착상기간의 자궁내 환경이 생쥐 난자 및 배아의 투명대 미세구조에 미치는 영향

한성원[1,3], 정호삼[2], 강희규[3], 이호준[3,4], 계명찬[5], 김성례[6], 김문규[1]

한양대학교 자연과학대학 생명과학과[1]

한양대학교 의과대학 해부학교실[2]

을지병원 의과학연구소[3],

을지대학교 의과대학 생리학교실[4]

경기대학교 이과대학 생물학과[5]

이화여자대학교 의과대학 의학과[6]

The Effect of Uterine Environment during Peri-implantation Period on the Ultrastructure of Zona Pellucida in Mouse Oocytes and Embryos

Sungwon Han[1,3], Ho Sam Chung[2], Hee-Gyoo Kang[3], Ho Joon Lee[3,4], Myung Chan Gye[5], Sung Rye Kim[6], Moon Kyoo Kim[1]

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul, 133-791, Korea[1]

Department of Anatomy, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, 133-791, Korea[2]

Eulji Medical Science Institute, Eulji Medical Center, Seoul 139-711, Korea[3]

Department of Physiology, School of Medicine, Eulji University, Taejon 301-112, Korea[4]

Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea[5]

Department of Medicine, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea[6]

연락처: 김문규, 서울특별시 성동구 행당동 산 17번지 한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Tel: 02-2290-0954, Fax: 02-2295-1960, Email: kimmk@email.hanyang.ac.kr

ABSTRACT: In the studies on the hatching mechanisms in mammals, many investigators focused on the embryonic intrinsic factor(s) in *in vitro* culture, but the uterine environment as an extrinsic factor(s) is thought to play an important role in hatching mechanism. Therefore to evaluate the effect of uterine environment on the hatching event *in vivo*, the immature(GV) and ovulated (MII) oocytes, and the late 2-cell embryos of mouse were transferred to pseudopregnant foster mother's uterus during peri-implantation period. So it was verified whether there would happen hatching by only uterine environment independently on embryonic stage. The ultrastructural changes of the zona surface of transferred group were compared with those of *in vivo* and *vitro* group by SEM. 36hrs after transfer, the immature and ovulated oocytes almost degenerated, and the late 2-cell embryos developed to various embryonic stages. However, the embryos which didn't develop to blastula stage did not hatch. The ultrastructural network of ZP in transferred group seemed to be smoothed uniformly, which was different from *in vitro* group. In conclusion, it is suggested that the uterine environment during peri-implantation period enhances the embryo hatching by provoking the structural change of ZP.

Key words: Hatching, Mouse embryos, Zona pellucida (ZP), Uterus, SEM

서 론

수정 후 포유류의 초기 배아는 밀집화(compaction), 포배형성 (blastocyst formation), 부화 (hatching), 착상(implantation) 등 역동적인 여러 사건을 통해 하나의 개체로 발생한다. 특히 배아가 투명대(zona pellucida, ZP)로부터 이탈하는 부화현상은 배아가 모체의 자궁내막에 착상하기 위해서 선행되어야만 하는 중요한 사건이다.

투명대는 포유류의 난자가 분비하여 형성되는 당단백질(glycoprotein)의 두꺼운 막으로서 성장 시기 중 2차 난포 (secondary follicle) 시기에 형성되어 난자가 성숙하면서 복잡한 구조로 변화한다. 또한 종에 따라 당단백질의 종류와 구조는 다양하며 생쥐의 경우 ZP1 (200 kD), ZP2 (120 kD)와 ZP3 (83 kD) 등 3 종류의 당단백질로 구성되어있다 (Wassarman, 1988). 투명대는 수정 직후 피질반응(cortical reaction)과 투명대반응(zona reaction)을 통해서 생화학적 구조가 변화하여 다수정(polyspermy)을 방지하고, 배아를 외부 환경으로부터 보호하며, 배아의 형상을 유지시켜 준다.

부화는 포배강의 확장에 의한 팽압의 증가와 특정 단백질 분해효소에 의한 투명대 용해에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다 (Pinsker *et al*., 1974; Perona and Wassarman, 1986). 그러나, 일부 보고에 의하면 팽압은 부화와는 무관하며 주로 단백질 분해효소 등에 의해 투명대가 용해되는 것이 부화의 주된 기작이라고 알려져 있다 (Gordon and Dapunt, 1993: cheon *et al*., 1997).

부화에 관련된 여러 가지 단백질 분해효소들은 이미 극피동물 (Yasumasu, 1961; Edwards *et al*., 1977), 양서류 (Caroll and Hedrick, 1974; Katagiri, 1976), 파충류 (Yamagami, 1972) 등에

서 잘 알려져 있다. 생쥐의 경우, 모체의 자궁액에는 단백질 분해효소가 존재하며 (Pinsker *et al*., 1974), 포배의 영양외배엽(trophoectoderm)에서 분비하는 trypsin과 유사한 단백질 분해효소 (trypsin-like proteinase)인 strypsin이 부화를 유도하는 것으로 보고되었다 (Perona and Wassarman, 1986; Sawada *et al*., 1990). 그리고 착상 시기에 포배의 영양외배엽이 분비하는 효소의 일종인 tissue type plasminogen activator (t-PA)는 착상시에는 trypsin 유사 효소의 기능을 가지고 있다 (Strickland *et al*., 1976).

