大韓不妊學會雜誌: 第18卷 第2號 1991
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 18, No. 2, 1991, 12

배양된 생쥐여포에서 Ca^{++} Uptake에 대한 Gonadotropin의 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

배 인 하 · 강 신 해

Effect of Gonadotropin on Ca^{++} Uptake in Follicle-Enclosed Mouse Oocytes Cultured in Vitro

In-Ha Bae and Shinhae Kang

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul, Korea

=Abstract=

The present study was undertaken to clarify the role of calcium ion as a factor for the maturation of follicle-enclosed mouse oocytes.

Follicles were isolated with two sharp needles under a stereomicroscope from mouse(ICR) ovaries which were treated PMSG 5 IU 45 hours previously. Isolated follicles were cultured for 14-16 hours in an organ culture system at 37℃, 5% CO_2 in air and in a 100% humidified incubator by treatment of hCG, EDTA and $^{45}Ca^{++}$. Culture medium was Modified Hank's Balanced Salt Sol.(MHBS) and addition of hCG(human chorionic gonadotropin) was made into two doses level 0.4 IU and 0.8 IU from the stock sol. and also $^{45}Ca^{++}$ was treated in the culture medium. To explain the role of calcium, calcium chelating agent EDTA was treated to the culture of the mouse follicle-enclosed oocytes.

Two observations were made in the present study; nucleus phase and $^{45}Ca^{++}$ uptake into the oocyte.

HCG induced oocyte maturation in the follicle about two folds as much as the control group, whereas there is no difference in oocyte maturation between 0.4 IU and 0.8 IU of hCG. Optimum level of hCG seems to be 0.4 IU/ml in the mouse follicle culture.

HCG stimulated $^{45}Ca^{++}$ uptake into the oocyte of the follicles by two folds. $^{45}Ca^{++}$ uptake in the control group is about 2.5 folds in comparison of the EDTA(1.71mM) treated group. However, calcium uptake in the EDTA treated groups tends to increase depending on the decrease of EDTA concentration.

These observations suggest that firstly, hCG stimulates maturation of the oocyte of the follicle, secondly, Ca^{++} influx is induced by hCG and thirdly, Ca^{++} influx by the treatment of EDTA decreases as a dosage-dependent process.

This Ca^{++} uptake may take place by the changes of permeability which was induced by hCG treatment. That is, Ca^{++} influx may trigger the resumption of oocyte maturation. It is further necessary in the future study how this Ca^{++} uptake is induced by hCG and increases permeability of the follicle and oocyte.

*본 연구는 1989 문교부 학술진흥재단과 한국과학재단 지원에 의한것임.

서 론

포유동물의 난자는 출생직후부터 제1감수분열의 전기(prophase)중 복사기(diplotene stage)에 멈추어져 있다가 사춘기이후 적절한 시기에 preovulatory gonadotropin surge에 의해 감수분열이 재개(resumption of meiosis)되어 제2감수분열 중기(metaphase Ⅱ, MⅡ)까지 진행된다. 이 MⅡ상태에서 배란되어 수정을 할 수 있는 상태가 되는 것이다. 그런데 포유동물의 배란전여포(preovulatory follicle)에서 난구내난자(cumulus-enclosed oocytes)를 생식소자극호르몬인 luteinizing hormone(LH)의 surge가 일어나기 전에 여포로부터 분리하여 in vitro에서 배양하면 자발적인 성숙(spontaneous maturation)이 일어나 MⅡ시기에 도달한다(Pincus & Enzmann, 1935;Edwards, 1962). 또한 포유류 난소로부터 LH surge가 일어나기 전에 유리시킨 Graafian follicles을 in vitro에서 배양하면 in vivo와 마찬가지로 여포내난자의 성숙은 억제된 상태로 있으며 여기에 LH 또는 human chorionic gonadotropin(hCG)을 첨가하면, 여포내 난자의 성숙이 일어나게 된다(Baker & Neal, 1972). 그리고 hCG는 기관배양시 LH와 follicle stimulating hormone(FSH)처럼 난소에서 progesterone의 생산을 증가시킨다(Neal et al., 1975).

양서류난자에서는 progesterone이 감수분열을 야기시키며 이때 난자내로의 Ca^{++} uptake가 일어나 세포내의 Ca^{++}농도가 증가한다고 알려져 왔다(Kostellow & Morrill, 1980;Wasserman et al., 1980).

난자성숙시 Ca^{++}이 요구된다는 사실을 입증한 실험으로 Bae(1981)가 돼지난자의 배양으로 입증한 바 있다. 즉 배양액내의 Ca^{++}농도가 낮은 경우나 Ca^{++}-deficient medium에서 난자성숙이 전혀 일어나지 않음을 알았고, 그 이후에 Paleos와 Powers(1985)가 생쥐난자에서도 Ca^{++}이 배양액내의 필수적인 요소임을 입증하였으며 이때 생쥐에서 최소한 0.5mM의 Ca^{++}이 필요하다고 De Felici와 Siracusa(1982)는 보고하였다. 그런데 Bae등(1985)이 밝힌 바에 의하면 돼지난자는 생쥐의 경우보다 훨씬 낮은 농도인 0.08mM의 Ca^{++}농도가 필요하다고 하였다. 또 in vivo에서는 흰쥐의 경우 핵막붕괴(Germinal Vesicle Breakdown, GVBD)가 일어날 때 난자내 Ca^{++}의 농도가 증가함을 Batta와 Knudsen이 1980년에 밝힌 바 있다.

