

배양중에 있는 생쥐 濾胞卵자의 核崩壞(Germinal Vesicle Break-down)에 미치는 Progesterone의 영향에 관하여

서울대학교 文理大科大學 動物學科

趙 完 圭·權 赫 邦

延世大醫科大學 產婦人科

鄭 淳 五

I. 緒 論

Progesterone이 배양중에 있는 생쥐의 初期胚兒의 卵割을 억제한다는 보고(Whitten, 1957)가 있는 이래 몇몇 학자들이 포유동물의 초기배아에 미치는 steroid hormone의 영향을 조사한 바 있다. Daniel(1964)은 배양중에 있는 토끼의 초기배아는 10 µg/ml의 progesterone에 의하여 발생이 억제된다고 보고하였다. 한편 Schuetz(1967, a,b)와 Masui(1967)는 progesterone이 개구리 濾胞卵자의 核崩壞(Germinal Vesicle Break-down, GVBD.)를 유발하는 것을 관찰하였다. 그러나 포유동물의 여포난자의 成熟에 미치는 progesterone의 영향에 관한 보고는 아직 없다. 본 실험은 포유동물에서 progesterone이 초기배아에서 처럼 여포난자의 성숙을 억제할 것인지 혹은 양서류의 여포난자 처럼 성숙을 촉진할 것인지를 밝히고자 행하여졌다.

본 연구는 WHO(세계보건기구)의 연구비 5H9/181/120(조완규)와 P.C.(인구문제연구소)의 연구비, M 71. 0136 C(정순오)의 지원을 받아 행해진 연구결과와 일부임을 밝혀둔다.

II. 材料 및 方法

본 실험에서는 생후 3~4주된 A-strain 생쥐가 사용되었다. 생쥐에서 난소를 빼내어 기본배양액인 modified Krebs-Ringer bicarbonate solution(Biggers et al., 1971)으로 서너번 씻은 다음 해부현미경 아래에서 예리한 needle로 여포를 터뜨려 난자를 적출해 내었다. 적출한 난자중 核(胚胞, GV)이 뚜렷이 보이는 난자만 배양의 재료로 삼았고 배양액으로는 기본배양액에 0.4

% bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 첨가한 것을 사용하였다. Progesterone(Sigma)은 일단 ethanol로 용해한 뒤 정해진 농도가 되도록 배양액에 첨가하였으며 배양액내의 ethanol의 최고농도가 1%를 초과하지 않도록 하였다. 실험에 사용된 모든 기구는 乾熱 혹은 高壓滅菌으로, 배양액은 millipore filter로 멸균을 하였다. Progesterone은 油溶性物質이므로 그의 정확한 효과를 측정하기 위하여 새로 고안된 microtube culture method(Cho, 1974)를 이용하였다. 이 배양법은 Brinster의 배양법(1963)을 이용할 때 paraffin oil과 배양액이 직접 접촉하며 접촉면을 통해 배양액내의 progesterone이 oil속으로 용해해가는 것을 피하기 위하여 고안된 것으로 그 실용성이 난자 혹은 초기배아의 배양을 통하여 이미 실증된 바 있다(Cho, 1974). 배양에 들어가기 전에 먼저 10 µl의 배양액을 tube(직경 1 mm 길이 50 mm)의 중앙부위에 주입하고 tube의 한쪽끝은 5 µl의 paraffin oil로 막고 이를 CO₂배양기에 4~5시간 넣어두어 충분히 平衡을 유지토록 하였다. 10~20개의 난자들을 capillary pipette으로 tube의 막히지 않은 다른 한쪽끝을 통하여 tube 중앙의 배양액에 주입한 후 이 끝마저 5 µl의 oil로 막았다. 이렇게 함으로써 배양액과 oil 사이에는 공간이 채워지게 된다. 이 tube를 37°C를 유지하며 5% CO₂를 포함한 습기찬 공기를 공급받는 배양기 내에 설치하였다. 배양기간이 끝나면 난자들을 acetic alcohol로 20~24시간 고정한 후 位相差 顯微鏡 아래에서 그들의 核相을 관찰하였다.

