

포유동물의 배아 및 기간세포의 분화와 세포사멸 기작:

I. 생쥐 배아줄기세포의 확립과 분화유도에 미치는 생식호르몬의 영향

성지혜 · 윤현수¹ · 이종수 · 김철근 · 김문규 · 윤용달[†]

한양대학교 자연과학대학 생명과학과, ¹미즈메디병원 여성의학연구소

Differentiation and Apoptosis of the Mammalian Embryo and Embryonic Stem Cells(ESC):

I. Establishment of Mouse ESC and Induction of Differentiation by Reproductive Hormones

Ji Hye Sung , Hyun Soo Yoon¹, Jong-Soo Lee, Chul-Keun Kim,
Moon Kyo Kim and Yong-Dal Yoon[†]

Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea.

¹Infertility Research Centre, MizMedi Hospital, Daechidong, Seoul 135-128, Korea.

ABSTRACT : Embryonic stem cells(ES cells) are derived from the inner cell mass(ICM) of blastocysts, which have the potentials to remain undifferentiated, to proliferate indefinitely *in vitro*, to differentiate into the derivatives of three embryonic germ layers. ES cells are an attractive model system for studying the initial developmental decisions and their molecular mechanisms during embryogenesis. Additionally, ES cells of significant interest to those characterizing the various gene functions utilizing transgenic and gene targeting techniques. We investigated the effects of reproductive hormones, gonadotropins(GTH) and steroids on the induction of differentiation and expressions of their receptor genes using the newly established mouse ES cells. We collected the matured blastocysts of inbred mice C57BL/6J after superovulation and co-cultured with mitotically inactivated STO feeder cells. After 5 passages, we confirmed the expression alkaline phosphatase(Alk P) activity and SSEA-1, 3, 4 expressions. The protocol devised for inducing ES differentiation consisted of an aggregation steps, after 5 days as EBs in hormone treatments(FSH, LH, E₂, P₄, T) that allows complex signaling to occur between the cells and a dissociation step, induced differentiation through attachment culture during 7 days in hormone treatments. Hormone receptors were not increased in dose-dependent manner. All hormone receptors in ES cells treated reproductive hormones were expressed lower than those of undifferentiated ES cell except for LHR expression in E₂-treated ES cells group. After hormone induced differentiation, at least some of the cells are not terminally differentiated, as is evident from the expression of *Oct-4*, a marker of undifferentiated. To assess their differentiation by gene expression, we analyzed the expression of 7 tissue-specific markers from all three germ layers. Most of hormone-treated group increased in the expression of *gata-4* and *α-fetoprotein*, suggesting reproductive hormone allowed or induced differentiation of endoderm.

Key words : Embryonic stem cell, Embryonic body, Differentiation, Endoderm, Steroids, Gonadotropins.

요 약 : 배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC)는 미분화상태로 지속적인 계대가 가능하며, 정상 핵형과 전 분화능(pluripotency)을 가져 생체내-외에서 분화 유도시 삼배엽성의 모든 세포로 분화 가능하다. ESC를 feeder 세포 없이 부유배양하면 배아체(embryoid body, EB)를 형성하고, 초기 배아 발생과 유사한 분화 양상을 갖는다. ESC의 분화 유도가 초기배아 발생처럼 생식호르몬(GTH: FSH, LH; steroids)의 영향을 받는지는 불명하다. 본 연구는 ESC가 분화과정중 생식호르몬처리에 의해 그들 수용체가 발현되는가를 알아보고자 하였다. 순계혈통 생쥐인 C57BL/6J에서 과배란 유도후 포배를 수확하고, 유사분열적으로 불활성화된 feeder 세포와 공배양하여, 계대배양 하는 중 배아줄기세포주(JHY1)를 확립하였다. JHY1의

alkaline phosphatase 활성과 SSEA-1, 3, 4 발현을 통해 ESC임을 확인하였다. Feeder 세포 없이 ESC를 계대배양 후 호르몬 처리(FSH, LH, E₂, P₄, T)하에서 5일 동안 부유배양하여 배아체를 형성시키고, 이후 7일 동안 부착배양하여 분화를 유도하였다. GTH와 스테로이드의 수용체 발현 실험에서 ESC에 E₂ 처리에 의한 LHR의 발현 증가를 제외한 나머지 호르몬 처리군에서 ESC보다 낮은 생식호르몬의 수용체 발현이 관찰되었다. 생식호르몬을 농도별 수용체 발현 정도는 증감되지 않았다. 미분화 ESC 표지유전자인 *Oct-4*는 호르몬 처리군에서도 발현되었다. 각 배엽의 표지유전자들(영양세포, *hand1*; 외배엽성, *keratin*와 *fgf-5*; 중배엽성, *enolase*와 *α-globin*; 내배엽성, *gata-4*와 *α-fetoprotein*) 등의 발현 양상을 조사한 결과 호르몬 처리후 내배엽성 표지유전자외에는 발현 증가가 관찰되지 않았다. 즉 생식호르몬에 의해 *gata-4*, *α-fetoprotein*의 발현이 증가되는 것으로 보아 내배엽성 계열로의 분화 유도가 이루어진 것으로 사료된다.

서 론

배아줄기세포(ESC)는 포배의 내세포피에서 기원한 세포 주로 정상 핵형을 유지하며, 지속적인 계대가 가능하다. 생체 내 외에서 삼배엽성 기원 세포로 분화 가능한 전분화능을 가지며, 면역 결핍 생쥐에 주사시 teratocarcinoma를 형성한다 (Beddington & Robertson, 1989; Bradley, 1992). ESC를 12시간 이상 부유배양하면, 배아체를 형성한다. 배아체는 초기 배아의 발생과 유사한 분화 양상을 나타내어, 배아 발생시 분화 방향의 결정과 분자생물학적 결정기작의 연구, 형질전환 및 gene targeting 과정중 유전자의 발현 및 기능연구에 많이 이용되고 있다(Rossant, 2001; Odorico et al., 2001).

최근 다양한 성장인자나 사이토카인(cytokine) 등을 처리하여 ESC를 특정 세포로 분화시키기 위한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. ESC에 retinoic acid를 처리하였을 때 성상교세포, 신경교 전구세포, 뉴런, 희돌기교세포 등의 신경계 세포로의 분화가 유도되며(Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strubing et al., 1995; Brustle et al., 1999; Lee et al., 2000), 또 지방세포로 분화되는 것도 보고되었다. 배양액에 leukemia inhibitory factor(LIF), retinoic acid의 첨가, 그리고 feeder 세포로 섬유아세포(Doetschman et al., 1988; Maltsev et al., 1993)를 이용하면 심근세포로의 분화가 유도되며, ESC를 직접 심장에 주입하면 심근세포로 분화 유도된다고 보고되었다(Bader et al., 2000). 또한 ESC에 BMP(bone morphogenetic protein)-2나 BMP-4를 처리하면 연골세포(Kramer et al., 2000), 혈구계열 세포로의 분화가 유도된다(Wiles & Keller, 1991; Johansson & Wiles, 1995; Nakayama et al., 2000). ESC배양시 hematopoietic growth factors(HGF)나 vascular endothelial growth factor(VEGF)를 처리하면, 내피 세포로 분화되고(Risau et al., 1988; Yamashita et al., 2000), transforming growth factor(TGF)-β나 platelet-derived growth factor(PDGF)는 골격근으로 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다(Slager et al., 1993; Hirashima et

al., 1999). Dexamethasone, 기질 세포층, steel factor 등을 이용하여 멜라닌세포로 분화를 유도한 연구도 보고되었다(Yamane et al., 1999).

