

Ca²⁺ Inhibitor가 생쥐난자 성숙에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 산부인과 · 성신여자대학교 생물학과*

정혜원 · 유한기 · 배인하*

Effect of Calcium Inhibitors on Mouse Oocyte Maturation

Hye Won Chung, M.D., Han Ki Yoo, M.D. and In-Ha Bae, Ph. D.*

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Woman's University
Department of Biology, College of Natural Science, Sungshin Women's University*
Seoul, Korea*

= Abstract =

In the present study, it was aimed to find the role of calcium on the maturation of mouse follicular oocytes as well as for the role of calcium inhibitors, Ni²⁺ and La³⁺.

Mouse follicular oocytes were cultivated in different media at 37°C, in 100% humidified CO₂ incubator for 3 and 17 hrs.

The results were as follows ;

1. There was no differences in GVBD between the control and experimental groups during the 3 hr culture.
2. Mouse oocytes were matured to higher rate in MHBS rather than HTF for 17 hr culture.
3. Maturation rate was significantly lower in Ca²⁺-free and Ca²⁺ 0.4 mM which were tested, compared to other calcium concentration used in the present study.
4. Calcium inhibitor, Ni²⁺, it showed highest degeneration rate at all calcium concentrations and additionally in Ni²⁺ 100 μM treated group next. Maturation rate was significantly decrease as the Ca²⁺ inhibitor concentration increased.
5. In all Lanthanum treated groups of calcium-free, degeneration were significantly high treated groups at 0.4 mM Ca²⁺ concentrations degeneration rates of all group were significantly lower than that of the control but maturation rates were not significantly different in any group. In lanthanum 10 μM treated group at 0.4 mM and 0.8 mM calcium concentration, its maturation rate was significantly higher than that of the control. Maturation rates of all groups of lanthanum treated at 1.71 mM calcium concentration were not significantly different among groups.
6. In the calcium treated group (0.4 mM-1.7 mM), the presence of phosphate does not seem to be needed for oocyte maturation. However, the presence of phosphate at Ca²⁺ 0.8 mM only seems to stimulated maturation.

서 론

포유류에서 난자의 감수분열은 태생기 동안에 시작되었다가 출생전 직후로 제 1감수분열의 전기 (prophase) 중 복사기 (diplotene stage)에서 정지되는데 이 정지는 사춘기까지 지속되

다가 preovulatory gonadotropin surge에 의해서 감수분열이 재개 (resumption of meiosis)되어 제 2감수분열 중기 (2nd meiotic division metaphase)에서 난자가 배란된다.

한편 배란전 여포 (preovulatory follicle)에서 얻은 유리된 난자를 체외에서 적절한 배양액에서 배양하면 자발적인 성숙 (spontaneous matu-

ration)이 일어나게 되며 (Pincus와 Enzmann, 1985; Edwards, 1965; Bae와 Cho, 1982), 최근 홀몬자극을 하지 않은 사람의 난소에서 미성숙 여포난자 (follicular oocyte)를 체외 성숙시켜서, 수정후 agonal recipient에게 이식하여 임신에 성공하여 (Cha 등, 1991) 인간체외수정 (human In Vitro Fertilization)에 새로운 관심이 되고 있다.

난자의 체외성숙에 있어서 calcium이 난자의 생존도 (viability) 뿐만 아니라 난자성숙 과정에서도 필수적이라고 보고되어 있으며 (De Felici와 Siracusa, 1982; Powers와 Paleos, 1982; Bae와 Channing, 1985; Bae와 Chang, 1989), 특히 포유류의 난자성숙에 Ca^{2+} 이 어떠한 역할을 하는지에 대해서 최근 많은 연구가 되고 있다 (Tsafriri와 Bar-Ami, 1978; Leibfried와 First, 1979; Paleos와 Powers, 1980, 1981; Sato 등, 1980; Jagiello 등, 1982; Powers와 Paleos, 1982; Bae와 Channing, 1985; Bae와 Chang, 1989).

이러한 연구중 1980년 Paleos와 Powers, 1980년 Sato 등, 1982년 Powers와 Paleos는 돼지와 생쥐 난자의 핵막붕괴 (germinal vesicle breakdown), 난자생존도 (oocyte viability), 극체형성 (polar body formation)에 Ca^{2+} 이 요구된다고 하였으며, Ca^{2+} -free 배양액에서 생쥐와 돼지 난자를 배양하면 급속한 난자괴사 및 변성 (oocyte necrosis and degeneration)이 일어남을 보고하였다.

Ca^{2+} 이 난자성숙에 어떠한 기전으로 관여하는지에 대한 연구로 난자를 여포로부터 분리시키면 난구세포와 난자 사이의 gap junction이 깨어져 난자의 자발적 성숙이 일어나는데, 이때 난자내로 Ca^{2+} 이 유입 (influx)되어서 난자내의 다른 대사과정을 증진시키어 감수분열이 재개되는 것으로 추정하고 있다 (Bae와 Kang, 1991).

포유류 난자의 체외성숙에 있어서 필요한 최소의 external calcium의 농도는 돼지 여포난자 (pig follicle oocyte)에서 0.05 mM (Bae와 Channing, 1985), 난구세포가 제거된 생쥐난자 (mouse denuded oocyte)에서 0.5 mM (De Felici와 Siracusa, 1982)로 보고되었으며, calcium antagonist로 Ca^{2+} 의 기전을 규명하려는 연구로는 1985년 Bae와 Channing이 돼지 여포난자에서 verapamil이 핵막붕괴를 억제한다고 보고하였고 1982년 De Felici와 Siracusa는 생쥐난자에서 오히려 Ca^{2+} -free media에서 La^{3+}

1 mM과 Sr^{2+} 10 mM이 보호효과 (protective effect)가 있다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 미성숙 생쥐난자의 17시간 배양시 어떤 external Ca^{2+} 농도에서 난자성숙이 억제되는지에 대한 실험과 calcium inhibitor인 Ni^{2+} 와 La^{3+} 이 난자성숙에 미치는 영향을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 난자의 수집

Albino계통인 ICR의 암컷으로 생후 21-24일 된 것으로 사용하였다. 경추골 파열로 도살 후 난소를 떼어 해부현미경 (SNZ-U, Nikon, Japan) 하에서 지방조직 및 다른 혈액응고 성분들을 완전히 제거한 후에 새로운 배양액에 옮겼다. 다시 2회의 세척과정을 거친 후 해부현미경하에서 성장한 여포를 예리한 바늘로 터뜨려 난자를 여포로부터 분리하였다.

분리한 난자의 난구세포 (cumulus cell)는 micropipette을 이용하여 흡입배출을 반복하는 물리적 방법으로 제거하였으며, 해부현미경하에서 난구세포가 제거된 정상 미성숙 난자 (denuded germinal vesicle oocyte)만을 수집하여 사용하였다. 수집된 난자를 다시 배양액에서 micropipette을 이용하여 흡입배출을 반복하여 3번 세척하였다. 이때 Ca^{2+} -free 배양액에서 난자 퇴화가 증가하므로 Ca^{2+} 1.7 mM의 배양액에서 세척하였다.

2. 난자의 배양

수집된 난자를 해부현미경하에서 (300X) 검경하여 퇴화하고 있거나 크기가 크거나 적은 것은 제외하였고, 건강하게 보이는 난구세포가 제거된 미성숙난자만을 골랐다.

난자의 배양은 배양접시 (plastic dishes, Falcon; 60 × 15 mm) 위에 배양액을 50 μ l씩 놓고 그 위에 평형시킨 파라핀유 (equilibrated paraffin oil)로 덮어서 (Brinster, 1963) 37°C, 5% CO_2 in air, 100% 습도가 유지되는 배양기 내에서 배양하였다.

