

저장성 용액에 노출된 햄스터 난자에 관찰되는 이온전류의 변화

최원영 · 김양미* · 한재희* · 허일오* · 박춘옥* · 홍성근* · 류판동** · 김종수

경상대학교 수의과대학 약리학교실, 의과대학 생리학교실*
서울대학교 수의과대학
(1995년 12월 4일 접수)

Ionic currents elicited by the hypotonic solution in hamster eggs

Won-yeong Choi, Yang-mi Kim*, Jae-hee Haan*, Il-oh Huh*, Choon-ok Park*,
Seong-geun Hong*, Pan-dong Pyu**, Jong-shu Kim

College of Veterinary Medicine and Department of Physiology,
College of Medicine, Gyeongsang National University*
College of Veterinary Medicine Seoul National University**

(Received Dec 4, 1995)

Abstract : Cell volume regulatory mechanisms are usually disclosed by exposure of cell to anisotonic media. If a cell is suddenly exposed to hypotonic media, it swells initially like an osmometer but within minutes regains its original cell volume. This behavior has been labelled as regulatory cell volume decrease (RVD). RVD is believed to result from the loss of permeable ions through the membrane. In this study, we examined hypotonically induced changes in the membrane currents involved in RVD by using whole cell voltage clamp technique in the unfertilized hamster egg.

At -40mV of the holding potential, the stationary current was maintained in the hamster egg exposed to isotonic solution composed of, mainly, 115mM NaCl and 40mM mannitol. Hypotonic solution was prepared by removing mannitol. Therefore, the concentrations of Na⁺ and Cl⁻ in this hypotonic media were the same as those in the isotonic solution. Following 30 to 60 sec after applying the hypotonic media to the egg, the inward current was evoked. This inward current was eliminated by 100μM 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid(SITS), an anion channel blocker, leaving the small outward current component. Further addition of 2mM Ba²⁺, a broad K⁺ channel blocker, completely abolished the small outward current left even in the presence of SITS during hypotonic stress. These results suggest that K⁺ and Cl⁻ move out of cells, resulting in RVD.

To test the involvement of Na⁺ in RVD, 20mM Na-isethionate was substituted for mannitol in isotonic media(135mM Na⁺) and Na-isethionate (20mM) was freed the hypotonic solution. Only Cl⁻ concentration in both isotonic and hypotonic media was kept constant at 115mM, whereas concentration of Na⁺ was lowered in hypotonic solution to 115mM from

135mM in isotonic solution. Hypotonic medium induced the outward current in the egg equilibrated isotonicly. This current was reduced by 100 μ M SITS but was augmented by 2 mM Ba²⁺. In terms of RVD, these results imply that Cl⁻ efflux is coupled with K⁺, maybe for electroneutrality during hypotonic stress and/or with Na⁺ via unknown transport mechanism(s).

From the overall results, the hypotonic stress facilitates the movement of Cl⁻ and K⁺ out of the hamster egg to regain cellular volume with electroneutrality. If there exist a difference in [Na⁺]_o between isotonic and hypotonic solution, another transport mechanism concerned with Na⁺ may, at least partly, participate in regulatory volume decrease.

Key work : Cell volume regulatory mechanism, hypotonic media, Cl⁻ efflux regulatory cell volume decrease(RVD)

서 론

세포용적의 유지는 세포 항상성 유지에 가장 필요한 것중의 하나이다. 만일 세포가 갑자기 저장성 용액이나 고장성 용액에 노출된다면 세포는 용적이 증가하여 팽창되거나, 세포용적이 감소된다. 이때 대부분의 세포는 세포 고유의 용적으로 되돌아 오려는 작용을 하는데 이러한 현상을 용적조절감소(regulatory volume decrease, RVD)과정, 혹은 용적조절증가(regulatory volume increase, RVI)과정이라고 한다^{1,2}. 즉, 세포내 용질을 퍼내거나 세포의 용질을 세포내로 이동시켜서 세포내 삼투농도의 변화를 초래하고 그 결과 수반되는 물의 이동을 통하여 세포의 용적을 조절하는 것이다.

