

사람 다수정난자의 체외배양시 **Fragmented Embryo**와 **Non-fragmented Embryo**에서의 **Methionine** 유입량 및 미토콘드리아 분포양상의 비교

차병원 여성의학연구소

도병록 · 정미경 · 장미경 · 이경아 · 고정재 · 윤태기 · 차광열

Mitochondrial Distribution and Methionine Uptake in Fragmented and Non-fragmented Embryos Derived from Multi-pronuclei Zygotes in Human In Vitro Fertilization (IVF) Program

B. R. Do, M. K. Chung, M. K. Chang, K-A. Lee, J. J. Ko, T-K. Yoon and K-Y. Cha

Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul, Korea

= Abstract =

Despite the frequent incidence of embryo fragmentation in early human embryos, the reason of the embryo fragmentation has not been known yet. This study was conducted to investigate the histological difference(s) between fragmented (FR) and non-fragmented (NFR) human embryos focusing on comparison of mitochondrial distribution and protein synthesis. Multi-pronuclei zygotes (MPZ) such as three or more pronuclei containing in human in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program were used for this study. MPZ were cultured in TCM-199 supplemented with 10% of human fetal cord serum (hFCS) in 5% CO₂ incubator at 37°C for 24 hours. The cleaved embryos to 2-4 cells after 24 hours were grouped by their grade of fragmentation. Embryos were stained with Rhodamine123 (Rh123) and fluorescence was evaluated under the fluorescence microscope through PB 450-490 filter (Leitz). Regarding to protein synthesis during early human embryogenesis, there is no significant difference in the amount of synthetic proteins between FR and NFR embryos. Distribution of cytoplasmic organelles in embryos was evaluated by transmission electron microscope (TEM). The cytoplasmic distribution of mitochondria was different between FR and NFR embryos. The mitochondrial distribution was even in NFR, whereas severely aggregated in FR. It is not able to clarify in the present study whether this uneven mitochondrial distribution in FR embryo is the reason for embryo fragmentation or is the result from fragmentation. Physiological disparity related to the mitochondrial distribution may be one of the reasons for embryo fragmentation. Further studies should be addressed to investigate the physiological differences between FR and NFR embryos.

서 론

포유류의 수정란은 지속적인 난할과정을 거치면서 발생을 하게 된다. 이러한 난할과정중 일부

난자는 비정상적인 분열을 하게 되고, 그 결과 완전한 핵을 포함하지 않은 세포질만의 빠르고 지속적인 분열현상이 관찰되는데 이러한 현상을 cytoplasmic fragmentation이라 한다. 이러한 cytoplasmic fragmentation 현상이 일어난 배아의 할

구들은 1개 또는 그 이상의 불완전한 핵을 가지기도 하며, 과배란이 유도된 난자 또는 aging된 난자의 체외수정과 관련되어 나타난다고 알려져 있다(Veeck, 1986). Cytoplasmic fragmentation이 사람의 체외수정 및 수정란이식(IVF-ET)시에 미치는 영향으로는, 배반포형성을 및 착상율이 감소됨이 보고되어 있으며(Hartshone, 1989; Hartshone과 Edwards, 1991) 특히 15% 이상의 세포질이 fragmentation된 초기배를 이식할 경우 착상율이 10% 정도 감소됨이 보고되어 있다(Cohen, 1986; Alkani 등, 1993). 1995년 Van Blerkom 등은 임신율과 정비례 관계를 나타내는 ATP의 난자내 절대농도가 fragmentation 현상이 일어난 사람의 초기배에서는 낮게 나타남을 보고하였다. 1990년 Slotte 등도 fragmentation이 일어난 초기배에서 ATP의 합성정도가 낮음을 보고한 바 있다. 그러나 흰쥐의 경우에 있어서 lactose dehydrogenase (LDH)의 활성도는 fragmentation이 일어난 초기배에서나 non-fragmentation된 초기배에서 차이가 없다고 보고되어 있다(Guraya, 1985).

이러한 세포생리학적 차이에 대한 보고 이외에도 fragmentation이 일어난 초기배의 37%에서 염색체의 이수성이 관찰됨이 보고되어 있다(Plachot, 1987).

