

발생간의 연관성을 조사하고자 실시하였다.

**Method:** 5주령의 B6/CBA F1 생쥐에게 7.5 IU의 PMSG를 주사하고, 48시간 후에 7.5 IU의 HCG를 주사하여 다배란을 유도하였다. 체내수정은 동종의 웅성생쥐와 합사하여 유도하였으며, 체외수정은 HCG를 주사한 14시간 후에 난자를 회수하여 정자를 첨가함으로써 유도되었다. 두 군에서 2-세포기 수정란을 각각 회수하여 0.4% BSA를 함유한 MTF 배양액으로 포배기까지 배양하였다. 두 군간의 세포수 차이는 포배기 배아를 PI로 염색한 후 관찰하였으며, apoptosis 빈도는 TUNEL 방법을 사용하여 형광현미경하에서 확인하였다. 또한 2-세포기와 포배기 배아에서 RT-PCR 방법을 사용하여 IGF-I과 -II의 발현양상을 조사하였다.

**Results:** 두 군간의 포배기 배아 발생율을 비교한 결과, 체내에서 수정한 군에서 98.2% (807/822), 체외에서 수정한 군에서 92.9% (695/748)로 차이가 없었다. 그러나 부화율은 체내에서 수정한 군에서 64.1% (527/822)를 나타내, 체외에서 수정한 군의 44.8% (335/748)에 비하여 높은 경향을 보였다. 포배기 배아의 총 세포수도 체내에서 수정한 군 (68.4±5.3)보다 높게 나타났다. 포배기 배아에서 총 세포수에 대한 apoptosis를 나타낸 세포 수를 비교한 결과, 체내에서 수정한 군에서 3.4%로 체외에서 수정한 군 (6.5%)보다 낮게 나타났다. IGFs의 발현은 체내에서 수정한 군의 2-세포기와 포배기 배아에서 체외에서 수정한 군의 배아들보다 높게 나타났다.

**Conclusions:** 체내에서 수정한 군이 체외에서 수정한 군에 비하여 IGF-I과 -II의 발현과 부화율이 증가하였고, apoptosis의 빈도는 낮게 나타났다. 이 결과는 IGFs의 발현을 증가시킬 수 있다면 수정란이 체외에서 배양하더라도 apoptosis의 빈도가 낮아질 것이라는 것을 제시하고 있다. 향후, 여러 성장인자들이 수정란 발생 및 apoptosis에 어떠한 영향을 끼치는지를 규명하기 위해 더 많은 성장인자들에 대한 정량적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## P-10 생쥐 난소에서의 Wig1 (Wild-type p53-induced Gene 1) 발현에 관한 연구

김경화<sup>1</sup> · 윤세진<sup>2</sup> · 박창은<sup>1,2</sup> · 이경아<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>포천중문의대 생명과학전문대학원, <sup>2</sup>차병원 여성의학연구소

**Background & Objectives:** 후기난포발달에 관한 연구가 많이 되어 있는 반면 초기난포발달 즉, 원시난포-1차난포-2차난포로의 발달에 관련된 연구는 매우 미흡한 상태이다. 본 연구진은 이전의 연구에서 각 발달단계별 초기난포를 분리하여 cDNA microarray를 이용한 분석방법으로 유전자 발현에 관한 연구를 시행하였다. 본 연구는 이들 유전자 중에서 p53에 의해 발현이 증가되면서 매우 특이한 zinc finger protein을 만들며, 과발현될 경우 세포의 성장을 저해하는 기능을 갖는 것으로 알려진 wig1에 대하여 유전자 발현 양상을 규명하고자 실시하였다.

**Method:** ICR 생쥐의 난소에서 각 발달단계별 난포 (원시난포; 200개, 1차난포; 150개, 2차난포; 70개)를 분리하고, RNA를 분리하고 증폭한 후, cDNA microarray를 실시하였다. 이렇게 얻어진 유전자 중에서 발현빈도가 높은 유전자중 하나가 wig1 이었다. Dig-labeled wig1 probe (1:100)를 제작하여 in situ hybridization을 수행하였고, 각 발달단계별 난포에서의 유전자발현 양상을 분석하였다.

**Results:** Microarray 결과 wig1은 1차난포에서 2차난포로 발달하는데 현저히 증가하는 유전자로 나

타났다. 생쥐의 난소에서 제작하여 *in situ hybridization*을 수행한 결과 *wig1*은 원시난포에서는 난자의 세포질과 핵에서 전반적으로 강하게 발현되고, 난포가 성장함에 따라 점차 난자의 핵에서만 발현되며 난포강 (antrum)을 갖는 난자에서는 세포질에서의 발현이 사라짐을 관찰하였다. 이에 반해 과립세포 (*granulosa cells*)의 경우는 2차난포에서부터 현저하게 발현함을 알 수 있었다.

**Conclusions:** p53은 세포주기의 진행/억제 및 세포사멸의 결정에 매우 중요하게 관여하는 조절자로서 난포발달에 매우 중요한 역할을 하고 있을 것으로 사료된다. 이와 같은 p53과 매우 밀접한 연관 관계를 갖는 유전자로서 *wig1*의 연구가 의미를 갖는다. 난소, 특히 난자에서의 *wig1* 발현양상에 대한 연구결과는 본 연구가 첫 보고이며, 원시난포 및 1차난포에서는 *wig1*의 발현이 난자의 세포질과 핵에서 발현하다가 난포발달에 따라 점차 핵으로만 발현이 제한되는 현상에 대한 심층분석이 수행되어야 할 것이다.

---

**Acknowledgement:** 본 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (R01-2003-000-10174-0) 지원으로 수행되었음.

## P-11 In Vitro Maturation of Mouse Oocyte from Early Preantral Follicles: Role of Retinoic Acid in the Culture Medium

Hong JY, Song SJ, Kim SK, Cheon KW, Kim JS, Byun HK

*Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, Samsung Cheil Hospital and Women's Healthcare Center, Seoul, Korea*

**Background & Objectives:** Retinol had been tested to support developmental potential in mammalian oocytes. Recent studies have shown that addition of retinoic acid, a retinol metabolite to in vitro culture of bovine oocytes promotes cytoplasmic maturation and subsequent embryonic development. The objective of this study was to evaluate the effect of RA on mouse oocyte maturation of in vitro follicle culture.

**Method:** Ovaries were obtained from 14 day-old mice aseptically. Early preantral follicles were released from the ovaries using 25 gauge needle. The culture medium consisted of  $\alpha$ -MEM enriched 5% FBS, ITS (5  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ $\mu$ l, 5 ng/ml), FSH (100 mIU/ml), with or without all-trans-retinoic acid (5 nmol/l). Each follicle was cultured in the culture droplets under oil. On day 2 of culture, 10  $\mu$ l of medium was added to each droplet and was refreshed every other day. Follicles were cultured for 10 days at 37°C, 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub> in air. Ovulation induction and oocyte maturation were induced by the addition of HCG (1.5 IU/ml) with EGF (5 ng/ml) on day 10. The status of cumulus-oocyte complex was observed 14~16 h later. The nuclear maturation of the oocytes was assessed after denudation.

**Results:** The treatment of all-trans-RA in the preantral follicle cultures improved GVBD rate of the oocytes from 57.7% to 70.8%. However, it showed no significant difference in the follicle morphology and the growth speed from the early preantral stage to the Graafian follicle stage.

**Conclusions:** In conclusion, RA might enhance the maturation of the mouse oocytes in the follicle culture. The effect of RA on the embryonic development and the molecular mechanisms of RA affecting the oocyte maturation remained to be further study.