

북방산개구리(*Rana dybowskii*)여포의 프로제스테론 생성에 대한 cAMP의 조절작용

권혁방 · 안연섭 · 김지열* · 윤용달**

전남대학교 자연과학대학 생물학과 · *의과대학 핵의학교실 · **한양대학교 자연과학대학 생물학과

북방산개구리의 여포를 인공배양하면서 여포의 progesterone(P₄)의 생성양상과 cAMP의 조절작용을 조사하여 보았다. 배양중인 여포에 뇌하수체 추출물(frog pituitary homogenate, FPH)을 처리하였을 때 배양 한시간 부터 여포내 P₄의 양이 급격히 증가하였다. 그러나 생성된 P₄의 최대양이나(약 60-300 pg/follicle), peak를 이루는 시간이(2시간 이후) 개체에 따라 차이가 있었다. FPH의 처리를 받지않은 대조군에서는 배양기간에 관계없이 여포내에서 대략 10 pg/follicle 정도의 P₄가 측정되었으나 예외인 개체도 있었다. 배양액내로 분비된 P₄의 양은 여포내에 생성된 P₄양의 약 60%정도 이었다. 배양액에 adenylate cyclase의 촉진제인 forskolin이나 phosphodiesterase의 저해제인 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx)을 동시에 혹은 따로 처리하면 P₄의 생성과 분비가 역시 증가하며 모든 양상이 FPH의 자극에 의한 것과 거의 같았다. 따라서 개구리여포의 스테로이드생성은 cAMP를 통하여 조절된다는 것과 여포세포내에는 cAMP의 생성과 분해에 관계하는 효소들이 있다는 것을 알았다.

KEY WORDS: Follicular steroidogenesis, cAMP, Amphibia.

무미양서류(anurans)의 여포난자는 다른 척추동물처럼 감수분열 전기에 분열이 정지되어 있다. 뇌하수체 호르몬의 자극으로 성숙재개와 더불어 배란이 일어난다 (Smith and Ecker, 1970; Schuetz, 1971). 이때 뇌하수체 호르몬이 난자를 둘러싸고 있는 여포세포들을 자극하여 P₄를 비롯한 스테로이드들을 생성케하고 이들 호르몬이 난자의 성숙을 유도한다고 알려져 있다 (Masui, 1967; Masui and Clarke, 1979). 여포세포들이 생성하는 스테로이드들 중에서 P₄가 생체외배양에서 난자의 성숙을 매우 효과적으로 유도하고 (Schuetz, 1967), 또한 이 호르몬의 생성을 억제하는 저해제는 난자의 성숙은 물론 배란까지도 역시 억제하는 것으로 보아 P₄가 성숙유도요인 (meiotic inducing substance)으로 생각되고 있다 (Snyder and Schuetz, 1973; Maller, 1983). 본인

등은 이미 한국에서 서식하는 북방산개구리(*Rana dybowskii*)와 참개구리(*Rana nigromaculata*)의 여포들도 인공배양에서 뇌하수체 추출물(FPH) 혹은 P₄ 등에 의해 난자의 성숙이 유도됨을 확인한 바 있다 (Kwon *et al.*, 1988).

무미양서류의 난자성숙과정에 관해서는 많은 연구가 있어 왔으나 뇌하수체 호르몬이 어떤 과정에 의해 여포세포에서 P₄의 생성을 조절하는지에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. Fortune 등이 (1975) 처음으로 제노푸스(*Xenopus laevis*)의 난소 조각을 배양하면서 뇌하수체 호르몬을 처리했을 때 P₄의 생성이 증가된다는 것을 보고한 이래, 범개구리(*Rana pipiens*)에서도 이 현상이 보고되었으며 (Schuetz and Lessman, 1982) 특히 제노푸스에서는 P₄뿐 아니라 다량의 testosterone과 estradiol도 생성, 분비된다는 것이 알려지게 되었다 (Fortune, 1983). 근래에 본인등은 (Kwon and Schuetz, 1985, 1986) 여포세포의 스테로이드생성의 기작을 밝히기 위하여 북미산인 범개구리

본 연구는 1987년도 문교부 학술연구조성비에 의해 수행된 연구의 일부임

(*Rana pipiens*)의 여포를 배양하면서 간접적으로 세포내 cAMP의 농도를 높여준 결과 P₄의 생성이 촉진된 것을 발견하고 뇌하수체 호르몬이 여포 세포내의 cAMP를 증가로 하여 P₄ 생성을 조절한다는 것을 밝힌 바 있다.