이러한 RVD 과정이나 RVI 과정에 기여하는 용질은 amino acid, K⁺, Cl⁻, Na⁺ 등으로 다양한 물질의 이동에 의한다고 알려져 있다³. 일부 하등동물에서는 urea, trimethylamine 및 taurine과 같은 유기용질이 RVD 작용에 관여하지만 물질이동면에서는 이온통로와 같은 전용이동로를 이용하거나 교환기전의 대상이 될 수 있는 전해질이 효율적이다^{3,4}. K⁺이나 Cl⁻와 같은 전해질의 배출에 의한 RVD 과정은 Madin-Darby canine kidney(MDCK) cell, frog skin cell, frog urinary bladder cell에서 잘 알려져 있다^{3,6}. 이러한 이온들의 이동경로로, 1) K⁺/H⁺와 Cl⁻/HCO₃⁻ 등의 교환기전, 2) K⁺과 Cl⁻의 co-transport system, 3) K⁺이나 Cl⁻ 이온의 독립된 통로 등이 보고되어 있다^{3,7-9}. 그러나 포유류 난자에서 이온의 이동을 통한 RVD 기전에 대해서는 아직 밝혀진 것이 없다.

다만 저장성 용액에 노출된 난자에 관한 것으로는

마우스난자를 hyaluronidase로 처리한 후 삼투농도를 달리한 저장액 배지에 노출시켰을 때, 난관내에서만 발생할 수 있는 pronucleus상태인 처녀생식(parthenogenesis) 유발이 보고되었을 뿐이다¹⁰. 처녀생식이 전기나 alcohol 자극을 통해서도 유발될 수 있으므로 이러한 자극이 순간적인 난자의 흥분 또는 이온의 이동을 통하여 이루어진다면 저장성 용액에 노출되어 일어나는 이온의 움직임은 처녀생식 유발기전을 이해하는 단서가 될 수 있을 것으로 기대된다. 이에 본 실험은 햄스터 난자를 저장성 용액에 노출시켰을 때 나타나는 전류의 변화와 따라서 이에 관여하는 이온의 종류 및 이동기전을 살펴 포유류 난자에서의 RVD 기전 및 생식과 관련된 문제해결의 기초자료를 얻고자 시행하였다.

재료 및 방법

햄스터 미수정란 : 실험동물은 생후 6~8주령의 Chinese 골든 햄스터를 사용하였다. 항상 오전 5시부터 오후 7시까지 점등하여 햄스터의 생식주기를 일정하게 유지시켰다. 미수정란을 분리하기 63~68시간 전에 pregnant mareserum gonadotropin (PMSG, Sigma) 20 unit를 복강내 주사하고 48시간 후 (세포분리 15~20시간전) human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma) 20 unit를 복강내에 다시 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG 주사후 15~20시간만에 미수정란을 분리하였다. 분리방법은 햄스터의 경추를 탈구시키고 복강을 열어 유리미세관으로 난구세포(cumulus cell)에 싸여있는 난자를 수집하여 0.1% hyaluronidase (Sigma, type I-

S)용액으로 실온(20~25℃)에서 난구세포를 제거한 후, 0.5 unit protease (Sigma, type I-S) 용액으로 실온(20~25℃)에서 난구세포를 제거한 후, 0.5 unit protease (Sigma, type VII)로 투명대를 제거하였다. Protease에 의한 세포막 손상을 줄이기 위하여 투명대가 소실되는 즉시 표준용액 (NaCl 140mM; NaH₂PO₄ 0.33mM; MgCl₂ 1.2mM; HEPES 5mM; Glucose 5mM; CaCl₂ 2mM; polyvinyl pyrrolidone, 1mg/ml)에 3번 이상 세척하여 실험에 사용하였다. 분리된 난자는 표준용액에 넣어 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

