

생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 Nicotine의 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

성기청·배인하

The Effects of Nicotine on the Mouse Oocyte Maturation In vitro

Ki-Cheong Sung, In-Ha Bae

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

Objective: The present study was done to clarify the effects of nicotine and nicotine tartrate on the mouse oocyte maturation in vitro.

Methods: GV (germinal vesicle) oocytes were isolated from Graafian follicle of ovaries with sharp needles under a stereomicroscope from female mouse of ICR strain (4 weeks old).

Collected oocytes were cultured for 17 hours at 37°C, 5% CO₂ in air and 100% humidified condition in incubator. New MHBS was the basic medium used in which nicotine, nicotine tartrate, and mecamlamine (antagonist of nicotinic acetylcholine receptor) were added depending on the experimental group. GV oocytes were cultured in one of these media.

Results: Nicotine (300 µM~5 mM) had no effects on GVBD (germinal vesicle breakdown) compared to the control, but increasing concentration of nicotine led to an decrease in the first polar body formation. However, nicotine (10~500 µM) induced GVBD in a dose-dependent manner of GV oocytes in a medium containing dbcAMP.

Nicotine tartrate (50 µM~5 mM) had no effects on GVBD compared to the control but, increasing concentration of nicotine tartrate led to an decrease in the first polar body formation.

Mecamlamine 10 µM added to the medium containing nicotine (300 µM~5 mM) showed higher percentage of the first polar body formation compared to the nicotine (300 µM~5 mM) treatment group.

Mecamlamine 10 µM added to the medium containing nicotine tartrate (50 µM~5 mM) showed higher percentage of the first polar body formation compared to the nicotine tartrate (50 µM~5 mM) treatment group.

Conclusion: The present study suggest that nicotine and nicotine tartrate have the harmful effects on the meiotic maturation of the mouse oocytes in vitro. However, mecamlamine block harmful effects of nicotine and nictine tartrate.

Key Words: Nicotine, Oocyte maturation, Nicotine tartrate

흡연, 즉 담배연기 속에는 일산화탄소 (CO), nicotine, radioactive polonium, benzopyrene, dimethylbenzanthracone, dimethylnitromine, methylnapthalene 등 약 4,000 여종의 성분이 들어 있는 것으로 보고되어 있으며, 이 중에는 발암물질과 돌연변이 유발물질 등

이 있으나 대부분의 성분에 대한 독성이 분석되지 않고 있는 상태이다.¹

흡연은 수명을 단축시키고²⁻⁴ 지질대사를 저하시키며,⁵ 호르몬의 불균형을 초래한다^{6,7}는 보고가 있다. 또한, 정자의 생식능력을 저하시켜 수정율을 감소시키

고,⁸⁹ 난자의 성숙을 저해한다.¹⁰¹¹ 특히, 임신 중의 흡연은 태아의 출생무게 (birth weight)를 감소시키며 성장을 지연시킨다¹²는 보고들이 있으나, 이들 대부분은 담배연기의 각 성분 연구에서 나온 것이 아니라 인구 통계학적 분석이다. 담배연기가 건강에 해롭다는 결론을 내릴 때 담배연기 각 성분에 대한 연구 없이는 분명한 과학적 근거가 불충분하다고 사료된다.

어떤 성분이 혈액 속으로 들어가 각 조직의 세포로 전달되어 여러 가지 대사작용에 이상을 초래하거나, 어떤 해로운 영향을 미칠 때 그 물질이 건강에 해롭다는 결론을 내릴 수가 있다. 따라서, 흡연이 건강에 해롭다는 것은 담배연기가 호흡기를 통해 폐로 들어가서 폐 속의 수분에 녹은 후 확산과정을 통해 혈액 속으로 들어가는 과정을 통해서이므로 담배연기 성분 중 특히 수용성인 nicotine과 tar가 주요 유해 성분이라고 추정할 수 있다.

1970년대부터 흡연의 특정 성분에 대한 생리적 현상 규명을 위한 연구가 서서히 활성화 되고 있다. 여러 연구자들은 흰쥐의 암컷에 nicotine을 생체 주입하여 배 발달 및 태아에 미치는 여러 가지 생리적 영향을 연구하였다. Hudson과 Timiras¹³는 태아의 발달이 저해되고 출생무게가 감소되었다고 보고하였고,¹³ Card와 Mitchell¹⁴은 배의 착상 (implantation)이 지연되었다고 보고하였다.¹⁴ Hammer와 Mitchell¹⁵은 배 발달 (embryo growth)이 저해되었고, 착상 (implantation)과 출산 (parturition)이 지연되었다고 보고하였다.¹⁵ Navarro 등¹⁶은 장기적으로 nicotine을 흰쥐의 모체에 주입한 결과 태아의 뇌에서 nicotine 수용체 (nicotinic receptor)가 증가하는 사실을 발견하였다.¹⁶ 또한, Maritz¹⁷,¹⁸는 nicotine이 흰쥐 암컷의 태반 (placenta)을 쉽게 통과하여 태아의 폐에 축적된다고 보고하였다.

Pekarsky 등¹⁹은 햄스터를 재료로 한 실험에서 체외 수정 시에 nicotine이 정자가 난자에 접근하여 관입하는 것을 방해한다고 보고하였다.

Balling과 Beier²⁰는 토끼의 착상 전 배 (preimplantation embryo)에 nicotine을 처리하여 체외 배양했을 때 발달이 저하되고 DNA 합성이 감소된다고 보고하였다.

최근, DiCarlantonio와 Talbot²¹는 흡연이 햄스터의 난관에서 배의 이동과 근 수축을 저해한다고 보고하였다.

현재까지 흡연이 포유동물에 미치는 영향에 대한 체내 실험은 많이 보고되어 왔지만 포유동물의 난자를 이용한 체외 실험에 대한 보고는 거의 없다. 따라서, 체내 실험과 달리 모든 요인분석을 정확하게 할 수 있는 체외 실험이 필요하다.

본 연구에서는 담배연기의 주요 성분으로 알려진 nicotine과 nicotine tartrate가 생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 영향을 알아보려고 하였고, nicotinic acetylcholine 수용체의 억제물질로써 nicotine의 작용을 억제하는 mecamlamine을 nicotine, nicotine tartrate와 함께 처리하여 생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

또한, nicotine이 세포 내 Ca²⁺을 증가시킨다는 최근보고에 의거하여 본 연구에서는 dbcAMP로 난자의 자발적 성숙을 억제시킨 상태에서 nicotine을 농도별로 처리하였을 때 난자의 성숙이 일어나는지를 살펴 보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물 및 난자의 준비

본 실험에서는 성신여자대학교 생물학과 내에 있는 사육실에서 명기 14시간, 암기 10시간으로 광 주기를 조절하고 물과 먹이를 충분히 공급하여 사육한 Swiss albino인 ICR 계통의 4주된 생쥐 암컷을 사용하였다.

