

體外成熟牛卵胞卵의 體外受精과 發達에 關한 研究

IV. 卵丘細胞의 生化學的 特性 檢討

朴世必, 鄭炳敏, 李勳澤, 鄭吉生

建國大學校 畜產大學

Studies on *In Vitro* Fertilization and Development of Bovine Follicular Oocytes Matured *In Vitro*

IV. Studies on the Biochemical Characteristics of Cumulus Cell

Park, S.P., H.M. Chung, H.T. Lee, and K.S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were undertaken as a basic study to understand the role of cumulus cell on *in vitro* maturation and fertilization process with identifying the cumulus cell-secreted proteins.

By sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and fast protein liquid chromatography (FPLC), the proteins of cumulus cells were identified.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. When the proteins secreted from cultured cumulus cell for 30 hours were separated by SDS-PAGE, there were a major band (>94,000) and other minor 2 bands with molecular weight ranging 30,000~67,000 dalton.
2. In addition, the fractionations of these proteins by FPLC were indirectly shown that three bands were hyaluronic acid, chondroitin sulfate, and heparin.

I. 緒 論

Glycosaminoglycans (GAGs)은 卵丘細胞와 granulosa cell에서 分泌되어 卵胞腔內的 卵胞液에 존재하며 (Sato 등, 1987) 그 양은 0.2~0.3% (w/v)로 알려져 있다 (Yanagishita 등, 1979). 일찌기 Jensen과 Zachariae (1985)는 卵胞液에 함유된 GAGs의 量은 成熟이 진행되면서 현저히 감소되는 반면 卵丘細胞 사이의 intercellular matrix에서는 증가했으며, 또한 이들 GAGs의 主成分은 chondroitin sulfate (CS)라고 報告한 바 있다 (Yanagishita와 Hascall, 1979; Yanagishita 등, 1979). 그러나 소 卵胞液에는 낮은 濃度の CS가 함유되어 있으나 閉鎖 卵胞內에는 多量으로 포함되어 있으며 (Bellin과 Ax; 1984) 그 밖에도 heparin-like substances, dermatan sulfate 등

이 존재한다는 報告도 있다 (Gebauer 등, 1978; Ax와 Ryan, 1979; Grimek과 Ax, 1982; Bellin 등, 1983; Grimek 등, 1984).

위의 경우, 卵丘細胞의 intercellular matrix에는 多量의 hyaluronic acid가 존재하며 (Eppig, 1979 a, b), 소에 있어서도 마찬가지로 hyaluronic acid가 존재하는데 (Ball 등, 1982) 특히 排卵前 卵子 (pre-ovulatory)를 둘러싸고 있는 卵子로부터 分泌되는 glycoprotein (Ball 등, 1982; Lenz 등, 1982) 및 生化學的 役割이 아직 규명되지 않은 다양한 非스테로이드 系列의 物質들 (Tesarik, 1981)은 精子的 尖體反應 (Lenz 등, 1983) 및 前核 形成率 (Ball 등, 1983)을 향상시키며 精子侵入과 細胞質成熟을 促進시킨다 (Vanderhyden과 Armstrong, 1989).

따라서 本 研究은 未成熟 牛卵胞卵을 體外成熟시키는

본 연구는 건국대학교 동물자원연구센터 연구비에 의하여 수행되었음.

데 있어서 卵丘細胞로부터 分泌되는 物質의 特性을 把握하여 卵胞卵의 體外成熟과 受精時 卵丘細胞의 役割을 구체적으로 究明하기 위한 일환으로서 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

卵胞卵은 屠畜場(宇星農場)에서 屠殺된 Holstein 成 牝牛로부터 回收하였다.

2. 卵子 處理用 培養液

卵자의 回收, 體外 成熟 및 受精卵의 體外培養을 爲 해서는 TCM 199(Gibco Co.)에 Na-pyruvate(0.11 g/l)와 gentamycin(0.2mg/ml)을 添加한 것을 基礎 培養液으로 使用하였다.

卵子回收을 爲해서는 25mM HEPES(Sigma Co.)를, 體外成熟을 爲해서는 10%의 fetal calf serum (FCS, Sigma Co.)과 1 μ g/ml의 FSH, 2IU/ml hCG 및 1 μ g/ml의 Oestradiol-17 β (Sigma Co.)를 添加한 것을 使用하였다.

