

P-10

## Improved in vitro Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos Treated with Flavonoid

Jin Cheol Tae<sup>1</sup>, Eun Young Kim<sup>1</sup>, Kilsoo Jeon<sup>1</sup>, Keum Sil Lee<sup>1</sup>,  
Chang Hyun Lee<sup>1</sup>, Yeon Ok Kim<sup>1</sup>, Se Pill Park<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Mirae Biotech/Cheju National University Stem Cell Research Center, <sup>2</sup>Cheju National University

**Objectives:** The success of somatic cell cloning gives promise to applications such as species preservation, cell therapy and production of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryonic stem cells. To improve the in vitro developmental capacity of SCNT bovine embryos, flavonoid additive effect as a radical scavenger in culture medium was examined.

**Methods:** To optimize the treatment concentration of flavonoid, parthenogenetic day 2 ( $\geq 2\sim 4$  cell) bovine embryos were treated with various concentrations of flavonoids (3,4-dihydroxyflavone; 1, 10 and 100  $\mu\text{M}$ ) for 6 days. Also, the 10  $\mu\text{M}$  flavonoid addition effect was examined on in vitro development of SCNT day 2 ( $\geq 2\sim 4$  cell) bovine embryos. The treatment effect was assessed by in vitro blastocyst development rate.

**Results:** In comparison with the absence of flavonoid, treatment with flavonoid at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  showed a significant increase for the blastocyst formation in the parthenogenetic embryos (control, 27.4%; 1  $\mu\text{M}$  F, 32.7; 10  $\mu\text{M}$  F, 38.9 and 100  $\mu\text{M}$  F, 32.7%;  $p < 0.05$ ). Also, the supplementation of 10  $\mu\text{M}$  flavonoid (30.7%) during in vitro culture gives positive effect on blastocyst formation of SCNT embryos compared to control (26.1%).

**Conclusion:** This result suggests that flavonoid addition in culture medium brings beneficial effects on subsequent embryo development of bovine SCNT embryos.

P-11

## 할구 유래의 생쥐 배아줄기세포주 확립 과정에서 배양액에 첨가된 LIF와 ACTH의 영향

조재원 · 임친규 · 한상철 · 고덕성 · 전진현

관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구소

**Objectives:** 할구 유래의 배아줄기세포주 확립 방법은 초기 배아의 생명력에 손상을 주지 않으면서 배아 파괴에 따른 윤리적인 문제를 극복할 수 있는 획기적인 방법이다. 그러나 이러한 할구 유래 배아줄기세포주 확립 효율성은 생쥐와 인간에 있어서 각각 4.0% (5/125)와 2.2% (2/91) 정도로 매우 낮은 성공률을 보고하고 있다. 본 연구에서는 생쥐 초기 배아에서 분리한 할구 유래의 배아줄기세포주 확립 과정에서 배양액 첨가물의 영향을 살펴보고자 하였다.

**Methods:** 생쥐 초기 배아의 배양액에 leukaemia inhibitory factor (LIF)를 농도별 (control, 1000 U, 2500 U, 5000 U)로 첨가하여 포배기 배아의 세포수에 미치는 영향을 살펴보기 위해 영양배엽의 세포수와 내세포피의 세포수를 differential staining을 통해서 관찰하였으며, LIF 농도에 따른 배아줄기세포주 확립 효율을 비교하였다. 또한, 2-세포기와 4-세포기의 생쥐 초기 배아에서 분리한 할구유를 2500 U의 LIF가 첨가된 G2.3 배양액에서 2~3일간 배양하여 포배기 배아를 획득한 후 15% serum replacement (SR), 0.01 mg/ml의 adrenocorticotrophic hormone (ACTH), 2000 U의 LIF가 첨가된 배양액 하에서 단일 할구 유래 배아줄기세포주 확립 효율을 비교하였다. 확립된 배아줄기세포주는 배아줄기세포 특이적인 항체를 이용한 면역세포학적 방법과 RT-PCR 방법을 통해 그들의 특성

을 확인하였으며, 배아체 형성 후 삼배엽성 표지인자의 발현을 RT-PCR 방법으로 확인하였다.

