생쥐 초기배아의 Glucose Transporter 유전자 발현 양상에 관한 연구

삼성제일병원 제일의학연구소 불임연구실[1], 서울여자대학교 생물학과 발생학실험실[2]

염혜원[1,2], 변혜경[1], 송견지[1], 김해권[2], 이호준[1]

Differential Expression of Glucose Transporter Gene in Mouse Early Embryos

Youm Hyewon[1], Byun Hyekyung[1], Song Gyunji[1], Kim Haekwon[2] and Lee Ho-Joon[1]

[1]Infertility Research Laboratory, Cheil Research Institute, Samsung Cheil Hospital, [2]Laboratory of Development, Department of Biology, Seoul Women's University, Seoul, Korea

= Abstract =

The uptake of glucose for metabolism and growth is essential to most animal cells and is mediated by glucose-transporter(GLUT) proteins.

The aim of this study was to determine which class of glucose transporter molecules was responsible for uptake of glucose in the mouse early embryo and at which stage the corresponding genes were expressed. In addition, co-culture system with Vero cell was used to investigate the effect of the system on GLUT expression.

Two-cell stage embryos were collected from the superovulated ICR female and divided into 3 groups. As a control, embryos were cultured in 0.4% BSA-T6 medium which includes glucose. For the experimental groups, embryos were cultured in either co-culture system with Vero cells or glucose-free T6 medium supplemented with 0.4% BSA and pyruvate as an energy substrate. 2-cell to blastocyst stage embryos in

those groups were respectively collected into microtubes(50 embryos/tube). Total RNA was extracted and RT-PCR was performed. The products were analysed after staining ethidium bromide by 2% agarose gel electrophoresis.

Blastocysts were collected from each group at 120hr after hCG injection. They were fixed in 2.5% glutaraldehyde, stained with hoechst, and mounted for observation.

In control, GLUT1 was expressed from 4-cell to blastocyst. GLUT2 and GLUT3 were expressed in morula and blastocyst. GLUT4 was expressed in all stages. When embryos were cultured in glucose-free medium, no significant difference was shown in the expression of GLUT1, 2 and 3, compared to control. However GLUT4 was not expressed until morular stage. When embryos were co-cultured with Vero cell, there was no significant difference in the expression of GLUT1, 2, 3 and 4 compared to control.

To determine cell growth of embryos, the average cell number of blastocyst was counted. The cell number of co-culture (93.8±3.1, n=35) is significantly higher than that of control and glucose-free group (76.6± 3.8, n=35 and 68.2±4.3, n=30).

This study shows that the GLUT genes are expressed differently according to embryo stage. GLUTs were detectable throughout mouse preimplantation development in control and co-culture groups. However, GLUT4 was not detected from 2- to 8-cell stage but detected from morula stage in glucose-free medium, suggested that GLUT genes are expressed autocrinally in the embryo regardless of the presence of glucose as an energy substrate. In addition, co-culture system can increase the cell count of blastocyst but not improve the expression of GLUT.

In conclusion, expression of GLUT is dependent on embryo stage in preimplantation embryo development.

서 론

포도당은 두가지 기작에 의해 세포막을 통과 할 수 있다. Sodium-coupled active carrier system과 sodium-independent Facilitative glucose transporter system이다 (Silverman, 1991). facilitative glucose transporter(GLUT) 유전자들은 세포막을 관통하는 단백질로서(Thorens et al., 1990) 구조적으로는 서로 다르지만 많은 유사성을 지니고 있다. 지금까지 7종류의 GLUT isoform 유전자 서열과 단백질이 알려졌지만 GLUT가 포유류 배아에서 발현되는 시기와 기능을 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다.

GLUT의 여러 가지 isoform들 중 GLUT1은 대부분의 조직세포에서 발현되며 GLUT2는 hepatocytes와 insulin을 생산하는 β-세포에서 포도당의 이동을 매개하고 (Hogan et al., 1991) GLUT3은 기본적으로 뇌와 신장에서 발현된다(Pantaleon et al., 1997). Insulin으로 포도당의 유입을 자극하면 근육과 지방조직 등의 세포 안에 분포하는 GLUT4 분자들이 세포막 쪽으로 이동하고 그곳에서 insulin에 의해 자극된 포도당 흡수를 주관한다. GLUT5는 최근에 알려진 유전자로서 소장에서 포도당을 흡수하는데 관여한다(Bell et al., 1990).