실험용액 : 실험에 사용한 세포의 용액은 NaCl 115mM; mannitol 40mM; NaH₂PO₄ 0.33mM; MgCl₂ 1.2mM; HEPES 5mM; Glucose 5mM; CaCl₂ 2mM로 조성하였으며 control M으로 표기하여 사용하였다. 또다른 세포의 용액인 control N은 control M에서 mannitol 대신 Na-isethionate 20mM로 바꾸어 조성하였다. Control N의 조성은, NaCl 115mM; Na-isethionate 20mM; NaH₂PO₄ 0.33mM; MgCl₂ 1mM; HEPES 5mM; CaCl₂ 2mM로 하였다. 이 두 용액의 pH는 NaOH를 이용하여 7.4로 적정하였다. 표준용액 (control M과 control N)의 삼투농도는 289.60mOsm로 같게 하였다. 저장성 용액은 표준용액에서 mannitol이나 Na-isethionate 성분만을 제거하여 준비하였다. Control M에 대한 저장성 용액은 세포막을 투과할 수 없는 mannitol만을 제거하여 세포막을 통한 이동이 가능한 Na⁺과 Cl⁻농도 및 K⁺과 같은 이온의 농도는 두 용액에서 동일하게 유지되도록 하였다(pH 7.4). Control N에 대한 저장성 용액은 Na-isethionate 성분만을 제거함으로써 두 용액 사이에서 Na⁺ 농도가 달라지도록 조성하였고, Cl⁻ 대신 불투과성 음이온인 isethionate를 이용하여 Cl⁻ 농도를 일정하게 하였다. 이외의 이동 가능한 ion의 조성은 같게 하였다(pH 7.4). 저장성 용액의 삼투농도는 249.6mOsm으로 하여 정상용액과 40mOsm의 삼투농도 경사를 유지시켰다. 두 저장성 용액의 pH는 7.4로 적정하였다.

유리미세전극 용액(internal solution)은 K-aspartate를 주성분으로 하여, K-aspartate 130mM; KCl 120mM; Mg-ATP 5mM; Creatine phosphate 5mM; MgCl₂ 1mM; HEPES 5mM; EGTA 5mM의 조성을 가진 것으로 pH는 KOH를 사용하여 7.4로 적정하였다.

막전압 고정법 : 분리한 난자를 도립현미경하에 설치된 용기에 옮긴후 실험용액을 관류시켰다. 실험은 실온 20~25℃에서 진행되었다. 유리전극(glass electrode)의 저항이 0.5~1MΩ인 것을 사용하여 유리전극을 세포막에 접근시키고 -10내지 -20 cmH₂O의 음압을 가하여 giga seal (seal resistance, 500~1GΩ)을 형성시킨 후, 음압을 더욱 높여 세포막을 파열시켜서 whole cell patch를 만들어 실험에 임하였다. 세포막 전류의 기록을 위하여 patch clamp 증폭기(EPC-7, List/Medical Electronics, Germany)를 통하여 Hamill 등¹¹과 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 physiograph (Harvard Oscillograph, UK)로 기록하고 PCM (501ES, Sony, Japan)을 통해 비디오 테이프에 저장하여 분석시 활용하였다.

결 과

저장성 용액에 의하여 나타나는 내향전류 : 세포내 용액은 K-aspartate를 주성분으로 하였다. 세포외 용액은 NaCl 115mM과 세포막을 투과할 수 없는 mannitol 40mM을 첨가한 등장성 용액을 control M이라고 정하였다.

Fig 1-B는 난자의 안정막전압에 가까운 -40mV를 유지전압으로 하고 control M에서 항정상태를 유지시킨 후 저장성 용액에 노출시켰을 때 30초에서 1분후 내향전류를 관찰할 수 있었다(30±10 pA, n=10). 내향전류는 세포내 음이온이 세포밖으로 나가거나 양이온이 세포내로 들어올 경우 발생한다. Volume regulation의 입장에서 볼 때 저장성 용액에서 세포는 팽창된 상태이므로 세포내의 이온들을 퍼내야 한다. 그러므로 이 내향전류는 세포내의 Cl⁻ 이온이 밖으로 이동한 결과라고 짐작되었다. 이를 증명하기 위하여 음이온(Cl⁻) 통로 차단제인 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonic acid(SITS)를 저장성 용액에 첨가해서 SITS 투여전의 대조실험과 비교하였다. 저장성 용액에서 유발된 내향전류는 100μM SITS 첨가시 완전히 소실되었

고 오히려 미세한 외향전류가 관찰되었다(Fig 2). 이는 저장성 용액에 의하여 유발되는 내향전류가 음이온 특히 Cl⁻ 전류성분으로 판단되었다.

