

## 생쥐난자에 있어서 투명대 경화 현상이 체외수정에 미치는 영향

### I. 단백질분해효소에 의한 투명대의 용해성 분석

이상진 · 이상민 · 지희준 · 장경환 · 정형민 · 이훈택 · 정길생

전국대학교 축산대학 동물자원연구센터

## Effect of Zona Hardening on *In Vitro* Fertilization in Mouse Oocytes

### I. Analysis of Zona Soluble Properties with Proteolytic Enzymes

Lee, S.J, S.M. Lee, H.J. Jee, K.H. Chang, H.M. Chung, H.T. Lee, and K.S. Chung

Animal Resources Research Center, College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

### SUMMARY

These experiments were carried out to investigate whether zona hardening affect the efficiency of *in vitro* fertilization in mouse oocytes. The soluble properties for zona pellucida of oocytes matured *in vivo*, aged oocytes, and ovarian oocytes matured *in vitro* have been analyzed with proteolytic enzyme, 3mg/ml of  $\alpha$ -chymotrypsin. The mean solubility( $t_{50}$ ) for the zona of unfertilized oocytes, oocytes not fertilized at the first insemination and *in vitro* produced zygotes were 10.1, 20.3 and 32.3min., respectively. The  $t_{50}$  for zona lysis of fertilized oocytes was significantly difference than those observed for unfertilized oocytes and oocytes not fertilized at the first insemination( $P < 0.01$ ). In addition, the  $t_{50}$  of zona in ovulated oocytes with and without cumulus cells incubated for 0, 3, 6, 9 and 12 hr *in vitro*,  $t_{50}$  were 13.9, 11.1, 20.7 and 28.0min., and 22.3, 21.0, 30.0 and 33.5min., respectively. In these experiments, the zona pellucida showed a gradual increase in resistance to dissolution by  $\alpha$ -chymotrypsin with *in vitro* aging for more than 6 hrs. This effect was greater in cumulus-free as compared to cumulus-intact oocytes. Finally, in cumulus-intact and cumulus-free ovarian oocytes matured for 0, 5, 10 and 15 hr *in vitro* the  $t_{50}$  of zona pellucida were 3.0, 10.6, 18.4 and 24.5 min., and 3.0, 14.0, 26.2 and 32.0 min., respectively.

Clear differences in solubility between the zona pellucida of oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. This data were found suggest that under *in vitro* conditions there is a gradual change in the soluble properties of the zona pellucida, particularly in the absence of the cumulus cells.

### I. 서 론

포유동물 난자의 투명대는 정자의 수용체가 존재하고, 수정시 다정자 침입을 방지하며, 착상전 난자의 수송이나 보호 등과 같은 중요한 생물학적 기능을 수행한다(Barros와 Yanagimachi, 1972). 그러나 수정 혹은 단위발생이 유도된 난자의 투명대는 정자 결합성

(sperm binding property)의 변화(Barros와 Yanagimachi, 1971; Gwatkin 등, 1973; Inoue와 Wolf, 1975a, b; Wolf와 Inoue, 1976)와 함께 투명대의 물리적 성질이 변한다(Baranska 등, 1975; Gulyas와 Schmell, 1980). 이것은 수정시 난자의 세포질 표면에 산재해 있는 cortical granule이 방출되어 그 분비산물 중의 단백질분해효소가 투명대에 작용하여 구조적 변화를 유지시키기 때문이다(Smithberg,

1953 : Chang과 Hunt, 1956 : Gwatkin, 1964 : Krzanowska, 1972 ; Inoue와 Wolf, 1974a, b, 1975a, b ; Schmell과 Gulyas, 1980). 그러므로 투명대는 단백분해효소와 chemical reagents에 의한 용해성이 감소되는데, 이러한 투명대의 물리적 변화를 투명대 경화 현상(zona hardening)이라고 부르고 있다 (Foerder와 Shapiro, 1977 ; Klebanoff 등, 1979 ; Schmell과 Gulyas, 1980 ; Gulyas와 Schmell, 1980 ; DeFelici와 Siracusa, 1982).

투명대 경화는 지금까지, 수정후에 야기되는 현상으로써, cortical reaction시, 난자의 표면에 존재하는 cortical granule의 분비산물에 의하여 발생한다고 알려져 왔으며, 직접 또는 간접적인 방법에 의하여 포유동물 중에서도 확인되었다. 그 예로서, 단백분해효소에 대한 투명대의 용해성에 관한 연구는 mouse (Smithberg, 1953 ; Gwatkin, 1964 ; Inoue와 Wolf, 1974a, b), rat (Chang과 Hunt, 1956), rabbit (Chang과 Hunt, 1956 ; Conrad 등, 1971) 및 bovine (Katska 등, 1989)등에서 보고되었고, Inoue와 Wolf (1975a)는 mouse, rat 및 hamster 난자에서 2-mercaptoethanol을 사용하여 투명대의 용해성을 비교하였다.

