

*in vitro*에서 B(a)P이 착상전 마우스 배자에 미치는 독성학적 영향에 관한 연구

박귀례 · 이유미* · 김판기** · 신재호 · 강태석 · 김주일 · 장성재
식품의약품안전청 국립독성연구소, *부산대학교, **용인대학교 환경보건학과

Toxicological Effects of B(a)P on Preimplantation Mouse Embryos *in Vitro*

Kui Lea Park, Yoo Mie Lee*, Pan Gui Kim**, Jae-Ho Shin,
Tae Seuk Kang, Joo-Il Kim and Seung Jae Jang

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, KFDA

*Department of Molecular Biology, Pusan National University

**Department of Environmental Health, Youngin University

ABSTRACT

Effects of B(a)P on preimplantation mouse embryos *in vitro* were studied. Preimplantation mouse embryos were exposed to a concentration of 0.3, 1, 3 and 10 μM B(a)P for 72 hrs. The toxicological effects of B(a)P were evaluated by morphological observation of embryos up to the blastocyst stage, and by measuring DNA, RNA and protein synthesis by radioactive precursor incorporation. At 1 μM B(a)P did not affect preimplantation development but interfered with hatching and ICM formation. Suppressing effect of ICM formation was dose dependent. At the eight cell stage, the developmental rate was decreased at above 3 μM of B(a)P. At the blastocyst stage, attachment and trophoblast outgrowth were diminished at the 10 μM of B(a)P and ICM formation was decreased at 1 μM of B(a)P. Inner cell number of blastocyst was decreased dose dependently. So, number of ICM was one of the most sensitive and toxicological end point. The RNA incorporation rate of 0.1 μH -uridine was dose-dependent and the protein incorporation of 0.5 μCi ^{35}S -methionine showed a significant decrease after 48 hrs. But the DNA incorporation rate of methyl- ^3H thymidine was not affected. Our results suggested that B(a)P did not affect the DNA replication but transcription was inhibited by dose dependent manner. There delay of development during the blastocyst stage was mainly due to the inhibition of RNA synthesis followed by protein synthesis.

Keywords: B(a)P, Preimplantation embryos, Trophoblast outgrowth, Cell number of ICM, DNA, RNA, Protein incorporation rate

I. 서 론

착상전 임신 모체에 화학물질이나 환경오염물질 등이 노출되면 기형발생율 및 분만전후의 사망율이 증가된다는 보고가 최근에 많이 발표되었다. 이는 착상전 배자에 대해 외부 환경물질은 초기 흡수율만 증가시킬 뿐 기형은 유발시키지 않는다는 보고¹⁾와 착상전 배자가 심한 손상을 받으면 그 배자는 죽지만 가벼운 손상을 받으면 살아있는 세포들은 잃은

세포를 repair하여 정상으로 성장이 가능하다²⁾는 이른바 all or nothing law에 수정을 요구하게 되었다. 또한 일반적으로 착상전의 배자는 모체의 약물동태와 무관하다고 알려져 있는 것과는 달리 uterine luminal fluid를 통해 착상전 배자에 도달될 수 있다고 밝혀졌으며^{3,4)} 이에 대해 임신 초기에 약물이나 화학물질에 노출되어 손상을 받으면 recovery되거나 어느 정도 가벼운 손상을 받으면 착상후 기형유발의 원인으로 작용하기도 한다고 알려져 있다. 그러나

아직까지 착상전 배자에 외부환경물질이 어떻게 작용하는지, 어떤 기전으로 기형을 유발하는지에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않고 있다. 다만 착상전 배자에도 용량의존적으로 배자의 발달을 억제한다고 보고되었으며,^{5,6)} 포배기 배자의 분화된 세포의 종류에 따라 다른 예민도를 보인다는 점,^{6,7)} 단백질의 생성을 억제하고⁸⁾ 세포의 분화 및 성장, 난합의 시기를 지연시킨다는 보고,⁹⁾ 그리고 염색체 이상을 일으킨다¹⁰⁾는 보고가 있다. 또한 착상전 배자는 DNA손상시 회복하는 기능을 가지고 있으며,¹⁰⁾ phase I, phase II의 대사효소를 가지고 있음을 간접적으로 확인하였으며¹¹⁾ steroid hormone의 대사효소를 간접적인 방법으로 확인하였다고^{12,13)} 보고되었다.

