

생쥐 난자성숙에 미치는 Ca^{++} Ionophore와 Ca^{++} Channel Blocker의 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과, 한양대학교 자연과학대학 생물학과*

배인하 · 김현숙 · 김문규*

Effect of Ca^{++} Ionophore and Ca^{++} -Channel Blocker on the Mouse Oocyte Maturation

In-Ha Bae, Hyun Sook Kim and Moon Kyoo Kim*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul, Korea,

**Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul, Korea*

= Abstract =

The present study was examined to clarify the role of calcium ion as a factor for the maturation of mouse oocytes.

Follicles and cumulus-enclosed oocytes were isolated with two sharp needles under a stereomicroscope from female mouse (ICR) ovaries which were treated PMSG 5 IU 45-46 hours previously.

Isolated follicles and cumulus-enclosed oocytes were cultured for 14-16 hours in an organ culture system at 37°C, 5% CO₂ in air and 100% humidified in incubator.

MHBS was the basic medium used from which A23187, verapamil, NiCl₂ · 6H₂O and LaCl₃ · 7H₂O were added depending on the experimental groups. In follicle- or cumulus-enclosed oocytes were cultured in these differently treated media.

Following results were obtained from the present study.

1. The calcium ionophore A23187 directly or indirectly seems to stimulate GVBD of follicle-enclosed mouse oocytes. Increasing concentration of ionophore A23187 led to an increase in oocytes degeneration from the cumulus-enclosed mouse oocytes.
2. The organic Ca^{++} channel blocker, verapamil does not induce GVBD of follicle-enclosed mouse oocytes. Specially, higher dose of 1 mM verapamil induced GVBD of follicle-enclosed mouse oocytes. However, cytoplasm of GVBD oocytes in 1 mM verapamil treated groups appeared shrunk. In the cumulus-enclosed oocytes, polar body formation was reduced in verapamil treated groups and degeneration increased.
Verapamil inhibit oocyte maturation (polar body formation).
3. The Ca^{++} inhibitor, Nickel (NiCl₂ · 6H₂O) inhibits maturation of the follicle-enclosed oocytes. In the cumulus-enclosed oocytes the progression to MII (PB formation) was reduced and degeneration of mouse oocytes increased as the concentration of Ni⁺⁺ increase.

The results indicates that nickel act as an inhibitor of calcium.

4. The Ca^{++} inhibitors, Lanthanum (LaCl₃ · 7H₂O) has shown different effect from that of nickel.

* 본 연구는 문교부 기초과학 육성연구비(BSR1-91-426)의 보조로 수행되었음.

In follicle-enclosed oocytes, 0.01mM lanthanum induced maturation of mouse oocytes. Polar body formation was reduced in the cumulus-enclosed oocytes all lanthanum treated group.

서 론

대부분의 포유류에서의 난자성숙은 성체가 된 후 주기적인 호르몬분비로 일어나고 있다. 즉 출생후부터 사춘기 (puberty)까지 제1감수분열의 전기 (prophase I) 중 복사기 (diplotene)에 멈추어 있다가 사춘기 이후 적절한 시기에 성숙한 여포 (mature follicle)에서의 난자는 주기적인 preovulatory LH surge에 의해 제2감수분열 중기 (metaphase II, MII)까지 진행되며 이때 다시 분열이 중지된다. 이후의 분열재개는 MII에서 배란된 난자가 정자를 만나 수정이 일어나야 가능하다.

그런데 대부분의 포유류의 성체의 난소 (ovary)에 있는 그라아프 여포 (graafian follicle)을 생식소자극호르몬인 luteinizing hormone (LH)의 surge가 일어나기전 분리하여 배양하면 in vivo에서와 마찬가지로 난자성숙은 억제된 상태로 있으며, 이때 배양액에 생식소자극호르몬을 첨가하면 여포내 난자의 감수분열이 재개된다 (Baker & Neal, 1972; Neal & Baker, 1973; 1974a; 1976b; Bae & Kang, 1991)

그러나 그라아프 여포로부터 적출한 난자를 적당한 배양액에서 배양하면 생식소자극호르몬의 처리가 없이도 난자의 성숙과정이 자발적으로 일어난다. 이와같이 생체에서와는 달리 호르몬처리 없이도 성숙과정이 일어나는 것을 자발적 성숙 (spontaneous maturation)이라 한다 (Pincus & Enzman, 1935; Edwards, 1962). 물론, 이런 자발적 성숙과정은 적당한 성숙 억제물질을 처리하면 일어나지 못하게 된다. 이러한 여포내 난자 성숙 억제물질의 존재가 Pincus와 Enzman (1935)에 의해 인정된 이래 여포액내에서 이들 억제물질을 찾으려는 노력이 활발히 진행되어왔다. 난자성숙 억제제로 알려진 N^6O^2 -dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (dbc AMP)나 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)를 처리하여 GV를 유지시킨 난자를 다시 여포에 옮겨넣었을 경우 그 난자가 GV를 계속 유지한다 (Lee et al., 1985). 이것은 dbc AMP나 IBMX에 의해 유도되는 효과가 여포에 의해 유도되는 성숙억제효과와 서로 같은 기작임을 추정할 수 있다. 이러한 dbc AMP와 IBMX에 의한 성

숙억제효과는 생식소자극호르몬에 의해 감소되었다 (Dekel & Beers, 1978). 즉, 이런 자발적 성숙이 일어나는 과정은 여포 환경이 난자의 성숙을 억제하는 기능을 가지고 있으며, 생식소자극호르몬은 이 효과를 극복하여 난자의 성숙 재개 현상이 일어나는 것임을 시사하고 있다 (Lee et al., 1985). 한편 난자성숙억제효과를 극복하는 데는 칼슘 (Ca^{++})이 관여하고 있는데 이러한 포유류 난자성숙과정에 칼슘이 관여하고 있다는 사실은 여러학자들에 의해 보고되어져 왔다 (Bae, 1981; De Felici & Siracusa, 1982; Paleos & Powers, 1981).

