

## Concanavalin A와 PGE<sub>2</sub>의 순차적 노출에 의한 포배의 분화 조절

전 용 필

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

### Regulation of Blastocyst Differentiation by the Serial Exposure of Concanavalin A and PGE<sub>2</sub>

Yong Pil Cheon

*Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea*

**ABSTRACT** : Differentiation of blastocyst is critical step for implantation and is under the control of regulation factors originated from embryo or reproductive tracts. The sequential communication with those factors is suspected as critical events for differentiation. It has been suggested that intracellular signaling pathways activated by calcium is essential in differentiation of blastocyst. Previously, it was known that concanavalin A (Con A) increase the levels of free calcium in blastocyst stage. However, Con A can not accelerate the hatching, although heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF), a modulator of calcium level, accelerate the hatching of blastocyst. In this study, it was investigated whether Con A or prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) can modulate the differentiation of blastocyst. Con A accelerated the expansion of blastocyst in both 1 hr pulse treatment group and continuous treatment group. However, Con A significantly suppressed the hatching in both groups. The inhibition was significantly strong in continuous treatment group compared with 1 hr pulse treatment group. On the other hand, PGE<sub>2</sub> induced the increase the free calcium level, but did not accelerate the expansion. In addition 10  $\mu$ m PGE<sub>2</sub> inhibited hatching. However, PGE<sub>2</sub> could accelerate hatching in Con A pretreated blastocyst. PGE<sub>2</sub> also caused the increase of free calcium level in Con A pretreated blastocyst. From these results, it is suggested that changes of the free calcium level induce a different calcium-mediated signaling pathways. In addition, sequential stimulation by signal molecules may triggers the cellular mechanisms for the differentiation of blastocyst.

**Key words** : Free calcium ion, Concanavalin A, PGE<sub>2</sub>, Hatching.

요 약 : 포배의 분화는 배아의 착상에 있어 핵심적인 단계로 배아 자체 또는 생식수관에서 유래하는 조절요인의 조절을 받는다. 이들 조절요인과 포배와의 순차적인 신호의 주고 받음은 분화의 중요한 단계로 인식되고 있다. 한편, 포배기 때 자유 칼슘을 통한 신호전달경로가 포배의 분화에 중요한 축의 하나로 제안되어 왔다. Concanavalin A(Con A)가 포배의 자유 칼슘 농도 증감을 유도한다는 것을 밝혀졌으나, 포배 내 자유 칼슘 농도를 변형시켜 부화와 그 이후의 발생을 촉진하는 것으로 알려진 heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor(HB-EGF)와는 달리 팽창 이후의 부화를 억제하였다. 따라서 본 연구에서는 착상과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)가 포배의 분화에 관여하는지를 Con A와 연계하여 알아보았다. Con A는 그 처리 시간에 관계없이 1시간 처리군 그리고 계속처리군에서 팽창은 촉진하고 부화는 유의하게 억제하였다. 특히 계속처리군에서 부화율이 1시간 처리군에 비하여 유의하게 감소하였다. 또한, PGE<sub>2</sub>도 포배 내 자유 칼슘 농도를 증가시켰으나 팽창과 부화를 촉진하지 않았다. 또한, 10  $\mu$ m PGE<sub>2</sub> 농도에서는 부화가 억제되는 경향을 보였다. 그러나 흥미롭게도 PGE<sub>2</sub>는 Con A가 처리된 포배의 부화를 촉진하였다. Con A를 전처리한 포배에 PGE<sub>2</sub>를 처리할 경우 포배 내 자유 칼슘의 농도 증감이 진행됨을 공촛점현미경을 이용하여 분석할 수 있었다. 이러한 결과는 신호물질에 의해 유도된 자유 칼슘 농도의 증감이 신호물질에 따른 각기 다른 칼슘 매개로 활성화되는

신호경로를 조절하는 것을 추정할 수 있다. 또한, 순차적 신호물질 조절에 의한 자유 칼슘의 농도 증감이 포배의 분화에 있어 중요함을 제안한다.

† 교신저자: 서울특별시 성북구 동선동 3가 249-1, 성신여자대학교 자연과학대학 생물학과, (우) 136-742, (전) +82-2-920-7639, (팩) +82-2-920-2093, E-mail: ypcheon@sungshin.ac.kr

## 서 론

착상전 영양배엽의 분화는 새로운 유전자의 발현이 관찰되는 포배의 팽창과 함께 진행되며, 이러한 과정을 통하여 순차적으로 착상을 준비하도록 한다(Wang et al., 2004). 이러한 포배 내에서의 새로운 유전자 발현은 배아 자체에 의한 조절뿐만이 아니라 자궁에서 유래한 성장인자나 integrin-결합 물질을 매개로 조절됨이 밝혀지고 있다. 최근에 concanavalin A (Con A)가 포배의 세포내 칼슘 농도를 변형시킬 수 있고 포배가 팽창하는 것을 촉진하는 것을 밝혔다. 그러나 투명대를 벗고 나오는 부화를 억제하여 부화율이 유의하고 현격하게 감소되는 것을 확인하였다(Cheon, 2005). 다른 한편으로 ionophore A23187을 Con A가 전처리된 포배에 처리한 경우 부화율이 Con A를 단독 처리한 경우에 비하여 유의하게 증가하였고, 그 비율이 대조군과 유사하게 됨을 밝혔다. 이를 바탕으로 포배 내 칼슘량의 변화 유도가 포배의 팽창과 부화를 조절하는 주된 요인 중의 하나임을 알 수 있었다(Cheon, 2005).

