大韓不妊學會誌 : 第30卷 第4號 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 4, 2003, 12

생쥐 초기 2-세포 배에서 세포 내 칼슘 농도의 변화에 Ni^{2+}이 미치는 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

윤숙영 · 이은미 · 배인하

The effect of Ni^{2+} on the intracellular Ca^{2+} increase of the mouse early 2-cell embryos

Sook-Young Yoon, Eun-Mi Lee, In Ha Bae

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University

Objective: We reported the overcoming effect of Ni^{2+} on the in vitro 2-cell block of mouse embryos. In this study, we aim to investigate whether Ni^{2+} should induce intracellular Ca^{2+} transient in the mouse embryos.

Materials and Methods: Embryos were collected at post hCG 32hr from the oviduct of the ICR mouse and cultured in M2 medium omitted phenol red. Intracellular Ca^{2+} was checked by using a confocal laser scanning microscope and fluo-3AM by using various intracellular Ca^{2+} antagonists.

Results: In 1mM Ni^{2+} treated medium which contained Ca^{2+}(1.71mM), 75.7% of the embryos showed $[Ca^{2+}]i$ transient about 200 sec later. In the Ca^{2+}-free medium, 69.8% of the embryos showed $[Ca^{2+}]i$ transient. In U73122, phospholipaseC(PLC) inhibitor (5uM, 10min) pretreated group, 33.3% of the embryos showed $[Ca^{2+}]i$ transient. Heparine, inositol 1,4,5-triphosphate receptor(IP_3R) antagonist preinjected embryos showed no response with 1mM Ni^{2+}. In danthrolene treatment, ryanodine receptor(RyR)-antagonist , 43% embryos showed $[Ca^{2+}]i$ transient but they showed delayed response about 340sec in the presence of Ca^{2+}.

Conclusions: Summing up the above results, Ni^{2+} seems to induce Ca^{2+}-release from the Ca^{2+}-store even in the Ca^{2+}-free medium. IP_3 receptors of the mouse 2-cell embryos might have an essential role for the intracellular Ca^{2+} increase by Ni^{2+}.

Key Words: mouse in vitro 2-cell block, intracellualr Ca^{2+} increase, Ni^{2+}, IP3 antagonist, ryanodine receptor antagonist

몇몇 포유동물의 수정란을 체외에서 배양할 때 동물 종에 따라 특정시기에 발생이 정지되는 발생 정지현상이 일어나는데, 생쥐의 경우 그 시기가 2-세포기이므로 2-cell block이라 한다. 이 현상을 규명하기 위한 여러 연구에 따르면, 생쥐에서의 2-cell block 현상은 그 시기가 발생 과정 중 난자로부터 유래된 모계 유전적 조절(maternal genomic control)에서 배아 유전적 조절(embryonal genomic

주관책임자: 배인하, 우)136-742 서울 성북구 동선동 3가 249-1, 성신여자대학교 자연과학대학 생물학과
Tel: (02) 920-7171, FAX: (02) 927-5565, e-mail: ihbae@sungshin.ac.kr
* 본 연구는 2001학년도 이세웅박사 학술진흥연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

control)로 바뀌는 2-세포기로, 이는 체외 배양조건이 embryonic genome activation을 저해하거나 충족시켜 주지 못하는 데에 기인된다.[1,2] 즉, non- blocking strain과 blocking strain의 생쥐의 역교배 실험결과 2-cell block 현상은 모계 조절 현상임을 알 수 있고 [3], blocking strain 수정란에 non-blocking strain 수정란의 세포질을 미세주입 시 포배기까지 발생이 가능하므로 수정란의 세포질에 2-cell block을 극복할 수 있는 물질이 존재함을 알 수 있다[4].

이와는 달리 체외배양조건이 체내의 환경을 충족시켜 주지 못하여 배발생이 저해된다는 보고도 있다. Whittingham[5] (1968)이 생쥐 수정란을 생쥐 난관(ampulla region)에서 기관배양함으로써 포배기로의 발생에 성공한 이래 난관 상피 세포 등 다른 체세포를 이용한 co-culture system으로 2-cell block 이 극복되었다.[6] 또 배양액내의 여러가지 조성 성분이 배발달을 저해한다는 보고도 있다. Schini 와 Bavister[7] (1986)에 의하면 햄스터의 수정란 체외배양에 포도당과 인산은 초기 발생을 저해하며 이는 생쥐의 경우에도 마찬가지로 보고 되었다.[8] 이외에도 배양액내의 hypoxanthine[9], hydrogen peroxide와 superoxide radical[10] 이 저해효과를 주므로 이들을 배양액에서 제거함으로써 배 발생에 성공하였다.[11,12]

세포의 대사과정에서 Ca^{2+}는 매우 중요한 요소로 인정되고 있다. 세포의 생존을 위한 여러 가지 대사과정에서 효소의 activator로써, 신경세포에서 신경 전달 물질 분비과정, 근육세포의 수축과정 및 action potential에 직접적으로 참여하고 있다. 또 체세포 분열 및 생식세포의 감수 분열에서 세포분열의 조절 등 세포 내 신호 전달에 중요한 역할을 한다.[13,14] 이러한 여러 가지 역할 때문에 Ca^{2+}는 세포의 신호 전달 체계(cellular signal transduction)에서 2차 전령물질(second messenger)로 불리고 있다.[15] 이러한 세포 내 Ca^{2+}의 역할 규명을 위한 연구가 여러 방면에서 여러 방법으로 현재 활발히 진행 중이다.

세포 분열 중 세포분열 중기에서 딸세포가 형성될 때까지 세포질 내 Ca^{2+}농도가 증가하고 이 현상은 세포 주기 동안에 반복적으로 일어남이 증명되었다.[16,17] 생식 세포인 난자의 성숙과 수정 후에도 이 현상은 나타난다. 성게 수정란의 핵막 붕괴(nuclear envelope breakdown) 및 염색질 응축(chromatin condensation)이 일어날 때 세포질 내의 Ca^{2+} 증가 현상이 일어나며, 이때 Ca^{2+}-chelator인 ethylenebis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid(EGTA) 나 ethylenedioxybis(o-phenylenenitrilo)tetraacetic acid (BAPTA) 등을 세포 내로 미세 주입하면 핵막 붕괴 및 염색질 응축 현상이 일시적으로 중지된다.[16] 또 성숙된 난자가 정자의 침투 없이도 세포질 내 Ca^{2+}을 미세주입 하거나 세포 내 Ca^{2+} 증가를 유발하는 Ca^{2+}-ionophore를 처리하여 세포질 내 Ca^{2+}의 증가를 인위적으로 유도하면 정상적인 수정을 일으킨 난자와 동일한 일련의 수정 반응이 일어난다.[13,17]

