

Dibutyryl Cyclic AMP로 처리된 생쥐난자의 수정능에 관한 연구

강해묵 · 이영기 · 조완규

서울대학교 자연과학대학 동물학과

dbcAMP에 의해 성숙이 억제된 생쥐난자의 수정능을 조사하기 위해 본 실험을 행하였다. dbcAMP로 일시 성숙이 억제되었던 난자를 배양액내에서 정자와 섞고 24시간 배양한 후 발생한 2세포기의 배아형성, 정자의 관입, 전핵형성을 조사하여 2세포기로 배아발생이 진척된 것을 수정율의 기준으로 정하였다. dbcAMP를 처리하지 않은 난자는 약 53.3%의 수정율을 보였으며, dbcAMP가 함유된 배양액에서 배양한 후 기본 배양액에서 성숙시킨 난자들의 수정율은 dbcAMP의 처리시간에 비례하여 낮으나, 정자의 관입은 정상적으로 일어났다. 전자현미경적 관찰에 의하면 dbcAMP 처리는 난자의 미세구조에 어떠한 변화도 야기하지 않았다.

따라서 dbcAMP를 사전처리하여 성숙을 억제한 난자라 할지라도 어느 정도의 수정능력을 보유하고 있다고 사료된다.

KEY WORDS: dbcAMP, Oocyte maturation

성숙한 여포로부터 분리한 포유류 난자는 체외에서 적당한 배양액으로 배양했을 때, 감수분열이 자발적으로 재개되어 제 1극체를 가진 단계의 난자로 성숙한다고(Pincus and Enzmann, 1935; Edwards, 1962; 1965) 알려진 이래 난자성숙에 관한 연구가 활발히 진행되어왔다.

조 등(1974)이 cyclic AMP의 유도체인 dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP)가 생쥐난자의 자발적인 성숙을 가역적으로 억제함을 보고한 이래 비슷한 결과가 흰쥐(Dekel and Beers, 1978)와 돼지(Rice and McGaughey, 1981) 등에서 관찰되었다. 또한 이러한 난자성숙 억제효과는 dbcAMP뿐만 아니라 phosphodiesterase 억제제인 theophylline과 isobuthylmethylxanthine(IBMX) 그리고 adenylate cyclase 활성제인 forskolin과 cholera toxin 등의 처리에 의해서도 나타난다고 보고되었다(Cho *et al.*, 1974; Dekel and Beers, 1978; Tsafiriri *et al.*, 1982; Schultz *et al.*, 1983a; Urner *et al.*, 1983). 따라서

난자성숙과정은 난자내 cAMP 농도에 의해 조절되고 있으나 (Dekel and Beers, 1980; Schultz *et al.*, 1983b) 자세한 난자성숙 억제기작에 관해서는 아직까지 밝혀진 바가 없다. 또한 체외에서 dbcAMP로 일단 성숙이 억제되었던 난자는 dbcAMP를 배양액으로부터 제거하였을 때 다시 성숙을 재개하며, 외견상 정상적인 형태를 보여 주지만 (Cho *et al.*, 1974) 이 난자들이 정상적인 여포내 난자와 동일하게 수정과 배아발생 능력을 보유하는 지에 대해서는 아직 보고된 바가 없다.

한편, 포유동물 난자의 체외수정이 가능해진 이래로 체내 및 체외에서 성숙한 난자들의 수정능에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 체외에서 자발적으로 성숙된 대부분의 포유류 난자는 정자 관입 후, 응성전핵이 형성되지 않아 일반적으로 수정이 실패한다고 (Thibault, 1977; Leibfried and Bavister, 1983) 알려졌으나, 생쥐를 포함한 몇몇 종에서는 자발적으로 성숙된 난자의 수정은 체내에서 성숙된 난자에 비해 그 수정율이 비록 낮기는 하나 가능하다고 밝혀졌다 (Cross and Brinster, 1970; Mukherjee, 1972; Morr and Trounson, 1977; Shalgi *et al.*, 1979; Schroeder and Eppig, 1984).

본 연구는 과학재단(1985) 연구비 지원을 받아 수행되었음.

