체세포배양액이 생쥐 난자의 chymotrypsin에 대한 내성에 미치는 영향

김 성례[1] · 정 혜원[2] · 김 성임[1] · 김 해권[3]

이화여자대학교 의과대학, 생물학교실[1], 산부인과학교실[2] 및 의과학연구소 분자생물학부[1,2], 서울여자대학교 생물학과[3]

Effects of somatic cell conditioned medium on the chymotrypsin resistance of mouse oocytes

Kim, Sung Rye[1], Chung, Hye Won[2], Kim, Seong-Im[1] and Kim, Haekwon[3]

Department of Biology[1], Department of Obstetrics & Gynecology[2], Division of Molecular Biology[1,2], Ewha Medical Research Center, College of Medicine, Ewha Womans University, Department of Biology, Seoul Women's University[3]

4 Figures & 1 Table

Send proofs to : 김 성 례
서울시 양천구 목6동 911-1
이화여자대학교 의과대학 의학과
우편번호 158-056
Tel : 02-650-5761
Fax : 02-650-5761

—— 본 논문은 1996학년도 이화여자대학교 교내연구비지원에 의해 이루어졌음.

Abstract

Certain types of somatic cells, as well as follicular cumulus cells associating with mammalian oocytes, are known to produce beneficial effects on *in vitro* fertilization and preimplantation development of mammalian eggs when they are present in oocyte culture medium. To investigate the nature of the effects of somatic cells, the resistance of mouse oocytes against chymotrypsin treatment was examined after culture within various cell conditioned media.

When mouse oocytes matured for 17-18 hr in the presence of cumulus cells were treated with 1% chymotrypsin, half of them remained still alive even after 240 min(t_{50}>240.0). In contrast half of mouse oocytes cultured without cumulus cells underwent degeneration within 65.0 min(t_{50} = 65.0± 13.2 min) of the same treatment. To see if the effects were due to the secretory products of cumulus cells, mouse cumulus cells were cultured for 20 hr in medium containing 0.4% BSA and the supernatant of culture medium(conditioned medium) was taken. After maturation in the cumulus cell conditioned medium, mouse oocytes exhibited t_{50} = 190.0± 10.8 min upon chymotrypsin treatment whereas half of oocytes cultured without conditioned medium degenerated within 25.5 min. Human granulosa cell conditioned medium gave similar effects such that oocytes matured in conditioned medium exhibited t_{50} = 183.3± 19.1 min while t_{50} of control group oocytes was 60.0±6.8 min. Oocytes matured in vero cell conditioned medium exhibited t_{50} = 196.7±8.8 min. On the other hand, amniotic cell conditioned medium resulted in the chymotrypsin resistance of t_{50} = 80.0±8.4 min which was not statistically different from the control value of t_{50} = 48.0± 13.2 min.

Based upon these results, it is suggested that certain somatic cell types including cumulus cells might change the biochemical properties of mouse oocyte membrane during meiotic maturation as revealed by the enhanced resistance against chymotrypsin treatment. Such effects of somatic cells appear to be mediated via the secretory products rather than direct communication between somatic cells and oocytes.

Key words : mouse oocyte, chymotrypsin resistance, conditioned medium, somatic cells

서 론

포유동물의 난포는 기저막을 경계로 난소 내의 다른 조직층과 구분이 되는 구형의 조직으로, 충분히 성장한 난포 내에는 여러 층의 과립세포가 난포기저막의 안쪽을 따라 조밀하게 둘러싸고 있고 난포의 가장 안쪽에는 난포액과 여러 겹의 난구세포로 둘러싸인 난자-난구세포 복합체가 위치하고 있다. 난포액은 과립세포 및 난구세포가 분비하는 스테로이드호르몬, 단백질, 전해질, proteoglycan 등의 여러 가지 물질들로 구성되어 있다. 난자를 둘러싸고 있는 난구세포는 원래는 과립세포와 같은 기원이나 난포의 성장과정 동안 주위의 과립세포와 분리되어 분화한 세포로 성숙한 난자가 배란될 때 같이 수란관 내로 진입하게 된다. 이러한 구조로 인해 난포 내 난자가 수정을 위한 성숙을 일으킬 때에는 난포 내의 과립세포와 난구세포 그리고 난포액의 영향을 받게 된다(Brower & Schultz, 1982). 예를 들어 난자의 성숙과정 동안에 요구되는 에너지원으로는 주로 피루브산이며 이는 난자 자신에 의해 합성되는 것이 아니라 주위의 체세포 즉 난구세포로부터 공급된다는 사실은 잘 알려져 있다(Kim & Schuetz, 1991).

