

멜라토닌이 생쥐 미성숙 난자의 체외성숙과 난구세포의 세포자연사에 미치는 영향

나경아^{1*} · 김은선^{2*} · 엄진희¹ · 김정호¹ · 윤성일³ · 이동률^{1,2,†}

¹포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소, ²포천중문의과대학교 생명과학전문대학원

³한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Effect of Melatonin on the Maturation of Mouse Germinal Vesicle(GV)-Stage Oocytes and Apoptosis of Cumulus Cells *In Vitro*

Kyoung-Ah Na^{1*}, Eun Sun Kim^{2*}, Jin Hee Eum¹, Jung Ho Kim¹
Seong-Il Yoon³ and Dong Ryul Lee^{1,2,†}

¹Fertility Center of CHA General Hospital, CHA Research Institute, Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea

²Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea

³Dept. of Life Science, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT : Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine), a major hormone of pineal gland in vertebrates, is known to be associated with regulation of the dynamic physiological functions in general and has some functions on reproduction in the ovarian follicles in particular. And its antioxidant properties as a scavenger are also reported. The aim of this study was to investigate the effect of melatonin on the *in vitro* maturation of mouse germinal vesicle (GV)-stage oocytes. Oocyte maturation, apoptosis, and mRNA expression of melatonin receptor were analyzed in the cumulus cell-enclosed oocytes (CEOs) cultured with melatonin for 18 h. The CEOs were obtained from 3 wk-old ICR female mice cultured in media with 0, 0.1 nM, 10 nM, or 1,000 nM melatonin for 18 h. And then the extrusion of the first polar body was assessed to evaluate the maturation rate. The apoptosis and mRNA expression of melatonin receptor (Mtnr1-a and Mtnr1-b) in cumulus cells of each group were measured by TUNEL assay, ELISA, and real time RT-PCR after *in vitro* maturation(IVM). The addition of melatonin in the IVM medium significantly improved nuclear maturation of the mouse GV oocytes and the highest maturation rate were obtained from the group treated with 1,000 nM melatonin. Apoptosis was not detected in IVM oocytes, but detected in cumulus cells. And cumulus cells treated with 1,000 nM melatonin exhibited significantly lower apoptosis. In the group treated with 1,000 nM melatonin, the expression of melatonin receptor mRNA was decreased in CEOs. In conclusion, melatonin has a potentially important role for regulating oocyte maturation and reduces the apoptosis of cumulus cells *in vitro*.

Key words : Melatonin, Oocytes, *In vitro* maturation, Apoptosis, Cumulus cells.

요 약 : 멜라토닌(*N*-acetyl-5-methoxytryptamine)은 포유동물의 뇌의 송과선에서 분비되는 호르몬으로 수면과 생체 리듬 등을 조절하고 산소 기능과 번식에도 영향을 미친다. 또한, 강력한 scavenger로서 항산화제의 역할을 한다. 이 연구의 목적은 멜라토닌이 생쥐 난구세포-핵낭(germinal vesicle, GV) 시기 난자 복합체의 체외성숙에 미치는 영향을 알아보는 것이다. 3주령의 ICR 암컷 생쥐의 난소에서 회수된 난자-난구세포 복합체를 0, 0.1 nM, 10 nM, 1,000 nM의 멜라토닌이 첨가된 배양액에서 18시간 동안 배양하고, 제1극체의 방출 여부를 확인하여 성숙율을 확인하였다. 체외성숙 후 TUNEL assay와

면역효소흡착법, 실시간 역전사 연쇄증합법을 통하여 세포자연사(apoptosis)와 난구세포 내 멜라토닌 수용체(Mtnr1)의 mRNA 발현량을 측정하였다. 체외성숙 배양액에 멜라토닌을 첨가한 결과, 핵낭시기 난자의 핵 성숙율이 유의하게 증가하였으며, 멜라토닌을 1,000 nM 첨가한 군의

* Na KA and Kim ES contributed equally to this work.

† 교신저자: 서울시 강남구 역삼동 606-5, 포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소, (우) 135-081, (전) +82-3468-3421, (팩) +82-2-501-8704, E-mail: drleedr@cha.ac.kr

성숙율이 가장 높게 나타났다. 체외성숙된 난자에서는 세포자연사가 나타나지 않았으나 난구세포에서는 관찰되었으며, 1,000 nM을 첨가하여 배양한 군의 난구세포는 유의하게 낮은 세포자연사를 나타냈다. 그리고 1,000 nM의 멜라토닌을 첨가한 군의 난구세포에서 멜라토닌 수용체의 mRNA가 대조군에 비해 낮게 발현되었다. 이상의 결과를 종합하면 체외성숙 배양액에 첨가된 멜라토닌은 난구세포의 세포자연사를 줄여줌으로써 생쥐 미성숙 난자의 체외성숙을 향상시키는 역할을 하는 것으로 사료된다.

