

체내에서 성숙이 재개된 생쥐난자의 투명대 경화

서울여자대학교 자연과학대학 생물학과, 피엘산부인과 체외수정연구실¹
충북대학교 자연과학대학 생물학과² 한양대학교 자연과학대학 생물학과³

김지수 · 김해권 · 박종민¹ · 이승재¹ · 이준영² · 김문규³

Zona Hardening of Mouse Oocytes Undergone Meiotic Resumption In Vivo

Jisoo Kim, Haekwon Kim, Jong Min Park¹, Seung Jae Lee¹,
Joonyoung Lee² and Moon Kyo Kim³

Department of Biology, Seoul Women's University, Seoul, Korea IVF Research Laboratory,
Park & Lee Infertility Clinic, Seoul, Korea¹ Department of Biology, Choongbuk University,
Cheongju, Korea² Department of Biology, Hanyang University, Seoul, Korea³

= Abstract =

It is well known that the zona pellucidae of mouse oocytes become "hardened" when they are allowed to mature *in vitro* in the absence of serum components. To see if oocytes already undergone meiotic resumption *in vivo* exhibit similar zona hardening, hardening of ZP of cumulus-enclosed oocytes(CEOs) was examined after culture *in vitro* since their release from follicles various hours after hCG injection.

When CEOs matured *in vivo* for 3h or longer were subjected to culture *in vitro* for 14h with BSA alone, zona hardening was significantly reduced compared to those cultured *in vitro* from the beginning of maturation. However, when CEOs matured *in vivo* for 5h were freed from cumulus cells and then cultured *in vitro* with BSA alone, little reduction of zona hardening was observed. Preincubation of CEOs for 5h with fetuin, one of the well known inhibitor of *in vitro* zona hardening, did not prevent zona hrdening during its subsequent culture of CEOs for 14h without fetuin. However, when CEOs precultured with both fetuin and PMSG for 5h and then further cultured with BSA alone for 14h, zona hardening was dramatically reduced. Under these conditions, the expansion of cumulus cell was observed.

In addition, CEOs cultured with both BSA and dbcAMP to prevent their meiotic resumption showed a significant increase of zona hardening.

Whether the observed zona hardening was correlated with the conversion of ZP₂ to ZP_{2f} was examined. Zona pellucida, isolated from CEOs matured for 5h *in vivo* and then further cultured with BSA alone was subjected to SDS-PAGE. Most of ZP₂ molecules from these CEOs did not undergo conversion from ZP₂ to ZP_{2f}.

From these results, it is concluded that CEOs undergone meiotic resumption *in vivo* do not exhibit zona hardening when they were subsequently cultured *in vitro* without serum components. It appears that cumulus cells play an important role in this phenomenon.

*본 연구는 1995년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-95-4437) 및 1995년도 한국과학재단(951-0507-058-2)의 지원에 의한 것임.

서 론

대부분의 포유류의 난자는 원형질막의 바깥쪽에 약간의 공간, 즉 위난강(perivitelline space)을 사이에 두고 투명한 막상 구조물로 둘러싸여 있는데 이를 투명대라고 한다. 생체내에서 투명대는 수정 및 수정란의 초기 배발생에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Yanagimachi, 1981; Wassarman, 1988), 이러한 투명대 당단백질은 난자가 성장하는 동안 전적으로 난자에 의해 합성된다(Greve *et al.*, 1982).

생쥐 난자의 경우 투명대는 ZP1, ZP2, ZP3 라는 세가지 종류의 당단백질로 구성되어 있으며 그 분자량은 각각 200,000, 120,000, 83,000 dalton 이다(Wassarman, 1988). 이 중에서 ZP3는 정자와의 수정시 정자 수용체로서의 기능 및 투명대에 결합한 정자의 침체반응을 유도하는 기능을 가지며(Bleil and Wassarman, 1983; Wassarman, 1990; Saling, 1991), ZP2는 수정 직후 다정자 수정을 막기 위한 주요 방어 기작에 관여한다. 즉 수정에 의해 난자의 세포질이 활성화되면 피질반응(cortical reaction)이 일어나게 되고 그 결과 ZP2가 ZP_{2c}의 형태로 전환되어 더 이상의 정자가 투명대를 침투하지 못하게 하는 투명대 경화를 일으킨다(Wassarman, 1988). 즉, 피질과립에 존재하는 아직까지 밝혀지지 않은 단백질 분해 효소에 의해 분자량이 120,000 dalton인 ZP2가 90,000 dalton으로 감소하여 ZP_{2c}의 형태가 되며, α -chymotrypsin과 같은 단백질 가수분해 효소에 대한 저항성이 증가하는 것으로 알려져 있다.

이러한 투명대 경화는 수정이외에 parthenogenetic activation을 유도하는 자극에 의해서도 일어나는 현상이며 또한 생쥐 미성숙 난자를 체외에서 배양할 때에도 자발적으로 투명대 경화가 일어나는 것이 잘 알려져 있다(De Felici and Siracusa, 1982; De Felici *et al.*, 1985). 그러나 체외 성숙 동안 배양액 내에 혈청성분이 첨가되면 이러한 투명대 경화현상은 억제된다(Downs *et al.*, 1986; Choi, 1987). 이에 대한 자세한 기작은 아직 밝혀져 있지 않으나 생쥐 미성숙 난자는 체내 혹은 체외 성숙시 상당량의 피질과립을 분비한다는 사실이 보고된 바 있다(Ducibella *et al.*, 1988). 따라서 혈청은 체외 성숙시기 동안 분비되는 피질과립의 단백질 분해 효소가 ZP2를 ZP_{2c}로 전

환시키는 것을 막는 어떤 요인을 가지고 있어서 투명대의 경화를 억제시킬 수 있는 것으로 제안된 바 있다(Ducibella *et al.*, 1990a,b).

한편 혈청 이외에도 난포내의 여러 성분 즉, 난포액, sulfated glycosaminoglycan, 난구세포, 과립세포 및 ZHS-glycoprotein등이 투명대 경화의 억제에 관여한다는 보고되어 있으나 구체적인 성분 및 기작에 대해서는 거의 알려지지 않고 있다(Downs *et al.*, 1986; Vanderhyden and Armstrong, 1989).

