난포세포가 생쥐 난자의 chymotrypsin에 대한 내성에 미치는 영향

김 성임1 · 배 인하2 · 김 해권3 · 김 성례1

이화여자대학교 의과대학, 의학과1 및 의과학연구소 분자생물학부1, 성신여자대학교 생물학과2, 서울여자대학교 생물학과3

Effects of follicle cells on the chymotrypsin resistance of mouse oocytes

Kim, Seong-Im1, In-Ha Bae2, Haekwon Kim3 and Sung Rye Kim1

Department of Biology, Division of Molecular Biology, Ewha Medical Research Center, College of Medicine, Ewha Womans University1, Department of Biology, Sungshin Women's University2, Department of Biology, Seoul Women's University3

7 Figures & 1 Table

Send Proofs to : 김 성 례
이화여자대학교 의과대학 의학과 및 의과학연구소 분자생물학부
서울 양천구 목6동 911-1
Tel) 02-650-5761
Fax) 02-650-5761
E-mail) srkim@mm.ewha.ac.kr

Key words ; Mouse oocyte, Maturation, Chymotrypsin resistance, Follicle cell

ABSTRACT

Mammalian follicle cells are the most important somatic cells which help oocytes grow, mature and ovulate and thus are believed to provide oocytes with various functional and structural components. In the present study we have examined whether cumulus or granulosa cells might play a role in establishing the plasma membrane structure of mouse oocytes during meiotic maturation. In particular the differential resistances of mouse oocytes against chymotrypsin treatment were examined following culture with or without cumulus or granulosa cells, or in these cell-conditioned media..

When mouse denuded oocytes, freed from their surrounding cumulus cells, were cultured *in vitro* for 17-18 hr and then treated with 1 % chymotrypsin, half of the oocytes underwent degeneration within 37.5 min(t_{50} = 37.5 ± 7.5 min) after the treatment. In contrast cumulus-enclosed oocytes showed t_{50} = 207.0. Similarly, when oocytes were co-cultured with cumulus cells which were not associated with the oocytes but present in the same medium, the t_{50} of co-cultured oocytes was 177.5 ± 13.1 min. Furthermore, when oocytes were cultured in the cumulus cell-conditioned medium, t_{50} of these oocytes was 190.0 ±10.8 min whereas t_{50} of the oocytes cultured in M16 alone was 25.5 ± 2.9 min. Granulosa cell-conditioned medium also increased the resistance of oocytes against chymotrypsin treatment such that t_{50} of oocytes cultured in granulosa cell-conditioned medium was 152.5 ± 19.0 min while that of oocytes cultured in M16 alone was 70.0 ± 8.2min. To see what molecular components of follicle cell-conditioned medium are involved in the above effects, the granulosa cell-conditioned medium was separated into two fractions by using Microcon-10 membrane filter having a 10kDa cut-off range. When denuded oocytes were cultured in medium containing the retentate, t_{50} of the oocytes was 70.0 ± 10.5 min. In contrast, t_{50} of the denuded oocytes cultured in medium containing the filtrate was 142.0 ± 26.5 min. T_{50} of denuded oocytes cultured in medium containing both retentate and filtrate was 188.0 ± 13.6 min. However, t_{50} of denuded oocytes cultured in M16 alone was 70.0 ± 11.0 min and that of oocytes cultured in whole granulosa cell-conditioned medium was 156.0 ± 27.9 min. When surface membrane proteins of oocytes were electrophoretically analyzed, no difference was found between the protein profiles of oocytes cultured in M16 alone and of those cultured in the filtrate.

Based upon these results, it is concluded that mouse follicle cells secrete a factor(s) which enhance the resistance of mouse oocytes against a proteolytic enzyme treatment. The factor appears to be a small molecules having a molecular weight less than 10 kDa.

포유류의 난자는 출생직후 제 1 감수분열 전기에 머물러 있으며, 발정기 혹은 사춘기가 되면서 주기적인 endogeneous LH (luteinizing hormone)의 자극에 의해 감수분열이 재개된다. 이때 배란전의 난자는 난소내 난포라는 환경 내에 있으며, 난포 내에서 난자는 여러 겹의 난구세포로 둘러싸여 난자-난구세포 복합체를 구성한다. 이들은 다시 과립세포에 의해 둘러싸여 있으며, 난자-난구세포 복합체와 과립세포사이에는 난포액으로 채워진 난포강(antrum)이 발달한다. 따라서 난자가 체내에서 성장과 성숙을 일으킬 때에는 난포내의 체세포 및 난포액의 영향을 받게 된다.1 난자를 난포에서 분리하여 체외에서 배양하게 되면 비록 황체호르몬(luteinizing hormone)이 존재하지 않아도 자발적인 성숙을 일으키며, 체외배양에 의해 성숙된 포유류의 난자는 체내에서 성숙된 난자와 유사하게 정상적인 수정 및 발생을 일으키며 때로는 출생하기도 한다.2 그러나 체외에서 성숙된 난자의 수정 및 발생능력은 체외성숙시의 배양조건에 의해 많은 영향을 받으며,3 체외에서 성숙한 난자의 수정 및 발생능력은 체내에서 성숙한 난자와 비교해 볼 때 대부분 열등하므로 이를 극복하기 위한 다양한 체외배양방법의 개발이 시도되고 있다.