세포내에 일시적인 Ca^{2+}증가와 감소 현상(Ca^{2+}-oscillation)은 미성숙 동물 난자의 성숙이 재개될 때도 일어난다.[13,16,19,50,51] 또 세포분열 중 중기에서 딸세포 형성되는 말기까지 반복적으로 일어나는데, 특히 중/후기 전환에서 나타나는 Ca^{2+}증가가 후기를 유도한다.[18,20] inositol 1,4,5-triphosphate receptorgated Ca^{2+} pool의 고갈(depletion)은 세포 주기의 G0/G1phase와 S phase 에서 정지현상을 유도한다. 또 voltage-dependent L-type Ca^{2+}-channel과 N-methyl-D-aspartic acid(NMDA) receptor로 유입된 Ca^{2+}이 DNA-조절요소를 통해 전사를 개시한다. 그리고 Whitaker 와 Patel[15]에 의하면 세포 주기동안 일어나는 Ca^{2+}증가는 세포 주기 조절인자인 p34 와 cyclin의 합성, 인산화과정과 파괴를 조절하여 세포 주기에 관여한다고 한다.

hCG 주사후 30-33hr 에 얻은 생쥐의 수정란과 초기 2세포 배는 체외배양중 배양액내의 Ca^{2+}를 절대적으로 요구하는 반면, 46-48시간에 얻은 후기 2세포 배는 배양액에 Ca^{2+}가 제거된 상태에서 상실배(morula)를 형성하기 전 48시간 동안 발생한다.[21] 또 Abramczuk[22]에서 2-cell block overcome 효과를 보인 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)가 Ca^{2+}과 Mg^{2+} 등의 2가 이온 chelator로 작용하지만 세포내로는 투과하지 못하며, Suzuki 등[23]과 Fissore[24]의 연구에서는 EDTA를 생쥐 수정란의 위황강(perivitelline space)에 미세주입한 결과 2-cell block 현상이 극복되었다. 위의 보고들을 종합해 볼 때 생쥐 초기 2-세포배의 생존에 배양액내의 Ca^{2+}이 절대적으로

요구되며 처리된 EDTA는 세포막에 존재하는 Ca^{2+}-channel이나 pump에 작용하였거나 세포막에 어떤 영향을 줌으로써 Ca^{2+} signal transduction을 유도하였다고 볼 수 있다. Bae 와 Yoon[25]에서 사용된 Ca^{2+}-channel blocker인 Cd^{2+}와 Ca^{2+}-agonist 인 Ba^{2+}와 Sr^{2+}는 처리된 농도에 따라 약한 overcome effect를 보이면서 embryo의 viability를 증가시키고 있다. a^{2+}-channel blocker인 Ni^{2+}이 매우 강한 overcome effect를 보이는 점을 볼 때 생쥐 초기배에서 나타나는 2-cell block 현상은 배양액내의 Ca^{2+} ion과 밀접한 관계가 있다고 추정된다.

Hormone, growth factor, other agonists 등의 외부 자극은 세포막에 존재하는 G-단백질을 경유하여 inositol triphosphate (IP_3) 와 diacylglydcerol(DAG)를 만들며 증가된 IP3는 소포체(endoplasmic reticulum) 등의 intracellular Ca^{2+} store로부터 IP_3-gated Ca^{2+} release channel을 열어 intracellular Ca^{2+} transient를 일으키거나 sarcoplasmic reticulum의 ryanodine receptor(RyR)을 통해 calcium release를 유도한다.[26] 이렇게 증가된 calcium ion은 calmodulin이나 다른 Ca^{2+}-dependent kinase에 결합하여 세포 내 대사를 조절하는 것으로 보인다.

본 연구에서는 생쥐 초기 2-세포배를 inositol triphosphate receptor inhibitor인 xestospongine을 처리함으로써 ER로부터 Ca^{2+} release를 막은 후 Ni^{2+}을 처리하여 $[Ca^{2+}]i$ 증가 현상이 일어나면 ryanodyne receptor를 통한 $[Ca^{2+}]i$ 증가로 판명할 수 있다. 또한 바꾸어서 ruthenium red(ryanodyne receptor inhibitor)를 처리한 후 Ni^{2+}처리하여 $[Ca^{2+}]i$ 증가가 일어날 경우는 IP_3 receptor로부터 Ca^{2+}- release가 일어난다는 증거가 된다. 본 연구에서는 외부 Ca^{2+} 처리없이 Ni^{2+}처리로 $[Ca^{2+}]i$의 기원이 되고 있는지를 밝혀보기로 한 연구이다.

연구 대상 및 방법

1. 실험 동물 및 배의 수집

5-10주된 ICR strain female mouse를 5IU PMSG와 hCG로 과배란을 유도한 후 fertile male과 합사시킨 후 vaginal plug가 확인된 female mouse로 부터 hCG주사 30-33시간에 난관을 채취하여 oviduct flushing으로 배를 수집하여 두개의 전핵과 극체를 가진 수정란과 건강하게 보이는 2-세포배만 수집하였으며 필요에 따라 0.1% hyaluronidase를 사용하여 배의 mucin성분과 난구세포를 제거하였다.

2. 배양 방법

수집된 배는 microdroplet 방법으로 소량의 M2 배양액을 mineral oil (Sigma)로 덮고 이를 37°C가 유지되고 5%의 CO_2와 95% 공기,100%의 습도가 유지되는 배양기에 넣어 4시간 이상 평형시킨 후 배양에 사용한다.

3. 배양액과 처리 물질

모든 실험에 사용된 기본 배양액은 M2 배양액[27]으로 하며 pH는 7.30 -7.40 하고 삼투압은 290-310mOsm 되도록 하였다.

$NiCl_2 \cdot 6H_2O$은 증류수(Milli-Q water, Millipore, USA) 에 녹여 500mM stock 으로 만들어 최종 농도가 1000μ, 100μ, 50μ, 10μ 으로 되게 사용하였다. inositol-triphosphate receptor(IP_3R) antagonist인 xestospongin (XeC, Calbiochem)은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 1mM 농축액을 만들어 최종 농도 10uM로 기본 배양액에 희석하여 30분간 처리하였다. 다른 종류의 IP_3R receptor antagonist로 사용된 heparin (Mw= 4,000 Da)은 증류수에 4.5mg/ml 농도로 미세주입 후 30분 간 배양하여 사용하였다. Dantrolene (Alomone Labs, Israel)은 1uM로 20분 간 배양한 후 사용하였다. Phospholipase C(PLC)의 저해제인 U73122는 DMSO에 녹여 2mM 농축액으로 냉동 보관하였으며 사용 직전에 배양액으로 희석하여 최종 농도 5uM로 5분간 처리하였다. Protein kinase C (PKC) 저해제인 sphingosine (Sigma)은 10uM을 10분간 처리하였다. 세포질 내 Ca^{2+}-chelator인 ethylenedioxybis(o-phenylenenitrilo)tetraacetic acidacetoxylmetyl ester(BAPTA-AM)을 20uM로 20분간 처리하였다.

4. 공초점 현미경(confocal laser scanning microscope)을 이용한 난자 내 calcium 농도 측정

살아있는 상태의 난자를 관찰하기 위해 본 실험실에서 고안된 배양 접시를 70% EtOH와 증류수

(Milli-Q)로 세척하였다. 배양접시 밑에 vaselin: paraffin oil (=20:1)를 조심스럽게 구멍 주위로 얇게 도말하고 깨끗하게 세척된 cover glass를 구멍 밑으로 밀착시킨 후 cover glass에 안쪽에 난자의 움직임을 막기 위해 Cell-Tak (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)를 아주 소량(1-2$\mu\ell$) 정도 도말한 후 건조시켰다.

