

사람 난포액과 소의 수란관 조직추출액이 생쥐 난구세포에 미치는 영향

홍민정 · 김지수¹ · 심명선¹ · 김해권^{1†}

차병원 여성의학연구소, ¹서울여자대학교 생명공학과

Effect of Human Follicular Fluid and Bovine Oviductal Tissue Extract on the Mouse Oocyte-Cumulus Complex

Minjeong Hong, Jisoo Kim¹, Myung-Sun Shim¹ and Haekwon Kim^{1†}

Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul 135-081, Korea

¹*Department of Biotechnology, Seoul Woman's University, Seoul 139-774, Korea*

ABSTRACT : In most mammals, mature oocyte-cumulus complex(OCCs) ovulate into the oviduct where fertilization by sperm takes place. However, the complex that fail to fertilize eventually undergoes degeneration while they reside in the oviduct. Yet there is no known mechanism how both oocyte and cumulus cells degenerate. Using human follicular fluid (hFF), bovine oviductal tissue extract (BOX) and mouse OCC, the present study aimed to find how the oviduct influence the viability of the oocyte and cumulus cells *in vitro*. There was no difference of oocyte maturation rate between the control and BOX-treated groups. However, there was a significant difference in the survival of cumulus cells between two groups. Cumulus cells cultured in the presence of hFF alone underwent initially expansion and then they formed monolayer in the culture dish. Even after 72 hr, they proliferated well and showed fibroblast-like morphology. Cumulus cells cultured in the presence of both hFF and BOX also expanded after 24 hr, however, after 72 hr culture, they eventually detached and degenerated. Cumulus cells cultured in the BOX alone gave a similar drastic result. When the cumulus cells cultured in the presence of BOX were stained with DAPI, their nuclei showed partial condensation and fragmentation. After detailed analysis of these cells by TUNEL assay, many nuclei of them exhibited well stained spots indicating the signs of apoptosis. Based upon these observations, it is suggested that BOX might possess a factor that leads mouse cumulus cells to undergo apoptosis *in vitro*.

Key words : Human follicular fluid, Bovine oviductal tissue extract, Cumulus cell, Apoptosis.

요약 : 대부분의 포유동물에서 수란관내로 배란된 난자는 정자에 의해 수정이 된 후 개체발생을 시작한다. 그러나 수정이 되지 못한 난자들은 난구세포와 함께 수란관내에서 퇴화하여 제거되는데, 그 기작에 대해서는 구체적으로 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 포유동물의 수란관내 물질이 난자-난구 복합체에 미치는 영향을 알아보고자 사람의 난포액과 소의 수란관 조직 추출액을 생쥐의 난자-난구 복합체에 처리하고 난자의 생존율 및 난구세포의 세포자연사(apoptosis)를 조사하였다. 수란관 조직 추출액을 처리한 미성숙난자는 난포액만을 처리한 난자와 비교하여 난자의 성숙률에 차이를 보이지 않았다. 그러나 난구세포에서 난포액만을 처리한 경우 확장을 일으키면서 배양접시 바닥에 붙어서 배양 후 72시간까지 분열 증식을 계속하는 것이 관찰된 반면, 수란관 조직 추출액을 처리한 난구세포는 확장이 억제되며 72시간 배양 후 모두 죽었다. 한편 난포액과 수란관 조직 추출액을 함께 처리한 난구세포는 배양 후 24시간에 확장을 일으켰으나 72시간 후에는 수란관 조직 추출액만을 처리했을 때와 마찬가지로 모든 난구세포가 죽었다. 이러한 난구세포의 죽음이 세포자연사에 의한 것인지 알아보기 위하여 DAPI로 핵을 염색한 후 관찰한 결과 세포자연사의 특징인 응축되고 분절화된 핵을 관찰할 수 있었고, 특히 수란관 조직 추출액을 처리한 난구세포에서 많이 관찰되었다. 또한 TUNEL 방법으로 세포자연사를 확인한 결과 응축되고 분절화된 핵을 가진 난구세포에서 염색되는 것을 확인하였다. 본 연구의 결과들을 종합해 볼 때 소의 수란관 조직 추출액에 의한 생쥐 난구세포의 죽음은 세포자연사에 의한 것으로 판단되며, 이로 미루어 수란관 조직 세포에는 난구세포의 세포자연사를 유도할 수 있는 물질을 포함하고 있는 것으로 사료된다.

* 이 연구는 2001년도 서울여자대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

†교신저자: 서울시 노원구 공릉2동 126, 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과. (우) 139-774, (전) 02-970-5665, (팩) 02-970-5074, E-mail: hwkim@swu.ac.kr

