

마우스 난모세포에 사람정자 추출물의 주입이 단위발생에 미치는 영향

전은숙 · 이종인* · 오종훈** · 박창식

충남대학교 동물자원학부

Effect of Parthenogenesis of Mouse Oocyte following Intracytoplasmic Injection with Human Sperm Extract

Jeon, E. S., J. I. Lee*, J. H. Oh** and C. S. Park

Division of Animal Science and Resources,
Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of intracytoplasmic injection of Ca^{2+} and human sperm extract on the parthenogenetic activation of mouse oocytes. The results obtained were as follows :

1. The mouse oocytes were injected with 10 μ l of PBS medium containing 0, 1.7 and 5 mM calcium concentrations, respectively. Activation rate of the oocytes with formation of pronuclei and extrusion of the second polar bodies was 14.5, 9.8 and 14.9% at the above calcium concentrations, respectively. There were no significant differences in the activation rates among the calcium concentrations.
2. The mouse oocytes were injected with 10 μ l of non-heated human sperm extract, and cultured for 12~15 h in the PBS media with the 0, 1.7 and 5 mM calcium concentrations, respectively. Activation rate(51.8%) of the oocytes at the 1.7 mM calcium concentration was significantly higher than those at the 0 and 5 mM calcium concentrations.
3. The mouse oocytes were injected with 10 μ l of heated human sperm extract, and cultured for 12~15 h in the PBS media with the 0, 1.7 and 5 mM calcium concentrations, respectively. No significant differences were found in the activation rates (11.8~17.0%) among the calcium concentrations.
4. The mouse oocytes were injected with 10 μ l of PBS medium, non-heated sperm extract and heated sperm extract, and cultured for 12~15 h in the PBS media with 1.7 mM calcium concentrations, respectively. Activation rate(54.5%) of the oocytes injected with the non-heated sperm extract was highest. There were significant differences in the activation rates among the above injection materials ($P < 0.05$).
5. The mouse oocytes were injected with 10 μ l of 1 and 6 days old non-heated sperm extracts,

* 신아 불임 클리닉(Shin-A Infertility Clinic, Taejon, Korea).

** 세브란스 불임 클리닉(Severance Infertility Clinic, Seoul, Korea).

and cultured for 12~15 h in the PBS media with 1.7 mM calcium concentrations, respectively. Activation rate(60.0%) of the oocytes injected with 1 days old sperm extract was significantly higher than that (11.1%) injected with 6 days old sperm extract.

The results obtained in this study suggest that non-heated human sperm extract may contain sperm-associated oocyte-activating factor such as oscillin.

(Key words : Parthenogenesis, Sperm extract, Activation, Oscillin)

I. 서 론

난모세포의 세포질내 정자 주입이 성공한 예는 토끼(Hosoi 등, 1988), 소(Goto 등, 1990) 그리고 마우스(Kimura와 Yanagimachi, 1995) 등에서 보고 되었다. 임상적으로 이 방법은 여성 요인에 의한 불임 치료에 사용되어 왔다(Palermo 등, 1992, 1996 ; Van Steirteghem 등, 1993, 1996).

그러나 세포질내 정자 주입에 의한 난모세포의 활성화에 관한 확실한 기전은 아직도 밝혀져 있지 않다(Edwards와 Van Steirteghem, 1993). 수정과정중 단지 수정능을 획득한 정자만이 배란된 난모세포에 침투할 수 있고, 이 여성배우자와 자성배우자의 결합후 나타나는 일련의 현상을 난모세포의 활성화라 한다.

난모세포 활성화는 수정과 더불어 감수분열의 재개로 나타나며, 가장 현저한 형태적 변화는 전핵의 형성, 제2극체의 방출, 표층과립의 방출, 증가된 대사 작용, 세포골격의 재형성, 그리고 난할이다(Albertini, 1987, 1992 ; Stice와 Robl, 1990 ; Yanagimachi, 1994 ; Van Blerkom 등, 1995).

