

흰쥐 난자의 체외수정에 미치는 Calcium Chelator의 영향

홍순갑¹ · 김해권² · 김성례³ · 이영기⁴ · 이준영¹

¹충북대학교 생물학과, ²서울여자대학교 생물학과

³이화여자대학교 의학과, ⁴제주대학교 의과대학 조직학교실

Effects of Calcium Chelator on *in vitro* Fertilization of Rat Oocyte

Soon Gab Hong¹, Haekwon Kim², Sung Rye Kim³, Youngki Lee⁴ and Joon Yeong Lee¹, Korea

¹Department of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

²Department of Biology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

³Department of Medicine, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

⁴Department of Histology, College of Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

요약 : 흰쥐 난자의 체외수정에 있어서 calcium chelator 처리에 따른 피질반응 및 피질과립막의 형성 여부와 피질과립막의 전자현미경적 미세구조를 관찰하고, 수정율 및 단정자수정과 다정자수정 빈도에 미치는 영향을 조사하여 수정기간중 calcium의 역할을 조사하였다. Calcium chelator로는 BAPTA/AM을 사용하였으며, 난자의 미세구조와 피질과립막은 주사전자현미경으로 관찰하였다. 투명대가 제거된 난자의 체외수정 과정에서는 피질반응에 의해 형성된 피질과립막 (cortical granule envelope)이 관찰되었고, calcium chelator (1, 5, 10 μ M BAPTA/AM) 처리후 투명대가 제거된 난자의 체외수정에서도 마찬가지로 피질과립막이 관찰되었다. 또한 체외수정 후 시간의 경과에 따라 피질과립막은 좀 더 발달되는 양상을 나타내었다. 수정율은 calcium chelator 처리군 (59.8, 38.1, 37.0%)이 대조군 (60.6%)에 비해 감소했으나, 단정자수정은 calcium chelator 처리군 (45.0, 47.3, 50.9%)이 대조군 (37.5%)에 비해 증가하였다. 위의 결과들로부터 흰쥐에서 수정시 피질과립막이 형성된다는 것을 밝혔고, 피질반응에 extracellular calcium이 이용됨을 알 수 있다. 또한 난자내의 적절한 free calcium 함량이 수정에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 사료된다.

ABSTRACT : In order to examine the effect of Ca^{2+} -chelation on *in vitro* fertilization of rat zona-free oocyte, the formation of cortical granule envelope (CGE) and the rate of fertilization related to monospermy and polyspermy were determined. The ultrastructural characteristics of oocytes were observed with the scanning electron microscope and BAPTA/AM was used for calcium-chelation. The CGE formed by cortical reaction was observed in zona-free oocyte inseminated *in vitro* and it was also observed in the calcium chelator (1, 5, 10 μ M BAPTA/AM) treated zona-free oocytes inseminated *in vitro*. The CGE developed according to incubation time. The fertilization rate was decreased in the calcium chelator-treated group (59.8, 38.1, 37.0%) compared to the control group (60.6%) but monospermy rate was increased in the calcium chelator-treated group (45.0, 47.3, 50.9%) compared to control group (37.5%). The above results demonstrate that the CGE is formed during fertilization in rat and the extracellular calcium is used in cortical reaction. Also the results suggest that proper concentration of free calcium in oocyte acts as important factor in fertilization.

Key words : Calcium chelator, BAPTA/AM, Cortical granule envelope, Fertilization rate, Zona-free oocyte, IVF.

서론

포유류를 포함하는 많은 종의 동물에서 난자들은 세포막 부근에 존재하는 분비성 낭포 (secretory vesicle)인 피질과립 (cortical granule)을 함유하고 있다. 포유류 난자에서 피질과립의 방출 (exocytosis)은 투명대와 세포막 표면에서 다정자수정 (polyspermy) 방지를 위해 필요한 것으로 보고되고 있다 (Stewart-Savage and Bavister, 1988; Cherr et al., 1988).

생쥐에 있어서 난자에 도달하는 정자수의 조절, 투명대에서의 차단 (zona pellucida block), 세포막에서의 차단 (plasma membrane block) 그리고 난자세포질에서 여분의 정자의 제거와 같은 서로 다른 수준에서 다정자수정의 억제가 일어남이 보고되어 왔다 (Yu and Wolf, 1981; Tatone et al., 1994). 투명대가 제거된 생쥐 난자에 있어서 알코올과 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)로 난자의 단위 활성화 (parthenoactivation)을 유발시키면 일시적인 세포막에서의 차단을 일으켜 난자의 정자에 대한 결합 능력의 소실을 야기한다고 보고

되었다 (Tatone et al., 1994). 피질반응 후 삼출물에 의해 형성된 새로운 막인 피질과립막 (cortical granule envelope, CGE)이 ruthenium red로 고정된 체내수정된 생쥐, 햄스터, 주머니쥐의 난자, 그리고 체외수정된 사람 난자의 위란강 (perivitelline space, PVS)에서 관찰된다고 보고되었다 (Dandekar and Talbot, 1992; Dandekar et al., 1993).

