

미수정란 및 발달부적합 사람난자의 활성화에 관한 연구

전수현 · 정형민 · 신태은 · 고정재 · 이문기 · 차광렬 · 박을순¹ · 장경희¹ · 김태민¹ · 임정목^{1†}
포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

Pronuclear Formation of Unfertilized or Developmentally-Incompetent Human Oocytes after Different Stimuli in Stimulated IVF Program

S. H. Jun, H. M. Chung, T. E. Shin, J. J. Ko, M. G. Lee, K. Y. Cha, Y. S. Park¹,
K. H. Jang¹, T. M. Kim¹ and J. M. Lim^{1†}
College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea

SUMMARY

A total of 92 unfertilized human oocytes were treated with ethanol (EtOH), calcium ionophore A23187 (CI) or electric pulse (EP) for activating pronuclear formation and subsequent development. In Experiment 1, there was a significant ($P=0.0001$) treatment effect on the activation of unfertilized oocytes. No spontaneous activation was occurred in the control, but activation treatments induced PN formation with various efficacy. More unfertilized oocytes (UFOs) were activated after EtOH or EP treatment than after CI treatment. EP was as effective (63.6 %) as EtOH, but fragmentation was observed in 43% of UFOs activated by EP. Proportion of UFOs that formed presumptive haploid PN (2 PNs + 1 PB or 1 PN + 2 PBs) was 33.3, 0 and 28.6% after EtOH, CI and EP treatments, respectively. In Experiment 2, a significant ($P=0.0362$) effect of immature oocytes (IOs) status on activation was found. IOs at the GVBD-MI oocytes had higher potential to form PN than those at the GV stage or with abnormal morphology (25 vs. 77.8%). The results of this study clearly demonstrated that the treatment of 10% ethanol for 5 min effectively induced the activation of UFOs. IOs could form pronucleus with high efficacy by ethanol treatment, as long as they grew beyond the GVBD stage.

(Key words : human oocyte, activation)

서 론

체외수정 및 수정란이식기법 등의 보조생식술이 인간불임증 치료에 적용된 이후 많은 불임관련 질환

병들이 치료 가능하게 되었다. 하지만 미수정란, 미성숙란 및 비정상적 형태의 성숙란들은 정상적 배발달이 불가능하므로 상당한 수의 난자들이 폐기되고 있으며 이에 따른 치료효율성 저하가 문제점으로 지적되고 있다. 비정상적인 난자는 미세소

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구과제에 의하여 수행되었음.

¹ 서울대학교 농생명공학부 발생공학연구실(School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

[†] Correspondence : Tel/Fax : 031-290-2341, E-mail : limjm@snu.ac.kr

관 및 미토콘드리아와 같은 세포내소기관들이 불완전하므로 정상적 발생을 위하여 정상세포질을 형태적 비정상 난자에 이식하는 “세포질 이식법”이나 핵이 제거된 정상난자에 비정상란의 핵을 이식하는 방법(Fliid 등, 1990; Levron 등, 1996) 등이 시도되고 있다. 이 방법은 불임환자나 노령여성으로부터 회수되는 비정상 난자의 발생능을 회복할 수 있는 방법이나 아직까지 동 방법의 실제 임상 적용성에 대하여서는 검증되고 있지 않다.

