

동결·융해시킨 햄스터 난자에서 정자침입의 지연

김청미*·백재승*·이상호
고려대학교 응용동물과학과

Delayed Sperm Penetration into Frozen-Thawed Zona-Free Hamster Oocytes

C. M. Kim, J. S. Paik* and S. H. Lee

Dept. of Animal Science, Korea University

SUMMARY

Frozen storage of the oocytes has been used in a few mammalian species including mouse, hamster, human and cattle. However, frozen-thawed oocytes show different sperm penetration on the levels of the zona pellucida and the plasma membrane when compared with fresh oocytes. To elucidate biological changes occurring during freezing and thawing, we examined the kinetics of sperm penetration into frozen-thawed hamster oocytes. Oocytes obtained from superovulated female golden hamsters were frozen-thawed in an autofreezer according to an established method. Fresh and frozen-thawed oocytes were fertilized *in vitro* with capacitated hamster spermatozoa after removing the zona pellucida. The oocytes were examined at 1, 2, 3 and 6 h postinsemination. Sperm penetration found to be 1 h delayed in frozen-thawed oocytes. Other parameters such as degree of polyspermy and decondensing sperm heads were not affected by freezing and thawing. The results suggest that freezing and thawing may cause changes in the egg membrane surface and subsequently which leads to delay in the sperm-egg fusion.

서론

투명대 제거 난자는 Yanagimachi 등(1976)이 햄스터에서 이용한 이래, 보편적으로 사용하게 되었다(Quinn 등, 1982). 인간 정자의 수정능 검증의 한 방법으로 투명대를 제거한 햄스터 난자를 이용하는 정자침투검사(sperm penetration assay; SPA)가 현재 널리 쓰이고 있다. 한편, 최근에는 햄스터를 포함한 몇몇 동물종의 난자 동결 방법이 확립되어 이를 SPA에 사용한 예가 보고되었다(Quinn 등, 1982). 그러나 동결보존난자 사용시 편의성이란 장

점이외에 몇가지 문제점이 발견되었다. 햄스터의 경우 동결·융해후 정자 침투율이 매우 낮은 것으로 보고되어 있다(Tobback 등, 1991). 비록 그 원인은 잘 알려져 있지 않으나 동결·융해시 일어나는 난자 표면의 물리·화학적 손상에 기인하는 것으로 추정할 뿐이다. 본 실험은 동결·융해한 햄스터 난자와 신선한 햄스터 난자를 각각 동종의 정자와 수정시켜 햄스터 난자내로의 정자 침입 및 정자두부의 팽화 정도에 의해 동결·융해후 햄스터 난자에서 일어나는 생물학적 기능 변화를 구명하고자 실시하였다. 또한 동결·융해한 햄스터 난자의 정자 침입속도 및 정자두부 팽화 지연 정도 등을 검토

* 서울대학교 병원 비뇨기과(Department of Urology, Hospital of Seoul National University)

하고 난자가 동결·융해 중 손상받는 난자부위의 국지화를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 난자의 준비

과배란을 유도하기 위해 6~8주령의 자성 골든 햄스터에 25IU의 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin(PMSG)를 복강 주사한 후 52~54시간 후 25IU의 hCG(human Chorionic Gonadotropin, Lucky Pharmaceutical Div)를 투여하여 과배란을 유도시켰다. hCG를 투여후 16시간에 햄스터를 희생시켰으며, 분리된 난관 팽대부로부터 난자괴를 150IU hyaluronidase에 5분 처리하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포제거 난자는 0.3%의 BSA(Bovine Serum Albumin, crystalline, Sigma, U. S. A.)가 함유되어 있는 PB1+BSA에 3회 정도 세정하여 본 실험에 이용하였다.

