韓國家畜繁殖學會誌 17(2) : 75~83(1993)
Korean J. Animal Reprod.

Purine이 생쥐 미성숙난자의 핵성숙에 미치는 영향

I. 난핵포붕괴(GVBD)에 대한 Purine, 인간태아제대혈청 및 인간성숙난포액의 작용

지희준 · 고정재 · 이훈택 · 정길생
건국대학교 동물자원연구센터

Effect of Purine on Meiotic Maturation of Mouse Immature Oocytes

I. Actions of Purine, Human Fetal Cord Serum and Human Mature Follicular Fluid in Germinal Vesicle Break Down

Chi, H.J, J. J. Ko, H. T. Lee and K. S. Chung
Animal Resources Research Center ; Kon-Kuk University

SUMMARY

Purine has been identified in the preparation of follicular fluid and shown an activity in maintaining oocyte meiotic arrest. Therefore this study was performed to examine the inhibitory effect of purine on germinal vesicle break down(GVBD) in the presence and absence of human fetal cord serum(HFCS) or human mature follicular fluid(HMFF), as a protein source, *in vitro* culture.

Immature oocytes(GV stage) were collected from ovaries of 21~28 days old ICR mice by puncturing the antral follicles with a fine needle, at 48 hrs after PMSG injection. Some of the oocytes were denuded by drawing the cumulus-enclosed(complex) oocytes in and out of a pasteur pipet. Complex oocytes and denuded oocytes were cultured 3 hrs. in T6 media containing 0.75mM adenosine or /and 4mM hypoxanthine, with HFCS or HMFF. Their GVBD rates were observed at every 1 hr. during the culture time.

Both adenosine and hypoxanthine have shown a time-dependent inhibitory effect on GVBD in complex and denuded oocytes and the inhibitory effect was maximized in culture medium containing hypoxanthine and adenosine. HFCS and HMFF incresed the GVBD rates in the presence of the purines, thus HFCS and HMFF may contain a factor that could reverse the inhibitory effect of purines. Also complex oocytes were more sensitive to not only the inhibitory effect of purines but the promoting action of HMFF on GVBD than denuded oocytes. Therefore it was reconfirmed that granulosa cells play an important part in meiotic arrest and resumption.

I. 서 론

포유동물의 미성숙난자는 제1차 감수분열 전기의 dictyate stage에서 핵성숙이 억제되었다가 세포성장이 완료된 후 배란직전 gonadotropin surge에 의해 핵성숙을 재개한다. 또한 이러한 핵성숙이 억제된 미성숙난자를 인위적으로 난포로부터 회수하여 체외에

서 배양시키면 자발적인 핵성숙이 재개된다(Pincus and Enzmann, 1935; Edwards, 1962). 이러한 현상은 난포내에 존재하는 somatic components가 핵성숙 억제의 조절인자로서 작용을 하므로 이들로부터 난자를 분리하게 되면 그 억제작용으로부터 벗어나게되어 핵성숙이 재개되는 것이라는 보고(Chang, 1955)가 된 이래로 이와 같은 미성숙난자의 핵성숙억제에 관여하는 물질이나 이들의 작용기전을 규명하기 위한 많은 연구가 진행되어오고 있다.

Cho(1974), Wassarman(1976), Magnusson(1977), Dekel(1980)과Shults(1983)등에 의해 cAMP가 난자의 핵성숙 억제 및 재개에 결정적인 역할을 한다는 연구결과가 보고되었고 이 후 cAMP의 유사체로서 막투과성인 dibutyryl cyclic AMP(dbcAMP)를 비롯하여 cholera toxin, forskolin등의 adenylate cyclase activator 및 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX), hypoxanthine등의 phosphodiesterase inhibitor를 이용하여 난자의 핵성숙억제를 유발시킴으로써 이들의 연구결과를 입증하였다. 특히 Downs(1984)등은 돼지 난포액내에 핵성숙억제에 cAMP와 공동상승작용(synergy)을 갖는 물질이 함유되어 있음을 확인하였고 이 물질은 돼지, 설치류 등의 다태동물의 난포액내에 높은 농도로 함유되어 있으면서 직접 또는 cAMP의 수준을 조절하는 간접적인 방법으로 핵성숙억제에 관여하는 purine임을 보고하였다(Downs, 1985; Eppig, 1985). 이들 purine중 특히 hypoxanthine과 inosine monophosphate(IMP)의 xanthyl, guanyl 유도체 등이 가장 두드러진 억제효과를 나타낸다고 보고되고 있으며(Downs, 1986) 이들의 metabolic pathway에 관여하는 여러 enzyme 또는 이들의 inhibitor등을 이용한 체내, 체외실험을 통해 purine의 구체적이고 정확한 작용기전을 구명하려는 연구가 여러 연구자들에 의해 진행 중이다. 따라서 본 연구 역시 이들 purine을 이용하여 다각적인 측면에서 연구를 시도하여 이들 물질이 핵성숙억제에 관여하는 기전을 이해하고 이들의 억제효과를 극복시켜 핵성숙을 재개시키는 물질에 대한 접근을 위해 수행하였으며 그 기초적인 실험결과를 보고하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 미성숙 난자의 회수

