大韓不妊學會誌: 第29卷 第3號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 3, 2002, 9

분절화된 인간 배아에서 세포자연사와 *Fas, Fas-ligand, Bax, Bcl-2* 발현에 관한 연구

서울여성병원 불임연구실[1], 을지대학교 의과대학 산부인과학교실[2], 인하대학교 생물학과[3], 한양대학교 생명과학과[4], 성신여자대학교 생명과학과[5], 서울여성병원 불임클리닉[6]

김종식[1,3] · 김명신[1,4] · 양현원[2] · 류재혁[3] · 윤용달[4] · 배인하[5] · 정병준[6] · 송현진[6]

The Study on Apoptosis and Expression of *Fas, Fas-ligand, Bax,* and *Bcl-2* in Human Fragmented Embryos

Jong Sik Kim[1,3], Myoung Shin Kim[1,4], Hyun Won Yang[2], Chai Hyeock Yu[3], Yong-Dal Yoon[4], In Ha Bae[5], Byeong Jun Jung[6], Hyun Jin Song[6]

Infertility Research Laboratory, Seoul Women's Hospital[1], Department of OB/GYN, Eulji University School of Medicine[2], Department of Life Science, College of Natural Sciences, Inha University[3], Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University[4], Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungsin Women's University[5], Infertility Clinic, Seoul Women's Hospital[6]

Objective: The present study was performed to investigate whether apoptosis occur in human embryos by annexin staining and detect the expression of *Fas*, *Fas-ligand* (*FasL*), *Bax*, and *Bcl-2* in human fragmented embryos derived from IVF-ET by immunofluorescence and Western blot analysis.

Materials and Methods: Using annexin staining, immunofluorescence and Western blot analysis on normal and fragmented embryos, we were able to detect apoptotsis and apoptotic gene products in fragmented embryos.

Result: Phosphatidylserine (PS) translocation, the marker for apoptosis, were detected frequently in fragmented embryos. *Bcl-2* and *Bax* protein were detected in both fragmented and non-fragmented embryos. When fragmented embryos compared to normal embryos, immunofluorescent intensity of *Bcl-2* tended to be lower in fragmented embryos. *Bax* gene expression increased in the fragmented embryos compared to the normal embryos. This result supports a model in which the molar ratio of *Bcl-2* to *Bax* determines whether apoptosis induced or inhibited in human embryo. *Fas* was highly expressed in human preimplantation embryos but not *FasL*. It suggests that embryo may undergo apoptosis by binding with *FasL* produced by follicular or immune cells.

Conclusion: The over expression of *Bax* and *Fas* will trigger apoptosis to lead embryo fragmentation and change embryo to be nonviable.

Key Words: Apoptosis, *Fas*, *Fas-ligand* (*FasL*), *Bax*, *Bcl-2*, Human fragmented embryos

주관책임자: 송현진, 우) 402-204 인천광역시 남구 주안4동 1534-4, 서울여성병원 3F 불임클리닉
Tel: (032) 230-3630, Fax: (032) 247-2001, e-mail: shyunjin@chollian.net
연락저자: 김종식, 우) 402-204 인천광역시 남구 주안4동 1534-4, 서울여성병원 3F 불임연구실
Tel: (032) 230-3638, Fax: (032) 247-2001, e-mail: ivf@unitel.co.kr
본 논문의 내용은 2002. 5. 10. 제42차 춘계불임학술대회에서 발표되었음.

최근 과배란 유도를 통한 체외수정 시술 방법의 발달 및 배양조건의 개선으로 불임환자의 임신 가능성이 많이 향상되어 왔다. 그러나 이러한 발전에도 불구하고 소수의 배아만이 좋은 상태에서 환자에게 이식되고 나머지는 비정상적인 형태와 느린 발생률을 나타내는 것으로 보고되고 있다.[1] 정상적인 배아를 선별하는데 기준이 되는 것으로는 난할의 진행 상태와 세포질의 분절화 (fragmentation) 현상을 들 수 있으며,[2] 분절 (fragment)이 심한 배아는 포배기까지의 발달률이 떨어지며 착상과 임신에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.[3,4] 체외수정 및 배양시 세포질의 분절이 일어나는 배아는 전체 중 약 50% 정도를 차지하는 것으로 보이며,[5] 세포질의 분절화는 난할 초기에서부터 시작되고 난할이 진행되어 환자의 자궁에 이식할 시기에 분절화가 사라져 정상적인 모습을 회복하는 경우가 보고되기도 했으나[6] 대부분의 경우에서는 배아가 분열을 거듭하여도 분절화 현상은 지속된다.[7]

발생중의 배아에서 나타나는 분절화 현상의 원인은 환자가 고령으로 인해 이미 세포자연사 (apoptosis)가 진행된 난자의 생성[8]을 제외하면 체내와는 다른 환경에서 배아를 배양함으로서 나타나는 경우가 대부분을 차지하고 있다. 체외배양시 배아발달에 필요한 성장인자 (growth factor)나 활성물질과 같은 생존인자 (survival factors)의 결핍으로 세포의 성장이 멈추거나 세포질의 분절이 일어나고, 세포사멸이 진행되는 것으로 밝혀졌다.[9] 또한 산소유리기 (reactive oxygen species, ROS)가 배아의 분절화를 유발한다는 연구가 보고되었다.[10] 대기 중 고농도의 산소는 세포나 배양액내의 금속 이온이나 다른 구성성분과 결합을 하여 산소유리기를 발생시키게 되며, 산소유리기는 세포막과 DNA에 손상을 주어 세포질의 분절화를 유발하는 것으로 알려져 있다.[11] 또한 수정을 위해 난자를 정자와 반응시킬 때 정자로부터 분비되는 유해한 물질이나 과배란 유도 과정에서 생기는 미성숙란의 발생 등이 배아의 분절화를 유발하는 것으로 알려져 있다.[12] 그러나 이러한 모든 요인들은 최근 보조생식 기술이 발달하면서 많이 극복되었고, 현재 배아의 분절화 현상과 가장 밀접한 관련이 있는 것으로는 세포자연사를 들 수 있다.[13] 또한 위에서 밝힌 원인들이 세포자연사를 일으키는 직접적인 유발인자이므로 세포자연사와 배아의 분절화는 밀접한 관련이 있는 것으로 보여진다. Jurisicova 등[14]은 분절화가 진행된 배아의 약 75%가 세포자연사와 직접적인 관계가 있는 것으로 보고하였다.

