

Matrinals and Results: In obesity group we administrated 0.3 ml of Yi-Jin Tang (二陳湯) high density protein, high density lipid & breeding in high density. Between them, Control group is below 22 g in body weight and sample group is over 27 g in body weight. In normal group we administrated 0.3 ml of water, general feeding & breeding in low density. Between them, Control group was below 22 g in body weight and sample group was over 23 g in body weight.

Results:

1. Compared with the control group, the body weight was significantly decreased totally in the sample group of obesity and normal group.
2. Compared with control group, mean number of oocytes per mice ovulated & mean number of normal oocytes per mice ovulated were significantly increased totally in the sample group of obesity and normal group.
3. Compared with control group, the rate of in vitro embryonic development of oocytes was significantly increased totally in the sample group of obesity and normal group.

Key Words: Yi-Jin Tang, Obesity, Body weight, Ovarian reaction

P-28 인간배아줄기세포의 확립과 그 특성 분석

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소¹, 의과대학 산부인과학교실²

김희선¹ · 이기주² · 안희진¹ · 오선경¹ · 서창석² · 김석현² · 최영민² · 문신용^{1,2}

목 적: 줄기세포 (stem cell)는 미분화된 상태로 무한히 증식하면서 환경에 따라 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 특히 배아줄기세포 (embryonic stem cell)는 원시적인 미분화 상태의 특성을 지닌 세포로써 성체의 모든 세포로 분화할 수 있는 배아세포의 특성, 즉 전발생능 (pluripotency)을 유지하고 있다고 보고되고 있다. 이에 인간배아줄기세포를 확립하고 확립된 배아줄기세포의 미분화 특성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 본 연구에 사용된 배아는 서울대학병원 산부인과에서 시험관 아기 시술 시 냉동보존시킨 수정란 (2PN stage)을 환자의 동의를 얻어 사용하였다. 용해시킨 수정란을 포배기까지 배양하였고, 포배기에 이른 배아는 pronase (5 µg/ml)를 처리하여 투명대를 제거하였다. 투명대가 제거된 포배를 미리 준비된 STO feeder layer위에 직접 얹어 배양하거나 (whole embryo culture) 또는 anti-human polyvalent immunoglobulins와 guinea pig complement를 이용한 immunosurgery를 시행하여 영양세포층을 제외한 순수한 내세포괴 (inner cell mass)를 획득하여 준비된 STO feeder layer위에서 배양하였다. 배양 7일째에 크게 자란 덩어리만을 골라 새로 준비된 feeder layer위로 옮겼다. 배양 2일째에 옮겨준 세포들의 부착을 확인하고 배양액을 다음 계대배양 때까지 매일 전체양의 1/2만 새 배양액으로 교체하였다. 배양 5~7일째에 크기가 커진 colony를 200개의 배아줄기세포들로 이루어진 덩어리로 절개하여 다음 계대 배양을 하였다. 확립된 배아줄기세포들의 미분화 특성을 알아보기 위해 alkaline phosphatase 활성도, SSEA-1, 3 & 4의 발현여부, Oct-4 mRNA 발현, telomerase의 활성도 그리고 핵형분석을 시행하였다.

결 과: Immunosurgery 방법을 통해 SNUhES1과 2를 확립하였고 whole embryo를 배양하여 SNUhES3를 확립하였다. 세 개의 배아줄기세포주 모두 세포질에 비해 핵이 커서 세포의 대부분을 차지하며 두

릿한 세포경계를 지닌 편평한 colony의 형태로 성장하였다. SNUhES1과 3은 정상적인 46,XY의 핵형을 보였으며 SNUhES2는 정상적인 46,XX의 핵형을 보였다. 배아줄기세포의 미분화 특성 확인 결과 alkaline phosphatase 및 SSEA-4가 강하게 발현되었고 SSEA-3는 부분적인 발현을 하였다. 세 개의 세포주 모두 Oct-4와 telomerase가 발현되었다.

결 론: 이상의 결과로 세 개의 인간배아줄기세포주를 확립하였다. 앞으로는 확립된 세포주를 이용하여 자발적인 분화와 함께 인위적으로 유도된 분화에 관련된 여러 현상들을 연구하고자 한다.

P-29 배양액의 조성차이에 따른 인간 배아 줄기세포의 계대 배양에 관한 비교 연구

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소¹, 의과대학 산부인과학교실²

안희진¹ · 김희선¹ · 김윤영¹ · 설혜원¹ · 오선경^{1,2} · 서창석²
김석현² · 최영민² · 문신용^{1,2}

목 적: 최근 인간 배아 줄기세포를 이용한 실험이 급속히 증가하면서 계대 배양에 사용되는 배양액의 종류와 첨가되는 물질의 조성이 다양해지고 있다. 이에 조성이 다른 배양액을 이용하여 보다 효과적인 인간 배아 줄기세포의 계대 배양 방법을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법: 본 연구실에서 확립된 SNUhES2에 각기 다른 조성을 가진 배양액을 첨가하여 3계대에 걸쳐 배양에 미치는 영향을 살펴보았다. 기본 배양액으로 Knockout-DMEM과 DMEM-F12를 사용하였으며, 기본 배양액에 fetal bovine serum (FBS, Hyclone)과 serum replacement (SR, Gibco)을 따로 첨가하여 4가지 종류 (KO-DMEM/FBS, KO-DMEM/SR, DMEM-F12/FBS & DMEM-F12/SR)의 배양액을 준비하였다. SR이 첨가된 배양액에는 bFGF를 첨가하였다. 각각의 배양액을 이용하여 SNUhES2를 3계대까지 배양하였다. 각 실험군의 배아 줄기세포군의 부착률과 분화률, 형태와 면적을 관찰하였으며, alkaline phosphatase 활성도와 SSEA-1, 3 & 4의 발현여부, 그리고 Oct-4 mRNA의 발현여부를 확인하여 배아 줄기세포의 미분화 특성을 확인하였다.

결 과: 배아 줄기세포군의 부착률은 KO-DMEM/SR과 DMEM-F12/SR 실험군에 비해 각 배양액에 FBS를 첨가한 두 군에서 현저하게 낮게 나타났다 (92.2% and 86.4% Vs 15% and 6.7%). KO-DMEM/FBS와 DMEM-F12/FBS의 실험군의 경우 조기 분화에 의해 3계대 이상의 계대 배양 유지가 불가능하였다. KO-DMEM/SR과 DMEM-F12/SR 실험군 간의 배양 양상을 비교해 보면 두 실험군 간의 부착률과 세포 분열에 따른 세포군 면적에서는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 그러나 현미경상에서 DMEM-F12/SR 실험군의 세포간 간격이 KO-DMEM/SR 실험군보다 조밀하게 관찰되었다. 그러나 계대 배양 7일 후의 배아 줄기세포군의 부분적인 분화률에선 DMEM-F12/SR 실험군이 KO-DMEM/SR 실험군보다 높게 나타났다 (30.7% Vs 7.1%). 두 실험군의 배아 줄기세포의 미분화 특성 확인 결과 alkaline phosphatase 및 SSEA-4가 강하게 발현되었으며, SSEA-3는 부분적으로 발현되고 SSEA-1은 발현되지 않았다. 또한 두 실험군에서 모두 Oct-4 mRNA가 강하게 발현됨으로써 배아 줄기세포가 미분화 특성을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다.

결 론: 본 실험 결과, SNUhES2을 이용한 실험에서 배양액내 serum replacement 성분이 fetal bovine serum보다 인간 배아 줄기세포의 계대 배양에 보다 효과적이었으며, Knockout-DMEM과 DMEM-F12