서론

난자의 체외성숙(*in vitro* maturation, IVM)은 난소에 존재하거나 배란된 미성숙 난자를 체외 환경에서 수정 및 초기 배아 발생능력을 가진 성숙 난자로 배양하는 기술이다. 가축을 포함한 많은 동물에서 이러한 체외성숙 방법은 인공번식과 복제, 형질전환동물 생산 등을 위한 필수적인 방법으로 여겨지고 있다. 인간에서도 1989년 폐기된 난소에서 채취된 미성숙 난자의 체외성숙에 이은 배아의 생산과 임신의 성공 사례가 보고(Cha et al., 1991)된 이래로, IVM 기술은 다낭성 난소증후군 환자의 새로운 불임 치료 기술로 자리매김하게 되었다(Trounson et al., 1994). 이 방법은 과배란 유도를 이용하는 일반적인 시험관아기 기술에 비해 호르몬 사용량이 감소되어 비용이 절감되며, 난소 과자극 증후군과 약제의 부작용을 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다. 하지만 동물과 인간에서 모두 미성숙 난자를 체외 배양하여 얻은 성숙 난자는 과배란 유도를 통해 체내에서 성숙된 난자에 비해 그 성숙도가 떨어지며, 수정 이후에는 낮은 배발달율을 보여준다(Trounson et al., 2001; van Wagtenonk-de Leeuw et al., 2000). 이는 일반적으로 부적절한 체외 배양 환경에 의해 난자의 성숙도가 떨어지기 때문으로 사료되며, 이를 극복하기 위한 배양 조건의 개선이 요구되고 있다.

최근 활발하게 진행되어 온 활성산소와 항산화제에 관한 연구는 대사과정 중에 발생하는 oxidative stress가 체외배양과 성숙과정에서 성숙 난자의 발생률을 떨어뜨리는 주요한 원인 중의 하나라고 제안하고 있다(Krisher, 2004). 실제로 활성산소는 세포 내의 미토콘드리아에서 대사 과정 중 생기는 것으로 포유동물 수정란의 배발달에 유해한 영향을 미치는 요인으로 알려져 있다. 또한, 배양액 내 활성산소의 농도가 증가한 경우 배아의 질이 떨어지는 것으로 나타났고(Paszowski & Clarke, 1996), 세포질편질(fragment)이 없는 수정란에 비해 세포질편질이 있는 수정란에서 활성산소의 농도가 높았다(Yang et al., 1998). 그리고 활성산소 제거

제의 첨가는 포유동물의 체외 배발달 과정의 oxidative stress로부터 수정란을 보호해주는 역할을 한다. 이러한 활성산소 제거제로는 superoxide dismutase, catalase, hypotaurine, β -mercaptoethanol, glutathione, cysteine 등이 알려져 있으며(Kim et al., 1999), 여러 가지 기능을 가진 멜라토닌(*N*-acetyl-5-methoxytryptamine)도 이러한 역할을 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다(Tan et al., 2002).

