大韓不妊學會誌: 第30 卷 第1號 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 1, 2003, 3

착상전 생쥐 배아 발달에 대한 Apoptotic Gene의 발현

전남대학교 의과대학 산부인과학교실[1], 호르몬연구센터[2]

이여일[1] · 이 진[1] · 김미영[1] · 전상영[2]

Expression of Apoptotic Genes in Mouse Preimplantation Embryo Development

Yu-Il Lee[1], Jin Lee[1], Mi-Young Kim[1], Sang-Young Chun[2]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, [2]Hormone Research Center, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Objective: The aim of this study was to evaluate the influence of three different media on preimplatation embryo development and the expression of *Bcl-2*, *Mcl-1*, *Bax*, and *Bok* in mouse.

Materials and Methods: Two-cell embryos were retrieved from ICR female mice (4 weeks old) at 48 hr after hCG injection and cultured in Ham's F-10, HTF, and G1.2 media. The developmental rate of 2-cell embryos was evaluated from 24 hr to 72 hr after culture. RT-PCR was performed for the detection of *Bcl-2*, *Mcl-1*, *Bax*, and *Bok* gene expression.

Results: The rates of morula and blastocyst in HTF and G1.2 media (88%, 98.1%) were significantly higher than those in Ham's F-10 media (39.6%) at 48 hr. Likewise, the rates of hatching and hatched blastocyst in HTF and G1.2 media (21.9%, 52.9%) were higher than those in Ham's F-10 media (3.5%) at 72 hr. *Bcl-2* and *Bax* mRNAs were highly detected in embryos cultured in Ham's F-10 when compared in embryos cultured in HTF and G1.2. In contrast, the expression of *Mcl-1* and *Bok* was not significantly different.

Conclusion: These results show that HTF and G1.2 culture media increase the rate of blastocyst formation and stimulate *Bcl-2* and *Bax* gene expression in mouse preimplantation embryos.

Key Words: Blastocyst, Culture medium, Apoptotic gene, Preimplantation embryo

포유류 발생 초기에 배아는 수정 후 최소한 96~120시간 동안 나팔관을 따라 내려오면서 일련의 난할이 진행되어 포배 초기에 이른 배아가 자궁벽에 착상을 하게 된다. 이러한 착상전 배아 발달 과정은 임신의 성공에 있어 결정적으로 중요한 시기이다.[1] 왜냐하면 수정 후 많은 수의 배아들은 분절화 (fragmentation), 정지 (arrest) 및 죽음 (dying) 등으로 인하여 배아 발달을 계속적으로 진행할 수 없기 때문이다. Janny와 Menezo는[2] 생쥐와 인간 배아에서, 수정 후 15~50% 배아들이 착상전 배아 발달시 죽게 되며 체외 배양에서 인간 배아의 단지 30~50%만이 포배기까지 성장한다고 보고하였다.

보조생식술에서 체외 수정 후 체외 배양된 배아를 자궁내로 이식시 착상률은 자연적인 착상률과 비교할 때 매우 낮으며 출산 성공률은 15% 정도로 보고되고 있다.[3,4] 이는 체외 수정과 배아 이식 과정 중에 물리적 또는 화학적 배양조건이 모체와 동일하지 않고, 배양액 자체의 부적합한 조성으로 인해

주관책임자: 이여일, 우) 501-190 광주광역시 동구 학1동 8번지, 전남대학교병원 산부인과
Tel: (062) 220-6371, Fax: (062) 227-1637, e-mail: leeyi@chonnam.ac.kr
*이 논문은 전남대학교 병원 임상연구소 학술연구비 (CUHRI-U-200146)에 의하여 연구되었음.