또한, 최근의 연구에 의하면 혈청 성분 중 하나인 fetuin이 체외 배양시 일어나는 자발적인 투명대 경화를 막을 수 있는 주요 물질인 것으로 보고된 바 있다(Schroeder *et al.*, 1990; Kalab *et al.*, 1991). Fetuin은 fetal bovine serum에서 분리된 산성 단백질로서, 사람의 난포액에서 발견되는 α_2 HS-glycoprotein과 homologue 이며 serine 계열의 단백질 가수 분해 효소의 억제제로 알려져 있다(Kalab *et al.*, 1991).

본 연구에서는 체내에서 성숙이 재개된 생쥐 미성숙 난자를 혈청 성분이 없는 배양액에서 배양할 때 투명대 경화현상이 일어나는지를 조사해 보고자 하였으며 이때 투명대의 구조변화, 즉 ZP2가 ZP_{2c}로 전환되는지를 알아보려고 하였다. 그리고 이러한 과정에 난구세포가 관여하는지도 조사해 보고자 한다. 또한 투명대 경화 억제 물질로 알려진 혈청과 fetuin을 사용하여 이러한 물질이 포함된 배양액에서 성숙을 재개시킨 후 혈청 성분이 없는 배양액으로 옮겨 배양하였을 때 체내에서 성숙이 재개된 난자와 동일한 효과를 보이는지 알아보고 그 기작에 대해 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 난자의 채취

본 실험에는 3-4주된 ICR계통의 암컷을 사용하였으며 미성숙 난자는 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Folligon, Intervet) 5 IU 를 복강에 주사한 후 45-48시간째 경추과일로 도살한 후 난소를 꺼내어 난포를 터뜨려 얻었다. 이때 인이 뚜렷한 난자-난구 복합체(그림 1-A)만을 수집하여 기본배양액으로 3-4번 씻은 후 실험에 사용하였다. 성숙재개 난자는 PMSG와 human chorionic gonadotropin(hCG; Chorulon, Intervet)를 각각 45-48시간 간격으로 각각 5 IU씩 주사한 후

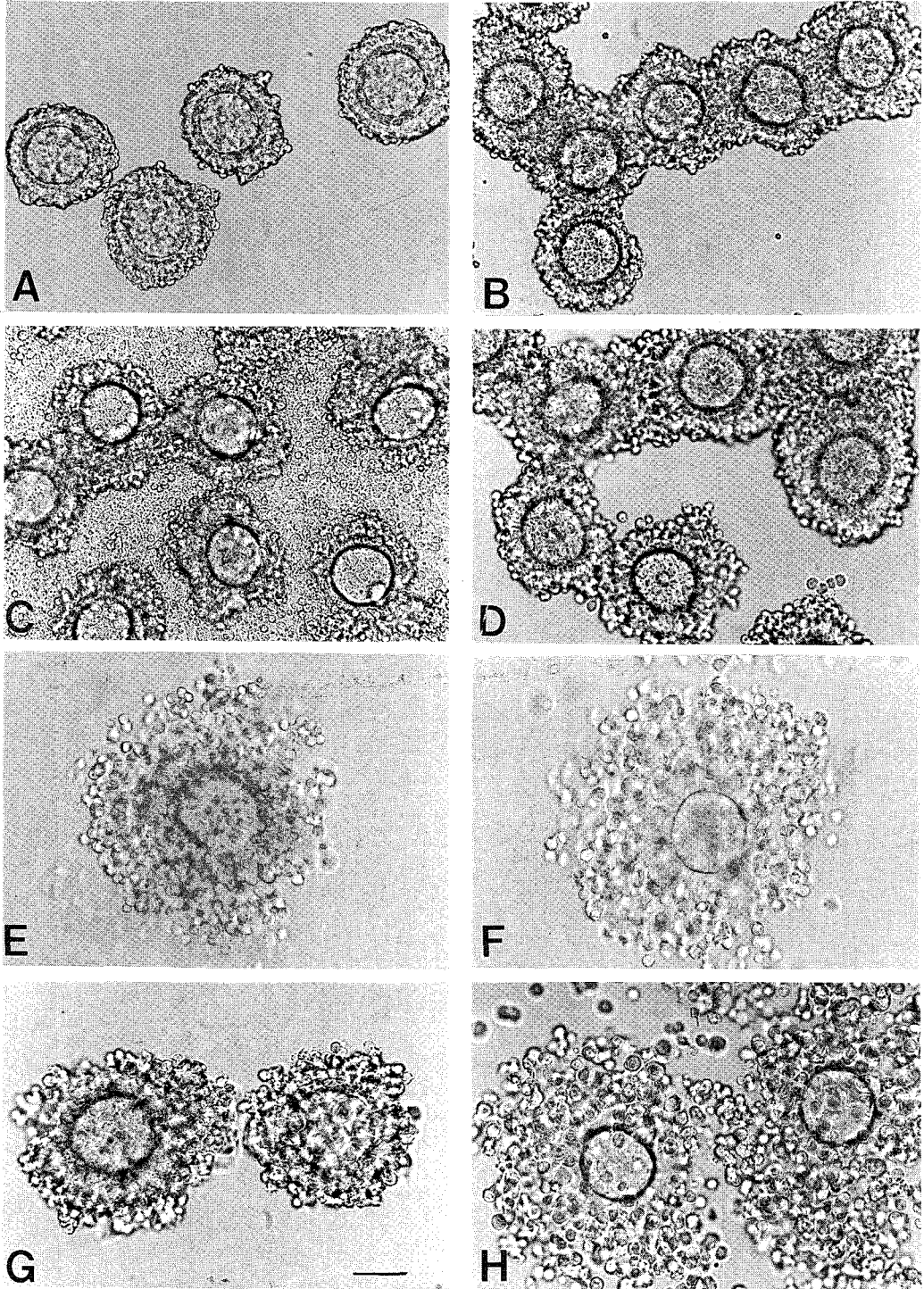


Fig. 1. Photomicrographs of mouse cumulus-enclosed oocytes(CEOs) before or after culture. A; CEOs freshly isolated from follicles, B; CEOs cultured in the presence of 0.4% BSA for 19h, C; CEOs cultured in the presence of 10% FBS for 19h, D; CEOs cultured in the presence of both BSA and dbcAMP(100 μ g/ml) for 16h, E; A CEO isolated from follicles 5h after hCG injection. Note the absence of GV, F; A CEO isolated as in E but cultured in the presence of BSA for 14h, G; CEOs cultured for 5h in the presence of both fetuin and PMSG(5i.u./ml) , H; CEOs pre-cultured as in G and then cultured further in the presence of BSA alone for 14h. Scale bar = 50 μ m.

