大韓不妊學會雜誌: 第27卷 第1號 2000
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 27, No. 1, 2000, 3

인간양수에 의한 생쥐 난자 투명대의 정자수용능력 억제의 관찰

경북대학교병원 산부인과학교실[1], 대구대학교 축산학과[2]

박기상[1,2] · 이택후[1] · 송해범[2] · 전상식[1]

Human Amniotic Fluid Induces Spontaneous Hardening of the Zona Pellucida of Mouse Immature Oocytes During Maturation *In Vitro*

Kee Sang Park[1,2], Taek Hoo Lee[1], Hai Bum Song[2], Sang Sik Chun[1]

[1]Department of OB/Gyn, Kyungpook National University Hospital and
[2]Department of Animal Science, Taegu University

Objective: Zona pellucida (ZP) has been thought to be the barrier of egg to sperm penetration before and after fertilization. The phenomenon of ZP hardening has been considered as a post-fertilization event until now, and it is generally accepted that it is caused by the secretory products of cortical granules released during the cortical reaction. Hardening of ZP could occur "spontaneously" in mammalian oocytes in standard culture conditions, and that it is probably not a consequence of cortical reaction. The purpose of our study was to investigate the effect of human amniotic fluid (HAF) on nuclear maturation (NM) and fertilization ability of mouse immature oocytes.

Methods: HAF was obtained from patients undergoing amniocentesis at 16～20 weeks of gestation. HAF from five to ten patients was centrifuged and the supernatants was pooled. Cumulus-enclosed mouse immature oocytes were incubated in the medium containing HAF, and examined to confirm NM and fertilization. Female ICR mice (about 3 weeks old) were stimulated with 7.5 IU PMSG. Immature oocytes were isolated at 48～52 hrs post PMSG injection and cultured in TCM-199 supplemented with 20% HAF for 18 hrs. FBS was used as a control for the examination. Matured oocytes (MII) were fertilzed with sperms collected from the epididymis of male mice (over 10 weeks old). Fertilization was in conducted T6 medium containing 15 mg/ml BSA, and confirmed at 6 hrs post-insemination. Fertilization rate was assessed in zona-intact or zona-free oocytes (denuded by trypsin). Evaluation of NM and fertilization was carried out by rapid staining method. ZP hardening was evaluated by incubating cumulus cell-free mature oocytes in 0.001% chymotrypsin at 37℃ for 10 min.

Results: There was no significant difference between the effects of HAF (86.6%) and FBS (87.7%) supplements on NM of immature oocytes. When maturation medium was supplemented with HAF, total fertilization rates (7%) were significantly lower ($p<0.01$) than that of FBS (85.1%). In HAF group, fertilization rate was increased ($p<0.01$) in zona-free oocytes (7% versus 100%). The resistance of mouse oocyte ZP to digestion by chymotrypsin after maturation *in vitro* was

*교신저자: 박기상, 대구시 중구 삼덕동 2가 50번지, 경북대학교병원 산부인과학교실
전화: (053) 420-5727, 팩스: (053) 423-7905, e-mail: keespark@yahoo.com

significantly higher ($p<0.01$) in HAF group (86.7%) than in FBS (6.7%). To culture oocytes in FBS were very effective in preventing ZP hardening. However cultured oocytes in HAF showed high rate of ZP hardening ($p<0.01$).

Conclusions: These results suggest that HAF can be used as a supplement for the NM of mouse immature oocytes *in vitro*. However, HAF induces spontaneous hardening of ZP of mouse immaure oocytes during maturation *in vitro*.

Key Words: Mouse immature oocyte, Human aminotic fluid (HAF), Hardening of zona pellucida

