

in-situ hybridization(FISH)방법으로 분석하였다. 123례의 ICSI program에서 채취된 총 1561개의 난자중 1235개에서 ICSI를 시행하여 963개에서 전핵을 관찰하였으며, 1PN은 52개(5.4%), 2PN이 892개(92.6%), 3PN이 19개(2.0%)로 나타났다. 정자의 상태에 따른 1PN의 형성률은 OATS군에서 3.2%(5/155), SOATS군에서 4.4%(13/296)로 정상군의 1.9%(3/155)에 비해 높은 경향을 보였으며, MESA군에서 8.7%(4/46)와 TESE군에서 8.7%(27/310)로 정상군에 비해 높았다. 정상난자에서 1PN의 형성률은 6.3%(31/490)으로 비정상난자의 4.4%(21/473)와 차이가 없었다. 또한 배양된 28개의 1PN 배아로부터 32개의 할구를 분리하여 FISH방법으로 핵상을 분석하였다. 핵이 관찰된 28개의 할구중 23개에서 FISH signal이 나타났고, 12번 염색체의 probe를 이용한 FISH 결과 10개의 할구에서 haploid(43.5%)가 관찰되었으며, 9개에서 diploid(39.1%), 4개에서 polyploid(17.4%)가 관찰되었다. Y 염색체의 probe를 이용한 FISH 결과 2개(8.7%)의 할구에서 FISH signal이 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 ICSI에 의한 수정과정에서 나타나는 대부분의 1PN은 난자의 단위생식적 활성화에 의해 형성되며, 그 원인은 정자의 기능장애에 의한 전핵형성 실패로 사료된다.

P-22

배양된 사람 과립-황체화 세포의 Apoptosis와 FSH에 의한 억제 효과

피엘 산부인과, 한양대학교 생물학과¹

양현원, 최규완, 이승재, 박종민, 윤용달¹

일반적으로 FSH는 뇌하수체에서 분비되어 난소내 과립 세포에 작용하는 단백질 호르몬으로써 난포 성장에 필요한 여러 호르몬과 성장 인자의 생성을 자극하며, 또한 LH 수용체 합성을 자극하여 난자의 성숙을 유도한다. 한편 FSH는 생존 인자로서 이를 제거하면 난포의 폐쇄(atresia) 현상이 일어나고, 다시 체내로 FSH를 투여하면 이러한 난포 폐쇄 현상이 억제되는 것으로 보고하고 있다. 이러한 난포의 폐쇄 현상은 과립 세포의 apoptosis

와 관련이 있으며, 여러 물질에 의한 과립 세포의 apoptosis는 FSH에 의해 억제되는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 실험은 사람의 과립-황체화 세포를 이용하여 배양하면서 자발적으로 일어나는 과립-황체화 세포의 apoptosis를 확인하고 FSH를 처리하여 apoptosis 억제 효과를 알아보았다.

난자 채취시 얻은 과립-황체화 세포를 40% percoll을 처리하여 혈구 세포를 제거한 후 10% FBS를 포함한 dMEM에서 배양하였다. 배양하면서 FSH를 농도별 시간별로 처리하면서 apoptosis 억제 효과를 조사하였다. 배양된 과립-황체화 세포는 in situ apoptosis detection kits(ApopTag, Oncor)을 이용하여 apoptosis 정도를 조사하였고, 또한 과립-황체화 세포에서 DNA를 추출한 후 전기영동을 시행하여 DNA 'laddering'을 확인하였다.

배양된 과립-황체화 세포에서 apoptosis를 확인한 결과 배양 후 3 일째 전체 살아있는 세포의 20 - 30%가 apoptosis를 보였으며, FSH를 처리한 군에서는 1% 이하로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 FSH를 처리하면서 7 일을 배양한 결과 생존율이 85%로 FSH를 처리하지 않은 군(56%)에 비해 유의하게 증가된 것으로 알 수 있었다. 자발적으로 apoptosis가 일어난 군에서 전기영동으로 DNA 'laddering'을 확인할 수 있었으며, 전자현미경하에서 'apoptotic body'를 가진 세포들을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 배양된 사람의 과립-황체화 세포에서 일반 세포와 같은 자발적인 apoptosis를 확인할 수 있었으며, 또한 이러한 apoptosis는 FSH에 의해 억제된다는 것을 확인할 수 있었다.

