

시험관내 생쥐난자의 성숙과정에서 배양시간에 따른 난자성숙의 진행에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실

유 한 기

= Abstract =

Studies on Timing of the Oocyte Maturation Progression in Maturation of the Mouse Oocyte in Vitro

Han Ki Yu

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Womans University

For the aim of clarifying oocyte maturation process in mammalian oocyte, we have studied the patterns of the germinal vesicles breakdown according to the stage of nuclear changes after various periods of culture.

As the culture time was prolonged, the germinal vesicles breakdown were significantly increased and after nine hours of culture, 14% of the oocytes were in metaphase II. After 12 and 16 hours of culture, the germinal vesicles break down occurred 35% and 54% respectively.

The oocytes of metaphase II were significantly accumulated after 9 hours of culture.

Each steps of the meiotic division appeared to be asynchrony in maturation of oocytes in vitro.

We have found that in vitro mouse oocyte can be occurred spontaneous maturation without the gonadotropin stimulation.

서 론

포유동물의 난모세포는 제1감수분열의 전기(Prophase)중 복사기(diplotene)에 머물러 있다가 사춘기에 이르러 뇌하수체로부터의 자극에 의해 분비되는 생식선호르몬(gonadotrophin)의 파동성 급증에 의해 감수분열(meiosis)이 재개(vesumpton)되면서 성숙이 완료된다.

이 결과 큰 핵 즉 germinal vesicle(GV)을 갖고있는 난자(oocyte)는 핵막붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)를 일으키고 제2 감수분열의 중기(metaphase II)까지 세포주기(cell cycle)가 진행된다.

한편 이 시기에 이른 난자는 수정이 이루어질 때까지 또다시 정지되어 있게된다. 이것을 제2의 정지기라고 부르고 있다. 다시 말해서 GV를 갖는 난자가 핵막붕괴를 일으켜 수정이 이루어질 수 있는 metaphase II 까지 진행되는 일련의 과정을 감수분열 난자성숙(meiotic maturation)이라고 부른다.

그러나 난자가 여포로부터 분리될 경우는 생식선 자극호르몬의 영향없이도 적절한 배양액에서 자발적으로 감수분열재개(spontaneous meiotic resumption)가 일어난다¹⁾²⁾. 이러한 감수분열 성숙과정은 염색체 반응의 변화³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾에 의해서 구분할 수 있으며 이와 아울러 단백질 합성 양상의 변화도 일어난다⁷⁾.

성적으로 성숙한 암컷 생쥐에서는 그라피안씨 여포에서 완전 성숙된 난모세포가 난자성숙을 재개하고 배란 직전까지 감수분열이 일어나며 감수분열 성숙과정은 핵막붕괴, 염색체 농축, 제1극체의 방출, 제2감수분열 증기에서 감수분열이 멈추어질 때까지 일어난다.

본 실험에서는 이런 일련의 과정을 관찰하기 위해 배양시간을 다양하게 주어 시간변화에 따른 난자성숙률의 관계를 알아보고자 한다.

연구재료 및 방법

1. 생쥐의 난자채취

본 실험에서는 이화여자대학교 실험동물사육장에서 사육된 생후 3~4주된 ICR Strain의 생쥐 100마리가 사용되었다. 이 실험동물은 실내온도가 19~22°C가 유지되고 08:00~20:00까지 조명이 가해지는 사육조건이 주어졌다.

경추골 파열방법을 이용하여 암컷생쥐를 도살하여 난소를 떼어 MHBS가 담긴 배양접시에 놓고 해부현미경(wild M5A, swiss)하에서 지방조직 및 다른 혈액 응고성분을 제거한 후 배양액에 옮겨 사용하였다.

미세한 바늘로 여포(follicle)를 터트려 난자를 방출시킨 후 mouth-controlled micropipette을 이용하여 G.V. (germinal vesicle)가 확실한 난자만을 수집하였다. 난소 제거시 부터 in vitro culture에 난자를 이용할때 까지 약 30분이 소요되었고 각 실험에는 8~10마리의 생쥐가 사용되었다.

2. 체외난자배양

수집된 난자는 culture dish(35×10mm, costar)에 light paraffin oil(sigma)로 덮인 microdrop을 만들고 37°C, 5% CO₂, 95% air, 100% 습도가 유지되는 배양기에서 1시간이상 평형을 유지시킨 후 배양시켰다. 실험에 사용된 배양액은 modified Hank's Balanced Salt Solution(MHBS)을 이용했으며 그 조성은 Table 1과 같다.