한편 Powers와 Paleos (1982)는 dbc AMP에 의한 생쥐 난자성숙 억제효과를 극복하는 데는 cellular Ca^{++} uptake를 자극하는 물질을 처리하므로 이루어짐을 밝혔는데, extracellular Ca^{++} level이 1.71mM보다 높은 10mM 이상시 150 μ M 이상의 dbc AMP 농도의 억제효과를 현저히 감소시킨다고 하였다. 또한 Ca^{++} ionophore A23187 ($>1 \mu$ M)은 1.7 또는 20mM Ca^{++} 을 함유하는 배양액에서 dbc AMP의 효과를 현저히 극복시킨다고 하였다. 즉, 이러한 억제물질의 효과를 극복하는 데는 Ca^{++} 이 작용하고 있음을 알 수 있다. 또한 Schuetz (1975)는 조개 난자에 ionophore A23187을 처리하여 난자내 Ca^{++} 함량을 높인 결과 난자의 성숙이 재개된 것을 보았으며, 양서류 난자 성숙에도 Ca^{++} 이 필수적이라는 결과가 보고되었다 (Merriam, 1971; Wasserman & Masui, 1975; Kostellow & Morrill, 1980). 또한 Bae와 Channing (1985)은 돼지 난자의 배양에서 Ca^{++} inhibitor인 verapamil을 0.2mM 처리하면 Ca^{++} 의 이동이 억제되어 난자 성숙이 억제되고 있음을 보고 하였다.

본 연구에서는 LH surge전에 분리한 여포 (follicle)와 여포로부터 적출한 난자-난구세포 복합체 (cumulus-enclosed oocytes)에 Ca^{++} channel을 열게 하는 ionophore A23187, Ca^{++} 의 수송을 방해하는 organic Ca^{++} channel blocker인 verapamil과 아울러 Ca^{++} inhibitor인 란타넘 (La^{3+})과 니켈 (Ni^{2+})등을 처리하여 난자 성숙 조절 기작에 대한 Ca^{++} 의 역할에 대해 알아보 고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에는 Albino 계통인 ICR strain 생쥐의 암컷을 사용하였다. 공란 생쥐는 생후 22-26일이었고 일조시간(명기, 14시간: 암기 10시간)과 온도가 일정하게 조절되는 사육실에서 사육하였으며 급이와 급수는 무제한으로 급여하였다. 5 IU의 PMSG (Sigma, St. Louis, U.S.A.)를 0.9% 생리식염수에 녹여 복강주사하고 45-46시간 뒤에 경추골 파열로 도살한 후 개복하여 난소를 얻었다.

2. 여포분리 및 여포배양방법

제거된 난소는 1회의 세척 과정을 거친후 해부현미경 (Wild, M5A, Swiss) 하에서 두개의 날카로운 바늘을 이용하여 직경 1mm 내외의 그라아프 여포 (graafian follicle) 만을 유리하였다. 이때 투명도가 낮은 여포들은 대체로 퇴화하는 여포로 배양에서 제외시켰다. 분리시킨 여포들은 새로운 배양액으로 3회정도 세척 후 배양에 이용하였다.

한 실험군에 10-15개의 여포를 배양하였으며 배양방법은 Bae와 Kang (1991)이 고안한 방법을 이용하였다. 즉, 배양접시 (35×10mm, Falcon)에 1ml 기본배양액을 붓고 여기에 25mm millipore membrane (pore size 0.45 μm; Millipore Co., Bedford, Massachusetts, U.S.A.)을 띄우고 이위에 다시 분리시킨 개개의 여포를 올려 놓았다. 배양접시 밑에는 다시 시계접시를 놓았고 그 사이에 3~4ml의 증류수를 부어 배양접시가 움직일 수 있도록 하여 배양접시내 배양액에 산소가 잘 녹아지도록 하였다. 또 시계접시에 petri 접시를 놓아 전체 배양 system이 쉽게 진동될 수 있도록 하였다. 배양접시의 여포는 37°C를 유지하며 5% CO₂와 95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기내에서 14-16시간동안 배양하였다.

3. 난자수집 및 난자배양방법

해부현미경 하에서 그라아프 여포를 예리한 바늘로 터뜨려 그 속에 들어 있는 난자를 여포로부터 분리하였다. 분리된 난자는 난구세포 (cumulus cell)가 매우 조밀하게 둘러싸고 있으면서 germinal vesicle oocyte (GV)가 뚜렷한 건강한 난자만을 골라서 실험에 이용하였다. 배

양할 난자는 기본 배양액에 3회 세척후 4개의 well을 가진 기관 배양접시 (4 well Multidish, Nunclon, Denmark)에서 배양하였다. 즉, 4well multidish (16mm×11mm)에 1ml의 배양액을 채우고 그 속에 12-15개의 난자를 삽입하고, 가운데 증류수 3-4ml을 채워 배양액이 증발하는 것을 방지하여 14-16시간 동안 37°C, 5% CO₂, 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

4. 배양액과 처리된 화학물질

모든 실험에 사용된 기본 배양액은 Modified Hank's Balanced Salt Solution (MHBS, Bae & Channing, 1985)이며 그 조성은 다음과 같다.

NaCl (126.17 mM), KCl (5.37 mM), MgSO₄ (0.81 mM), Na₂HPO₄ (0.34 mM), KH₂PO₄ (0.44 mM), glucose (5.55 mM), phenol red (10 mg/1), penicillin (100 I.U./ml), streptomycin (50 μg/ml) 등을 salt solution으로 준비하고 필요시 적당량을 따서 사용하였다. CaCl₂ (1.71 mM), Na-lactate (2.5 mM), Na-pyruvate (0.33 mM) 등은 각각 stock solution으로 만들어 놓고 사용했으며 0.4% bovine serum albumin (BSA; Sigma)와 배양액내에서 여포 및 난자-난구복합체를 배양하는 시간동안의 pH변화를 방지하기 위해 N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES; Sigma) 10 mM를 0.1N의 NaOH로 미리 pH 7.3-7.4로 적정하여 사용하였다. 배양액은 pH 7.3-7.4, 280 mOsm 전후 (Bae and Foote, 1980)로 조정된 후 배양기에서 2시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

처리용물질인 ionophore A23187 (Sigma)은 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)에 녹여 3.84×10⁻⁶M의 stock solution을 만들어 놓고, 희석하여 사용하였으며 (3.84×10⁻⁷M, 3.84×10⁻⁸M), verapamil (Sigma)은 ethanol에 녹여 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM의 stock solution을 만들어 사용하였다. 이때 대조군 배양에는 용매 (solvent)를 첨가하여 사용하였다. 또한 NiCl₂·6H₂O (Shinyo Co., Tokyo, Japan)와 LaCl₃·7H₂O (Sigma) 등도 각각 증류수에 녹여 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM의 stock solution을 만들어 사용했으며, 이때 란타넘을 처리하는 실험군에서는 배양액내에서 란타넘에 의해 침전물이 생기므로 인산성분이 들어 있는 Na₂HPO₄와 KH₂PO₄를 제거하여 사용하였다. 실험에 사용된 처리물질은 예비실험을 통해 생리학적으로 유의성이 있는 농도로 설정하였다.