이러한 변화가 유도되어지는 기전에 대하여 광범위한 연구는 이루어지지 않았지만, Steinhardt 등(1974), Fulton과 Whittingham(1978), 그리고 Kaufman(1983)은 포유동물의 난모세포 활성화는 세포질내 칼슘농도를 증가시킴으로 유도할 수 있다고 하였다. 또한, Cuthbertson과 Cobbold(1985) 그리고 Igusa와 Miyazaki(1986)는 마우스와 햄스터의 난모세포에서 수정후 수시간 동안 세포내 칼슘농도가 일시적으로 증가한다고 보고하여, 난모세포의 활성화에 칼슘의 역할을 강조하였다.

Gearon 등(1995)은 칼슘농도가 1.78 mM인 배지와 칼슘이 포함되지 않은 배지에서 사람 난모세포에 생존능력이 없는 정자를 주입한 결과, 두 처리간 난모

세포 활성화에는 차이가 없었으나 1.78 mM의 칼슘농도를 가진 배지에서 주입된 정자만이 정상적인 수정이 이루어졌다고 하였다.

최근 포유동물의 난모세포 활성화는 G-protein과 phosphoinositide의 대사물질이 세포내 칼슘농도를 증가시킴으로써 개시될 수 있다고 보고하였다(Mac-haty 등, 1995). Miyazaki(1988), 그리고 Fissore와 Robl(1994)은 inositol 1,4,5-triphosphate를 햄스터의 난모세포에 미량주입하였을 때 칼슘농도의 일시적인 증가를 야기시키며, 가수분해 저항성 유사체인 GTP, GTP-r-S를 난모세포에 주입하는 경우도 칼슘농도의 일시적인 증가를 유도한다고 보고하였다. 그러나 G-protein 활성 억제제인 GDP-β-S의 주입은 정자에 의해서 유도되는 칼슘농도의 일시적인 증가를 차단한다고 보고하였다.

Perreault와 Zirkin(1982), Lanzendorf 등(1988), 그리고 Edwards와 Van Steirteghem(1993)은 난모세포를 일시적으로 높은 세포밖 칼슘농도에 노출시키면 기계적 단위발생을 유도할 수 있다고 하였다.

최근 Tesarik 등(1994), 그리고 Parrington 등(1996)은 난모세포에서 칼슘농도를 증가시키는 것은 수용성 정자 단백질, 즉 oscillin이라고 하였다.

그러나 아직까지 난모세포 활성화에 대한 적정 칼슘농도와 수용성 정자 단백질과의 관계는 구명되지 않았다. 따라서 본 연구는 서로 다른 칼슘농도와 사람정자 추출물이 마우스 난모세포의 활성화에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 과배란 유기 및 난모세포의 회수

공시 동물로는 생후 5~6주령된 ICR계통의 암컷 마우스를 사용하였으며, PMSG (pregnent mare's

serum gonadotropin ; Intervet, U.S.A) 7.5 IU를 복강주사한 다음, 45~48시간 후에 hCG (human chorionic gonadotropin ; Sernono, U.S.A) 7.5 IU를 주사하였다. hCG 주사후, 8~12시간 내에 M2 배지(Fulton과 Whittingham; 1978) 내에서 적출한 난소를 천자하여 난모세포를 회수하고, 회수된 난모세포는 배지내에서 여러번 세척하였다.

난모세포는 37℃, 5% CO₂, 95% 공기 조건으로 M2배지에서 4시간 배양한 다음, 1mg/ml hyaluronidase에 2분내로 침지시켜 150 μm fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하고 D-PBS 배지 30 μl에 mineral oil (Sigma, U.S.A)을 피복하여 well당 5~10개의 성숙 난모세포를 넣었으며, 제1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것을 공시 난모세포로 사용하였다.