3. 배양액과 화학물질 첨가

먼저 기본 배양액을 정하기 위하여 MHBS (modified Hank' balanced salt solution, Bae and Channing, 1985)와 HTF (Human tubal fluid, Quinn 등, 1985)를 사용하여 난자를 17시간 배

Table 1. Medium component

Component (M.W.)	MHBS		HTF	
	g/l	mM	g/l	mM
NaCl (58.45)	7.057	120.74	5.9375	101.6
KCl (74.55)	0.4	5.3655	0.3498	4.69
MgSO ₄ (120.4)	0.0977	0.8118	0.02408	0.20
Na ₂ HPO ₄ (142.0)	0.0477	0.3358		
KH ₂ PO ₄ (136.09)	0.06	0.4409	0.05036	0.37
NaHCO ₃ (84.01)	0.35	4.166	2.1	25.0
CaCl ₂ (111.0)	0.1898	1.711	0.22644	2.04
Glucose (180.16)	1.0	5.55	0.5009	2.78
Na-lactate (112.07)	0.2802	2.5	2.3989	21.4
Na-pyruvate (110.0)	0.033	0.3	0.363	0.33
Phenol Red	0.01		0.001	
Streptomycin	0.052		0.050	
Penicilin-G	0.064		0.060	
BSA	4.0		4.0	
Chemical agents				
CaCl ₂ ·2H ₂ O (M.W.=111.0)		0.4mM		
		0.8 mM		
		1.2 mM		
		1.7 mM		
NiCl ₂ ·6H ₂ O (M.W.=237.51)		10 μM		
		100 μM		
		1 mM		
LaCl ₃ ·7H ₂ O (M.W.=371.3)		10 μM		
		100 μM		
		1 mM		

MHBS=Modified Hank's balanced salt solution. M.W.=Molecular Weight.
HTF=Human tubal fluid. BSA=Bovine Serum Albumin.

양하여 성숙율을 비교한 결과 MHBS가 성적이 더 우수하여 MHBS를 기본 배양액으로 선택하여 화학물질을 처리하였다. 두 배양액의 조성은 표 1과 같다. MHBS에서 NaCl (126.17 mM), KCl (5.37 mM), MgSO₄·7H₂O (0.81 mM), Na₂HPO₄·12H₂O (0.34 mM), KH₂PO₄ (0.44 mM), Glucose (5.55 mM), Phenol red (10 mg/L), Penicilin (100IU/ml), Streptomycin (50 μg/ml)을 stock solution I으로 하여 calcium농도별 실험 및 nickel 처리실험에서 사용하였으며, lanthanum은 stock solution I에서 침전이 생겨서 Na₂HPO₄·12H₂O와 KH₂PO₄를 뺀 stock solution II를 만들어서 사용하였다. Na-lactate (2.5 mM), Na-pyruvate (0.33 mM)도 각각 stock solution을 만들어 놓고 사용하였으며, CaCl₂·2H₂O (M.W.=111.0, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)는

calcium농도별로 0.4 mM, 0.8 mM, 1.2 mM, 1.7 mM의 각기 다른 stock solution을 만들어서 사용하였다. NiCl₂·6H₂O (M.W.=237.51, Shinyo Pure Chemical Co., Japan)과 LaCl₃·7H₂O (M.W.=371.3, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)도 각각 10 μM, 100 μM, 1 mM의 stock solution을 만들어서 사용하였다. 각각의 stock solution은 필요시 적당량을 따내어서 사용하였다. 각각 배양액에 0.4% Bovine Serum Albumin (BSA; Fraction V, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)를 첨가했고 난자처리 과정에서 pH변화를 방지하기 위해 10.0 mM의 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethanesulphonic acid (HEPES; Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)를 0.2N의 NaOH로 미리 pH 7.3으로 적정한 후에 첨가하였다. 배양액은 pH 7.20-7.30,

280 mOsm (Bae와 Foote, 1980)로 조정시킨 후 배양기에서 2시간 이상 평형시킨 후 사용하였다. Calcium농도별, Ca²⁺각기 농도마다 NiCl₂ 10, 100, 1000 μM, LaCl₃ 10, 100, 1000 μM의 drop을 각기 다른 배양접시에 만들어서 각 drop당 10-20개의 난자를 넣어서 배양하였다. 실험에 사용된 모든 기구는 고온 또는 고압멸균 시켰으며 배양액은 매 실험마다 stock solution으로 부터 새로 만들었으며, 사용직전에 0.22 μM Millipore membrane으로 일회용 주사기를 사용하여 여과한 후 사용전에 2시간 이상 평형시켰다.

4. 배양후 난자의 검경

난자의 성숙상태를 배양후 3시간과 17시간 후에 간섭 위상차 도립현미경 (Interference phase microscope, Labovet, Leitz, Germany)하에서 관찰하였다.

미성숙 난자 (immature oocyte)는 원상 그대로의 핵막이 있는 난자핵막상태 (Germinal vesicle)의 난자를 구분하였고, 핵막붕괴난자 (Germinal vesicle breakdown oocyte)는 난자핵막이 소실되었으며 제 1극체가 나타나지 않은 상태를 구분하였고, 퇴화난자 (degenerative oocyte)는 metaphase I, anaphase I, telophase I, metaphase II에서 비정상적으로 응축된 난자 (condensed oocyte)와 이핵난자 (binuclear oocyte) 및 fragmented oocyte등도 이에 포함시켰다.

대조군과 실험군의 통계적 유의성은 student-t test로 하였다.

결 과

1. MHBS와 HTF의 미성숙 생쥐난자의 체외 성숙율 비교

난구세포가 제거된 미성숙 생쥐난자 (mouse denuded germinal vesicle oocyte)를 17시간동안 MHBS (대조군)와 HTF배양액에서 배양 후 난자성숙의 양상을 판별하였다 (표 2).

MHBS에서 MII로 성숙한 난자는 67.95%였고, HTF에서는 45.0%였으며, 핵막붕괴는 MHBS에서 14.1%, HTF에서 33.0%였고, 난자 핵막 상태로 머물러 있는 비율은 MHBS에서 9.6%, HTF에서 15.6%였다. 두 배양액의 성숙율의 차이는 p<0.01로 통계적으로 유의하였다.

2. 미성숙 생쥐난자의 체외성숙율에 Calcium 농도가 미치는 영향

난구세포가 제거된 미성숙 생쥐난자를 Ca²⁺-free, Ca²⁺ 0.4 mM, Ca²⁺ 0.8 mM, Ca²⁺ 1.2 mM, Ca²⁺ 1.7 mM (대조군)에서 3시간과 17시간 배양 후 난자성숙율을 비교하였다.

3시간 배양후 핵막붕괴 (GVBD)가 일어나는율은 대조군, 실험군 모두에서 73-83%였다 (data not shown).

17시간 배양후 MII까지로의 성숙율은 Ca²⁺ 1.7 mM에서 72.0%로 가장 높았고 1.2 mM과 Ca²⁺ 0.8 mM은 각각 61.9%, 60.3%로 비슷하였고, Ca²⁺ 0.4 mM에서 44.8%로 성숙율이 유의하게 떨어졌으며 (P<0.05), Ca²⁺-free에서는 8.6%로 매우 낮은 성숙율을 보였다 (P<0.01). 난자의 퇴화율은 Ca²⁺ 0.4 mM-Ca²⁺ 1.7 mM까지는 유사하였으나, Ca²⁺-free media에서 48.6%로서 매우 높은 퇴화율을 보였다 (그림 1).

3. 미성숙 생쥐난자의 체외성숙율에 Calcium inhibitor인 Ni²⁺이 미치는 영향

난구세포가 제거된 미성숙 생쥐난자를 Ca²⁺-free, Ca²⁺ 0.4 mM, Ca²⁺ 0.8 mM, Ca²⁺ 1.7 mM의 각기 다른 Ca²⁺농도별로 Ni²⁺을 처리하지

Table 2. Comparison of mouse denuded oocyte maturation rate between modified Hank's balanced salt solution and Human tubal fluid

Medium	Number of oocytes	Number of oocytes and percent of oocytes				P vs MHBS
		GV	GVBD	MI I	Deg.	
Modified Hank's balanced salt solution + 0.4% BSA	156	15 (9.6%)	22 (14.1%)	106 (67.95%)	13 (8.3%)	
Human tubal fluid + 0.4% BSA	109	17 (15.6%)	36 (33.0%)	49 (45.0%)	7 (6.4%)	<0.01

GV=germinal vesicle. GVBD=germinal vesicle breakdown. MII=metaphase II. Deg.=degeneration.

