大韓不妊學會雜誌：第13卷 第2號, 1986
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 13, No. 2, 1986, 12.

Cordycepin이 생쥐의 난구세포 분산과 난자의 성숙에 미치는 영향

전남대학교 자연과학대학 생물학과

〈지도교수 권 혁 방〉

이 기 숙

=Abstract=

Effect of Cordycepin on the Cumulus Expansion and Meiotic Maturation of Mouse Cumulus-oocyte Complexes *in Vitro*

Lee Gy-Soog

Department of Biology, College of Natural Sciences, Chonnam National University
(Adviced by Hyuk-Bang Kwon)

These experiments were conducted to know whether RNA syntheis is involved in the cumulus expansion and oocyte maturation of mouse cumulus-oocyte complexes *in vitro*. Mouse cumulus-oocyte complexes(COC's) were cultured in the presence of cordycepin, an inhibitior of RNA synthesis and its effect on the cumulus expansion and oocyte maturation were examined.

The results were as follows.

1. Continuous presence of cordycepin in the medium(200μg/ml) inhibited the HCG-induced cumulus cell expansion of mouse complexes. This inhibition was reversible.
2. When the COC'S were preincubated with different concentration of cordycepin plus HCG for 3 hours and then transferred to the plain medium, the HCG induced cumulus expansion was suppressed at 100μg/ml of cordycepin.
3. When the COC'S were cultured with cordycepin after HCG stimulation(3hrs), the cumulus expansion were not suppressed by cordycepin.
4. Oocyte meiotic maturation did not appear to be affected by cordycepin.

The data presented here imply that RNA synthesis is involved in the cumulus expansion process and that mouse oocytes are more resistant to RNA synthesis inhibitor than cumulus cells.

서 론

포유동물에서 난자의 감수분열 과정은 태아기(fetal life)에 시작하여 출생후 즉시 diplotene stage에서 멈추어 있다가 성숙기(adult life)에 gonadotrophins(luteinizing hormone, LH)의 자극으로 배란이 일어남과 동시에 감수분열이 재개된다(Austin, 1961[1]). 한편 *in vitro*에서 난자를 인공배양하면 호르몬의 도움없이도 자발적으로 감수분열을 재개하여 제 2감수분열 중기까지 진행이 된다(Pincus and Enzman, 1935[2]). 여포난자(follicular oocytes)는 여포세포(granulosa cells)로부터 파생된 여러 층의 난구세포(cumulus cells)에 의해 둘러싸여 있으며, 이들 난자-난구부합체 (cumulus-oocyte complex)라 부른다. 난자는 난구세포와 gap junction으로 연결되어 있어 이 junction을 통해 난구세포로부터 성장에 필요한 물질을 공급받는다(Anderson and Albertini, 1976[3]; Gilular et al., 1978[4]; Heller et al, 1981[5]). 배란이 일어날 때 난구세포들은 hyaluronic acid로 알려진 glycosaminoglycan(GAG) matrix를 합성하여 세포사이에 분비하므로써 난구세포의 분산(cumulus expansion)을 일으키는데(Maruska et al., 1984[6]; Ball et al., 1985[7]), 이때 두 세포사이의 gap junction이 파양되는 것으로 알려져 있다. 근래에 난구세포에서 생성된 cAMP가 gap junction

을 통해 난자로 전달이 되어 난자내 cAMP의 농도를 높여줌으로 감수분열을 억제하고 생식소자극호르몬의 영향으로 난구세포가 분산을 일으키면 cAMP의 공급이 끊어져 감수분열이 재개된다는 보고가 많이 나오고 있으므로(Cho et al., 1974[8]; Dekel and Beers, 1978[9]; Schultz et al., 1983[10]; Racowsky, 1985[11]) 난구세포의 분산과정이 중요한 문제로 대두되고 있다.

본 실험에서는 HCG에 의해 유도된 난구세포의 분산과정에 유전자의 발현이 필요한지의 여부를 밝히기 위하여 RNA합성의 저해제로 알려진 cordycepin을 사용하여 분산에 미치는 영향을 여러 면에서 조사하여 보았다.