음이온 통로 억제제인 SITS의 존재시에도 관찰되는 외향전류는 음이온의 이동이 차단되었으므로 양이온이 세포밖으로 이동한 결과로 해석할 수 있다. 농도경사에 따라서 세포밖으로 확산될 수 있는 세포내 주된 양이온은 K⁺이므로 SITS존재시 저장성 용액에 의하여 나타나는 외향전류는 K⁺ 성분으로 추측되었다. 이를 확인하기 위하여 저장성 용액에 다양한 K⁺ 통로 차단제로 알려진 Ba²⁺ 2mM을 Ca²⁺ 대신 교환하여 얻은 결과를 교환전의 결과와 비교하였다. Ca²⁺ 2mM이 담긴 저장성 용액에서는 약 50pA의 내향전류가 관찰되었으나 Ba²⁺으로 교환하면 내향전류는 더욱 증가하였다(78.3 ± 18.6pA, n=6, Fig 3). 이상의 결과를 통하여 저장성 용액에 노출된 햄스터 난자에서 K⁺, Cl⁻가 RVD과정에서 기여하고 있음을 시사하였다. 이러한 가정은 Fig 4에 제시된 그림과 같이 K⁺, Cl⁻의 통로 차단제인 SITS와 Ba²⁺을 동시에 첨가했을 때 저장성 용액에서 관찰되는 내향전류는 물론 외향전류 성분까지 완전히 억제되었다. 이로써 mannitol를 가감하여 삼투농도를 변화시켰을 때 유발되는 이온전류는 K⁺과 Cl⁻가 같이 관여한다는 것이 확인되었다.

햄스터 난자의 용적조절 과정에 대한 Na⁺의 영향 : 세포용적 변화에서 Na⁺ 증감에 따르는 이온전류 변화를 보기 위해 control solution의 조성을 바꾸었다. Mannitol 대신 Na-isethionate를 첨가하여 만든 등장성 용액(control N)에서 항정상태를 유지시킨 후 저장성 용액에 노출시켰다. Mannitol이 첨가된 control M에서 내향전류 발생과는 달리 control N에서 Na-isethionate-free 저장성 용액을 관류시켜 주면 선명한 외향전류를 관찰할 수 있었다(Fig 5). Hypotonic stress시 팽창된 세포의 용적을 감소시키기 위하여 용질의 배출이 이루어졌다면 관찰된 외향전류는 세포내의 양이온이 이동한 결과로 추측되었다. Fig 6-A에서 저장성 용액 관류시 나타나는 외향전류는 100μM SITS에 의해 억제되었다. 그러므로 이 외향전류 역시 Cl⁻ 이온의 이동과 관련되었음을 알 수 있었지만 세포내 Cl⁻ 배출은 내향전류로 기록되므로 이 외향전류는 Cl⁻가 이동한 결과로 보기 어렵다. 따라서 세포의

Na⁺ 감소에 의하여 나타나는 외향전류는 양이온의 이동이 Cl⁻와 연계되어 이동하지만 Cl⁻의 이동이 SITS에 의하여 차단되면 양이온의 이동도 같이 감소한 결과로 추측하였다. 이를 확인하기 위하여 Fig 6-B에 제시된 바와 같이 K⁺ 통로 차단제인 2mM Ba²⁺을 Ca²⁺ 대신 교환하여 기록한 결과 오히려 외향전류가 증가하였다. 이러한 결과는 Na⁺ 농도를 감소시킨 저장성 용액에 대한 난자의 반응이 K⁺와 Cl⁻의 연계만으로 이루어지지 않고 있음을 보여주었다. Mannitol에 의한 삼투농도 변화시 나타나는 내향전류가 K⁺과 Cl⁻ 이온이 관여된 것이라고 한다면 Control N(135mM Na⁺)에서 Na-isethionate가 없는 저장성 용액(115mM)으로의 교환은 control M 때와는 달리 Na⁺이 상대적으로 더 감소한 상태이다. 그러므로 Ba²⁺에 의해 K⁺ 이동을 차단하여 나타난 외향전류는 Na⁺의 이동이나 Na⁺과 coupling된 운반기전에 따른 결과라고 추측되었다.