2. 난자의 동결 및 융해

난자의 동결은 PB1+BSA에 1.5M 1,2-propanediol과 0.1M sucrose가 포함된 보존액을 사용하였다. 준비된 배란 난자를 동결 보존액에 옮겨 15분간 평형시키고 0.5ml plastic straw에 20~30개의 난자를 옮긴 후 straw powder로 봉하여 자동 세포동결기(CryoLogic 863, Australia)에 옮겨 동결시켰다. 동결 과정은 18℃로 부터 -7℃까지는 1℃/min의 속도로 하강시킨 후, 식빙하여 10분간 정체시키고, -30℃까지 0.3℃/min의 비율로 냉각시켜 -196℃인 액체 질소로 옮겨 보존하였다. 일정기간 보존후 실험에 이용할 난자 준비를 위해, straw는 상온에서 20초 동안 노출시킨 후, 30~33℃ 온수에서 10초간 얼음결정이 사라질때까지 융해시켰다. 융해된 straw 내용물을 0.4M sucrose의 PB1+BSA용액에 옮겨 8분간 노출시켜 동해 방지제를 제거한 다음 PB1+BSA에 수회 세정하였다. 세정한 난자는 acid Tyrode's solution에서 투명대를 제거시키고 형태학적으로 정상적인 것만 수정에 사용하였다. 투명대가 온전한 난자의 수정에는 직접 1.5% BSA가 함유된 mTALP(mTALP+BSA)용액에 세정 후 이용하였다.

3. 체외 수정

정자 준비를 위해 7~8주령 음성 골든 햄스터를 희생시킨 후 정소상체를 분리하여 mTALP+BSA에 3.5~5시간 직출시켜서 수정능 획득을 유기한 후 난자를 첨가하여 CO₂ 배양기에서 체외수정을 실시하였다. 정자 침입 분석을 위해 투명대 제거 난자는 1, 2, 3, 6시간 후에 관찰하였고 투명대가 온전한 난자의 체외수정 결과는 2, 4, 6시간 후에 분석하였다.

4. 정자침입 속도 및 정자두부 팽화의 분석

체외수정후 앞서 기술한 적정시간별로 배양된 난자는 3.5% formalin용액에 1~2분 정도 고정시킨 후, 배양액으로 수회 세정하여 부착 정자들을 완전하게 제거시키고 glass slide 위 네 귀퉁이에 vaselin : wax 혼합물로 지지대를 만든 후 난자를 이미 보고된 급속 염색법을 이용하여 염색하였다(Byun 등, 1991).

5. 형광 염색법

투명대 온전 난자는 수정한 후 1시간 뒤 *Ulex europaeus*(UEA I) lectin이 접합된 fluorescein-isothiocyanate(FITC)로 표식하였다. 이러한 FITC-UEA I (200µg/ml)은 4mg/ml가 되게 PBS+BSA로 희석하여 천천히 혼합한 다음 원심분리한 상층액으로 plastic petridish위에 10µl drop을 만든 후 난자를 첨가하여 37℃ 배양기에 2시간 동안 빛이 차단된 곳에서 보관하였다. 정자의 운동성을 감소시키기 위해 4℃ 냉장고에 보관하였다. 이어서 PBS+BSA용액에서 총 20분 동안 3회 난자를 세정한 다음 glass slide위에 vaselin + wax혼합물로 지지대를 만든 후 난자를 올려 놓고 관찰하였다.

결 과

미수정란의 동결 보존은 초기배의 경우에 비해 그 연구 보고 및 이용 등이 햄스터를 비롯한 극히 몇몇 종에 제한되어 있는 실정이다. 이에 대한 이유 중 하나는 동결·융해 과정중 발생하는 세포 손상에 미수정란이 보다 민감하게 반응하기 때문일 것으로 추정된다.

동결·융해 중에 일어나는 난자의 변화와 이에 따른 생물학적 기능 변화를 구명하기 위하여, 햄스터 난자를 체외수정하여 우선 난자에서 변화가 일어나는 부위 및 변화 유발요인 등을 막성 구조물인 투명대, 세포막 및 세포질의 변화 등에 비추어 검토하였다.

신선난자(UF)와 동결·융해 난자(FT)를 수정능 획득 유기시킨 햄스터 정자로 체외 수정시킨 후 각각 1, 2, 3, 6시간 경과에 따라 분석한 결과를 보면 수정 1시간에 UF의 경우 51%의 난자가 정자침입을 받은 것에 비하여 FT의 경우 정자 침입을 받은 난자는 발견되지 않았다(Table 1). 정자 침입율이 FT의 경우 2~3h 사이에 31%에서 61%로 증가되는 것으로 보아 FT난자의 경우 UF난자에 비하여 약 1~1.5시간 정자 침입의 지연이 일어나는 것으로

추정된다. 그러나 그 이후의 정자침입율 및 정자팽화는 신선 난자와 동결·융해 난자 사이에 차이가 없었다.

