

## 생쥐난자에 있어서 투명대 경화현상이 체외수정에 미치는 영향

### II. 투명대 경화 현상을 유도하는 원인물질의 구명

이상진 · 정길생

건국대학교 축산대학 동물자원연구센터

## Effect of Zona Hardening on *In Vitro* Fertilization in Mouse Oocytes.

### II. Analysis of Materials Causing Zona Hardening

Lee, Sang-Jin and Kil-Saeng Chung

Animal Resources Research Center, College of Animal Husbandary, Kon-Kuk University

### SUMMARY

In order to demonstrate whether ovoperoxidase hardens the zona of oocytes activated by incubating in M-S buffer supplemented with 20  $\mu$ M of Ca-ionophore A 23187, the effect of peroxidase inhibitors(250 mM phenylhydrazine, 28 mM sodium sulfite, 350 mM glycine ethyl ester and 50 mM sodium azide), tyrosine analogue(12.5 mM tyramine) and exogeneous peroxidase(50  $\mu$ g/ml horseradishperoxidase : HRP) on zona hardening in ionophore-treated oocytes were investigated.

The results obtained from these experiments were summarized as follows :

1. The zona solubility ( $t_{50}$ ) of ionophore-activated and DMSO-treated oocytes at 1, 2 and 3 hr of culture were 25.0, 31.6 and 40.6 min., and 9.7, 10.8 and 15.5 min., respectively. The longest time required for zona lysis of ionophore activated oocytes at 1 hr after onset of ionophore treatment. The differences in  $t_{50}$  for zona was significantly greater as compared to DMSO-treated controls( $P < 0.01$ ).
2. The inhibition rates of hardening in the oocytes treated with the phenylhydrazine, sodium sulfite, glycine ethyl ester and sodium azide, were 23.8, 61.9, 95.2 and 23.8%, respectively, and the tyramine, was 14.3%. Several known peroxidase inhibitors and tyrosine analogue were blocked zona hardening in ionophore activated oocytes.
3. The treatment of exogeneous peroxidase promoted the zona hardening of activated oocytes but not in unactivated oocytes.

These results indicate that the ovoperoxidase apparently catalyzes the hardening of the zona following ionophore activation of mouse oocytes.

### I. 서 론

투명대 경화 현상은 배양액의 불완전한 조성으로 인하여 체내 혹은 체외에서 장기간 배양된 난모세포나

수정란의 투명대가 물리적, 화학적 및 구조적으로 변형됨으로서 발생하는 생물학적인 현상으로 체외수정의 효율을 저하시키는 근본 원인 중의 하나이다.

포유동물에 있어서 투명대 경화현상의 발생기전은 명료하게 증명되어 있지 않지만, sea urchin 난자에서

는 많은 연구가 보고되어져 왔다(Katsura와 Tominga, 1974 ; Czhak, 1975 ; Foerder와 Shapiro, 1977 ; Veron 등, 1977 ; Foerder 등, 1978 ; Hall, 1978 ; Klebanoff 등, 1979 ; Shapiro 등, 1980, 1981). 그 중에서도 Katsura와 Tominga (1974) 및 Klebanoff 등 (1979)은 sea urchin 난자의 cortical granule에는 ovoperoxidase가 존재하고, 이 ovoperoxidase는 수정시에 cortical granule의 단백질 분해 효소와 함께 난자의 위란강으로 분비되어 투명대의 tyrosine 기에 교차결합을 함으로써, tyrosine을 dityrosine 혹은 trityrosine으로 전환시킴으로써, fertilization envelope(FE)의 경화를 유도한다고 보고하였으며(Foerder와 Shapiro, 1977 ; Foerder 등, 1978 ; Hall, 1978 ; Klebanoff 등, 1979), Foerder 등(1978)은 ovoperoxidase의 촉매작용에 필요한 산화기질인 hydrogen peroxide가 난자에서 합성되고, 이것은 수정후에 분비되는 ovoperoxidase와 함께 정자에 대한 독성을 가지고 있다는 것을 증명하였다(Smith와 Klebanoff, 1970 ; Boldt 등, 1981).

따라서 최근에는 포유동물 난자에 있어서도, sea urchin 난자의 FE 경화에서 증명된 것과 같이, 투명대 경화에 대한 cross-linking mechanism이 구명됨으로써, 포유동물 난자의 투명대 경화를 유도하는 물질 역시 cortical granule의 분비산물에 존재하는 ovoperoxidase라는 것을 시사하였다(Gulyas와 Schmell, 1980 ; Schmell과 Gulyas, 1980). 그러므로 ovoperoxidase에 의해 유도되는 투명대 경화 현상이 체내 혹은 체외에서 배양되는 난모세포의 체외수정의 효율을 저하시키는 주된 원인이라고 보고(Schmell과 Gulyas, 1980 ; DeFelici와 Siracusa, 1982 ; DeFelici 등, 1985 ; Gianfortoni와 Gulyas, 1985 ; Downs 등, 1986)되고 있다.