21~28일령의 ICR계통의 생쥐에 5IU의 PMSG를 주사한 후 48시간째에 적출한 난소로 부터 성장이 완료된 난핵포기(germinal vesicle:GV) 단계의 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 난구세포(granulosa cell)에 둘러싸여 있는 복합구조 형태의 난자(complex oocyte)와 반복적인 pipetting에 의해 난자를 싸고 있는 난구세포를 제거시킨 나화된 형태의 난자(denuded oocyte)로써 본 연구에 공시하였다.

2. 난자의 배양

기초배양액으로는 modified Whittingam's T6 배양액을 사용하였으며 0.75 mM adenosine과 4 mM hypoxanthine등을 기초배양액에 단독 또는 혼용첨가하여 이들 물질의 핵성숙억제 효과를 조사하였다. 난자 체외배양시 단백질 공급원으로서 10% 또는 50%의 인간태아제대혈청(human fetal cord serum, HFCS)과 인간성숙난포액(human mature follicular fluid, HMFF)을 사용하였고, 이들 첨가 물질이 purine의 핵성숙억제 작용에 어떠한 효과를 나타내는지를 조사하였다. 특히 사용된 HMFF는 인간의 체외수정시술(human IVF)과정에서 난자채취시 LH surge의 영향을 받은 배란 직전의 graffian follicle로 부터 회수한 것이다. 난자의 배양은 37℃, 5% CO_2 배양기에서 3시간 동안 배양하면서 각 시간마다 이들의 난핵포붕괴(GVBD)를 광학현미경하에서 관찰하여 핵성숙 정도를 측정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Purine의 핵성숙(GVBD) 억제효과

기초배양액인 modified Whittingam's T6 배양액에 0.75 mM adenosine 과 4 mM hypoxanthine을 단독 또는 혼합첨가한 배양조건에서 일정시간 체외배양시 denuded, complex oocytes의 GVBD rate를 비교조사한 결과는 Fig. 1의 a, b에 각각 제시한 바와 같다.

Fig. 1 a에서 보는 바와 같이 대조구와 50% HMFF을 첨가한 배양액에서 배양된 난자들의 GVBD rates는 1시간만에 80%를 넘는 rate를 나타냈고 배

