

난자와 난구세포간 Cell-to-Cell Communication이 난자에 미치는 영향

신창숙 · 윤세진 · 박창은 · 이경아^{1†}

차병원 여성의학연구소, ¹포천중문 의과대학교

Effects of the Cell-to-Cell Communication between Oocyte and Cumulus Cells on the Quality of Oocytes

Chang Sook Shin, Se-Jin Yoon, Chang Eun Park and Kyung-Ah Lee^{1†}

Infertility Medical Center, CHA General Hospital,

¹College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea

요 약 : 난자와 난포세포는 gap junction channel을 통해 긴밀한 연락을 주고받음으로써 난자의 발달이나 난포의 성장에 영향을 미친다. 본 연구는 같은 크기의 난포에서 나온 난자라고 하여도 cumulus cell(난구세포)들이 붙어있는 상태가 다르다는 것을 관찰, 이렇게 난구세포와의 서로 다른 연결상태를 갖는 난자의 재질에 차이가 있을 것으로 가정하고, 난자의 competence와 이때 난자와 난구세포 사이의 cell-to-cell communication에 관여하는 gap junction protein인 connexin(CX) 37과 CX 43의 발현 정도가 어떤 상관관계가 있는지를 알아보려고 수행하였다. 생후 3주일 된 생쥐에 PMSG를 주입하고 48시간 후에 난소를 적출하여 난포를 450 μ m 이상(large)의 난포와 200~400 μ m(small) 난포로 분리하여 그 난자를 얻었다. 난자에 난구세포가 compact하게 붙어있는 것은 intact로(LI, SI), 난구세포가 어느 정도 붙어 있거나, 하나도 붙어있지 않은 것은 partial/denuded로 그룹을 나누었다(LPD, SPD). 각 그룹의 난자를 체외에서 성숙시키고, 수정시켜서 발달율을 비교하였다. 각각의 CX의 mRNA 발현을 RT-PCR과 in situ hybridization으로 비교하였다. intact와 denuded 난자의 비율은 큰 난포의 경우는 55%와 45%의 비율로, 작은 난포의 경우는 30%와 70%의 비율로 난포가 작을수록 denude 상태의 난자가 많이 나왔다. 어떤 경우의 난자는 체외 성숙율은 차이가 없이 모두 97% 이상 성숙하였다. 그러나, 수정률에서는 차이를 보여서 intact한 난자에서 높은 수정율을 보였으며, SPD의 경우, 가장 낮은 수정·발달율을 보였다. 난자의 경우, 주로 발현되는 것은 CX 37이었으며, CX 43은 발현되지 않았다. 난구세포의 경우, CX 43이 가장 높게 발현하였고, 그 다음으로 CX 37이 관찰되었다. 본 실험 결과, 같은 발달크기의 난포라고 하더라도 그 안에 존재하는 난자의 상태는 난구세포와 얼마나 밀접한 cell-to-cell communication을 이루고 있는가에 따라 영향을 받는다는 것을 확인하였다. 본 연구결과 다음과 같이 결론 내릴 수 있었다. 1) 아직 발달이 끝나지 않은 난포에서 나온 미성숙난자라고 하여도 난구세포와 밀접한 연결을 갖는 경우 성숙난자와 거의 같은 능력을 갖고 있으며, 2) 난자와 난구세포간의 gap junctional communication은 heterotypic channel로 이루어지고, 3) 본 연구에서 관찰한 CX 43과 CX 37 두 종류만으로는 intact와 denuded의 차이점을 설명할 수 없었다.

ABSTRACT : Production of a mature oocyte is a complex process that requires the close association between oocyte and follicular cells. The present study was conducted to investigate the difference between oocytes with and without close junctional communication with cumulus cells and the involvement of two connexins(CXs) in the interactions. Follicles at different sizes(small: 200~400 μ m; large: >450 μ m) were mechanically isolated from PMSG-primed mouse ovaries, and punctured to get cumulus-oocyte complex(COC). Oocytes were released themselves(denuded), with partially attached(partial), or with tightly attached(intact) cumulus cells. Maturation and fertilization capacity of the COCs were measured. Expression of CX 37 and CX 43 was examined by RT-PCR and in situ hybridization. The ratio between intact COC and denuded/partial oocytes was 30%(SI) and 70%(SPD) in small follicles, while 55%(LI) and 45%(LPD) in large follicles, respectively. Maturation and fertilization rates of the released oocytes were similar among SI, LPD, LI groups, but those were significantly lower in SPD oocytes. In oocytes, CX 37 was the major CX and CX 43 was not expressed, whereas in the cumulus cells, CX 43 was the major, and CX 37 was the next. Results of the present study suggest that 1) immature oocytes from small follicles with intact cell-to-cell communication with cumulus have the similar quality to that of the oocytes from larger follicles,

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-2-20500-001-2) 지원으로 수행되었음.

[†]교신저자: 서울시 강남구 역삼 1동 606-5, 포천중문 의과대학교 차병원 여성의학연구소. (우) 135-081, (전) 02-3468-3440, (팩) 02-501-8704, E-mail: leeka@nuri.net

2) gap junction between oocyte and cumulus cells may be the heterotypic channel, and 3) we could not explain the difference in the cell-to-cell communication between intact and partial/denuded COCs through the expression of the two CXs.

