

Indomethacin이 생쥐 착상전 배아의 발생 및 부화에 미치는 영향

한양대학교 자연과학대학 생물학과, 경기대학교 이과대학 생물학과¹,
울산대학교 의과대학 산부인과학교실²

전용필 · 계명찬¹ · 김정훈² · 김문규

Effects of Indomethacin on Development and Hatching of Mouse Embryo

Yong Pil Cheon, Myung Chan Gye¹, Chung Hoon Kim² and Moon Kyoo Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul, Korea,

¹*Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyonggi University, Suwon, Korea,*

²*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, University of Ulsan, Asan Medical Center, Seoul, Korea*

= Abstract =

The present study was designed to define the role of prostaglandin in the development and hatching of mouse embryo. The effects of indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis, on the development and hatching of morula and blastocyst were examined. In early morula stage, embryos were degenerated significantly at 100 μ M and 200 μ M indomethacin. However, the viability of embryos was not influenced by concentration in any other embryonic stages. In all embryonic stages, the hatching was suppressed with concentration dependent manner, but expansion was not suppressed. Particularly, in 84h embryos post hCG injection, the hatching was suppressed significantly compared with post hCG 72h or 96h embryos. When embryos were treated with 100 μ M indomethacin for a specific time (12h) in according to the development stage, the hatching was suppressed all groups. These suppressional effect was decreased as embryonic development stage was progressed. However, the expansion was not affected in all treatment group. This study suggests that hatching-related metabolic substances are synthesized from morula stage and intraembryonic signaling mediated prostaglandin was important for development and hatching of mouse embryo.

Key Words: Morula, Blastocyst, Prostaglandin, Indomethacin, Expansion, Hatching.

서 론

수정후 난황을 진행한 포유류의 배아는 부화를 거쳐 자궁에 착상하여 개체발생을 하게된다. 생쥐의 배아는 후기 8-세포기에 밀집 (compaction)

을 통해 할구내 극성이 심화되어 배아내 특정 영역 (domain)을 형성하면서 포배로 발생한다. 포배는 자궁 상피와의 상호 작용을 통해 착상을 준비하게 되는데, 포배로부터의 신호는 자궁내막이 착상 직전의 배아를 인식할 수 있도록 하고, 투명대를 빠져나오는 부화 (hatching)를 수행한다

*본 연구는 1996년도 교육부, 기초과학 육성연구비(BSRI 96-4437) 지원에 의한 것임.

(Guillomot *et al.*, 1993).

체의 수정이나 체외 배양된 배아를 모체내로 이식시 착상률은 자연적인 착상률과 비교할 때 매우 낮을 뿐만 아니라 최근까지의 인위적인 노력으로 근소하게 증가되었을 뿐이다 (Dokras *et al.*, 1994; Tucker *et al.*, 1991; Khalifa *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1995). 이는 체외에서 성숙된 난자의 핵 및 세포질 성숙의 저하로 인한 투명대의 경화 (hardening)가 중요한 원인이다 (Downs *et al.*, 1986). 또한 체외의 물리적 또는 화학적 배양조건이 모체와는 동일하지 않기 때문에 배아를 구성하는 할구의 세포질의 충실도 (quality, 질) 및 배아내 할구 수의 차이가 나타나 결과적으로 포배강의 형성, 부화, 착상 등이 저조해지기 때문이다 (Colver *et al.*, 1991). 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 배양액내에 성장인자를 첨가하거나 또는 수란관 상피세포 등과의 공동배양 등을 통하여 배아의 생존력이나 충실도를 증가시키려는 노력이 경주되고 있다 (O'Neill *et al.*, 1989; Ryan *et al.*, 1989; Paria & Dey, 1990; Goldberg *et al.*, 1991; Nishi *et al.*, 1995; Wiemer *et al.*, 1995).

