

포유류의 난포발달과 난자성숙

포천중문 의과대학교 생명과학 전문대학원¹, 차병원 여성의학연구소²

이 경 아^{1,2}

Mammalian Follicular Development and Oocyte Maturation

Kyung-Ah Lee^{1,2}

¹Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University College of Medicine,

²Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul, Korea

서 론

최근에 생명공학 또는 의과학 분야에서 중요한 연구로 대두되고 있는 배아 줄기세포 연구, 복제 돼지의 생산 및 체외수정을 통한 불임환자의 치료 등과 같은 과제 성공을 위해서 반드시 극복해야 하는 문제점이 바로 체외에서의 난자성숙 과정이다. 난자를 체외에서 키우거나, 혹은 성숙하게 하는 일은 유용한 대동물이나 멸종동물의 생산, 또는 불임환자의 치료를 위한 체외수정에 있어서 필요한 성숙한 난자를 얻기 위해 반드시 거쳐야 과정이기 때문이다.

여성의 난소에 존재하는 대부분의 난자는 제 1 감수분열 전기에 멈추어 있는 상태로 성장을 멈추고 원시난포 (primordial follicle) 안에 존재한다. 이 시기로부터 시작하여 난자가 제 1, 제 2 감수분열을 모두 끝내고 metaphase II (MII) 단계의 성숙한 난자가 되기 위해서는 Figure 1에서 설명된 바와 같이 난자의 성장 (oocyte growth)과 난자의 성숙 (oocyte maturation) 과정을 모두 거쳐야만 한다. 난자의 성장은 난포의 성장과 더불어 진행된다. 난포는 원시난포로부터 1차 난포 (primary follicle), 2차 난포 (secondary follicle), preantral 난포시기를 거쳐서 an-

trum이 형성된 난포로 성장하게 된다. 1차 난포가 되면서 그 안의 난자는 성장을 다시 시작하게 되고, 그 주변의 과립세포는 입방형이 되면서 분열을 시작하게 된다. 그러나 아직까지 성장을 멈추고 있던 원시난포의 성장이 어떻게 재개되어 난포의 성장과 난자의 성장이 시작되는지에 대해서는 그 기전이 밝혀져 있지 않다.

여성의 난소 내에 이렇게 성장을 멈추고 있는 원시난포가 많이 존재하는 것을 생각할 때, 체외배양을 통하여 원시난포로부터 난자의 성장을 유도할 수 있는 방법을 개발한다면 우선적으로 연구 및 치료를 위해 필요한 난자의 공급에 새로운 영향을 줄 수 있으며, 나아가서 생식생리학적으로 난소에 존재하는 생식세포의 수를 조절할 수 있는 길도 열리게 될 것으로 사료된다. 그러나 체외에서 원시난포의 난자로부터 성숙한 난자로 키우는 난자의 성장에 대한 연구는 생쥐 이외에서는 성공한 예가 없어 아직도 많은 연구가 이루어져야 하는 영역이다. 한편, 난자성숙에 대해서는 상대적으로 많은 연구가 이루어져 있음에도 불구하고 아직도 난자성숙 과정의 정확한 조절기전에 대한 이론이 정립되어 있지 않아 앞으로 많은 연구가 진행되어야 할 분야로 남아 있다.

체내에서 자연적으로 일어나는 난자성숙 과정과

주관책임자: 이경아, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼동 606-13, 차병원 여성의학연구소 분자생식생리학연구실
Tel: (02) 3468-3441, Fax: (02) 563-2028, e-mail: leeka@ovary.co.kr

*본 연구는 농림부 바이오 장기 생산 연구사업의 연구비 지원을 받았음.