Key words : Cell-to-cell communication, Connexin 43, Connexin 37, Cumulus cells, Follicle development, Oocyte.

서론

포유류의 난소에는 태어날 때 일정한 개수의 원시난포 (primordial follicle)가 존재하고, 사춘기를 지나면서 발달을 멈추고 있던 원시난포가 자라기 시작한다. 난포의 성장이 일어나는 동안, 난포 안에 존재하는 과립세포, 난구세포 등의 세포분열, 성장과 분화가 일어나며, 동시에 난자의 성장이 일어난다. 성장에 필요한 여러 가지 요인들이 난소 밖으로부터 과립세포 및 난구세포를 통하여 난자에 공급되며, 난자로부터도 여러 가지 요인이 난구세포 및 과립세포에 전달되어 난포의 발달을 조절한다. 따라서 난자와 난포세포 사이의 연결 상태는 난자성숙 및 난포발달에 매우 중요하다. 그 중에서도 cumulus-oocyte-complex(COC)는 gap junction를 통한 세포간의 연결이 난자 및 난구세포의 발생에 중요한 역할을 하는 것을 아주 잘 보여주는 예라고 할 수 있다(Eppig, 1991, 1994)

난자와 난구세포, 그리고 과립세포간에는 gap junction이 존재하여 이를 통한 물질이동에 의해 서로 간의 발달을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다(Albertini et al., 1975; Valdimarsson et al., 1993). Gap junction은 세포간에 존재하는 채널로서 이를 통해 두 세포간에 무기이온, 세포내 제2전달자 등과 같은 1,000 dalton 정도의 작은 물질의 직접적인 이동이 일어난다(Bruzzone et al., 1996a, b). Gap junction은 connexon이라는 unit로 이루어져 있고, connexon은 다시 6개의 connexin (CX) subunit으로 이루어져 있으며(Kumar & Gilula, 1996; Unger et al., 1999), 어떤 CX로 이루어졌는가에 따라서 conductance, permeability, gating 등의 성격이 결정된다(Bruzzone et al., 1996b; Goodenough et al., 1996; Kumar & Gilula, 1996). CX family는 현재 15가지 정도 알려져 있으며, 그 중에 CX 26, CX 30.3, CX 31.1, CX 32, CX 37, CX 40, CX 43, CX 45 등이 사람을 포함한 여러 종의 난소의 여러 가지 세포에서 발현됨이 확인되어 있다(Grazul-Bilska et al., 1997; Nuttinck et al., 2000; Ackert et al., 2001; Wright et al., 2001).

본 연구팀은 난소로부터 난포를 물리적으로 분리해 낸 다음, 각각의 크기별로 난포를 터뜨려 난자를 얻어내는 과정에서 같은 크기의 난포에서 나온 난자라고 하여도 난구세포가 붙어있는 상태가 다르다는 것을 관찰하게 되었다(Fig. 1). 이렇게 난구세포와의 서로 다른 연결상태를 갖는 경우 즉, 난

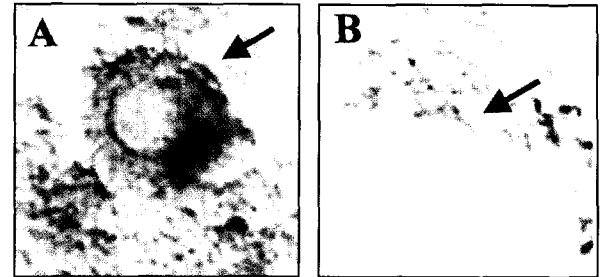


Fig. 1. Picture of oocytes released from the same size of isolated follicles. (A) Intact cumulus-oocyte-complex, (B) partially denuded cumulus-oocyte-complex.

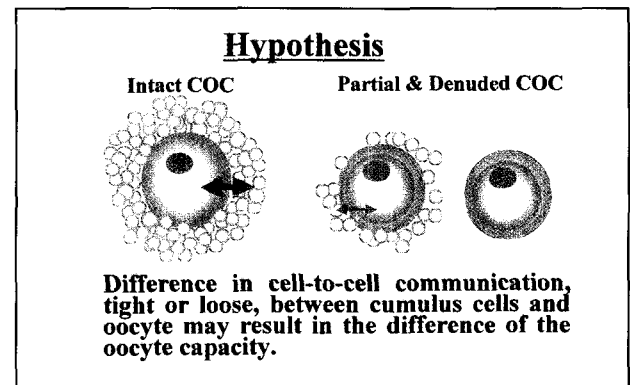


Fig. 2. Our working hypothesis: Oocytes from the same developmental stage of follicles may have different quality according to the difference in strength between tight and loose cell-to-cell communication between cumulus cells and oocyte.