미성숙 난자를 얻기 위해 생쥐 암컷을 경추골 파열로 도살한 후, 복강을 열고 양쪽 난소를 적출하여 성숙 난포를 해부현미경 (Wild M5A, Swiss)하에서 미세한 바늘 (26G needle)로 터뜨려 여포로부터 난자를 분리해 냈다. 분리된 난자를 둘러싸고 있는 난구 세포는 mouth controlled micropipette을 이용하여 제거하고 핵막 (germinal vesicle; GV)이 확인된 건강한 난자만을 선별하여 실험에 사용하였다.²²

2. 난자의 배양

수집된 난자는 microdroplet방법으로 배양접시 (60×15 mm, Falcon)위에 30 μl의 배양액 방울을 만들어 그 위에 고압 멸균된 equilibrated mineral oil (light oil, Sigma)을 덮어 배양기 (Forma Scientific, Model 3130)에서 2시간 이상 평형시킨 후, 그 속에 20~25개의 난자를 넣어 배양하였다.

Nicotine 처리군은 nicotine의 용매인 ethyl alcohol 이 mineral oil에 용해되는 것을 방지하기 위해 4개의 well을 가진 기관 배양접시 (4-well multidish, Nunclon, Denmark)의 각 well에 300 μ l의 배양액을 채워 동일한 배양기에서 2시간 이상 평형시킨 후, 그 속에 20~25개의 난자를 넣어 open culture하였고, 4개의 well 가운데에는 증류수 3~4 ml을 채워 배양액이 증발로 인한 삼투압의 변화를 방지하였다. 이렇게 수집된 난자는 37°C, 5% CO₂와 95% 공기가 공급되며 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

3. 배양액과 처리물질

모든 실험에 사용된 기본배양액은 Modified Hanks' Balanced Salt Solution²² (MHBS)에서 인산 성분을 줄이고 완충작용을 강화하여 삼투압을 280 mOsm로 조정된 New MHBS 배양액을 사용하였으며 그 조성은 다음과 같다. NaCl; 98.7 mM, KCl; 5.3655 mM, MgSO₄; 0.8118 mM, Na₂HPO₄; 0.3358 mM, KH₂PO₄; 0.1533 mM, glucose; 5.551 mM, phenol red; 10 mg/l, penicillin-G; 100 units/ml, streptomycin; 52 mg/l 등을 Milli-Q (Millipore SA-67120, France)에 녹여 10배로 농축된 stock solution을 만들었고, Na-Lactate (Sigma), Na-pyruvate (Sigma)와 CaCl₂ (Sigma)는 100배로 농축된 stock solution을 만들어 냉장 보관하여 매 실험마다 필요량을 희석하여 사용하였다. NaHCO₃ (Sigma)와 0.4% bovine serum albumin (BSA, Sigma)은 사용 직전에 녹여서 사용하였고, 모든 stock solution은 활성감소를 방지하기 위해 1주일마다 새로 만들어 사용하였다. 배양액의 최종 pH는 7.3~7.4로 하고 삼투압은 280~290 mOsm²³ (Wescor, Vapro, model 5520, U.S.A)이 되도록 하여 사용하였다. 난자의 자발적 성숙을 억제하는 dbcAMP는 dPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)에 녹여 20배 stock solution을 만들어 냉동 (-20°C) 보관 후, 실험 직전에 최종 농도가 0.2 mM이 되도록 희석하여 사용하였다.

처리물질 중 nicotine (C₁₀H₁₄N₂, M.W. 162.2, Sigma)은 ethyl alcohol (Carlo Erba, Italy)에 녹여 300배로 농축된 stock solution을 만들었고, nicotine tartrate (C₁₀H₁₄N₂ · 2C₄H₆O₆, M.W. 462.4, Sigma)는 Milli-Q에 녹여 100배로 농축된 stock solution을 만든 후 냉장 보관하여 사용하였다. Nicotinic acetylcholine 수용체

의 억제제 (antagonist)인 mecamlamine (C₁₁H₂₁N · HCl, M.W. 203.8, Sigma)은 Milli-Q에 녹여 300배로 농축된 stock solution을 만든 후 냉장 보관하여 사용하였다.

4. 난자의 관찰

미성숙 난자 (immature oocyte)의 성숙은 배양 4시간 후에 일어나는 핵막붕괴 (germinal vesicle breakdown; GVBD)와 배양 17시간 후 제1극체 (first polar body) 형성을 간접 위상차 현미경 (Interference contrast microscope, Labovert, Leitz, Germany)하에서 관찰하여 핵막붕괴율과 제1극체 형성율을 대조군과 비교하였다.

미성숙 난자는 온전한 핵막 (germinal vesicle; GV)이 존재하는 난자로 하고, 핵막붕괴 (GVBD) 난자는 핵막이 소실된 난자로 하였다. 성숙된 난자는 제1극체 (first polar body)를 방출한 난자로 하고, 퇴화된 난자 (degenerated oocyte)는 비정상적으로 응축된 난자 (condensed oocyte)와 세포질 파편화 현상 (fragmentation)이 일어난 난자로 하였다.

난자의 핵상은 배양이 끝난 난자를 0.4% PVP (polyvinylpyrrolidone, Sigma)가 포함된 dPBS에 washing하여 0.4% PVP와 1% glutaraldehyde가 포함된 bisbenzimidazole solution (Hoechst 33342, 100 μ g/ml, Sigma)에 염색한 후, 염색된 난자를 다시 dPBS에 washing하여 mounting하고 IX 70 형광 현미경 (Olympus, Japan)하에서 UV filter를 사용하여 관찰하였다.

5. 통계처리

핵막붕괴율과 제1극체 형성율은 실험에 사용된 총 난자 수와 핵막이 붕괴된 난자 수, 제1극체를 방출한 난자의 수를 이용하여 백분율을 구하였다. 관찰 결과의 통계처리는 spss/pc⁺ (version 3.0)를 이용하여 student's t-test로 하였다.

