

과산화수소와 동결에 의해 유도된 생쥐와 소 수정란의 사멸에 있어서 칼륨 통로의 역할

최창용² · 김창운^{1,3} · 강다원^{1*} · 한재희^{1*}

¹경상대학교 의학전문대학원 생리학교실 · 건강과학연구원, ²국립축산과학원, ³창원 삼성병원

Role of K⁺ Channels in H₂O₂- and Cryo-induced Apoptosis of Mouse and Bovine Embryos

Changyong Choe², Chang-Woon Kim^{1,3}, Dawon Kang^{1*} and Jaehee Han^{1*}

¹Department of Physiology and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju 660-751, South Korea

²National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, South Korea

³Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Changwon Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Changwon 630-723, South Korea

ABSTRACT

Programmed cell death or apoptosis is associated with changes in K⁺ concentration in many cell types. Recent studies have demonstrated that two-pore domain K⁺ (K_{2p}) channels are involved in mouse embryonic development and apoptotic volume decrease of mammalian cells. In cerebellar granule neurons that normally undergo apoptosis during the early developmental stage, TASK-1 and TASK-3, members of K_{2p} channels, were found to be critical for cell death. This study was performed to identify the role of K⁺ channels in the H₂O₂-induced or cryo-induced cell death of mouse and bovine embryos. Mouse and bovine two-cell stage embryos (2-cells) exposed to H₂O₂ for 4 h suffered from apoptosis. The 2-cells showed positive TUNEL staining. Treatment with high concentration of KCl (25mM) inhibited H₂O₂-induced apoptosis of 2-cells by 19%. Cryo-induced death in bovine blastocysts showed positive TUNEL staining only in the cells near the plasma membrane. Cryoprotectant supplemented with 25 mM KCl reduced apoptosis slightly compared to cryoprotectant supplemented with 5 mM KCl. However, the combination of antioxidants (β -mercaptoethanol) with 25 mM KCl significantly decreased the rate of H₂O₂-induced and cryo-induced apoptosis compared to treatments with only antioxidants or 25 mM KCl. These results show that blockage of K⁺ channel efflux for a short-time reduces H₂O₂- and cryo-induced apoptosis in mouse and bovine embryos. Our findings suggest that apoptosis in mouse and bovine embryos might be controlled by modulation of K⁺ channels which are highly expressed in a given cell type.

(Key words : apoptosis, antioxidant, cryopreservation, K⁺ channel)

서 론

생명공학 기술의 발전으로 생체(*in vivo*)와 유사한 환경에서 다양한 체외(*in vitro*) 실험들이 수행되고 있다. 그러나 생체와 유사한 환경이라 할지라도 개체로부터 분리된 세포는 분리된 후 얼마 지나지 않아 본연의 생리학적 기능 또는 생물학적 활성이 부분적으로 또는 완전히 소실되게 된다. 체외 실험에서 가장 많이 접하는 문제점은 세포의 변형 또는 사멸이다. 생체

에서도 나타나는 세포 자멸사(apoptosis)는 정교하게 조절되는 생리학적 환경에서 벗어난 체외 세포들에게는 그 현상이 극심하게 나타날 수 있다. 세포 자멸사는 진행 시간에 따라 다양한 세포 내 변화 및 형태학적 변화가 나타나는데(Ekhterae 등, 2003), 세포 자멸사 초기에 나타나는 세포의 위축(shrinkage)은 세포의 용적이 감소된 상태로 이온 통로들이 관여한다(Bortner 등, 1997; Bortner와 Cidlowski, 1999; Maeno 등, 2000; Yu와 Choi, 2000; Trimarchi 등, 2002). 이온 통로들은 세포 자멸

* 이 논문은 2010년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2010-0024258).