이에 본 연구에서는 투명대 경화 현상을 유도시키는 원인물질을 구명하기 위하여, Ca-ionophore A 23187을 함유한 M-S buffer에 peroxidase inhibitor, tyrosine analogue 및 외인성 peroxidase를 첨가한 다음, 단위발생이 유도된 난자의 투명대 용해성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 배양액

난자의 관류와 회수를 위해 사용된 기초배양액으로는 수정 tyrode's 용액(이, 1991)을 사용하였고, 난자의 난구세포를 제거하기 위해서는 기초배양액에 1 mg/ml의 hyaluronidase를 첨가하여 사용하였다.

그리고 투명대 경화 분석(zona hardening assay)을 위한 배양액으로는 minimal salts buffer(M-S buffer ; Schmell과 Gulyas, 1980)와 전술한 기초배양액을 사용하였으며, 투명대 용해용 배양액으로는 단백질원이 함유되어 있지 않은 Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)에 3 mg/ml  $\alpha$ -chymotrypsin(Sigma, U. S. A.)을 첨가하여 사용하였다. 그리고 투명대 경화 현상의 파악을 위한 미수정란의 단위발생유기를 위해서는 M-S buffer에 20  $\mu$ M의 Ca-ionophore A 23187을 첨가하여 사용하였고, 투명대 경화를 유지하는 원인물질의 구명을 위하여는 Ca-ionophore A 23187이 첨가된 M-S buffer에 peroxidase inhibitors(250 mM phenylhydrazine, 28 mM sodium sulfite, 350 mM glycine ethyl ester 및 50 mM sodium azide)와, tyrosine analogue (12.5 mM tyramine)를 각각 첨가한 것이었으며, 또한 외인성 peroxidase인 HRP (horseradishperoxidase ; 50  $\mu$ g/ml)를 M-S buffer에 첨가하여 투명대 경화의 원인물질이 peroxidase인가를 구명하기 위하여 사용하였다.

단위발생 유도물질인 Ca-ionophore A 23187 (Sigma ; U.S.A)은 DMSO (dimethylsulfoxide ; Shinyo Co. Japan)에 용해시켜서 2mM의 보존액을 만든 다음, 최종농도가 20  $\mu$ M이 되도록 M-S buffer로 조정하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보존하면서 사용하였고, 이때 사용된 DMSO의 농도는 1% 미만이었다.

이들 배양액의 pH는 7.2~7.4, 특히 투명대 경화 현상의 분석을 위한 M-S buffer의 경우, pH는 7.6으로 조절하였다. 그리고 모든 배양액의 삼투압은 280~290 mOsm로 조정하여, 사용직전에 0.2 혹은 0.45 m의 milliphore filter (German Science Inc., U.S. A.)로서 여과·제균한 다음, 소량으로 분주하여  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관하면서 사용하였다.

### 2. 과배란 처리와 난자의 회수

자성생쥐의 복강내에 5 IU의 pregnant mare's

serum gonadotropin (PMSG ; Intervet, Holland)을 주사한 다음, 48시간째에 동일한 방법으로 5 IU의 human chorionic gonadotropin(hCG ; Sigma, U.S.A.)을 주사하여 과배란을 유도하였고, 난자의 회수는 hCG 주사후 14~16시간째에 생쥐를 도살하여 외과적인 방법으로 난관을 적출한 후, 난관에 부착된 혈액과 불순물을 제거하고, 체외수정을 위한 배양액소적(0.4 ml)이 들어있는 조직배양용 petridish내의 유동 paraffin oil속으로 옮겨서, 40~60 배의 실체현미경하에서 해부침을 사용하여 난관팽대 부로부터 난구세포에 둘러쌓인 난자를 회수하였다.

### 3. Ca-ionophore A 23187 처리에 의한 난자의 단위발생유기

HCG 주사후 14~16시간째에 회수한 미수정란을 Ca-ionophore가 첨가된 M-S buffer의 소적(0.4 ml)에 옮긴 다음, CO<sub>2</sub> 배양기에서 실험목적에 따라 1, 2 및 3시간 동안 배양하여 난모세포의 단위발생을 유기하였다.