본 연구는 한국산인 북방산개구리의 여포들도 cAMP에 의해 P₄의 생성이 조절되는지를 보기 위하여 여포들을 인공배양하면서 뇌하수체추출물(FPH)의 자극에 의한 여포의 P₄ 생성양상을 조사하고 아울러 cAMP가 FPH의 기능을 대체할 수 있는지를 조사하였다. 본 연구의 결과로 북방산개구리의 여포에서도 뇌하수체 호르몬이 cAMP를 증가로 하여 P₄의 생성을 촉진한다는 것을 확인하였으나 그 조절양상이 범개구리의 그것과 매우 다르다는 것을 알았다.

재료 및 방법

동물유지 및 여포배양

본 실험에 사용한 북방산개구리(*R. dybowskii*)는 전라남도 일원에서 12-1월 사이에 물속에서 동면중인 것을 채집하였다. 개구리들을 10% amphibian Ringer (AR)를 포함하고 있는 수조에 넣은 후 4°C를 유지하는 저온실에서 보관하였으며 3-4일에 한번씩 AR을 갈아주었다. 개구리를 두부절개로 죽인 후 난소를 떼어내어 AR용액에서 몇번 씻은 다음 해부현미경하에서 난소조각으로부터 여포들을 예리한 핀셋(watch maker's forcep)으로 분리해 내었다. 분리해낸 여포들을 실험군의 수에 따라 무작위로 나누다듬 2 ml의 AR을 포함하고 있는 다공배양접시(multi well culture plate, CoStar)의 각 well에 20개씩 넣어 배양하였다. 이 배양접시를 진탕기에 넣고 22°C를 유지하는 항온실에서 일분당 80회전을 시키면서 배양하였다. 배양기간 동안에 배양액의 교환은 없었으며 배양이 끝난 후 배양액을 취하여 호르몬측정에 사용하였다. 그 외에 자세한 것은 이미 전보(Kwon *et al.*, 1988)에 기술한 바 있다.

호르몬 및 시약

뇌하수체추출물(FPH)은 개구리의 뇌하수체를

50개 정도 모은다음 AR 용액에서 분쇄, 원심분리(10,000 rpm, 20 min) 과정을 거쳐 상등액을 1 pituitary equivalent(pit. equiv.)/ml의 농도로 만들어서 소량씩 분주하여(0.5 ml) 냉동(-20°C)보관하였다(Kwon *et al.*, 1988). Forskolin(Sigma)은 순수한 에탄올에 녹인후 AR로 희석시켜 180 μM(에탄올 1%이하)의 stock으로, IBMX(Sigma)는 직접 AR용액에 녹여 1.8 mM의 stock으로 만든후 필요할 때 AR로 희석시켜 사용하였다. 배양액내의 에탄올 농도는 0.02%를 넘지 않았다.

Progesterone radioimmunoassay(RIA)

일정배양기간이 지난후 배양접시의 각 well에서 배양액을 따라내어 따로 보관하였다. 여포들이(20개) 남아있는 well에 1 ml의 methanol(GR, Merck)을 첨가한 후 이 배양접시를 실온에서 100 rpm으로 15분간 진탕함으로써 여포내의 스테로이드를 추출하였다(Kwon and Schuetz, 1985). 여포가 분비한 P₄의 양은 위에서 보관한 배양액을 정제과정 없이 직접 시료로 사용하여 측정하였다. 추적자로 1,2,6,7³H-progesterone (99 Ci/mmole, Amersham)을 사용하였으며 항혈청은 progesterone-11 α-hemisuccinate-BSA(Sigma)를 토끼에 면역주사하여 얻었고 최종적으로 1:28,000으로 희석하여 사용하였다. 이 항체의 교차반응도(cross reactivity)는 4-pregnandione과 0.065%, 17 α-OH-progesterone과 0.001%, 5-pregnen-3-ol-20-one 및 기타 스테로이드와는 0.0001% 이하이었다(Yoon and Jeon, unpublished data). Scintillation cocktail로는 3.75g PPOP(2,5-diphenyloxazole)와 0.047g POPOP(2,2-phenylene-bis[5-phenoxyloxazole])를 500 ml의 toluene과 250 ml의 Triton X-100(Merck)에 녹인 것을 사용하였으며 Packard 4530 counter로 방사선량을 측정하였다. 통상적으로 두조의 progesterone 표준시료들을 정량 과정에 포함시켜 표준곡선을 구하였으며(Yoon, 1981) NIH의 RIA 계산방식에 의하여 P₄량을 결정하였다. 이 방법에 의한 측정가능치는 5 pg 수준이었다.

