

Vero Cell과의 공동배양이 체외에서 생쥐 난자성숙과 배아발생에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생리학교실
강 혜 나 · 하 중 식

= Abstract =

The Effects of Vero Cell Coculture on Mouse Oocyte Maturation and Embryo Development in Vitro

Hye Na Kang · Jong-Sik Hah

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

Assisted reproductive technology(ART) have contributed significantly to alleviating subfertility in the childless couple. In spite of the many advances in the field of ART, the pregnancy and take-home baby rates for in vitro fertilization(IVF) have been very poor. In order to overcome these problems, a variety of coculture systems has been devised. Vero cells, derived from African green monkey kidney, were selected because kidney and genital tract have a common embryonic origin. In addition, these cells are safe for coculture with embryos : they are highly controlled for viruses and other contaminants because they are used for vaccine production. Several investigators showed that coculturing human embryos with Vero cells in vitro resulted in an improvement of embryo development. However, they did not observe the same results using mouse oocytes and embryos. We thus designed a series of experiments to demonstrate whether or not Vero cells do indeed enhance mouse oocyte maturation and embryo development. In this experiment, Vero cell does not allow the mouse immature oocytes to be enhanced maturation rate in vitro.

To study the 'In-Vitro 2-cell Block' in mouse embryo, we have cocultured ICR one-cell mouse embryos with Vero cell in different medium. In Ham's F-10 the mouse embryos arrested their development prior to 4-cell stage(control 76.7% ; coculture 75.0%). In contrast, the coculturing mouse embryos revealed enhanced development(control 0% ; coculture 22.8%) in human tubal fluid(HTF) only in late embryonic stages(hatching).

On the other hand, the degree of blastomere fragmentation exhibited a reverse trend to that of the developmental capacity. Embryos from coculture groups(Ham's F-10 & HTF) showed some fragmentation(0% & 4.2%) while 13.3% and 14.3% of the embryos in control groups (Ham's F-10 & HTF) were severely fragmented($P < 0.05$). Thus the use of coculture systems appears to be dependent on the type of medium used as a support.

The development rate of late 2-cell mouse embryos in Vero cell coculture was no significant

differences until blastocyst stage but improved at late developmental stage(control 42.1% ; coculture 70.7%). Thus the Vero cell coculture system was shown to increase the hatching rate of mouse embryos.

KEY WORDS : Vero cell · Coculture · In-vitro · 2-cell block.

서 론

1978년 첫 IVF가 성공한 이후 assisted reproductive technology(ART)분야는 gamete intra fallopian transfer(GIFT), tubal embryo transfer(TET)¹⁾등에서 microinsemination-sperm transfer²⁾에 이르기까지 여러가지 IVF 방법의 시도로 그 성공률을 높이려 하였다. 그러나 이러한 노력에도 불구하고 IVF에서의 임신률과 출산률은 각각 15~20%와 10% 이하로 매우 낮다³⁾. IVF program에서의 낮은 성공률은 여러가지로 설명될 수 있겠으나 그 중에서도 수정란의 체외 배양동안 일어나는 세포 분열 정지와 생존률(viability)의 감소는 가장 중요한 원인이다⁴⁾. 이러한 stage-specific cell block으로 인한 세포 분열 정지와 배아의 생존률 감소는 배아 이식(embryo transfer)전 체외 배양 시간에 크게 영향을 받을 수 있으므로 인위적으로 배양시간을 제한하게 되었다^{5,6)}. 즉 오랜 배양으로 인한 배아의 생존률 감소를 피하기 위해 체외 수정후 발생 4~8세포기에 자궁에 이식해 주는 것이다. 자연 임신의 경우 4~8세포기의 배아는 수란관에 위치하여 포배기에 이르기까지 70~75시간을 더 발생한 후 자궁으로 이동하여 20~24시간 뒤 착상하게 된다. 이와 비교할 때 IVF program에서의 4~8세포기 배아의 자궁 이식은 착상전 90~99시간 동안 자궁환경에 배아가 계속 노출됨으로써 배아와 자궁사이 이질성(asynchrony)이 생겨 배아의 퇴화와 착상률 감소를 일으키게 된다^{6,7)}.

