

후기 2-세포기의 생쥐배아 배양에서 단백질 및 아미노산의 영향에 관한 연구*

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실

유 한 기

= Abstract =

Effects of Protein and Amino Acid (Glutamine) on the Development of Late 2-Cell Mouse Embryo in vitro

Yu Han Ki

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Woman's University

Late two-cell mouse embryos from ICR(Swiss albino) mice were cultured to the blastocyst stage in New MHBS media.

In order to investigate the effect of protein macromolecule and glutamine on the development of preimplantation embryos, late 2-cell mouse embryos were cultured in media containing bovine serum albumin(BSA), polyvinylpyrrolidone(PVP) and glutamine and the rate of blastocyst development was observed.

The results were as following :

- 1) There were a significant difference in blastocyst development of early and late 2-cell mouse embryos($p < 0.05$).
- 2) The development of late-2-cell mouse embryo to blastocyst in the BSA-free but containing glutamine was higher than those of 0.4% BSA, 0.4% PVP group.
- 3) The development of late 2 cell mouse embryo in the MHBS containing glutamine was higher than MHBS with BSA but glutamine-free media group($p < 0.05$).
- 4) Blastocyst development is higher in media supplemented with glutamine than in media containing no glutamine.
- 5) These study suggests that the addition of glutamine to the culture media may be a required for energy substrate for in-vitro development of late 2-cell mouse embryo.

서 론

인간을 비롯한 포유동물의 수정과 초기배아발생은

* 본 연구논문은 1991년 이화교수 연구기금 연구비에 의해서 이루어졌음.

난관의 내강에서 성숙, 수정 및 분할과정이 일어나지만 그 정확한 발생기전은 아직도 밝혀져 있지 않다. 그러나 착상전 초기배아는 체외에서 포배기까지 화학적으로 정한 배양액내 배양이 가능하므로 세포의 분화, 유전자 발현, 우량동물의 증식과 불임증의 임신성공에 많은 공헌을 하게 되었다.

배아의 체외배양 성공은 배양기와 배양액 및 그 첨가제등이 배아의 발달에 적합할때 가능하다. 대부분 species에서 생겨난 배아는 in vitro에서는 in vivo에서 보다 배아의 발달이 느리고 어느 특수한 세포기에서 발생이 정지하는 block 현상이 나타나기도 한다¹⁾. 이런 동물에서 생긴 배아는 in vivo에서 발달하기 때문에 체외에서 배양을 성공시키기 위한 배양액의 최적조건들에 대해서는 아직도 충분히 밝혀져 있지 않다.

인간 난자의 체외수정과 배아이식을 성공하기 위해서는 태아제대혈청, 모체의 혈청 및 인간혈청 알부민 등을 배양액을 첨가하는 것이 보통이지만 배아 배양을 성공하기 위한 잘 정제된 배양액을 사용하는 데도 단백질 첨가와 아미노산의 구성성분에 따라 배아발달의 차이가 있다.

Caro와 Trounson(1986)²⁾등은 인간의 체외수정의 성공은 protein-free T₆ 배양액으로도 가능하다고 보고하였다.

생쥐배아의 성공적인 배양은 protein-free 배양액으로도 가능하며 Whitten과 Bigger's 배양액과 nitrogen source 없이도 modified Whitten's 배양액내에서 생쥐배아의 2-세포기에서 배포기에 도달하는데 배양되고 있다³⁾⁴⁾.

부가해서 protein-free Ham's F10 배양도 생쥐배아 2-세포기에서 포배기의 성장을 연장할 수 있다⁵⁾⁶⁾. 그러나 protein-free 배양액의 전부가 동등하게 효과 있는 것은 아니다. Dandekar(1986)⁵⁾등과 Calver(1987)⁶⁾등은 protein-free T₆와 인간난관액 배양액에서 생쥐 2-세포기의 배아의 발달은 Ham's F10 배양액 내에서의 발달보다 낮다고 보고하였다.

착상전 배아의 배양조건을 연구하기 위하여 대조군으로는 0.4% BSA 첨가된 MHBS 배양액과 실험군으로 protein-free와 0.4% PVP 및 1mM glutamine이 첨가된 MHBS를 이용하여 후기 2-세포기의 생쥐배아의 발달과정을 비교관찰하기 위해 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 생후 6~8주된 swiss albino인 ICR 계통의 생쥐암컷과 생후 12주 이상된 생식력이 확인된

수컷을 사용하였다. 이들을 명기와 암기가 조절되는 (14시간 : 10시간) 사육실에서 사육하였다.

5 I.U.(international unit)의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG ; Sigma chem. Co., St. Louis, U. S.A.)을 생쥐암컷에 복강주사하고 47시간후 5 I.U.의 human chorionic gonadotropin(hCG ; Sigma)을 복강주사하여 과배란(superovulation)을 유도한 후 수컷과 합사시켰다. 다음날 아침 질전(Vaginal plug)이 관찰된 암컷을 골라 hCG 주사후 50시간에 경추골 파열로 양쪽난관을 채취하였다. 지방조직과 혈괴를 세척액에서 가위와 핀셋으로 제거하였다.

