

## 에스트로겐이 생쥐 초기배의 $Ca^{2+}$ 전류에 미치는 영향

강다원 · 신용원 · 김은심 · 구현모<sup>1</sup> · 홍성근 · 한재희<sup>†</sup>  
경상대학교 의과대학 생리학교실

### 17 beta-Estradiol Increases Peak of $Ca^{2+}$ Current in Mouse Early Embryo

D. W. Kang, Y. W. Shin, E. S. Kim, H. M. Koo<sup>1</sup>, S. G. Hong and J. H. Han<sup>†</sup>

Department of Physiology, Medicine of College, Gyeongsang National University,  
Chinju 660-751, Republic of Korea

#### SUMMARY

Steroid hormones control the expression of many cellular regulators, and a role for estrogen in mouse oocytes has been well documented. The preovulatory  $E_2$  increment is generally accepted as the endocrine process regulating induction of *in vivo* oocyte maturation. To address whether the activity of the T-type  $Ca^{2+}$  channel is altered by 17 beta-estradiol ( $E_2$ ), we examined the actions of  $E_2$  on the calcium channel of mouse oocytes and early embryos. Oocytes were collected from the oviduct of mice treated with pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG). Whole cell voltage clamp technique and confocal microscopy were used to examine that  $E_2$  increase intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) via voltage dependent  $Ca^{2+}$  channel (VDC) and estrogen receptor (ESR), and  $E_2$  concentration by the use of radioimmunoassay (RIA) were examined in mouse.

The results obtained were as follows:

The peak of  $Ca^{2+}$  current induced by  $E_2$  increased 122% to  $1.50 \pm 0.03$  nA from  $1.23 \pm 0.21$  nA ( $n=15$ ) in the presence of 5 mM extracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_o$ ). The increased  $Ca^{2+}$  current was temporally associated with  $Ca^{2+}$  transients. The intracellular  $Ca^{2+}$  level increased 207%~30 s following the addition of 1  $\mu$ M  $E_2$  (relative fluorescence intensity:  $836.4 \pm 131.2$  for control,  $n=10$ ,  $1736.4 \pm 192.0$  in the presence of  $E_2$ ,  $n=10$ ).  $E_2$  increased amplitude of  $Ca^{2+}$  current and  $[Ca^{2+}]_i$ .  $E_2$ -induced  $Ca^{2+}$  current and  $E_2$  concentration in blood were showed difference on the stage of embryo. These results suggest that  $E_2$  modulate  $Ca^{2+}$  channel to increase  $Ca^{2+}$  influx.

(Key words :  $Ca^{2+}$  current, intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, 17  $\beta$ -estradiol, RIA)

#### 서 론

세포내  $Ca^{2+}$ 은 근육수축, 호르몬과 신경 전달 물질의 분비,  $Ca^{2+}$  의존성 단백질에 의해 조절되는 대사과정 등의 중요한 세포기능에 관여한다는 것

본 연구는 1999년도 한국과학재단의 연구지원에 의해 수행되었음.

<sup>1</sup> 대구대학교 재활과학과 (Department of Rehabilitation Science, Taegu Univ.)

<sup>†</sup> Correspondence : jheehan@nongae.gsnu.ac.kr

이 오래 전부터 알려져 왔다 (Reuter, 1979, 1983; Tsien, 1983; Hille, 1992). 포유동물의 초기 배발달에 있어서,  $Ca^{2+}$ 은 난자의 핵막 붕괴, 생존력, 극체형성, 수정, 분화, 세포주기 조절 및 수정란의 치밀화 과정에 중요한 역할을 한다 (Homa 등, 1993; Robert 등, 1992). 이와 같은 세포내 일련의 변화는 세포막을 통한  $Ca^{2+}$  이동이나 세포내 저장고로부터  $Ca^{2+}$ 이 유리됨으로써 초래되는 세포내  $Ca^{2+}$  농도 변화에 기인한 것으로 생각되나,  $Ca^{2+}$  유출입 경로나 조절양상이 조직이나 세포에 따라 매우 다양할 뿐 아니라 조절기전 자체도 아직 명확히 규명되어 있지 않다.

Estrogen ( $E_2$ , 17  $\beta$ -estradiol)은 난자의 체외성숙 시 난포의 발달, 과립세포의 증식 및 분화에 필요한 호르몬으로서 최근에는 항산화제 (antioxidant)와 free-radical scavenging activity를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Reyes-Romero, 2001). 그리고  $E_2$ 는 수정과 초기 분화 단계에서 난관내의 환경을 배발달 단계에 적합한 환경 (microenvironment)으로 조절하고 있다 (Amstislavskii and Eroshenko, 2000; Buih 등, 2000).

비홍분성 세포 중의 하나인 난자는 분화 이전의 원시세포로서 이온통로에 대한 정보가 거의 없으나 수정시 생쥐 난자에서 나타나는 세포내  $Ca^{2+}$  농도의 변화와 반복적인 막전압의 변동으로써  $Ca^{2+}$  의존성  $K^+$  전류 (Day 등, 1993, 1998)와 T-type  $Ca^{2+}$  전류가 (Hong, 1992; Day 등, 1998; Kang 등, 2001) 보고되었다. 세포내  $Ca^{2+}$ 은 어떤 자극이 있게 되면 (주로 extracellular stimuli) 농도가 10~100배로 증가되면서 여러 가지 대사의 급격한 변화를 초래하게 된다. 본 실험에서는 세포내  $Ca^{2+}$ 을  $E_2$ 라는 호르몬으로 자극하여 생쥐난자에서 나타나는  $Ca^{2+}$  변화를 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 실험동물은 유한양행으로 분양 받은 4주령의 암컷 생쥐 (ICR)를 경상대학교 의과대학 실험동물 사육장에서 점등 시간 14시간, 온도 20~24°C 및 환풍 조절 하에서 2주 정도 적응

시킨 후 본 실험에 사용하였다. 실험 전에 각 cage에 분리하여 사육하였으며 사료와 물은 자유로이 급식하였다. Dark-light Cycle 조절은 오전 7:00에서 오후 9:00까지 14 시간은 light로, 오후 9:00부터 다음날 오전 7:00까지 10시간은 dark로 조절하였다.