이러한 문제의 해결을 위해 다양한 공동배양(coculture) system이 고안되어 배아를 자궁 이식 전에 좀더 오랫동안 체외에서 발생시킬 수 있게 되었다. 사용되는 공동배양 system의 type에는 trophoblastic vesicle과 cellular monolayer 두 가지가 있는데 이 중 후자가 더욱 널리 사용되고 있다. 여기에 사용되는 세포는 자궁세포⁸⁾, 난관세포⁹⁾, Vero cell⁷⁾등이 있는데 이들은 종(species), 기관(organ), 호르몬에 특이성(specificity)이 없는 것이 특징이다. 이중 Vero cell은 아프리카 초록원

숭이 신장세포(African green monkey kidney cell)로서 생식수관과 발생학적 기원이 같으며 초기 배아 발생을 위한 배양액에서 쉽게 증식되며 오랫동안 vaccine 생산에 사용되어 왔으므로 virus나 기타 오염으로부터 안전하게 사용할 수 있는 장점을 가지고 있다¹⁰⁾. 현재까지 알려진 공동 배양의 영향은 다음 여섯가지로 요약될 수 있다. 첫째, 난자의 성숙을 유도하고 둘째, 정자의 생존률 향상과 과활성화 유도로 수정률을 높이고^{11,12)} 셋째, 초기 수정란의 질(quality)을 향상시키고 넷째, 포배까지의 발생률을 증가시키고 다섯째, 임신률과 착상률을 향상시키고 여섯째, 배아의 냉동-해동 과정에서 그 성공률을 높인다^{3,4,13)}.

본 실험은 Vero cell과 ICR계 생쥐의 미성숙 난자, 수정된 1-세포기와 후기 2-세포기 배아를 각각 공동배양하여 난자의 성숙과정과 수정란의 세포분열 정지 및 발생에 미치는 공동배양의 영향을 알아보고 앞으로 이를 인간에 적용하여 IVF program에서 임신 성공률을 높이기 위하여 실시하였다.

대상 및 방법

1. Vero cell monolayer의 준비

냉동된 Vero cell vial을 37℃ 수조에서 녹였다. 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Ham's F-10으로 세척한 후 $2-3 \times 10^6$ cells을 tissue culture flask(75 cm², Falcon, Becton, Dickinson, CA, USA)에 넣어 37℃에서 5% CO₂+95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 4~5일 후 증식된 세포들(8×10^6 cells)을 0.05% trypsin/0.02% ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)로 trypsinization시켜 4well-multidish에 다시 1×10^5 cells/well의 농도로 배양하였으며, monolayer가 형성되면 2일 간격으로 배양액을 교체하였다(Fig. 1).

한편 Vero cell의 증식을 위한 계대 배양(subculture)에서 실험에 사용하는 Vero cell은 4계대를 넘지 않도록

하였고, 보존을 위한 동결의 방법은 Fig. 2와 같이 하였다¹⁴⁾.

2. 실험 동물 및 난자와 배아의 준비

본 실험에서는 명 14시간, 암 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육한 생쥐 Swiss Albino인 ICR계통의 5~6주된 암컷을 사용하였다.

1) 미성숙난자(Oocyte with germinal vesicle ; GV oocyte)

생쥐를 경추골 파열로 도살후 난소를 적출하여 성장한 여포를 예리한 바늘로 터뜨려 난자를 여포로부터 분리하여 실험에 사용하였다. 분리된 난자의 난구세포는 micropipette을 이용하여 제거하였으며 해부현미경하에서 난구세포가 제거된 정상 미성숙 난자(nude & denuded GV oocyte)만을 수집하여 사용하였다.

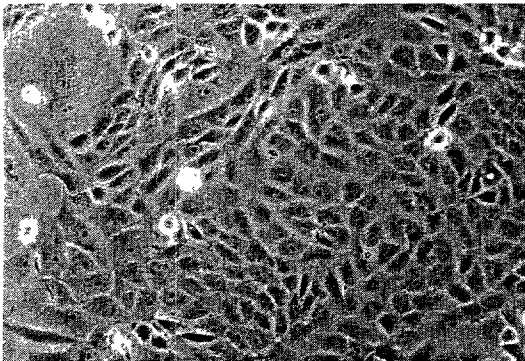


Fig. 1. Microphotograph of Vero cell monolayer(X100).

