

용해된 Matrigel에 의한 생쥐 초기배아 발생의 조절

계명찬, 정병목
경기대학교 생물학과

Regulation of Preimplantation Development of Mouse Embryos by Solubilized Matrigel

Myung Chan Gye, Chung Byung Mok
Department of Biology, Kyonggi University

서론

착상전 초기배아는 모체로부터 기원되거나 자체적으로 생산된 다양한 성장인자와 호르몬에 의해 발생을 조절받게 된다. 이외에도 세포주위에 존재하는 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)은 세포의 증식과 분화 및 사멸의 주요한 조절요인이다 (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Bozzo et al., 1997). Laminin은 기저막의 주요성분으로 integrin과 결합하여 outside-in 신호를 전달하여 세포의 증식과 분화, 사멸을 조절하고 세포의 필요에 따라 inside-out신호를 발생하여 이동과 형태분화등 다양한 작용을 나타낸다 (Giancotti & Ruoslahti, 1999). 착상전 초기배아는 laminin 및 그 수용체 integrin을 발현하며 (Shim et al., 1996; Sutherland et al., 1993) 자성 생식수관에는 고형 또는 용해된 상태의 다양한 ECM성분들이 존재한다 (Turpeenniemi-Hujanen et al., 1995; Yanagishita et al., 1994). 따라서 초기배아 발생 과정에서 배아주위에 존재하는 다양한 ECM 성분들이 배아발생에 조절적 역할을 수행할 것으로 추측된다. 본 연구에서는 laminin-rich ECM의 일종인 Matrigel (GF/GFR)이 생쥐 초기배아의 형태발생, 세포수의 증가, apoptosis에 미치는 영향을 조사하고 그 효과가 발휘되는 신호전달 과정에서 MAPK의 활성의 변화를 추적하였다.

재료 및 방법

발생을 및 세포수, apoptosis추적

과배란시킨 후 교배시킨 ICR생쥐로부터 post hCG 48hr시기에 2-세포기 배아를 수집하여 HTF (human tubal fluid) 배양액 (0.4 % insulin-free BSA)에 GF- 또는 GFR-Matrigel (0.5%)을 처리하여 posthCG 120 hr까지 배양하였다. 각 실험군에서 발생을 기록한 후 1% formalin (in PBS) 으로 고정된 포배시기의 배아를 Hoechst (1 ug/ml)로 염색한

후 배아 내 핵의 수를 계수 하였다.

In situ visualization of apoptosis in blastomere

Matrigel을 처리한 배아를 0.7% sodium citrate solution에 15분간 정치한 후 slide에 부착 시킨 후 Carnoy용액으로 고정하였다. PBS 5분간, 3% H₂O₂에 5분 정치, 증류수로 5분간 2번 세척하고 equilibrium buffer에서 1분간 정치하였다. Apoptaq kit내의 TdT enzyme 반응을 37°C, 1시간 수행하였다. 반응 후 Stop buffer에서 10분, PBS에서 1분간 3회 세척했다. Anti-digoxigenin-HRP conjugate로 상온에서 30분간 반응시켰다. PBS로 2분간 4회 세척한 후 DAB solution으로 2-5분간 발색시킨후 PBS로 세척했다. Hematoxylin으로 counter staining한 후 PBS로 세척후 mounting하였다. Control과 insulin군, 각군에서 TdT enzyme 처리군, 비처리군을 비교하여 판정하였다.

Caspase-3 활성의 측정

Matrigel을 처리한 포배를 lysis buffer (10mM Tris-Cl pH 8.0, 1% Tx-100, 5mM EDTA, 2mM DTT, 0.3M sucrose)에 용해한 후 원심분리한 상층액을 assay buffer (100mM HEPES pH 7.5, 1mM DTT, 0.1% CHAPS, 10% sucrose)에 첨가한 후 caspase-3 substrate (Ac-Tyr-VIa-Asp-amino-4-methyl coumarine)를 첨가한 후 37°C에서 30분간 배양한 후 fluorescence spectrophotometer (ex 380 nm, em 460 nm)를 이용하여 형광을 측정하였다.

Immunoprecipitation

포배에 Matrigel을 처리한 후 배아를 HTF (1% PVP)로 희석한 후 10ul ADB 용액 (20 mM MOPS pH 7.2, 25mM β -glycerol phosphate, 5mM EGTA, 1mM Na-orthovanadate, 1mM DTT)에 용해하였다. Protein A-agarose bead slurry 30 ul에 1ug Erk1/2 항체를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 진탕배양한 후

2회 세척하였다. 배아추출물과 혼합하여 4°C에서 2시간 동안 진탕배양한 후 2회 세척하였다.