체외에서 성숙한 포유동물의 난자는 체내에서 성숙한 난자와 유사하게 정상적인 수정 및 배발생을 일으키며 때로는 개체로 발생하기도 한다(Schroeder & Eppig, 1984). 그러나 체외에서 성숙한 난자의 수정 및 발생능력은 체내에서 성숙한 경우와 비교해 볼 때 대부분 열등하며 따라서 적절한 체외배양방법을 개발하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

일반적으로 아미노산(Moore & Bondioli, 1993)이나 serum(Eppig *et al*., 1992) 혹은 LH 호르몬(Brackett *et al.*, 1989)이나 estradiol(Gliedt *et al.*, 1996) 등의 물질이 배양액 내에 존재하면 체외배양된 난자의 수정능력 혹은 발생능력이 상당히 증가하며 일부 growth factor(Lonergan *et al.*, 1996) 등도 유사한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 난자를 난포세포나 다른 종류의 체세포와 공배양할 경우에는 이같은 효과가 더욱 큰 것으로 알려져 있다. 돼지의 난자를 난포벽의 일부 조직세포와 공배양할 경우 배양된 난자의 체외수정율이 증가하며(Abeydeera *et al*., 1998), 난포의 과립세포(Maeda *et al.*, 1996)나 수란관세포(Fukui, 1989)와 공배양된 소의 난자, vero cell과 함께 배양된 원숭이의 난자(Lanzendorf *et al.*, 1996)도 수정 후 배발생율이 증가한다.

이러한 결과들로 미루어 포유동물 난자의 체외배양시에 흔히 사용되는 난포세포 혹은 체세포들은 함께 배양되는 난자의 성숙과정에 영향을 미쳐 결과적으로 성숙한 난자의 수정능력 및 발생능력을 증가시키는 것으로 추측된다. 그러나 아직까지 체

세포 등이 성숙과정 동안의 난자에 미치는 영향에 대한 구체적인 기작에 관해서는 거의 알려지지 않고 있다.

본 연구는 같은 종 및 다른 종의 난포세포를 비롯한 몇 종류의 체세포를 배양하여 얻어진 conditioned medium을 사용하여 생쥐 난자를 배양하고 이 때 성숙한 난자들이 chymotrypsin에 대해 나타내는 저항성(chymotrypsin resistance)을 조사함으로써 생쥐 난자의 성숙에 따른 세포막 분화에 미치는 여러 체세포의 영향을 구체적으로 비교 연구하였다.

재 료 및 방 법

1. 실험동물 및 난자의 준비

ICR 계의 3 주된 암컷생쥐에 5 IU의 PMSG를 복강내에 주사한 뒤 45-47시간 후에 경추탈골하여 희생시켰다. 이로부터 난소를 회수한 다음 혈액 및 지방을 제거하기 위해 M2 배양액으로 2-3회 세척하였다. 100μg/ml의 dbcAMP가 함유되어 있는 M2 배양액에서 날카로운 바늘과 핀셋을 이용하여 난포를 터뜨린 후 실험의 목적에 따라 난구세포가 여러 겹으로 치밀하게 부착되어 있는 핵막과 인이 뚜렷하게 보이는 건강한 난자(cumulus enclosed oocyte, CEO)를 골라 수집하여 사용하거나, 난자의 직경보다 약간 큰 미세유리관으로 여러 번 흡입과 배출을 반복함으로써 난구세포를 제거한 난자(denuded oocyte, DO)를 사용하였다.

2. 난자의 배양

수집된 난자는 배양하기 전 기본배양액인 M16으로 세척한 후 사용하였으며 배양방법은 microdroplet 방법을 이용하였다. 즉, 플라스틱 배양접시(Falcon, #3002)에 40 μl의 배양액 drop을 만들고 그 위를 light mineral oil로 덮은 다음 5 % CO_2 및 100 % 습도가 공급되는 37℃ 배양기에서 배양하였다.

3. 배양액과 처리물질

기본배양액인 M16은 NaCl 94.66mM, KCl 4.78mM, KH_2PO_4 1.19mM, $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ 1.19mM, glucose 5.56mM을 혼합하여, 10배 stock solution으로 만들어서 사용하였다. Na-pyruvate(0.33mM), Na-lactate(23.28mM), $CaCl_2$(1.71mM), penicillin(0.06 g/l)과 streptomycin(0.05 g/l)는 100배 농축된 stock solution으로 만들어서 첨가하였다. Na-pyruvate와 Na-lactate는 매주 새로 만들고 $NaHCO_3$(25mM)는 phenol red와 함께 10배 stock solution으로 만들어서 첨가하였다. M2 배양액의 기본조성은 M16과 같으며 20.85mM 농도의 N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2- ethanesulfonic acid(HEPES)를 사용전 첨가하였다. M16 및 M2 배양액에는 0.4%의 bovine serum albumin(BSA)을 첨가한 후 pH를 7.4로 맞춘 후 0.45 μm의 pore size를 갖는 millipore membrane(Millipore)으로 여과 멸균하여 2시간 이상 배양기에서 평형시킨 후 배양에 사용하였다. 한편 체세포의 배양에 사용된 배양액은 10%의 FBS가 첨가된