피질과립의 exocytosis는 세포내 free calcium의 증가에 의존하는 반응이라는 것이 보고되었다 (Kline, 1988; Kline and Kline, 1992). 포유류에 있어서 정자는 수정시 다발적이며 반복적인 free calcium 전이 (transient)를 일으킴이 밝혀졌다 (Kline and Kline, 1992; Fissore and Robl, 1994; Keith et al., 1995). 생쥐와 햄스터의 수정시에 난자에서 일어나는 세포내 free calcium의 증가는 세포내 저장고로부터의 방출이나 세포막에 존재하는 Calcium channel을 통해 이루어지는 것으로 알려져 왔다. Fissore 등 (1992)은 소의 난자에 InsP3와 thimerosal의 미세주입 후 난자내 calcium의 증가를 야기할 수 있었다. 햄스터에서 난자내 calcium 전이는 배양액으로부터 calcium을 제거할 때 중지되며, calcium 전이의 빈도는 calcium 유입을 억제하는 cobalt chloride의 처리에 의해 감소됨이 보고되었다 (Igusa and Miyazaki, 1983). 또한 Kline과 Kline (1992)은 생쥐 난자에 있어서 calcium 전이와 수정시의 반복적인 calcium 전이는 calcium 유입에 의존적이라는 것을 보고하였으며, 또한 calcium chelator인 1 μ M BAPTA/AM을 처리한 난자의 수정에서 피질과립의 약 30% 정도가 피질반응을 일으켰음을 보고하였다. 이러한 난자내 free calcium 증가는 정자-난자 융합에 의해 야기되며, 이차감수분열중기 난자의 감수분열 재개, 피질과립 방출 그리고 난자의 활성화를 일으키는 것으로 알려져 왔다.

그러므로 본 실험에서는 투명대가 제거된 난자에 calcium chelator인 BAPTA/AM을 처리한 후 피질과립 반응의 유무와 피질과립막 (CGE)의 형성여부를 주사전자현미경으로 관찰하고, 또한 calcium chelator 처리에 따른 수정율 및 단정자수정과 다정자수정 빈도를 측정하여 수정시 calcium의 역할을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 배란유도 및 체외수정

생후 26일된 Sprague-Dawley strain의 흰쥐 암컷에 20 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 복강주사하고, 46~48시간에 20 IU human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 복강주사하여 과배란을 유도하였

다. hCG 주사 후 15~16 시간에 경추과열로 도살하여 수란관을 떼어내 해부현미경하에서 수란관의 한쪽 끝에 30 gauge needle을 삽입하여 M2 배양액 (modified Krebs-Ringer bicarbonate solution) 0.5 ml을 넣어 씻어내리는 방법으로 얻었다. 난구세포는 0.1% hyaluronidase (Sigma)를 처리하여 제거하였고, M2 배양액으로 수세 후 투명대를 제거하기 위해 0.5% pronase에 1분간 처리 후 mouth-controlled glass pipette를 사용해 투명대를 제거하였다.

정자는 성숙한 수컷의 부정소미 (cauda epididymis)를 떼어내 혈액과 지방조직을 제거하고, 배양액이 담긴 접시에 넣어 정자괴를 방출시켜 습기찬 공기를 공급받는 37°C 항온기에서 30분간 방치하여 정자괴를 분산시켰다. 정자괴의 분산 후 4% bovine serum albumin (BSA)을 함유하는 M16 배양액에 옮겨 5% CO₂가 혼합된 습기찬 공기를 공급받는 37°C 항온기 내에서 2시간 동안 배양하여 수정능력획득을 유도하였다. 모든 배양액은 사용하기 전에 millipore filter (pore size, 0.22 μ m)로 멸균하였고, 초자기구는 15 lb에서 20분간 고압멸균하거나 180°C에서 20분간 건열멸균하였다.

2. Calcium Chelator 처리

투명대가 제거된 난자 (zona-free oocyte)는 calcium chelator인 BAPTA/AM (Molecular Probes)이 각각 1, 5, 10 μ M로 용해된 M2 배양액에 옮겨 넣은 후 paraffin oil drop method로 5% CO₂가 혼합된 습기찬 공기를 공급받는 37°C 항온기 내에서 30분간 배양하였다. BAPTA/AM은 1mM로 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)에 용해시켜 stock solution으로 보관했다가 사용시에 M2 배양액으로 희석하여 사용하였다. 또한 세포내 유입을 촉진하기 위해 Pluronic F-127 (Molecular Probes)을 DMSO에 25% (w/w)로 용해한 후 BAPTA/AM loading 시에 1 μ l/ml로 배양액에 첨가하여 사용하였다. 배양 후 calcium chelator를 첨가하지 않은 M2 배양액으로 5회 수세 후 M16 배양액 (modified Krebs-Ringer bicarbonate solution)에 15~20개의 난자를 넣어 수정능력을 획득한 정자와 체외수정시켰다.

