

배양액에 첨가하는 에너지원이 생쥐 배 발생 능력에 미치는 영향

박기상^{1,*} · 이현정² · 박성백³ · 김지철³ · 이택후¹ · 전상식¹

¹경북대학교병원 산부인과, ²대구파티마병원 산부인과, ³대구대학교 축산학과

Effects of Energy Substrates in Culture Media on Developmental Capacity of Mouse Embryos

Kee Sang Park^{1,*}, Hyun Jung Lee², Sung Baek Park³, Ji Chul Kim³,
Taek Hoo Lee¹ and Sang Sik Chun¹

¹Department of OB/GYN, Kyungpook National University Hospital, Daegu 700-721, Korea

²Department of OB/GYN, Daegu Fatima Hospital, Daegu 701-724, Korea

³Department of Animal Science, Daegu University, Gyungbuk 712-714, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to examine the effects of energy substrates in different concentration of carbohydrates in the human oviduct and uterus on the *in vitro* development of mouse 2-cell embryos. Two-cell embryos were collected from ICR female mice at 46~50 hr after 5 IU hCG injection, and cultured in three different media [Control: 0 mM, Group A: glucose (G) 0.5 mM + pyruvate (P) 0.32 mM + lactate (L) 10.5 mM, Group B: G 3.15 mM + P 0.1 mM + L 5.83 mM] for 72 hr. Rates of morula formation of group A (72.3%) and B (56.6%) were significantly higher ($p<0.05$) than that of control (34.9%) at 24 hr. However, blastocyst rate was significantly higher ($p<0.05$) in control (51.8%) than group A (39.8%) and B (28.9%) at 48 hr. At 72 hr, no differences were found in the number of zona-intact, zona-escape and total blastocysts among groups. Mean and ICM cell numbers were significantly higher ($p<0.05$) in group A (78.0, 13.4) and B (64.4, 11.8) than control (53.1, 5.7), respectively. The percent of ICM were significantly higher ($p<0.05$) in group A (22.9%) and B (23.7%) than control (14.2%). No differences were found in the TE cell numbers (34.1~45.1). The ICM:TE ratio was significantly higher ($p<0.05$) in control (1:6.0) than group A (1:3.4) and B (1:3.4). This study shows that energy substrates added to culture media especially, the oviductal level of carbohydrates increase the developmental capacity of 2-cell mouse embryos.

(Key words : Energy substrates, Mouse embryos, Blastocysts, Cell numbers)

요 약

본 연구는 인간 난관액 또는 자궁액 내에 존재하는 에너지원이 생쥐 2-세포기 배의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. ICR 암 생쥐에 5 IU hCG 주사 후 46~50시간에 2-세포기 배를 회수하였다. 회수된 배는 3가지 배양 조건 [대조군: 0 mM, Group A: glucose(G) 0.5 mM + pyruvate(P) 0.32 mM + lactate(L) 10.5 mM, Group B: G 3.15 mM + P 0.1 mM + L 5.83 mM]에서 72시간 배양하였다. 배양 24 시간에 상질배 출현율은 group A (72.3%)와 group B (56.6%)가 대조군(34.9%)보다 유의하게 높았다($p<0.05$). 그러나 48시간에 배반포기 배 출현율은 대조군(51.8%)이 group A (39.8%)와 group B (28.9%)보다 유의하게 ($p<0.05$) 높았다. 72시간에 투명대 부착 (ZiB, 41.0~51.8%), 투명대 탈출 (ZeB, 18.1~32.5%) 및 총 배반포기 배 출현율 (68.7~73.5%)은 실험군 간에 통계적인 차이가 없었다. 배반포기 배의 평균 세포수와 ICM 세포수는 group A (70.8, 13.4)와 group B (64.4, 11.8)가 대조군 (53.1, 5.7)보다 유의하게($p<0.05$) 많았고, 통계적인 유의차는 없었으나 group A가 group B보다 많은 경향이 있었다. 총 세포수에 대한 ICM 비율은 group A(22.9%)와 group B(23.7%)가 대조군(14.2%)보다 유의하게($p<0.05$) 높았다. 영양배엽(TE) 세포수(34.1~45.1)는 실험군 간에 통계적인 차이가 없었다. ICM에 대한 TE 비율(ICM:TE ratio)은 대조군(1:6.0)이 group A(1:3.4)나 group B(1:3.4)보다 유의하게($p<0.05$) 높았다. 생쥐 2-세포기 배를 배양하여 72시간까지의 배 발달을 살펴보면 배양액에 에너지원을 첨가하는 것이 효과적이며, 자궁액 농도보다는 난관액 농도로 에너지원을 조절했을 때 배 발생 능력이 높은 경향을 보였다.

