

### 마그네슘 이온이 생쥐 초기 배 발생에 미치는 영향

최수진<sup>1,2</sup>, 박용석<sup>1</sup>, 배인하<sup>2</sup>

삼성제일병원 불임연구실<sup>1</sup>, 성신여자대학교 생물학과<sup>2</sup>

#### 서론

칼슘 이온과 마그네슘 이온은 여러 세포 유형에서 다양한 세포 기능(cellular function)을 조절한다고 보고되었다(Carvalho *et al.*, 1963; Yamamoto *et al.*, 1992). 세포 분열을 진행하는 과정에는 세포질 내 칼슘 이온의 진동 현상(calcium oscillation)이 나타나며 이는 세포 분열을 조절하는데 매우 중요한 요소로 작용한다(Bos-Mikich *et al.*, 1997). 세포 내 칼슘 이온 농도의 조절 이상(abnormal control)은 단백질 생성, DNA replication, 미토콘드리아의 기능과 세포간의 communication에 악영향을 가져 올 수 있다고 보고되었다(McCormack *et al.*, 1990; Lazrak and Peracchia, 1993). Fisher(1980)는 칼슘 이온이 없는 배양 조건에서는 고농도 마그네슘 배양액에서 최적 자극(optimal stimulation)이 일어남을 관찰하여 마그네슘 이온이 칼슘 이온과 대체될 수 있음을 나타냈다. 칼슘 이온이 부족한 배양액에서는 DNA 합성과 세포의 증식이 억제되며 마그네슘 이온이 부족한 배양액에서 uridine uptake와 incorporation이 매우 감소되었다(Bowen-Pope and Robin, 1977; Bowen-Pope *et al.*, 1979). 이는 칼슘 이온과 마그네슘 이온이 체외의 성장 조절 인자(growth regulation factors)라는 것을 나타내는 증거이다.

세포 내 칼슘 농도를 적절하게 유지하는데 활용되는 세포 내 기작의 하나는 소포체(endoplasmic/sarcoplasmic reticulum), 미토콘드리아, 핵 등 세포소기관에 의한 칼슘 제거이다(Ebashi, 1960; Hales *et al.*, 1974; Fasolato *et al.*, 1994).

이 중 미토콘드리아는 살아 있는 세포의 에너지 대사 작용에 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아의 세포 내 분포는 에너지가 요구되는 부분에 밀집되는 경향이 있으며 미토콘드리아의 배치와 분포는 세포 증식과 분화 과정 등 세포 기능의 변화에 따라 다양하게 나타난다(Van-Blerkom and Runner, 1984; Batten *et al.*, 1987; Muggleton-Harris and Brown, 1988; Noto *et al.*, 1993).

이에 본 연구는 전핵 시기에 이러한 칼슘 이온에 대한 마그네슘 이온의 완화 작용을 알아보고자 전핵 형성 전/후 수정란을 여러 마그네슘 이온 농도 배양액에서 체외 배양하여 발생율과 세포 내 할구수를 관찰하였다. 또한 발생율과 발생 속도 차이가 세포 내 미토콘드리아의 재배열 변화와 관계가 있는지 알아보고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험 동물 및 수정란의 수집

생후 5-6주령의 암컷 생쥐(C57BL/6 x CBA F1)와 생후 12주령 이상의 생식력 있는 수컷을 사용하였다. 생쥐 암컷의 복강에 5 IU PMSG를 투여하고 48 시간 간격으로 5IU hCG를 주사하여 과배란을 유도하였다.

전핵 형성 전 수정란(pre PN) 수집 : 질전이 확인된 암컷에서 hCG 주사 후 15 시간째 수정란을 회수하였다. 수집 시 전핵(pronucleus)이 관찰되지 않고 투명대에 정자가 관찰된 수정란만을 선택하여 실험에 사용하였다.

전핵 형성 후 수정란(post PN) 수집 : 질전이 확인된 암컷에서 hCG 주사 후 21 시간째 수정란을 회수하여, 전핵이 관찰되고 투명대에 정자가 관찰된 수정란만을 선택하여 실험에 사용하였다.

##### 배양방법

수집된 수정란은 T6 배양액을 사용하여 microdroplet 방법으로 배양하였다. 서로 다른 마그네슘 농도를 갖는 배양액에서 배양 후 발생율을 관찰하였다. hCG 주사 후 96 시간째 관찰시 3-8세포기, 상실기(morula), 포배기(blastocyst), 배의 퇴화(degeneration)로 분류하였다.

##### 배의 염색 및 할구수 계수

상실배 혹은 포배를 Hoechst 33342로 염색하여 배의 할구수를 측정하였다.

