

## 생쥐난자에 있어서 투명대 경화현상이 체외수정에 미치는 영향

### Ⅲ. Peroxidase Inhibitors와 Tyrosine Analogue 처리된

#### 난자의 투명대 경화 현상과 체외수정

이 상 진 · 정 길 생

건국대학교 축산대학 동물자원연구센터

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

### Ⅲ. Analysis of *In Vitro* Fertilization and Zona Hardening in Oocytes Treated with Peroxidase Inhibitors and Tyrosine Analogue

Lee, Sang-Jin and Kil-Saeng Chung

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

### SUMMARY

These experiments were carried out to investigate whether the enzyme is involved in zona hardening during normal activation of the oocytes by sperm, and demonstrate peroxidase activity during *in vitro* fertilization of oocytes treated with peroxidase inhibitors (250  $\mu$ M phenylhydrazine, 28 mM sodium sulfite, 350 mM glycine ethyl ester and 50 mM sodium azide) and tyrosine analogue (12.5 mM tyramine). Also, zona soluble properties of the ovarian oocytes incubated for 0, 5, 10 and 15 hr in the presence of phenylhydrazine or tyramine were studied by using  $\alpha$ -chymotrypsin.

The results obtained from these experiments were summarized as follows :

1. The rates of fertilization in control oocytes and oocytes treated with phenylhydrazine or tyramine were 69.8%, 62.3% and 88.2%, respectively. However *in vitro* fertilization in oocytes treated with three different peroxidase inhibitors, sodium sulfite, glycine ethyl ester and sodium azide, were not induced. The oocytes treated with phenylhydrazine had no significant effect on *in vitro* fertilization rate as compared to control. However there was a significantly different in fertilization between tyramine treated group and control group ( $P < 0.01$ ).
2. The zona solubility ( $t_{50}$ ) of control and fertilized oocytes in culture treated with phenylhydrazine or tyramine were 30.7, 26.0 and 16.3 min., respectively. Phenylhydrazine treated group and tyramine treated group had effect on inhibition of zona hardening as compared to control group. These results suggest that ovoperoxidase is involved in zona hardening during normal activation of the oocytes by sperm.
3.  $t_{50}$  of control oocytes and ovarian oocytes treated with phenylhydrazine or tyramine for 5, 10 and 15 hr *in vitro* were 14.0, 26.2 and 32.0 min., 14.5, 26.9 and 30.2 min., and 14.0, 24.3 and 31.2 min., respectively. These results suggest that zona hardening in ovarian oocytes

matured for various times *in vitro* cannot be inhibited by peroxidase inhibitors and tyrosine analogue, that the spontaneous zona hardening in cultured ovarian oocytes is not caused by the secretory products of cortical granules released during the cortical reaction, ovoperoxidase.

## I. 서 론

생쥐 난자의 체외수정에 있어서 수정율에 영향을 미치는 제요인에는 사용하는 생쥐의 계통과 유전형 (Iwamatsu와 Chang, 1971 ; Fraser와 Drury, 1976 ; Parkening과 Chang, 1976 ; Fraser, 1977 ; Kaleta, 1977 ; Niwa 등, 1980), 배란된 난자의 핵성 속도 (Krzanowska, 1970, 1972 ; Kaleta와 Polak, 1978 ; Krzanowska 등, 1984 ; Polanski, 1986) 및 배양액의 조성과 배양조건 등 (Schmell과 Gulyas, 1980 ; DeFelici와 Siracusa, 1982 ; DeFelici 등, 1985 ; Gianfortoni와 Gulyas, 1985 ; Downs 등, 1986)이 있다. 그 중에서도 배양액의 불완전한 조성으로 인해 발생하는 투명대 경화 현상은 수정율을 저하시키는 주된 원인중의 하나이다.

이러한 투명대 경화 현상은 정자가 난자에 침입할 때, 난자의 세포질 표면에 산재해 있는 cortical granule의 방출시, 그 분비산물 중에 존재하는 ovoperoxidase에 의해 유도된다고 알려져 왔다. 따라서 이러한 물질은 주로 sea urchin 난자에서 구명되었고 (Katsura와 Tominga, 1974 ; Czihak, 1975 ; Foerder와 Shapiro, 1977 ; Veron 등, 1977 ; Foerder 등, 1978 ; Hall, 1978 ; Klebanoff 등, 1979 ; Shapiro 등, 1980, 1981), 포유동물 난자의 경우에는 Gulyas와 Schmell(1980, I, II)이 sea urchin 난자에서와 같이 ovoperoxidase가 투명대 경화를 유도하는 주된 원인물질이라고 보고하였다.