본 연구에서는 다환계 방향족 탄화수소중의 하나로 환경오염물질인 Benzo(a)pyrene [B(a)P]을 사용하였다. B(a)P는 체내에서 대사되어 B(a)P-7,8 dioxide나 B(a)P-4,5 dioxide로 대사되며 이들은 epoxide hydroxylase에 의해 diol을 형성하고 다시 microsomal enzyme에 의해 B(a)P-7,8 diol, 9,10 epoxide를 생성한다. 이는 강력한 발암원이면서 변이원물질로 알려져 있다. 본 실험에 사용된 ICR mouse는 Ah locus를 가지고 있지 않고 임신 3.5일 mouse 배자는 B(a)P를 대사시킬 수 있는 기능이 거의 발달되어 있지 않다. 또한 다환계탄화수소 대사에 관여하는 Ah locus를 가지고 있는 mouse와 rat의 경우라도 적어도 임신 7.5일 이후의 배자만이 그 기능을 갖는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 따라서 B(a)P의 대사체나 S-9를 사용하지 않고 B(a)P 그 본체를 사용하여 *in vitro* 상에서 B(a)P를 착상전 배자에 미치는 발생단계별 독성학적인 endpoint를 찾고자 하였으며 성장지연의 원인을 알아보기 위해 protein, RNA, DNA의 생성율에 미치는 영향을 실험하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 기구

1) 실험동물

식품의약품안전청에서 사육된 SPF동물 ICR系 mouse(5~7주령) 암수를 케이지당 10마리씩 암수 분리하여 수용하고 고형사료 및 수도물을 자유롭게 섭취시켰다. 사육온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 상대습도 $55 \pm 5\%$ 를 유지시켰으며 명암교대는 약 12시간(명: 0700~19:00)으로 하였다.

2) 시약 및 기구

Hank's balanced salts, Benzo(a)pyrene{B(a)P}, Human chorionic gonadotropin(HCG), Pregnant mares serum gonadotropin(PMSG), Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), Giemsa stain, Cyclophosphamide(CP), Bovine Serum Albumin(BSA), Dimethyl sulfoxide(DMSO), Proteinase, RNase, BD-cellulose는 Sigma chemical사에서 구입하였다. Fetal calf serum(FCS), Fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사에서, ³H-Uridine, L-[³⁵S]-Methionine, methyl-[³H] Thymidine은 Amco사에서, Insta-gel은 Packard사에서 구입하여 사용하였다.

CO₂ incubator(Forma Sci. U.S.A.), Stereo microscope(Nikon, Japan), Liquid scintillation counter(Packard, U.S.A.), Spectrophotometer(Dupon Sorvall instrument U.S.A.), Omni mixer homogenizer(Omni Co: U.S.A.).

3) 검체의 조제

B(a)P은 100 μM의 stock solution을 만들어 0.3 μM, 1 μM, 3 μM, 10 μM 농도로 DMSO로 희석시켜 사용하였다.

2. 실험방법

1) 과배란 유도, 배자 채취 및 배양

과배란을 유도하기 위하여 PMSG와 HCG를 48시간 간격으로 5 IU씩 복강내 주사하고, HCG투여 직후에 동일계 마우스 수컷과 1:1로 합사하여 자연 교미를 유도하였다. 다음날 오전에 질전을 확인하여 그날을 임신 0일로 하였다. 임신 확인 후 임신 3.5일에 암컷 마우스를 경추탈구 후 개복하여 자궁내강에서 Hank's solution으로 관류시켜 8세포기, 포배기 배자를 채취하였다. 배자는 조직배양용 petridish(falcon 3032)에 30% rat IC serum이 함유된 DMEM 배양액을 5% CO₂ 배양기(Forma Sci. U.S.A.)에서 37°C를 유지하면서 배양하였다. 배양후 배자의 발달상태를 실험현미경 하에서 관찰하였다.

2) Rat IC Serum조제 및 CP대사체 함유 혈청 조제¹⁵⁾

SD系 rat 복대동맥에서 채혈한 다음 4°C에서 5분간 2,500 rpm으로 즉시 원심분리하여 혈청을 분리하고 혈청에서 fibrin clot를 제거한 다음, 다시 4°C 2,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 56°C에서 30분간 water bath에서 비동화시킨 다음, 0.3 μM microfilter에 여과시켜 멸균하여 사용하였다. CP대사

체 함유 혈청은 SD계 랫드에 50 mg/kg의 CP를 복강내 주사한 다음 1시간 후에 대동맥에서 채혈하여 혈청을 얻었다.

3) Blastocyst의 세포수 및 Inner cell mass(ICM) 세포수

Blastocyst의 세포수는 Tarkowski 방법¹⁶⁾을 변형시켜 실험하였다. 즉, 포배기 배자를 uterus에서 관류하여 24시간 배양시킨 후 75 mM KCl용액이 담긴 3 well petri dish에 배자를 옮긴 후 상온에서 50분간 저장액 처리하고 처리된 배자를 slide glass에 올려놓은 후 고정액 I(MeOH:HAC:H₂O=5:1:4)에서 3분, 고정액 II(MeOH:HAC=3:1)에서 2분, 고정액 III(MeOH:HAC=1:1)에서 5분간 처리하여 고정시켰다. Air dry를 30분간 실시하여 slide glass표면이 깨끗하게 마르면 3% Giemsa 용액으로 15분간 염색한 후 세포수를 현미경아래서 셈하였다.

