

Ca²⁺ 농도에 따른 생쥐 초기배의 발생

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

양정숙 · 배인하

The Development of Early Mouse Embryos Depend on Ca²⁺ Concentration

Jung-Sook Yang, In-Ha Bae

Department of Biology, College of Natural Science, Sungshin Women's University

Objective: This study was to determine the effect of different concentration of calcium in medium on the preimplantational development of zygotes and early 2-cell embryos.

Methods: Female mice of ICR strain (5~8 weeks old) were superovulated and mated with fertile males. Zygotes or early 2-cell embryos were collected by flushing the oviducts 31~32 hours after hCG injection. The embryos were cultured in various concentrations of Ca²⁺ in medium or with EDTA, EGTA and Ni²⁺.

Result and Conclusion: Treatment of high concentration of Ca²⁺ (3.42 mM (2X)~17.1 mM (10X)) in medium didn't develop well compared to the control. Low concentrations of Ca²⁺ (0.214 mM (1/8X)~0.855 mM (1/2X)) were detrimental to development beyond 2-cell stage. EDTA, Ca²⁺ chelating agent was treated with ranged concentrations of EDTA (0.014 mM~0.107 mM) to medium containing 1.71 mM Ca²⁺ showed beneficial effect to development to blastocyst compared to the control. EGTA, extracellular Ca²⁺ chelator, was treated with ranged concentrations of EGTA (0.014~0.107 mM) to the medium containing 1.71 mM Ca²⁺. There is no significant difference with the control. Ni²⁺ (50 μM), T-type Ca²⁺-channel blocker was treated to medium containing low concentration of Ca²⁺. It overcame 2-cell block significantly. Rate of degenerated embryos decreased and developmental rate to morula and blastocyst increased more than low Ca²⁺ concentration alone. Further studies are needed for the overcoming effect of 2-cell block by Ni²⁺.

Key Words: Early 2-cell mouse embryo, Ca²⁺, EDTA, EGTA, Ni²⁺

생쥐의 수정란 (zygote)을 체외배양 (In Vitro culture)시 착상전인 포배기 (blastocyst stage)까지 발생하지 못하고 2세포기에 발생이 정지되어 퇴화한다.¹ 이와 같이 수정된 후 2세포기에서 세포분열이 정지되는 현상을 '2-cell block' 이라고 하며,² 이것은 생쥐의 계통에 따라 차이가 있다. Biggers³는 몇몇 hybrid계 (B6AF1, B6D22F-1)와 순종계 (inbred strain, C3H)의 수정란의 체외배양시 포배기로의 발생이 30~60%에 이르나 다른 계 (C57, DBA와 Swiss mice)는 0~8%에 불과하다고 보고하였다. 이러한 2-cell block을 극복하기 위하여

체외배양에서의 많은 연구들이 있었지만, 2-cell block의 정확한 원인은 아직 밝혀지고 있지 않다.

Whittingham⁴은 생쥐 수정란을 난관에 이식하는 방법으로 포배로의 발생을 보였고, Muggleton-Harris 등⁵은 2-cell block을 보이지 않는 계통의 수정란의 세포질을 2-cell block을 보이는 계통의 세포질에 미세주입 (microinjection)을 함으로써 2-cell block이 극복됨을 보여 세포질에 2-cell block을 극복시키는 요소의 충분한 mRNA가 존재한다고 보고하였다. 이것은 McLaren⁶이 보고한 모계영향에 의한 2-cell block 현상임을 증명하고 있다.

1977년 Abramczuk 등⁷은 ICR계 수정란을 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 10.8 μM 이 포함된 Whitten's 배양액에 배양했을 때 포배기까지의 발생률이 대조군 15~30%에 비해 70%의 높은 배 발생률을 보였다. 그리고 Suzuki 등⁸은 2-cell block을 보이는 생쥐 수정란의 세포질에 108 μM 의 EDTA가 함유된 배양액을 미세주입함으로써 92%의 4세포기 이상의 발생률을 보였으며, Fissore 등⁹은 EDTA가 함유된 배양액을 위황강 (perivitelline space)에 미세주입하여 배의 발생을 유도하였다.

