

## Concanavalin A를 매개로한 세포내 Calcium의 변화와 생쥐 포배의 팽창과 부화

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과  
전 용 필

### Concanavalin A Mediated Calcium Changes on Expansion and Hatching of the Mouse Blastocyst

Yong Pil Cheon

*Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University,  
249-1, Dongseondong 3ga, Seongbuk-gu, Seoul, 136-742, Korea*

**Objective:** The oligosaccharide moieties of glycoproteins and proteoglycans have a vital function in blastocyst differentiation. Concanavalin (ConA), a lectin, is known to bind on the preimplantation embryos, especially on blastocyst. In this study, we investigated whether ConA can modulate the trophoblast development and about the regulating mediator. Also, we investigated whether expansion is enough for hatching procession of the mouse blastocyst.

**Method:** Embryos were collected at 72 h post hCG injection and chemicals were treated after 24 h (96 hr post hCG injection). ConA or calcium ionophore A23187 were exposed to blastocyst and than analysis the developmental process for 48 hr. Intracellular free-Ca<sup>2+</sup> concentration in trophectoderm was measured with confocal laser microscope after exposing to ConA or calcium ionophore A23187. ConA-pretreated blastocyst exposed to the calcium ionophore A23187 and then analyzed the developmental process. Otherwise ouabain was treated to the blastocyst to block the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity.

**Results:** In contrast to the control blastocyst, the ConA-exposed blastocysts developed beyond the expansion stage with significantly high rate (90.4%) at 12 h post administration. ConA induced an increase the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in trophectoderm. Calcium ionophore A23187 also stimulated expansion of blastocyst. Most of the control blastocysts developed to the hatching stage at 144 h post hCG injection. However, strongly 65% of the ConA-exposed embryos were arrested at expanded stage at same time point. The developmental progression rates to hatching stage of both ConA- and calcium ionophore A23187-expose blastocysts were significantly lower than that of the control. However ConA-pretreated embryos developed to the hatching stage like control embryos. Ouabain showed a tendency to delayed the progress to expansion stage but did not inhibit the development to the hatching stage.

**Conclusion:** ConA-mediated expansion is the result of the increase of intracellular free-calcium in blastocyst stage embryo. It is suspected that expansion of the blasocyst is a essential indirect factor in

hatching and the calcium may triggering the cellular mechanisms for the both expansion and hatching progression.

**Key Words:** Concanavalin A, Calcium, Expansion, Hatching, Blastocyst

포배의 분화에 관한 연구는 착상과 연계되어 많은 측면에서 접근되어 왔으며 포배강의 형성과 팽창 그리고 영양배엽의 세포수준에서의 구조나 구성의 변화 등이 한 분야를 이루고 있으며 활발한 연구가 진행되고 있다. 포배강의 형성과 팽창은 영양배엽세포 내 극성을 형성하며 존재하는 sodium pump ( $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ )에 의한  $\text{Na}^+$ 의 포배강 내 축적과 영양배엽 (trophoectoderm)에서 분비되는 물질 축적을 통하여 물의 유입으로 진행되는 것으로 알려져 왔다.<sup>12</sup> 근래들어 포배강의 형성과 관련된 실험들을 통하여  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  이외에 small GTP-binding protein RhoA의 하부 작용기 (effector)인 Rho-kinase,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger-3 등 다른 여러 유전자 산물이 관여하고 있음이 밝혀지고 있다.<sup>34</sup>

투명대를 벗어나는 부화 기작으로는 포배강 내의 팽압 형성으로 인한 투명대에 대한 물리적인 압력 형성, 영양배엽과 자궁내막에서 분비되는 단백질 분해효소의 용해 작용,<sup>5-7</sup> 포배의 영양배엽 내 actin filament를 매개로한 세포이동<sup>8</sup> 알려져 있다. 햄스터 포배의 부화 과정은 자궁 내에서 진행될 경우 체외에서와는 달리 팽창과 무관하게 단백질 분해효소에 의해 진행되는 것으로 보고되었다.<sup>9,10</sup> 그러나 생쥐 배아는 햄스터에서와는 달리 팽창 이후 과열된 투명대 부위로 통해 빠져 나오며, 빠져나오는 과정에 actin filament의 중합과 해체를 통한 세포이동과 지속적인 포배강의 팽압의 변화를 매개로 하여 부화한다.<sup>5,8,11</sup> 따라서 생쥐 포배의 팽창 기작과 이후 발생 과정으로 발전하는 기작을 밝히는 것은 사람을 포함한 포유류 초기 발생을 이해하는데 필요하다.

착상전 초기 포배의 발달 과정은 새로운 유전자 발현을 통한 조절에 의존적이지 않는 반면, 세포 표면에 존재하는 수용체를 통한 순차적 외부 신호에 반응하여 자궁 준비 과정과 조직적으로 연계적인 발달 양상을 보인다. 포배강의 형성과 관련된 유전자 발현은 포배 이전의 시기에 진행되어 포배강 형성을 관장하나<sup>1-4</sup> 포배 형성 이후에는 여러 세포내

신호전달 과정을 통한 세포 활성화로 진행될 것으로 추정된다. 초기 배아의 표면에는 많은 올리고당들 (oligo-saccharides)이 존재하는데 lectin의 한 종류인 concanavalin A (ConA)에 결합하는 올리고당들의 양이 포배기에 유의하게 증가한다.<sup>12</sup> ConA는 세포 표면에 분포하는 분자들과 결합하여 많은 trans-membrane-signaling system을 자극하여 세포의 변화를 유도한다.<sup>13,14</sup> ConA는 cytotoxic T lymphocyte를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며 또한 세포내 calcium의 변화를 조절하여 세포 반응을 유도한다.<sup>15</sup> 따라서 ConA는 외부 신호에 대한 연구에 사용되어 왔다.

