

## NO(Nitric Oxide)가 생쥐의 배 발달에 미치는 영향

원광대학교 의과대학 산부인과학교실, \*원광대학 약학대학

민부기 · 김기석 · 이희섭 · 홍기연 · 신형도 · 성연경 · 김형민\*

### The Effect of Nitric Oxide on the Embryonal Development in Mouse

Bu-Kie Min, Kie-Suk Kim, Hee-Sub Rhee, Gi-Youn Hong, Hyeong-Do Shin,  
Yeon-Kyeong Sung and Hyung-Min Kim\*

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,*

*\*College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Korea*

#### = Abstract =

**Objective:** To analyze the direct effect of nitric oxide (NO), generated from sodium prusside (SNP) on the embryo developments in reproductive process.

**Design:** Ova from mouse were treated to allow fertilization in in vitro culture. And the samples of fertilized ova were allotted into five aliquots. Each aliquot was cultured in media treated with either concentration at 0 (n=92), 25 $\mu$ M (n=84), 50 $\mu$ M (n=80), 100 $\mu$ M (n=77), 500 $\mu$ M (n=54) of SNP.

**Main Outcome Measure:** Rates of embryonal cell cleavages, viability and cell morphology were assessed during in vitro fertilization and culture.

**Results:** As analyse the cell cleavage at 24 hours after in vitro culture of fertilised egg in variuos NO concentration, all of egg cells of each aliquot were developed to 2~4 cell stage. But the aliquot of egg cells treated with 500 $\mu$ M, which were totally degenerated. And also all embryonal cells of each aliquot were developed to 8 cell stage and morula stage on culture continuously.

And the embryonal cells of each aliquot were analysed at 24 and 48 hours following the in vitro culture. The rates of cell fragmentation and fusion were  $4.2 \pm 3.4\%$  in control group which is not treated with NO, while experimental groups was high, as rated  $23.4 \pm 6.2\%$  in 25 $\mu$ M,  $28.2 \pm 5.7\%$  in 50 $\mu$ M and  $32.1 \pm 6.4\%$  in 100 $\mu$ M concentration of NO. Accordingly the rate of abnormal morphology of embryonal cell in control was lower significantly than that in each aliquot of experimental groups ( $p < 0.05$ ). And the degenerated rates of embryonal cells were 0% in control,  $17.8 \pm 6.7\%$  in 25 $\mu$ M,  $23.6 \pm 4.7\%$  in 50 $\mu$ M and  $26.8 \pm 11.2\%$  in 100 $\mu$ M at 8 cells and morula on culture of 48 and 72 hours.

On the examination of embryonal cells developed to blastocyst through in vitro culture, the rates of degenerated cells were  $16.8 \pm 7.2\%$  in control,  $37.5 \pm 6.2\%$  in 25 $\mu$ M,  $73.4 \pm 4.6\%$  in 50 $\mu$ M, 100% in 100 $\mu$ M.

**Conclusion:** This results suggested that the NO in any concentrations is harmful on embryos in view of morphology as well as viability of cell, and the toxicity of NO on embryo is stronger at

본 연구는 1997년도 원광대학교 지원 연구비의 보조로 이루어졌음.

condition in higher concentration of NO.

