

**Studies on the Effects of Follicular Environment and Human Chorionic  
Gonadotropin (hCG) on the Maturation of Rat Oocytes**

**Kyung Ah Lee, Kun Soo Rhee and Wan Kyoo Cho**  
(Department of Zoology, Seoul National University)

흰쥐 난자의 성숙에 미치는 여포환경 및 hCG의 영향에 관한 연구

이 경 아 · 이 건 수 · 조 완 구  
(서울대학교 자연과학대학 동물학과)  
(Received August 5, 1985)

---

**ABSTRACT**

It has been found that the rat oocytes maintain germinal vesicle (GV) in general in the follicles either untreated or punctured, or in the foreign follicles for 17 hours culture unless they are cultured in the medium supplemented with human chorionic gonadotropin (hCG). That is, the proportion of oocytes with GV was in range of 88.8% and 95.2% in the plain medium, and on the other hand, only 11.1% to 19.4% of the oocytes were intact with GV when the follicles were exposed to hCG. The experiments with the oocytes which had once been cultured in the presence of dbcAMP or IBMX, and returned to the follicles for the additional culture showed almost the same results as above. That is, when the oocytes exposed to dbcAMP or IBMX for a certain length of period had been returned to the follicles, and set the additional culture, their maturation continuously suppressed even in the cultivation in the plain medium in which most of the oocytes usually resume meiosis. That is, despite of the cultivation in the plain medium, the oocytes transferred into the follicles failed to start maturation division, while the oocytes once exposed to the inhibitors immediately resume their maturation process in the inhibitor-free medium. Thus, it is apparent that the follicles provide inhibitory environment to the oocytes, and the inhibitory function is nullified by the presence of hCG.

---

본 연구는 1983년도 문교부 기초과학연구 육성연구비의 지원을 받아 행하여진 것임.

## 서 론

포유류 난소로부터 적출한 그라아프 여포(Graafian follicle)를 배양하면 *in vivo*에서와 마찬가지로 난자의 성숙은 억제된 상태로 있으며, 이때 배양액에 생식소 자극 호르몬을 첨가하면 난자의 감수분열이 재개된다(Baker and Neal, 1972; Tsafiriri *et al.*, 1972; Lindner *et al.*, 1974; Hillensjö, 1976). 그러나, 그라아프 여포로부터 적출한 난자를 적당한 배양액에서 배양하면 생식소 자극 호르몬의 존재에 관계없이 성숙이 일어난다(Pincus and Enzmann, 1935; Edwards, 1962). 이 사실은 여포환경이 난자의 성숙을 억제하는 억제기능을 가지고 있으며 생식소 자극 호르몬은 이 효과를 극복하여 난자의 성숙재개 현상이 일어나는 것임을 시사한다.

난자내의 cAMP 농도가 난자의 성숙조절기작에 관련하고 있다는 사실은 여러 학자가 보고하고 있다. 배양중인 난자에 dbcAMP, phosphodiesterase(PDE) 억제제 또는 adenylyate cyclase 활성제 등을 처리하였을 때 이것들은 공통적으로 난자의 자가성숙을 억제하며(Cho *et al.*, 1974; Cho, 1976; Wassarman *et al.*, 1976; Magnusson and Hillenjö, 1977; Vivarelli *et al.*, 1983; Ekholm *et al.*, 1984; Sato and Koide, 1984), 또한 배양액내에서 자가성숙을 하는 생쥐난자에서는 성숙초기에 난자내의 cAMP농도가 낮아진다(Vivarelli *et al.*, 1983). 위의 결과들로부터 공통적으로 발견되는 것은 배양중인 난자내의 cAMP농도가 높을 때에 난자의 성숙이 억제된다는 것이다.

여포로부터 난자를 꺼내어 dbcAMP, PDE억제제 또는 adenylyate cyclase활성제 등이 첨가된 배양액에서 배양할 경우, 난자내의 cAMP농도가 높게 유지됨으로서 자가성숙이 억제되는데, 만약 역으로 위와 같은 성숙억제제가 들어있는 배양액에서 배포(GV)를 유지하던 난자를 여포에 되돌려 넣었을 경우에도 계속 배포가 유지 된다면 *in vitro*에서 성숙억제제에 의하여 억제되는 것과 여포내부환경에서 성숙이 억제되는 것은 서로 같은 원인에 의한 것이라고 생각할 수 있다. 즉, 여포안의 난자가 성숙하지 못하고 GV를 유지하는 것은 여포환경에 의하여 난자내의 cAMP농도가 높게 유지되기 때문이라고 추론할 수 있다. 이러한 가정을 검증하기 위하여 dbcAMP, PDE억제제인 3-isobutyl-1-methyl-xanthine(IBMx)으로 얼마간 그 성숙이 억제되었던 난자를 여포내에 다시 넣어 배양하면서 그 때의 난자성숙양상을 조사하여, 성숙억제제에 의한 억제효과와 여포환경에 의한 억제효과를 비교하고, 아울러 난자성숙 유발원인 human chorionic gonadotropin(hCG)이 배양중인 여포내에 들어있는 난자에 어떠한 영향을 주는가를 조사하여 hCG와 여포의 억제효과와의 연관 관계를 규명하기 위하여 본 연구를 행하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 실험동물

본 실험에는 생후 28~30일 되는 Sprague-Dawley strain의 흰쥐가 사용되었다. 8 I.U.의 pregnant male's serum gonadotropin(PMSG : Sigma)를 0.2 ml의 0.9% 생리식염수에 녹여 복강주사하고 46시간 뒤에 도살한 후 개복하여 난소를 얻었다.

