

배양중인 개구리 여포의 cAMP 흡수와 분해

권혁방 · 나철호 · 안련섭 · 김경진*

전남대학교 자연과학대학 생물학과, *서울대학교 자연과학대학 분자생물학과

양서류 여포를 배양할 때 외부에서 cAMP를 첨가하면 호르몬에 의한 난자의 성숙이 억제된다는 많은 보고가 있었다. 그러나 실제 외부의 cAMP가 여포내로 들어간다는 보고는 아직 없다. 본 연구에서는 배양액내의 cAMP가 여포내로 침투해 들어가는 현상과 들어간 cAMP의 분해과정을 radioimmunoassay로 조사하였다. 개구리 여포를 배양하면서 배양액에 난자의 성숙을 억제하는 농도의 cAMP(2.5 mM)를 첨가한 후 일정시간 간격으로 여포내에 축적된 cAMP의 농도를 조사한 결과 2시간에서 이미 기본 수준(여포당 약 3 p mole)의 수십배로 증가하였다(여포당 90 p mole). cAMP를 포함한 배양액에서 6시간 배양 후 보통 배양액으로 옮겨 배양하면서 일정 시간마다 여포내 cAMP의 농도를 측정된 결과 6시간 내에 cAMP의 농도가 여포당 160 p mole에서 약 10 p mole로 급격히 낮아졌다. 그러나 18시간 후에도 기본 수준으로까지 내려가지는 않았다. 이러한 cAMP의 감소과정이 progesterone이나 isobutyl methylxanthine(IBMX)에 크게 영향을 받지 않았다. 배양중인 여포를 forskolin(9 μ M)으로 자극했을 때에는 기본 수준의 약 3배 정도로 cAMP의 농도가 증가하였다. 본 결과는 배양액내의 cAMP가 여포내로 투과해 들어가고 이들은 곧 여포에 의해 분해된다는 것을 시사하고 있다.

KEY WORDS: Amphibian follicles, cAMP uptake

양서류 여포의 스테로이드 생성과 난자의 성숙 재개 과정에 cAMP가 중요한 역할을 한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 개구리(*Rana*) 여포를 배양할 때 간접적으로 여포내 cAMP의 농도를 높여주면 뇌하수체호르몬을 처리한 것처럼 progesterone의 생성을 촉진하며 성장중인 여포들도 estradiol과 testosterone을 생성하게 된다(Kwon and Schuetz, 1986; Kwon *et al.*, 1989; Kwon *et al.*, 1990). 즉 여포의 스테로이드 생성 조절에 cAMP는 양성조절자로 작용한다. 반면에 progesterone의 자극에 의해 재개되는 난자의 성숙과정에서 cAMP는 음성조절자로 작용한다. 즉, 난자내 cAMP의 농도를 간접적으로 높여주면 예외 없이 호르몬에 의한 난자의 성숙이 억제되기 때문이다(Maller, 1983; Kwon and Schuetz, 1985; Kwon *et al.*, 1989). 이러한 현상은 양서류의 여포

나 난자에 국한되지 않고 대부분의 척추동물에서 일어나는 현상이다(Masui and Clarke, 1979; Maller, 1983). 일련의 이러한 연구 결과들은 대부분 생체의 배양중인 난자나 여포에 cAMP나 그 유사체를 외부에서 처리함으로써 얻어진 결과들이었다. 그러나 외부 배양액에 처리한 cAMP나 그 유사체들이 얼마나 세포내로 투과해 들어가는지에 대해서는 거의 알려진 바 없다. cAMP 자체는 친수성인 물질이므로 세포막을 투과해 들어가지 못할 뿐 아니라 곧 분해가 된다고 알려져 있으므로 다른 동물을 사용한 실험모델에서는 그 유사체인 dibutyryl cAMP(dbc AMP)나 8-Br-cAMP가 흔히 사용되고 있다(Marsh, 1975; Pastan *et al.*, 1975; Sanborn, 1980). 실제 포유동물의 난자는 cAMP의 처리에는 거의 자발적 성숙이 억제되지 않고 dbc AMP에 의해서만 영향을 받는다(Cho *et al.*, 1974). 그러나 본인 등이 개구리(*Rana*)의 여포를 배양하면서 cAMP의 효과를 조사했을 때 그 효과가 cAMP와 dbc AMP간에

본 연구는 1989년도 문교부 기초과학 육성연구비의 지원에 의한 것임.