† Correspondence : dawon@gnu.ac.kr, jeehan@gnu.ac.kr

사 시 칼슘 신호의 조정, 미토콘드리아 보전과 같은 중요하고도 복잡한 세포 내 일련의 반응들에도 관여한다. 세포 용적은 세포 내 이온 항상성에 의해 우선적으로 조절되므로 세포 내액의 주요 이온인 칼륨의 역할이 중요시되어 왔다(Lang 등, 1998). 세포 자멸사 과정에서 나타나는 세포 위축 현상은 정상적으로 유지되어야 하는 세포 내 칼륨 농도인 ~ 150 mM을 유지하지 못하고, 칼륨 유출이 증가되어서 나타나는 하나의 결과로 설명될 수 있다. 높은 세포 내 칼륨 농도는 세포 내 이온 항상성 유지를 위해 필요할 뿐만 아니라, 세포 용적을 정상적으로 유지하고, caspase와 nuclease 효소 활성을 억제시키는데 필요하다(Bortner 등, 1997; Maeno 등, 2000). 칼륨 통로의 차단은 세포의 용적 감소를 억제시켜 세포 자멸사를 감소시켰다(Bortner 등, 1997; Bortner와 Cidlowski, 1999; Maeno 등, 2000; Yu와 Choi, 2000; Trimarchi 등, 2002). 칼륨 통로 차단은 고농도 칼륨을 사용하여 스크리닝될 수 있다.

칼륨 통로 중 two-pore domain 칼륨(K_{2p}) 통로는 바탕(background) 통로로 세포의 안정막 전압을 일정하게 유지시키는데 기여한다. K_{2p} 통로 역시 세포 자멸사와 관련이 있는데, K_{2p} 통로의 멤버인 TASK 통로의 차단이 소뇌 과립 세포의 자멸사를 억제시켰다(Lauritzen 등, 2003). 이들 TASK 통로는 전기생리학적 실험 기법에 의해 확인된 바 소뇌 과립 세포에서 기능적으로 발현한다(Han 등, 2002). 소뇌 과립 세포는 TASK 통로 이외의 TREK 통로도 높게 발현한다. TREK 통로는 생쥐 및 소 수정란에서 발현하면서 배 발달에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Hur 등, 2009; Hur 등, 2012; Kim 등, 2012). Trimarchi 등(2002)에 의해 생쥐 수정란의 자멸사에 K_{2p} 통로의 연관성이 오래전부터 제시되어 왔지만, 아직 K_{2p} 통로의 어떤 멤버가 생쥐 수정란의 세포 자멸사에 연관되어 있는지는 알려져 있지 않다.

체의 실험에서 나타나는 세포 자멸사를 최소화하고 효율적으로 실험을 수행하고자, 생체로부터 조직 또는 세포를 분리하고 동결시킨 후 필요시 용해하여 사용한다. 그러나 동결·용해 역시 세포에 대한 독성을 나타내는 것으로 보고되었으며, 세포 자멸사를 유발한다(Martin 등, 2004; Said 등, 2010; Xu 등, 2010). 동결·용해는 세포막의 손상과 함께 세포 내에 존재하는 항산화 시스템을 교란시켜 과도한 활성 산소를 생성하게 하여 세포의 생존에 영향을 줄 수 있다(Wang 등, 1997; Thomson 등, 2009; Said 등, 2010). 세포, 특히 수정란의 체외 배양 동안 발생하는 활성 산소를 감소시키기 위해 사용된 항산화제(β -mercaptoethanol, β -ME)는 효율적으로 체외 수정란의 발달을 돕는다(Caamano 등, 1996; Choe 등, 2010).

본 연구에서는 K_{2p} 통로를 발현하는 생쥐 수정란과 한우 수정란을 과산화수소와 동결에 의해 세포 자멸사를 유도한 후 고농도의 칼륨과 항산화제의 효과를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 연구에 사용된 생쥐(ICR, 5주령) 및 흰쥐(Sprague-Dawley, 1 일령)는 코아텍(Animal Breeding Center, Pyeongtaek, South Korea)에서 구입하여 실험에 사용될 때까지 온도(24°C)와 명암(12시간:12시간)이 조절되는 곳에서 사육하였으며, 사료와 물은 제한 없이 공급하였다.

2. 실험 재료

별도의 표기가 없는 시약들은 시그마 화학약품 회사(Sigma, St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

3. 세포 배양

1) 소뇌 과립 세포

흰쥐(6~7일령)로부터 분리된 소뇌 과립 세포를 Neurobasal[®] 배양액(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 소뇌 과립 세포의 수를 계산하여 배양 접시에 분주한 후 37°C , 5%의 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 배양하였으며, 2일마다 배양 상태를 확인하고 배양액을 교환하였다. 고농도 칼륨 효과를 확인하기 위하여 세포를 15일간 배양하였다.

2) 생쥐 수정란

생쥐의 난관으로부터 회수된 2세포기 수정란(hCG 처리 및 교미 후 48 h)은 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid(HEPES)-buffered(M2) 배양액에 배양되었다.

