

생쥐난자내 cAMP Phosphodiesterase의 활성에 미치는  
억제제의 영향에 관한 연구

정민환 · 조완규  
(서울대학교 자연과학대학 동물학과)

Effects of Inhibitors on the Activity of cAMP Phosphodiesterase  
in the Mouse Oocytes

Min Whan Jung and Wan Kyoo Cho  
(Dept. of Zoology, College of Natural Sciences, Seoul National University)  
(1985. 7. 5 접수)

---

ABSTRACT

The purpose of the present experiment is to make certain the existence of cAMP phosphodiesterase (PDE) in mouse oocytes and confirm its possible role on meiotic resumption.

The results showed two types of cAMP in the oocytes with different Michaelis constants ( $K_m$ ) with specific maximum ( $V_{max}$ ); The  $K_m$  and  $V_{max}$  of one of two types of PDE were estimated at  $0.14 \pm 0.01 \mu M$  and  $0.42 \pm 0.07$  fmol cAMP hydrolyzed/oocyte/minute, and the other at  $14.5 \pm 2.0 \mu M$  and  $2.2 \pm 0.5$  fmol cAMP hydrolyzed/oocyte/minute.

cAMP hydrolysis by PDE was reversibly inhibited *in vitro* by presence of theophylline or isobutyl-methyl-xanthine (IBMX), which is well known as an inhibitor of oocyte maturation.

Consequently, it can be assumed that maturation of oocyte is affected by the high level of intracellular cAMP, and its level is well maintained by presence of PDE inhibitor, such as theophylline and IBMX.

서      론

여포에서 추출한 생쥐의 난자를 cAMP의 유도체인 dibutyl cAMP(dbcAMP), 또는 phosphodiesterase(PDE) 저해제인 theophylline이나 isobutyl-methyl-xanthine(IBMX), 또는

---

본 실험은 1984년 문교부 학술연구조성비의 지원을 받아 행하여 졌음.

adenylate cyclase 촉진제인 forskolin을 함유하는 배양액에서 배양하면 그의 감수분열이 억제된다는 것이 알려지고 있다(Cho *et al.*, 1974; Magnusson and Hillensjo, 1977; Schultz *et al.*, 1983b; Sato and Koide, 1984). 이와 같은 사실들을 바탕으로 cAMP가 난자의 성숙억제와 관련되며, 난자의 감수분열이 재개되려면 난자내의 cAMP농도가 저하되어야 할 것이라는 보고가 있다(Dekel and Beers, 1978; Schultz *et al.*, 1983a).

실제로 Schultz 등(1983b)과 Vivarelli 등(1983)은 난자내의 cAMP농도를 측정된 결과 감수분열이 재개되는 시기에 난자내의 cAMP농도가 낮아지며, 한편 PDE 저해제인 IBMX를 배양중인 난자에 처리했을 때는 난자내의 cAMP농도에 저하가 일어나지 않는다고 보고하였으며, 최근 Bornslaeger 등(1984)은 생쥐 난자내에 cAMP PDE가 존재함을 암시하였다.

이같은 사실들로 보아 난자가 감수분열을 재개하려면 난자내의 cAMP농도가 낮아져야 하며 이 과정에 cAMP PDE가 참여한다는 것을 추측할 수 있다. 이같은 가정을 전제로 하여 생쥐난자내 cAMP PDE의 존재를 확인하고 난자성숙과의 관계를 살펴보고자 본 실험이 행해졌다.

## 재료 및 방법

### 1. 난자 채취

일정한 조명조건(14시간 조명, 10시간 소등) 아래 서울대학교 실험동물사육장에서 사육된 생후 3주된 ICR 생쥐 암컷을 경추과열로 도살한 후 복부를 절개하여 떼어낸 난소로부터 실험에 사용할 난자를 얻었다. 떼어낸 난소를 기본배양액인 modified Krebs Ringer bicarbonate solution (Biggers, 1971)이 들어 있는 embryological watch glass에 넣고 해부현미경 아래서 예리한 바늘로 여포를 터뜨려 난자를 적출해 내었다. 배양할 난자를 채취할 때는 난자의 성숙을 억제하기 위하여 난자의 채취 전과정을 1 mM theophylline 또는 0.1 mM IBMX가 용해된 기본배양액내에서 행하였다. 여포로부터 적출한 난구세포 복합체는 mouth-controlled micropipette으로 반복적인 흡입, 배출에 의해 난자와 난구세포를 분리하였다. 분리된 난자들 중 핵막(GV)이 뚜렷하고 건강해 보이는 난자만을 골라 실험에 사용하였으며, 특히 PDE 활성도 측정을 위해서는 난자들을 완충액(Tris-HCl 40 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM, imidazole 4 mM, dithiothreitol 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.08 mM, pH 7.4)에서 씻은 뒤 10  $\mu$ l의 완충액에 100~400개의 난자를 넣어 사용직전까지 -20°C로 냉동보관하였다. 난소로부터의 난자 채취는 1시간 이내에 행하였으며 모든 실험은 3번 이상 반복하였다.

