

## 햄스터 난자에서 관찰되는 내향전류의 성장과 수정후의 변화

한 재 희 · 홍 성 근

경상대학교 의과대학  
(1998년 3월 15일 접수)

### Characteristics of the inward current and its changes following fertilization in hamster eggs

Jae-hee Han, Seong-geun Hong

*Department of Physiology, College of Medicine, Gyeongsang National University*

(Received Mar 15, 1998)

**Abstract** : Voltage-sensitive ion channels contribute to establishment of the cell excitability and the generation of the cellular function. At hamster oocytes in the primitive stage during developing process, an inward current elicited by voltage pulses was found to be carried mainly by  $Ca^{2+}$ . Even at present,  $Ca^{2+}$  channels serve as the most probable route to pass this inward current but there is no evidence of the presence of this channels in eggs. To date, both the characteristic properties and the physiological role in the early stage of development remain unclear. Here we examined the characteristic properties of the inward current and changes in this currents at unfertilized oocytes, fertilized zygotes and two-cell embryos using whole-cell voltage clamp technique.

The inward current carried reportedly by  $Ca^{2+}$  was remained following removing external  $Ca^{2+}$  but completely abolished by further replacement of impermeants such as tetramethylammonium ion ( $TMA^+$ ) or choline<sup>+</sup> instead of  $[Na^+]_o$ . Tetrodotoxin did not affect on this inward current remained at  $[Ca^{2+}]_o$ -free condition. Removal of  $Na^+$  ion out of the experimental solution clearly decreased the current. After adding 2mM  $Ca^{2+}$  to the  $Na^+$ -free media, the inward current was restored. Interestingly, this current carried by either  $Ca^{2+}$  or  $Na^+$  was decreased by the reduction of intracellular  $Cl^-$  concentration, or by  $Cl^-$  channel blockers such as niflumic acid, DIDS and SITS. When  $Cl^-$  concentration was lowered without changes in other ionic components, this inward current was reduced. At fertilized oocytes and two-cell embryos, the inward current carried by  $Ca^{2+}$  and  $Na^+$  was severely reduced. Also  $Cl^-$  component could not be observed.

From these results, the inward current is composed of  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$  component,

suggesting that the channel carrying this inward current is not selective specifically to  $Ca^{2+}$ . During early stage of development, the voltage-sensitive ion current seems not to contribute essentially to the cell cleavage and differentiation. The loss of  $Cl^-$  component after fertilization suggests that  $Cl^-$  may play a role in maintaining the viability of unfertilized ova.

**Key words :**  $Ca^{2+}$  current,  $Na^+$  current,  $Cl^-$  current, fertilization, hamster oocyte.

## 서 론

막전압 의존성 이온통로는 막전압의 변화에 반응하여 개폐가 조절되는 통로로 흥분성 발현과 세포의 고유한 기능발휘에 긴요하다. 신경과 근육과 같은 흥분성 세포에서 잘 확인되어 있는  $Na^+$  통로,  $K^+$  통로 및  $Ca^{2+}$  통로 등과 같은 대표적인 막전압 의존성 이온통로(voltage-operated channel, VOC)는 비흥분성 세포에서도 확인되고 있다<sup>28</sup>. 임파구에서는 tetrodotoxin-sensitive  $Na^+$  통로,  $Ca^{2+}$  통로 및 다양한 종의 막전압 의존성  $K^+$  통로가 관찰되었으며 종양(tumor)세포에서도 막전압 의존성  $K^+$  통로가 보고되어 있다. 흥분성 세포에서의 VOC와 달리 비흥분성 세포에서의 VOC의 생리적 기능은 세포의 종류에 따라 다양하게 표현된다. 종양세포의  $K^+$  통로는 세포증식과 관련이 있으며 상피세포나 혈구세포에서의  $Na^+$  통로와  $Ca^{2+}$  통로는 세포용적 조절에 기여하는 것으로 추측하고 있다<sup>28</sup>.

비흥분성 세포중의 하나인 난자는 분화 이전의 원시 세포로서 이온통로에 대한 정보는 거의 없으나 수정시 햄스터 난자에서 세포내  $Ca^{2+}$  농도의 변화<sup>25</sup>와 반복적인 막전압의 변동<sup>14,26</sup>을 근거로  $Ca^{2+}$ -의존성  $K^+$  전류( $I_{KCa}$ )가 확인되었으며<sup>16,34</sup>, T-type<sup>20</sup>과 유사한  $Ca^{2+}$  전류<sup>9,11,23</sup> 및 delayed rectifier  $K^+$  전류가 보고되어 있다<sup>16,24</sup>. 그러나 이외에도 미수정란에서 분명한 선택성을 지닌 분화된 VOC가 존재하고 있는지 확실하지 않다.

난자는 수정후 활발한 난할과 분화를 거쳐 개체로 발달하는 단세포이므로 적어도 수정 초기까지 세포활동 및 대사에 필요한 구조와 기능을 보유하고 있다고 추측된다. 이러한 난자에서 세포막을 통한 물질교환과 용적 조절 등에 관여하는 이온통로에 관한 것은  $I_{KCa}$  통로를

제외하고는 보고되어 있지 않다. 더구나 햄스터 난자에서 관찰되는 몇 종류의 이온전류를 감당하는 통로가 일반적인 VOC와 같이 뚜렷한 선택성을 보이는 것인지 판단할 수 있는 근거는 불충분하다. 수정이 이루어지지 않을 경우, 일정시간후 기능이 퇴화하는 난자에서 빠른 세포내  $Ca^{2+}$  농도변화와 막전압의 변화가 독립적인 통로의 활성을 통하여 이루어지기 보다는 비선택적 통로를 통하여 두종류 이상의 이온이 전기화학적 경사에 따라 이동하는 것이 에너지 효율면에서 유리할 것으로 판단된다. 특히 mouse 난자에서 관찰되는 막전압 의존성  $K^+$ 의 항전류는  $Ca^{2+}$  내향전류와 같은 경로를 통한 결과로 풀이되고 있다<sup>30</sup>. 이러한 결과는 mouse 난자의  $Ca^{2+}$  전류가 비선택적 VOC를 통하여 이동된다는 것을 시사하고 있다. 따라서 햄스터 난자에서 관찰되는 막전압 의존성  $Ca^{2+}$  전류도 비선택적인 통로를 통한 혼합 전류성분일 가능성이 높다고 생각된다.

