

## O-1 Annealing Control Primer (ACP) System을 이용한 미성숙 난자와 성숙 난자의 유전자 발현 차이에 관한 연구

차병원 여성의학연구소<sup>1</sup>, 포천중문외과대학교 생명과학전문대학원<sup>2</sup>,  
충북대학교 농과대학 축산학과<sup>3</sup>

윤세진 · 김영훈<sup>2</sup> · 윤내영<sup>1</sup> · 권 황<sup>1</sup> · 고정재<sup>1,2</sup> · 김남형<sup>3</sup> · 이경아<sup>1,2</sup>

**Background & Objectives:** 본 연구는 Germinal Vesicle 단계의 미성숙 난자 (GV)와 배란된 Metaphase II 단계의 성숙 난자 (MII)로 부터 유전자 발현의 차이를 동정함으로써 난자 성숙에 관여하는 유전인자를 밝히고자 실시하였다.

**Method:** 실험에 사용된 GV는 4주령된 ICR 암컷 생쥐에 PMSG를 주사한 후 48시간 뒤에 배란 직전의 난포에서 회수하였으며 MII는 PMSG와 hCG를 48시간 간격으로 5 IU씩 주사하고, hCG 주사 후 16시간째에 회수하였다. Dynabeads mRNA DIRECT kit (Dynal, Oslo, Norway)를 이용하여 GV와 MII 난자에서 mRNA를 정제한 후 ACP (Annealing Control Primer; Seegene, Inc., Seoul, Korea) System을 이용하여 cDNA를 합성하고 PCR하여 두 그룹간의 유전자 발현차이를 2% agarose gel 상에서 분석하였다. 양적으로 서로 다르게 발현하거나 한쪽에서만 특이적으로 발현하는 유전자를 TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 cloning하고, BLAST database로 확인하였다. 이들 유전자 발현의 차이는 Semi-quantitative RT-PCR을 통해 18s rRNA에 대한 상대적인 값을 구하여 비교 분석하였다.

**Results:** ACP primer 1번부터 12번까지를 사용하여 GV와 MII에서 서로 다르게 발현하는 26개의 유전자를 찾았는데 이중에 pleckstrin는 GV-specific였으며, protein kinase D2, COP9 complex, myomesin2 등은 GV에서 더 높게, MCM2, Mor2, Gas-6, Diva 등은 MII에서 더 높게 발현하였다. Diva를 제외한 대부분의 유전자는 본 연구를 통해 난자에서 발현한다는 사실을 처음 밝혔으며, 특히 MCM2, Gas-6, Diva의 경우는 난소 조직에서의 Immunohistochemistry를 통해 이들의 단백질 또한 난자에서 발현하는 것을 확인하였다.

**Conclusions:** COP9 signalosome은 signaling pathway와 ubiquitin-dependent protein degradation에 관여하며, PKD와 상호작용하는 유전자로 알려져 있는데 본 실험의 결과 두 가지 유전자를 모두 확인함으로써, PKD-COP9 System이 난자에서 작용하고 있다는 것을 알 수 있었다. 본 연구의 결과, 난자 성숙 과정에서 서로 다르게 발현하는 유전인자를 밝혀냈으며 이들 유전인자의 기능을 연구함으로써 난자 성숙에 관여하는 조절기전을 연구하는데 기여할 것이다.

## O-2 체내와 체외에서 수정된 생쥐의 배반포에서 Apoptosis와 IGF-II 발현에 관한 연구

마리아병원<sup>1</sup>, 고려대학교<sup>2</sup>

윤 정 · 윤혜진<sup>1</sup> · 윤산현<sup>1</sup> · 고 용<sup>2</sup> · 임진호<sup>1</sup> · 이원돈<sup>1</sup>

