

# 난관수종액이 생쥐 배아발달에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 산부인과교실<sup>1</sup>, 시카고의과대학 병리학교실<sup>2</sup>

박준철<sup>1</sup> 김정아<sup>1</sup> 김동자<sup>2</sup> 배진곤<sup>1</sup> 김종인<sup>1</sup> 이정호<sup>1\*</sup>

## Effect of Human Hydrosalpingeal Fluid on the Development of Mouse Embryo

Joon-Cheol Park<sup>1</sup>, Jeong-A Kim<sup>1</sup>, Dong-Ja Kim<sup>2</sup>, Jin-Gon Bae<sup>1</sup>, Jong-In Kim<sup>1</sup>, Jeong-Ho Rhee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

<sup>2</sup>Department of Pathology, Rosalind Franklin University of Chicago Medical School, North Chicago, USA

**Objective:** The aim of this study was to measure the concentrations of cytokines contained in the hydrosalpingeal fluid and to evaluate the effect on the mouse embryo development with the different cytokine concentration.

**Methods:** The hydrosalpingeal fluids (HSF) were collected during the surgery for hydrosalpinx which was confirmed by hysterosalpingogram. The cytokines in HSF including interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) were measured by ELISA method. HSF were added up to culture media with 5%, 10%, and 30% concentrations. The blastulation rates were compared.

**Results:** IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , VEGF, EGF, and MCP-1 were detected, but the concentrations were different from each sample. IL-6 and IL-10 were increased in HSF-1 group, and IFN- $\gamma$ , MCP-1, VEGF were increased in HSF-2 compared with normal serum range. The Th1/Th2 ratio of HSF-2 (IFN- $\gamma$ :IL10) was highly elevated to 61.64, compared with that of HSF-1 (3.69). The blastulation rate was significantly decreased in HSF-2 group (27.7%) compared those of the HSF-1 group (74%) and control group (76.7%). It showed the trend that the blastulation rate was decreased depending on the concentration HSF of culture media in HSF-2 group, but it was not statistically significant.

**Conclusion:** The composition and concentration of cytokines in each HSF were different, and increased proinflammatory cytokines in HSF might be associated with poor embryonic development. Further study will be needed about the effect of each cytokines in HSF.

[Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(2): 125-134.]

**Key Words:** Hydrosalpingeal fluid, Cytokine, Mouse embryo, Blastulation rate

난관 인자에 의한 불임증은 체외수정시술의 가장 흔한 적응증이다. 그러나 난관수종이 체외수정시술 후 임신율에 미치는 영향에 관해서 많은 논

란이 있어 왔다. 여러 연구에서 난관수종이 있는 경우 체외수정시술 후 임신율이 감소한다고 알려져 있으나 차이가 없다는 보고도 있다.<sup>1</sup> 최근까지의 메타분석 결과 난관수종이 있는 불임 환자에 있어 체외수정시술시 임신 성공률이 절반 정도 감소하고 유산율이 두 배 증가한다고 알려져 있다.<sup>2,3</sup> 또한 체외수정시술 전에 난관 절제술을 시행하는 것이 체외수정을 통한 임신율을 향상시킨다는 보고가 있는 반면,<sup>4-6</sup> 수술이 오히려 난소로의 혈류를

접 수 일: 2010년 1월 27일, 수정일: 2010년 3월 10일  
게재확정일: 2010년 5월 14일  
주관책임자: 이정호 우) 700-712 대구광역시 중구 동산동 194번지,  
계명대학교 동산의료원 산부인과학교실  
Tel: (053) 250-7871, Fax: (053) 250-7599  
e-mail: r1670416@dsmc.or.kr

\*본 논문의 초록은 제 55차 대한생식학회 추계학술대회에 Poster로 발표되었음.

\*\*본 연구는 계명대학교 신진연구기금에 의하여 이루어졌음.

감소시키거나 유착을 유발하여 획득되어지는 난자의 수가 오히려 감소된다는 주장도 있어 왔다.<sup>7,8</sup> 난관수종이 임신율을 감소시키는 기전 또한 불명확하여 이런 논란을 가중시켜 왔다. 난관수종이 체외수정에 미치는 악영향에 대한 원인이전으로 제시되고 있는 가설로는 난관수종액이 배아에 독성을 갖는다는 것, 자궁내막 수용성의 변화를 유발하여 착상을 감소시킨다는 것, 그리고 자궁강내의 액체의 존재가 착상을 방해하는 기계적 방해물이 된다는 것 등이다.<sup>9</sup> 그러나 난관수종액에 의한 배아 독성에 관한 결과 역시 상이한 결과가 보고되었는데, 난관수종액이 생쥐 배아에 대해 독성을 미친다는 보고가 있으나<sup>10,11</sup> 영향이 없다는 보고도 있다.<sup>12</sup> 또한 생쥐 배아에 대한 인간 난관수종액의 영향이 다를 수 있으므로 인간 배아를 이용한 실험에서도 100% 난관수종액을 배양액으로 사용 시 포배기로의 발달이 50% 감소했다는 보고가 있으나<sup>13</sup> 전혀 차이가 없다는 보고도 있다.<sup>14</sup> 저자 등은 이러한 상이한 연구결과가 실험에 사용된 난관수종액 조성의 차이에 기인한 것일 수 있다고 추정하였고, 실제 난관수종액내의 사이토카인에 관한 연구에서도 그 종류 및 농도에 있어 다양성이 보고된 바 있다.<sup>15</sup> 또한 체외수정시술시 반복된 착상 부전을 보이는 환자들에 있어 혈중 Th1/Th2 사이토카인이 증가되어 있으며, 염증성 사이토카인인 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )의 증가가 임신 예후 결정에 중요한 인자가 된다고 알려져 있다.<sup>16</sup> 따라서 본 연구는 난관수종액내의 사이토카인 농도를 측정하고, 사이토카인 농도가 다른 난관수종액을 이용하여 생쥐 배아 발생에 미치는 영향을 비교 분석하고자 하였다.

