

## 한우의 정상 난포와 난포낭종 난포에서 Aquaporin7 발현 양상

김창운<sup>1</sup> · 한신규<sup>2</sup> · 최창용<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>삼성창원병원 산부인과, <sup>2</sup>부산대학교 분자생물학과, <sup>3</sup>국립축산과학원 가축유전자원센터

### Patterns of Aquaporin 7 Expression in Normal Follicles and Follicular Cyst Follicles of *Hanwoo*

Chang-Woon Kim<sup>1</sup>, Sunkyu Han<sup>2</sup> and Changyong Choe<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Changwon Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Changwon 630-522, South Korea

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 609-735, South Korea

<sup>3</sup>Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, South Korea

#### ABSTRACT

Alteration in ion channel or transporter expression levels affects cell volume which is produced by movement of water and ion across the plasma membrane. In particular, aquaporin (AQP) channels among ion channels play a crucial role in movement of water across the cell membrane. This study was performed to identify whether AQP expression is changed in bovine follicular cystic follicles using microarray, RT-PCR and Western blotting analyses. In microarray data, AQP4 expression was decreased, whereas AQP7 was increased in cystic follicles. Additional experiments were focused on the AQP7 expression increased in cystic follicles. The microarray data was confirmed by semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR) and Western blot analysis. AQP7 mRNA and protein expressions were significantly increased in the cystic follicles ( $p < 0.05$ ). Application of estrogen (10  $\mu\text{g/ml}$ ) to bovine ovarian cells showed a trend of increase in AQP7 expression. From these results, we suggest that the increase in AQP7 expression in cystic follicles may play an important role in movement of water in bovine ovary. In addition, AQP7, a aquaglyceroporin permeating water and glycerol, could be a good target in development of methods for the cryopreservation of bovine ovary.

(Key words : aquaporin, Korean cattle, follicular cyst, estrogen)

#### 서 론

난포낭종은 포유동물에서 빈번하게 발생하는 난소질환 중의 하나로(최 등, 2006), 다양한 인자에 의해 시상하부-뇌하수체 전엽-난소 호르몬 축이 파괴되어 성숙난포가 배란에 실패하면서 나타나는 것으로 알려져 있다(Hamilton 등, 1995; Peter, 2004). 난포낭종은 난자가 배출되지 못하고, 난포가 계속 자라나 커지면서 액체로 채워진다. 정상 난포에 비해 지나치게 많은 양의 액체는 아쿠아포린(aquaporin, AQP)과 같은 물통로 단백질의 발현량을 변화시킬 수 있다(Tiwari 등, 2014). AQP 단백질은 물 수송뿐만 아니라, 혈관 생성, 세포이주, 세포증식, 세포용적 조절, 미토콘드리아 대사 및 세포사멸에 중요한 역할을 하므로 난포낭종 생성에 밀접한 관련이 있을 것이다.

AQP 통로의 유전자 또는 단백질의 발현 변화는 세포내 수분의 변화를 초래하여 세포를 위축(shrinkage)시키거나 팽창(swelling)시켜 세포 용적 변화를 유발시킬 수 있다(Lang, 2007). 이들 통로는 다양한 종류의 세포 및 조직에 존재하면서 수분 균형의 중추적인 역할을 한다. AQP11과 12는 아스파라긴(asparagine)-프롤린(proline)-알라닌(alanine) NPA 상자의 부분적 차이로 두 그룹에 속하지 못한다(Agre 등, 1998; Ishikawa 등, 2006). 다양한 세포와 조직에서 연구된 AQP의 역할에 비해 상대적으로 생식기계에서 그 역할 연구는 여전히 제한적이다.

AQP 통로 중 9종이 사람을 포함한 흰쥐, 생쥐, 소, 돼지의 정소, 난소 및 자궁에서 발현된다(Huang 등, 2006; Skowronski 등, 2009). 흰쥐 난포방 난포(antral follicle) 내로 물의 이동은 AQP7, 8 및 9에 의해 조정된다(McConnell 등, 2002). AQP1

\* 본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명 : 가축유전자원질병 차단강화 연구, 세부과제번호 : PJ90703105)의 지원에 의해 이루어진 것임.