## 2. 배양액

실험에 사용된 기본배양액은 modified Hank's balanced salt solution(MHBSS)이며 그 조성은 NaCl(101.61 mM), KCl(5.82 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.42 mM),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.25 mM),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.77 mM),  $\text{NaHCO}_3$ (2.08 mM), glucose(5.82 mM), Na-lactate(2.36 mM), Na-pyruvate(0.31 mM), penicillin(100 I.U./ml), streptomycin(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), phenol red(10 mg/l) 등이다. 여기에 0.4% bovine serum albumin(BSA: Sigma)와 배양액내에서 여포를 처리하는 시간동안 배양액의 pH를 일정하게 유지하기 위하여 21 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethane-sulphonic acid(HEPES: Sigma)를 첨가하고 0.3 N NaOH로 pH 7.3이 되도록 적정하여 사용하였다.  $\text{N}^6, \text{O}^2'$ -dibutyryladenine 3':5'-cyclic monophosphate(dbcAMP: Sigma) 5 mg을 MHBSS 1 ml에 녹였고 3-isobutyl-1-methyl-xanthine(IBMx: Sigma)는 0.3 N NaOH에 녹여 20 mM이 되게 하였으며 human chorionic gonadotropin(hCG: Sigma)의 경우는 250 I.U.를 phosphate buffered saline(PBS) 1 ml에 녹였다. 이러한 억제제와 호르몬의 저장용액은 사용할 때까지  $-20^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 또 실험에 사용한 모든 기구는 건열 혹은 고압멸균 하였으며 배양액은 사용직전에 Millipore membrane(pore size 0.45  $\mu\text{m}$ : Millipore Co.)으로 여과·멸균하였다.

## 3. 여포배양방법

해부현미경 아래에서 날카로운 핀셋을 이용하여 직경 1 mm 내외의 그라아프 여포를 난소로부터 유리하였다. 이 여포들을 새로운 배양액으로 세번 씻어준 다음, Jensen (1964) 등의 기관배양법을 다소 변형한 방법으로 배양하였다. 즉, 배양접시(60×15 mm, Falcon)에 습도를 조절하도록 2 ml의 증류수로 적신 해면대를 놓고 그 위에 1 ml의 배양액이 담긴 시계접시를 얹어 놓은 후에 시계접시 안에 Steel grid(Falcon)를 놓고 그 뒷 표면에 Tea bag paper를 깔고 다시 그 위에 여포를 놓아 여포가 직접 배양액에 잠기지 않고 배양액의 얇은 막이 여포위를 덮도록 하였다. 배양접시의 여포는  $37^\circ\text{C}$ 를 유지하며 5%  $\text{CO}_2$ 를 포함한 습기찬 공기가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다.

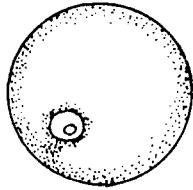
## 4. 난자배양방법

해부현미경 아래에서 그라아프 여포를 날카로운 바늘로 찢어 그 속에 들어 있는 난자를 배양액 안으로 추출한 후, 난구 세포가 매우 조밀하게 둘러 싸고 있으면서 GV가 뚜렷한 건강한 난자만을 골라서 실험에 사용하였다. 배양할 난자는 기본배양액으로 세번 씻어준 다음 Microtube culture method(Cho, 1974)에 의하여 배양하였다. 즉, 내경 0.7 mm, 길이 5 cm 가량의 유리관의 중앙부위에 1 cm 가량되도록 배양액을 채우고 그 속에 5~10개의 난자를 삽입하고 유리관의 양쪽 끝은 paraffin oil로 막아 배양기 내에서 일정기간 배양하였다.

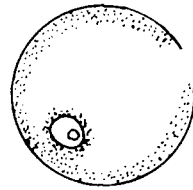
## 5. 배양여포의 종류

여포내의 난자의 상태가 어떻게 달라지는가를 보기 위하여 여포를 다음과 같이 세가지로 처리하였다. 난소로부터 유리한 후 아무런 처리를 가함이 없이 그대로 배양한 여포(follicle not treated: FNT), 여포막의 한쪽을 날카로운 바늘로 찢어서 직경 300  $\mu\text{m}$  정도의 구멍만을 내고 배양한 여포(punctured follicle: PF), 그리고 여포막의 한쪽을 바늘로 찢어서 그 속에 들어 있는 난구 세포와 난자의 복합체(COC)를 빼내고 대신 다른 여포로부터 얻은 COC를 이식하고 배양한 여포(foreign follicle: FF)의 세가지 종류의 여포를 구분하여서 배양하였다. 경우에 따라서는 COC를 일정시간 동안 각종 배양액내에서 배양한 후 다른