**Key Words:** No concentration, Embryonal development, Toxicity of NO

## 서 론

NO는 생물학적 매체로서 여러조직 세포 뿐만 아니라 생식기관에서도 생성되는 활성물질로서 free radical gas이다. NO는 세포의 기능을 조정하는 역할이 있어서 생리학적, 병리학적 또는 약리학적으로 여러작용에 관여한다 (Moncada *et al.*, 1991)고 한다. 최근에는 NO가 생식기관에서도 생성되어 분비된다 (Izumi *et al.*, 1993; Yallampalli *et al.*, 1994; Buhimschi *et al.*, 1995a)는 보고가 있으며 Helstrom 등 (1994)은 세포내에서 NO의 생성을 유도하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 이용하여 인간의 정액을 체외에서 처리하여 정자의 운동성 및 생존력을 향상시킨다 (Helstrom *et al.*, 1994)는 결과를 제시하였다. 그러나 생식기가 염증 또는 손상되었을 때 백혈구, 대식세포의 수가 증가하여 NO가 다량 생성되며 증가된 NO가 생식기능에 악영향을 준다 (Barat *et al.*, 1990; Nussler *et al.*, 1993; Marinella *et al.*, 1995)고 한다. 또한 NO는 난소에서 난포의 성장과 성숙에 관여하며 내상피세포에서도 생성되며 (Lewis *et al.*, 1996) Bonello 등 (1996)은 *in vitro*에서 NO가 난소조직의 배란을 자극하는데 직접적인 역할을 한다고 보고한바 있다. 그러나 NO는 세포독성물질인 peroxynitrite로 대시되어 난소에서 세포와 세포사이의 상호작용에 의한 세포 독성의 매체역할을 하는 것으로 관찰되었다 (Ellmam *et al.*, 1993). 한편으로 난소에서 배란 과정의 난포가 폐쇄를 일으키는데 NO가 관여하며 폐쇄 난세포의 핵에서 DNA 분절현상이 나타나는 것은 폐쇄의 징후라는 보고가 있었다 (Hsueh *et al.*, 1994). 또한 NO는 인간 세포계의 DNA를 손상시켜 apoptosis를 일으킨다고 한다 (Nguyen *et al.*, 1992; Sarih *et al.*, 1993; Kaneto *et al.*, 1995).

본 연구에서는 NO가 생식 과정 배아의 분할에 미치는 영향을 관찰하기 위해 체외수정된 난을 배양하여 NO의 생성 촉매제인 SNP를 농도별로 첨가하여 배아에 대한 NO의 보호 또는 해독성 여부를 실험하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난자 회수와 체외수정의 과정

11주령의 B6C3F1종의 암컷 생쥐에게 과배란을 유도하기 위해 PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) 5IU를 복강내 주사하고 48시간 후에 HCG (human chorionic gonadotropin) 5IU를 복강내에 주사하였다. HCG 투여 후 15시간이 경과하여 생쥐를 경추골 파열로 희생시켜 난관 팽대부를 터뜨려 난자를 회수하였다.

회수한 난자들은 TYH (Toyoda Yokoyama Hosi) 배양액을 300 $\mu$ l 소적한 30x30x10mm 조직 배양 접시 (Falcon)로 옮겨 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분동안 보관하였다. 또한 11주령의 B6C3F1종 수컷 생쥐를 희생시켜 정소상체 미부를 절제한 후 압착하여 정액을 채취한 후 TYH 배양액으로 300 $\mu$ l 소적한 배양 접시로 옮겨 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간동안 배양한 후 난자가 있는 체외수정의 5시간 후 소적된 MWM (modified whitten medium) 배양액내에서 수정난들을 세척하였다.

### 2. 실험계획

세척한 수정난들은 대조군과 실험군으로 분류하여 SNP를 첨가하지 않은 MWM의 300 $\mu$ l를 소적한 배양액에서 배양한 수정난들을 대조군 (92개)과 실험군으로 분류하였고 실험군은 SNP를 25 $\mu$ M (84개), 50 $\mu$ M (80개), 100 $\mu$ M (77개), 500 $\mu$ M (54개)의 농도로 첨가한 MWM배양액에서 각각 배양하여 세포 분할, 세포막 분절, 세포의 퇴화 등을 관찰하여 비교분석하였다. 세포 퇴화는 세포막 분질이 25% 이상 나타났거나, 세포질이 과립현상 또는 검은색으로 변질된 경우로 판정하였다.

### 3. 통계처리

실험결과는 백분율의 중앙값을 구하여 표준편차로 가감하여 student t-test로 분석하여 p<0.05를 유의있는 신빙도로 판정하였다.

