

Ionomycin과 6-Dimethylaminopurine(6-DMAP)처리로 활성화된 토끼 난자의 단위발생

윤희준 · 이효종* · 최상용* · 박충생**

경상대학교 축산진흥연구소

Parthenogenetic Development of Rabbit Oocytes Activated by Iononycin Plus 6-Dimethylaminopurine Treatments

Yin, X. J., H. J. Lee*, S. Y. Choe* and C. S. Park**

Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was carried out to determine the effects of ionomycin and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) treatments on parthenogenesis of rabbit oocytes. The oocytes were randomly assigned to the activation treatments with either ionomycin plus 6-DMAP or electric stimulation. The oocytes were collected from the oviducts of superovulated rabbits at 13~14 hours and 19~20 hours post hCG injection and were activated with 5 μ M ionomycin for 5 min and 2 hours incubation in 2 mM 6-DMAP. The other oocytes were stimulated by three pulses of 3.6 kV/cm for 60 μ sec each 30 min apart, starting 19 hours post hCG in 0.28 M mannitol solution with 100 μ M Ca²⁺ and Mg²⁺.

The results obtained were summarized as follows:

1. Following treatment of the oocytes with ionomycin plus 6-DMAP, the cleavage rate and *in vitro* developmental rate to blastocyst were significantly(P<0.01) higher in the oocytes collected between 19~20 hours than between 13~14 hours after hCG injection.
2. When the oocytes were treated with ionomycin plus 6-DMAP, 85(98.8%) of 86 treated oocytes extruded the second polar bodies, with the entire chromatin complements outside ooplasm. However when the oocytes were restored during subsequent incubation in the drug-free medium, the cytoplasts regain their full capacity for parthenogenetic activation and nuclear remodelling.
3. The cleavage rate and the *in vitro* developmental rate to blastocyst were not significantly different in the oocytes activated by ionomycin plus 6-DMAP treatment(91.2 and 45.6%) or electrical stimulation(89.6 and 34.3%).

(Key words : Ionomycin, 6-DMAP, Parthenogenesis, Rabbit oocytes)

* 경상대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

** 경상대학교 축산학과(Department of Animal Sciene, Gyeongsang National University)

I. 서 론

포유류 난자는 제 2감수분열 중기에서 배란되어, 분열정지현상을 유지하고 있다가, 수정이 되거나 활성화 자극을 받으면 감수분열을 재개한다. 이후 난자는 표층과립(cortical granule)의 유출(exocytosis), 제2극체의 방출, 염색체의 탈응축(decondensation), 전핵형성과 세포질 분열 등 여러가지 변화가 일어난다. 난자 내 Ca^{2+} 농도의 증가는 난자의 활성화를 일으키는 중요한 요인이 되므로, Ca^{2+} 을 인위적으로 주입하거나 Ca^{2+} ionophore를 이용하여 난자의 활성화를 유도할 수 있다고 한다(Ware 등, 1989). Ionomycin은 Ca^{2+} 의 복합체로서 단백질 인산화 억제제인 6-DM-AP와 같이 난자의 활성화에 많이 이용되고 있다(Rho 등, 1996; Liu 등, 1998).

체외에서 24시간 성숙된 소 난자를 ionomycin 처리 후 6-DMAP로 3시간 처리하면 높은 활성화률과 배반포까지의 발달률을 얻을 수 있었다고 하며 이 두가지 처리간에 시간간격을 두면 정상적인 이배체 형성이 잘 일어나지 않고 이배체(diploid)와 단배체(haploid)가 혼합된 단위발생이 증가한다고 한다(Susko-Parrish 등, 1994). 또한 난자의 연령에 따라 활성화 자극에 대한 반응이 다르게 나타난다. Ethanal, calcium ionophore 혹은 저온배양은 과숙한 소 난자를 활성화시키지만 성숙 직후의 난자는 활성화 되지 않는다고 하였고(Nagai, 1987; Ware 등, 1989), ethanal, calcium ionophore 혹은 전기자극후 cycloheximide나 단백질 합성 억제제의 처리는 성숙 직후 난자의 활성화를 촉진한다고 보고하였다(Presicce와 Yang, 1994; Shi 등, 1993). 생쥐와 소 난자에 있어서(Moses와 Msui, 1994; Moses 등, 1995; Susko-Parrish 등, 1994; Szollosi 등, 1993) 6-DMAP는 전핵의 형성과 단위발생을 촉진한다고 보고하였고, 토끼에서 하등(1998)은 $5\mu M$ 의 ionomycin에서 5분간 처리 후 2.0 mM의 6-DMAP에 2시간 노출시 난자 활성화를 및 배반포 발달률에서 좋은 성적을 얻었다고 한다.