발달부적합 난자의 정상적인 발달을 위하여 양질의 탈핵된 난자에 비정상적인 난자의 반수체 전핵을 이식한 후 이식난자에 정자를 미세주입하는 방법이 가능해진다면 복제인간 탄생에 따른 윤리적 부담 없이 첨단의료기술을 발전시킬 수 있을 것이다. 이 기법이 가능하게 되려면 반수체 전핵을 효과적으로 생성할 수 있는 난자 활성화 방법이 요구되어진다. 따라서 본 연구에서는 성공적 전핵 이식방법을 구축하기 위한 기초 실험으로서 에탄올, calcium ionophore 및 전기자극 등의 난활성화 방법을 통하여 미수정란의 전핵 형성율을 최대화할 수 있는 방법을 검토하였으며, 구축되어진 난활성화 방법에 의해 미성숙난에서 발달한 성숙란 및 비정상적인 형태를 가진 성숙란의 난활성율을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 1999년 12월부터 2000년 4월까지 강남차병원 여성의학연구소 불임센터에 내원한 불임 환자 중 체외수정을 실시한 30명의 시술동의 환자를 대상으로 실시하였다. 환자의 평균나이는 33.0 ± 4.6 세이며 평균불임기간은 5.8 ± 3.6 년이었다. 불임 원인으로는 남성원인이 8명, 난관요인이 11명, 자궁내막의 문제가 1명, 원인 불명이 6명 그리고 그 밖의 원인이 4명 이었다.

2. 난자회수

불임 환자의 난자 회수를 위해 gonadotropin-releasing hormone agonist (buserelin Hoechst AG, Seoul, Korea)와 human menopausal gonadotropin

(HMG, Pergonal Serono, Seoul, Korea)을 이용하여 난소를 자극하고, 그 후 직경 18mm 이상의 난포가 관찰될 때 10,000 IU human chorionic gonadotropin (Profasi, Serono)을 투여하여 배란을 유도하였다 (Hong 등, 1999). 배란이 유도된 환자로부터 얻은 난자는 체외성숙 및 수정과정을 거친 후 체외수정 후 24~28시간까지 수정이 이루어지지 않은 난자, 제 2감수분열 중기까지 성숙이 이루어지지 않은 미성숙난자, 비정상적 형태의 성숙난자를 각각 회수하여 실험에 공여하였다.

3. 난활성화 방법

실험 1에서는 체외수정 후 24시간까지 수정이 이루어지지 않은 미수정란을 다음 방법에 따라서 활성화를 유도하였다: 1) 무처리군 (대조군), 2) 10% ethanol, 5분, 3) 5 μ g/ml calcium ionophore (CI), 5분, 그리고 4) 통전압 1.5 kV/cm, 1 pulse, 30 초. 활성화처리 미수정란은 100 μ l의 TCM-199 배양액의 droplet 에 위치시킨 후 37°C, 5% CO₂, 포화습도공기 기상 하에서 24시간동안 배양한 후 전핵 형성을 관찰하였다. 실험 2에서는 미성숙난자와 형태적 비정상 난자를 실험 1의 최적조건하에서 활성화 처리를 한 후 처리 24시간 후까지의 전핵형성을 관찰하였다. 미성숙란의 경우 미성숙 정도에 따라 제 1차 감수분열 전기의 난자는 24~28시간, 제 1차 감수분열 중기의 난자는 8~15시간 동안 성숙배양한 후 실험에 공여하였다.

4. 통계학적 분석

각각의 parameters에 대한 통계학적 분석을 위하여 SAS program에 포함되어 있는 proc-glm model 및 ANOVA를 이용하였으며, 각각의 처리에 대한 parameter에서 model 효과가 발견되었을 경우 최소자승법에 의하여 실험구간 유의수준을 검증하였다 ($p < 0.05$).

결 과

1. 미수정란의 전핵 형성을 위한 활성화 방법 확립

총 67개의 미수정란을 실험에 이용한 결과, 비처

Table 1. Parthenogenetic activation of mature oocytes that failed to be fertilized by conventional IVF following treatment with different stimulators

Treatments	No. (%) [*] of oocytes		No (%) [†] of activated oocytes 18 h after treatment				
	Examined	Activated	1PN/1PB	2PN/1PB+ 1PN/2PB	2PN/2PB+ Multi-PN	>2-cell	Fragmented
Control	19	0 (0) ^a	-	-	-	-	-
Ethanol	20	12 (60) ^b	2 (16.6)	4 (33.3)	5 (41.6)	1 (8.3)	0 (0)
CI	17	5 (29.4) ^a	1 (20)	2 (40)	0 (0)	2 (40)	0 (0)
EP	11	7 (63.6) ^b	2 (28.5)	2 (28.6)	3 (42.9)	0 (0)	3 (42.9)

PN = pronucleus, PB = polar body

Model effect of treatment on oocyte activation was 0.0001 (p value).

