韓國家畜繁殖學會誌 19(3) : 161~169(1995)
Korean J. Animal Reprod.

소 체외수정란에 있어서 Non-invasive 방법에 의한 기질 대사량의 측정

류재웅 · 박홈대* · 菅原七郎** · 이경광
한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소

Measurement of the Metabolism of Energy Substrates in Single IVF-derived Bovine Embryos by a Non-invasive Method

Ryoo, Z. Y., H. D. Park*, S. Sugawara and K. K. Lee**
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST

SUMMARY

To investigate the metabolism of various substrates in preimplantation bovine embryos, uptake of glucose and pyruvate, and lactate production were measured in single IVF-derived bovine embryos by a non-invasive method. When the embryos were incubated for 5 h in culture medium supplemented with 1 mM glucose and 0.4 mM pyruvate as substrates at each developmental stage, glucose uptake was increased with more advanced developmental stages while pyruvate uptake was decreased. Total lactate production of 2-cell embryos was significantly higher than that of blastocysts ($p<0.05$). Both of glucose uptake and lactate production in normal morulae produced *in vitro* was significantly high compared to the degenerated embryos ($p<0.05$).

The results obtained in the study suggest that pyruvate as an exogenous substrate may be support in bovine embryos until 8-cell stage, whereas glucose may be effective as an energy source after morula stage. In addition, it was proven that lactate was not effective as an energy source in preimplantation development of IVF-derived bovine embryos.

Key words : substrate uptake and pool, IVF-derived bovine embryos, non-invasive method

Ⅰ. 서 론

착상전 포유동물 수정란은 모체환경과의 사이에서 에너지 물질대사와 기질의 흡수(uptake)와 축적(pool)이 이루어지고 있다는 연구가 생쥐(Cross와 Brinster, 1973; Gardner와 Leese, 1990), 흰쥐(Brison와 Leese, 1991) 및 면양 (Butler와 Whilliams, 1991; Thompson 등, 1991) 등에서 보고되었다. 또한 소의 초기 수정란에서도 외부기질의 산화능 (Renard 등, 1980; Takahashi와 First 등, 1992)과 해당계의 다양한 효소계 (Iwasaki 등, 1991; Ryoo와 Sugawara, 1994)가 존재하는 것으로 알려져 있다. 직접적인 외부기질의 흡수량을 측정한 것은 아니지만, 체외배양 실험을 통하여 여러 종의 포유동물 수정란에서와 같이 소 초기 수정란에서도 여러 종류의 중간대사 물

* 대구대학교 생물공학과 (Dept. of Biotechnology, Tae-Gu University)
** 日本 東北大學 農學部 畜産學科

질이 흡수되고 있음이 밝혀졌다 (Rieger와 Guay, 1988; Tiffin 등, 1990; Javed와 Wright 등, 1991; Tiffin 등, 1991). 즉, 소 미성숙 난포란이 체외 성숙과 수정을 거쳐 배반포기까지 발생하기 위해서는 pyruvate, lactate 및 glucose 등의 에너지원과 많은 종류의 아미노산을 필요로 하는 것으로 보고되었다 (Takahashi와 First, 1992). 그 동안 포유동물 수정란의 기질 이용성을 규명하기 위해서 체외배양과 방사성동위원소의 실험을 통하여 발달시기에 따른 에너지원 및 핵산 합성에 이용되어지는 기질이 밝혀지게 되었다 (Whitten, 1956, 1957; Brinster, 1965, 1973; Brinster와 Thomason, 1966; Bigger 등, 1967). 생쥐 수정란의 배양에 있어서 pyruvate는 초기 분할시기에 필요한 에너지원이지만, glucose는 pyruvate의 대체에너지로 전환되지 않고 4세포기 이후에 에너지원으로 작용한다 (Whitten, 1956, 1957; Brinster, 1965 ; Brinster와 Thomson, 1966). 사람 수정란에 있어서 pyruvate와 glucose의 기질 이용성은 생쥐와 유사한 것으로 보고되었다 (Hardy 등, 1989; Gott 등, 1990).

