大韓不妊學會雜誌: 第21卷 第1號 1994
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 21, No. 1, 1994, 4

생쥐 8세포배의 Compaction에 미치는 칼슘 Inhibitor의 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

김 희 선 · 배 인 하

Effects of Ca^{++} Inhibitors on Compaction of Mouse 8-cell Embryos

Hee Sun Kim and In-Ha Bae

Department of Biology, Graduate School, Sungshin Women's University, Seoul, Korea

=Abstract=

In mammalian development, the embryo which is in the process of compaction, involves a progressive flattening of blastomeres against each other with the consequence that the embryo assumes a spherical shape. This stage happens in the first differentiation.

The present study was aimed to examine the involvement of other metal ions in compaction by treating with various divalent cations in the absence of Ca^{++}.

When 8-cell embryos were cultured in Ca^{++}-free medium for 24hrs, they developed to 16-cell stage but did not compaction, and degenerated after 48hrs of culture. Embryos were cultured in Ca^{++}-free medium for 24hrs and then transferred to the control medium showed the normal compaction afterwards.

When 8-cell embryos were cultured in the presence of Ni^{++}, known as a Ca^{++} inhibitor, they cleaved to 16-cell stage but did not compact in the absence of Ca^{++}. On the other hand, embryos cultured in the media containing both Ca^{++} and Ni^{++} developed normally so that they underwent compaction during culture for 48hrs. However, they failed to hatch during further 24hrs in the same medium, indicationg that Ni^{++} may exert some harmful effects. Embryos grow in the control medium that contained Ca^{++} but not Ni^{++}, developed to the hatched blastocysts.

The treatment with Cd^{++} 10^{-1}, $10^{-2}\mu M$, Mn^{++} or Ba^{++} 10, 100, $1000\mu M$ in Ca^{++}-free medium, respectively, inhibited compaction and embryonic degeneration began as in Ca^{++}-free medium.

When 3, 5, 10mM of Sr^{++}, known as a substitute for Ca^{++} in cell, was added to Ca^{++}-free medium, respectively, compaction was induced unlike the above metal ions. Embryos were cultured in Sr^{++} developed to blastocysts, but failed to hatch after 72hrs and degenrated. On the other hand, when embryos were cultured in 3, 5, 10mM of Sr^{++} but in Ca^{++}-free medium for 24hrs respectively and then transferred to the control, they showed the similiar development as that in the control.

서 론

대부분의 포유동물의 배아는 초기 배 발생 과정 중 대략 8세포기에 이르러 compaction이란 독특한 분화 현상을 나타낸다. 이때 이 8개의 할구는 서로간에 일정한 공간을 가지고 배열되어 있다가 뒤이어 할구사이의 접촉을 최대화하여 결국엔 각 할구의 형태를 구별할 수 없는 구 형태를 보인다.

Ducibella등(1975)에 따르면 바깥쪽에 위치

*본 연구는 문교부 기초과학 육성연구비(BSRI-92-426) 및 한국과학재단 목적 기초연구비의 보조로 수행되었음.

한 할구들 사이에 생긴 밀착 결합(tight junction)은 세포사이의 접촉을 최대화하여 모계환경(maternal enviroment)으로부터 내세포괴를 격리시킬 뿐만 아니라 체액의 축적을 통한 포배강(blastocoel)의 팽창에 필요한 것으로 보고되고 있다. 또한 내세포괴는 모계환경으로부터 격리될 뿐만아니라 포배강으로부터도 격리되는데 이것은 영양세포 돌기(trophoblast process)들이 내세포괴를 둘러싸기 때문이며 이때, 내세포괴와 영양세포사이에는 틈 결합(gap junction)이 존재하여 둘 사이에는 밀착접촉(close contact)이 유지된다고 하였다. 생쥐 할구간에 gap junctional channel이 존재하는 것은 Goodall과 Johnson(1982)이 6-carboxyfluorescein diacetate(CFDA)를 이용하여 2세포배(2-cell)와 4세포배(4-cell)의 할구 사이에는 틈 결합을 통한 색소의 이동이 없는 반면에 8세포배(8-cell)에서 색소의 이동이 있는 것을 보고한 것으로 알 수 있다. 이것은 틈 결합을 통한 세포간 연락(intercellular communication)이 8세포배에서 시작된다고 보고한 McLachlin등(1983)의 결과와 일치한다.

Compaction과정에는 세포표면에 존재하는 분자들이 중요하게 작용한다. Kemler등(1977)이 rabbit anti-F9 Fab fragment를 2세포배와 8세포배에 처리하였을 때 세포분열은 저해하지 않고 상실배와 포배(blastocyst)형성은 방지됨을 보고한 이래로 compaction과 관련된 표면분자에 대한 많은 관심이 이어져 왔다. 특히, tunicamycin을 처리하면 compaction이 저해되기 때문에 compaction과 관련된 당단백질(glycoprotein)의 역할에 촛점이 맞추어졌다(Surani et al., 1991; Sutherland & Calarco-Gillam, 1983). 이 tunicamycin은 N-linked glycosylation inhibitor인 점으로 보아 N-glycosidically linked glycoprotein을 포함하는 세포표면 분자가 compaction과정에 중요한 것으로 판단된다. 그 동안의 연구결과 compaction에 관련하는 이 당단백질은 분자량이 124,000으로 세포와 세포의 접촉에 관여하는 분자이며 cadherin(Yosida-Noro et al., 1984; Hirano et al., 1987; Takeichi, 1988) 또는 uvomorulin(Peyieras et al., 1983; Vestweber & Kemler, 1984; Vestweber et al., 1987)이라고 불려진다. Vestweber등(1987)은 이 uvomorulin이 8세포기까지는 세포표면에 고르게 분포하다가 compaction이 진행되면서 세포와 세포의 접촉지역에 집중한다는 보고는 uvomorulin이 세포접착에 관여한다는 직접적인 증거가 된다.

8세포배를 칼슘(Ca^{++})이 제거된 배양액에서 배양하면 compaction이 완전히 억제되며(Ducibella & Anderson 1975, 1979) 또 Bae와 Park(1987)과 Pratt등(1982)이 후기 2세포기배를 칼슘이 제거된 배양액에서 배양했을 때 세포분열은 정상적으로 일어나지만 상실배와 포배기로의 발달을 볼 수 없는 것으로 미루어 칼슘은 compaction에 반드시 필요한 요소이다.

한편 compaction시 칼슘이 직접적으로 어디에 관여하는지를 밝히는 여러실험들이 행해졌다. 8세포배와 같은 표면 당단백질을 가진 embryonal carcinoma cell(Kemler et al., 1977)의 경우에 Kartha등(1983)은 칼슘의 농도를 2mM이하로 처리했을 경우 세포가 응집(aggregate)되지 않았고 칼슘 ionophore인 A23187을 처리했을 때 compaction을 야기하지 못한 것으로 보아 세포내 칼슘보다는 세포 바깥쪽 칼슘이 제한요소로써 작용한다고 보고하였다. 그리고 Hyafil등(1981)과 Yoshida-Noro등(1984)은 칼슘이 존재할 때 접착에 관여하는 당단백질은 trypsin에 저항성을 가지게 되는데 이것은 칼슘이 이 당단백질과 결합하는 구조적인 변화를 일으킴으로써 활성화된 형태가 되었기 때문이며 이 활성화된 형태가 compaction에 관여한다고 주장하였다. 이와같이 칼슘은 세포접착에 반드시 필요한데 이는 calcium-dependent cell-cell adhesion system (CDS)으로도 알려져 있다. Teratocarcinoma cell에 존재하는 CDS(t-CDS)를 인식하는 monoclonal antibody, 즉 ECCD-1을 이용하였을 때 이 ECCD-1은 칼슘이 존재할 때만 t-CDS를 인식하고(Yoshida-Nore et al., 1984), 8세포기배와도 이 항체는 반응을 나타내어 그 결과 compaction이 일어나지 않는다는 점에서(Shirayoshi et al., 1983) CDS가 compaction에 반드시 필요하며 이때 세포 바깥쪽 칼슘이 필수적임을 알 수 있다.