이와 같이 토끼에서는 아직 ionomycin과 6-DM-AP를 이용한 난자의 활성화에 관한 연구가 미진하다. 본 연구에서는 이러한 물질을 사용하여 난자의 성숙도에 따른 단위발생과 핵의 운동성 그리고 전기자극법에

의한 활성화와의 차이를 조사함으로써 포유류에서 단위발생 및 핵이식 기술의 향상을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 공시동물은 New-Zealand White 종의 체중이 3 kg 전후의 성숙된 토끼로서 연암원에 축산전문대학으로부터 공급받았으며 빛(light: 14시간, dark: 10시간)을 조절하여 분리 사육하였고 물과 사료(토끼용 펠렛사료, 푸리나사료)는 자유로이 급식하였다.

2. 과배란처리와 난자의 회수

난자의 확보를 위한 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 10 mg의 FSH(Follitropin, Vetrepharm Co., Australia)를 1일 2회 3일간 근육주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(Peamax, Japan)를 100 IU를 정맥 주사하였다. 난자는 hCG 주사 후 13~15시간 사이에 암토끼를 chlorpromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복수술하여 난관으로부터 성숙난자를 10% FCS가 함유된 D-PBS로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)에서 39℃, 5% CO_2 조건에서 7분간 배양한 다음, $150\mu m$ fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하여 제 1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것을 공시난자로 사용하였다.

3. 난자의 활성화

1) Ionomycin과 6-DMAP에 의한 활성화

난자의 활성화 적기를 알고자 배란 직후에 해당되는 hCG 투여 후 13~14시간과 19~20시간에 $5\mu M$ 의 ionomycin(Sigma, U.S.A.)에서 5분간 배양한 후 2.0 mM의 6-DMAP(Sigma, U.S.A.)에서 2시간 활성화 처리하였다.

2) 전기자극적 방법

hCG 투여 19시간에 난자를 Collas 등(1992)의 방법에 따라 활성화를 실시하였다. 전기자극의 전압은

직류전압 3.6 kV/cm, 통전시간은 60 μ sec 및 통전 횟수는 3회 30분 간격으로 실시하였다. 난자의 활성화를 위한 용액은 100 μ M CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.30 μ M mannitol 용액으로 차여진, 30℃에서 예열된 간격이 0.5 mm인 Chamber에 넣은 후 난자를 정렬시키고 전기세포융합기(BTX, U.S.A.)로 난자의 활성화를 유도하였다.

4. 난자의 핵운동성 검사

hCG 투여후 19~20시간에 채란된 난자를 5 μ M의 ionomycin에서 5분간 배양하고 2.0 mM의 6-DMAP에서 2시간 처리하여 제 2극체의 출현 여부를 확인한 다음 5 μ g/ml Hoechst 33342가 함유된 D-PBS로 염색한 후 형광현미경 아래서 핵운동성을 확인하였다.

5. 활성화된 난자의 체외배양

활성화 처리한 난자는 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에 옮겨 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 난관 상피 세포와 공배양하였다.