결 과

FPH가 여포의 progesterone 생성과 분비에 미치는 효과

FPH(0.1 pit. equiv./well)가 배양중인 여포의 P₄ 생성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 한 마리에서 취한 여포들을 실험군별로 나누어 배양을 하면서 시간별로 (0, 1, 2, 4, 6시간) 회수하여 여포내에 혹은 배양액으로 분비해낸 P₄의 양을 측정하여 보았다. 뇌하수체의 자극에 의한 여포난자의 성숙에는 9-12시간이 걸리므로 (Kwon *et al.*, 1988) 그 이전에 P₄가 생성될 것으로 생각되어 여섯시간까지의 생성양상을 조사하였다. 그림1은 FPH의 자극을 받은 여포들의 P₄ 생성양상을 보여주는 한 예로서 배양 한시간만에 여포내 P₄의 농도가 급격히 증가하여 (49 pg/follicle) 두시간 후에는 peak에 이르다가 (58 pg/foll.) 네시간 후부터 줄어들기 시작하여 (32 pg/foll.) 여섯시간 후에는 급격히 감소함을 볼 수 있다 (6 pg/foll.) (Fig. 1). 이와같이 시간별로 변하는 호르몬의 생성양상이 배양액에서 측정되는 호르몬의 분비양상에서도 유사하게 나타나는 것을 또한 볼 수 있다 (Fig. 1). 그러나 분비된 호르몬의 양은 항상 여포내의 농도보다 낮은 것을 알 수 있었다. 본 연구에서 FPH나 시약(forskolin, IBMX)의 자극을 받은 여포들이 분비한 P₄의 양을 종합하여본 결과 여포내 P₄의 약 60% (63.2 ± 6.2%, n=7) 정도이었다. 이에 대해 호르몬의 자극이 없었던 대조군에서는 배양기간이 6시간에 이르기까지 여포내에서나 배양액내에서 측정가능한 P₄의 양이 발견되지 않았다(5 pg이하). 이결과는 P₄의 생성 및 분비증가가 FPH의 자극에 의한 것이라는 것을 분명히 보여주고 있다. 그러나 생성된 P₄의 양이나 peak에 이르는 시간은 개체에 따라 큰 차이가 있었다. (n=10 마리: P₄의 양, 60-1800 pg/follicle: peak time, 2-12 hour).

여포내 cAMP의 증가가 progesterone의 생성에 미치는 영향

범개구리의 여포에서는 여포내 cAMP의 농도

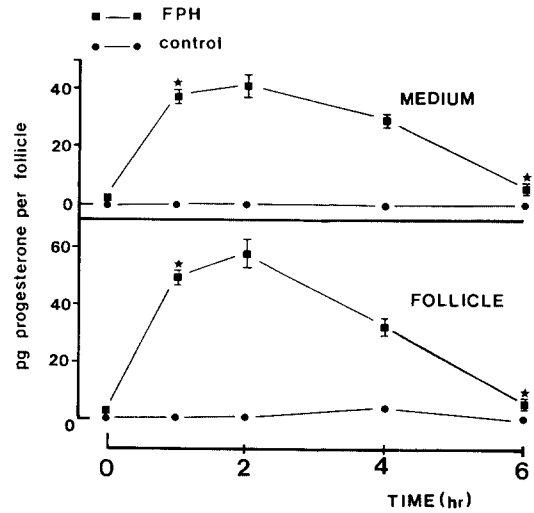


Fig. 1. Time course of progesterone production by follicles in response to frog pituitary homogenate (0.1 pit. equiv./well) *in vitro*. Follicles from one animal were cultured for up to 6 hour in wells containing 2 ml of AR in the presence or absence of FPH. Culture medium and follicle extracts with methanol were collected at designated time point for progesterone RIA. Each value represents the mean ± SEM of 4 determinations (4 assay replicates). *P < 0.05, when compared to control by Student's t-test.