세포외 칼슘이 compaction에 반드시 필요한 바와 같이 세포내 칼슘이 또한 필요하다. 그것은 Bilozur와 Powers(1982)가 calmodulin antagonist인 trifluoperazine(TFP)를 처리하여 recompaction을 유도하지 못한 경우와 Pakrasi와 Dey(1984)가 TFP를 comapaction의 초기과정과 후기과정에 처리하였을 때 초

기과정에 처리했을 때만 compaction이 유도되지 않은 보고로 알 수 있다. 한편, Winkel등(1990)이 protein kinase C(PKC)의 activator인 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)를 4세포배에 처리하여 premature compaction을 유도하였으며, 또 PKC 저해제인 sphingosine을 처리했을 때는 정상적인 compaction을 억제한다는 사실을 보았을 때 PKC도 compaction에 관여하는 것을 알 수 있다.

본 실험에서는 compaction시 중요하게 작용하는 칼슘대신에 칼슘 저해제(inhibitor)들을 처리했을 때 이들이 칼슘에 대치하여 compaction을 유도하는지의 여부와 그 이후의 배발생에 대해 알아보고자 한다. 처리물질로는 칼슘 inhibitor인 니켈($NiCl_2 \cdot 6H_2O$), 망간($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)과 카드뮴($CdSO_4$)을 처리하였다. 그리고 칼슘 channel에 투과성을 가진 것으로 보고된 바륨($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)과 스트론튬($SrCl_2 \cdot 6H_2O$)을 처리하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 생후 6-8주된 Swiss albino인 ICR계통의 생쥐 암컷과 생후 12주 이상된 생식력이 확인된 수컷을 사용하였다. 이들을 명기와 암기가 조절되는(14시간 : 10시간) 사육실에서 사육하였다.

7.5 I.U.(international unit)의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Sigma Chem, Co., St. Louis, U.S.A.)을 생쥐 암컷에 복강주사하고 48시간 후 5 I.U.의 human chorionic gonadototropin(hCG; Sigma)을 복강 주사하여 과배란(superovulation)을 유도한 후 수컷과 합사 시켰다. 다음날 아침 질전(vaginal plug)이 관찰된 암컷을 골라 hCG 주사 후 62-63시간에 경추골 파열로 도살하여 양쪽 난관과 함께 난관과 연결된 자궁상부를 채취하였다.

2. 배의 수집

배의 수집과정에는 기본 배양액인 M16으로부터 Ca^{++}을 제거한 Ca_{++}-free 배양액을 사용하였다. 얻어진 난관과 자궁상부는 배양액으로 3번 세척한 후 100㎕의 배양액이 들어있는 시계접시로 옮겼다. 해부 현미경(Bausch & Lomb, U.S.A.)하에서 끝을 둥글게 만든 30gauge 바늘과 1ml 주사기를 이용하여 난관 입구 팽대부(infundibulum)에 바늘 끝을 삽입하고 안과용 핀셋으로 바늘끝이 들어있는 난관 입구를 잡고서 100㎕의 배양액으로 난관을 세척하여 4세포배 및 8세포배를 수집하였다.

3. 배양 방법

수집된 4세포배와 8세포배는 다음과 같은 방법으로 배양한 후 실험군으로 옮겼다. 수집된 4세포배는 대조군(control)에서 6시간 배양한 후 8세포배로 발달된 것만 재 수집하였다. 이들을 칼슘 무처리군(Ca^{++}-free)에서 1시간 배양한 후 각각의 실험군으로 옮겨서 배양을 시작하였으며 이때를 배양 후 Ohr으로 하였다.

한편 수집된 8세포배는 칼슘 무처리군에서 1시간 배양한 후 각각의 실험군으로 옮겨서 배양을 시작하였으며 이때를 배양 후 Ohr으로 하였다.

8세포배를 실험군으로 옮기기전에 칼슘 무처리군에서 잠시 배양하는 것은 모든 배의 상태를 compaction이 일어나기 직전의 상태로 만들어 준 후 실험에 사용하기 위해서이다.

수집된 배는 microdroplet 방법으로 배양하였다. 즉, 배양접시(plastic dishes, 60mm×15mm, Falcon, U.S.A.)에 40㎕의 배양액을 실험군의 수에 맞추어 만든 후 고압멸균된 mineral oil(Sigma)로 덮었다. 이 준비된 배양접시는 적어도 배양 2시간 전에 37℃가 유지되고 5% CO_2와 95% air가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기에 넣어 평형을 유지시켰다.

실험에 사용된 모든 초자기구는 160℃에서 90분간 건열 멸균하였으며 이외의 다른 기구는 121℃, 15Lb/inch^{2}으로 15분간 고압멸균하였다.

4. 배양액과 처리된 화학 물질

모든 실험에 사용된 기본 배양액은 M16 배양액으로 하였으며 bovine serum albumin (BSA, Sigma)을 제외한 성분은 3차 증류수에 녹여 10배로 농축된 stock solution을 만들어 냉장보관하여 필요시에 희석하여 만들어 사용하였으며 성분중에서 sodium lactate, sodium pyruvate와 $CaCl_2$는 100배로 농축된 stock solution으로 만들어 냉장보관하여 사용하였다. BSA는 사용직전에 녹여 사용하였다.

배양액의 pH는 7.30-7.40으로하고 삼투압은

290-310mOsm이 되도록 하였다. 모든 배양액은 사용적전에 Millipore membrane(pore size 0.45㎛, Millipore Co., Bedford, U.S.A.)으로 여과 멸균하였다.

처리물질($NiCl_2 \cdot 6H_2O$, M.W. 237.51, Shingo; $CdSO_4$, M.W. 208.48, Junsei Chem. Co., Japan; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, M.W. 197.9, Sigma; $BaCl_2 \cdot 2H_2O$, M.W. 244.28, Katayama Chem. Japan; $Srcl_2 \cdot 6H_2O$, M.W. 266.6, Sigma)은 처리된 농도별로 3차 증류수에 녹여 100배로 농축된 stock solution을 만들어 Millipore membrane으로 멸균한 후 냉동 보관하였다.

5. 배의 관찰

배의 상태를 배양 후 6시간, 24시간, 48시간, 72시간 후에 위상차 도립 현미경(inverted phass contrast microscope, Labovert, Leitz, Germany)하에서 관찰하였다.

관찰결과는 할구가 8개인 배를 8세포배(8-cell; 8C)라 하였고 할구사이의 경계가 뚜렷해 보이지 않고 서고 들러 붙은 모양을 한 compaction이 일어난 배를 상실배(morula; MO)라 하였다. 같은 시기에 compaction이 일어나지 않고 10개에서 16개의 할구를 가진 배를 10-16세포배(10-16-cell; 10-16C)라 하였다. 그리고 상실배를 지나서 포배강이 형성된 배를 포배(blastocyst; BL)라 하였다. 그리고 상실배를 지나서 포배강이 형성된 배를 포배(blastocyst; BL)라 하였고 포배중에서 투명대(zona pellucida)를 뚫고 나오는 hatching까지 관찰하였다. 또 세포질이 응축되었거나 액포가 형성된 것 또는 세포막이 터지는 등의 비정상적인 배를 퇴화(degeneration; DEG)로 분류하였다.

6. 통계처리

대조군과 실험군의 통계적 유의성은 spss/pc$^+$(version 3.0)을 이용하여 student t-test로 하였다.

결 과

1. 배양액내 칼슘이온의 제거가 compaction에 미치는 영향

배양액내 칼슘이 8세포배 compaction에 미치는 영향을 알아보기위해 72시간 배양한 결과는 그림 1과 같다.

