

Hypoxanthine과 Ovarian Steroids가 생쥐난자 성숙에 미치는 영향

전북대학교 의과대학 산부인과학교실

노효섭 · 정영주 · 조한구 · 박환규 · 송완례 · 이기숙 · 김종덕

Effect of Hypoxanthine and Ovarian Steroids on the Maturation of Mouse Oocytes

Hyo-Syup Ro, M.D., Young-Ju Jeong, M.D., Han-Gu Cho, M.D., Hwan-Kyu Park, M.D.,
Wan-Rye Song, M.D., Ki-Suk Lee, Ph.D. and Jong-Duk Kim, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Chonbuk National University Medical School

= Abstract =

The influence of hypoxanthine and ovarian steroids on the meiotic maturation process of mouse oocytes was investigated for the qualified application of culture medium in in vitro fertilization(IVF). Mouse oocytes were cultured in hypoxanthine and various ovarian steroids(progesterone, estradiol-17 β and testosterone) and their effects on the oocyte maturation had been observed. When mouse oocytes were cultured in the various concentration(1-4 mM) of hypoxanthine, meiotic maturation of cumulus cell-enclosed oocytes was inhibited by presence itself, which was a dose-dependent effect in meiotic arrest of mouse oocytes. The presence of progesterone, estradiol-17 β and testosterone have made the mouse oocyte mature properly. Meanwhile maturation of cumulus cell-enclosed oocyte was severely inhibited by 3 hours-culture in the media of progesterone supplemented with hypoxanthine. However the continuous presence lasting 24 hours of progesterone even supplemented with hypoxanthine had got rid of the inhibition of oocytes maturation. Not only estradiol-17 β supplemented with hypoxanthine but also testosterone supplemented with hypoxanthine exert the severe inhibition of the maturation of cumulus cell-enclosed oocytes for 3-hours culture. However the continuous presence lasting 24 hours of estradiol-17 β and testosterone even supplemented with hypoxanthine had relieved the inhibition of oocytes maturation.

These results make us suggest that hypoxanthine inhibits the mouse oocyte maturation, particularly markedly in conjunction with ovarian steroids for short period, which indicated some sort of the synergistic inhibitory relationship between the ovarian steroids and hypoxanthine.

서 론

대부분의 포유류에서 난자의 감수분열 과정(meiotic division)은 태아기에 시작되어 출생 후 제 1 감수분열 전기(prophase 1)의 복사기(diplothe stage) 혹은 휴지기(dictyate stage)에서 장시간 억제되어 있다가 성숙기에 뇌하수

체의 여포자극호르몬(FSH)과 황체형성호르몬(LH)의 자극으로 다시 감수분열이 시작된다.

여포난자(follicular oocytes)는 과립세포(granulosa cells)로부터 파생된 여러층의 난구세포(cumulus cells)에 의해 둘러싸여 있으며 이들을 난자-난구 복합체(oocy-tecumulus complex)라 부른다. 난자(oocyte)와 난구세포는 gap junction으로 연결되어 있어(Amster-

dam et al., 1976; Anderson et al., 1976; Gilula et al., 1978) 두 세포들 사이에 작은 분자들이 (분자량 1,000 이하) 통과할 수 있으며(Flagg-Newton et al., 1979)이 gap junction을 통해 난자는 난구세포로부터 성장에 필요한 영양 물질을 공급받는다(Anderson et al., 1976; Gilula et al., 1978; Heller et al., 1981). 배란(ovulation) 직전에 난자-난구 복합체의 물리적 연결(ionic coupling)이 파괴되어(Odor et al., 1960; Dekel et al., 1979) 두 세포사이의 gap junction도 파괴되고 난구세포와 난자 사이에 소통이 종결되어지는 것으로 알려져 있다(Gilula et al., 1978). 동시에 난자는 핵막붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)가 일어나며 감수분열이 재개되어 제 1극체(the first polar body)를 형성하고 제 2감수분열 중기에서 성숙이 멈춘다. 포유동물의 난자성숙 조절 과정에서 난구세포로부터 생성된 cAMP가 gap junction을 통해 난자로 전달이 되어 감수분열을 억제하고 난구세포가 분산을 일으키며 이 물질의 공급이 끊어지면 감수분열이 재개된다고 주장하는 학자들도 있다(Cho et al., 1974; Dekel et al., 1978; Eppig et al., 1979; Eppig et al., 1992; Eppig et al., 1981; Schultz et al., 1983). Tsafiridung(Tsafari et al., 1974; 1975; 1979)은 돼지 여포액(pig follicular fluid)은 감수분열의 저해제를 갖고 있다고 보고한 바 있으며 Downs등(1985)은 hypoxanthine이 돼지 여포액의 주요 저해요소라고 하였다.