**Background & Objectives:** 체외에서 수정된 수정란은 apoptosis가 높게 나타나고, 체내에서 수정된

수정란에 비하여 발달 속도가 느리다고 보고되고 있으며, 이러한 양상은 IVF 접합자에 의해 생산되는 여러 성장인자의 발현이 낮음에 기인한다는 가능성이 제시되고 있다. 최근, 수정란의 발달에 영향을 미치는 IGF-I, -II, EGF와 같은 성장인자를 배양액에 첨가하여 apoptosis 발현양상이 조절되었다는 보고가 제시되고 있으나, 수정환경에 따른 apoptosis와 성장인자 사이의 상관관계에 대한 연구는 미흡하다. 따라서, 본 연구는 체외와 체내에서 수정된 수정란의 발달율과 apoptosis의 생리학적 연관성을 살펴보고, apoptosis 억제인자로 알려진 IGF-II 유전자의 발현이 apoptosis에 미치는 영향을 조사하고자 실시되었다.

**Method:** 5주령의 B6CBA F1 생쥐에 PMSG 7.5 IU를 주사하고, 48시간 후에 hCG 7.5 IU를 주사하여 과배란을 유도하였다. 체내수정을 유도하기 위하여 동종의 생쥐와 교배하여 2-세포기의 수정란을 회수하였으며, 체외수정을 유도하기 위하여 hCG 주사 후 14시간 후에 IVF를 실시하여 2-세포기의 수정란을 회수하였다. 회수된 두 그룹의 2-세포기 수정란은 0.4% BSA가 첨가된 MTF에서 배반포까지 배양하여, 배반포 발달율과 부화율을 조사하였다. 두 그룹간 세포수의 차이는 배반포를 PI로 염색하여 비교하였으며, TUNEL 방법을 사용하여 형광현미경하에서 apoptosis 정도를 확인하였고, RT-PCR 방법을 사용하여 IGF-II의 발현을 조사하였다.

**Results:** 두 그룹간에 배반포 발달율을 비교한 결과, 체내수정 그룹에서는 98% (482/492), 체외수정 그룹에서는 92% (355/384)의 발달율을 나타내어 두 그룹간에 차이가 없었다. 그러나 부화율은 체내수정 그룹에서 64% (318/492)를 나타내어, 47% (180/384)의 부화율을 나타낸 체외수정 그룹에 비하여 높은 경향을 보였다. 배반포의 세포수에 있어서도 체내수정 그룹 ( $72.1 \pm 5.5$ )이 체외수정 그룹 ( $66.6 \pm 5.1$ )에 비하여 높은 것으로 조사되었다. 또한 배반포의 총 세포수 대비 apoptosis를 나타낸 세포수를 비교한 결과, 체내수정 그룹의 경우 3.6%가 apoptosis를 나타낸 반면 체외수정 그룹에서는 6.9%가 apoptosis를 나타내었다. 배반포 시기에서 apoptosis 억제역할을 가진 IGF-II 유전자는 체내수정 그룹에서 높은 발현 양상을 보였다.

**Conclusions:** 체내수정은 체외수정에 비하여 부화율과 IGF-II 유전자의 발현양상이 증가된 반면, apoptosis 발현은 적게 나타났으며, 이러한 결과는 체내에서 수정되었을 경우 생성되는 IGF-II의 발현이 apoptosis의 억제에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이 연구는 수정환경의 차이에 의하여 여러가지 생리학적 차이가 존재할 수 있다는 가능성을 제시하고 있으며, 향후 수정란의 apoptosis에 영향을 미치는 다른 성장인자의 발현에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 0-3 Effects of GnRH Agonist and GnRH Antagonist on the Steroidogenesis and Apoptosis of Cultured Rat Granulosa Cells

BJ Jung, MS Kim, JS Kim, HJ Song

*Seoul Wome's Hospital*

**Background & Objectives:** The purpose of this study was to evaluate the effects of GnRH agonist and GnRH antagonist on the Steroidogenesis and Apoptosis of Cultured Rat Granulosa Cells.

**Method:** Granulosa cells were collected from immature rats, and cultured for 24 hours with GnRH