

수정란의 대사

경상대학교 농과대학

이 효 종

Metabolism of the Embryo

Hyo Jong Lee

College of Agriculture, Gyeongsang National University, Jinjoo

서 론

수정란은 수정 직후부터 착상까지의 초기 발생기간에 형태학적으로나 생화학적으로 많은 변화과정을 밟게 된다. 형태학적으로는 수정이후 분할기를 거쳐 쌍실배를 이룬 다음 포배기에는 포배의 확장과 부화과정이 따르며 이후 영양세포에 의한 착상과정과 확장 등 세포의 수, 크기 그리고 모양에서 일반세포와는 매우 다른 변화가 생쥐에서는 수정후 5일만에 그리고 소에서는 수정후 10여일 만에 일어난다.

수정란의 대사에 관한 연구는 1960년대 이후부터 많은 연구가 수행되어 왔다. 이러한 연구는 수정란의 기본 생리를 이해하는데 많은 도움을 주었을 뿐만 아니라 수정란의 체외 배양을 위한 인공배지의 선택과 제조 및 시험관내 조작등에 매우 유용하게 응용되었다. 또한 체외수정, 수정란의 이식, 수정란의 장기보존, 수정란의 미세조작과 유전자의 미세주입 및 면역학적 반응 등에 있어서 수정란은 한번씩은 자기 모체로부터 벗어나서 *in vitro* 상태에서 조작과정을 밟게 되는데, 이때의 수정란의 생리와 특성을 이해함으로써 수정란이 체외에서 최대한 손상을 덜 받고 다음 발달 과정에 지장을 방지하는 데도 응용되었다.

수정란의 형태학적 변화와 대사에 관하여는 비교적 많이 알려져 있으나 주로 생쥐, 쥐, 토끼 및 햄스타 등 실험동물을 대상으로 연구되어 왔고, 실제 응용대상이 되어 흥미가 있는 사람과 가축의 수정란에 관하여는 많이 알려져 있지 않다. 포유류의 수정란은 그 크기가 작을 뿐만 아니라 한번에 많은 양을 얻을 수 없는 제한적 조건을 갖고 있으며 또한 사람과 가축에서는 다량의 수정란을 얻는데 어려움이 있다. 그러므로 수정란의 대사에

관한 실험은 주로 소형의 실험동물을 대상으로 이루어져 왔다. 분석방법에 있어서도 제한된 수의 수정란으로 대사산물의 성분함량과 합성 그리고 이의 조절에 관여하는 효소의 순수분리와 활성도 조사 등에 어려움이 있다. 근래에는 enzyme cycling techniques 나 방사선 표시 물질들의 이용으로 미세분석이 가능하여 적은 양으로 상당히 정밀하게 측정할 수 있게 되었다. 또한 미세조작기술의 발달로 수정란의 대사 혹은 유전자 발현에 관여하는 물질을 수정란에 직접 미세주입함으로써 대사조절 기전에 관한 규명도 근래에 수행되어 오고 있다.

수정란의 형태학적 발달과정

포유류에서 수정란의 형태학적 발달과정은 모체 생식기 내에서의 시간적 이동과 아울러 잘 알려져 있다 (Table 1).

포유류의 수정란은 다른 동물에 비하여 그 크기가 매우 작을 뿐만 아니라 난황이 적고 등분할 과정을 밟는다. 수정란은 형태학적으로 수정된 다음 분할기를 거쳐 상실배기에서는 할구세포들의 migration와 polarization이 일어나고, 포배기에서는 동공형성(cavitation)과 내세포괴(inner cell mass)의 형성에 이어 포배의 팽창(expansion)과 부화(hatching)과정이 따르며, 이후 영양세포에 의한 착상과정과 확장(elongation) 등 세포의 수, 크기 그리고 모양에서 일반세포와는 매우 다른 변화가 짧은 기간에 일어난다. 비록 동물의 임신기간은 품종간에 큰 차이가 있으나 수정후 포배까지 초기 수정란의 발달 과정은 동물간에 큰 차이가 없다. 예를 들면, 사람은 임신기간이 270일 정도 되나 수정란이 포배기까지 발달하는 데는 약 8일이 소요되며 생쥐는 임신기간이 21일 정도 되는데도 수정란의 착상전단계

Table 1. Stages of Embryonic Development at Various Times After Ovulation

Stage of embryonic development	Days after ovulation, by species							
	Cow	Mare	Ewe	Goat	Pig	Rabbit	Mouse	Rat
1-cell	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1
2-cell	0-2	0-2	0-1	0-1	0-1	0-1	1.5	1.5
4-cell	1-2	1-2	1-2	1-2	2-3	1	2	1-2
8-cell	2-4	2-3	2-3	2-3	3-4	1	2-2.5	3-4
Early morula	3-5	2-4	2-4	2-4	3-4	2	2-3	4
Compacted morula	4-6	4-5	4-5	4-5	3-5	2	3	
Early blastocyst	6-7	5-6	5-6	5-6	4-5	3	3-4	
Blastocyst	6-8	6-7	6-7	6-7	5-6	3	4	4-5
Expanded blastocyst	7-9	7-8	7-8	7-8	5-7	4-6	4	
Hatching blastocyst	8-10	8-9	8-9	7-9	6-8	7	4-5	5-6
Gestation period	280	330	150	150	115	30	21	22

Adapted and revised from Betteridge(1977).

Table 2. Size and Volume of Mouse Embryos and Pig Embryos at Preimplantation Stages

Stage	Mouse		Pig*	
	ID (μm) Mean+ S. E.	Vol. (10^{-12} L) Mean+ S. E.	OD (μm) Mean+ S. E.	Vol. (10^{-12} L) Mean+ S. E.
Unfertilized	85	321.6		
1-2 cells	81.2+0.2	280.3+0.7	157+ 7	2030+ 276
3-4 cells	83.6+0.1	305.9+1.2	151+ 5	1799+ 193
5-8 cells	85.7+0.1	329.6+1.0	153+ 5	1861+ 185
9-16 cells			153+ 4	1879+ 163
Morula	88.6+0.1	364.2+0.6	156+ 2	1988+ 58
Blastocyst	98.0+0.3	492.8+4.6	156+ 3	1969+ 132
Expanded blastocyst	116.6+0.4	830.0+8.2	230+16	6388+1455
Hatched blastocyst			290+60	12824+9723

*Cited from Lindner and Wright (1978)

발생기간은 5일이 소요된다.

