

발생단계에 따라 Prostaglandins가 생쥐배아의 팽창과 부화에 미치는 영향

전용필^{1,2} · 김정훈² · 윤용달¹ · 김문규¹

¹ 한양대학교 자연과학대학 생물학과

² 울산대학교 의과대학 산부인과학교실

Effects of Prostaglandins on Embryonic Expansion and Hatching by Developmental Stage in Mouse

Yong Pil Cheon^{1,2}, Chung Hoon Kim², Yong-Dal Yoon¹ and Moon Kyoo Kim¹

¹Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791

²Department of OB/GYN, College of Medicine, University of Ulsan, Asan Medical Center, Seoul 138-040, Korea

요 약 : 부화 및 착상에서 prostaglandins의 역할에 대한 연구는 많으나 배아단계에 따라 포배의 팽창과 부화에 미치는 영향에 대한 연구는 미미하다. 따라서 본 실험에서는 다양한 농도의 prostaglandins를 발생단계에 따라 처리하거나, indomethacin과 prostaglandins의 양 변화를 통해 팽창과 부화에 미치는 영향을 알아보고, 배아 단계별 PGE₂와 PGF_{2α}의 생합성양 변화양상을 알아보았다. 100μM 이상 농도의 PGE₂ 처리시 거의 모든 상실배가 퇴화하는 유해성을 보이거나 PGF_{2α}에 있어서는 관찰되지 않았다. PGE₂나 PGF_{2α} 모두에서 배아의 부화를 억제하지만 팽창포배로의 발생은 대조군과 유사하였다. hCG 주사 후 84시간과 96시간 단계 배아에 처리한 경우 부화율이 전반적으로 감소하는 경향을 보였으나 팽창포배로의 발생은 대조군과 유사하였고 PGE₂에 의한 세포독성은 발생단계가 높을수록 감소되었다. 한편 배아 단계와 관련없이 PGF_{2α}의 농도가 높아짐에 따라 부화가 억제되었다. Indomethacin과 PGE₂나 PGF_{2α}를 함유한 배양액에서 각 단계의 배아를 배양할 경우 prostaglandins를 단독으로 처리한 경우보다 부화율이 증가하였다. 한편 PGE₂의 경우 낮은 농도에서 부화율이 대조군 수준으로 증가하였다. 한편 PGE₂ 합성은 발생단계에 따라 급격히 증가한 반면 PGF_{2α}는 점진적인 증가를 보였다. 이상의 결과에서 PGE₂에 의한 세포독성은 배아 단계가 높아질수록 감소하고, 고농도의 PGF_{2α}는 배아의 부화를 억제하였으며, 발생 단계에 따라 prostaglandins의 요구 양이 다를 수 있다. 또한 상실기 이후 배아에서 합성되며, 발생시기에 따라 그 영향이 다르고 팽창과 부화에 관여하는 것으로 사료된다.

ABSTRACT : The effects of prostaglandins in hatching and implantation have been studied but the results were various, and those are not well known by the embryonic stage. The present study examined the effects of prostaglandin E₂ (PGE₂) and prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) on the expansion and hatching of mouse embryos by embryonic stage. Also we tried to measure the concentration of prostaglandins of morula, expanded, and hatching embryos. In early morula stage embryos, high concentration of PGE₂ (>100μM) showed cytotoxicity but PGF_{2α} did not. The hatching was inhibited all groups but not gave negative effects on expansion. In 84 hr and 96 hr stage embryos, the hatching rate was decreased at all treatment groups but not inhibited the expansion. When combine prostaglandin with indomethacin, the hatching rate was increased significantly compared to the prostaglandin-treated groups, and as lower and lower the PGE₂ concentration, the hatching rate increased to the control level. The embryonic synthesis of PGE₂ increased dramatically but that of PGF_{2α} increased gradually. PGE₂ showed cytotoxicity at early stage embryos much than late stage embryos, but PGF_{2α} did not. Hatching was inhibited by the high PGF_{2α} concentration. It is suggested that the inhibition of hatching might be at resulted from cytotoxicity of PGE₂ on embryo. However, it is thought that the mechanisms of inhibition of hatching are different between PGE₂ and PGF_{2α}. In conclusion, it can be suggested that PGE₂ and PGF_{2α} concerned with the expansion and hatching, and their effects on hatching were different by the embryonic stage.

Key words : Hatching, Expansion, Prostaglandins, Mouse.

서 론

본 연구는 1997년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-97-4437)와 보건복지부 보건의료기술연구 개발사업(HMP-97-0006)의 지원으로 이루어짐.

포배는 자궁과 상호 작용을 하여 착상하는데 그 연계성을 기준으로 1) 투명대를 벗어나는 단계, 2) 자궁내벽에 접하기 전 단계로 포배의 위치 결정 단계, 3) 접근 단계, 4) 부착단계, 5) 자궁내벽 침투단계로 나누어 볼 수 있다. 포배로 발생한 배아는 팽창을 거쳐 부화한 후 자궁에 착상하며 성장인자

등 여러 조절인자가 관여하는데 이 중 하나로 prostaglandins가 알려져 있다. 세포내 인지질은 여러 대사경로를 통해 prostaglandins, thromboxane, prostacyclin, 그리고 leukotrien으로 합성된다. Arachidonic acid와 그 대사 산물인 prostaglandins는 안정성이 크지 않으며, 이웃한 세포 또는 아주 짧은 거리에서 합성되어 세포활성을 조절하는 auto- 또는 para-crine 조절인자의 역할을 수행한다 (Khan et al., 1995).