### 2. PDE의 활성도 측정

난자내의 Michaelis 상수(Km)와 반응최대속도(Vmax)를 구하기 위한 효소의 활성도는 Butcher와 Sutherland(1962)의 방법을 변형해서 측정하였다. 냉동보관했던 난자를 녹인 뒤 완충액 5  $\mu$ l당 35개의 난자가 되도록 한 후, 이를 용량 1.5 ml의 유리로 된 수동 조직분쇄기내에 넣고, 얼음위에서 100~150회의 분쇄에 의해 균질화하였다. 난자 균질액 5  $\mu$ l에 완충액으로 희석된, 3 중수소로 표지된 cAMP (<sup>3</sup>H-cAMP: 31.5 Ci/mmol, NEN) 5  $\mu$ l를 첨가하여 30°C에서 25분간 반응시킨 후 끓는 물에 2분동안 담가 반응을 정지시켰다. 반응시키기 전까지의 모든 단계는 얼음위에서 행해졌다. 반응정지된 반응액 5  $\mu$ l를 실리카 겔이 입혀진 얇은막판(TLC plate, 두께 : 0.2 mm, 20×20 mm, Merck)에 점적한 뒤 전개통에

서 10cm 상행진개해 cAMP와 5'-AMP를 분리하였다. 진개용매로는 물, pyridine, n-butanol (각각 22:28:50, 부피비)의 혼합용매를 사용하였다. 진개가 끝난 얇은막 판을 건조시켜 일정한 길이로 자른 뒤, toluene cocktail (toluene 666.6 ml, triton X-100 333.3 ml, POPOP 0.3 g, PPO 7 g)을 5 ml씩 가하여 방사능계수기(Packard)로 방사능을 측정하였다. 이때 측정효율(counting efficiency)은 37% 였다.

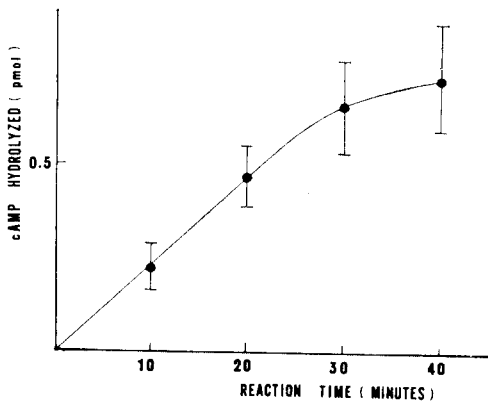
### 3. 난자 배양

적출한 난자는 paraffin oil drop method (Brinster, 1963)에 의해 배양하였다. Petri dish (35×10 mm, Falcon Plastic Co.)에 5ml의 paraffin oil을 붓고 dish 바닥에 100  $\mu$ l씩의 배양액 방울을 mouth-controlled micropipette으로 여러개 정착시켜, 이 배양액 방울속에 6~40개의 난자를 mouth-controlled micropipette를 이용해서 넣은 후, 5% 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)를 포함한 습도 100%의 공기가 공급되는 37°C의 배양기에서 일정시간 배양하였다. 난자는 먼저 theophylline이나 IBMX가 포함된 배양액 내에서 4시간 동안 배양한 뒤 억제제가 제거된 배양액에서 여러번 씻은 후 다시 새로운 기본 배양액내에 옮겨서 4시간 동안 배양하였고, 배양이 끝난뒤 해부 현미경(Wild) 아래에서 핵을 관찰하여 난자의 성숙여부를 알아보았다.

## 결 과

### 1. cAMP분해와 반응시간과의 관계

한 실험군당 약 60 개의 난자의 균질액을 10, 20, 30, 40 분간 cAMP와 반응시킨 후 분해된 cAMP의 양을 측정된 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 30분의 반응시간까지는 분해되는 cAMP의 양이 반응시간과 비례하여 일정하게 증가하였다. 이에 따라 이후는 반응시간을 분으로 책정하여 실험하였다.