재료 및 방법

본과 사료실에서 사육되는 생후 4~5주된 흰생쥐에 5IU의 PMSG(pregnant mare serum gonadotrophin, Sigma)를 복강주사한 후 이틀후에 실험의 재료로 사용하였다. 복부절개로 난소를 꺼내어 해부현미경(Olympus)하에서 미세한 바늘로 여포를 터트려 입으로 조절하는 capillary pipette으로 난자-난구복합체를 분리하였으며, 기본 배양액으로 TC 199에 10% FBS(Gibco)를 포함한 것을 사용하였다. 난구세포의 분산 유도를 위해 HCG(5IU/ml, human chorionic gonadotrophin, Sigma)를 배양액에 첨가하였으며, RNA합성 저해제로 cordycepin(Sigma)을 사용하였다(Fouquet et al., 1975[12]; Levey et al., 1977[13]). Cordycepin은 TC199에 녹여 1,000μg/ml의 농도로 stock을 만든 후 −20℃에 보관하였고, 25~200μg/ml의 범위에 농도로 첨가하였다. 난자-난구복합체의 배양은 Brinster (1963)[14]의 배양법에 따랐다. 즉 1회용 배양접시 (삼우)에 멸균한 paraffin oil(Fisher)을 약 10ml넣고 이 속에 0.5ml의 배양액을 방울로 만들어 2~3시간 이상 37℃, 5% CO_2가 혼합된 습기찬 공기로 포화된 정온기에 넣어 평형을 얻게 한후 정상적인 난자-난구복합체를 골라 넣어 배양하였다. 배양기간이 지난 난자-난구복합체들을 도입 현미경으로 옮겨 난구세포의 분산현상을 시찰하였으며, 난구세포의 생존력을 조사하기 위해 trypan blue용액(0.4% in SECM)에 난자일란구 복합체를 15분간 염색시킨 후 다시 S-ECM(standard egg culture medium)에 옮겨 염색여부를 조사하였다. 난자의 핵상을 조사하기 위해 Hyaluronidase(Sigma)로 난구세포들을 제거한 후, acetic alcohol(ethyl alcohol: acetic acid, 3:1)로 24

Table 1. Effect of cordycepin on the HCG-induced cumulus expansion and oocyte maturation of mouse coc's *in vitro*

Cordycepin(μg/ml)	Expansion(No.)				No. examined	@% expansion	% polar body
	+++	++	+	0			
HCG+0	95	0	1	0	96	99	68
HCG+25	97	2	1	1	114	87	59
HCG+50	89	5	0	0	94	100	52
HCG+100	69	11	8	4	92	87	45
HCG+200	1	5	5	73	84	7	45

@ : Percentage of moderately and fully expanded cumuli(+++ plus ++)
The cumulus-oocyte complexes(coc's) were cultured for 18~20hours in the simultaneous presence of HCG(5IU) and different concentration of cordycepin(0−200μg/ml).

Table 2. Effect of cordycepin on the triggering action of HCG of cumulus expansion *in vitro*

Preincubation medium cordycepin(μg/ml), 3hrs	Incubation medium 18hrs	Expansion(No.)				No. examined	% expansion
		+++	++	+	0		
HCG+0	Plain medium	56	2	0	0	58	100
HCG+25	〃	57	2	0	0	59	100
HCG+50	〃	55	0	3	11	69	80
HCG+100	〃	11	3	3	29	46	30
HCG+150	〃	0	0	7	45	52	0

The cumulus-oocyts complexes(coc's) were preincubated with HCG(5IU) and different concentration of cordycepin(0−150μg/ml) for 3hours, and then transferred to the plain medium and cultured further for 18hours. Cumulus expansion was checked after culture.

시간 고정하고 aceto-orcein으로 염색하여 위상차 현미경(Nikon)하에서 핵상을 시찰하였다.