부화는 포배의 할구 세포에서 진행되는 prostaglandin, 초기 배아의 충실도 등에 영향을 받는 것으로 보고되었다 (Terranova & Dey, 1983). Indomethacin은 arachidonic acid로부터 prostaglandin E(PGE) 또는 prostaglandin F (PGF)가 합성될 때 관여하는 cyclooxygenase의 억제제 (antagonist)로 prostaglandin합성에 의존적인 생체내 현상의 연구에 널리 사용되어 왔다 (Biggers *et al.*, 1981; Chida *et al.*, 1986; Geisert *et al.*, 1986). 난소를 제거한 햄스터에서 배아를 이식하고 indomethacin을 주사하면 부화와 착상이 지연되며 (Terranova & Dey, 1983), 돼지에서는 indomethacin을 포배에 처리할 경우 영양외배엽 할구의 형태가 구형에서 선형으로 전환되는 것이 억제된다 (Geisert *et al.*, 1986). 생쥐의 경우 indomethacin을 체내에 처리할 경우 포배의 부착과 영양배엽의 성장 (trophoblastic outgrowth)이 억제되고 (Chida & Mettler, 1989), 포배에 처리하면 부화가 억제된다 (Biggers *et al.*, 1978; Baskar *et al.*, 1981; Chida *et al.*, 1986). 그러나 생쥐 배아의 부화는 포배의 형성과 포배강의 출현 및 팽창 이후에 진행되는 현상이므로 prostaglandin에 의한 부화조절 기작을 정확히 이해하기 위해서는 포배의 출현이전 즉 morula 시기의 배아로부터 완전히 팽창된 포

배시기의 배아를 대상으로 발생단계에 따른 prostaglandin에 의존적인 신호전달체계를 조사하여야만 한다. 따라서 본 실험에서는 hCG주사 시기를 기준으로 세분한 발생 단계에 따라 다양한 농도의 indomethacin을 배아에 처리하여 부화직전 단계로까지의 발생에 미치는 영향을 조사하는 한편 부화에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 배아의 수획

본 실험에 사용한 실험 동물은 명 14시간, 암 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이를 충분히 공급한 상태에서 사육한 생쥐 (ICR strain)로서 암컷은 생후 4-6주된 것, 수컷은 생후 8주 이상된 것을 사용하였다.

배아를 획득하기 위하여 PMSG (Sigma) 5IU를 복강에 주사한 후 48시간 지나, hCG 5IU를 주사하여 과배란을 유도하고 수컷과 합사하였다. 다음날 아침 질전의 유무를 통해 수정 여부를 확인하고 실험에 사용하였다. hCG 주사후 72시간 지나 생쥐를 경추 파괴로 도살한 후 수란관과 자궁의 일부를 적출하였으며 0.4% BSA를 함유한 BWB (Biggers *et al.*, 1971)로 세척하고 혈액이나 불필요한 조직을 제거하였다. 그리고 동일 배양액으로 관류하여 8-세포기 이후의 배아를 획득하여 밀착된 이후의 배아를 선택적으로 수집하여 사용하였다.

2. 배아의 배양

배아의 배양은 0.4% BSA를 함유한 BWB를 기본 배양액으로 하여 사용하였다. 배양은 배양 접시 (plastic dishes, Falcon; 60 × 15mm)위에 배양액을 20 μ l씩 분주하고, 그 위에 고온 고압 멸균한 후 BWB로 평형시킨 파라핀유 (paraffin oil, mineral oil light, Sigma)를 덮어서 37 $^{\circ}$ C, 공기중 5% CO $_2$ 가 혼합되어 공급되고, 습도가 100%인 배양기내에서 배양하는 방법을 사용하였다. 상실기 배아는 각 실험군에 따라서 indomethacin을 처리하기 전까지 기본 배양액에서 배양하고 이후 indomethacin을 첨가한 조절 배양액 (conditioned medium, IBW)에서 hCG 주사한 시간을 기준으로 144 시간까지 배양하였다.

