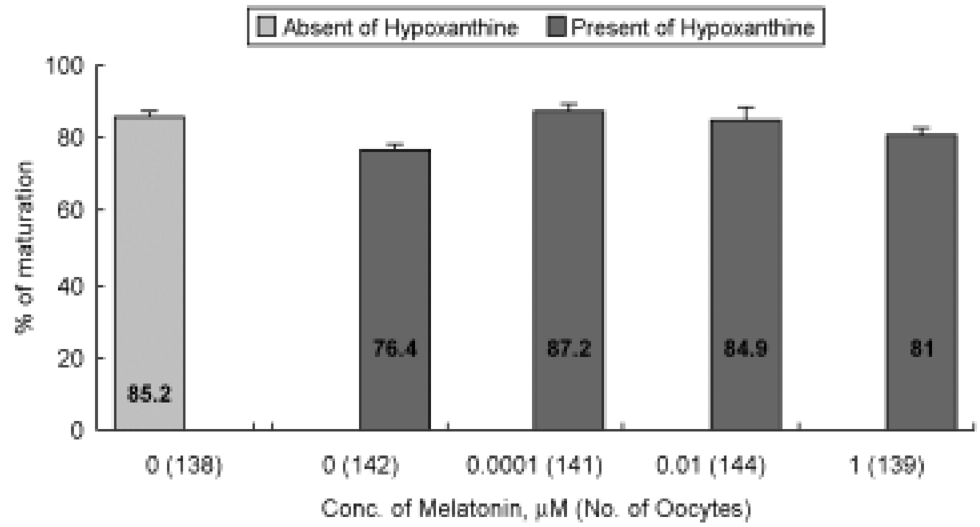

Figure 10. Effects of melatonin on the germinal vesicle breakdown of mouse oocytes in the presence of hypoxanthine cultured for 4 hours under 21% O_2 *in vitro*. The above results were obtained by pooling of eight replicates.

험군에서 유의하게 높은 성숙율을 보여 melatonin이 dbcAMP에 의한 핵막붕괴 현상을 극복하는 것으로 나타났다 (Figure 5, 6).

또한, 5% 산소를 공급한 배양 조건에서는 21%의 산소를 공급한 배양 조건에서 보다 더욱 유의하게 높은 성숙율을 보였다 (Figure 7, 8, 9).

4. Hypoxanthine을 함유한 기본 배양액에서의 생쥐 미성숙 난자의 체외 성숙에 미치는 melatonin의 영향

미성숙 난자의 체외 배양 시 난자의 성숙을 억제하는 물질로 알려진 hypoxanthine을 함유한 상태에

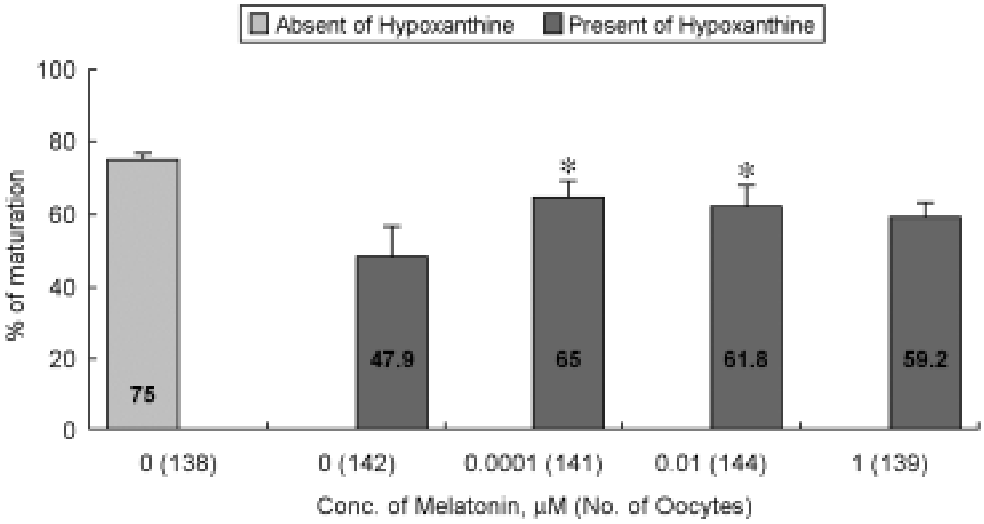

Figure 11. Effects of melatonin on the polar body formation of mouse oocytes in the presence of hypoxanthine cultured for 17 hours under 21% O_2 *in vitro*. The above results were obtained by pooling of eight replicates. *$p<0.05$