실험에 사용한 모든 기구는 견열 또는 고압멸

관하였으며 배양액은 매 실험마다 stock solution으로부터 새로 만들었고, 사용직전에 millipore membrane (pore size 0.45 μ m)으로 여과 멸균하였다.

5. 배양후 난자의 핵상관찰

1) 여포배양후 난자수집

14-16시간동안의 여포배양이 끝나면 여포를 터뜨려 그 속의 난자를 적출하였다. mouth-controlled-micropipette를 사용하여 난자를 회수하고, 난자 주위의 난구세포들을 제거하였다.

2) 난자-난구세포 복합체의 배양 후 난자수집

14-16시간동안의 난구내난자의 배양이 끝나면 mouth-controlled-micropipette를 사용하여 난자를 들어싸고 있는 난구세포들을 제거하였다.

3) 난자의 염색 및 핵상관찰

Pipette로 난구세포를 제거 후 염색과 고정과정은 회수된 난자를 slide glass위에 놓고 cover glass로 덮은 후 고정액 (ethyl alcohol 3 : acetic acid 1)에서 12-24시간 정도 고정시킨 후 0.1 % acetoorcein용액으로 염색하여 간섭위상차도립 현미경 (interference phase contrast microscope, Leitz, Germany)으로 관찰하였다.

핵상은 germinal vesicle oocyte (GV), germinal vesicle breakdown oocyte (GVBD, MI-TI), 1st polar body (PB)가 형성된 난자, 퇴화된 난자 degenerative oocyte (Deg), 그 밖의 비정상적인 난자들 (other)로 하여 분류하였다. 이때 핵상 관찰에 대한 기준으로는, 핵막 (GV)의 소실 또는 인 (nucleolus)의 소멸, 염색체의 분산

과 응축, 염색체의 배열 상태 및 제1극체의 형성등을 조사하여 분류하였다.

6. 통계처리

대조군과 실험군의 통계적 유의성은 spss/pc⁺ (version 3.0)를 이용하여 student t-test로 하였다.

결 과

1. 생쥐 난자성숙에 대한 Ca⁺⁺ ionophore A23187의 영향

Divalent ionophore A23187에 대한 여포내 난자 (follicle-enclosed oocytes)에서의 효과는 표 1에서와 같다. 3.84×10^{-7} M 농도에서의 여포내 난자의 성숙율 (GVBD+PB 형성율)은 대조군 22%에 비해 46%로 약간 높게 나타났으며 ($p < 0.05$), 3.84×10^{-6} M의 농도에서는 58.8%로 훨씬 높은 난자 성숙율을 보이고 있으나 대조적으로 난자 퇴화율은 19.6%로 높게 나타났다 ($p < 0.01$). 또한 보다 높은 농도 3.84×10^{-5} M에서는 50%의 핵막붕괴 (germinal vesicle breakdown; GVBD)가 일어났고, 20%의 난자 퇴화율을 보이고 있어 대조군과 유의한 차이를 보이고 있다 ($p < 0.01$).

한편 난자-난구세포복합체 (cumulus-enclosed oocytes)에서 ionophore A23187의 영향은 여포내 난자에서와는 다른 양상을 보이고 있다 (표 2). 3.84×10^{-7} M의 농도에서 대조군과 비교하여 볼때 극체 (polar body; PB)형성율이 낮아졌고, 3.84×10^{-6} M에서도 극체형성이 감소하

Table 1. Effects of ionophore A23187 on meiotic maturation of follicle-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours*

A23187 concentration	No. of oocytes	Nuclear phase					P vs. control
		GV	GVBD	PB	DEG	Other	
Contrl	50	34 (68.0)	6 (12.0)	5 (10.0)	4 (8.0)	1 (2.0)	-
3.84×10^{-7} M	50	18 (36.0)	15 (30.0)	8 (16.0)	5 (10.0)	0 (0.0)	<0.05
3.84×10^{-6} M	51	11 (21.6)	22 (43.1)	9 (15.7)	10 (19.6)	0 (0.0)	<0.01
3.84×10^{-5} M	50	8 (16.0)	25 (50.0)	7 (14.0)	10 (20.0)	0 (0.0)	<0.01

*Five replications were done.

*: Number of the oocytes, the numerical numbers in parentheses indicate percentage of the total of the oocytes examined.

Abbreviation: P; probability, GV; germinal vesicle, GVBD; germinal vesicle breakdown, PB; polar body (metaphase II), DEG; degeneration, Other; abnormal oocytes.

Table 2. Effects of ionophore A23187 on meiotic maturation of cumulus-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours*

A23187 concentration	No. of oocytes	Nuclear phase					P vs. control
		GV	GVBD	PB	DEG	Other	
Control	56	0 (0.0)	*18 (32.1)	31 (55.4)	6 (10.7)	1 (1.8)	-
$3.84 \times 10^{-7}M$	59	0 (0.0)	27 (45.8)	26 (44.1)	6 (10.2)	0 (0.0)	NS
$3.84 \times 10^{-6}M$	61	0 (0.0)	28 (45.9)	20 (32.8)	13 (21.3)	0 (0.0)	<0.05
$3.84 \times 10^{-5}M$	61	0 (0.0)	24 (39.3)	4 (6.6)	33 (54.1)	0 (0.0)	<0.01

*Five replications were done.