### 4. 투명대 경화 현상 분석(zona hardening assay)

투명대 용해용 배양액인 0.3%  $\alpha$ -chymotrypsin 소적(100  $\mu$ l)에 10~20개의 난자를 공여하여 투명대의 용해성을 조사하였다. 공시된 난자의 투명대 용해 정도의 관찰은 매 1분 간격으로 37°C의 가온판을 장착한 위상차 현미경하에서 실시하였으며, 투명대의 일부가 용해되었거나, 완전히 용해되었을 때를 관찰의 기준으로 삼았고, 난자의 투명대 경화 정도는 공시된 난자의 투명대가 50% 용해되는데 요구되는 시간 즉 t<sub>50</sub>으로 나타내었다. 한편 peroxidase inhibitor인 phenylhydrazine(250 mM), sodium sulfite (28 mM), glycine ethyl ester(350 mM) 및 sodium azide(50 mM)와, tyrosine analogue인 tyramine(12.5 mM)을 각각 ionophore 용액에 첨가하여 투명대 경화의 억제 정도 관찰하였고, 또 외인성 peroxidase인 horseradishperoxidase (HRP; 50 g/ml)를 M-S buffer에 첨가하여 투명대 경화의 정도를 관찰하였다.

투명대 경화의 정도는 Schmel과 Gulyas(1980)의 방법에 준하여 계산하였다.

본 연구에 사용된 투명대 경화의 계산 공식을 살펴 보면,

Total hardening, H<sub>T</sub> = t<sub>50</sub>(A 23187) - t<sub>50</sub>(DMSO)이며

Extent hardening with inhibitors, H<sub>E</sub> = t<sub>50</sub>(inhibitors) - t<sub>50</sub>(DMSO) 이고,

$$\text{Percent of total hardening, } H\% = \frac{H_E}{H_T} \times 100$$

Percent inhibition of hardening, I% = 100 - H% 로 나타내었다.

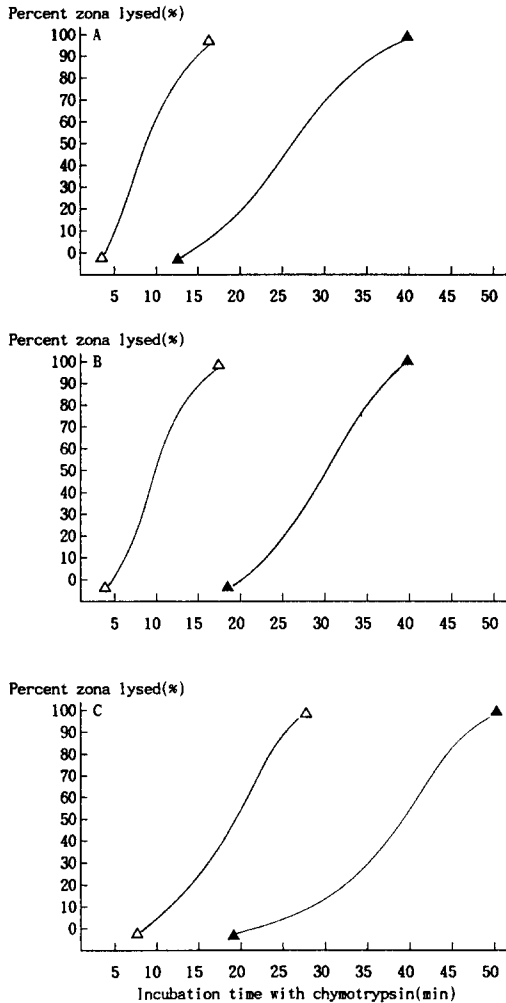
## III. 결과 및 고찰

### 1. Ca-ionophore A 23187을 처리한 난자의 투명대 경화

Ca-Ionophore A 23187을 처리한 미수정란을 1, 2 및 3시간 동안 배양하여 투명대 경화현상이 어느 시기에 발생하고, 또 투명대 경화를 유도하는 물질의 구멍을 위하여 배양시간별로 난자를 회수하여 t<sub>50</sub>을 조사한 결과는 Fig. 1과 Table 1과 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이, ionophore A 23187 처리후, 1, 2 및 3시간 동안 배양된 난자의 t<sub>50</sub>은 각각 25, 31.6 및 40.5분이었으며, DMSO를 처리한 대조구의 그것은 각각 9.7, 10.8 및 15.5분으로써, Ca-ionophore 처리구에서 유의하게 투명대 경화현상이 유도되었다. 그리고 Table 1에서 투명대 용해성에 대한 total hardening은 배양 1, 2 및 3시간째에 각각 15.3, 20.8 및 25.0분으로 배양 시간을 연장할수록 증가하였다. 이러한 결과는 Schmel과 Gulyas(1980)의 결과와 대체로 일치하는 성적이었다. 그러나 Schmel과 Gulyas(1980)의 결과에서는 배양 1시간째에 회수된 난자의 투명대 경화의 정도는 처리구와 대조구 사이에는 유의한 차이가 없었고, 배양 2시간과 3시간째에는 차이가 인정되었지만, 본 연구에서는 배양 1 시간째에도 Ca-ionophore를 처리한 구에서 투명대 경화현상은 뚜렷하게 인정되었다(P<0.001).