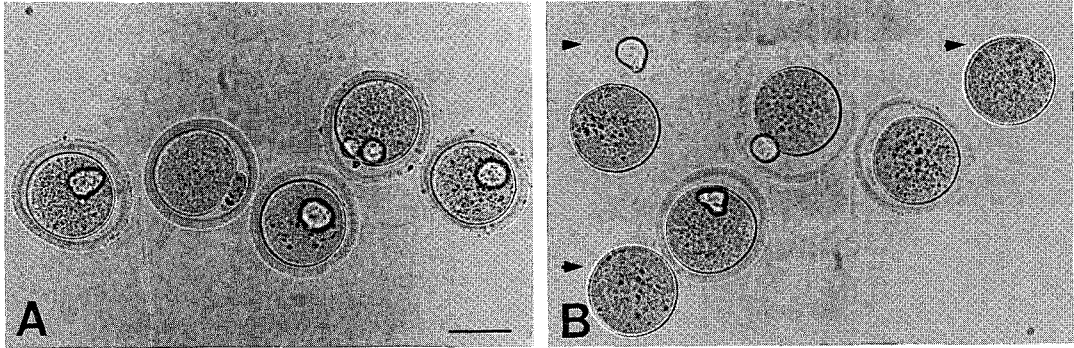


Fig. 2. Photomicrographs of cumulus cell-removed oocytes before(A) or during(B) chymotrypsin treatment for zona hardening assay. Scale bar = 50 μ m.

3시간, 5시간, 9시간째에 난소로부터 얻었으며 핵막붕괴가 일어난 난자-난구 복합체만을 수집하였다.

2. 난자의 배양

모든 실험에 사용한 기본배양액은 Eagle's Minimum Essential Medium(MEM, Gibco)이며 60 μ g/ml의 penicillin G, 50 μ g/ml의 streptomycin sulfate, sodium bicarbonate의 최종농도가 25mM이 되도록 첨가한 후 pH를 7.4로 맞추어 사용하였다. 난자의 체외배양을 위해서는 MEM에 0.4%의 BSA를 첨가하거나 10%의 fetal bovine serum(FBS, Gibco)을 첨가하여 사용하였으며 이를 각각 투명대 경화가 일어난 대조군과 억제된 대조군으로 설정하였다(그림 1-B, 1-C).

난자 성숙 억제제인 N^6 , O^2 -dibutyl 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP)는 증류수에 녹여 10mg/ml의 stock solution을 만든 후 100 μ g/ml의 농도로 희석하여 사용하였다. Fetuin은 최종농도가 0.4%가 되도록 배양액에 직접 녹여 사용하였다. 배양액에 첨가된 PMSG는 0.9% 생리식염수에 녹여 500IU/ml의 stock solution을 만든 후 5IU/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

3. 투명대 경화의 측정

체외배양이 끝난 난자를 먼저 0.4% polyvinylpyrrolidone(PVP)이 들어 있는 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS)에서 씻은 후 난구세포를 제거하여 제1극체가 형성된 난자만을 선택하여 투명대 경화의 측정에 사용하였다. DbcAMP를 처리한 난자의 경우는 성숙이 억제되어 인이 뚜렷한 것만을 선택하여 사용하였다

(그림 1-D). 이 때 난구세포는 mouth-operating micropipetting 을 여러번 반복하여 제거하였다. 이렇게 난구세포가 제거된 난자를 50 μ l의 0.1% chymotrypsin-용액에 옮긴 후 paraffin oil로 덮고 slide warmer에서 37 $^{\circ}$ C를 유지시키며 10분 간격으로 난자를 관찰하였다(그림 2-A, B). T_{50} 은 측정된 전체 난자 중 반수의 투명대가 완전히 녹아 해부현미경하에서 구분이 되지 않는 시간이다.

4. 투명대 경화의 전기영동적 분석

(가) 투명대의 biotinylation

난자-난구 복합체를 먼저 0.4% PVP가 포함된 D-PBS로 옮겨서 씻은 후 위와 동일한 방법으로 난구세포를 제거하였다. 투명대의 분리는 protease inhibitor가 첨가된 배양액내에서 행하였으며 mouth-operating pipetting을 반복하여 세포질이 제거된 투명대를 분리해 내었다.

투명대의 biotinylation은 수용성 sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate (NHS-LC-biotin, Pierce)을 사용하여 행하였다. 즉, NHS-LC-biotin을 0.1M $NaHCO_3$ (pH 8.3)에 녹여 100 M이 되도록 한 후, 20mM의 HEPES와 0.4%의 PVP가 포함된 150mM $NaCl$ (pH 7.4)과 3:1의 비율로 섞어 biotinylation 용액을 준비하였다. 이러한 biotinylation-용액을 50 μ l drop으로 만들어 이 속에 투명대를 넣고 위를 paraffin oil로 덮은 후 실온에서 20시간동안 반응시켰다(Moose et al., 1994). 반응이 끝난 투명대는 다시 0.4% PVP가 포함된 D-PBS 로 여러번 씻은 후 전기영동 재료로 삼았다.