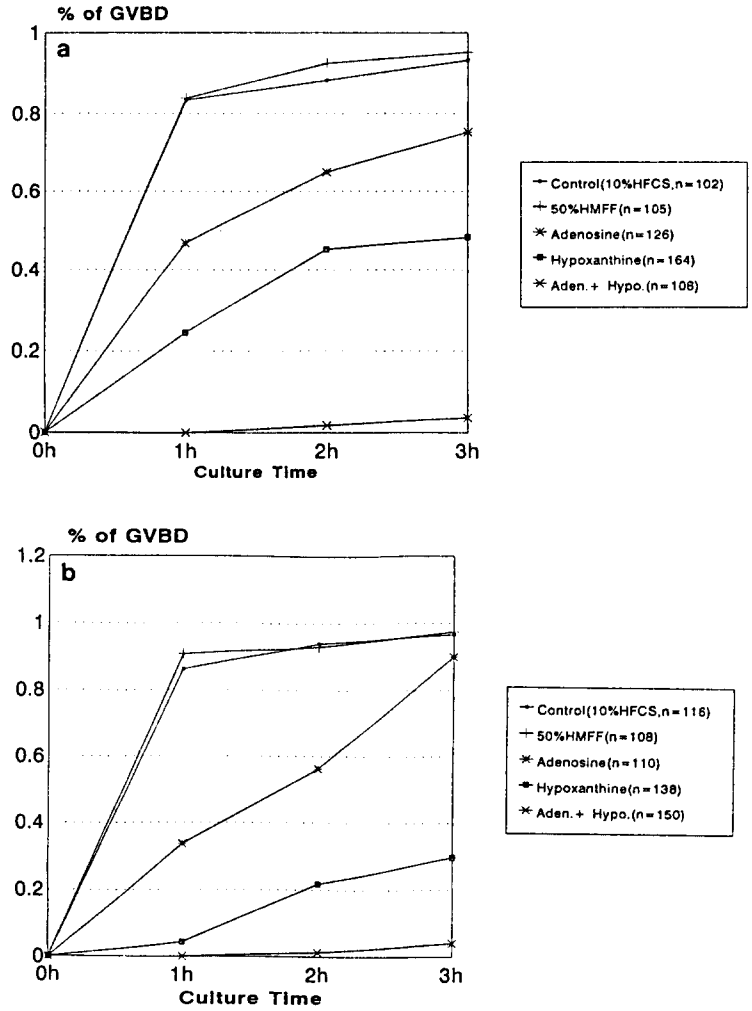

Fig. 1. Effects of purines on meiotic arrest. Denuded and cumulus-enclosed oocytes(complex oocytes) were cultured up to 3 hrs in media containing 0.75 mM adensine or/and 4 mM hypoxanthine. Denuded oocytes, (a); complex oocytes, (b). GVBD were assessed at every 1 hr.

양 3시간 후에는 각각 93%, 95%의 높은 GVBD rates를 나타낸 반면 adenosine, hypoxanthine등 purine이 첨가된 배양군에서는 상대적으로 현저히 낮은 GVBD rate를 나타냄으로써 GVBD 억제에 adenosine과 hypoxanthine이 공동상승작용을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 같은 실험을 complex oocytes를 이용하여 수행하였을 때의 결과를 Fig. 1 b에 제시하였다. Complex oocytes에서도 denuded oocytes에서 나타난 결과와 유사한 경향을 나타내었으나 adenosine이 첨가된 배양군에서 배양 3시간 후에는 핵성숙 억제 효과가 거의 상실되는 것을 관찰하였다. 따라서 핵성숙 억제작용을 하는 purine중 adenosine 보다는 hypoxanthine이 주된 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었으며 이들 purine의 억제효과는 시간의 경과에 따라서 점차 그 효과가 상실되어가는 시간의존적인 효과라는 것을 관찰할 수 있었

다. 이러한 결과는 Downs(1993)등이 보고한 바와 같이 hypoxanthine이 metabolic pathway를 거쳐 uric acid 등으로 분해되면서 그 억제효과가 상실된다는 보고와 일치한다. 한편 adenosine과 hypoxanthine의 공동상승작용은 Eppig(1985)등도 보고하였으나 아직까지 이에 대한 명확한 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다. 다만 hypoxanthine의 억제효과는 phosphodiesterase의 억제제로서 작용한다고 보고되었고(Downs, 1993) adenosine의 경우는 adenylate cyclase의 substrate로서 또는 adenylate cyclase의 stimulator로서 cAMP를 증가시키는 효과가 보고되었으나(Hall, 1981; Polan, 1983) adenosine의 analog로서 adenosine과 달리 낮은 대사작용의 특성을 갖는 2-chloroadenosine 역시 hypoxanthine과 함께 공동억제상승작용(synergistic inhibitory action)을 나타냄으로써 adenosine의 핵성숙억제작용은 그 대사산물이나 cAMP생산에 의존적이라기 보다는 adenosine 그 자체에 의한 것이라는 가능성이 제시되고 있다(Downs, 1986).

2. Hypoxanthine의 핵성숙 억제작용에 대한 HFCS, HMFF의 효과

핵성숙(GVBD)억제에 두드러진 효과를 나타낸 hypoxanthine에 HFCS 또는 HMFF을 동시에 첨가하였을 때 이들 첨가된 단백질공급원들이 hypoxanthine의 핵성숙억제 작용에 미치는 효과를 조사하여 Fig. 2에 제시하였다.

