

생쥐 난자 배양시의 자발적 투명대 경화 현상과 PMA에 의한 투명대 경화 현상 비교

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과, 서울여자대학교 자연과학대학 생물학과*

강혜나 · 배인하 · 김해권*

The Comparison of the Spontaneous Zona Pellucida Hardening and PMA-induced Zona Pellucida Hardening during in Vitro Culture of the Mouse Oocytes

Hye Na Kang, In-Ha Bae and Haekwon Kim*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University
*Department of Biology, College of Natural Sciences, Seoul Woman's University**

= Abstract =

One consequence of fertilization in mammals is an increased resistance of the zona pellucida (ZP) to proteases and various chemical reagents. This phenomenon has been called 'zona pellucida hardening' (ZPH), and it is generally accepted that it is caused by the secretory products of cortical granules released by the egg at fertilization. ZP of mouse oocytes maturing in vitro in a chemically defined medium becomes progressively more resistant to solubilization by chymotrypsin ("Spontaneous" ZP hardening).

In the present study, it was aimed to find the specificity of spontaneous ZPH in relation to its possible relevance to the cortical reaction and the physiological block to polyspermy.

When a maturation inhibitors, cAMP analog dbcAMP and phosphodiesterase inhibitor (IBMX) was added to culture medium, it prevent spontaneous ZPH of mouse oocyte during in vitro culture. Thus spontaneous ZPH requires GVBD, since it is prevented by those agents, which inhibit GVBD in vitro.

However, culture for 3 hours in the presence of PMA (10ng/ml), a protein kinase C activator, resulted in ZPH without GVBD, thus suggesting that ZPH may be regulated independently apart from the event of GVBD.

Pretreatment of mouse oocyte with FBS result in partially inhibitory effect on subsequent spontaneous ZPH.

Induction of GVBD in vivo had a inhibitory effect on the spontaneous ZPH, but subsequent spontaneous ZPH.

Induction of GVBD in vivo had a inhibitory effect on the spontaneous ZPH, but had no inhibitory effect on PMA-induced ZPH.

Treatment with a microfilament formation blocker (cytochalasin-B) at 1 μ g/ml concentration, resulted in the excellent inhibitory effect on spontaneous ZPH. However cytochalasin-B did not inhibit PMA-induced ZPH. Thus this suggesting that spontaneuse ZPH had a different mechanism from PMA-induced ZPH.

*본 연구는 문교부 기초과학육성 연구비(BSR-90-426)의 일부 보조 및 한국 과학 재단지원 목적기초 목적 연구비로 수행되었음.

서 론

많은 무척추와 척추동물(echinoids와 어류, 양서류, 포유류)의 난자의 원형질막 바로 아래 위치하고 있는 피질 과립(cortical granule)은 여러 단백질(효소)과 탄수화물로 구성되어 있는 특수화된 분비 과립체로 알려져 있다(Guraya, 1982).

이러한 피질 과립의 내용물들은 난자가 수정가능한 정자에 의해 자극될 때 signal transduction에 의한 외분비(exocytosis)기작을 통해 분비되어 다정자 수정 방지(polyspermy block)를 야기하게 된다(Schuel, 1978, 1985; Pierce et al., 1990). 즉, 정자가 난막과 결합하게 되면 막상의 G-protein이 활성화되어 phospholipase C로 하여금 phosphatidyl inositol 4, 5-bisphosphate(PIP₂)에서 inositol 1, 4, 5-triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DG)을 만들게 하여, IP₃는 세포내 calcium 저장체로부터 calcium의 분비를 일으키고 DG는 PKC활성을 야기하게 된다. 그리고 이때 분비된 calcium에 의해 피질 과립의 막과 난자의 원형질막사이 여러 위치에서 융합이 유도되어, 난막과 난황막사이 지역 즉 위황강(perivitelline space)으로 피질 과립의 내용물이 분비되어 진다(Berridge, 1984; Berridge and Irvine, 1989; Whitaker and Patel, 1990). 이를 피질반응(cortical reaction)이라하며 피질 과립 분비에 의한 막구조 변화를 일으켜 다정자의 침투를 막는 장해물(barrier)로서의 기능을 수행한다.

생쥐란의 경우, 피질반응동안 위황강으로 피질 과립내 가수분해효소를 분비하여 투명대(zona pellucida)라는 난자 최외막의 변화를 일으킨다(Wassarman, 1987). 이러한 투명대는 ZP1, ZP2, ZP3의 3가지 당단백으로 구성되어 있는데(Bleil and Wassarman, 1980a; Wassarman, 1988), 이들 당단백 중 특히 ZP2는 피질 과립 구성분 중 단백질 분해 효소의 분비로 ZP2(120, 000Mr, glycopeptide)의 아미노-혹은 카복실-말단 근처가 단백질 가수분해되어 ZP2_i(90, 000Mr, glycopeptide)로 전환됨으로써 더 이상의 정자가 결합 못하게 된다(Moller and Wassarman, 1989; Moller et al., 1990; Saling, 1991). 그리고 이러한 변화는 투명대 경화(zona pellucida hardening; ZPH)와도 연관성을 지닌 것으로 보고있다(De Felici

and Siracusa, 1982; Ducibella et al., 1990).

한편 난구세포(cumulus cell)를 제거한 미성숙 난자(denuded oocyte)를 체외 배양(*in vitro* culture)하면 투명대가 변화하여 수정률을 낮추게 되는 현상이 발견되었다. De Felici와 Siracusa(1982)는 난구세포가 제거된 미성숙(germinal vesicle stage; GV) 생쥐 난자를 체외 배양시 chymotrypsin 분해에 대한 저항성이 증가되는 자발적 투명대 경화현상("spontaneous" ZPH)을 발표하였다. 이같은 투명대의 경화는 수정 후 정상적 발달 과정에서는 필수적 과정이나 성숙시 일어날 경우에는 수정을 방해하게 된다. 체외에서 자발적 성숙 동안의 투명대 경화를 막을 수 있는 다양한 요소들이 발견되고 있는데, 난구세포, 과립세포(granulosa cells), 여포액(follicular fluid), 혈청(serum)등이 그것이다(De Felici et al., 1985; Downs et al., 1986; Choi et al., 1987; Vanderhyden and Armstrong, 1989; Zhang et al., 1991). 이러한 요소들은 역시 혈청에서도 유도될 수 있어, 혈청을 배양액에 첨가시 성숙 동안 분비된 피질 과립의 단백질 분해 효소가 ZP2를 ZP2_i로 전환시키는 것을 막을 수 있다(Ducibella et al., 1990). 가장 최근의 연구에서 Ducibella 등(1990)은 난자 성숙과 관련된 피질 과립의 감소가 피질 과립의 부재지역형성, 그리고 혈청없는 배양액에서의 ZP2에서 ZP2_i로의 전환에 관계됨을 보고하였다.