(나) 전기영동

(가)에서 준비된 biotinylation된 투명대는 Laemmli(1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl

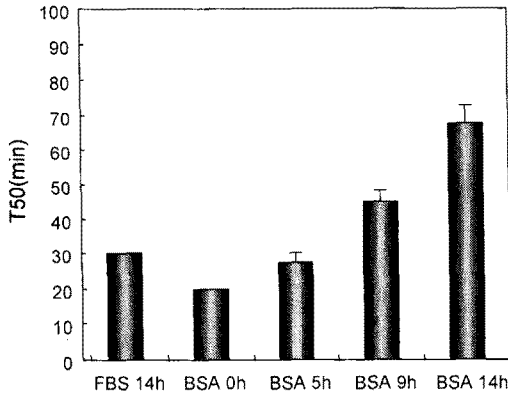


Fig. 3. Zona hardening of mouse CEOs after culture *in vitro* in the presence of BSA. CEOs were isolated from follicles and subjected to culture in the presence of BSA for varying periods. As a control, some CEOs were cultured in the presence of FBS for 14h. The data are expressed as the mean \pm SEM from 4 independent experiments.

sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 행하였다. 전기영동 lane 당 10-15개의 투명대를 loading하였으며 Mighty Small Kit (Hoefer) 를 이용하여 200volt 에서 1시간 동안 분리하였다.

(다) Western blotting과 ECL(Enhanced Chemiluminescence)

전기영동이 끝난 후 gel을 transfer kit(Bio-rad) 를 이용하여 30volt에서 14-16시간 동안 nitrocellulose membrane으로 electrophoretic transfer 을 행하였다. Transfer가 끝난 membrane은 0.1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) 가 포함된 D-PBS(세척용액)로 1시간 동안 씻은 후 3% BSA, 0.1% Tween 20가 첨가된 D-PBS (blocking solution)로 2시간 동안 blocking 시킨다. 이를 다시 세척용액으로 1시간 동안 씻은 후 5 μ l/ml의 horseradish peroxidase(HRP)-streptavidin (Vector)이 든 blocking solution으로 2시간 동안 반응시킨다. 마지막으로 세척용액으로 2시간 동안 깨끗이 씻은 후 ECL detection reagent(Amersham) 로 1분간 반응시키고 암실에서 X-ray film(ECL-Hyperfilm; Amersham)로 30분간 노출시켰다. X-ray film은 Kodak RP X-Omat developer을 사용하여 현상하였다.

5. 통계 처리

실험결과의 유의성을 검정하기 위한 통계 처리는 student's t-test를 이용하였으며 모든 실험은

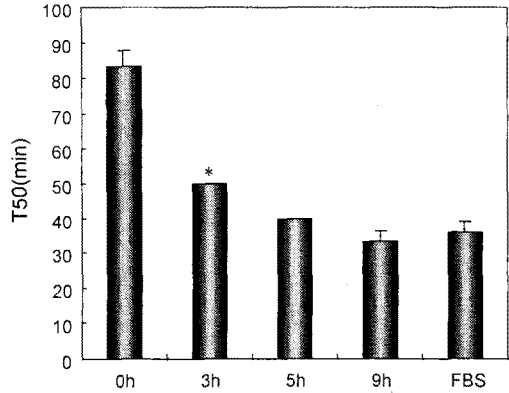


Fig. 4. Zona hardening of CEOs isolated from follicles at varying hours after hCG injection. CEOs were isolated 0, 3, 5, or 9h after hCG injection and then cultured *in vitro* in the presence of BSA for 14h. As a control, some CEOs were cultured in the presence of FBS for 14h. The data are expressed as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. The asterisk indicates that the differences are significant ($P < 0.01$, t-test) from the 0h control.

3회 이상 실시하였으며 각각의 실험군마다 10-30개의 난자를 조사하였다.

결 과

1. 체외 배양 시간에 따른 투명대 경화현상

생쥐의 미성숙 난자-난구복합체를 BSA가 든 배지에서 각각 0시간, 5시간, 9시간, 14시간 동안 배양한 후 chymotrypsin으로 투명대 경화정도(T₅₀)를 측정된 결과를 그림 3에 나타내었다. 0시간에 측정된 난자의 T50은 20.0 \pm 0분, 5시간 동안 배양된 난자는 27.5 \pm 2.5분, 9시간, 14시간 동안 배양된 난자는 각각 45.0 \pm 2.9분, 67.5 \pm 4.8분으로 BSA가 든 배지에서 체외배양하게 되면 그 배양시간이 경과함에 따라 투명대 경화정도가 점차 증가하는 것으로 나타났다. 한편 대조군 즉, 10% FBS가 든 배지에서 14시간 동안 배양된 난자는 T50이 30.0 \pm 0분으로 나타났다.

2. 체내에서의 성숙 재개 시간에 따른 투명대 경화현상

체내에서 성숙이 부분적으로 진행된 난자-난구 복합체를 BSA가 든 배지에서 체외배양할 경우 이들의 투명대 경화현상이 어떻게 나타나는지를 조사하였다. 즉, PMSG와 hCG를 45-48시간 간격으로 주사한 후 3시간, 5시간, 9시간째에 난

소로부터 난자-난구 복합체를 수집하여 BSA가 든 배지에서 14시간 동안 체외배양한 후 투명대 경화정도를 측정하였다. 투명대 경화가 일어난 대조군으로는 BSA에서 14시간 동안 배양한 것을, 그리고 투명대 경화가 일어나지 않은 대조군으로는 FBS에서 14시간 동안 배양한 난자를 측정, 비교하였다.

각 실험군의 투명대 경화정도를 조사해 본 결과 체내에서 3시간 동안 성숙이 진행된 난자를 다시 체외에서 14시간 배양한 경우 T_{50} 이 50.0 ± 0 분으로 BSA 대조군($T_{50}=83.3 \pm 5.8$ 분)에 비해 투명대 경화정도가 현저히 감소함을 보였으며 5시간, 9시간 동안 체내에서 난자 성숙이 진행된 경우 T_{50} 이 각각 40.0 ± 0 분, 33.3 ± 2.9 분으로 FBS 대조군과 비교해 볼 때 투명대 경화가 거의 일어나지 않았다($P < 0.01$)(그림 4).