포배강의 형성과 변화는 착상을 할 수 있도록 포배의 발생을 유도하기 때문에 이와 관련된 분화에 대한 연구는 많은 측면에서 접근되어 왔다. 특히 포배강의 형성과 팽창 그리고 영양배엽의 세포수준에서의 구조나 구성의 변화 등이 한 분야를 이루고 있으며, 활발한 연구가 진행되고 있다. 포배강의 형성과 팽창 기작은 영양배엽세포 내 기저면과 측면에 극성을 갖고 위치하고 있는 sodium pump( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), 그리고 포배기 전후 small GTP-binding protein RhoA의 하부 작용기(effector)인 Rho-kinase,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger-3에 의해 진행된다(Kawagishi et al., 2004a, b; Khidhir et al., 1995; Eckert et al., 2004; Houghton et al., 2003; Kidder & Watson, 2005). 한편,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase가 주된 작용기작으로 알려져 왔으나, 특히 억제제인 ouabain을 이용한 실험에서 포배 내 포배강의 형성과 팽창이  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase의 활성화에 전적으로 의존적이지 않다는 것이 밝혀졌다(Cheon, 2005).

이러한 과정을 통한 포배의 팽창과 더불어 이후 관찰되는 부화는 포배의 직접적 자궁내막 접촉을 가능하게 함으로써 착상을 시작하게 한다. 부화 기작으로는 삼투물 농도 차이 형성을 통한 포배강 내의 팽압에 의한 투명대에 미치는 물리적인 압력, 영양배엽과 자궁내막에서 분비되는 단백질 분해 효소의 용해 작용(Cole, 1967; Gordon & Dapunt, 1993;

O'Sullivan et al., 2001), 포배의 영양배엽 내 actin filament를 매개로한 세포 이동(Cheon et al., 1999)이 알려져 있다. 즉, 팽창 이후 파열된 투명대 부위로 배아가 빠져 나오며, 이 과정에서 actin filament의 중합과 해체를 통한 세포이동과 지속적인 포배강의 팽압의 변화를 매개로 하여 부화한다(Cole, 1967; Cheon et al., 1999; Niimura, 2003). 그러나 아직 포배에서의 포배강 형성과 팽창 그리고 부화의 기작과 조절에 대한 전반적 이해가 부족하다.

포배형성 이후 포배의 분화는 여러 세포내 신호전달 과정을 통한 세포 활성화로 진행될 것으로 추정된다. 초기 배아의 표면에는 많은 올리고당들(oligo-saccharides)이 존재하는데, lectin의 한 종류인 Con A에 결합하는 올리고당들의 양이 포배기에 유의하게 증가한다(Kitamura et al., 2003). Con A는 세포 표면에 분포하는 분자들과 결합하여 많은 transmembrane-signaling system을 자극하여 세포의 변화를 유도하는 것으로 알려져 있으며(Kobayashi et al., 2005; Mazzoni et al., 2005), Cytotoxic T lymphocyte 활성화(Choi et al., 1995), 포배 내 칼슘의 변화 조절을 그 예로 들 수 있다(Cheon, 2005).

다른 한편으로 포배 또는 자궁에서 유래한 prostaglandins (PGs)는 착상과정에서 혈관 발달 등의 분화, 그리고 포배의 부화에 관련되어 있다(Cheon et al., 1998; Huang et al., 2004; Jones et al., 1986). 따라서 본 실험에서는 이를 바탕으로 Con A에 의해 유도된 팽창 촉진과 이후 부화 억제를 prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ )가 조절할 수 있는가를 연구하였고, 또한 칼슘이 매개할 가능성에 대한 연구를 수행하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 착상전 초기 배아의 수획

실험동물은 성신여자대학교 동물사육실에서 명 14시간, 암 10시간으로 광주기가 조절되고, 물과 먹이가 충분히 공급되는 표준 사육 환경에서 사육하였다. 6~8 주령의 CD1 암컷 생쥐에 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma)을 복강주사 후 48시간에 5 IU의 human chorionic gonadotropin(hCG)을 주사하여 과배란을 유도하였다. 이후 생후 10~12주 된 생식력 있는 수컷과 합사하고 다음날 질전(copulation plug) 유무를 통하여 수정 여부를 확인하였다. hCG 주사 후 72시간된 임신한 생쥐를 경추 파괴로 도살한

후 난관과 자궁 연접부위를 적출하였고, 이후 해부 현미경하에서 0.4% bovine serum albumin(BSA)을 함유한 BWW 배양액을 관류하여 배아를 획득하였다. 이후 건강한 8세포기 배아만을 선택하여 배양하였다.