정자두부의 팽화 단계를 위상차 현미경으로 관찰한 결과(Fig. 1)를 바탕으로 UF에서는 초기 팽화단계(E), 중간 팽화단계(M), 완전히 팽화한 두부단계(F)의 비율은 1시간 후 각각 51, 15, 34%로 E가 가장 높았으나 6시간 후에는 M, F의 비율이 각각 18, 43%로 증가한 반면 E는 39%로 점차 감소함을 알 수 있었다. 반면에 FT에서는 1시간 후 정자가 침투하지 못하였으나 2시간 후에는 M, F의 비율이 6%, 29%로서 E(65%)보다 훨씬 낮지만 3~6시간 후에는 UF 난자의 6시간 후 보여지는 M, F의 61%와 유사한 결과인 65%비율을 나타내었다(Table 2).

Table 1. The time-course analysis of sperm penetration at various postinsemination stages of *in vitro* fertilization in frozen-thaw(FT) zona-free hamster oocytes

Treat- ments	Hours postinsemination(No. of experiments)	No. of oocytes	Total No. of spermatozoa penetrated	No. of penetrated oocytes(%)	No. of polyspermic oocytes(%)	No. of oocytes with the following No. of sperm head(%)				
						1	2~4	5~7	8~10	≥ 11
UF	1(6)	107	156	53(51)	31(29)	22(41)	21(40)	7(13)	2(4)	1(2)
	2(4)	62	103	31(50)	11(35)	20(65)	6(19)	0(0)	0(0)	5(16)
	3(3)	63	453	47(75)	41(65)	6(13)	14(30)	6(13)	5(10)	16(34)
	6(3)	46	509	45(98)	44(98)	1(2)	2(4)	8(18)	11(25)	23(51)
FT	1(4)	19	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	2(5)	26	31	8(31)	5(19)	3(38)	1(12)	4(50)	0(0)	0(0)
	3(4)	31	181	19(61)	16(52)	3(16)	5(26)	1(5)	0(0)	10(53)
	6(3)	20	147	18(90)	17(85)	1(5)	3(17)	4(22)	5(28)	5(28)

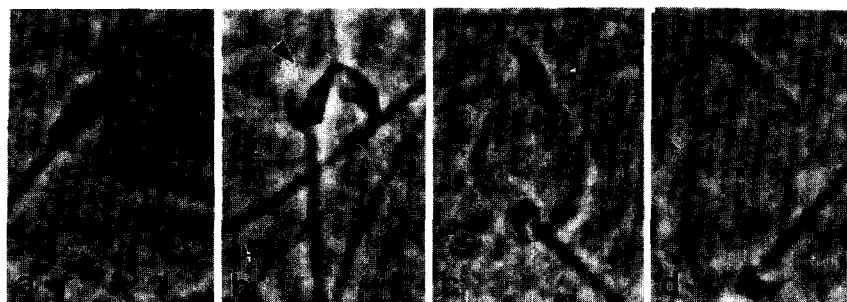


Fig. 1. Stages of sperm decondensation. Photographs of intact(a), early-decondensed(b), mid-decondensed(c) and fully-decondensed(d) sperm heads(X1,000).

Table 2. The time-course analysis of sperm decondensation(SDC) at various postinsemination stages of *in vitro* fertilization in fresh (UF) and frozen-thaw(FT) zona-free hamster oocytes.

Treatment	Hours postinsemination (No. of experiments)	No. of the oocytes used	No. of spermatozoa penetrated	No. of SDC at the following stages(%)*		
				E	M	F
UF	1(6)	107	156	80(51)	23(15)	53(34)
	2(4)	62	103	44(43)	9(9)	50(49)
	3(3)	63	453	196(43)	96(21)	161(36)
	6(3)	46	509	196(39)	93(18)	220(43)
FT	1(4)	19	0	0(0)	0(0)	0(0)
	2(5)	26	31	20(65)	2(6)	9(29)
	3(4)	31	181	63(35)	52(29)	66(36)
	6(3)	20	147	52(35)	29(20)	66(45)

* Stages of SDC were arbitrarily defined as early(E), mid(M), and fully(F) decondensed sperm heads found in the oocyte cytoplasm.

