

은 난포의 성장과 배란 등의 과정에 중요한 역할을 할 것으로 추측되지만 대부분의 경우 그 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다. 최근 본 연구실에서는 난포액 내에 분자량 110 kDa에 달하는 새로운 형태의 MMP (GA110)가 존재하는 것을 발견한 바 있다. 본 연구에서는 이 GA110의 생리적 기능을 규명하기 위해 먼저 GA110을 분리 동정하고자 하였다.

대상 및 방법: 체외수정시술 시에 채취된 난포액을 원심분리하여 얻은 상층액을 얻어 동결보존한 후 혹은 직접 사용하였다. 또한 효소의 분리 전 먼저 난포액에 EDTA를 처리하여 GA110의 활성을 증가시킨 후 사용하였다. 난포액 내의 단백질은 DEAE Sepharose chromatography, ammonium sulfate 침전법, Sephacryl S300-HR chromatography 등의 방법으로 분리하였고 이때 효소의 존재는 zymography 방법으로 확인하였다. Sephacryl로 분리된 단백질들은 zymography로 분리하고 이로부터 GA110 band를 잘라 단백질을 추출한 후 전기 영동 및 western blotting을 실시하였다.

결 과: 난포액의 GA110은 DEAE Sepharose 크로마토그래피의 결과 0.23 M NaCl 분획에서 용출이 되었고 이를 ammonium sulfate 침전법으로 분리하였을 때에는 대부분이 50~60%에서 침전이 되었다. 활성이 나타난 분획들을 모아 이를 SDS가 첨가된 완충액을 사용하여 Sephacryl S300으로 분리한 결과 GA110은 약 155 kDa 분자량의 분획에서 용출되었다. 이 분획들을 zymography로 분리한 후 활성 band를 잘라내어 이로부터 단백질을 전기 용출하였다. Western blotting 결과 이 단백질은 MMP-2의 isoform인 것으로 확인되었다. 환원성 전기 영동 결과 이 단백질은 MMP-2와 unknown protein이 이황화결합으로 결합된 단백질인 것으로 판명되었다.

결 론: 난포액 내에는 EDTA를 처리할 경우 분자량 110 kDa에 달하는 새로운 gelatinase가 존재하는데 이 단백질은 MMP-2의 항체와 반응하는 것으로 미루어 MMP-2의 새로운 isoform인 것으로 여겨진다. 또한 이 단백질은 mercaptoethanol에 의해 분자량이 감소하는 것으로 보아 unknown protein이 MMP-2와 이황화결합으로 연결된 구조를 갖는 것으로 추정된다. 이 단백질의 기능은 앞으로 더 연구가 되어야 할 것이다.

P-9 Maintenance of Human Embryonic Stem Cells Derived from Frozen-thawed Blastocysts on Feeder-free Culture Condition

¹마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소, ²건국대학교, ³마리아 병원

김은영¹ · 이금실¹ · 박은미¹ · 조현정¹ · 민현정¹ · 박세필¹ · 정길생² · 임진호³

Objective: This study was to confirm whether the established human embryonic stem (hES) cell growth can be maintained without mouse embryonic feeder (MEF) cells.

Materials and Methods: The hES cells derived from frozen-thawed blastocysts were subcultured until 10th passage (about 2 month, 40 population doublings) on MEF feeder. And then some of these hES colonies were cultured on feeder-free condition using Matrigel-coated plates with MEF conditioned medium. Characterization of hES cells cultured on feeder or off feeder were taken by alkaline phosphatase staining, karyotyping, surface marker staining, Oct4 gene expression and telomerase activity.

Results: The hES cells cultured on feeder-free condition during subculture indicated stable proliferation rate, normal karyotype, high telomerase activity. Especially, compared with culture on feeder condition, hES cells cultured on feeder-free condition were tended to decrease spontaneous differentiation. Similar

to cells cultured on feeders, hES cells maintained under feeder-free conditions expressed Oct4, alkaline phosphatase, surface marker (SSEA-4).

Conclusions: The established hES cells derived from frozen-thawed blastocysts can be maintained on feeder-free condition without loss of human cell characterization.