3) 한우 배반포

한우 체외 수정란의 생산은 도축장의 도축 난소를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취한 난포란은 체외 성숙을 위해서 TCM 199 배양액에 FSH($10\ \mu\text{g/ml}$), LH($10\ \mu\text{g/ml}$)와 5% FBS를 첨가하여 5% CO_2 조건에서 22시간 체외 성숙 후 체외 수정에 공시하였고, 체외 수정은 BO 배양액에서 6시간 동안 체외 수정을 실시하였으며, 체외배양은 무혈청 배양액에서 배양하여 체외 수정 후 6일째까지 수정란을 발달시키고, 초기 배반포를 동결 실험에 사용하였다.

4. MTT 정량

소뇌 과립 세포를 24 well 배양 접시에 각 well당 $200\ \mu\text{l}$ (2×10^4 cells/ml)씩 넣고, 37°C , 5% CO_2 가 공급되는 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 배양 접시에 부착시킨 후 각각의 시약들을 처리한 후 15일 동안 배양기에서 배양하였다. 배양 완료 후, 각 well에 PBS에 녹인 $5\ \mu\text{g/ml}$ 농도의 MTT (3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)를 20 μ l 씩 첨가한 후, 150 rpm에서 5분간 흔들어서 MTT를 잘 섞어 준 뒤 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 완전히 제거한 후 DMSO(dimethylsulfoxide)를 각 well당 200 μ l 씩 넣고, 150 rpm에서 5분간 흔들어 형성된 포르마잔(formazan)을 잘 녹였다. 그 후 ELISA 판독기 (Infinite F200, TECAN)로 MTT 흡광도를 조사하여 대조군과 비교하였다.

5. 면역 염색

TASK-1, TASK-3, TREK-2 일차 항체는 Alomone labs(Jerusalem, Israel)으로부터 구입하여 사용하였다. 4% paraformaldehyde가 들어있는 PBS를 사용하여 세포를 실온에서 30분간 고정시킨 후, PBS로 세포를 5분간 3번 세척한 후 비특이적 반응의 억제제를 위해 1시간 30분 동안 실온에서 Triton X-100을 포함한 normal goat serum으로 세포를 전 처리하였다. 세포들은 세척 없이 일차 항체에 4°C에서 16시간 동안 노출시키고, 대조군은 일차 항체 대신 일차 항체 희석 용액에 노출시켰다. 16시간 후 일차 항체를 PBS로 세척하고, 이차 항체(secondary antibody)를 1시간 30분 동안 실온에서 처리한 후, 세포를 PBS로 3번 이상 세척하여 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 K₂P 통로의 발현을 조사하였다.

6. ELISA 분석을 통한 세포 자멸사 확인

Cell death detection ELISA plus kit(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 세포 자멸사를 측정하였다. 소뇌 과립 세포를 배양 접시에 일정 시간 동안 배양한 후 트립신을 처리하여 분리한 뒤 PBS로 세척하고, 1.5 ml E-Tube로 옮겼다. 각 튜브에 세포가 10⁴개씩 존재하도록 한 후, 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 후 각각의 E-tube에 200 μ l의 용해 완충액을 첨가하여 15~25°C에서 30분간 반응시켰다. 튜브를 다시 10분간 원심 분리한 후, 각각의 상층액 20 μ l를 streptavidin이 코팅된 96 well 배양 접시에 옮겼다. 각각의 배양 접시에 면역 반응액을 80 μ l 씩 첨가하고, 호일로 감싼 후 300 rpm에서 15~25°C의 온도에서 2시간 동안 반응시켰다. 용액을 제거하여 반응액으로 3회 세척한 후, 각각의 well에 ABTS 용액을 100 μ l 씩 첨가하고, 250 rpm으로 10~20분 동안 충분한 발색 반응이 보일 때까지 반응시켰다. 그 후 405 nm에서 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하였다.