## 2. 착상전 초기 배아의 배양

0.4% BSA를 첨가한 BWW를 기본 배양액으로 하여 배양 접시(plastic dishes, Falcon; 60×15 mm) 위에 10  $\mu$ l를 방울 지게한 후, 고온 고압 멸균법으로 멸균하고 BWW로 평형시킨 미네랄유(mineral oil, Sigma)로 덮어 배양하는 방법(oil drop method)으로 배양하였다. 배양은 37°C, 공기 중 5% CO<sub>2</sub>를 유지하는 배양기에서 hCG 주사 후 96시간까지 기본 배양액을 이용하였으며, 이후 실험 목적에 따라 화합물을 첨가한 배양액을 사용하였다.

## 3. Con A, PGE<sub>2</sub>의 처리

Cheon(2005) 실험을 근거로 10  $\mu$ g/ml ConA를 함유한 10  $\mu$ l 배양액에 10~12 개의 포배(hCG 주사한 후 96시간된 포배)를 60분간 배양한 후 다시 기본 배양액으로 옮겨 47시간 더 배양하였다. 또한, 지속적 처리에 의한 포배의 분화에 미치는 영향을 알아보기로 Con A를 함유한 배양액에서 48시간 동안 배양하였다. PGE<sub>2</sub>는 1997년 Cheon 등의 보고를 바탕으로 Con A와 같은 방법으로 10  $\mu$ m 농도로 처리하였다. 한편, Con A의 팽창 유도 및 부화 억제 효과를 PGE<sub>2</sub>가 어떻게 변형할 수 있는가를 알아보기 위하여 Con A를 hCG 주사 시간을 기준으로 96시간된 포배에 1시간 처리한 후 PGE<sub>2</sub>가 첨가된 배양액으로 옮겨 47시간 더 배양하였다. 처리 후 도립현미경(Olympus) 하에서 12시간 또는 24시간과 48시간 후에 각각 관찰하였다. 각각의 실험은 8회 반복하여 진행되었다(각 실험군당 배아의 수는 80~100).

## 4. Con A 또는 PGE<sub>2</sub> 처리 후 포배의 세포질 내 자유 칼슘량의 측정

Con A 처리 후 포배의 세포내 자유 칼슘(free-Ca<sup>2+</sup>)의 양 변화는 Cheon(2005)의 방법에 따라 수행하였다. 간단히 살펴보면, 자유 칼슘에 특이적인 Fluo 3-AM(Molecular Probes, Inc)을 이용하여 세포 내 칼슘의 변화를 측정하였다. Fluo 3-AM을 5  $\mu$ m로 준비하여 hCG 주사후 95시간된 포배에 1시간 동안 37°C, 공기 중 5% CO<sub>2</sub>를 유지하는 배양기내

에서 배양하였다. 배양 후 배양액으로 세척한 후 paraffin dot slide glass에 옮겨 coverslip을 이용하여 고정시킨 후 carrier에 올려놓았다. 이 후 3초 간격으로 300회 측정하면서 측정을 시작하지 30초 후에 10  $\mu$ g/ml Con A 또는 10  $\mu$ m PGE<sub>2</sub>를 함유한 배양액 0.5 ml를 첨가하여 세포내 칼슘의 양 변화를 측정하여 변화양상을 분석하였다. 한편, Con A와 PGE<sub>2</sub>를 순차적으로 처리하면서 결과에서처럼 포배내 자유 칼슘의 양을 측정하였다.

## 5. 결과 분석 및 통계적 검증

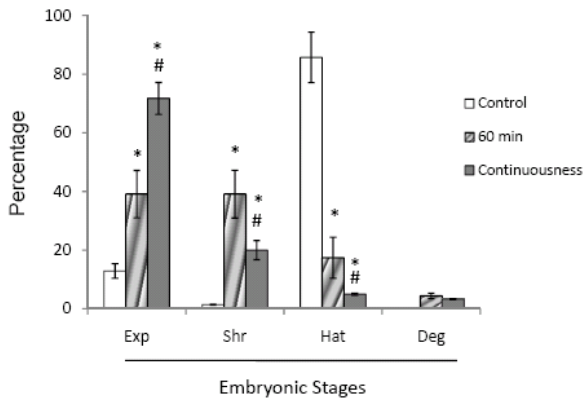
hCG 주사 후 144시간까지 배양하면서 각 실험마다의 관찰 시점에 따라 hCG 주사 후 108시간, 120시간 또는 144시간에서 도립 현미경(Hoffman modulated contrast, Olympus)을 이용하여 팽창과 부화 여부를 확인하였다. 발생 정도는 부화하는 배아(hatching), 위란강이 없어지고 투명대가 얇아진 팽창한 배아(expansion), 팽창하였다가 수축한 상태로 남아 있는 포배(shrunken), 포배가 세포 덩이 형태로 퇴화한 배아(degeneration)로 구분하였다.

