

Mouse 미수정란에서의 electrogenic Na pump 활동여부에 관한 연구

홍 성 근
경상대학교 의과대학
(1989. 5. 30 접수)

Electrophysiological study on the presence of the electrogenic Na pump of the mouse unfertilized eggs

Seong-geun Hong
College of Medicine, Gyeongsang National University
(Received May 30, 1989)

Abstract: In order to manifest the presence of Na-K pump and its property on the unfertilized egg membranes of mouse, membrane potential was recorded under the physiological condition (at 37°C and 4mM Ca²⁺). After an induction of superovulation, the fresh eggs with zona pellucida were collected from mouse oviduct. Transient hyperpolarization as pump action was recorded after the switch into the high potassium perfusate (15mM K⁺) from K-free perfusate, and the difference between membrane potential observed just before the perfusion of high potassium solution and the maximal membrane potential during the perfusion of high potassium solution was regard as pump activities.

The results observed were as follows,

1. Resting membrane potential was depolarized under the treatment of 10⁻⁵M ouabain.
2. Pump activities of the unfertilized mouse eggs were -3.38 ± 0.61 mV (Mean \pm SD, n=6), recorded as transient hyperpolarization due to the electrogenic property.
3. Pump activities were blocked by both treatment of 10⁻⁵M ouabain and perfusion of Na-free solution, while increased by high Na⁺ (300mM) perfusion (-7.45 ± 0.75 mV, n=2).
4. Hyperpolarization due to pump activity was not altered by Mn²⁺.
5. Above results confirm the presence of ouabain-sensitive Na-K pump, which affected the membrane potential directly, on the unfertilized egg membranes of mouse.

Key words: unfertilized egg, Na-K pump, electrophysiological study, membrane potential, mouse

서 론

세포막을 경계로 나타나고 있는 세포내외간의 전압차인 막전압(membrane potential)은 존재하는 ion들 사이의 농도경사와 상대적인 세포막투과도(membrane permeability)에 의존하고 있다고 할 수 있으므로 안정상태의 세포에서 측정되는 안정막전압(resting membrane potential)은 일반적인 흥분성 조직 세포에서

potassium ion에 대한 막투과도(g_K)가 Na ion이나 Cl ion들과 같은 다른 ion들에 비해서 상대적으로 매우 높기 때문에 potassium ion의 평형전압(equilibrium potential)을 반영하고 있다. 따라서 안정막전압은 세포막사이의 potassium ion의 농도 경사와 전압 경사간의 균형을 유지한 결과로 나타나기 때문에 흥분성 조직의 세포는 안정 상태를 유지하기 위하여 potassium ion 이외의 다른 ion들의 확산이나 흥분시 막투과도

변화에 기인한 불균형상태를 회복시키는 다양한 운반 기전을 보이고 있다. 안정상태를 유지하기 위한 운반 기전 가운데 대표적인 Na pump는 에너지를 이용한 능동적 운반기능 수단으로 일반적인 조직이나 근육세포에서 Na ion과 K ion의 교환을 통하여 세포내 Na ion의 축적을 억제하고 K ion 농도를 일정하게 유지하여 과도한 K ion의 세포의 유출을 억제하는 기능을 발휘하며 일정한 교환비율(3Na : 2K)을 통하여 직접적으로 세포의 안정막전압 유지에 기여하는 것으로 알려져 있다.^{1,2,3} 배란된 mouse의 미수정란은 -30mV 내외의 일정한 안정막전압을 보이며^{4,5,6,7,8} 일정한 형태의 ionic channel들이 존재하는 흥분성 세포로 확립되어 있으나^{8,9,10} 미세전극 삽입등에 의한 egg membrane의 손상으로 ionic leakage가 크기 때문에 안정막전압 유지를 위하여 pump 활동의 기여도가 높을 것으로 예상됨에도 불구하고 양서류인 개구리 oocyte(*Rana esculenta*)와 *Xenopus* oocyte(*Xenopus laevis*) 등과 같은 하등동물에서 Na pump 활동이 보고되고 있으나^{11,12} 포유류의 미수정란에서의 pump 활동에 대한 보고가 이루어지고 있지 않다. 이와같은 이유는 상당 기간의 안정된 기록을 위하여 실온(20~25°C)에서 진행하였으므로 대사과정에서 공급하는 에너지인 ATP를 이용하는 Na pump의 활동을 기대하기 힘든 것으로 사료되는 바, 본 실험은 생리학적인 조건에서 미수정란의 Na pump 활동여부 및 성상에 관하여 막전압의 기록을 통하여 알아보려고 시행하였다.

