

흰쥐 초기발생에서 배아막의 미세구조적 특징

홍순갑·이준영

충북대학교 자연과학대학 생물학과

The Ultrastructural Characteristics of Preimplantation Embryonic Envelope in the Rat

Soon-Gab Hong and Joon-Yeong Lee

Department of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

요약 : 흰쥐의 배아발생 동안에 피질반응 후 배아 외부에 새롭게 형성된 피질과립막 (cortical granule envelope, CGE)이 존속하는지 여부와 투명대와 배아표면의 미세구조 변화를 조사하였다. 흰쥐배아의 투명대와 배아표면의 미세구조는 주사전자현미경으로 관찰하였으며, 피질과립막 형성과 분포는 Ulex europaeus agglutinin I lectin을 표지하여 형광현미경으로 관찰하였다. 배아표면은 미수정란과는 다르게 배아표면의 미세용모가 단축된 특징을 보였고, 8-세포기 배아에서 뚜렷하게 볼 수 있는 CGE에 의해 덮여 있다. 투명대의 구조 역시 미수정란자에 존재하는 구조와는 다른 특징을 나타냈고, 특히 투명대의 섬유성 미세공 구조가 거칠어지고 수적인 감소가 나타났다. 위관강에 피질반응에 의한 피질과립막이 형성되어 배아발생 동안에 존속하였으나 수정란보다는 얇고 국소적인 분포양상을 나타내었다. 본 연구 결과를 종합해 볼 때 흰쥐 초기 배아 발생 동안에는 배아 외부에 피질과립막이 존속하고, 수정시에는 투명대 경화 뿐만 아니라 피질반응에 의해 투명대의 미세구조와 배아표면의 구조도 변화됨을 알 수 있다.

ABSTRACT : Preimplantation embryos of the rat was examined by the morphological changes in the cortical granule envelope (CGE), blastomere surface, and zona pellucida (ZP) of embryo after cortical reaction. The ultrastructural characteristics and CGE of embryos were observed with the scanning electron microscope and fluorescence microscope. In the ultrastructural characteristic of embryo surface, surface microvilli were shortened and the CGE-like structure existed above microvilli in eight-cell embryo. Rough spongy surface and decreased network numbers were key characters of embryonic ZP compared to unfertilized oocyte. The CGE formed by cortical reaction existed in perivitelline space during embryo development but it was thin and locally distributed in contrast to fertilized oocyte. The present results indicate that cortical reaction forms cortical granule envelope in perivitelline space and causes not only zona hardening, but also ultrastructural changes in ZP and cell membrane of preimplantation embryos.

Key words : Cortical granule envelope (CGE), Zona pellucida, Preimplantation embryo, Rat.

서론

많은 종의 동물에서 난자들은 난막 부근에 존재하는 분비성 과립인 피질과립 (cortical granule)을 가지고 있다. 수정시 피질반응은 난막과 세포외막에 생화학적인 변화를 일으키게 되고, 이러한 변화들은 다정자수정 방지와 배아의 정상적인 발생을 위해 중요한 작용을 한다. 몇 종의 포유류에서 피질반응 후에 형성된 새로운 막이 ruthenium red로 처리하여 고정된 수정란의 위관강에서 관찰되었으며, 이러한 새로운 막을 피질과립막 (cortical granule envelope, CGE)이라 부르고 있다 (Dandekar & Talbot, 1992; Dandekar et al., 1993). 이러한 CGE는 햄스터와 생쥐의 착상전 배아 발생과정 동안에 존재함이 관찰되었다.

포유류 난자와 배아를 둘러싸고 있는 투명대는 당단백질

로 구성된 세포외막으로 배아발생에 필수적이지 않은 구조물로 알려져 왔다. 그러나 동결보존된 배아는 해동 후 배아의 생존능력이 감소하며 할구의 분리가 나타나게 된다. 동결보존된 후 해빙된 생쥐배아의 발생능력은 투명대의 손상 정도에 영향을 받으며 (Lee et al., 1997a; Marti et al., 1997; Matson et al., 1997), 수정된 배아가 발생을 진행하며 생식수관을 이동하는 동안에 투명대나 당단백질의 변화가 일어남이 알려지고 있다 (Confino et al., 1997; Miosge et al., 1997). 본 실험에서는 흰쥐에서 배아 발생 동안 CGE가 존속하는지 여부와 이러한 물질에 의한 배아표면의 미세구조 변화를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