멜라토닌은 소의 송과선에서 멜라닌 과립의 응집과 개구리의 피부색을 조절하는 인자로서 처음 발견되었으며, 난소, 정소, 골수, 망막, 수정체 등의 조직에도 존재한다. 이 호르몬은 포유동물의 수면과 온도, 생체 리듬(circadian and seasonal rhythm) 등의 다양한 생리적 기능을 조절(Cassone, 1990)할 뿐만 아니라 시상하부와 뇌하수체에 작용하여 척추동물의 번식에도 영향을 미친다(Diaz Lopez et al., 2005). 실제로 인간의 배란 직전 난포액 내의 멜라토닌의 농도는 혈액에 비해 3배 가까이 더 높아 멜라토닌이 난자의 성숙과 초기 배발달에 관여할 것으로 여겨진다(Brzezinski et al., 1987). Tamura 등은 시험관 아기 기술에서 수정율이 낮고 임신에 실패한 환자를 대상으로 멜라토닌을 경구 투여하여 시술한 결과 이전 주기에 비해 유의하게 증가된 수정율을 확인할 수 있었다(Tamura et al., 2008). 또한, 생쥐 미성숙 난자에 H₂O₂를 첨가하여 12시간 동안 배양하였을 때에는 제1극체 방출율이 유의하게 감소되었으나 멜라토닌을 동시에 첨가한 경우에는 제1극체 방출율이 상당히 극복되었다. 이상의 연구 결과로 oxidative stress가 난자의 성숙 과정에 유해한 영향을 미치는 요인이며, 난포액 내 멜라토닌이 이러한 oxidative stress로부터 난자를 보호하여 난자의 질과 수정율을 향상시키는 역할을 할 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구자들은 난포액 내에 다수 존재하며 강력한 활성산소 제거제로 알려진 멜라토닌을 배양액에 첨가하여 생쥐 난구세포-핵낭(geminal vesicle, GV) 시기 난자 복합체의 체외성숙에 미치는 영향을 알아보고자 하였으며, 이를 이용하여 체외성숙과정의 효율을 증진하기 위한 체외배양조건을 개선하고자 이 연구를 시

행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에 사용한 실험동물(생타코, 오산)은 생후 3주된 ICR 계통의 생쥐 암컷을 이용하였고, 온도와 낮밤(낮 12시간, 밤 12시간)이 조절되는 사육실에서 물과 먹이를 충분히 공급하여 사육하였다.

2. 미성숙 난자의 획득과 배양

미성숙 난자의 채취를 위해 암컷 생쥐의 복강 내에 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Folligon)을 주사하여 난자의 성숙 정도를 균일하게 하고, 44~46시간 후에 경추 파열로 도살한 후 복강을 절개하여 난소를 분리하였다. 난소는 M2 배양액이 들어있는 배양접시(Falcon)로 옮겨 해부 현미경 하에서 forcep과 29G 바늘로 난포를 터트려 난구세포-난자 복합체를 채취하였다. 회수된 핵낭 시기의 난자는 세척 후 체외 배양을 위해 준비해 둔 배양접시의 배양액 방울(50 μ L)로 옮겨서 배양하였다. 배양접시는 최소한 12 시간 이전에 mineral oil(Sigma)로 덮은 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 평형하여 적정 pH가 유지되도록 한 후 사용하였다. 난자의 채취 및 세척은 M2 배양액을 이용하였고, 미성숙 난자의 체외 배양을 위한 기본배양액으로는 5% human serum albumin(HSA, Vitrolife)과 0.075 IU/mL FSH (Gonal-F, Serono), 0.5 IU/mL hCG(Pergonal, Serono), 1.0 g/mL-estradiol (Sigma)이 첨가된 G2.3 배양액(Vitrolife)을 사용하였다. 멜라토닌(Sigma)은 G2.3 배양액으로 희석하여 준비한 후 0.1 nM, 10 nM, 1,000 nM의 농도로 기본배양액에 첨가하였다.

3. 미성숙 난자의 성숙을 평가

채취한 난구세포로 둘러싸인 난자(cumulus cells-enclosed oocytes, CEOs)는 체외성숙을 위해 임의로 나누어 각각 기본 배양액 또는 멜라토닌이 첨가된 기본 배양액에서 18시간 동안 배양한 후 도립 현미경(Nikon)으로 극체 형성(polar body formation, PB)을 확인하여 체외 성숙을 평가하였다.

4. 난구세포의 세포자연사 확인

각 군의 난구세포로 둘러싸인 체외성숙 전후의 난자로부터 난구세포를 회수하고 세포자연사를 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling(TUNEL)을 시행하였다. 회수된 난구세포는 1% paraformaldehyde로 10분간 고정시킨 후 1% BSA가 첨가된 Dulbecco's phosphate-buffered solution (DPBS, Gibco)으로 세척하고 fluorescein(tetra-methyl-rhodamine) conjugated dUTP(Roche Diagnostics)를 이용한 *in situ* apoptosis detection kit을 사용하여 염색하였다. propidium iodide(PI, Sigma)를 이용하여 핵을 염색하였으며, 1% BSA가 첨가된 DPBS 용액으로 세척 후에 mounting한 뒤 형광현미경 하에서 검정하였다.