서 론

포유동물의 수란관은 정자와 난자의 수정을 위한 가장 적합한 환경을 제공할 뿐 아니라 착상 전 배아의 발생에도 중요하다. 대부분 포유동물의 수정란은 체외에서 배양할 경우 포배로의 발생을 진행하지 못하고 종에 따라 다양한 발생시기에서 체외발생중지(*In vitro* block) 현상을 나타내게 된다. 그러나 체외 혹은 체내에서 수정된 난자를 수란관에 이식시켜 체외에서 기관배양을 하면 모체와는 격리되어 있더라도 포배로 정상 발생을 한다(Whittingham, 1968). 또한 수정란을 수란관의 조직세포와 함께 배양하여도 소(Ellington et al., 1990), 돼지(White et al., 1989), 양(Gandofi & Moor, 1987), 생쥐(Sakkas & Trounson, 1990)에서 보는 것처럼 체외발생 중지 현상이 일부 극복되거나 배발생 속도가 생체 내와 유사하게 진행된다고 알려져 있다. 이런 결과들로 미루어 볼 때, 수란관이란 환경은 포유동물의 착상 전 배발생 시기에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 한편, 수란관의 내부 공간을 채우고 있는 수란관액은 혈액 성분과 수란관 조직 세포액으로부터 분비되는 물질 그리고 자궁액으로 구성되어 있으며, 이 중 수란관 조직에 의한 분비물이 수정 과정과 착상 전 배발생에 특히 중요한 역할을 담당하는 것으로 믿어진다. 이는 생식주기에 따른 생식호르몬의 변화에 맞추어 단백질을 포함한 수란관액의 여러 가지 물질의 종류와 양 등에 변화가 일어나며(Killian et al., 1989; Kouba et al., 2000) 수란관내 상피세포의 구조도 생식주기에 따라 변화를 일으킨다는 사실들로 뒷받침된다(Shirley & Reeder, 1996; Abe et al., 1999; Abughrien & Dore, 2000; Leese et al., 2001).

출생시 제 1감수분열 전기에 머물러 있는 포유동물의 난자는 난소내 난포에서 성장 및 성숙, 즉 제 2감수분열 중기 시기까지의 진행을 일으키게 되는데, 성장 초기의 원시난포는 한 층의 난포세포로 이루어져 있다가 이후 난포 자극 호르몬에 의해 난포세포가 증식함에 따라 평평한 모양에서 입체적인 모양으로 변화하는 1차 난포가 된다. 사춘기가 됨에 따라 난포의 크기는 급격히 증가하여 난포내의 한쪽 공간에는 난포세포가 분비한 난포액이 축적되는 난포강이 형성되는데 이 때의 난포를 성숙난포(Graafian follicle)라 한다. 성숙난포내 난자의 바로 주위에는 일부의 난포세포들이 여러 층으로 밀착하여 분포하고 있는데 이를 난구세포라 하며 이들은 난자와 gap junction 등으로 연결되어 여러 가지 물질을 분비하여 난자의 성장을 도와준다(Kato et al., 1999). 이렇게 성장한 성숙난포는 황체화 호르몬의 영향을 받아 난포 내 미성

숙 난자로 하여금 성숙을 재개하도록 하고 동시에 난자 주위의 난구세포는 hyaluronic acid를 합성 분비하여 난자-난구 복합체의 확장 현상을 일으킨다. 난자가 완전히 성숙하여 제 2감수분열 중기에 도달하고 난구세포의 확장이 충분히 일어나면 이들은 수란관으로 배란된다(Spearow et al., 1999). 대부분 포유동물의 배란 시에는 난자뿐만 아니라 난자를 둘러싸고 있는 난구세포와 일부의 난포액 성분이 수란관 내로 흘러 들어가는데 특히 생쥐 등의 설치류에서 보는 것처럼 난소가 막(ovarian sac)으로 둘러싸여 있고 이 막이 수란관과 직접 연결되어 있는 경우에는 배란되는 난포의 모든 성분들이 수란관내로 들어가게 된다(Hunter, 1988).

배란된 난자는 수정이 일어나면 배발생을 진행하여 이 후 자궁으로 이동하여 개체로 발생하게 되나 수정이 되지 않을 경우 퇴화한다. 또한 난자와 함께 배란된 난구세포는 난자의 수정 여부와 상관없이 반드시 퇴화하게 된다. 특히 생쥐 등의 경우에서 보는 것처럼 생식주기가 4~5일에 불과하고 한번에 배란되는 난자의 수가 수란관 당 5~7개인 경우 수정에 실패한 난자와 난구세포의 효과적인 제거는 수란관이란 조직이 갖추어야 할 매우 중요한 기능이다. 만일 이들의 제거에 실패한다면 수란관 내부는 이들 세포로 포화되어 결국 그 종의 생식은 더 이상 불가능하게 될 것이다. 특히 생쥐 등의 미수정 난자는 특별한 혈액단백질 성분이 없이 albumin만으로도 적어도 2일 이상 체외에서 생존하며, 소의 난포 과립세포는 혈액은 물론 albumin마저 제거된 배지에서 3일 이상 생존이 가능하다(Hu et al., 2001). 이러한 사실들로 미루어 볼 때에 수란관 조직은 수정된 난자 이외의 모든 세포들을 죽이거나 혹은 제거할 수 있는 특별한 기작을 갖춘 것으로 추측된다.

따라서 본 연구는 위와 같은 수란관의 역할을 알아보기 위하여 소의 수란관 조직추출액이 체외에서 배양되는 생쥐의 난자 및 난구세포에 어떤 영향을 미치는가를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 사람의 난포액(Human Follicular Fluid, hFF)의 획득

불임시술 과정에서 기증받은 사람의 난포액을 12,000 × g로 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이를 -20°C에 보관하였다가 사용직전에 녹인 후 millipore membrane(0.45 μm, Millipore, USA)으로 여과하여 실험에 사용하였다. 배지에 첨가된 hFF의 농도는 10%가 되도록 하였다.