포유류에서 수정란의 크기는 Table 2에 나타난 바와 같이 생쥐와 돼지에서 배란 직후부터 분할기 과정까지는 직경 및 용적이 약간 줄어든다. 물론 단백질 함량은 배란후 점차 감소하여 상실배기에는 약 25%가 줄어드는 것이 생쥐 수정란에서 관찰되었다 (Brinster, 1967). 그러다가 포배기부터는 점차 증가하여 expanded blastocyst에 도달하면 생쥐에서는 그 직경이 약 1.4배 증가하고 따라서 용적도 약 3배 증가하며, 돼지에서는 그 직경이 약 1.7배 증가

하며 용적은 약 3.1배 증가한다. 돼지 수정란은 부화후 임신 제10일에서 12일 사이에 그 모양이 구형에서 관형으로 변하면서 급속히 그 길이가 확장된다 (Geisert 등, 1982).

수정란을 시험관내에서 배양할 경우 동물 종류에 따라 어느 시기에 그 발달이 정지 혹은 지연되는 "Block" 현상이 일어난다. 생쥐에서는 2 세포기에 block 현상이 나타난다 (Whitten과 Biggers, 1968). 쥐에서는 8 세포기에 나타나며 (Folstad 등, 1969; Mayer, 1974), 햄스타에서는 8 세포기에 나타나고 (Wh-

ittingham 과 Bavister, 1974), 폐지에서는 4 세포기에 (Polge와 Frederik, 1968; Rundell과 Vincent, 1968), 소에서는 8 세포기에서 (Renard 등, 1967) 발견되었다.

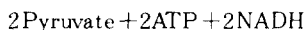
이러한 block 현상의 극복은 생쥐에서는 C57 BL 종이나 그의 잡종 등에서는 나타나지 않음으로 이를 이용하거나 (Whitten과 Biggers, 1968), block 현상을 나타내지 않는 품종의 수정란에서 세포질 성분을 떼어내어 block 현상을 나타내는 품종의 수정란에 소량 넣어주면 이 현상을 극복할 수 있다 (Muggleton-Harris 등, 1982). 또는 10 μ M의 EDTA를 첨가하면 좋은 결과를 얻을 수 있다 (Abramczuk 등, 1977). Menino와 Wright (1982)는 폐지 수정란에서 높은 수준(1.5%)의 bovine serum albumin을 첨가하여 block 현상을 극복하였다고 하며, Wright 등 (1976)은 혈청을 이용하여 소에서 block 현상을 방지하였다고 한다. 수정란의 배양시에 흔히 bovine serum albumin을 첨가하게 되는데 이의 역할은 아직 불명한 점이 많으나, 몇가지 추정되는 사항은, 수정란의 발달을 촉진하는 성장인자의 존재 (Kane, 1985). 독성물질들에 대한 chelation 역할 (Whitten, 1971; Whittingham, 1972), 배양액에 물리적 성상의 전달 (Brinster, 1965c) 및 에너지 공급원으로서 지방산들과 다른 분자물질들의 함유 (Kane, 1979) 등이 주장되고 있다.

탄수화물 및 에너지 대사

1. 해당작용

착상전단계까지의 초기 수정란의 주 에너지 공급로는 Embden-Mayerhof와 Krebs의 tricarboxylic acid(TCA) cycle에 의한 해당경로이다. 이를 요약하여 설명하면 다음과 같다.

Glucose 1분자가 10단계의 효소반응을 거쳐 2분자의 pyruvate로 분해되는 일련의 과정을 해당경로라 한다. 이 과정에서 2분자의 ATP와 2분자의 NADH가 각각 ADP와 NAD로부터 생성된다.



이렇게 생성된 pyruvate와 NADH는 O₂가 존재하느냐, 존재하지 않느냐에 따라 그 운명이 달라진다. 심한 운동을 하기 때문에 산소가 부족한 상태

의 근육세포나, 젖산발효를 하는 미생물에 있어서 pyruvate는 lactate로 환원되고 NADH는 NAD로 다시 산화된다. 그러나 산소가 존재하면 pyruvate는 acetyl-Co A로 바뀌어 Krebs cycle로 들어가게 되며 NADH는 전자전달계로 들어가 ATP를 생산하게 된다.

해당작용은 직접 ATP와 NADH를 생산하는 외에 glucose를 pyruvate로 분해하여 그 뒤의 Krebs cycle로 들어갈 수 있도록 준비하는 역할을 수행한다.

해당작용에 의하여 생성된 pyruvate는 호기상태에서 acetyl-Co A로 바뀌어 cycle형의 효소반응연쇄로 들어가서 산화되는데 이것이 Krebs cycle이다. Pyruvate가 acetyl-Co A로 변화되는 과정에서 NADH가 한 분자 생성되며 acetyl-Co A가 Krebs 회로를 한 바퀴 돌면 3분자의 NADH, 1분자의 FADH, 1분자의 ATP를 생성한다. NADH와 FADH는 전자전달계로 들어가 NADH는 3분자, FADH는 2분자의 ATP를 생산한다. Glucose 1분자는 2분자의 pyruvate를 만들므로 호기상태에서 glucose 1분자는 Krebs cycle에서 모두 30분자의 ATP를 생산하는 것이 된다. 이것은 해당작용에서 생산되는 8분자(NADH 2분자에 의한 6분자의 ATP를 포함하여)에 비해 훨씬 많은 에너지가 Krebs c-

Table 3. Energy Sources Which will allow Development of the Mouse Embryo

Substrate	Oocyte	One-cell	Two-cell	Eight-cell
Pyruvate	+	+	+	+
Oxalacetate	+	+	+	+
Lactate	-	-	+	+
Phosphoenolpyruvate	-	-	+	+
Glucose	-	-	-	+
Malate	-	-	-	+
a-Ket glutarate	-	-	-	+
Acetate	-	-	-	+
Citrate	-	-	-	+
Succinate	-	-	-	+
Glucose-6-phosphate	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-

(Brinster, 1965b; Brinster and Thomson, 1986; Biggers et al., 1967)

+, Development; -, No development.

ycle 과 전자전달계 의하여 ATP 로 저장된다는 것을 의미한다.

수정란의 시험관 내 배양에 있어서 탄수화물 및 에너지 공급에 관하여는 수 많은 연구가 진행되어 왔다. Table 3 에 나타난 바와 같이 1 세포기의 생쥐 수정란은 pyruvate 와 oxaloacetate 밖에 이용하지 못하나 2 세포기에서는 이외에도 lactate 와 phosphoenolpyruvate 를 이용할 수 있고 8 세포기에서는 glucose α -ketoglutarate, malate 및 acetate 까지 이용이 가능하게 된다.

