

## P-18 Effect of Flavonoid on the Development and Gene Expression of Bovine in vitro Fertilized Embryo

Keum Sil Lee<sup>1,2</sup>, Eun Young Kim<sup>1</sup>, Kilsoo Jeon<sup>1,2</sup>, Jin Cheol Tae<sup>1</sup>,  
Yeon Ok Kim<sup>1</sup>, Hoon Taek Lee<sup>2</sup>, Se Pill Park<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup>KonKuk University, <sup>3</sup>Cheju National University

**Objectives:** The culture of embryos with a high concentration oxygen produces free oxygen radicals which have been implicated as major causes of in vitro embryos development arrest and cell death. Superoxide dismutase (SOD) and others that serve as radical scavengers were known to have beneficial effects on embryonic development in vitro. This study was to compare the treatment effect of a type of flavonoid and SOD as anti-oxidants on the bovine embryo development in vitro.

**Methods:** In vitro produced day 2 ( $\geq 2 \sim 8$  cell) bovine embryos were treated with various concentrations of flavonoids (3,4-dihydroxyflavone; 5, 10, 50 and 100  $\mu\text{M}$ ) or SOD (300 and 600 IU) for 6 days. The treatment effect was assessed by in vitro blastocyst development rate, total cell/inner cell number, ROS production, apoptotic index and internal anti-oxidant gene expression level.

**Results:** In flavonoid test, 1 and 10  $\mu\text{M}$  treatment groups were indicated higher development rates (40.0 and 42.1%) than control group (30.4%), while 50 and 100  $\mu\text{M}$  treatment groups were not effect (24.5 and 30.0%) compared to control group, respectively. In SOD test, 300 IU treatment group was shown similar development rate (31.8%) to control group (30.8%), while 600 IU SOD treatment was not good for the embryo development (22.7%). When the effects of 10  $\mu\text{M}$  flavonoid or 300 IU SOD on the bovine embryo development rate and total cell numbers were compared, 10  $\mu\text{M}$  flavonoid treatment group (42.1%,  $104.2 \pm 13.9$ ) was higher than 300 IU SOD treatment group (31.8%,  $94.6 \pm 0.3$ ), control group (30.2%,  $90.0 \pm 17.7$ ), respectively. We then measured intracellular ROS production using the oxidant-sensitive fluorescent dye, the results of the addition of SOD and flavonoid groups showed lower generation of fluorescent DCF in the blastocysts than control. Also, TUNEL assay of DNA fragmentation indicated the lowest apoptotic index was in 10  $\mu\text{M}$  flavonoid treatment group compared than other groups ( $p < 0.05$ ). In addition, transcripts levels of anti-oxidant gene (Mn SOD) and anti-apoptotic gene (survivin, BaxI) were significantly higher in the flavonoid treatment group than other groups ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** This result indicated that a special type of flavonoid treatment supports for the in vitro developmental capacity of bovine embryos. Thus, flavonoid can be a good radical scavenger of poor in vitro environment for the embryo development.

## P-19 생쥐 자궁 및 자궁내막기질세포에서 BMP2 및 Wnt4 유전자의 발현

강 한 승 · 계 명 찬

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

**Objectives:** 스테로이드호르몬인 프로게스테론과 에스트로젠은 수정된 배아의 자궁으로의 착상에 있어 매우 중요한 역할을 한다. 프로게스테론은 자궁내막기질세포 (endometrial stromal cells)을 탈락막세포 (decidual cells)로