세포자연사는 보통 예정세포사 (programmed cell death, PCD)와 같은 의미로 사용되어지며 세포의 형태적인 변화보다 생화학적 변화가 선행되어 이루어진다.[15] 세포자연사는 세포 내에서 이를 유발하는 신호에 의해 능동적인 세포죽음의 형태로 진행되며 이 결과 mRNA의 발현 및 단백질 합성이 일어나며 이 단백질은 핵내의 DNA를 규칙적인 다중체의 크기로 절편하게 되고, 그 결과 세포가 수축하면서 여러 조각으로 나누어진다.[16] 세포자연사의 또 다른 큰 특징은 세포막에서도 일어나는데 주로 DNA의 분절이 일어나기 전에 선행되며 세포막의 기능을 잃어버리는 특징을 보인다.[17] 실제로 여성의 자궁내막과 난소의 주기적인 퇴화 과정은 세포자연사를 설명해 주는 좋은 예이다.[18,19] 그리고 이러한 세포자연사의 특징은 형태학적인 면에서 배아의 분절화 현상과 매우 유사한 점을 지니고 있다.

세포자연사가 개시되기 위해서는 유전자의 발현이 필수적이며 이와 관련된 유전자로는 *Fas*, *Fas ligand* (*FasL*), *Bax*, *Bcl-2* 등이 있다.[20] 그 중 *Bcl-2*는 세포자연사를 억제하는 기능을 수행하며, *Bax*, *Fas*, *FasL*는 세포자연사가 개시되도록 한다.[21] 특히 *Bcl-2*와 *Bax*는 유사한 구조를 보이지만 상반되는 기능을 수행하며 이 두 단백질은 서로 결합하여 각각의 단백질이 발현되는 비율에 의해서 세포자연사를 조절하는 것으로 알려져 있다.[22] 배란 후 난포의 퇴화 과정이 세포자연사에 의한 것이며 여기에 *Bcl-2*와 *Bax*가 관여한다는 연구 결과가 발표되었고,[23] 특히 난소의 과립세포에서 발현되는 *Bax* 유전자가 난포의 퇴화에 직접적인 영향을 주며 이때 *Bcl-2* 유전자는 세포자연사를 억제하는 작용을 하는 것으로 밝혀졌다.[19,24] 또한 성장이 정지된 인간의 미성숙란에서 *Bax*와 *Fas* 유전자가 발현된 것도 보고되었다.[25] *Fas*는 세포자연사를 인지하는 세포막에 위치하고 있는 수용체로서 여기에 *FasL*이 결합하면서 세포내부로 세포자연사의 신호를 전달하는 것으로 알려져 있다.[26] 또한 *Fas*를 매개로 한 세포자연사 과정

을 *Bcl-2* 유전자가 조절한다는 연구도 보고되었다.[20] 따라서 세포자연사와 관련된 유전자들은 각각 독립적인 작용을 하는 것 보다는 서로 긴밀한 관계를 가지고 세포자연사의 각 단계를 조절하는 것으로 보여진다. 세포자연사의 mRNA 발현을 유도하는 조절인자로는 여러 가지 호르몬 (hormones), 성장인자 (growth factor), 사이토카인 (cytokine) 등이 작용하는 것으로 추정되고 있지만 자세한 기작은 많이 밝혀지지 않고 있다.[27]

인간 배아에서 분절화는 초기 난할 시기부터 주로 나타나는 현상이고 배아의 세포자연사를 규명하려는 연구는 대부분 동물실험을 통해 이루어졌고 인간 배아에서 분절화와 관련된 유전자 발현에 관한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구는 과배란 유도와 체외수정을 통해서 얻어진 인간 배아에서 분절화가 없는 배아와 분절화가 심한 배아를 대상으로 배아의 분절화와 세포자연사의 상관관계를 annexin 염색법을 통하여 살펴보고자 한다. 또한 세포자연사와 관련된 *Fas*, *FasL*, *Bax*, *Bcl-2* 유전자 산물의 발현 양상을 형광면역염색법과 Western Blotting 방법을 통하여 살펴보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 2001년 9월부터 2002년 5월까지 서울여성병원 불임클리닉을 내원한 총 37명의 불임환자 중 체외수정 및 배아이식 시술 결과 정상적인 수정 후 분절화 현상이 심해 폐기 처분할 배아를 실험군 (n=46, Figure 1a)으로, 다정자 침입으로 인한 배아 중 정상적인 난할 과정과 분절화 현상이 나타나지 않은 배아를 대조군 (n=46, Figure 1b)으로 하였다. 그리고 실험군은 연구 목적으로 환자에게서 기증받은 배아만을 대상으로 하였다.

2. 과배란 유도 및 체외수정 시술

1) 과배란 유도 및 난자 채취

난자 채취를 위한 과배란 유도는 gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa, Lucrine subQ, ABBOT)와 follicle stimulating hormone (FSH, Metrodin, Serono)와 human menopausal gonadotropin (hMG, Pergonal, Serono)을 병용하는 GnRHa 장기 투여법 (GnRHa long protocol)을 실시하여 유도하였다. 과배란 전주기 제 21일에 GnRHa의 피하주사를 시행하였고 월경주기 제 3일에 과배란 유도를 시작하였다. 과배란 유도제는 FSH 단독 또는 FSH와 hMG를 병합하여 사용하였고 혈중 estradiol (E_2) 농도와 질식초음파를 사용하여 난포 성장을 관찰하였다. 18 mm 이상의 우성 난포가 3개 이상일 때 10,000 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, Profasi, Serono)을 근육주사하여 배란을 유도하였다. hCG를 주사한지 36시간 후에 질식초음파를 사용하여 난자 채취용 바늘 (Single Lumen Ovum Pick-Up Needle Set, COOK)로 난자를 채취하였다.