소 초기 수정란은 돼지 (Flood와 Wiebold, 1988; Petters 등, 1990), 흰쥐 (Brison과 Leese, 1991; Reed 등, 1992), 생쥐 (O'Fallon과 Wright, 1986) 및 토끼 (Leese 등, 1979)등과 유사한 glucose 산화경로를 보여주고 있다. 즉, 돼지는 8세포기, 흰쥐와 토끼는 상실배기까지 glucose가 5탄당의 경로 (pentose phosphate pathway : PPP)을 거쳐 산화되어지고, 배반포기에서는 Embden-Meyerhof pathway (EMP)의 경로로 산화된다. 한편, 생쥐에 있어서는 1세포기부터 배반포기까지 줄곧 EMP의 경로로 산화되어진다. 소 초기 수정란의 산화경로도 기본적으로는 이들 포유동물 수정란과 공통되는 부분이 있다. 그러나, ATP와 NAD의 대사는 분할기에 이용되는 기질의 종류에 따라 달라진다. 실제로, 생쥐 수정란에서는 발달단계별 사용되는 기질이 다르며 (Barbehenn 등, 1974; Gardner와 Leese, 1988), 소 수정란에서도 ATP와 NAD의 대사경로 및 기질 이용성이 발달단계별로 다를 수 있다는 의문이 제기되고 있다. 지금까지 대부분의 연구는 분석을 목적으로 다수의 수정란을 사용하여 방사성 동위원소에 의한 흡수량만을 측정하였다 (Brinster, 1973). 그러나, 방사성 동위원소에 의한 대사량의 측정은 기술적인 면에 있어서 수정란에 손상을 끼칠 가능성이 있을 뿐 아니라, 다수 수정란의 대사량 평균치로 측정되기 때문에 한개의 수정란에 대한 발달단계별 대사활성 차이를 정확하게 규명할 수 없는 어려운 점이 있다. 이러한 문제점을 좀 더 구체적으로 보완하기 위해 수정란에 손상을 끼치지 않고, 한개의 수정란으로부터 대사량을 측정할 수 있는 non-invasive 방법이 개발되어 포유동물 수정란의 외부기질 이용성 및 에너지 대사량 측정이 가능하게 되었다 (Leese 등, 1984).

본 연구에서는 non-invasive 방법을 이용하여 해당계 중간대사물질인 pyruvate, glucose 및 lactate의 흡수, 축적, 생산 및 소비량을 각각의 수정란 발달단계별로 측정하여 소 체외수정란에 있어서 기질대사량을 비교 · 검토하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 소 난포란의 체외성숙

본 실험에 공시된 난포란은 도축장에서 도살된 암소 홀스타인종에서 깨끗한 난소를 채취하여 100 IU/ml penicilin과 100 μg/ml streptomycin이 첨가된 생리식염수로 2~3회 깨끗이 씻은 다음, 33℃로 보온한 상태에서 실험실로 운반하였다. 채란은 직경 1~5 mm의 난포로부터 18 gauge 주사바늘이 부착된 5 ml 주사기로 흡입하여 채란한 후, 실체현미경 하에서 난구세포가 고르게 부착된 난포란만을 선별하여 5% CO_2, 38.5℃의 배양기에서 22시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다. 체외성숙 배지로는 25 mM Hepes 완충 Earle형 TCM-199 (Gibco, USA)에 10% FBS와 항생물질 (100 IU/ml penicilin 및 0.05 μg/ml streptomycin)을 첨가하여 사용하였다.

2. 체외수정

홀스타인종의 동결정액을 32~35℃ 온수에서 15초간 융해하여 사용하였으며, 체외수정용 배양액으로는 BO액 (Brakett와 Oliphant, 1975)을 사용하였다. 이들 동결정액은 BSA가 포함되어 있지 않고, 10 mM caffeine이 첨가된 정자세척용 BO액에 넣어 200 × g에서 2회 반복 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 정자를 2회 반복 원심분리하여 세척한 후, 15 μg/ml

heparin (H-3125, Sigma) 및 10 mM caffeine이 첨가된 BO액으로 200 × g에서 8분간 1회 더 원심분리하였다. 체외수정은 0.01 g/ml BSA가 포함되어 있는 50 μl BO액에 정자부유액을 50 μl 첨가하였다. 체외성숙배양 후 22시간째의 난포란을 수정용 BO액으로 2~3회 세척하여 수정용 BO액에 넣어 6시간 동안 수정시켰다. 체외수정시 정자의 최종농도는 5×10^6 cells/ml로 조정하였다.