이처럼 현재까지의 결과로는 자발적 투명대 경화 현상의 유도나 억제에 대한 연구가 있을 뿐 그 구체적인 특성이나 기작은 밝혀지지 않은 상태여서, 본 연구에서는 난자의 성숙과 투명대 경화의 원인이 되는 피질 과립의 외분비에 관여할 것으로 생각되는 여러 물질들을 처리하여 자발적 투명대 경화 현상과 어떤 관계가 있는가를 조사함으로써 그 특성과 기작 규명에 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 난자의 준비

본 실험에는 성신여자대학교 생물학과에서 명 14시간, 암 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육한 Swiss albino인 ICR계통의 3-4주된 암컷을 사용하였다.

1) 미성숙 난자(Oocyte with germinal vesi-

cle;GV oocyte)

생쥐를 정추골 파열로 도살 후 난소를 적출하여 성장한 여포를 예리한 바늘로 터뜨려 난자를 여포로부터 분리하여 실험에 사용하였다. 분리된 난자의 난구세포는 mouth controlled micropipette을 이용하여 제거하였으며 해부현미경(stereozoom 7, Bausch & Lomb, zoomrange 1.0×-7.0× U.S.A.)하에서 난구세포가 제거된 정상 미성숙 난자(nude & denuded GV oocyte)만을 수집하여 사용하였다.

2) 성숙재개 난자(Oocyte with germinal vesicle breakdown;GVBD oocyte)

생쥐 복강에 5 I.U.(international units)의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Sigma Chem. Co., St. Louis, U.S.A.)와 human chorionic gonadotropin(hCG;Sigma)을 0.9%의 생리 식염수에 녹여 46시간 간격으로 복강내 주사하고 hCG주사 후 3시간째에 그라아프여포(Graafian follicle)를 터뜨려 난구세포로 완전히 둘러싸인 난자에서 난구세포를 제거한 후 성숙이 재개되어 핵막 붕괴가 일어난 난자만을 수집하였다.

위의 모든 난소와 난관은 채취 후 기본배양액으로 3번 세척 후 2ml의 기본 배양액이 들어있는 시계접시로 옮겨 해부현미경하에서 난자 분리를 하였으며, 완전 분리된 난자도 또한 각 배양액으로 3번 세척하여 배양 접시로 옮겼다.

2. 난자의 배양

난자의 배양은 다음 2가지 방법을 이용하였다.

1) 실험군에 처리할 친수성 화학물질은 증류수 혹은 PBS에 녹여서 사용하였으며 이때의 난자 배양은, microdroplet 방법을 이용하였다(Biggers, 1971).

2) 실험군에 처리할 소수성 화학물질은 ethanol 혹은 dimethylsulfoxide(DMSO;Sigma)에 녹여서 사용하였으며 이때의 난자 배양은, open culture 방법을 이용하였다.

3. 배양액과 처리물질

모든 실험에 사용된 기본배양액은 M16배양액(Hogan et al., 1986)으로 하였으며 BSA가 들어있는 기본배양액에서 배양되어 투명대 경화가 일어난 대조군의, 투명대 경화가 억제된 다른 대조군 설정을 위한 변형된 기본배양액으로는 M16배양액에 BSA대신 10% fetal bo-

vine serum(FBS;Gibco, Grand Island, NY)을 녹인 것을 사용하였다. 단, 실험군의 처리물질을 유기용매 즉, DMSO나 ethanol에 녹인 경우 그 용매의 처리 최고 농도를 대조군 배양액에 첨가하여 배양에 사용하였다.

실험군 설정을 위한 각 처리용 물질의 stock solution은 다음과 같이 만들었다.

1) 3 - iso - butyl - methyl - xanthine(IBMx; Sigma)은 ethanol에 녹여 10mM의 stock solution을 만든 후 0.2mM로 희석하여 사용하였다(Schultz et al., 1983).

2) N⁶, O^{2'}-dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate(dbcAMP;Sigma)는 PBS에 녹여 2mg/ml의 stock solution을 만든 후 100μg/ml로 희석하여 사용하였다(Cho et al., 1974).

3) Phorbol, 12-myristate 13-acetate(PMA; Sigma)는 DMSO에 녹여 10mg/ml의 stock solution을 만든 후 10ng/ml로 희석하여 사용하였다(Ducibella et al., 1991).

4) Retinoic acid(RA;Sigma)는 ethanol에 녹여 10⁻²M의 stock solution을 만든 후 10⁻⁴M로 희석하여 사용하였으며, stock solution은 1주일마다 새로 만들었다(Bement and Capco, 1989).

5) Cytochalasin B(Cyto-B;Sigma)는 ethanol에 녹여 5mg/ml의 stock solution을 만든 후 각각 0.1, 1, 10μg/ml로 희석하여 사용하였다(Longo and Chen, 1985).

배양액은 사용전 0.22μm millipore membrane으로 여과필균하여 2시간 이상 배양기에서 평형시킨 후, 암처에서 냉동 보관된 처리용 물질의 stock solution의 희석과 배양에 사용하였다. 희석은 기본배양액과 변형된 기본배양액을 모두 사용한 PMA, cytochalasin-B 경우를 제외하고는 모두 기본배양액으로 하였으며, 실험에 사용될 모든 초자기구는 건열멸균(160°C, 90분) 또는 고압멸균(121°C, 15Lb/inch², 15분)하였다.

4. 배양 후 난자의 검정

배양 시작 시간을 0으로 하여 예비실험을 통해 배양 3시간 이전에 투명대 경화를 최고로 일으킬 수 있음을 확인한 PMA처리 경우만 3시간 배양하였고, 나머지는 정상적 난자의 제 2감수분열 중기도달 시기인 17-18시간을 기준으로 배양시간을 정하였다. 체내에서의 성숙재개 경우의 비교를 위해서는 hCG주

사 후 3시간에 성숙을 재개하여 핵막이 붕괴된 난자를 난소로부터 적출하여 체외에서 14시간 더 배양하여 사용하였다.