체외배양시 fragmentation을 감소시키는 방법으로는 난관세포 또는 난포세포 공배양방법이 보고되어 있으나(Sathananthan 등, 1990; Plachot 등, 1993), fragmentation이 일어나는 원인에 대한 연구는 아직 미진한 상태이다.

따라서 본 실험에서는 사람의 IVF-ET시 얻은 다수정난자(multi-pronuclei zygote, MPZ)를 체외 배양하여 얻은 fragmented(FR)와 non-fragmented(NFR) 초기배의 미토콘드리아의 분포 및 단백질 합성을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. MPZ의 배양

본 실험에 사용된 수정란은 사람의 IVF-ET 과정에서 생긴 MPZ를 사용하였으며, 사람의 제대혈청(human fetal cord serum, hFCS)이 10% 첨가된 TCM-199 배양액을 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 24시간 배양하였다. 배양된 초기배는 FR 현상이 보이지 않는 초기배와 FR 현상이 보이는 초기배로 나누어 각각을 실험에 사용하였

다.

2. 조직학적 관찰

2-1. 형광현미경에 의한 미토콘드리아의 분포양상 관찰

각 실험군의 2-4 세포기 초기배(전체실험군, n=38)를 회수하여 5 µg/ml의 Rh123(Sigma)가 들어있는 phosphate buffered saline(PBS)에서 15분간 염색하고, PBS로 10분간 세척한 후, slide glass에 올려 Leitz 형광현미경의 PB450-490 filter를 사용하여 관찰하였다.

2-2. 전자현미경적 관찰

각 실험군의 2-4 세포기의 초기배를 0.1M cacodylate 완충용액(pH7.2)내의 1% glutaraldehyde로 전고정하고, 동 완충용액내의 1% osmic acid로 후고정 하였다. 고정된 초기배는 alcohol series를 거쳐서 탈수하여 propylene oxide로 치환시킨 후 Epon 812 혼합액으로 포매하였다. 포매된 조직은 초박편 절단기(Ultratome V, LKB)를 사용하여 1 µm 두께로 잘라 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 미세구조관찰이 필요한 부위는 초박절단(50nm)한 후, 초박편은 uranyl acetate와 lead nitrate로 이중염색하여 전자현미경(Hitachi 600, 75 KV)으로 관찰하였다.

3. Methionine 유입량 분석

다수정된 난자의 난구세포를 완전히 제거한 후, TCM-199 배양액에 10%의 hFCS를 첨가한 배양액에 ³⁵S가 붙은 methionine(L-[³⁵S] Methionine, >1000 Ci/mM, Amersham)을 250 µCi/ml 첨가하여 24시간 동안 100 µl의 micro-drop에서 배양하였다. 동일 micro-drop내에서 24시간 배양 후, 정상적인 할구가 1개 이상 있으며, 동일 세포기의 FR 과 NFR이 동시에 관찰된 경우에만 실험에 사용하였다(n=7). 회수된 각각의 초기배는 PBS로 5회 세척하고 scintillation vial에 옮겨 15 ml의 scintillation fluid(Insta-gel XF, Packard)를 첨가하여 1분 동안 균질화 시킨 후 β-scintillation counter(LS6000IC, Beckman)로 측정하였다. 또한 scintillation vial로 난자를 옮길 때 들어간 마지막 세척액을 동량 동시에 측정하여 각 측정치의 cpm에서 제외하였다.