위의 결과로 미루어 난자성숙과정에는 난자내로의 Ca^{++} uptake가 증가할 것으로 생각된다. 그러나 이러한 사실과는 반대의 견해도 있는데 Tsafriri와 Bar-Ami(1978)는 흰쥐의 난자-난구복합체 배양결과 Ca^{++}-deficient medium이나 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 1mM) 또는 ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether)N, N'-tetraacetic acid(EGTA, 1mM) 존재하에서도 감수분열재개(meiosis resumption)가 유도된다고 하였다. 한편 external Mg^{++}, Ca^{++}이 제거되면 bovine의 난자-난구복합체에서 감수분열재개현상이 거의 일어나지 않음을 보고한 예도 있다(Leibfried & First, 1979). 또 EGTA처리로 Ca^{++}을 chelating시키면 세포주기가 돌아가지 않거나 세포자체의 생존에도 영향을 미치고 있음이 증명되고 있다(Knightbridge & Ralph, 1981).

그러나 지금까지 행해진 대개의 실험들은 여포로부터 난자를 분리해낸후 자발적 성숙과정(spontaneous maturation)이 일어날 때의 Ca^{++} uptake에 대한 관찰이었고, 또한 이런 Ca^{++}의 필요성과 불필요성에 대한 상반된 견해들이었다. 즉 LH surge전에 여포를 분리하여 난자성숙시 Ca^{++}의 influx를 본 경우는 없기에 본 실험에서는 여포를 분리하고 hCG홀몬을 처리하여 난자성숙을 유도하였고, 이렇게 배양된 여포내난자의 경우에 Ca^{++} uptake의 증가여부를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 성신여자대학교 실험동물 사육장에서 사육된 생후 22-26일된 ICR strain의 생쥐가 사용되었다. 이 실험동물은 실내온도가 19-22℃가 유지되게 하고 08:00-20:00까지 조명을 주었다. 5IU의 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin(PMSG;Folligon, intervet)을 암컷생쥐에 복강주사하고 45-47시간 뒤에 경추골 파열로 도살하여 난소를 떼어 해부현미경하에서 지방조직 및 다른 혈액응고성분들을 완전히 제거한 후에 새로운 배양액에 옮겼다.

2. 여포분리 및 여포배양방법

제거시킨 난소를 1회의 세척과정을 거친후

해부현미경(Wild, M5A, Swiss)하에서 두개의 날카로운 바늘을 이용하여 3-4조각으로 나누었다.

각 조각으로부터 여포간 결합조직(perifollicular connective tissue)을 제거하고 직경 1mm 내외의 여포만을 분리시켰고 투명도가 낮은 여포들은 대체로 퇴화하는 여포이므로 역시 배양에서 제외시켰다. 분리시킨 여포들은 기본배양액으로 3회정도 세척한 후 배양에 이용하였다. 한개의 난소로부터 약 8-10개의 여포를 얻었으며, 생쥐 한마리당 여포분리시 약 30분의 시간이 소요되었다. 또 한 실험군에 25-30개의 여포를 배양시켰다.

모든 실험에 사용된 기본배양액은 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)을 개량한 배양액(Bae & Channing, 1985)을 이용했으며, 그 조성은 다음과 같다.

NaCl(126.17mM), KCl(5.37mM), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.81mM), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$(0.34mM), KH_2PO_4 (0.44mM), Phenol red(10mg/l), Penicillin(100 IU /ml), Streptomycin(50μg/ml)을 salt solution으로 준비해두고, 필요시 적당량을 따내어 사용하였다.

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1.71mM), Na-lactate (2.5mM), Na-Pyruvate(0.33mM), Glucose(5.55mM)등도 각각 stock solution으로 만들어놓고 사용했으며, 0.3% Bovine serum albumin(BSA;Fraction V, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)를 첨가했고 여포분리과정중 pH변화를 방지하기위해 10.0mM의 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethanesulphonic acid(HEPES:Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)를 0.2N의 NaOH로 미리 pH 7.3으로 적정한후에 첨가하였다. 배양액은 pH 7.20-7.30, 280mOsm(Bae & Foote, 1980)로 조정시킨후 배양기에서 1시간 이상 equilibrium을 시켰다.

처리용 물질인 hCG stock solution은 phosphate buffer salt solution에 녹여 20 IU/ml이 되게 하였고 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA;Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)는 17.1mM의 농도로 만들어 사용하였다.