M199(Gibco)을 사용하였다.
α-chymotrypsin은 Dulbecco's phosphate-buffered salines(DPBS, Gibco)에 1%의 농도로 준비하여 사용하기 전까지 -20℃에서 냉동보관하였다.

4. 체세포 배양액(Somatic cell conditioned medium)의 준비

Mouse cumulus cell conditioned medium

난구세포가 여러겹으로 치밀하게 싸여있는 난자를 수집하여 M16으로 세척하고 배양액 1㎕당 1개의 난자-난구세포 복합체의 비율로 M16이 들어있는 multi-well plate(Miles)에 옮겼다. 그런 후에 난자의 직경보다 약간 큰 미세유리관으로 흡입과 배출을 반복하여 난자와 난구세포를 분리시키고 이때 나온 난자는 배양액에서 제거하였다. 남아 있는 난구세포를 그대로 18-20 시간 동안 배양한 후에 세포를 제외한 배양액만을 회수하고, 여과멸균(0.45㎛, Millopore)하여 밀봉한 후 -20℃에서 실험에 사용하기전까지 냉동보관하였다.

Human granulosa cell conditioned medium

체외수정시술을 받기 위해 이화여자대학교병원을 내원한 환자들을 대상으로, ovum pick-up시 얻어진 human granulosa cell과 blood cell의 혼합물을 45% percoll 위에 올려 원심분리하는 방법으로 human granulosa cell을 얻었다. 얻어진 세포는 M199으로 2회 세척한 후 trypan blue dye exclusion test를 통해 살아있는 세포의 농도를 측정하여 96-well culture plate에 약 5×10^4 cell/well의 농도로 seeding하고 10% FBS가 첨가된 M199 (M199+S)으로 3일간 배양한 후 M16으로 수회 세척하고 같은 배양액으로 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 human granulosa cell은 버리고 남아있는 배양액(human granulosa cell conditioned medium, hGC-CM)을 회수하여 여과멸균하여 난자의 배양액으로 사용하였다.

Vero cell conditioned medium

액화질소에 보관된 cell suspension을 37℃에서 재빨리 녹여 M199+S로 원심분리를 이용하여 세척하였다. Resuspension시킨 후 trypan blue dye exclusion test에 의해 cell의 농도를 결정하였다. 플라스틱 4 well dish(Nunc)에 5×10^4 cells/ml의 농도로 세포

를 심고 M199+S로 배양하였다. 2일간 배양한 후 conditioned medium을 만들기 위해 M199 배양액을 버리고 M16으로 배양액을 바꾸어 다시 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포는 버리고 남아있는 배양액을 회수하여 여과멸균하여 난자의 배양에 사용하였다.

Human amniotic cell conditioned medium

유전학적검사를 위해 내원한 환자에게서 양수천자방법에 의해 양수를 얻어 원심분리하는 방법으로 양수세포의 pellet을 얻었다. 양수와 배양액을 1:1로 혼합하여 25cm^2 culture flask(Falcon)에서 배양하였다. 2-3주간 배양 후 0.5% trypsin을 이용하여 4-well dish(Nunc)에서 5×10^5 cell/ml의 농도로 subculture하였다. 배양액은 FBS가 들어 있는 M199+S를 사용하였다. 3일간 배양 후에 conditioned medium을 만들기 위해 M16으로 배양액을 바꾸어 24시간 배양하고 배양액을 회수하여 여과멸균한 다음 난자의 배양에 사용하였다.

5. Chymotrypsin resistance assay

생쥐 난자를 각각의 배양액에서 17-18 시간동안 배양한 후 0.4%의 polyvinylpyrrolidone(PVP)이 함유된 DPBS로 여러 번 세척한 후 1% chymotrypsin solution에 옮기고 37℃를 유지시키면서 해부현미경 하에서 매 10분마다 난자의 상태를 관찰하였다. 난자의 반수가 죽은 시간을 측정하여 t_{50}으로 나타내었고, 난자들 중 원형질막이 파괴되고 세포질 내용물이 흘러나온 난자들을 chymotrypsin에 의해 죽은 것으로 판정하였다.