배아 발생 양상의 관찰 결과의 통계적 유의성 검증은 one-way ANOVA를 사용하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. Con A의 일시적 처리 및 장시간 처리에 의한 포배의 분화 억제

팽창을 유도하나 부화를 억제하는 일시적 Con A의 영향(Cheon, 2005)은 흥미롭게도 경향성에 있어서 Con A를 함유한 배양액에서 계속적으로 배양한 포배에서도 동일하였다(Fig. 1). Con A를 지속적으로 처리한 군에서 팽창은 1시간 또는 대조군과 유사하였으나, 48시간 배양한 후 부화하는 포배의 비율은 각각 17.4%와 5%로 대조군(85.7%)에 비하여 유의하게 감소되었다. 퇴화율이 Con A를 지속적으로 처리한 군에서 퇴화율이 대조군과 유사하였는데, 이를 통하여 포배의 생존과 관련된 독성이 없는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 따라서 이러한 결과는 Con A에 의한 팽창의 유지와 부화의 억제는 처리 시간에 관계없이 나타나는 현상임을 알 수 있다. 다른 한편으로 부화 단계로 분화하지 못하고 팽창한 상태로 유지되는 경향은 Con A 처리 시간과 비례적임을 알 수 있다.



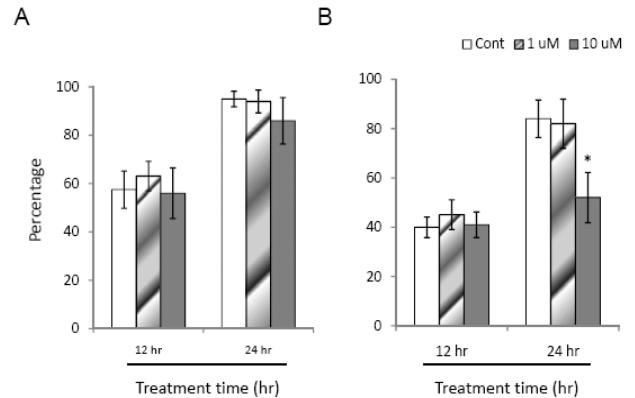
**Fig. 1. Con A accelerated the differentiation of blastocyst to expansion but inhibited the hatching of expanded blastocyst.** Early blastocyst were cultured in the medium containing 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con A for 1 hr or continuousness until 144 hr time point after hCG injection. Exp, expanded embryo; Shr, shrunken embryo; Hat, hatching embryo; Deg, degenerated embryo. \* $p < 0.05$  versus control group; # $p < 0.05$  versus 1 hr treatment group versus continuousness group.

2. PGE<sub>2</sub>가 포배의 분화에 미치는 영향

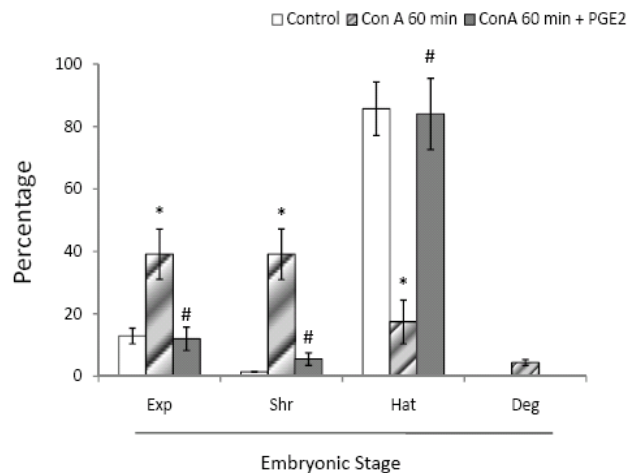
PGE<sub>2</sub>의 초기 포배의 발달에 미치는 영향에 대한 연구(Cheon, 1998)에서 팽창한 상태로 발달하였으나, 부화가 되지 않았는지 또는 팽창한 상태로 발달하지 않아 부화율이 낮은지에 대하여 뚜렷하지 않아 시간별 관찰을 수행하였다. 흥미롭게도 초기 포배가 PGE<sub>2</sub>에 노출되었을 때 팽창단계로 발달하는 것은 대조군에 비하여 감소하지 않았다(Fig. 2A). 1  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>는 12시간까지는 팽창을 촉진하는 경향을 보였으나, 24시간에는 대조군과 차이가 없었다. 10  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>를 처리한 포배에서 팽창으로의 발달은 대조군과 비교하여 차이가 없었으나 부화율은 감소하였다(Fig. 2A, B). 따라서 PGE<sub>2</sub>에 의한 부화의 억제에는 있을 수 있었던 팽창의 억제나 촉진이 원인이 아님을 알 수 있다.