2. 소의 수란관 조직추출액(Bovine Oviductal Tissue Ex-

tract, BOX)의 획득

소의 수란관은 인천시 남구 가좌동에 위치한 삼성식품 도축장에서 제공받아 사용하였다. 적출된 수란관을 0.9% 생리 식염수로 여러번 씻은 후, 해부가위로 수란관만을 잘라내어 Ca^{2+} -free Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS, GIBCO, USA)으로 깨끗이 씻었다. 여과지로 조직의 혈액을 제거한 후 플라스틱 배양접시에서 slide glass로 내용물을 짜내고 이를 4°C에서 12,000×g로 1시간 동안 원심분리한 후 상등액은 제거하고 조직세포의 침전물을 얻어 -20°C에 보관하였다. 사용 직전 동결된 수란관조직 세포에 동량의 DPBS를 첨가하고 이를 균질화한 후, 4°C에서 12,000×g로 1시간 동안 원심분리 하였다. 이로부터 상등액을 얻어서 millipore membrane (0.45 μm)으로 여과하여 실험에 사용하였다.

3. 생쥐 난구세포의 배양

ICR 계통의 생후 3주 및 8주된 암컷 생쥐를 실험에 사용하였다. 미성숙 난자-난구의 복합체를 얻기 위해 3주된 암컷 생쥐에 5 I.U.의 PMSG(Folligon, Intervet, Netherland)를 주사한 후 45시간 후에 경추파열로 도살한 후 난소를 떼어냈다. 이것을 MEM에 0.4% BSA가 들어 있는 배양액에 넣고 해부현미경(SZH, Olympus, Japan)하에서 예리한 핀셋으로 난포를 터뜨려서 흘러나온 내용물 중 난구세포에 의해 둘러싸여 있는 난자, 즉 난자-난구 복합체를 골라낸 후, MEM에서 여러번 씻어서 실험에 사용하였다.

배란된 난자는 8주된 암컷 쥐에 5 I.U.의 PMSG를 주사한 후 48시간 후 hCG를 주사하고 이로부터 15시간 후 도살하여 수란관을 떼어냈다. 이것을 MEM에 넣고 해부현미경 아래에서 예리한 핀셋으로 수란관 팽대부를 찢어 흘러나온 난자-난구 복합체를 MEM으로 여러번 씻어서 실험에 사용하였다.

이렇게 얻어진 난자-난구의 복합체를 각각 사람 난포액이 첨가된 MEM과 소의 수란관 조직추출액이 첨가된 MEM 그리고 사람의 난포액과 소의 수란관 조직 단백질이 함께 첨가된 MEM의 세 군으로 나누어 37°C, 5% CO₂와 100% 습도가 제공되는 배양기에서 배양하였다. 모든 배양액에는 0.2 I.U./ml의 PMSG를 첨가하여 사용하였다. 한편 필요에 따라 난자-난구세포의 복합체는 0.1%의 hyaluronidase를 처리하여 난구세포만을 분리하여 실험에 사용하였다.

4. 세포의 염색 및 관찰

난구세포를 hFF를 첨가한 배양액에서 24시간 배양한 후 hFF와 BOX를 첨가한 배양액으로 교체한 후 6시간, 24시간 배양하여 세포의 모양을 관찰하였다.

핵의 모양을 관찰하기 위해서 난구세포를 먼저 1% paraformaldehyde로 10분간 고정하고 1 μg/ml 농도의 4'-6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 30분간 염색한 후 PBS로 씻어낸 후 도립형광현미경(IMT-10, Olympus, Japan)하에서 관찰하였다.

5. TUNEL 방법에 의한 세포자연사 확인

배양된 난구세포에서 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling(TUNEL) 방법에 의한 자연세포사를 확인하기 위하여 *in situ* apoptosis detection kit(ApopTag; Intergen, USA)를 사용하였다. 배양된 난구세포는 1% paraformaldehyde로 10분간 고정 후 Tris buffer로 세척하였다. ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 10초간 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) enzyme을 첨가한 후 37°C에서 90분간 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 stop buffer를 상온에서 10분간 처리한 후 Tris buffer로 3번 세척하였다. 다음 anti-digoxigenin-FITC로 37°C에서 30분간 처리한 후 증류수로 세척하였다. 핵을 propidium iodide(PI)로 2차 염색하였으며 형광 mounting 용액으로 봉입한 후 형광현미경하에서 검경하였다. 세포자연사 정도의 계산은 임의적으로 선택된 200× 시야에서 각각 다른 시야로 5번을 옮기면서 300~500개의 세포를 계수하였으며, 그 중 TUNEL에 의해 염색된 세포만을 계수하여 전체 세포수에 대한 세포자연사 세포수의 비율로 표시하였다.

6. 단백질 정량

소의 수란관 조직추출액 내의 단백질의 정량분석은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 bicinchoninic acid protein assay reagent(BCA, Pierce, USA)와 함께 제공된 사용법에 따라 측정하였다.