† Correspondence : cychi@korea.kr

과 AQP5는 돼지 난포 발달동안 발현량의 변화가 나타난다 (Skowronska 등, 2014). 난포형성 과정 동안 AQP는 난포강 형성과 성장에 중요하게 관여하는데, 난포강 내로 난포액의 이동을 조절한다. 생쥐 난포 과립세포에서 발현하는 AQP8의 부족은 다낭자 난포(multi-oocyte follicles) 형성과 관련이 있고(Su 등, 2013), AQP8 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이 다낭성 난소증후군(polycystic ovary syndrome, PCOS)에서 나타난다(Li 등, 2013). AQP7은 다낭성 난소증후군에서 그 발현량이 증가된다(Seow 등, 2013). 다낭성 난소증후군에서 보이는 남성호르몬 과다증은 과립세포에서 발현하는 AQP9의 발현을 억제한다(Qu 등, 2010). 다낭성 난소증후군과 대조적으로 한우에서 나타난 난포낭종은 낮은 남성호르몬 농도를 보인다. 소의 난포낭종은 25 mm 이상의 큰 난포를 특징적으로 가지고 있다(Kengaku 등, 2007).

본 연구에서는 25 mm 이상의 큰 난포를 가지고 있는 한우의 난포에서 AQP 통로의 발현 변화를 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 연구에 이용된 한우의 난소는 도축장으로부터 회수되어 저온(4°C) 및 ~37°C의 보관 상태에서 실험실로 운반되었다. 단백질 분석용 난소는 저온상태의 PBS에 담겨 실험실까지 운반되었다. 운반된 난소는 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 신속하게 난포액을 채취하고, 난포 조직을 절제하여 -80°C로 옮겨 RNA 및 단백질 분석 실험 시까지 보관하였다. 난포액의 채취는 시험구당 정상난소는 20개, 난포낭종은 5개의 난소에서 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 직경 8~10 mm의 정상적인 미성숙 난포와 25 mm 이상의 난포낭종 난소의 난포액을 각각 흡입 회수하였다. 난소의 형태학적 병리학적 소견을 근거하여 난포낭종으로 구분하였다(최 등, 2006). 난포낭종을 보이는 난소는 과립층 세포 층의 수가 정상난소에 비해 현저히 적었으며, 황체는 보이지 않았다. 난포벽은 얇고 투명하였다.

### 2. 난소표피세포 분리 및 배양

멸균된 가위로 난소조직을 채취하고, 오염 요인에 노출된 조직은 70% 알코올에 살짝 담갔다 TCM-199/DMEM으로 3회 세척하였다. 난포가 위치하는 부분의 표면 조직 일부를 잘라내어 기본 배양액에 수차례 세척하고, 세절판에 올려 칼로 세절한 후 0.25% trypsin-EDTA를 조금씩 떨어뜨리면서 되도록 잘게 세절하였다. 세절된 조직을 15 ml tube로 옮겨, 0.25% trypsin-EDTA를 최종 용량이 3 ml 되도록 넣어 37°C 배양기에서 5분간 배양하였다. 배양 후, 세절된 조직은 원심분리기(Labo-