##### 미토콘드리아의 관찰

hCG 주사 후 21 시간에 전핵 형성된 것을 수집하여 0.0 mM, 2.0 mM, 8.0 mM 각 마그네슘 이온 농도의 배양액에 6 시간 체외 배양하여 실험군에 사용하였으며, 체내 배양 상태와의 비교를 위한 대조군(control)의 수정란은 hCG 주사 후 27 시간에 전핵이 보이는 것을 수집하였다. 미토콘드리아를 관찰하기 위해 rhodamine 123을 이용하여 염색하였다. 미토콘드리아의 세포 내 재배열 양상은 전핵 주위 응축 양상(distinct perinuclear clustering), 전핵 주위 밀집 양상(perinuclear clustering), 세포질 내 균등 양상(dispersed throughout the cytoplasm)으로 분류하였다.

## 결과 및 논의

## 배양액 내 마그네슘 이온이 발생률에 미치는 영향

마그네슘 농도에 따른 발생률을 관찰한 본 실험에서 전핵이 형성되기 전 초기 1-세포기 배를 배양했을 때 마그네슘이 이온 0.0 mM 농도군의 상실배 혹은 포배 발생률은 27.0%이며 2.0 mM, 4.0 mM, 8.0 mM 농도군에서 상실배 혹은 포배 형성률이 각각 61.7%, 57.0%, 54.1%로 유의하게 높게 나타났으며( $P < 0.05$ ), 2.0 mM 농도의 배양액에서 가장 높은 발생률을 나타내었다.

또한 전핵 형성 후 후기 1-세포기 배를 배양했을 때는 마그네슘 농도가 0.0 mM (25.1%)인 배양액 보다 2.0 mM, 4.0 mM 일 때 71.3%, 64.4%로 높은 발생률을 나타냈으며 2.0 mM일 때 가장 높게 나타났다.

## 배양액내 마그네슘 이온이 상실배 혹은 포배의 할구수에 미치는 영향

Hoechst 33342 염색을 이용한 세포 내 할구수 관찰 실험에서도 전핵 형성 전 수정란의 할구수는 2.0 mM, 4.0 mM, 8.0 mM 마그네슘 이온 농도군에서 23.7, 25.0, 22.4로 마그네슘 이온이 없는 대조군(17.1)에서 보다 유의한 차이로 높은 할구수가 나타났으며( $P < 0.05$ ), 4.0 mM 농도군에서 가장 높은 평균 할구수가 관찰되었다. 반면 전핵 형성 후 수정란 배양시 할구수는 1.0 mM, 2.0 mM, 4.0 mM 마그네슘 이온 농도일 때 할구수는 각각 20.2, 21.0, 18.8 개로 마그네슘이 없는 대조군(15.5)에서 보다 유의하게 높게 나타났으며( $P < 0.05$ ), 2.0 mM 농도군에서 가장 높은 평균 할구수가 관찰되었다( $P < 0.01$ ).

## 미토콘드리아의 세포 내 재배열 양상

발생이 진행됨에 따라 나타나는 전핵 주위의 미토콘드리아의 응축 양상을 나타낸 비율은 hCG 주사 후 27 시간째에 수집한 대조군에서 70.0%로 가장 높은 비율을 나타내었으며, 이는 6 시간 체외 배양이 이루어진 다른 실험군보다 유의한 차이를 나타내었다( $P < 0.01$ ).

6 시간 체외 배양이 이루어진 실험군 중에서 2.0 mM 마그네슘 이온 농도군에서 전핵 주위의 미토콘드리아의 응축 양상을 보이는 수정란 비율이 21.1%로 0.0 mM, 8.0 mM 배양액의 2.8%, 4.8%보다 유의하게 높게 관찰되었다.

본 실험에서는 전핵 형성 전 수정란보다 전핵 형성 후 수정란의 발생률이 각 농도별 비교하여 전반적으로 높게 나타났으며, 8.0 mM 고농도 마그네슘에서는 오히려 전핵 형성 후 수정란의 발생률이 떨어지는 결과가 나타났다. 이것은 너무 과도한 농도의 마그네슘 이온 역시 배 발생을 저해하는 것으로 보여진다.

이 결과는 전핵 형성 전 수정란 배양에서 더 높은 마그네슘 이온 농도가 요구되는 것을 나타내며 마그네슘 이온은 칼슘 이온의 항상성(homeostasis)을 유지시켜주는 buffer 역할을 함으로써 배 발생률을 증가시키는 것으로 추정된다.

미토콘드리아 재배열 양상을 관찰한 본 연구에서 2.0 mM 마그네슘 농도에서 전핵 주위에 미토콘드리아 응축 양상을 보이는 배가 20.7%로 가장 높게 나타났으며, 이는 체내 배양이 이루어진 대조군에서 가장 높게 나타난 미토콘드리아 분포 양상이다.