토끼의 수란관 내에는 glucose 의 농도는 매우 낮고, lactate 및 pyruvate 의 농도는 매우 높는데 이러한 사실에 비추어 보더라도 수정란의 분할기 초기에서는 pyruvate 와 lactate 가 에너지원으로서 중요하고, 분할기 후기에서는 glucose 의 이용이 증가하므로 공급되어야 한다 (Table 4).

2. Adenine Ribonucleotides 의 함량

초기 수정란의 대사능력은 ATP, ADP 및 AMP 와 같은 adenine ribonucleotide 의 함량과 비율을 측정함으로써 조사하여 왔다 (Quinn 과 Wales, 1971; Ginsberg 와 Hillman, 1975; Barbehenn 등, 1978; Leese 등, 1984; Spielmann 등, 1984). 수정란에서 adenine ribonucleotides 의 함량은 enzyme cycling technique 를 이용하여 fluorimetry 로 측정하거나 firefly luciferin assay 를 이용하여 luminometry 로 측정 가능하다.

Spielmann 등 (1984) 의 측정에 의하면, 생쥐 수정

란에서 1 세포기에는 ATP 함량이 0.64 p mole 수준이고 이후 점차 감소하여 늦은 포배기에서는 0.21 p mole 수준으로 떨어졌으며 ATP/ADP 비율도 또한 0.74에서 0.37로 낮아졌다. ADP 함량에는 유의할 만한 변화가 없었으며, AMP 함량은 초기에는 ATP 함량에 비하여 매우 낮은 수준이었으나 수정란의 발달에 따라 점차 증가하였다 (Table 5).

Table 5. Adenine Ribonucleotide Content (p mole/embryo) in Preimplantation Mouse Embryos during Development *in vivo* (Strain NMRI)

Development stage	ATP	ADP	AMP	ATP/ADP
1-cell	0.64+0.08(77)	0.10	0.05	6.4
2-cell	0.57+0.08(76)	0.08	0.14	7.3
4 and 8-cell	0.43+0.04(14)	0.06	0.14	7.3
Morula and early blastocyst	0.43+0.07(30)	0.12	0.13	3.6
Late blastocyst	0.21+0.08(21)	0.15	0.28	1.40

(Spielmann, 1984)

3. Phosphocreatine 의 함량

무척추 동물은 L-arginine 을 ATP 로부터 phosphoacceptor 로 이용하고 있으나 척추동물에서는 creatine 을 phosphoacceptor 로 이용한다. 그러므로 무척추동물에서는 arginine kinase (EC 2.7.3.3; AK) 가 잘 발달되어 있고, 척추동물에서는 creatine kinase

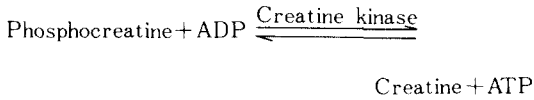
Table 4. Comparison of Carbon Dioxide Production from Glucose, Pyruvate and Lactate by the Preimplantation Mouse and Rabbit Embryo

Stage of development	Glucose		Pyruvate		Lactate	
	Mouse	Rabbit	Mouse	Rabbit	Mouse	Rabbit
Unfertilized	0.13 ^a	0.16	7.24	16.68	3.09	14.71
Fertilized	0.68	0.81	6.95	14.47	3.31	11.28
Day 2	1.19	5.98	6.03	13.42	2.77	22.11
Day 3	2.16	13.71	7.25	22.31	4.54	23.06
Day 4	8.84	50.33	11.96	201.19	11.20	178.20
Day 5	14.69	1335.15	15.73	2032.91	15.06	655.20
Day 6	—	4904.98	—	9882.36	—	3844.20

(Brinster, 1970)

^aAll values are p moles of CO₂ produced/embryo/hour. The substrate concentration was for glucose, 1mg/ml; for pyruvate, 5 × 10⁻⁴M; and for lactate, 5 × 10⁻³M.

(EC 2.7.3.2;CK)가 잘 발달되어 있다. 따라서 생쥐 난자와 수정란에서도 높은 수준의 creatine kinase의 활성도 및 phosphocreatine의 농도가 관찰되었으며 (Iyengar 등, 1983; Lee와 Iyengar (미발표문) 성계의 정자에서도 높은 creatine kinase의 활성도가 조사된 바 있다 (Tombes와 Shapiro, 1985). Phosphocreatine은 에너지 대사에 있어서 많은 에너지를 생산하는 nucleotides에 phosphate를 공급할 수 있는 에너지 저장고로서 척추동물에 있어서 매우 중요한 물질이다. 그 반응과정은 다음과 같다.



저자가 조사한 바에 의하면, 생쥐 난자에서 metaphase I 상태에서 metaphase II 상태로 성숙할 경우 0.316 p mole 수준에서 0.251 p mole 수준으로 증가하였다가 수정후에는 0.211 p mole 수준으로 약간 떨어졌으며 2 세포기에서는 0.135 p mole 수준으로 떨어졌다. 이후 4 세포기부터는 점차 증가하기 시작하여 expanded blastocyst에서는 1.061 p mole 수준으로 5 배 이상 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 1).

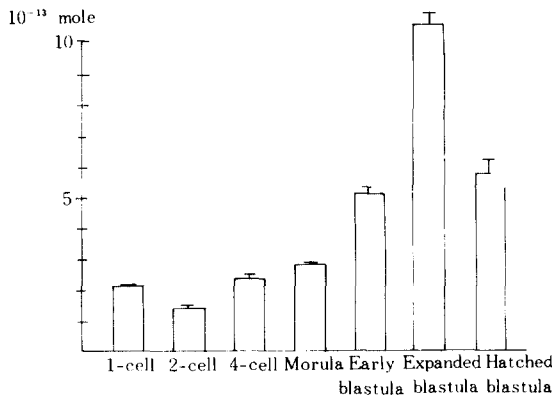


Fig. 1. Phosphocreatine concentrations in mouse embryos.