투명대가 부착된 난자를 2, 4, 6시간 수정시킨 후 급속 염색을 실시하여 난자의 염색체 활성화와 정

자두부 팽화 정도를 비교 관찰하였다(Fig. 2). 신선 난자의 염색체 활성화 과정은 말기(telophase), 제

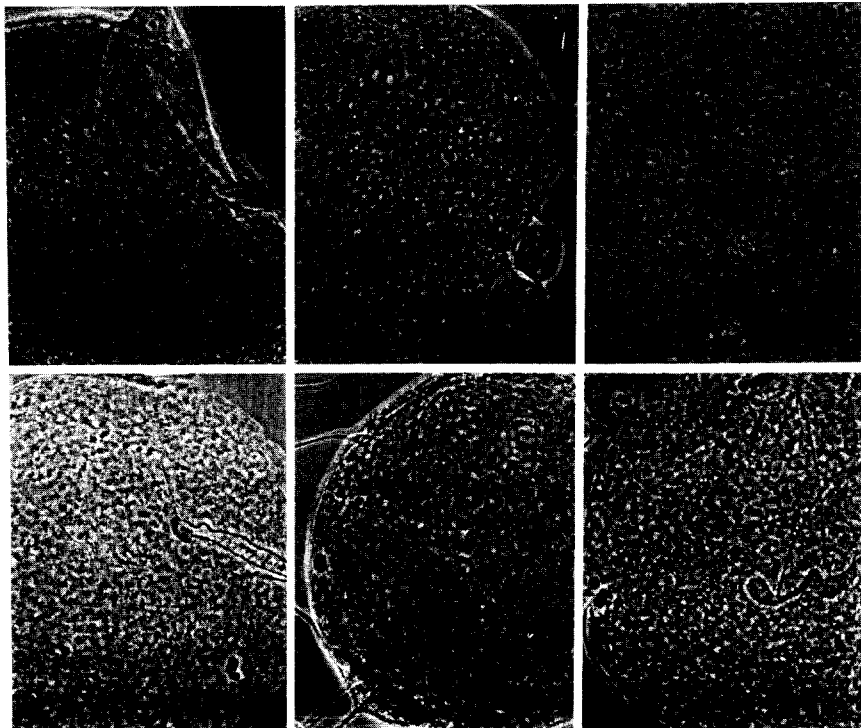


Fig. 2. Analysis of chromosome activation in oocytes by the rapid staining method. Telo formation at 2h(a), PN formation at 4h(b), and PN formation at 6h(c) postinseminations in fresh oocytes. Abnormal chromosomes(d), telo formation at 4h(e) and PN formation at 6h(f) postinseminations in frozen-thawed oocytes(X400).

2극체(2nd PB), 전핵(pronuclei)형성으로 정상적인 발달을 보여 주고 있는 반면 동결·융해 난자에서는 염색체의 응축 및 다정자 침입 등 비정상적인 발달을 볼 수 있었다. 즉, 동결·융해 난자의 2시간 후 수정율(83%)은 신선난자에 비해 12% 정도 낮으나 6시간 후에는 같은 비율을 나타내며(Fig. 3a), 시간 별로 유의하게 다정자침입율이 각각 88, 86, 100%로 높았다(Fig. 3b). 또한 6시간 후 동결·융해 난자의 제 2극체 및 전핵 형성율(23%)은 신선난자의 2시간 후인 28%와 유사하였다(Fig. 3c). 투명대 제거한 난자에서 정자두부 팽화 정도가 3~6시간 후 신선난자와 동결·융해 난자에서 유사한 비율로 나타난 것에 비해 투명대 완전한 난자에서는 팽화율이 시간이 경과함에 따라서도 동결·융해 난