5. 면역효소흡착법(ELISA)을 이용한 세포자연사의 정량

Cytoplasmic histone-associated DNA 단편을 정량하기 위해 cell death detection kit(Roche)을 사용하여 two-step sandwich-type immunoassay 방법으로 면역효소흡착법을 수행하였다. 각 그룹의 난구세포를 회수하여 anti-histone으로 피막이 형성된 각 well에서 반응시킨 후 세척하였다. Conjugation solution(anti-DNA-POD)을 첨가하여 실온에서 90 분간 incubation 후 세척하고 기질 용액을 첨가하여 반응시킨 다음 일정시간이 경과한 후 반응 종결 용액을 첨가하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6. 난구세포 내 멜라토닌 수용체(Mtnr1) 유전자의 발현

1,000 nM 멜라토닌이 처리되거나 처리되지 않은 실험군의 난구세포를 회수하고, 세포 내 유전자 발현의 분석을 위해 실시간 역전사 연쇄중합법(real time-reverse transcription-polymerase chain reaction, real time RT-PCR)을 시행하였다. 회수된 난구세포에 300 μ L의 trizole(Sigma)를 넣어 섞은 후에 10분간 정치하였다. Choroform(Sigma) 50 μ L를 넣어 섞고 잠시 정치한 후에 20분간 원심분리를 하였다. 상등액을 새 tube로 옮긴 후에 동량의 isopropanol(Sigma)을 넣어 준 후 -20~-80°C에서 1시간 가량 보관하였다. 30 분간 원심분리하여 침전물에 70% Et-OH(Sigma)를 넣어 세척하였고, 정량을 하여 추출된 RNA량을 확인하였다. 1 μ g의 total RNA로 Super ScriptTM II R Kit(Invitrogen)을 이용하여 RT를 시행하였다. Oligo dT와 dNTP 등의 합성 시약을 RNA sample과 혼합한 후 PCR 기계에서 37°C 20분, 65°C

5분 후에 0.1 M DTT와 superscript를 첨가한 후 얼음에서 5분간 정지한 후 기계에 42°C 60 min, 70°C 15 min 동안 두어 first strand cDNA를 합성하였다. 연쇄증합법은 4 µL DEPC-treated water, 2 µL forward primer(5 pmole), 2 µL reverse primer(2 pmole), 10 µL premix with SYBR Green and 2 µL of cDNA template를 포함하는 20 µL에서 35 cycle을 증폭시켰다. 각 Cycle은 95°C에서 30초, 각 primer의 annealing 온도에서 30초, 72°C에서 30초로 구성되어 있다. 각 역전사 연쇄증합반응의 mixture는 DyNAmo SYBR green qPCR kit(Finnzymes)을 사용한 DNA Engine 2 fluorescence detection system(MJ research)을 사용하여 분석하였다. 본 실험에서 사용한 primer는 ribosomal protein S16 (RPS16) (5'-aga tga tgc agc cgc gc-3', 5'-gct acc agg gcc ttt gag atg ga-3': 163 bp, 58°C), Mtnr1-a(5'-cca ttt cat cgt gcc tat g-3', 5'-gta act agc cac gaa cag c-3': 259 bp, 58°C), Mtnr1-b(5'-acg cat cta ttc ctg cac ctt c-3', 5'-ctg cgc aaa tca ctc ggt ctc-3': 192 bp, 58°C)이었다. 형광의 확인은 각 cycle의 72°C step에서 측정되었다. 유전자 발현의 상대적 양은 2^{-ΔΔCT} method에 의해 분석되었다(Livak & Schmittgen, 2001).

7. 통계적 검증

각각의 실험은 3회 이상 반복하여 수행하였고, 실험 결과의 통계 처리는 Statistical Analysis System(SAS, Cary, NC, USA)에 의한 One-way ANOVA를 이용하였으며 $p < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

난구세포로 둘러싸인 생쥐 미성숙 난자를 체외 배양한 후 극체 형성율을 통하여 멜라토닌이 체외성숙에 미치는 영향을

알아보았다. 실험에 앞서 멜라토닌의 첨가 농도는 예비실험을 통해 결정하였다(data not shown). 18시간 동안 체외배양한 난자의 성숙율은 멜라토닌을 첨가하지 않은 대조군에서는 84.9%이었고, 멜라토닌이 각각 0.1 nM, 10 nM 첨가된 배양액에서 배양된 실험군에서는 각각 85.7%, 85.3%로 나타나 대조군에 비해 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 1,000 nM의 멜라토닌이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군에서는 92.3%로 멜라토닌을 첨가하지 않거나 낮은 농도의 멜라토닌을 첨가한 그룹에서보다 더 높은 성숙율을 나타냈다(Table 1).