* : Number of the oocytes, the numerical numbers in parentheses indicate percentage of the total of the oocytes examined.

NS : Not significant.

Table 3. Effects of verapamil on meiotic maturation of follicle-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours*

Verapamil concentration	No. of oocytes	Nuclear phase					P vs. control
		GV	GVBD	PB	DEG	Other	
Control	54	*38 (70.4)	3 (5.7)	7 (13.0)	5 (9.3)	1 (1.9)	-
0.01 mM	57	36 (63.7)	5 (8.8)	9 (15.8)	5 (8.8)	2 (3.5)	NS
0.1 mM	58	36 (62.1)	4 (6.9)	9 (15.5)	9 (15.5)	0 (0.0)	NS
1 mM	58	1 (1.7)	26 (44.8)	8 (13.8)	22 (37.9)	1 (1.7)	<0.05

*Five replications were done.

* : Number of the oocytes, the numerical numbers in parentheses indicate percentage of the total of the oocytes examined.

In 1 mM verapamil concentration, cytoplasm appered shruink.

고 있고 난자의 퇴화율이 대조군에 비해 높게 나타났다. ($p < 0.05$). 또한 $3.84 \times 10^{-5}M$ 의 농도에서는 54.1%의 난자퇴화율을 보이고, 극체형성도 매우 감소하고 있어 난자성숙이 억제됨을 나타내고 있다 ($p < 0.01$).

2. 생쥐 난자성숙에 대한 Verapamil의 영향

Orgnic Ca^{++} channel blocker인 verapamil의 여포내 난자에 대한 영향은 표 3과 같다. 대조군에 대해 0.01 mM과 0.1 mM의 농도에서는 유의한 차이가 없었으며, 1 mM의 농도에서는 오히려 핵막붕괴가 대조군에 비해 많이 일어났으나 이때 GVBD와 PB로 판명된 난자들의 대부분이 세포질 수축현상을 보였고, 난자퇴화율에 있

어서도 대조군에 대해 높게 나타났다 ($p < 0.05$).

한편 verapamil의 난자-난구세포 복합체에 대한 영향은 여포내 난자에서와 달리 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다(표 4). 즉, 대조군이 61%의 높은 MII로의 진행을 보이고 있으나, 0.01 mM과 0.1 mM의 verapamil 농도에서는 낮은 극체형성을 보이고 ($p < 0.01$), 1 mM의 농도에서는 핵막붕괴와 극체를 형성한 난자는 하나도 없었으며 93%라는 높은 난자퇴화율을 보이고 있어, 난자성숙이 억제됨을 나타내고 있다 ($p < 0.01$).

3. 생쥐 난자성숙에 대한 Nickel chloride ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)의 영향

여포내 난자에 대한 Ca^{++} inhibitor인 니켈의

Table 4. Effects of verapamil on meiotic maturation of cumulus-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours*

Verapamil concentration	No. of oocytes	Nuclear phase					P vs. control
		GV	GVBD	PB	DEG	Other	
Control	59	0 (0.0)	*22 (37.3)	36 (61.0)	1 (1.7)	0 (0.0)	-
0.01 mM	53	1 (1.9)	36 (67.9)	14 (26.4)	2 (3.8)	0 (0.0)	<0.01
0.1 mM	54	1 (1.9)	36 (66.7)	6 (11.1)	10 (18.5)	1 (1.9)	<0.01
1 mM	57	2 (3.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	53 (93.0)	2 (3.5)	<0.01

*Five replications were done.

*: Number of the oocytes, the numerical numbers in parentheses indicate percentage of the total of the oocytes examined.

Table 5. Effects of NiCl₂·6H₂O on meiotic maturation of follicle-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours*

NiCl ₂ ·6H ₂ O concentration	No. of oocytes	Nuclear phase					P vs. control
		GV	GVBD	PB	DEG	Other	
Control	52	*36 (69.3)	4 (7.7)	6 (11.5)	2 (3.9)	4 (7.7)	-
0.01 mM	50	32 (64.0)	5 (10.0)	5 (10.0)	6 (12.0)	2 (4.0)	NS
0.1 mM	54	29 (53.7)	7 (13.0)	5 (9.3)	10 (18.5)	3 (5.6)	NS
1 mM	56	0 (0.0)	6 (10.7)	0 (0.0)	44 (78.6)	6 (10.7)	<0.01

*Five replications were done.

*: Number of the oocytes, the numerical numbers in parentheses indicate percentage of the total of the oocytes examined.

Table 6. Effects of NiCl₂·6H₂O on meiotic maturation of cumulus-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours*

NiCl ₂ ·6H ₂ O concentration	No. of oocytes	Nuclear phase					P vs. control
		GV	GVBD	PB	DEG	Other	
Control	55	0 (0.0)	*19 (34.6)	35 (63.6)	1 (1.8)	0 (0.0)	-
0.01 mM	53	0 (0.0)	30 (56.6)	19 (35.9)	4 (7.6)	0 (0.0)	<0.05
0.1 mM	54	0 (0.0)	30 (55.6)	19 (35.2)	5 (9.3)	0 (0.0)	<0.01
1 mM	58	0 (0.0)	2 (3.6)	1 (1.8)	46 (82.1)	7 (12.5)	<0.01

*Five replications were done.

*: Number of the oocytes, the numerical numbers in parentheses indicate percentage of the total of the oocytes examined.

영향은 organic channel blocker verapamil에서와 비슷하게 난자성숙이 억제된 상태로 나타났으며, 1mM 농도에서는 verapamil과는 달리 극체를 형성한 난자는 하나도 없었으며 많은 난자들이(78.6%) 퇴화를 보였다($p < 0.01$). 0.01mM과 0.1mM의 농도에서는 대조군과 유의한 차이가 없었다(표 5).

한편 난자-난구세포 복합체에서 니켈의 영향은 표 6에서와 같이 verapamil에서와 유사한 결과를 보이고 있다. 즉, 0.01mM에서는 대조군에 비해 극체형성이 낮게 나타났고($p < 0.05$), 0.1mM에서 역시 낮은 극체형성을 보이고 있

다($p < 0.01$). 특히 1mM의 농도에서는 높은 난자퇴화를 보이고 있다($p < 0.01$).