3. Indomethacin의 처리

Indomethacin (1-[p-chlorobenzoly]-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid)을 고순도의 ethyl alcohol (Sigma)에 녹인 후 0.4% BSA를 함유한 BWB에 녹여 stock solution을 만들었다. 이후 4°C 냉장고에 보관하면서 알콜성분이 휘발되도록 하였다. Indomethacin의 농도는 0.1, 1, 10, 100, 200 µM로 배양액에 첨가하여 사용하였고 (조절 배양액, IBW) 처리군에 따라 각각의 농도를 hCG 주사 시간을 기준으로 72시간, 84시간, 96시간으로 나누어 다음과 같이 처리하였다. 배아의 발생단계에 따라서 1) 초기 상실기부터 IBW 배양액내에서 72시간 배양, 2) hCG 주사 후 84시간부터 IBW 배양액으로 옮겨 60시간 배양, 3) hCG 주사 후 96시간부터 IBW 배양액으로 옮겨 48시간 배양한 군으로 나누어 실험하였다. 그리고 indomethacin에 노출하는 시간대를 제한하였을 때의 영향을 알아보기 위하여 1) 초기 상실기에서부터 hCG 주사 후 84시간까지 IBW 배양액에서 배양하고 그후 기본 배양액으로 옮겨 60시간 배양, 2) hCG 주사 후 84시간에서 96시간까지 IBW 배양액에서 배양한 후 기본 배양액으로 옮겨 48시간 배양, 3) hCG 주사 후 96시간에서 108시간까지 IBW 배양액에서 배양한 후 기본 배양액으로 옮겨 36시간 배양한 군으로 나누어 발생과 부화에 미치는 영향을 알아보았다.

4. 부화의 관찰과 유의성 검증

각 군에 따라 hCG 주사 시간을 기준으로 144

시간 지난 후에 도립현미경 (inverted microscope, DIC modulated, Nikon)하에서 상실배 (morula), 팽창된 배아 (expanded), 팽창후 수축된 포배 (shrunken), 부화되기 시작한 이후의 배아 (hatching), 그리고 퇴화한 배아 (degenerated)로 나누어 발생되는 것을 관찰하였다.

관찰 결과의 통계적 유의성 검증은 χ^2 -test로 하였으며, $p < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 착상전 배아의 발생과 부화에 미치는 indomethacin의 영향

초기 상실배를 각 농도의 IBW 배양액내에서 배양하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 부화율은 0.1, 1, 10 µM indomethacin 농도에서 각각 76%, 74.5%, 85.7%로 대조군 (83.5%)과 유사한 결과를 보였다. 팽창한 상태로 남아있는 배아는 0.1, 1, 10 µM 농도에서 각각, 12%, 13.7%, 10.7%로 대조군 (11.4%)과 유사한 결과를 보였다 (Fig. 1). 팽창 후 수축된 포배의 비율은 농도에 따라서 각각 10%, 9.8%, 3.6%로 대조군 (2.5%)과 유사하였으며 퇴화율도 각각 2%, 2%, 0%로 대조군 (2.5%)과 차이를 보이지 않았다. 그러나 100 µM 이상의 농도에서는 부화율이 23.5%로 대조군 (83.6%)에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$). 즉, 100 µM 농도에서는 팽창되었다가 수축한 상태의 포배나, 퇴화한 배아가 유의하게 증가하였다 (각각 $p < 0.001$). 그리고 200 µM 농도에서도 100 µM

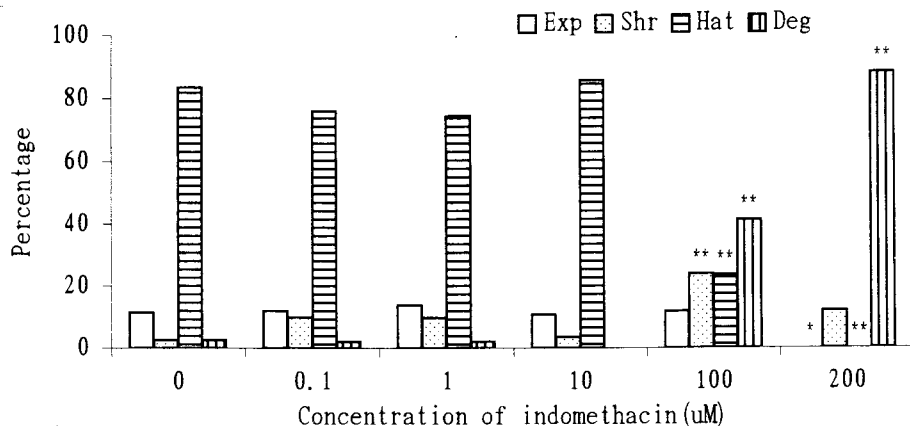


Fig. 1. Effects of indomethacin on development of early morula. Exp, expanded; Shr, shrunken; Hat, hatching; Deg, degeneration.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ versus control (0)

