

## Theophylline 이 생체내에서 백쥐의 排卵, 受精 및 着床에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학

金星禮

서울대학교 자연대 동물학과

趙完圭

=Abstract=

### **In Vivo Effect of Theophylline on the Ovulation, Fertilization and Implantation of Mice**

Sung Rye Kim

*College of Medicine Ewha Womans University*

Wan Kyoo Cho

*Dept. of Zoology, College of Natural Science, Seoul National University*

In vivo treatment of theophylline, we have obtained results and summarized them as below.

- 1) Effects of theophylline on ovulation, and maturation of the oocytes in mouse;
  - (1) The group treated with theophylline at the time of PMS injection, showed marked decrease of the ovulation rate.
  - (2) If theophylline was given to the animals at the time of injection of HCG, the maturity of the oocytes in the Graafian follicles seemed to be inhibited.
- 2) Effects of the theophylline on the maturity of the oocytes ovulated, and fertilizability of the eggs.
  - (1) The female mice injected with theophylline with PMS remarkably decreased in mating rate.
  - (2) If treatment of theophylline was made with HCG injection, oocyte maturation was inhibited.
  - (3) The production of 2-cell embryo markedly decreased in either group treated with theophylline with PMS or with HCG.
- 3) Theophylline effect on implantation of the embryos.
  - (1) Pregnancy rate was markedly decreased in both group of control and theophylline treatment.

## 緒 論

1970년 Jost, Richenberg<sup>2)</sup>는 N,<sup>6</sup>O<sup>2</sup>-dibutyryl cyclic AMP(dbcAMP)가 adenylate cyclase의 활성을 높여서 細胞내 adenosin 3', 5'-cyclic monophosphate(cAMP)의 농도를 증가시킨다고 보고한 바 있으며, 1971년 Robison등<sup>3)</sup>은 theophylline에 의해 phosphodiesterase의 활성이 저해되어 cAMP가 5'-AMP로 전환되는 것이 억제됨으로 결국 cAMP의 농도가 증가된다고 하였다. 또한 細胞내 cAMP농도의 증가는 여러형태의 細胞분열이나 分化를 저하시키거나 억제시킨다는 보고가 있다<sup>3)~5)</sup>. 조등(1974)<sup>6)</sup>은 濾胞에서 卵자를 抽出하여 培養할 때 培養液에 cAMP의 類似體인 dbcAMP나 theophylline을 처리하면 卵자의 成熟이 抑制됨을 관찰하였다. 이러한 현상은 위의 사실들로 미루어 보아 cAMP농도가 증가되기 때문인 것으로 추정되나 아직까지 그 기전이 분명히 밝혀지지 못한 상태임으로 이를 究明할 목적으로 이들 물질이 培養中에 있는 卵자의 RNA합성에 미치는 영향<sup>10)</sup>과 또 한편 glycogen함량에 미치는 영향<sup>11)</sup>등에 관한 것이 추구되었다.

그러나 아직까지 이들 물질이 哺乳類의 初期胚兒發生에 미치는 研究結果는 없으며 Robison(1972)<sup>12)</sup>은 정상 胚兒 初期發生過程에서는 cAMP농도의 감소현상이 일어난다고 했는데 그러면 초기배아 발생과정에 이 cAMP농도를 증가시키면 胚兒에 어떤 영향이 미치게 될 것인가의 의문이 생기게 된다. 그뿐 아니라 이렇게 증가된 cAMP는 胚兒 자체의 성장이나 分化뿐만이 아니라 胚兒를 着床해서 자라게 하는 환경조건이 되는 자궁조직의 細胞分化에도 영향을 미칠 것으로 사료되어 본 研究에서는 in vivo로 theophylline을 처리하였을 때 첫째 卵자의 排卵에 미치는 영향과 둘째로는 排卵된 卵자의 成熟과 受精率에 미치는 영향과 셋째로는 임신기간중 胚兒의 着床과 發生에 미치는 結果를 검토하고자 시행하였다.