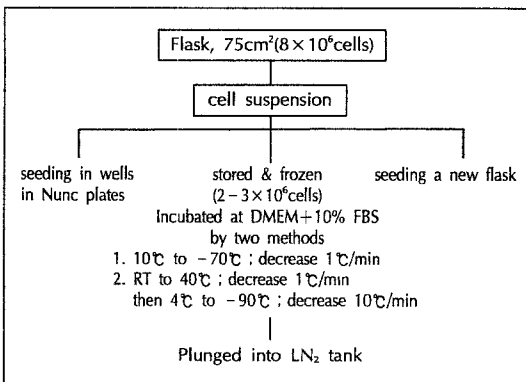


Fig. 2. Diagram of the procedure for maintenance of Vero cells for the coculture programme.

2) 1-세포기와 후기 2-세포기 배아(1-cell & late 2-cell stage embryo)

Pregnant mares' serum gonadotropin(PMSG, Sigma, St. Louis, USA) 5 IU를 암컷에 복강주사하고 48시간 후 5 IU hCG를 주사하여 과배란(superovulation)을 유도한 후 수컷과 교배시켰다. 다음날 아침 질전(vaginal plug)이 관찰된 암컷을 골라 hCG 주사 후 28시간에 1-세포기 배아를, 주사 후 50시간에 후기 2-세포기 배아를 수란관으로부터 얻었다.

3. 배양액과 공동배양의 준비

Ham's F-10+10% FBS를 기본배양액으로 하여 실험 26시간 전에 Vero cell을 10⁴cells/well로 4well dish에 깔고 24시간 후 monolayer가 형성되면 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척한 후 다시 배양액을 넣어 2시간 전배양(preincubation)한 후 난자나 배아를 넣어 그 성숙률과 발생률을 관찰하였다.

단, 1-세포기 배아의 공동배양 중 배양액 비교를 위해 human tubal fluid(HTF)를 배양액으로 사용한 경우는 실험 72시간 전에 Vero cell을 10⁵cells/well로 4well dish에 깔고 Ham's F-10+10%FBS와 HTF+bovine serum albumin(BSA ; 4mg/ml)를 1 : 1비율로 섞은 혼합 배양액에서 24시간 적응시킨 후 HTF+BSA(4mg/ml)로 배양액을 교체하여 48시간 더 배양하고 그 뒤 배아를 넣어 공동배양하였다¹⁵⁾. 한편 HTF배양액은 101.60mM NaCl, 4.69mM KCl, 0.37mM KH₂PO₄, 2.02mM CaCl₂·2H₂O, 0.20mM MgSO₄·7H₂O, 25.00mM NaHCO₃, 0.33mM NaPyruvate, 21.40mM NaLactate, 2.78mM glucose로 제조하여 사용하였다.

Ham's F-10에서 Vero cell은 계속 증식되어 overgrowth로 인한 배양액의 산성화와 배아의 metabolic shock를 야기할 수 있으므로 적은 농도(10⁴cells/well)로, 그리고 HTF에서 Vero cell은 적응후 계속 일정 농도를 유지하므로 Ham's F-10보다 높은 농도(10⁵cells/well)로 실험전 monolayer 형성을 위해 각각 dish에 깔았다.

모든 실험에서의 대조군은 Vero cell 없이 배양액만으로 배아를 배양한 군으로하여 공동배양한 실험군과 성숙률 및 발생률 비교에 사용되었다.

4. 통계처리

실험결과와 통계학적 유의성은 χ^2 -test방법을 사용하여

P값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. Vero cell과의 공동배양이 체외 난자 성숙률에 미치는 영향

생쥐 미성숙 난자의 체외 성숙시에 Vero cell과의 공동 배양이 그 성숙률에 영향을 미치는지를 알아보기 위해 실험한 결과, 대조군(Ham's F-10+10%FBS)과 Vero cell과의 공동배양군의 생쥐 미성숙 난자의 성숙률은 각각 81.7%와 83.4%로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1).