핵상은 핵막과 인이 뚜렷한 미성숙 난자(GV), 핵막과 인이 소실되어 성숙을 재개한 난자(GVBD, 제 1감수분열 중기-말기), 그리고 제 1감수분열 후 일차 극체를 형성한 난자(PB, 제 2감수분열중기)로 분류하였다.

5. Zona hardening assay를 위한 난자의 선택

두 대조군에서 투명대 경화 현상이 억제된 경우의 기준인 FBS가 들어있는 배양액에서의 배양이나, 투명대 경화현상이 억제되지 못한 경우의 기준인 BSA가 들어있는 배양액에서의 배양은 제 1극체형성 난자를 선택 사용하였고 실험군에서는 각 처리 경우의 최종 성숙 상태 난자만을 정상적 발달로 고려하여 선택 사용하였다.

6. Zona hardening assay

각 배양시간 후 성숙도에 따라 난자를 분류하여 각각 4mg/ml 농도의 PVP(Sigma)가 들어있는 M16배양액(M16+4mg/ml PVP)에서 3회 세척한 후 pH 7.2인 1mg/ml 농도의 α -chymotrypsin(Sigma) 50 μ l drops에서 1회 세척한 다음 enzyme drop에 파라핀유(Sigma)를 덮어 배양기에 넣어 37°C를 유지시키며 assay 하였다. Assay 처음시작 시간부터 1시간 30분까지는 5분 간격으로, 그 후부터 assay 종료시까지는 15분 간격으로 위상차도립현미경

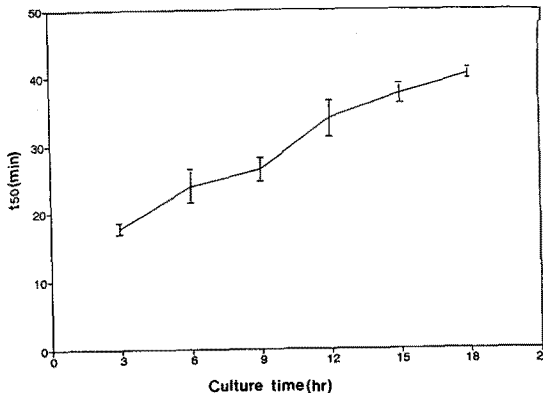


Fig. 1. Kinetics of spontaneous zona pellucida hardening of mouse oocytes during in vitro culture. Each point represents the mean \pm SEM; mean of 4 replicates.

(Phase contrast microscope, Leitz, Germany)을 이용하여 투명대가 완전히 분해된 난자수를 세었다(Schmell and Gulyas, 1980; De Felici and Siracusa, 1982; Gulyas and Yuan, 1985).

7. 통계처리

대조군과 실험군 사이의 분해 시간 차이를 비교하기 위한 실험 자료의 통계처리는 student t-test를 이용하였으며, 이 계산의 값은 각 실험에서의 t₅₀, 즉 전체 난자수의 50%에 해당하는 난자의 투명대가 분해되어 사라지는데 요구되는 시간의 평균값을 직선회귀(linear regression)으로 구한 후 그것의 \pm SEM(standard error means)로 정하였다.

결 과

1. 체외 배양 시간에 따른 자발적 투명대 경화 현상

실험에 사용할 두 대조군 중 자발적 투명대 경화 현상의 기준으로 삼을, BSA가 들어있는 기본배양액에서 배양 경우의 시간에 따른 경화 정도 변화를 알아보기 위하여 이 실험을 하였다. 생쥐의 미성숙 난자를 BSA가 들어있는 기본배양액에서 각각 3-18시간 배양한 후 3시간 간격으로 sampling하여 chymotrypsin에 대한 투명대의 solubility를 조사하여 t₅₀을 구한 후 결과를 그림 1로 요약하였다. 배양 3시간에

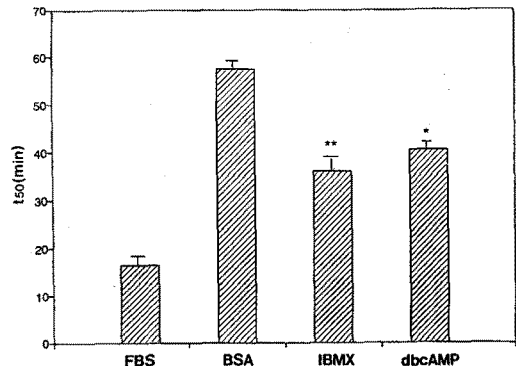


Fig. 2. Effects of maturation inhibitor on spontaneous zona pellucida hardening during in vitro culture of the mouse oocytes. Data are expressed as mean \pm SEM from 5 replicates, each using oocytes from 10 different mouse. Asterisks denote a significant difference (*, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$) from the control group containing BSA by t-test.

서 거의 모든 난자는 성숙을 재개하였고(76%) 9시간 이후에는 제 1차 극체 형성을 하였으며, 3-9시간 배양 후 얻은 성숙 재개 난자와 12-18시간 배양 후 얻은 극체 형성 난자의 t_{50} 은 모두 배양 시간에 관계없이 점진적으로 증가하였다.

2. 난자 성숙 억제제 처리가 자발적 투명대 경화 현상에 미치는 영향

투명대의 경화와 난자 성숙사이의 관련 여부 조사를 위해 생쥐 미성숙 난자를 두 대조군과, 체외 배양시의 자발적 성숙 억제제인 IBMX 0.2mM과 dbcAMP 100 μ g/ml 농도로 BSA첨가 기본배양액에 각각 녹인 후 17시간 배양하였다(그림 2). 배양 후 두 대조군에서 75% 이상이 극체를 형성했음을 확인하여 그를 골라 투명대 경화 assay에 사용하였고, 실험군에서 IBMX경우 100%, dbcAMP 경우 90%가 미성숙 상태에 머물러 있어 그를 골라 투명대 경화 assay에 사용하였다. 투명대의 solubility 조사 후 두 대조군과 t_{50} 을 비교하면, 대조군 M16+FBS($t_{50}=16.55\pm 2.18$)보다는 높으나 M16+BSA($t_{50}=57.49\pm 1.52$) 보다는 실험군인 M16+BSA+IBMX($t_{50}=36.09\pm 2.50$)와 M16+BSA+dbcAMP($t_{50}=40.53\pm 1.30$)의 t_{50} 이 짧게 나타나 투명대 경화가 유의하게 억제되었음을 보였다($p<0.001$, $p<0.01$).