본 실험에는 8~10주된 Sprague-Dawley strain의 흰쥐 암

컷을 사용하였으며, 배아는 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)와 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 각각 20 IU씩 48시간 간격을 두고 복강에 주사한 후 수컷과 합사시켜 얻었다. 수란관으로부터 채취한 배아는 필요한 경우 0.1% hyaluronidase를 처리하였고 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 수세 후 동일 buffer로 희석한 2.5% glutaraldehyde 용액으로 4°C에서 15시간 동안 고정하였다. 배아표면의 미세구조 관찰을 위해서는 cacodylate buffer로 여러 번 수세 후 유리침 (glass pin)을 사용하여 투명대를 제거하였다. 투명대와 배아표면의 미세구조 관찰은 cacodylate buffer로 수세 후 poly-L-lysine을 바른 coverslip 위에 난자를 붙여서 알콜 series (50, 70, 80, 90, 95, 100%)로 각각 15분씩 단계적으로 탈수하였고, isoamyl acetate로 15분씩 3회 치환한 다음 임계점 건조기 (critical point dryer, Hitachi HCP-2)에서 liquid CO₂로 건조시킨 후 금으로 코팅하여 주사전자현미경 (Hitachi, S-570)으로 관찰하였다.

위관강내 CGE의 존속여부는 fluorescence isothiocyanate (FITC)로 표지된 Ulex europaeus agglutinin I (UEA I) lectin을 사용하여 판정하였다. FITC-conjugated UEA I을 PBS에 100µg/ml로 희석한 50µg 용액에 배아를 10개씩 넣어 상온에서 10분간 처리하여 lectin 결합을 유발하였다. Non-fluorescence medium (Sigma)으로 whole mounting한 표본은 형광현미경 (Orthorux II, Leitz, filter block I 2/3) 하에서 관찰하였다.

결 과

배아 발생과정 동안에 투명대와 배아표면의 변화가 관찰되었다.

1. 난막의 표면구조

난막은 수정란의 경우 미수정난자에 비해 미세융모가 단축되고 피질과립물에 의해 매몰된 구조를 나타내었다 (Fig. 1c, 1f). 그러나 2-세포기 배아 표면에서는 미세융모의 분포가 균일해지고 신장되는 양상을 보였다 (Fig. 2c). 그 후 발생이 진행됨에 따라 배아표면의 미세융모는 단축된 상태를 보였고 어떤 피질과립물에 부분적으로 덮혀져 있는 모습을 나타내었다 (Fig. 2f, 3c, 3f, 4c). 특히 8-세포기의 경우 두꺼운 피질과립물이 배아표면을 덮고 있고 길쭉하게 신장된 미세융모가 자라 나오는 형상을 하고 있다 (Fig. 3c).

2. 투명대의 구조

투명대는 미수정란에 비해 수정란과 배아에 있어 차이를 보이고 있는데, 미수정란의 경우 (Fig. 1a,b) 투명대의 두께가 얇고 미세공들이 많이 분포한 반면, 수정란 (Fig. 1d,e)에서는 투명대가 상당히 두터워지고 미세공이 막히는 현상이 관찰되었다. 그러나 2-세포기에서 8-세포기로 배아 발생이 진행됨에 따라 다시 미세공이 형성되는 양상을 보였고 (Fig. 2a,b, 2d,e, 3a,b), 16-세포기에서는 다시 미세공이 막히기 시작하는 양상을 보였으며 (Fig. 3d,f) 포배기에서는 미세공이 사라진 막힌 구조물로 나타났다 (Fig. 4a,b).

3. 위관강내의 피질과립막

피질과립막은 UEA I 형광 염색을 통해 흰쥐의 배아에서도 배아 발생 동안 존속하는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 수정란에 있어서는 상당히 두껍고 균질한 구조물이 존재하나 발생이 진행됨에 따라 피질과립막의 양적 감소가 일어났고 분포 위치 또한 할구 연접 부위나 할구 표면에 국부적으로 나타났다. 그러나 16-세포기에서는 균일하고 좀 더 두터운 층을 나타내었다.