결 과

1. 미토콘드리아의 분포

Human의 IVF-ET시 얻은 다수정난자를 Rh123 형광염색 및 투과전자현미경으로 관찰한 결과, Rh123 형광염색된 세포내 소기관이 미토콘드리아임을 확인하였다(그림 1A; 1B; 1C). 이들 다수정난자를 체외배양하여 얻은 FR 과 NFR 배아를 Rh123 형광염색 및 투과전자현미경으로 관찰한 결과 세포질내 미세구조 중 미토콘드리아의 분포양상에 가장 현저한 변화를 보였다. 즉, Rh123 형광염색 결과 정상적인 할구에서는 미토콘드리아의 분포가 비교적 균일한데 비해(그림 2A, 2a), fragmentation된 비정상적인 할구에서는 극단적인 불균일한 분포를 나타냄이 관찰되었다(그림 2B, 2b; 2C, 2c; 2D, 2d). 즉, 정상적인 할구와 fragmentation된 할구를 모두 가지는 초기배의 경우, 정상적인 할구에서는 균일한 미토콘드리아의 분포를 보인 반면(그림 2B,2b; 2C,2c, arrow), fragmentation된 할구에서는 심한 편중분포를 보이는 것이 관찰되었다(그림 1D, 1E; 2B,2b, arrow; 2C, 2c, arrow head). 또한 모든 할구가 fragmentation된 경우에 있어서도 역시 미토콘드리아의 심한 편중분포를 보였으며, 이들 미토콘드리아의 분포양상 및 분포정도가 각 할구마다 다르게 나타남이 관찰되었다(그림 2D,2d).

전자현미경 관찰 결과 동일한 시기의 정상적인 할구에서는 거의 관찰되지 않으나 비정상적으로 fragmentation된 할구에서는 secondary lysosome과 fusion된 mitochondria-vacuole complex들이 관찰되었다(그림 3A; 3B).

2. Methionine 유입정도

동일 배지에서 동시에 배양한 NFR과 FR 배아의 [³⁵S]-methionine 유입정도를 NFR을 1로 놓고 비교한 결과, 유의한 차이가 나타나지 않았다(표 1). 본 실험의 FR군에는 모든 할구가 fragmentation된 배아(그림 2D; 2d)는 포함되지 않았다.

고 찰

포유동물의 2-4 세포기 초기배는 주로 lactate와 pyruvate를 필요로 하는 aerobic상태의 metabol-

ism에 의존한다고 알려져 있다(Brinster, 1965b; Wales와 Whittingham, 1973; Pomp 등, 1988). 이 시기의 초기배는 외부로부터 주로 lactate 또는 pyruvate를 받아들여 TCA cycle을 수행하고 그 결과 획득한 에너지를 ATP로 전환시켜 필요한 발생의 단계를 진행한다. 이러한 에너지의 전환은 세포질내 미토콘드리아에서 일어나고, 따라서 이 시기의 미토콘드리아의 분포는 배아내부의 에너지의 요구도와 관련이 있는 것으로 생각된다. 이에 대한 예로서, 미토콘드리아는 수정후 전핵형성시 전핵 주위에 집중 분포된다고 보고되어 있는데(Noto 등, 1993), 본 실험에서도 같은 결과를 볼 수 있었다. 미토콘드리아는 난할시에는 mitotic spindle과 밀접히 연관되어 이동하는 현상이 생쥐의 초기배에서 보고되어 있다(Muggleton-Harris와 Brown, 1988). 또한 성숙과정과 수정, 그리고 발생 과정의 정상적인 진행과 세포질내의 ATP농도간의 연관성도 보고되어 있어 미토콘드리아의 분포양상에 따른 에너지의 공급 및 그 절대량이 초기배의 발생에 중요한 요인으로 작용함을 알 수 있다(Van Blerkom 등, 1995).

Rat와 생쥐의 착상전 배아의 경우 미토콘드리아의 분포변화는 물질대사의 변화나 세포질내 구조의 변화와 연관이 있다는 보고(Biggers와 Borland, 1976)가 있으며, 또한 미토콘드리아의 밀도변화는 세포내 소기관들과 관련된 대사기능과 직접 관계가 있음이 보고되어 있다(Anderson 등, 1970; Van Blerkom 등, 1973). Trounson 등(1984)은 degenerated embryo에서 vesicular smooth endoplasmic reticulum과 밀접히 연관된 리소솜들을 보고한 바 있으며, 본 실험의 결과에서도 동일한 시기의 정상적인 할구에서는 거의 관찰되지 않으나 fragmented blastomere에서는 secondary lysosome과 밀접히 연관된 수많은 미토콘드리아들의 극단적인 불균형 분포가 관찰되었다. 따라서 이러한 미토콘드리아의 분포양상의 변화가 에너지공급과 초기배의 정상적인 발달에 밀접한 관계가 있다고 생각된다.

