

포유동물배 (embryo)에서 In vitro culture block의 극복과 Ca^{2+} 의 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

배 인 하

현재까지 포유동물의 수정란(fertilized embryo, zygote)을 In vitro 배양시 이들 embryo가 포배(blastocyst)로 발생하지 못하고 중도에서 발생이 정지되는 시기가 있어 이것을 In vitro culture block이라고 불렀으며 생쥐의 경우 early 2-cell 시기에 일어난다하여 2-cell block이라 부른다. 그러나 다른 동물은 4-cell, 8-cell 및 16-cell stage 등에서도 일어나는 것으로 알려지고 있다. 이와같은 In vitro culture block 현상이 나타나는 것은 아무리 In vitro culture system에서 모든 조건을 다 충족시키려고 노력하고 있지만 In vivo에서의 모든 조건을 다 충족시킬 수 없는에서 기인된다고 하겠다. 즉 In vivo에서는 이런 block현상이 관찰되지 않고 배의 발생이 진전되고 출산이 가능하기 때문이다.

이런 In vitro culture block이 발견되기는 Whitten & Biggers(1968)의 연구에서 생쥐 strain에 따라 이런 In vitro culture block이 있음이 알려졌고 그후 거의 모든 포유동물(토끼, 사람 제외)에서 이와같은 In vitro culture block이 어느 동물에서나 나타나고 있음이 밝혀졌다. Abramczuk et al.(1977)은 우연히도 생쥐 수정란의 배양에서 Na_2-EDTA 를 처리한 그룹에서 2-cell block의 극복현상을 관찰할 수 있었다.

이와같은 Na_2-EDTA 의 극복효과를 발견 후 Fissore et al.(1988) 및 Suzuki et al.(1989)등이 micromanipulator를 이용하여 Na_2-EDTA 가 함유된 buffer를 perivitelline space에 넣어 주었을 경우에도 2-cell block의 극복을 유도할 수 있었다. 이와같은 Abramczuk et al.(1989), Fissore et al.(1988) 및 Suzuki et al.(1989)등의 실험에서

- 1) EDTA는 세포막 투과가 일어나지 않는다.
- 2) EDTA는 Ca^{2+} 등의 2가 이온의 chelator 이다.
- 3) Perivitelline space 밖에서 Na_2-EDTA

buffer를 주입시에도 2-cell block의 극복효과가 있다.

이런점에서 보면 분명히 Na_2-EDTA 가 생쥐 2-cell block을 극복할 수 있다는 것은 분명히 Ca^{2+} 과 밀접한 관계가 있는 것으로, 그리고 반드시 세포막상에서 작용하고 있다는 점에서 Na_2-EDTA 가 세포막상의 Ca^{2+} channel이나 Na-Ca antiport system과 분명 관계가 있는 것을 추정할 수가 있다. 이런 추정에서 본 교실에서 Ca^{2+} inhibitor로 2-cell block을 test해 보아야겠다는 실험계획을 시행한 결과 여러가지 Ca^{2+} inhibitor 및 Ca^{2+} channel blocker중에서 Ni^{2+} 이 2-cell block의 극복효과가 있다는 것을 처음으로 입증하였다(Bae et al., 1991; Bae & Yoon, 1993). 그러나 본인이 처음으로 입증한 Ni^{2+} 이나 Abramczuk et al.(1977), Fissore et al. 및 Suzuki et al.(1989)등이 증명한 Na_2-EDTA 가 어떤 기작으로 2-cell block을 극복할 수 있는나?