한편, 세포질내의 Ca^{2+} 의 일시적인 증가 현상^{10,11}은 세포 대사의 중요 조절작용을 담당할 뿐만 아니라,^{12,13} 수정란의 초기 발생과정을 촉진시킨다는 연구 결과가 있고,^{14~17} Ca^{2+} ionophore인 A 23187 또는 ethanol을 사용하여 세포내 Ca^{2+} 의 증가가 일어나면 착상전 배발생 (pre and peri-implantation)이 증가된다는 보고가 있다. 그러나, 세포내 Ca^{2+} 의 착화합물 (Ca^{2+} chelator)인 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester (BAPTA-AM)을 사용할 때 ionophore에 의해 유도되었던 Ca^{2+} 신호체계 (Ca^{2+} -signaling)가 저해되어 포배형성이 농도의존적으로 (dose dependent) 감소하였다.^{18~20} 이로써 세포내 Ca^{2+} 신호체계 (Ca^{2+} -signaling)는 Ca^{2+} 농도에 의존하며, 생쥐배의 체외 발생시 세포분열에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

또한, 생쥐 수정란과 초기 2세포배를 Ca^{2+} 이 없는 배양액에 48시간 배양 후 모두 퇴화하는 반면,²¹ 후기 2세포배는 Ca^{2+} 이 제거된 배양액에서 상실배까지 발달이 가능한 점으로 보아 초기 2세포기에 일어나는 2-cell block은 Ca^{2+} 과 관계가 있다고 보여진다.²²

Bac와 Park²²은 후기 2세포배를 Ca^{2+} 이 존재하지 않는 배양액에서는 포배형성률 0%를 보였고, 1.71 mM의 Ca^{2+} 이 있는 배양액에서는 포배형성률 38%를 보인 반면, 3.42 mM, 8.55 mM로 농도를 높인 배양에서는 형성률이 각각 34%, 37%로써 세포 외부의 Ca^{2+} 농도를 높여도 포배형성률이 증가하지 않았다. 이런 점들을 종합해 볼 때 2-cell block은 Ca^{2+} 과 관련이 있을 것으로 가정된다. 따라서, 본 실험에서는 2-cell block이 일어나는 생쥐의 수정란과 2세포배를 여러 가지 농도의 Ca^{2+} 이 처리된 배양액에서 배양하였다. Ca^{2+} chelator인 EDTA와 또다른 배양액 내 Ca^{2+} chelator인 EGTA (ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether)N,N'-

tetraacetic acid)를 Ca^{2+} 이 존재하는 배양액에서 배양하였다. Ca^{2+} channel blocker로서 2세포배의 2-cell block을 극복시킨 Ni^{2+} 을 저농도의 Ca^{2+} 이 존재하는 배양액에 처리하여 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발생에 미치는 Ca^{2+} 의 역할을 알아보고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 실험에서는 명기와 암기가 조절 (14시간 : 10시간)되는 사육실에서 사육된 생후 5~8주의 Swiss albino인 ICR 계통의 암컷과 생후 12주 이상되어 생식력이 있는 수컷을 사용하였다.

생쥐 암컷의 복강에 5 IU (international unit)의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)과 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 0.9%의 생리 식염수에 녹여 47시간 간격으로 주사하여 과배란 (superovulation)을 유도한 후 수컷과 합사시켰다. 다음날 아침에 질전 (vaginal plug)이 확인된 암컷을 hCG 주사 후 31~32시간에 경추 파열로 도살한 후 양쪽 난관을 채취하여 두 개의 전핵 (pronucleus) 또는 두 개의 극체 (polar body)를 가진 수정란과 건강하게 보이는 초기 2세포배를 수집하였으며 필요에 따라 0.1% hyaluronidase (Sigma)를 사용하여 수정란의 mucin 성분과 난구세포 (cumulus cell)를 제거하였다.

2. 연구 방법

1) 배양 방법

수집된 생쥐 수정란과 초기 2세포배는 배양접시 (Falcon, 3002)에 40 μl 의 배양액을 실험군의 수에 맞추어 만든 후 고압 멸균된 equilibrated mineral oil (Sigma)로 덮었다. 이를 37 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하고 5%의 CO_2 와 95% 공기가 공급되고 100%의 습도가 유지되는 배양기에 넣어 3시간 동안 평형시킨 후 배양에 사용하였다.

2) 배양액과 처리 물질

모든 실험에 사용된 배양액은 MHBS (modified Hank's balanced salts solution)²³를 다시 조정하여 만든 New MHBS를 사용하였고 New MHBS의 조성은 다음과 같다.