쥐, 토끼, 그리고 양 등에서 prostaglandins가 자궁 내막 또는 포배에서 합성되어 착상을 조절하는 것으로 보고되었다 (Jonson & Dey, 1980; Kennedy & Armstrong, 1981; Harper et al., 1983; Snabes & Harper, 1984). 생쥐 체내나 배아에 prostaglandins의 길항제나 대사 억제제들을 처리할 때 부화(hatching)가 억제되거나 (Cheon et al., 1997) Racowsky와 Biggers (1983)는 포배에서 prostaglandin이 합성되지 않는 것으로 보고하였다. 한편 Hoversland 등은 (1982) 생쥐에서 prostaglandins의 생성 억제는 착상을 지연시키는 효과를 갖는 것으로 보고하였다. 햄스터에서는 부화와 착상이 늦추어진다 (Terranova & Dey, 1983). 쥐에서는 착상기 동안 자궁 내막 내에서 prostaglandins (PGE, PGF, IGI)가 생성되어 착상부위에서 탈락막형성을 촉진하고 모세관의 투과성을 증가시킨다 (Kennedy, 1979). 토끼에서는 포배에서 prostaglandins가 생성되며 (Dey et al., 1980), 소의 경우에 있어서는 oxytoxin이나 platelet-activating factor의 영향을 받아 자궁내막세포에서 PGE₂와 PGF_{2α}가 생성되며 포배에서도 합성된다 (Kim & Fortier, 1995).

액체로 가득찬 포배강의 형성은 포유동물 초기 발생에서 공히 관찰되는 현상으로 질량 변화없이 부피가 아주 빨리 증가하는 과정을 수반한다. 포배강의 형성은 세포 극성의 변화와 세포분열을 통한 이집단화에 의한 것으로 이를 설명하기 위하여 여러 가지 모델이 제시되고 있다 (Wiley 1987). 이는 부화하고 발생하는 과정의 한 단계로 prostaglandins가 포배강내 액체 축적에 관여하는 것으로 알려져 있다.

Indomethacin (Indo)은 phospholipid의 대사과정 중 arachidonic acid가 prostaglandins로 대사하는 과정에 관련된 prostaglandin endoperoxide synthetase를 억제하는 물질로 밝혀져 있으며, Indo를 이용하여 생쥐 배아에서 prostaglandins가 부화에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되어져 왔다 (Chida & Mettler, 1989, Cheon et al., 1997). 또한 Indo와 함께 prostaglandins의 농도를 다양하게 하여 부화에 미치는 영향 (Chida et al., 1986)이나 다양한 농도의 prostaglandins에 의한 비세포 등에서의 cAMP 등의 변화 분석 등

(Zhong et al., 1994)을 통하여 농도에 의한 영향이 있는 것으로 밝혀지고 있다.

그러나 이들 prostaglandins가 상실배 이후의 배아 발생단계에 따라 그리고 처리 농도별 발생에 미치는 영향에 대한 이해는 미미한 단계이다. 따라서 본 실험에서는 prostaglandin의 대사 산물인 PGE₂와 PGF_{2α}를 다양한 농도로 처리하거나 혹은 indomethacin과 함께 처리하여 배아 발생단계에 따라 팽창과 부화에 미치는 영향을 알아보았다. 그리고 상실배, 그리고 팽창과 부화과정의 배아내 PGE₂와 PGF_{2α}의 합성과 그 양의 변화를 비교하였다.

재료 및 방법

1. 배아의 수획

광주기가 명 14/암 10시간으로 조절되는 사육실에서 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육된 생쥐 (ICR strain)를 사용하였다. 암컷은 생후 5~8주된 것을 사용하여 과배란 유도에 사용하였고 수컷은 생후 8~12 주된 건강한 것을 사용하여 교미에 이용하였다.

과배란을 유도하기 위하여 5 IU pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 복강주사한 후 48시간만에 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 복강주사하여 과배란을 유도하였다. 유도 후 건강한 수컷과 합사하였고 다음날 아침 질전을 통하여 교미 여부를 확인하였다. hCG 주사 후 72시간에 경추과피법으로 도살하여 수란관과 자궁 일부를 적출하였다. 배양액 내에서 혈액과 불필요한 조직을 제거한 후 배양액을 관류하고 8-세포기 이후 밀착(compaction)된 건강한 상실기 단계의 배아를 회수하여 실험에 사용하였다.

2. 배아의 배양 및 화학물질의 처리

회수한 배아는 배양접시 (Falcon; 60×15mm) 위에 20μL의 배양액을 방울지게 떨어뜨려 만든 후 파라핀유 (Sigma)로 덮어 배양하는 micro drop 방법을 이용하였다. 파라핀유는 고온 고압 방법으로 멸균한 후 BWW로 평형시켜 사용하였으며, 배아 배양은 5% CO₂, 95% 공기가 공급되고 37°C, 100% 습도를 유지하는 배양기 내에서 배양하였다.

hCG 주사 후 72시간만에 획득한 초기 상실기 단계의 배아는 prostaglandins를 함유한 배양액에 노출시키기 전까지 기본배양액 (0.4% BSA in BWW) 내에서 배양하였으며 다음과 같이 처리하였다. 1) hCG 주사시간을 기준으로 한 각각의 배아단계에 미치는 PGE₂의 영향을 알아보고자 초기 상

실기 단계의 배아 (early morula, 72h post hCG injection), 84시간 (post hCG injection), 그리고 96시간 (post hCG injection) 단계의 배아를 0.1, 1, 10, 100, 200 μ M 농도로 PGE₂를 함유한 0.4% BSA, BWW 배양액으로 각각 옮겨 hCG 주사 후 144시간까지 배양하였다. 2) 각각의 단계별 배아를 1) 과 동일하게 나누어 0, 0.1, 1, 10, 100, 200 μ M 농도로 PGF_{2 α} 를 함유한 0.4% BSA, BWW 배양액으로 각각 옮겨 hCG 주사 후 144시간까지 배양하였다.

Cheon 등 (1997)의 결과를 바탕으로 100 μ M Indo와 10 μ M PGE₂와 PGF_{2 α} 를 각각 함유한 배양액 (100 μ M Indo+10 μ M PGE₂, 100 μ M Indo+10 μ M PGF_{2 α}) 내에서 96시간 단계 배아를 48시간 배양하면서 그 영향을 관찰하였다. 그리고 Indo와 prostaglandins의 양에 따라 어떠한 반응을 보이는지를 알아보기 위하여 50 μ M Indo+5 μ M PGE₂와 50 μ M Indo+5 μ M PGF_{2 α} 를 동일하게 처리하여 배양하여 비교하였고, 한편으로 실험결과를 바탕으로 Indo의 양을 100 μ M로 고정하고 PGE₂의 양을 조절하여 (10 μ M 그리고 1 μ M PGE₂) 그 영향을 알아보았다.