최근에 저자들은 햄스터 미수정란에서 관찰되는  $Ca^{2+}$  내향전류의 성상을 조사하여  $Na^+$  성분에 의하여 영향을 받는다는 사실을 관찰하고 이 전류성분이 비선택적인 통로를 통하여 이동할 수 있다는 가능성을 확인하였다. 이러한 가능성을 근거로 본 연구에서는 햄스터 난자의 내향전류 성상을 확인하고 수정전후의 변화를 비교하여 초기 분화과정에서 이 전류가 어떤 역할을 수행하는지 유추하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**햄스터 미수정란, 1-세포기 수정란 및 2-세포기 수정란의 분리 :** 실험동물은 생후 6-8주령의 chinese golden 햄스터를 사용하였다. 오전 5시부터 오후 7시까지 점등하여 햄스터의 생식주기를 일정하게 유지시켰다. 미수

정관을 분리하기 63~68시간전에 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG, Sigma) 20 unit를 복강내 주사하고 48시간만에(세포분리 15~20시간전) human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma) 20 unit를 복강내에 다시 주사하여 과배란을 유도하였다. 난자는 hCG 주사 15~20시간후 분리하였고, 1-세포기 수정란(fertilized zygote)은 hCG 주사후 수컷과 교미를 유도한 후 다음날 아침 질도말을 하여 정자를 확인하고 미수정란과 같은 시간에 1-세포기 수정란을 분리하였다. 분리방법은 햄스터의 경추를 탈구시키고 복강을 열어 유리미세관으로 난구세포(cumulus cell)에 싸여 있는 난자를 수집하여 0.1% hyaluronidase(Sigma, type I-S) 용액으로 실온(20~25℃)에서 난구세포를 제거한 후 10 unit protease(sigma, type VII) 용액으로 투명대(zona pellucida)를 제거하였다. Protease에 의한 세포막 손상을 줄이기 위하여 투명대가 소실되는 즉시 표준용액(NaCl 145mM, KCl 5.4mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, HEPES 5mM, glucose 5mM, polyvinyl pyrrolidone 0.05mM, pH 7.4)으로 3번 이상 세척하여 실험에 이용하였다. 2-세포기 수정란(two-cell embryo)은 hCG 주사후 교미를 유도한 후 hCG 주사 46~50시간만에 경추를 탈구시키고 복강을 열어 난관을 적출한 후 30G needle를 자궁쪽 난관에 삽입하고 난관을 난류하여 2-세포기 수정란을 회수한 후 미수정란과 같은 순서로 2-세포기 수정란을 분리하였다. 분리된 난자는 표준용액에 넣어 4℃에 보관하면서 사용하였다.

**실험용액** : 실험에 사용한 용액은 NaCl 145mM, KCl 5.4mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, HEPES 5mM, glucose 5mM로 조성하였으며, pH는 NaOH로 적정하여 7.4로 맞추었다. 전극내 용액은 KCl 130mM, Mg-ATP 5mM, di-Tris creatine phosphate 5mM, HEPES 5mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EGTA 0.1mM의 조성을 가진 것을 사용하였고, pH는 KOH로 적정하여 7.4로 맞추었다. Ca<sup>2+</sup> 전류를 기록할 때는 세포의 용액의 NaCl을 TMA-Cl(tetramethylammonium chloride)와 TEA-Cl(tetraethylammonium chloride) 20mM을 치환하여 사용하였고, 전극내 용액은 KCl을 Cs-aspartate와 TEA-Cl 20mM로 치환하여 사용하였다. Na<sup>+</sup> 전류를 기록할 때는 세포의 용액의 Ca<sup>+</sup>을 Mg<sup>2+</sup>으로 치환하고<sup>19</sup> NaCl 대신 20mM TEA-Cl를 사용하였다. 세포내 용액은 Cs-aspartate를 주성분으로 하였고, EGTA는 10mM로 증가시켰으며 TEA-Cl 20mM을 함께 사용하였다. Cl<sup>-</sup> 전류의 존재를 확인할 때에는 세포

외 용액의 NaCl을 TMA-Cl과 TEA-Cl 20mM로 치환하고 CaCl<sub>2</sub>은 2mM로 조성하였고, 세포내 용액은 KCl을 주성분(132mM Cl<sup>-</sup>)으로 하는 용액과 K-aspartate를 주성분(22mM Cl<sup>-</sup>)으로 하는 용액을 사용하였다.

**전기적 기록** : 분리한 난자를 도립 현미경 위에 설치된 용기에 옮긴 후 실험용액을 관류시켰다. 실험은 실온(20~25℃)에서 진행하였다. 유리전극은 저항이 0.5~1MΩ인 것을 사용하여 유리전극에 세포막에 접근시키고 -10내지 -20cm H<sub>2</sub>O의 음압을 가하여 giga seal(seal resistance, 500MΩ-1 GΩ)을 형성시킨 후, 음압을 더욱 높여 세포막을 파괴시켜서 whole cell patch를 만들어 실험에 임하였다. 세포막 전류의 기록을 위하여 patch clamp 증폭기(CEZ-2100, Nihon Kodan, Japan)을 통하여 Hamil *et al*<sup>12</sup>과 유사한 막전압 고정법을 시행하였다. Patch clamp 증폭기를 통하여 나온 신호는 digital oscilloscope(CS-8010, Kenwood, Japan)로 관찰하면서 A/D & D/A converter(AXOLAB 1100, Axon Inc, USA)를 사용하여 컴퓨터 모니터에서 관찰함과 동시에 컴퓨터 hard disc에 저장하였으며, 컴퓨터 모니터와 XY plotter(DXY-1300, Roland, Japan)에 재생하여 분석하였다. 세포막의 면적을 나타내는 capacitance는 triangle-wave의 막전압을 줄 때 기록되는 전류를 기록하여 계산하였다<sup>27</sup>.