이들 모든 培養液은 pH 7.2~7.4, 滲透壓 285~290 mOsmol/kg 으로 調整하였으며 使用 直前に 0.22 μ m의 membrane filter를 사용하여 除菌한 다음 10ml 씩 分注하여 4°C에서 保管하면서 使用하였다.

3. 卵胞卵의 回收

Holstein 成牝牛의 卵巢를 屠殺한 直後에 切取하여 保溫瓶에 들어있는 生理的 食鹽水에 浸漬하여 2時間 이 내에 實驗室까지 運搬하였다. 이때 使用한 生理的 食鹽 水에는 penicillin G(1,000 IU/ml)와 streptomycin sulfate(100 μ g/ml)를 添加하였으며 그 溫度는 38~39°C로 調整하였다. 卵巢 表面에 附着되어 있는 血液은 生理的 食鹽水로 洗滌한 다음 2~6mm의 可視卵 胞로부터 卵胞卵을 回收하였다.

卵胞卵의 回收方法으로서 是 20gauge의 注射針이 附 着된 10ml 注射器로 卵胞液과 함께 吸引한 다음 TCM-HEPES 培養液 2ml가 들어 있는 試驗管으로 옮겨 5 分 동안 靜置하였다. 靜置 후 下層의 卵胞液과 卵胞卵을 Spoid-pipette 으로 吸引하여 2ml TCM-HEPES가 들어 있는 watch glass로 다시 옮긴 다음 實體顯微鏡 下에서 卵胞卵을 回收하였다.

4. 卵胞卵의 體外成熟

前述한 體外 成熟用 培養液 100 μ l 小滴을 流動 paraffin oil로 被覆한 다음 39°C, 5% CO₂ 및 95% 空氣條件의 培養器內에서 5~6時間 平衡시킨 후 이 培養 液 小 滴 에 回 收 된 卵 胞 卵 을 浸 漬 하여 30時間 培 養 하였다.

5. 卵丘細胞 代謝產物의 分離度 檢査 및 分子量 測定 1) One-Dimensional SDS-PAGE

O'Farrel(1975)과 Laemmli(1970)의 方法을 併用 하여 實施하였다. 卵丘細胞의 分泌物(15 μ l)을 sample buffer(2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.06M Tris-HCl, pH 6.8)와 1:1로 섞 어 100°C에서 3~5分間 加熱한 後, 3%적재젤과 100% 전개젤에서 120V로 7時間 전개시켰다. 전개한 후 Coomassive Brilliant Blue-R 250으로 染色하였고 脫色은 脫色溶液(50% methanol, 10% acetic acid) 에 젤을 3회 이상 2時間 靜置하여 실시하였다. 蛋白質 樣相의 分析은 Ferguson(1964)의 方法에 따라 分子量 을 測定하였다.

2) FPLC(Fast protein liquid chromatography)

卵丘細胞 分泌物의 分離度 檢査 및 分子量 確認을 爲 하여 FPLC(Superose 12, Code No. 17-0538-01, Pharmacia, Sweden)를 실시하였는데 gel 溶出 buffer는 0.15M의 NaCl을 含有한 phosphate buffer(0.1M, pH 7.0)였다. 溶出速度는 分當 0.7ml 로 하였고 280nm의 吸光度와 0.01Aufs (absorbance unit full scale)에서 實施하였다. 또한 分子量 推 定을 위한 standard maker로서는 商業的으로 市販되 고 있는 glycosaminoglycans(GAGs)의 構成成分中 hyaluronic acid(Grade I, Sigma Co., M.W. > 50,000), chondroitin sulfate(Grade III from whale or shark cartilage, Sigma, Co., M.W. 40,000-50,000) 및 heparin(Grade I from porcine intestinal mucosa, Sigma Co., M.W. 6,000~30,000)을 使用하였다.

III. 結果 및 考察

1. 卵丘細胞 分泌物の 分子量 測定

1) One-Dimensional SDS-PAGE

卵丘細胞로 둘러싸인 卵胞卵을 30時間 동안 培養한 後, 卵丘細胞로 부터 分泌된 物質의 分子量 測定을 위하여 電氣泳動을 實施하였던 結果는 Fig. 1, 2에 나타난 바와 같다.

