

생쥐 Age에 따른 난자-난구 복합체의 분산과 성숙에 관한 연구

전남대학교 생물학과

이 원 교 · 권 혁 방

=Abstract=

Cumulus Expansion and Oocyte Maturation of Oocyte-Cumulus Complexes Isolated from Different Ages of Mice *In vitro*

Won Kyo Lee and Hyuk Bang Kwon

Department of Biology, Chonnam National University

In order to know when the cumulus cells of mouse follicles get ability to expand *in vitro*, the oocyte cumulus complexes obtained from different growing ages of mice were cultured in the medium containing HCG and their rate of expansion were observed and at the same time their maturation rate was examined. The growth of follicles was also checked by histological method. It was impossible to isolate the oocyte-cumulus complexes from 13 or 15 days old mouse ovaries. The oocyte-cumulus complexes collected from 17 days old mouse were partially induced to expanded by HCG, and from 19 days, most of the complexes were induced to full expansion. The rate of cumulus cell expansion by HCG and the oocyte maturation increased steadily during the growing ages to adult. Thus, the time for follicles to get competence for expansion and maturation seems to be closely related. Antral follicles were appeared from 17 days old mice and Graafian follicles were seen from 21 days old mice. The competence for cumulus expansion increased during follicle growth up to 21 days old mice.

서 론

포유동물에서 그라프씨 여포(Graafian follicle)내의 난자는 조밀하게 배열되어 있는 여러층의 난구세포들에 의해 완전히 둘러 싸여 있는데 이를 특히 난자-난구복합체(oocyte-cumulus complex)라고 부른다. 이러한 난구의 내층세포들과 여포난자 사이에는 gap junction에 의해 물리적으로 연결되어 있으며(Anderson and Albertini, 1976), 난구세포들은 이 연결부위를 통해서 난자내에 영양물질을 공급하고 세포질의 성장을 도와준다(Heller et al., 1976). 배란이 되기 직전에 luteinizing hormone (LH)이 분비되어 그라프씨 여포를 자극하면 여포난자의 성숙분열(oocyte maturation)이 재개됨과 더불어 이들 난구세포들은 hyaluronic acid를 주성분으로 하는 다량의 뮤코당을 세포간격에 분비하면서 소위 분산현상을 일으킨다(Hillenko et al., 1976; Dekel et al.,

1980). *In vitro*에서 그라프씨 여포로부터 분리한 난자를 적합한 배양액에서 배양하면 자발적인 성숙분열(spontaneous maturation)이 일어나는데(Edward, 1965), *in vivo*에서는 여포의 억제작용에 의해 puberty가 되어 LH 분비가 시작될 때 까지 분열이 정지된 채 멈추어 있으나(Foote and Thibault, 1969; Jagiello et al., 1967). 이미 여포강 형성 직전의 여포 난자가 *in vitro*에서 성숙분열을 재개할 수 있는 능력을 획득하는 것으로 알려져 있다(Sorensen and Wassarman, 1976). *In vitro*에서 난구세포의 분산은 생식소 자극 호르몬의 도움을 받든지 또는 cyclic AMP(cAMP) 농도를 높여주는 물질인 dibutyryl cyclic AMP, caffeine 및 methylxanthine 등의 도움을 받아야만 일어남으로 난구세포의 분산과 난자의 성숙분열은 별개의 현상으로 생각된다(Dekel and Beers, 1980; Epping, 1982; Kwon, 1982). 본 연구는 puberty 이전의 어느 시기에 난구세포가 *in vitro*에서 분산현상을 일으킬 수 있는 능력을 획득

특하게 되는지를 조사하고 아울러 여포난자 *in vitro* 에서 성숙능력을 획득하게 되는 시기와외 상관관계를 규명하고자 시행하였다.

재료 및 방법

실험재료로는 본 과에서 사육하는 A-strain 생쥐를 사용하였다. 생후 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 일 된 암컷 생쥐에 3international unit(IU)의 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG, Sigma)을 복강 주사하여 48시간이 지난후 이들로 부터 난소를 적출하여 일부는 난자-난구복합체의 채취에 사용하였고, 그 나머지는 난소내의 여포상태를 관찰하기 위하여 paraffin section에 사용하였다.