차이가 없었다(Kwon and Schuetz, 1986). 또한 북방산개구리의 여포를 사용하여 배양액내의 cAMP를 적절히 조절하여 난자의 성숙을 유도하는데 성공한 바도 있다(Kwon *et al.*, 1990)

본 연구는 한국산개구리인 북방산개구리와 움개구리를 사용하여 배양액내의 cAMP가 여포 혹은 난자내로 투과해 들어가는지의 여부와 여포내로 들어간 cAMP가 어떻게 분해되는지를 조사하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용한 개구리는 북방산개구리(*Rana dybowskii*)와 움개구리(*Rana rugosa*)로써 이들은 전남 일원에서 물속에서 동면중인 것을 11월에서 1월 사이에 채집한 것이었다. 채집해온 개구리들을 10% amphibian Ringer(AR)를 포함한 plastic box에 옮겨놓은 다음 4°C를 유지하는 서온실에서 보관을 하였으며 며칠에 한번 씩 AR을 갈아주었다.

여포배양 및 cAMP 추출

개구리를 두부절개로 죽인 후 난소를 떼어내어 AR 용액에서 몇번 씻은 다음 해부현미경하에서 여포들을 예리한 핀셋으로 분리해 내었다. 분리해낸 여포들을 실험군에 따라 무작위로 나눈 후 2 ml의 AR을 포함한 다공배양접시(24 well multidish, Nunclon)의 각 well에 20개씩 넣었으며 이곳에 필요한 시약이나 cAMP를 첨가하였다. 여포를 포함한 배양접시를 진탕배양기(shaking incubator, 국제싸이엔)에 옮겨 22-24°C를 유지하고 일분에 80회전 진탕을 시키며 배양하였다. 실험에 사용한 cAMP, IBMX 및 forskolin의 농도는 전보에서 얻은 결과들을 토대로 하여 난자의 성숙을 억제하는 것으로 정하였으며(Kwon and Schuetz, 1986; Kwon *et al.*, 1990) 호르몬과 시약은 모두 Sigma 회사에서 구입한 것을 사용하였다. 여포 혹은 여포세포를 제거한 난자에서 cAMP를 추출할 때에는 다음과 같은 과정을 따랐

다. 일정시간 배양한 여포 혹은 난자들을 AR로 여러번 씻은 다음 microcentrifuge tube로 옮겨왔다. 0.27 mM IBMX를 포함한 70% ethanol 0.5 ml을 이 tube에 넣은 다음 초음파분쇄기로 여포들을 부수고 다시 이들을 원심분리(10,000 g, 10분)하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 냉동건조하여 냉동기에 보관하다가 분석 직전에 assay buffer(50 mM sodium acetate, pH, 6.2)로 녹인 후 cAMP assay에 사용하였다(Cicirelli and Smith, 1985).

cAMP radioimmunoassay(RIA)

cAMP 정량은 Steiner 등(1972)이 개발한 nonacetylated cAMP RIA 방법을 주로 따랐다. 방사성 cAMP는 chloramine-T 방법(Steiner *et al.*, 1972)으로 요오드화 시킨 cAMP(¹²⁵I-succinyl-cAMP-tyrosine methyl ester)를 사용하였으며, antiserum(% cross reactivity: cyclic GMP, 1.9; GTP, 0.01; ATP, 0.005; 기타, 0.001 이하)은 Kew Sci. Incorp.(미국)에서 구입하여 사용하였다. 일련의 polyethylene tube에 표준 시료 100 μ l, 9,000-10,000 cpm으로 희석한 방사성 cAMP 50 μ l, 그리고 20,000:1로 희석한 antiserum 50 μ l을 넣고 잘 섞은 다음 4°C에서 16-18시간 반응시켰다. 이들 tube에 2차 항체로 100 μ l의 rabbit IgG(4 mg/ml)를 첨가한 다음 4°C에서 3시간 재차 반응시킨 후 95%의 찬 ethanol 2 ml을 첨가한 후 상온에서 10분 정도 방치한 다음 원심분리하여(2,000 g, 20분, 4°C) cAMP와 항체의 결합형을 유리형으로 부터 분리하였다. 시료 tube의 방사선량을 gamma counter (Autogamma 5,000, Packard)로 측정한 후 SecuRIA program(Packard)으로 cAMP의 농도를 계산하였다. 본 실험에서 얻은 cAMP의 sensitivity는 0.25 p mole이었고 실험내와 실험간의 변이 계수는 10 p mole 수준에서 각각 6.5 \pm 1.2%와 9.2 \pm 2.2%(n = 9)이었다.