포유동물에서 정자가 난자와 수정을 이루기 위해서는 우선 난자의 투명대와 binding을 해야 된다. 일단 binding 되면 정자는 acrosome reaction이 일어나서 투명대를 녹이고 세포질 내로 침입하게 된다. 생쥐난자의 투명대는 ZP1, ZP2, ZP3와 같은 3개의 glycoprotein으로 구성되어 있다. 정자는 ZP3의 O-linked oligosacharide side chain에 의해서 acrosomal reaction이 일어난다.[1] 생쥐에서, glycoprotein ZP3는 정자의 투명대와의 binding과 acrosomal exocytosis를 유발시키는 작용을 한다.[1,2] 성숙이 완료된 난자가 체외에서 수정에 실패하는 원인은 정자가 난자의 투명대와 binding을 못하거나 난자의 투명대가 지나치게 두꺼워지거나 경화되는 현상 때문에 정자가 난자의 투명대를 통과할 수 없어서 일어난다.[3~7] 미성숙난자를 체외에서 배양할 때 투명대는 단백질 분해효소에 대한 용해성이 저해되는 자연적인 투명대경화현상이 일어날 수 있다.[4,8] 투명대경화현상을 유도하는 물질은 표층과립물질의 부산물에 존재하는 ovoperoxidase이며,[4,9] 체외성숙배양 시에는 불완전한 배양액의 조성에 의해서도 일어난다.[4~7] 투명대경화현상이 일어난 난자는 정자의 침입과 그 후의 배발달이 배란된 난자보다 저조하다.[5] 미성숙난자의 체외성숙, 수정 및 발달은 배양액의 종류와 성숙배양액에 첨가되는 물질의 종류 등에 따라 영향을 받게 된다.[10~12] 인간을 포함한 포유동물난자를 체외에서 배양할 때 다양한 체액 (biological fluid)의 사용이 검토되고 있으며, 일부의 체액은 현재 human ART (Assisted Reproductive Technologies) Program에서 이용되고 있다.[13,14] 인간체액으로는 난포액, 복수액, 제대혈청, 양수 (HAF) 및 maternal serum 등이 있다.[11,15] 이중에서 HAF는 쉽게 많은 양을 얻을 수 있는 체액임에도 불구하고 미성숙난자의 성숙배양에 이용할 자료가 매우 제한적이다.[11,16]

따라서 본 연구는 생쥐를 실험 동물로 하여 인간양수 (HAF)를 성숙배양액에 첨가할 때 미성숙난자의 핵성숙과 성숙 후 정자수용능력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

연구 대상 및 방법

1. 배양액의 준비

난자의 실온에서의 조작은 2 mg/ml의 BSA (SIGMA, USA)가 포함된 M2 배양액 (M2+BSA)을 이용하였으며, CO_2 배양기 내에서의 배양은 tissue culture medium-199 (TCM 199, GIBCO, USA)을 이용하였다. M2 배양액은 매주 stock 용액으로 준비하여 BSA를 첨가한 다음 37℃로 조절하여 이용하였다. TCM은 HAF 또는 FBS (GIBCO, USA)를 첨가한 후 0.2 μm 여과기 (Millipore, USA)를 통과시켜 제균한 다음 CO_2 배양기 내에서 6시간 이상 평형시켜 이용하였다.

2. HAF의 준비

HAF는 임신 16~19주의 환자로부터 양수검사시 회수하였다. 태아 염색체이상이나 태아 신경관 결손이 없는 양수만을 실험 대상으로 하였다. 회수한 HAF는 원심분리 (4500 rpm)를 2회 (30분과 10분간) 실시하여 상층액만을 회수한 다음 56℃에서 35분간 불활성화시킨 다음 0.2 μm의 여과기로 여과하여 제균하고 나서 -20℃에서 냉동보관하다가 사용하였다. 해동 후 2일이 경과한 것은 실험에서 제외하였다.

3. 난자의 채취

3~4주령된 ICR 자성생쥐에게 7.5 IU의 PMSG (Intervert, Holland)를 복강주사 후 48~52시간에 경추탈골법으로 생쥐를 희생시켜 M2 배양액에서 난포를 해부침으로 터뜨려 난자를 회수하였으며, 이렇게 회수된 난자중에서 난구세포가 치밀하게 부착된 난자-난구세포 복합체만을 배양에 사용하

였다.

4. 난자의 배양

미성숙난자의 체외배양은 TCM 배양액을 기초 배양액으로 하고, 20% 농도로 HAF를 첨가하여 실험에 사용하였다.[11,16] 대조군으로는 20%의 FBS를 사용하였다.[6] 난자의 성숙을 위한 체외배양은 직경이 60 mm 크기의 배양접시 (Falcon, USA)에 50 μl의 배양액을 소적한 후 액상파라핀 오일 (BDH, UK)을 덮어 5% CO_2 배양기에서 18시간 동안 지속 배양하였다.

5. 체외수정

체외수정용 난자는 성숙배양 후 150 IU/ml의 hyaluronidase (SIGMA, USA) 용액에서 반복된 pipetting으로 난구세포를 제거한 난자를 M2 배양액에서 3회 세정한 후 제 1 극체가 명확히 보이며, 그 크기가 비정상적인 것은 모두 제외시키고 정상 소견을 보이는 MII 난자만을 선별하여 T6 배양액으로 3회 세정하여 수정에 이용하였다.