세포 내 Ca^{2+}-indicator인 fluo 3-AM (acetomethyl type, F-1042, Molecular Probe)을 DMSO에 1$\mu g/\mu\ell$로 녹여 냉동 보관 후 사용 직전에 녹여서 최종 농도가 5μ l이 되도록 M16배양액에 처리하여 45분-1시간 정도 배양하였다. 이때 배양액 내의 산도(pH) 지시제인 phenol red는 제거하여 사용하였다. 배양이 끝난 난자는 M2배양액으로 3회 이상 세척하여 난자 내로 들어가지 못한 fluo 3-AM을 제거하였다. 관찰에 사용되는 배양액은 난자가 Cell-Tak에 잘 붙어 있도록 하기 위해 배양액내의 BSA가 제거된 BSA-free M2 배양액을 사용하며 난자의 마지막 세척은 0.01%의 BSA 함유된 M2 배양액을 사용하였다.

제작된 배양접시에 50$\mu\ell$의 M2-BSA 배양액을 준비한 후 난자를 세척하여 조심스럽게 Cell-Tak이 도말된 위치에 난자를 놓고 현미경으로 관찰 하였다. Fluo 3-AM에서 배양된 난자의 최초 세척에서 현미경까지 2-3분이 넘지 않도록 주의하였다. 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화를 유도하는 화학 물질의 처리는 10X 농축된 용액을 준비하여 scan을 시작한 후 일정 시각에 배양액에 직접 주입하였다.

공초점 현미경은 IX 70 형광 도립현미경(fluorescence inverted microscope)에 laser가 부착된 Fluoview (Olympus, Japan)를 사용하였다. Fluo 3-AM에 의한 세포내 calcium 농도 변화를 관찰하기 위해 488nm excitation argon laser, 510 nm long pass emission filter (BA 510F)를 사용하였다. FV 200 (Olympus, Japan) program으로 XYT series scan을 실행하여 20x (N.A 0.70) 대물렌즈를 사용하여, 5초 간격으로 250초- 495초 동안 scan (512 x 512 pixel)하였으며 scan시 동일한 background로 얻기 위해 매 실험 시 동일한 photo multiplier tube (PMT) value로 조절 하였다. 각 난자의 단위 면적당 relative fluorescence intensity를 시간의 진행에 맞추어 image analysis (series analysis; FV 200, Olympus, Japan)를 실행한 후 평균값을 구했다.

5. 미세주입 (Microinjection)

Intracellular Ca^{2+}-modulator 중에서 세포막의 투과가 불가능한 물질, heparine, inositol tri-phosphate (IP3)은 micromanipulator를 이용하여 미세주입 하였다. 본 실험에 사용된 도립 현미경 (IX70, Olympus)에 부착된 micromanipulator는 Narishige의 Model을 사용하였으며, injector는 난자마다 동일한 양을 주입하기 위해 picoinjector인 IM-300 (Narishige)를 사용하였다. Micropipette은 borocilicated glass tube (P-2174, Sigma)를 micropuller (P-97, Sutter instrumnet)와 microforge (MF-90, Narishige), 그리고 microbeveller (RI)를 사용하여 제작하였다.

6. 통계처리

대조군과 실험군의 통계적 유의성 검정은 spss/pc^{+} (version 8.0)을 이용하여 mean ± SEM을 구해 Student's t-test 하였다.

결 과

1. $NiCl_2$가 생쥐 2 - 세포배 체외배양에 미치는 영향

과배란 유도된 생쥐 암컷을 hCG 주사 30-33시간에 초기 2-세포배를 수집하여 체외에서 배양하면서 배양액내에 Ni^{2+}를 농도별로 처리하여 72기간 동안 배양한 결과는 Figure 1과 같다. 대조군은 전체 79개의 배에서 2-cell block을 극복하지 못한 2-세포기가 22개로 27.8%(22/79), 3-8세포기가 20개로 25.3%(20/79), 2-cell block을 완전히 극복한 상실배와 포배가 6개로 7.6%(6/79)였다. 그러나 50μ 의 $NiCl_2$을 처리한 군은 전체 83개의 배에서 상실배와 포배가 54개로 66.3%(54/83)였다. 또 100μ l의 $NiCl_2$ 처리군에서는 80개 중에서 67.5%(53/80)의 상실배와 포배를 보여 50μ 처리군과 비슷한 결과를 보였다. 그러나 500μ 처리군은 82개 모두가 배양 48시간에 91.5%(75/82개)가 정지된 2세포기 상태에서 퇴화되어 대조군 10.1%(8/79개)의 퇴화율과 비교할 때 유의한 차이를 보여 준다(P<0.001). 퇴화된 배는 세모막이 파손되고 세포질에 비정상적인 액포가

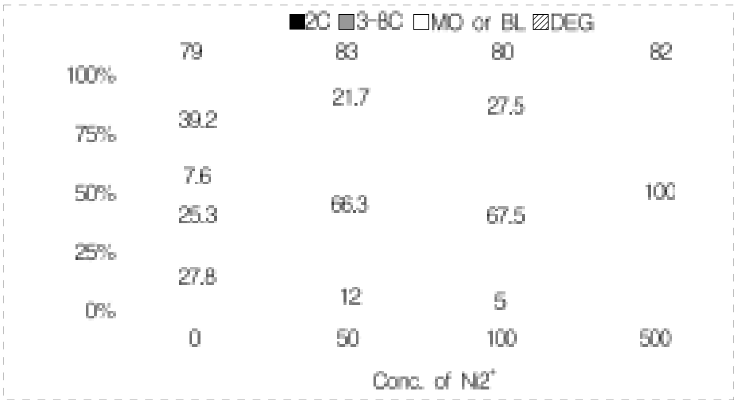


Figure 1. Effect of various concentration of $NiCl_2$ on the in vitro development of the mouse early 2-cell embryos cultured for 72hrs. Mouse embryos were cultured in the presence of various concentration of $NiCl_2$. *, Percentages of the beyond the 2-cell stage embryos significantly differs from the control ($p<0.001$). **, Percentage of degenerated embryos significantly differs from the control ($p<0.0001$). The above results were obtained by pooling of six replicates. 2C; 2-cell, 3~8C; 3~8-cell, MO; morula, BL; blastocyst, DEG; degenerated embryos.