결 과

배양중인 북방산개구리 여포의 cAMP 흡수작용

배양액에 첨가된 cAMP가 과연 여포내로 투과해 들어가는지를 보기 위하여 난자의 성숙을 억제하는 농도의 cAMP(2.5 mM)를 포함한 배양액에서 여포들을 일정시간(2-6시간) 배양하면서 시간별로 여포내에 축적된 cAMP의 농도를 RIA로 측정하였다(Fig. 1). 여포내 cAMP의 농도는 배양 2시간에 이미 여포당 98 p mole로 아무것도 처리하지 않은 태조군의 그것(약 3 p mole/여포)보다 급격히 높아졌다($p < 0.01$). 배양시간이 길어

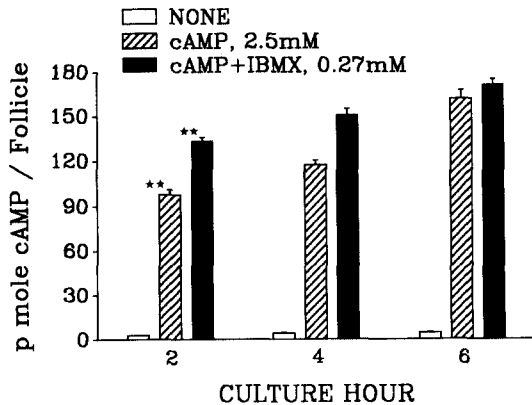


Fig. 1. Uptake of exogenous cAMP by ovarian follicles of *R. dybowskii* in vitro. Isolated follicles cultured for 2-6 hours in the presence of cAMP (2.5 mM) or cAMP plus IBMX (0.27 mM). cAMP were extracted and measured by RIA. Each bar represents p mole (mean \pm SEM) cAMP per follicle (n = 9, triplicate incubations per animal, 3 animals). **P < 0.01, when compared to control.

짐에 따라 여포의 cAMP 농도는 점차 증가하는 경향을 보여 주어 6시간에는 여포당 162 p mole까지 높아졌다. 이로보아 cAMP의 투과가 비교적 단시간내에(2시간 내) 이루어진다는 것을 알 수 있었다. cAMP의 분해를 막는 IBMX(0.27 mM)를 첨가했을 때에도 큰 증가는 이루어지지 않았다(Fig. 1). 본 결과들은 배양액에 있는 cAMP가 여포내로 투과해 들어간다는 것을 시사하고 있다.

여포내로 흡수된 cAMP의 분해현상

일단 여포내로 투과해 들어간 cAMP들의 운명이 어떻게 되는지를 보기 위하여 cAMP(2.5 mM)를 포함한 배양액에서 6시간 전배양하여(preincubation) 여포내의 cAMP의 농도를 높인 후 이들을 보통배양액으로 옮기어 18시간까지 배양하면서 일정 시간마다 여포의 일부를 취하여 cAMP의 농도변화를 조사하여 보았다(Fig. 2).

