

Epidermal Growth Factor(EGF)와 Insulin-like Growth Factor-1(IGF-1)이 소 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

윤종택 · 정영호* · 한기영 · 최선호**
안성산업대학교 동물생명자원학과

Effects of Epidermal Growth Factor (EGF) and Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) on Maturation of Bovine Follicular Oocytes *In Vitro*

J. T. Yoon, Y. H. Chung*, K. Y. Han and S. H. Choi**

Department of Animal Life Resources, Ansung National University

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the effects of growth factors such as epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on maturation of bovine follicular oocytes *in vitro*. Oocytes were recovered from the ovaries of slaughtered Hanwoos. The oocytes were matured in TCM 199 at 39°C, 5% CO₂ in air. Growth factors were added to maturation medium as follows: control (no serum), EGF (10ng/ml, 50ng/ml or 100ng/ml), IGF-1 (100ng/ml) and EGF (50ng/ml)+IGF-1 (100ng/ml). The oocytes were placed onto a slide and stained with aceto-orcein dye. Nuclear maturation was evaluated and classified as germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase-I (M I) or metaphase-II(M II). Maturation rates were 37.9% (control), 45.8% (EGF, 10ng/ml), 55.8% (EGF, 50ng/ml), 44.4% (EGF, 100ng/ml), 46.7% (IGF-1, 100ng/ml) and 67.0% (IGF-1+EGF). The highest group developed to M II stage was IGF-1+EGF treatment group ($p<0.05$). Therefore, nuclear maturation of bovine oocytes were affected by both of growth factors, and it seems to have a mutual activity between them.

(Key words: oocyte, *in vitro* maturation, bovine, EGF, IGF-1)

서 론

포유류의 난포란은 태아시절 초기 감수분열을 시작하여 배란되거나 폐쇄될 때까지 dictyate stage에

서 휴지기가 유지되고 LH surge에 의해서만 난포 세포의 성숙이 재개되는 것으로 알려져 있다(Tsafirri, 1978). 그 결과, 핵막이 붕괴되는 germinal vesicle breakdown (이하 GVBD)이 일어나고 제1

† 본 연구는 1997년 학술진흥재단 자유공모과제에 지원하는 연구비로 수행되었음.

* 중부대학교 동물자원학과(Department of Animal Science, Joongbu University)

** 농촌진흥청 축산기술연구소(National Livestock Research Institute, Rural Development Administration)

극체가 형성되면서 metaphase-II (이하 MII)에서 다시 발육이 정지된다(Sirard 등, 1989). 대부분의 포유동물의 난포란은 난소의 난포에서 분리되었을 때 자발적으로 감수분열이 재개되어 GVBD가 일어나며 (Edward, 1965), 체외에서 적절한 조건을 갖추어 배양하게 되면 정상적으로 발육할 수 있게 된다 (Critser 등, 1986; Sirard와 First, 1988).

이와 같이 난포로부터 분리된 난포란은 적정조건에서 배양될 때 자발적으로 핵성숙이 재개되는 것으로 보고되고 있으나 체외에서 배양된 난포란은 세포질의 성숙까지 수반하는 완전한 체외성숙에는 이르지 못하는 등 난포란의 최적의 성숙조건이 아직 완전히 알려져 있지 못하다 (Ball 등, 1983; Warnes, 1977). 난포란의 체외성숙율을 높이기 위하여 성선자극호르몬을 첨가하였으며 (Fukushima와 Fukui, 1985), 특히 최근에는 epidermal growth factor (이하 EGF), insulin-like growth factor-1 (이하 IGF-1), transforming growth factor- α 및 transforming growth factor- β 등의 체외성숙 및 초기배 발육에 대한 유효성이 인정되었다 (Lorenzo 등, 1993; Yang 등, 1993). 이러한 연구에 있어서 각종 성장인자의 유효성을 명확히 입증하기 위하여 혈청이 배제된 한정배양액을 이용한다.

따라서 본 연구에서는 각종 성장인자 중 IGF-1 및 EGF를 무혈청 배양액에 첨가하여 소 난포란을 체외배양하고 이러한 성장인자들이 무혈청배양액에서 소 난포란의 체외성숙에 어떠한 영향을 미치는가를 규명하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

1) 미성숙난자의 채취

완충액으로 25mM의 HEPES가 첨가된 tissue culture medium (TCM) -199 (이하 세정용 TCM 199; Gibco BRL, U.S.A.)을 18 gauge 주사침을 장착한 10ml 주사기로 흡인하여 주사침과 주사기의 내강을 세정한 후 도축장에서 채취된 난소의 소난포(직경 2~5mm)로부터 난포액과 함께 난포란을 흡입 채취하였다. 난자를 포함한 난포액을 플라스

틱 petridish (100×20 mm, Becton Dickinson Labware, U.S.A.)에 5분간 정지시킨 후 상층액을 제거하였다. 난포란은 난구세포가 치밀하며 2층 이상 부착되어 있고 균일한 난자세포질을 갖는 난자만을 선발하였다.