7. 동결 · 용해

기본 동결 보존제로서 10% FBS를 포함한 PBS에 40%(v/v) ethyleneglycol, 18%(w/v) ficoll 70 및 0.3 M sucrose가 최종 농도가 되도록 혼합 제조하여 사용하였다(EFS 용액). EFS 용액에 고농도 염화칼륨(20 mM KCl)과 25 μ M β -ME를 첨가하

여 동결 보존액으로 사용하였다. 한우 수정란(10개씩)을 EFS 동결 보존액에 1분간 평형을 실시한 후, 플라스틱 스트로우 내에 주입하여 즉시 -196°C의 액체질소에 침지하였다. 동결 세포의 용해 방법은 스트로우를 액체질소에서 꺼내어 공기 중에서 10초간 노출시킨 후 30~37°C의 물에 침지시켜서 흔들면서 용해하였다. 용해된 세포들은 0.5 M sucrose 용액에 4분간 평형시킨 다음 0.25 M의 sucrose에 3분간 평형시킨 후 각각 D-PBS로 3~4회 세척하였다. 그 다음 5분간 정지시킨 후 세포에 적합한 배양액으로 3~4회 세척하여 용해 과정을 완료하였다. 용해 후 수정란은 고농도 염화칼륨과 25 μ M β -ME이 첨가된 배양액에서 4시간 동안 배양되었다.

8. TUNEL 염색을 통한 세포 자멸사 확인

세포 자멸사를 확인하기 위하여 *in situ* cell death detection kit(Roche Diagnostics)를 이용하여 TUNEL 염색을 실시하였다. 4% paraformaldehyde로 고정된 세포를 PBS로 세척한 후, 세포에 TUNEL 반응 혼합물(TUNEL reaction mixture)의 침투를 용이하게 하기 위해 삼투성 용액을 30분간 처리하고, 15분간 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 TUNEL 반응 혼합물(TdT and Fluorescein-dUTP)을 처리하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때 양성 대조군(positive control)은 DNase를 37°C에서 1시간 동안 처리 후 TUNEL 반응 혼합물로 반응시키고, 음성 대조군(negative control)은 말단 트랜스퍼라제(terminal transferase)를 제외한 TUNEL 반응 혼합물로 반응시켰다. 이후 PBS로 15분간 3회 세척하였고, 핵 염색을 위해 PI(propidium iodide) 염색을 수행하였다. 이후 세포를 wet mounting하여 형광현미경으로 세포 자멸사를 관찰하였다.

9. 통계학적 분석 및 실험 성적의 처리

실험 결과의 통계 처리는 ANOVA와 Student's *t*-test를 이용하여 처리구 간의 유의성을 검정하였다($p < 0.05$). 결과들은 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 고농도 칼륨에 의한 세포 자멸사(Apoptosis) 억제 효과

훈취(7일령) 소뇌 과립 세포를 고농도 염화칼륨(25 mM KCl)이 포함된 배양액에서 배양한 결과, 5 mM KCl이 포함된 배양액에서 보다 높은 생존률을 보였다(Fig. 1A). 소뇌 과립 세포는 5 mM KCl이 포함된 배양액에서는 평균적으로 7일간의 생존을 보이는 반면, 25 mM KCl이 첨가된 배양액에서는 15일 이상의 생존을 보였다(Fig. 1A). 배양 15일째에는 25 mM KCl이 첨가된 배양액에서 자란 소뇌 과립 세포가 5 mM KCl에 비해 2배 정도 높은 세포 생존률을 보였다(Fig. 1B, $p < 0.05$,

0.08 ± 0.05 vs 0.16 ± 0.03). 세포 자멸사 역시 25 mM KCl 처리군에서 유의적으로 감소되었다(Fig. 1C, $p < 0.05$, 2.89 ± 0.41 vs 1.61 ± 0.16). 소뇌 과립 세포에서 TASK-1, TASK-3, TREK-2 통로의 발현을 면역 염색으로 확인한 결과, TASK-3 통로가 가장 우세하게 발현하였다(Fig. 1D). 칼륨 통로의 차단이 생쥐 및 소 수정란의 세포 자멸사에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고자 과산화수소를 이용하여 세포 자멸사를 유도한 후 25 mM KCl 첨가 효과를 분석하였다. 과산화수소(500 μM)에 4시간 동안 노출된 수정란을 고정시켜 TUNEL 염색을 실시한 결과, 25 mM KCl을 처리한 그룹에서 세포 자멸사가 억제되었다(Fig. 2). 소 수정란의 세포 자멸사에도 25 mM KCl