이러한 차이는 투명대 용해성을 조사할 때, Schmel과 Gulyas(1980)는 0.1%의 pronase를 사용하였고, 본 연구에서는 0.3%의  $\alpha$ -chymotrypsin을 사용하였기 때문에, 투명대에 미치는 효소활성의 차이와 사용된 생쥐의 계통차가 그 원인이라고 생각되지만, 구체적으로 확인할 수는 없었다. 그러나 일반적으로 3~10  $\mu$ M 농도의 Ca-ionophore를 2분 정도 미수



**Fig. 1. Zona hardening assays of ovulatory oocytes treated with 1% DMSO or Ca-ionophore A 23187(20  $\mu$ M) and incubated for 1(A), 2(B) and 3hr(C) in CO<sub>2</sub> incubator.**

△ - △ : DMSO treated oocytes  
 ▲ - ▲ : Ionophore treated oocytes

정란에 처리할 경우, 난자의 cortical reaction은 30분 이내에 일어나고, 2시간내에는 전핵이 형성된다고 보고되고 있다(Steinhardt와 Epel, 1974 ; Steinhardt 등, 1974 ; Kaufman, 1983).

이상의 결과에서, Ca-ionophore을 처리한 난자는

**Table 1. Total hardening of ovulatory oocytes treated with DMSO or ionophore and incubated for 1 h, 2 h, and 3 h in CO<sub>2</sub> incubator.**

Incubation time	Total hardening
1 h	15.3
2 h	20.8
3 h	25.0

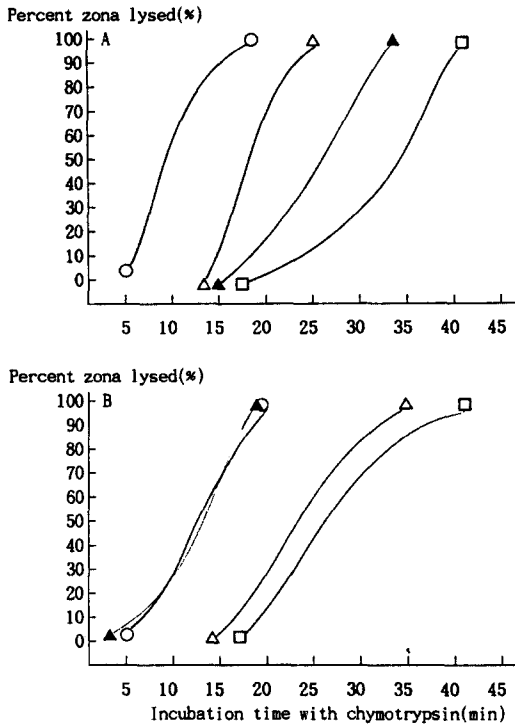
Total hardening,  $H_T = t_{50}(A23187) - t_{50}(DMSO)$

배양 1시간째부터 투명대 용해성이 대조구의 난자보다 현저하게 감소한다는 것을 알 수 있었다. 이것은 Ca-ionophore에 의하여 이미 난자는 cortical reaction이 유기되어 투명대에는 이미 물리적 변화가 유도되었다는 것을 간접적으로 시사하는 것이었다.

## 2. Ca-ionophore A 23187을 처리한 난자에 있어서 peroxidase inhibitors 의 투명대 경화 억제효과

투명대 경화현상을 유도하는 주요 원인물질이 무엇인가를 검토하기 위하여, Ca-ionophore(20  $\mu$ M)가 함유된 배양액에 peroxidase inhibitor를 첨가하여, 미수정란을 2시간 동안 처리한 다음, 투명대 경화 정도를 분석한 결과를 Fig. 2와 Table 2에 제시하였다.

먼저 Fig. 2에서 보는 바와 같이, DMSO가 첨가된 대조구의  $t_{50}$ 은 10.8분이었고, Ca-ionophore 처리구는 31.6분이었다. 그리고 phenylhydrazine, glycine ethyl ester, sodium sulfite 및 sodium azide를 첨가한 구의  $t_{50}$ 은 각각 26.6, 19.4, 10.3 및 26.5분으로써, Ca-ionophore 단독처리구보다도  $t_{50}$ 이 증가하였다. 다시 말해서, 투명대 경화의 억제효율은 Table 2에서 보는 바와 같이, phenylhydrazine과 sodium azide 첨가구가 각각 23.8%와 23.8%, sodium sulfite 첨가구는 61.9% 그리고 glycine ethyl ester 첨가구는 95.2%로써, 투명대 경화의 억제효과가 가장 높았던 것은 glycine ethyl ester였으며, 그 다음이 sodium sulfite였고, phenylhydrazine과 sodium azide가 가장 낮았지만, DMSO만이 첨가된 대조구(Fig 2 A, B)보다는 투명대 용해성이 저하하였다. 한편 sodium sulfite의 경우, 투명대 경화를 억제시키는 농도인 28 mM을 처리하였을 때, 투명대는, 투명대는 팽윤되는 현상을 관찰할 수 있었다.