2. 배의 수집

배의 수집과정에는 0.1% BSA와 1mM glutamine이 첨가된 Modified Hank's Balanced Solution(MHBS, Bae and Channing, 1985)⁷⁾을 사용하였다.

얻어진 난관은 배양액으로 3번 세척한 후 100μl의 배양액이 들어있는 시계접시로 옮겼다. 해부현미경(Wild 5M, Swiss)하에서 끝을 둥글게 만든 300 gauge 바늘과 1ml 주사기를 이용하여 난관입구 팽대부(infundibulum)에 바늘끝을 삽입하고 안과용 핀셋으로 바늘끝이 들어 있는 난관입구를 잡고서 100μl의 배양액으로 난관을 세척하여 후기 2세포배(late 2-cell)를 수집하였다.

수집된 배를 실험군으로 옮기기 전에 실험군의 배양액으로 2번 세척한 후 실험군으로 옮겼다.

3. 배양방법

수집된 후기 2세포배는 microdroplet 방법으로 배양하였다. 즉 배양접시(plastic dishes, 60mm×15mm, Falcon, U.S.A)에 40μm의 배양액을 넣고 equilibrated mineral oil(Sigma)로 덮었다.

이 준비된 배양접시는 적어도 배양 2시간전에 37℃가 유지되고 5% CO₂와 95% air가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기에 넣어 평형을 유지시켰다. 실험에 사용된 모든 초자기구는 160℃에서 90분간 건열 멸균하였으며 이외의 다른 기구는 121℃, 15 Lb/inch²으로 15분간 고압멸균하였다.

4. 배양액

모든 실험에 사용된 기본배양액은 MHBS이며 Bae and channing이 개발한 MHBS media로 PH를 더 안정화시키기 위해서 phosphate 성분을 Henderson-Ha-

Table 1. New MHBS medium component

Compound(M.W.)	Amount(g/l)	(g/500ml)	mM	mOsm
Nacl	(58.45)	5.7690	2.8845	98.7
KCL	(74.55)	0.4	0.2	5.3655
MgSO ₄	(120.4)	0.0977	0.0489	0.8118
Na ₂ HPO ₄	(142.0)	0.0477	0.0239	0.6716
KH ₂ PO ₄	(136.09)	0.0209	0.0105	0.1533
NaHCO ₃	(84.01)	2.101	1.0505	25.009
CaCl ₂	(110.99)	0.1899	0.0949	1.711
Glucose	(180.16)	1.0	0.5	5.551
Sodium lactate	(112.07)	0.2802	0.1401	2.5
Sodium pryuvate	(110.00)	0.033	0.0615	0.3
Phenol red		0.01	0.005	0.6
Penicilin G. Postassium salt		0.064	0.032	
Streptomycin sulfate		0.052	0.026	
BSA		4.0	2.0	

NHBS : Modified Hank's Balanced Salt Solution

M.W. : Molecular Weight

BSA : Bovine Serum Albumin

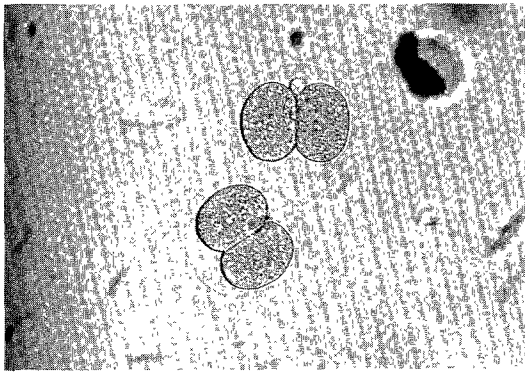


Fig. 1. Late two-cell staged mouse embryos after flushing from the oviducts.

Selbach식으로 조정하였고 NaHCO₃를 증가시킨 배양액으로 HTF media보다 난자 성숙율에 있어서 훨씬 더 좋은 성적이 나타났기에(Chung et al)⁸⁾이 media를 사용했으며 그 조성은 Table 1과 같다. BSA를 제외한 성분은 3차 증류수에 녹여 10배로 농축된 stock solution을 만들어 냉장보관하여 사용하였으며 성분중에서 sodium lactate, sodium pyruvate와 CaCl₂는 100 배로 농축된 stock solution으로 만들어 냉장보관하여 사용하였다. 그리고 모든 배양액에 1mM glutamine을 첨가하였다. BSA는 사용직전에 녹여 사용하였다.

배양액은 pH 7.20~7.30, 280mOsm으로 조정시킨 후 Millipore membrane(pore size 0.45μm, Millipore

Co., Bedford, U.S.A.)으로 여과 멸균하였다.