6. 통계학적 분석

실험결과는 Chi-square test를 실시하여 처리군간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 난자의 성숙도에 따른 ionomycin 및 6-DMAP의 활성화 효과

난자의 성숙도에 따른 활성화를 및 단위발생란의 발달률을 알아보기로 hCG 투여후 13~14시간과 19~20시간에 채란한 난자를 5 μ M의 ionomycin에서 5분간 배양한 후 2.0 mM의 6-DMAP에서 2시간 활성화 처리하였는 바, 그 결과는 Table 1에 나타난 바와 같

다.

hCG투여 후 19~20 시간에 채란한 난자의 활성화율은 92.3%로서 13~14시간에 채란한 난자의 14.5%보다 유의적($P < 0.01$)으로 높았으며, 19~20시간에 채란한 난자에서는 4-세포(92.3%), 상실배(77.7%)와 배반포(35.8%)까지 유의성 있는 높은 발달률을 나타냈으나, 13~14시간에 채란한 난자에서는 매우 낮은 발달률을 보였고, 배반포까지 발달한 것은 하나도 없었다. 따라서 ionomycin과 6-DMAP로 토끼 난자를 활성화시 hCG 투여 후 19~20시간에 채란한 난자를 이용함이 효과적임을 알 수 있었다.

2. 활성화된 난자에서 제2극체의 운동성

제2극체의 출현을 알아보기로 hCG 투여후 16~20시간에 채란한 난자를 5 μ M의 ionomycin에서 5분간 침지한 후 2.0 mM의 6-DMAP에서 2시간 배양하여 제2극체의 출현을 확인하였다. 확인된 난자는 5 μ g/ml Hoechst 33342가 함유된 D-PBS에서 염색한 후 형광현미경 아래서 핵 운동성을 확인하였는 바, 98.83%(95/96)의 난자에서 제2극체가 관찰되었고 난자의 염색체는 응축된 상태로 제2극체 부근에 나와 있는 자체탈핵상태를 나타내었다(Fig. 1).

3. 전기자극에 의한 난자의 활성화 효과와 ionomycin 및 6-DMAP 처리에 의한 난자의 활성화 효과 비교

토끼 난자의 전기자극 및 ionomycin과 6-DMAP의 병용처리에 의한 활성화를 및 단위발생의 발달률을 알아보기로, hCG 투여후 19~20시간에 채란한 난자를 5 μ M의 ionomycin에서 5분 배양한 후 2.0 mM의 6-DMAP에서 2시간 활성화 처리하였고, 전기자극법은 토끼 난자에서 가장 높은 배반포 발달률을 제시했던 Collas 등(1992)의 방법에 준하였다. 즉, 3.6kv/cm의 전압과 60 μ sec의 통전을 30분 간격으로 3회

Table 1. Effect of oocyte age on parthenogenetic activation and development of rabbit oocytes following ionomycin plus 6-DMAP treatments

Age of oocytes (hour-post hCG inject.)	No. of oocytes used	No. of oocytes developed to(%)			
		Cleaved	4-cell	Morula	Blastocyst
13~14	55	8(14.5) ^a	5(0.09) ^a	1(0.02) ^a	0(0.0) ^a
19~20	39	36(92.3) ^b	36(92.3) ^b	28(77.7) ^b	14(35.8) ^b

Values with different superscripts in the same column were significantly different ($P < 0.01$).