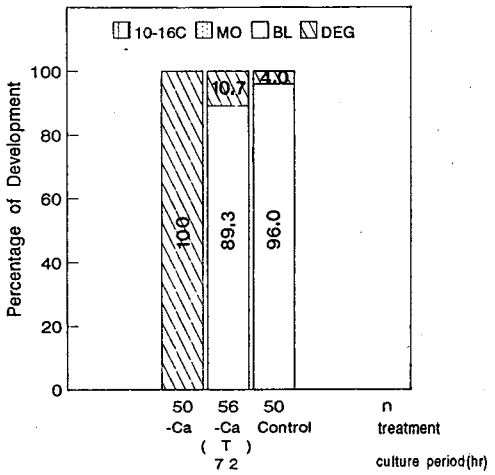

Fig. 1. Effects of Ca^{++} on compaction of 8-cell embryos.

Numbers in the columns indicate percentages of developed embryos. The above results were obtained by pooling of five replicates. T, Embryos developed from 8-cell stage embryos which were precultrued in Ca^{++}-free medium for 24hrs and then cultured in the control (Ca^{++}-containing) medium for an additional 48hrs; n, number of the total examined embryos; 10-16C, 10-16 cell stage embryos; MO, morulae; BL, blastocysis; DEG, degenerated embryos.

8세포기배(그림 10-B)를 칼슘이 제거된 배양액에서 배양한 결과 배양 24시간에 10-16세포기로 발달하지만 compaction은 일어나지 않았다(그림 11-A). 이들을 24시간 더 배양할 경우 100%가 퇴화하였다. 한편 배양 24시간에 대조군(M16+0.4% BSA)에서는 compaction이 일어나 상실배와 포배가 되었고(그림 11-B), 48시간 배양 후엔 96%가 포배로 발달했으며(그림 12-A) 포배로 발달한 배중 87.5%가 배양 72시간에 hatching하였다.

24시간 칼슘이 제거된 배양액에서 배양한 배가 compaction만 일으키지 않고 살아있을 뿐 정상적이어서 대조군에 옮겼을 때 compaction을 일으킬 수 있는지를 확인키 위해서 배양 24시간에 대조군에 옮겨서 배양해 보았다(그림 1-T). 그 결과 10-16세포기이던 52개의 배중 50개가 48시간 더 배양할 경우 포배로 발달하였다. 또한 포배로 발달한 배중 68%가 hatching하였다.

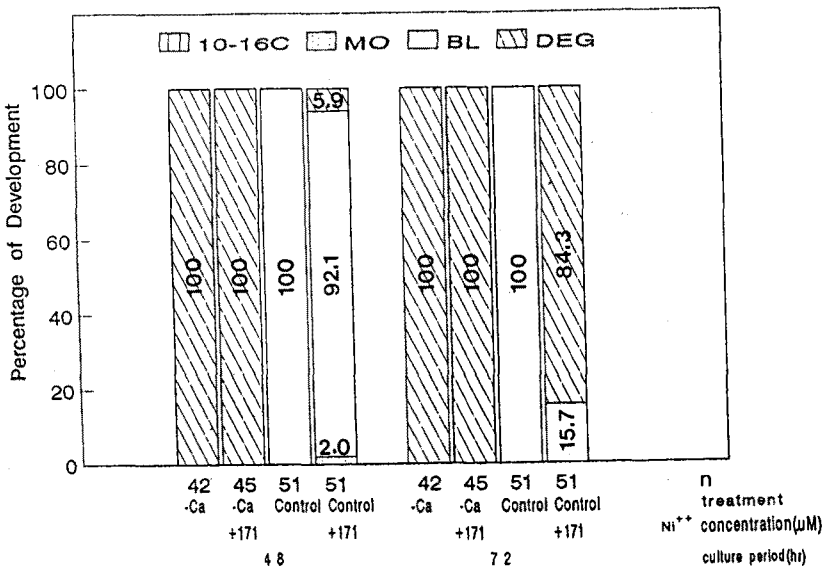

Fig. 2. Effects of Ni^{++} on compaction of 8-cell embryos.
Numbers in the columns indicate percentages of developed embryos. The above results were obtained by pooling of five replicates. n, number of the total examined embryos; 10-16C, 10-16 cell stage embryos; MO, morulae; BL, blastocysts; DEG, degenerated embryos.

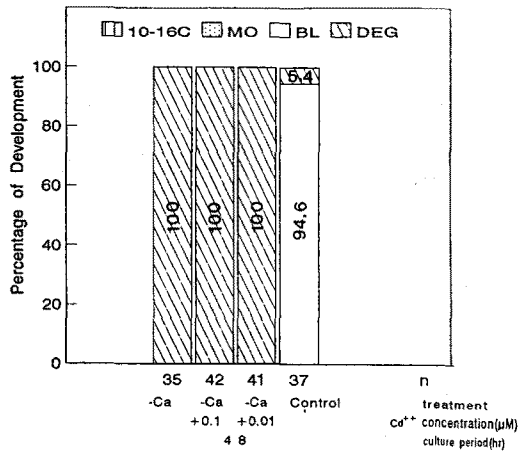

Fig. 3. Effects of various concentrations of Cd^{++} on compaction of 8-cell embryos in Ca^{++}-free medium.
Numbers in the columns indicate percentages of developed embryos. The above results were obitained by pooling of five replicates. n, number of the total examined embryos; 10-16C, 10-16 cell stage embryos; MO, morulae; BL, blastocysts; DEG, degenerated embryos.

2. Compaction에 미치는 니켈의 영향

칼슘 channel blocker인 니켈을 배양액내 칼슘 농도의 1/10인 171μM을 대조군과 칼슘 무처리군에 각각 처리한 결과는 그림 2와 같다. 칼슘 무처리군에 니켈을 처리한 경우 배양 24시간까지 compaction이 일어나지 않았고 칼슘 무처리군과 동일하게 세포 분열만 일으켰고 배양 48시간엔 모두 퇴화하였다.

한편 대조군에 니켈을 처리한 경우는 상실배와 포배형성에 있어서 배양 48시간까지 대조군과 차이가 없었으나 72시간 배양 후에는 배의 대부분이 퇴화(84.3%)하였으며 포배로 남아있다하여도 대조군이 96%의 hatching율을 보이는 반면 0%의 hatching율을 보이고 있다(그림 12-B).

3. Compaction에 미치는 카드뮴의 영향

Inorganic 칼슘 inhibitor인 카드뮴을 각각 10^{-1}, $10^{-2}$$\mu$M의 농도로 칼슘 무처리군에 처리하여 compaction을 일으키는 가를 관찰한 결과(그림 3) 전혀 compaction을 일으키지 않았다. 즉 24시간 배양 후에는 칼슘 무처리군과 거의 동일한 세포분열 일으켰으며 48시간 배양 후에는 모두 퇴화하였다. 반면에 대조군에서는 90%이상의 배아가 포배로 발달하였다.

4. Compaction에 미치는 망간의 영향

칼슘 channel blocker인 망간을 농도별(10, 100, 1000μM)로 칼슘 무처리군에 처리한 후 24시간 및 48시간에 각각 관찰하였다(그림

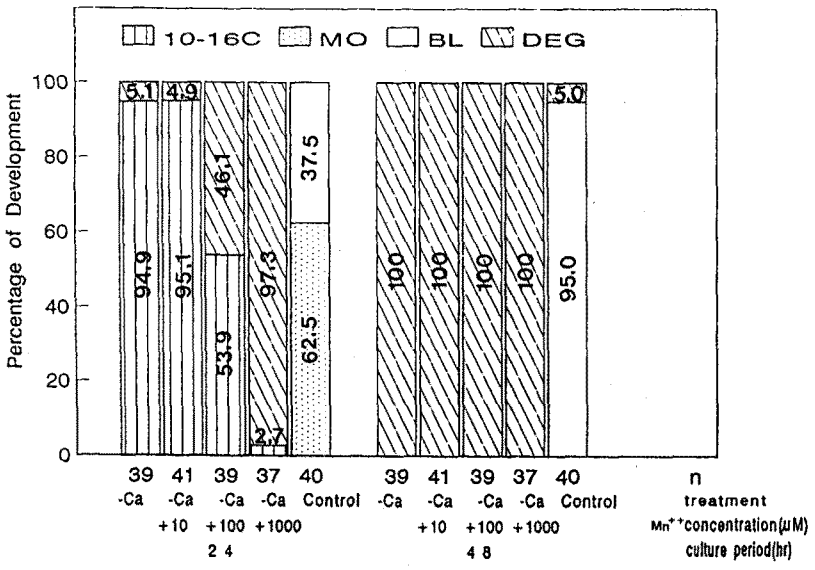

Fig. 4. Effects of various concentrations of Mn^{++} on compaction of 8-cell embryos in Ca^{++}-free medium.