포배의 분화에서 팽창과 부화에 관한 이해는 아직까지 미미하다. 따라서 lymphocyte 등에서 세포내 활성을 유도하는 ConA를 이용하여 생쥐 포배에서 ConA에 의해 유도되는 포배의 반응을 분석하고, 세포의 반응이 lymphocyte에서 관찰되는 신호전달물질 중의 하나인 세포질 내 calcium의 양적 변화에 의한 것인지를 알아보아 포배의 팽창과 부화에 대한 이해를 도모하고자 하였다. 이를 위하여 영양배엽 세포내 calcium의 양적 변화를 calcium ionophore A23187를 이용하여 직접적으로 유도하여 calcium 증가 양상 분석과 ConA에 의한 포배의 반응이 세포내 free-calcium의 영향인지를 알아보았다. 다른 한편으로 ConA를 전처리한 후 calcium ionophore A23187을 처리하여 calcium의 변동 (oscillation)을 유도하거나 또는 ouabain을 이용하여  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 의 활성을 조절하였다. 이를 통하여 팽창과 부화에 미치는 이들 화학물질의 영향 그리고 팽창과 분화와의 상호 관계를 알아보았다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 착상전 초기 배아의 수획

착상전 초기 배아를 획득하기 위하여 6~8주 된 CD1 암컷 생쥐를 사용하였다. 실험동물은 성신여자대학교 동물사육실에서 명 14시간, 암 10시간으로

광주기가 조절되고 물과 먹이가 충분히 공급되는 표준 사육 환경에서 사육하였다. 암컷에 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 합사하여, 다음날 질진 (copulation plug) 유무를 통하여 수정 여부를 확인하였다. 실험에 사용할 배아는 임신한 생쥐를 hCG 주사 후 72시간에 경주 파괴로 도살한 후 난관과 자궁 부위를 적출하여 해부 현미경하에서 0.4% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 BWB 배양액<sup>16</sup>을 관류하여 획득하였으며, 밀착 (compaction)이 시작된 후기 8세포기 배아만을 선택하여 배양하였다.

## 2. 착상전 초기 배아의 배양

0.4% BSA를 첨가한 BWB를 기본 배양액으로 하여 배양접시 (plastic dishes, Falcon; 60×15 mm) 위에 20 µL를 방울 지게한 후, 고온 고압 멸균법으로 멸균하고 BWB로 평형 시킨 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 배양액에서 배양하였고, 이후 실험군에 따라 화학물을 첨가하여 배양하였다.

## 3. Ouabain 및 ConA의 처리

포배강의 형성과 팽창을 유도하는 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase의 억제제인 ouabain을 hCG 주사 후 96시간된 건강한 포배에 처리하여 48시간 동안 배양하였다. Ouabain은 배양액에 녹여 stock solution을 준비한 후 배양액으로 희석하여 100 µM로 준비하여 사용하였다.

처리시간에 따른 ConA의 독성 분석을 위하여 30분, 60분, 또는 지속적으로 처리한 결과를 바탕으로 10 µg/ml ConA를 함유한 20 µl 배양액에 10~13개의 hCG 주사한 후 96시간된 포배에 60분간 처리하여 발생에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 각각의 실험은 8회 반복하여 진행하였다 (n = 80~104). 이들 화학물질을 처리하면서 배아의 발생 양상을 도립현미경 (Olympus)하에서 12시간 또는 24시간과

48시간 후에 각각 관찰하였다.

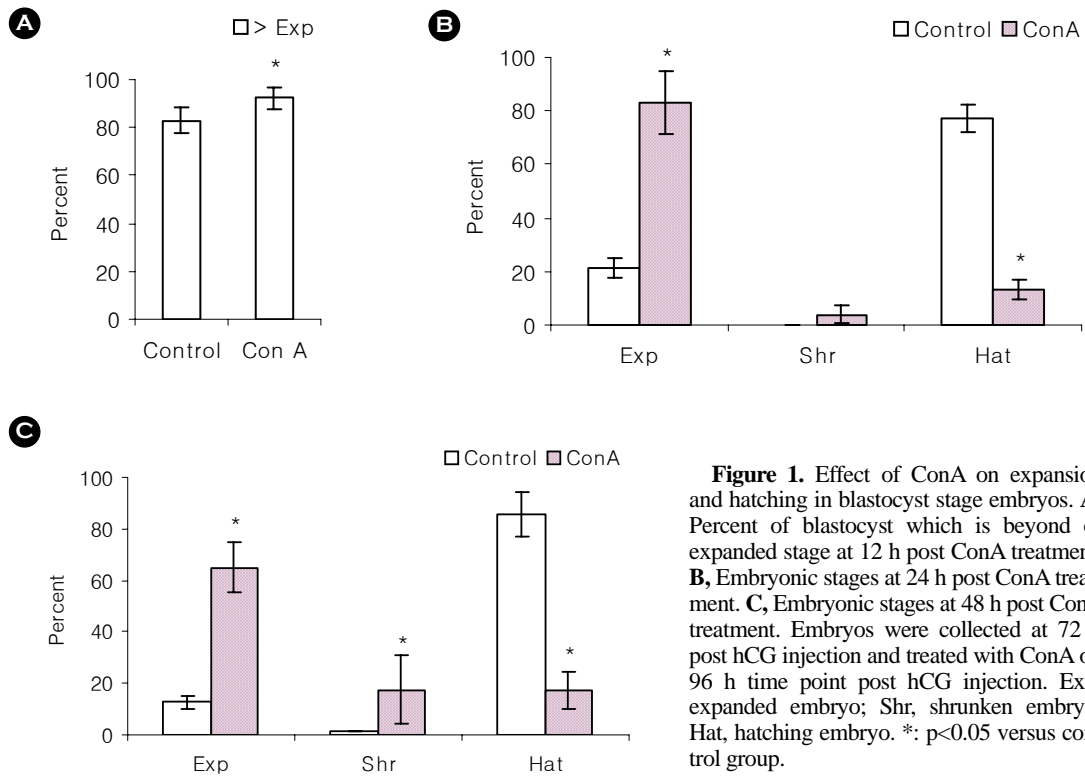
## 4. ConA 또는 calcium ionophore A23187 처리 후 포배의 세포질 내 calcium 양의 측정