고 찰

본 연구결과로 볼 때 흰쥐 난자의 수정시 피질반응에 의해 투명대와 위관강, 난막표면에 변화가 나타나며, 피질과립막이 초기배아 발생 동안에도 존속함을 알 수 있다 (Fig. 1f, 2c, 2f, 3c, 3f, 4c, 5). 피질과립막에는 fucose, mannose, galactose 등의 탄수화물 잔기를 갖는 물질이 존재하며 (Lee et al., 1988), fucose 잔기에 결합하는 특성을 지닌 UEA I lectin은 생쥐의 미수정난자에서는 결합하지 않고 수정란과 초기배아의 투명대, 위관강, 난막표면에 결합하며 (Gye et al., 1994), 착상전 생쥐 배아의 RCA I, WGA 그리고 LTA 결합 부위는 투명대와 배아 표면에 존재하며 분포 양상이 다르다 (Miosge et al., 1997). 이와 같은 사실들은 흰쥐에서도 피질반응에 의해 특히 위관강과 난막표면에서의 변화와 이렇게 형성된 변화들이 부분적인 차이는 있지만 초기배아 발생 동안 존속함을 시사한다.

포유류의 다정자수정 방지는 투명대와 난막표면의 변형으로 일어난다. 투명대 반응 (zona reaction)은 정자수용체로 작용하는 투명대 당단백질의 생화화적인 변형을 일으키는데 (Bleil & Wassarman, 1980), 이러한 투명대 반응 결과 생쥐에서는 투명대 당단백질인 ZP2가 ZP2의 형태로 전환되어 투명대 경화 (zona hardening)를 일으킨다 (Wassarman, 1988).

