

## Purine이 생쥐 미성숙난자의 핵성숙에 미치는 영향 II. 미성숙 난자의 제 1극체 방출과 생존성에 미치는 Purine의 효과

지희준 · 황영희\* · 이훈택 · 정길생  
건국대학교 동물자원연구센터, 안양병원\*

## Effects of Purine on Meiotic Maturation of Mouse Immature Oocytes II. Effects of Purine on Extrusion Rates of 1st pb and Viability of Immature Oocytes

Chi, H.J, Y. H. Whang\*, H. T. Lee and K. S. Chung  
Animal Resources Reserch Center, Kon-Kuk University, An-Yang Hospital\*

### SUMMARY

In the previous study, we observed that Purine has a time dependent effect in maintaining the oocytes in meiotic arrest, and human fetal cord serum(HFCS) and human mature follicular fluid(HMFF) reverse the GVBD suppressed by purines. And it was reported that purine has a harmful effect on the development of oocytes or embryos, when they were cultured for a long time, *in vitro*. Therefore this study was performed to investigate the effects of purine on extrusion rates of 1st pb and viability of oocytes cultured for a long time, *in vitro*.

Immature oocytes(GV stage) were collected from ovaries of 25~28 day old ICR mice at 48 hrs after PMSG injection. Cumulus-enclosed and denuded oocytes collected were assigned randomly to one of several culture conditions. Some of the oocytes were cultured in 4mM hypoxanthine for 24hr, and the extrusion rates of 1st pb and viability of the oocytes were assessed at every 12 hrs. In the viability, the oocytes showed granulation, pigmentation of cytoplasm or lysis of 1st pb extruded were regarded as degenerating oocytes. Also some of the oocytes were cultured in hypoxanthine for 12 hrs then the resulting oocytes were transferred to hypoxanthine-free medium and cultured for 12 hrs to determine whether the inhibitory effect of hypoxanthine on the 1st pb extrusion was reversible. The rest of the oocytes were cultured in medium containing hypoxanthine and adenosine for 18 hrs to compare the 1st pb extrusion be attendant upon the concentration of HFCS or HMFF supplemented.

Hypoxanthine suppressed the extrusion of 1st pb and viability of the oocytes significantly, when they were cultured for more than 12 hrs and the harmful effect of hypoxanthine was showed in denuded oocytes, prominently. The suppressive effect of hypoxanthine was reversed by just removal of the hypoxanthine from the culture medium. Also there was no difference in reverse the pb extrusion rate suppressed between HFCS and HMFF. The extrusion rate of 1st pb in medium containing adenosine and hypoxanthine was increased in line with the concentration of HFCS or HMFF supplemented.

## I. 서 론

인간 또는 소의 난포액은 돼지나 설치류 등 다태동물의 난포액에 비해 낮은 농도의 purine을 함유하고 있으나(Gad Lavy, 1990), 소의 미성숙난포로부터 회수한 난포액을 소의 미성숙난자의 체외배양액에 첨가하였을 때 이들 난자의 핵성숙을 억제시키는 효과를 나타냈으며 특히 100% 농도의 난포액은 adenosine과 hypoxanthine이 혼합 첨가된 배양액 보다 높은 핵성숙 억제효과를 나타냈다(Sirad, 1988). 그러나 이전의 본 연구에서 사용된 인간의 성숙난포로부터 회수한 난포액(HMFF)은 LH surge의 영향을 받은 배란 직전의 graffian follicle로부터 회수한 난포액으로서 생쥐 미성숙난자의 체외배양시 핵성숙을 촉진시킬 뿐만 아니라 purine의 핵성숙 억제효과를 감소시키는 상반된 결과를 나타냈다. 이러한 상반된 결과는 purine의 난포액내 농도가 난포성장에 따른 난포크기와 관계없이 일정하게 유지된다는 것(Eppig, 1985)을 감안할 때 난포액내에 존재하는 핵성숙 억제물질의 불활성화, 또는 purine등의 핵성숙 억제작용을 극복시키는 물질의 합성 및 활성화가 LH surge라는 난포내 환경의 급격한 변화에 의해 개시 조절된다는 가능성을 시사하여 준다. 또한 난포액내에 높은 농도로 함유되어 있는 FSH 또는 epidermal growth factor(EGF) (Hsu, 1987)등을 첨가하였을 때 hypoxanthine에 의한 핵성숙억제 효과를 유의하게 감소시킨다는 것(Eppig, 1987; Down, 1989)과 이러한 EGF가 핵성숙 촉진뿐만 아니라 세포질성숙에도 중요한 역할을 한다는 보고(Kamallini, 1991)는 LH surge와 EGF의 activity 사이에 어떠한 상관관계가 있을 수 있다는 보다 구체적인 가능성을 제시하였다.