Magusson등(1977)은 dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dbc AMP)와 phosphodiesterase의 저해제가 *in vitro*에서 자연적 성숙(spontaneous maturation)을 억제한다고 보고한 바 있다.

또한 Loutradis등(1989)은 Ham's F-10 배양액의 구성 성분의 하나인 hypoxanthine이 생쥐 배아(mouse embryos)를 체외 배양할 때 2-cell block의 원인이 된다고 보고하였다. Lee 등(1989)은 단지 몇가지 구성 성분만으로 되어있는 HT6 배양액이 많은 구성 성분을 가진 복합 배양액인 Medium 199, Ham's F-10, MEM에 비해 유의하게 높은 배아발달을 보이는 것을 발견하고 이는 아마도 복합 배양액내에 있는 hypoxanthine이 배아의 발달에 영향을 미칠 것으로 추정하였다. 또한 McGaughey (1977)는 스테로이드가 포유류의 난자성숙 저

해에 관여한다고 하였으며 Rice와 McGaughey (1980)는 스테로이드가 nucleotide와 같이 작용할 때 난자의 성숙을 저해한다고 하였다.

따라서 본 실험은 난자의 성숙기전을 밝히는 연구의 일환으로 난자의 성숙과정에 hypoxanthine이 관여하는지의 여부와 난소 스테로이드 호르몬이 난자성숙에 저해인자로 작용하는지를 규명하고자 시행되었다.

재료 및 방법

1. 실험재료(material)

실험동물은 물과 먹이를 자유롭게 섭취시켜 사육한 ICR계 흰 생쥐암컷을 사용하였다.

2. 난자채취(oocyte collection)

생쥐암컷의 여포성장을 촉진시키기 위해 4-5주된 흰 생쥐에 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma Co.) 5 IU를 복강 주사한 후 이틀 후에 난자를 채취하였다. 먼저 생쥐의 복부를 절개하여 가는 핀셋과 해부용 미세수술 가위로 무균적으로 양쪽 난소를 절취하여 배양액이 든 배양접시에 옮긴 후 해부현미경(zoom stereomicroscope, Olympus, model SZH-131)하에서 예리한 바늘로 난소 표면의 여포를 터뜨려 난자를 추출해 내었다. 난자들중 난구세포가 붙어있는 난자-난구 복합체는 복합체의 크기보다 약간 큰 직경을 갖게 뽑아낸 미세피펫을 이용하여 분리해 내었다.

3. 난자-난구 복합체의 배양 및 관찰(culture and observation)

60×15mm(2 well)의 1회용 배양접시(Falco, 3037)의 안쪽 벽에 배양액을 2ml 넣고 12-18시간 동안 배양기에 넣어 평형(equilibrium)을 충분히 시켰다. 이 배양액에 정상적인 난자-난구 복합체를 골라넣어 37°C의 5% CO₂가 공급되는 습기찬 배양기(Forma Scientific CO, model 3187)에서 3-24시간 배양하였다. 배양기간이 지난 난자-난구 복합체들을 배양접시에 든 상태로 도립현미경(inverted microscope, Olympus, model IMT-2)하에서 관찰하였다.

모든 실험은 2번 이상 반복하여 시행하였으며 얻은 자료는 student t-test로 통계적 유의성을 검정하였다.

Table 1. Effect of hypoxanthine on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes

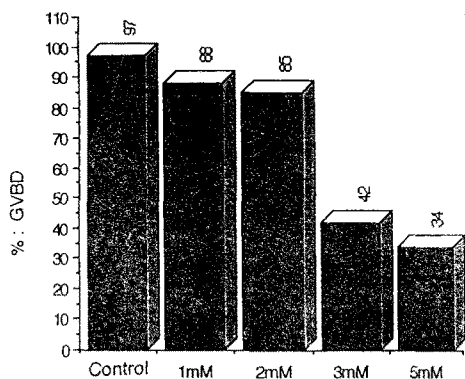
Group	Total number of oocytes	No. of GVBD	Percentage GVBD
Control(no hypoxanthine)	35	34	97
1 mM hypoxanthine	49	43	88
2 mM hypoxanthine	40	34	85
3 mM hypoxanthine	43	18	42
4 mM hypoxanthine	41	14	34

Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured in control medium or medium containing hypoxanthine for 24 hrs. Oocytes were scored for GVBD after removal of cumulus cells.