^{*} Percentage of the number of oocytes examined.

[†] Percentage of the number of oocytes activated.

^{ab} Different superscripts in each parameter are significantly different, P<0.05.

리군인 대조군에서는 난활성이 이루어지지 않았다. 난활성 유도군의 경우 (Table 1), 미수정란의 전핵형성율은 CI 처리를 하였을 때보다 에탄올이나 전기자극을 주었을 때 유의적으로 높은 전핵형성율을 나타내었다 (29.4% vs. 60~63.6%). 전기자극법은 에탄올과 같이 효과적으로 전핵형성을 유도하였으나 동시에 높은 fragment (42.9%) 율이 관찰되어졌다. Fig. 1은 에탄올 처리에 의해 형성된 전핵의 모습이다. 에탄올, CI 그리고 전기자극으로 난활성을 유도한 미수정란의 반수체 전핵형성율은 (2 PNs + 1 PB 또는 1 PN + 2 PBs) 각각 33.3, 40,

28.6%였다.

2. 미성숙란과 형태적 비정상 난자의 활성화에 관한 연구

상이한 미성숙 단계로부터 체외성숙에 의하여 성숙한 난자와 비정상적인 형태를 가진 성숙란을 실험 1의 최적처리방법인 에탄올을 이용하여 활성화 유도한 결과 제1차 감수분열 중기 유래의 성숙란이 전기유래성숙란 및 형태적 비정상난자에 비하여 유의적으로 높은 전핵형성율을 나타내었다 (25 vs. 77.8%).

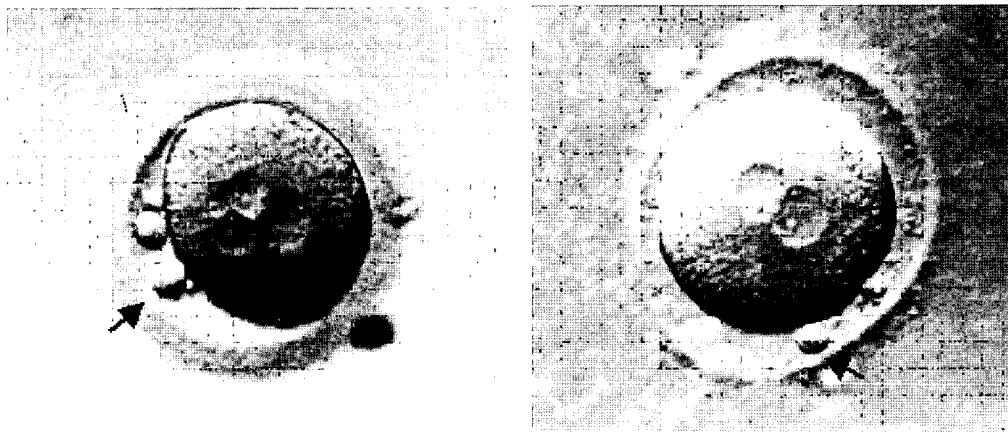


Fig. 1. Pronucleus formation of unfertilized oocytes at 24h after the treatment of 10% ethanol for 5min. Oocytes having (a) two pronuclei and (b) three pronuclei. Polar bodies were visible in those oocytes (arrows)($\times 200$).