**Fig. 2. Zona hardening assay of unfertilized oocytes treated with 1% DMOS or 20  $\mu$ M Ca-ionophore A23187 in MS buffer supplemented with peroxidase inhibitors.**

A. Peroxidase inhibitors (250  $\mu$ M phenylhydrazine and 28 mM sodium sulfite) and ionophore (20  $\mu$ M) were added to unfertilized eggs. After two hours, 10~20 cells from each group were assayed with  $\alpha$ -chymotrypsin.

- : DMSO treated cells
- : Ca-ionophore A23187 treated cells without inhibitors
- ▲-▲ : Ca-ionophore A23187 treated cells with phenylhydrazine
- △-△ : Ca-ionophore A23187 treated cells with sodium sulfite

B. Peroxidase inhibitors (350 mM glycine ethyl ester or 50 mM sodium azide) and 20  $\mu$ M ionophore A23187 or 1% DMSO were added to unfertilized eggs, and then incubated or

2hr in CO<sub>2</sub> incubator and assayed.

- : DMSO treated cells
- : Ca-ionophore A23187 treated cells without peroxidase inhibitors
- ▲-▲ : Ca-ionophore A23187 treated cells with glycine
- △-△ : Ca-ionophore A23187 treated cells with sodium azide

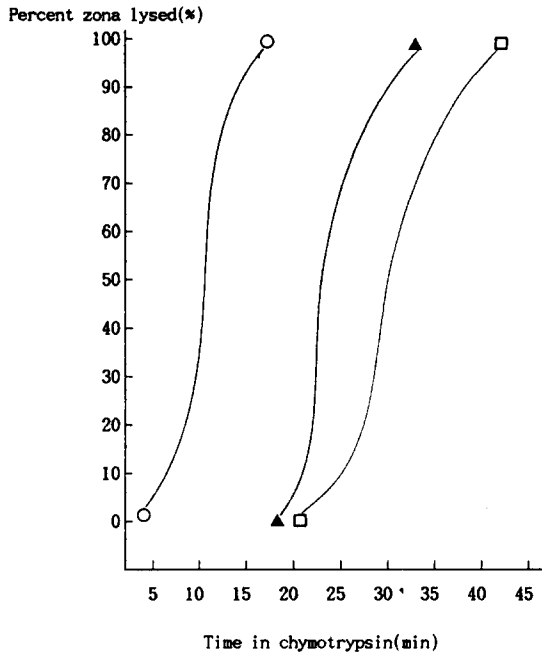
**Table 2. Inhibitor of zona hardening by peroxidase inhibitors or tyrosine analogue.**

Compound	Percent inhibition of hardening
Phenylhydrazine	23.8
Peroxidase sodium sulfite	61.9
Inhibitors Glycine ethyl ester	95.2
Sodium azide	23.8
Tyrosine analogue tyramine	14.3

이러한 결과는 zona hardening assay에 사용된 proteolytic enzyme으로 pronase를 사용한 Schmill과 Gulyas(1980)의 결과와는 다소 상이하였지만, peroxidase inhibitor 각각의 hardening 억제 정도는 비슷한 경향을 나타내었다. 따라서 peroxidase inhibitors들이 투명대 경화를 억제시키는 것으로 미루어 볼 때, ovoperoxidase가 투명대의 tyrosine 잔기에 작용하여, 이 tyrosine 잔기를 dityrosine 혹은 trityrosine으로 구조적 변화(Foerder와 Shapiro, 1977 ; Foerder 등, 1978 ; Hall, 1978 ; Klebanoff 등, 1979)를 유도하기 전에 peroxidase inhibitor들과 먼저 상호작용을 함으로써, 투명대 경화의 발생을 억제한다는 것을 확인할 수 있었고, 이로 미루어 보아 투명대 경화를 유도하는 주요 원인물질이 ovoperoxidase라는 것을 알 수 있었다.

### 3. Ca-ionophore A 23187을 처리한 난자의 투명대 경화에 미치는 tyrosine analogue의 효과

Tyrosine analogue인 tyramine이 peroxidase inhibitor들과 마찬가지로 투명대 경화를 억제시키는 효과가 있는지를 검토한 결과는 Fig. 3과 같다.