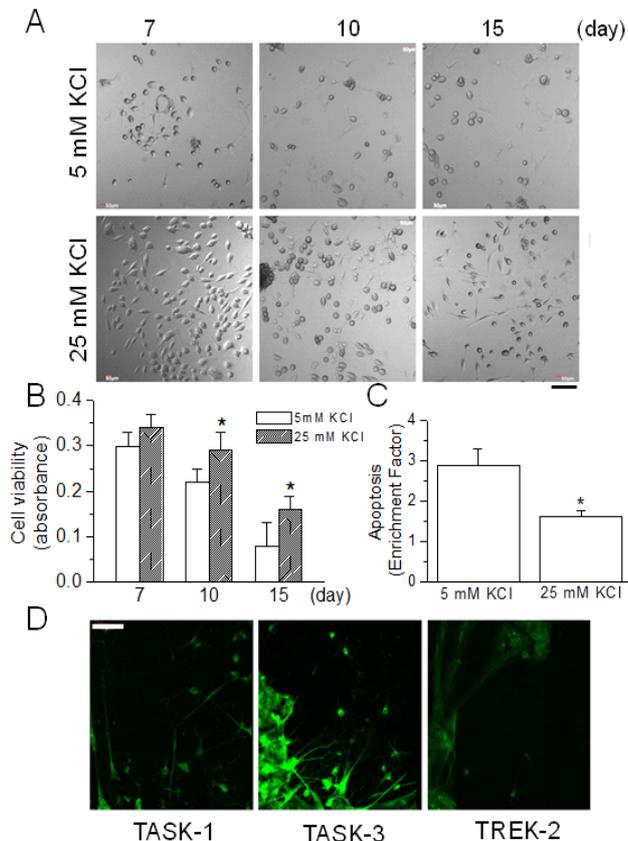


Fig. 1. Effect of high concentration of KCl on apoptosis of rat cerebellar granule neurons (A) Representative microphotograph of cerebellar granule neurons cultured for 15 days. Treatment with 25 mM KCl showed high survival compared to regular medium (5 mM KCl) (B and C) The bar graphs show the percentage of cell viability and apoptosis. Data represent the mean ± SD of five repeated experiments. * $p < 0.05$ compared to 5 mM KCl. (D) High expression of TASK-3 in cerebellar granule neurons. Green fluorescence (FITC) signals represent TASK-1, TASK-3 and TREK-2 antigens. The scale bar represents 50 μm.

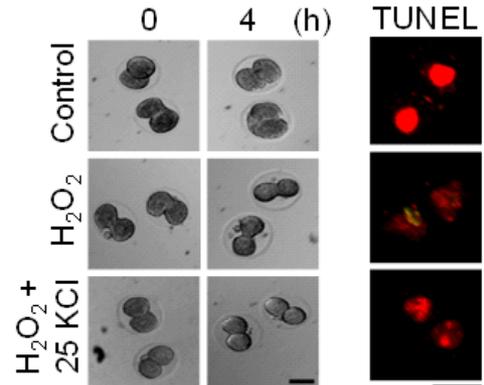


Fig. 2. Inhibitory effect of high concentration of KCl on H_2O_2 -induced apoptosis of mouse 2-cell stage embryos. The 2-cells exposed to H_2O_2 for 4 hours showed TUNEL-positive. Green and red fluorescences show apoptosis (TUNEL) and nuclear staining (propidium iodide), respectively. The scale bar represents 50 μm.

첨가는 유사한 결과를 보였다(data not shown).

고농도 염화칼륨에 의한 소뇌 과립 세포의 생존률 증가가 의미하는 것은 소뇌 과립 세포에 존재하는 칼륨 통로의 차단이 세포 자멸사를 조절할 수 있다는 것을 암시한다. 고농도 염화칼륨뿐만 아니라, TASK-3 통로 차단제를 처리하여 실험한 결과, 소뇌 과립 세포에서 강하게 발현하는 TASK-3 통로가 실질적으로 세포 자멸사에 연관 있음이 확인되었다(Lauritzen 등, 2003). 소뇌 과립 세포와 마찬가지로 생쥐 및 소 수정란 역시 K_{2P} 통로를 발현하므로(Hur 등, 2009; Hur 등, 2012; Kim 등, 2012), 과산화수소에 의해 유도된 세포 자멸사에 고농도 염화칼륨을 처리하여 K_{2P} 통로의 역할을 확인할 수 있을 것으로 예상하였다. 고농도 염화칼륨 처리는 과산화수소에 의해 유도된 생쥐 수정란의 세포 자멸사를 억제시켰다. 그러나 과산화수소가 처리되지 않은 대조군에서는 고농도 칼륨을 처리할 경우, 배 발달률이 억제된다(Hur 등, 2012). 이들의 큰 차이는 정상 세포와 세포 자멸사를 겪고 있는 세포의 차이이다. 정상 세포는 나트륨 펌프와 칼륨 이온 통로들을 통해 칼륨이온의 항상성을 잘 유지하고 있으므로, 칼륨 통로의 차단은 오히려 막전압 변화를 초래하여 세포의 사멸을 유도할 수 있을 것이다. 그러나 세포 자멸사가 나타나고 있는 세포는 칼륨이온의 유출이 있으므로, 이를 차단시켜 세포 용적을 유지하는 것이 세포의 생존에 도움을 줄 수 있을 것이다. 과산화수소에 의해 유도된 생쥐 수정란의 세포 자멸사에 K_{2P} 통로가 관여함은 확인하였지만, K_{2P} 통로 중 어느 멤버가 직접적으로 관여하는지는 본 연구에서 확인하지 못하였다. 신경 세포에 비해 수정란은 칼륨 통로의 발현이 낮아, 단일 이온 통로 분석이 용이하지 않다는 한계가 있다.