난자-난구 복합체의 배양 및 관찰

분리한 난소를 embryological watch glass에 넣고 해부현미경하에서 미세한 칩으로 여포를 터뜨려 입으로 조절하는 미세피펫으로 난자-난구 복합체를 골라 낸 후 3~4회 씻은 다음 난구세포가 완전히 붙어있는 정상적인 복합체를 배양의 재료로 삼았다. 배양접시 (12×50mm, Falcon)에 멸균한 paraffin oil(Fisher)을 약 7ml 넣고 여기에 50 μ l의 배양액을 주입하여 방울을 만들어 습기찬 공기로 포화하고 5% CO₂가 혼합된 정온기(Forma Scientific)내에 2~3시간 넣어서 평형을 얻게 한 후 10~20개의 복합체들을 미세피펫으로 배양액에 넣어서 같은 정온기내에서 20시간 배양하였다(Brinster, 1963). 배양시간이 지난후 이들 복합체들을 Hole slide에 옮겨서 도립현미경(Nikon)하에서 난구세포의 분산현상을 관찰하였다. 난자의 핵상 관찰은

난구세포를 제거 한 후 vasselin drop (vasselin:paraffin, 10:1)이 찍혀진 slide glass에 난자를 모아서 cover glass로 덮고 압착하고 acetic alcohol (ethyl alcohol:acetic acid, 3:1)에 24시간 고정한 다음 aceto-orcein으로 염색하여 위상차현미경(Nikon)하에서 관찰하였다. 난소및 난자-난구 복합체를 조각 및 세척할 때는 개량된 Krebs ringer bicarbonate salt solution(Bigger et al., 1971)인 standard egg culture medium(SECM)을 사용하였다. PMSG는 saline (0.9%)에 녹여서 stock solution(200IU)으로 준비한 다음 사용하였다. 배양액으로는 10% fetal calf serum(FCS, Difco)을 첨가한 TC 199(Difco)을 사용하였고, 난구세포의 분산을 유도하기 위하여 human chorionic gonadotropin(HCG, Sigma)을 TC 199에 녹여서 stock solution(250 IU)으로 준비한 다음 해당량을 배양액에 첨가하였다.

난소의 section 및 관찰

분리한 난소를 Bouin's fluid에 24시간 고정한 다음 paraffin section method에 따라 prepartate를 만들어 위상차현미경하에서 난소내의 여포의 상태를 관찰하였으며 Pedersen과 Peters(1968)의 분류방식에 따라 여포의 성장단계를 조사하였다.

결 과

Puberty 이전의 생쥐에서 채취한 난자-난구 복합체의 분산과 성숙

미성숙 생쥐의 난소로 부터 분리한 난구세포가 *in vitro*에서 분산현상을 일으킬 수 있는지의 여부를 조사하고 난구세포의 분산과 난자의 성숙과의 관계

Table 1. Effects of HCG on the cumulus expansion and oocyte maturation of mouse oocyte-cumulus complexes isolated from 17 days old mice

Culture medium	(a) Cumulus expansion				(c) % expanded	(b) Oocyte maturation			*% matured
	+++	++	+	0		D	P-MI	PII-MII	
Control		1	2	27	3(30) ^c	2	13	15	50(30)
HCG 1IU	1	2	8	20	10(31)	2	15	13	42(31)
HCG 5IU	2	6	9	13	27(30)	3	14	13	43(30)
HCG 10IU	9	5	4	10	50(28)	2	14	12	43(28)

Oocyte-cumulus complexes were culture 20 hours in plain medium(control; TCM 199+10% fetal calf serum) or in medium containing HCG.

(a) Degree of cellular expansion was arbitrarily classified as; 1) compact cumuli with smooth outline(0); 2) compact cumuli with rough outline(+); 3) moderately expanded cumuli with viscous matrix(++); 4) fully expanded cumuli with a large quantity of viscous matrix(+++)

(b) D; dictyate oocyte, P-MI; prophase I-metaphase I, PII-MII; prophase II-metaphase II

(c) Percentage of moderately and fully expanded cumuli(+++ plus ++)

* Percentage of oocytes with polar body(PII-MII)

() \emptyset No. of the complexes examined

Table 2. Effects of HCG on the cumulus expansion and oocyte maturation of mouse oocyte-cumulus complexes isolated from 19 days old mice

Culture medium	(a) Cumulus expansion				(e) % expanded	(b) Oocyte maturation			*% matured
	+++	++	+	0		D	P-MI	PII-MII	
Control			1	29	0(30) ^c	8		22	73(30)
HCG 1IU	12	6	6	7	58(31)	11		20	65(31)
HCG 5IU	26	2	1	1	93(30)	9		21	70(30)
HCG 10IU	28			2	93(30)	10		20	67(30)

(a) Degree of cellular expansion was classified as described in Table 1.