본 실험에서는 dbcAMP에 의하여 일정시간 임의로 성숙을 억제시켰던 생쥐 난자를 다시 성숙을 유도한 뒤 이를 체외수정시켰으며, 그후 이들 난자의 수정능과 형태적 특징을 관찰함으로써 dbcAMP가 난자성숙과 수정능에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

난자는 생후 21-22일 된 Balb/c × C57BL (CB6F1) strain의 생쥐난소에서 얻었으며 정자는 생식능이 있는 생후 3개월된 수컷 CBA strain의 cauda epididymis와 vas deferens에서 얻었다. 이 실험에 이용한 생쥐는 서울대학교 실험동물 사육장에서 낮 14시간 밤 10시간 광주기조건 하에서 충분한 물과 먹이를 주고 사육된 것이다.

배양액 및 시약준비

난자성숙을 유도하기 위하여 10% fetal bovine serum (FBS)이나 0.4% bovine serum albumin (BSA, essentially fatty acid free, Sigma)를 첨가한 Standard Egg Culture Medium (SECM, Biggers *et al.*, 1971)을 사용했으며, 난자채취를 위해서는 난자채취 중 수소이온 농도의 변화를 막기 위해 BSA를 첨가한 SECM에 20 mM의 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethansulphoric acid (HEPES, Sigma)를 첨가하여 1N NaOH로 수소이온 농도가 7.4가 되게 적정하여 사용하였다.

체외수정과 배아배양을 위한 배양액으로는 0.5 mM Na-pyruvate를 함유하는 Tyroide's 용액에 기초한 Whittingham medium (1971)을 사용하였으며, 체외수정을 위한 배양액에는 BSA 32 mg/ml를 그리고 배아배양을 위해서는 4mg/ml의 BSA를 첨가했다. dbcAMP(Sigma)는 SECM배양액에 10mg/ml의 농도가 되도록 용해하였고, human chorionic gonadotrophin (hCG, Sigma)은 phosphate buffered saline (PBS)에 1,000 I.U./ml의 농도로 녹였다. 이들 stock 용액은 사용전까지 -20°C에서 보관하였다. Glutaraldehyde 용액

은 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)에 2.5%로 만들었으며 OsO₄ (Tousimis Research Co.) 용액은 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)에 2% 농도로 준비하였다. 전자현미경 관찰을 위한 embedding medium의 조성은 13.2 ml methyl nadic anhydride (MNA), 19.4 ml Epon812, 7.4 ml dodecenylsuccinic anhydride (DDSA), 그리고 0.6 ml tri-dimethyl aminomethyl phenol (DMP30)이다.

난자 채취, dbcAMP 처리 및 성숙유도

0.1 ml 생리 식염수 (0.85%)에 녹인 5 I.U. pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG, Sigma)을 45-46시간전에 미리 주사한 CB6F1 생쥐 암컷의 난소에서 cumulus enclosed germinal vesicle단계의 난자를 채취하였다. 즉 난자채취용 배양액을 담은 petri dish (60 × 15 mm, Falcon)에 난소를 놓고 해부현미경 (Wild)하에서 날카로운 바늘로 난소를 터뜨려 cumulus enclosed oocytes (CEO)를 적출한 후 각 실험에 사용될 새로운 배양액으로 세 번 씻어 주었다. 이 방법으로 취한 마리당 약 40-50개의 CEO를 얻었다.

성숙조건에 따른 수정능을 조사하기 위해 난자는 4개 실험군 1) 10% FBS, 2) 10% FBS + 2 I.U./ml hCG, 3) 0.4% BSA, 그리고 4) 0.4% BSA + 2 I.U./ml hCG를 각각 함유한 배양액 (SECM)에서 16시간동안 성숙시켰다. 그리고 dbcAMP 처리시간에 따른 난자의 수정능 변화를 조사하기 위하여 난자는 dbcAMP(100 μg/ml)를 함유한 SECM (10% FBS)에서 각각 2, 4, 8 그리고 16시간동안 배양한 후, dbcAMP가 없는 SECM (10% FBS)에서 철저히 씻은 다음 자발적인 성숙을 유도하기 위하여 16시간동안 더 배양하였다. 난자의 배양은 5% CO₂와 습기찬 공기가 공급되는 37°C 항온 배양기에서 행했으며 paraffin oil drop방법 (Brinster, 1963)을 사용하였다.

