

성숙배양액에 첨가되는 인간 양수가 생쥐 미성숙난자의 투명대경화 현상에 미치는 영향

차병원 여성의학연구소

박기상 · 손원영 · 김진희 · 고정재
윤태기 · 차광열

인간을 포함한 포유동물 난자를 체외에서 배양함에 있어서 다양한 체액(biological fluid)의 사용이 검토되고 있으며, 일부의 체액은 현재 Human ART(Assisted Reproductive Technologies) Program에서 이용되고 있다. 본 연구는 인간 양수(human amniotic fluid, hAF)를 성숙배양액에 첨가할 때 미성숙난자의 종합적인 발생능력에 미치는 효과를 조사하기 위하여 생쥐를 실험 동물로 하여 실시하였다.

3주령의 ICR 자성 생쥐에 pregnant mare's serum gondotropins(PMSS)를 7.5IU 투여 하고 48시간 후에 도살하여 회수한 난포에서 미성숙난자를 채취하여 FBS(대조군, fetal bovine serum)와 hAF(실험군)가 각각 20%씩 첨가된 TCM-199 배양액에서 18시간 동안 체외배양하므로써 체외성숙을 유도하였다. 체외성숙이 유도된 각 실험군의 난자는 급속염색법(rapid staining)에 따라 핵성숙을 조사하였다. 성숙이 완료된 난자의 수정능력을 확인하기 위하여, 생식능력이 확인된 웅성생쥐의 정소상체미부로 부터 회수된 정자와 성숙난자를 공배양하여 체외수정을 유도하였다.

그 결과, 두 실험군간의 핵성숙율을 FBS 첨가군에서 87.9% 그리고 hAF 첨가군에서 85.6%로 나타나 두 첨가군간의 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 한편, 체외성숙이 완료된 난자를 체외수정시킨 결과, 수정율에 있어서는 FBS 첨가군의 경우, 85.1%인데 반해 hAF 첨가군의 경우 7.0%로서 유의적으로 낮은 수정율을 나타내었다($p < 0.01$). 이와 같이 hAF 첨가군에서 수정율이 극히 저조한 현상의 원인이 투명대경화현상(zona-hardening) 때문인지를 확인하기 위하여, Acid Tyrode's

Solution으로 투명대를 제거한 난자를 대상으로하여 체외수정을 실시한 결과, 두 처리군에서 공히 100%의 수정율을 나타내었다.

위의 결과로 미루어 보아, hAF는 생쥐 미성숙 난자의 체외성숙에는 양호한 성적을 나타내었지만, 이들 난자를 수정에 이용하였을 경우에는 극히 저조한 수정율을 나타내었다. 이러한 현상은 난자의 투명대경화 현상에 의해 기인된 듯 하다. 그러나 추후의 연구를 통하여 hAF내에 어떠한 물질이 이러한 투명대경화 현상을 초래하는지를 검토하여야 할 것으로 사료되며, 수정 후 발생능력에 미치는 영향을 미치는 세포질성숙에 대해서도 종합적으로 조사되어야 할 것이다. 이러한 연구는 현재 진행하고 있다.

정자직접주입법(ICSI)에 의한 수정실패 난자의 재 ISSI에 관한 연구

차병원 여성의학연구소

엄기봉 · 오종훈 · 김현주 · 정형민
곽인평 · 고정재 · 윤태기 · 차광열

최근에 정자직접주입법(ICSI)의 실시로 과거에는 여러가지 원인으로 인하여 수정이 불가능 했거나 실패했던 많은 불임환자의 경우에도 수정 및 임신이 가능하게 되었다. 정자직접주입법(ICSI)은 다소의 Technique이 요구되는 바, 시술자나 시술센터에 따라 다르나 현재 대략 50% 정도의 수정성공율을 보고하고 있다. 본 저자들은 최근들어 극심한 남성 불임의 경우에 ICSI를 적용하여 약 70%의 수정율을 보이고 있지만 전체적으로 성적을 고려해 볼때 약 30-50%의 난자들이 ICSI 후에도 수정에 실패하고 있으며, 통상 미세조작시 물리적 손상을 10%로 볼때 수정실패율은 20-40%로 볼 수 있다. 또한 적은수(1-2개)의 수정란을 이식하는 것 보다는 다소 많은 수(3-4개)의 수정란을 이식할 때 임신성공율이 높아진다는 것은 주지의 사실이다. 따라서 본 저자들은 ICSI 후 수정에 실패한 난자들을 구제, 활용할 목적으로 재 ICSI를 실시하여 수정을 유도하였다.