그리고 Baranska 등 (1975)은 전자현미경을 이용하여 수정란과 미수정란의 투명대 구조가 서로 상이하다는 것을 관찰하였고, Gulyas와 Schmell (1980)은 단위발생이 유도된 난자의 세포질 표면과 cortical granule에서 ovoperoxidase의 활성을 전자현미경으로 직접 관찰함으로써, 수정란 혹은 단위발생란의 투명대가 미수정란의 투명대보다 구조적으로 현저하게 다르다는 것을 확인하였다. 또 Drobnis 등 (1988)은 mouse와 hamster의 난자를 미세한 피펫으로 흡입하여 투명대가 파괴되는 시점을 manometer로 측정한다음, 투명대 경화의 정도를 관찰하는 역학적 투명대 경화(mechanical zona hardening) 현상을 보고하였다.

그러나 난소내 미성숙 난모세포나 배란된 난자를 완전합성배지 (chemically defined medium)에서 체외배양할 경우, 투명대는 cortical granule의 방출과는 상관없이 배양시간이 지연될수록 단백분해효소에 대한 용해성이 감소하는데(De Felici와 Siracusa, 1982 ; Downs 등, 1986), 이를 자연적인 투명대 경화

(spontaneous zona hardening) 현상이라고 한다.

이에 대해 Gianfortoni와 Gulyas (1985)는 생쥐의 배란난자를 체외에서 장시간 배양한 결과, 투명대의 용해성은 난구세포의 존재여부에 관계없이 배양시간이 지연될수록 감소하였고, 특히 난구세포가 제거된 난자에서 투명대 경화 현상이 더욱 뚜렷하였으며, 이러한 난자의 체외수정을 역시 저조하다는 것을 증명함으로써, 난구세포가 제거된 난자의 노화와 수정율에는 밀접한 상관이 있다고 보고하였고, Downs 등 (1986)은 난소에서 채취한 난모세포를 제 2 감수분열의 중기까지 성숙시킬 때에도 난모세포의 배양시간이 경과할수록 투명대 경화 현상도 현저히 증가함으로써, 투명대 경화 현상이 유도된 난자는 정자침입률이 저하한다고 보고하였다(Schmell과 Gulyas, 1980 ; DeFelici와 Siracusa, 1982 ; DeFelici 등, 1985 ; Gianfortoni와 Gulyas, 1985 ; Downs 등, 1986).

이에 본 연구에서는 투명대경화현상이 체외수정에 미치는 영향을 구명하기 위한 기초연구로서, 단백질 분해효소인  $\alpha$ -chymotrypsin을 사용하여 배란난자, 난소내 미성숙 난자, 노화난자 및 수정란의 투명대 용해성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 공시동물

공시동물은 ICR 계통의 생쥐로써, 자성생쥐는 4~6주령, 체중은 15~25g이었으며, 웅성생쥐는 10~14주령, 체중은 30~45g이었다.

일조시간은 14시간(오전 8시~오후 10시)으로 조절하였으며, 고행사료와 식수는 무제한 급여하였다.

#### 2) 배양액 및 배양조건

본 연구에 사용된 정자의 처리, 난자회수, 체외성숙 및 체외수정용 배양액은 NaCl : 5.7190 g/L, KCl : 0.1060 g/L, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O : 0.0960 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O : 0.1290 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O : 0.2620 g/L, NaHCO<sub>3</sub> : 2.1010 g/L, Na-lactate : 6510 g/L, glucose : 1.0000 g/L, Na-pyruvate : 0.0520 g/L에 penicillin G(75 mg/ml)과 streptomycin(5 mg/ml) 및 3 mg/ml의 BSA(bovine

serum albumin ; Sigma, U.S.A.)를 함유한 수정 tyrode's 용액이었고, 난구세포를 제거하기 위한 배양액은 수정 tyrode 용액에 1 mg/ml의 hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)를 첨가하여 사용하였다.

투명대 경화 현상의 분석(zona hardening assay)을 위한 투명대 용해용 배양액으로는 단백질원이 함유되어 있지 않은 Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)에 3 mg/ml  $\alpha$ -chymotrypsin(Sigma, U.S.A.)을 첨가하여 사용하였으며, 이들 배양액의 pH는 7.2~7.4, 삼투압은 280~290 mOsm로 조정하였고, 사용 직전에 0.2 혹은 0.45 m의 millipore filter (German Science Inc., U.S.A.)를 사용하여 여과·제균한 다음, 소량으로 분주하여 4℃ 냉장고에서 보관하면서 사용하였다. 한편 배양조건은 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기조건인 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

## 2. 방 법

투명대 경화 현상의 분석을 위해 사용된 난자회수와 분석방법은 다음과 같다.