III. 結 果

먼저 Brinster의 方法(paraffin oil method)과 microtube culture method의 두가지 배양법을 비교하기 위

Table 1. Comparison of the results obtained from the mouse oocytes cultured for three hours in different type of the culture system.¹⁾

Culture system	No. oocytes cultured	No. of oocytes GVBD ²⁾	% oocytes GVBD
Paraffin oil method(progesterone free)	65	53	81.5
Paraffin oil method(plus progesterone) ³⁾	49	42	85.7
Micro tube method(progesterone free)	66	50	75.8
Micro tube method(plus progesterone)	63	4	6.4

1) All systems were equilibrated with 5% CO₂ in air in an incubator for 2 to 15 hours before placing oocytes in medium.

2) GVBD: Germinal vesicle break-down.

3) Concentration of progesterone was 100 µg/ml.

하여 배양액에 progesterone 을 첨가한 후 간단한 실험을 하였다.

배양액에 100 µg/ml의 progesterone 을 첨가한 후 paraffin oil method 를 이용하여 난자들을 3시간 동안 배양하였을 때 85%의 난자들이 GVBD 를 일으키었다. 이 비율은 progesterone 이 섞이지 않은 대조배양액에서 보여주는 GVBD 의 그것과(81.5%) 거의 비슷함을 알 수 있다. 그러나 microtube 를 사용하여 progesterone(100 µg/ml)을 포함한 배양액에서 난자를 배양하던

단지 6.4%의 난자들만이 GVBD 를 보일 뿐 나머지는 모두 GV 를 그대로 간직하고 있었다. Parffin oil method 를 사용할 때 progesterone 의 존재하에서도 減數分裂이 시작되는 것으로 미루어 볼 때 배양액내의 progesterone 은 平衡시키는 기간이나 배양기간 동안 paraffin oil 속으로 擴散해 들어가는 것으로 믿어지며 따라서 progesterone 의 농도가 배양기간 동안 낮아져서 그 영향이 남아나지 않아 GVBD 가 일어나는 것으로 생각 된다. 그러므로 이 후의 실험은 microtube culture

Table 2. Effect of progesterone at different doses on the germinal vesicle break-down of the mouse oocytes in three hours in culture

Date of progesterone µg/ml	Experiments						Average % GVBD
	1	2	3	4	5	Total	
0.0 %**	8/11* 72.7	14/14 100.0	7/10 70.0	14/15 93.3	10/15 66.7	53/65	81.5
5.9 %	9/12 75.0	12/15 80.0	6/10 60.0	9/16 56.3	10/15 66.7	46/68	67.6
8.8 %	7/12 58.3	14/17 82.3	9/10 90.0	5/12 41.7	7/14 50.0	42/65	64.6
13.2 %	5/10 50.0	8/14 42.9	6/9 66.7	3/13 23.1	4/15 26.7	26/61	42.6
19.8 %	3/11 27.3	9/17 52.9	2/10 20.0	5/15 33.3	3/14 21.4	22/67	32.8
29.6 %	3/11 27.3	4/17 23.5	2/13 15.4	3/13 23.1	1/11 9.1	13/65	20.0
44.4 %	0/9 0.0	2/17 11.8	0/11 0.0	2/16 12.5	0/13 0.0	4/66	6.1
66.7 %	1/11 9.1	0/15 0.0	0/10 0.0	1/14 7.1	2/13 15.4	4/63	6.4
100.0 %	0/11 0.0	2/18 1.1	1/10 1.0	1/12 8.3	0/12 0.0	4/63	6.4

* No. of oocytes GVBD/No. of oocytes cultured There is no significant difference in response of the oocytes between five replications of the experiments $X^2=5.43$, d.f=4 $p<0.05$

