

계태에서의 ^{31}P 자기공명분석법을 이용한 인대사변화의 추적

울산대학교 의과대학 진단방사선과학교실, 소아과교실 *,
아산생명과학연구소, 방사선의학연구과**

유 시 준 · 이 정 희** · 이 대 근** · 임 태 환 · 홍 창 의*

= Abstract =

Analysis of Changes In Phosphorous Metabolites of Fertilized Eggs by Magnetic Resonance Spectroscopy

Shi-Joon Yoo, Jung Hee Lee**, Tae-Keun Lee**, Tae-Hwan Lim, Chang Yee Hong*

Departments of Diagnostic Radiology, and Pediatrics,
University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center and
Department of Radiological Sciences**, Asan institutes of Life Sciences*

Chick embryo is a convenient model for embryologic teratologic studies. We performed the present experimental study to establish the basic technology for magnetic resonance studies of chick embryos and to examine the biochemical changes occurring during the development of chick embryos. Fertilized Leghorn eggs were examined by ^{31}P -phosphorous magnetic resonance spectroscopy (^{31}P -MRS) on days 6, 9, 12, 14, 15, 17 and 20 after the start of incubation. Spectroscopic data of live embryos were acquired by using a 4.7T MR spectrometer, and signals from phosphorous metabolites were analyzed. Total phospholipid signal decreased, which resulted in the overall decrease in total phosphorous signal over time. Signals from other metabolites such as ATPs and phosphocreatine increased over time, while those from inorganic phosphate and sugar phosphates decreased. Before the incubation days 12, signals from sugar phosphates and inorganic phosphate were predominant, and other metabolites became remarkably functional between the days 12 and 14 when the decrease in the phospholipid signal was significant. MR spectroscopy is an effective method in evaluation of the biochemical changes occurring during the developmental period of chick embryos.

Key Words : Chick embryo, ^{31}P -MRS, phosphocreatine, ATP, sugar phosphate

I. 서 론

계태(chick embryo)는 모체와 분리되어 완전히 독립적으로 비교적 짧은 기간(21일)내에 발생과정을 밟을 뿐 아니라 각피에 인공적으로 창을 뚫어서 태(embryo)를 육안 또는 입체 현미경으로 관찰하면서 직접 태에 실험조작을 할 수 있고, 전 발생과정을 추적 관찰할 수 있어 발생과학적 연구에 널리 이용되고 있는 실험 모형이다.¹⁻⁶ 발생학적 연구는 형태조직학적 연구와 생화학적 연구로 대별할 수 있는데 Moseley 등⁷은 자기공명기기를 이용하여 계태에서 일어나는 형태학적 발달과 생화학적 변화를 연관시켜 연구보고한 바 있다.

저자 등은 태의 발생에 따른 생화학적 변화를 생체에서 연구할 수 있는 ^{31}P -자기공명분석법(magnetic resonance spectroscopy : MRS)의 기본기술을 확립하고 ^{31}P 자기공명분석법으로 증명할 수 있는 생화학적 변화에 관한 보다 정확하고 정밀한 정보를 얻기 위하여 본 연구를 시행하였다.

II. 대상 및 방법

상업용 부화장에서 $38\sim 39^\circ\text{C}$ 의 온도와 60~80%의 습도로 3일간 부화시킨 레그혼(Leghorn)의 수정란을 구입하여 실험용 부화기에서 유사한 조건으로 계속 부화시키면서, 부화를 시작한 날로부터 6일, 9일, 12일, 14일, 15일, 17일 되는 날에 각 2개 내재 6개씩의 수정란을 임의로 선택하여 P-31 자기공명분석을 시행하였다.

자기공명분석은 주자장의 세기가 4.7Tesla이고 자석의 내경이 30cm인 Bruker Biospec(Zurich, Switzerland)를 사용하였으며, ^{31}P 분광 스펙트럼은 길이 6.5cm, 폭 5.5cm인 타원형 코일에 82.049 MHz의 주파수로 공명되도록 자체 제작한 표면코일(surface coil)로 얻었다. 한 스펙트럼을 얻기 위하여 512회씩 스캔하여 평균값을 구했으며, 펄스의 반복시간(repetition time)을 2.6초로 하여 한 스펙트럼을 얻는데에 약 22분이 필요하였다. 얻은 스펙트럼을 위상(phase)과 기저치(baseline)를 교정하여 표준화 하였으며, 표준화된 스펙트럼의 각 피크(peak)들의 영역을 Aspect-3000 컴퓨터로 계산하였다. 부화를 시작