6. 통계 처리

Student's t-test를 이용하여 통계적 유의성을 검정하였고, mean(t_{50})± SEM으로 값을 나타내었다.

결 과

1. 생쥐 난구세포가 난자의 chymotrypsin에 대한 내성에 미치는 영향

생쥐의 미성숙난자를 난구세포가 붙어 있는 채(CEO)로 혹은 난구세포를 제거한 후(DO) M16 배양액 내에서 17-18 시간동안 배양하고 제 1 극체를 방출한 성숙한 난자만을 골라 이들에 1%의 chymotrypsin을 처리하고 10 분 간격으로 관찰하여 반수의 난자가 죽는 시간(t_{50})을 측정하였다. 또한 난구세포만을 먼저 배양하여 얻은 conditioned medium으로 DO를 배양한 후 동일한 방법으로 시험하였다. 배양이 끝난 난자에 chymotrypsin을 처리한 결과 일차적으로 난자의 투명대가 먼저 용해되는 것이 관찰되었으며 이어서 난자의 원형질막이 손상되어 세포질이 흘러나오는 것이 관찰되었다. 본 실험에서는 난자의 원형질막이 용해되고 세포질이 터져 나온 것들을 죽은 것으로 판정하였다(Fig. 1).

난구세포가 붙어있는 채로 배양한 난자(CEO)들로부터 배양이 끝난 후 난자만을 분리하여 chymotrypsin을 처리한 결과 반수의 난자가 죽는데 걸린 시간은 240 분 이상으로 나타났다. 그러나 난구세포가 제거된 난자를 같은 방법으로 배양한 후 chymotrypsin을 처리하였을 때는 반수의 난자들이 65.0±13.2 분에 죽는 것이 관찰되었다(Table 1).

또한 난구세포를 18-20 시간 동안 배양하여 얻은 배양액(mouse cumulus cell conditioned medium)에서 DO를 배양하고 1% chymotrypsin에 노출시켰을 때에는 반수의 난자가 죽는 시간인 t_{50}이 190.0±10.8분이었고, conditioned medium이 아닌 M16에서 동일한 방법으로 배양한 대조군의 경우에서는 25.5±2.9 분만에 반수의 난자가 죽었다(Table 1).

2. 사람 과립세포의 conditioned medium이 생쥐 난자의 chymotrypsin에 대한 내성에 미치 는 영향

사람의 과립세포를 M16 배양액에서 24 시간 동안 배양하여 얻은 conditioned medium에서 DO를 17-18시간 동안 배양한 후 위와 같은 방법으로 1%의 chymotrypsin에 노출시켜 난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 조사하였다. 대조군으로는 M16 배양액에서 배양된 DO를 사용하였다. 매번 서로 다른 사람으로부터 얻은 과립세포를 사용하여 총 6회에 걸친 실험 결과 사람 과립세포의 conditioned medium의 효과는 사람에 따라 조금씩 다른 것으로 나타났으나(Fig. 2) 모두 대조군에 비해

생쥐난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 높이는 것으로 나타났다. 각각의 사람 과립세포의 conditioned medium에서 배양된 DO의 평균 t_{50}은 183.3±19.1 분으로써 M16에서 배양한 경우에 얻어진 t_{50}=60±6.8 분보다 높았다($p<0.001$).

3. Vero cell conditioned medium이 생쥐난자의 내성에 미치는 영향

난포세포 이외의 다른 종류의 체세포들이 생쥐난자의 chymotrypsin에 대한 내성에 어떠한 영향을 주는지 조사하기 위하여 vero cell conditioned medium(VC-CM)을 사용하여 실험하였다. DO를 vero cell conditioned medium에서 17-18시간 동안 배양한 후 1%의 chymotrypsin으로 처리하여 t_{50}을 측정하였고, VC-CM 대신 M16에서 배양된 DO를 대조군으로 사용하여 같은 방식으로 t_{50}을 측정비교하여 이를 Fig. 3에 나타내었다. 결과에서 보는 것처럼 VC-CM에서 배양된 DO의 t_{50}은 196.7±8.8 분으로 대조군(t_{50}=63.3±14.6 분)보다 높았다($p<0.001$).

4. 사람의 양수세포 conditioned medium이 생쥐난자의 내성에 미치는 영향

사람의 양수세포를 24 시간 동안 배양하여 얻은 양수세포 conditioned medium(human amniotic cell-conditioned medium, hAC-CM)에 DO를 넣어 17-18 시간 동안 배양한 후 chymotrypsin에 대한 내성을 조사하였다. 그 결과 conditioned medium에서 배양된 후 1% chymotrypsin을 처리한 DO의 t_{50}은 80±8.4 분이었으나 대조군으로 사용한 M16에서 동일하게 배양된 DO의 t_{50}은 48±13.2 분으로 나타나 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4).