체외수정용 정자는 ICR 웅성생쥐 (10주령 이상)를 희생시켜 정소상체미부만을 회수하여 BSA를 함유하지 않은 500 μl의 T6 배양액에 옮겨 정자괴를 15∼20분 동안 CO_2 배양기 내에서 배양하여 정자를 부유시켰으며 정자 drop 내에 있는 응집된 정자를 제거한 후 15 mg/ml의 BSA (Fraction V, SIGMA, USA)를 포함한 500 μl의 T6 배양액 (T6+BSA)으로 옮겨 1.5∼2시간 동안 배양하여 수정능획득이 일어나도록 한 다음 체외수정에 이용하였다. 수정능획득을 유기한 정자의 농도는 $1 \sim 2 \times 10^6$/ml가 되도록 조절하여 10∼15개의 난자를 50 μl의 T6+BSA 배양액으로 옮긴 다음 2∼6시간 동안 정자와 함께 배양하므로써 수정을 유도하였다.[17]

6. 투명대의 제거

HAF가 첨가된 배양액에서 성숙이 완료된 난자는 수정율이 크게 떨어져, 이의 원인이 세포질 성숙 또는 투명대의 경화에 의한 물리적인 변화에 따른 것인 지를 확인하기 위해서 Acid Tyrode's solution (GIBCO, USA)을 이용하여 투명대를 완전히 제거한 다음 체외수정에 이용하였다.

7. 투명대경화현상의 판정

투명대경화현상이 일어났는지를 알아보기 위해서 성숙이 완료된 성숙난자를 50 μl 소적의 0.001% chymotrypsin (SIGMA, USA)에 10분간 노출시킨 다음, 투명대의 반응으로 판단하였다. 난자의 투명대가 chymotrypsin에 노출되어도 전혀 녹지 않는 것을 투명대경화현상이 일어난 것으로 판정하였다.[18]

8. 난자의 핵성숙과 정자침입의 판정

미성숙난자의 핵성숙과 성숙난자에 대한 정자침입의 판정은 급속염색법을 이용하였다.[19] 미성숙난자의 핵성숙은 배양 18시간 후에 분석하였으며, 수정의 여부는 난자 내에 정자두부의 팽화와 정자미부에 해당하는 부분이 발견되는 것과, 난자가 핵분열을 보이거나 전핵이 형성된 것을 정자가 침입해서 수정이 이루어진 것으로 판정하였다.

9. 통계분석

실험 결과에 대한 유의성 여부는 χ^2 검정을 이용하였으며, 표준 오차율은 ±SEM으로 나타내었다. p값이 0.05 이하인 것을 유의차가 있는 것으로 인정하였다.

결 과

배양액에 첨가하는 HAF가 미성숙난자의 핵성숙과 수정능력에 미치는 효과를 Figure 1과 2에 보여 주었다. 핵성숙에 미치는 영향을 살펴보았을 때, HAF군 (85.6%)과 대조군 (87.7%) 사이에는 성숙율에 미치는 효과에서 차이가 나지 않았다. 미성숙난자를 체외에서 배양할 때 첨가되는 HAF가 미성숙난자의 핵성숙 후 체외수정에 미치는 영향을 보면, 대조군의 경우 85.1%인데 반해 HAF군의 경우 7.0%로서 현저하게 낮은 수정율을 나타내었다 ($p<0.01$). 핵성숙이 완료된 성숙난자에서 수정율이 저조하게 나타나는 원인이 투명대 자체의 정자수용능력 저하에 의한 것인지를 알아보기 위하여 투명대를 제거하여 체외수정을 실시하였다 (Table 1). 투명대가 완전히 제거된 난자의 수정율이 두 처리군에서 모두 100%를 나타내었다. 따라서 HAF군에서 수정율이 낮게 나타난 원인은 투명대의 정자수용능력이 저하되어 일어난 것임을 알게 되었다. HAF군에서 성숙이 완료된 난자를 0.001%의 chymotripsin에 10분간 노출시켜 투명대의 반응을 관찰하여 투명대의 정자수용능력의 저하가 투명대경화현상에 의한 것인지를 살펴보았

Table 1. Effects of additives during *in vitro* maturation and intact or free zona pellucida on *in vitro* fertilization of mouse oocytes