Numbers in the columns indicate percentages of developed embryos. The above results were obtained by pooling of six replicates. n, number of the total examined embryos; 10-16C, 10-16 cell stage embryos; MO, morulae; BL, blastocysts; DEG, degenerated embryos.

4). 24시간 배양시에는 망간의 농도가 높아질수록 퇴화율도 증가하였으며 48시간 배양 후에는 모두 퇴화하였다. 한편 대조군에서는 95%가 포배로 발달하였다.

5. Compacition에 미치는 바륨의 영향

칼슘 channel을 통해서 세포내로 유입이 가능한 바륨을 처리한 결과는 그림 5와 같다. 바륨 10, 100, 1000μM의 농도를 칼슘 무처리군에 처리하였을 때 배양 24시간까지 compaction은 일어나지 않았고 칼슘 무처리군과 유사한 세포분열을 보였으며 농도별 처리군간에 큰 차이는 보이지 않았다. 그리고 48시간 배양 후에는 모두 퇴화하였다.

6. Compaction에 미치는 스트론튬의 영향

여러세포에서 칼슘에 대치물질로써 잘 알려진 스트론튬을 각각 3, 5, 10mM의 농도로 칼슘 무처리군에 처리하였을 때 compaction이 유도되는가를 살펴보았다(그림 6). 배양 24시간 후에는 3, 5, 10mM 각각에서 81.9%, 89.7%, 83.6%가 상실배와 포배로 발생하였다. 48시간 배양에서는 5mM처리군이 포배로 가장 많이 발달했으며 대조군과 마찬가지 형태인 hatching직전의 포배모습을 보였다(그림 13-

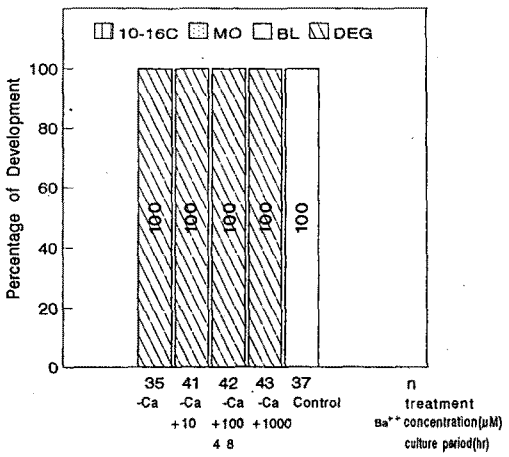

Fig. 5. Effects of various concentrations of Ba^{++} on compaction of 8-cell embryos in Ca^{++}-free medium.

Numbers in the columns indicate percentages of developed embryos. The above results were obtained by pooling of six replicates. n, number of the total examined embryos; 10-16C, 10-16 cell stage embryos; MO, morulae; BL, blastocysts; DEG, degenerated embryos.

A). 그러나 72시간 배양에서는 10mM 처리군은 모두 퇴화하였고 3, 5mM 처리군에서 각각 24.6%, 8.8%가 포배로 남아있었지만 이들은

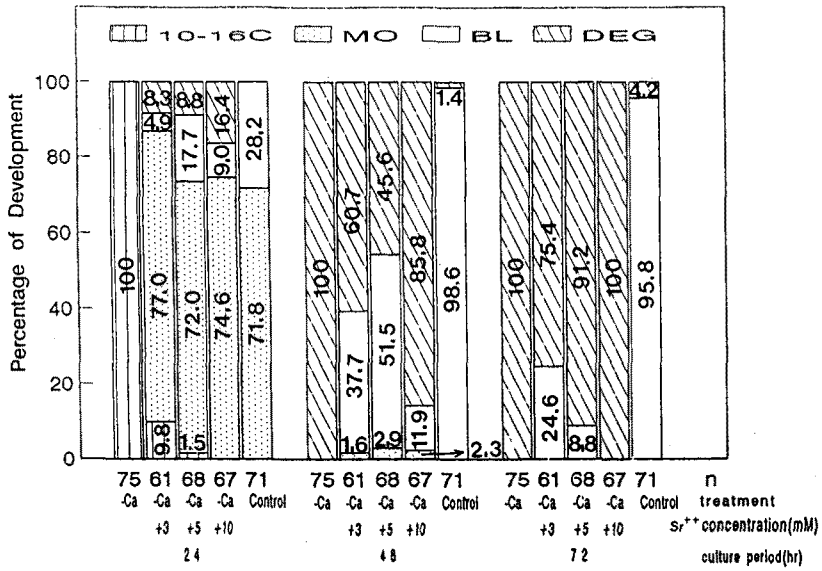

Fig. 6. Effects of various concentrations of Sr^{++} on compaction of 8-cell embryos in Ca^{++}-free medium.

Numbers in the columns indicate percentages of developedd embryos. The above results were obtained by pooling of six replicates. n, number of the total examined embtyos; 10-16C, 10-16 cell stage embryos; MO, morulae; BL, blastocysts; DEG, degenerated embryos.

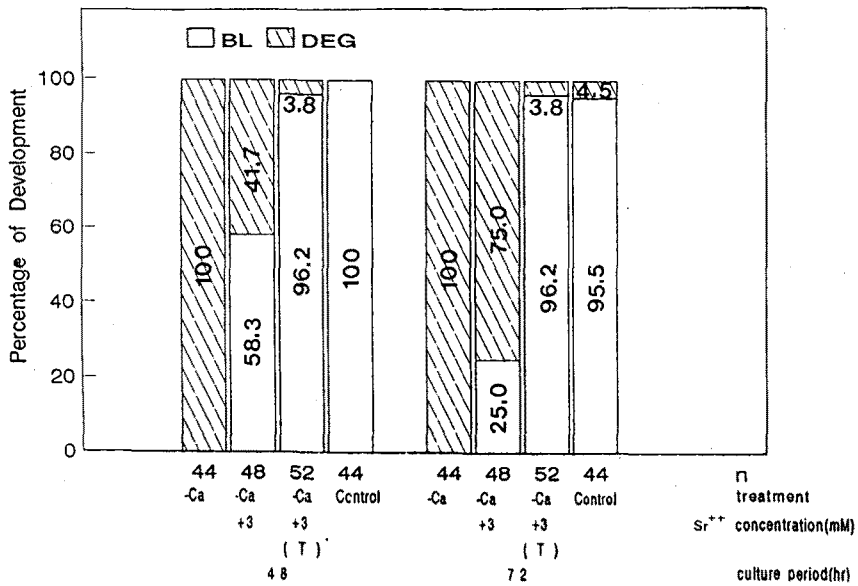

Fig. 7. Effects of 3mM concentration of Sr^{++} on compaction of 8-cell embryos in Ca^{++}-free medium.

Numbers in the columns indicate percentages of developed embryos. The above results were obtained by pooling of five replicates. T, Embryos developed from 8-cell stage embryos which were precultured in Ca^{++}-free medium but containing 3mM concentration of Sr^{++} for 24hrs and then transferred to the control medium. Observations were made at 24 and 48hrs after transfer; n, number of the total examined embryos; 10-16C, 10-16 cell stage embryos; MO, morulae; BL, blastocysts; DEG, degenerated embryos.