Table 2. Effect of progesterone on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes

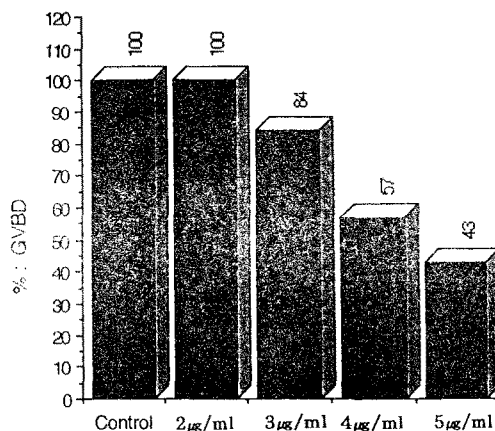
Group	Total number of oocytes	No. of GVBD	Percentage GVBD
Control(no progesterone)	34	34	100
2 μ g/ml progesterone	43	43	100
3 μ g/ml progesterone	38	32	84
4 μ g/ml progesterone	28	16	57
5 μ g/ml progesterone	28	12	43

Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured for 3 hrs in control medium or fluid medium containing progesterone. Oocytes were scored for GVBD after removed of cumulus cells.

**Fig. 1.** Effect of hypoxanthine on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes after 24 hrs incubation.

4. 배양액(media)

각 배양액을 제조한 수원은 4차 증류수를 사용하였다. 기본 배양액으로는 수정된 HT6 배양액(NaCl 5.805 g/l, KCl 0.106 g/l, CaCl₂ · 2H₂O 0.262 g/l, MgCl₂ · 6H₂O 0.096 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.175 g/l, NaHCO₃ 1.050 g/l, Na₂HPO₄ 0.051 g/l, NA-pyruvate 0.051 g/l, Na-lactate 4.3ml/l, Glucose 1.0 g/l, Penicillin 0.06 g/l, Streptomycin 0.05 g/l, HEPES 2.979 g/l, Phenol red 0.005 g/l) (Lee et al., 1989)을 사용하였고 여기에 FBS(Gibco Co.)를 10%로 첨가하였다.

**Fig. 2.** Effect of progesterone on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes after 3 hrs culture.

배양액의 osmolarity는 280-300 milliosmol/kg으로, pH는 7.2-7.4(Corning 120)로 조정하였다.

모든 배양액은 사용하기전 membrane filter paper(Gelman Co. pore size 0.22 μ m)를 통과시켜 멸균하였다. Progesterone(Sigma Co.), estradiol-17 β (Sigma Co.), testosterone(Sigma Co.), hypoxanthine(Sigma Co.)은 기본 배양액에 2 μ g/ml-5 μ g/ml의 각 실험농도 범위로 첨가하여 사용하였다.

Progesterone, estradiol-17 β , testosterone은 먼저 95% ethanol에서 녹인 후 각 농도별로

Table 3. Effect of progesterone on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes

Group	Total number of oocytes	No. of GVBD	Percentage GVBD
Control(no progesterone)	34	34	100
2 $\mu\text{g/ml}$ progesterone	32	32	100
3 $\mu\text{g/ml}$ progesterone	36	36	100
4 $\mu\text{g/ml}$ progesterone	42	41	98
5 $\mu\text{g/ml}$ progesterone	40	39	98

Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured for 24 hrs in control medium or fluid medium containing progesterone. Oocytes were scored for GVBD after removed of cumulus cells.

Table 4. Effect of progesterone + 2mM hypoxanthine on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes

Group	Total number of oocytes	No. of GVBD	Percentage GVBD
Control(no progesterone, no hypoxanthine)	23	22	96
3 $\mu\text{g/ml}$ progesterone + 2mM hypoxanthine	39	15	39
4 $\mu\text{g/ml}$ progesterone + 2mM hypoxanthine	47	10	21
5 $\mu\text{g/ml}$ progesterone + 2mM hypoxanthine	30	1	3

Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured for 3 hrs in control medium or fluid medium containing progesterone (3-5 $\mu\text{g/ml}$) plus 2 mM hypoxanthine.

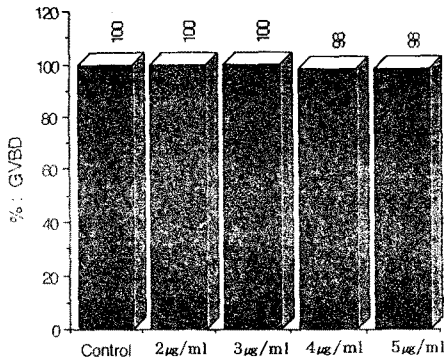


Fig. 3. Effect of progesterone on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes after 24 hrs culture.

배양액에 첨가하였고, hypoxanthine은 0.5 N HCl에서 녹인 후 배양액에 첨가하였다.

결 과

난자의 성숙에 대한 억제작용을 규명하고자 대조군(control medium)과 여러농도의 hypoxanthine(1 mM-4 mM)을 포함한 배양액에서 난자-난구 복합체를 배양하여 보았다.