재료 및 방법

8~12 주령의 mouse(ICR, female)를 대상으로 실험 개시 60시간전과 12시간전에 PMSG(pregnant mare serum gonadotropins, Sigma) 10unit, hCG(human chorionic gonadotropins, Sigma) 10unit를 각각 복강 내로 주사하여 과배란을 유도하였다. 복강을 열고 난관으로부터 배란된 egg들을 수집하여 0.1% hyaluronidase(Sigma Type I-S) 용액으로 cumulus cell들을 제거하고 이들 중에서 투명대(zona pellucida)와 극체(polar body)가 분명한 미수정란들을 선택하여 1ml 크기의 실험용기로 옮겨 실험을 진행하였다.

막전압의 기록은 Fig 1과 같이 끝이 30~40 μ m인 glass pipette을 이용하여 미수정란을 지지하고 3M KCl로 채운 30~50M Ω 사이의 유리미세전극을 미세조정기

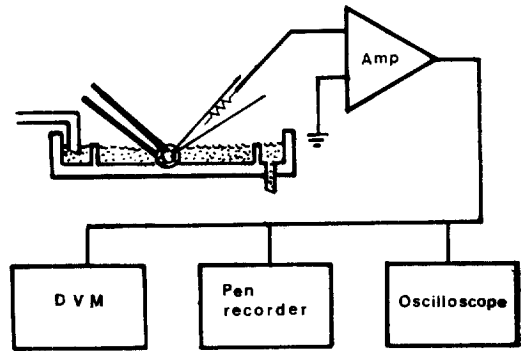


Fig 1. Recording circuit diagram

Table 1. Composition of experimental solutions

(unit : mM)

	Na	K	Ca	Mg	Mn	Ba	Choline	Cl
Standard	140	6.0	4.0	1.2	—	—	—	156.4
0K	140	—	4.0	1.2	—	—	(140)	150.4(290.4)
15K	140	15	4.0	1.2	—	—	(140)	165.4(305.4)
300Na+ 0 K	300	—	4.0	1.2	—	—	—	310.4
300Na+15 K	300	15	4.0	1.2	—	—	—	325.4
4Mn+ 0 K	140	—	—	1.2	4.0	—	—	150.4
4Mn+15 K	140	15	—	1.2	4.0	—	—	165.4
0Na+ 0 K	—	—	4.0	1.2	—	—	140	150.4
0Na+15 K	—	15	4.0	1.2	—	—	140	165.4
4Ba+ 0 K	140	—	—	1.2	—	4.0	—	150.4
4Ba+15 K	140	15	—	1.2	—	4.0	—	165.4

All experimental solutions contains BSA 2mg/ml, PVP 2mg/ml and glucose 1mg/ml. pH of all media was adjusted to 7.4 at 37°C. To observe the osmotic effect with standard Na⁺ concentration, the equimolar choline chloride with Na⁺ was added to the standard solution.

를 이용, 투명대를 통과하여 egg membrane내에 삽입한 다음 agar bridge reference electrode 사이의 막전압을 증폭기(amplifier)를 통하여 oscilloscope (Tektronix, R5113)와 physiograph(Narco Biosystem, MK-IV-P)등으로 관찰 기록하였다. 실험용액의 삼투질 농도 측정은 osmometer(Precision, Osmomette A)를 이용하였다.