GLUT 분자는 약 500개의 아미노산을 지닌 단백질이며 아미노산 배열에 있어서 서로간에 40-65%의 유사성을 갖는다(Thorens et al., 1990). GLUT는 구조적으로 12개의 membrane-spanning domains을 지니며 이것은 포도당이 통과할 수 있는 channel이나 pore를 이룰 것이라고 알려져 있다.

GLUT는 에너지원인 포도당을 흡수하는 transporter이므로 체세포를 이용한 공동배양이 GLUT 유전자 발현에 영향을 끼쳐 단백질 활성을 증가시키고 결국 생쥐 배아의 발달을 도울 것이라는 가정으로 공동배양한 생쥐 배아를 실험군에 포함시켰다.

본 연구에서는 착상 전, 생쥐 초기배아가 포도당을 흡수하는데 어떤 GLUT 분자군이 관여하며 배아의 발생단계에 따라 어떤 GLUT 유전자들이 발현되는지 RT-PCR 방법을 이용하여 알아보고자 하였다. 또한 배아를 vero cell로 공동배양하였을 때, 그리고 포도당이 결여된 배양액에서 키웠을 때 GLUT의 발현 양상에 어떤 변화가 있는지를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 배아의 획득

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 4-5주된 암컷 생쥐(ICR strain)와 생후 12주 이상된 수컷 생쥐(ICR strain)이다.

초기배아를 획득하기 위하여 암컷 생쥐의 복강내에 25 IU/ml의 PMSG를 투여하고 46-48시간 간격으로 암컷 생쥐의 복강에 hCG를 주사하여 과배란을 유도하였다. 이어서 각각 한 마리의 암컷, 수컷 생쥐를 하룻밤 동안 교미시키고 다음날 아침에 암컷 생쥐의 vagina를 관찰하여 plug가 보일 때 교미하였다고 판정하였다.

hCG를 주사한 뒤 48시간 째에 plug가 확인되었던 암컷 생쥐를 경추파열로 도살한 뒤 수란관을 적출하여 0.4% BSA를 함유한 T6 medium에서 배양액을 관류하는 방법으로 2-세포기의 배아를 획득하였다.

2. 배아의 배양

채취된 2-세포기 배아를 세 군으로 나누어 첫 번째 군은 포도당이 첨가된 배양액에서 배양하였고, 두 번째 군은 vero cell mono layer 위에서 공동배양 하였고, 세 번째 군은 포도당이 없는 배양액 내에서 배양하였다.

첫 번째 군의 배아는 포도당이 함유된 T6 medium에 0.4%의 bovine serum albumin(BSA)를 첨가한 배양액 내에서 paraffin oil drop 방법, 즉 배양접시 바닥에 50㎕의 배양액 drop을 만들고 그 위에 paraffin oil을 덮은 후 drop 내에서 배아를 키우는 방법을 이용하여 배양하였다.

두 번째 군의 배아는 vero cell이 한 층으로 깔려 있는 4-well 배양접시(Falcon)에서 0.4%의 BSA를 첨가한 T6 medium으로 배양하였다.

세 번째 군의 배아는 포도당이 결여된 T6 medium에 0.4%의 BSA를 첨가한 배양액에서 paraffin oil drop 방법을 이용하여 배양하였다.

이 때 세 군의 배아들을 37℃ 온도에서 공기중 5% CO_2, 100% 습도가 유지되는 배양기(Queue)에서 배양하였다.

3. 공동배양

공동배양에 사용된 세포는 vero cell line(F-11497)으로 10% FBS를 첨가한 Ham's F10 배양액을 이용하여 최종 농도가 0.5 X 10^5/ml로 되게 준비하였고 4-well 배양접시에 각 well 당 1.0ml씩 분주하였다.