한편 Carroll(1991)등의 보고에서 hypoxanthine에서 체외배양한 균의 난자들의 퇴행율이 다른 배양군에 비해 다소 높게 나타난 것이 확인되었고 생쥐의 초기 수정란을 체외배양할 때 나타나는 2-cell block현상에 hypoxanthine이 관여를 하며(Loutradis, 1987., Downs, 1991) 수정란의 체외발달에도 해로운 효과를 나타낸다는 연구결과가 보고되었다(Nureddin, 1990). 또한 그 결과를 제시하지는 하지는 않았지만, 이전의 본 연구에서도 purine이 함유된 배양액에서 장시간

체외배양할 때 난자들이 퇴행적인 특성을 나타내는 것이 관찰됨으로써 이들 purine이 난자의 체외배양시 단순히 핵성숙 억제효과 뿐만 아니라 해로운 영향까지 미친다는 것을 확인하였다. 그리고 Shim(1992)등은 이러한 hypoxanthine이 세포막을 통과하지 못하는 물질이기에 배양액에 첨가된 hypoxanthine중 극소량만이 핵성숙 억제에 관여한다는 보고를 함으로써 체외배양시 나타나는 hypoxanthine의 해로운 효과가 hypoxanthine의 직접적인 영향보다는 이들로 부터 과생되는 세포막 투과가 용이한 물질에 의한 영향이라는 가능성을 시사하였다.

따라서 본 연구에서는 미성숙난자의 배양액에 첨가된 hypoxanthine이 핵성숙의 마지막 단계인 제1극체의 방출의 억제와 이들 난자의 생존성에 어느 정도 해로운 효과를 나타내는지를 조사하였으며 이전의 연구에서 purine의 GVBD 억제효과를 감소시키는 효과가 확인된 HFCS와 HMFF등이 purine의 극체방출 억제 등의 해로운 효과도 감소시키는지를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 미성숙 난자의 회수

21~28일령의 ICR계통의 생쥐에 5IU의 PMSG를 주사한 후 48시간째에 적출한 난소로부터 성장이 완료된 난자(fully grown oocyte, GV stage)를 회수하였다. 회수된 난자는 난구세포에 둘러 싸여있는 복합구조형태의 난자(complex oocyte)와 반복적인 pipetting에 의해 난자를 싸고 있는 난구세포를 제거시킨 나화된 난자(denuded oocyte)로써 본 연구에 공시하였다.

### 2. 난자의 배양

기초배양액으로는 modified Whittingam's T6 배양액을 사용하였으며 기초배양액에 4mM hypoxanthine을 첨가한 배양액에서 난자를 24시간 체외배양하면서 첨가된 hypoxanthine이 이들 난자의 제1극체 방출과 생존성에 미치는 영향을 12시간별로 조사하였다. 또한 12시간 간격으로 hypoxanthine이 함유된 배양액에서 1차 배양 후 이들 난자를 hypoxanthine이 제거된 배양액으로 옮겨 2차 배양하였을 때 2차 배양까지 hypoxanthine내에서 지속적으로 배양한 군과