3. 주사전자현미경 관찰

투명대가 제거된 난자의 체외수정에 따른 난자 세포막의 미세구조 변화를 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM)으로 관찰하였다.

체외수정 시작후 10분과 3시간에 난자를 채취해 M16 배양액에서 여분의 정자를 제거하였고, 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 수세 후 동일 buffer로 희석한 2.5%

glutaraldehyde 용액으로 4°C에서 15시간 동안 고정하였다. 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.

4. 전핵 형성 관찰

투명대가 제거된 난자의 수정을 및 단정자수정과 다정자수정의 빈도를 측정하기 위해 체외수정 시작 3시간 후에 M16 배양액으로부터 난자를 채취하여 여분의 정자를 제거하고 슬라이드 글라스 위에 옮긴 후, cover glass의 네 귀퉁이에 paraffin/wax 혼합액으로 지지대를 세운 후 난자가 이동하지 않도록 슬라이드 글라스 위에 안치시켰다. 그리고 고정액 (acetic acid:ethyl alcohol, 1:3)에서 1시간 고정하였다. 고정된 난자는 1% aceto orcein에서 20분간 염색하고 위상차현미경 (Leitz, Laborux 2)하에서 전핵형성 여부를 관찰하였다.

과배란된 난자의 성숙시기별 배란율을 측정하였다. 생후 26일된 Sprague-Dawley strain의 흰쥐 암컷에 대조군은 4 IU, 과배란군은 20 IU PMSG (Sigma)를 복강 주사하고, 46~48시간 후에 대조군은 4 IU, 과배란군은 20 IU hCG (Sigma)를 복강 주사하여 배란을 유도하였다. 난자의 고정 및 염색은 전핵형성 관찰 방법과 동일하게 하였다. 난자내 핵상 구분은 극체를 갖는 난자는 metaphase II로 간주하였

고, metaphase I은 염색체가 적도판에 퍼져 있는 상태를 가지고 판정하였으며, anaphase I 난자는 세포질 돌출정도 및 상동염색체간의 거리 정도를 가지고 판정하였다.

실험은 4~5회 이상 반복하였으며 얻은 자료는 Student's t-test로 통계 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 피질과립막 형성

투명대가 제거된 난자의 체외 수정 후 난막 외부에 피질과립막의 삼출물에 의해 형성된 피질과립막이 관찰되었다. 수정 후의 난막구조 변화는 미수정란의 난막 구조 (Fig. 1)와 비교해 볼 때 확실하게 피질과립막의 형성이 관찰된다 (Fig. 2-3). 투명대가 제거된 난자의 정상적인 체외수정에 있어서, 수정 초기 (10분)에는 피질막 위에 미세융모가 약간 관찰되나 (Fig. 2A), 수정후기 (3시간)가 될 수록 미세융모가 거의 보이지 않으며, 피질과립막의 형성이 더욱더 진행되는 것으로 나타났으며, 제 2 극체가 나타났다 (Fig. 2B). 투명대가 제거된 난자에 calcium chelator인 BAPTA/AM (1, 5, 10 μ M)을 처리한 후의 체외수정 관찰 결과 대조군인 정상난자의 수정 (Fig. 2)과 별 차이점이 관찰되지 않았다 (Fig. 3). 정상군과 calcium chelator인 BAPTA/AM 처리군 모두에서 피질과립막은 형성되었고, 정자가 피질과립막에 부착된 위치에 따른 정자관입의 극성 (polarity)은 극체부위와 적도부분에 한정되어 나타났으나 (Fig. 2-3D), 10 μ M의 BAPTA/AM 처리군에서는 극성이 관찰되지 않았다 (Fig. 3F).