3. 포배내 prostaglandins 양의 변화 측정

PGE₂와 PGF_{2 α} 가 상실배 이후의 생쥐 배아내 발현 여부는 논쟁이 되어왔으며, 본 논문에서는 발현 여부와, 발생단계에 따른 (상실배, 팽창한 포배, 그리고 부화하는 배아) 양의 변화를 알아보고자 하였다. 각 단계의 배아를 각각 10개씩 수회 회수하여 PBS로 세척하고 eppendorf tube에 넣어 실험에 사용하기까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. Prostaglandin의 양은 radioimmunoassay (RIA) 방법을 이용하여 Chang 등 (1995)의 방법을 이용하여 각 단계의 배아를 함유한 실험관에서 추출용액으로 추출한 후 300 μ l로 재용해하고 100 μ l 안에 있는 prostaglandins의 양을 측정하였으며, 이를 이용해 배아당 prostaglandins의 양을 환산하였다.

4. 관찰 및 유의성 검증

hCG 주사시간을 기준으로 144시간 지난 후에 도립현미경 (inverted microscope, DIC modulated, Nikon) 하에서 상실배, 포배 또는 수축한 배아, 팽창한 배아, 부화하였거나 부화중인 배아, 퇴화한 배아로 나누어 관찰하였다.

관찰 결과의 통계적 유의성 검정은 χ^2 -test로 하였으며, p<0.05인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 발생단계에 따른 Prostaglandin E₂가 팽창 및 부화에 미치는 영향

초기 상실배를 PGE₂에 노출하였을 때 부화율은 0.1, 1 μ M에서는 변화가 없었으나 10 μ M 이상의 농도에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 1). 한편 팽창한 상태로 부화가 억제된 배아의 비율은 10 μ M에서 유의하게 많았다 (Fig. 1). 100 μ M 이상의 농도군에서는 거의 모든 배아가 퇴화하였으나 다른 농도군에서는 대조군과 유사한 양상을 보였다 (Fig. 1). 한편 0.1, 1, 그리고 10 μ M 농도군에서 팽창이 진행된 배아의 비율은 대조군과 유사하였다.

hCG 주사후 84시간 된 배아에 처리시 농도에 따른 처리 효과는 초기 상실배와 유사하였다. 배아의 부화율은 10 μ M 이상의 농도군에서는 유의하게 감소하였다 (Fig. 1). 팽창한 상태로 부화되지 않은 배아는 10 μ M 이하의 농도에서는 증가하여 부화가 억제되었으며, 100 μ M 이상의 농도에서는 세포독성에 의해 유의하게 감소하였다 (Fig. 2). 팽창했던 배아가 수축되거나 포배로 남아 있는 배아의 비율은 모든 농도군에서 대조군과 유사하였다 (Fig. 2). 100 μ M에서 96%, 200 μ M 농도에서는 100%로 상실배에서와 마찬가지로 거의 모든 배아가 퇴화하는 것이 관찰되었다 (Fig. 2). 팽창한 포배로 발생한 비율은 10 μ M 농도까지는 대조군과 유사하였다. 따라서 초기 상실배와 마찬가지로 저농도의 PGE₂는 팽창하는 것은 억제하지 않았으나 부화율은 감소하였다.

hCG 주사후 96시간 된 배아는 상실배 (Fig. 1)나 84시간 된 배아 (Fig. 2)와 경향성은 유사하였으나 퇴화유도 농도가 달라졌다. 팽창 상태로의 발생은 100 μ M 이상의 농도에서는 감소하였으나 그 이하의 농도에서는 대조군과 유사하거나

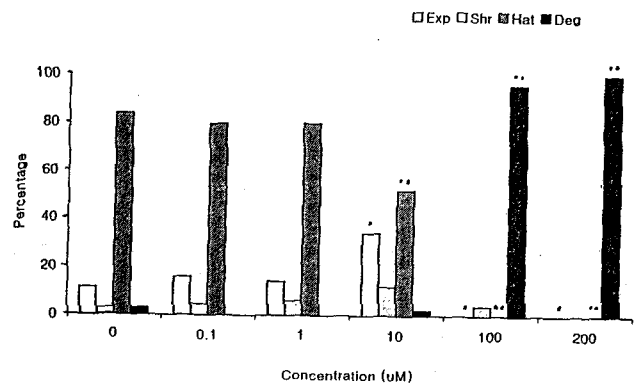


Fig. 1. Effects of prostaglandin E₂ on expansion and hatching of the mouse embryos which were treated at morula stage. Exp, expanded; Shr, shrunken; Hat, hatching; Deg, degeneration. *:p<0.05, **:p<0.01 versus control.

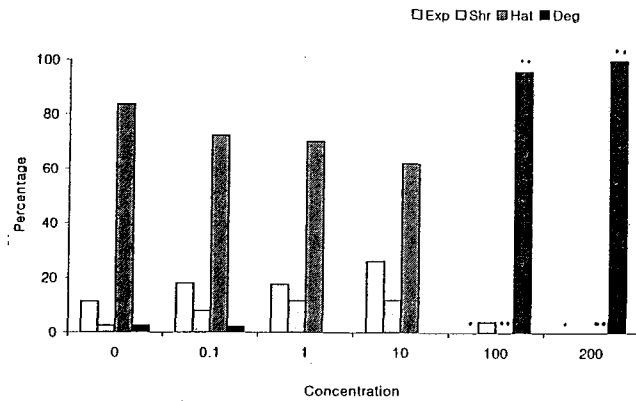


Fig. 2. Effects of prostaglandin E₂ on expansion and hatching of the mouse embryos which were treated at 84 hr stage embryos. Exp, expanded; Shr, shrunken; Hat, hatching; Deg, degeneration. *:p<0.05, **:p<0.001 versus control.