한 날로부터 6일째 얻은 스펙트럼에서 총 ^{31}P 피크의 영역을 100%로 하여, 각 피크들이 대표하는 화학물질의 상대농도를 산출하였다. 또한, 각 인대사물질의 프랙션을 아래의 공식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{fraction}(f) = \frac{\text{total } ^{31}\text{P signal from each metabolite}}{(\text{total } ^{31}\text{P signal} - ^{31}\text{P signal from phospholipids})}$$

III. 결 과

부화장에서 부화를 시작한지 6일, 9일, 12일, 15일, 17일, 20일된 수정란으로부터 얻은 P-31 스펙트럼은 Fig.1과 같다. 6일된 수정란은 인지질(phospholipid : PL)의 높은 피크와 인단백(phosphoprotein)과 당인산(suger phosphate : SP)의 낮은 피크들만을 보였다. 고에너지 인대사산물인 에이티피(adenosine triphosphate : ATP)들과 포스포크레아틴(phosphocreatine : PCr)은 14일된 수정란으로부터 관찰되었으며 포스포모노에스터(phosphomonoester : PME)와 포스포다이에스터(phosphodiester : PDE)는 17일된 수정란으로부터 관찰되었으나 PME와 PDE의 전체 ^{31}P 의 신호에 대한 기여는 낮았다. 피크 영역을 계산하여 얻은 각 피크들의 상대농도는 Fig.2와 3과 같다. 전체 ^{31}P 농도는 12일과 14일 사이에 급속히 감소하였으며, 그 변화는 인지질 농도의 감소와 유사한 추세를 보였으나 인지질농도의 감소가 보다 현저하였다. 또한, 전체 ^{31}P 농도의 감소는 인지질의 감소에 의한 것이라고 할 수 있다. 반면 ATP 피크는 12일과 14일 사이에 급격히 증가하여 그 이후에는 서서히 증가하였다. PCr은 12일 이후 서서히 증가하였고, 당인산과 무기인산(inorganic phosphate : Pi)의 농도들은 전과정을 통하여 감소하는 경향을 보였다.(Fig.3). 인지질을 총 ^{31}P 량에서 뺀 값에 대한 각 대사산물의 프랙션(fraction)의 부화일수에 따른 변화는 Fig.4와 같다. 6일과 12일 사이에는 당인산과 무기인산의 프랙션이 PCr과 ATP의 프랙션에 비해 현저히 우세하였으나 12일과 14일 사이에 이들 프랙션들에 급격한 변화가 일어나 17일과 20일에는 ATP 프랙션이 현저히 우세하였고 PCr과 당인산 및 무기인산들은 비슷한 프랙션을 차지하였다.

