

Electric Stimulation(음이온 pad)이 생쥐난자의 성숙 및 수정난의 난할에 미치는 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과,*한양대학교 자연과학대학 생물학과

배인하 · 박 원 · 최성미 · *김문규

The Effect of Electric Stimulation(anion pad) on the Maturation of Follicular Oocytes and the Cleavage of Fertilized Embryos of the Mouse

In-Ha Bae, Won Park, Sung-Mi Choi and *Moon Kyo Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea

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

=Abstract=

In the present study, mouse follicular oocytes and 2-cell embryos(late -zygote stage embryos included) were cultured on the electric pad for electric stimulation in the culture incubator. In addition, follicular oocytes and embryos were tested for maturation and development under higher temperature condition(39°C). Mouse follicular oocyte maturation were not affected by anion electric stimulation and there is no significant difference in GBVD and MI between the control and experiment group after 4hr culture.

In the embryo culture, it was found that more morula and blastocyst were found in the electric stimulation group rather than the control(96hr). This may seem to be caused with cytoplasmic Ca²⁺ transient rise by electric stimulation(anion pad). On the other hand higher temperature incubation (39°C) on the anion pad caused all the embryos degenerated within 12h~24hr culture. This was quite different from large animal embryos(bovine, pig, sheep), in which beneficial effect of high temperature incubation for oocyte maturation and embryo development were found.

서 론

모든 생물의 생체는 세포로 구성되어 있고 이런 세포와 세포밖의 세포를 싸고 있는 환경에는 여러가지 종류의 금속이온, 수소이온등을 포함한 +(plus)하전을 가진 양이온(cation) 및 Cl-, OH- 및 -하전(minus)을 갖고있는 유기물등의 음하전(anion)으로 구성되어 있어 세포안과 밖의 하전분포가 다르며 또 세포밖은 이에따라 막 전

위(membrane potential)이 생기고 있다. membrane potential뿐만 아니라 세포밖의 세포간 기질(intercellular matrix)에도 이와 같은 여러가지 종류의 -하전 +하전을 갖고 있는 물질들로서 채워져 있어 생체 자체가 도체(conductor) 역할을 하고 있다(Baxter & Byrne, 1991). 그래서 일반 생활에서 물 문은 손으로 전기 code를 잡을때 짜릿하게 전기가 온몸을 통하게 된다. 물론 생체가 갖고 있는 하전의 양이 극히 작을때에는 느끼지 못하다가 전류가 접촉하는 부위의 하전이 그 부

*본 연구는 Solco회사의 일부지원과 교육부 기초과학 연구소 학술 연구조성비(BSRI-94-4437)의 지원으로 이루어졌습니다.

위의 생체가 갖고 있는 하전보다 클때에는 분명히 외부하전이 몸 속으로 흐르는 것이기 때문에 짜릿함을 느끼게 된다.

이러한 전류의 흐름은 비단 직류, 교류 전류에서만이 아니라 정전기에서도 인간은 이런 정전기 자극을 분명히 느끼고 있다. 자연 섬유가 아닌 합성 섬유에서는 옷을 입고 다닐때 마찰이 원인이 되어 -하전을 갖고 있는 음하전을 많이 발생시키고 있기 때문에 이런 정전기가 어떤 이유로 많이 모여있는 부위가 생체와 접촉하면서 정전기의 shock을 받게된다. 즉, 모든 세포는 이와같은 전기의 전류가 통할수 있는 여러가지 종류의 양하전 및 음하전을 갖고 있기 때문에 세포가 자극을 받게 된다. 이런 자극이 작용기작에 따라서 전기의 흐름에 따른 자기장(magnetic field)일수 있고 전자파가 많이 발생하는 computer 및 television 에서의 전자파(electron wave) 일수도 있다. 오늘날은 문명이 발달할수록 일상 생활에서도 전기 및 전자를 이용한 기구들을 많이 사용하고 있어 어떤 전자기구는 몸에 해롭다는 말을 하고 또 전자요 같은 것은 몸에 이롭다는 말을 하고 있으나 실제로 세포 level에서 어떤 영향이 있는지에 대해서는 그렇게 많은 연구가 많이 되어 있지 않다. 그러나 이와같은 전기 및 자기장 및 전자파가 생체세포에 어떤 영향을 미치고 있는가 하는 연구가 근래에 들어 점점 많아지고 있는 것은 사실이다. Glogauer et al(1995)은 섬유모세포(fibroblast)를 이들이 개발한 magnetic-particle-electromagnet model로 자기장(magnetic field)에 노출시켰을때 세포내 Ca^{2+} 을 50-300nM로 증가시키는 Calcium transient rise현상을 발견하였다. 그러나 이들 섬유모세포를 $GdCl_3$ 나 EGTA (Ethylene glycol-bis-(β -aminoethylether) N, N, N' N' -tetraacetic acid)가 포함된 배양액에 넣어 같은 magnetic field에 노출시켰을때는 이와같은 세포내 Ca^{2+} transient rise를 발견할수 없다고 함으로서 섬유모세포(fibroblast)의 세포막(plasma membrane)에서는 Ca^{2+} channel의 존재를 증명하였으며 세포외 Ca^{2+} 의 influx가 일어남으로서 Calcium transient rise가 일어남을 증명하였다. 또 Blackman et al(1991)은 PC-12 cell을 이용하여 neurite outgrowth(NO)를 측정하려고 이를 PC-12cell을 50-Hz magnetic field에서 37°C에서 22시간 노출시켰을때 magnetic field가 50-100mGauss(mG)에서는 NO의 생장이 51-27%감소하였다. 한편 79-