ICM 세포수를 측정 방법은 다음과 같다.¹⁷⁾ 포배기 배자를 24시간 배양시킨 후 Rabbit anti-mouse serum과 DMEM을 1:30으로 희석한 medium으로 embryo를 옮긴 후 10분간 배양시켰다. 1:50으로 희석된 guinea pig complement embryo를 옮긴 후 30분간 배양시켜 lysis된 trophectoderm cell을 조심스럽게 pipette으로 제거한 후 75 mM KCl용액으로 저장액 처리를 하고 고정액 I, 고정액 II, 고정액 III 용액으로 각각 3분, 2분, 5분간 고정시킨 후 공기 중에서 깨끗하게 건조시켜 3% Giemsa용액으로 염색하여 cell number를 counting하였다

4) RNA, DNA, Protein 합성(Incorporation rate 측정)

(1) RNA, Protein의 합성

임신 3.5일의 mouse uterus에서 Hank's solution으로 관류시켜 얻은 배자를 배양액 5.6-³H-Uridine 0.1 μ Ci/ml, L-³⁵S-Methionine을 0.5 μ Ci/ml을 각각의 petridish에 넣은 다음 B(a)P을 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M씩 각각 넣어 24시간, 48시간, 72시간 배양하였다.

(2) Thymidine에 의한 DNA incorporation rate

임신 3.5일의 mouse uterus에서 관류시켜 얻은 배자를 배양액에 culture하면서 각각의 dish에 B(a)P을 0.5 μ M, 1 μ M, 3 μ M을 가하고 methyl-³H-thymidine 0.3 μ Ci/ml을 2시간 노출¹⁸⁾시킨 후 24시간, 48시간, 72시간 배양하였다.

5) 배자에서 DNA분리

Carrier로 사용되는 임신 마우스 간 300 mg에 digestion butter 3.6 ml를 가하여 homogenize시킨

다음, Methyl-³H-thymidine 0.3 μ Ci/ml으로 2시간 pulse한 다음 72시간 배양한 배자를 넣고 proteinase 0.1 mg/ml 20 μ l를 가한 다음 50°C shaking incubator에서 18시간 배양하였다. phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1) 4 ml를 가한 다음 핵산을 추출하고 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 수층을 취하였다. 같은 조작을 phenol로 2회 반복하였다. 7.5 M ammonium acetate 0.5배 용량, 100% ethanol 2배 용량을 가하여 DNA를 얻는다. DNA에 함유되어 있는 RNA를 제거하기 위해 TE buffer에 녹인 후 1 μ g/ml의 RNase를 가한 다음 37°C에서 1시간 배양한 다음 동일방법으로 DNA를 얻었다.

6) BD-cullulose chromatography 추출¹⁹⁾

내경 10 mm의 glass column에 regeneration (boiling)시킨 BD-cellulose를 충전한 다음 얻은 DNA를 loading한다. 이때 carrier로 calf thymus DNA 100 μ g을 같이 loading한다. 0.3 M NaCl-TE butter solution 4 ml, 1 M NaCl-TE solution 10 ml, 55°C로 가열한 1.8% caffen-TE solution 10 ml을 차례로 유출시켜 각 분획을 얻은 다음 liquid scintillation counter로 측정하였다.

III. 실험결과 및 고찰

Table 1는 B(a)P이 8세포기 배자의 성장 및 분화에 미치는 영향을 보여주고 있다. B(a)P의 용량은 B(a)P 0.3 μ M을 최저용량으로 하고 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M로 3배수 증량하여 실험하였다. 6시간 배양후 대조군에서는 100% 16~32세포기로 발달되나 10 μ M B(a)P 투여군에서는 57.7%만이 stage전이가 일어남을 볼 수 있다. 3 μ M의 농도에서 18시간 노출하면 상실기로의 전이는 대조군 29.3%에 비해 15%로 낮아지며, 24시간 배양하면 그보다 더 낮은 농도인 1 μ M투여군에서도 배자의 성장이 지연됨을 알 수 있다.