난자수집과정중 배양액의 PH변화를 방지하기위해 10.0mM의 N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2'-ethanesulphonic acid(HEPES, Sigma)를 사용했고 배양액은 pH7.2-7.3, 280mOsm로 조정후 사용하였다. 배양액은 사용직전에 Millipore membranes으로 여과, 멸균하였고 실험에 사용된 모든 기구도 고온 또는 고압멸균시켰다. 난자 배양시 시간에 따른 다양한 난자의 핵상을

Table 1. Modified Hank's balanced salt solution(MHBS)

(320 mOsm, but expected mOsm is 280-290)			
Components(Mol. wt.)	Amounts(g/l)	mM	mOsm
NaCl(58.45)	8.2262	140.73	281.47
KCl(74.55)	0.4	5.3655	10.731
MgSO ₄ 7H ₂ O (246.38)	0.2	0.8118	1.6235
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (358)	0.12	0.3358	0.6716
KH ₂ PO ₄ (136.09)	0.06	0.4409	0.8818
NaHCO ₃ (84.01)	0.35	4.166	8.332
CaCl ₂ 2H ₂ O (146.99)	0.2515	1.711	5.133
Glucose (180.16)	1.0	5.55	5.55
Na-lactate (112.07)	0.2802 ^a	2.5	5.0
Na-pyruvate (110)	0.033	0.3	0.6
BSA	4.0		
Phenol Red	0.01		
Antibiotics stock solution ^b	1.0ml		
			320 mOsm

a : 0.4269 ml of 60% syrup

b : 100,000 IU/ml penicillin and 50mg/ml streptomycin. This stock solution is kept frozen in 1-ml lots.

관찰하기 위해 각각 3, 5, 7, 9, 12, 16시간별로 배양하였다.

3. 난자 성숙도 관찰 및 사진촬영

일정시간 배양시킨 난자를 배양액에 옮겨 세척과정을 거친다음 Slide glass위에 놓고 cover glass를 덮은후 고정액(ethyl alcohol 3 : glacial acetic acid)에서 1시간이상 고정시킨 후 0.1% acetoorcein용액으로 염색하였다.

핵상은 phase-contrast microscope(olympus, Japan)으로 관찰하였고, G.V.(germinal vesicle), Diak(diakinesis), M.I.(metaphase I), AI-TI(anaphase I-telophase I), MII(metaphase II), Deg(degneration), 및 기타등으로 분류하였다.

각시기별로 35mm panatonic-X film(kodak)으로 사진촬영을 시행하였다.

결 과

핵막붕괴의 양상은 성숙된 난자의 핵형태(nuclear morphology)가 in vivo나 in vitro에서 다르지 않기 때문에 아래의 기준을 이용하여 핵상을 판별하였다.

첫째, 핵막(germinal vesicle) 또는 인(nucleolus)의 소실.

둘째, 염색체 분산(chromosome dispersion)과 농축상태(condensation).

셋째, 방추사(spindle fiber) 형성의 유무.

넷째, 염색체 배열상태(chromosome arrangement).

다섯째, 제1극체(first polar body)형성의 유무.

Fig. 1~Fig. 6에서는 우리가 관찰한 각 시기의 난자핵상을 보여주고있다. Fig. 1는 G.V.시기의 난자로 핵(nucleus)을 갖고 있는 것을 볼수 있으며 이핵을 G.V.라고 부른다 대개의 경우 명확한 인(nucleolus)이 관찰되며 핵막(nuclear membrane)도 분명해 보인다.

Fig. 2과 Fig. 3(B)의 난자에서는 염색체가 둥글게 배열되어 있는것을 볼수 있으며 이 상태의 난자도 본 연구에서는 GV stage의 난자로 분류하였다.

Fig. 3(A)는 diakinesis의 난자이며 이 시기에는 염색체가 대개 산발적으로 흩어져 있는 상태로 관찰되고 Fig. 3(B)의 경우와는 달리 더 넓은 부위에 퍼져있는 것으로 나타난다.

Fig. 4는 metaphase I에 있는 난자이며 염색체가

적도면에 일렬로 배열되어 있는 것을 볼수 있고 방추사(spindle fiber)역시 관찰된다.

Fig. 5는 Anaphase I과 Telophase I의 시기에 있는 난자로서 이때는 염색체가 방추사에 의해 양쪽으로 끌려가고 있는 양상을 볼수 있다. 그러나 이 시기는 매우 짧은 시간이므로 관찰이 그리 용이하지 않다.