한편, 난자를 장시간에 걸쳐 체외에서 배양하면, 이러한 효소와는 관계없이 발생하는 자연적인 투명대 경화 현상에 관해서도 보고(Schmell과 Gulyas, 1980 ; DeFelici와 Siracusa, 1982 ; DeFelici 등, 1985 ; Gianfortoni와 Gulyas, 1985 ; Downs 등, 1986)되고 있다.

그러나 이러한 투명대 경화 현상을 유도하는 물질의 구명에 있어서 주로 사용되어온 방법은 체내 혹은 체

외에서 채취한 난자를 peroxidase inhibitors와 tyrosine analogue를 배양액에 첨가하여 체외에서 배양된 난자 혹은 수정란의 투명대를, 단백질해 효소를 이용한 투명대의 용해성 정도를 측정함으로써, 투명대 경화를 분석하는 간접적인 조사방법(Gulyas와 Schmell, 1980 ; Schmell과 Gulyas, 1980)이 주로 사용되어져 왔고, 실제 정자에 의한 수정과정에서 투명대 경화의 원인을 직접적으로 구명하고자 하는 시도는 아직 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 투명대 경화 현상을 유도하는 원인물질이 ovoperoxidase인가를 정자에 의한 체외 수정 과정에서 확인하기 위하여 체외수정용 배양액에 peroxidase inhibitors와 tyrosine analogue를 첨가하여 수정에 공시된 난자의 수정을 유도함으로써, 투명대의 경화에 미치는 체외수정율의 조사와 함께 투명대 경화의 억제 효과를 조사하였고, 다른 한편으로는 자연적인 투명대의 경화 현상이 수정란 혹은 단위발생란에서와 같이 ovoperoxidase에 의해 유도되는가를 난소내 난모세포를 이용하여 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 공시동물

공시동물은 ICR 계통의 생쥐로써, 자성생쥐는 4~6주령, 체중은 15~25 g이었으며, 웅성생쥐는 10~14주령, 체중은 30~45 g이었다.

일조시간은 14시간(오전8~오후10시)으로 조절하였으며, 고형사료와 식수는 무제한 급여하였다.

#### 2) 배양액 및 배양조건

정자의 처리, 난자회수, 체외성숙 및 체외수정을 위해 본 연구에서 사용한 기초배양액은 수정 tyrode's 용액(이, 1991)에 penicillin G(75 mg/ml)와 streptomycin(5mg/ml) 및 3mg/ml의 BSA(bovine serum albumin ; Sigma, U. S. A.)를 첨가하여

사용하였고, 난자의 난구세포를 제거하기 위해서는 1 mg/ml의 hyaluronidase가 함유된 기초배양액을 사용하였다.

한편, 투명대 경화 현상의 분석(zona hardening assay)을 위한 투명대 용해용 배양액으로는 단백질원이 함유되어 있지 않은 Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)에 3mg/ml  $\alpha$ -chymotrypsin(Sigma, U. S. A.)을 첨가하여 사용하였으며, 체외수정에 공시되는 난자의 투명대 경화 현상을 구명하기 위해서는 기초배양액에 peroxidase inhibitors(250  $\mu$ M phenylhydrazine, 28 mM sodium sulfite, 350 mM glycine ethyl ester and 50 mM sodium azide) 와 tyrosine analogue(12.5 mM tyramine)를 각각 첨가하여 사용하였다.

이들 배양액의 pH는 7.2~7.4, 삼투압은 280~290 mOsm로 조정하였으며, 사용 직전에 0.2 혹은 0.45  $\mu$  m의 millipore filter (German Science Inc., U. S. A.)를 사용하여 여과·제균한 다음, 소량으로 분주하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 보관하면서 사용하였다.

한편 배양조건은 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기조건인 CO<sub>2</sub> 배양기에서 실험목적에 따라 배양하였다.

## 2. 방 법

### 1) 정자의 처리

웅성 생쥐를 경추탈골법으로 도살하여 웅성생식기로 부터 정소상체 미부만을 적출한 후, 이것을 전술한 정자부유용 배양액소적(0.4 ml)이 들어있는 petridish(Falcon Co., U. S. A.)내의 유동 paraffin oil (Shinyo Co., Japan)속에 침적한 다음, 실체현미경 하에서 해부침으로 정소상체 미부를 절개하여 누출된 정자괴를 배양액 소적으로 유도하여 정자를 부유시켰다. 이 정자 부유액은 수정능획득을 위하여 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 조건인 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 2시간 동안 배양하였다.