구세포와 밀접하게 연결되어 있던 난자와 그렇지 못한 난자는 서로 주고받는 물질교환의 성격에 달라지고, 따라서 그 난자의 능력에 차이가 있을 것으로 가정하게 되었다(Fig. 2). 각 난자의 발생 능력과 이때 난자와 난구세포 사이의 cell-to-cell communication에 관여하는 gap junctional protein CX 43과 CX 37의 발현 정도가 어떤 상관관계를 갖는지 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 생쥐 난포 및 난자의 준비

생후 21일 된 ICR 생쥐에 5 IU의 PMSG를 주사하고 48시간 후에 경추탈골시킨 후 난소를 얻어 해부현미경 하에서

FBS와 dbcAMP가 들어있는 TCM-199(Gibco, Grand Island, NY)에서 난포를 크기별로 분리하였다. 새 배양액으로 옮겨 세척한 후 450 μm 이상의 난포(large)와 200~400 μm (small) 난포로 나누어 난포를 터뜨려 난자를 얻었다. 이때 난자는 난구세포가 밀접하게 둘러싸고 있는 상태로 나오거나(intact), 혹은 난구세포가 성글게 붙어있는 경우(partial), 그리고 전혀 동반된 난구세포 없는 상태(denuded)로 방출된다. Large follicle과 small follicle에서 나온 난자를 다시 intact한 난자를 한 그룹으로, 그리고 partial과 denuded 난자를 합쳐서 다른 한 그룹으로 하여 실험에 사용하였다.

2. *In Vitro* Maturation과 *In Vitro* Fertilization

난자의 *in vitro* maturation은 TCM 199에 10% FBS(Hyclone, Logan UT), PMSG(Folligon; Intervet, Boxmeer, Holland) 100 IU, HCG(Chorulon; Intervet, Boxmeer, Holland)가 첨가된 배지에서 배양하였다. 난자의 MII stage까지의 상태를 확인하고 IVF(*in vitro* fertilization)를 진행하였다. IVF는 P1(Irvine Scientific Co., San Diego, CA) 배양액에 glucose(Sigma, St. Louis, MO) 0.001g/ml와 BSA 15mg/ml가 포함된 배지에서 37°C에서 2시간 동안 capacitation시킨 정자를 난자와 함께 4시간 동안 incubation하였다. 그 이후 난자의 발달은 P1 배양액에 fatty acid-free BSA(3mg/ml), modified Eagle medium nonessential(0.5%), 그리고 essential amino acid solution(1%), hemoglobin(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), EDTA(0.1mM)를 첨가하여 배양하였다.

3. RT-PCR

각 그룹의 난자는 1.5% hyaluronidase를 포함한 100 μl 배양액에 넣어 37°C에서 1시간 동안 기다렸다가, 효소 처리되어 느슨해진 COC를 난자의 직경과 같게 뽑은 glass micropipette를 통과시킴으로써 난자로부터 난구세포를 물리적으로 떼어내어 denuded 난자를 만들었고, 한 번 실험에 6~8개의 난소를 사용하여 얻어지는 난자의 수는 LI, LPD, SI, SPD 각 그룹에 38, 28, 22, 67개의 비율로 얻어졌으며, 다섯 번 실험을 반복하였다. 이때 모아진 각 그룹의 난구세포들은 효소가 들어 있지 않은 새로운 배양액으로 2번 washing하여 사용하였다.

각 그룹의 검체와 TRIzol(Gibco) 용액을 넣고 균질화시킨 후 상온에서 5분간 방치하였다. 여기에 전체부피의 1/5에 해당하는 chloroform을 넣고 4°C에서 12,000 g로 15분간 원심 분리하였다. 그리고 RNA를 포함하는 무색의 상층액을 새로운 튜브에 옮긴 후, 동일한 양의 isopropanol과 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 Glycoblue(Ambion, Inc., Austin, TX) 2 μl 를 첨가하여 상온에서 10분간 방치하였다. 그런 후 4°C에서 12,000 g로 10분간

원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 따라버린 후 75% ethanol을 넣고 4°C에서 5분간 7,500 g로 원심분리하였다. RNA 침전물을 공기 중에서 건조시킨 후 DEPC 처리된 증류수로 용해시켜 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

역전사(reverse transcription) 반응에는 RNA suspension 5 μl 를 사용하여 SuperScript Preamplification System(Gibco)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 총 반응 용액을 20 μl 로 하여 SuperScript II RNase H- reverse transcriptase 200U, oligo(dT) 12~18 primer 0.5 μg 을 사용하여 cDNA를 합성하였고 negative control로는 reverse transcriptase 없이 반응한 것을 cDNA 대신 사용하였다.

중합효소연쇄반응(PCR)에 사용된 GAPDH primer는 forward와 reverse primer를 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. CX 37 primer는 forward primer로 5'-CTGCCTCCAGCACACTCTTACA-3', reverse primer로 5'-GCAAGATCTGGTTAACGGTGCT-3', CX 43 primer는 forward primer로 5'-GAGAGGAAGCAGTCCACCTG-3', reverse primer로 5'-AACAGTCTGCCTTTCGCTGT-3'을 사용하였다. 이때 예상되는 PCR 결과는 각각 446bp, 437bp, 461bp이었다. PCR은 75mM Tris-HCl(pH8.8), 20mM (NH₄)₂SO₄, 1.5mM MgCl₂, 0.01% Tween 20, 0.2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.625 Unit Taq DNA polymerase가 포함된 PCR master mixture (ABgene, Survey, UK)를 전체 25 μl 반응으로 하여 시행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 predenaturation 반응한 후에 94°C에서 40초간 denaturation, 60°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 40회 반복하였고 postelongation 반응을 72°C에서 10분간 실시하였다. 이를 통해 얻어진 PCR product는 1.5% agarose gel에 전기영동한 후에 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. PCR reaction에서 cDNA의 존재를 확인하고 RT-PCR을 통한 상대적인 양을 비교하고자 GAPDH 발현을 positive control로 사용하였다. 상대적인 CX 37, CX 43의 발현 정도를 알아보기 위하여 전기영동한 결과를 Image Analyzer(Vilber Lourmat, France)를 이용하여 정량분석하고, GAPDH의 발현에 대한 CX 37, CX 43 발현 정도를 arbitrary unit(AU)로 환산하였다. RT-PCR을 통해 얻어진 product는 CX의 염기서열임을 sequencing을 실시하여 확인하였고, 원하는 유전자의 염기서열임이 입증된 클론은 In situ hybridization을 시행하기 위하여 보관하였다.