결 과

1. 기본배양액에서의 생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 nicotine의 영향

예비실험에서 17시간 배양시 대부분의 난자가 nicotine의 독성 때문에 퇴화되었으므로 기본배양액 (New

MHBS)에 nicotine을 농도별로 처리하여 4시간 후 핵막붕괴를 관찰하였고, 기본배양액에서 4시간 배양하여 핵막붕괴를 일으킨 난자만을 수집하여 nicotine을 농도별로 처리한 배양액에서 13시간 배양하여 제1극체 형성여부를 관찰하였다.

기본배양액에서 배양한 난자를 대조군으로 하고, nicotine을 농도별로 처리하여 배양한 난자를 실험군으로 하였다.

1) Nicotine이 핵막붕괴에 미치는 영향

기본배양액에 nicotine을 300 μ M, 500 μ M, 1 mM, 5 mM의 농도로 처리하여 배양 4시간 후 관찰한 결과는 Table 1과 같다. Nicotine 300 μ M, 500 μ M, 1 mM,

Table 1. Effects of nicotine on GVBD of the mouse GV oocytes

Conc. of nicotine (μ M)	Total No. of oocytes	No. of oocytes (%)	
		4 hours	
		GV	GVBD
0	98	5.1 \pm 2.3	94.9 \pm 2.3
300	74	13.5 \pm 2.4	86.5 \pm 2.4
500	109	14.7 \pm 6.0	85.3 \pm 6.0
1000	102	3.9 \pm 5.8	96.1 \pm 5.8
5000	100	11.0 \pm 4.0	89.0 \pm 1.8

Data are presented as mean \pm SD and four replications were done.

Abbreviation: GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown

5 mM을 처리한 실험군의 핵막붕괴율은 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다.

2) Nicotine이 제1극체 형성에 미치는 영향

기본배양액에서 미성숙 난자를 4시간 배양 후 핵막붕괴 난자만을 수집하여 nicotine을 300 μ M, 500 μ M, 1 mM, 5 mM의 농도로 처리하여 13시간 배양한 후 관찰한 결과는 Table 2과 같다. 300 μ M 실험군의 제1극체 형성율은 대조군의 80.6%과 비슷한 79.6%로 나타났고, 1 mM과 5 mM 실험군의 제1극체 형성율은 nicotine의 농도가 증가함에 따라 57.1, 16.1%로 유의하게 낮게 나타났으나 ($p < 0.001$), 500 μ M 실험군은 대조군에 비해 높은 91.3%의 제1극체 형성율을 보였다. 500 μ M 이상의 nicotine을 처리한 실험군은 농도가 증가할 수록 많은 수의 난자가 세포질의 응축 (shrinkage)현상을 나타냈고 (Figure 3), Hoechst 염색 결과 응축된 염색체 (pyknotic chromosome)를 관찰할 수 있었다 (Figure 4). 한편, 5 mM 실험군은 39%의 퇴화율을 나타냈다 ($p < 0.001$).

2. dbcAMP를 함유한 기본배양액에서의 생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 nicotine의 영향

미성숙 난자의 체외 배양시 나타나는 자발적인 성숙을 억제하는 물질인 dbcAMP를 처리하여 난자를 GV (germinal vesicle)로 유지시킨 상태에서 nicotine을 처리하여 미성숙 난자의 성숙과정에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보려고 하였다. dbcAMP를 함유한 배양액에서 배양한 난자를 대조군으로 하고 dbcAMP를

Table 2. Effects of nicotine on the meiotic maturation of the mouse GVBD oocytes^a

Conc. of nicotine (μ M)	Total No. of oocytes (GVBD)	No. of oocytes (%)		
		17 hours		
		GVBD	PB	Deg
0	129	19.4 \pm 9.1	80.6 \pm 9.1	0
300	103	20.4 \pm 6.7	79.6 \pm 6.7	0
500	126	8.7 \pm 7.0	91.3 \pm 7.0*	0
1000	112	42.9 \pm 9.0	57.1 \pm 9.0**	0
5000	118	44.9 \pm 3.3	16.1 \pm 4.3	39.0 \pm 5.8

Data are presented as mean \pm SD and five replications were done.

^aGVBD oocytes were transferred to nicotine contained media after culture for 4 hrs in New MHBS medium.

Abbreviation: GVBD, germinal vesicle breakdown; PB, polar body; Deg, degeneration

*, **Significantly different from the control (0 μ M), $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

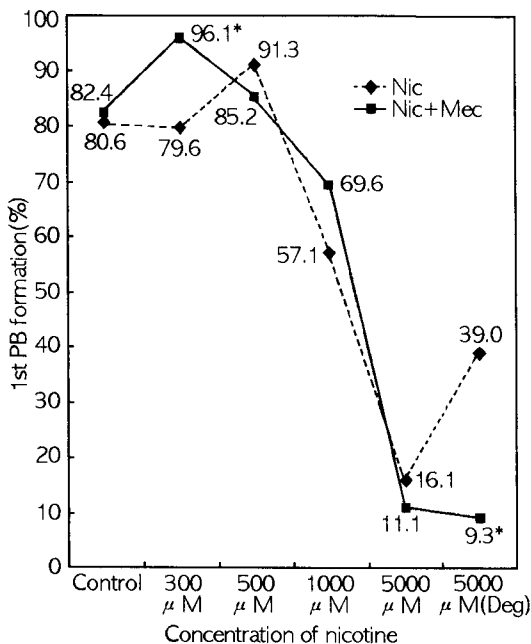


Figure 1. Effects of nicotine (Nic) on the meiotic maturation of mouse GVBD oocytes in the absence or presence of mecamlamine (Mec, 10 μM). *Significantly different from the control, *p<0.001.

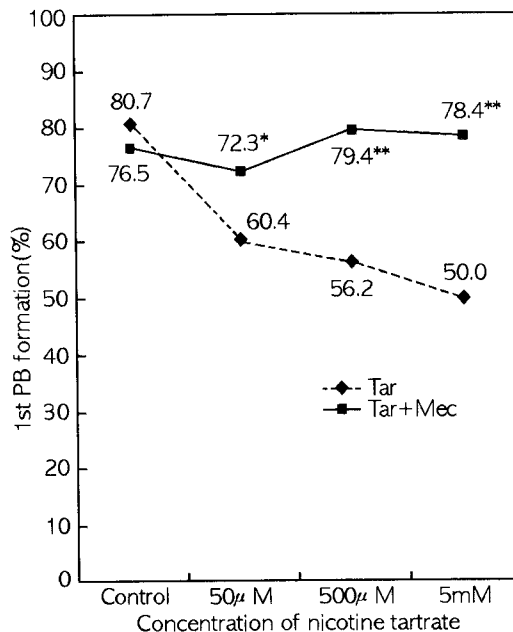


Figure 2. Effects of nicotine tartrate (Tar) on the meiotic maturation of mouse oocytes in the absence or presence of mecamlamine (Mec, 10 μM). **Significantly different from the control, *p<0.05, **p<0.001.