3. Protein kinase C 활성화제 처리가 자발적 투명대 경화 현상에 미치는 영향

결과 2에서 난자 성숙 억제제의 처리에 따른 난자 성숙 재개의 억제는 투명대 경화억제에도 역시 효과가 있는 것으로 나타나 이의 확인을 위해 이 실험을 하였다. 역시 난자 성숙의 억제제이며 수정에 의한 피질 과립 외분비시의 signal transduction 과정 중간산물인 PKC의 활성화제인 PMA를 M16+BSA에 10ng/ml 농도로 녹여 난자를 배양한 후 얻은 미성숙 난자와 두 대조군에서 각각 배양된 극체 형성 난자의 투명대 분해 시간을 비교하였다(그림 3). 예비실험을 통해 10ng/ml 농도의 PMA를 포함한 배양액에서의 경우 배양 3시간 이전에 이미 가능한 투명대 경화를 모두 유도할 수 있음을 확인하여, 대조군과의 비교에는 3시간 배양한 미성숙 난자를 사용하였다. 실험결과, PMA는 난자의 성숙재개 없이도 투명대 경화를 일으킬 수 있음을 확인하였다.

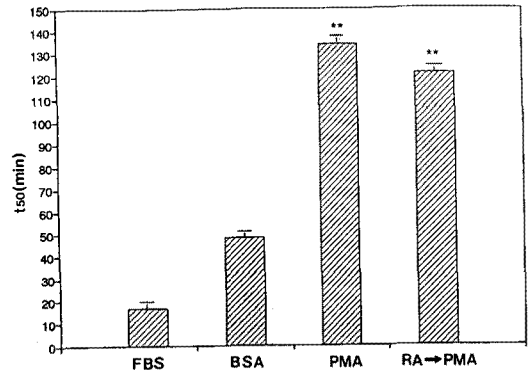


Fig. 3. Effects of PMA on zona pellucida hardening during in vitro culture of the mouse oocytes. Data are expressed as the mean \pm SEM from 8 replicates, each using oocytes from 16 different mouse. The asterisk denotes a significant difference (**, $p<0.001$) from the control group containing BSA by t-test.

그리고 PMA 활성 억제제인 retinoic acid (RA)를 BSA첨가 기본배양액에 10^{-6} M 농도로 녹인 후, 이곳에서 난자를 3시간 배양하여 성숙 재개 난자만을 골라 PMA포함 배양액으로 옮겨 14시간 더 배양하였다. 그리하여 RA에서 성숙 재개된 난자를 생쥐 난자에서의 RA작용 관찰을 위해 사용하였다.

t_{50} 비교시 대조군인 M16+FBS($t_{50}=16.48\pm 1.47$)와 M16+BSA($t_{50}=48.18\pm 2.24$)에 비해 실험군인 M16+BSA+PMA($t_{50}=134.02\pm 3.12$)와 RA처리군($t_{50}=120.73\pm 2.11$)이 고도의 유의차로 투명대 경화가 심화됨을 나타냈다($p<0.001$).

4. FBS 처리가 PMA에 의한 투명대 경화 현상에 미치는 영향

자발적 투명대 경화를 저해하는 FBS가 PMA에 의한 투명대 경화 역시 억제할 수 있을지 알아보기 위해 이 실험을 하였다. 대조군으로 사용한 두 배양액 각각에 10ng/ml 농도로 PMA를 녹여 미성숙 난자를 10분, 30분과 1, 2, 3시간 동안 배양하여 투명대의 solubility 조사를 하였다(그림 4). PMA의 경우 t_{50} 이 배양 1시간에 이미 최고치를 나타내, 유도 가능한 투명대 경화가 모두 일어났음을 보였다(M16+FBS+PMA의 $t_{50}=59.19\pm 3.86$; M16+BSA+PMA의 $t_{50}=149.16\pm 4.03$). 그리고 PMA를 BSA첨가 기본배양액에 녹인 경우보다 FBS를 첨가한 변형된 기본배양액에 녹인

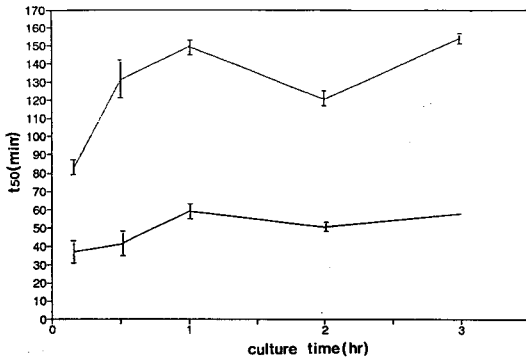


Fig. 4. Effects of FBS on PMA-induced ZPH. Data are expressed as the mean \pm SEM from 3 replicates, each using oocytes from 6 different mouse. t_{50} is shown in solid(FBS+PMA) or dotted(BSA+PMA) lines. Each value in the experimental group(FBS treatment group) is significantly different from that of control group containing BSA ($p < 0.001$).

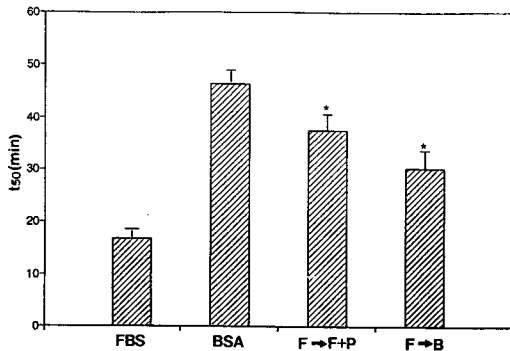


Fig. 5. Effects of pretreatment with FBS on subsequent spontaneous ZPH of mouse oocytes during in vitro culture. Data are expressed as the mean \pm SEM from 6 replicates, each using oocytes from 12 different mouse. The asterisk denotes a significant difference(*, $p < 0.01$) from the control group containing BSA by t-test.

경우의 t_{50} 이 고도의 유의한 차이를 보이며 시간별로 100분 가량씩 짧게 나타났다($p < 0.001$). 이것은 결과 2에서의 두 대조군 경우 BSA처리보다 FBS처리의 t_{50} 이 25분 가량 짧았던 것과 비교할 때, 자발적 투명대 경화와는 달리 PMA에 의한 투명대의 경화는 FBS가 완전히 억제할 수는 없기 때문인 것으로 사료되어졌다.