Fig. 2a는 denuded oocytes에서의 GVBD rate를 나타낸 것으로서 단백질공급원으로 사용된 HFCS 또는 HMFF를 첨가하였을 때 대조군인 무첨가군 보다 모두 유의하게 높은 GVBD rates를 나타냈다. 특히 10% HFCS 첨가군과 50% HMFF 첨가군에서 가장 높은 GVBD rate를 나타냈으며 이들 두 첨가군간의 유의차는 인정되지 않았다. Complex oocytes에서의 결과는 Fig. 2b에 제시하였다. Fig. 2a와 마찬가지로 무첨가군에 비해 첨가군에서 보다 높은 GVBD rates를 나타내었으며 특히 50% HMFF배양군에서 유의하게 높은 GVBD rate를 나타내었다. 이러한 결과들을 통해 HFCS, HMFF내에 hypoxanthine의 핵성숙 억제효과를 방해 또는 극복시키는 어떤 물질이 함유되어 있다는 것을 확인하였으며, 이러한 본 연구결과는 Downs (1989)등이 보고한 HFCS과 특히 HMFF내에 높은 수준으로 함유되어 있는 gonadotropins 또는 epidermal growth factor 등에 의해 hypoxanthine의 억제효과가 극복될 수 있다는 연구결과와 유사한 경향을 나타낸 것이었다.

한편 Fig. 2a, b의 결과에서 핵성숙 억제물질인 hypoxanthine의 작용을 감소시킨 HMFF의 효과는 denuded oocytes 보다는 complex oocytes에서 보다 sensitive한 반응을 나타내었으며 이러한 결과는 hypoxanthine 및 HMFF내에 존재하는 물질들의 난자내로의 유입되는 경로가 난자와 난구세포와의 gap junction에 의해 주로 이루어진다는 것 (Eppig, 1984; Downs, 1986)을 확인한 것이었다. 한편 이러한 promoting factor의 receptor가 주로 난구세포에 분포되어 있어 denuded oocyte 보다는 complex oocyte에 보다 민감한 반응을 나타낸다는 가능성도 앞으로 실험을 통해 확인해야 할 과제이다.

3. Adenosine과 hypoxanthine의 공동상승작용에 대한 HFCS, HMFF의 영향

핵성숙 억제에 있어서 adenosine과 hypoxanthine의 공동상승효과가 첨가된 HFCS과 HMFF에 의해 감소될 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여 denuded oocytes와 complex oocytes를 이용하여 실험한 연구결과는 Fig. 3a, b에 각각 제시한 바와 같다.

Fig. 3a는 4mM hypoxanthine과 0.75mM adenosine이 첨가된 배양액에서 denuded oocytes를 체외성숙시킬 때, adenosine과 hypoxanthine의 GVBD 억제효과에 HFCS와 HMFF의 첨가가 어떠한 영향을 나타내는지를 관찰한 것으로서 이전의 실험에서 hypoxanthine의 핵성숙 억제작용을 감소시키는데 유의한 효과를 나타낸 10%의 HFCS나 HMFF의 첨가군은 본 실험에서 그 효과가 인정되지 않았고 다만 50% HMFF첨가군에서 유의하게 높은 GVBD rate를 나타내었다. 이러한 결과는 adenosine과 hypoxanthine의 동시첨가로 인한 공동상승작용으로 강한 GVBD 억제효과에서 기인한 것으로, 이 두가지 종류의 purine에 의한 GVBD 억제작용을 감소시키기 위해서는 보다 높은 농도의 HFCS이나 HMFF의 첨가가 요구된다고 본다. 또한 complex oocytes에서의 결과인 Fig. 3b에서도 같은 유형을 나타냈으며 50%