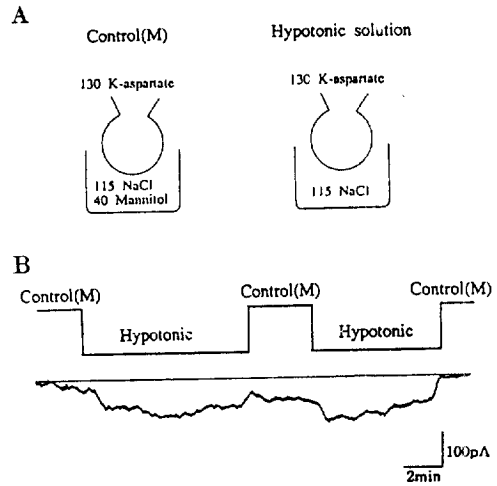


Fig 1. Inward currents induced by the hypotonic solution. A. Modified experimental diagram representing the major ionic compositions of pipette and bath solution in a whole-cell patch. Pipette solution contained 130mM K-aspartate. Control M stands for the isotonic solution containing 115mM NaCl with addition of 40mM mannitol as a impermeant.

Hypotonic solution was prepared by subtracting mannitol. B, Changes in the membrane current in response to isotonic (control M) and hypotonic solution. A continuous line on the current trace shows zero current level.

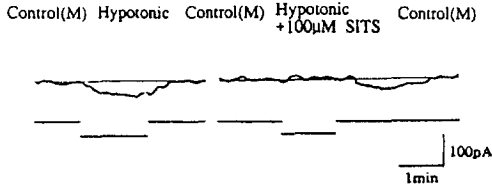


Fig 2. The effect of SITS, a Cl^- channel blocker on the hypotonically induced inward current. Thin lines on current traces indicate zero current level. Thick lines in the bottom represent the duration of hypotonic application.

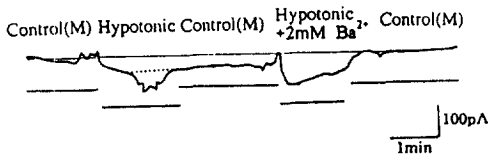


Fig 3. The effect 2mM Ba^{2+} , a broad K^+ channel blocker on the hypotonically induced inward current. Current under the dotted line was due to the experimental artifact which was ignored on analysis.

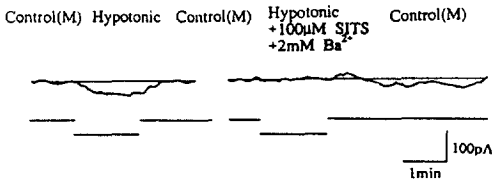


Fig 4. Complete inhibition of the hypotonically induced inward current by the simultaneous application of 100 μM SITS and 2mM Ba^{2+} . This was obtained in a same egg.

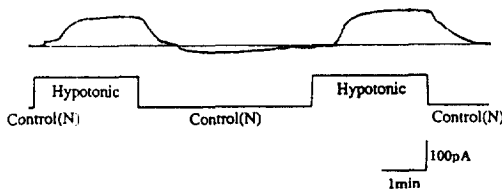


Fig 5. Outwardly current changes induced by the hypotonic medium with reducing Na^+ concentration from isotonic solution.

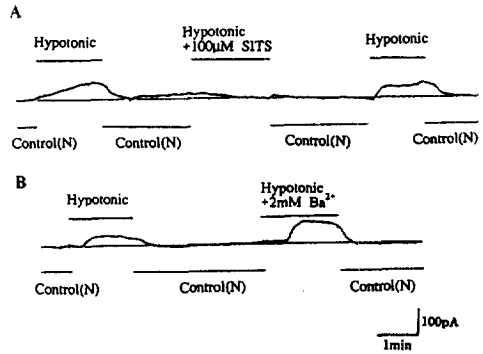


Fig 6. Effect of Ba^{2+} and SITS on the hypotonically induced hypotonic media with reduced Na^+ concentration (control N). A. Effect of 100 μM SITS on the outward current by hypotonic solution. Upper and lower bars indicate the duration of perfusion. B. Effect of Ba^{2+} on the outward current induced by hypotonic solution with low Na^+ concentration.