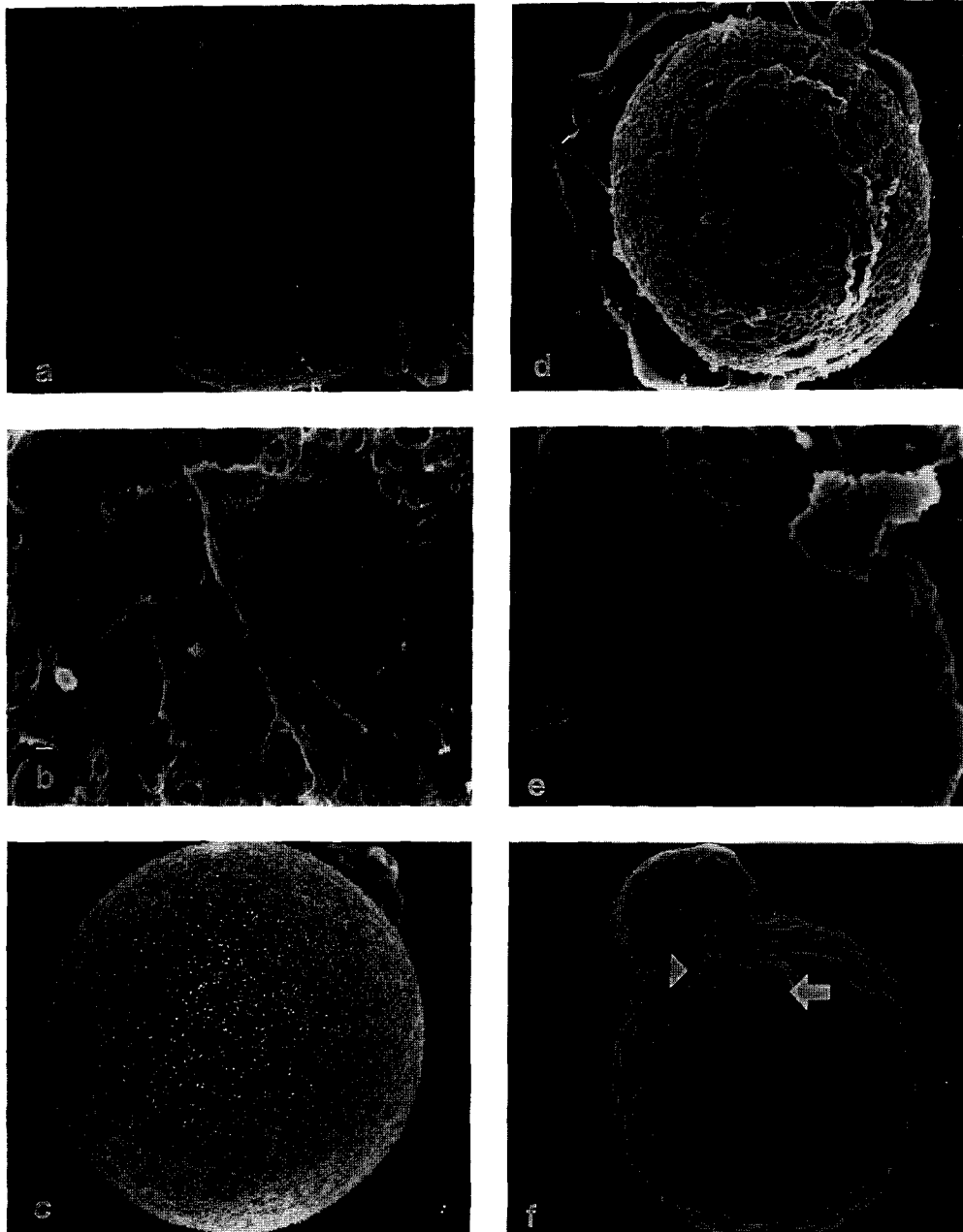


Fig. 1. Scanning electron micrograph of zona pellucida and plasma membrane in the unfertilized and fertilized rat oocyte. a: ZP structure of unfertilized oocyte. $\times 1500$. b: A higher magnification of ZP. The ZP looks like a spongy. $\times 7,000$. c: Membrane surface of the unfertilized oocyte is covered uniformly with microvilli. $\times 1,500$. d: ZP structure of fertilized oocyte. $\times 1500$. e: A higher magnification of ZP. The ZP appears rough and shrunken spongy. $\times 7,000$. f: Membrane surface of the fertilized oocyte. Membrane has a smooth surface with a few and short microvilli. There are the second polar body (arrow) and small round bodies (arrowhead) near the first polar body. $\times 1,500$.

본 연구결과에서 나타난 배아 발생 동안에 보였던 투명대의 변화들은 피질 반응에 따른 투명대경화시 투명대 당단백질의 생화학적 변화 뿐만 아니라 투명대의 입체구조에도 변화가 일어남을 알 수 있다. 이러한 변화는 생쥐 배아가 체외와 체내 발생 동안에 투명대의 두께가 점차 얇아진다는 결과

(Confino et al., 1997)와 일치한다. 특히 수정시 피질반응을 통한 투명대 경화는 단백질 분해효소에 대한 저항을 나타내게 되지만, 배아발생이 진행됨에 따라 수란관과 자궁의 상피세포로부터 기원되는 단백질 분해효소에 대한 가수분해 작용을 통해 배아의 투명대가 얇아지므로 (zona thinning) 배