24시간 동안 배양 후 난자의 성숙율을 조사한 결과 난자의 성숙율은 대조군에서 97%의

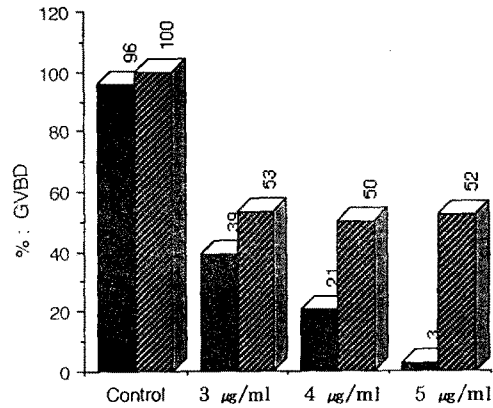


Fig. 4. Effect of progesterone + 2 mM hypoxanthine on the rate of maturation of cumulus oophorus-enclosed oocyte after 3 hrs (■) or 24 hrs (▨) culture.

난자성숙을 보였으며 hypoxanthine 배양액에서는 hypoxanthine의 농도가 높아짐에 따라 성숙율의 저해를 보였고 3mM과 4mM에서는 34% GVBD의 난자성숙을 보였다(표 1, 그림 1). 이로서 배양액내의 hypoxanthine은 난자의 성숙을 억제하며 그 정도는 투여량과 비례하였다($p < 0.01$).

난자의 성숙에 progesteron의 미치는 영향을 규명하기 위하여 핵이 붕괴되어 GVBD가 일어날 수 있는 최저 시간인 3시간 동안만

Table 5. Effect of progesterone + 2mM hypoxanthine on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes

Group	Total number of oocytes	No. of GVBD	Percentage GVBD
Control(no progesterone, no hypoxanthine)	18	18	100
3 $\mu\text{g/ml}$ progesterone + 2mM hypoxanthine	19	10	53
4 $\mu\text{g/ml}$ progesterone + 2mM hypoxanthine	20	10	50
5 $\mu\text{g/ml}$ progesterone + 2mM hypoxanthine	21	11	52

Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured for 24 hrs in control medium or fluid medium containing progesterone (3-5 $\mu\text{g/ml}$) plus 2 mM hypoxanthine.

Table 6. Effect of various steroids on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes

Group	Total number of oocytes	No. of GVBD	Percentage GVBD
Control	30	30	100
Estradiol-17 β	30	30	100
Testosterone	34	34	100

Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured in control medium or fluid medium containing 2 $\mu\text{g/ml}$ of estradiol-17 β or testosterone for 3 hrs.

Table 7. Effect of various steroids and 2 mM hypoxanthine on the rate of cumulus cell-enclosed oocytes.

Group	Total number of oocytes	No. of GVBD	Percentage GVBD
Control	30	30	100
Estradiol-17 β + 2mM hypoxanthine	34	20	60
Testosterone + 2mM hypoxanthine	37	28	76

Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured for 3 hrs in control medium or fluid medium containing 2 mM hypoxanthine plus 2 $\mu\text{g/ml}$ of estradiol-17 β or testosterone.

progesterone의 여러농도에서 난자-난구 복합체를 배양하여 보았다. Progesterone이 없는 대조군에서는 난자가 100% 성숙하였으나 2 $\mu\text{g/ml}$ progesterone에서는 100%, 3 $\mu\text{g/ml}$ progesterone에서는 84%의 난자성숙을 보였다. 그러나 4 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 57%, 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 43%의 난자성숙을 보여 4 $\mu\text{g/ml}$ 와 5 $\mu\text{g/ml}$ progesterone에서 3시간 동안 난자를 배양할 때에는 난자의 성숙이 일부 저해되었다($P < 0.01$)(표 2, 그림 2).

또한 progesterone의 각 농도에서 24시간 동안 난자-난구 복합체를 배양했을 때 난자의 성숙율은 progesterone이 없는 대조군에서는 100%의 난자가 성숙하였으며 2 $\mu\text{g/ml}$ 와 3 $\mu\text{g/ml}$ progesterone에서는 100%의 성숙을 보였고, 4 $\mu\text{g/ml}$ 와 5 $\mu\text{g/ml}$ progesterone에서는 98% 난자성숙을 보여 모든 실험군에서 난자가 성숙하였다($p < 0.01$)(표 3, 그림 3). 이로부터

