

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

액으로 고정된 후 acridine orange로 염색하여 형광현미경하에서 세포수를 계수하였다. 난자 세포질내 ROS를 측정하기 위하여 2 세포기 (post-hCG 48시간)의 배아에 DCHFDA를 침투시킨 후 Confocal microscope를 이용하여 발현 강도를 측정하였다.

실험 결과, 배아의 발생은 hCG 주사 후 96시간부터 다른 군에 비해 발생이 빨랐으며, 120시간에 포배기 이상 발생된 배아와 144시간에 탈각이 진행 혹은 완료된 배아는 B3-B5 (81.3%, 75.0%)가 P1-P2 (52.1%, 47.9%), G1-G2 (51.2%, 44.0%)에 비해 유의하게 많이 관찰되었다 ($p < 0.01$). 120시간의 포배 배아의 세포수는 B3-B5가 모든 실험군에 비해 유의하게 1.5배 가량 증가하였다 (B3-B5: 120.4 ± 13.1 , mHTF: 84.1 ± 7.8 , P1-P2: 77.4 ± 14.2 , G1-G2: 83.0 ± 14.3). 2 세포기에서의 ROS의 양은 B3에서 배양된 배아에서 가장 낮았고, 특히 m-HTF와 P1에서의 배아에 비해 유의하게 낮은 강도를 보였다.

이상의 결과에서 배양액내의 조성은 배아의 발달에 영향을 미치는 중요한 요인이며, 초기 배아의 세포질내 ROS 양과 배아의 발생은 음의 관계가 있을 것으로 추측되며, 항산화제 및 아미노산과 성장요인들의 복합제제를 성분으로 하는 B3-B5 배양액은 배아 발달에 유용하며, 사람의 체외수정 및 이식술에 유용한 배양액이 될 것으로 사료된다.

O-9 체외배양된 생쥐 Preantral Follicle내 난자의 성장, 성숙 및 수정후 배발달과 체내에서 성장된 난자와 발생능력의 비교

을지병원 의과연구소¹, 을지의대 산부인과², 생리학교실³, 건국대학교 축산학과⁴
김동훈¹ · 강희규¹ · 한성원¹ · 김묘경¹ · 박원일² · 이호준^{1,3} · 이훈택⁴ · 정길생⁴

본 연구의 목적은 체외성장된 생쥐 preantral follicle내 난자의 체외성숙, 수정 및 배발달을 조사하고, 또한 체내에서 성장, 성숙된 난자와 발생능력의 차이를 비교하는데 있었다.

난소는 12일령 ICR계통의 생쥐로부터 회수되었으며, 회수된 난소는 1 mg/ml collagenase와 0.2 mg/ml DNase I이 함유된 Leibovitz L-15 배양액에 침적한 후, 반복적인 pipetting을 통하여 preantral follicle을 분리하였다. 분리된 preantral follicle은 Transwell-COL membrane insert에서 배양을 하였으며, 배양액은 5% FBS, 100 mIU/ml FSH 그리고 10 mIU/ml LH가 첨가된 α MEM 배양액을 이용하였다. preantral follicle은 10일간 체외배양을 실시하여 체외성장을 시킨 후, 체외성숙을 유도하기 위하여 1.5 IU/ml hCG가 첨가된 배양액에서 16~18시간 배양을 실시하였다. 한편, 체내성장 및 성숙된 난자는 과배란 처리된 23일령의 생쥐로부터 회수하였다. 이러한 체내 혹은 체외성숙된 난자는 수정능획득이 유기된 정자와 수정을 실시하였으며, 수정란은 10% SSS와 amino acids가 첨가된 KSOM 배양액에서 5일간 배양을 하였다. 그리고 형태적으로 정상적인 2세포기 수정란을 위임된 대리모 (ICR)의 난관에 이식을 실시하였다.

Metaphase II까지의 성숙율은 체외성장군 (53.7%)이 체내성장군 (70.5%)보다 유의하게 낮은 결과를 나타냈으며 ($p < 0.05$), 난자직경 또한 체외성장군 (69.6 ± 2.1)이 체내성장군 (73.3 ± 3.0)이 작은 것으로 나타났다. 체외수정율에 있어서도 체외성장군 (76.5%)이 체내성장군 (90.2%)이 유의하게 낮은 결과를 보여주었고 ($p < 0.05$), 난할율 및 배반포 발달율에 있어서도 체외성장군 (58.7와 14.4%)이 체내성장군 (84.4와 56.6%)이 유의하게 낮은 결과를 보여주었다 ($p < 0.001$). 그리고 배반포의 세포수도 체외성장군 (39.0 ± 10.8)이 체내성장군 (60.5 ± 12.5)