를 간접적으로 높여주면 P₄의 생성이 급격하게 증가하는 것으로 보아 뇌하수체의 작용이 cAMP를 중개하여 이루어진다는 것을 알 수 있었다 (Kwon and Schuetz, 1986). 북방산개구리의 여포에서도 이러한 현상이 일어나는지를 보기 위하여 adenylylate cyclase의 촉진제인 forskolin(9 μM)과 phosphodiesterase의 저해제인 IBMX(0.27 mM)를 동시에 첨가하여 여포내 cAMP의 농도를 간접적으로 높여주고 이에 의한 P₄의 생성양상의 변화를 조사하여 보았다 (Fig. 2). 이 시약들의 처리를 받은 여포들에서 보면 여포내 P₄의 농도가 두시간서부터 뚜렷이 증가하기 시작하여 (96 pg/foll.) 네시간에 peak를 이루다가 (100 pg/foll.) 여섯시간에는 점차 감소하는 (60 pg/foll.) 현상을 볼 수 있다 (Fig. 2). 배양액내에 분비된 호르몬의 농도변화도 유사한 양상을 보여주고 있다 (Fig. 2). 더우기 FPH를 처리한 구간에서 나타나는 시간별 P₄의 생성 및 분비양상이 forskolin+IBMX

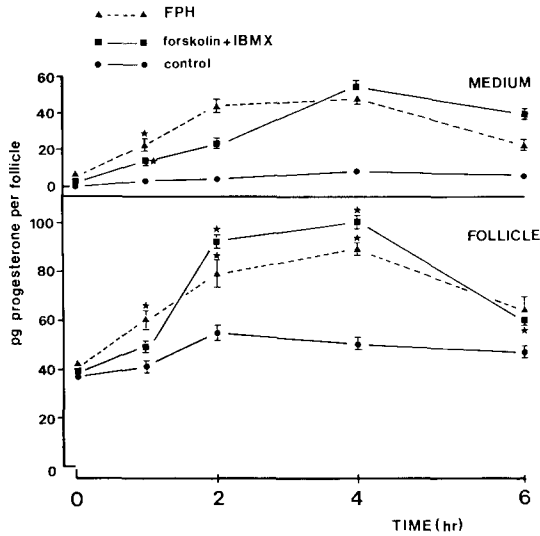


Fig. 2. Time course of changes of follicular progesterone levels following FPH or forskolin plus IBMX treatment. Follicles from one animal were cultured for up to 6 hour in the presence of FPH(0.1 pit. equiv./well) or forskolin(9 μ M) plus IBMX(0.27 mM), and extracted with methanol for steroid RIA at designated time points. Culture media were also saved for designated time points. Culture media were also saved for the RIA. Each value represents the mean \pm SEM of 4 determinations (2 well replicates, 2 assay replicates). * $P < 0.05$

group과 거의 같은 것으로 보아 cAMP의 증가가 FPH의 기능을 충분히 흉내냈다고 볼 수있다. 이에 대해 아무 처리를 받지않은 대조군에서는 배양 초기에 여포내에서 38 pg/foll. 이 측정되었고 배양 두시간 후에 56 pg/foll.이 측정되었으나 더 이상의 증가없이 시간이 지남에 따라 점차 감소하였다 (Fig. 2). 배양액내의 P_4 양도 전 배양기간동안 13 pg(여포당)을 넘지 않았다. 따라서 복방산개구리에서도 여포의 cAMP변화가 P_4 의 생성조절에 중요한 역할을 한다는 것을 알았다. 본 결과는 두마리의 개구리를 조사하였으나 유사한 결과를 얻었으므로 한마리의 것만을 표시하였다.

Forskolin이 여포의 progesterone생성에 미치는 영향

여포세포내의 cAMP가 P_4 의 생성조절에 관여한다면 cAMP의 생성에 참여하는 효소들의 작용이 또한 중요하다하겠다. 본 실험은 forskolin만