### 1) 투명대 경화 현상의 분석을 위한 난자의 회수

#### (1) 배란된 난자의 회수

자성생쥐의 복강내에 5 IU의 pregnant mares serum gonadotropin(PMSG ; Intervet, Holland)을 주사한 다음, 48시간째에 동일한 방법으로 5 IU의 human chorionic gonadotropin(hCG ; Sigma, U.S.A.)을 주사하여 과배란을 유도한 다음, hCG 주사 후 14~16시간째에 생쥐를 도살하여 외과적인 방법으로 난관을 적출한 후, 난관에 부착된 혈액과 불순물을 제거하고, 체외수정을 위한 배양액 소적(0.4 ml)이 들어있는 조직배양용 petridish내의 유동 paraffin oil속으로 옮겨서, 40~60배의 실체현미경하에서 해부침을 사용하여 난관팽대부로 부터 난구세포에 둘러쌓인 난자를 회수하여 투명대 용해성을 조사하였다.

#### (2) 난소내 난모세포의 회수와 체외성숙

자성생쥐의 복강내에 5 IU의 PMSG만을 투여한 후, 46~48시간째에 생쥐를 도살하여 난소를 적출한 다음, 20G needle이 부착된 주사기를 이용하여 난소에 존재하는 그라아프 난포를 파열하여 germinal vesicle(GV) 단계의 난자들을 회수하여, 난구세포의 존재 유무에 따라 체외성숙용 배양액 소적(0.1 ml)에

10~20개씩 넣은 다음, 0, 5, 10 및 15시간동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 난소내 난모세포의 투명대 용해성을 조사하였다.

#### (3) 노화난자의 회수

HCG 주사후 14~16시간째에 회수한 배란된 난모세포를 배양액 소적(0.1 ml)에 옮긴 다음, 0, 3, 6, 9 및 12시간 동안 난구세포의 유·무에 따라 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, 노화난자의 투명대 용해성을 조사하였다.

#### (4) 체외수정란의 회수

상술한 1)의 방법으로 과배란처리하여 얻은 배란된 성숙난자를 체외수정용 배양액 소적(0.4 ml)에 10~20개씩 옮긴 다음, 수정능을 획득한 정소상체 미부의 정자부유액을 난자가 함유된 배양액 소적에 10~30  $\mu$ l 가주하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 조건하의 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 6시간 동안 수정을 유도하여 수정된 난자와 수정이 유도되지 않은 난자를 회수하였다. 수정의 판정기준은 2개의 진핵이 뚜렷하게 관찰되는 것을 수정란으로 판정하였다. 이때 사용된 정자의 최종농도는  $1\sim3 \times 10^6$  /ml이었다.

### 2) 난구세포의 제거

배란된 난자와 난소내 미성숙 난자의 난구세포는 실험목적에 따라 0.1% hyaluronidase 용액으로 제거하였고, 완전히 제거되지 않은 난구세포와 방사관 세포는 gentle pipetting 조작으로 완전히 제거하여 준비하였다.

### 3) 투명대 경화현상 분석(zona hardening assay)

투명대 경화 현상의 분석을 위해 배란 직후의 난자, 노화난자, 난소내 미성숙난자 및 체외수정란은 petridish 내의 paraffin oil하의 투명대 용해용 배양액인 0.3%  $\alpha$ -chymotrypsin 소적(100  $\mu$ l)에 1,020개의 난자를 공여하여 37℃의 가운데판 위에서 투명대의 용해성을 조사하였다. 공시된 난자의 투명대 용해 정도의 관찰은 매 1분 간격으로 위상차 현미경하에서 실시하였으며, 투명대의 일부가 용해되었거나, 완전히 용해되었을 때를 관찰의 기준으로 삼았고, 난자의 투명대 경화 정도는 공시된 난자의 투명대가 50% 용해되는데 요구되는 시간 즉  $t_{50}$ 으로 나타내었다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 미수정란, 노화난자 및 수정란의 투명대 용해성

HCG 주사후 14~16시간제에 회수한 미수정란, 수정후 6시간제에 회수된 전핵기 수정란과 수정에 실패한 노화난자를 0.3%  $\alpha$ -chymotrypsin 용액에서 배양하여 매 1분 간격으로, 이들 난자의 투명대 용해성을 조사하여 그 결과를 Fig. 1에 제시하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이, 미수정란, 수정에 실패한 노화난자 및 전핵기 수정란의 투명대 용해성 정도( $t_{50}$ )는 각각 10.0, 20.2 및 32.2분으로서, 용해속도는 미수정란이 가장 빨랐고, 그 다음이 수정에 실패한 노화난자였으며, 수정란의  $t_{50}$ 이 가장 늦었다.