4. 산소소비와 대사율

각 동물의 수정란에서 산소 흡수율은 Table 6에 나타난 바와 같다. 생쥐에서는 수정 후 3일까지는 산소 흡수가 증가하지 않다가 수정 후 4일부터는 급격히 증가하는 경향을 나타낸다. 토끼 수정란에서

Table 6. Oxygen Uptake of Preimplantation Embryos

Stage of development	Uptake in nl/embryo/hour					
	Mouse	Rabbit	Rat	Cow	Pig	Sea urchin
Follicular	—	—	1.11	23.0	4.31	0--
Unfertilized	0.16	—	—	—	0.82	0.40
Fertilized	0.16	0.64	0.56	—	—	0.60
Day 2	0.15	0.60	—	—	—	—
Day 3	0.19	0.84	1.23	—	—	—
Day 4	0.41	5.45	1.40	—	—	—
Day 5	0.54	53.00	2.00	—	—	—
Day 6	—	214.20	—	—	—	—

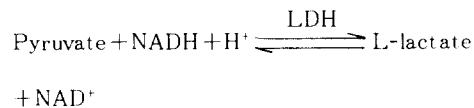
(Brinster, 1970)

도 비슷한 경향을 나타내는데 토끼 수정란의 용적이 생쥐 수정란의 용적에 비하여 약 3.5배 크므로 따라서 산소 흡수량도 약 3.5배 많다. 토끼에서는 포배기 이후에 산소흡수량의 기하급수적인 증가가 특이하다. 배란된 생쥐 난자는 산소소비량이 건물량 mg당 3.7 μ l이었는데 이는 피부의 산소소비량과 맞먹는 상당히 낮은 대사율에 해당한다. 그러나 포배기에서는 급격히 산소 소비량이 증가하여 건물량 mg당 16.3 μ l로서 뇌에서의 산소소비량과 맞먹는 수준이다.

수정란의 에너지대사에 관여하는 몇가지 효소들

1. Lactate Dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 27, LDH)

초기 수정란의 대사에 있어서 여러 종류의 효소의 활성도가 측정되어 왔다. 그 중 lactate dehydrogenase는 초기 수정란의 대사에 중요한 물질인 lactate 및 pyruvate와 깊이 관련되어 있고, 또한 초기 수정란의 발달단계에 따라 활성도와 이성체에 있어서 현저한 변화가 일어나기 때문에 중요시 되고 있다.



생쥐 수정란에서는 lactate dehydrogenase의 환

성도가 골격근에 비하여 10배 가량 높고, 심장근에 비하여는 약 15배 가량 높다. 난자 발생시기에 LDH의 활성도가 난자 자체가 함유하고 있는 lactate를 pyruvate로 바꾸는데 필요한 LDH의 활성도에 비하여 자그만치 약 10,000배 가량 높게 축적된다. 이러한 이유는 난자의 수정 후 수정란의 발달과 난할과정에 사용되어질 것이기 때문이다. 그러다가 수정란이 포배기 이후로 발달하게 되면 LDH의 활성도는 급격히 떨어지기 시작하고 착상직전에는 수정직후에 비하여 10% 수준으로 낮아진다(Table 7).

토끼 난자에서는 생쥐에 비하여 LDH 활성도가 매우 낮다(1/20). 생쥐의 수정란에서는 착상시기에 LDH의 활성도가 1 세포기에 비하여 90%가 감소하였으나 토끼 수정란에서는 현저한 변화가 없다.

LDH의 총활성도는 포배기에 많이 증가하나 단백질 함량 단위로 계산하면 생쥐와 큰 차이가 없다(Table 8).

각 동물의 난자에서의 LDH 활성도는 Table 9에서 보는 바와 같이 상당한 차이가 있다. 생쥐, 쥐 및 소의 난자에서는 비교적 높은 편이고, 토끼, squirrel, 원숭이 및 사람에서는 매우 낮은 편이다. LDH의 이성체 5종중에서 2 세포기의 수정란에서는 LDH-1이 주로 발견되고 착상 후에는 LDH-5가 주로 발견된다(Brinster, 1979).

2. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 49, G6PD)

G6PD는 지방산과 sterol의 합성과정에 소요되

Table 7. Lactate Dehydrogenase Activity in the Early Mouse Embryo

Approximate time after ovulation (hours)	Stage of development	NADH oxidized per hour embryo (moles $\times 10^8$)	NADH oxidized per hour per gram of protein (moles)
12	Unfertilized	4.16+0.12a	1.66+0.05a
12	Fertilized	4.62+0.10	1.64+0.04
36	Two-cell	4.68+0.14	1.79+0.05
60	Eight-cell	4.23+0.12	1.81+0.05
84	Morula	2.24+0.21	1.09+0.10
84	Day 4 blastocyst	1.69+0.12	0.17+0.05
108	Day 5 blastocyst	0.51+0.04	0.25+0.02

^aValues are mean + SEM.

(Brinster, 1979)

Table 8. Lactate Dehydrogenase Activity* in the Early Rabbit Embryo

Approximate time after ovulation (hours)	Stage of development	NADH oxidized per hour per embryo (moles $\times 10^9$)	NADH oxidized per hour per gram of protein (moles $\times 10^2$)
12	Unfertilized	2.33+ 0.13 ^a	2.33
12	Fertilized	2.05+ 0.09	2.05
36	Day 2 8-cell	2.01+ 0.19	2.01
60	Day 3 Morula	1.68+ 0.11	1.68
84	Day 4 blastocyst	1.92+ 0.20	—
108	Day 5 blastocyst	11.23+ 1.08	0.86
132	Day 6 blastocyst	225.00+21.10	3.61

*Specific activity calculated on the basis of estimated protein content.

^aValues are means + SEM.

(Brinster, 1979)

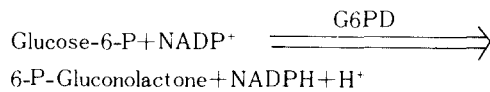
Table 9. Lactate Dehydrogenase Activity in the Oocytes of Different Mammalian Species

Species	NADH oxidized per hour per oocyte (moles $\times 10^9$)	Diameter of vitellus (μ)	NADH oxidized per hour cu μ (moles $\times 10^{15}$)
Mouse	49.10 \pm 2.00 ^a	81.5	173.50
Rabbit	1.63 \pm 0.12	125.8	1.57
Rat	17.66 \pm 0.31	88.5	48.65
Hamster	5.80 \pm 0.43	81.3	20.64
Guinea pig	3.97 \pm 0.16	80.7	14.44
Rhesus monkey	6.32 \pm 0.34	115.5	7.83
Squirrel monkey	1.58 \pm 0.16	92.8	3.77
Human	1.30 \pm 0.11	107.7	1.99
Cow	12.35 \pm 0.48	120.0	13.65
Ferret	6.65 \pm 0.81	127.1	6.20

^aValues are means \pm SEM.

(Brinster, 1979)

는 환원된 NADP(NADPH)를 공급하거나 nucleotide나 핵산합성에 필요한 ribose의 공급에 있어서 중요한 hexose monophosphate 분로경로에서 glucose-6-p의 분해에 중요한 효소이다.



