

P-27 **Effects of Epidermal Growth Factor on the Apoptosis and Implantation Related Genes in Bovine Embryos Developing in vitro**

SY Park, JC Tae, EY Kim, NH Kim¹, SP Park, JH Lim²

*Maria Infertility Hospital Medical Institute/ Maria Biotechnology,
¹Chungbuk National University, ²Maria Infertility Hospital*

Background & Objectives: Epidermal growth factor (EGF) induces well-documented mitogenic and differentiating effects on murine and bovine preimplantation embryos. However, the effects of EGF on apoptosis and implantation-related gene expression in bovine embryos developing in vitro have not been evaluated. The objective of this study was to determine the effects of exogenous EGF in the presence and absence of BSA on the preimplantation development of bovine embryos. In addition, we measured cell number, apoptosis, and expression of apoptosis and implantation-related genes of the blastocysts that developed in these culture conditions.

Method: In vitro produced bovine embryos were randomly cultured in the same medium containing 0 or 10 ng/ml EGF in the presence and absence of 0.8% BSA. More 2-cell embryos developed into blastocysts at day 7 when BSA was present than when BSA was absent.

Results: The addition of 10 ng/ml EGF into the medium did not significantly increase the developmental rate and the cell numbers per blastocyst. However, addition of EGF in the presence of 0.8% BSA significantly reduced the degree of apoptosis in the blastocysts ($p < 0.01$). To investigate whether EGF modulates mRNA expression of apoptosis-related genes, mRNA was prepared from single blastocysts and each preparation was subjected to RT-PCR for Bcl-2 and Bax transcripts. EGF did not alter the relative abundance of Bax gene expression in the presence of BSA, but increase Bcl-2 ($p < 0.01$). The relative abundance of Interferon tau expression was increased by EGF treatment in the presence of BSA.

Conclusions: These results suggest that EGF and BSA synergistically enhance Bcl-2 and interferone tau gene expression, which may result in a net increase in viability in bovine embryos.

P-28 **Effect of Gonadotrophic Hormones on AQP Genes Expression and Localization in Mouse Ovary**

SE Lee, MC Gye, HS Shin, JW Lee, SM Kang, HS Kang, MK Kim

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University

Background & Objectives: AQP은 passive water transporter로써 현재까지 11개가 밝혀져 있으며 그 중 AQP 7, 8, 9의 경우 aquaglyceroporin이라 불리며 이 경우 water 뿐만 아니라 glycerol이나 urea같은 small molecule의 투과가 가능하다. Folliculogenesis 시기에 일어나는 급속한 난포액의 축적에 AQPs 유전자를 통해 이루어 질 것으로 추측되고 있다. 본 실험에서는 folliculogenesis 동안의 AQP 7, 8, 9의 발

현량과 부위를 조사하였다.

Method: 3주령의 미성숙 생쥐를 이용하였다. PMSG 주사후 8, 24, 48시간, 연속적으로 hCG injection 후 8, 16, 24시간 후 도살하여 난소를 획득하였다. RT-PCR을 이용해 일차적으로 전체 ovary의 mRNA 발현량을 확인하고, 이후 laser captured microdissection (LCM)을 이용하여 theca layer와 granulosa cell (GC) 부위를 나누어 획득하여 조직별 발현을 확인하였다. AQP 7, 8, 9 specific Ab들을 이용해 immunohistochemistry를 수행하여 발달중인 난포내 AQP 7, 8, 9 protein localization을 보았다.

Result: RT-PCR 결과 AQP 7, 8, 9 모두 PMSG, hCG injection 후 증가하였다. AQP 7과 9의 발현양은 injection 초기에 감소한 후 ovulation 시기에 이르러서 그 양이 증가함이 확인되었다. AQP 8의 경우 이와 다르게 초기 증가 후 다시 감소하였다. LCM sample RT-PCR 결과 AQP 7, 8, 9 모두 대부분 theca layer에서 GC 부분보다 많은 발현을 보였으며 일부 luteal cell에서는 이전의 GC들에 비해 높은 AQP 발현을 보였다. Immunohistochemistry 결과 mRNA 발현량과 유사하게 난포발달 전 과정에서 theca cell layer에서 발현이 강하게 검출되었으며, luteal cell에서의 발현은 GC에서의 발현보다 강하였다.

Conclusions: 난포형성과정에서 AQP 7, 8, 9의 mRNA 및 단백질의 발현에 근거할 때 이들은 난포발달과 배란과정 동안에 난포액의 축적에 관여할 뿐만 아니라, 이후의 corpus luteum 형성에도 관여하는 것으로 보인다.

P-29 혈액-정소 장벽 형성과 정소 내 밀착결합 유전자 발현 및 조절

한양대학교 생명과학과

최진국 · 계명찬

Background & Objectives: 정소의 세정관 외곽에 존재하는 Sertoli cell 사이에 형성되는 밀착결합은 혈액정소 장벽을 형성하여 정자형성 과정에 요구되는 세정관 내부의 독특한 환경을 조성한다. 밀착결합은 occludin, claudin 등의 integral membrane protein과 ZO-1 등의 plaque protein으로 구성되며 세포질 내부로 세포질골격 및 다양한 신호전달 분자와 복합체를 형성하고 있으므로 다양한 세포 내외부의 신호에 반응하여 그 구조와 기능이 역동적으로 조절된다. 본 연구에서는 생쥐 정소의 발달과정 동안 밀착결합 유전자 3종 (occludin, claudin-1, -11)의 발현을 추적하였으며 in vitro model을 통해 interstitial cell (주로 Leydig cell)과의 상호작용이 Sertoli cell 밀착결합 유전자의 발현 및 기능적 지표인 transepithelial electrical resistance (TER)에 미치는 영향을 조사하였다.

Method: 생쥐 정소의 발달과정 동안 밀착결합 유전자 3종 (occludin, claudin-1, -11)의 발현을 추적하였으며 in vitro model을 통해 interstitial cell (주로 Leydig cell)과의 상호작용이 Sertoli cell 밀착결합 유전자의 발현 및 기능적 지표인 transepithelial electrical resistance (TER)에 미치는 영향을 조사하였다. 임신 18일 (GD18) 및 생후 4, 8, 12, 16, 20, 24, 70일령의 수컷 생쥐의 고환조직에서 occludin, claudin-1, claudin-11의 발현을 조사하였다. Total RNA를 역전사하여 cDNA를 합성하고 최적의 PCR cycle 수를 결정한 후 이에 근거하여 RT-PCR을 수행하였다. 한편 미성숙 생쥐 (2주령)의 고환을 절편에 collagenase, DNase, trypsin을 처리하여 Sertoli cell을 분리하여 cell culture plate에 집중한 후 bottom well에 interstitium (Leydig cell)을 배양하였다. 배양 기간 동안 TER의 변화를 추적하였고 종료된 Sertoli cell로