2. 정자 추출물의 준비

1) 신선 및 노화정자 추출물의 준비

신선정자 추출물은 정상적인 정자 운동성과 모양을 지닌 정액 표본 3 ml을 15 ml 시험관에 넣어 PBS (Gibco, U.S.A)와 1:3의 비율로 혼합하여 1,500 rpm으로 10분동안 원심분리한 후 침전된 정자 침전물을 남기고 상층액만 제거하는 세척 과정을 2번 반복하였다. PBS배지로 서서히 층을 만들어 정자를 부유시켰다.

24시간 부유시킨 ~500 μl 정도의 정자를 동결튜브에 옮겨 동해 방지제를 처리하지 않고 액체질소에 3분동안 침지시킨 후 꺼내어 실온으로 융해시켰다. 이런 과정을 3번 반복하였다. 완전히 생존력을 상실한 정자를 확인하고, 1,000 rpm으로 5분동안 원심분리한 후, 정자 추출물이 포함되어 있는 상층액만 준비하여 0.2 μm 필터 (Millipore, U.S.A)로 여과한 후, microcentrifuge tube에 정자 추출물을 넣어 영하 20℃로 냉동 저장하였다.

노화 정자 추출물도 정상적인 운동성과 모양을 지닌 정액표본 3 ml을 신선정자 추출물 처리사와 동일하게 처리하여 PBS 배지로 서서히 층을 만들어 정자를 부유시켰다.

24시간 부유시킨 ~500 μl 정도의 정자를 동결튜브에 옮겨 37℃, 5% CO₂, 95% 공기 조건의 배양기에서

6일 동안 보존하여 정자를 노화시켰다. 6일 보존한 노화정자 추출물의 처리도 신선정자 추출물의 처리과정과 동일한 방법으로 실시하였다.

2) 가열 처리한 정자 추출물의 준비

위에서 기술한 신선정자 추출물의 처리방법으로 추출한 정자추출물을 90℃로 가열된 항온 수조에 넣고 30분간 불활성화시킨 후, 실온에서 5분 정도 정체시켜 영하 20℃로 냉동 저장하였다.

3. 난모세포의 세포질내 미량 주입 방법

칼슘 농도별 PBS 배지, 칼슘 농도별 신선한 정자 추출물, 가열처리한 정자 추출물 그리고 노화정자 추출물을 모든 처리시에 D-PBS 배지에서 난모세포당 10 μl(Lee, 1989) 정도 주입하였다. 마우스 난모세포는 미세 주입기(Narishige microinjector, Japan)에 장착시킨 holding pipette으로 난모세포를 흡입하여 제1극체를 시계 12시 방향으로 고정시키고, injection pipette에는 처리된 각 주입물을 흡입하여 세포질내에 조심스럽게 주입하였다. 주입후, 20분내로 현미경(×400)하에서 난자 세포질 파동을 확인하였고, 10% hFCS가 함유된 PBS 배양액에서 12~15시간 배양시켰다.

4. 미량 주입후 난모세포의 배양 및 활성 평가 방법

12~15시간 배양 후 난모세포의 활성 여부를 검사하기 위하여 신선한 PBS 배양액에 2~3회 세척한 다음, slide glass 위로 옮겨 cover glass를 덮어 정지시킨 후 25% acetic alcohol로 24시간 이상 고정한 다음 1% aceto-orcein으로 염색하여 난모세포의 활성상태를 위상차 현미경으로 판정하였다. 난모세포의 제2극체 출현, 단핵형성 여부를 확인하는 방법으로 판정하였다.

5. 통계 처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS통계 Package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 처리 평균간 유의성 검정은 Duncan's Multiple Range Test를 이용하여 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 칼슘 농도에 의한 난모세포의 활성화 유도

각기 다른 칼슘농도가 성숙한 마우스 난모세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 1.7 그리고 5 mM의 칼슘농도를 가지는 PBS 배지를 난모세포의 세포질내에 각각 10 μ l 정도 직접 주입하고 12~15시간 배양한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

0 mM 칼슘농도의 PBS 배지에서 배양한 전체 난모세포의 활성화율은 14.5%로써 1PN이 9.1%, \geq 3PN 이상이 5.4%였다. 1.7과 5 mM 칼슘농도의 PBS 배지에서 배양한 전체 난모세포의 활성화율은 각각 9.8과 14.9%였다.