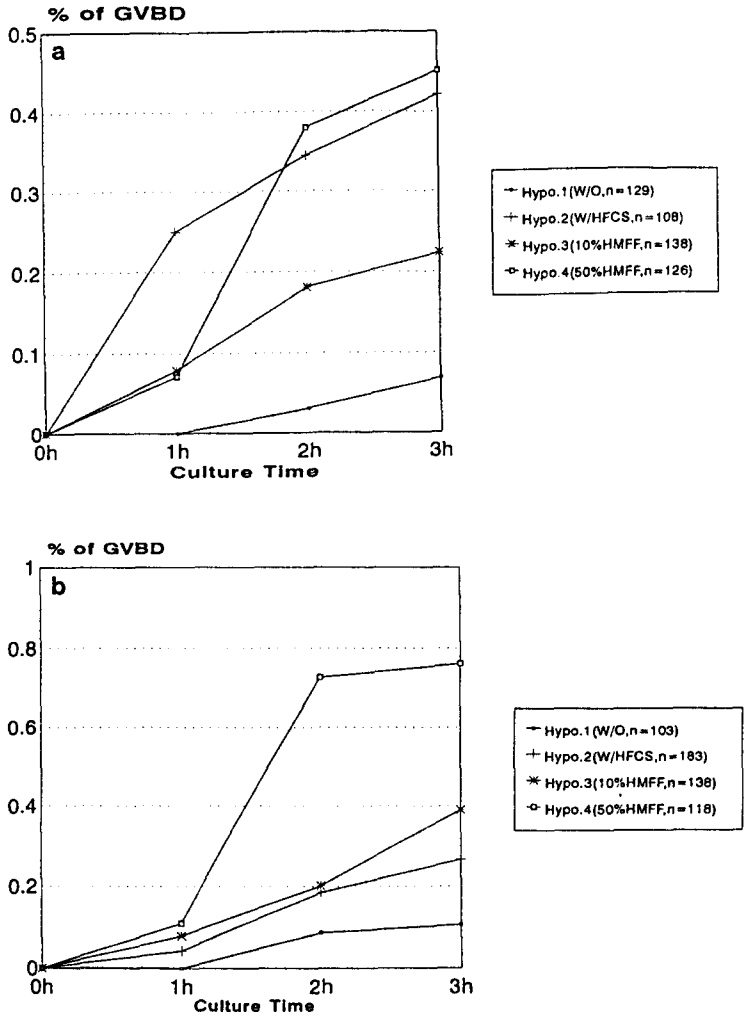

Fig. 2. Effects of HFCS, HMFF on GVBD in the presence of hypoxanthine. Denuded and complex oocytes were cultured up to 3 hrs in media containing 4 mM hypoxanthine with HFCS or HMFF. Denuded oocytes, (a); complex oocytes, (b). The promoting effects of HFCS and HMFF on GVBD were assessed at every 1 hr.

HMFF 첨가군에서 purine의 GVBD 억제효과를 감소시키는 현상은 denuded oocytes 보다는 complex oocytes 에서 우월하게 나타남으로써 gap junction을 통한 조절작용을 재입증하였다. 따라서 adenosine과 hypoxanthine의 GVBD 억제효과는 HMFF내에 존재하는 promoting factor의 적정농도에 노출되었을 때는 그 효과가 감소된다는 것을 확인하였으며 생체내와 같은 조건으로 HMFF를 100% 수준으로 높였을 때 이 감소효과는 더욱 증대될 것으로 사료된다. 또한 돼지의 미성숙난포로 부터 회수한 난포액은 cAMP와 GVBD 억제에 공동상승작용이 있다고 보고하였으나 (Downs, 1984), 본 연구에서 사용한 HMFF는 LH surge의 영향을 받은 graaffian follicle로 부터 회수한 난포액으로서 정반대의 효과를 나타냄으로써 LH surge가 이러한 난포액내의 promoting factor의 합성 또는 활성화 시키는 개시작용을 한다는 가능성을