Fig. 1에서 Lane A는 各各의 molecular weight 를 나타낸 것이며, Lane B에서 나타난 卵丘細胞 分泌

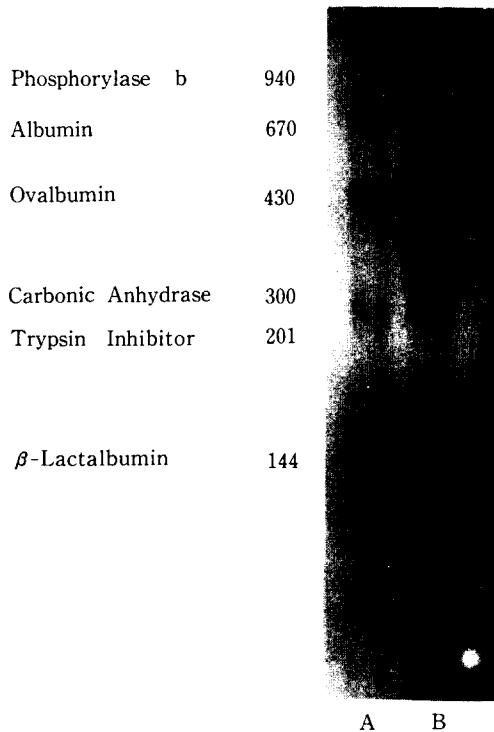


Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10%) of proteins secreted by bovine cumulus cells

A: Protein molecular weight markers ($\times 10^2$ dalton) are indicated to the left in corresponding known proteins

B: Proteins secreted by bovine cumulus cells

物의 分子量 範圍는 M.W. 94,000 以上の 한개의 main band와 M.W. 67,000과 30,000사이에서 2개의 band가 形成되었음을 알 수 있고, Densitometer (CAMAG, Sweden)로 測定한 結果 再次 確認되었다 (Fig. 2).

2) FPLC(Fast protein liquid chromatography)

앞서 確認된 3個의 band成分을 具體적으로 檢討하기 위하여 商業적으로 市販되고 있는 Glycosaminoglycans(GAGs)의 成分中 Hyaluronic acid(Grade I, Sigma Co., M.W.>50,000), Chondroitin

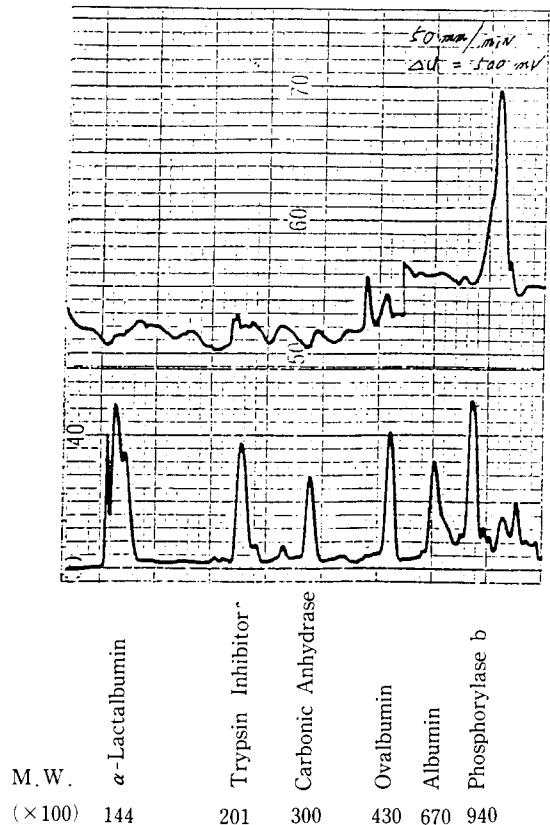


Fig. 2. Densitometry of separated protein bands of bovine cumulus cell by SDS-PAGE