Rista 등에 의하면²⁰⁾ Ricin 0.01 pg/ml의 농도에서 24시간 배양시 생존율의 큰 변화는 없었으나 48시간 배양시에는 생존율이 54%로 떨어짐을 보고하고 있다. 또한 Ricin 0.01~1 pg/ml의 농도에서 2세포기를 24시간 배양하면 생존율이 60%로 떨어졌으며, 4~8세포기 배자의 경우 세포기 배자보다는 영향을 적게 받는다고 보고하면서 배자의 생존율에 영향을 주는 것은 약물의 농도 뿐만 아니라 노출시간도 중요한

Table 1. Effects of B(a)P on the development of mouse embryos at 8 cell stage

Exposure Time (hours)	Cell Stage	Concentration (μM)				
		0 (n=17)	0.3 (n=27)	1 (n=18)	3 (n=20)	10 (n=26)
3	8 Cell	100	100	100	100	100
6	8 Cell	0	11.8	11.1	25.0	34.6*
	16~32 Cell	100	88.2	88.9	75.0	57.7
18	16~32 Cell	70.6	58.8	66.1	75.0	76.9
	Morula	29.3	35.3	27.8	15.0**	15.4**
24	Morula	28.6	29.4	50.0*	50.0**	61.5**
	Blastocyst	58.6	58.8	38.9**	25.0**	19.2**

· 10 embryos were treated in each replicate experiment. Data were from two or three experiments at each concentration.

· Data are expressed as percentage.

*Significantly different from control group; $p < .05$, student's t-test.

**Significantly different from control group; $p < .01$, student's t-test.

자가 된다고 보고하였다. CdCl_2 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 4세포기의 배자를 24시간 배양시 100% 상실기로 성장하였으며 48시간 또는 72시간 배양시 대조군과 유사하게 blastocyst hatching이 일어나나 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 상실기나 포배기의 배자로 성장되지 않고 괴사가 일어난다고 보고하고 있다. 그러나 상실기의 배자를 24시간 같은 농도인 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 배양하면 괴사의 정도는 감소하였으며, 70% 정도가 포배기로 전이되었다고 한다. 계속해서 48시간 또는 72시간 배양시 hatching attached spread로의 성장지연을 보고하고 있다.²³⁾ 다른 농도 CdCl_2 10⁻⁵에서 상실기의 cleavage 억제에 대한 보고도 있다.²⁴⁾ 이렇게 B(a)P도 Ricin이나 CdCl_2 와 같이 배자의 시기, 약물의 농도, 배양시간에 따라 생존율이 달라짐을 알 수 있었다.

Table 2는 blastocyst 발생단계인 hatching, attachment, trophoblast outgrowth, ICM에 미치는 B(a)P농도의 영향을 보여주고 있다. 양성대조군으로 사용한 CP처리군은 SD계 랫드에 50 mg/kg CP를 복강내 주사 1시간후 대동맥에서 채혈하여 혈청을 사용하였으며 이 혈청중에는 CP대사체인 4-hydroperoxy-CP가 함유되어 있다고 보고된 바 있다.⁹⁾ Hatching은 zona pellucida에서 일어났으며 B(a)P의 용량을 중량하면 hatching은 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. Attachment, trophoblast outgrowth는 3 μM 농도까지는 성장지연 등으로 크기는 약간 작아지는 경향은 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 그러나 고용량에서는 유의적으로 감소하였고 크기도 더욱 작아짐을 알 수 있다. ICM형성은 1 μM 의 농도에서도 충분히 ICM은 거의 생성

Table 2. Effects of B(a)P on blastocyst development

Treatment	No. of Embryos	No. of embryos developing to endpoints (mean \pm S.D.)			
		Hatching	Attachment	Trophoblast outgrowth	Inner Cell Mass
None	30	8.3 \pm 1.4	7.7 \pm 2.3	6.7 \pm 1.6	5.6 \pm 2.6
CP	33	8.2 \pm 2.0	4.4 \pm 1.9*	4.4 \pm 1.9	3.4 \pm 1.6
B(a)P 0.3 μM	27	9.0 \pm 1.1	7.2 \pm 2.7	6.7 \pm 3.2	4.8 \pm 1.7
B(a)P 1 μM	31	8.3 \pm 1.9	6.9 \pm 2.5	5.1 \pm 1.3	3.1 \pm 1.0*
B(a)P 3 μM	39	8.5 \pm 1.0	6.6 \pm 1.2	4.7 \pm 1.9*	2.7 \pm 1.1**
B(a)P 10 μM	33	6.5 \pm 2.9	4.1 \pm 1.9*	3.7 \pm 1.8*	1.3 \pm 0.9**

· 10 embryos were treated in each replicate experiment. Data were from three experiments at each treatment.

· CP: Cyclophosphamide; positive control.

*Significantly different from control; $p < .05$, Student's t-test.