의 제 1극체 방출율을 비교조사하였으며 2차 배양시 배양액에 첨가된 HMFF의 영향도 조사하였다. 한편 GVBD억제에 가장 현저한 효과를 나타내었던 adenosine과 hypoxanthine이 공동함유된 배양액에 HFCS와 HMFF를 10%, 50%로 농도를 달리 첨가하여 18시간 체외배양하였을 때 이들 HFCS와 HMFF의 농도에 따른 제 1극체 방출율을 비교조사 하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Hypoxanthine의 제 1극체 방출 및 생존성에 미치는 영향

4mM 농도의 hypoxanthine이 함유된 배양액에서 미성숙난자를 24시간 체외배양하면서 12시간별로 이

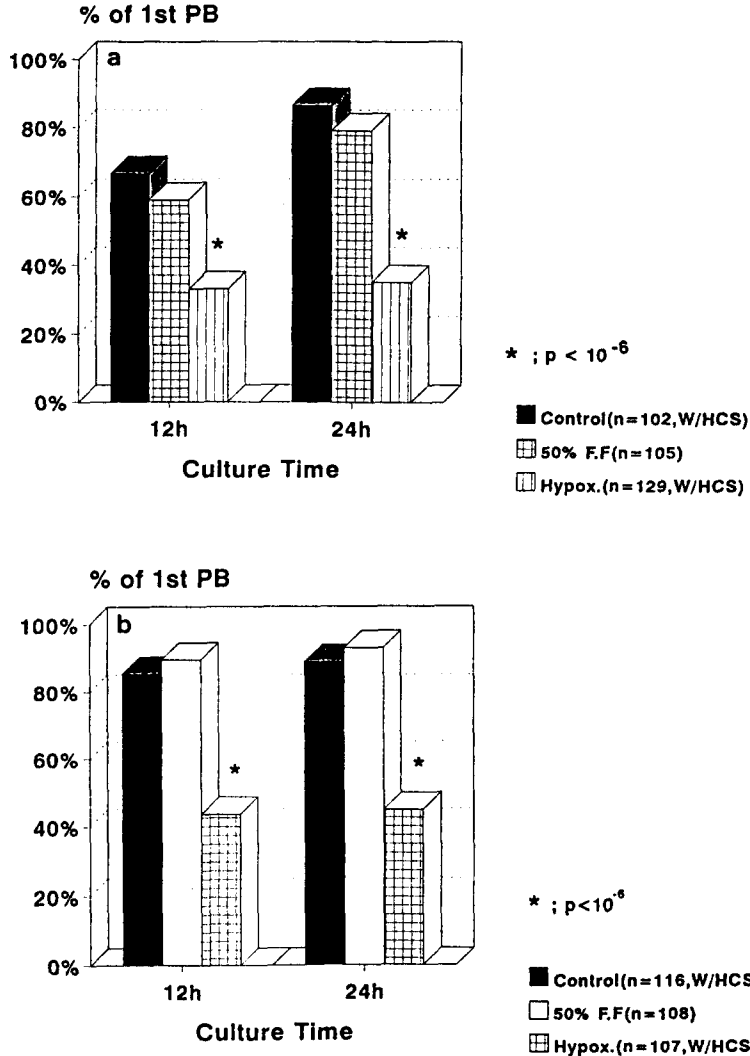


Fig. 1. The effect of hypoxanthine on 1st pb extrusion. Denuded and cumulus-enclosed oocytes (complex oocytes) were cultured for 24 hrs in media containing 4mM hypoxanthine, no added hypoxanthine with HFCS or HMFF. Denuded oocytes, (a); complex oocytes, (b). The pb extrusion was assessed at every 12 hrs. The groups were compared by  $\chi^2$  analysis.

들 미성숙난자들의 제 1극체 방출 및 생존성을 조사하였다.

Fig. 1에 제시한 바와 같이 denuded oocyte, complex oocytes 모두 대조군과 50% HMFF 첨가군에서의 제 1극체 방출율에 비해 hypoxanthine 첨가군에서의 방출율은 유의하게 낮은 성적을 보였으며 배양 후 12시간째의 제 1극체 방출율이 배양 24시간 후에도 더 증가되지 않고 그대로 유지되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 hypoxanthine에서 장시간 체외배양시 미성숙 난자의 성숙과정에 있어 해로운 영향이 발생한다는 것을 의미하는 것이며 이러한 해로운 영향은 hypoxanthine의 대사과정시 생성되는 부산물들에 의한 영향이라고 사료된다.