mG가 일정하게 형성되는 magnetic field에서는 0.3cm직경에서는 3.7 μ V가 형성되었고 17.5mm직경에선 22 μ V/m, 36mm직경에서는 46 μ V/m의 전장을 나타내었는데 magnetic field의 세기에 비례하여 NO의 생장이 감소하였다. 즉 이로서 PC-12cell의 신경세포 수상 돌기의 생장(neurite outgrowth)이 자력장의 세기에 따라서 감소한다고 주장하였다. 또 한편 Blackman (1993,1994)은 ion parametric resonance model(1PR)로 역시 PC-12 cell를 45Hz 에서 23시간 노출시켰을때 0.4-68mG rms에서는 NO생장이 감소한다는 주장을 다시 한번 보여 주었다. Luben & Uckun(1994)은 human leukemia cell 에다 Merrit Coil exposure system으로 low energy electromagnetic field(EMF) 60Hz,1.0Gauss rms magnetic field에다 노출시켜 이런 EMF의 노출을 받은 사람은 leukemia를 유발시킨다고 주장하여 EMF노출로 leukemia 유발이 가능하다고 주장하여 사람에게는 극히 해로운 작용을 한다는 주장을 다시한번 보여 주었다.

Harland & Liburdy(1994)는 human breast cancer cell, MCF-7 의 세포를 2m Gauss 및 12m Gauss에 7일간 노출시켰을 때 이 cancer cell의 생장에 하등의 영향을 미치지 않았으나 melatonin 및 tamoxifen 등의 홀몬을 처리했을때는 2 mG에서는 20%의 생장감소가 있었는데 비해 12mG에서는 단지 2%만의 생장감소가 있다고 하여 홀몬과 magnetic field의 세기와 관련성이 있고 magnetic field의 세기가 홀몬작용에 영향을 미친다고 보고 하였다. 한편 하등동물과 고등동물의 난자에서 전기적자극(electric stimulation, DC pulse treatment) kv/cm;duration;0-80 μ S)를 노출시킬때 난자내 Ca^{2+} transient increase를 유발시키며 여러가지 생리적 대사변화를 야기시키는 것으로 알려지고 있다. Baker et al(1980) 및 Rossignol et al (1983) 등은 electric stimulation으로 meiosis(감수분열)뿐만 아니라 피질과립반응(cortical granule exocytosis)를 유도한다고 하였고 Colonna et al (1989)는 이와같은 반응은 고등동물인 포유류(생쥐)의 난자에서도 protein kinase C를 activation시키는 반응을 유도한다고 알려져 있다. 또한 이와같은 전기적 자극은 난자내에서 transient Ca^{2+} increase를 유발시키는 것으로 알려져 있다. 이와같은 전기적 자극으로 인한 난자내에서의 Ca^{2+} increase는 난자가 정자에 의해서 수정될때 일어나는 Ca^{2+} increase와는 좀 다른 성질을 갖고있는 것으로 알려지고 있

다(Sun et al,1992). 이와같이 전기장이나 자기장(magnetic field)에 대한 세포의 노출이 세포에 이롭다고한 주장과 해가된다는 보고등이 많았으나(Harland&Liburdy,1994) 자기장이 아닌 음이온(anion)이 생체세포에 어떤 영향을 주는지에 대한 보고는 없으나 근래에 전자파(electron wave)에 대한 유해논란이 야기되고 있어 세포실험에 대한 결과가 있어야 분명한 유해무해의 결론이 나올수 있다. 본 실험에서는 음이온을 발생시킨다는 solarion pad(Solco)위에서 음이온 발생 눈금의 두번째 눈금 -200V/m에서 고정시켜 음이온이 생쥐난자성숙 및 수정란의 난화에 어떤 영향이 있는지를 실험하였다. 그리고 온도에 따른 영향을 온도증감방향으로 증가시켜 39°C에서 난자의 성숙 및 수정란의 난화과정을 시험하였다. Hoest염색으로 blastomere수등에 대한 연구는 다음 실험에서 하기로 계획한다.

