

투명대를 제거한 생쥐 난자의 체외수정 및 Embryo encapsulation에 의한 배발달에 관한 연구

연세대학교 의과대학 산부인과학교실

박원일 · 조동제 · 장경환
박기현 · 송찬호

포유동물 수정기전의 핵심은 정자의 경우, 수정능획득 (capacitation) 과 침체반응 (acrosome reaction)으로 구분될 수 있다. 하지만 이러한 연구 사례는 생쥐의 경우에 있어서 in vitro 실험에서도 침체반응이 일어나기 때문에 중간에 있어서 차이가 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 생쥐를 이용하여 배란직전의 난자를 채취한 후, 투명대를 제거하여 체외수정을 실시하여 수정유무와 2-세포기 수정란의 embryo encapsulation을 실시하여 정상적인 배발달을 알아보고자 실시하였으며 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 배란직전에 얻어진 난자는 실험목적에 따라 대조군인 1) CC+ZP-intact군과 시험군인 2) ZP-intact, 3) ZP-free군으로 분류하여 체외수정을 실시한 결과 각각 66.7, 62.6, 29.2%의 수정율을 얻었다.

2. 생쥐 체외수정시 다정자 침입율 (poly-sperm)은 각각 5.2, 6.2, 1.9%로 오히려 투명대가 제거된 난자에 있어서 낮은 결과를 나타내었다.

3. 체외수정 실시후 얻어진 수정란을 배양하여 배반포까지의 발달성적은 1)의 경우 116개의 수정란중 약 75.9%인 88개에서 배반포까지의 발달을 보였고, 3)의 경우 63개의 수정란중 약 22.2%인 14개에서 배반포까지의 발달성적을 나타내었다.

4. 한편 정상적인 생쥐 2-세포기 단계의 수정란을 회수하여 sodium alginate(1.1%)를 이용한 embryo encapsulation을 실시한 후 실험목적에 따라 대조군은 1) 대조군 1(2-cell) 2) 대조군 2(2-cell+encap)으로 분류하였고, 시험군의 경우에는 3) 시험군 1(2-cell:ZP free)와 4) 시험군 2(2-cell;ZP free+encap)으로 분류한 후 배반포까지의 배발달 성적은 1),

2), 3), 4)에서 각각 734, 68.2, 46.6, 22.5%의 결과를 얻을 수 있었다.

이상의 결과에서 볼때 생쥐 난자 체외수정의 경우에 있어서 투명대가 없는 상태하에서도 수정이 이루어짐을 알 수 있었으며, 아울러 뿔정자증 (oligospermia), 정자무력증 (asthenospermia), 정자항체증 (antisperm antibody), 난자 투명대의 형태학적 이상, 등의 불임 환자에 있어서 적용 가능성을 검토하고자 하였고, sodium alginate를 이용한 embryo encapsulation의 심사는 다소 낮은 성적이지는 하지만 배반포까지의 발달성적을 나타내었다. 그러나 미세세포 조작술 (micro-manipulation)의 다양한 방법의 시도 및 성공사례에서 견주어 볼때, 수정기전에 관한 기초학적인 연구로의 접근이 타당할 것으로 사료된다.

원시생식세포의 colony 형성에 미치는 성장인자의 효과

고려대학교 자연자원대학 응용동물학과

이 황 · 김석옥 · 이상호

원시생식세포 (primordial germ cell, PGC)는 성성숙 이후에 기능을 갖는 생식세포의 근원이 되는 세포로서, 다능성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 chimera 및 유전자 변환동물 생산을 위해 널리 사용되어 온 배아주 (embryonic stem, ES) 세포를 대신할 다른 세포계라고 생각되어져 많은 연구가 진행되어지고 있다. 본 실험은 체외배양을 통하여 원시생식세포의 증식과 확립을 위해 배양조건을 구명하고, 또한 성장인자의 효과를 검증하기 위하여 실시되었다. 원시생식세포는 12.5일째의 ICR 생쥐 태아의 원시생식선용기조직으로부터 추출하였으며, DMEM+20% FCS+nucleosides+antibiotics로 조성된 sDMEM 배양액을 사용하여 mitomycin C로 전처리한 되먹임세포층 (feeder layer) 위에서 체외배양하였다. bFGF 및 LIF를 20, 40ng/ml 농도로 각각 또는 함께 첨가하여 성장인자의 효과를 검토하였다. 원시생식세포는 성에 따라 유의적인 colony 형성율을 보였고 (♂:1.13 colonies/genital ridges; ♀:1.9 colonies/genital ridges), bFGF 및 LIF의 첨가 및 첨가농도에 따라서