### 2) 과배란 처리와 난자의 회수

#### (1) 배란된 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 ; Sig-

ma, U. S. A.)을 주사하여 과배란을 유도하였다.

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, 40~60배의 실체현미경하에서 해부침을 사용하여 난관관대부로부터 난구세포에 둘러쌓인 난자를 회수하여 체외수정과 투명대 경화 현상의 분석에 공여하였다.

#### (2) 난소내 난모세포의 회수

자성생쥐의 복강내에 5 IU의 PMSG만을 투여한 후, 46~48시간째에 생쥐를 도살하여 난소를 적출한 다음, 20G needle이 부착된 주사기를 사용하여 난소에 존재하는 그라아프 난포를 파열하여 germinal vesicle(GV) 단계의 난자들을 회수한 다음, 실험목적에 따라 0, 5, 10 및 15시간 동안 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 조건인 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 투명대의 용해성을 조사하였다.

#### 3) 체외수정

배란된 성숙난자는 peroxidase inhibitor와 tyrosine analogue가 첨가된 체외수정용 배양액 소적(0.4 ml)에 10~20개씩 옮긴 다음, 수정능을 획득한 정소상체 미부의 정자부유액을 난자가 함유된 배양액 소적에 10~30  $\mu$ l 가주하였다. 이때 정자의 최종농도는  $1\sim3 \times 10^6$  /ml이었다. 이어 수정을 유도하기 위하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 조건하의 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 6시간 동안 배양하여 수정의 여부를 관찰하였다.

#### 4) 난자의 고정과 염색

수정후 6시간째에 수정된 난자를 확인하기 위해서 난구세포가 부착된 난자는 0.1% hyaluronidase 용액에서 5분간 처리하여 난구세포를 제거하거나, gentle pipetting으로 제거한 다음, 신선한 배양액으로 3~4회 세척함으로써, 난자에 부착되어 있는 정자와 불순물을 완전히 제거하였다. 이어 난구세포와 정자를 완전히 제거한 난자들은 2.5% glutaraldehyde 용액으로 난자의 투명대를 고정한 다음, 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 10% 중성 formalin 용액으로 6~12시간 동안 난자의 세포질을 고정한 후, 0.25% lacmoid 용액으로 5~10

분간 염색을 실시하여 수정의 여부를 판정하였다.

### 5) 수정의 판정

난자의 수정 여부는 난자의 세포질내에 정자가 침입하였거나, 정자의 두부가 팽화된 것, 그리고 응성전핵 및 정자의 미부 등이 관찰되는 난자를 수정란으로 판정하였다.

### 6) 투명대 경화 현상 분석(zona hardening assay)

투명대 용해용 배양액인 0.3%  $\alpha$ -chymotrypsin 소액(100  $\mu$ l)에 10~20개의 난자를 공여하여, 37°C 가온판이 장착된 위상차 현미경하에서 매 1분 간격으로 투명대의 용해성을 조사하였다. 이때 투명대의 일부가 용해되었거나, 완전히 용해되었을 때를 관찰의 기준으로 삼았고, 난자의 투명대 경화 정도는 공시된 난자의 투명대가 50% 용해되는데 요구되는 시간 즉  $t_{50}$ 으로 나타내었다. 그리고 투명대 경화의 정도는 전술한 Schmell과 Gulyas(1980)의 방법에 준하여 계산하였다.

한편 투명대 경화의 발생이 실제로 peroxidase에 의하여 유기되는가를 구체적으로 확인하기 위하여, hCG 주사후 14~16시간째에 회수한 배란된 난자를 peroxidase inhibitor와 tyrosine analogue를 전술한 체외수정용 배양액에 첨가하여 체외수정을 실시한 다음, 수정후 6시간째에 난자를 회수하여 고정·염색한 후, 수정율을 조사함과 동시에 전핵기 수정란의 투명대 경화 분석을 실시하였다.