재료 및 방법

1) 미성숙 난자의 수집

Albino계통인 ICR의 암컷으로 생후 21-24일된 생쥐를 사용하였다. 경추골파열로 도살한 후 난소를 떼어 내어 난자 성숙 억제제인 dbcAMP를 포함하는 배양액을 사용하여 해부현미경하에서 지방조직 및 다른 혈액응고 성분을 완전히 제거한 후에 새로운 배양액에 옮겼다. 다시 2회의 세척 과정을 거친 후 해부현미경하에서 성장한 여포를 예리한 바늘로 터뜨려 난자를 여포로부터 분리하였다. 분리된 난자의 난구세포(cumulus cell)는 micropasteur pipette을 이용하여 흡입 배출을 반복하는 물리적인 방법으로 난구세포(cumulus cells)를 제거하였다. 해부현미경하에서 난구세포가 제거된 정상 미성숙 난자(germinal vesicle oocyte)만을 수집하였다. 이렇게 수집된 난자를 dbcAMP의 제거를 위해 dbcAMP가 들어 있지 않은 control medium(Bae,1994)으로 3번 세척한 후 미리 preincubation시킨 배양액에다 넣어 배양시켰다.

2) 초기 2세포기 배아 수집

명기와 암기가 조절되는 (명기:암기=14:10 hr) 사육실에서 사육된 생후 5-10 주된 ICR계 생쥐 암컷과 생후 10주이상된 생식력이 확인된 수컷을 사용하였다.

PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin) 5IU를 암컷의 복강에 주사한 후 47시간만에 hCG(human chorionic gonadotropin) 5IU를 주사한후 바로 수컷과 합사시켰다. 다음날 아침 질전(vaginal plug)이 check된 암컷을 플라 hCG주사후 31-33시간에 경추골파열로 도살하여 양쪽 난관을 적출 하였다. 지방조직 및 응고 혈액을 제거하고 3번의 세척과정을 거쳤다. 나팔관 입구 ampulla부분에 30gauge needle과 1ml 주사기(0.1ml의 배양액이 들어있는)를 넣어 난관을 세척하는 방법으로 초기 2세포기 배아를 수집하였다.(Bae & Yoon,1995)

3) 난자의 배양액 및 배양 방법

배양액은 모든 난자의 성숙을 일정하게 비교하기 위해 난자 성숙 억제제인 dbcAMP 100µg/ml를 포함한 M16배양액을 사용하여 GV가 뚜렷한 미성숙난자(immature oocyte)를 얻은 후 기본 배양액으로 세척하였다. microdroplet(Bigger, 1971)방법으로 배양 접시(plastic dishes, Falcon. No.3002, Becton, Dickinson & Co.)에 50µl의 기본 배양액이 들어 있는 light mineral oil(Sigma,St Louis,Mo.)층 밑에서 배양하였다. 대조군은 37°C가 유지되고 5% CO₂, 95%공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하고 실험군은 같은 조건의 incubator안에서 음전하를 띤 PAD, -200V/m,위에서 배양하였다.

4) Oocyte의 electrostimulation 처리

a)장시간처리: 배양 4시간동안 electrostimulation 처리하였다.

b)단시간처리: 4시간동안 배양중 난자배양 처음 1시간동안 electrostimulation 처리하였고 나머지 3시간은 control 배양상태에서 배양하였다.

5) 생쥐초기 배아의 배양액 및 배양 방법

모든 실험은 New MHBS(Bae & Channing,1985, Bae,1994) 배양액으로 하였으며 모든 배양액의 pH는 7.3으로 맞추고 0.45µm pore size의 millipore membrane으로 여과하였으며 삼투압은 280mOsm(Bae & Foote,1980)근처가 되도록 조정하였다. 수집된 배는 New MHBS 배양액으로 3번 세척한 후 37°C가 유지되고 음전하를 띤 PAD위에서 배양된 배를 실험군으로 하였다. 또한 온도효과를 보기위한 실험은 39°C로 높은 PAD, -200V/m, 위

에서 배양된 배를 실험군으로 하여 37℃로 유지되는 대조군과 구별하고 각각 배양접시에 옮겼다. 배의 배양은 Microdroplet 방법(Biggers,1971)으로 배양 접시 (plastic dishes,Falcon,No.3002, Becton,Dickinson & Co.)에 50μl의 배양액이 들어 있는 mineral oil (Sigma)층 밑에서 하였다. 이때 37℃가 유지되고 5% CO₂와 95%공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

실험에서 사용된 모든 초자기구는 전열 멸균 하거나 고압 멸균하였다.

6) Embryo의 electrostimulation 처리

a)장시간처리: 배양 72시간동안 electrostimulation 처리하였다.

b)단시간처리: 72시간동안 배양중 각 24시간을 단위로 처음 1시간동안을 electrostimulation 처리하였고 나머지 23시간동안은 control 배양상태에서 배양하였다.

7)난자의 고정, 핵염색 및 관찰

미성숙 난자를 4시간 동안 incubator에서 배양후 slide glass위에 올려놓고 cover glass로 눌러 1.5배의 크기가 될 때까지 누른 뒤에 fixation solution

(Acetic acid:alcohol=1:3)에서 5-24시간 고정시킨다. 고정된 난자를 핵염색을 위해 aceto-orcein 으로 30분간 염색하여 핵상을 관찰하였다.

8)배의 관찰

배양후 배의 상태를 24시간 간격으로 24시간 48시간 72시간 후에 위상차 현미경(inverted phase contrast microscope,Leitz)하에서 관찰하였다.