본 실험에 사용한 여포배양방법은 새로 고안한 방법을 이용하였는데 그림 1에 나타낸 바와 같다. 즉 culture dish (35×10mm, Costar)에 1ml의 기본배양액을 붓고 여기에 25mm Millipore membrane(pore size 0.45μm;Millipore Co.)을 띄우고 이 위에 분리시킨 개개의 여포를 올려놓았다. Culture dish밑에 다시 시계접시를 놓았고 그 사이에 3-4ml의 증류수를 부어 culture dish내의 배양액에 산소가 잘 녹여지도록 하였다. 또 시계접시밑에는 다시 petri dish를 놓아 전체의 배양 system이 쉽게 진동될 수 있도록 하였다. 이렇게하여 37℃, 5% CO_2, 100% 습도가 유지되는 배양기에서 14-16시간 배양하였다. 또 실험에 사용된 모든 기구는 고온 또는 고압멸균시켰으며 배양액은 매 실험마다 stock solution으로부터 새로 만들었으며 사용직전에 Millipore membrane으로 여과, 멸균하였다.

3. 여포난자의 성숙도 관찰

배양액 1ml에 0.4 IU와 0.8 IU의 hCG를 각각 처리하여 14-16시간 배양하였다. 배양후 여포를 새로운 배양액에 옮겨 날카로운 바늘로 터뜨려 mouth-controlled-micropipette을 사용하여 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 slide glass 위에 놓고 cover glass를 덮은 후 고정액(ethyl alcohol 3:acetic acid 1)에서 하루정도 고정시킨 후 0.1% acetoorcein용액으로 염색하여 위상차 현미경(Olympus, Japan)으로 핵상을 관찰하였다. 핵상은 germinal vesicle(GV), diakinesis

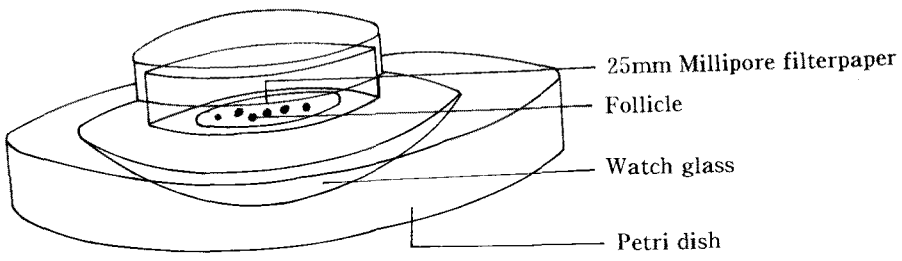

Fig. 1. Follicle culture system.

이 배양 system에서는 상부의 culture dish가 미세한 움직임에도 영향을 받도록 되어 있어 산소가 쉽게 배양액내로 녹아 들어가도록 고안되었음.

(Diak), metaphase I (M I), anaphase I-telophase I (A I-T I), metaphase II (M II), degeneration(Deg), other등으로 분류하였다.

4. $^{45}Ca^{++}$ counting(EDTA처리에 의한 Ca^{++} influx의 영향)

각 실험군에 $^{45}Ca^{++}$ (specific activity ; 10-40mCi/mg calcium, Amersham, U.S.A.)을 0.95 μg/ml이 되게 첨가하여 앞서와 같이 14-16시간 배양하였다. 실험군에 따라서 hCG(0.8IU/ml)와 함께 EDTA를 각각 1.71mM, 0.855mM, 0.428mM, 0.214mM을 처리하였으며, EDTA는 17.1mM농도의 stock solution으로부터 희석하여 사용하였다. hCG처리로 Ca^{++} uptake를 본 실험(표 2)에서는 EDTA를 처리하지 않았으며 Ca^{++} uptake에 대한 EDTA의 영향을 본 것(표 3)에서만 농도별로 EDTA를 처리하였다.

배양시킨 여포를 plain medium에 옮겨 여포를 터뜨려 난자를 회수하고 회수된 난자는 3회에 걸쳐 세척한 후 scintillation counting vial에 옮겨 5ml의 scintillation cocktail(2, 5-diphenyloxazole, PPO;1, 4-bis 2-(5-phenoxazolyl)-benzene, POPOP;toluene을 붓고 1분간 sonicator (Fisher, sonic dismembrator Model 300)로 50 stroke에서 균질화시키고 다시 10ml의 cocktail을 첨가하여 scintillation counter로 난자내로 uptake된 calcium의 양을 측정하였다. Blank은 세번째 washing medium에서 5μl를 취하였다. Counting은 5분씩 4회 반복하였으며 이들의 평균으로 얻어진 cpm치로부터,

$$\text{cpm/oocyte} = \frac{\text{cpm of experimental group} - \text{cpm of blank group}}{\text{Number of oocytes}}$$

를 계산하여 이 값으로 Ca^{++} uptake의 상대적인 양을 비교하였다.

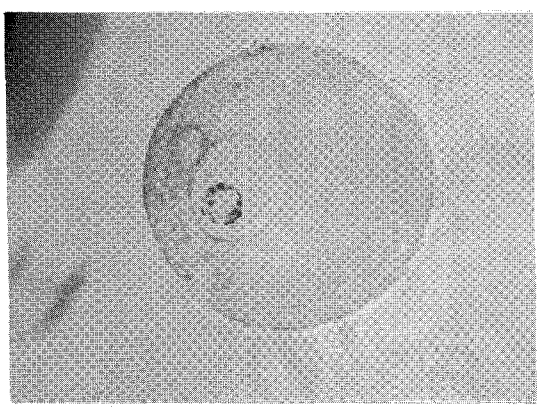

Fig. 2. GV(Germinal Vesicle) stage oocyte of the follicles cultured for 14-16hr in vitro.