Fig. 6는 Metaphase II시기의 난자로 제1극체와 함께 적도면에 배열된 염색체가 동시에 관찰된다. 제 1감수분열 중기와 비교해보면 이 제 2감수분열 중기시기의 염색체는 더욱 모여있어 제 1감수분열중기의 염색체가 차지하는 부분보다 더욱 적은 부분을 차지하고 있는 것으로 나타난다. 간혹 polar body가 GV로 착각될 경우가 있으므로 핵상판별시 세심한 주의가 요구된다.

각 배양시간별로 배양시킨 난자의 핵막붕괴 양상은 Fig. 7과 Table 2에 나타내었다. 물론 배양에 이용한 난자는 모두 GV시기의 난자로 골랐으므로 배양시간이 0시간일때의 GVBD율은 0%로 나타내었고 핵상판별이 곤란한 것들은 다른군으로 간주하였다.

실험결과 3시간 배양시에는 약 69%의 난자가 거의 GV상태로 유지되었고 5시간 배양시에 약 45%의 난자가 핵막붕괴를 일으켰다.

배양 7시간째는 약 39%의 난자가 GV시기였고 나머지 55%정도가 핵막붕괴를 일으켰으며 9시간 배양에서는 약 62%의 난자가 핵막붕괴를 일으킨 것으로 관찰되었다.

또한 배양 9시간째부터 metaphase II시기의 난자 비율이 배양 7시간째 까지에 비해 의미있게 증가한 것으로 나타났고 제2감수분열중기 시기의 난자비율이 배양 9시간, 12시간, 16시간 에서 각각 약 14%, 35%, 54%의 비율로 나타났다.

반면 퇴화(Degeneration)를 일으킨 난자율은 배양 시간이 길어지는 9~16시간대에 거의 10% 정도의 일정한 비율로 유지되고 있는 것으로 나타났다.

Fig. 7에서 배양시간에 따라 핵막붕괴율이 어떻게 증가되고 있는지를 잘 보여주고 있다.

고 찰

포유동물 난자의 정상적인 성숙과정은 출생시부터 사춘기 직후까지 중복염색체기 즉 제1감수분열 전기에 머물러있던 난자가 사춘기에 개시되면서부터 시작된다.

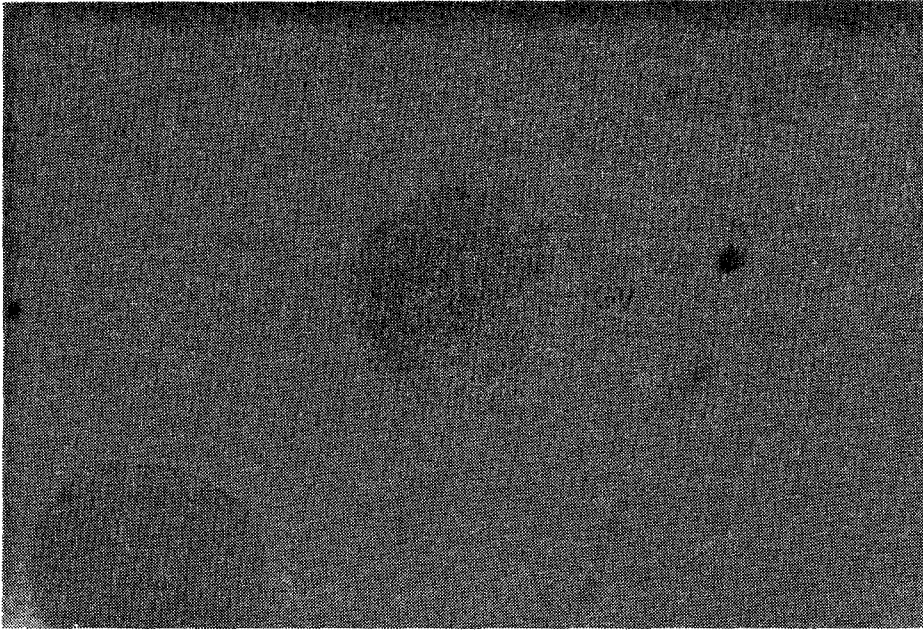


Fig. 1. Germinal Vesicle(GV). The intact germinal vesicle is characterized by a distinct nuclear envelope, a nucleolus, and by the chromatin which is stained only around the nucleolus in the form of a ring.($\times 400$)