**통계처리** : 결과는 mean ± SD로 나타내었다. 실험결과와 통계학적 의미는 Student's *t*-test로 검정하였고, p값이 0.05 이하인 경우 유의하다고 판단하였다.

## 결 과

**미수정란의 내향전류** : 햄스터 난자에서 내향전류를 기록하기 위하여 -80mV에 막전압을 유지시키며 30초 간격으로 300ms동안 -60mV부터 50mV까지 10mV 간격으로 저분극 자극을 주었다(Fig 1). 내향전류는 -50mV부터 활성화되어 -30mV에서 최대값을 보이고 +40mV에서 역전되는 종모양의 전류-전압(I-V) 관계를 보였다(Fig 1B). 낮은 막전압에서 활성이 나타나는 내향전류는 Ca<sup>2+</sup> 농도에 매우 의존적이고, Ba<sup>2+</sup>이나 Sr<sup>2+</sup>에 투과성을 보이며, Ca<sup>2+</sup> 통로 차단제인 Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, verapamil 및 nifedipine에 의하여 차단되는 것으로 보아 Ca<sup>2+</sup> 전류로 판단되었다.

이와같은 내향전류는 세포밖의 Ca<sup>2+</sup> 성분을 완전히 제거하여도 일부의 내향전류가 여전히 관찰되었다(Fig 2). 이같은 결과는 내향전류 성분에 Ca<sup>2+</sup> 이외의 다른 이온

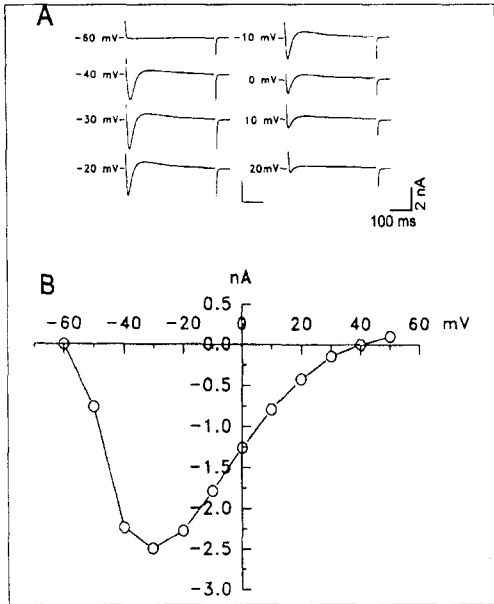


Fig 1. Current traces and current-voltage(I-V) relations of the voltage-activated inward currents in the unfertilized egg of the hamster. A; representative whole cell current traces. B; the I-V relation of inward currents. Step depolarizations of 300ms duration was applied from -60mV to 50mV at every 10mV intervals. Membrane potential was held at -80mV.

전류가 혼합되어 있는 것으로 추측되었다.

내향전류에  $Ca^{2+}$  성분외에 어떤 이온전류가 포함되어 있는지 확인하기 위하여 내향전류의 형태로 나타날 수 있는  $Na^+$  이온전류를 조사하였다.  $Na^+$  전류를 기록하기 위하여  $Ca^{2+}$  성분을 제거한 세포의 용액을 관류시킨 상태에서 저분극 자극에 반응하는 이온전류를 기록하고 각 전류의 최대값을 이용하여 I-V 관계를 구하였다(Fig 2A, 2B). 막전압을 -80mV로 유지시키며 이온통로가 저분극 자극으로부터 충분히 회복할 수 있도록 하기 위하여 30초 간격으로 300ms동안 10mV 간격으로 -60mV부터 50mV까지의 저분극 pulse를 주었다(Fig 2A). 최대  $Na^+$  전류크기는 -30mV에서  $-819 \pm 242pA$  ( $n = 32$ ) 였다. 이 크기는  $Ca^{2+}$  성분을 제거하기 전의 36%에 해당하였다. 전류의 크기는  $Ca^{2+}$  성분을 제거하기 전보다 감소하였으나 (Fig 1B 참조), Fig 2B에 제시된 바와 같이  $Ca^{2+}$ -free 상태에서 구한 I-V 관계는 -60mV에서 활성화 되기 시작하여 -30mV에서 최대값을 보이고 40mV에서 역전되는 등 세포의  $Ca^{2+}$  유무와 관계없이 동일하였다.  $Ca^{2+}$  제거후에도 지속적으로 관찰되는 내향전류 성분이  $Na^+$  성분에 의한 결과인지 확인하기 위하여  $Ca^{2+}$ -free 용액의  $Na^+$  성분 대신 세포막을 투과할 수 없는 tetramethylammonium ion