* 이 연구는 2005년도 경북대학교병원 생명의학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

† Corresponding author : Phone: +82-53-420-5727, E-mail: keespark@yahoo.com

서 론

여러 가지 배양 방법에 따라 형성된 포유동물의 배반포기 배는 내부세포피(inner cell mass, ICM) 또는 영양배엽세포(trophoblast, TE)로 각기 분화된다. ICM은 태아로 발달하는 모든 조직으로 발달하고, TE는 장막이 되므로, 이들 두 가지 세포의 수와 형태는 체외 배양 체계를 판단할 수 있는 기준으로 사용되고 있는데(Iwasaki 등, 1990; 박 등, 2002; Park 등, 2004; 박 등, 2004) 이런 발생 능력 지표를 이용하여 착상울과 임신울에 직접적으로 영향을 미칠 수 있는 최적의 배반포기 배의 생산을 위한 배양 체계를 마련하기 위해 연구가 이루어지고 있으나 연구자마다 많은 이견을 보이고 있어 발생 능력이 우수한 배반포기 배의 확보에 많은 어려움이 있다.

포유동물의 수정란은 난관에서 자궁으로 이동하는 동안 생체 내 환경의 영향을 받게 되는데 대사를 위한 에너지원도 환경요인 중의 하나로, 배양액에 첨가하는 주요 에너지원으로는 glutamine, glucose, pyruvate 및 lactate 등이 있다(Rosenkrans 등, 1993; Barnett과 Bavister, 1996; Gardner와 Lane, 1997; 김 등, 2000; Park 등, 2004; 박 등, 2004; Herrick 등, 2006). 인간의 생식 기관에서 glucose, pyruvate 및 lactate와 같은 에너지원의 농도는 난관액(0.50 mM, 0.32 mM, 10.5 mM)과 자궁액(3.15 mM, 0.1 mM, 5.87 mM)에서 각기 다르게 나타난다(Gardner와 Lane, 1997). 난관액은 자궁액보다 glucose 농도가 낮고 pyruvate 및 lactate의 농도는 높은 반면 자궁은 난관보다 glucose 농도가 높고 pyruvate 및 lactate의 농도가 상대적으로 낮기 때문에, 배반포기가 되기 전의 초기배 발달에서 에너지의 이용성은 상대적인 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Rosenkrans 등, 1993). 한편, 이들 에너지원이 배 발달에 미치는 영향에 대한 연구가 많이 진행되었으나, 연구자나 실험 환경에 따라 각각 다르게 보고되고 있을 뿐만 아니라 배 발달의 단계에 따라 배양액에 첨가해야 하는 각 에너지원의 농도에 대한 자료가 제한되어 있다(김 등, 2000; Park 등, 2004; 박 등, 2004; Herrick 등, 2006). 따라서 체외에서 수정란의 배 발달을 유도할 때 각 발달 단계에 따른 에너지 요구량을 인위적으로 적절하게 공급하는 데에는 한계가 있다.

따라서 본 실험은 인간의 체외수정술에서 임신울을 향상시킬 수 있는 방법 중에서 발생 능력이 가장 우수한 배반포기 배아의 획득을 모색하기 위해, glutamine이 단독 에너지원으로 함유되어 있는 배양액에 인간 생식 기관(난관, 자궁) 내 에너지원인 glucose, pyruvate 및 lactate를 각각 다른 농도로 첨가하여 생쥐 2-세포기 배 발생 능력에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

공시 동물

본 연구에 사용된 생쥐는 국내에서 사육중인 ICR 계통 마우스로, 암컷은 생후 3~6주령, 수컷은 10~15주령인 것을 사용하였다. 생쥐는 온도와 명암이 조절되는 곳에서 실험에 사용될 때까지 사육되었으며, 명암의 주기는 14:

10시간으로 조절하였고, 사료와 물은 무제한으로 급여하였다.

배양액 및 염색 용액의 준비

실험용 배양액

난자의 배양은 glutamine을 단독 에너지원으로 함유하고 있는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium; 11966-025, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 20% 인간 난포액(hFF)을 첨가하여 사용하였다(대조군). 배양액에 glucose(G) 0.5 mM, pyruvate(P) 0.32 mM, lactate(L) 10.5 mM(난관액 농도, group A) 또는 G 3.15 mM, P 0.1 mM, L 5.83 mM(자궁액 농도, group B)을 각각 첨가하여 실험에 사용하였다.

모든 배양액은 0.0125 g/l의 streptomycin sulfate(S-9137, Sigma, St. Louis, MO, USA)와 0.01375 g/l의 penicillin-G(P-3032, Sigma)를 첨가한 다음 삼투압 측정기(Osmomat 030, Gonotec, Germany)를 이용하여 삼투압을 280 mOsm/kg으로 보정하고 나서, 0.2 µm 여과기(Millex-GV, Millipore, USA)로 제균하면서 14 ml tube(2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4°C 냉장고에서 보관하였다. 2-세포기 배를 배양할 때 배양액은 37°C와 5% CO₂를 유지하고 있는 배양기(BB 6620, Heraeus, Germany)에서 6시간 이상 평형시킨 다음 사용하였다.