NaCl (98.7 mM), KCl (5.3655 mM), MgSO_4 (0.8118 mM), Na_2HPO_4 (0.3358 mM), KH_2PO_4 (0.1533 mM), glucose (5.551 mM), phenol red (10

Table 1. Effects of high concentrations of Ca^{2+} in medium on the development of zygotes and early 2-cell mouse embryos to morula and blastocyst*

Conc. of Ca^{2+} (mM)	Total No. of embryos	No. of developed embryos (%)				
		2C	3~8C	MO	BL	DEG
1.71	73	14 (19.1)	20 (27.4)	10 (13.7)	2 (2.7)	27 (37.0)
3.42	76	20 (26.3)	19 (25.0)	9 (11.8)	0 (0.0)	28 (36.8)
6.84	70	22 (31.4)	15 (21.4)	7 (10.0)	0 (0.0)	26 (37.1)
13.68	75	11 (14.7)	25 (33.3)	7 (9.3)	3 (4.0)	29 (38.7)
17.1	73	11 (15.1)	15 (20.5)	8 (11.0)	0 (0.0)	39 (53.4)

The results were obtained by seven replicates. *: 72hr culture

mg/l), penicillin-G (100 units/ml), streptomycin (52 mg/l) 등을 10배의 stock solution으로 준비하고 CaCl_2 (1.71 mM), Na-lactate (2.5 mM), Na-pyruvate (0.33 mM) 등을 각각 100배의 stock solution으로 준비하여 사용하였으며, 0.4% bovine serum albumin (BSA)과 NaHCO_3 (25 mM)는 사용 직전에 녹여 사용하였다.

배양액은 대체로 278mOsm~280mOsm²⁴로 조정하고 ($\mu\text{Osmette}$, Mass, U.S.A.) pH 7.3으로 적정하여 여과 멸균 (Millipore, 0.45 μm) 하였다.

서로 다른 Ca^{2+} 농도를 갖는 각각의 배양액의 삼투압을 278mOsm~280mOsm로 맞추기 위하여 NaCl과 KCl의 양으로 조절하였다.

처리 물질 ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, M.W. 237.7, Sigma; Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), M.W. 336.2, Sigma)은 처리된 농도별로 증류수에 녹여 100배의 stock solution을 만들어 냉동보관 하였으며, ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether) $\text{N,N}'$ -tetraacetic acid (EGTA) (M.W. 380.4, Sigma)는 stock solution을 사용하지 않고 해당되는 몰농도를 계산하여 배양액에 첨가하였다.

3) 배의 관찰

관찰 결과는 2세포배 중 핵막이 있고 세포질이 투명하며 정상적인 것을 2세포배로 하였고 3세포배~8세포배, 상실배 (morula; MO)와 포배 (blastocyst; BL), 그리고 세포질이 응축되거나 액포가 형성된 것 등의 비정상적인 것과 비정상적인 발생 (fragmentation)을 배의 퇴화 (degeneration; DEG)로 분류하였다.

4) 통계 처리

대조군과 실험군의 통계적 유의성은 spss/pc[†] (version 3.0)을 이용하여 student t-test로 하였다.

결 과

1. 고농도 Ca^{2+} 이 처리된 배양액이 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발생에 미치는 영향

대조군과 유의한 차이는 보이지 않았지만, 모든 실험군에서 포배를 형성하지 않거나 낮은 비율 (4%)을 보였다 ($p>0.05$). 발생이 정지되어 2세포배를 유지하고 있는 비율은 3.42 mM (2X), 6.84 mM (4X) 실험군에서 26.3%, 31.4%를 나타내어 대조군의 19.1% 보다 높았고, 3~8세포배, 상실배, 포배에서의 비율은 대조군보다 각각 낮게 나타났다 (Table 1).

2. 저농도 Ca^{2+} 이 처리된 배양액이 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발생에 미치는 영향

대조군의 퇴화율은 37.5%인 반면 0.855 mM (1/2X), 0.428 mM (1/4X), 0.214 mM (1/8X) 실험군은 각각 48.4%, 48.4%, 51.7%의 퇴화율을 보였다. 또한, 모든 실험군에서 상실배 형성이 10% 미만을 보였고, 포배형성은 보이지 않아 배발생에는 특정 농도가 필요한 것을 알 수 있었다 (Figure 1).