결 과

1. 소의 수란관 조직추출액이 생쥐 미성숙 난자의 성숙에 미치는 영향

소의 수란관 조직추출액이 체외배양중인 생쥐 미성숙난자의 성숙에 미치는 영향을 조사하였다. 혈청대신 사람의 난포액을 10%의 농도로 MEM에 첨가하고 여기에 각각 0, 0.15, 0.6, 혹은 3.0 mg/ml의 수란관 조직추출액을 넣어 이들 배양액에서 생쥐의 미성숙 난자-난구 복합체를 17시간 동안 배양한 후 극체가 형성된 난자의 수를 조사하였다. Fig. 1에서 보

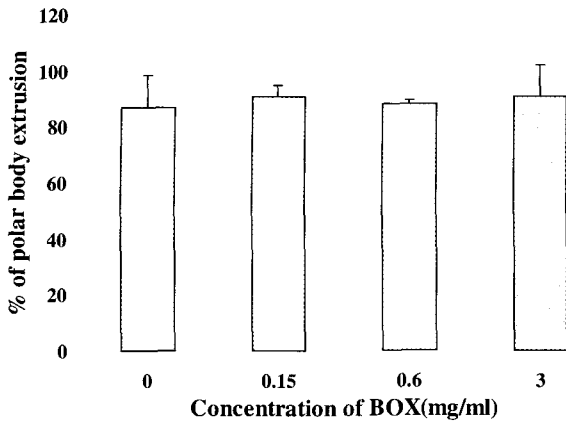


Fig. 1. Effect of bovine oviductal tissue extract (BOX) on the meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*.

는 것처럼 0 mg/ml의 경우 87%, 0.15 mg/ml의 경우 91%, 0.6 mg/ml의 경우 88%, 그리고 3.0 mg/ml의 경우 91%의 난자가 극체를 형성하는 등 모든 실험군 난자의 80~90%가 성숙을 일으킨 것이 관찰되었다. 즉 소의 수란관 조직추출액은 생쥐 미성숙난자의 성숙에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

2. 소의 수란관 조직추출액이 생쥐 미성숙 난자-난구 복합체의 체외배양에 미치는 영향

생후 3주된 생쥐의 난소로부터 적출한 난자-난구의 복합체를 각각 10%의 난포액이 첨가된 배양액, 혹은 조직추출액이 3.0 mg/ml의 농도로 첨가된 배양액, 그리고 난포액과 추출액이 함께 첨가된 배양액에서 각각 24시간 및 72시간 동안 배양한 후에 난자 및 난구세포의 상태를 관찰하였다. Fig. 2의 A, B에서 보는 것처럼 난포액만 첨가된 배양액에서 배양된 난자-난구 복합체의 난구세포들은 24시간 후에 확장 현상을 나타내었고 72시간 후에는 난자로부터 분리하여 배양접시의 바닥에 붙어 왕성하게 분열하는 것이 관찰되었다. 이때 대부분의 난자들은 24시간이 경과하였을 때에는 대부분이 극체를 방출하는 등 성숙을 일으킨 것이 관찰되었다. 그러나 72시간이 경과하였을 때에는 일부 난자들이 단성생식을 일으켜 2세포기로 발생하거나 비정상적인 분절화(fragmentation)현상을 나타내었다. 이와는 대조적으로 수란관 조직추출액만 첨가된 배양액에서 배양된 난구세포들은 Fig. 2의 C, D에서 보는 것처럼 24시간이 경과하였을 때에는 난구세포의 부분적인 확장 현상이 관찰되는 등 난포액만 첨가된 배양액의 경우와 일부 유사하였으나 72시간째에는 거의 대부분의 난구세포들이 난자의 주위에 묻혀 있는 채 퇴화된 것

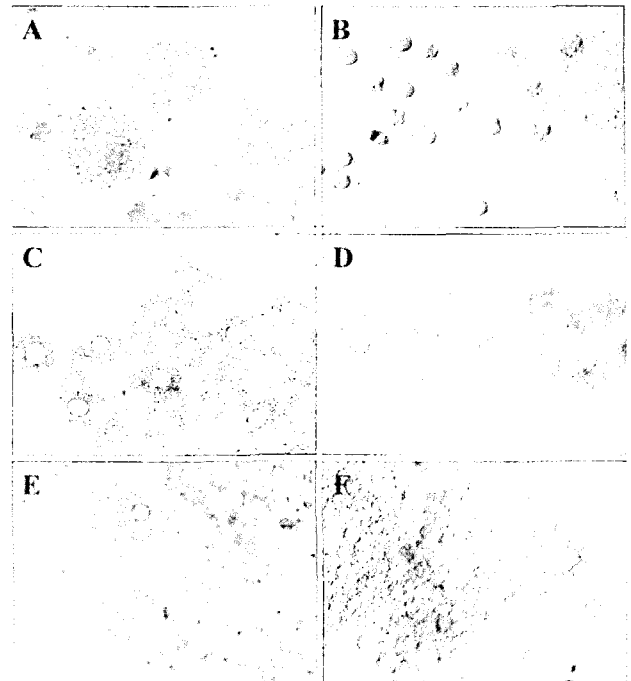


Fig. 2. Effect of BOX on the viability of mouse oocyte-cumulus complex. Immature oocyte-cumulus complexes were obtained from mice injected with hCG 48 h earlier. The complexes were cultured for 24 h (A, C, E) or 72 h (B, D, F) in the presence of hFF (A, B), BOX (C, D) or both (E, F).

이 관찰되었다. 또한 난자들도 난구세포에 둘러싸인 채로 혹은 난구세포와 분리된 채로 퇴화된 것이 관찰되었다. 그러나 난포액과 조직추출액을 함께 첨가한 배양액에서 배양된 난구세포들은 24시간째에는 난포액만 첨가된 배양액의 경우와 유사하였으나 72시간째에는 앞의 두 경우와는 달리 난구세포들이 난자와는 분리되었으나 바닥에 붙지 않은 채 둥근 모양을 유지한 상태로 존재하는 것이 관찰되었다 (Fig. 2E, F).