2. Vero cell과의 공동배양이 1-세포기 배아의 발생률에 미치는 영향

ICR계 생쥐의 후기 2-세포기 배아를 체외에서 배양하면 포배기까지 완전한 발생이 일어나는데 1-세포기 배아를 체외에서 배양하면 제 1난할과 제 2난할 사이의 intermitotic period 동안 발생정지가 일어나 2-세포기에서 발생이 정지되는 현상이 나타난다. 이러한 'In Vitro 2-cell Block' 현상이 Vero cell과의 공동배양으로 극복될 수 있는지를 알아보기 위해 이 실험을 하였다. Table 2와 Table 3은 Ham's F-10과 HTF 두 가지의 서로 다른 배양액이 Vero cell과의 공동배양과 더불어 2-cell block 극복과 그 이후의 발달에 어떠한 영향을 주는가를 보여주고 있다.

1-세포기 배아를 각 배양액에서 48시간 배양하였을 때 Ham's F-10의 경우 대조군과 공동배양군간의 3-세포기 이상 발생률은 10.0%(6/60)와 59.8%(55/92)이고, HTF의 경우는 60.7%(34/56)와 79.2%(57/72)로 나타났다. 그러므로 3-세포기 이상의 발생률은 Ham's F-10과 HTF의 각 공동배양군에서 유의하게 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) 높게 나타났고 두 배양액의 경우를 비교할 때에는 HTF군에서 더욱 높게 나타났다.

Table 1. Maturation of mouse immature oocyte on Vero cell monolayer

Culture condition(n)	No of oocytes matured at each stage Mat(%)				
	GV	GB	MII	Deg	Mat
Control	109	5	14	89	81.7
Coculture	151	5	17	126	83.4

GV : germinal vesicle, GB : GV breakdown, MII : meta-phase II, Deg : degeneration Mat : maturation

한편 할구들의 질적인 불량도를 나타내는 세편화(fragmentation)는 대조군의 경우 Ham's F-10과 HTF 군에서 각각 13.3%(8/60)과 14.3%(8/56)이고 공동배양군의 경우는 Ham's F-10과 HTF군에서 0%와 4.2%(3/72)으로 나타나 대조군에서 유의하게 ($P < 0.05$) 높은 세편화를 나타냈다(Table 2).

그리고 각 군에서 3-세포기 이상의 발생을 보인 세포들을 배양 48시간에 골라 다시 72~96시간까지 배양하면 HTF에서의 배반포율은 대조군(35.3%)과 공동배양군(36.8%)이 유사하게 나타났으나 부화율(hatching rate)은 공동배양군(22.8%)이 유의하게 높게 나타났다(Table 3).

Table 2. Development of 1-cell stage embryos in each culture systems

Culture condition(n)	No of embryos developed at each stage(%)			
	1-cell	2-cell	3-8 cell	frag
Control				
Ham's F-10(60)		46 (76.7)	6 (10.0) ^a	8 (13.3) ^b
HTF (56)	2 (3.6)	12 (21.4)	34 (60.7) ^b	8 (14.3) ^b
Coculture**				
Ham's F-10(92)	6 (6.5)	31 (33.7)	*55 (59.8) ^a	0 (0) ^b
HTF (72)	2 (2.8)	10 (13.9)	57 (79.2) ^b	3 (4.2) ^b

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$

*Embryos arrested at 4-cell stage(38/55, 75.0%)

**Embryos were cultured on Vero cell monolayer frag : fragmentation

Table 3. Development of 3-8cell stage embryos for the last 24hours

Culture condition(n)	No of embryos at each stage(%)		
	morulae	blastocyst	hatching
Control			
Ham's F-10 (6)	4 (66.7)		
HTF (34)	8 (23.5)	12 (35.3)	0 (0) ^a
Coculture**			
Ham's F-10(55)	5 (9.1)		
HTF (57)	24 (43.6)	21 (36.8)	13 (22.8) ^a