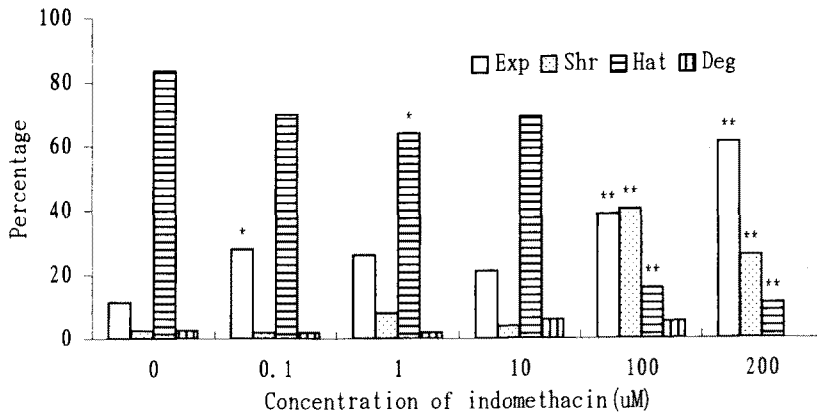


Fig. 2. Effects of indomethacin on development of 84h embryos post hCG injection. Exp, expended; Shr, shrunken; Hat, hatching; Deg, degeneration.
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ versus control (0)

농도에서와 같은 경향을 보였으나 부화가 진행되거나 팽창된 배아가 없이 퇴화된 배아가 대부분 (88%)이었다 (Fig. 1). 그리고 밀착한 8-세포 배아에 100 μM indomethacin을 처리한 경우 밀착 현상이 사라지고 퇴화하여 초기 8-세포처럼 되었다.

hCG 주사 후 84 시간된 배아에 60시간 동안 처리할 때 미치는 영향은 다음과 같았다. 부화율은 0.1 μM과 10 μM에서는 각각 70%와 69%로 유의한 차이를 보이지 않았으나 1.0, 100.0, 200.0 μM 처리군에서는 각각 64%, 15.8%, 11.0%로 대조군 (83.6%)에 비해 유의하게 감소하였으며 (각각 $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$), 특히 100 μM 이상의 농도에서 현저한 감소를 보였다. 한편 팽창한 상태로 남아있는 율은 0.1 (28.0%), 100.0 (38.6%), 200.0 μM (61.1%)에서 11.4%인 대조군에 비해 유의하게 증가하였고 (각각 $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$), 1 μM (26.0%)과 10 μM (21.0%) 처리군에서는 각각 p 값이 0.056으로 증가하는 경향을 보였다. 그리고 팽창후 수축된 포배로 남아있는 배아는 100 μM (40.3%)과 200 μM (25.9%) 농도에서 2.5%인 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나 ($p < 0.001$) 다른 처리군에서는 대조군과 차이가 없었으며 퇴화율은 대조군에 비해 차이가 없었다 (Fig. 2). 이와같이 84시간된 배아의 부화는 indomethacin의 농도에 의존적으로 감소되며, 초기 상실기 배아와는 달리 퇴화를 유도하는 유해한 효과를 받지 않았다. 그리고 초기 상실배나 96시간된 배아에서 보다 indomethacin에 대한 감수성이 컸다.

hCG 주사 후 96 시간된 배아에 있어서는, 부화율은 100.0 μM에서 51.7% 그리고 200.0 μM에서 0.8%로 대조군의 83.6%에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$) (Fig. 3). 한편 팽창한 상태로 남아있는 배아는 10.0, 100.0, 그리고 200.0 μM 농도에서 각각 28.3%, 26.7%, 34.2%로 대조군의 11.4%에 비해 유의하게 증가하였다 (각각 $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) (Fig. 3). 그리고 팽창후 수축한 상태로된 율은 100.0 μM에서 16.6%, 200.0 μM에서 48.8%로 대조군의 2.5%에 비해 유의하게 증가하였으나 퇴화율은 차이가 없었다 (Fig. 3). 즉 indomethacin의 농도에 의존적으로 부화율이 감소하며 팽창은 영향을 받지 않았다. 한편 84시간 배아에서와 마찬가지로 후기 8-세포 배아나 초기 상실배에서 나타난 독성효과는 없었다 (Fig. 3).