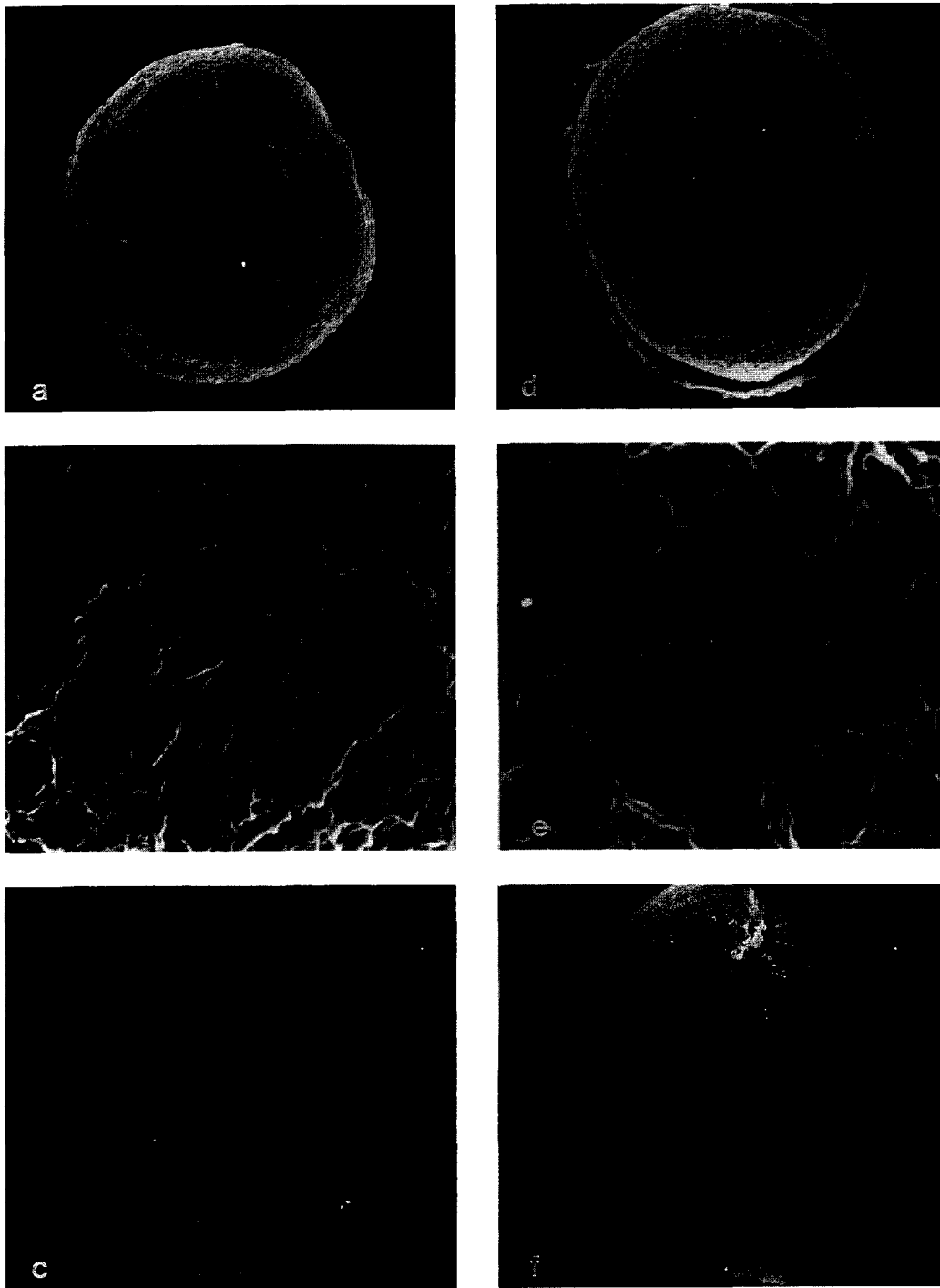


Fig. 2. Scanning electron micrographs of zona pellucida and plasma membrane in the rat embryos. a: ZP structure of 2-cell embryo. $\times 1500$. b: A higher magnification of ZP. The ZP looks like again as spongy surface. $\times 7,000$. c: Membrane surface of the 2-cell embryo is covered uniformly with microvilli. $\times 1,500$. d: ZP structure of 4-cell embryo. $\times 1500$. e: A higher magnification of ZP. The surface of ZP shows smooth spongy-like structure. $\times 7,000$. f: Membrane surface of the 4-cell embryo. Membrane surface appears to be surrounded by thin CGE-like layer. $\times 1,500$.

아의 부화 (hatching)가 용이하게 이루어질 수 있다. 이러한 단백질 분해효소는 투명대와 위란강의 구조변화를 일으켜 배아의 부화를 촉진하는 것으로 제시되고 있다 (Lee et al.,

1997b). 본 연구 결과 배아 발생이 진행됨에 따라 투명대의 미세공 수가 감소하며 특히 포배의 경우 거의 모든 미세공이 사라진 양상을 볼 수 있었다. (Fig. 4a, b). 또한 위란강에