체외배양시 배양액에 아미노산,4,5 serum6,7, growth factor8,9, 호르몬10 등을 첨가하거나, 체세포들과 공동배양11~13을 하는 경우 전핵형성, 수정 및 발생률이 향상된다. 생쥐난자에서는 체외배양시 난구세포가 있어야만 성숙 후 EGF에 의한 Ca2+ efflux의 oscilation이 일어난다.14 소의 난자의 체외배양시 growth hormone는 성숙률을 현저히 증가시키는데 이같은 효과도 난구세포가 있어야만 나타난다.15 이처럼 난자가 성숙되는 동안의 배양조건은 난자의 세포질 성숙에 영향을 끼치며 결과적으로 난자의 체외수정 및 발생능력을 향상시킨다. 그러나 아직까지 난자의 성숙과정 동안 체세포 등이 난자에 미치는 구체적인 영향에 관해서는 잘 알려지지 않고 있다.

포유동물의 난자는 투명대로 둘러싸여 있는데 이들은 trypsin이나 chymotrypsin 등의 단백질 가수분해효소에 의해 쉽게 제거되지만 때로는 투명대를 제거하기 위해 처리하는 이들 효소에 의해 난자의 원형질막이 치명적인 손상을 받아 결국 죽게 된다.16~19 최근에 본인 등은20, 난자의 체외배양시 수정 및 발생능력에 체세포와의 공동배양 혹은 conditioned medium이 난자의 세포질성숙에 미치는 효과를 모색하기 위한 연구의 하나로써, 난포에서 분리한 생쥐의 미성숙난자를 체외에서 성숙시킨 후 가수분해효소인 chymotrypsin을 처리하면 난자의 체외배양조건에 따라 chymotrypsin에 대한 난자의 내성이 변화한다는 사실을 관찰한 바 있다. 이에 본 연구에서는 난자의 체외배양 시 수정 및 발생율을 현저히 증가시키는 것으로 알려진 난포세포와의 공동배양이나 난포세포의 전배양액(conditioned medium)이 난자의 chymotrypsin에 대한 내성에 어떠한 영향을 나타내는지를 조사하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험 동물 및 난자의 준비

생후 3-4주된 ICR 계의 암컷 생쥐에 5 IU의 PMSG(Intervet)을 복강내주사한 후 45-47시간에 경추 탈골하여 희생시켰다. 이들로부터 난소를 얻어, M2 배양액으로 2회 세척한 후 날카로운 바늘과 핀셋을 이용하여 난포를 터뜨렸다. 실험에 사용된 난자는 난구세포가 여러 겹으로 싸여있고 핵막과 인이 뚜렷하게 보이는 건강한 난자들을 수집하여 사용하였고, 필요에 따라 난자의 직경보다 약간 큰 미세유리관으로 여러번 흡입과 배출을 반복함으로써 난구세포를 제거하였다(Fig. 1).

2. 난자의 배양

수집된 난자는 배양하기 전 M16으로 세척한 후 배양하였으며 배양방법은 microdroplet 방법을 이용하였다. 즉, 플라스틱 배양접시(Falcon # 3002)에 40 l의 배양액 drop을 만들고 그위를 light mineral oil로 덮은 다음 5 % CO2 및 100 % 습도가 공급되는 37℃ 배양기에서 배양하였다.

3. 배양액과 처리물질

본 실험에 사용된 모든 화학물질은 특별한 언급이 없는 한 Sigma(USA)제품을 사용하였다. 기본배양액인 M16은 NaCl 94.66mM, KCl 4.78mM, CaCl22H2O 1.71mM, KH2PO4 1.19mM, MgSO42H2O 1.19mM, glucose 5.56mM 을 혼합하여, 10배 stock solution으로 만들어서 사용하였다. Na-pyruvate(0.33mM), Na-lactate(23.28mM), CaCl2(1.71mM), penicillin(0.06 g/l)과 streptomycin(0.05 g/l)은 100배 농축된 stock solution으로 만들어서 첨가하였다. Na-pyruvate와 Na-lactate는 매주 새로 만들었다. NaHCO3(25mM)는 phenol red와 함께 10배 stock solution으로 만들어서 첨가하였다. M2 배양액의 기본조성은 M16과 같으며 20.85mM 농도의 HEPES를 사용전 첨가하였다. 모든 배양액에는 0.4%의 bovine serum albumin(BSA)를 첨가한 후 pH 7.2-7.4로 맞춘 후 0.22 m의 pore size를 갖는 millipore membrane(Millipore)으로 여과 멸균하여 2시간 이상 배양기에서 평형시킨 후 배양에 사용하였다. Filtrate medium에 첨가한 BSA solution은 50배 농축된 stock을 만든 후에 -70℃에서 사용시까지 보관하였다.