형광 염색 용액

배양 72시간에 배반포기 배의 형광 염색은 염색액 1과 2로 실시하였다.

(1) 염색액 1

Ham's F-10(11550-043, Gibco) (BSA free) + Triton X-100(T-9254, Sigma) + 100 µg/ml propidium iodide (PI, P-4170, Sigma).

(2) 염색액 2

EtOH(Absolute Ethanol, Duksan, Korea) + 25 µg/ml bisbenzimidazole(B-2883, Sigma).

2-세포기 배의 배양 및 관찰

과배란을 유도하기 위해 PMSG(G-4877, Sigma)와 hCG(CG-10, Sigma)를 각각 5 IU씩 48시간 간격으로 복강 주사하고 암컷과 수컷을 합사시킨 다음, 12시간 후에 질전이 확인된 암컷만 실험에 이용하였다. hCG 주사 후 약 48시간째에 경추탈골법으로 생쥐를 희생시킨 다음 난관을 적출하여 실체현미경 하의 배양 접시(3037, Falcon, USA)에서 난관을 관류하여 2-세포기 배를 회수하였다. 회수한 2-세포기 배중에서 형태적으로 정상적인 것만을 선별하여 실험에 이용하였다 (Fig. 1A).

회수된 2-세포기 배는 각각의 실험용 배양액 50 µl 소액에 mineral oil (M-8410, Sigma)을 덮은 배양 접시(3002, Falcon)에 10개 내외의 배를 배양하였다. 모든 실험군은 72시간 동안 배양하면서 배양 48시간째에 동일한 배양액을 1/2씩 교체하였고 24시간 간격으로 배 발달 양상을 조사하였다. 배 발달은 상실배기 배(morula), 배반포기

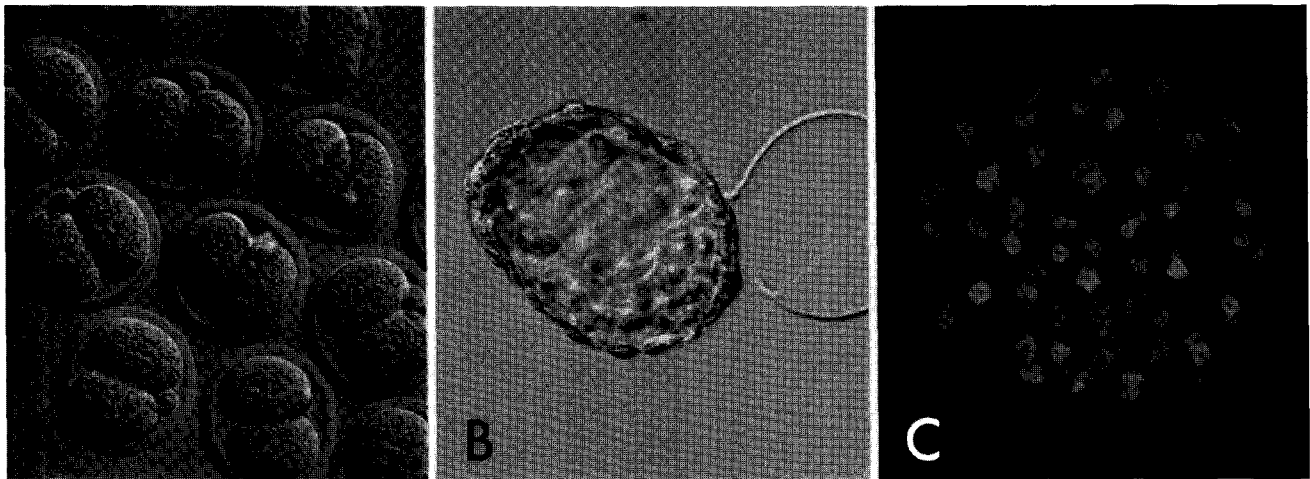


Fig. 1. Specific features of the developing mouse embryos and differentially stained blastocyst. (A) Retrieved 2-cell embryos. (B) Completely hatched blastocyst from zona pellucida. (C) Differentially stained blastocyst. Note that the intense pink color represents the chromatin in nuclei of lysed trophectoderm cells. The blue color represents the inner cell mass.

배(blastocyst), 투명대 부착 배반포기 배(zona-intact blastocyst, ZiB) 및 투명대 탈출 배반포기 배(hatching-hatched blastocyst, zona-escape blastocyst, ZeB, Fig. 1B) 등으로 나누어 관찰, 기록한 다음, 배양 72시간에 형광 염색법을 이용하여 배반포기 배에서 총 세포 수 및 ICM/TE 세포수를 조사하였다.