2) 성숙배양액의 제조

체외성숙 배양액은 25mM sodium bicarbonate가 함유된 TCM 199을 기본배양액으로 하여 EGF (10 ng/ml, 50ng/ml 또는 100ng/ml), IGF-1 (100ng/ml) 및 EGF(50ng/ml) + IGF-1(100ng/ml)를 첨가, 체외성숙 배양액으로 이용하였다. 각각의 성숙배양액은 4-well plate 내에 0.5 ml씩 분주하여 성숙배양 2시간 전에 배양기 내에서 전배양하였다.

3) 성숙배양

선발한 미성숙난자는 세정용 TCM199으로 3회 세정한 후 성숙배양용 TCM199으로 1회 세정하여 well 당 20~50개를 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator 내에서 24시간 성숙배양하였다.

2. 난자의 염색

성숙배양 후 난자는 다음과 같이 고정 및 염색을 실시하여 핵의 발달단계를 판정하였다. 난자를 hyaluronidase(300 IU; Sigma, U.S.A.)로 5분간 처리하고 fine glass pipette을 이용하여 mouth pipetting으로 난구세포층을 완전히 제거한 다음, 고정액 (glacial acetic acid 1: ethanol 3)에 24~72시간 고정하였다. 이후 난자는 염색액(1% aceto-orcein)으로 염색, 400×의 실체현미경 하에서 핵의 발달상태를 조사하였다 (Toyoda와 Chang, 1974). 핵의 발달단계는 난핵포기(geminal vesicle), 난핵포붕괴기(GVBD), 1차 성숙분열 중기(MI) 및 2차성숙분열 중기(MII)의 4단계로 구분하여 평가하였다 (Fig. 1).

3. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 유의성 검정에는 Chi-square test를 이용하였다.

결과 및 고찰

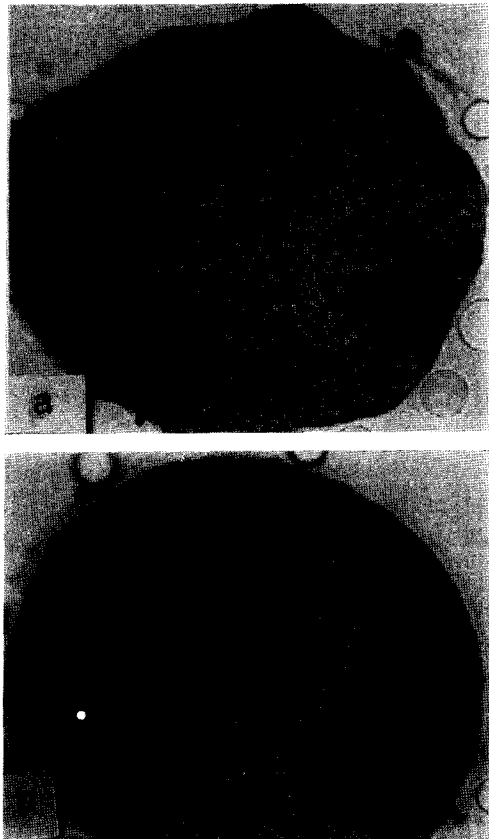


Fig. 1. Stage of meiosis (X400)
a : Germinal Vesicle, b : Metaphase-II

1. EGF 농도에 따른 난포란의 체외성숙을

난포란을 무혈청 성숙배양액에서 배양하는 군을 대조군으로, 10, 50 및 100ng/ml의 EGF를 첨가하여 체외성숙시킨 결과는 Table 1과 같다. 소 난포란을 대조군에서 배양하였을 때 37.9%만이 M II기에 도달하였으며 10ng/ml의 EGF 첨가군에서

45.8%, 50ng/ml 첨가군에서 55.8%, 100ng/ml 첨가군에서 44.4%에 도달하였다. 체외성숙율은 EGF 첨가농도에 관계없이 대조군에 비하여 높았으며 50ng/ml 첨가군이 체외성숙율이 가장 높았으나 통계학적 유의성은 인정되지 않았다. 본 실험결과, 무혈청 배양액내에서 50ng/ml의 EGF를 첨가하는 것이 소 난포란의 체외성숙에 유효한 것으로 판단되어 실험 2에서는 50ng/ml의 EGF를 첨가, IGF-1과의 병용처리효과를 알아보았다.