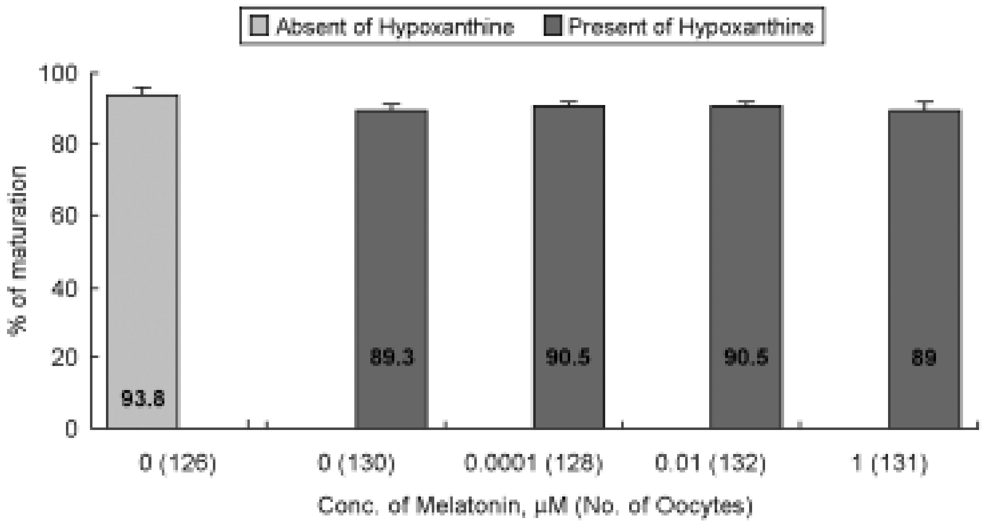

Figure 12. Effects of melatonin on the germinal vesicle breakdown of mouse oocytes in the presence of hypoxanthine cultured for 4 hours under 5% O_2 *in vitro*. The above results were obtained by pooling of seven replicates.

서 melatonin을 처리하여 미성숙 난자의 체외 성숙 과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

21% 산소를 함유한 배양 조건에선 생쥐 난자의 핵막붕괴율에서는 실험군과 대조군 사이에 별다른 차이점이 없었지만, 제 1극체 형성에 있어서 0.0001 μM과 0.01 μM의 melatonin을 함유한 실험군이 대조군에 비해 유의하게 높이 나타남에 따라 melatonin이 hypoxanthine에 의한 미성숙 난자의 GV arrest 현상을 극복하는 것으로 나타났다 (Figure 10, 11).

그러나 hypoxanthine이 GYBD 현상을 억제하는 효과는 5% O_2가 공급되는 환경에서는 나타나지 않았다 (Figure 12).

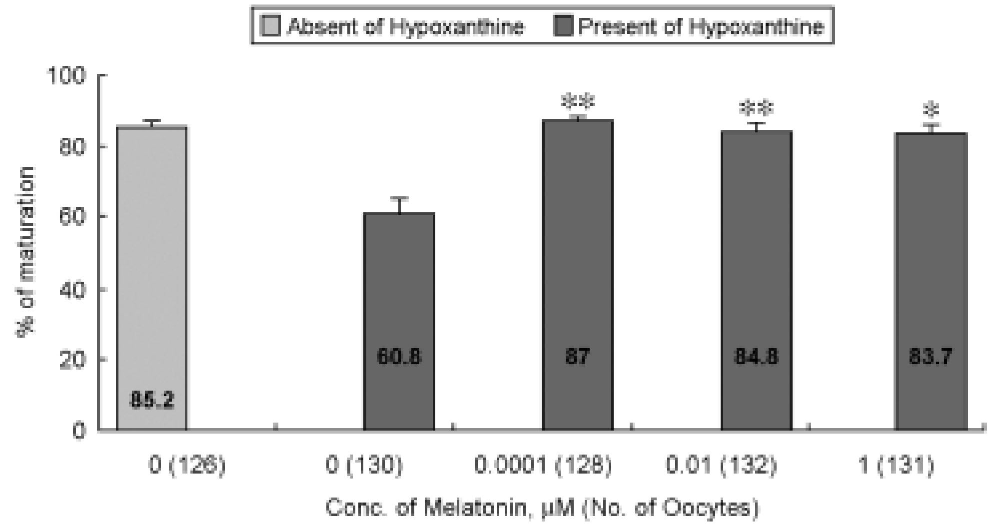

Figure 13. Effects of melatonin on the polar body formation of mouse oocytes in the presence of hypoxanthine cultured for 17 hours under 5% O_2 *in vitro*. The above results were obtained by pooling of seven replicates. *$p<0.05$, **$p<0.005$