일어나며 배아 발달의 정지와 퇴화가 빈번히 발생하여 임신율을 높이는데 많은 어려움이 따르고 있다.[5~7] 최근에 수정란의 체외 발달률 및 임신율을 보다 높이기 위한 노력 중 모체의 난관과 유사한 새로운 배양액의 개발 및 배양액의 조성 성분을 바꿔 보완시키거나 공배양을 첨가하는 등의 배양조건 개선을 위한 연구들이 활발히 진행되고 있으며,[8] 최근에도 Gardner 등[9,10]은 체외에서 초기 배아의 배양시 대사적 요구가 단계적으로 변화할 수 있으므로 둘 이상의 연속 배양액을 사용하여 더 많은 수의 양질의 포배기 배아를 얻을 수 있고 이를 이식하여 45.5%로의 개선된 착상률을 얻었다고 보고하였다.

한편으로, 수정란의 생존은 난자의 성장과 성숙시에 축적된 모체의 mRNA와 단백질에 의존하며, 이 물질들은 착상전 배아의 genome activation이 이루어지기 전 초기 난할단계에서 이용될 것으로 여겨지고, 난할 초기에 일어나는 genome activation은 programmed cell death를 방해하는 것으로 보고되었다.[11] 최근에 조류와 포유류의 착상전 배아에서 여러 개의 세포고사를 조절하는 유전자들이 일시적으로 발현되는 양상이 발표되었으며[11] 초기 배아 발달시 일어나는 세포고사는 *Bcl-2*계 유전자에 의해 영향을 받는다고 보고되었다.[12,13]

본 실험에서는 수정 후 배아 발달 과정에서 자연스럽게 일어나는 것으로 알려진 배아의 세포고사 현상이 배양액에 따라 어떠한 영향을 받게 되는지를 생쥐 배아를 이용하여 그 발달률로 살펴보고, 이때 배아의 세포고사 현상에 관여하는 것으로 알려진 *Bcl-2*계 유전자의 발현양상을 살펴봄으로서 간접적이나마 배양액이 배아의 생존에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 배양액의 준비

생쥐의 2세포기 배아를 체외 배양하기 위하여 사용한 배양액은 F-10 Nutrient Mixture Medium (Ham's F-10, Gibco, USA), Human Tubal Fluid (HTF) 및 G1.2 (IVF Science, Sweden) 배양액이었다. Ham's F-10 배양액은 1 mM Ca-lactate (Calbiochem, Germany), 20 mM $NaHCO_3$ (Sigma, USA) 및 각각 0.075 g의 antibiotics (Streptomycin sulfate; Penicillin-G, Sigma, USA)를 첨가하여 제조하였다. HTF 배양액은 101 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 0.37 mM KH_2PO_4, 0.2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 25 mM $NaHCO_3$, 2 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$으로 이루어졌으며 여기에 21.4 mM Sodium lactate, 0.33 mM Sodium pyruvate, 2.8 mM Glucose, 1 mM Glutamine, 0.1 mM EDTA, 0.025 g Streptomycin sulfate 및 0.025 g Penicillin-G를 첨가하여 사용하였다. 또한 상품화된 G1.2 배양액을 사용하였으며, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Gibco, USA)은 0.1 g $CaCl_2$ (Gibco, USA)를 첨가하였다. 본 실험에 사용된 배양액은 모두 하루 전 37℃, 5% CO_2 배양기에서 안정화시켰다.

2. 실험 동물 및 배아의 준비

본 실험에서는 명 14시간, 암 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육한 ICR계 생쥐로 암컷은 생후 4~6주된 것, 수컷은 생후 8주 이상된 것을 사용하였다.

배아를 얻기 위하여 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma, USA)을 암컷에 복강 주사하고 48시간 후 5 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma, USA)을 주사하여 과배란을 유도한 후 수컷과 교배시켰다. hCG를 주사한 후 48시간째에 경추탈골법으로 도살한 후 난관관류법을 이용하여 2세포기의 배아를 회수하였으며, 형태학적으로 정상적인 것만을 선별하여 실험에 이용하였다.