3. 체외수정란의 배양

체외성숙 난포란을 6시간 동안 체외수정 시킨 후 체외배양용 배양액으로 옮겼다. 수정란의 체외배양용 배양액은 성숙용 배양액과 동일한 TCM-199액에 5% FBS를 사용하였다. 수정전 난포란을 성숙시켰던 난구세포의 단층세포가 형성된 drop에 수정란을 옮겨 38.5℃, 5% CO_2 배양기에서 공동배양시켰다. 배양액은 48시간마다 신선배양액으로 교체하였다. 실험에 공시된 초기배는 체외성숙 22시간째에 미수정난자, 수정후 20~30시간째에 2세포기, 40~48시간째에 4세포기, 50~55시간째에 8세포기, 120~125시간째에 상실배기 및 165~170시간째에 배반포기 수정란을 얻었다.

4. 기질농도 측정을 위한 난자의 배양과 배양액의 채취

Pipetting 혹은 0.25% trypsin/0.04% EDTA 액(Gibco)으로 난구세포를 제거한 1개의 난자 또는 수정란을 10 μl의 발생배지에 넣어 CO_2 배양기 (38.5℃, 5% CO_2)에 5시간 배양하였다. 발생배지는 Ca^{2+}과 Mg^{2+}이 포함되지 않은 phosphate-buffered saline (dPBS), pH 7.3에 1 mM glucose 및 0.4 mM pyruvate의 혼합기질과 1 mM glucose, 0.4 mM pyruvate와 3 mM lactate의 단독기질을 각각 첨가한 4개의 기질군으로 구별하여 실험을 수행하였다. 이들 발생배지는 petri dish (Falcon, 35 mm, No. 3001)에 10 μl drop을 만들어서 mineral oil을 피복하여 38.5℃, 5% CO_2의 조건하에서 3시간 평형을 실시하였다. 각각의 수정란들을 5시간 배양한 후 이들 배양액을 0.5 ml tube에 넣어 기질농도를 측정하기 전까지 −70℃에서 보관하였다. 또한 배양된 난자 및 수정란은 dPBS로 3회 세척하여 10 μl dPBS micro tube에 넣어서 −70℃에 보존했다.

5. 배양액의 기질농도 측정

배양액의 기질농도 측정은 Leese와 Barton (1984) 및 Gott 등 (1990)의 방법을 일부 변경하여 행하였다.

1) 효소반응

각 효소반응액 4 μl와 함께 내경 5 mm, 깊이 1 mm로 특수제작한 slide glass 위에 1 μl 배양액 sample을 넣어 mineral oil로 피복한 후에 37℃에서 5분간 반응을 시켰다.

2) 지시반응

Glucose, pyruvate 및 lactate의 세가지 기질은 각각 특이적 효소반응에 의한 형광도를 측정하였다. 현미측광장치 (CAM-220 : Fluorometer, Nicon, Japan)을 사용한 형광측정은 각 sample의 측정시간을 10초간 설정하여 형광조사 (UV 여기 Ex 300~400 nm, 간섭파장 Em 465)에 의한 형광도를 측정했다. Standard로는 10^{-3}~10^{-8} M의 NADH 및 NADPH 용액을 사용했다.

6. 효소반응액

1) Glucose 반응액

Glucose 반응액은 EPPS buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine propane-sulphonic acid) (pH 8.0)에 0.5 mM dithiotheritol, 3.7 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 mM ATP, 0.6 mM NADP, 12 U/ml hexokinase (EC : 2. 7. 1. 1), 6 U/ml glucose 6-phosphate dehydrogenase (EC : 1. 1. 1. 49)를 용해하여 사용하였다.

2) Pyruvate 반응액

Pyruvate 반응액은 EPPS buffer (pH 8.0)에 0.075 mM NADH, 28 U/ml lactate dehydrogenase (EC : 1. 1. 1. 27)을 용해하여 사용하였다.

3) Lactate 반응액

Lactate 반응액은 glycine-hydrazine buffer (pH 9.4)에 4.76 mM NAD, 2.6 mM EDTA, 100 U/ml

lactate dehydrogenase을 용해하여 사용하였다.

실험은 아래의 3처리구에서 행하여 그 성적을 비교·검토하였다.

(실험1): 소 초기 수정란의 energy 대사를 규명하기 위해 소 수정란 한개로부터 glucose, pyruvate 및 lactate 흡수량 및 축적량을 측정하여 이들의 관계를 비교하였다.