다음날 0.4% BSA를 함유한 T6 medium으로 4-well 배양접시 바닥에 붙어서 자라기 시작한 vero cell을 살짝 씻어준 후 다시 0.4% BSA를 넣은 T6 medium을 0.8ml씩 각 well에 채웠다. 1시간 이상 지난 뒤, 위와 같이 준비한 4-well 배양접시로 암컷 생쥐에서 획득한 2-세포기 배아를 옮기고 체외배양 하였다. 배아의 발달에 따라 각 단계별로 배아를 50개씩 채취하여 200㎕의 Trizol(Gibco BRL)에 넣었다.

4. RNA 추출

생쥐의 체내 혹은 체외에서 발행한 배아를 각 발생단계별로 나누어 200㎕의 Trizol이 들어있는 eppendorf tube에 넣은 뒤 -70℃에 보관하였다.

각 tube 당 50개의 배아를 담은 후 여기에 RNA 추출 및 RT-PCR 효율에 대한 비교군으로 0.5pg/embryo의 rabbit α-globin을 첨가하였다. RNA를 분리하기 위하여 tube에 Trizol 부피의 2/10의 chloroform을 넣고 섞은 후 12,000g, 4℃에서 15분간 원심분리하였다. 이것의 상층액을 따서 동량의 isopropyl alcohol과 섞은 후 다시 12,000g, 4℃에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 남은 pellet에 75% ethanol 500㎕를 첨가한 뒤 vortex하고 앞과 같은 조건으로 원심분리하였다. 침전

한 pellet 위로 남은 ethanol은 버리고 alcohol이 다 빠질 때까지 pellet을 공기 중에서 건조시킨 후, 3차 증류수에 0.1% diethyl pyrocarbonate(Sigma)를 녹인 용액(DEPC-DW)으로 최종 부피 20μl를 맞추었다.

5. RT-PCR

Reverse transcription(RT)은 각각의 발생단계에 따라 50개씩의 배아를 재료로 DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer)를 이용하여 행하였다.

반응은 DEPC-DW로 최종부피를 20μl로 맞춘 total RNA에 10μl의 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl과 1mM dNTP, 20unit의 RNase inhibitor 그리고 5pmol oligo(dT), 마지막으로 5 unit의 Avian myeloblastosis virus(AMV)를 넣어 총 50μl의 부피를 맞춘 혼합용액에서 진행되었다.

RT 반응은 65℃에서 10분동안 RNA를 denaturation하고, 42℃ 온도에서 60분동안 RNA를 역전사하여 cDNA를 합성하고, 99℃에서 5분동안 AMV reverse transcriptase를 불활성시키는 과정으로 진행되었다. 반응이 끝난 후 sample을 -20℃에서 보관하거나 곧이어 PCR과정을 수행하였다.

PCR은 각 발생단계별로 동일하게 RT product 부피의 1/5을 사용하였다. 시료에 2μl의 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 각각 1mM의 dNTP 4μl, 1unit의 Taq polymerase (TaKaRa), 3'과 5'의 primer 10pmol을 1μl씩 그리고 10μl의 RT product를 첨가한 후 각 혼합물들의 증발을 방지하기 위하여 oil을 덮고 Stratagene PCR machine을 사용하여 PCR을 행하였다.

PCR 반응은 첫 번째 cycle에서 94℃, 2분동안 denaturation을 행하였고, GLUT의 종류에 따라 primer가 annealing 하기 알맞은 온도를 정하여 GLUT1은 66℃, GLUT2은 64℃, GLUT3은 64℃ 그리고 GLUT4는 60℃에서 1분 30초동안 annealing을 진행하였다. 그 후 72℃에서 1분동안 extension 과정을 수행하였다. 다음의 43 cycle은 첫 번째 cycle에서 94℃, 40초동안 denaturation을 수행하였고, 첫 번째 cycle과 동일하게 각 GLUT 종류에 따른 primer의 annealing 온도에서 1분 30초동안 annealing을 진행하였으며 72℃에서 1분동안 extension 행하였다. 마지막 1 cycle은 94℃, 40초동안 denaturation 하였고, 첫 번째 cycle과 동일하게 각 GLUT 종류에 따른 primer의 annealing 온도에서 1분 30초동안 annealing 하였고, 72℃에서 1분동안 extension 과정을 진행하였다. 이렇게 얻어진 PCR product를 0.5μg/ml의 ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel에 전기영동하여 UV에서 관찰하였다.