TUNEL 방법을 이용하여 난구세포에서의 세포자연사 여부를 알아보았다. PI 염색을 통하여 전체 세포 수를 계수하고, 이에 대한 TUNEL 양성 염색을 나타내는 세포의 비율을 계산하여 분석하였다. Apoptotic 세포의 수는 대조군에서는 20.8±4.5였고, 멜라토닌을 각각 0.1 nM, 10 nM, 1,000 nM 첨가한 실험군에서는 각각 11.7±3.6, 7.7±2.7, 3.7±1.8로 배양액에 첨가한 멜라토닌의 농도가 증가됨에 따라 apoptotic 세포의 수가 감소한 것으로 나타났으며, 특히 1,000 nM의 멜라토닌을 첨가한 실험군에서는 다른 군에 비해 유의하게 낮았다(Fig. 1).

멜라토닌의 첨가가 배양 중 난구세포에서의 세포자연사에 미치는 영향을 정량적으로 알아보려고 면역효소흡착법을 이용하여 다시 분석하였다. 멜라토닌을 첨가하지 않은 대조군에서는 평균 흡광도 값이 0.087±0.004이었고, 1,000 nM의 멜라토닌을 첨가한 군에서는 흡광도 값이 0.052±0.011로 대조군에 비해 유의하게 낮은 것으로 나타났다. 이것은 1,000 nM의 멜라토닌을 체외성숙 배양액에 첨가하여 체외 배양하였을 때 난구세포의 세포자연사가 보다 많이 감소하였다는 것을 나타낸다(Fig. 2).

또한, 배양액에 첨가된 멜라토닌에 의한 난구세포 내 멜

Table 1. Effect of melatonin on the maturation of mouse immature cumulus cell-enclosed oocytes(CEOs) *in vitro**

Concentration of melatonin	No. CEOs examined*	No. M I (%±SEM)	No. M II (%±SEM)
0	365	45 (12.3±0.9) ^a	310 (84.9±0.2) ^a
0.1 nM	372	44 (11.8±0.6) ^a	319 (85.7±0.7) ^a
10 nM	367	46 (12.5±0.1) ^a	314 (85.3±0.0) ^{a,b}
1,000 nM	379	27 (7.1±0.5) ^a	350 (92.3±0.1) ^b

* Three replicates.

^{a,b} Values within the same column with different superscripts are significantly different($P < 0.05$).

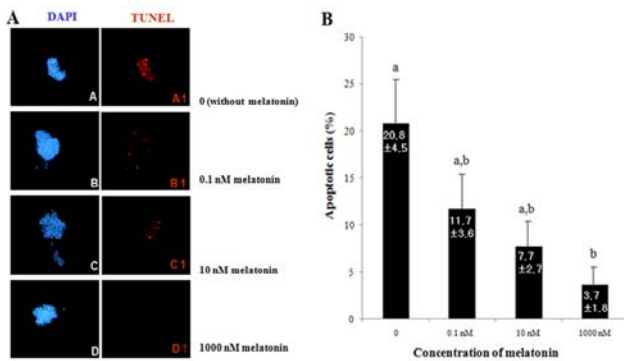


Fig. 1. Comparison of TUNEL assay and DAPI staining in cumulus cells (CC) from *in vitro* matured CC-enclosed oocytes (CEO) depending on the melatonin concentration. A : TUNEL and DAPI staining. B : Percent of apoptotic cells in total cumulus cells. Data are shown as mean SEM for three replications. ^{a,b} Values within the panel B with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Concentration of melatonin	Absorbance($A_{420} - A_{492}$) Mean (\pm SEM)
0	0.087 (\pm 0.004) ^a
0.1 nM	0.061 (\pm 0.010) ^{a,b}
10 nM	0.055 (\pm 0.011) ^{a,b}
1000 nM	0.052 (\pm 0.011) ^b

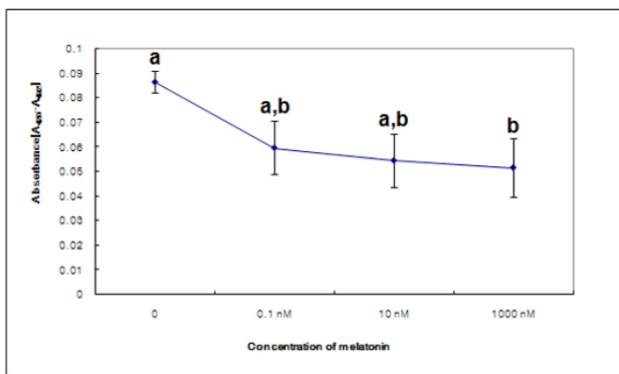


Fig. 2. Quantification of apoptosis in cumulus cells (CC) from *in vitro* matured CC-enclosed oocytes (CEO) depending on the melatonin concentration. The extent of apoptosis in the cumulus cells was measured by ELISA. ^{a,b} Values within the same column with different superscripts are significantly different (^a vs. ^b $P < 0.05$).