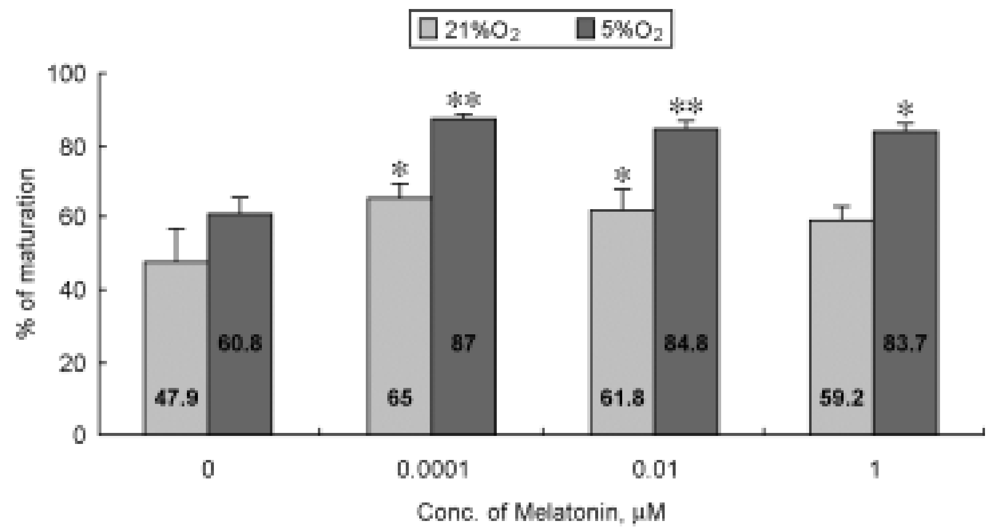

Figure 14. Effects of melatonin on the polar body formation of mouse oocytes in the presence of hypoxanthine cultured for 17 hours under 21% O_2 or 5% O_2 *in vitro*. *$p<0.05$, **$p<0.005$

Hypoxanthine의 난자성숙을 억제하는 현상은 4시간 이상의 장시간 (17시간) 배양의 경우에만 나타났으며 (Figure 13) 이는 21% 산소가 공급되는 배양 조건과 비교해 보았을 때 현저하게 높은 성숙율을 보여주고 있다 (Figure 14).

고 찰

세포내 미토콘드리아의 물질 대사 과정에서 생성되는 활성 산소 (free radical oxygen, ·OH)의 독성 (toxity)으로 DNA가 손상됨으로써 결국엔 사멸 (death)되는 과정은 세포가 사멸되는 주된 원인 중의 하나이다. 세포내 활성 산소를 제거하는 물질로 mannitol, glutathione과 함께 melatonin을 들 수 있다.[6] 이러한 melatonin은 미토콘드리아의 대사 과정 중 발생한 활성 산소에 의해 미토콘드리아가 손상되면서 제 기능을 하지 못해 에너지 생산을 못함으로써 세포가 사멸되는 것을 방지하고,[26] 흰쥐 암컷의 체내에 melatonin을 처리하면 임신된 태아의 미토콘드리아가 활성 산소로부터 보호된다는 실험 결과로 확인된 바 있다.[27]

본 실험에서는 생쥐 미성숙 난자의 성숙 과정에서 melatonin이 활성 산소 제거제로써 작용하는지 알아보았다.

그 결과, 21% 산소가 공급되는 배양 조건에서 배양된 생쥐 미성숙 난자들은 0.01 μM의 melatonin을 처리한 실험군이 대조군에 비해 유의하게 높은 핵막붕괴율 (GVBD)과 제 1극체 (PB) 형성율을 나타내었다 (Figure 1). 체내 산소 농도와 유사한 5% 산소가 공급되는 배양 조건에서는 melatonin이 생쥐 난자 성숙에 별다른 영향을 미치지 않았다. 그러나 핵막붕괴율과 제 1극체 형성율이 21% 산소가 공급되는 배양 조건에서의 대조군과 비교했을 때 높았으며 0.01 μM의 melatonin을 처리했을 때의 성숙율과 비슷하게 관찰되었다 (Figure 2, 3).