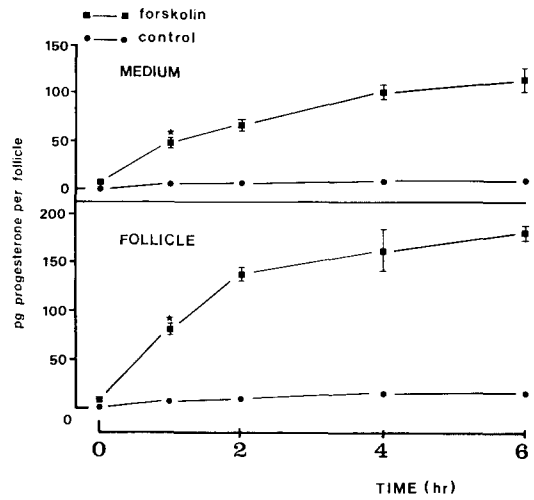


Fig. 3. Stimulation of follicular steroidogenesis by forskolin. Follicles from one animal were cultured for up to 6 hour in the presence or absence of forskolin(9 μ M). Culture media and follicle extracts with methanol were collected for steroid RIA at designated time point. Each value represents the mean \pm SEM of 4 determinations (4 assay replicates). * $P < 0.05$

을 사용하여 P_4 의 생성을 촉진시킬 수 있는지의 여부를 조사해 보았다. Forskolin(9 μ M)을 포함한 배양액에서 여포를 배양하면서 배양시간별로 P_4 수준의 변화를 조사해본 결과 그림 3과 같았다. 여포내의 P_4 는 물론 배양액내에 분비된 호르몬의 농도도 한시간부터 급격히 증가하기 시작하여(각각 88 pg/foll., 48 pg/foll.) 여섯시간까지 계속하여 증가하였다 (191 pg/foll., 112 pg/foll.). 이에 대해 대조군에서는 미미한 정도의 P_4 밖에 생성되지 않았다. 즉 여포내에 혹은 배양액에 존재하는 P_4 는 배양시간이 지남에 따라 약간 증가하는 경향을 보여주고 있으나 여섯시간까지 배양한 경우에도 15 pg/foll. 이상의 농도는 측정이 되지 않았다. 따라서 이 결과는 forskolin이 여포세포의 adenylate cyclase를 촉진하는 것만으로도 cAMP의 농도를 충분히 높이어 P_4 의 생성을 유도할 수 있다는 것으로 해석되었다. 추가로 다섯마리의 개체를 조사하여본 결과 모두 forskolin이 P_4 의 생성을 유의하게 촉진하는 것을 확인하였다 (결과 표시하지 않음).

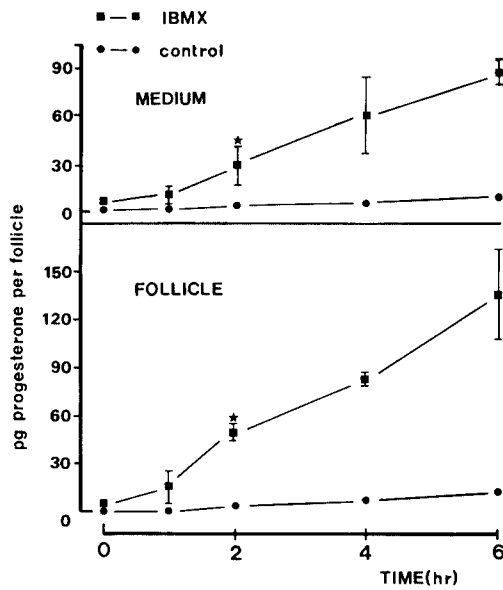


Fig. 4. Stimulation of follicular steroidogenesis by IBMX. Follicles were cultured for up to 6 hour in the presence or absence of IBMX (0.27 mM) and extracted with methanol for steroid RIA at designated time points. Culture media were also saved for the RIA. Each value represents the mean \pm SEM of 8 determinations (4 assay replicates, 2 animals). * $P < 0.05$

IBMX가 여포세포의 progesterone 생성에 미치는 영향

여포세포내에서 cAMP의 분해를 억제하는 것으로도 P_4 의 생성을 촉진할 수 있는지를 보기 위하여 배양액에 IBMX (0.27 mM)를 첨가한 후 일정시간 배양후에 여포와 배양액내에서 P_4 농도를 측정해 보았다 (Fig. 4). IBMX 처리군에서는 배양후 두시간에서부터 P_4 의 양이 증가하기 시작하여 (여포내, 49 pg/foll., 배양액내, 28 pg/foll.), 네시간, 여섯시간 까지 계속 증가하였다 (여포내, 135 pg/foll., 배양액내, 88 pg/foll.). 이에 대해 대조군에서는 대부분이 호르몬의 수준이 측정가능치 이하였으며 (5 pg) 넷 혹은 여섯시간까지 배양했을 때도 13 pg/foll. 이하이었다. 이 결과는 본 개구리의 여포세포에는 phosphodiesterase가 존재하며 cAMP의 분해를 막는 것만으로도 충분히 cAMP의 농도를 높여서 P_4 의 생성을 촉진시킬 수 있었다는 것을 보여주는 것으로 해석

되었다.