### 2. 과배란유도 및 난자의 채란

과배란을 유도하기 위하여 암컷생쥐 (6주령)에 5 IU의 PMSG (Serarumon<sup>®</sup>, Japan)를 복강내 주사한 후 48시간째에 5 IU의 hCG (Yuhan Co., Korea)를 역시 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다. 난자는 hCG 주사 후 14 시간째에, 수정란은 hCG 주사 후 20 시간 (전핵배), 32 시간 (초기 2세포기 배), 그리고 56 시간 (4세포기 배)에 채란하였다. 회수된 난자는 0.01% hyaluronidase (Type I-S, Sigma, USA) 용액에 30초간 노출시킨 후 실온에서 반복 pipetting하여 난구세포를 제거한 후, 제 1극체가 명확하고 세포질이 균일하고 충실한 것만을 선택하여 사용하였다.  $Ca^{2+}$  전류를 기록하기 위해서는 난자의 투명대 (zona pellucida)를 0.5%의 protease (Type XXIV, Sigma, USA)에 30초 동안 노출시킨 후 pipette으로 부드럽게 세척하여 투명대를 제거하였으며, 이때 protease에 의한 추가적인 세포막 손상을 줄이기 위하여 투명대가 소실되는 즉시 HEPES-buffered cultured medium (M2)으로 3번 이상 세척하여 실험에 이용하였다.

### 3. 실험용액

$Ca^{2+}$  전류를 기록하기 위해 사용된 HEPES buffered Tyrode 용액 (125 mM NaCl, 6 mM KCl, 0.3 mM Na-pyruvate, 10 mM Lactate, 2 mM  $MgCl_2$ , 10 mM HEPES, 5 mM  $CaCl_2$ )은 NaOH를 이용하여 20°C에서 pH 7.4로 적정하였다. 세포내 (또는 pipette) 용액은 외향전류를 억제하기 위하여  $Cs^+$ 을 주성분으로 하여 130 mM CsCl, 15 mM TEA-Cl, 1 mM Mg-ATP, 2 mM  $MgCl_2$ , 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 5 mM di-Tris creatine phosphate로 조성하였고, pH는 1 N CsOH를 이용하여 7.4로 적정하였다. 본 실험에 이용한 whole cell recording 기법상 세포막의 안정과 gigaseal 형성을 촉진하기

위하여  $Ca^{2+}$  농도는 생리적 수준보다 높여 5 mM 로 사용하였다.  $Ca^{2+}$  전류 측정의 배양 실험 및 세포내  $Ca^{2+}$  농도 측정은 M2 배양액을 사용하였으며, 실험목적에 따라 0.4% bovine serum albumin (BSA)의 첨가 유무를 결정하였다.  $Ca^{2+}$  변화에 있어서  $E_2$ 의 영향을 조사하기 위해 본 실험에서는 IVM/IVF시 일반적으로 사용하는 농도인 1  $\mu$ g/ml (Beker 등, 2001)을 난자에 처리하였다. 1  $\mu$ g/ml  $E_2$ 의 농도는 생쥐 난자에 있어서는 다소 높아 보이나,  $Ca^{2+}$  통로를 통한  $Ca^{2+}$  전류의 기록은 세포 바깥에 약물을 직접 처리하여 빠른 시간에 나타나는 변화로써 배양시에 사용하는 농도보다는 높은 농도를 사용하였다.

#### 4. $Ca^{2+}$ 전류의 기록

투명대를 제거한 난자를 도립현미경 위에 설치된 용기로 옮긴 후 미세조정기 (WR-88, Narishige)를 이용하여 tip 저항이 2~3 M $\Omega$ 인 유리전극을 난자의 세포막에 접근시키고 10~20 cmH<sub>2</sub>O 정도의 음압을 가하여 giga seal (seal resistance > 1 G $\Omega$ )을 형성시킨 후 순간적으로 음압을 높여 세포막을 파열시켜 whole cell patch를 형성하였다. 실험용액은 1 ml/min의 속도로 관류시키며, 실온에서 실험을 진행하였다. Patch clamp 증폭기 (CEZ-2100, Nikon Koden)와 pClamp (V6.01, Axon, USA) 및 A/D & D/A converter (TL-1-125, Axon, USA)를 사용하여 막전압 고정과 test pulse를 적용하였다. 막전압은 -80 mV로 유지하고 -50 mV부터 10 mV 간격으로 50 mV까지 250 ms의 저분극 자극을 15초마다 한번씩 가하여 전류를 기록하였다. Patch clamp 증폭기를 통해서 나온 전류와 전압신호는 digital oscilloscope (CS-8010, Kenwood)와 pen recorder로 관찰하고, 결과의 기록은 personal computer hard disc에 저장하였으며, 컴퓨터 모니터와 sigma plot 4.0 프로그램을 이용하여 결과를 재생·분석하였다.

#### 5. 세포내 $Ca^{2+}$ 농도

배란 난자의 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 기록하기 위하여 먼저 fluo-3 AM (Molecular probes,  $Ca^{2+}$  indicator) 4  $\mu$ M을 1시간 동안 난자와 함께 배양한 후

0.4% BSA가 첨가된 M2 배양액으로 세척하였다. 그리고 난자의 움직임을 막기위해 Cell Tak<sup>®</sup> (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)으로 미리 코팅시켜 놓은 chamber를 BSA가 첨가되지 않은 M2 배양액 50  $\mu$ l로 먼저 채운 다음 난자를 살며시 올려놓는다. pipette으로 난자의 움직임을 확인하여 움직임을 없을 때 공초점현미경 (IX 70 Fluoview, Olympus, Japan)으로 scanning하였다. 약물 처리시는 최소한의 stock 용액을 이용하여 난자가 움직이지 않도록 조심스럽게 점적하였다. Scanning 후에는 Fluoview (version 2.0, Olympus, Japan)를 이용하여 image를 분석하였고, scanning은 10분 동안 5초 간격으로 하였다.