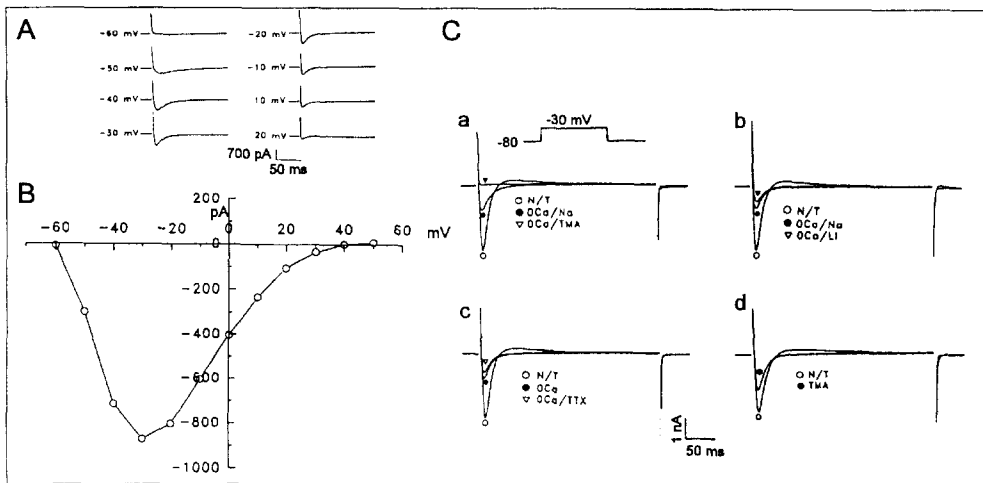


Fig 2. Contribution of extracellular  $Na^+$  on the inward current in unfertilized eggs. A; Representative current traces of  $Na^+$  current components recorded in  $Ca^{2+}$ -free solution. Currents were measured from unfertilized eggs of the hamster. Applied step depolarizations and their protocols were same as shown in Figure 1. B; I-V relation of the  $Na^+$  current components recorded in  $Ca^{2+}$ -free solution. C; Effects of extracellular ions on the voltage-dependent ionic currents. At four panels (a to d), current traces recorded in the normal Tyrode solution (N/T, ○), in the  $Ca^{2+}$ -free Tyrode solution (0 Ca/Na, ●) except panel d, and in both  $Ca^{2+}$ - and  $Na^+$ -free condition (▽). At panel d, current trace obtained from the Tyrode solution replaced by TMA<sup>+</sup>, instead of  $Na^+$  ion(●), was superimposed on to the trace recorded in the normal Tyrode solution. Step depolarization shown as the inset above the panel a was applied to evoke voltage-activated inward currents. These data were collected from the unfertilized egg.

(TMA<sup>+</sup>)이나 choline으로 치환하거나 막전압 의존성 Na<sup>+</sup> 통로 차단제인 tetrodotoxin(TTX)를 처리하고 동일한 저분극 자극에 대한 전류 변화여부를 관찰하였다(Fig 2C). Ca<sup>2+</sup>과 Na<sup>+</sup> 성분이 모두 제거시켰을 때 Ca<sup>2+</sup> 성분이 없을 때에도 관찰되던 내향전류가 모든 전압대에서 완전히 소실되었고(a in Fig 2C), TMA<sup>+</sup>나 choline<sup>+</sup> 대신 Li<sup>+</sup>으로 바꾸어 주면 다시 내향전류 성분이 회복되었다(b in Fig 2C). 그러나 Na<sup>+</sup> 성분에 대한 내향전류는 10 $\mu$ M TTX에 의해서는 거의 영향받지 않았다(c in Fig 2C). TTX 농도를 30 $\mu$ M까지 증가시켜도 그 효과는 비슷하였다. 세포 밖의 Ca<sup>2+</sup>을 정상상태로 조성하고 세포 밖의 Na<sup>+</sup>을 TMA<sup>+</sup>로 치환하였을 때 내향전류는 697 $\pm$ 73pA(n = 10)만큼 감소하였고, choline<sup>+</sup>으로 치환하였을 때는 556 $\pm$ 83pA(n = 10)만큼 감소하였다(d in Fig 2C).

내향전류로 나타날 수 있는 전류로 Cl<sup>-</sup> 전류를 생각할 수 있다. 세포내 Cl<sup>-</sup> 농도를 높게(130mM KCl) 조성하였을 때 내향전류의 최대치는 -2546 $\pm$ 395pA(n = 16)이었고, 세포내 Cl<sup>-</sup> 농도를 낮게(110mM K-aspartate, 20mM KCl) 조성하였을 때의 내향전류의 최대치는 -1857 $\pm$ 220pA(n = 10)이었다(Fig 3). 세포내 Cl<sup>-</sup> 농도가 높을 때 증가하는

내향전류는 세포내 Cl<sup>-</sup> 농도의 증가와 관련이 있을 것으로 보이므로 내향전류에 대한 음이온 운반체 및 전압의존성 Cl<sup>-</sup> 전류 억제제인 niflumic acid<sup>1,2,6,9,15,29</sup>의 효과를 관찰하였다. 내향전류는 10 $\mu$ M niflumic acid에 의하여 663 $\pm$ 156pA(n = 7) 만큼 억제되었고, 농도를 100 $\mu$ M로 증가시켰을 때는 827 $\pm$ 128pA(n = 8) 정도 억제되었으며, 최대치에 이르는 시간과 비활성화 과정이 느려졌다(Fig 3A). 이러한 효과는 모든 전압대에서 보였으며, 전류-전압 관계도 변하지 않았다(Fig 5B).

또 다른 차단제인 100 $\mu$ M DIDS(4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid)와 같은 농도의 SITS(4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid)를 사용하였을 때에도 내향전류가 억제되었다.

햄스터 난자에서 관찰되는 막전압 의존성 내향전류와 이를 전도시키는 이온통로의 역할을 유추하기 위하여 수정전후의 변화를 조사하였다. 특히 수정후 할구분할이 일어나므로 세포막 면적이 변화하기 때문에 세포막의 capacitance의 변화를 함께 측정하고 세포막 면적당 전류의 크기를 관찰하여 수정전후의 변화를 기록하였다.