3. EDTA를 처리한 배양액이 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발생에 미치는 영향

0.014 mM 실험군은 대조군과 유의한 차이가 없었지만 ($p>0.05$), 0.027 mM, 0.054 mM, 0.107 mM 실험군의 퇴화율은 대조군의 40.3%에 비해 38.6%, 27.5%, 31.4%로서 대조군 보다 낮아 2-cell block 극복 효과가 있는 것으로 보였다. 모든 실험군에서 상실배·포배 형성률이 대조군의 9.7%에 비해 23.9~55.7%로서 높은 비율을 보였고 특

Table 2. Effects of various concentrations of Na₂-EDTA in medium on the development of zygotes and early 2-cell mouse embryos to morula and blastocyst*

Conc. of EDTA (mM)	Total No. of embryos	No. of developed embryos (%)					P vs. control
		2C	3~8C	MO	BL	DEG	
0	72	15 (20.8)	21 (29.2)	5 (6.9)	2 (2.8)	29 (40.3)	
0.014	71	4 (5.6)	17 (23.9)	10 (14.1)	7 (9.9)	33 (46.5)	
0.027	70	0 (0.0)	12 (17.1)	13 (18.6)	18 (25.7)	27 (38.6)	<0.05
0.054	69	0 (0.0)	16 (23.1)	12 (17.4)	22 (31.9)	19 (27.5)	<0.05
0.107	70	0 (0.0)	9 (12.9)	13 (18.6)	26 (37.1)	22 (31.4)	<0.05

The results were obtained by six replicates. p<0.05; Significantly differs from the control (0 mM EDTA). *; 72hr culture

Table 3. Effects of various concentrations of EGTA in medium on the development of zygotes and early 2-cell mouse embryos to morula and blastocyst*

Conc. of EGTA (mM)	Total No. of embryos	No. of developed embryos (%)				
		2C	3~8C	MO	BL	DEG
0	72	17 (23.6)	18 (25.0)	5 (6.9)	2 (2.8)	30 (41.7)
0.014	73	16 (21.9)	13 (17.8)	4 (5.5)	6 (8.2)	34 (46.6)
0.027	68	10 (14.7)	26 (38.2)	6 (8.8)	4 (5.9)	22 (32.4)
0.054	74	10 (13.5)	20 (27.0)	10 (13.5)	2 (2.7)	32 (43.2)
0.107	76	20 (26.3)	24 (31.6)	4 (5.3)	4 (5.3)	24 (31.6)

The results were obtained by seven replicates. *; 72hr culture

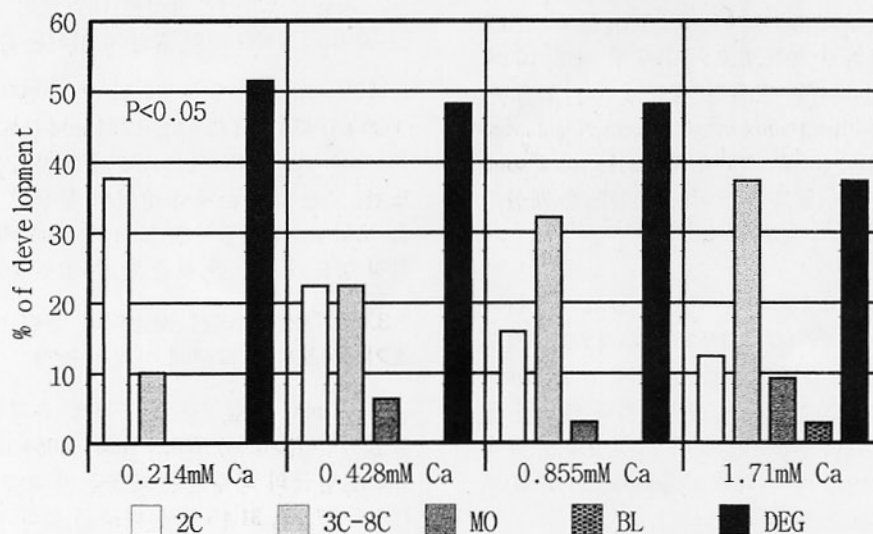


Figure 1. Effects of low concentrations of Ca²⁺ in medium on the development of zygotes and early 2-cell mouse embryos to morula and blastocyst.* The results were obtained by six replicates. p<0.05; Significantly differs from the control (1.71 mM Ca²⁺). *; 72hr culture