** % GVBD

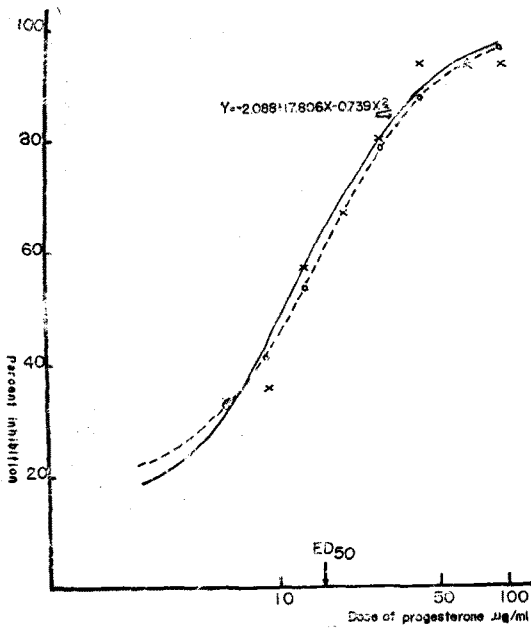


Fig. 1. Fitted curves of response of the mouse oocytes to progesterone doses. The solid line expresses the observed and broken line the theoretical percent suppressed. There is no significant difference between the observed and the expected responses ($X^2=1.22$, $\text{D.F.}=7$, $p<0.1$). X; observed and o; theoretical percent.

method를 취하였다. progesterone의 GVBD抑制現象에 대한 dose response를 구하기 위해 여포난자들을 progesterone의 농도를 달리한 배양액에서 3시간 동안 배양한 결과 다음과 같았다(Table 2 and Figure 1).

위의 도표에서 볼 수 있는 바와 같이 progesterone의 농도가 증가하면 그에 따라서 GVBD의 억제효과가 증가한다. non-responder의 probit를 참고하면 ED_{50} 은 $15.7 \mu\text{g/ml}$ 이고 ED_{90} 은 $60.7 \mu\text{g/ml}$ 이다. progesterone

($100 \mu\text{g/ml}$)을 포함한 배양액에서 8시간까지 배양을 해보면 對照群에서는 91%가 이미 GVBD를 나타내는데 반하여 단지 8%의 난자들만이 GVBD를 일으켰다. progesterone 배양액에서 2~8시간 배양하여 GVBD를 억제했다가 대조배양액으로 옮겨서 배양을 계속하면 대부분의 난자들은 감수분열을 시작하여 옮긴 후 3시간내에 GVBD를 일으키었다(Table 3). 이는 이 hormone에 노출되었던 기간에 관계없이 progesterone이 제거되면 정상적으로 GVBD가 일어난다는 것을 의미한다. progesterone을 처리한 배양액에서 3시간 동안 배양을 한 후 대조배양액으로 옮겨서 배양을 계속하면 3시간내에 66%, 7시간내에 84%의 난자들이 GVBD를 일으켰다.

후자의 비율(84%)은 대조배양액에서 3시간 동안 배양했을 때의 GVBD의 율과 비슷하며 이것으로 보아 progesterone에 일단 露出되었던 난자들은 GVBD가 얼마간 遲延되는 것으로 보여진다.

Table 4는 이미 成熟分裂을 진행하고 있는 난자들에 미치는 progesterone의 영향을 보기 위하여 일단 대조 배양액에서 난자들을 일정기간 배양한 다음 progesterone을 포함한 배양액으로 옮겨서 계속 배양하여 본 결과를 나타낸 것이다. 대조배양액에서 먼저 2시간 배양 후 progesterone을 포함한 배양액에서 4시간을 배양했을 때 난자들은 모두 대조배양액에서 2시간 배양했을 때 보여주는 condensed chromatin 상태로 그대로 머물러 있었다. 한편 대조배양액에서 6시간 계속 배양한 난자들은 이미 제 1차분열중기에 도달해 있었다. 대조배양액에서 4시간 배양 후 progesterone을 포함한 배양액에 옮겨 다시 2시간 배양을 했을 때에도 대부분의 난자들은 대조배양액에서 4시간이면 도달하는 前中期(prometaphase)의 염색체를 보여주고 있었다. 24시간 배양을 한 group을 살펴보면 처음 대조배양액에서 6시간 배양하고 다음 progesterone을 처리한 배양액에서 18

Table 3. Reversibility of inhibiting effect of progesterone($100 \mu\text{g/ml}$) on the germinal vesicle breakdown of mouse oocytes in vitro

Hours exposed to progesterone	Hours in plain medium after transfer	Experiments					% GVBD
		1	2	3	4	Total	
2	3	13/17*	13/14	12/18	10/16	48/65	73.8
3	3	10/11	5/10	4/13	18/22	37/56	66.1
3	7	9/10	8/9	12/15	14/17	43/51	84.3
8	0	1/8	1/11	1/8	0/8	3/34	8.6
0	7	11/12	12/14	8/10	18/20	49/56	87.5

* No. of oocytes GVBD/No. of oocytes cultured.