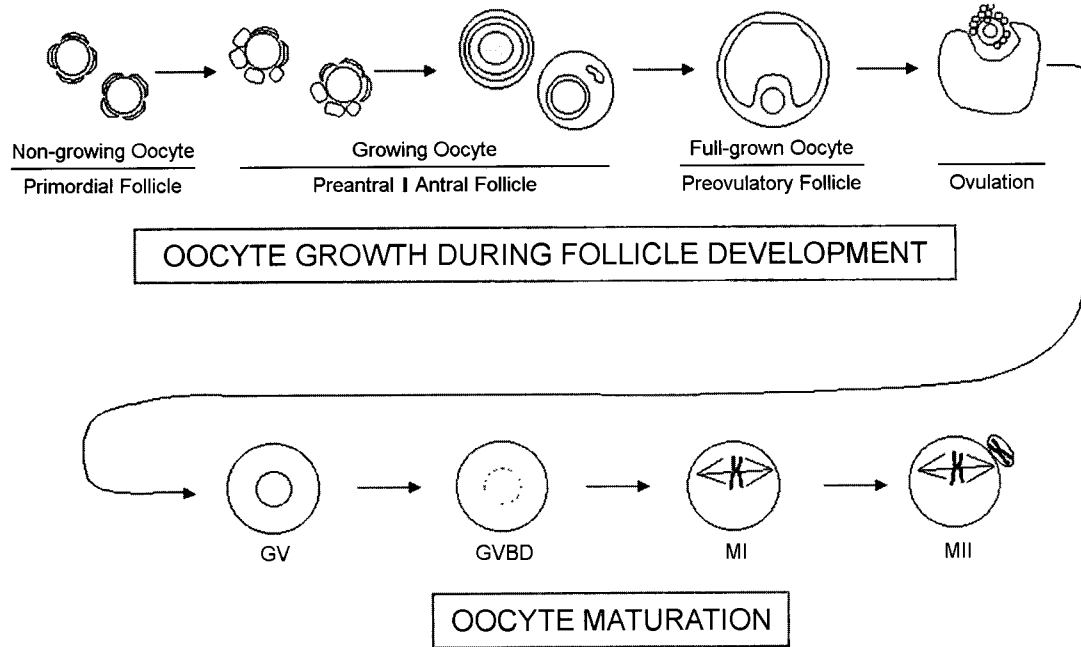


Figure 1. Schematic diagram depicts the mammalian oocyte growth during follicular development from primordial follicles to preovulatory follicles, and the oocyte maturation after ovulation. GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI: metaphase I, MII: metaphase II.

는 달리 난자를 체외에서 배양하면서 난자성숙을 유도할 때는 그 성공률이 여러 가지 요인에 의해 좌우되는데, 처음 배양을 시작할 때의 난자의 크기가 너무 작아도 체외에서의 성장이 매우 어렵다. 또 적당한 크기에서 시작하여 난자의 크기가 충분히 자란다고 하여도, 성숙란으로의 발달률이 비교적 낮은 편이고, 특히 대동물에서는 매우 낮는데, 아직까지 그 이유가 무엇인지 밝혀지지 않고 있다. 최초로 난자의 체외배양을 시도하여, 난포 밖으로 나온 난자는 저절로 난자성숙이 일어나는 것을 안 것은 1935년 Pincus와 Enzman의 실험을 통해서였다.¹ 그 이후 지금까지 약 70년간 난자성숙에 대한 연구는 많은 연구자들에 의해 여러 방향으로 수많은 연구가 이루어졌음에도 불구하고 아직까지도 완벽한 체외배양시스템이 개발되어 있지 않다. 특히 사람 및 돼지에서 체외에서의 난자성숙 및 그 이후 배아로의 발달율이 매우 낮은 것이 현실이다. 따라서 포유류 난자의 성장과 성숙에 관여하는 분자생물학적 기전을 연구 분석하여 이해하는 일은 기초학문적인 관점에서의 발전은 물론이고, 궁극적으로

는 수정 및 배아발달에 필요한 성숙난을 얻기 위하여 또는 난자의 냉동보존 후 최적의 체외배양체계를 확보할 수 있는 방법을 모색하는데 매우 중요한 연구분야라고 생각된다.

난포 및 난자발달의 상호관계

난포 안에는 난자만 존재하는 것이 아니라 난자를 둘러 싸고 있는 과립세포 (granulosa cells)와 그 바깥쪽의 혈막세포 (theca cells)가 함께 존재하고 있다. 원시난포의 경우, 동물의 종에 따라서 대개 10~25 개의 원시상태의 과립세포 (pre-granulosa cells)가 납작하게 난자를 둘러싸고 매우 밀접하게 연결되어 있어 거의 모든 상태가 정지되어 있다.² 이렇게 모든 것이 정지되어 있던 원시난포가 1차 난포로의 성장이 재개되면서 그 안의 난자는 성장을 다시 시작하게 되고, 그 주변의 과립세포는 입방형이 되면서 왕성한 세포분열을 시작하게 된다. 이때 과립세포가 두 층 이상으로 증가할 때, 이를 2차 난포라고 하고, 그 동안에 과립세포 바깥 쪽으로 혈막세포가

나타내기 시작한다. 과립세포의 수는 계속 증가하게 되어 어느 이상으로 자라게 되면서 난포강 (antrum) 이 형성되게 된다. 이렇게 난포강이 형성된 난포를 3차 난포 (tertiary follicle)라고 부르기도 한다.³

난자와 과립세포 간에 또는 과립세포와 과립세포 간에는 gap junction을 통한 구조적으로 매우 긴밀한 형태가 형성되어 있다.^{4,5} Gap junction을 통해서 저분자량의 물질, 특히 영양소나 대사전구물질, 이차신호전달물질 등과 같이 난자의 성장과 발달의 조절에 필요한 물질의 이동이 있음이 보고되어 있다.⁶⁻⁸ 이렇게 운반되는 물질 중 대표적으로 잘 알려진 것이 cAMP로서, 난포 안에 존재하는 난자의 성숙이 저절로 일어나지 않도록 저지하는 역할을 한다.