2. 고농도의 염화칼륨 및 항산화제 첨가가 과산화수소에 노출된 생쥐 수정란의 배반포 발달에 미치는 영향

고농도 염화칼륨이 과산화수소에 의한 생쥐 수정란의 세포 자멸사는 감소시켰지만, 배반포로의 발달에 있어서는 유의적인 영향을 주지 못하였다. 고농도 염화칼륨과 항산화제(β -mercaptoethanol, β -ME)를 과산화수소에 노출된 생쥐 수정란에 병합 처리한 결과, 과산화수소에 의해 억제된 배반포로의 발달률을 26% 증가시켰다(Table 1). 그러나 과산화수소가 처리되지 않은 대조군만큼 회복시키지는 못하였다.

세포 자멸사와 배 발달에 있어서 고농도 염화칼륨은 다른 효과를 보였다. 일반적으로 칼륨 통로의 차단은 두 가지 효과를 나타낼 수 있는데, 세포의 용적을 일정하게 유지하여 세포 사멸을 억제시킬 수 있는 효과와 막 전압을 탈분극시켜 세포의 흥분성을 증가시킬 수 있는 효과가 있다. 칼륨이온을 포함한 이온들은 세포 내에서 정교하게 조절되기 때문에, 그 적정 수준을 가늠하기는 어렵지만, 생리학적 상황 또는 병태생리학적 상황에서 칼륨 통로의 적절한 조절은 충분히 긍정적인 효과를 만들어낼 수 있을 것이다. 병태생리학적 상황에 노출된 세포들은 활성 산소를 발생시키는데, 그러한 활성 산소는 세포 자멸사를 유발할 수 있다(Simon 등, 2000). 활성 산소를 이차 전령계로 사용하여 신호 전달 체계를 구축하여 세포 자멸사를 유도한다. 활성 산소 역시 너무 많아도 적어도 세포에 좋은 효과를 나타낼 수 없기 때문에 적정 수준의 활성 산소를 유지하여야 한다. 그러나 세포 자멸사를 겪고 있는 세포들은 정상 세포에 비해 활성 산소 발생이 높기 때문에 활성 산소를 낮추어주는 것이 세포의 생존성을 높일 수 있는 방법으로 착안하여 고농도 염화칼륨과 항산화제의 병합 효과를 확인하였는데,

Table 1. Effect of 25 mM KCl and β -mercaptoethanol on the development of mouse embryo exposed to H_2O_2

Treatment	No. of 2-cells	No. of embryos developed to
		blastocyst (%)
Control	100	97 (97.0 \pm 4.5) ^a
H_2O_2	100	33 (33.0 \pm 21.1) ^b
H_2O_2 + 25 mM KCl	100	52 (52.0 \pm 8.4) ^{b,c}
H_2O_2 + β -ME	100	54 (54.0 \pm 11.4) ^c
H_2O_2 + 25 mM KCl + β -ME	100	78 (78.0 \pm 8.4) ^{c,d}

^{a-d} Values with different superscripts within each column are significantly different ($p < 0.05$). Percentages are the means \pm S.D. of five independent experiments. Each treatment was administered for 4 hours, and then cells were cultured in the fresh medium.

각각의 단일 처리보다 병합 처리가 효과적이었다. 세포 자멸사 시, 세포막을 통한 칼륨 유출을 막고 교란된 항산화 시스템을 안정화시킴으로써, 생쥐 수정란을 세포 자멸사로부터 극복시켜 배반포로의 발달을 유도할 수 있을 것이다.