배의 상태는 1-2 세포기, 3-4 세포기, 5-8 세포기, 상실배(morula:Mo), 포배(Blastocyst:Bl), Fragmentation(Frag), 퇴화되는 배(Degeneration:DEG)로 분류하였다.

9)통계 처리

Student t-test로 통계 처리 하여 대조군과 실험군을 비교하였다.

spss/pc 5.0 program을 사용하였다.

결 과

1)미성숙 난자의 성숙율

음전하를 띠고 37℃로 유지되는 solarion pad위

Components of New Modified Hanks Balanced Salt Sol

Compound(M.W)	Amount (g/l)	(g/500ml)	mM	mOsm
NaCl (58.45)	5.7690	2.8845	98.7	197.4
KCl (74.55)	0.4	0.2	5.3655	10.731
MgSO ₄ (120.4)	0.0977	0.0489	0.8118	1.6236
Na ₂ HPO ₄ (142.0)	0.0477	0.0239	0.3358	0.6716
KH ₂ PO ₄ (136.09)	0.0209	0.0105	0.1533	0.3066
NaHCO ₃ (84.01)	2.101	1.0505	25.009	50.018
CaCl ₂ (110.99)	0.1899	0.0949	1.711	5.133
Glucose (180.16)	1.0	0.5	5.551	5.55
Sodium lactate (112.07)	0.2802	0.1401	2.5	5.0
Sodium pyruvate (110.00)	0.033	0.0165	0.3	0.6
Phenol red	0.01	0.005		
Penicillin G. Potassiumsalt	0.064	0.032		
Streptomycin sulfate	0.052	0.026		
BSA	4.0	2.0		

Table 1. Effect of electrostimulation on the maturation of the mouse follicular oocyte* (P>0.05)

	GV	D1	D2	M1	Total
Contro	22(12.2)	44(24.4)	58(32.2)	35(19.4)	180
PAD	23(17.6)	38(29.0)	44(36.6)	26(19.8)	131

* 4hr culture. GV: germinal vesicle, D I : diakinesis I, D II : diakinesis II, MI: metaphase of 1st meiosis.

에 처리한 난자를 실험군으로 하여 대조군과 실험군으로 나누었으며 4시간 배양후의 결과를 비교하였다(Table 1). 배양 4시간후 GV와 GVBD (germinal vesicle, germinal vesicle break-down) 및 M1(metaphase of 1st meiosis) 비교결과 GV와 GV 이후의 난자성숙사이에는 통계적 유의성이 없는 것으로 나타났으며($P>0.05$) 즉 실험군과 대조군의 차이가 없는것으로 나타났다. Phase로 나누어 GVBD이후 phase를 난자성숙의 기준을 삼았다 (Table 1).

2)단시간처리: 처음 배양시작후 1시간 처리에서도 4시간동안 배양한 처리군과 비교하여 차이를 보이지 않았다(Table 2).

3)생쥐 초기배아의 배 발생률 장시간 노출 (Table 3)

Solarion PAD위의 온도를 37℃로 맞추고 음전하를 띠게 한후 배양한 배를 실험군으로 하였다. 몇번의 반복실험을 통해 대조군과 실험군을 비교해 본 결과 실험군은 대조군에 비하여 배발생률이 더 높게 나타나고 있다. 실험군은 상실배와 포배가 각각 19.5%, 9.2%인데 비해 대조군은 13.

7%, 5.7%의 발생률을 보인다(Table 3). 한편 온도 영향을 보기 위해서는 Solarion PAD위 온도를 39℃로 높힌후 실험한 결과 생쥐배아는 48시간 이후 거의 모두 가뭇게 퇴화되었다(Data not shown).

4)단시간 노출:전체배양 72시간중 매24시간마다 1시간씩 electrostimulation 처리: 배양시간 매 24시간마다 1시간씩만 electric stimulation에 처리한 군에서의 배발생 진전은 72시간 배양중 계속

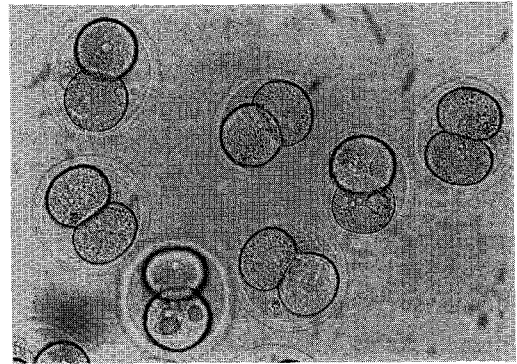


Figure 1. Early 2-cell embryos of ICR strain mouse before culture.