그러나, ESC가 ICM에서 유래되고, ICM의 특성을 가진다면, 초기 배아 발생에서 생식소자극호르몬이나 스테로이드 호르몬이 많은 영향을 받는 것과 같이 배아체의 분화 유도에도 영향을 미칠 것이 확실하다(Rossant, 2001). 그러나 생식호르몬의 영향에 대한 연구는 거의 없었다. FSH가 난포를 성장-성숙시키며, 배란을 촉진하며, LH는 난소내 간질 세포에 작용하여 배란후 황체를 형성하여, progesterone(P₄)을 분비시킨다. LH는 정소내 Leydig 세포에 작용하여 안드로젠의 합성과 분비를 증가시킨다(Norman & Litwak, 1997; Yen et al., 1999). Estrogen(E₂)은 암컷의 성 특징과 성 행동의 유지, 남자 성장-성숙, 자궁 증식을 촉진한다. Estradiol은 자궁에서 에스트로젠 수용체(estrogen receptor, ER)와 프로게스테론 수용체(progesterone receptor, PR) 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 보고되었다(Bergman, 1992). Progesterone은 자궁과 유선에 작용하여 자궁내 분비를 유지시키고, 유선관 형성을 촉진시킨다고 알려져 있다(Rider et al., 1998). Androgen 중 testosterone(T)은 Leydig 세포에서 분비되며, 표적 조직에 작용하여 수컷 특징과 행동의 유지, 정자형성과정을 증진시킨다고 보고되어 왔다(Verhoeven & Swinnen, 1999).

본 연구는 초기 배아와 유사한 배아체를 모델로 이용하여 생식소자극호르몬(FSH, LH)과 스테로이드호르몬(E₂, P₄, T)이 ESC에 작용하여 각각의 호르몬 수용체 발현과 분화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 동물은 순계혈통 생쥐(inbred mice C57BL/6J, 수컷 7주령, 암컷 5주령)를 일본 SLC사로부터 공급 받아 사용하였다. 사육조건은 광주기를 명 14시간, 암 10시간으로

조절하였고, 물과 먹이를 충분히 공급하였다.

2. 포배의 수획

C57BL/6J 생쥐는 과배란 유도를 위해 암컷의 복강에 PMSG (Sigma) 5 IU를 주사하고, 46~48시간 후 hCG(Sigma) 5 IU를 주사하여 과배란을 유도한 후 수컷과 합사시켰다. 12시간 후 질전이 확인된 암컷들은 hCG 주사 후 96시간째에 경추과괴로 도살한 후 수란관과 자궁을 적출하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM high glucose, Gibco BRL)으로 수란관과 자궁을 관류하여 포배를 수획하였다.

3. Feeder 세포의 배양 및 불활성화

배아줄기세포 배양을 위한 feeder 세포는 STO(American Type Culture Collection, ATCC)를 사용하였다. Feeder 세포의 배양액은 DMEM(high glucose)에 10% FBS, 0.1 mM MEM non-essential amino acids(Gibco BRL), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma), 2 mM glutamine(Sigma), 100 U/ml penicillin(Sigma), 100 μ g/ml streptomycin(Sigma)이 첨가된 배양액을 이용하여 37°C를 유지하며 95% 공기와 5% CO₂가 공급된 배양기에서 배양하였고, 3~4일마다 계대배양을 실시하였다. ESC와 공배양을 위한 feeder 세포는 유사분열적으로 불활성화시키기 위해서 mitomycin C(10 μ g/ml, Sigma)를 1시간 30분 동안 처리한 후 Ca²⁺, Mg²⁺가 포함되지 않은 PBS(phosphate buffered saline, Gibco BRL)를 세척완충액(washing buffer, PBS-WB)으로 2~3회 수세하고, trypsin/EDTA(0.25%/0.02%, Gibco BRL)를 이용하여 수획하였다. 수획된 feeder 세포는 0.1%의 gelatin (Sigma)으로 코팅된 plate에 1×10⁵ cells/cm²로 접종하였다. 배양액은 이틀에 한번씩 교체하였다.

4. 배아줄기세포의 확립

*In vivo*에서 분화한 포배는 0.5% pronase로 투명대를 녹인 후, 0.1%의 젤라틴으로 코팅된 24-well tissue-culture plate에서 유사분열적으로 불활성화된 STO 세포주와 공배양하였다. 공배양한 ICM은 7일간 생체의 성장시킨 후(*in vitro* outgrowth) ICM만을 영양외배엽과 물리적으로 분리하여 새로운 feeder 세포와 공배양하였다. 배아줄기세포의 계대배양은 PBS-WB로 2~3회 수세한 뒤, trypsin/EDTA를 37°C에서 5분 동안 처리하여 세포를 분리시킨 후 PBS-WB로 2~3회 수세하였다. 이를 새로운 feeder 세포와 공배양하였고, 4~5일 간격으로 반복적으로 실시하였다. 배아줄기세포는 DMEM(high glucose)에 15% ES cell qualified FBS(Gibco BRL), 0.1 mM MEM

nonessential amino acids, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 1000 U/ml leukemia inhibitory factor(LIF, Sigma)이 첨가된 배양액을 이용하여 37°C를 유지하며 95% 공기와 5% CO₂가 공급된 배양기에서 배양하였고, 배양액은 매일 교체하였다.

5. 배아줄기세포의 단독배양

Feeder 세포가 없는 배양 용기에서 공배양된 ESC를 반복적으로 계대배양함으로써 단독배양을 실시하였다. 단독배양 역시 공배양시와 동일한 배양액을 사용하고, 95% 공기와 5% CO₂가 공급된 37°C 배양기에서 배양하였다. 계대배양은 0.1%의 젤라틴으로 코팅된 plate를 사용하여 4~5일 간격으로 실시하였고, 배양액은 매일 교체하였다.

6. 배아체의 형성과 분화

단독배양된 ESC는 trypsin/EDTA를 처리하고, 60 mm 박테리아 배양용기에 1.2×10⁵ cells/ml로 접종한 후 5일 동안 부유 배양하여 배아체로 전환시켰다. 배양액은 접종 후 3일째 되는 날 교체하였고, 배아체는 95% 공기와 5% CO₂가 공급된 37°C 배양기에서 배양하였다. ESC를 60 mm 박테리아 배양용기에 접종시부터 FSH, LH, 스테로이드호르몬을 처리하여, 분화 유도시켰다. GTH 재조합 인간 난포자극호르몬(rhFSH, Serono) 1 IU의 농도로 처리하였고, 재조합 인간 황체형성호르몬(rhLH, Serono) 25 mU/ml의 농도로 처리하였다. 스테로이드호르몬은 E₂(3.7×10⁻⁵ M), P₄(3.2×10⁻⁶ M), T(5×10⁻³ M)의 농도로 각각 처리하였다(Lavranos & Seaman, 1989; Sakkas & Trounson, 1990). 배아체 형성 후에는 0.1%의 젤라틴으로 코팅된 plate에서 7일 동안 배아체 형성시 처리하였던 농도와 동일한 배양액을 이용하여 부착배양하였다. 호르몬 농도에 따른 호르몬 수용체 발현 양상을 알아보기 위하여 다음과 같은 농도로 ESC에 처리하여 배양하였다: FSH(10 IU, 1 IU, 0.1 IU); E₂(3.7×10⁻⁴ M, 3.7×10⁻⁵ M, 3.7×10⁻⁶ M); P₄(3.2×10⁻⁵ M, 3.2×10⁻⁶ M, 3.2×10⁻⁷ M); T(5×10⁻² M, 5×10⁻³ M, 5×10⁻⁴ M). 배아체 대조군의 배양액은 ESC 배양할 때 사용하였던 것과 동일한 것을 사용하였다. 면역세포화학 반응을 위해 chamber slide(Nalge Nunc International)에 서로 같은 조건으로 배양하였다. 배양액은 이틀마다 교체하였다.

