

## Hypoxanthine이 포유동물 난자의 핵성숙에 미치는 영향

지 회 준

한나여성의원 체외수정연구소, 건국대학교 동물자원연구센터

### Studies on the Effect of Hypoxanthine on Nuclear Maturation of Mammalian Oocytes

Hee-Jun Chi

Hanna Women's Clinic IVF Laboratory,  
Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

#### SUMMARY

These studies were performed to approach the precise pathway inducing the meiotic inhibitory action of hypoxanthine on mouse follicular oocytes and to identify the cause of detrimental effect of hypoxanthine on viability of the oocyte *in vitro*. In addition, a correlation between the meiotic inhibitory effect and the detrimental effect of hypoxanthine was investigated.

Mouse follicular oocytes at germinal vesicle(GV) stage were collected from the ovaries of ICR mice by puncturing the antral follicles with a fine needle, at 48 hours after PMSG injection. Oocytes were cultured in Modified Whittingham's T6 media containing hypoxanthine and several materials (phosphodiesterase(PDE), 6-mercaptopurine(6-MP), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase(HGPRT), phosphoribosylpyrophosphate(PRPP), allopurinol, superoxide dismutase (SOD), catalase) that involved in metabolism of hypoxanthine, and the effects of the materials on the actions of hypoxanthine were investigated by observing germinal vesicle break down (GVBD), 1st polar body (PB) extrusion and viability of the oocytes.

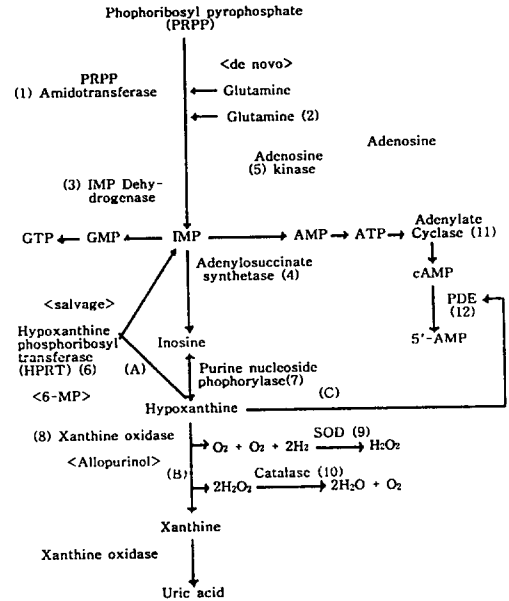
Phosphodiesterase significantly reduced the meiotic inhibitory effect of dbcAMP but did not influence on the inhibitory effect of hypoxanthine. Allopurinol and 6-MP significantly enhanced the meiotic inhibitory effect of hypoxanthine, but the materials themselves also showed the meiotic inhibitory action like hypoxanthine. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase significantly enhanced the meiotic inhibitory effect of hypoxanthine, on the contrary HGPRT itself promoted meiotic resumption of the oocytes. Catalase did not induce any change in the meiotic inhibitory effect of hypoxanthine, but SOD increased the GVBD rate suppressed by hypoxanthine. The detrimental effect of hypoxanthine on viability of the oocytes was significantly reduced by allopurinol and catalase, but SOD did not reduce the detrimental effect of hypoxanthine.

In conclusion, the meiotic inhibitory effect of hypoxanthine may be caused by guanyl derivatives converted from hypoxanthine via salvage pathway, and superoxide anion may partially participate in the inhibitory effect of hypoxanthine. The detrimental effect of hypoxanthine on viability of the oocytes be caused by hydrogen peroxide produced during the metabolism of hypoxanthine.

