

생쥐 초기배아에서 Insulin과 Tumor Necrosis Factor α 에 의한 발생의 조절

계명찬[†] · 한현주 · 최진국

경기대학교 생물학과

Regulation of Preimplantation Development of Mouse Embryos by Insulin and Tumor Necrosis Factor alpha

Myung Chan Gye[†], Hyun Joo Han and Jim Kook Choi

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon, Gyeonggi-do 442-760, Korea

요 약 : Insulin과 tumor necrosis factor alpha(TNF- α)에 의한 초기 배아 발생의 조절기작을 알아보려고 생쥐의 상실배를 대상으로 이들이 첨가된 배양액에서 형태발생, 세포증식을 조사하고, 포배에서 mitogen activated protein kinase(MAPK, ERK1/2)의 활성 변화에 미치는 영향을 조사하였다. Insulin은 상실배의 체외발생 및 포배내 할구 수를 대조군에 비해 유의하게 증가시켰으며, TNF- α 는 발생율을 유의하게 감소시켰다. Insulin은 TNF- α 에 의한 배아 발생을 감소를 완화하였다. TNF- α 는 농도에 의존적으로 MAPK 활성을 감소시켰으며, insulin은 포배에서 MAPK의 활성을 유의하게 증가시킨 반면 TNF- α 는 처리농도에 의존적으로 MAPK 활성을 감소시켰다. 50 ng/ml 농도의 TNF- α 를 전처리한 포배에서는 insulin에 의한 MAPK 활성의 증가가 저해되었다. 이러한 결과로부터 생쥐의 착상전 초기 배아 발생조절에 insulin과 TNF- α 사이에 MAPK를 경유하는 cross talk이 존재함을 확인하였고 insulin은 TNF- α 에 의한 배아의 손상을 억제하는 것으로 사료된다.

ABSTRACT : Present study was aimed to verify the role of insulin and TNF- α in development of preimplantation embryos. Mouse morula were cultured for 40 hr in the presence or absence of insulin(400 ng/ml) and TNF- α (50 ng/ml). The morphological development, cell number of blastomeres per blastocyst, and mitogen activated protein kinase(MAPK) activity were examined. The developmental rate and cell number per embryo were the highest in insulin treatment group and the lowest in TNF- α treatment group. There was no significant difference in developmental rate between control and insulin plus TNF- α group. Taken together, it suggested that TNF- α impaired embryonic development and that insulin rescued developmental impairment imposed by TNF- α . In blastocysts, insulin treatment significantly increased MAPK activity. TNF- α decreased the MAPK activity in a concentration-dependent manner. In the TNF- α (50 ng/ml) -primed embryos, activation of MAPK by insulin was attenuated. In conclusion, these results suggest that there was a cross talk between insulin and TNF- α by means of activation of MAPK in preimplantation embryos and that insulin might rescue damage of embryos exposed to TNF- α .

Key words : Insulin, TNF- α , Blastocyst, MAPK.

서 론

착상 전 초기배아는 모체로부터 기원되거나 자체적으로 생산된 다양한 성장인자와 호르몬에 의해 발생을 조절 받는다(Schultz et al., 1992). 인슐린은 척추동물과 무척추동물에서 광범위하게 발현되는 펩타이드 호르몬으로(Shi et al., 1994), 다양한 조직에서 glucose 흡수 촉진, glycogen 합성 증가, Na/

K-pump 활성의 증가 등 다양한 생리적 조절효과를 나타낸다(Moule et al., 1995; Azipazu et al., 1996; Hurel et al., 1996; Pantaleon & Kaye, 1996; Yenush & White, 1997). 인슐린의 생물학적 효과는 인슐린 수용체를 통해 매개되며 다양한 세포주에서 그 경로가 규명되었다. 수용체에 전달된 신호는 인슐린 수용체 기질-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)과 phosphatidylinositol 3'-kinase(PI3K) - protein kinase B(PKB) - mammalian target of rapamycin(mTOR)을 거쳐 단백질번역에 관계되는 Rsk(ribosomal S6 kinase)로 신호가 전달된다(Yenush & White, 1997). 한편 insulin 수용체 하부의 RAS - RAF - MAPK cascade의 활성화는 다양한 전사조절 효과 및 세포의 분화 조절에 관여한다(Yenush & White, 1997).