체외수정

5% CO₂, 37°C 조건에서 충분히 평형시킨 2 ml의 paraffin oil로 덮힌 1 ml의 수정용 배양액을 함유한 embryological watch glass에 생식능이 있는 CBS strain 생쥐의 수컷에서 얻은 vas deferens와

cauda epididymis를 놓고, 핀셋으로 부드러운 압력을 가하여 정자를 배양액속으로 나오게하여 정자를 준비했다. 정자는 사용 전에 capacitation을 위해 5% CO₂ 배양기에서 약 1-1.5 시간동안 사전 배양하였다.

체내에서 성숙한 난자는 5 I. U. PMSG를 48시간 전에 주사한 CB6F1 암컷에 5 I. U. hCG를 복강주사하고 14시간이 지난후에 생쥐 수란관의 ampulla에서 채취하였다. 한마리 쥐에서 떼어낸 수란관은 paraffin oil로 덮힌 수정용 배양액 0.4 ml을 함유한 embryological watch glass에 놓고, 날카로운 핀셋으로 수란관을 찢어 난자를 가진 cumulus mass를 적출하였다. dbcAMP (100 μ g/ml)를 처리하거나 혹은 자발적으로 성숙된 난자는 수정용 배양액으로 한 번 씻어주고 paraffin oil로 덮힌 수정용 배양액 0.4 ml을 함유한 embryological watch glass에 넣었다.

위와 같이 준비된 embryological watch glass에 앞서 준비한 20-40 μ l의 정자용액을 넣어줌으로써 수정을 유도하였다. 정자의 농도는 약 1.0×10^6 /ml이었고, 6-8시간동안 난자와 같이 항온배양기에 넣어 두었다.

dbcAMP로 처리하여 성숙이 일시 억제되었던 난자의 수정능력 여부와 미세 구조의 변화를 조사하기 위하여, 일부 난자는 dbcAMP 배양액에서 8시간 처리하고 다시 정상배양액에서 성숙을 유도한 후 정자와 섞고 5시간이 지난 후 이를 채취하여 전자현미경으로 난자내 미세구조를 관찰하였다.

배아배양 및 관찰

정자와 섞어 수정을 유도한 후 난자는 여분의 정자와 난구세포를 제거하기 위하여 배아배양액으로 철저히 씻어준 후, petri dish (35 \times 10 mm, Falcon)에 oil로 덮힌 50 μ l의 배양액 방울에 넣어 배양하였다. 24시간 배양한 후 2세포기 배아로의 분열을 조사하였으며, 이를 수정율의 기준으로 삼았다. 그다음 24시간 간격으로 배아발생을 관찰하였으며, 총 5일간 배양하여 포배기로 진행한 배아수를 기록하였다. 정상적인 2세포기 배아로 표시되는 모든 배아는 각 분할구에 분명한 핵과 제 2극체를 가졌다.

dbcAMP로 처리된 난자 가운데서 24시간 배양

한 후 2세포기 배아로 진전되지 못한 난자는 슬라이드 위에서 고정액 (acetic acid 1: ethanol 3)으로 고정하고 0.5% lacmoid로 염색하고 위상차 현미경(Wild)으로 난자내 정자의 관입과 선행형성 여부를 관찰하였다.

각 실험군 간의 2세포기배아 발생율은 분산분석 (Analysis of a variance) 방법에 의해 그 유의성이 검정되었다.

전자현미경적 연구

수정시킨 난자를 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 씻은 후 2.5% glutaraldehyde에서 두 시간동안 고정하였다. 그 후 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)로 씻은 다음, 1% OsO₄로 1시간동안 재고정하였다. 고정된 난자는 일련의 ethanol 용액으로 탈수시킨 후 propylene oxide와 Epon 혼합용액을 1:1로 섞은 용액에서 하룻밤동안 방치한 후 Epon 혼합용액으로 embedding하였다. Ultramicrotome (Sorvall MT-5,000, Dupont)으로 60-30 nm의 두께로 연속적인 절단을 하였으며 uranyl acetate 용액과 lead citrate 용액으로 이중 염색한 후 투사 전자현미경 (TEM, 100X Joel)으로 관찰하였다.