ICSI는 16명의 환자로부터 209개의 난자를 채취하여 이중 Metaphase II 상태의 154개를 대상으로 실시하여 56.5%인 87개가 수정(2PN)되었으며, 이중 수정에 실패한 난자 67개 중 49개를 재 ICSI하였다. 재 ICSI한 난자 중 51%인 25개가 수정(2PN)되었으며, 이중 14개를 체외배양하였다. 체외배양 결과로 14개 중 64%인 9개가 8 cell 혹은 그 이후의 단계까지 발달하였다. 따라서 두번 혹은 세번 micro pipette에 의한 물리적 손상이 있다고 하더라도 난자는 정상적으로 수정되고 발달함을 알 수 있었다.

결론적으로 ICSI 후 수정이 되지 않은 경우라 하더라도 난자의 상태에 따라 재 ICSI를 시도하는 것이 시험관아기 시술의 효율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

-6-

생쥐 난자의 성숙에 따른 투명대의 구조 변화

서울여자대학교 자연과학대학 생물학과,
한양대학교 자연과학대학 생물학과

윤혜진 · 김해권 · 김문규*

생쥐 난자의 성숙에 따른 투명대의 구조 변화를 FITC-casein을 이용한 형광염색법으로 조사하였다.

생쥐 암컷에 PMSG를 주사한 후 48시간째에 난소내의 미성숙 난자를 골라 FITC-casein으로 염색하고 세포질을 터뜨려 투명대만을 관찰한 결과 섬유 및 점 형태의 형광이 나타났다. 그러나 hCG 주사 후 11시간째의 난소로부터 얻은 성숙 난자는 점 형태의 형광만이 관찰되었고 또한 hCG 주사 후 17시간째에 수란관으로부터 얻은 성숙 난자에서도 같은 양상이 나타났다. 난구세포에 싸인 미성숙 난자를 FBS 혹은 BSA가 있는 배지에서 각각 배양한 후 동일한 방법으로 조사한 결과 이들 난자들은 체내에서 성숙한 난자에 비해 전반적으로 점 형태의 형광이 많이 나타났다. 또한 BSA 처리군은 FBS 처리군 보다 점 형태의 형광이 많이 나타났다. PMSG를 이용하여 체외에서 난구세포의 확장을 유도한 결과 난구세포의 확장은 투명대의 구조 변화에 영향을 미치지 않았다. 한편 난구세포를 제거한

미성숙 난자를 각각 FBS 혹은 BSA가 첨가된 배지에서 배양한 후 조사한 결과 난구세포와 함께 배양한 결과와는 달리 FBS 처리군에서 BSA 처리군보다 점 형태의 형광이 많이 나타났다.

이러한 결과로 미루어 생쥐 난자의 투명대는 성숙에 따라 구조 변화를 나타내며 체외배양시 FBS는 체내에서와 유사한 변화를 유도한다. 또한 이같은 변화에는 난구세포가 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

-7-

생쥐 난자의 생화학적 특성 변화를 유도하는 소의 수란관 요인에 관한 연구

제일병원 불임 연구실
서울여대 자연대 생물학과*

한미현 · 이호준 · 김해권*

생쥐 난자의 배란에 따른 생화학적 특성 변화를 유도하는 수란관 요인을 소의 수란관 추출액과 ghost ZP를 재료로 하여 조사 하였다. ghost ZP는 생쥐의 미성숙 난자를 Triton X-100로 처리하여 얻었으며 이들에 수란관 추출액을 처리한 후 FITC-casein으로 염색하여 형광이 나타나면 추출액내에 요인이 있는 것으로 판정하였다. 소의 수란관으로부터 내액을 채취하여 활성 여부를 조사한 결과 내액으로 처리된 모든 ghost ZP가 형광으로 염색되는 등 강한 활성이 나타났다. 이 수란관 내액에 0.01% trypsin을 처리하거나 65°C에서 10분간 가열한 후 조사한 결과 활성은 전혀 나타나지 않았다. 수란관 내액을 DEAE-Sepharose CL 6B를 이용한 Ion-exchange chromatography를 시행한 결과 4개의 분획에서 활성이 나타났으며 전기영동 결과 이들 분획에서는 32kD의 단백질이 공통적으로 나타났으며 활성이 없는 분획에서는 이 단백질이 나타나지 않았다. 이 결과로 미루어 소의 수란관 내액에는 생쥐의 수란관과 마찬가지로 생쥐난자의 생화학적 특성 변화를 유도하는 단백질 요인이 존재하며 약 32kD의 분자량을 갖는 것으로 추정된다.