세포생리학적 면에서 이러한 미토콘드리아의 기능과 연관된 보고들을 보면, 흰쥐의 경우 모든 초기배에서 lactose dehydrogenase(LDH) 활성도의 변화는 없는데 반해(Guraya, 1985), ATP농도는 NFR에 비해 FR에서 낮게 나타난다는 보고(Slotte 등, 1990; Van Blerkom 등, 1995)등이 있으며, 이들의 결과로부터 FR 초기배에서는 대사물

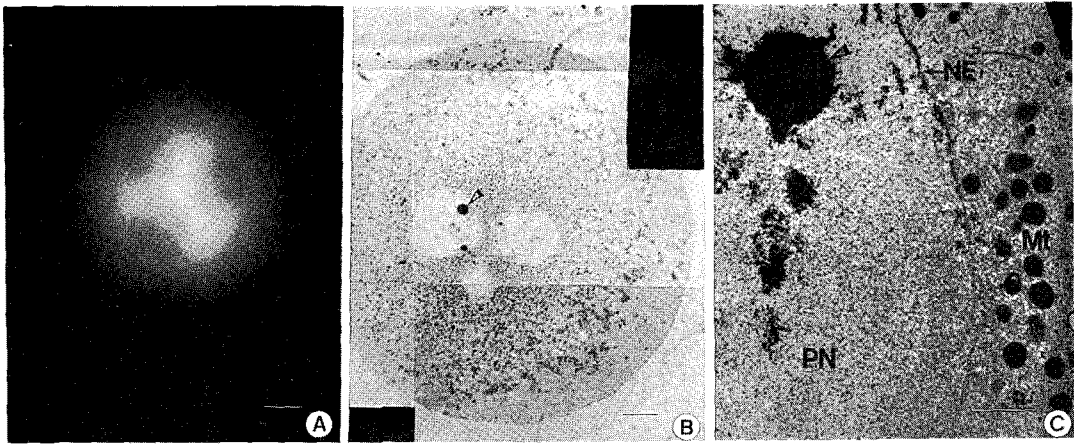


Fig. 1. Mitochondrial distribution in human multi-pronuclei zygote (3 pronuclei) prior to culture. **A)** Rh123 staining under fluorescence microscope. Yellowish staining was found in center around pronuclei. $\times 400$. Bar indicate $20 \mu\text{m}$. **B)** Light microscopic view. Matched to Rh123 staining, mitochondria distribute around pronuclei. $\times 1,000$. Bar indicate $10 \mu\text{m}$. **C)** Transmission electron microscopic view, $\times 8,000$. Bar indicate $2 \mu\text{m}$. Arrow head in **B)** and **C)** indicate the same nucleolus. Mt:mitochondria, NE: nuclear envelope, PN: pronucleus.