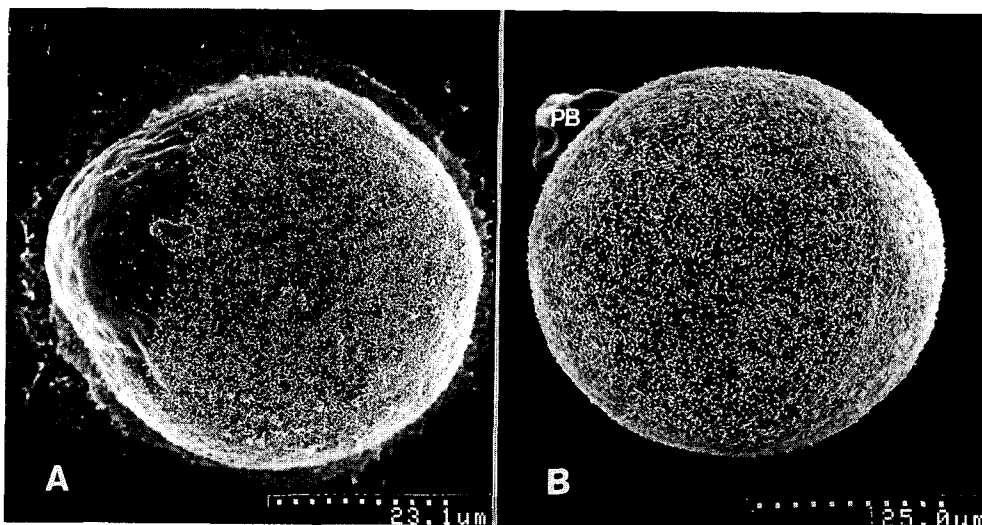


Fig. 1. Scanning electron micrographs of the unfertilized rat zona-free oocytes. (A) Immature oocyte. (B) Matured oocyte. Surface of the unfertilized oocyte membrane is covered uniformly with microvilli. PB=polar body.

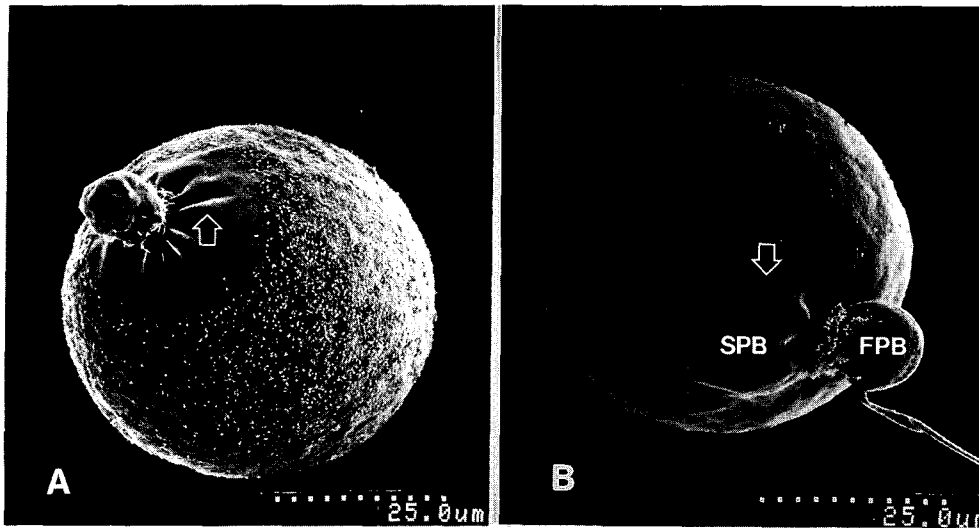


Fig. 2. Scanning electron micrographs of rat zona-free oocytes inseminated *in vitro*. Oocytes were fixed at 10 minutes (A) and 3 hours (B) after insemination. Surface of oocyte membrane appears to be surrounded by thin cortical granule envelope (arrows). FPB=first polar body, SPB=second polar body.

2. 수정율과 다정자수정 빈도

투명대가 제거된 난자의 체외수정 후 3시간에 수정란 표

면의 정자를 제거하고, aceto-orcein으로 염색하여 전핵형성을 관찰한 결과는 Table 1에 나타내었다. 대조군에서 수정율은 60.6%로 나타났고, 단정자수정 (monospermy, 37.5%)보

Table 1. Effect of calcium chelator (BAPTA/AM) on fertilization rate of zona pellucida removed rat oocytes *in vitro*.

Treatment	No. of observed oocytes	Percentage of fertilized oocytes*	Percentage of monospermy	Percentage of polyspermy
Control	104	60.6 ± 3.8	37.5 ± 18.8	62.5 ± 18.1
BAPTA / AM (1 μM)	152	59.8 ± 9.2	45.0 ± 13.8 ^a	55.0 ± 13.8 ^a
BAPTA / AM (5 μM)	160	38.1 ± 7.5 ^a	47.3 ± 16.4	52.7 ± 16.1 ^a
BAPTA / AM (10 μM)	173	37.0 ± 9.8 ^a	50.9 ± 14.2 ^a	49.1 ± 15.3 ^a

Rats were superovulated by intraperitoneal injection of pregnant mare's serum gonadotropin (20 IU), followed by human chorionic gonadotropin (20 IU) after 48 hours. Oocytes were fixed at 3 hours after insemination *in vitro*.