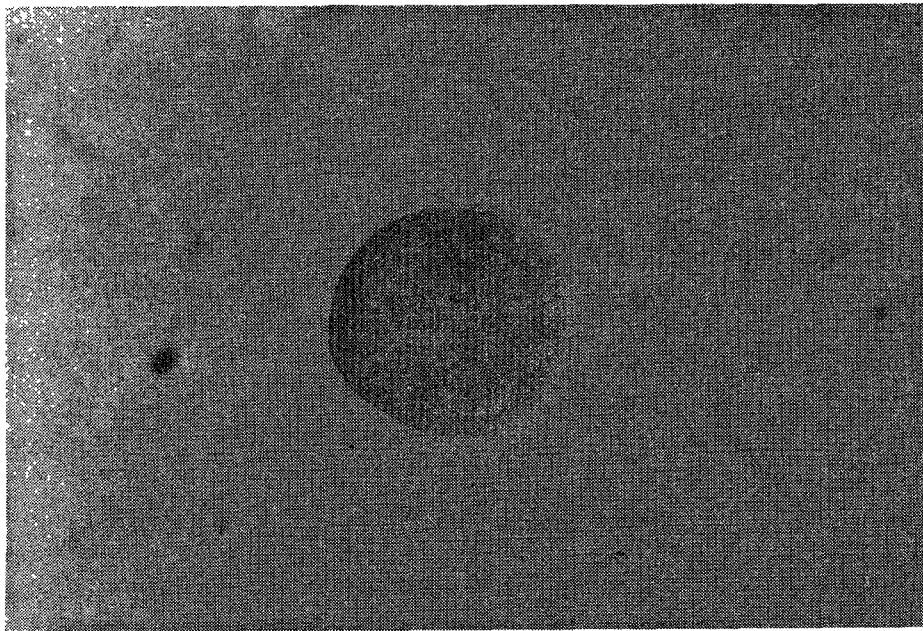


Fig. 2. Germinal Vesicle(GV). In this stage, the nuclear envelope becomes less distinct and the nucleolus disappears completely. Chromatin continues to condense. ($\times 400$)

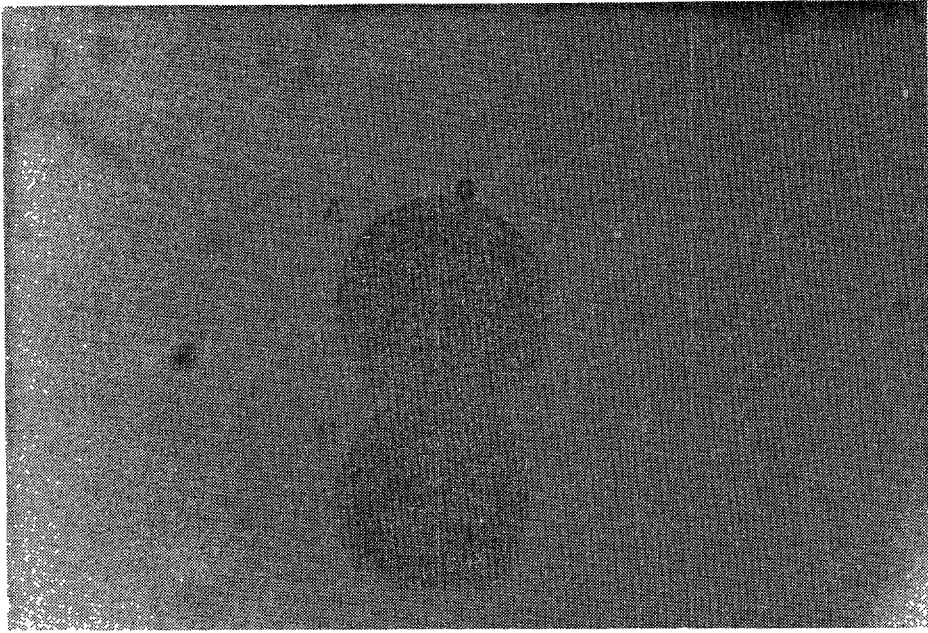


Fig. 3. (A) Diakinesis.

In diakinesis chromatin is undergoing condensation into smaller discrete fragments. ($\times 400$)

(B) Same as in Fig. 3.