#### 6. 방사선 동위원소 면역분석법

$E_2$ 의 측정은 시험관에 부착된 항체에 대해 항원과 표지항원이 서로 경쟁적으로 반응하는 경쟁원리를 이용하여 측정하였다.  $E_2$  항체가 부착된 시험관을 각각 표준용액, 대조 혈청 (기준액), 검체 (생쥐 혈액)로 준비한 후  $E_2$  항체가 부착된 시험관에 각각의 표준용액 (0, 20, 50, 150, 500, 1,800, 3,600 pg/ml), 기준액 및 생쥐혈액을 100  $\mu$ l씩 시험관에 취하였다. 동위원소가 표지된  $^{125}I$   $E_2$  (Spectria<sup>®</sup>, Orion, USA)를 각 시험관에 1.0 ml씩 넣은 후 교반기로 잘 혼합하여 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 후 유리형태는 조심스럽게 제거하고 감마계수기 (Packard, Canberra)로 1분간 측정하여  $E_2$  농도를 계산하였다. 검체인 생쥐혈액은 6주령의 암컷 생쥐 심장을 1ml 주사기로 천자하여 혈액을 수집한 후 용혈이 일어나지 않도록 원심분리한 후 혈청을 회수하였다. 혈청 회수와 동시에 난관과 자궁을 적출한 후 배발달 단계를 조사하여 배발달 단계와 일치하는 혈청만을 실험에 공시함으로써 실험의 정확성을 더하고자 하였다.

#### 7. 난자의 배양

배란핵을 가지고 있는 (GV-intact) 미성숙 난자를 0.4% BSA가 첨가된 M16 배양액(Hogan 등, 1986)으로 만든 50  $\mu$ l drop 내에서 20 시간동안 배양하였다. 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기를 이용하였다. 그리고 고압 멸균된 ligh min-

eral oil로 drop을 피복하여 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 2시간 이상 평형화시킨 후 난자를 배양하였다.

#### 8. 통계학적 분석 및 실험성적의 처리

실험결과의 통계학적 분석은 paired student t-test를 이용하여 처리구간의 유의성을 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. E<sub>2</sub> 처리에 따른 난포란의 성숙

E<sub>2</sub>가 미성숙 난자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 난소에서 난포를 26 G 주사기로 천자한 후 0.4 % BSA가 첨가되어 있는 M16 배양액에 미성숙 난자를 E<sub>2</sub>를 처리한 군 (1 µg/ml)과 처리하지 않은 군으로 나누어 20 시간 배양하였다 (Table 1). 난자를 각각 100개씩 나누어 20 시간 배양한 후 제 1극체 (Polar body, PB)를 형성하는 난자의 비율로 성숙률을 표시하였다. E<sub>2</sub>를 처리한 미성숙 난자는 100개 중 94개의 난자가 PB를 나타낸 (94%) 반면 E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 대조군은 100개중 83개의 난자가 PB를 나타냄으로써 난자의 성숙률은 E<sub>2</sub> 처리시 유의적으로 (P<0.05) 증가함을 알 수 있었다. 이로써 E<sub>2</sub>는 생쥐 미성숙 난자의 성숙과정에 필요한 호르몬의 하나로 생각되었다. 본 결과는 성숙률을 산정하는 대략적인 지표로서 이용하고자 하였다.

공과 이(1997)의 연구결과에 의하면 난자의 성숙 및 배반포로 분화하는 과정에서 호르몬을 처리한 군(FSH & LH)과 호르몬을 처리하지 않은 군을 비교해 보면 호르몬을 처리하지 않은 군에 비해 호르몬을 처리한 군이 분화율과 배반포로의 발달률이 상승하였다. 그리고 호르몬을 한 가지 처리한 군(FSH 및 LH 단독 처리군)과 두 가지를 함께 처리한 군(FSH & LH)을 비교 해보았을 때는 분화율에 있어서는 차이를 보이지 않았지만 호르몬 단독 처리군보다는 두 가지를 함께 처리한 군에서 배반포로의 발달률이 유의적으로 (P<0.05) 높게 나타났다. Beker 등(2001)은 소 난자의 핵 성숙 및 배반포 형성률에 있어서 E<sub>2</sub>의 처리는 효과적이지 않은 것으로 보고하였다. 공과 이(1997)의 연구결과는 본 실험과 동일한 호르몬은 아니지만 발정주기

Table 1. Effect of E<sub>2</sub> treatment during *in vitro* maturation of mouse immature oocytes

Treatment	No. of immature oocyte used	No.(%) of oocytes with PB
Control	100	83 (83.0) <sup>a</sup>
E <sub>2</sub>	100	94 (94.0) <sup>b</sup>

\* Values with different superscripts in the same column were significant difference (P<0.05)

PB: Polar body, E<sub>2</sub> : 17β-estradiol, estrogen

상으로 살펴보았을 때 동일한 시기에 필요한 호르몬으로써 비슷한 양상을 나타낼 것으로 생각된다. 그리고 Beker 등(2001)의 연구결과는 소와 생쥐의 차이로 보여지며 종 특이성에 기인하는 것으로 미루어 짐작된다. Table 1에서 보는 바와 같이 E<sub>2</sub> 처리시 미성숙 난자의 제 1극체 형성률(성숙의 지표)은 E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 군 (83%:83/100)보다 E<sub>2</sub> 처리한 군에서 (94%, 94/100)에서 높게 나타나는 것은 이 시기에 필요로 하는 Ca<sup>2+</sup>과 관련지어서 생각해 볼 수 있을 것이다.

#### 2. 배란난자의 Ca<sup>2+</sup> 전류

E<sub>2</sub>를 처리한 미성숙 난자의 제 1극체의 형성률이 E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 대조군보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 Ca<sup>2+</sup>이 제 1극체 형성을 유발시키는데 필요하다는 연구결과들 (Whittingham, 1980 ; Paleos and Powers, 1981; Jaffe, 1983; Whitaker and Steinhardt, 1985; Homa 등, 1993; Robert 등, 1992)과 함께 배발달에 있어서 E<sub>2</sub>와 Ca<sup>2+</sup>의 상호 관련성을 제시할 수 있다. 먼저 E<sub>2</sub>가 배란난자에서 Ca<sup>2+</sup> 전류에 미치는 영향을 조사하였다. 생쥐 배란난자에서 Ca<sup>2+</sup> 전류를 기록하기 위해 -80 mV의 막전압을 유지한 채 15초 간격으로 250 ms 동안 -50 mV부터 50 mV까지 10 mV 간격으로 저분극 자극을 주었다. 배란난자에서 관찰되는 내향 전류는 주어진 저분극 자극에 따라 leak 전류를 동반하기 때문에 leak subtraction을 한 후 전류를 기록하였다 (Fig. 1). Fig. 1A에서 내향전류는 -40 mV부터 활성화되어 -10 mV에서 최대값 (I<sub>max</sub>, -1.23 ± 0.01 nA, n=15)을 나타내고, 더욱 저분극될수록 전류의 크기가 감소하였으며 +40 mV와 +50 mV