4. 생쥐 난자성숙에 대한 Lanthanum chloride ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)의 영향

란타넘은 배양액의 인산성분과 반응하여 침전물을 형성하므로 배양액에서 인산성분을 생략하여 사용하였으며, 이때 인산성분이 있는 배양액에서 여포배양에 있어 유의한 차이는 없었다.

니켈과 같이 Ca^{++} inhibitor인 란타넘은 니켈과는 다른 경향을 보이고 있다. 여포내 난자성숙에 있어 란타넘의 효과는 표 7에서 보는것과

Table 7. Effects of $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on meiotic maturation of follicle-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours*

LaCl ₃ ·7H ₂ O concentration	No. of oocytes	Nuclear phase					P vs. control
		GV	GVBD	PB	DEG	Other	
Control (I)	42	*27 (61.4)	8 (18.2)	5 (11.4)	2 (4.5)	0 (0.0)	-
control (II)	47	27 (57.6)	7 (14.9)	6 (12.8)	4 (8.5)	3 (6.4)	NS
0.01 mM	43	11 (25.6)	14 (32.6)	7 (16.3)	6 (14.0)	5 (11.6)	<0.01
0.1 mM	43	18 (41.9)	9 (20.9)	6 (14.0)	9 (20.9)	1 (2.3)	NS
1 mM	44	19 (43.2)	7 (15.9)	5 (11.4)	10 (22.7)	3 (6.8)	<0.05

*Four replications were done.

*: Number of the oocytes, the numerical numbers in parentheses indicate percentage of the total oocytes examined.

Control (I) group medium contained phosphates, control (II) group and other groups media were omitted phosphates.

Table 8. Effects of $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on meiotic maturation of cumulus-enclosed mouse oocytes cultured for 14-16 hours*

LaCl ₃ ·7H ₂ O concentration	No. of oocytes	Nuclear phase					P vs. control
		GV	GVBD	PB	DEG	Other	
Control	51	0 (0.0)	*19 (37.3)	29 (56.9)	3 (5.9)	0 (0.0)	-
0.01 mM	52	0 (0.0)	30 (57.7)	20 (38.5)	2 (3.8)	0 (0.0)	NS
0.1 mM	42	1 (2.4)	28 (66.7)	7 (16.7)	6 (14.3)	0 (0.0)	<0.01
1 mM	46	1 (2.2)	20 (43.5)	5 (10.9)	20 (43.5)	0 (0.0)	<0.01

*Four replications were done.

*: Number of the oocytes, the numerical numbers in parentheses indicate percentage of the total of the oocytes examined.

Phosphates were omitted from the all media.

같이 특이하게도 0.01 mM 농도에서 대조군에 비해 높은 난자성숙율을 보이고 있다 ($p < 0.01$). 그러나 0.1 mM의 농도에서는 대조군과 유의한 차이는 없었으나 조금 높은 난자퇴화를 보이고 있으며, 1 mM의 농도에서는 22.7%의 난자퇴화를 보이고 대조군과 같이 낮은 난자성숙율을 보이고 있다 ($p < 0.05$).

한편 난자-난구세포 복합체에서 란타늄의 영향은 대조군에 비해 0.01 mM에서는 38.5%만이 극체를 형성하였으며, 0.1 mM의 경우 0.01 mM에 비해 더욱 낮은 난자 성숙을 보이고 ($p < 0.01$), 1 mM의 농도에서는 10.9%만이 MII로 진행되었으며 역시 높은 난자퇴화를 보이고 있다 ($p < 0.01$, 표 8).

고 찰

여포내 난자성숙의 감수분열 재개 억제현상은 난구세포 (cumulus cell)와 난자사이의 gap junction을 통해 난자내로의 cAMP 이동으로 난자내 cAMP의 농도증가가 감수분열재개를 방해하는 요인이라고 보고하고 있으며 (Dekel & Beers, 1978; Dekel et al, 1981; Schultz et al, 1983), 이와 다른 견해로 난자성숙분열 재개시 cAMP 농도는 감소되지 않으나 난자와 난구세포사이의 coupling등이 유지되지 않기 때문이라고 주장하였다 (Moor & Heslop, 1981; Crosby et al; 1985; Racowsky, 1985). 이와는 달리 난자의 여포내에서의 성숙억제현상을 설명하는 데는 난자성숙 억제물질인 OMI (oocyte maturation inhibitor)의 존재를 가정하기도 하며 steroid hormone (estrogen and progesterone) 등에 의한 여러가지 가설이 제시되어 있다 (Hillensjo et al., 1978; Tsafiriri et al., 1976; 1982).

한편 난자의 자발적인 성숙이나 여포내에서의 성숙에는 난자의 이온 투과력 (permeability)의 증진이 일어나며, 이때 세포내에서는 칼슘의 농도 증가가 일어나므로 난자성숙에 있어서의 칼슘의 필요성을 강조하고 있다. 즉 이처럼 칼슘은 난자의 생존도 (viability) 뿐 아니라 난자성숙과정에서도 필수적이라는 보고가 많은 연구자에 의해 밝혀졌다 (Sato et al., 1980; Paleos & Powers, 1981; De Felici & Siracusa, 1982; Powers & Paleos, 1982; Maruska et al., 1984; Bae & Channing, 1985; Bae & Chang, 1989; Bae & Kang, 1991).

난자성숙시 난자내 칼슘의 증가현상이 난자

-난구세포사이의 gap junction에 의한 것인지 칼슘 channel이 열리는 것인지 아니면 sequestered 칼슘의 유리에 의한 것인지 분명하지 않다. 난자성숙조절 기작에 대한 칼슘의 역할에 대해서 알아보기 위한 일환으로 칼슘 channel을 열게 하는 ionophore A23187 (Schuetz, 1975; Wasserman & Masui, 1975; Moreau et al., 1976; O'Conner et al.; 1977; Tsafiriri & Bar-Ami, 1978; Powers & Paleos, 1982), 칼슘 channel을 봉쇄하여 칼슘의 수송을 방해하는 verapamil, D600 등의 억제제를 이용한 연구들 (Bae & Channing, 1985)이 진행되었다.