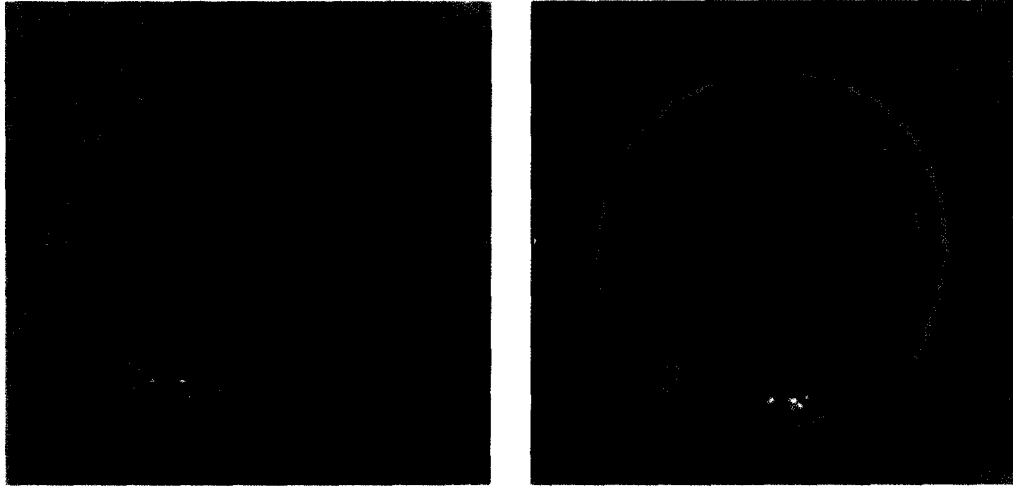


Fig. 1. A rabbit oocyte under a phase contrast microscope(A) and a fluorescence microscope(B) after ionomycin and 6-DMAP treatment. Note that the entire chromatin complement was extruded outside ooplasm($\times 400$)

Table 2. Effect of electric pulse on activation and development of rabbit oocytes treated with ionomycin and 6-DMAP

Treatments	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No. of oocytes developed to(%)		
			4-cell	Morula	Blastocyst
ES	67	60(89.6)	56(83.6)	46(68.7)	23(34.3)
ID	57	52(91.2)	50(87.7)	44(77.2)	26(45.6)

There was no significant difference in developmental rate between ES and ID.

ES=electrical stimulation, pulse; 3.6kv/cm for 60 μ sec; 3 pulses in 30 min. apart, beginning 19 h post hCG.

ID=ionomycin(5 min.) plus 6-DMAP(2 h), beginning 19 h post hCG injection.

실시하였는 바, 그 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. Ionomycin과 6-DMAP 병용법에서는 난자 활성화율이 91.2% 이었고 배반포로의 발달률은 45.6%로서 전기자극법의 89.6%와 34.3%보다 다소 높았지만 유의적 차이를 나타내지 않았다.

IV. 고 찰

hCG투여 후 19~20시간에 채란한 난자의 활성화율은 92.3%로서 hCG투여 후 13~14시간에 채란한 난자의 14.5%보다 유의적($P < 0.01$)으로 높았으며, 이들 난자는 이후 4-세포기(92.3%), 상실배(77.7%) 및

배반포(35.8%)로의 발달을 나타냈으나 13~14시간에 채란한 난자에서는 거의 발달하지 않았다. 따라서 ionomycin과 6-DMAP로 토끼 난자를 활성화시 성숙이 진행된 19~20시간에 채란한 난자를 이용함이 효과적임을 알 수 있다. Collas 등(1990)은 hCG투여 후 16.5시간에 채란한 난자와 hCG투여 후 22시간에 채란한 난자를 사용하여 핵이식을 실시하고 전기자극으로 활성화를 유도할 때 전자에서는 3%, 후자에서는 37%의 활성화율을 보였다고 한다. 비록 난자의 활성화는 활성화 방법, 강도 등 여러 가지 요인에 의해 영향을 받으므로 일괄적으로 판정하기는 어렵지만 ionomycin과 6-DMAP를 이용한 본 실험에서도 유사한

결과를 나타내고 있다. 생쥐(Collas 등, 1989)와 소(Ware 등, 1989)에서도 최근 배란된 난자보다 다소 시간이 경과된 난자에서 활성화률이 상승했다고 한다. 그 이유는 최근 배란된 난자는 CSF나 C-mos 단백질을 계속적으로 합성하여 MPF농도를 상승시키지만, 다소 시간이 경과된 난자에서는 그렇지 못하여 물리화학적 자극에 의하여 활성화가 빠르게 진행되기 때문이라고 한다(Presicce와 Yang, 1994).