## 材料 및 實驗方法

本 實驗에서는 서울대학교 實驗動物 飼育場에서 飼育中인 生後 8~10週된 A-strain mice가 사용되었다. 첫째 卵자의 排卵에 미치는 영향을 보기 위하여 mouse 암컷에 pregnant mare serum (PMS 10 I.U. organon)을 복강에 주사하고 48時間 後에 human chorionic gonadotrophin(HCG 10IU organon)을 주사하여 多排卵(superovulation)시켰으며<sup>13)</sup> theophylline(1.6mg

=8mM Sigma)은 PMS나 HCG를 주사할 때 동시에 처리하였다. 둘째로 theophylline이 排卵된 卵자의 成熟과 受精率에 미치는 結果를 觀察하기 위한 實驗群은 첫째 실험군과 같이 theophylline을 처리하였으며 HCG처리시에 수정능력이 있는 수컷을 同棲시키고 그 다음날 아침 陰栓 有無를 조사하여 陰栓이 있는 것을 임신 第1日(pregnancy day 1)로 정하였다. 첫째 실험군에서는 HCG주사한 다음날 오전중에, 둘째 실험군에서는 임신 第2日(pregnancy day 2)째 되는날 mouse를 頸椎破裂로 屠殺後 輸卵管을 抽出하여 基本培養液(standard egg culture medium—SECM)으로 씻은 다음 해부 현미경하에서 輸卵管膨大部(ampulla of fallopian tube)에 30gauge needle을 꽂은 주사기를 삽입하여 flushing out해서 卵자나 胚兒를 採取하였다<sup>14)</sup>. 셋째의 實驗群은 theophylline이 임신기간중 胚兒의 着床과 發生에 미치는 結果를 검토하고자 2 I.U.의 PMS를 주사하고 48時間後에 2 I.U.의 HCG를 주사하여 性週期를 同時化(synchronize)시켰으며 HCG주사와 同時 수정능력이 있는 수컷을 同棲시키고 다음날 아침 陰栓이 있는 것을 pregnancy day 1으로 한 다음에 한 實驗群은 着床前인 pregnancy day 2, 3에, 또 한 實驗群은 着床時期인 pregnancy day 4, 5, 6에 theophylline을 처리하였으며 pregnancy day 12에 頸椎破裂로 屠殺한 후 開腹하여 着床된 胚兒를 관찰하였다.

## 實驗結果 및 考察

(1) 卵자의 成熟과 排卵에 미치는 theophylline의 영향(Table 1): 表 1에서 보는 바와 같이 對照群에서는 평균 한 개체당 21.5개의 卵자를 排卵하였으며 排卵된 卵자의 核像을 보면 第 1成熟分裂中期(metaphase I, MI)에서 末期(Telophase I, TI) 사이에 있는 것이 95개(36.8%)였고 第 2成熟分裂中期(metaphase II, MII)에 도달된 것이 98개(38.0%)로서 正常卵자의 절반 이상이 第 2成熟分裂에 도달하고 있었다. 그러나 PMS와 同時에 theophylline을 처리한 實驗群에서는 그 排卵率이 현저하게 감소되어 평균 한 개체당 7.4개의 卵자를 排卵하였으며 第 1成熟分裂中期에 있는 卵자가 20개(22.5%) 정도로 현저하게 감소되었고 第 2成熟分裂中期에 도달된 것은 44개(49.3%)로 排卵된 正常卵자의 3분의 2가 第 2成熟分裂에 이르고 있으며 사용한 12마리중 2마리는 전혀 排卵을 하지 않았다. 그리고 theophylline을 HCG와 同時에 처리하였을 때는 한마리가 排卵한 卵자는 17.1개여서 對照群에 비하여 큰 차이가 없었으나 卵자의 成熟에 미치는 영향은 커서 正常卵자의 3분의 2에 해당하는 75개(66.4%)가 第 1成熟分裂中期에서 末期사이(MI—TI)에 머물러

**Table 1.** Effects of theophylline treatment of ovulation and maturation of the oocytes in mouse

Group	No. of mice	No. of ova ovulated	Aver. No. of ova shed per mouse	Nuclear phase*			No. of mouse not ovulated
				MI-TI	MII	Others	
PMS, HCG	12	258	21.5	95 (36.8)	98 (38.0)	65 (25.2)	
PMS+Th(1.6mg) HCG	12	89	7.4	20 (22.5)	44 (49.3)	25 (28.1)	2
PMS HCG+Th(1.6mg)	12	206	17.1	75 (66.4)	23 (20.4)	15 (13.3)	3

\* Figures in parenthesis mean percent to total ova ovulated.