한편 hypoxanthine이 미성숙 난자의 생존성에 미치는 영향은 배양시간 12시간 간격으로 이들 난자의 형태를 현미경적 관찰로써 측정하였다. 이 측정의 기준은 난자 세포질의 과립화(granulation), 착색화(pigmentation) 또는 이미 방출된 제 1극체의 붕괴(lysis)등 비정상적인 퇴행적 형태를 나타낸 난자들과 정상적인 형태의 난자들을 분류하여 배양된 난자중 정상적인 형태의 난자들이 차지하는 비율로써 hypoxanthine이 난자의 생존성에 미치는 영향을 나타내었다. 단 핵막의 붕괴(GVBD) 유무는 고려하지 않았다.

결과는 다음의 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에 제시한 바와 같이 hypoxanthine내에서 denuded oocytes 보다는 complex oocytes에서 보다 높은 생존율을 나타내었으며 이들의 생존율은 배양 후 12시간 이후로 급격히 떨어지는 것을 확인하였다.

## 2. 2단계배양에 의한 hypoxanthine의 억제효과의 극복

Hypoxanthine이 첨가된 배양액내에서 12시간 1차 배양 후 이들 난자를 hypoxanthine이 제거된 배양액으로 옮겨 12시간 2차 배양하였을 때, Fig. 1의 결과에서 나타난 hypoxanthine의 제 1극체 방출 억제효과가 그대로 지속적으로 유지되는지 아니면 단순히 hypoxanthine을 배양액에서 제거함으로써 그 억제효과도 제거되는지의 여부와 2차 배양시 첨가된 HMFF이 제 1극체 방출에 미치는 영향을 조사한 연구결과를 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3에 제시한 바와 같이 denuded oocyte나 complex oocyte 모두 hypoxanthine이 제거된 배양액으로 옮겨 2차 배양하였을 때 1차배양에서 억제되었던 제 1극체 방출이 다시 증가하는 결과를 나타냈고 denuded oocyte에서는 hypoxanthine만을 단순히 제거한 대조군 보다 HMFF첨가군에서의 제 1극체 방

