

의 난자의 성숙에 미치는 정확한 작용에 대해서는 알려져있지 않으므로, 따라서 본연구는 mouse 미성숙난자의 체외배양시 EGF와 gonadotropin의 핵성숙에 미치는 효과를 알아보고 이들의 핵성숙과정시 서로의 상호작용을 알아보는데 그 목적이 있다.

TCM 199배양액에 0.4% PVP를 넣어 기본배양액을 사용하였으며 기본배양액에 EGF (1 ng/ml) 또는/그리고 FSH (1 µg/ml)를 첨가하여 핵성숙을 유도하였으며, 위의 군에 EGF-receptor specific inhibitor (Tryphostin AG1478)를 처리하여 배양한 후 핵성숙에 미치는 결과를 관찰하였다.

1. 대조군 (58.1%)에 비해 EGF (82.5%), FSH (87.8%), 그리고 EGF + FSH (96.3%)를 첨가한 군에서 핵성숙이 증가함을 나타냈다.

2. 배양액에 EGF와 EGFR-specific inhibitor를 처리했을 때 EGF의 핵성숙율은 떨어졌으나, 배양액에 FSH와 EGF처리시와 동일한 EGFR inhibitor를 처리하여 배양했을 때 inhibition의 효과는 없었다. 즉 EGFR-specific inhibitor는 EGF에 작용에 관여하지만, FSH의 작용에는 영향을 주지않는 것으로 관찰되었다.

따라서 본 실험을 통하여 EGF와 FSH는 서로 다른 경로를 통하여 난자의 성숙에 관여하는 것으로 사료된다.

P-19 여러 가지 초자화동결보존액을 이용한 제3일째 생쥐 배아의 초자화동결에 대한 연구

대학산부인과¹, 불임연구실 성신여자대학교 생물학과²

윤숙영^{1,2} · 배인하² · 손 철¹

최근 시험관 아기기술이 발달하면서, 과배란 유도로 얻어진 많은 수의 배아는 배아 이식에 필요한 적정수를 초과하고 있어 그에 따른 잉여 배아에 대한 해결책으로 동결보존방법이 활발하게 연구되고 있다. 동결보존방법의 하나인 초자화동결 (vitrification)은 기존의 automatic freezer를 이용한 완만 동결방법과는 달리 세포내 ice crystal 형성이 없으므로 해빙 후 세포의 생존 및 발달에 매우 효과적이며 그 과정이 매우 간단하고 경제적인 것으로 최근에 활발히 보고되고 있다.

본 연구에서는 지금까지 보고되어 온 여러 가지 초자화 동결보존액을 사용하면서 그 과정을 단순화하거나 보완하여 제3일째 생쥐 배아를 동결, 해빙한 후 생존율과 발생율을 조사함으로써 가장 효과적인 초자화동결 보존법을 알아보고자 하였다.

ICR계 생쥐 6-8주령 암컷을 과배란유도 후 vaginal plug가 확인된 날을 제1일로하여 제3일째 (hCG 주사 후 72~74시간)에 8세포배와 상실배를 회수하였다. 초자화 동결 보존액은 1) EFS40 (Ethylene glycol 40% (v/v), Ficoll 70 30% (W/V), sucrose 0.5M), 2) VS11 (Ethylene glycol 6.0M, glycerol 1.8M), 3) VS3a (glycerol 6.5M, BSA 6% (w/v)를 10% FBS가 함유된 dPBS로 사용 직전에 제조하였다. 동결 방법은 각 동결액에 10~15개의 배아를 넣고 다시 0.25 ml straw에 넣어 2분간 상온에서 평형시킨 후 액체 질소 (LN₂)에 넣었다. 대조군으로는 회수 직후 그대로 배양한 군과 1.5M PrOH와 0.1M sucrose를 이용한 완만 동결한 군으로 하였다. 동결된 배아를 이틀 후에 0.5M sucrose로 5분간 해빙하여 충분한 세척을 거친 후, 2일 동안 배양하고 포배강이 형성된 포배기와 부화중이거나 부화가 완전히 끝난 배아 수를 조사하였다. 또 각 동결보존액의 독성을 조사하기 위해 배아를 각 동결보존액에

3분간 상온에서 방치한 후 0.5M sucrose로 5분간 처리하여 세척하여 배양하였다.