생쥐 난자에서 G6PD의 활성도는 LDH에 비하여 약 1/30에 해당하는 낮은 수준이다. 초기 분할 과정에서의 G6PD의 수준은 매우 높는데 다른 조직에서의 G6PD의 활성도에 비교하면, 성숙에서 가장 높은 G6PD의 활성도를 가지고 있는 비유충의 유선조직과 유사한 수준이다. 생쥐에서는 수정 후 2일간은 이 효소의 활성도가 높게 유지되다가 착상시기에는 이의 약 90%는 소멸된다. 왜 초기수정란에서 G6PD의 활성도가 높게 유지되는지는 아직 명확하지 않으나 LDH에서와 같이 난자의 성숙에 이 효소의 활성이 중요한 역할을 할 것이며, 또한 축적될 것으로 여겨지고 있다. G6PD는 X-염색체 유전자와 깊게 관련되어 있고 XX-염색체를 가지고 있는 난자에서 XO-염색체를 가지고 있는 난자에 비하여 그 활성도가 높게 나타난다. 이외에도 hypoxanthine phosphoribosyl transferase(EC 2.4.2.8, HPRT), α -galactosidase(EC 3.2.1.22, α -G) 및 phosphoglycerate kinase(EC 2.7.2.3, PGK-1) 등도 X-염색체와 깊게 관련되어 있다고 한다(Brinster, 1979).

3. Creatine Kinase (EC 2.7.3.2, CK)

Creatine kinase는 phosphocreatine으로 저장된 고에너지를 ATP로 전환시키는데 중요한 역할을 하는 효소이다. Creatine kinase는 근육, 심장근 및 뇌에 높은 농도를 유지하고 있으나 생쥐 난자의 성숙에 따라서 CK의 활성도도 증가하여 성숙된 난자에서는 그 활성도가 0.030 n mole/min에 이른다. 생쥐 수정란의 초기 분할과정 중에도 계속 증가하여 8세포기에는 0.058 n mole/min 수준으로 가장 활성도가 증가하였다가 이후 감소하기 시작하여 포배기

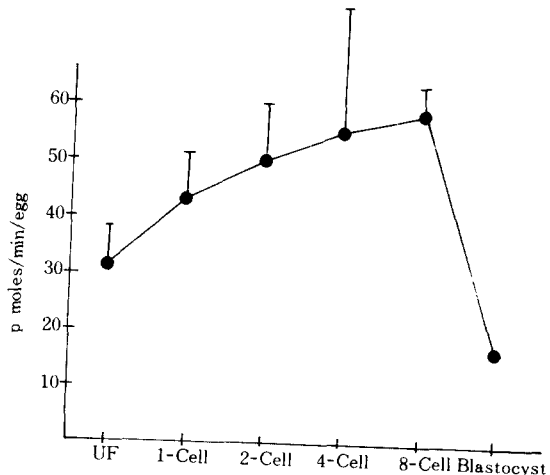


Fig. 2. Creatine kinase activity during preimplantation development in mouse embryos. UF means unfertilized egg (Iyengar et al., 1983)

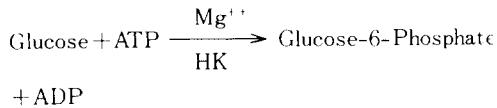
에서는 0.016 n mole/min 수준으로 저하되는 것이 관찰되었다.(Iyengar 등, 1983) (Fig. 2).

초기 수정란에서의 이러한 높은 CK 활성도는 pyruvate에 의한 energy의 생산이나, DNA, RNA 혹은 단백질과 같은 거대분자의 생합성을 활발히 일으키는데 필요한 에너지의 공급에 중요한 역할을 할 것으로 본다. 아울러 Spielmann 등 (1984)이나 Quinn과 Wales (1971)가 조사한 바와 같이 초기 수정란에서 ATP/ADP 비율이 높게 유지되는 현상에 관하여도 충분한 설명이 될 수 있다.

CK에는 3가지의 isozymes가 있다. 골격근에 주로 있는 것은 MM형이고 뇌와 자궁근에는 BB형이며, 심장근에는 이의 hybrid형인 MB형이 주로 있다. 생쥐의 수정란에는 대부분이 BB형의 CK가 존재하고, MM형의 CK는 약 15%가량 활성도가 있다고 한다(Iyengar 등, 1983).

4. Hexokinase (EC 2.7.1.1, HK)

HK는 해당경로에 있어서 glucose가 pyruvate로 전환되기에 앞서 ATP로 인산기를 공급받아 glucose-6-phosphate로 변환시키는 작용을 한다.



수정란에서 HK의 활성도는 배란 직후부터 상실배기까지의 세포 분할과정에서는 매우 낮고 blastocyst로 발전함에 따라 매우 빠른 속도로 활성도가 증가하여 착상직전에 최고조에 이른다(Table 10).

이런 현상은 초기 수정란에서 glucose를 이용하지 못하고 주로 에너지원으로서 pyruvate와 lactate에 의존하고 있는 것과 밀접한 관계가 있다.

5. 기타 수정란의 세포막에 존재하는 효소들

“Marker” 효소로서 중요한 alkaline phosphatase는 1세포기의 생쥐 수정란 세포막에서 발견되었으며 8세포기 및 상실배기로 발전함에 따라 이 효소의 활성도가 증가하였다. 포배기에서는 영양배엽에서만 나타났다. Nucleotide의 분해에 관여하는 5'-nucleotidase의 활성도는 4세포기에서부터 8세포기에 나타나서 포배기에 영양배엽에서 가장 높은 활성도를 나타내었다. Na⁺ 및 K⁺의 막이동에 중요한 Na⁺-K⁺-ATPase는 상실배기와 포배기에 나타났다. 세포분열, 성장 및 대사조절에 매우 중요한 물질인 cyclic AMP (cAMP)의 세포내 농도조절에 관여하는 cAMP phosphodiesterase는 영양배엽의 세포막의 r-에서 가장 높은 활성을 나타내었고, adenylate cyclase는 1세포기에서부터 나타나고, 세포막내부에 존재하였다고 한다(Vorbrodt 등, 1977).