5. 통계처리

대조군과 실험군의 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 통계처리하였다.

결 과

1. 여포내난자(follicle-enclosed oocyte)에 대한 hCG의 영향

회수된 난자에서 핵상관찰에 대한 기준으로는

I) 핵막(germinal vesicle)의 소실 또는 인(nucleolus)의 소멸상태.

II) 방추사(spindle fiber)형성의 유무.

III) 염색체 배열(chromosome arrangement) 상태.

IV) 제1극체(first polar body)의 형성등을 조사하여 앞서의 재료 및 방법에서 처럼 분류하였다.

대조군은 약 16%가 핵막붕괴(Germinal Vesicle Breakdown, GVBD)를 일으켰고, 거의 84%가 GV시기에 머물러있었다. 반면에 hCG처리군은 약 34-41%정도가 GV시기에 머물러있었고 약 60%가 GVBD을 일으켰다. 즉 0.4IU처리군은 각각 Diak(13.96%), M I (25.27%), M II (30.20%)에 각각 도달하였고 0.8IU처리군은 Diak(8.23%), M I (27.03%), A I-T I (3.70%), M II (36.22%), Deg(4.90%)의 비율로 나타났다. 그러나 0.4IU처리군과 0.8IU 처리군 사이에서는 난자성숙율의 유의한 차이를 찾아볼 수 없었다.

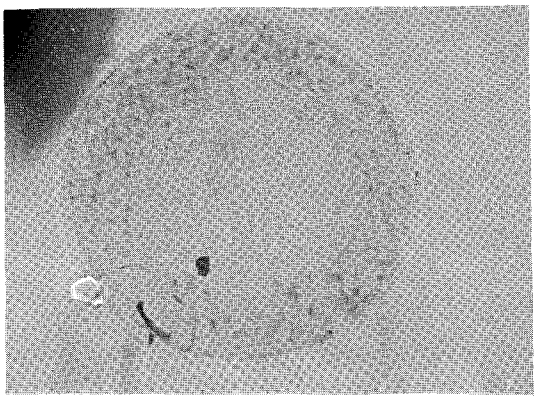

Fig. 3. In vitro matured follicular oocyte(Metaphase II), (PB)-Polar Body, (C)-Chromosome. ×400.

대조군의 경우 GV상태의 난자를 그림 2에 나타내었고, hCG처리군에서 MⅡ시기까지 도달한 난자를 그림 3에 나타내었다.

2. 여포내난자(follicle-enclosed oocyte)에서 hCG가 $^{45}Ca^{++}$ uptake에 미치는 영향

14-16시간 배양시킨 여포에서 난구세포를 완전히 제거시킨 후에 회수된 난자내로 uptake된 calcium의 양을 측정하였다(표 2).

대조군과 hCG처리군의 counting level을 비교해보면, 대조군의 경우 0.123이었고, hCG처리군은 각각 0.216, 0.226으로 나타나 대조군보다 약 2배정도 높게 유의하게 나타났다($p<0.05$).

그러나 hCG 0.4 IU처리군과 0.8 IU처리군에서는 홀몬의 dose를 약 2배로 증가시켰으나 counting level에는 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

3. 여포내난자(follicle-enclosed oocyte)에서 EDTA가 $^{45}Ca^{++}$ uptake에 미치는 영향

HCG (0.8 IU/ml)와 함께 EDTA (1.71mM, 0.855mM, 0.428mM, 0.214mM)가 처리된 배양액에서 14-16시간 배양시킨 여포에서 회수된 난자의 경우, calcium uptake를 보았다(표 3).

HCG단독으로 처리된 대조군의 counting level은 0.389로 가장 높은 값을 나타내었다. 또 EDTA처리군에서는 EDTA농도가 낮아질수록 counting value가 증가하는 경향을 보여주는데 각각 0.157(1.71mM), 0.189(0.855mM), 0.318(0.214mM)등이다. 한편 EDTA 1.71mM처리군에서 회수된 난자의 거의 대부분은 퇴화되었거나 비정상적인 상태를 나타내었다. 이 EDTA처리군에서는 activated oocyte, 예를 들어 2-cell, 4-cell등의 출현빈도가 다소 높았다. 이들 activated oocyte는 counting시 제외시켰다.