7. RNA 추출

배양된 세포는 RNA 획득을 위해 TRIzol™(Gibco) 400 μ l에서 여러번 피펫팅하여 세포를 용해한 후, 4°C에서 15분 동안 정치시켰다. 40 μ l의 chloroform(Sigma)을 첨가한 후, 30초

동안 진탕한 뒤 4°C에서 15분 동안 정치시켰다. 이후 14,000 rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리 후 상층액만 분리하여 새 튜브에 옮기고, 100% 에탄올(ethanol, Sigma)을 첨가한 뒤, -20°C에서 30분 동안 정치시켰다. 14,000 rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리한 뒤, 상층액을 제거하고, 70% 에탄올로 수세한 후 건조시켰다. 30 μ l의 3차 증류수로 침전물을 녹였다. 양성대조군으로 사용한 난소와 정소는 성체 생쥐에서 각 조직을 떼어내 일부만을 TRIzol™ 600 μ l에서 피펫팅하여 조직을 용해한 후 4°C에서 15분 동안 정치시켰다. 60 μ l의 chloroform을 첨가한 뒤, 30초 동안 진탕한 뒤 4°C에서 15분 동안 정치시켰다. 이후의 과정은 위와 동일하게 수행하였다.

8. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

방법 7에서 획득한 RNA는 70°C에서 10분 동안 방치하여 변성시켰다. 변성된 RNA는 20 U/ μ l AMV, 5 \times AMV RT buffer, 10 mM dNTP, 40 U/ μ l RNasin, 0.1 M DTT, Random primer p[dN]₆ 등 Boehringer Mannheim(BM, Germany)제품들을 3차 증류수와 혼합하여 42°C에서 1시간 동안 역전사(reverse transcription, RT) 반응을 수행하였다. 역전사 반응 후 cDNA, 10 \times PCR buffer, 5 U/ μ l Taq polymerase(BM), 10 mM dNTP(BM), 3차 증류수와 각각의 생식호르몬 수용체의 primer들을 이용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였

Table 1. Primer sequences of hormone receptors used for RT-PCR and the sizes of their amplification products

Gene		Primer sequence	Product Size	Restriction enzyme	Digested size
FSHR*	Forward	5'-aatacacaactgtgcattcaac-3'	321 bp		
	Reverse	5'-atttggatgaagtcagaggtt-3'			
FSHR nest*	Forward	5'-tttggagaattgctgatgat-3'	175 bp	NcoI	91, 84 bp
	Reverse	5'-catgacaaaactgtctagacta-3'			
LHR*	Forward	5'-gggctggagtcattcagacg-3'	453 bp		
	Reverse	5'-cagttataacgactggtcag-3'			
LHR nest*	Forward	5'-aattcaccagcctactggtg-3'	383 bp		
	Reverse	5'-cagttataacgactggtcag-3'			
ER α	Forward	5'-ggtaaatgtgtggaaggcatgg-3'	491 bp		
	Reverse	5'-gaatgtgctgaagtgagctgg-3'			
ER α nest	Forward	5'-tgcagggtgaagattgtg-3'	242 bp	PstI	175, 67 bp
	Reverse	5'-ttgttactcatgtgccgga-3'			
ER β	Forward	5'-aagtgcgtggaaggattctgg-3'	402 bp		
	Reverse	5'-tcgaagcgtgtgagcattcagc-3'			
ER nest	Forward	5'-tgtgtgtgaagccatgatt-3'	246 bp	XmnI	146, 100 bp
	Reverse	5'-tcattgctgagcagatgttcc-3'			
PR	Forward	5'-ccagcatgctctgagaaa-3'	453 bp		
	Reverse	5'-atgctgtacgacctccacc-3'			
PR nest	Forward	5'-gagcattgagcctgatgta-3'	153 bp		
	Reverse	5'-tgtaagttccgaaacctgg-3'			
AR	Forward	5'-caactgcatgtggatgacc-3'	410 bp		
	Reverse	5'-ggagcttggtagctgtag-3'			
AR nest	Forward	5'-atgagtaccgcatgacaag-3'	158 bp	EcoRI	96, 62 bp
	Reverse	5'-attttcagccatccaactg-3'			
β -actin	Forward	5'-gtggccctctaggcaccaa-3'	540 bp		
	Reverse	5'-ctctttgatgtcacgcagatttc-3'			

FSHR, FSH receptor; LHR, LH receptor; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; AR, androgen receptor; *, FSHR, FSHR-nest; and LHR, LHR-nest(Patsoula et al., 2001); ER α and ER α nest, NM_007956; ER β and ER β nest, NM_010157; PR and PR nest, NM_008829; AR, X53779; β -actin, X03765. bp means base pairs

다. 난포자극 호르몬 수용체(follicle stimulating hormone receptor, FSHR), 황체형성호르몬 수용체(luteinizing hormone receptor, LHR), 에스트로젠 수용체 α (estrogen receptor α , ER α), 에스트로젠 수용체 β (estrogen receptor β , ER β), 프로제스테론 수용체(progesterone receptor, PR)와, 안드로젠 수용체(androgen receptor, AR) primer는 Table 1에 나타내었다. 미분화 ESC marker gene(표지유전자)인 *Oct-4*, 영양세포 표지유전자인 *hand1*, 외배엽성 표지유전자인 *keratin*과 *fgf-5*, 중배엽성 표지유전자인 *enolase*와 α -*globin*, 그리고 내배엽성 표지유전자인 *gata-4*와 α -*fetoprotein* 등의 primer는 Table 2에 나타내었고, 위의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR의 반응 조건은 호르몬 수용체의 경우 1차 PCR은 94°C, 10분 동안 전변성(predenaturation, P) 과정을 거친 후, 94°C로 1분 동안 변성(denaturation, D), 55°C로 1분 동안 결합(annealing, A), 72°C로 1분 동안 합성(polymerization, Po) 과정을 한 주기로 35회 실시하였고, 최종적으로 72°C로 10분 동안 신장(extension, E) 과정을 수행하였다. 호르몬 수용체의 2차 PCR은 P(94°C, 10분) - D(94°C, 1분) - A(55°C, 1분), -Po(72°C, 1분) 과정을 한 주기로 30회 실시하였고, 최종적으로 E(72°C, 10

분) 과정을 수행하였다. β -actin과, 분화 표지유전자 중 *hand1*, *enolase*, α -*globin*, *gata-4*와 α -*fetoprotein*은 P(94°C, 10분) - D(94°C, 30초) - A(64°C, 30초), -Po(72°C, 30초) 과정을 한 주기로 35회 실시하였고, 최종적으로 E(72°C, 10분) 과정을 수행하였다. *Oct-4*는 같은 조건으로 주기만 25회로 다르게 실시하였다. 나머지 분화 표지유전자 중 *keratin*과 *fgf-5*는 P(94°C, 10분) - D(94°C, 30초) - A(55°C, 1분), -Po(72°C, 1분) 과정을 한 주기로 30회 실시하였고, 최종적으로 E(72°C, 10분) 과정을 수행하였다.

RT-PCR 결과를 Bio-print with color Bio-capt를 이용하여 캡처 후 BioID version 99 프로그램을 이용하여 정량하였다.

9. Alkaline Phosphatase 활성의 조직화학적 관찰

배아줄기세포의 alkaline phosphatase 활성을 조직화학적 방법을 통해 확인하였다. 세포는 PBS-WB를 이용하여 2~3회 수세한 후 4°C에서 30분 동안 4% paraformaldehyde(PFA, Merck)에 고정시켰다. PBS-WB로 수세한 후 2 ml의 0.1 M Tris-HCl(pH 8.2)에 Fast Red Tablets(0.5 mg naphthol substrate, 2 mg Fast Red chromogen and 0.4 mg levamisole, Boehringer Mannheim, Germany)을 녹인 후 실온에서 15~30분 동안 처리하여 발색반응을 유도시켰다. 발색반응은 Tris-EDTA(TE, pH 7.5)로 수세하여 종결시켰다.

