

the periovulatory period. In the present study, gonadotropin and GnRH regulation of PACAP gene expression were examined in PMSG/hCG-treated immature rat ovaries and cultured preovulatory follicles. The major cell types expressing PACAP mRNA were granulosa cells of preovulatory follicles and some theca/interstitial cells. In preovulatory follicles cultured in serum-free medium, PACAP transcripts were transiently induced by LH, reaching a maximum 6~9 h after stimulation. Treatment of preovulatory follicles with LH stimulated GnRH receptor gene expression within 3 h. Interestingly, cotreatment with GnRH antagonist suppressed the LH-stimulated PACAP gene expression in a dose-dependent manner, suggesting that GnRH mediates the LH action on induction of PACAP gene expression in preovulatory follicles. Furthermore, treatment of preovulatory follicles with GnRH agonist also stimulated PACAP gene expression in a time- and dose-dependent manner. This GnRH-induced PACAP gene expression was inhibited by an inhibitor of PLA2, but not by an inhibitor of adenylate cyclase, or an inhibitor of protein kinase C, implying the role of PLA2 activation in GnRH-stimulated PACAP gene expression. Addition of PACAP-38 or -27 antagonist in culture of preovulatory follicles inhibited GnRH-stimulated progesterone production at 6~9 h, suggesting the role of endogenously produced PACAP in GnRH-stimulated progesterone production. Lastly, GnRH could also stimulate the PACAP promoter activity. Taken together, the present study demonstrates that GnRH plays a role in regulating PACAP gene expression and thus may act as a local regulator during periovulatory period.

O-7 Vero Cell과 Cumulus Cell을 이용한 공동배양 체계에서 IL-1 β 와 IL-6의 분비 및 Mouse 배아의 발생에 관한 연구

마리아산부인과, *마리아기초의학연구소, **서울대학교 동물자원과학과

윤혜균 · 이준범 · 윤산현 · 박세필* · 임경순** · 임진호

인간의 난자를 체외에서 포배기 배아로 발생시키는데 있어서 defined culture system을 도입하려는 많은 연구가 있음에도 불구하고, 각종 체세포를 이용한 공동배양 체계에서 높은 발생율을 보이고 있다. 공동배양 체계에서는 배아의 발생과 착상에 영향을 미치는 여러 성장인자들과 cytokine들이 분비되는 것으로 알려져 있다.

본 연구의 목적은 vero cell이나 cumulus cell을 배양하였을 때, 분비되는 interleukine-1 β (IL-1 β)와 interleukine-6 (IL-6)를 분석하고, 이들이 mouse 배아의 체외발생에 어떠한 영향이 있는지를 조사한 것이다.

기본 배양액으로 20% 인간난포액이 첨가된 YS 배양액을 사용하였으며, IL-1 β 와 IL-6는 vero cell이나 cumulus cell을 각각 혹은 혼합 배양한 24시간 후에 ELISA와 western blotting에 의해 분석하였다. mouse는 C₅₇BL과 CBA의 F1 (국제실험동물)을 공시하였다. 본 실험에 사용한 배아는 과배란과 체외수정을 통하여 확보하였으며, 96시간 및 120시간 동안 배양하면서 feeder layer와 배아발생과의 관계를 조사하였다.

cumulus cell을 배양하였을 때 IL-1 β 는 187.4 pg/ml가 분비되었으나 IL-6는 2 pg/ml 수준에서 검출되지 않았다. 이와는 반대로 vero cell에서는 IL-1 β 는 검출되지 않은 반면, IL-6는 2,200 pg/ml이 분비되었다. 또한 cumulus cell과 vero cell을 혼합배양하였을 때, IL-1 β 는 198.1 pg/ml

이 분비되었고 IL-6는 6,160 pg/ml이 분비되므로써 혼합배양이 IL-6의 분비에 상승효과가 있는 것으로 나타났다. 한편 같은 조건에서 생쥐배아를 배양한 결과는 다음표와 같다.

The development rates of IVF-mouse embryos cultured on various feeder layers

Feeder layer	No. of embryos	% of blastocyst	
		Blastocyst	Hatching
Control	139	68.3 ^a	46.0 ^a
Cumulus	123	80.5 ^b	56.9 ^a
Vero	112	72.3 ^{ab}	58.0 ^a
Cumulus + Vero	120	84.1 ^{b,c}	72.5 ^b

^{a,b,c}: p<0.05

feeder cells의 종류에 따라서 분비되는 cytokine들의 종류가 각각 다르게 나타났으며, mouse 배아의 발생률도 차이가 있는 것으로 나타났다 (p<0.05).

이상의 결과로 미루어 보아 feeder layer의 종류에 따라 배아의 발생 및 착상에 영향을 미치는 각기 다른 growth factor/cytokine들이 분비될 가능성이 있으므로 배아의 체외발생을 유도하는 데는 발생시기에 맞는 feeder layer를 선발하여 분리 이용함이 바람직하다고 사료된다.

O-8 상용화 연속 배양액 (B3-B5)의 배아 발생에 미치는 영향 (I): 생쥐 배아를 이용한 기초 결과

바이오메드연구소¹, 경기대학교 자연과학대학 생물학과²,
아주대학교 자연과학대학 생명과학과³, 아주대학교 의과대학 산부인과⁴,
아주대학교 분자과학기술학과⁵

최규완^{1,4} · 손인표^{1,2} · 안학준³ · 민철기³ · 계명진² · 권혁진^{4,5}

체외에서의 배아 발생은 배양환경의 산소압 혹은 배양액내의 성분 등에 지대한 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 체외수정 및 이식술에서 배양 환경을 개선하고자 배양액의 성분 변화, 산소압이 낮은 배양기, 공배양 등의 끊임없는 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 체내와 유사한 조성의 배양액을 응용하고자 sequential medium을 개발 사용하고 있다. 본 연구는 체외수정 및 이식술에 적용하고자 개발된 B3-B5가 배발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생쥐의 배아 배양 결과를 외산 상용 배양액들과 비교 분석하였다. 실험에 사용한 배아는 ICR계 생쥐로부터 얻은 전핵시기의 배아 (hCG 주사 후 24시간)를 사용하였고, 배양액으로는 m-HTF (Quinn, 1995), B3-B5 (BMI Co. Ltd), P1-P2 (Irvine), G1-G2 (IVF Science)를 사용하였으며, micro-drop 배양방법을 사용하였다. 배양 24시간 후 2 세포기 배아만을 골라 phase 1 배양액에 배양하였고, hCG 주사 72시간에 phase 2 배양액에 옮겨 배양했으나, m-HTF는 다른 drop으로만 옮겨 배양하였다. 배양 중 hCG 주사 후 매 24시간마다 배아 발달을 관찰하였고, 포배 배아의 세포수를 계수하기 위하여 hCG 주사 120시간에 Carnoy's 고정