24시간 동안 난자-난구 복합체를 progesterone에서 배양할 때에는 난자의 성숙저해가 다시 풀리는 것으로 확인되었다. 이에 비해 난자-난구 복합체를 progesterone과 2mM hypoxanthine 배양액에서 3시간 동안 배양하여 보았을 때 대조군에서는 96%의 난자성숙을 보인 반면에 3 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ progesterone에서는 각각 39%, 21%, 3%의 난자성숙을 보였다($p < 0.01$)(표 4). 이로부터 3시간 동안 배양한 모든 실험군에서는 난자의 성숙을 현저히 저해하는 것으로 나타났다. 또한 24시간 동안 progesterone과 2mM hypoxanthine 배양액에서 난자-난구 복합체를 배양하여 난자의 성숙을 조사하여 보았다. 대조군에서는 100%의 난자성숙을 보였으며 3 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ progesterone에 2mM hypoxanthine를 첨가한 배양액에서는 각기 53%, 50%, 52%의 난자성숙을 보여 모든 실험

Table 8. Effect of various steroids and 3 mM hypoxanthine on the rate of cumulus cell-enclosed oocytes

Group	Total number of oocytes	No. of GVBD	Percentage GVBD
Control	30	30	100
Estradiol-17 β + 3 mM hypoxanthine	28	0	0
Testosterone + 3 mM hypoxanthine	38	26	66

Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured for 3 hrs in control medium or medium containing 3 mM hypoxanthine plus 2 μ g/ml of estradiol-17 β or testosterone.

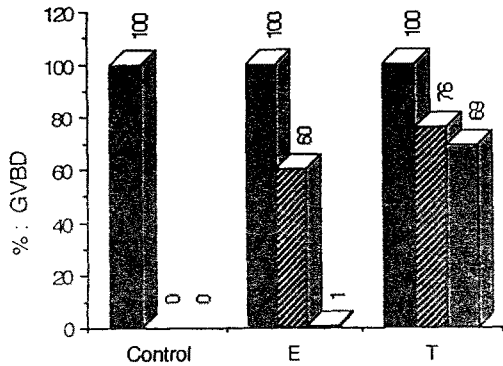


Fig. 5. Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured for 3 hrs control medium or medium containing hypoxanthine 2 mM (▨) and 3 mM (■) plus 2 μ g/ml of estradiol-17 β or testosterone.

군에서 난자의 성숙이 저해되는 것으로 나타났다($p < 0.01$) (표 5).

3 μ g/ml, 4 μ g/ml, 5 μ g/ml progesterone에 2 mM hypoxanthine를 첨가한 배양액에서 3시간 배양한 것과 24시간 동안 배양한 것을 비교하였을 때 대조군에 비해 모든 실험군에서 난자의 성숙율이 현저히 저하되어 나타났으며 24시간 동안 난자-난구 복합체를 배양할 때에는 난자의 성숙 저해가 일부 풀리는 것으로 나타났다.

이들 결과로 보아(표 4, 5, 그림 4) hypoxanthine은 progesterone과 상승작용을 이루며, 이 상승작용을 통해 난자의 성숙이 저해되는 것으로 사료되었다.

난자를 estradiol-17 β (2 μ g/ml)와 testosterone(2 μ g/ml)에서 3시간 동안 배양 하였을 때 estradiol-17 β 와 testosterone에서 모두 100%로 난자가 성숙하였다(표 6).

Estradiol-17 β (2 μ g/ml)와 testosterone(2 μ g/ml)을 각기 2 mM hypoxanthine 배양액에서 3시간 동안 난자-난구 복합체를 배양하여 보았다. Estradiol-17 β 와 2 mM hypoxanthine 배

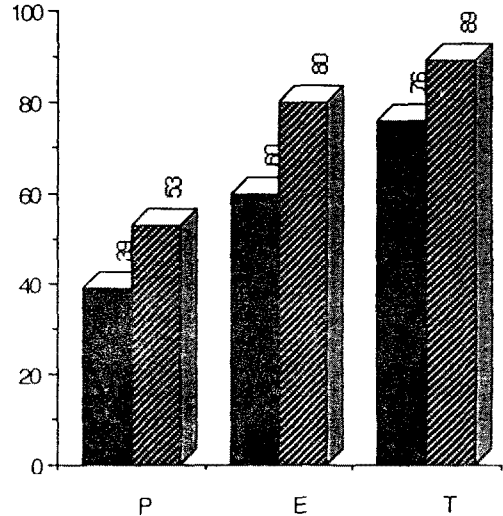


Fig. 6. Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured for 3 hrs (■) or 24 hrs (▨) in medium containing various steroids plus 2 mM hypoxanthine, progesterone, estradiol-17 β , testosterone.

양액에서 난자-난구 복합체를 배양하였을 때에는 난자의 성숙율이 60%로 대조군의 100%에 비해 난자의 성숙율이 저해되어 나타났고($p < 0.01$) testosterone과 2 mM hypoxanthine 배양액에서 3시간 동안 난자-난구 복합체를 배양 하였을 때에는 역시 대조군의 100%에 비해 76%로 난자의 성숙율이 저해되어 나타났다($p < 0.01$) (표 7).