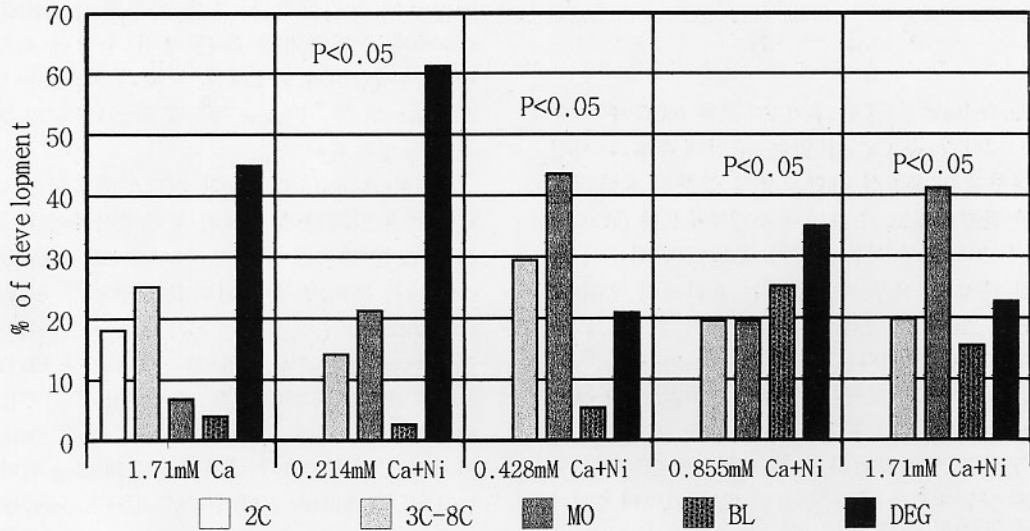


Figure 2. Effects of Ni^{2+} on the development of zygotes and early 2-cell mouse embryos to morula and blastocyst. * The results were obtained by seven replicates. $p < 0.05$; Significantly differs from the control (1.71 mM Ca^{2+}). *; 72hr culture

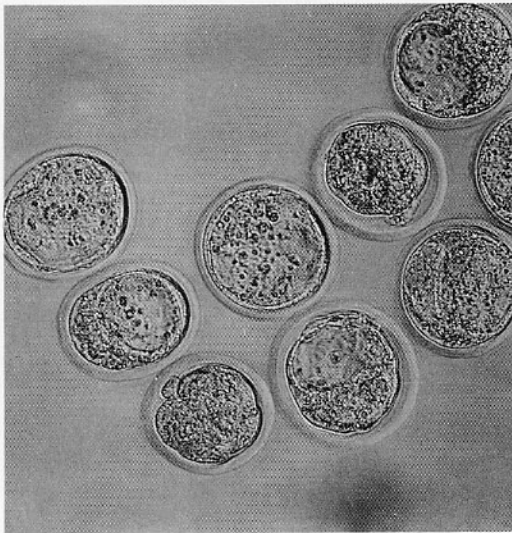


Figure 3. A light micrograph of embryos cultured for 72 hours in the presence of 0.855 mM Ca^{2+} and 50 μM Ni^{2+} . X400.

히 0.107 mM 실험군은 대조군의 포배형성률 2.8% 보다 13.3배 높은 37.1%의 포배형성률을 보여 2-cell block 극복 효과가 컸다 (Table 2).

4. 저농도의 EGTA를 처리한 배양액이 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발생에 미치는 영향

모든 실험군에서 (0.014~0.107 mM) 상실배, 포배형성률이 대조군 9.7%에 비해 높은 10.6~16.2%의 비율을 보였으나 유의하지는 않았으며 ($p > 0.05$), 같은 농도의 EDTA 실험군의 포배형성률 보다는 낮았다 (Table 3).