### 7) 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과의 분석은  $\chi^2$  검정법을 사용하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. Peroxidase inhibitors 와 tyrosine analogue 가 배란난자의 체외수정에 미치는 영향

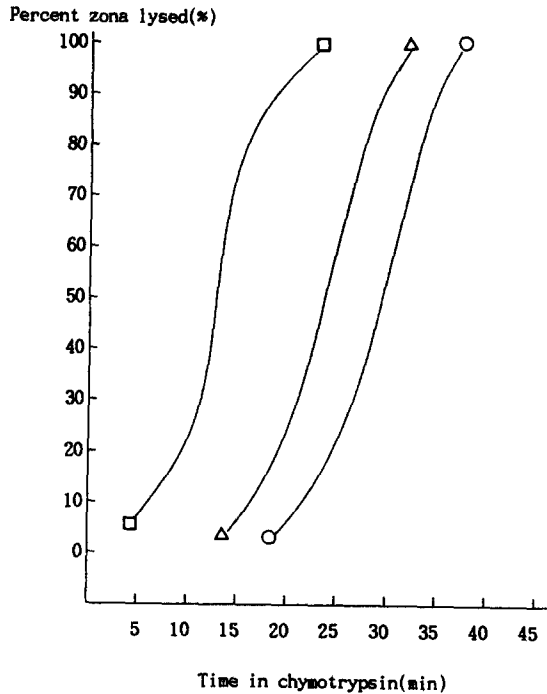
투명대 경화현상을 유도하는 물질이 ovoperoxidase라는 것을 간접적으로 확인(이, 1991)할 수 있었지만, 실제 체외수정에서 이러한 물질들이 투명대 경화현상을 억제시키려는가는 알 수 없었다. 따라서 peroxidase inhibitor들과 tyrosine analogue를 체외수정용 배양액에 첨가하여 난자의 체외수정을 유도하였을 때, 체외수정의 효율과 투명대 경화의 억제 정도를 관찰한 결과를 Table 1과 Fig. 1에 제시하였다.

먼저 Table 1에서, 무처리구에서의 체외수정율은 69.8%였으며, 다정자 침입율은 3.5%였다. 그리고 peroxidase inhibitors 중에서, sodium sulfite, glycine ethyl ester 및 sodium azide를 각각 처리한 구에서는 투명대 경화를 억제시킬 수 있는 농도에서 수정에 공시한 난자는 모두 퇴행하였고, 정자 또한 모두 사멸함으로써, 수정이 전혀 유도되지 않았지만, phenylhydrazine 첨가구에서는 수정이 유도되어 체외수정율은 62.3%였고, 다정자 침입율은 1.3%로 무처리구의 그것과는 유의한 차가 인정되지 않았다. 그

**Table 1. *In vitro* fertilization of ovulatory oocytes treated with peroxidase inhibitors and tyrosine analogues in order to inhibit of zona hardening**

Compound	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized(%)		
		Total	Monospermic	Polyspermic
Control	86	60(69.8)	57(66.3)	2( 3.5)
Phenylhydrazine(250 $\mu$ M)	77	48(62.3)	47(61.0)	1( 1.3)
Sodium Sulfite(28 mM)	92	—	—	—
Glycine Ethyl Ester(350 mM)	45	—	—	—
Sodium Azide(50 mM)	48	—	—	—
Tyramine(12.5 mM)	85	75(88.2)*	54(63.5)	21(24.7)

\* : Values with different superscripts between control and treatment groups are significantly different,  $p < 0.01$ .



**Fig. 1. Zona hardening assaya of pronucleated embryo treated with peroxidase inhibitor or tyrosine analogue during *in vitro* fertilization.**

- : Control
- : Tyramine
- △—△ : Phenylhydrazine

리고 tyrosine analogue인 tyramine 첨가구에서의 체외수정율은 88.2%였고, 그 중에서 다정자 침입율은 24.7%로써, 무처리구보다 유의하게 높았다( $P < 0.01$ ). 따라서 tyrosine analogue가 peroxidase inhibitor보다 투명대 경화를 억제하는 효과가 인정된다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는, 정자가 세포질에 침입할 때, 방출되는 cortical granule의 분비산물 중 ovoperoxidase가 배양액에 첨가된 tyrosine analogue인 tyramine과 투명대의 tyrosine기와의 경쟁적 교차결합 반응에서 tyramine과 먼저 결합함으로써, 투명대의 tyrosine 기에는 결합할 기회가 상대적으로 줄어들었기 때문에, 투명대의 경화가 억제되었다고 생각된다. 특히 tyramine 처리구에서 다정자 침입이 현저히 증가된 원인은 이에 기인하는 것이라고 사

료된다.