MI-TI: oocytes at metaphase 1 to telophase 1

MII: oocytes at metaphase II.

Th-theophylline.

**Table 2.** Development of the fertilized oocytes in the mouse previously injected with theophylline. Animal was killed 45-48 hours after HCG injection and the embryos were flushed out from fallopian tube into medium to examine their types

Group	Does of theophylline (mg)	No. of mice	No. of mated female mice	Type of embryos			No. of ova per mouse	% of fertility
				MI-MII	2-cell	others		
PMS, HCG	0	6	4	5	90 (23*)	23	29.5	76.3
PMS+Th, HCG	1.6	7	1		28 (28)	3	31.0	90.0
	3.2	9	2	3	20 (10)	9	16.0	62.5
PMS,HCG+Th	1.6	6	4	32	44 (11)	11	21.8	50.6
	3.2	14	6	35	67 (11)	13	19.1	60.5

\*Average number of 2-cell embryos per mouse.

있고 단지 23개 (20.4%)만이 第2成熟分裂中期에 도달하고 있으며 사용된 12마리중 3마리는 전혀 排卵을 하지 못하고 있었다. 이러한 結果로 보아 theophylline을 HCG와 동시에 처리하였을 때는 濾胞의 成長을 저해시키며 HCG와 동시에 처리하였을 때는 卵子 자체의 成熟을 抑制시키는 것으로 생각된다. 이것은 theophylline을 PMS와 동시에 처리했을 때는 腦下垂體性生殖腺刺戟호르몬인 濾胞刺戟호르몬(follicle stimulating hormone, FSH)의 作用이 抑制되어 결국 濾胞細胞의 分裂이 抑制되어 第1成熟分裂中期에 도달된 卵子가 적어서 排卵率이 감소된 것으로 생각된다. 이는 theophylline을 위시킨 methylxanthine이 細胞分裂을 抑制시킨다는 보고<sup>9)~12)</sup>와 一致되는 結果라고 하겠다. 또한 HCG와 同時에 theophylline을 처리하였을 때는 卵子 자체의 成熟을 抑制시켜 第2成熟分裂中期에 도달된 난자가 감소되는 것은 조동(1974)<sup>9)</sup>이 cAMP의 類似體인 dbcAMP나 theophylline을 in vitro로 난

자에 직접처리하였을때 난자의 成熟이 抑制되는 것을 관찰한 結果와 一致되는 것으로 in vivo라 할지라도 theophylline은 그 처리시기에 따라 濾胞細胞에, 또는 卵子의 成熟에 抑制作用을 하는 것을 알 수 있다. 또한 Robison은 theophylline에 의하여 cAMP농도가 증가된다고 하였으며<sup>13)</sup> 正常 胚兒發生過程中 cAMP농도가 감소된다고 하였는데<sup>12)</sup> 本實驗에서나 조동<sup>9)~11)</sup>의 實驗結果로 미루어 볼때 theophylline에 의한 正常值이상의 cAMP농도의 증가는 卵子의 成熟이나 排卵을 抑制한다는 것을 알 수 있다. 그러나 theophylline과 腦下垂體性生殖腺刺戟호르몬과의 관계는 앞으로 좀더 상세히 研究 해야될 과제인 것으로 생각된다. 그러나 1976년 Weiss등<sup>14)</sup>은 sheep(양)의 濾胞細胞에서, Selstam등<sup>15)</sup>은 rabbit(토끼)에서 生殖腺刺戟호르몬인 luteinizing hormone(LH)이나 HCG에 의하여 cAMP농도가 현저히 증가된다고 보고한바 있으며 cAMP가 mediator가 되어 生成되는 steroid호르몬은 핵막붕괴

Table 3. Theophylline effect on implantation of the embryos

Group	No. of mice whose vaginal plug were found	No. of mice with pregnancy	No. of embryos implanted	No. of embryos per mouse
Saline on Day 2, 3	23	3	48	16
Theophylline (1.6mg) on Day 2, 3	26	11	135	12.3
Saline on Day 4, 5, 6	20	3	39	13
Theophylline (1.6mg) on Day 4, 5, 6	25	8	151	18.8

(germinal vesicle break-down, GVB)에 없어서는 안되는 것이라고 하였다<sup>18-20</sup>. 1976년 Marsh<sup>20</sup>는 LH, HCG를 처리하였을 때 cAMP가 progesterone합성에 mediator로 작용하며 theophylline으로 처리하여도 LH, HCG를 처리하였을때와 마찬가지로 progesterone 합성이 촉진된다고 하였다. 그러나 cAMP가 과도하게 축적될 경우에는 progesterone은 합성되지 않는다고 하였다.