3. 수정란의 배양 및 관찰

회수된 2세포기 배아를 DPBS 용액으로 2회 이상 세척한 후에 세 군으로 나누어 혈청이 첨가되지 않은 Ham's F-10, HTF 및 G1.2에서 배양하였다. 배아는 24시간 배양한 후 난할 정도에 따라서 2~3세포기 배아군과 4~8세포기 배아군으로 나누어 72시간까지 추가로 배양하고 관찰하였다. 이때 세 군의 배아들을 37℃ 온도에서 공기 중 5% CO_2, 100% 습도로 유지하였다.

4. Total RNA 추출 및 RT-PCR

2세포기 배아를 24시간 배양한 후 각 발달단계별로 나누어 72시간까지 추가 배양하여 얻은 배아를

Table 1. Primers designed for amplification of the target mRNA in RT-PCR reaction

Name of the gene product	Forward (F) and reverse (R) primer sequences	RT-PCR product size	Gene Bank accession No.	Reference
Anti-apoptotic				
Bcl-2	F 5'-ACTTTGCAGAGATGTCCAGT-3' R 5'-CGGTTCAGGTACTCAGTCAT-3'	217 bp	U34964	(14)
Mcl-1	F 5'-TTAAAAACGAGGACGATGTT-3' R 5'-CCTTCTAGGTCCTGTACGTG-3'	268 bp	AF115380	(15)
Pro-apoptotic				
Bax	F 5'-CGGCGAATTGGAGATGAACTG-3' R 5'-GCAAAGTAGAAGAGGGCAACC-3'	160 bp	L22473	(16)
Bok	F 5'-TCTTCTCAGCAGGTATCACA-3' R 5'-CTGTGCTGACCACACACTT-3'	207 bp	AF027954	(17)

Table 2. In vitro development of mouse 2-cell embryos cultured in different media for 24 hr

Media	Total No. of 2-cell embryos	Developmental stage (%)	
		2~3-cell	2~3-cell
Ham's F-10	366	254 (68.2)	112 (31.2)
HTF	760	83 (10.1)*	677 (89.9)*
G1.2	504	65 (15.2)*	439 (84.8)*

* $p<0.01$, when compared to embryos in Ham's F-10

2 ml eppendorf tube에 넣어 -70℃에 보관하였다.

획득한 배아는 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. Reverse transcription은 DEPC-DW로 최종 부피를 20 ?l로 맞춘 total RNA에 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM dNTP, 1 unit의 RNase inhibitor, 2.5 ?M Random Haxamers 그리고 2.5 unit MuLV reverse transcriptase를 넣어 총 60 ?l의 부피로 맞춘 혼합 용액에서 수행하였다.

RT 반응은 65℃에서 10분 동안 RNA를 denaturation 하고, 42℃ 온도에서 60분 동안 RNA를 역전사하여 cDNA를 합성하고, 99℃에서 5분 동안 MuLV reverse transcriptase를 불활성화시키는 과정으로 진행되었다. PCR 반응은 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM의 dNTP, 1 unit Taq polymerase (Takara, Japan), 10 pmol 5과 3' primer 그리고 RT product를 첨가하고 Roche PCR machine을 사용하여 PCR를 수행하였다.

PCR 반응은 첫번째 cycle에서 95℃, 10분 동안 denaturation을 행하였고, primer에 따라 annealing 하기 알맞은 온도를 택하여 *Bcl-2*는 55℃, *Mcl-1*은 50℃, *Bax*는 61℃, 그리고 *Bok*는 50℃에서 5초 동안 annealing을 수행한 후 72℃로 extension 과정을 수행하였다. 이렇게 얻어진 PCR product를 0.5 ?g/ml의 ethidium bromide를 첨가한 1.8% agarose gel에 전기영동하여 UV하에서 관찰하였다. Band density는 Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, Italy)를 이용하여 측정하였다.

5. Primer Pairs

본 실험에서 RT-PCR에 이용한 *Bcl-2*, *Mcl-1*, *Bax* 및 *Bok* cDNA의 primer pairs는 Table 1에 제시하였다.