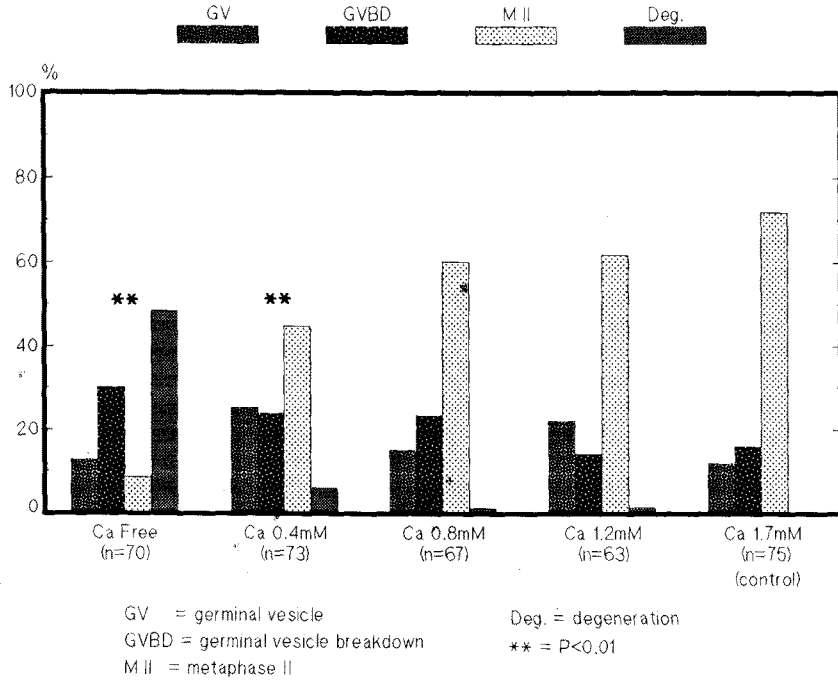


Fig. 1. Effect of Calcium concentration on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs.

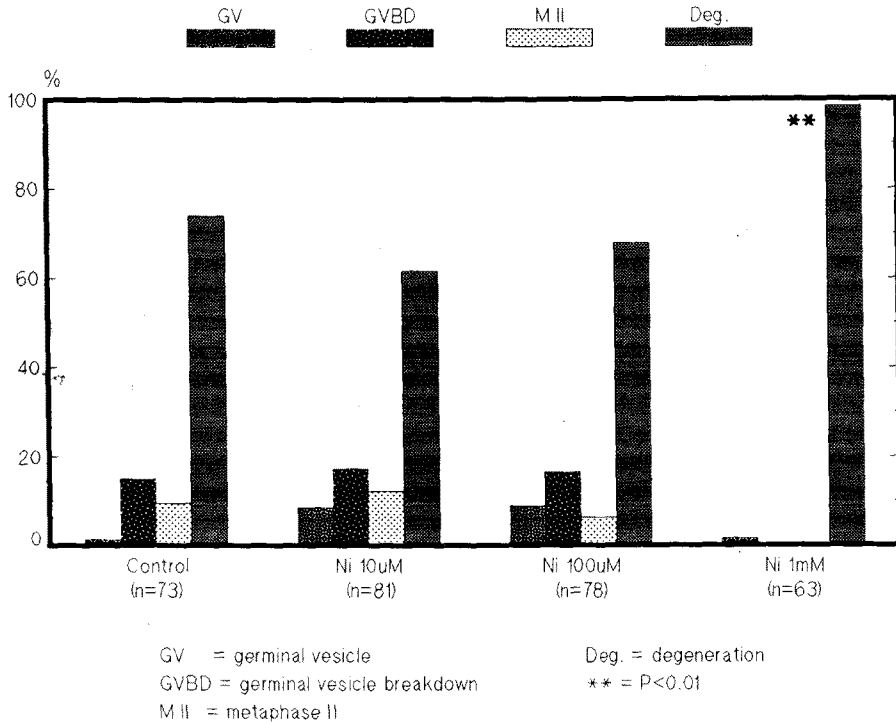


Fig. 2. Effect of Calcium inhibitor (Mi^{++}) on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs at Ca^{++} free.

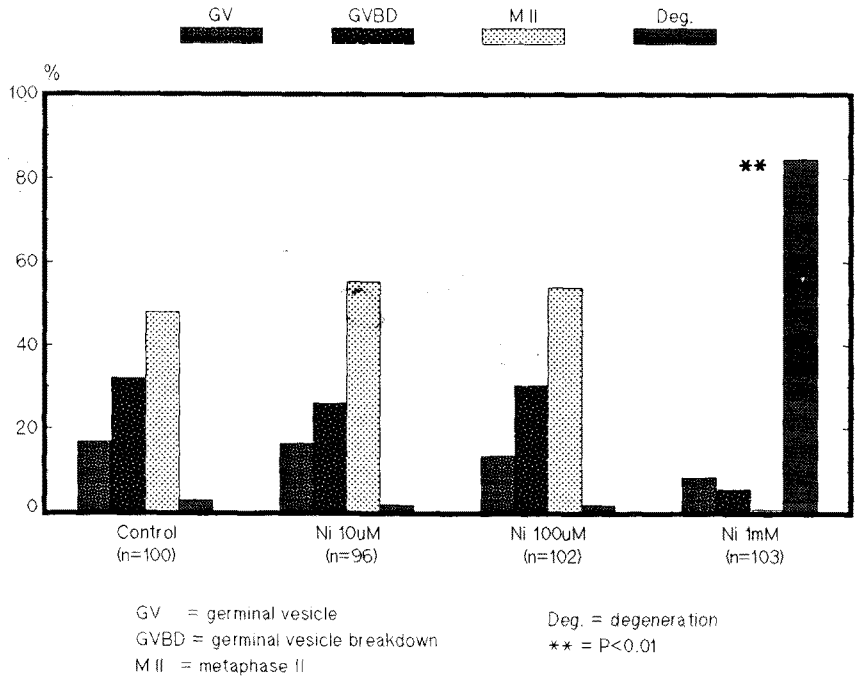


Fig. 3. Effect of Calcium inhibitor (Ni^{++}) on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs at Ca^{++} 0.4 mM.

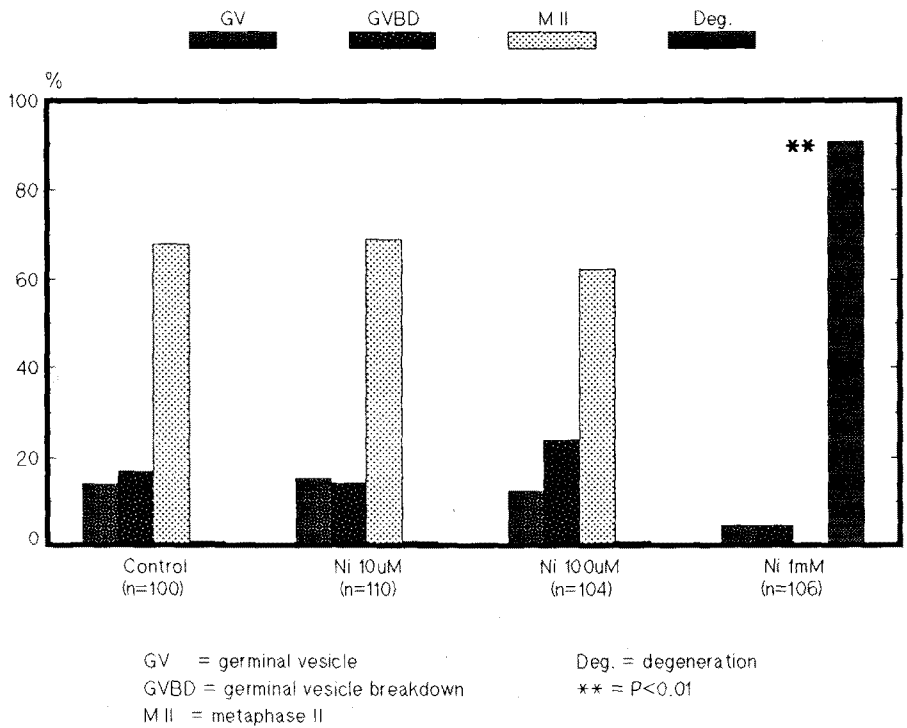


Fig. 4. Effect of Calcium inhibitor (Ni^{++}) on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs at Ca^{++} 0.8 mM.