(i) 10 μl 발생배지 (dPBS buffer)에 1 mM glucose 및 0.4 mM pyruvate의 혼합기질을 첨가하여 수정란 한개를 넣어 5시간 배양한 배양액에서 glucose, pyruvate의 흡수 및 lactate의 생산량을 측정하였다.

(ii) 5시간 배양후 10 μl dPBS와 함께 −70℃에 보존된 수정란을 dry ice에서 동결·융해를 3~4회 반복한 후 dPBS에 방출된 수정란내의 glucose, pyruvate 및 lactate의 축적량을 측정하였다.

(iii) (i)과 (ii)의 glucose, pyruvate 및 lactate 각각의 흡수 및 축적에 의한 한개 수정란의 glucose, pyruvate 및 lactate의 소비량을 측정하였다. 즉, glucose와 pyruvate의 소비량은 (i)의 glucose 및 pyruvate의 흡수량에 (ii)의 glucose 및 pyruvate의 축적량을 가감한 량, 총 lactate의 소비량은 (i)의 lactate 생산량과 (ii)의 lactate 축적량을 더한 양으로부터 산정하였다.

(실험2): 실험 1에서는 혼합기질의 배양에 의한 대사량을 측정하였지만, 실험 2에서는 기질 1종류만을 이용한 배지에서 glucose, pyruvate 및 lactate의 흡수량과 생산량을 측정하였다. 즉, 10 μl 발생배지에 1 mM glucose, 0.4 mM pyruvate 및 3 mM lactate의 단독기질을 각각 첨가해, 수정란 한개씩 넣어서 5시간 배양한 후에 배양액으로부터 기질의 소실·증가량에 의한 glucose, pyruvate 및 lactate의 흡수량과 생산량을 측정하였다.

(실험3): 정상수정란 및 퇴행수정란 (발달지연, 발달정지 및 발달불량)에 있어서 기질의 흡수량과 생산량을 비교 검토하였다. 체외수정 5일째 정상적으로 발달한 상실배기 수정란과 퇴행수정란을 1 mM glucose 및 0.4 mM pyruvate이 첨가된 10 μl 발생배지에 각각 한개씩 넣어서 5시간 배양한 후 배양액으로부터 glucose, pyruvate의 흡수량과 lactate의 생산량을 측정하였다.

7. 통계분석

실험결과의 통계학적 분석은 Student's t-test 를 실시하여 유의차를 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

소 체외수정란에 있어서 1 mM glucose 및 0.4 mM pyruvate의 기질이 첨가된 dPBS 발생배지에 있어서 glucose 와 pyruvate의 흡수량 및 lactate의 생산량은 Table 1에서 보는 바와 같다. Glucose 흡수량은 2세포기로부터 배반포기까지는 수정란이 발달함에 따라 점차 증가하는 반면에, pyruvate 흡수량 및 lactate 생산량은 점점 감소하는 경향을 보여 주었다. 한편, 미수정난자에 있어서 glucose 및 pyruvate의 흡수량은 각각 99.60±26.41과 105.20±15.49 pmol /embryo /h로서 비교적 높았다. 또한 소 체외수정란에 있어서 각 발달단계별 glucose, pyruvate 및 lactate의 축적량이 조사되었다 (Table 2). Glucose 축적량은 배반포기 수정란에서 가장 높았으며, pyruvate의 축적량은 상실배기에서 가장 낮았다. 그리고 pyruvate의 축적량은 미수정 난자, 상실배기 및 배반포기 수정란에서 약간 높은 경향을 나타내었다. 각각의 발달단계별 기질 소비량에 있어서 glucose는 배반포기 단계에서 대사량이 현저히 증가하였으며, pyruvate의 대사는 8세포기 이후에 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 3). 단독기질에 대한 energy 대사량을 검토한 결과가 Table 4에 제시되었다. 즉, 발생배지의 단독기질로서 1 mM glucose 혹은 0.4 mM pyruvate을 첨가한 실험군의 lactate 생산량은 3 mM lactate만 기질로서 사용한 실험군보다 전반적으로 낮은 경향을 나타내었다. 상실배기의 정상 수정란 및 퇴행수정란에 있어서 각 기질의 흡수 및 생산량을 비교하였다 (Table 5). 그 결과, 1 mM glucose 및 0.4 mM