Table 3. Effects of nicotine on the meiotic maturation of the mouse oocytes in the presence of dbcAMP (0.2 mM)

Conc. of nicotine (μM)	Total No. of oocytes	No. of oocytes (%)				
		4 hours		17 hours		
		GV	GVBD	GV	GVBD	PB
0	145	100±0	0	100±0	0	0
10	105	89.5±15.0	10.5±15.0	87.6±16.1	2.9±5.6	9.5±11.1**
100	166	76.5±9.4	23.5±9.4	69.9±10.3	9.0±0.9	21.1±10.8**
500	116	73.3±10.8	26.7±10.8	66.4±9.6	8.6±8.9	25.0±13.1**
1000	101	100±0	0	95.0±4.1	5.0±4.1*	0

Data are presented as mean±SD and five replications were done.

0: New MHBS media + dbcAMP 0.2 mM

Abbreviation: GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; PB, polar body

*, **Significantly different from the control (0 μM), *p<0.05, **p<0.001

함유한 배양액에 nicotine을 농도별로 처리하여 배양한 난자를 실험군으로 하였다.

Table 3에서 보면 nicotine 10, 100, 500 μM을 처리하여 4시간 배양한 실험군의 핵막붕괴율은 nicotine 농도가 증가함에 따라 대조군의 0%에 비해 10.5, 23.5, 26.7%로 유의하게 나타났다 (p<0.001).

17시간 배양 후 10, 100, 500 μM 실험군에서 제1극체 형성율은 nicotine의 농도가 증가함에 따라 대조군의 0%에 비해 9.5, 21.1, 25%로 유의하게 높게 나타났고 (p<0.001), 1 mM을 처리한 실험군은 제1극체가 전혀 형성되지 않았으며, 5%의 핵막붕괴율을 나타냈다.

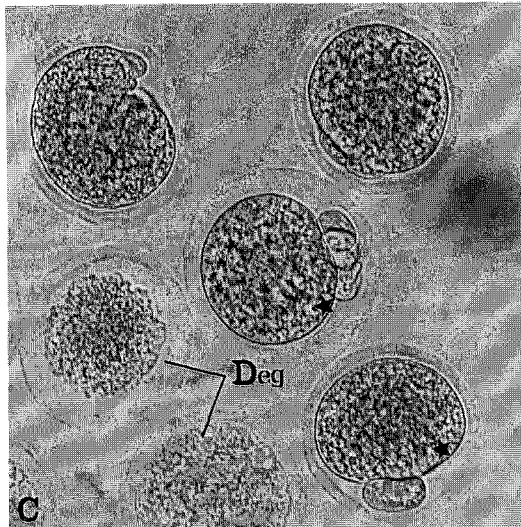
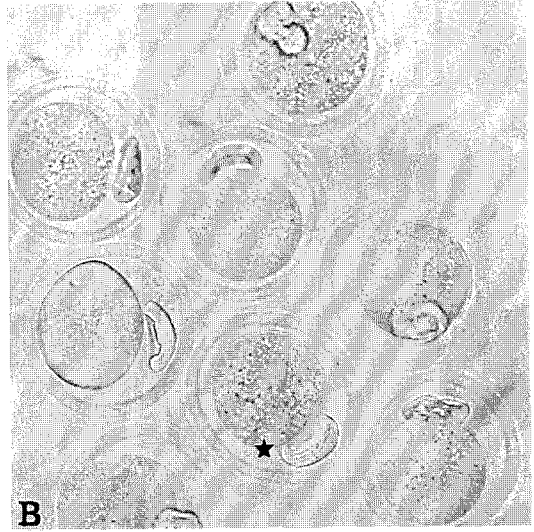
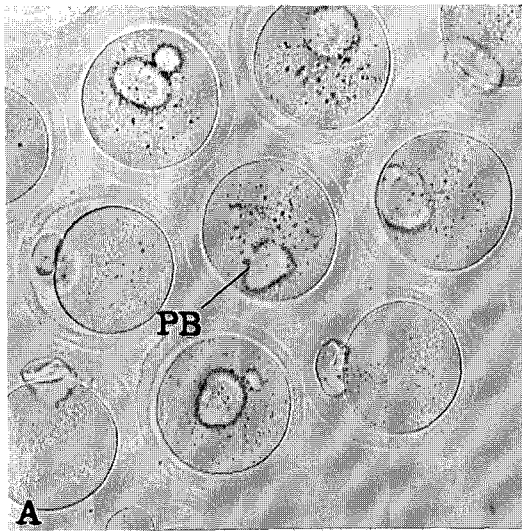


Figure 3. Light micrographs of mouse oocytes cultured for 17 hrs in the presence of nicotine ($\times 400$). **A.** Control (New MHBS), **B.** Nicotine 500 μM , **C.** Nicotine 5 mM (PB, polar body; Deg, degeneration; ★, indicates oocyte with shrunken cytoplasm).

3. 기본배양액에서의 생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 nicotine tartrate의 영향

Nicotine과 함께 담배연기의 주요 성분으로 알려진 nicotine tartrate가 난자의 성숙과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였으며, 기본배양액에 nicotine tartrate를 농도별로 처리하여 4시간 배양한 후 핵막붕괴와 17시간 배양한 후 제1극체 형성여부를 관찰하였다.

50 μM , 500 μM , 5mM 농도의 nicotine tartrate를 처리하여 17시간 배양 후에 관찰한 결과는 Table 4와 같다.

4시간 배양한 후 관찰한 결과, 50 μM , 500 μM , 5 mM 실험군의 핵막붕괴율은 대조군의 핵막붕괴율에 비해 유의한 차이가 없었다.

17시간 배양한 후 관찰한 결과, nicotine tartrate의 농도가 50 μM , 500 μM , 5 mM로 증가함에 따라 제1극체 형성율은 대조군 80.7%에 비해 60.4, 56.2, 50%로 유의하게 낮게 나타났다 ($p < 0.001$).