本實驗에서 theophylline이 FSH와 LH의 작용을抑制하는 결과를 가져온 것은 위의 보고들로 미루어 보아 theophylline에 의해서 cAMP가 과도하게 축적된 결과에서 기인된 것이라고 추측된다.

(2) 排卵된 卵子的 成熟과 受精率에 미치는 theophylline의 영향(Table 2): 표 2에서 보는 바와 같이 對照群에서는 6마리중 4마리가 교배를 하였는데 PMS와 同時에 theophylline 1.6mg을 처리받은 實驗群에서는 7마리중 단 1마리만이 교배를 하였으며 3.2mg을 처리받은 實驗群에서는 9마리중 2마리만이 교배를 하였다. HCG와 同時에 처리한 實驗群에서는 對照群과 교배율은 같았다. 한편 이 時期는 2細胞期胚兒(2-cell embryo)가 가장 많은 時期<sup>21</sup>인데 對照群에서는 한마리당 23이 2-cell embryo이었고 1.6mg을 처리받은 實驗群에서는 28이었으나 이것은 단 한마리만이 교배를 한 實驗群에서 보여주는 것이므로 큰 의의를 찾아볼 수 없는 것이고 3.2mg을 PMS와 같이 처리받은 實驗群에서는 2마리만이 교배를 하였는데 한마리당 10개만이 2-cell embryo에 도달하였으며 HCG와 같이 처리받은 實驗群에서는 현저히 감소되어 2-cell embryo가 된 것이 11로서 受精率의 감소를 보이고 있다. 이와같이 2-cell embryo는 theophylline처리군이 對照群에 비해 현저히 감소하고 있다. 이것역시 표 1에서 보여준 바와 같이 PMS와 同時에 처리된 實驗群에서 2-cell embryo가 감소된 것은 濾胞細胞의 성장이 抑制된 結果 排卵된 卵子的 수가 감소된 結果라고 보겠으며 HCG와 同時에 theophylline을 처리한 實驗群에서 2-cell embryo가 감소되는 것은 卵子成熟이 저해 되었기 때문에 오는 結果라고 추측된다.

1975년 조동<sup>10,11</sup>은 theophylline (100 $\mu$ g/ml, 0.5

mM)을 培養液에 처리하였을때 핵막이 붕괴되지 못하며 RNA합성도 극히 抑制되는 것을 관찰하였다. 이 처리기간은 1972년 Bloom등<sup>22</sup>이 배양후 2~6시간 되면 RNA합성이 된다는 時期와 1968년 Donahue<sup>23</sup>가 핵막이 붕괴된다는 時期와 一致되는 기간이다. 이와 같이 처리받지 않고 培養된 것에서는 RNA합성이 되고 핵막이 붕괴되나 theophylline을 처리받음으로써 이 모든 과정이 저해되는 것은 成熟分裂초기에 합성되는 RNA는 핵막이 붕괴되고 열색사가 응축되며 방추사가 형성(mitotic apparatus) 되는데 주 역할을 할 some specific protein(histone, RNA polymerase, DNA polymerase, microtubule proteins)<sup>24</sup>을 합성 하리라 생각되는데 이 과정이 억제되어 결국 卵子成熟이 억제된다고 하겠다.