10. 배아시기 특이항체 분석

배아줄기세포는 PBS-WB로 2~3회 수세한 후 4°C에서 30분 동안 4% PFA에 고정시켰다. 고정 후 2~3회 PBS-WB로 수세한 후 1차 항체인 SSEA(stage specific embryonic antigen)-1 antibody(F9 teratocarcinoma stem cells), SSEA-3 antibody(4~8 cell stage mouse embryos)와, SSEA-4 antibody(human embryonal carcinoma cell line 2102 Ep, Hybridoma bank, University of Iowa)를 각각 1:500으로 희석하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 다시 PBS-WB로 수세하고 2차 항체인 anti-mouse IgG-AP 1:100으로 희석하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 PBS-WB로 세척했다. 3차 항체인 anti-goat IgG-HRP, anti-rabbit IgG-POD는 1:100으로 각각 희석하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 PBS-WB로 수세하였다. 3,3'-Diaminobenzidin(DAB)를 사용하여 발색시킨 후 염색 결과를 확인하였다. 발색반응은 TE(pH 7.5)로 수세하여 종결시켰다.

11. 생식호르몬 수용체의 확인

각 호르몬을 처리하여 배양한 EB는 chamber slide에서 배

Table 2. Primer sequences of differentiation markers used for RT-PCR and the sizes of their amplification products

Gene		Primer sequence	Product size
<i>Oct-4</i>	Forward	5'-tgacccttctctctgctttacg-3'	545 bp
	Reverse	5'-gccttctctataggttgggctcc-3'	
<i>hand1</i>	Forward	5'-tgaaggctcgactcaaggt-3'	553 bp
	Reverse	5'-gaggtagaagaagaggtggg-3'	
<i>keratin</i>	Forward	5'-tgatcagcagtggtgaggac-3'	530 bp
	Reverse	5'-cctggaactctgactttggc-3'	
<i>fgf-5</i>	Forward	5'-cgttttctctctcttcc-3'	501 bp
	Reverse	5'-tgaacctggtaggaactgg-3'	
<i>enolase</i>	Forward	5'-gctgctaagacagccatcc-3'	613 bp
	Reverse	5'-acggaacttttccagca-3'	
α - <i>globin</i>	Forward	5'-aagccctggaagatggtt-3'	353 bp
	Reverse	5'-ggcagcttaacggtacttg-3'	
<i>gata-4</i>	Forward	5'-tgtccaactccagactac-3'	552 bp
	Reverse	5'-cgagcaggaattgaagagg-3'	
α - <i>fetoprotein</i>	Forward	5'-agctgcgcttctaccagac-3'	563 bp
	Reverse	5'-ggagatgtttaacgccaa-3'	

Oct-4(Nichols et al., 1998); *keratin*, AF264006; *fgf-5*, NM_010203; *hand1*, NM_08213; *enolase*, BC013460; α -*globin*, L75940; *gata-4*, NM_008092; α -*fetoprotein*, NM_007423. bp means base pairs.

양액을 제거한 후, PBS-WB로 2~3회 수세하고, 4% PFA를 첨가한 뒤 4°C에서 30분 동안 고정시켰다. PBS-WB로 2~3회 수세한 후 0.2% Tween 20(Sigma)으로 실온에서 30분 동안 방치시켰다. PBS-WB로 수세한 후 1차 항체인 polyclonal goat anti-mouse FSHR antibody, polyclonal rabbit anti-mouse ER α antibody, polyclonal rabbit anti-mouse ER β antibody, polyclonal rabbit anti-mouse PR antibody(Santa Cruz), polyclonal rabbit anti-mouse AR antibody(Affinity Bioreagents, Inc)는 1:100으로 희석하여 각각 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-WB로 2~3회 수세한 후, 2차 항체로 FSHR는 anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz), ER, ER, PR과 AR은 anti-rabbit IgG-POD(Boehringer Mannheim GmbH)를 사용하여 각각 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-WB로 2~3회 수세한 후, DAB를 이용하여 발색시켰다. 발색반응은 TE(pH 7.5)로 수세하여 종결시켰다.

결 과

1. 배아줄기세포의 확립

포배와 feeder 세포를 공배양한지 2일 후에, 포배는 feeder 세포에 부착하였으며, 부착 후 6일 정도에 영양외배엽은 내 세포피 주변에 얇게 퍼져 증식함을 볼 수 있었다(Fig. 1A). 지속적 계대 후 영양외배엽세포는 사라지고, ESC colony와 유사한 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). ESC는 증식 속도가

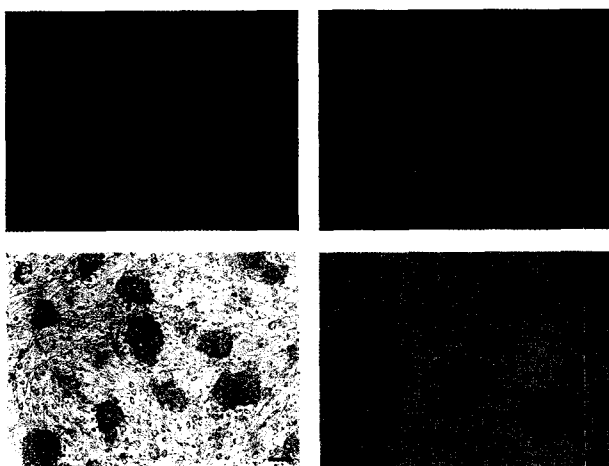


Fig. 1. Photographs of mouse ES cells. (A) Mouse blastocyst with inner cell mass(ICM, arrow) and trophectoderm around ICM attached to a lawn of mitotically inactivated STO feeder layer, (B) mouse ES cells after subculture ES cells, (C) mouse ES cell colonies after 5 passages of culture. (D) Histochemistry of alkaline phosphatase. Scale bars represent 100 μ m.

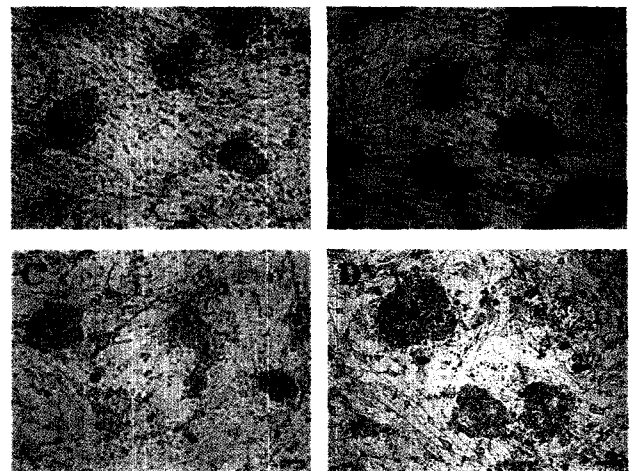


Fig. 2. Expression of stage specific cell surface markers of mouse ES cells. (A) Negative control. (B) SSEA-1. (C) SSEA-3. (D) SSEA-4. Cell staining intensity varied within and between colonies. Scale bars represent 100 μ m.

빨라 5일 정도에 한번씩 계대배양하였으며, 5~6 계대 후 ESC 콜로니를 확인할 수 있었다(Fig. 1C). 배아줄기세포의 확인을 위해 수행한 alkaline phosphatase 활성은 조사해본 결과 강한 양성반응을 보였다(Fig. 1D).

또한 ESC 특이적 표지 단백질인 SSEA-1, 3, 4의 면역세포 화학반응을 조사하였다. 본 실험에서 확립한 JHY1 ESC line 은 SSEA-1에서 양성반응을 보였고(Fig. 2B), SSEA-3(Fig. 2C)와 SSEA-4(Fig. 2D)에서는 음성반응을 보였다. 위의 결과, JHY1 세포는 배아줄기세포와 유사한 특성을 가지고 있음을 확인하였다.

