大韓不妊學會雜誌：第14卷 第2號 1987
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 14, No. 2, 1987, 12.

세포분열이 왕성한 생쥐 배세포에서 세포분열에 대한 Ca^{++}의 요구와 세포막투과성에 대한 연구

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과 · 서울대학교 대학원 동물학과*

배 인 하 · 박 지 혜*

=Abstract=

Studies on the Requirements of Ca^{++} for Cell Division and Ca^{++} Permeability of Plasma Membrane of Fast Dividing Mouse Embryo Cells.

In-Ha Bae, Ph.D. and Ji-Hye Park*

Department. of Biology., College of Natural Science, Sungshin Women's University
*Department. of Zoology., Graduate School, Seoul National University**

To determine the effect of calcium on the preimplantational development of mouse two-cell embryo, the various concentrations of calcium were added into the culture media and the rate of blastocyst formation was observed.

Also, to examine the effect of trifluoperazine, an inhibitor of calmodulin which is involved in the several intracellular calcium functions, embryos were cultured for 48 hours at the various concentrations of this inhibitor.

An additional 24 hour culture was done to examine the effect of this drug on the transformation from morula to blastocyst.

The results are as following ;

1. About 1.71mM of extracellular calcium is adequate for blastocyst formation and the higher concentrations of calcium (3.43mM and 8.55mM) do not affect on the blastocyst formation and the degenerating rate.
2. Trifluoperazine 100μM presents the inhibitory effect on the blastocyst formation while 1μM and 10μM do not so.
3. After an additional 24 hour culture, there is transformation of morula to blastocyst and the degenerating rate of embryo is increased all together.

서 론

포유동물의 수정된 초기 태아는 완전한 diploid genome을 갖추며 분화된 세포보다 분열속도가 빨라서 세포분열의 기작을 연구하는데 좋은 재료가 되며 그외 물질대사 및 기초적인 생물학의 여러 기작을 연구하는데 좋은 재료가 된다. 포유동물중 생쥐의 경우, 착상전 초기배아는 세포분열단계가 똑같은 세포들을 동시에 많이 얻을 수 있고 체외에서 포배까지 화학적으로 정한 배양액(simple chemically defined medium)내 배양이 가능하므로 세포의 분화나 유전자 발현 및 물질대사를 추구하는데 있어 좋은 재료가 되는 것이다.

2-가 이온인 칼슘이 세포내에서 제 2차 정보전달자(2nd messenger)로 작용하며 여러 효소계를 자극, 세포내 대사를 활성화시키는 것은

본 연구는 1985년 한국학술진흥재단의 '85 첨단과학기술분야에 대한 연구지원과 Rockefeller Foundation Grant(RF 78084)에 의해 이루어졌음.

이미 널리 알려져 있다(Cheung, 1980).

초기배아 및 난자에서 칼슘이온은 상당히 중요한 요인으로 작용하고 있음이 여러 연구에서 조사되고 규명된 바 있다. 즉 체외배양시 배양액내 칼슘이온이 적당량 존재하여야 하며 난자에서는 핵막붕괴가 일어나기 직전에 세포질내 칼슘이온이 증가하는 것이 척추동물에서는 실제로 증명된 바 있다(Wasserman et al., 1980 ; Paleos and Powers, 1982 ; Bae and Channing, 1985).

또한 양서류의 경우 수정후 첫 세포분열이 일어나기 전의 DNA 합성시 세포내 free Ca^{++}의 농도가 일시적으로 증가함이 보고되었고(Osborn et al., 1979 ; Poenie et al., 1985), 이외에도 다른 여러조직에서도 마찬가지로 세포분열 직전의 간기(interphase)에 칼슘이온의 증가가 있어야 함이 증명되었다(Whitfield et al., 1979).

포유류의 경우 배란된 난자에 iontophoresis 방법으로 intracellular free-Ca^{++}의 농도를 증가시키면 정자와 수정되지 않고도 세포분열이 활성화되어 포배기까지 유도될 수 있어서 체외에서 포배까지 발달시킨 보고도 있다 (Fulton and Whittingham, 1978).

양서류의 경우, 수정후 연속적인 세포분열과정인 난할시에 microtubule의 disassembly나 assemble시 칼슘이온이 작용하는 것이 보고되었다(Harris, 1975). 세포에서 calcium-dependent regulator protein인 calmodulin은 생리적인 Ca^{++}의 농도($\sim 10\mu M$)에서 microtubule assembly를 억제하며 세포분열시 방추사가 있는 지역에 나타나므로 칼슘이온은 microtubule을 조절한다는 것이 증명되었다(Marcum et al., 1978 ; Zavortink et al., 1983 ; Welsh et al., 1978 and 1979).