TNF- α 는 monocytes, macrophages, lymphocytes에서 우선적

본 연구는 경기도 중소기업청 산학연 콘소시움 연구비(2001)지원에 의한 것임.

[†]교신저자: 경기도 수원시 팔달구 이의동 산 94-6, 경기대학교 자연과학대학 생물학과. (우) 442-760, (전) 031-249-9646, (팩) 031-253-9646, E-mail : mcgye@kuic.kyonggi.ac.kr

으로 발현되는 cytokine으로(Fiers, 1991; Heller & Kronke, 1994) apoptosis를 유도하며(Thompson, 1995) 비면역조직에서도 다양한 생리활성을 갖는다. TNF- α 의 생물학적 효과는 두 종류의 수용체, TNFR1(55kDa)과 TNFR2(75kDa)에 의해 발휘되는데(Heller & Kronke, 1994) TNF- α 가 유발하는 cytotoxic 작용은 TNFR1에 의해 매개된다(Tartaglia et al., 1993a, 1993b). 이 두 수용체의 extracellular ligand-binding domain내 상동 염기서열이 존재하나 cytoplasm 부위에는 유사 서열이 없다. 많은 종류의 세포에서 TNFR1과 TNFR2가 같이 발현되지만(Goodwin et al., 1991) 이러한 구조적 차이는 TNF- α 의 다양한 생리활성 효과를 설명한다(Lewis et al., 1991; Tartaglia et al., 1991).

인슐린은 생쥐 초기 배아에서 발생을(Gardner & Kaye, 1991), DNA, RNA, 단백질합성(Heyner et al., 1989; Rao et al., 1990; Rappolee et al., 1992; Schultz et al., 1993; Yenush & White, 1997) 및 인산화(Gye et al., 2000)를 증가시키며, apoptosis를 억제하는 것으로 보고되었다(Rao et al., 1990; Wu et al., 1996; Morales et al., 1997; Herrler et al., 1998; Moley et al., 1998; Nah & Gye, 2000). 반면, TNF- α 는 자성 생식수관의 생리를 조절하는 cytokine중의 하나로(Hunt et al., 1996) 수관관과 자궁에 상당량이 존재한다(Sanford & Word, 1992; Hunt et al., 1993). TNF- α receptor 1(TNFR1)이 상실배에서 발현되며, inner cell mass의 세포 수를 감소시키는 것으로 보고되었다(Lachapelle et al., 1993; Pampfer et al., 1994; Sharkey et al., 1995). 더욱이 당뇨병과 같은 병리적 조건하에서 모체 자궁내 TNF- α 농도의 증가는 당뇨병 임신부에서 초기 배아 손상과 관련된 것으로 추측되고 있다(Eisermann et al., 1988; Pampfer et al., 1995a). Maternal diabetic rats에서 인슐린 치료나 TNFR1에 대한 antisense oligodeoxyribonucleotides 처리는 TNF- α 의 효과를 중화하여 착상 전 초기 배아의 발생을 향상시킨다(De Hertogh et al., 1992; Pampfer et al., 1995b). 그러나 인슐린이 TNF- α 에 노출된 착상 전 배아의 발생과 세포 생존을 조절할 가능성과 관련하여 이들 신호전달 경로에 중요한 위치를 차지하는 MAPK 활성을 미치는 영향은 밝혀지지 않았다.

TNF- α 는 근육세포와 비만 세포에서 IRS-1이 매개하는 PI3-kinase와 MAPK의 활성화를 촉진시키는 인슐린 신호경로를 저해하는 것으로 알려졌다(Feinstein et al., 1993; Hotamisligil et al., 1994). 생쥐 초기 배아에서 인슐린 신호가 전달되는 경로에 PI3-kinase와 MAPK가 활성화되며 이 경로는 insulin의 배아 세포의 생존과 형태 발생, 단백질 합성 조절 효과의 근간을 이루는 회로로 확인되었으나(Gye et al., 2000; Nah

& Gye, 2000), 일반적으로 이와 반대적인 작용을 갖는 TNF- α 가 초기배아에서 insulin에 의한 신호전달을 어떻게 조절하는지는 알려지지 않았다. 본 연구는 생쥐 초기배아를 대상으로 insulin과 TNF- α 에 의한 배아 발생조절 작용을 복합적으로 추적하고, 특히 당뇨병 임신의 경우 자성 생식수관에서 양이 증가하는 TNF- α 에 의해 배아 발생이 손상될 것이라는 연구결과가 세포내 신호전달 수준에서 확인될 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

삼육실험동물(Osan, Korea)에서 공급받은 ICR strain의 암컷 생쥐 6주령 및 수컷 생쥐 12주령을 사용하였다.