(3) Theophylline이 胚着床에 미치는 영향(Table 3): 표 3에 나타난 바와 같이 着床前時期에 theophylline의 영향을 관찰하기 위하여 pregnanay day 2, 3에 생리식염수만으로 처리한 대조군과 theophylline으로 처리한 실험군에 있어서 교배된 것은 23, 26마리였으나 12日後에 開腹하여 본 결과 着床하고 있는 개체는 대조군에서 3마리, 처리군에서는 11마리가 착상을 하고 있어 개체당 着床된 胚兒의 수는 대조군에서 16마리, 처리군에서 12.3마리 이었다. 또한 着床時期인 pregnanay day 4, 5, 6에 theophylline을 처리하였을 때 대조군에서는 3마리, 처리군에서는 8마리가 着床을 하고 있었으며 개체당 착상된 胚兒의 수는 대조군에서 13마리 처리군에서는 18.8마리로 호르몬 처리를 받지않고 正常으로 임신하는 마리수(7~8마리)보다 높았다. 이것은 性週期를 同時化하려고 처리한 호르몬이 多排卵을 시킨 結果를 초래하였으므로 theophylline 영향 이전에 호르몬에 의한 영향 때문에 着床이 일어나지 않았다고 생각된다. 1975년 Spindle<sup>25</sup>이 호르몬으로 처리하여 배란시킨 卵子和 임의로 배란된 난자를 in vitro에서 培養시켰을때 포배기까지는 별차이가 없으나 in vivo에서 着床에 미치는 영향을 관찰한 바는 호르몬에 의한 maternal factors 때문에 多排卵시킨 것이 着床이 이루어지지 않는다고 하였다. 또한 theophylline을 비롯한 methylxanthin은 half life가 3.5

시간밖에 되지 않는다는 Timson<sup>9)</sup>의 보고와 같이 본 실험에서도 2日, 3日間 처리하고 임신 12日째되는 날 까지 두었기 때문에 theophylline에 의한 영향보다는 多排卵된 결과 着床이 일어나지 않아서 대조군과 처리군에서 그 차이를 찾아볼 수 없는 것으로 생각된다. 그러므로 in vivo로 theophylline이 着床에 미치는 결과를 관찰하기 위해서는 性週期를 人爲的으로 同時化해서는 안되겠고 theophylline도 계속 처리해야 될 것으로 생각되나 계속 처리한다는 것도 기계적 자극도 문제가 될 것이며 같은 性週期에 있는 암컷을 同時에 많은 개체를 얻는다는 것도 지금의 사육실 형편으로는 힘든 일이므로 여건이 갖추어진 후에 다시 추후해 보려고 한다.

### 結 論

Theophylline을 in vivo로 처리해서 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) Theophylline이 흰생쥐 卵자의 成熟과 排卵에 미치는 영향.

(1) PMS와 同時에 theophylline을 처리한 처리군에서 排卵率이 현저하게 감소하고 있다.

(2) Theophylline을 HCG와 同時에 처리하였을 때는 濾胞細胞내에 있는 卵子자체의 成熟을 抑制시킨다.

2) Theophylline이 排卵된 卵자의 成熟과 受精率에 미치는 영향.

(1) Theophylline을 PMS와 同時에 처리한 처리군에서 교배율이 현저히 감소하였다.

(2) HCG와 同時에 theophylline을 처리한 처리군에서는 卵자의 成熟이 抑制되고 있다. HCG 혹은 PMS와 同時에 theophylline을 처리한 처리군에서 다같이 2-cell embryo가 현저히 감소되고 있다.

3) Theophylline이 胚兒着床에 미치는 영향 : 着床이 억제되어 임신된 개체가 대조군, 처리군에서 다같이 감소되고 있다.

### — References —

- 1) Jost, J.P. and H.W. Richkenberg: Cyclic AMP. *Ann Rev. Biochem.* 40 : 741—774, 1971.
- 2) Robison, G.A., R.W. Butcher and E.W. Sutherland: Cyclic AMP. Academic press. New York : 515, 1971.
- 3) Pastan, I. and R. Perlman: Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science*, 169: 339, 1970.
- 4) Thomas, D.B., G., Medley, and C.A. Lingwood,

Growth inhibition of murine tumor cells, in vitro, by puromycin, (<sup>6</sup>N)O<sup>2</sup>-dibutyryl 3', 5'-adenosine monophosphate, or adenosine. *J. Cell Biol.*, 57 : 397, 1973.