자는 각각 7, 71, 61%로 신선난자에 비해 낮았다(Fig. 3d). 수정시에는 정자와 난자 융합으로 표층립 방출이 일어나고 표층립 삼출물의 구성성분과 투명대 당단백질 사이의 상호작용으로 투명대 반응을 유기하여 더 이상의 정자침입을 방어한다. 난자의 활성화 후 표층립의 기원인 퓨코실 분자에 UEA I lectin을 표시한 후 적도면에 초점을 맞추어 형광 현미경으로 관찰한 결과 표층립 방출이 뚜렷하게 나타남을 보았으며(Fig. 4a) 원형질 표면위에 초점을 맞추어 무수히 많은 작은 형광들이 점으로 나타나는 것으로 보아 표층립 방출을 확인할 수 있었다(Fig. 4b). 그러나 동결·융해 난자에서는 정자와 융합하였음에도 불구하고 FITC-UEA I 으로 관찰한 결과 표층립 방출은 일어나지 않았다(Fig. 5).

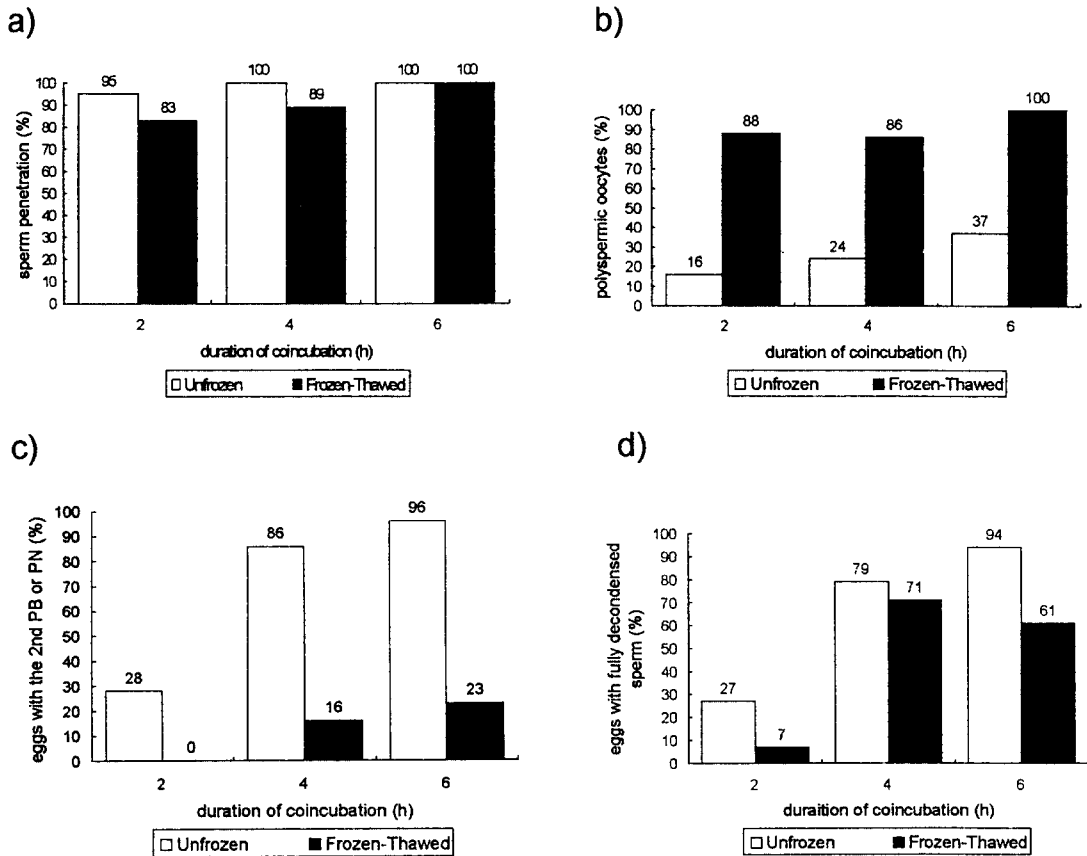


Fig. 3. Analyses of oocyte chromosome activation and sperm head decondensation during fertilization. Rates of sperm penetration(a), polyspermy(b). Percentages of oocytes with the 2nd PB or PN(c) and with fully decondensed sperm head or PN(d).