고찰

본 실험의 결과는 국내산인 북방산개구리 여포의 P_4 생성 및 분비양상을 처음으로 보여주었으며 또한 이들 여포세포가 뇌하수체호르몬의 자극으로 P_4 의 생성을 조절할 때 cAMP를 제2전달자로 사용한다는 것을 보여주었다. 이 결과는 근본적으로 본인 등이 (Kwon and Schuetz, 1986) 밝힌 범개구리 (*R. pipiens*)의 P_4 생성조절과 유사한 것으로서 대부분의 양서류에서 공통적인 현상일 것으로 추정되고 있다. 본 실험의 결과와 범개구리의 그것과 유사한 점으로는 북방산개구리의 여포들도 P_4 의 생성량이 개체에 따라 큰 차이가 나타난다는 점이다. 즉 그림1의 개구리는 FPH의 자극에도 불구하고 P_4 의 최고 생성량이 58 pg/follicle에 지나지 않으나 그림3의 개구리는 forskolin에 의해 181 pg/follicle을 생성하고 있다. 또한 본 실험실에서 10마리의 개체를 조사한 결과 cAMP에 의해 생성된 P_4 의 최고치는 60-1800 pg/follicle이었다. 아무처리를 하지않은 대조군에서도 그림2의 개구리여포는 40 pg/follicle 가량의 P_4 를 생성하고 있는데 반하여 다른 개구리들에서는 대부분 측정 불가능한 낮은 농도를 나타내고 있다 (12마리의 개체중 8마리는 측정 불가능; 4마리는 30-40 pg/follicle). 배양시간에 따른 P_4 의 생성양상도 자극의 종류에 관계없이 여섯시간에 감소하는 것과 계속 증가하는 것들이 나타나고 있다. 즉 forskolin이나 IBMX의 자극을 받은 여포들도 6시간에 급격히 감소하는 것들이 나타나므로 보아 (결과 표시하지 않음) 이는 peak time의 차이에 의한 것으로 보여지며 이러한 차이들은 모두 개구리들의 개체차이에서 나오는 것이라고 볼 수 있다. 그 예로 FPH의 자극에 대해 조사한 10마리중 4마리는 2-4시간에, 6마리는 6-12시간에 peak가 나타나는 것을 알 수 있었다 (결과 표시하지 않음). 또한 P_4 의 양이 누적적으로 증가하지 않고 감소하는 현상은 여포에 의해 다른 중간산물 (metabolite)로 변환한다는 것을 의미한다.

이에 대하여 FPH나 forskolin 혹은 IBMX에

의해 촉진된 북방산개구리 여포의 P_4 생성양상은 범개구리(*R. pipiens*)의 그것과 다음과 같은 점에서 다르다. 첫째, 여포내 P_4 분비양상이 매우 달라서 범개구리의 경우에는 여포내 P_4 의 20% 정도가 통상 배양액으로 분비되고 예외적으로 높은 경우에도 약 30%를 넘지 않았으나 (Kwon and Schuetz, 1986) 북방산개구리의 여포에서는 여포내 P_4 의 수준이 항상 배양액보다 높지만 상당량을(평균 약 60%) 배양액으로 분비하여 거의 비슷한 수준을 유지하는 경우도 나타나는 것을 볼 수 있다 (Fig. 1,3,4). 이러한 현상은 제노푸스의 여포를 배양할 때도 나타나는 것으로 (Fortune and Tsang, 1982; Fortune, 1983) 북방산개구리여포의 P_4 분비양상은 범개구리보다 오히려 제노푸스에 더 유사한 것을 알 수 있었다. 둘째, P_4 의 생성촉진이 cAMP의 농도증가에 의한다면 북방산개구리여포의 cAMP 조절방법이 범개구리와 매우 다른 것을 알 수 있다. 범개구리 여포에서는 외부에서 첨가한 forskolin이나 cAMP 혹은 IBMX 등을 단독으로 처리하면 거의 P_4 의 생성을 유발하지 못하고 forskolin과 IBMX 혹은 cAMP와 IBMX를 동시에 첨가해야만 FPH의 작용을 흉내내어 P_4 의 생성을 촉진하였다. 이 사실은 범개구리 여포세포는 cAMP의 생성촉진은 물론 분해까지도 억제해 해야 P_4 생성을 유도할만한 충분한 cAMP의 수준을 유지할 수 있다는 것으로 해석되었다 (Kwon and Schuetz, 1986). 이에 대해 북방산개구리의 여포는 forskolin이나 IBMX를 단독으로 처리했을 때에도 P_4 의 생성을 충분히 촉진할 수 있는 것으로 나타났다 (Fig. 3, 4). 이 결과는 여포세포의 adenylate cyclase를 자극하여 cAMP의 생성을 촉진하거나, 단순히 phosphodiesterase를 억제하여 cAMP의 분해를 막는 것만으로도 충분히 cAMP의 농도를 일정수준이상으로 유지하여 P_4 의 생성을 유발할 수 있다는 것을 보여주고 있다. 또 다른 가능성으로 북방산개구리의 여포세포가 범개구리의 그것보다 cAMP에 훨씬 더 민감하게 반응하여 낮은 cAMP의 농도하에서도 P_4 의 생성을 촉진했다고도 볼 수 있겠다.