결 과

dbcAMP를 처리한 난자의 수정능을 조사하기에 앞서서 여러 체외배양 조건에 따라 성숙한 난자의 수정과 발생정도를 비교조사하였다(Table 1). hCG주사로 배란된 난자의 체외수정율은 92.4%이며, 2세포기 배아의 62%가 96시간 배양하는 동안 포배기로 진행되었다. 그에 비해 체외에서 성숙된 난자의 수정율은 전반적으로 낮았으며, 포배기까지 진전된 배아는 거의 관찰되지 않았다. FBS를 첨가한 배양액에서 성숙된 난자의 수정율은 52.7%로써 BSA를 첨가한 배양액에서 성숙된 것(21.7%)보다 훨씬 높았다. FBS와 hCG를 동시 함유한 배양액에서 성숙시킨 경우 FBS만을 함유한 배양액에 비해서 약간 높은 수정율을 얻었으나 통계적으로 유의하지 않았다. 따라서 dbcAMP로 처리된 난자의 체외성숙에는

Table 1. Culture conditions for inducing the fertilization of mouse oocytes *in vitro*.

Culture ¹ conditions	No. of oocytes examined	No. of embryos developed				Percent of ⁴ embryos developed
		2-cell ² embryos	Embryos beyond 2-cell stage	Blasto- cysts	Total	
<i>In vivo</i> matured	264	22	71	151	244	92.4 ± 4.0 ³
<i>In vitro</i> matured						
a) FBS(10%)	188	80	18	1	99	52.7 ± 4.2
b) FBS(10%) + hCG(2 I. U./ml)	173	76	36	2	114	65.9 ± 1.7
c) BSA(0.4%)	166	33	3	0	36	21.7 ± 15.7
d) BSA(0.4%) + hCG(2 I. U./ml)	137	29	8	0	37	27.0 ± 16.3

1) Standard egg culture medium(SECM) was used as the basic medium. After fertilization, embryos were cultured for 96 hours. 2) All 2-cell embryos were degenerated by the end of a 96hr culture. 3) Mean ± S.D. (n=3). 4) Statistical significance: *In vivo* matured > *in vitro* matured (p < 0.05); FBS > BSA (p < 0.05); FBS + hCG > BSA + hCG (p < 0.05).

Table 2. Fertilizability of the mouse oocytes previously exposed to dbcAMP (100 µg/ml).

Length of hours ¹ of dbcAMP treatment	No. of oocytes examined	No. of pronucleus (%)	No. of sperm penetration(%)	No. of 2-cell embryos ³ (%)
0	259	47(18.1±5.0) ²	13(5.0± 2.5)	138(53.3±11.6)
2	264	58(22.0±7.0)	34(12.9± 8.5)	86(32.3± 5.6)
4	248	50(20.2±6.6)	67(27.0± 6.7)	36(14.5± 5.6)
8	236	15 (6.4±4.8)	120(50.8±14.0)	11(4.7± 4.5)
16	249	23 (9.2±7.0)	127(51.0±18.5)	22(8.8± 9.1)

1) Oocytes enclosed by cumulus cells were initially exposed to dbcAMP for a certain length of hours and cultured further in the plain (dbcAMP-free) media for 16 hours prior to insemination. Observation were made 24 hr after fertilization. 2) Mean ± S.D.; n=7. 3) Proportion of 2-cell embryos developed from the oocytes pre-exposed to dbcAMP was significantly lower than that of the control (p < 0.05).

기본 배양액에 FBS를 첨가하여 사용하였다.