그 중에서도 특히 다른 처리구에 비해 전핵기 수정란의 투명대 경화 현상이 뚜렷하였고, 각 처리구 사이에는 유의한 차이가 인정되었다( $p < 0.05$ ).

이러한 결과는 disulfide-bond cleaving agent인 mercaptoethanol (Inoue와 Wolf, 1974a, 1974b) 및 단백질 분해 효소인 pronase (Schumell과 Gulyas, 1980)를 사용하여 수정란과 미수정란의 투명대 용해성을 조사한 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한 Gulyas와 Yuan(1985)은 단위발생란의 투명대 용해성도 수정란의 그것과 유사하다고 보고하였다. Baranska 등(1975)과 Gulyas와 Schmel(1980)은 전자현미경적 관찰을 통하여 수정란과 미수정란의 투명대 구조가 서로 상이하다는 것을 확인하였으며, Bleil 등(1981)은 수정후 생쥐의 투명대는 ZP2의 분자량이 변한다고 보고하였다. 또한 Shabanowitz와 O'Rand(1988)는 인간 난자의 경우에도 수정란과 미수정란의 투명대의 분자량이 서로 상이하다고 보고하였다. 이들의 결과는 수정된 난자의 경우 투명대 용해성의 저하는, 수정시 유기되는 cortical granule의 분비산물에 의한 물리적 성질의 변화로 그 구조의 변성에 기인한다는 것을 뒷받침해 주고 있다.

그러나 DeFelici와 Siracusa(1982)는 난소내 GV 단계의 난모세포를 간단한 배양액에서 수정적기인 제 2 감수분열 중기까지 성숙시킬 때, 투명대는 수정시 야기되는 cortical reaction과는 상관없이 자연적인 투명대 경화 현상이 유기된다고 보고하였다. 이것을 본 실험(Fig. 1)에서 수정에 실패한 난자가 투명대 용해

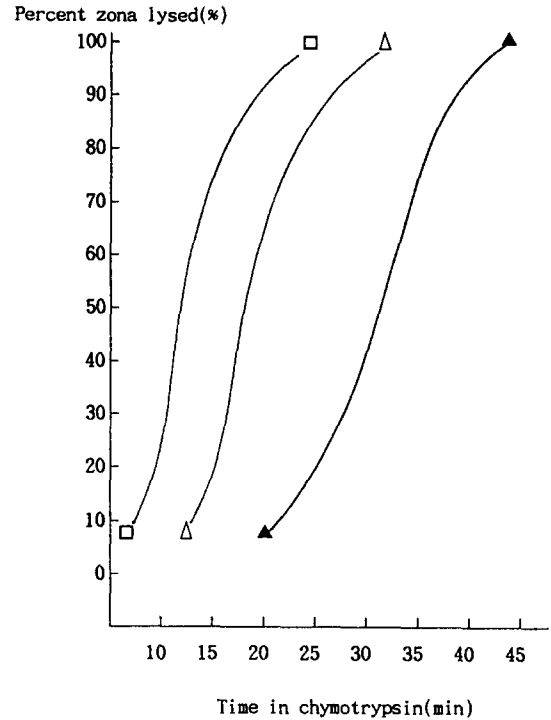


Fig. 1. Zona hardening assay of unfertilized eggs recovered at 14~16hr after hCG injection, and fertilized and unfertilized eggs recovered at 6hr after *in vitro* fertilization.

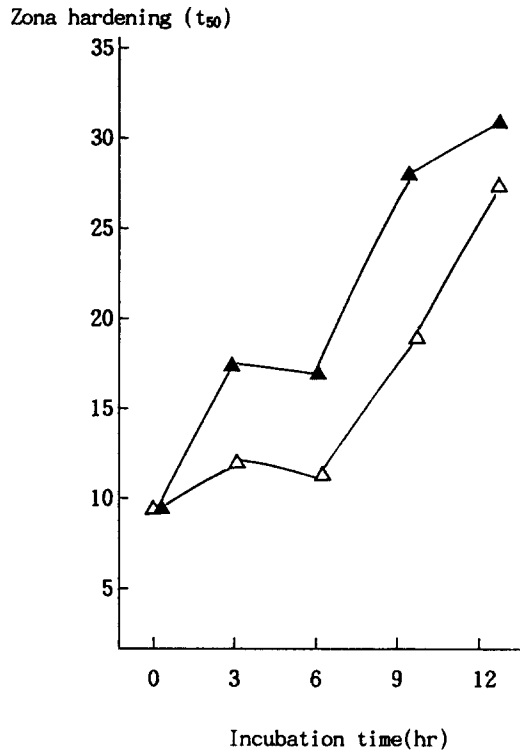
- ▲-▲ : Pronucleate egg ( $t_{50}=32.2$ min.)
- △-△ : Aging eggs not fertilized ( $t_{50}=20.2$ min.)
- : Unfertilized eggs collected at 14~16hr. after hCG injection ( $t_{50}=10.0$ min.)