3. PGE<sub>2</sub> 처리 전 Con A처리에 의한 부화율 증가

앞의 결과처럼 PGE<sub>2</sub>는 처리한 농도에서 팽창에는 영향이 없었으나 부화율을 감소시켰다. 그러나 PGs 배아의 착상을 촉진하는 것이 알려져 있을 뿐만 아니라 림프구의 증식에 있어서 Con A의 전처리가 중요한 요인으로 작용할 수 있음이 알려져 있다. 또한, 포배는 순차적인 신호를 인지하여 착상을 준비하는 것으로 예측되고 있다. 따라서 Con A를 처리

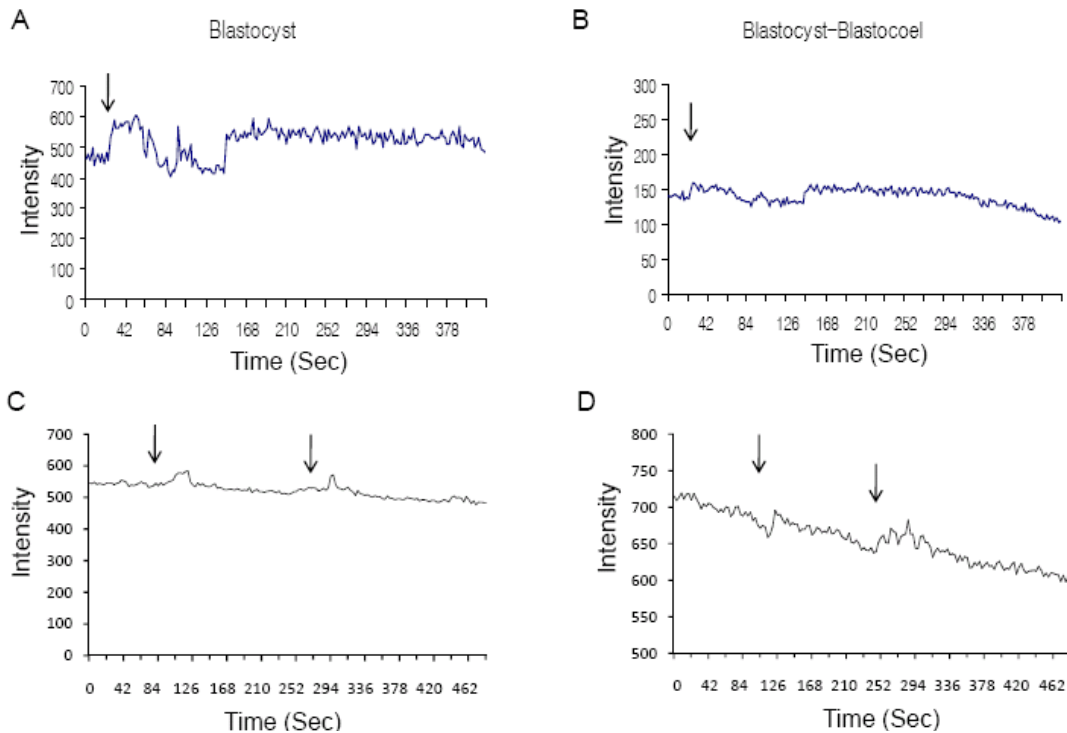


**Fig. 2. Development of early blastocyst to expanded blastocyst was modulated by treatment of PGE<sub>2</sub>.** Early blastocysts were cultured in the media containing 1  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>, and observed at 12 and 24 after treatment. A, the percentage of expanded blastocyst; B, the percentage of hatching embryo. \* $p < 0.05$  versus control group.



**Fig. 3. Pretreatment of Con A accelerated the hatching by PGE<sub>2</sub>.** Early blastocysts were cultured for 1 hr in the medium containing 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con A and then transferred to the medium containing 10  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>. Embryonic stages were observed after 47 hr. \* $p < 0.05$  versus control group; # $p < 0.05$  versus Con A 1 hr treatment group versus Con A 1 hr+PGE<sub>2</sub> group.

한 후 PGE<sub>2</sub> 처리하여 포배의 발생을 관찰하여 순차적 신호의 중요성을 확인해 보았다. 예상한 것처럼 Con A를 전처리한 후 PGE<sub>2</sub>를 함유한 배양액으로 옮겨 배양할 경우 부화율이 대조군 수준으로 증가하였다(Fig. 3). Con A를 1시간 처



**Fig. 4. The changes of [Ca<sup>2+</sup>] in Con A pretreated or non-pretreated blastocyst.** The levels of free calcium were measured using Fluo-3 AM as mentioned in Materials and Methods. A: The levels of [Ca<sup>2+</sup>] in Con A non-pretreated blastocyst, B: The levels of [Ca<sup>2+</sup>] in blastocoel of Con A non-pretreated blastocyst, C: The levels of [Ca<sup>2+</sup>] in Con A pretreated blastocyst, D: The levels of [Ca<sup>2+</sup>] in blastocoel of Con A pretreated blastocyst. The arrow indicated the point when Con A or PGE<sub>2</sub> were added.