fuge 400, Heraeus®, Germany)를 이용하여 1,000 rpm(194 g)에서 10분간 원심 분리시켜 상층액을 제거하고, 새로운 TCM-199/DMEM 5 ml를 넣어 피펫팅한다. 다시 그 세절된 조직을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨다. 세척과 원심분리 과정을 2회 더 반복한 후 상층액을 제거하고, 새로운 배양액 3 ml를 채워 culture flask(25 cm<sup>2</sup>, Nunc, Roskilde, Denmark)에 조심스럽게 분주하였다. 세포의 분주 형태 및 양을 현미경으로 관찰하여 37°C, 5%의 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 1일 후 오염 및 배양 상태를 확인하고, 3일 후 배양액을 2 ml 첨가하여 7일 동안 배양하면서 세포의 상태를 확인하였다. 배양액은 2일마다 새로운 배양액으로 교환하였다. 난소의 표피를 구성하는 세포를 표피세포로 정의하며, 상피세포와 유사한 모양으로 자라는 세포만을 본 실험에 사용하였다. 에스트로겐 처리에 따른 AQP7의 단백질 발현 변화를 확인하기 위해서는 7일 동안 배양된 정상 난소표피세포에 에스트로겐(10 µg/ml)을 24시간동안 처리한 후 실험에 공시하였다.

### 3. 마이크로어레이 분석

난소로부터 난포조직(난포를 구성하는 각각의 세포를 구분하지 않음)을 분리하여 RNA를 추출한 후 cRNA를 합성하고, 정제한 후 표지된 cRNA 10~15 µg을 분절용액(fragmentation buffer, Affymetrix Inc, CA, USA)으로 35 bp에서 200 bp까지 분절시켰다. 만들어진 cRNA, 분절용액 및 RNA 분해효소가 없는 물(RNase free water)을 0.2 ml PCR tube에 넣고, 94°C에서 35분간 반응을 유도하였다. 분절된 cRNA는 GeneChip® Bovine Genome Array Chips(Affymetrix)을 이용하여 제조사의 실험 과정에 따라 진행하였다. 어레이(array)들은 streptavidin-phycoerythrin complex를 가지고 염색한 후 GeneChip Operating Software(Affymetrix, CA, USA)로 강도를 조정하여 GeneChip scanner 3000(Affymetrix)을 이용하여 스캔하고, 발현 패턴을 분석하였다. 마이크로어레이 분석의 전 과정은 서린 바이오에 의뢰되었다(Agency of Affymetrix Gene Chip, Seoul, South Korea).

### 4. 정량적 역전사증합효소증합반응(qRT-PCR)

Total RNA는 TRIzol(invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 하나의 난소에서 정상과 난포낭종을 보이는 난포조직으로부터 추출되었다. 추출된 total RNA는 Superscript preamplification system (Invitrogen)과 oligo (dT)를 이용하여 cDNA로 합성되었다. 합성된 cDNA는 소(bovine)에 특징적으로 작용하는 AQP7 프라이머(sense: 5'-ATCTACGGCTCTTCTACA-AC-3', antisense: 5'-AAGAACAAGTAGATGATGGCA-3')를 이용하여 증폭하였다. 증폭산물은 염기서열 분석을 통하여 확인하였다. 각 유전자의 mRNA 발현량은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH, sense: 5'-CAGCGACTCAC-

TCTTCTAC-3', antisense: 5'-GGAAGTCAGGAGATTCTCAG-T-3')의 발현량으로 정량·비교 분석하였다.

5. 단백질 분석(Western Blot Analysis)

난포조직 및 난소표피세포에서 AQP7의 단백질 발현을 확인하기 위하여 Western blot 분석을 실시하였다. 시료를 D-PBS로 씻은 뒤 1.5 ml 튜브에 분해용액(lysis buffer; RIPA buffer, Cell signaling technology, Danvers, MA, USA)을 넣은 뒤 분쇄하였다. 분쇄 후, 조직들을 4℃에서 30분간 배양한 후 4℃를 유지하면서 13,000 rpm (16,609 × g, Micro 17TR, Haniil, Korea)에서 30분간 원심 분리시켰다. 원심 분리 후 상층액은 새로운 1.5 ml 튜브로 옮기고, Bradford protein assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 시약을 이용하여 정량하였다. 정량된 단백질 중 50 µg을 각 웰에 넣고 8% SDS-PAGE에서 전기영동한 후, polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane(0.45 µm, Millipore, Bedford, MA, USA)에 전기영동한 단백질을 옮긴 후, blocking 용액(5% fat-free milk and 0.05% Tween20 in TBS), 1차 항체(Anti-aquaporin7, Chemicon International (Temesula, CA, USA) 2차 항체(Anti-rabbit IgG-HRP, Sigma)를 처리하고, membrane을 세척한 후 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL Plus kit, ELPIS, Taejeon, Korea)을 이용하여 AQP7 단백질을 증폭시켜 단백질 존재를 확인하였다. 각 단백질의 발현량은 β-actin의 발현량으로 정량·비교 분석하였다.