6. Primer Pairs

본 실험에서 RT-PCR에 이용한 GLUT cDNA의 primer pairs는 Table. 1에 제시하였다.

7. 포배아의 할구수 계수

hCG를 주사한 뒤 120시간 되는 때 체외에서 배양중이던 세군의 배아들로부터 포배기 배아를 채취하였다. 이 포배아들을 2.5% glutaraldehyde에서 고정시킨 후 PBS로

씻어내고, 100μg/ml의 hoechst를 이용하여 염색하였다. 다시 포배아들을 PBS에서 씻어낸 뒤 mounting 하고 UV에서 관찰하며 배아의 할구수를 세었다.

Table 1. Primers used in the experiment.

GLUT	Primer pairs	Primer Sequence	Size	Orgin
GLUT1	5'-primer	5'-GCA TCG CCC TCG CCC TGC TCG ACG-3'	361bp	Rat
	3'-primer	5'-GCA CCC CCC TGC CCG AAG CCG CAA-3'		
GLUT2	5'-primer	5'-CCG TCG GAC TTG TCC TCC TCG-3'	418bp	Mouse
	3'-primer	5'-CTC TCT GAA GAC CCC ACG AAT TG-3'		
GLUT3	5'-primer	5'-TCA TCT TCG CTG CCT TCC TCA-3'	284bp	Mouse
	3'-primer	5'-CAG CAC TCA GAA GCA GTC CTG GT-3'		
GLUT4	5'-primer	5'-CGA GCT CGT GTG GTC AAT ACC GTG-3'	244bp	Rat
	3'-primer	5'-CCG CCA CAA TGA ACC ACG GCA TCG-3'		

결 과

배아를 2-세포기부터 체외배양하다가 발생 시기별로 2-세포기, 4-세포기, 8-세포기, 상실기, 포배기의 배아들을 50개씩 선택하여 RNA를 추출하고, GLUT(1-4) cDNA primer들을 이용하여 RT-PCR을 행하였다. 세포별 GLUT(1-4)의 발현 결과는 아래와 같다.

1. GLUT1의 발현

GLUT1의 발현양상을 살펴보면 대조군은 4-, 8-세포기, 상실기와 포배기에서 GLUT1 cDNA의 primer 크기인 361bp band를 보이고(Fig. 1, panel A), 첫 번째 실험군인 공동배양 그룹도 4-, 8-세포기, 상실기와 포배기에서 GLUT1을 발현하였다(Fig. 1, panel B). 포도당이 결여된 배양액에서 배양한 생쥐 배아는 8-세포기, 상실기, 포배기에서만 GLUT1에 해당하는 361bp 부위에서 band를 보였다(Fig. 1, panel C). 세 군 사이에서 GLUT1이 발현되는 양에는 큰 차이가 없었다.

2. GLUT2의 발현

대조군과 두가지 실험군 모두에서 상실기와 포배기에 GLUT2 cDNA의 primer 크기인 418bp band를 나타내므로 이 시기에 GLUT2가 발현됨을 보았다(Fig. 2, panel A,B,C). 세 군에서 발현되는 GLUT2의 양에는 큰 차이가 없었다.

3. GLUT3의 발현

대조군과 두 실험군에서 상실기와 포배기에 GLUT3의 발현을 의미하는 84bp의 band를 보이므로 그 발현시기를 확인하였고 양적인 차이는 없었다(Fig. 3, panel A,B,C).

4. GLUT4의 발현

대조군에서는 2-, 4-, 8-세포기, 상실기 및 포배기까지 연속적으로 GLUT4 cDNA의 primer 크기인 244bp band가 나타났다(Fig. 4, panel A). Vero Cell로 공동배양한 실험군에서도 4-, 8-세포기와 상실기 및 포배기에서 연속적으로 GLUT4의 cDNA를 의미하는 244bp band가 발현되었다(Fig. 4, panel B)
포도당이 결여된 배양액에서 배아를 키운 실험군에서는 2-세포기부터 8-세포기까지 GLUT4가 발현되지 않다가 상실기와 포배기에 이르러 244bp의 band를 보이며 GLUT4가 발현되었다(Fig. 4, panel C).
세 군간에 GLUT4가 발현되는 양에는 큰 차이가 없었다.