3. 고농도 칼륨과 항산화제의 동결 보존에 미치는 영향

고농도 칼륨과 항산화제가 첨가된 EFS 동결 보존액을 이용하여 한우 배반포배를 동결·용해 후 세포의 생존 여부를 확인하였다. 배반포를 동결·용해한 후 회복력이 없는 배반포를 TUNEL 염색을 실시한 결과, 세포 자멸사가 세포막 근처에서 나타나는 것을 알 수 있었다(Fig. 3A). 고농도 칼륨과 항산화제 첨가 그룹은 EFS 동결 보존액 단독 그룹보다 배반포 회복률을 19% 증가시켰다(Fig. 3B).

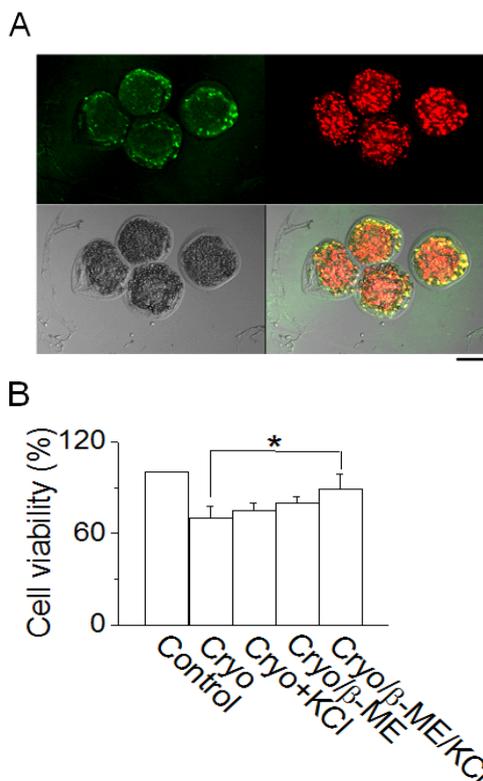


Fig. 3. Inhibitory effect of combination of high concentration of KCl and β -mercaptoethanol on cryopreservation-induced apoptosis of bovine blastocyst (A) Representative TUNEL-positive cells of blastocyst after cryopreservation and thawing. Green and red fluorescences show apoptosis (TUNEL) and nuclear staining (propidium iodide), respectively. The scale bar represents 50 μ m. (B) The bar graphs show the percentage of blastocyst survived after thawing. The survived cells are TUNEL-negative cells. Data represent the mean \pm SD of five repeated experiments. * $p < 0.05$ compared to cryopreservation.

화학 물질뿐만 아니라, 동결·융해 역시 세포 자멸사를 유발한다(Martin 등, 2004; Said 등, 2010; Xu 등, 2010). 고농도 염화칼륨과 항산화제의 병합 처리는 동결·융해에 의한 세포 자멸사를 억제시켰다. 고농도 염화칼륨 및 항산화제 각각의 처리는 배반포의 동결·융해에 따른 세포 자멸사를 억제시키는 경향은 보였지만, 유의적이지는 않았다. 이상의 결과로 보면 과산화수소와 동결·융해는 칼륨 유출을 촉진시키며, 활성 산소의 발생을 가속화시키는 것으로 생각된다. 고농도 염화칼륨과 항산화제 β -ME 사용으로 동결·융해에 의한 칼륨 유출을 차단하고, 활성 산소 발생을 감소시킴으로써 세포 자멸사를 억제시켜 배발달을 회복시킬 수 있다. 그러므로 생쥐 수정란 및 소 수정란에서 주로 발현하는 칼륨 통로를 찾아 그 통로의 차단제를 사용한다면, 보다 효과적으로 세포 자멸사를 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 항산화제 역시 그 세포에 가장 효과적으로 활성 산소의 발생을 감소시킬 수 있는 것으로 개발이 필요하다고 생각된다.