실험 그룹에 따라 BSA, PVP(polyvinylpyrrolidone), glutamine을 배양액내 첨가하였다.

5. 배의 관찰

배의 상태를 배양 후 6시간, 24시간, 48시간, 72시간 후에 위상차 도립현미경(inverted phase contrast microscope, Laborert, Leitz, Germany)하에서 관찰하였다.

관찰결과는 2세포기 3세포기~8세포기배, 상실배(morula; MO)와 포배(blastocyst; BL), 그리고 세포질이 응축되거나 액포가 형성된 것등의 비정상적인 것을 배의 퇴화(degeneration; DEG)로 분류하였다.

대조군과 실험군의 통계적 처리는 유의성을 분석하기 위해서 Chi-square test를 사용하였다.

결 과

1. 초기 2-세포기 배아와 후기 2-세포기 배아 발달의 비교

1) 초기 및 후기 2-세포기 배아를 얻기 위해서 hCG 주사후 30~33시간후 및 48~50시간후 초기 2-세포기 배아 및 후기 2-세포기 배아의 발달을 New MHBS+0.4% BSA 배양액에서 비교관찰 하였다(Fig. 1, Table 2). 초기 2-세포기 배아에서 48시간 배양후

Table 2. Comparison of development between early 2-cell and late 2-cell mouse embryos

1) Early 2-cell (30–33hr post hCG injection)

Culture	Stage of embryo development(%)								Total egg
	1-cell	2-cell	3–4cell	8-cell	MO	BL	DEG	FRAG	
48 hr	8(7)	24(22)	48(44)	6(6)	20(9)			2(2)	108
72 hr	2(2)	32(30)	38(35)	2(2)	6(6)	20(19)	8(7)		108
96 hr	2(2)	18(17)	10(9)	2(2)		30(28)*	46(43)		108

MO : Morula, BL : Blastocyst, DEG : Degeneration, FRAG : Fragment
Culture medium : MHBS+0.4% BSA

2) Late 2-cell (48–50hr post hCG injection)

Culture	Stage of embryo development(%)				Total egg
	2–8cell	MO	BL	DEG	
48 hr	14 (15.11)	46 (49.68)	29 (30.77)	2 (2.17)	91
72 hr		20 (18.3)	80* (73.3)	9 (8.2)	109

MO : Morula, BL : Blastocyst, DEG : Degeneration, FRAG : Fragment
*Chi-square test : $X^2=43.3563(p<0.05)$
Culture medium : MHBS+0.4% BSA

Table 3. Effect of macromolecules on the development of late-2-cell mouse embryos

1) 0.4% BSA+1mM glutamine

Culture	Stage of embryo development(%)								Total egg
	1-cell	2-cell	3–4cell	8-cell	MO	BL	DEG	FRAG	
48 hr		6(8)	30(38)	6(8)	20(25)	6(8)	4(5)	8(10)	80
72 hr	2(3)	10(13)	24(30)		6(8)	20(25)* ^a		18(23)	80

MO : Morula, BL : Blastocyst, DEG : Degeneration, FRAG : Fragment
^aChi-square test : $X^2=11.7851(p<0.05)$

2) 0.4% PVP+1mM glutamine

Culture	Stage of embryo development(%)								Total egg
	1-cell	2-cell	3–4cell	8-cell	MO	BL	DEG	FRAG	
48 hr	2(2)	2(2)	26(31)	20(19)	16(19)	18(21)			84
72 hr			22(27)	14(17)	6(7)	32(39)**	4(5)	4(5)	82

MO : Morula, BL : Blastocyst, DEG : Degeneration, FRAG : Fragment
*Chi-square test : $X^2=3.0891(p>0.05)$

3) BSA-Free+1mM glutamine

Culture	Stage of embryo development(%)								Total egg
	1-cell	2-cell	3–4cell	8-cell	MO	BL	DEG	FRAG	
48 hr		4(5)	16(19)	22(26)	20(24)	22(26)			84
72 hr			4(5)	22(26)		44(52)* ^a	14(17)		84

MO : Morula, BL : Blastocyst, DEG : Degeneration, FRAG : Fragment
*Chi-square test : $X^2=2.4684(p>0.05)$

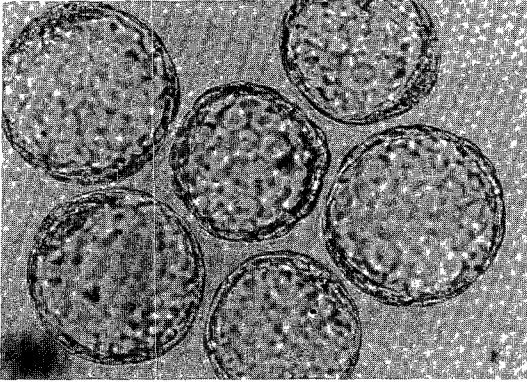


Fig. 2. Blastocysts developed in the presence of BSA for 72 hours culture.