이상의 결과에서 나타난 바와 같이 0부터 5 mM까지의 칼슘농도에서 난모세포의 활성화율에는 차이가 없었으며, 난모세포의 활성화율도 상당히 낮았다. 따라서 Table 1에 나타난 단위발생은 칼슘농도보다는 PBS

배지 주입자극에 의한 것으로 사료된다.

Fulton과 Whittingham(1978)은 마우스 난모세포에 칼슘을 주입한 결과 단위발생을 유도하였다고 하였고, Liu 등(1994)은 1.8에서 5 mM까지의 칼슘농도를 가진 배지에서 사람의 신선한 난모세포의 세포질내에 정자를 주입한 결과 수정율의 차이가 없다고 하였고, Gearon 등(1995)은 0과 1.78 mM의 칼슘농도를 가지는 배지에서 사람 난모세포의 활성화에는 차이가 없었으나, 1.78 mM의 칼슘농도를 가진 배지에서 주입된 정자만이 정상적인 수정이 이루어졌다고 하였다. Colonna와 Tatone(1993)은 세포내에서 칼슘 농도의 증가는 세포내 저장된 칼슘을 동원하거나 세포막의 칼슘 침투 능력을 증가시킴으로써 이끌어 낼 수 있다고 보고 한 바, 난모세포에 PKC (protein kinase C)의 자극 물질인 OAG (1-oleyl-2-acetyl-SN-glycerol)를 서로 다른 외부 칼슘농도 (0.1 μ M~1.7 mM)에서 처리했을 때 OAG 처리구의 단위 발생율이 무처리구 단위 발생율 4~5%보다 월등이 높았다고 하였으

Table 1. Mouse oocyte activation after intracytoplasmic injection of PBS medium with the different Ca^{2+} concentrations¹

Con. of Ca^{2+} ion (mM)	No. of oocytes injected	No. of oocytes activated(%)				No. of oocytes non-activated (%)
		1PN	2PN	\geq 3PN	Total	
0	55	5(9.1)	—	3(5.4)	8(14.5)	47(85.5)
1.7	61	4(6.5)	—	2(3.3)	6(9.8)	55(90.2)
5	47	5(10.6)	—	2(4.3)	7(14.9)	40(85.1)

¹ The injected oocytes were assessed after 12~15h culture in the PBS medium containing different Ca^{2+} concentration for the presence of pronuclei(PN) and polar bodies.

Table 2. Mouse oocyte activation after intracytoplasmic injection of non-heated human sperm extract and culture in the different Ca^{2+} concentration media¹

Con. of Ca^{2+} ion (mM)	No. of oocytes injected	No. of oocytes activated(%)				No. of oocytes non-activated (%)
		1PN	2PN	\geq 3PN	Total	
0	57	18(31.6) ^b	—	5(8.8)	23(40.4) ^b	34(59.6) ^a
1.7	58	26(44.8) ^a	2(3.5)	2(3.5)	30(51.8) ^a	28(48.2) ^b
5	63	22(34.9) ^b	—	2(3.2)	24(38.1) ^b	39(61.9) ^a

¹ The injected oocytes were assessed after 12~15h culture in the PBS medium for the presence of pronuclei (PN) and polar bodies.

^{a,b} Values within columns with different superscripts differ ($P < 0.05$).

며, OAG 처리구중 0.1 μM 칼슘농도에서는 46%, 1.7mM 칼슘농도에서는 82%의 단위발생율을 나타내었다고 보고하였다.

