

P-12 The Role of Wee1 Kinase in Primordial-Primary Follicle Transition

Park CE(박창은), Yoon SJ, Ko JJ, Lee SH, Cha KY, Lee KA

Infertility Medical Center, CHA General Hospital, College of Medicine, Pochon CHA University

Objectives: Despite of importance of the primordial follicle recruitment in female reproduction, factors and mechanisms for this process are poorly understood. By using subtractive hybridization method, we identified list of differentially expressed genes in the primordial follicles, including wee1 kinase. Wee1 kinase phosphorylates and inhibits cdc2 and creates an interphase of the cell cycle. Objectives of the present study were to evaluate expression of wee1 transcript and protein, and to elucidate and role of wee1 kinase in the follicular transition from primordial (PMF) to primary (PRIF).

Materials and Methods: To confirm the differential expression of wee1 transcript, each stage follicles were collected by using laser capture microdissection and analyzed by RT-PCR. Immunohistochemistry and Western blot was used for evaluating localize the wee1 protein expression. To determine the role of wee1 in early follicular growth, neonatal ovaries were cultured with increasing doses of wee1 antibody (0, 1, 10, 100 ng/ml). Number of growing follicles, oocyte diameter, FSHR expression and amount of phosphorylated cdc2 were measured at 4 day and 8 day of culture.

Results: We confirmed the higher wee1 mRNA and protein expression in the PMF than PRIF. Wee1 protein expression was oocyte-specific. We found more growing follicles in the ovaries cultured with 10 and 100 ng/ml wee1 antibody than in control ovaries. We observed increase in FSH receptor expression but decrease in phosphorylated cdc2 concurrent to the follicular growth.

Conclusions: Results from the present study strongly suggest that the presence of wee1, a universal mitotic inhibitor, in oocytes of the early stage follicles may play a role in the arrest of meiotic cell cycle of primary oocytes at the PMF stage as well as in the arrest of PMF growth.

This work was supported by a grant (NO. 2000-2-20500-001-2) of the Korea Science Engineering Foundation.

P-13 세포내 Ca^{2+} 고갈에 의한 생쥐 난자막의 Ca^{2+} -channel의 존재에 대한 연구

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

정 주 연 · 배 인 하

서 론: 다양한 세포에서 세포내 Ca^{2+} 저장고가 고갈되면 세포내 Ca^{2+} 농도의 변화가 일어났다. Ca^{2+} 저장고의 고갈은 세포막의 Ca^{2+} 투과성을 조절하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 조절한다. 근육세포 및 백혈구에서 Ca^{2+} 저장고가 고갈되면 세포내 기관으로부터 세포질로 Ca^{2+} influx factor (CIF)를 분비하게 되며,

CIF가 세포막을 자극하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 생쥐의 미성숙 난자 (germinal vesicle, GV)에서 세포내 Ca^{2+} 저장고를 고갈시켰을 때, Ca^{2+} 농도의 변화를 알아보고자 한다. 이때 Ca^{2+} 저장고의 고갈이 난자 성숙에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 또한 세포내 Ca^{2+} 농도의 변화가 Ca^{2+} -channel을 통해 일어나는지 알아보기 위하여 Ca^{2+} -channel blocker를 처리하였다.

재료 및 방법: 생후 3주된 생쥐 암컷에 5IU PMSG를 주사하여 여포 성숙을 유도하였다. 45시간 후 난소를 적출하여 난포를 터뜨려 난자를 얻었다. 세포내 Ca^{2+} 저장고를 고갈시키기 위해 20 μ M thapsigargin (TG)을 처리하였다. 세포내 free Ca^{2+} 농도를 측정하기 위해 공초점현미경과 fluo 3-AM을 사용하였다. Ca^{2+} 이 포함된 배양액과 Ca^{2+} 이 없는 배양액에 1시간 동안 TG를 처리한 후 배양하여 난자 성숙 (polar body formation, PB)을 관찰하였다. Ca^{2+} -channel blocker는 ω -conotoxin GVIA, ω -conotoxin MVIIC, nifedipine을 처리하였다.

결 과: Ca^{2+} 이 없는 배양액에 TG을 처리하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 측정하였을 때, 세포밖에 Ca^{2+} 이 존재하지 않아도 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하였다. 또한 1시간 동안 TG을 처리한 난자를 Ca^{2+} 이 없는 배양액에서 Ca^{2+} 농도를 측정할 경우, Ca^{2+} 을 처리하면 Ca^{2+} -transient가 나타났다. 반면, TG을 처리하지 않은 난자에 Ca^{2+} 을 처리하면 Ca^{2+} -oscillation이 나타나는 것으로 보아 생쥐 난자에서 Ca^{2+} -channel의 존재가 증명되고 있다. 또한 TG을 1시간 동안 처리하여 생쥐 난자 성숙을 살펴보았을 때 대조군에 비해 처리군의 난자 성숙이 유의하게 낮았다 ($p < 0.005$). 그리고 Ca^{2+} -channel blocker를 처리한 난자는 blocker를 처리하지 않은 난자에 비해 Ca^{2+} 농도 증가가 유의하게 낮음을 관찰할 수 있었다.

결 론: 이상의 결과로 미루어 보아 생쥐 난자의 체외 성숙 과정에서 세포내 Ca^{2+} 저장고의 Ca^{2+} 이 고갈되면 세포막의 Ca^{2+} -channel이 열림을 증명하였다. 또한 TG가 난자 성숙을 저해시킴을 관찰하였다.

P-14 질이 낮은 인간 수정란에서 보조부화술 (Assisted Hatching, AH)의 효과

인천마리아의원, *서울마리아병원

조경아 · 허용수 · 손원영* · 윤산현* · 김규현 · 임진호*

목 적: 체외에서 배양된 수정란의 투명대 경화현상은 일반적으로 임신률을 개선하는데 저해요소로 인식되고 있다. 본 연구는 부위에 따라 실시한 산성 Tyrode solution을 이용한 AH이 착상률과 임신률에 어떠한 영향을 주는 지를 알아 보고자 실시하였다.

대상 및 방법: 본 연구는 2001년 6월부터 2002년 6월까지 실시하였다. 수정란은 10% 인간난포액을 첨가한 YS배양액에서 약 48시간 동안 자가난구세포와 공배양하였다. 난자채취 2일째에 수정란을 관찰하고 수정란을 난세포의 균일함과 편절 정도에 따라 4개 등급으로 나누었다: 난세포가 균일하고 편절이 없는 수정란을 A등급, 난세포는 균일하나 편절이 5% 이하로 관찰될 때는 B등급, 난세포가 다소 균일하지 않고, 편절도 5~15% 가량 관찰되는 경우는 D등급으로 분류하였다. 한편, A등급의 수정란만을 이식한 경우를 그룹1 (192 주기), A등급의 수정란은 없고 D등급의 수정란이 이식한 수정란의 50% 이상을 차지한 경우를 그룹2 (504 주기)로 구분하였다. 각 그룹은 무작위로 양분하여 받은 AH를 실시하였고 그 받은 AH를 실시하지 않았다 (Table 1). 특히, 그룹2의 AH를 실시한 그룹은 다시 난세포 편절