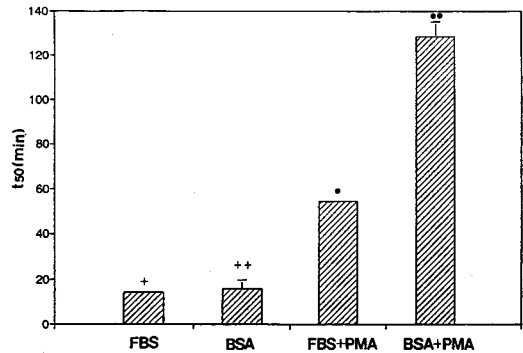


Fig. 6. Effects of delayed retrieval on spontaneous ZPH of mouse oocytes during in vitro culture. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 replicates, each using oocytes from 8 different mouse. Different marks represent significant differences(+ vs ++, no significance; + vs #, ++ vs ##, and # vs #, $p < 0.001$).

5. FBS 첨가 배양액에서의 성숙 재개가 투명대 경화 현상에 미치는 영향

난자 성숙 재개에 걸리는 배양 초기 3시간 동안의 FBS 효과를 조사하기 위해, 생쥐 미성숙 난자를 M16+FBS에서 3시간 배양한 후 얻은 성숙이 재개된 난자를 M16+FBS와 M16+BSA로 각각 옮겨 14시간 더 배양하여 100% 극체 형성한 난자의 투명대 분해 시간을 비교하였다(그림 5). 이중 M16+FBS에서 3시간 배양 후 M16+BSA로 옮겨 14시간 더 배양한 경우의 t_{50} (=30.18 \pm 3.29)은 계속 M16+BSA에서 17시간 배양한 경우의 t_{50} (=46.27 \pm 2.75)과 비교할 때 그 차이는 그림 1에서 FBS를 첨가하지 않은 배양액에서 3시간 배양시의 t_{50} (=17.76 \pm 0.47) 만큼만을 FBS가 낮춘 것으로 나타났다. 또한 생쥐 미성숙 난자를 M16+FBS에서 3시간 배양 후 FBS+PMA로 옮겨 14시간 더 배양한 경우의 t_{50} 은 37.53 \pm 2.85로 결과 4와 동일하게 FBS의 부분적 투명대 경화 억제 효과를 보였다.

6. 체내에서의 난자 성숙 재개가 자발적 투명대 경화 현상에 미치는 영향

체내에서 난자 성숙을 재개한 경우의 효과를 조사하기 위해, PMSG와 hCG를 46시간 간격으로 주사한 뒤 3시간째에 난소로부터 성숙이 재개된 난자를 적출하여 각각 M16+FBS와 M16+BSA에서 14시간 배양하여 투

명대의 분해 시간을 비교한 결과, M16+FBS의 t_{50} ($=14.19 \pm 1.66$)과 M16+BSA의 t_{50} ($=15.81 \pm 2.68$)은 모두 투명대 경화가 억제되었음을 보였다. 한편 체내에서 성숙이 재개된 난자에 PMA 처리시의 FBS 효과를 보기 위해 성숙 재개 난자를 각기 M16+FBS+PMA와 M16+BSA+PMA에서 14시간 배양한 후 투명대의 분해 시간을 조사하여 t_{50} 을 비교하였다(그림 6). FBS첨가 경우($t_{50}=54.51 \pm 0.24$)와 BSA첨가 경우($t_{50}=128.40 \pm 6.26$) 모두 투명대 경화를 일으켰으며($P < 0.001$), FBS첨가 경우는 결과 5의 체외에서 성숙이 재개된 경우와 동일하게 체내에서의 성숙 재개 경우에서도 BSA첨가 경우보다 t_{50} 이 짧게 나타나 PMA에 의한 투명대 경화에 부분적 억제 효과만을 나타냄을 보였다.

7. Cytochalasin-B 처리가 자발적 투명대 경화 현상에 미치는 영향

투명대 경화의 원인이 되는 피질 과립 외분비와 microfilament(MF)의 관련성 조사를 위해 MF 형성 억제제인 cytochalasin-B(Cyto-B)를 사용하였다. 생쥐 미성숙 난자를 BSA 첨가 기본배양액에 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 녹아있는 Cyto-B 처리군에서 배양한 경우의 최종성숙 상태 난자와, 두 대조군에서 성숙된 극체 형성 난자의 t_{50} 을 비교하였다(그림 7). 대조군 M16+FBS($t_{50}=17.52 \pm 2.87$)보다는 t_{50} 이 길게 나타났으나 M16+BSA($t_{50}=48.71 \pm 4.75$)보다

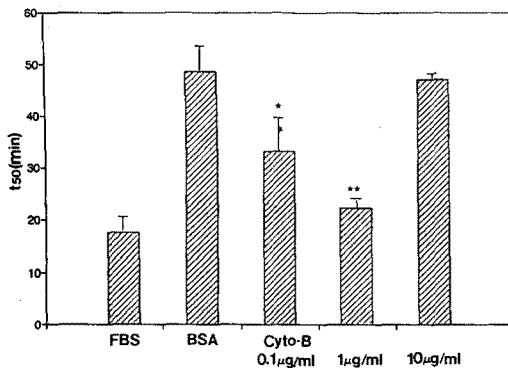


Fig. 7. Effects of cytochalasin B on spontaneous ZPH. Data are expressed as the mean \pm SEM from 6 replicates, each using oocytes from 12 different mouse. Asterisks denote a significant difference (*, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$) from control group containing BSA, by the pooled t-test.

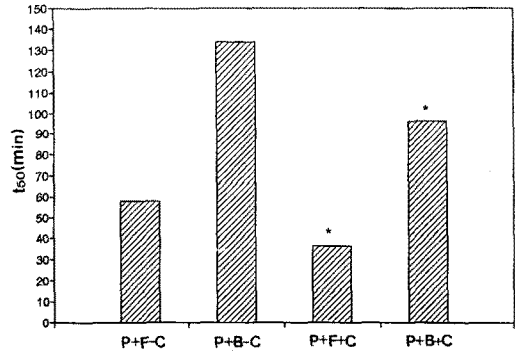


Fig. 8. Effects of cytochalasin-B on PMA-induced ZPH. Data are expressed as the mean \pm SEN from 3 replicates, each using oocytes from 6 different mouse. The asterisk denotes a significant difference ($p < 0.01$) from the each control group by t-test. P:PMA F:FBS B:BSA C: Cytochalasin- β .