4. *In Situ* Hybridization

In Situ Hybridization에 사용되는 RNA probe를 제작하기 위하여, RNA *in vitro* transcription(*In vitro* transcription kit,

Promega) 반응을 시켰다. 이때 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA template($1 \mu\text{l}$), 5X Trans buffer($4 \mu\text{l}$), RNAsin($2 \mu\text{l}$), T7 또는 SP6 RNA polymerase($2 \mu\text{l}$), DIG RNA labeling mix(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; $2 \mu\text{l}$), 100mM DTT($2 \mu\text{l}$) 및 DEPC-H₂O를 전체 $20 \mu\text{l}$ 가 되도록 첨가하여 37°C에서 3시간 반응시킨 후 RNase-free DNase I(Gibco BRL)을 처리하였다. RNA probe의 생산을 확인하기 위하여 반응물 $1 \mu\text{l}$ 를 1% agarose gel에 전기영동하여 band를 조사하였다. DNA 양을 확인한 후 probe 반응물을 G-50 Columns(Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ)으로 정제한 후 DNA 농도가 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 Hybe buffer(50% formamide, 5X SSC, 1mg/ml Torula yeast RNA, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ heparin, 1X Denhardt's solution, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 0.5mM EDTA)로 희석하였다.

생쥐의 난소조직을 4% paraformaldehyde에 고정시킨 후 paraffin block을 제작하였으며, $5 \mu\text{m}$ 두께의 절편을 silanized glass slide에 부착하여 보관하였다. Paraffin 절편 슬라이드를 xylene에 처리하여 paraffin을 제거하고, 알코올 처리과정을 거쳐 PBS 용액으로 세척한 후 4% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 10분간 재고정 하였다. PBS 용액으로 세척한 후 0.1M triethanolamine(TEA) 용액으로 5분간 반응시키고, 0.25% acetic acid가 포함된 0.1M TEA 용액으로 실온에서 10분간 처리하였다. 알코올 처리과정을 거쳐 탈수시킨 후 Hybe buffer에 RNA probe를 100배 희석하여 조직 위에 처리하였다. 조직이 마르지 않도록 parafilm을 덮어서 65°C humid chamber에서 overnight 처리하였다. 이후 65°C로 예열된 2X SSC-50% formamide 용액으로 30분간 처리한 후 blocking reagent(20% sheep serum, 2% BMB; Boehringer Mannheim Blocking buffer)가 들어있는 MAB(100mM maleic acid in 150mM NaCl, pH 7.5) 용액으로 실온에서 1시간 반응시켰다. 여분의 용액을 제거하고 anti-DIG antibody(Boehringer Mannheim)를 blocking reagent가 포함된 MAB 용액으로 1000배 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. MAB 용액으로 10분씩 4회 수세하고 BCIP-NBT(Sigma)로 실온에서 1시간 발색시켰다. 발색 후 PBS로 수세하고, Nuclear Fast Red로 counter stain한 후 Aqueous mounting medium(DAKO, Carpinteria, CA)으로 봉입하였다.

5. 통계처리

체외배양되는 난자의 성숙정도 및 정상적인 2-세포기 형성 성적의 비교는 ANOVA로 분석하였다. 유의차에 대한 수준은 p 값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있다고 분석하였다.

결 과

1. Intact 난자와 Partial/Denuded 난자의 비교

난소로부터 물리적으로 분리된 난포를 크기에 따라 large 와 small로 분리한 뒤, 각 난포로부터 난자를 얻었는데, 회수된 난자의 구성은 Fig. 3과 같다. 큰 난포의 경우 55%의 난자가 intact COC이었으며, 나머지 45%가 partial/denuded COC이었다. 그러나 작은 난포의 경우, 70%의 난자가 partial/denuded COC 상태로 나왔고 나머지 30%가 intact COC이었다(Fig. 3). 이렇게 회수된 난자를 체외에서 배양하면서 체외성숙을 유도하였을 경우 어느 난포에서 나왔던 상관없이 intact COC의 경우 LI에서 100%, SI에서 98.6% 핵성숙이 일어났으며, partial/denuded의 경우에도 96.6%(LPD), 96.7%(SPD)의 핵 성숙을 보였다(Fig. 4A). 그러나 이들 난자의 체외수정 후 정상적인 2-세포기 배아로의 발달율을 비교하여 보면 LI, LPD, SI 난자에서 75.9%, 62.4%, 68.6%를 보인 반면, SPD 난자는 32.2%로 통계적으로 유의하게 낮은 발달율을 보였다(Fig. 4B).