Table 2. Effect of short time electrostimulation on the maturation of the mouse follicular oocytes* ($p>0.5$)

	GV	D1	D2	M1	Total
Control	12(9.9)	39(32.2)	24(19.8)	46(38.0)	121
PAD	11(9.3)	24(20.3)	25(21.2)	57(48.3)	118

* 4hr culture: Initial first hour is exposed to electric stimulation and further 3 hours were treated in the control group. GV: germinal vesicle, D I : diakinesis I, D II : diakinesis II, M I : metaphase of 1st meiosis

Table 3. Effect of electrostimulation on the development of the mouse preimplantational embryo* ($p<0.02$)

	1-2cell	3-4cell	5-8cell	Mo	Bl	Deg	Frag	total
control	51(29.1)	21(12.0)	8(4.6)	24(13.7)	10(5.7)	29(16.6)	32(18.3)	175 (100)
PAD	67(36.2)	12(6.5)	1(0.5)	36(19.5)	17(9.2)	30(16.2)	22(11.9)	185 (100)

72hr culture. MO : morula, Bl : blastocyst, Deg : degeneration, Frag : fragmentat

Table 4. Effect of short time electrostimulation on the development of mouse preimplantational embryo* ($p<0.005$)

	1cell	2cell	3-4cell	5-8cell	Mo	Bl	Frag	Deg	total
control	1(0.9)	36(31.3)	27(23.5)	7(6.1)	3(2.6)	2(1.7)	19(16.5)	20(17.4)	115(100)
PAD	2(1.6)	38(31.1)	33(27.0)	3(2.5)	17(13.9)	3(2.5)	5(4.1)	21(17.2)	122(100)

*Total incubation hours is 72: initial first hour was exposed to elect stimulation every 24hr, and embryos were cultured in the control for the rest 23hr. Mo : morula, Bl : blastocyst, Deg : degeneration, Frag : fragmentat

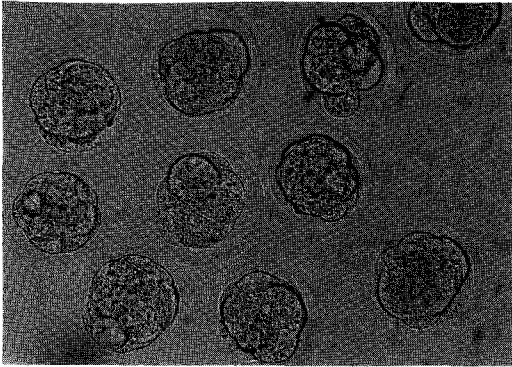


Figure 2. Morula stage of the embryos after 48 hr culture.

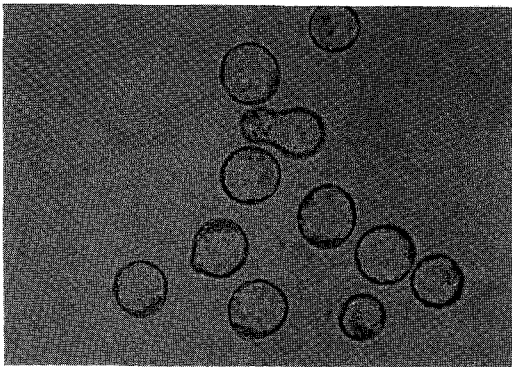


Figure 3. Blastocyst stage of the embryos after 72 hr culture. A few of the embryos are beginning hatching.

하여 electrostimulation 처리군과 매우 비슷한 결과를 보였으나 상실기에서는 현저히 발생이 지연되었으며 fragmentation의 비율이 아주 감소하였다. 즉 상실기(morula)에서는 electrostimulation 처리로 발생지연이 현저하였다(Table 4, ($p < 0.01$?).

고 찰

하등동물이나 고등동물의 세포를 전기장(electric field) 및 자기장(magnetic field)에 노출시킨 결과 세포의 대사과정을 촉진시킨다든가 혹은 오히려 억제시키다든가 혹은 암(cancer) 유발 효과가 있는 등의 주장이 있으나 이와같은 주장이 세포에 따라 또 방법에 따라 서로 상반된 주장들이 많다.(Glogauer et al, 1995; Blackman et al, 1991, 1994; Luben & Uckun, 1994) 또 이들 대부분이 사용한 10mG, 50-60Hz 자기장은 우리 인간이 일상 생활에서 노출되어 있는 정도의 자기장(Weaver

& Astumian, 1994)으로 집이나 혹은 작업장 등에서 일하고 놀고 할때 이런 정도의 자기장에 항상 노출되고 있는 상태이다. 이러한 범위에서 한 여러 연구 결과가 Coulton & Barker(1991)이 지적했듯이 서로 너무나 상반된 주장들을 하고 있어 단적으로 어떤 결론을 내릴수 없다고 이들은 결론짓고 있다.

그러나 이들이 사용한 세포들이 체세포(somatic cell)들이라 세포내에서의 대사과정을 측정하기란 방법상으로 아주 어려웠던 것은 사실이다. Cameron et al (1993)은 chick, sea urchin & mouse embryo를 10-100mG, rotating 60-Hz magnetic field에 노출시켰을때 상실기(morula stage)에서 세포분열을 방해한다고 하였으나 64-cell기 전의 난할에서는 난할(cleavage)이 전혀 지연되는 일 없이 정상적인 속도로 발생하였다 한다. 이들은 결과에서 60Hz자장에서는 ionic surges, DNA replication 및 단백질 합성등의 세포내 대사가 크게 영향을 받지 않는다고 결론짓고 있다. 이와같은 Cameron et al(1993)의 결과는 본 보고서와 우선 자장과 전장에서의 차이란 점에서 또 embryo의 난할과정의 촉진과 억제라는 점에서 서로 상반된 결과를 보여주고 있으나 이들 두 결과는 비교할 수는 없다. (즉 자장과 전장을 같은 unit 하에서 비교하지 못했기 때문에)

Yip et al(1995)은 incubation 후 42시간내의 chick embryo를 1.5T, 64-Hz에서 6시간동안 노출(자장)시켰든바 비정상적인 발생 비율과 치사율이 대조군에 비해 훨씬 높았다고 주장하고 있다.