## 결 과

수정난들을 배양한 후 24시간에서 세포분할 상

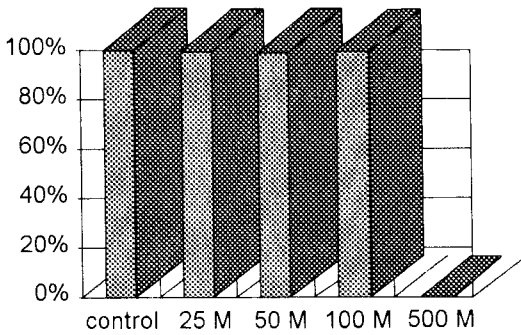


Fig. 1. The rates of 2~4 cell development at 24 hours after culture in various NO concentration.

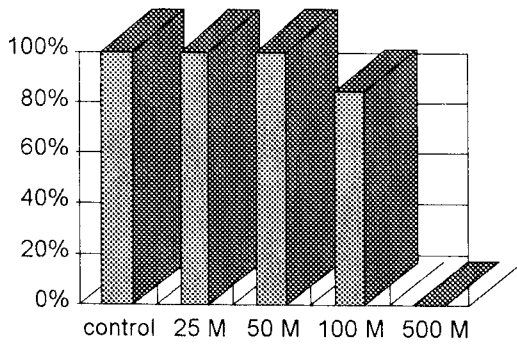


Fig. 2. The rates of development of cell cleavage to 8-morula at 48 and 72 hours on culture in various NO concentrations.

태를 관찰하였을 때 500 $\mu$ M의 NO 농도에서 배양한 실험군을 제외한 모든 실험군들과 대조군에서 전체 수정란들이 2~4 세포기에 도달하였다. 그리고 500 $\mu$ M의 NO 농도에서는 전체 수정란들이 세포괴사를 나타냈다 (그림 1).

수정란들을 계속 배양하여 48~72시간에서 8 세포기 또는 상실배기에 도달한 세포분할율은 500 $\mu$ M 실험군을 제외하고 모든 군에서 전 수정란들이 세포가 발달된 것을 관찰하였다 (그림 2).

또한 수정란을 배양하는 동안 2 세포기에서 상실배기에 도달한 배아세포의 형태를 관찰하였는 바 세포막 분절과 세포융합이 나타난 비율은 대조군에서 4.2 $\pm$ 3.4%이었고 실험군에서는 각각 25  $\mu$ M 일때 23.4 $\pm$ 6.2%, 50 $\mu$ M에서 28.2 $\pm$ 5.7%, 100  $\mu$ M에서 32.1 $\pm$ 6.4%였고 배아의 세포 퇴화는 대조군에서는 관찰되지 않았고 25 $\mu$ M에서 17.8 $\pm$ 6.7%, 50 $\mu$ M에서 23.6 $\pm$ 4.7%, 100 $\mu$ M에서 26.8 $\pm$ 11.2%로 각각 나타났다 (그림 3).

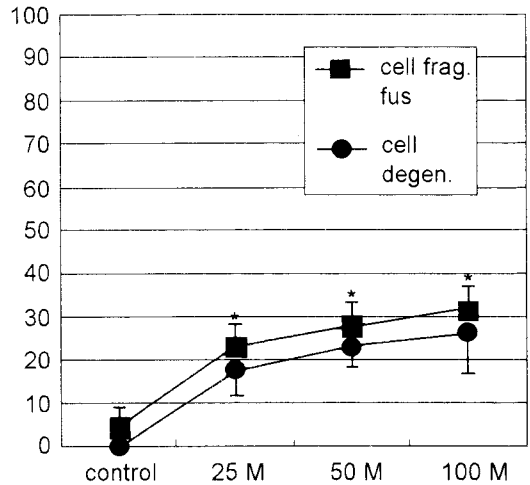


Fig. 3. The rates cell fragmentation, fusion and cell degeneration at 48 and 72 hours on culture to morula development in various NO concentrations Data are means  $\pm$  S.D. \*Significant difference at  $p > 0.05$ .