Estradiol-17 β 와 testosterone에 각각 3 mM hypoxanthine을 첨가한 배양액에서 배양하여 보았다. Estradiol-17 β 와 3 mM hypoxanthine 배양액에서 배양 하였을 때에는 난자의 성숙이 완전 억제되고 testosterone과 3 mM hypoxanthine에서 난자-난구 복합체를 3시간 동안 배양 하였을 때에는 69%로 난자의 성숙이 저해되어 나타났다($p < 0.01$) (표 8). 이처럼 estradiol-17 β 와 testosterone을 각각 2 mM

Table 9. Effect of various steroids and 2mM hypoxanthine on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes

Group	Incubation hrs	Total number of oocytes	No. of GVBD	Percentage GVBO
Control	3	34	34	100
Control	24	30	30	100
Progesterone + 2 mM hypoxanthine	3	39	15	39
Progesterone + 2 mM hypoxanthine	24	38	20	53
Estradiol-17 β + 2 mM hypoxanthine	3	63	38	60
Estradiol-17 β + 2 mM hypoxanthine	24	30	24	80
Testosterone + 2 mM hypoxanthine	3	37	28	76
Testosterone + 2 mM hypoxanthine	24	36	32	89

Cumulus cell-enclosed oocytes were cultured for 3 hrs or 24 hrs in control medium or medium containing 2 mM hypoxanthine plus 3 μ g/ml progesterone, 2 μ g/ml of estradiol-17 β or testosterone.

hypoxanthine, 3mM hypoxanthine에 첨가한 배양액에서 배양하여 얻은 난자의 성숙율은 비교하여 보았을 때 대조군에 비해 모든 실험군에서 난자의 성숙율이 저해되어 나타났으며 (그림 5) 이들 결과로 보아(표 6, 7, 8, 그림 5) hypoxanthine은 estradiol-17 β 와 testosterone과도 상승작용을 이루어 난자의 성숙을 억제하는 것으로 나타났다.

시간에 따라 난자성숙에 미치는 영향을 보기 위해 각 난소 스테로이드와 2mM hypoxanthine 배양액에서 24시간 난자-난구 복합체를 배양하여 보았다(표 9, 그림 6). 먼저 progesterone(3 μ g/ml)과 hypoxanthine 2 mM 배양액에서 24시간 동안 배양하였을 때에는 3시간 동안 배양하였을 때(39%)보다 난자의 성숙율이 조금 높아졌다(53%)($p < 0.01$).

Estradiol-17 β (2 μ g/ml)와 2 mM hypoxanthine 배양액에서 24시간 동안 배양하였을 때에는(80%) 3시간 동안 배양하였을 때 보다(60%) 난자의 성숙율이 조금 높아져 난자의 성숙 저해가 일부 풀리는 것으로 나타났다($p < 0.01$). 또한 testosterone(2 μ g/ml)과 2mM hypoxanthine 배양액에서 난자-난구 복합체의 배양은 3시간 동안 배양하였을 때보다(76%) 24시간 배양에서 난자의 성숙율이 조금 높아졌다(89%)($p < 0.01$).

이들의 결과로 보아 난소 스테로이드와 hypoxanthine 배양액에서 난자-난구 복합체를 배양하는 것은 3시간에서 난자의 성숙이 억제되었다가 24시간에 난자의 성숙억제가 일부 풀리는 것으로 나타났다.

고 찰

난구세포(cumulus cells)는 난자(oocyte)를 둘러싸고 있는 세포들의 군집(population)으로서 *in vivo*와 *in vitro*에서 호르몬의 자극으로 배란(ovulation)이 일어남에 따라 그 구조와 특징이 근본적으로 변화한다. 난구세포의 가장 현저한 특징은 배란후기 단계(postovulatory stage)에서 세포들 사이에 hyaluronidase에 민감한 점액물질의 존재이다. 점액물질의 축적은 난구세포의 주변에서 부터 투명대(zone pellucida)까지 생기게 되며 동시에 세포와 세포간 junction의 손실이 일어나게 된다. 그러므로 junction을 통한 저해물질(inhibitory substances)들의 흐름이 중단되어 유리된 난자는 휴지기(dictyate stage)로 부터 제 2중기(metaphase II)까지 핵성숙(nuclear maturation)을 일으키게 된다. 난자-난구 복합체(oocytecumulus complex)에서 난자 성숙억제 신호의 전달은 난자와 여포세포가 대사성으로

연결되는 gap junction을 통해 전달되며 여포액내로 여포세포에 의해 분비되어지는 물질에 의해서 그리고 난구세포를 통해 직접적인 흡수(up-take)와 간접적인 흡수에 의해 난자내로 합체 되어짐에 의해서 전달되어져 나타난다(Tsafiriri et al., 1982; Eppig et al., 1985).