배반포기 배의 형광 염색

각각의 배양액에서 형성된 배반포기 배는 이중 형광 염색법(박 등, 2002)으로 ICM과 TE를 염색하여 관찰하였다. 염색법을 간단하게 설명하면, 배반포기 배를 실온에서 염색액 1에서 15초 이내로 노출하고 나서 즉시 염색액 2로 옮긴 다음 4°C에서 1.5시간 이상 방치하여 염색을 유도하였다. 염색이 완료된 배반포기 배는 glycerol (G-2025, Sigma)에서 과다한 양의 염색액을 제거하고 나서 slide glass로 옮겨 놓고 cover glass로 덮은 다음, 형광 현미경(BX50, Olympus, Japan)에 부착된 형광 여파기에 자외선(UV)을 통과시켜 청색으로 나타나는 것은 ICM, 분홍색으로 나타나는 것은 TE로 관찰하였다(Fig. 1C).

통계 분석

생쥐 배의 체외 발달에 대한 실험 결과는 백분율로 나타내었고, 불연속 변수에 대한 표준 편차는 \pm SD로 표시하였다. 배양 시기에 따라 각 처리군 간 평균에 대한 유의성은 Sigma plot 2001(v7.0)과 SAS package program (v8.0)을 이용하여 Student's *t*-test와 Chi-square 검정을 병용 실시하여 분석하였고, 5% 내($p < 0.05$)일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

시간의 경과에 따른 배 발달율과 배반포기 배의 세포 수 배양액에 첨가한 에너지원이 생쥐 배 발달에 미치는 영

향을 조사하기 위하여 7회 실험에 249개의 2-세포기 배를 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 조사한 결과는 Table 1에 제시하였다. 배양 24시간에 상실배 출현율은 에너지 첨가군인 group A(72.3 \pm 27.0%)와 group B(56.6 \pm 14.6%)가 대조군(34.9 \pm 19.3%)보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 배양 48시간에 배반포기 배 출현율은 대조군(51.8 \pm 16.1%)이 에너지 첨가군인 group A(39.8 \pm 26.8%)와 group B(28.9 \pm 21.8%)보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 배양 72시간에 ZiB(41.0 \pm 30.1~51.8 \pm 34.4%), ZeB(18.1 \pm 14.6~32.5 \pm 30.0%) 및 총 배반포기 배 출현율(68.7 \pm 14.3~73.5 \pm 21.9%)은 실험군 간에 통계적인 차이가 없었다. 176개의 배반포기 배(대조군: 58; group A: 61; group B: 57)에서 총 세포 수(대조군: 3,079; group A: 4,620; group B: 3,673)를 관찰하였다. 평균 세포수는 group A(70.8 \pm 30.7)와 group B(64.4 \pm 31.3)가 대조군(53.1 \pm 21.1)보다 유의하게 많았고($p < 0.05$), 통계적인 차이는 없었으나 group A가 group B보다 많은 경향을 보였다.

배반포기 배의 세포수에서 ICM과 TE 세포의 비율

3회 실험에서 105개의 2-세포기 배를 72시간 배양한 다음 나타난 배반포기 배에서 ICM/TE 세포 수, %ICM 및 ICM:TE 비율을 조사하여 Table 2에 제시하였다. 57개의 배반포기 배(대조군: 17; group A: 20; group B: 20) 중에서 55개(대조군: 15; group A: 20; group B: 20)가 이중 형광 염색에 성공하여, ICM, TE 및 총 세포수를 대조군(85, 512, 597), group A(267, 901, 1,168) 및 group B(235, 761, 996)에서 각각 조사하였다.

ICM 세포수와 %ICM은 에너지 첨가군인 group A(13.4 \pm 4.4, 22.9 \pm 15.1%)와 group B(11.8 \pm 6.3, 23.7 \pm 13.7%)가 대조군(5.7 \pm 3.8, 14.2 \pm 11.0%)보다 유의하게 높았고($p < 0.05$), 통계적인 차이는 없었으나 group A가 group B보다 높은 경향이 있었다. TE 세포 수(34.1 \pm 21.2~45.1 \pm 29.2)는 실험군 간에 통계적인 차이가 없었다. ICM : TE ratio는 대조군(1:6.0 \pm 4.4)이 에너지 첨가군인 group A(1:3.4 \pm 3.3)나 group B(1:3.4 \pm 2.3)보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

Table 1. Effects of energy substrates on blastocyst formation and their cell numbers of mouse 2-cell embryos at 24, 48 and 72 hrs after *in vitro* culture*