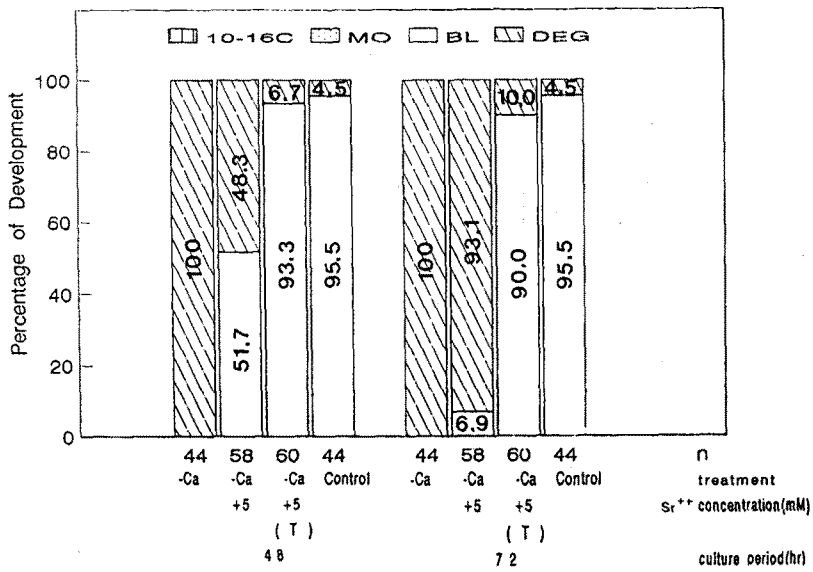

Fig. 8. Effects of 5mM concentration of Sr^{++} on compaction of 8-cell embryos in Ca^{++}-free medium.

Numbers in the columns indicate percentages of developed embryos. The above results were obtained by pooling of five replicates. T, Embryos developed from 8-cell stage embryos which were precultured in Ca^{++}-free medium but contanining 5mM concentration of Sr^{++} for 24hrs and then transferred to the control medium. Observations were made at 24 and 48hrs after transfer; n, number of the total examined embryos; 10-16C, 10-16 cell stage embryos; MO, morulae; BL, blastocysts; DEG, degenerated embryos.

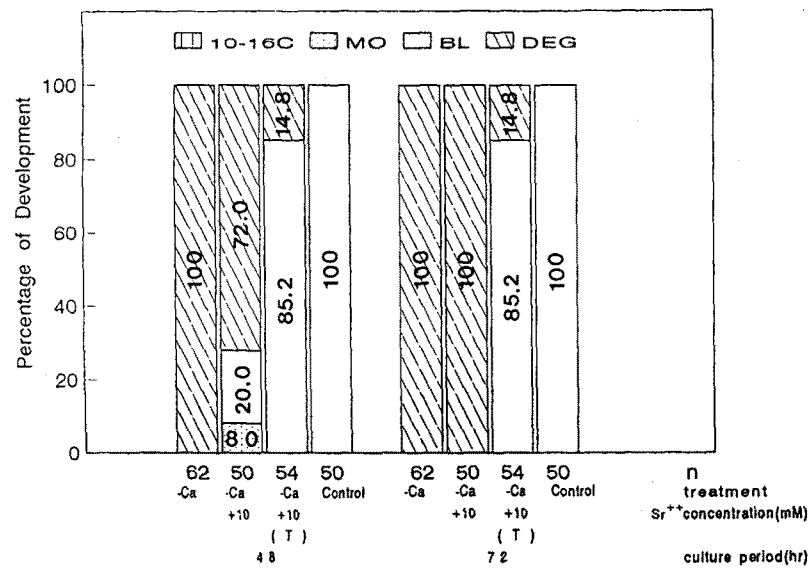

Fig. 9. Effects of 10mM concentration of Sr^{++} on compaction of 8-cell embryos in Ca^{++} free medium.

Numbers in the columns indicate percentages of developed embryos. The above results were obtained by pooling of five replicates. T, Embryos developed from 8-cell stage embryos which were precultured in Ca^{++}-free medium but containing 10mM concentration of Sr^{++} for 24hrs and then transferred to the control medium. Observations were made at 24 and 48hrs after transfer; n, number of the total examined embryos; 10-16C, 10-16 cell stage embryos; MO, morulae; BL, blastocysts; DEG, degenerated embryos.

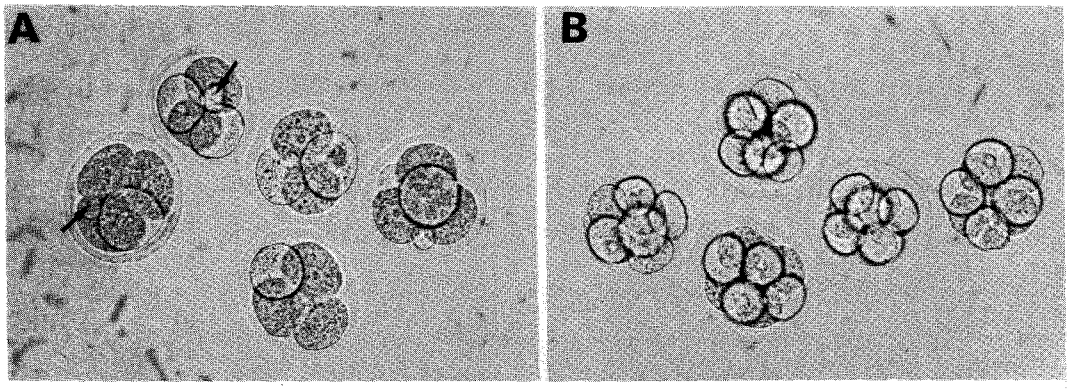

Fig. 10. Light micrographs of early mouse embryos. **A)** Five 4-cell stage embryos immediately collected from oviduct at 62hrs after hCG injection ×400. Arrows indicate a polar body. **B)** Five 8-cell stage embryos immediately collected from oviduct at 62hrs after hCG injection ×400.

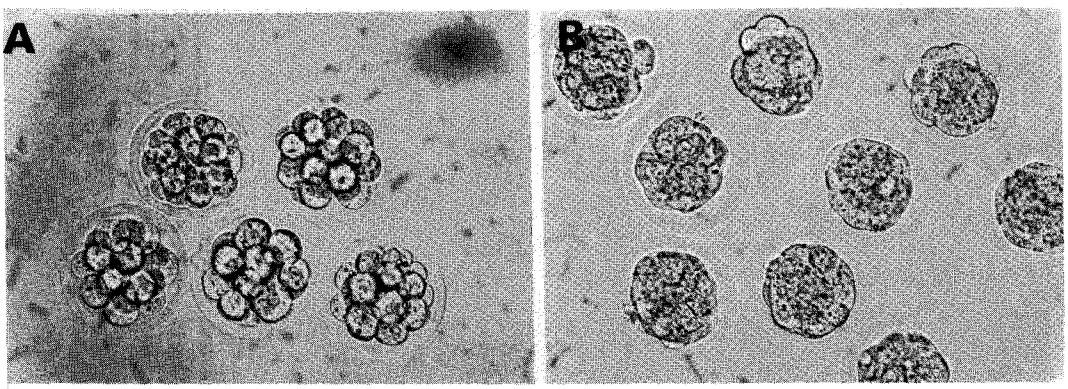

Fig. 11. Light micrographs of early mouse embryos cultured *in vitro*. **A)** Five 10-16 cell stage embros developed from 8-cell stage(62hrs post hCG injection) which were cultured in Ca^{++}-free medium for 24hrs ×400. Note that the embryos do not undergo compaction. **B)** Nine morulae developed from 8-cell stage embryos(62hrs post hCG injection) which were cultured in the control (Ca^{++}-contatining) medium for 24hrs ×400.