2. 배아의 수획 및 배양

암컷 생쥐의 복강에 5IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG)(Sigma, St. USA)을 주사한 후 48h 이후에 human chorionic gonadotropin(hCG)(Sigma, St. USA) 5IU를 주사하여 과배란을 유도한 후 교미시켰다. 익일 오전 copulation plug 형성을 육안으로 확인한 후 hCG 주사 후 83h에 도살하여 자궁을 적출하였다. 배양액을 관류하여 상실배를 수집하여 HTF (human tubal fluid) 배양액(0.4 % insulin-free BSA)에서 40시간 동안 배양하면서 insulin(400ng/ml), TNF- α (50ng/ml)를 단독 또는 복합 처리하였다. MAPK 활성변화를 추적하기 위해서는 포배를 수획하여 이용하였다. 10 및 100 ng/ml 농도의 TNF- α 를 처리하여 10분 배양한 후 MAPK 활성변화를 추적하였고 insulin과 복합처리한 경우에는 50 ng/ml 농도의 TNF- α 를 처리한 후 60 분 후 insulin을 처리하였다.

3. 발생율 및 세포 수 측정

각 실험군에서 post-hCG 119h에 상실배, 포배형성, 부화, 퇴화된 배아를 계수한 후 포배 및 부화중에 있는 배아를 회수하여 0.8% sodium citrate에 5분간 정치시킨 후 Canny's 용액(acetic acid:ethanol = 1:3)으로 고정된 후 상온에서 건조하여 표본을 제작하였다. Phosphate buffered saline(PBS)에 1분간 정치한 후 Hoechst 33258 용액(1 μ g/ml in PBS)으로 30초간 염색한 후 PBS로 세척한 후 wet mount로 제작하였다. Epifluorescence microscope(Olympus BX50)하에서 관찰하고 사진 기록한 후 할구수를 계수하였다. 발생율 및 할구 수의 측정을 위해 3회 독립된 실험을 진행하고 발생율은 Chi square test로, 포배 당 할구 수는 Student's *t*-test로 분석하였다.

4. Immunoprecipitation 및 MAPK 활성 측정

Insulin(400 ng/ml) 또는 TNF- α (10, 50, 100 ng/ml)를 처리한 후 배아를 HTF(1% PVP)로 세척한 후 10ul assay dilution buffer(ADB, 20 mM MOPS pH 7.2, 25mM β -glycerophosphate, 5mM EGTA, 1mM Na-orthovanadate, 1mM DTT)에 용해하였다. Protein A-agarose bead(Santacruz, CA, USA) slurry 30 μ l에 1 μ g Erk1/2 항체(Upstate, NY, USA)를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 진탕배양한 후 buffer A(50mM Tris, pH 7.5, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.5mM sodium ortho-vanadate, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 50mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 10mM sodium β -glycerophosphate, and 0.1% complete TM)로 2회 세척하였다. 배아추출물과 혼합하여 4°C에서 2시간 동안 진탕배양한 후 buffer A로 2회 세척하였다.

Immune complex-protein A-agarose bead에 ADB를 넣고 3회 세척한 후, 14000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리한 immunocomplex의 상층액을 제거한 후, ADB, MAPK substrate cocktail(2 mg/ml myelin basic protein in ADB), protein kinase inhibitor cocktail(Upstate, NY, USA), Mg-ATP cocktail(75 mM magnesium chloride와 500 μ M ATP in ADB)과 [32 P]-ATP(specific activity 5 μ Ci/mol, Amersham, USA)를 첨가하여 30°C에서 20분간 반응한 후 얼음에 정치하여 반응을 종결한 후 phosphocellulose paper에 점적하였다. 1% phosphoric acid에서 3회, ethanol로 2회 세척한 후 건조시키고 PC paper 상의 방사선량을 scintillation counter를 이용하여 측정하였다. Kinase 활성은 기질 첨가군 - 기질 비첨가군의 방사선량으로 계산하였다.