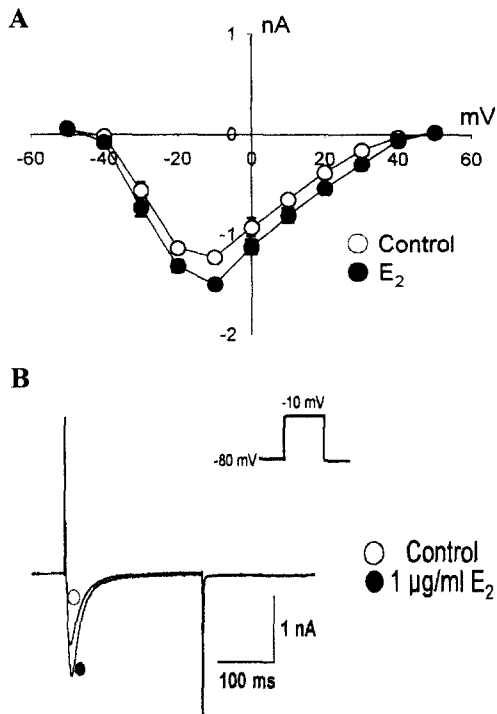


Fig. 1. E<sub>2</sub>-induced increase in Ca<sup>2+</sup> inward current. A: The mean I-V relationship for the peak Ca<sup>2+</sup> current in ovulated oocytes (n=15). Membrane potential was kept at -80 mV. Inward currents were elicited by voltage pulses from -50 mV to +50 mV for 250 ms. I-V relations for the Ca<sup>2+</sup> current when the bathing solution contained 5 mM Ca<sup>2+</sup> (control, open circle; n=15), 5 mM Ca<sup>2+</sup> with 1 μg/ml E<sub>2</sub>. (filled circle; n=15). Each point is the mean ± SD obtained from 15 oocytes. B: Representative current traces recorded before (○) and after (●) applying 1 μg/ml E<sub>2</sub> were superimposed. Peak current was recorded -10 mV.

사이에서 역전전압 (reversal potential, E<sub>rev</sub>)을 보이는 종모양의 전류-전압곡선 (I-V curve)을 보였다. E<sub>2</sub>의 효과를 알아보기 위해 세포 밖에 1 μg/ml의 E<sub>2</sub>를 처리하였다. E<sub>2</sub>를 처리하였을 때 Ca<sup>2+</sup> 내향전류의 변화는 -1.23 ± 0.01 nA (n=15)에서 -1.50 ± 0.03 nA (n=15)로 122% 상승하였다. Fig. 1 A에서 살펴본 바와 같이 내향전류의 최고치를 나타내는 전압과 역전전압 등은 E<sub>2</sub>와 무관하게 유지

되는 것으로 보아 동일한 통로를 통한 Ca<sup>2+</sup> 전류로 생각된다. Fig. 1B는 -10 mV에서 나타나는 I<sub>max</sub>를 E<sub>2</sub> 처리 전·후로 비교한 것으로서 Ca<sup>2+</sup> 전류는 E<sub>2</sub> (1 μg/ml) 첨가 전 -1.47 nA에서 첨가 후 -1.61 nA로 Ca<sup>2+</sup> 전류의 크기가 109% 상승하였다.

최근 estrogen receptor alpha (ESR α)가 난자에 존재함이 보고된 (Hiroi 등, 1999) 이후, E<sub>2</sub>의 작용이 난구세포를 매개로 하여 난자에 전해진다는 (Vanderhyden and Tonary, 1995) 결과에 대한 의문을 제시하게 되었다. 따라서 본 실험에서는 난구세포가 제거된 난자를 선택하여 투명대를 제거한 후 Ca<sup>2+</sup> 내향전류를 기록하였다. E<sub>2</sub> 처리 후 Ca<sup>2+</sup> 전류의 변화를 확인함으로써 ESR이 난자의 세포막에 존재함을 간접적으로 증명하였다. 그리고 E<sub>2</sub> 처리 후 Ca<sup>2+</sup> 내향전류가 증가하는 것으로 보아 E<sub>2</sub>는 생쥐 난자에서 Ca<sup>2+</sup> 전류에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

### 3. E<sub>2</sub> 처리 후 배발달에 따른 Ca<sup>2+</sup> 전류의 변화

생쥐 난자에서 E<sub>2</sub>가 Ca<sup>2+</sup> 전류를 증가시켰다. 이러한 E<sub>2</sub>의 효과가 수정란의 배발달과정에는 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다. E<sub>2</sub> 처리 후 난자 및 수정란에서 나타나는 Ca<sup>2+</sup> 내향전류의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 Ca<sup>2+</sup> 내향전류는 수정란의 발달단계별로 각각의 대조군 (E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 군)을 1로 정한 후 대조군에 대한 상대적인 값으로 전류의 크기를 비교하였다.

E<sub>2</sub>를 처리한 난자는 전류의 크기가 1.22 ± 0.17 nA (n=10), 전핵배는 1.20 ± 0.14 nA (n=10), 2세포기배는 1.07 ± 0.01 nA (n=10), 4세포기배는 1.05 ± 0.09 nA (n=10)를 나타냄으로써 2세포기 배나 4세포기 배보다는 난자와 전핵배에 있어서 E<sub>2</sub>가 Ca<sup>2+</sup> 전류의 크기를 크게 증가시켰다. Ca<sup>2+</sup> 내향전류 크기에 있어 E<sub>2</sub> 처리 수정란 모두 대조군에 비해 유의적인(P<0.05) 차이를 보였다. 본 실험의 결과에서 E<sub>2</sub> 처리 후 난자와 전핵배의 Ca<sup>2+</sup> 내향전류 크기의 증가율이 2세포기와 4세포기 배에서 나타나는 반응보다 크게 증가하는 것은 햄스터 난자를 대상으로 한 한과 홍(1998)의 실험결과와 같았다.