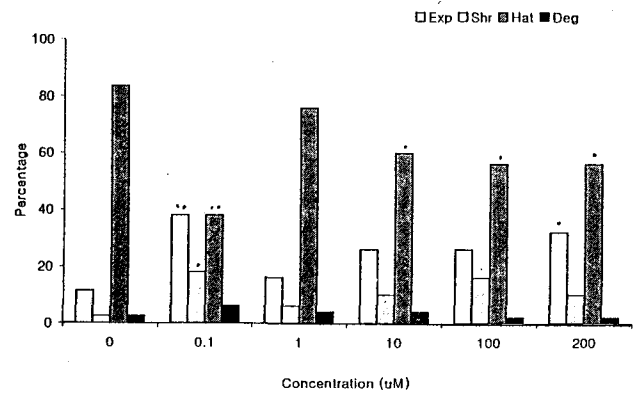


Fig. 4. Effects of prostaglandin F_{2α} on expansion and hatching of the mouse embryos which were treated at morula stage. Exp, expanded; Shr, shrunken; Hat, hatching; Deg, degeneration. *:p<0.05, **:p<0.001 versus control.

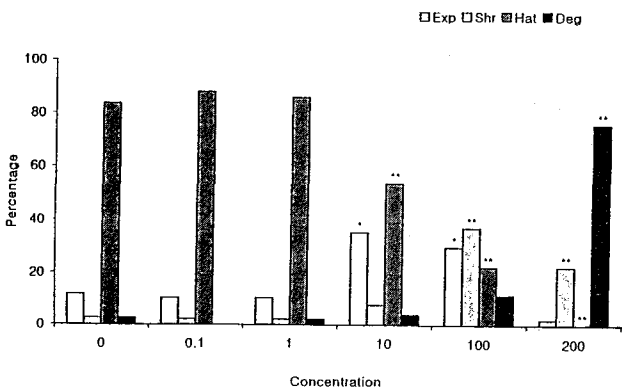


Fig. 3. Effects of prostaglandin E₂ on expansion and hatching of the mouse embryos which were treated at 96 hr stage embryos. Exp, expanded; Shr, shrunken; Hat, hatching; Deg, degeneration. *:p<0.05, **:p<0.001 versus control.

증가 양상을 보였으며, 팽창한 상태로 부화가 억제된 배아의 비율은 10과 100 μ M 농도에서 유의한 증가를 보였다. 퇴화는 다른 배아단계군과는 달리 200 μ M군을 제외하고는 대조군과 유사하였다 (Fig. 3).

2. 발생단계에 따른 Prostaglandin F_{2α}가 팽창 및 부화에 미치는 영향

PGE₂와 동일계열이나 신호전달 계통을 달리하는 PGF_{2α}의 영향을 살펴보면 다음과 같다. 초기 상실배 단계에서는 배아의 부화율이 모든 농도군에서 감소하였으며 0.1과 10 μ M 이상의 농도에서 유의성을 보였다 (Fig. 4). 팽창으로의 발생은

대조군과 유사하였으나, 팽창한 상태로 부화가 억제된 배아는 0.1과 100 μ M에서는 유의하게 증가하였고, 팽창되었다가 수축된 배아의 비율은 대조군에 비해 모든 농도에서 증가하였다.

hCG 주사후 84시간에 처리한 배아의 부화율은 초기 상실기 배아에서와 마찬가지로 감소하는 경향을 보였으며 0.1과 200 μ M에서는 유의하였다. 동일한 시간에 처리한 PGE₂가 부화에 미치는 영향 (Fig. 2)과 비교할 때 감소하는 경향성은 동일하였으나 그 감소의 폭이 작았다. 팽창으로의 발생은 모든 농도군이 대조군과 유사하였으나, 팽창한 상태로 부화가 억제된 배아가 차지하는 비율은 모든 농도군에서 증가하였다. 퇴화율은 대조군과 유사하였다 (Fig. 5).

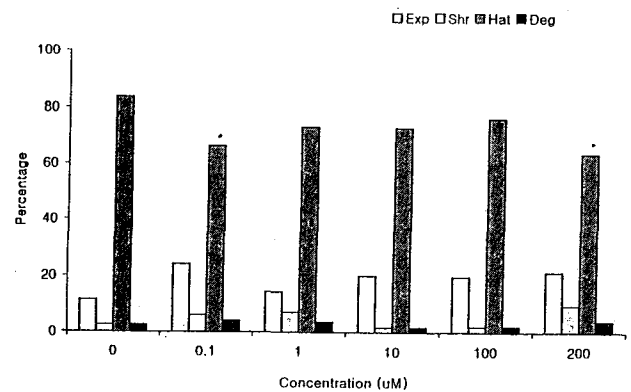


Fig. 5. Effect of prostaglandin F_{2α} on expansion and hatching of the mouse embryos which were treated at 84 hr stage embryos. Exp, expanded; Shr, shrunken; Hat, hatching; Deg, degeneration. *:p<0.05, **:p<0.001 versus control.

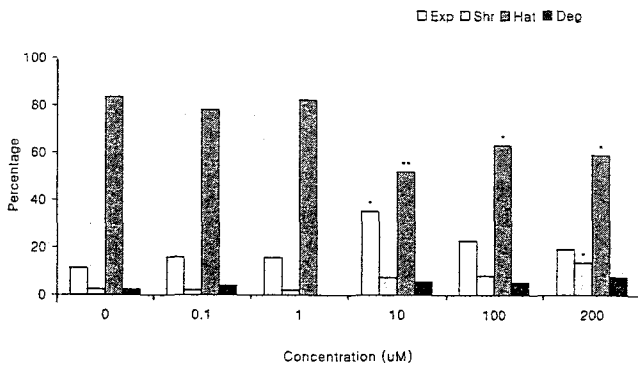


Fig. 6. Effect of prostaglandin F_{2α} on expansion and hatching of the mouse embryos which were treated at 96 hr stage embryos. Exp, expanded; Shr, shrunken; Hat, hatching; Deg, degeneration.