는 짧게 나타난 Cyto-B 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 경우의 t_{50} ($=33.13 \pm 6.37$)은 BSA첨가 대조군과 비교시 유의한 투명대 경화 억제능을 보였으며($P < 0.01$), 극체 형성을 억제하는 가장 최소 농도(optimal concentration)인 1 $\mu\text{g/ml}$ ($t_{50}=22.34 \pm 1.56$)에서 투명대 경화를 현저히 억제함을 보였다($P < 0.01$). 그리고 고농도 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 효과를 나타내지 못해 Cyto-B는 저농도에서 더욱 투명대 경화에 억제 효과를 나타냄을 또한 보여주었다.

8. Cytochalasin-B 처리가 PMA에 의한 투명대 경화 현상에 미치는 영향

자발적 투명대 경화를 억제하는 것으로 나타난 Cyto-B가 앞서 실험했던 PMA에 의한 투명대 경화(결과 4) 또한 억제할 수 있나를 알아보려고 이 실험을 하였다(그림 8).

생쥐 미성숙 난자 배양시, BSA 첨가 기본배양액과 FBS를 첨가한 변형된 기본배양액에 PMA를 10 ng/ml 로 녹여 배양한 경우를 각각 대조군으로 삼아, 각각에 1 $\mu\text{g/ml}$ Cyto-B가 녹아있는 경우의 실험군과 t_{50} 을 비교하였다. 단, 결과 3에서의 예비 실험에 따라 배양시간은 3시간으로 하였다.

대조군 M16+FBS+PMA의 t_{50} ($=57.93 \pm 0.47$)과 Cyto-B 포함의 실험군 t_{50} ($=36.39 \pm 2.00$)이, 대조군 M16+BSA+PMA의 t_{50} ($=134.02 \pm 1.25$)과 Cyto-B 포함의 실험군 t_{50} ($=96.28 \pm 0.50$)이 각각 20-30분의 유의한 차이를

보이며 효과를 나타내 Cyto-B가 PMA에 의한 투명대의 경화는 완전하게는 억제하지 못함을 보였다($P < 0.01$).

고 찰

수정 후 투명대의 변화로 다정자 수정 방지(polyspermy block)를 유도하는 피질 과립의 외분비는 signal transduction에 의한 세포질내 calcium release peak유발 혹은 calcium 농도 증가에 따른 것으로 이미 알려져 있다. 이것은 미수정란에 guanyl nucleotide analog, IP_3 , calcium, ionophore A23187을 미세 주입하여 피질 과립 외분비를 유도할 수 있음을 보인 많은 실험 결과에 의해 뒷받침된다(Turner et al., 1986; Kline, 1988; Kurasawa et al., 1989). 반면 체외에서 난자 배양시의 자발적 투명대 경화에 관여하는 피질 과립 외분비의 원인이나 기작은 거의 밝혀지고 있지 않아, 본 연구에서는 수정시 피질 과립 외분비 기작의 중간 산물인 protein kinase C의 활성제인 PMA에 의한 투명대 경화와의 비교를 통해 이를 조사하고자 하였다.

체의 배양시의 시간에 따른 투명대 경화 정도 변화(그림 1)는 chymotrypsin에 대한 투명대의 solubility가 점진적으로 감소함을 보여 피질 과립의 외분비는 배양 시간의 증가에 따라 지속적으로 일어남을 나타냈다. 이는 De Felici와 Siracusa(1982)에 의한 생쥐 실험 결과와 일치하며 Zhang 등(1991)에 의한 rat 난자의 경우와는 차이를 나타낸다. Rat의 경우 배양의 일차 시기인 0-6시간동안은 chymotrypsin에 대한 투명대의 저항성이 약간 증가하고 이차 시기인 8-12시간에 저항성이 주로 증가함을 보여 생쥐와의 차이를 확인할 수 있었다. 그리고 체외 배양에 의한 자발적 투명대 경화는 그 효과가 배양시간에 따라 점진적으로 나타나므로 이때의 투명대 경화는 수정에 의한 순간적 투명대 경화와는 다른 기작에 의해 조절되는 것으로 여겨진다.

한편 난자 성숙과 피질 과립 외분비의 관련 여부 확인을 위해 난자 성숙 억제제로 알려진 cAMP analog(dbcAMP)와 phosphodiesterase inhibitor(IBMx)를 처리한 실험결과, 실험군의 미성숙 난자(Schultz et al., 1983; Bornslager and Schultz, 1985)는 투명대 경화가 억제됨을 보여주었다(그림 2). 이러한 결과는 자

발적 투명대 경화는 난자내 calcium농도 증가에 따른 난자의 성숙 재개가 일어나야만 가능하다는 것을 의미한다(Batta and Knudsen, 1980; Ducibella and Rangarajan, 1987; Ducibella et al., 1990).

이에 대해 과연 성숙 재개가 피질 과립 외분비에 절대적 요건인가를 알아보기 위해 또 다른 난자 성숙 억제제로 알려진 PKC 활성제인 PMA를 처리해 보았다(그림 3). 그 결과, 처리 후 3시간 된 미성숙 난자는 성숙 재개는 억제되어도 투명대의 경화는 현저하게 일어남을 보여주었다. 그러므로 비록 자발적 투명대 경화는 난자의 성숙 재개와 더불어 일어나지만 난자의 피질 과립은 성숙 재개 이전에 이미 외분비가 가능한 형태로 존재하고 있는 것으로 추측된다. 결국 난자의 피질 과립 외분비 현상은 성숙 재개와는 독립된 사건으로 PMA첨가로 인한 세포내 calcium농도 증가와 관련된 것으로 사료된다(Kurasawa, 1989). 또 PMA에 의한 피질 과립 외분비는 난자 성숙을 요하지 않고 단시간내에 일어나며 많은 양의 피질 과립 내용물을 분비하는 것으로 보아 수정시 일어나는 피질 과립의 외분비와 유사한 경우로 추정된다. 수정시 signal transduction 과정에서의 IP_3 에 의한 세포내 calcium증가가 야기하는 피질 과립 외분비 과정과 DG에 의한 PKC 활성화 과정이 어떻게 상호연관성 있는가는 아직 밝혀진 바 없으나, IP_3 에 의해 증가된 calcium이 DG와 함께 PKC에 결합하여 여러 calcium과 관련된 과정과 PKC에 의한 과정을 활성화시킬 수도 있다(Berridge, 1987). 다른 한가지의 가능성은 chromaffin granule-결합 단백질같은 여러 분비 과립체와 관련된 단백질을 인산화 및 탈인산화시켜 세포막과의 상호작용을 유도하여 결국 외분비를 일으키게하는 경우와 유사한 것으로, 피질 과립과 세포막의 융합 과정에 어떤 중개적 단백질이 존재하고 이 단백질 작용 활성화에 PKC가 작용할 수 있다는 것이다(Summers and Creutz, 1985; Burgoyne, 1990). Phorbol ester와 DG를 생쥐란에 처리하여 ZP2의 변형을 유도한 보고(Endo et al., 1987; Ducibella et al., 1991)나, 역시 phorbol ester를 처리하여 ZP3의 변형을 본 보고(Endo et al., 1987)는 PKC 활성제가 수정시의 투명대 변화와 동일한 반응을 일으킬 수 있다는 전자의 경우를 뒷받침해 줄 수 있다. 이러한 PKC 활