상실배는 9%였고 72시간, 96시간 배양후 포배기의 발달은 각각 19%, 28%로 나타났다.

2) 후기 2-세포기 배아에서 72시간 배양후 상실배는 9%, 포배기는 73.3%로 초기 2-세포기에 비해 훨씬 높게 나타났다. 초기 2세포기 배아와 후기 2세포기 배아의 72시간 배양후 포배기의 발달율은 후기 2-세포기 배아의 발달율이 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($p < 0.05$).

2. Macromolecules이 후기 2세포기 배아의 발달에 미치는 영향

0.4% BSA + Glutamine, 0.4% PVP + glutamine 및 BSA를 제거하고 glutamine만을 첨가한 배양액에 배

양후 후기 2-세포기 배아의 발달을 비교 관찰하였다 (Table 3). 72시간 배양후 후기 2-세포기 배아의 발달율은 0.4% BSA + glutamine는 포배기로의 발달이 25%였고, 0.4% PVP + glutamine에서는 39%, BSA free + glutamine에서는 52%로 BSA가 없더라도 glutamine만으로도 후기 2-세포기 배아에서 포배기로 발달할 수 있었다(Fig. 2). 2-세포기 배아의 퇴화는 17%로 0.4% PVP보다 많이 나타났다.

3. Glutamine이 후기 2-세포기 배아의 발달에 미치는 영향

Glutamine 첨가하지 않고 0.4% BSA가 제거된 MHBS 배양액과 1mM glutamine 첨가하고 0.4% BSA 제거된 MHBS 배양액에서 후기 2-세포기 배아의 포배기까지의 발달을 비교하였다(Table 4). 72시간 배양후 glutamine 첨가하지 않은 배양액에서 포배기로 발달은 27%였고 glutamine 첨가된 배양액에 포배기로 발달은 43%로 glutamine 투여군에서 포배기로 발달이 유의하게 높게 나타났다($p < 0.05$). 후기 2-세포기 배아의 퇴화율도 39%로 많이 발생하였다.

4. PVP가 후기 2-세포기 배아의 발달에 미치는 영향

PVP 자체로 embryo의 발생을 촉진시키는 효과가 거의 없으면 오히려 농도 증가에 따른 발생율이 저하되고 있다. 그러나 이러한 PVP도 glutamine이 들

Table 4. Effect of glutamine on the development of late 2-cell mouse embryos

1) New MHBS(-0.4% BSA-glutamine)

Culture	Stage of embryo development(%)								Total egg
	1-cell	2-cell	3-4cell	8-cell	MO	BL	DEG	FRAG	
		41	20				2		63
24 hr		5(8)	17(27)	13(21)	50(40)		3(5)		63
48 hr		4(6)	6(10)	3(13)	15(24)	6(10)	24(38)		63
72 hr			3(5)	7(11)	2(3)	17(27)*	17(27)		63

MO : Morula, BL : Blastocyst, DEG : Degeneration, FRAG : Fragment

2) New MHBS(-0.4% BSA+1mM glutamine)

Culture	Stage of embryo development(%)								Total egg
	1-cell	2-cell	3-4cell	8-cell	MO	BL	DEG	FRAG	
		43	23				1		67
24 hr		8(12)	12(18)	15(22)	29(43)		3(4)		67
48 hr		6(9)	5(7)	11(16)	26(39)	10(15)	9(13)		67
72 hr		1(1)	1(1)	8(12)	2(3)	29(43)*	26(39)		67

MO : Morula, BL : Blastocyst, DEG : Degeneration, FRAG : Fragment

*Chi-square test : $X^2 = 3.0936(p > 0.05)$

Table 5. Effect of PVP on the development of late 2-cell mouse embryos for 72hr culture

Culture media	Stage of embryo development(%)								Total egg	
	1-cell	2-cell	3-4cell	5-8cell	8-16cell	MO	BL	DEG		FRAG
0.1% PVP - glutamine							40(61)* ^a	26(39)		66
0.4% PVP - glutamine			2(3)			12(18)	4(6)* ^b	47(72)		65
0.1% PVP + glutamine			3(5)			1(1)	43(69)+ ^a	15(24)		62
0.4% PVP + glutamine			4(6)		2(3)	7(11)	38(61)+ ^b	11(18)		62

*Chi-square test : $X^2=41.1230(p<0.05)$

+Chi-square test : $X^2=0.5696(p>0.05)$

^aChi-square test : $X^2=0.7239(p>0.05)$

^bChi-square test : $X^2=41.1277(p<0.05)$

어있는 배양액에서는 PVP가 발생억제 현상을 상쇄 되는 것으로 보여진다.

고 찰

포유동물중 생쥐의 2-세포기 배아가 포배기로 발달하는데는 여러가지 화학적으로 정한 배양액내에서 가능해졌다⁹⁾¹⁰⁾. 그러나 대부분의 포유동물의 수정란을 체외배양시 배아발생이 진전하지 못하고 정지되어 배아의 퇴화현상이 일어나는데 특히 초기 2-세포기 생쥐배아는 체외배양에서 2-cell block을 나타낸다¹¹⁾¹²⁾.