체외(*in vitro*)에서 배양한 배아의 부화기작과 체내(*in vivo*)에서의 부화기작은 상당히 다른 것으로 알려져 있다. 배양 상태에서 투명대는 배아에 의해 찢겨진 후 빈 투명대(ghost ZP, shed ZP)가 그대로 남아있게 되지만 체내에서 부화가 진행된 경우에는 빈 투명대는 사라지게 된다 (McLaren, 1970). 이는 자궁에서 분비한 lysin과 같은 단백질 분해효소에 의해 용해되는 것이라고 추정된다. 특히 hamster의 경우 자궁에서 분비하는 proteolysin이 능동적으로 부화에 관여하는 것으로 보고되었다 (Gonzales and Bavister, 1995). 그러나 생쥐의 경우 자궁의 환경보다는 산소유리기(oxyradical) (Thomas *et al*., 1997)나 여러 단백질 분해효소 등과 같은 배아 자체의 요인에 의해서 투명대를 직접 용해하는 것으로 보고되고 있고 (Perona and Wassarman, 1986; Confino *et al*., 1997), 배아와 자궁의 상호 조절에 의한 기작이라는 중론적인 의견이 제시되고 있다 (McLaren, 1970; Gonzales and Bavister, 1995).

많은 종(species)에서 배아의 부화에 대한 연구가 진행되었지만 생체 내에서의 연구는 부진한 상태이다. 그 이유는 생쥐의 경우처럼 비교적 짧은 몇 시간동안에 부화가 일어나고 부화와 투명대의 용해(lysis) 현상이 매우 근접하여 일어나기 때문이다 (McLaren, 1970).

본 연구에서는 자궁내 환경이 투명대 미세구조의 변화에 미치는 영향을 조사하기 위해 자궁과 시기적으로 일치하지 않는 난자와 초기 배아를 착상기간의 자궁내로 이식하여 배아의 발생시기와 부화의 관계와 그리고, 자궁에서 분비하는 lysin같은 효소들이 부화를 어떻게 일으키는 지를 알아보고자 하였다. 또한 주사전자현미경(scanning electron microscope)을 이용하여 이들 이식군의 투명대 외면(surface)의 미세구조 변화를 정상군 및 체외배양군과 비교 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 난자 및 배아의 획득

실험동물은 광주기를 명(light) 14시간, 암(dark) 10 시간으로 조절하고, 물과 먹이를 충분히 공급하여 사육된 생쥐(Swiss Albino, ICR)로서 생후 8 10 주 된 암컷과 10주 이상된 수컷을 사용하였다. 난자와 배아의 획득을 위한 모든 생쥐들은 경추파괴로 도살하였다. 난자와 배아의 수집을 위한 기본배양액으로는 0.4 %의 bovine serum albumin (BSA)이 함유된 Hepes-buffered Medium 2 (M2+BSA; Fulton and Whittingham, 1978)를 사용하였다.

미성숙 난자(GV stage oocyte) 획득은 암컷의 복강에 pregnant mare's serum gonadotropin

(PMSG, Sigma) 5 IU를 복강 주사한 후 45 46 시간에 난소를 적출하고 M2 배양액으로 세척하여 혈액을 제거한 다음 해부현미경(Wild, M5) 시야에서 예리한 바늘로 난포(follicle)를 터뜨려 핵막(germinal vesicle, GV)이 보이는 난자만을 수획하였다.

배란 난자 (MⅡstage oocyte)는 복강에 PMSG 5 IU를 주사한 후 48 시간만에 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma) 5 IU를 주사하여 과배란을 유도하고, hCG 주사 후 19 20 시간에 수란관의 팽대부에서 난자-난구복합체(oocyte-cumulus complex)를 적출한 다음, 0.3 mg/ml의 hyaluronidase (Sigma)로 난구세포(cumulus mass)를 녹여내어 수획하였다.

후기 2-세포기 배아의 획득은 암컷에 PMSG와 hCG를 48 시간 간격으로 5 IU 씩 복강주사하여 과배란을 유도한 뒤 수컷과 합사시켰고, 다음날 질전(vagina plug)이 확인된 암컷들에서 hCG 주사 후(post hCG injection) 47 48 시간만에 수란관을 적출하여 M2+BSA 배양액으로 관류시켜 2-세포기의 배아만을 수획하였다.

획득한 난자 및 배아는 3%의 BSA를 함유한 KSOM 배양액 (Lawitts and Biggers, 1993)이 담긴 조직배양접시(Tissue culture dish, 60×15 mm, Corning 25010)로 옮긴 다음, 대리모의 자궁으로 이식하거나 배양하였다.