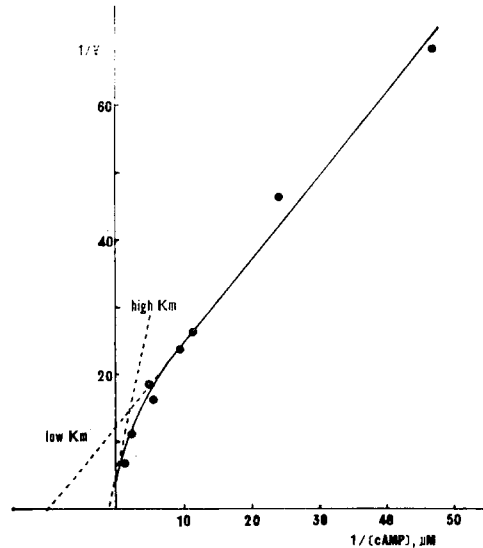


**Fig. 1.** The relationship between cAMP hydrolysis and reaction time. Oocytes were homogenized by glass hand homogenizer, and incubated at pH 7.4, 30°C for various time intervals as described under Materials and Methods. The concentration of <sup>3</sup>H-cAMP was 0.72  $\mu$ M and 60 oocytes were used at each point. The experiment was performed three times and data are expressed as the average  $\pm$  SEM.

### 2. Km 값의 측정

PDE의 Km 값과 Vmax 값을 구하기 위해 기질(cAMP)의 농도에 따른 PDE 활성도를 측정된 뒤 이를 Lineweaver-Burk plot(Lineweaver and Burk, 1934)으로 나타낸 결과를 Fig. 2에 실었다. 실험결과 다른 체세포에서와 같이 생쥐난자에도 Km 값이 다른 두 종의 cAMP PDE (low Km PDE와 high Km PDE)가 존재한다는 것을 알게 되었다. low Km PDE의

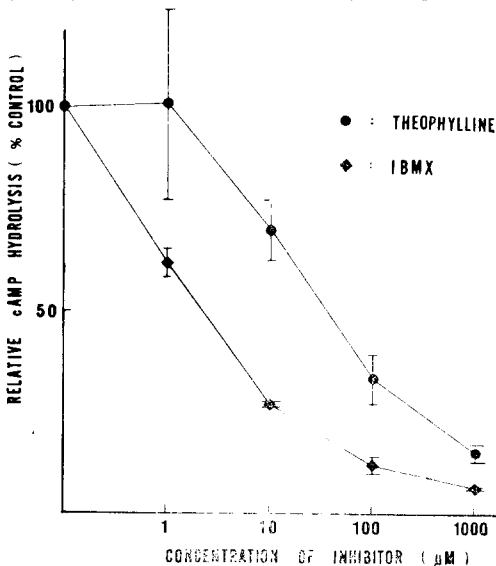
**Fig. 2.** Lineweaver-Burk plot of cAMP PDE activity in the oocytes. cAMP PDE activity in the oocytes was assayed at pH 7.4 for 25 minutes using various concentrations (0.02~1.55  $\mu\text{M}$ ) of  $^3\text{H}$ -cAMP, and the number of oocytes was between 32~37. The data were plotted according to the method of Lineweaver and Burk (1934), and then two straight lines were obtained to determine values for the  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) and  $V_{\text{max}}$  (fmol cAMP hydrolyzed/oocyte/minute) of both low and high  $K_m$  PDE. This is a representative of five performances.



$K_m$  값과  $V_{\text{max}}$  값은 각각  $0.14 \pm 0.01 \mu\text{M}$  및  $0.42 \pm 0.07$  fmol cAMP hydrolyzed/oocyte/minute이고, high  $K_m$  PDE의  $K_m$  값과  $V_{\text{max}}$  값은 각각  $14.5 \pm 2.0 \mu\text{M}$  및  $22.0 \pm 0.5$  fmol cAMP hydrolyzed/oocyte/minute였다.

### 3. PDE활성 및 난자성숙에 미치는 theophylline과 IBMX의 영향

난자의 균질액에서 나타나는 cAMP 분해활성이 PDE에 의한 것인가를 확인하고 PDE와 난자성숙과의 연관성을 알아보기 위해 PDE의 활성을 저해하며 또한 난자성숙 억제제로 알려진 theophylline과 IBMX가 난자내 cAMP의 분해에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 보는 것처럼 theophylline과 IBMX는 농도에 비례해 cAMP 분해를 저



**Fig. 3.** Effect of PDE inhibitors on cAMP hydrolysis. cAMP hydrolysis in the oocytes was assayed in the presence of increasing amount of either theophylline or IBMX. Assays were performed at pH 8.0 for 25 minutes using a  $^3\text{H}$ -cAMP concentration of  $0.41 \mu\text{M}$ , and the number of oocytes was between 31~39. The experiment was performed three times and the data are expressed as the average  $\pm$  SEM.