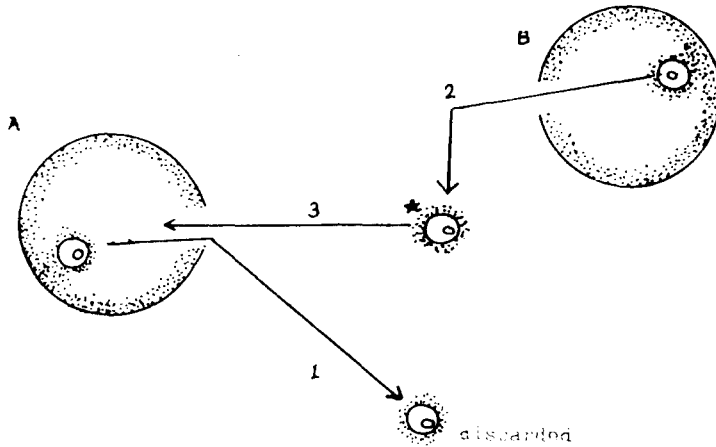
oocyte in  
follicles not treated(FNT)



oocyte in  
punctured follicles(PF)



oocyte in  
foreign follicles(FF)



**Fig. 1.** Illustration of the preparation of follicles described in the text. The oocyte marked by an asterisk was removed from the follicle and transferred into the foreign follicle immediately or after a given period of the culture according to the experimental protocol.

여포내로 이식하였다. 배양기간중 COC를 다룰때에는 mouth-operated capillary pitette을 이용하였다. 여포에서 난자를 꺼내어 다른 여포로 옮겨 넣는 것은 일부이 넘지 않도록 하였다 (Fig. 1).

6. 핵상관찰

정해진 시간 여포 배양이 끝나면 여포를 파열하여 그 속의 난자를 적출하여 acid-alcohol로 고정하고 0.5% lacmoid용액으로 염색한 후 위상차 현미경(Wild)으로 관찰하였다. 대조군과 실험군간의 통계적 검토는 Students' T-test에 의하였다.

결 과

여포로부터 얻은 난자를 다른 여포에 넣어 배양하면서 난자성숙의 양상을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Table 1). FNT를 기본배양액에서 배양할 경우 그 안의 난자는 17

**Table 1.** Proportion of the rat oocytes in the punctured follicles or in the foreign follicles after culture in the presence or absence of hCG (5 I.U./ml) for 17 hours.

Oocyte in <sup>1)</sup>	hCG	No. of follicles cultured	No. of oocytes with GV <sup>2)</sup>	% of oocytes with GV <sup>3)</sup>
FNT	—	20	19	94.4±4.8
	+	17	1	11.1±9.6
PF	—	15	14	95.2±4.1
	+	15	2	16.7±8.4
FF	—	16	14	88.8±9.6
	+	13	2	19.4±8.7

1) Illustration of the abbreviations described under Materials and Methods.

2) GV: germinal vesicle

3) Values are mean ±S.D.

시간 배양이 끝날 때까지 94.4%가 GV를 유지하였고, PF나 FF의 난자도 95.2%, 88.8%의 GV를 유지하였다. 그러나 배양액에 5 I.U./ml의 hCG를 첨가할 경우에는 FNT내의 난자는 11.1%, PF내의 난자는 16.7%, FF내의 난자는 19.4%가 GV를 유지하고 있을 뿐, 나머지는 모두 성숙분열에 들어가고 있음을 보여주었다. 이것은 여포에 구멍을 내거나 난자를 바꾸어 넣어도 역시 난자성숙은 여포환경에 의하여 억제되지만 hCG를 첨가하면 여포의 억제효과가 감소되는 것을 알 수 있다.

Table 2에는 dbcAMP가 들어 있는 배양액에서 COC를 4시간 동안 배양한 뒤, 이를 미리 COC를 적출한 다른 여포에 옮겨 넣어 17시간을 계속 배양하면서 난자성숙에 미치는 dbcAMP의 전배양의 영향과 아울러 배양액에 첨가된 hCG의 영향을 관찰하고 그 결과를 실었다. 이 표를 보면 여포를 hCG가 없는 배양액에서 배양하였을 때, FNT의 경우와 dbcAMP로 전배양을 한 후 다른 여포에 넣었을 경우 모두 86.1%~100%의 난자가 성숙분열에 들

**Table 2.** Nuclear phases of the oocytes cultured within the foreign follicles for 17 hours in the presence or absence of hCG (5 I.U./ml) after preculture in the medium containing dbcAMP (500 ug/ml) for 4 hours.

Oocyte in <sup>1)</sup>	hCG	No. of follicles cultured	% of oocytes <sup>2)</sup>			
			GV	MI-TI	MII	Deg. <sup>3)</sup>
FNT	—	37	100	0	0	0
	+	29	12.7±5.5	19.1±8.3	58.8±17.9	9.4±4.6
FF	—	32	93.3±5.8	0	6.7±5.8	0
	+	23	8.5±3.8	50.8±6.9	32.3±11.6	8.5±3.8
FF-D <sup>4)</sup>	—	21	86.1±6.4	4.2±3.6	4.2±3.6	5.6±4.8
	+	20	13.1±6.3	32.5±8.9	54.4±12.8	0

1) Illustration of the abbreviations described under Materials and Methods.