2. 배아줄기세포 분화시 생식호르몬 수용체 발현

확립된 JHY1 ESC는 feeder 세포와 공배양하지 않고 계대 배양을 거쳐 feeder 세포와 분리시켰다. 이후 각각의 호르몬이 첨가된 배양액에서 5일 동안 부유배양을 실시하여, 배아체가 5일째에 형성된 것을 현미경하에서 관찰하였다(Fig. 3). 이 배아체는 0.1%의 젤라틴으로 코팅된 6-well plate에서 7일 동안 배양한 뒤 7일째에 세포를 수확하여 RT-PCR을 수행하여, 호르몬 수용체의 발현 정도를 관찰하였다. 1차 PCR에서 호르몬 수용체 발현이 극히 낮아 1차 PCR에서 증폭된 PCR 산물의 염기서열내에서 primer를 제작하여 2차 PCR을 수행하였다(Table 1). JHY1 ESC에 FSH, LH, E₂, P₄와 T를 처리한 후 호르몬 수용체의 발현 양상 결과는 Fig. 4에 나타내었다. β -actin에 대한 각 호르몬 수용체 발현 정도를 Bio-print with color Bio-capt를 이용하여 캡처 후 Bio1D version 99 프로그램

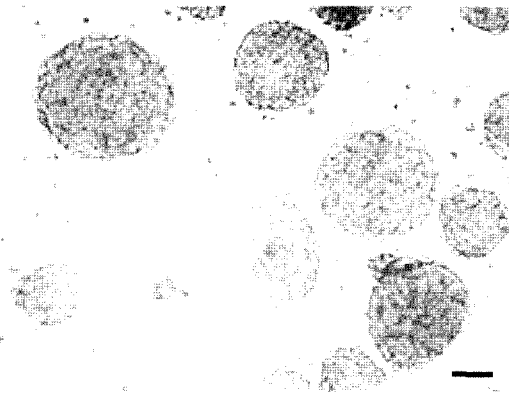


Fig. 3. 5-day-old embryonic bodies by suspension culture of mouse ES cells. Scale bar represents 100 μ m.

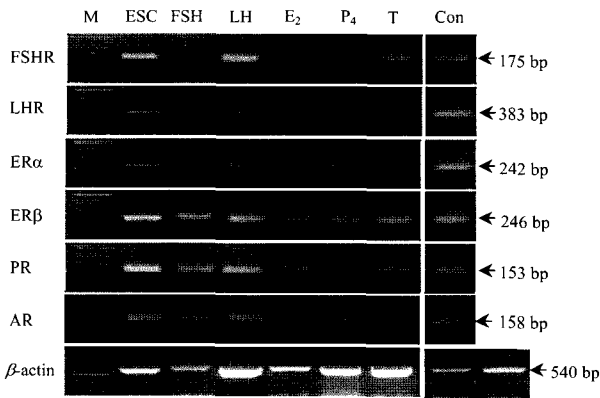


Fig. 4. Expression patterns of hormone receptors after hormone treatments(FSH, LH, E₂, P₄, and T) in mouse ES cells. RNA samples from ES cells, 5-day-old EBs, and 7-day-old differentiated ES cells were analyzed by RT-PCR for expression of specific receptors. RNA from ES, 5-day-old EBs, and DE cells treated with GTH(FSH, LH) and steroid hormones(17 β -Estradiol, E₂; Progesterone, P₄; Testosterone, T) were analyzed by RT-PCR for expression of their hormone receptors and β -actin housekeeping gene. M, marker; ESC, embryonic stem cell; FSHR, FSH receptor; LHR, LH receptor; ER α , estrogen receptor α ; ER β , estrogen receptor β ; PR, progesterone receptor; AR, androgen receptor; Con, control; bp, base pairs. Positive control of FSHR, LHR, ER α , ER β and PR is ovary while AR is testis.

을 이용하여 정량한 결과를 Fig. 5에 재구성하여 나타내었다.

2차 PCR 결과 생식호르몬을 처리하여 분화를 유도한 ESC에서의 호르몬 수용체의 발현은 호르몬이 처리되지 않은 미분화 상태의 ESC보다 상당히 적은 전사체가 존재함을 알 수 있었다. 생식호르몬 처리후 FSHR의 발현 양상은 모든 호르몬 처리군에서 배아줄기세포에서보다 낮은 수준으로 나타났 다(Fig. 5A). LHR의 발현 양상은 E₂ 처리군은 대조군보다 높은 반면, 특히 P₄, T의 경우는 ESC에서보다 현저히 낮은 수

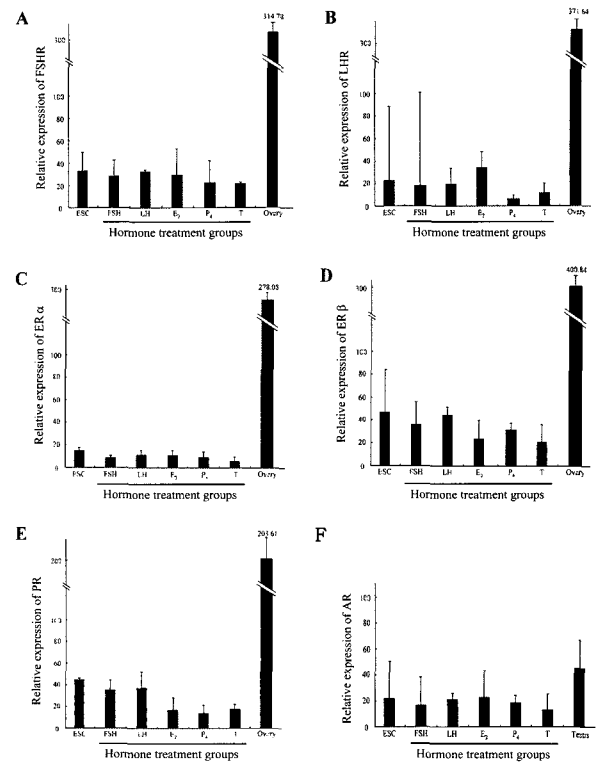


Fig. 5. Expression patterns of hormone receptors(FSHR, LHR, ER α , ER β , PR, and AR) after hormone treatments(FSH, LH, E₂, P₄, and T) in mouse ES cells. The ratios of hormone receptors versus β -actin by semi-quantitative RT-PCR analysis. A, FSHR; B, LHR; C, ER α ; D, ER β ; E, PR; F, AR.

준을 보였고, 그중 P₄ 처리군에서 가장 낮은 수준으로 나타났 다(Fig. 5B). ER α 의 발현 양상은 다른 호르몬 수용체에서의 발현 정도에 비해 매우 낮은 수준을 보였으며, 호르몬 처리 군에서의 ER α 발현은 ESC에 비해 모두 낮았다(Fig. 5C). ER β 의 발현 양상은 다른 호르몬 수용체들에 비해 상대적으로 높은 수준을 보였으나, ESC에 비해 생식호르몬 처리군에서 보다 낮은 발현 정도를 보였다. 특히 E₂와 T에 의해 현저히 낮은 ER β 의 발현을 나타내었다(Fig. 5D). LH 처리군에서 ER β 의 발현은 배아줄기세포와 비슷하였다. PR의 발현 양상 도 또한 호르몬 처리군에서 ESC에서보다 낮았지만, 그 수준 은 FSH와 LH 처리군에서와 큰 차이를 보이지 않았고, 스테 로이드호르몬 처리군에서는 그들의 발현 정도보다 50% 정도 낮은 수준을 보였다(Fig. 5E). FSHR, LHR, ER α , ER β 와 PR 에 사용되었던 양성대조군인 난소에서의 이들 호르몬 수용 체 발현 수준은 배아줄기세포와 호르몬 처리군에 비해 상대 적으로 높은 수준을 보였다. AR의 발현 양상 역시 호르몬 처 리군에서 배아줄기세포보다 낮은 수준을 나타내었다(Fig. 5F). PCR 결과물의 확인을 위해 제한효소를 처리하여 잘라진

크기를 확인한 결과 일치하였다.