**Fig. 3. Zona hardening assay of unfertilized eggs treated with 1% DMSO or 20  $\mu$ M ionophore A23187 in MS buffer in the presence of tyrosine analogue (21.5mM tyrosine), and then incubated for 2 hr.**

- : Ca-ionophore A23187 treated cells
- : DMSO treated cells
- ▲-▲ : Ca-ionophore A23187 treated cells in MS buffer supplemented with tyramine.

Fig. 3에서 보는 바와 같이, DMSO만을 처리한 대조구에서의  $t_{50}$ 은 10.8분이었고, Ca-ionophore 만을 처리한 구에서의  $t_{50}$ 은 31.6분이었다. 그리고 tyramine을 첨가한 구에서는 28.7분으로써 대조구보다는 용해성이 감소하였지만, Ca-ionophore 처리구보다 증가한 것으로 보아 투명대 경화현상을 억제시키는 tyramine의 효과가 인정되었으며, 그 억제효율은 14.3%였다(Table 2). 그러나 이러한 결과는 Schmell과 Gulyas(1980)가 보고한 81%보다는 상당히 떨어지는 것이었는데, 그 원인은 구체적으로 알 수 없었고, 다만 proteolytic enzyme의 활성과 생쥐의 계통상의 차이

에 기인하는 것으로 생각된다. 이 결과는 비록 투명대 경화의 억제 정도가 peroxidase inhibitor들보다 낮다 하더라도 tyramine이 투명대의 tyrosine기와 경쟁적으로 반응하여 투명대 경화를 억제시킨다는 것을 시사하는 것이었고, 이것은 투명대 경화현상에 있어서 ovoperoxidase의 작용기전을 간접적으로 입증하는 것이었다.

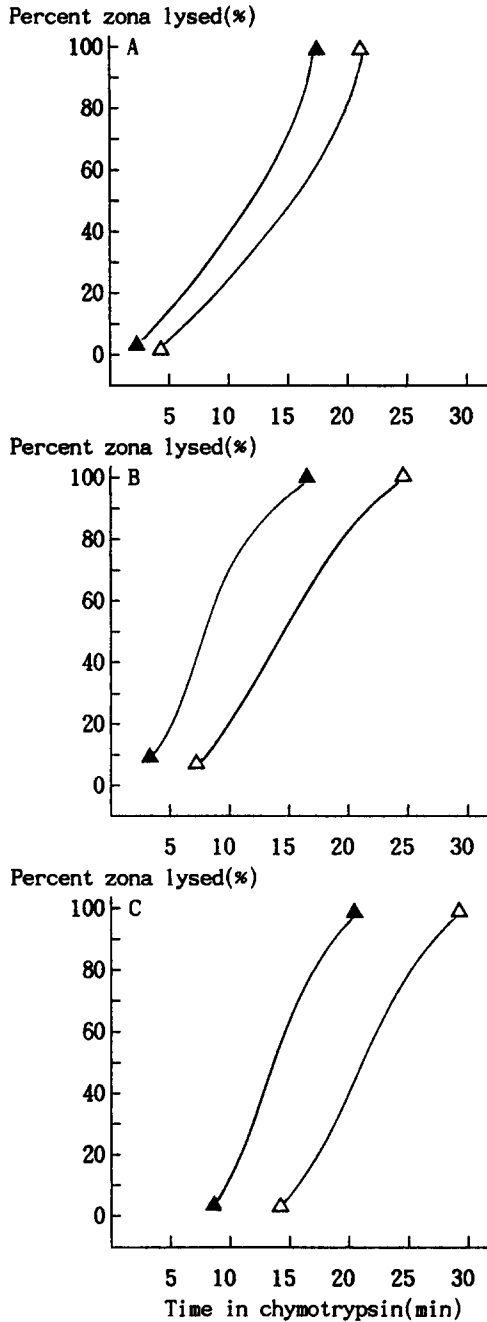
한편 투명대 경화에 있어서 ovoperoxidase에 의한 tyrosine residue의 교차결합의 화학적 특징은 sea urchin egg(Foerder and Sharpiro, 1977, Hall, 1978), dragon flies(Kawasaki등, 1974)에서 많이 보고되어져 있으나, 포유동물 난자의 경우에는 그 크기나 체적이 너무 작기 때문에, 이에 관한 보고는 전무한 실정이다.