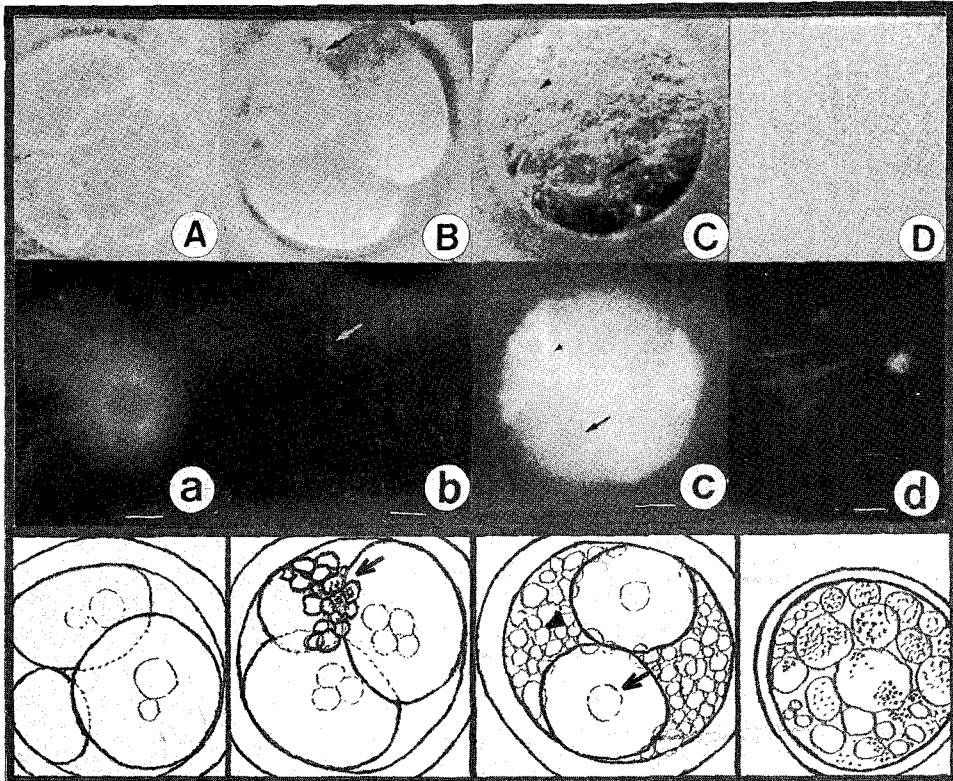


Fig. 2. Difference interference contrast (**A-D**) and fluorescence (**a-d**) microscopic view of early human embryos derived from multinuclei-zygotes. **A, a)** Non-fragmented embryo with even mitochondrial distribution. **B, b)** Embryo with intact and fragmented blastomeres. Arrow indicates clumped mitochondrial staining in the fragmented blastomere. **C, c)** Embryo with one intact (arrow) and rest of fragmented (arrow head) blastomeres. **D, d)** Severely fragmented degenerating embryo with clumped mitochondrial distribution. **A-C)** $\times 400$, **D)** $\times 250$. Bar indicates $50 \mu\text{m}$. Schematic diagrams in the last row depicts corresponding oocyte in each column.

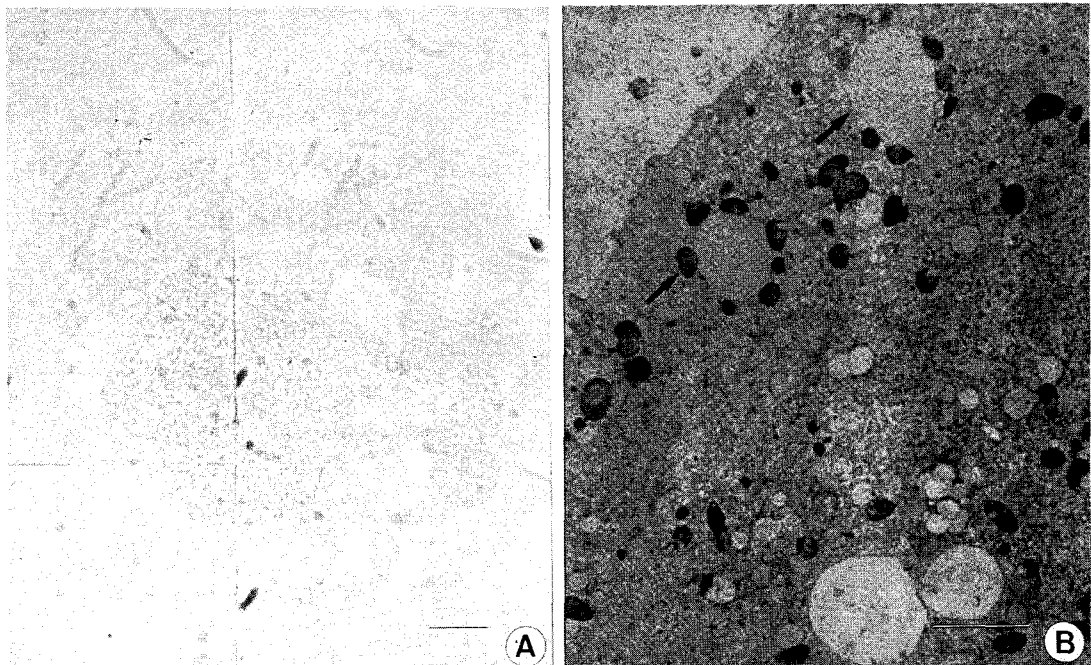


Fig. 3. Mitochondrial distribution in human fragmented embryo derived from multi-pronuclei zygote. A) Light microscopic view, $\times 1,000$. Bar indicate 10 μm . B) Transmission electron microscopic view. Bar indicate 2 μm . Arrows indicate the large vacuole-mitochondria complexes. $\times 6,000$

Table 1. Ratio of [^{35}S]-Methionine incorporation between fragmented and non-fragmented embryos. Experiment was repeated three times.