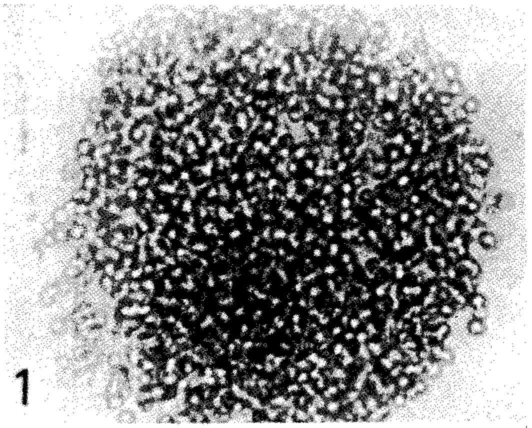
결 과

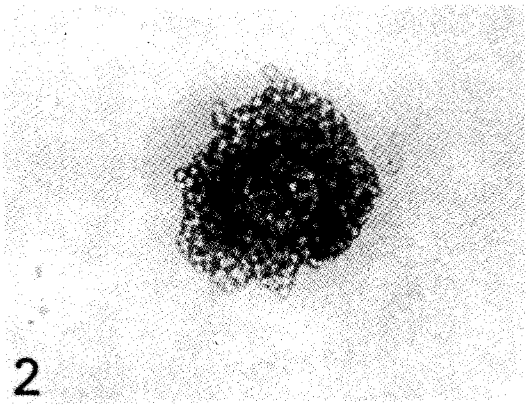
Cordycepin이 난구세포의 분산과 난자의 성숙에 미치는 영향을 보기 위해 HCG(5IU)와 여러 농도의 cordycepin(25~200μg/ml)을 포함한 배양액에서 난자-난구 복합체를 배양하여 보았다(Table 1). 대부분의 난자-난구 복합체는 hormone(HCG)에 반응하여 난구세포의 분산이(87~100%) 일어났고(Fig. 1), 분산된 난구세포는 둥글고 정상적인 모양을 갖추고 있었다. 그러나 200μg/ml의 cordycepin 내에 배양되었을 때에는 난구세포의 분산이 현저히 저해되어 밀집된 난구세포층을 간직한 상태로 머물렀다(Fig. 2). 난자의 성숙율을 조사한 결과 난자의 성숙율은 100μg/ml와 200μg/ml에서 부분적인 억제현상이 나타났다(45%, $P<0.05$). 이로보아 배양액내의 cordycepin은 HCG에 의해 유도된 난구세포의 분산을 현저히 억제하며, 난자의 성숙율도 유의하게 부분적으로 억제한다는 것을 알 수 있었다.

Eppig(1980)[15]는 생쥐의 난구세포의 분산을 위해 요구되는 FSH의 노출시간은 2시간이며, hyaluronic acid 합성은 SH로 분산을 trigger한 후 3~6시간사이에 일어난다고 보고하였다. 또한 Kwon (1983)[16]은 HCG에 3시간 노출로 생쥐 난구세포의 분산이 일어나는 것으로 보아 HCG의 자극기간이 3시간이면 충분하다고 보았다. RNA의 합성이 위의 어느 시간에 일어나는지를 알기 위해 HCG로 자극하는 3시간동안 cordycepin도 동시에 첨가하여 복합체들을 배양한 뒤 기본배양액에 옮겨 18시간동안 배양하여 보았다(Table 2). 도표에서 볼 수 있듯이 50μg/ml의 농도까지는 난구세포의 분산이 정상적으로 일어났으나(80~100%), 100μg/ml부터는 급격히 억제되며(30%), 150μg/ml에서는 완전 억제되었다(0%).

이에 대해 난자-난구 복합체를 HCG배양액에서 3시간 배양하여 분산을 trigger한 후 cordycepin을 포함한 배양액으로 옮겨 18시간 계속 배양해본 결과(Table 3) 50μg/ml와 100μg/ml에서도 난구세포의 분산이 완전히 일어났다(100%). 또한 난자의 성숙율을 조사한 결과 모든 실험군에서 성숙율에 거의 차이가 없었다(52~54%, $P>0.05$). 이로 보아 cordycepin은 뮤코당 합성시기(≈3시간 이후)보다 HCG 자극시기(≈3시간 이내)에 더 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Cordycepin이 난구세포의 분산에 어떤 손상을 주





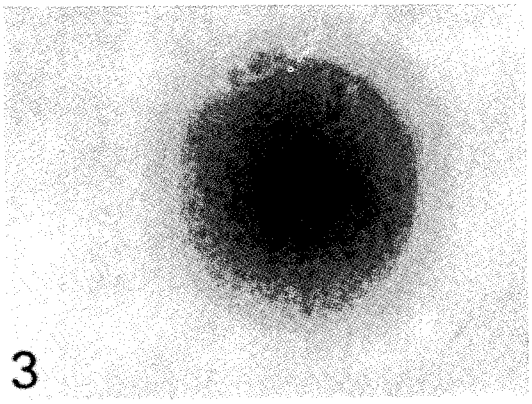


Fig. 1. Mouse cumulus oocyte complexes showing a typical cumulus expansion by induced HCG. The cumulus cells are fully expanded. ×100