본 실험에서는 여포세포내의 cAMP를 직접 측정하지 않았으므로 실제 여포내 cAMP의 농도변

화가 P_4 의 생성을 촉진했다는데에 대한 직접적인 증거는 없다고 보겠다. 그러나 다음과 같은 사실들이 이를 뒷받침해주고 있다. 첫째, 포유동물에서는 여포세포(granulosa cell)가 뇌하수체호르몬의 자극을 받으면 세포내 cAMP의 농도가 높아지고 이것이 각종 스테로이드의 생성을 촉진함과 동시에 난구세포의 분산을 유도한다는 것이 이미 잘 알려진 사실이므로 (Lindner *et al.*, 1974; Racowsky, 1985; Kwon *et al.*, 1987), 이로 미루어 볼때 이러한 여포내 cAMP의 기능이 척추동물에서 공통적인 현상으로 추정되고 있다. 둘째, 제노푸스의 여포에서 혹은 *Rana catesbeiana*의 여포에서 뇌하수체호르몬을 처리하면 실제 cAMP가 증가한다는 것이 보고 되었으며 (Jordana *et al.*, 1982; Gavaud *et al.*, 1979) 이러한 cAMP의 증가가 여포세포의 스테로이드생성과 관련이 있을 것으로 추정되었다. 셋째, 최근 본 실험실에서 forskolin이나 cAMP에 여포들을 8시간 노출시킨 후 보통배양액으로 옮겨 24시간까지 계속 배양한 결과 여포난자의 성숙이 유도됨을 발견하였다. 이 결과는 forskolin이나 cAMP가 성숙유도호르몬인 P_4 의 생성을 유발시켰다는 것을 의미하므로 P_4 의 생성과정에 cAMP가 중요한 조절작용을 한다는 것을 분명하게 보여준 것으로 해석되었다. 이러한 사실들을 종합해볼 때 북방산개구리의 여포세포도 cAMP를 증가시켜 스테로이드생성을 조절한다는 사실이 분명하다고 하겠다. 개구리의 여포세포는 여포강이 없이 직접 난자에 한층으로 부착되어 있으므로 생존력있는 여포세포들을 난자로부터 분리해내기가 쉽지 않다. 따라서 여포세포에 비해 체적이 월등히 큰 난자자체에도 cAMP system이 있으므로 여포내의 cAMP 변화측정은 cAMP의 근원을(여포세포 혹은 난자) 알 수 없는 난점을 가지고 있다. 앞으로 여포세포를 효율적으로 분리해내는 방법이 개발되면 여포세포와 난자사이의 상호작용을 규명하는데 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

인용문헌

- Fortune, J. E., 1983. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages.