Table 1. Glucose and pyruvate uptake and lactate production in IVF-derived bovine embryos

Stage of development	No. of embryos examined	Glucose uptake	Pyruvate uptake	Lactate production
		(pmol/embryo/hr)**		
Matured*	10	99.60±26.41[a]	105.20±15.49	99.20±10.65[g]
2-cell	10	37.20±18.16[b]	104.60±14.14	103.00± 4.31[h]
4-cell	10	32.60±14.01[c]	85.80±17.68	100.00± 8.89[i]
8-cell	10	73.60±21.35[d]	86.40±17.76	97.80± 6.73[j]
Morula	10	64.80±22.18[e]	68.60±17.49	95.20± 6.47[k]
Blastocyst	8	127.50±31.36[f]	74.25±22.68	77.50± 7.19[l]

a, f vs b, c ; l vs h : $p<0.05$

* Oocyte was matured for 22 h.

** Mean±S. E.

Table 2. Glucose, pyruvate and lactate pool in IVF-derived bovine embryos

Stage of development	No. of embryos examined	Glucose	Pyruvate	Lactate
		(pmol/embryo/hr)		
Matured	10	3.40±0.78[a]	6.49±1.94[g]	41.60±9.28[m]
2-cell	10	2.16±0.52[b]	9.10±2.40[h]	18.90±2.95[n]
4-cell	10	2.12±0.69[c]	9.48±2.04[i]	20.40±4.65[o]
8-cell	10	2.05±0.64[d]	7.29±1.71[j]	18.80±3.25[p]
Morula	10	2.98±0.68[e]	4.14±0.82[k]	31.10±3.22[q]
Blastocyst	8	6.06±1.12[f]	10.89±1.74[l]	36.10±7.92[r]

b, c, d, e, vs f ; k vs i, l ; n, p vs m, q, r : $p<0.05$.

Table 3. Results of substrate metabolism in IVF-derived bovine embryos

Stage of development	No. of embryos examined	Glucose	Pyruvate	Lactate
		(pmol/embryo/hr)		
Matured	10	98.24±26.40[a]	97.90±13.46	140.90± 9.58[g]
2-cell	10	34.78±17.98[b]	96.10±13.39	121.90± 5.79[h]
4-cell	10	30.62±11.34[c]	78.72±17.13	120.40±10.03[i]
8-cell	10	71.80±20.92[d]	79.54±17.63	116.60± 7.98[j]
Morula	10	60.79±21.64[e]	64.79±17.96	126.30± 7.49[k]
Blastocyst	8	119.61±29.71[f]	65.48±20.96	113.50± 6.19[l]

b, c vs a, f ; g vs l ; $p<0.05$.

및 lactate 생산량은 퇴행수정란보다 각각 유의적으로 높았다 ($P<0.05$).

Ⅳ. 고 찰

본 실험에서는 소 체외수정란의 발달시에 요구되는 해당계의 중간대사물질인 glucose, pyruvate와 lactate의 흡수 및 생산량을 non-invasive 방법을 이용하여 한개의 소 수정란으로부터 측정할 수 있었다. 소 체외수정란에 있어서 glucose의 대사량은 발달단계가 진행될수록 증가하는 반면에, pyruvate의 대사량은 감소하는 경향을 보였다 (Table 1, 2 and 3). 이러한 결과는 소 초기 수정란에서 요구되는 영양대사물질로는 pyruvate가 초기발달단계 (난모세포~8세포기)

Table 4. Glucose or pyruvate uptake and lactate production in IVF-derived bovine embryos incubated for 5 h at various substrates

Stage of development	No. of embryos examined	Glucose uptake	Pyruvate uptake	Lactate production
		(pmol /embryo /hr)		
Embryos incubated in 1mM glucose				
Matured	10	180.40±28.92[a]	#	34.60± 5.19[e]
8-cell	10	49.60±19.64[b]	#	7.40± 2.50[f]
Morula	8	61.75±27.15[c]	#	15.14± 5.56[g]
Blastocyst	7	135.42±18.95[d]	#	10.86± 4.16[h]
Embryos incubated in 0.4mM pyruvate.				
Matured	10	#	61.90±16.13[i]	23.60± 6.68[m]
8-cell	10	#	34.00± 6.12[j]	35.30± 7.42[n]
Morula	8	#	95.25±21.29[k]	49.25± 4.94[o]
Blastocyst	7	#	88.00±16.59[l]	18.14± 5.28[p]
Embryos incubated in 3mM lactate.				lactate uptake
Matured	10	#	#	86.02±11.85[q]
8-cell	10	#	#	70.10±16.79[r]
Morula	10	#	#	63.68±12.96[s]
Blastocyst	10	#	#	48.64±11.80[t]

a vs b, c ; b vs d ; e vs f, g, h ; i vs l, k ; o vs p, m ; q vs t : $p<0.05$.