### 연구대상 및 방법

난관수종액은 불임 검사를 위하여 본원 불임클리닉을 방문한 환자 중 자궁난관 조영술에서 난관수종이 확인되어 복강경을 통한 난관 절제술을 시행하는 경우에 채취되었다. 복강경 트로카 삽입 후

난관수종이 확인되면 난관 절제술 시행 전에 18G 흡입바늘을 이용하여 난관으로부터 먼저 채취한 다음, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 상층액만을 모아 -20°C에서 실험 전까지 보관하였다.

난관수종액 내에 함유된 사이토카인의 종류 및 농도는 보고된 논문마다 큰 차이를 보여 왔으므로<sup>15,17,18</sup> 우선 기존 난관수종액 사이토카인에 관한 연구에서 가장 높은 빈도로 검출되었던 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 농도를 채취된 난관수종액마다 먼저 측정하기로 하였다. TNF- $\alpha$  ELISA kit (Biosource, Camarillo, CA, USA)와 Quantikine HS IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용해 효소면역측정법 (ELISA)으로 측정하였으며, 이들 농도가 가장 높은 것과 가장 낮은 두 난관수종액을 선정하여 난관수종액내에 존재하는 사이토카인 및 키모카인을 검사하였다. 채취된 난관수종액의 사이토카인 농도는 개인마다 큰 차이를 보였는데, IL-6는 5.34~530 pg/mL, TNF- $\alpha$ 는 <0.01~2.6 pg/mL로 측정되었다. 이중 IL-6가 530 pg/mL로 가장 높고 TNF- $\alpha$ 가 <0.01 pg/mL인 난관수종액-1 (HSF-1)과 IL-6가 5.34 pg/mL로 가장 낮고 TNF- $\alpha$ 가 2.6 pg/mL로 가장 높은 난관수종액-2 (HSF-2)를 선정하였다. 선정된 두 난관수종액은 사이토카인 및 성장 인자 등의 조성 및 농도를 확인하기 위하여 Evidence investigator kit (Randox, Crumlin, UK)를 이용하여 interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)를 측정하였다. Sandwich chemiluminescent immunoassay 방식으로 검사되었으며 각 검사 항목의 검사 범위는 IL-1 $\alpha$  (0~500 pg/mL), IL-1 $\beta$  (0~250 pg/mL), IL-2 (0~3,000 pg/mL), IL-4 (0~4,000 pg/mL), IL-6 (0~900 pg/mL), IL-8 (0~3,000 pg/mL), IL-10 (0~1,000 pg/mL), TNF- $\alpha$  (0~1,500 pg/mL), IFN- $\gamma$  (0~1,500 pg/mL), VEGF (0~3,000 pg/mL), EGF (0~900 pg/mL), MCP-1 (0~1,500 pg/mL)이었다. 난관수종액-2는 난관수종액-1에 비하여 Th1:Th2 ratio (IFN- $\gamma$ :IL-10, TNF- $\alpha$ :IL-10)가 크게 증가되어 있었다.

실험용 쥐는 10~12주령의 수컷과 4~6주령 암컷을 사용하였다. 암컷 생쥐에 임신한 말의 혈청 성선자극호르몬 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG; Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 IU를 주사하고 48시간 후에 융모선 성선자극호르몬 (human chorionic gonadotropin, hCG; Sigma) 5 IU를 주사하여 과배란 유도를 하였다. 수컷과 합사하여 교미를 시킨 후 다음날 아침 교접흔적을 확인된 생쥐만을 골라서 hCG 투여 20시간 후 경추 탈골법으로 희생시켜 난관을 적출한 다음, 30게이지 바늘을 이용하여 난관 팽대부를 절개함으로써 전핵시기의 접합자를 얻었다.

배양액은 P1 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) 배양액에 10% 난포액 (follicular fluid)를 첨가하여 기본 배양액으로 사용하였고, 선정된 난관수종액을 5%, 10%, 30%의 비율로 첨가하여 실험하였다. 첨가되는 난포액은 각개인마다 그리고 각각의 난포마

다 다를 수 있으므로 난자 채취 시 다량의 난포액이 획득되어진 한 환자의 난포액을 모든 배양액에 첨가하였다. 난관수종액 첨가군은 사용된 난관수종액에 따라 HSF-1군과 HSF-2군으로 구분하였고, 난관수종액을 첨가하지 않은 배양군을 대조군으로 하였다. 모든 배양액은 CO<sub>2</sub> 배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도)에서 전 배양 시킨 후 사용하였다. 준비된 배양액에 생쥐로부터 채취한 접합자를 넣고 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하면서 매일 현미경 하에서 배아발달 상황을 관찰하였다. 각 군마다 포배기까지의 배아발달을 확인하였다.

통계처리는 윈도우 SPSS ver. 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Chi-square test, Fisher's exact test, Kaplan Meier test, 반복측정이요인 분석을 시행하였고 *p*-value가 0.05 미만인 것을 유의성이 있다고 하였다.