3. 호르몬 농도에 따른 생식호르몬 수용체 발현 양상

ESC와 3가지 농도로 호르몬이 처리된 실험군에서 호르몬 수용체 발현 양상을 RT-PCR과 면역세포화학적 방법을 실시하여 알아 보았다. FSH 처리군에서 FSHR는 EB에서 낮게 발현하였고, 고농도(1ug/ml)에서는 FSHR의 발현은 억제되었다. 그러나 0.1~0.01 수준의 저농도에서 FSHR의 발현이 ESC와 비슷하였다(Fig. 6A). E₂ 처리군에서 ER α 의 발현은 약한 반면(Fig. 6B), ER β 의 발현은 상대적으로 높음을 관찰할 수 있었다(Fig. 6C). 특히 EB의 ER β 의 발현은 ESC의 3배 정도로 높게 발현되었다. 그러나 E₂의 처리에 의해 ESC보다 낮은 발현을 나타내었다. P₄ 처리군에서 PR의 발현은 배아체 형성 시 호르몬이 처리되지 않은 조건에서 배양한(배양액내 LIF포함) 경우 높게 발현하였다(Fig. 6D). 그러나 P₄에 의해 ESC의 PR은 현저하게 발현이 억제되었다. T 처리군에서 또한 배아체에서 상대적으로 높은 AR의 발현을 보였다(Fig. 6E). 그리고 T에 의해 AR의 발현은 저하되는 것이 관찰되었다. 위의

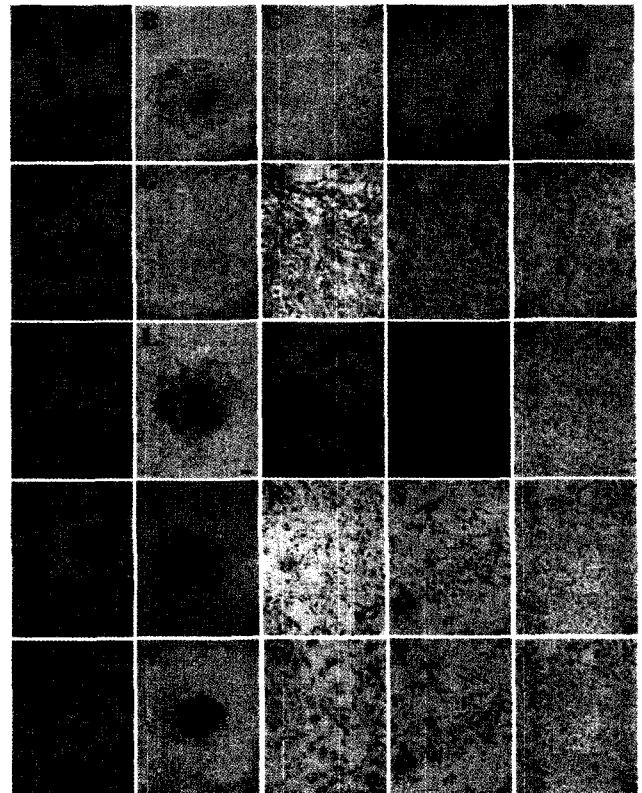


Fig. 7. Localizations of FSHR, ER α , ER β , PR, and AR in mouse ES cell colonies and *in vitro* differentiated mouse ES cells. Photographs in the first column(A, F, K, P, U) are the results of ESC. Those of second column(B, G, L, Q, V), results of EB. FSHR expressions in (C) FSH 10 IU (D), FSH 1 IU, and (E) FSH 0.1 IU. ER α and ER β expressions in (H) and (M) E₂ 3.7 \times 10⁻⁴ M, (I) and (N) E₂ 3.7 \times 10⁻⁵ M, and (J) and (O) E₂ 3.7 \times 10⁻⁶ M. PR expressions in (R) P₄ 3.2 \times 10⁻⁵ M, (S) P₄ 3.2 \times 10⁻⁶ M, (T) P₄ 3.2 \times 10⁻⁷ M. AR expressions in (W) T 5 \times 10⁻² M, (X) T 5 \times 10⁻³ M, (Y) T 5 \times 10⁻⁴ M. Scale bars represent 100 μ m.

결과로 보아 생식호르몬의 처리에 의한 그 수용체의 발현은 감소하는 것을 알 수 있었다.

면역세포화학적 방법을 통한 호르몬 수용체 발현 확인에서도 RT-PCR 결과와 일치함을 확인할 수 있었다(Fig. 7). FSHR의 발현은 주로 세포막에서 나타났으며, ER α , ER β , PR과 AR의 발현은 주로 핵에서 관찰할 수 있었다. 호르몬을 농도별로 처리하였지만 FSH 처리군을 제외하고는 유의한 차이를 관찰할 수 없었으며, 농도 의존적 호르몬 수용체 발현의 유도 역시 관찰할 수 없었다.

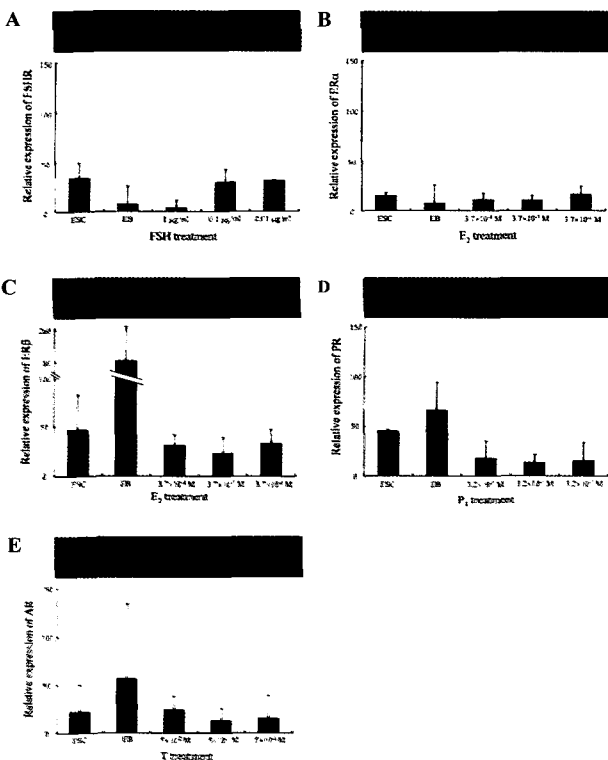


Fig. 6. Dose-dependent expression patterns of each hormone receptor (FSHR, ER α , ER β , PR, and AR) after treatments of various hormone concentration(FSH, E₂, P₄, and T) in mouse ES cells. The ratios of hormone receptors versus β -actin by semi β -quantitative RT-PCR analysis. A, FSHR; B, ER α ; C, ER β ; D, PR; E, AR.

4. 호르몬 처리에 의한 배아줄기세포의 분화

GTH와 스테로이드 처리시 분화에 미치는 영향은 각각의 호르몬을 처리한 뒤 7일째에 세포를 수확하여 분화 표지유전

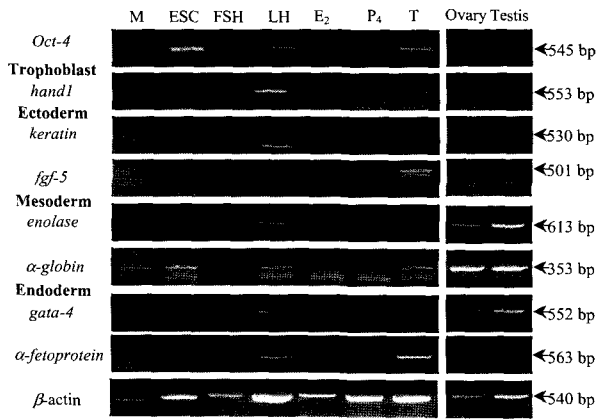


Fig. 8. Analysis of expression of cell-specific genes in mouse ES cells treated with gonadotropins and steroid hormones. RNA from ES, 5-day-old EBs, and ESC treated with hormones were analyzed by RT-PCR for expression of seven cell specific genes and β -actin housekeeping gene. The genes were categorized by their embryonic germ layers. Positive control of FSHR, LHR, ER α , ER β and PR is ovary while AR is testis. M, Marker; ESC, Embryonic stem cell; *hand1*, trophoblast marker; *keratin* and *fgf-5*, ectoderm markers; *enolase* and *α -globin*, mesoderm markers; *gata-4* and *α -fetoprotein*, endoderm markers. Results are shown the effects of FSH, LH, E₂, P₄, and T on the expression of seven genes. bp represents base pairs.