성이 감소된다는 결과와 비교하여 볼 때, 배란된 미성숙 난자가 수정후 6시간제까지도 수정이 유도되지 않고 체외에서 계속 배양됨으로써, 핵성숙과 더불어 자연적인 투명대 경화 현상이 유기된다는 것을 확인할 수 있었다. Longo(1980,1981)도 장시간 체외에서 노화되어 수정이 유도되지 않은 난자는, 투명대와 세포질에 차이가 있다는 것을 concanavalin A 결합성과 alcian blue 염색을 실시하여, 노화된 난자의 환외구조가 그렇지 않은 난자의 그것과는 뚜렷하게 구조적 차이가 있다는 것을 증명하였다. 따라서 투명대 구조

의 이러한 차이가 투명대의 용해성을 감소시키고 수정율을 저하시키는 원인이라고 생각된다.

## 2. 체외배양 시간에 따른 배란난자의 투명대 용해성

배란 혹은 난소내 난모세포를 체외에서 배양하는 시간이 길어질수록 체외수정율이 저하(이 등, 1991)하는 원인이 투명대의 물리적 변화에 기인하는지를 검토하기 위하여, hCG 주사후 14~16시간째에 미수정란을 회수하여 난구세포의 유·무에 따라, 0, 3, 6, 9 및 12시간 동안 체외배양한 다음, 투명대의 용해성 정도를 매 1분 간격으로 위상차 현미경하에서 관찰한 결과를 Fig. 2에 제시하였다.



**Fig. 2. Zona hardening assays of ovulatory oocytes with and without cumulus cells incubated for 0, 3, 6, 9 and 12h *in vitro*.**

△ - △ : Cumulus-intact oocytes  
▲ - ▲ : Cumulus-free oocytes

HCG 주사후 14~16시간째에 배란된 난자를 회수 즉시 난구세포를 제거하여 투명대 용해성을 조사한 결

과, 배양 0시간째의 대조구 난자의 투명대 용해성은 8분이었다.

그리고 난구세포가 부착된 상태에서 3, 6, 9 및 12시간 동안 체외배양된 난자의 투명대 용해성은 각각 13, 8, 11.0, 20.7분 및 28.0분이었고, 난구세포를 제거한 나화난자의 경우는 각각 22.3, 21.0, 30.0 및 33.5분으로써, 난구세포의 존재 유·무에 관계없이 배양시간이 길어질수록 t<sub>50</sub>도 감소하였다. 이 중에서 특히 배양 12시간째는 난구세포의 유·무에 관계없이 Fig. 1의 수정란의 그것과 유사한 용해성을 보였다. 그리고 난구세포의 부착 유·무에 따른 투명대의 total hardening 은 3, 6, 9 및 12시간 난자를 배양했을 때, 난구세포 부착구가 각각 4.0, 1.2, 10.9 및 18.2분이었고, 난구세포가 제거된 구는 12.5분, 11.2분, 20.2분 및 23.7분으로써, 난구세포가 부착된 구의 경우, 배양 3시간과 6시간째에는 투명대의 용해성에 별다른 차이가 나타나지 않았지만, 9시간과 12시간째에는 투명대 용해성에 현저한 차이가 있었고, 난구세포가 제거된 구에서도 같은 경향이었고, 배양시간이 연장될수록 투명대 용해성도 점차 감소하여 투명대 경화 현상이 현저하게 나타났다.