채취한 난자는 37℃와 5% CO_2로 조절되는 배양기 내에서 해부현미경 (SZH10, Olympus)을 이용하여 난자와 난구세포 복합체 (oocytes cumulus complex, OCC)의 존재 유무를 확인하였고 OCC가 발견되면 배율을 높여서 난자의 형태와 성숙도를 판정하였다. 난자의 성숙도는 세포질 내의 핵 (germinal vesicle, GV)의 유·무, 제 1극체의 출현 유·무, 그리고 난구세포의 분포 특징에 따라 확인하였다. 성숙 정도에 따라 각 난자를 10% synthetic serum substrate (SSS, Irvine)이 첨가된 P 1 (Preimplantation 1) 배양액으로 옮겼다. 성숙도에 따라 성숙란 (metaphase II, MII)은 난자 채취 3~4시간, 중간성숙란 (metaphase I, MI)은 난자 채취 8~10시간, 미성숙란 (immature, GV)은 20~48시간 동안 CO_2 배양기에서 배양 후 체외수정을 시행하였다. 그리고 각 배양접시에는 3~5개 미만의 난자가 배양되도록 조절하였다.

2) 배양액의 준비

정자의 준비에는 F-10 Nutrient Mixture Medium (Ham's F-10, Gibco)에 0.5% antibiotics (Penicillin-G, Streptomycin sulfate)를 첨가하여 사용하였다.

난자의 수정 및 배양에는 직접 제조한 P 1 배양액 (2.04 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 101.6 mM NaCl, 4.69 mM KCl, 0.2 mM $MgSO_4$, 25 mM $NaHCO_3$, 0.33 mM Na-pyruvate, 21.4 mM Na-lactate, 0.05 mM Taurine, 0.15 mg/l Na-citrate, 10 ? g/l Gentamicin, 0.005 g/l Phenol red)을 사용하였고, 배양액 제조에 사용한 시약은 Sigma 제품을 사용하였다. 모든 배양액은 95% 이상의 습도, 37℃ 및 5% CO_2를 유지하는 배양기 (CO_2 incuba-

tor, Heraeus)에서 10시간 이상 평형시킨 다음 사용하였다.

3) 난포액 (human follicular fluid, hFF)의 준비

난포액은 난자 채취 시술 중 성숙난자를 가지고 있는 난포에서 회수한 난포액에 혈액이 섞여 있지 않은 것만 이용하였다. 회수된 난포액은 3500 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상층액만 회수한 후 56℃로 조절된 항온수조에서 35분간 불활성화 (heat inactivation)시키고 나서 0.22 ?m의 필터 (Sterivex GV, Millipore)로 제균한 뒤 -20℃에 보관하였다. 냉동보관된 난포액은 융해 후 체외수정을 위한 정자 준비에 사용하였다.

4) 체외수정 및 수정 확인

난자 채취 후 수음 (masturbation)으로 받은 정액을 37℃에서 20~30분간 방치하여 액화를 유도한 다음 정자의 농도와 운동성을 세계보건기구 (WHO)[28]의 기준에 따라 측정하였다. 액화된 정액은 10% 난포액이 첨가된 Ham's F-10 배양액으로 2회 세척한 후 pellet을 제외한 상층액은 제거하고 그 위에 1 ml의 Ham's F-10 배양액을 조심스럽게 분주하고 5% CO_2로 조절된 배양기에서 30분 동안 정자를 부유 (swim up)시켜 수정 (insemination)에 이용하였다.

수정 후 약 18~22시간 뒤 수정 (fertilization) 여부를 조사하였다. 물리적으로 손상을 입지 않은 수정란 중 웅성전핵 (male pronuclear)과 자성전핵 (female pronuclear)이 형성되고 핵 내부에 핵소체를 함유하고 있고, 두 개의 극체 (polor body)가 출현된 것을 정상적인 수정으로 확인하였다. 만일 2개의 극체와 1개의 전핵만이 관찰된 경우에는 4~5시간 뒤에 전핵의 상태가 어떻게 변하는지를 관찰하였다. 수정이 되지 않은 난자는 신선정자를 이용하여 재수정을 유도하였다.

5) 수정란의 배양 및 배아이식

정상적인 수정이 이루어진 배아는 수정 후 37℃와 5% CO_2로 조절되는 배양기에서 10% SSS가 첨가된 P 1 배양액으로 약 72시간 동안 배양 후 형태학적 등급을 판정하였다. 배아의 할구 크기가 균일하고 세포질의 분절화가 없는 것을 Grade 1 (G1), 할구의 크기가 불균일하지만 세포질의 분절화가 없는 것을 G2, 할구의 크기가 불균일하고 20% 미만의 세포질의 분절이 있는 것을 G3, 할구의 크기도 불균일하고 50% 정도의 세포질의 분절이 있는 것을 G4, 정상적인 할구가 거의 보이지 않으며 전체적으로 세포질의 분절화가 나타난 것을 G5로 하였다.[29] 배아이식은 G1~G3의 등급을 받은 3~5개의 배아만을 환자의 자궁 안으로 이식하였고, 잉여 배아 중 세포질의 분절화가 50% 이상인 G4와 G5 grade의 배아를 실험군으로, 그리고 다정자 침입으로 수정된 배아 중 세포질의 분절화가 없고 정상적인 난할을 보이는 G1과 G2 grade의 배아들은 대조군으로 사용하였다.

3. 세포자연사 및 관련된 유전자 발현 확인

1) Annexin V 염색법

각 군마다 5개씩의 배아에서 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences)를 이용하여 세포자연사를 확인하였다. 우선 배아를 phosphate buffered saline (PBS, Gibco)로 세척한 다음 annexin V-FITC로 20분간 반응시킨 후 PBS로 세척하여 propidium iodide (PI)로 염색하였다. 염색된 배아는 UV를 광원으로 하고 DAPI/FITC/Rhodamine triple filters가 장착된 형광현미경 (E600, Nikon)하에서 관찰하였다.

2) 형광면역염색법

실험에 사용할 배아는 acid tyrode solution (pH 2.1~2.5)을 이용하여 투명대를 얇게 하고 또 투명대에 붙어 있는 정자나 과립세포를 제거하였다. 배아를 10% NBF (neutral buffered formalin, Sigma)에서 약 10분간 고정한 후 PBS로 세척하고 일차항체의 비특이적 결합을 억제하기 위해서 2% BSA가 첨가된 PBS에서 10분간 반응시켰다. 각 배아는 *Fas*, *FasL*, *Bax*, *Bcl-2*에 대한 일차항체 (Table 1, BD PharMingen)와 상온에서 1시간 동안 반응시키고, PBS로 세척한 다음 FITC로 표지된 이차항체로 상온에서 암반응의 조건으로 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 배아는 PBS로 세척하여 슬라이드에 mounting medium (Sigma)으로 봉입하여 형광현미경으로 관찰하였다.