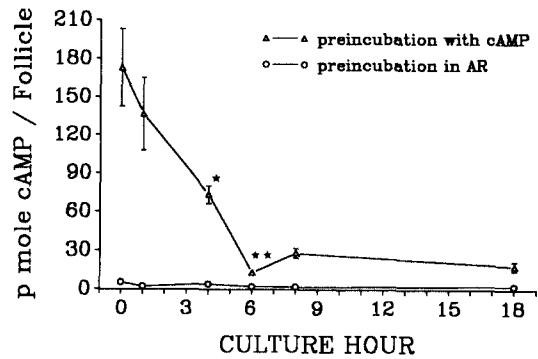


Fig. 2. Degradation of intrafollicular cAMP in *R. dybowskii* follicles. Follicles were precultured for 6 hours in the presence or absence of cAMP and then transferred to plain medium and cultured further for 18 hours. At designated time points, intrafollicular cAMP levels were measured. Each point in the graph represents p mole (mean \pm SEM) cAMP per follicle (n = 6, triplicate incubations per animal, 2 animals). *P < 0.05 and **P < 0.01, when compared to initial level (time 0).

6시간의 전배양기간 동안에 여포내에 축적된 cAMP의 농도는 여포당 173 p mole이었다(배양 시간, 0; Fig. 2). 배양시간이 지남에 따라 여포내 cAMP의 농도는 급격히 감소하기 시작하여 배양 후 4시간에는 여포당 74 p mole로 낮아졌으며($P < 0.05$) 6시간에는 13 p mole로 감소하였다($P < 0.01$). 그 이후에는 10-20 p mole을 유지하였다(Fig. 2). cAMP가 없는 배양액에서 전배양한 태조군의 여포들에서는 cAMP의 농도가 여포당 1-6 p mole 사이의 기본 농도를 유지하고 있었다. 이 결과는 외부의 cAMP가 없으면 여포내의 cAMP가 급격히 감소된다는 것을 보여주고 있다. 그러나 18시간 배양 후에도 기본농도(base level)로 까지 낮아지지 않는다는 것을 알 수 있었

다.

cAMP의 분해에 미치는 Progesterone과 IBMX의 영향

Progesterone이 난자내의 cAMP농도를 낮춘다는 보고가 있으므로(Baulieu, 1983) 이를 조사하기 위하여 여포내의 cAMP를 전배양으로 높인 후 보통배양액으로 옮겨 배양할 때 progesterone을 첨가하여 cAMP의 분해에 미치는 효과를 조사하였다. cAMP의 분해를 막는 IBMX의 효과도 아울러 조사하였다(Fig. 3). Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 progesterone이나 IBMX가 첨가된 배양액에서도 여포내 cAMP의 분해는 보통배양액으로 옮긴 대조군의 그것과 거의 차이가 없이 일

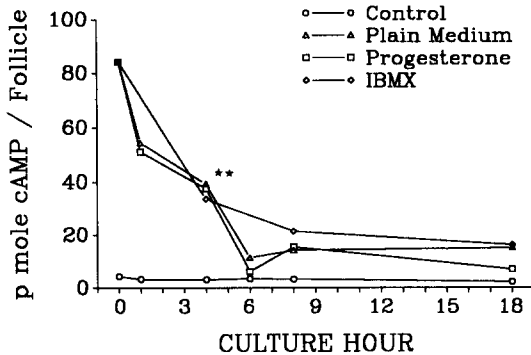


Fig. 3. Effect of progesterone or IBMX on the degradation of cAMP in the follicles of *R. dybowskii*. Follicles precultured in AR or cAMP medium for 6 hours were cultured for 18 hours in the presence or absence of progesterone or IBMX. At designated time points, intrafollicular cAMP were extracted and measured by RIA. Each point in the graph represents p mole (mean \pm SEM) cAMP per follicle (n = 3, triplicate incubations). **P < 0.01, when compared to initial level (time 0).

어났다. 즉, 이들의 존재 유무에 관계없이 6시간 내에 cAMP의 농도가 급격히 감소하고 그 이후에는 여포당 10-20 p mole 사이의 농도를 유지하였다.