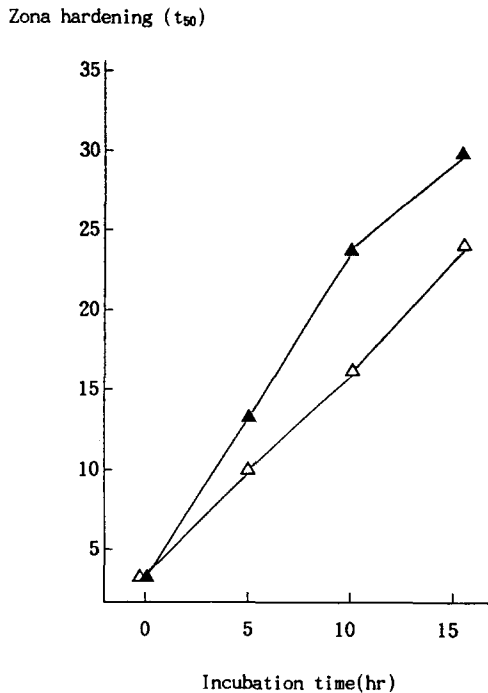
DeFelici와 Siracusa(1982)는 dictyate 단계에 있는 난자를 체외에서 수정적기인 metaphase II 단계까지 성숙시킬 경우, 난자의 cortical reaction과는 관계없이 자연적인 투명대 경화 현상이 유도된다고 보고함으로써, 수정된 난자의 투명대와는 다른 형태의 경화현상을 보고하였다. 또한 Gianfortoni와 Gulyas(1985)는 배란된 난자를 난구세포의 유·무에 따라 6시간 동안 체외배양하였을 때, 난구세포가 부착된 구에서는 투명대 용해성에 차이가 나타나지 않았지만, 난구세포를 제거한 구에서는 뚜렷한 투명대 경화현상이 관찰되었다고 보고하였다.

따라서 본 연구의 결과도 DeFelici와 Siracusa(1982) 및 Gianfortoni와 Gulyas(1985)의 결과와 대체로 일치하는 것이었으나, 본 연구의 결과에서 난구세포가 부착된 상태에서 9시간과 12시간 체외배양된 난자의 투명대 용해성은 3시간과 6시간째보다 유의하게(P<0.05) 경화현상이 증가되어 난구세포가 제거된 6시간째의 투명대 용해성과 유사하였는데, 이는 DeFelici와 Siracusa(1982)의 보고와 같이, 체외배양 6시간째까지는 난구세포가 투명대 경화현상을 억제시키는 중요한 생물학적 기능을 수행하지만, 난자를 체

외에서 배양하는 시간이 6시간 이상으로 길어지면 투명대 경화현상이 난구세포를 제거한 난자의 그것과 같은 정도로 계속 진행된다는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 현상에 대해 Longo(1980, 1981)는 배란후 12~24시간째의 난구세포는 nuclear pycnosis와 cytoplasmic vacuolization과 같은 형태학적, 세포화학적 변화에 의해 난구세포가 퇴행하기 때문이라고 보고한 바 있다.

### 3. 체외성숙 난소내 난모세포의 투명대 용해성

체외성숙 난소내 난모세포의 체외수정율이 감소(이 등, 1991)하는 원인이 난자의 체외성숙용 배양액의 불완전한 조성으로 인한 투명대의 물리적 변화에 기인하는지를 검토하기 위하여, 자성 생쥐의 복강에 PMSG 만을 단독으로 처리한 후, 46~48시간째에 난소내 난모세포를 채취하여 0, 5, 10 및 15시간 동안 체외성숙



**Fig. 3. Zona hardening assays of cumulus-intact and cumulus-free ovarian oocytes incubated for 0, 5, 10 and 15h *in vitro*.**

△-△ : Cumulus-intact oocytes  
▲-▲ : Cumulus-free oocytes

시킨 다음, 배양시간별로 난구세포가 부착된 난모세포와 난구세포를 제거한 난모세포의 zona hardening assay를 실시한 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서, 배양 0시간째(대조구)의 GV 단계의 난모세포의 투명대 용해성은 3.0분이었고, 5, 10 및 15시간 동안 체외성숙시킨 후, 난구세포가 부착된 난모세포의 투명대 용해성은 각각 10.5, 18.3 및 24.5분이었으며, 난구세포를 제거한 구에서는 각각 14.0, 26.2 및 32.0분으로써, 난구세포의 유·무에 관계없이 난모세포의 체외성숙 시간이 길어질수록 점차 투명대 용해성은 감소하였다. 그 중에서 특히 난구세포가 제거된 구가 부착된 구보다 투명대 용해성이 더욱 감소하였다.

한편 DeFelici와 Siracusa(1982)는 GV 단계의 난모세포를 4시간 체외성숙시켰을 때, 투명대 용해성은 17.0분이었고, 배양 15~17시간째에 metaphase II 단계 까지 성숙한 난자는 76분이었다고 보고함으로써, 난소내에서 채취한 난모세포의 경우도 배양시간을 연장함에 따라 투명대 용해성이 점차 감소하고, 이러한 투명대 용해성의 감소는 난포세포를 제거하면 더욱 뚜렷하게 나타난다고 보고하였다. 그리고 Kaufman 등(1989)은 생쥐 난자의 투명대는 발정주기에 따라 glycoconjugate의 분포와 밀도에 차이가 있다고 보고함으로써, 난자의 성숙단계별 투명대의 구조적 변화가 sperm-zona binding과 sperm-egg interaction에 영향을 주기 때문에 수정을 저하의 원인이 된다고 보고하였다. 이들의 결과는 본 실험(이, 1991)의 체외성숙 난소내 난모세포의 체외수정율이 감소하는 원인이 자연적인 투명대 경화현상 때문이라는 것을 직접적으로 시사하는 것이었다.