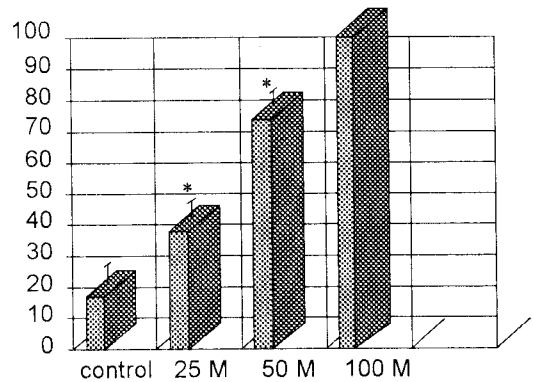


Fig. 4. The rates of cell degeneration at blastocyst development on culture in various NO concentrations Data are means  $\pm$  S.D. \*Significant difference at  $p < 0.05$ .

수정란들이 포배기 발달에 도달한 후 세포 퇴화를 일으킨 비율은 대조군에서는 16.8 $\pm$ 7.2%였고 25 $\mu$ M에서 37.5 $\pm$ 6.2%, 50 $\mu$ M에서 73.4 $\pm$ 4.6%, 100 $\mu$ M에서 0%로 나타났다 (그림 4).

## 고 찰

포유동물의 내상피세포와 뇌세포에서는 동형의 NO를 생성되며 반감기가 수초 정도로 매우 짧고 lipophilic 분자 구조를 나타내는 생물학적

물질로서 (Ignarro *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1996) nitric oxide synthase의 효소작용에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 신진대사 과정에서 생성된다. SNP는 세포 또는 세포막에서 신진대사 과정을 통해 화학적 분해를 일으키며 NO를 발생시키며 세포내의 SNP 농도와 NO의 생성량은 거의 비례한다 (Kowulak *et al.*, 1992)고 한다. 그러나 실제로 SNP가 세포내에서 NO를 발생시키는 기전은 확실히 밝혀지지 않았다. 또한 NO는 인간정자의 운동성을 활성화시키고 냉동정자를 해동시키는 과정에서 NO처리를 하는 경우 reactive oxygen species라는 독성 물질을 중화시켜 lipid peroxidation에 의한 세포막 손상으로부터 보호역할을 하여 정자의 생존력을 연장시킨다 (Helstrom *et al.*, 1994)고 한다. 또한 NO는 난소에 직접적으로 영향을 주어 난세포의 발달을 촉진시키며 실제로 난포액내의 NO 농도는 30~40 $\mu$ M 정도라고 한다 (Shuovski *et al.*, 1994; Kaneto *et al.*, 1995; Powers *et al.*, 1995). NO는 난포기 동안 그 농도가 증가하여 난포의 성장 또는 퇴화를 조절하는 역할을 하며 (Ulf *et al.*, 1996) 퇴화 난포의 세포는 DNA 분절이 나타나는데 이런 현상은 NO가 세포의 핵에서 DNA 분절을 일으켜 Apoptosis를 유도하는 것이라는 견해가 있다 (Hsueh *et al.*, 1994; Bonello *et al.*, 1996). 그러나 Chun 등 (Chun *et al.*, 1995)은 반대로 NO가 난포의 apoptosis를 억제하여 난포세포의 생존을 촉진시킨다고 보고하였다. 본 연구실험에서 NO는 배세포에 대해 독성작용을 나타내어 NO를 25 $\mu$ M의 저농도에서도 세포 분할과 세포 분절, 세포 융합의 형태 변화 등이 나타났으며 더우기 배아의 생존력은 향상되지 않았다. 또한 50 $\mu$ M 이상의 농도에서는 세포 분할의 정지와 할구 세포막의 분절의 비율이 증가하고 배세포의 퇴화를 일으킨다. 따라서 NO는 배세포에 대해 독성작용을 나타내며 농도가 높을수록 강력하게 독성작용을 나타낸다. 그리고 세포에 대한 NO의 역할은 아직 확실치 아니하며 아마도 세포의 유형에 따라 보호 또는 독성으로 작용을 할 수도 있다.