There was no glucose or pyruvate uptake by the embryos.

Table 5. Glucose or pyruvate uptake and lactate production in single bovine morulae produced *in vitro*

Group	No. of embryos examined	Glucose uptake	Pyruvate uptake	Lactate production
		(pmol /embryo /hr)		
Embryos incubated for 5h in 1mM Glucose.				
Normal	10	85.80±19.92[a]	#	24.20±3.41
Degenerated	10	23.00± 8.92[b]	#	16.00±3.69
Embryos incubated for 5h in 0.4mM Pyruvate.				
Normal	10	#	80.60±19.92	35.20±3.52[a]
Degenerated	10	#	65.40±16.41	16.50±5.38[b]

a vs b : $p<0.05$.

There was no glucose or pyruvate uptake by the embryos.

의 기질로 (Biggers 등, 1967; Leese와 Barton, 1984; Butler와 Williams, 1990), glucose가 상실배기부터 배반포기 이후 발달 energy원으로 이용된다는 다른 연구자들의 결과와 일치하고 있다. 한편 소를 포함한 포유동물에 있어서 pyruvate는 초기배의 energy원으로 이용되고 있지만 (Gardner와 Leese, 1988; Butler와 Williams, 1991), 생쥐의 초기 수정란에서는 glucose가 주된 energy원으로 작용하고 있는 것으로 알려져 있다 (Pike와 Wales, 1982). 이러한 원인으로 생쥐 초기 수정란에 있어서 energy가 충분히 증가할 때에는 glucose 제한에 의해 해당계의 blockade (glycolysis blockade)가 작용하며, 이러한 해당계의 blockade는 glucose 흡수량의 증가와 동시에 hexokinase, phosphofructokinase 활성 및 이

들과 관련된 합성대사 물질을 저해하기 때문인 것으로 보고되고 있다 (Barbehenn 등, 1974, 1978). 또 다른 원인으로는 생쥐 수정란의 분할과 함께 급속한 ATP와 ADP의 합성저하도 중요한 원인인 것으로 추정하고 있다 (Quinn와 Wales, 1973 ; Leese 등, 1984). 본 실험에서 배반포기 수정란의 glucose 흡수량은 약 127 pmol/embryo/h이었는데 (Table 1), 이러한 결과는 Renard 등 (1980)이 소 배반포기 수정란에서 측정한 결과보다 낮은 것이었다. 그러나 그들의 결과는 발정 10~11일째의 체내수정란을 채취하여 측정한 것이고, 본 실험에서는 체외수정란으로부터 측정한 것이기 때문에 glucose의 흡수량이 낮을 수도 있다. 면양에 있어서도 체내수정란이 체외수정란보다 glucose의 산화량이 유의적으로 높은 것으로 보고되었다 (Thompson 등, 1991). Table 5에서 보는 바와 같이 정상수정란에 있어서 glucose 흡수량과 lactate의 생산량은 퇴행수정란보다도 유의적으로 높았다. 이러한 사실을 유추하여 볼 때, 본 실험에서 기질대사량 측정에 사용된 non-invasive 방법은 수정란의 생존능력을 판단하는 척도로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 glucose의 흡수는 배반포기에서 활발히 이루어지고 있지만, 다른 동물종과 사람에 있어서는 glucose 대사가 상실배기 수정란부터 활발히 이루어지고 있는 것으로 알려져 있다 (Thompson 등, 1991; Gott 등, 1990). 이러한 차이점은 본 실험에서는 pyruvate와 glucose의 혼합기질 배양액을 사용하였지만, 기존의 다른 연구자들은 단독기질 배양액만을 사용하였기 때문에 기인한 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서는 다수 난자의 측정에 의한 대사량의 평균오차가 아니라 한개 수정란에 의한 각각의 발생단계별 측정오차였으며, 기질의 흡수와 생산량뿐만 아니라 수정란내 기질의 축적량과 소비량을 동시에 산정하였기 때문에 본 연구결과의 신뢰성은 인정할 수 있을 것으로 사료된다. 체외수정란에 있어서 pyruvate의 흡수는 생쥐 (Leese와 Barton, 1984)와 흰쥐 (Brison과 Leese, 1991)에서 보고된 것처럼 상실배기 이후의 수정란에서도 급격한 저하가 없었다. 이러한 결과는 소에서도 사람의 수정란과 같이 상실배기 이후에 있어서도 pyruvate가 수정란의 분할에 관여하고 있다는 가능성을 시사하고 있다. Table 3에 나타난 바와 같이, 발생배지의 기질로 lactate의 첨가와 관계없이 lactate의 생산 및 대사량이 높은 결과는 착상전 소 체외수정란의 배양에 있어서 초기 수정란의 분할을 지지해 주는 영양대사물질로서 lactate를 첨가하지 않아도 될 수 있다는 것을 시사한다. 그러나 상실배기 이후에 lactate의 축적량이 급격히 증가한 것에 대해서는 앞으로 lactate의 생산경로와 관련하여 좀더 상세한 규명이 필요할 것으로 생각된다.