이때 과립세포로부터 난자로의 물질이동이 매우 중요한 것으로 오랫동안 당연하게 생각되어져 왔는데,⁹ 최근에 그 반대로 난자로부터 과립세포로의 물질이동이 존재하여 난자와 과립세포는 서로의 성장과 발달을 서로가 긴밀하게 조절해 주며, 이때에 난자가 모든 과정을 진두지휘하고 있다는 개념이 대두되었다.¹⁰ 따라서 oogenesis, 즉 난자의 성장과 발달, 그리고 이후 난자의 성숙 및 배아발달을 위한 모든 준비과정은 난자에만 국한되지 않고, 주변의 과립세포 및 험막세포의 역할을 고려한 autocrine 및 paracrine 조절인자까지 모두 포함한 난포 발달, 즉 folliculogenesis와 관련하여 전체적인 조명이 필요하다.¹¹

난자의 성장 (Oocyte Growth)

원시난포로부터 시작하여 모두 다 자란 난자의 성장과정은 생쥐의 경우 3주,¹² 소는 6개월,¹³ 사람의 경우는 약 185일 정도의 시간을 필요로 하며 이 기간 동안 난자의 전체 부피는 약 100배 정도 증가하게 된다.¹⁴ 이렇게 정지하고 있던 난자의 성장이 다시 시작되어 크기가 증가하기 시작하면 난자의 내부에서는 전사 (transcription)와 전이 (translation)가 활발히 일어나기 시작하여 최대크기로 다 자랄 때까지 계속된다. 난자의 성장과 성숙과정을 통하여 난자는 정량적뿐만 아니라 정성적인 변화를 갖음으로써 궁극적으로는 정자와 수정되었을 때 배아로 발달하기 위한 모든 기초적인 준비를 하게 된다. 또

한 이때에는 여러 가지 중요 분자의 변화 이외에도 동시에 세포내 소기관 (organelles)의 양적인 증가 및 발현하는 위치의 변화도 일어난다.^{15,16}

특히 난자의 세포질에서는 미토콘드리아의 수가 증가하고 모양도 변화한다. 골지체의 미세구조가 바뀌고 리보솜의 양도 증가한다. 핵에서 가장 큰 변화를 갖는 것은 인 (nucleolus)인데, 싱글던 형태에서 조금 더 진해지고, 질서정연해지는 구조적인 변화가 있는데 이것은 여러 종류의 RNA (hnRNA, mRNA, rRNA) 합성이 왕성하게 일어나기 때문이다.¹⁷

위에서 설명한 바와 같이 난자의 성장은 난포의 발달과 긴밀하게 연관되어 있으며 크기가 성장하는 동안 중요한 maternal factors를 축적하고 genomic modification 과정을 거치면서 수정과 배아발달을 준비한다. 그러나 이와 같은 준비과정은 마지막으로 난자의 성숙과정 (oocyte maturation)을 통하여 완성되며 이렇게 성숙한 난자, 즉 수정과 배아발달을 해 낼 수 있는 난자를 competent한 난자라 한다.

따라서, 난소 내에는 다음과 같이 네 단계의 난자가 존재한다. 첫째는 성장이 멈춰있는 난자 (resting oocytes)로 원시난포 안에 존재한다. 둘째는 자라고 있는 난자 (growing oocytes)로서, 아직은 다 자라지 못하여 크기가 작으며 난포 밖으로 꺼내어 체외배양 하더라도 성숙한 난자가 될 수 없는 단계다. 셋째는 중간크기의 난자 (middle-size oocytes)로 체외에서 성숙할 수 있으나 그 과정이 완전하게 이루어지지 못하여 metaphase I (MI) 단계에서 다시 정지되는 난자, 그리고 마지막으로 다 자란 난자 (full-grown oocytes)로서 체내에서 생식주기에 따른 성선 자극 호르몬에 반응하거나 혹은 밖으로 꺼내어 체외배양을 하거나 성숙과정을 재개할 수 있는 단계다. 거의 모든 포유류의 난자는 이 시기가 되어야지만 정상적인 수정이 이루어질 수 있다.^{18,19}

그런데, 난포의 발달단계에 따른 난포의 크기와 그 안에 존재하는 난자의 크기는 종에 따라서 다르다. 예를 들면 생쥐의 경우는 early antral follicle 정도 되면 그 안에 존재하는 난자는 거의 모두 다 자란 난자임에 비하여,²⁰ 돼지나 소의 경우는 late antral stage를 지나야 한다.²¹⁻²³

난자의 성숙 (Oocyte Maturation)

난자의 성숙과정은 크게 핵 성숙 (nuclear maturation)과 세포질 성숙 (cytoplasmic maturation)으로 나누어진다. 핵 성숙은 멈춰있던 감수분열이 재개되어 metaphaseII (MII) 단계로 진행되는 과정을 말하는 것이며, 세포질 성숙은 감수분열을 위한 핵의 변화를 제외한 모든 변화를 통칭한다.^{24,25} 그러나 핵 성숙이 일어난 난자라고 하여도 세포질 성숙이 제대로 완성되지 못할 경우, 수정은 된다고 해도 그 이후의 배아발달이 정상적으로 이루어지지 못한다. 따라서 정상적인 발달을 위해서는 핵 성숙과 세포질 성숙이 병행하여 함께 일어나야 한다.