3. 소의 수란관 조직추출액이 생쥐의 배란된 성숙난자-난구 복합체에 미치는 영향

Fig. 3의 A와 B에서 보는 것처럼 난포액만이 첨가된 배양액에서 배양된 성숙 난자-난구 복합체의 난구세포는 24시간이 경과하였을 때 일부의 세포가 난자로부터 떨어져 나와 바닥에 붙어서 자라는 것이 관찰되었다. 배양한 지 72시간 후에는 배양접시의 바닥에 부착한 상태의 잘 발달된 세포의 단일층이 관찰되었다. 그러나 조직추출액만 첨가된 배양액에서 배양된 난구세포들은 Fig. 3의 C와 D에서 보는 것처럼 24시간이 지났을 때 난자의 주위에 묻혀 있거나 난자로부터 분리된 채 덩어리를 형성하기 시작하였으며 세포의 분열 혹

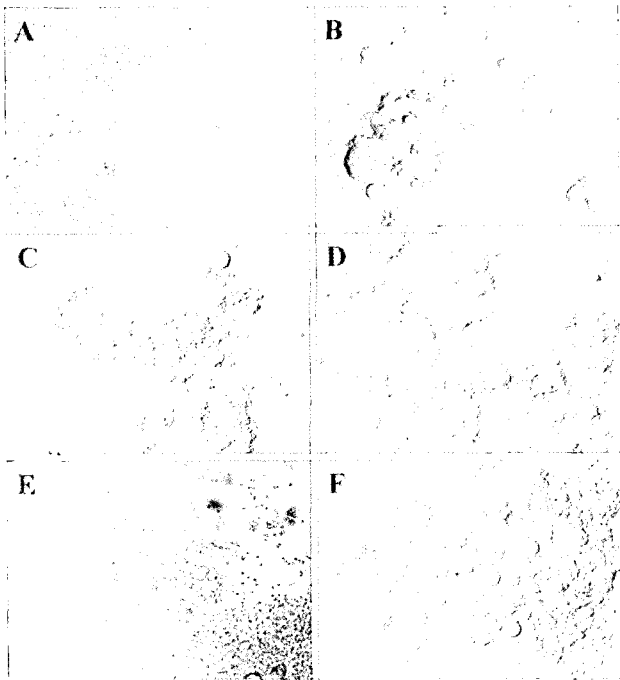


Fig. 3. Effect of BOX on the viability of mouse ovulated oocyte-cumulus complex. The complexes were cultured for 24 h(A, C, E) or 72 h(B, D, F) in the presence of hFF(A, B), BOX(C, D) or both(E, F).

은 증식을 나타내는 징후는 전혀 보이지 않았다. 72시간 후에는 대부분의 세포들이 난자와 분리된 채 덩어리를 이루며 배양접시의 바닥에 부착한 세포는 전혀 관찰되지 않았다. 한편 난포액과 조직추출액을 함께 첨가한 배양액에서 배양된 난구세포들은 24시간이 경과하였을 때에 일부 세포들이 난자로부터 떨어져 나왔으나 덩어리를 이룬 세포들도 없었고 바닥에 붙은 세포도 관찰되지 않았다. 그러나 72시간이 지났을 때에는 모든 난구세포들이 서로 뭉쳐서 검은색의 세포 덩어리를 형성한 것이 관찰되었다(Fig. 3E, F).

4. 소의 수란관 조직추출액이 난구세포의 배양에 미치는 영향

소의 수란관 조직추출액에 의한 생쥐 난구세포의 퇴화 현상의 원인을 알아보기 위하여 먼저 배란된 난자-난구세포로부터 난구세포만을 분리하여 난포액이 첨가된 배양액에서 24시간 동안 배양하여 배양접시의 바닥에 부착시켰다. 그런 후 난포액과 조직추출액이 같이 들어 있는 배양액으로 6시간 및 24시간 동안 배양하였다. 그 결과 Fig. 4A와 B에 나타난 바와 같이 난포액만 처리한 난구세포들은 거의 모든 세포들이 둥근 형태의 정상적인 핵형을 보였으나 조직추출액을 처

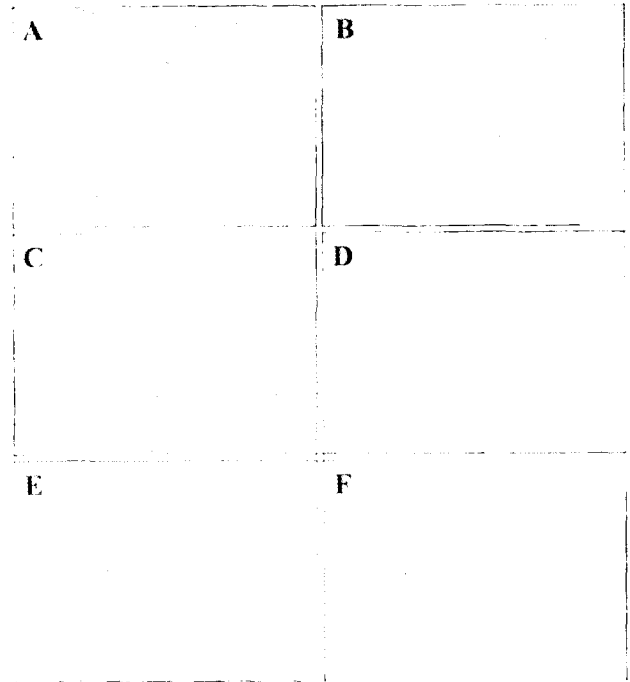


Fig. 4. Effect of BOX on the viability of mouse cumulus cells during culture *in vitro*. Cumulus cells were isolated from the ovulated oocyte-cumulus cell complex at 15 h post hCG and then cultured for 24 h in the presence of either hFF alone(A, $\times 200$; B, $\times 400$), or for additional 6 h(C, $\times 200$; D, $\times 400$) or 24 h(E, $\times 200$; F, $\times 400$) in the presence of both hFF and BOX.