생쥐의 착상전 초기배아가 포배기로 발달하는데 있어서 8세포기에 첫형태 형성과정인 compaction이 반드시 일어나야만 한다. 정상적인 생쥐의 초기배아발달과정에서 8세포기에 할구와 할구사이에 tight junction이 생기므로 fluid accumulation이 가능하며 배아는 상실기에서 포배로 분화할 수가 있다.

이때 칼슘이온은 microtubule이나 microfilament에 작용하여 할구사이의 접촉을 최대로 만드는 것이 증명된 바 있다(Ducibella and Anderson, 1979).

체외배양시 배양액내 칼슘이온이 없으면 compaction이 일어나지 못하고 포배는 발달하지 못하여 그대로 퇴화하고 마는 것이 보고(Ducibella and Anderson, 1975) 된 뒤, compaction시 칼슘이온의 작용부위에 관한 연구들이 진행되어 왔다. 그뒤 배양액내 칼슘이온이 세포내로 유입되는 것이 증명(Bilozur and Powers, 1982) 되었고 compaction시 calmodulin-dependent intracellular calcium의 중요성이 입증되었으나 intracellular calcium의 정확한 역할은 알지 못하고 있다(Bilozur and Powers, 1982).

Compaction시 세포밖의 세포막 표면에 존재하는 glycoprotein이 관여하는데 "uvomorulin"이라 명명된 이 cell-adhesion molecule이 활성화하는데 반드시 칼슘이온이 있어야함이 증명되었다 (Hyafil et al., 1981 ; Peyrieras et al., 1983 ; Vestweber and Kemler, 1984).

생쥐의 착상전 초기 배아가 발달하는데 있어서 칼슘이온의 작용을 조사하기위해서 본 연구에서는 배양액내 칼슘 농도에 대한 영향을 조사하고 이 칼슘 이온은 Ca^{++}-dependent regulator protein인 calmodulin을 통해서 반드시 작용하리라 보고 그 억제제와 Ca^{++}이 포배형성에 어떤 영향을 미치는가를 조사하였다.

재료 및 방법

본 실험실에서는 성신여대 및 서울대학교 실험동물사육장에서 사육 된 생쥐 ICR strain을 사용하였다. 2개월된 생쥐의 암컷에 5 IU의 PMSG(Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Intervet)를 오후 1시에 복강주사하였고 48시간 뒤에 hCG(human Chorionic Gonadotropin, Intervet)를 5 IU 주사하여 배란 및 수정을 유도키위해 수컷과 합사시켰다. 다음날 아침 copulation plug가 관찰된 암컷만을 골라 실험에 사용하였다.

후기 2세포기 배아(late 2 cell stage embryo)를 얻기 위해서 hCG 주사후 50시간될때 생쥐 암컷을 경추파열로 도살한 뒤 양쪽 수란관을 떼어내어 1 ml의 배양액이 들어있는 배양접시에 넣었다.

해부 현미경(Wild, type M5)하에서 수란관의 한쪽끝에 30 guage 바늘과 1 ml 주사기 (Hamilton)를 삽입하여 기본 배양액 0.5 ml을 주입, 씻어내리는 방법으로 2-cell 배아를 얻었다. 이렇게 하여 얻은 배아는 기본 배양액으로 3~4회 씻은

다음 paraffin oil drop method(Brinster, 1963)로 5% CO_2와 95%공기가 공급되는 37℃ 배양기내에서 3일까지 배양하였다.

Paraffin oil drop method의 배양방법은 다음과 같다. plastic petri dish (Falcon, No. 1008)에 4ml의 paraffin oil(Sigma Co.)을 붓고 mouth-controlled micro-pipette을 사용하여 petri dish의 바닥에 100 μl의 배양액 drop을 정착시킨뒤 배양하기 2시간 전에 배양기에 넣어 평형을 유지시켰다.