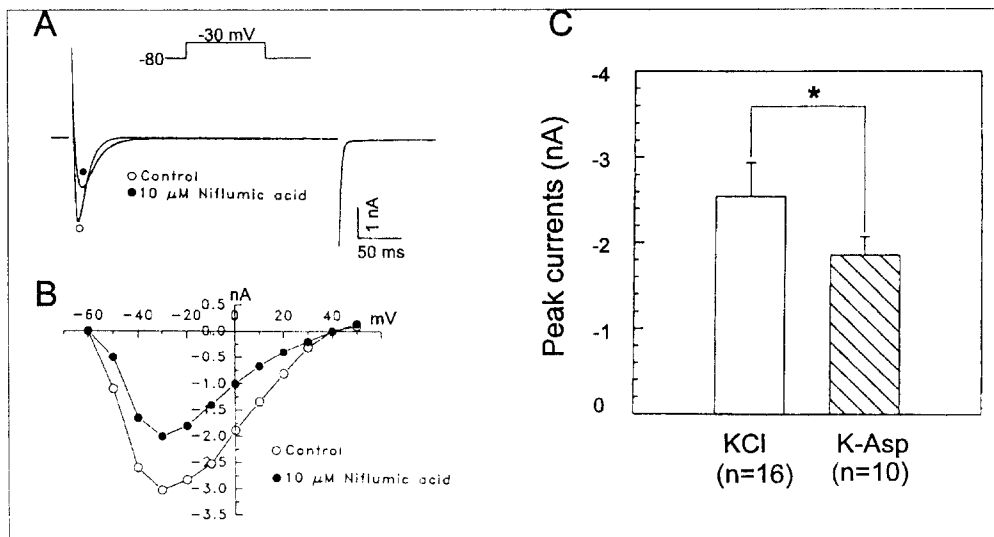


Fig 3. Decrease in the inward current by reducing chloride concentration. A; effect of niflumic acid on the inward current. Representative current traces recorded before(○) and after(●) applying 10 $\mu$ M niflumic acid was superimposed. B; I-V relation of the inward currents before(○) and after(●) applying 10 $\mu$ M niflumic acid. C; decrease in peak current by reducing the intracellular Cl<sup>-</sup> concentration([Cl<sup>-</sup>]). By substituting 120mM potassium aspartate(K-Asp) for 120mM KCl, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> was significantly lowered to 22mM from 132mM(\*, p < 0.05). Numerics in parenthesis indicates the number of observation.

Capacitance의 측정: 전기적으로 콘덴서(capacitance) 성질을 갖고 있는 세포막은 단위면적당 일정한 용량을 나타내고 있으므로 수정전후의 세포막 면적의 변화를 확인하기 위하여 Moody & Bosma의 방법<sup>27</sup>으로 capacitance 값을 조사하였다. 미수정란은  $734 \pm 81 \text{pF}$  (n = 16), 1-세포기 수정란에서는  $470 \pm 67 \text{pF}$  (n = 19) 그리고 2-세포

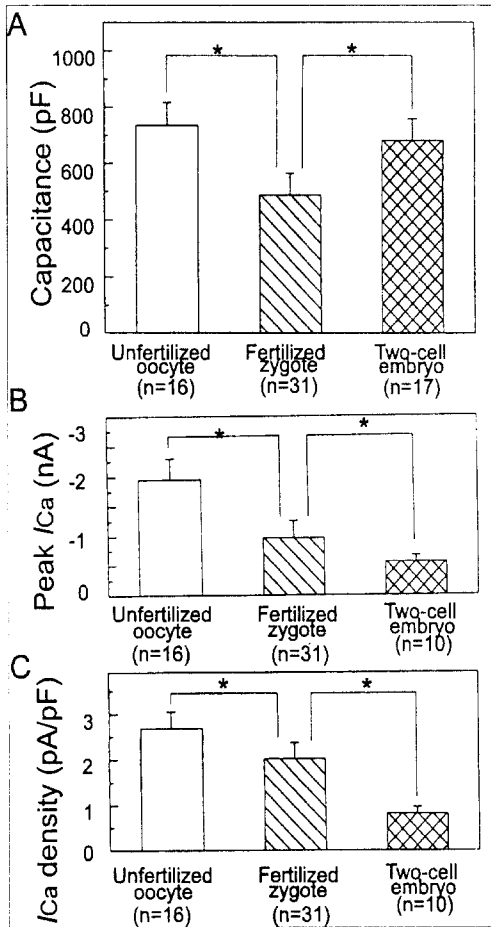


Fig 4. Changes in membrane surfaces and inward currents after fertilization. A; the reduced membrane capacitance ( $C_m$ ) after fertilization. B; Peak currents before (open bar) and after fertilization (bar in middle, fertilized, zygotes and bar in right, two-cell embryos, respectively). C; changes in inward current densities before and after fertilization. Current amplitudes divided by the measured  $C_m$  was calculated as the current densities. Adopted current amplitudes used in this figure were obtained from peak amplitudes evoked by  $-30 \text{mV}$  step depolarization from holding potential of  $-80 \text{mV}$ . Asterisks represent the significant difference ( $p < 0.05$ ) between two groups.

기 수정란에서는  $682 \pm 75 \text{pF}$  (n = 17))의 capacitance 값이 측정되었다(Fig 4A). 이 값을 근거로 미수정란의 1-세포기 수정란에서 감소되었다가 2-세포기 수정란에서 다시 증가하였다(\* $p < 0.05$ ).

수정후의 막전압 의존성 이온전류의 변화: 내향전류의 크기는 미수정란이  $-1948 \pm 347 \text{pA}$  (n = 16), 1-세포기 수정란이  $-964 \pm 287 \text{pA}$  (n = 10)로 점차 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig 4B). 수정후 일어나는  $\text{Ca}^{2+}$  전류의 감소가 세포막의 감소에 따른 것인지 아니면 내향전류의 절대값이 감소하여 나타난 것인지 구분하기 위하여 전류의 density

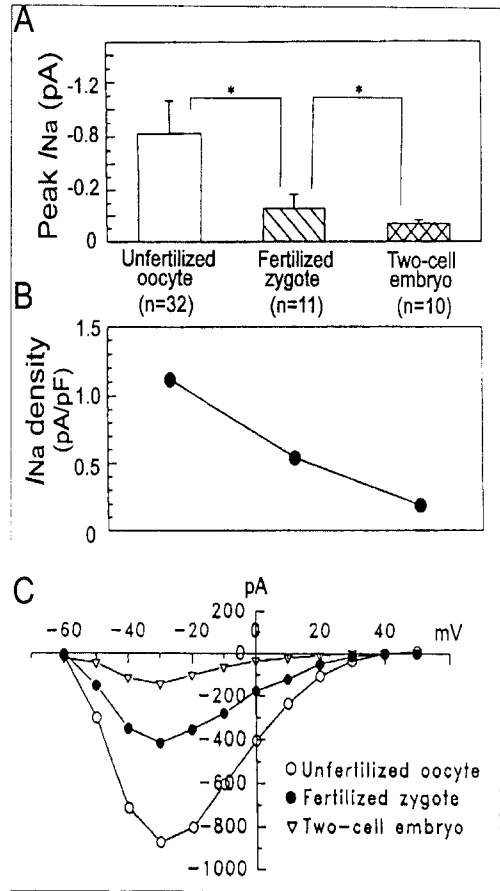


Fig 5. Changes in  $\text{Na}^+$  current component of inward currents. A; decrease in peak  $\text{Na}^+$  components after fertilization. B; Reduced  $\text{Na}^+$  current density in fertilized zygotes and two-cell embryos. C; Superimposed I-V relations of  $\text{Na}^+$  current components in fertilized eggs ( $\circ$ ), fertilized zygotes ( $\bullet$ ) and two-cell embryos ( $\nabla$ ). These current were measured in the normal experimental solution freed of  $\text{CaCl}_2$ . Numerics in parenthesis indicates the number of observations.