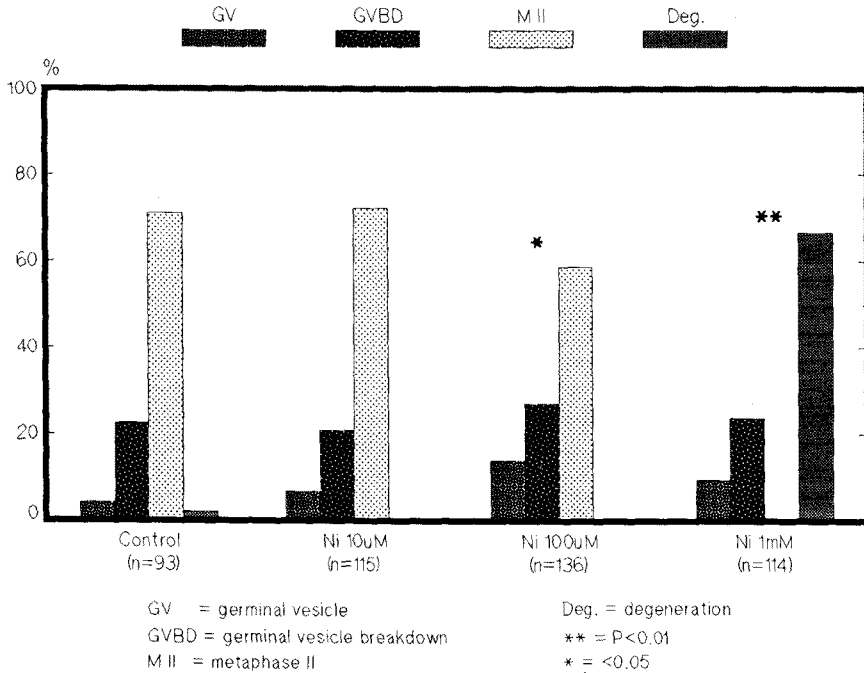


Fig. 5. Effect of Calcium inhibitor (Ni^{++}) on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs at Ca^{++} 1.7 mM.

않은 대조군과 NiCl_2 10 μM , 100 μM , 1 mM로 처리한 실험군을 3시간 및 17시간 배양후 난자성숙율을 비교하였다.

3시간 배양후 전체 대조군과 실험군 모두에서 72-89% 사이의 핵막 붕괴율을 보였다 (data not shown).

17시간 배양 후 Ca^{2+} -free 배양액에서 농도별로 Nickel을 처리한 결과 대조군, 실험군 모두 높은 난자 퇴화율을 보였으며, 특히 Ni^{2+} 1 mM에서 대조군보다 매우 높은 퇴화율을 보였다 ($P < 0.01$) (그림 2).

Ca^{2+} 0.4 mM과 0.8 mM에서 Ni^{2+} 을 처리할 경우에 대조군, 100 μM , 100 μM 에서는 난자성숙율에서는 별다른 차이가 없었으나, Ni^{2+} 1 mM 처리한 경우에는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 난자성숙율을 보였다 ($P < 0.01$) (그림 3, 4).

Ca^{2+} 1.7 mM에서, Ni^{2+} 10 μM 에서는 대조군에 비해 난자성숙율에 있어서 별다른 차이가 없었으나, Ni^{2+} 100 μM 처리시 대조군에 비해 유의하게 낮은 난자성숙율을 보였고, Ni^{2+} 1 mM의 경우 M II로 성숙하는 난자가 하나도 없었으며 66.7%의 퇴화를 보여 대조군에 비해 매우 낮은 난자성숙율을 보였다 ($P < 0.01$) (그림 5).

4. 미성숙 생쥐난자의 체외성숙율에 Calcium inhibitor인 La^{3+} 이 미치는 영향

난구세포가 제거된 미성숙 생쥐난자를 Ca^{2+} -free, Ca^{2+} 0.4 mM, Ca^{2+} 0.8 mM, Ca^{2+} 1.7 mM의 각기 다른 Ca^{2+} 농도별로 인산(phosphate)을 첨가한 대조군과 인산을 뺀 대조군, 인산을 뺀 배양액에 LaCl_3 10 μM , 100 μM , 1 mM을 첨가한 실험군을 3시간 및 17시간 배양후 관찰하였다.

3시간 배양 후 대조군, 실험군 모두에서 73-89%의 핵막붕괴율을 보였다 (data not shown).

17시간 배양후 calcium inhibitor인 La^{3+} 를 처리한 결과, Ca^{2+} -free 배양액에서는 La^{3+} 처리군 모두에서 대조군보다 유의하게 높은 난자 퇴화율을 보였으며, Ca^{2+} 0.4 mM에서는 La^{3+} 처리군 모두에서 대조군보다 유의하게 낮은 난자 퇴화율을 보였고, Ca^{2+} 0.8 mM에서는 La^{3+} 10 μM 을 처리한 경우에만 대조군보다 높은 난자성숙율을 보였다. Ca^{2+} 1.7 mM에서 La^{3+} (처리군)은 대조군과 차이를 보이지 않았다 (그림 6, 7, 8, 9). La^{3+} 처리군에서는 Ca^{++} -free를 제외한 Ca^{++} 의 존재하에서는 모두 퇴화율이 Ni^{2+} 과는 현저히 다르게 낮은 비율을 보였다.

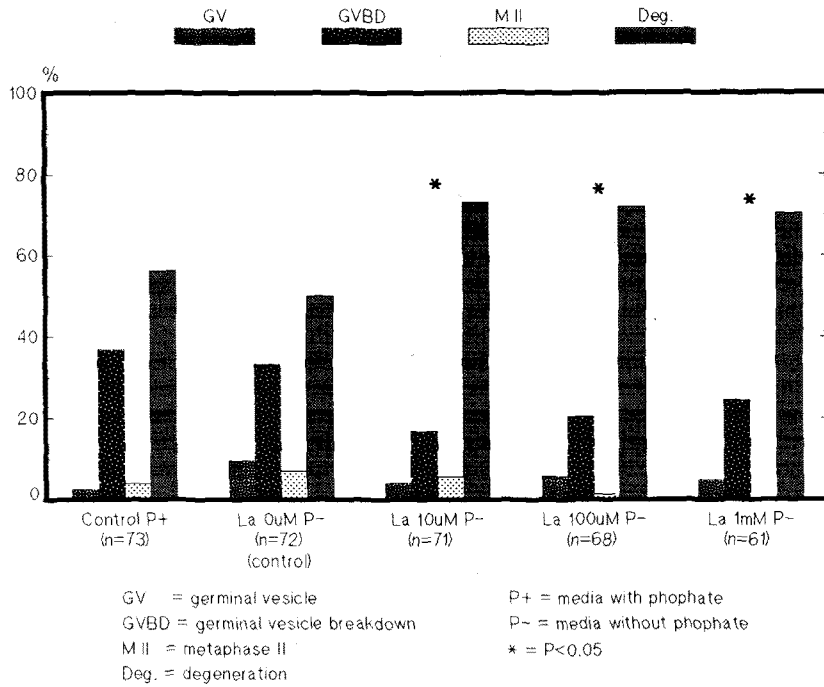


Fig. 6. Effect of Calcium inhibitor (La^{++}) on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs at Ca^{++} free.

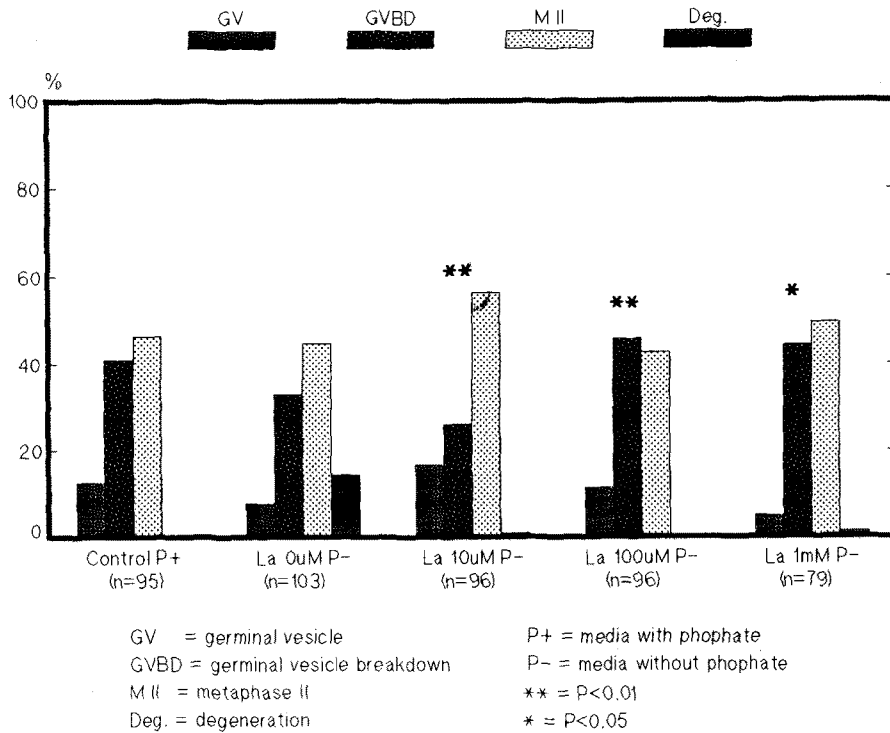


Fig. 7. Effect of Calcium inhibitor (La^{++}) on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs at Ca^{++} 0.4mM.