In control group, zona pellucida of rat oocytes were removed and then inseminated *in vitro*.

In experimental groups, the zona pellucida removed rat oocytes were treated with BAPTA/AM (1, 5, 10 μM) for 30 minutes and then inseminated *in vitro*.

* Percentage of fertilized oocyte which obtained after *in vitro* insemination.

The values represents the percentage ± SEM. a: P < 0.05.

Table 2. Effect of gonadotropin on the nuclear maturation of the ovulated oocytes in rat

Treatment	No. of examined oocytes*	Nuclear stage of meiosis(%)**			
		Metaphase I	Anaphase I	Metaphase II	Undetermined
4 IU Gonadotropin	117	23.1 ± 5.1	27.4 ± 1.7	47.0 ± 7.7	3.4 ± 2.6
20 IU Gonadotropin	271	40.2 ± 1.5 ^a	15.1 ± 0.4 ^a	39.8 ± 2.6 ^a	4.8 ± 1.8

Rats were superovulated by intraperitoneal injection of pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG), followed with human chorionic gonadotropin (hCG) after 48 hours.

* Number of examined oocytes were obtained after 15~16 hours post-injection of hCG.

** Nuclear maturation of rat oocytes ovulated by injection of gonadotropin.

The values represents the percentage ± SEM. a: P < 0.05

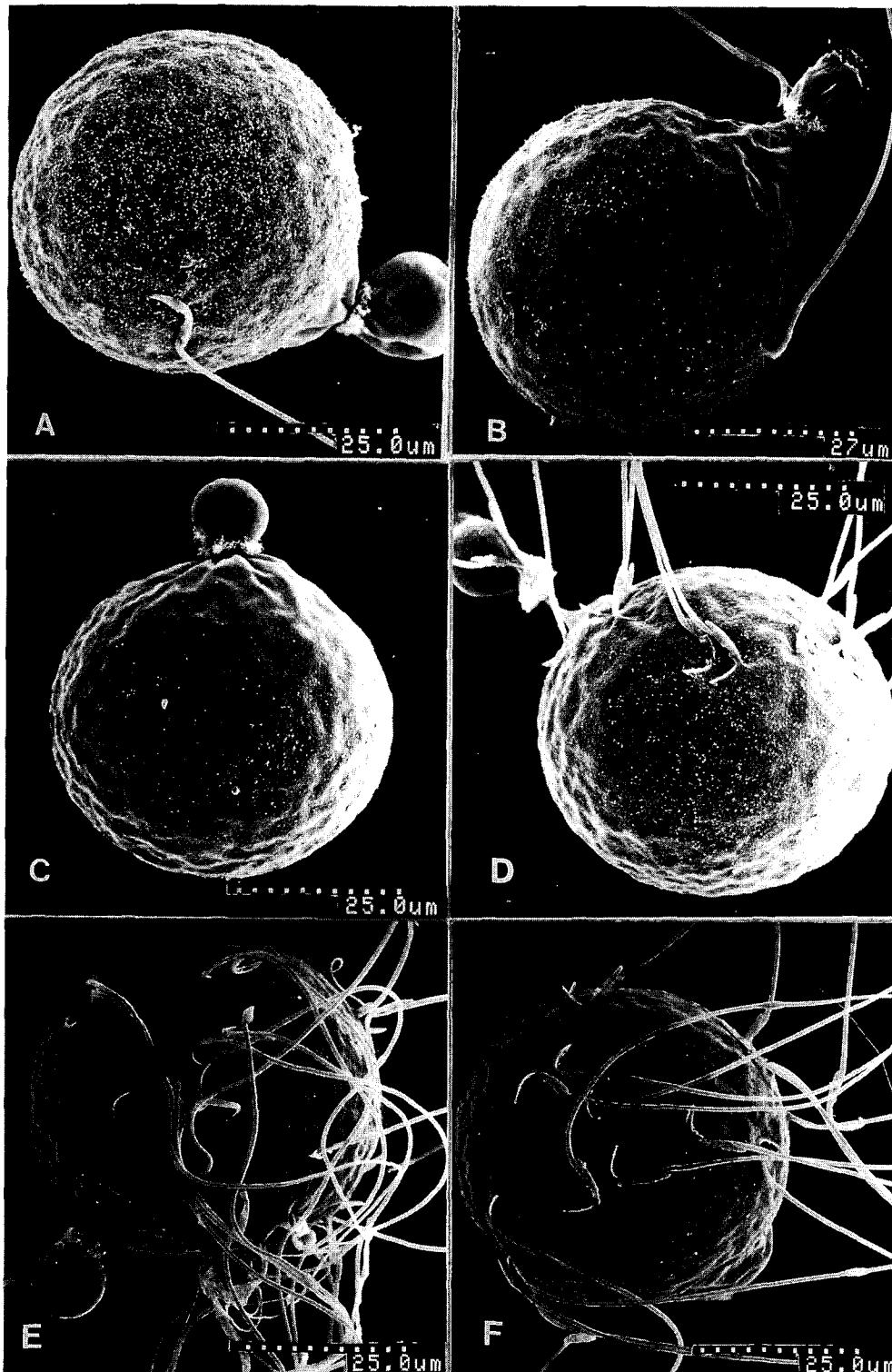


Fig. 3. Scanning electron micrographs of rat zona-free oocytes treated with 1 μM (A-B), 5 μM (C-D) and 10 μM (E-F) BAPTA/AM for 30 minutes and then inseminated *in vitro*. Oocytes were fixed at 10 minutes (A, C, E) and 3 hours (B, D, F) after insemination. Surface of oocyte membrane appears to be surrounded by thin cortical granule envelope.