를 비교하였다(Fig 4C). 미수정란 1-세포기 수정란 및 2-세포기 수정란에서  $Ca^{2+}$  전류의 density는 각각  $2.65 \pm 0.41 pA/pF$  ( $n = 16$ ),  $2.05 \pm 0.38 pA/pF$  ( $n = 31$ ),  $0.81 \pm 0.16$  ( $n = 10$ )으로 수정후 점점 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig 4C).

본 실험에서  $Cl^-$  전류의 크기는 세포내 용액을 KCl로 조성한 후 기록한 내향전류의 크기와 K-aspartate로 기록한 전류의 크기의 차이를  $Cl^-$  전류로 정하였다. 미수정란에서 내향전류는 KCl을 주성분으로 하였을 때  $-2546 \pm 395 pA$  ( $n = 16$ )이었고, K-aspartate를 주성분으로 하였을 때  $-1857 \pm 220 pA$  ( $n = 10$ )으로 약 0.7nA 내외의 크기로 관찰되었다. 그러나 1-세포기 수정란과 2-세포기 수정란에서는 세포내  $Cl^-$  농도변화에 따른 내향전류의 변화가 관찰되지 않았으며,  $Cl^-$  통로 차단제에 의해서도 내향전류 크기의 차이를 기록하지 못하였다. 따라서 미수정란에서 관찰되던  $Cl^-$  농도차이에 기인한 내향전류의 변화가  $Cl^-$  성분이라면 수정후  $Cl^-$  전류성분은 소실되는 것으로 생각되었다.

수정후  $Na^+$  전류성분은 유의하게 감소하였다(Fig 5).  $Na^+$  전류의 최대값은 미수정란, 1-세포기 수정란 및 2-세포기 수정란에서 각각  $-819 \pm 241 pA$  ( $n = 32$ ),  $-254 \pm 111 pA$  ( $n = 11$ ),  $-134 \pm 26 pA$  ( $n = 10$ )로 기록되었으며( $p < 0.05$ , Fig 5A), density도 감소하였다(Fig 5B). Fig 5C에 도시한 것과 같이  $Na^+$  전류성분은  $Ca^{2+}$ 에 의하여 주도되는 내향전류의 I-V 관계와 유사하게 나타남에 따라 통로성상의 변화는 초래되지 않은 것으로 보이나  $Na^+$  ion에 대한 투과도가 감소한 결과로도 해석할 수 있었다.

## 고 찰

내향전류의 특성 : 현재까지 햄스터 난자에서 기록되는 내향전류는  $Ca^{2+}$  전류로 생각되어져 왔다<sup>11,24</sup>. 그러나 본 실험결과 내향전류는  $Ca^{2+}$  전류,  $Na^+$  전류,  $Cl^-$  전류가 혼합되어 있는 것으로 밝혀졌다. 일반적으로 내향전류는  $Ca^{2+}$  전류와  $Na^+$  전류에 의해 나타나며 이들 전류는 선택적인  $Na^+$  통로 차단제(TTX와 saxitoxin)를 이용하여 쉽게 분리하여 왔다. 그러나 본 실험에서 TTX에 반응하지 않는  $Na^+$  통로는 T-type  $Ca^{2+}$  통로와 매우 유사한 전류-전압 관계, 활성화 및 비활성화 시정수(time constant)를 보이므로 kinetics 차이만으로  $Ca^{2+}$  통로와  $Na^+$  통로를 분리하기는 매우 어렵다<sup>17</sup>. Kostyuk *et al*<sup>19</sup>은 세포의 2가 양이온의 농도가  $10^{-7}$  이하로 떨어지면  $Ca^{2+}$  통로가 그

성질을 잃어버리고  $Na^+$  통로로 변하기 때문에 세포밖의  $Ca^{2+}$ 은  $Mg^{2+}$ 으로 치환할 것을 제안하였다. 이러한 방법으로 얻은 내향전류의 전류-전압 관계는  $Ca^{2+}$  전류의 것과 같았으나 앞서 설명한 TTX에 차단되지 않는  $Na^+$  전류의 전류-전압 관계와도 같았다(Fig 2). 따라서 Kostyuk *et al*<sup>19</sup>의 방법에 의하여 기록된 내향전류는  $Na^+$  전류성분으로 생각되었다.