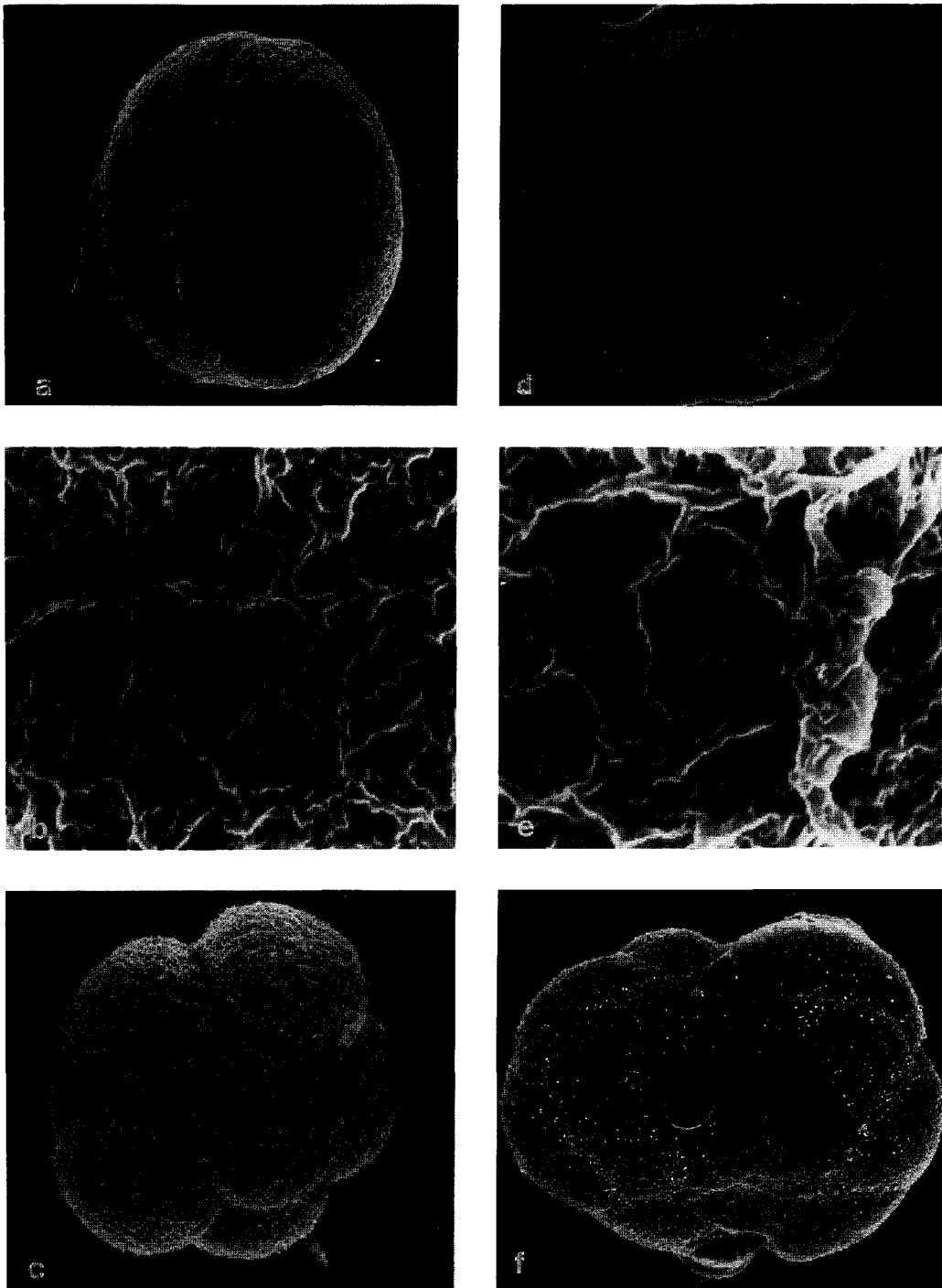


Fig. 3. Scanning electron micrographs of zona pellucida and plasma membrane in the rat embryos. a: ZP structure of 8-cell embryo. $\times 1500$. b: A higher magnification of ZP. The ZP looks like again as spongy surface. $\times 7,000$. c: Membrane surface of 8-cell embryo appears to be surrounded by thick CGE-like constitute and "sprouting" elongated microvilli appear to be locally distributed through CGE. $\times 1,500$. d: ZP structure of 16-cell embryo. $\times 1500$. e: A higher magnification of ZP. The surface of ZP shows smooth spongy-like structure. $\times 7,000$. f: Membrane surface of the 16-cell embryo. Short microvilli appear to be locally distributed and CGE-like structure remains to be intact. $\times 1,500$.