고 찰

포유류에서 난자성숙에 대한 기작은 현재까

Table 2. $^{45}Ca^{++}$ uptake in follicle-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours in vitro

Experimental groups	No. of oocytes	cpm/oocyte (Mean±S.E.)
Control	116	0.123±0.050
hCG Ⅰ (0.4 IU/ml)	138	0.216±0.053**
hCG Ⅱ (0.8 IU/ml)	128	0.226±0.097**

**:Significantly different from control value, $p<0.05$.

Table 1. Effect of human chorionic gonadotropin(hCG) on maturation in follicle-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours

Nuclear phase	Experimental groups		
	Control	hCG Ⅰ (0.4 IU/ml)	hCG Ⅱ (0.8 IU/ml)
GV	150 (83.85±10.14)	91 (41.37±12.13)**	81* (33.69± 8.27)**
Diak	11 (8.20± 4.74)	12 (13.96± 4.06)	16 (8.23± 3.57)
MI	5 (5.59± 1.28)	57 (26.27±11.15)**	59 (27.03± 9.29)**
AI-TI	0 ( )	1 ( )	2 (3.70± 0.09)
MⅡ	4 (4.75± 0.72)	61 (30.20± 9.91)**	79 (36.22±11.66)**
Deg	2 ( )	1 ( )	3 (4.90± 0.29)
Other	4 (13.35± 3.95)	1 ( )	1 ( )
Total	176	224	241
Replicates	8	11	11

* :No. of oocytes
Number in parenthesis is percentage of oocytes.
**:Mean±S.E., $p<0.05$.

Table 3. Effect of EDTA concentration on $^{45}Ca^{++}$ uptake in follicle-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hous in vitro

Experimental groups	No. of oocytes	cpm/oocyte (Mean±S.E.)
hCG(0.8 IU/ml)	68	0.389±0.060
hCG+EDTA(1.71mM)	58	0.157±0.092**
hCG+EDTA(0.855mM)	65	0.189±0.105**
hCG+EDTA(0.428mM)	56	0.272±0.023
hCG+EDTA(0.214mM)	61	0.318±0.020

**:Significantly different from control value, $p<0.05$.

지도 생식생리학 분야에 큰 과제로 남아 있어 이것을 해명하기위해 많은 연구가 행해져왔고 또 행해지고 있다. 배란전여포(preovulatory follicle)에서 얻은 유리된 난자를 in vitro system에서 배양하면 자발적인 성숙(spontaneous maturation)이 일어나게 된다(Edwards, 1962; Bae & Cho, 1982). 반면 여포내난자(follicle-enclosed oocyte)를 배양했을 때는 복사기에 그대로 머물러 있으며 gonadotropin을 처리하지 않으면 여포내난자의 자동성숙이 일어나지 않는다(Edwards, 1962).

여포에서 분리해 낸 난자가 적당한 배양액에서 배양될 경우 LH, hCG의 처리없이도 자발적인 성숙이 일어나는 것이 어떤 기작에 의해서인지를 설명하기 위해 많은 시도가 있어왔다. 한편 여포내난자성숙의 감수분열재개 억제현상은 난구세포(cumulus cell)와 난자 사이의 gap junction을 통해 난자내로의 cAMP이동으로 난자내의 cAMP농도증가가 감수분열재개를 방해하는 한 요인이라고 주장하여 왔으며(Dekel & Beers, 1978;Dekel et al., 1981;Schultz et al., 1983;Bornslaeger et al., 1986), 난자를 여포로부터 분리시킬 때 이러한 cumulus cell과의 coupling이 깨어져 난자내로 cAMP의 이동이 정지되어 난자의 자동적 성숙과정이 일어난다고 보고있다. 이와는 다른 견해로 Moor와 Heslop(1981), Crosby et al.,(1985), Racowsky (1985)등은 난자성숙분열 재개시 cAMP농도의 감소는 일어나지 않으며 난자와 난구세포사이의 coupling도 유지되지 않는다고 주장하였다.

한편 Powers와 Paleos(1982), Bae와 Channing(1985)등은 난자의 생존도(viability)뿐만아니라 난자성숙과정에 calcium이온이 필수적임을 알았고, De Felici와 Siracusa(1982)는 Ca^{++}-free medium에서 생쥐난자의 괴사(necrosis)가 일어나며 Ca^{++}-deficient medium에서 배양된 denuded oocytes도 degeneration을 일으킴을 밝혔다.

난구세포는 gap junction이나 Ca^{++}-channel을 통해 난자내로 Ca^{++}을 공급하여 난자의 degeneration을 막아주는 작용을 하고 있을 것으로 추정되며(Bae & Channing, 1985), 난구세포가 gonadotropin action의 primary target이라는 견해(Meinecke & Meinecke-Tillman, 1979)와도 일치한다.

난구세포에도 hCG receptor의 존재를 증명하고 있어(Channing et al., 1981) hCG-receptor complex는 난구세포막상의 phospholipase C의 활성을 유도하여 cytoplasmic Ca^{++}증가를 일으켜 난구세포-난자복합체의 gap junction을 통해 난자에 Ca^{++}의 유입이 일어나 난자성숙분열을 일으키는 것이 아닌가 추정된다. 또 Bae와 Channing(1985)도 난구세포를 통한 Ca^{++}의 이전을 주장하고 있다. 즉 hCG처리로 여포를 싸고 있는 theca layer의 permeability를 증가시킴으로써 여포내로 hCG influx현상이 나타남으로써 follicular fluid내로 hCG이동 현상이 수반된다. In vivo에서는 outer theca layer에서의 capillary vessel에서부터 여포내로의 침출현상이 일어나 여포액내의 gonadotropin의 침출현상이 수반되는 현상과 비교된다. 다음 여포액내의 hCG는 cumulus cell(난구세포) 막상의 gonadotropin receptor와 결합하여(Channing et al., 1981;Amsterdam et al., 1979) cumulus cell의 plasma membrane상 phospholipase C를 활성화시켜 $InsP_3$(inositol 1, 4, 5-triphosphate) 및 DAG(diacylglycerol)를 생성케함으로써 cumulus cell내의 intracellular calcium reservoir에서 Ca^{++} release를 유도하여 cytoplasmic Ca^{++}의 증가현상이 일어난다(Berridge & Irvine, 1989). 결국은 cumulus cell과 난자와의 gap junction을 통해 난자로의 Ca^{++}의 이동현상이 일어나 궁극적으로 난자내 Ca^{++}의 증가가 유도된다. 이러한 난자세포질내 free-Ca^{++}의 증가가 난자의