Table 2는 일단 dbcAMP로 성숙이 억제되었던 난자를 dbcAMP-free배양액에서 성숙시킨 후, 정자와 섞어 체외수정시켜서 24시간 배양한 후에 2세포기 분열을 관찰한 결과이다. 대조군 즉 dbcAMP 처리없이 자발적으로 성숙한 난자가 2세포기 배아로 발생하는 비율은 53.3%이었으나, dbcAMP(100 µg/ml)에 2, 4, 8 그리고 16시간 노출시킨 후 성숙시킨 난자의 2세포기 배아로의 발생율은 각각 32.2%, 14.5%, 4.7% 및 8.8% 이었다. 즉 dbcAMP 처리시간에 비례하여 수정율이 감소하였으나 장시간 dbcAMP를 처리하여도 일부 난자들은 수정할 수 있음을 보여주고 있다. 또한 분열하지 않은 난자를 고정, 염색한 후 관찰

한 결과 dbcAMP에 장시간 처리후 수정된 난자의 경우 정자의 관입은 대조군과 별 차이가 없으나, 관입된 정자의 대부분이 응성전핵으로 진행되지 않고 있음을 보여주고 있으므로 2세포기 분열이 일어나지 않은 것으로 사료된다.

그리고 전자현미경을 사용하여 dbcAMP로 처리된 난자의 수정현상을 형태적으로 관찰하였다. 사용된 수정란은 Table 2의 결과를 토대로 하여 2세포기 분열 즉 수정율이 급격히 감소하는 시간인 dbcAMP를 8시간동안 처리한 난자로 수정 후 5시간만에 얻었다. Fig. 1과 같이 cortical granule이 세포질에서 관찰되지 않고 원형질막이 함입되어 있는 것으로 보아 exocytosis된 것으로 추정되며 대부분의 mitochondria가 vacuole형태로 존재하

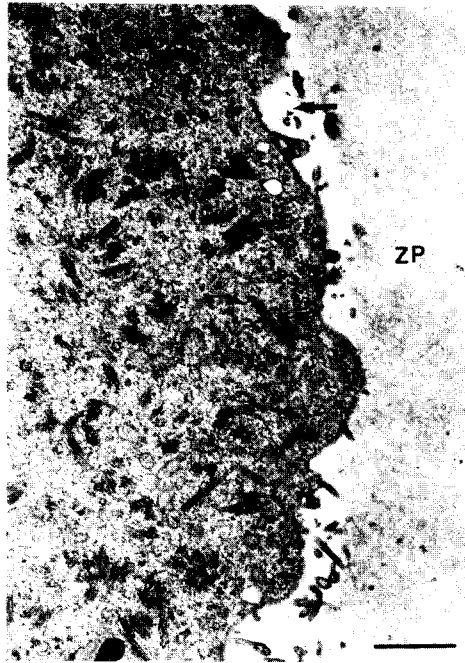


Fig. 1. The surface of the dbcAMP-treated fertilized ovum. Note the presence of vitelline membrane (arrow) and absence of cortical granules. ZP, zona pelucida. Bar, 1 μ m.



Fig. 2. Mitochondria of the dbcAMP-treated fertilized ovum. Bar, 1 μ m.

였다(Fig. 2). 또한 제 2 감수분열 결과로 제 2 극체가 형성되었고, 자성전핵과 perivitelline space에서 cytoplasmic process, vesicle 및 membraneous profile을, 세포질내에서 골지체구조도 보여주고 있다(Fig. 3, 4). 관입된 정자는 핵이 응축된 상태로 있으며 정자 꼬리를 둘러싸고 있는 원형질막이 소실되는 것으로 보아 수정이 진행중임을 보여주고 있다(Fig. 5).

결론적으로 본 실험은 dbcAMP를 처리한 난자에 있어서 정자의 관입현상등은 정상이나 응성전핵이 잘 이루어지지 않아 2세포기 배아까지 발생이 진척되는 비율이 낮으나, 비록 장시간 dbcAMP를 처리하여도 일부 난자들은 수정능을 갖고 있음을 나타냈다.