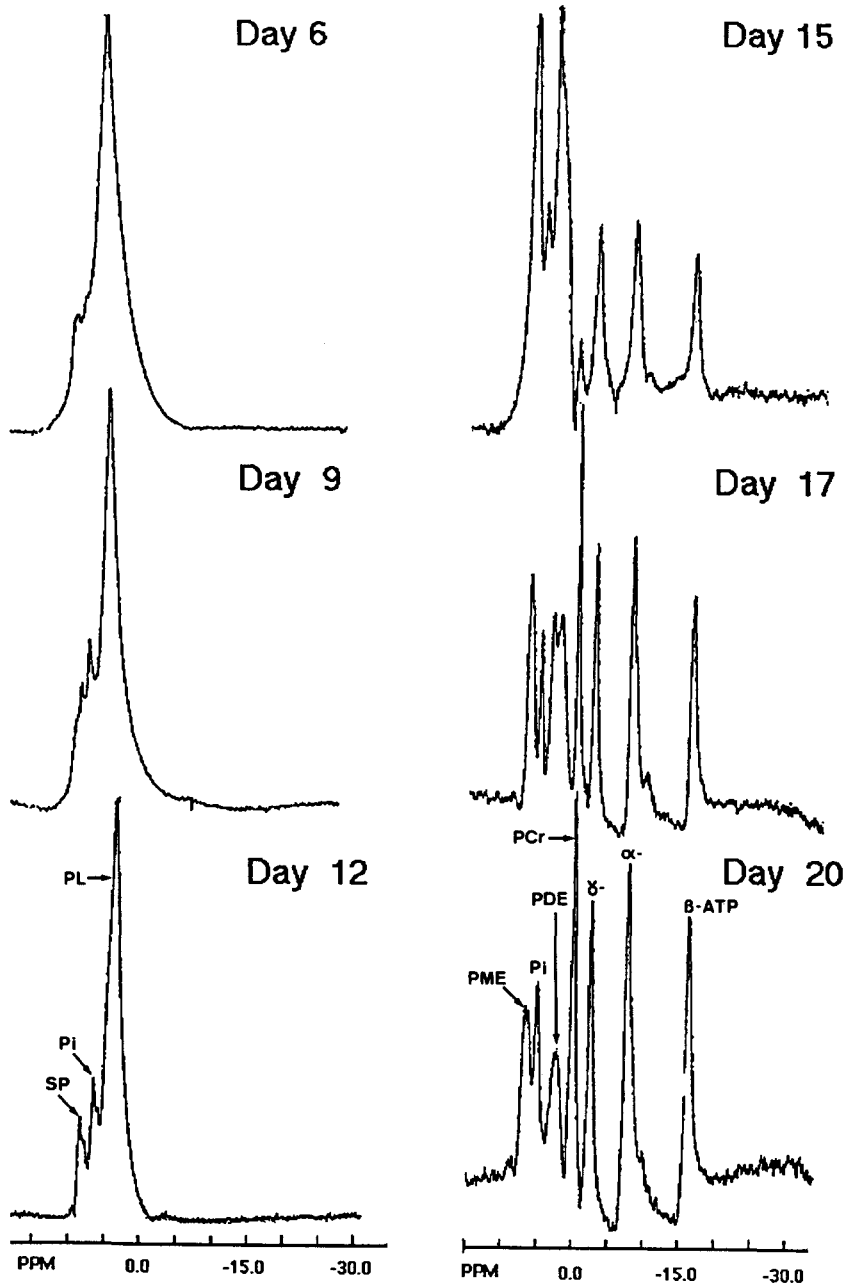


Fig.1. Representative ^{31}P spectra obtained from eggs at days 6, 9, 12, 14, 15, 17 and 20. ATP=adenosine triphosphates, PCr=phosphocreatine, PDE=phosphodiester, Pi=inorganic phosphate, PL=phospholipids, PME=phosphomonoester, SP=sugar phosphates.

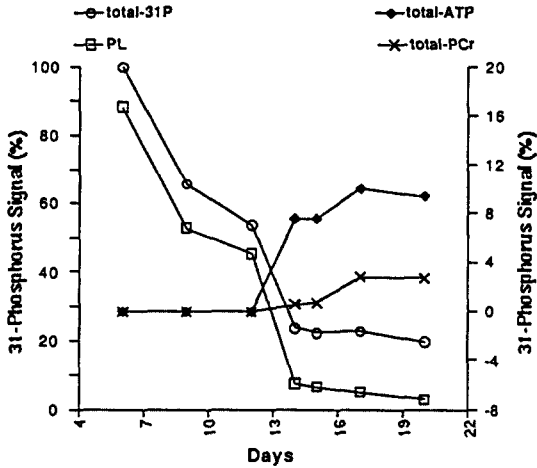


Fig.2. Changes in total ^{31}P signal volume and ^{31}P signal volumes from phospholipids(PL), adenosine triphosphates(total-ATP) and phosphocreatine(PCr) as plotted over time. Total ^{31}P signal volume at day 6 is considered as 100%. Total ^{31}P signal and ^{31}P signals from phospholipids decrease, and signals from adenosine phosphates and phosphocreatine increase over time with accelerated changes between days 12 and 14.