형성된 피질과립막도 배아 발생 동안 국소적인 분포 양상을 보이다가 16-세포기에 이르러서는 위란강내에서 보다 균질

하고 두꺼운 구조물로 나타났다 (Fig. 5f). 또한 8-세포기 배아 표면의 미세음모 위에 피질과립 성분으로 보이는 구조물

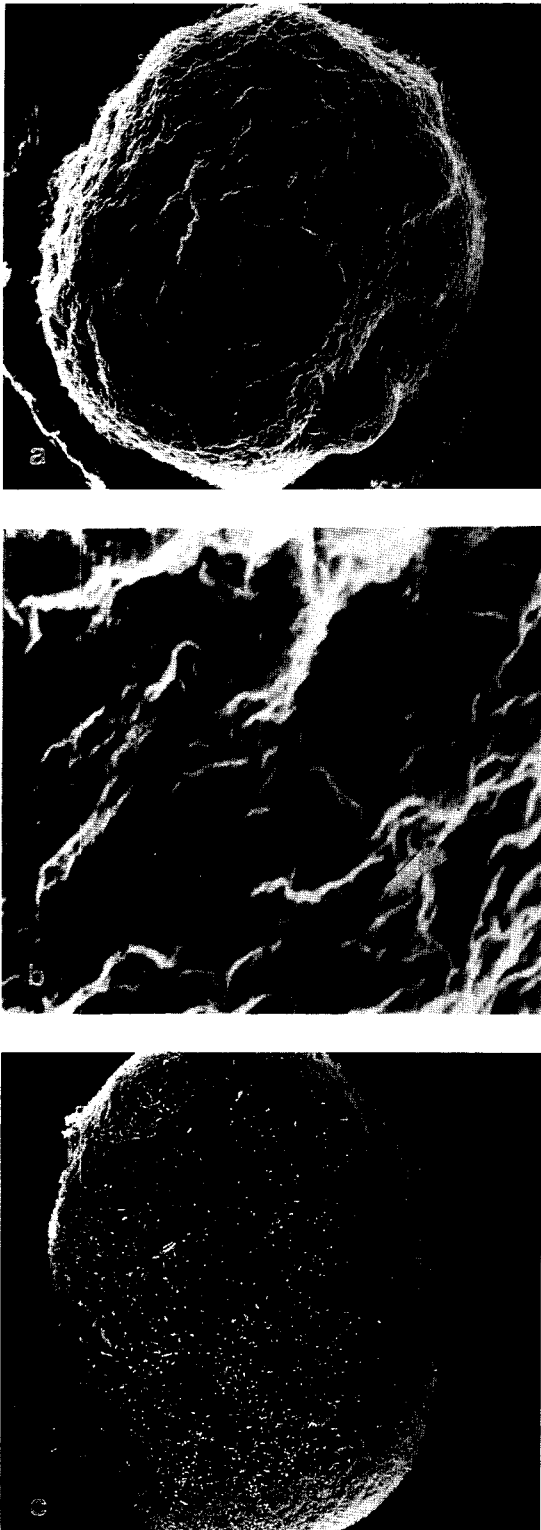


Fig. 4. Scanning electron micrograph of zona pellucida and plasma membrane in the rat embryos. a: ZP structure of blastula. $\times 1500$. b: A higher magnification of ZP. The meshed network disappeared from the smooth spongy surface of ZP. $\times 7,000$. c: Membrane surface of the blastula is uniformly covered with microvilli and CGE-like structure remains intact. $\times 1,500$.

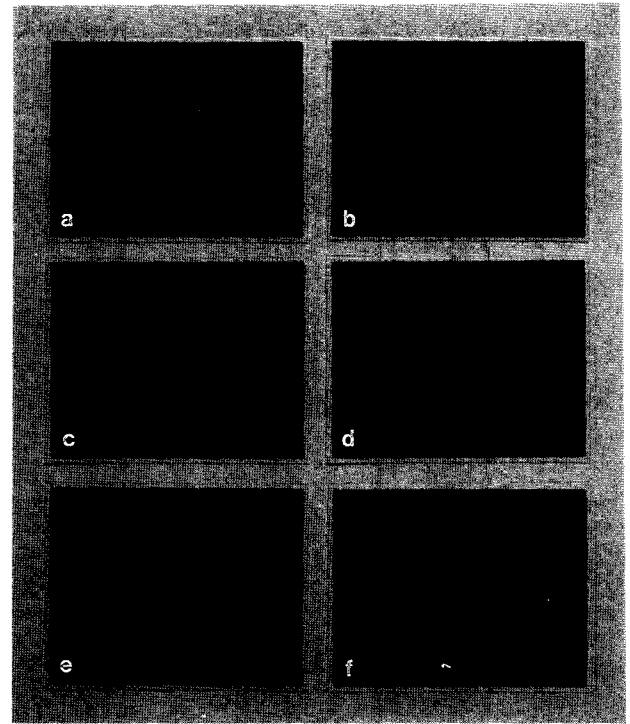


Fig. 5. Fluorescence photographs showing FITC-conjugated UEA I stained early rat embryo. a: Fertilized oocyte, b: 2-cell embryo, c: 3-cell embryo, d: 4-cell embryo, e: 8-cell embryo, f: 16-cell embryo. Fluorescence was present in the perivitelline space and membrane surface. Magnification $\times 250$.