자의 발현 정도를 RT-PCR을 통해 관찰하였다(Fig. 8). β -actin에 대한 각 호르몬 수용체 발현 정도를 Bio-print with color Bio-capt를 이용하여 캡쳐 후 BioID version 99 프로그램을 이용하여 정량한 결과를 Fig. 9에 재구성하였다. *Oct-4*는 미분화 배아줄기세포 표지유전자로서, ESC에서 가장 강하게 발현하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 9A). 생식호르몬 처리군에서의 *Oct-4*의 발현은 ESC에 비해 현저하게 낮게 나타났다. 즉 다소간 분화가 유도되었을 가능성을 제시하였다. 특히 LH와 T 처리군에서 강하게 발현함을 볼 수 있었다. 발현 정도가 가장 낮게 발현하는 호르몬 처리군은 E₂ 처리군이었다(Fig. 9A).

영양세포 표지유전자인 *hand1*의 발현 양상은 LH 처리군에서 가장 높은 수준을 보였고, FSH 처리군, E₂ 처리군과 P₄ 처리군에서는 ESC와 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 9B). 한편, T의 처리에 의해 *hand1*의 발현은 ESC에서의 발현보다 증가하였다.

외배엽성 표지유전자로 *keratin*과 *fgf-5*의 발현양상을 조사하였다. *keratin*의 발현은 ESC와 호르몬 처리군에서 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 9C). *fgf-5*의 발현 역시 호르몬 처리군과 배아줄기세포에서 비슷한 수준을 보였다(Fig. 9C). 그러

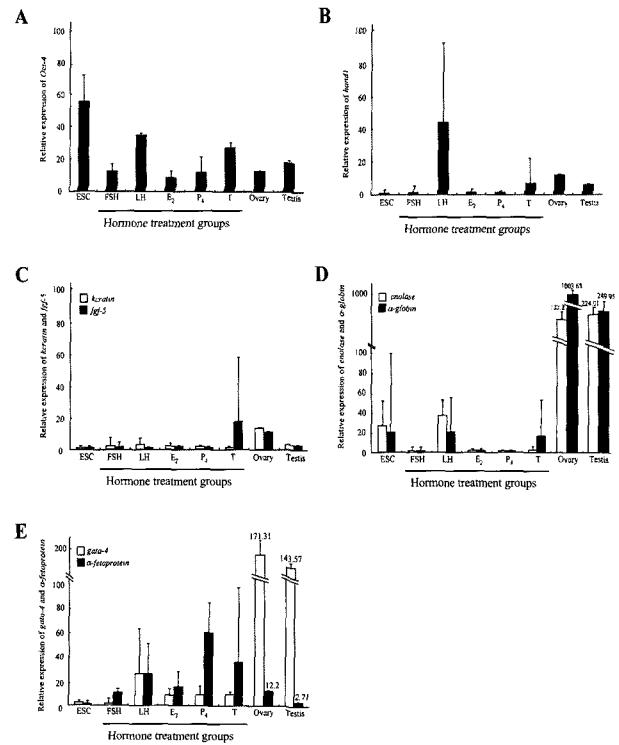


Fig. 9. Effects of differentiation markers expression after hormone treatments(FSH, LH, E₂, P₄, and T) in mouse ES cells. The ratios of differentiation markers versus β -actin by semi-quantitative RT-PCR analysis. A, *Oct-4*; B, *hand1*; C, ectoderm markers, *keratin* and *fgf-5*; D, mesoderm markers, *enolase* and *α -globin*; E, endoderm markers, *gata-4* and *α -fetoprotein*.

나 T 처리군은 다른 호르몬 처리군들에 비해 상당히 높은 수준의 발현양상을 보였다.

중배엽성 표지유전자(*enolase*와 *α -globin*)의 발현은 LH 처리군을 제외한 다른 호르몬 처리군에서 모두 ESC에서의 발현보다 현저하게 낮은 수준을 보였다(Fig. 9D). LH 처리군에서 *enolase*와 *α -globin*의 발현은 ESC에서보다 1.5배 정도 높은 수준으로 나타났다.

내배엽성 표지유전자(*gata-4*와 *α -fetoprotein*)의 발현 정도는 다른 분화 표지유전자에서보다 상대적으로 높은 수준을 보였다. *gata-4*의 발현 정도는 FSH 처리군을 제외한 다른 호르몬에서 ESC보다 현저히 높은 수준으로 나타났으며, 그중 LH 처리군에서 가장 높았다(Fig. 9E). *α -fetoprotein*의 발현 정도는 모든 호르몬 처리군에서 ESC보다 높은 수준을 보였고(Fig. 9E), 그중 P₄ 처리군에서 상당히 높은 수준으로 나타났다.

고 찰

본 연구에서 순계혈통 생쥐(C57BL/6J)의 포배를 feeder 세포와 공배양을 통해 생체의 성장시킨 후 ICM만을 영양외배엽과 분리하여, 지속적인 계대배양을 통해 배아줄기세포, JHY1을 확립하였다. 일반적으로 alkaline phosphatase(Alk P) 활성, SSEA-1, 3, 4의 발현, 핵형분석, *Oct-4*의 발현, 키메라형성 등의 방법을 통해 배아줄기세포임을 확인할 수 있다(Vassilieva et al., 2000). 본 연구에서 이들 방법 중 Alk P 활성과 SSEA-1, 3, 4의 발현, *Oct-4*의 발현 등의 방법을 통해 JHY1이 ESC임을 확인하였다. JHY1은 Alk P 활성에 양성반응을 보였고, ESC 특이적 표지 단백질인 SSEA-1에 양성반응을 보였다 그러나 SSEA-3, 4에는 음성반응을 보였다(Fig. 2). 위의 결과들로 만들어진 세포(JHY1)가 배아줄기세포임을 확인할 수 있었다. *Oct-4*는 생쥐의 totipotent ESC과 생식 세포에서 발현되고, 낭배형성기에 이르면 체세포의 분화와 더불어 발현이 감소한다(Pesce & Schoeler, 2001). 본 연구에서 ESC는 *Oct-4*가 잘 발현되나 호르몬을 처리한 ESC는 그 발현이 억제되어 생식호르몬에 의한 분화가 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 9A).

배아줄기세포는 다양한 성장인자나 사이토카인 등을 처리하여 특정 세포로의 분화 유도한 연구들이 보고되고 있다(Hirashima et al., 1999; Kramer et al., 2000; Yamashita et al., 2000). 그리고 생식세포를 정소에 이식하면 불임이었던 생쥐의 정소에서 정자형성과정이 진행된다고 보고되고 있다. 즉 adult stem cell도 목적세포로 분화를 유도할 수 있다(Schlatt, 1999; Schlatt et al., 1999; Ogawa et al., 2000). 본 연구에서는 배아체를 형성시킨 후, GTH(FSH, LH)와 스테로이드호르몬(E_2 , P₄, T)을 처리함으로써 이들 호르몬의 수용체 발현 정도와 ESC의 분화유도 여부를 조사한 결과 GTH에 의해서는 영향이 적은 반면 스테로이드 처리에 의해서는 스테로이드 수용체의 발현이 감소하였다. 그러나 Estrogen 처리에 의해 LH 수용체는 증가함을 보여 배아가 스테로이드에 반응성을 가진 것(Lavranos & Seamark, 1989)과 일치하였다.