## I. 서 론

포유동물의 non-atretic ovarian follicles내 oocytes는 핵성숙이 정지되어 meiosis prophase I의 단계에 머물러 있다가 배란전 gonadotropin surge가 일어나기에 따라 이들중 선택된 일부의 oocytes는 자발적인 핵성숙을 재개하게 된다. 한편 성장이 완료된 이러한 follicular oocytes를 난포로부터 회수하여 체외에서 배양할 때에도 자발적인 핵성숙재개 (germinal vesicle break down, GVBD)를 하게된다. 따라서 난포내에는 배란전 gonadotropin surge가 일어나기까지 난자의 핵성숙억제를 유지시키는 작용을 하는 물질 즉, OMI(oocyte maturation inhibitor)가 함유되어 있는 것이 확인되었다. 이러한 OMI의 작용에 있어서 난자내 cAMP의 수준이 결정적인 역할을 한다(Sc-hultz et al., 1983; Eppig and Downs, 1984)는 연구결과는, dbcAMP(Magnusson and Hillensjo, 1977), cholera toxin(Moss and Vaughan, 1979), forskolin(Ekholm et al., 1984), IBMX(Bornslaeger et al., 1986), hypoxanthine(Downs, 1984)등 대부분의 핵성숙억제제들도 난자내 cAMP 수준을 증가시키거나 유지시키는 작용을 통해 핵성숙을 억제시킨다는 공통점을 갖고 있다는 보고에 의해 뒷받침되고있다. 특히 cAMP를 5'-AMP로 가수분해시키는 phosphodiesterase의 inhibitor로서 알려진 hypoxanthine은 저분자량의 purine으로서 여러 종(species)의 난포액내에서 그 존재가 확인되었고(Eppig et al., 1985; Sirad and First, 1988; Warikoo and Bavister, 1989), 난자와 granulosa cell의 gap junction에 의해 난자내로의 유입이 용이하며(Downs et al., 1986), 난포액의 핵성숙억제작용에 hypoxanthine이 결정적 역할을 하는 물질이라는 연구결과가 보고되었다(Downs and Eppig, 1984). 이러한 결과는 hypoxanthine이 난포내 OMI라는 가능성을 제시하였고, 이후 hypoxanthine의 핵성숙억제작용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져왔는데, 특히 hypoxanthine의 정확한 핵성숙억제작용경로에 대한 규명을 위해 hypoxanthine의 전반적인metabolism경로를 이용한 연구가 수행되었다(그림 참조).

이러한 연구를 통해 hypoxanthine의 핵성숙억제작



**Fig. 1. Purine metabolic pathway.** Purine de novo synthesis utilizes PRPP that is catalyzed by PRPP amidotransferase(1). De novo synthesis requires glutamine, and these reactions are sensitive to inhibition by azaserine(2). IMP dehydrogenase(3) catalyze the conversion of IMP to GMP and which is inhibited by mycophenolic acid and bredinin. Adenylosuccinate synthetase(4) catalyzes the conversion of IMP to AMP and which is inhibited by sodium hadacidin and dl-alanosine. Adenosine kinase(5) phosphorylates adenosine to produce the mononucleotide and which is sensitive to inhibition by adenosine analogues such as 6-methylmercaptapurine riboside. HPRT(6) catalyzes hypoxanthine to form IMP. The salvage is inhibited by 6-mercaptopurine(6-MP), 6-mercapto-(tetrahydro-2-furyl)-purine, 6-Azauridine and 6-bis-hydroxyamino-ribofura nosyl-purine. Purine nucleoside phosphorylase(7) catalyzes the reversible deribosylation of inosine to form hypoxanthine. Xanthine

**oxidase(8) catalyzes the conversion of hypoxanthine to xanthine and which is inhibited by allopurinol. Superoxide anion and hydrogen peroxide are produced from the oxidation reaction catalyzed by xanthine oxidase, and the oxygen derivatives are converted by SOD(9) and catalase(10), respectively. In addition, cyclic AMP is formed from ATP by the action of adenylate cyclase (10), which is stimulated by forskolin and cholera toxin. The cAMP is degraded by a phosphodiesterase(12) and the enzyme is inhibited by theophylline, pentoxiphylline, caffeine, IBMX and hypoxanthine.**

용에 있어서 metabolized hypoxanthine의 guanyl derivatives(Downs et al, 1986)와 non-metabolized hypoxanthine(Downs, 1993)이 중요한 역할을 한다는 서로 상반된 두가지 결과가 보고되었으나, 이에 대해 PDE inhibitor로서의 non-metabolized hypoxanthine의 작용과 guanyl derivatives의 adenylate cyclase stimulation작용과의 복합적인 작용에 의해 hypoxanthine의 핵성숙억제작용이 이루어진다고 설명하고있다(Downs, 1993).