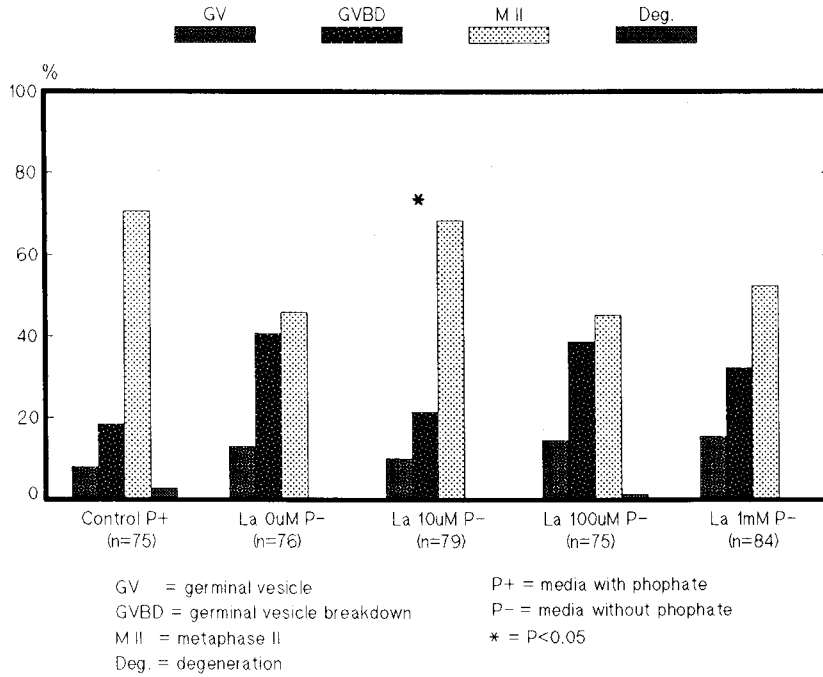


Fig. 8. Effect of Calcium inhibitor (La^{++}) on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs at Ca^{++} 0.8 mM.

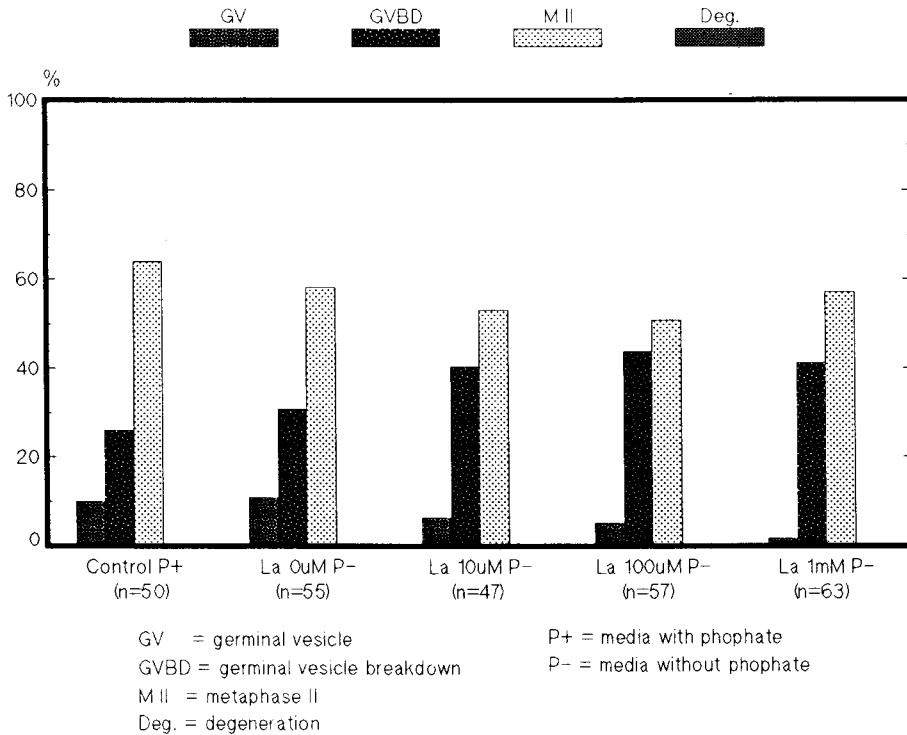


Fig. 9. Effect of Calcium inhibitor (La^{++}) on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs at Ca^{++} 1.7 mM.

5. 미성숙 생쥐난자의 체외성숙율에 인산이 미치는 영향

La³⁺를 첨가하면 기본 배양액에서 인산과 결합하여 침전이 생김으로 인산(Na₂HPO₄, KH₂PO₄)를 뺀 배양액에서 La³⁺이 난자성숙에 미치는 영향에 대하여 실험을 하여야 했다. 따라서 인산의 유무가 생쥐 난자성숙율에 미치는 영향을 보기 위하여 calcium각 농도별로 인산을 첨가한 대조군과 인산을 첨가하지 않은 실험군으로 비교하여 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 17시간 배양 후 Ca²⁺ 1.7mM과 Ca²⁺-free에서는 대조군과 실험군간의 난자성숙율의 차이가 없었으나, Ca²⁺ 0.4mM에서는 실험군에서 대조군에서 보다 높은 난자 퇴화율을 보였다(P<0.01). Ca²⁺ 0.8mM에서 인산을 뺀 배양액에서 인산을 첨가한 배양액에서 보다 유의하게 낮은 MII 성숙율을 보였다(P<0.01) (표 3).

고 찰

배란전 여포(preovulatory follicle)에서 얻은 유리된 난자를 체외에서 적절한 배양액에서 배양하면 자발적인 성숙(spontaneous maturation)이 일어나게 된다(Pincus와 Enzmann, 1935; Edwards, 1965; Bae와 Cho, 1982).

먼저 체외(in vitro)에서 미성숙 난자의 성숙

과정에 대한 실험에 사용할 기본 배양액을 선택하기 위하여 MHBS(Modified Hank's balanced salt solution) (Bae와 Channing, 1985)와 인간체외수정(human In Vitro Fertilization)에서 사용되고 있는 HTF(human tubal fluid) (Quinn등 1985)를 비교, 실험하였다. 17시간 배양 후 제1극체가 나타나는 MII(Metaphase II)까지 성숙한 난자는 MHBS에서 67.95%, HTF에서 45.0%로서 MHBS가 통계적으로 유의하게 높은 난자성숙율을 보였기에 MHBS배양액을 기본 배양액으로 결정하였다. MHBS에서의 성숙율이 높은 것은 MHBS에서는 NaHCO₃의 농도가 4.1mM이어서 배양액의 pH 변동이 별로 없고 phosphate buffer에 의한 비교적 안정된 pH 때문이 아닌가 추정된다.