2. 초기 상실배 이후 12시간 간격으로 indomethacin을 처리했을 때 발생에 미치는 영향

Indomethacin의 농도를 96시간 배아에서 부화를 유의하게 억제한 100 μM로 하고 각 단계별 초기 배아에 처리하여 다음과 같은 결과를 얻었다. hCG 주사후 72시간된 배아를 수집하고 12시간 IBW 배양액에서 배양한 후 기본 배양액으로 옮겨 60시간 배양하였을 때, 부화율은 20.0%로 대조군의 83.5%에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$). 한편 팽창한 상태로 남아있는 배아는 30.3%, 팽창후 수축한 포배는 38.0%로 대조군과 비교할 때 유의하게 증가하였다 (각각 $p < 0.05$, $p < 0.001$). 퇴화율은 12.0%로 2.5%인 대조군과

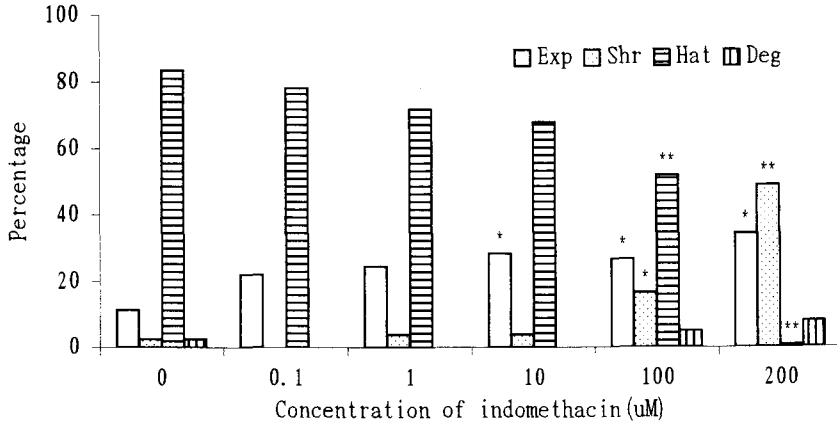


Fig. 3. Effects of indomethacin on development of 84h embryos post hCG injection. Exp, expanded; Shr, shrunken; Hat, hatching; Deg, degeneration. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ versus control (0)

Table 1. Effects short term treatment of indomethacin on development of mouse embryos at different stages

Embryonic stage treated (h post hCG)	No. of Embryos	Embryonic stage (%)			
		Expanded	Hatching	Shrunken	Degeneration
Control	79	9 (11.4)	66 (83.6)	2 (2.5)	2 (2.5)
72 - 84h	50	15* (30.0)	10** (20.0)	19** (38.0)	6 (12.0)
84 - 96h	51	14* (27.5)	23** (45.1)	12** (23.5)	2 (3.9)
96 - 108h	50	14* (28.0)	33* (66.0)	2 (4.0)	1 (2.0)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ versus control

유의한 차이는 없었다 (Table 1).

hCG 주사후 86시간된 배아를 12시간 IBW 배양액에 노출시킨후 기본 배양액으로 옮겨 48시간 동안 배양하였을 때 다음과 같았다. 부화율은 45.1%로 대조군에 비해 유의하게 감소하였으나 ($p < 0.001$) 팽창한 상태의 배아는 27.5%, 팽창후 수축한 포배는 23.5%로 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다 (각각 $p < 0.05$, $p < 0.001$) (Table 1).

hCG 주사후 96시간된 배아를 12시간 IBW 배양액에 노출시키고 기본 배양액으로 옮겨 36시간 배양하면 부화율이 66%로 다른 처리군에 비해서 유의한 증가를 하였으나 대조군에 비해서는 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 그리고 팽창된 상태

로 남아있는 배아는 28%로 대조군 (11.4%)에 비해 유의한 증가를 보였으며 ($p < 0.05$), 팽창후 수축한 포배는 4.0%로 대조군 (2.5%)과 유사하였다 (Table 1).

