

으로 0, 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 이러한 세포들로부터 RNA를 추출하였으며, reverse transcriptase로 cDNA를 합성한 후 real-time PCR을 수행하였다. 착상관련 유전자들로는 progesterone receptor (PR), estrogen receptor- $\alpha/\beta$  (ER- $\alpha/\beta$ ), cyclooxygenase-2 (Cox-2), leukemia inhibitory factor (LIF), homeobox A10-1 and -2 (HoxA10-1 and -2)를 선정하여  $\beta$ -actin에 대한 상대정량방법으로 발현양상을 분석하였다.

**Results:** 자궁조직에서 분리, 배양한 기질세포의 모양은 다변형의 방추형이었으며, 면역세포염색에서 95% 이상의 세포들이 vimentin에 대한 양성반응을 나타내었다. 착상관련 유전자의 발현 양상에서 PR의 발현은 FSH의 종류와 농도에 따른 변화가 없었으나, ER- $\alpha$ 의 발현은 두 종류의 FSH 모두에서 처리시간이 증가함에 따라 6배 정도의 증가가 관찰되었다. 또한, 1,000 mIU/ml의 rFSH는 uFSH에 비해 5배의 ER- $\beta$  발현과 8배의 Cox-2 발현 증가를 유도하였다. LIF 유전자는 FSH를 처리하지 않은 군에 비해 두 종류의 FSH에 의해 3~4배 정도의 발현 증가가 관찰되었으며, HoxA10-1과 -2는 rFSH와 uFSH 처리에서 2배 정도 증가하였다.

**Conclusions:** 본 연구의 결과를 통해, LH 성분을 포함하고 있는 uFSH와 포함하지 않는 rFSH는 배양 중인 자궁내막 기질세포의 유전자 발현 양상에 상이한 효과를 미치는 것으로 확인되었다. 특히, rFSH는 착상관련 유전자들 중에서 ER- $\alpha/\beta$ 와 Cox-2의 발현 증가를 유도하는 것으로 관찰되었다. 이러한 차이는 기존의 uFSH에 비해 rFSH가 자궁의 착상능력에 나쁜 영향을 주지는 않음을 시사하는 것으로 생각된다. 보다 직접적인 rFSH의 영향을 분석하기 위한 자궁내막 조직의 생검 시료에 대한 분석이 필요할 것으로 사료된다.

## P-34 미세조작술을 이용한 배아 해동 시 발생하는 손상된 할구 제거의 임상적 효과

최원운 · 손지은 · 최경희 · 이동률 · 이우식 · 김태형 · 정미경  
정형민 · 곽인평 · 윤태기

차병원 여성의학 연구소, 포천중문 의과대학교

**Background & Objectives:** 최근의 불임치료 기술이 빠르게 발전해 감에 따라 냉동된 배아의 해동과 이식, 그리고 그에 따른 임상적 결과를 얻는 것은 직면 과제가 되었다. 이에 본 연구는 배아의 해동 시 발생하는 부분적으로 손상된 할구를 미세 조작술을 이용하여 제거하고 이것을 통한 임상적 결과를 알아 보고자 하였다.

**Method:** 2003년 1월에서 2004년 1월 동안에 해동 배아 이식술을 시행한 161례의 시술 중 해동 후 미세조작술로 손상된 할구를 제거한 군과 제거하지 않은 군으로 나누어 처리 후 각군의 배아를 이식하여 착상과 임신 그리고 유산의 비율을 비교해 보았다. 첫번째 군 (n=23)은 해동 후 할구의 부분 손상이 없는 배아만으로 구성하였고 나머지 부분적으로 손상된 할구를 지닌 배아를 무작위로 선택하여 다음과 같이 두 군으로 나누었다. 두 번째 군 (n=67)은 acid tyrode's를 이용하여 Assisted hatching (AH)을 시행한 군으로 하였고, 세 번째 군 (n=11)은 AH와 동시에 손상된 할구를 제거한 군으로 하였다.

