

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 접종한 후 bottom well에 interstitium (Leydig cell)을 배양하였다. 배양 기간 동안 TER의 변화를 추적하였고 종료된 Sertoli cell로

부터 claudin-11의 발현을 조사하였다.

**Results:** Occludin은 GD18 정소에서 발현되었으며 신생기에 발현이 증가하기 시작하여 12일에 정점에 달한 후 감소하였다. Claudin-1은 GD18에 다량 발현되었으며 출생 후 계속 증가하여 12일령에 정점에 달한 후 점차 감소하였다. 반면 claudin-11은 GD18에 거의 발현되지 않았으며 출생 후에 미량이 발현되다가 서서히 증가하여 생 후 20일령에 이르러 정점을 보이고 이후 서서히 감소하였다. 공배양 상태의 Sertoli cell의 delta TER값이 유의하게 높았으며 이때 claudin-11의 발현 또한 높았다.

**Conclusions:** 이들 유전자의 발현이 출생 후 증가하다가 성체에서 감소하므로 전체적인 발현정도는 정소 내 Sertoli cell의 증식에 비례함을 알 수 있었으나 TJ 유전자들의 시간적 발현 양상에는 차이가 있으므로 정소 발달 과정에서 Sertoli cell에서 일어나는 밀착결합 유전자 발현은 차등적으로 조절되며 특히 claudin-11의 발현은 사춘기 직전에 완성되는 기능적 혈액-정소 장벽의 형성에 매우 중요한 요인으로 사료된다. 세정관의 분화 단계에서 interstitium 기원된 확산가능 인자가 Sertoli cell 사이의 paracellular barrier의 기능을 강화하며 혈액-정소 장벽의 구조와 기능조절에 중요한 요인으로 사료된다. Sex steroid 및 정소내 국부조절인자들에 의한 TJ 유전자 발현의 조절에 대한 연구는 혈액-정소 장벽의 발달에 대한 정교한 이해를 가능케 할 것이다.

## P-30 생쥐 정소 발달과정에서 Aquaporin9의 발현과 조절

한양대학교 생명과학과

강 희 정 · 계 명 찬

**Background & Objectives:** Aquaporin (AQP) family protein은 일종의 수분 전달 통로 역할을 하는 단백질로 AQP를 통한 수분의 조절은 삼투압을 통한 물의 이동과 함께 조직 내 정상적인 수분의 상생 유지에 필수적이다. 현재까지 11종의 AQP이 신장, 뇌, 정소, 안구 등에서 발현이 확인되었다. AQP9은 물 뿐 아니라 carbamide, polyol, purine, pyrimidine, urea, glycerol 등의 이동에 관여한다. 본 연구에서는 정자형성 및 steroid 생성 등 정소의 주요 기능에 AQP9의 역할을 규명하기 위한 연구의 일환으로 생쥐에서 출생 후 성체에 이르는 동안 정소 내 AQP9의 발현, Leydig cell의 분화에 따른 AQP9의 발현 및 그 조절을 조사하였다.

**Method:** 생 후 1, 2, 4, 8주령의 생쥐 정소를 이용하여 발생 시기에 따른 발현의 변동을 분석하였다. AQP9 mRNA 발현량 분석은 optimized semiquantitative RT-PCR 및 realtime PCR로 수행하였다. AQP9 단백질의 분석을 위해 Western blot을 수행하였다. AQP9 단백질의 발현부위는 immunohistochemistry로 분석하였다. 성체 정소로부터 분리한 Leydig cell-enriched culture에 hCG (0.375 IU/ml)를 처리하여 2일간 배양한 후 AQP9 mRNA 발현을 RT-PCR로 분석하였다. 생후 3주령의 생쥐에 hCG (0.2 iu/g b.w.)을 주사한 후 3일 경과한 후 정소 조작으로부터 AQP9 mRNA 발현을 RT-PCR로 분석하였고 단백질 발현부위를 immunohistochemistry로 분석하였다.

**Results:** 1, 2, 4, 8주령의 정소로부터 semiquantitative RT-PCR 및 real time PCR법으로 AQP9의 발현을 분석한 결과 1주령에서는 발현되지 않았고 2주령에서는 미량이 발현되기 시작하였고, 4주령에서는 성체의 1/2수준으로 발현량이 급격히 증가하였고 성체에서는 다량으로 발현됨이 확인되었다. Semiquan-