P-10 체외수정된 생쥐 배아에서 배아줄기세포의 확립

서울대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 의학연구원 인구의학연구소²

박용빈² · 김희선² · 오선경^{1,2} · 천대우^{1,2} · 서창석^{1,2} · 김석현^{1,2}
최영민^{1,2} · 김정구¹ · 문신용^{1,2} · 이진용¹

목 적: 본 실험에서는 체외수정으로 얻은 생쥐 배아를 이용하여 ES 세포주를 확립하기 위한 조건을 알아보기 위한 연구의 일환으로 첫째, 내세포피 분리 방법과 발생 단계에 따른 내세포피의 획득률과 ES 세포주의 확립률을 조사하고, 둘째, 배아로부터 ES 세포 확립에 이르기까지의 형태학적 관찰과 셋째, 확립된 ES 세포의 미분화 특성을 조사하여, 향후 불임치료가 끝난 환자로부터 기증받은 잉여의 배아로부터 ES 세포를 확립하는데 필요한 기초 자료를 얻고자 한다.

대상 및 방법: 6주령 F1 hybrid (C57BL♀ x CBA♂)를 과배란 유도하여 체외수정시킨 후 수정이 확인된 2세포기 배아를 일정 시간 동안 체외배양하여 적정 발생 단계 (expanded blastocyst, hatched blastocyst)에 도달한 배반포만을 골라 투명대를 제거하고, immunosurgery 혹은 전체 배아를 배양한 후 내세포피를 분리하여 배양하였다.

분리한 내세포피를 trypsin-EDTA로 처리하여 작은 조각으로 만든 후, DMEM (high glucose, 15% FBS)를 배양액으로 사용하여, STO feeder layer로 미리 처리한 배양접시에서 배양하였다. ES-like cell clump가 형성된 균을 계속 계대배양하여 ES-like 세포주를 확립하고, ES-like 세포주로 확립되기까지의 cell clump의 모양을 위상차 현미경으로 관찰하였다. 또한, 확립된 ES-like 세포주의 특성을 알아보기 위하여 미분화된 세포의 표지자로 알려진 alkaline phosphatase의 활성을 조직화학적 방법으로 측정하고, transcription factor인 Oct-4의 발현 여부를 RT-PCR로 확인하였다.

결 과: Immunosurgery 혹은 전체 배아를 배양하여 내세포피의 분리, 배양한 결과, 두 경우 모두 내세포피가 크게 성장하였으나 immunosurgery에 의한 경우는 이틀간 배양에도 이미 원시내배엽과 외배엽으로 분화가 이루어져서, 작은 조각을 내어 다시 배양하면 ES-like cell clump가 형성되지 않고 세포의 분화가 이루어졌으나, 전체 배아를 배양하여 내세포피를 성장시킨 경우에는 내세포피의 분화가 이루어지지 않은 상태에서 성장이 일어나 이를 작은 조각을 내어 다시 배양하면 ES-like cell clump가 형성됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 이후 실험은 전체 배아를 배양하여 내세포피를 분리, 배양하였다.

발생시기에 따라서는 expanded blastocyst가 hatched blastocyst 보다 내세포피의 성장 (89% vs 59%)이 더 잘 되었으며, ES-like cell clump의 생성 (11% vs 0%)도 더 높은 것으로 나타났다. 또한 이렇게 확립된 ES-like cell에서 미분화된 pluripotent 세포의 특성인 alkaline phosphatase의 활성과 Oct-4 mRNA의 발현이 모두 양성으로 나타났다. 반면에 분화가 일어난 ES-like cell에서는 alkaline phosphatase의 활성이 나타나지 않았으며, 내배엽 유사세포 (endodermal-like cell), 신경 유사세포 (neuron-like cell), 근 유사사태세포 (muscle-like syn-citium)과 같은 다양한 형태의 세포로 분화되었음을 관찰하였다.

결 론: 본 실험의 결과, 체외수정하여 얻은 생쥐 배아로부터 ES-like 세포주를 확립하였으며, 특히