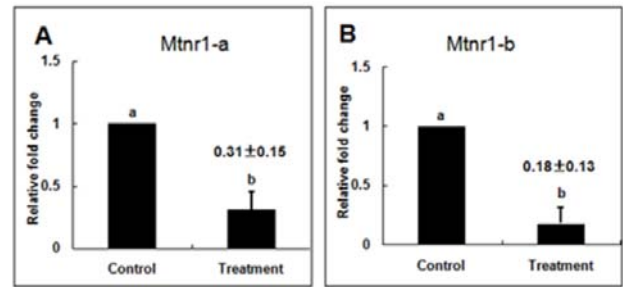


Fig. 3. Relative fold change of melatonin receptor (Mtnr1-a and Mtnr1-b) in cumulus cells after *in vitro* maturation. A : Mtnr1-a. B : Mtnr1-b. Mtnr mRNA levels were measured by real time RT-PCR. Treatment group were cultured with 1,000 nM melatonin. ^{a,b} Values within the same panel with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

라토닌 수용체인 Mtnr1 발현의 조절 가능성을 검증하였다. 멜라토닌의 영향에 의해 성숙율이 가장 높고 세포자연사가 가장 낮게 관찰된 1,000 nM군과 멜라토닌을 첨가하지 않은 군을 선택하여 실험을 진행하였다. 난구세포 내에서 멜라토닌 수용체 유전자들인 Mtnr1-a와 Mtnr1-b의 발현량은 멜라토닌을 첨가하지 않은 대조군을 기준으로 상대적으로 비교하였을 때 1,000 nM의 멜라토닌을 첨가한 군(0.31±0.15, 0.18±0.13)에서 발현이 낮게 나타났다(Fig. 3).

고찰

체외에서 성숙된 난자는 체내에서 성숙된 배아에 비해 난자의 질과 양질의 배아로의 발생율이 저조하다. 이는 체외성숙과정을 충분히 지원할 수 없는 배양액과 배양환경에 기인하는 것으로 알려져 있다. 최근 미성숙 난자의 배양조건을 개선하기 위해 연구자들은 크게 두 가지 방향으로 집중하고 있다. 첫째로 배양액을 개선하기 위해 기본배양액 성분을 알 수 있는 chemical defined medium으로 바꾸고 있으며, 많은 다양한 성장인자와 에너지원으로 pyruvate와 glucose, glutamine의 양을 조절하고 있다. 또한, 미성숙 난자의 배양은 일반적인 배양과정에 비해 좀 더 장기간의 배양을 요하기 때문에 항활성산소제(antioxidant system scavenging reactive oxygen species)의 도입이 고려되고 있다. 한편, 배양조건에서 산소의 분압을 줄여 배양 중에 생성되는 활성산소의 양을

줄이려는 노력도 또한 진행되고 있다. 실제로 활성산소는 세포 내의 미토콘드리아에서 대사 과정을 거치며 ATP의 생성과 함께 연쇄반응으로 생겨나게 된다. 미토콘드리아의 호흡 사슬에 생긴 결합은 ATP 생성에 심각한 문제를 유발하며, 미토콘드리아 내 활성산소종의 생성을 증가시켜 미토콘드리아 DNA의 common deletion을 일으켜 궁극적으로 세포를 사멸에 이르게 한다(Jou et al., 2007).