정상적인 난자는 활성화시 제2극체를 방출하며 핵은 제2극체와 난자내에 나누어 가지게 된다. 본 실험에서는 난자를 ionomycin에서 5분간 그리고 6-DMAP에서 2시간 배양시 난자는 돌기 모양의 제2극체를 보여 주고 있으며 염색체는 응축되어 제2차극체 부근에서 난자의 형질막 밖에 나와 있는 '자체탈핵상태'를 보였다. 이를 TCM-199배양액에 세척후 다시 배양하면 돌기 모양의 제2극체는 30분 이내에 난자의 형질막 안으로 들어가는 이배체 단위발생을 일으킨다. Fulka와 Moor(1993)은 M I 기의 마우스 난자를 50 μ g/ml의 etoposid(ETO)와 50 μ g/ml의 cycloheximide에 배양시 96%의 난자에서 염색체는 응축되어 제1극체와 같이 방출되는 자체탈핵을 나타냈으며 다시 drug-free 배양액에서 배양시 난자는 단위발생을 시작하였다고 한다. 염색체의 자체탈핵은 CHXM의 염색체에 대한 응축작용과 관련된다고 하며 본 실험에서의 자체탈핵 현상도 6-DMAP와 관련되어 있다고 사료된다.

Liu 등(1998)은 소 난자에서 체외성숙 24시간에 난자를 5 μ m의 calcium ionophore A22187(CaA)에서 5분간 그리고 2.5 mM의 6-DMAP에서 3.5시간 처리 후 15~16 시간 후에 난자의 핵을 확인한 결과 95%의 난자에 하나의 전핵과 1개의 극체를 가지고 있었으며 배양시 40%의 높은 배반포 발달률을 보였다고 한다. 또 CaA와 6-DMAP를 이용하여 난자를 활성화시킬 때 난자내의 138-kDa과 133-kDa의 단백질의 소실을 보였으며 이는 Susko-Parrish 등(1994)이 보고한 CaA과 6-DMAP처리된 성숙 직후 소의 난자에서 MPF가 소실한다는 것과 일치한 것 같다. 그리고 제2극체의 출현 억제는 이배체인 난자의 단위발생을 촉진하며 이는 난자의 단위발달률을 높이는 원인의 하나라고 보고 있다(Liu 등, 1998). 본 실험에서도 돌기모양으로 방출한 제2극체는 drug-free 배양액에서 배양시

작 30분내에 돌기는 난자 내로 들어가 이배체인 난자의 단위발생을 일으켰으며 높은 체외발달률을 나타내어 소에서의 유사한 결과를 나타냈다.

토끼 난자의 활성화 및 단위발생후 배반포 발달률에 대한 전기자극법과 ionomycin과 6-DMAP를 병용처리시 그 효과를 비교한 결과, ionomycin과 6-DMAP 병용법에서는 난자의 활성화률이 91.2% 이었고 배반포로의 발달률은 45.6%로 나타나 전기자극법에 의한 난자 활성화를 89.6%와 배반포 발달률 34.3%보다 다소 높았으나 유의적 차이를 나타내지 않았다. Rho 등(1996)은 소의 난자 활성화에서 ionomycin을 단독적으로 사용하는 것보다 6-DMAP을 병용할 경우 난자 활성화률은 23.5%에서 70.0%로, 그리고 배반포 발달률은 1.2%에서 17.3%로 증가시킬 수 있다고 하였으며, Moses와 Masui 등(1994)은 생쥐 난자에서 calcium ionophore의 단독처리와 6-DMAP 병용 실험에서 6-DMAP는 세포간기로의 전환을 촉진한다고 보고하고 있으며 병용 처리구에서 높은 발달률을 나타내는 것은 제2극체의 출현을 억제하여 이배체 상태에서 단위발생을 일으키기 때문인 것으로 사료되며 이는 Liu 등(1998)의 견해와 일치한다.