의 존재가 명확하게 관찰되었다 (Fig. 3c). 이러한 결과들은 앞선 보고 내용들과 일치하며, 이러한 결과로부터 배아 발생 동안에 투명대의 두께는 얇아지나 위란강 내의 피질과립막은 좀 더 균질해지고 발달이 이루어지며 또한 배아 표면의 구조 변화도 일어남을 알 수 있다.

위란강내 구성물질의 변화는 수정시에 피질반응을 통한 피질과립의 내용물들에 의해 이루어져 배아발생 동안에 존속되어 영향을 미치거나 (Dandekar & Talbot, 1992) 또는 수란관 상피세포에서 분비되는 물질들로부터 기원되어 배아 발생을 조절하는 (Von Winkle et al., 1985; Boatman, 1997) 것으로 알려지고 있으나, 이들 조절자들에 의한 배아 발생 조절기작은 아직 불분명한 상태이므로 앞으로 이에 관한 연구가 필요하다고 사료된다. 또한 본 연구에서 나타난 결과들이 배아의 수송 과정중 수란관에서 분비되는 단백질 분해효소와도 연관성을 갖는지의 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Bleil JD, Wassarman PM (1980) Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20:873-882.
- Boatman DE (1997) Responses of gametes to the oviductal environment. *Hum Reprod* 12(Suppl):133-149.
- Confino E, Rawlins R, Binor Z, Radwanska E (1997) The effect of the oviduct, uterine, and *in vitro* environments on zona thinning in the mouse embryo. *Fertil Steril* 68:164-167.
- Dandekar P, Mate K, Talbot P (1993) A cortical granule envelope forms in the perivitelline space of marsupial oocytes. *Mol Biol Cell Suppl* 4:141a.
- Dandekar P, Talbot P (1992) Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Mol Reprod Dev* 31:135-143.
- Gye MC, Cheun YP, Jeon JH, Yoon YD, Kim HK, Kim MK (1994) Lectin binding pattern in mouse oocytes and early embryos. *Kor J Zool* 37:120-129.
- Lee RK, Su JT, Chen YW, Hwu YM (1997a) A comparison of the effects of different degrees of zona pellucida damage followed by cryopreservation on the postthaw development of mouse embryos. *J Assist Reprod Genet* 14:170-173.
- Lee RD, Lee JE, Yoon HS, Lee HJ, Kim MK, Roh SI (1997b) The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos. *Hum Reprod* 12:2493-2498.
- Lee SH, Ahuja KK, Gilbert DJ, Whittingham DG (1988) The appearance of glycoconjugates associated with cortical granule release during mouse fertilization. *Development* 102:595-604.
- Marti M, Grossmann M, Santalo J, Egozcue J, Ponsa M (1997) Characteristics of actin fibers and ultrastructure of the contact regions involved in the separation of blastomeres of two-cell mouse embryos, frozen-thawed without the zona pellucida. *Cryobiology* 34:94-106.
- Matson PL, Graefling J, Junk SM, Yovich JL, Edirisinghe WR (1997) Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an *in-vitro* fertilization programme. *Hum Reprod* 12:1550-1553.
- Miosge N, Dresch W, Herken R (1997) Ultrastructural localization of binding sites for the lectins RCA I, WGA, and LTA in the preimplantation mouse embryo. *J Histochem Cytochem* 45:447-453.
- Von Winkle LJ, Campione AL, Kester SE (1985) A possible effect of the Na⁺ concentration in oviductal fluid on amino acid uptake by cleavage-stage mouse embryos. *J Exp Zool* 235:145-151.
- Wassarman PM (1988) Zona pellucida glycoproteins. *Ann Rev Biochem* 57:415-442.