#### 4. 외인성 peroxidase에 의한 미수정란의 투명대 경화

Peroxidase가 실제로 투명대 경화현상을 유도하는 물질인가를 검토하기 위하여, 50 g/ml의 외인성 peroxidase인 HRP를 첨가한 배양액(M-S buffer)에서 1, 2 및 3시간 동안 배양하여  $t_{50}$ 을 조사한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이, 외인성 peroxidase인 HRP(50 g/ml)를 처리하지 않은 무처리구의  $t_{50}$ 은 1, 2 및 3시간째에 각각 10분, 13분 및 15분이었고, HRP 처리구에서는 각각 11분, 18분 및 20분으로써, 무처리구나 처리구 모두 배양시간이 경과함에 따라 투명대의 용해성은 감소하였다. 그리고 투명대 경화현상은 배양 1시간째에는 처리구와 무처리구 사이에는 별다른 차이가 나타나지 않았으나, 배양 2시간과 3시간째에서 뚜렷한 차이가 나타났으며, 처리구가 무처리구보다 약 5분 정도의 total hardening이 인정되었다.

Schmell과 Gulyas(1980)는 peroxidase inhibitors와 tyrosine analogue 그리고 외인성 HRP에 의한 투명대 경화현상을 유도하는 물질을 규명하는 데에는 아직도 해결해야 할 문제점들이 많이 남아있다고 보고하였는데, 특히 투명대 경화를 유도하는 원인물질의 분석을 제외수정과 같은 직접적인 방법의 개발과 아울러 tyrosine 교차결합의 화학적 분석을 sea urchin 난자(Foerder 와 Shapiro, 1977)에서와 같이, 직접적으로 수행할 수 있는 방법의 개발등을 지적하고



**Fig. 4. Effect of exogenous peroxidase on zona hardening : Oocytes were cultured for 1 h(A), 2h(B) and 3h(C) *in vitro***  
 ▲-▲ : Oocytes incubated in MS buffer  
 △-△ : Oocytes incubated in MS buffer

있다. 그러나 본 연구의 결과는 Schmel과 Gulyas (1980)의 성적과 일치하는 것으로써, 실제로 외인성 peroxidase인 HRP가 미수정란의 투명대 경화를 유도하며, 그 실체가 peroxidase analogue라는 것을 확인할 수 있었다.

#### IV. 적 요

투명대 경화 현상은 체내 혹은 체외에서 배양된 난모세포의 체외수정율을 저하시키는 근본 원인중의 하나이다. 따라서 본 연구는 난자의 투명대 경화를 유도하는 ovoperoxidase의 antagonist와 analogue를 Ca-ionophore A 23187이 처리된 난자에 첨가하여 배양한 다음, 0.3%  $\alpha$ -chymotrypsin으로 투명대의 용해성을 조사함으로써, 난자의 투명대가 경화되는 원인을 구명하고, 이를 극복하는 방법을 개발하여 난자의 이용성과 체외수정의 효율을 증진시키기 위하여 수행하였다.

본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Ca-ionophore를 처리한 다음, 1, 2 및 3시간 동안 배양한 난자의 투명대 용해에 소요되는 시간은 각각 25.0, 31.6 및 40.6분이었고, DMSO 처리난자의 그것은 각각 9.7, 10.8 및 15.5분으로써, Ca-ionophore의 처리에 의해 유의하게 투명대 경화현상이 유기되었다.
2. Ca-ionophore(20  $\mu\text{M}$ )가 첨가된 배양액에 peroxidase inhibitors인 phenylhydrazine, glycine ethyl ester, sodium sulfite 및 sodium azide를 첨가한 결과, 투명대 경화현상의 억제효과가 가장 높은 것은 glycine ethyl ester였고, 이어 sodium sulfite였으며, phenylhydrazine과 sodium azide가 가장 낮았다. 또 Ca-ionophore로 처리된 난자에 tyramine(12.5 mM)을 첨가하여 2시간 동안 배양한 결과, 투명대 경화현상이 억제되었으며, 그 억제효율은 14.3%였다.
3. 배양액에 외인성 peroxidase인 horseradishperoxidase를 첨가한 결과, 투명대 용해에 소요되는 시간이 연장되는 것으로 보아 투명대 경화현상을 일으키는 원인물질은 ovoperoxidase 유연물질

이라고 판단되었다.