ConA가 포배의 세포내 free-Ca<sup>2+</sup>의 양 변화를 유발하는지를 알아보기 위하여 또한 calcium ionophore A23187에 반응하여 변하는 영양배엽 내 Ca<sup>2+</sup>의 농도변화 특성을 알아보기 위하여 세포 투과성이 있고 free-Ca<sup>2+</sup>에 특이적인 Fluo 3-AM (Molecular Probes, Inc)을 이용하여 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 변화를 측정하였다. Confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, ISM410)을 이용하여 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 양 변화를 관찰하였다. Fluo 3-AM을 5 µM로 준비하여 hCG 주사 후 95시간된 포배에 60분 동안 37°C, 공기 중 5% CO<sub>2</sub>를 유지하는 배양기 내에서 배양하였다. 배양 후 paraffin dot slide glass에 옮겨 coverslip을 이용하여 고정시킨 후 carrier에 올려놓았다. 이 후 2초 간격으로 300회 측정하면서 측정을 시작한지 20초 후에 10 µg/ml Con A 또는 10 µM calcium ionophore A23187을 함유한 기본 배양액 0.5 ml를 첨가하여 세포내 calcium의 양 변화를 측정하여 변화 양상을 관찰하였다.

## 5. Calcium ionophore A23187의 처리

배양액내 Ca<sup>2+</sup>의 직접적인 유입이 생쥐 포배의 팽창과 부화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 calcium ionophore A23187을 10 µM 농도로 기본 배양액에 녹여 배양하였다. hCG 주사를 기준으로 96시간되는 포배를 ConA와 같은 방법으로 처리하여 48시간 동안 배양하면서 발달 과정을 관찰하였다. 처리시간에 따른 발생률 비교 실험 결과를 바탕으로 30분 동안 처리하였다 (n = 87). 배아의 배양은 organ culture dish (Falcon 3037, 60×15 mm)를 이용한 open culture 방법 또는 oil drop 방법을 사용하여 시행하였다.

다른 한편으로, ConA를 60분 동안 미리 처리한 포배를 다시 calcium ionophore A23187에 30분간 노출시킨 후 기본 배양액으로 옮겨 hCG 주사시간을 기준으로 144시간까지 배 발생을 관찰하였다 (n = 96).



**Figure 1.** Effect of ConA on expansion and hatching in blastocyst stage embryos. **A**, Percent of blastocyst which is beyond of expanded stage at 12 h post ConA treatment. **B**, Embryonic stages at 24 h post ConA treatment. **C**, Embryonic stages at 48 h post ConA treatment. Embryos were collected at 72 h post hCG injection and treated with ConA on 96 h time point post hCG injection. Exp, expanded embryo; Shr, shrunken embryo; Hat, hatching embryo. \*:  $p < 0.05$  versus control group.

## 6. 결과 분석 및 통계적 검증

hCG 주사 후 144시간까지 배양하면서 각 실험 마다의 관찰 시점에 따라 hCG 주사 후 108시간, 120시간 또는 144시간에서 도립 현미경 (Hoffman modulated contrast, Nikon Diapot TMD)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 세포덩이 형태로 퇴화한 배아 (degeneration)로 구분하였다.