본 실험에서는 여포내 난자 (follicle-enclosed oocyte) 및 난자-난구세포 복합체의 체외 배양에 미치는 A23187의 영향을 살펴보았다. 여포내 난자에서 A23187를 처리한 실험군 모두에서는 높은 핵막붕괴가 유도되었으며, 난자-난구세포 복합체에서는 $3.84 \times 10^{-5} M$ 의 높은 농도에서 극체형성이 대조군에 비해 떨어지고, 난자퇴화율이 증가하고 있는 반면 $3.84 \times 10^{-7} M$ 에서는 대조군과 유사한 난자성숙을 보이고 있다. 이는 A23187에 의해 세포 및 세포표면의 칼슘 channel이 열림으로 하여 세포안으로 칼슘의 이동이 일어나 난자내 칼슘의 유입이 증가되어 직접 또는 간접적으로 여포내 난자의 핵막붕괴를 유도한 것으로 사료된다. 결국 여포내 난자배양에서 A23187은 exogenous hCG가 난자내로의 Ca^{++} uptake를 증가시켜 난자성숙을 유도한 것 (Bae & Kang, 1991)과 같이 난자막 표면, 세포에 존재하는 Ca^{++} channel을 열어주므로써 난자내로의 칼슘의 유입을 증가시켜 난자 성숙을 유도한 것으로 사료된다. 또한 난자-난구세포 복합체에서 고농도 ($3.84 \times 10^{-5} M$)의 A23187의 효과는 돼지난자에서 A23187을 처리하였을 때 농도증가에 따라 난자퇴화도 증가하고 성숙이 억제되었다는 보고 (Bae & Channing, 1982)에서 처럼 생쥐에서도 높은 난자퇴화를 보였다. 이는 A23187의 의한 난자세포질내 칼슘의 높은 농도가 오히려 난자의 대사 과정을 방해하고 있으므로써 높은 퇴화율을 나타내는 것이 아닌가 추정된다.

난자성숙에 있어 칼슘의 역할을 규명하기 위한 연구의 하나로 칼슘 억제제들의 이용이 있으며, 그 중 칼슘 channel blocker을 이용한 연구가 진행되어 왔다 (Morrill et al, 1980; Hagiwara & Byerly, 1981; Moger, 1983; Yoshida, 1982; 1985; 1986).

Organic Ca^{++} channel blocker인 verapamil은 막 표면을 가로지르는 칼슘의 이동을 방해하고 (Singh et al, 1978; Moger, 1983), 여러자리에서 action을 가지며 세포막에서 칼슘 펌프 (Ca^{++} pump)을 방해한다는 보고도 있다 (Charch & Zsoter, 1980).

본 연구에서도 verapamil을 이용하여 난자성숙에 미치는 영향을 살펴보았는데, 여포내 난자에서는 대조군과 유의한 차이 없이 난자성숙이 억제되었다. 1mM의 농도에서는 오히려 대조군에 비해 높은 난자성숙을 보였으나 핵막붕괴와 극체형성이 판명된 난자들에서는 정상적인 난자들에 비해 세포질 수축현상 (cytoplasm shrinkage)을 나타내었다. 여포내 난자배양을 1mM verapamil에 처리한군에서는 핵막붕괴 및 극체형성율이 대조군보다 높았으나 퇴화율 역시 높게 나타났다. 이것은 난자주위의 난구세포에서 칼슘 channel을 봉쇄하여 난자내로의 칼슘이동은 억제되었으나 난자내 sequestered 칼슘의 유리 (release)로 난자성숙이 유도된 것으로 추정된다. 즉, Yoshida (1982)가 주장했듯이 난자막에서도 Na^{++} channel은 없고 Ca^{++} channel만이 존재하므로 칼슘 channel을 봉쇄시킬 경우 칼슘뿐 아니라 나트륨의 이동도 전적으로 봉쇄되므로 이에 따라 물 (H_2O)의 이동도 방해되어 세포질은 결국 hyperosmol에 노출되는 현상과 같아지기 때문인 것으로 추정된다.

또한 난자-난구세포 복합체의 배양에서는 대조군에 비해 극체형성이 억제되어 나타났다. 1mM의 농도에서 나타나는 극체형성의 억제는 verapamil에 의해 세포 및 세포표면의 칼슘 channel이 봉쇄되어 extracellular 또한 intracellular 칼슘의 이동이 억제되며, 이로 인해 극체형성을 위해 요구되는 칼슘의 농도에 이르지 못하기 때문이며, 난자퇴화율이 높은 것으로 미루어 난자 생존에도 영향을 주고 있음을 추정할 수 있다. Paleos와 Powers (1981)에 의하면 난구세포가 제거된 생쥐 난자 (denuded oocyte)의 배양에서는 verapamil에 대해 sensitivity (민감성)이 증가되므로 극체형성을 방해하고 있으나 핵막붕괴에는 별다른 효과가 없음을 보고하였는데, 이는 난구세포가 제거된 난자들의 verapamil에 대한 민감성이 아마도 난구세포의 제거에 그 원인이 있음을 나타내고 있다고 생각된다. 그러므로 Sandberg 등 (1992)의 보고에서 *Xenopus laevis* 난자에서 난자와 난구세포가 gap junction을 통해 칼슘의 이동현상이 일어나 궁극적

으로 난자내의 칼슘의 증가가 일어난다는 결과에서와 같이 난구세포가 gap junction이나 칼슘 channel을 통해 칼슘을 공급하고, 난자의 퇴화를 방지하는 역할을 하고 있음을 추정할 수 있으며 (Bae & Channing, 1985), 이는 난구세포가 gonadotropin action의 1차적 target라는 견해도 일치한다 (Meinecke & Meinecke-Tillman, 1979). 즉, 난자를 둘러싸고 있는 여포나 난구세포들이 칼슘을 난자내로 공급하며 난자를 외부환경으로부터 보호하고 있어 verapamil과 같은 칼슘 억제제의 작용을 감소시키고 있음을 추정할 수 있다.