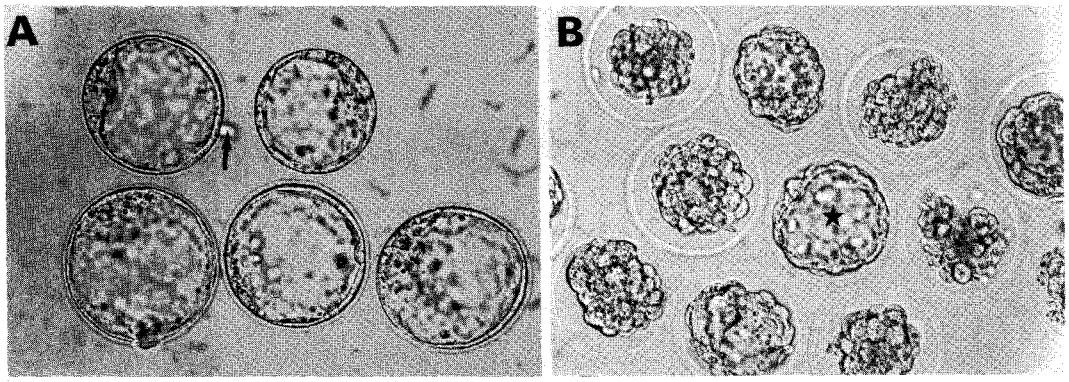

Fig. 12. Light micrographs of mouse embryos cultured in vitro. **A)** Five fully-grown blastocysts cultured for 48hrs in the cuntrol medium ×400. Note that the beginning of hatching as indicated by an arrow. **B)** Ten embryos undergoing degeneration following cavitation for 72hrs in the presence of 171μM concentration of Ni^{++} ×400. Some of them appear still to be healthy(★).

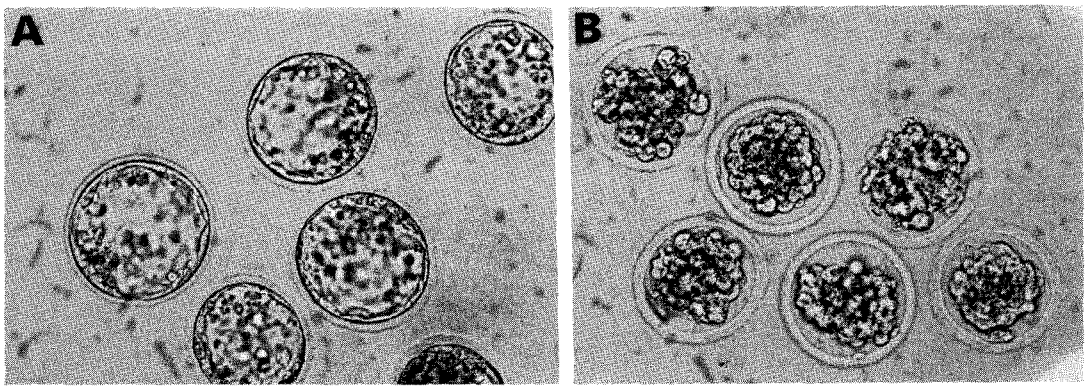

Fig. 13. Light micrographs of mouse embryos cultured in vitro **A)** Five expanded blastocysts cultured for 48hrs in Ca^{++}-free medium but containing 5mM comcentration of Sr^{++} ×400. Note that they have already undergone compaction. **B)** Six blastocysts undergoing degeneration prior to hatch due to culture for 72hrs in Ca^{++}-free medium in the presence of 5mM concentration of Sr^{++} ×400. They had already undergone compaction but failed to develop further in the continuous presence of Sr^{++} but without Ca^{++}.

대조군이 64.7%의 hatching율을 보이는 것과는 달리 hatching하지 못하고 응축된 모습을 하였다(그림 13-B).

24시간 배양 후부터 스트론튬 처리군에서 퇴화율이 증가하고 있어 그 이후에 대조군에 옮겼을 때 정상적인 발생을 할 수 있는가를 살펴본 결과(그림 7, 8, 9) 대조군에 옮긴지 48시간 후 3, 5, 10mM 각각에서 96.2%, 90%, 85.2%가 포배로 발달했으며 대조군과 거의 비슷한 hatching율을 보였다.

고 찰

대부분의 포유동물은 발생에 있어서 compaction이라는 첫번째 분화과정을 나타낸다. Compaction과정중에 배의 할구들은 서로의 접촉을 최대화하여 배 전체가 하나의 구형태를 보인다.

Ducibell와 Anderson(1975, 1979)이 배양액내 칼슘을 제거한 후 8세포배를 배양하였을 때 compaction이 저해된 현상을 보았으며 또한 칼슘이 제거된 배양액에서 키운배를 대조군으로 옮겼을 때 compation을 유도하는 것으로 보아 칼슘이 compaction에 필수적임을 보였다. 또한 Bae와 Park(1987)과 Pratt등(1982)이 후기 2세포배를 칼슘이 제거된 배양액에서 배양했을 때 세포분열은 정상적으로 일어나지만 compaction을 유도하지 못해 상실배와 포배로 발달할 수 없다고 하였다.

Compaction을 일으키는데 칼슘이 반드시 필요하다는 것은 칼슘 무처리군과 칼슘 처리군(대조군)을 비교해 본 실험을 통해서 확인되었다(그림 1). 대조군에서는 배양 후 24시간이면 배가 모두 compaction을 일으켜 상실배와 포배로 발달하고(그림 11-B) 배양 48시간이면 모두 포배로 발달(그림 12-A)하였다. 반면에 칼슘 무처리군에서는 compaction을 일으키지않고 배가 24시간까지는 거의 죽지않고 16세포까지 분열을 한다(그림 11-A). 그러나 배양 48시간이면 모두 퇴화하였다. 칼슘 무처리군의 배가 48시간 후 모두 퇴화한 반면 칼슘 무처리군에서 24시간 배양 후 대조군으로 옮겨준 배의 89.3%는 포배로 발달하였고 포배로 발달한 배 중 68%가 hatching하였다. 이것은 24시간동안 칼슘 무처리군에서 배양한 배는 compaction을 일으키지 못했을 뿐 그 이상의 발생을 할 준비는 되어 있음을 의미한다.

배양액내의 칼슘이 세포내로 유입되는 것을 방지해 보았을 때 compaction이 어떤 영향을 받는가를 알아보기 위해 칼슘-channel blocker인 니켈을 대조군과 칼슘 무처리군에 각각 처리해 보았다(그림 2). 니켈의 농도는 배양액내 칼슘농도의 1/10인 171μM을 사용하였다. 니켈을 대조군에 처리했을 때 48시간까지는 대조군과 배의 발생이 비슷했으나 72시간에는 대조군의 100%가 포배로 발달한 반면 니켈 처리군에서는 84.3%가 퇴화하였고 포배로 남아있는 배도 hatching하지 못하고 약간 응축된 모습을 보였다(그림 12-B). 이것은 10-

1000μM 농도의 $NiCL_2$를 처리하였을 때 농도가 높아짐에 따라 상실배와?! 포배형성이 저해된다는 Store과 Johnsen(1980)의 결과와 마찬가지로 니켈의 toxic효과로 여겨진다. 본 실험에서 니켈이 compaction을 유도할 수 있는지를 보기 위해 칼슘 무처리군에 니켈을 처리했을 때 compaction은 일어나지 않았고 칼슘 무처리군과 별 차이가 없었다.