Tsafiriri등은 돼지 여포액(porcine follicular fluid, PFF)를 meiosis의 regulator로써 연구하였으며 작고, 열에 안정한 peptide가 여포액내의 active substance라고 결론지었다(Dekel et al., 1979; Cho et al., 1974; Dekel et al., 1978). 이들은 여포액내 저해제의 존재는 여러종에서 확인되었고 여포세포가 저해제의 근원인 것으로 간주하였다(Oder et al., 1960; Schultz et al., 1983; Tsafiriri et al., 1974; 1975).

돼지 여포액(porcine follicular fluid, PFF)은 낮은 분자무게를 갖고 있으며 이들은 protease에 반응치 않고 ether에 녹지않는 물질로서 포유류 난자의 감수분열을 억제한다. 그리고 이 물질의 activity는 cAMP에 의해 크게 증대된다(Downs and Eppig, 1984). PFF를 분석하면 adenine, uracil과 7-methylinosine을 포함하여 높은 농도의 다른 purine과 pyrimidine들이 나타난다. 그러나 이들 다른 purine과 pyrimidine들은 PFF에서 성숙억제 활성에 크게 기여하지는 않는 것 같다. PFF는 낮은 분자무게 저해 구성요소는 hypoxanthine인 것으로 추정된다(Magnusson et al., 1977).

Purine과 pyrimidine 파생물질이 생쥐 난자 성숙에 최소한 부분적인 저해 영향을 보이며 이들 purine과 pyrimidine은 여포액내로 분비되어지지 않는으나 난구세포(cumulus cells)에서 난자로 직접 운반되어지며 *in vivo*에서 감수분열 억제의 유지에 관여하는 것으로 보인다. 생쥐 여포액(mouse follicular fluid) 역시 생쥐의 난자성숙을 저해하며 높은 levels의 hypoxanthine을 포함하고 있다. 그러므로 hypoxanthine은 낮은 분자무게의 주요한 저해 구성 요소인 것 같다.

약 2mM의 농도가 *in vitro*에서 생쥐난자의 성숙을 저해하기에 충분한 것으로 나타나며 그러므로 hypoxanthine은 생쥐 난자의 감수분열 억제의 유지에 관여한다(Eppig et al., 1985). 유사한 저해 합성물질이 다른 포유류의 여포액내에 존재하는지의 여부, hypoxanthine과 관련된 분자의 저해 영향에 대한

포유류 난자의 민감도 그리고 여포액내에 나타나는 다른 형태의 분자들이 저해영향의 유지에 기여하는 역할을 밝히는 것이 중요할 것으로 사료된다.

본 실험에서는 배양액내의 hypoxanthine은 난자성숙을 억제하며 hypoxanthine이 없는 배양액내에서는 대부분의 난자가 자발적으로 난자성숙을 일으키나 hypoxanthine이 배양하는 동안에 나타날 때에는 난자성숙이 저해되어 나타났다. 또한 저해의 매우 높은 범위가 hypoxanthine의 생리학적 농도와 난소 스테로이드의 높은 농도와 함께 이루어질 수 있음을 보이며 이 system은 난자성숙의 조절기전을 연구하기에 매우 유용할 것으로 추측된다. 배양액에 hypoxanthine을 첨가한 것은 대조군과 비교하여 성숙에 심한 저해를 초래하며, 난자성숙이 hypoxanthine과 스테로이드 호르몬을 포함하는 배양액내에서도 역시 저해되었다. 그러나 난자의 성숙이 hypoxanthine과 스테로이드에 의해 저해된다 할지라도 본 실험의 결과는 이 저해에 있어서는 스테로이드는 강하게 작용하지 못하고 hypoxanthine이 난자의 직접적으로 작용하는 것으로 보인다. 즉 난소 스테로이드의 독립적인 저해작용은 없다 할지라도 이들 양 물질이 배양액내에 서로 같이 존재할 때에는 현저한 저해 반응을 보이는 것 같다.

본 연구의 결과 hypoxanthin은 난자의 성숙을 억제하는 물질이며 hypoxanthine은 난소 스테로이드와 상승작용을 이루어 난자의 성숙을 저해할 수 있는 물질로 사료되었다.

결 론

생쥐 난자-난구 복합체의 배양시에 hypoxanthine과 난소 스테로이드가 난자의 성숙에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Hypoxanthine을 포함한 배양액에서 난자-난구 복합체를 배양할 때 hypoxanthine의 농도에 비례하여 난자의 성숙율이 저하되었다.