Goddard & Pratt(1983)¹¹⁾는 in vitro 2-cell block 현상은 모체에서 조절하는 하나의 현상이라고 하였고 수정란의 세포질 요인에 기인한다고 하였다¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾.

초기 2-세포기 배아가 체외에서 잘 발달할 수 있는 조건은 생쥐 strain의 기능, 배양액 성분, 배양환경이 배아발달에 가장 적합할 때 성공할 수 있다고 보고 하였다¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾.

배아의 일부 blocking strain을 극복하는 데는 배양액내 lactate, pyruvate 및 EDTA를 첨가함으로써 가능하지만 배양성공에는 다양하다¹⁶⁾¹⁸⁾.

Golden hamster 배아는 2~4세포기에서 in vitro block이 일어나지만 8-세포기 배아의 2%만이 포배기로 발달한다¹⁹⁾. 그러나 기본배양액에 4개의 아미노산을 첨가하면 8-세포기 배아에서 포배기로의 발달이 36%나 증가하였다¹⁹⁾. Carney & Bavister(1987)는 이 배양액내 4개의 아미노산중 glutamine이

배아발달에 가장 효과적이라고 보고하였다²⁰⁾.

본 연구에서는 MHBS(Modified Hank's Balanced Salt Solution) 배양액은 돼지 미성숙 난자 뿐만 아니라 생쥐배아를 배양하는데도 Ca 및 PH의 더 안정화로 더 좋은 배아의 발달을 본 실험을 통해 보여주고 있다¹⁹⁾²⁰⁾.

초기 2-세포기 배아가 포배기로의 발달은 28%인데 비해 후기 2-세포기 배아에서 포배기로의 발달은 80.1%로 후기 2-세포기에서 유의하게 높게 나타났다($p<0.05$, Table 2).

이와같이 초기 및 후기 2-세포기의 배아발생능력에 있어서 큰 차이가 있는것은 2-세포기에서 8-세포기까지는 정상적으로 발달하나 그 뒤 compaction이 시작되어야 할 8-세포기에서 세포분열이 계속 일어나지 못함으로써 48시간내 배아가 포배기로 분화하지 못하고 퇴화하게 된다.

초기 2-세포기에서는 세포질내 칼슘이온이 없으면 16-세포기까지 발생 못하지만 후기 2-세포기에서는 칼슘이온이 없는 배양액에서도 compaction 없이도 16-세포기까지 발생할 수 있어 배아의 발생이 잘 된다.

또한 초기배양액내 칼슘의 결핍이 배아발달에는 별영향이 없고 단지 compaction에만 영향을 주는 것이며 일단 compaction이 일어나면 모두 포배로 발달되므로 compaction 과정이 배아발달에 아주 중요하다²¹⁾²²⁾.

본 연구에 macrocule이 후기 2-세포 배아의 발달에 대한 영향은 0.4% BSA와 아미노산(glutamine)을 첨

가한 배양액에서 후기 2세포기에서 포배기배아의 발달은 25%인데 비해 0.4% PVP 첨가시 39%, BSA free 및 glutamine 포함된 배양액에서는 52%로 glutamine만으로도 포배기의 발달율이 가장 높게 나타났다. 이는 glutamine이 세포성장에 에너지원으로 작용하고 아미노전이 반응(transamination) 작용을 경유해서 아미노산 균형을 보전할 뿐만 아니라 암모니아의 비독성원(source)으로 세포를 공급하는데 중요한 작용을 하기 때문이다¹⁸⁾²³⁾. Ogawa와 Marr²⁵⁾ 등은 2-세포기에서 포배기로의 발달은 아미노산이 없는 protein-free TYH-280과 Whitten & Bigger's 배양액에서 성취할 수 있다고 하였고, Cholewa and Whitten 등은 고정된 질소원이 없어도 생쥐 2-세포기에서 포배기로 잘 발달할 수 있다고 하였다³⁾.

Glutamine은 in vitro에서 생쥐와 햄스터 배아의 초기발달에 중요한 역할로서 초기 2-세포기에서는 pyruvate와 lactate가 배아발달을 지지할 수 있지만 포도당은 배아발달을 지지할 수 없다. 생쥐의 초기 배아는 감소된 인합유 펜토스당을 생산하기 위해 펜토스 인산염 경로를 경유해서 유용한 포도당의 일부를 이용할 수 있다. 이러한 계통의 활성도는 초기 2-세포기가 포배기로의 발달이 진행됨에 따라 점차 감소하게 된다²⁵⁾.

포도당은 후기 배아 발달중에 상실배 및 포배기 시작에 우선적으로 이용된다. 이러한 에너지원 요구의 차이가 있는 배경은 초기난황기에서 기능적 해당(glycolytic) 경로가 없기 때문이다.