리한 난구세포들은 처리 후 6시간만에 일부 세포의 크기가 수축하면서 검은색으로 변하였으며(Fig. 4C, D), 24시간 후에는 대부분의 난구세포들이 심하게 수축된 형태를 보이면서 퇴화하였다(Fig. 4E, F).

이러한 세포의 죽음이 세포자연사에 의한 것인지를 알아보기 위하여 먼저 DAPI로 핵을 염색한 후 모양을 조사하였다. 난포액 처리군의 난구세포들은 배양 후 24시간까지 거의 모든 세포의 핵이 둥글고 골고루 염색된 정상적인 핵형을 나타내었다(Fig. 5A, C). 그러나 조직추출액 처리군의 난구세포들은 비정상적으로 응축된 핵형을 나타내었으며, 일부 세포들은 세포자연사의 특징인 분절화된 핵을 보여 주었다(Fig. 5B, D, E).

다음으로 TUNEL 방법을 이용하여 염색한 결과, Fig. 5의 F와 H에서 보는 것처럼 난포액 처리군에서는 염색된 세포들이 거의 없었으나 조직추출액 처리군에서는 Fig. 5의 G, I, J에서 보는 것처럼 많은 세포들이 노란색으로 염색되는 것을 관찰할 수 있었다. 세포자연사를 일으킨 생쥐의 난구세포를 정량한 결과, 난포액 처리군에서는 세포자연사가 일어난 난

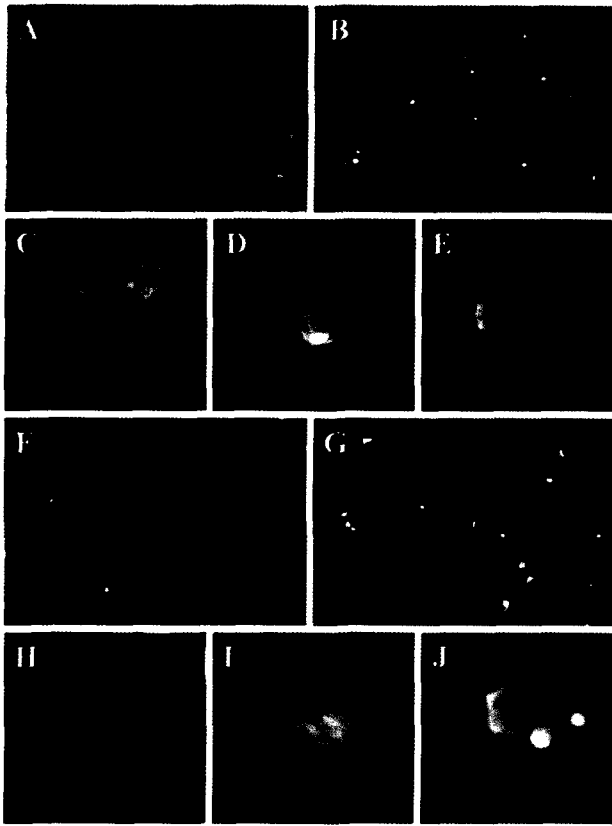


Fig. 5. Nuclear morphology of mouse cumulus cells cultured in the presence or absence of BOX. Cumulus cells were isolated from the ovulated oocyte-cumulus cell complex at 15 h post hCG and then cultured for 24 h in the presence of either hFF alone(A, C, F and H) or for additional 6 h in the presence of both hFF and BOX(B, D, E, G, I and J). After culture, cells were stained with 1 μ g/ml of DAPI(A to E) to visualize their nucleus or analysed by TUNEL method(F to J). A, B, F, G, $\times 200$; C, D, E, H, I, J, $\times 400$.

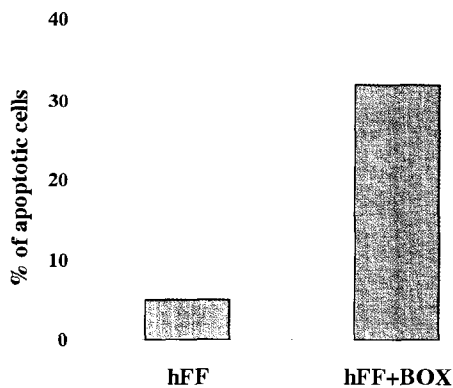


Fig. 6. Effect of BOX on the apoptosis of mouse cumulus cells. After culture, cells were labeled for TUNEL analysis and the number of labeled cells, i.e., apoptotic cells are shown as the percentage of total cells.

구세포가 5% 이었으나, 조직추출액 처리군에서는 처리 후 6 시간만에 32%의 세포가 세포자연사를 진행하는 것이 관찰되었다(Fig. 6).

고 찰

본 연구는 포유동물의 수란관이란 환경이 난자 및 난구세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 소의 수란관으로부터 조직추출액을 얻어 이것이 생쥐의 미성숙난자의 성숙에 미치는 영향과 배란 전후의 난구세포에 미치는 영향을 조사하였다.