2. Connexin 43과 connexin 37의 발현

RT-PCR을 이용한 CX 발현의 대표적인 연구결과는 Fig. 5에 나타났다. CX 37은 난자와 난구세포 모두에서 그리고 intact이거나 partial/denuded 상태에 상관없이 모두 발현되었다. 그러나 난자에서의 발현이 난구세포에 비하여 항상 높았고, 작은 난포가 큰 난포보다 높게 발현되었다. CX 43은 난구세포에서만 발현할 뿐, 난자에서는 발현하지 않았는데(Fig. 5) 이 결과는 in situ hybridization을 이용한 연구결과에서 다시 확인되었다(Fig. 6). CX 43은 난자에서는 발현되지 않은 반면, 모든 크기 난포의 난구세포 및 과립세포에서 강하게 발현하였다.

고 찰

본 연구에서는 발달상태가 비슷한 같은 크기의 난포로부터 나온 난자라고 하여도 난포내에서 난자와 난구세포가 연결되어 있었던 상태에 따라서 난자의 능력도 달라질 것이라는 가설을 증명하기 위하여 수행되었으며, 실제로 난구세포와의 결합정도에 따라서 난자의 능력이 결정된다는 것을 확인하였다.

200~400 μm 의 작은 난포로부터는 예상했던 대로 많은(70%) 난자가 난구세포와 전혀 결합하지 않은 채 혹은 몇 개의 난구세포와 결합한 채로 나왔다. 난포의 성장이 정지되어 있

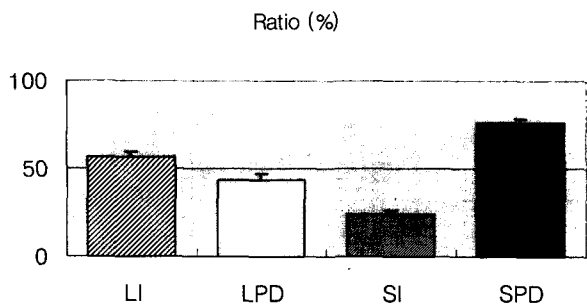


Fig. 3. This graph depicts the ratio between intact and partial/denuded oocytes released from the large and small follicles. Portion of intact COC from large follicle was 55%(LI), while partial/denuded COC from large follicles(LP) was 45%. In the case of small follicles, it was 30%(SI) and 70%(SPD). Results were from 8 different experiments.

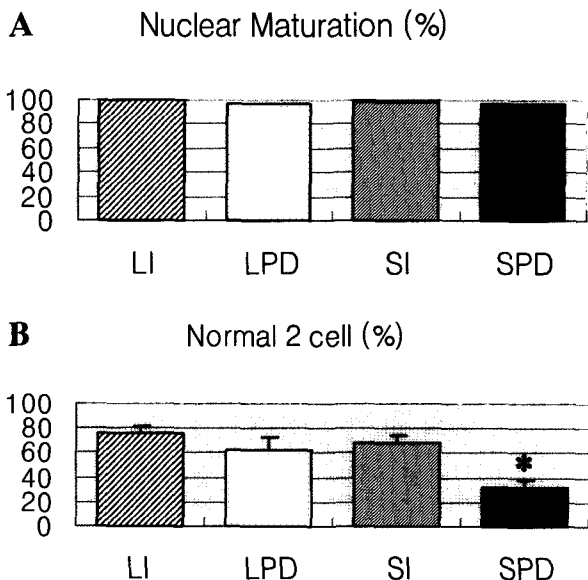


Fig. 4. Developmental competence of oocytes from follicles of different sizes. Results are from four experiments. Value with asterisk is significantly different($p < 0.05$).

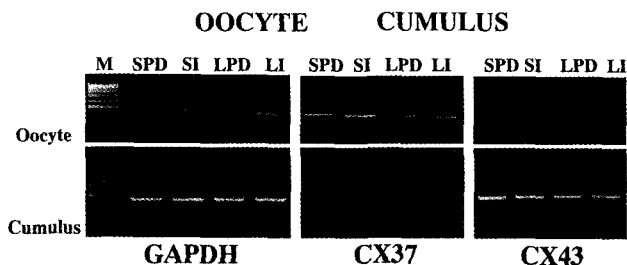


Fig. 5. Typical RT-PCR data of the house keeping gene, GAPDH, and two different connexins, 43 and 37, expressed in the separated oocytes and cumulus cells. Experiments were repeated five times. Connexin 43 and connexin 37 were the major one expressed in the cumulus cells and oocytes, respectively.

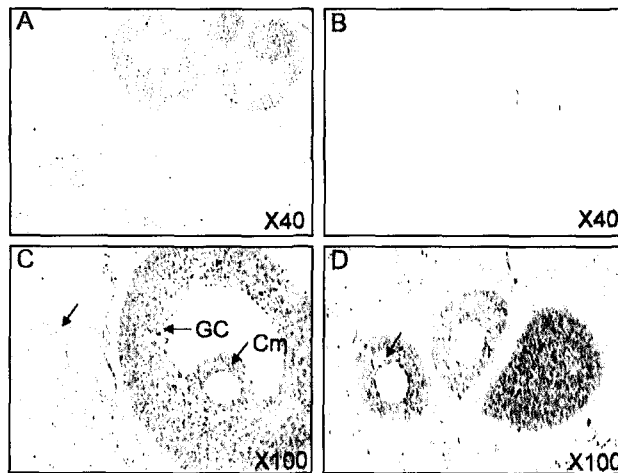


Fig. 6. Connexin 43 mRNA expression in the mouse ovaries 48 hours after PMSG injection. A, C, D: antisense probe, B: sense probe. GC, granulosa cells; CM, cumulus cells.