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

## 결 과

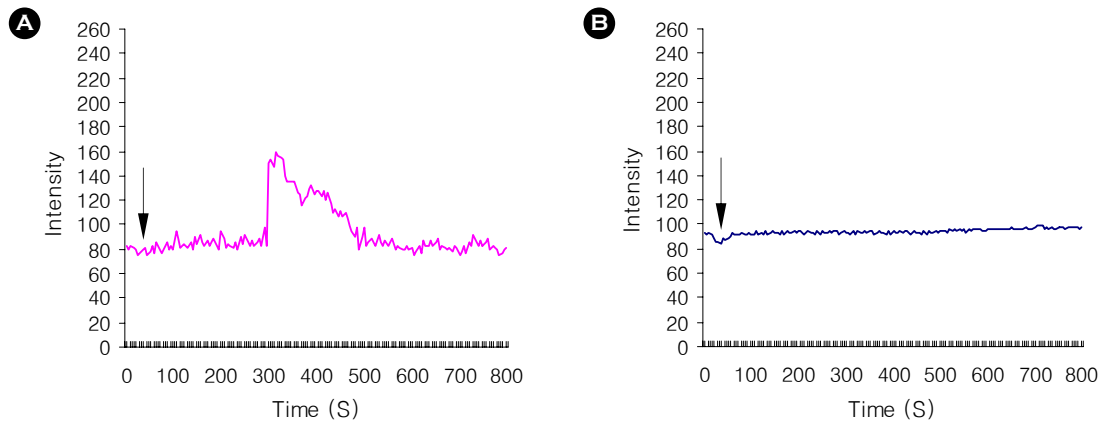
### 1. ConA가 팽창과 부화에 미치는 영향

ConA를 포배에 처리한 후 12시간에 관찰할 경

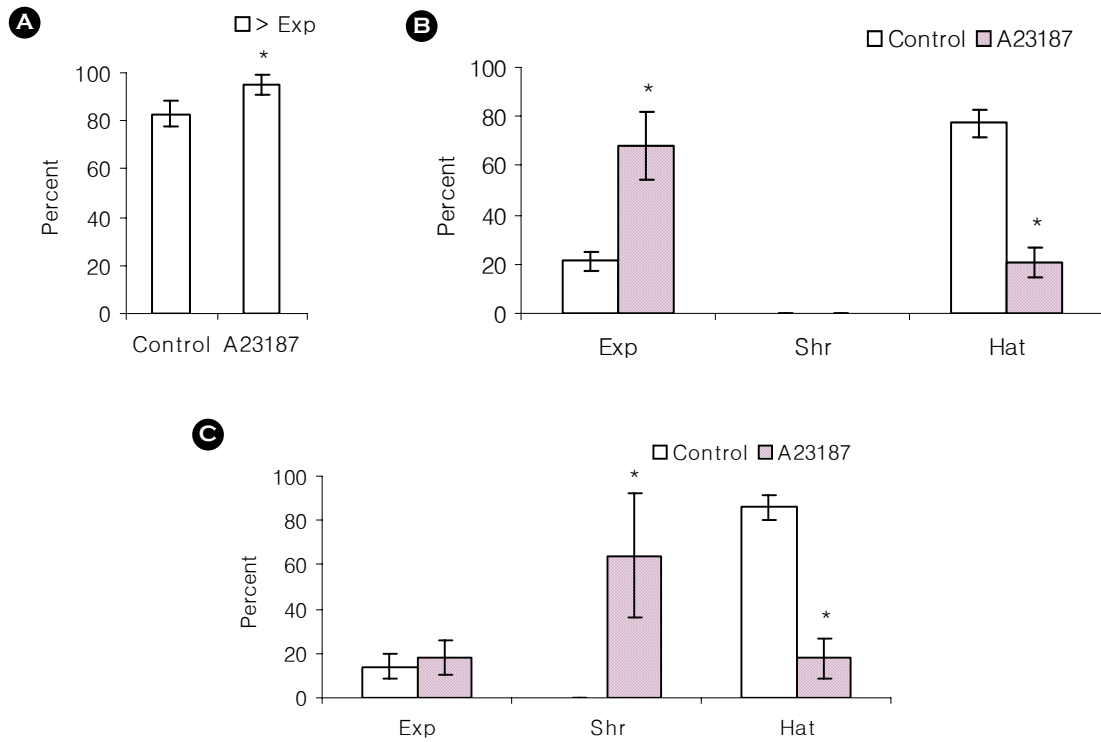
우 팽창한 상태로 발달한 배아의 비율이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다 (Figure 1A). 화학물질을 처리한 시간을 기준으로 24시간과 48시간에 부화 단계로 발전하는 비율이 대조군에서 77% 이상인 것과는 대조적으로 ConA를 처리한 포배에 있어서는 부화로 발전하는 비율이 20%를 넘지 않았다. 즉 팽창한 상태로 계속 머물러 있는 배아의 비율이 65% 이상이다 (Figure 1B, 1C).

### 2. ConA에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화

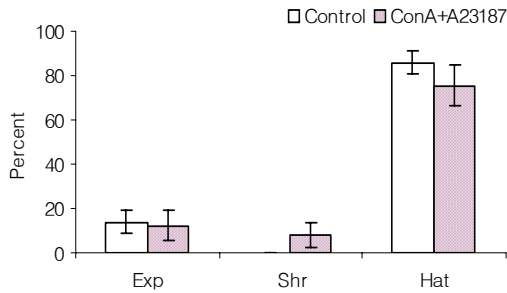
생쥐 포배에서 ConA가 세포내  $[Ca^{2+}]_i$  증가를 유도할 수 있는가를 알아보기 위하여 ConA를 처리한 후 재료 및 방법에서 언급한대로 calcium 양을 측정하였다. 포배강 형성 이후의 배아에 ConA를 처리하였을 경우 Figure 3에서와 같은 유형의  $[Ca^{2+}]_i$  변화가 영양배엽에서 관찰되었다 (Figure 2A). 한편 포배강이 수축된 배아에서는 ConA에 대한  $[Ca^{2+}]_i$ 의 양적 변화 반응을 보이지 않았다 (Figure 2B). 따라서 ConA는 기존에 보고된 체세포에서와 마찬가지로 건강한 포배의 영양배엽 내 calcium양의 증가



**Figure 2.** The change of  $[Ca^{2+}]_i$  in mouse blastocyst exposed to ConA. The arrow is the point when ConA was added. The closed arrow head show a peak. **A**, Changes of  $[Ca^{2+}]_i$  of the healthy blastocyst. Intracellular free-calcium was increased by the ConA. **B**, Changes of  $[Ca^{2+}]_i$  of the shrunken blastocyst.