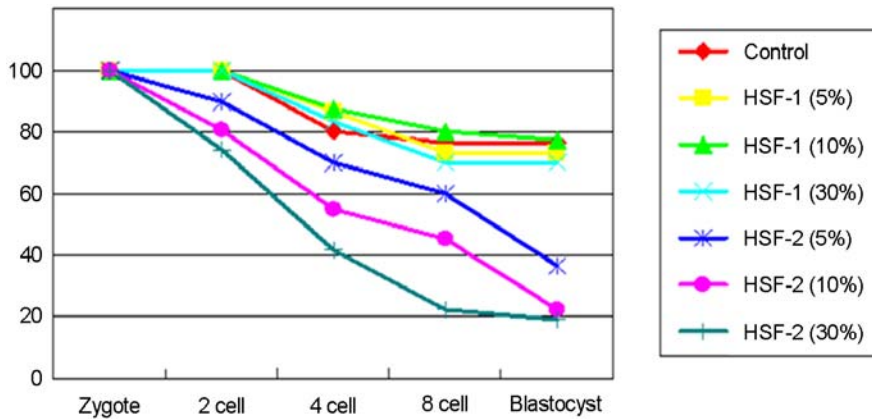
**Table 1.** The concentrations of cytokines and growth factors in each hydrosalpingeal fluid compared with normal serum range

	Hydrosalpingeal fluid-1	Hydrosalpingeal fluid-2	Normal serum range
IL-1 $\alpha$	0.14	0.23	0.00~0.46
IL-1 $\beta$	<0.01	0.85	0.00~6.50
IL-2	3.39	5.00	0.00~12.37
IL-4	1.76	3.99	0.00~1.79
IL-6	530	5.34	0.00~12.7
IL-8	1.85	187.46	0.00~379.5
IL-10	0.62	0.57	0.00~0.26
IFN- $\gamma$	2.92	34.85	0.00~0.90
TNF- $\alpha$	<0.01	2.60	0.00~19.70
MCP-1	304.59	900	158.90~425.70
VEGF	18.32	572.85	3.00~364.00
EGF	<0.01	4.81	19.10~204.50

All concentration data were presented as pg/mL.

IL, interleukin; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; VEGF, vascular endothelial growth factor; EGF, epidermal growth factor.

Joon-Cheol Park. Effect of Human Hydrosalpingeal Fluid on the Development of Mouse Embryo. Korean J Reprod Med 2010.



**Figure 1.** The comparison of development of mouse embryos between control group and the experimental groups of hydrosalpingeal fluid supplemented with different concentrations. Hydrosalpingeal fluids (HSF)-1 contained the highest concentration of interleukin (IL)-6 and the lowest concentration of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and HSF-2 contained the highest concentration of TNF- $\alpha$  and the lowest concentration of IL-6 among the HSF samples.

Joon-Cheol Park. Effect of Human Hydrosalpingeal Fluid on the Development of Mouse Embryo. Korean J Reprod Med 2010.

## 결 과

실험에 사용된 난관수종액의 조성은 Table 1과 같다. 난관수종액-1과 비교하여 IL-6, IL-10을 제외한 다른 사이토카인은 난관수종액-2에 더 많은 양이 포함되어 있었으며, 특히 IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인의 농도의 차이가 컸다. 또한 VEGF의 농도도 난관수종액-1과 비교하여 난관수종액-2에서 크게 증가되어 있었다. 그러나 검체의 수가 한정되어 있고 또한 정상 난관액내의 사이토카인 농도에 관해서 밝혀진 바가 없으므로 그 증가의 의미성을 판단할 수는 없었다. 단지 정상 혈청내의 사이토카인 농도와 비교 시 난관수종액-1의 경우 IL-6가 530 pg/mL로서 정상 혈청 농도 (0~12.7 pg/mL)에 비하여 크게 증가되어 있었으며, IL-10 0.62 pg/mL, IFN- $\gamma$  2.92 pg/mL로서 역시 정상 혈청에서의 IL-10 (0~0.26 pg/mL)과 IFN- $\gamma$  (0~0.90 pg/mL) 농도보다 증가되어 있었다. IL-2, IL-4, IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 정상 혈청 농도 범위 내에 있었고, TNF- $\alpha$ 는 검출되지 않았다. VEGF는 정상 혈청 농도 내에 있었으나, EGF는 검출되지 않았다. 난관수종액-2의 경우 IL-6는 정상 혈청 농도 범위 내에 있었고, IFN- $\gamma$ 이 34.85 pg/mL가 크게 증가되어 있었

다. 또한 IL-4는 3.99 pg/mL, IL-10는 0.57 pg/mL로 증가되어 있었다. VEGF는 572.85 pg/mL로 정상 혈청 농도 (3.0~364 pg/mL)에 비하여 증가되어 있었으나, EGF는 4.81 pg/mL로 정상 혈청 농도보다 낮게 검출되었다. 그리고 MCP-1는 900 pg/mL 이상으로 정상 혈청 농도 (158.9~425.7 pg/mL)에 비하여 증가되어 있었다. IL-2, IL-4, IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 정상 혈청 농도 범위 내에 있었고, TNF- $\alpha$ 는 정상 혈청 농도에 비하여 낮게 검출되었다. 그러나 IL-8 187.46 pg/mL, TNF- $\alpha$  2.6 pg/mL로서 난관수종액-1에서 IL-8 1.85 pg/mL, TNF- $\alpha$  <0.01에 비하여 난관수종액-2에서 증가되어 있었다. 각 난관수종액의 Th1/Th2 비는 HSF-1의 경우 IFN- $\gamma$ :IL-10이 3.69로 정상 수치인 반면에 HSF-2의 경우 IFN- $\gamma$ :IL-10이 61.14로 크게 증가되어 있었다.