고 찰

체외 배양된 배아와 체내에서 발생한 배아간 부화율의 차이를 통해 초기 발생 동안의 배아 충실도가 부화에 중요한 요인임을 알 수 있다. 따라서 착상에 관계있는 물질의 억제제가 초기 배아의 발생에 미치는 영향 분석은 중요하다. 본 실험에서 indomethacin을 초기 상실배에 처리하였을

경우 100 μM 이상의 농도에서 퇴화율이 대조군이나 그 이하 농도군과 비교하여 유의하게 높게 나타났으며 초기 상실배 이전의 밀집된 8-세포기 배아에 처리했을 때에도 거의 모든 배아가 퇴화하였다. 그러나 hCG 주사후 84시간 이후의 배아에 있어서는 퇴화율이 대조군과 차이가 없었다. 이러한 결과를 통해 arachidonic acid의 물질대사가 초기 배아의 생존에 관계하거나 또는 고농도가 원인이 되어 유해성이 있는 것으로 추정할 수 있다. 그리고 발생단계에 따라 100 μM 이상의 indomethacin을 처리할 경우 부화가 유의하게 억제되는데 이는 햄스터 체내에 indomethacin을 처리할 경우 투병대를 빠져나오는 현상이 지연되어 착상이 억제되는 결과 (Terranova & Dey, 1983)와 비슷한 현상임을 알 수 있다. 그리고 hCG 주사후 84시간된 배아에 처리하였을 때 초기 상실배에서 보다 더 낮은 농도에서도 민감하게 부화가 억제되었고, 100 μM 농도간에는 유의하게 감소한 결과를 통해 hCG 주사를 기준으로 84시간대가 체외에서 배양된 생쥐 배아의 부화에 관련된 arachidonic acid 물질대사에 중요한 시점인 것으로 사료된다.

한편 hCG 주사후 96시간된 배아에서 팽창한 상태로 남아있는 올은 10.0 μM 이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고, 팽창후 수축된 포배 상태로 존재하는 올은 100 μM 농도 이상에서 유의하게 증가하였는데 전자가 주를 이루었다. 또한 초기 상실배나 hCG 주사후 84시간된 배아에 있어서도 팽창을 억제하는 영향은 없었다. 따라서 정상적인 팽창 진행과, 포배강을 갖는 포배로의 발생은 대조군과 비슷하나 부화율이 유의하게 감소하는 것을 알 수 있다. 한편 Chida 등 (1986)이 생쥐를 대상으로 한 보고에서 indomethacin 10^{-4}M 처리시 부화가 유의한 감소 ($p < 0.01$)를 한다는 보고와, 본 실험 결과 hCG 주사후 96 시간된 배아에 여러 농도로 indomethacin을 처리하였을 때 100 μM 에서 유의하게 부화를 억제한 결과를 바탕으로 100 μM 을 선택하여 각 단계의 배아를 IBW 배양액에서 12시간씩 배양 후 기본 배양액으로 옮겨 다시 배양하였을 경우 발생이 진척될수록 부화율이 증가하였으며 퇴화율은 대조군과 유사하였으나 팽창한 상태로 남아있거나 팽창후 수축한 상태의 배아가 증가하였다. 따라서 Hurst와 MacFarlane (1981)은 non-steroidal antiinflammatory compounds를 처리시 부

화가 억제되는 것이 포배강의 확장이 제한되거나 또는 영양배엽층에 작용하여 prostaglandins의 합성에 관여하여 부화를 억제한 것으로 추정하여 왔는데 본 실험 결과를 통하여 indomethacin이 팽창을 억제하는 것이 아니라 영양배엽에 작용하여 부화에 관계된 물질대사를 억제한다는 추측이 가능하다.

포배시기 (day 4 또는 hCG 주사 후 96시간)에 nonsteroidal antiinflammatory compound중 indomethacin을 처리한 다른 실험들에서는 ID_{50} 에서 또는 10 μM 농도에서 부화가 억제되거나 부화되는 것들도 존재한다는 (Biggers *et al.*, 1978; Hurst & MacFarlane, 1981) 보고도 있으나, Fig. 2에서 보듯이 앞서 보고된 농도보다도 더 높은 100 μM 농도에서 처리 방법에 따라 다르지만 50% 정도의 부화율을 보여, 그 결과가 논쟁적임을 알 수 있다. 이는 Table 1의 결과를 비교해 볼 때 indomethacin을 처리하기 전에 이미 부화에 관련된 물질이 발현되어 있어 indomethacin의 억제작용을 받지 않았거나, 또는 이미 발현되어 있는 것과 indomethacin을 함유하지 않은 배양액으로 옮겨진 경우 다시 발현되어 회복되는 것으로 사료된다. 한편 Biggers 등 (1978)과 Basker 등 (1981)이 prostaglandins가 포배강내액의 축적을 유도하여 부화에 도움을 준다는 주장은 본 실험에서 각 발생단계에 따른 indomethacin을 처리한 결과에서 포배강내액의 축적이 완전히 prostaglandins에 의존적이지 않다는 것을 확인 할 수 있었다.