**Significantly different from control; $p < .01$, Student's t-test.

Table 3. Effects of B(a)P on blastocyst development at different endpoints

Treatment	Incubation hours		
	24 hr (Hatching)	48 hr (Attachment)	72 hr (ICM)
None	8.9±1.1 (n=39)	6.3±1.9 (n=32)	5.6±2.6 (n=30)
CP	7.5±0.7 (n=36)	3.9±2.0 (n=37)	3.4±1.7 (n=33)
B(a)P 0.3 µM	7.8±2.0 (n=37)	5.6±3.2 (n=31)	4.8±2.3 (n=27)
B(a)P 1 µM	7.0±2.0 (n=45)	3.9±2.2 (n=29)	3.1±1.0 (n=31)*
B(a)P 3 µM	4.9±2.2 (n=53)**	4.0±1.9 (n=24)	2.8±1.0 (n=39)*
B(a)P 10 µM	3.9±1.1 (n=49)**	2.7±1.6 (n=49)	1.6±0.7 (n=36)**

· 10 embryos were treated in each replicate experiment. Data were from four or five experiments at each treatment.

· Data are expressed as mean±S.D.

· CP: Cyclophosphamide; positive control.

*Significantly different from control; $p < .05$, student's t-test.

**Significantly different from control; $p < .01$, student's t-test.

되지 않았다. B(a)P은 포배기에 단기간 노출시 ICM 형성에 심한 영향을 주었다.

Table 3은 포배기의 배자를 B(a)P에 24시간, 48시간, 72시간 배양하였을 때 hatching, attachment, ICM 형성을 각 endpoint로하여 용량에 따른 영향을 나타내었다. 가장 예민도가 높은 지표는 ICM 형성의 감소, hatching, attachment 순으로 용량의존적인 양상을 보였으며 ICM형성은 1 µM에서 hatching은 3 µM, attachment는 10 µM에서 유의성 있는 감소를 보였다. 양성대조군 CP와 가장 유사한 농도는 1 µM으로 무독성 영향농도인 0.1 µM과 비교시 안전역이 매우 좁은것을 알 수 있었다.

B(a)P이 착상전배자의 cytotoxicity에 미치는 영향은 Table 4와 같다. B(a)P를 포배기의 배자에 노출하면 용량의존적으로 blastocyst total cell number (BTCN)은 감소하는 경향을 보였으며 ICM의 세포수 감소는 BTCN의 감소보다 더욱 현저함을 알 수 있다. 양성대조군으로 사용한 CP에 의한 BTCN의 정도는 Spelmann 등의 보고²⁰⁾와는 유사한 결과를 얻었다. B(a)P이 ICM의 세포수가 BTCN 다시말하면 trophoblast 보다는 훨씬 더 예민하게 반응함을 알 수 있었다. 이는 ICM의 세포수가 예민한 독성지표로서 제시될 수 있으리라 생각된다. 그러나 ICM 세포수가 분화를 계속하여 외배엽과 내배엽을 형성하고 그 내·외배엽이 각각 다른 조직이나 기관을 형성하는 중요부위임에는 틀림이 없으나 배자의 기관부위별 독성물질에 대한 예민도를 가 기형유발과 직접적인 상관관계를 설명하기에는 포배기가 발생에 아주 초기 단계이기 때문에 어려운 점이 많다. 한 보고에 의하면 우리주변에서 가장 많이 노출되기 쉬

Table 4. Cytological effects of B(a)P at the blastocyst stage

Treatment	No. of embryos	Blastocyst Cell Number (as % of control)	BTCN/ICM (as % of control)
None	24	56.6±10.5 (100)	26.3±1.2 (100)
CP	13	38.8±9.9* (68.5±17.5)	16.8±0.7* (63.8±2.6)
B(a)P 0.1 µM	15	48.3±7.9 (85.3±13.9)	22.7±1.4 (86.3±5.3)
B(a)P 0.3 µM	13	40.7±7.4* (71.9±13.0)	13.4±0.9* (50.9±3.4)
B(a)P 1 µM	14	38.7±10.6* (68.3±29.3)	12.7±1.1 (48.2±4.1)
B(a)P 3 µM	13	33.6±7.3** (59.3±12.8)	6.9±1.0** (26.2±3.8)

· Data are expressed as mean±S.D.

· CP: Cyclophosphamide, positive control.

*Significantly different from control; $p < .05$, student's t-test.