Exp. No.	No. of Oocytes FR / NFR	FR / NFR *
1	1 / 1	1.80
2	2 / 1	0.99
3	1 / 1	1.55
Average		1.45 \pm 0.24

* FR : Fragmented embryos; NFR : Non-fragmented embryos

질의 공급과 연관된 세포질적인 면보다는 미토콘드리아의 기능저하에 의한 ATP합성율의 저하가 중요한 요인이 됨을 추측할 수 있다.

본 실험에서 사용한 사람의 초기배에서도 미토콘드리아는 secondary lysosome과의 fusion현상 및 심한 불균형 분포를 보였고 따라서 사람의 초기배도 흰쥐의 초기배에서와 마찬가지로 fragmentation이 일어난 초기배는 미토콘드리아가 관련된 ATP합성율의 저하가 배발달에 있어서 중요한 요인으로 생각된다. 이러한 초기배에서의 에너지공급의 불균형이 전체적인 배발달에 영향을 주어 착상율에도 영향을 줄 것으로 생각된다.

Fragmentation이 일어나는 초기배의 37%에서 염색체의 숫적이상이 관찰되었고 (Plachot, 1987), Puisant등의 분류법에 따른 Grade IV 초기배에서 chromosomal abnormality가 높게 나타나며 (Pellestor, 1994), FR 초기배를 가졌던 난포의 난포액내 progesterone농도가 NFR 초기배를 가졌던 난포액보다 유의성 있게 높았다고 보고되어 (Hartshorne, 1989), 난자 자체의 질적인 면의 중요성이 논의되어 있다. 그러나 사람의 난관세포와 공배양시 fragmentation정도가 현저히 줄어든다는 보고(Sathanathan, 1990)는 체외배양의 조건도 초기배의 발달에 영향을 줄 수 있음을 말해 준다. 따라서 fragmentation이 일어난 할구, 노화된 난자, 퇴화되는 난자에서 일반적으로 관찰되는 미토콘드리아의 비정상적인 분포들이 체외배양시의 배양조건에 의한 것일 수 있음을 시사한다.

미토콘드리아의 응집현상을 보이면서 "2 cell block"된 생쥐의 초기배에 normal developed cytoplasm을 injection한 경우 정상적인 발달을 보였다는 보고(Muggleton-Harris와 Brown, 1988)가 있어 초기배 발생의 조절에 관여하는 세포내 조절 단백질 등과 이들의 발현을 조절하는 세포외적 조절물질들이 관여함을 알 수 있다.

본 실험에서도 FR과 NFR 초기배에서의 methionine 유입정도를 관찰하여 세포내 중요 조절물질인 단백질의 합성정도를 간접적으로 알아보고자 하였으나, methionine의 유입정도에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 따라서 본 실험의 결과와 공배양 및 normal cytoplasmic injection에 의해 초기배의 기능이 회복되는 등의 결과를 종합하면, 외래 조절물질의 유입이 초기배의 발달단계의 세포생리적 조절에 중요하게 작용하여 세포내 소기관들, 특히 미토콘드리아의 분포에 영향을 줄 수 있으며, 이들에 의해 조절 받을 수 있는 단백질의 합성에 있어서는 합성량의 변화보다는 그 질적 변화나 또는 에너지공급과 관련된 세포생리적 변화가 더 중요하게 작용하리라 생각된다.