실험용액은 Table 1과 같이 조성하였으며 Na ion 농도를 감소시키거나 제외할 경우는 choline으로 대체하고 K ion 또는 Ca의 농도 변화시에 증가된 농도만큼 Na 농도에서 가감하여 실험에 이용하였다. 삼투압의 효과를 보기 위하여 사용된 용액의 경우는 Na ion의 농도를 높이거나 choline ion을 첨가하여 조성하였다. 모든 실험용액에 egg가 실험용기 바닥에 고착되지 않고 oncotic pressure를 유지하기 위하여¹³ PVP(polyvinylpyrrolidone, Sigma) 2mg/ml과 BSA(bovine serum albumin, Sigma) 2mg/ml, glucose 1mg/ml을 첨가하였다. 실험용액의 pH는 HEPES 10mM과 NaOH 혹은 choline hydroxide를 첨가하여 37°C에서 pH 7.4로 조성하였다.

움겨진 미수정란의 pump 기능에 대한 실험은 1~2 ml/min으로 관류되는 표준실험용액에서 약 30분간 안정시킨 후 유리미세전극을 삽입하였고 삽입 직후 막전압이 일정하게 유지되는 것을 확인한 이후에 실험을 개시하였다.

Na ion의 세포내 유입을 위하여 K-free 용액을 5분 이상 관류시킨 후 high K ion 용액(15mM)을 관류시켜 나타나는 과분극을 pump 활동의 지표로 이용하였으며 한번의 관찰이 끝나면 반드시 10분 이상 표준실험용액을 관류시켜 회복시킨 후에 다음 과정을 적용시켰다. Pump 활동의 크기는 15mM K ion 용액으로 교환 직전의 K-free 용액관류시의 막전압과 교환 직후에 관찰되는 최대과분극사이의 막전압 차이로 하였다(Fig 3). 모든 실험은 37°C의 상태에서 이루어졌으며 신선한 미수정란에서의 자료를 얻기 위하여 채란 후 6시간 이내에 수행하였다.

결 과

Mouse egg의 pump 활동여부: 유리미세전극을 투명대(zona pellucida)를 통한 세포막의 투과와 동시에 안정막전압이 관찰되었다. 삽입 직후 나타나는 안정막전압은 탈분극이나 과분극을 보인 후 일정한 값으로 유지되었으나 유리미세전극 삽입에 의한 egg membrane의 손상으로 -10mV 이상 탈분극된 막전압을 보이거나 터져버린 미수정란은 실험대상에서 제외하였다. 관

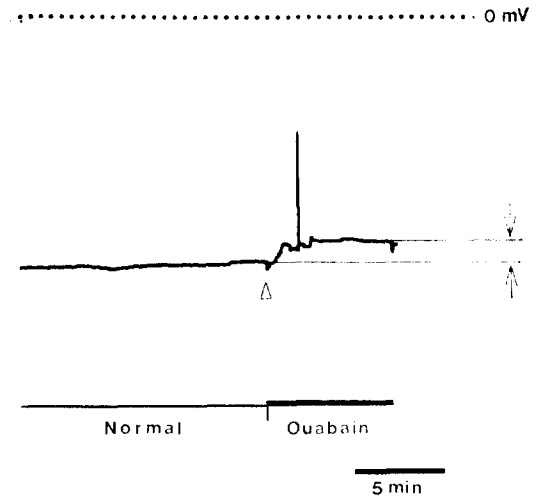


Fig 2. Effect of ouabain on the resting membrane potential. Difference between the depolarized potential and the resting potential is similar to the mean value of pump activities. Dotted line represents the 0mV.