**Significantly different from control; $p < .01$, student's t-test.

운 물질인 ethanol, nicotine, caffeine, DDT, sodium salicylate 등을 각각 혹은 복합 노출시켰을 때 이들은 착상전 배자의 성장과 발달의 지연을 일으켰으나 이들 물질에 의한 성장과 발달의 지연이 기형으로 이어지지는 않았다고 보고하면서 기형발생에 작용하는 요인이 다양하고 이 분야에 대한 연구가 미진한 상태이므로 기형발생과 직접 연결지어 설명할 수는 없다고 하였다. ICM세포수의 감소도 기형발생의 한 요인임에는 틀림없으나, chromosome

abbreviation의 유발가능성, 독성물질의 비정상적인 착상유도, 포배기 배자에 직접 착상에 관여하는 호르몬의 영향, 착상과정에 작용하는 것으로 알려진 포배기배자의 histamine 생성능력도 넓게는 초기배의 기형발생과 연관시켜 생각될 수 있다는 것이다. 그러나 독성물질을 투여 받은 모체에 있어 착상과 관련하여 기형유발 원인을 제거하는 실험으로 수정란을 대리모에 이식하여 *in vivo* 실험을 거치지 않고는 기형발생 여부를 정확히 밝히기는 어렵다는 것이다.

지금까지 실험결과로 미루어 보아 B(a)P은 착상 전 배자의 초기 성장 및 분화에 강력한 억제작용이 있었다. 그리고 그 강력한 억제효과는 B(a)P의 농도, 노출시간, 배자의 발달시기에 따라 다른 예민도를 갖고 있었으며 ICM 세포수의 감소가 가장 예민함을 확인할 수 있었다.

한편, 이들 배자의 초기 성장 및 분화의 억제원인을 알아보기 위해 RNA, DNA, protein의 합성에 미치는 영향을 실험하였다. RNA 합성에 미치는 영향을 보기 위해 blastocyst 시기의 배자를 B(a)P 0.3, 1, 3 μM 이 함유된 배양액에 0.1 μCi ^3H -Uridin/m/을 가하여 24시간, 48시간, 72시간 배양한 결과는 Fig. 1과 같다. H-Uridine으로 pulse시켜 24시간 배양시 control군에 비해 B(a)P 처리군은 거의 유사한 incorporation rate를 보였다. 그러나 48시간 배양하였을 때 control군에 비해 B(a)P 처리군은 RNA incorporation rate는 감소하였다. 그러나 B(a)P 처리로 인한 각군의 차이는 인정되지 않았다. 그러나 72시간 배양시 역시 B(a)P 처리군 용량의존적으로

감소하였다. 처음 24시간에는 RNA 합성에 영향을 미치지 않으나 배양 48시간이후부터는 영향을 미치기 시작하여 72시간이후부터는 RNA합성에 용량의존적으로 합성의 감소가 일어남을 알 수 있다.

Protein 합성에 미치는 영향을 보기 위해 B(a)P 0, 0.3, 1, 3 μM 처리군에서 시간에 따른 ^{35}S -Methionine의 protein incorporation rate는 Fig. 2과 같다. 24시간 배양시 control군과 B(a)P 처리군과의 incorporation rate는 거의 유사한 경향을 보였으나 3 μM B(a)P 처리군에서 약간 감소하는 경향을 보였다. 48시간 배양시 1 μM 이상 B(a)P 처리군에서 incorporation rate 감소를 나타냈으며 72시간 배양시 3 μM B(a)P이상의 농도에서 용량의존적으로 감소하였다. 염화수은²⁵⁾ 염화메칠수은²⁶⁾ 4×10^{-4} M의 농도에서 상실기에서 포배기로의 배자증식 억제 및 단백질 합성억제에 대해 보고된 바도 있다. 상실기와 초기 포배기에 단백질합성을 억제하였다고는 보고²³⁾와 본 실험결과는 유사하였다.

DNA 합성에 미치는 영향을 보기 위해 ^3H -Thymidine 0.3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 에 의한 B(a)P 0, 0.3, 1, 3 μM 처리군에서 배양시간에 따른 DNA incorporation rate에 대한 결과는 Fig. 3과 같다. Thymidine 자체의 독성으로 pulse시간은 1일 2시간으로 제한하였으며 thymidine 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 농도로 pulse하였을 때는 검출되는 양이 작았고 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 농도로 증가시키면 thymidine 자체의 독성으로 인한 성장지연이 현저하였다. 따라서 독성이 적으면서 실험이 가능한 농도인 0.3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 를 선택하여 실험하였다. 실험결과 blastocyst 성장지연의 원인으로 B(a)P이 DNA

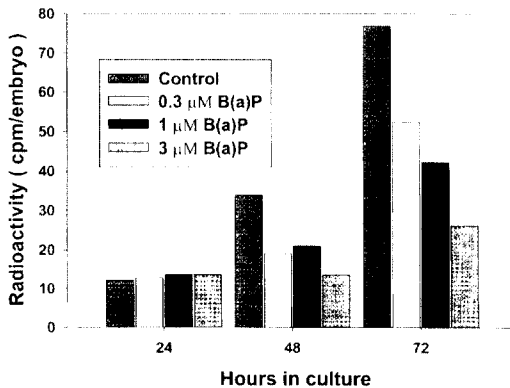


Fig. 1. Effect of B(a)P on the incorporation of 0.1 μCi [5,6- ^3H] uridine/ml by blastocyst mouse embryos cultured *in vitro*.