한편 칼슘 channel inbitor인 카드뮴은 세포내에서 calmodulin과 결합하여(Chao et al., 1984; Mills & Johnson, 1985; Cheung, 1988) 구조적인 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다. 또 카드뮴은 calmodulin외에도 세포내 Ca^{++}-binding protein인 troponin C, CaBP II, parvalbumin에도 친화력이 있는 것으로 알려져 있어(Richardt *et* al., 1986) 본 실험에서 칼슘대신에서 카드뮴 10^{-1}, 10^{-2}μM을 처리하였으나 역시 칼슘 무처리군처럼 세포분열만 할 뿐 compaction을 일으키지는 않았다(그림 3). 이것은 카드뮴이 세포내 Ca^{++}-binding protein에 친화력이 있으나 세포표면에 존재하여 직접적으로 cell adhesin에 관계하는 cadherin(또는 uvomorulin)에는 결합할 수 있는 능력이 없기 때문이라 사료된다.

칼슘 channel block로써 알려진 망간은 칼슘 channel을 통해 세포내로 들어올 수 있다(Ozaki *et al.*, 1992). Hyafil등(1981)이 hCG 주사 후 75시간된 상실배를 칼슘대신 5mM $MnCl_2$를 처리한 배양액에서 1시간 배양했을 때 compaction이 유지됨을 보였다. 본 실험에서는 10, 100, 1000μM을 칼슘 무처리군에 처리했을 때 24시간 배양 후에 compaction을 일으키지 않았으며 농도에 의존하여 퇴화되는 것을 보았다(그림 4). 그리고 48시간 배양 후엔 모두 퇴화하였다. 이것은 저농도의 망간에서는 compaction을 일으키지 않고 퇴화율이 증가되는 것으로 보아 고농도의 망간이 일시적인 compactin만 유지할 뿐 배자체에 망간이 매우 해로움을 알 수 있다.

칼슘 channel을 통해 세포내로의 유입이 가능한 바륨과 스트론튬을 각각 칼슘대신에 배양액에 넣어 배양하였다(Schilling et al., 1989; Kwan & Putney, 1990; Ozaki et al., 1992).

본 실험에서 바륨을 칼슘 무처리군에 10, 100, 1000μM을 처리하였으나 compaction을 유도하지는 못하였다(그림 5). 그러나 칼슘 무처리군처럼 16세포배로의 세포분열은 유도하였다.

세포내로의 유입이 가능한 스트론튬은 많은 부분에서 칼슘의 대치역할을 할 수 있다고 알려져있다. 즉, 칼슘을 대신하여 스트론튬은 mouse sperm의 capacitation과 acrosome reaction을 일으킬 수 있다(Fraser, 1987). 또한 De Felici와 Siracusa(1982)는 fully grown oocytes의 배양에는 필수적인 칼슘대신에 10mM 스트론튬을 처리하였을 때 lethality가 거의 없다고 보고하였다. 이와같이 칼슘의 대치물로써 가장 잘 알려진 스트론튬을 본 실험의 예비실험에서 1, 10, 100, 1000μM을 칼슘 무처리 군에 처리하였을 때 compaction을 유도하지 못하였다. 그러나 3, 5, 10mM의 높은 농도를 처리하였을 때 24시간에 이들은 각각 81.9%, 89.7%, 83.6%가 상실배와 포배로 발달하였다(그림 6). 따라서 스트론튬이 칼슘에 대치하여 compaction을 유도하기 위해서는 칼슘보다 훨씬 높은 농도의 스트론튬이 요구됨을 알 수 있다. 이와비슷하게 Hyafil등(1981)이 hCG 주사 후 75시간된 compaction이 일어난 배를 칼슘 무처리군에서는 decompact시키는 것과는 달리 compaction을 유지시킨 결과를 보고한 바 있다. 그러나 스트론튬은 단순히 compaction상태를 유지시킬 뿐만 아니라 compaction을 초기에서부터 유도할 수 있음을 본 실험을 통해서 알 수 있다. 한편 48시간 배양 후에는 각각 39.3%, 54.4%, 14.9%만이 상실배와 포배로 남아 있었으며 시간이 지날수록 퇴화율이 높아졌다. 여기서 특이할 만한 점은 배양 후 72시간에 대조군의 64.7%가 hatching을 하는 반면 hatching직전까지의 포배로 발달했던 스트론튬 처리군들이 hatching하지 않고 퇴화하는 현상이다(그림 13-B).

스트론튬은 칼슘을 대신하여 compaction을 일으켜 상실배와 포배로 발달하지만 포배에서 hatching을 하지 못하고 퇴화하는 것은 hatching시에 중요하게 작용하는 prostaglandin 합성과정인 polyphosphoinositide pathway가 정상적으로 일어나지 않기 때문인 것으로 생각된다. 즉 polyphosphoinositde pathway는 세포막에 존재하는 polyphosphoinositide(PPI)를 phospholipase C에 의해 inositol 1, 4, 5-triphosphate(IP_3)와 diacylglycerol(DG)로 분해되는 과정으로 IP_3는 세포질로 나와 sequestered된 칼슘의 세포질내로의 분비를 촉진시켜 세포질내 칼슘의 농도를 높여준다. 한편

DG는 막에 존재하며 protein kinase C를 활성화시키며 또한 diacylglycerol lipase에 의해 arachidonic acid가 된다(Bolander, 1989; Hadley, 1992). 이 arachidonic acid가 prostaglandin의 전구물질이 되며 배 자체에서 생산되어 hatching시에 작용하는 것으로 알려져 있다(Biggers et al., 1978; Baskar et al.,1981). Prostaglandin은 막에 존재하는 adenylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cAMP의 농도를 높이는 것으로 알려졌는데 Dardik와 Schultz (1992)가 hatching에 가까운 생쥐 포배에서 cAMP가 1세포기와 2세포기때보다 많이 상승한다고 보고한 것과 미루어 보면 prostaglandin이 hatching시에 작용함을 알 수 있다. 그러므로 스트론튬을 칼슘대신에 처리하였을 때 compaction은 유도하지만 위와같은 hatching시의 많은 enzyme활성에는 칼슘을 대신할 수 없기 때문에 정상적인 배발생이 일어나지 않는 것으로 생각된다.

스트론튬 처리군에서 24시간 배양 후 퇴화율이 급속히 증가했기 때문에(배양 후 48시간일 때 퇴화율은 3mM, 75.4%; 5mM, 91.1%; 10mM, 100%) 각각의 처리군을 24시간 배양 후 대조군으로 옮겨서 정상적인 발생을 할 수 있는가를 보았다(그림 7, 8, 9). 옮겨준 배는 대조군과 비교했을 때 발생에 있어서 별 차이가 없었다. 그리고 스트론튬에 장시간 처리했을 때는 hatching이 전혀 안 일어났지만 옮겨준 군은 거의 정상적인 hatching을 했다는 것은 compaction시에 칼슘에 specific한 기작이 있었던 것처럼 hatching시에도 칼슘에 specific한 기작이 있다는 것을 의미하며 이 기작에는 스트론튬이 대치할 수 없는 것으로 보인다.

본 실험에서 니켈, 카드뮴, 망간과 바륨을 칼슘 무처리군에 처리했을 때 칼슘 무처리군처럼 세포분열은 보였지만 compaction은 일어나지 않았다. 그러나 칼슘 무처리군에 스트론튬을 처리했을 때는 compaction이 유도되었다. 이것은 compaction동안에 cadherin(또는 uvomorulin)이 칼슘과 결합하여 구조적인 활성화를 통해 compaction을 유도한 것처럼 스트론튬도 이 과정에 칼슘대신 반응했을 것으로 사료된다. 그러나 대조군과는 달리 퇴화율이 증가하는 것은 그 이후의 배 발생에 칼슘이 반드시 필요하며 이때는 스트론튬이 칼슘을 대신할 수 없는 것으로 보인다. Compaction시 스트론튬의 기작에 대해서는 좀 더 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

대부분의 포유동물의 배아는 초기 배 발생 중 compaction이라는 독특한 분화과정을 나타낸다. Compaction이란 배의 할구들이 서로의 접촉을 최대화하여 각 할구의 경계를 구별할 수 없는 형태를 보이는 것을 말한다.