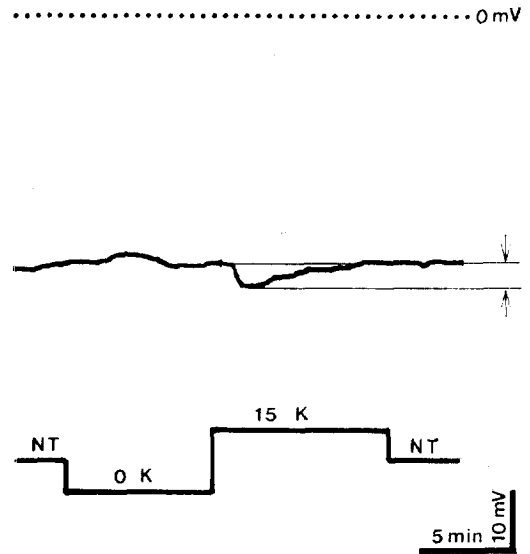


Fig 3. Pump activity as transient hyperpolarization. Arrows indicate the potential change due to the pump and the difference between arrows regards as the parameter of pump activity.

찰된 안정막전압은 $-26.3 \pm 9.2 \text{ mV}$ (mean \pm SD, n=19) 이었다.

안정시 막전압유지에 Na pump 활동이 발현되고 있는지 알아보기 위하여 pump 차단제인 ouabain 10^{-5} M 을 표준용액에 첨가하여 관류시킨 결과 Fig 2와 같이

안정 막전압(-36.5mV)으로부터 3.5mV 탈분극되었다.

Mouse 미수정란에서 관찰된 pump의 정상 : Fig 2에서 나타난 결과에 따라 egg membrane의 pump 활동이 Na-K pump인지 확인하기 위하여 K-free 용액을 5분이상 관류시켜 세포내의 Na ion 농도를 증가시킨 후 15mM K⁺ 용액으로 교환하여 pump의 가동여부를 관찰하였다. Pump의 활동은 Fig 3과 같이 과분극 형태로 기록되었으며 pump 활동의 크기는 15mM K⁺ 용액으로 관류시키기 직전의 막전압과 high K⁺ 관류중에 관찰되는 최대 과분극을 보이는 막전압과의 차이로 계산한 결과 $-3.38 \pm 0.61 \text{mV}$ (mean \pm SD, n=6)이었으며, 과분극 형태로 기록된 pump 활동(Fig 4-A)이 Na-K pump의 specific blocker인 10⁻⁵M ouabain에 의하여 관찰할 수 없었으나(Fig 4-B), 정상실 험용액에서 pump 기능이 다시 회복하였다(Fig 4-C).

A Normal



B Ouabain treatment



C Recovery

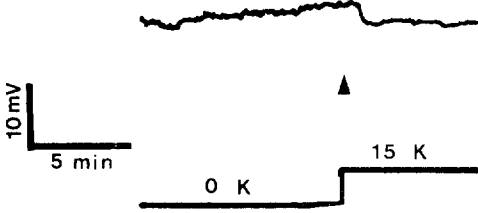


Fig 4. Effect of ouabain on the pump activity. Top trace (A) shows the hyperpolarization due to pump activity in normal solution but hyperpolarization is disappeared by ouabain treatment (B). Twenty minutes later after return to the perfusion of normal solution, hyperpolarization is reappeared. These records were obtained in the same egg. Filled arrows indicate the beginning of high potassium solution.

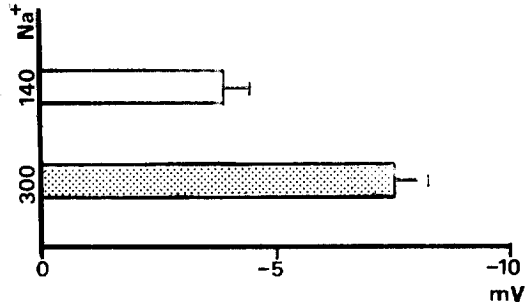


Fig 5. Effect of Na ion concentration on the pump activity.

이상의 과분극현상은 high Na⁺ 용액(300mM Na⁺)으로 관류시킨 결과 $-7.45 \pm 0.75 \text{mV}$ (mean \pm SD, n=2)로 정상실험용액(140mM Na⁺)의 과분극보다 2배 이상 증가 되었다(Fig 5).