**Results:** 세군 간에 임신율을 비교하였을 때, 26.1 (6/23) vs. 31.3 (21/67) vs. 35.2% (25/71) 그 차이가 없었고 착상율 또한 8.7% (8/90) vs. 7.3% (21/288) vs. 9.1% (26/287)로 차이가 없었다. 다만 유산율의 경우 세번째 군 (38.1% (8/21))이 첫번째 군 (20.0% (1/5))과 두번째 군 (17.6% (3/17))보다 조금 높게 나타났

으나 통계적으로 유의하지 않았다.

**Conclusions:** 이상의 결과로 동결된 난자의 해동 시 부분적으로 발생하는 할구의 손상된 부분을 제거한 배아의 이식은 임상적으로 유의한 효과를 보이지 않는 것으로 사료된다.

이 연구는 Interdisciplinary Research Program of the KOSEF (1999-2-205-002-5)에서 지원되었다.

## P-35 비폐색성 무정자증 환자에서 생식줄기세포의 분리와 증식에 관한 연구

이동률 · 김계성 · 양윤희 · 오화순 · 정미경 · 정형민 · 정태규  
김현주 · 조정현 · 윤태기 · 차광열

차병원여성의학연구소, 세포 유전자 치료연구소, 포천 중문의과대학교

**Background & Objectives:** 정자형성과정은 고환의 세정관내에서 생식줄기세포 (GSCs; type A spermatogonia)의 분열과 분화를 통하여 성숙된 정자를 생산하는 일련의 과정이다. 생식줄기 세포의 체외 배양을 통한 증식과 분화는 남성불임의 원인을 찾고 남성생식능력의 생물학적 기초를 제공하는데 매우 효율적인 접근방법이라고 할 수 있다. 본 연구의 목적은 비폐색성 무정자증 환자의 분리된 고환조직의 동정과 증식을 한 생식줄기세포의 배양조건을 확립하는데 있다.

**Method:** 비폐색성 무정자증 환자 (2명: maturation arrest, 7명 Sertoli cell only syndrome)의 고환조직 분리 후 2회에 걸쳐 enzyme를 처리하여 세정관을 완전히 풀어준다. 분리된 세포들은 gelatin 코팅이 된 dish에 15% fetal bovine serum, 10  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 1% non-essential amino acids, 4 ng/ml bFGF, 10  $\mu$ M forskolin, 1,500 U/ml human leukemia inhibitory factor이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 2~4주 배양하여, large multi-cellular colonies를 형성시키고 3~5회에 걸쳐 계대배양을 하였다. 이후 large multi-cellular colonies의 일부는 고정하여 alkaline phosphatase activity를 확인하고 integrin  $\beta$ 1 and  $\alpha$ 6에 대한, immunocytochemistry를 실시하였으며, oct-4, integrin  $\beta$ 1에 대한 역전사 중합효소반응을 실시하였다.

**Results:** 2~4주간 배양 후 모든 Maturation arrest (100%) 환자와 4명의 sertoli cell only syndrome (36.3%) 환자에서 large multi-cellular colonies가 형성되었고 계대배양 후에도 성공적으로 증식되었다. 다른 세 명의 sertoli cell only syndrome 환자는 colony-like structures가 형성 되었지만 계대배양 후 사라졌다. 계대배양을 한 후 colonies에서 alkaline phosphatase 활성화 반응과 면역학적 표지인자인 integrin  $\beta$ 1과  $\alpha$ 6의 발현을 보였으며, Oct-4와 integrin  $\beta$ 1의 mRNA의 발현이 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

**Conclusions:** 비폐색성 무정자증 환자의 생식줄기세포는 우리의 체외배양조건 하에서 증식, 유지됨을 알 수 있다. 그러므로, 이 체외배양 조건은 germ cell 확인을 위해 유용한 방법이며, 비폐색성 무정자증 환자의 치료를 위한 가능성을 제시할 수 있으리라 생각된다.