(b) D; dictyate oocyte, P-MI; prophase I-metaphase I, PII-MII; prophase III-metaphase II

(c) Percentage of moderately and fully expanded cumuli (+++ plus ++)

* Percentage of oocytes with polar body (PII-MII)

() ∅ No. of the complexes examined

Table 3. Effects of HCG on the cumulus expansion and oocyte maturation of mouse oocyte-cumulus complexes isolated from 21, 23 and 25 days old mice

Culture medium	(a) Cumulus expansion				(e) % expanded	(b) Oocyte maturation			*% matured
	+++	++	+	0		D	P-MI	PII-MII	
21 days	Control		1	2	36	3(39) ^c	6	33	85(39)
	HCG 1IU	20	10	6	2	79(88)	7	31	82(38)
	HCG 5IU	35	2			100(37)	6	31	84(37)
	HCG 10IU	36	3			100(39)	6	33	85(39)
23 days	Control		1	1	28	3(30) ^c	5	25	83(30)
	HCG 1IU	29	1	1	1	94(32)	4	27	87(31)
	HCG 5IU	30				100(30)	5	25	83(30)
	HCG 10IU	30				100(30)	6	24	80(30)
25 days	Control	1	1	1	29	6(32) ^c	5	27	84(32)
	HCG 1IU	29	1	1	1	94(32)	6	26	81(32)
	HCG 5IU	30				100(30)	6	24	80(30)
	HCG 10IU	30				100(30)	5	25	83(30)

(a) Degree of cellular expansion was classified as described in Table 1.

(b) D; dictyate oocyte, P-MI; prophase I-metaphase I, PII-MII; prophase II-metaphase II

(c) Percentage of moderately and fully expanded cumuli (+++ plus ++)

* Percentage of oocytes with polar body (PII-MII)

() ∅ No. of the complexes examined

를 조사하기 위해서 생후 13~25일 된 생쥐로부터 난자-난구 복합체를 적출하여 배양액에서 20시간 동안 배양하여 난자의 성숙률과 HCG(1-10IU)에 의해서 유도된 난구세포의 분산률을 조사하였다. 생후 13~15일된 생쥐에서는 난자-난구 복합체를 분리할 수 없었으며 생후 17일된 생쥐에서 비로소 난자-난구 복합체의 분리가 가능하였다.

생후 17일된 생쥐에서 얻은 난자-난구 복합체등을 배양하였을 때 호르몬(HCG)의 도움이 없이는 거의 일어나지 않았으나, 1IU의 HCG를 처리했을 때는 10%, 5IU의 HCG에서는 27%, 10IU의 HCG에서는 50%의 난구세포들이 호르몬의 자극에 의해 분산이 유도되었으며 난자의 성숙률은 호르몬의 유

무나 농도에 관계없이 42~50%를 보여 주었다 (Table 1). 생후 19일된 생쥐에서 보면 난구세포의 분산은 대조군에서는 역시 거의 일어나지 않았으나, 1IU의 HCG를 처리했을 때는 58%, 5IU와 10IU의 HCG에서는 각각 93%의 분산률을 나타냈으며, 난자의 성숙률은 대조군에서 73%로 증가되었으며 실험군에서도 65~70%로 증가되었다 (Table 2). 따라서 2일 사이에 호르몬에 의해 유도된 분산률이 증가하였으며 난자의 성숙률도 증가한 것을 알 수 있었다 (Table 2).

Puberty 이후 생쥐에서 채취한 난자-난구 복합체의 분산과 성숙

Table 4. Mean numbers of follicles with six or more layers each mouse age

Mouse age (days)	Numbers of follicles with six or more layers each mouse age (\pm S.E.)
13	0
15	0
17	9 \pm 2.37
19	18 \pm 4.10
21	25 \pm 3.41
23	37 \pm 2.61
25	31 \pm 2.89