기본 배양액으로는 standard egg culture medium (SECM ; Biggers et al., 1971)을 사용하였으며 그 조성은 다음과 같다. NaCl 94.8mM, KCl 4.78mM, KH_2PO_4 1.19mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.19mM, $CaCl^2 \cdot 2H_2O$ 1.71mM, Glucose 5.56mM, Na-pyruvate 0.25mM, $NaHCO_3$ 20.57mM, Streptomycin 80mg/ml, Penicillin G 100 units/ml, Na-lactate 21.58mM, Bovine Serum Albumin (BSA) 4mg/ml.

배양액으로는 calcium ion의 농도를 다양하게 조절할 수 있고 pH 변화가 거의없는 Modified Hank's Balanced Salt Solution(MHBS ; Modified by Bae and Channing, 1985)을 사용하였고 그 조성은 다음과 같다.

NaCl 140.73mM, KCl 5.37mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.81mM, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.34mM, KH_2PO_4 0.44mM, $NaHCO_3$ 4.17mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.71mM, Glucose 5.55mM, Na-lactate 2.5mM, Na-pyruvate 0.3mM, BSA 4mg/ml, Penicillin-Streptomycin 50μg/ml.

칼슘이온의 농도를 다르게 할 때 배양액의 osmolality는 NaCl의 농도를 높이거나 줄임으로 계산상 전체 배양액의 osmolality가 320mOsm이 되도록 했다. 배양액의 osmolality를 280mOsm으로 하지않고 320mOsm로 만든 것은 실제 osmolality는 계산치보다 그 이유가 정확히 밝혀지지는 않았지만 항상 20~40이 낮았으므로 실제 기대치는 280mOsm이 되도록 했다(Bae and Foote, 1980).

Calmodulin antagonist인 trifluoperazine(Sigma Co.)는 1.71mM $CaCl_2$가 들어 있는 MHBS에 사용직전에 녹였다. 배양액의 pH는 7.2로 맞추고 0.45μm pore size의 Milipore membrane (Millipore CO.)으로 걸러 멸균하였으며, 초자기구는 180℃에서 20분간 건열멸균 하거나 151b에서 20분간 고압멸균하여 사용하였다.

배양후 각 그룹의 배아를 기본 배양액으로 씻은 후 고정액(acetic acid : ethanol=1 : 3)에 1시간 고정한 후 0.5% aceto-orcein solution으로 핵을 염색하고 45% acetic acid로 잔여분의 염색을 세척하였다. 400X의 배율로 배아의 발달을 관찰하고 2세포기-상실배전, 상실배, 포배, 퇴화등의 4개 group 혹은 2-세포기-상실배, 포배기 및 퇴화등의 3group으로 나누기로 하였으며 이보다 더 세분하게 분류하기로 하였다.

대조군과 실험군의 통계적 유의성을 분석하기 위해서 student's t-test를 사용하였다.

결 과

생쥐의 2-세포 배아가 포배까지 생체외에서 발달하는데 있어서 고농도의 칼슘의 영향을 알아본 것은 Table 1과 같다.

48시간 배양한 뒤 대조군에서는 약 40%가 포배로 발달하였다. 배양액내 칼슘농도를 높힌 두 실험군인 2X(3.42mM), 5X(8.55mM)에서 배아의 발달은 대조군과 별 차이가 없었으므로 포배형성 정도는 칼슘농도에 따라 비례하지 않음을 나타낸다. 그러나 칼슘을 처리하지 않은 군에서는 포배가 전혀 형성되지 않았다. 따라서 다른 군에 비해서 배아의 퇴화율도 현저히 증가했다(48.2%).

Table 1. Effects of various higher concentrations of calcium on the blastocyst formation from two-cell of mouse embryo(culture time ; 48hours)*

Ca^{++} Concentrations	Percent of embryonic development(Mean±SE)			Total embryos	P
	2Cell−Morula	Blastocyst	Degeneration		
0	51.83±18.32	−	48.17±18.82	97	−
1.71mM	60.43±13.11	38.06±12.86	1.52± 1.52	90	$p<0.005$
3.42mM	62.99± 2.94	34.07± 6.66	2.94± 2.94	71	$p<0.005$
8.55mM	61.88± 7.86	37.32± 7.77	0.81± 0.81	82	$p<0.005$

*Four replications were done.