6. 통계 처리

실험 결과 비교에 대한 통계 처리는 Pearson's Chi-

Table 3. In vitro development of 2~3-cell and 4~8-cell embryos cultured in different media for 48 hr

Media	Morula (%)		Blastocyst (%)	
	2~3-cell	4~8-cell	2~3-cell	4~8-cell
Ham's F-10	5 (2.2)	32 (35.5)	0	4 (4.1)
HTF	10 (11.5)	480 (67.7)*	0	114 (20.3)*
G1.2	11 (9.9)	210 (46.7)*	1 (0.7)	222 (51.4)*

* $p<0.01$, when compared to embryos in Ham's F-10

Table 4. In vitro development of 2~3-cell and 4~8-cell embryos cultured in different media for 72 hr

Media	Blastocyst (%)		Hatching & Hatched Blasto. (%)	
	2~3-cell	4~8-cell	2~3-cell	4~8-cell
Ham's F-10	8 (3.8)	30 (31.5)	0	4 (3.5)
HTF	2 (0.7)	404 (60.4)*	0	135 (21.9)*
G1.2	7 (12.5)	172 (43.5)*	3 (2)	249 (52.9)*

* $p<0.01$, when compared to embryos in Ham's F-10

square test로 시행하였으며, p값이 0.01 보다 작은 경우를 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. Ham's F-10, HTF 및 G1.2 배양액에서 2세포기 배아의 발달률 비교

과배란을 유도와 교배로 얻은 ICR계 생쥐 2세포기 배아를 각각의 배양액에 24시간 배양한 후 난할 정도에 따라 2~3세포기와 4~8세포기로 나누어 72시간까지 추가로 배양하였다. 24시간 배양한 후 발달률을 비교하였을 때 HTF 및 G1.2에서는 4~8세포기로의 발달률이 각각 89.9% (677/760)과 84.8% (439/504)로 나타난 반면, Ham's F-10에서는 31.2% (112/366)로 나타나 배양액의 종류에 따라 2세포기 배아의 발달률에 차이를 보였다 (Table 2).

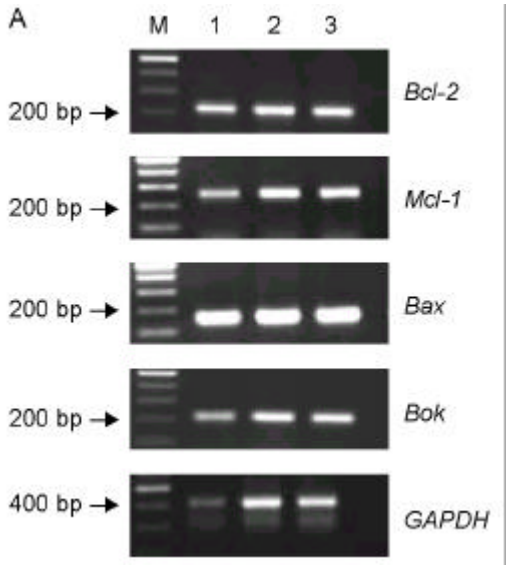
24시간 배양한 후 4~8세포기에 이른 배아는 Ham's F-10, HTF 및 G1.2에서 48시간 배양하였을 때에도 상실배 이상으로의 발달률이 각각 39.6%, 88%와 98.1%로 나타났으며, 2~3세포기에 이른 배아의 발달률도 각각 2.2%, 11.5%와 10.6%로 현저한 차이를 보였다 (Table 3).

이러한 현상은 Ham's F-10, HTF 및 G1.2에서 72시간 배양한 후 발달률을 비교하였을 때 역시 hatching과 hatched blastocyst로의 발달률이 Ham's F-10의 경우에 3.5% (4/112)으로 매우 낮았으나 HTF과 G1.2 경우에는 21.9% (135/677), 52.9% (249/439)로 Ham's F-10과 비교하여 유의하게 높았다 (Table 4).