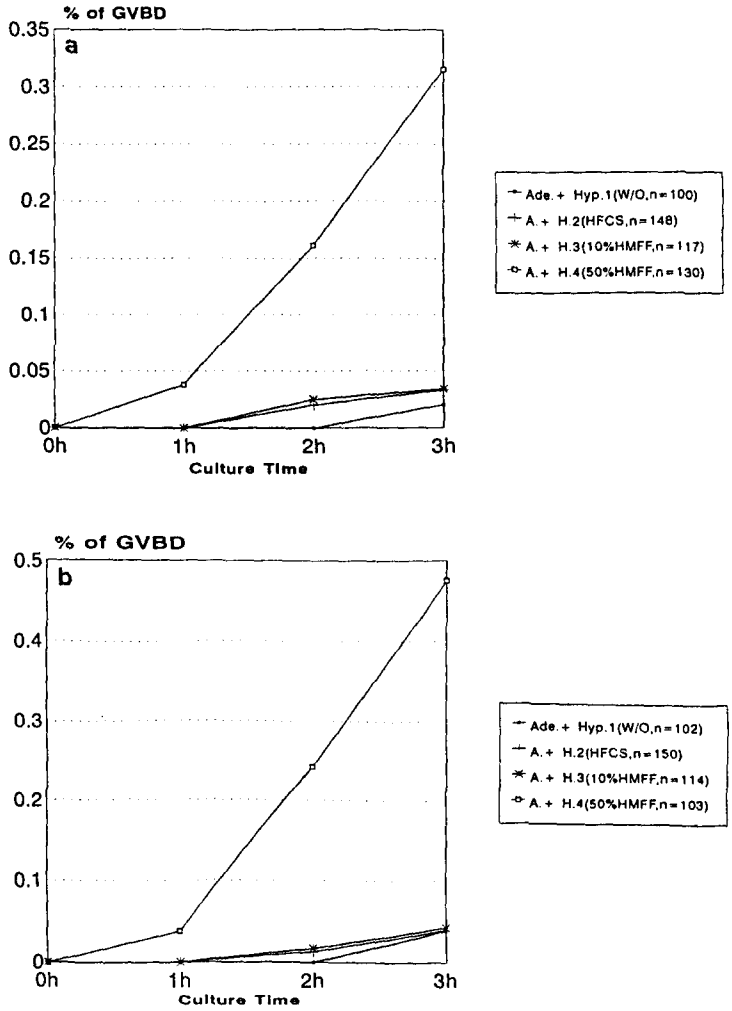

Fig. 3. Effects of HFCS, HMFF on the synergistic activity of adenosine and hypoxanthine. Denuded and complex oocytes were cultured for 3 hrs in media containing 0.75 mM adenosine and 4 mM hypoxanthine with HFCS or HMFF. Denuded oocytes, (a); complex oocytes, (b). The effects of HFCS, HMFF on GVBD were assessed at every 1 hr.

시사하였다.

그러나 다태동물인 돼지나 설치류보다 단태동물인 소 또는 사람의 난포액내의 purine의 농도가 상대적으로 낮다는 연구결과가 보고되었고 (Gad, 1990), 이 보고에 의하면 본 연구에서 purine의 억제효과의 감소에 유의한 성적을 나타낸 50% HMFF 첨가의 효과가 단순히 배양액내에 함유되어 있는 purine의 농도를 희석시켜 GVBD 억제효과를 감소시키는 효과라는 가능성을 완전히 배제할 수는 없었다. 이에 본 실험에서는 adenosine과 hypoxanthine이 혼합, 첨가된 배양액에 50% HFCS 또는 HMFF를 첨가한 군과, 이들의 대조군으로서 purine이 첨가되지 않은 기초배양액인 T6를 purine이 함유되어 있는 배양액과 1:1의 비율로 혼합하여 purine의 농도를 1/2로 희석시킨 다음 10% HFCS 또는 HMFF를 첨가한 군에서 denuded, complex oocyte의 GVBD rate를 비교조사함으로써