Forskolin과 IBMX가 배양중인 여포의 cAMP 농도에 미치는 효과

북방산개구리의 여포를 사용하여 adenylate

cyclase의 촉진제인 forskolin과 phosphodiesterase의 억제제인 IBMX가 배양중인 여포의 cAMP의 농도를 높일 것인가의 여부를 조사하여 보았다. 여포를 배양하면서 배양액에 forskolin(9 μ M) 혹은 IBMX(0.27 mM)를 첨가한 다음 6시간 까지 배양하면서 2시간 간격으로 일부의 여포를 취하여 여포내 cAMP의 농도를 측정하였다. Forskolin은 배양 2시간에 기본농도의 약 3배 정도 cAMP의 수준을 증가시켰었다(P < 0.01) (Fig. 4). 그러나 배양기간이 길어짐에 따라 점차 그 농도가 낮아졌다. 이에 대해 IBMX는 cAMP의 농도를 증가시키는 효과가 거의 없었다 (Fig. 4).

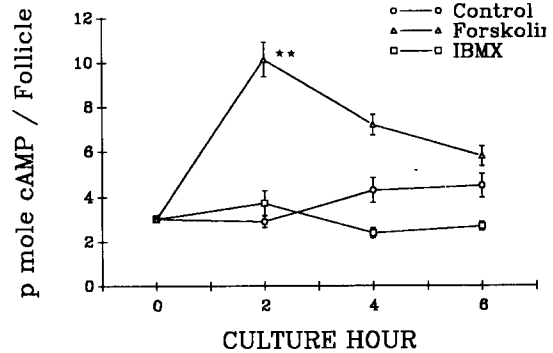


Fig. 4. Effect of forskolin and IBMX on the intrafollicular levels of cAMP in *R. dybowskii* in vitro. Isolated follicles were cultured in the presence or absence of forskolin or IBMX for 6 hours. At designated time points, intrafollicular cAMP were extracted and measured by RIA. Each point in the graph represents p mole (mean \pm SEM) cAMP per follicle (n = 9, triplicate incubations per animal, 3 animals). **P < 0.01, when compared to control.

배양중인 올개구리 여포 혹은 난자의 cAMP 흡수

올개구리의 여포를 사용하여 여포와 난자 사이에 외부 cAMP의 흡수능력이 서로 다른지를 비교하여 보았다. 먼저 여포로부터 상피층, thecal layer 및 여포세포들을 완전히 제거하여 denude 난자들을 얻은 다음 이들과 여포들을 배양하면서 여러 농도의 cAMP(0-2.5 mM)를 첨가한 후 6시간에 이들 세포내로 투과해들어간 cAMP의 농도를 측정하여 보았다. 여포내의 cAMP의 농도는

배양액에 0.1 mM의 cAMP가 존재할 때 이미 기본농도(여포당 4.1 p mole)보다 8배로 증가하였으며(여포당 32 p mole) 2.5 mM일 때에는 약 40 배로 증가하였다(여포당 148 p mole)(Fig. 5). 이 현상은 난자에서도 똑같이 나타났다. 따라서 배양액내의 cAMP의 농도가 높아질수록 여포 혹은 난자내로 투과해 들어간 cAMP의 양이 증가한 것을 알 수 있었으며 여포막(follicular envelope)은 cAMP의 투과에 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 알았다(Fig. 5). 이들 여포내로 흡수된 cAMP의 감소과정도 북방산개구리의 그것과 비슷하였다(결과 표시하지 않음). 이로부터 여포나 난자들이 외부 cAMP를 흡수하는 효과는 중간에 큰 차이가 없음을 또한 알 수 있었다(Fig. 1과 5).

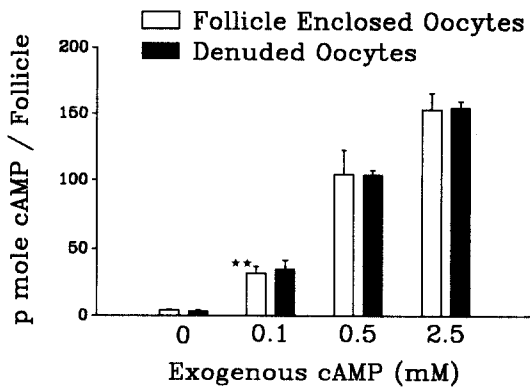


Fig. 5. Uptake of exogenous cAMP by follicles or denuded oocytes of *R. rugosa* *in vitro*. Follicles or denuded oocytes were cultured for 6 hours in the presence of different concentration of cAMP (0-0.25 mM) with IBMX (0.27 mM). After culture, intrafollicular cAMP were extracted for RIA. Each bar in the figure represents p mole (mean \pm SEM) per follicle (n = 4, duplicate incubations per animal, 2 animals). **P < 0.01, when compared to control.