난관수종액을 포함하지 않는 배양액에서는 30개 접합자 중 23개의 배아 배반포기에 도달하여 배반포기 발달률은 76.7%이었다. 난관수종액-1군의 경우 총 100개의 접합자 중 74개의 배아가 배반포기까지 발달하여 (74%) 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만, 난관수종액-2군의 경우 총 94개의 접합자 중 26개 (27.7%)만이 배반포기가 되어 대조군 및 난관수종액-1군과도 유의한 차이를 보였다 ( $p <$

0.01) (Figure 1). 또한 2-세포기 배아를 기준으로 배반포기 발달률을 비교하였을 때도 대조군에 비하여 난관수종액-1군은 유의한 차이를 보이지 않았지만 난관수종액-2군의 경우 34.7%로 유의한 감소를 보였다.

첨가된 난관수종액의 농도에 따른 변화를 살펴보면, 난관수종액-1군의 경우 배반포기로의 발달률이 5% 첨가군은 73.3%, 10% 첨가군은 77.5%, 30% 첨가군은 70%로서, 대조군의 76.7%과 비교하여 배반포기로의 발달률은 첨가된 난관수종액의 농도에 관계없이 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 난관수종액-2군 중의 5% 첨가군은 30개의 접합자 중 11개 (36.7%)가 배반포기까지 발달하여 대조군과 비교하여 배반포기의 발달이 유의한 감소를 보였으며 ( $p<0.05$ ), 10%첨가군 역시 32개의 접합자 중 8개 (25%)가 배반포기로 발달하여 대조군과 비교 시 유의한 감소를 보였다 ( $p<0.01$ ). 또한 30% 첨가군의 경우에도 32개의 접합자 중 7개 (21.9%)가 배반포기로 발달하여 대조군과 비교 시 유의한 감소를 보였다 ( $p<0.01$ ). 난관수종액-2군에서는 첨가된 농도가 증가함에 따라 배반포기로의 발달이 감소하는 양상을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 ( $p=0.44$ ).

난관수종액이 배반포기까지의 발달 중 어느 세포기에 특히 영향을 주는가를 보기 위하여 배아발달 단계별로 비교해 보면, 난관수종액-1의 경우 2-세포기에서 4-세포기로의 발달과 4-세포기에서 8-세포기로의 발달이 유의한 감소를 보였다 ( $p<0.01$ ). 난관수종액-2의 경우는 2-세포기에서 4-세포기로의 발달, 4-세포기에서 8-세포기로의 발달, 또한 8-세포기에서 배반포기로의 발달이 모두 유의한 감소를 보였다 ( $p<0.01$ ) (Figure 1).

## 고 찰

난관 인자에 의한 불임증은 체외수정시술의 가장 흔한 적응증으로서 과거 난관 성형술에 의한 임신 시도보다 높은 임신 성공률을 보이고 있다.

그러나 난관 폐색이 있는 환자 중 난관수종이 있는 경우 체외수정시술시 착상률, 임신율의 감소 및 초기 유산율의 증가가 보고되고 있으며, 실제 초음파 검사에서 관찰되는 양측성 난관수종의 경우 체외수정시술 시행 전에 난관 절제술을 먼저 시행함으로써 임신율이 향상되는 것이 보고된 바 있다.<sup>45</sup> 또한 난관수종을 가진 환자의 체외수정시술시 배란되는 난자의 수정률이 저하되는 것이 아니라 착상률이 감소되는 것은 난관수종액이 배아발달이나 착상기전에 영향을 있음을 시사하며,<sup>19</sup> 난자 공여주기나<sup>20</sup> 동결 보존 배아 이식 주기에서도<sup>2</sup> 착상률의 감소를 보여주고 있다. 그러나 체외수정시술 전에 난관 절제술을 시행하는 것이 난소의 혈류장애를 초래하여 난소 배란능의 감소를 가져올 수 있다는 보고도 있으며,<sup>7,8</sup> 환자 역시 복강경을 통한 수술이라 하더라도 전신마취하의 난관 절제술을 시행받는 것을 기피하고 있다. 또한 난관수종이 체외수정에 미치는 영향이 개개인마다 다르고, 난관수종액내의 사이토카인의 조성 및 농도가 개인별로 차이가 많으므로 모든 환자에서 난관 절제술을 시행하기에는 어려움이 있다. 최근 Chen 등<sup>17</sup>은 체외수정시술시 채취된 난관수종액을 생쥐 배아 배양액에 첨가하여 포배기로의 발달이 감소되는 환자에 한해서만 선택적으로 난관 절제술을 시행하는 것이 좋겠다는 보고를 한 바 있다.