Pump 활동에 대한 삼투 효과 : Fig 5에서 진행한 실험용액의 삼투농도는 300mM Na ion의 조성으로 인하여 정상용액의 2배 정도이므로 삼투현상에 따르는

0 mV

A



0 mV

B

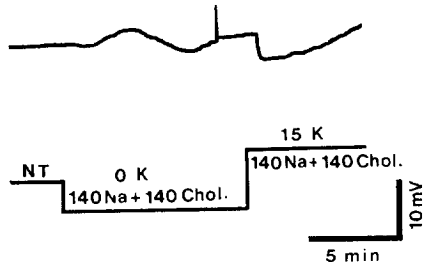


Fig 6. Effect of osmolarity on the pump activity. Note increased hyperpolarization by the Na⁺ concentration, not by osmolar concentration.

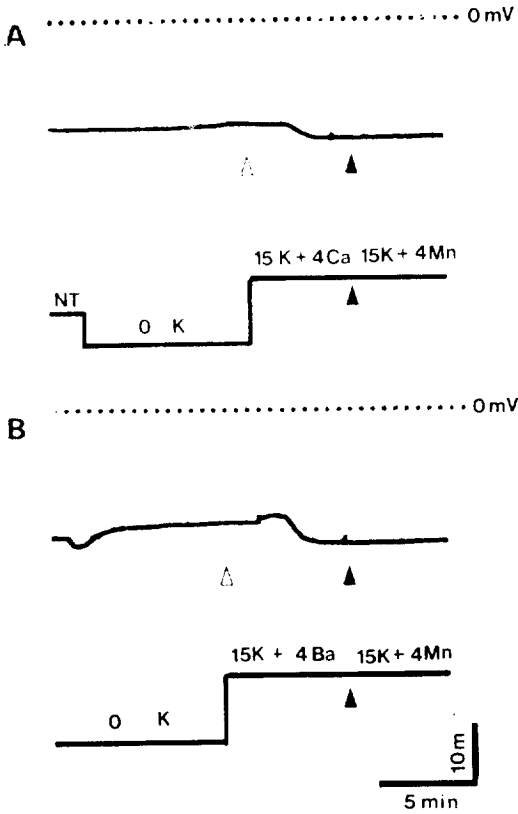


Fig 7. Effect of divalent ions on the pump activity. Open arrows indicate the beginning of high potassium solution, while filled arrows indicate the beginning of the Mn solution.

세포내액의 수분 감소로 세포내 ion 농도변화가 생길 수 있으므로 이에 의한 pump 활동의 변화를 알아보기 위하여 정상용액에 140mM choline chloride만을 첨가하여 삼투농도를 520mOsm/L로(288mOsm/L in standard solution) 높여 동일한 방법으로 진행한 결과, 300mM Na⁺ 용액 관류시 기록된 pump 활동(Fig 6-A, -8.2mV)의 1/2 정도인 -4.5mV로 관찰되었다(Fig 6-B).

Pump 활동에 대한 divalent ion의 효과: 미수정란에서 관찰되는 pump 활동기간은 15mM K⁺ 용액 관류 기간동안 지속적으로 나타나고 있기 때문에 이 기간동안 i) Na pump 활동에 이어 Ca²⁺-dependent ionic exchange 활동에 기인하거나, ii) Ca channel을 통하여 electrogenic pump가 이루어지고 있는지 알아보기 위하여 pump 활동 개시 후 1~2분경에 Ca ion 대신 Ca blocker인 같은 농도의 Mn²⁺으로 조성한 용액으로 관류시켜 주었으나 Fig 7과 같이 pump 활동의 변화를 관찰 할 수 없었다.