Fig. 2. The cumulus-oocyte complexes (COC') were cultured for 18-20hours in the simultaneous presence of HCG(5IU) plus cordycepin (200μg/ml). The cumulus expansion was suppressed by the cordycepin. The cumulus-oocyte complexes was surrounded by intact cumulus cells. ×100

Fig. 3. A matured mouse oocyte after 20hours of incubation in basic medium. The oocyte has a typical polar body and metaphase chromosome(M-II stage). ×200

Table 3. Effect of cordycepin on the cumulus expansion and oocyte maturation of coc's when the drug is treated after HCG stimulation

Preincubation medium (μg/ml)(3hrs)	Incubation medium (μg/ml)(18hrs)	Expansion(No.)				% examined	% expansion	% polar body
		+++	++	+	0			
HCG	HCG+0	95	0	1	0	96	99	68
HCG	HCG+50	27	5	0	0	32	100	52
HCG	HCG+100	27	3	0	0	30	100	54

The cumulus-oocyte complexes(coc's) were preincubated in HCG-medium for 3hours and cultured further in medium containing cordycepin(0－100μg/ml) for 18hours. Cumulus expansion and oocyte maturation were checked after culture.

Table 4. Reversibility of cordycepin effect on the cumulus expansion and oocyte matruation of mouse coc's *in vitro*

Preincubation medium, 3hrs cordycepin(μg/ml)	Incubation medium 18hrs	Expansion(No.)				No. examined	% expansion	% via-bility	Maturation (No.)		% Polar body
		+++	++	+	0				Met I	Met II	
0	HCG	29	0	0	0	29	100	100	13	16	55
50	HCG	20	5	0	0	25	100	100	9	16	64
100	HCG	19	3	0	0	22	100	100	7	15	68
150	HCG	16	7	0	0	23	100	100	9	14	61
200	HCG	19	5	0	0	24	100	100	9	15	63

The cumulus-oocyte complexes(coc's) were preincubated with cordycepin(0－200μg/ml) for 3hours, and then transferred to the HCG-medium and cultured further for 18hours, and their degree of expansion, viability and oocyte maturation were examined after culture.

는가를 알아보기 위해 3시간동안 cordycepin에서 배양한 후 HCG배양액에 옮겨 18시간 배양하였다(Table 4). 높은 농도의 cordycepin(200μg/ml까지)에 노출되었던 복합체들에서도 거의 완전한 난구세포의 분산을 일으켰으며(100%), 이때 난자의 성숙율에도 거의 차이가 없었다(55～68%, $P>0.05$). 난구세포의 분산을 조사한 후 0.04% trypan blue에 난구세포를 옮겨 15분둔후 SECM에 옮겨 trypan blue에 염색여부를 조사한 결과 모두 염색되지 않았다(100%). 그러므로 이들 난자－난구 복합체는 3시간 cordycepin에 노출되었어도 손상을 받지 않았다는 것을 알 수 있었다.