한편 early 2-cell embryo(hCG 주사 후 33hr)를 Ca^{2+} -free 배양액에서 배양 할 경우 24시간에 전부 퇴화하지만 이와달리 mouse 2-cell embryo를 hCG 주사 후 50시간 정도에서 난관을 flushing해 낸 late 2-cell embryo에서는 배양액에 Ca^{2+} 의 성분을 전부 제거한 Ca^{2+} -free 배양액에서도 8-cell 및 16-cell까지는 분열이 잘 일어나기는 하지만 compaction 과정이 일어나지 않아 blastocyst로 발생하지 못한다는 사실(Bae & Park, 1989)과 비교하면 극히 대조적인 면을 찾아볼 수 있다. 또 late 2-cell embryo에서는 이와같은 2-cell block 현상이 일어나지 않는데 대해 early 2-cell에서는 2-cell block 현상이 따르며 또 Ca^{2+} 의 절대적인 요구가 있다는 것은 극히 대조적인 현상이라 보겠다.

그러나 어떤 세포이공간에 세포분열이 일어나려면 세포내 free- Ca^{2+} 농도 증가현상이 일어난다. 그러나 세포내 free- Ca^{2+} 의 조절과정

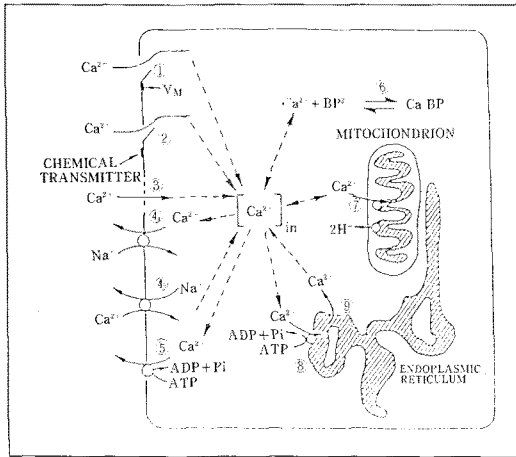


그림 1. 세포내 Ca^{2+} 의 조절과정 : 1) Ca^{2+} 은 voltage-regulated channel(L, T, N, and P type Ca^{2+} channel)을 통해 세포내로 유입이 일어난다, 2, 3, 4b) Channels 및 다른 통과경로등을 혹은 이와 반대경로를 통해 Ca^{2+} 의 유입, Na^{2+} - Ca^{2+} 의 교환등이 일어난다, 4a) Ca^{2+} 과 Na^{2+} 의 교환방식으로 Ca^{2+} 이 세포밖으로 유출되고 있다, 5) Ca^{2+} -ATPase의 pump작용, 6) 세포내 Ca^{2+} binding proteins(BP^{2-})으로 Ca^{2+} 이 하전을 잃고 bound calcium으로의 전환과정, 7) 세포내 Ca^{2+} 이 mitochondria안으로 들어가 하전을 잃게 된다. 즉, bound calcium으로 전환된다. 그리고 $2H^+$ 을 mitochondria에서 밀어낸다, 8) Ca^{2+} -ATPase가 세포질내 Ca^{2+} 을 세포체안으로 pump질하고 있다, 9) Ca^{2+} 의 유리 및 방출과정이 소포체로부터 일어나고 있다.

은 그림 1에서 처럼 아주 복잡한 과정이고 어느 과정으로 Cytosolic Ca^{2+} 이 조절되는가 하는 것은 영커진 실가닥 한끝을 잡고 당길 때 다른 실들이 다시 헝클어져 얽히는 것과 같이 어느 한과정만 반드시 다른 과정에 관계가 있기 때문에 Cytosolic Ca^{2+} 의 조절은 정말 어려운 과제이다. 세포분열에 필요한 요소들은 Ca^{2+} 이외에도 수없이 많다(이에 관여하는 여러가지 유전자 및 cyclin 및 MPF factor(Mitosis Promoting Factor, Parrish et al, 1992)). 그러나 분명히 Ca^{2+} 의 농도 증가현상으로 여러가지 enzymes의 activity증가, H1 histone kinase등 microtubule의 assembly 및 disassembly과정 및 microtubule의 수축, 세포질의 수축등에 있어 Ca^{2+} 의 관여와 농도 증가현상등이 필수적이다. 수정란이 early 2-cell이 될 때 하나의 세포에서 2개의 세포로 나누어 지면서 mitochondria, endoplasmic reticulum등의 증식 및 biogenesis과정이 반드시 수반되어야함에 따라