리한 군(Fig. 1)과 PGE<sub>2</sub>를 단독 처리한 군(Fig. 3)을 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

**4. Con A 전처리 포배에서 PGE<sub>2</sub>에 의한 세포질 내 칼슘 이온량의 변화**

Con A가 생쥐 포배 내 칼슘의 양 변화를 유도할 수 있고 (Cheon, 2005), 위의 실험 결과에서 Con A와 PGE<sub>2</sub>의 순차적 처리가 부화율의 증가로 귀결되었다. 이러한 부화율의 증가가 Con A 처리 이후 PGE<sub>2</sub>에 의한 세포 내 자유 칼슘의 양 증감의 원인이 될 수 있는지 알아보기 위하여 Fluo-3AM과 공초점현미경을 이용하였다. Con A를 전처리한 포배 내 자유 칼슘 이온의 변화를 공초점현미경을 이용하여 측정하면서 10 μm PGE<sub>2</sub>를 첨가하였다. 포배는 Con A와 PGE<sub>2</sub>에 반응하여 칼슘의 양적 증감을 수행하였다. 포배 전체에서 자유 칼슘량은 PGE<sub>2</sub>에 의해 큰 폭으로 증감하였다. 그러나 Con A를 처리한 후 처리한 경우 상대적으로 적은 양의 변화가 감지되었다. 포배강에서의 자유 칼슘의 양은 Con A를 전

처리하지 않은 포배에서는 뚜렷한 증감이 관찰되지 않으나 Con A를 전처리한 포배에서는 증감을 보였다. 이러한 결과는 세포질 내 자유 칼슘량이 순차적인 외부 신호물질에 의하여 순차적으로 변화하는 것이 포배의 팽창과 부화에 중요한 요인으로 작용함을 잘 보여주는 것이다.

**고 찰**

포배 분화는 착상전 초기배아에서 발현되는 유전자 산물과, 수란관과 자궁을 이동하는 동안 이들 생식수관에서 분비되거나 또는 배아에서 분비되는 신호전달물질에 의해 조절된다. 포배의 팽창과 부화 그리고 착상에서 중요한 역할을 할 것으로 추정되는 heparin-binding EGF-like growth factor(HB-EGF)는 포배의 Erb receptor를 통하여 칼슘의 양적 증감을 유도한다(Wang et al., 2000; Xie et al., 2007). HB-EGF는 세포 내 자유 칼슘량의 증감을 유도할 뿐만이 아니라 이러한 칼슘의 양적 증감이 진행되지 못하도록 하면 포

배의 부화와 착상이 억제된다(Wang et al., 2000). 따라서 칼슘의 양적 증감이 포배의 분화에 중요한 요인으로 작용함을 알 수 있다(Niger et al., 2004; Wang et al., 2000). 이러한 칼슘의 변화가 Con A에 의하여 포배에서 유도될 수 있다(Cheon, 2005). 그러나 Con A에 의한 칼슘의 양적 증가는 팽창을 촉진하나 부화를 억제하는 특성을 보여 부화와 착상을 촉진하는 것으로 알려진 HB-EGF(Lim et al., 2006; Lim & Dey, 2008)와 다르다(Cheon, 2005).

착상전 초기배아 할구의 세포의 기질은 배아의 발생과 분화를 조절하며, 이들은 많은 경우 올리고당을 갖는 분자들로 구성되어 있다. Lectin은 올리고당에 비특이적으로 결합하는데, 세포의 분화 등을 조절할 수 있는 활성물질로 역할을 수행하기도 한다. 초기배아 시기에 lectin인 Con A 등의 수용체가 발현하며(Kitamura et al., 2003; Rowinski et al., 1976), 배아발생에 관여하는 것으로 알려져 있으나(Reeve, 1982) 이들 수용체의 종류나 그 작용기작은 알려져 있지 않다. 보고에 의하면 20  $\mu\text{g/ml}$  Con A를 밀착 이전의 생쥐 배아에 2시간 정도 처리하였을 때 밀착과 포배로의 발전이 억제된다(Reeve, 1982). 그러나 포배에 1시간 동안 처리된 Con A는 포배가 팽창한 단계로 발달하는 것을 촉진하였으나, 그 다음 단계인 부화는 억제하였다(Cheon, 2005). 또한, 본 실험 결과에서 보듯이 Con A를 포배기 때 지속적으로 처리할 경우에도 1시간 처리한 경우와 유사한 경향으로 팽창과 포배에 영향을 주었다. 지속적 처리는 팽창을 촉진하였으나 1시간 처리군에 비하여 부화를 더욱 강하게 억제하였다. 이러한 결과는 Con A에 의한 칼슘의 양적 증감이 HB-EGF에 의한 칼슘의 양적 변화 양상과 다르기 때문으로 사료된다.