RNA 함량과 합성

수정란은 다른 세포에 비하여 상당히 많은 RNA가 저장되어 있다. 토끼 수정란에서 RNA 함량은 수정직후 0.020μg으로서 16세포기까지는 큰 변화가 없다가 상실배기에서 초기 포배기로 발달하는 수정 3일부터는 급격히 증가하기 시작하여 수정 6

Table 10. Regulation of Glucose Utilization in the Preimplantation Mouse Embryo

Stage of development	Hexokinase activity p moles of NADP reduced/hr/embryo	CO ₂ produced	Lactate produced	Carbon incorporated	Total
Unfertilized	1.23 (7.38)	0.13	0.15	—	—
Fertilized	1.76 (10.56)	0.68	0.72	—	—
Two-cell	1.70 (10.20)	1.19	2.10	1.65	4.94
Eight-cell	2.24 (13.44)	2.16	3.75	1.72	7.63
Morula	5.63 (33.78)	6.73	27.96	—	—
Blastocyst	7.94 (47.64)	10.94	33.30	7.01	41.70
Late blastocyst	9.40 (56.40)	14.69	42.30	20.01	77.00

(Brinster, 1970)

() Indicate maximum intracellular glucose carbon available to the embryo.

^a Values are p moles of carbon from glucose per hour per embryo.

^b Values are average of previous 24 h.

Table 11. Nucleic Acid Content of the Mouse and Rabbit Embryo

Stage of development	Mouse		Rabbit
	DNA pg/cell	RNA pg/cell	RNA, pg/cell
Unfertilized	45.8 (45.8) ^a	1750 (1750)	20000 (20000)
Day 1	49.0 (49.0)	1680 (1680)	14000 (28000)
Day 2	24.0 (48.0)	905 (1810)	2125 (34000)
Day 3	20.4 (163.0)	200 (1600)	539 (69000)
Day 4	19.3 (308.0)	50 (807)	120 (123000)
Day 5			46 (414000)
Day 6	Embryos implant on day 5		35 (2790000)

(Brinster, 1970)

^aNumbers in parentheses indicate values per embryo.

일제에는 세포수가 80,000으로 증가하면서 RNA 함량도 2.80 μ g으로서 수정직후에 비하여 140배 가량 증가한다(Table 11).

생쥐의 수정란은 수정직후에 난자의 발달과정에서 모체로부터 전달받은 난자유래성(oogonetic) mRNA가 이행되나 2세포기 이후부터는 급격히 감소하고, 이후 새로운 polypeptides와 부계(정자)로부터 전수된 isozyme 유도체들로 encode된 embryonic mRNA로 대체된다. 이 embryonic mRNA는 수정란의 compaction, cavitation 및 hatching 등 형태학적 변화과정에 중요한 역할을 할 것이라고 추측된다(Kidder와 McLachlin, 1985). Ellen과 Gwatkin(1968) 및 Tasca(1969)는 ³H-uridine이 8세포기 이후에 RNA에 결합하는 능력이 증가하므로써 이때부터 많은 유전자가 전사될 것이라고 한다(Fig. 3).

Ebert(1983, 1984)는 mRNA를 생쥐의 난자와 초기수정란에 직접 미세주입하여 이의 전사효율을 조

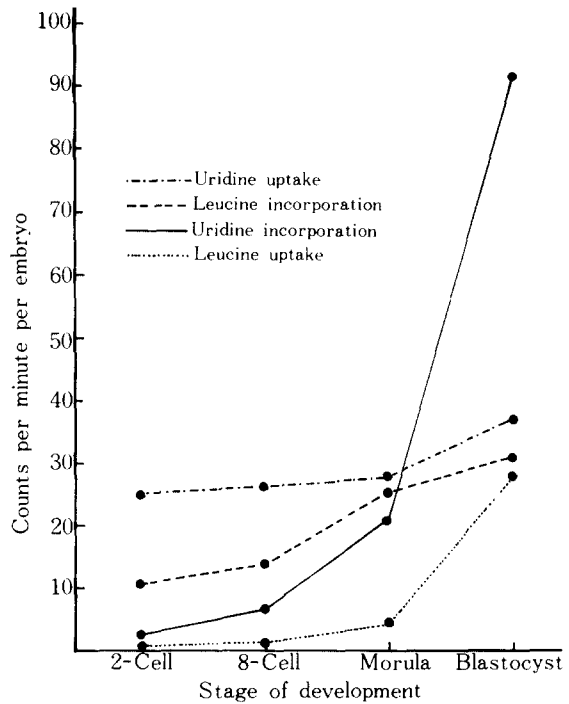


Fig. 3. Uptake and incorporation of C¹⁴-leucine and H³-uridine into protein and RNA of mouse embryos (data taken from Tasca, 1969)

사하였던 바 reticulocyte에 비하여 40배나 낮았다고 한다. 또한 이의 반감기는 난자에서는 147-366시간이었고, 수정란에서는 3-5시간 이었다고 한다.

DNA 함량과 합성

수정란이 함유하고 있는 DNA 수준은 다른 세포에 비하여 매우 높은 편이다. 배란시에 생쥐 수정란이 함유하고 있는 DNA 함량은 45 picograms 이다. 수정란의 분할이 계속되면 세포 하나 당 갖는 DNA 함량은 점차 줄어들어서 16세포기에는 약 20 picograms에 이른다. 그러나 수정란 하나가 가지고 있는 총 DNA 함량은 1세포기에 비하여 16세포기에는 약 7배 증가한 것이다(Table 11).

Mintz(1964)에 의하면, 생쥐 수정란에서 DNA 합성은 수정란의 발달과정에 줄곧 일어난다고 한다.

단백질 함량과 합성

수정란의 시험관내 배양에 있어서 아미노산과 단

Table 12. Protein and Free Amino Acid Contents of Preimplantation Mouse Embryos Developing *in vivo*

Development stage	Protein values (ng) obtained by			ng free amino acids/embryo	Ratio (amino acids: protein)
	Sellens (1981)	Brinster (1967)	Schiffner & Spielmann (1976)		
1-cell (unfertilized)	29.9+3.1 ^a			1.35+0.30	0.052
1-cell (fertilized)	28.3+1.5	27.8+6.5	24.5+6.5	1.07+0.16	0.044
2-cell	27.5+2.2	26.1+1.9	26.2+6.6	0.78+0.10	0.033
4-cell	26.1+2.7			0.90+0.20	0.041
8-cell	27.0+2.0	23.4+1.4	22.0+5.5	0.97+0.18	0.042
Morula	25.2+1.6	20.6+2.1	20.9+5.0	1.02+0.14	0.048
Early blastocyst	25.3+0.3	23.9+2.4	24.8+6.0	1.04+0.14	0.049
Late blastocyst (unhatched)	24.0+1.1			1.00+0.10	0.050
Late blastocyst (hatched)	25.2+2.3	20.0+2.1	40.8+8.4	0.59+0.22	0.023

^aValues are mean + S.D.