2. 대리모의 가임신 유도

대리모(foster mother)를 얻기 위하여 암컷 생쥐를 2주 전에 미리 수란관(oviduct)을 결찰(ligation)하였고, 가임신(pseudopregnancy)을 유도하기 위해서 PMSG 5 IU와 hCG 5 IU를 48 시간 간격으로 복강 주사하여 배란을 유도시킨 다음 수컷과 합사시켰다. 다음 날 오전에 질전이 발견된 암컷만을 선별하여 대리모(foster mother)로 사용하였다.

3. 난자 및 배아의 이식 (oocyte/embryo transfer)

대리모로 사용할 암컷 생쥐가 hCG 주사후 75 76 시간이 되었을 때 2.5 % Avertin을 체중 1 g 당 0.014 ml의 기준으로 복강 주사하여 마취시키고 등쪽으로 절개하여 자궁을 꺼냈다. 바늘(26 gauge)로 좌우 자궁의 상단부에 구멍을 낸 후 미리 준비된 공여 난자나 배아를 glass pipette를 이용하여 각각의 자궁각(uterine horn)에 10 개씩 이식하였다.

4. 정상군 및 이식군의 수획

정상군(*in vivo* group)은 배란을 유도하여 수컷과 합사시킨 후 질전이 확인된 암컷에서 획득하였다. hCG 주사후 96 112 시간 사이에서 자궁을 적출한 후 자궁경부로부터 1 ml의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)을 3회 이상 관류시켜 배아를 수획하였다

이식군(transferred group)은 난자 및 배아를 이식받은 대리모가 이식 후 36 시간(hCG 주사 후 111 112 시간)이 되었을 때 자궁을 적출한 후 자궁경부로부터 1 ml의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)을 3회 이상 관류시켜 이식시킨 난자와 배아를 수획하였다.

5. 체외배양 (*In vitro* culture)

체외배양군(*in vitro* cultured group)은 이식군을 위한 동일한 집단에서 획득한 공여난자나 배아로서 3mg/ml의 bovine serum albumin을 함유한 KSOM 배양액이 담긴 조직배양접시(Tissue

culture dish, 60×15mm, Corning 25010)에서 37℃, 5 %의 이산화탄소(CO_2)와 95 %의 공기가 혼합공급되고 100 % 습도가 유지되는 배양기(Cellstar, QWJ500)에서 이식군이 자궁내 환경에 노출되는 기간과 동일하게 36 시간동안 배양하였다.

6. 주사전자현미경 관찰

투명대의 외면(outer surface)을 주사전자현미경으로 관찰하여 미세구조를 분석하였다. 모든 시료는 0.5 % glutaraldehyde (Sigma)가 함유된 PBS로 4℃에서 하루동안 고정한 후, PBS로 3회 이상 세척하여 0.1 %의 poly-L-lysin 용액(Sigma)으로 얇게 덮인 유리 slide (8 mm×8 mm)에 시료가 건조되지 않도록 주의하여 부착하였다. 시료가 부착된 slide는 0.1 % osmium tetroxide (OsO_4)로 1 시간동안 후고정 (post fixation)하였다. 이렇게 준비된 시료는 일련 농도(50 100%)의 ethanol(Merk)로 탈수과정(dehydration)을 거친 후 이산화탄소와 친화력이 좋은 isoamylacetate로 치환한 다음 액화 이산화탄소 임계건조기(Critical Point Dryer; HITACHI, HCP-2)를 사용하여 건조시켰다. 건조된 시료는 알루미늄 시료 고정대(specimen holder, stub)에 휘발성 접착제를 이용하여 부착시키고 접착제가 완전히 마르면, 고진공상태에서 이온분사기 (HITACHI, E-1010)를 이용하여 금이온(Au^{2+})을 20nm의 두께로 시료의 표면에 증착시킨 후 주사전자현미경 (HITACHI, S-2380)으로 15 25kV의 전압 상에서 관찰하였다.

결 과

1. 정상군(*In vivo* group)에서의 부화기간

본 실험에서 정상군의 경우, hCG 주사시간을 기준으로 하였을 때, 96 시간 이전에는 부화가 전혀 진행되지 않았으며(0%), 96 시간에서부터 104 시간사이에서 부분적으로 투명대를 찢고 나오거나(10%) 완전히 부화한 포배(12%)가 관찰되었고 104 시간에서부터 112 시간사이에서 주로 부화가 완전히 진행되어 투명대가 남아 있지 않는 포배(50%)가 관찰되었다. 112 시간에서는 대부분의 배아가 부화하였고(55%) 부화과정에 있는 배아는 전혀 관찰되지 않았으며 부화하지 않은 포배는 주로 수축된 포배였다(32%) (Fig. 1).