한편 magnetic field exposure와는 달리 Fitzsimmons et al(1989, 1992)은 10V/Cm, 100Hz보다 낮은 low frequency의 전장(electric field)에 bone cell을 노출시켰을때 노출된 세포의 배양액에서 mitogenic activity를 가진 물질의 release에 따라 세포분열증식과정이 일어난다고 하였고 이들 세포에 IGF-II mRNA의 축적이 일어난다고 주장하였다. 이러한 IGF-II가 전장의 노출에 따라 세포증식의 증가현상을 주도한다고 해석하고 있다. Naegel et al(1991)은 human osteosarcoma-derived cell을 각 1, 10, 100 and 625mV의 전장에(배양액내)노출시켰을때 1-10mV/Cm에서는 세포가 아무런 변화를 나타내지 않았으나 100mV/Cm에서는 adherence가 증가 하였으며 625mV/Cm에서는 세포의 adherence 및 세포 증식과정이 감소하였다고 보고 하였다. 전장의 세기에 따른 영향이 각

기 다름을 보여주었다. Naegele et al(1991)의 연구에서 한계가 분명하지는 않지만 625mV/Cm 전장은 분명히 과도한 exposure range에 속함을 보여주고 있다. 이들은 또한 적절한 Electric field 노출이 골절(bone fracture)의 치유에 유익한 방법이 되고 있음을 시사하고 있다. 한편 전장(electric field)이 세포에 미치는 영향에 대해서는 Azadniv et al(1993)은 이 전장의 영향으로 세포막 전위(EF-induced transmembrane potential, V_{im})에 변화를 야기시키는데서 온다고 주장하였다. 적어도 60Hz EF 이상의 threshold에서도 이런 전위차는 세포의 성장감소 현상을 유도한다고 한다. Livingston et al(1991)은 human lymphocyte와 chinese hamster ovary fibroblast (CHO) cell을 3-3000mA/Cm²의 electric field와 2.2G에서 고정된 magnetic field에 노출시켰을 때에는 human lymphocyte는 72시간 계속 노출시켰고, CHO cell은 24-96hr 처리결과 이들 전장과 자장의 노출에 세포의 성장이나 세포분열등은 하등의 영향을 입지 않았다고 보고 하고 있다. 이와같이 세포의 크기가 극히 작은 체세포(somatic cell)에 전극(electrode)를 꼽고 전위차를 측정한다는 것은 방법상 불가능하다. 이러한 단점을 피하고 비교적 세포가 큰 사이즈인 난자세포, 배세포(oocyte & embryo)를 이용하여 electric shock or electric field에 노출시킨 결과 몇가지 흥미로운 사실들이 발견되고 있다. Baker et al(1980)과 Rossignol et al(1983)등이 sea urchin 난자에다 electric shock 를 주었을 때 난자내 Ca²⁺의 증가로 난자를 activation(배란된 난자가 정자와 수정하기위해 M II, 2nd meiotic metaphase 상태에 머물러 있는 상태에서 anaphase II 및 telophase II 로의 분열을 유도하며 수정하지 않았지만 수정한 난자처럼 세포분열을 유도하는 현상)시킬뿐만 아니라정자와의 수정시에 나타나는 피질과립반응도(cortical granule exocytosis) 일으킨다고 보고한적이 있으며 이와같은 electric shock 0.3Kv/Cm, 60 μ seconds 반응을 포유류의 돼지난자에 처리했을 때 Sun et al(1992)는 (Fura-2 AM로 loading시킨 난자)에서 세포질내 free-Ca²⁺의 증가현상을 관찰하였다. 즉 이러한 electric field에 노출시킴으로써 세포질내 Ca²⁺이 증가한다는 것이다. 그러나 extracellular calcium이 존재하지 않는 medium에서 이런 electric field에 노출시켰을 때는 세포질내 Ca²⁺의 증가를 볼수 없었다고 하므로서 medium 내의 Ca²⁺이 Ca²⁺channel 을 통해서