4. Mecamylamine을 함유한 기본배양액에서의 생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 nicotine의 영향

Nicotinic acetylcholine 수용체의 억제물질 (antago-

Table 4. Effects of nicotine tartrate on the meiotic maturation of the mouse oocytes

Conc. of nicotine tartrate (μM)	Total No. of oocytes	No. of oocytes (%)				
		4 hours		17 hours		
		GV	GVBD	GV	GVBD	PB
0	124	10.5 \pm 2.4	89.5 \pm 2.4	4.8 \pm 1.4	14.5 \pm 1.9	80.7 \pm 2.9
50	101	10.9 \pm 5.2	89.1 \pm 5.2	3.0 \pm 1.8	36.6 \pm 2.7	60.4 \pm 1.0*
500	105	5.7 \pm 1.4	94.3 \pm 1.4	2.9 \pm 1.9	40.9 \pm 1.9	56.2 \pm 1.9*
5000	102	10.7 \pm 3.3	89.3 \pm 3.3	9.8 \pm 2.4	40.2 \pm 11.4	50.0 \pm 9.2*

Data are presented as mean \pm SD and four replications were done.

Abbreviation: GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; PB, polar body

*Significantly different from the control (0 μM), * $p < 0.001$

Table 5. Effects of mecamlamine on effects of nicotine on the meiotic maturation of the mouse GVBD oocytes^a

Conc. of nicotine (μM)	Total No. of oocytes (GVBD)	No. of oocytes (%)		
		17 hours		
		GVBD	PB	Deg
0	108	17.6 \pm 2.6	82.4 \pm 2.6	0
300	102	3.9 \pm 0.7	96.1 \pm 0.7*	0
500	101	14.8 \pm 1.6	85.2 \pm 1.6	0
1000	102	30.4 \pm 2.4	69.6 \pm 2.4*	0
5000	108	79.6 \pm 1.5	11.1 \pm 1.4	9.3 \pm 0.1**

Data are presented as mean \pm SD and four replications were done.

^a GVBD oocytes were transferred to nicotine contained media after culture for 4 hrs in mecamlamine 10 μM contained medium.

0: New MHBS media + mecamlamine 10 μM

Abbreviation: GVBD, germinal vesicle breakdown; PB, polar body; Deg, degeneration

*, **Significantly different from the control (0 μM), * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

nist)로 알려진 mecamlamine을 10 μM 처리한 기본 배양액에 nicotine을 농도별로 처리하여 난자의 제1극체 형성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다. Mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에서 배양한 난자를 대조군으로 하였고, mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에서 4시간 배양 후 핵막붕괴가 일어난 난자만을 수집하여 mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine을 300 μM , 500 μM , 1 mM, 5 mM의 농도로 처리하여 13시간 배양한 난자를 실험군으로 하였다.

Table 5에서 보면 mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine 300 μM 을 처리한 실험군은 대조군보다 높은 제1극체 형성율을 보였고 ($p < 0.05$),

nicotine 500 μM 을 처리한 실험군은 대조군과 비슷한 제1극체 형성율을 보였다. Nicotine 1 mM과 5 mM을 처리한 실험군은 대조군에 비해 69.6, 11.1%의 낮은 제1극체 형성율을 보였다 ($p < 0.05$).

Figure 1을 보면 mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine 300 μM 을 처리한 실험군은 nicotine 300 μM 만을 처리했을 때 (Table 2) 제1극체 형성율이 79.6%로 나타난 데 비해 96.1%로 증가하였고 ($p < 0.001$), mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine 1 mM을 처리한 실험군은 nicotine 1 mM만을 처리했을 때 (Table 2) 제1극체 형성율이 57.1%로 나타난 데 비해 69.6%로 증가를 나타냈다. 또한, mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine

Table 6. Effects of mecamlamine on effects of nicotine tartrate on the meiotic maturation of the mouse oocytes

Conc. of nicotine tartrate (μM)	Total No. of oocytes	No. of oocytes (%)				
		4 hours		17 hours		
		GV	GVBD	GV	GVBD	PB
0	102	4.9 \pm 3.5	95.1 \pm 3.5	3.9 \pm 4.2	19.6 \pm 0.9	76.5 \pm 4.8
50	101	11.9 \pm 2.4	88.1 \pm 2.4	5.9 \pm 1.1	21.8 \pm 3.0	72.3 \pm 1.9
500	102	8.8 \pm 1.1	91.2 \pm 1.1	20.6 \pm 1.9	79.4 \pm 1.9	79.4 \pm 1.9
5000	102	17.6 \pm 4.5	82.4 \pm 4.5*	8.8 \pm 1.3	12.8 \pm 2.5	78.4 \pm 1.2

Data are presented as mean \pm SD and four replications were done.

0: New MHBS media + mecamlamine 10 μM

Abbreviation: GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; PB, polar body

*Significantly different from the control (0 μM), $p < 0.01$

5 mM을 처리한 실험군에서는 nicotine 5 mM만을 처리했을 때 (Table 2) 퇴화율이 39%로 나타난 데 비해 9.3%로 현저히 감소되었다 ($p < 0.001$).

5. Mecamlamine을 함유한 기본배양액에서의 생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 nicotine tartrate의 영향

Mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine tartrate를 농도별로 처리하여 4시간 배양한 후 핵막붕괴와 17시간 배양한 후 제1극체 형성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. Mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에서 배양한 난자를 대조군으로 하고, mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine tartrate를 농도별로 처리하여 배양한 난자를 실험군으로 하였다.

Table 6에서 보면 mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine tartrate 50 μM ~5 mM을 처리하여 4시간 배양한 결과, nicotine tartrate 5 mM을 처리한 실험군의 핵막붕괴율은 대조군에 비해 낮게 나타났고 ($p < 0.05$), 50, 500 μM 을 처리한 실험군의 핵막붕괴율은 대조군과 비슷하게 나타났다. 또한, 17시간 배양한 후에 모든 실험군의 제1극체 형성율은 대조군과 비슷하게 나타났다.