2. 정상군의 투명대 미세구조 변화

정상군의 투명대 외면의 미세구조를 살펴보면, 미성숙 난자(GV oocyte; 46 hrs post PMSG injection)는 완만한 굴곡을 보이는 구멍이 적은 형상(Fig. 2A)이고 배란 난자(20 hrs post hCG injection)는 방사관 세포(corona radiata cells)의 세포질 돌기가 자리했던 구멍이 많이 보이는 해면체 구조이었다 (Fig. 2B). 2-세포기 배아(48 hrs post hCG injection)는 굴곡이 심한 망상구조가 더 선명하고 (Fig. 3A), 말기 포배(96 hrs post hCG injection)에서는 비교적 표면이 평평해지고 구멍이 매우 작아져 있었다 (Fig. 3B). 수축된 포배(shrunk blastocyst; 112 hrs post hCG injection)에서는 망상구조는 보이지 않고 매끈한 모양이었다 (Fig. 3C).

3. 이식군(Transferred oocyte/embryo group)의 투명대 미세구조 변화

Fig. 1의 결과에 근거하여 hCG 주사후 96 시간까지는 부화는 일어나지 않았으며 112 시간 (post hCG injection)에는 충분히 부화가 진행되었다고 판단하고 이를 기준으로 하여 가임신된 (pseudopregnant) 대리모가 hCG 주사 후 76 시간이 되었을 때 난자나 배아를 이식하였고, 96 시간이나 112 시간이 되었을 때 이식군을 관류법으로 수거하였다. 이식된 후 대다수 미성숙 난자(82%)와 배란 난자(84%)는 퇴화되었고, 이식된 2-세포기 배아는 대리모의 자궁으로 이식된 후 대리모가 hCG 주사 후 96 시간이 되었을 때 (이는 20 시간동안 자궁 환경에 노출된 때) 초기 포배기까지 발생이 진행되었으나 부화가 진행된 것은 없었고(data were not shown), 112 시간 (36 시간동안 자궁 환경에 노출된 때)에서도 거의 전부가 부화되지 않았으며 체외배양군과 비교하였을 때 대부분이 발생을 진행하지 못하였다 (Table 1).

이들 이식군의 투명대 미세구조를 살펴보면 2-세포기의 배아의 경우, 정상군이 부화가 진행되기 전인 hCG 주사후 96 시간에 수획된 배아의 투명대는 평평한 해면체 구조로서 구멍이 보이지만 (Fig. 4C) 112 시간에 수획한 배아는 구멍이 거의 사라지거나 매우 매끈한 모양이다 (Fig. 4A). 112시간에 수획한 이식군의 미성숙 난자와 배란 난자의 투명대도 전체적으로 매끈한 모양이지만 미성숙 난자의 것이 조금 더 거칠은 형상을 나타내었다 (Fig. 5A and 6A).

4. 체외배양군(*In vitro* group)의 투명대 미세구조 변화

체외배양군은 이식군이 자궁 환경내에 노출되는 시간과 동일하게 36 시간동안 체외배양하였다. 이때 체외배양군의 난자 및 배아는 이식군과 동일한 암컷에서 획득한 것들이었다. 말기 2-세포기의 배아는 포배강이 형성되기 시작하는 초기 포배(26.7%)와 상실배(73.3%)로 발생하였고 (Table 1), 미성숙 난자와 배란 난자는 대부분이 퇴화하였다.

이들 체외배양군의 투명대 외면의 미세구조는 이식군의 것과는 다른 양상을 나타내었다. 2-세포기에서부터 36 시간동안 배양되어 상실기(morula)에 도달한 배아의 투명대 외면은 해면체 모양으로 구멍이 크고 망상구조의 연결이 부드럽게 보였다 (Fig. 4B). 배양된 미성숙 난자는 망상구조가 굵고 굴곡이 있는 모양으로 변하였고 (Fig. 5B), 배란 난자는 망상구조의 구멍이 없어지는 양상을 나타내었다 (Fig. 6B).

고 찰

포유류 배아에서 부화 기작으로는 포배강의 확장에 의한 팽압설과 단백질 분해요인에 의한 용해설 두 가지가 있는데 팽압은 부화와는 무관한 것으로 보고되고 있으나 (Gordon and Dapunt, 1993) 부화에 관련된 여러 가지 단백질 분해효소들은 계속 발견되고 있다.

특히 체외 배양기술의 발달로 말미암아 배아 자체에서 분비하는 부화인자들에 관하여 많은 것들이 밝혀졌다. 포배의 영양외배엽에서 분비하는 strypsin, tissue type plasminogen activator, hepsin, metalloproteinase 등과 같은 단백질 분해효소와 포배에서 급격히 발생하는 oxyradical은 투명대를 직접 용해하는 것으로 보고되었다 (Caroline *et al*., 1996; Perona and Wassarman, 1986; Thomas *et al*., 1997; Vu *et al.,* 1997). 그러나, 체외에서 배양한 배아의 부화현상과 체내에서의

부화현상은 상당히 다른 것으로 알려져 있으며 (McLaren, 1970) 생체 모델(*in vivo* model)로서 부화에 관한 초창기 연구에서는 자궁의 내분비학적 환경 변화에 따라 투명대가 사라지는 현상(zona pellucida lysis)은 착상기간을 전후하여 증가된 자궁액의 단백질 분해 능력(proteolytic activity)에 의한 것이며(Pinsker *et al.*, 1974), 이런 현상은 생쥐의 경우 estrogen에 의존적이고 (Orsini and McLaren, 1967; McLaren ; 1970) 햄스터 및 토끼에서는 progesterone에 의존적인 것으로 보고되었다 (Gonzales and Bavister, 1995).