고 찰

본 실험의 결과로 배양액내의 cAMP의 농도가 충분히 높으면 그들의 일부가 개구리 여포나 난자내로 투과해 들어가 세포내 cAMP의 농도를 높이

며 외부의 cAMP를 제거하면 세포내 cAMP의 농도가 급속히 낮아진다는 것을 알았다. 이러한 결과는 배양액에 존재하는 cAMP가 개구리 난자의 성숙을 억제하는 현상이나 cAMP에 노출시킨 시간을 적절히 조절하여 여포나 난자의 성숙을 유도한 진보의 결과를(Kwon *et al.*, 1990) 잘 설명해주고 있다. 즉 이같은 cAMP의 억제 및 유도 작용은 세포내로 투과해 들어온 cAMP에 의해 일어났으며 외부의 cAMP 존재 유무에 따라 난자내의 cAMP 농도가 변하기 때문에 일어났다고 볼 수 있다.

척추동물에서 cAMP의 농도가 낮아지는 것이 난자의 성숙제거에 필수적이라는 사실은 세포내 cAMP의 농도를 간접적으로 높이는 phosphodiesterase의 억제제들(theophylline, IBMX)이나 adenylate cyclase의 촉진제(forskolin)가 호르몬에 의한 난자의 성숙을 억제하는 현상으로부터 밝혀지기 시작하였다(Maller, 1983). 그러나 호르몬의 자극 후 실제 난자내에서 cAMP의 농도가 낮아지는 현상을 확인하는데에는 아직도 많은 어려움이 있다. 양서류의 경우 일부의 학자들에 의해 이러한 현상이 보고된 바 있으나(Specker and Butcher, 1977; Morrill *et al.*, 1977), 다른 일부의 학자들은 이를 확인할 수 없었다(Schorderet-Slatkine *et al.*, 1978; Thibier *et al.*, 1982). 이는 난자내 cAMP의 절대 농도가 매우 낮고 adenylate cyclase system이 극히 정교하여 이들의 변화를 측정하는데에는 많은 문제가 있기 때문이다. 따라서 학자들은 배양액에 cAMP나 그 유사체를 첨가하여 이들의 효과를 조사하는 방법을 주로 사용하여 왔다. cAMP는 생체막을 거의 투과하지 못하는 것으로 알려져 있으므로 포유동물의 배양계에서는 주로 투과가 용이하도록 변형된 그 유사체들(dbc AMP, 8-Br-cAMP)이 흔히 사용되고 있다. 그러나 외부에 첨가된 cAMP나 그 유사체가 실제 얼마나 세포내로 들어가는지에 관해서는 거의 알려진 바가 없었다.