면역세포에서 Con A는 세포내 칼슘의 양 증가를 유도하여 세포반응을 유도한다. 이전 실험(Cheon, 2005)에서 Con A와 calcium ionophore A23187을 이용하여 포배의 팽창은 자유 칼슘의 양적 변화가 그 원인 중의 하나임을 알 수 있었다. Con A를 전처리하고 calcium ionophore A23187을 처리하였을 경우, 이들 화합물에 노출된 배아의 팽창과 부화단계로 발달하는 비율은 대조군과 유사하게 되었다. Con A를 전처리한 후 calcium ionophore A23187을 처리한 후 포배의 영양배엽 내 자유 칼슘의 양을 측정하였을 때 증감하는 진동 상태를 보였다. Con A를 지속적으로 처리한 경우 1시간 처리한 실험군에 비하여 부화율이 유의하게 감소하였다. 이는 순차적인 신호물질에 의한 세포의 자극을 통한 세포질 내 칼

슘의 양적 증감이 포배의 분화에 필요하다는 것을 의미한다.

PGE<sub>2</sub>는 배아의 착상에 중요한 요소로 알려져 있으며, PGs의 물질대사를 조절하는 효소인 prostaglandin H synthase의 활성을 억제할 경우 부화가 억제된다(Huang et al., 2004). 그러나 생쥐에서 prostacyclin에 비하여 큰 효과가 없는 것으로 보고되고 있다(Pakrasi & Jain, 2008b). 한편, 생쥐나 돼지 등에서 PGE<sub>2</sub>가 포배와 자궁 모두에서 착상조절에서의 역할이 증명되고 있다(Pakrasi & Jain, 2008a, b). 또한, 영양배엽의 성장에 관여하는 것으로 보고되었다(Chan, 1991). 다른 한편, PGE<sub>2</sub>의 농도에 따라 포배의 팽창 또는 부화가 촉진될 수 있음이 밝혀졌다(Cheon et al., 1998). 이러한 실험 결과를 바탕으로 PGE<sub>2</sub>가 배아의 착상 전 후 분화를 조절하는 한 요인임을 추정할 수 있다.

PGE<sub>2</sub>를 1  $\mu\text{M}$ 과 10  $\mu\text{M}$  농도로 포배기에 처리하면 포배는 팽창단계로 발달하고 부화를 수행하나 10  $\mu\text{M}$  농도에서는 부화가 감소하였다. 그러나 Con A를 전처리한 포배에 10  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>를 처리하면 부화율이 증가하여 대조군과 유사하였다. 1  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>를 처리한 경우에는 대조군보다 높은 비율로 부화하였다. 한편, Con A에 의한 자유 칼슘 농도의 증감 이후 PGE<sub>2</sub>에 의하여 자유 칼슘의 농도 증감이 있다. 이와 함께 Wang 등의 보고(2000)와 Niger 등의 보고(2004)를 바탕으로 포배 내 자유 칼슘의 양적 증감이 포배의 분화를 조절하는 요소임을 증명할 수 있었다.

위 결과를 토대로 Con A는 세포질 내 자유 칼슘의 양적 증감을 통하여 생쥐 포배의 팽창을 촉진하는 것을 알 수 있다. 다른 한편으로 PGE<sub>2</sub>도 자유 칼슘 농도의 증감을 유도하나, Con A와는 달리 팽창과 부화를 촉진하지 않았다. 그러나 Con A가 전처리된 포배에서는 부화를 촉진하였는데, 이러한 결과는 순차적 신호전달물질에 의한 반복적 자유 칼슘 농도의 변화가 착상이 가능하도록 포배의 분화를 촉진하는 데 중요함을 알 수 있다. 즉, 신호물질의 순차적 노출에 의해 유도된 자유 칼슘의 농도 증감이 칼슘 매개로 활성화되는 각기 다른 신호경로를 조절하여 팽창 또는 부화로의 분화를 촉진하는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 성신여자대학교 학술연구조성비 및 한국과학재단의 KOSEF RO12006000 1050102006 지원을 통하여 수

행되었음.