-chymotrypsin은 Dulbecco's phosphate-buffered salines(DPBS, Gibco)에 1%로 녹여 냉동보관한 후 사용하였다.

4. 난구세포의 전배양액(conditioned medium)의 준비

난자-난구세포 복합체를 수집하여 M16으로 세척한 후 배양액 1 l 당 1 개의 난자-난구세포 복합체를 multi-well plate(Miles)에 옮겼다. 그런 후에 미세유리관으로 난자-난구세포 복합체를 여러번 흡입과 배출을 반복함으로써 난구세포를 난자로부터 분리시켰다. 이를 18-20시간 동안 M16으로 배양한 후 배양액만을 회수하여 1,750 ×g에서 원심분리하여 상등액을 얻어 여과멸균(0.45 m, Millipore) 하였다. 이 전배양액(conditioned medium)은 -20℃에서 냉동보관하였다가 사용하였다.

5. 과립세포의 conditioned medium의 준비

난소를 터뜨린 후 얻어지는 과립세포를 수집하여 1,750 ×g에서 원심분리하는 방법으로 2회 세척하였다. 배양액은 FBS(Gibco)가 첨가된 M16을 사용하였고, 4-well culture dish(Nunc)에서 1×106 cells/ml의 농도로 배양하였다. 살아 있는 과립세포의 농도 결정은 trypan blue dye exclusion test를 이용하였다.21 과립세포는 먼저 2 일간 FBS가 함유된 배양액에서 배양하여 배양접시의 바닥에 부착시킨 후 BSA가 들어 있는 배양액을 사용하여 18-20시간 배양하여 전배양액을 얻었다.

필요에 따라 전배양액은 분자량 10kDa의 cut-off range를 갖는 microcon-10 membrane filter(Amicon)를 사용하여 1,750 ×g로 원심분리하였다. 이때 retentate는 M16으로 희석하여 원래의 volume으로 맞추어 사용하였고(retentate medium), filtrate는 BSA 농축 용액을 0.4%가 되도록 첨가하였다(filtrate medium).

6. 단백질 농도의 측정

Microcon-10에 의해 얻어진 배양액내의 단백질 양은 bicinchoninic acid(BCA) assay 방법으로 측정하였다.22 사용된 시약은 Pierce 제품으로 동회사에서 설명한 방법으로 정량분석하였다. Standard는 M16을 희석하여 사용하였다.

7. 전기영동(SDS-PAGE)

전기영동에 사용된 용액들 중 acrylamide-bisacrylamide(Bio-Rad) 용액은 30 : 0.8의 비율로 제조하여 4℃에 보관하였다. Stacking gel buffer stock solution은 0.5M Tris-HCl(pH 6.8), resolving gel buffer stock

solution은 3.0M Tris-HCl(pH 8.8)을 사용하였다. Ammonium persulfate(Bio-Rad)는 1.5%, sodium dodecyl sulfate(SDS, Bio-Rad)는 10%의 농도로 사용하였다. Reservoir buffer는 0.025M Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS로 만들었다. Nonreducing sample buffer는 0.125M Tris, 4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue를 첨가하여 2배 농축하여 만든 후 사용 직전 희석하여 사용하였다. Reducing sample buffer는 nonreducing sample buffer에 5%의 mercaptoethanol을 첨가한 것을 사용하였다. 단백질의 분리는 12.5% acrylamide gel로 Mighty small kit(Hoefer)를 이용하여 200V에서 1 시간 동안 행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 silver staining 방법으로 염색하였다.23

8. 난자의 chymotrypsin resistance assay

체외에서 17-18 시간동안 배양한 후 제 1 극체가 방출된 난자만을 골라 실험재료로 사용하였고 매번의 경우 제 1 극체의 방출률, 즉 성숙률은 90% 이상이었다. 난구세포가 붙어 있는 난자의 경우에는 미세유리관을 이용하여 난구세포를 제거하고, 0.4%의 polyvinylpyrollidone(PVP)이 함유된 DPBS로 여러번 세척한 후 1% chymotrypsin이 든 배지에 옮기고 37℃를 유지시키면서 해부현미경 하에서 매 10분마다 난자의 상태를 관찰하였다. 난자들 중 원형질막이 파괴되고 세포질 내용물이 흘러나온 난자들을 chymotrypsin에 의해 죽은 것으로 판정하였다.