또한 본 연구에서는 Ca^{++} inhibitor인 니켈 ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)와 란타늄 ($LaCl_3 \cdot 7H_2O$)을 이용하여 실험하였다. 니켈의 경우 아직까지 난자성숙에 미치는 영향에 대한 보고는 되지 않았으나 Bae 등 (1991)이 생쥐 초기 2-cell 배를 이용하여 in vitro 2-cell block을 실험한 결과 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 10-20 μM 처리한 경우 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)를 처리한 것과 같은 극복 효과가 있었다고 보고한 바가 있다.

본 연구에서 여포내 난자에 대한 니켈의 효과는 대조군과 같이 난자성숙을 억제하고 있으며, 1mM의 농도에서는 78%의 높은 난자퇴화를 보였다. 또한 난자-난구세포 복합체의 경우 verapamil과 유사한 효과를 나타내고 있는데 역시 극체형성을 억제시켰으며 1mM에서는 82%의 높은 난자퇴화를 나타냈다. 이는 니켈이 0.1-1mM의 어떤 농도에서 칼슘의 자리로 대체하였거나 또는 칼슘 channel을 봉쇄하여 칼슘의 기작을 방해하므로써 난자를 퇴화시키는 것으로 생각된다. 이와같이 니켈의 농도증가에 따른 칼슘 억제현상의 증가는 분명 니켈이 칼슘의 억제제로 작용하고 있음을 증명하고 있다.

한편 칼슘과 가장 유사한 화학적 특성을 가지고 있는 란타늄은 칼슘과 ionic radius는 거의 같지만 칼슘보다 높은 원자가를 갖고 (La^{3+}) 세포표면에 있는 칼슘 자리에 결합하고 있으나 칼슘보다는 덜 가역적으로 작용하며, 어떤 농도에서는 칼슘을 대신하여 정해진 조직위치에서 칼슘의 이동과 작용을 방해하거나 증진시키며 고농도에서는 cellular integrity에 toxic한 영향을 미칠 수 있다고 추정되었다 (Weiss, 1974). 란타늄은 양서류 난자에서 칼슘의 uptake 및 efflux 모두를 자극한다는 보고가 있고 (Morrill et al, 1980), Magaribuchi 등 (1977)은 란타늄이 guinea pig 평활근에서 칼슘의 transmembrane

influx를 억제한다고 보고한 바 있다.

본 연구 결과에서 여포내 난자 배양시 0.01mM의 란타넘 농도에서는 대조군에 비해 핵막 붕괴와 극체형성율의 증가를 보이고, 1mM의 농도에서는 니켈과 달리 22% 정도만이 난자퇴화를 보여 니켈과 다른 영향을 나타내고 있다. 한편 Paleos와 Powers(1981)는 0.5mM 이상의 란타넘 농도에서 난자들이 빠르게 퇴화하나 일반적인 toxicity와 구별되는 성숙에는 영향을 미치지 않는다는 보고하고 있으며, De Felici와 Siracusa(1982)는 란타넘이 난자막에서 칼슘이 out-flux하는 것을 방지하여 sealing action에 의한 보호기능이 있다고 보고하였다. 즉 란타넘은 난자내로 들어올 수 없기 때문에 (Hagiwara & Byerly, 1981) 난자 세포질내의 칼슘에는 하등의 영향이 없는 것으로 추정된다.

또한 난자-난구세포 복합체에서는 대조군에 대해 극체형성이 억제되어 나타났으며 농도 증가에 따라 난자퇴화가 많이 나타났다. 이때 란타넘 처리군의 실험에 있어서 De Felici와 Siracusa(1982)의 실험을 근거로 란타넘 처리시 배양액의 침전을 막기위해 인산성분의 시약을 모두 빼고 사용하였다. 그러나 1mM의 농도에서는 여전히 침전물이 생겼다. 인산성분이 제거된 배양액에서의 여포내 난자의 배양은 인산이 들어 있는 배양액에서와 유의한 차이는 없었다. 이와같은 현상은 인산이 난자성숙에 별다른 영향을 끼치지 않는다는 추정이 가능하다. 이러한 난자성숙에 있어 인산의 필수여부에 대해서는 앞으로 좀 더 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

난자성숙에 있어 칼슘 역할의 중요성은 많은 연구들로 강조되어 왔지만 그 역할과 작용시기에 대해서는 아직까지도 명확하지 않으나, 난자성숙 재개에 대한 여포내에서의 명확한 기작에 대해서는 세포표면, 세포막에 존재하는 Ca^{++} channel, Ca^{++} pump 또는 Ca^{++} receptor로 작용하는 calmodulin의 작용과 관련있는 것으로 추측되며 이에 대한 연구가 더 진행되어야 하리라 생각된다.

인 용 문 헌

Bae IH: Role of calcium in resumption of meiosis of cultured porcine cumulus-enclosed oocytes. Society for the Study of Reproduction 14th Annual Meeting August 10-13,

Suppl. No. 1, *Biol Reprod* 1981, 24, 92A.

Bae IH, Chang BY: Calcium uptake in mouse oocyte matured in vitro. *Kor J Fertil Steril* 1989, 16, 1-7.

Bae IH, Channing Cp: Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized graafian follicles. *Biol Reprod* 1985, 33, 79-87.

Bae IH, Min KM, Wang YM, Yu HK: The effect of calcium inhibitors on the mouse 2-cell block. Society for the Study of Reproduction, 24th annual meeting July 29-31, Suppl. No. 1, *Biol Reprod* 1991, 44, 157.

Bae IH, Foote RH: Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolarity. *J Reprod Fert* 1980, 59, 11-13.

Bae IH, Kang SH: Effects of gonadotropin on $^{45}Ca^{++}$ uptake in follicle-enclosed mouse oocytes cultured in vitro. *Kor J Fertil Steril* 1991, 18, 153-162.

Baker TG, Neal P: Gonadotropin-induced maturation of mouse graafian follicles in organ culture. In: *Oogenesis*, J.D. Biggers & A.W. Schuetz, ed., University Park Press, Baltimore Maryland 1972, 296-377.

Batta SK, Knudsen JF: Calcium concentration in cumulus-enclosed oocytes of rat after treatment with pregnant mare's serum. *Biol Reprod* 1980, 22, 243-246.