이에 본 연구는 hypoxanthine이 핵성숙억제작용을 나타낼수 있는 경로라 할 수 있는 salvage pathway (A)와 uric acid로의 hydrolysis경로(B) 그리고 phosphodiesterase inhibition(C) 등을 차단 또는 활성화시켰을 때 hypoxanthine의 핵성숙억제작용에 어떠한 영향을 미치는지를 조사함으로써 hypoxanthine의 정확한 핵성숙억제작용경로를 재확인하고자 하였다.

한편 hypoxanthine이 난자(Caroll et al., 1991) 및 수정란(Loutradis et al., 1987; Nureddin et al., 1990; Downs et al, 1988; Downs and Dow, 1991)의 체외발달에 해로운 영향을 미치며 이러한 해로운 효과가 다른 PDE inhibitors, dbcAMP 등에 의해서는 유발되지 않는다는 연구결과가 보고되었다. 이러한 hypoxanthine의 해로운 효과는 본 연구의 예비실험을 하는 과정에서 hypoxanthine에서 생쥐난포란을 배양하였을 경우에도 이들 난자의 생존성이 배양시간

의 경과에 따라 유의하게 감소되는 현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 hypoxanthine의 이러한 해로운 효과는 배양시간의 경과에 따른 hypoxanthine의 대사과정중에 생성되는 superoxide anion과 hydrogen peroxide등 산화부산물의 축적에 의한 것일 가능성 매우 높다고 하겠다. 이러한 가능성은 hypoxanthine의 대사과정중에 생성되는 free oxygen radicals이 세포에 대해 해로운 영향을 미친다는 보고(Halliwell and Gutteridge, 1989)에 의해 뒷받침되고 있다.

이에 본 연구는 hypoxanthine이 난자의 생존성에 미치는 해로운 효과가 대사부산물인 superoxide anion 또는 hydrogen peroxide에 의한 것인지를 확인하고자 하였으며, 한편 이러한 산화부산물이 hypoxanthine의 핵성숙억제작용과 어떤 관련성을 갖는지를 조사하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

본 연구에 사용된 생쥐난포란은 ICR계통의 3주령 생쥐에게 PMSG 5IU를 주사한 후 48시간째에 적출한 난소로부터 회수하였으며 회수된 난포란은 Modified Whittingham's T6배양액을 이용하여 체외배양하였다. 체외배양시 이들 난포란의 핵성숙억제를 위해 주로 4mM 농도의 hypoxanthine이 사용되었으며, hypoxanthine의 핵성숙억제 작용경로를 확인하기 위하여 allopurinol, 6-mercaptopurine, hypoxanthine-guaninephosphoribosyltransferase(HGPRT), 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate(PRPP), phosphodiesterase(PDE)등 hypoxanthine의 metabolism에 관여하거나 방해하는 물질들을 이용하였다.

한편 난포란의 생존성에 대한 hypoxanthine의 해로운 효과가 hypoxanthine의 대사과정중에 생성되는 산화부산물인 superoxide anion과 hydrogen peroxide등에 기인하는지를 조사하기 위하여 이들 부산물의 생성을 차단하는 효소인 allopurinol과 이들 부산물 각각의 전환효소인 superoxide dismutase(SOD)와 catalase를 이용하였다. 또한 이들 산화부산물이 hypoxanthine의 핵성숙억제작용에도 관련성을 갖는지를 조사하고자하였다.