난관수종이 체외수정에 미치는 악영향에 대한 원인기전은 명확히 밝혀진 바 없으나, 자궁내막 수용성의 변화를 유발하여 착상을 감소시킨다는 것, 자궁강내의 액체의 존재가 착상을 방해하는 기계적 방해물이 된다는 것과 난관수종액이 배아에 독성을 갖는다는 것 등이다.<sup>9</sup> 먼저 난관수종액이 자궁강내로 역류함으로써 자궁내막의 수용성에 변화를 초래할 수 있는데, 난관수종을 가진 환자의 자궁내막에서  $\beta$ -integrin이나 HOXA gene의 발현의 감소가 보고된 바 있으며<sup>21,22</sup> leukemia inhibitory factor (LIF), Tropho-uteronection (TUN), IL-1이 착상과정에 영향을 줄 수 있다고 보고된 바 있다.<sup>23,24</sup> 또한 난관수종액을 용모상피암세포주 (JEG3 cell line) 배양

액에 첨가 시 Th-1 cytokine의 하나인 TNF- $\alpha$  농도가 높은 경우 세포증식을 억제하는 효과가 큰 것으로 보고하여<sup>25</sup> 난관수종액내의 사이토카인으로 인해 착상에 악영향이 발생할 수 있음을 시사하였다. TNF- $\alpha$ 가 용모막세포의 자멸사를 유도할 뿐 아니라<sup>26</sup> anti-TNF- $\alpha$  항체를 투여하는 경우 유산율이 감소하는 것으로 보고되었다.<sup>27</sup> 그러나 난관수종액이 자궁내막에 악영향만을 미치는 것이 아니라 난관수종액이 오히려 사람 cytotrophoblast에서 TUN 및  $\beta$ -hCG 생성을 촉진한다는 보고가 있으나,<sup>24</sup> 생쥐 모델에서는 이러한 촉진작용이 없다는 보고가 있어 생쥐 모델과 차이가 있을 수 있음을 시사한다.<sup>1</sup> 본 연구에서 난관수종액내에 IL-1 $\beta$ 가 검출되었는데, 배아에서의 IL-1 $\beta$ 이 분비됨으로써 자궁내막에서의 여러 사이토카인들의 생성 및 분비가 시작되어 착상에 적합한 환경으로 변화된다고 본다면<sup>28</sup> 난관수종액내에 함유되어 있는 IL-1 $\beta$  또한 자궁내막에 영향을 미칠 수 있으며 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 TNF- $\alpha$ 에 의한 용모막세포의 세포자멸사는 IFN- $\gamma$ 이 공존하는 경우 더욱 촉진되며, EGF가 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 에 의한 독성을 감소시켜 용모막세포를 보호하는 작용이 있다고 알려져 있다.<sup>26,29,30</sup> 즉, 사이토카인의 작용은 여러 사이토카인들이 복합적인 상호작용을 가질 수 있으며, 또 착상 및 배아발달과정에 모두 영향을 줄 수 있다.

난관수종액의 배아 독성에 관해서는 난관수종액이 생쥐 배아에 대해 독성을 미친다는 보고가 있으나<sup>10,11</sup> 영향이 없다는 보고도 있다.<sup>12</sup> 본 연구에서는 사용된 난관수종액에 따라 배반포기로의 발달에 유의한 차이를 보였다. 이러한 생쥐 배아를 이용한 연구의 한계점은 사용된 난관수종액의 조성의 다양성이 있을 수 있으며, 실험에 이용된 생쥐의 종류에 따라 특이 사이토카인에 더 민감할 수 있다는 차이가 있을 수 있으며, 인간 난관수종액에 의한 생쥐 배아 영향은 다를 수 있다는 것이다. 배아 독성 및 착상에 악영향을 줄 수 있는 사이토카인으로서는 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  등이 제시되

고 있으며, 또한 반복 유산 환자들에 있어 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 및 IFN- $\gamma$  유전자 다양성 (polymorphism) 이 보고되고 있다.<sup>31</sup> 난관수종액내의 사이토카인의 농도를 처음 측정한 Barmat 등<sup>15</sup>의 연구에서 TNF- $\alpha$ 가 70%, EGF가 50%에서 검출되었고 TGF- $\beta$ 2, IFN- $\gamma$ 는 검출되지 않았다고 하였다. 그러나 Strandell 등<sup>18</sup>의 연구에서는 TGF- $\beta$ 2가 78%, IFN- $\gamma$ 이 28%에서 검출된다고 보고하여 차이를 보이고 있다. 또한 IL-8 (100%), IL-12 (83%), IL-1 $\alpha$  (78%), TNF- $\alpha$  (56%)와 같은 염증성 사이토카인이 검출됨으로써 난관의 감염에 의한 악영향이 지속되는 것이라는 것을 뒷받침하였다. 최근까지의 난관수종액내의 사이토카인에 관한 연구에서는 일부 사이토카인만이 측정되었으며 국내에서는 아직까지 이에 대한 보고가 없었다. 본 연구에서는 난관수종액내에서 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , VEGF, EGF, MCP1가 검출되었으며, 또한 그 농도에 있어서도 차이를 보였다. Barmat 등<sup>15</sup>의 연구에서는 검출된 평균 농도가 TNF- $\alpha$ 가 6.2 $\pm$ 3.6 pg/mL, EGF는 26.7 $\pm$ 11.4 pg/mL였고 Strandell 등<sup>18</sup>의 연구에서는 TNF- $\alpha$  5.7 pg/mL (0.23~13.8), EGF 37 pg/mL (8.1~128), IFN- $\gamma$  8.1 pg/mL (1.2~25.8), IL-8 1,1400 pg/mL (12~74641), IL-1 $\alpha$  4.1 pg/mL (0.25~18.5)로 보고되어, 기존의 연구와 비교 시 난관수종액-1의 경우 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ 의 농도가 모두 낮았고 난관수종액-2의 경우 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-8의 농도는 낮았고, IFN- $\gamma$ 의 농도는 더 높았다. 또한 EGF는 난관수종액-1에서는 검출되지 않았고 난관수종액-2의 경우 감소되어 있어 다른 논문과 차이를 보였다. 그러나 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, VEGF, MCP-1 등은 기존에 측정된 바가 없어 비교할 수 없었다. 배반포기로의 발달에 있어 유의한 차이를 보인 난관수종액-2의 경우 IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인의 농도가 증가되어 있었으며 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  역시 난관수종액-1보다 증가되어 있었다. 즉 난관수종액에 따라 배반포기로의 발달에 유의한 차이를 보임으로써 난관수종액내의 사이토카인에 따라 배아발달에 차이를 줄 수 있다고 할 수 있겠

