

such as wounding and skin disease. Estrogen plays critical roles in regulating various physiological events via its nuclear estrogen receptors (ER). Interestingly, it was shown that Sprr2a was significantly up-regulated in uteri of ovariectomized (OVX) mice exposed to 17 β -estradiol (E₂). Following investigation has shown that E₂ induces expression of other members of Sprr2 family as well as Sprr2a in the mouse uterus. Thus, we further characterized the potential actions of estrogen on the regulation of Sprr2a family in uterus and other reproductive organs in mice.

Methods: OVX mice (6~8 week old) were given a single injection of E₂ and/or progesterone (P₄) at various concentrations to examine the regulation of Sprr2 family in the mouse uterus by steroid hormones. To examine whether E₂-induced expression of Sprr2 family is ER-dependent, ICI 182,780 (an ER antagonist) was pretreated to OVX mice 30 min before E₂ injection. To investigate whether endocrine disruptors with estrogenic effects can also induce expression of Sprr2 family in the mouse uterus, 4-tert-octylphenol (OP) or bisphenol A (BPA) was given to immature mice. Mice were sacrificed and uterine horns were collected for RNA extraction and immunohistochemistry at 6 and/or 12 h after injection. RT-PCR with appropriate primers for all members of Sprr2 family was performed.

Results: Expression of Sprr2a, 2b, and 2e, which showed E₂ dose-dependent regulation, was significantly reduced by pretreatment with ICI 182,780, an ER antagonist, suggesting the ER-dependent regulation of estrogen on their expression. In contrast, ICI 182,780 pretreatment was not able to efficiently inhibit estrogen-induced expression of Sprr2c, 2d, 2f and 2g in the mouse uterus. Immunohistochemistry showed that expression of Sprr2a protein, which is mainly localized in the epithelial cell compartments, is also effectively inhibited by ICI 182,780 pretreatment in the mouse uterus. A single injection of P₄ as well as E₂ rapidly up-regulated the expression levels of Sprr2c, 2f and 2g mRNAs while P₄ did not significantly enhance or antagonize the action of E₂ on the expression of Sprr2 family. OP and BPA were able to induce mRNA expression of Sprr2 family, suggesting that Sprr2 family members are truly regulated by estrogen. In addition, RT-PCR for Sprr2 family in reproductive organs of immature and adult mice showed that they are mainly expressed in adult uterus but not in others in our analysis.

Conclusion: E₂ dose-dependent regulation of Sprr2 family is mediated via genomic and/or non-genomic actions of estrogen signaling pathways mainly in the mouse uterus.

P-21 Progesterone과 TGF- β 1에 의해 탈락막화가 유도된 자궁내막세포의 3차원 배양이 생쥐 2-Cell의 발달에 미치는 영향

김휘곤¹ · 권옥현² · 고경래³ · 김미경³ · 이규섭¹

¹부산대학교 의학전문대학원 산부인과학교실, ²창원 한마음병원 산부인과,

³부산대학교병원 불임클리닉

Objectives: 분리한 상피세포와 기질세포의 3차원 공배양을 통한 탈락막화 유도에서 두 세포간의 상호작용, 성호르몬과 TGF- β 1의 역할을 알아보고 생쥐 2-cell과 탈락막화가 유도된 자궁내막세포와의 공배양을 통하여 배 발달을, 부화율, 부착율을 알아보기 위해 수행 되었다.

Methods: 상피세포와 기질세포를 분리하여 상피세포 표식인자인 cytokeratin과 기질세포 표식인자인 vimentin을 이용하여 면역조직화학염색으로 분리를 확인하고 공배양과 단일배양에 성호르몬과 TGF- β 1을 첨가하여 탈락막화 표식인자의 발현을 조사하고 발현 유무에 따라 생쥐 2-cell과 공배양을 하였다.