이러한 결과를 직접 입증하기 위하여 체외수정의 효율을 실제로 증진시킨 phenylhydrazine과 tyramine이 첨가된 배양액에서 수정된 전핵기 수정란의 투명대 용해성을 조사한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이, phenylhydrazine과 tyramine 첨가구의  $t_{50}$ 은 각각 26.0분과 16.3분으로써, 무처리구의 전핵기 수정란(30.7분) 보다 증가하였다. 특히 phenylhydrazine보다는 tyramine이 투명대 경화현상을 억제시키는 효과가 월등하게 인정된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 Table 1의 체외수정의 결과에서 tyramine의 체외수정율이 phenylhydrazine의 그것보다 높은 이유를 확인시켜 주는 결과였다. 이로 미루어 보아 peroxidase inhibitors와 tyramine이 투명대 경화현상을 억제시켜서 체외수정율을 향상시키는 점으로 보아 투명대 경화를 유도하는 물질이 ovoperoxidase라는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다.

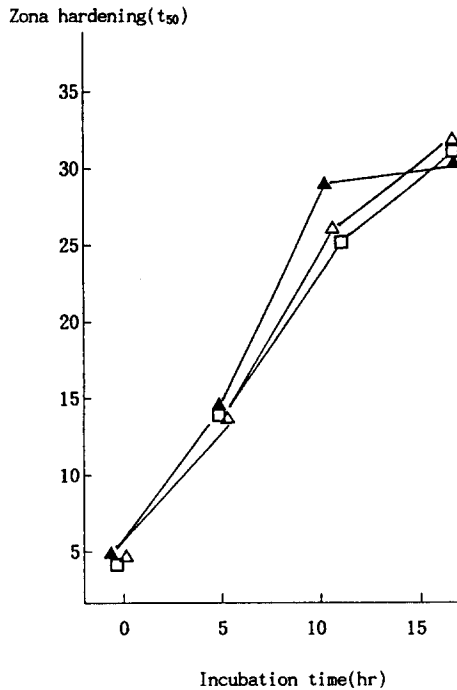
## 2. 난소내 난모세포의 투명대 경화에 미치는 phenylhydrazine과 tyramine의 효과

배란된 난자를 체외에서 장시간 배양할 때(이, 1991)와 난소내에서 채취한 난모세포를 체외성숙시킬 때(이, 1991), 발생하는 투명대 경화현상이 수정란 혹은 단위발생란에서와 같이 ovoperoxidase에 의하여 발생하는지를 검토하기 위하여, Table 1의 결과에서 체외수정의 효율을 증진시키고, 투명대 경화의 억제효과가 현저히 인정된 phenylhydrazine(250  $\mu$ M)과 tyramine(25 mM)을 각각 체외성숙용 배양액에 첨가하여 난구세포가 제거된 난소내 미성숙 난모세포를 0, 5, 10 및 15시간 동안 체외배양한 다음, 투명대의 용해성을 조사하여 Fig. 2에 제시하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이, 체외에서 5, 10 및 15시간 동안 배양된 난소내 난모세포(무처리구)의  $t_{50}$ 은 각각 14.0, 26.2 및 32.0분으로써, 배양시간이 연장됨에 따라 점차 증가하였다.

또한 phenylhydrazine(250  $\mu$ M) 첨가구의  $t_{50}$ 은 난자의 체외성숙 시간에 따라 각각 14.5, 26.8 및 30.2분 이었고, tyramine(25 mM) 첨가구는 각각 14.0분, 24.3 및 31.2분으로, 두 구 모두 난자의 체외성숙 시간이 연장됨에 따라 투명대 용해성은 점차 감소하는 경향을 보임으로써, 무처리구와는 차이가 나타나지 않

았다. 특히 수정적이인 배양 15시간째의 투명대 용해성은 약 30분 정도로서 전핵기 수정란의 그것과 유사한 결과(이 등, 1993)였다.



**Fig. 2. Zona hardening assaya of ovarian oocytes treated with phenylhydrazine (250 mM) or tyramine (28 mM) for 0 h, 5 h, 10 h and 15 h *In Vitro*.**

- △-△ : Cumulus-free ovarian oocytes
- ▲-▲ : Phenylhydrazine treated cumulus-free oocytes
- : Tyramine treated cumulus-free oocytes

그러나 이 와 정 (1993)의 결과에서 peroxidase inhibitor와 tyrosine analogue는 수정란과 ionophore 처리된 난자에서 투명대 경화를 억제하는 효과가 명료하였지만, Fig. 2의 결과에서는 phenylhydrazine과 tyramine이 투명대 경화현상을 억제하는 효과가 관찰되지 않았다. 이것은 수정란 혹은 ionophore 처리된 난자는 cortical granule의 분비산물 중, ovoperoxidase가 투명대의 tyrosine 기에 결합하여 투명대의 구조적 변화를 유지시켰기 때문에 peroxidase inhibitor와 tyrosine analogue의 투명대

