

human spermatogenesis. RT-PCR method was used to detect DAZ, HSP70A, and HSP70B transcripts in all RNA samples. Total RNA was extracted from 22 testis tissues using TRIZOL reagent. cDNAs were synthesized with reverse transcriptase, AMV. All PCR reaction were performed on a PCR thermocycler with DAZ, HSP70A, and HSP70B-specific primers. PCR products were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed. Semen analysis, karyotyping and testis histology were performed. DAZ gene, known as a candidate gene of azoospermia factor (AZF), was deleted in 3 of 21 patients (16%). To evaluate the only effects of HSPs in this patients, 3 DAZ deleted cases were removed. HSP70A gene was detected in all patients tested. But HSP70B gene was not detected in 11/18 (61%) without DAZ deletion. In 13 non-obstructive azoospermia patients, 4 of 7 Sertoli cell only, 3 of 5 hypospermatogenesis, 1 of 1 maturation arrest patients have no HSP70B transcript. Of those patients, 8 patient were identified various types of sperm such as immature sperm and mature sperm. Whereas HSP70B gene didn't express in 4 of 5 obstructive azoospermia, who have mature spermatozoa in testicular biopsies. This results may be indicated that expression of HSP70B is related with spermatogenesis, especially, and sperm maturation process. In conclusion, HSP70B as well as DAZ gene seem to be involved causing spermatogenic failure. We suggest that HSP70B plays an important role in spermatogenesis and one of factors induced sperm maturation in human. Therefore, we think that HSP70B may be a maturation arrest factor in human spermatogenesis.

12 무정자증 환자에서 YRRM 과 Y-specific STS (Sequence-tagged sites)의 유전자 분석

포천중문의대 차병원 여성의학연구소 비뇨기과, 산부인과, 유전학 연구실

이숙환 · 김현주 · 한정희 · 조성원 · 엄기봉 · 고정재
곽인평 · 한세열 · 윤태기 · 차광열

원인 불명의 Azoospermia로 인한 남성불임의 빈도는 10% 정도로 결코 낮지 않은 비율을 차지하고 있다. 1976년 Azoospermia 환자에서 Y-염색체 submicroscopic deletion 이 밝혀진 이래 여러 연구에 의해 Y-염색체내에서 spermatogenesis를 control하는 하나 또는 그 이상의 유전자 (AZF, Azoospermia factor)는 interval 6에 해당된다는 것이 알려졌다. 1993년 Ma 등은 Y 염색체 interval 6 내에는 Y-chromosome RNA recognition motif (YRRM)라는 일종의 gene family를 identify 해냈고 infertile men에서 이 YRRM sequence내에 deletion이 있음을 밝혀냈다.

이 gene family가 AZF의 candidate gene일 수 있다는 설은 아직 확인이 되지 않고 있다.

본 연구에서는 Azoospermia 환자에서 Y 염색체의 microdeletion 여부를 보기 위해 YRRM sequence 및 interval 6 에 해당되는 13개의 Y-specific STS 부위에서 PCR을 이용했다.

61명의 Azoospermia 환자에서 FSH, LH 등의 hormone analysis 및 testicular biopsy 을 시행하였다. 모두 61명의 Azoospermia 환자 중 PCR 결과 18.03% 에 해당하는 11명에서 deletion을 보였으며 이 중에는 multiple deletion을 나타낸 경우도 있었다.

이와 같이 Azoospermia 환자에서 Y-specific region의 PCR amplification은 infertile men의

screening에 신속하고 sensitive한 test인 것으로 사료된다.

13 인간정액의 동결보존시 동결보존액의 종류와 동결방법이 해동후 정자의 운동성에 미치는 영향에 관한 연구

차병원 여성의학 연구소¹, 포천 중문의과대학교²

전윤정¹ · 엄기봉^{1,2} · 이경림¹ · 남윤성^{1,2} · 김시영^{1,2} · 고정재^{1,2} · 윤태기^{1,2} · 차광열^{1,2}

인간정자의 동결보존은 시간적, 공간적 제약을 극복하여 필요한 시기에 인공수정이나 체외수정을 시킬 수 있는 장점을 가지고 있으며, 또한 피임이나 치료 등의 목적으로 정관 결찰술이나 방사선치료 및 화학치료를 받게되는 남성환자의 정액을 시술이나 치료 전에 미리 동결보존함으로써 필요한 시기에 임신할 수 있게 하는 유용한 방법이다. 그러나 정자를 동결, 해동하는 과정에 있어 가장 큰 문제점은 운동성의 저하로서, 동결 전의 정자운동성과 비교하여 30~70%가 감소된다고 보고되고 있으며 운동성 소실의 정도는 동결보존액의 조성, 동결방법이나 해동방법의 선택에 따라 차이가 날 수 있다.

본 연구에서는 보다 효율적인 동결보존법을 수립하기 위하여 현재 사용되는 동결보존액과 동결방법을 정자의 운동성 측면에서 비교해 보았다. 즉, 세 종류의 조성이 다른 동결보존액인 TEST-Yolk buffer (TYB), dithiothreitol을 첨가한 TEST-Yolk buffer (TYB+DTT), KSII buffer 등이 동결보존 전후에 있어 운동성에 미치는 영향을 조사하였으며, 또한 vapor freezing방법과 automatic freezer를 사용한 동결방법이 정자 운동성에 미치는 영향을 알아보았다. 정자의 분석은 현미경적 방법과 두 종류의 컴퓨터 정자 자동측정기인 SAIS (Medical Supply Co., Korea)와 Hamilton-thorn (Hamilton Thorn Research, Inc., USA)을 사용하여 동결 전, 후의 정자 운동성과 VCL, VSL, VAP, ALH, LIN 등의 세부운동성을 측정하였다.

동결보존액을 비교 실험한 결과 정액성상이 정상인 군에서 TYB군과 TYB+DTT군, 그리고 KSII군의 정자의 운동성은 동결전을 100%로 보았을 때, 용해후 각각 41.0%, 30.1%, 51.8%로 나타났고 동결방법의 비교실험에서는 vapor freezing군과 automatic freezing군의 경우에는 용해 후의 정자의 운동성이 각각 43.7%, 51.9%가 회복되었다. 또한 무력정자증을 보인 정액군에서는 TYB군, TYB+DTT군, KSII군에서 용해후 정자운동성이 각각 32.0%, 23.8%, 45.5%가 회복되었으며, vapor군과 automatic군의 정자운동성은 각각 39.1%, 38.5%가 회복되었다. 정자운동성의 측정에서는 현미경을 이용한 방법, 두가지의 다른 CASA 인 SAIS와 Hamilton thorn의 운동성이 거의 일치하여 두 개의 CASA의 성능은 거의 비슷한 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 운동성이 정상인 정액과 무력정자증을 보이는 정액 모두 KSII buffer를 사용해 동결하는 것이 TYB나 TYB+DTT를 사용하는 것보다 운동성 있는 정자를 회수하는데 더 큰 효과를 볼 수 있었으며, 동결방법 측면에서는 정액의 운동성이 정상일 경우에만 automatic freezer를 사용하는 것이 vapor freezing 방법으로 동결하는 것보다 운동성 있는 정자를 회수하는데 더 큰 효과를 볼 수 있었다.