Table 4. Progesterone effect in vitro on the maturation of mouse oocytes cultured previously in the plain medium

Hours in plain medium	Hours exposed to progesterone 100 µg/ml	No. of oocytes cultured	Nuclear phases*						Deg.
			D	P	PMI	MI	AI-TI	MII	
2	0	59	13	44	1	—	—	—	1
2	4	55	—	53	—	2	—	—	—
6	0	50	2	5	6	35	1	1	—
4	0	61	1	22	32	5	—	—	1
4	2	65	—	27	31	7	—	—	—
24	0	51	3	—	3	13	3	27	2
6	18	64	—	2	8	15	—	7	32

* D:Dictyate, P:Prophase, PMI:Prometaphase I, MI: Metaphase I, AI-TI: Anaphase-TelophaseI, MII: Metaphase II, Deg: Degenerative oocytes.

시간 배양을 하면 단지 몇개의 난자들만 第2次分裂中期(Metaphase II)에 도달할 뿐, 대부분의 난자들은 第1次分裂中期(Metaphase I)에 머물러 있거나 退化하고 있었다. 이것은 fragment 되는 난자나 퇴화하는 난자의 수가 많은 것 외에는 대조배양액에서 6시간 배양했을 때의 현상과 매우 비슷하였다. 따라서 감수분열을 하고있는 난자들은 성숙분열 과정중 progesterone에 노출되었을 때에는 어느때나 분열이 정지됨을 알 수

있다. progesterone이 代謝物質이나 無機 ion의 透過性에 영향을 미칠 것으로 추측되었기 때문에 progesterone의 효과가 pyruvate같은 기본대사물질이나 Ca⁺⁺, K⁺, Mg⁺⁺ 등의 무기 ion의 농도를 높여준 상태에서 어떻게 작용하나를 조사해 보았다. Table 5는 progesterone의 존재하에 Na-pyruvate의 농도를 높여 주었을 때의 난자들의 상태를 보여주고 있다. 대조배양액에서의 그것보다 10배로 Na-pyruvate의 농도를 높여준 배

Table 5. Progesterone effect on the germinal vesicle break-down of the mouse oocytes cultured in the medium with high concentration (2.5 mM) of sodium pyruvate. The oocytes were cultured for six hours

Dose of progesterone µg/ml	Experiments					% of GVBD oocytes
	1	2	3	4	Total	
0	14/15*	7/8	14/17	5/6	40/46	87.0
12.5	7/11	3/11	11/15	6/7	27/44	61.4
25.0	9/15	1/10	10/13	2/9	22/47	46.8
50.0	1/10	0/8	0/12	1/8	2/38	5.3

* No. of oocytes GVBD/No. of oocytes cultured.

Table 6. Progesterone effect on the germinal vesicle break-down of the mouse oocytes cultured in the medium containing mineral ions at high concentration. The oocytes were cultured for six hours.

Ion*	Magnification of concentration of the basic medium, mM	Progesterone 50 µg/ml	Experiments				% GVBD oocytes
			1	2	3	Total	
Ca ⁺⁺	2 X of 1.71	none	11/15	11/15	—	22/30	73.3
		yes	0/15	1/19	—	1/34	2.9
K ⁺	10 X of 4.78	none	10/17	13/16	—	23/33	70.0
		yes	0/16	0/12	—	0/28	0.0
Mg ⁺⁺	10 X of 1.19	none	9/15	13/15	14/17	36/47	76.6
		yes	0/20	2/21	1/22	3/63	4.8

* Ca⁺⁺, K⁺ and Mg⁺⁺ were present in the medium in the form of CaCl₂, KCl and MgSO₄, respectively.

양액에서도 progesterone의 억제효과는 변하지 않았다. 다시 말하면 progesterone 없이 Na-pyruvate의 농도만 높여준 배양액에서는 거의 모두 GVBD를 일으켰지만 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 progesterone의 존재하에서는 단지 5.3%만이 감수분열을 시작하는데 성공하였다.

Table 6는 배양액에 무기 ion들의 농도를 높였을 때에 progesterone의 효과를 보여주고 있다. Table에서 보듯이 高濃度의 무기 ion을 공급받아도 progesterone (50 $\mu\text{g/ml}$)의 존재하에서는 여전히 GVBD의율이 낮음을 알 수 있다.