최근에 다시 체내(*in vivo*) 환경의 중요성이 대두되면서 이 방향으로 연구가 진행되고 있다 (Gonzales and Bavister, 1995; Lee *et al.,* 1997). 특히, 사람의 불임 치료를 위한 IVF-ET (*In Vitro* Fertilization-Embryo Transfer) 시술과정에서 배아의 체외배양은 불가피한데 이때 일어나는 투명대의 경화현상(zona hardening)은 부화율 감소의 원인이 되며 이는 임신의 성공 여부와 직접적으로 관련되어 있다. 따라서 생체내 부화기작을 명확히 밝히는 것은 착상과 임신을 조절하고 개선하는 데 매우 중요하다 (Gordon and Dapunt, 1993a and b).

본 연구에서는 부화에서의 자궁의 영향을 조사하기 위해 부화가 일어나는 착상기간의 자궁에 발생시기가 일치하지 않는 난자와 초기 배아를 이식하므로써 자궁환경이 배아의 발생시기와 무관하게 부화를 일으킬 수 있는 지를 알아보았다.

부화는 hCG 주사후 102 시간에서부터 개시되어 몇 시간 이내에 완결되는 것으로 관찰되었으며 이 결과는 이전의 보고와 유사하였다 (Thomas *et al.*, 1997) (Fig. 1). 실험결과에서 보면 hCG 주사후 96 시간이 되기 이전에는 대리모의 자궁내에서 특별한 부화인자가 발현되지 않고 그 이후에는 발현되어 부화가 충분히 진행되었다고 판단하였다. 그러나 112 시간(post hCG injection)에도 부화되지 못하고 잔류해 있는 수축된 포배(shrunk blastocyst)나 상실배와 같은 배아들이 정상군에서 관찰되었는데, 이는 배란 유도를 위해서 PMSG나 hCG와 같은 외래 호르몬을 과량 주사하였을 때 나타나는 배아의 비정상적인 발생과 투명대의 경화현상 (Miller and Armstrong, 1981a and b; Lim *et al.*, 1997)에 기인한 것으로 추측된다.

자궁내에 이식한 미성숙 난자와 배란 난자는 대다수가 퇴화(degeneration) 하거나 절편화(fragmentation) 되었고, 이식된 2-세포기 배아는 발생이 지연되거나 정지되는 경향을 보였으며 일부 정상 발생을 진행한 경우에도 부화가 된 것은 극소수였고 이것을 제외하고는 어느 이식군도 투명대가 사라진 것은 없었다 (Table 1). 이상의 결과는 착상기간 자궁내에 조성된 환경만으로는 투명대가 사라지지 않으며 최소한 포배기(blastula)에 도달한 배아만이 부화할 수 있는 능력을 가진다고 추정할 수 있고, 배아에서 기원한 부화에 관련된 여러가지 효소들이 포배기에서부터 발현된다는 사실이 이를 뒷받침한다 (Perona and Wassarman, 1986; Sawada *et al.*, 1990; Strickland *et al.*, 1976).

정상군의 투명대 미세구조 변화를 관찰한 결과, 생쥐의 투명대는 난자의 성숙과 발생에 따라 변화하였고, 이전의 보고와 유사한 결과를 얻어내었고, 미성숙 난자와 배란 난자에서 보이는 투명대 구조의 변화는 정자와 수정할 수 있는 수정능력과 관련이 있을 것으로 보고되었다 (Familiari

et al., 1992).

체외배양군의 투명대 미세구조와 이식군은 매우 다른 양상을 보였다. 2-세포기 배아를 이식한 군들은 36 시간동안 착상기간 전후의 자궁내 환경에 노출된 후 포배, 상실배, 4-세포기 등 다양한 발생양상을 보였는데 이들의 투명대 미세구조 (Fig. 4A)는 초기의 2-세포기 모양과는 달리 미세한 망상구조가 보이지 않고 전체적으로 망상구조가 용해되어 구멍이 사라진 것으로 관찰되었고 이는 정상군에서 post hCG 112시간에 존재하던 수축된 포배의 투명대 구조 (Fig. 3C)와 유사하였다. 반면에 같은 시간동안 체외배양한 2-세포기 배아는 초기 포배와 상실배로 발생하였지만 이들의 투명대 구조에서는 망상구조의 구멍이 잘 관찰되었다 (Fig. 4B). 이식한 미성숙 난자와 배란 난자는 역시 이식한 2-세포기 배아처럼 전체적으로 매끈한 모양으로 망상구조와 구멍은 관찰되지 않았다 (Fig. 5A and 6A). 반면 체외배양한 배란 난자는 퇴화하면서 미세한 망상구조가 서로 융합된 듯이 보였고 (Fig. 5B), 미성숙 난자는 비록 퇴화하는 과정이었지만 망상구조가 나타났다 (Fig. 6B). 이는 미성숙난자가 체외에서 성숙(maturation) 되는 동안 배란 난자와 유사한 투명대 구조를 갖게 되는 것으로 추정된다 (Familiari, 1992).