P-23

생쥐 초기 배아의 Oxygen Free Radicals 농도 및 Superoxide

Dismutase가 배아 발달에 미치는 영향

아주대학 산부인과, 피엘 산부인과¹

박지영, 홍순정, 황경주, 양현원¹, 최규완¹, 권혁찬, 오기석

일반적으로 생쥐 초기 배아를 체외에서 배양할

경우 포배기로 발달하지 못하고 대부분 2 세포기에서 발생이 정지된다. 이러한 현상을 일으키는 원인중의 하나로 oxygen free radicals의 증가가 관련있는 것으로 알려지고 있다. 이러한 배아내 상승된 oxygen free radicals가 세포막, 단백질, 핵산과 같은 biological system에 상해를 주어 배아 발달에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 최근 연구에서는 세포내 oxygen free radicals 증가는 DNA fragmentation을 일으키는 것으로 밝혀져 있다.

본 연구에서는 전핵과 2세포기 시기에 획득된 배아를 체외에서 배양하여 발달 시기에 따른 oxygen free radicals level을 측정하였고, 포배기까지의 발달률을 조사하고 포배내 할구수를 계산하였다. 또한 전핵과 2세포기 시기에 획득된 배아를 free radical scavenger의 하나인 superoxide dismutase (SOD)를 배양액에 첨가하여 각 발달 시기별로 free radicals level 및 발달율과 포배내 할구수를 측정하여 SOD가 배아 발달에 미치는 영향을 알아 보았다. oxygen free radical 측정은 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCDHF-DA)를 이용하여 440nm의 "excitation"과 510nm의 "emission"하에서 Quanti-cell 500(Applied imaging Co.UK)으로 단일 배아 세포내에서 발생하는 oxygen free radical level을 정량적으로 측정하였다. 또한 포배기의 배아에서 omnibind nuclear and terminal transferase mediated DNA end labelling(TUNEL) method를 이용하여 할구의 DNA fragmentation의 여부를 in situ detection함으로써 초기 배아내 증가된 oxygen free radicals와 apoptosis와의 연관성을 알아보았다.

P-24

Expression of c-kit in the Ovary and Testis of Fetal and Adult Human and Subhuman Primates

충북의대 산부인과, University of California,
San Francisco

김학순, Collin B. Smikle, Robert B. Jaffe

Gametogenesis in the mature ovary and testis is regulated primarily by follicle stimulating hormone secreted by the anterior pituitary. Gonadotropin-regulated autocrine and paracrine factors may mediate communication between the various cell types within the microenvironment of the gonads, and these coordinated events may influence follicular development, egg maturation and cyclic release of ova from selected follicles during each menstrual cycle in the ovary and spermatogenesis in the testis. Recently, stem cell factor(SCF) and its receptor, c-kit, have been proposed as critical elements not only in gametogenesis, but also in the migration of germ cells from the hindgut to the gonadal ridge in embryonic development. Although the ontogeny of c-kit has been studied in the reproductive tract of the rodent, it has not been studied in the human and subhuman primates. Therefore, we examined the ontogeny of c-kit in the testis and ovary of the human and subhuman primate.

We determined the localization of c-kit in the testes of 4 human fetuses(15-22 weeks' gestation) and 7 adults(35-82 years old), and in the ovaries of 6 human(13-23 weeks' gestation) and 2 rhesus monkey(90-165 days; model for late gestation human fetus) fetuses and 5 adult human(35-62 years old) and 1 adult rhesus monkey by immunocytochemistry using a highly specific polyclonal antibody to peptides 145-158 of the extracellular portion of the c-kit molecule. In the testes, c-kit was expressed by the spermatogonia in the fetus and by the spermatids and spermatozoa in adults. The level of c-kit expression did not appear to change in the different age groups studied. In the ovaries, staining for c-kit was limited to the oogonia and oocytes in human and rhesus monkey. Furthermore, during fetal life, there was abundant staining for c-kit in the oocytes which diminished after birth and was seen only rarely in the ovaries of postmenopausal women. This decline in staining mirrors the age-related decline in the number of oocytes that occurs with aging. Interestingly, c-kit staining in