## 결 론

배아세포에 대한 NO의 영향을 관찰하기 위해 NO의 발생을 유도하는 SNP를 농도별로 처리한 배양액에서 생쥐의 수정난들을 배양한 결과 모든

농도의 NO는 배세포에 대해 세포 독성을 나타냈다. 그리고 저농도에서는 세포 분할과정에서 세포 분절과 융합 등 약한 독성작용을 나타냈으며 농도가 높을수록 강한 세포 독성작용이 있어서 높은 배세포 퇴화율을 관찰되었다.

## 인 용 문 헌

- Baratt CLR, Bolton AE, Cook LD: Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reprod* 1990, 5, 639-48.
- Buhimschi I, Yallampalli C, Dong IL and Garfield RE: Involvement of a nitric oxide cGMP pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obst Gynec* 1995, 172, 1577-1584.
- Bonello N, McKie K, Jasper M, et al: Inhibition of nitric oxide: effects on IL-1b enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* 1996, 54, 436-445.
- Ellman C, Corbett J, Misko T, et al: Nitric oxide mediates interleukin-1b induced cellular cytotoxicity in the rat ovary. *J Clin Invest* 1993, 92, 3053-2056.
- Chun S, Eisenhauer KM, Kubo M and Hsueh AJW: Interleukin-1 $\beta$  suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology* 1995, 136, 3120-3127.
- Helstrom WJG, Bells M, Wang R and Sikka S: Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fertil Steril* 1994, 61, 1117-1122.
- Hsueh AWJ, Billing H and Tsafirri A: Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocri Rev* 1994, 15, 707-724.
- Ignarro LJ, Gold ME and Buga GM: Basic polyamino acids rich in argine, lysine or ornithin cause both enhancement and refractoriness to formation of endothelium derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circul Rec* 1989, 64, 315-329.
- Izumi H, Yallampalli C and Garfield RE: Gestational changes in L-arginine induced relaxation of preg-

- nant rat and human myometrial smooth muscle. *Am J Obst Gynec* 1993, 169, 1327-1337.
- Kaneto H, Fujii J, Seo HG, et al: Apoptotic cell death triggered by nitric oxid in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 1995, 44, 733-738.
- Kowulak EA, Seth P, Fung HL: Metabolic activation of sodium nitroprusside in vascular smooth muscle. *J Parma Exp Ther* 1992, 262, 916-22.
- Lewis SEM, Donnelly ET and Sterling ESL, et al: Nitric oxide synthase and nitrite production by human sperm: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod* 1996, 2, 873-878.
- Marinella R, Raghvendra KD, Bruno I, Ervin M, Paul JK: Effect of nitric oxide on human spermatozoa; evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Human Reprod* 1995, 10, 1786-90.
- Moncada S, Palmer RMG and Higgs EA: Nitric Oxide; physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43, 109-142.
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, et al: DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89, 3030-3034.
- Nussler AK, Billiar TR: Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leucocyte Biol* 1993, 54, 171-8.
- Powers RW, Chen L, Russel PT and Larsen WJ: Gonadotropin stimulated regulation of blood follicle barrier is mediated by nitric oxide. *Am J Physiol* 1995, 269, E290-98.
- Sarih M, Souvannavong V and Adam A: Nitric oxide synthase induce macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 191, 503-508.
- Shukovski L and Tsafiriri A: The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 1994, 135, 2287-2290.
- Ulf Z, Masato M, Ann W, Dick D, Lars H and Mats B: Cell specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Human Reproduction* 1996, 11, 2667-2673.
- Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M and Garfield RE: An L-arginine-nitric oxide cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obst Gynec* 1994, 170, 175-185.