3) Western blot 분석

수집된 배아를 PBS에서 여러 번 세척한 후 Lysis buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 1 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride), 125 mM dithiothreitol, 20% glycerol, 0.002% bromophenol blue)에 넣어 전기영동 전까지 -80℃의 저온 냉동고에 보관하였다.

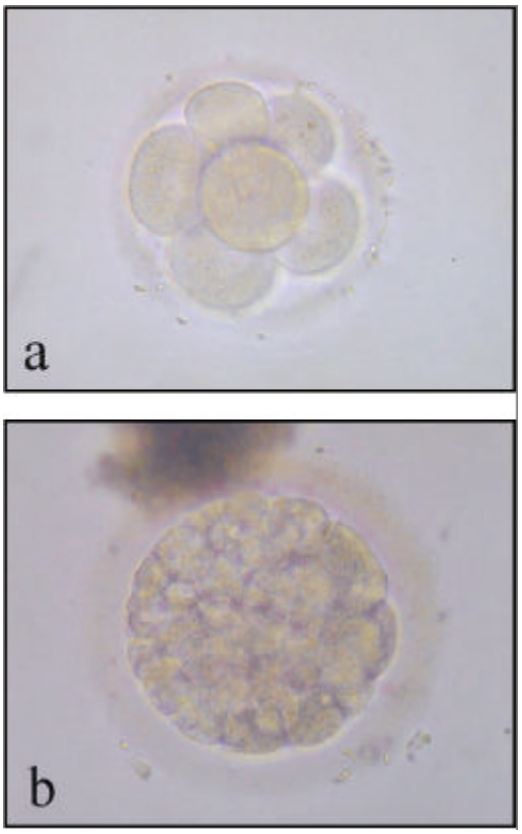

Figure 1. Light microscopy of normal and fragmented human embryos collected at the 8 cell stage. All embryos were collected at approximately 72 hours after post-insemination. **a.** Control group, 8 cell embryo with non-fragmentation derived from 3 pronuclei embryo (3PN), **b.** Study group, embryo with fragmentation derived from 2 pronuclei embryo (2PN).

12% SDS-Polyacrylamide gel에서 전기영동을 수행한 단백질을 transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.037% SDS, 20% methanol)에서 니트로셀룰로스 막 (Hybond ECL, Amersham pharmacia biotech)에 전이시켰다. 니트로셀룰로스 막을 5% 탈지분유를 함유하는 TBS-T (Tris buffered saline, 10 mM Tris, 0.2 M NaCl, 0.1% Tween-20)에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 여러 번 세척하였다. *Fas*, *FasL*, *Bax*, *Bcl-2*에 대한 일차항체 (BD PharMingen)로 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 여러 번 세척하고, HRP (horseradish peroxidase)로 표지된 이차항체와 1시간 동안 반응시켰다. TBS-T로 여러 번 세척한 후 ECL (enhanced chemi-luminescence) 시약 (Amersham pharmacia biotech)

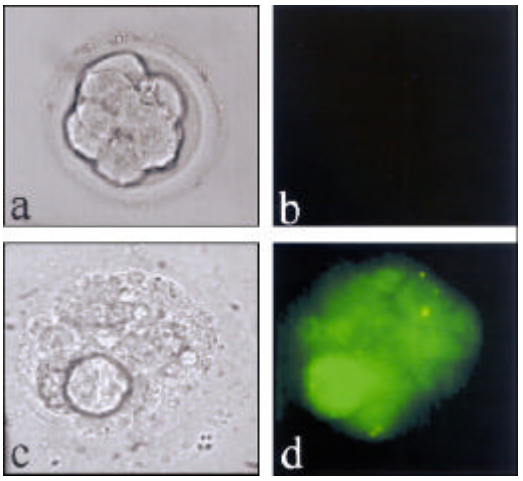

Figure 2. Detection of apoptosis in a human embryo by annexin V staining. Normal and fragmented embryos were stained with PharMingen annexin V-FITC apoptosis detection kit. After staining, pictures were taken under bright field (**a**, **c**) and under UV light with FITC filter (**b**, **d**). (**b**) Non-fragmented embryo negatively stained but (**d**) fragmented embryo positively stained for annexin V staining.

으로 1분간 반응시킨 후 X-ray 필름 (Hyperfilm, Amersham pharmacia biotech)에 노출시켰다.

결 과

1. Annexin V 염색법에 의한 세포자연사의 관찰

두 군에서 각각 5개의 배아를 annexin V-FITC로 염색한 결과 분절이 없는 군에서는 염색이 되지 않았으나 분절이 심한 군은 녹색으로 염색되었다 (Figure 2). 특히 분절화가 나타난 배아 중 분절이 이미 진행된 할구보다 정상인 할구에서 더 강하게 염색이 되었고 (Figure 2d) 이는 형태적으로 정상으로 보이지만 이미 세포막의 변화가 유발된 세포자연사 초기 상태라는 것을 알 수 있었고 또한 앞으로 분절화를 유발할 것으로 예상되었다. 두 군 모두 PI로는 염색되지 않았다.

2. 형광면역염색 결과

분절이 없는 배아와 분절이 심한 배아 각각 21개씩 총 42개의 배아를 형광면역염색법에 사용하였다. 세포자연사와 관련된 각 유전자 산물의 형광면역염

Table 1. Primary antibodies used in immunofluorescence staining

Primary antibody	Source	Dilution	Company
Fas	mouse anti-human *Fas*	1 : 100	BD PharMingen, USA
FasL	mouse anti-human *FasL*	1 : 100	BD PharMingen, USA
Bax	rabbit anti-human *Bax*	1 : 100	BD PharMingen, USA
Bcl-2	mouse anti-human *Bcl-2*	1 : 100	BD PharMingen, USA

Table 2. Frequency of positive staining of Fas, FasL, Bax, and Bcl-2 in fragmented and non-fragmented embryos

	Frequency of positive staining (+/n)[a]			
	Bcl-2	*Bax*	*Fas*	*FasL*
Non-fragmented embryos	5/5	3/5	4/5	0/6
Fragmented embryos	3/4	5/5	6/6	1/6

a+/n, Number of samples with positive staining / of total samples

색 결과는 Table 2와 같다. *Bcl-2*와 *Bax*는 두 군에서 모두 염색되는 특징을 보였지만 양적 차이를 보여, *Bcl-2*는 분절이 없는 군에서 더 많이 염색되었고 *Bax*는 분절이 심한 군에서 더 많이 염색되었다. 특히 *Bcl-2*는 분절이 심한 배아 내에서도 정상적인 모습을 보이는 할구에서는 강하게 염색되는 특징을 보였다 (Figure 3). 반면 *Fas*와 *FasL*의 발현 유무는 분절과는 상관없이 나타났다. *Fas*는 두 군에서 모두 염색되었지만, *FasL*는 거의 염색되지 않는 결과를 보였다 (Figure 4).