분열을 유도한다. 즉 난자내 Ca^{++}이 난자의 성숙분열을 유도한다는 증명은 Bornslaeger et al. (1984)이 calmodulin inhibitor W7과 W13등을 이용하여 난자의 핵막붕괴를 억제하였으며 또한 EDTA첨가로 calmodulin modulated PDE activity를 50%감소시킴으로써 핵막붕괴를 억제한 난자에다 calmodulin 및 다량의 Ca^{++}을 주입함으로써 난자의 핵막붕괴를 다시 일으킬 수 있었다는 연구에서도 증명된다. Muallem et al.(1989)와 Tsien & Tsien(1990)의 주장대로 $InsP_3$도 gap junction을 통과할수 있어 난구세포에서 hCG-receptor complex에 의한 phospholipase C의 활성화로 증가된 $InsP_3$는 난자로 이동(난자막에서는 아직 hormone receptor의 존재가 인정되지 않고 있음)하므로서 난자세포질내 $InsP_3$의 증가로 난자내 calcium reservoir로부터 calcium을 release하여 난자내 세포질 Ca^{++}의 증가현상이 유발되어 난자의 성숙분열을 재개한다는 추정도 할 수 있겠다. 난자에서의 성숙분열이나(Bae & Channing, 1985) 여러 종류의 체세포에서도 마찬가지로 세포질내의 Ca^{++}의 증가현상이 반드시 유사분열의 유도작용 및 유사분열의 필수조건이라는 것은 극히 일반적인 견해이다(Tombes & Borisy, 1989;Ratan et al., 1988). 이 이외에도 Sasaki와 Hidaka(1982)는 Ca^{++} receptor인 calmodulin의 antagonist를 처리함으로써 celll cycle이 중지된(chinese hamster ovary)실험에서도 calcium이 DNA합성 및 유사분열과정에서 S phase에서 M phase로의 이전에 필수 불가결한 요소임이 증명되고 있다. 본 실험에서 hCG처리로 인한 난자성숙의 유도과정은 여포의 theca layer에서부터 투과도 증가에 의하여 많은 양의 Ca^{++}이 여포내로 influx되며 이차적으로는 난자와 난구 세포간의 coupling으로 인해 난자내로 Ca^{++} influx가 일어나는 것으로 해석된다. 이것은 hCG를 처리하지 않은 대조군에서의 $^{45}Ca^{++}$ uptake가 실험군에 비해 반정도밖에 되지않으며 난자성숙도 $^{45}Ca^{++}$ uptake에 비례하는 것으로 보아 알 수 있다. 이런 갑작스런 난자내로의 Ca^{++} 증가현상은 난자내에서 다른 대사과정을 증진시키어 감수분열이 재개되는 것으로 추정되며 특히 Ca^{++}은 microtubule의 형성에 관여하고 있어 Ca^{++} influx가 microtubule assembly의 평형을 깨뜨림으로서 microtubule형성을 촉진시키는데 이것도 감수분열 재개의 한 요인이라고 생각된다(Welsch et al., 1979;Marcum et al., 1978;Dyer & Benjamins, 1990).

그러나 dbcAMP나 IBMX에 의한 성숙억제효과는 생식소자극홀몬에 의해 감소(Dekel & Beers, 1978)되며 앞서의 난자와 난구세포사이에서의 uncoupling현상이나 난자성숙억제제에 의해 유도되는 난자와 난구세포간의 작용은 매우 깊은 관계가 있을 것으로 본다. 또 이와같은 사실로부터 난자성숙현상과 관련되어 난자막의 성질이 변화하고 있다는 것도 추정할 수가 있다.

한편 배양액에 gonadotropin을 첨가하여 배양하면 meiosis resumption외에 난구-난자복합체(cumulus-oocyte complex)사이의 coupling이 깨어져 uncoupling되지만 난자막의 변화는 일어나지 않는 것으로 추정되며 또 in vitro system에서 isolated follicle의 경우에도 cumulus-oocyte communication은 배란에 앞서 termination된다(Dekel et al., 1981;Gilula et al., 1978).