착상기간의 자궁내 환경은 배아의 발생시기와는 무관하게 배아의 투명대 구조를 평평하게 변화시킨 것으로 관찰되었다 (Fig. 4A, 5A, 6A). 자궁내의 어떠한 요인의 난자와 배아의 투명대 미세구조를 변화시켰는지 본 연구에서 밝힐 수 없었지만 투명대를 용해시키는 요인으로는 높은 온도, 낮은 pH와 투명대 구조 사이의 공유결합을 파괴하는 protease, dithiothreitol 등이 알려져 있다 (Robert and Steven, 1995). 이들 중 자궁에서 분비하는 protease가 가장 유력한 요인으로 추정되는데, 착상기간 중 생쥐 자궁액의 단백질 분해능력이 증가되고 (Pinsker *et al.*, 1974), 생쥐 배아의 배양액에 protease를 첨가하면 부화율이 증가한다고 하였다 (Lee *et al.*, 1997). 따라서 자궁에서 분비되는 단백질 분해효소들은 배아의 발생상태와 무관하게 투명대의 구조를 평평하게 변화시키며, 이때 배아의 발생 단계가 적절치 않은 경우 부화에는 충분하지 않은 것으로 사료된다.

결론적으로 착상기간의 자궁내 환경은 투명대 구조를 변화시키므로써 부화를 용이하게 하지만 부화 현상에는 배아 자체요인에 의한 투명대의 변화가 반드시 수반되어야 하는 것으로 사료된다. 앞으로 착상을 전후하여 자궁에서 분비된 부화요인에 대한 분석과 부화과정에서 배아와 자궁간의 신호전달기작에 관하여 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

감사의 말씀

본 실험에서 주사전자현미경을 이용하는데 많은 기술적 지원과 조언을 해주신 권중균 박사님(한양대학교 의과대학 전자현미경실)께 깊은 감사를 드립니다. 본 연구는 1998년도 교육부 기초과학육성연구비(98-015-D00241)의 지원으로 이루어 짐.

참 고 문 헌

Caroll EI and Hedrick JL. Hatching in the toad *Xenopus laevis*: Morphological events and evidence for a hatching enzyme. Devel Biol 1974; 38: 1-13.

Cheon YP, Gye MC, Kim CH, and Kim MK. Effects of Indomethacin on development and hatching of mouse embryo. Kor J Fertil Steril 1997; 24 (1): 35-42.

Confino E, Rawlins R, Binor Z, and Radwanska E. The effect of the oviduct, uterine, and *in vitro* environments on zona thinning in the mouse embryo. Reprod Fertil Steril 1997; 68 (1): 164-167.

Edwards BF, Allen WR, and Barret D. Purification and partial characterization of hatching protease of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. Arch Biochem Biophys 1977; 182: 696-704.

Gonzales DS and Bavister BD. Zona pellucida escape by hamster blastocyst *in vitro* is delayed and morphologically different compared with zona escape *in vivo*. Biol Reprod 1995; 52: 470-480.

Gordon JW, and Dapunt U. A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. Fertil Steril 1993; 59 (6): 1296-1301.

Familiari G, Nottola SA, Macchiarelli G, Micara G, Aragona C, and Motta PM. Human zona pellucida during *in vitro* fertilization: An ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. Mol Reprod Dev 1992; 32: 51-61.

Fulton BP and Whittingham DG. Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. Nature 1978; 273: 149-151.

Katagiri C. Properties of the hatching enzyme from frog embryos. J Exp Zool 1976; 193: 109-118.

Lawitts JA and Biggers JD. Culture of preimplantation embryos. In: Wassarman PM, DePanphilis ML, editors. Methods In Enzymology. Vol. 225, San Diego, CA: Academic Press; 1993. p.153-164.

Lee DR, Lee JE, Yoon HS, Lee HJ, Kim MK and Roh SI. The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos. Hum Reprod 1997; 12 (11): 101-106.

Lim CK, Kim JW, Lee HJ, and Yoon YD. Ovulation rate and early embryonic development of mouse atretic follicular oocytes induced by high-dose gonadotropin. Dev Reprod 1997; 1 (1): 67-77.

McLaren A. The fate of the zona pellucida in mice. J Embryol Exp Morph 1970; 23 (1): 1-19.

Miller BG and Armstrong DT. Superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin

cause delayed implantation and infertility in immature rats. Biol Reprod 1981a; 25: 253-260.

Miller BG and Armstrong DT. Effect of superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol and progesterone levels and early emrbyo development in immature rats. Biol Reprod 1981b; 25: 261-271.