세포내로의 influx를 일으켜 세포질내 free Ca²⁺이 증가함을 증명하였다. 이와같은 결과는 Azadniv et al(1993)의 실험결과와 일치하고 있다. 전장에 노출시켰을 때 세포막의 막전위 변화로 ion 의 channel이 open되어 Ca²⁺influx를 유도한 결과라고 추정된다. 이와같은 결과는 본실험에서 cytoplasmic Ca²⁺증가에 의한 난황(cleavage blastomere)세포의 분열이 활발해 졌든 결과와 일치하는 결과라고 생각된다. 난자나 수정난이후의 embryo가 아닌 체세포(somatic cell)에서 calcium influx를 본것은 Liburdy(1992)이 처음으로 lymphocyte 를 전기장(electric field, 100-170mV/m)에 노출시켜 calcium influx를 유도하여 세포질내 Ca²⁺transient increase를 유도하였다. 이와같은 Liburdy(1992)의 결과, Azadniv et al(1993)의 결과와 Sun et al(1992)의 결과를 합하여 유추하여 볼 때 porcine oocyte나 lymphocyte를 electric field에 노출시켜 세포질내 transient Ca²⁺increase가 유도된 기작은 electric field에 노출시킬 때 막전위(membrane potential) 변화로 voltage dependent Ca²⁺channel을 open시켜 extracellular Ca²⁺의 influx로 인해서 일어난것으로 추정된다. 이것은 Sun et al (1992)의 실험에서 extracellular Ca²⁺이 존재하지 않으면, 즉 Gd³⁺처리나 EDTA로 Ca²⁺을 chelating 시키고 나면 electric field에 똑같이 세포를 노출시키더라도 transient Ca²⁺rise가 일어나지 않은 것으로 보아 증명되고 있다. 세포내에서 Ca²⁺increase는 많은 대사과정을 일으키는 trigger역할을 하고 있다는 것은 이미 잘 알려져 있으며 분열전의 세포내 Ca²⁺increase 로 세포분열을 유도하게 된다(Whitaker and patel, 1990). 이 현상은 마치 분열이 정지된 채 수정을 기다리는 난자가 정자와 수정이 일어나면 여러가지 대사변화가 유도됨과 동시에 세포분열이 계속 일어나는 현상에 비유할수 있다. 이런 수정과정에서 cytoplasmic Ca²⁺oscillation 현상이 2-3시간 계속되고 있다. 본 실험에서 electric field에서 음이온 발생에 의한 결과는 난자와 정자의 수정이 일어나면 여러가지 대사변화가 유도됨과 동시에 세포분열이 계속 일어나는 현상에 비유할 수 있다. 본 실험에서 electric field에서 음이온 발생 (200V/m)에서 상실기 및 포배기 배의 발생이 더 빨리 및 많이 일어난것은 electric field에서의 노출에 의한 Ca²⁺channel의 opening에 의한 Ca²⁺influx인 것으로 추정된다. 이와같은 현상은 Liburdy(1992)는 elec-

tric field에다 PC-12 cell을 노출시킴으로써 세포 내의 calcium influx의 유도에 의한 것과 같은 현상으로 유추된다. Electric field유발시 AC (alternative current)가 아닌 DC(direct current)에 의해 neuron growth가 야기된다고 주장한 Patel&Poo(1982)의 주장과는 달리 Blackman et al(1993)은 DC,AC electric field가 세포변화를 초래할수도 있겠지만 이들은 오히려 magnetic field에 의해 세포생장유도가 일어난다고 한 Patel &Poo(1982)이나 Borgeus et al (1990)의 견해와는 다른 견해를 나타내고 있다는 점에 대해서는 더욱 연구해보아야 할것으로 보인다.

한편, 39℃ 에서 노출시킬때 (12-24시간) 배가 전부 퇴화하는 것은 Hendrey & Kola(1991)의 주장처럼 39℃노출에서 heat shock protein 70이 합성되지 않았고 더욱이나 39℃에서는 이런 heat shock protein 70이 합성되지 않았다는 점에서 찾을 수 있을 것 같다. 그리고 난자 및 착상전의 초기 배의 경우에는 heat shock protein 70을 합성하지 못한다는 Hahnel et al(1986)의 주장에서 찾을 수 있을 것 같다. 나날이 전자 기구의 발달이 이루어지고 있어 이에 대한 연구가 더욱 요청되고 있으며 전자파에 관한 생물학적 영향도 세포수준에서 더 많은 연구가 있어야겠다.

인용문헌

Azadniv M, Miller MW, Eox C,Valentine F: On the mechanism of a 60-Hz electric field induced growth reduction of mammalian cells in vitro. *Radiat EnvironBiophys* 1993, 32(1),73-83.

Bae I-H, Channing CP: Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolation from medium-size graffian follicles. *Biol Reprod* 1985, 33,79-87.

Bae I-H, Foote RH: Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium osmolality. *J Reprod &Fert* 1980, 59,11-13

Bae I-H, Yoon SY: Effect of Ca²⁺ the in vitro 2-cell block of the mouse. *Mol Biol Cell.* 1993, 4, 250a.

Bae I-H, Yoon SY: The effect of Ca²⁺ inhibitors on the in vitro 2-cell block of the mouse . *Kor J Fert Steril* 1995, 22(1),1-10.

Bae I-H: The effect of Ca²⁺ and Its Specific Time in

the Maturation of mammalian Oocyte. *Kor J Fert Steril* 1994, 21(3),285-296.