위의 실험 결과에 비추어, melatonin이 21%의 산소가 공급되는 배양 조건하에서 과연 활성 산소 제거제로써 작용하여 난자의 성숙율을 높여, 상대적으로 oxygen의 stress를 덜 받는 5% 산소가 공급되는 배양 조건에서 배양한 난자의 성숙율과 비슷한지 여부를 확인하기 위해 21% 산소가 공급되는 배양 조건에서 melatonin을 처리하지 않은 대조군과 0.01 μM의 melatonin을 처리한 실험군, 그리고 5% 산소를 공급하는 배양 조건에서 melatonin을 처리하지 않은 실험군으로 나누어 같은 난소에서 수집한 난자를 이용하여 실험하였다.

그 결과 21% 산소 공급 배양 조건에 0.01 μM의 melatonin을 처리한 실험군과 5% 산소 공급 배양 조건에서 melatonin을 처리하지 않은 실험군이 대조군에 비해 유의하게 높은 제 1극체 형성율을 보였다 (Figure 4).

따라서 melatonin이 oxygen의 stress를 덜 받는 5% 산소가 공급되는 배양 조건에서는 활성 산소 제거제로써 작용하지 않아 난자 성숙에 별다른 영향을 미치지 않았으며 체내에서보다 월등히 높은 21%의 산소가 공급되는 배양 조건에서는 0.01 μM의 melatonin이 세포 속에 녹아든 산소의 제거제로써 작용하여 세포내 oxygen에 의한 stress를 줄여 난자 성숙을 도와주는 것으로 여겨진다.

공기 중의 산소 농도 (21%)보다 월등히 낮은 산소 농도에서의 세포 발달율의 향상은 여러 논문을 통해서 증명되었다. Dumoulin 등[12]은 배양 조건을 21% 산소에서 5% 산소로 낮춰주었을 때 체외에서 사람의 난자의 수정율과 배 발달율이 현저하게 높아지는 것을 관찰한 바 있고 많은 동물의 경우에도 유사한 효과가 나타나는 것으로 알려져 있다.

세포내 활성 산소를 제거시키는 기능을 가진 melatonin은 다른 활성 산소 제거제보다 높은 소수성과 확산도를 가지고 있어 생체 내에서 세포로의 유입이 용이한 이점을 가지고 있으며 당뇨병을 가지고 있는 rat에서 lipid peroxiation을 억제하고 anti-oxidant status를 자극하고,[28] 이자의 β-cells의 파괴에 의해 생성된 ·OH기인 alloxan을 제거하기도 한다.[29,30] 그 밖에 ·OH기의 제거를 통해 위 손상에 의한 stress를 줄여주기도 한다.[31]

또한 melatonin은 생쥐 뇌를 이용한 실험에서 노화에 의한 oxidative DNA damage를 방지하며,[32] 쥐에서는 brain cortex로부터 antioxidant enzyme을 분비하는 mRNA의 발현 정도를 높여 활성 산소로부터 DNA를 보호하는 것으로 밝혀졌다.[33,34] 특히, 생쥐의 체외 수정 (*in vitro* fertilization)시 melatonin을 처리하면 수정율이 높아지고 '2-cell block' 현상을

극복하여 포배기 (blastocyst)로의 발달율이 높아진다.[22]

본 연구에서 난자 성숙을 억제하는 물질로 알려진 dbcAMP를 함유한 배양액에 농도별로 melatonin을 처리하여 난자 성숙에 미치는 영향을 알아본 결과, melatonin은 dbcAMP에 의한 난자의 GV arrest를 극복하는 것이 관찰되었는데 (Figure 5, 6) 이러한 효과는 특히 21% 산소가 공급되는 배양 조건보다 5% 산소가 공급되는 배양 조선에서 현저하게 나타났다 (Figure 7, 8, 9).

dbcAMP에 의한 포유류 미성숙 난자의 성숙 억제 기작은 아직도 밝혀지지 않고 있으나 세포내 cAMP를 생성하는 adenylate cyclase의 활성을 증가시키는 물질을 처리하면 난자의 성숙이 억제되는 점으로 미루어 결국 dbcAMP에 의한 성숙 억제 기작은 dbcAMP가 세포질 내에서 cAMP를 mimic하여 결국 높아진 cAMP 농도로 인해 성숙이 억제되는 것으로 여겨지고 있다. 이와는 달리 melatonin은 흑색소세포 (melanophores) 등에서 세포질내 cAMP의 농도를 감소시키는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.[8] 따라서 비록 dbcAMP가 난자의 세포질내로 들어오더라도 melatonin은 이들의 양을 감소시켜 결국 난자의 성숙을 재개시킬 수 있도록 하는 것으로 추측된다.