Figure 2를 보면, mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine tartrate 50 μM 을 처리하여 17시간 배양한 실험군의 제1극체 형성율은 nicotine tartrate 50 μM 만을 처리했을 때 (Table 4) 60.4%로 나타난 데 비해 72.3%로 증가하였고, mecamlamine 10 μM 을 처

리한 기본배양액에 nicotine tartrate 500 μM 을 처리한 실험군의 제1극체 형성율은 nicotine tartrate 500 μM 만을 처리했을 때 (Table 4) 56.2%로 나타난 데 비해 79.4%로 증가하였다 ($p < 0.001$). 또한 mecamlamine 10 μM 을 처리한 기본배양액에 nicotine tartrate 5 mM을 처리한 실험군의 제1극체 형성율은 nicotine tartrate 5 mM만을 처리했을 때 (Table 4) 50%로 나타난 데 비해 78.4%로 현저한 증가를 나타냈다 ($p < 0.001$).

고 찰

본 실험에서는 담배연기의 주요 성분으로 알려진 nicotine과 nicotine tartrate가 생쥐 난자의 체외 성숙에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 흡연자의 혈액에 존재하는 nicotine의 평균적인 농도는 0.1~1 μM 인데 예비 실험결과 nicotine의 생리적인 농도 (0.1~1 μM)는 생쥐 난자의 체외 성숙에 아무런 영향을 미치지 않았다.

Nicotine 300 μM ~5 mM을 처리하여 4시간 배양한 실험군의 핵막붕괴율은 대조군과 비슷하게 나타나 통계적 유의성이 없었다.

Nicotine 300 μM ~5 mM을 처리하여 17시간 배양했을 때 대부분의 난자가 퇴화되었으므로, nicotine이 제1극체 형성에 미치는 영향을 보기 위해 기본배양액에서 4시간 배양하여 핵막붕괴를 일으킨 난자만을 수집하여 nicotine 300 μM ~5 mM을 처리한 실험군으로 옮겨 13시간 배양하였다. 그 결과, nicotine 500 μM 을 처리하여 17시간 배양한 실험군의 제1극체 형성율은 대

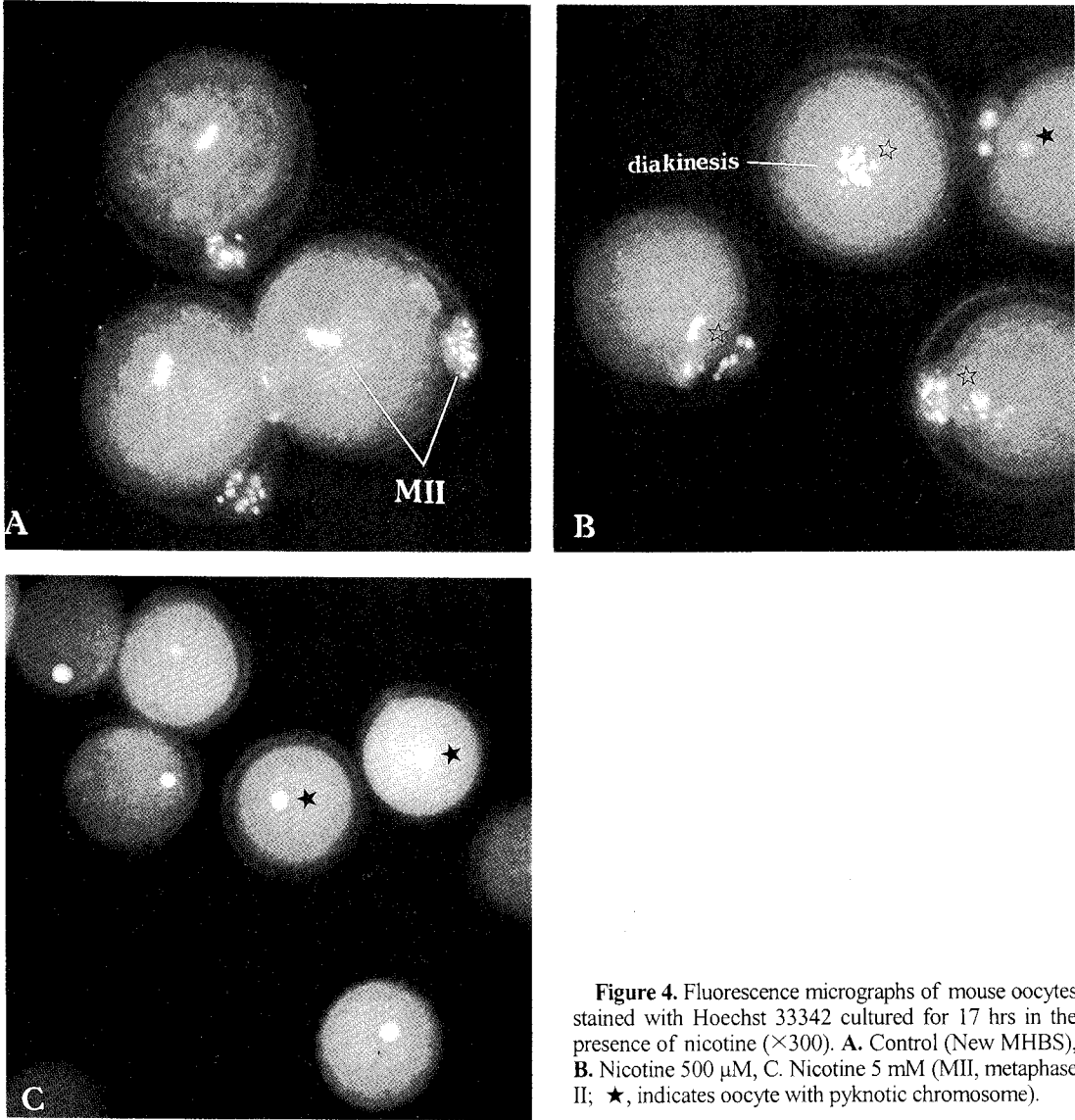


Figure 4. Fluorescence micrographs of mouse oocytes stained with Hoechst 33342 cultured for 17 hrs in the presence of nicotine ($\times 300$). **A.** Control (New MHBS), **B.** Nicotine 500 μM , **C.** Nicotine 5 mM (MII, metaphase II; \star , indicates oocyte with pyknotic chromosome).

조군의 80.6%에 비해 91.3%로 증가했지만, nicotine 300 μM , 1 mM, 5 mM을 처리한 실험군들은 농도가 증가함에 따라 79.6, 57.1, 16.1%로 제1극체 형성율의 감소를 보였다. 한편, 500 μM 이상의 nicotine을 처리한 실험군에서는 농도가 증가함에 따라 세포질의 응축현상을 보이는 난자가 증가하였고, Hoechst 염색 결과 응축된 염색체 (pyknotic chromosome)가 많이 관찰되었다. 또한, 5 mM 실험군은 39%의 퇴화율을 보이는 등 고농도의 nicotine은 난자에 toxic한 효과를 보이는 것을 알 수 있다.