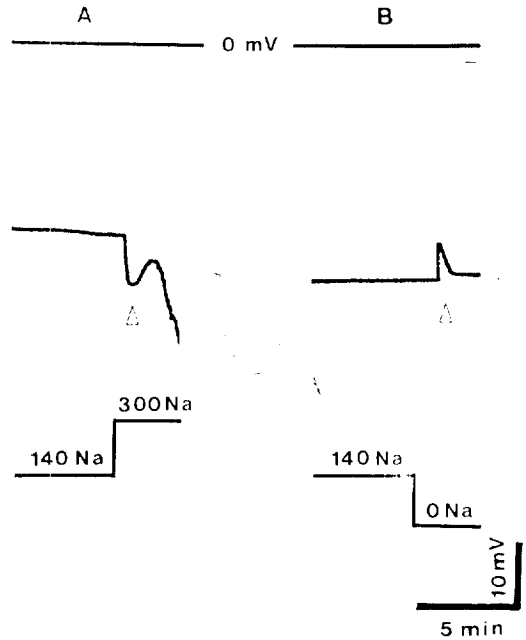


Fig 8. Changes of membrane potential due to the Na⁺ concentration. Membrane potential is hyperpolarized transiently at 300mM Na⁺ (A) and is depolarized at Na-free solution (B). These records was obtained on the same egg.

고 찰

Sodium-potassium transport에 대한 증거는 Hodgkin과 Keynes 등에 의하여 squid giant axon에서 행한 일련의 실험에서 보여주고 있는 바, Na ion은 활동전압을 빈번하게 유발시키거나 세포내 주입을 통하여 intracellular Na loading 후의 Na efflux rate를 측정하여 얻은 결과로 4가지 특징을 제시하였다. 첫째로 세포내사과정의 억제제의 투여로 Na efflux가 감소하거나 사라지고, 둘째로 세포외에서 digital glycoside인 ouabain을 세포외에서 적용하여 pump기능을 차단시킬 수 있으며 셋째로 세포의 K ion을 제거하였을 때 pump 기능이 억제 되었으며 마지막으로 Na ion 대신 처환시킬 수 있는 Li ion은 pump 활동에 의하여 세포 밖으로 이동되지 않는다고 하였다. 생화학적으로 순수하게 동정된 Na pump는 ATPase를 함유하여 ATP 한 분자의 hydrolysis에 의하여 3개의 Na ion과 2개의 K ion을 교환하여 결과적으로 하나의 positive charged molecule이 세포밖으로 유출되어 막전압을 과분극(hyperpolarization) 시키는 electrogenic한 면을 발휘하므로 안정시 농도경사에 의하여, 또는 연속적인 흥

분과의 결과로 생기는 Na conductance에 의한 Na ion의 유입과 K ion의 유출을 환원시키는 효과를 거두고 있다.¹⁴ 따라서 electrogenic property에 의한 막전압의 pump 기여도는 다음과 같은 식을 이용하여 계산할 수 있는 바,