결 론

결론적으로, 사람의 초기배 발생에서 나타나 착상율을 감소시킨다고 알려진 cytoplasmic fragmentation 현상은 미토콘드리아의 분포와 직접적인 상호연관성이 있고, 이러한 미토콘드리아의 극단적인 불균형현상은 초기배의 에너지공급과 관련이 있다고 보여진다. 그러나 이러한 cytoplasmic fragmentation 현상이 folliculogenesis 과정 동안 형성된 난자의 자체 요인에 의한 결과로 나타나는 현상인지, 아니면 외부 환경의 영향에 의한 것인지 또는 양쪽 다에 의한 것인지에 대해서는 지속적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

- Alkani M, Oliveness F, Cohen J: Microsurgical correction of partially degenerate mouse embryos promotes hatching and restores their viability. *Hum Reprod* 1993, 8, 1723-1728.
- Anderson E, Condon W, Sharp D: A study of oogenesis and early embryogenesis in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, with special reference to the structural changes of mitochondria. *J Morphol* 1970, 130, 67-91.
- Biggers JD, Borland RM: Physiological aspects of growth and development of the preimplantation mammalian embryo. *Annu Rev Physiol* 1976, 38, 95-119.
- Brinster RL: Studies on the development of mouse embryos in vivo and in vitro. IV. Interaction of energy source. *J Reprod Fertil* 1965b, 10, 679-687.
- Cohen J, Simons RS, Fehilly CB, Edwards RG: Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1986, 3, 46-52.
- Guraya SS: Follicular atresia. In : *Biology of ovarian follicles in mammals*. Brelin : Springer-Verlag, 1985, 252.
- Hartshorne GM: Steroid production by the cumulus: relationship to fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1989, 4, 742-175.
- Hartshorne GM, Edwards RG: Role of embryonic factors in implantation: Recent developments. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1991, 5, 133-158.
- Jonson LV, Walsh ML, Chen LB: Localization of mitochondria in living cells with Rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci* 1980, 77, 990-994.
- Muggleton-Harris AL, Brown JJG: Cytoplasmic factors influence mitochondrial reorganization and resumption of cleavage during culture of early mouse embryos. *Hum Reprod* 1988, 3, 1020-1028.
- Noto V, Campo R, Roziers KS, Vercruyssen M, Gordts S: Mitochondrial distribution after embryo freezing. *Hum Reprod* 1993, 8, 2115-2118
- Pellestor F, Dufour M-C, Arnal F, Humeau C: Direct assessment of the rate of chromosomal abnormalities in grade IV human embryos produced by in-vitro fertilization procedure. *Hum Reprod* 1994, 9, 293-302.
- Plachot M, Antoine JM, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandelbaum J, Junca A-M, Salat-Baroux J: Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993, 8, 2133-2140.
- Plachot M, de Grouchy J, Junca AM, Mandelbaum J, Turleau C, Couillin P, Cohen J, Salat-Baroux J: From oocyte to embryo: a model, deduced from in vitro fertilization, for natural selection against chromosome abnormalities. *Ann Genet* 1987, 30, 22-32.

- Pomp D, Crister ES, Rutledge JJ: Lower sodium lactate in Whitten's medium improves in vitro developmental capacity of one-cell mouse embryos. *Theriogenology* 1988, 29, 1019-1024.
- Sathananthan H, Bongso A, Ng S-C, Ho J Mok H, Ratnam S: Ultrastructure of preimplantation human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1990, 5, 309-318.
- Slotte H, Gustafson O, Nylund L, Pousette A: ATP and ADP in human pre-embryos. *Hum Reprod* 1990, 5, 319-322.
- Trounson A, Sathananthan AH: The application of electron microscopy in the evaluation of two- to four-cell human embryos cultured in vitro for embryo transfer. *J of in Vitro Fertil Embryo Transfer* 1984, 1, 153-165
- Van Blerkom J, Davis PW, Lee J: ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995, 10, 415-424.
- Van Blerkom J, Manes C, Daniel JC: Development of preimplantation rabbit embryos in vivo and in vitro. I An ultrastructural comparison *Dev Biol* 1973, 35, 262-282.
- Veeck LL : Possible abnormal conditions. In : *Atlas of the human oocyte and early conceptus*. Baltimore : Williams and Wilkins, 1986, 308.
- Wales RG, Whittingham DG: The metabolism of specifically labelled lactate and pyruvate by two-cell mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1973, 33, 207-222.