던 primordial 단계로부터 선택된 난포가 성장을 재개하기 시작하면 난포내 과립세포의 분열이 왕성해져서 세포의 수가 증가하고 antrum이 형성되기 시작하는데, 이때부터 과립세포와 난구세포도 확실하게 구분할 수 있게 된다. 이렇게 난포가 자라는 동안 난자도 함께 성장하는데, 난포의 성장이 진행되는 동안 난자는 난포 표면으로부터 멀어지게 되므로 주위의 난구세포와 과립세포 등과 밀접하게 결합함으로써 난포 밖으로부터 공급되는 여러 가지 물질의 원활한 수송을 꾀할 수 있게 된다. 따라서 난구세포와 난자의 결합력도 난포의 성장과 함께 증가할 것으로 생각되었다. 그러나, 450 μ m 이상의 충분히 자란 antral follicle 즉, preovulatory 난포로부터 얻어진 난자의 경우에도, 난구세포와 밀접하게 붙어있는 intact한 상태의 난자가 의외로 적어서 55% 정도였고, 난구세포와 느슨한 cell-to-cell 결합을 갖는 난자가 기대 밖으로 많아서 45%나 되었다. 반면에 작은 난포로부터도 30%의 난자는 난구세포와 매우 밀접하게 결합한 채로 얻어지는데, 성숙한 난포로부터 나온 intact한 난자와 외형적으로 다를 것이 없었다. 따라서, 이렇게 난구세포와 서로 다른 결합력을 갖고 있는 난자는 분명 서로 다른 물질이동 능력을 갖게 될 것이므로 난자의 품질, 성숙한 정도가 서로 다를 것으로 추정할 수 있다.

위와 같은 가정 하에서 우선 난자의 체외성숙정도, 수정능력, 그리고 2-세포기로 발달하는 정도를 비교하였다. 아직 덜 발달한 작은 난포로부터 나온 난자라고 하여도 3% 정도의 난자만 GV 상태로 남아 있었을 뿐, 대부분 핵성숙이 일어났다. 그러나, 이렇게 체외에서 성숙한 난자를 수정시키고 2-세포기까지 발달시켜 봤을 때에는 그 능력의 차이가 나타나기

시작하여 각각의 크기의 난포에서 비교해 볼 때, intact한 난구세포를 갖는 난자가 그렇지 못한 난자에 비해 높은 수정과 발생률을 보였다. 그러나, preovulatory 난포에서 나온 성숙한 난자의 경우에는 충분한 시간을 두고 정상적인 발생을 한 난자, 즉 preovulatory 난포의 경우에는 거의 같은 수준의 발생 능력을 보유하게 된 것으로 생각된다. 그러나, 두 군간의 차이가 통계학적으로는 의미가 없었지만, 역시 intact한 난구세포를 가졌던 난자(LI)의 능력이 그렇지 못한 난자(LPD)보다 좋은 경향을 보였다. 이와 같이 난포의 크기가 충분히 발달하는 동안 그 안의 난자는 충분한 발생능력을 갖게 된다는 점은 여러 종류의 동물에서 난포를 크기별로 비교한 연구논문에서 잘 알려져 있다(Lonergan et al., 1994; Crozet et al., 1995).

본 연구에서도 미발달된 작은 난포로부터 나온 미성숙 난자들 중에서 난구세포와 밀접한 결합을 갖지 못하였던 난자(SPD)는 2-세포기 배아를 형성한 것이 32.2%로 그 성적이 다른 세 그룹의 난자보다 월등히 낮았다. 그러나, 이때에 예상치 못했던 결과를 얻은 것은 아직 덜 발달한 작은 난포로부터 나온 난자 중 30%의 난자, 난구세포와 밀접한 결합을 갖고 있던 미성숙난자(SI)의 능력이었다. 이들로부터 2-세포기의 배아가 만들어진 성적은 68.6%로서 이는 큰 난포로부터 얻어진 성숙한 난자로부터 얻어진 결과와 차이가 없었으며, 비록 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 LPD 그룹의 난자(62.4%)보다 오히려 높은 경향을 보인 것이었다. 즉, 충분히 발달한 난포로부터 얻은 성숙한 난자에 비하여 통계적으로 유의한 차이가 없이 좋은 성적이었다. 이와 같이 작은 난포로부터 나온 난자는 체외배양에서 거의 모두 핵성숙을 이루었으나, 수정능력과 배발달 능력에는 차이를 보이는 것으로 보아서 난포발달 과정 중 함께 진행되는 난자의 발달과정 중 난구세포를 통한 물질교환이 난자의 능력을 결정하는데 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