고찰

저장성 용액에 노출되어 부피가 증가된 세포는 항상성을 유지하기 위하여 본래의 용적으로 회복하려는 과정을 진행한다. 이러한 **regulatory volume decrease (RVD)** 과정은 세포내의 용질을 밖으로 배출하여 세포내 삼투농도를 감소시킴으로써 가능해지며, 이에 해당하는 물질은 대부분 세포막을 통하여 이동할 수 있는 이온들이라고 알려져 있다. 이러한 이온의 이동은 전류의 형태로 나타나므로 본 실험은 난자에 저장성 자극을 가했을 때 나타나는 전류의 변화여부를 관찰하고 그 성분을 파악하여 어떤 이온이 용적감소 조절기전에 관여하는지를 알아보려고 하였다. 실험결과, 포유류인 햄스터 난자에서 K^+ 과 Cl^- 이온이 RVD에 기여한다는 사실을 처음으로 확인하였다.

그러나 이러한 현상은 저장성 용액과 등장성 용액 사이에 Na^+ 농도의 변화가 일어나면 다른 양상으로 RVD 과정이 진행될 수 있다는 가능성도 본 실험을 통하여 관찰할 수 있었다. Na^+ 이나 K^+ 및 Cl^- 와 같은 투과성 이온들의 농도는 그대로 유지한 채, 불투과성 물질인 mannitol을 감하여 만든 저장성 용액에 대한 난자의 RVD 과정은, 내향전류를 동반하는 Cl^- efflux로 나타나지만(Fig 1,2), Na^+ 농도를 감소시킨 저장성 용액에 노출된 난자에서는 외향전류가 기록되었기 때문이다(Fig

5, 6).

K⁺과 Cl⁻ 이온배출에 의한 Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell⁶, 피부세포, 방광세포¹²나 위장관세포¹³에서 알려져 있다. 그러나 생리학적인 측면에서 저장성 용액에 노출시 Na⁺ 농도감소를 동반하는 경우를 충분히 예상할 수 있다. 따라서 저장성 용액에서 관찰되는 이온전류의 방향은 생리학적 변화에 대한 세포의 반응을 이해할 수 있는 중요한 단서가 될 수 있다. RVD의 진행이 세포내 용질이동을 전제로 할 때 우선 Na⁺ 감소에 의한 외향전류는 세포내 양이온의 배출로 해석할 수 있다. 이 외향전류가 K⁺ 통로 차단제인 Ba²⁺에 의하여 더욱 증가되었으므로(Fig 6), 이는 K⁺ 이외의 다른 양이온이 더욱 활발하게 이동하였거나 K⁺와 연계되어 있는 음이온의 흐름이 감소되어 양이온의 이동이 상대적으로 두드러진 결과로 추측할 수 있다. 둘째, 135mM Na⁺로 조성된 등장성 용액에서 115mM Na⁺의 저장성 용액으로 교환하여 주었을 때, 세포안의 양이온 농도는 세포밖의 135mM Na⁺에 상응하는 만큼 조성되어 있다가 115mM Na⁺의 저장성 용액으로 바뀌게 되면 20mM 만큼의 세포내 양이온도 감소되어야 할 것이다. 감소되는 양이온과 이와 전기적 중성을 유지하였던 음이온도 세포내 양이온과 더불어 배출되어야 하는데 이러한 이온들의 이동이 외향전류로 나타난 결과로 생각할 수 있다. 셋째, 덧붙여 고려해야 할 것은 많은 종류의 서로 다른 세포에서 보고되어 있는 Na⁺/Ca²⁺ 교환기전이다⁵. Na⁺의 이동은 Ca²⁺의 이동과 맞물려 있으므로 Na⁺ 농도의 변화는 Ca²⁺ 이동을 조래할 수 있으므로 이에 관한 신중한 관찰이 요망된다.

이러한 근거로 MDCK 세포에서는 Ca²⁺ 축적에 의하여 K⁺과 Cl⁻의 투과도가 더욱 증가되어 삼투농도 조절에 기여한다고 알려져 있다^{6,12}. 이와는 반대로 retinal pigment epithelial cell과 cardiac myocyte, lymphocyte 및 다른 상피세포에서 RVD 효과에 따른 Cl⁻ 전류가 세포내 Ca²⁺에 의존하지 않고도 증가하였다는 보고도 있다^{15,16}.