Puberty가 시작되는 것으로 생각되는 생후 21일 된 생쥐에서 부터 난구세포의 분산률이 비교적 낮은 농도의 HCG(1IU)에서도 효과적으로 일어나기 시작했으며 (79%) 5IU와 10IU의 HCG를 배양액에 첨가했을 때에는 거의 완전한 분산률을 나타내었다. 난자의 성숙률도 또한 21일에서 부터 80%로 증가하였으며 그 이후에도 거의 변화없이 높은 성숙률을 보여 주었다(Table 3). 이러한 결과들은 비록 미성숙된 생쥐의 (17일 or 19일) 난소에서 채취한 복합체들도 분산과 성숙을 일으킬 수 있지만 그 효율이 비교적 낮으며 21일 이후의 생쥐에서 얻은 복합체들이 비로소 분산과 성숙을 일으킬 수 있도록 충분히 성장했다는 것을 의미하는 것으로 해석되었다.

생쥐 성장에 따른 여포의 성숙

*In vitro*에서 이러한 난구세포의 분산능력과 여포난자의 성숙능력이 여포의 성장상태와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되어 생후 13일에서 25일 사이의 생쥐에서 난소를 적출하여 난소내의 여포의 상태를 관찰하였다. 생후 13~15일된 생쥐의 난소에서는 난자-난구 복합체들을 분리할 수 없었으며 이들의 여포를 section하여 보면 6층 이상의 여포세포층을 가진 여포를 관찰할 수 없었다. 생후 17일된 생쥐의 난소에서 비로소 6층 이상의 여포세포층을 가진 여포가 관찰되기 시작하였으며 antrum이 형성되기 시작하여 여포액이 들어있는 것을 관찰할 수 있었다. 생후 19일된 생쥐의 난소에서 뚜렷이 여포강을 가진 여포들이 늘어나기 시작하였고 생후 21일 이후의 생쥐에서 비로소 배란이 가능한 그라프씨 여포(Graafian follicle)를 관찰할 수 있었다. 또한 6층 이상의 여포세포층을 가진 여포들의 수가 증가하였다. 본 실험에 사용된 난자-난구 복합체들은 여포강을 가지기 시작하는 생후 17일된 난소

로부터 분리할 수 있었으며 17일 이후 여포의 성장이 꾸준히 일어나 6층 이상의 여포세포층을 가진 여포들의 수가 계속 늘어나는 경향을 보여 주었다(Table 4). 따라서 여포의 성장과 함께 난구세포들의 호르몬에 대한 감수성이 증가하는 것 (Table 1, 2, 3)으로 보아 난구세포의 분산능력이 동시에 증가한 것을 알 수 있었다.

논 의

출생직후, 포유동물의 난소는 제 1 강수 분열전기(dictyate stage)에 분열이 정지된 수많은 작은 난자들로 차있다. 난자의 주위를 둘러 싸고 있는 여포세포들은 일련의 형태적 변화를 거쳐 성장 하는데 (Pedersen and Peters, 1968), 생후 15일된 생쥐에서 가장 큰 여포는 4~5개의 세포층으로 둘러 싸여 있으며, 16일째 여포강을 가진 여포가 형성되고 20일째 처음으로 거대여포가 나타난다(Kent, 1972). *In vitro*에서 생쥐의 난자가 분열을 재개할 수 있는 능력을 갖추는 것은 생후 15일된 생쥐에서 부터이며 나이가 들어감에 따라서 여포난자의 성숙률이 증가하는 것으로 알려져 있다(Sorensen and Wassarman, 1976). 본 실험의 결과에서도 난자의 성숙률은 생후 17일된 생쥐의 난소에서 적출한 난자들은 50%이었으나 나이가 들어감에 따라서 증가하여 21일에 80% 이상에 도달하고 그 이후 비슷한 성숙률을 보였다(Table 1, 2, 3). 난구세포의 분산은 *in vitro*에서 그라프씨 여포로부터 얻은 난자-난구 복합체를 생식소 자극 호르몬(FSH or LH)을 첨가한 배양액에서 배양하면 유도를 할 수가 있는데 순도가 높은 호르몬을 사용할 경우 FSH가 가장 효율적으로 분산을 유도하는 것으로 알려져 있다(Fppig, 1979a). HCG는 LH와 유사한 활성도를 가지고 있는데(Kammerman and Canfield, 1972), *in vitro*에서 역시 난구세포의 분산을 유도할 수가 있다. 그러나 고순도의 HCG는 *in vitro*에서 직접 난자-난구 복합체에 노출되었을 때 분산을 일으킬 수 없다는 보고도 있다(Eppig, 1979b) b). *In vivo*에서 FSH에 의해 자극을 받음에도 불구하고 난구세포가 분산을 일으키지 않는 것은 여포내에 난구세포의 분산을 억제하는 어떤 요인이 있음을 시사하는 것이며 이 현상은 난자의 성숙분열이 거대여포내에서 억제되어 있는 현상과 매우 유사하다고 볼 수 있다. *In vitro*에서 난소를 기관배양하면서 HCG를 첨가하면 난구세포의 분산을 유도할 수 있는데 이는 LH 혹은 HCG가 여포내 이 억제인자의 작용을 중화시키는 것으로 해석되었다(Eppig, 1980). *In vitro*에서