3. 난구세포가 투명대 경화에 미치는 영향

위 실험의 결과 체내에서 5시간 이상 성숙을 진행한 난자는 체외에서 BSA가 든 배지에서 14시간 동안 배양이 되더라도 투명대 경화현상이 현저히 감소하는 것이 관찰되었다. 이 때 난자의 투명대 경화 억제에 난구세포가 관여하는지를 조사하였다. HCG 주사 후 5시간째에 난자-난구 복합체를 채취하여 일부는 난구세포에 둘

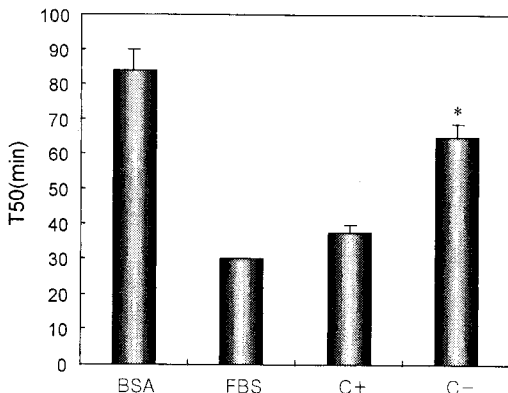


Fig. 5. Role of cumulus cells on zona hardening of CEOs during culture *in vitro* in the presence of BSA. CEOs were isolated 5h after hCG injection and CEOs with GVBD were then cultured with(C+) or without cumulus cells(C-) in the presence of BSA for 14h. As controls, CEOs with GV isolated before hCG injection were cultured in the presence of either BSA or FBS for 14h. The data are expressed as the mean \pm SEM from 4 independent experiments. The asterisk indicates that the differences are significant($P < 0.01$, t-test) compared to C+.

러싸여 있는 채로, 나머지는 mouth-operating micropipetting으로 난구세포를 제거한 후 BSA에서 14시간 동안 배양하였다. 그 결과 난구세포에 둘러싸인 채로 배양된 난자는 T_{50} 이 37.5 ± 2.5 분으로 FBS에서 배양한 경우($T_{50}=30.0 \pm 0$ 분)와 유사한 정도로 투명대 경화가 억제되었지만, 난구세포가 제거된 후 배양된 난자는 T_{50} 이 65.0 ± 4.5 분으로 투명대 경화정도가 현저히 증가하는 것으로 나타났다($P < 0.01$)(그림 5).

4. FBS와 fetuin의 효과

생쥐난자의 체외배양시 투명대 경화현상 억제제로 알려진 FBS와 fetuin의 효과를 조사하기 위해 미성숙 난자를 각각 10% FBS와 0.4% fetuin이 첨가된 배지에서 5시간 동안 배양한 후 핵막이 붕괴된 난자 즉 성숙을 진행한 난자만을 골라 BSA만 든 배지로 옮겨 14시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 난자들의 투명대 경화정도를 측정해 본 결과 FBS 혹은 fetuin이 첨가된 배지에서 5시간동안 전배양한 경우 T_{50} 이 80.0 ± 4.1 분, 72.5 ± 7.5 분으로 투명대 경화 억제에 거의 효과가 없었다($P < 0.01$)(그림 6).

5. 난구세포의 확장이 투명대 경화에 미치는 영향

위의 결과들을 종합해보면 체내에서 5시간 동안 성숙이 재개된 난자들과는 달리 FBS나 fetuin

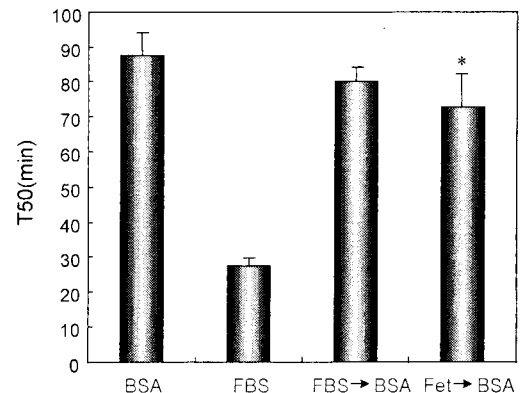


Fig. 6. Effect of FBS or fetuin pre-culture on zona hardening of CEO during subsequent culture *in vitro*. CEOs were precultured in the presence of FBS or fetuin for 5h and then transferred to the medium containing BSA alone for an additional 14h culture. The data are expressed as the mean \pm SEM from 4 independent experiments. The asterisk indicates that the differences are significant ($P < 0.01$, t-test) from the FBS control.

이 첨가된 배지에서 5시간 동안 성숙이 진행된 난자는 BSA만 든 배지에서 연속 배양될 경우 투명대 경화현상이 여전히 나타난다(그림 6). 한편 체내에서는 hCG 주사 후 5시간 정도 경과하면 난구세포의 확장이 어느 정도 일어나므로(그림 1-E) fetuin이 첨가된 배지에서 5시간 배양하는 동안 난구세포의 확장을 유도하기 위해 PMSG(5 IU/ml)를 첨가한 후 그 효과를 조사하였다. 그 결과 그림 7에서 보는 바와 같이 fetuin 처리군의 T_{50} 은 52.5 ± 4.8 분인데 비해 fetuin과 PMSG를 함께 처리한 난자는 35.0 ± 2.9 분으로 투명대 경화 정도가 현저히 감소하였으며 ($P < 0.05$) 난구세포의 확장도 부분적으로 일어남이 관찰되었다(그림 1-G).

6. 난자 성숙 억제제가 투명대 경화에 미치는 영향

난자의 체외 배양시 일어나는 투명대 경화가 난자의 성숙 재개와 관련이 있는지를 조사하였다. 미성숙 난자-난구 복합체를 BSA가 든 배지에 난자 성숙 억제제인 dbcAMP를 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하여 16시간 동안 배양한 후 투명대 경화정도를 측정하였다. 이 때 난자의 성숙 억제는 75.7% 였다. 투명대 경화의 측정 결과 T_{50} 이 57.4 ± 4.8 분으로 나타나 FBS 대조군(32.5 ± 4.8 분)

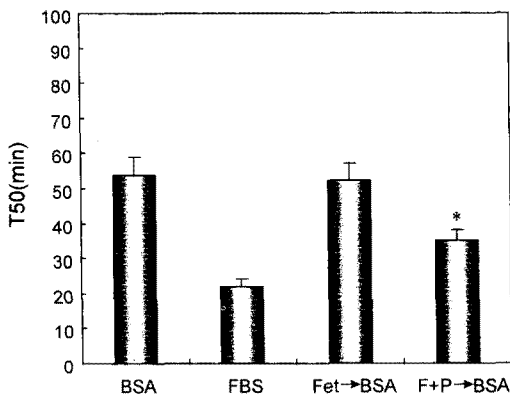


Fig. 7. Role of cumulus expansion on zona hardening of CEO during culture *in vitro*. CEOs were cultured in the presence of fetuin alone(Fet->BSA) or both PMSG and fetuin(F+P->BSA) for 5h and then transferred to the medium containing BSA alone for an additional 14h culture. The data are expressed as the mean \pm SEM from 4 independent experiments. The asterisk indicates that the differences are significant ($P < 0.05$, t-test) compared to Fet->BSA.