미수정란, 전핵배 및 2세포기 수정란에서 기록

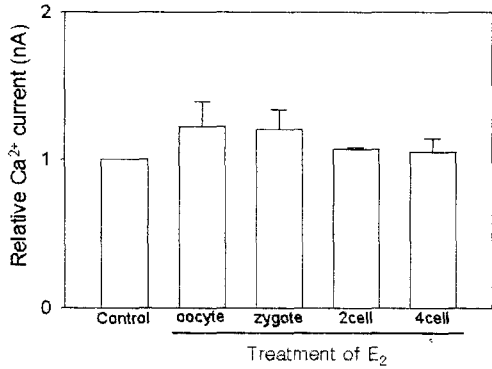


Fig. 2. E<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> current on the oocytes and embryos. Bar graph showed E<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> current in the oocytes, zygote, 2-cell and 4-cell, respectively. Data represented mean ± S.D. from 10 determinations in all cell stage, and as before (control) and after (treatment of E<sub>2</sub>) applying 1 μg/ml E<sub>2</sub>.

된 Ca<sup>2+</sup> 내향전류의 크기는 막전압 의존성 이온전류가 세포의 분화에 따라 감소한다는 보고 (한과홍, 1998)에 비추어볼 때 배발달에 있어 E<sub>2</sub> 처리에 따른 Ca<sup>2+</sup> 전류의 변화는 단순한 Ca<sup>2+</sup> 전류 변화의 결과일 수도 있을 것이다. 본 실험에서도 E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 수정란(전핵배, 2세포기, 4세포기)의 Ca<sup>2+</sup> 내향전류를 기록해 본 결과 한과홍(1998)의 결과와 유사함을 알 수 있었다. 그러나 전핵배에 있어서는 다소 차이를 보였는데, 본 실험에서 수행되었던 결과로는 배란 난자의 Ca<sup>2+</sup> 전류의 크기와 전핵배의 Ca<sup>2+</sup> 전류 크기에 있어서는 유의적인 차이가 없었다. 그러나 배란난자에 비해 전핵배의 Ca<sup>2+</sup> 내향전류가 감소한다는 보고 (한과홍, 1998; Mitani, 1985)와 배란난자에 비해 전핵배에서 Ca<sup>2+</sup> 내향전류가 상승하는 보고 (Hong, 1992)가 있었다. 전핵배에서 이러한 상이한 결과를 나타내는 것은 전핵배의 Ca<sup>2+</sup> 전류는 수정 후 일시적으로 상승하는 현상으로 각 세포의 세포주기 차이의 변화로 보여진다. 불안정한 시기인 전핵배를 거쳐 수정란이 분화하는 과정 중 2세포기 이후부터 나타나는 수정란에서 Ca<sup>2+</sup> 내향전류의 감소는 다음과 같은 이유로 생각해 볼 수 있을 것이다. 전핵배보다는 다소 안정 시기에 도달한 2세포기 이후의 수정란

은 할구간에 gap junction으로 연결되어 있다 (Igusa and Miyazaki, 1983). 세포에서 나타나는 변화를 세포밖의 Ca<sup>2+</sup>에 의존한다기 보다는 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 빠른 변화로써 세포 항상성을 유지하려고 함으로써 분화를 위한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 증가하면 할구간의 연결이 단절되어 Ca<sup>2+</sup> 전류가 감소할 수 있을 것으로 생각된다. 본 실험에서의 E<sub>2</sub> 처리 후 배발달에 따른 Ca<sup>2+</sup> 내향전류의 변화는 E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 수정란에서 나타나는 Ca<sup>2+</sup> 전류의 변화와 유사한 양상을 보이는 것으로 보아 E<sub>2</sub> 반응은 Ca<sup>2+</sup>에 의존하는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Tamoxifen (E<sub>2</sub> 길항제)을 흰쥐의 혈관평활근에 처리했을 때 L-type Ca<sup>2+</sup> 내향전류가 감소한다는 보고 (Song 등, 1996)와 GH<sub>3</sub> anterior pituitary 세포에서 E<sub>2</sub>가 T-type Ca<sup>2+</sup> 내향전류를 증가시킨다는 (Ritchie, 1993) 보고로 유추해 볼 수 있다. 이는 모두 E<sub>2</sub>가 Ca<sup>2+</sup> 통로를 통한 Ca<sup>2+</sup>의 이동에 관련이 있음을 시사한다. 특히 E<sub>2</sub>에 의해 Ca<sup>2+</sup> 내향전류가 증가함은 본 실험의 결과와 동일하다. Yamamoto (1995)는 whole cell patch clamp 기법을 이용해 임신한 흰쥐의 자궁근 세포에서 E<sub>2</sub>와 Ca<sup>2+</sup> 통로의 연관성을 살펴 본 결과, 본 실험과는 상반된 결과를 제시하였다. 이 상반된 결과 조차도 E<sub>2</sub>와 Ca<sup>2+</sup>의

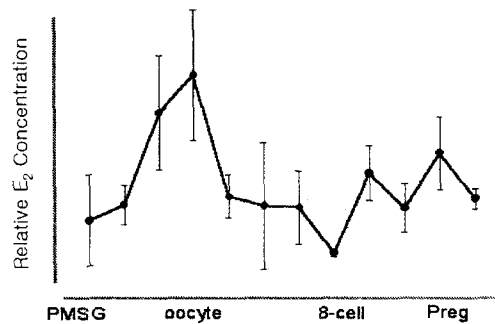


Fig. 3. A trend curve of serum E<sub>2</sub> concentration. E<sub>2</sub> concentration in the peripheral blood of mice from the time of the post-PMSG 12h to the 10 day of pregnancy. Each filled circle represented as post-PMSG 12h, 24h, 36h, post-hCG 14h, 1 cell, 2 cell, 4 cell, 8 cell, 16 cell -embryos, morulae, blastocysts and 10 day of pregnancy.

관련성을 설명하고 있으며, 어떠한 원인에 의해 상반된 결과를 제시할 수 있었는지를 생각해 보면 먼저 세포의 차이를 들 수 있다(난자와 자궁근 세포의 차이). 그리고 두 번째로는 본 실험에서 확인되지 않은 임신 후 세포상태의 변화를 생각해 볼 수 있다. Fig. 3에 의하면 임신 10일경에는 E<sub>2</sub>의 농도가 상승하는 것을 볼 수 있다. 이로서 이미 높은 E<sub>2</sub> 농도에 노출되어 있는 자궁근 세포라면 정확한 반응을 확인할 수 없을 것으로 생각되며 이미 E<sub>2</sub>가 자궁근세포와 반응했다면 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 상승에 따른 세포의 Ca<sup>2+</sup> 이동의 감소가 있을 것이다.