2. 착상전 배아에서 *Bcl-2*계 유전자의 발현

Ham's F-10, HTF 및 G1.2에서 각각 2세포기 배아를 24시간 배양 후 얻은 4세포기의 배아를 72시간까지 추가 배양한 후 total RNA를 추출하고 *Bcl-2*, *Mcl-1*, *Bax* 및 *Bok* cDNA primer들을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

초기 배아에서 배양액의 차이에 따른 *Bcl-2*계 유전자 발현양상을 살펴보면, Table 2에서 보여진 발달률과 유사하게 세포고사를 유발하는 유전자인 *Bax*의 발현은 72시간 배양 후 hatching과 hatched blastocyst로의 발달률이 3.5%로 저조하게 나타난 Ham's F-10에서 HTF 및 G1.2 보다 약 2.5배 높게 발현되었다 (Figure 1). 한편 *Bax*와 이종이합체를 형성하는 것으로 알려진 *Bcl-2*도 Ham's F-10에서 HTF 및 G1.2에서 보다 약 2배 높게 발현되었다. 또한, 최근에 알려진 세포고사를 유발하는 유전자인 *Bok* 역시 이종이합체 형성 유전자인 *Mcl-1*과 함께 *Bax*와 *Bcl-2*에서



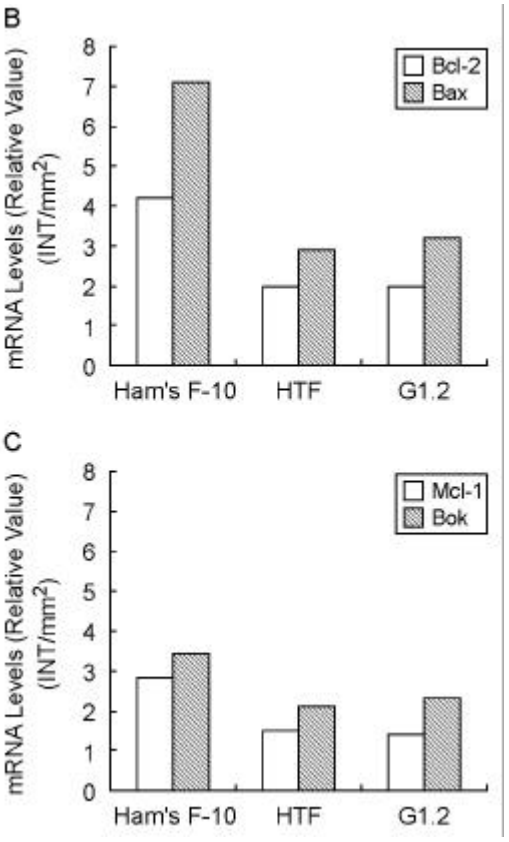


Figure 1. Expression of Bcl-2 family members in mouse preimplantation embryos. **(A)** Total RNA extracted from 4-cell embryos curtured in Ham's F-10 (lane 1), HTF (lane 2), and G1.2 (lane 3) for 72 hr were used for RT-PCR. The expression of GAPDH was used as an internal standard. M, MW marker. Densitometric analysis of relative mRNA levels of *Bcl-2*/*Bax* **(B)** and *Mcl-1*/*Bok* **(C)**. Data represent mean value from two independent experiments.

만 못하지만 Ham's F-10에서 HTF와 G1.2 보다 높은 발현양상을 보였다.