V. 적 요

소 초기 수정란내에 있어서 해당계 중간대사물질의 흡수, 축적 및 영양요구량을 분석할 목적으로 non-invasive 방법을 이용하여 한개의 소 체외수정란으로부터 glucose, pyruvate 및 lactate에 대한 흡수, 축적, 생산량 및 소비량을 측정하였다. 혼합 발생배지에서 glucose, pyruvate 및 lactate의 대사량을 수정란의 발달단계별로 각각 측정한 결과, glucose의 흡수량은 2세포기부터 배반포기까지 점차적으로 증가하는 반면에, pyruvate 흡수량 및 lactate 생산량은 점점 감소하는 경향을 보였다. 체외수정란에 있어서 glucose와 pyruvate의 축적량은 lactate와 비교하여 전반적으로 낮았다. Glucose 또는 pyruvate 단독배지에 있어서 정상적인 수정란의 glucose 흡수량 및 lactate 생산량은 퇴행수정란의 것보다도 유의적으로 높았다 ($P<0.05$).

결론적으로 소 체외수정란에 있어서 기질대사는 배반포기에서 glucose 대사계로 전환되는 반면에, pyruvate는 8세포기까지의 분할을 주로 지지해 주는 energy원으로 이용되고 있다는 사실을 알게 되었다. 아울러 체외수정란의 발달에 있어서 lactate 기질의 첨가 없이도 lactate의 축적량이 흡수량에 관계없이 상대적으로 높은 양을 나타낸 본 실험의 결과는 소 체외수정란의 체외배양시 lactate의 첨가가 필요하지 않을 수 있음을 제시하고 있다.

VI. 인용문헌

1. Barbehenn, E. K., R. G. Wales and O. H. Lowry. 1974. The explantation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 : 1056-1060.