(Sellens et al., 1981)

백질은 수정란의 발달에 매우 중요한 물질이다. 그러나 대부분의 포유류의 수정란은 이러한 물질들을 함유하고 있으며 또한 자체적으로 단백질을 합성할 수 있는 능력을 가지고 있으므로 생쥐 수정란의 경우에는 8 세포기까지는 배양액에 이러한 물질들이 없더라도 발달에 지장을 주지 않는다.

Table 12에 나타난 바와 같이 생쥐 수정란에서 단백질 함량은 수정이후부터 착상단계에 이르기까지 줄곧 감소된다 (Brinster, 1967; Schiffner와 Spielmann, 1976; Sellens 등 1981). Sellens 등 (1981)의 조사에 의하면 수정란이 함유하고 있는 free amino acids는 1 ng 수준으로서 수정전에 비하여 수정후에 그 수준이 낮아졌고 2 세포기에서 8 세포기 사이에는 1 ng 이하의 수준이었다. 그리고 amino acid 대 단백질의 비율은 약 0.05 수준이었다. 2 세포기의 수정란을 *in vitro* 상에서 배양할 경우 free amino acids의 함량은 *in vivo* 상에서 보다 훨씬 낮았다. blastocyst기에 있는 수정란에서는 배양액에 amino acids와 fetal calf serum이 함유되어 있을 때 *in vitro* 상에서 수정란내 단백질 함량이 급격히 증가하였다. 그러나 fetal calf serum만 첨가하고 amino acids는 첨가하지 않은 상태에서 *in vitro* 배양하였을 경우 수정란내 단백질 함량은 극히 낮은 속도로 증가하였다.

결론

포유류의 수정란은 초기 발생과정에서 형태학적

으로나 생화학적으로 많은 변화과정을 밟는다. 특히 설치류의 초기 수정란은 탄수화물대사에 있어서 glucose를 에너지원으로 이용하지 못하고 주로 pyruvate와 lactate에 의존하고 있다. 또한 이들 두 물질의 농도조절에 관여하는 LDH의 활성도는 난자시기에 이미 매우 높은 수준으로 축적되어 있다가 분할기에는 물결근에 비하여 10배 가량 높은 활성도를 띠우며 포배기로 발전하면서 그 활성도는 급격히 감소한다. 그러나 생쥐 수정란은 8 세포기 이후부터는 Krebs cycle에 의한 해당과정이 주에너지 공급원으로 작용하므로 산소의 섭취 및 소비가 증가할 뿐만 아니라 glucose의 이용이 증가하고 따라서 glucose로부터 glucose-6-phosphate로 변형시키는 HK의 활성도는 포배기 이후에 급격히 증가한다. 고에너지물질인 ATP는 초기에 많이 저장되어 있다가 수정란이 발달함에 따라 점차 감소하며 아울러 ATP/ADP 비율도 낮아지게 된다. 그러나 ATP 합성에 있어서 인산기를 공급함으로써 에너지 저장고 역할을 하는 phosphocreatine은 수정란의 발달에 따라 점차 증가하여 팽창된 포배기에서 심정에 이른다. Phosphocreatine의 분해 및 합성에 관여하는 CK의 활성도는 8 세포기에 가장 높은 활성도를 나타내었다가 그 후 점차 감소하고 생쥐 수정란에는 BB형의 CK 이성체가 대부분을 차지한다.

핵산합성에 있어서, 수정란은 다른 세포에 비하여 상당히 높은 수준의 RNA를 함유하고 있으며, 그 발달과정에서도 줄곧 이의 합성이 일어나서 토

끼에서는 수정 직후에 비하여 포배기에 약 140배가량 증가한다. RNA polymerase로부터 합성되는 mRNA는 수정 후에는 난자유래성 mRNA가 이행되나 2세포기 이후부터는 정자로부터 전수된 embryonic mRNA로 대체된다. DNA 또한 다른 세포에 비하여 수정란은 그 함량이 높은 편이다. 세포가 분할하면 할수록 세포 하나가 갖는 DNA량은 줄어드나 수정란 총체의 DNA함량은 계속 합성이 일어나므로써 1세포기에 비하여 16세포기에는 약 7배가량 증가한다.

단백질은 수정란 자체가 함유하고 있고 또한 합성할 수 있는 능력이 있어서 초기 수정란에서는 발달에 큰 영향을 미치지 않는다. 그러나 수정란내의 단백질 함량은 수정기 이후부터 착상단계에 이르기까지 줄곧 감소한다.

이상과 같이 실험동물에서의 수정란의 형태학적 발달과 아울러 대사과정의 변화, 이의 조절에 관여하는 효소활성도의 변화 및 이성체의 발현 등에 관하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 앞으로는 사람과 가축 등 동물별 수정란의 대사기작에 관한 연구가 더 수행되어야 할 것으로 보이며, 수정란의 발달 단계에 따른 각 효소의 활성에 관여하는 유전자의 발현이나 수정란 세포의 분화에 있어서 유전자의 재발현 등에 관한 연구가 더 수행될 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowski, H. (1977). The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Developmental Biol.*, 61:378-383.
2. Barbehenn, E.K., Wales, R.G. and Lowry, O.H. (1978). Measurement of metabolites in single preimplantation embryos; a new means to study metabolic control in early embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 43:2-46.
3. Betteridge, K.J. (1977). Embryo transfer in farm animals. Ottawa, Canada Dept. Agric. Monograph 16, 92pp.
4. Biggers, J.D., Whittingham D.G. and Donahue, R.P. (1967). The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 58:560-565.
5. Brinster, R.L. (1964). Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. Ph.D. Thesis, University of Pennsylvania, Philadelphia.
6. Brinster, R.L. (1965a). Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *J. Exp. Zool.*, 158:49-58.
7. Brinster, R.L. (1965b). Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. II. The effect of energy source. *J. Exp. Zool.*, 158:59-68.
8. Brinster, R.L. (1965c). Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. V. Interaction of energy sources. *J. Reprod. Fert.*, 10:227-240.
9. Brinster, R.L. (1967). Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. *J. Reprod. Fert.*, 13:413.
10. Brinster, R.L. (1979). Isozymic analyses of early mammalian embryogenesis. *Isozymes: Current topics in biological and medical research*, 3:155-184.
11. Brinster, R.L. and Thomson, J.L. (1966). Development of eight-cell mouse embryo *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, 42:308-315.
12. Ebert, K.M. and Brinster, R.L. (1983). Rabbit α -globin messenger RNA translation by the mouse ovum. *J. Embryol. exp. Morph.*, 74:159-168.
13. Ebert, K.M., Paynton, B.V., McKnight, G.S. and Brinster, R.L. (1984). Translation and stability of ovalbumin messenger RNA injected into growing oocytes and fertilized ova of mice. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 84:91-103.
14. Ellem, K.A.O. and Gwatkin, R.B.L. (1968). Patterns of nucleic acid synthesis in the early mouse embryo. *Develop. Biol.*, 18:311.
15. Folstad, L., Bennett, J.D. and Dorfman, R.I. (1969). *In vitro* culture of rat ova. *J. Reprod. Fert.* 18: 145-146.
16. Geisert, R.D., Renegar, R.H., Thatcher, W.W., Roberts, R.M. and Bazer, F.W. (1982). Establishment of pregnancy in the pig: 1. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. *Biol. of Reprod.* 27: 925-939.