V. 적 요

본 연구는 토끼 난자에 있어서 ionomycin과 6-DMAP의 처리에 의한 단위발생에 있어서 난자의 배란후 경과시간에 따른 단위발생률과 제2극체와 아울러 난자핵의 방출 효과를 조사하였으며 전기자극법에서의 효과와 비교 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 난자의 배란후 경과시간에 따른 활성화률은 hCG 주사후 13~14 시간의 난자에서는 14.5%이었으며 배반포까지의 발달은 일어나지 않아 19~20 시간에 채란된 난자에서의 92.3%의 활성화률과 35.8%의 발달률에 비해 유의적으로($P < 0.01$) 낮게 나타났다.
2. hCG 후 19~20 시간의 난자를 ionomycin과 6-DMAP로 처리할 때 98%의 난자에서 제2극체가 방출되었으며 핵은 응축되어 제2차 극체에 머물러 있는 자체탈핵현상을 나타내었다.
3. 토끼 난자를 ionomycin과 6-DMAP로 처리하였던 바, 91.2%의 활성화률과 45.6%의 배반포 발

달률을 나타내어 전기자극법에서의 활성화률과 배발달률보다는 다소 좋은 성적을 보였지만 유의적 차이를 나타내지 않았다.

VI. 인용문헌

1. Collas, P. and J. M. Robl. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 43:877-884.
2. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology*, 32:835-844.
3. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:492-500.
4. Fulka, J. Jr and R. M. Moor. 1993. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 34, 427-430.
5. Lee, H. J., M. C. Choi., C. S. Park., C. H. Yun and D.J. Kang. 1993. Study on production of cloned animals by recycling nuclear transplantation I. Activation of nuclear recipient oocytes by electrostimulation in rabbits. *Korean J. Emb. Trans.*, 8(2):151-157.
6. Lee, H. J., D. S. Ha., T. Y. Kang and M. C. Choi. 1992. Parthenogenetic development of mouse eggs. I. Parthenogenetic activation by ethanol and hyaluronidase treatments. *Korean J. Vet. Res.*, 32:663-669.
7. Liu, L., J. C. Ju and X. Z. Yang. 1998. Parthenogenetic development and protein of patterns of Newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol. Reprod. Develop.*, 49:298-307.
8. Moses, R. M., D. Kline and Y. Masui. 1995. Maintenance of metaphase in colcemid-treated mouse eggs by distinct calcium- and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP)-sensitive mechanisms. *Dev. Biol.*, 167(1), 329-337.
9. Moses, R. M. and Y. Masui. 1995. Metaphase arrest in newly matured or microtubule-depleted mouse eggs after calcium stimulation. *Zygote.*, 3(1), 1-8.
10. Moses, R. M. and Y. Masui. 1994. Enhancement of mouse egg activation by the kinase inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). *J. Exp. Zool.*, 270(2), 211-218.
11. Nagai, T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamete Res.*, 16:243-249.
12. Presicce, G. A. and X. Yang. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured *in vitro* for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mor. Reprod. Development*, 37:61-68.
13. Rho, G. J., B. wU, S. D. Leibo and K. J. Beteridge. 1996. Bovine parthenogenesis following various oocytes activation regimens. *Society for the Study of Reprod(abstract)*.
14. Susko-Parrish, J. L., M. L. Leibfried-Rutledge, D. L. Northey, V. Schutzkus, N. L. First. 1994. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev. Biol.*, 166(2), 729-739.
15. Szollosi, M. S., J. Z. Kubiak, P. Dedej, H. Pennart, D. Szollosi, and B. Maro. 1993. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J. Cell Sci.*, 104(Pt 3), 861-872.
16. Shi, Z., S. Jiang, and X. Yang. 1993. Synergistic effect of A23187 and cycloheximide allows effective activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 39: 309(abstract).

17. Ware, C. B., F. L. Barnes, M. Meike-Laurila, and N.L. First. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res.*, 22:265-275.
18. 하란조, 강다원, 최창용, 윤희준, 강태영, 최상용,

이효종, 박충생. 1998. Ionomycin과 6-dimethylaminopurine이 토끼의 난자활성화와 핵이식배 생산효율에 미치는 효과. *한국수정란이식학회* 13: 11-19.

(접수일자 : 1998. 7. 1. / 채택일자 : 1998. 8. 20.)