생쥐 미성숙 난자를 5%와 21% oxygen에서 배양액에 멜라토닌을 첨가하여 각각 체외 성숙시켰을 때 5%에서는 대조군과 차이가 없었으나, 21%의 배양 조건에서 배양된 미성숙 난자의 경우 0.1 nM의 멜라토닌을 처리하여 배양한 실험군이 대조군에 비해 유의하게 높은 핵막 붕괴율과 제1극체 형성율을 나타냈다(Ahn & Bae, 2004). 이것은 멜라토닌이 oxygen stress를 덜 받는 5%의 산소가 공급되는 배양 조건에서는 scavenger로 작용하지 않아 난자 성숙에 별다른 영향을 미치지 않고, 체내에서보다 월등히 높은 21%의 산소가 공급되는 배양 조건에서는 멜라토닌이 세포 속에 녹아든 산소의 제거제로서 작용하여 세포 내 oxygen에 의한 stress를 줄여 난자 성숙을 도와준 결과로 생각되나, 그 자세한 기작에 대한 연구는 없었다. 또한, 최근 연구에 의하면 멜라토닌은 H₂O₂에 노출되어 생기는 활성산소종을 줄여주는 역할을 한다(Jou et al., 2004). 이러한 결과는 멜라토닌이 활성산소에 의한 미토콘드리아 세포막의 depolarization, 미토콘드리아 pore(MPTP, mitochondrial permeability transition pore)의 opening, cytochrome c의 방출을 방지하는 역할을 한다는 것을 말한다(Jou et al., 2007). 따라서 본 연구는 체외배양과정 중에 첨가된 멜라토닌이 생쥐 난자의 체외성숙과정 중 생성되는 활성산소 제거제로 작용하여 성숙율을 증진시킬 수 있는지 알아보고, 이를 이용하여 배양조건을 개선하고자 수행되었다. 생쥐 난소에서 회수된 미성숙 난자를 네 군으로 나누었고, 첫번째 군을 대조군으로 멜라토닌을 첨가하지 않은 기본 성숙 배양액에서 배양하였다. 나머지 실험군으로는 각각 0.1 nM, 10 nM, 1,000 nM의 멜라토닌을 첨가하여 체외성숙을 실시하였다. 본 연구에서 1,000 nM의 멜라토닌을 첨가한 군의 미성숙 난자가 대조군과 0.1 nM을 첨가한 군에 비하여 유의적으로 높은 체외 성숙율을 나타냈다(Table 1). 이러한 결과는 멜라토닌이 생쥐 난자의 체외 성숙 과정에 있어 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 다시 한번 확인하게 하였고, 그 자세한 기작을 알아보기 위하여 추가의

연구를 진행하였다.

난구세포의 수와 그 compactness가 난자의 발달 능력을 결정하는 중요한 요인이라는 것은 이미 잘 알려진 사실이다(Boni et al., 2002). 난자를 둘러싸고 있는 난구세포는 oocyte maturation inhibitor(OMI)를 방출하여 난자의 감수분열을 막고 적절한 세포질 성숙을 증진시키며, 난자로의 LH stimulation을 매개하고, 감수분열을 개시하도록 돕는다(Channing et al., 1980). 또한, 난구세포는 정자에 있어서도 활성산소종과 같은 stress를 경감시켜주며(Aitken, 1999), 난자 내의 glutathione 함량이 높은 경우 oxidative-stress-induced apoptosis로부터 난자를 보호하는 역할을 한다(Tatemoto et al., 2000). 체외에서 배양된 난자는 suboptimal 배양 조건에 노출되기 때문에 난자를 보호하고 영양분을 공급받기 위해 난구세포의 역할이 중요하다. 소의 난자와 난구세포의 세포자연사를 비교하였을 때 난자에서는 세포자연사가 나타나지 않고 난구세포에서만 관찰되었다. 또한, 난구세포-난자 복합체 내에서 세포자연사를 관찰하여 그 위치를 보았을 때 주로 난구세포-난자 복합체의 바깥쪽에 위치하고 있었다(Yuan et al., 2005). 이것은 복합체의 바깥쪽에서 난구세포가 보호해 주었기 때문에 corona 안쪽의 세포자연사가 감소된 것으로 여겨진다. 본 연구에서 각 군에서 체외성숙시킨 생쥐 난자의 세포자연사를 TUNEL 방법을 이용하여 분석하였으나, 어떠한 세포자연사도 관찰할 수 없었다(data not shown). 하지만 멜라토닌이 첨가되거나 첨가되지 않은 배양액에서 배양된 난구세포를 수집하여 세포자연사를 비교한 결과, 멜라토닌을 첨가하지 않은 군에 비하여 1,000 nM을 첨가하였을 때 세포자연사율이 유의하게 감소하였다. 따라서 이러한 결과는 멜라토닌이 체외배양 중에 형성되는 활성산소의 유해한 영향으로 난구세포가 자연사하는 것을 방지하고, 이를 통해 난구세포가 체외성숙 과정 중 난자를 보호하고 난자성숙에 도움을 줄 수 있을 것이라고 예상할 수 있었다. 또한, 멜라토닌의 첨가는 난구세포 내의 멜라토닌 수용체의 mRNA의 발현을 증가시키지 않고, 오히려 감소시키는 결과를 보여준다(Fig. 3). 이 결과는 멜라토닌의 난구세포에 대한 영향이 직접적이기보다 성숙을 도와주어 황체화하는 것과 같은 간접적인 영향을 미칠 것이라는 암시를 주나, 그 자세한 기작을 알기 위해서는 보다 많은 추가 연구가 필요하다.