- 5) Zeilig, C.E., Johnson, R.A., Freidman, D.L., and Sutherland, E.W.: Cyclic AMP concentrations in synchronized HeLa Cells. *J. Cell Biol.*, 55 : 590, 1971.
- 6) Timson, J.: Effect of theobromine, theophylline, and caffeine on the mitosis of human lymphocytes: *Mutation Res.*, 15 : 197—201, 1972.
- 7) Nath, J. and L.I. Rebhun: Effect of caffeine & other methylxanthines on the development & metabolism of sea urchin eggs. *J. Cell Biol.*, 68 : 440—450, 1976.
- 8) Ax, R.L., R.J. Collier & J.R. Lodge: Effect of dietary caffeine on the testis of the domestic fowl. *J. Reprod. Fert.*, 47 : 235—238, 1976.
- 9) Cho, W.K., S. Stern and J.D. Biggers: Inhibitory effect of dibutyl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Exp. Zool.* 187 : 383—386, 1974.
- 10) W.K. Cho. and S.H. Yoo: Studies on the effects of dibutyryl cyclic AMP and theophylline on RNA synthesis in mouse follicular oocytes in vitro. *Korean J. Zool.* 18 : 19—26, 1975.
- 11) W.K. Cho and Y. D. Yoon: Studies on the effect of dibutyryl cyclic AMP and theophylline on intracellular contents of glycogen of mouse follicular oocytes in vitro. *Korean J. Zool.* 18 : 27—40, 1975.
- 12) Robison, G.A.: Cyclic AMP and hormone action. *Am. J. Pharm. Ed.*, 36 : 723, 1972.
- 13) Biggers, J.D., W.K. Whitten and D.G. Whittingham: The culture of mouse embryos in vitro In: *Methods in mammalian embryology* pp. 86—116. J.C. Daniel, Jr. Ed., W.H. Freeman & Co., 1971.
- 14) Weiss, T.J., R.F. Seamark, J.E.A. McIntosh and R.M. Moor: Cyclic AMP in sheep ovarian follicles: Site of production and response to gonadotrophins. *J. Reprod. Fert.* 46 : 347—353, 1976.
- 15) Selstam, G., P.O. Janson, & S. Eden: Effect of LH on the release of cAMP by the rabbit

- ovary perfused in vivo & in vitro. *J. Reprod Fert* 46 : 355—358, 1976.
- 16) Polznetti-Magni, A.C. Lupo di Pusco R.K. Rastogi Lbellini Cardellini and G. Chiffi: Estrogenes in the plasma of females of *Rana esculenta* during the annual cycle and following ovariectomy. *Gen. Comp. Endocrinol.* 14: 212, 1970.
- 17) Redshaw, M. and T. Nicolls: Estrogen biosynthesis by ovarian tissue of the south Africans clawed toad, *Xenopus laevis*. *Gen, Comp. Endocrinol*: 16—85, 1971.
- 18) Schuetz, A.W.: Estrogens and ovarian follicular functions in *Rana Pipiens*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 18 : 32, 1972a.
- 19) Snyder, B. and A.W. Schuetz: In vitro evidence steroidogenesis in amphibian *Rana pipiens* ovarian follicle and its relationship to meiotic maturation and ovulation. *J. Exp. Zool.* 183: 333, 1973.
- 20) Marsh, J.M.: The role of Cyclic AMP in Gonadal Steroidogenesis. *Biology of Reproduction.* 14 : 30—53, 1976.
- 21) Dickmann Z.: Egg transfer. In: *Methods in mammalian embryology.* pp. 133—145. J.C. Daniel, Jr. Ed., W.H. Freeman & Co., 1971.
- 22) Bloom, A.M., and B.B. Mukherjee: RNA synthesis in maturing mouse oocytes. *Exptl. Cell Res.*, 74 : 577—582, 1972.
- 23) Danahue R.P.: Maturation of the mouse oocytes in vitro sequence and timing of nuclear progression. *J. Exp. Zool.*, 169 : 237—250, 1968.
- 24) Davidson, E.H.: *Quantitative Aspects of Protein Synthesis in Early Embryos; Synthesis and inheritance of some specific embryonic proteins.* In: *Gene Activity in Early Development* pp, 85—135. Academic Press 1976.
- 25) Spindle, A.I. and L.S. Goldstein: Induced ovulation in mature mice and developmental capacity of the embryos in vitro. *J. Reprod. Fert.* 44, 1 : 113—116, 1975.
-