#### 4. 배발달에 따른 E<sub>2</sub> 농도 변화

생쥐난자에서 배발달에 따른 Ca<sup>2+</sup> 전류의 변화를 살펴본 결과 E<sub>2</sub>가 Ca<sup>2+</sup> 통로를 조절함으로써 Ca<sup>2+</sup> 전류의 증가를 유발한 것으로 생각된다 (Fig. 1과 Fig. 2). 이러한 Ca<sup>2+</sup> 전류의 증가가 배발달 과정 중 혈액중에 존재하는 E<sub>2</sub> 농도의 변화와 어떠한 관련이 있는지 알아보았다.

PMSG와 hCG로 배란을 유도한 후 난자는 14시간째에, 수정란은 hCG 유도와 함께 수정능력이 확인된 수컷 생쥐 (8주령)와 교미시켜 hCG 투여 후 20시간째부터 수정란의 단계에 맞추어 채란하였다. E<sub>2</sub>의 농도는 생쥐의 심장에서 채취한 혈액으로 방사선 동위원소 면역법 (RIA)을 이용하여 정량하였다. 각각의 검체는 난자에서 PMSG 처리 후 12h, 24h, 36h, 48h / hCG 처리 후 12h, 24h, 36h, 48 시간째 채취한 혈액을 사용하였고, 수정란은 1세포기, 2세포기, 4세포기, 8세포기, 16세포기, 상실배, 배반포 그리고 임신 10일의 혈액(Fig. 3)을 이용하였다.

E<sub>2</sub>가 난자의 성숙과 배발달에 필요한 물질로 여겨진 이래 아직까지 어떠한 기전을 통하여 이루어지고 있는지는 정확하지 않다. Fig. 3은 분화과정 중 생쥐의 혈액에서 정량한 E<sub>2</sub> 농도의 상대적인 곡선이다. PMSG 처리 후 지속적인 상승을 보이다가 배란시기에 최고치를 나타내었으며 배란 후 다시 감소하여 8세포기에서는 급격한 감소현상이 나타났다. 이후 다시 상실기를 거쳐 배반포기 임신기간 동안 E<sub>2</sub>의 농도가 상승하는 것을 확인하였다. 여기서 관찰한 흥미로운 사실은 8세포기 (hCG 처리 후

56시간)에 급격하게 농도가 감소한다는 것이다. 방사선 동위원소 면역법 (Polyntsev 등, 1980; Zhao 등, 1998)으로 배발달에 따라 혈중 E<sub>2</sub>의 농도를 측정된 결과 (Polyntsev 등, 1980)는 본 실험과 유사한 결과를 보여주었다. 임신 후 E<sub>2</sub>의 농도가 상승하는 것도 동일한 변화였다. 이러한 E<sub>2</sub> 농도변화 양상은 앞서 살펴본 Ca<sup>2+</sup> 전류의 변화양상 (Fig. 2)과 매우 유사한 것을 알 수 있다. 특히 8세포기 배를 채란 할 수 있는 시기의 혈중 E<sub>2</sub> 농도 감소 (Fig. 3), 8세포기에서 Ca<sup>2+</sup> 내향전류가 기록되지 않았던 점 (data not shown), 그리고 8세포기 배에서 ESR α의 존재를 확인하지 못한 결과로 보아 (Hiroi 등, 1999) 배발달 과정중 E<sub>2</sub> 농도 변화와 Ca<sup>2+</sup> 농도 변화는 밀접한 관련성이 있는 것으로 생각된다.

#### 5. Estrogen이 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도에 미치는 영향

E<sub>2</sub>가 Ca<sup>2+</sup> 전류의 증가를 나타내었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 E<sub>2</sub>가 Ca<sup>2+</sup> 통로를 조절함으로써 나타나는 반응으로 생각되며, 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 변화에는 어떠한 작용을 하는지 알아보하고자 하였다.

세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도는 공초점현미경을 이용하여 Fluo-3 AM indicator로 488 nm에서 기록하였다. Fig. 1과 같이 E<sub>2</sub>를 처리하였을 때 세포막에 존재하는 Ca<sup>2+</sup> 통로를 통하여 Ca<sup>2+</sup>이 세포 밖에서 안으로 이동하였다. Hiroi 등(1999)은 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 방법으로 ESR α의 존재 유무를 확인한 결과 8세포기를 제외한 모든 단계의 수정란에서 E<sub>2</sub> 수용체가 존재함을 확인하였다. 난자에서 수용체의 존재가 보고된 이래 본 연구에서는 E<sub>2</sub> 처리 후 Ca<sup>2+</sup> 통로의 조절에 의한 Ca<sup>2+</sup> 이동 외에 ESR과 E<sub>2</sub>의 결합으로 인한 세포내 일련의 신호전달과정을 거침으로써 세포내 Ca<sup>2+</sup> 저장고로부터 유리되는 Ca<sup>2+</sup> 변화를 생각해 보았다.

Fig. 4는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 형광의 밝기로써 나타내었으며, E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 난자들의 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도는 836.4±131.2 (n=10), E<sub>2</sub>를 처리한 난자들의 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도는 1736.4±192.0 (n=10)으로써 유의한 (P<0.05) 차이를 보였다. E<sub>2</sub> 처리에 의한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 상승은 E<sub>2</sub>로 난자를 자극함으로써 Ca<sup>2+</sup> 통로를 조절하여 세포 밖의 Ca<sup>2+</sup>