이러한 해당의 block을 제거하고 효소의 활성도를 증가함으로써 배아의 발달을 대호전시킬 수 있다고 하였다²⁶⁾.

배양액에서 glutamine을 첨가하고 포도당을 제거하면 2세포기에서 block을 나타내는 1-세포기 생쥐 배아의 in vitro 발달을 증진시킨다. Glutamine은 포도당이 억제하는동안 발달 block을 통한 이행기동안 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. Glutamine은 2-세포 및 8-세포 이행기에는 필요조건을 상실하지만 포도당은 이시기에 배아발달에 더 필요하다²⁷⁾.

본 연구에서 에너지원으로 포도당 첨가된 배양은 에너지원이 없는 배양에 비해 많은 수의 pre-block 생쥐배아를 상실배와 포배기로 더 발달하게 했다. 또한 관찰된 포배기 발달의 43%는 Pope의 연구보고와 비슷하게 나타났다. 이것은 포도당 포함된 배

양액이 2개의 난합분열후 당해 경로를 통해서 배아 발달에 더 많은 에너지를 제공하기 때문이다²⁸⁾.

Glutamine은 단독 혹은 BSA와 혼합상태에서도 포도당의 작용처럼 생쥐배아를 상실배와 포배기까지 발달을 계속하여 glutamine은 in vitro에서 여러가지 체세포(somatic cell)에 대한 에너지기질(substrate)이 나타났으며 생쥐배아는 glutamine을 에너지원으로 이용할 수 있다³⁰⁾³¹⁾.

그러나 Meyen등³²⁾은 glutamine이 상실배 및 포배기 발달에 아무런 유의한 효과가 없다고 보고하였다. 이러한 glutamine의 억제효과는 MEM 배양액(minimum Essential Medicen)에 존재하는 아미노산과 비타민 복합체의 함유에서 관찰된다고 하였다. 이러한 관찰들의 차이는 시간경과후 특수한 아미노산 혹은 비타민에 대한 MEM 배양액 성분에 대한 돼지배아의 예민도의 차이를 암시하고 있다.

Glutamine은 초기배아 발달에 긍정적으로 영향을 나타내는 것으로 Rosenkrans³³⁾ 등은 glutamine이 in vitro에서 돼지 배아의 발달을 호전시킨다고 결론을 내렸다.

본 연구에서 생쥐의 착상전 배아의 발달은 0.4% PVP 첨가시 protein free glutamine 첨가 배양액보다 포배기 발생율이 낮은 것은 질소가 세포활성에 이용 안되고 삼투압의 조직현상이 없기 때문인 것으로 본다. 한편 BSA은 삼투압 조절현상으로 PVP보다 더 효과가 있지만 본 연구에서는 포배기 배아의 발달이 낮게 나타났다.

Glutamine이 후기 2-세포기 생쥐배아발달에 미치는 영향을 보면 MHBS 배양액에 glutamine 첨가하지 않는 배양액에서 포배기로 배아의 발달은 29%인데 비해 1mM glutamine 첨가된 배양액에서는 43%로 glutamine 투여후 포배기로 발달이 유의하게 높았다($p < 0.05$).

이것은 glutamine 자체가 에너지원으로 단백질없이도 생쥐배아의 발달이 잘된다는 것을 의미한다³⁾.

이상으로 본 연구 결과를 요약하면 Table 2에서는 초기 2-세포기 배아와 후기 2-세포기 배아의 발달을 비교하였던바 96시간 배양후의 결과는 포배기 발생율이 28% 및 73%로 현격한 차이를 나타내고 있다. 이것은 생쥐에서는 난관으로 부터 세척하여 얻은 배아이기 때문에 2-cell block에 걸려 발생이 진전되지 않는 비율때문에 후기 2-세포기의 발생에 비해 훨씬

낮은 비율이다. 이와같은 초기 2-세포기 배아의 발생율은 앞서의 많은 연구가들에 의해 밝혀진 바 있다 (Abramczuk et al, 1977¹⁸), Bae & Park, 1987³⁵).

한편 후기 2-세포배아의 발달은 어느 다른 배아에서와는 달리 Ca^{2+} 가 없는 배양액에서도 8-세포기 및 16세포기까지의 배아로 발생되고 있음을 Bae & Park(1989)³⁵이 보여 주었다. 그러나 후기 2-세포기 배아가 Ca^{2+} 세포분열 자체에는 Ca^{+2} 이 필요치 않으나 초기 8-세포기에 나타나는 compaction 과정에서는 Ca^{+2} 없이는 전혀 compaction이 일어나지 않아 장기간 더 배양할 경우 배아의 퇴화 현상이 궁극적으로 일어나고 있다(Kim & Bae, 1993)³⁶. 또한 Kim & Bae(1993)³⁶은 compaction시 Ca^{+2} 대신 Sr^{+} 이 고농도로 존재할시는 Ca^{+2} 대신으로 compaction을 유도될 수 있다는 증명을 이미 한 바 있다.