5. 저농도 Ca^{2+} 의 배양액에 처리한 Ni^{2+} 50 μM 이 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발생에 미치는 영향

저농도의 Ca^{2+} 만 존재하는 배양액에서 보였던 2-cell block 현상이 모든 실험군에서 극복되었다. 상실배 형성률은 각 실험군마다 21.4%, 43.7%, 19.7%, 41.4%를 보였고 저농도의 Ca^{2+} 만 처리했을 때 형성되지 않았던 포배가 50 μM Ni^{2+} 첨가 시 각 실험군마다 2.9%, 5.6%, 25.4%, 15.7%의 비율을 보였다. 퇴화율도 감소하여 배발생에 유익하게 작용하였다 ($p < 0.05$). 가장 낮은 농도인 0.214 mM의 Ca^{2+} 과 Ni^{2+} 이 처리된 실험군은 높은 퇴화율 61.4%를 나타내었고 대부분 3~8세포배가 퇴화하였다. 또, 0.855 mM의 Ca^{2+} 과 Ni^{2+} 이 처리된 실험군은 가장 높은 포배율 25.4%를 보여 1.71 mM의 Ca^{2+} 이 존재할 때보다 Ni^{2+} 의 효과가 크게 작용하였다 (Figure 2, 3).

고 찰

Bae와 Park²²은 생쥐 후기 2세포배 (hCG 주사 후 50~52시간)를 Ca^{2+} 이 없는 배양액에서 48시간 배양하여 포배형성 전단계까지 충분히 발달하는 것을 관찰하였고, 수정란과 초기 2세포배 (hCG 주사 후 30~33시간)를 Ca^{2+} 이 없는 배양액에서 48시간 배양 후 모두 퇴화한다는 결과로써 생쥐 수정란과 초기 2세포배는 체외배양시 외부 Ca^{2+} 이 필수적으로 요구되는 것을 보고한 바 있다.²¹ 이 사실로 생쥐 2세포배에서 일어나는 2-cell block은 초기 2세포배에서 후기 2세포배로 발생이 진행되는 동안 Ca^{2+} 과 밀접하게 관련된다고 할 수 있다.

본 실험에서는 생쥐 수정란 및 초기 2세포배가 외부 Ca^{2+} 농도가 절대적으로 요구되는 것을 바탕으로 외부 Ca^{2+} 농도를 여러 가지 농도로 조절하여 Ca^{2+} 농도에 대한 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발생 정도를 알아보았다.

Ca^{2+} 농도를 높인 3.42 mM~17.1 mM 배양액에서는 대조군과 비슷한 퇴화율을 보여 통계적 유의성은 없었다. 따라서, 수정란 및 생쥐 초기 2세포배를 체외배양시, 외부 Ca^{2+} 농도를 높였다고 해서 대조군에 비해 배발생이 촉진되지는 않음을 알 수 있었다.

1.71 mM 보다 낮은 농도인 0.855 mM (1/2X), 0.428 mM (1/4X), 0.214 mM (1/8X)의 Ca^{2+} 이 포함된 배양액에 72시간 배양 결과 저농도의 Ca^{2+} 실험군이 고농도의 Ca^{2+} 실험군보다 퇴화율이 높게 보여 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발달에는 적정 농도의 Ca^{2+} 이 필수적으로 필요하다고 추정할 수 있다. 그러나 본 실험에서 0.428 mM의 Ca^{2+} 실험군은 대조군과 비교해서 통계적 유의성이 없는 점으로 보아 적어도 0.428 mM의 이상의 외부 Ca^{2+} 이 필요하다고 추정된다. 이와 같은 농도는 생쥐여포난자 배양에서 적어도 0.5 mM Ca^{2+} 이 필수적인 실험적 보고^{25,26}와 일치하고 있다.

또한, 본 실험에서는 배양액 내 Ca^{2+} 농도 1.71 mM을 기준으로하여 Ca^{2+} 과 chelation 하는 EDTA, EGTA를 여러 농도로 조절하여 배양한 결과, 0.027 mM~0.107 mM EDTA 실험군은 대조군보다 상실배, 포배의 형성률이 높게 나왔고, 퇴화율도 낮아 배발생에 유의하게 작용하였다. 특히 107 μ M의 EDTA 실험군은 대조군 2.8%에 비해 37.1%의 높은 포배형성률을 보였는데, 108 μ M의 EDTA를

배양액에 처리하거나, 혹은 위황강 (perivitelline space)에 주입하거나 혹은 생쥐 수정란 세포질에 미세주입하여 92%의 높은 포배형성률을 보인 Abramzuck 등,⁷ Fissore 등⁹ 및 Suzuki 등⁸의 연구결과와 일치한다.