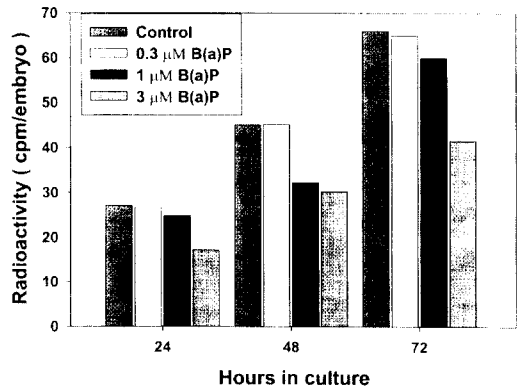


Fig. 2. Effect of B(a)P on the incorporation of 0.5 μCi L-[^{35}S] methionin/ml by blastocyst mouse embryos cultured *in vitro*.

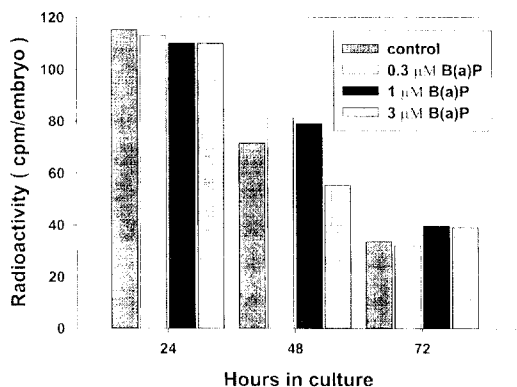


Fig. 3. Effect of B(a)P on the incorporation of 0.3 μ Ci [methyl- 3 H] thymidine/ml by blastocyst mouse embryos cultured in vitro.

합성에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각되어진다. 이는 Olsen¹⁾ 등의 2~8 cell의 배자에 0.5 μ Ci/ml thymidine를 계속해서 노출시 형태학적인 이상은 없다하더라도 cell의 갯수에서는 현저한 감소를 보였으며, 1일 2시간씩 0.1 μ Ci/ml 3 H-thymidine에 노출시켰을 때 blastocyst formation cell의 갯수에 영향을 주지 않아 in vitro에서 초기배양시 DNA합성의 정량성을 제시한 실험결과와 유사하였다. B(a)P 3 μ M의 농도에서 DNA생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 methyl- 3 H-thymidine 0.3 μ Ci/ml로 하루에 2시간씩 72시간 배양한 배자에서 얻은 DNA를 BD-cellulose column을 통해 elution되는 DNA양을 각 fraction별로 확인한 결과 thymidine에 의한 DNA incorporation rate은 대조군에 비해 거의 유사한 것으로 확인되었다.

지금까지 실험결과를 요약하면 B(a)P를 처리하여 blastocyst를 in vitro에서 배양시간 24~72시간동안 배양하면 hatching, attachment, trophoblast outgrowth, ICM의 생성지연, ICM 세포수의 감소의 성장지연등이 나타났으며 ICM의 세포수가 가장 민감한 독성지표였다. 또한 이들의 성장지연의 원인은 DNA 합성저해에 의한 영향 보다는 RNA 합성저해로 인한 protein 생성저해로 인한 것으로 생각된다.

IV. 결 론

B(a)P를 이용하여 in vitro에서 착상전 배자를 배양하였을 때 독성학적인 endpoint와 Blastocyst시기에 B(a)P를 0, 0.3, 1, 3 μ M의 농도로 24시간, 48시

간, 72시간 노출하였을 때

1. B(a)P 3 μ M 이상의 농도에서 8세포기의 배자를 배양하였을 때 배자의 생존율은 감소하는 경향을 보였으며, B(a)P 1 μ M 이상의 농도에서 배자의 성장 및 분화 억제를 보였다.

2. B(a)P 10 μ M 이상의 농도에서 포배기의 배자는 attachment, 3 μ M 이상의 농도에서 trophoblast outgrowth, 1 μ M 이상의 농도에서 ICM 생성 등의 성장지연을 보였다.

3. B(a)P 0.3 μ M 이상에서 용량의존적으로 포배기 배자의 ICM 세포수가 감소되었다.

4. 0.1 μ Ci 3 H-Uridine의 RNA incorporation rate는 48시간 이후 용량의존적으로 감소하였다.

5. 0.5 μ Ci 35 S-Methionine의 경우 48시간 이후 B(a)P 1 μ M 이상의 농도에서 protein incorporation rate는 유의하게 감소하였다.