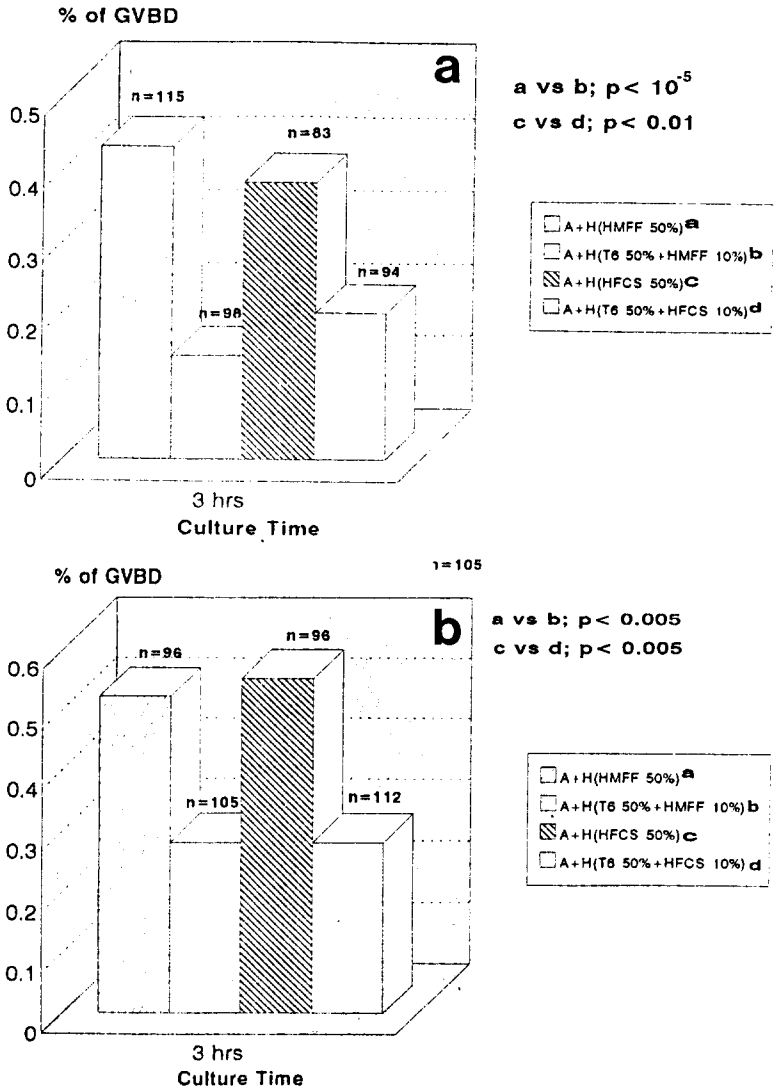

Fig. 4. The dilution effect of purine concentration by the addition of 50% HFCS, HMFF on GVBD. Denuded and complex oocytes were incubated for 3 hrs in media containing 0. 75mM adenosine and 4mM hypoxanthine with 50% HFCS or HMFF. And, as the controls, the media containing the half of the purines concentration with 10% HFCS or HMFF were used for oocytes culture. Denuded oocytes, (a); complex oocytes, (b). The groups were compared by χ^2 analysis.

purine의 존재하에서 50% HFCS 또는 HMFF의 첨가군에서의 GVBD rate가 purine의 농도희석에 의한 것인지, 이들 물질속에 함유되어 있는 GVBD promoting factors에 의한 것인지를 확인하고자 하였으며 그 결과를 Fig. 4에 각각 나타내었다.

Fig. 4에 나타난 바와 같이 denuded , complex oocyte 모두 50% 농도의 HFCS, HMFF 첨가군들에서 가장 높은 GVBD rate를 나타내었고 HFCS와 HMFF 첨가군간의 GVBD rate는 유의차를 나타내지 않았다. 그리고 10% HFCS, HMFF 첨가군에서

의 GVBD rate는 이들 물질의 50% 첨가군들에 비해 유의하게 낮은 GVBD rate를 나타내었으나 Fig. 3에 제시하였던 purine의 농도를 희석시키지 않은 배양액내의 10% HFCS, HMFF 첨가군에서의 GVBD rate에 비해 다소 높은 성적을 나타내었다. 이러한 결과를 통하여 50% HFCS, HMFF 첨가군에서의 purine의 GVBD억제작용의 감소효과가 어느 정도 purine의 농도희석에 의한 효과를 포함하고 있다는 것이 인정되나 이러한 농도희석에 의한 효과를 배제한 조건하에서도 HFCS, HMFF의 첨가농도에 따라 GVBD rate가 증가하는 결과를 나타냄으로써 이러한 감소효과의 주된 요인은 이들 물질들속에 함유되어 있는 GVBD promoting factors에 의한 것임을 재확인하였다.