0.014 mM~0.107 mM의 EGTA 실험군은 유의하지는 않았지만 상실배와 포배형성률이 대조군과 비슷한 결과를 보이고 있어 2-cell block overcome에는 전혀 영향이 없다고 판단된다. EGTA는 Ca^{2+} chelation 과정에서는 EDTA 보다 효과적이나 전혀 beneficial effect가 없었다. 또 Ca^{2+} 과 EDTA가 1:1로 chelation 한다고 할 때 108 μ M의 EDTA는 배양액 속의 극히 일부분만의 Ca^{2+} 만을 chelation 시키고 있어 EDTA가 세포막상에 binding 되어 있는 Ca^{2+} 과 chelation 되어 Ca^{2+} -EDTA complex가 signal transduction을 유도하여 intracellular Ca^{2+} increase를 유발하는 것이 아닌가 하는 추정이 가능하다. 이 가정에 대한 실험을 앞으로 계획하고 있다.

한편, T-type Ca^{2+} channel blocker로 알려진 Ni^{2+} 은 최근 파골세포 (osteoclast)에서 세포내 Ca^{2+} 저장으로부터 Ca^{2+} 을 유리시켜 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시킨다고 보고되었다.^{27,28} 이들은 파골세포막상에 가상적인 Ca^{2+} -receptor가 있어 Ni^{2+} 이 이 receptor에 binding 될 때 세포내 Ca^{2+} 을 증가시킨다고 가정하고 있으나 정확한 기작 설명은 아직까지 못하고 있다. 이와는 달리 생쥐 초기 2세포배에서도 Ni^{2+} 을 10~100 μ M로 배양액에 처리할 때 Ni^{2+} 처리 후 약 60초 정도에서 intracellular Ca^{2+} 농도가 올라감을 dual wavelength excitation spectrophotometer로 관찰하였다.²⁹ 이와 같이 세포내 Ca^{2+} 농도 증가가 세포분열을 조장하는 trigger 역할을 하고 있었으며 2~8분 후에도 다시 basal level로 돌아갔다. Basal level로 돌아온 2세포배에다 다시 높은 농도의 Ni^{2+} 을 처리하더라도 재차 intracellular Ca^{2+} transient는 없었다.²⁹ 파골세포와 생쥐 2세포배에서 Ni^{2+} 이 똑같은 기작으로 intracellular Ca^{2+} transient를 일으키는지 여부는 아직 밝혀지지 않고 있다. Ni^{2+} 은 Ca^{2+} -channel 중 T-type channel의 blocker로도 작용하고 있어 Ni^{2+} 의 작용 기작에 관한 연구는 더 계속되어야 한다. 앞서 기술된 저농도의 Ca^{2+} 배양액에서 2-cell block을 보인 실험군에 50 μ M의 Ni^{2+} 을 처리한 결과 모든 실험군에서 2-cell block 극복 현상을 유의하게 보였다 (Figure 2). 0.855 mM의 Ca^{2+} 과 50 μ M Ni^{2+} 을 처

리한 실험군은 가장 높은 포배형성률을 보여 1.71 mM Ca²⁺이 존재할 때 보다 0.855 mM Ca²⁺ 존재시 더욱 효과적으로 작용했다고 보여진다 (Figure 2). 0.214 mM Ca²⁺과 Ni²⁺을 처리한 실험군은 61.4%의 높은 퇴화율을 보였고, 대부분 3~8세포에서 퇴화했으며 특히 8세포배는 compaction을 이루지 못하고 퇴화하였다. 이것은 8세포배를 외부 Ca²⁺이 없는 배양액에 24시간 배양시 16세포배까지 세포분열은 일어나지만 compaction은 일어나지 않았고 48시간 배양후에 모두 퇴화하였다는 보고³⁰와도 일치하여 compaction 과정 중에 배양액 내의 적정 Ca²⁺ 농도를 필요로 한다는 것을 시사한다.