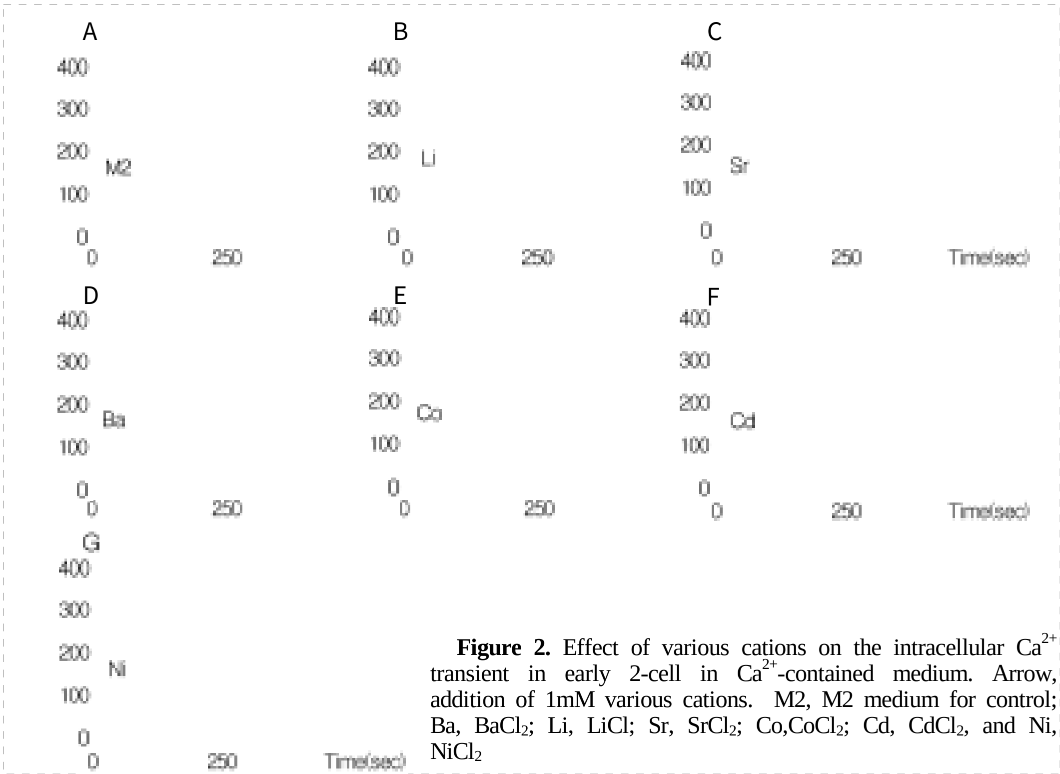


Figure 2. Effect of various cations on the intracellular Ca^{2+} transient in early 2-cell in Ca^{2+}-contained medium. Arrow, addition of 1mM various cations. M2, M2 medium for control; Ba, $BaCl_2$; Li, LiCl; Sr, $SrCl_2$; Co,$CoCl_2$; Cd, $CdCl_2$, and Ni, $NiCl_2$

형성된 후 응축되면서 퇴화되었다.

2. 초기 2 - 세포배 세포 내 Ca^{2+}농도 변화에 미치는 Ni^{2+} 이온의 영향

Ni^{2+}를 포함하여 여러 가지 Ca^{2+}channel blocker를 처리하면서 공초점 현미경을 이용하여 세포내 Ca^{2+}의 농도 변화를 조사하였다(Figure 2). Figure 2 A는 공초점 현미경으로 세포 내 Ca^{2+}를 측정하면서 여러 가지 물질을 처리할 때 생기는 물리적 자극의 영향을 조사한 결과이다. 기본 배양액인 M2 배양액을 대조

군으로 첨가하였을 때 Ca^{2+} 농도 변화에는 영향을 주지 못했다. Ni^{2+}을 처리하여 세포질 내 Ca^{2+} 농도 변화를 측정하였다. 75.7%(258/341)의 배에서 Ca^{2+} 농도가 증가되었으며, 증가된 fluo-3AM의 fluorescence intensity는 1185±26이었다. Ba^{2+}은 13개의 배에서 6개의 배에서 Ca^{2+}의 농도가 증가되었으며(46.2%, 6/13), Co^{2+}는 (72.7%, 32/44), Cd^{2+}(83.3%, 15/18)의 배에서 Ca^{2+}증가가 관찰되었다. 그러나 Li^{+}과 Sr^{2+}의 경우에는 각각 12개 25개에서 M2 배양액을 처리한 군과 마찬가지로 Ca^{2+}의 농도 변화가 관찰되지 않았다. Ni^{2+}의 첨가로 증가되는 Ca^{2+}의 농도 변화는 Figure 3.에서와 같이 2-세포 배마다 그 증가량과 증가되는 시기에서 매우 다른 양상을 보였다.

생쥐 2-세포 배에 Ni^{2+}처리로 나타나는 Ca^{2+}의 농도 증가가 세포 내 혹은 세포 외에서 유래한 것인가를 조사하기 위해 Ca^{2+} 농도를 측정할 때 배양액내 Ca^{2+}를 제거하고 2mM의 EGTA를 첨가하였다. Figure 4에서와 같이 Ca^{2+}가 함유된 군은 75.7%(258/341)에서 Ca^{2+}가 증가되었고, Ca^{2+}-free+2mM EGTA 처리군에서도 69.8%(30/43)가 Ca^{2+} 증가 현상을 보였다.

Figure 3. Effect of Ni2+ on the $[Ca^{2+}]i$ of mouse early 2-cells embryos in control medium. Total tested embryos were 31 embryos. Arrow, addition of 1mM Ni2+.

Figure 4. 1mM Ni^{2+} addition induced $[Ca^{2+}]i$ transient in Ca^{2+}-contained medium or Ca^{2+}-free medium (2mM EGTA contained). Arrow, addition of 1mM Ni^{2+}.

3. Ni^{2+}에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가에 미치는 여러 가지 세포 내 Ca^{2+}조절 물질 (intracellular Ca^{2+} modulator)의 영향

생쥐 초기 2-세포 배에서 Ni^{2+}처리로 유도되는 Ca^{2+}의 농도 증가가 어떤 경유로 유도되는가를 조사하기 위해 여러 가지 세포 내 Ca^{2+} 조절물질(intracellular Ca^{2+} modulator)를 사용하였다. Phospholipase C(PLC)의 저해제인 U73122를 5μl 농도로 10분간 처리한 후 공초점 현미경으로 Ca^{2+}농도를 측정하면서 Ni^{2+}를 처리하였다(Figure 5). DMSO처리군은 U73122를 녹이기 위해 사용된 용매로 0.5% DMSO를 대조군으로 사용하였다. U73122처리군에서 33.3%(48/114)가 Ca^{2+}농도 증가를 보였으나 66.7%(96/114)는 Ni^{2+}처리시 아무런 변화를 보이지 않았다. PKC 저해제인 sphingosine을 10μl로 20분동안 배양한 후 동일한 방법으로 세포질

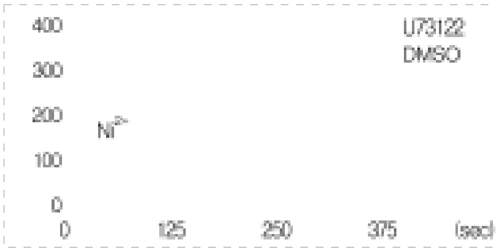


Figure 5. The effect of U73122 (PLC inhibitor, 5uM) on the Ni^{2+} induced $[Ca^{2+}]i$ transients. Ni^{2+} addition was 50 sec. DMSO was solvent of U73122, used 0.5%. Early 2-cell embryos were cultured in control medium or U73122 contained medium (5uM, 10min).