Tsafriri와 Bar-Ami(1978), 그리고 Leibfried와 First(1979)는 쥐와 소의 난자에서 배양액에 10% calf serum을 첨가하여 배양한 결과 calcium이 미치는 영향을 발견하지 못했는데, 이는 Bae와 Channing(1985)이 지적한 바와 같이 10% calf serum을 첨가한 배양액에는 난자성숙에 적당한 양인 Ca²⁺ 0.25mM이 들어있기 때문이다. Calf serum에는 10.4-12.6mg/600ml의 Ca⁺⁺이(Biologic data book, 1974) 존재한다. 이는 2.5mM에 해당하는 농도이다. 초기 실험 단계에서의 Ca²⁺-free배양액에서 MII 성숙비율이 35%를 보인 것은 FBS(Fetal bovine serum)

Table 3. Effect of phosphate on maturation rate of mouse oocytes in vitro cultured for 17 hrs at different Ca⁺⁺ concentration

Ca ⁺⁺ concentration	Number of oocytes	Number of oocytes and percent of oocytes				P vs control
		GV	GVBD	MII	Deg.	
<u>Ca⁺⁺ free</u>						
P ⁺	73	2 (2.7%)	27 (37.0%)	3 (4.1%)	41 (56.2%)	-
P ⁻	72	7 (9.7%)	24 (33.3%)	5 (7.0%)	36 (50.0%)	NS
<u>Ca⁺⁺ 0.4mM</u>						
P ⁺	95	12 (12.6%)	39 (41.1%)	44 (46.3%)	0 (0%)	-
P ⁻	103	8 (7.8%)	34 (33.0%)	46 (44.7%)	15 (14.5%)	<0.01
<u>Ca⁺⁺ 0.8mM</u>						
P ⁺	75	6 (8.0%)	14 (18.6%)	53 (70.7%)	2 (2.7%)	-
P ⁻	76	10 (13.2%)	31 (40.8%)	35 (46.0%)	0 (0%)	<0.01
<u>Ca⁺⁺ 1.7mM</u>						
P ⁺	50	5 (10.0%)	13 (26.0%)	32 (64.0%)	0 (0%)	-
P ⁻	55	6 (10.9%)	17 (30.9%)	32 (58.2%)	0 (0%)	NS

GV=germinal vesicle. GVBD=germinal vesicle breakdown.
 MII=metaphase II. Deg.=degeneration.

중의 Ca^{2+} 농도의 영향으로 사료되어서 그 이후 BSA (Bovine Serum Albumin) 0.4%를 사용하였다.

세포내 Ca^{2+} level은 체세포분열의 조절에 매우 중요하다고 보고되었으며 (Whitfield 등, 1979; Dulbecco와 Elkington, 1975; Ralph, 1983), calcium이 난자의 생존도 뿐만 아니라 난자성숙 과정에도 필수적이라는 보고가 있다 (De Felici와 Siracusa, 1982; Powers와 Paleos, 1982; Bae와 Channing, 1985; Bae와 Chang, 1989). Ca^{2+} 는 무척추동물의 난자성숙 (invertebrate oocyte nuclear maturation)에 필수적이며 (Steinhardt 등, 1974; Schuetz, 1975; Baker와 Whitaker, 1978; Gilkey 등, 1978), 양서류 난자 (amphibia oocyte)의 성숙에도 필수적이라고 보고되었다 (Merriam, 1971; Hollinger 등, 1977; O'Connor 등 1977; Baker와 Whitaker, 1978; Gilkey 등 1978; Wasserman 등, 1980). 한편 포유류 난자성숙에서 Ca^{2+} 의 역할에 대하여 최근 많은 보고가 되고 있는데 (Tsafiriri와 Bar Ami, 1978; Leibfried와 First, 1979; Paleos와 Powers, 1980, 1981; Sato 등, 1980; Jagiello 등 1982; Powers와 Paleos, 1982; Bae와 Channing, 1985; Bae와 Chang, 1989), 1980년 Paleos와 Powers, 1980년 Sato 등, 1982년 Powers와 Paleos는 돼지와 생쥐난자의 핵막붕괴, 난자 생존도, 극체형성 비율증가에 calcium이 요구된다고 하였다.

Calcium ion이 어떤 기전으로 난자성숙에 관여하게 되는지에 대한 연구가 많이 되고 있는데, 1980년 Batta와 Knudsen은 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin)를 미성숙 쥐 (immature rat)에 주사한 후 LH (Lutenizing Hormone)가 혈청내에서 올라간 후, 난구내 난자 (cumulus enclosed oocyte)가 핵막붕괴상태일 때 난자내의 Ca^{2+} 농도가 증가한다고 보고하였고, 1979년 Burgoyne 등은 토끼에서 핵막붕괴가 일어나는 시기에 여포액내의 Ca^{2+} 농도가 혈액에 비해 현저히 감소한다고 하였다. 돼지 난자의 배양에서 Ca^{2+} -free 배양액에서는 Ca^{2+} 이 포함된 배양액에서 보다 낮은 핵막붕괴율을 보였으며 (Sato 등, 1980), 또 다른 보고들에서 핵막붕괴 후에도 긴 시간동안 calcium이 요구된다고 하였다 (Alexandere, 1977; Sato 등, 1980; Bae와 Foote, 1980; Paleos와 Powers, 1981; Jagiello, 1982; Bae와 Channing, 1985). 난자성숙시 난자내 Ca^{2+} 의 증가현상이 Ca^{2+} Channel이 열리는 것인지, 아니면 sequestered calcium

의 유리에 의한 것인지는 분명하지가 않다. 그러나 *Rana pipiens* 난자에서 입증된 것처럼 (Morrill 등, 1980) 감수분열 재개시 specific site로부터 calcium의 선택적 유리 (selective release)와 감소된 유입 (reduced influx)이 포유동물의 난자에도 해당될 수 있는지는 아직 규명이 되고있지 않다. 체내 (in vivo)에서 LH surge로 인한 여포내 난자의 성숙과 배란과정에서 LH surge에 의한 Ca^{2+} uptake의 증가가 난자 감수분열 재개의 하나의 요인이며 (Batta와 Knudsen, 1980) exogenous HCG (Human Chorionic Gonadotropin)가 생쥐 난자성숙 과정에서 적어도 난자내로의 Ca^{2+} uptake를 증가시키고 있다는 것이 보고되고 있었다 (Bae와 Kang, 1991).

포유류 난자의 체외성숙에 필요한 최소의 external calcium 농도는 이온화 calcium의 실제 농도를 측정하지는 않았으나 돼지 여포난자가 metaphase II로 성숙하는데는 0.05 mM의 calcium이 필요하며 (Bae와 Channing, 1985), 난구세포가 제거된 생쥐난자의 배양에는 최소 0.5 mM의 calcium이 필요한 것으로 보고되고 있는데 (De Felici와 Siracusa, 1982), 본 연구에서 Ca^{2+} 농도별로 난구세포가 제거된 미성숙 난자를 17 시간동안 배양한 결과 Ca^{2+} 0.8 mM, Ca^{2+} 1.2 mM, Ca^{2+} 1.7 mM에서는 난자성숙율이 유사하였으나, Ca^{2+} 0.4 mM에서 대조군인 Ca^{2+} 1.7 mM보다 통계적으로 유의하게 낮은 난자성숙율을 보였고 Ca^{2+} -free 배양액에서 metaphase II까지 진행된 난자가 8.6%로 나타나서, 0.4 mM 이하의 calcium 농도는 난자성숙에 부족한 것으로 나타났다. 상기의 결과를 종합할 때 생쥐난자의 성숙에 필요한 Ca^{2+} 농도는 0.5 mM 근처인 것으로 추정되며, 이러한 주장은 De Felici와 Siracusa (1982)의 주장과 같다. 이렇게 Ca^{2+} 함량이 낮은 배양액에서 난자의 생존도가 감소하는 것은 낮은 cytosolic Ca^{2+} activity로 인한 난자 퇴화의 빈도 증가를 반영하는 것인데 (Knox, 1980), 이렇게 external calcium이 없어서 metabolic requirement를 충족하지 못할 정도로 세포내 Ca^{2+} 농도가 떨어지게 되면, 난구세포가 제거된 미성숙난자 energy 생성에 유일한 substance가 되는 pyruvate가 Krebs's cycle로 가는 pyruvate dehydrogenase complex activity에서 Ca^{2+} 이 mediate하는 기전이 방해되는 난자내 energy 생성 과정이 방해되기 때문에 난자 생존도에 영향을 미치게 되는 것으로 생각된다 (Hansford, 1987; Hansford와 Staddon, 1987).