Groups		Used matured oocytes	No. (%) of fertilized oocytes	
Additives	Zona pellucida		Total	Poly-spermy
FBS	Intact	47	40 (85.1)[a]	11 (23.4)
	Free	42	42 (100)	34 (81)
HAF	Intact	57	4 (7)[b]	0 (0)
	Free	64	64 (100)[c]	57 (67.9)

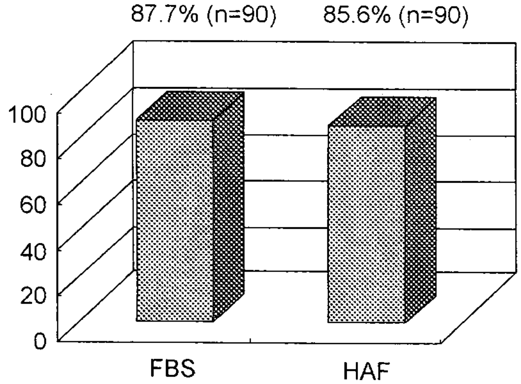

Figure 1. Effects of HAF during in vitro maturation on nclear maturation of mouse immature oocytes. (NS, ±SEM)

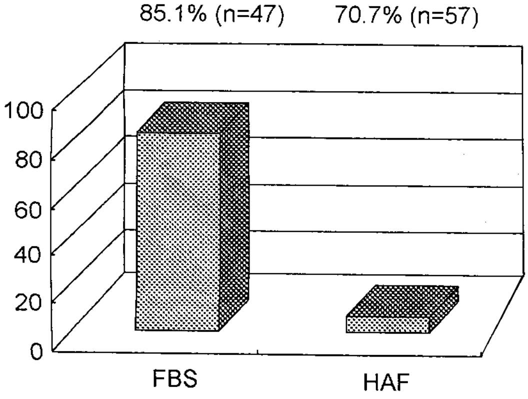

Figure 2. Effects of HAF during in vitro maturation on fetilizability of mouse immaturse oocytes. (p<0.01, ±SEM)

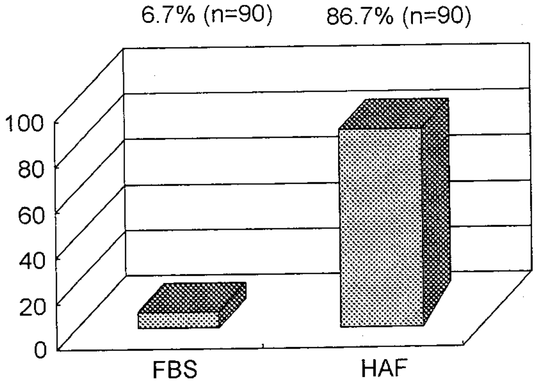

Figure 3. Resistance of zona pellucida of mouse oocyte to digestion by chymotrypsin after in vitro maturation. (p<0.01, ±SEM)

다 (Figure 3). 대조군에서는 86.7%가 chymotrypsin에 반응하여 녹는데 비하여 HAF군에서는 6.7%만이 반응하여 녹고 나머지는 전혀 반응하지 않았다 (p<0.01). 따라서 생쥐 미성숙난자를 HAF가 첨가된 배양액에서 배양하면 투명대경화현상이 유발되어 투명대의 정자수용능력이 저하되는 것을 관찰하였다.

고 찰

배양액 내에 성선자극호르몬의 첨가,[11,20] granulosa cell과의 공배양,[21] *Vero* cell과의 공배양,[22] EGF와 insulin-like growth factor-1의 첨가[23] 등에 따라 난자의 성숙율과 체외성숙된 난자의 수정능력을 높일 수 있다. 인간 미성숙난자에서 난구세포를 제거한 다음 정자와 공배양함으로써 난자에 activation을 가하면 MII까지의 성숙과 수정능력을 높이는데 효과적이라는 보고도 있다.[12] 본문에서 인간양수 (HAF)는 생쥐 미성숙난자의 핵성숙에 효과적으로 이용할 수 있었는데 (Figure 1), Nagai 등[16]도 돼지 미성숙난자를 돼지양수에서 체외성숙을 성공적으로 이용할 수 있음을 보여 주었다. 그러나 본문에서 HAF는 투명대경화현상을 유발