결 과

1. 발생율

상실배를 배양하여 post hCG 119 h에 포배로의 발생율은 insulin, 대조군, TNF- α plus insulin, TNF- α 처리군의 순으로 나타났다. 부화를 진행중이거나 부화된 배아의 비율은 TNF- α 처리군에서 제일 낮게 나타났다. 퇴화된 배아의 비율은 insulin 처리군이 다른 군들에 비해 가장 낮게 나타났으며, TNF- α 처리군에서 제일 높았다(Fig. 1).

2. 포배 당 세포 수

상실배를 배양하여 post hCG 119 h에 포배로 발생한 배아 당 세포 수는 발생율과 비슷한 양상으로 insulin, 대조군, TNF- α plus insulin, TNF- α 처리군의 순으로 나타났으며,

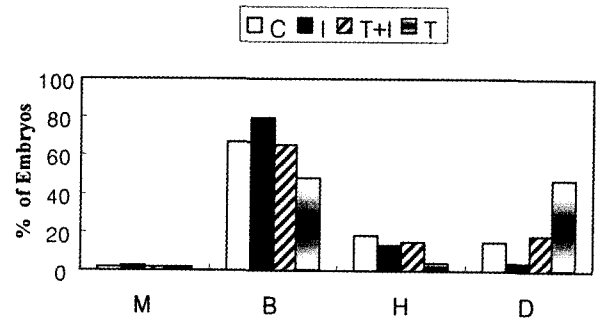


Fig. 1. Development of mouse embryos in the presence or absence of insulin and/or TNF- α . Morula collected from uterus post hCG 83 h were incubated in the presence or absence of insulin(400 ng/ml) and/or TNF α (50 ng/ml) for 36 h. M, morula; B, blastocysts; H, hatched; D, degenerated. C, control; I, insulin, T, TNF- α ; T+I, TNF- α plus insulin. Data are from 3 independent trials.

insulin 처리군의 경우 다른 군과 비교하여 유의하게 많았다 (Fig. 2).

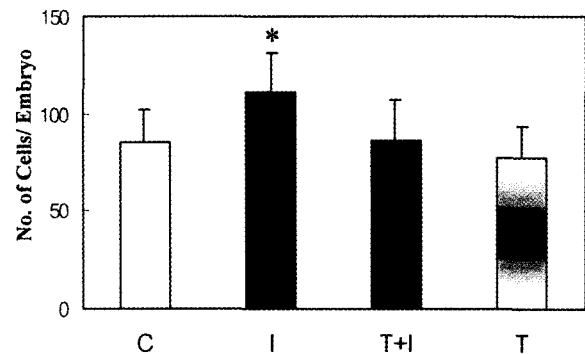


Fig. 2. Changes in number of cells per blastocyst in the presence or absence of insulin and/or TNF- α (50 ng/ml). Morula collected from uterus post hCG 83 h were incubated in the presence or absence of insulin(400 ng/ml) and/or TNF α (50 ng/ml) for 36 h. At the end of culture, embryos which developed blastocoel or hatched their zona pellucida were subjected to cell counting. C, control; I, insulin; T, TNF- α ; T+I, TNF- α plus insulin. At least more than 10 embryos per group were analyzed. *, significantly different from control by Student's *t*-test, $p < 0.05$.

3. TNF- α 에 의한 MAPK 활성변화

TNF- α 는 처리한 농도(10, 100 ng/ml)에 의존적으로 포배 내의 MAPK활성을 유의하게 감소시켰다(Fig. 3).