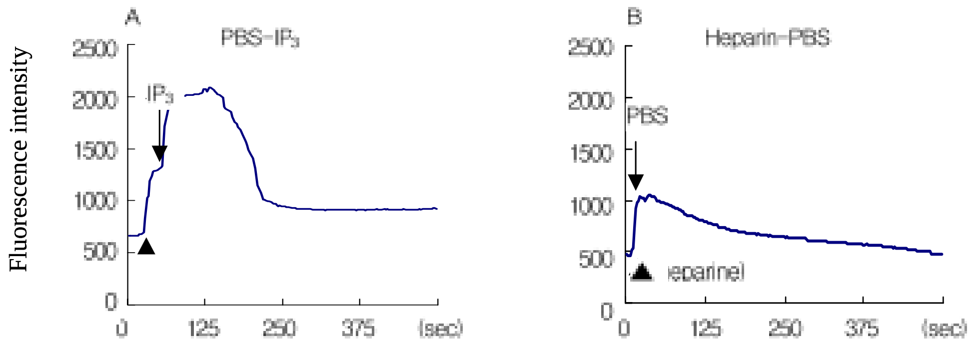
Figure 6. The effect of sphingosine (PKC inhibitor, 10uM) on the Ni^{2+} induced $[Ca^{2+}]i$ transients. Ni^{2+} addition was 50 sec. Early 2-cell embryos were cultured in control medium or sphingosine contained medium (10uM, 20min).

내 Ca^{2+} 농도 변화를 측정하였다. 41개의 초기 2-세포기 배 모두에서 Ca^{2+}의 농도 변화가 나타나지 않았다(Figure 6).

세포 내 소기관인 소포체(endoplasmic reticulum, ER)의 막에 있는 inositol tri-phosphate receptor(IP3R)를 저해하여 소포체에 저장되어 있던 Ca^{2+}의 분비를 저해하는 시약으로 heparine과 xestospongin C (XeC)를 사용하였다. Heparine(MW 4000)을 미세 주입하였으며 주입된 heparine의 기능 여부를 확인하기 위해 IP3R을 자극하는 IP3(MW 648.6)를 heparine이 주입된 수정란에 미세 주입하였다 (Figure 7). Heparine에 대한 대조군으로 용매로 사용된 PBS를 heparine 대신 미세 주입하였다. 각 처리 물질을 함유한 미세주입 피펫이 세포막을 통과하는 순간 세포질내 Ca^{2+}이 급격히 증가되었다 (Figure 7. A, B, & C). 세포질내로 주입된 피펫으로 IP3가 주입되면 Figure 7. A에서와 같이 2차적으로 Ca^{2+}의 증가가 나타나지만 heparine이 미리 주입된 수정란에서는 IP3가 주입되어도 세포질 내 Ca^{2+}의 농도 증가 현상은 관찰되지 않았다 (Figure 7. C). 이 실험으로 미리 주입된 heparine이 IP3R의 저해제로 작용고 있음이 확인되었다. Heparine이 미리 주입되어 20분간 배양된 수정란 및 초기 2-세포 배를 Ca^{2+}의 농도를 측정하면서 1mM Ni^{2+}를 세포 외에 처리하였다. Figure 8에서와 같이 대조군인 PBS 미세 주입군은 다른 실험에서와 같이 92.7%(115/124)가 Ca^{2+} 농도 증가를 보였지만, heparine 미세 주입군은 6.1%(2/33)만이 Ca^{2+}농도 증가를 보였다.

또 다른 IP3R antagonist인 xestospongin은 DMSO를 용매로 하여 10uM을 20분 처리후 Ni^{2+}를 처리하였으며, 대조군은 용매로 사용된 1% DMSO를 20분간 처리하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 DMSO는 다른 실험에서 대조군인 기본 배양액과 큰 차이를 보이지 않았다. IP3R 저해제인 xestospongin 처리군은 62.8%(98/148)의 배에서 Ca^{2+} 농도 증가를 보였다. 이는 다른 실험의 대조군인 기본 배양액 처리군과 비교할 때 큰 차이를 보이지 않고 있다(Figure 9).

세포 내 Ca^{2+} 조절물질인 dantrolene은 소포체 막에 존재하는 ryanodine receptor를 통해 세포질로의 Ca^{2+} 분비를 저해하는 시약이다. 본 실험에서는



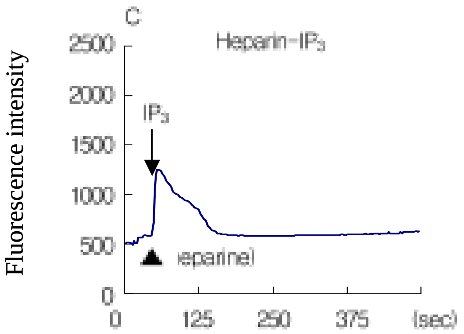


Figure 7. Effect of IP_3(250nM) or PBS injection(▼) on the $[Ca^{2+}]i$ of mouse zygote. Zygotes were pre-microinjected PBS or Heparine(1mg/ml) before 20min. (▲), micropipette injected through oolemma

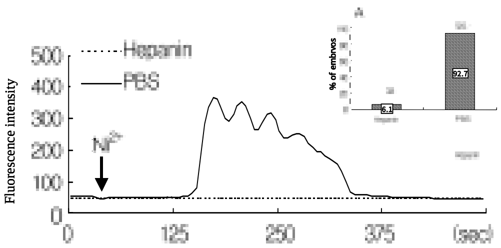


Figure 8. The effect of heparine(IP$_3$ receptor antagonist, 4.9mg/ml) on the Ni^{2+} induced $[Ca^{2+}]i$ transients. Ni addition was 50 sec. PBS injected embryos, heparine injected embryos, A : Percentage of the responsed embryos by Ni^{2+} addition, ( ): total treated embryos.

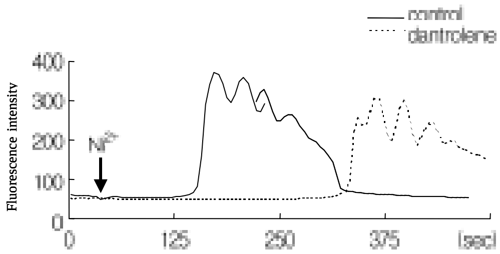


Figure 10. The effect of dantrolene (Ryanodine receptor antagonist, 1uM) on the Ni^{2+} induced $[Ca^{2+}]i$ transients. Ni addition was 50 sec. Early 2-cell embryos were cultured in control medium or dantrolen contained medium (10uM, 20min).

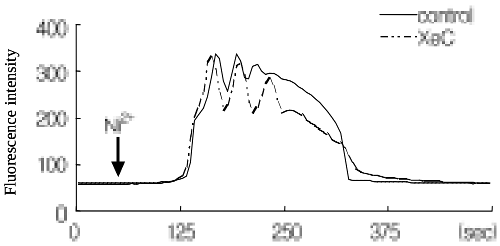


Figure 9. The effect of xestospongin (IP$_3$ receptor antagonist; XeC) on the Ni^{2+} induced $[Ca^{2+}]i$ transients. Ni addition was 50 sec. Early 2-cell embryos were cultured in control (1% DMSO contained) medium or XeC contained medium (10uM, 20min).