본 실험의 결과는 배양액의 cAMP가 비교적 단시간내에(2시간) 개구리의 여포 혹은 난자로 투과해 들어간다는 것과 cAMP의 분해를 억제하는

IBMX를 배양액에 함께 첨가했을 경우 배양 초기에는 어느 정도 상승 효과를 나타내나 6시간 이후에는 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주고 있다(Fig. 1). 본 실험에서 측정된 여포당 cAMP의 기본 수준은(아무 자극이 없을 때의 농도) 여포당 1-6 p mole로서 *Xenopus*의 결과와 일치되었다(Cicirelli and Smith, 1985). 일단 여포 혹은 난자내로 들어간 cAMP는 바로 분해된다는 사실을 Fig. 2에서 보여주고 있다. 즉 외부의 cAMP의 지속적인 공급이 없으면 6시간 내에 cAMP의 농도가 급격히 낮아지는 것을 알 수 있었다. 이러한 cAMP의 감소과정에 progesterone이나 IBMX가 거의 영향을 미치지 않는다는 사실은(Fig. 3) 현재로서는 매우 설명하기 어려운 현상이다. 본 실험에 사용된 IBMX의 농도(0.27 mM)는 호르몬에 의한 난자의 성숙을 충분히 억제하는 농도이므로(미발표 결과) 난자내 cAMP의 분해를 방지할 것으로 예상되는 것이었다. 또한 progesterone은 일부의 학자들(Specker and Butcher, 1977; Baulieu, 1983)에 의하면 cAMP의 농도를 낮추는 효과가 있다고 하였는데 본 실험의 경우에는 아무 효과가 없는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 난자내 cAMP의 조절 기작이 매우 복잡하고 정교하다는 것을 의미한다. 이미 Baulieu(1983)는 cAMP를 생성하는 adenylate cyclase가 막에 존재하는 것과 세포질내에 있는 것으로 구분될 수 있으며 오직 막에 있는 adenylate cyclase만 progesterone에 의해 일부 억제된다고 보고한 바 있다. 양서류의 난자는 다량의 난황물질을 포함하고 있으므로 난자내의 세포질들이 생리적으로 다른 세포들에 비하여 보다 다양하게 구획화 되어 있을 가능성이 크다. 따라서 외부에서 첨가된 IBMX가 난자내에 있는 일부의 phosphodiesterase에만 영향을 미쳤던 것으로 추측된다. Fig. 5에서 forskolin이 단지 기본 농도의 약 3배 정도 밖에 cAMP의 농도를 높일 수 없었던 것도 비슷한 경우로 볼 수 있다. 즉 배양액의 forskolin은 여포세포나 난자내에 있는 모든 adenylate cyclase를 충분히 촉진할 수 없었던 것으로 추측된다. 그러나 이러한 예상은 아직 실험

적 증거가 없는 형편이므로 앞으로 더 추구해 보아야할 문제라고 생각된다.

외부의 cAMP에 의해 높아진 난자내 cAMP의 농도가 보통배양액으로 옮겨 18시간까지 배양했어도 결코 기본 농도 까지 내려가지 않는다는 사실은(Figs. 2, 3) 매우 중요한 점을 시사해 주고 있다. 양서류의 난자에서 progesterone의 자극에 의해 낮아지는 cAMP의 농도는 대개 기본 농도의 50-80%선으로 알려져 있다(Cicirelli and Smith, 1985). 따라서 배양 18시간 후에도 잔류 cAMP가 기본 농도의 3배 이상되므로 외부 cAMP에 노출되었던 난자들은 지속적으로 cAMP의 영향을 받을 것으로 예상된다. 그러나 cAMP를 배양액에서 제거한 후 progesterone을 처리하면 바로 난자의 성숙을 일으킬 수 있으며 더우기 북방산개구리에서는 cAMP의 제거 자체가 난자의 성숙까지도 유도했다는 사실은(Kwon *et al.*, 1990) 난자내 cAMP의 절대 농도 보다는 상대적인 농도의 변화가 성숙조절에 중요하다는 것을 시사해주고 있다. 이러한 생각은 이미 포유동물의 여포배양계를 다루는 몇몇 학자들에 의해 제안된 바 있으나(Dekel *et al.*, 1988) 그에 대한 뚜렷한 증거는 제시되지 않고 있다. 여포의 구성이 포유류와 다른 양서류에서도 과연 난자내 cAMP의 상대적인 증감이 난자의 성숙조절에 중요한 역할을 할 것인지는 앞으로 더 연구해 보아야할 과제라고 생각된다.

인용문헌

- Baulieu, E-E., 1983. Steroid-membrane-adenylate cyclase interactions during *Xenopus laevis* oocytes meiosis reinitiation: A new mechanism of steroid hormone action. *Exp. Clin. Endocrinol* **81**: 3-16.
- Cicirelli, M. F. and L. D. Smith, 1985. Cyclic AMP levels during the maturation of *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **108**: 254-258.
- Cho, W. K., S. Stern, and J. D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **187**: 383-386.
- Dekel, N., D. Galiani, and I. Sherizly, 1988. Dissociation