ESC 분화 유도는 배아체를 형성시키는 과정이 포함된다. 배아체를 형성시키는 방법에는 박테리아 배양 용기, spinner flask와 MCM에서 부유배양하는 방법과 hanging drop 방법들이 있는데(Rossant, 2001; Odorico et al., 2001), 본 연구에서는 박테리아 배양 용기에 부유배양시키는 방법을 이용하여 배아체를 형성시켰다. 부유배양 5일 후 ESC는 정상적으로 배아체를 형성하였다. 예비 실험에서, GTH와 스테로이드호르

몬을 처리하여 5일 동안 부유배양하여 배아체를 형성시킨 후 7일 동안 부착배양하여 호르몬 수용체 발현을 관찰한 결과, 3일 동안 처리하였을 때보다 호르몬 수용체 발현이 감소함을 관찰할 수 있었다. JHY1 ESC에서 호르몬 수용체들의 발현은 약했으며, 호르몬 처리시 발현 정도는 감소하였다. 이로 보아 생식호르몬 수용체는 ESC에서 호르몬 처리에 의해 발현이 유도되지 않는 것으로 사료된다. 그러나 이러한 현상은 생식호르몬들이 배양액내 고농도로 존재함으로 세포내 호르몬 수용체의 발현이 줄어든 것으로 여겨지며, 다른 한편 ESC의 분화로 인해 이들 호르몬 수용체의 발현이 감소되는 것으로 사료된다. 특히 $ER\alpha$ 는 다른 호르몬 수용체의 발현 정도와 비교해 볼 때 배아줄기세포와 호르몬을 처리하여 분화 유도시킨 실험군들에서 낮은 발현을 보였다. 각 호르몬을 농도별로 처리한 경우 호르몬 수용체의 발현은 농도 의존적으로 증감되지 않음을 관찰할 수 있었다. 면역세포화학적 방법으로 알아본 호르몬 수용체의 세포내 발현은 이미 알려진 바와 같이 GTH는 주로 세포막에서 발현하였으며, 스테로이드호르몬은 핵에서 발현하는 것으로 보아 이들 호르몬 수용체를 발현하는 다른 세포들과 유사한 기작으로 호르몬들이 배아줄기세포에서도 작용하는 것으로 사료된다.

배아줄기세포의 분화 표지유전자로 알려진 *Oct-4* 유전자가 호르몬 처리로 분화 유도시킨 실험군에서도 발현된 것으로 보아, ESC를 특정세포로 분화 유도시키는 성장인자나 사이토카인과는 달리 호르몬에 의한 ESC의 완전한 분화 유도는 이루어지지 않는 것으로 사료된다. LH 처리군의 경우 다른 호르몬 처리군들에 비해 상대적으로 모든 분화 표지유전자들에서 높은 발현을 보였다. 그중 *hand1*, *gata-4*와 *α -fetoprotein*의 발현이 강한 것으로 보아 영양세포나 내배엽성 계열로의 분화 유도에 영향을 미치며, hCG와 수용체를 공유하는 이 호르몬이 착상전 자궁내에서 배아의 분화에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 호르몬 처리군에서 대체적으로 내배엽성 표지유전자들의 발현(특히 *α -fetoprotein*)이 높게 나타났다.

난소와 정소에서 분화 표지유전자의 발현 양상은 호르몬 처리시 분화된 ESC에서의 발현과 유사함을 관찰할 수 있었다. 본 연구는 단기간의 호르몬 처리에 의해 ESC의 분화를 관찰한 실험이므로 ESC의 특정 세포로의 분화 유도는 이루어지지 않았으나, 특정 계열로의 분화 유도는 시작된 것으로 사료된다. 위의 결과들을 종합하면, 생식소자극호르몬, 스테로이드호르몬의 처리로 인해 호르몬 수용체의 발현을 증가시키지는 못하나, 내배엽성 계열 세포로의 분화 유도 작용에 중요한 역할을 담당하는 것으로 사료된다.

이러한 결과는 생식호르몬들이 ESC 및 EB의 초기분화에 영향을 미치며, 생식호르몬의 수용체는 발현이 억제된다고 가정된다. 지금까지의 연구 보고들을 조사하여 볼 때 생식호르몬이 ESC의 분화에 미치는 영향은 본 연구가 최초이며, GTH 및 steroid는 ESC를 내배엽성 구조물로 분화시킨다고 가정된다.

인용문헌

- Bader A, Al Dubai H, Weitzer G (2000) Leukemia inhibitory factor modulates cardiogenesis in embryoid bodies in opposite fashions. *Circ Res* 86:787-794.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb EI (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev Biol* 168:342-357.
- Beddington RSP, Robertson EJ (1989) An Assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105:733-737.
- Bergman MD (1992) Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: The role of estradiol. *Endocrinology* 130:1923-1930.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone marrow stromal stem cells: Nature, Biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192.
- Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan OD, McKay RD (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science* 285: 754-756.
- Doetschman TC, Williams P, Maeda N (1988) Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem(ES) cells. *Dev Biol* 127:224-227.
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J (1995) *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 108: 3181-3188.
- Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S, Matsuyoshi N, Nishikawa S (1999) Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an *in vitro* model of vasculogenesis. *Blood* 93:1253-1263.
- Johansson BM, Wiles MV (1995) Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 15:141-151.
- Kelly DL, Rizzino A (2000) DNA microarray analyses of genes regulated during the differentiation of embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev* 56:113-123.
- Koyanagi-Katsuta R, Akimitsu N, Arimitsu N, Hatano T, Sekimizu K (2000) Apoptosis of mouse embryonic stem cells induced by single cell suspension. *Tissue & Cell* 32:66-70.
- Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J (2000) Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation *in vitro*: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 92:193-205.
- Lavranos TC, Seamark RF (1989) Addition of steroids to embryo-uterine monolayer co-culture enhances embryo survival and implantation *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1:41-46.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD (2000) Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18:675-679.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM (1993) Embryonic stem cells differentiate *in vitro* into cardiomyocytes representing sinusodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44:41-50.
- Nakayama N, Lee J, Chiu L (2000) Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4 dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells *in vitro*. *Blood* 95:2275-83.
- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct 4. *Cell* 95:379-91.
- Norman AW, Litwack G (1997) *Hormones*. 2nd ed. Academic Press.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA (2001) Multilineage differentiation from embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19: 193-204.
- Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL (2000) Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Med* 6:29-34.
- Patsoula E, Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Bletsas R, Michalakis S (2001) Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction* 121:455-61.

- Pesce M, Schoeler HR (2001) *Oct-4*: Gatekeeper in the biggining of mammalian development. *Stem Cells* 19:271-278.
- Rider V, Kimler BF, Justice WM (1998) Progesterone-growth factor interactions in uterine stromal cells. *Biol Reprod* 59: 464-469.
- Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, Doetschman T (1988) Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102:471-478.
- Rossant J (2001) Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells* 19:477-481.
- Sakkas D, Trounson AO (1990) Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. *J Reprod Fertil* 90:109-118.
- Schlatt S (1999) Prospects and problems for the germ cell transplantation in the male. *Int'l J Androl* 22:13-18.
- Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer GF, Rolf C, Brook PF, Nieschlag E (1999) Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod.* 14:144-150.
- Slager HG, Van Inzen W, Freund E, Van den Eijnden-Van Raaij AJM, Mummery CL (1993) Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: Implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Dev Genet* 14:212-224.
- Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM (1995) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage *in vitro* gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* 53:275-287.
- Vassilieva S, Guan K, Pich U, Wobus AM (2000) Establishment of SSEA-1- and *Oct-4*-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *Exp Cell Res* 258:361-73.
- Verhoeven G, Swinnen JV (1999) Indirect mechanisms and cascades of androgen action. *Mol Cell Biol* 151:205-212.
- Wiles MV, Keller G (1991) Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem(ES) cells in culture. *Development* 111:259-267.
- Yamane T, Hayashi H, Mizoguchi M, Yamazaki H, Kunisada T (1999) Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture. *Dev Dyn* 216:450-458.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S (2000) Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408:92-96.
- Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL (1999) *Reproductive Endocrinology; Physiology, pathophysiology, and clinical management.* 4th ed., WB Saunders Co.