본 연구의 결과 소의 수란관 조직추출액은 생쥐의 미성숙난자의 체외성숙에는 전혀 영향을 나타내지 않았다. 대부분의 포유동물의 난자는 수란관 내로 배란되는 즉시 수정이 일어나지만 사람 등에서 보는 바와 같이 배란이 일어난 후 상당한 시간이 경과한 후에 수정이 일어날 수도 있다(Hunter, 1987). 이때 난자는 수란관 내에서 제 2감수분열 중기 상태에 머무르며 수정능력을 유지하는데 이 같은 사실은 수란관이란 환경이 난자의 수정 및 발생능력에는 영향을 주지 않는다는 것을 의미한다. 나아가서 소의 수란관의 조직추출액이 생쥐의 미성숙난자의 성숙에도 영향을 미치지 않는다는 사실은 수란관이란 환경은 수정을 위한 난자의 활성 유지에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다.

한편 난포로부터 난자가 배란될 때에는 난자 뿐만 아니라 난자를 둘러싸고 있는 난구세포도 수란관 내로 들어가게 된다(Tanghe et al., 2002). 배란시 난자와 함께 수란관으로 들어가는 난구세포는 난자와는 달리 수란관 내에서 제거되는데 생쥐의 경우 배란 후 2일 이상이 지나면 수란관내에는 미수정 혹은 수정란만이 남고 난구세포는 발견되지 않는다. 이러한 사실은 함께 배란된 난자의 수정 여부와 상관없이 난구세포들이 선택적으로 퇴화한다는 사실을 의미한다. 그러나 아직까지 포유동물의 수란관이란 환경이 난구세포를 제거하는 기작에 관한 정보는 거의 알려지지 않고 있다. 다만 수란관의 내액이 수란관 조직세포가 분비한 물질과 배란될 때 들어온 난포액 성분(Hunter, 1988) 들로 구성된다는 점에 비추어 볼 때, 수란관 내의 난구세포의 선택적인 퇴화는 이들 물질들에 의해 결정되는 것으로 믿어진다.

본 연구의 결과 소의 수란관 조직의 추출액이 들어있는 배지에서 배양된 난구세포는 48시간이 경과하였을 때에도 배양접시의 바닥에 전혀 붙지 못하였으며 72시간 이내에는 대부분 죽는 것이 관찰되었다. 소의 난포 과립세포는 배양액 내에 혈청성분이 없으면 세포자연사를 진행한다(Hu et al., 2001). 이런 점에서 볼 때에 난포로부터 배란이 된 난구세포

는 수란관 내에서 난포액 혹은 혈청의 양이 제한되어 세포자 연사를 일으킬 수도 있다. 그러나 본 실험에서 소의 수란관 조직추출액을 난포액과 함께 난구세포의 배양액에 처리하였 음에도 불구하고 세포가 죽는 것으로 보아 난구세포의 죽음 은 혈청 성분의 결핍에 의한 것이 아니라 수란관 요인에 의 한 죽음으로 판단된다. 생쥐 초기 배아를 재료로 한 실험 결 과, 소의 수란관 조직추출액이 배아의 생존에 심각한 손상을 준다는 사실은 이미 알려진 바 있다(Lee et al., 1998). 난관수 중을 나타내는 사람의 난관으로부터 채취한 hydrosalpinx fluid는 그 성분이 정상 난관의 내액과 거의 유사하다 (Strandell, 2000). 그럼에도 불구하고 이 난관 수중액은 체외 배양 중인 생쥐의 배아에 대해서 독성을 나타낸다(Mukherjee et al., 1996; Beyler et al., 1997; Koong et al., 1998; Strandell, 2002). 체내에서는 수란관이 수정란의 발생에 가장 적합한 환경을 제공한다는 점에서 볼 때, 이러한 연구 결과들은 아 마도 수란관액의 성분 중 일부가 체외에 노출됨으로 인해 독 성을 나타내게 되는 것으로 추측된다.

세포에 내재된 기작을 발동시켜 자살로 유도하는 세포자 연사는 포유류의 생식기관의 발생과 분화, 생리주기에 따른 자궁내막의 변화, 난소내 난포의 퇴화 등을 초래하여 조직의 분화와 재구성을 가능하게 한다. 일반적인 세포괴사와는 달 리 세포자연사를 진행하는 세포들은 공통적으로 핵의 응축, DNA 분절화, 원형질막의 blebbing 등의 특징을 나타낸다 (Gruslin et al., 2001). 본 연구에서 소의 수란관 조직추출액에 의해 죽어가는 난구세포들의 핵을 DAPI로 염색한 결과 이들 난구세포의 핵은 세포자연사에서 관찰되는 것과 유사한 응 축현상을 보여 주었으며, 특히 일부 세포의 핵은 응축된 핵 의 분절화 현상도 나타내었다. 또한 TUNEL 방법을 이용하여 난구세포의 세포사를 조사한 결과 세포자연사의 특징을 뚜 렷하게 나타내었다. 이러한 결과들로 미루어 소의 수란관 조 직추출액에 의한 생쥐 난구세포의 죽음은 세포자연사에 의 한 것으로 여겨지며 수란관내에는 난구세포의 세포자연사를 유도하는 특정 요인이 있을 것으로 사료된다. 이와 관련하여 사람의 난구세포에는 Fas, FasL, Bcl-xl, TIAR 등 세포자연사 와 관련된 여러 종류의 단백질들이 발현되는 것이 관찰된 바 있고(Moffatt et al., 2002) 또한 사람의 난포액내에도 Fas-FasL 이 존재하는 것이 발견되고 있다(Jose de los Santos et al., 2000). 흰쥐를 재료로 한 근래의 연구에 의하면 난구세포는 수란관내로 배란된 후 5시간 내에 이미 일부 세포가 세포자 연사의 특징을 나타내기 시작하며 18시간이 경과하면 거의 모든 세포가 그리고 35시간이 경과하면 대부분의 난구세포 들은 이미 퇴화하고 일부만이 수정란으로부터 분리된 채로