실험 결과는 다음과 같다.

각 초자화동결보존액의 독성을 조사한 결과 생존율은 EFS40, VS11, VS3a에서 각각 95.6% (43/45), 90.9% (40/44), 84.4% (38/45)로 EFS40에서 유의하게 높은 생존율을 보였다. 3분간 각 용액으로 처리한 후 배양한 결과 대조군은 69개중 포배율 43.0%이고 부화율 50.7%이며 EFS 40은 전체 43개중 포배율이 16.3%, 부화율이 81.4%이었다. 또 VS11은 40개중 포배율이 37.5%, 부화율이 62.5%이고 VS3a 38개중 포배율이 47.4%, 부화율이 50.0%로 전체적인 발생율은 세 처리군 모두 비슷하지만 EFS40 군에서 높은 부화율을 보였다.

각 초자화동결보존액으로 동결후 해빙한 후의 생존율은 다음과 같다. 대조군으로 실행한 완만동결군은 96.8% (60/63), EFS40처리군은 94.1% (64/68), VS11처리군은 85.5% (65/72), 그리고 VS3a처리군은 80.0% (63/78)로 VS11처리군과 VS3a처리군이 대조군에 비해 낮은 생존율을 보여 주었다. 각 처리군의 해빙 후 발생율은 각각 포배율이 대조군(무처리군)이 35.2% (25/71), 완만동결처리군이 33.4% (20/60), EFS40처리군이 23.4% (15/64), VS11처리군이 24.6% (16/65), 끝으로 VS3a처리군은 36.5% (23/63)이었다. 또 부화율은 대조군(무처리군)이 53.5% (38/71), 완만동결처리군이 58.4% (35/60), EFS40처리군이 70.3% (45/64), VS11처리군이 63.1% (41/65), 끝으로 VS3a처리군은 36.5% (23/63)이었다. 즉 동결, 해빙 후의 발생율은 EFS40과 VS11이 오히려 대조군보다 매우 높은 부화율을 보여주었으나 VS3a는 퇴화율(23.8%, 15/63)이 높게 나타났다.

이상의 실험결과를 통해 볼 때 생쥐 제3일째 배아의 초자화동결보존은 EFS40이 다른 VS11과 VS3a 보다 적절하며 완만동결보다 높은 부화율을 보이고 있어 EFS40의 이용이 효과적인 것으로 사료된다.

P-20 Expression of Epidermal Growth Factor-Receptor (EGF-R) on the Human Embryos Developed from IVF Multi-Pronucleated zygotes and Inner cell mass Cells (ICMs)

**Eun Young Kim, Myo Kyung Kim, Bong Kyung Yi, Hyeon Sook Lee,
San Hyun Yoon*, Sepill Park, Kil Saeng Chung** and Jin Ho Lim***

*Maria Infertility Medical Institute (마리아기초의학연구소), *Maria OB/GYN, Seoul*

***College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University*

The objective of this study was to examine whether EGF-R is expressed on human embryos developed from multi-pronucleated (MPN; $\geq 3PN$) zygotes using indirect immunofluorescence (IIF). Human MPN zygotes were obtained from patients undergoing *in vitro* fertilization. For embryo development, MPN zygotes were co-cultured with human cumulus cells from day 1, which is assessed to MPN zygote, to day 5. The results in these experiments were summarized as follows; When expression of EGF-R was examined by IIF, it presented almost similar pattern from the 2-cell to blastocyst stage. Especially, to detect of EGF-R on human ICMs, surplus blastocysts were used for immunosurgery. After immunosurgery, the viability of the recovered ICMs was confirmed by live (calcein; green) and dead (ethidium homodimer; red) staining method. In addition, the EGF-R was also detected on isolated ICMs by IIF. Therefore, these results de-