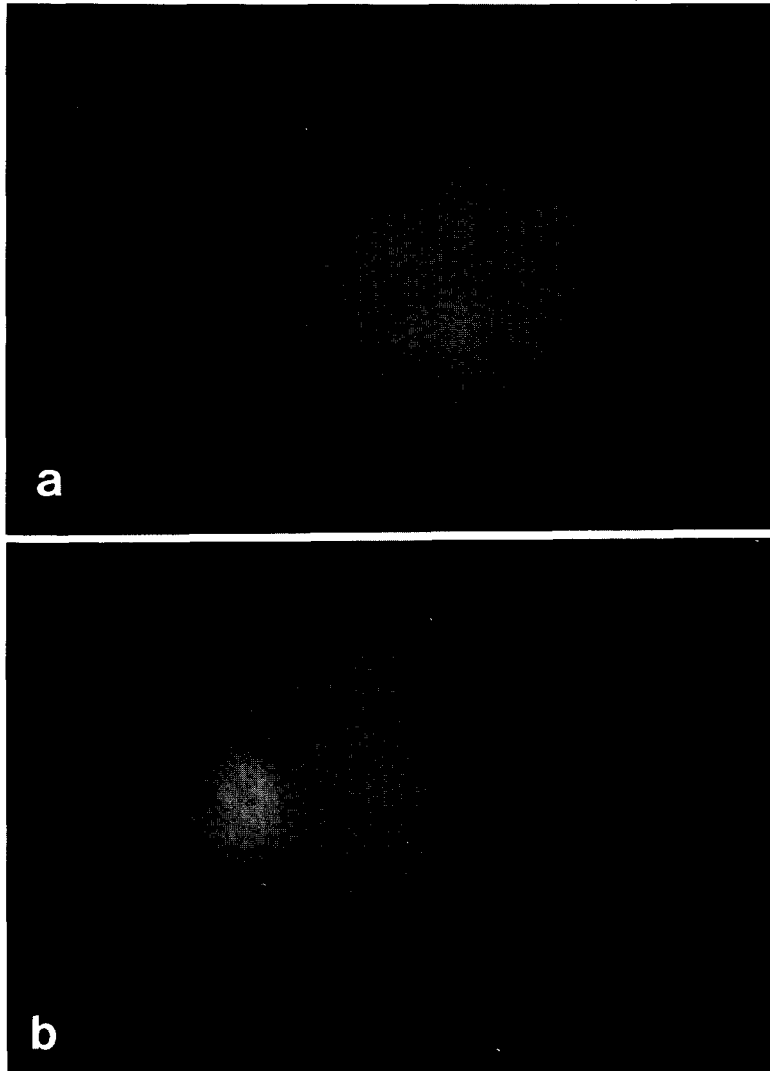


Fig. 4. Analysis of cortical granule release from the oocyte by the FITC-UEA I staining at 1h postinsemination. The equatorial section with uniform distribution of fluorescence(a) and the membrane surface showing discrete spots($\times 400$).

고 찰

인간 정자를 인간의 난자와 수정시켜 정자의 수정능력을 검사하는 것이 정확도가 더 높을 것이지만 대부분의 병원, 실험실에서는 용이하게 이용할 수 없고 비윤리적인 문제때문에 투명대를 제거한 햄스터 난자를 사용하였다. Yanagimachi 등(1976)

은 다양한 동물 가운데서 난자·정자의 상호작용을 연구하는 동안 초기에는 인간 정자가 투명대 제거한 햄스터 난자를 침투할 수 없었지만 체외에서 몇 시간 incubation하였을 때는 침투할 수 있는 능력을 획득하는 것을 발견하였다. 최근에는 투명대 제거한 햄스터 난자를 인간정자의 수정능력 여부를 예비 평가하는데 인간의 난자 대신 사용하게 되었다. 또한 신선한 햄스터 난자를 이용시 불편한 점을