	Groups			P-value		
	Control	A	B	1	2	3
No of examinations	7	7	7	-	-	-
No of 2-cell embryos cultured	83	83	83	-	-	-
No of morula after 24 hr cultured (%)	29(34.9±19.3)	60(72.3±27.0)	47(56.6±14.6)	<0.05	<0.05	NS
No. of blastocysts after 48 hr cultured (%)	43(51.8±16.1)	33(39.8±26.8)	24(28.9±21.8)	<0.05	<0.05	NS
No. of blastocysts after 72 hr cultured (%)	58(69.9±24.9)	61(73.5±21.9)	57(68.7±14.3)	NS	NS	NS
Zona-intact	43(51.8±34.4)	34(41.0±30.1)	37(44.6±16.2)	NS	NS	NS
Zona-escape	15(18.1±14.6)	27(32.5±30.0)	20(24.1±16.1)	NS	NS	NS
No. of blastocysts stained	58	61	57	-	-	-
Total cell no.	3,079	4,620	3,673	-	-	-
Mean cell no.	53.1±21.1	70.8±30.7	64.4±31.3	<0.05	<0.05	NS

* Groups: Control, 0 mM; A, glucose(G) 0.5 mM + pyruvate(P) 0.32 mM + lactate(L) 10.5 mM; B, G 3.15 mM + P 0.1 mM + L 5.83 mM. Values are means±standard deviation.

P-value: 1, control vs. group A; 2, control vs. group B; 3, group A vs. B. NS, not significant.

Table 2. Effects of energy substrates on the cell numbers of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) of mouse blastocysts differentially stained after 72 hr cultured*

	Groups			P-value		
	Control	A	B	1	2	3
No of examinations	3	3	3	-	-	-
No of 2-cell embryos cultured	35	35	35	-	-	-
No. of blastocysts after 72 hr cultured	17	20	20	-	-	-
No. of blastocysts differentially stained	15	20	20	-	-	-
Total No. of cells	597	1,168	996	-	-	-
ICM	85	267	235	-	-	-
TE	512	901	761	-	-	-
Mean No. of cells	-	-	-	-	-	-
ICM	5.7±3.8	13.4±4.4	11.8±6.3	<0.05	<0.05	NS
TE	34.1±21.2	45.1±29.2	38.1±21.7	NS	NS	NS
% ICM per total cells	14.2±11.0	22.9±15.1	23.7±13.7	<0.05	<0.05	NS
ICM:TE ratio	1:6.0±4.4	1:3.4±3.3	1:3.4±2.3	<0.05	<0.05	NS

* Groups: Control, 0 mM; A, glucose(G) 0.5 mM + pyruvate(P) 0.32 mM + lactate(L) 10.5 mM; B, G 3.15 mM + P 0.1 mM + L 5.83 mM. Values are means±standard deviation.

P-value: 1, control vs. group A; 2, control vs. group B; 3, group A vs. B. NS: not significant.

고 찰

에너지원과 생쥐 2-세포기 배의 발달 양상과의 상관관계를 밝히고자 에너지원을 첨가 또는 제거하는 방법에 따른 결과가 다양하게 보고되었다(김 등, 2000; Park 등,

2004; 박 등, 2004). 배양 96시간에 부화 배반포기 배 발생률이 glucose(0.5 mM: 82.3%; 3.15 mM: 78.5%)를 첨가하였을 때 가장 우수하였고 특히 저 농도(난관액 농도, 0.5 mM)에서 가장 좋았다. 반면, pyruvate(0.1 mM: 34.1%; 0.32 mM: 34.1%)나 lactate(5.87 mM: 25.9%; 10.5 mM: 33.3%) 첨가군에서는 대조군(63.2%)보다 낮았다(김 등, 2000). Glucose의 단독 효과를 분석하기 위해 몇 가지 실험을 수행한 바가 있는데, 생쥐 2-세포기 배의 배양 72시간에 배반포 형성율은 통계적인 유의차는 없었으나 대조군(60.9%)이 glucose 첨가군(47.8~52.2%)보다 높게 나타났지만, 평균 세포수는 glucose 첨가군(45.6~50.5)이 대조군(39.2)보다 높게 나타나는 경향이었고 % ICM은 glucose 0.5 mM 첨가군(20.6%)이 대조군(15.2%)이나 glucose 3.15 mM 첨가군(13.9%)보다 높게 나타났다(박 등, 2004). 한편 glucose의 첨가시기를 24~72시간, 24~48시간, 48~72시간, 0~72시간, 0~48시간, 0~24 및 48~72시간(24~48시간 제거) 또는 0~24시간으로 나누어 조사하였을 때, 첨가 또는 제거시기에 따라 배반포기 배 형성율은 차이가 나지 않는 반면, ICM 세포수는 24~48시간 제거군(13.49)이 다른 군(10.44~12.80)보다 많았고 %ICM은 0~72시간 첨가군(23.03%)이 다른 군(16.9~22.42%)보다 높게 나타나서(Park 등, 2004), 본 연구에서 실시한 혼합 에너지원의 첨가에 있어서도 첨가 또는 제거시기에 따라 배 발생 능력에 영향을 미칠 수 있음을 시사하였다. Conaghan 등(1993)은 pyruvate를 0 mM, 0.23 mM 또는 0.47 mM의 농도로 조절된 배양액에서 인간 2-세포기 배아를 배반포기까지 배양하였을 때, 각각 16%, 33% 및 48%로 첨가 농도가 증가할수록 배반포기 배의 출현율이 높았으나 배반포기 배아의 세포수에는 영향을 미치지 않는다고 하였고, glucose의 농도를 0 mM, 0.5 mM 또는 1 mM로 조절하였을 때 배반포기 배아 형성율은 차이가 없었으나 세포수에서는 대조군(99.1±13.5)보다 1 mM(58.4±8.2)에서 현저히 적었는데, 이 차이는 ICM 세포 수(33.0±6.8 vs. 21.2±2.8)의 차이에 의해서가 아니라 TE 세포 수(66.1±7.7 vs. 37.2±7.1)의 차이 때문이라고 하였다. 이들의 결과를 요약하면, 체외 배양에서는 0.47 mM의 pyruvate는 계속 첨가하고 상실배기 이후에는 1 mM의 glucose를 같이 첨가하는 것이 배반포기 배아의 발생률을 높이고 각각의 배반포기 배아에서는 세포수가 증가한다고 하였다. 그러나 이들의 실험에서는 10% maternal serum과 5.55 mM의 glucose를 첨가한 EBSS에 인간 난자를 2~4-세포기까지 배양하여 2일째 이식을 하고 남은 여분의 난자를 배양하였으므로 난자가 고농도의 glucose에 노출되어 받은 영향에 대해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 점이다.