10uM을 20분간 전처리 후 Ca^{2+}의 농도 변화를 측정하였다. Dantrolene이 전 처리된 초기 2-세포 배는 78.1%(43/55)의 배에서 Ca^{2+} 농도 증가가 관찰되었다. 그러나 반응을 나타낸 초기 2-세포 배 43개 모두가 대조군에 비해 매우 늦은 반응을 보였다. 대조군의 경우 Ni^{2+}가 처리 된 후 143.5초(±2.0)이였으나 dantrolene 처리군은 291.7초(±4.9)로 대조군에 비해 약 150초가 늦은 반응을 보였다(Figure 10).

고 찰

생쥐 초기 2- 세포 배를 체외에서 배양할 때 관찰되는 "in vitro culture block" 현상은 체외 배양 조건이 체내 발생 조건을 충족시켜 주지 못하는데서 나타나는 현상이라고 볼 수 다[25]. Abramczuk 등[22]에서 배의 정지 현상에 극복 효과를 보여준 EDTA가 칼슘 등의 2가 이온 chelator이며 ^{14}C-labeled의 EDTA를 처리하여 초기배를 배양한 결과 세포질내로의 유입은 보이지 않았다. 또한 Suzuki 등[26]은 108μ의 EDTA가 처리된 배양액을 세포질에 미세 주입한 실험 결과 4세포기 이상의 배의 발생이 92%에 이르렀고 Fissore등[24]의 위황강으로의 미세주입 결과 얻어진 발생 정지 현상의 극복 효과는 Abramczuk 등[22]의 주장과는 달리 EDTA가 단순한 배양액내의 metal ion chelator가 아님을 알 수 있다. 그러므로 위의 실험들에서 보인 극복 효과는 EDTA가 세포질이나 세포막의 칼슘-channel 또는 칼슘-pump등에 작용하였거나 세포막에 signal transduction을 일으켜 세포질내 칼슘의 농도가 증가함으로써 세포 분열의 재개를 일으키고 있음을 보여주고 있는 것이지 Abramczuk 등[22]이 주장했던 것처럼 중금속의 chelator 작용으로서 2-cell block이 극복되는 것은 아니었다. 한편 세포막에 있는 Ca^{2+}-channel bloker인 Ni^{2+}이 미량으로 배양액에 첨가된 경우 "in vitro culture block" 현상이 극복되었다.[25]

본 실험에서는 배양액에 첨가된 Ni^{2+} 이 세포내 Ca^{2+}농도 증가 현상을 유도하며 이때 증가되는 Ca^{2+}의 기원을 확인하고자 하였다. Figure 1은 Bae와 Yoon[25]와 유사한 결과를 보여 주고 있으며, Bae와 Yoon[25]에서 배양액에 처리된 여러 가지 양이온을 처리하면서 세포내 Ca^{2+} 농도 변화를 조사하였다. Ca^{2+} 저해제인 Co^{2+}은 생쥐의 Leydig cell의 steroidogenesis를 저해하며[28], 골격 골화 과정(skeletal ossification)과 배아와 태아의 발달을 지연시킨다.[29]

또 생쥐 배아의 체외 배양 중 부화 및 영양세포층의 outgrowth에는 영향을 미치지 않지만 ICM 형성에는 영향을 준다[39]. 본 실험에서는 Co^{2+}의 처리로 세포질 내 Ca^{2+}의 농도가 급격히 증가함을 알 수 있다 (Figure 2. E). Cd^{2+}는 Paskey등[30]은 Cd^{2+}가 2-세포 배에는 저항성을 보이지만 배의 발달이 진전되면서 저항력은 낮아져 상실배 이후에는 쉽게 퇴화된다고 하였다. Bae 와 Yoon[25]에서도 10^{-2}uM 처리군에서 72시간 배양이 지속되어도 건강한 상태의 2-세포 배의 비율이 매우 높다. 본 실험에서는 Co^{2+} 보다 더욱 높은 Ca^{2+} 증가를 보이고 있다 (Figure 2. F). Co^{2+}와 Cd^{2+}는 고양이의 부신 수질 세포에서 세포 내 Ca^{2+}를 증가 시켜 catecholamine의 유도를 증가시킨다고 보고한 바 있다.[30] Co^{2+} 와 Cd^{2+}와 같이 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가를 보여주는 Ni^{2+}는 배양 실험에서 "in vitro culture block" 현상을 극복하는 효과를 보였다 (Figure 2. G). 또 Ni^{2+}에 의해 증가되는 Ca^{2+}는 각 배아마다 매우 유사한 양상을 보이고 있다 (Figure 3). 이들 양이온들과는 달리 Ba^{2+}, Sr^{2+} 와 Li+는 Ca^{2+} 농도에 영향을 주지 못하고 있다 (Figure 2. B, C, and D).

"In vitro culture block"을 극복시키면서 세포질 내 Ca^{2+} 농도 증가를 보인 Ni^{2+}를 처리하면서 세포 내에 증가되는 Ca^{2+}의 기원을 조사하고자 여러 가지 화학 물질을 처리하였다. 세포 내에 증가되는 Ca^{2+}는 소포체등과 같은 ER에서 분비되거나 세포막에 있는 Ca^{2+}-channel을 통해 세포 밖으로부터 유입된 결과일 것이다. 본 실험에서는 Ni^{2+}에 의해 증가된 Ca^{2+}의 기원을 조사하기 위해 배양액 내의 Ca^{2+}를 완전히 제거하고 2mM EGTA를 첨가하여 Ca^{2+} 농도 변화를 측정한 결과 Ca^{2+}가 세포 내 소기관에서 분비되고 있음을 알 수 있다(Figure 4).

Hormone, growth factor, other agonists등의 외부 자극은 세포막에 존재하는 G-단백질을 경유하여 inositol triphosphate (IP_3) 와 diacylglydcerol(DAG)를 만들며 증가된 IP3는 소포체(endoplasmic reticulum) 등의 intracellular Ca^{2+} store 로부터 IP_3-gated Ca^{2+} release channel을 열어 intracellular Ca^{2+} transient를 일으키거나 sarcoplasmic reticulum의 ryanodine receptor(RyR)을 통해 calcium release를 유도한다[26]. Figure 5에서 G protein을 통해 활성화 되는 phospholipase C의 저해제 시약인 U73122를 전처리한 후 Ni^{2+}에 의한 Ca^{2+} 농도 변화를 조사하였다.