배양액 내에 멜라토닌의 첨가가 난자의 세포질 성숙에 미

치는 영향을 비교하기 위해서는 각 군에서 얻은 성숙 난자를 이용한 배아 발생의 확인이 필요하다. 하지만 배아를 생성하기 위해서는 체외수정을 통한 수정란의 생산이 필요하나, 본 연구에서는 수정란의 생산율이 매우 저조하여 체외성숙을 통해 얻은 배아의 발생을 연구할 수 없었다. 이는 체외성숙과정에서 배양액 내 혈청의 결핍으로 인해 투명대 경화가 일어났거나, 세포질 성숙이 완전하지 않았기 때문으로 사료된다. 따라서 보다 직접적인 연구를 위해서는 미성숙 난자의 체외수정이 가능한 다른 동물 시스템을 이용하거나 세포질 내 정자 직접주입술의 도입이 필요할 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 종합하면 체외성숙 배양액에 첨가된 멜라토닌은 체외배양과정에 형성되는 활성산소에 의한 난구세포의 세포자연사를 감소시킴으로써 난자의 체외성숙 능력을 향상시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 따라서 배아발생 능력이 확인된다면 미성숙 난자의 배양액에 멜라토닌을 첨가하는 것이 배양조건의 개선에 많은 기여를 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 LG생명과학의 연구지원(2007-LG-CHAIMC-01)에 의거 수행되었음.

인용문헌

- Ahn HJ, Bae IH (2004) Effects of melatonin on the meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*. Kor J Fertil Steril 31:155-168.
- Aitken RJ (1999) The amoroso lecture. The human spermatozoon-a cell in crisis? J Reprod Fertil 115:1-7.
- Boni R, Cuomo A, Tosti E (2002) Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. Biol Reprod 66:836-842.
- Brzezinski A, Seibel MM, Lynch, HJ, Deng MH, Wurtman RJ (1987) Melatonin in human preovulatory follicular fluid. J Clin Endocrinol Metab 64:865-867.
- Cassone VM (1990) Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. Trends Neurosci 13:457-464.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK (1991) Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. Fertil Steril 55:109-113.
- Channing CP, Schaerf FW, Anderson LD, Tsafiri A (1980) Ovarian follicular and luteal physiology. Int Rev Physiol 22:117-201.
- Diaz Lopez B, Diaz Rodriguez E, Urquijo C, Fernandez Alvarez C (2005) Melatonin influences on the neuroendocrine-reproductive axis. Ann N Y Acad Sci 1057:337-364.
- Jou MJ, Peng TI, Reiter RJ, Jou SB, Wu HY, Wen ST (2004) Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. J Pineal Res 37:55-70.
- Jou MJ, Peng TI, Yu PZ, Jou SB, Reiter RJ, Chen JY, Wu HY, Chen CC, Hsu LF (2007) Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. J Pineal Res 43:389-403.
- Kim IH, Van Langendonck A, Van Soom A, Vanroose G, Casi A, Hendriksen PJ, Bevers MM (1999) Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 52:537-547.
- Krisher RL (2004) The effect of oocyte quality on development. J Anim Sci 82:E-Suppl, E14-23.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-408.
- Paszkowski T, Clarke RN (1996) Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. Hum Reprod 11:2493-2495.
- Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N (2008) Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage

- and improves fertilization rate. *J Pineal Res* 44:280-287.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R (2002) Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2: 181-197.
- Tatemoto H, Sakurai N, Muto N (2000) Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *In vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 63:805-810.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G (2001) Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction* 121:51-75.
- Trounson A, Wood C, Kausche A (1994) *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 62:353-362.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos AP, Merton JS, den Daas JH, Kemp B, de Ruigh L (2000) Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53:575-597.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 13:998-1002.
- Yuan YQ, Van Soom A, Leroy JL, Dewulf J, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ (2005) Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 63:2147-2163.