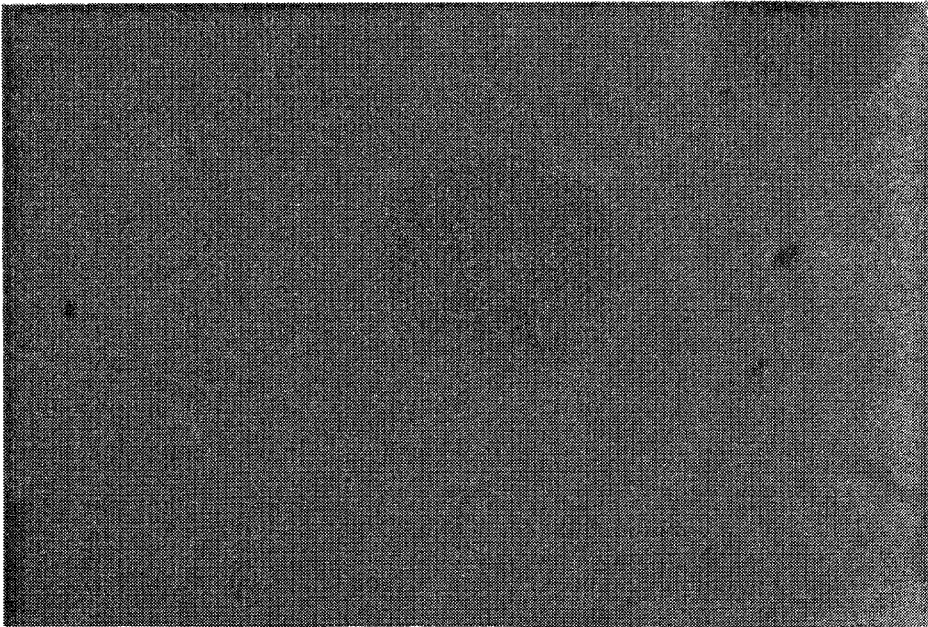


Fig. 4. Metaphase I.

The bivalent lie midway between the two presumed spindle poles. ($\times 400$)

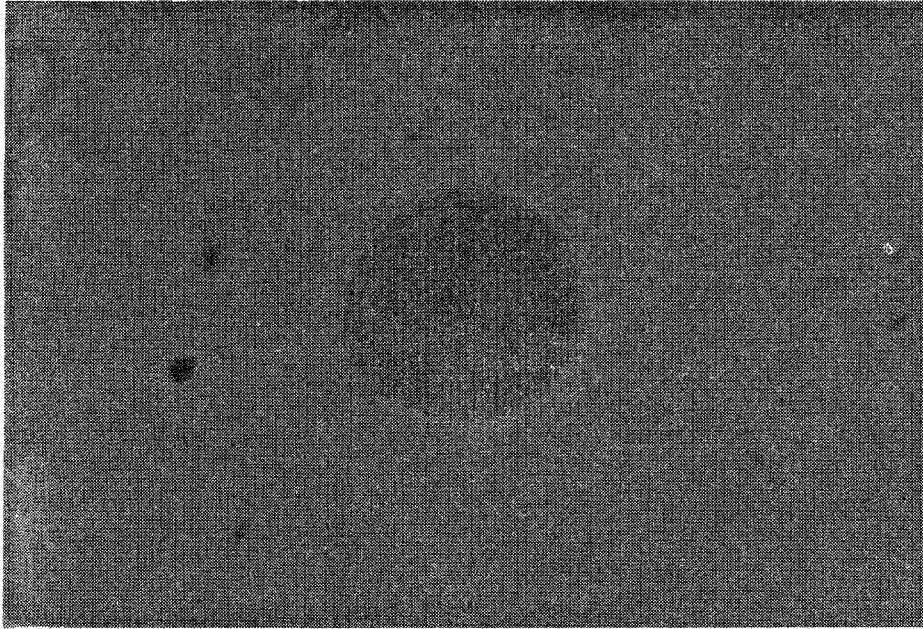


Fig. 5. Anaphase I ~Telophase I .
Two dense chromatin groups are formed. Two triangular shaped chromosome groups, one will pass into polar body and the other will remain in the egg. ($\times 400$)