**Figure 3.** Blastocyst stage embryonic development after exposed to calcium ionophore A23187. Embryos were collected at 72 h post hCG injection and exposed to calcium ionophore on 96 h post hCG injection. Embryonic stages were observed at 12 h, 24 h, and 48 h post calcium ionophore A23187 administration. **A**, Percent of blastocyst which is beyond of expanded stage at 12 h post treatment. **B**, Embryonic stages at 24 h post treatment. **C**, Embryonic stages at 48 h post treatment. Embryos were collected at 72 h post hCG injection and treated with calcium ionophore A23187 on 96 h time point post hCG injection. Exp, expanded embryo; Shr, shrunken embryo; Hat, hatching embryo. \*:  $p < 0.05$  versus control group.



**Figure 4.** Development of the ConA-pretreated blastocyst after exposed to the calcium ionophore A23187. The embryonic development was analysed at 48 h after treatment of calcium ionophore A23187. Exp, expanded embryo; Shr, shrunken embryo; Hat, hatching embryo. \*:  $p < 0.05$  versus control group.

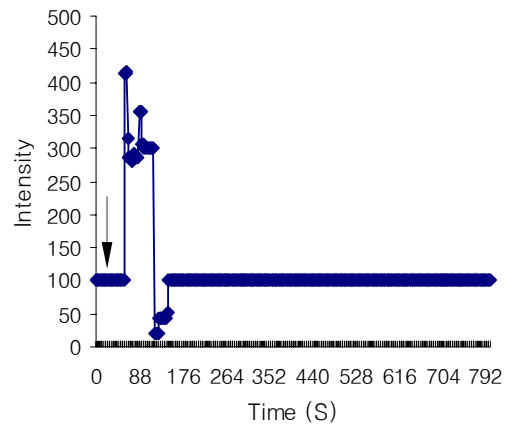
유도를 실험적으로 증명할 수 있었다.

### 3. Calcium ionophore A23187이 팽창과 부화에 미치는 영향

ConA가 생쥐 포배 내 calcium의 양 변화를 유도함으로써 팽창을 촉진한 것임을 알아보기 위하여  $IP_3$ 의 역할을 수행할 수 있는 calcium ionophore A23187을 포배에 처리하여 팽창과 부화에 미치는 영향을 알아보았다. hCG 주사를 기준으로 96시간된 배아에  $10 \mu M$  calcium ionophore A23187을 30분간 처리하고 12시간과 24시간 지난 후에 관찰 분석하였다. 포배의 팽창은 calcium ionophore A23187에 의해 촉진되었다 (Figure 3A). 즉 처리한 후 12시간이 경과되었을 때 ConA 처리 군에서와 마찬가지로 팽창 단계 이상으로 발달한 배아의 비율이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. 또한 팽창한 후 투명대의 일부가 파열되고 배아가 투명대를 빠져나오는 단계로 발전하는 비율이 대조군에 비하여 유의하게 낮았다 (Figure 3B, C).

### 4. ConA 전처리 후 calcium ionophore A23187이 부화에 미치는 영향

위의 결과에서 영양배엽 내 calcium이 팽창과 관련된 이차적인 신호전달 물질로 작용할 수 있음을 알 수 있다. Calcium ionophore A23187 처리군과 ConA 처리군에서 팽창 이후로의 배 발달율이 저조한 원인을 calcium의 양적 증가와 관련되어 있는가



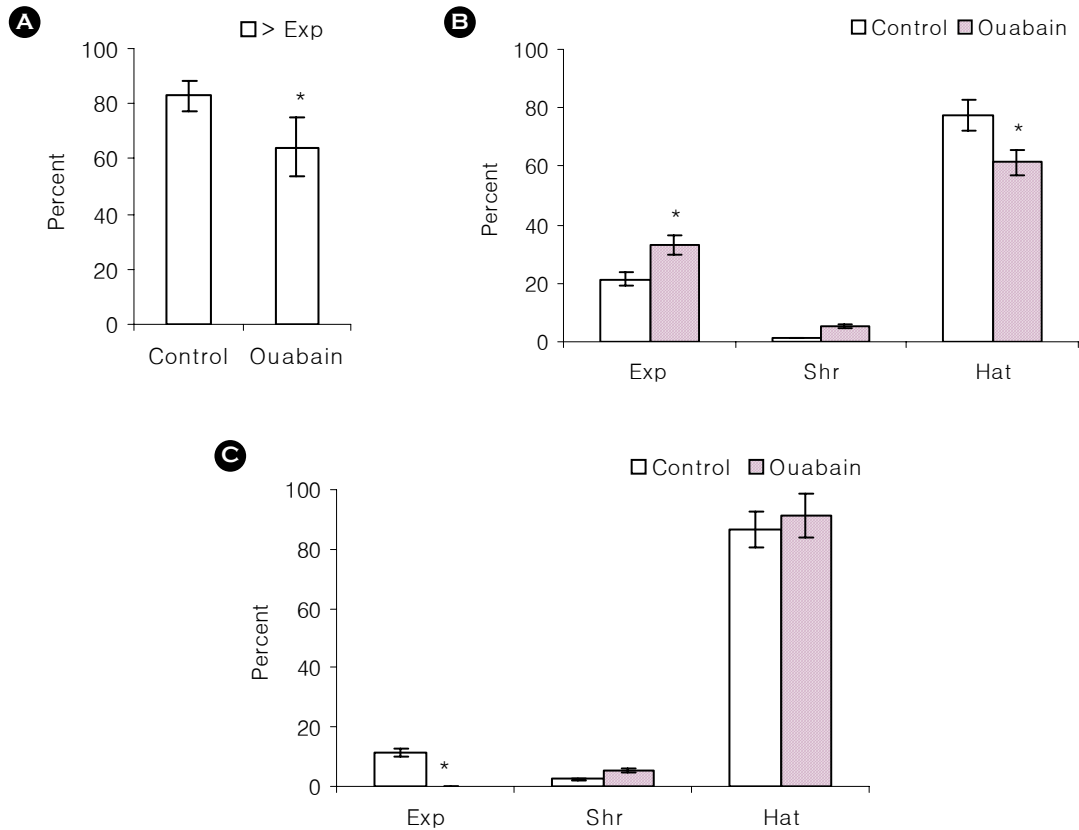
**Figure 5.** The change of  $[Ca^{2+}]_i$  in ConA-pretreated mouse blastocyst exposed to calcium ionophore A23187. The arrow is the point when calcium ionophore A23187 was added.