위에서 언급한 연구자들의 보고에 의하면 난모세포의 활성화를 위해서는 칼슘농도는 물론 정자의 주입이나 OAG의 주입이 중요한 요인으로 작용하였다. 따라서 칼슘농도가 단위발생에 미치는 기전을 구명하기 위해서는 앞으로 종합적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

2. 신선한 정자추출물에 의한 난모세포의 활성 유도

운동성이 좋은 신선한 정자의 추출물을 10 μl 정도 마우스 난모세포의 세포질내에 주입한 후 0, 1.7 그리고 5 mM의 칼슘농도를 가지는 PBS 배지에서 12~15시간 배양하여 활성화 비율을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

1.7 mM 칼슘농도의 PBS 배지에서 배양한 전체 난모세포의 활성율은 51.8%로써 1PN이 44.8%, 2PN과 $\geq 3\text{PN}$ 이상이 각각 모두 3.5%였다. 0과 5 mM 칼슘농도의 PBS 배지에서 배양한 전체 난모세포의 활성율은 각각 40.4와 38.1%로써 1.7 mM 칼슘농도의 활성율 보다 낮았다($P < 0.05$). 따라서 신선한 정자 추출물을 마우스 난모세포에 주입할 경우 1.7 mM의 칼슘농도를 가진 배지가 난모세포의 활성화에 가장 적절한 것으로 나타났다. 또한 정자 추출물을 난모세포에 주입한 경우가 Table 1에 나타난 바와 같이 PBS 배지를 난모세포에 주입한 경우보다 난모세포의 활성율이 월등히 높았다.

이상의 결과는 난모세포의 활성이 정자내에 존재하는 어떤 요인에 의한 것이라는 Rybouchkin 등(1996)

의 보고, 정자내에 존재하는 용해성 정자 단백질이라는 Stice와 Robl(1990), Swann(1990, 1994), Dozortsev 등(1995), 그리고 Meng과 Wolf(1997)의 보고, 햄스터 정자에 존재하는 oscillin 단백질이라는 Parrington 등(1996)의 보고를 잘 입증해 주고 있다.

3. 가열 처리한 정자 추출물에 의한 마우스 난모세포의 활성 유도

신선한 정자 추출물을 가열 처리하여 10 μl 정도 마우스 난모세포의 세포질내에 주입후, 0, 1.7 그리고 5 mM의 칼슘농도를 가지는 PBS 배지에서 12~15시간 배양하여 활성화 비율을 조사한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

0 mM 칼슘농도의 PBS 배지에서 배양한 전체 난모세포의 활성율은 17.0%로써 1PN이 11.3%, 2PN과 $\geq 3\text{PN}$ 이상이 1.9와 3.8%였다. 1.7과 5 mM 칼슘농도의 PBS 배지에서 배양한 전체 난모세포의 활성율은 각각 13.5와 11.8%로써, 3처리간 통계적 유의성은 인정되지 않았다.

이상의 결과는 정상적인 사람정자를 동결-융해후 가열처리하여 햄스터 난모세포의 세포질내에 주입한 경우 난모세포 활성율이 7%로 상당히 낮다는 Rybouchkin 등(1996)의 보고와 비슷하였다.

4. 난모세포내 주입물질에 의한 난모세포의 활성 유도

칼슘농도가 1.7 mM인 PBS 배지에서 신선한 정자 추출물, 가열처리한 정자 추출물, 그리고 PBS 배지를 10 μl 정도 난모세포의 세포질내에 주입후 12~15시간 배양하여 활성화 비율을 조사한 결과를 Table 4와

Table 3. Mouse oocyte activation after intracytoplasmic injection of heated human sperm extract and culture in the different Ca^{2+} concentration media¹

Con. of Ca^{++} (mM)	No. of ion oocytes injected	No. of oocytes activated(%)				No. of oocytes non-activated (%)
		1PN	2PN	$\geq 3\text{PN}$	Total	
0	53	6(11.3)	1(1.9)	2(3.8)	9(17.0)	44(83.0)
1.7	52	4(7.7)	1(1.9)	2(3.9)	7(13.5)	45(86.5)
5	51	4(7.9)	—	2(3.9)	6(11.8)	5(8.2)

¹ The injected oocytes were assessed after 12~15h culture in the PBS medium for the presence of pronuclei (PN) and polar bodies.