2) Values are mean±S.D.

3) GV: germinal vesicle, MI-TI: metaphase I-telophase I, MII: metaphase II, Deg.: degeneration

4) Oocytes in foreign follicles after preculture in the dbcAMP medium.

**Table 3.** Nuclear phases of the oocytes cultured within the foreign follicles for 17 hours in the presence or absence of hCG (5 I.U./ml) after preculture in the medium containing IBMX (0.2 mM) for 4 hours.

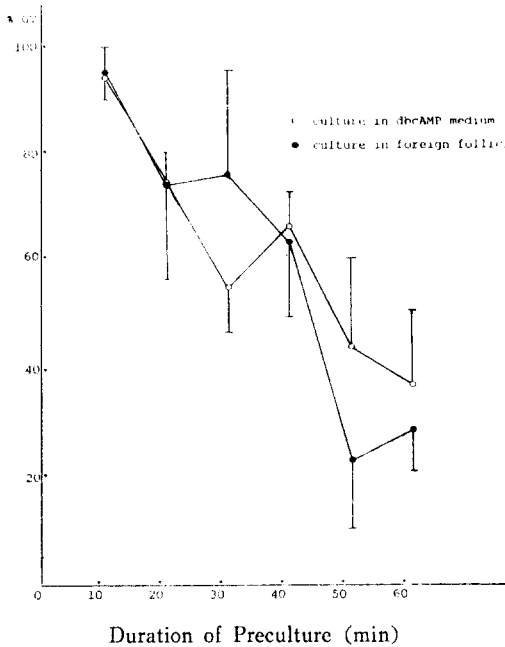
Oocyte in	hCG	No. of follicles cultured	% of oocytes			
			GV	MI-TI	MII	Deg.
FNT	-	16	100	0	100	0
	+	16	0	0	100	0
FF	-	12	91.7±7.2	0	8.3±7.2	0
	+	13	0	0	100	0
FF-X <sup>1)</sup>	-	13	85.0±6.6	0	15.0±6.6	0
	+	14	6.7±5.8	0	86.7±11.5	6.7±5.8

1) Oocytes in the foreign follicles after preculture in the IBMX medium.

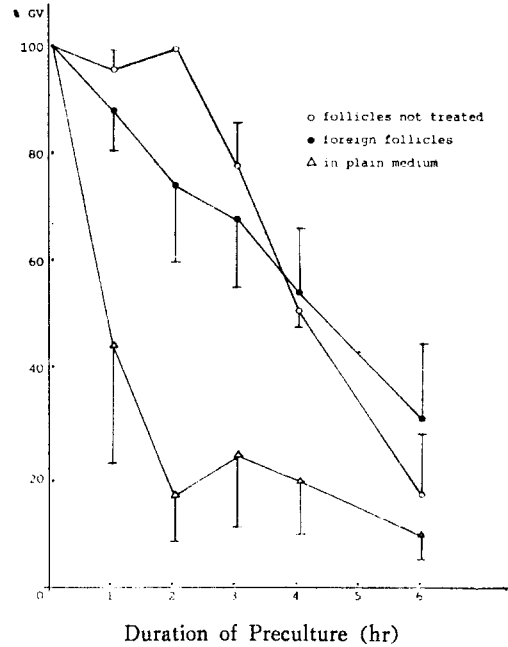
여가지 못하고 GV상태를 보여주고 있다. 그러나 이 여포들은 일단 hCG가 들어있는 배양액에서 배양하면 8.5%~13.1%가 GV를 보일뿐, 대부분의 여포내 난자는 성숙분열에 들어가서 17시간 후면 dbcAMP로 전배양한 경우에는 54.4%, 전배양없이 직접 옮겨 넣는 경우는 32.2%가, 그리고 FNT인 경우라고 하더라도 58.8%의 난자가 여포내에서 Metaphase II까지 성숙하였다.

Table 3에는 IBMX가 첨가된 배양액에서 전배양한 난자를 미리 난자를 제거한 다른 여포 내로 이식한 뒤 기본 배양액에서 계속 배양하면서 여포 내의 난자성숙 양상을 관찰하고 이에 대한 hCG의 영향을 아울러 관찰한 결과를 실었다. 그 결과를 보면 dbcAMP배양액에서 전배양했던 경우(Table 2)와 같은 경향을 보여 주고 있다. hCG가 없는 배양액에서는 85%~100%의 여포내 난자가 그대로 GV로 머물러 있지만 hCG가 들어 있는 배양액에서 배양하면 FNT의 난자나 전배양없이 다른 여포에 옮겨 넣은 난자는 1%가 Metaphase II로 성숙하였고, IBMX로 전배양한 경우라 하더라도 hCG의 존재 아래에서 여포내 난자는 86.7%가 Metaphase II까지 성숙하였다. 만일에 난자를 dbcAMP나 IBMX가 들어있는 배양액에서 4시간 전배양한 뒤 다른 여포로 옮겨 넣어서 17시간을 배양할 경우 대부분이 GV를 유지하지만 성숙억제제에서 전배양하던 난자를 이것들이 들어 있지 않은 기본 배양액으로 옮겨 17시간을 배양했을 때에는 12.7%, 5.6%의 난자만이 GV를 지니고 있을 뿐 거의가 감수분열에 들어갔다. 결국 dbcAMP나 IBMX의 진처리에 의하여 성숙이 억제된 난자는 여포내에 다시 옮겨 집으로서 그 억제상태가 지속되지만 그렇지 않고 기본배양액으로 옮겨 배양을 계속하면 억제상태에서 벗어나 성숙분열에 들어감을 알 수 있다.