를 알아보기 위하여 ConA를 전처리한 후 calcium ionophore A23187을 재료 및 방법에서 언급한 바와 같이 처리하였다. 흥미롭게도 부화율이 ConA 전처리 군에서 유의하게 증가하였다 (Figure 4).

ConA를 전처리한 후 calcium ionophore A23187을 처리하면서 calcium의 양을 측정하였을 때 영양배엽 내 calcium의 양이 증가하고 감소하는 진동 양상을 보였다 (Figure 5).

### 5. Ouabain이 팽창과 부화에 미치는 영향

포배강 부피의 변화로 인한 팽압의 변화가 부화에 미치는 영향을 살펴봄으로써 팽창과 부화와의 관련성을 알아보았다. 밀착 (compaction) 이후 극성형성과 포배강 형성에  $Na^+/K^+$ -ATPase의 활성이 중요한 요인으로 작용하기 때문에 이 ATPase의 특이 억제제인 ouabain을 hCG 주사 후 시간을 기준으로 96시간된 포배에 처리하고 12시간, 24시간 48시간에 각각 관찰하였다. Ouabain을 처리한 후 12시간 경과된 후에 관찰한 경우 팽창 단계로 발전한 배아의 비율은 대조군에 비하여 낮았으나 (Figure 6A), 24시간이 경과되었을 때에는 팽창 단계 이후로 발달한 비율이 95.7%로 대조군과 통계적 차이가 없었다. 그러나 부화하지 않고 팽창한 상태로 남아 있는 비율은 대조군에 비하여 유의하게 높았다 (Figure 6B). 시간이 경과할수록 ouabain 처리 군의 부화를



**Figure 6.** Effects of ouabain on expansion and hatching in mouse blastocyst stage embryos. Embryos were collected at 72 h post hCG injection, exposed to ouabain on 96 h and cultured until 144 h post hCG injection. **A**, Percent of blastocyst which is beyond of expanded stage at 12 h post ouabain treatment. **B**, Embryonic stages at 24 h post ouabain treatment. **C**, Embryonic stages at 48 h post ouabain treatment. Exp, expanded embryo; Shr, shrunken embryo; Hat, hatching embryo. \*:  $p < 0.05$  versus control group.

이 증가하여 처리 후 48시간에는 부화 진행률이 대조군과 유사하였다 (Figure 6C). 한편 팽창하였다가 수축되었거나 팽창하지 않고 머물러 있는 포배가 차지하는 비율은 대조군과 비교하면 관찰한 시간과 관계없이 차이가 없었다.

## 고 찰

포배 분화는 착상전 초기 배아에서 발현되는 유전자 산물과, 수란관과 자궁을 이동하는 동안 이들 생식수관에서 분비되거나 또는 배아에서 분비되는 신호전달물질에 의해 조절된다. 포배의 착상 준비는 자궁 내벽의 분화와 동시시 되는 특성을 갖고 있어 수란관과 자궁에서 순차적으로 분비되는 외부

신호에 반응하면서 진행된다.<sup>17</sup> 착상전 초기 배아 할구의 세포외 기질은 배아의 발생과 분화를 조절하며, 이들은 많은 경우 올리고당을 갖는 분자들로 구성되어 있다. Lectin은 세포의 분화 등을 조절할 수 있는 활성물질로 역할을 수행하기도 하는데, 초기 배아 시기에 ConA 등의 수용체가 발현하며<sup>18,19</sup> 배아 발생에 관여하는 것으로 알려져 있으나 그 기작은 잘 알려져 있지 않다.

보고에 의하면 20  $\mu\text{g/ml}$  ConA를 밀착 이전의 생쥐 배아에 2시간 정도 처리하였을 때 밀착과 포배로의 발전이 억제되며, 이러한 ConA의 기작은 가역적이다.<sup>20</sup> 그러나 현재까지 ConA가 포배의 팽창에 미치는 영향에 대한 이해는 미미한 상태이다. ConA의 농도와 처리시간에 따른 독성 검사를 통

하여 본 실험에서는 ConA를 10 µg/ml의 낮은 농도로 사용하여 팽창 단계로 포배가 발달하는 것을 촉진하는 상반된 결과를 얻었다.

포배의 발달과 관련된 세포내 신호전달과정에 calcium이 중요한 위치를 차지하고 있다는 사실들이 밝혀지고 있다.<sup>17,21</sup> 면역세포에서 ConA는 세포내 calcium의 양 증가를 유도하여 세포 반응을 유도한다. 흥미롭게도 ConA에 노출된 포배의 영양배엽내 free-calcium의 양적 증가가 관찰되었다. 따라서 이러한 결과는 calcium이 포배의 발생과 분화에 중요한 조절요인이라는 보고들에<sup>22-24</sup> 의해 뒷받침 되듯이 영양배엽 내 calcium 농도 증가가 포배의 팽창을 촉진한 것에 기인한 것으로 추정된다.