한편 BSA, PVP의 macromolecule의 효과를 보기위해서 각 0.4%의 BSA, PVP, BSA-free group등으로 나누었으나 1mM glutamine이 첨가된 것은 공통적이다. 이들 group에서 포배기로의 발생율은 현격한 차이가 있을것 같지는 않다.

다만 BSA 0.4%에서 유의한 차이가 나타났다. 이와같이 group간의 현격한 차이가 없는 것은 1mM glutamine이 공통적으로 첨가됨으로서 발생율의 차이를 상쇄시킨 것처럼 보인다. 이와같은 해석이 맞다는 것은 Table 5에서 보면 그 이유가 분명하게 밝혀지고 있다. 즉, PVP 자체는 배아발생에 오히려 저해되는 경향을 나타내며 이러한 저해경향은 농도에 따라 증가하고 있으나 만약 glutamine이 배양액에 첨가될 경우 이러한 PVP의 발생저해작용을 오히려 상쇄하여 없어지고 있다. 이와같이 아미노산이 macromolecule을 대신할 수 있다는 것을 증명해주고 있다. 아미노산중 glutamine의 에너지원 및 단백질 합성에 기여한다는 점은 Bae & Foote(1975)²¹등이 일찍이 이미 토끼의 여포난자 성숙과정에서 증명한바 있으며 glutamine이 생쥐배아에서는 에너지원으로 사용되고 있다는 뒷받침을 Carney & Bavister(1987)²⁰ 및 Gardner et al(1989)³⁷, Zielke et al(1984)²⁴ 역시 glutamine의 에너지로 사용된다는 증명을 한바 있으며 이후 Chatot et al(1989)²⁸, Petters et al(1990) 생쥐배아 발생에 있어 glutamine의 에너지원을 지지하고 있다.

결 론

본 연구에서 0.4% BSA 첨가된 MHBS 배양액과 protein-free, 0.4% PVP 및 1mM glutamine 첨가된 MHBS 배양액을 이용하여 후기 2-세포기 생쥐배아의 발달과정을 비교관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 생쥐배아의 발생능력이 있어서 초기 2-세포기 배아보다(28%) 후기 2-세포기 생쥐배아의 발달이 73%로 유의한 증가를 나타냈다($p < 0.05$).

2) Macromolecule이 후기 2-세포기의 배아발달에 미치는 영향으로 0.4% BSA, 0.4% PVP 투여보다 BSA 없는 glutamine 첨가된 배양에서 더 유의성 있게 나타났다($p < 0.05$).

3) 1mM glutamine 첨가된 New MHBS 배양액에서 BSA 및 glutamine 없는 MHBS 배양액에서 보다 후기 2-세포기의 포배기 배아발달이 더 효과있게 나타났다.

4) PVP는 배아발생을 촉진하기 보다는 오히려 억제시키는 것 같으며 이러한 억제 효과는 농도에 비례하여 증가하지만 glutamine이 첨가될 때는 PVP의 배아발생의 억제효과가 모두 상쇄되어 없어지는 것으로 나타나고 있어 glutamine의 중요성이 더욱 강조되고 있다.

5) 본 연구에서 New MHBS 배지에 glutamine 첨가가 후기 2-세포기 생쥐배아의 체외발달하는데 촉진역활을 하고 있는 점이 재차 강조되고 있다.

References

- 1) Bavister BD : *Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. In the Mammalian Preimplantation Embryos. Regulation of Growth and Differentiation in Vitro, pp219-249. Ed BD Bavister, Plenum Press, New York, 1987*
- 2) Caro CM and Trounson A : *Successful fertilization, embryo development, and pregnancy in human in vitro fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. J Vitro Fert Embryo Transfer 1986 : 3 : 215-217*
- 3) Cholewa JA and Whitten WK : *Development of two-*