$$V_m = \frac{RT}{zF} \ln \frac{r[K]_o + b[Na]_o}{r[K]_i + b[Na]_i}$$

위 식에서 V_m 은 막전압, R 은 gas constant, z 는 valency, F 는 Faraday constant이며 r 은 pump ratio (여기서는 1.5), b 는 Na ion과 K ion간의 막투과도비를 나타내고 있고 $[K]_o$ (or $[K]_i$)는 세포외(또는 세포내) K ion 농도, $[Na]_o$ (or $[Na]_i$)는 세포내외의 Na⁺ 농도를 나타내므로 b 를 0.03으로 하여 계산하면 Na ion과 K ion의 세포외의 조성에 의존하나 일반적으로 6~7mV 정도의 막전압에 대한 pump 효과를 생각할 수 있으며 이는 작은 세포일수록 큰 비중을 차지하는 것으로 예상할 수 있다.¹⁴ 특히 mouse의 미수정란에서 Na ion에 의한 막투과도는 Fig 8에서 볼 수 있는 바와 같이 두드러지게 나타나고 있으며 미세전극 삽입에 의한 leakage conductance도 존재하고 있으므로,^{5,7,8} 일정한 안정막전압의 유지를 위하여 Na pump의 존재는 필수적이며 막전압에 대한 기여도도 클 것으로 사료된다. 이상과 같은 전제하에 mouse 미수정란에서 관찰한 결과, 안정막전압에 기여하는 pump의 활동은 차단제인 10⁻⁵M ouabain에 의하여 resting membrane potential이 3.5mV 탈분극되었고 이 값은 K-free 용액으로 egg cell 내에 Na ion loading 시킨 후 15mM K ion 용액 관류에 의하여 생긴과분극값(-3.8±0.61 mV)과 유사한 수준으로 막전압 유지에 pump 기능이 안정막전압 유지에 관여함을 알 수 있었다. Pump 활동은 Fig 3과 같이 과분극의 형태로 electrogenic하게 기록되었으며 정상용액에서 관찰된 pump 기능이 Na pump blocker에 의해 사라졌다가 회복시키면 다시 pump 기능이 나타난 결과로 보아 Na-K pump임을 확인할 수 있었다(Fig 4). 아울러 세포의 높은 농도의 Na 용액에 의하여 pump 기능이 증가하였으며 제시되지 않았으나 Na-free 용액에 의하여 pump 활동은 기록되지 않았으며 삼투현상에 기인한 pump 기능의 변화는 보이지 않고 세포의 Na ion 농도에 의존하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig 5 & 6).

본 실험에서 나타난 여러가지 결과로 미루어 볼 때 mouse unfertilized egg cell에서 Na-K pump가 존재하고 있으며 그 성상은 electrogenic하나 pump 활동기간이 심장근¹⁵이나 개구리 골격근¹⁶과 달리 오랫동안 유지되며 high K⁺ 용액(15mM)에 따른 탈분극현상을

관찰할 수 없었고 과분극 개시 후 1~2분이 경과한 후 바꾸어준 Mn²⁺ 용액관류에 기인한 pump 활동의 변화를 기록할 수 없었다(Fig 7). 이와같이 오래 유지되는 pump 활동(long-lasting hyperpolarization)을 설명할 수 있는 것으로 15mM high K⁺ 용액에 의한 Na pump의 가동으로 과분극이 나타난 후 1) Na-Ca exchange mechanism에 의한 과분극의 부가나 연장, 또는 2) Ca-dependent K channel conductance 변화에^{4,17} 의한 K ion의 투과도 증가에 연유하는 것으로 생각할 수 있으며 3) non-specific channel을 통한 세포내 K⁺ 혹은 Na⁺의 유출이나 Cl⁻의 유입에 의한 과분극의 지속현상을 고려할 수 있다. 미수정란은 발생과정상 수정이전의 미분화된 세포로서 tunicate egg나 sea urchin egg에서 보이는 Na specific channel 등과 같이 분화된 channel이 아닌 non-specific channel을 통하여 흥분성이 발휘되는 것으로 알려지고 있다.^{18,19,20} 이러한 미분화된 non-selective channel 차단제인 Mn ion의 존재시에도 과분극현상이 지속되는 것으로 보아 이 channel을 통한 ion의 이동에 의한 과분극 형성은 어려울 것으로 생각된다.

결 론

포유동물인 mouse 미수정란의 안정막전압에 직접적으로 영향을 발휘하는 pump 활동 여부 및 성상에 관하여 알아보기 위하여 과배란을 유도하여 얻은 egg에 유리 미세전극을 삽입하고 세포내 막전압의 기록을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Mouse 미수정란의 안정막전압은 10⁻⁵M ouabain에 의하여 탈분극되었다.
2. Mouse 미수정란의 pump 활동은 -3.38±0.61mV (mean±SD, n=6) 크기의 electrogenic property를 보이는 과분극 형태로 기록되었다.
3. 과분극 형태의 pump 활동은 10⁻⁵M ouabain에 의하여 차단되었으며 세포외의 300mM Na⁺ 용액에서 과분극의 크기가 증가하였고 (-7.45±0.75mV, n=2), Na-free 용액에서 관찰할 수 없었다.
4. 15mM K⁺ 용액 관류시 관찰되는 과분극은 Mn ion에 의하여 변화되지 않았다.
5. 이상의 결과로 보아 mouse 미수정란의 안정막전압에 직접적으로 영향을 미치는 ouabain-sensitive Na-K pump가 존재하고 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Kuffler SW, Nicholls JG, Robert Martin A. The role of active transport. In: *From Neuron To*