난자는 다른 세포에 비하여 핵이 매우 크기 때문에 특별히 이 시기의 핵을 germinal vesicle (GV)로 명명하여 부르는데, 호르몬에 의하거나 혹은 난포 밖으로 나와서 성숙과정을 시작하게 되면 그 핵막 붕괴가 먼저 일어나게 되고, 따라서 germinal vesicle break down (GVBD)가 난자성숙을 시작한다는 신호가 된다. 이와 동시에 핵 안에 존재하던 염색체들은 다시 정렬하여 MI 단계를 거쳐 MII 단계에서 다시 정지하게 된다. 난자의 감수분열이 재개되는 일은 maturation promoting factor (MPF)에 의하여 조절되고 있고,²⁶ 그 외에 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 중에서도 ERK1/2, p38의 역할에 대하여 생쥐,²⁷ 돼지,²⁸ 등에서 보고되어 있다. 이 두 시스템 간의 연관관계에 대한 연구보고는 다른 여러 종설 논문을 참조하기 바란다.^{27,29} 그러나 이 기전 이외에도 난자성숙을 조절하는 데에는 아직까지 알려지지 않은 다른 기전이 관계하고 있을 것으로 추정되고 있다.

본 저자의 연구실에서 현재 진행 중인 연구의 예비결과에 의하면 생쥐의 난자성숙 과정에는 세 가지의 유명한 MAPK, 즉 ERK1/2, p38, JNK의 phosphorylation이 모두 동시에 일어나며 STAT3도 중요한 역할을 담당할 것으로 추측된다.³⁰ 그러나 이외에도 아직 더 많은 시그널 시스템에 대하여 난자성숙과의 관계를 심도 있게 다루어야 할 영역이라고 사료된다.

보통의 세포에서는 RNA와 단백질의 생성과 분

해가 빠르게 조절되고 있는 반면에 난자의 경우에는 난자가 성장하는 동안 RNA와 단백질이 축적되어 수정 후 배아발달이 시작하여 embryonic gene expression이 시작할 시기까지 존재하면서 작용하는 것이 매우 다른 점이다. 이렇게 물질을 축적하고, 축적하고 있는 물질 중 필요한 것을 적절한 시간에 사용하는 난자의 작용기전을 충분히 알게 된다면, 체외수정으로 competent 수정란을 만드는데 필요한 배양조건을 구축하는 데 많은 도움이 될 것이다. 앞에서 설명한 바와 같이 난자의 competence는 난자가 성장하는 동안 점차적으로 획득되는 현상이지만, 그 난자가 들어있는 난포가 궁극적으로 배란될 운명인지 아니면 atresia에 의해서 소멸될 운명인지에 따라서 그 안에 들어있는 난자의 competence가 결정된다. 따라서 난포발달과 난자의 competence여부의 관계는 정비례하지는 않는다.

난자의 성장과 성숙과정 중에 난자의 competence를 결정하는 것은 결국 매우 정교하게 잘 조절되는 유전자 발현에 의해서라고 할 수 있겠다. 난자에서의 유전자 발현의 조절은 주로 post-transcriptional 조절기전과 세포질 내에 존재하는 성분에 의해서 결정되는데 예를 들면, RNA polyadenylation, RNA masking, RNA localization, RNA sorting, 단백질의 phosphorylation 등의 과정에 의해 결정된다.³¹ 이와 같이 난자성숙은 핵물질의 감수분열 및 세포질의 reprogramming과 관련된 여러 가지 요인들의 변화가 얽혀있는 매우 복잡한 과정이다.

이제까지 oogenesis와 folliculogenesis의 과정이 서로 긴밀하게 연관되어 난자의 성장과 성숙이 일어남을 살펴보았다. 그러나 실제로 이렇게 만들어진, 성숙한 난자를 사용하기 위해서는 어떻게 competent한 난자를 구별해 내는가 하는 것이다. 분자생물학적인 침습적인 방법을 이용하여 난자의 성향을 구별해 낼 수는 있겠으나, 그 후에 그 난자의 사용이 어려우므로 살아있는 상태에서 난자의 상태를 구별하여 사용할 수 있는 방법을 개발하는 것도 매우 중요한 일이다.

살아있는 상태에서 좋은 상태 (competent) 난자를 골라서 사용하기 위해서 몇 가지의 방법을 생각해 볼 수 있다.³² 첫째, 순전히 난자의 전체적인 모습을 봄으로써 결정하는 것인데, 난자가 완벽한 구

형인가, 투명대 (zona pellucida)가 균등한가, 극체 (polar body)가 있는가, 세포질이 투명하고 분포가 균질한가, 또한 배란될 때 난자에 corona cell이 균일하게 잘 붙어 있고, 그 주변의 cumulus cell들이 균일하게 잘 퍼져있는 상태로 존재하는가 하는 등의 육안적인 관찰을 통해서다. 둘째로, 극체의 모양을 이용하기도 한다. 불임환자의 치료를 위한 체외 수정 시 특별히 ICSI (intracytoplasmic sperm injection) 방법을 이용하기 위해서는 난자 주변의 모든 세포를 다 제거하게 되는데, 이때에 극체가 있는지, 있다면 크기가 작은지 등의 형태 관찰로 난자의 핵 성숙 정도를 알려주는 척도가 될 수 있다는 보고가 있다.^{32,33} 그러나 극체의 형태가 난자의 competence를 대변한다는 사실에 대해서는 일치하지 않는 보고도 많이 되어 있어서,³⁴ 아직도 의견이 통일되어 있지 않다. 그 다음으로 생각해 볼 수 있는 것은 세포질과 투명대의 형태가 수정률, 난자의 발달에 미치는 영향을 관찰한 것인데, 이 또한 아직까지 영향이 있다는 보고와³⁵ 전혀 상관이 없다는 보고가³⁶ 있어 연구의 여지를 남겨 놓고 있다. 마지막으로 최근에 개발된 polscope을 이용한 meiotic spindle의 관찰법이 있다.³⁷⁻³⁹ Wang 등은 사람의 난자를 체외에서 배양할 때에 aging에 따라 spindle modification이 있음을 보고하였다.⁴⁰