고 찰

최근 보조생식술의 발달 및 배양조건의 개선으로 불임 치료의 성공률이 많이 향상되어 왔다. 그러나 이러한 발전에도 불구하고 일부의 배아만이 좋은 상태로 발생하며 나머지는 비정상적인 형태와 느린 발달률을 나타내는 것으로 보고되고 있다.[18] 체외 수정 및 배양시 세포질의 분절화는 난할 초기에서부터 시작되며 대부분의 경우에 배아가 분열을 거듭하여도 분절화 현상은 지속되어 전체 배아 중 세포질의 분절화를 보이는 예는 약 50% 정도를 차지한다.[2,19] 현재 배아의 분절화 현상과 가장 밀접한 관련이 있는 것으로는 세포고사를 들 수 있으며, 이는 세포내에서 능동적인 세포죽음의 형태로 진행되고 *Bcl-2*, *Bax* 등의 유전자 발현이 세포고사의 개시를 위해 반드시 필요하다.[20] 본 실험은 생쥐 착상전 초기 배아를 이용하여 체외 배양시 배아의 분절화와 관련된 세포고사를 개시하는 유전자의 발현양상을 조사하여 배양액이 배아의 질에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다. 혈청이 첨가되지 않은 Ham's F-10, HTF 및 G1.2 각각의 배양액에 2세포기 배아를 48시간 배양했을 때, 초기 배아의 발달에 유익한 영향을 주는 것으로 알려진 비필수 아미노산류를 함유한 G1.2 및 HTF에서 상실배 이상으로의 발달률이 97.2%, 88%로 비필수 아미노산 뿐만 아니라 각종 필수 아미노산까지 포함된 Ham's F-10 (39.6%)에서의 배아보다 더 좋은 발달률을 보였다. 또한, 각각의 배양액에서 72시간 배양한 배아로부터 분리한 RNA를 이용하여 세포고사를 개시하는데 관여하는 유전자인 *Bcl-2*, *Mcl-1*, *Bax* 및 *Bok*의 발현양상을 살펴본 결과, Ham's F-10에서 회수한 배아는 HTF와 G1.2에서 회수한 배아보다 *Bax* 유전자를 약 2.5배 높게 발현시키는 양상을 보였다.

보조생식술에서 채취한 대부분의 난자를 수정시킨 후 2~3일 후에 이식하는 것은 난관에 있어야 할 난할단계의 배아를 자궁으로 이식하는 것이 되므로 결과적으로 낮은 착상률을 보인다. 따라서 자궁과 배아의 생리환경을 일치시켜 주고자 난할단계의 배아를 좀더 배양하기에 적합한 배양액의 개발 및 다양한 혈청과 단백질 첨가제의 첨가에 관한 연구가 이루어져 왔다.[8,9] Quinn 등[8]은 인간 난관에서와 생리적 조성이 비슷한 HTF를 사용하여 더 높은 임신율을 얻었다고 보고하였다. 한편, 체세포나 혈청 등을 배양액에 첨가하여 나타날 수 있는 감염 및 생물학적 변화들을 제거하고 배아의 대사적 변화 요구에 적합한 둘 이상의 연속 배양액 개발이 제안된[21,22] 이후, Gardner 등[9]은 최근에 배아를 처음 2일간 G1 배양액에서 배양하고 3일 이후는 G2 배양액으로 바꿔 배양하여 45.5%의 개선된 착상률을 보고하였다. 본 실험에서는 기존에 가장 보편적으로 사용되었던 Ham's F-10과 새롭게 사용되고 있는 HTF 및 G1.2에서 2세포기 배아를 72시간 배양하여 배양액간에 발달률의 차이를 살펴보았다. 24시간 후 배아의 발달률을 살펴본 결과, 배양액에 비필수 아미노산이 첨가된 HTF와 G1.2에서 필수 아미노산과 비필수 아미노산을 모두 포함한 Ham's F-10 보다 유의하게 빠른 발달률을 보였다. 24시간 배양 후 느린 배아 발달군 (2~3세포군)과 빠른 배아 발달군 (4~8세포군)으로 나누어 72시간까지 배아 발달률을 살펴본 결과, 빠른 배아 발달군 (4~8세포군)에서 계속적으로 더 높은 배아 발달률을 보였다. 이 결과는 생쥐, 소, 인간 배아에서 첫번째 난할의 개시가 빠른 배아들은 더 높은 포배 형성 및 착상률을 보였다는 결과와 일치하는 양상이었다.[23,24] 즉, Fenwick 등[23]은 인간 배아에서 수정 후 25시간 내에 2세포기에 도달한 배아에서는 32.2%가 포배기에 이르렀으나, 25시간 내에 2세포기에 도달하지 못한 배아에서는 16.6%만이 포배기에 이르렀다고 보고하였다.