EGF는 세포질성숙에 필요한 kinase의 활성화와 peptide 잔유물의 이산화를 자극한다고 알려져 있으며(Schultz, 1988), 소(Harper와 Brackett, 1993)에서 뿐만 아니라 마우스(Downs, 1989)나 돼지(Ding과 Foxcroft, 1994) 및 사람(Das 등, 1991)에서도 세포질 성숙을 촉진하는 것으로 보고되어 있다.

2. EGF 및 IGF-1의 병용처리에 의한 난포란의 체외성숙율

난포란을 EGF 50ng/ml, IGF-1 100ng/ml 및 동일농도의 EGF, IGF-1 병용처리군으로 나누어 체외성숙시킨 결과는 Table 2와 같다. 소난포란의 체외성숙율은 혈청이 첨가되지 않은 대조군은 37.9%, EGF 첨가군은 45.3%, IGF-1 첨가군은 46.7% 및 병용처리군은 67.0%의 체외성숙율을 나타내어 EGF와 IGF-1 병용처리군이 대조군 및 EGF, IGF-1 단독처리군에 비하여 유의적으로 높은 성숙율을 보였다 ($p < 0.05$, Table 2).

이와 같은 결과는 Downs (1989) 및 Lorenzo (1994)의 결과와 유사하였다. 본 실험결과 무혈청배양액에서 배양된 소 난포란의 체외성숙율은 EGF와 IGF-1에 의하여 영향을 받으며 특히 EGF와

Table 1. Effect of EGF on maturation of bovine oocytes *in vitro*

EGF* Conc.	No. of oocytes	Germinal vesicle	GVBD**	Metaphase-I	Metaphase-II(%)
Control	87	10	23	21	33(37.9)
10ng/ml	83	15	8	22	38(45.8)
50ng/ml	77	11	4	19	43(55.8)
100ng/ml	81	21	6	18	36(44.4)

* Epidermal growth factor

** Germinal vesicle breakdown

Table 2. Effect of EGF and IGF-1 on maturation of bovine oocytes *in vitro*

Group	No. of oocytes	Germinal vesicle	GVBD*	Metaphase-I	Metaphase-II(%)
Control	87	10	23	21	33(37.9) ^a
EGF** (50ng/ml)	86	16	9	23	39(45.3) ^a
IGF-1*** (100ng/ml)	75	13	6	21	35(46.7) ^a
EGF+IGF-1	91	9	2	19	61(67.0) ^b

* Germinal vesicle breakdown

** Epidermal growth factor, ***Insulin-like growth factor

^{ab} Different superscripts differ significantly (p<0.05).

IGF-1의 상호작용에 의하여 더 유효한 영향을 받는 것으로 사료되었다.

적 요

본 연구는 성장인자 EGF, IGF-1, EGF+IGF-1 이 소 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 규명하기 위하여 실시하였다.

소 난포란의 체외성숙 시 EGF를 농도별(10, 50 및 100ng/ml)로 첨가하여 실험한 결과 통계학적 유의성은 인정되지 않았으나 24시간 배양 후 성숙율은 대조군에 비하여 높은 경향을 나타내었다.

소 난포란의 체외성숙 시 EGF와 IGF-1을 병용 처리하여 실험한 결과, EGF 또는 IGF-1 단독처리군에 비하여 병용처리군이 유의적으로 높은 체외성숙율을 나타내었다 (p<0.05).

따라서 소난포란의 체외성숙율은 EGF와 IGF-1에 의하여 영향을 받으며 특히 EGF와 IGF-1의 상호작용에 의하여 더 유효한 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28: 717-725.
- Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, First NL, Eyestone WH and Northey NDL. 1986. Influence of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryonic development. *Biol. Reprod.*, 34 (Suppl. 1):192.
- Das KG, Tagatz GE, Stout LE, Phipps WR, Hensleigh HC and Leung BS. 1991. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fert. Steril.*, 55:1000-1004.
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:30-40.
- Downs SM. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 441:371-379.
- Edward RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus, monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
- Fukushima M and Fukui Y. 1985. Effect of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 9:323-332.
- Harper KM and Brackett BB. 1993. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Reprod.*, 48:409-416.
- Lorenzo P, Illera MJ and Sanchez J. 1993. Bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro* with growth factors and estrus cow

- serum. *Theriogenology*, 39:262.
- Sirard MA and First NL. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.*, 39:229-234.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML and First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40:1257-1263.
- Schultz RM. 1988. Role of protein phosphorylation in meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*. *ANN. NY. Acad. Sci.*, 541:219.
- Tsafiri A. 1978. Inhibition of nuclear maturation of isolated rat oocytes by follicular constituents. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 18:523-520.
- Yang BK, Tang X and Foote RH. 1993. The effect of growth factors on development of IVM/IVF bovine embryos. *Theriogenology*, 39:343
-
- (접수일자 : 1998. 9. 10/채택일자 : 1998. 12. 4)