6. 통계학적 분석 및 실험 성적의 처리

실험 결과의 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 처

리구 간의 유의성을 검정하였고( $p < 0.05$ ), 결과들은 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

결 과

1. 난포낭종에서 변화되는 이온 및 수송체 관련 유전자 선별  
난포낭종에서 발현변화를 보이는 유전자들을 분석하기 위하여 마이크로어레이 분석을 실시하였다. 마이크로어레이 분석 결과에서 AQP 통로 중 AQP4와 AQP7의 발현이 변화되었다. AQP4는 발현량이 6.96배 감소하였고, AQP7은 발현량이 4.9배 증가하였다. 두 배 이상 변화되는 유전자(differentially expressed genes; DEG)를 의미 있게 변하는 유전자로 간주할 때(log 2<sup>2</sup>=1), AQP7은 DEG로 분류된다. 본 연구에서는 감소하는 AQP4보다 증가하는 AQP7에 초점을 맞추어 연구를 수행하였다.

2. 난포낭종에서 증가하는 AQP7의 발현 검증

마이크로어레이 결과에 의해 확인된 난포낭종 난포에서 AQP7 발현 증가는 정량적 역전사중합효소 연쇄반응에 의해 재 확인되었다. AQP7은 난포낭종 난포에서 mRNA 발현이 유의적으로 2.3배 증가하였다( $n=3, p < 0.05$ , Fig. 1A). 난포낭종 난포에서 AQP7 mRNA 발현 증가가 단백질 발현으로 나타나는지를 확인하기 위하여 Western blot 분석을 통하여 AQP7의 단백질 발현을 정상과 난포낭종 난포에서 비교하였다. Fig. 1B에서 보여주는 바와 같이, 난포낭종 난포에서 발현되는 AQP7 단백질은 mRNA 발현 변화와 동일한 형태로 증가하였다. 그