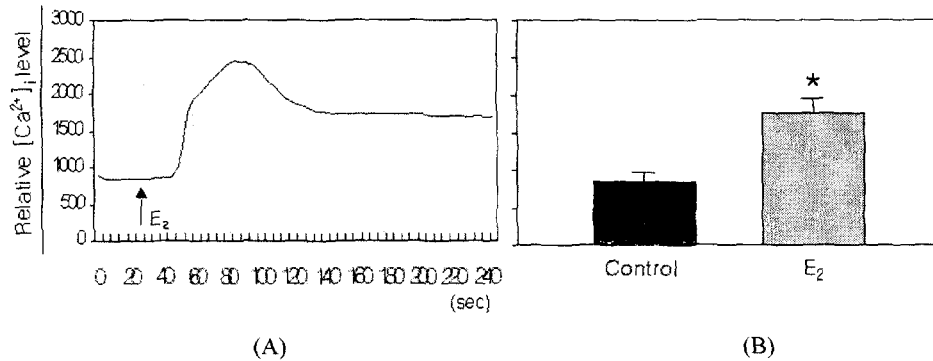


Fig. 4. E<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> transient in mouse oocytes. Fluorescence was recorded from oocytes loaded with the Ca<sup>2+</sup> sensitive dye fluo-3 AM. A: Characteristic Ca<sup>2+</sup> transient appeared in response to E<sub>2</sub> treatment. Arrow indicates the onset of the exposure to E<sub>2</sub>. B: Bar graph showed E<sub>2</sub>-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in the oocytes. Data represented mean ±SD from 10 determinations, and as before (control) and after (E<sub>2</sub>) applying 1 μg/ml E<sub>2</sub>.

이 이동하여 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 변화시키거나 E<sub>2</sub>가 난자의 ESR과 결합함으로써 세포내 일련의 신호전달 과정을 거쳐 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 변화시키는 것으로 생각된다.

최근 E<sub>2</sub> 수용체에 관한 연구 (Wu 등, 1992; Hiroi 등, 1999)는 RT-PCR 방법을 이용하여 난소, 난자 및 수정란에서 ESR mRNA를 검출함으로써 진행되어왔다. ESR mRNA는 배란난자 및 난자-난구세포 복합체에서 강하게 나타났으며, 그 발현정도가 2세포기 수정란에서는 다시 낮아졌다. 그리고 ESR mRNA는 상실배와 배반포기에서는 전혀 검출되지 않았다. 임신 후 gestation 10일에서 18일까지의 시기에 다시 상승하는 것을 보았다 (Wu 등, 1992). 그러나 Hiroi 등(1999)은 초기 배발달 동안 E<sub>2</sub>의 역할을 확인하고자 ESR 여러 아종 중 ESR α와 β의 발현 유무를 난소, 난자, 2세포기, 4세포기, 8세포기, 상실배, 배반포에서 조사하였다. ESR α는 8세포기를 제외한 배에서 나타났고, ESR β는 8세포기와 상실배에서 나타나지 않았다. 이처럼 세포단계에 따라 특이하게 ESR의 발현 유무가 달라지는 것으로 보아 E<sub>2</sub>는 초기 배발달과정에 있어 중요한 기능을 하는 것으로 생각된다. 난자의 성숙 및 배발달 동안 나타나는 ESR의 변화는 과립 세포에 의해 분비된 E<sub>2</sub>이 체내에서 난자의 성장과 성숙에 직접 영향을 주는 것이고, 착상 전 수정란

(상실배, 포배)에서 ESR이 확인되지 않는 것은 자궁에서 E<sub>2</sub>가 성장촉진인자를 유발시키는데 기여함으로써 나타나는 현상이다 (Wu 등, 1992). 이러한 연구결과로 미루어 E<sub>2</sub>는 Ca<sup>2+</sup> 통로의 조절과 함께 ESR과 결합한 후 세포내 일련의 신호전달과정을 거쳐 Ca<sup>2+</sup>의 변화를 초래함으로써 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시키는 것으로 생각된다. 그러나 본 실험에서 직접적인 ESR의 존재는 확인한 바 없다. 따라서 본 연구에서는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가를 E<sub>2</sub>가 Ca<sup>2+</sup> 통로를 조절함으로써 나타나는 현상으로 설명하고자 한다. 그리고 전기생리학적 결과로써 ESR의 존재를 간접적으로 확인하였다.

### 적 요

배분화과정시 나타나는 Ca<sup>2+</sup> 변화에 미치는 E<sub>2</sub>의 영향을 알아보기 위하여 whole cell voltage clamp 기법, 방사선 동위원소 면역측정법, 그리고 공초점 현미경을 통하여 E<sub>2</sub> 처리 후 나타나는 Ca<sup>2+</sup> 전류 변화 및 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 변화를 조사하였다.

생쥐의 미성숙 난자는 난소의 난포를 천자하고, 배란난자는 과배란 처리 후 난관에서 회수하였다. 수정란은 과배란 처리 후 수컷 생쥐와 교미를 유도한 후 각각의 단계에 맞는 수정란을 채란하였다. 혈중 E<sub>2</sub>의 농도는 심장을 천자하여 혈액을 채취한



후 배발달 단계와 호르몬 처리 시간이 일치하는 혈액만을 사용하였다.

본 실험의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. E<sub>2</sub> 처리시 미성숙난자의 제 1극체 형성률 (성숙의 지표)은 E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 난자(83% : 83/100)보다 E<sub>2</sub>를 처리한 난자 (94%, 94/100)에서 유의적 (P<0.05)으로 높게 나타났다.
2. E<sub>2</sub>를 처리하였을 때 Ca<sup>2+</sup> 내향전류의 변화는 -10 mV에서 -1.23±0.01 nA (n=15)에서 -1.50±0.03 nA (n=15)로 122% 상승함으로써 유의한 (P<0.05) 변화를 보였다.
3. E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 난자 및 수정란을 1로 한 후 E<sub>2</sub>를 처리한 난자 및 수정란의 변화를 상대적인 값으로 표시하였다. E<sub>2</sub> 처리한 난자는 1.22±0.17 (n=10), E<sub>2</sub> 처리한 전핵배는 1.20±0.14 (n=10), E<sub>2</sub> 처리한 2세포기배는 1.07±0.01 (n=10), 4세포기배는 1.05±0.09 (n=10)를 나타냄으로써 수정란의 단계마다 E<sub>2</sub>의 반응 결과가 차이가 남을 알 수 있었다.
4. E<sub>2</sub> 농도 곡선에서 PMSG 처리 후 E<sub>2</sub>의 혈중 농도는 계속적인 상승을 보이다가 배란시기에 최고치를 나타내었으며, 배란 후 다시 감소하여 8세포기에서는 급격한 감소현상이 나타났다. 이후 다시 상승기를 거쳐 배반포기 임신기간동안 E<sub>2</sub>의 농도가 상승하였다.
5. E<sub>2</sub> 처리 후 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도변화의 결과로, E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 난자들의 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도는 836.4±131.2 (n=10), E<sub>2</sub>를 처리한 난자들은 1736.4±192.0 (n=10)로써 유의한 (P<0.05) 차이를 보였다.