- cell mouse embryo in the absence of a fixed-nitrogen source. *J Reprod Fert* 1990 : 22 : 553-555
- 4) Caro CM and Trounson A : *The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro. J Vitro Fert Embryo Transfer* 1984 : 1 : 183-187
 - 5) Dandekar P and Glass R : *Effect of media and protein source on mouse embryo development. Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the American Fertility Society and the 18th Annual Meeting of the Canadian Fertility and Andrology Society, 1986, Abstr p366*
 - 6) Colver R, Howe AM, White EW, et al : *Stage specific development of mouse embryo in simple and complex culture media. Proceedings of the Fifth World Congress on in Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 1987, Abstr, Ap-610*
 - 7) Bae IH, Channing CP : *Effect of calcium ion on the maturation of cumulus enclosed pig follicular oocytes isolated from medium sized graafian follicles. Biol Reprod* 1985 : 33 : 79-87
 - 8) 정혜원 · 유한기 · 배인하 : Ca^{2+} Inhibitor가 생쥐 난자 성숙에 미치는 영향. *대한불임학회지* 1992 : 19 : 15-29
 - 9) Brinster RI : *A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp Cell Res* 1963 : 32 : 205-208
 - 10) Brinster RI : *Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interactions of energy sources. J Reprod Fert* 1965a : 10 : 227-240
 - 11) Goddard MJ and Pratt HPM : *Control of events during early cleavage of the mouse embryo : an analysis of the 2-cell block. J Embryol Exp Morph* 1983 : 73 : 111-133
 - 12) Kaufman MH and Sacks I : *Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos. J Embryol Exp Morph* 1976 : 35 : 179-190
 - 13) Muggleton-Harris AL, Whittingham DG, Wilson L : *Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. Nature* 1982 : 299 : 460
 - 14) Pratt HPM, Muggleton-Harris AL : *Cycling cytoplasmic factor that promote mitosis in the cultured 2-cell mouse embryo. Development* 1988 : 104 : 115
 - 15) Biggers JD, Whittingham DG and Donahue RP : *The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc Natn Acad Sci USA* 1967 : 58 : 560-567
 - 16) Cross PC and Brinster RI : *The sensitivity of on-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. Exp Cell Res* 1973 : 77 : 57-62
 - 17) Quinn P and Harlow GM : *The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. J Exp Zool* 1978 : 206 : 73-80
 - 18) Abramczuk J, Salter D and Koprowski H : *The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Deve Biol* 1977 : 61 : 378-383
 - 19) Bavister BD, Leibfried M and Leiberman G : *Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol Reprod* 1983 : 28 : 235-247
 - 20) Carney EW and Bavister BD : *Stimulatory and inhibitory effects of amino acids on development of hamster eight-cell embryos in vitro. J in Vitro Fert Embryo Transfer* 1987 : 4 : 162-167
 - 21) Bae IH And Foote RH : *Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. J Reprod Fert* 1980 : 59 : 11-13
 - 22) Ducibella T and Anderson E : *Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo : prerequisite for morphogenesis of the blastocyst. Devel Biol* 1975 : 47 : 45-48
 - 23) Bilozur M and Powers RD : *Two sites for calcium action in compaction of the mouse embryo. Exp Cell Res* 1982 : 142 : 39-45
 - 24) Zielke HR, Aielke CI, Oz and PT : *Glutamine : A major energy source for cultured mammalian cell. Test Proc* 1984 : 43 : 121-125
 - 25) Ogawa T, Marrs RP : *The effect of protein supplement in single-cell mouse embryos in vitro. Fertil Steril* 1985 : 44 : 493-498
 - 26) O'Fallon JV, Wright RW, Jr : *Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. Biol Reprod* 1986 : 34 : 58-64
 - 27) Barbehenn FK, Wales RG, Lowry OH : *The explanation for the blockade of glycolysis in early mouse embryo. Proc Natn Acad Sci USA* 1974 : 71 : 1056-1060
 - 28) Chatot CI, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JI and Torres I : *An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. J Reprod Fert* 1989 : 86 : 679-688
 - 29) Pope CE : *In vitro culture of preimplantation pig embryos. PhD thesis. University of Missouri-Columbia*
 - 30) Reitzer LI, Wice BM and IV Encell D : *Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. J Biol Chem* 1979 : 254 : 2669-2676

- 31) Brinster RI : *Uptake and incorporation of amino acid by the preimplantation mouse embryo. J Reprod Fert* 1971 : 27 : 329-338
- 32) Chatot CI, Tasca RJter BD : *Stimulatory and inhibitory effects and Ziomek CA : Glutamine uptake and unilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium. J Reprod Fert* 1990 : 89 : 335-346
- 33) Meyen BA, Rasenkrans CF and Davis DI : *Development of pig blastocysts in vitro is altered by serum, bovine serum albumin and amino acid and vitamins. Theriogenology* 1989 : 31 : 463-471
- 34) Rosenkrans CF, Jr, Davis DI and Milliken G : *Pig blastocyst development in vitro is affected by amino acid. J Anim Sci* 1989 : 67 : 1503-1508
- 35) 배인하 · 박지혜 : 세포분열이 왕성한 생쥐배세포에서 세포분열에 대한 Ca^{++} 의 요구와 세포막 투과성에 대한 연구. 대한불임학회잡지 1987 : 14 : 93-100
- 36) 김희선 · 배인하 : 생쥐 8세포배의 compaction에 미치는 칼슘 inhibitor의 영향. 1994 : 21 : 49-62
- 37) Gardner DK, Clarke RN, Lechene GP, Biggors ID : *Development of a noninvasive ultramicrofluorometric method for measuring net uptake of glutamine by single preimplantation mouse embryos. Gamete Res* 1989 : 24 : 427
- 38) Petters RM, Johnson BH, Real MI, Archibong AE : *Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro. J Reprod Fert* 1990 : 89 : 269-275