**Table 1.** Effect of PDE inhibitors on oocyte maturation in the 4 hour culture

Concentration ( $\mu$ M)		GV	GVBD	Degeneration	% GVBD
of PDE inhibitors					
0	Theo*	5	53	1	93.0
	IBMX	6	29	0	82.9
5	Theo	3	28	0	90.3
	IBMX	11	18	2	58.1
10	Theo	3	46	0	93.9
	IBMX	14	21	3	55.1
50	Theo	14	65	2	80.2
	IBMX	32	0	4	0**
100	Theo	13	45	3	73.8
	IBMX	33	0	3	0**
500	Theo	19	8	0	29.6**
1,000	Theo	17	1	0	5.6**

The extent of oocyte maturation was determined by scoring the number of the oocytes with germinal vesicle break down (GVBD) after 4 hours culture in medium containing theophylline or IBMX. The experiment was performed three times.

\* Theo; theophylline.

\*\*  $P < 0.05$  when compared to the control

**Table 2.** Reversibility of the PDE inhibitors on oocyte maturation.

Pre-culture	No. of oocytes	No. of GV oocytes	No. of GVBD oocytes	Degeneration	% GVBD
Theophylline	60	18	42	0	70
IBMX	90	25	63	2	70

After culture of the oocytes in the medium containing either theophylline or IBMX for 4 hours, only GV oocytes were transferred to inhibitor-free medium and then cultured for another 4 hours. The experiment was performed three times.

해함으로써 난자의 cAMP 분해현상이 PDE에 의한 것이라는 사실을 뒷받침하고 있다. 이때 IBMX는 theophylline 보다 약 10배의 PDE활성에 대한 저해효과를 나타냄으로써 IBMX의 저해작용이 더 강력하다는 것을 보여 주고 있다.

난자를 theophylline 또는 IBMX가 함유된 배양액에서 4시간 배양한 후 성숙의 과정을 표현하는 핵막붕괴(GVBD)가 일어난 정도를 관찰해 본 결과 Table 1과 같이 theophylline과 IBMX 모두 농도에 비례해 핵막붕괴를 억제하였다. IBMX는 0.5  $\mu$ M에서 난자 성숙을 억제한 반면 theophylline은 500  $\mu$ M에서 난자성숙을 억제함으로써 IBMX가 theophylline 보다 난자성숙 억제효과가 큰 것을 가리키고 있다.

Theophylline과 IBMX에 의해 성숙이 억제된 난자를 억제제가 없는 배양액으로 옮겨 4시간 배양한 결과 Table 2와 같이 theophylline에서 사전배양 했거나 IBMX에서 사전배양한

경우 70%의 난자가 핵막붕괴를 일으키고 있어서 이로 보아 theophylline과 IBMX는 모두 가역적으로 난자성숙을 억제하는 것임을 알게 되었다.

## 고 찰

난자내의 cAMP 농도의 저하가 난자성숙을 유도하며 이 과정에 cAMP PDE가 작용할 것이라는 제안이 (Dekel and Beers, 1978; Schultz *et al.*, 1983 a, b; Vivarelli *et al.*, 1983) 있었지만 본 실험과 난자 균질액이 cAMP를 분해하며, 또한 PDE 저해제인 theophylline과 IBMX에 의해 cAMP분해가 저해되는 것으로 보아 난자내에 cAMP PDE가 존재한다는 것이 분명해 졌다. 이는 생쥐난자의 균질액이 cAMP를 분해 한다는 Bornslaeger등 (1984)의 보고와 일치하고 있다. 일반적으로 체세포내에 여러종의 cAMP PDE가 존재한다(Cercek *et al.*, 1983)는 것이 알려져 있으며 이 사실은 본 실험의 결과에서도 밝혀졌다. 다만 Bornslaeger등은 생쥐난자에서 Km 값이  $0.12 \pm 0.02 \mu\text{M}$  이며 본 실험의 결과 얻게된  $0.14 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 의 수치와 거의 일치하는 low Km 값을 얻고 있다. 반면 본 실험에서는  $14.5 \pm 2.0 \mu\text{M}$ 인 high Km 값을 가지고 있는 다른 한가지의 cAMP PDE의 존재를 확인할 수가 있어서 결국 본 실험결과 생쥐난자에는 두 가지의 cAMP PDE가 있다는 것을 밝힐 수 있었다.

