

P-14 칼슘 이온 농도에 따른 생쥐 초기배아의 발생

배인하, 양정숙

성신여자대학교 생물학과

서 론

생쥐의 수정란(zygote)을 체외배양(in Vitro culture)시 착상전인 포배기(blastocyst stage)까지 발생하지 못하고 2세포기에 발생이 정지되어 퇴화한다. 이와같이 수정된 후 2세포기에서 세포분열이 정지되는 현상을 '2-cell block'이라고 하며, 이것은 생쥐의 계통에 따라 차이가 있다. 이러한 2-cell block을 극복하기 위하여 체외배양에서의 많은 연구들이 있었지만, 2-cell block의 정확한 원인은 아직 밝혀지지 않고 있다. 생쥐 수정란과 초기 2세포배를 칼슘이 없는 배양액에 48시간 배양 후 모두 퇴화하는 반면(Bae and Yoon, 1995), 후기 2세포 배는 칼슘이온이 제거된 배양액에서 상실배까지 발달이 가능한 점으로 보아 초기 2세포기에 일어나는 2-cell block은 칼슘과 관계가 있다고 보여진다(Bae and Park, 1987).

Bae와 Park(1987)은 후기 2세포배를 칼슘이 존재하지 않은 배양액에서는 포배형성을 0%를 보였고, 1.71mM의 칼슘이 있는 배양액에서는 포배형성을 38%를 보인 반면, 3.42mM, 8.55mM로 농도를 높인 배양액에서는 형성율이 각각 34%, 37%로써 세포 외부의 칼슘농도를 높여도 포배형성율이 증가하지 않았다. 이런 점들을 종합해 볼 때 2-cell block은 배양액 내 칼슘과 관련이 있을 것으로 가정된다. 따라서, 본 실험에서는 2-cell block이 일어나는 생쥐의 수정란과 2세포배를 여러 가지 농도의 칼슘이 처리된 배양액에서 배양하였다. 칼슘 chelator인 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)와 또다른 배양액 내 칼슘 chelator인 EGTA(ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether)N,N'-tetraacetic acid)를 칼슘이 존재하는 배양액에서 배양하였다. 칼슘과 비슷한 이온 반경을 갖고 있으면서 세포내 조절 역할을 하는 calmodulin에 칼슘 대신 결합하는 것으로 알려진 카드뮴(Cd²⁺)을 처리하여 그 영향을 보았으며, 칼슘 channel blocker로서 2세포배 2-cell block을 극복시킨 니켈(Ni²⁺)을 저농도의 칼슘이 존재하는 배양액에 처리하여 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발생에 미치는 칼슘의 역할을 알아보려고 한다.

재료 및 방법

생쥐 5-8주의 ICR계통 암컷에 과배란을 유도하여 hCG 주사 후 31-32시간에 난관을 채취하

여수정란과 초기 2세포배를 수집하였다. 수집된 배는 37°C에서 5%의 CO₂와 100%의 습도가 유지되는 배양기에서 microdroplet 방법으로 72시간 동안 배양되었다. 기본 배양액은 New ModifiedHank's Balanced Salts Solution(MHBS)으로 하였다. 배양액의 칼슘을 고농도, 저농도로 처리하였고, EDTA, EGTA, 카드뮴을 1.71mM의 칼슘이 존재하는 배양액에 처리하였으며 니켈을 저농도의 칼슘이 존재하는 배양액에 처리하였다.

결과 및 논의

칼슘 농도를 높은 3.42mM(2X), 6.84mM(4X), 13.68mM(8X), 17.1mM(10X) 배양액에서는 대조군과 비슷한 퇴화율을 보여 통계적 유의성은 없었다. 배양액 내 칼슘 농도가 대조군보다 높아도 발생률에는 큰 차이가 없는 점으로 보아 일정 농도 이상의 칼슘만 존재하면 배의 발생에는 영향이 없는 것으로 추정된다. 1.71mM보다 낮은 농도인 0.855mM(1/2X), 0.428mM(1/4X), 0.214mM(1/8X)의 칼슘이 포함된 배양액에서 2세포기에 정지하는 배의 비율이 증가하였고, 저농도의 칼슘 실험군이 고농도의 칼슘 실험군보다 퇴화율이 모두 높게 보여 생쥐 수정란 및 초기 2세포배의 발달에는 적정농도의 칼슘이 필요하다고 추정할 수 있다. 그러나 본 실험에서 0.428mM의 칼슘 실험군은 대조군과 비교해서 통계적 유의성이 없는 점으로 보아 적어도 0.428mM의 외부 칼슘이 필요하다고 추정된다. 이것은 생쥐 여포 난자를 배양 할 경우 0.5mM 이상의 칼슘 농도가 필요한 것과 일치하고 있다. 배양액 내 칼슘 농도 1.71mM을 기준으로하여 칼슘을 chelation하는 EDTA, EGTA를 여러농도로 처리하여 배양액 내의 칼슘 이온이 생쥐 초기배의 발생에 미치는 영향을 알아보았다. 고농도 0.214mM-1.71mM EDTA 실험군은 대조군에 비해 퇴화율을 높게 보인 결과, 이는 EDTA 자체의 해로운 영향 때문이라고 본다. 저농도 0.027mM-0.107mM EDTA 실험군은 대조군보다 상실배와 포배의 형성율을 높게 보였다. 특히 107 μ M의 EDTA 실험군은 대조군의 2.8%에 비해 37.1%의 높은 포배형성율을 보였는데, 108 μ M의 EDTA를 생쥐 수정란 세포질에 미세주입하여 92%의 높은 포배형성율을 보인 Suzuki(1988)의 연구 결과와 일치한다. 다음으로 배양액의 고농도 0.214mM-1.71mM