5. α-globin의 발현

RNA를 추출하고 RT-PCR과정을 수행한 결과를 확인하기 위하여 control로 α-globin을 이용하였다. 포도당이 포함된 배양액에서 자란 배아와 vero cell monolayer 위에서 공동배양된 배아 그리고 포도당이 없는 배양액에서 배양된 배아의 2-, 4-, 8-세포기, 상실기 및 포배기의 모든 발생단계에서 α-globin을 의미하는 257bp band가 나타났으므로 α-globin가 발현되었음을 보았다(Fig. 5, panel A, B, C)

6. 포배아의 할구수

배아의 성장률을 보기 위하여 포배기 배아의 할구수를 계수하였다.
대조군에서는 35개의 포배아에서 평균 76.6(±3.8)개의 할구를 확인하였다. 공동배양군에서는 포배아 35개의 할구수를 계수하여 평균 93.8(±3.1)임을 관찰하였다.
포도당이 결여된 배양군에서는 30개의 포배기 배아에서 평균 68.2(±4.3)개의 할구를 확인하였다.

Table 2. Differential expression of GLUT(1-4) in a control group and two experimental groups.

Type of culture	Type of GLUT	In vivo	In Vitro			
		2-cell	4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
Control	GLUT1		○	○	○	○
	GLUT2				○	○
	GLUT3				○	○
	GLUT4	○	○	○	○	○
Co-culture	GLUT1		○	○	○	○
	GLUT2				○	○
	GLUT3				○	○
	GLUT4		○	○	○	○
Glucose free	GLUT1			○	○	○
	GLUT2				○	○
	GLUT3				○	○
	GLUT4				○	○

'○'means presence of GLUT expression.

Table 3. Total cell number of blastocyst after 120 hr after hCG injection.

	No. of Embryo	Average	SE
Control	35	76.57	3.76
Co-culture	35	93.83*	3.10
Glugcose-free	30	68.20	4.25

*, $P < 0.0007$

고 찰

본 실험의 결과 GLUT 1은 포도당을 함유한 배양군과 vero cell을 이용한 공동배양군의 생쥐 배아 모두에서 4-, 8-세포기, 상실기, 포배기에 발현되었고, 포도당을 제거한 배양군의 생쥐 배아에서는 8-세포기, 상실기 그리고 포배기에서 발현되었다. GLUT 2와 GLUT 3는 포도당을 함유한 배양군과 공동배양군, 포도당을 제거한 배양군 모두의 생쥐 배아에서 상실기와 포배기에 발현되었다. GLUT 4는 포도당을 함유한 배양액으로 배양한 생쥐배아의 2-, 4-, 8-세포기, 상실기와 포배기에서 연속적으로 발현되었고 공동배양군의 배아에서도 4-, 8-세포기, 상실기와 포배기에서 발현되었지만 포도당을 제거한 배양군의 배아에서는 상실기와 포배기에서만 발현되었다.

생쥐 배아에서 insulin receptor 유전자의 발현이 8-세포기부터 그 이후로 계속 관찰되었기 때문에(Heyner et al., 1989) insulin에 의해 조절되는 GLUT 4도 8-세포기부터 발현될 것이라고 알려져 왔으나, 착상 전 초기배아의 발생단계 중 GLUT 4 유전자의 발현이나 단백질을 발견하지 못하였다(Hogan et al., 1991). 하지만 본 연구에서는 GLUT 4가 2-세포기부터 연속적으로 발현되었고, 포도당이 결여된 환경에서 그 발현 시기가 늦어지는 결과를 얻었다.