일정시간 theophylline 이나 IBMX에 의해서 성숙이 억제되었던 난자들을 이들 억제제가 없는 배양액에 옮겼을 때 난자가 다시 성숙을 재개하는 현상은 곧 PDE의 활성이 이들 억제제에 의해서 가역적으로 작용한다는 사실을 암시해 준다고 볼 수 있다. 본 실험에서 IBMX가 theophylline 보다 더 강하게 PDE의 활성을 억제하고 있으나 이는 Bornslaeger 등 (1984)의 실험결과와 일치하고 있다.

theophylline이나 IBMX를 배양중인 난자에 처리 했을 때 난자성숙이 억제될 뿐 아니라 이들 저해제는 난자내 PDE의 활성을 억제하였다. 이는 난자의 성숙이 억제되는 현상은 난자내 cAMP의 농도가 높은 수준으로 유지되기 때문이라는 설(Dekel and Beers, 1987; Schultz *et al.*, 1983a)을 뒷받침 해주는 실험의 예가 될 수 있다.

PDE가 어떤 기작에 의해 난자성숙을 조절하는 지는 아직 확실히 밝혀져 있지 않으나, 생쥐난자가 성숙할 때 인산단백질의 인산화 양상이 변한다는 보고(Schultz *et al.*, 1983b)를 고려하면 PDE에 의한 cAMP 농도의 저하는 곧 protein kinase를 비활성화하게 함으로써 결국 효소체계의 탈인산화를 유발해 난자성숙을 유도하는 것이 아닌가 추측할 수 있으나 그 점에 대해서는 앞으로도 계속 많은 인구가 있어야 할 것이다.

## 요 약

생쥐난자내에 cAMP phosphodiesterase(PDE)가 존재하는 가를 확인하고 cAMP PDE와 난자성숙간의 관계를 밝히기 위해 본 실험을 행하였다.

실험결과 생쥐난자내에는 Michaelis 상수 (Km)와 반응 최대속도 (Vmax)가 다른 두종의 cAMP PDE가있다는 것이 밝혀졌다. 즉 하나는 Km 값이  $0.14 \pm 0.01 \mu\text{M}$  이고 Vmax 값이  $0.42 \pm 0.07 \text{ fmol cAMP hydrolyzed/oocyte/minute}$ 이고, 다른 하나는 Km 값이  $14.5 \pm 2.0 \mu\text{M}$  이고 Vmax 값이  $2.2 \pm 0.5 \text{ fmol cAMP hydrolyzed/oocyte/minute}$ 이다.

또한 PDE의 cAMP 분해작용은 난자성숙 억제제로 알려진 theophylline과 isobutyl-methyl-xanthine에 의해 저해되었으나 그 작용은 가역적이었다.

이 실험결과는 PDE의 활성저해로 인한 난자내의 cAMP의 축적이 결국 난자성숙을 억제하고 있다는 것을 암시하고 있다.

## REFERENCES

- Biggers, J.D., 1971. New observations on the nutrition of the mammalian oocyte and the preimplantation embryo. In "The Biology of the Blastocyst" (R.J. Blandau, ed.), pp.319-322. Univ. of Chicago Press, Chicago.
- Bornslaeger, E.A., M.W. Wilde and R.M. Schultz, 1984. Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cAMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev. Biol.*, **105**:488-499.
- Brinster, R.L., 1963. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell embryo to blastocyst. *Exp. Cell. Res.*, **32**:305-308.
- Butcher, R.W. and E.W. Sutherland, 1962. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. *J. Biol. Chem.*, **237**:1244-1250.
- Cercek, B., S.R. Wilson and M.D. Houslay, 1983. Heterogeneity of cyclic nucleotide phosphodiesterase in liver endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, **213**:89-97.
- Cho, W.K., S. Stern and J.D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, **187**:383-386.
- Dekel, N. and W.H. Beers, 1978. Rat oocyte maturation *in vitro*: Relief of cAMP inhibition by gonadotropins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:4369-4373.
- Lineweaver, H. and D. Burk, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**:658-666.
- Magnusson, C. and T. Hillensjö, 1977. Inhibition of maturation and metabolism in rat oocytes by cyclic AMP. *J. Exp. Zool.*, **201**:139-148.
- Sato, E. and S.S. Koide, 1984. Forskolin and oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, **230**:125-129.
- Schultz, R.R. Montgomery, P.F. Ward-Baily and J.J. Eppig, 1983a. Regulation of oocyte maturation in mouse: Possible roles of intercellular communication, cAMP, and testosterone. *Dev. Biol.*, **95**:294-304.
- Schultz, R.M., R.R. Montgomery and J.R. Belanoff, 1983b. Regulation of mouse meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.*, **97**:264-273.
- Vivarelli, E., M. Conti, M. de Felici and G. Siracusa, 1983. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Differ.*, **12**:271-276.