Table 2. Effect of various lower concentrations of calcium on the blastocyst formation from mouse two-cell embryo(MEAN±SEM)*

Ca^{++} Concentrations		2C-8C	Morula	Blastocyst	Degeneration	Total egg
Free	24hr	98.96(± 1.81)	–	–	1.04(1.81)	89
	48hr	54.52(±13.39)	29. 1(18.63)	–	16.39(14.60)	
	72hr	9.99(± 8.74)	–	–	94.26(5.44)	
1/16x(0.107mM)	24hr	74.24(±26.61)	25.76(26.61)	–	–	85
	48hr	20.53(± 9.43)	70.89(13.67)	3.38(3.90)	5.20(6.45)	
	72hr	7.89(± 5.34)	11.20(9.30)	27.49(12.19)	53.43(23.60)	
1/ 8x(0.214mM)	24hr	59.54(±28.50)	39.42(28.36)	–	1.04(1.81)	90
	48hr	18.93(± 1.36)	55.97(12.74)	19.33(12.17)	5.77(3.83)	
	72hr	6.46(± 3.77)	5.77(3.83)	50.37(11.79)	37.39(13.64)	
1/ 4x(0.428mM)	24hr	61.04(±23.07)	37.71(22.01)	–	1.25(2.17)	89
	48hr	19.11(± 9.55)	56.43(17.64)	19.92(11.75)	4.54(5.51)	
	72hr	4.17(± 4.17)	12.71(12.71)	76.67(5.49)	6.45(6.40)	
1/ 2x(0.855mM)	24hr	56.96(±24.97)	43.05(24.97)	–	–	89
	48hr	22.22(±25.74)	59.06(23.71)	15.15(10.93)	3.57(3.95)	
	72hr	2.28(± 2.28)	8.13(5.16)	82.91(3.18)	6.69(6.84)	
1x (1.71mM)	24hr	67.60(±24.01)	32.41(24.01)	–	–	91
	48hr	15.11(±14.36)	49.68(16.23)	30.77(5.02)	2.17(2.17)	
	72hr	4.85(± 3.15)	9.00(8.51)	81.09(8.67)	5.06(6.41)	

*Four replications were done.

Table 3. Time-sequenced Ca^{++} treatment on the mouse 2-cell embryo*(72hr culture)

Ca^{++} concentration	Total	4 – 8C	8C	Mor.	Bla.	Deg.
Control	115			7.78(± 4.04)	92.22(± 4.04)	
1/64x(0.027mM)	103		1.28(±3.14)			98.72(± 3.14)
1/32x(0.053mM)	104			0.79(± 1.94)	3.56(± 5.82)	95.65(± 5.56)
1/ 8x(0.214mM)	105	1.67(±2.59)	2.50(±6.12)	14.74(± 7.57)	30.51(±29.18)	50.58(±27.74)
1/ 2x(0.855mM)	106	1.88(±2.93)	1.04(±2.55)	8.97(± 6.98)	72.79(±16.33)	15.33(± 8.79)
1x (1.71mM)	109			23.34(±16.70)	73.79(±14.20)	2.87(± 3.32)

Six replications were done

*After 24hr culture in Ca^{++}-free medium additional 48hr culture was done in the experimental groups and degenerating embryo were removed in additional 48hr cultured groups.

생쥐의 2-세포 배아가 포배로 발달하는데 있어서 저농도 칼슘의 영향을 알아본 것은 Table 2와 같다. 48시간이나 72시간 배양한뒤 1/2X(0.86 mM), 1/4X(0.43mM), 1/8X(0.22mM)에서 포배로의 발달은 대조군과 별 차이가 없었으나 1/16 X(0.11mM)에서는 포배발달이 현저하게 감소됨을 알 수 있었다.

Compaction에 미치는 배양액내 칼슘이온의 역치농도를 조사하기 위하여 배아들을 Ca^{++}-free 배양액에서 24시간 동안 배양하다가 여러가지 저농도 칼슘이 들어있는 배양액에 옮겨 48시간을 더 배양한 결과는 Table 3에 나타내었다.

표에서 보듯이 처음 24시간동안 칼슘이 없을 경우 (1/64X~1X) 72시간을 1.71mM 칼슘을 처리한 대조군에 비해서 포배발달은 상당히 감소함을 보였다(대조군 92.2% : 실험군 73.8%). 칼슘을 처리하지않고 24시간뒤에 각 농도로 옮겼을 경우, 1/8X(0.22mM)로 옮긴 군에서 포배발