GLUT 1은 난자에서부터 초기 배아시기 전반에 걸쳐 발현되고 1-세포기 이후부터 관찰되는 포도당 흡수와 관계 있으며, GLUT 2는 상실기와 포배기에서 발현되는데 8-세포기 이후부터 포도당 흡수가 증가함에 따라 GLUT 1과 함께 더 많은 포도당을

받아들이기 위하여 발현된다고 보고하였다(Gardner and Leese, 1988). 특히 GLUT 1은 초기 배아의 trophectoderm과 ICM에 광범위하게 분포하며 GLUT 2는 포배강 쪽의 trophectoderm에 분포한다(Aghayan et al., 1992). GLUT 3는 상실기와 포배기 배아의 apical surface에서 포도당의 흡수에 관여하는 것으로 보이며 에너지원이 pyruvate로부터 포도당으로 전환되는 시기부터 GLUT 3가 발현되는 것으로 보아 포도당에 의해 조절받는 것이라고 생각된다(Pantaleon et al., 1997). GLUT 4는 체세포에서 insulin 자극에 의해 포도당을 흡수하는 transporter로서 초기 배아가 포배기에 이르기까지 어느 시기에서도 발현되지 않았다. 따라서 본 실험에서 GLUT 4가 2-세포기 이후로 포배기까지 발현된다고 밝힌 결과는 이제까지의 실험결과와 상반되는 것이었으며 그 정확한 원인은 아직 찾지 못하였다. 이전까지의 실험에서는 CD1 mice를 이용하였으나 본 실험에서는 ICR mice를 사용하였으므로 strain에 의한 차이이거나, GLUT isoform들은 서로 그 구조와 염기서열에서 매우 높은 유사성을 지니므로 그 기능이 종에 따라 중복되거나 바뀔 수도 있다고 생각된다. 또한 포도당이 부족한 배양환경에서는 GLUT 4의 발현시기가 늦어지는 것으로 보아 GLUT 4가 포도당의 존재 유무에 의해 영향을 받고 있는 것으로 사료된다. 이렇게 GLUT의 발현양상과 분포가 각각의 isoform마다 차이를 갖고 있는 것은 생쥐 배아의 초기 발생과정에서 기능적인 중요성을 갖는 것으로 추측된다.

Trocino 등(1994)에 의하면 포도당이 적당한 농도를 유지할 때 체세포 조직은 충분히 GLUT의 활성을 조절할 수 있다. 즉 포도당의 결핍이 GLUT의 활성을 높여주거나 GLUT 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시킬 수 있으며 포도당을 필요로 하는 세포 내로 포도당의 유입을 최대화 시킬 수도 있다. 반면에 포도당이 지나치게 많이 공급되면 세포내로 더 이상의 포도당이 유입되지 않도록 GLUT의 활성, GLUT 유전자나 단백질의 발현은 감소되는데 이는 GLUT system이 포도당의 농도에 의해 down-regulation 됨을 의미한다(Purrello et al., 1991; Takao et al., 1993)

생쥐 초기배아 발생 과정에서 포도당이 반드시 필요한 조건은 아니지만 전체적인 배아 발생 과정을 보면 포도당이 발생능력을 활성화 시키는 것으로 생각되며 포도당의 결여가 포도당 대사에 영향을 미침으로 GLUT의 발현이 늦어지거나 감소하고 이에 따라 배아의 발달률도 감소하는 것이라고 사료된다(Trocino et al., 1994). 최근 연구에 의하면 체외배양시 포도당은 배아가 상실기에서 포배기로 발달하기 위하여 필수적으로 요구되는 물질이다(Brown and Whittingham, 1991). 그러므로 GLUT가 상실기와 포배기에서 더 뚜렷한 발현양상을 보이는 것으로 추측된다.