생쥐 난자에 IP_3나 Ca^{2+}자체를 미세주입 하였을 때 IP_3보다는 Ca^{2+} 주입이 세포 내 반복적인 Ca^{2+}-농도 증가(Ca^{2+}-oscillation)를 유도하고 있다고 보고하였으며[31], Miyazaki[32]는 햄스터 수정란에 IP_3 에 대한 antibody를 미세 주입하였을 때 Ca^{2+}-oscillation이 저해되고 있다고 보고하여 난자 성숙 및 수정 과정에서 일어나는 Ca^{2+}-oscillation의 경로를 조사하였다.[33,34,35] 또 생쥐 난자의 수정시에 나타나는 Ca^{2+}-oscillation은 난자의 성숙 상태에 따라 ionomycin, thapsigargin, ryanodine, 그리고 정자에 대한 반응도가 달라 난자 성숙동안 Ca^{2+}-modulation이 변함을 뒷받침 한다.[36] 소의 성숙된 난자에서도 IP_3과 ryanodine receptor가 존재하고 있음이 밝혀졌으며 Ca^{2+}-modulator를 처리함으로써 Ca^{2+}-transient가 유도되는 것으로 증명되었다.[37] 한편 미성숙 난자의 성숙 과정에서 나타나는 Ca^{2+}-oscillation의 경로를 조사하는 보고에서도 여러가지 Ca^{2+}-modulator를 처리하였을 때, IP_3-induced calcium release (IICR)이 유도되고 있다고 보고하였다.[38] 한편 생쥐 배의 발생 과정에서 PLC-dependent pathway를 통해 세포 내 Ca^{2+}-농도 증가로 포배기 형성이 촉진되며, 이는 IP_3을 통해 이루어진다.[39,40] 미성숙 난자의 성숙 과정에서 관찰되는 Ca^{2+}-oscillation은 U73122를 처리하여 IP3의 분비를 저해하면 나타나지 않는다.[38] 성숙 난자의 경우 PLC gamma(γ)과 beta(β) type이 존재하고 있으며, PLC 저해제인 U73122를 사용하면 정자 혹은 acetylcholine에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가가 저해 된다.[41] U73122는 PLC를 저해하고 그로 인해 IP3의 생성이 저해되고 이어 IP3 수용체를 통한 소포체로 부터의 Ca^{2+}의 분비가 저해된다고 할 수 있다. 또 성숙난자가 정자와 수정과정 중 정자의 세포막에 있는 PLC zeta form이 난자의 Ca^{2+} oscillation을 유도하고 있어 이를 'sperm factor' 로 보고 있다.[42]

본 실험에서도 U73122가 처리된 배들은 Ni^{2+}를 처리하여도 Ca^{2+}의 농도 변화는 관찰 되지 않아 Ni^{2+}에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 증가는 PLC를 경유하고 있음을 알 수 있다.

PLC에 의해 세포막의 phosphatidylinositol(4,5)

bisphosphate (PIP2)로부터 생성된 DAG은 protein kinase C를 활성화시킨다. 돼지 난자가 단위 생식적으로 활성화될 때 PKC는 mitogen- activatied protein kinase를 저해하여 난자의 활성화를 유도한다.[44] 또 사람 난자의 활성화 과정에서 PKC 저해제를 전처리하면 정자에 의한 Ca^{2+}의 증가 현상이 나타나지 않는다.[45] 본 실험에서도 PKC의 저해제인 sphingosin은 처리된 41개의 배에서 Ni^{2+}를 처리하여도 Ca^{2+} 농도 변화를 일으키지 않고 있다. 이런 과정으로 볼때 NI^{2+} 의한 Ca^{2+} 의 농도 변화는 PKC를 통해 이루어지는 것으로 볼 수 있다.

Ca^{2+}이 세포내 소기관으로부터 분비되는 경로를 확인하기 위해 IP3 receptor의 저해제인 heparine을 미세 주입한 후 Ni^{2+}를 처리하였다. Fig 7에서 A는 수정란 세포막을 미세주입용 파이펫의 PBS는 Ca^{2+}가 제거되고 2mM EGTA가 첨가되어 미세 주입용 용액에는 Ca^{2+}가 완전히 제거되었다고 할 수 있다. 따라서 Ca^{2+}의 농도 증가는 stress-induced Ca^{2+} release 로 볼 수 있다.[46] Fig 7 B에서 heparine을 미세주입한 수정란에 IP3를 미세 주입하면 Ca^{2+}가 급격히 증가하므로 본 실험에 사용된 heparine이 IP3 수용체의 저해제로써의 기능을 갖고 있음을 확인하였다. Fig 8에서는 heparin이 미세 주입된 수정란은 Ni^{2+}를 처리하여도 Ca^{2+} 농도가 증가하지 않았다. 따라서 이는 Ni^{2+}에 의해 증가되는 Ca^{2+}는 세포내 IP3 수용체를 경유하여 이루어짐을 알 수 있다.[47,48]

RyR의 저해제인 dantrolene(Dan)은 돼지 골격근 세포의 RyR 1을 저해하여 Ca^{2+} 의 분비를 저해한다.[49] 본 실험에서도 Dan을 전처리 하면 처리하지 않은 군 보다 Ni^{2+}에 대한 반응이 초기에는 나타나지 않다가 느리게 나타났다.

결론적으로 위의 결과를 종합해 볼 때 생쥐 초기 2-세포 배는 Ni^{2+}에 의해 세포질내 Ca^{2+}의 농도가 증가하며 이는 IP3R를 통하여 세포내 소기관으로부터 분비되는 것으로 여겨진다. 이때 증가된 Ca^{2+}가 다른 세포 주기 조절 단백질을 활성화하여 2-cell block이 극복된 것으로 추정된다. 이로서 초기 2-세포기 배에서 일어나는 2-cell block 현상은 세포내 Ca^{2+} 대사 결여로 인한 것이며 Ni^{2+}이 2-cell block overcome에 효과가 있는 것은 세포내 Ca^{2+}저장고로부터 Ca^{2+} 방출을 유도하여 세포질 내 Ca^{2+} 농도가 높아져 이로 인한 세포주기 조절 단백질을 활성화 하여 2-cell block이 극복된다고 추정된다.

참 고 문 헌

1. Flach, G., M.H. Johnson, P.R. Braude, R.A.S. Tayler and V.N. Bolton, 1982. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. EMBO 1: 681-686.
2. Braude P, Pelham H, Flach G, Lobatto R. 1979 Post-transcriptional control in the early mouse embryo. Nature. 282(5734): 102-5.
3. Goddard MJ, Pratt HP 1982. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block'. J Embryol Exp Morphol 73: 111-33.
4. Muggleton-Harris, A., D.G. Whittingham and L. Wilson, 1982. Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. Nature 299: 460-462.
5. Whittingham, D.G., 1968. Development of zygotes in cultured mouse oviducts. I. The effect of varying oviductal conditions. J. Exp. Zool. 169: 391-398.
6. Ouhibi J Hamidi J Guillaud and Y Ménézo 1990. Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. Human Reprod. 5: 737-743.
7. Schini, S.A. and B.D. Bavister, 1986. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. Biol. Reprod. 39: 1183-1192.
8. Chatot, C.L., C.A. Ziomek, B.D. Bavister, J.L. Lewis and I. Torres, 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. J. Reprod. Fert. 86: 679-688.
9. Downs, S.M. and M.P.D. Dow, 1991. Hypoxanthine-maintained two-cell block in mouse embryos: Dependence on glucose and effect of hypoxanthine phospho-ribosyltransferase inhibitors. Biol. Reprod. 44: 1025-1039.