시켜 수정이 현저히 저하되었다 (Table 1, Figure 2). Serum free medium에서 rat oocyte를 culture하면 zona hardening이 일어나서 수정이 거의 이루어지지 않는다. 그러나 fetal calf serum (FCS), soybean trypsin inhibitor, 또는 β-mercaptoethanol이 첨가된 배양액에서는 zona hardening이 일어나지 않으므로 serum이 첨가되지 않은 배양액에서는 난자의 투명대경화현상이 일어날 수 있다.[6] 체외에서 성숙된 생쥐 미성숙난자의 수정율이 낮게 나타나는 원인은 투명대의 qualitative change 때문으로 FCS를 성숙배양액에 첨가하면 이런 현상은 극복할 수 있는데, 이는 FCS 내에는 투명대경화현상을 억제할 수 있는 factor가 있기 때문이다.[24] 생쥐난자의 투명대는 ZP1, ZP2, 및 ZP3의 3가지 glycoprotein으로 구성되어 있는데, glycoprotein ZP3는 정자가 투명대와 binding하는 것과 acrosomal exocytosis를 유발시키는 작용을 한다.[1,2] ZP3에 대한 정자의 receptor는 protein tyrosin kinase 특성을 갖고 있는 95 KD mouse sperm protein이다.[2] ZP3 protein antibody가 있다면 정자가 투명대 내로 침입하지 못하게 된다.[25] 투명대의 두께가 지나치게 두꺼운 것도 정자의 penetration이 저하되는 원인이 되는데, 이런 경우 미세수정을 함으로써 정상적인 수정을 얻을 수 있다.[3] 동결과정에 의해서도 투명대의 변성이 일어날 수 있는데,[26] 동결보존액에 FBS를 첨가하면 투명대의 cortical granule reaction을 차단해서 zona hardening을 방지할 수 있다.[18]

Pronase와 같은 단백질 분해 효소에 투명대의 용해성이 저하되는 것은 zona hardening에 의한 것이며,[4] zona hardening의 mechanism은 cortical reaction과 다정자침입의 physiological block과 관련이 있다.[6] Zona hardening을 유발시키는 물질은 표층립물질에 존재하는 ovoperoxidase이다. Zona hardening의 inhibitor는 phenylhydrazine, sodium sulfate, sodium azide 및 glycine ethylester 등이 있다. O-methyltyrosine은 hardening을 부분적으로 억제시키는 반면, tyramine과 N-acethyltyrosine은 hardening을 효과적으로 방지할 수 있다.[4] 투명대경화현상으로 수정에 실패할 경우 zona drilling을 이용하는 것이 수정율을 높일 수 있는 효과적인 방법이지만,[3,25] zona drilling은 생쥐와 사람난자에서 cytoplasmic acidification을 급격히 증가시켜 cytoplasmic degeneration을 일으킬 위험성이 높다.[27] 미성숙난자를 HAF가 첨가된 배양액에서 체외성숙을 실시할 경우 성선자극호르몬을 부가적으로 첨가하면 수정능력을 증가시킬 수 있다는 보고가 있는데,[16,23] 저자들[11]이 이전에 실시한 실험에서도 성선자극호르몬으로 수정율을 높일 수 있었다.

결론적으로 인간양수 (HAF)는 생쥐 미성숙난자의 핵성숙을 위한 체외성숙배양에는 효과적으로 이용할 수 있지만 이들 난자의 수정능력이 극히 저조하였는데, 이러한 원인은 배양액에 첨가된 HAF가 난자의 투명대경화현상을 유발하여 투명대의 정자수용능력이 억제되었기 때문으로 사료된다. 그러나 이후의 연구를 통하여 HAF 내에 어떠한 물질이 투명대경화현상을 초래하여 난자의 수정능력이 저하되었는지를 검토하고, 전자현미경으로 투명대를 미세하게 관찰하여 구조적인 변화 양상을 알아보아야 할 것이다. 또한 수정이 이루어진 후 발생능력에 영향을 미칠 수 있는 세포질 성숙에 대해서도 종합적으로 조사되어야 할 것이다.

감사의 글

본 실험의 많은 부분은 차병원 기초의학연구소에서 수행되었음을 밝혀두며, 실험이 진행되는 동안 도움을 주신 여러 선생님들을 기억합니다. 특히 실험에 대한 조언을 아끼지 않았던 손원영 선생님과 도병록 선생님, sample (HFF)과 실험의 편의를 제공해 주신 이숙환 선생님, 정형민 선생님, 이경아 선생님, 고정재 선생님께 감사드립니다. 본 논문의 교정에 도움을 주신 고려대학교 생명공학원의 이상호 교수님께도 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Blei JD, Wassarman PM. Structure and function of zona pelluda: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. Dev Biol 1980; 76: 185-202.
2. Burks DJ, Carballada R, Moor HDM, Saling PM. Interaction of kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. Science 1995; 269: 83-6.
3. Bertrand E, Van Den Bergh M, Englert Y. Dose zona pellucida thickness influence the fertilization. Human Reprod 1995; 10: 1189-93.
4. Schmell ED, Gulyas BJ. Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs: Evidence of the enzyme's role in hardening the zona pellucida.