9. 배양된 난자의 전기 영동적 분석

1)배양된 난자 표면의 biotinylation 및 전기영동

배양된 난자는 PVP가 들어 있는 M2(M2-PVP)로 여러번 세척한 후 35℃에서 1 시간 동안 500 g/ml의 NHS-LC-biotin (Pierce)으로 biotinylation을 행하였다.24 반응이 끝난 난자는 M2-PVP로 여러번 세척한 후 SDS-PAGE nonreducing sample buffer에 넣어 -70℃ deep freezer에 보관하였다가 3분간 100℃에서 끓인 후 10% acrylamide gel로 200V에서 1시간 동안 전기영동하였다.

2)Western blotting과 chemiluminescent detection

전기영동이 끝난 gel 내의 단백질을 transfer kit(Hoefer)를 이용하여 nitrocellulose membrane(Bio-Rad)으로 transfer하였다. Transfer buffer로는 0.025M Trizma-base, 0.192M glycine, 20% methanol을 사용하였고 transfer가 끝난 nitrocellulose membrane은 Western Light Plus system(Tropix)을 사용하여 chemiluminescent detection을 하였다. 먼저 nitrocellulose membrane을 0.58M Na2HPO4, 0.17M NaH2PO4, 0.68M NaCl이 함유된 PBS에서 5분간 세척하였다. 0.2% I-Block, 0.1% Tween-20이 포함된 PBS로 1 시간동안 처리한 후 Tween-20이 0.1% 함유된 PBS로 세척하였다. 그런 후 Avidx-alkaline phosphate conjugate를 1 : 20,000로 희석하여 만든 blocking buffer로 20분 동안 반응시키고 세척한 후assay buffer로 chemiluminescent detection을 하였다. Assay buffer는 0.1M diethanolamine, 1mM MgCl2(pH 10)를 사용하였다. Chemiluminescent detection은 N-Block, disodium-3-(4-methoxyspyro-[1,2-dioxyetane-3,2'(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1.]decan]-4-yl) phenyl phosphate (CSPD)용액을 manufacturer's manual에 따라 사용하여 행하였다. 즉, 이 용액에 membrane을 5분간 반응시킨 후 X-ray film(ECL-hyperfilm, Amersham)에 30분간 노출시키고 Kodak RP X-Omat developer를 사용하여 현상하였다.

10. 통계 처리

통계처리는 Student t-test를 이용하였다. 시험된 난자의 반수가 죽는 시간을 측정하여 t50으로 하였고 각각 세 번 이상 시행한 실험결과를 얻어 mean ± SEM으로 나타내었다.

결 과

1. 세포간 연락이 단절된 난구세포와 함께 배양된 난자의 chymotrypsin에 대한 내성

M16에서 난자-난구세포 복합체와 난구세포가 제거된 난자를 각각 17-18시간 배양한 후 chymotrypsin을 처리하여, 1/2이상의 난자가 죽는 시간(t50)을 측정하였다. 처리 도중 난자의 원형질막의 소멸 또는 원형질막의 손상에 의해 세포질이 흘러나오거나 검게 변색되는 것들을 죽은 것으로 판정하였다(Fig. 1).

난구세포의 존재가 난자의 chymotrypsin에 대한 내성에 영향을 주는지 보기 위해 실험을 하였다. 또한 이러한 효과가 난자와 난구세포간의 직접적인 연락에 의한 것인지를 알아보기 위해, 난자로부터 난구세포를 분리시킨 후 이들을 같은 배지에서 함께 배양하였다. 대조군으로는 난구세포를 제거한 난자를 사용하였다.

그 결과 난구세포가 완전히 제거된 난자는 37.5 ± 7.5분으로 나타난 반면, 난자-난구세포복합체의 경우 t50이 207.0 ± 4.8분이었다. 그러나 세포간 연락이 단절된 난구세포와 공동배양된 난자는 177.5 ± 13.2분으로, 난자-난구세포 복합체의 t50에 가까운 값을 보여 주었다(Fig. 2).

2. 난구세포전배양액(cumulus cell-conditioned medium)에서 배양된 난자의 chymotrypsin에 대한 내성

위 실험 결과에서 보여진 것처럼 난구세포는 비록 난자의 성숙기간 동안 직접적인 세포간 연락을 취하지 않더라도 난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 증가시키는 것으로 나타났다. 난구세포에 의한 이러한 효과가 난구세포가 배양액 내로 분비한 물질에 의해 나타나는지를 알기 위해 먼저 난구세포를 M16에서 배양한 배양액, 즉 난구세포전배양액(cumulus cell-conditioned medium ; CC-CM)을 얻어 이 배양액의 효과를 조사하였다. 즉, 난구세포만을 17-18 시간동안 M16으로 배양하여 얻은 배양액만을 얻은 후 여기에 난구세포가 제거된 난자를 넣어서 체외성숙시킨 후 이들 난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 조사해 보았다.