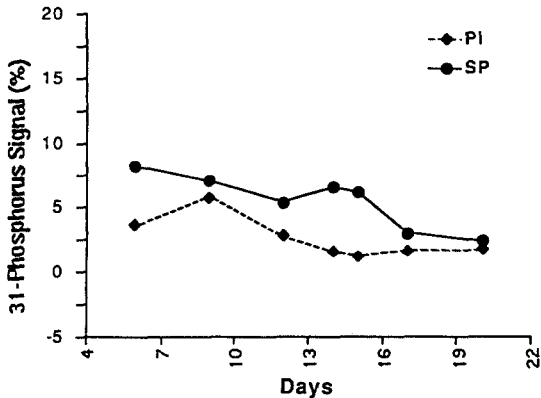


Fig.3. Changes in ^{31}P signal volumes from inorganic phosphates(Pi) and sugar-phosphates(SP) as plotted over time. Total ^{31}P signal volume at day 6 is considered as 100%. There is very little change in signal volumes throughout the incubation time.

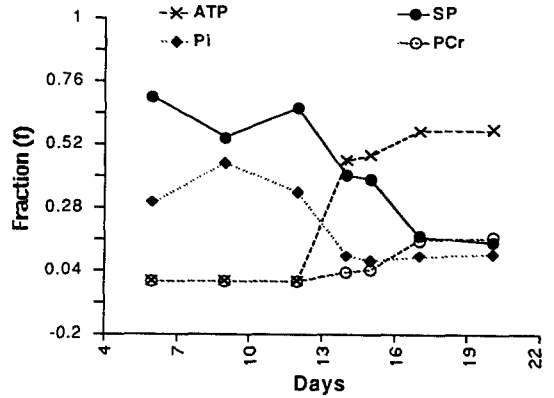


Fig.4. Changes in fraction of adenosine phosphates(ATP), inorganic phosphates(Pi), phosphocreatine(PCr) and sugar-phosphates(SP) over time. Fraction(f) is calculated by following equation for each metabolite :

$$\text{fraction}(f) = \frac{\text{total } ^{31}\text{P signal from each metabolite}}{\text{(total } ^{31}\text{P signal} - ^{31}\text{P signal from phospholipids)}}$$

From day 6 to 12, ^{31}P signals from sugar-phosphates and inorganic phosphates are dominant over signals from adenosine phosphates and phosphocreatine, which become more functional from day 14.

IV. 고찰

기형학 연구에 이용되는 실험방법들은 특정 발생 시점에 태를 기형원으로 처리한 실험군과 실험조작을 가하지 않은 대조군을 비교함으로써 기형원의 병리발생학적 영향과 효과를 추론하는 방법들이 대부분이다. 그러나 이들 방법들은 많은 경우에 실험군의 상당수에서 기형이 유발되지 않거나 유발된 기형들도 특정기형으로 한정되지 않고 매우 다양한 스펙트럼을 보이기 때문에 통계학적으로 이미 있는 결과를 얻기 위해서는 많은 수의 실험군을 필요로 한다.^{4,8} 또한 이들 방법으로 유발된 기형을 형태학적으로 분석하려면 태나 분만된 개체를 희생시켜 관찰하여야 하기 때문에 특정기형의 병리발생 과정을 규명하기 위해서는 각 발생과정에 있는 많은 수의 태를 필요

로 할 뿐 아니라 규명된 정보도 가설에 불과하다. 따라서 발생과정의 태를 희생시키지 않고 태의 생명을 유지한 상태로 태를 반복 관찰할 수 있는 방법보다도 경제적이며 정확한 실험방법이 될 수 있지만 현재까지 개발된 방법들은 만족스럽지 못하다. 이러한 연구방법으로 양수의 pH나 화학물질의 농도를 추적하는 방법⁹과 비디오로 발생중인 태를 추적 촬영하는 방법¹⁰들이 있지만 전자는 태 자체보다는 그 주위환경을 검사하는 방법이라고 할 수 있고 후자는 태의 표피를 통하여 광학적으로 관찰할 수 있는 장기들의 표면만을 검사할 수 있다는 단점이 있다.

Colman 등¹¹과 Burt 등¹²에 의해 개구리의 태나 계태에서 시도된 ³¹P 자기공명분석법은 태의 생명을 보존한 상태에서 태를 생화학적으로 추적할 수 있다는 장점이 있다. Mosely 등⁷은 2.0 Tesla 자기공명기로 계태를 ³¹P 자기공명분석법으로 검사하고 계태의 ¹H자기공명미세영상을 얻어 두 방법으로 얻은 결과를 연관지어 분석하였다. 본 연구에서는 현재까지 보고된 내용을 재현하였으며, 과거의 연구에서 기술되지 않았던 PME, PDE의 변화와 인지질을 제외한 인대사산물 총량에 대한 각 대사산물의 프랙션을 분석하여 새로운 지견을 추가하였다.