6. Blastocyst시기의 B(a)P에 의한 성장지연은 RNA, protein 합성저해로 인한 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) H. Spielman and R. Vogel: Unique role of studies on preimplantation embryos to understand mechanisms of embryotoxicity in early pregnancy, *Toxicology*, **20**, 51-64, 1989.
- 2) C. R. Austin: Embryotransfer and sensitivity to teratogenesis. *Nature*, **2**, 333, 1973.
- 3) S. M. Sieber and S. Fabro: Identification of drugs in the preimplantation blastocysts and in the plasma uterine secretion and urine of the pregnant rabbit. *J. pharmacol. Exp. Ther.* **176**, 65, 1971.
- 4) H. Spielman and R. Vogel: Transfer of drugs into the embryo before and during implantation in pharmacokinetics in teratogenesis Vol. 1 Nau H. and W scott. *J. eds. CRC Press Boca Raton H.* **45**, 1987.
- 5) H. G. Eibs and H. Spielmann: Inhibition of postimplantation development of mouse blastocysts in vitro after cyclophosphamide treatment in vivo. *Nature*, **270**, 54, 1977.
- 6) H. Spielman: Analysis of embryotoxic effects in preimplantation embryos in the mammalian preimplantation embryo. Bavister B.D Ed Plenum Press N.Y. 309, 1987.
- 7) A. Spindle and K. Wu: Developmental and cytogenic effects of caffeine on mouse blastocysts alone or incubation with B(a)P. *Teratology*, **32**, 213-218, 1985.
- 8) S. Katagams, H. Kuba and N. Matsumoto: Acute

- effects of mercuric compounds on implantation mouse embryos *in vitro*. *Acta, Obstet. Gynecol. Jpn.* **36**, 1957. 1984.
- 9) R. Vogel, C. Krager, I. Granata and H. Spielmann: Development and sister chromatid exchange of mouse morulae and blastocysts cultured in rat serum containing active metabolites of cyclophosphamide. *Tox. Lett* **28**, 23, 1985.
 - 10) R. Vogel and H. Spielmann: Potentiating effect of caffeine on embryotoxicity of cyclophosphamide treatment *in vivo* during the preimplantation period. *Teratogenesis mutagenesis*. **7**, 169, 1987.
 - 11) R. Balling, H. Hof, R. Maydl, M. Netzler and H. M. Beier: Oxidative and conjugative metabolism of diethylstilbestrol by rabbit preimplantation embryos. *Devel. Biol.* **109**, 370, 1985.
 - 12) J. S. Perry, R. B. Heap, R. A. Burion and J. E. Gadsby: Endocrinology of the pig blastocyst and its role in the establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **25**, 85, 1976.
 - 13) F. W. George and J. D. Wilson: Estrogen formation in the early rabbit embryo. *Science*. **199**, 200, 1973.
 - 14) Nebert, D. W.: The Ah Locus: Genetic difference in toxicity. *Toxicol.* **20**, 137-152, 1989.
 - 15) N. Brock: Comparative pharmacology study *in vitro* and *in vivo* with cyclophosphamide cyclophosphamide metabolites, and plain nitrogen mustard compounds. *Cancer Treat Rep.* 301-308, 1976.
 - 16) A. K. Tarkowski: An air-drying method for chromosome preparation from mouse egg. *cytogenetics*. **5**, 394-400, 1966.
 - 17) A. H. Handyside and S. C. Barton: Evaluation of the technique of immunosurgery for the isolation of inner cell mass from mouse blastocysts. *J. embryol. exp. morph.* **37**, 217-226, 1977.
 - 18) W. M. Olsen and R. Storeng: Effects of ³H-Thymidine on preproplantation mouse embryos *in vitro*. *Pharmacol. Toxicol.* **61**, 203-208, 1987.
 - 19) P. H. T. Huang and W. G. McBride: Thalidomide induced alteration in secondary structure of rat embryonic DNA *in vivo*. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* **10**, 281-294, 1990.
 - 20) H. Spielmann, U. Jacob-Mcler, M. G. Eibs and W. Beckord: Investigation on cyclophosphamide treatment during the preimplantation period. Differential sensitivity of preimplantation mouse embryos to maternal cyclophosphamide treatment. *Teratology* **23**, 1-5, 1981.
 - 21) R. Storeng and J. Joosen: Inhibitory effect of ricin on the development of preimplantation mouse embryos. *J. of Toxicol. and Environ. health.* **12**, 193-202, 1983.
 - 22) S. Fabro, J. A. McLachlan and N. M. Demes: Chemical exposure of embryos during the preimplantation stages of pregnancy: Mortality rate and intrauterine development. *Am. obstet. Gynecol.* **148**, 929, 1984.
 - 23) S. K. Dey and D. C. Johnson: Reevaluation of histamin in implantation in the endometrium. 269-283. New York Spectrum pub. 1980.