Barnett와 Bavister(1996)는 1 mM의 glutamine과 0.1~0.25 mM의 pyruvate가 들어 있는 HECM 배양액에 glucose/inorganic phosphate(Glu/Pi, 5 mM/0.35 mM)의 첨가 유무에 따라 햄스터 2-세포기 배를 배반포기까지 배양할 때, 무첨가군은 75%였고 첨가군이 36%로 무첨가군이 첨가군보다 유의하게 높아서 Glu/Pi가 배아의 발달에 저해작용을 한다고 하였다. 이와 같은 저해 작용은 Glu/Pi action에 의한 glycolysis 때문에 일어나는데, 과도한 glycolysis가 일어나면 cytosolic metabolism과 mitochondrial metabolism 사이의 균형을 잡기 위해서 oxidative phosphorylation이 일어나게 되어 배 발달에 유해한 역할

(Crabtree effect)을 하게 되는 것으로 알려져 있다(Crabtree, 1929). Seshagiri와 Bavister(1989)는 햄스터 8-세포기 배는 에너지를 생산하는데 있어서 glycolysis를 이용하지 못하는 "Crabtree effect"가 있기 때문이라고 하였다. 이와 같은 "Crabtree effect" 작용으로 여러 가지 에너지원이나 단백질원의 oxidative potential이 줄어들게 되므로 결과적으로 배 발달이 억제된다고 하여(Seshagiri와 Bavister, 1989; Barnett와 Bavister, 1996) 본 연구 결과와는 상반된 결과를 나타내었다.

배양액에 glucose는 없이 glutamine과 EDTA를 첨가하여 생쥐에서 2-cell block을 극복했지만, 배반포기 배의 형성율을 높이기 위해서는 4-세포기와 상실배 사이에 glucose의 첨가가 필요하다는 보고도 있다(Chatot 등, 1989). Conaghan 등(1993)은 glucose가 인간 난자에서 1-세포기와 3-세포기 기간인 처음 48시간 동안 배 발달에 유해한 영향을 미치고, 4~5일에는 glucose-free 배양액에서 pyruvate uptake가 급격히 증가하는 것은 상실배에서 배반포로 전환하는데 pyruvate를 필요로 하고, 최종 배양 기간(5~6일 쯤)에 glucose uptake가 급격히 높아진 것은 배반포기에서는 glucose의 영향을 받지 때문일 것이라고 하였다. Glucose-free medium을 사용할 경우, 생쥐에서 배반포기 배의 부화가 늦어지고, 사람에서도 같은 문제점을 내포하고 있을 것으로 생각된다(Conaghan 등, 1993). 본 실험에서도 배양액에 glucose를 포함한 에너지원을 혼합하였을 때, 생쥐 2-세포기 배에서 배반포기까지의 발달율에서는 대조군과 크게 차이가 나지 않다가 배반포기 배의 평균 세포수와 ICM 세포 수 및 %ICM이 에너지원 첨가군에서 높아서, 후기 배 발달에 에너지원이 매우 큰 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