In Vivo Maturation vs. In Vitro Maturation

체외에서 발달한 수정란이나 이를 이용한 배아는 체내에서 만들어진 배아에 비하여 발달률이 낮는데, 그 이유에 대한 연구가 오랫동안 많은 연구자의 관심이 되어오고 있다. 서론에서 밝힌 바와 같이, 불임환자의 치료를 위한 체외수정이나 복제동물의 생산과 같이 인류복지를 위한 연구의 발전에 가장 큰 장애물로 남아 있는 것이 바로 이 체외에서 발달한 난자 및 배아의 상태가 정상적인 발달에 비하여 부족하다는 것인데, 무엇이 문제점인지 아직 그것을 해결하지 못한 상황이다.

체외발생으로 배아를 생산하기에 어려운 문제점들은 무엇인가 살펴보면 다음과 같다.⁴¹ 첫째, in vitro maturation으로 만들어진 난자의 competence

가 완전하지 못하다는 것이고, 염색체의 이상이나, polyspermy가 높게 나타나는 점, 그리고 핵 성숙과 세포질 성숙이 일치되지 못하는 경우가 많다는 것이다.^{42,43} 둘째, 배아의 발달률이 떨어진다. 소의 경우, in vitro에서 성숙하고 수정된 난자로부터 포배의 발달은 약 35%임에 비하여 in vivo에서 성숙하여 수정된 난자로부터의 발달은 70%가 넘는 것으로 알려져 있다.⁴¹ 셋째, 배아의 대사가 다르다. 넷째, 유전자 발현에 차이가 있다.⁴⁴ 이 경우, connexin 43, leukemia inhibitory factor와 그 receptor, heat-shock protein 70.1, glucose transporter-1과 같은 배아 발달에 중요한 몇 개의 한정된 유전자를 정하여 RT-PCR 방법으로 유전자 발현량을 측정하여 in vivo와 in vitro 배아간의 차이가 있음을 보고하였다.

불임치료를 위한 IVF, 즉 의과학 분야에서나 유용동물의 생산을 위한 생명과학 분야에서 가장 많은 관심을 갖고 연구하고 있음에도 불구하고 다른 학문 분야에 비하여 이 분야의 발달 속도가 매우 느린 것은 아마도 생식세포를 가지고 연구하기에 어려운 점이 많기 때문일 것이다. 특히 난자의 경우, 다른 세포에 비하여 크기는 크지만, 생화학적 또는 분자생물학적 연구를 하기에 충분한 양의 난자를 구하는 일이 어렵고, 무엇보다 사람에서는 윤리적인 문제점 때문에 정상적인 난자나 배아를 이용한 연구가 거의 불가능하기 때문이다.

난자 및 배아의 체외발생과 체내발생의 차이점을 정량적이고 정성적인 유전자 발현의 분석을 통한 연구로 접목하려는 시도가 많이 되고 있다. 최근 들어 빠른 속도로 발전하고 있는 여러 가지 OMICS 분야, 즉 transcriptomics, proteomics, phosphoproteomics, bioinformatics 등과 같은 분야의 연구 기술의 발전으로 이제는 적은 양의 실험대상을 가지고서도 유전자의 발현 및 단백질 발현에 대한 정보를 얻는 것이 충분히 가능해지고 있다. 최근 5년을 전후하여서는 이와 같은 유전자 발현의 분석을 genome-wide high-throughput 방법으로 할 수 있게 되었는데, 그것은 난자 몇 개, 혹은 배아 몇 개로부터 얻은 적은 양의 RNA를 가지고서도 RNA amplification을 이용하여 DNA Chip이나 suppression subtractive hybridization과 같은 분석방법을 접목할 수 있게 되었기 때문이다.⁴⁵⁻⁴⁷

저자가 알고 있는 한 아직까지 *in vivo*와 *in vitro* 난자간 혹은 배아간의 유전자 발현의 차이를 *high throughput method*를 이용하여 직접 비교 분석한 연구논문은 보고된 바가 없다. 그러나, folliculogenesis, oogenesis, 그리고 embryogenesis 동안 관심 있는 발달단계의 난자나 배아를 택하여 *subtractive hybridization*, *ACP-PCR*, *DNA chip* 등의 방법을 이용하여 중요한 발달단계에서 서로 차이 나게 발현하고 있는 유전자를 알아내고, 이들 유전자의 기능을 하나 하나 분석해 나가는 연구가 최근 몇 년간 매우 왕성하게 진행되고 있다.^{46,48-62} 이렇게 쏟아져 나와 쌓이는 유전자 발현에 관한 정보는 앞으로 난자의 성장과 성숙, 그리고 수정과 배아발달에 관련된 문제점들을 풀어나가는데 필요한 방법과 방향을 제시해 줄 매우 중요한 정보가 될 것이다.