*:p<0.05, **:p<0.001 versus control.

hCG 주사후 96시간에 처리한 배아의 부화율은 0.1μM과 1μM에서 대조군과 유사한 결과를 보였으나 10μM 이상의 농도군에서는 유의하게 감소하였다. 팽창으로의 발생은 200μM에서 감소하였으나 다른 농도에서는 대조군과 유사하였고, 팽창한 상태로 부화가 억제된 배아의 비율은 모든 처리 농도에서 증가하는 경향을 보였다. 퇴화율은 모든 농도에서 대조군과 유사한 결과를 보였다 (Fig. 6). 즉 팽창까지의 발생은 잘 이루어지나 부화 이후로의 발생 능력이 감소하는 결과를 보였다. 이러한 현상은 농도가 높아질수록 뚜렷하였다. PGE₂가 200μM 농도에서와 같이 퇴화를 야기하는 유해성을 보이는 것과는 달리 PGF_{2α}는 퇴화를 야기하는 유해성을 보이지 않았다.

위 결과에서 배양액내 prostaglandins는 배아의 발생에 있어서 처리 농도나 배아단계에 따라 그 영향이 다르며, 전반적으로 팽창으로의 발생은 억제하지 않지만 부화를 저해하는 경향을 보였으며 특히 고농도에서 강하게 나타났다.

3. Prostaglandins와 indomethacin을 함께 처리할 때의 발생

5μM PGE₂와 50μM Indo를 처리한 군에서는 10μM PGE₂나 100μM Indo만을 처리한 군에 비해 부화율이 유의하게 증가하였다. 그러나 PGE₂와 Indo를 각각 10μM+100μM로 하여 처리한 경우 배아의 부화율은 각각을 단독 처리하였을 때와 유사하였다. 팽창한 상태로의 발생은 대조군과 유사하였고 팽창한 상태로 부화가 억제된 비율은 PGE₂ 동일농도 간에는 유사하였으나 대조군에 비해서는 유의하게 높았다. 그러나 5μM 농도로 처리한 군에서는 감소하였다 (Table 1). 5μM PGE₂+50μM Indo 처리군과 10μM PGE₂+100μM Indo를 처리한 군의 비교해보면 prostaglandin의 농도가 낮을 때 부화율이 유의하게 높아 대조군과 비교시 부화억제현상이 감소되었다 (Table 1).

위의 결과를 바탕으로 Indo의 농도를 100μM로 하고 PGE₂의 양을 1μM로 하여 배양액내 PGE₂의 양 변화가 미치는 영향은 다음과 같았다. 1μM PGE₂만을 처리한 경우 부화율이 82.4%로 대조군과 유사하나 Indo를 같이 처리하였을 경우에 있어서는 84.4%로 통계적 유의성은 없었으나 긍정적 반응을 보였다. 한편 Indo를 단독으로 처리하였을 때 나타났던 퇴화율 증가가 두 물질을 동시에 처리할 경우에 나타나지 않았다 (Table 1).

Table 1. Effects of prostaglandin E₂ combined with indomethacin on expansion and hatching of mouse embryos which were treated at 96 hr embryonic stage

Treatment	No. of Embryos	Development			
		Expansion	Shrink	Hatching	Degeneration
Control	79	9 (11.4)	2 (2.5)	66 (83.6)	2 (2.5)
Indo (100μM)	60	16* (26.7)	10* (16.6)	31*** (51.7)	3 (5.0)
PGE ₂ (10μM)	54	19* (35.2)	4 (7.4)	29*** (53.7)	2 (3.7)
Indo(50μM)	60	9 (15.0)	9 (15.0)	42 (70.0)	0 (0.0)
PGE ₂ (5μM)	62	17* (27.4)	14** (22.6)	31*** (50.0)	0 (0.0)
Indo(100μM)	64	10 (15.6)	0 (0.0)	54 (84.4)	0 (0.0)
PGE ₂ (1μM)					

*: p<0.05, **: p<0.001 versus control group, ***: p<0.001 versus Indo(100μM)+PGE₂(1μM)

Table 2. Effects of prostaglandin F_{2α} on expansion and hatching of mouse embryos which were treated at 96 hr embryonic stage

Treatment	No. of embryos	Development			
		Expansion	Shrink	Hatching	Degeneration
Control	79	9 (11.4)	2 (2.5)	66 (83.6)	2 (2.5)
Indo (100μM)	60	16* (26.7)	10* (16.6)	31** (51.7)	3 (5.0)
PGF _{2α} (10μM)	54	19* (35.2)	4 (7.4)	28** (51.9)	3 (5.6)
Indo(50μM)	58	13 (22.4)	2 (3.4)	43# (74.2)	0 (0.0)
PGF _{2α} (5μM)	62	8 (12.9)	7 (11.3)	47# (75.8)	0 (0.0)
Indo(100μM)					
PGF _{2α} (10μM)					

*: p<0.05, **: p<0.001 versus control group, #: p<0.05 versus Indo and PGF_{2α}

PGF_{2α}와 Indo를 각각 5μM+50μM 그리고 10μM+100μM으로 처리한 실험군 모두에서 PGF_{2α}나 Indo를 단독으로 처리한 결과보다 유의하게 부화율이 증가하였으나 대조군과는 유사하였다 (Table 2). Fig. 6에서 보듯이 5μM과 10μM PGF_{2α}는 부화를 억제할 수 있는 농도이나 Indo와 동시에 처리할 경우와 또한 부화율이 PGF_{2α}만을 처리했을 때보다 유의하게 증가하여 부화 억제 현상이 감소되는 결과를 보였다 (Table 2).