Nicotine은 nicotinic acetylcholine 수용체를 활성화시키는데, 신경으로부터 분비되는 acetylcholine은 muscarinic acetylcholine 수용체와 nicotinic acetylcholine 수용체 두 종류의 수용체를 가진다. Muscarinic acetylcholine 수용체는 muscarine에 의해 활성화되고, nicotinic acetylcholine 수용체는 ion-channel-linked 수용체로써 골격근 세포 (skeletal muscle cell)와 신경 세포 (nerve cell)에서 nicotine에 의해 활성화된다. Nicotine이 골격근 세포와 신경 세포에서 nicotinic acetylcholine 수용체를 활성화시켜 세포 내 Ca^{2+} 을 증가시킨다²⁴⁻²⁷

는 보고가 있는데, 세포 내 Ca^{2+} 은 신호전달과정에서 중요한 역할을 하며,²⁸⁻³⁰ 난자의 성숙과정 및 활성화 과정에 필수적인 것으로 보고되어 있다.³¹⁻³³ cAMP의 agonist인 N^6, O^2 -dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (dbcAMP)의 처리로 난자의 자발적 성숙을 억제³⁴시킨 상태에서 Ca^{2+} 농도가 증가되면 dbcAMP의 억제효과가 극복되어 난자의 성숙이 재개된다는 보고가 되어 있다.³¹ 본 연구에서 dbcAMP로 생쥐 난자의 자발적 성숙을 억제시킨 상태에서 nicotine을 처리한 결과, nicotine은 넣지 않고 dbcAMP만 처리한 대조군에서는 핵막붕괴가 전혀 일어나지 않은 반면 dbcAMP와 nicotine을 같이 처리한 실험군에서는 nicotine의 농도가 10, 100, 500 μM 로 증가함에 따라 핵막붕괴율이 10.5, 23.5, 26.7%로 농도에 따라 점차 증가하는 것이 관찰되었다.

이와 같은 결과로 미루어 생쥐 난자에도 nicotinic acetylcholine 수용체가 존재하며 nicotine이 이 수용체를 활성화시켜 세포 내 Ca^{2+} 을 증가시켰을 것으로 추정된다.

담배연기의 또 다른 주요 성분인 nicotine tartrate도 nicotine과 비슷한 양상을 보여주고 있다. Nicotine tartrate 50 μM , 500 μM , 5 mM을 처리하여 4시간 배양한 실험군들의 핵막붕괴율은 대조군과 비슷하게 나타나 통계적 유의성이 없었으나, 17시간 배양 후 제1극체 형성율은 대조군의 80.7%에 비해 60.4, 56.2, 50.0%로 농도가 증가함에 따라 유의하게 감소되었다. 한편, nicotine 5 mM을 처리했을 때 39%의 퇴화율을 나타냈던 것과 달리 퇴화된 난자가 없는 것으로 보아, nicotine이 nicotine tartrate보다 toxic하다고 할 수 있다.

Nicotinic acetylcholine 수용체의 억제물질인 mecamlamine은 nicotine에 의해 nicotinic acetylcholine 수용체가 활성화되는 것을 억제한다는 보고가 있다.³⁵⁻³⁷ 이에 본 실험에서는 mecamlamine이 nicotine에 의해 억제된 난자 성숙을 극복시킬 수 있는지 알아보았다. Mecamlamine 10 μM 을 처리하여 4시간 배양했을 때 기본배양액에서 배양한 대조군과 비슷한 핵막붕괴율을 보인 것을 예비 실험을 통해 확인하였다. Nicotine이 난자 성숙에 미치는 영향을 알아본 실험과 동일한 조건에서 비교하기 위해 mecamlamine 10 μM 을 처리하여 4시간 배양한 후 핵막붕괴를 일으킨 난자만을 수집하여 mecamlamine 10 μM 을 처리한 배양액에

nicotine을 300 μM ~5 mM 농도로 처리하여 제1극체 형성율을 비교하였다.

Nicotine 300 μM 을 처리한 실험군의 제1극체 형성율은 mecamlamine 10 μM 만을 처리한 대조군의 82.4%에 비해 96.1%로 높게 나타났고, nicotine 1 mM과 5 mM을 처리한 실험군의 제1극체 형성율은 69.6, 11.1%로 낮게 나타났다.

Nicotine만을 처리하였던 실험과 비교했을 때, mecamlamine 10 μM 을 처리한 배양액에 nicotine 300 μM , 1 mM을 처리한 실험군의 제1극체 형성율은 nicotine만을 처리한 실험군의 79.6, 57.1%에 비해 96.1, 69.6%로 유의하게 증가했고, 5 mM에서의 퇴화율은 39.0%에서 9.3%로 유의하게 감소하였다. Mecamlamine이 nicotine에 의해 억제된 난자 성숙을 극복시킨 것으로 보아 nicotinic acetylcholine 수용체가 생쥐 난자에 존재할 가능성이 있다는 앞서의 주장을 뒷받침한다고 할 수 있다.

또한, mecamlamine이 nicotine tartrate에 의해 억제된 난자 성숙을 극복시킬 수 있는지 알아보았다. Nicotine tartrate가 난자 성숙에 미치는 영향을 알아본 실험과 동일한 조건에서 비교하기 위해 mecamlamine 10 μM 을 처리한 배양액에 nicotine tartrate 50 μM ~5 mM을 처리하여 4시간 배양 후 핵막붕괴율과 17시간 배양 후 제1극체 형성율을 비교하였다.

Nicotine tartrate만을 처리하였던 실험과 비교했을 때 mecamlamine 10 μM 을 함유한 배양액에 nicotine tartrate 50 μM , 500 μM , 5 mM을 처리한 실험군의 제1극체 형성율은 nicotine tartrate만을 처리한 실험군의 60.4, 56.2, 50.0%에 비해 72.3, 79.4, 78.4%로 유의하게 증가하였다. 즉, mecamlamine을 처리했을 때는 난자가 nicotine tartrate의 영향을 별로 받지 않음을 알 수 있다.