고 찰

본 연구의 결과 난구세포가 붙어 있는 채로 배양된 생쥐난자는 난구세포가 없이 배양된 난자에 비해 체외에서 성숙하였을 때 chymotrypsin에 대한 높은 저항성을 나타내었다. 또한 생쥐 난구세포의 conditioned medium을 사용하여 동일한 실험을 한 결과 대조군에 비해 현저히 높은 저항성을 나타내었다. 나아가서 사람의 과립세포나 vero cell의 conditioned medium도 난구세포의 conditioned medium과 마찬가지 효과를 나타내었지만 사람의 양수세포 conditioned medium을 배양액으로 사용한 경우에는 거의 효과가 없었다.

포유동물 난자의 성숙과정은 핵상이나 세포질뿐만이 아니라 및 세포막의 구성에도 많은 변화를 수반한다. 생쥐 난자의 경우 성숙이 진행됨에 따라 세포막의 칼슘 채널의 분포양상(Murnane & DeFelice, 1993), microvillus의 분포양상(Longo & Chen, 1984), 정자와의 세포막 융합능력(Pyrzynska *et al.,* 1996) 등에 변화가 생기며 소의 경우 membrane permeability(Agca *et al.*, 1998)나 미세구조(Suzuki *et al*., 1994)에 변화가 나타나고 이외에 말(Grondahl *et al.*, 1995), 돼지(Pivko *et al.,* 1982), 토끼(McCulloh & Levitan, 1987) 그리고 사람(Ji *et al.*, 1997)의 난자에서도 성숙에 따른 변화가 관찰된다. 특히 생쥐 난자의 체외성숙과정에서 발견되는 피질과립 분포의 변화는 널리 알려진 사실이다(Ducibella *et al.,* 1988). 이같은 변화 즉 성숙에 따른 난자의 세포막 분화의 원인은 생쥐(Evans *et al*., 1995)나 사람(Ji *et al*., 1997), 소(Homa *et al*., 1991)의 예에서 보는 바와 같이 난자의 원형질막을 구성하고 있는 단백질과 phospholipid의 조성에 변화가 생기기 때문으로 여겨지며 본 연구에서 생쥐 난자의 성숙에 따른 chymotrypsin에 대한 내성의 변화는 이를 반영한다. 즉 체세포로부터 분비된 물질이 난자의 성숙에 따른 막구성분의 재배열에 영향을 주고 그 결과 영향을 받지 못한 난자와는 달리 이들 난자의 세포막 단백질들이 chymotrypsin의 작용에 대해 상대적으로 높은 내성을 갖게 되는 것으로 사료된다. 최근의 연구에 의하면 소의 난자의 경우 난구세포의 유무에 따라 난자가 합성하는 단백질에 차이가 생긴다(Edwards & Hansen, 1997)고 알려져 있다.

한편 포유동물의 미성숙난자는 체외에서 성숙할 때 난포세포 혹은 다른 체세포가 존재하면 성숙한 후의 난자의 생존기간이 길어지며 또한 성숙한 난자의 수정율 및 배발생율도 증가한다. 생쥐 난자를 체외배양하면 비록 수정이 되지 않더라도 이들은 배양 후 72시간 정도는 viability를 유지하고 이 후부터 난자들은 세포질이 불규칙하게 분열하는 fragmentation을 나타내며 퇴화하기 시작한다. 그러나 만일 난구세포가 함께 존재하면 fragmentation의 비율이 현저히 감소한다(Sato *et al*., 1987). 또

한 난구세포(Chen *et al*.,1993) 혹은 과립세포(Cecconi *et al*., 1996) 등 난포세포와 함께 배양된 생쥐 난자는 난포세포가 없이 성숙한 난자와 비교해 볼 때 현저히 높은 수정율 혹은 배발생율을 보이는데 이같은 현상은 생쥐뿐만 아니라 흰쥐(Vanderhyden & Armstrong, 1990), 소(Maeda *et al*., 1996), 돼지(Abeydeera *et al*., 1998), 사람(Magier *et al*., 1990; Dandekar *et al*., 1991)의 난자 등에서도 잘 알려져 있다. 또한 난관세포와 난자를 공배양할 경우에도 양(Czlonkowska *et al*., 1991), 소(Gliedt *et al*., 1996)에서 보는 것처럼 수정이 되었을 때 배발생율이 증가하는 것을 볼 수 있으며, vero cell과 공배양된 원숭이의 난자(Lanzendorf *et al*., 1996)에서도 유사한 효과가 나타난다. vero cell은 사람의 미성숙난자의 성숙율도 증가시키는 것으로 보고된 바 있다(Janssenswillen *et al*., 1995). 이러한 보고들로 미루어 체세포와의 공배양은 대부분의 포유동물의 난자의 성숙율, 수정율 혹은 초기배아의 배발생율 등을 향상시키지만 구체적으로 난자가 어떠한 영향을 받게 되며 또한 그 기작은 어떤 것인가에 대한 연구는 거의 알려지지 않고 있다. 이에 대해 본 연구는 이러한 효과가 체세포와 난자간의 직접적인 연락보다는 체세포의 분비물을 통하여 이루어지며 또한 그 결과 성숙에 따른 난자의 원형질막 구성물의 재배열 즉 세포막의 분화가 영향을 받는다는 사실을 보여 주고 있다.