착상전 배아의 질을 예측할 수 있는 2가지 기준은 배아 발달률과 분절화 정도이다.[25] 근자에 와서 생쥐와 인간의 착상전 배아에서 세포고사를 조절하는 유전자, *Bcl-2*와 *Bax*의 발현이 RT-PCR을 이용하여 확인되었다.[25] 또한 흰쥐에서 세포고사를 억제하는 *Bcl-2*계 유전자인 *Mcl-1*이 난소, 정소, 수란관 및 자궁에서 높게 발현되며[15] 최근에 밝혀진 세포고사를 유발하는 유전자인 *Bok*는 *Mcl-1*과는 이종이합체를 형성하지만 *Bcl-2*와는 이종이합체를 형성하지 않고 흰쥐의 난소, 정소 및 자궁에서 높게 발현되는 것으로 보고되었다.[17] 본 실험에서는 24시간 배양 후 빠른 배아 발달군의 4세포기 배아를 Ham's F-10, HTF 및 G1.2 배양액에서 72시간까지 배양시 세포고사에 관여하는 유전자의 발현양상을 조사하여 배양액이 세포고사를 통해 배아의 질에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 *Bcl-2*와 *Bax*의 발현은 Ham's F-10에서 배양한 배아에서 각각 약 2배와 2.5배로 높게 나타났다. 이 결과는 배아의 낮은 발달률과도 일치하는 양상이었다. 또한 HTF와 G1.2에서는 Ham's F-10 보다 낮은 *Bcl-2*와 *Bax*의 발현양상을 보였으며, 이들 배양액에서의 배 발달률은 72시간에 82.3%와 96.4%의 높은 발달률을 보였다. *Mcl-1*과 *Bok*의 이종이합체도 역시 아직까지 밝혀지지 않은 착상전 배아에서 발현됨을 이번 실험으로 사상 처음으로 확인할 수 있었고 그 발현 정도는 *Bcl-2*와 *Bax* 이종이합체에 비해 상대적으로 낮았지만 마찬가지로 Ham's F-10군에서 더 높았다. Sano 등[26]은 생쥐와 인간 배아에서 세포고사를 억제하는 *Bcl-2*계 유전자인 *EAT/mcl-1* 단백질의 발현이 수정 후 2세포기에 최고치에 도달하며 8세포기까지 지속되고 점차 낮아져 포배기에 이른다고 보고한 바 있다. Kim 등[27]은 인간 배아에서 분절화가 없는 배아군에서는 *Bcl-2*가 많이 발현되었지만, 분절화가 있는 배아군에서는 *Bax*가 더 많이 발현되어 *Bcl-2*는 세포고사를 억제하지만 *Bax*는 세포고사를 유발하는 작용을 하는 것으로 보이며 두 단백질이 발현되는 비율이 세포고사를 조절하는 것으로 보여진다고 하였다.