논 의

포유동물이 성체가 되면 생식주기에 따른 LH (luteinizing hormone)의 분비에 의하여 주기적으로 난소로부터 배란현상이 일어나며, 이때 난구세포의 분산과 난자의 성숙재개가 동시에 일어나게 된다. 난자의 성숙분열은 *in vitro*에서 특별한 hormone의 자극이 없어도 저절로 일어나지만 난구세포의 분산은 생식소자극호르몬(follicle stimulating hormone, FSH)이나 그 유사체(human chorionic gonadotrophin, HCG) 혹은 cAMP의 농도를 상승시키는 물질을 배양액에 넣어 주어야만 난구세포의 분산이 정상적으로 일어난다(Dekel and Beers, 1980[17]; Eppig, 1982[18]). 일부 학자들은 여포내에서 난자의 성숙이 억제되어 있는 것은 난자를 조밀하게 둘러싸고 있는 난구세포에서 gap junction을 통해 공급받은 cAMP가 난자의 성숙억제요인으로 작용한다고 보고하였다(Cho et al., 1974[8]; Dekel and Beers, 1978[9]; Schultz et al., 1983[10]; Racowsky, 1985[11]). 또한 여포액(follicular fluid)내에 존재하는 성숙억제제(oocyte maturation inhibition, OMI)의 작용도 난구세포의 존재하에서만 그 효과가 크게 나타나는 것으로 알려져 있다(Biggers et al, 1967[19]; Tsafriri et al., 1976[20]; Heller et al., 1981[21]; Centola et al., 1981[22]; Racowsky, 1985[11]). 따라서 난자－난구세포사이에는 긴밀한 조절관계가 있는 것으로 보인다. 아직도 난자－난구 복합체의 생물학적 기능에 대한 난구세포의 역할은 완전하게 밝혀지지 않고 있다. Ball(1985)[7] 등은 ^{3}H-thymidine, ^{3}H-uridine 및 ^{3}H-leucine을 사용하여 난구세포의 분산과정에서 이들 고분자의 전구물질들이 cumulus-oocyte에 동화(incorporation)되는 비율을 조사한 결과 hormone (FSH)에 노출된 24시간동안 난자－난구 복합체의

DNA합성은 오히려 감소하였고, RNA합성은 변하지 않았으며, 단백질은 증가하는 것을 관찰한 바 있다. 따라서 그들은 분산과정에서 RNA내지 단백질의 합성이 필요하다는 것을 시사한 바 있다. 또한 Kwon(1983)[14]은 생쥐를 재료로 하여 puromycin과 actinomycin D가 난구세포의 분산을 현저히 억제하는 것으로 보아 역시 고분자의 합성이 분산에 필요하다는 것을 밝힌 바 있다. 그러나 actinomycin D가 난구세포의 분산을 억제하는 과정에서 비사역적인 손상을 주었으므로 Kwon(1983)의 결과만 가지고는 이 시약이 RNA의 합성을 저해하여 분산을 억제한 것인지 혹은 세포에 독성을 끼쳐서 다른 부작용에 의해 억제한 것인지 알 수 없었다.

본 실험의 결과에서 보는 바와 같이 cordycepin은 난구세포에 어떤 손상을 주지않고 분산을 억제하였으므로, cordycepin은 난구세포의 분산을 위해 요구되는 RNA합성을 억제하므로써 난구세포의 분산을 저해하였다고 해석할 수 있겠다. 이 저해는 cordycepin의 농도에 의존하게 되는데 25~100μg/ml의 농도에서는 난구세포의 분산에 거의 영향을 보이지 않았다(Table 1). 또는 cordycepin이 후기 분산과정(3~18시간)보다 분산 초기과정인 HCG자극기간(3시간)에 훨씬 더 민감하게 영향을 미치는 것으로 보아 cordycepin이 분산에 필요한 RNA합성을 분산초기에 억제했다는 것을 의미하는 것 같았다(Table 2). Table 3에서 처럼 난구세포를 HCG로 3시간 자극한 후 cordycepin을 첨가한 HCG배양액에 옮겨 배양기간이 18시간 계속되더라도 난구세포의 분산이 정상적으로 일어난 것으로 보아 HCG 자극기간에 이미 필요한 RNA가 합성이 되었다는 것을 알 수 있었다. Cordycepin이 첨가된 배양액에서 3시간 배양후 HCG배양액에서 배양하였을 때(Table 4) 모든 농도에서 난구세포의 분산이 일어난 것으로 보아 cordycepin은 이 기간동안에 비가역적인 어떤 손상을 입히지 않았다는 것을 알 수 있었다. 난자의 성숙율은 cordycepin을 첨가한 배양액에서 계속 배양했을 때에는(Table 1) 높은 농도에서(100μg/ml, 200μg/ml) 유의한 억제가 나타났으나 그 외에 단기간 cordycepin에 노출된 실험군에서는(Table 3, 4) 모든 농도에서 정상적으로 성숙이 일어났다. 이로 보아 cordycepin에 계속 노출되었을 때에는 난자의 성숙이 영향을 받으나 단기간 노출시에는 영향을 받지 않는 것으로 보아 난구세포보다 RNA합성 저해효과에 훨씬 저항성이 큼을 알 수 있었다. 이는 난자의 성숙재개에 필요한 대부분의 RNA를 이미 모체로부터 받아 난자내에 저장하고 있다는 것을 의미하는 것 같았다.

