

is required for ovulation.

Methods: Immature *Egr1*(+/-) and *Egr1*(-/-) female mice (4 week old) were superovulated by intraperitoneal injection of PMSG followed by hCG 48 h later and paired with wildtype male mice. The numbers of 2-cell stage embryos and unfertilized oocytes collected from oviducts were counted at post-hCG 48 h, and viable embryos were cultured to blastocyst stage. Immature ovaries at various time points (post-hCG 0, 1, 3, 6, 12, and 24 h) during superovulation were collected for RNA extraction and/or histological analysis. Semi-quantitative RT-PCR with appropriate primers for *Egr* family and *Nabs* was performed.

Results: The number of oocytes superovulated from *Egr1*(-/-) mice was significantly lower than that of *Egr1*(+/-) mice. The rates of embryos developed to blastocyst stages were comparable between *Egr1*(+/-) and *Egr1*(-/-) mice. *Egr1* mRNA was rapidly induced at post-hCG 1 h and its level reached peak at post-hCG 3 h with gradual decrease afterwards. While *Egr1* was a predominantly expressed factor among *Egr* family in the ovary during ovulation, *Egr2* and *Egr3* had similar temporal expression patterns to that of *Egr1*, suggesting functional compensation for the loss of *Egr1* in ovulation in the *Egr1*(-/-) ovary. *Egr4* and *Nabs* were constantly expressed in the ovary throughout time points of superovulation.

Conclusion: *Egr* transcription factors are concomitantly and transiently induced by LH signaling pathways during ovulation process. *Egr1* is an essential factor to fully respond to gonadotropins for ovulation in the ovary. The suboptimal response to exogenous gonadotropins for ovulation in *Egr1*(-/-) ovaries could be derived from functional compensation of other *Egr* family members in the ovary.

P-15

생쥐 Leydig Cell에서 Bisphenol A에 의한 성장조절인자의 변화

김동민 · 이재은 · 계명찬

한양대학교 생명과학과

Objectives: JAK (Janus family), ERK (MAP Kinase), STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) 등은 세포의 성장조절, 사멸, 줄기세포의 분화 그리고 병원성 물질에 대한 저항 기작과 관련한 cytokine 수용체계, 발암 유전자의 발현 조절 등에서 중심적인 역할을 담당한다. 특히 JAK2와 ERK에서 STAT3 등으로 이어지는 신호 전달은 GH등의 성장 인자에 의해 활성화되며 핵안의 여러 전사인자들을 조절하게 된다. 본 실험에서는 내분비계장애물질에 의한 생식기능에 있어 GH 및 IGF-1 신호전달의 변형을 이해하기 위해 GH 수용체를 경유한 주요 신호전달 구성요소인 JAK/STAT 및 ERK 신호전달의 변형을 Leydig cell을 통해 확인하고자 한다. 또한 Leydig cell의 steroidogenesis에 있어서 내분비계장애물질의 처리에 따른 GH 작용의 교란도 확인하고자 한다.

Methods: 4주령의 생쥐 정소에서 Leydig cell을 원심분리법으로 분리, 수확한 후 10% FBS/DMEM media로 48 시간 동안 배양하였다. 수세 후 GH, IGF-1, BPA를 각각의 농도 (10 ng/ml, 10 ng/ml, 0.1 nM)별로 처리하여 24시간 추가 배양하였다. 수확한 Leydig cell로부터 분리한 total RNA를 이용하여 최적화된 RT-PCR로 GHR mRNA와 steroidogenic enzyme 유전자의 발현량을 분석하였고, 단백질을 이용하여 Western blot을 수행하였다. Western blot은 SDS-PAGE 후 NC membrane에 전이시켜 ERK, JAK2, STAT3, 그리고 각각의 인산화 형태의 항체들을 사용하여 ECL kit로 신호를 검출하였다.

Results: GHR mRNA의 발현은 GH 처리시 증가하였고, GH와 BPA를 동시에 처리하였을 때는 감소하였다. steroidogenic enzyme 유전자의 경우 GH 처리시 3 β -HSD와 StAR mRNA 발현이 증가하였고, GH와 BPA 동시 처

리시 3 β -HSD, 17 β -HSD, StAR mRNA 발현이 감소하였다. Western blot에서는 성장호르몬의 경우 BPA가 Leydig cell의 p-ERK, JAK2, p-JAK2의 발현에 있어서 GH나 IGF-1의 작용을 억제하거나 감소시키는 것을 확인하였고 특히 STAT3의 경우 BPA의 영향 하에서 성장호르몬의 작용을 확연하게 감소시켰다.

Conclusion: 실험 결과에서 확인할 수 있듯이 GH나 IGF-1 등의 성장인자는 Leydig cell내의 성장조절인자들의 발현을 증가시키지만 BPA에 의해서 그 효과가 감소하거나 억제되는 현상을 확인하였다. 또한 GH 처리에 의해 Leydig cell의 steroidogenesis에 관여하는 효소들의 발현이 증가하는 것을 통해 GH에 의한 생식소 기능이 직접적으로 조절됨을 알 수 있다. 이러한 BPA의 영향으로 인해 Leydig cell 자체의 활성이나 성장에 영향이 있을 것으로 예상되며 그러한 변화가 정자형성 과정으로의 negative 효과로 이어질 것으로 사료된다.

P-16 Genes Stimulated by the Activation of PKC ζ after LH/hCG Treatment in the Rat Ovary

You Mi Seo, Sun Gyun Kim, Sang Young Chun

*Hormone Research Center and School of Biological Sciences & Technology,
Chonnam National University, Kwangju 500-712, Republic of Korea*

Objectives: The present study was aimed to identify PKC ζ -regulated genes in the preovulatory granulosa cells following LH stimulation by using annealing control primer-based PCR method.

Methods: 1. Granulosa cell isolation and culture 2. Annealing control primer (ACP) RT-PCR analysis and cloning of cDNAs 3. Northern blot analysis 4. In situ hybridization 5. Western analysis 6. MTT assay.

Results: Among 16 genes identified, six (testin, glypican-4, retrovirus SC1, connective tissue growth factor, aminolevulinic acid synthase 1 and serum inducible kinase) showed rapid and transient stimulation of mRNA levels by LH/hCG in the ovary of PMSG-primed immature rat. In situ hybridization analysis revealed that LH/hCG administration induced the expression of these six genes in granulosa cells of preovulatory follicles. The Western analysis showed that protein levels of testin and serum-inducible kinase were also increased by LH/hCG. The expression of remaining 10 identified genes in the ovary was stimulated during 24~72 h following LH/hCG treatment. MTT assay revealed that treatment of preovulatory granulosa cells with high dose of protein kinase C inhibitor RO 31-8220 (10 μ M) or PKC ζ -specific inhibitor pseudosubstrate peptide markedly suppressed cell survival, indicating anti-apoptotic function of PKC ζ pathway.

Conclusion: The present data demonstrate the identification of PKC ζ -regulated genes during ovulation which implicates the possible role of PKC ζ pathway in the process of luteinization.