고 찰

dbcAMP에 의해서 일단 그 성숙이 억제되었던

난자들이 다시 기본 배양액에서 배양하면 난자들은 정상적으로 성숙한다(Cho *et al.*, 1974)는 것은 알려졌지만 그같은 처리를 받은 난자의 수정 및 발생능력에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다. 본 연구의 결과는 dbcAMP에 의해 성숙이 억제되었던 생쥐난자는 비록 대조군에 비해 2세포기의 배아형성 정도는 낮지만 어느정도 수정능을 가지고 있음을 나타내었다. 더불어 2세포기로 발생되는 수정율은 dbcAMP처리시간에 비례하여 감소되거나 정자의 난자내 관입은 큰 영향을 받지 않음을 보여주고 있다. 전자현미경적 관찰에서도 dbcAMP로 처리된 생쥐난자가 정상 배란된 난자와 거의 유사한 양상을 보이며 그 미세구조에서도 차이를 발견할 수 없었다.

이와같이 dbcAMP로 처리된 난자에서 수정능력의 보존은 난자성숙과정에서 이미 알려진 dbcAMP역할과 감수분열 억제기작면에서 상당한 유사성을 보여주고 있다. 즉 Cho와 Yoo(1975)는 dbcAMP가 GVBD 후 곧바로 일어나는 RNA 합성(Bloom and Mukherjee, 1972)을 억제한다고

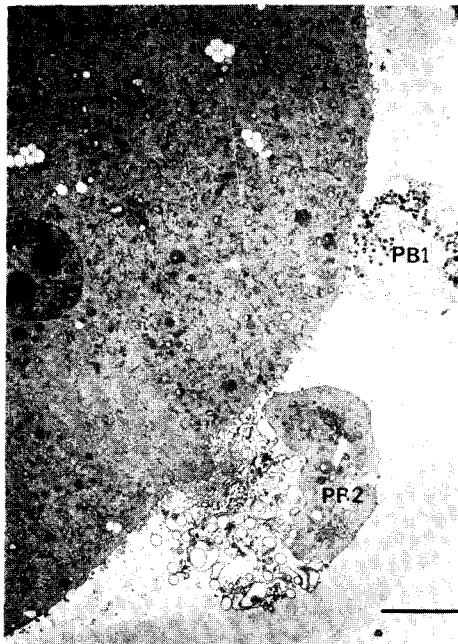


Fig. 3. The second polar body (PB2) and degenerating first polar body (PB1) in the dbcAMP-treated fertilized ovum. The female pronucleus (FP) and many cytoplasmic processes, vesicles and membrane profiles in the vicinity of second polar body are shown. Bar, 0.5 μ m.



Fig. 4. Golgi body of the dbcAMP-treated fertilized ovum. Bar, 0.5 μ m.

주장했으며, Richter와 McGaughey(1981)는 난자성숙에 따른 특수한 단백질의 합성양상이 dbcAMP에 의해 가역적으로 억제되는 것으로 보아 이는 난자성숙에 있어서 cAMP의 조절역할을 반영한 것이라고 주장하였다. 또한 Schultz 등(1983b)은 dbcAMP가 핵막붕괴에 따른 특수한 단백질의 탈인산화를 억제한다고 제안했으며, 최근 Lee 등(1985)는 난자성숙에 있어서 dbcAMP의 억제효과는 여포내 환경과 비슷하다고 주장하였다. 그러나 정자의 난자내 관입은 dbcAMP로 처리된 난자나 대조군의 난자에서 차이가 없었지만 2세포기 배아로의 발생이 현저히 낮은 현상을 보여주고 있는 것은 사전에 dbcAMP의 영향을 받은 난자의 세포질내에서 융성전핵의 형성이 정상적으로 일어나지 않았기 때문인 것으로 보이며 이러한 난자의 세포질 변화의 원인으로서는 dbcAMP의 약리적 효과나 부작용에 의한 것으로 추측된다(Richter and McGaughey, 1981).

dbcAMP로 처리된 수정란의 전자현미경적 연구는 형태적으로 정상적인 수정현상이 일어나고 있음을 보여주고 있다. 본 실험에 사용된 수정란은 수정후 5시간째에 관찰한 것으로서, 일반적으로 체외수정된 난자는 이 시간 무렵에는 제 2감수분열이 끝나고 융성전핵의 형성이 시작된다는 보고와 일치하고 있으며(Howlett and Bolton, 1985), 또한 이러한 형태적 특징은 Thompson 등(1974)의 체외수정된 생쥐수정란의 전자현미경적 연구와 매우 유사성을 보여주고 있다. 즉 cortical granule의 exocytosis, 제 2감수분열, 정자의 핵과 퇴화되고 있는 정자꼬리 및 골지체의 구조, 난황의 분포 등의 미세구조에서도 차이점을 발견할 수 없었다. 그리고 포유류의 난자나 수정란의 mitochondria는 대부분 vacuole형태를 보여주는데(Szollosi, 1972), dbcAMP로 처리된 수정란에서도 이와 비슷한 결과를 나타내고 있다.

