

되면서 공배양은 사람의 체외수정시술에도 널리 이용되고 있다. 그러나 이러한 공배양의 작용에 대한 기전은 아직 명확하지 않다. 그러므로 본 연구는 공배양의 작용기전을 규명하기 위해 ICR 계통의 생쥐 1-세포기 배아를 사람의 난관상피세포와 공배양하여 공배양이 배발생에 미치는 효과를 확인한 다음, 보조세포의 배양으로부터 얻은 조건배양액 (CM)과 배아와 보조세포와의 접촉을 방지하기 위한 배양 삽입물 (cell culture insert) 이용에 따른 배발생률을 조사하였다. 또한 공배양 후 배발생의 유해물질의 하나로 알려진 superoxide anion 치의 변화를 조사하였다. 조건배양액은 준비과정에 따라 난관상피세포만을 2일 동안 배양하여 회수한 배양액을  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관 후 사용한 경우를 CM-1, 배양액으로 사용하기 바로 전에 회수한 경우를 CM-2, 난관상피세포와 배아를 함께 배양한 후 사용전에 바로 회수한 경우 CM-3, CM-2와 CM-3를 Microcon-10 (10 KDa cut-off)으로 농축시킨 후 단순배양액에 첨가하여 이용한 경우를 각각 CM-4와 CM-5로 구분하여 이용하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하였으며, 결과는 Mann-Whitney test를 이용하여  $p < 0.05$ 면 유의하다고 판정하였다. 공배양 결과 포배까지의 배발생률은 69.6%로 단순배양액에서 배양한 대조군의 2.7%보다는 현저히 높았다 ( $p < 0.05$ ). 조건배양액 가운데 CM-1에서는 2-세포기 이후로 전혀 배발생이 진행되지 않았으며, CM-2,3,4,5를 이용한 경우에는 4세포기까지의 배발생률은 30% 이상으로 대조군 (18%)에 비해 유의하게 증가하였으나 포배형성률은 대조군과 비슷하였다. 배양 삽입물을 첨가하여 배양한 경우에도 공배양의 효과가 없었으며 공배양을 실시한 배양액에서 superoxide anion의 값이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 상기 결과들은 저자들이 사용한 공배양 조건이 생쥐 초기배아의 체외배양시 cell-block 극복과 배발생을 향상시키는데 매우 효과적이며, 이러한 공배양의 이로인한 효과는 배아영양조절인자에 의해서보다는 배양액내 유해물질의 제거와 배아와 보조세포사이의 직접적인 접촉에 기인하고 있음을 시사한다.

## P-19 인간 난관상피세포의 공배양이 초기 생쥐배아의 유전자 활성화에 미치는 영향

부산대학교 의과대학 산부인과학교실

고형권 · 이규섭 · 최욱환 · 김원희

본 연구는 인간 난관상피세포를 ICR계통의 생쥐 1-세포기 배아와의 공배양에 이용하여 첫째, 공배양술이 생쥐 초기 배아의 발생에 미치는 효과를 조사하고 둘째, 공배양을 초기 배아의 유전자 활성화 시기인 1-세포기 배아 전후에 적용하여 공배양이 배아의 유전자 활성화에 미치는 역할을 이해함으로써 공배양을 인간배아의 체외배양 조건 개선에 이용하고자 수행하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 2-세포기로 발생한 경우는 공배양군에서 97.3%, 대조군에서 98.7%로서 두 방법간에 유의한 차이는 없었다 ( $p < 0.05$ ). 그렇지만 4~8 세포기로는 각각 72.0%와 20.0%, 상실배로는 각각 69.3%와 4.0%, 포배로는 각각 64.0%와 2.7%로서 4-세포기 이후의 발달율은 공배양군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높았다 ( $p < 0.05$ ).

2. 1-세포기 배아를 공배양한 후 hCG주사후 36, 44, 52, 60시간째 단순배양액으로 옮겨 공배양의 효과를 제거하였을 때 2-세포기까지의 배아발생은 4개군 모두에서 95% 이상 진행되었으나 4-세포기 이후의 배발생률은 공배양의 처리시기에 따라 유의한 차이를 보였다.