Wale와 Whittingham(1973)은 생쥐 2-세포기 배 발달을 지지하는 최적의 조건은 pyruvate와 lactate의 농도가 각각 0.3~0.4 mM과 4.0 mM이라고 하였다. Seshagiri와 Bavister(1989)는 햄스터 배를 pyruvate가 단일 에너지원으로 첨가된 배양액에서 배양하면 배반포기 배 형성율을 증가시킬 수 있다고 하였고, Brown와 Whittingham(1991)은 생쥐 배에서 상실배 단계까지의 발달을 향상시킨다고 하였다. 배양액에 단독 에너지원으로 함유되어 있는 glutamine은 생쥐(Chatot 등, 1989; Gardner와 Leese, 1990), 햄스터(Schini와 Bavister, 1988)의 세포발생증지현상을 극복하는데 도움을 준다고 하였는데, glutamine은 glutamine transaminase를 통하여 2-oxoglutarate로 변환된 후 에너지를 생산하며, 생쥐 배는 대사 에너지로 glutamine을 이용한다(Nasr-Esfahani 등, 1992). 본 연구 결과에서 에너지를 별도로 첨가하지 않은 대조군에서 사용된 배양액은 glutamine이 기본적으로 포함되어 있는데, 생쥐 2-세포기 배가 배반포기까지 발달하는데 이 에너지를 사용할 것으로 판단된다. 그러나 에너지원 무첨가군인 대조군보다 에너지원 첨가군에서 배 발생 능력의 향상이 뚜렷하게 관찰되는 것으로 미루어 보아, 배양액에 기본적으로 포함되어 있는 glutamine에 의한 간접 효과가 없거나 있더라도 매우 미미한 것으로 사료된다. 본 연구에서 배양액에 기본적으로 포함되어 있는 glutamine 농도(3.15 mM)는 다른 연구에서 사용된 농도(0.2 mM; 0.7 mM; 1 mM)(Gardner와 Leese, 1990; Krisher와 Bavister, 1998)보다 다소 높은 농도가 사용되었으며, 체외 배양에 사용할 배는 1-세포기 배가 아니라 2-세포기 배였다. 또한 ICR

계통의 생쥐를 PMSG-hCG 주사 후 48시간에 난관팽대부로부터 회수한 2-세포기 배를 배양에 사용하였는데, 이 시기에는 세포분열중지현상이 체내에서 극복된 상태이기 때문에 '2 cell-block'을 극복할 수 있는지의 여부는 조사하지 않았다. 한편, Herrick 등(2006)은 염소에서 큰 난포액(large antral follicular fluid) 내 glucose, pyruvate 및 lactate의 농도는 평균 1.4 mM, 0.002 mM 및 7.09 mM이었으며, 난자의 체외 성숙 배양액에 첨가하는 glucose (3.0~12.0 mM)와 lactate (0.75~3.0 mM)에서 각각의 첨가 농도 및 이들의 교차 첨가에 따라 배 발달에 영향을 주지 않는다고 하였다.

배 발생 능력의 지표로는 배반포기까지의 발달 속도(Iwasaki 등, 1994), 배반포기 배에서 ICM의 크기와 모양(Richter 등, 2001) 또는 세포수와 ICM의 비율(박 등, 2002; Park 등, 2004; 박 등, 2004) 등이 사용되고 있다. Iwasaki 등 (1994)은 돼지 배반포기 배를 -196°C에서 동결할 때 팽창 단계에 있는 것보다는 부화가 완료된 것에서 ICM 손상이 낮아서 이들의 생존율이 더 높아서 발달 단계가 높을수록 동결에 대한 저항도를 높일 수 있는데, 이는 배반포기까지의 배 발달 속도가 빠르면 TE에 대한 ICM의 비율이 높아 체외 수정란 유래 배반포기 배의 질을 결정하는 기준이 될 수 있다고 하였다. 그러나 Richter 등(2001)은 인간 배반포기 배아 이식에서, 사용한 배양액의 종류(IVC-1/IVC-3 또는 P-1/Blastocyst medium)나 난자의 공급원(공여 난자 또는 환자 자신의 난자)에 따라 착상율에 차이가 없는 반면, 배반포기 배아에서 최적의 ICM 크기(>4,500 μm^2 : 55%; <4,500 μm^2 : 31%)나 구형에 가까운 모양(완전한 구형: 7%; 구형에 가까운 모양: 58%; 다소 긴 모양: 33%)일 때 착상율이 좋았고, 이들이 조합된 경우에는(ICM 크기, >4,500 μm^2 + 구형에 가까운 모양) 착상율(71%)이 가장 높게 나타나므로 배아의 발생 능력이 ICM의 크기뿐만 아니라 모양에 따라서도 크게 좌우된다고 하여 세포수와는 상관관계에 있지 않음을 시사하기도 하였다. Mishira와 Seshagiri(1998)는 햄스터 8-세포기 배를 체외에서 배양하여 배반포기 배를 유도하였을 때 % ICM은 26.6~28.4%, ICM:TE ratio는 1:2.6~2.7이었고, 체내 배양하여 나타난 부화가 완료된 배반포기 배에서 %ICM은 36.5%, ICM:TE ratio는 1:1.9로 나타난다고 하였고, Iwasaki 등(1990)은 소 난자를 가토 난관에서 배양할 경우에 배반포기 배의 총 세포수와 ICM 비중이 증가하므로 난자의 배양 조건이 배 발생 능력에 많은 영향을 준다고 하여, 생식 기관과 같은 조건의 배양 환경은 아직 더 많은 연구가 필요하다고 하였다(Iwasaki 등, 1990; 1994; Mishira와 Seshagiri, 1998; 김 등, 2000; Park 등, 2004; 박 등, 2004).

