

0-16 분절화된 인간 배아에서 세포자연사와 관련된 유전자 발현에 관한 연구

서울여성병원 불임연구실¹, 을지외대 산부인과², 인하대학교 이과대학 생물학과³,
한양대학교 자연과학대학 생명과학과⁴, 성신여자대학교 자연과학대학 생물학과⁵,
서울여성병원 불임클리닉⁶

김종식^{1,3} · 김명신^{1,4} · 양현원² · 류재혁³ · 윤용달⁴ · 배인하⁵ · 정병준⁶ · 송현진⁶

목 적: 분절화된 배아는 포배기 형성 및 착상률이 떨어지며 세포자연사와 비슷한 형태적인 특징을 지닌다. 따라서 본 연구는 세포질의 분절이 세포자연사와 관련이 있는지를 밝히고 이와 관련된 유전자의 발현 양상을 조사하고자 시행하였다.

재료 및 방법: 2001년 9월부터 2002년 4월까지 서울여성병원에서 시행한 체외수정시술 중 정상적인 수정이 이루어졌지만 세포질의 분절화가 심한 배아와 다정자 침입으로 얻어진 수정란 중 세포질의 분절화가 없는 배아를 대상으로 각각 비교 실험하였다. Annexin V 염색법을 사용하여 세포자연사를 확인하였고, 형광면역염색법과 Western Blotting 방법을 사용하여 세포자연사와 관련된 단백질, Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax의 발현 양상을 관찰하였다.

결 과: 분절화된 배아와 정상 배아에서 Annexin V 염색법으로 세포자연사를 확인한 결과, 분절화된 배아에서 세포자연사를 확인하였고, 세포자연사와 관련된 단백질의 발현 양상은 형광면역염색법으로 확인한 결과 분절화가 심한 배아와 분절화가 없는 배아에서 각각 Bcl-2; 3/4, 5/5, Bax; 3/3, 3/4, Fas; 5/5, 2/4, Fas-ligand; 0/4, 0/4로 나타났다. Western Blotting 방법으로 확인한 결과에서는 Bcl-2, Bax, Fas 단백질은 발현되지만, Fas ligand는 발현되지 않았다.

결 론: 본 연구 결과 세포질의 분절화는 세포자연사와 밀접한 관계가 있는 것으로 보여진다. Fas는 두 군 모두에서 발현되기는 하지만, 분절화가 심한 배아에서 많이 나타났으며 Fas ligand는 두 군에서 나타나지 않았다. 따라서 Fas ligand가 배아 자체에서 발현되기보다 외부로부터 조절받는 것으로 생각된다. Bcl-2와 Bax는 분절화가 심한 배아와 그렇지 않은 배아에서 모두 많이 발현되었지만, 그 발현 위치가 분절화 양상에 따라 다르게 나타났다. 이는 세포자연사가 Bcl-2와 Bax의 발현 정도에 따라 조절됨을 의미하는 것으로 사료된다.

0-17 In vitro Neural Cell Differentiation Derived from Human Embryonic Stem Cells: I. Effect of Neurotrophic Factors on Neural Progenitor Cells

마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소, ¹마리아 병원

김은영 · 조현정 · 최경희 · 안소연 · 박세필 · 임진호¹

Objective: This study was to investigate the effect of neurotrophic factors on neural cell differentiation in vitro derived from human embryonic stem (hES, MB03) cells.

Materials and Methods: For neural progenitor cell formation derived from hES cells, we produced

embryo bodies (EB: for 5 days, without mitogen) from hES cells and then neurospheres (for 7~10 days, 20 ng/ml of bFGF added N2 medium) from EB. And then for the differentiation into neuronal cells, neurospheres were cultured in N2 medium (without bFGF), supplemented with brain derived neurotrophic factor (BDNF, 5 ng/ml) or platelet derived growth factor (PDGF, 20 ng/ml) for 1 or 2 weeks. Identification of neural cell differentiation was carried out by immunocytochemistry using human nestin (1:100; Chemicon), β_{III} -tubulin (1:250; Sigma), MAP-2 (1:1000; Sigma) and GFAP (1:500; DAKO). It was carried out using standard protocol.

Results: In vitro neural cell differentiation derived from hES cells, neurotrophic factor (PDGF and BDNF) treated neural progenitor cells were high expressed β_{III} -tubulin, MAP-2 and GFAP. Especially, the cells in the presence of BDNF were expressed with MAP-2 and β_{III} -tubulin.

Conclusion: These results suggest that BDNF as well as PDGF related to neural development in neurospheres derived from hES cells.

O-18 Human Embryonic Stem Cell Transplantation in Parkinson's Disease Animal Model: I. In vivo Transplantation in Intact Rat Brain

마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소, ¹서울대학교, ²마리아 병원

최경희 · 주완석¹ · 김용식¹ · 김은영 · 박세필 · 임진호²

Objective: This study was to examine whether the in vitro differentiated neural cells derived from human embryonic stem (hES, MB03) cells can be survived and expressed TH in grafted intact rat brain.

Materials and Methods: To differentiate in vitro into neural cells, embryoid bodies prepared from hES cells were cultured in b-FGF added N2 medium for three weeks. Being grafted neural cells were divided into early (10 days) and late neural cells (>20 days) according to culture duration and their cell types were determined by indirect immunocytochemistry. For transplantation, neural cells (1×10^7 cells/ml) in both groups were grafted to the striatum of intact rats. Based on this data, as a preliminary test, early neural cells were grafted to the striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesioned (parkinson's disease; PD) rats. After 2 weeks, we confirmed the survival, neural pattern and TH expression of grafted hES cells in intact rats or PD rats by immunohistochemical analysis.

Results: When the survival of grafted hES cells was examined, the early neural cell group indicated higher NeuN+, MAP2+, tubulin- β_{III} + and GFAP+ than late neural cell group in grafted sites of intact rats. This result demonstrated that the differentiation of grafted hES cells be increased simultaneously in both of neuronal and glial cell type. Early neural cell grafted intact rats expressed TH. Also, we confirmed that the early neural cells grafted in PD rats expressed TH although the analysis term of grafted hES cells is too short.

Conclusion: This result suggested that in vitro differentiated early neural cells derived from hES (MB03) cells can be survived and expressed TH in intact and PD rats.