Fig. 2에는 여포로부터 적출한 난자를 먼저 기본배양액에서 배양하면서 매 10분 간격으로 60분에 이르기까지 배양난자의 받은 dbcAMP가 들어있는 배양액으로, 나머지 받은 여포 내로 옮겨 넣고 4시간 동안 계속 배양한 후 난자의 핵상을 관찰한 결과를 나타낸 것이다. 이 결과를 보면 dbcAMP나 여포 환경의 난자 성숙 억제 효과는 난자를 사전에 기본배양액에서 배양한 시간의 길이에 비례하여 약해졌으며 dbcAMP 및 여포환경의 억제효과는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 즉, 10분을 기본배양액에서 배양하던 난자를 dbcAMP가 첨가된 배양액 또는 여포 내로 옮겨 넣어서 배양했을 때, GV를 갖는 난자의 비는 95%가 되지만, 기본 배양액에서 배양하던 시간이 길어질수록 억제효과는 점차 감소하여 50분



**Fig. 2.** Effect of duration of preculture in the plain medium on the meiotic resumption of oocytes under the inhibitory environment. Oocytes were precultured in the plain medium during 10~60 minutes, then transferred and cultured in the dbcAMP medium or in the foreign follicles further 4 hours.



**Fig. 3.** Meiotic behavior of oocytes cultured in the foreign follicles. Oocytes were cultured in their own follicles or in the foreign follicles in the presence of hCG (○, ●), and oocytes liberated from the follicles were cultured in the plain medium without hCG (△). Figure shows that meiotic behavior of the oocytes in the foreign follicles (●) is similar to those in their own follicles (○) rather than those matured spontaneously (△).

을 기본배양액에서 배양한 난자를 dbcAMP배양액이나 여포내에서 계속 배양할 경우 20%~45%의 난자가 GV를 유지하고 나머지는 모두 감수분열에 들어가고 있음을 보여준다.

Fig. 3은 배양액에 첨가된 hCG가 FNT의 난자와 FF의 난자성숙에 어떻게 영향을 주는지를 살펴 본 결과를 나타낸다. FNT이거나 FF이거나 간에 그 안의 난자들은 모두 hCG에 민감하게 반응을 하여 배양 1시간 뒤의 GV난자의율이 90%에 이르던 것이 6시간이 지나면 20%~30%가 GV이고 나머지는 감수분열에 들어갔다. 그러나 여포로부터 적절한 난자를 기본배양액에서 배양할 경우에는 배양액내에 hCG가 존재하지 않아도 난자성숙은 유도되어 배양 1시간 후의 GV난자의 비율은 44%, 2시간 후는 18%가 되며, 6시간 후에는 10%만이 GV를 유지하고 나머지는 모두 germinal vesicle break down(GVBD)를 일으키고 있었다. 이 실험결과를 보면 FF내의 난자는 FNT내의 난자와 유의한 차이 없이 hCG의 영향을 받아서 성숙이 유도되었지만 기본배양액에서 배양한 난자는 앞의 경우보다 빠른 속도로 성숙이 유도되는 것을 볼 수 있다.

## 고 찰

그동안 여러 학자들의 연구에 의하여 여포 내의 난자는 LH의 영향이 없는 한 성숙이 억제된 상태로 있으며(Baker and Nerl., 1972; Tsafiriri *et al.*, 1972; Hillensjö, 1976), 일단 난자가 여포로부터 축출되면 LH와는 관계없이 기본배양액에서 즉시 성숙분열에 들어간다는 사실이 밝혀졌다(Pincus and Enzmann, 1935; Edwards, 1962). 여포로부터 축출된 난자들은 cAMP의 유사물질인 dbcAMP(Cho *et al.*, 1974), phosphodiesterase억제제인 theophylline(Cho *et al.*, 1974) 또는 IBMX(Vivarelli *et al.*, 1983)가 첨가된 배양액 내에서 성숙이 억제된다는 사실도 밝혀졌다. 이 같은 사실을 근거로 하여 여러 학자들은 여포내에 난자성숙의 억제인자가 있을 것으로 추정하고 이 인자를 밝히기 위한 실험을 활발히 진행하여 왔다.