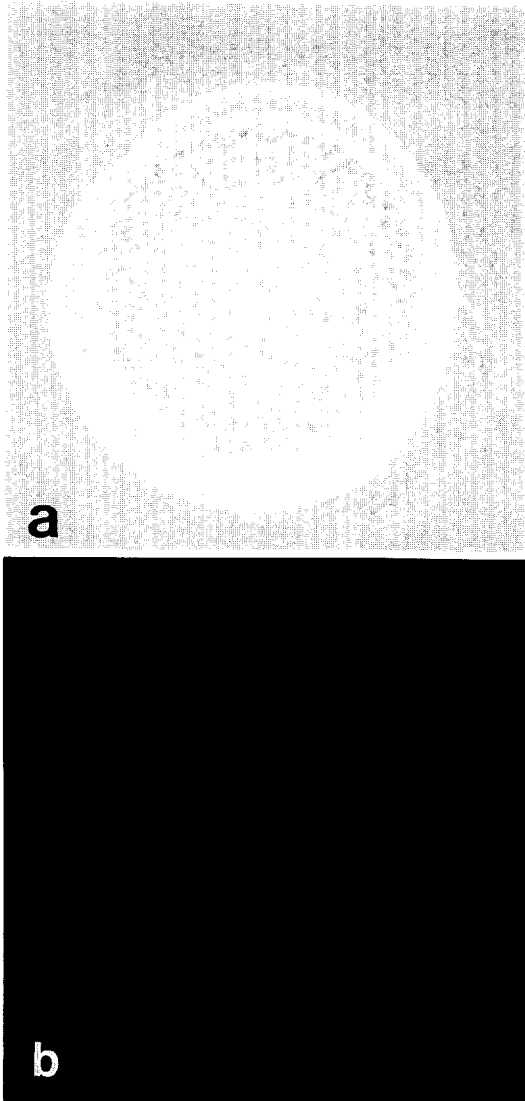


Fig. 5. A typical binding pattern of FITC-UEA I in frozen-thawed oocyte at 1h postinsemination under a bright(a) and a fluorescence (b) microscopes(X400).

극복하기 위하여 반영구적 보존이 가능한 동결법으로 햄스터 난자를 일시에 동결해 두었다가 편리한 시간대에 검사할 수 있도록 하였다. 본 연구에서는 인간 정자를 검사하기에 앞서 동결·융해한 햄스터 난자와 신선한 햄스터 난자를 각각 동종의 정자와 수정시켜 햄스터 난자내에서 진행되는 상태를 관찰

하여 보았다.

동결 융해된 투명대 제거 난자에서는 정자 침투가 느리거나 일어나지 않는 것으로 보아 정자·난자의 융합이 지연됨을 관찰하였다. 본 실험 및 대부분의 다른 연구 보고(Wood 등, 1992)의 최종 분석 시간이 6시간 수정의 경우 두 난자구 사이에 차이는 발견되지 않고 있어(98% 대 90%) 난자 세포막의 정자 수용성의 변화가 매우 미묘하여 이 같은 kinetics 연구가 아니면 발견될 수 없는 것으로 보인다. 특이한 것은 다정자 침입에 있어서도 난자당 8정자 이상이 침입한 난자의 비율도 6시간 수정의 경우 UF와 FT가 각각 76%, 56%로 신선 난자가 매우 높아 이는 난자 세포막의 동결 중 정자침입 지연을 일으키는 변화가 야기됨을 암시해 주는 또 다른 결과라 할 수 있다.

수정 중에는 정자·난자 융합으로 표층립이 방출되어 표층립 삼출물의 구성성분과 투명대 당단백질 사이의 상호작용으로 투명대 반응이 야기되어 더 이상의 정자가 침투하지 못하게 된다. 이러한 정상적인 수정 현상이 동결·융해 난자에서도 일어나는지 투명대 완전한 난자를 가지고 염색체 활성화와 수정율, 표층립 방출 등을 비교 관찰하였다. 먼저 급속 염색법을 실시하여 동결·융해 난자의 염색체 활성화와 정자 두부 팽화율을 검토한 바 신선난자에 비해 지연되고 비정상적인 염색체의 응축 및 다정자 침입 등을 관찰하였다. 또한 FITC-UEA I으로 표식한 동결·융해된 난자는 정자와 완전히 융합되더라도 표층립 방출이 없거나 부분적으로 일어나는 것으로 미루어 난자의 원형질막과 정자 두부의 팽화, 염색체 활성화, 표층립 방출 등을 유도하는 세포질 구성성분 등이 동결·융해 과정 중 손상을 받는 것으로 사료된다.