Baker PF, Knigat DE, Whitaker MJ: The relation between calcium and cortical granule exocytosis in eggs of sea urchin *Echinus esculentus*. *Proc R Soc Lond B* 1980, 207,149-161.

Baxter DA, Byrne JH: Ionic conductance mechanism contributing to the electrophysiological properties of neurons. *Curr Opin Neuro Biol* 1991, 1,105-112.

Biggers JD: New observation on the nutrition of the mammalian oocyte and preimplantation embryo. In: *Biology of the blastocyst*(Blandau R.J. ed). *Univ Chicago Press Chicago* 1971, 319-327.

Blackman CF, Blanchard JP, Benane SG, House DE: Agreement between IPR model predictions and magnetic field influence on PC -12 cell neurite production. *Mol Biol of the Cell* 1994, 5, 359a.

Blackman CF., Benane SG, House DE: Evidence for direct effect of magnetic fields on neurite outgrowth. *FASEB J* 1993, 7,801-806.

Blackman CF, Benane SG, House DE: A Direct, Inhibitory role for 50-Hz magnetic fields in the NGF-induction of neurite outgrowth in PC-12 cells. *J Cell Biol* 1991, 115(3)part2,268a.

Cameron IL, Hardman WE, Zimmerman SZ, Zimmerman AM: Environmental magnetic fields: subhences on early embryogenesis. *J Cell Biochem* 1993, 51(4),417-425.

Colonna R, Tatone C, Malgaroli G, Mangia F: Effect of protein kinaseC stimulation and free Ca²⁺ rise in mammlian egg activation. *Gamete Res* 1989, 24,71-183.

Coulton LA, Barker AT: The effect of low-frequency pulsed magnetic fields on chick embryonic growth. *Phys Med Biol* 1991, 36(3)369-381, Development 115,947-956.

Fitzsimmons RJ, Strong DD, Mohan S, Baylink DJ: Low-amplitude,low-frequency electric field-stimulated bone cell proliferation may in part be mediated by increased IGF- II release. *J Cell Physiol* 1992, 150,84-89.

Fitzsimmons RJ, Farley JR, Adey WR, Baylink DJ: Frequency dependence of increased cell prol-

- iferation in vitro, in exposures to a low-amplitude, low-frequency electric field: Evidence for dependence on increased mitogen activity released into culture medium. *J Cell Physiol* 1989, 139(3), 586-591.
- Glogauer M, Ferrier J, McCulloch CAG: Magnetic fields applied to collagen-coated ferric oxide beads induce stretch-activated calcium flux in human fibroblast. *Mol Biol Cell* 1995, 6,371a.
- Hahnel AC, Gifford DJ, Heikella JJ, Schultz GA: Expression of the major heat shock protein(hsp 70) family during early embryo development. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 1986, 6, 493-510.
- Harland JD, Liburdy RP: Inhibition of melatonin's and tamoxifen's action in MCF-7 cells by magnetic fields. *Mol Biol of the Cell* 1994, 5,107.
- Henrey J, Kola I: Thermolability of mouse oocytes is due to the lack of expression and/or inducibility of Hsp 70. *Mol Reprod Devel* 1991, 28, 1-8.
- Liburdy RP: Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields:evidence for and electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel. *FEBS Lett* 1992, 301,53-59.
- Livingston GK, Witt KL, Gandhi OP, Chatlerjee I, Roti JL: Reproductive integrity of mammalian cells exposed to power frequency; electromagnetic fields. *Environ Mol Mutagen* 1991, 17(1),49-58.
- Luben RA, Uckun FM: 60Hz 1G Magnetic fields activate protein tyrosine kinase and PKC in human leukemia cells: A possible mechanism linking leukemia development and magnetic field exposure. *Mol Biol of the cell* 1994, 5,61a.
- Naegele RJ, Lipari J, Chakkalakal D, Strales B, McGuire M: electric field stimulation of human osteosarcoma-derived cells: a dose-response study. *Cancer Biochem Biophys* 1991, 12(2),95-101.
- Patel NB, Poo MM: Orientation of neurite growth by extracellular electric fields. *J Neurosci* 1982, 2,483-496.
- Rossignol DP, Decker GL, Lennary WJ, Tsong TY, Teissie J: Induction of calcium-dependent localized cortical granule breakdown in sea-urchin eggs by voltage pulsation. *Biochim Biophys Acta* 1983, 763,346-353.
- Sun FZ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Mool RM: A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electro activation. *Development* 1992, 115: 947-956.
- Whitaker M, Patel R.: Calcium and cell cycle control. *Development* 1990, 108,525-542.
- Yip YP, Capriotti C, Yip JW: Effect of MR exposure on axonal outgrowth in the sympathetic nervous system of the chick. *J Magn Reson Imaging* 1995, 5(4),457-462.
- Weaver J, Astumian RD: The thermal noise limit for threshold effect of electric and magnetic fields in biological system. In "Biologic effect of electric and magnetic fields"(Carpenter DO, Ayrapetyan S, eds) Vol. 1, Chapter 3, Academic press, San Diego, CA U S A.