이러한 calcium의 역할을 규명하기 위하여 여러 종류의 calcium channel inhibitor를 처리하여 연구하였는데, calcium channel inhibitor로는 verapamil, D600, Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , La^{3+} 등이 있는 것으로 알려져 왔다(Eckert 등, 1988). 1985년 Bae와 Channing은 돼지 난자에서 verapamil 0.2mM이 난구내 난자(CEO, Cumulus enclosed oocyte)와 난구세포가 제거된 난자 모두에서 핵막붕괴를 방해하였으나, 0.02mM는 난구내 난자에서는 영향이 없었고, 난구세포가 제거된 난자에서는 영향을 미친다고 하였다. 이는 난구세포가 gap junction이나 calcium channel을 통해 난자에 Ca^{2+} 를 공급하여(Amsterdam 등, 1976; Anderson과 Albertin, 1976; Bae와 Channing, 1985), 난자퇴화를 방지하는 역할을 하며 치밀한 난구세포는 diplotene stage 난자의 퇴화를 방지한다. 이는 난구세포가 gonadotropin action의 primary target이라는 견해(Meinecke와 Meinecke-Tillman, 1979)와도 일치한다. 또한 1977년 Schatzmann과 Roelofson은 세포표면의 ATP-dependent Ca^{2+} pump에 의한 Ca^{2+} removal을 verapamil과 ionophore의 고농도가 방해한다고 보고하였다. 본 연구에서는 calcium inhibitor로서 Ni^{2+} 와 La^{3+} 를 이용하여 실험하였는데, nickel이 난자에 영향을 미치는가에 대한 연구는 아직 되어있지 않으나, Bae 등(1991)이 2-cell 생쥐주기배의 in vitro 2-cell block을 실험한 결과 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 10-20 μM 처리한 경우 EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)를 처리한 것과 2-cell block의 극복(overcome) 효과가 있었다고 보고하였다. 본 연구에서 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 μM , 100 μM , 1mM을 처리한 결과 10 μM 은 Ca^{2+} 의 모든 농도에서 별다른 inhibitor 역할을 하지 못하였지만, Ni^{2+} 를 1mM 처리한 경우에는 Ca^{2+} 모든 농도에서 대조군보다 매우 높은 난자 퇴화율을 보였으며 Ni^{2+} 를 100 μM 처리한 경우에는 Ca^{2+} 1.7mM에서만 inhibitor 작용이 보였다. 이는 Ni^{2+} 100 μM 에서 1mM사이의 어떤 농도에서 Ni^{2+} 이 calcium의 자리로 대치하여 들어가 calcium activity를 방해함으로써 난자를 퇴화시키는 것으로 생각된다. 이와 같이 Ni^{2+} 의 농도증가에 따른 calcium inhibitor activity 증가는 분명히 Ni^{2+} 이 Ca^{2+} inhibitor임을 증명하는 사실이며 Ni^{2+} 100 μM 에서 Ca^{2+} 1.7mM의 Ca^{2+} activity를 방해하는 것으로 보아도 Ni^{2+} 이 Ca^{2+} inhibitor임을 증명되고 있다.

Calcium inhibitor로 알려져 있는 lanthanum

은 알카리 토양족(alkaline earths)중에서 가장 Ca^{2+} 과 유사한 화학적 특성을 가지고 있는데, 최근 La^{3+} 의 cellular와 subcellular reaction에서 Ca^{2+} 의 antagonist인지 substitute인지에 대해 관심이 집중되고 있다. La^{3+} 은 Ca^{2+} 과 ionic radius는 거의 같지만 Ca^{2+} 보다 높은 원자가(valence)를 가지며 세포표면에 있는 Ca^{2+} site에 결합하지만 Ca^{2+} 보다 덜 가역적으로 작용하여, 어떤 농도에서 Ca^{2+} 을 대체하여 정해진 조직의 위치에서 Ca^{2+} dependent movement와 반응을 방해하거나 증진시킨다. 또한 La^{3+} 은 고농도에서 cellular integrity에 나쁜 영향을 미칠 수 있다고 추정되었으며(Weiss, 1974), 1977년 Magaribuchi 등은 La^{3+} 이 guinea pig 평활근에서 Ca^{2+} 의 transmembrane influx를 억제한다고 보고한 바 있으며, 반면 Morrill 등(1980)은 양서류 난자에서 La^{3+} 이 난자의 Ca^{2+} uptake 및 efflux 모두를 자극한다고 하지만, La^{3+} 은 세포막을 투과할 수 없는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 10 μM , 100 μM , 1mM을 처리하였는데, MHBS 기본배양액에 La^{3+} 를 처리한 경우 100 μM 과 1mM에서 심한 침전이 생겨서 기본 배양액에서 인산($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$)을 뺀 후 calcium을 농도별로 처리하고, La^{3+} 을 또 처리하였다. Ca^{2+} -free 배양액에서는 lanthanum 처리군 모두에서 대조군보다 유의하게 높은 난자 퇴화율을 보였으며($P < 0.05$), Ca^{2+} 0.4mM에서는 La^{3+} 처리군 모두에서 대조군보다 유의하게 낮은 난자 퇴화율을 보였고, Ca^{2+} 0.8mM과 0.4mM에서 lanthanum을 10 μM 처리한 경우에만 대조군보다 높은 난자성숙율을 보였으며, Ca^{2+} 0.8mM에서는 La^{3+} 100 μM , 1mM에서 대조군과 거의 같은 난자성숙율을 보였으나, Ca^{2+} 1.7mM에서는 La^{3+} 처리군 모두에서 대조군과 같은 난자성숙율을 보였다. 이와같은 결과는 Ca^{2+} 으로 어떤 농도하에서 La^{3+} 이 오히려 Ca^{2+} 을 대신하여 세포표면의 Ca^{2+} 자리에 결합하지만 난자막을 투과할 수는 없어서 난자내 Ca^{2+} 의 역할까지 방해하지는 않음으로서 난자 퇴화를 방지하는 효과가 있는 것으로 보여진다. 1982년 De Felici와 Siracusa의 보고에서 Ca^{2+} -free 배양액에서 La^{3+} 1mM과 Sr^{2+} 10mM이 보호 효과가 있다고 알려져 있는데, La^{3+} 은 난막에서 Ca^{2+} 이 outflux하는 것을 방지하여 sealing action에 의한 보호 효과가 있으며 Sr^{2+} 은 세포질에서 Ca^{2+} 대신 역할을 할 수 있는데서 난자를 치사상태로부터 보호하는 것이 아닌가 추

정된다. 또한 Yoshida (1982)가 주장하였듯이 생쥐 난자막에서는 Na^{2+} channel이 없고 Ca^{2+} channel만이 존재하므로 calcium channel을 blocking시킬 경우 Ca^{2+} 뿐만 아니라 Na^{2+} 의 이동도 전적으로 blocking됨에 따라 세포질내의 calcium농도에는 별다른 영향을 미치지 못하기 때문이 아닌가 추정된다. 본 연구에서는 Ca^{2+} -free배양액을 제외하고는 (Ca^{2+} 0.4-1.7 mM) 난자성숙율이 Ni^{2+} 처리군과는 완전한 차이를 보여주고 있어서, 본 연구에서의 La^{3+} 은 Ca^{2+} channel을 방해하는 것 같지 않은 것으로 추정된다. 또한 La^{3+} 은 난자내로 들어올 수 없기 때문에 (Hagiwara, 1981) 난자 세포질내의 [Ca^{2+}]_i에는 하등의 영향이 없는 것으로 추정되나 La^{3+} 처리로 세포질내의 [Ca^{2+}]_i농도 변화에 대한 연구는 더 진행되어야겠다.