Charch J, Zsoter TT: Calcium antagonistic drugs: Mechanism of action. *Can J Physiol Pharmacol* 1980, 58, 254-264.

Crosby IM, Moor RM, Heslop JP, Osborn JC: cAMP in ovine oocytes: Localization of synthesis and its action on protein synthesis, phosphorylation and meiosis. *J Exp Zool* 1986, 234, 307-318.

De Felici M, Siracusa G: Survival of isolated, fully grown mouse ovarian oocytes is strictly dependent on external Ca^{++} . *Dev Biol* 1982, 92, 539-543.

Dekel N, Beers WH: Rat oocyte maturation in vitro: Relief of cAMP inhibition by gonadotropins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1978, 75, 4369-4373.

Dekel N, Lawrence TS, Gilura NB, Beers WH: Modulation of cell-to-cell communication in

- the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev Biol* 1981, 86, 356-362.
- Edwards RC: Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocyte. *Nature* 1962, 208, 349-351.
- Foote WD, Thibault C: Recherches experimentales sur la maturation in vitro des oocytes de truis et de veau. *Annls Biol Anim Biochem Biophys* 1969, 9, 329-349.
- Hagiwara S, Byerly L: Calcium channel. *Ann Rev Neurosci* 1981, 4, 69-125.
- Hillensjo T, Kripner AS, Pomerantz SH, Channing CP: Action of porcine follicular fluid oocyte maturation inhibitor in vitro: Possible role of the cumulus cells. In: *Ovarian follicular and corpus luteum function*. Eds. Cornelia P. Channing, John M. Marsh, William A. Sadler, New York, Plenum Press. 1979, pp 283-290.
- Kostellow AB, Morrill GA: Calcium dependence of steroid and guanine 3', 5'-monophosphate induction of germinal vesicle breakdown in *Rana pipiens* oocytes. *Endocrinology* 1980, 106, 1012-1019.
- Lee KA, Rhee KS, Cho WK: Studies on the effects of follicular environment and human chorionic gonadotropin (hCG) on the maturation of rat oocytes. *Korean J Zool* 1985, 28, 245-256.
- 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.
- Maruska DV, Leibfried ML, First NL: Role of calcium and calcium-calmodulin complex in resumption of meiosis, cumulus expansion, viability and hyaluronidase sensitivity of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 1984, 31, 1-6.
- Meinecke B, Meinecke-Tillmann S: Effects of gonadotropins on oocyte maturation and progesterone produced by porcine ovarian follicles cultured in vitro. *Theriogenology* 1979, 11, 351-365.
- Merriam RW: Progesterone-induced maturational events in oocytes of *Xenopus laevis*. I. Continuous necessity for diffusible calcium and magnesium. *Exp Cell Res* 1971, 68, 75-80.
- Moor RM, Heslop JP: Cyclic AMP in mammalian cells and oocytes during maturation. *J Exp Zool* 1981, 216, 205-209.
- Moreau M, Doree M, Guerrier P: Electrophoretic introduction of calcium ions into the cortex of *Xenopus laevis* oocytes triggers meiosis reinitiation. *J Exp Zool* 1976, 197, 443-449.
- 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.
- Moger WH: Effects of the calcium-channel blockers cobalt, verapamil and D600 on leydig cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 1983, 28, 528-535.
- Neal P, Baker TG: Response of mouse ovaries in vivo and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. I. Examination of critical time intervals. *J Reprod Fert* 1973, 33, 399-410.
- Neal P, Baker TG: Response of mouse ovaries in vivo and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. II. Effect of different doses of hormones. *J Reprod Fert* 1974a, 37, 399-404.
- Neal P, Baker TG: Responses of mouse ovaries in vivo and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. III. Effect of age. *J Reprod Fert* 1974b, 39, 411-414.
- O'Connor CM, Robinson 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 mamma-

- lian oocyte. *J Exp Zool* 1981, 217, 409-416.
- Pincus G, Enzmann EV : The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935, 62, 665-675.
- Powers RD, Paleos GA : Combined effect of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *J Reprod Fert* 1982, 66, 1-8.
- Racowsky C : Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of hamster oocyte-cumulus complexes. *J Exp Zool* 1985, 234, 87-96.
- Sandberg K, Ji H, Iida T, Catt KJ : Intercellular communication between follicular angiotensin receptors and *Xenopus laevis* oocytes : Mediation and inositol 1, 4, 5-triphosphate-dependent mechanism. *J Cell Biol* 1992, 117, 157-167.
- Sato E, Iritani A, Nishikawa Y : Mechanism of inhibition of germinal vesicle breakdown in pig follicular oocytes with special reference to the role of granulosa cell layer. *Jap J Fert Steril* 1980, 25, 229-233.
- Schuetz AW : Induction of nuclear breakdown and meiosis in *Spisula solidissima* oocytes by calcium ionophore. *J Exp Zool* 1975, 191, 433-440.
- Schultz RM, Montgomery RR, Belanoff JR : Regulation mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev Biol* 1983, 97, 264-273.
- Singh BN, Ellrodt G, Peter CT : Verapamil : A review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 1978, 15, 169-197.
- Tsafriri A, Dekel N, Bar-Ami S : The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fert* 1982, 64, 554-551.
- Tsafriri A, Pomerantz SH, Channing CP : Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid : Partial characterization of the in by porcine follicular fluid : Partial characterization of the inhibitor. *Biol Reprod* 1976, 14, 511-516.
- Tsafriri 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, Masui Y : Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cation and ionophore A23187. *J Exp Zool* 1975, 193, 369-375.
- Weiss GB : Cellular pharmacology of lanthanum. *Ann Rev Pharmacol* 1974, 14, 343-354.
- Yoshida S : Na and Ca spikes produced by ions passing through Ca channels in mouse ovarian oocytes. *Plugers Arch* 1982, 395, 84-86.
- Yoshida S : Action potentials dependent on monovalent cations in developing mouse embryos. *Dev Biol* 1985, 110, 200-206.
- Yoshida S : Effects of the calcium channel blocker diltiazem on the excitability of mouse oocytes. *Gamete Res* 1986, 13, 309-316.