미토콘드리아 재배열 파괴 현상은 spindle 형성 또는 소멸과 염색체 이동에 필요한 에너지 생산과 활용의 조절 기능을 약화시키며 미토콘드리아의 대사 작용의 변화를 일으켜 초기 발생에 영향을 미친다고 생각되어진다.

핵 주위에 미토콘드리아가 응축되어 있는 것은 체내(in vivo) 상태에서 가장 높은 비율을 차지하는 것으로 보아 배 발생에 가장 적합한 미토콘드리아의 배열 방식이라고 생각된다. 그러나 체외 배양 후 (6 시간) 세포질 내에 고르게 퍼져 있는 형태((dispersed throughout the cytoplasm)가 많고 또 배 발생이 잘 되지 않는 점으로 보아 미토콘드리아는 세포질에 퍼져 있는 상태에서 전핵 주위에 밀집되는 형태(perinuclear clustering)를 거쳐 응축되는 형태(distinct perinuclear clustering)로 변하는 것으로 추정된다. 실험군 중에서 2 mM의 마그네슘 이온 배양에서 응축 양상이 가장 높게 나타났으며 배 발생률 즉 상실배 및 포배로의 발생률 또한 가장 높은 점으로 보아, 마그네슘 이온 농도에 따라 미토콘드리아 분포 조절이 달라지며 발생률에 차이가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 마그네슘 이온에 의한 buffer 작용은 전핵 형성 전 수정란의 배양에서 더 높은 마그네슘 이온 농도가 필요하며 발생 속도 증가 효과 또한 더 높게 나타났다. 따라서 생쥐 배 발생에는 기존의 연구들에서 사용되는 0.1 mM~1.0 mM 정도의 마그네슘 이온 농도와 다르게 더 높은 마그네슘 이온 농도가 요구되는 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Batten, B.E., Albertini, D.F., Ducibella, T. (1987) Patterns of organelle distribution in mouse embryos during preimplantation development. *Am. J. Anat.* 178: 204-213.
- Bos-Mikich, A., Whittingham, D.G., Jones, K.T. (1997) Meiotic and mitotic  $Ca^{2+}$  oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. *Dev. Biol.* 182:172-179.
- Bowen-Pope, D.F., Rubin, H. (1977) Magnesium and calcium effects on uptake of hexose and uridine by chick embryo fibroblasts. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U.S.A. 74: 1585-1589.
- Bowen-Pope, D.F., Vidair C., Sanui, H., Rubin, A.H. (1979) Separate roles for calcium and magnesium in their synergistic effect on uridine uptake by cultured cells: significance for growth control. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 1308-1312.
- Carvalho, A.P., Sanui, H., Pace N. (1963) Calcium and magnesium binding properties of cell membrane materials. J. Cell Comp. Physiol. 62: 311-318.
- Ebashi, S. (1960) Calcium binding and relaxation in actomyosin system J. Biochem. 48: 150-151.
- Fasolato, C., Innocenti, B., Pozzan, T. (1994) Receptor-activated  $Ca^{2+}$  influx: how many mechanisms for how many channels? Trends Pharmacol. Sci. 15: 77-83.
- Fisher, S.B. (1980) The role of divalent cations in the metabolic response of mouse blastocysts to serum. J. Embryol. Exp. Morph. 58: 217-229.
- Hales, C.N., Luzio, J.P., Chandler, J.A., Herman, L. (1974) Localization of calcium in the smooth endoplasmic reticulum of rat isolated fat cells. J. Cell Sci. 15: 1-15.
- Lazrak, A., Peracchia, C. (1993) Gap junction gating sensitivity to physiological internal calcium regardless of pH in Novikoff hepatoma cells. Biophys. J. 65: 2002-2012.
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P., Denton, R.M. (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. Physiol. Rev. 70: 391-425.
- Muggleton-Harris, A.L., Brown, J.J.G. (1988) Cytoplasmic factors influence mitochondrial reorganization and resumption of cleavage during culture of early mouse embryos. Hum. Reprod. 3: 1020-1028.
- Noto, V., Campo, R., Roziars, P., Swinnen, K., Vercruyssen, M., Gordts, S. (1993) Mitochondrial distribution after fast embryo freezing. Hum. Reprod. 8: 2115-2118.
- Van-Blerkom, J., Runner, M. (1984) Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. Am. J. Anat. 171: 335-355.
- Yamamoto, Y., Chen, G., Miwa, K., Suzuki, H. (1992) Permeability and  $Mg^{2+}$  blockade of histamine-operated cation channel in endothelial cells of rat intrapulmonary artery. J. Physiol. 450: 395-408.