한편 체내성숙 후 배란된 난자의 수정 및 배아 발생율은 Frazer와 Drury(1975)의 결과와 일치하며, 체외에서 성숙된 포유류 난자의 체외수정이 일반적으로 어렵지만 생쥐에서만 가능하다



Fig. 5. Undecondensed nucleus of the sperm fully incorporated into the dbcAMP-treated ovum. Mitochondria of sperm tail (ST) are being degenerated. PVS, perivitelline space. Bar, 1 μ m.

는 보고(Thibault, 1977)와 FBS를 함유한 배양액에서 성숙된 난자의 수정율이 BSA를 첨가한 배양액에서 성숙된 난자보다 높다는 결과(Cross and Brinster, 1970; Schroeder and Eppig, 1984)와 일치하고 있다. 또한 Eppig(1979)가 난구세포 복합체에 hCG를 처리하는 경우 cumulus세포의 expansion이 일어난다고 보고하였고, Schroeder와 Eppig(1984)는 그러한 cumulus expansion이 정자를 용이하게 난자에게 접근하게하여 수정율을 높힌다고 하였는데, 본 실험에서도 hCG를 첨가한 배양액에서 성숙한 난자의 수정율이 높았으며 FBS를 첨가하면 더욱 수정율이 높아지는 것을 보았다.

결론적으로 dbcAMP에 의해 성숙에 억제되었던 생쥐난자는 2세포기 배아로 발생되는 비율을 근거로 그 수정율을 판정했을 때 정상난자에 비해 그 비율이 현저히 감소되거나 정자의 관입은 정상적

으로 일어나고 있으며 형태적 측면에서 정상적인 수정현상 및 미세구조에서도 어떠한 변화도 없는 것으로 보아 정상난자와 큰 차이가 없는 것으로 판단된다. 따라서 적절한 배양조건하에서는 정상적인 배아발생능력을 가질 것으로 추측된다.

引用文獻

- Biggers, J. D., W. K. Whitten, and D. C. Whittingham, 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. In: *Methods in Mammalian Embryology* (Daniel, Jr., J. C. ed.), pp. 86-116. W. H. Freeman, San Francisco.
- Bloom, A. M. and B. B. Mukherjee, 1972. RNA synthesis in maturing mouse oocytes. *Exp. Cell Res.* **74**:577-582.
- Brinster, R. L., 1963. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp. Cell Res.* **32**:205-208.
- Cho, W. K., S. Stern, and J. D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **138**:383-386.
- Cho, W. K. and S. S. Yoo, 1975. Studies on the effect of dibutyryl cyclic AMP and theophylline on RNA synthesis in mouse follicular oocytes *in vitro*, *Kor. J. Zool.* **18**:1318.
- Cross, P. C. and R. L. Brinster, 1970. *In vitro* development of mouse oocytes. *Biol. Reprod.* **3**:298-307.
- Dekel, N. and W. H. Beers, 1978. Rat oocyte maturation *in vitro*: Relief of cAMP inhibition by gonadotropins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**:4369-4373.
- Dekel, N. and W. H. Beers, 1980. Development of rat oocytes *in vitro*: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev. Biol.* **75**:247-254.
- Edwards, R. G., 1962. Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. *Nature (London)* **196**:446-450.
- Edwards, R. G., 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature (London)* **208**:349-351.
- Eppig, J. J., 1979. Gonadotropin stimulation of expansion of cumuli oophori isolated from mice: general conditions for expansion of *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **208**:111-120.
- Fraser, L. R. and L. M. Drury, 1975. The relationship between sperm concentration and fertilization *in vitro* of mouse ova. *Biol. Reprod.* **13**:513-518.
- Howlett, S. K. and V. N. Bolton, 1985. Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J. Embryol. exp. Morph.* **87**:175-206.