난자의 성숙은 자발적으로 일어나나 난구세포의 분산은 자발적으로 일어나지 않는 것으로 보아 난자

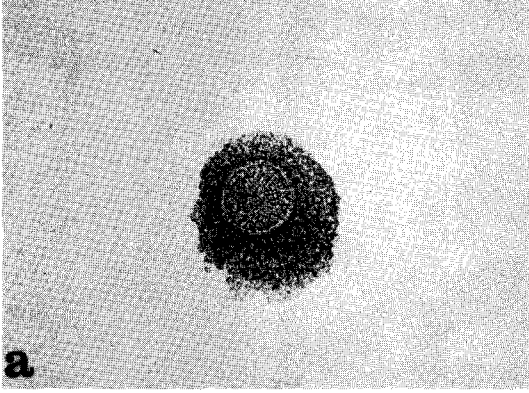


Fig. a. Oocyte-cumulus complexes obtained from 21 days old mouse were incubated in plain medium for 20 hours. Those oocytes are surrounded by intact cumulus cells ($\times 100$).

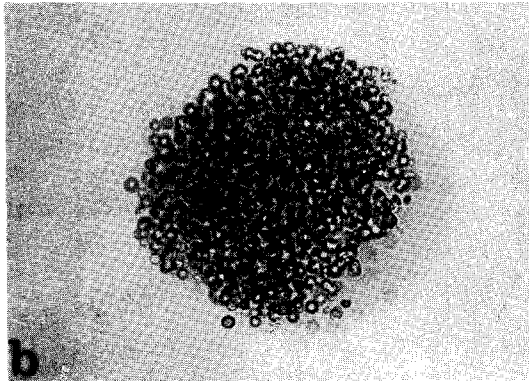


Fig. b. Oocyte-cumulus complexes obtained from 21 days old mouse were incubated in the medium containing 10 IU of HCG. The cumulus cells are moderately expanded ($\times 100$).

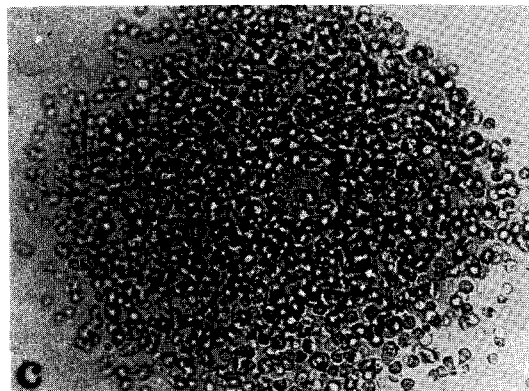


Fig. c. Oocyte-cumulus complexes obtained from 21 days old mouse were incubated in the medium containing 10 IU of HCG. The cumulus cells are fully expanded ($\times 100$).