Table 4. Mouse oocyte activation after intracytoplasmic injection of different injection material and culture in the 1.7 mM Ca²⁺ concentration medium¹

Material ²	No. of oocytes injected	No. of oocytes activated(%)				No. of oocytes non-activated(%)
		1PN	2PN	≥3PN	Total	
PBS	76	7(9.2) ^c	—	—	7(9.2) ^c	69(90) ^a
NHSE	66	31(47.0) ^a	3(4.5)	2(3.0)	36(54.5) ^a	30(45.5) ^c
HSE	65	13(20.2) ^b	—	2(3.1)	15(23.1) ^b	50(76.9) ^b

¹ The injected oocytes were assessed after 12~15h culture in the PBS medium for the presence of pronuclei (PN) and polar bodies.

² PBS: phosphate buffered saline, NHSE: non-heated sperm extract, HSE: heated sperm extract.

^{a,b,c} Values within columns with different superscripts differ (P<0.05).

같다.

신선한 정자 추출물을 주입한 난모세포의 활성화율은 54.5%로써 1PN이 47.0%, 2PN이 4.5%, 그리고 ≥ 3PN 이상이 3%였다. 가열 처리한 정자 추출물과 PBS 배지를 주입한 처리구에서의 난모세포 활성화율은 각각 23.1과 9.2%로써, 3처리간에 통계적 유의성이 인정되었다. 가열 처리한 정자 추출물 처리구가 PBS 배지 처리구보다 난모세포 활성화율이 높은 것은 정상적인 사람정자를 동결-융해후 가열 처리하여도 정자 두부에 존재하는 난모세포 활성인자를 완전히 제거 하지 못할 경우 적은 비율이라도 활성화가 일어날 수 있다는 Rybouchkin 등(1996)의 보고를 입증해 주고 있다.

5. 신선 및 노화정자 추출물에 의한 난모세포의 활성화 유도

정액 채취후 1일된 정자와 6일된 정자에서 추출한

정자 추출물을 10 μ l 정도 난모세포의 세포질내에 주입후 칼슘농도가 1.7 mM인 PBS 배지에서 12~15시간 배양하여 활성화 비율을 조사한 결과는 Table 5와 같다.

1일령과 6일령 정자 추출물을 주입한 난모세포의 전체 활성화율은 각각 60.0과 11.1%였다. 이상의 결과는 정자에 포함된 난모세포 활성화 물질은 신선한 정자에 존재한다는 것을 입증하였다.

지금까지의 연구 결과를 종합해 보면, 난모세포의 단위발생을 위해서는 1.7 mM의 칼슘농도와 신선한 정자에 포함된 난모세포 활성화물질이 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다

IV. 적 요

본 연구는 사람정자 추출물을 마우스 난모세포의 세포질내에 주입하여 단위발생에 미치는 영향을 구명하

Table 5. Mouse oocyte activation after intracytoplasmic injection of 1 and 6 days old human sperm extracts¹

Age of sperm extract	No. of oocytes injected	No. of oocytes activated(%)				No. of oocytes non-activated (%)
		1PN	2PN	≥3PN	Total	
Day 1	25	11(44.0) ^a	2(8.0)	2(8.0)	15(60.0) ^a	10(40.0) ^b
Day 6	27	2(7.4) ^b	—	1(3.7)	3(11.1) ^b	24(88.9) ^a

¹ The injected oocytes were assessed after 12~15h culture in the PBS medium containing 1.7 mM Ca²⁺ for the presence of pronuclei(PN) and polar bodies.

^{a,b} Values within columns with different superscripts differ (P<0.05).