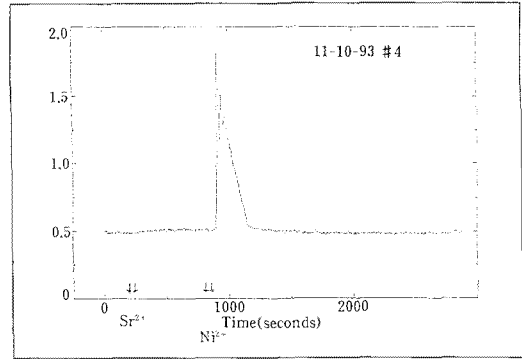


그림 2. Mouse zygote에서 Ni^{2+} 처리로 인한 cytosolic Ca^{2+} 증가 : 배양액내 Sr^{2+} $100 \mu M$ 처리로는 post hCG 20시간의 ICR계 생쥐 zygote에서 Ca^{2+} peak가 유도되지 않으나 같은 배에 Ni^{2+} $50 \mu M$, $20 \mu M$ 을 처리시 Ca^{2+} peak가 유도되고 있다.

early 2-cell은 이런점에서 비교적 cell cycle 기간이 길다. 이런 긴 cell cycle은 제 2의 분열에 대한 준비과정으로 볼 때 다량의 calcium 축적현상이 뒤따른다고 볼 수 있으며 early 2-cell stage 때는 이런 calcium의 축적현상과 제 2분열을 위한 여러가지 biogenesis과정이 일어난다고 추정된다.

2-cell block은 이러한 중요한 calcium의 축적과 여러가지 세포기관의 biogenesis가 일어나는 시기에 주위로부터 공급받는 여러가지 factor등의 공급차단이 주원인이 되어 일어나는 것으로 추정된다. 세포분열에 필요한 여러가지 growth factor는 분열이 중지된 배에서 trigger 역할을 하는 것이 아닌가 추정된다. 이런 2-cell block의 극복의 한 방편으로 다른 분열이 왕성한 somatic cell과 co-culture할 때 growth factor의 공급을 받아 2-cell block 및 In factor와 함께 Ca^{2+} 의 농도증가 자체로 (inositol 1, 4, 5-triphosphate, cyclic ADP ribose, and ryanodine처리) 중지된 세포의 분열을 재개시키는 trigger역할을 하고 있다 (Shen & Buck, 1993, Steinhardt et al., 1974, Fulton & Whittingham, 1978, Igusa & Miyazaki, 1983, Ducibella et al., 1988, Marcus, 1990, Kline & Kline, 1992).

이와같은 관점에서 볼 때 2-cell block의 극복효과가 있는 Ni^{2+} 이나 Na_2 -EDTA가 세포막에 작용하여 signal transduction을 유도하는 과정으로 cytosol Ca^{2+} 농도 증가현상이 2-cell block의 극복에 trigger역할을 하리라는 추정

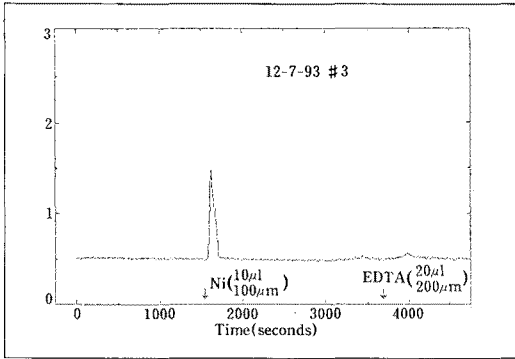


그림 3. Mouse early 2-cell embryo에서 Ni^{2+} 처리로 인한 cytosolic Ca^{2+} 증가: 배양액내 Ni^{2+} $100 \mu M$, $10 \mu l$ 처리로 post hCG 35시간의 ICR 계 생쥐 2-cell에서 Ca^{2+} peak가 바로 유도되지만 같은 embryo에 다시 2,000초후 Na_2 -EDTA $200 \mu M$ 을 처리하였으나 Ca^{2+} peak가 유도되지 않고 있다.