Gamete Res 1980; 3: 279-90.
5. Downs SM, Scroeder AC, Eppig JJ. Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro* by preventing hardening of the zona pellucida. Gamete Res 1986; 15: 115-22.
6. Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. Mol Reprod Develop 1991; 28: 292-6.
7. George MA, Johnson MH. Use of fetal bovine serum substitutes for the protection of the mouse zona pellucida against hardening during cryoprotectant addition. Human Reprod 1993; 8: 1898-900.
8. De Felici M, Siracusa G. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. Gamete Res 1982; 6: 107-13.
9. Gulyas BJ, Schmell ED. Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs: I Electron microscopic localization. Gamete Res 1980; 3: 267-77.
10. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PG. Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes of mature *in vitro*. Nature 1969; 221: 632.
11. Park KS, Son WY, Kim JH, Lee KA, Han SY, Ko JJ, Cha KY. Influences of human body fluids and gonadotrophins supplemented in the maturation medium on the nuclear maturation and fertilizability of mouse immature oocytes. Kor J Fertil Steril 1994; 21: 183-90.
12. Farhi J, Nahum H, Zakut H, Levran D. Incubation with sperm enhances *in vitro* maturation of the oocyte from the germinal vesicle stage to the M2 stage. Fertil Steril 1997; 68: 318-22.
13. Leese HJ, Lenton EA. Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationships. Human Reprod 1990; 5: 915-9.
14. Liu DY, Bourne H, Baker HWG. High fertilization and pregnancy rates after ICSI in patients with disordered with zona pellucida-induced acrosome reaction. Fertil Steril 1997; 67: 955-8.
15. Shipley CF, Nelson GH. Prenatal diagnosis of a placental cyst: Comparison of postnatal biochemical analyses of cyst fluid, amniotic fluid, cord serum, and maternal serum. Am J Obstet Gynecol 1993; 168: 211-3.
16. Nagai T, Takahashi T, Shioya Y, Oguri N. Maturation and fertilization og pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid. Theriogenology 1990; 43: 195-204.
17. Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocyte at -196℃ and fertilization *in vitro* of the frozen-thawed oocytes. J Reprod Fert 1982; 66: 161-8.
18. George MA, Johnson MH, Vincent C. Use of fetal bovine serum to protect against zona hardening during preparation of mouse oocytes for cryopreservation. Human Reprod 1992; 7: 408-12.
19. Byun TH, Lee SH, Song HB. Development of a rapid staining method for nucleus of the domestic animals. Korean J Anim Sci 1991; 33: 25-31.
20. Zhang X, Armstrong DT, Zerafa, Khamsi F, Wong J. Human menopausal gonadotrophin during *in vitro* maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances *in vitro* fertilization and cleavage rates. Fertil Steril 1993; 59: 850-3.
21. Dandekar PV, Martin MC, Glass RH. Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. Fertil Steril 1991; 55: 95-9.
22. Jassenwillen C, Nagy ZP, Van Steirteghem A. Maturation of human cumulus-free germinal vesicle stage oocytes to metaphase II by culture with monolayer Vero cells. Human Reprod 1995; 10: 375-8.
23. Gomez E, Tarrin JJ, Pellicer A. Oocyte maturation in human: the role of gonadotropins and growth factor. Fertil Steril 1993; 59: 40-6.
24. Chio TS, Mori M, Kohmoto K, Shoda Y. Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro*. J Reprod Fert 1987; 79: 565-8.
25. Conover JC, Gwatkin RBL. Fertilization of zona-drilled mouse oocytes treated with a monoclonal antibody to the zona glycoprotein, ZP3. J Exp Zoo 1988; 247: 113-8.
26. Wood MJ, Whittingham DG, Lee SH. Fertilization failure of frozen mouse oocytes is not due

to premature cotical release. Biol Reprod 1992; 46: 1187-95.
27. Depypere HT, Leybaert L. Intracellular pH changes during zona drilling. Fertil Steril 1994; 61: 319-23.