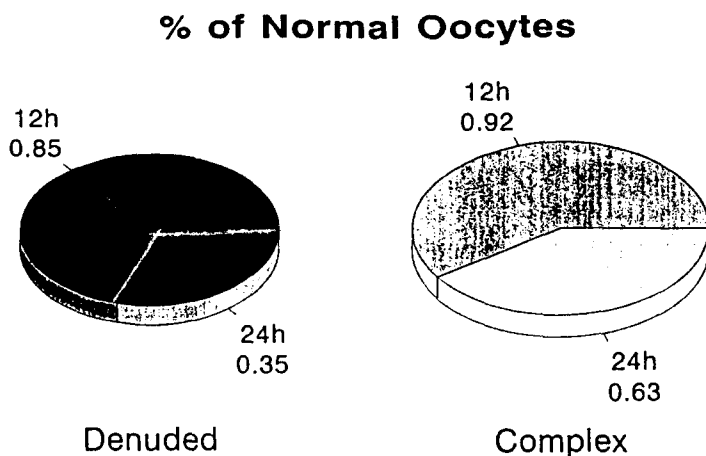
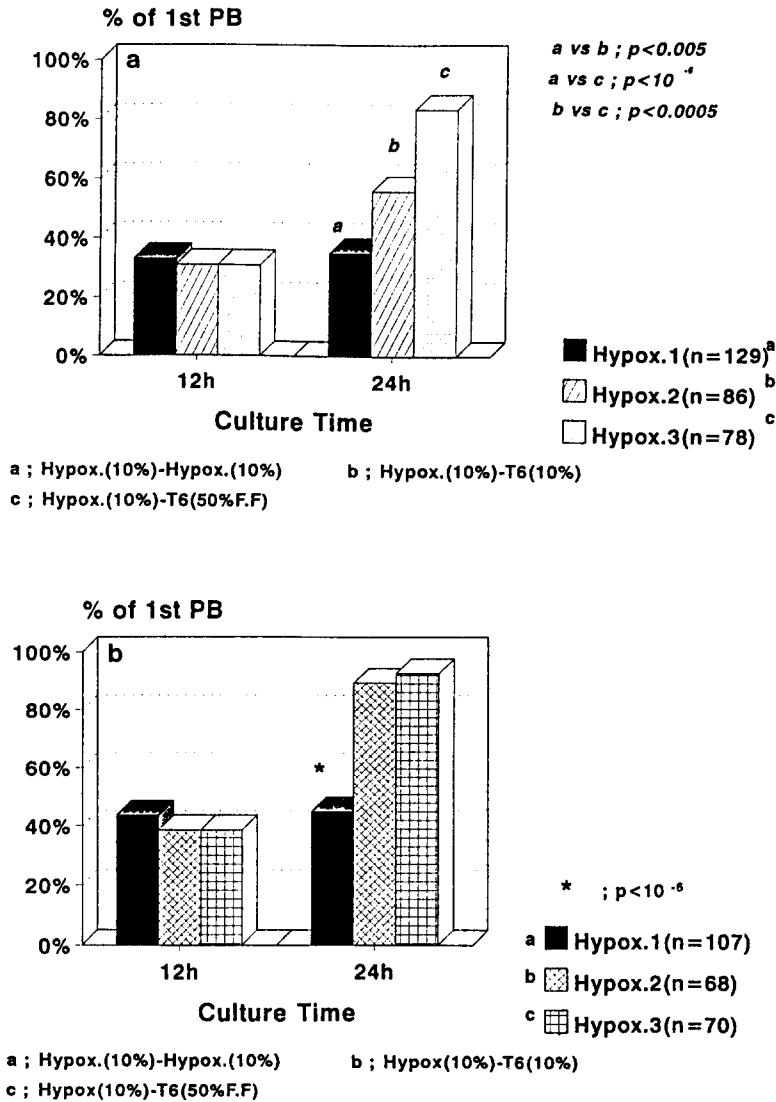


Fig. 2. The effect of hypoxanthine on viability of immature oocytes. Denuded and complex oocytes were cultured for 24 hrs in 4mM hypoxanthine and their viability was assessed at every 12 hrs. The pigmentation and granulation of cytoplasm or the lysis of 1st pb extruded were regarded as the characteristics of degenerating oocytes. The values represented the percentage of normal oocytes.



**Fig. 3.** Effect of hypoxanthine withdrawal on the pb extrusion after 12 hrs culture in the presence of 4mM hypoxanthine. Denuded and complex oocytes were cultured in 4mM hypoxanthine for 12 hrs then the resulting oocytes were transferred to hypoxanthine-free medium and cultured for 12 hrs. The effect of withdrawal was assessed with the variation of pb extrusion rates. Denuded oocytes, (a); complex oocytes, (b). The groups were compared by  $\chi^2$  analysis.

출이 다시 증가하는 결과를 나타냈고 denuded oocyte에서는 hypoxanthine만을 단순히 제거한 대조군 보다 HMFF첨가군에서의 제 1극체 방출율이 유의하게 높았으나 complex oocyte에서는 이 두 배양군간의 방출율에 있어서 유의차는 인정되지 않았다.