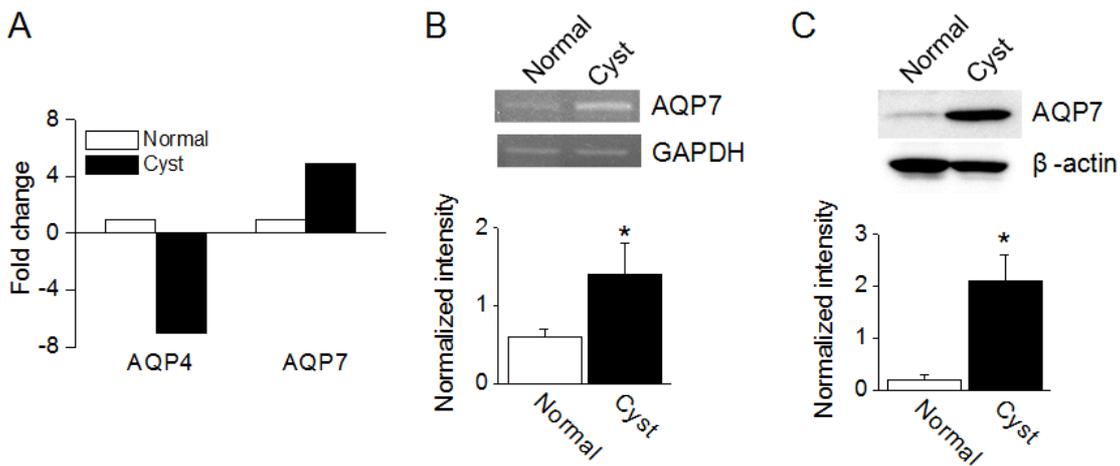


Fig. 1. Up-regulation of AQP7 in follicular cystic follicles. (A) An up-regulation of AQP4 and a down-regulation of AQP7 in follicular cystic follicles by microarray analysis. (B) RT-PCR products for AQP7 derived from bovine ovaries. The mRNA expression of AQP7 was normalized to that of GAPDH. (C) Western blot analysis of AQP7 in bovine follicular cystic follicles. The expression levels were normalized to β-actin. Each bar represents mean ± S.D. of three experiments. The asterisks indicate a significant difference from the corresponding control value obtained for normal ovaries ( $p < 0.05$ ).

그러나 AQP7은 mRNA 발현보다 단백질 수준에서 그 변화 정도가 유의적으로 높게 나타났다(정상 난포:  $0.2 \pm 0.1$ , 난포낭중 난포:  $2.1 \pm 0.5$ ,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ).

### 3. 에스트로겐에 의한 AQP7의 단백질 발현 증가

난포낭중 난포액 내 에스트로겐의 농도는 정상 난포액에 비해 유의적으로 높고, 테스토스테론 농도는 낮다(Fig. 2A). 증가된 에스트로겐 농도가 AQP7 발현을 변화시키는지 확인하기 위하여 정상난소의 표피세포를 분리하여 에스트로겐( $10 \mu\text{g/ml}$ )을 24시간 처리한 후 AQP7의 단백질 발현을 조사하였다. 에스트로겐의 처리는 AQP7의 단백질 발현을 62% 증가시켰다(Fig. 2B). 그러나 유의한 차이를 보이지 않았다.

## 고 찰

본 연구는 처음으로 한우 난소의 25 mm 이상의 난포에서 AQP7의 발현이 유의적으로 증가함을 보고한다. 특히, 난소, 난포 및 난자의 동결에 있어서 물과 글리세롤을 통과시킬 수 있는 AQP7 통로의 발현은 중요한 의미를 부여할 것이다. 지금까지의 AQP 통로 연구는 정상 난소, 난관 및 자궁 등에서 면역염색을 통한 AQP 통로의 분포 영역을 조사함으로써 그 기능을 유추해왔다. 본 연구에서는 정상과 난포낭중으로부터 유래된 조직 및 세포에서 AQP7 통로의 발현 변화를 비교함으로써 AQP7 통로의 난포에서 난포액 이동과 관련된 기능을 유추해 보고자 하였다. 특히 소의 난포에서 AQP7의 발현은 아

직 보고된 바가 없다.

다양한 종류의 AQP 통로는 포유동물의 난소, 난관 및 자궁에서 발현한다. 이러한 AQP 통로의 발현은 각 조직 내에서 물 항상성에 중요한 역할을 하는 것으로 제시되어왔다. 특히, AQP7 통로는 생쥐의 난소, 난자 및 정자에서 발현하고(Edashige 등, 2000), 흰쥐의 난소에서도 발현을 하는데, AQP7은 난포벽을 통한 물의 유입에 관여함이 확인되었다(MaConnell 등, 2002). 과립층 세포에서 발현되는 AQP7 통로는 작은 분자량 물질의 빠른 수송에 관여하여 난포 발달에 기여한다(Huang 등, 2006). 많은 연구에서 AQP의 과립층 세포에서의 발현을 보고해 왔지만, 본 연구에서는 과립층 세포에서의 AQP7 발현 변화는 확인하지 않았다. 왜냐하면, 난포낭중 난포에서 과립층 세포의 감소가 본 연구에서 그것을 배제하도록 하였다. 소의 난소에서는 AQP1, AQP3 및 AQP4가 발현하였으며, 난포강의 형성에 있어서 과립층 세포 감소는 AQP1의 발현 감소를 초래한다(Mobasheri 등, 2008). 그러나 본 연구에서는 과립층 세포가 감소함에도 불구하고, AQP7 통로는 감소가 아닌 증가가 유도되었다. 이는 에스트로겐의 농도변화에 따른 차이로 생각된다.