기 위하여 실시하였으며, 그 얻어진 결과는 다음과 같았다.

1. 마우스 난모세포가 0, 1.7 그리고 5 mM의 칼슘 농도를 가지는 PBS 배지로 각각 10 μ l씩 주입되었을 때, 전핵을 형성하고 제2극체를 방출하는 난모세포의 활성율은 각각 14.5, 9.8 그리고 14.9%였다. 칼슘농도별 난모세포의 활성율은 유의성이 인정되지 않았다($P>0.05$).
2. 마우스 난모세포에 가열하지 않은 사람정자 추출물 10 μ l을 주입 후 0, 1.7 그리고 5 mM의 칼슘 농도를 가지는 PBS 배지에서 각각 배양하였을 때, 1.7 mM 칼슘 농도에서의 난모세포 활성율(51.8%)은 0과 5 mM 칼슘 농도에서의 난모세포 활성율보다 유의하게 높았다.
3. 마우스 난모세포에 가열처리한 사람정자 추출물 10 μ l을 주입 후 0, 1.7 그리고 5 mM의 칼슘 농도를 가지는 PBS 배지에서 각각 배양하였을 때, 칼슘 농도별 난모세포 활성율은 유의성이 인정되지 않았다. 난모세포 활성율은 11.8~17.0%의 범위에 있었다.
4. 마우스 난모세포에 가열하지 않은 사람 정자 추출물, 가열 처리한 사람 정자 추출물, 그리고 PBS 배지를 각각 10 μ l씩 주입 후 1.7 mM 칼슘 농도를 가지는 PBS 배지에서 각각 배양하였을 때, 가열하지 않은 사람 정자 추출물을 주입한 난모세포의 활성율이 54.5%로 제일 높았다. 처리별 난모세포의 활성율은 유의성이 인정되었다($P<0.05$).
5. 마우스 난모세포에 가열하지 않은 1일령과 6일령 정자 추출물을 각각 10 μ l씩 주입 후 1.7 mM 칼슘 농도를 가지는 PBS 배지에서 각각 배양하였을 때, 1일령 정자 추출물을 주입한 난모세포의 활성율은 60.0%로 6일령 정자 추출물을 주입한 난모세포의 활성율 11.1%보다 유의하게 높았다.

이상의 결과를 종합해 보면 가열하지 않은 사람정자 추출물에는 oscillin과 같은 난모세포 활성인자가 존재한다는 것이 입증되었다.

V. 인용문헌

1. Albertini, D.F. 1987. Cytoplasmic reorganization during the resumption of meiosis in cultured preovulatory rat oocytes. *Dev. Biol.*, 120:121-131.
2. Albertini, D.F. 1992. Regulation of meiotic maturation in the mammalian oocyte: interplay between exogenous cues and the microtubule cytoskeleton. *Boissays*, 12:97-103.
3. Colonna, R. and C. Tatone. 1993. Protein kinase C-dependent and independent events in mouse egg activation. *Zygote*, 1: 243-256.
4. Cuthbertson, K.S.R. and P.H. Cobbold. 1985. Phorbol ester and sperm activates mouse oocytes by inducing sustained oscillation in cell Ca^{2+} . *Nature*, 316:541-542.
5. Dozortsev, D., A. Rybouchkin and P. De Sutter. 1995. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Hum. Reprod.*, 10:403-407.
6. Edwards, R.G. and A.C. Van Steirteghem. 1993. Intracytoplasmic sperm injection: does calcium hold the key to success? *Hum. Reprod.*, 8:988-989.
7. Fissore, R.A. and J.M. Robl. 1994. Mechanism of calcium oscillation in fertilized rabbit eggs. *Dev. Biol.*, 166:634-642.
8. Fulton, B.P. and D.G. Whittingham. 1978. Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature*, 273:149-151.
9. Gearon, C.M., A.S. Taylor and R.G. Forman. 1995. Factors affecting activation and fertilization of human oocytes following intracytoplasmic injection. *Hum. Reprod.*, 10:896-902.
10. Goto, K., A. Kinoshita., Y. Takuma and K. Ogawa. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised killed sper-