3. Western blot 분석 결과

Western blot 분석에는 각 유전자마다 5개씩 총 40개의 배아가 사용되었다. *Bcl-2*는 분절이 없는 군에서 더 많이 발현되었고 그리고 *Bax*는 분절이 있는 군에서 더 많이 발현되는 결과를 보였다. *Fas*는 두 군에서 모두 발현이 되었지만 분절이 있는 군에서 더 많이 발현되었고, *FasL*는 두 군에서 모두 발현되지 않았다 (Figure 5).

고 찰

본 실험은 과배란 유도와 체외수정 시술시 인간 배아의 세포질 분절화에 관련된 세포자연사와 단백질 발현을 알아보고자 실시하였다. 배아의 운명은 배아 시기에서만 국한된 것이 아니라 이미 이전부터 많은 영향을 받는 것으로 알려졌다. 수정란의 생존과 발생은 이미 난자가 자라는 동안 모계 유전적인 mRNA 발현과 단백질의 분비에 의존적이며 이러한 유전자 산물의 대부분은 초기 난할 과정에 사용되어지고 이때 배아의 운명이 거의 결정되는 것으로 보고되었다.[14,30] 생쥐의 경우 2 세포기 시기 그리고 인간을 비롯한 다른 포유동물의 경우는 4 세포기와 8 세포기 시기에 배아의 운명이 결정되어지며,[31,32] 인간 배아의 경우 8 세포기 이전 시기의 배아에서 세포질의 분절화가 심하거나 난할 진행이 정지되면 착상이 되지 않는다는 것이 지배적인 의견이다.[33] 또한 Aoki 등[34]은 난할 초기인 1 세포기 시기에 배아 활성 (embryonic activation)이 진행되며 이 배아 활성은 초기 배아의 세포자연사를 억제하는 기능을 수행한다고 하였다.

세포자연사는 세포 내부의 생리적 변화로 인한 세포의 죽음을 의미하며 핵내의 DNA의 분절과 세포막의 변화로 특징지을 수 있다.[35] DNA의 분절은 핵산분해효소 (endonuclease)의 활성화로 진행되며 이 효소는 DNA를 180~200 bp의 일정한 다중체의 크기로 잘라 전기영동한 gel 상에서 DNA를 사다리 꼴의 모양인 ladder-like한 유형으로 나타나게 한다. 이러한 DNA의 분절은 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-dogoxygenin nick end-labling) 방법으로 쉽게 관찰할 수 있다.[36] 배아에서 세포질의 분절은 DNA의 분절과 직접적인 연관이 있고 세포질의 분절이 많이 진행된 배아는 DNA의 분절 또한 많이 진행되었다는 보고[7]는 이러한 내용을 잘 설명해 주는 것으로 볼 수 있다. 또 다른 특징은 세포자연사가 진행되는 초기에 나타나는데 세포막의 지질 이중층 구조 중 안쪽 층에 있는 phosphatidylserine (PS)이 바깥쪽 층으로 이동하는 변화를 보이며 이러한 변화는 DNA의 분절이 일어나기

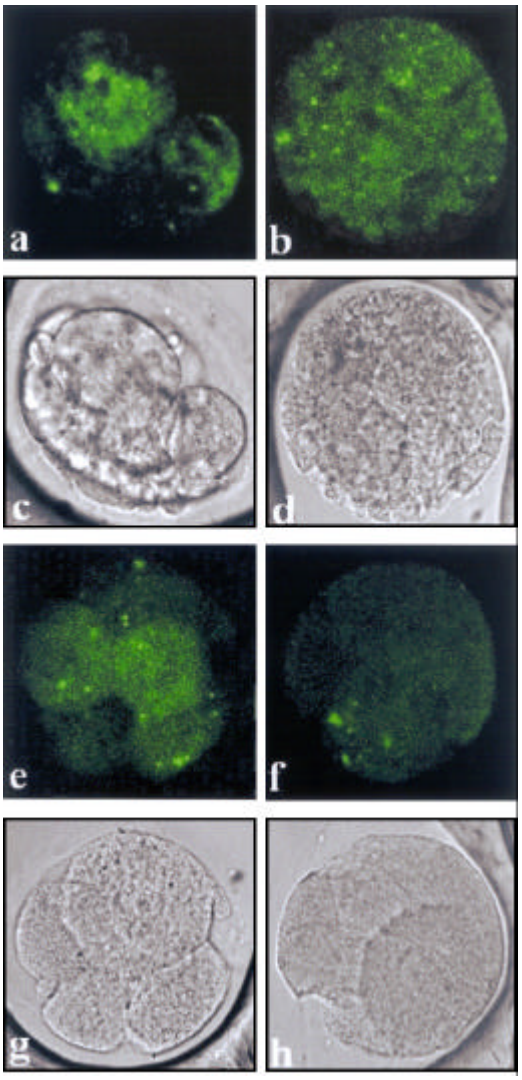

Figure 3. Immunofluorescent detection of *Bcl-2* and *Bax* in fragmented and non-fragmented embryos by confocal image analysis. Fragmented embryos (**a**~**d**) and non-fragmented embryos (**e**~**h**) were collected at 72 hours after post-insemination. The presence of green stain on the embryos to show that expression of *Bcl-2* (**a**, **e**) and *Bax* (**b**, **f**) during embryogenesis. (**a**, **b**, **e**, **f**) The upper pannel shows pictures were taken with confocal microscope and (**c**, **d**, **g**, **h**) lower pannel shows picture taken in bright field.