수정중의 투명대 변화는 정상난자에서는 방출된 표층립의 매개로 이루어지나 동결·융해 난자에서는 표층립의 방출이 미약하여 투명대 변화가 표층립이 아닌 다른 자극에 의해 일어나는 것으로 추측된다. 이에 대해 Wood 등(1992)은 동결 난자에서 투명대 구성성분인 당단백질 분자가 동결액 중 염농도의 증가와 pH의 변화에 의한 탈수화에 기인하는 물리·화학적 변화가 일어날 것이라고 보고하였다. 그리고 동결·융해 난자의 투명대에 어떤 정자

가 침투하더라도 완전한 수정이 일어나지 않는데 이는 아마도 부분적으로 경화된 투명대가 정자의 에너지 저장고를 고갈시키거나 정자 두부와의 결합 부위의 변화를 유발하기 때문일 것으로 사료된다.

적 요

난자의 동결보존은 생쥐, 햄스터, 인간, 소 등의 포유동물에서 이용되어져 왔다. 그러나, 동결·융해된 난자를 투명대와 원형질막 수준에서 신선난자와 비교하였을 때 정자침투율에서 차이를 보여 준다. 동결·융해 과정동안 일어나는 생물학적인 변화들을 알아보기 위해 동결·융해된 햄스터 난자에서 경시적으로 정자 침투율을 조사하였다. 과배란 유기된 자성 햄스터에서 난자를 회수한 후 확립된 방법에 따라 자동동결기를 사용하여 동결·융해하였다. 신선난자와 동결·융해된 난자에서 투명대를 제거한 후 수정능 유기된 햄스터 정자와 체외수정을 유도하였다. 체외수정 후 1, 2, 3, 6시간 후에 난자를 조사한 결과 동결·융해된 난자에서 정자 침투율이 1시간 정도 지연된다는 것이 밝혀졌다. 다정자 침투율과 정자 두부의 팽화 정도는 조사결과 동결·융해 처리에 의해 영향 받지 않는 것으로 나타났다.

본 실험결과에 의하면 동결·융해 처리는 난자의 원형질막에 미세한 변화를 일으켜서 정자와 난자의 융합을 지연시키는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Barros C, Jedlicki A and Vigil P. 1988. The gamete membrane fusion test to assay the fertilizing ability of human spermatozoa. *Human Reprod.*, 3:637-644.
- Bronson RA and Rogers BJ. 1988. Pitfalls of the zona-free hamster egg penetration test : protein source as a major variable. *Fertil. Steril.*, 50:851-854.
- Choi SC, Yoo HJ and Lee SH. 1994. Analysis of cortical granule exocytosis and pronucleus formation in bovine oocyte upon exposure to Ca^{2+} ionophore A23187 and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Korean J. Anim. Sci.*, 36(2):144-153.
- Diedrich K, Al-hasani S, Van der ven H and Krebs D. 1988. Successful *in vitro* fertilization of frozen-thawed rabbit and human oocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 541:562-570.
- Gould JE, Overstreet JW, Yanagimachi H, Yanagimachi R, Katz DF and Hanson FW. 1983. What functions of the sperm cell are measured by *in vitro* fertilization of zona-free hamster eggs? *Fertil. Steril.*, 40:344-352.
- Quinn P, Barros C and Whittingham DG. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66:161-168.
- Tobback C, Hough S and Foote RH. 1991. A procedure for cryopreservation of hamster oocytes yielding highly conserved oocytes suitable for sperm penetration tests. *Fertil. Steril.*, 55:184-188.
- Wood MJ, Whittingham DG and Lee SH. 1992. Fertilization failure of frozen mouse oocytes is not due to premature cortical granule release. *Biol Reprod.*, 46:1187-1195.
- Yanagimachi R, Yanagimachi H and Rogers BJ. 1976. The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod.*, 15:471-476.
- 김재명, 서명희, 이세현, 유승환, 정길생. 1991. 햄스터 난자의 동결보존과 그의 임상적 이용에 관한 연구. *대한불임학회지*, 18:81-87.
- 정구민, 방명길, 김석현, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석. 1992. 투명대 존재/부재 햄스터 난자의 동결보존:1-단계 평형과 2-단계 융해의 효과. *대한불임학회지*, 19:143-152.