성숙의 억제와 난구세포의 분산 억제와는 어떤 다른 기작에 의해 이루어진다는 것을 시사해 주는 것 같다. 본 실험의 결과로부터 생식능력이 생기기전인 생후 17일된 생쥐로부터 얻은 난구세포들도 HCG의 도움으로 분산이 유도될 수 있다는 것을 알았으며 19일된 생쥐 이후 부터 복합체들의 분산률이 점차 증가한다는 것을 알 수 있었다(Table 1, 2). 그러나 미성숙 생쥐의 HCG에 대한 감수성은 매우 낮아서 17일된 복합체들이 1IU의 HCG에 10%만이 반응하였고, 19일된 복합체에서도 58%만이 반응하는데 그쳤다. 그러나 21일 이후의 생쥐로부터 얻은 난구세포들은 HCG에 대한 감수성이 급격히 증가하여 사용된 모든 농도 구간의 HCG(1-1IU)에서 거의 완전한 분산현상을 일으키었다(Table 3). 따라서 이는 난구세포의 분산능력 역시 Sorensen과 Wassarman(1976)이 보고한 난자의 성숙능력 증가와 유사한 양상을 보여주는 것으로 나타났다. 즉 puberty에 도달하는 몇일 사이에 난자의 성숙능력과 난구세포의 분산능력이 현저히 증가함을 보여주고 있다. 여포의 성장 상태를 조사한 결과 생후 17일된 생쥐의 난소에서 비로소 여포액이 들어 있는 여포낭을 가지며, 6층 이상의 여포층을 가진 여포들이 발견되고 이때 얻은 난자-난구 복합체들이 *in vitro*에서 분산할 수 있는 것으로 보아 난구세포들은 puberty가 되기 이전에 이미 분산능력을 보유하는 것 같았다. 그러나 생식소 자극 호르몬에 충분히 반응하려면 여포의 성장이 더 이루어져 21일에 도달해야 되므로, 여포의 성장, 여포내 난자의 감수분열 재개능력, 난구세포의 분산능력등이 상호긴밀한 조절관계를 가지며 점차 발달되어 간다는 것을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Anderson, E. and D.F. Albertini : *Gap junctions between the oocyte and companion cells in the mammalian ovary. J. Cell. Biol. 71:680-687, 1976.*
- Biggers, J.D., D.G. Whittingham, and R.P. Donahue: *The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 58:560-567, 1967.*
- Biggers, J.D., W.K. Whitten, and D.G. Whittingham: *The culture of mouse embryos in vitro. In: Methods in mammalian Embryology, ed by J.C. Daniel, Jr. W.H. Freeman and Co. pp. 86-116, 1971.*

- Brinster, R.L.: *A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocysts. Exp. Cell. Res.* 32:201-1963.
- Dekel, N. and W.H. Beers : *Development of rat oocyte in vitro inhibition of maturation in the presence of absence of the cumulus oophorus. Devl. Biol.* 75:247-245, 1980.
- Dekel, N., T.S. Lawrence, N.B. Gilula, and W.H. Beers: *Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus oocyte complex and the cumulus oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. Devl. Biol.* 86:356-362, 1981.
- Edward, R.G.: *Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, rhesus monkey and human ovariag oocyte. Nature* 208:349-351, 1965.
- Eppig, J.J.: *Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice : General conditions for expansion in vitro. J. Exp. Zool.* 208:111-120, 1979a.
- Eppig, J.J.: *FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus complexes from mouse preovulatory follicles. Nature.* 281: 483: 484, 1979b.
- Eppig, J.J.: *Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins in vivo and in vitro. Biol. Reprod.* 23:545-552, 1980.
- Eppig, J.J.: *The relationship between parthenogenic embryonic development and oocyte-cumulus cell intercellular coupling during oocyte meiotic maturation. Gamete Res.* 5:229-237, 1982.
- Foote, W.D. and C. Thiabault: *Recherches experimentales sur la maturation in vitro des oocytes de truie et de veau. Ann. Anim. Biochem. Biophys.* 9:329-349, 1969.
- Heller, D.T., D.M. Cahill, and R.M. Schultz: *Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. Devl. Biol.* 84: 455-464, 1981.
- Hillenjo, N. Dekel, and K. Ahren: *Effects of gonadotrophins on the cumula oophorus of isolated rat Graafian follicles. Acta Physiol. Scand.* 96:558-568, 1976.
- Jagiello, G., J. Graffeo, M. Ducayen, and R. Prosser: *Further studies of inhibitors of in vitro mammalian oocyte maturation. Fert. Steril.* 28: 476-481, 1977.
- Kammerman, S. and R.E. Canfield: *The inhibition of binding of iodinated human chorionic gonadotropin to mouse ovary in vivo. Endocrin.* 90:384-389, 1982.
- Kent, J.: *Changes in the ovarian follicle population of mice aged 16 to 20 days. J. Reprod. Fert.* 31:323-326, 1972.
- Kwon, H.B.: *On the study of the cumulus cell dispersion in mammalian oocyte-cumulus complexes in vitro. J. Natur. Sci.* 13:93-104, 1982.
- Pedersen, T. and H. Peters: *Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. J. Reprod. Fert.* 17:555-557, 1968.
- Sorensen, R.A. and P.M. Wassarman: *Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. Devl. Biol.* 50:527-528, 1972.