Orsini MW and McLaren. Loss of the zona pellucida in mice, and the effect of tubal ligation and ovariectomy. J Reprod Fert 1967; 13: 485-499.

Perona RM and Wassarman P. Mouse blastocysts Hatch *in vitro* by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. Dev Biol 1986; 114: 42-52.

Pinsker MC, Sacco AG, and Mintz B. Implantation- associated proteinase in mouse uterine fluid. Dev Biol 1974; 38: 285-290.

Robert G and Steven A. Principles and practice of assisted human reproduction. W. B. saunders company; 1995. p.293-297.

Sawada H, Yamazaki K, Hoshi M. Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. J Exp Zool 1990; 254 (1): 83-87.

Schiewe MC, Hazeleger NL, Sclimenti C, and Balmaceda JP. Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model. Fertil Steril 1995; 63 (2): 288-294.

Strickland S, Reiche E, and Sherman MI. Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. Cell 1976; 9: 231-240.

Thomas M, Jain S, Kumar GP, and Laloraya M. A programmed oxyradical burst causes hatching of mouse blastocysts. J Cell Sci 1997; 110: 1597-1602.

Vu T-KH, Liu RW, Haaksma CJ, Tomasek JJ. and Howard EW. Identification and cloning of membrane-associated serine protease, hepsin, from mouse preimplantation embryos. J Biol Chem 1997; 272 (50): 31315-31320.

Wassarman PM . Zona pellucida glycoprotein. Annu Rev Biochem 1988; 57: 415-442.

Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins: regulators of mammalian fertilization. In: Evers, JHL Heineman MJ, editors: "From Ovulation to Implantation." Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1990. p.239-250.

Yamagami K. Isolation of choriolytic enzyme (hatching enzyme) of the teleost, *Oryozias latipes*. Dev Biol 1972; 29: 343-348.

Yasumasu I. Crystalization of hatching enzyme of the sea urchin, *Anthocidaris crassispina.* Sci. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo. 1961; 11: 275-280.

Table 1. The Development of the 2-cell embryos transferred to uterus (A) and cultured *in vitro* (B)

Exp. group		No.(%) of embryos						
		2C	3-4C	5-8C	M	BL	HdBL	Deg
A	29[a]	7 (24.1)	5 (17.2)	0 (0.0)	4 (13.8)	1 (3.5)	1 (3.5)	11 (37.9)
B	30[b]	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	22 (73.3)	8 (26.7)	0 (0.0)	0 (0.0)

Embryos were exposed to uterus for 36hrs, when foster mothers were at 76 112 hrs post hCG injection (A) or embryos were cultured for 36 hrs (B). a: Number of embryos recovered after transfer. b: Number of embryos cultured.
Abbreviations: C; cell, M; morula, BL; blastocyst, HdBL; hatched blastocyst, Deg; degenerate embryo.

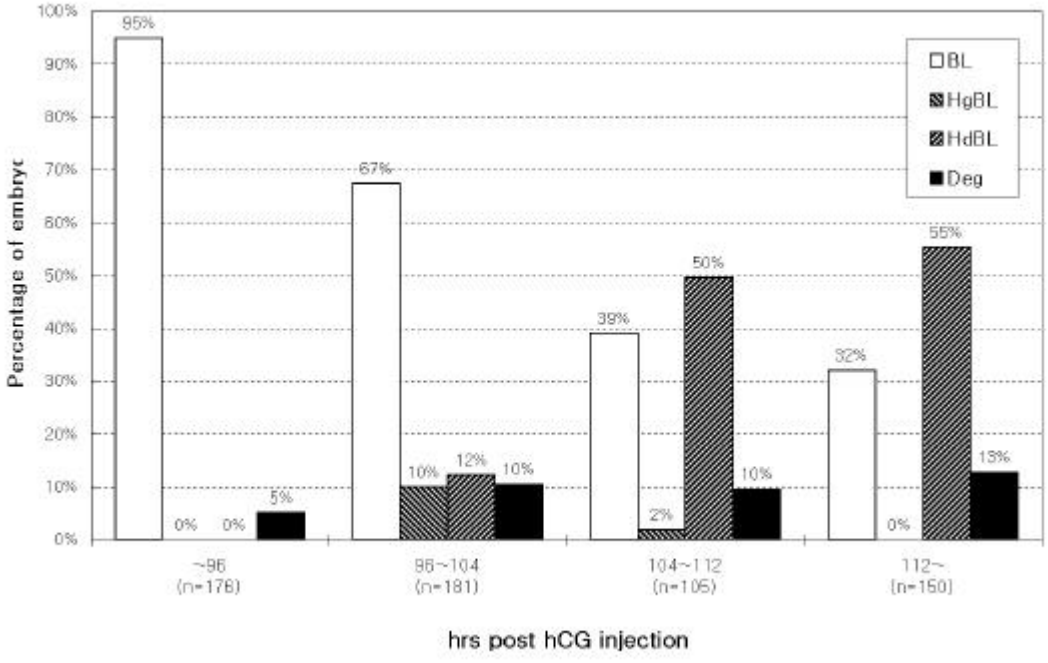

Fig. 1. The state of mouse blastocysts retreived from the uterus (*in vivo* group) according to the times of post-hCG injection. BL; blastocyst, HgBL; hatching blastocyst, HdBL; hatched blastocyst without zona pellucida. Deg; degenerate embryo. n= number of embryos retreived

Fig. 2. Scanning electron microphotographs of the outer surface of zona pellucida of mouse immature (A) and ovulated oocyte (B). Arrows indicate cumulus derivatives. Scale bar is 2μm.