성체 효과는 생쥐의 다른 종에서도 보고되어, 성계란의 경우에는 PMA가 오히려 피질 과립을 세포질 쪽으로 더욱 이동시켜 피질 과립 외분비를 억제시킴으로써 막상의 어떠한 변화도 유도할 수 없으나(Ciapa et al., 1988) *Xenopus laevis* 난자(oocyte)와 난(egg)경우의 PMA처리는 생쥐 경우와 동일하게 피질 과립의 외분비를 야기할 수 있음이 보고되어 졌다(Bement and Capco, 1989). 그러나 *Xenopus laevis* 경우는 PMA에 의한 활성화 과정에 억제제로 작용하는 retinoic acid를 pretreatment시 PMA에 의한 피질 과립 외분비가 억제된데 반해(Bement and Capco, 1989) 본 실험(결과 3)에서의 생쥐 경우는 retinoic acid가 억제효과를 나타내지 못하는 서로 다른 양상을 보여 *Xenopus laevis*경우와 생쥐의 경우 사이에도 차이가 있는 것으로 보여졌다.

한편 PMA를 FBS와 BSA 포함 배양액에 각각 녹여 처리하였을 때 PMA에 의한 투명대 경화는 배양 1시간에 가장 심화됨을 나타냈고, BSA 포함 배양액의 경우가 더욱 심화된 투명대 경화 양상을 보였다(그림 4). 이는 FBS+PMA 경우 자발적 투명대 경화는 FBS에 의해 억제되고(Downs et al., 1986) PMA에 의한 투명대 경화만 일어난데 반해, BSA+PMA 경우는 양자의 투명대 경화가 모두 일어나 t_{50} 이 더욱 길게 나타난 것으로 보여진다. 그리고 FBS+PMA 경우도 비록 t_{50} 이 짧은 것은 하나 역시 투명대의 경화는 일어나 FBS가 PMA에 의한 투명대 경화를 완전히는 억제하지 못함을 나타냈다. 그러므로 PMA에 의한 투명대의 경화는 FBS로 완전 억제 가능한 체외 성숙동안의 자발적 투명대 경화와는 차이가 있는 것으로 보여졌다.

체내에서 성숙이 재개된 난자를 체외 배양한 실험결과 자발적 투명대의 경화는 완전억제되어 나타났다(그림 6). 이것의 원인이 체내 여포액등에 의해 피질 과립의 외분비가 억제되었기 때문인지, 피질 과립 외분비는 일어났으나 위황강(perivitelline space)에서의 분비된 내용물 변화로 투명대의 경화를 일으키지 못했기 때문인지는 분명치않으나 체외 FBS에서 성숙을 재개시킨 후 기본배양액으로 옮겨 배양하여 투명대 경화 야기를 확인한 경우(그림 5)와 비교할 때 체외에서의 성숙 재개와 체내에서의 성숙 재개사이에는 차이가 있음을 알 수 있었다. 그리고 체외 FBS 존재하에서

난자 성숙을 재개시킨 후 BSA포함 기본배양액으로 옮겨 계속 성숙시킨 경우의 t_{50} (=30.18±3.29)은 BSA에서 계속 성숙시킨 경우의 t_{50} (=46.27±2.75)과 약 17분의 차이가 나타나는데 이는 실험 결과 1(그림 1)에서의 BSA 포함 배양액에서 3시간 배양시의 t_{50} 과 일치함을 보여, FBS는 피질과립 외분비로 인한 투명대의 경화를 처리 시간인 3시간 동안만 억제할 뿐 체내에서의 성숙 재개와는 달리 연속적인 억제 작용은 나타내지 못함을 확인하였다.

한편 PMA에 의한 투명대 경화 현상이 체내에서 성숙이 재개된 난자에서도 나타나는지를 알아보았다(그림 6). 계속 체외 PMA 존재하에서 배양한 경우보다도 체내에서 성숙을 재개시킨 후 PMA를 처리한 경우에서 오히려 t_{50} 이 길게 나타나 투명대의 경화가 현저하게 일어났음을 보여주었다.

또 체내에서 난자 성숙이 재개된 난자를 FBS와 BSA를 포함한 각각의 배양액에 PMA를 녹여 배양하면, 미성숙 난자를 계속 PMA에서 배양한 앞에서의 실험 결과(그림 4)와 동일한 경향성으로 FBS가 자발적 투명대 경화와 약간의 PMA에 의한 투명대 경화를 막아 FBS+PMA경우보다 BSA+PMA경우의 t_{50} 이 더 길게 나타났다(그림 6). 그리고 두 대조군에서 모두 투명대의 경화가 일어난 것은 체내에서의 성숙 재개는 자발적 투명대 경화는 억제할 수 있으나 PMA에 의한 투명대 경화는 억제 불가능하기 때문인 것으로 추정된다.

MF 형성 억제제인 cytochalasin-B의 처리는 저농도에서 뚜렷한 투명대 경화 억제 효과를 보였다. 특히 Cyto-B는 극체 형성을 억제하는 최소의 농도에서 고도의 유의차를 지닌 투명대 경화 억제효과(그림 7)를 나타냈는데 이는 미세용모의 현저한 감소(Longo and Chen, 1985)로 미세용모 분포 지역에서 일어나는 피질 과립 외분비가 억제되어지고, Cyto-B가 MF의 외분비 관여를 막아(Bretscher, 1991) 피질 과립의 subcortical region으로의 이동을 방해하기 때문인 것으로 사료된다.

한편 미성숙 난자의 PMA에 의한 투명대 경화에 Cyto-B가 작용할 수 있나를 알아본 결과, Cyto-B는 결과 8에서의 자발적 투명대 경화 경우에서 억제 가능했던 t_{50} (=22.34±1.56)정도만을 낮출 뿐 PMA에 의한 투명대의 경화는 억제할 수 없음을 나타냈다.