- matozoa. *Vet. Rec.*, 127:517-520.
11. Hosoi, Y., M. Miyake, K. Utsumi and A. Iritani. 1988. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon. *Proc.*, 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., 3:331-333.
 12. Igusa, K., and S. Miyazaki. 1986. Periodic increase of cytoplasmic free calcium in fertilized hamster eggs measured with calcium-sensitive electrodes. *J. Physiol (Lond)*., 377:193-205.
 13. Kaufman, M.H. 1983. *Early Mammalian Development: Parthenogenic Studies*. Cambridge: Cambridge University Press.
 14. Kimura, T. and R. Yanagimachi. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, 52:709-720.
 15. Lanzendorf, S.I., M.K. Maloney and L.L. Veeck. 1988. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil. Steril.*, 49:835-842.
 16. Lee, G.M. 1989. Measurement of volume injected into individual cells by quantitative fluorescence microscopy. *J. Cell Sci.*, 94:443-447.
 17. Liu, J., Z. Nagy, H. Joris, H. Tournaye, P. Devroey and A. C. Van Steirteghem. 1994. Intracytoplasmic sperm injection does not require special treatment of the spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 9:112-1130.
 18. Machaty, Z., M. A. Mayes and R. S. Prather. 1995. Parthenogenetic activation of porcine oocytes with guanosine-5'-0-(3'-thiotriphosphate). *Biol. Reprod.*, 52: 753-758.
 19. Meng, L. and Don P. Wolf. 1997. Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: unclear and cytoplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 12:1062-1068.
 20. Miyazaki, S. 1988. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J. Cell Biol.*, 106:345-353.
 21. Palermo, G., H. Joris, P. Devroey and A.C. Van Steirteghem. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.*, 340:17-18.
 22. Palermo, G., J. Cohen and Z. Rosenwaks. 1996. Intracytoplasmic sperm injection : a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil. Steril.*, 65:899-908.
 23. Parrington, J., K. Swann, V.I. Shevchenko, A.K. Sesay and F.A. Lai. 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*, 379:364-368.
 24. Perreault, S.D. and B. Zirkin. 1982. Sperm nuclear decondensation in mammals: role of sperm-associated protease *in vivo*. *J. Exp. Zool.*, 224:253-257.
 25. Rybouchkin, A., D. Dozortsev, M.J. Pelinck, P. De Sutter and M. Dhont. 1996. Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocyte. *Hum. Reprod.*, 11:2170-2175.
 26. Steinhardt, R.A., D. Epel, E.J. Carroll and R. Yanagimachi. 1974. Is calcium ionophore a universal activator of unfertilized eggs? *Nature*, 252:41-43.
 27. Stice, S.L. and J.M. Robl. 1990. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 25: 272-280.
 28. Swann, K. 1990. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, 110:1295-1302.
 29. Swann, K. 1994. Ca²⁺ oscillations and sensitization of Ca²⁺ release in unfertilized mouse

- eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium*, 15:331-339.
30. Tesarik, J., M. Souza and J. Testart. 1994. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 9:511-518.
31. Van Blerkom, J., P. Davis, J. Merriam and J. Sinclair. 1995. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration. Pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum. Reprod. Update*, 1:429-461.
32. Van Steirtegham, A.C., P. Nagy and J. Liu. 1993. Intracytoplasmic sperm injection. *Assist. Reprod. Rev.*, 3:160-163.
33. Van Steirtegham, A.C., P. Nagy and H. Joris. 1996. The development of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 11:59-75.
34. Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In Knobil, E. and J.D. Neill(eds). *The Physiology of Reproduction*, 2nd edn. Raven Press, New York. pp. 189-317.
- (접수일자 : 1999. 1. 25. / 채택일자 : 1999. 2. 15.)