2. Progesterone에서 난자-난구 복합체를 배양 하였을 때 난자의 성숙은 3시간 동안 배양 하였을 때에는 일부 억제를 보였으나 24시간 배양 하였을 때에는 모든 난자가 성숙하였다.

3. Progesterone과 2mM hypoxanthine 배양액에서 3시간 동안 난자-난구 복합체를 배양하였을 때에는 모든 실험군에서 난자의 성숙이 심히 저해되었다.

4. Estradio-17 β 와 testosterone 배양액에서 난자-난구 복합체를 배양하였을 때에는 난자 모두가 성숙하였다(100%).

5. Estradiol-17 β 와 testosterone에 2mM hypoxanthine을 첨가한 배양액에서 3시간 동안 난자-난구 복합체를 배양하였을 때에는 난자의 성숙이 억제되어 나타났다(60-70%).

6. Estradiol과 testosterone에 3mM hypoxanthin을 첨가한 배양액에서 3시간 동안 난자-난구 복합체를 배양하였을 때에는 난자의 성숙이 더욱 억제되어 나타났다(0-69%).

7. 난소 스테로이드와 hypoxanthine이 첨가된 배양액에서 각각 24시간 동안 난자-난구 복합체를 배양하였을 때에는 3시간 동안 배양하였을 때에 비해 난자의 성숙억제가 일부 풀렸다.

이상의 결과를 종합하면 hypoxanthine은 난자의 성숙을 억제하는 물질이며 난소 스테로이드와 상승작용을 이루어 난자의 성숙을 저해하는 물질로 사료되었다.

인용문헌

- Amsterdam A, Josephs R, Lieberman ME, Lindner HR: Organization of intramembrane particles in freeze-cleaved gap junction of rat Graafian follicles: optical-diffraction analysis. 1976, 21, 93-105.
- Anderson E, Albertini DF: Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* 1976, 71, 680-686.
- Gilula NB, Epstein ML, Beers WH: Cell-to-cell communication and ovulation: A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* 1978, 78, 58-75.
- Flagg-Newton J, Simpson I, Loewenstein WR: Permeability of the cell-to-cell membrane channels in mammalian cell junction. *Science* 1979, 205, 404-407.
- Heller DT, Cahill DM, Schultz RM: Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Dev Biol* 1981, 84, 455-464.
- Odor DL: Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. *J Biophys Biochem Cytol* 1960, 7, 567-574.
- Dekel N, Hillensjo T, Kraicer PF: Maturation effects of gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. *Biol Reprod* 1979, 20, 191-197.
- Cho WK, Stem S, Biggers JD: Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J Exp Zool* 1974, 187, 383-386.
- Dekel N, Beers WH: Rat oocyte maturation *in vitro*: Relief of cyclic AMP inhibition with gonadotropins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75, 4369-4373.
- Eppig JJ: Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: General conditions for expansion *in vitro*. *J Exp Zool* 1979, 208, 11-120.
- Eppig JJ: Ovarian glycosaminoglycans: Evidence for a role in regulation of the response of the oocyte-cumulus cell complex to FSH. *Endo* 19921-1994, 108.
- Eppig JJ: Regulation by sulfated glycosaminoglycans of the expansion of cumuli oophori isolated from mice. *Biol of Reprod* 1981, 25, 599-608.
- 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.
- Tsafirri A, Lindner HR, Zor U, Lamprecht SA: *In vitro* induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E₂. *J Reprod Fert* 1974, 31, 39-50.
- Tsafirri A, Channing CP: An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon oocyte meiosis *in vitro*. *Endo* 1975, 96, 922-927.
- Tsafirri A: Oocyte maturation in mammals. In the vertebrate ovary, PP. 409-442. Ed. E.

- Jones. Plenum Press, New York 1979.
- Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF, Eppig JJ: Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Dev Biol* 1985, 82, 454-458.
- Magnusson C, Hillensjo T: Inhibition of maturation and metabolism of rat oocytes by cyclic AMP. *J Exp Zool* 1977, 201, 138-147.
- Loutradis D, John D, Kiessling AA: Hypoxanthine causes a 2-cell block in randombred mouse embryos. *Biol of Reprod* 1989, 37, 311-316.
- Lee GS, Park JD, Lee CK, Kim JD: Mouse embryo culture as quality control for human IVF: Culture media and supplements. *Korean J of Fert and Ster* 1989, 16, 161-171.
- McGaughey RW, Berkorn J: Patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes during maturation *in vitro*. *Dev Biol* 1977, 56, 241-254.
- Rice C, McGaughey RW: Interactions between the granulosa cell and the oocyte *in vitro*. *J Anim Sci* 1980, 51, 521-524.
- Tsafiri A, Dekel N, Bar-Ami S: The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 1982, 64, 541-551.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PE, Coleman DL: Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: Concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol of Reprod*. 1985, 33, 1041-1049.
-