최근 연구에 의하면 다낭성 난소낭종(polycystic ovarian syndrome) 환자에서 AQP9 통로의 발현이 감소하였다. 이러한 감소현상은 난포액 내의 성호르몬이 PI3-kinase 신호전달을 통해 과립층 세포에서 AQP9을 억제하는 것으로 설명되었다(Qu 등, 2010). AQP7의 성호르몬에 대한 발현 변화는 아직 보고된바 없다. 본 연구에서 관찰된 AQP7은 에스트로겐에 의해 발현량이 증가하는 경향은 보였으나, 유의한 차이는 확인되지 않았다. 에스트로겐의 농도 변화에 따른 AQP7 통로 발현 변화를 관찰함으로써 에스트로겐에 의한 조절기전 및 정확성을 규명해야 할 것이다.

한우 난포낭중 난포에서 AQP7 통로의 발현 증가는 난포액의 이동이 AQP7 통로를 통해 나타날 수 있음을 제시한다. 본 연구에서 AQP7의 분포영역은 확인되지 않았지만, AQP7 통로는 난포에서 난포액 형성에 중요한 역할을 할 것으로 기대한다. 그리고 글리세롤을 통과시킬 수 있는 통로이므로, AQP7은 난소조직 및 난자에서 물과 동결보호제의 수송에 관여함으로써 동결보존에 중요하게 기여할 수 있을 것이다.

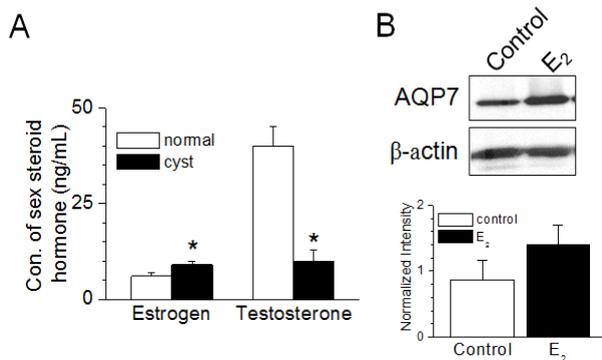


Fig. 2. Estrogen-induced up-regulation in AQP7 expression in ovarian cells. (A) Changes in concentration of sex steroid hormone in follicular cystic follicular fluid. (B) Up-regulation of AQP7 by estrogen treatment in normal ovarian surface cells. The cells were treated with  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours. The expression levels were normalized to  $\beta$ -actin. Each bar represents mean  $\pm$  S.D. of three experiments. \*  $p<0.05$  compared to the corresponding control.

## 결 론

이온통로 및 수송체 등의 발현 변화는 세포내의 수분 및 이온들의 변화를 초래하여 세포 용적 변화를 유발한다. 특히, 이온통로 중 아쿠아포린(aquaporin, AQP) 물 통로는 다양한 세포에 존재하면서 세포 간 또는 세포막 사이의 물 이동에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 난포에서

AQP 통로의 발현 변화를 확인하고자 하였다. 마이크로어레이 실험 결과, 난포낭종 난포에서 AQP4는 감소하고, AQP7은 발현이 증가하였다. 본 연구에서는 난포낭종 난포에서 증가하는 AQP7에 관심을 가지고 실험을 진행하였다. 마이크로어레이에서 증가한 AQP7은 반정량 역전사 중합효소 연쇄반응과 웨스턴 블랏 분석을 통하여 재확인하였다. AQP7의 mRNA와 단백질 발현은 난포낭종 난포에서 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 난포낭종에서 증가되는 에스트로겐이 AQP7의 발현량을 조절하는 지를 조사하였다. 한우 난소에서 분리된 세포에 에스트로겐 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리는 AQP7의 발현량을 증가시켰다. 그러나 통계적 유의성은 나타나지 않았다( $p > 0.05$ ). 이상의 결과에서 살펴본 바와 같이, 난포낭종 난포에서 AQP7 발현량 증가는 AQP7이 난소에서 난포액 이동에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 그리고 물론만 아니라 글리세롤을 이동시키는 AQP7 통로는 한우 난소의 동결기술 개발에 활용될 수 있다.

