

체외수정란의 발생에 미치는 난구세포와 난포액의 역할

김 광 식

연암축산원예전문대학 축산기술연구소 수정란이식연구실

가축에 있어서, 체외성숙 및 수정된 초기배의 발생율은 체내성숙, 수정된 것에 비하여 매우 낮고, 이 원인에 대하여 몇가지의 문제점이 거론되고 있으며, 그중에서도 난자의 성상과 성숙조건이 중요한 것으로 시사되어 있다.

난자의 충분한 발생을 위한 성숙은 핵성숙에 따른 세포질성숙이 이뤄져야 한다는 것이 알려져 있다. 핵성숙은 단순배지에서 성숙배양을 하여도 대부분의 난자가 수정가능한 상태(MII)로 성숙되며 그 성숙여부도 염색을 통하여 판단가능하다. 그러나 난자의 세포질성숙은 수정 및 배발생과정을 걸쳐 배반포배로 발달된 초기배의 비율에 의하여 판단할 수밖에 없으며, 세포질성숙은 난자의 형태학적 특징과 체외성숙배양 조건의 차이가 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이러한 세포질성숙을 개선하기 위해서 성숙배양액에 성장인자, 혈청, 호르몬 과 난포액 등의 다양한 물질을 첨가하여 배양하거나, 난자를 난구세포/과립막세포와의 공배양 등을 연구하고 있으나, 아직 체내성숙조건을 만족시키지 못하고 있다.

돼지와 소난포액중에는 난자의 핵성숙을 억제 또는 촉진하는 물질이 함께 포함되어 있으며, 이러한 물질은 난포의 발달과 함께 변화된다고 보고되어 있으며, 대난포액의 난포액을 첨가한 배양액중에서 성숙시킨 소난자가 대조구 보다 수정후의 초기배발생율이 높았다고 보고되어 있다. 또한 성숙배양전 난자로부터 난구/방사관세포를 기계적으로 분리하여 성숙배양시킨 난자가 난구/방사관세포 부착난자에 비하여 성숙, 수정 및 초기배발생율이 저하되었다고 보고하였다. 그러나 난포액중에 포함되어 있는 성숙 억제 또는 촉진인자가 초기배의 발생에 미치는 효과에 대한 결과는 그다지 보고되어 있지 않으며, 또한 기계적으로 난구/방사관세포의 분리가 난자의 세포질성숙에 미치는 영향에 대해서도 아직 보고가 많지 않다.

따라서 본연구는 난포액중에 포함되어 있는 성숙촉진인자가 난자의 성숙,

수정 및 초기배발생에 미치는 효과를 난포액의 농도 및 유래, 호르몬과의 조합, 난포액을 분자량에 의해 분리첨가하여 초기배의 발생율과 발생한 배반포의 세포수에 의해 난포액이 성숙과정에 미치는 효과를 검토하였으며, 성숙배양시 난구/방사관세포의 기계적인 분리, 분리시기가 난자의 성숙, 수정 및 초기배발생에 미치는 효과와 난구세포의 부착유무가 난자중의 성숙촉진인자의 변화에 미치는 영향에 관해서도 검토하였다.

1. 소난자의 체외성숙에 있어서 소난포액의 효과

도축장유래의 1-5mm, 10-12mm 또는 발정중(승가시)의 난포액을 채취하여 무혈청배지에 각각 10, 30, 60%(v/v) 첨가하고, 난자를 도입하여 24시간 성숙배양하고, 동결용해 시킨 정자와 6시간 수정하고, 수정후 과립막세포의 단층과 9일간 체외배양하였다. 그결과 어떠한 난포액에 있어서도 10%를 첨가한 성숙배양액에서 성숙시킨 미성숙난자는 수정후 배반포배 발생율이 대조구(PVP, 3^{mg}/ml)와 동일하였으나, 30% 또는 60%의 난포액을 첨가한 성숙배양액에서 성숙시킨 난자는 유의하게 저하되어($P < 0.05$), 난포의 발달(크기)과는 관계없이 어떠한 난포액중에도 난자의 성숙을 억제하는 물질이 포함되어 있다는 것이 시사되었다. 또한 난포액중에서 성숙시킨 난자의 주변에는 피브린상의 물질이 부착되어 성숙배양후 제거가 어려우며, 이러한 것에 의해 수정이 방해되었다고 생각되어, 피브린상의 물질을 제거하기 위해 난포액에 heparin을 첨가하였다. 이미 보고된 자료에 의하면, 성숙배지에 첨가한 heparin은 난자가 배양접시의 바닥에 부착되는 것을 억제시키나, 난자성숙에는 영향이 없는 것으로 밝혀져 있다.

다음에는 heparin처리한 1-5mm의 난포액을 estradiol/ hCG를 첨가한 기초배지에 10, 30, 60% 첨가하여 성숙배양액으로 사용하였다. 그결과 난자주변에 부착되는 피브린상이 없어졌으며, 난포액을 호르몬과 함께 첨가하는 것에 의하여 배반포배로의 발생율이 전체적으로 증가되었으나, 여전히 고농도의 난포액중에서 성숙시킨 난자는 수정후의 배반포배 발생이 대조구 또는 저농도에 비하여 억제되어, 난포액중에 포함되어 있는 것으로 생각되어지는 난자성숙억제 물질은 외인성호르몬에 의해 영향을 받지 않는 물질인 것으로 추측되었다.