경화 억제효과가 인정되었는데 반하여 체외성숙 난소내 난모세포의 경우는 peroxidase inhibitor와 tyrosine analogue의 영향을 전혀 받지 않은 사실로 미루어 볼 때, 체외성숙 난소내 난모세포의 투명대 경화에는 ovoperoxidase가 관여하지 않는다는 것을 시사하는 결과였다.

DeFelici와 Siracusa(1982)는 수정란 혹은 난자의 단위발생적 활성과는 상관없이 난자를 체외에서 성숙시키거나 배양할 경우에 자연적인 투명대 경화현상이 일어난다고 보고하였다. 그러나 미성숙한 cortical granule의 방출 (Nicosia 등, 1977 ; Wolf 등, 1979), 즉 dictyate 단계의 난모세포의 세포질에 존재하는 소수의 미성숙 cortical granule이 체외성숙 난소내 난모세포의 투명대 경화현상과 관계가 있을지도 모르지만(Zamboni, 1970), cortical reaction 시, 방출되는 ovoperoxidase가 자연적인 투명대 경화현상과는 관계가 없다고 보고하였고, Longo(1981)도 체내 혹은 체외에서 24시간 동안 배양된 노화난자의 투명대 경화도 cortical reaction과는 관계가 없다고 보고하였다.

또한 DeFelici와 Siracusa(1982)도 자연적인 투명대 경화현상은 난자가 저산소 조건인 난포에서 채취되어 체외배양될 때, 일어나는 산화과정의 결과로써 발생한다는 것을 시사하였다

그러나 이러한 자연적인 투명대 경화현상은 난구세포 및 난포세포와의 공동배양(DeFelici와 Siracusa, 1982)을 하든지 아니면 배양액에 혈청(Downs 등, 1986 ; Choi 등, 1987), 난포액(DeFelici 등, 1985) 및 glycosaminoglycans 등(DeFelici 등, 1985)을 첨가하여 배양액을 개선시키면 자연적인 투명대 경화현상을 방지할 수 있는 것으로 보고되어 있다.

그러나 이미 자연적인 투명대 경화가 유기되어 투명대가 정자침입의 장벽으로 작용할 경우에는, 수정율과 그 후의 배발생율은 극히 저조한 것으로 밝혀져 있다 (Szollosi, 1971 ; Longo, 1980, 1981 ; DeFelici와 Siracusa, 1982 ; Gianfortoni와 Gulyas, 1985)

이상의 결과를 종합하여 고찰하여 볼 때, 수정란과 미수정란의 투명대 경화현상은 현저한 차이가 인정된다는 것을 알 수 있었고, 체외에서 노화된 수정되지 않은 난자 역시 미수정란보다 hardening이 인정된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 이러한 투명대 경화 현상은 peroxidase inhibitor (phenylhydrazine, sodium

sulfite, sodium azide, 및 glycine ethyl ester)와 tyrosine analogue인 tyramine에 의해 억제되고, 또 외인성 peroxidase에 의해서는 경화현상이 촉진되는 것으로 보아 ovoperoxidase가 투명대 경화를 유도하는 물질이라는 것을 확인하였다.

이것은 cortical granule의 분비산물중 투명대의 전자 결합성과 물리화학적인 구조의 변성을 유도하는 물질이 ovoperoxidase라는 것을 확인할 수 있는 증거를 제시하는 결과였다. 그러나 이러한 결과는 ionophore 처리난자에서의 투명대 경화 현상이지 실제 정자가 난자에 침입해서 발생하는 투명대 경화의 원인 물질인가는 알 수가 없었다. 따라서 실제 체외수정된 난자에서 발생하는 투명대 경화현상을 유도하는 물질이 ovoperoxidase인가를 확인하기 위하여 체외수정용 배지에 peroxidase inhibitors와 tyrosine analogue를 첨가한 결과, phenylhydrazine tyramine 첨가구에서 유의하게 높은 체외수정율과 투명대 경화의 억제 효과가 충분히 인정되었는데, 그 중에서도 tyramine이 투명대 경화의 억제효과가 더욱 인정되었다.