본 실험 결과를 종합하여 볼때, 피질 과립

외분비에 관여하여 투명대의 경화 유도에 영향을 줄 것으로 추정되어진 여러 물질의 처리는 체외 난자 성숙시의 자발적 투명대 경화와 PMA에 의한 투명대 경화는 서로 다른 기작에 의해 조절됨을 보여주었다. 또한 PMA에 의한 투명대의 경화는 수정에 의한 투명대 경화와 여러가지로 유사성을 보였다. 그러므로 체외에서 난자 성숙시 일어나는 자발적 투명대 경화 현상은 배양 시간과는 무관하게 지속적으로 일어나고 체내에서의 성숙 재개나 FBS 혹은 Cyto-B 처리에 의해 완전 억제 가능함에서 PMA에 의한 투명대 경화와의 차이를 나타냈다.

인 용 문 헌

- Batta SK, Knudsen JF: Calcium concentration in cumulus-enclosed oocytes of rat treatment with pregnant mare's serum. *Biol Reprod* 1980, 22, 243-246.
- Bement WM, Capco DG: Activators of protein kinase C trigger cortical granule exocytosis, cortical contraction, and cleavage furrow formation in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* 1989, 108, 885-892.
- Berridge MJ: Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 1984, 220, 345-360.
- Berridge MJ: Inositol triphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem* 1987, 56, 159-193.
- Berridge MJ, Irvine RF: Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989, 341, 197-205.
- Biggers JD: New observations on the nutrition of the mammalian oocyte and the preimplantation embryo. In: *Biology of the blastocyst* (Blandau, R.J.). Univ Chicago Press Chicago 1971, pp319-327.
- Bleil JD, Wassarman PM: Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 1980, 76, 185-202.
- Bornslaeger EA, Schultz RM: Regulation of mouse oocyte maturation: Effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte levels. *Biol Reprod* 1985, 33, 698-704.
- Bretscher A: Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Ann Rev Cell Biol* 1991, 7, 337-374.
- Burgoyne RD: Secretory vesicle-associated proteins and their role in exocytosis. *Ann Rev Physiol* 1990, 52, 647-659.
- Cho WK, Stern S, Biggers JD: Inhibitory effect on dibutyryl cAMP of mouse oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool* 1974, 187, 383-386.
- Choi TS, Mori M, Kohmoto K, Shoda Y: Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro. *J Reprod Fert* 1987, 79, 565-568.
- Ciapa B, Crossley I, De Renzis G: Structural modifications induced by TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) in sea urchin eggs. *Dev Biol* 1988, 128, 142-149.
- 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 hardening of the zona pellucida. *Gamete Res* 1986, 15, 115-122.
- Ducibella T, Rangarajan S: The development of cortical granule (CG) exocytosis competence in the mouse oocyte. *J Cell Biol* 1987, 105, 339a.
- 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* 1990, 43, 870-876.
- Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, Kopf

- GS, Schultz RM: Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol* 1990, 137, 46-55.
- Ducibella T, Duffy P, Kurasawa S, Kopf GS, Schultz RM: The cortical reaction and modifications of the zona pellucida are stimulated by protein kinase C agonists in the mouse egg. *J Cell Biol* 1991, 115, 461a.
- Endo Y, Mattei P, Kopf GS, Schultz RM: Effects of phorbol esters on mouse eggs: Dissociation of sperm receptor activity from acrosome reaction-inducing activity of the mouse zona pellucida protein, ZP3. *Dev Biol* 1987, 123, 574-577.
- Endo Y, Schultz RM, Kopf GS: Effects of phorbol esters and a diacylglycerol on mouse eggs: Inhibition of fertilization and modification of the zona pellucida. *Dev Biol* 1987, 119, 199-209.
- Gulyas BJ, Yuan LC: Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *J Exp Zool* 1985, 233, 269-276.
- Guraya SS: Recent progress in the structure, origin, composition, and function of cortical granules in animal egg. *Int Rev Cyto* 1982, 78, 257-360.
- Hogan B, Costantini F, Lacy E: Manipulating of Mouse Embryo. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1982, pp. 250.
- Kline D: Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg: Injection of a calcium buffer block ion channel opening exocytosis, and formation of pronuclei. *Dev Biol* 1988, 126, 346-361.
- Kurasawa S, Schultz RM, Kopf GS: Egg-induced modifications of the zona pellucida of mouse eggs: Effects of microinjected inositol 1, 4, 5-triphosphate. *Dev Biol* 1989, 133, 295-304.
- Longo FJ, Chen D-Y: Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol* 1985, 107, 382-394.
- Moller CC, Wassarman PM: Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* 1989, 132, 103-112.
- Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA, Wassarman PM: Structural and functional relationship between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol* 1990, 137, 276-286.
- Pierce KE, Siebert MC, Kopf GS, Schultz RM, Calarco PG: Characterization and localization of a mouse egg cortical granule antigen prior to and following fertilization or egg activation. *Dev Biol* 1990, 141, 381-392.
- Saling PM: How the egg regulates sperm function during gamete interaction: Facts and fantasies. *Biol Reprod* 1991, 44, 246-251.
- Schmell ED, Gulyas BJ: Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence for the enzyme's role in hardening the zona pellucida. *Gamete Res* 1980, 3, 279-290.
- Schuel H: Secretory functions of egg cortical granules in fertilization and development: A critical review. *Gamete Res* 1978, 1, 299-382.
- Schuel H: Function of egg cortical granules. In "Biology of fertilization" (C.B. Metz and Monroy, Eds), Academic Press, New York, 1985, 3, 1-44.
- Schultz RM, Montgomery RR, Belanoff JR: Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev Biol* 1983, 97, 264-273.
- Summer TA, Creutz CE: Phosphorylation of a chromaffin granule-binding protein by protein kinase C. *J Biol Chem* 1985, 260, 2437-2443.
- Turner PR, Jaffe LA, Fein A: Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs by inositol 1, 4, 5-triphosphate and GTP-binding protein. *J Cell Biol* 1986, 102, 70-76.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT: Role of cu-

mulus cells and serum on the in-vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod* 1989, 40, 720-728.

Wassarman PM: The biology and chemistry of fertilization. *Science* 1987, 235, 553-560.

Wassarman PM: Zona pellucida glycoproteins.

Ann Rev Biochem 1988, 57, 415-442.

Whitaker M, Patel R: Calcium and cell cycle control. *Development* 1990, 108, 525-542.

Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT: Studies on zona hardening in rat oocyte that are matured in-vitro in a serum-free medium.

Mol Reprod Dev 1991, 28, 292-296.