그 결과 대조군으로서 M16에서만 배양된 난자는 t50이 25.5 ± 2.9분인 반면, 난구세포전배양액에서 배양된 난자의 t50은 190.0 ± 10.8분으로 나타나 난구세포전배양액에서 배양된 난자는 chymotrypsin에 대한 내성이 매우 높게 나타났다(Fig. 3).

3. 과립세포전배양액(granulosa cell-conditioned medium)에서 배양된 난자의 chymotrypsin에 대한 내성

난구세포와 마찬가지로 난포내에 존재하는 또 다른 체세포인 과립세포도 난구세포와 유사한 효과를 갖고 있는지를 실험 2에서와 유사한 방법으로 알아보았다.

그 결과 Fig. 4에서 보는 것처럼 M16에서 배양된 난자의 t50은 70.0 ± 8.2분이나, 과립세포전배양액에서 배양된 난자의 t50은 152.5 ± 18.0분으로, 과립세포전배양액도 난구세포전배양액과 마찬가지로 난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 높이는 효과를 가지고 있는 것으로 나타났다.

4. Microcon-10으로 분리된 과립세포전배양액의 효과

과립세포전배양액(granulosa cell-conditioned medium)내의 여러 성분들 중 난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 증가시키는 물질을 좀더 구체적으로 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다. 먼저 다량의 과립세포전배양액을, 분자량 10kDa의 cut-off 범위를 갖는 Microcon-10을 사용하여 각각 retentate와 filtrate로 분리시키고 그런 후 이들 각각의 분획이 나타내는 효과를 조사하였다. 그 결과 과립세포전배양액에서 배양된 난자의 t50이 156.0 ± 27.9분인데 비해, retentate분획 즉 과립세포전배양액성분 중 대체로 분자량 10kDa 이상의 물질이 들어 있는 M16에서 배양된 난자의 t50은 70.0 ± 10.5분, filtrate분획 즉 과립세포전배양액 성분중 대체로 분자량 10kDa 이하의 물질이 들어 있는 M16의 경우에는 142.0 ± 26.5분, retentate분획이 들어 있는 M16과 filtrate분획이 들어 있는 M16을 1 : 1로 혼합한 M16의 경우에는 t50이 188.0 ± 13.6분으로 나타났다. 한편 기본배양액인 M16에서만 배양된 난자의 t50은 70.0 ± 11.0분으로 나타났다(Fig. 5).

5. 과립세포전배양액내 단백질의 분석

과립세포전배양액을 Microcon-10으로 분리하여 얻은 filtrate와 retentate 분획들을 SDS-PAGE로 전기영동한 후 silver staining을 해본 결과 retentate 내에는 분리하기전의 과립세포전배양액과 마찬가지로 분자량 약 10kDa이상의 단백질들이 존재하는 것으로 나타났다. 그러나 fitrate 분획에는 10kDa이상의 단백질들은 없는 것으로 나타났으며 이외에도 다른 단백질은 거의 나타나지 않았다(Fig. 6). 한편 이들

각각의 분획내의 단백질 총량을 BCA assay방법으로 정량분석한 결과 filtrate에는 총 단백질양의 약 5% 정도만이 존재하는 것으로 나타났다(Table 1).

6. Filtrate medium에서 배양된 난자의 표면 단백질의 전기영동적 분석

Filtrate 분획이 들어 있는 배양액에서 배양된 난자의 표면단백질을 biotinylation시킨 후 chemiluminescent detection방법으로 분석한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 결과에서 보는 것처럼 이같은 방법을 사용한 경우 filtrate medium에서 배양된 난자의 표면 단백질과 기본배양액인 M16에서 배양된 난자의 표면 단백질간에는 거의 차이가 없는 것으로 나타났다.

고 찰

본 연구의 결과 난자의 체외배양시 난구세포가 존재하면 단백질 가수분해 효소인 chymotrypsin에 대한 저항성이 현저히 증가하는 것이 관찰되었다. 난구세포의 이러한 효과는 gap junction과 같은 난자와 난구세포간의 직접적인 연락에 의한 것이 아니라 난구세포에서 합성 분비되는 분비물질에 의한 것으로 여겨진다. 또한 chymotrypsin에 대한 난자의 내성을 증가시키는 효과는 난구세포뿐만 아니라 과립세포를 재료로 한 경우에서도 관찰되었다. 난포내 체세포인 난구세포와 과립세포가 갖는 이러한 효과는 사람의 과립세포나 vero cell에서 얻은 전배양액에서도 관찰이 되나 사람의 양수세포의 전배양액은 효과가 없다.20 따라서 모든 체세포가 효과를 갖는 것이 아니라 세포의 종류에 따라 차이가 있는 것으로 여겨진다. 한편 난포세포-전배양액 내의 성분 중 난자의 내성을 증가시키는 요인은 본 연구의 결과 10kDa이하의 분자량을 갖는 물질인 것으로 추측된다.