4. Insulin과 TNF- α 에 의한 MAPK 활성변화

Insulin 단독처리 시 처리 후 10분만에 MAPK 활성이 20% 증가하였다. TNF- α (50 ng/ml)를 60분간 전처리 한 포배에

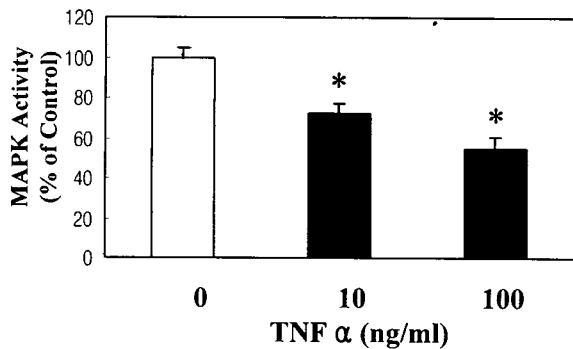


Fig. 3. Changes in MAPK activity of blastocysts by TNF- α . Blastocysts were treated with TNF- α (0, 10, 100 ng/ml) for 10 min. Following the lysis of whole embryo, RIPA lysates of embryos was subjected to immunoprecipitation by the MAPK(Erk1/2) antibody and *in vitro* phosphorylation kinase assay. Results represent the means + SD of 3 independent trials. *, significantly different from control by Student's *t*-test($p < 0.05$).

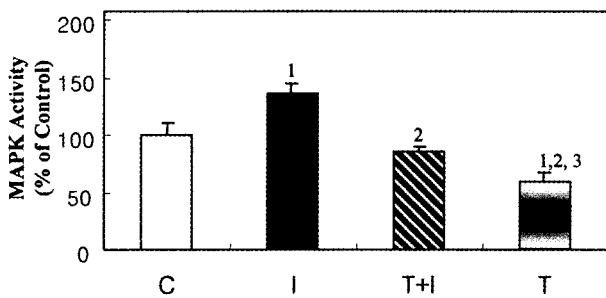


Fig. 4. Effect of insulin on the MAPK activity of TNF- α primed the mouse embryos. Blastocysts were collected and pre-treated with TNF- α (50 ng/ml) for 1h and subjected to insulin(400 ng/ml) treatment for 10min. Results represent the means + SD of 3 independent experiments. C, control; I, insulin, T, TNF- α ; T+I, TNF- α plus insulin. 1, significantly different from control; 2, significantly different from insulin group; 3, significantly different from T+I group by Student's *t*-test($p < 0.05$).

insulin을 처리한 후 10분에 MAPK 활성은 대조군 및 insulin 단독처리군에 비해 유의하게 낮았으나 TNF- α 단독처리군의 MAPK 활성보다는 유의하게($P < 0.05$) 높았다(Fig. 4).

고 찰

본 실험에서 생쥐 상실배에 insulin을 처리한 후 발생을 추적한 결과 배아의 형태발생 및 포배내 세포 수가 증가되었는데 이는 선행 연구결과들과 일치한다(Gye et al., 2000). 반면 TNF- α 처리시 형태발생은 유의하게 저해되었고 포배 당 세

포 수는 감소하였으나 유의한 차이를 보이지 않아 선행연구에서 TNF- α 에 의해 포배내의 세포수가 감소한다는 Pampfer et al.(1997)등의 보고와 차이를 보인다. 이러한 차이는 본 실험에서 TNF- α 에 장시간 배양한 후 사멸의 징후를 보이는 배아를 제외한 후 형태적으로 포배의 구조를 갖추고 있는 배아만을 대상으로 세포 수를 계수한 데 기인한 것으로 사료된다. 특히 Fig. 1에서 퇴화된 배아의 비율은 insulin 처리군이 다른 군들에 비해 가장 낮게 나타났으며, TNF- α 처리군에서 제일 높게 나타나 TNF- α 가 배아 할구세포의 사멸을 유발한다는 결과를 확인하였다. 한편 insulin과 동시에 처리된 경우 TNF- α 에 의한 배아의 형태발생 저해 효과가 극복됨을 확인하였다. 따라서 형태적 발생을 기준으로 TNF- α 에 의한 배아 발생 저해효과는 insulin에 의해 완화될 수 있으며 이는 당뇨병 조건하에서 TNF- α 에 의한 배아 발생의 저해작용이 insulin 처리에 의해 극복될 가능성을 제시한다.