^a $P < 0.05$

**Embryos were cultured on Vero cell monolayer

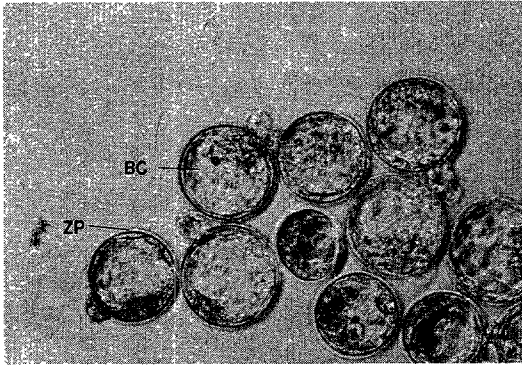


Fig. 3. Photograph of mouse late 2-cell embryos cocultured with Vero cell(X100).

Table 4. Development of late 2-cell stage embryos

Culture condition(n)	No of embryos at each stage(%)				
		Morulae	Blastocyst	Hatching	Frag
Control 105	88 (83.8)	70 (66.7)	52 (49.5) ^a	10 (9.50) ^b	
Coculture** 113	103 (91.2)	96 (85.0)	85 (75.2) ^a	2 (1.8) ^b	

^aP<0.05, ^bP<0.01

**Embryos were cultured on Vero cell monolayer

3. Vero cell과의 공동배양이 후기 2-세포기 배아의 발생률에 미치는 영향

생쥐 후기 2-세포기 배아 발달에 미치는 Vero cell의 영향을 조사한 결과 상실배(대조군 83.8% : 공동배양군 91.2%)와 배반포(대조군 66.7% : 공동배양군 85.0%)까지의 발생률에는 유의한 차이가 나타나지 않았으나 부화율에 있어서는 대조군 49.5% 및 공동배양군 75.2%로 커다란 차이를 보였다(P<0.05, Fig. 3). 그리고 세편화는 1-세포기 배아의 경우와 동일하게 대조군에서 유의하게(P<0.01) 높게 나타났다(Table 4).

그러므로 공동배양의 효과는 배발달 초기보다는 후기로 갈수록 그 효과가 크게 나타남을 알 수 있다.

고 찰

난자와 배아의 체외배양시 여러가지 효과를 나타내는 공동배양의 monolayer system 작용 기작은 다음 두 가지 중 하나로 설명될 수 있다⁴⁵⁾.

첫째, 배양액으로부터 중금속 2가 양이온이나 대사 억제제같은 유해물질을 제거하거나 둘째, 배아발생에 직접, 간접으로 영향을 주는 embryotrophic factor를 제

공하는 것이다.

체외에서 생쥐 미성숙 난자의 성숙이 일어날 때 공동배양이 그 성숙률을 높일 수 있는지를 알아본 결과 공동배양은 유의한 영향을 나타내지 않았다. 또 결과를 보이지는 않았으나 난구세포를 포함한 미성숙 난자의 체외 성숙이나 zona hardening assay를 통한 투명대의 경화현상에도 영향을 미치지 않았다. 그러므로 생쥐 미성숙 난자의 체외 성숙에서는 Vero cell과의 공동배양으로 유의한 효과를 기대할 수는 없을 것으로 생각된다.