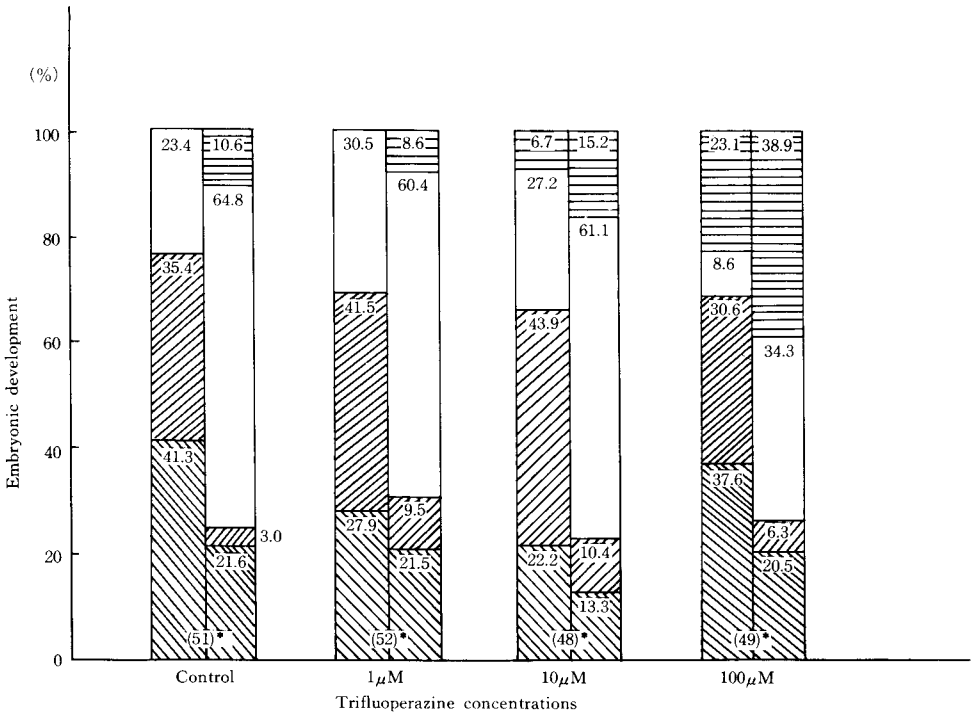

Fig. 1. Effect of the various concentrations of trifluoperazine on the preimplantational development from two-cell to blastocyst of mouse.

Three replications were done
Left column ; 48 hours culture
Right column ; 72 hours culture
* ; Total number of embryos

Degeneration
Blastocyst
Morula
2 Cell-premorula

달은 1X나 1/2X(0.85mM)로 옮긴 군보다 저조했고 1/32X(0.06mM)에서는 더 현저히 감소했다(1X78.8% ; 1/2X 72.8%, 1,8X 30.5%, 1/32X 3.56%). 1X나 1/2X에서 포배형성은 별차이가 없었다. 또한 1/64X(0.03mM)의 칼슘이온이 든 배양액으로 옮긴 경우 포배형성은 전혀되지 않았다.

Calmodulin억제제인 trifluoperazine이 포배형성에 미치는 영향은 Fig. 1과 같다. 48시간 배양했을 경우 1μM 처리군과 10μM 처리군에서 표배형성율은 대조군에 비해서 별 차이가 없었다. Trifluoperazine을 100μM 처리한 군에서 포배형성이 억제되었으며(8.6%), 이때 퇴화율도 높았다(23.1%). 72시간 배양시 포배형성은 상당히 증가했는데 이는 24시간을 더 연장하는 동안 이미 발달한 상실배가 포배로 전환된 대신 퇴화율로 증가한 현상을 나타내었다.

논 의

간단한 배양액 MHBS(Modified Hank's Baanced Salt Solution)는 돼지 미성숙난자뿐 아니라 생쥐 배아를 배양하는데도 적당함이 본 실험을 통해 보여주고 있다(Bae, 1980 ; Bae and Channing, 1985).

표 1에서 보듯이 생쥐의 2-세포 배아가 포배로 발달하는데 배양액내 칼슘이온의 영향을 받는다. 칼슘 무처리군에서는 포배가 전혀 형성되지 않으나 처리군에서는 48시간 배양시 약 40%의 포배가 형성되었다. 칼슘 무처리군에서 포배가 형성되지 않은 것은 2-세포에서 8-세포까지는 정상적으로 발달하나 그 뒤 compaction이 시작되어야할 8-세포에서 세포분열이 계속 일어나지 못함으로써 퇴화하는 것 같다.