배아 내 MAPK 활성은 insulin 처리시 단시간내에 증가하여 선행 연구 결과들과 일치한다(Nah & Gye, 2000). 반면, TNF- α 처리시 농도에 의존적으로 감소하였다. 생쥐 초기배아는 상실배 시기 이후부터 TNFR1을 발현하므로 수용체 하위의 신호전달 과정에 MAPK의 활성이 연계되어 있음을 추측케 하며, TNF- α 에 의한 배아세포 발달 장애 및 사멸 유도의 기작으로 배아내 MAPK 활성의 저감화 작용이 관여할 가능성을 의미한다. TNF- α 를 전처리한 배아에 insulin을 처리한 경우 MAPK 활성은 insulin 단독처리군에 비해 유의하게 낮았지만 TNF- α 단독처리군에 비해 유의하게 높았다. 이러한 결과에서 첫째, 배아에 작용하는 생존과 사멸 신호 사이의 균형이 배아 발달에 중요한 결정 요인으로 작용한다는 것과 둘째, TNF- α -TNFR1 신호전달 및 insulin - insulin receptor 신호전달의 하위경로 사이에 MAPK 활성조절에 관여하는 cross talk이 존재하는 것으로 사료된다. 이미 이와 유사한 결과가 배아 이외에도 다양한 세포주에서 보고되었다(Feinstein et al., 1993; Hotamisligil et al., 1994). 따라서 셋째, 배아에서 MAPK 활성조절에 관여하는 insulin과 TNF 신호전달 사이의 cross talk은 생물학적으로 보존된 활동임을 짐작케 한다. 그러나 insulin과 TNF- α 에 의한 배아 발생 조절효과가 MAPK 이외에 배아 발달 및 사멸 조절회로와 관련된 다양한 효과기(effector) 수준에서 어떻게 상호작용하는지는 추가적인 연구가 필요하다.

결론적으로 insulin에 의한 배아의 형태발생 및 세포증식 촉진효과 및 사멸억제 효과가 TNF- α 에 의해 길항됨을 알 수 있으며 MAPK 활성을 조절하는 신호기작에 cross talk이 존재함을 확인하였다. 이는 당뇨병 조건하에서 상승된 TNF- α

에 의한 배아의 손상과 그 대응책으로서 insulin의 이용이 가능한 실험적 증거로 활용될 수 있을 것이다.

인용문헌

- Azpiazu ML, Rao V, Smith LM, Jarett L, Charron MJ, Thorens B, Heyner S (1996) Developmental expression and cellular localization of glucose transporter molecules during mouse preimplantation development. *Development* 115:305-312.
- De Hertogh R, Vanderheyden I, Pampfer S, Robin D, Delcourt J (1992) Maternal insulin treatment improves preimplantation embryo development in diabetic rats. *Diabetologia* 35:406-408.
- Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odem RR, Collins JL (1988) Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril* 50:573-577.
- Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A, (1993) Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 268:26055-26058.
- Fiers W (1991) Tumor necrosis factor: Characterization at the molecular, cellular and *in vivo* level. *FEBS Lett* 285:199-212.
- Gardner HG, Kaye PL (1991) Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 3:79-91.
- Goodwin RG, Anderson D, Jerzy R, Davis T, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Smith CA (1991) Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 11:3020-3026.
- Gye MC, Nah H, Kim MK (2000) Involvement of PI3 kinase in insulin signaling during preimplantation development of mouse embryos. *Dev Reprod* 4:29-35.
- Heller RA, Kronke M (1994) Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* 126:5-9.
- Herrler RA, Krusche CA, Beier HM (1998) Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod* 59:1302-1310.
- Heyner S, Rao LV, Jarett L, Smith RM (1989) Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor mediated endocytosis: Pattern of uptake and functional correlations. *Dev Biol* 134:48-58.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM (1994) Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4854-4858.
- Hunt JS, Chen HL, Hu XL, Pollard JW (1993) Normal distribution of tumor necrosis factor- α messenger ribonuclei and protein in the uteri, placentas and embryos of osteopetrotic (op/op) mice lacking colony stimulating factor-1. *Biol Reprod* 49:441-452.
- Hunt JS, Chen HL, Miller L (1996) Tumor necrosis factors: pivotal components of pregnancy. *Biol Reprod* 54:554-562.
- Hurel SJ, Rochford JJ, Borthwick AC, Wells AM, Vandenheede JR, Turnbull DM, Yeaman JM (1996) Insulin action in cultured human myoblasts: contribution of different signaling pathways to regulation of glycogen synthesis. *Biochem J* 320:871-877.
- Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Falcone T, Granger L, Bourque J, Langlais (1993) Embryonic resistance to tumor necrosis factor- α mediated cytotoxicity: novel mechanism underlying maternal immunological tolerance to the allograft. *Hum Reprod* 8:1032-1038.
- Lewis M, Tartaglia LA, Lee K, Bennett GL, Wong GHW, Chen EY, Goeddel DV (1991) Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2830-2834.
- Moley KH, Chi MM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Mueckler MM (1998) Hyperglycemia induces apoptosis in preimplantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med* 4:1421-1424.
- Morales AV, Serna J, Alrcón C, de la Rosa EJ, de Pablo F (1997) Role of prepancreatic (pro) insulin and the insulin receptor in prevention of embryonic apoptosis. *Endocrinology* 138:3967-3975.
- Moule SK, Edgell NJ, Welsh GI, Diggle TA, Foulstone EJ, Heesom KJ, Proud CG, Denton RM (1995) Multiple signalling pathways involved in the stimulation of fatty acid and glycogen synthesis by insulin in rat epididymal fat cells. *Biochem J* 311:595-601.
- Nah H, Gye MC (2000) Regulation of ribosomal S6 kinase and MAPK activity by insulin in preimplantation mouse embryos. *Proc 10th Conf Kor Soc Devel Biol* p. 31-32.