포유동물의 난자는 많은 난포세포와 난포액에 둘러싸여 체세포들과의 긴밀한 연락에 의해 상호조절되고 있는데 성숙과정에서 핵상 뿐만 아니라 세포질, 난막 등에 많은 변화가 일어난다. 세포막의 칼슘채널의 분포양상,25 microvillus의 분포양상26 등이 변화하며, 세포질 내 단백질의 발현 및 재배치가 일어나며,9, 27~28 정자와의 세포막 융합능력등29 많은 변화가 일어나게 된다. 사람30과 생쥐31, 소32 등의 난자에서는 성숙에 따라 세포막표면 구조에 변화가 일어나며 특히 생쥐난자의 성숙에서 일어나는 피질과립의 변화양상은 널리 알려져 있다.33 또한 Mattioli등은 돼지난자를 과립세포전배양액에서 배양하면 난자의 투명대, 원형질막, 그리고 세포질에 변화가 일어난다고 보고한 바 있고34 Sato 등은 생쥐난자의 배양시 난구세포가 붙어 있지 않는 난자의 퇴화현상이 난구세포가 붙어 있는 난자보다 더 많이 일어나고, 난구세포의 존재가 퇴화현상을 지연하거나 방지하는 역할을 한다고 하였다.35 이로 미루어 포유동물 난자는 성숙에 따라 원형질막을 구성하는 단백질, phospholipid 조성 등에 변화를 일으키는 것으로 여겨진다. Cecconi 등에 의하면 난구세포와 함께 배양된 생쥐난자는 난구세포없이 배양된 난자에 비하여 미세융모의 길이가 현저히 길어진다.26 본 연구에서 나타난 난구세포의 분비물에 의한 난자의 chymotrypsin에 대한 저항성이 원형질막 미세융모의 구조변화에 기인하는 것인지는 좀더 연구가 이루어져야 할 것이다.

Chymotrypsin에 대한 난자의 저항성을 증가시키는, 난포세포의 특이분비물질은 본 연구의 결과 분자량 10kDa 이하의 비교적 작은 물질인 것으로 나타났는데 난자의 분화에 영향을 미치는 난포내 체세포의 분비물에 대해서는 비교적 많은 연구결과가 알려져 있다. 돼지의 난포액내에 존재하는 glycosaminoglycan(GAG)은 체외배양된 돼지난자의 생존을 증가시키는데 아마도 hyaluronic acid와 유사한 특성을 보이는 물질인 것으로 추정된다.36 Dekel과 Sherizly37, Das 등8에 의하면 생쥐, 흰쥐 혹은 사람의 과립세포는 체외배양 시에 growth factor등을 분비한다고 보고한 바 있다. 소의 과립세포는 proteoglycan 등을 합성 및 분비하며 난포의 분화에 이들이 주요한 역할을 할 것으로 제안된 바 있다.38 난포의 구성체세포 중 하나인 과립세포의 경우 LH의 자극에 의해 단백질을 합성하는데 이 중 일부 단백질은 세포 밖으로 분비된다.39 충분히 성장한 사람 난포의 과립세포는 체외배양시 많은 종류의 단백질을 분비하며, 미성숙 난포에서 얻은 과립세포도 유사한 결과를 나타내는 것으로 알려져 있다.40 돼지 난자에서도 난구세포-난자 복합체에 FSH 및 LH를 처리하면 처리하기 전과 비교하여 분비되는 단백질의 발현에 변화가 일어난다.41

EGF는 난포내 난자의 성숙을 유도하고,37 또한 난포액에서도 EGF가 존재하여 성숙을 촉진한다.8 TGF- 의 mRNA의 발현과 과립세포의 steroid의 합성에 깊은 관련이 있음이 보고되었는데, 다른 동물은 EGF가 발현되지 않고 TGF- 의 mRNA만이 발현되는 것으로 알려져 있으나42 흰쥐의 경우에서는 EGF가 과립세포의 증식을 촉진하는 것으로 보고되고 있다.43 Yoshida 등은 돼지난포액내에는 난구세포의 팽창, 핵 성숙뿐만이 아니라 난포내 난자의 정상적인 수정 및 발생을 도와주는 분자량 10,000-200,000 정도의 물질이 존재함을 보고하고 있다.44 그러나 이 물질이 본 연구 결과에서 나타난 10 kDa 이하의 저분자량 물질과 동일한 것인지는 더 연구되어야 할 것이다.