본 실험에서 nicotine이 어떤 기작으로 생쥐 난자의 성숙을 저해하였는지 알 수 없지만, dbcAMP로 성숙을 억제시킨 난자에 nicotine을 처리하여 성숙 재개를 일으킨 점과 nicotinic acetylcholine 수용체의 억제제인 mecamlamine을 처리했을 때 nicotine과 nicotine tartrate의 난자 성숙 저해효과를 극복한 점을 통해 생쥐 난자에 nicotinic acetylcholine 수용체가 존재할 가능성을 추정할 수 있었다. 이 점에 대해서는 앞으로 분자 생물학적인 연구가 더욱 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 여자대학교 연구기반확충사업 (98-N6-04-01-A-03)과 1998 성신여자대학교 연구소 특별사업지원계획지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Stillman RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *Fertil Steril* 1986; 46: 545-66.
2. DiFranza JR, Lew RA. Effect of maternal cigarette smoking on pregnancy complications and sudden infant death syndrome. *J Fam Pract* 1995; 40: 385-94.
3. Slotkin TA, Saleh JL, McCook EC, Seidler FJ. Impaired cardiac function during postnatal hypoxia in rats exposed to nicotine prenatally: Implications for perinatal morbidity and mortality, and for sudden infant death syndrome. *Teratology* 1997; 55: 177-84.
4. Milerad J, Vege A, Opdal SH, Rognum TO. Objective measurements of nicotine exposure in victims of sudden infant death syndrome and in other unexpected child deaths. *J Pediatr* 1998; 133: 232-6.
5. Pelletier O. Smoking and Vitamin C levels in humans. *Am J Clin Nutr* 1968; 21: 1259-67.
6. Berta L, Fortunati N, Gennari P, Appendino M, Casella A, Frarira R. Influence of cigarette smoking on pituitary and sex hormone balance in healthy premenopausal women. *Fertil Steril* 1991; 56: 788-9.
7. Berta L, Frarira R, Fortunati N, Fazzari A, Gaidano G. Smoking effects on the hormonal balance of fertile women. *Horm Res* 1992; 37: 45-8.
8. Attia AM, EL-Dakhly MR, Halawa FA, Ragab NF, Mossa MM. Cigarette smoking and male reproduction. *Arch Androl* 1989; 23: 45-9.
9. Rubes J, Lowe X, Moore D, Perreault S, Slott V, Evenson D, et al. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil Steril* 1998; 70: 715-23.
10. Zenzes MT, Wang P, Casper RF. Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 1995; 10: 3213-7.
11. Zenzes MT, Reed TE, Casper RF. Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 1997; 12: 1736-41.
12. Eskenazi B, Prehn AW, Christianson RE. Passive and active maternal smoking as measured by serum cotinine: The effect on birthweight. *Am J Public Health* 1995; 85: 395-8.
13. Hudson DB, Timiras PS. Nicotine injection during gestation: impairment of reproduction, fetal viability, and development. *Biol Reprod* 1972; 7: 247-53.
14. Card JP, Mitchell JA. The effects of nicotine on implantation in the rat. *Biol Reprod* 1979; 20: 532-9.
15. Hammer RE, Mitchell JA. Nicotine reduces embryo growth, delays implantation, and retards parturition in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 162: 333-6.
16. Navarro HA, Seidler FJ, Schwartz RD, Baker FE, Dobbins SS, Slotkin TA. Prenatal exposure to nicotine impairs nervous system development at a dose which does not affect viability or growth. *Brain Res Bull* 1989; 23: 187-92.
17. Maritz GS. Effect of maternal nicotine exposure on growth in vivo of lung tissue of neonatal rats. *Biol Neonate* 1988; 53: 163-70.
18. Maritz GS. The influence of maternal nicotine exposure on neonatal lung metabolism. Protective effect of ascorbic acid. *Cell Biol Int* 1993; 17: 579-85.
19. Pekarsky A, Rust PF, Varn E, Mathur RS, Mathur S. Effects of nicotine on sperm attachment and penetration of zona-free hamster eggs. *Arch Androl* 1995; 34: 77-82.
20. Balling R, Beier HM. Direct effects of nicotine on rabbit preimplantation embryos. *Toxicology* 1985; 34: 309-13.
21. DiCarlantonio G, Talbot P. Inhalation of mainstream and sidestream cigarette smoke retards embryo transport and slows muscle contraction in oviducts of hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Biol Reprod* 1999; 61: 651-6.
22. Bae I-H, Channig CP. Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocy-

- tes isolated from medium-sized Graafian follicles. *Biol Reprod* 1985; 33: 79-87.
23. Bae I-H, Foote RH. Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolarity. *J Reprod Fertil* 1980; 59: 11-13.
 24. Mülle C, Choquet D, Korn H, Changeux JP. Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron* 1992; 8: 135-43.
 25. Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 1992; 8: 127-34.
 26. Wakakura M, Utsunomiya-Kawasaki I, Ishikawa S. Rapid increase in cytosolic calcium ion concentration mediated by acetylcholine receptors in cultured retinal neurons and Müller cells. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236: 934-9.
 27. Zhang J, Xiao Y, Abdrakhmanova G, Wang W, Cleemann L, Kellar KJ et al. Activation and Ca^{2+} permeation of stably transfected $\beta 3/\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacology* 1999; 55: 970-81.
 28. Means AR. Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. *FEBS Lett* 1994; 347: 1-4.
 29. Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transient and the role of calcium in exocytosis cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992; 149: 80-9.
 30. Whitaker M, Patel R. Calcium and cell cycle control. *Development* 1990; 108: 525-42.
 31. Powers RD, Paleos GA. Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *J Reprod Fertil* 1982; 66: 1-8.
 32. Bae I-H, Chang BY. Calcium uptake in mouse oocyte matured in vitro. *Kor J Fertil Steril* 1989; 16: 1-7.
 33. Homa ST. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 122-34.
 34. Cho WK, Stern S, Biggers JD. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocytes maturation in vitro. *J Exp Zool* 1974; 187: 383-6.
 35. Malin DH, Lake JR, Carter VA, Cunningham JS, Hebert KM, Conrad DL, et al. The nicotinic antagonist mecamylamine precipitates nicotine abstinence syndrome in the rat. *Psychopharmacology* 1994; 115: 180-4.
 36. Glick SD, Visker KE, Maisonneuve IM. An oral self-administration model of nicotine preference in rats: effects of mecamylamine. *Psychopharmacology* 1996; 128: 426-31.
 37. Watkins SS, Epping-Jordan MP, Koob GF, Markou A. Blockade of nicotine self-administration with nicotinic antagonists in rats. *Pharmacology Biochem Behav* 1999; 62: 743-51.