

PMSG (Sigma, St. Louis, U.S.A.)를 주사한 후 46시간 후에 경추골 파열로 도살하여 난소를 적출한 후 난자를 채취하였다. 기본 배양액으로는 Modified Hanks' Balanced Salt solution (MHBS; Bae & Channing, 1985)에서 인산 성분을 줄이고 완충작용을 강화하여 삼투압을 280mOsm로 조정 한 New MHBS배양액을 사용하였고, 핵막 (germinal vesicle: GV)이 확인된 건강한 난자를 수집하여 nicotine, nicotine-tartrate 및 nicotinic acetylcholine receptor antagonist 인 mecamylamine을 농도별로 처리 한 기본 배양액에서 배양하여 배양시작 4시간 후에 일어나는 핵막붕괴 (GVBD)율과 배양 17시간 후 제1극체 형성율을 대조군과 비교하였다.

결 과: 1. Nicotine을 농도별 (300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 5 mM)로 처리하였을 때 난자의 핵막붕괴율에는 별 영향이 없었으나, 제1극체 형성율은 nicotine의 농도가 증가 (300  $\mu$ M~500  $\mu$ M~1 mM~5 mM) 할수록 감소하였다.

2. Nicotine tartrate를 농도별 (50  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 5 mM)로 처리하였을 때 난자의 핵막붕괴율에는 별 영향이 없었으나, 제1극체 형성율은 nicotine tartrate의 농도가 증가 (50  $\mu$ M~500  $\mu$ M~5 mM) 할수록 감소하여 nicotine과 비슷한 양상을 보였다.

3. Nicotine과 nicotine tartrate를 동시에 처리 (300  $\mu$ M + 50  $\mu$ M, 300  $\mu$ M + 500  $\mu$ M, 1 mM + 50  $\mu$ M, 1 mM + 500  $\mu$ M)하였을 때에는 각각을 따로 처리하였을 때와 달리 두 물질의 상호작용으로 핵막붕괴율이 감소하였고, 제1극체 형성율 또한 감소하였다.

4. Nicotinic acetylcholine receptor의 antagonist인 mecamylamine (10  $\mu$ M)과 nicotine (300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 5 mM)을 함께 처리하였을 때에는 nicotine (300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 5 mM)만을 처리하였을 때보다 제1극체 형성율이 증가하였다.

5. Mecamylamine (10  $\mu$ M)과 nicotine tartrate (50  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 5 mM)를 함께 처리하였을 때에는 nicotine tartrate (50  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 5 mM)만을 처리하였을 때보다 제1극체 형성율이 증가하였다.

결 론: 위의 결과에서 nicotine과 nicotine tartrate는 생쥐난자의 체외성숙 (제1극체 형성)을 억제하였고, mecamylamine은 nicotine과 nicotine tartrate가 생쥐난자의 성숙에 미치는 부정적 효과를 억제시켰다. 이에 nicotine과 nicotine tartrate가 생쥐난자의 성숙에 미치는 부정적 영향에 대한 분자생물학적인 수준에서의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## P-37 Fibronectin과 배양액 내 $Ca^{2+}$ 의 상호작용이 생쥐 포배의 Outgrowth에 미치는 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

박 은 미 · 배 인 하

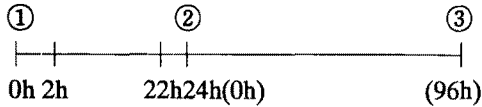
Fibronectin은 중요한 세포 밖 기질 중의 하나로서 세포의 부착 및 outgrowth에 관여한다. 그런데 최근 fibronectin이 세포 밖  $Ca^{2+}$ 을 세포 내로 유입시킴으로써 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 농도를 증가시킨다는 보고가 있었다. 또한 생쥐포배에서 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 농도가 증가하면 outgrowth의 속도나 면적이 증가한다는 보고도 있었다.

따라서 본 연구에서는 생쥐 포배에 soluble fibronectin을 처리했을 때 세포 내  $Ca^{2+}$ 농도의 증가 유무를 outgrowth의 속도를 통해 간접적으로 알아보려고 하였다.