Table 2. Parthenogenetic activation of *in vitro*-matured oocytes* or morphologically abnormal mature oocytes following IVF and subsequent treatment with 10% (v/v) ethanol for 5 min

Stages before IVM	No. (%) [†] of oocytes		No. (%) [‡] of activated oocytes 18 h after treatment				
	Examined	Activated [*]	1PN/1PB	2PN/1PB+ 1PN/2PB	2PN/2PB+ Multi-PN	>2-cell	Fragmented
GV	8	2 (25) ^a	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GVBD-MI	9	7 (77.8) ^b	5 (60)	1 (14.3)	1 (14.3)	0 (0)	0 (0)
MI II, abnormal	8	2 (25) ^a	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

PN=pronucleus, PB=polar body, GV=germinal vesicle, GVBD=germinal vesicle breakdown, MI=metaphase-I Model effect of treatment on oocyte activation indicated as P value was 0.0362.

* Oocytes arrested at the GV and GVBD-MI stages were cultured for 14~18 hours and 6~10 hours, respectively.

[†] Percentage of the number of oocytes examined.

[‡] Percentage of the number of oocytes activated.

^{ab} Different superscripts in each parameter are significantly different, P<0.05.

고 찰

본 실험의 결과 에탄올을 이용하여 난활성을 유도할 때, 미수정난자의 60%, 제1차 감수분열 중기 유래 체외성숙난자의 77.8%가 전핵형성이 가능하였다. 그러나 비정상적인 형태를 가진 성숙란과 제1차 감수분열 전기 난자로부터 유래한 체외성숙난자는 에탄올처리 후에도 상대적으로 저조한 전핵형성능을 나타내었다. 본 연구결과로 에탄올은 보조생식술 시술과정에서 유래한 미수정난자 및 일부체외성숙난자의 활성화를 유도할 수 있는 유효한 방법으로 사료되어진다.

사람난자의 전핵형성을 위해 부분적인 투명대 절개 (Laxendorf 등, 1992), 진공 압력 (Muechler 등, 1989), hyaluronidase (Johnson 등, 1990), 저장액 (Abramczuck와 Lopata, 1990), 에탄올 (Abramczuck 등, 1990), sucrose (Laxendorf 등, 1992), phorbtor ester (Balakier와 Dasper, 1993), calcium ionophore (CI) (Winston 등, 1991: Taylor와 Braude, 1994), 그리고 puromycin (De Sutter 등, 1992) 등의 여러 가지 방법들이 보고되었다. 이들 모두 calcium oscillator나 단백질합성 억제제로 난자의 활성화를 유도하는 기전을 가지고 있다. 이 중 puromycin (88~100%)을 제외하고는 활성화 유도가 낮으며 puromycin의 경우 calcium oscillator 없이 난활성을 유도하였으므로 임상응용을 위하여서

는 충분한 기초연구가 필요하다고 사료된다.

실험 1의 결과, 미수정란의 활성화율은 CI 처리를 하였을 때보다 에탄올이나 전기자극을 주었을 때 유의적으로 높았다. 전기자극법의 경우, 에탄올과 동등한 전핵형성율을 나타내었으나 동시에 fragment율도 높았기 때문에 (42.9%) 에탄올에 비하여 효과적이지 않은 방법으로 판정되었다. 또한 형성된 전핵은 다음과 같이 여러 가지 상태를 나타내었다. 하나의 극체와 하나의 전핵을 가진 것, 하나의 극체와 두개의 전핵을 가진 것, 두개의 극체와 하나의 전핵을 가진 것, 두개의 극체와 두개 또는 여러 개의 전핵을 가진 것 그리고 2 세포기로 발달한 것 등이 관찰되는데, 하나의 극체와 두개의 전핵을 가진 것 또는 두개의 극체와 하나의 전핵을 가진 난자가 전핵 이식에 이용할 수 있는 정상적인 반수체의 전핵이라 사료되어진다.