이는 표 2에서 Ca^{++}-free에서 24시간 배양에서 대부분의 2-세포기때가 정상적인 상태로 유지되는데서도 볼 수 있다(98.96%). 이것은 compaction시 칼슘이온이 필수불가결임을 증명함과 동시에, 수정된 초기 배아가 발달하는데 있어서

외부의 칼슘 보충없이 초기에는 수정후 증가한 세포질내 칼슘으로도 계속 발달이 가능한 것으로 사료된다.

본 논문에서 2-세포기 -8세포기까지는 Ca^{++}-free에서 24시간동안 퇴화하지 않고 정상적인 배를 유지할 수 있는 것은 이 시기의 배에서는 많은 양의 칼슘이 sequestered된 상태(bound calcium)로 저장되어 있어 필요시에 언제나 free-Ca^{++}으로 전환할 수 있는 상태로 있는 것이 아닌가 보여진다. 즉 소포체(endoplasmic reticulum)나 미토콘드리아가 칼슘저장소 역활을 하고 있다는 견해가 타당한 것이 아닌가 추정된다. 이것은 수정되지 않은 미성숙난자의 경우(unpublished data, Bae)와는 판이한 현상이라 아주 흥미있는 과제라 좀더 깊은 추구가 요구된다.

또한 수정된 배아는 외부의 영향을 받지않고 수정난 내에 programmed된 대로 난할이 일어나는 것임을 나타낸다(Ducibella and Anderson, 1975 and 1979 ; Bilozur and Powers, 1982 ; Duncan, 1984 ; Johnson et al., 1984).

Table 1과 Table 2에서 보듯이 초기 배아 발달시 배양액내 적당한 양의 칼슘만 존재하면 포배형성이 가능하여 1.71mM 이상을 처리하여도 농도에 따른 효과는 없으며 저농도 처리시에도 별 차이가 없는 것으로 나타난다.

그러나 0.21mM 이하에서 처리시에는 현저히 감소하는 것으로 보아 생쥐의 8-세포기때 배아 발달시 배양액내 필요한 칼슘이온의 농도는 0.21mM 이상이어야함을 알 수 있다. compaction에 미치는 칼슘이온의 농도를 조사하기 위하여 칼슘 무처리에서 칼슘 처리군으로 이전시킨 실험이 Table 3으로 나타내었다.

배아 발달의 초기 24시간동안 칼슘이온을 처리하지 않을 경우, 나머지 48시간동안 칼슘을 처리해주면 대조군보다 포배형성은 지연되나 상실배 형성이 증가한 것으로 이 상실배는 다시 24시간정도 칼슘 처리하에서 배양할 경우 모두 포배로 전환된다. 이는 초기 배양액내 칼슘의 결핍이 배아 발달에는 별 영향이 없고 단지 compaction에만 영향을 주는 것이며 일단 compaction이 일어나면 모두 포배로 전환되므로 compaction과정이 배아발달에서 아주 중요함을 알 수 있다(Ducibella and Anderson, 1975 and 1979 ; Bilozur and Powers, 1982).

처음 24시간까지는 배양시 배양액내의 Ca^{++}의 영향을 거의 받지 않고 그대로 viable 상태를 유지할 수 있는 것은 세포내의 미토콘드리아 및 소포체(endoplasmic reticulum등이 Ca^{++}의 저장고 역활을 한다는 견해에서 sequestered calcium이 free-Ca^{++}으로 전환되는 것이 아닌가 추정된다. 그러나 계속해서 배양액내의 Ca^{++}을 공급치 않을 경우 세포내 sequestered calcium과 free-Ca^{++}의 불균형(unbalance)으로 인해 대사에 이상을 초래함으로서 퇴화율이 증가되는 것으로 추정된다.

이와같이 칼슘이 배아의 compaction뿐만 아니라 세포분열 자체에도 영향을 미친다고 보아진다. Fulton and Whittingham(1979)은 iontophoresis방법으로 배란된 생쥐 난자내의 Ca^{++} 증가를 유도할 경우 정자와 수정하지 않은 상태에서 처녀생식(parthenogenesis)방법으로 표배기까지의 정상적인 발달을 유도할 수 있었다는 점에서도 유추된다.