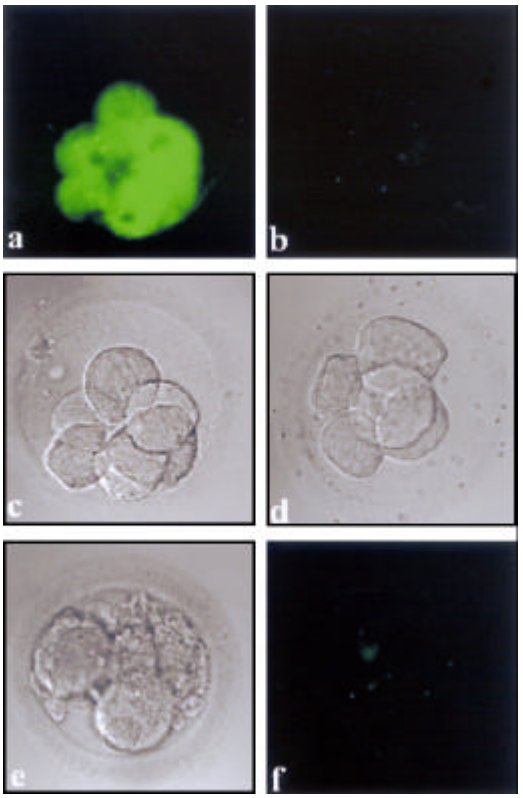

Figure 4. Immunofluorescent detection of *Fas* and *FasL* in fragmented and non-fragmented embryos by confocal image analysis. The presence of green stain on the embryos to show that expression of *Fas* during embryogenesis (**a**, **c**). *FasL* was not detected in both group (**b**, **d**). (**a**, **b**) The upper pannel shows pictures were taken with confocal microscope and (**c**, **d**) lower pannel shows picture taken in bright field. (**e**, **f**) Negative control.

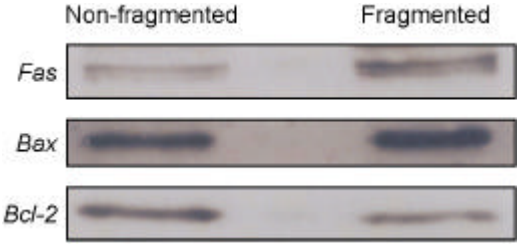

Figure 5. Western blot analysis of *Fas*, *FasL*, *Bax*, and *Bcl-2* in normal and fragmented embryos.

전에 선행되어진다.[37]

본 실험에서 PS가 막 표면으로 이동하는 것을 검출하기 위해 annexin V가, 세포막의 상태를 관찰하기 위해서 propidium iodide (PI)가 각각 이용되었다. 세포자연사가 진행되는 세포에서 막 내부의 PS는 막 표면으로 이동하게 되고 여기에 FITC로 표지된 annexin V가 결합함으로써 쉽게 막의 변화를 관찰

할 수 있었다. PI는 핵산물질을 염색할 수 있는 형광물질로서 세포막의 원형을 유지하고 있는 세포에서는 세포막을 통과하지 못한다. 따라서 세포자연사 초기 세포는 세포막의 원형을 그대로 유지하고 있기 때문에 PI로 염색이 되지 않지만 세포괴사(necrosis)나 세포자연사 후기와 같이 막이 깨지는 세포에서는 PI가 쉽게 DNA와 결합하는 특징을 보인다. 살아있는 세포에서는 annexin V와 PI 모두 염색이 되지 않는 것으로 나타나고, 세포자연사 초기 세포에서는 annexin V는 염색되지만 PI는 염색되지 않는다. 세포자연사 후기 세포 및 세포괴사에서는 annexin V도 염색되고 PI도 염색되는 결과를 보인다.

Figure 2에서와 같이 분절화가 없는 정상 배아에서는 annexin V에 염색이 되지 않았지만 분절화가 심한 배아에서는 염색된 결과로 세포자연사를 확인할 수 있었다. 특히 분절화가 심한 부분보다 아직 분절화가 진행되지 않은 부분에서 더 진하게 염색되는 특징을 보였고 이는 세포가 현재 정상적인 모습을 보이고 있지만 이미 세포자연사 과정이 진행중이며 앞으로 세포질의 분절화가 진행될 것을 의미하는 것이었다 (Figure 2d). 또한 분절화가 있는 배아에서 PI로는 염색되지 않은 결과를 얻었고 이 결과 역시 실험에 사용된 분절화된 배아가 모두 세포자연사 초기라는 사실을 나타내는 것이었다.

세포자연사는 사멸신호의 자극에 의해 능동적인 형태로 진행되며 여기에는 관련된 유전자의 발현과 단백질의 분비가 필수적이다.[38] 본 연구에 사용된 세포자연사와 관련된 유전자는 *Bcl-2* gene family, *Fas*, 그리고 *Fas ligand* (*FasL*)이며 이외에도 많은 유전자가 세포자연사에 관련이 있는 것으로 알려져 있다.[39] 여기서 *Bcl-2* 유전자 산물은 세포자연사를 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 나머지 유전자들은 세포자연사를 개시하도록 조절하는 것으로 밝혀졌다.[22]

각 단백질의 발현 양상은 형광면역염색법과 Western blot 분석을 통해 알 수 있었다. 먼저 *Bcl-2*와 *Bax*는 실험군과 대조군 모두에서 발현되었지만 발현 양적 차이를 보였다 (Figure 3). 분절화가 없는 군에서는 *Bcl-2*가 많이 발현되었지만, 분절화가 있는 군에서는 *Bax*가 더 많이 발현되는 특징을 보였다 (Figure 3b, e). 특히 분절화된 배아에서 *Bcl-2*는 정상적인 할구에 집중적으로 발현되었고 *Bax*는 전체적으로 고르게 발현되는 염색 결과를 보여주었다. 따라서 *Bcl-2*는 세포자연사를 억제하지만 *Bax*는 세포자연사를 유발하는 작용을 하는 것으로 보이며 두 단백질이 발현되는 비율이 세포자연사를 조절하는 것으로 보여진다.