Cho and Lim(1976)에 의하면 여포액의 dialysable fraction은 거의 amino acid로 이루어져 있으며 소의 난자성숙을 촉진하였으나, non-dialysable fraction은 오히려 난자의 성숙을 억제하고 있으며 이 결과로 보아 이들은 난자성숙억제인자는 여포액내의 macromolecule이 될 것이라고 주장하였다. 한편, Channing and Tsafiriri(1975) 등은 여포액을 분석한 후 여포액내의 granulosa cell이 기원인 분자량이 약 2000정도의 난자성숙 억제인자가 있다고 보고하였으나 아직도 그 존재가 확인되지는 못하고 있다.

이제까지 시행된 여포와 난자와의 관계에 대한 연구는 여포 전체를 그대로 배양하거나(Tsafiriri *et al.*, 1972; Lindner *et al.*, 1974) 절개된 여포의 조각위에 난자 또는 난자와 난구 여포의 복합체를 얹어 배양하면서(Foote and Thibault, 1969) 또 granulosa cell monolayer 위에 난자를 얹거나(Tsafiriri and Channing, 1975), 배양액에 여포액을 첨가하여 난자를 배양하면서(Leibfried and First, 1980a, b) 난자의 성숙에 대한 여포의 영향에 관한 연구가 시도되어 왔다. 위와 같은 실험방법을 보완하여 보다 더 정밀하게 여포와 난자와의 관계를 규명하고자 본 실험은 대조를 위하여 여포를 그대로 배양하고, 실험군으로는 여포에 바늘로 구멍을 낸 상태로 배양하거나 또는 구멍을 통해 난자 또는 난자와 난구 세포의 복합체를 바꾸어 넣어 난자에 대한 여포환경의 영향을 관찰하였다.

여포를 배양하는 경우 여포의 벽을 뚫어서 배양액과 여포액과의 교류를 가능하게 하거나, 혹은 여포내의 난자를 다른 여포의 난자로 바꾸어 넣어서 일정시간 동안 배양하여도 난자는 배양기간동안 아무 처리를 하지 않은 여포내의 난자와 같이 성숙분열이 억제되고 있는데, 이는 여포내의 환경이 결정적으로 여포난자의 성숙을 억제하고 있다는 것을 말하는 것이며, 여포내의 여포 세포들이 난자성숙 억제물질을 계속 생성하고 있다는 것을 암시하는 것이라 할 수 있다. hCG의 첨가로 여포내 난자가 즉시 성숙 분열에 들어 가는 것은 hCG가 여포 세포에서 성숙억제물질의 형성을 억제하는 작용이 있기 때문인 것으로 생각된다. 본인들의 예비실험에 의하여 여포세포 혹은 난구세포를 제거한 여포내의 난자는 hCG가 없어도 90% 이상의 난자가 성숙하는 것을 관찰하였으나 이 결과는 위의 두가지 여포내 세포들의 어느 하나라도 없으면 실질적으로 난자성숙 억제물질의 생성이 가능하지 않거나 또는 그 억제물질이 난자에 전달되지 못한다는 것을 말하여 주는 것이 된다. 특히 LH/hCG의 수용체가 여포의 theca interna와 여포 세포에 분포하고 있으며(Amsterdam *et al.*, 1975; Channing



*et al.*, 1981), 이로 보아 LH/hCG와 그 수용체와의 복합체는 결국 성숙억제물질의 형성을 불활성화하는 것이라 하겠다.

Cho *et al.* (1974) 등이 dbcAMP가 배양중의 생쥐난자의 성숙을 억제한다는 것을 밝힌 바가 있으며, 본 실험에서도 먼저 dbcAMP가 들어있는 배양액 내에서 흰쥐의 난자를 4시간 배양한 뒤 이를 다시 여포내에 이식하고 dbcAMP가 없는 배양액 내에서 이 여포를 계속 배양하였으나 배양액내에 hCG가 첨가되지 않는 한 난자성숙억제는 그대로 지속되었다. IBMX로 4시간 전배양한 경우도 dbcAMP의 경우와 같았는데 이는 Cho (1974) 등이 theophylline을 이용하여 생쥐난자의 성숙을 억제시켰던 실험의 결과와 일치하고 있다. 즉, theophylline이나 IBMX는 PDE의 활성을 억제함으로써 난자내 cAMP의 농도의 저하를 억제하고 있고(Robison *et al.*, 1971), 또 dbcAMP는 직접 난자내의 cAMP의 기능을 대신 함(Wahrmann *et al.*, 1973)으로서 난자내 cAMP농도를 일정수준 유지하게 하고 있으며 이 같이 난자내 cAMP가 일정 수준을 유지할 때에 난자의 성숙이 억제되고 있다는 사실이 근래에 밝혀졌으며(Dekel and Beers, 1978; Schultz *et al.*, 1983a, b; Vivarelli *et al.*, 1983; Dekel *et al.*, 1984; Eppig and Downs, 1984; Sato and Koide, 1984), LH가 난자내 cAMP 농도를 낮추게 함으로서 난자의 성숙이 재개된다는 것도 Dekel and Beers(1978, 1980), Schultz (1983b)등에 의해 제안되고 있으며 이들의 주장은 우리의 실험 결과를 뒷받침 해 주고 있다. 특히 Dekel and Beers(1978)와 Dekel (1984)등은 난구 세포에서 생성된 cAMP가 gap junction을 통하여 난자내로 이동함으로써 난자성숙을 억제하며 LH가 난구세포에서의 cAMP생성을 중지시킴으로서 난자의 성숙이 유도된다고 하였고 Schultz (1983b)등은 여포 세포에서 생성되는 억제인자가 난자내의 cAMP농도를 높게 유지시키는 역할을 하며 LH가 이 인자를 제거 혹은 비활성화시킴으로서 성숙이 유도된다고 주장했는데 Eppig (1983)등과 Downs and Eppig (1984)가 같은 사실을 보고하였다.