ConA에 노출된 포배에서의 포배강 팽창이 영양배엽 내 calcium의 양적 변화에 의한 것인가를 세포내에서 IP<sub>3</sub>의 역할을 수행하여 세포질 내 calcium의 양 변화를 유도하는 것으로 잘 알려진 calcium ionophore A23187을 Stachecki 등 (1994)의 방법을 변형하여 알아보았다.<sup>25</sup> 흥미롭게도 calcium ionophore A23187에 노출된 포배는 ConA에 노출된 포배에서와 같이 팽창한 단계로 발전하는 비율이 대조군에 비하여 유의하게 높았다. 이러한 결과를 통하여 ConA에 의한 포배의 팽창이 calcium의 양적 변화가 그 원인 중의 하나가 됨을 추정할 수 있다. 따라서 팽창은 배아의 유전자 산물인 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-3 이외에 외부에서 전달된 신호의 자극으로 세포질 내 Ca<sup>2+</sup>의 농도 변화 유도 반응으로 신호전달계를 통하여 진행됨을 예상할 수 있다.

한편 ConA나 calcium ionophore A23187에 노출된 포배들의 대부분은 팽창 단계로 발달하였으나 그 다음 단계인 부화로 진행되는 비율은 대조군에 비하여 유의하게 낮았다. 흥미롭게도 ConA를 전처리하고 calcium ionophore A23187을 처리하였을 경우, 이들 화합물에 노출된 배아의 팽창과 부화 단계로 발달하는 비율은 대조군과 유사하였다. ConA를 전처리한 후 calcium ionophore A23187을 처리한 포배의 영양배엽 내 calcium의 양을 측정하였을 때 증감하는 진동 상태를 보였다. 따라서 ConA 전처리 후 ionophore A23187 처리에 의한 부화율 증가의 원인은 더 많은 실험적 증거가 필요하겠으나 Wang의 보고<sup>17</sup>와 실험 결과를 바탕으로 세포질 내 calcium

oscillation에 의한 세포내 신호전달의 변화에 의한 결과로 사려된다.

포배가 팽창할 때 일시적으로 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 활성이 증가하고, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase의 억제제인 ouabain에 특이적인 86Rb<sup>+</sup>의 세포내 이동이 상실배와 포배에서 각각 증가한다.<sup>26,27</sup> 사람의 포배에서는 생산된 총 ATP의 60%가 이 시기의 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 활성에 사용되고, 소의 포배에서는 36%가 사용된다.<sup>27</sup> 즉 포배강이 왕성하게 팽창할 때 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump의 활성이 일시적으로 급격하게 증가한다.<sup>26</sup> 상실기의 배아에 ouabain을 처리하면 포배강의 형성이 억제된다.<sup>28</sup> 그러나 포배가 형성된 이후 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase를 억제하기 위하여 ouabain을 처리하여도 대부분의 포배가 24시간 후에는 팽창한 단계로 발달하였다. 본 실험 결과는 팽창 현상과 관련된 일부 보고들에서 처럼 팽압 형성은 포배강이 형성된 이후에는 ouabain에 특이한 이온통로만이 아니라 다른 기작들을 조절하는 요인들도 관여한다는 것을 뒷받침 하고 있다. 따라서 Hicks와 Guzma-Gonzalez가 ConA를 포배에 처리할 경우 착상이 억제된 것은<sup>29</sup> 본 실험 결과에서 알 수 있듯이 발생중인 포배가 퇴화되어 일어난 결과가 아니라 자궁과 배아 사이의 인식을 방해 또는 부화억제에 의한 결과임으로 추정할 수 있다.

흥미롭게도 ouabain에 노출시킨 포배를 배양하면서 관찰 시점을 달리하여 분석해보면 초기에는 팽창으로 발달하는 비율이 낮았으나 배양 시간이 경과할수록 팽창하는 비율이 대조군에서와 같은 율로 발달하였고 부화하는 배아의 비율도 대조군과 유사하였다. 따라서 포배강이 형성된 후 팽창된 상태로 발달하는 것은 ouabain에 의해 늦추어 지나 부화는 대조군과 유사한 비율로 진행되는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase에 의한 물질이동이 포배의 팽창에 관여하여 팽창한 포배로의 발달은 지연되거나 부화와 관련된 다른 세포내 기작에는 영향을 없기 때문인 것으로 사료된다.

ConA에 노출되었던 배아의 경우 대부분이 팽창 단계로 발달하였고 흥미롭게도 hCG 주사 후 144시간이 경과한 시점에서도 전체 배아의 65%가 팽창한 상태를 계속적으로 유지하였다. 반면 부화한 배아의 비율은 17%에 불과하였다. 반면 대조군에서는



85% 이상의 배아가 동일 시기에 부화 단계로 발전하였다. 대조군에 비하여 유의하게 포배의 팽창을 유도한 ouabain의 경우 팽창한 대부분의 배아가 부화 단계로 발달하는 것이 대조군에 비하여 늦추어지거나 부화 진행률을 대조군과 차이가 없었다. 이러한 결과는  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 또는 calcium을 매개로한 물질이동에 의한 포배강 내 팽압의 증가가 부화 진행에 있어서 직접적인 요인이 아니라 간접적인 요인으로 작용하는 것을 의미한다.