이상의 사실로부터 여포내의 난구세포(cumulus cell)가 난자성숙과정에서 중요한 역할을 하고 있음을 유추할 수 있게된다. 즉 난자의 자발적인 성숙이나 여포내에서의 성숙에는 난자의 투과력(permeability)의 증진이 일어나며 이때 난자내의 calcium이온농도가 증가하므로 난자성숙시 Ca^{++}의 필요성이 강조되는 것이다(Paleos & Powers, 1981;Sato et al., 1980;Maruska et al., 1984;Bae & Channing, 1985). 그러나 Ca^{++}농도증가로 인한 cAMP와의 평형에서 cAMP의 상대적 감소로 인하여 난자의 성숙과정이 재개될 수 있을 것이고 난자핵막붕괴에 필요한 lamin생성 microtubule assembly의 과정에 참여함으로서 난자의 성숙과정이 이루어진다(Dessev et al., 1991).

여포배양에서 난자성숙시 난자내 Ca^{++}의 증가현상은 gap junction과 intracellular store에서 release되는 Ca^{++}으로 추정된다. 그러나 Rana pipiens oocytes에서 입증된 것처럼(Morrill et al., 1980) 감수분열재개시 specific site로부터 calcium의 selective release와 reduced influx가 포유동물의 난자에도 해당될 수 있는 지는 아직 규명되지 않고 있다. 한편 Tsafriri와 Bar-Ami(1978)의 쥐 여포배양에서 Ca^{++} deficient medium에서 여포내 난자가 성숙한다고 한것은 이들이 사용한 Ca^{++} dificient medium은 사실상 Ca^{++} deficient medium이 아니라는 사실을 Bae와 Channing(1985)이 이미 지적한바 있다.

본 실험의 결과(표 1, 표 2)에 의하면 hCG의

처리로 인한 난자성숙과 $^{45}Ca^{++}$ uptake 사이에는 분명히 비례적인 상관관계가 있음을 확인할 수 있었고 EDTA는 external calcium이온을 chelating시켜 Ca^{++} uptake를 감소시킨다는 것을 알았으며, 아울러 이 과정은 Dosage-dependent process임도 확인하였다(표 3). 이와 같은 결과는 Bornslaeger et al.(1984)의 결과와 같다 하겠다. 결국 여포배양에서 exogeneous hCG가 난자성숙과정에 적어도 난자내로의 Ca^{++} uptake를 조절하고 있다는 것을 추정할 수 있으며, 또한 in vivo에서 LH surge로 인한 여포내난자의 성숙과 배란과정에서 LH surge에 의한 Ca^{++} uptake의 증가가 하나의 요인이 되고 있다는 것은 확실하다고 본다(Batta & Knudsen, 1980).

난자를 여포밖의 적당한 배양액에서 배양할 경우, LH와 hCG의 처리없이도 자발적인 성숙이 일어나는 것이 gap junction을 통한 Ca^{++}의 influx증가로 인한것으로 추정된다(Powers & Paleos, 1982;Bae & Channing, 1985). 그러므로 난자 성숙재개에 대한 여포내에서의 명확한 역할과 난자세포질내의 free calcium 및 bound calcium이 어떤 역할을 하는가에 대한 것도 앞으로 남은 과제라 생각하며 이에 대한 연구가 더욱 기대된다.

인 용 문 헌

Amsterdam A, Kohn F, Nimrod A, Lindner HR:Lateral mobility and internalization of hormone receptor to human chorionic gonadotropin in cultured rat granulosa cells. In:Advances in experimental medicine and biology, vol. 12:Ovarian follicular and corpus luteum function. Edited by Channing CP, Marsch J and Sadler WA. New York: Plenum Press, 1979.

Bae IH:Role of calcium in resumption of meiosis of cultured porcine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod* 1981, 24, 92.

Bae IH, Channing CP:Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized Graafian follicles. *Reprod Biol* 1985, 33, 79-87.

Bae IH, Cho WK:Oocyte maturation in some vertebrates and mammals(Review article). *Kor J Fert Steril* 1982, 9, 1-28.

Bae IH, Foote RH:Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. *J Reprod Fert* 1980, 59, 11-13.

Baker TG, Neal P:Gonadotropin-induced maturation of mouse Graafian follicles in organ culture. In:Oogenesis. Edited by Biggers JD and Schuetz AW, Baltimore, Maryland: University Park Press, 1972, pp. 377-296.

Batta SK, Knudsen JF:Calcium concentration in cumulus-enclosed oocytes of rat after treatment with pregnant mare's serum. *Biol Reprod* 1980, 22, 243-246.

Berridge MJ, Irvine RF:Inositol phosphates and cell signalling(Reviews). *Nature* 1989, 341, 197-205.

Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz RM:Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Devel Biol* 1986, 114, 453-462.

Bornslaeger EA, Wilde MW, Schultz RM:Regulation of mouse oocyte maturation:Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Devel Biol* 1984, 105, 488-499.

Channing CP, Bae IH, Stone SL, Anderson LD, Edelson S, Fowler SC:Porcine granulosa and cumulus cell properties:LH/hCG receptor, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. *Mol Cell Endocrin* 1981, 22, 359-370.

Cheek TR:Calcium regulation and homeostasis. *Current Opinion Cell Biol* 1991, 3, 199-205.

Crosby IM, Moor RM, Heslop JP, Osborn JC: cAMP in ovine oocytes:Localization of synthesis and its action on protein synthesis, phosphorylation and meiosis. *J Exp Zool* 1986, 234, 307-318.