배아의 발달률에 따른 GLUT의 발현양상을 보기 위해서 배아의 발달을 향상시키는 방법으로 알려져 있는 공동배양법을 이용하였는데 배아의 형태, 포배아로의 발달, 탈각 등을 개선하여 배아의 발생에 도움을 준다고 보고되고 있다(Plachot et al., 1996). 본연구에서는 Vero Cell을 이용한 공동배양군과 포도당이 결여된 실험군과 대조군에서 얻은 배아에서 각각 포배아의 할구수와 GLUT의 발현을 확인해 본 결과, 포배아의 발달률에서는 공동배아군에서 배아의 할구수가 유의하게 많았으며, 대조군과 포도당이 결여된 군을 비교하였을 경우에도 대조군의 할구수가 유의하게 많았다. 배아의 발달률은 공동배양군에서 현저히 증가함을 알 수 있었으나, 배아의 GLUT 발현양상은 공동배양군과 대조군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다. 이

러한 결과는 공동배양이 배아 발달에는 유용하지만 배아의 대사작용에서 포도당과 관련된 GLUT의 기능과는 연관성이 없는 것으로 사료된다.
본 연구의 결과, 포도당을 에너지원으로 이용한 배양군의 GLUT1 유전자는 생쥐 초기배아의 4-, 8-세포기, 상실기, 포배기에 발현되었고 GLUT2와 GLUT3는 상실기와 포배기에 발현되었다. 그리고 GLUT4는 2-, 4-, 8-세포기, 상실기와 포배기에서 연속적으로 발현되었다. 공동배양군에서 GLUT(1-4) 유전자의 발현양상은 대조군과 비교하여 큰 차이가 없었다. 포도당이 제외된 배양군에서 GLUT2와 GLUT3 유전자의 발현양상은 대조군과 차이가 없었으나 GLUT1 유전자는 8-세포기, 상실기와 포배기에서만 발현되었고 GLUT4 유전자는 상실기와 포배기에서만 발현되었다. GLUT는 포도당을 에너지원으로 이용하는 상실기와 포배기에서 그 발현양상이 현저함을 보았다. 이런 점을 미루어 GLUT 유전자 발현은 포도당과 밀접한 관계가 있으며 특히 GLUT4 유전자의 발현은 포도당에 의하여 조절되는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 착상 전 생쥐 초기배아의 발생단계에 따라 어떤 GLUT 유전자들이 발현되는지 알아보고자 하였다. 또한 배아를 vero cell로 공동배양하였을 때와 포도당이 결여된 배양액에서 배아를 키웠을 때 GLUT의 발현 양상에 어떤 변화가 있는지를 관찰하였다.
그 결과 GLUT1은 4-세포기부터 포배기까지 발현되고, GLUT2와 GLUT3는 상실기와 포배기에서 발현되며, GLUT4는 2-세포기부터 포배기까지 발현되는 것을 확인하였다. 대조군과 vero cell로 공동배양한 실험군 배아의 GLUT 유전자 발현 양상을 비교해 본 결과 서로간에 유의한 차이는 보이지 않았다. 한편 포도당이 없는 배양액에서 배아를 키운 경우, GLUT1, 2, 3의 유전자 발현은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나 GLUT4가 8-세포기까지는 발현되지 않다가 상실기와 포배기에서만 발현되는 것을 관찰하였다.
포배아의 할구수는 공동배양군에서 유의하게 증가하는 것을 보았지만 GLUT의 발현과는 연관성이 없는 것으로 사료된다.
결론적으로 GLUT1, 2, 3 및 GLUT4 유전자는 생쥐 초기배아가 포도당을 에너지원으로 이용하는 상실기와 포배기에서 뚜렷한 발현양상을 보이는 것으로 미루어 초기배아의 포도당 대사에 이들 GLUT(1-4) 유전자가 관여하는 것으로 여겨지다.

참 고 문 헌

Aghayan, M., L. V. Rao, R. M. Smith, L. Jarett, M. J. Charron, B. Thorens, and S. Heyner (1992) Develpomental expression and cellular localization of glucose transporter molecules during mouse preimplantation development.. *Development*. 115: 305-312

Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H. and Seino, S. (1990) Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*. 13: 198-208

Brown, J.J.G., and Whittingham (1991) The role of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice in vitro. *Development*. 112: 99-105

Gardner, D.K and Leese, H J (1988) The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation embryos. *Development*. 104: 423-429

Heyner, S., Rao, L.V., Jarett, L. and Smith, R.M. (1989) Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlation. *Dev Biol.* 134: 48-58

Hogan, A., Heyner, S., M. J. Charron, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, Thorens, B and G. A. Schultz (1991) Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development.* 113: 363-372

