

Materials and Methods: Mouse ovulated oocytes (metaphase II) were collected and cryopreserved by a modified slow-freezing method with 1.5 M propanediol (PrOH)- 0.1M sucrose or by vitrification protocol using cryo loop and EM grids with 40% ethylene glycol-0.6 M sucrose. Four hours after thawing, intact oocytes were fixed, and stained spindles with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated antibody against to α -tubulin and chromosomes with propidium iodide (PI). Spindle morphology was classified as follows: normal (barrel-shaped), slightly abnormal and abnormal (multipolar or absent).

Results: After thawing, survival rate of the oocytes in vitrification group (62.7%) was significantly ($p<0.01$) higher than that of slow-freezing group (24.4%). Vitrification with cryo loop showed significantly higher survival rate than that with EM grids (67.7% vs 53.5%, $p<0.05$). Normal spindle and chromosome configurations of oocytes after thawing between two vitrification group was not significantly different.

Conclusion: For mouse ovulated oocytes, vitrification with cryo loop may be a preferable procedure comparing to slow-freezing methods. Further study should be needed to investigate the developmental competency of frozen-thawed mouse oocytes

P-25 Glycerol와 DMSO를 이용한 생쥐 고환조직의 동결-용해 후 미세구조의 변화 관찰

삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실¹, 순천향대학교 생명과학과²

한상철 · 오승한² · 송상진¹ · 이선희¹ · 박용석¹

Background & Objectives: 동결보호제인 glycerol과 DMSO가 동결보존 시 정세관의 형태에 미치는 효과를 비교하기 위하여 광학 및 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

Method: 생쥐의 정세관을 20% glycerol 혹은 DMSO를 동결보호제로 사용하고 computer controlled freezing program을 사용하여 동결하였다. 동결보존한 생쥐의 정세관을 37°C water bath에서 용해 후 광학 및 전자현미경적 관찰을 위하여 4% glutaraldehyde에 고정하였다. 탈수, 치환과정을 거쳐 광학현미경 sample은 파라핀을 포매제로 사용하여 7 μ m의 두께로 H-E staining을 실시하고, 전자현미경 sample은 Epon을 포매제로 사용하여 70 nm의 두께로 uranyl acetate와 lead citrate를 이용한 double staining을 실시하여 각각 관찰하였다.

Results: 동결을 시행하지 않은 정상 대조군의 생쥐 정세관에서는 정조 세포 (germ cell)와 Sertoli 세포에서 정상적인 세포소기관을 관찰할 수 있었고, 세포사이의 공간을 관찰할 수 없었다. 그러나 동결-용해한 정세관에서는 다수의 mitochondria 파괴, 세포질의 공포 그리고 세포와 세포사이의 공간이 존재하는 것을 관찰할 수 있었다. 일부 세포의 경우, 세포 소기관이 파괴되어 생성된 듯한 다각형의 빈 공간을 관찰할 수 있었다. Glycerol과 DMSO에 의한 동결보호 효과를 비교하였을 때 두 실험군간의 세포형태 변화는 유사하였다. 즉, 두 실험군에서 세포미세구조의 파괴, 정조세포의 기저막 이탈, lysis된 세포 그리고 세포간의 결합과 파괴 등이 모두 관찰되었다. 그러나 glycerol군에 비해 DMSO군의 조직에서 세포간 결합과 세포미세구조의 보존상태가 비교적 양호하며 lysis된 세포수도 적었다.

Conclusions: 정세관의 동결보존 시 세포소기관, 세포간의 결합 그리고 세포의 파괴가 나타났다. 이와 같은 현상을 극복하기 위해 사용하는 동결보호제인 glycerol과 DMSO의 효과를 비교하였을 경우

DMSO군에서 세포의 손상이 적은 것으로 관찰되었는데 이는 DMSO가 glycerol에 비해 조직내 침투가 용이하기 때문인 것으로 사료된다.

P-26 Estrogen Regulates the Expression of Sprp2 Family Gene in Mouse Uterus During the Estrous Cycle and the Pregnancy Period

SH Hong, HY Nah², JY Lee², YJ Lee^{1,2}, CH Kim², HD Chae²,
SH Kim², BM Kang², MK Kim¹

*Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul, Korea¹,
Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ulsan University,
Asan Medical Center, Seoul, Korea²*

Background & Objectives: To investigate estrogen-regulated genes in the mouse uterus, we studied the effect of ovariectomy (OVX) with or without estrogen treatment using cDNA microarray. Of these genes, Sprp2A showed the highest level of up-regulation by estrogen in the OVX/estrogen treatment/12-h protocol. Therefore, we examined the expression of Sprp2 family (2A-2K) genes during the estrous cycle and the pregnancy period.

Method: Using real-time PCR, we examined Sprp2 family genes in the mouse (outbred ICR) uterus at various stages of the natural estrous cycle and during the pregnant period. The estrous cycle was staged by examining vaginal smears. The presence of a vaginal plug after mating was designated as day 1 of pregnancy (D1) and the uteri were collected on specified days of pregnancy (D1-6). For the investigation of the effect of estrogen, adult female mice were ovariectomized two week before the treatment of estrogen (300 ng/mouse).

Results: Sprp2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F and 2G were up-regulated by estrogen in the OVX mouse uterus. The expression of Sprp2A, 2B, 2C, 2D and 2E was showed in increased level at pregnancy D1-2, but decreased at D3-6. During the estrous stages, Sprp2A, 2B and 2F were appeared intensively in proestrous and estrous, then declined rapidly from metestrous and diestrous.

Conclusions: Although the clarification of the function of Sprp2 family and the significance of estrogen responsiveness in relation to uterine physiological events have not been identified, our results suggest that the Sprp2 family gene plays a pivotal role in the estrous cycle and the implantation process.