De Felici M, Siracusa G:Survival of isolated, fully grown mouse ovarian oocytes is strictly dependent on external Ca^{++}. *Dev Biol* 1982, 92, 539-543.

Dekel N, Beers WH:Rat oocyte maturation in vitro:Relief of cAMP inhibition by gonadotropins. *Proc Natl Sci USA* 1978, 75, 4369-4373.

Dekel N, Lawrence TS, Gilura NB, Beers WH: Modulation of cell-to-cell communication in

the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev Biol* 1981, 86, 356-362.

Dessev G, Iovcheva-Dessev C, Bischoff JR, Beach D, Goldman R:A complex containing $p34^{cdc2}$ and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J Cell Biol* 1991, 112, 522-533.

Dyer CA, Benjamins JA:Glycolipids and transmembrane signaling:Antibodies to galactocerebroside cause an influx of calcium in oligodendrocytes. *J Cell Biol* 1990, 111, 625-633.

Edwards RC:Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocyte. *Nature* 1962, 208, 349-351.

Gilula NB, Epstein ML, Beers WH:Cell-to-cell communication. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* 1978, 78, 58-75.

Knightbridge A, Ralph RK : The control of growth of mouse mastocytoma cells by N^6, O^2-dibutyryl adenosine cyclic 3'-5'-monophosphate. *Mol Cell Biochem* 1981, 23, 153-164.

Kostellow AB, Morrill GA:Calcium dependence of steroid and guanine 3', 5'-monophosphate induction of germinal vesicle breakdown in Rana pipiens oocytes. *Endocrinology* 1980, 106, 1012-1019.

Leifried L, First NL:Effects of divalent cations on in vitro maturation of bovine oocytes. *J Exp Zool* 1979, 210, 575-580.

Marcum JM, Dedman JR, Brinkly BR, Means AR:Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75, 3771-3775.

Maruska DV, Leibfried ML, First NL:Role of calcium and calcium-calmodulin complex in resumion of meiosis, cumulus expansion, viability and hyalulonidase sensitivity of bovine cumulus-oocyte complexs. *Biol Reprod* 1984, 31, 1-6.

Meinecke B, Meinecke-Tillmann S:Effects of gonadotropins on oocyte maturation and progesterone production by porcine ovarian follicles cultured in vitro. *Theriogenology* 1979, 11, 351-365.

Moor RM, Heslop JP:Cyclic AMP in mammalian follicle cells and oocytes during maturation. *J Exp Zool* 1981, 216, 205-209.

Morrill GA, Ziegler DH, Kostellow AB:Kinetics of calcium efflux and exchange from Rana pipiens oocytes immediately following reinitiation of the first meiotic division:Comparision of various meiotic agonists and antagonists. *Cell Calcium* 1980, 1, 359-370.

Muallem S, Pandol SJ, Beeker TG:Hormone-evoked calcium release from intracellular stores is a quantal process. *J Biol Chem* 1989, 264, 205-212.

Neal P, Baker TG, McNatty KP, Scaramuzzi RJ:Influence of prostaglandins and human chorionic gonadotropin in progesterone concentration and oocyte maturation in mouse ovarian follicles maintained in organ culture. *J Endocrinology* 1975, 65, 19-25.

Paleos GA, Powers RD:The effect of calcium on the first meiotic division of the mammalian oocyte. *J Exp Zool* 1981, 217, 409-416.

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

Powers RD, Paleos GA:Combined effect of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *J Reprod Fert* 1982, 66, 1-8.

Racowsky C:Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of hamster oocyte-cumulus complexes. *J Exp Zool* 1985, 234, 87-96.

Ratan RR, Maxfield FR, Shelanski ML:Long-lasting and rapid calcium changes during mitosis. *J Cell Biol* 1988, 107, 993-999.

Sasaki Y, Hidaka H:Calmodulin and cell proliferation. *Biochem Bioph Res Comm* 1982, 104, 451-456.

Sato E, Iritani A, Nishikawa Y:Mechanism of inhibition of germinal vesicle breakdown in pig follicular oocytes with special reference to the role of granulosa cell layer. *Jap J Fert Steril* 1980, 25, 229-233.

Schultz RM, Montgomery RR, Belanoff JR: Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment of resume meiosis. *Dev Biol* 1983, 97, 264-273.

Tombes RM, Borisy GG: Intracellular free calcium and mitosis in mammalian cells: Anaphase arrest is calcium modulated, but is not triggered by a brief transient. *J Cell Biol* 1989, 109, 627-636.

Tsafriri A, Bar-Ami S: Role of divalent cations in the resumption of meiosis of rat oocytes. *J Exp Zool* 1978, 205, 293-311.

Tsien RW, Tsien RY: Calcium channels, stores and oscillations. *Ann Rev Cell Biol* 1990, 6, 715-760.

Wasserman WJ, Pinto LH, O'Connor CM, Dennis-Smith L : Progesterone induces a rapid increase in Ca^{++} in Xenopus laevis oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77, 1534-1536.

Welsh MJ, Dedman JR, Brinkley BR, Means AR: Effect of microtubule and microfilament inhibitors on localization in the mitotic apparatus. *J Cell Biol* 1979, 81, 624-634.