1991년 차 등(Cha et al., 1991)은 미성숙한 난자를 이용하여 건강한 아기를 탄생시키는데 성공하였다. 여성의 정상적인 배란은 난포가 20mm 이상으로 자랐을 때 일어나는데, 위 연구에서는 폐기되는 난소로부터 2~5mm 정도 크기의 난포로부터 미성숙난자를 얻어, 체외성숙과 시험관아기 방법을 통해 임신과 출산에 성공하게 된 것이다. 이 연구로부터 미성숙 난자로부터도 정상적인 아기가 탄생할 수 있다는 사실이 밝혀지게 되었고, 이는 그 시기의 작은 난포라고 하여도 그 안의 미성숙 난자는 성숙한 난자와 같은 능력을 갖고 있음을 시사해주는 결과였다. 또한 미성숙난자를 이용한 시험관아기 연구결과에서도 체외수정 성적은 성숙한 난자와 거

의 차이가 없으나 임신률의 성적은 매우 낮아서 성숙한 난자와의 차이점이 분명히 있다는 것을 알 수 있다(Cha et al., 1991; Cobo et al., 1999; Mikkelsen et al., 1999). 본 연구에서 SI 그룹의 난자가 미성숙난자이면서도 성숙난자를 이용할 때와 같은 결과를 가져올 수 있는 능력을 갖고 있다는 것을 간접적으로 보여주는 결과라고 생각되며 이 또한 난자의 능력을 결정하는데 난구세포와의 결합이 중요함을 시사해준다.

난포가 성장해감에 따라서 난포내 난자도 함께 성장하고, 이때 과립세포 및 난구세포와 cell-to-cell 결합을 하게 되는데, 이때 세포사이에 형성된 gap junction을 통해서 물질이동이 이루어진다는 것은 잘 알려져 있는 사실이다(Eppig, 1991). Gap junction은 혈액세포와 운동근육조직을 제외한 신체 어느 부위에나 분포하고 있다(Yamasaki & Naus, 1996). Gap junction을 이루고 있는 주요 단백질은 CX인데, CX는 여러 개의 유전자로부터 만들어지며, 현재까지 그 종류가 16종 이상이 밝혀져 있고, 그 숫자는 계속적으로 증가할 것으로 추측되고 있다(Lo, 1999). 이제까지 사람을 포함한 영장류, 생쥐, 흰쥐, 토끼, 소, 양 등의 포유류 난소 내에서 CX 26, CX 30.3, CX 31.1, CX 32, CX 37, CX 40, CX 43, CX 45 등이 발현된다고 보고되었다(Grazul-Bilska et al., 1997; Sommersberg et al., 2000; Wright et al., 2001).

이 중에서 CX 37과 CX 43에 대해서는 Knock out 생쥐를 이용한 실험을 통하여 가장 많은 연구가 이루어져 있고, 두 CX 모두 folliculogenesis에 매우 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다(Simon et al., 1997; Juneja et al., 1999). Simon 등의 연구에 의하면 CX 37이 결핍된 생쥐는 불임으로서 과립세포와 난자사이의 염색약 이동이 이루어지지 않는 것을 관찰함으로써 gap junction을 통한 연결이 끊어졌기 때문인 것을 알아내었다. CX 37이 결핍된 생쥐의 난소에서는 folliculogenesis가 정지되고, 황체형성이 일찍 일어나는 premature corpus luteum formation 현상을 보였는데, 이것은 다낭성 난소증후군 여성의 난소에서 황체화 호르몬에 의해 gap junction이 끊어지면서 조기난포발달이 일어나는 현상과 비슷한 결과로 보인다(Simon et al., 1997). Juneja 등의 연구에 의하면, CX 43 결핍생쥐의 난소에서는 난포가 제 1차 난포 단계까지만 발달하는 것을 관찰함으로써 gap junction을 통한 긴밀한 연락이 난포성숙과정 중 과립세포의 증식에 매우 중요함을 알 수 있게 되었다(Juneja et al., 1999).

본 연구에서는 위에서 언급한 바와 같이 folliculogenesis 동안 그 역할이 매우 중요한 것으로 알려져 있는 CX 43과 CX 37의 유전자 발현을 알아보기로 네 그룹의 난자와 그 곁을 싸고 있는 난구세포를 각각 분리하여 RT-PCR을 수행하였고,

분포를 다시 한번 확인하기 위하여 *in situ hybridization*을 수행하였다. 이제까지 보고된 많은 연구들이 모두 난자와 과립 세포에 초점을 맞추고 있는 반면 본 연구팀은 난구세포에 초점을 두었다. 그 이유는 난구세포에 대한 많은 연구가 되어 있지 않다는 이유 이외에도, 난구세포는 난자와 가깝게 위치하는 난포세포로서 난자와 직접 연결되어 난포 밖으로부터 전달되는 물질의 이동통로가 되기 때문에 난구세포와 난자의 연결상태에 따라서 난자의 형질이 가장 큰 영향을 받을 것이기 때문이다. CX 43은 *preantral follicle* 이후 단계의 과립 세포와 난구세포에서 모두 발현되었으나, 난자에서는 관찰되지 않았다. 반면에 난자에서 가장 강하게 발현되는 것은 CX 37이었고, 난구세포에 존재하는 CX 37은 CX 43에 비해서는 적은 양이었다. 그러나, 발현이 관찰되는 경우는 네 그룹에서 모두 발현되어서, 기대했던 발현의 차이 즉, *intact COC*를 이루고 있는 경우와 *partial/denuded*한 *COC*의 경우 CX 발현의 차이점은 발견할 수 없었다. 또한, 절편에서 관찰되는 난포내 난자와 난구세포가 실제로 *intact*하게 존재하고 있는 것인지, 그 결합이 약하여 결국에는 *partial/denuded* 결합을 하고 있는 것인지는 알 수 없기 때문에 *in situ hybridization*을 이용한 연구결과는 RT-PCR 결과를 다시 확인하는 이상의 효과를 주지 못하였다.