위 결과들을 요약하면 생쥐 난구세포의 분산에 RNA의 합성이 필요하며 이 합성은 분산 초기과정에 일어난다고 말할 수 있겠다.

REFERENCES

Austin, C.R. : *The mammalian eggs. Blackwell, Oxford, pp. 96, 1961.*

Pincus, G. and Ezmann, E.V. : *The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. J. Exp. Med. 62: 665-675, 1935.*

Anderson, E. and Albertini, D.F. : *Gap junctions between the oocyte and the companion follicle cells in the mammalian ovary. J. Cell biol. 77: 680-686, 1976.*

Gilula, N.B., Epstein, M.L. and Beers, W.H.: *Cell to cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. J. Cell Biol. 78: 58-75, 1978.*

Heller, D.T., Cahill, D.M. and Schultz R.M.: *Biochemical studies of mammalian oogenesis:Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. Devl. Biol. 84: 455-464, 1981.*

Maruska, D.V., Leibfried, M.L. and First, N.L.: *Role of calcium and the calcium-calmodulin complex in resumption of bovin cumulus expansion, viavility and hyaluronidase sensitivity of bovin cumulus-oocyte complexes. Biol. of Reprod. 31: 1-6, 1984.*

Ball, G.D., Wieben, E.D. and Byers, A.P.: RNA, *RNA and protein synthesis by porcine oocyte-cumulus complexes during expansions. Biol. Reprod. 33: 739-744, 1985.*

Cho, W.K., Stern, S. and Biggers, J.D.: *Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. J. Exp. Zool. 187:383-386, 1974.*

Dekel, N. and Beers, W.H.: *Development of rat oocyte in vitro inhibition and induction of maturation in the prence or absence of the cumulus oophorus. Devl. Biol. 75:247-254, 1980.*

Schultz, R.M., Montgomery, R.R. and Belanoff, J. R.: *Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephospholylation in com-*

mitment to resume meiosis. Devl. Biol. 97: 264-273, 1983.

Racowsky, C.: *Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesteron and cyclic AMP prodution by pig oocyte-cumulus complexes. J. Reprod. Fert. 74: 9-21, 1985.*

Fouquet, H., Wick, R., Bohme, R. and Sauer, H. W.: *Effects of cordycepin on RNA synthesis in physarum polycephlum, Archives of Biochem. and Biophy. 168: 273-280, 1975.*

Levey, I.L. and Brinster R.L.: *Effects of cordycepin on macromolecular synthesis and development in the preimplantation mouse embryo. Exp. Cell Res. 109: 397-405, 1977.*

Brinster, R.L.: *A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocysts. Exp. Cell Res. 32: 205-208, 1963.*

Eppig, J.J.: *Regulation of cumulus oophrous expansion by gonadotrophins in vivo and i tvitro. Reprod. 23: 645-552, 1980.*

Kwon, H.B.: *Effects of puromycin and Actinomycin D on the HCG-induced expansion of cumulus oophrus in vitro. Korean J. Zool. 26: 225-233, 1983.*

Dekel, L. and Beers, W.B.: *Rat oocyte maturation in vitro: Relief of cyclic AMP inhibitor by gonadotrophins. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4369-4373, 1978.*

Eppig, J.J.: *The relationship between parthenogenetic embryonic development and cumulus cell-oocyte intercellular coupling during oocyte meotic maturation. Gamete Res. 5: 229-237, 1982.*

Biggers, J.D. Whittingham, D.G. Donahue, and R. P.: *The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 58: 560-567, 1967.*

Tsafrifi, A., Pomerantz, S.H. and Channing, C.P.: *Porcine follicular fluid inhibitor of oocyte meiosis: Partial purification and characterization. Biol. Reprod. 14: 511-516, 1976.*

Heller, D.T., Cahill, D.M. and Schultz, R.M.: *Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. Devl. Biol. 84: 455-464, 1981.*

Centola, G.M., Anderson, L.D. and Channing, C. P.: *Oocyte maturation inhibitor(OMI) activity in porcine granulosa cells. Gamete Res. 4: 451-461, 1981.*