그러나 본 연구에서 나타난 것처럼 모든 종류의 체세포들이 유사한 효과를 나타내는 것은 아니다. 사람의 과립세포의 경우 개인에 따라 생쥐 난자의 chymotrypsin에 대한 내성효과가 조금씩 차이가 있는 것으로 관찰이 되었으며 특히 사람의 양수로부터 채취한 양수세포는 chymotrypsin에 대한 생쥐 난자의 내성을 높여 주지 못하는 것이 관찰되었다. 이에 대한 자세한 원인은 차후 밝혀져야 하겠지만 양수세포로부터 분비되는 물질의 성분내에는 생쥐 난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 증가시킬 수 있는 요인이 결여되어 있거나 혹은 오히려 난자의 세포질성숙을 억제하는 물질이 존재하기 때문으로 볼 수 있다. 이러한 가설은 소의 난자를 소의 amniotic fluid가 함유되어 있는 배양액으로 배양할 경우 amniotic fluid의 함량이 높을수록 난자의 성숙이 저해되며(Ocana-Quero *et al*., 1995), 또한 돼지의 난자를 닭의 amniotic fluid가 함유된 배양액에서 성숙시켜 체외수정을 하면 웅성전핵의 형성율이 현저하게 감소한다(Ocampo *et al*., 1994)는 보고로 설명될 수 있다. 이러한 연구결과들로 미루어 볼 때 생쥐 난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 증가시키는 체세포의 분비물은 cell-specific한 물질로 사료된다.

본 연구의 결과 체세포와 공배양되거나 체세포의 conditioned medium에서 배양된 생쥐 난자는 그렇지 않은 난자에 비해 chymotrypsin에 대한 내성이 상대적으로 매우 강한 것으로 나타났다. 또한 대부분의 포유동물 난자의 수정율 및 배발생율을 증가

시키는 것으로 알려진 난구세포, 과립세포, vero cell 등의 conditioned medium은 내성을 현저하게 증가시켰는데 비해 난자의 성숙이나 성숙된 난자의 수정율을 감소시키는 양수액으로부터 얻은 양수세포의 conditioned medium은 거의 효과가 없었다. 이로 미루어 생쥐 난자의 경우 chymotrypsin에 대한 강한 내성은 성숙에 따른 난자의 정상적인 세포질분화와 밀접한 관계가 있는 것으로 여겨지며 체내에서 성숙한 난자를 대상으로 앞으로 더욱 연구되어야 할 것이다.

결 론

포유동물의 난포 내 난자는 난구세포에 의해 둘러싸여 있고 이 난구세포는 체외배양시 미수정 난자의 생존율 그리고 성숙한 난자의 수정율과 발생율을 높이는 것으로 알려져 있다. 또한 난구세포뿐만 아니라 동종 혹은 이종의 체세포들도 난자와의 공배양시 난자의 수정 및 발생능력을 증가시킨다. 본 연구에서는 생쥐 난자의 체외배양시 난구세포와의 공배양 혹은 체세포의 conditioned medium이 체외성숙한 난자의 chymotrypsin에 대한 내성에 어떤 영향을 주는가를 조사하였다.

