

progenitor enrichment culture, N-CAM was expressed in most cells. bFGF, strong mitogen for neuroepithelial precursor cells, used for proliferation of neural precursor cells derived from human and mouse embryonic stem cells. LIF is known to that inhibits the formation of cardiac mesoderm and promote the neuronal differentiation at early stages of CNS development or differentiation of mouse ES cells. Our result suggests that bFGF and LIF effectively promoted the neural progenitor differentiation in human ES cells also. RA affected to differentiation of another cell types as well as neuronal cells and β -NGF more effectively induced the neuronal differentiation.

Conclusions: In this study, neural progenitors and further differentiated neuronal cells could be induced from human ES cells and every differentiation stage could be controlled by differentiation times and some inducing factors. It was expected that neural progenitor and differentiated cell populations are used for source of transplantation without teratoma formation but it was remained to problem that gained homogeneous cell population. Now, we try to sort the differentiated cells each and apply them to animal model. This research was supported by a grant (SC 11011) from Stem Cell Research Center of the 21st. Century Frontier Research Program funded by the Ministry of Science & Technology, Republic of Korea.

O-6 생쥐 정원줄기세포의 체외배양기간 동안 LIF/bFGF와 FSH에 의한 분화와 증식의 조절

포천 중문의과대학교 차병원 여성의학연구소¹, 해부학교실²,
세포유전자 치료연구소³, 한양대학교 생명과학과⁴

임정진¹ · 이동률¹ · 정태규¹ · 김현주¹ · 윤태기¹ · 윤 호³
고정재¹ · 김문규⁴ · 김계성²

Background & Objectives: 최근 생식세포의 re-encapsulation이라는 3차원적 체외배양 방법에 의하여 남성불임의 생체 내 기작에 대한 기초과학적 연구가 급속히 촉진되었다. 본 연구소에서는 그 동안 소의 정소내 세포들의 분리한 후 다시 재결합하여 hydrogel의 일종인 calcium alginate를 이용, 새로운 capsule형태로 하여 장기간 배양을 진행하였으며, 그 결과 반수체인 정세포에서 특이적으로 나타나는 유전자의 발현을 관찰할 수 있었다 (Biol Reprod 65: 873-8, 2001). 그러나 지금까지의 배양방법으로는 정원줄기세포로 재증식하지 않는다고 생각되며, 극소수의 정세포만을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 생식세포의 증식과 분화에 관여한다고 알려진 LIF/bFGF와 FSH를 3차원적 체외배양법 적용하였을 경우 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 하였으며, 이를 통한 정자형성과정의 새로운 체외 배양법을 확립하고자 하였다.

Method: 실험재료는 3~5일령의 ICR 수컷 생쥐를 사용하였으며 생쥐정원세포의 세포분리 및 재 결합을 하여 calcium alginate을 이용하여 capsule형태로 만들어 체외배양 하였으며 LIF/bFGF와 FSH를 처리하여 2주간 배양 후 역전사중합효소반응과 면역조직화학을 이용하여 발현정도와 발현부위를 관찰하였다.

Results: LIF/bFGF를 처리하여 체외배양한 그룹에서 정원세포의 지표유전자와 항체인 Oct-4 mRNA와 Integrin beta1가 유의하게 높게 발현되었으며, 이와는 반대로 FSH처리군에서는 농도의존적으로 감

소하는 것을 볼 수 있었다. 한편 1, 2차 정모세포의 지표유전자인와 항체인 c-kit, TH2B mRNA, anti-c-kit 항체는 LIF/bFGF처리군에서 낮게 나타났으며, FSH처리군에서는 농도의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 정세포의 지표유전자인와 항체인 TP-1 mRNA와 TRITC-PNA 항체는 LIF/bFGF, FSH 처리군 모두에서 발현되지 않았으나, LIF/bFGF 처리 후 FSH를 처리해줄 경우 TP-1이 발현됨을 볼 수 있었으며 2주보다는 4주에서 더욱 증가하는 것을 볼 수 있었다.

Conclusions: 위의 결과를 종합하면, 체외배양시 LIF/bFGF는 정원줄기세포의 분화쪽보다는 증식쪽에 관여한다고 생각되어진다. 이와는 반대로 FSH는 정원줄기세포를 반수체의 정세포로 분화를 유도하는데 관여한다고 여겨진다. 따라서 체외에서 정자형성과정 중 분화와 증식을 조절하기 위하여 위의 인자들을 단계적으로 사용한 배양방법이 효과적일 것이라 사료된다.

위 연구는 21세기 프론티어 연구개발사업단인 세포융용연구사업단의 연구비 지원 (과제번호 SC12011) 및 과학재단 특정기초 (RO1-2001-000-00144-0)에 의해 수행 되었습니다.

0-7 Different Spindle Locations in in vivo and in vitro Matured Mouse Oocytes

JH Moon, BC Jee, SE Hur, YB Kim, KH Park, CS Suh

Department of Obstetrics and Gynecology, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul, Korea

Background & Objectives: To better understand the difference of cytoskeletal structure between in vivo and in vitro matured mouse metaphase II (MII) oocytes, the spindle locations were examined with Polscope (CRI, Cambridge, MA), and their developmental competency were followed.

Method: B6CBAF1 female mice at 5 weeks of age were superovulated by injection of 5 IU pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG). For in vivo maturation, 5 IU of human chorionic gonadotropin (HCG) was injected 46~48 h later, then cumulus-enclosed oocytes were collected from oviduct 17 h later. For in vitro maturation, immature oocytes were collected from oviduct after 46~48 h of PMSG injection. They were incubated for 17 h within YS medium with 30% hFF, 1 IU/ml FSH, 10 IU/ml HCG + 10 ng/ml rhEGF. After denudation of cumulus cells, the spindles of MII oocytes were examined under the Polscope without any staining. MII oocytes in each group were fertilized with epididymal sperms obtained from male mice at 8 weeks of age after 1 h capacitation in Ham's F-10 with 10% hFF. They were co-cultured with human cumulus cell drop in YS medium with 10% hFF till blastocyst stage.

Results: In in vivo matured group, most of oocytes (89.1%) had the spindle position beneath the first polar body. Only 6%, 3% of oocytes had the spindle positioned at 0~90 degree and > 90 degree angled from the polar body, respectively. Birefringent spindle was not observed in 2%. In in vitro matured group, most of oocytes (85.0%) had the spindle location from 0~90 degree angled from the polar body. Fertilization and blastocyst rate in in vivo matured group were 80%, 83.8%, respectively, and these were significantly higher than those in in vitro matured group (64.9%, 66%, respectively). We also observed that