칼슘 binding protein인 calmodulin은 양서류의 알(Head et al., 1979 ; Nishida and Kumagai, 1980 ; Epel et al., 1981)과 포유동물의 정자에서 존재한다고 보고되었다(Jone et al., 1978). 그러나 생쥐의 초기 배아에 calmodulin이 존재하는 지의 여부는 아직 잘 밝혀지지 않았지만 생쥐 난자의 경우 calmodulin 억제제인 trifluoperazine을 2.5mM 정도 처리할 경우 난자성숙이 억제되었다는 보고(Schultz et al., 1983 ; Maruska et al., 1984)가 있으므로 난자내 calmodulin의 존재는 확실하다고 추정된다.

본 연구에서는 trifluoperazine 100μM을 생쥐 초기배아에 처리했을 때 포배형성이 제한되었다. 이것은 토끼의 경우 같은 농도의 trifluoperazine을 처리하여 pronucleus 형성을 억제시켰던 보고(Lenz and Cormier, 1982)와 일치한다. 이런 trifluoperazine이 배아 발달에 미치는 영향이란 calmodulin에 의한 세포내 칼슘 기능을 방해했기 때문이라고 사료된다(Levin and Weiss, 1977 and 1979 ; Lenz et al., 1984).

본 연구에서 생쥐의 2-세포 배아가 포배로 발달하는데 있어서 trifluoperazine 1μM이나 10μM의 농도는 억제작용을 하지 못했으나 다른 저자(Pakrasi and Dey, 1984)에 의하면 0.5μM의 trifluoperazine을 4-세포기 배아나 8-세포기 배아에 처리하여 포배 형성율을 감소시켰다. 이는 실험적 상황이 두 실험실간에 다르기 때문이라고 사료된다. Fig. 1에서 보듯이 1μM과 10μM의 trifluoperazine에서는 상실배가 포배로

전환될 때 trifluoperazine이 전혀 영향을 주지 못했는데 앞서 언급했듯이 일단 형성된 상실배는 모두 포배로 전환되기 때문이다.

생쥐의 2-세포 배아가 체외에서 포배로 발달하는데는 세포내 칼슘뿐 아니라 반드시 배양액내 칼슘이 필요하다는 것이 본연구에서 증명되었고 또 이때 칼슘은 calmodulin을 통해서 작용하는 것이 아닌가 추정된다. 앞으로의 연구에서는 compaction시 정확한 칼슘의 작용부위를 찾아내어서 microtubule 및 microfilament 형성과 초기 배아 발달시 세포분열과의 관계를 규명하고저 한다.

REFERENCES

Bae, I.H. and Foote, R.H. : *Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. J. Reprod. Fert. 59 : 11-13, 1980.*

Bae, I.H. : *Role of calcium in resumption of meiosis of cultured porcine cumulus-enclosed oocytes. Biol. Reprod. 24 : 92, 1980.*

Bae, I.H. and Channing, C.P. : *Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized Graafian follicles. Biol. Reprod. 33 : 79-87, 1985.*

Bilozur, M. and Powers, R.D. : *Two sites for calcium action in compaction of the mouse embryo. Exp. Cell Res. 142 : 39-45, 1982.*

Brinster, R.L. : *A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp. Cell Res. 30 : 205-208, 1963.*

Cheung, W.Y. : *Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science 207 : 19-27, 1980.*

Ducibella, T. and Anderson, E. : *Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo ; prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. Devl. Biol. 47 : 45-48, 1975.*

Ducibella, T. and Anderson, E. : *The effects of calcium deficiency on the formation of the zonula occludens and blastocoel in the mouse embryo. Devl. Biol. 73 : 46-58, 1979.*

Duncan, C.J. : *The role of Ca^{++} in the regulation of embryogenesis in early amphibian and echinoderm embryos. Life Sciences 35 : 2481-2488.*

Epel, D., patton, C., Wallace, R.W. and Cheung, W.Y. : *Calmodulin activates NAD Kinase of sea urchin eggs ; An early event of fertilization. Cell 23 : 543-549. 1981.*

Fulton, B.P. and Whittingham, D.G. : *Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. Nature 273 : 149-151, 1978.*

Harris, P. : *The role of membranes in the organization of the mitotic apparatus. Exp. Cell Res. 94 : 409-425, 1975.*

Head, J.F., Mader, S. and Kaminer, B. : *Calcium-binding modulator protein from the unfertilized egg of the sea urchin, Arbacia punctula. J. Cell Biol. 80 : 211-218, 1979.*

Hyafil, F., Babinet, C. and Jacob, F. : *Cell-cell interactions in early embryogenesis ; a molecular approach the role of calcium. Cell 26 : 447-454, 1981.*