4. 발생에 따른 prostaglandins의 합성의 변화

배아 발생단계에 따라 측정된 양을 배아당의 양으로 환산하여 Table 1에 나타내었다. 상실배에서 포배 그리고 부화로 발생이 진행됨에 따른 prostaglandins의 양은 다음과 같이 증가하였다. PGE₂는 상실기에 1.91±0.37pg, 팽창된 포배에서는 6.04±0.47pg, 부화하는 배아에서는 38.74±2.37pg으로 급격히 증가하였다. 한편 PGF_{2α}는 상실기에 2.38±0.47pg, 팽창된 포배에서는 2.75±0.26pg, 그리고 부화하는 배아에 있어서는 6.82±1.66pg으로 점진적인 증가를 하였다. 따라서 내인성 PGE₂는 상실기 때의 값을 1로 하였을 때 발생이 진

행되면서 약 3.1배, 20.3배 증가하고, PGF_{2α}는 약 1.1배, 2.9배 증가하여 그 증가 양상이 다르게 나타나 팽창과 부화, 그리고 착상에서 이들의 역할이 다름을 추정할 수 있다.

고 찰

토끼에서는 prostaglandins가 포배나 자궁내막에서 합성되며 (Dey et al., 1980) estrogen의 자극을 받아 분비가 증가하고 (Pakrasi & Dey, 1983), 자궁이 포배에 반응하는데 관여하고 부화에 관여한다 (Hoffman, 1978). 또한 돼지에서는 포배가 구형 (spherical form)에서 선형 (filamentous form)으로 성장하는데 관여한다고 알려졌다 (Geisert et al., 1986). 본 실험에서 PGE₂와 PGF_{2α}는 착상전 배아의 발생에 미치는 영향이 배아 단계와 농도에 따른 다양함을 볼 수 있었다 (Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6). PGE₂가 미치는 유해한 영향은 포배로 발생함에 따라 점진적으로 감소한 결과를 보인 반면 PGF_{2α}는 배아의 발생 시기에 관계없이 생존력에 영향이 없었다. 한편 Indo의 농도를 100μM로 하고 PGE₂의 양을 1μM로 하여 배양하였을 때 부화율이 84.4%로 대조군과 유사하였다. 한편 Indo를 단독으로 처리하였을 때 나타나던 생존력에 미친 영향이 두 물질을 동시에 처리할 경우 없어졌다 (Table 1). 이는 생쥐배아에서 고농도의 PGE₂는 포배에 있어서 세포 유해성을 갖는다는 보고 (Chida et al., 1986)에 의해 뒷받침되고 있다. 한편 생쥐 배아내 prostaglandins 양을 볼 때 PGE₂가 PGF_{2α}에 비해 급격히 증가함에도 불구하고 PGF_{2α}와는 달리 고농도의 PGE₂에서 배아가 퇴화하는 것은 세포내 신호전달계의 균형 파괴 등의 원인으로 사료된다. 고농도의 PGE₂는 부화를 감소와 퇴화를 증가의 원인이 되나 PGF_{2α}는 퇴화를 유도하지 않았다. 한편 PGE₂나 PGF_{2α} 모두에서 팽창으로의

Table 3. Endogeneous concentration (pg) of prostaglandin E₂ and prostaglandin F_{2α} at morula, expanded and hatching stage embryos

Prostaglandins	Embryonic stage		
	Morula	Expanded blastula	Hatching
PGE ₂	1.91±0.37	6.04±0.47	38.74±2.37
PGF _{2α}	2.38±0.47	2.75±0.26	6.82±1.66

Data are expressed as mean±SEM. Observation were three times.

발생은 세포독성을 보인 농도군 외에는 대조군과 유사하였다. 그러므로 $PGF_{2\alpha}$ 에 의한 부화율 감소는 생존력에 의한 결과라기보다는 부화 이후로의 발생이 억제되었기 때문인 것으로 보인다.

Indo와 PGE_2 를 동시에 처리한 실험에서 PGE_2 의 농도를 감소시킬 경우 부화율이 증가하였다. 따라서 PGE_2 가 부화에 관계된 물질대사 조절에 영향을 미치는 물질로 추정할 수 있다. 이러한 추정은 Biggers 등 (1978)이 PGE_2 의 적절한 공급에 의존해 생쥐 배아의 부화와 포배강내 액체가 축적된다고 논의한 것에 의해 뒷받침되고 있다. 그러나 Indo를 처리하고 PGE_2 를 $1\mu M$ 로 하여 배양하였을 때 대조군과 유사한 부화와 생존력을 보이는 것으로 보아 PGE_2 가 배아의 생존력 유지와 부화에 관계하고 있음을 알 수 있어 Biggers 등 (1978)의 이러한 논의는 본 실험에서 배아단계에 따른 각각의 처리농도군에서 나타난 다양한 결과를 분석해 볼 때 외인성 PGE_2 또는 $PGF_{2\alpha}$ 가 미치는 영향에 대해서는 보다 많은 논의가 있어야 할 것으로 사료된다. 즉 PGE_2 처리군에서 상실배아와 hCG 주사후 84시간군에서는 부화가 억제되는 양상을 보였으나 hCG 주사후 96시간군에서는 $0.1\mu M$, $1\mu M$ 에서는 대조군과 유사하거나 약간 증가하는 경향을 보여 저농도로 처리할 경우에는 Biggers 등의 보고 (1978)와 같이 긍정적인 영향이 있을 것으로 사료된다.

한편, Fig. 4, 5, 그리고 6에서 보듯이 외인성 $PGF_{2\alpha}$ 는 각각의 배아단계에서 $100\mu M$ 이상의 고농도를 제외한 농도에서 PGE_2 보다 부화율이 높은 경향을 보이지 않았다. 이러한 결과는 토끼의 포배에서 PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ 가 존재하는 것과 (Dickmann & Spilman, 1975), 포배에서 arachidonic acid로부터 PGE_2 와 $PGF_{2\alpha}$ 가 합성될 수 있다는 측면을 고려할 때 Baskar 등의 보고 (1981)와 마찬가지로 PGE_2 와 $PGF_{2\alpha}$ 모두 포유류의 포배의 기능에 관여하는 것으로 간주된다.