이와 같이 자연적인 투명대 경화현상은 dictyate 단계의 난모세포를 저산소 조건인 난포내에서 채취하여 체외성숙에 공여할 때, 난자 주위에서 일어나는 산화과정의 결과로서 발생하고, 또한 난포세포의 diffusible factor가 hardening의 발생 정도를 억제시킬 수 있다(DeFelici와 Siracusa, 1982).

이상의 결과에서 난구세포가 투명대 경화현상을 억제시키는 작용이 있다는 것을 알 수 있었고, 또한 투명대 경화현상은 수정란을 비롯하여 체외에서 배양되는 모든 난자에서 발생한다는 것을 알 수 있었다.

#### IV. 적 요

본 연구는 난자의 투명대 경화현상이 체외수정의 효율에 영향을 미치는지의 여부를 구명하기 위한 기초연구로서 배란 직후의 미수정란, 난소내 미성숙란, 체내 및 체외에서 장기간 배양된 노화난자 및 수정란의 투명대 용해성을 단백분해효소인  $\alpha$ -chymotrypsin 으로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 미수정란, 수정후 수정에 실패한 노화난자 및 전핵기 수정란의 투명대의 용해에 소요되는 시간은 ( $t_{50}$ )는 각각 10.1, 20.3 및 32.3분으로써, 용해속도는 미수정란이 가장 빨랐고, 이어 수정에 실패한 노화난자였으며, 전핵기 수정란이 가장 늦었다.
2. 배란된 난자를 체외에서 0, 3, 6, 9 및 12시간 동안 배양했을 때, 투명대 용해에 소요되는 시간은 난구세포가 부착된 난자는 각각 13.9, 11.1, 20.7 및 28.0분이었고, 난구세포가 제거된 난자의 그것은 각각 22.3, 21.0, 30.0 및 33.5분으로써, 양자 다같이 배양시간이 길어질수록 용해속도는 떨어졌다. 그리고 total hardening은 난구세포가 부착된 난자의 경우, 배양 6시간째까지는 인정되지 않았으나, 9시간째 부터 나타나기 시작했고, 난구세포가 제거된 난자의 경우는 투명대 경화현상이 더욱 신속하게 그리고 현저하게 나타났다.
3. PMSG 처리후, 46~48시간째에 회수한 난소내 난모세포를 체외에서 0, 5, 10 및 15시간 동안 배양한 결과, 투명대 용해에 소요되는 시간은 난구세포가 부착된 난모세포는 각각 3.0, 10.6, 18.4 및 24.5분이었고, 난구세포가 제거된 난모세포는 각각 3.0, 14.0, 26.2 및 32.0분으로써, 난구세포의 유·무에 관계없이 체외성숙 시간이 연장될수록 용해속도는 떨어졌고, 특히 난구세포가 제거된 난자의 경우가 현저했는데 이는 난구세포가 투명대 경화현상을 억제하기 때문인 것으로 생각된다.

이상의 결과를 살펴보면, 투명대 경화현상은 수정란을 비롯하여 체외에서 배양되는 모든 난자에서 발생한다는 것을 알 수 있었고, 난구세포가 투명대 경화현상을 억제시키는 작용이 있다는 것을 알 수 있었다.

#### V. 인용문헌

1. Baranska, W., M. Konwinski and M. Kujawa. 1975. Fine structure of the zona pellucida of unfertilized egg cells and embryos. J. Exp. Zool., 192: 193-202.
2. Barros, C. and R. Yanagimachi. 1971. Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. Nature(London), 233: 268-269.
3. Barros, C. and R. Yanagimachi. 1972. Polyspermy preventing mechanism in golden hamster eggs. J. Exp. Zool., 180: 544-545.
4. Bleil, J. D., C. Beall and P.M. Wassarman. 1981. Mammalian sperm-egg interaction : fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. Devl. Biol., 86: 189-197.
5. Chang, M. and D.M. Hunt. 1956. Effects of proteolytic enzymes on the zona pellucida of fertilization and unfertilization mammalian eggs. Exp. Cell Res., 11 : 497-499.
6. Conrad, K., J. Buckley and R. Stambaugh. 1971. Studies on the nature of the block to polyspermy in rabbit ova. J. Reprod. Fertil., 27:133-135.
7. DeFelici, M. and G. Siracusa. 1982. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. Gamete Res., 6:107-113.
8. DeFelici, M., A. Salustri and G. Siracusa. 1985. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture : II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. Gamete Res., 12:227-235.
9. Downs, S.M., A.C. Schroeder and J.J. Eppig. 1986. Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro* by preventing hardening of the zona pellucida.