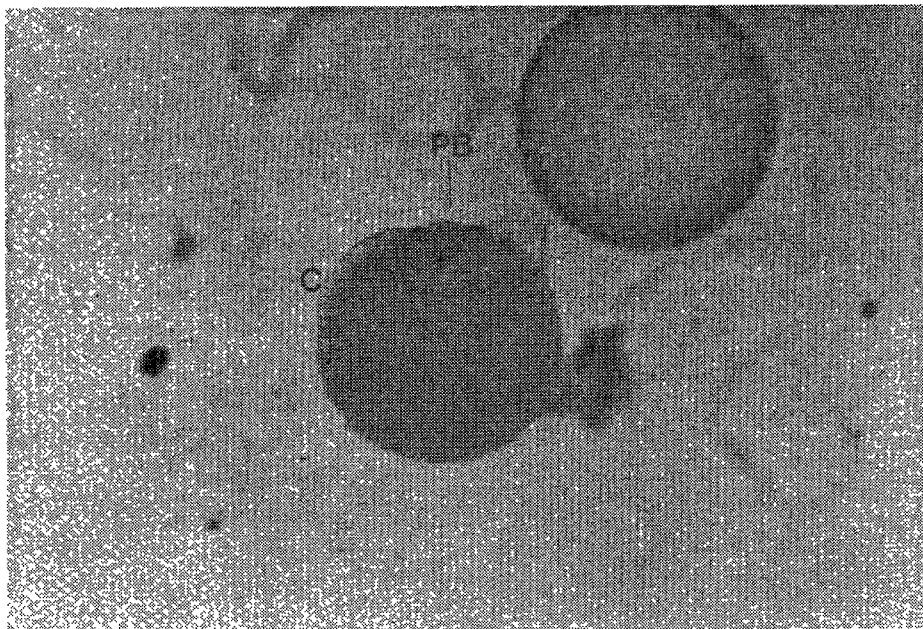


Fig. 6. Metaphase II
The chromosome is not as wide and is less extended toward the poles than MI group. The polar body cytoplasm and chromatin are usually degenerated, but some orcein positive material remains. PB-polar body, C-chromosome($\times 400$)

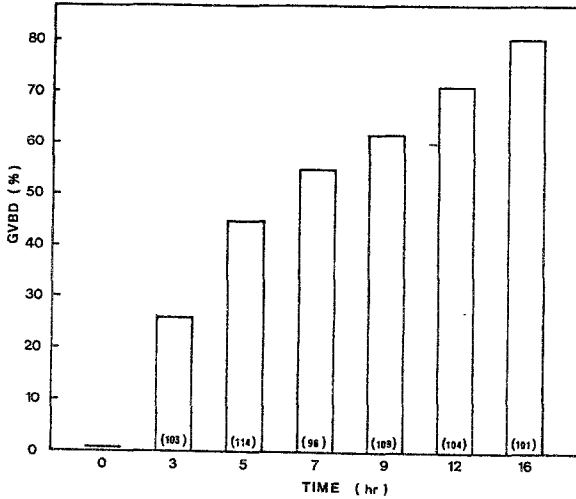


Fig. 7. Germinal vesicle breakdown of mouse oocytes during culture time.

사춘기가되면 대개의 여포는 퇴화되는 과정인 퇴행을 일으키고 단지 극히 일부의 여포만이 성주기(sexual cycle)에 따라 빠른 성숙과정을 진행하게 된다. 즉 난자의 크기가 증가하고 과립세포(granulosa cells)나 다른 부속의 세포들이 증가하게 되고 아울러 여포의 크기 역시 커지게 된다. 물론 이때까지도 난자는 중복염색체에 머물러 있다.

일단 성숙여포가 되면 이때는 뇌하수체호르몬인 황

체자극호르몬(luteinizing hormone)에 의해 크게 두가지 작용을 일으키게 된다. 하나는 여포내 난자의 감수분열 재개이고 다른 하나는 배란을 일으키기 위해 여포를 변화시켜가는 작용이다.

LHsurge에 의해 제1감수분열이 완성되는데 즉 diakinesis→metaphase I→anaphase→telophase→metaphase II의 단계로 이어지며 이 결과 제2난모세포와 세포질의 불균형 분배에 의해 생겨난 세포인 제1극체가 만들어지는 것이다 이 시기의 난자는 수란관내에 존재하게 되며 이곳에서 정자를 만나면 수정이 이루어지고 다시 감수분열이 진행되어 결국 제2극체를 만들어냄으로써 마치게 된다.

생쥐 토끼 돼지등은 배란시 여러개의 난자들을 배란하나 대개의 동물은 하나의 난자만을 배란한다. 체외에서 배양시킨 생쥐난자 역시 감수분열 재개를 일으키는데 이 감수분열 재개의 판별기준으로 사용하는 것이 핵막소실과 염색체 농축(chromosome condensation)현상 이었다. 그리고 12시간 배양하게 되면 난자가 제2감수분열중기 시기에 도달하게 되는데 이것은 LH surge가 체내에서 일어나는 시간과 매우 밀접한 관계가 있는 것이다.