이상의 결과로부터 E<sub>2</sub> 처리에 의한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 상승은 E<sub>2</sub>가 Ca<sup>2+</sup> 통로를 자극함으로써 세포 바깥의 Ca<sup>2+</sup>이 세포안으로 이동하여 나타나는 변화로 생각된다.

### 참고문헌

Amstislavskii SI and Eroshenko VP. 2000. The effect of ecoestrogens on the development of the mammalian reproductive system. *Ontogenez*, 31(3):165-177.

- Beker ARCL, Zeinstra E, Colenbrander B, and Bevers MM. 2001. Effect of addition of 17 $\beta$ -estradiol during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent blastocyst formation. *Theriogenology(Abs)*, 55(1):462.
- Buhi WC, Avarez IM and Kouba AJ. 2000. Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs*, 166(2):165-179.
- Day ML, Johnson MH and Cook DI. 1998. A cytoplasmic cell cycle controls the activity of a K<sup>+</sup> channel in pre-implantation mouse embryos. *The EMBO Journal*, 17(7):1952-1960.
- Day ML, Johnson MH and Cook DI. 1998. Cell cycle regulation of a T-type calcium current in early mouse embryos. *Pflugers Arch*, 436(6): 834- 842.
- Day ML, Pickering SJ, Johnson MH and Cook DI. 1993. Cell-cycle control of a large conductance K<sup>+</sup> channel in mouse early embryos. *Nature*, 365(7):560-562.
- Hille B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed., Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp183-186.
- Hiroi H, Momoeda M, Inoue S, Tsuchiya F, Matsumi H, Tsutsumi O, Muramatsu M and Taketani Y. 1999. Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantational mouse embryos. *Endocr. J.*, 46(1):153-158.
- Hogan B, Beddington R, Constantini F and Lancy E. 1994. *Manipulating the mouse embryo* (2nd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press p. 390.
- Homa ST, Carroll J and Swann K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Repro.*, 8(8):1274-1281.
- Hong SG. 1992. Changes in the inward current and membrane conductance after fertilization the mouse eggs. *Kor. J. Vet. Res.*, 32:157-164.
- Igusa Y and Miyazaki S. 1983. Effects of altered

- extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. *J. Physiol.*, 340:611-632.
- Jaffe LA. 1983. Sources of calcium in egg activation; a review and hypothesis. *Dev. Biol.*, 99: 265-276.
- Kang DW, Yi SM, Kim ES, Han JH, Bae IH, and Hong SG. 2001. Electrical and pharmacological properties of T-type calcium current in mouse oocytes. *Theriogenology(Abs)*, 55(1):322.
- Mitani S. 1985. The reduction of calcium current associated with early differentiation of the murine embryo. *J. Physiol.*, 363:71-86.
- Paleos GA and Powers RD. 1981. The effect of calcium on the first meiotic division of the mammalian oocyte. *J. EXP. Zool.*, 217:409-416.
- Polyntsev IuV, Misiulin SS, Kamakhin AP and Rozen VB. 1980. Progesterone and 17-beta-estradiol concentration in the peripheral blood of pregnant mice at various stages of pre-implantation period of embryonal development. *Probl. Endokrinol (Mosk)*, Jul-Aug. 26(4):65-69.
- Reuter H. 1979. Properties of two membrane currents in the heart. *Annu. Rev. Physiol.*, 41: 414-424.
- Reuter H. 1983. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzyme and drugs. *Nature*, 301: 569-574.
- Reyes-Romero MA. 2001. The physiological role of estradiol during human fetal development is to act as antioxidant at lipophilic milieu of the central nervous system. *Med. Hypotheses*, 56 (1):107-109.
- Ritchie AK. 1993. Estrogen increases low voltage-activated calcium current density in GH3 anterior pituitary cells. *Endocrinol.*, 132(4):1621-1629.
- Robert MT, Calvin S, Gary GB and Gerald S. 1992. Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on  $Ca^{2+}$ , whereas germinal vesicle breakdown is  $Ca^{2+}$  independent in the mouse oocyte. *J. Cell. Biol.*, 117:799-811.
- Song J, Standley PR, Zhang F, Joshi D, Gappy S, Sowers JR and Ram JL. 1996. Tamoxifen (estrogen antagonist) inhibits voltage-gated calcium current and contractility in vascular smooth muscle from rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277(3):1443-1453.
- Tsien RW. 1983. Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu. Rev. Physiol.*, 45:341-358.
- Vanderhyden BC and Tonary AM. 1995. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the oocyte. *Biol. Reprod.*, 53(6):1243-1250.
- Whitaker M and Steinhardt RA. 1985. Ionic signaling in sea urchin egg fertilization. In Metz, C and Monroy, B. (eds), *Biology of fertilization*. Vol. 3. Academic Press, New York, pp. 167-221.
- Whittingham DG. 1980. Parthenogenesis in mammals. In Finn, C.A.(ed.), *Oxford Reviews in Reproductive Biology*. Vol. 2. Oxford University Press, Oxford, pp. 205-211.
- Wu TC, Wang L and Wan YJ. 1992. Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis. *Mol. Reprod. Dev.*, 33 (4):407-412.
- Yamamoto T. 1995. Effects of estrogens on Ca channels in myometrial cells isolated from pregnant rats. *Am. J. Physiol.*, 268:C64-69.
- Zhao XX, Zhang Y and Chen BX, 1998. Serum progesterone and 17 beta-estradiol concentrations during pregnancy of bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology*, 50(4):595-604.
- 공일근, 이은봉. 1997. 체외성숙 동안에 호르몬 처리에 따른 Calcium 반응과 체외발달에 미치는

영향. 한국수정관아식학회지, 21(3):303-310.  
한재희, 홍성근. 1998. 햄스터 난자에서 관찰되는  
내향전류의 성상과 수정 후의 변화. 대한수의

학회지, 38(2):280-289.

---

(접수일: 2001. 6. 12 / 채택일: 2001. 7. 15)