다는 다정자수정 (polyspermy, 62.5%)이 많이 일어났다. 1 μ M BAPTA/AM 처리군에서는 대조군과 비슷한 수정율 (59.8%)을 나타내었고, 단정자수정 (45.0%)보다 다정자수정 (55.0%)이 높게 나타났다. 5 μ M BAPTA/AM 처리군에서는 대조군 보다 훨씬 낮은 수정율 (38.1%)을 나타내었고 ($P < 0.05$), 단정자수정 (47.3%)보다 다정자수정 (52.7%)이 높게 나타났다. 10 μ M BAPTA/AM 처리군에서는 대조군보다 낮은 수정율 (37.0%)을 나타내었고 ($P < 0.05$), 단정자수정 (50.9%)과 다정자수정 (49.1%)이 비슷하게 나타났다. 종합적으로 볼 때 대조군보다 BAPTA/AM 처리군이 수정율은 낮아졌으나 단정자수정 비율은 높아지는 것으로 나타났다.

3. 배란난자의 성숙도

생식소자극호르몬에 의해 과배란된 난자들은 상당히 많은 양의 미성숙난자를 포함하고 있음을 보여주고 있다 (Table 2). 4 IU의 생식소자극호르몬에 의해 배란된 난자중 극체를 갖는 성숙한 metaphase II 난자는 47.0%로 나타났고, 20 IU를 처리한 배란군에서는 39.8%로 4 IU군보다 낮게 나타났다 ($P < 0.05$). 반면에 미성숙한 metaphase I 난자는 4 IU의 생식소자극호르몬에 의한 배란군에서는 23.1%를 나타내었으나, 20 IU의 배란군에서는 40.2%로 나타나 4 IU군보다 매우 많은 미성숙 난자가 배란되는 것으로 나타났다 ($P < 0.05$).

고 찰

포유동물의 난자가 수정되면 난자의 활성화라고 부르는 피질반응, 감수분열의 재개, 제 2극체 형성, 정자핵의 팽창 그리고 전핵형성과 같은 일련의 반응이 일어난다 (Whitaker and Patel, 1990; Kline and Kline, 1992). 이러한 반응은 정자의 자극에 의해 방출되는 난자내 free calcium 농도의 주기적인 증가에 의해 시작되며, 여러시간 동안 calcium 농도 증가가 지속된다고 보고 되었다 (Kline and Kline, 1992; Fissore et al., 1992). 이러한 free calcium은 protein kinase나 phosphatase를 통해 작용하게 되며 (Whalley et al., 1991), 또한 직·간접적으로 exocytosis에 관계되는 다른 단백질들에 영향을 미치게 된다 (Jackson and Modern, 1990; Lawrence et al., 1998). Calcium 함량의 변화는 exocytosis를 조절하는 protein kinase C의 활성화에 연관된다고 생쥐와 개구리에서 보고되었다 (Colonna et al., 1989; Bement and Capco, 1990). 피질반응 후에 형성된 새로운 막은 ruthenium red로 고정된 체내수정된 생쥐, 햄스터, 주머니쥐의 난자 그

리고 체외수정된 사람 난자의 위관강에서 관찰되었다 (Dandekar and Talbot, 1992; Dandekar et al., 1993).