A: Standard maker

B: Protein secreted by bovine cumulus cells

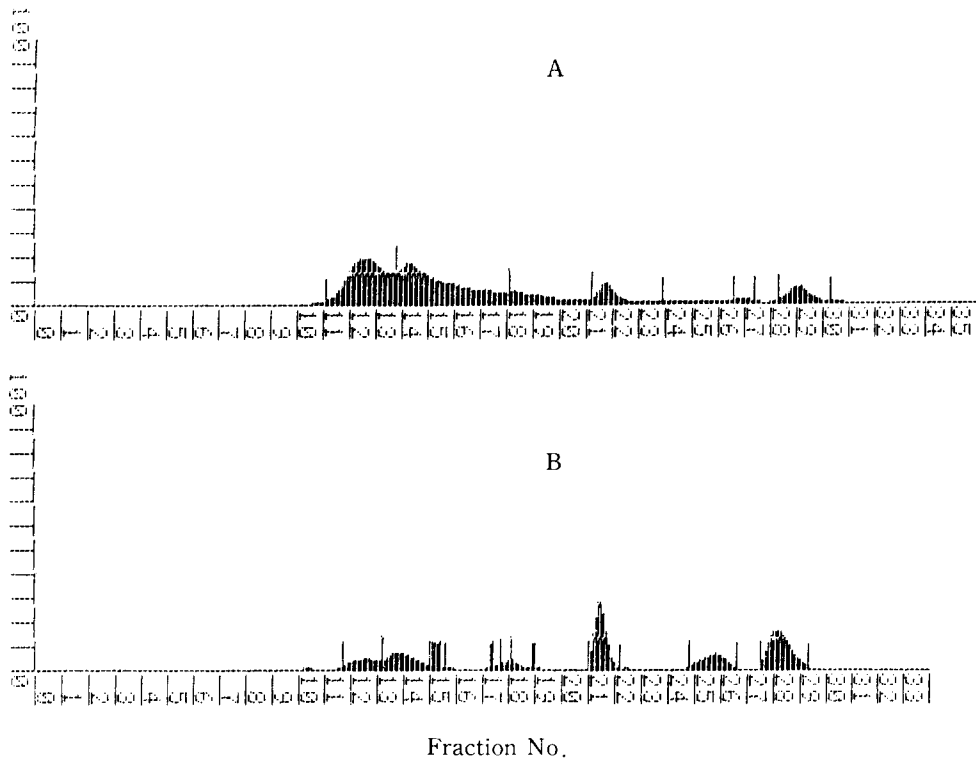


Fig. 3. Separation of proteins of bovine cumulus cell by fast protein liquid chromatography (FPLC)

A : I : Hyaluronic acid II : Chondroitin sulfate III : Heparin

B : Proteins secreted by bovine cumulus cells

sulfate (Grade III from whale or shark cartilage, Sigma Co., M.W. 40,000~50,000) 및 Heparin (Grade I from porcine intestinal mucosa, Sigma Co., M.W. 6,000~30,000) 등을 Standard maker로 사용하여 FPLC를實施한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다.

Fig. 3A의 fraction No. 12~14는 hyaluronic acid, fraction No. 21~22는 chondroitin sulfate 및 fraction No. 28~29는 heparin을 사용했을 때 나타난 peak이다.

또한 Fig. 3B는 卵丘細胞로 둘러싸인 卵胞卵을 30時間동안 培養한 後, 分泌物를 檢討한 것으로 fraction no. 12~14, 17~18, 21, 25~26, 28의 다섯개 peak를 얻을 수 있었다. 이러한 결과를 Fig. 3A와 比較해

볼 때 fraction no. 12~14와 21 및 28의 경우 각각 hyaluronic acid, chondroitin sulfate 및 heparin의 成分이라는 것을 間接적으로 確認할 수 있었으며, 그외에도 두 개의 未知因子 (fraction no. 17~18과 25~26)가 存在함을 알 수 있다.

이러한 결과를 綜合해 볼 때 卵丘細胞로부터 分泌된 卵丘細胞사이의 intercellular matrix에는 多量的 GAGs가 存在하며 (Yanagishita 등, 1979; Yanagishita와 Hascall, 1979; Dekel 등, 1979; Eppig, 1979 a, b; Ball 등, 1982; Sato 등, 1987), 이들 GAGs의 主成分은 hyaluronic acid (Eppig, 1979 a, b; Ball 등, 1982) 혹은 chondroitin sulfate (Yanagishita 등, 1979; Yanagishita와 Hascall, 1979)이고, 그밖에도 heparin-like substances,

dermatan sulfate(Gebauer 等, 1978; Ax 와 Ryan, 1979; Grimek 과 Ax, 1982; Bellin 等, 1983; Grimek 等, 1984) 및 生化學의 特性이 아직 細明되지 않은 多樣한 非스테로이드 系列의 物質 (Tesarik 等, 1988)이 含有되어 있다는 報告를 確認하는 것으로써 이들 分泌物中 어떤 物質이 卵成熟과 受精에 影響을 미치는가 하는 具體的인 檢討가 隨伴되어야 할 必要性이 있다고 생각된다.