결 론

프로그래밍된 세포사멸 및 세포 자멸사는 칼륨이온의 농도 변화와 연관되어 있다. 최근 연구들은 two-pore domain 칼륨 (K_{2p}) 통로가 생쥐 수정란의 세포 자멸사와 포유 동물 세포의 세포 자멸사 시 나타나는 세포 용적 감소에 관여한다는 사실을 발표해왔다. 소 뇌 과립 신경 세포에서 TASK-1과 TASK-3 K_{2p} 통로가 세포 사멸에 중요한 역할을 함이 확인됨에 따라, 본 연구에서는 과산화수소와 동결에 의해 유도된 세포 자멸사에 있어서 칼륨 통로의 역할을 확인하고자 하였다. 생쥐와 소 2세포기 수정란은 4시간 동안 과산화수소에 노출시켜 세포 자멸사를 유도하였다. 2세포기 수정란은 세포 자멸사 지표로 활용되는 TUNEL 염색에 양성을 보였다. 고농도 염화칼륨(25 mM)의 처리는 과산화수소에 의해 유발된 세포 자멸사를 19% 억제시켰다. 소 배반포를 동결·융해 후 TUNEL 염색을 실시한 결과, 세포막에 인접한 할구들이 세포 자멸사를 보였다. 고농도 염화칼륨을 포함한 동결 보존제 사용은 5 mM 칼륨을 포함한 동결 보존제보다 세포 자멸사를 억제하였지만, 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 고농도 염화칼륨과 항산화제(베타-머캅토에탄올)를 병합 처리하였을 때는 과산화수소 및 동결에 의한 세포 자멸사가 유의적으로 감소되었다. 이상의 결과들로부터 단기간 동안의 고농도 염화칼륨 노출은 세포막을 통한 칼륨 유출을 억제시켜 과산화수소 및 동결에 의한 세포 자멸사를 억제시킬 수 있다는 것을 알게 되었다. 생쥐와 소 수정란에서 나타나는 세포 자멸사는 각 세포에서 우세하게 발현하는 칼륨 통로의 조절에 의해 조절될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Bortner CD, Hughes FM Jr. and Cidlowski JA. 1997. A primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:32436-32442.
- Bortner CD and Cidlowski JA. 1999. Caspase independent/dependent regulation of K^+ , cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:21953-21962.
- Caamano JN, Ryoo ZY, Thomas JA and Youngs CR. 1996. beta-Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. *Biol. Reprod.* 55: 1179-1184.
- Choe C, Shin YW, Kim EJ, Cho SR, Kim HJ, Choi SH, Han MH, Han J, Son DS and Kang D. 2010. Synergistic effects of glutathione and beta-mercaptoethanol treatment during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. *J. Reprod. Dev.* 56:575-582.
- Ekhterae D, Platoshyn O, Zhang S, Remillard CV and Yuan JX. 2003. Apoptosis repressor with caspase domain inhibits cardiomyocyte apoptosis by reducing K^+ currents. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284:C1405-1410.
- Han J, Truell J, Gnatenco C and Kim D. 2002. Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* 542:431-444.
- Hur CG, Choe C, Kim GT, Cho SK, Park JY, Hong SG, Han J and Kang D. 2009. Expression and localization of two-pore domain K^+ channels in bovine germ cells. *Reproduction* 137:237-244.
- Hur CG, Kim EJ, Cho SK, Cho YW, Yoon SY, Tak HM, Kim CW, Choe C, Han J and Kang D. 2012. K^+ efflux through two-pore domain K^+ channels is required for mouse embryonic development. *Reproduction* 143:625-636.
- Kim CW, Choe C, Kim EJ, Lee JI, Yoon SY, Cho YW, Han S, Tak HM, Han J and Kang D. 2012. Dual effects of fluoxetine on mouse early embryonic development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 265:61-72.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E and Haussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78:247-306.
- Lauritzen I, Zanzouri M, Honore E, Duprat F, Ehrengruber MU, Lazdunski M and Patel AJ. 2003. K^+ -dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K^+ channels. *J.*

- Biol. Chem. 278:32068-32076.
- Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A and Okada Y. 2000. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:9487-92.
- Martin G, Sabido O, Durand P and Levy R. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. Biol. Reprod. 71:28-37.
- Said TM, Gaglani A and Agarwal A. 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. Reprod. Biomed. Online 21:456-462.
- Simon HU, Haj-Yehia A and Levi-Schaffer F. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 5:415-418.
- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA and Clark AM. 2009. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum. Reprod. 24: 2061-2070.
- Trimarchi JR, Liu L, Smith PJ and Keefe DL. 2002. Apoptosis recruits two-pore domain potassium channels used for homeostatic volume regulation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 282:C588-594.
- Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ and Loughlin KR. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. Urology 49:921-925.
- Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour L and Cui Z. 2010. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. Biotechnol. Prog. 26:827-837.
- Yu SP and Choi DW. 2000. Ions, cell volume, and apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:9360-9362.
-
- Received September 20, 2014, Revised September 22, 2014, Accepted September 25, 2014