In Vitro Growth of Follicles and Oocytes

난소 내에 존재하고 있는 원시난포의 개수를 생각해 볼 때, 원시난포로부터 성숙한 난자를 얻을 수 있게 된다면 이는 매우 중요한 난자의 공급원으로 이용될 수 있을 것이다. 그러나, 현재까지의 연구결과 원시난포를 체외에서 배양해서 성숙한 난자를 만들고, 이로부터 개체까지 태어나게 한 것은 생쥐에서 뿐이다.⁶³ 그러나, 사람을 포함한 대동물의 경우에는 원시난포를 체외에서 배양하여 성장과 발달, 그리고 난자의 분화를 유도한 보고는 아직 없다. 돼지의 경우에는 *preantral follicle* 단계,⁶⁴ 소의 경우에는 *early antral follicle* 단계의 난자로는 성숙난자로 발달시켜 개체가 태어난 보고가 있다.⁶⁵ 그 외에도 포유류의 여러 종에서 원시난포 혹은 *preantral follicle*로부터의 *IVG*가 시도되었으나, 그 연구를 통한 난포발달에 대한 결과만 보고되어 있고, 같은 연구에서의 난자의 성장에 대한 결과는 미비하다 (rat: 66; hamsters: 67; cats: 68; pigs: 64, 69; sheep: 70; goats: 71; cows: 72, 73; humans: 74, 75).

초기단계의 난포를 체외에서 자라도록 하기 위해서는 난소조직을 그대로 혹은 난포를 조직으로부터 분리한 후 *in vitro growth* 배양법과 *xenotransplantation*, 이렇게 두 가지 방법을 사용할 수 있다. 난포

의 *in vitro growth* 배양법은 배양액의 조성 및 배양 방법의 여러 가지 변화를 시도하여 좋은 배양조건을 찾아갈 수 있다는 장점이 있는 반면에 아직까지도 밝혀지지 않은 여러 가지 조절인자를 모두 다 조합하여 생체와 같은 완벽한 배양 시스템을 만들어 내지 못하고 있는 문제점이 있다. 반면에 면역학적으로 조직거부반응을 일으키지 않는 *SCID* 생쥐의 몸을 이용하여 배양할 경우, 체외배양액으로는 만들어내지 못하는 체내의 환경을 만들어 준다는 점에서는 장점이 있으나, 이식할 대동물의 조직 및 자라나는 난자의 크기가 제한적이 될 수 있고, 사람의 조직을 이용할 경우 동물의 몸을 이용하여 사람의 난자를 배양한다는 윤리적인 문제점도 있다. 난포배양에 대하여 더 자세히 정리되어 있는 종설이 보고되어 있다.⁷⁶⁻⁸⁰

지난 십여 년간, 난소 특히 생쥐의 난소를 체외 배양하면서 배양액 내에 그 기능이 이미 잘 알려져 있는 물질 중에서 여러 인자를 한 가지씩 첨부하여 보면서 각 인자가 난포발달에 미치는 영향을 연구하여 왔는데, 이때에 갓 태어난 생쥐의 난소가 사용되었다. 그 이유는 이 시기의 생쥐난소에는 거의 원시난포만이 존재하고 있기 때문에 배양액의 효과가 난포발달에 미치는 영향을 확실하게 확인할 수 있기 때문이다. 이렇게 연구된 물질로서 난포발달을 촉진시켜 주는 것으로는 *nerve growth factor*,⁸¹ *growth differentiation factor-9*,⁸² *basic fibroblast growth factor*,⁸³ *leukemia inhibitory factor*,⁸⁴ *insulin*,⁸⁵ 그리고 본 저자의 연구실에서 보고한 *bone morphogenetic protein-7*⁸⁶ 등이 있다. 그 이외에도 본 저자의 연구실에서는 *platelet-derived growth factor (PDGF)*도 원시난포의 발달을 촉진한다는 사실을 밝혀 보고한 바 있는데, 이때에 *PDGF*를 선정된 것은 바로 *DNA chip*을 이용하여 원시난포와 1차 난포, 2차 난포간에 차이 나게 발현하는 유전자의 목록을 얻어낸 후, 그 목록 중에서 *PDGF*를 발견하여 그 기능을 확인하는 과정 중에 얻어진 결과였다.⁴⁶

결 론

본 종설에서 저자는 정상적인 난포발달을 통해 얻어지는 정상적인 난자의 형성과정에 대한 기본

개념을 살펴보았다. 난자의 성장과정과 성숙과정에서 서로 분리되어 고찰되어야 할 개념이므로 따로 정리해 보았다. 또한 체외배양을 통하여 성숙한 난자를 얻기 위해서 초기발달단계 난포의 체외성장과 난자의 체외성숙을 시도할 때의 문제점 등을 살펴 보았다. 마지막으로 지난 5년간 급속하게 발달하고 있는 분자생물학적 연구방법을 응용한 연구도 소개하였다.