Pantaleon, M., M. B. Harvey, W. S. Pascoe, D. E. James, and P. L. Kaye (1997) Gluose transporter GLUT3: Oncogene, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proc, Natl, Acad, Sci, U.S.A.* 94: 3795-3800

Plachot., M. (1996) Co-culture of embryos and feeder cells. *Human Reprod. 11.(suppl.1)* :35-42

Purrello, F., Buscema, M., Vetri, M. et al., (1991) Glucose regulates both glucose transport and the glucose transporter gene expression in a hamster-derived panreatic Beta-cell line (HIT). *Diabetologia.* 34: 366-369

Silverman, M. (1991) Structure and function of hexose transporters. *Ann. Rev.*

Biochem. 60: 757-794

Takao, Y. S. Akazawa, K. Matsumoto, H. Takino, M. Akazawa, R. A. Trocino, Y. Maeda, S. Okuno, E. Kawasaki, S. Uotani, A. Yokota, S. Nagataki (1993) Glucose transporter gene expression in rat conceptus during high glucose culture. *Diavetologia*. 36:696-706

Thorens, B., M. J. Charron, and H. R. Lodish (1990) Molecular physiology Dof glucose transporters. *Diabetes Care*. 13: 209-218

Trocino, R. A., S. Akazawa, H. Takino, Y. Rakao, K. Matsumoto, Y. Maeda, S. I. Okuno, and S. Nagataki (1994) Cellular-tissue localization and regulation of the GLUT-1 protein in both the embryo and visceral yolk sac from normal and experimental diabetic rats during the early postimplantation period. *Endocrinology*. 134: 869-878

Figure 1. Expression of GLUT1 in mouse early embryos. Arrows indicate bands of GLUT1 PCR product(361bp). A; Brain tissuse was used for a control. B; Embryos were cultured in the presence of glucose. C; Embryos were co-cultured with vero cell. D; Embryos were cultured in glucose free T6 medium. S, standard; 2, 2-cell embryos; 4, 4-cell embryos; 8, 8-cell embryos; M, morula; B, blastocyst.

Figure 2. Expression of GLUT2 in mouse early embryos. Arrows indicate bands of GLUT2 PCR product(418bp). A; Liver tissuse was used for a control. B; Embryos were cultured in the presence of glucose. C; Embryos were co-cultured with vero cell. D; Embryos were cultured in glucose free T6 medium. S, standard; 2, 2-cell embryos; 4, 4-cell embryos; 8, 8-cell embryos; M, morula; B, blastocyst.

Figure 3. Expression of GLUT3 in mouse early embryos. Arrows indicate bands of GLUT3 PCR product(284bp). A; Brain tissuse was used for a control. B; Embryos were cultured in the presence of glucose. C; Embryos were co-cultured with vero cell. D; Embryos were cultured in glucose free T6 medium. S, standard; 2, 2-cell embryos; 4, 4-cell embryos; 8, 8-cell embryos; M, morula; B, blastocyst.

Figure 4. Expression of GLUT4 in mouse early embryos. Arrows indicate bands of GLUT4 PCR product(244bp). A; Muscle tissuse was used for a control. B; Embryos were cultured in the presence of glucose. C; Embryos were co-cultured with vero cell. D; Embryos were cultured in glucose free T6 medium. S, standard; 2, 2-cell embryos; 4, 4-cell embryos; 8, 8-cell embryos; M, morula; B, blastocyst.

Figure 5. Expression of α-globin in mouse early embryos. Arrows indicate bands of α-globin PCR product(257bp). A; Embryos were cultured in the presence of glucose. B; Embryos were co-cultured with vero cell. C; Embryos were cultured in glucose free T6 medium. S, standard; 2, 2-cell embryos; 4, 4-cell embryos; 8, 8-cell embryos; M, morula;B,blastocyst.

A

B

C

Figure 6. Microphotograph of cultured blastocyst stained with hoechst 120 hours post-hCG. A; Embryos in 0.4% BSA-T6 medium. B; Embryos co-cultured with Vero cell in 0.4% BSA-T6 medium. C; Embryos in 0.4% BSA-glucosefree T6 medium.