참 고 문 헌

- Whitten WK, Biggers JD. Complete development *in vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fert* 1968; 17: 399-401.
- Goddard MJ, Pratt HPM. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block'. *J Embryol Exp Morph* 1983; 73: 111-33.
- Biggers JD. New observations on the nutrition of the mammalian oocyte and the preimplantation embryo. In: *Biology of the blastocyst*. Chicago: Univ Chicago Press; 1971. p. 314-327.
- Whittingham DG. Development of zygotes in cultured mouse oviducts. I. The effect of varying oviductal conditions. *J Exp Zool* 1968; 169: 391-8.
- Muggleton-Harris A, Whittingham DG, Wilson L. Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse. *Nature* 1982; 299: 460-2.
- McLaren A. Analysis of maternal effects on development in mammals. *J Reprod Fert* 1981; 62: 591-6.
- Abramczuk J, Solter D, Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 1977; 61: 378-83.
- Suzuki S, Komatsu S, Kitai H, Endo Y, Iizuka R, Fukasawa T. Analysis of cytoplasmic factors in developmental cleavage of mouse embryo. *Cell Differ* 1988; 24: 133-8.
- Fissore RA, Jackson KV, Kiessling AA. Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid. *Biol Reprod* 1989; 41: 835-41.
- Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 1995; 82: 415-24.
- Jaconi M, Pyle J, Bortolon R, Ou J, Clapham D. Calcium release and influx colocalize to the endoplasmic reticulum. *Current Biology* 1997; 7: 599-602.
- Harootunian AT, Kao JPY, Paranjape S, Tsien RY. Generation of calcium oscillations in fibroblasts by positive feedback between calcium and IP₃. *Science* 1991; 251: 75-8.
- Hepler PK. The role of calcium in cell division. *Cell Calcium* 1994; 16: 322-30.
- Kline JT, Kline D. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: evidence for inositol trisphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. *Biol Reprod* 1994; 50: 193-203.
- Suprynowicz FA, Prusmack C, Whalley T. Ca²⁺ triggers premature inactivation of the cdc2 protein kinase in permeabilized sea urchin embryos. *Pro Natl Sci U.S.A.* 1994; 91: 6176-80.
- Ayabe T, Kopf GS, Schultz RM. Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on unseminated and inseminated eggs. *Development* 1995; 121: 2233-44.
- Striker SA. Time-lapse confocal imaging of calcium dynamics in starfish embryos. *Dev Biol* 1995; 170: 496-518.
- Stachecki JJ, Yelian FD, Schults JF, Leach RE, Armant DR. Blastocyst cavitation is accelerated by ethanol- or ionophore-induced elevation of intracellular calcium. *Biol Reprod* 1994a; 50: 1-9.
- Stachecki JJ, Yelian FD, Leach RE, Armant DR. Mouse blastocyst outgrowth and implantation rates following exposure to ethanol or A23187 during culture *in vitro*. *J Reprod Fert* 1994b;

101: 611-7.

20. Stachecki JJ, Armant DR. Regulation of blastocoele formation by intracellular calcium release is mediated through a phospholipase C-dependent pathway in mice. *Biol Reprod* 1996a; 55: 1292-8.
21. Bae IH, Yoon SY. The effect of Ca^{2+} inhibitor on the *in vitro* 2-cell block of the mouse. *Kor J Fertil Steril* 1995; 22: 1-10.
22. Bae IH, Park JH. Studies on the requirements of Ca^{2+} for cell division and Ca^{2+} permeability of plasma membrane of fast dividing mouse embryo cells. *Kor J Fertil Steril* 1987; 93-100.
23. Bae IH, Channing CP. Effect of Ca^{2+} on pig follicular oocyte maturation *in vitro*. 1985; 33: 79-87.
24. Bae IH, Foote RH. Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. *J Reprod Fert* 1980; 59: 11-3.
25. DeFelici M, Siracusa G. Survival of isolated, fully grown mouse ovarian oocytes is strictly dependent on external Ca^{2+} . *Dev Biol* 1982; 92(2): 539-43.
26. Chung HW, Yoo HK, Bae IH. Effect of calcium inhibitors on mouse oocyte maturation. *Kor J Fert Steril* 1992; 19: 15-29.
27. Almers W, Palade PT. Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurements with a vaseline-gap technique. *J Physiol* 1981; 312: 159-76.
28. Shanker VS, Bax CMR, Bridget E, Bax B, Alam ARHT, Moonga BS, et al. Activation of the Ca^{2+} 'receptor' on the osteoclast by Ni^{2+} elicits cytosolic Ca^{2+} enhance for receptor activation and inactivation, intracellular Ca^{2+} redistribution, and divalent cation modulation. *J Cell Physiol* 1993; 155: 120-9.
29. Bae IH. The effect of Ni^{2+} in overcoming the 2-cell block in the mouse embryo. *Suppl Mol Biol Cell* 1994; 5: 354a.
30. Bae IH, Kim HS. Effect of Ca^{2+} inhibitors on compaction of mouse 8-cell embryos. *Kor J Fertil Steril* 1994; 21: 49-62.