실험 2에서는 미성숙란에서 발달한 체외성숙난자와 비정상적 형태를 가진 성숙난자를 에탄올을 이용하여 활성을 유도하였다. 결과적으로, 제1차 감수분열 중기에서 유래한 성숙난자가 제1차 감수분열 전기에서 유래한 성숙난자나 형태적 비정상 성숙난자보다 유의적으로 높은 전핵형성율을 나타내었다. 이 결과로 미성숙난자의 성숙과정 개시시기와 난활성화와는 밀접한 관계가 있다고 사료된다. 또한, 본 실험의 연구결과는 적은 수이지만 난자 회수시 미성숙 상태 또는 비정상적인 형태를

가진 성숙란도 활성화 자극에 의하여 정상적 수정란으로의 발생할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 따라서 난자활성화 방법을 기초로 한 전핵이식 방법은 불임환자를 위한 효과적인 생식보조술로 발전할 가능성이 있다고 사료되어진다.

본 연구의 결과, 난자활성화를 통한 전핵이식법은 미수정란, 비정상적인 형태를 가진 성숙란 또는 미성숙란과 같은 발달에 부적합한 난자를 구제할 수 있는 효과적인 방법이라 사료되어진다. 그러나 이러한 보조생식술을 보다 효과적이고 안정적으로 확립하기 위하여서는 반수체의 염색체를 가진 전핵의 효율적 생산을 포함한 사람 난자에 적합한 미세조작기술 개발등이 요구되어진다.

적 요

미수정란, 형태적 비정상난자 및 체외성숙난자에 있어서 다양한 활성화 방법을 검토하였으며, 난자의 활성화를 위하여 에탄올, 전기자극 및 calcium ionophore 등이 이용되었다. 또한 난자의 활성화를 검증하기 위하여 전핵형성과 fragment을 조사하였다.

1. 미수정란에 있어서 에탄올에 의한 난활성방법이 가장 효과적이었으며 전기자극법의 경우 에탄올과 동등한 활성화를 유도하였으나 fragmentation이 다수 발생하였다.
2. 제 1차 감수분열 중기에서 유래한 체외성숙난자가 제1차 감수분열 전기에서 유래한 체외성숙난자 및 형태적 비정상 성숙난자보다 유의적으로 높은 활성화를 나타내었다.

참고문헌

Abramczuk JW and Lopata A. 1990. Resistance of human follicular oocytes to parthenogenetic activation: DNA distribution and content in oocytes maintained *in vitro*. Hum. Reprod., 5:578-581.

Balakier H and Dašper RF. 1993. Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. Hum. Reprod., 8:740-743.

De Sutter P, Dozortzev D, Cieslak J, Wolf G, Verlinsky Y and Dyban A. 1992. Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. J. Assist. Reprod. Genet., 9:328-337.

Fliid JT, Chillic CF, Van Uem JF, Iritani A and Hodgen GD. 1990. Ooplasmic transfusion: prophase germinal vesicle oocytes made developmentally competent by microinjection of metaphase II egg cytoplasm. Fertil. Steril., 53:1049-1054.

Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, Cha KY. 1999. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. Fertil. Steril., 72:141-146.

Johnson MH, Pickering SJ, Braude PR, Vincent C, Cant A and Currie J. 1990. Acid tyrode's solution can stimulate parthenogenetic activation of human and mouse oocytes. Fertil. Steril., 53:266-270.

Laxendorf SE, Kazer RR, Patton PE and Wolf DP. 1992. Cortical granule complements in human oocytes undergoing partial zona dissection. Mol. Reprod. Dev., 31:131-134.

Levron J, Willadsen S, Bertoli M and Cohen J. 1996. The development of mouse zygotes after fusion with synchronous and asynchronous cytoplasm. Hum. Reprod., 11:1287-1292.

Muechler EK, Graham MC, Huang K, Partridge AB and Jones K. 1989. Parthenogenesis of human oocytes as a function of vacuum pressure. J. *in vitro* Fert. Embryo Transfer, 6:335-337

Taylor AS and Braude PR. 1994. The early development of DNA content of activated human oocytes and parthenogenetic human embryos. Hum. Reprod., 9:2389-2397.

Winston N, Johnson M, Pickering S and Braude P. 1991. Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. Fertil. Steril., 56:904-912.

(접수일: 2000. 11. 16 / 채택일: 2000. 12. 15)