본 연구의 생쥐난자의 chymotrypsin에 대한 내성을 증가시키는 물질이, 위에 언급한 물질들 중의 하나인지 혹은 또 다른 물질인지는 더 연구되어야 할 것이나, 본 연구결과들을 종합하여 볼 때 생쥐 난포세포는 난자의 성숙기간 동안 chymotrypsin에 대한 난자의 저항성을 증가시키는 물질(들)을 분비하며 이 요인(들)은 난구세포 및 과립세포 모두에서 분비되는 것으로 사료된다. 또한 이 물질은 분자량 10kDa 이하의 저분자 물질로 추정된다.

참 고 문 헌

1. 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
2. Schroeder AC, Eppig JJ: The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev Biol* 1984; 102:493-497
3. Eppig JJ, Schroeder AC, O'Brien MJ: Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro : Effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J Reprod Fert* 1992; 95:119-127
4. Ka HH, Sawai K, Wang WH, Im KS, Niwa K: Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured penetrated in vitro. *Biol Reprod* 1997; 57:1478-1483
5. Yamauchi N, Nagai T: Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod* 1999; 61:828-833
6. Kito S, Bavister BD: Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes maturd in vitro with gonadotropins, amino acids and cysteamine. *J Reprod Fert* 1997; 110:35-46
7. Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H: Ultra structure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes:comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev* 1999; 53:325-335
8. Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR, Leung BS: Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* 1991; 55:1000-1004
9. Yoshida Y, Miyamura M, Hamano S, Yoshida M: Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and afterfertilization in vitro. *J Vet Med Sci* 1998; 60:549-554
10. 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 Diary Sci* 1996; 79:536-542
11. 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
12. 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.
13. Yadav PS, Saini A, Kumur A, Jain GC: Effect of oviductal cell co-culture on cleavage and development of goat IVF embryos. *Anim Reprod Sci* 1998; 51:301-306
14. Hill JL, Hammar K, Smith PJ, Gross DJ: Stage-dependent effects of epidermal growth factor on Ca2+ efflux in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1999; 53:244-253
15. Izadyar F, Dijkstra G, Van Tol HT, Colenbrander B, Bevers MM: Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev* 1997; 47:175-180
16. Boldt J, Wolf DP: An improved method for isolation of fertile zona-free mouse eggs. *Gamete Res* 1986; 13:213-222
17. Boldt J, Howe AM, Preble J: Enzymatic alteration of the ability of mouse egg plasma membrane to interact with sperm. *Biol Reprod* 1988; 39:19-27
18. Boldt J, Gunter LE, Howe AM: Characterization of cell surface polypeptides of unfertilized, fertilized and protease-treated zona-free mouse eggs. *Gamete Res* 1989; 23:91-101
19. Zuccotti M, Urch UA, Yanagimachi R: Collagenase as an agent for dissolving the zona pellucida of hamster and mouse oocytes. J Reprod Fert 1991; 93:515-520
20. Kim SR, Chung HW, Kim S-I, Kim H: Effects of somatic cell conditioned medium on the chymotrypsin resistance of mouse oocytes. *K J Fertil Steril* 1998; 25:207-216
21. Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, First NL. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 1986; 35:850-857
22. Wiechelman K, Bram R, Fitzatric T: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay : Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 1988; 175:231-237