Jones, H.P., Lenz, R.W., Palevitz, B.A. and Cormier, M.J. : *Localization of calmodulnin mammalian spermatozoa by immunolfuorescence methods. In : Calmodulin and Cell functions(eds by Watterson, D. M. and Vincenzi, F.F.) p. 393. The New York Academy of Science, 1980.*

Johnson, M.H., McConnel, J. and Blerkom, J. V. : *Programmed development in the mouse embryo. J. Embryol. exp. Morph. Suppl. 83 : 197-231, 1984.*

Lenz, R.W. and Cormier, M.J. : *Effects of calmodulin-binding drugs on the guinea pig spermatozoan acrosome reaction and the use of these drugs as vaginal contraceptive agents in rabbits. Ann. NY. Acad. Sci. 383 : 85-97, 1982.*

Lenz, R.W., Hart, R., Ax, R.L. and Cormier, M.J. : *Inhibition of mouse embryonic development by calmodulin antagonists. Gamete Res. 9 : 253-260, 1984.*

Levin, R.M. and Weiss, B. : *Binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Mol. Pharmacol. 13 : 690-697, 1977.*

Levin, R.M. and Weiss, B. : *Selectively binding of antipsychotics and other psychoactive agents to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. J. Pharmacol. and Expl. Therapeutics 208(3) : 454-459, 1979.*

Marcum, J., Dedman, J.R., Brinkley, B.R., and Means, A.R. : *Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75(8) : 3771-3775, 1978.*

Maruska, D.V., Leibfried, M.L. and First, N. L. : *Role of clacium and the calcium-calmodulin complex in resumption of meiosis, cumulus expansion, viability and hyaluronidase sensitivity of bovine cumulus-oocyte complexes. Biol. Reprod. 31 : 1-6, 1984.*

Means, A.R. : *Tubulin and calmodulin ; effects of microtubule and microfilament inhibitors on localization in the mitotic apparatus. J. Cell Biol. 81 : 624-634, 1979.*

Nishida, E. and Kumagai, H. : *Calcium-sensitivity of sea urchin tubulin in vitro assembly and the effects of calcium-dependent regulator(CDR) proteins isolated from sea urchin eggs and porcine brains. J. Biochem(Tokyo) 87 : 143-151, 1980.*

Osborn, J. C., Duncan, C.J. and Smith, J.L. : *Role of calcium ions in the control of embryogenesis of Xenopus. J. Cell. Biol. 80 : 589-604, 1979.*

Pakrasi, P.L. and Dey, S.K. : *Role of calmodulin in blastocyst formation in the mouse. J. Reprod. Fert. 71 : 513-517, 1984.*

Peyrieras, N., Hyafil, F., Louvard, D., Ploegh, H.L. and Jacob, F. : *Uvomorulin : A non-integral membrane protein of early mouse embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 6274-6277, 1983.*

Poenie, M., Alderton, J., Tsien, R.Y. and Steinhardt, R.A. : *Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle. Nature 315 : 147-149, 1985.*

Powers, R.D. and Paleos, G.A. : *Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. J. Reprod. Fert. 66 : 1-8, 1982.*

Schultz, R.M., Heller, D.T. and Buklud, N. : *Implication of a calmodulin-dependent step in mouse oocyte maturation. Biol. Reprod. 28, Suppl. 1, 138 abstr. 212, 1983.*

Vestweber, D. and Kemler, R. : *Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. Cell Differentiation 15 : 269-273, 1984.*

Wasserman, W. J., Pinto, J.H. O'Connor, C. M. and Smith, L.D. : *Progesterone induces a rapid increase in Ca^{++} in Xenopus laevis oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 1534-1536, 1980.*

Welsh, M.J., Dedman, J.R. Brinkley, B.R. and Means, A.R. : *Calcium-dependent regulator protein ; localization in mitotic apparatus of eukaryotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75(4) : 1867-1871, 1978.*

Welsh, M.J. Dedman, J.R. Brinkley, B.R. and Whitfield, J.F., Boynton, A.L., Macmanus, J.P., Sikorska, M. and Tsang, B.K. : *The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. Mol. Cell Biochem. 27(3) : 155-179, 1979.*

Zavortink, M., Welsh, M.J. and McIntosh, J. R. : *The distribution of calmodulin in living mitotic cells. Exp. Cell Res. 149 : 375-385, 1983.*