ICR계 생쥐 1-세포기 배아의 체외 발생에, 공동배양과 배양액의 차이가 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 각기 Ham's F-10과 HTF배양액을 사용하여 발생률을 비교하였다. 3-세포기 이상의 발생률은 두 공동배양군(Ham's F-10, HTF)에서 모두 높았고, 공동배양군보다는 낮으나 HTF대조군에서도 발생률이 60.7%로 나타났다(Table 2). 그러나 더 오랜 시간 배양할 경우 HTF대조군은 배반포까지는 공동배양군과 비슷하게 발생하였으나 부화에서는 차이를 보였고(0%와 22.8%) Ham's F-10 공동배양군도 상실배 이상의 발생을 안보여 진정한 의미의 'In-Vitro 2-cell block' 현상의 극복은 HTF공동배양군에서만 일어남을 알 수 있었다(Table 3). 지금까지 배의 지놈(genome) 활성화와 관계되어 일어나는 'In-Vitro block' 현상이 공동배양에 의해 극복될 수 있음이 여러 종에서 실험되었다. Gandolfi와 Moor⁹⁾는 양의 경우 난관상피세포(oviduct epithelial cell)와의 공동배양으로 8~16 cell block이 극복됨을 보였고, Goodeux등¹⁰⁾은 원숭이 배아를, Ellington등¹⁷⁾은 1~2세포기 소의 배아를 공동배양하여 각 시기에서의 발생정지 현상을 공동배양으로 극복할 수 있음을 보였다. 그리고 생쥐의 'In-Vitro 2-cell block' 현상도 1990년 Ouhibi 등¹⁸⁾의 실험에서 여러 세포와의 공동배양으로 극복 가능함을 보여주고 있다. 그는 보고서에서 생쥐와 소의 oviduct cell monolayer와의 공동배양으로 각기 67%와 48%의 발생률을, 신장세포와의 공동배양에서는 소의 MDBK(Madin-Darby Bovine Kidney) cell 경우 74%의 발생률을 보여 2-세포기 정지현상 극복의 가능성을 나타냈다. 반면 아프리카 초록원숭이 신장세포인 Vero cell의 경우에는 8%의 발생률로 정지현상이 극복되지 못함을 보였다. 한편 1992년 Lai 등¹⁵⁾은 Vero cell과의 공동배양시 생쥐에서의 발생정지 현상을 다양한 배양액과 세포주(strain)에서 실험한 결과,

배양액 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)/F-12에서 ICR세포주는 앞의 Ouhibi등의 결과와 마찬가지로 정지현상을 극복하지 못했으나 CB6F1세포주와 DF1세포주는 대조군과 유의한 차이를 보이며 상실패로 발생하였다. 그리고 배양액 HTF에서는 ICR, CB6F1, DF1 세 세포주 모두 배반포까지의 발생률은 대조군과 유사하나 부화율에서 유의한 차이를 보였다. 이는 앞의 실험 결과(Table 2와 Table 3)에서 보는 바와 같이 Ham's F-10의 경우 대조군과 공동배양군 모두에서 4-세포기 이전에서 거의 모두 발생이 정지되었고(76.7%와 75.0%) HTF의 경우 배반포까지의 발생률은 차이가 없다가 부화율에서 공동배양군이 유의한 차이를 나타내는 것과 그 결과가 일치함을 알 수 있다. 그러므로 공동배양을 통한 체외 발생정지현상의 극복을 위해서는 공동배양 세포의 종류 선택과 더불어 배양을 위한 적절한 배양액 선택이 무엇보다 중요할 것으로 사료된다⁴⁾¹⁹⁾. 한편 배양액 DMEM/F-12에서 공동배양시 CB6F1세포주와 DF1세포주는, 배양액 HTF 경우 초기발생률이 대조군과 차이가 없었던 것과는 달리 공동배양군에서 유의한 차이를 보이며 그 효과를 나타냈다. 이것은 배양액 DMEM/F-12가 HTF보다 배아 발생에 적합하지 않음에 착안할 때 Vero cell이 배양액 DMEM/F-12 내에 존재하는 배아 발생에 해로운 어떤 물질을 제거한 것으로 생각된다. 그리고 역시 그들의 실험 결과중 cell-conditioned medium에서는 배아 발생률 증가가 나타나지 않았고, 배아 발생에 해롭지 않은 HTF배양액에서의 초기발달에 공동배양이 효과가 없는 것으로 볼때 Vero cell은 embryotrophic factor의 분비보다는 배양액내 대사억제제 제거에 의해 공동배양 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 배양액 Ham's F-10은 HTF와 그 성분을 비교할 때 중금속 이온, 아미노산, 비타민, hypoxanthine등이 더 첨가되어 있는데 그 중 hypoxanthine은 'In-Vitro 2-cell Block'을 야기하는 주요 원인이 될 수 있다. Loutradis등²⁰⁾에 따르면 Ham's F-10 배양액에서 나타나는 생쥐 배아의 발생 정지 현상의 원인은 hypoxanthine에 있으며 이는 BWW배양액에서 30 μ M의 hypoxanthine의 처리로 정지 현상이 없는 생쥐에서 정지 현상이 유도되고 이를 제거하면 발생이 유도되는 것으로 입증되었다. 이 현상은 xanthine oxidase pathway에 의해 hypoxanthine이 uric acid로 전환되고 이때 uric acid가 배아에 해로운 물질로서 배아 발생을 저