그러나 Baskar 등의 보고 (1981)와는 달리 indomethacin을 처리하였을 경우 팽창까지 발달하는 양상은 대조군과 비교해 큰 차이점을 보이지 않고 있기 때문에 PGE_2 나 $PGF_{2\alpha}$ 가 포배강내 액의 축적에 관여한다는 내용과는 상반된다. 또한 Table 2에서 보듯이 외인성 $PGF_{2\alpha}$ 와 내인성 $PGF_{2\alpha}$ 의 합성을 억제하는 Indo를 동시에 처리할 때 인도나 $PGF_{2\alpha}$ 를 단독으로 처리한 실험군에서보다 유의하게 증가하는 결과를 보여 포배강 팽창이 prostaglandins에 의존적이지 않은 것을 보였다. 그리고 Fig. 6에서 부화율이 유의하게 감소하였는데 이는 퇴화가 원인이 된 것이 아니고 팽창까지의 발생은 성공적으로 이루어지나 팽창 이후의 부화에 관련된 단백질분해 효소가 발현되지 않은 것이 원인으로 사료된다. 이외의 농도군

에서도 팽창으로의 발생이 많이 진전되었으나 부화되는 것이 적은 것은 84시간대 배아에서 $PGF_{2\alpha}$ 의 영향으로 유의하게 억제된 농도군에서와 같이 팽창 이후로의 발생이 억제되기 때문으로 사료된다.

Biggers 등 (1978)과 Baskar 등 (1981)이 주장한 대로 PGE_2 가 $PGF_{2\alpha}$ 보다 부화에 더욱 밀접하게 관여한다는 보고나 PGE_2 의 세포독성이 발생이 진척됨에 따라 감소한 결과는 PGE_2 가 상실배 이후 급격한 양의 증가를 보이는 반면 $PGF_{2\alpha}$ 는 점진적인 양의 증가를 보이는 결과를 통해 뒷받침 될 수 있다. 한편 더 진척된 단계의 배아에서는 자궁에 부착과 영양배엽의 성장 등의 발생에 대해서 Chida와 Mettler (1989)는 $PGF_{2\alpha}$ 가 PGE_2 보다 더 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 본 실험에서 부화하는 배아에서 PGE_2 의 양이 급격히 증가하는 것으로 보아 배아에서 합성된 prostaglandin이 착상에 관여하리라는 추측을 할 수 있다. 또한 배양액내 PGE_2 나 $PGF_{2\alpha}$ 의 농도에 따른 발생양상이 다른 것은 배아단계에 따른 요구가 다르기 때문인 것으로 추정할 수 있다.

Prostaglandin antagonists (예; 7-oxa-13-prostynoic acid와 meclofenamic acid)들을 생쥐 포배에 처리할 경우 부화가 억제되는데 meclofenamic acid는 prostaglandin 합성에서 cyclo-oxygenase에 경쟁적으로 결합함으로써 arachidonic acid에서 만들어지는 물질의 생성을 억제하며 (Cushman & Cheung, 1976), 7-oxa-13-prostynoic acid의 경우에는 prostaglandin의 합성을 억제하고 prostaglandin binding을 감소시키거나 adenylate cyclease의 catalytic sub-unit에 영향을 주기 때문에 non-specific effects를 갖는다 (Hynie et al., 1975). Baskar 등의 보고 (1981)에 의하면, 체외에서 생쥐 포배의 부화를 억제하는 화합물 중 가장 큰 활성물은 18,18,20-trimethyl PGE_2 로 PGE_2 의 억제제로 7-oxa-13-prostynoic acid 보다는 활성이 떨어지고, meclofenamic acid보다는 큰 활성을 보인다. 이들 물질들을 착상이 예상되는 시기에 자궁내로 주입시킬 경우 생쥐의 출산이 감소한다 (Biggers et al., 1981). 이와 같은 출산의 감소나 착상의 감소는 생식선에 대한 영향과 배아의 부화억제에 의한 것으로 논의되고 있으나 아직 논쟁의 대상이 되고 있다.

한편 Niimura와 Ishida (1987)의 prostaglandins의 anti sera를 이용한 면역형광법으로 생쥐의 8-세포와 상실배에서 prostaglandins가 가장 강하게 나타나며 배아와 배양액 모두에서 검출된다는 보고와는 달리 본 실험에서는 상실배 이후의 발생단계로 진행되면서 PGE_2 의 양 변화가 급격히 증가되고 $PGF_{2\alpha}$ 는 점진적인 증가 양상을 보인 것과는 대조적이다. 배아의 발생단계별 처리결과에서 발생단계가 높아짐에 따라

PGE₂나 PGF_{2α}에 대한 내성이 높아지는 것으로 보아 그 농도가 높아진다는 결과가 더 합당한 것으로 추정된다.

감염과 염증에 대한 숙주의 면역 반응에 있어서 prostaglandins는 감염과 염증에 대한 숙주의 면역반응의 조절에서 중요한 역할을 하며 비장내 단핵세포인 비세포 등은 다른 조직내 세포에 영향을 미쳐 prostaglandins의 합성을 촉진한다고 보고되고 있다 (Zhong et al., 1994). 한편 사람의 단핵세포에서는 prostaglandins에 의하여 matrix metalloproteinase (MMP) 등의 합성이 조절된다 (Corcoran et al., 1994). MMP는 extracellular matrix (ECM)내 collagen과 proteoglycan glycoprotein을 용해하여 ECM을 제거하는데 관여한다 (Birkedal-Hansen et al., 1993). 아주 흥미롭게도 이러한 현상에 prostaglandin이 관련되어 있으며, 착상과정에서 ECM 제거에 관여하는 단백질 분해 효소가 유사하게 보고되고 있다 (Turpeenniemi-Hujanen et al., 1995).

이상의 결과로부터 prostaglandins는 배아의 발달 및 팽창과 부화의 조절에 관여하는 것을 알 수 있다. 그리고 배아 발생단계에 따라 PGE₂와 PGF_{2α} 영향이 각각 다르고, 각 단계의 배아내 PGE₂와 PGF_{2α}의 양 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다. 고농도의 prostaglandins는 세포독성을 주어 배아의 퇴화를 유발하나 배아의 발생이 진행될수록 그 독성에 대한 내성이 증가하였다. 또한 PGE₂는 PGF_{2α}에 비해 부화단계로 갈수록 양이 급격히 증가하는 것으로 보아 부화와 초기 착상시기에 밀접히 관련된 prostaglandin인 것으로 사료된다.