IV. 結 論

Microtube culture system으로 얻은 위의 결과로부터 볼 때 progesterone은 확실히 생쥐 여포난자의 성숙을 억제한다. progesterone의 ED_{50} 가 15.7 $\mu\text{g/ml}$ 가 되는데 이것은 생쥐(4 $\mu\text{g/ml}$, Whitten: 1957)나 토끼(10 $\mu\text{g/ml}$, Daniel: 1964)의 초기배아의 발생을 억제하는 dose보다 높은 것이다. 여포난자에 작용하는 progesterone의 억제작용은 아직 보고된 바 없다. 그러나 다음과 같은 몇가지 가능성을 추측할 수 있다.

첫째 progesterone이 細胞膜에 작용하여 透過性을 변화시켜서 GVBD나 감수분열에 필요한 물질의 흡수를 방해한다는 생각이다. Muller(1957)는 steroid hormone이 세포막의 蛋白質 성분이나 膜 자체에 작용하여 막의 투과성을 변화시킨다고 주장했다. Daniel과 Levy(1964)는 標識된 progesterone이 割球細胞의 표면에서 부착하고 있는 것을 관찰하였고 또한 progesterone을 포함한 배양액에 아미노산의 농도를 높여주면 일부의 초기배아는 난할을 계속할 능력을 회복하는 것을 발견하였다. 위의 결과를 토대로 하여 그들은 progesterone이 난할에 필요한 아미노산의 세포막에 대한 투과성을 변화시킨다고 가정하였다. 그들은 또한 배양액내에 포함된 아미노산의 농도를 높이면 progesterone의 억제효과가 감소함을 발견하고 아미노산의 일부가 progesterone의 존재하에서도 膜을 투과하여 세포속으로 들어가서 난할을 지원한다고 추측하였다. 본 실험에서는 그러나 progesterone의 억제효과가 pyruvate 같은 대사물질의 농도를 높여 주었어도 감소하지 않았다. 즉 dictyotene에 있는 여포난자의 GVBD는 기본배양액의 함량보다 10배의 Na-pyruvate를 넣어준 배양액에서도 progesterone에 의하여 억제되었다(Table 5). Ca^{++} , Mg^{++} 혹은 K^{+} 과 같은 무기 ion의 경우에도 기본배양액에서의 농도보다 2~10배로 농도를 높였어도 역시 progesterone의 억제효과는 변하지 않았다.

위의 결과들을 고찰할 때 progesterone은 卵黃膜의 투과성에 영향을 미치는 것이 아니라 어떤 다른 기작으로 그의 효과를 나타내는 것이라고 볼 수 있다.

두번째 가정으로 progesterone의 효과는 세포내의 cyclic AMP(cAMP)의 농도와 일부 관련이 있을 것으로 추측된다. Cho 등(1974)은 생쥐의 여포난자는 dibutylcyclic AMP dbc AMP나 혹은 cAMP를 5'-AMP로 분해하는 phosphodiesterase의 inhibitor인 theophylline의 존재하에서 dictyate 상태로 억압됨을 발견하였다. 이것은 난자내에 cAMP가 증가하면 dictyate의 난자는 不活性化 되는 것을 의미한다. 따라서 배양액내에 progesterone이 세포내에 cAMP의 증가를 유도하고 이 현상에 의하여 GVBD가 억제된다고 가정할 수도 있다. 다시 말하면 dictyate期の 난자가 progesterone이나 혹은 dbc AMP에 반응하는 형태는 GVBD의 억제나 이 억제작용이 可逆性을 띠었다는 점에서 어느정도 비슷한 양상을 보여 주고 있다. 그러나 난자가 progesterone과 dbc AMP에 나타내는 반응에는 하나의 근본적인 차이가 있다. 즉 progesterone은 배양액에 GV期를 지난 난자의 성숙과정중 어느 시기에 첨가하여도 곧 난자에 작용하여 성숙과정을 즉시 중지시킨다. 반면에 dbc AMP나 theophylline은 단지 dictyate 상태에 있는 난자에게만 억제효과를 나타내고 있다. 이것은 progesterone과 dbc AMP의 작용기작이 서로 다를 수도 있음을 의미하는 것이다.