따라서 hypoxanthine의 극체방출 억제효과는 단순히 hypoxanthine을 제거함으로써 극복 할 수 있다는 것을 확인 할 수 있었으며 이러한 해로운 효과는 hypoxanthine내에서 12시간 이상 체외배양시 현저하게 나타난다는 것을 알 수 있었다. 그러나 Carroll(1991),

Eppig(1987, 1989)등의 보고에 의하면 생쥐의 미성숙 난자를 hypoxanthine 또는 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)내에서 며칠씩 장기간 배양한 후에도 정상적인 성숙 및 산자까지 생산한 연구결과를 보고함으로써 본 연구의 결과와 차이를 나타냈지만 이러한 차이는 Caroll 등이 사용한 미성숙난자는 10~12일령의 유아기 생쥐의 난소로부터 회수한 primary oocytes인 반면 본 연구에 사용된 난자는 21~28일령의 생쥐의 난소로부터 얻은 fully grown oocytes로서 이들 난자의 성장단계의 차이에 따른 난자의 미세구조적, 생리학적 차이등에서 나타난 결과라 사료된다. 그리고 이러한 hypoxanthine의 해로운 효과는 hypoxanthine의 배양액 또는 난자내에서 분해되면서 생산되는 대사성 부산물에 의한 효과일 가능성이 크다. 예를 들면 hypoxanthine이 xanthine oxidase에 의해 xanthine, uric acid로 전환되는 과정에서 생성되는 hydrogen dioxide등은 이미 oocyte나 embryo의 체외발달에 해로운 영향을 미친다고 잘 알려져있다. 따라서 이와 같은 물질을 중화시키는 enzyme들이 결여된 체외배양 조건에서는 이들 물질의 toxic effect를 완전히 배제 할 수는 없을 것이다.

또 다른 한편으로 생각 할 수 있는 것은 본 연구에 사용된 난자는 배란 직전의 fully grown oocytes로써 이미 세포질 성숙은 완료단계에 와 있고 핵성숙 재개 직전의 난자인데 이들 난자를 hypoxanthine을 이용하여 인위적으로 장시간 핵성숙을 억제시킨다는 것은 난자의 핵과 세포질 사이의 성숙도의 불균형을 야기시키게 되고 이로 인해 발생하는 난자 자체 차원의 퇴행 효과일 가능성도 크다고 하겠다. 따라서 이것 역시 이후 실험을 통해서 확인 할 과제이다. 한편 hypoxanthine이 제거된 배양액에서 2차 배양하였을 때 제 1극체 방출율에 있어서 전체적으로 denuded oocyte보다는 complex oocyte에서 높은 성적을 나타냈는데 이는 난포란의 체외배양시 난포내에서 핵성숙억제와 핵성숙재개 및 난자성장에 관여하는 물질들의 생성 또는 난자내로의 전달등에 중요한 역할을 한다는 난구세포(Eppig 1984)를 인위적으로 제거하는 것 보다는 체외배양을 통한 이들 세포들의 자연적인 expansion의 유도가 난자의 체외성숙에 있어서 보다 바람직하다는 것을 재확인하는 것이었다.