위의 결과를 종합하여 볼 때 melatonin은 dbcAMP에 의해 높아진 cAMP의 농도를 감소시켜 생쥐 난자의 성숙을 촉진하였으며 5% 산소가 공급되는 배양 조건에서 oxygen stress가 줄어듦으로써 melatonin과 낮은 산소 농도간의 상승 효과 (synergic effect)가 작용하여 더 높은 난자 성숙율을 보인 것으로 사료된다.

난자 성숙 억제제로 알려진 hypoxanthine을 이용한 실험에서도 dbcAMP를 처리했을 때와 비슷한 양상의 결과를 보였다. 1 mM의 hypoxnathine을 함유한 기본 배양액에 melatonin을 농도별로 처리했을 때 0.0001 μM과 0.01 μM의 melatonin을 처리한 실험군에서 대조군보다 유의하게 높은 제 1극체 형성율이 관찰되었다 (Figure 10, 11, $p<0.05$).

공급되는 산소 농도를 달리하여 수행한 실험에서도 낮은 산소 농도 (5%)가 공급되는 배양 조건에서 배양된 난자가 높은 산소 (21%)의 배양 조건 보다 월등히 높은 난자 성숙율을 보였으며 hypoxanthine을 처리하지 않은 대조군과 비슷한 성숙율을 보여 낮은 산소 농도와 melatonin간의 상승 효과 (synergic effect)를 보였다 (Figure 12, 13, 14).

Hypoxanthine은 물질 대사 과정에서 xanthine oxidase에 의해 uric acid로 분해되고, 이렇게 생성된 uric acid는 할구 (blastomere)에 유해하게 작용하여 난할 과정을 억제시키기도 한다.[35] Hypoxanthine을 생쥐 초기배에 처리하면 세포내 H_2O_2의 양이 증가되고,[36] 난자내 dbcAMP phosphodiesterase의 activity를 저해함으로써 cAMP의 감소를 억제하여 난자 성숙을 방해한다.[37~40] 따라서 본 연구의 결과로 미루어 melatonin은 hypoxanthine에 의해 높아진 난자 내 cAMP와 고농도의 산소에 의해 난자내에서 발생한 H_2O_2의 농도를 낮춰줌으로써 난자 성숙을 가능하게 하는 것으로 여겨진다.

본 실험의 모든 결과를 종합해 볼 때, melatonin은 oxygen에 의한 stress를 줄여 난자의 성숙을 가능하게 하며 나아가서 난자 성숙을 억제하는 dbcAMP와 hypoxanthine의 영향을 극복함을 알 수 있었다. Melatonin의 이 같은 효과에 대한 구체적인 기작은 앞으로 더욱 연구되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Villanua MA, Agrasal C, Esquifino AI. Meonatal melatonin administration advances rat vaginal opening and disrupts estrous cyclicity and estrogen-dependent regulatory mechanisms of luteinzing hormone and prolactin. J Pineal Res 1989; 7: 165-74.
2. Fernandez B, Diaz E, Colmenero MD, Diaz B. Maternal poneal gland participates in prepubertal rat's ovarian oocyte development. Anat Rec 1995; 243: 461-5.
3. Spanel-Borowski K, Richardson BA, King TS, Petterborg LJ, Reiter RJ. Follicular growth and intraovarian and extraovarian oocyte release after daily injections of melatonin and 6-chloro-melatonin in the Syrian hamster. Am J Anat 1983; 167: 371-80.
4. Ying SY, Greep RO. Inhibition of ovulation by me-

latonin in the cyclic rat. Endocrinology 1973; 92: 333-5.