해하거나 또는 hypoxanthine이 phosphodiesterase의 작용을 저해함으로써 cAMP의 증가로 발생이 저해되기 때문에 일어난다고 볼 수 있다. 그러므로 Lai등¹⁵⁾이 CB6F1세포주와 DF1세포주 배아를 DMEM/F-12 배양액에서 Vero cell과 공동 배양했을 때 초기 발생률이 대조군과 비교하여 증가된 원인 또한 Vero cell이 DMEM/F-12 내 hypoxanthine을 제거하였기 때문인 것으로 추정된다. 그러나 ICR세포주 배아의 경우에는 이러한 결과가 나오지 않고 이전(2~6 cell)에 발생이 정지된 것으로 보아 세포주의 차이 또한 관계가 있는 것으로 생각된다. 그리고 본 실험에서 배아의 질적 불량도를 나타내는 세편화(fragmentation)는 고도의 유의성을 보이며 대조군에서 높게 나타났는데 이는 인체 난관세포²¹⁾와 Vero cell⁷⁾을 이용한 인간 배아의 공동배양 결과와도 일치하는 것으로 세편화의 원인을 외부환경에 대한 stress라고 볼때 공동배양이 환경과 배아 사이에서 간접적으로 작용하여 배아의 stress에 대한 민감도를 어느 정도 낮춘 것으로 추정된다.

생쥐 후기 2-세포기의 발생에서의 공동배양은 배발달 초기보다 후기로 갈수록 그 효과가 크게 나타났는데 이 작용 기작은 몇 가지로 추측이 가능하다. 즉 공동배양 세포군이 후기 발생시기에 배양액성분의 분해로 생긴 독소 성분을 배양액에서 제거하고 단백질 분해효소 즉 chymotrypsin등을 분비하여 펩타이드성분의 배양액내 억제물질을 파괴함으로써 생쥐배아의 부화를 유도¹⁵⁾하거나 또는 난관세포와의 공동배양에서처럼 배양액내 산소농도 감소($P < 0.005$)와 관계되어 일어날 것이다²²⁾.

1994년 Watson등²³⁾에 따르면 모든 포유류 세포들은 산화-환원 반응(oxidative/reduction reaction)의 산물인 활성 산소(superoxide radical, hydrogen peroxide)에 의해 상해를 받을 수 있다고 하였다. 즉, 활성 산소가 다당류나 막지질(membrane lipid)과 반응하여 효소 불활성화와 지질 과산화작용(lipid peroxidation)을 야기함으로써 세포에 상해를 일으킬 수 있는 것이다. 한편 이러한 상해는 superoxide dismutase(SOD)에 의한 superoxide free radical의 dismutation에 의해 일부 상쇄될 수 있는데 토끼의 난관액 내에서 이 SOD 활성도가 측정되는 것으로 보아 난관 세포들이 free oxygen radical 형성에 의한 상해의 영향을 최소화하여 착상전 배아발생을 도울 수 있을 것으로 추정된다. 그리고 소의 경우 95% 공기가 공급되는 배양기에서

난관상피세포와 공동배양한 배아군과, 5%로 산소농도를 낮추어 공동배양하지 않고 배아만을 단독배양한 군과 포배형성률이 유사한 것은 공동배양시 난관세포들이 산화 피해를 어느 정도 상쇄시킬 수 있다는 또 다른 증거가 될 수도 있다.