이러한 결과로 미루어 보아, 실제 체외수정에서 정자가 난자에 침입하면, 세포질 표면에 산재해 있는 cortical granule의 분비산물중에서 ovoperoxidase가 투명대를 경화시키는 원인물질이라는 것을 구체적으로 입증할 수 있었다.

#### IV. 적 요

투명대 경화현상을 유도하는 물질이 ovoperoxidase라는 것을 직접적으로 확인하기 위하여, peroxidase inhibitors(250  $\mu$ M phenylhydrazine, 28 mM sodium sulfite, 350 mM glycine ethyl ester and 50 mM sodium azide)들과 tyrosine analogue(12.5 mM tyramine)를 수정 tyrode's 용액에 첨가한 다음, 난자의 체외수정을 유도하여 체외수정의 효율과 투명대 경화의 억제정도를 관찰하였고, 한편으로는 난소내 난모세포에서 발생하는 투명대 경화현상이 수정란 혹은 단위발생란에서와 같이 ovoperoxidase에 의하여 발생하는지를 검토하기 위하여, 난구세포가 제거된 난소내 난모세포를 0, 5, 10 및 15시간 동안 체외배양한 다음, 투명대의 용해성을 조사하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. Peroxidase inhibitors와 tyrosine analogue를 체외수정용 배양액에 첨가하여 체외수정을 유도한 결과, 대조구의 체외수정율과 다정자 침입율은 각각 69.8%와 3.5%였으며, 처리구의 그것들은 peroxidase inhibitors 중에서 sodium sulfite, glycine ethyl ester 및 sodium azide를 각각 첨가한 구에서는 투명대 경화를 억제시킬 수 있는 농도에서 수정에 공시한 난자는 모두 퇴행하였고, 정자 또한 모두 사멸함으로써, 수정이 전혀 유도되지 않았지만, phenylhydrazine과 tyrosine analogue인 tyramine 첨가구에서의 체외수정율은 각각 62.3%와 88.2%였고, 다정자 침입율은 1.3%와 24.7%로서, 대조구의 그것과 비교할 때, tyramine 처리구에서 유의하게 높았다 ( $P < 0.01$ ).
2. Phenylhydrazine과 tyramine이 첨가된 배양액에서 수정된 전핵기 수정란의 투명대 용해성은 각각 26.0분과 16.3분으로써, 대조구의 전핵기 수정란의 30.7분보다 증가하였다. 따라서 phenylhydrazine보다는 tyramine이 투명대 경화현상을 억제시키는 효과가 월등하게 인정된다는 것을 알 수 있었고, 투명대 경화 현상을 유도하는 물질이 cortical granule의 분비산물 중에 존재하는 ovoperoxidase라는 것을 확인할 수 있었다.
3. 체외에서 5, 10 및 15시간 동안 배양된 난소내 난모세포의 투명대 용해성은 대조구에서 각각 14.0, 26.2 및 32.0분이었고, phenylhydrazine(250  $\mu$ M) 첨가구는 각각 14.5, 26.8 및 30.2분, tyramine(25 mM) 첨가구는 각각 14.0, 24.3 및 31.2분으로, 모든 구에서 난자의 체외성숙 시간이 연장됨에 따라 투명대 용해성은 점차 감소하는 경향을 보임으로써, 유의한 차는 인정되지 않았다. 따라서 체외성숙 난소내 난모세포는 수정란 혹은 단위발생란의 경우와는 달리 투명대 경화현상에는 ovoperoxidase가 관여하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