데 hCG주사후 60시간군에서 포배까지의 배발생률은 포배까지 계속 공배양을 한 군과 유의한 차이가 없는 반면 (58.3% versus 64.0%), 공배양의 효과를 hCG주사후 60시간 이전에 제거한 나머지 3개군은 포배기배아 발생률이 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ).

3. 1-세포기 배아를 단순배양액으로 배양한 후 hCG주사후 36, 44, 52, 60시간제 공배양으로 전환하였을때 2-세포기로 발생한 배아는 4개군 모두에서 95% 이상 진행되었으나 4~8 세포기로 발달한 배아는 각각 55.7%, 53.3%, 48.3%와 41.4%, 상실배로는 각각 52.9%, 46.7%, 45.0%와 37.1%, 포배로는 각각 52.9%, 46.7%, 43.3%와 37.1%로서 4-세포기 이후의 배발생률은 공배양을 초기부터 시작할수록 높았으며, hCG주사후 52시간부터 공배양 했을때 4-세포기 이후 포배까지의 배발생률은 지속적으로 공배양을 한 군에 비해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ).

본 실험의 결과 배아의 발달을 높이기 위해서는 초기부터 공배양을 시작하는 것이 좋으며, 특히 배아의 2차 핵분열이 일어나는 기간동안 공배양 환경을 지속시켜 주어야 하며 그 결과 공배양에 의한 배양조건으로 인해 초기 배아의 유전자가 활성화되어 2-cell block을 극복하여 포배이후까지의 정상적인 배발생이 이루어진다. 그러나 이러한 효과가 공배양의 보조세포로부터 분비되는 성장인자들에 의한 것인지에 대한 기전과 그 외 여러 요인들과 배아의 유전자 활성화의 상관관계에 대한 연구가 더욱 필요하리라 사료된다.

## **P-20**            공배양이 초기 배아발달에 미치는 효과에 있어 Leukemia Inhibitory Factor의 역할 규명에 관한 연구

부산대학교 산부인과, 부산대학교 불임클리닉\*

이영아 · 김미경\* · 이재익\* · 이규섭

초기배아의 발달 및 분화에 영향을 미치는 여러 인자들 중 인간의 난관에서 분비되는 LIF가 착상 전 초기배아의 발달에 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제기되었고, 체외수정시술시 사용되는 배양액상에서 LIF의 영향을 확인하기 위한 여러 연구들이 보고되고 있다. 이에 본 저자들은 인간 난관상피세포를 이용한 공배양시 LIF에 대한 항체를 첨가하여 LIF가 생쥐배아의 체외발달에 미치는 영향을 확인하고, 2-cell block이 있는 ICR계통의 생쥐 배아를 이용하여 LIF투여로 난할 억제에 극복되는 정도를 알아보기 위해 본 연구를 수행하였다.

1. 배양액 단독 (0.4% BSA가 첨가된 HTF)으로 배양한 경우보다 인간 난관상피세포를 이용한 공배양의 경우 배아의 난할정도가 의미있게 높았다 ( $p < 0.05$ ).

2. LIF에 대한 항체를 난관상피세포와의 공배양에 첨가한 경우 첨가한 항체의 농도가 높을수록 4-세포기 이후로의 난할률이 낮아지는 것을 볼 수 있었으며 ( $p < 0.05$ ), 첨가한 항체의 농도가 1 ng 이상인 경우에는 2-세포기 이후로는 난할이 관찰되지 않았다.

3. 2-세포기 정지가 일어난 ICR계통의 생쥐 배아 배양시 LIF를 첨가한 경우와 배양액 단독으로 배양한 결과를 비교하여 보았을 때 양군 모두 4-세포기까지는 난할이 일어나는 것을 볼 수 있었으나, 그 이상의 분화는 일어나지 않았고, LIF를 첨가한 군에서 분화정도가 의미있게 높았다 ( $p < 0.05$ ).

이상의 결과로 볼 때 공배양시 인간 난관상피세포에서 분비되는 LIF는 착상전 초기배아의 발달에 중요한 영향을 미치는 인자로 작용하나, 체외배양시에 재조합 LIF의 첨가만으