본 연구에서 얻어진 결과, 즉 핵막붕괴율이 약 80

Table 2. Germinal vesicle breakdown in mouse oocytes matured in vitro

Culture time (hour)	No. of oocytes	Nuclear Phase							
		GV	Diak.	MI	AI-TI	MII	Deg	Other	Remarks
3	103	71	26	1			5		
	(%)	(68.9)	(25.2)	(1.0)			(4.9)		
5	114	52	34	17			11		
	(%)	(45.6)	(29.8)	(14.9)			(9.7)		
7	95	37	29	18	4	1	6		
	(%)	(38.9)	(30.5)	(19.0)	(4.2)	(1.1)	(6.3)		
9	109	30	14	27	11	15	9	3	
	(%)	(27.5)	(12.8)	(24.8)	(10.1)	(13.8)	(8.3)	(2.7)	
12	104	19	10	16	12	36	11		
	(%)	(18.3)	(9.6)	(15.4)	(11.5)	(34.6)	(10.6)		
16	101	9	5	13	9	54	11		
	(%)	(8.9)	(4.9)	(12.9)	(8.9)	(53.5)	(10.9)		

GV : Germinal vesicle

MI : Metaphase I

MII : Metaphase II

Diak : Diakinesis

AI-TI : Anaphase I -Telophase I

Deg : Degeneration

%정도인 것은 앞서의 연구결과²¹³⁾와 일치하며 Fig. 2에서 처럼 염색체가 동심원배열상(circular grouping)을 하는 것은 방추사 형성에 필수적인 것이며 이러한 방추사 형성은 colchicine 처리에 의해 억제시킬 수도 있다.

Table 2에서 보면 난자성숙과정이 동시화(synchronization)되어 일어나지 않는다는 것을 볼 수 있다. 또한 12~16시간 배양후에도 일부의 난자(약 10%)는 핵막붕괴를 일으키지 못하는 것으로 나타났다. 이것은 아마도 난자자체내의 어떤 요인에 의해 성숙을 일으키지 못한 것으로 사료된다. 예를 든다면 여포성숙이 덜 된 여포로부터 얻은 난자일 경우가 높은 것으로 생각된다.

이러한 난자성숙에 대한 기전을 밝히기 위해 현재 까지 수많은 연구가 진행되어 왔다.

1974년 Cho⁸⁾ 등은 난자성숙에 cAMP가 관여된다고 하였으며 cAMP의 합성 유사물질인 dbcAMP(dibutyryl cAMP), 8-bromo cAMP, 그리고 phosphodiesterase inhibitor인 theyophyllin, IMB×(isobutylmethylxanthine) 및 adenylate cyclase activator인 forskolin에 의하여 본 실험에서 관찰했던 자발적인 성숙과정이 억제되는 결과를 보여 주었다⁷⁾⁸⁾⁹⁾.

특히 1982년 Powers & Paleos는 dbc AMP에 의한 감수분열억제를 생쥐에서 세포질내 Ca^{2+} 상승으로 재개시킬 수 있었다. 이런 Ca^{2+} 이 감수분열 재개현상에 관여되고 있음이 햄스터, 흰쥐, 생쥐, 소등에서 보고되었다¹⁰⁾¹¹⁾.

또한 돼지에서는 배양액내 Ca^{2+} 이 없거나 난자내 이동을 방해하였을때 GVBD가 일어나지 않았고, 성숙후기에 Ca^{2+} 이 없으면 염색체의 응축과 퇴행이 일어났다¹²⁾¹³⁾. 그러나 생쥐와 소에서 GVBD가 Ca^{2+} 에 의존하지 않는다는 보고도 있다.

한편 어린 포유동물의 난모세포와 여포강이 형성안된 난모세포는 자발적 감수분열 능력이 없으나¹⁵⁾ GVBD가 일어난 성숙난자와 융합후에는 염색체 응축이 일어났다¹⁶⁾. 이런 현상을 일으키는 물질 성숙 촉진인자(maturation promoting factor CMPF)가 성숙된 여포내에서 활성화 또는 합성되어짐이¹⁷⁾ Masui & Clarke (1979)에 의해 보고되었다.

반면 최근에는 돼지, 생쥐난포액에서 분리된 purine(hypoxanthine)에 의해 자발적 감수분열의 휴지가 유지됨이 보고되기도 하였다⁶⁾¹⁸⁾.