- Brain* 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1984;122~125.
2. Kurachi Y, Noma A, Irisawa H. Electrogenic sodium pump in rabbit atrio-ventricular node cell. *Pflügers Arch* 1981;391:261~266.
 3. Glitsch HG, Grabowski W, Thielen J. Activation of the electrogenic sodium pump in guinea-pig atria by external potassium ions. *J. Physiol* 1978;276:515-524.
 4. McNiven AJ, Yoshida S, Georgiou P, et al. A delayed all-or-none hyperpolarisation induced by a single Ca action potential in hamster eggs. *Pflügers Arch* 1988;412:451~453.
 5. Peres A. Resting membrane potential and inward current properties of mouse ovarian oocytes and eggs. *Pflügers Arch* 1986;407:534~540.
 6. Mitani S. The reduction of calcium current associated with early differentiation of the murine embryo. *J Physiol* 1985;363:71-86.
 7. Hagiwara S and Jaffe LA. Electrical properties of egg cell membranes. *Ann Rev Biophys Bioeng* 1979;8:385-416.
 8. Okamoto H, Takahashi K, Yamashita N. Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin. *J Physiol* 1977; 267:465~495.
 9. Yamashita N. Enhancement of ionic currents through voltage-gated channels in the mouse oocyte after fertilization. *J Physiol* 1982;329: 263~280.
 10. Eusebi F, Colonna R, Mangia F. Development of membrane excitability in mammalian oocytes and early embryos. *Gamete Res* 1983;7:39-47.
 11. Marx A, Ruppertsberg JP, Rüdell R. Dependence of the electrogenic pump current of *Xenopus* oocytes on external potassium. *Pflügers Arch* 1987;408:537~539.
 12. Peres A, Bernardini G, Mancinelli E, et al. A voltage-dependent K⁺ channel controlling the membrane potential in frog oocytes. *Pflügers Arch* 1985;403:41~46.
 13. Powers RD and Tupper JT. Some electrophysiological and permeability properties of the mouse egg. *Dev Biol* 1974;38:320~331.
 14. Kuffler SW, Nicholls JG, Martin AR. Active transport of ions. In: *From neuron to brain*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1984;187~205.
 15. Hong SG, Kwun JG, Chung SI. Effect of thyroid hormone on the electrical activity of rabbit heart. *대한생리학회지* 1986; 20:17~29.
 16. Venosa RA. Ionic movements across the plasma membrane of skeletal muscle fibers. In: Giebisch G, Tosteson DC, Ussing HH. *Membrane Transport in Biology* Vol. II. Berlin: Springer-Verlag, 1982;211~262.
 17. Miyazaki S, Igusa Y. Ca-mediated activation of a K current at fertilization of golden hamster eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:931~935.
 18. Hagiwara S. *Membrane potential-dependent ion channels in cell membrane; Phylogenetic and developmental approaches*, Distinguished Lecture Series of the Society of General Physiologists Volume 3. New York: Raven Press, 1983;49~60.
 19. Yoshida S. Permeation of divalent and monovalent cations through the ovarian oocyte membrane of the mouse. *J Physiol* 1983;339: 631~642.
 20. Shen SS. Membrane properties and intracellular ion activities of marine invertebrate eggs and their changes during activation. In: Hartmann JF, ed. *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. New York: Academic Press, 1983;213~267.