EGTA 실험군은 대조군에 비해 높은 퇴화율을 보여 배발생에 해로운 영향을 주었다. 반면, 저농도 0.014mM-0.107mM의 EGTA 실험군은 유의하지는 않았지만 상실배와 포배형성율이 대조군과 비슷한 결과를 보이고 있다. 칼슘 이온 반경인 0.99Å 과 가장 근접하여 칼슘과 같은 기능을 하는 중금속 이온이라고 보고된 카드뮴을 고농도인 25μM, 50μM을 처리시 퇴화율이 높았으며, 10μM의 실험군은 대조군과 유의하지는 않았지만 높은 발달효과를 보였다. 또한 1nM, 5nM, 10nM의 저농도의 카드뮴 처리는 대조군에 비해 배발생 진전도를 약간 저해하는 것 같았으나 통계적으로는 유의성이 없었다. 한편, T-type 칼슘 channel blocker로 알려진 니켈은 최근 파골세포 (osteoclast)에서 칼슘 channel receptor에 결합하여 signal transduction을 일으켜 세포 내 칼슘 저장고로부터 칼슘을 유리시켜 세포 내 칼슘 농도를 증가시킨다고 보고되었다(Shanker et al., 1993). Bae와 Yoon(1995)은 50μM의 니켈이 생쥐 수정란 및 초기 2세포의 2-cell block을 극복시킨다는 사실을 보고하였다. 앞서 기술된 저농도의 칼슘 배양액에서 2-cell block을 보인 실험군에 50μM의 니켈을 처리한 결과 모든 실험군에서 2-cell block 극복 현상을 유의하게 보였을 뿐만 아니라, 퇴화율도 감소하였다. 0.855mM의 칼슘과 니켈을 처리한 실험군은 가장 높은 포배율을 보여 니켈이 1.71mM의 칼슘이 존재할 때 보다 0.855mM의 칼슘이 존재할 때 더욱 효과적으로 작용하였다. 0.214mM 칼슘과 니켈을 처리한 실험군은 61.4%의 높은 퇴화율을 보였고, 대부분 3-8세포 시기에서 퇴화했으며 특히 8세포배는 compaction을 이루지 못하고 퇴화하였다. 이것은 8세포배를 외부칼슘이 없는 배양액에 24시간 배양시 16세포배까지 세포분열은 일어나지만 compaction은 일어나지 않았고 48시간 배양후에 모두 퇴화하였다는 보고(Bae and Kim, 1994)에서도 나타난 바와 같이 compaction 과정에는 배양액 내의 적정 농도의 칼슘이 필요하다는 것을 시사한다.

96시간 배양시 0.855mM의 칼슘과 50μM의 니켈을 처리한 실험군은 부화가 시작이 되나 배양액 내 낮은 농도인 0.214mM의 칼슘과 50μM의 니켈을 처리한 실험군은 부화가 일어나지 않아 포배 발달 과정 중 외부 배양액의 적정 칼슘 농도의 필요성을 알 수 있다.

요 약

생쥐 수정란 및 초기 2세포배를 체외배양시 0.428mM 이상의 칼슘 농도를 필요로 하는 것을 알았다. 칼슘 chelator인 EDTA를 저농도로 배양액에 처리 할 경우 2-cell block이 유의하게 극복되었으며, 저농도의 칼슘이 존재하는 배양액에서 보인 2-cell block은 니켈 50μM을 처리함으로써 극복 효과를 보였다. EDTA와 니켈에 의한 2-cell block 극복 현상이 어떠한 기작에 의해 이루어지는가에 대한 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

참고문헌

- Bae IH and Park JH (1987) *Kor J Fertil Steril* 14: 93-100.
- Bae IH and Kim HS (1994) *Kor J Fertil Steril* 21: 49-62.
- Bae IH and Yoon SY (1995) *Kor J Fertil Steril* 22: 1-10.
- Shanker VS, Bax CMR, Bridget E, Bax B, Alam ARHT, Moonga BS, Simon B, Pazianas M, Hung CL, and M. Zaide M (1993) *J Cell Physiol* 155: 120-129.
- Suzuki S, Komatsu S, Kitai H, Endo Y, Iizuka R, and Fukasawa T (1988) *Cell Differ* 24: 133-138.