- Lee, K. A., K. S. Rhee, and W. K. Cho, 1985. Studies on the effect of follicular environment and human chorionic gonadotropin (hCG) on the maturation of rat oocytes. *Kor. J. Zool.* **28**:245-256.
- Leibfried, M. L. and B. D. Bavister, 1983. Fertilizability of *in vitro* matured oocytes from golden hamster. *J. Exp. Zool.* **228**:481-485.
- Moor, R. H. and A. O. Trounson, 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.* **49**:101-109.
- Mukherjee, A. B., 1972. Normal progeny from fertilization *in vitro* of mouse oocytes matured in culture and spermatozoa capacitated *in vitro*. *Nature (London)* **327**:397-398.
- Pincus, G. and E. V. Enzmann, 1935. The comparative behavior of mammalian egg *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.
- Richter, J. D. and R. W. McGaughey, 1981. Pattern of polypeptides synthesis in mouse oocytes during germinal vesicle breakdown and during maintenance of the germinal vesicle stage by dibutyl cAMP. *Dev. Biol.* **83**:188-192.
- Schroeder, A. C. and J. J. Eppig, 1984. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Dev. Biol.* **102**:493-497.
- Schultz, R. M., R. Montgomery, D. F. Ward-Bailey, and J. J. Eppig, 1983a. Regulation of oocyte maturation in the mouse: Possible roles of intracellular communication cAMP and testosterone. *Dev. Biol.* **95**:294-304.
- Schultz, R. M., R. Montgomery, and J. Belanoff, 1983b. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.* **97**:246-273.
- Shalgi, R., N. Dekel and P. F. Kraicer, 1979. The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* **55**:429-435.
- Szollosi, D. 1972. Changes of some cell organelles during oogenesis in mammals. In: Oogenesis (Biggers, J. D. and A. W. Schuetz. eds). pp. 47-64. University Park press, Baltimore.
- Thompson, R. S., D. M. Smith, and L. Zamboni, 1974. Fertilization of mouse ova *in vitro*: An electron microscopic study. *Fertil. Steril.* **25**:222-248.
- Tsafiri, A., N. Dekel, and S. Bar-Ami. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J. Reprod. Fert.* **64**:541-551.
- Urner, F., W. L. Herrmann, E. E. Baulieu, and S. Schderet-Slatkin, 1983. Inhibition of denuded mouse oocyte meiotic maturation by forskolin, an activator of adenylate cyclase. *Endocr.* **113**:1170-1172.
- Whittingham, D., 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **14**:7-21.

(Accepted December 6, 1987)

Studies on *In Vitro* Fertilizability of Mouse Oocytes Pre-exposed to Dibutyl Cyclic AMP

Hae Mook Kang, Young Ki Lee, and Wan Kyoo Cho (Dept. of Zoology, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea)

The present study was carried out to examine the fertilizability of the mouse oocytes pre-exposed to dbcAMP which is a well-known inhibitor of the oocyte maturation. The oocytes once cultured in the dbcAMP-containing medium for a certain length of time were cultivated in the dbcAMP-free medium to induced the maturation, then mixed with sperms, and observed following culture for 24 hours.

The fertilization rate of oocytes was judged by the index of the number of 2-cell embryo developed 24hr following insemination. The fertilization rate of the oocyte previously incubated with dbcAMP (100 g/ml) for 2, 4, 8 16 hours was 32.3, 14.5, 4.7 and 8.8%, respectively, while that of the control was 53.3% indicating that the fertilizability was decreased as a function of time exposed to dbcAMP. The pretreatment of dbcAMP, however, didn't affect the process of sperm penetration to egg. In addition, there is no prominent changes in the morphological architecture of fertilized eggs which has been exposed to dbcAMP as revealed by electron microscopic observation.

Consequently, it can be concluded that the mouse oocytes once inhibited their maturation by dbcAMP may retain, in some extent, the fertilizability, although most of the fertilized egg may not proceed to further development because of the failure of pronucleus formation.