*Bcl-2*와 *Bax* 유전자는 세포자연사 연구에 가장 많이 이용되어진 유전자이다. 발생중의 *Bcl-2* 유전자는 세포의 증식에 별다른 영향을 주진 않지만 세포사멸을 억제하는 기능을 지닌 단백질을 만들어 내는 것으로 보고되었다.[40] 특히 *Bcl-2* 유전자가 제거된 배아는 더 이상 발생을 진행하지 못하고 죽게 되는 것이 생쥐를 이용한 실험에서 증명되었다.[41] 또 *Bcl-2*가 과도하게 발현된 인간 자궁내막 조직에서 세포소멸이 억제되고 종양이 형성되는 경우가 보고되기도 했다.[21] *Bax* 유전자는 *Bcl-2* 유전자와 약 45%의 유사한 유전자 구조를 가지고 있지만 세포자연사를 유발하는 기능을 수행한다. *Bax*와 *Bcl-2*는 각각 독립적으로 세포자연사를 조절한다고 알려지기도 하였지만,[42] 두 단백질은 서로 결합하여 heterodimer를 이루며 각각의 비율에 따라 세포자연사를 결정한다는 것이 현재 지배적인 의견이다. Tilly 등[43]과 Ginger 등[44]은 동물실험을 통해 퇴화중인 난포와 난자에서 *Bax* 유전자의 비율이 *Bcl-2* 유전자 비율보다 높게 나왔고 이 과정에서 *Bax*가 중요한 기능을 수행한다고 보고하였고 본 실험 역시 이러한 내용을 뒷받침 해주는 것으로 생각되어진다.

Liu 등[25]은 분절이 있는 배아에서 *Bax* 유전자가 많이 발현된 것을 밝혀냈고 분절을 인위적으로 제거하였을 때 그 배아에서는 더 이상 *Bax* 유전자가 발현되지 않았고 배아의 생존율도 크게 향상되는 것으로 보고하였다. 그리고 본 실험에서는 주로 수정 후 72시간 뒤인 8 세포기 이상의 배아를 대상으로 유전자 발현을 조사하였는데 초기 정상 배아 (7 세포기 미만)에서는 *Bcl-2* 유전자가 거의 발현되지 않고 인간 genomic DNA가 활성화되는 7 세포기 이상에서 발현되는 것으로 보고하였다. 이 내용은 생쥐에서 *Bcl-2* 유전자가 발현되는 시기와 일치하는 것이라고 하였다. 따라서 발생 초기보다 발생 후기에 세포자연사와 관련된 유전자의 영향을 더 많이 받는다고 하였다.

반면 *Fas*와 *FasL*는 발현 유무의 차이를 보이는 것으로 관찰되었다 (Figure 4). 두 군에서 분절 유무와는 상관없이 *Fas*는 모두 발현되었지만 *FasL*는 발현되지 않는 특징을 보였고 특히 정상인 배아에서도 *Fas*가 많이 발현되는 것으로 나타났다 (Figure 4a). 이것은 *Fas*가 세포를 사멸로 이끄는 작용을 하지만 그 기능을 수행하기 위해 *FasL*에 의해 조절되는 것을 의미하는 것이었다. 또한 본 실험을 통해서 *FasL*는 거의 발현되지 않는 결과를 얻었고 *FasL*는 배아 자체에서 발현되기 보다는 외부로부터 유래한 것으로 사료된다.

최근 인간 생식세포에서 *Fas*와 *FasL*에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. *Fas*는 세포자연사를 유도하는 Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor (TNF/NGF) 세포표면 수용체계의 일부이다.[26] *Fas*에 *FasL*이 결합하게 되면 막 내부에서 세포자연사의 신호전달 과정이 일어나고 세포질 내의 세포자연사에 관계하는 단백질을 활성화시키게 되고 그 결과 mitochondria 기능의 손상 및 핵의 외형적인 변화 등을 유발한다. 면역세포 외에 인간과 생쥐의 난소와 난자와 같이 면역계와 직접적인 관련이 없는 세포에서 퇴화 과정의 조절에 *Fas*과 *FasL*이 관여한다는 연구가 보고되었다.[45] 따라서 인간 배아에서의 *FasL*의 유래는 난자가 생성되는 시기의 난포내 또는 이와 관련된 세포, 그리고 면역체계와 관련된 세포에서 유래하는 것으로 생각되어지며 여기에는 많은 연구가 따라야 할 것으로 생각된다.

또한 정상인 난자 및 배아에서도 *Fas*와 *FasL*이 발현된 경우가 보고되었는데[25,46] 이러한 내용은 *Fas*와 *FasL*이 발현된 세포가 모두 세포자연사를 일으키는 것이 아니라 *Fas*에 의해 유발된 세포자연사 과정을 여러 단백질이 조절하는 것으로 보인다. 아직 완전한 생화학적 기작은 밝혀지지 않았지만 *Bcl-2* 유전자계에 의해 *Fas*로 매개된 세포자연사가 조절되는 것으로 밝혀졌고[47] 이는 신호전달 과정 중 특정 단계에서 여러 가지 조절인자 및 세포자연사와 관련된 단백질에 의해서 신호가 억제될 수 있는 가능성을 나타내고 있다. 이러한 결과들은 세포자연사를 유발하는 유전자가 각각 독립적으로 작용하기 보다는 서로 긴밀한 관계를 가지고 세포자연사의 각 단계를 조절하는 것을 보여주는 것으로 생각된다. 본 실험에서도 *Fas*로 진행되는 세포자연사에 다른 유전자가 미치는 영향은 조사하지 않았지만 이 부분은 앞으로 연구되어야 할 대상으로 생각된다.

Western blot 분석에서도 형광면역염색법과 일치하는 결론을 얻었다. 정상인 배아에서는 *Bcl-2* 단백질이 더 많이 발현되었고 분절이 있는 배아에서는 *Bax* 단백질과 *Fas* 단백질이 더 많이 발현되었으며, 특히 *Fas*는 형광면역염색법으로 그 양적인 차이를 구별할 수 없었지만 정상 배아보다 분절화가 있는 배아에서 더 많이 발현되는 차이를 보여주었다. 그리고 *FasL*는 발현되지 않는 특징을 보였다 (Figure 5).

세포자연사의 개시 신호의 자세한 기작에 대한 연구는 아직 미미하지만 생존요인이나 사이토카인과 같은 여러 요소에 의해 진행된다는 설명이 최근에 많이 밝혀졌고, 체외 배양조건의 개선과 질 좋은 난자의 생성 등이 세포자연사를 억제하는데 중요한 역할을 하리라 생각된다.