한편, 초기 상실배에서는 100 μM 이상의 indomethacin을 계속적으로 처리하였을 경우 hCG 주사후 84시간 이후의 배아에 처리한 실험군에서와는 달리 퇴화율이 높았다. 한편 84시간 이후의 배아에 100 μM 이상의 농도로 처리할 경우 팽창이나 수축한 포배를 유지하게 하는 영향 이외의 생존력에는 영향을 주지 않았다. 그리고 발생이 진척될수록 부화에 미치는 배아의 indomethacin 감수성이 감소한다. 따라서 본 실험의 결과 발생 단계가 높을수록 발생에 미치는 indomethacin에 의한 유해한 영향력이 감소함을 알 수 있었다. 그리고 팽창까지의 발생에는 억제하는 효과가 없었으나 부화가 억제되어, arachidonic acid의 물질대사가 부화에 관련된 물질의 활성 또는 발현에 영향을 주는 것과 초기 상실배에서부터 발현되는 것을 추측할 수 있다. 이러한 결과는 indomethacin 처리에 의한 cAMP의 감소로 cAMP

의존적인 유전자 발현이나 물질대사의 억제에 의한 것이거나 또는 inositol phosphate 대사와 calcium channel의 활성 변화 등의 변화로 부화에 관여하는 물질의 조절을 통해 이루어 지는 것으로 사료된다.

결 론

포유류의 초기 배아는 부화후 착상을 하며 부화에 관계된 요인의 하나로 초기 배아의 충실도가 있다. 따라서 배아의 발생단계에 따른 indomethacin 농도, 또는 indomethacin에 노출되는 시간에 따른 영향을 조사함으로써 팽창까지의 발생과 그 후 부화에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 수행하였다. 초기 상실기 단계의 배아나 밀집된 배아에 있어서는 100 μM 이상의 농도에서 생존에 유해한 영향을 주었으나 hCG 주사 후 84시간 이후의 배아는 indomethacin에 대한 감수성이 감소하여 생존력에 영향을 받지 않았다. 처리한 모든 발생단계에서 팽창단계까지의 발생은 정상적으로 이루어지나, 부화가 억제되었다.

한편 indomethacin의 농도를 100 μM 로 고정하고 노출하는 시간을 제한하였을 경우 퇴화한 배아는 모든 군에서 유의한 차이가 없었으나 초기 상실배-84 시간대에서 증가하는 경향은 있었다. 한편 부화된 배아대 팽창과 수축 상태로 남아있는 배아와의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 부화가 유의하게 억제되었음을 알 수 있다.

이상의 결과에서 밀착된 초기 배아는 고농도의 indomethacin에 의해 생존력에 유해한 영향을 받으나, 저농도의 경우에 있어서는 팽창으로의 발생은 억제되지 않고 부화만이 억제되는 것을 알 수 있었다. 그리고 발생이 진척되면서 indomethacin에 의한 유해한 영향이 감소함을 알 수 있었다. 또한 indomethacin과 관련된 arachidonic acid의 대사가 팽창을 조절하는 요인으로 작용할 수 있으나 의존적이지는 않고, 부화에 관련된 물질의 합성을 조절하는 한 요인으로 작용한다고 사료된다. 그리고 부화를 조절하는 물질이 밀착 이후의 상실배 단계에서부터 발현되어 축적되며, 특히 84-96 시간 단계의 배아에서 특이적인 것으로 추정할 수 있었다.