보다 현저하게 증가하였다($P < 0.05$)(그림 8).

7. ZP2의 ZP2_f로의 전환

본 실험의 결과, 체내에서 어느 정도 성숙이 진행된 난자는 혈청 성분이 없는 배지에서 체외 배양할 경우 투명대 경화가 일어나지 않는 것으로 나타났다. 투명대의 경화 현상과 직접적인 관련이 있는 ZP2의 ZP2_f로의 전환 여부를 각각의 배양조건에서 배양된 난자의 투명대를 분리하여 전기영동으로 분석하였다. 그림 9에서 보는 바와 같이 BSA가 든 배지에서 배양되어 투명대 경화가 일어난 ZP2는 대부분 ZP2_f로 전환되었지만 FBS가 든 배지에서 배양되어 투명대 경화가 일어나지 않은 난자의 투명대는 대부분 ZP2의 형태로 나타났다. 이에 대해 hCG 주사 후 5시간째

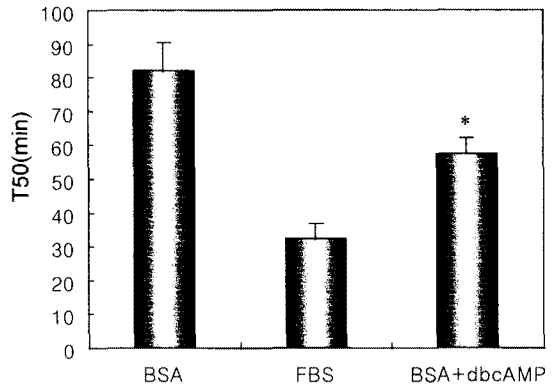


Fig. 8. Effect of dbcAMP to inhibit maturation on zona hardening of CEO during culture *in vitro*. CEOs were cultured in the presence of both BSA and dbcAMP($100 \mu\text{g/ml}$) for 16h after culture, GV oocytes were examined on their zona hardening. The data are expressed as the mean \pm SEM from 4 independent experiments. The asterisk indicates that the differences are significant ($P < 0.05$, t-test) from the FBS control.

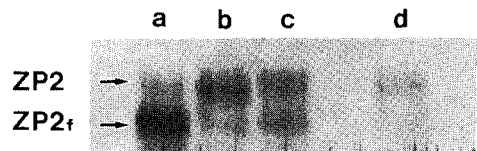


Fig. 9. SDS-PAGE pattern of biotinylated zona pellucida proteins. Lane a; ZP isolated from CEOs cultured in the presence of BSA for 19h, lane b; ZP isolated from CEOs cultured in the presence of FBS for 19h, lane c; ZP isolated from CEOs cultured in the presence of BSA for 14h following maturation *in vivo* for 5h, lane d; ZP isolated from freshly collected GV-intact CEOs.

에 채취하여 BSA가 든 배지에서 14시간 동안 배양된 난자의 투명대는 일부는 ZP₂로의 전환이 일어났지만 대부분 ZP₂의 형태로 존재하는 것으로 나타났다.

고 찰

투명대의 경화는 수정이나 parthenogenetic activation에 의해 난자의 세포질에 존재하는 피질과립의 분비가 일어나서 초래되는 현상으로 다량자 수정을 방지하며 투명대 당단백질인 ZP₂의 구조변화와 직접적인 관련이 있다고 알려져 있다(Moller and Wassarman, 1989; Ducibella *et al.*, 1990a, b; Salang, 1991; Ducibella *et al.*, 1993). 그러나 아직까지 투명대 경화현상의 본질에 대해서는 거의 밝혀지지 않고 있다. 한편 투명대의 경화현상은 생쥐의 미성숙 난자를 혈청 성분이 없는 체외에서 배양할 경우에도 일어나며 이 때의 경화현상은 수정이나 parthenogenetic activation과는 무관하게 나타난다(De Felici and Siracusa, 1982; De Felici *et al.*, 1985).

본 연구에서는 체내에서 성숙이 부분적으로 진행된 난자를 체외 배양을 통해 성숙을 완료시켰을 때 이들 난자에서의 투명대 경화의 유무 및 정도를 chymotrypsin을 이용하여 측정하였다. 또한 투명대 경화와 관련하여 ZP₂의 ZP₂로의 전환을 전기영동 방법으로 분석하였다.

생쥐의 미성숙 난자-난구 복합체를 혈청이 없는 즉, BSA만 포함된 배지에서 체외배양한 결과 배양시간이 경과함에 따라 투명대의 경화정도가 증가하였다. 이러한 결과는 난구세포가 제거된 난자만을 실험재료로 사용한 De Felici와 Siracusa(1982)의 연구결과와 유사하다. 따라서 생쥐 미성숙 난자는 체외배양시 난구세포의 유무에 상관없이 투명대 경화현상을 일으키는 것으로 사료된다.