결론적으로, 생쥐 2-세포기 배를 인간 난관액 내 농도로 조절된 에너지원(glucose 0.5 mM, pyruvate 0.32 mM, lactate 10.5 mM; group A)이 첨가된 배양액에서 배양하면 발생 능력을 높이는 데 도움이 될 것이다. 이 연구의 결과들은 앞으로 인간 배아의 체외 배양 조건을 향상시키는 데 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 인간의 생식 기관액 내에 함유되어 있는 서로 다른 종류와 농도의 에너지원 간 상호 작용 및 최적의 첨가 또는 제거 시기가 생쥐와 사람 배아의 체외 발달에 미치는 효과에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것이다.

인용문헌

1. Barnett DK, Bavister BD (1996): Inhibitory effect of glucose and phosphate on the second cleavage division of hamster embryos: is it linked to metabolism? *Hum Reprod* 11:177-183.
2. Brown JJC, Whittingham DG (1991): The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F₁ hybrid mice *in vitro*. *Development* 112:99-105.
3. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I (1989): An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fert* 86:679-688.
4. Conaghan J, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ (1993): Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro*. *J Reprod Fert* 99:87-95.
5. Crabtree HG (1929): Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. *Biochem J* 23:536-545.
6. Gardner DK, Lane M (1997): Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 3:367-382.
7. Gardner DK, Leese HJ (1990): Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J Reprod Fert* 88:361-368.
8. Herrick JR, Lane M, Gardner DK, Behboodi E, Memili E, Blash S (2006): Metabolism, protein content, and *in vitro* embryonic development of goat cumulus-oocyte complexes matured with physiological concentrations of glucose and L-lactate. *Mol Reprod Dev* 73:256-266.
9. Iwasaki S, Mizuno J, Kobayashi K, Yoshikane Y, Hayashi T (1994): Changes in morphology and cell number of inner cell mass of porcine blastocysts during freezing. *Theriogenology* 42:841-848.
10. Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T (1990): Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fert* 90:279-284.
11. Krisher RL, Bavister BD (1998): Development of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49:103-114.
12. Mishira A, Seshagiri PB (1998): Successful development *in vitro* of hamster 8-cell embryos to 'zona-escape' and attached blastocysts: assessment of quality and trophoblast outgrowth. *Reprod Fert Dev* 10:413-420.
13. Nasr-Esfahani MH, Winston NJ, Johnson MH (1992): Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryos *in vitro*. *J Reprod Fert* 96:219-231.

14. Park SB, Park KS, Lee TH, Chun SS, Kim KS, Song HB (2004): Effects of various addition and exclusion time of glucose on development of mouse two-cell embryos. *Reprod Dev Biol* 28:227-233.
15. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS (2001): Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 76:1157-1167.
16. Rosenkrans CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL (1993): Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 49:459-462.
17. Schini SA, Bavister BD (1988): Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod* 39:1183-1192.
18. Seshagiri PB, Bavister BD (1989): Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos *in vitro*. *Biol Reprod* 40: 607-614.
19. Wales RG, Whittingham DG (1973): The metabolism of specifically labelled lactate and pyruvate by two-cell mouse embryos. *J Reprod Fertil* 33:207-222.
20. 김주환, 박기상, 이택후, 전상식, 송해범 (2000): Glutamine 함유 배양액에 첨가한 에너지원이 마우스의 배 발달에 미치는 영향. *대한불임학회지* 27:1-7.
21. 박기상, 이택후, 전상식, 송해범 (2002): 마우스에서 배반포 배의 differential staining에서 propidium iodide와 bisbenzimidazole의 노출이 미치는 영향. *대한불임학회지* 29:317-322.
22. 박성백, 김지철, 박기상, 이택후, 전상식, 송해범 (2004): 생쥐 배의 배반포 형성과 세포수에 미치는 glucose의 영향. *대한산부인과학회지* 47:663-669.
(접수일자: 2007. 2. 15 / 채택일자: 2007. 3. 5)