## 참 고 문 헌

- Agre P, Bonhivers M and Borgnia MJ. 1998. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J. Biol. Chem.* 273:14659-14662.
- Edashige K, Sakamoto M and Kasai M. 2000. Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos. *Cryobiology* 40:171-175.
- Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS and Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol. Reprod.* 53:890-898.
- Huang HF, He RH, Sun CC, Zhang Y, Meng QX and Ma YY. 2006. Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum. Reprod. Update* 12:785-795.
- Ishikawa Y, Cho G, Yuan Z, Skowronski MT, Pan Y and Ishida H. 2006. Water channels and zymogen granules in salivary glands. *J. Pharmacol. Sci.* 100:495-512.
- Kengaku K, Tanaka T and Kamomae H. 2007. Changes in the peripheral concentrations of inhibin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, progesterone and estradiol-17 $\beta$  during turnover of cystic follicles in dairy cows with spontaneous follicular cysts. *J. Reprod. Dev.* 53:987-993.
- Lang F. 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J. Am. Coll. Nutr.* 26:613S-623S.
- Li Y, Liu H, Zhao H, Xu C, Zhao Y, Ma J and Chen ZJ. 2013. Association of AQP8 in women with PCOS. *Reprod. Biomed. Online* 27:419-422.
- McConnell NA, Yunus RS, Gross SA, Bost KL, Clemens MG and Hughes FM Jr. 2002. Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins. *Endocrinology* 143:2905-2912.
- Mobasher A, Sawran A, Marples D and Luck M. 2008. Aquaporin water channels in the bovine ovary. *FASEB. J.* 22:1159.
- Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 39:1-7.
- Qu F, Wang FF, Lu XE, Dong MY, Sheng JZ, Lv PP, Ding GL, Shi BW, Zhang D and Huang HF. 2010. Altered aquaporin expression in women with polycystic ovary syndrome: Hyperandrogenism in follicular fluid inhibits aquaporin-9 in granulosa cells through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Hum. Reprod.* 25:1441-1450.
- Seow KM, Lin YH, Wang PH, Hwang JL, Ho LT and Juan CC. 2013. Aquaglyceroporin-7 overexpression in women with the polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Obstet. Invest.* 75:126-131.
- Skowronska A, Mlotkowska P, Eliszewski M, Nielsen S and Skowronski MT. 2014. Expression of aquaporin 1, 5 and 9 in the ovarian follicles of cycling and early pregnant pigs. *Physiol. Res.* In press.
- Skowronski MT, Kwon TH and Nielsen S. 2009. Immunolocalization of aquaporin 1, 5, and 9 in the female pig reproductive system. *J. Histochem. Cytochem.* 57:61-67.
- Su W, Guan X, Zhang D, Sun M, Yang L, Yi F, Hao F, Feng X and Ma T. 2013. Occurrence of multi-oocyte follicles in aquaporin 8-deficient mice. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11:88-93.
- Tiwari A, Hadley JA and Ramachandran R. 2014. Aquaporin 5 expression is altered in ovarian tumors and ascites-derived ovarian tumor cells in the chicken model of ovarian tumor. *J. Ovarian Res.* 7:99.
- 최창용, 손동수, 최규찬, 송상현, 최창열, 최선호, 김현중, 조상래, 허창기, 강다원. 2006. 한우 번식우 사육 농가의 번식 장애 실태 조사. *한국수정란이식학회지* 21:331-338.

---

Received February 4, 2015, Revised March 10, 2015, Accepted March 18, 2015