난구세포가 붙어있는 채로 0.4%의 BSA가 첨가된 기본배양액 내에서 17 시간동안 배양된 난자(CEO)는 배양이 끝난 후 1%의 chymotrypsin으로 처리한 결과 50%의 난자가 퇴화하는데 걸린 시간(t_{50})이 240 분 이상이었다. 그러나 난구세포가 없이 배양된 난자(DO)는 t_{50}이 65.0±13.23 분이었다. 한편 난구세포를 0.4%의 BSA가 든 기본배양액으로 18-20시간동안 배양하여 얻은 conditioned medium으로 배양된 난자의 t_{50}은 190.0±10.8 분이었고 이 때 대조군의 난자의 t_{50}은 25.5±2.9 분이었다. 사람의 과립세포의 conditioned medium을 배양액으로 사용한 결과 성숙한 난자의 chymotrypsin에 대한 t_{50}은 183.3±19.1 분이었고 이 때 대조군의 t_{50}은 60.0±6.8 분이었다. Vero cell conditioned medium을 배양액으로 사용한 경우 t_{50}은 196.7±8.8 분으로 63.3±14.6 분의 대조군과 비교하여 현저한 차이를 나타내었다. 마지막으로 사람의 양수세포의 conditioned medium에서 배양된 생쥐 성숙난자의 chymotrypsin에 대한 내성은 t_{50}이 80.0±8.4 분으로써 48.0±13.2 분의 대조군과 통계적으로 유의하지 않은 차이를 나타내었다.

위 결과로부터 생쥐의 난구세포는 성숙한 난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 증가시키는 사실로 미루어 생쥐 난자의 체외성숙과정 동안 세포막의 구조에 영향을 미치며 이같은 효과는 난구세포와 난자간의 직접적인 연락이 아니라 난구세포의 분비물에 의해 주도되는 것으로 여겨진다. 또한 난구세포 이외에 난포세포, vero cell 등의 일부 체세포들도 유사한 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

Abeydeera, LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Day BN : Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol Reprod* 1998, 58, 213-218.

Agca, Y, Liu J, Peter AT, Critser ES, Critser JK : Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol Reprod Dev* 1998, 49, 408-415 .

Brackett, BG, Younis AI, Farrer-Hosken RA : Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertil Steril 198*9, 52, 319-324.

Brower, PT, Schultz RM : Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: Existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev Biol* 1982, 90, 144-153 .

Cecconi, S, D'Aurizio R, Colonna R : Role of antral follicle development and cumulus cells on in vitro fertilization of mouse oocytes. *J Reprod Fert* 1996, 107, 207-214.

Chen, L, Russel PT, Larsen WJ : Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 1993, 34, 87-93.

Czlonkowska, M, Eysymont U, Guszkiewicz A, Kossakowski M, Dziak J : Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization, and coculture with oviductal cells. *Mol Reprod Dev* 1991, 30, 34-38.

Dandekar, PV, Martin MC, Glass RH : Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. *Fertil Steril* 1991, 55, 95-99 .

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.

Edwards, JL, Hansen PJ : Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev* 1997,46, 138-145 .

Eppig, JJ, Wigglesworth K, O'Brien MJ : Comparison of embryonic developmental competence of mouse oocytes grown with and without serum. *Mol Reprod Dev* 1992, 32, 33-40.

Evans, JP, Schultz RM, Kopf GS : Identification and localization of integrin subunits in

oocytes and eggs of the mouse. *Mol Reprod Dev* 1995, 40, 211-220.

Fukui, Y : Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. *J Anim Sci* 1989, 67, 1318-1323.

Gliedt, DW, Rosenkrans CF Jr, Rorie RW, Munyon Al, Pierson JN, Miller GF, Rakes JM : Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *J Dairy Sci* 1996, 79, 536-542.

Grondahl, C, Hyttel P, Grondahl ML, Eriksen T, Gotfredsen P, Greve T : Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Mol Reprod Dev* 1995, 42, 94-105.

Homa, ST, Webster SD, Russell RK : Phospholipid turnover and ultrastructural correlates during spontaneous germinal vesicle breakdown of the bovine oocyte: effects of a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor. *Dev Biol* 1991, 146, 461-472 .

Janssenswillen, C, Nagy ZP, Van Steirteghem A : Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocyets to metaphase **II** by coculture with monolayer Vero cells. *Hum Reprod* 1995, 10, 375-378.

Ji, YZ, Bomsel M, Jouannet P, Wolf JP : Modifications of the human oocyte plasma membrane protein pattern during preovulatory maturation. *Mol Reprod Dev* 1997, 47, 120-126 .

Kim, H, Schuetz AW : Regulation of nuclear membrane assembly and maintenance during in vitro maturation of mouse oocytes: role of pyruvate and protein synthesis. *Cell Tissue Res* 1991, 265, 105-112 .

Lanzendorf, SE, Gordon K, Mahony M, Boyd CA, Neely B, Hodgen GD : The effect of coculture on the postfertilization development of in vitro-matured monkey oocytes. *Fertil Steril* 1996, 65, 420-425.

Lonergan, P, Carolan C, Van Langendonckt A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P : Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 1996, 54, 1420-1429.

Longo, FJ, Chen DY : Development of surface polarity in mouse eggs. *Scan Electron Microsc* 1984, Pt 2, 703-716 .