본 실험 결과에서 투명대가 제거된 흰쥐 난자의 정상적인 수정후 난막위에 피질과립막 형성이 관찰되었다 (Fig. 2). 또한 난자에 calcium chelator (BAPTA/AM)를 처리한 후의 수정에서도 피질과립막이 마찬가지로 나타났다 (Fig. 3). 이러한 결과는 투과전자현미경적 구조 (Dandekar and Talbot, 1992), 형광 염료가 표지된 lectin을 사용하여 피질과립 삼출물의 염색을 통해 관찰한 사람, 생쥐, 햄스터의 보고들 (Ducibella et al., 1990a, b; Tombes et al., 1992; Ducibella and Buetow, 1994; Ducibella et al., 1994; Tatone et al., 1994)과 일치하고 있다. 본 실험의 주사전자현미경 관찰 결과 수정후 형성된 피질과립막은 이차적인 정자 관입을 차단할 수 있는 구조로 되어 있으며, 피질과립막 형성후의 여분의 정자들은 피질과립막에 부분적인 매몰현상이 관찰될 뿐이고 정자관입에 필요한 난막의 미세융모와의 결합은 차단된 상태로 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 전자현미경적 구조의 입증을 통해서 정자 핵염색을 통한 다정자수정 측정에 정확한 판정 근거가 될 수 있을 것으로 생각한다. 왜냐하면 난자의 인위적인 활성을 유발한 후의 체외수정 실험에서 난자의 피질과립막에 부착된 정자를 관입술에 포함시키는 오류를 범할 수 있기 때문이다.

Calcium chelator 처리를 한 후 calcium-free 배양액에서 난자의 활성을 유발한 연구에서는 피질반응이 일어나지 않았다고 보고되었다 (Kline and Kline, 1992; Tombes et al., 1992). 그러나 본 실험 결과에서는 calcium chelator인 BAPTA/AM을 처리한 난자는 calcium을 함유하는 기본배양액에서 배양시 피질반응이 일어났다 (Fig. 3A, B). 햄스터에서 calcium 전이는 배양액으로부터 calcium을 제거할 때 중지되며, calcium 전이의 빈도는 calcium 유입을 억제하는 cobalt chloride의 처리에 의해 감소됨이 보고되었다 (Igusa and Miyazaki, 1983). Kline과 Kline (1992)은 생쥐에 있어서 calcium 전이 (transient)는 세포외액의 calcium 유입에 의존적이라고 보고했다. 이러한 보고들을 고려할 때 본 실험의 BAPTA/AM 처리군에서 피질과립막의 형성은 배양액내 calcium이 난자내로 유입되어 피질반응에 의해 일어난 것으로 사료된다.

본 실험의 대조군에서 투명대가 제거된 난자의 수정율이 60.6%로 낮은 수치를 나타냈는데 (Table 1), 이것은 과배란된 난자의 핵성숙 (Table 2) 정도와 연관성이 있는 것으로 사료된다. 즉 체외수정에서 난자의 과배란 방법을 사용하게 되는데 이것은 PMSG의 영향 즉 종간의 변이는 있지만 조기배

란을 유도하고, 폐쇄성 난포로부터도 배란을 유도하기 때문에 난자의 질적인 저하가 일어난다는 보고 (Yun et al., 1987; Opavsky and Armstrong, 1989)로 보아 이러한 난자로 인해 수정율이 낮게 나타난 것으로 생각된다. 생쥐 미성숙난자 (germinal vesicle-metaphase I oocyte)의 피질과립 반응은 성숙란과는 달리 국부적으로 일어나며, 성숙란에서 볼 수 있는 피질반응은 metaphase I -metaphase II 난자에서 활발하다는 것이 보고되었다 (Ducibella and Buetow, 1994). 또한 돼지에서 난자의 심재부에서 난막부위로의 피질과립 이동은 난자성숙 동안에 일어남이 보고되었다 (Wang et al., 1997). 본 실험에서 낮은 수정율을 보인 것은 과배란된 난자를 사용했기 때문에 미성숙 난자로 인해 수정율이 영향 받은 것으로 생각되며, calcium chelator 처리군에서 BAPTA/AM의 처리 농도에 비례해서 수정율이 감소하여 전핵형성에 영향을 미친 것으로 생각된다. 수정시 난자내 증가된 calcium 전이가 성숙촉진인자 (maturation promoting factor)를 활성화시키고 세포안정화요인 (cyto-static factor)의 활성을 억제해 감수분열 재개, 염색질 팽창 그리고 전핵형성을 시작하게 한다고 양서류에서 보고되었으며 (Kline, 1988), 반복적인 calcium 증가는 감수분열 재개의 속도와 전핵형성의 시기를 조절할 수 있다는 보고 (Vitullo and Ozil, 1992)를 고려할 때 본 실험결과는 calcium chelator에 의해 수정율에 영향을 미친 것으로 생각된다.