### 3. HFCS와 HMFF의 농도에 따른 purine의 억제 효과의 극복

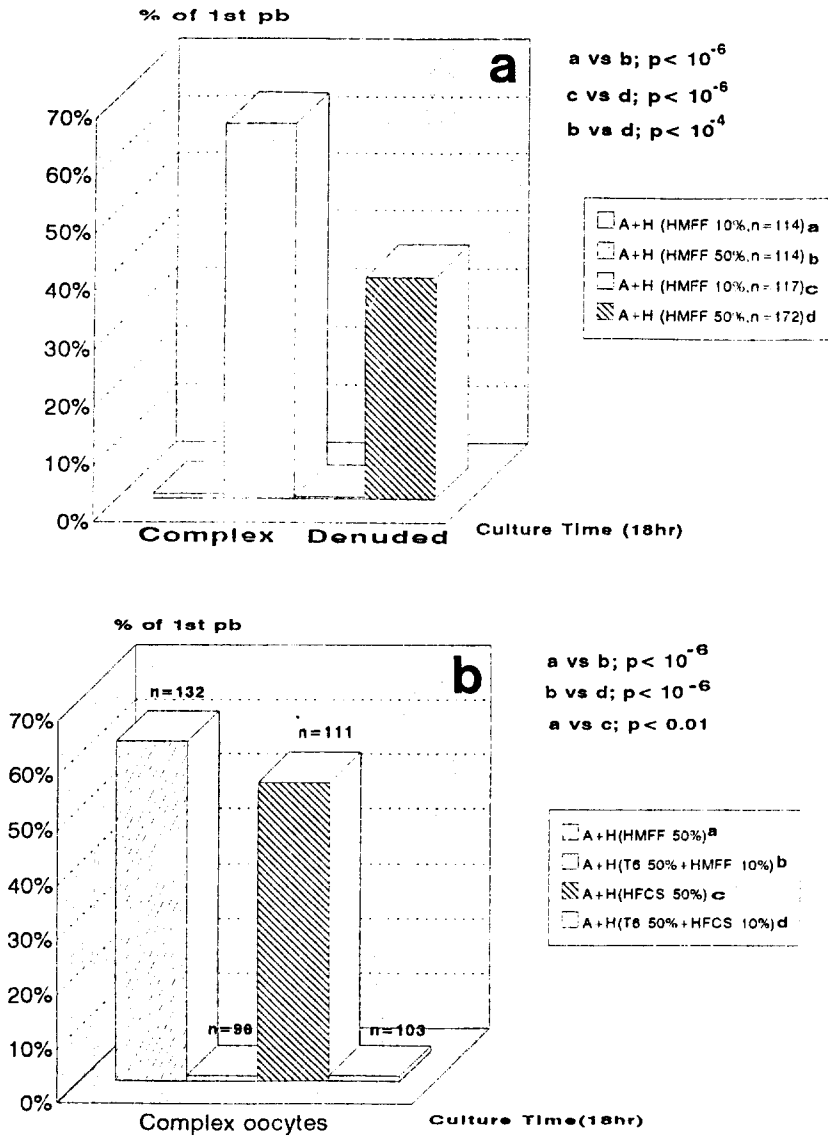
난핵포붕괴(GVBD) 억제에 가장 두드러진 효과를 나타내었던 adenosine과 hypoxanthine을 공동 함유한 배양액에 HMFF를 10% 또는 50%의 농도로 첨가하여 미성숙 난자를 18시간 체외배양한 후 HMFF 첨가농도에 따른 이들 난자의 제 1극체 방출율을 조사하였으며, 50% 농도의 HFCS, HMFF 첨가에 의한 purine의 농도회색효과를 배제하기 위해 purine이 함유된 배양액과 기초배양액인 T6를 1:1비율로 혼합하여 purine의 농도를 희석한 후 10% 농도의 HFCS 또는 HMFF를 첨가한 배양군을 50% HFCS, HMFF 첨가군들에 대한 대조군으로하여 제 1극체 방출율을 비교조사하였다.

Fig. 4a에 제시된 바와 같이 HMFF 10%첨가 배양군에서는 complex, denuded oocytes 모두 zero에 가까운 극체 방출율을 나타냈으나 50% HMFF 첨가 배양군에서는 각각 64.9%, 38%의 높은 제 1극체 방출율을 나타내었다. 따라서 이들 purine의 제 1극체 방출 억제효과 역시 첨가된 HMFF의 농도에 의존적인 극복현상을 나타냈으며 denuded oocytes보다는 complex oocytes에서의 제 1극체 방출율이 유의하게 높은 성적을 나타내었다.

한편 Fig. 4b에 나타난 바와 같이 50% HFCS와 HMFF 첨가군에서의 극체 방출율이 대조군인 10% 농도의 첨가군에 비해 유의하게 높은 성적을 나타냄으로써 50% 첨가군에서의 높은 방출율이 단순히 purine의 농도희석에 의한 효과가 아니라는 것을 확인하였다. 또한 이전의 연구결과에서 GVBD rate에 있어서 50% HFCS, HMFF 두 첨가군간에 차이를 나타내지 않았으나 성숙의 마지막 단계인 제 1극체방출에 있어서는 HFCS 보다는 HMFF 첨가군에서 보다 높은 성적을 나타냄으로써 purine이 함유된 배양액내에서 체외배양시 purine의 핵성숙억제효과를 극복하고 난자가 지속적인 핵성숙과정을 진행하는데 있어서는 HFCS 보다는 HMFF가 보다 이상적이라는 것을 확인하였다.