#### V. 인용문헌

1. Choi, T.S., M. Mori, K. Kohmoto and Y.

- Shoda. 1987. Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocyter matured *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 79 :565-56.
2. Czihak, G. 1975. "The Sea Urchin Embryo. Biochemistry and Morphogenesis". Springer-Verlag, Berlin and New York.
  3. DeFelici, M. and G. Siracusa. 1982. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. Gamete Res., :107-113.
  4. 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.
  5. 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.
  6. Foerder, C.A. and B.M. Shapiro. 1977. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine cross-links. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74:4214-4218
  7. Foerder, C.A., S.J. Kelbanoff and B.M. Shapiro. 1978. Hydrogen peroxide production chemiluminescence and the respiratory burst of fertilization. Interrelated events in early sea urchin development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75:3183-3187.
  8. Fraser, L.R. and Drury. 1976. Mouse sperm genotype and the rate of egg penetration *in vitro*. J. Exp. Zool., 197:13-20.
  9. Fraser, L.R. 1977. Differing requirments for capacitation *in vitro* of mouse spermatozoa from two strains. J. Reprod. Fertil., 49:83-87.
  10. 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.
  11. Giudice, G. 1973. "Developmental Biology of the Sea Urchin Embryo." Academic Press, New York.
  12. Gulyas, B.J. and E.D. Schmill. 1980. Ovoperoxidase activity in ionophore Treated mouse eggs: I. Electron microscopic localization. Gamete Research., 3: 267-277.
  13. Hall, H.G. 1978. Hardening of the sea urchin fertilization envelope by peroxidase catalyzed phenoliccoupling of tyrosines. Cell., 15:343-355.
  14. Iwamatsu, T. and M.C. Chang. 1971. Factors involved in the fertilization of mouse eggs *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 26: 197.
  15. Kaleta, E. 1977. Influence of genetic factors on the fertilization of mouse ova *in vitro*. J. Reprod. Fert., 51: 375-381.
  16. Kaleta, E. and Z. Polka, 1978. Solubility properties of the zona pellucida of mouse oocytes from inbred strains differing the number of cortical granules. zwertzeta Laboratoryjne 15, 53-61.
  17. Katsura, S. J. and A. Tominga. 1974. Peroxidatic activity of catalase in the cortical granules of sea urchin eggs. Dev. Biol., 34: 111-122.
  18. 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.
  19. 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.
  20. Krzanowska, H. 1970. Relation between fertilization rate and penetration of eggs by supplementary spermatozoa in different mouse strains and crosses. J. Reprod. Fertil.,



- 22:199-204.
21. Krzanowska, H. 1972. Rapidity of removal *in vitro* of the cumulus oophorus and the zona pellucida in different strains of mice. J. Reprod. Fertil., 31:7-14.
  22. Krzanowska H., E. Lorenc, A. Koncewicz, and B. Lipina, 1984. The rate of maturation and fertilizability of oocytes in KE and CBA/Kw female mice with induced superovulation. Zwierzeta Laboratory, 21:313.
  23. Longo, F. J. 1980. Aging of Mouse Eggs *In Vivo* and *In Vitro*. Gamete Research., 3: 379-393.
  24. Longo, F.J. 1981. Changes in the Zonae Pellucidae and Plasmalemmae of Aging Mouse Eggs. Biol. Reprod., 25: 399-411.
  25. 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.
  26. Niwa, K., H. Imai, C.I. Kim and A. Iritani. 1980. Fertilization *in vitro* of hamster and mouse in a chemically defined medium. J. Reprod. Fert., 58: 109-114.
  27. Parkening, T.A. and M.C. Chang. 1976. *In vitro* fertilization of ova from senescent mice and hamsters. J. Reprod. Fert., 48: 381-383.
  28. Polanski, Z. 1986. *In vitro* and *in vivo* maturation rate of oocytes from two strains of mice. J. Reprod. Fert., 78: 103-108.
  29. Schmell, E.D. and B.J. Gulyas. 1980. Ovaperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. : I. Electron microscopic localization. Gamete Research, 3: 267-277.
  30. 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.
  31. Shapiro, B.M. and E.M. Eddy. 1980. When sperm meets eggs: Biochemical mechanisms of gamete interactions. Int. Rev. Cytol., 66: 257-302.
  32. 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.
  33. Shapiro, B.M., R.W. Schackmann and C.A. Gable. 1981. Molecular approaches to the study of fertilization. Annu. Rev. Biochem., 50: 815-843.
  34. Szollosi, D. 1971. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. Am. J. Anat., 130:209-226.
  35. 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.
  36. Zamboni, L. 1970. Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. Biol. Reprod., 2:44-63.
  37. 이상진. 1991. 생쥐 난자의 핵성숙과 투명대 경화가 체외수정과 배발생에 미치는 영향. 건국대학교 대학원 박사학위 청구논문., pp 1-170.
  38. 이상진, 이상민, 지희준, 장경환, 정형민, 이훈택, 정길생. 1993. 생쥐 난자에 있어서 투명대 경화 현상(zona hardening)이 체외수정에 미치는 영향. : I. 단백질해효소에 의한 투명대의 용해성 분석. 한국가축번식학회지., 17(2) : 93~101(인쇄중).
  39. 이상진, 정길생. 1993. 생쥐난자에 있어서 투명대 경화현상(zona hardening)이 체외수정에 미치는 영향. : II. 투명대 경화 현상을 유도하는 원인물질의 구명. 한국가축번식학회지, 17(3) : 173~181(인쇄중)