인용문헌

- Baskar JF, Torchiana DF, Biggers JD, Corey EJ, Andersen NH, Subramanian N (1981) Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by various prostaglandin antagonists. *J Reprod Fertil* 63:359-363.
- Biggers JD, Leonov BV, Baskar JF, Fried J (1978) Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by prostaglandin antagonists. *Biol Reprod* 19:519-533.
- Biggers JD, Baskar JF, Torchiana DF (1981) Reduction of fertility of mice by the intrauterine injection of prostaglandin antagonists. *J Reprod Fertil* 63:365-372.
- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, Decarlo A, Engler JA (1993) Matrix metalloproteinase: a review. *Crit Rev Oral Bio Med* 4:197-250.
- Chang KJ, Kim JW, Lee J, Im WB, Kwon HB, Schuetz AW (1995) Prostaglandin production and ovulation during exposure of amphibian ovarian follicles to gonadotropin of phorbol ester *in vitro*. *Gen Comp Endo* 100:257-266.
- Cheon YP, Gye MC, Kim CH, Kim MK (1997) Effects of indomethacin on development and hatching of mouse embryo. *Kor J Fertil Steril* 24:35-42
- Chida S, Mettler L (1989) Effects of indomethacin, prostaglandin E₂ and prostaglandin F_{2α} on mouse blastocyst attachment and trophoblastic outgrowth *in vitro*. *Prostaglandins* 37:411-416.
- Chida S, Uehara S, Hoshiai H, Yajima A (1986) Effects of indomethacin, prostaglandin E₂, prostaglandin F_{2α} and 6-keto-prostaglandin F_{1α} on hatching of mouse blastocysts. *Prostaglandins* 31:337-342.
- Corcoran ML, Stetlerr-Stevenson WG, DeWitt DL, Wahl LM (1994) Effect of cholera toxin and pertussis toxin on prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E₂, and matrix metalloproteinase production by human monocytes. *Arch Biochem Biophys* 310:481-488.
- Cushman DW, Cheung HS (1976) Effects of substrate concentration on inhibition of prostaglandin synthetase of bull seminal vesicles by anti-inflammatory drugs and fenamic acid analogs. *Biochem Biophys Acta* 424:449-456.
- Dey SK, Chien SM, Cox CL, Crist RD (1980) Prostaglandin synthesis in the rabbit blastocyst. *Prostaglandins* 19:449-453.
- Dickmann Z, Spilman CH (1975) Prostaglandins in rabbit blastocysts. *Science* 190:997-998.
- Geisert RD, Rasby JE, Minton JE, Wettemann RP (1986) Role of prostaglandins in development of porcine blastocysts. *Prostaglandins* 31:191-204.
- Harper MJK, Norris CJ, Rajkumar K (1983) Prostaglandin release by zygotes and endometria of pregnant rabbits. *Biol Reprod* 28:350-362.
- Hoffman LH (1978) Antifertility effects of indomethacin during early pregnancy in the rabbit. *Biol Reprod* 18:148-153.
- Hoversland RC, Dey SK, Johnson DC (1982) Catechol estradiol induced implantation in the mouse. *Life Sci* 30:1801-1804.

- Hynie S, Čepelik J, Černohorský M, Klenerová V, Skřivanová J, Wenke M (1975) 7-oxa-13-prostynoic acid and polyphloretin phosphate as non-specific antagonists of the stimulatory effects of different agents on adenylate cyclase from various tissues. *Prostaglandins* 10:971-981.
- Johnson DC, Dey SK (1980) Role of histamine in implantation: dexamethasone inhibits estradiol-induced implantation in the rat. *Biol Reprod* 22:1136-1141.
- Kennedy TG (1979) Prostaglandins and increased vascular permeability resulting from the application of an artificial stimulus to the rat sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* 20:560-566.
- Kennedy TG, Armstrong DT (1981) The Role of prostaglandins in endometrial vascular changes at implantation. In: Glasser SR and Bullock DW (eds.), *Cellular and Molecular Aspects of Implantation*. Plenum Press, New York, pp 349-358.
- Khan WA, Blobe GC, Hannun YA (1995) Arachidonic acid and free fatty acids second messengers and the role of protein kinase C. *Cell Signal* 7:171-184.
- Kim JJ, Fortier MA (1995) Cell type specificity and protein kinase C dependency on the stimulation of prostaglandin E_2 and prostaglandin $F_{2\alpha}$ production by oxytocin and platelet-activating factor in bovine endometrial cells. *J Reprod Fertil* 103:239-247.
- Niimura S, Ishida K (1987) Immunohistochemical demonstration of prostaglandin E_2 in preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fertil* 80:505-508.
- Pakrasi PL, Dey SK (1983) Catechol estrogens stimulate synthesis of prostaglandins in the preimplantation rabbit blastocyst and endometrium. *Biol Reprod* 29:347-354.
- Racowsky C, Biggers JD (1983) Are blastocyst prostaglandins produced endogenously? *Biol Reprod* 29:379-388.
- Snabes MC, Harper MJK (1984) Site of action of indomethacin on implantation in the rabbit. *J Reprod Fertil* 71:559-565.
- Terranova PF, Dey SK (1983) Indomethacin delays zona-shedding and implantation in the ovariectomized progesterone-treated hamster. *Prostaglandins* 24:165-194.
- Turpeenniemi-Hujanen T, Feinberg RF, Kauppila A, Puistola U (1995) Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertil Steril* 64:132-138.
- Wiley L (1987) Development of the blastocyst: role of cell polarity in cavitation and cell differentiation. In: Bavister BD (ed.), *The Mammalian Preimplantation Embryo*. Plenum, New York, pp 65-93.
- Zhong WW, Chavali SR, Forse RA (1994) Effect of prostaglandin E_2 and other intracellular cyclic AMP elevating agents on the mitogen induced mouse splenocyte proliferation in a serum free culture condition. *Life Sci* 55:193-198.