

소하는 것을 볼 수 있었다. 한편 1, 2차 정모세포의 지표유전자인 *c-kit*, *TH2B* mRNA, *anti-c-kit* 항체는 LIF/bFGF 처리군에서 낮게 나타났으며, FSH 처리군에서는 농도의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 정세포의 지표유전자인 *TP-1* mRNA와 TRITC-PNA 항체는 LIF/bFGF, FSH 처리군 모두에서 발현되지 않았으나, LIF/bFGF 처리 후 FSH를 처리해줄 경우 *TP-1*이 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.

O-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

most of in vivo matured oocytes (63.8%) changed their spindle locations from beneath the first polar body to at 0~90 degree after further incubation for 24 h.

Conclusions: Different spindle locations may reflect the chronological change of the oocytes. In vitro matured mouse MII oocytes have their spindle locations one-day faster compared with in vivo matured oocytes. This finding suggests that lower developmental competency in in vitro matured oocytes may be related with their more accelerated changes in cytoskeletal structure.

O-8 인간성숙 난자의 유리화 동결 후, 세포골격계와 관련된 MAP Kinase 인산화

포천중문의대 차병원 유전학연구소¹, 여성의학연구소 불임의학연구소²,
보건복지부 지정 생식의학 및 불임 유전체 연구센터³,
세포유전자치료연구소⁴, 기초의학연구소⁵

정혜진 · 이숙환^{1,2,3} · 박성은^{3,5} · 박상희^{1,3} · 진미옥¹
정형민^{4,5} · 고정재² · 윤내영^{1,2} · 윤태기²

Background & Objectives: 유리화 동결법은 동결 중 ice crystal의 형성이 이루어지지 않으므로 난자의 세포질의 손상을 줄일 수 있는 장점이 있다고 많은 포유동물의 실험 결과에서 보고되었다. 그러나 여러 연구자들은 성숙난자의 유리화 동결 보존시 염색체와 방추사의 이상성이 증가됨을 보고하였다. 이전의 우리의 연구에서도 유리화 동결 용해시킨 난자가 대조군의 난자보다 방추사와 염색체의 이상성이 증가되었다. 이 결과는 유리화 동결이 난자 세포계의 중요한 손상을 일으키는 요인으로 동결 동안 세포골격계를 안정화시키는 것이 동결 용해 후의 난자의 생존률과 발달률을 증진시키는 것으로 관찰되었다. 최근의 연구에서 MAP kinase가 염색체와 미세소관을 조절하는 중요한 기능을 가지고 있는 것이 보고되었다. 따라서 세포골격계의 변화가 동결 용해된 인간난자의 MAP kinase와 관련되어 있는지 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

Method: IVF 환자로부터 수정에 실패한 난자를 회수하여 난자를 두군으로 분류하였다. 1군: 대조군, 2군: 유리화 동결시킨 난자들, 이들중 대조군 (n=10)과 2군에서 생존한 난자들 (n=10)을 MAP kinase 인산화 분석에 이용하였다. MAP kinase 인산화는 western blotting 방법을 사용하여 분석하였다. 동결군의 난자들은 유리화 동결법을 사용하였으며 난자들은 D-PBS에 1.5 M ethylene glycol이 첨가된 항동해제에 2분 30초간 노출시켰으며 그 후 5.5 M ethylene glycol에 1.0 M sucrose가 첨가된 항동해제에 20초간 노출시킨 후 grid에 난자를 부착시켰다. 핀셋을 사용하여 난자가 부착된 grid를 직접 액체질소에 침지시킨 후 분석을 위해 5단계의 sucrose 용액에서 각 단계마다 2분 30초 간격으로 서서히 용해시켰다. 대조군의 난자와 생존한 2군의 난자를 인산화된 MAP kinase 항체를 이용하여 western blotting에 이용하였다.

Results: 두 군의 성숙한 인간 난자들은 인산화된 형태를 나타내었고, 반면에 동결 용해된 난자들은 MAP kinase 인산화된 정도가 대조군에 비해 감소하였다.

Conclusions: 성숙한 인간 난자의 유리화 동결은 방추사의 형태를 변화시키고 MAP kinase의 인산화 정도의 변화를 유도하였다.