인산성분을 배양액에서 제거한 실험은 난자에서는 없지만 Hamster 배의 2-cell block으로 Bavister 등 (1990)에 의해 최근 많은 연구가 되어있다. 본 연구에서는 인산이 난자성숙에 기여하는 바가 뚜렷하지 않다. 본 연구에서 인산을 첨가한 배양액과 인산을 뺀 배양액에서 난자성숙율을 비교한 결과 Ca^{2+} -free와 Ca^{2+} 1.7 mM의 배양액에서는 인산의 유무가 난자성숙율에 별다른 영향이 없었지만 Ca^{2+} 0.4 mM에서는 실험군에서 대조군보다 높은 난자 퇴화율을 보였으며, Ca^{2+} 0.8 mM에서는 실험군에서 대조군보다 매우 낮은 M II로의 성숙율을 보였다. 이와 같은 난자성숙율 및 퇴화율이 Ca^{2+} 1.7 mM에서도 전연 효과가 없는 것으로 나타나 인산이 난자성숙율에 뚜렷한 효과가 없는 것으로 추정된다. 이런 점으로 보아 난자성숙 과정에서 배양액내의 인산 성분에 대해서는 좀 더 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

인 용 문 헌

- Alexadere H, Gerin Y: Study on the genetic activity of mouse oocyte during its in vitro "spontaneous" maturation. *C R HELB Seances Acad Sci Ser Sci Nat*, 1977, 284, 1815-1818.
- Altman PL, Dittmer DS: *Biology Data Book Volume III* 2nd Ed, Maryland: Federation of American Societies for Experimental Biology, 1974, 1773.
- Amsterdam A, Hoseph R, Liberman M, Linder HR: Organization of intramembrane particles in Freeze-cleaved gap Junction of rat Graffian Follicle; optical-diffraction analysis. *J Cell Sci*, 1976, 21, 93-105.
- Anderson E, Albertini DF: Gap junction between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol*, 1976, 71, 680-686.
- Bae I-H, Chang BY: Calcium Uptake in Mouse Oocyte Matured in Vitro. *Kor J Fertil Steril*, 1989, 16, 1-7.
- Bae I-H, Channing CP: Effect of calcium ion on the maturation cumulus-enclosed pig follicles. *Biol Reprod*, 1985, 33, 79-87.
- Bae I-H, Foote RH: Utilization of glutamine for energy and porcine synthesis of cultured rabbit follicular oocytes. *Exp Cell Res*, 1975a, 90, 432-436.
- Bae I-H, Foote RH: Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolarity. *J Reprod Fert*, 1980, 59, 11-15.
- Bae I-H, Kang SH: Effect of gonadotropin on Ca^{2+} uptake in follicle enclosed mouse oocyte cultured in vitro. *Kor J Fertil Steril*, 1991, 18, 153-162.
- Bae I-H, Min KM, Wang YM, Yu HK: The effect of Ca^{2+} inhibitors on the mouse 2-cell block. *Biol Rep*, 1991, 44 (supp.), 419.
- Baker PF, Whitaker MJ: Influence of ATP and calcium on the cortical reaction in sea urchin eggs. *Nature*, 1978, 76, 513-515.
- Batta SK, Knudsen JF: Calcium concentration in cumulus-enclosed oocytes of rats after treatment with pregnant mare's serum. *Biol Reprod*, 1980, 243-246.
- Bavister BD: Regulation of hamster preimplantation embryo development in vitro by glucose and phosphate. Early embryo development and paracrine relationships In: 79-96 Alan R Liss Inc.
- Burgoyne PS, Borland RM, Biggers JD, Lechene CP: Elemental composition of rabbit antral fluid during preovulatory follicular swelling. *J Reprod Fertil*, 1979, 55, 109-113.
- Cha KY, Choi DH, Koo JJ, Han SY, Ko JJ, Yoon TK: Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from

- nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril*, 1991, 55, 109-113.
- De Felici M, Siracusa G: Survival of isolated fully grown mouse ovarian oocytes is strictly dependent on external Ca^{2+} . *Devel Biol*, 1982, 92, 539-543.
- Dulbecco R, Elkington J: Induction of growth in resting Fibroblastic cell culture by Ca^{2+} . *Proc Nat Acad Sci USA*, 1975, 72, 1584-1588.
- Eckert R, Randall D, Augustine G: Animal physiology 3rd edn, WH Freeman and company N.Y., N.Y. USA 1988.
- Edwards RG: Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 1965, 208, 349-351.
- Gilkey JC, Jaffe, LF, Ridgway EB, Reynolds GT: A free calcium wave traverses the activating egg of the Medaka, *Oryzias latipes*. *J Cell Biol*, 1978, 76, 448-466.
- Hagiwara S: Calcium channel. *Ann Rev Neurosci*, 1981, 4, 69-125.
- Hansford RG: Relation between cytosolic free Ca^{2+} concentration and the control of pyruvate dehydrogenase in isolated cardiac myocytes. *Biochem J*, 1987, 241, 145-151.
- Hansford RG, Staddon JM: The relationship between the cytosolic free calcium ion concentration and the control of pyruvate dehydrogenase. In: Cell calcium and the control of membrane transport. Edited by J Mandel and DC Eaton. The Rockefeller University Press, New York 1987, 241-257.
- Hollinger TG, Dumont JN, Wallace RA: Calcium-induced cortical granule breakdown in small oocytes from *Xenopus laevis*. *J Cell Biol*, 1977, 75, G1110 (abstract).
- Jagiello G, Ducayen MB, Downey R, Jonassen A: Alterations of mammalian oocyte meiosis I with divalent cations and calmodulin. *Cell Cal*, 1982, 3, 153-162.
- Knox FG: Physiology of calcium and phosphate regulation. *The physiologist*, 1980, 23 (4), 1-20.
- Leibfried L, First NL: Effects of divalent cations on in vitro maturation of bovine oocytes. *J Exp Zool*, 1979, 210, 575-580.
- Magaribuchi T, Nakajima H, Kiyomoto A: Effects of diltiazem and lanthanum ion on the potassium contracture of isolated guinea pig smooth muscle. *Japan J Pharmacol*, 1977, 27, 333-339.
- Meinecke B, Meinecke-Tillmann S: Effects of gonadotropins on oocyte maturation and progesterone production by porcine ovarian follicles cultured in vitro. *Theriogenology*, 1979, 11, 351-365.
- Merriam RW: Progesterone-induced maturational events in oocytes of *Xenos laevis*. II. Changes in intracellular calcium and magnesium distribution at germinal vesicle breakdown. *Exp Cell Res*, 1971, 68, 81-87.
- Morrill GA, Ziegler DH, Kostellow AB: Kinetics of calcium efflux and exchange from *Rana pipiens* oocytes immediately following reinitiation of the first meiotic division: Comparison of various meiotic agonists and antagonists. *Cell Calcium*, 1980, 1, 359-370.
- O'Connor CM, Roninson KR, Smith LD: Calcium, potassium and sodium exchange by full grown and maturing *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol*, 1977, 61, 28-40.
- Paleos GA, Powers RD: The effect of calcium on the first meiotic division of the mammalian oocyte. *J Exp Zool*, 1981, 217, 409-416.
- Paleos GA, Powers RD: The role of calcium in the control of germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *J Cell Biol*, 1980, 87, G1123 (abstract).
- Pincus G, Enzmann EV: The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J Exp Med*, 1935, 62, 665-675.
- Powers RD, Paleos GA: Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *J Reprod Fert*, 1982, 66, 1-8.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GH: Improved pregnancy rate in human IVF with the use of a medium based on the composition of HTF. *Fertil Steril*, 1985, 44, 493-498.
- Ralph RK: cAMP Ca^{2+} and control of cell growth. *FEBS* 1983, 161, 1-7.
- Sato E, Iritani A, Nishikawa Y: Mechanism of inhibition of germinal vesicle in pig follicular

- oocytes with special reference to the role of granulosa cell layer. *Jpn J Fertil Steril*, 1980, 5, 229-233.
- Schitzmann HJ, Roelofson B : Some aspects of the Ca^{2+} pumps in human red blood cells, In *Biochemistry of Membrane Transport*, Springer, Heidelberg 1977, 389.
- Schuetz AW : Induction of nuclear breakdown and meiosis in *Spisula solidissima* oocytes by calcium ionophore. *J Exp Zool*, 1975, 191, 440-433.
- Steinhardt RA, Epel D, Carrol EJ, Yanagimachi R : Is the calcium ionophore a universal activator of unfertilized egg? *Nature*, 1974, 252, 41-43.
- Tsafiriri A, Bar Ami S : Role of divalent cations in the resumption of meiosis of rat oocytes. *J Exp Zool*, 1978, 205, 293-300.
- Wasserman WJ, Pinto LH, O'Connor CM, Dennis-Smith L : Progesterone induces a rapid increase in Ca^{2+} in *Xenos laevis* oocytes. *J Cell Biol*, 1980, 77, 1534-1536.
- Weiss GB : Cellular pharmacology of Lanthanum. *Ann Rev Pharmacol*, 1974, 14, 345-355.
- Whitfield JF, Boyton AL, Macmanus JP, Sikorska M, Tsang BK : The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. *Molecular and Cellular Biochem*, 1979, 27, 155-179.
- Yoshida S : Na^{2+} and Ca^{2+} spikes produced by ions passing through Ca^{2+} channels in mouse ovarian oocytes. *Pflugers Arch*, 1982, 395, 84-86
-