5. Brzezinski A, Fibich T, Cohen M, Schenker JG, Laufer N. Effects of melatonin on progesterone production by human granulosa lutein cells in culture. Fertil Steril 1992; 58: 526-9.
6. Hadley M. Endocrinology (fourth edition). Department of anatomy, university of arizona. 1996; 458 -76.
7. Romero MP, Garcia-Perganeda A, Guerrero JM, Osuna C. Membrane-bound calmodulin in Xenopus laevis oocytes as a novel binding site for melatonin. FASEB J 1998; 12: 1401-8.
8. Martensson LG, Andersson RG. Is Ca^{2+} the second messenger in the response to melatonin in cuckoo wrasse melanophores? Life Sci 2000; 66: 1003-10.
9. Auerbach S, Brinster RL. Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos. Nature 1968; 3; 217: 465-6.
10. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. Mol Reprod Dev 1991; 28: 356-60.
11. Dumoulin JC, Vanvuchelen RC, Land JA, Pieters MH, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on *in vitro* fertilization and embryo culture in the human and the mouse. Fertil Steril 1995; 63: 115-9.
12. Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on human *in-vitro* fertilization and embryo culture. Hum Reprod. 1999; 14: 465-9.
13. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. J Reprod Fertil 1990; 89: 573-8.
14. Watson AJ, Watson PH, Warnes D, Walker SK, Armstrong DT, Seamark RF. Preimplantation development of *in vitro*-matured and *in vitro*-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. Biol Reprod 1994; 50: 715 -24.
15. Liu Z, Foote RH. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O_2. Biol Reprod 1995; 53: 786-90.
16. Li J, Foote RH. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. J Reprod Fertil 1993; 98: 163-7.
17. Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. Influence of temperature and gas atmosphere on *in-vitro* fertilization and embryo development in domestic cats. J Reprod Fertil 1991; 92: 377-82.
18. Pabon JE Jr, Findley WE, Gibbons WE. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertil Steril 1989; 51: 896-900.
19. Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Effects of superoxide dismutase on mouse *in vitro* fertilization and embryo culture system. J Assist Reprod Genet 1992; 9: 274-80.
20. Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or in vivo. Development 1990; 109: 501-7.
21. Yie SM, Brown GM, Liu GY, Collins JA, Daya S, Hughes EG, Foster WG, Younglai EV. Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production. Hum Reprod 1995; 10: 50-5.
22. Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, Amemiya A, Itoh MT. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. J Pineal Res 2000; 28: 48-51.
23. Bae IH, Channing CP. Effect of cakium in the maturation of cumulus enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized graafian follicles. Biol Reprod 1985; 33: 79-87.
24. Bae IH, Foote RH. Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. J Reprod Fert 1980; 59: 11-3.

25. Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. Ann N Y Acad Sci 1994; 719: 1-12. Review.
26. Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. J Pineal Res 2001; 30: 65-74. Review
27. Wakatsuki A, Okatani Y, Shinohara K, Ikenoue N, Kaneda C, Fukaya T. Melatonin protects fetal rat brain against oxidative mitochondrial damage. J Pineal Res 2001; 30: 22-8.
28. Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. J Pineal Res. 2001; 31: 193-8.
29. Bromme HJ, Morke W, Peschke D, Ebelt H, Peschke D. Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. J Pineal Res 2000; 29:201.
30. Ebelt H, Peschke D, Bromme HJ, Morke W, Blume R, Peschke E. Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells *in vitro*. J Pineal Res 2000; 28: 65-72-8.
31. Bandyopadhyay D, Biswas K, Bandyopadhyay U, Reiter RJ, Banerjee RK. Melatonin protects against stress-induced gastric lesions by scavenging the hydroxyl radical. J Pineal Res 2000; 29: 143-51.
32. Morioka N, Okatani Y, Wakatsuki A. Melatonin protects against age-related DNA damage in the brains of female senescence-accelerated mice. J Pineal Res 1999; 27: 202-9.
33. Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. J Pineal Res 1998; 24: 83-9.
34. Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Siu AW, Garcia JJ. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium (III) and H_2O_2: protection by melatonin and related molecules. J Pineal Res 2000; 29: 54-61.
35. Loutradis D, John D, Kiessling AA. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. Biol Reprod 1987; 37: 311-6.
36. Nasr-Esfahani MM, Johnson MH. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. Development 1991; 113: 551-60.
37. Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF, Eppig JJ. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82: 454-8.
38. Warikoo PK, Bavister BD. Hypoxanthine and cyclic adenosine 5'-monophosphate maintain meiotic arrest of rhesus monkey oocytes *in vitro*. Fertil Steril 1989; 51: 886-9.
39. Tornell J, Brannstrom M, Magnusson C, Billig H. Effects of follicle stimulating hormone and purines on rat oocyte maturation. Mol Reprod Dev 1990; 27: 254-60.
40. Downs SM. Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. Mol Reprod Dev 1993; 35: 82-94.