Hypoxanthine의 핵성숙억제효과는 난포란의 핵막 붕괴(GVBD), 제 1극체 방출율(1st PB extrusion)

로서 측정하였으며 배양후 각각 3시간, 24시간째에 관찰하였다. 한편 hypoxanthine의 난포란의 생존성에 대한 해로운 효과는 배양후 24시간, 48시간째에 trypan blue염색법을 이용하여 이들 난포란의 생존율을 관찰함으로써 조사하였다.

이들 난포란의 체외배양시 10%농도의 인간제대혈청을 단백질원으로 첨가하였으나, hypoxanthine의 생존성에 대한 해로운 효과를 조사하는 실험에 있어서는 이들 단백질원을 첨가하지 않았다. 첨가된 혈청내에는 높은 농도의 catalase외에도 gonadotropins, growth factors, enzymes등 hypoxanthine의 효과에 영향을 미칠 수 있는 다양한 물질들이 함유되어있어 hypoxanthine의 효과에 대한 정확한 측정이 불가능할 수 있기 때문이었다.

### III. 결과 및 고찰

본 연구를 통해서 얻은 결과를 요약, 고찰하면 다음과 같다.

1. Phosphodiesterase를 dbcAMP 또는 hypoxanthine이 함유된 배양액에 첨가하였을 때, dbcAMP의 핵성숙억제작용을 유의하게 감소시켜 핵성숙을 재개시켰으나, hypoxanthine의 핵성숙억제작용에는 아무런 영향을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 hypoxanthine의 핵성숙억제작용이 PDE의 작용억제에 의한 것이 아니라는 것을 의미하기에 Downs(1993)이 제시한 non-metabolized hypoxanthine에 의해 핵성숙억제작용이 이루어진다는 연구결과와 상반되는 결과를 나타냈다.
2. Hypoxanthine의 uric acid로의 가수분해를 차단하기 위해 사용된 allopurinol과 salvage pathway를 차단하기 위해 사용된 6-mercaptopurine 모두 hypoxanthine의 핵성숙억제효과를 유의하게 향상시키는 결과를 나타냈으나 allopurinol, 6-mercaptopurine 두 물질자체가 핵성숙억제작용을 갖고 있다는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 allopurinol과 6-mercaptopurine이 hypoxanthine의 metabolism을 억제시켜 hypoxanthine의 핵성숙억제작용을 향상시킨 것(Downs, 1993)이라기 보다는 단순히 이 두 물

질의 핵성숙억제작용간의 공동상승작용이라는 가능성이 높다.

3. HGPRT와 PRPP를 이용하여 hypoxanthine이 IMP로 전환되는 hypoxanthine의 salvage pathway를 촉진시켰을 때 hypoxanthine의 핵성숙억제작용에 미치는 영향을 조사한 결과 HGPRT와 PRPP에 의해 hypoxanthine의 핵성숙억제효과가 향상되는 것이 관찰되었으며, 이 두 물질자체는 핵성숙억제효과가 없다는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 hypoxanthine의 핵성숙억제효과가 salvage pathway와 깊은 관련성을 갖고 있음을 제시하였다.
4. Allopurinol은 생쥐난포란의 생존성에 대한 hypoxanthine의 저해효과를 유의하게 감소시키는 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 hypoxanthine이 가수분해되는 과정에서 생성되는 산화부산물인 hypoxanthine의 해로운 효과와 밀접한 관련이 있음을 제시하였다.
5. Catalase는 hypoxanthine의 생존성저해효과를 유의하게 감소시켰으나 SOD는 이에 대해 영향을 미치지 못하였다. 따라서 hypoxanthine의 생존성저해효과가 superoxide anion보다는 hydrogen peroxide에 의해 기인된다는 것을 확인하였다.
6. Superoxide dismutase는 hypoxanthine의 핵막붕괴(GVBD) 억제작용을 유의하게 감소시켰으나 제 1극체 방출억제작용에는 영향을 나타내지 않았으며 catalase는 아무런 영향을 미치지 못하였다. 따라서 superoxide anion이 hypoxanthine의 핵성숙억제효과에 어느 정도 관여하나 hydrogen peroxide는 핵성숙억제작용과 관계가 없음을 확인하였다.