내향전류의 형태로 나타날 수 있는 이온전류로  $Cl^-$  전류를 들 수 있다.  $Cl^-$ 의 이동은 전기화학적 경사(electrochemical gradient)를 고려하여야 하는 대표적인 예가 될 수 있다. 즉, 대개의 경우  $Cl^-$  통로가 열리면 세포안이 세포밖에 비하여 음전위로 하전되어 있으므로  $Cl^-$ 는 전압경사에 따라 세포 밖으로 이동하다가 화학적 평형에 이르면 이동이 제한될 것이다. 이때까지의  $Cl^-$  이동은 내향전류의 형태로 기록될 수 있다. 또 하나의 가정으로서 양이온의 이동과 동반되어 이동할 때 음이온의 농도경사에 의한  $Cl^-$  이동이 제한되어 내향전류의 크기에 영향을 미치는 경우를 생각할 수 있다. 세포안으로  $Ca^{2+}$ 이나  $Na^+$ 과 같은 양이온이 이동할 때 전기적 중성을 이루기 위하여 음이온이 동반된다면 이는 세포안으로 향하는 음이온의 이동은 외향전류로서 표현될 것이며 이동된 만큼 내향전류를 상쇄시킬 것이다. 그러나 세포내외의  $Cl^-$  농도가 동일하여 농도경사가 사라지면 양이온과 동반되는  $Cl^-$  이동은 격감되어 상쇄폭이 감소된 만큼 내향전류의 증가로 반영될 것이다. 역으로 세포내  $Cl^-$  농도( $[Cl^-]_i$ )가 세포외  $Cl^-$  농도( $[Cl^-]_o$ )에 비하여 현저하게 낮아 세포내로의  $Cl^-$ 에 대한 농도경사가 형성되었다면 양이온과의 동반이동이 가속되어 세포내로의 이동이 용이하게 되어 내향전류는 증가된  $Cl^-$  이동량 만큼 상쇄되어 감소될 것이다. 본 실험에서 ( $[Cl^-]_i$ )가 높은 경우(132mM), 낮은 경우(22mM)에 비하여 내향전류가 크게 기록되며 이들의 차이가  $Cl^-$  전류( $I_{Cl}$ )의 크기로 생각되었다. 이상과 같은 가정이 본 연구결과에 적용될 수 있는 것인지 확인하기 위해서는 순수한  $I_{Cl}$ 에 대한 검증이 요구된다.

$Cl^-$  전류는 삼투압의 변화에 따른 용적 조절에 관여하고<sup>35</sup>, 명계 난자의 경우 초기분화에도 관여한다고 알려져 있다<sup>5</sup>. 또한  $Cl^-$  통로 차단제를 이용하여도  $Cl^-$  전류의 존재를 확인할 수 있다. 본 실험결과  $Cl^-$  전류의 크기는  $-700 pA$  정도인 것으로 기록된다. 본 실험에서 햄스터 난자에서 기록되는 내향전류에는  $Ca^{2+}$  전류,  $Na^+$  전류,  $Cl^-$  전류가 혼합되어 있는 것으로 보인다. 그러나 수정후  $Cl^-$

전류성분이 감소되었다가 소실된 결과(Fig 4)는 미수정란에서 관찰되는 Cl<sup>-</sup>의 이동이 비선택적인 양이온의 이동로와는 독립적인 통로를 통하여 이루어질 것이라는 추론을 가능케 한다. 만일 양이온과 같은 경로로 이동한다면 수정후 Ca<sup>2+</sup>이나 Na<sup>+</sup>의 이동으로 표현되는 내향전류도 소실되거나 Cl<sup>-</sup> 통로 차단제에 의하여 감소되어야 하지만 [Cl<sup>-</sup>], 변화나 Cl<sup>-</sup> 통로 차단제에 의해서도 내향전류의 변화가 관찰되지 못하였기 때문이다.

초기 분화과정에서의 이온전류의 변화와 생리적 의의 : 햄스터 난자를 대상으로 미수정란, 1-세포기 수정란 및 2-세포기 수정란에서 기록된 내향전류의 크기를 비교한 결과 막전압 의존성 이온전류가 감소하였다. 일반적으로 세포분열시에는 Ca<sup>2+</sup>이 증가하는데 비하여 할구분열이 왕성한 초기 분화단계에서 Ca<sup>2+</sup> 전류가 감소한다는 사실은 흥미로운 현상이다. 햄스터 난자에서 발생초기에 어떤 이유로 Ca<sup>2+</sup> 전류의 감소가 일어나는지 잘 알려져 있지 않으며 본 실험결과만으로도 설명하기 어렵다. 그러나 몇가지 가능성은 유추해볼 수 있다. 첫째, 세포분화과정중에 Ca<sup>2+</sup> 통로의 유지를 위해 필요한 세포질에 존재하는 어떤 물질의 변화가 일어날 가능성을 들 수 있다. 일반적으로 Ca<sup>2+</sup> 통로는 세포내 관류를 하거나 단일 이온통로 기록을 위해 patch를 만들면 수분내에 사라지는 불안정한 통로로써 Ca<sup>2+</sup> 통로의 유지를 위해서는 ATP, Mg<sup>2+</sup>, cAMP, PKA 등이 필요함이 알려져 있다<sup>4,7,18</sup>. 따라서 수정후 초기 분화단계에서 이러한 물질중 어떤 물질이 변화가 초래된다면 Ca<sup>2+</sup> 전류는 감소할 수 있을 것이다. 현재까지 이러한 가설을 뒷받침하는 실험결과는 없다. 그러나 생쥐 난자에서 Ca<sup>2+</sup> 전류가 cAMP에 의하여 조절된다는 실험결과<sup>10</sup>와 수정후 ATP/ADP ration가 변한다<sup>21,32</sup>는 사실에 비추어볼 때 세포내 어떤 물질에 의하여 Ca<sup>2+</sup> 통로가 조절될 가능성을 배제할 수 없는 것으로 생각된다. 둘째, 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가에 의해서 Ca<sup>2+</sup> 전류가 감소할 가능성이 있다. 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 증가하면 Ca<sup>2+</sup> 통로는 비활성화 상태로 될 수 있다(Ca<sup>2+</sup>-mediated inactivation)<sup>3,19,31,33</sup> 그리고 2-세포기 이상의 수정란은 할구간에 gap junction으로 연결되어 있는 것으로 생각되는데<sup>14</sup> 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 증가하면 할구세포간의 연결이 단절되어 Ca<sup>2+</sup> 전류가 감소할 수 있다<sup>22</sup>. 어떤 기전을 통하여 Ca<sup>2+</sup> 전류가 감소하는지는 앞으로 계속 추구할 과제이나 이 현상이 세포분열이 일어나는 시기에 관찰되므로 세포분화과정에 기여할 수 있을 것으로

추측된다. 그리고 햄스터 난자에서 cytochalasin D를 처리하여 세포분열을 억제하면 Ca<sup>2+</sup> 전류의 감소가 지연된다는 보고<sup>24</sup>는 이러한 추측을 뒷받침한다고 보여진다.