방 법: hCG 주사 후 97시간에 포배를 얻어 fibronectin을 농도별, 시간별로 처리하였다. 또 free  $Ca^{2+}$ 이 없는 M16 media나 3.4 mM  $Ca^{2+}$ 의 M16 media에 fibronectin을 첨가시켜 배양

하였다.

그 후 동시성을 갖는 포배를 얻기 위해 미세한 pipette으로 zona pellucidae를 벗겨 50 µg/ml fibronectin으로 coating된 dish로 옮겨서 96시간 동안 24시간마다 관찰하여  $t_{50}$ 을 구했다.



① 포배 수집, ② 부화율 관찰→ZP제거, ①→② 물질 처리시기, ②→③ 96시간 동안 fibronectin coating dish에 배양하여 outgrowth 관찰

결 과: 1. 0, 5, 50 µg/ml의 soluble fibronectin에서 24시간 동안 처리 시 농도가 증가함에 따라 부화율에는 영향이 없었지만 outgrowth 속도는 농도에 비례하여 증가했다.

2. 50 µg/ml의 soluble fibronectin을 시간별로 처리했을 때 24시간 중 0~2시간에, 22~24시간에 처리한 경우가 24시간 동안 50 µg/ml soluble fibronectin 처리한 경우와 outgrowth 속도가 비슷하였다.

3. 24시간 중 22~24시간에서 배양 시, 1.71 mM EGTA가 있는 M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우는 1.71 mM EGTA가 있는 M16, M16에서 배양한 경우와는 outgrowth속도가 비슷하였지만 M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우보다는 outgrowth속도가 느렸다.

4. 24시간 중 22~24시간에서 배양 시,  $Ca^{2+}$  free M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우는  $Ca^{2+}$  free M16, M16에서 배양한 경우와는 outgrowth속도가 비슷하였지만 M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우보다는 outgrowth속도가 느렸다.

5. 24시간 배양 시,  $Ca^{2+}$  free M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우는 M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우와는 outgrowth속도가 비슷하였지만  $Ca^{2+}$  free M16, M16에서 배양한 경우보다는 outgrowth속도가 빨랐다. 그러나 모든 경우에서 부화율에는 영향이 없었다.

6. 24시간 중 22~24시간에서 배양 시, 3.42 mM  $Ca^{2+}$ M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우는 M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 보다 outgrowth속도가 빨랐고. M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우는 M16, 3.42 mM  $Ca^{2+}$ M16에서 배양한 경우보다 outgrowth속도가 빨랐다.

7. 24시간 배양 시, 3.42 mM  $Ca^{2+}$ M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우는 M16 + 50 µg/ml soluble fibronectin에서 배양한 경우와는 outgrowth속도가 비슷하였지만, 3.42 mM  $Ca^{2+}$ M16, M16에서 배양한 경우보다는 outgrowth속도가 빨랐다.

결 론: 본 연구결과에 따르면 생쥐 포배의 체외배양 시 fibronectin은 배양액 내  $Ca^{2+}$ 의 유무에 관계없이 부화율에는 영향을 주지 않았는데 이는 fibronectin이 작용하는데 걸리는 시간 때문이라고 사료된다. 또한 outgrowth에 있어서는 배양액 내  $Ca^{2+}$ 의 농도가 높을수록 fibronectin의 효과가 상승하지만  $Ca^{2+}$ 이 없을 때에는 fibronectin의 효과가 없다. 이는 fibronectin이 배양액 내  $Ca^{2+}$ 과의 상호작용, 즉 fibronectin이  $Ca^{2+}$ 을 세포 내로 유입시키기 때문이라고 사료된다. Fibronectin을 24시간 동안 처리했을 때 배양액 내  $Ca^{2+}$ 의 농도에 관계없이 비슷한 속도로 outgrowth가 일어나는 것은 fibronectin의 조절효과 때문이라고 사료된다.