Maeda, J, Kotsuji F, Negami A, Kamitani N, Tominaga T : In Vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and vero cells cultured in exogenous protein- and amino acid-free chemically defined human tubal

fluid medium. *Biol Reprod* 1996, 54, 930-936.

Magier, S, van der Ven HH, Diedrich K, Krebs D : Significance of cumulus oophorus in in-vitro fertilization and oocyte viability and fertility. *Hum Reprod* 1990, 5, 847-852 .

McCulloh, DH, Levitan H : Rabbit oocyte maturation: changes of membrane resistance, capacitance, and the frequency of spontaneous transient depolarizations. *Dev Biol* 1987, 120, 162-169.

Moore, K, Bondioli KR : Glycine and alanine supplementation of culturemedium enhances development of in vitro matured and fertilized cattle embryos. *Biol Reprod* 1993, 48, 833-840.

Murnane, JM, DeFelice LJ : Electrical maturation of the murine oocyte: an increase in calcium current coincides with acquisition of meiotic competence. *Zygote* 1993, 1, 49-60.

Ocampo, MB, Ocampo LC, Mori T, Ueda J, Kanagawa H : Nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes cultured in the amniotic fluid of developing chick embryos. *J Vet Med Sci* 1994, 56, 173-176 .

Ocana-Quero, JM, Moreno Millan M, Valera Cordoba M, Pinedo Merlin M, Rodero Franganillo A : The effect of bovine amniotic fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. *Br Vet J* 1995, 151, 547-554 .

Pivko, J, Motlik J, Kopecny V, Flechon JE : The fate and role of macromolecules synthesized during mammalian oocyte meiotic maturation. II. - Autoradiographic topography of [3H]-fucose incorporation in pig oocytes cultured in vitro. *Reprod Nutr Dev* 1982, 22(1A), 93-106 .

Pyrzynska B, Maleszewski M, Maluchnik D : Mouse oocytes penetrated by sperm at GV or GVBD stage lose the ability to fuse with additional spermatozoa. *Zygote* 1996, 4, 123-128 .

Sato, E, Ishibashi T, Koide SS : Prevention of spontaneous degeneration of mouse oocytes in culture by ovarian glycosaminoglycans. *Biol Reprod* 1987, 37, 871-876.

Schroeder, AC, Eppig JJ : The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Dev Biol* 1984, 102, 493-497.

Suzuki, H, Yang X, Foote RH : Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Mol Reprod Dev* 1994, 38, 421-430.

Vanderhyden, BC, Armstrong DT : Effects of gonadotropins and granulosa cell secretions on the maturation and fertilization of rat oocytes in vitro. *Mol Reprod Dev* 1990, 26, 337-346.

Table 1. Chymotrypsin resistance of mouse oocytes after maturation in the presence of cumulus cells or their secretions.

Culture type	No. of total oocytes examined	Resistance (t_{50})
DO/M16	78	65.0 ± 13.2
CEO/M16	115	>240.0
DO/mCC-CM	58	190.0 ± 10.8
DO/M16	67	25.5 ± 2.9

Either mouse cumulus-enclosed oocytes(CEO) or cumulus-free oocytes(DO) were cultured in M16 or mouse cumulus cell conditioned medium(mCC-CM) for 17-18 hr. After culture, only mature oocytes with a polar body were collected and exposed to 1% chymotrypsin. Resistance, defined as time(min) required for half of oocytes to degenerate during enzyme treatment, was expressed as mean(t_{50})±SEM. Data were obtained by pooling the results of 3 replicates.

Figure Legends

Fig 1. Microphotograph of mouse oocytes before(a) and during(b) chymotrypsin treatment. An arrowhead indicates zona pellucida undergoing dissolution due to the enzyme treatment and arrows indicate degenerated oocytes during enzyme treatment. Scale bar = 70μm.

Fig. 2. Chymotrypsin resistance of mouse oocytes after maturation in human granulosa cell-conditioned medium(hGC-CM). Fig. 2**b** is summation of Fig. 2**a**. Data were obtained by pooling the results of 5 replicates. An asterisk denotes a significant difference(*, $P < 0.001$) from the control group(M16) by t-test.

Fig. 3. Chymotrypsin resistance of mouse oocytes after maturation in vero cell conditioned medium(VC-CM). Data were obtained by pooling the results of 2 replicates. An asterisk denote a significant difference(*, $P < 0.001$) from the control group(M16) by t-test.

.

Fig. 4. Chymotrypsin resistance of mouse oocytes after maturation in human amniotic cell-conditioned medium(hAC-CM). Data were obtained by pooling the results of 4 replicates.