도 유의성 있는 결과를 보였다(0.25-1.5 colonies/genital ridges). 그러나 3회 이상 계대배양을 할 경우, 원시생식세포의 colony 형성은 급격히 감소되었다. 원시생식세포 colony의 세포화학적 염색을 위해, alkaline phosphatase(AP) 염색법을 이용하였으며, 이를 위해 colony를 4% paraformaldehyde로 20분간 고정 한 후, tris-maleate buffer(pH 9.0)로 10분간 3회 세정하였다. Fast Red로 염색을 실시한 결과, 대부분의 colony가 염색반응을 보여 다능성을 갖는 원시생식세포의 colony임이 입증되었다. 그러나 대부분의 colony가 3회 이상의 계대배양시 생존율이 급격히 떨어지는 것을 감안하면, 또다른 미지의 성장인자나 보다 적절한 배양조건이 요구된다고 생각된다.

-18-

소 초기배 발생 중 배양액내 energy source의 조절 효과

고려대학교 자연자원대학 응용동물과학과

이홍준 · 김승범 · 김선욱

최승철 · 이상호

본 연구는 체외수정을 실시한 소 초기배의 체외배양시 사용되는 배양액 내의 에너지물질 첨가에 따른 발생효과를 연구하기 위하여 실시되었다. 도살장에서 채취한 난소로부터 직경이 4-7mm 정도의 난포에서만 난포란을 회수하여, TCM199+20% FCS+10IU/ml hCG+10IU/ml PMS 배양액으로 24-26시간 체외배양 한 후, 동결정액을 용해하여 45 및 90%의 two-step percoll gradient법을 이용하여 운동성이 활발한 정자만을 회수하여 준비된 성숙난자와 체외수정을 실시하였다. 수정된 난자를 CZB+15% FCS 배양액 하에서 소 과립막세포(GCM), 소 난관상피세포(BOEC) 및 마우스 태아성 섬유아세포(EMFC)와 공배양하였다. 여러 농도로 조정된 pyruvate, glutamine를 CZB 배양액에 에너지원으로 첨가하여 초기배 발생율의 향상을 유도하고자 하였다. Pyruvate와 glutamine의 농도는 본 실험실의 CZB 배양액 조성표에 의해 계산 첨가되었다. 체외발생율은 체외수정후 48시간째의 난할율과 148시간째의 배 발달율을 확인하여 계산

되었다. 총 646개의 난포란을 사용한 결과, 수정 후 48시간째 난할율은 BOEC, GCM, MEFC에서 각각 41.5, 48.1, 40%를 보였으며, 148시간째 상실기 및 배반포기는 각각 16.3, 0.0, 15.0%가 관찰되었다. 수정후 48시간째 관찰한 난할율의 경우, Na-pyruvate를 0.2, 0.50, 1.00mM 첨가한 구에서 각각 33.3, 57.7, 54.2%를 보였으며, D-glucose를 5.55, 11.1 mM 첨가한 경우, 첨가하지 않은 대조구의 23.1%의 난할율에 비해 높은 33.4 및 40.0%를 각각 보였다. 즉, 전체적인 난할율은 D-glucose 첨가구에 비해 Na-pyruvate 첨가구에서 더 높았지만, 같은 시기의 4-세포기까지의 난할율만을 비교할 경우, D-glucose 첨가구가 1.5배 정도 더 높은 결과를 보였다.

-19-

Estrogen Increases the Expression of bFGF mRNA in Cultured Human Endometrial Stromal Cells

Young-Min Choi, Seok-Hyun Kim, Chang-Jae Shin, Jung-Gu Kim, Shin-Yong Moon, Jin-Yong Lee, Yoon-Seok Chang and John Yeh*

Department of Obstetrics and Gynecology, Seoul National University School of Medicine, Seoul, Korea, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, U.S.A.*

It is well known that estrogen regulates the growth and proliferation of the endometrium. However, the specific mechanisms of estrogen action are not well defined.

Recently it has been suggested that estrogen exerts its effects via increase in some growth factors and/or growth factor receptor in estrogen responsive organs. The purpose of this study was to evaluate the influence of estrogen on the expression of bFGF mRNA in cultured human endometrial stromal cells.