본 연구실에서는 현재까지, subtractive hybridization,⁵⁸ ACP-PCR,⁸⁷ 그리고 DNA chip,⁴⁶ 등의 방법을 모두 이용하여 원시난포, 1차 난포, 그리고 2차 난포간에 서로 차이 나게 발현되는 유전자의 목록 및 성숙난과 미성숙난간의 차이 나는 유전자의 목록을 확보하고 있으며,⁶² 현재는 난자를 체외배양하는 동안 시간별로 변화하는 유전자의 변화를 DNA chip 분석을 이용하여 분석 중에 있다. 이렇게 high-throughput 방법으로 얻어진 유전자의 목록은 보물창고와 같아서, 그 자체만으로도 각 발달단계에 작용하고 있는 유전자를 알게 됨으로 중요한 정보가 되며 또한 그 중에 있는 유전자들의 기능을 하나하나 밝혀나가는 동안 아직도 불모지인 난포발달의 초기단계와 난자의 성장과 난자성숙을 조절하고 있는 여러 가지 기전을 밝혀낼 수 있을 것으로 기대하고 있다.

감사의 글

본 논문을 읽고 개념정리에 도움을 주신 연구실 황상준 박사, 박사과정 윤세진, 박창은에게 감사하며, 참고문헌 정리와 타이핑을 도맡아준 석사과정 김경화에게 감사합니다.

참 고 문 헌

1. Pincus E, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935; 62: 665-75.
2. Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 2001; 55: 1193-210.
3. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122: 829-38.
4. Brower PT, Schultz RM. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev Biol* 1982; 90: 144-53.
5. Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 1991; 13: 569-74.
6. Eppig JJ. Analysis of mouse oogenesis in vitro. Oocyte isolation and the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes. *J Exp Zool* 1976; 198: 375-82.
7. David T. Heller, Daniel M. Cahill and Richard M. Schultz. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Dev Biol* 1981; 84: 455-64.
8. Colonna R, Mangia F. Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. *Biol Reprod* 1983; 28: 797-803.
9. Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 1990; 43: 543-7.
10. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2890-4.
11. Albertini DF, Sanfins A, Combelles CM. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 410-5.
12. Peters H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1969; 62: 98-116.
13. Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 301-7.
14. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Rev* 1996; 17: 121-55.

15. Gosden RG. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186: 149-53.
16. Gosden RG, Bownes M. Cellular and molecular aspects of oocyte development. In: Grudzinskas JG, Yovich JL, editor. *Cambridge review in human reproduction, gamete-the oocyte*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p.23-53.
17. Knobil E, Neill JD. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1988.
18. Eppig JJ. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Adashi EY, Leung PCK, editor. *The ovary*. New York: Raven press; 1993. p.185-208.
19. Fulka J Jr, First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 41-9.
20. Sorensen RA, Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 1976; 50: 531-6.
21. Motlik J, Crozet N, Fulka J. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil* 1984; 72: 323-8.
22. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 437-42.
23. Hirao Y, Tsuji Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor RM. Association between p34cdc2 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote* 1995; 3: 325-32.
24. Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1994; 164: 1-9.
25. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 54: 197-207.
26. Masui Y. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 2001; 69: 1-17.
27. Fan HY, Sun QY. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2004; 70: 535-47.
28. Villa-Diaz LG, Miyano T. Activation of p38 MAPK during porcine oocyte maturation. *Biol Reprod* 2004; 71: 691-6.
29. Abrieu A, Doree M, Fisher D. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci* 2001; 114: 257-67.
30. 인쇄중: Lee KA, Yoon SJ, Park CE, Choi DH, Yoon TK, Cha KY. Simultaneous detection of 7 phosphoproteins of various signal transduction pathways in a single sample during oocyte maturation process. 61th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Montreal, Quebec, Canada, October 15-19, In press 2005.
31. Gandolfi TA, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 2001; 55: 1255-76.
32. Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034: 132-44.
33. Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, Soewarto D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* 1995; 10: 2343-49.
34. Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, Kuliev A. Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 336-41.
35. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12: 1267-70.
36. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fer-

- tilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 3431-3.
37. Keefe D, Liu L, Wang W, Silva C. Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 24-9.
 38. Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003; 18: 817-20.
 39. Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, Lessing JB, Amit A, Azem F. Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum Reprod* 2004; 19: 649-54.
 40. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 348-53.
 41. Lechniak D. Quantitative aspect of gene expression analysis in mammalian oocytes and embryos. *Reprod Biol* 2002; 2: 229-41.
 42. Holm P, Callesen H. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev* 1998; 38: 579-94.
 43. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 234-48.
 44. Niemann H, Wrenzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 2000; 53: 21-34.
 45. Yoon SJ, Choi DH, Lee WS, Cha KY, Kim SN, Lee KA. A molecular basis for embryo apposition at the luminal epithelium. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 219: 95-104.
 46. 인쇄중: Yoon SJ, Kim KH, Chung HM, Choi DH, Lee WS, Cha KY, Lee KA. Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. *Fertil Steril*. In press 2005.
 47. Patel OV, Suchyta SP, Sipkovsky SS, Yao J, Ireland JJ, Coussens PM, Smith GW. Validation and application of a high fidelity mRNA linear amplification procedure for profiling gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 105: 331-42.
 48. Ko MS, Kitchen JR, Wang X, Threat TA, Wang X, Hasegawa A, Sun T, Grahovac MJ, Kargul GJ, Lim MK, Cui Y, Sano Y, Tanaka T, Liang Y, Mason S, Paonessa PD, Sauls AD, DePalma GE, Sharara R, Rowe LB, Eppig J, Morrell C, Doi H. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development* 2000; 127: 1737-49.
 49. Robert C, Barnes FL, Hue I, Sirard MA. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 167-75.
 50. Dalbies-Tran R, Mermillod P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2003; 68: 252-61.
 51. Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L, Robert C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod Suppl* 2003; 61: 117-29.
 52. Zeng F, Schultz RM. Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes. *Biol Reprod* 2003; 68: 31-9.
 53. Bermudez MG, Wells D, Malter H, Munne S, Cohen J, Steuerwald NM. Expression profiles of individual human oocytes using microarray technology. *Reprod*