2. Barbehenn, E. K., R. G. Wales and O. H. Lowry. 1978. Measurement of metabolites in single preimplantation embryos : a new means to study metabolic control in early embryos. J. Embryol. Exp. Morph. 43 : 26-94.
3. Bigger, J. D., D. G. Whittingham and R. P. Donahue. 1967. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58 : 560-567.
4. Bracket, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 27 : 147-158.
5. Brinster, R. L. 1965. Studies on the development of mouse embryos *in vitro* : Ⅱ. The effect of energy source. J. Exp. Zool. 158 : 69.
6. Brinster, R. L. 1973. Nutrition and metabolism of the ovum, zygote and blastocysts. In Handbook of Physiology 7 : 165-185.
7. Brinster, R. L. and J. L. Thomson. 1966. Development of eight-cell mouse embryos *in vitro*. Expl. Cell Res. 42 : 308-315.
8. Brison, D. R. and H. J. Leese. 1991. Energy metabolism in late preimplantation rat embryos. J. Reprod. Fert. 93 : 245-251.
9. Butler, J. E. and J. E. Williams. 1991. Noninvasive measurement of pyruvate uptake by ovine preimplantation embryos and unfertilized ova. Theriogenology 36 : 1043-1048.
10. Butter, J. E. and J. E. Williams. 1990. Preliminary characterization of pyruvate uptake by one-cell ovine embryos. Theriogenology 33 : 423-432.
11. Cross, P. C. and R. L. Brinster. 1973. The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. Expl. Cell Res. 77 : 57-62.
12. Flood, M. R. and J. R. Wiebold. 1988. Glucose metabolism by preimplantation porcine embryo. J. Reprod. Fert. 84 : 7-12.
13. Gardner, D. K. and H. J. Leese. 1988. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. Development 194 : 423-429.
14. Gardner, D. K. and H. J. Leese. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. J. Reprod. Fert. 84 : 361-368.
15. Gott, A. L., K. Hardy, R. M. Winston and H. J. Leese. 1990. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. Human Reprod. 5 : 104-108.
16. Hardy, K., M. A. K. Hooper, A. H. Handyside, A. J. Rutherford, R. M. L. Winston and H. J. Leese. 1989. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. Human Reprod. 4 : 188-191.
17. Iwasaki, S., Y. Shioya, Y. Moniji and T. Nakahara. 1991. Measurement of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in bovine oocytes and embryos using quantitative fluorescence microscopy. Jpn. J. Anim. Reprod. 37 : 273-276.
18. Javed, M. H. and R. W. Wright, Jr. 1991. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activites in bovine embryos. Theriogenology 35 : 1029-1037.
19. Leese, H. J., J. D. Biggers, E. A. Mroz and C. Lechene. 1984. Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. Anal. Biochem. 140 : 130-144.
20. Leese, H. J., S. Aldridge and K. S. Jeffries. 1979. The movement of amino acids into rabbit oviduct fluid. J. Reprod. Fert. 56 : 623-626.
21. Leese, H. J. and A. M. Barton. 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. J. Reprod. Fert. 72

: 9-13.

22. O' Fallon, J. V. and R. W. Wright, Jr. 1986. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. Biol. Reprod. 34 : 58-64.
23. Petters, R. M., B. Johnson, M. L. Reed and A. E. Archibong. 1990. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo *in vitro*. J. Reprod. Fert. 89 : 269-275.
24. Pike, I. L. and R. G. Wales. 1982. Uptake and incorporation of glucose especially into the glycogen pools of preimplantation mouse embryos during culture *in vitro*. Aus. J. Biol. Sci. 35 : 195-206.
25. Quinn, P. and R. G. Wales. 1973. Adenosine triphosphate content of preimplantation mouse embryos. J. Reprod. Fert. 25 : 133-135.
26. Reed, M. L., D. I. Jin and R. M. Petters. 1992. Glucose and inoranic phosphate inhibits rat 8-cell embryo development *in vitro*. Theriogenology 37 : 282 (abst.)
27. Renard, J. P., A. Philippon and Y. Menezo. 1980. *In-vitro* uptake of glucose by bovine blastocysts. J. Reprod. Fert. 58 : 161-164.
28. Rieger, D. and P. Guay. 1988. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. J. Reprod. Fert. 83 : 585-591.
29. Ryoo, Z. Y. and S. Sugawara. 1994. Estimation of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activity and development of fresh bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. J. Reprod. & Devel. 40 : 1-5.
30. Takahashi, Y. and N. L. First. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos : Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acid and vitamins. Theriogenology 37 : 963-978.
31. Thompson, J. G. E., A. C. Simpson, P. A. Pugh, R. W. Wright, Jr. and H. R. Tervit. 1991. Glucose utilization by sheep embryos derived *in vivo* and *in vitro*. Reprod. Fertil. Dev. 3 : 571-576.
32. Tiffin, G. J., D. Rieger, K. J. Betteridge, B. Yadav and W. A. King. 1990. Measurement of the activity of the pentose phosphate pathway in sexed bovine embryos. Theriogenology 33 : 339 (abstr.).
33. Tiffin, G. J., D. Rieger, K. J. Betteridge, B. Yadav and W. A. King. 1991. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. J. Reprod. Fert. 93 : 125-132.
34. Whitten, W. K. 1956. Culture of tubal ova. Nature 177 : 96.
35. Whitten, W. K. 1957. The effect of progesterone on the development of mouse eggs *in vitro*. J. Endocrinol. 16 : 80-85.