Fig. 3. Scanning electron microphotographs of outer surface of zona pellucida of mouse 2-cell (48 hrs post hCG injection) (A), expanded blastocyst (96 hrs post hCG injection)(B) and shrunk blastocyst (112 hrs post hCG injection)(C) *in vivo*. Scale bar is 2μm.

Fig. 4. Scanning electron microphotographs of the outer surface of zona pellucida of mouse embryo transferred to uterus (A, C) and cultured *in vitro* (B). A, Blastocyst developed from the 2-cell embryo which was exposed to uterus for 36hrs, when foster mothers was at 76 112 hrs post hCG injection; B, Morula cultured from 2-cell embryo for 36 hrs; C, 4-cell embryo developed from the 2-cell embryo which was exposed to uterus for 20hrs, when foster mother was at 76 96 hrs post hCG injection. Scale bar is 2μm.

Fig. 5. Scanning electron microphotographs of the outer surface of zona pellucida of ovulated oocyte transferred to uterus (A) and cultured *in vitro* (B). A, Oocyte degenerated from the ovulated oocytes (MII) which was exposed to uterus for 36hrs, when foster mother was at 76 112 hrs post hCG injection; B, Degenerate oocyte cultured from ovulated oocyte for 36 hrs. Arrows indicate cumulus derivatives. Scale bar is 2μm

Fig. 6. Scanning electron microphotographs of outer surface of zona pellucida of immature oocyte transferred to uterus (A) and cultured *in vitro* (B). A, Oocyte degenerated from the immature oocytes (GV) which were exposed to uterus for 36hrs, when foster mother was at 76 112 hrs post hCG injection; B, Degenerate oocyte cultured from GV stage for 36 hrs. Arrows indicate cumulus derivatives. Scale bar is 2μm.
Abbreviation: GV, germinal vesicle.

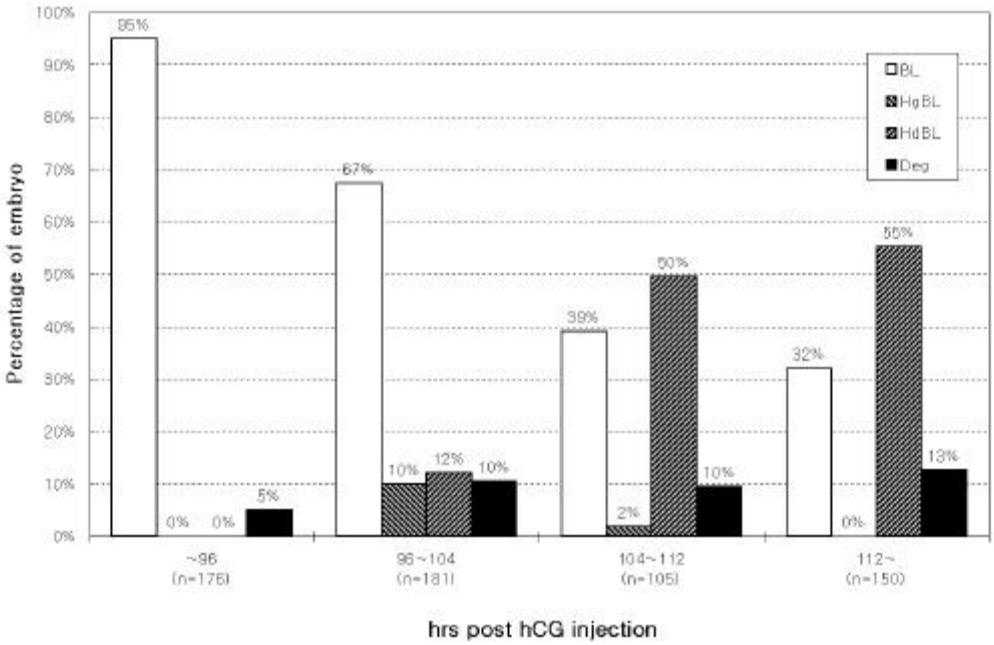
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Percentage of embryo
95%
0%
0%
5%
67%
10%
12%
10%
39%
2%
50%
10%
32%
0%
55%
13%
BL
HgBL
HdBL
Deg
~96
(n=176)
96~104
(n=181)
104~112
(n=105)
112~
(n=150)
hrs post hCG injection

Fig .2

Fig .3

Fig .4

Fig .5

Fig .6