위 결과를 토대로 ConA는 생쥐 포배의 세포질 내 calcium의 양적 변화를 유도하여 팽창을 촉진할 수 있음을 알 수 있다. 즉 포배의 팽창은 ouabain에 의해 특이적으로 억제되는  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 이외에 calcium을 매개로한 기작도 팽창에 관여한다는 것이다. 또한 팽창이 계속적으로 유지되는 지속 시간과 부화율 간에는 비례적 상관관계가 없었고 ouabain과 ConA가 미치는 영향 비교에서 팽창과 부화는 별개의 사건으로 팽창은 부화의 간접적인 요인으로 작용하는 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

이 논문은 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의해 연구되었음.

#### 참 고 문 헌

- Kidder GM, Watson AJ. Role of  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase in early development and trophectoderm differentiation. *Semin Nephrol* 2005; 25: 352-5.
- Eckert JJ, McCallum A, Mears A, Rumsby MG, Cameron IT, Fleming TP. Specific PKC isoforms regulate blastocoel formation during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 2004; 274: 384-401.
- Kawagishi R, Tahara M, Sawada K, Ikebuchi Y, Morishige K, Sakata M, et al. Rho-kinase is involved in mouse blastocyst cavity formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004b; 319: 643-8.
- Kawagishi R, Tahara M, Sawada K, Morishige K, Sakata M, Tasaka K, et al.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger-3 is involved in mouse blastocyst formation. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2004a; 301: 767-75.
- Cole RJ. Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 1967; 17: 481-90.
- O'Sullivan CM, Rancourt SL, Liu SY, Rancourt DE. A novel murine tryptase involved in blastocyst hatching and outgrowth. *Reproduction*. 2001; 122: 61-71.
- Gordon JW, Dapunt U. A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. *Fertil Steril* 1993; 59: 1296-301.
- Cheon YP, Gye MC, Kim CH, Kang BM, Chang YS, Kim SR, et al. Role of actin filaments in the hatching process of mouse blastocyst. *Zygote* 1999; 7: 123-9.
- Gonzales DS, Bavister BD. Zona pellucida escape the hamster blastocysts in vitro is delayed and morphologically different compared with zona escape in vitro. *Biol Reprod* 1995; 52: 470-80.
- Gonzales DS, Bavister BD, Mese SA. In utero and in vitro proteinase activity during the *Mesocricetus auratus* embryo zona escape time window. *Biol Reprod* 2001; 64: 222-30.
- Niimura S. Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J Reprod Dev* 2003; 49: 413-23.
- Kitamura K, Suganuma N, Takata K, Matsuyama K, Goto J, Furuhashi M, et al. Changes in oligosaccharide expression on plasma membrane of the mouse oocyte during fertilization and early cleavage. *Zygote* 2003; 11: 183-9.
- Mazzoni IE, Ledebur Jr HC, Paramithiotis E, Cashman N. Lymphoid signal transduction mechanisms linked to cellular prion protein. *Biochem Cell Biol* 2005; 83: 644-53.
- Kobayashi S, Sato R, Inanami O, Yamamori T, Yamato O, Maede Y, et al. Reduction of concanavalin A-induced expression of interferon-gamma by bovine lactoferrin in feline peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunopathol* 2005; 105: 75-84.

15. Choi J, Sawant SG, Couch DB, Ho IK, Farley JM. Continuous measurement of changes in intracellular calcium concentration in mouse splenic T cells attached to a glass substrate. *J Biomed Sci* 1995; 2: 379-83.
16. Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DB. The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC Jr, editor. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco: Freeman; 1971. p.86-116.
17. Wang J, Mayernik L, Schultz JF, Armant DR. 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* 2000; 127: 33-44.
18. Rowinski J, Solter D, Koprowski H. Change of concanavalin A induced agglutinability during preimplantation mouse development. *Exp Cell Res* 1976; 100: 404-8.
19. Kitamura K, Suganuma N, Takata K, Matsuyama K, Goto J, Furuhashi M, et al. Changes in oligosaccharide expression on plasma membrane of the mouse oocyte during fertilization and early cleavage. *Zygote* 2003; 11: 183-9.
20. Reeve WJ. Effect of concanavalin A on the formation of the mouse blastocyst. *J Reprod Immunol* 1982; 4: 53-64.
21. Niger C, Malasine A, Cronier L. Calcium channels activated by endothelin-1 in human trophoblast. *J Physiol* 2004; 561: 449-58.
22. Armant DR. Blastocyst don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Dev Biol* 2005; 280: 260-80.
23. Contos JJ, Ishii I, Chun J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1188-96.
24. Liu Z, Armant DR. Lysophosphatidic acid regulates murine blastocyst development by transactivation of receptors for heparin binding EGF-like growth factor. *Exp Cell Res* 2004; 296: 317-26.
25. Stachecki JJ, Yelian FD, Leach RE, Armant DR. Mouse blastocyst outgrowth and implantation rates following exposure to ethanol or A23187 during culture in vitro. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 611-7.
26. Van Winkle LJ, Campione AL. Ouabain-sensitive Rb+ uptake in mouse eggs and preimplantation conceptuses. *Dev Biol* 1991; 146: 158-66.
27. Houghton FD, Humpherson PG, Hawkhead JA, Hall CJ, Leese HJ. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase activity in the human and bovine perimplantation embryo. *Dev Biol* 2003; 263: 360-6.
28. Watson AJ, Westhusin ME, De Sousa PA, Betts DH, Barcroft LC. Gene expression regulating blastocyst formation. *Theriogenology* 1999; 51: 117-33.
29. Hicks JJ, Guzma-Gonzalez AM. 1979. Inhibition of implantation by intraluminal administration of concanavalin A in mice. *Contraception* 1979; 20: 129-36.