다음에는 heparin처리한 난포액중에서 성숙된 난자의 수정후 발생된 배반포배의 세포수를 계산한 결과, 난포액을 첨가하지 않은 배양액중에서 발생된 배반포의 세포수에 비하여 난포액이 10% 또는 30%를 첨가한 배양액중에서 성숙된 난자가 유의하게 높은 세포수를 갖은 배반포배로 발생하는 것이 관찰되어($p < 0.01$), 난포액중에는 난자의 성숙을 억제하는 물질뿐만 아니라 촉진하는 물질, 특히 세포질성숙을 촉진하는 물질이 동시에 포함되어 있다는 것이 제시되었다.

끝으로 난포액중의 난자세포질성숙을 촉진하는 물질을 규명하기 위하여, 난포액을 분자량에 의해 분획, 성숙배양액에 첨가하여 난자를 성숙시킨 결과, 분자량 10,000 이상의 분획중에서 성숙배양한 난자가 배반포배의 발생을 및 발생된 배반포배의 세포수가 대조구와 분자량 10,000 이하의 난포액중에서 성숙된 난자에 비하여 유의하게 증가되었다($P < 0.01$). 이상의 결과에서 소난포액중에는 난자성숙을 억제하는 물질뿐만 아니라 세포질성숙을 촉진하는 물질이 함께 포함되어 있으며, 난자세포질성숙을 촉진하는 물질은 분자량 10,000 이상에 존재하는 것이 밝혀졌다.

2. 소난자의 체외성숙에 있어서 난포세포의 효과

난구/방사관세포의 부착유무가 난자의 성숙, 수정 및 배발생에 미치는 효과를 검토하기 위해, 난자(COC, cumulus oocyte complex)에 부착된 난구세포(CO, corona enclosed oocyte) 또는 방사관세포(DO, denuded oocyte)를 성숙배양전에 난자로 부터 분리 또는 분리된 세포를 재첨가하여 성숙배양을 하였다. 성숙율과 수정율에서는 세포부착 및 재첨가 유무와 관계없이 차이가 인정되지 않았다. 배반포배의 발생에 있어서, DO는 CO와 CO에 비하여 유의하게 저하되었으며($p < 0.01$), 그러나 분리제거된 세포(난구/방사관세포)를 재첨가하여 성숙배양한 경우, 적으나마 배반포배의 발생이 관찰되었으며, CO에 있어서는 세포(난구세포)의 재첨가에 관계없이 동일하였다.

다음에는 난구/방사관세포부착유무가 난자의 성숙재개(GVBD), 성숙완료(MII), 수정 및 배발생에 미치는 효과를 검토하기 위해, CO, CO 및 DO를 성숙배양개시후 다양한 시간(16-28시간)에 염색하여 핵성숙상태를 관찰하고, 각각의 시간에 수정을하여 배발생을 관찰하였다. 그결과, 성숙개시에 있어서

는 COC가 CO 또는 DO에 비하여 늦게 개시되었으나, 성숙배양개시 후 24시간의 MII 도달율에 있어서는 차이가 인정되지 않았으며, 24시간 성숙시킨 난자의 수정율도 동일 하였다. 그러나, 26시간 이상 성숙배양한 DO에 있어서는 수정율이 유의하게 저하되었다($P < 0.01$). 배반포배발생에 있어서, COC와 CO는 성숙배양시간이 길어지는 것에 따라 증가되었으며, 성숙배양개시후 24시간 과 20시간에 수정시켰을 때 최고의 발생이 관찰되었다. 한편, DO에 있어서는 18시간 성숙배양한 난자를 수정하였을 때 COC와 CO에 비해서는 낮으나(9.6%) 최고의 발생을 보였다. 그러나, 26시간이상 성숙배양후 수정시켰을 경우 배반포배의 발생이 전혀 관찰되지 않았다.

다음에는 난구/방사관세포를 성숙배양개시후 다양한 시간에 제거하는 것이 난자의 배발생에 미치는 효과를 검토하기 위해, 성숙배양개시후 0, 3, 6, 13, 16, 24 시간에 난구/방사관세포를 분리하여 24시간까지 배양후 수정을 하였다. 그결과, 성숙배양개시후 16시간 이후에 난구/방사관세포를 제거해도 그 발생능력에는 영향이 없는 것이 인정되었다.

끝으로 핵성숙변화에 따라 변화된다고 알려진 성숙촉진인자의 활성이 난구/방사관세포의 부착과 관계가 있는지의 여부를 검토하기 위해, COC와 DO를 성숙배양개시후 0, 3, 6, 13, 16, 24시간에 H1 kinase의 활성을 측정하였다. 그결과, GV, GVDD, anaphase I 및 telophase I기에는 낮고, MI와 MII기에서의 그 활성이 2배에 달하였다. 이러한 활성형태는 지금까지 보고된 결과와 동일하였다. 따라서 난자에 있어 성숙촉진인자의 활성은 성숙배양시 난자에 부착된 난구/방사관세포와는 무관한 것이 인정되었다.

이상의 결과를 요약해 보면, 소난자의 충분한 세포질성숙에는 적어도 방사관세포의 부착이 필요하며, 난구/방사관세포에서 난자에 부여되는 것으로 추측되어지는 발생능력 조절인자는 성숙배양개시 후 16시간 이내에 이루어지는 것이 제시되었다. 또한 성숙중에 일어나는 성숙촉진인자의 활성은 난구/방사관세포의 부착과는 관계 없이 난자의 핵성숙기에 따라 변화하는 것이 밝혀졌다.