다. 배양액에 첨가되는 난관수종액의 농도가 많아 질수록 배아발달이 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 100% 난관수종액에 배양한 생쥐 배아의 발달이 억제되는 것은 여러 논문에서 비교적 일관되게 보고되고 있으나, 이는 배아 성장에 필요한 최소한의 영양소조차 결핍된 결과일 수 있으므로 본 연구에서는 시행하지 않았다. 배아발달 단계별로 영향을 살펴보면 특정 세포 주기에 영향을 미치는 것이 아니라 전반적으로 각 단계마다 영향을 주는 것으로 추정된다. 사이토카인이 배아발달에 미치는 영향에 대하여는 정확히 밝혀진 바 없으나 Wu 등<sup>32</sup>은 자궁내막증 환자에서 복강내 IL-6이 높은 경우 배아의 발달이 유의하게 감소하나, IL-1 $\beta$ 나 TNF- $\alpha$ 는 통계적 차이가 없다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 IL-6이 크게 증가되어 있는 난관수종액-1의 경우 배아발달에 영향이 없었고, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 가 증가되어 있는 난관수종액-2가 배아발달을 저해하는 것으로 나타났다. 이는 반복 유산이나 착상 부전 환자들에 있어서 TH1 사이토카인이 증가되고 TH2 사이토카인이 감소되어 있는 것과 일치하는 결과이다. 즉 T helper 1 세포에서 분비되는 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 는 pro-inflammatory 경향을 보여 배아발달 및 착상에 나쁜 영향을 미치고 T helper 2 세포에서 분비되는 IL-4, IL-6, IL-10의 경우 anti-inflammatory 경향을 보임으로써 배아가 착상하는 데 적합한 환경으로 조절한다는 것이다.<sup>31</sup> IFN- $\gamma$ 는 정상 임신의 경우 착상 부위의 혈관 생성에 관여하여 착상에 중요한 기능을 하는 반면에, 유산이나 임신 중독증 등의 임신 합병증과도 관련이 높은 것으로 알려져 있다.<sup>33</sup> TNF- $\alpha$ 와 마찬가지로 IFN- $\gamma$  역시 배아 및 용모막세포에 대한 독성이 보고된 바 있으며<sup>34,35</sup> 배아줄기세포 연구에서도 IFN- $\gamma$ 이 배아줄기세포의 세포자멸사를 증가시키는 것으로 보고되었다.<sup>36</sup> 본 연구에서도 IFN- $\gamma$ 이 증가된 난관수종액을 첨가한 경우 배반포로의 발달이 감소하였다. 그러나 Cameo 등<sup>37</sup>의 연구에서는 IFN- $\gamma$ 가 배반포기로의 발달과정에는 별다른 악영향이 없고 이후 확산 (spreading)과정에서 배아 독성을

가진다고 하였다. 향후 배양기간을 연장하여 착상기까지의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

정상 난관세포가 배아 성장에 적합한 사이토카인을 분비한다고 알려져 있을 뿐만 아니라<sup>38</sup> Strandell 등<sup>18</sup>의 연구에서 난관수종액에서 LIF, EGF, GM-CSF가 검출되는 것은 난관수종액이 배아발달을 촉진할 수도 있다는 것으로 여러 사이토카인간의 상호작용이 배아발달에 부정적 혹은 긍정적 영향을 미침으로써 다양한 결과를 초래할 수 있다. 즉 Chen 등<sup>17</sup>의 연구에서 보듯이 난관수종액을 생쥐 배양액에 포함할 경우 생쥐 배아의 발달이 저해되었으나, 실제 이들 난관수종을 가진 환자에게 체외수정시술을 시행하는 경우 난관수종액내에 존재하는 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LIF, EGF 등의 농도에 의한 영향에 따라 체외수정시술의 성공률을 예측할 수 없다고 하였다. 또한 인간 배아를 이용한 실험에서도 100% 난관수종액을 배양액으로 사용 시 포배기로의 발달이 50% 감소했다는 보고가 있으나<sup>13</sup> 전혀 차이가 없다는 보고도 있다.<sup>14</sup> 100% 난관수종액에서의 인간 배아발달의 저하는 배양액내의 영양결핍에 의한 것일 수 있으므로, 인간 배아의 경우 난관수종액에 의한 배아 독성은 없다고 주장도 있으나, 인간 배아를 이용한 실험이 가지는 윤리적 한계로 인하여 사용되어지는 배아의 수가 적어서 결과를 단정하기는 어렵다.