IV. 摘 要

本 實驗은 牛卵胞卵의 體外成熟時 牛卵丘細胞로부터 分泌되는 物質을 SDS-PAGE 와 FPLC 를 利用하여 測定한 結果 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 卵丘細胞로 둘러싸인 卵胞卵을 30시간 동안 培養한 後, 卵丘細胞로 부터 分泌되는 物質의 分子量 測定을 위하여 電氣泳動을 實施하였던 結果, 卵丘細胞 分泌物의 分子量은 M.W. 94,000이상의 한 개의 main band와 M.W. 67,000과 30,000사이 에 두 개의 band가 형성되었음을 알 수 있다.
2. 이러한 卵丘細胞 分泌物를 FPLC에서 分子量에 따라서 分離시킨 結果 다섯개의 peak를 얻을 수 있었으며 이 중 3개의 peak는 hyaluronic acid, chondroitin sulfate 및 heparin이라는 것이 간접적으로 확인되었다.

V. 引用文獻

1. Ax, R.L. and R.J. Ryan. 1979. The porcine ovarian follicle. IV. Mucopolysaccharides at different stages of development. Biol. Reprod., 20: 1123-1132.
2. Ball, G.D., M.E. Bellin, R.L. Ax, and N.L. First. 1982. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocytes complexes: morphology and chemistry. Mol. Cell Endocrinol., 28: 113-122.
3. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister, and N.L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28: 717-725.
4. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.L. Lenz, R.L. Ax, and N.L. First. 1983. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 19: 112.
5. Bellin, M.E. and R.L. Ax. 1984. Chondroitin sulfate: an indicator of atresia in bovine follicles. Endocrinology, 114: 428-434.
6. Bellin, M.E., R.W. Lenz, L.E. Steadman, and R.L. Ax. 1983. Proteoglycan production by bovine granulosa cells *in vitro* occurs in response to FSH. Mol. Cell Endocrinol., 29: 51-65.
7. Dekel, N., T.S. Lawrence, N.B. Gilula, and W.H. Beers. 1981. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. Develop. Biol., 86: 356.
8. Eppig, J.J. 1979a. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. Nature(London), 281: 483-484.
9. Eppig, J.J. 1979b. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion *in vitro*. J. Exp. Zool., 208: 111-120.
10. Ferguson, K.A. 1964. Metabolism. 13: 985-1002.
11. Gebauer, H., H.R. Linder, and A. Amsterdam. 1978. Synthesis of heparin-like glycosaminoglycans in rat ovarian slices. Biol. Reprod., 18: 350-358.
12. Grimek, H.J. and R.L. Ax. 1982. Chromatographic comparison of chondroitin-containing proteoglycan from small and large bovine ovarian follicles. Biochem. Biophys. Res. Commun., 104: 1401-1406.
13. Grimek, H.J., M.E. Bellin, and R.L. Ax.

1984. Characteristics of proteoglycans isolated from small and large bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 30: 397-409.
14. Jensen, C.E. and F. Zachariae. 1958. Studies on the mechanism of ovulation. II. Isolation and analysis of acid mucopolysaccharides in bovine follicular fluid. *Acta. Endocrinol.*, 27: 356-368.
 15. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
 16. Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K. Lohse, N. L. First, and R.L. Ax. 1983. Chondroitin sulfate facilitates on acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.*, 28: 683-690.
 17. O'Farrel, P.H. 1975. high resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250: 4007~4021.
 18. Sato, E., T. Ishibashi, and S.S. Koide. 1987. Prevention of spontaneous degeneration of mouse oocytes in culture by ovarian glycosaminoglycans. *Biol. Reprod.* 37: 371-376.
 19. Tesarik, J., L. Pilka, J. Drahorad, D. Cechova, and L. Veselsky. 1988. The role of cumulus cell-secreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability: implication in IVF. *Human Reprod.*, Vol. 3. No.1 pp.129-132.
 20. Vanderhyden, B.C. and D.T. Armstrong. 1989. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol. Reprod.*, 40: 720-728.
 21. Yanagishita, M. and V.C. Hascall. 1979. Biosynthesis of proteoglycans by rat granulosa cell cultured *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 254: 12355-12364.
 22. Yanagishita, M., D. Rodbard, and V.C. Hascall. 1979. Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. *J. Biol. Chem.*, 254: 911-920.