Results: Cytokeratin과 vimentin을 이용한 면역조직화학염색 결과 95% 이상에서 양성반응을 나타내어 상피세포와 기질세포가 성공적으로 분리되었음을 확인하였다. 분리된 상피세포와 기질세포를 각각 단일배양하거나 공배양한 후 progesterone과 estrogen을 처리하여 TGF- β 1과 수용체-1,-2, integrin- β 3, prolactin mRNA 발현을 조사한 결과 단독배양에서는 모든 mRNA가 발현되지 않았다. 공배양에서는 progesterone 우세환경일 경우 TGF-수용체 2를 제외한 모든 mRNA가 발현하였으며, estrogen 우세환경에서는 TGF-수용체2와 prolactin이 발현되지 않아 TGF- β 1의 활성화에 필요한 paracrine factor의 필요성을 알 수 있었다. 기질세포 단일 배양에서 각각 progesterone과 estrogen 우세환경을 만든 후 TGF- β 1을 첨가하여 수용체의 발현을 조사한 결과, 두 환경에서 수용체-1과 -2의 mRNA가 발현하는 것이 관찰되어 상피세포와 기질세포를 공배양하여 progesterone 우세환경에서 TGF- β 1을 첨가할 경우 탈락막화가 이루어짐을 알 수 있었다. 상피세포와 기질세포의 공배양에 progesterone 우세환경 혹은 estrogen 우세환경을 만든 후 48시간 동안 배양하여 배양액내의 HGF농도 (mean \pm SD)를 측정된 결과, 호르몬 무첨가 (157 \pm 32)보다 progesterone (2107 \pm 486)과 estrogen (4126 \pm 407) 우세환경에서 높은 HGF 농도가 나타나 자궁내막증식 촉진인자인 HGF 발현에 성호르몬이 관여함을 알 수 있었다. 생쥐 2세포기 배아를 배양액 단독, 비탈락막화, 탈락막화 유도 자궁내막세포와 공배양한 결과 배발달율에서는 차이가 없었으나, 부화율은 탈락막화된 세포와의 공배양 (92%)이 배양액단독 (58%)과 비탈락막화 세포와의 공배양 (62%)보다 높은 부화율을 나타내었다 ($p < 0.05$). 부착율은 탈락막화 (82%)와 비탈락막화 (78%)사이에 차이를 나타내지 않았지만, 비탈락막화 세포와의 공배양에서 영양막세포가 투명대를 완전히 빠져나오지 않은 상태로 부착한 비정상형태를 관찰할 수 있었다. 배양액단독, 비탈락막화 혹은 탈락막화 자궁내막세포와의 공배양에서 부착된 생쥐포배의 세포수 (mean \pm SD)의 관찰에서 ICM수는 각각 13.83 \pm 0.51, 17.93 \pm 0.4, 17.9 \pm 0.52개로 탈락막화에 관계없이 공배양한 포배의 ICM수가 많았으며 ($p < 0.001$), 영양배엽세포수는 각각 49.23 \pm 0.77, 57.56 \pm 0.67, 72.63 \pm 0.86개로 탈락막화 세포와 공배양된 포배의 영양배엽수가 많은 것으로 나타났다 ($p < 0.001$).

Conclusion: 자궁내막조직에서 상피세포와 기질세포를 분리한 후 다시 공배양하여 progesterone 우세환경에서 TGF- β 1 (10 nM/ml)을 첨가하여 체외에서 인위적으로 탈락막화를 유도할 수 있었으며, 탈락막화를 유도한 자궁내막세포와 생쥐 2세포기를 공배양하였을 때 부화율, 내세포피와 영양막세포수를 가진 양질의 배아생성에 유효한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

P-22 Ongoing Pregnancy after Vitrification of Human Oocytes

Nae Young Youn, Joon Gyo Lim, Gwang Su Ghil, Kyu Young Lee, Choong Ku Kang

Sanborn Jeil Hospital

Objectives: We report the ongoing pregnancy after vitrification of oocytes which was retrieved from infertile couple failed obtain sperm on day of IVF.

Methods: Oocytes retrieved from a polycystic ovary syndrome patient undergoing ovarian stimulation using GnRH antagonists. Those oocytes were exposed to DPBS supplemented with 1.5 M of ethylene glycol for 5 minutes and DPBS supplemented with 5.5 M of ethylene glycol and 1 M of sucrose for 20 seconds in consecutive order. Oocytes mounted on EM grids were plunged into liquid nitrogen. For thawing of the vitrified oocytes, EM grids were transferred sequentially to DPBS + 10% SSS supplemented with 1 M, 0.5 M, 0.25 M, and 0.125 M of sucrose at intervals of 5 minutes.

Results: A total of 41 oocytes retrieved from patient were vitrified. For fertilization using intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) technique, sixteen oocytes was thawed. Fourteen oocytes morphologically survived after thawing and