본 연구에서도 배양액에 다양한 농도로 첨가할 만큼의 다량의 난관수종액을 가진 환자가 제한되어 있는 임상적 어려움으로 인하여 검체 수가 한정되어 있고 난관수종액내 다양한 사이토카인들이 다양한 농도로 존재하므로 어느 특정 사이토카인의 작용을 밝혀내기에는 한계가 있다. 그러나 본 연구는 난관수종액에 의한 배아 독성 여부에 관한 여러 연구들의 상반된 결과들이 난관수종액내에 함유된 사이토카인 조성의 다양성에 의한 것일 수 있음을 시사하며, 염증성 사이토카인/항염증성 사이토카인의 농도 비가 높은 경우 배아발달에 유해할 가능성이 높다고 하겠다. 각 사이토카인에 의한 작용기전을 규명하기는 위해서는 향후 지속적인

연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 참고 문헌

1. Strandell A, Lindhard A. Why does hydrosalpinx reduce fertility? The importance of hydrosalpinx fluid. *Hum Reprod* 2002; 17: 1141-5.
2. Zeyneloglu HB, Arici A, Olive DL. Adverse effects of hydrosalpinx on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 70: 492-9.
3. Camus E, Poncelet C, Goffinet F, Wainer B, Merlet F, Nisand I, et al. Pregnancy rates after in-vitro fertilization in cases of tubal infertility with and without hydrosalpinx: a meta-analysis of published comparative studies. *Hum Reprod* 1999; 14: 1243-9.
4. Strandell A, Lindhard A, Waldenstrom U, Thorburn J, Janson PO, Hamberger L. Hydrosalpinx and IVF outcome: a prospective, randomized multicentre trial in Scandinavia on salpingectomy prior to IVF. *Hum Reprod* 1999; 14: 2762-9.
5. Strandell A, Lindhard A, Waldenstrom U, Thorburn J. Hydrosalpinx and IVF outcome: cumulative results after salpingectomy in a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2001; 16: 2403-10.
6. Vandromme J, Chasse E, Lejeune B, Van Rysselberge M, Delvigne A, Leroy F. Hydrosalpinges in in-vitro fertilization: an unfavourable prognostic feature. *Hum Reprod* 1995; 10: 576-9.
7. Lass A, Ellenbogen A, Croucher C, Trew G, Margara R, Becattini C, et al. Effect of salpingectomy on ovarian response to superovulation in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 1998; 70: 1035-8.
8. Gelbaya TA, Nardo LG, Fitzgerald CT, Horne G, Brison DR, Lieberman BA. Ovarian response to gonadotropins after laparoscopic salpingectomy or the division of fallopian tubes for hydrosalpinges. *Fertil Steril* 2006; 85: 1464-8.
9. Ozmen B, Diedrich K, Al-Hasani S. Hydrosalpinx and IVF: assessment of treatments implemented prior to IVF. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 235-41.
10. Yang HS. Effect of human hydrosalpinx fluid on mouse in in vitro fertilization and embryo development. *Korean J Obstet Gynecol* 2001; 44: 1225-31.
11. Koong MK, Jun JH. Adverse effect of human hydrosalpingeal fluid on the development of mouse embryo. *Korean J Obstet Gynecol* 1997; 40: 514-7.
12. Koong MK, Jun JH, Song SJ, Lee HJ, Song IO, Kang IS. A second look at the embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid: an in-vitro assessment in a murine model. *Hum Reprod* 1998; 13: 2852-6.
13. Strandell A, Sjogren A, Bentin-Ley U, Thorburn J, Hamberger L, Brannstrom M. Hydrosalpinx fluid does not adversely affect the normal development of human embryos and implantation in vitro. *Hum Reprod* 1998; 13: 2921-5.
14. Granot I, Dekel N, Segal I, Fieldust S, Shoham Z, Barash A. Is hydrosalpinx fluid cytotoxic? *Hum Reprod* 1998; 13: 1620-4.
15. Barmat LI, Nasti K, Yang X, Spandorfer S, Kowalik A, El-Roeiy A. Are cytokines and growth factors responsible for the detrimental effects of hydrosalpingeal fluid on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer? *Fertil Steril* 1999; 72: 1110-2.
16. Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD, et al. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* 2003; 18: 767-73.
17. Chen CD, Yang JH, Lin KC, Chao KH, Ho HN, Yang YS. The significance of cytokines, chemical composition, and murine embryo development in hydrosalpinx fluid for predicting the IVF outcome in women with hydrosalpinx. *Hum Reprod* 2002; 17: 128-33.
18. Strandell A, Thorburn J, Wallin A. The presence of cytokines and growth factors in hydrosalpingeal fluid. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 241-7.
19. Blazar AS, Hogan JW, Seifer DB, Frishman GN, Wheeler CA, Haning RV. The impact of hydrosalpinx on successful pregnancy in tubal factor infertility treated by in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997; 67: 517-20.
20. Cohen MA, Lindheim SR, Sauer MV. Hydrosalpinges adversely affect implantation in donor oocyte cycles. *Hum Reprod* 1999; 14: 1087-9.
21. Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S, Sagoskin AW, Doyle M, Harris JE, et al. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1997; 12: 1393-8.
22. Daftary GS, Taylor HS. Hydrosalpinx fluid diminishes