- between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **56**: 115-121.
- Kwon, H. B., Y. K. Lim, M. J. Choi, and R. S. Ahn, 1989. Spontaneous maturation of follicular oocytes in *Rana dybowskii* *in vitro*: Seasonal influences, progesterone production and involvement of cAMP. *J. Exp. Zool.* **252**: 190-199.
- Kwon, H. B., H. J. Park, and A. W. Schuetz, 1990. Induction and inhibition of meiotic maturation of amphibian (*Rana dybowskii*) follicular oocytes by forskolin and cAMP *in vitro*. *Mol. Reprod. Develop.* **25**: 147-154.
- Kwon, H. B. and A. W. Schuetz, 1985. Dichotomous effects of forskolin on somatic and germ cell components of the ovarian follicle: evidence of cAMP involvement in steroid production and action. *J. Exp. Zool.* **236**: 219-228.
- Kwon, H. B. and A. W. Schuetz, 1986. Role of cAMP in modulating intrafollicular progesterone levels and oocyte maturation in amphibians (*Rana pipiens*). *Dev. Biol.* **117**: 354-364.
- Maller, J. L., 1983. Interaction of steroids with cyclic nucleotide system in amphibian oocytes. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **15**: 295-336.
- Marsh, J. M., 1975. The role of cyclic AMP in gonadal function. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **6**: 137-199.
- Masui, Y. and H. J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **57**: 185-281.
- Morrill, G. A., F. Schatz, A. B. Kostellow, and J. M. Poupko, 1977. Changes in cyclic AMP levels in the amphibian ovarian follicle following progesterone induction of meiotic maturation. *Differentiation* **8**: 97-104.
- Pastan, I. H., G. S. Johnson, and W. B. Anderson, 1975. Role of cyclic nucleotides in growth control. *Ann. Rev. Biochem.* **44**: 491-522.
- Sanborn, B. M., 1980. The role of cyclic nucleotides in reproductive processes. *Ann. Rev. Physiol.* **42**: 37-57.
- Schorderet-Slatkine, S., M. Schorderet, P. Boquet, F. Godeau, and E-E. Baulieu, 1978. Progesterone-induced meiosis in *Xenopus laevis* oocytes: A role for cAMP at the "maturation-promoting factor" level. *Cell.* **15**: 1269-1275.
- Speaker, M. G. and F. R. Butcher, 1977. Cyclic nucleotide fluctuations during steroid induced meiotic maturation of frog oocytes. *Nature (London)* **267**: 848-850.
- Steiner, A. L., C. W. Parker, and D. M. Kipnis, 1972. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides: I. preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **247**: 1106-1113.
- Thibier, C., O. Mulner, and R. Ozone, 1982. In vitro effects of progesterone and estradiol-17 β on cholera toxin activated *Xenopus* oocyte adenylate cyclase. *J. Steroid Biochem.* **17**: 191-196.

(Accepted January 31, 1991)

Uptake and Degradation of cAMP by Frog Follicles *in vitro*

Hyuk Bang Kwon, Chul Ho Ra, Ryun Sup Ahn, and Kyungjin Kim* (Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, *Department of Molecular Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

We previously showed that transient exposure of *Rana dybowskii* follicles to exogenous cAMP *in vitro* could induce meiotic maturation. The present experiments were carried out to ascertain whether the exogenous cAMP penetrate into the follicles. Isolated follicles were precultured in the medium containing cAMP (2.5 mM) for 6 hours and then cultured further in plain medium for 18 hours. The change of intrafollicular cAMP levels during the culture period were examined by utilizing cAMP radioimmunoassay (RIA). The intrafollicular levels of cAMP increased about thirty times of the basal level (about 3 p mole/follicle) in two hours and reached a peak in six hours (170 p mole/follicle) during the preculture period. However, when the follicles were transferred to plain medium, the levels decreased markedly in six hours to very low levels (about 10 p mole/follicle), and kept the same levels thereafter. But the levels did not decrease to the basal levels. The increase and decrease of the intrafollicular cAMP was not affected by the presence of isobutyl methylxanthine (IBMX) or progesterone. The data suggest that exogenous cAMP penetrate into the follicles and the cAMP accumulated by the follicles are degraded very rapidly.