## V. 인용문헌

1. Boldt, J., H. Schuel, R. Schuel, P. V. Dandekar and W. Troll. 1981. Reaction of sperm with egg-derived hydrogen peroxidase helps prevent polyspermy during fertilization in the sea urchin egg. *Gamete Res.* 4: 365-377.
2. Choi, T.S., M. Mori, K. Kohmoto and Y. Shoda. 1987. Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 79 : 565-56.
3. Czihak, G. 1975. "The Sea Urchin Embryo. Biochemistry and Morphogenesis". Springer-Verlag, Berlin and New York.
4. DeFelici, M. and G. Siracusa. 1982. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. *Gamete Res.*, 6:107-113.
5. DeFelici, M., A. Salustri and G. Siracusa. 1985. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture : II. The effect of follicular fluid and Glycosaminoglycans. *Gamete Res.*, 12:227-235.
6. Downs, S.M., A.C. Schroeder and J.J. Eppig. 1986. Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro* by preventing hardening of the zona pellucida. *Gamete Res.*, 15:115-122.
7. Foerder, C.A. and B.M. Shapiro. 1977. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with trosine cross-links. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74:4214-4218
8. Foerder, C.A., S.J. Kelbanoff and B.M. Shapiro. 1978. Hydrogen peroxide prouction hemiluminescence and the respiratory burst of fertilization. Interrelated events in early sea urchin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75:3183-3187.
9. Gianfortoni, J.G. and B.J. Gulyas. 1985. The effects of short-term incubation(aging) of mouse oocytes on *in vitro* fertilization, zona solubility, and embryonic development. *Gamete Research*, 11: 59-68.
10. Gulyas, B.J. and E.D. Schmell. 1980. Ovoperoxidase activity in ionophore Treated mouse eggs: I. Electron microscopic localization. *Gamate Research.*, 3: 267-277.
11. Hall, H.G. 1978. Hardening of the sea urchin fertilization envelope by peroxidase catalyzed phenolic coupling of tyrosines. *Cell.*, 15:343-355.
12. Katsura, S.J. and A. Tominga. 1974. Peroxidatic activity of catalase in the cortical granules of sea urchin eggs. *Dev. Biol.*, 34: 111-122.
13. Kaufman, M.H. 1983. Methodology: *In vitro* and *in vivo* activation techniques. Early mammalian development: Parthenogenetic studies, ed. P.W. Barlow, P.B. Green, C.C. Wylie, pp. 20-62, Cambridge.
14. Klebanoff, S.J., C.A. Foerder, E.M. Eddy and B.M. Shapiro. 1979. Metabolic similarities between fertilization and phagocytosis. *J. Exp. Zool.*, 14: 515-574.
15. Klebanoff, S.J., C.A. Foerder, E.M. Eddy and B.M. Shapiro. 1979. Metabolic similarities between fertilization and phagocytosis. *J. Exp. Med.*, 149 : 938-953.
16. Longo, F. J. 1980. Aging of Mouse Eggs *In Vivo* and *In Vitro*. *Gamete Research.*, 3 : 379-393.
17. Longo, F.J. 1981. Changes in the Zonae Pellucidae and Plasmalemmae of Aging Mouse Eggs. *Biol. Reprod.*, 25 : 399-411.
18. Nicosia, S.V., D.P. Wolf and M. Inoue. 1977. Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Dev. Biol.*, 57



- : 56-74.
19. Schmell, E.D. and B.J. Gulyas. 1980. Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. : I. Electron microscopic localization. *Gamete Research*, 3: 267-277.
  20. Schmell, E.D. and B.J. Gulyas. 1980. Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence of the enzyme's role in hardening the zona pellucida. *Gamete Research.*, 3 : 279-290.
  21. Shapiro, B.M., R.W. Schackmann, C.A. Gabel, C.A. Foerder, M. L. Farrance, E.M. Edd and S.J. Kelbanoff. 1980. Molecular alterations in gamete surface during fertilization and early development. In "The Cell Surface: Mediator of Developmental Processes" (S. Subtelny and N.K. Wessells, eds.), pp.127-150. Academic Press, New York.
  22. Shapiro, B.M., R.W. Schackmann and C.A. Gable. 1981. Molecular approaches to the study of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.*, 50: 815-843.
  23. Smith, D.C and S.J. Klebanoff. 1970. A uterin fluid-mediated sperm inhibitory system. *Biol. Reprod.*, 3: 229-235.
  24. Steinhardt, R.A. and D. Epel. 1974. Activation of sea-urchin eggs by a calcium ionophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71: 1915-1919.
  25. Steinhardt, R.A. and D. Epel, E.J. Carroll and R. Yanagimachi. 1974. Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs? *Nature(London)*. 252: 41-43.
  26. Szollosi, D. 1971. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *Am. J. Anat.*, 130 : 209-226.
  27. Veron, M., C. Foerder, E.M. Eddy and B.M. Shapiro. 1977. Sequential biochemical and morphological events during assembly of the fertilization membrane of the sea urchin. *Cell*, 10: 321-328.
  28. Zamboni, L. 1970. Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biol. Reprod.*, 2 : 44-63.
  29. 이상진. 1991. 생쥐 난자의 핵성숙과 투명대 경화가 체외수정과 배발생에 미치는 영향. 건국대학교 대학원 박사학위 청구논문., pp 1-170.