이상과 같은 연구 결과로 보아, 배아에서 세포질의 분절화 발생 및 진행 과정에서 *Bax* 유전자와 *Fas* 유전자의 발현이 가장 큰 영향을 미치고 있으며 두 유전자의 발현으로 세포질의 분절화와 세포의 사멸을 이끄는 것을 알 수 있었다. 그리고 세포자연사를 유발하는 신호 및 유전자의 발현, 그리고 각 유전자의 상호작용에 관한 생화학적 기작은 앞으로 많은 연구가 진행되어야 할 부분으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Andres S, Christel HG, Maria SA, Aila T, Timo T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Hum Reprod 2001; 16: 2177-81.
2. Scott L, Alvero R, Leonides M, Miller B. The morphology of human PN embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum Reprod 2000; 15: 2394-403.
3. Perez G, Tao XJ, Tilly J. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. Mol Hum Reprod 1999; 5: 414-20.
4. Alikani M, Cohen J, Tomkin G. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for preg-

nancy and implantation. Fertil Steril 1999; 71: 836-42.
5. Flechon JE, Kopecny V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. Zygote 1998; 6: 183-91.
6. Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. Hum Reprod 1999; 14: 429-47.
7. Levy R, Benchaib M, Cordonier H. Annexin V labelling and terminal transferase-mediated DNA end labelling (TUNEL) assay in human arrested embryos. Mol Hum Reprod 1998; 4: 775-86.
8. Fujino Y, Ozaki K, Yamamasu S, Ito F, Matsuoka I, Hayashi E, et al. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. Hum Reprod 1996; 11: 1480-3.
9. Collins MK, Perkins GR, Rodriguez TG, Nieto MA, Lopez RA. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. Bioessays 1994; 16: 133-8.
10. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. Hum Reprod 1998; 13: 998-1002.
11. Aitken RJ, Clakson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidant in defining the efficacy of sperm preparation technigues. J Andrology 1998; 9: 367-71.
12. Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. Spermatogonial apoptosis has three morpholgically recognizable phases and sows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. Cell Prolif 1992; 25: 241-50.
13. Jurisicova A, Ian R, Alessandro F, Robert FC, Sue V. Effect of maternal age and conditions of fertilization on programmed cell death during murine preimplantation embryo development. Mol Hum Reprod 1998; 4: 139-45.
14. Jurisicova A, Keith EL, Robert FC, Susannah LV. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. Mol Reprod Dev 1998; 51: 243-53.
15. Kypianou N, Issacs JT. Activation of programmed cell death in the rat ventural prostate after castration. Endocrinology 1998; 122: 552-62.
16. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. Mol Endocrinol 1993; 7: 643-50.
17. Palumbo A, Yeh J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. J Soc Gynecol Invest 1995; 2: 565-73.
18. Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 4144-7.
19. **이병석, 최은아, 장경환, 김진영, 배상욱, 박기현, 조동제, 이국, 김재욱, 송찬호. 황체화된 인간 과립세포에서** Apoptosis **관련 유전자인** bcl-2**와** T-RPM-2**의 발현. 대한불임회지** 1997; 24: 267-71.
20. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol 1997; 124: 1-6.
21. Katsuji K, Toshihiko S, Tsutomu O, Rika N, Yuki I, Shigetaka Y, et al. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. Hum Reprod 2001; 16: 2211-8.
22. Kokawa K, Shikone T, Otani T. Apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax in patients with endometrioid, clear cell and serous carcinomas of the uterine endometrium. Gynecol Oncol 2001; 81: 178-83.
23. Palumbo A, Yeh J. In situ location of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. Biol Reprod 1994; 51: 888-95.
24. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the number of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. Endocrinology 1995; 136: 3665-8.

25. Liu HC, He ZY, Mele CA, Veeck LL, Davis O, Rosenwaks Z. Expression of apoptosis-related genes in human oocytes and embryos. J Assist Reprod Genet 2000; 17: 521-33.
26. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-down reulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med 1989; 169: 1747.
27. Hsueh AJW, Billig H, Tsafriri A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. Endocrine Reviews 1994; 15: 707-24.
28. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. 3rd ed., Cambridge, Cambridge University Press; 1992.
29. Veeck LL. Preembryo grading: In atlas of the human oocyte and early embryo conceptus. Vol 2, Baltimore: Williams and Wilkins 1991; 121-49.
30. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. Mol Hum Reprod 1996; 2: 93-8.
31. Flach G, Jhonson MH, Braude PR, Taylor RS, Bolton VN. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. EMBO J 1982; 1: 681-6.
32. Jarrell VL, Day BN, Prather RS. The trancription from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, Sus scrofa: Quantitative and qualitative aspacts of protein synthesis. Biol Reprod 1991; 44: 62-8.
33. Gloria IP, Xiao JT, Jonathan LT. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. Mol Hum Reprod 1999; 5: 414-20.
34. Aoki F, Worrad DM, Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during first and second cell cycles in the preimplantation embryo. Dev Biol 1997; 181: 296-307.
35. Arends ML, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: The role of the endonuclease. Am J Pathol 1990; 136: 593-608.
36. Jonathan VB, Patrick D, Samuel A. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. Hum Reprod 2001; 16: 719-29.
37. Jonathan VB, Patrick WD. DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. Hum Reprod 1998; 13: 1317-24.
38. Owens GP, Hahn WE, Cohen J. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. Mol Cell Biol 1991; 11: 4177-88.
39. Kokawa K, Shikone T, Otani T. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. Cancer 1999; 85: 1799-809.
40. Hockenbery DM, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 1990; 348: 334-6.
41. Kamada S, Shimono A, Shinto Y, Tsujimura T, Takahashi T, Nada T, et al. Bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: Accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hairhypopigmentation, and distorted small intestine. Cancer Res 1995; 55: 354-9.
42. Kunson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and bax function independently to regulate cell death. Nat Genet 1997; 16: 358-63.
43. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the mature rat ovary: Equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is a associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xong messenger ribonucleic acid levels. Endocrinolgy 1995; 136: 232-41.
44. Ginger EE, Chaoyu T, Abigail SM, Carol MW. Expression of caspase and Bcl-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. Biol Reprod 1999; 61: 231-9.
45. Kondo H, Maruo T, Peng X, Mochizuki M. Im-

munological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 2702-10.
46. Kawamura K, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Kumagai A, Tanaka T. Expression of Fas and Fas ligand mRNA in rat and human preimplantation embryos. Mol Hum Reprod 2001; 7: 431-6.
47. Rodriguez IM, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P. Systemin injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. J Exp Med 1996; 184: 2067-72.