### 인용문헌

- Chan SY (1991) Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> alpha on peri-implantation development of mouse embryos *in vitro*. *Prostaglandins* 42:321-336.
- Cheon YP (2005) Concanavalin A mediated calcium changes on expansion and hatching of the mouse blastocyst. *Kor J Fertil Steril* 32:337-346.
- Cheon YP, Gye MC, Kim CH, Kang BM, Chang YS, Kim SR, Kim MK (1999) Role of actin filaments in the hatching process of mouse blastocyst. *Zygote* 7:123-129.
- Cheon YP, Kim CH, Yoon YD, Kim MK (1998) Effects of prostaglandins on embryonic expression and hatching by developmental stage in mouse. *Dev Reprod* 2:179-187.
- Choi J, Sawant SG, Couch DB, Ho IK, Farley JM (1995) Continuous measurement of changes in intracellular calcium concentration in mouse splenic T cells attached to a glass substrate. *J Biomed Sci* 2:379-383.
- Cole RJ (1967) Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 17:481-490.
- Eckert JJ, McCallum A, Mears A, Rumsby MG, Cameron IT, Fleming TP (2004) Specific PKC isoforms regulate blastocoel formation during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 274:384-401.
- Gordon JW, Dapunt U (1993) A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. *Fertil Steril* 59:1296-1301.
- Huang JC, Wun WS, Goldsby JS, Matijevic-Aleksic N, Wu KK (2004) Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin enhances mouse embryo hatching. *Hum Reprod* 19:2900-2906.
- Houghton FD, Humpherson PG, Hawkhead JA, Hall CJ, Leese HJ (2003) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase activity in the human and bovine periimplantation embryo. *Dev Biol* 263:360-366.
- Jones MA, Cao Z, Anderson W, Norris C, Harper MJ (1986) Capillary permeability changes in the uteri of recipient rabbits after transfer of blastocysts from indomethacin-treated donors. *J Reprod Fertil* 78:261-273.
- Kawagishi R, Tahara M, Sawada K, Ikebuchi Y, Morishige K, Sakata M, Tasaka K, Murata Y (2004a) Rho-kinase is involved in mouse blastocyst cavity formation. *Biochem Biophys Res Commun* 319:643-648.
- Kawagishi R, Tahara M, Sawada K, Morishige K, Sakata M, Tasaka K, Murata Y (2004b) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-3 is involved in mouse blastocyst formation. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301:767-75.
- Khidhir MA, Stachecki JJ, Krawetz SA, Armant DR (1995) Rapid inhibition of mRNA synthesis during preimplantation embryo development: vital permeabilization by lyssolecithin potentiates the action of  $\alpha$ -amanitin. *Exp Cell Res* 219:619-625.
- Kidder GM, Watson AJ (2005) Role of Na, K-ATPase in early development and trophectoderm differentiation. *Semin Nephrol* 25:352-355.
- Kitamura K, Suganuma N, Takata K, Matsuyama K, Goto J, Furuhashi M, Kanayama N (2003) Changes in oligosaccharide expression on plasma membrane of the mouse oocyte during fertilization and early cleavage. *Zygote* 11:183-189.
- Kobayashi S, Sato R, Inanami O, Yamamori T, Yamato O, Maede Y, Sato J, Kuwabara M, Naito Y (2005) Reduction of concanavalin A-induced expression of interferon-gamma by bovine lactoferrin in feline peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunopathol* 105:75-84.
- Lim HJ, Dey SK (2008) HB-EGF: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res* [Epub ahead of print].
- Lim JJ, Lee DR, Song HS, Kim KS, Yoon TK, Gye MC, Kim MK (2006) Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) may improve embryonic development and implantation by increasing vitronectin receptor (integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 3) expression in peri-implantation mouse

- embryos. *J Assist Reprod Genet* 23:111-119.
- Mazzoni IE, Ledebur Jr HC, Paramithiotis E, Cashman N (2005) Lymphoid signal transduction mechanisms linked to cellular prion protein. *Biochem Cell Biol* 83:644-653.
- Niger C, Malasine A, Cronier L (2004) Calcium channels activated by endothelin-1 in human trophoblast. *J Physiol* 561:449-458.
- Niimura S (2003) Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J Reprod Dev* 49: 413-423.
- O'Sullivan CM, Rancourt SL, Liu SY, Rancourt DE (2001) A novel murine tryptase involved in blastocyst hatching and outgrowth. *Reproduction* 122:61-71.
- Pakrasi PL, Jain AK (2008a) Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin reduces apoptosis and enhances embryo viability in mouse. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:27-33.
- Pakrasi PL, Jain AK (2008b). Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin reduces apoptosis and enhances embryo viability in mouse. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:27-33.
- Reeve WJ (1982) Effect of concanavalin A on the formation of the mouse blastocyst. *J Reprod Immunol* 4: 53-64.
- Rowinski J, Solter D, Koprowski H (1976) Change of concanavalin A induced agglutinability during preimplantation mouse development. *Exp Cell Res* 100:404-408.
- Wang J, Mayernik L, Schultz JF, Armant DR (2000) Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts. *Development* 127:33-44.
- Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW, Zernicka-Goetz M (2004) A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Cell* 6:133-144.
- Xie H, Wang H, Tranguch S, Iwamoto R, Mekada E, Demayo FJ, Lydon JP, Das SK, Dey SK (2007) Maternal heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18315-18320.

---

(received 17 October 2008, received in revised form 16 November 2008; accepted 17 November 2008)