Cho (1974)등과 Schultz (1983b)등이 관찰한 바와 같이 dbcAMP나 IBMX의 난자성숙 억제효과는 난자가 GV인 상태일 때에 일어나며 이미 성숙에 들어가게 된 난자에는 영향이 없음이 밝혀졌으나 이런 현상은 본 실험에서도 확인이 되었다. 즉, 난자성숙 억제제가 없는 배양액에서 60분을 배양하여 GVBD에 진입하게 된 난자를 여포내에 되돌려 주어 계속 배양하거나 또는 이를 dbcAMP가 들어 있는 배양액에 옮겨 계속 배양한다고 하더라도 난자의 성숙은 그대로 진행되었다. 이 현상은 여포환경이라 하더라도 이미 성숙과정에 진입한 난자에 대해서는 난자성숙 억제효과가 없다는 것을 말하는 것이며, 결국 여포내 성숙억제인자는 GV시기의 난자에게만 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 결국 여포내의 난자의 성숙이 억제되는 것은 여포내 세포가 난자내의 cAMP농도를 높이는 것과 관계가 있다는 것이 분명해졌지만 어떤 기작으로 난자내의 cAMP가 난자의 성숙을 억제하며 LH/hCG의 존재가 어떤 기작으로 난자내 cAMP농도를 낮추며 난자의 성숙 억제인자가 GVBD에 들어선 난자에는 아무런 효과가 없는 이유에 대해서는 아직도 분명히 밝혀지지 않고 있다.

앞으로 난자내의 phosphodiesterase와 adenylate cyclase 등의 활성변화에 대한 연구가 진행되면 난자 성숙억제와 cAMP와의 관계가 더 자세히 밝혀질 것이다.

## 적 요

흰쥐의 여포내 혹은 구멍만 낸 여포내의 난자, 또는 다른 여포에 옮겨 넣은 난자의 경우, 그 여포를 17시간 배양하여도 배양액에 hCG가 첨가되지 않는 한, 여포내 난자는 GV를 유지하였다. 즉, 기본 배양액에서 배양할 경우 88.8%~95.2%의 여포내 난자가 GV를 유지하였다. 그러나, hCG를 배양액에 첨가하였을 때 대부분이 핵막붕괴(GVBD)를 일으키고 단지 11.1%~19.4%의 여포내 난자만이 GV를 유지하였다.

난자를 dbcAMP나 IBMX가 들어있는 배양액에서 4시간 동안 배양한 후 다른 여포에 옮겨 넣어 계속 17시간동안 배양할 경우에도 그 결과가 앞의 것과 같았다. 즉 dbcAMP가 들어있는 배양액에서 배양한 후 다른 여포로 옮겨 넣었을 때 그 여포를 기본 배양액으로 배양하면 86.1%의 난자가 GV를 유지하였으며 만일 배양액에 hCG를 첨가하면 단지 13.1%의 난자가 GV를 유지하였다. 또한 IBMX가 들어있는 배양액에서 먼저 배양한 경우에는 85%의 난자가 GV를 보였고, hCG의 존재아래에서는 6.7%의 난자가 GV상태에 있었다. 결국 여포는 난자의 성숙을 억제하는 환경을 제공하고 있으며 이같은 억제효과는 배양액에 첨가된 hCG에 의하여 소실된다.

## REFERENCES

- Amsterdam, A., Y. Koch, M.E. Lieberman and H.R. Lindner, 1975. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J. Cell Biol.*, 67:894-900.
- Baker, T.G. and P. Neal, 1972. Gonadotropin induced maturation of mouse Graafian follicles in organ culture. IN: Oogenesis, J.D. Biggers and A.W. Schuetz, eds. Univ. Park Press, Baltimore, Maryland, pp. 377-396.
- Channing, C.P. and A. Tsafiriri, 1977. Mechanism of action of LH and FSH on the ovary *in vitro*. *Metabolism* 26:413-468.
- Channing, C.P., I.H. Bae, S.L. Stone, L.D. Anderson, S. Edelson and S.C. Fowler, 1981. Porcine granulosa and cumulus cell properties. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 22:359-370.
- Cho, W.K., 1974. A microtube culture method for mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 37:437-440.
- Cho, W.K., 1976. The effect of prostaglandin E-1 and F-2 $\alpha$  on maturation of mouse oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 47:1-5.
- Cho, W.K., and Kwang Ja, Lim, 1975. Studies on the effects of follicular fluid and its fractions on the cow oocyte maturation *in vitro*. *Korean J. Zool.*, 18:61-70.
- Cho, W.K., S. Stern and J.D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cyclicAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 187:383-386.
- Dekel, N., E. Aberdam and I. Sherizly, 1984. Spontaneous maturation *in vitro* of cumulus-enclosed rat oocytes is inhibited by forskolin. *Biol. Reprod.*, 31:244-250.
- Dekel, N. and W.H. Beers, 1978. Rat oocyte maturation *in vitro*: Relief of cyclicAMP inhibition by gonadotropin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:4369-4373.
- Dekel, N. and W.H. Beers, 1980. Development of the rat oocyte *in vitro*: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev. Biol.*, 75:247-254.