서로 어떤 종류의 CX로 이루어졌는가에 따라 *gap junction*의 특성이 달라지므로(Bruzzone et al., 1996b; Goodenough et al., 1996; Kumar & Gilula, 1996) 만약, 발현의 차이가 있는 CX가 있다면 *gap junction*의 특성을 변화시켜 유통되는 물질의 종류도 변화하게 되어 난자 및 난구세포 상호간의 특성 변화를 초래할 것이다. 그러나, 어떤 CX의 발현 차이에 의해 서로 다른 강도의 결합을 갖게 되는지, 그 원인에 대한 연구는 CX 43, 37 이외에도 본 연구에서 다루지 못한 더 많은 종류의 CX가 네 그룹간의 난자와 난구세포에서 어떻게 발현할지 모르는 일이기 때문에 매우 어려운 문제점이기도 하다. *Gap junctional communication*은 여러 종류의 CX가 함께 발현하면서 서로의 역할을 보완하기 때문에 각각의 CX 발현을 추적하는 것보다는 한꺼번에 확인할 수 있는 DNA chip을 이용하는 등의 방법으로 연구하는 것이 적절하다고 생각되며, *junction*을 통한 물질이동을 실제로 관찰하여 세포간에 이루어지는 물질교환의 기능에 초점을 두어서 확인해야 하는 것도 또 다른 연구 방법이라고 사료된다.

본 연구결과로는 서로 다른 강도를 갖는 난자와 난구세포간의 *cell-to-cell communication*에 관여하는 CX의 종류를 알 수 없었으나 난구세포와의 연결 정도가 서로 다른 난자는 확실히 서로 다른 능력을 갖는다는 생리학적 사실을 확인

할 수 있었다. 또한, 난자와 난구세포간의 *gap junction*은 서로 다른 종류의 CX로 이루어져서 *heterotypic*할 것이라는 것을 알 수 있었다. 따라서 이 후의 연구는 이렇게 같은 발달단계라도 난구세포와의 결합정도에 따라 서로 다른 능력을 갖는 난자간의 실제 능력의 차이점이 무엇인지 난자 자체의 유전자 발현의 차이점에 초점을 맞추어서 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Albertini DF, Fawcett DW, Olds PJ (1975) Morphological variations in gap junctions of ovarian granulosa cells. *Tissue Cell Res* 7:389-405.
- Ackert CL, Gittens JEI, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM (2001) Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Develop Biol* 233:258-270.
- Bruzzone R, White TW, Goodenough DA (1996a) The cellular internet: On-line with connexins. *BioEssays* 18:709-718.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996b) Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238:1-27.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK (1991) Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from non-stimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 55:109-113.
- Cobo AC, Requena A, Neuspiller F, Aragons M, Mercader A, Navarro J, Simon S, Remohi J, Pellicer A (1999) Maturation *in vitro* of human oocytes from unstimulated cycles: selection of the optimal day for ovum retrieval based on follicular size. *Human Reprod* 14:1864-1868.
- Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP (1995) Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J Reprod Fert* 103:293-298.
- Eppig JJ (1991) Intercommunication between mammalian oocytes and companion follicle cells. *Bio Essays* 13:569-574.
- Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F (1994) Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Develop Biol* 164:1-9.

- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65:475-502.
- Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Redmer DA (1997) Gap junctions in the ovaries. *Biol Reprod* 57:947-957.
- Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM (1999) Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. *Biol Reprod* 60:1263-1270.
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.
- Lo CW (1999) Genes, gene knockouts, and mutations in the analysis of gap junctions. *Develop Genet* 24:1-4.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I (1994) Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 37:48-53.
- Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenber S (1999) *In-vitro* maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Human Reprod* 14:1847-1851.
- Nuttinck F, Peynot N, Humblot P, Massip A, Dessy F, Flechon JE (2000) Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. *Mol Reprod Develop* 57:60-66.
- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL (1997) Female infertility in mice lacking connexin 37. *Science* 385:525-529.
- Sommersberg B, Bulling A, Salzer U, Frohlich U, Garfield RE, Ansterdam A, Mayerhofer A (2000) Gap junction communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: Regulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 63:1661-1668.
- Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M (1999) Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283:1176-1180.
- Valdimarsson G, De Sousa PA, Kidder GM (1993) Coexpression of gap junction proteins in the cumulus-oocyte complex. *Mol Reprod Develop* 36:7-15.
- Wright CS, Becker DL, Lin JS, Warner AE, Hardy K (2001) Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reprod* 121:77-88.
- Yamasaki H, Naus CC (1996) Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 17:1199-1213.