## 참 고 문 헌

1. Aickin CC, Brading AF. The role of chloride bicarbonate exchange in the regulation of intracellular chloride in guinea-pig vas deferences. *J Physiol*, 349: 587-606, 1984.
2. Aickin CC, Vermuë NA. Microelectrode measurement of intracellular chloride activity in smooth muscle cells of guinea-pig vas deferens. *Pflügers Arch*, 397: 25-28, 1983.
3. Akaike N, Lee KS, Brown AM. The calcium current in Helix neuron, *J Gen Physiol*, 71:509-531, 1978.
4. Byerly L, Hagiwara S. Calcium currents in internally perfused nerve cell bodies of Limnea stagnalis. *J Physiol*, 322:503-528, 1982.
5. Coombs JL, Viliatz M, Moody WJ. Changes in voltage-dependent ion currents during meiosis and first mitosis in eggs of an ascidian. *Dev Biol*, 153:272-282, 1992.
6. Cousin JL, Motais R. Inhibition of anion transport in the red blood cell by anionic amphiphilic compounds. II. chemical properties of the flufenamate-binding site on the band 3 protein. *Biochem Biophys Acta*, 1378: 437-460, 1982.
7. Fenwick EM, Marty A, Neher E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 331: 599-635, 1982.
8. Georgiou P, Bountra C, Bland KP, et al. Calcium-evoked opening of potassium channels in hamster eggs. *Q J Exp Physiol*, 68:687-700, 1983.
9. Gerstheimer FP. A chloride bicarbonate exchanging anion carrier in vascular smooth muscle of the rabbit. *Pflügers Arch*, 409:60-66, 1987.
10. Haan JH, Cheong SJ, Kim YM, et al. Regulatory action of  $\beta$ -adrenergic agonist and 8-bromo-cAMP on the Ca<sup>2+</sup> currents in the eggs of mouse : Relation to the signal trasduction pathway involving cyclic ade-



- nosine monophosphate. *Kor J Physiol*, 27:175-183, 1993.
11. Haan JH, Cho SW, Yang YS, *et al.* Calcium current in the unfertilized egg of the hamster. *Kor J Physiol*, 28:215-224, 1994.
  12. Hamill OP, Marty A, Neher E, *et al.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*, 391:85-100, 1981.
  13. Hong SG. Changes in the inward current and membrane conductance after fertilization the mouse eggs. *Kor J Vet Res*, 32:157-164, 1992.
  14. Igusa Y, Miyazaki S. Effects of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. *J Physiol*, 340:611-632, 1983.
  15. Inoue I. Voltage dependent chloride conductance of the squid axon membrane and its blockade by some disulfonic stilbene derivatives. *J Gen Physiol*, 85:519-537, 1985.
  16. Kim YM. Ca<sup>2+</sup> dependency of transient outward currents in hamster eggs. *Thesis, Gyeongsang Natl Univ*, 1993.
  17. Kostyuk PG, Veselovsky NS, Tsyndrenko Ya A. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 6:2423-2430, 1981a.
  18. Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI. Calcium inward current and related charge movements in the membrane of snail neurons. *J Physiol*, 310:403-421, 1981b.
  19. Kostyuk PG, Krishtal OA. Effects of calcium and calcium chelating agents on the inward and outward current in the membrane of mollusc neurons. *J Physiol*, 270:569-580, 1977.
  20. Kostyuk PG, Shuba YaM, Savchenko AN. Three types of calcium chelating in the membrane of mouse sensory neurons, *Pflügers Arch*, 411:661-669, 1988.
  21. Leese HJ. Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. *Anal Biochem*, 140:443-448, 1984.
  22. Loewenstein WR, Rose B. Calcium in (junctional) intracellular communication and a through on its behavior in intracellular communication. *Anal of the New York Academy Science*, 307:285-307, 1978.
  23. McNiven AI, Yoshida S, Georgiou P, *et al.* A delayed all-or-none hyperpolarisation induced by a single Ca action potential in hamster eggs. *Pflügers Arch*, 412:451-453, 1988.
  24. Mitani S. The reduction of calcium current associated with early differentiation of the murine embryo. *J Physiol*, 363:71-86, 1985.
  25. Miyazaki S, Hashimoto N, Yoshimoto Y, *et al.* Temporal and spatial dynamic of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Dev Bio*, 118:259-267, 1986.
  26. Miyazaki S. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium*, 12:205-216, 1991.
  27. Moody WJ, Bosma MM. Hormone- induced loss of surface membrane during maturation of starfish oocytes : differential effects on potassium and calcium changes. *Dev Biol*, 112:396-404, 1985.
  28. Nilius B. Ion channels in nonexcitable cells. In Sperelakis N, ed *Cell physiology source book* (Chap. 22), Academic Press, San Diego, 315-326, 1995.
  29. Pacaud P, Loirand G, Lavie JL, *et al.* Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflügers Arch*, 413:629-636, 1989.
  30. Peres A. The Calcium current of mouse egg measured in physiological calcium and temperature conditions. *J Physiol*, 391:573-588, 1987.
  31. Plant TD, Standen NB, Ward TA. The effects of injection of calcium ions and calcium chelators on calcium channel inactivation in *Helix* neurons. *J Physiol*, 334:189-212, 1983.
  32. Spielmann H. Changes of the adenosine ribonucleotide content during preimplantation development of mouse embryos *in vivo* and *in vitro*. *J Repord Fert*, 71:467-473, 1984.
  33. Takahashi K, Yoshii M. Effect of internal free calcium upon the sodium and channels in the tunicate egg analysed by the internal perfusion technique. *J Physiol*,

- 279:519-549, 1978.
34. Yoshida S, Plant S, McNiven AI, *et al.* Single  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in excised membrane patches of hamster oocytes. *Pflügers Arch* , 415:516-518.
35. Zhang J, Rasmusson RL, Hall SK, *et al.* A chloride current associated with swelling of cultured chick heart cells. *J Physiol* , 472:801-820, 1993.
-