23 Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1981; 118:197-203
24. Flaherty SP, NJ Swann NJ: Biotinylation of proteins on the surface of zona-free mouse oocytes. *Mol Reprod Devel* 1993; 35:285-292
25. 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
26. Cecconi S, Focarelli R, Rossi G, Talevi R, Colonna R: Antral follicle development influences plasma membrane organization but not cortical granules distribution in mouse oocytes. *Hum Reprod* 1998; 13:2842-2847
27. Mehlmann LM, Mikoshiba K, Kline D: Redistribution and increase in cortical inositol 1,4,5-triphosphate receptors after meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 1996; 180:489-498
28. Fissore RA, Longo FJ, Anderson E, Parys JB, Ducibella T: Differntial distribution of inositol triphosphate receptor iosforms in mouse oocytes. *Biol Reprod* 1999; 60:49-57
29. Wheeler E, Berger T, Behboodi E: Bovine oocyte plasma membrane binding sites for sperm plasma membrane during in vitro oocyte maturation and fertilisation. *Zygote* 1996; 4:67-72
30. 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
31. 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
32. 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
33. 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
34. Mattioli M, Galeati G, Seren E: Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res* 1988; 20:177-183
35. Sato E, Ishibashi T, Koide SS: Prevention of spontaneous degeneration of mouse oocytes in culture by ovarian glycosaminoglycans. *Biol Reprod* 1987; 37:871-876
36. Sato E, Miyamoto H, Koide SS: Glycosaminoglycans in porcine follicular fluid promoting viability of oocytes in culture. *Mol Reprod Devel* 1990; 26:391-397
37. Dekel N, Sherizly I: Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocyets. *Endocrinology* 1985; 116:406-409
38. Lenz RW, Ax RL, First NL: Proteoglycan production by bovine granulosa cells in vitro is regulated by calmodulin and calcium. *Endocrinology* 1982; 110:1052-1054
39. Rabahi F, Monniaux D, Pisselet C, Chupin D, Durand P: Qualitative and quantitative changes in protein synthesis of bovine follicular cells during the preovulatory period. *Mol Reprod Devel* 1991; 30:265-274
40. Sandow BA, Namy CA: Preliminary characterization of proteins secreted by human granulosa cells in culture. *Biol Reprod* (Suppl.) 1985; 32: 46
41. Schroeter D, Meinecke B: Comparative analysis of the polypeptide pattern of cumulus cells during maturation of porcine cumulus oocyte complexes in vivo and in vitro. *Reprod Nutr Dev* 1995; 35:85-94
42. Yeh J, Lee GY, Anderson E: Presence of transforming growth factor-alpha messenger ribonucleic acid (mRNA) and absence of epidermal growth factor mRNA in rat ovarian granulosa cells, and the effects of these on steroidogenesis in vitro. *Biol Reprod* 1993; 48:1071-1081
43. Fuginaga H, Yamoto M, Nakano R, Shima K: Epidermal growth factor binding sites in porcine granulosa cells and their regulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 1992; 46:705-709
44. Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba K, Kojima Y: Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J Reprod Fert* 1992; 95:481-488

Table 1. Total protein contents of fractionated granulosa cell-conditioned medium.

	Total protein (mg/ml)	% of GC-CM
GC-CM	3.895 ± 0.078	100 %
Retentate	3.875 ± 0.102	99.5 %
Filtrate	0.1915 ± 0.055	4.9 %

Total protein contents were determined by the BCA assay method. GC-CM ; granulosa cell -conditioned medium. Data were obtained by pooling the results of 2 replicates and the values are expressed as mean50 ± SEM.

Figure Legends

Figure 1. Photomicrographs of mouse oocytes.
A; cumulus cell-enclosed oocytes(an arrow) and cumulus cell-removed oocytes(an arrowhead) are both at germinal vesicle stage before culture, B; oocytes exposed to 1% chymotrypsin. Note some oocytes are undergoing degeneration(arrows) during the exposure(magnification ×100). Scale bar = 70μm.

Figure 2. Effects of the cumulus cells on the chymotrypsin resistance of mouse oocyte cultured in vitro.
DO ; denuded oocytes, CEO ; cumulus-enclosed oocytes, DO + CC ; denuded oocytes with dissociated cumulus cells. Data were obtained by pooling the results of 3 replicates and the values are expressed as mean±50 ± SEM. Asterisks denote a significant difference(★, P< 0.001) from the control group(DO) by t-test.

Figure 3. Effects of cumulus cell-conditioned medium (CC-CM) on the chymotrypsin resistance of mouse denuded oocytes cultured in vitro.
Data were obtained by pooling the results of 3 replicates and the values are expressed as mean±50 ± SEM. An asterisk denotes a significant difference(★, P< 0.001) from the control group (M16 + BSA) by t-test.

Figure 4. Effects of granulosa cell-conditioned medium (GC-CM) on the chymotrypsin resistance of mouse denuded oocytes cultured in vitro.
Data were obtained by pooling the results of 3 replicates and the values are expressed as mean±50 ± SEM. An asterisk denotes a significant difference(★, P< 0.001) from the control group (M16 + BSA) by t-test.

Figure 5. Effects of fractionated granulosa-conditioned medium (GC-CM) on the chymotrypsin resistance of mouse denuded oocytes cultured in vitro.
A ; M16 + BSA, B ; GC-CM, C ; retentate medium, D ; filtrate medium, E ; mixture of filtrate medium and retentate medium. Data were obtained by pooling the results of 4 replicates and the values are expressed as mean±50 ± SEM. Asterisks denote a significant difference(★, P< 0.001 ; ★★, P< 0.05) from the control group (M16 + BSA) by t-test.

Figure 6. SDS-PAGE of proteins secreted by mouse granulosa cells during culture for 20hr in vitro.
Lane 1; GC-CM, 2; retentate medium, 3; filtrate, 4; retentate + filtrate medium, 5; M16 medium, 6; wide-range molecular weight marker(Sigma).

Figure 7. Western blot analysis of surface proteins of mouse oocytes cultured in the presence of granulosa cell secretions or not.
Lane 1; Marker protein(Tropix), 2; oocytes cultured in the Microcon-10 filtrate of granulosa cell-conditioned medium(118 oocytes), 3; oocytes cultured in M16 + BSA alone(131 oocytes).