17. Binsbergg, L. and Hillman, N. (1975). Shifts in ATP synthesis during preimplantation stages of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 43:83-90.
18. Hamner, C.E. and Williams W.L. (1965). Composition of rabbit oviduct secretions. *Fertil. Steril.* 16, 170-.
19. Iyengar, M.R., Ivengar, C.W.L., Chen, H.Y., Brinster, R.L., Bornslaeger, E. and Schultz, R.M. (1983). Expression of creatine kinase isoenzyme during oogenesis and embryogenesis in the mouse. *Develop. Biol.*, 96:263-268.
20. Kane, M.T. (1979). Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. *Biol. Reprod.*, 20: 323-332.
21. Kane, M.T. (1985). A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 73:147-150.
22. Kidder, G.M. and McLachlin, J.R. (1985). Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Develop. Biol.*, 112:265-275.
23. Leese, H.J., Biggers, J.D., Mroz, E.A. and Lechene, C. (1984). Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. *Analytical Biochem.* 140:443-448.
24. Lewis, H.W. and Wright, E.S. (1935). On the early development of the mouse egg. *Contr. Embryol.*, 25:113-144.
25. Lindner, G.M. and Wright, R.W. (1978). morphological and quantitative aspects of the development of swine embryos *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46: 711-718.
26. Mastroianini, L. Jr. and Wallach R.C. (1961). Effect of ovulation and early gestation on oviduct secretions in the rabbit. *Amer. J. Physiol.*, 200: 815-.
27. Mastropianni, L. Jr., Urzua, M., Avalos, M. and Stambaugh, R. (1969). Some observations on fallopian tube fluid in the monkey. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 103:703.
28. Mayer, J.F., Jr. and Fretz, H.I. (1974). Culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. *J. Reprod. Fert.*, 39:1-9.
29. Menino, A.R. and Wright, R.W., Jr. (1982). Development of one-cell swine embryos. *J. Anim. Sci.*, 57 (Suppl. 1):359 (Abstr.)
30. Mintz, B. (1964). Synthetic processes and early development in the mammalian egg. *J. Exp. J. Zool.*, 157:85.
31. Muggleton-Harris, A., Whittingham, D.G. and Wilson, L. (1982). Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse. *Nature (Lond.)*, 299:460-462.
32. Nieder, G.L. and Corder, C.N. (1983). Pyruvate and lactate levels in oviducts of cycling, pregnant and pseudopregnant mice. *Biol. Reprod.*, 28: 566-574.
33. Poige, C. and Frederck, C.L. (1968). Culture and storage of fertilized pig eggs. *Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.*, Paris 1, 211 (Abstr.)
34. Guinn, P. and Wales, R.G. (1971). Adenosine triphosphate content of preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 25:133-135.
35. Quinn, P. and Wales, R.G. (1973). The effect of culture *in vitro* on the levels of adenosine triphosphate in preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 32:231-241.
36. Renard, J.P., du Mesnil du Buisson, F., Wintemberger-Torres, S. and Menezo, Y. (1976). *In vitro* culture of cow embryos from day 6 and day 7. In *Egg Transfer in Cattle*. Ed. L.E.A. Rowson. Commission of the European Communities, Luxemburg, pp. 159-164.
37. Restall, B.J. (1966). The fallopian tube of the sheep. II The chemical composition of the fluid from the fallopian tube. *Aust. J. Biol. Sci.*, 19: 687.
38. Rundell, J.W. and Vincent, C.K. (1968). *In vitro* culture of swine ova. *J. Anim. Sci.*, 27:1196 (Abstr.)
39. Schultz, G.A. and Tucker, E.B. (1977). Protein synthesis and gene expression in preimplantation rabbit embryos. In *Development in Mammals*. Vol. 1. North-Holland publishing Co. Amsterdam. pp. 69-97.

40. Sellens, M.H., Stein, S. and Scherman, M.I. (1981). Protein and free amino acid content in preimplantation mouse embryos and in blastocysts under various culture conditions. *J. Reprod. Fert.*, 61:307-315.
41. Spielmann, H., Jacob-Mueller, U., Schulz, P. and Schimmel, A. (1984). Changes of the adenine ribonucleotide content during preimplantation development of mouse embryos *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fert.*, 71:467-473.
42. Tasca, R.J. (1969). RNA synthesis and protein synthesis in preimplantation stage mouse embryos. Ph. D. Thesis. Temple University, Philadelphia.
43. Tombes, R.M. and Shapino, B.M. (1985). Metabolite channeling: A phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell*, 41:325-334.
44. Vishwakarma, P. (1962). The pH and bicarbonate ion content of the oviduct and uterine fluids. *Fertil. Steril.*, 13:481.
45. Vorbrodts, A., Konwinski, M., Solter, D. and Koprowski, H. (1977). Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound-phosphatases in preimplantation mouse embryos. *Develop. Biol.*, 55:117-134.
46. Whitten, W.K. and Biggers, J.D. (1968). Complete development *in vitro* of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 17:399-401.
47. Whitten, W.K. (1956). Culture of tubal mouse ova. *Nature (Lond.)*, 176:96.
48. Whitten, W.K. (1971). Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. *Adv. Biosci.*, 6:627-632.
49. Whittingham, D.G. (1972). The effect of copper on preimplantation development in the mouse. *Biol. Reprod.*, 7:140 (Abstr).
50. Whittingham, D.G. and Bavister B.D. (1974). Development of hamster eggs fertilized *in vitro* or *in vivo*. *J. Reprod. Fert.*, 38:489-492.
51. Wright, R.W., Jr, Anderson, G.B., Cupps, P.T. and Drost, M. (1976). Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 14:157-162.