상기의 감수분열 재개현상의 기작을 밝히기위해 오늘날까지 많은 연구자들의 관심속에서 꾸준히 연구되어오고 있지만 아직도 정확히 밝혀지지 않고있다.

그러므로 포유동물에서 이에대한 명확한 기작을 밝히기위해 더 깊은 연구가 기대되어진다.

결 론

3주된 암컷 생쥐 100마리의 난자를 이용하여 Modified Hank's Balanced Salt Solution(MHBS)에서 체외 배양하면서 배양시간에 따른 핵막붕괴율을 조사하였다. 핵막붕괴는 위상차현미경을 이용하여 난자핵상에서의 형태를 기준으로 하여 판별하였다.

1) 생쥐난자는 체외에서 생식선 자극호르몬의 자극 없이도 자발적인 난자성숙을 일으켰다.

2) 배양시간이 길어짐에 따라 핵막붕괴율이 의미있게 증가하였는데 배양전 100%였던 GV율이 16시간 배양에서는 약 10% 정도로 유지되고 나머지는 핵막붕괴를 일으켰다.

3) 제2감수분열 중기(metaphase II)시기의 난자는 배양시간이 9시간 이상되어야 의미있게 관찰되었다.

4) 난자의 체외배양시 각 감수분열의 단계가 동시화(synchronization)되어 일어나지 않는다.

References

- 1) Pincus G and EV Euzmann : *The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935 : 62 : 665-675
- 2) Edwards RG : *Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes*. *Nature(London)* 1965 : 208 : 349-351
- 3) Donahue RP : *Maturation of the mouse oocyte in vitro* I. Sequence and timing of nuclear progression. *J Exp Zool* 1968 : 169 : 237-250
- 4) Moltik J and J Fulka : *Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro*. *J Exp Zool* 1976 : 198 : 155-162
- 5) Bae IH and Cho WK : *Oocyte maturation in some vertebrates and mammals(Review Article)*. *Kor J Fert Steril* 1982 : 9 : 1-28

- 6) Epping JJ, Ward-Bailey PF and Coleman DL : *Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid : concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. Biol Reprod 1985 : 33 : 1041-1049*
- 7) Schultz RM, Montgomery R, Belanoff J : *Regulation of mouse oocyte maturation : Implication of a decrease in oocyte CAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. Dev Biol 1983 : 97 : 264-273*
- 8) Cho WK, Stern S and Biggers JD : *Inhibitory effect of dibutyryl CAMP on mouse oocyte maturation in vitro. J Exp Zool 1974 : 187 : 383-386*
- 9) Dekel N, Aberdam E and Sherizly : *Spontaneous maturation in vitro of cumulus-enclosed rat oocytes is inhibited by forskolin. Biol Reprod 1984 : 30 : 537-543*
- 10) Tsafiriri A and Bar-Ami S : *Role of divalent cations in the resumption of meiosis of rat oocytes. J Exp Zool 1978 : 205 : 293-300*
- 11) Bornslaeger EA, Wilde MW, Schultz RM : *Regulation of mouse oocyte maturation : involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. Dev Biol 1984 : 105 : 488-499*
- 12) Bae IH : *Role of calcium in resumption of meiosis of cultured porcine cumulus-enclosed oocytes. Society for the study of reproduction. Fourteenth Annual Meeting August 10-13, Suppl. No. 1, Biol Reprod 1981 : 24, 92A*
- 13) Bae, IH and Channing CP : *Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed dog follicular oocytes isolated from medium-sized Graafian follicles. Reprod Biol 1985 : 33 : 79-87*
- 14) Jagiello G, Ducayen MB and Goonan WD : *A note on the inhibition of in vitro meiotic maturation of mammalian oocytes by dibutyryl cyclic AMP J Exp Zool 1981 : 218 : 309-311*
- 15) Sorensen RM and Wassarman PM : *Regulation between growth and meiotic maturation of mouse oocytes. Dev Biol 1976 : 50 : 531-536*
- 16) Balakier, H : *Induction of maturation in small oocytes from sexually immature mice by fusion with meiotic or mitotic cells. Exp Cell Res 1978 : 112 : 137-141*
- 17) Masui Y and Clarke HJ : *Oocyte maturation. Int Rev Cytol 1979 : 57 : 185-282*
- 18) Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF & Eppig JJ : *Is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. Proc Natl Acad Sci USA 1985 : 82 : 454-458*