- Dev. Biol.* **99**:502-509.
- Fortune, J. E., P. W. Concannon, and W. Hansel, 1975. Ovarian progesterone levels during *in vitro* oocyte maturation and ovulation in *Xenopus laevis*. *Biol. Reprod.* **13**:561-567.
- Fortune, J. E. and P. C. Tsang, 1982. Production of androgen and estradiol-17 β by *Xenopus* ovaries treated with gonadotropins *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **43**:234-242.
- Gavaud, J., P. Licht, and H. Papkoff, 1979. *In vitro* stimulation of cyclic AMP production in *Rana catesbeiana* ovaries by homologous gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* **38**:83-92.
- Jordana, X., C. C. Allende, and J. E. Allende, 1982. Differential inhibition by progesterone of the adenylate cyclase of oocytes and follicle cells of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* **143**:124-128.
- Kwon, H. B., C. H. Cho, and C. G. Choi, 1988. Studies on the induction of oocyte maturation of Korean frogs (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) *in vitro*. *Korean J. Zool.* **31**:87-94.
- Kwon, H. B., W. K. Lee, N. J. Kim, and C. H. Ra, 1987. Regulation of cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes *in vitro*: Involvement of cAMP and calcium. *Korean J. Zool.* **30**:107-116.
- 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.
- Lindner, H. R., A. Tsafiriri, M. E. Lieberman, U. Zor, Y. Koch, S. Bauminger, and A. Barnea, 1974. Gonadotropin action on cultured Graafian follicles: Induction of maturation division of the mammalian oocytes and differentiation of the luteal cell. *Recent Prog. Horm. Res.* **30**:78-138.
- Maller, J. L., 1983. Interaction of steroids with the cyclic nucleotide system in amphibian oocytes. *Advances in Nucleotide Res.* **15**:295-336.
- Masui, Y., 1967. Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* **166**:365-376.
- Masui, Y. and H. J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **57**:185-282.
- Racowsky, C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J. Reprod. Fert.* **74**:9-21.
- Schuetz, A. W., 1967. Effect of steroids on the germinal vesicle of oocytes of the frog (*Rana pipiens*) *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **124**:1307-1310.
- Schuetz, A. W., 1971. *In vitro* induction of ovulation and oocyte maturation in *Rana pipiens* ovarian follicles: effects of steroidal and non-steroidal hormones. *J. Exp. Zool.* **178**:377-385.
- Schuetz, A. W. and C. A. Lessman, 1982. Evidence for follicle wall involvement in ovulation and progesterone production by frog (*Rana pipiens*) follicles *in vitro*. *Differentiation* **22**:79-84.
- Smith, L. D. and R. E. Ecker, 1970. Regulatory processes in the maturation and cleavage of amphibian eggs. *Curr. Top. Dev. Biol.* **5**:1-38.
- Snyder, B. W. and A. W. Schuetz, 1973. *In vitro* evidence of steroidogenesis in the amphibian (*Rana pipiens*) ovarian follicle and its relationship to meiotic maturation and ovulation. *J. Exp. Zool.* **183**:333-342.
- Yoon, Y-D, 1981. The hormonal levels of the short luteal phase in Korean women(I). LH, FSH, estradiol and progesterone. *J. Basic Sci. (Hanyang Univ.)* **1**:151-166.

(Accepted June 24, 1988)

Role of cAMP in the Regulation of Progesterone Production and Secretion by Frog (*Rana dybowskii*) Follicles *in vitro*.

Hyuk Bang Kwon, Ryun-Sup Ahn, Ji Yeul Kim* and Yong Dal Yoon** (Dept. of Biology, *Dept. of Nuclear Medicine, Chõnnam National University, Kwangju 500-757; **Dept. of Biology, Han Yang University, Seoul 133-792, Korea)

The pattern of progesterone production and secretion of frog(*R. dybowskii*) follicles was investigated in follicle culture *in vitro*. Involvement of cAMP in the regulation of the steroid production by the follicles was also investigated by manipulating endogeneous cAMP level with forskolin and/or 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX).

Endogeneous follicular progesterone level increased rapidly in one hour of culture by treatment of frog pituitary homogenate(FPH) and reached peak level at 2 hours or later. But the absolute amount of progesterone produced (60-300 pg/follicle) or the peak time of the hormone level was different between individual animals. Basal level of progesterone in untreated sister follicles was very low (around 10 pg/follicle) and nearly undetectable in most cases regardless of culture time. Secretion level of progesterone by the follicles obtained by measuring the hormone in the culture media was just the reflection of the intrafollicular level. Exogeneously added forskolin, an adenylate cyclase stimulator, and/or IBMX, a phosphodiesterase inhibitor, could mimic FPH action in terms of progesterone production and secretion. Thus, it seems clear that FPH regulates progesterone production via cAMP system in the follicle cells.