본 실험결과 투명대가 제거된 난자의 수정에 있어 정상군과 BAPTA/AM 처리군 모두에서 피질반응이 일어나 피질과립막이 형성되었다. BAPTA/AM 처리군에서 피질과립막이 형성된 것은 배양액의 calcium이 난자내로 유입되어 피질반응을 일으킨 것으로, 피질반응은 세포내 calcium 뿐만이 아니라 세포외액의 calcium에도 의존되는 반응이라고 사료된다. Calcium chelator 처리가 수정율 및 단정자수정 빈도에 미치는 영향에 있어서, BAPTA/AM 처리 농도 증가에 따라 수정율은 감소하지만 단정자수정 빈도는 비례해서 증가되어 나타났다. 이는 calcium chelator 처리농도에 비례해서 난자내 calcium ion 농도가 저하되고 이로 인해 sperm penetration 이 영향을 받아 다정자수정 빈도는 저하되고 상대적으로 단정자수정 빈도는 증가하는 것으로 사료되며, 난자내의 적절한 calcium 농도가 수정에 중요한 요인인 것으로 사료된다. 이에 관한 기작은 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Bement WM, Capco DG (1990) Protein kinase C acts downstream of calcium at entry into the first mitotic interphase of *Xenopus laevis*. *Cell Reg* 1: 315-326.
- Cherr GN, Drobnis EZ, Katz DF (1988) Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J Exp Zool* 246: 81-93.
- Colonna R, Tatone C, Malgaroli A, Eusebi F, Mangia F (1989) Effects of protein kinase C stimulation and free Ca^{2+} rise in mammalian egg activation. *Gamete Res* 24: 171-183.
- 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.
- Ducibella T, Buetow J (1994) Competence to undergo normal, fertilization-induced cortical activation develops after metaphase I of meiosis in mouse oocytes. *Dev Biol* 165: 95-104.
- Ducibella T, Duffy P, Buetow J (1994) Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod* 50: 467-473.
- Ducibella T, Duffy P, Reindollar R, Su B (1990a) Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. *Biol Reprod* 43: 870-876.
- Ducibella T, Kurasawa S, Ranharajan S, Kopf GS, Schultz RM (1990b) Precocious loss of cortical granules during mouse oocytes meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol* 137: 46-55.
- Fissore RA, Robl JM (1994) Mechanism of calcium oscillations in fertilized rabbit eggs. *Dev Biol* 166: 634-642.
- Fissore RA, Dobrinsky JR, Balise JJ, Duby RT, Robl JM (1992) Patterns of intracellular Ca^{2+} concentrations in

- fertilized bovine eggs. *Biol Reprod* 47: 960-969.
- Igusa Y, Miyazaki S (1983) Effects of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. *J Physiol* 340: 611-632.
- Jackson RC, Modern PA (1990) N-ethylmaleimide-sensitive proteins involved in cortical exocytosis in the sea urchin egg: Localization to both cortical vesicles and plasma membrane. *J Cell Sci* 96: 313-321.
- Keith TJ, John C, Julie AM, David GW, Tomohiro K (1995) Repetitive sperm-induced Ca^{2+} transient in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Development* 121: 3259-3266.
- Kline D (1988) Calcium-dependent events at fertilization in the frog egg : Injection of a calcium buffer blocks ion channel opening, exocytosis and formation of pronuclei. *Dev Biol* 126: 346-361.
- Kline D, Kline J (1992) Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 149: 80-89.
- Lawrence Y, Ozil JP, Swann K (1998) The effects of a Ca^{2+} chelator and heavy-metal-ion chelators upon Ca^{2+} oscillations and activation at fertilization in mouse eggs suggest a role for repetitive Ca^{2+} increases. *Biochemical J* 335 (2): 335-342
- Opavsky MA, Armstrong DT (1989) Effects of luteinizing hormone on superovulatory and steroidogenic response of rat ovaries to infusion with follicle stimulating hormone. *Biol Reprod* 40: 15-25.
- Stewart-Savage J, Bavister BD (1988) A cell surface block to polyspermy occurs in golden hamster eggs. *Dev Biol* 128: 150-157.
- Tatone C, Van Eekelen CG, Colonna R (1994) Plasma membrane block to sperm entry occurs in mouse eggs upon parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 38: 200-208.
- Tombes RM, Simerly C, Borisy GG, Schatten G (1992) Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{2+} , whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{2+} -independent in the mouse oocyte. *J Cell Biol* 117: 799-811.
- Vitullo AD, Ozil JP (1992) Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev Biol* 151: 128-136.
- Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN (1997) Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocyte during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod* 56: 1376-1382
- Whalley T, Crossley I, Whitaker M (1991) Phosphoprotein inhibition of calcium-stimulated exocytosis in sea urchin eggs. *J Cell Biol* 113: 769-778.
- Whitaker MJ, Patel R (1990) Calcium and cell cycle control. *Development* 108: 525-542
- Yu SF, Wolf DP (1981) Polyspermic mouse eggs can dispose of supernumerary sperm. *Dev Biol* 82: 203-210.
- Yun YW, Yuen HB, Moon YS (1987) Effects of an antiandrogen, flutamide on oocyte quality and embryo development in rat superovulated with pregnant mare's serum gonadotropin. *Biol Reprod* 39: 279-286.