- Downs, S.M. and J.J. Eppig, 1984. Cyclic adenosine monophosphate and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. *Endocrinology*, **114**:418-427.
- Edwards, R.G., 1962. Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. *Nature*, **196**:446-450.
- Ekholm, C., T. Hillensjö, C. Magnusson and S. Rosberg, 1984. Stimulation and inhibition of rat oocyte meiosis by forskolin. *Biol. Reprod.*, **30**:537-543.
- Eppig, J.J. and S.M. Downs, 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.*, **30**:1-11.
- Eppig, J.J., R.R. Freter, P.F. Ward-Bailey and R.M. Schultz, 1983. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: Participation of cAMP, steroid hormone, and a putative maturation-inhibitory factor. *Dev. Biol.*, **100**:39-49.
- Foote, W.D. and C. Thibault, 1969. Recherches expérimentales sur la maturation in vitro des oocytes de truie et de veau. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**(3):329-349.
- Hillensjö, T., 1976. Oocyte maturation and glycolysis in isolated pre-ovulatory follicles of PMS-injected immature rats. *Acta Endocr.*, **82**:809-830.
- Jensen, F.C., R.B.L. Gwatkin and J.D. Biggers, 1964. A simple organ culture method which allows simultaneous isolation of specific types of cells. *Exper. Cell Res.*, **34**:440-447.
- Leifried, L. and N.L. First, 1980a. Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.*, **23**:699-704.
- Leifried, L. and N.L. First, 1980b. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biol. Reprod.*, **23**:705-709.
- Lindner, H.R., A. Tsafiriri, M.E. Lieberman, U. Zor, Y. Koch, S. Baumingerb and A. Barnea, 1974. Gonadotropin action on cultured Graafian follicles: Induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. *Rec. Progr. Horm. Res.*, **30**:79-138.
- Magnusson, C. and T. Hillensjö, 1977. Inhibition of maturation and metabolism of rat oocytes by cyclicAMP. *J. Exp. Zool.*, **201**:138-147.
- Pincus, G. and E.V. Enzmann, 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, **62**:665-675.
- Rice, C. and R.W. McGaughey, 1981. Effect of testosterone and dibutyl cAMP on the spontaneous maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.*, **62**:245-256.
- Robison, G.A., R.W. Butcher and E.W. Sutherland, 1971. Cyclic AMP. Academic press, New York.
- Sato, E., T. Ishibadhi and A. Iritani, 1982. Meiotic arresting substance separated from porcine ovarian granulosa cells and hypothetical arresting mechanism of meiosis. IN: Intraovarian Control Mechanism Advances in Experimental Medicine Biology, C.P. Channing and S.J. Segal, eds. Plenum Press, New York, Vol. 147, pp.161-173.
- Sato, E. and S.S. Koide, 1984. Forskolin and mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, **230**:125-129.
- Schultz, R.M., R.R. Montgomery and J.R. Belanoff, 1983a. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.*, **97**:264-273.
- Schultz, R.M., R.R. Montgomery, P.F. Ward-Bailey and J.J. Eppig, 1983b. Regulation of oocyte maturation in the mouse: Possible roles of intercellular communication, cAMP, and testosterone. *Dev. Biol.*, **95**:293-304.

- Tsafiriri, A., H.R. Lindnes, U. Zor and S.A. Lamprecht, 1972. *In vitro* induction of meiosis division in follicle enclosed rat oocytes by LH, cyclicAMP and prostaglandin E<sub>2</sub>. *J. Reprod. Fert.*, 31:39-50.
- Tsafiriri, T. and C.P. Channing, 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. *Endocr.*, 96:922-927.
- Urner, F., W.L. Herrmann, E.E. Baulieu and S. Schoderet-Slatkine, 1983. Inhibition of denuded mouse oocyte meiotic maturation by forskolin, an activator of adenylate cyclase. *Endocr.*, 113:1170-1172.
- Vivarelli, E., M. Conti, M. DeFelici and G. Siracusa, 1983. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Differentiation*, 12:271-276.
- Wahrmann, J.P., R. Winand and D. Luzzati, 1973. Effect of cyclic AMP on growth and morphological differentiation of an established myogenic cell line. *Nature New Biol.*, 245:112-113.
- Wassarman, P.M., W.J. Josefowicz and G.E. Letourneau, 1976. Meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*: Inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *J. Cell Sci.*, 22:531-545.