자기공명분석법으로 관찰할 수 있는 인은 당인산, 인지질, 무기인산, PCr, PME, PDE, ATP등 인대사에 직접 관여하는 화학물질 들로 이들의 총량은 태의 연령이 많아질수록 적어진다⁷. 이러한 인의 총량의 감소는 가장 많은 량의 인을 함유하는 인지질이 세포막의 인지질이중막을 형성하는데 사용되고 골형성과정에서 인산칼슘(calcium phosphate)으로 골에 함입되어 자기공명분석법으로 관찰할 수 없는 인으로 변환되기 때문이다. 세포막이나 골에 함입된 인이 자기공명분석법으로 관찰할 수 없는 이유는 T2 이완시간(relaxation time)이 짧기 때문인 것으로 알려져 있다⁷. 인의 총량의 변화추세와 인지질의 변화추세는 거의 비슷한 양상을 보이지만 인지질의 감소가 보다 현저한 것은 인지질 감소의 폭이 가장 큰 12일과 14일 사이에 ATP가 급격히 상승하는 것과 관계가 있다고 생각된다. 즉 인지질의 감소의 일부가 ATP의 증가와 상쇄되어 ³¹P의 총량의 감소는 인지질의 감소추세에 비하여 둔화되었다고 할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 동일한 계태의 생명을 유지한 상태로 추적하지는 못하였지만 자기공명분석중에도 계태가 계속 부화과정을 지속할 수 있는 적절한 온도와 습도를 제공할 수 있는 기구를 마련하면 만족스러운 실험방법으로 개발할 수 있으리라 생각된다.

Reference

1. Fisher M, Schoenwolf GC. The use of early chick embryo in experimental embryology and teratology: Improvements in standard procedures. *Teratology* 1983; 27: 65-72.
2. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951; 88: 49-92
3. 유시준, 최영희, 이홍재, 서정욱, 박영관, 이영균. 계태를 이용한 심장발생학 및 기형학 연구에 관한 예비보고. *세종의학* 1987; 4: 11-16
4. Yoo SJ, Seo JW, Ishikawa S, Lee SW, Lee WH, Han MC. Dextroposition of the great arteries and left juxtaposition of the atrial appendage produced in chick embryos. In: Clark EB, Takao A, ed. *Developmental cardiology: Morphogenesis and Function*. Mount Kisco: Futura Publishing Co., Inc. 1990; 505-520.
5. Bone SN, Johnson GA, Thompson MB. Three-dimensional magnetic resonance microscopy of the developing chick embryo. *Invest Radiol* 1986; 21: 782-787.
6. Effmann EL, Johnson GA, Smith BR, Talbott GA, Cofer G. Magnetic resonance microscopy of chick embryos in ovo. *Teratology* 1988; 38: 59-65.
7. Moseley ME, Wendland MF, Darnell DK, Gooding CA. Metabolic and anatomic development of the chick embryo as studied by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and proton MRI. *Pediatr Radiol* 1988; 19: 400-405.
8. Pexieder T, Janecek P. Organogenesis of the human embryonic and early fetal heart as studied by microdissection and SEM. In: Nora J., Takao A, ed. *Congenital heart disease: Causes and pro-*

- cesses. Mount Kisco : Futura Publishing Co., Inc. 1984; 401-42.
9. Nuccitelli R, Webb DJ, Lagier ST, Matson GE. P-31 NMR reveals increased intracellular pH after fertilization in *Xenopus* eggs. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78 : 4421
10. Nishibatake M, Nakazawa M, Tomita H, Ikeda K, Takao A. Image analysis of cardiac contraction in the early stages of the chick embryo. In : Clark EB, Takao A, ed. Developmental cardiology, morphogenesis and function. Mount Kisco : Futura Publishing Co., Inc. 1990 ; 305-314.
11. Colman A, Gadian DG. P-31 nuclear magnetic resonance studies on the developing embryos of *Xenopus laevis*. Eur J Biochem 1976 ; 61 : 387.
12. Burt CT, Jeffreys-Smith L, London RE. P-31 characterization of hen egg yolk and white. Biochem Biophys Acta 1986 ; 887 : 118.