- Gamete Res., 15:115-122.
10. Drobnis, E.Z, J.B. Andrew, and D.F. Katz. 1988. Biophysical Properties of the Zona pellucida measured by Capillary Suction: Is zona hardening a mechanical Phenomenon? J. Exp. Zool., :245-219.
  11. Foerder, C.A. and B.M. Shapiro. 1977. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine cross-links. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74 : 4214-4218
  12. Gianfortoni, J.G. and B.J. Gulyas. 1985. The effects of short-term incubation(aging) of mouse oocytes on *in vitro* fertilization, zona solubility, and embryonic development. Gamete Research, 11: 59-68.
  13. Gulyas, B.J. and E.D. Schmell. 1980. Ovoperoxidase activity in ionophore Treated mouse eggs: I. Electron microscopic localization. Gamete Research., 3: 267-277.
  14. Gulyas, B.J. and L.C. Yuan. 1985. Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. J. Exp. Zool., 233:269-276.
  15. Gwatkin, R.B.L. 1964. Effect of enzymes and acidity on the zona pellucida of the mouse egg before and after fertilization J. Reprod. Fert., 7: 99-105.
  16. Gwatkin, R.B.L., D.T. Williams, J.F. Hartmann and M. Kniazuk. 1973. The zona reaction of hamster and mouse eggs: production *in vitro* by a trypsin-like protease from cortical granules. J. Reprod. Fert., 32: 59-265
  17. Inoue, M. and D. P. Wolf. 1974. Comparative solubility properties of the zona pellucida of unfertilized and fertilized mouse ova. Biol. Reprod., 11: 558-565.
  18. Inoue, M. and D.P. Wolf. 1974. Solubility properties of the murine zona pellucida. Biol. Reprod., 10: 512-518.
  19. Inoue, M. and D.P. Wolf. 1975b. Sperm binding characteristics of the murine zona pellucida. Biol. Reprod., 13: 340-346.
  20. Inoue, M. and D.P. Wolf. 1975a. Comparative solubility properties of rat and hamster zonae pellucidae. Biol. Reprod., 12: 535-540.
  21. Katska, L, P. Kauffold, Z. Smorag, U. Duschinski, H. Torner and W. Kanitz. 1989. Influence of hardening of the zona pellucida on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. Theriogenology, 32:767-777.
  22. Klebanoff, S.J., C.A. Foerder, E.M. Eddy and B.M. Shapiro. 1979. Metabolic similarities between fertilization and phagocytosis. J. Exp. Zool., 14:515-574.
  23. Klebanoff, S.J., C.A. Foerder, E.M. Eddy and B.M. Shapiro. 1979. Metabolic similarities between fertilization and phagocytosis. J. Exp. Med., 149:938-953.
  24. Krzanowska, H. 1972. Rapidity of removal *in vitro* of the cumulus oophorus and the zona pellucida in different strains of mice. J. Reprod. Fert., 31:7-14.
  25. Longo, F.J. 1980. Aging of Mouse Eggs In Vivo and In Vitro. Gamete Research., 3: 379-393.
  26. Longo, F.J. 1981. Changes in the Zonae Pellucidae and Plasmalemmae of Aging Mouse Eggs. Biol. Reprod., 25: 399-411.
  27. Schmell, E.D. and B.J. Gulyas. 1980. Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. : I. Electron microscopic localization. Gamete Research, 3: 267-277.
  28. Schmell, E. D. and B. J. Gulyas. 1980. Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence of the enzyme's role in hardening the zona pellucida. Gamete Research., 3:279-290.
  29. Shabanowitz, R.B. and M. G. O'Rand. 1988. Characterization of the human zona pellucida from Fertilized and Unfertilized Eggs.



- J. Reprod. Fert., 82: 151-161.
30. Smithberg, M. 1953. The effect of different proteolytic enzymes on the zona pellucida of mouse ova. Anat. Rec., 117: 554-555.
  31. Wolf, D.P. and M. Inoue. 1976. Sperm concentration dependency in the fertilization and zonae sperm binding properties of mouse eggs inseminated *in vitro*. J. Exp. Zool. 196: 27-37.
  32. 이상진. 1991. 생쥐 난자의 핵성숙과 투명대 경화가 체외수정과 배발생에 미치는 영향. 건국대학교 대학원 박사학위 청구논문., pp 1-170.