10. Nasr-Esfahani, M. H., J.R. Aitken and M.H. Johnson, 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. Development 109: 501-507.
11. Noda, Y., H. Matsumoto, Y. Umaoka, K. Tatsumi, J. Kishi and T. Mori 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two cell block. Mol. Reprod. Dev. 28: 356-360.
12. Kline D, Kline JT. 1992 Thapsigargin activates a calcium influx pathway in the unfertilized mouse egg and suppresses repetitive calcium transients in the fertilized egg. J Biol Chem. 267(25): 17624-30.
13. Umaoka, Y., Y. Noda, K. Narimoto and T. Mori, 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. Mol. Reprod. Dev. 31: 28-33.
14. Santella L. 1998. The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. Biochem Biophys Res Commun. 244(2): 317-24.
15. Whitaker, M and Patel R 1990. Calcium and cell cycle control. Development 108: 525-542.
16. Steinhardt RA, Alderton JM. 1988 Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo. Nature. 332(6162): 364-6.
17. Tombes, RM. and Borisy, GG. 1989. Intracellular free calcium and mitosis in mammalian cells: Anaphase onset is calcium modulated, but is not triggered by a brief transient. J. Cell Biol. 109: 627-636.
18. Kao JPY, Alderton JM, Tsien RY and Steinhsrdt RA 1990 Active involvement of Ca^{2+} in mitotic progression of swiss 3T3 fibroblaaasts J Cell Biol 111: 183-196
19. Homa ST. 1995 Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. Mol Re prod Dev. 40(1): 122-34. Review.
20. Hepler PK, 1989 Calcium transients during mitosis: observations in flux. J Cell Biol. 109(6 Pt 1): 2567-73
21. Bae IH and Park JH : Studies on the requirements of Ca^{2+} for cell division and Ca^{2+} permeability of plasma membrane of fast dividing mouse embryo cells. Kor. J. Fert. Steril. 1987, 14: 93-100
22. Abramczuk J, Solter D, Koprowski H 1977. The beneficial effect of EDTA on the development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Dev. Biol. 61: 378-383
23. Suzuki, S., S. Komatsu, H. Kitai, Y. Endo, R. Iizuka and T. Fukasawa, 1988. Analysis of cytoplasmic factors in developmental cleavage of mouse embryo. Cell Differ. 24: 133-138.
24. Fissore, R.A., K.V. Jackson and A.A. Kiessling, 1989. Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid. Biol. Reprod. 41: 835-841.
25. Bae IH and Yoon SY : The effect of Ca^{2+} inhibitor on the in vitro 2-cell block of the mouse. Kor. J. Fert. Steril. 1995, 22: 1-10
26. Berridge MJ. 1993 Cell signalling. A tale of two messengers. Nature. 365(6445): 388-9.
27. Hogan B, Beddington R, Constantini F, and Lacy E. 1986. Manipulating the mouse embryo(2nd Edition). Cold spring harbor laboratory press p390.
28. Moger WH. 1983 Effects of the calcium-channel blockers cobalt, verapamil, and D600 on Leydig cell steroidogenesis. Biol Reprod. 28(3): 528-35.
29. Wide M 1984 Effect of short-term exposure to five industrial metals on the embryonic and fetal development of the mouse. Environ Res. 33(1): 47-53.
30. Paksy K, Forgacs Z, Gati I. 1999 In vitro comparative effect of Cd2+, Ni2+, and Co2+ on mouse postblastocyst development. Environ Res. 80(4): 340-7.
31. Peres A. 1990. InsP3 and Ca^{2+}-induced Ca^{2+}-release in single mouse oocytes FEBS 275(1,2); 213-216.
32. Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K, Shirakawa H, Nakanishi S, Nakade S, Mikoshiba K. 1992 Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertili-

zed hamster eggs. Science. 257 (5067): 251-5.

33. Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H, Miyazaki S. 1993. Development of inositol trisphosphate- induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. Dev Biol. 156(1): 69-79.
34. Fissore RA, Robl JM. 1994. Mechanism of calcium oscillations in fertilized rabbit eggs. Dev Biol. 166(2): 634-42.
35. Mehlmann LM, Kline D. 1994. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. Biol Reprod 51(6): 1088-98
36. Jones KT, carroll J and Whttiingham DG 1995 Ionomycin, thapsigargin, Ryanodine, and sperm induced Ca^{2+}-release increase during meioic maturation of mouse oocytes J Biol Chem 270(12); 6671-6677
37. Yue C, White KN, Reed WA and Bunch TD 1995 The existence of inocitol 1,4,5 -triphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes Development 121: 2645-2654
38. Deng MQ, Huang XY, Tang TS and Sun FZ 1998 Spontaneous and fertilization-induced Ca^{2+}-oscilation in mouse immature germinal vesicle-stage oocytes Biol Reprod 58; 807-813
39. Stachecki JJ, Armant DR. 1996 a Regulation of blastocoele formation by intracellular calcium release is mediated through a phospholipase C-dependent pathway in mice. Biol Reprod. 55(6): 1292-8.
40. Stachecki JJ, Armant DR. 1996 b Transient release of calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-specific stores regulates mouse preimplantation development. Development. 122(8): 2485-96.
42. Dupont G, McGuinness OM, Johnson MH, Berridge MJ, Borgese F. 1996 Phospholipase C in mouse oocytes: characterization of beta and gamma isoforms and their possible involvement in sperm-induced Ca^{2+} spiking. Biochem J. 316 (Pt 2): 583-91.
43. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. 2002 PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+}-oscillations in eggs and embryo development. Development. 129(15): 3533-44.
44. Ito J, Shimada M, Terada T. 2003 Effect of Protein Kinase C Activator on Mitogen-Activated Protein Kinase and p34cdc2 Kinase Activity During Parthenogenetic Activation of Porcine Oocytes by Calcium Ionophore. Biol Reprod. [Epub ahead of print].
45. Sousa M, Barros A, Mendoza C, Tesarik J. 1996 Effects of protein kinase C activation and inhibition on sperm-, thimerosal-, and ryanodine-induced calcium responses of human oocytes. Mol Hum Reprod. 2(9): 699-708.
46. Nakao M, Ono K, Fujisawa S, Iijima T. 1999 Mechanical stress-induced Ca^{2+} entry and Cl- current in cultured human aortic endothelial cells. Am J Physiol. 276(1 Pt 1): C238-49.
47. He CL, Damiani P, Parys JB, Fissore RA. 1997 Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. Biol Reprod. 57(5): 1245-5548
48. Parrington J, Brind S, De Smedt H, Gangeswaran R, Lai FA, Wojcikiewicz R, Carroll J. Expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in mouse oocytes and early embryos: the type I isoform is upregulated in oocytes and downregulated after fertilization. Dev Biol. 1998 203(2): 451-61.
49. Zhao F, Li P, Chen SR, Louis CF, Fruen BR 2001 Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. J Biol Chem. 276: 13810-6.
50. Bae IH, Channing CP. 1985 Effect of Ca^{2+}on ping follicular oocyte maturation in vitro. Biol Reprod 33: 79-87
51. parrish JJ, Kim Cl, Bae IH. 1992 Current Conceptes of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo evelopement, Theriogenology 38: 277-296