## IV. 적 요

본 연구는 21~28일령의 ICR mice로부터 미성숙



**Fig. 4. Effects of the concentration of HFCS, HMFF on pb extrusion in the presence of purines. Denuded and complex oocytes were cultured in media containing 0.75mM adenosine and 4mM hypoxanthine with 10% or 50% HMFF, (a). And Some of complex oocytes were cultured in media containing the half of the purines concentration with 10% HFCS or HMFF, (b). The oocytes were cultured for 18 hrs before the oocytes were assessed for the 1st pb extrusion. The groups were compared by  $\chi^2$  analysis.**

난자를 회수하여 이들의 형태적 특성에 따라 denuded oocytes와 complex oocytes로서 분류하여 본 연구에 사용하였고 4mM hypoxanthine이 첨가된 배양액

과 0.75mM adenosine이 혼합 첨가된 2종류의 배양액 내에서 24시간 또는 18시간 체외배양하면서 이들 purine이 미성숙 난자의 제 1극체 방출율과 생존성에

미치는 영향 및 단백질공급원으로 첨가된 HFCS와 HMFF의 농도에 따른 제 1극체 방출율을 조사하고자 본 연구를 수행하였다.

본 연구에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. Hypoxanthine이 첨가된 배양액내에서 24시간 동안 지속적으로 배양할 경우 이들 미성숙난자의 제 1극체 방출율과 생존율에 해로운 영향을 나타내었다. 이 해로운 영향은 hypoxanthine의 대사성 부산물에 의한 효과 또는 핵과 세포질간의 성숙 불균형에 의한 효과일 가능성이라 생각된다.
2. Hypoxanthine에 의해 억제된 제 1극체 방출율 및 생존율은 단순히 배양액내에서 hypoxanthine을 제거함으로써 다시 정상적인 성적을 얻을 수 있었고 HMFF의 첨가는 보다 높은 성적의 제 1극체 방출율을 얻을 수 있었다.
3. Adenosine과 hypoxanthine을 함유한 배양액내에서의 제 1극체 방출율은 첨가된 HMFF의 농도에 의존적인 결과를 나타내었고 50% HFCS, HMFF 첨가군에서의 purine의 농도회석에 의한 제 1극체 방출효과는 인정되지 않았으며 50% HFCS 보다는 50% HMFF 첨가군에서 보다 높은 극체 방출율을 나타내었다.

## V. 인용문헌

1. Gad, L. 1990. Purine levels and metabolism in human follicular fluid. *Human, Reprod.* 5-5:529-532.
2. Sirad, M. A. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.* 39:229-234.
3. Eppig, J. J. 1985. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: Concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol. Reprod.* 33:-1041-1049.
4. Eppig, J. J. 1987. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development *in vitro*: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Dev. Biol.* 119:313-321.
5. Downs, S. M. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol. Reprod.* 41:371-379.
6. Kamllini, D. 1991. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fert. Steril.* 55-5:1000-1004.
7. Hsu, C. J. 1987. Ovarian epidermal growth factor-like activity concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 147:242-247.
8. Caroll, J. 1991. Effect of dbcAMP on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gells. *J. Reprod. Fert.* 92:197-207.
9. Loutradis, D. 1987. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. *Biol. Reprod.* 37:311-316.
10. Downs, S. M. 1991. Hypoxanthine-maintained two cell block in mouse embryos: Dependence on glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors. *Biol. Reprod.* 44:1025-1039.
11. Nureddin, A. 1990. Purines inhibit the development of mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 90:455-464.
12. Shim, C. S. 1992. Inhibitory effect of purines in meiotic maturation of denuded mouse oocytes. *Mol. Reprod. & Dev.* 31:280-286.
13. Eppig, J. J. 1989. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. 41:268-276.
14. Eppig, J. J. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 30:1-11.