난관의 팽대부에 남아 있게 된다(Szoltys et al., 2000). 이로 미 루어 포유동물의 수란관 내로 배란된 난구세포는 궁극적으 로 세포자연사에 의해 제거되며, 같이 배란된 난자는 이와는 다른 기작에 의해 사라지는 것으로 추측된다. 구체적으로 수 란관 내에서 일어나는 난구세포의 세포자연사가 유도물질에 의해서 일어나는 지의 여부는 앞으로 더 연구되어야 할 과 제이다.

인용문헌

- Abe H, Onodera M, Sugawara S, Satoh T, Hoshi H (1999) Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *J Anat* 195:515-521.
- Abughrien BM, Dore MA (2000) Ciliogenesis in the uterine tube of control and superovulated heifers. *Cells Tissues Organs* 166:338-348.
- Beyler SA, James KP, Fritz MA, Meyer WR (1997) Hydrosalpingeal fluid inhibits *in-vitro* embryonic development in a murine model. *Hum Reprod* 12:2724-2728.
- Ellington JE, Farrel PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE, Mcgrath AB (1990) Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2-cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 85:715-720.
- Gandolfi F, Moor RM (1987) Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 81:23-28.
- Gruslin A, Qiu Q, Tsang BK (2001) X-Linked inhibitor of apoptosis protein expression and the regulation of apoptosis during human placental development. *Biol Reprod* 64:1264-1272.
- Jose de los Santos M, Anderson DJ, Racowsky C, Hill JA (2000) Presence of Fas-Fas ligand system and bcl-2 gene products in cells and fluids from gonadotropin-stimulated human ovaries. *Biol Reprod* 63:1811-1816.
- Hu C-L, Cowan RG, Harman RM, Porter DA, Quirk SM (2001) Apoptosis of bovine granulosa cells after serum withdrawal is mediated by fas antigen(CD95) and fas ligand. *Biol Reprod* 64:518-526.
- Hunter RH (1987) Human fertilization *in vivo*, with special reference to progression, storage and release of competent

- spermatozoa. *Hum Reprod* 2:329-332.
- Hunter RH (1988) The fallopian tubes; their role in fertility and infertility. Springer-Verlag, New York, pp 53-80.
- Kato Y, Yabuuchi A, Motosugi N, Kato JY, Tsunoda Y (1999) Developmental potential of mouse follicular epithelial cells and cumulus cells after nuclear transfer. *Biol Reprod* 61: 1110-1114.
- Killian GJ, Chapman DA, Kavanaugh JF, Deaver DR, Wiggin HB (1989) Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 86:419-426.
- Koong MK, Jun JH, Song SJ, Lee HJ, Song IO, Kang IS (1998) A second look at the embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid: an *in-vitro* assessment in a murine model. *Hum Reprod* 13:2852-2856.
- Kouba AJ, Burkhardt BR, Alvarez IM, Goodenow MM, Buhi WC (2000) Oviductal plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): mRNA, protein, and hormonal regulation during the estrous cycle and early pregnancy in the pig. *Mol Reprod Dev* 56:378-386.
- Lee Y, Kim H, Kim MK (1998) *In vitro* toxicity of bovine oviductal fluid to the mouse embryos. *Dev Reprod* 2:29-38.
- Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ (2001) Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* 121:339-346.
- Moffatt O, Drury S, Tomlinson M, Afnan M, Sakkas D (2002) The apoptotic profile of human cumulus cells changes with patient age and after exposure to sperm but not in relation to oocyte maturity. *Fertil Steril* 77:1006-1011.
- Mukherjee T, Copperman AB, McCaffrey C, Cook CA, Bustillo M, Obasaju MF (1996) Hydrosalpinx fluid has embryotoxic effects on murine embryogenesis: a case for prophylactic salpingectomy. *Fertil Steril* 66:851-853.
- Sakkas D, Trounson AO (1990) Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. *J Biol Chem* 258:13243-13249.
- Shirley B, Reeder RL (1996) Cyclic changes in the ampulla of the rat oviduct. *J Exp Zool* 276:164-173.
- Spearow JL, Nutson PA, Mailliard WS, Porter M, Barkley M (1999) Mapping genes that control hormone-induced ovulation rate in mice. *Biol Reprod* 61:857-872.
- Strandell A (2000) The influence of hydrosalpinx on IVF and embryo transfer: a review. *Hum Reprod* 6:387-395.
- Strandell A, Lindhard A (2002) Why does hydrosalpinx reduce fertility? The importance of hydrosalpinx fluid. *Hum Reprod* 17:1141-1145.
- Szoltys M, Tabarowski Z, Pawlik A (2000) Apoptosis of postovulatory cumulus granulosa cells of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 202:523-529.
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A (2002) Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61:414-424.
- White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DL Jr, Wood TC (1989) Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol Reprod* 41:425-430.
- Whittingham DG (1968) Development of zygotes in cultured mouse oviducts. I. The effect of varying oviductal conditions. *J Exp Zool* 169:391-397.