**Results:** LIF 첨가에 따른 배반포기의 내세포괴 수는 증가하지 않은 반면, 영양배엽의 세포수가 증가하는 경향을 보였으며, LIF 첨가에 따른 포배기 배아를 이용한 생쥐 배아줄기세포주 확립 효율은 control, LIF 1000 U, LIF 2500 U, LIF 5000 U 첨가 시 각각 3/30 (10%), 2/30 (6.7%), 11/30 (36.7%), 7/30 (23.3%)로 나타나 생쥐 초기 배아의 배양 시 2500 U의 LIF를 첨가해 주는 것이 효율적인 것으로 나타났다. 또한, 2-세포기 단일 할구 유래의 배아줄기 세포주 확립 효율은 7개의 배아를 이용하여 획득한 14개의 할구 중 3개의 배아줄기세포주를 확립하여 3/14 (21.4%)의 효율을 보여주었다. 그리고 5개의 4-세포기 배아를 이용하여 획득한 20개의 할구 중 1개의 4-세포기 단일 할구 유래의 배아줄기세포주가 확립되어 1/20 (5.0%)의 효율을 나타내었다. 확립된 할구 유래의 배아줄기세포주는 표지인자인 Oct-4, alkaline phosphatase의 발현을 확인하였으며, 배아체 형성을 유도한 후 RT-PCR 방법으로 삼배엽성 표지인자들의 유전자 발현을 관찰할 수 있었다.

**Conclusion:** 결론적으로 LIF와 ACTH가 첨가된 배양액을 사용하여 포배기 배아와 분리한 할구에서의 배아줄기세포확립 효율성을 향상시킬 수 있었다. 그러나 4-세포기 배아에서 분리한 단일 할구 유래 배아줄기세포주 확립 효율은 다소 저조하여 이를 개선하기 위한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 향후 효율적으로 개선된 방법을 인간의 체외수정 및 배아이식술과 접목하면, 면역 거부반응이 없는 자가 유래의 배아줄기세포를 확립할 수 있는 기술로 발전될 수 있다.

## P-12 Expression of Ectodermal Neural Cortex 1 and its Interaction with Actin During the Ovulatory Process in the Rat

So Yun Choi<sup>1</sup>, Sun Gyun Kim<sup>1</sup>, Soo Jeong Jang<sup>2</sup>, Sang Young Chun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*School of Science & Biotechnology and Hormone Research Center,*

<sup>2</sup>*JB Stem Cell Institute, Chosun University College of Medicine*

**Objectives:** The present study was designed to examine the gonadotropin regulation and action of ENC1 during the ovulatory process in immature rats.

**Methods:** Ovaries were also collected from immature (26-day-old) rats at various times after treatment with 10 IU PMSG for Northern blot, Western blot, and in situ hybridization analyses. Granulosa cells of preovulatory follicles were also collected by the method of follicular puncture using 23-gauge needles at different time intervals. Coimmunoprecipitation was utilized to confirm interaction of ENC1 with actin. G/F-actin in vivo assay kit was utilized to detect actin polymerization in granulosa cells of preovulatory follicles.

**Results:** ENC1 expression was stimulated by LH/hCG with 3 hr in preovulatory granulosa cells both in vivo and in vitro. LH-induced ENC1 expression was suppressed by high dose of protein kinase C (PKC) inhibitor RO 31-8220 (10  $\mu$ M), but not by low doses RO 31-8220 (0.1~1.0  $\mu$ M), suggesting the involvement of atypical PKCs. ENC1 was mainly localized to the nucleus of preovulatory granulosa cells before LH/hCG treatment. Interestingly, however, ENC1 was detected in both nucleus and cytoplasm after LH/hCG treatment. Coimmunoprecipitation assay demonstrated that ENC-1 physically interacted with actin. Lastly, LH/hCG treatment increased actin polymerization of granulosa cell, implying the possible involvement of ENC1 in this process.

**Conclusion:** In conclusion, expression of ENC1 stimulated by LH/hCG interacts with actin and thus may play a role in cytoskeletal reorganization during the ovulatory process.