그러나 햄스터 난자에서 아직 Ca²⁺에 의한 RVD 조절효과 여부는 검증되지 않고 있다. 이와 관련하여 Fig 6에서 보여진 바와 같이 저장성 용액에 Ca²⁺을 대신하여 Ba²⁺을 첨가하였을 때 외향전류가 증가된 결과로부터 세포용적 조절에 관한 Ca²⁺의 기능에 관한 것을 생각할 수 있다. Ba²⁺은 K⁺ 통로 차단효과 외에 Ca²⁺ 통로를 통해 세포내로 이동할 수 있기 때문에 Ba²⁺에 의해

증가한 외향전류가 과연 K⁺통로가 차단된 결과로 유발된 것인지 아니면 Ca²⁺의 감소에 따른 결과인지 가늠하기 어렵지만 적어도 이러한 의문점들은 햄스터 난자에서 RVD에 대한 Ca²⁺의 효과를 추구하는 실마리로 삼을 수 있다고 판단된다.

본 실험에서 햄스터 난자의 RVD과정은 비교적 신속하게 이루어진 것으로 보인다. 각 세포의 전해질 배출기전이 다르듯이 용적 조절기전이 이루어지는 시간과 세포의 RVD 반응속도가 모두 같다고 할 수는 없다. 심지어 같은 난자일지라도 각각 팽창의 정도가 다르고 그에 따른 RVD반응속도도 다를 수 있다. Fibroblast의 경우 RVD 반응이 3~4분만에 이루어져 비교적 빠르게 나타나며⁷, keratinocyte는 거의 30분만에 일어난다고 알려져 있다¹⁷. 이에 비하면 햄스터 난자는 저장성 용액에 노출시켰을 때 약 1분 후에 외향전류가 관찰되는 것으로 보아 다른 세포에 비해 RVD 반응이 신속하게 이루어질 것으로 짐작된다. RVD 반응속도와 더불어 저장성 용액에 반응하는 난자의 단일통로 활동을 기록하는 것도 바람직한 일이라고 생각한다¹⁸. 왜냐하면 본 실험에서 일부 확인된 바와 같이 여러종류의 전해질 배출이 RVD 반응중 어느 시기에 이루어지는지 또한 이러한 전해질이 동시에 혹은 일련의 순서에 의해서 배출되는지 중요하기 때문이다.

난자는 전기자극이나 hyaluronidase 처리, alcohol의 노출, heat shock, 저장성 용액의 노출 등에 의해 쉽게 처녀생식이 일어난다¹⁹. 포유류 난자는 수정 직후 난관액에 떠있는 상태이기 때문에 난관내액의 삼투농도에 민감하게 반응하여 난자의 성숙에도 영향을 미칠 수 있다. 최근 Xenopus 난포세포에서 삼투적 stress로 나타나는 Cl⁻ 전류가 follicle stimulating hormone(FSH)에 의해 항진된다고 알려져 있다^{14,20}. 이러한 결과는 삼투적 stress가 주어질 때 관찰되는 이온 이동이 난자의 성숙과정과 관련된 것이므로, 저장성 용액에 노출되었을 때 관찰되는 K⁺-Cl⁻ copuling과 Na⁺전류의 움직임은 난자의 수정 및 분화에 관한 역할규명에 중요한 단서로 활용될 수 있기 때문이다.

결 론

햄스터 난자를 대상으로 단일세포 막전압고정법 (whole cell voltage clamp technique)을 사용하여 막전압

을 -40mV로 고정시킨 상태에서 저장성 용액에 노출되었을 때 관찰되는 전류를 기록하고 그 성상을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 등장성 용액에서 40mM mannitol 성분만을 제거한 저장성 용액에 의하여 30pA 크기의 내향전류가 기록되었다.

2. 저장성 용액에 의하여 나타나는 내향전류는 Cl⁻ 통로 억제제인 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid(SITS)에 의해 미세한 외향전류로 반전되었다. 이 내향전류는 Ba²⁺에 의하여 증가되었으나 SITS와 Ba²⁺을 동시에 처리하면 완전하게 소실되었다.