인 용 문 헌

- Baskar JF, Torchiana DF, Biggers JD, Corey EJ, Andersen NH, Subramanian N: Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by various prostaglandin antagonists. *J Reprod Fertil* 63: 359-363.
- Biggers JD, Leonov BV, Baska JF, Freid J. Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by prostaglandin antagonists. *Biol Reprod* 1978, 19, 519-530.
- Biggers JD, Baskar JF, Torchiana DF: Reduction of fertility of mice by the intrauterine injection of prostaglandin antagonists. *J Reprod Fertil* 1981, 63, 365-372.
- Biggers JD, Whitten WK, and Whittingham DG: The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC Jr, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco: Freeman, 1971, 86-116.
- Chida S, Mettler L: Effects of indomethacin, prostaglandin E_2 and prostaglandin $F_{2\alpha}$ on mouse blastocyst attachment and trophoblastic outgrowth in vitro. *Prostaglandins* 1989, 37, 411-416.
- Chida S, Uehara S, Hoshiai H, Yajima A: Effects of indomethacin, prostaglandin E_2 , prostaglandin $F_{2\alpha}$, and 6-ketoprostaglandin F_1 on hatching of mouse blastocysts. *Prostaglandins* 1986, 31, 337-342.
- Colver RM, Howe AM, McDonough PG, Boldt J: Influence of growth factors in defined culture medium on in vitro development of mouse embryos. *Fertil Steril* 1991, 55, 194-199.
- Dokras A, Sargent IL, Ross C, Barlow DH, Gosden B: Micromanipulation of human embryos to assist hatching. *Fertil Steril* 1994, 61, 514-520.
- Downs SM, Schoeder AC, Eppig JJ: Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing hardening of the zona pellucida. *Gamete Res* 1986, 15: 115-122.
- Geisert RD, Rasby RJ, Minton JE, Wettemann RP: Role of prostaglandins in development of porcine blastocysts. *Prostaglandins* 1986, 31, 191-204.
- Goldberg JM, Khalifa EAI-DM, Friedman CI, Kim MH: Improvement of in vitro fertilization and

- early embryo development in mice by coculture with human fallopian tube epithelium. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 165, 1802-1805.
- Guillomot M, Flechon JE, Leroy E: Blastocyst development and implantation, In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF, eds. *Reproduction in mammals and man*. Paris: Ellipses, 1993, 387-412.
- Hurst PR, MacFarlane DN: Further effects of non-steroidal anti-inflammatory compounds on blastocyst hatching in vitro and implantation rates in the mouse. *Biol Reprod* 1981, 25, 777-784.
- Khalifa EAM, Tucker MJ, Hunt PP, Hamidi J: Improved hatching in mouse embryos brought about by combined partial zona dissection and co-culture. *Human Reprod* 1993, 8, 599-603.
- Nishi O, Tominaga T, Goto Y, Hayashi K, Mori T: Effects of platelet activating factor on mouse embryo implantation in vitro. *J Assit Reprod Genet* 1995, 12, 330-334.
- O'Neill C, Ryan JP, Collier M, Saunders DM, Ammit AJ, Pike IL: Supplementation of in vitro fertilization culture medium with platelet activating factor. *Lancet* 1989, 30, 769-772.
- Paria BC, Dey DK: Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 4756-4760.
- Ryan JP, Spinks NR, O'Neill C, Ammit AJ, Wales RG: Platelet activating factor (PAF) production by mouse embryos in vitro and its effects on embryonic metabolism. *J Cell Biochem* 1989, 40, 387-395.
- Stein A, Pinkas H, Rufas O, Ovadia J, Amit S, Bisch B, Avrech O, 1995. Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryos in patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995, 63, 838-841.
- Terranova PF, Dey SK: Indomethacin delays zona-shedding and implantation in the ovariectomized progesterone-treated hamster. *Prostaglandins* 1983, 24, 165-194.
- Tucker MJ, Cohen J, Massey JB, Mayer MP, Wiker SR, Wright G: Partial dissection of the zona pellucida of frozen-thawed human embryos may enhance blastocyst hatching, implantation, and pregnancy rates. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 165: 342-345.
- Wiemer KE, Dale B, Hu Y, Steuervald N, Maxson WS, Hoffman DI: Blastocyst development in co-culture: development and morphological aspects. *Hum Reprod* 1995, 10, 3226-3232.