이 가능하다. Ni^{2+} 처리 후 2-cell blocked embryo에서 cytosolic free Ca^{2+} 증가현상을 증명하는 방법은 세포질내 free Ca^{2+} 의 정량방법밖에는 없다. 그림 2는 2-cell embryo(hCG 주사 후 33hr에 oviduct flushing하여 얻은 embryo임)에다 micromanipulator를 이용하여 fura-2 dextran을 주입하고서 Ni^{2+} 을 배양액에 처리 후 60sec내에 cytosolic free Ca^{2+} 의 증가가 일어나고 있는것을 Dual wavelength excitation fluorophotometer 및 486-DX₂ PC를 이용 촬영한 것이다. 이로서 Ni^{2+} 이 2-cell block의 극복에 EDTA처럼 효과적인 agent임과 또한 Ni^{2+} 은 cytosolic free Ca^{2+} 의 증가를 유도하고 있음이 증명되었다(Bae & Kline, unpublished). 이것은 2-cell block의 극복에 Ni^{2+} 이 Ca^{2+} inhibitor 및 Ca^{2+} channel blocker로서 세포막에 binding하여 signal transduction 과정으로 cytosolic Ca^{2+} 의 농도증가현상을 야기시키고 있는 것으로 추정된다. 그러나 Ni^{2+} 이 Ca^{2+} channel blocker로서 어떻게 cytosolic free Ca^{2+} 의 농도증가현상을 유도하는가 하는 기작설명은 현재까지 발표된 model로는 설명되지 않고 있어 새로운 model정립을 구상중에 있다.

인용 문헌

Abramczuk J, Solter D, Koprowski H: The beneficial effect of EDTA on development

of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 1977, 61, 378-383.

Bae IH, Park JH: Studies on the requirements of Ca^{2+} for cell division and Ca^{2+} permeability of plasma membrane of fast dividing mouse embryo cells. *Kor J Fertil Steril* 1987, 14, 93-100.

Bae IH, Min KM, Wang YM, Yu KH: The effect of calcium inhibitors on the mouse 2-cell block. *Biol Reprod* 1991, 44, 419.

Bae IH, Yoon SY: Effect of Ca^{2+} on the "in vitro 2-cell block" of the mouse. *Molecul Biol Cell* 1993, 4, 250.

Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, Alberg J, Rangarajan S: Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev Biol* 1988, 130, 184-197

Fissore RA, Jackson KV, Kiessling AA: Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid. *Biol Reprod* 1989, 41, 835-841.

Fulton BP, Whittingham DG: Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 1978, 273, 149-151.

Igusa Y, Miyazaki S: Periodic increase of cytoplasmic free calcium in fertilized hamster eggs measured with calcium-sensitive electrodes. *J Physiol* 1986, 377, 193-205.

Kline D, Kline JT: Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992, 149, 80-98.

Kline D, Kline JT: Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Evidence for inositol triphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. *Biol Reprod* 1994, 50, 193-203.

Marcus GJ: Activation of cumulus-free mouse oocyte. *Mol Reprod Dev* 1990, 26, 159-162.

Parrish JJ, Kim CI, Bae IH: Current concepts of cell cycle regulation and its relationship

- to oocyte maturation, fertilization, and embryo development. *Theriogenology* 1992, 38, 277-296.
- Shen SS, Buck WR : Sources of calcium in pig urchine eggs during the fertilization response. *Dev Biol* 1993, 157, 157-169.
- Steinhardt RA, Epel D, Carrol EJ, Yanagiuchi R : Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized egg? *Nature* (London) 1974, 252, 41-43.
- Suzuki S, Komatsu S, Kitai H, Endo Y, Iizuka R, Fukasawa T : Analysis of cytoplasmic factors in developmental cleavage of mouse embryo. *Cell Differ* 1988, 24, 133-138.
- Whitten WK, Biggers JD : Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 1968, 17, 399-401.