- endometrial cell HOXA10 expression. *Fertil Steril* 2002; 78: 577-80.
23. Simon C, Piquette GN, Frances A, Polan ML. Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 549-55.
  24. Sawin SW, Loret de Mola JR, Monzon-Bordonaba F, Wang CL, Feinberg RF. Hydrosalpinx fluid enhances human trophoblast viability and function in vitro: implications for embryonic implantation in assisted reproduction. *Fertil Steril* 1997; 68: 65-71.
  25. Lee JA, Choi BC, Byun HG, Kim JW, Han JR, Yoo GJ, et al. Implication for early implantation failure in women with hydrosalpinx: hydrosalpingeal fluid inhibits trophoblast cell proliferation in vitro culture system. *Korean J Obstet Gynecol* 2000; 43: 1344-8.
  26. Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994; 15: 819-35.
  27. Kawamura K, Kawamura N, Kumagai J, Fukuda J, Tanaka T. Tumor necrosis factor regulation of apoptosis in mouse preimplantation embryos and its antagonism by transforming growth factor alpha/phosphatidylinositol 3-kinase signaling system. *Biol Reprod* 2007; 76: 611-8.
  28. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994; 266: 1508-18.
  29. Pijnenborg R, Luyten C, Vercruyse L, Keith JC Jr, Van Assche FA. Cytotoxic effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha and interferon-gamma on cultured human trophoblast are modulated by fibronectin. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 635-41.
  30. Garcia-Lloret MI, Yui J, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. Epidermal growth factor inhibits cytokine-induced apoptosis of primary human trophoblasts. *J Cell Physiol* 1996; 167: 324-32.
  31. Choi YK, Kwak-Kim J. Cytokine gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions: a comprehensive review. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60: 91-110.
  32. Wu MY, Chen SU, Chao KH, Chen CD, Yang YS, Ho HN. Mouse embryo toxicity of IL-6 in peritoneal fluids from women with or without endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80: 7-11.
  33. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod* 2009; 80: 848-59.
  34. Berkowitz RS, Hill JA, Kurtz CB, Anderson DJ. Effects of products of activated leukocytes (lymphokines and monokines) on the growth of malignant trophoblast cells in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 199-203.
  35. Hill JA, Haimovici F, Anderson DJ. Products of activated lymphocytes and macrophages inhibit mouse embryo development in vitro. *J Immunol* 1987; 139: 2250-4.
  36. Zou GM, Reznikoff-Etievant MF, Hirsch F, Milliez J. IFN-gamma induces apoptosis in mouse embryonic stem cells, a putative mechanism of its embryotoxicity. *Dev Growth Differ* 2000; 42: 257-64.
  37. Cameo M, Fontana V, Cameo P, Vauthay LG, Kaplan J, Tesone M. Similar embryotoxic effects of sera from infertile patients and exogenous interferon-gamma on long-term in-vitro development of mouse embryos. *Hum Reprod* 1999; 14: 959-63.
  38. Liu LP, Chan ST, Ho PC, Yeung WS. Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) that improves the development of mouse embryo. *Hum Reprod* 1995; 10: 2781-6.

## = 국문초록 =

**목 적:** 난관수종액내의 사이토카인 농도를 측정하고, 사이토카인 농도가 다른 난관수종액을 이용하여 생쥐 배아 발생에 미치는 영향을 비교하고자 하였다.

**연구방법:** 난관수종액은 자궁난관 조영술에서 난관수종이 진단되어 복강경을 통한 난관 절제술을 시행하는 경우 난관 절제술 전에 난관으로부터 채취한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 상층액만을 -20℃에서 보관하였다. 난관수종액의 사이토카인의 조성 및 농도를 확인하기 위하여 interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), monocyte chemotactic protein (MCP)-1 등을 ELISA 방법으로 측정하였다. 기본 배양액에 난관수종액을 5%, 10%, 30%의 비율로 첨가하여 각 군별로 배반포로의 발달을 관찰하였다.

**결 과:** 난관수종액내에서 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , VEGF, EGF, MCP-1가 검출되었으며, 그 농도에 있어서는 큰 차이를 보였다. 정상 혈청 농도에 비하여 난관수종액-1은 IL-6, IL-10이 증가되어 있었고, 난관수종액-2는 IFN- $\gamma$ , MCP-1 및 VEGF가 증가되어 있었다. 각 난관수종액의 Th1/Th2 비는 HSF-1의 경우 IFN- $\gamma$ :IL-10이 3.69로 정상인 데 비하여 HSF-2의 경우 IFN- $\gamma$ :IL-10이 61.14로 크게 증가되어 있었다. 난관수종액을 포함하지 않는 배양액에서는 배반포기 발달률은 76.7%이었고, 난관수종액-1군은 74%로 대조군과 차이를 보이지 않았지만, 난관수종액-2군의 경우 27.7%로서 대조군 및 난관수종액-1군과도 유의한 차이를 보였다. 난관수종액-1의 경우 난관수종액 농도에 따른 차이는 없었으며, 난관수종액-2군의 경우 농도에 증가함에 따라 배반포로의 발달이 감소하기는 하였지만 통계적으로 유의하지는 않았다.

**결 론:** 난관수종액마다 사이토카인의 조성이 다르며 이에 따라 생쥐 배아발달에 미치는 영향이 다를 수 있다. 염증성 사이토카인이 증가된 난관수종액이 배아발달에 악영향을 미칠 것으로 추정된다. 특정 사이토카인에 의한 작용을 규명하기 위해서는 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

**중심단어:** 난관수종액, 사이토카인, 생쥐 배아, 배반포기 발달률