- Pampfer S, Wu YD, Vanderheyden I, De Hertogh R (1994) Expression of tumor necrosis factor- α (TNF α) receptors and selective effect of TNF α on the inner cell mass in mouse blastocysts. *Endocrinology* 134:206-212.
- Pampfer S, Vanderheyden I, Wu YD, Baufays L, Maillet O, De Hertogh R (1995a) Possible role for TNF- α in early embryopathy associated with maternal diabetes in the rat. *Diabetes* 44:531-536.
- Pampfer S, Vanderheyden I, Vesela J, De Hertogh R (1995b) Neutralization of tumor necrosis factor α (TNF α) action on cell proliferation in rat blastocysts by antisense oligodeoxyribonucleotides directed against TNF α p60 receptor. *Biol Reprod* 52:1316-1326.
- Pampfer S, Vanderheyden I, McCracken JE, Vesela V, De Hertogh R (1997) Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor- α *in vitro*. *Development* 124:4827-4836.
- Pantaleon M, Kaye PL (1996) IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts via IGF-I receptor. *Mol Reprod Dev* 44:71-76.
- Rao LV, Wikarczuk ML, Heyner S (1990) Functional roles of insulin and insulinlike growth factors in preimplantation mouse embryo development. *In Vitro Cell Dev Biol* 26:1043-1048.
- Rappolee DA, Sturm KS, Behrendtsen O, Schultz GA, Pedersen RA, Werb Z (1992) Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. *Genes Dev* 6:939-952.
- Sanford TR, Wood GW (1992) Expression of colony-stimulating factors and inflammatory cytokines in the uterus of CD-1 mice during days 1 to 3 of pregnancy. *J Reprod Fertil* 94:213-220.
- Schultz GA, Hogan A, Watson AJ, Smith RM, Heyner S (1992) Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 4:361-371.
- Schultz GA, Hahnel A, Arcellana PM, Wang L, Goubaau S, Watson A, Harvey M (1993) Expression of IGF ligand and receptor genes during preimplantation mammalian development. *Mol Reprod Dev* 35:414-420.
- Sharkey AM, Dellow K, Blayney M, Macnamee M, Charnock-Jones S, Smith SK (1995) Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biol Reprod* 53:974-981.
- Shi CZ, Collins HW, Buettger CW, Garside WT, Matschinsky FM, Heyner S (1994) Insulin family growth factors have specific effects on protein synthesis in preimplantation mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 37:398-406.
- Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Goeddel DV (1991) The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9292-9296.
- Tartaglia LA, Mothe M, Hu YF, Goeddel DV (1993a) Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73:213-216.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV (1993b) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845-853.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Wu Y, Tewari M, Cui S, Rubin R (1996) Activation of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits tumor necrosis factor-induced cell death. *J Cell Physiol* 168:499-509.
- Yenush L, White MF (1997) The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays* 19:491-500.