

생길 수 있다. 이 단계에서는 spindle apparatus 형성과 같은 에너지를 요구하는 다양한 세포내 구성요소가 존재하게 되므로 이때 에너지 량의 결핍은 불균등한 segregation과 aneuploidy를 일으키게 된다. 본 연구에서는 미수정난자와 3 PN으로부터 얻은 난할단계의 배아에서 산화적 인산화반응을 조절하는 것으로 알려진 미토콘드리아 ATPase6 유전자의 발현양상에 대해 연구하였다.

Method: 미수정란 (n=20)은 수정후 48시간에 얻어진 것을 사용하였다. 3 PN (n=20)은 수정후 18~24시간 후에 얻어진 것을 24~48시간 동안 배양하여 난할단계의 배아를 얻어 사용하였다. 미수정란과 난할단계의 배아는 acid tyroid를 사용하여 투명대를 제거한 후 lysis buffer를 처리하여 실험에 사용하였다. 미토콘드리아 ATPase6 유전자의 발현은 5가지 primer를 사용하여 RT-PCR로 확인하였고 대조군으로 hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT)를 사용하였다.

Results: 미수정란과 초기 난할단계에서의 배아를 이용하여 미토콘드리아 ATPase6 유전자들 가운데 MIT1, MIT2, MIT3, MIT6 및 MIT7의 상대적인 발현정도를 RT-PCR 결과로 확인하였다. 발현정도의 확인을 Imaging Densitometer로 측정한 결과 미수정란에서 보다는 난할단계의 배아에서 약 3배 이상 발현 정도의 차이를 보이는 것으로 관찰되었다.

Conclusions: 미수정란과 난할단계의 배아에서 ATPase6 유전자의 발현양을 분석한 결과, 미수정란에서의 미토콘드리아 ATPase6 유전자 발현양의 감소는 미토콘드리아 에너지 생성에 영향을 미치는 산화적 인산화 기능의 저하를 일으키는 것으로 보여진다. 그러므로 산화적 인산화 기능의 저하는 난자의 난할과 수정에 있어서, 미토콘드리아 에너지 생성에 영향을 미칠것으로 사료된다.

Acknowledgement: 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (과제고유번호: 01-PJ10-PG6-01GN13-0002)

O-13 Three Dimensional Culture of Spermatogenic Cells from Non-Obstructive Azoospermia Patients in Collagen Gel Matrix

Lee JH¹, Lee SE¹, Jung YJ¹, Lee JH¹, Choi KW¹, Hong JY², Lee YB², Lee SJ²

¹IVF Lab, MDplus LIS, ²Mirae and Heemang Infertility Clinic

Background & Objectives: About thirty percent of non-obstructive azoospermic population remain without any help. Successful in vitro differentiation of immature germ cells appears potential method for this population. Spermatogenesis is controlled by a highly complex machinery of paracrine interplay between extracellular matrix and hormonal signals among testicular cells. The objective of this study was to access the effectiveness of three-dimensional culture of spermatogenic cells in collagen gel matrix for the non-obstructive azoospermic patients.

Method: Testicular tissues were obtained from 5 patients with non-obstructive azoospermia. Collagen solution was mixed with 3x concentrated DMEM/F12, cell suspension in modified DMEM/F12, 5% Matrigel. The cells reconstructed in collagen gel matrix were cultured for up to 12 days in modified DMEM/F12 medium at 32°C with 5% CO₂ in air. Before and after culture, haploid cells were identified by immunocytochemistry and Fluorescence-activated cell sorter (FACS).

Results: From the result of histological study, four of 4 patients showed spermatocyte arrest. After 12 days of culture, collagen gel matrices were contracted upto 1~2 cm, and testicular cell complexes were formed firmly. Based on immunocytochemistry, the haploid cells appeared in a collagen gel matrix were 10~15% of cultured cells. FACS was also performed and indicated that 10~20% of the cells developed to haploid from seeding cells.

Conclusions: The novel culture system developed in this study is promoting the differentiation of spermatocytes to presumptive spermatids in vitro. Thus a three-dimensional culture system, which consisted of a collagen gel matrix plus matrigel can support in vitro differentiation of human immature male germ cells.

O-14 정자형성 과정에서 Vascular Endothelial Growth Factor 및 Endothelin-1 발현의 면역조직화학적 연구

박성우 · 박현준 · 박남철

부산대학교 의과대학 비뇨기과학교실

Background & Objectives: 특발성 남성불임에서 정자형성장애의 원인을 알아보기 위해서 고환 생검 조직에서 정세포 성숙 정도에 따른 VEGF 및 ET-1의 발현정도를 면역조직화학염색방법으로 관찰하여 조정기능에 미치는 영향을 분석하였다.

Method: 불임을 주소로 내원한 비폐색성 무정자증 환자 40례에서 채취한 고환조직과 전립선암, 외상 혹은 기타 원인으로 고환적출술 혹은 생검을 통해 병리조직학적으로 정상 정자형성을 확인한 10례의 고환조직을 실험재료로 하였다. 이들 조직을 각각 불임군과 대조군으로 분류하고 불임군은 정자형성 정도에 따라 Sertoli cell only syndrome (불임 I군), maturation arrest (불임 II군), hypospermatogenesis (불임 III군) 및 sloughing and disorganization (불임 IV군)으로 분류하였다. 불임군에서는 혈청 황체호르몬 (LH), 난포자극호르몬 (FSH), 테스토스테론 (T), 에스트라디올 (E₂) 및 프로락틴 (PRL) 등을 측정하였다. 고환내 VEGF와 ET-1의 발현 정도는 면역조직화학염색 후 무작위로 선정된 200배 확대시야 4군데에서 관찰된 염색강도의 평균으로 구하였으며, 각기 음성, 1+ (25% 미만), 2+ (25% 이상, 75% 미만) 및 3+ (75% 이상)로 표시하였다. 정세포의 직경은 무작위로 선정된 400배 확대시야 4군데에서 육안으로 측정한 값의 평균으로 구하였다. 통계는 Mann Whitney U test 및 Chi Square test를 이용하였다.

Results: VEGF의 발현은 불임군 및 대조군의 정세포에서 각각 13/40 (32.5%) 및 0/10 (0%)였지만 ($p<0.05$), 불임 I-IV군간에 유의한 차이는 없었다. ET-1의 발현은 불임군 및 대조군의 Leydig 세포에서 각각 24/40 (60%) 및 10/10 (100%)였고 ($p<0.05$), Sertoli 세포에서는 각각 15/40 (37.5%) 및 0/10 (0%)였다 ($p<0.001$). 정세포의 직경은 각 군간에 유의한 차이를 나타내지 않았다 ($p>0.05$). 불임군에서 ET-1이 정세포에서 양성일 경우 LH, FSH 및 PRL은 감소되었으며 ($p<0.001$), E₂는 증가되었다 ($p=0.01$).

Conclusions: 혈관조절인자 중 VEGF와 ET-1은 고환내 정세포, 영양세포 및 간질세포에 직간접적으로 작용하여 정자형성에 영향을 미치는 것으로 추정된다.