### IV. 결론

1. Hypoxanthine의 핵성숙억제효과가 phosphodiesterase의 작용억제 보다는 salvage pathway를 통한 IMP 또는 guanyl derivatives로의 전환과 uric acid로의 가수분해과정에서 생성되는 superoxide anion과 밀접한 관계가 있다는 것을 확인하였다. 따라서 hypoxanthine의 핵성숙억

제효과는 non-metabolized hypoxanthine에 의한 것이 아니라 metabolized hypoxanthine에 의존적이라고 할 수 있다.

2. Hypoxanthine의 생존성저해효과의 원인은 산화부산물인 hydrogen peroxide에 기인되며 hypoxanthine의 핵성숙억제작용과 생존성저해작용 사이에 상호간 직접적인 영향을 미치는 밀접한 상관관계가 없음이 확인되었다.

## V. 인용문헌

1. Bornslaeger, E. A., P. Mattei and R. M. Schultz. 1986. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 114:453-462.
2. Carroll, J., D. G. Whittingham and M. J. Wood. 1991. Effect of dbcAMP on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gels. *J. Reprod. Fertil.*, 92:197-207.
3. Downs, S. M. and J. J. Eppig. 1984. Cyclic AMP and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. *Endocrinology*, 114:418-427.
4. Downs, S. M., D. L. Coleman and J. J. Eppig. 1986. Maintenance of murine oocyte meiotic arrest: Uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by cumulus cell-enclosed and denuded oocytes. *Dev. Biol.*, 117:174-184.
5. Downs, S. M., S. A. J. Daniel and J. J. Eppig. 1988. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by FSH and EGF: Evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J. Exp. Zool.*, 245:86-96.
6. Downs, S. M. and M. P. D. Dow. 1991. Hypoxanthine maintained two cell block in mouse embryos: Dependence on glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors. *Biol. Reprod.*, 44:1025-1039.
7. Downs, S. M. 1993. Purine control of mouse oocyte maturation: Evidence that non-metabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol. Reprod. Dev.*, 35:82-94.
8. Ekholm, C., T. Hillensjo, C. Magnusson and S. Rosberg. 1984. Stimulation and inhibition of rat oocyte meiosis by forskolin. *Biol. Reprod.*, 30:537-543.
9. Eppig, J. J., R. R. Freter, P. F. Ward-Bailey and S. M. Schultz. 1983. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: Participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation-inhibitory factor. *Dev. Biol.*, 100:39-49.
10. Eppig, J. J. and S. M. Downs. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.*, 30:1-11.
11. Eppig, J. J., P. F. Ward-Bailey and D. L. Coleman. 1985. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: Concentration and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol. Reprod.*, 33:1041-1049.
12. Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1989. *Free radicals in Biology and Medicine*, 2nd edition. Oxford: Clarendon Press.
13. Loutradis, D., D. John and A. A. Kiessling. 1987. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 37:311-316.
14. Magnusson, C. and T. Hillensjo. 1977. Inhibition of maturation and metabolism in rat oocytes by cyclic AMP. *J. Exp. Zool.*, 201:139-147.
15. Moss, J. and M. Vaughan. 1979. Activation of adenylate cyclase by cholera toxin. *Annu. Rev. Biochem.*, 48:581-600.
16. Nureddin, A., E. Epsaro and A. A. Kiessling. 1990. Purines inhibit the development of mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*,

- 90: 455-464.
17. Schultz, R. M., R. R. Montgomery, and J. R. Belanoff. 1983. Regulation of mouse oocyte maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.*, 97:264-273.
  18. Sirad, M. A. and N. L. First. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.*, 39:229-234.
  19. Warikoo, P. K. and B. D. Bavister. 1989. Hypoxanthine and cAMP maintain meiotic arrest of rhesus monkey oocytes *in vitro*. *Fertil. Steril.*, 51:886-889.