3. 등장성 용액에서 Na⁺ 성분만을 감하여 조성한 저장성 용액에 의하여 외향전류가 관찰되었다.

4. Na⁺ 농도를 감소시킨 저장성 용액관류시 관찰되는 외향성 전류는 SITS에 의해 억제되었으나 Ba²⁺에 의해서는 증가되었다.

이상의 결과로부터 저장성 용액에 노출된 햄스터 난자는 각각의 독립된 통로를 통해 K⁺과 Cl⁻의 배출함으로써 용적을 조절하는 것으로 판단된다. Na⁺ 성분이 변화된 저장성 용액에 의하여 용적이 증가한 난자에서는 K⁺ Cl⁻의 이동기전에 Na⁺이 관여하는 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

- Grinstein S, Furuya W, Baianchini L. Protein kinases, phosphatases, and the control of cell volume. *News Physiol Sci*, 7 : 232~237, 1992.
- Mahrooz K, Zhang B, Loessberg P, et al. Regulation of cell volume by the osteosarcoma cell line UMR-106~01. *Am J Physiol*, 261 : C441~C447, 1991.
- Lang F, Völkl D Häussinger D. General principles in cell volume regulation *In Cell Volume Regulation (Beyenbach, K, W., edit), Karger Basel*, 1~25, 1990.
- Ziyach N, Mills JW, Kleinzeller A. Hypotonicity and cell volume regulation in shark rectal gland: role of organic osmolytes and F-actin. *Am J Physiol*, 261 : F468~F479, 1992.
- Parker JC. Sodium and calcium movements in dog red blood cells. *J Gen Physiol*, 71 : 1~17, 1978.
- Rothstein A, Mack E. Volume-activated calcium uptake: its role in cell volume regulation of Mardin-Darby canine kidney cells. *Am J Physiol*, 262 : C339~C347, 1992.
- Fatherazi S, Izutusu KT, Wellner RB, et al. Hypotonically activated chloride current in HSG cells *J Memb Biol*, 142 : 181~193, 1994.
- Hoffman EK, Simonsen LO. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells *Physiol Rev*, 69 : 315~382, 1989.
- Lewis SEA, Donaldson P. Ion channels and cell volume regulation: Chaos in an organized system. *News Physiol Sci*, 5 : 112~119, 1990.
- Kaufman MH, Sachs L. Effect of postovulatory aging of the oocyte on the activation frequency and types of parthenogenes induced. *J Embryo Exp Morphol*, 34 : 645~655, 1975.
- 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.
- Davis CW, Finn AL. Interaction of sodium transport, cell volume, and calcium in frog urinary bladder. *J Gen Physiol*, 89(5) : 687~702, 1987.
- Rowe WA, Blackman DL, Montrose MH. Protonate activates multiple ion transport mechanisms in the HT-18-Cl human colon cell line. *Am J Physiol*, 265 : G564~G571, 1993.
- Rogelio OA, Richard M. Osmo-dependent Cl⁻ currents activated by cyclic AMP in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B*, 258 : 229~235, 1994.
- Lev MB, Gary M. Chloride current activated by swelling in retinal pigment epithelium cells. *Am J Physiol*, 265 : C1037~C1045, 1993.
- Terreos DA, Kanil H. Role of intracellular calcium in renal proximal tubule cell volume regulation. *Am J Physiol*, 263 : R1086~R1092, 1992.
- Rogolo M, Mastrocola T, Deluca M, et al. A volume-sensitive chloride conductance revealed in cultured human keratinocytes by ³⁶Cl⁻ efflux and whole cell patch clamp recording. *Biochim Biophys Acta*, 1112 : 39~44, 1992.

18. Filipovic D, Sackin H. Stretch and volume activated channels in isolated proximal tubule cells. *Am J Physiol*, 262 : F857~F870, 1992.
 19. Mathew HK. The experimental Production of Mammalian Parthenogenetic Embryo. *In Methods in Mammalian Reproduction*, 21~46, 1978.
 20. Ackerman MJ, Wickman KD, Clapham DE. Hypotonicity activity a native chloride current in Xenopus oocyte. *J Gen Physiol*, 103 : 153~179, 1994.
-