마지막 가정으로 배양액내의 progesterone은 GVBD에 필요한 어떤 종류의 蛋白質合成을 억제하는 것이 아닌가 추측된다. Schuetz(1967, a)의 실험결과에 따르면 progesterone은 오히려 개구리 여포난자의 GVBD를 촉진하였다. 그러나 단백질합성의 inhibitor인 puromycin을 progesterone을 포함한 배양액에 첨가하면 개구리 여포난자의 GVBD는 억제되었다. Donahue(1968)는 생쥐의 여포난자를 puromycin을 처리한 배양액에서 배양해본 결과 성숙분열을 완결하지 못하고 condensing chromatin 상태에 정지됨을 발견하였다. 이런점으로 미루어 보아 progesterone이 GVBD나 감수분열의 완결을 위한 이러한 단백질의 합성을 억제한다고 가정하는 것이 타당한 것처럼 보인다.

REFERENCES

- 1) Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham, D. G.: *The culture of mouse oocytes in vitro*. In:

- Methods in Mammalian Embryology*, pp. 86, Ed. Daniel, J.C., Jr., W.M. Freeman & Co., San Francisco, Calif. 1971.
- 2) Brinster, R.L.: *A method for in vitro cultivation of mouse ova from 2 cell to blastocyst. Exptl. Cell Res.*, 32:205, 1963.
 - 3) Cho, W.K., Stern, S. and Biggers, J.D.: *Inhibitory effect of dibutyl cAMP on oocyte maturation in vitro. J. Exp. Zool.*, 187:383, 1974.
 - 4) Cho, W.K.: *A micro tube culture method for mouse oocytes. J. Reprod. Fertil.*, 37:437, 1974.
 - 5) Daniel, J.C., Jr.: *Some effects of steroids on cleavage of rabbit ova in vitro. Endocrinol.*, 75:706, 1964.
 - 6) Daniel, J.C., Jr. and Levy, J.D.: *Action of progesterone as a cleavage inhibitor of rabbit ova in vitro, J. Reprod. Fertil* 7:323, 1964.
 - 7) Donahue, R.P.: *Maturation of the mouse oocytes in vitro. Dissertation, Johns Hopkins Univ., Baltimore, Md. 1968.*
 - 8) Masui, Y.: *Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in Rana pipiens. J. Exp. Zool.*, 166:365, 1967.
 - 9) Muller, G.C.: *A discussion of the mechanism of action of steroid hormones. Cancer Res.*, 17:490, 1957.
 - 10) Schuetz, A.W.: *Action of hormones on germinal vesicle break-down in from (Rana pipiens) oocytes. J. Exp. Zool.*, 166:347, 1967a.
 - 11) Schuetz, A.W.: *Effects of steroids on germinal vesicle of oocytes of the frog (Rana pipiens) in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124:1307, 1967b.
 - 12) Whitten, W.K.: *The effect of progesterone on the development of mouse eggs in vitro. J. Endocrinol.*, 16:80, 1957.

◆

=Abstract=

Effect of Progesterone on the Germinal Vesicle Break-down of Mouse Oocytes in Vitro

Cho, Wan Kyoo and Kwon, Hyuk Bang

Department of Zoology College of Liberal Arts and Sciences Seoul National University

Chung, Soon O

Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University Medical School

In the present studies, effect of progesterone on the germinal vesicle break-down of the mouse oocytes cultured in the micro tube was investigated. The results obtained are as follows: As dose of progesterone in the medium rose, accordingly the break-down of the germinal vesicle was suppressed. It was found that ED₅₀ was 15.7 µg/ml, and ED₉₀ 60.7 µg/ml of progesterone. The dose suppressing the oocyte maturation was apparently higher than that on the rabbit or on the mouse embryonal development. The inhibiting effect of progesterone on the GVBD was reversible. The germinal vesicle of the oocytes were broken down immediately in the medium upon removal of the hormone. Progesterone stops meiosis at any stage upon administration, while dbc AMP or theophylline suppresses only the break-down of the nuclear membrane. Recovering of the meiotic division of the oocytes once exposed to progesterone was delayed a little. The inhibiting action of progesterone was not altered by adding more pyruvate or in the presence of higher concentration of the mineral ions in the culture medium.