본 실험에서는 compaction에 작용하는 칼슘의 역할을 규명하기 위하여 칼슘을 배양액에서 제거하고 대신 여러가지 이가이온을 처리하였을 때 칼슘대신에 compaction이 일어날 수 있는가를 보고자 하였다.

먼저 8세포배를 칼슘이 제거된 배양액에서 24시간 배양했을 때 16세포기로서의 세포분열은 일어나지만 compaction은 일어나지 않았고 48시간 배양 후에는 모두 퇴화하였다. 그러나 칼슘이 제거된 배양액에서 24시간 배양한 배를 칼슘이 들어있는 대조군으로 옮겼을 때는 compaction이 일어난 것이 관찰되었다.

칼슘 inhibitor로 알려진 니켈을 대조군과 칼슘 무처리군에 각각 171μM을 처리하여 8세포배를 배양했을 때 칼슘 무처리군에 처리한 결과는 칼슘 무처리군에서 배양한 배와 별 차이가 없었다. 반면에 대조군에 니켈을 처리한 결과는 48시간까지 대조군과 유사한 발생을 보였으나 72시간 배양 후에는 hatching하지 못하고 퇴화하였다.

칼슘 무처리군에 카드뮴 10^{-1}, $10^{-2}$$\mu$M과 망간과 바륨 10, 100, 1000$\mu$M을 각각 처리하였을 때 compaction을 전혀 일으키지 못했으며 칼슘 무처리군과 유사한 결과를 보였다.

세포내에서 칼슘의 대치물로 잘 알려진 스트론튬 3, 5, 10mM을 각각 칼슘이 제거된 배양액에 처리하였을 때 이들 각각은 24시간 후 배아의 compaction을 유도하였다. 그러나 스트론튬 처리군에서 포배로까지 발달한 배아들이 배양 72시간에는 hatching하지 못하고 응축된 모습으로 퇴화하였다. 한편 3, 5, 10mM에서 각각 24시간 배양 후 대조군에 옮겨주었을 때 48시간 배양 후에는 대조군과 유사하게 포배를 형성하였으며 정상적인 hatching도 보였다.

본 실험의 결과 칼슘 무처리군에 니켈, 카드뮴, 망간과 바륨을 처리했을 때 compaction을 일으키지 못했다. 그러나 칼슘 무처리군에

스트론튬을 처리했을 때는 compaction을 일으킴을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

Bae IH, Park JH: Studies on the requirements of Ca^{++} for cell division and Ca^{++} permeability of plasma membrane of fast dividing mouse embryo cells. *Kor J Fertil Steril* 1987, 14, 93-100.

Baskar JF, Torchiana DF, Biggers JD, Corey EJ, Andersen NH, Subraman N:Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by various prostaglandin antagonists. *J Reprod Fert* 1981, 63, 359-363.

Biggers JD, Leonov BV, Baskar JF, Fried J: Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by prostaglandin antagonists. *Biol Reprod* 1978, 19, 519-533.

Bilozur M, Powers RD:Two sites for calcium action in compaction of the mouse embryo. *Exp Cell Res* 1982, 142, 39-45.

Bolander FF:Calcium, calmodulin and phospholipids. *In*:Molecular Endocrinology. Aademic Press, Inc., *San Diego*, 1989, 146-172.

Chao SH, Suzuki Y, Zysk JR, Cheung EY: Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. *Mol Pharm* 1984, 26, 75-82.

Cheung WY:Calmodulin and its activation by cadmium ion. *In*:Calcium antagonists pharmacology and clinical research. Vanhoutte PM, Paoletti R, Govoni eds. The New York Academy of Sciences, N.Y. *Ann NY Acad Sci* 1988, 522, 74-87.

Dardik_A, Schultz RM:Changes in cAMP phosphodiesterase activity and cAMP concentration during mouse preimplantation development. *Mol Reprod Dev* 1992, 32, 349-353.

Ducibella T, Albertini DF, Anderson E, Biggers JD:The preimplamtation mammalian embryo:Characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Dev Biol* 1975, 45, 231-250.

Ducibella T, Anderson E:Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo:Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev Biol* 1975, 47, 45-58.

Ducibella T, Anderson E:The effects of calcium deficiency on the formation of the zonula occludens and blastocoel in the mouse embryo. Dev Biol 1979, 73, 46-58.

Fraser LR:Strontium supports capacitation and the acrosome reaction in mouse sperm and rapidly activates mouse eggs. *Gamete Res* 1987, 18, 363-374.

Goodall H, Johnsom MH:Use of carboxyfluoresce in diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres. *Nature* 1982, 295, 524-526.

Hadley ME:General mechanisms of hormone action. *In*:Endocrinology 3rd. Edit., Prentice-Hall International, Inc., Englewood Cliffs, *New Jersey* 1992, 65-97.

Hirano S, Nose A, Hatta K, Kawakami A, Takeichi M:Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules(cadherins):Subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J Cell Biol* 1987, 105, 2501-2510.

Hyafil F, Babinet C, Jacob F:Cell-cell interactions in early embryogensis:A molecular approach to the role of calcium. *Cell* 1981, 26, 447-454.

Kartha S, Felix JS, Littlefield JW:Calcium-induced compaction and its inhibition in embryonal carcinoma cell aggregates. *Dev Biol* 1983, 100, 172-180.

Kemler R, Babinet C, Eisen H, Jacob F:Surface antigen in early differntiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74, 4449-4452.

Kwan CY, Putney JW, Jr:Uptake and intracellular sequestration of divalent cations in resting and methacholine-stimulated mouse lacrimal acinar cells. *J Biol Chem* 1990, 265, 678-684.

McLachlin JR, Caveney S, Kidder GM:Control of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev Biol* 1983, 98, 155-164.

Mills JS, Johnson JD:Metal ions as allosteric regulators of calmodulin. *J Biol Chem* 1985, 260, 15100-15105.

Ozaki Y, Yatomi Y, Kume S:Evaluation of platelet calcium ion mobilization by the use of various divalent ions. *Cell Calcium* 1992. 13. 19-27.

Pakrasi PL, Dey SK:Role of calmodulin in blastocyst formation in the mouse. *J Reprod Fert* 1984, 71, 513-517.

Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL, Jacob F:Uvomorulin:A nonintegral membrane protein of early mouse embro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80, 6274-6277.

Pratt HPM, Ziomek CA, Reeve WJD, Johnson MH:Compaction of the mouse embryo:An analysis of its components. *J Embryol exp Morph* 1982, 70, 113-132.

Richardt G, Federolf G, Habermann E:Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca^{++} -binding proteins. *Biochem Pharm* 1986, 35, 1331-1335.

Schilling WP, Rajan L, Strobl-Jager E:Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1989, 264, 12838-12848.

Shirayoshi Y, Okada TS, Takeichi M:The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 1983, 35, 631-638.

Storeng R, Johnsen J:Effect of nickel chloride and cadmium acetate on the development of preimplatation mouse embryos *in vitro*. *Toxicology* 1980, 17, 183-187.

Surani MAH, Kimber SJ, Handyside AH: Synthesis and role of cell surface glycoproteins in preimplantation mouse development. *Exp Cell Res* 1981, 133, 331-339.

Sutherland AE, Calarco-Gillam PG:Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 1983, 100, 328-338.

Takeichi M:The cadherins:Cell-cell adhesion molecules comtrolling animal morphogenesis. *Development* 1988, 102, 639-655.

Vestweber D, Gossler A, Boller K, Kemler R: Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol* 1987, 124, 451-456.

Vestweber D, Kemler R:Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell Differ* 1984, 15, 269-273.

Winkel GK, Ferguson JE, Takeichi M, Nuccitelli R:Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo. *Dev Biol* 1990, 138, 1-15.

Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M:Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesin system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol* 1984, 101, 19-27.