한편 Sirad (1988)등은 인간의 난포액과 마찬가지로 purine의 농도가 돼지나 설치류보다 낮다는 소의 난포액도 소의 미성숙 난자의 핵성숙을 억제시킨다는 보고를 함으로써 인간 또는 소 등의 단태동물의 난자는 이들 다태동물의 난자 비해 낮은 농도의 purine에도 보다 민감한 억제반응을 나타낼 수 있다는 종특이적 차이의 가능성을 시사하여 주고 있다. 따라서 차후 인간의 small 또는 middle size의 난포로 부터 회수한 난포액을 이용하여 purine과 GVBD현상에 어떠한 상호작용을 나타내는지를 조사하고 일정농도의 purine에 대하여 다른 종간의 난자들이 어떠한 반응의 차이를 나타내는지를 조사하고자 한다.

Ⅳ. 적 요

본 연구는 21~28일령의 ICR mice로 부터 미성숙 난자를 회수하여 이들의 형태적 특성에 따라 denuded oocytes와 complex oocytes로서 분류하여 본 연구에 사용하였고 0.75mM adenosine과 4mM hypoxanthine등이 단독 또는 혼합첨가된 배양액내에서 3시간 동안 체외배양하면서 이들 물질의 핵성숙 억제효과를 조사하고자 하였으며 이들의 핵성숙 억제작용에 단백질 공급원으로 첨가된 HFCS과 HMFF등이 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고자 본 연구를 수행하였다.

본 연구에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 핵성숙 억제효과는 adenosine과 hypoxanthine이 혼합 첨가된 배양액에서 가장 현저하게 나타냄으로써 이 두 물질이 핵성숙 억제에 있어서 공동 상승작용을 갖는다는 것을 확인하였다.
2. 단백질 공급원으로 첨가된 HFCS나 HMFF는 purine의 핵성숙 억제효과를 감소시키는 효과를 나타내었으며 이는 HFCS나 HMFF내에 purine의 억제효과를 극복시키는 어떤 물질이 함유되어 있다는 것을 확인하였다.
3. Complex oocytes는 purine의 핵성숙 억제작용 및 HMFF의 이 억제작용에 대한 극복효과에 대해 denuded oocytes보다 더 민감한 반응을 나타내었다. 이는 난자의 핵성숙에 난구세포가 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다고 하겠다.

Ⅴ. 인용문헌

1. Pincus and Enzman. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vitro* and *in vivo*. I. The activation of ovarian eggs. J. Exp. Med. 62:665-675.
2. Edwards, R. G. 1962. Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. Nature. 196:-446-450.
3. Chang, M. C. 1955. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. J. Exp. Zool. 28:379-405.
4. Cho, W. K. 1974. Inhibitory effect of dbcAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. J. Exp. Zool. 201:383-386.
5. Wassarman, P. M. 1976. Meiotic maturation of mouse oocyte *in vitro*:Inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. J. Cell. Sci. 22:531-545.
6. Magnusson, C. 1977. Inhibition of maturation and metabolism in rat oocytes by cAMP. J. Exp. Zool. 201:139-147.
7. Dekel, N. 1980. Development of the rat oocytes *in vitro*:Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the

cumulus oophorus. Dev. Biol. 75:247.

8. Shults, R. M. 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation : Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein in dephosphorylation in commitment to resume meiosis. Dev. Biol. 97:264-273.
9. Downs, S. M. 1984. Cyclic AMP and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. Endocrinol. 114-2 :418-427.
10. Downs, S. M. 1985. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation: A low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:454-458
11. Eppig, J. J. 1985. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: Concentration and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. Biol. Reprod. 33:1041-1049.
12. Downs, S. M. 1986. Maintenance of murine oocyte meiotic arrest : Uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by cumulus cell-enclosed and denuded oocytes. Dev. Biol. 117:174-184.
13. Downs, S. M. 1993. Purine control of mouse oocyte maturation: Evidence that non-metabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. Mole. Reprod. Dev. 35:82-94.
14. Hall, A. L. 1981. Purine amplication of luteinizing hormone action in ovarian luteal cells. J. Biol. Chem. 256:10390-10398.
15. Polan, M. L. 1983. Adenosine amplifies follicle-stimulating hormone action in luteal cells of rat and human ovaries. J. Clin. Endocrinol. Metab. 56:288-294.
16. Downs, S. M. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. Biol. Reprod. 41:371-379.
17. Eppig, J. J. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. Biol. Reprod. 30:1-11.
18. Gad, L. 1990. Purine levels and metabolism in human follicular fluid. Human. Reprod. 5-5:529-532.