의 분화를 증진 시키며, 수정된 배아의 성장 및 발달에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Ghrelin은 위에서 분비되어 시상하부의 GH-secretagogue receptor (GHS-R)와 결합하여 뇌하수체 전엽의 somatotroph로부터 GH의 분비를 자극하는 것으로 알려져 있다. 또한 ghrelin은 인슐린분비자극, 식욕촉진, 사춘기 개시 등 많은 생리학적 기작에 관여하며, 최근의 연구에 의하면 사람의 자궁에 있어 자궁내막기질세포를 탈락막세포로 분화하는데 있어 ghrelin이 중요한 역할을 한다고 보고 되었다. BMP2는 TGF- $\beta$ 의 super family로서 배아의 착상시기에 자궁내막기질세포에서 발현이 되며, Wnt4도 자궁에서 발현이 되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 생쥐 자궁 및 자궁내막기질세포에서 스테로이드호르몬과 ghrelin 펩타이드가 BMP2 유전자와 Wnt4 유전자의 발현에 있어 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알아보려고 하였다.

**Methods:** BMP2와 Wnt4 유전자의 발현은 발정주기별과 OVX 생쥐에 에스트로젠 (300 ng/mouse, 1  $\mu$ g/mouse)과 프로제스테론 (1 mg/mouse), 그리고 에스트로젠 (300 ng/mouse)과 프로제스테론 (1 mg/mouse)을 함께 24시간 처리한 자궁에서 total RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후, 유전자의 발현변화를 RT-PCR 방법을 통하여 분석하였다. 또한 생쥐 자궁에서 자궁내막기질세포를 분리한 후, ghrelin 펩타이드 ( $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M)와 프로제스테론 ( $10^{-7}$  M)을 처리하여 10일간 세포배양을 하였다. 배양한 세포에서 total RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후, RT-PCR 방법을 통하여 BMP2와 Wnt4 유전자의 발현을 분석하였다.

**Results:** 발정주기에 따른 BMP2, Wnt4 유전자의 발현은 발정후기 (metestrus)에 발현이 높게 나타났으며, OVX 생쥐에 스테로이드 호르몬을 처리한 자궁에서의 BMP2, Wnt4 유전자의 발현은 에스트로젠 (300 ng/mouse)과 프로제스테론 (1 mg/mouse)을 함께 처리한 자궁에서 발현이 높게 나타났다. Ghrelin 펩타이드와 프로제스테론을 처리하여 배양한 자궁내막기질세포에서는 프로제스테론을 처리한 실험군보다 ghrelin 펩타이드를 처리한 실험군에서 BMP2와 Wnt4 유전자의 발현이 높게 나타났다.

**Conclusion:** BMP2, Wnt4 유전자의 발현은 발정후기 (metestrus) 및 에스트로젠 (300 ng/mouse)과 프로제스테론 (1 mg/mouse)을 함께 처리한 자궁에서 발현이 높게 나타났다. 프로제스테론과 ghrelin 펩타이드를 처리하여 배양한 자궁내막기질세포에서는 프로제스테론을 처리한 자궁내막기질세포보다 ghrelin 펩타이드를 처리한 자궁내막기질세포에서 발현이 높게 나타났다. 본 연구결과 스테로이드호르몬과 ghrelin 펩타이드는 BMP2 및 Wnt4 유전자의 발현에 영향을 미치며, 이들 유전자는 자궁내막기질세포의 탈락막세포로의 분화에 관여하는 것으로 사료된다.

## P-20 Estrogen Differentially Regulates the Expression of Small Proline-rich Protein 2 (Sprr2) Family in Estrogen Receptor (ER)-dependent and -independent Pathways in the Mouse Uterus

Hyunjoo Kim<sup>1</sup>, Seok-Ho Hong<sup>2,3</sup>, Ji Won Lee<sup>3</sup>, Hee Young Nah<sup>3</sup>,  
Moon Kyoo Kim<sup>2</sup>, Haengseok Song<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, Cheil General Hospital & Women's Healthcare Center, Kwandong University College of Medicine, <sup>2</sup>Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, <sup>3</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine, Ulsan University, Asan Medical Center

**Objectives:** The Sprr2 family consisting of 11 members (Sprr2a-2k) encode for a series of highly homologous proteins that are critical components of the cornified cell envelope, an effective barrier against environmental and extracellular factors