이상과 같은 연구 결과를 종합해보면, 체외에서 배아 배양시 배양액은 배아의 발달률 및 분절화 현상에 큰 영향을 미치고 있으며 이때 *Bax*나 *Bok*의 발현은 배아 발달의 정지와 세포질의 분절화를 야기시킬 수 있을 것으로 추정된다. 또한, 향후 보조생식술에서 높은 임신율을 얻기 위해서는 이러한 세포고사 유전자 연구 등의 기초적 연구를 토대로 한 모체의 환경과 유사한 조건의 보다 우수한 배양액 및 배양조건의 개발이 보다 더 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum Reprod Update 1997; 3: 367-82.
2. Janny L, Menezo YJR. Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. Mol Reprod Dev 1996; 45: 31-7.
3. Cohen J, DeMouzon J, Lancaster P. World collaborative report on assisted reproduction: results of 1991 attempts. J Assist Reprod Genet 1993; 10 (Supple 6): 2 (Abstr).
4. Stein A, Pinkas H, Rufas O, Ovadia J, Amit S, Bisch B, et al. Assisted hatching by parial zona dissection of human pre-embryos in patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. Fertil Steril 1995; 63: 838-41.
5. Min BK, Kim KS, Lee HS, Hong KY, Kim HG, Shin MC, et al. The effect of platelet activating factor on development of embryonic cells at co-culture in vitro with human salpingeal cell in mouse. Kor J Fertil Steril 1996; 23: 1-6.
6. Cheon YP, Gye MC, Kim CH, Kim MK. Effects of indomethacin on development and hatching of mouse embryo. Kor J Fertil Steril 1997; 24: 35-42.
7. Ham RG. An improved nutrient solution for diploid chinese hamster and human cell lines. Exp Cell Res 1963; 29: 515-26.
8. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril 1985; 44: 493-8.
9. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. Fertil Steril 1998; 69: 84-8.
10. Fong CY, Bongso A, Ng SC, Anandakurmar C, Trounson A, Ratnam S. Ongoing normal pregnancy after transfer of zona-free blastocysts: implications for embryo transfer in the human. Hum Reprod 1997; 12: 557-60.
11. Jurisicova A, Latham KE, Casper RF, Varmuza SL. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. Mol Reprod Develop 1998; 51: 243-53.
12. Adams JM, Cory S. The *Bcl-2* protein family: Arbiters of cell survival. Science 1998; 281: 1322-6.
13. Chao DT, Korsmeyer SJ. *Bcl-2* family: Regulators of cell death. Annu Rev Immunol 1998; 16: 395-419.
14. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the *Bcl-2* gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive *Bcl-2* and *Bcl-xlong* messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology 1995; 136: 232-41.
15. Leo CP, Hsu SY, Chun SY, Bae HW, Hsueh AJW. Characterization of the antiapoptotic *Bcl-2* family member myeloid cell leukemia-1 (*Mcl-1*) and the stimulation of its message by gonadotropins in the rat ovary. Endocrinology 1999; 140: 5469-77.
16. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. *Bcl-2* heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, *Bax*, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74: 609-19.
17. Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJW. *Bok* is a pro-apoptotic *Bcl-2* protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic *Bcl-2* family members. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 12401-6.
18. Andres S, Christel HG, Maria SA, Aila T, Timo T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the annessment of human embryo quality. Hum Reprod 2001; 16: 2177-81.
19. Levy R, Benchaib M, Cordonier H, Souchier C, Guerin JF. Annexin V labelling and terminal transferase-mediated DNA and labelling (TUNEL) assay

in human arrested embroys. Mol Hum Reprod 1998; 4: 775-83.
20. Reed JC. *Bcl-2* and the regulation of programned cell death. J Cell Biol 1994; 124: 1-6.
21. Scholtes MC, Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer result after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. Fertil Steril 1996; 65: 1245-8.
22. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. Hum Reprod 1998; 13: 169-77.
23. Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental Competence of human preimplantation embryos in vitro. Hum Reprod 2002; 17: 407-12.
24. Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. Hum Reprod 2001; 16: 2652-7.
25. Warner CM, Cao W, Exley GE, McElhinny AS, Alikani M, Cohen J, et al. Genetic regulation of egg and embryo survival. Hum Reprod 1998; 13: 178-90.
26. Sano M, Umezawa A, Suzuki A, Shimoda K, Fukuma M, Hata J. Involvement of *EAT/mcl-1*, an anti-apoptotic *Bcl-2*-related gene, in murine embryogenesis and human development. Exp Cell Res 2000; 259: 127-39.
27. Kim JS, Kim MS, Yang HW, Yu CH, Yoon YD, Bae IH, et al. The study on apoptosis and expression of *Fas*, *Fas-ligand*, *Bax* and *Bcl-2* in human fragmented embryos. Kor J Fertil Steril 2002; 29: 167-78.