한편 체내에서 성숙이 어느 정도 진행된 후 즉, hCG 주사 후 3시간 혹은 그 후에 난소로부터 난자-난구 복합체를 수집하여 BSA가 든 배지에서 체외배양한 결과, 성숙이 재개되지 않은 미성숙 난자-난구 복합체를 체외배양한 경우와는 달리 투명대의 경화정도가 현저히 감소하였다. 이러한 현상의 원인은 첫째, 체내에서 성숙이 진행되는 5시간 동안 난자내의 세포질에 변화가 생기고 그 결과, 이후의 성숙과정동안에는 난자의

세포질로부터 더 이상의 피질과립의 분비가 일어나지 않기 때문인 것으로 볼 수 있다. 둘째, 성숙과정동안 난자는 계속해서 피질과립의 분비는 일으키나 투명대 경화를 일으키는 과립효소의 작용이 난구세포에 의해 그 활성이 억제되어 일어나는 것으로 볼 수 있다. 즉 난자 성숙이 일어나는 동안 난구세포가 활성화되어 난자에서 분비된 피질과립 효소에 의한 투명대의 구조변화를 막는 것으로 여겨진다.

본 실험의 결과 체내에서 5시간 동안 성숙이 진행된 난자-난구 복합체를 꺼내어 난구세포를 제거한 후에 BSA가 든 배지에서 체외배양하면 여전히 투명대 경화가 일어나는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 체내에서 성숙이 일부 진행된 난자일지라도 체외배양시에는 여전히 투명대 경화현상, 즉 피질과립 효소를 분비한다는 것을 의미한다. 따라서 이는 위의 설명 중 후자를 뒷받침해준다. 그러나 난구세포의 제거에 사용된 기계적인 방법이 투명대 경화를 유도하였을 가능성도 배제할 수는 없다. 한편 Down등(1986)에 의하면 미성숙 난자를 체외배양하는 동안 난구세포가 존재하게 되면 투명대 경화의 정도가 부분적으로 감소한다는 보고가 있으며 이는 투명대 경화의 억제에 난구세포가 관여하는 것으로 보이는 본 실험결과와 대체로 일치한다.

한편 생쥐 미성숙 난자의 체외배양시 일어나는 투명대 경화현상은 여러 가지 물질들에 의해 억제될 수 있다. 그 중 FBS와 fetuin에 대해서는 비교적 많은 연구가 되어 있는데, 이들은 난자의 피질과립에 의해 분비되는 ZP₂ 전환효소의 억제제로 작용하여 투명대의 구조변화가 일어나지 않도록 하는 것으로 알려져 있다(Schroeder *et al.*, 1990; Kalab *et al.*, 1991; 1993). 본 실험에서는 미성숙 난자-난구 복합체를 5시간 동안 FBS 혹은 fetuin이 든 배지에서 전배양한 후 다시 BSA가 든 배지로 옮겨 배양하고 이들의 투명대 경화정도를 조사해보았다. 그 결과 이러한 처리는 투명대 경화를 억제시키지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 체내에서 어느 정도 성숙을 진행한 난자의 체외배양시 나타나는 투명대 경화의 억제 혹은 감소는 FBS나 fetuin에 의한 투명대 경화 억제는 서로 다른 기작에 의해 일어나는 것으로 여겨진다.

체내에서 5시간 동안 성숙이 진행된 난자의 경우 난구세포의 확장이 어느정도 일어나며 그 이

후의 배양 동안에도 여전히 난구세포의 확장이 유지되는 것을 관찰할 수 있다. 그러나 미성숙 난자를 FBS나 fetuin만이 든 배지에서 5시간 동안 배양하였을 때에는 이러한 현상이 나타나지 않는다. 따라서 생체내에서와 유사한 조건을 갖추기 위해 본 실험에서는 체외에서 난구세포의 확장을 유도하는 것으로 알려진 PMSG(Eppig, 1980; Salustri and Siracusa, 1983)를 fetuin이 든 배지에서 5시간 동안 배양하는 동안 함께 처리하였다. 그 후 이들을 fetuin과 PMSG가 없고 BSA만이 든 배지에 옮겨 배양한 후 투명대 경화정도를 조사한 결과 체내에서 성숙이 재개된 난자의 경우와 유사하게 투명대 경화가 억제되었다. 이러한 결과의 원인은 다음과 같이 설명될 수 있다. 첫째, 난구세포의 확장이 난자-난구 복합체의 체외배양시 난자의 투명대 경화를 억제한다는 것이다. 둘째, PMSG와 같은 생식소 자극 호르몬이 난자-난구 복합체의 체외배양시 난구세포의 확장 여부에 상관없이 난구세포를 자극하여 결과적으로 난자의 투명대 경화현상을 억제한다는 것이다.

한편 난자의 성숙과 투명대 경화와의 관련 여부를 조사하기 위해 체외배양 동안 dbcAMP를 처리해 본 결과 대조군과 비교해볼 때 투명대 경화가 현저하게 일어남이 관찰되었다. 이는 난자 성숙 억제제로 알려진 dbcAMP가 난자의 핵 성숙의 억제에는 관여하지만 세포질의 성숙 억제에는 관여하지 못하는 것으로 추측된다. 즉 생쥐 난자의 세포질은 난포라는 환경으로부터 벗어나면 비록 핵의 성숙이 억제되더라도 세포질의 성숙과정은 부분적으로 진행되는 것으로 사료된다.

마지막으로 체내에서 성숙이 부분적으로 진행된 난자의 체외배양시 보여지는 투명대 경화 억제 효과와 투명대 구조 변화와의 관계를 조사해 보기 위해 체외배양한 난자의 투명대를 분리하여 전기영동으로 분석해 보았다. 그 결과 체내에서 5시간 동안 성숙이 진행된 후 BSA에서 체외 배양한 난자의 투명대는 대부분이 ZP2의 형태로 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 투명대 경화와 ZP2로의 전환이 직접적인 관련이 있다는 이전의 연구결과들과 동일하다(Ducibella et al., 1990a, 1993).

본 연구 결과를 종합해 보면 체내에서 성숙이 일부 진행된 난자는 체외배양시 혈청성분이 없더라도 투명대 경화현상을 나타내지 않으며 이

에는 난구세포가 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 또한 미성숙 난자-난구 복합체를 생식소 자극 호르몬으로 5시간 동안 전처리한 후 혈청 성분이 없는 배지에서 배양하더라도 투명대 경화가 억제되므로 체내 혹은 체외에서 생식소 자극 호르몬의 영향을 받은 난구세포가 투명대 경화의 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 볼 수 있다. 한편 체외에서 인위적으로 난자의 성숙을 억제시킨 경우, 체내에서의 자연적인 성숙 억제는 달리 투명대 경화가 상당히 일어나는 것으로 보아 체외에서의 난자 성숙 억제는 핵의 성숙을 억제할 뿐 특정 세포질의 성숙을 억제하지 못하는 것으로 사료된다.