실험 결과 Vero cell과의 공동배양은 생쥐 미성숙 난자의 체외 성숙시 그 성숙률에는 무관하며 HTF배양액에서 'In-Vitro 2-cell block' 현상을 어느정도 극복시킬 수 있으며 후기 2-세포기 배아의 부화율을 높여줄 수 있는 것으로 나타났다. 그러므로 앞으로 인간에 적용하기 위해, 공동배양시 작용할 것으로 추측되는 embryotrophic factor나 growth factor 또는 배양시 제거되는 배양액내 발생저해물질(inhibitory substance)등에 관한 분자수준의 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

References

- 1) Balmaceda JP, Alam V, Roszjtein D, Ord T, Snell K, Asch RH : *Embryo implantation rates in oocyte donation : A prospective comparison of tubal versus uterine transfer. Fertil Steril 1992 ; 573 : 362*
- 2) Malter HE, Cohen J : *Partial zona dissection of the human oocyte : A nontraumatic method using micro-manipulation to assist zona pellucida penetration. Fertil Steril 1989 ; 51 : 139-148*
- 3) Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S : *Coculture : A new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil Steril 1991 ; 56 : 179-191*
- 4) Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E : *Vero cell effect on in-vitro human blastocyst development : Preliminary results. Hum Reprod 1994 ; 9 : 1131-1135*
- 5) Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S : *The search for improved in-vitro systems should not be ignored : Embryo co-culture may be one of them. Hum Reprod 1993 ; 8 : 1155-1162*
- 6) Bongso A, Ng SC, Ratnam S : *Coculture : Their relevance to assisted reproduction. Hum Reprod 1990 ; 5 : 893-900*
- 7) Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC : *Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. Biol Reprod 1990 ; 42 : 301-306*
- 8) Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA : *Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts : Embryonic morphology and implantation. Fertil Steril 1989 ; 52 : 503-508*
- 9) Gandolfi F, Moor RM : *Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J Reprod Fert 1987 ; 81 : 23-28*
- 10) Pearlstone AC, Chan SYW, Tucker MJ, Wiker SR, Wang C : *The effects of Vero(Green monkey kidney) cell coculture on the motility patterns of cryopreserved human spermatozoa. Fertil Steril 1993 ; 59 : 1105-1111*
- 11) Wetzels AMM, Bastiaans BA, Goverde HJM, Janssen HJG, Rolland R : *Vero cells stimulate human sperm motility in vitro. Fertil Steril 1991 ; 56 : 535-539*
- 12) Chen HF, Ho HN, Chen SU, Lien YR, Chao KH, Lin HR, Huang SC, Lee TY, Yang YS : *Coculture with Vero cell monolayer maintains the motility of asthenozoospermic semen samples. Hum Reprod 1994 ; 9 : 1276-1280*
- 13) Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S : *Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. Fertil Steril 1992 ; 58 : 569-574*
- 14) Menezo Y, Hazout A, Dumout M, Herbaut N, Nicollet B : *Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. Hum Reprod 1992 ; 7 : 101-106*
- 15) Lai YM, Stein DE, Soong YK, Tang YX, Grifo J, Malter HE, Talansky BE, Cohen J, Liu HC, Rosenwaks Z : *Evaluation of Vero cell coculture system for mouse embryos in various media. Hum Reprod 1992 ; 7 : 276-280*
- 16) Goodeaux LL, Voelkel SA, Anzalone CA, Menezo Y, Graves KH : *The effect of rhesus epithelial cell monolayers on in vitro growth of rhesus embryo. Theriogenology 1989 ; 39 : 197-201*
- 17) Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH : *Bovine 1-2cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. Biol Reprod 1990 ; 43 : 97-104*
- 18) Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, Menezo Y : *Coculture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. Hum Reprod 1990 ; 5 : 737-743*
- 19) Sakkas D, Jaquenoud N, Leppens G, Campana A : *Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium and in*

- coculture on Vero cells : A randomized study. Fertil Steril 1994 ; 61 : 521-525*
- 20) Loutradis D, John D, Kiessling AA : *Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. Biol Reprod 1987 ; 7 : 311-316*
- 21) Yeung WSB, Ho PC, Lau EYL, Chan STH : *Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. Hum Reprod 1992 ; 7 : 1144-1149*
- 22) Takeuchi K, Kaufmann RA, Sandow BA : *Enhanced mouse embryo development in oviductal and non-oviductal cell co-cultures is associated with reduced oxygen concentration in culture medium. Fertil Steril 47th annual meeting 1991 ; S8-S9*
- 23) 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 : 715-724*