- Biomed Online 2004; 8: 325-37.
54. Cui XS, Shin MR, Lee KA, Kim NH. Identification of differentially expressed genes in murine embryos at the blastocyst stage using annealing control primer system. *Mol Reprod Dev* 2005; 70: 278-87.
 55. Hwang KC, Park SY, Park SP, Lim JH, Cui XS, Kim NH. Specific maternal transcripts in bovine oocytes and cleaved embryos: identification with novel DDRT-PCR methods. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 275-83.
 56. Hwang KC, Lee HY, Cui XS, Kim JH, Kim NH. Identification of maternal mRNAs in porcine parthenotes at the 2-cell stage: a comparison with the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev* 2005; 70: 314-23.
 57. Lee KF, Kwok KL, Chung MK, Lee YL, Chow JF, Yeung WS. Phospholipid transfer protein (PLTP) mRNA expression is stimulated by developing embryos in the oviduct. *J Cell Biochem* 2005; 95: 740-9.
 58. Park CE, Cha KY, Kim K, Lee KA. Expression of cell cycle regulatory genes during primordial-primary follicle transition in the mouse ovary. *Fertil Steril* 2005; 83: 410-8.
 59. 인쇄중: Pennetier S, Uzbekova S, Guyader-Joly C, Humblot P, Mermillod P, Dalbies-Tran R. Genes Preferentially Expressed in Bovine Oocytes Revealed by Subtractive and Suppressive Hybridization. *Biol Reprod*. In press 2005.
 60. Shin MR, Cui XS, Jun JH, Jeong YJ, Kim NH. Identification of mouse blastocyst genes that are downregulated by double-stranded RNA-mediated knockdown of Oct-4 expression. *Mol Reprod Dev* 2005; 70: 390-6.
 61. Vallee M, Gravel C, Palin MF, Reghenas H, Stothard P, Wishart DS, Sirard MA. Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species. *Biol Reprod* 2005; 73: 63-71.
 62. Yoon SJ, Chung HM, Cha KY, Kim NH, Lee KA. Identification of differential gene expression in germinal vesicle vs. metaphase II mouse oocytes by using annealing control primers. *Fertil Steril* 2005; 83: 1293-6.
 63. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 54: 197-207.
 64. Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M, Kato S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil* 1994; 100: 333-9.
 65. Yamamoto K, Otoi T, Koyama N, Horikita N, Tachikawa S, Miyano T. Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 1999; 52: 81-9.
 66. Daniel SA, Armstrong DT, Gore-Langton RE. Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Res* 1989; 24: 109-21.
 67. Roy SK, Greenwald GS. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 103-14.
 68. Jewgenow K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology* 1998; 49: 1567-77.
 69. Shuttleworth G, Broughton Pipkin F, Hunter MG. In vitro development of pig preantral follicles cultured in a serum-free medium and the effect of angiotensin II. *Reproduction* 2002; 123: 807-18.
 70. Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M. In vitro development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod* 1999; 60: 594-601.
 71. Huanmin Z, Yong Z. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology* 2000; 54: 641-50.
 72. Harada M, Miyano T, Matsumura K, Osaki S, Miyake M, Kato S. Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: Effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology* 1997; 48: 743-55.

73. Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod* 2000; 62: 1322-8.
74. Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril* 1993; 59: 783-90.
75. Abir R, Franks S, Mobberley MA, Moore PA, Margara RA, Winston RM. Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. *Fertil Steril* 1997; 68: 682-8.
76. Telfer EE. In vitro models for oocyte development. *Theriogenology* 1998; 49: 451-60.
77. Cortvrint R, Smits J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod Domest Anim* 2001; 36: 3-9.
78. Cortvrint RG, Smits JE. Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in-vitro testing of ovarian function? *Hum Reprod Update* 2002; 8: 243-54.
79. Miyano T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology* 2003; 59: 61-72.
80. Senbon S, Hirao Y, Miyano T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev* 2003; 49: 259-69.
81. Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinol* 2001; 142: 2078-86.
82. Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP-17 in ovaries of immature rats. *Endocrinol* 2000; 141: 3814-20.
83. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 175: 123-30.
84. Nilsson E, Kezele P, Skinner MK. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188: 65-73.
85. Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 192: 37-43.
86. Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SH, Shimasaki S, Lee S, Lee KA. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 159-63.
87. Jeon EH, Yoon SJ, Cha KY, Kim NH, Lee KA. Analysis of genes expressed in early developmental stage of mouse ovaries. *Devel Reprod* 2003; 7: 127-36.