결 론

생쥐 난자는 체외배양시 혈청성분이 없으면 투명대의 경화현상이 일어나는 것이 잘 알려져 있다. HCG를 주사하여 체내에서 성숙이 일부 진행된 난자-난구 복합체를 채취하여 BSA가 든 배지에서 14시간 동안 배양한 후 chymotrypsin을 처리하여 투명대의 경화정도를 조사하였다. 체내에서 3시간 동안 성숙이 진행된 난자 즉, hCG 주사 후 3시간째에 채취한 핵막이 붕괴된 난자 (GVBD oocyte)를 체외배양한 후 조사한 결과 투명대의 경화정도가 현저히 감소하였으며 5시간 이상 진행된 난자에서는 투명대의 경화가 거의 일어나지 않았다. 한편 hCG 주사 후 5시간째에 난자-난구 복합체를 채취하여 난구세포를 제거한 후 BSA가 든 배지에서 배양한 결과 대조군에 비해 투명대의 경화정도가 현저히 증가하였다. 미성숙 난자-난구 복합체를 투명대 경화 억제제로 알려진 fetuin이 든 배지에서 5시간 동안 배양한 후 BSA가 든 배지로 옮겨 배양한 결과 경화현상의 억제는 나타나지 않았다. 그러나 fetuin과 PMSG를 함께 5시간 동안 처리한 후 BSA가 든 배지로 옮겨 배양했을 때 난자의 투명대 경화는 현저히 감소하였으며 이 때 난구세포의 부분적인 확장도 관찰되었다.

한편 미성숙 난자-난구 복합체를 BSA가 든 배지에 난자 성숙 억제제인 dbcAMP를 첨가하여 배양한 경우는 대조군에 비해 투명대 경화가 현저하게 일어남이 관찰되었다. 또한 체내에서 성숙이 재개된 난자를 재료로 하여 투명대의 경화현상과 직접적인 관련이 있는 ZP2의 ZP2로의 전

환여부를 조사하였다. 즉, hCG 주사 후 5시간째에 난포로부터 난자-난구 복합체를 채취하여 BSA가 든 배지에서 14시간 동안 배양한 후 전기영동 분석한 결과 대부분이 ZP2의 형태로 나타났다.

이와 같은 결과들로 미루어 체내에서 성숙이 재개된 난자들은 체외배양시 투명대 경화현상을 나타내지 않으며 이는 투명대의 구조 변화 즉, ZP2로의 전환이 거의 일어나지 않는다는 사실로도 뒷받침된다. 한편 이러한 투명대 경화의 억제에 난구세포가 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Bleil JD, Wassarman PM: Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 1983, 95, 317-324.
- Choi TS, Mori M, Kohmoto K, Shoda Y: Beneficial effect of serum on fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro*. *J Reprod Fert* 1987, 79, 565-568.
- De Felici M, Siracusa G: Spontaneous hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. *Gamete Res* 1982, 6, 107-113.
- De Felici M, Salustri A, Siracusa G: Spontaneous hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture: II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Res* 1985, 12, 227-235.
- Downs SM, Schroeder AC, Eppig JJ: Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro* by preventing the hardening of the zona pellucida. *Gamete Res* 1986, 15, 115-122.
- Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, Aalberg J, Rangarajan S: Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev Biol* 1988, 130, 184-197.
- Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, Kopf GS, Schultz RM: Precocious loss of cortical granules during oocyte meiotic maturation and correlation with an egg induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol* 1990a, 137, 46-55.
- Ducibella T, Duffy P, Reindollar R, Su B: Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. *Biol Reprod* 1990b, 43, 870-876.
- Ducibella T, Karasawa S, Duffy P, Kopf GS, Schultz RM: Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: Maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-triphosphate and an activator of protein kinase C. *Biol Reprod* 1993, 48, 1251-1257.
- Eppig JJ: Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* 1980, 23, 545-552.
- Greve JM, Salzman GS, Roller RJ, Wassarman PM: Biosynthesis of the major zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis. *Cell* 1982, 31, 749-759.
- Kalab P, Kopf GS, Schultz RM: Modifications of the zona pellucida during oocyte maturation and egg activation: Effects of newborn calf serum and fetuin. *Biol Reprod* 1991, 45, 783-787.
- Kalab P, Schultz RM, Kopf GS: Modifications of the zona pellucida during oocyte maturation: Inhibitory effects of follicular fluid, fetuin, and α_2 HS-glycoprotein. *Biol Reprod* 1993, 49, 561-567.
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- Moller CC, Wassarman PM: Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1989, 132, 103-112.
- Moose J, Kalab P, Kopf GS, Schultz RM: Rapid, nonradioactive, and quantitative method to analyze zona pellucida modifications in single mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 1994, 38, 91-93.
- Saling PM: How the egg regulates sperm function during gamete interaction: Facts and fantasies. *Biol Reprod* 1991, 44, 246-251.
- Salustri A, Siracusa G: Metabolic coupling, cu-

- mulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured in vitro in the presence of FSH or dbcAMP, or stimulated in vivo by hCG. *J Reprod Fert* 1983, 68, 335-341.
- Schroeder AC, Schultz RM, Kopf GS, Taylor FR, Becker RB, Eppig JJ: Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation *in vitro* in the absence of serum. *Biol Reprod* 1990, 43, 891-897.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT: Role of cumulus cells and serum on in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod* 1989, 40, 720-728.
- Wassarman PM: Zona pellucida glycoproteins. *Ann Rev Biochem* 1988, 57, 414-442.
- Wassarman PM: Profile of a mammalian sperm receptor. *Development* 1990, 108, 1-17.
- Yanagimachi R: Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L, Biggers JD, eds. *Fertilization and embryonic development in vitro*. New York: Plenum Press, 1981, 82-184.
-