MAPK 활성 측정

Immune complex-protein A-agarose bead에 ADB를 넣고 MBP, PK inhibitor cocktail Mg-ATP와 [³²P]-ATP를 첨가하여 30°C에서 20분간 반응한 후 ice에 정치하여 반응을 종결한 후 phosphocellulose paper에 점적한 후 1% phosphoric acid에서 3회, ethanol로 2회 세척한 후 건조하였다. PC paper 상의 방사선량을 scintillation counter를 이용하여 측정하였다. Kinase 활성은 total radioactivity - radioactivity in substrate-free reaction으로 계산하였다.

결과 및 논의

발생율 포배당 세포 수

GF-, GFR-Matrigel 처리군, 대조군의 순서로 발생율에 유의한 차이를 보였으며 특히 GF-Matrigel 처리군에서 퇴화된 배아의 수가 유의하게 적었다 (Fig. 1). 포배당 세포 수에서는 GF-Matrigel 처리군이 GFR-Matrigel 처리군 및 대조군 보다 유의하게 많았다 (Fig. 2). 다양한 조직에서 EGF등과 같은 성장인자 신호전달이 ECM-integrin 상호작용에 의해 상승적으로 촉진된다 (). 따라서 용해된 상태의 Matrigel 내의 ECM이 배아발달을 촉진하며 GF-Matrigel에 함유되어 있는 성장인자 등은 ECM의 배발달 효과를 상승적으로 조절하는 것으로 사료된다.

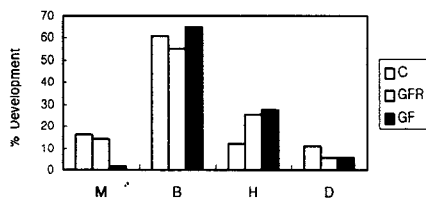


Fig. 1. Development of 2-cell embryos in the presence or absence of Matrigel (0.5%) post hCG 120 hr. M, morula; B, blastocyst; H, hatched; D, degenerated.

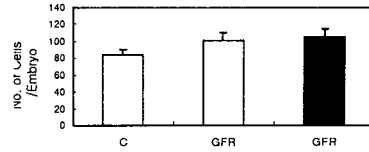


Fig. 2. Changes in cells per embryo in the presence or absence of Matrigel (0.5%) post hCG 120 hr. Bar = SD.

TUNEL 및 caspase-3 활성의 변화

GF- 및 GFR-Matrigel 처리군의 포배내 TUNEL 양성할구 수는 대조군 보다 유의하게 적었다 (Fig. 3). 또한 caspase-3의 활성 역시 유의하게 낮았다 (Fig. 4). 따라서 용해된 상태의 Matrigel내의 ECM에 의해 배아세포의 apoptosis를 억제되는 것으로 사료된다.

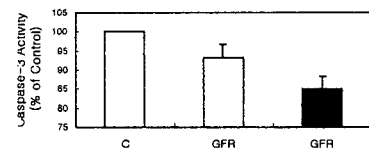


Fig. 3. Apoptotic (TUNEL-positive) index of blastocyst developed in the presence or absence of Matrigel (0.5%). Bar = SD (n > 36).

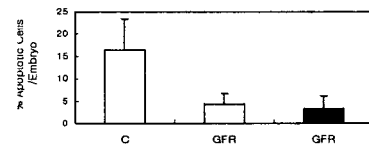


Fig. 4. Effect of Matrigel on the caspase-3 activity of blastocysts. Bar = SD (n = 3).

MAPK 활성

ECM에 의한 MAPK 활성변화를 추적하기 위해 포배에 GFR-Matrigel 처리한 후 60분까지 MAPK활성의 변화를 추적한 결과 10분 후 부터 유의하게 증가하여 증가함을 확인하였다 (Fig. 5). 이 같은 효과는 PD098059 처리시 상쇄되었다 (Fig. 6). 따라서 Matrigel에 의한 배발달 조절 과정에 MAPK cascade의 활성화를 포함하는 전형적인 MAPK (Erk1/2) 신호전달 과정이 관여하는 것으로 사료된다.

Turpeenniemi-Hujanen T, Feinberg RF, Kauppila A, Puistola U (1995) Fertil Steril 64: 132-138.
 Yanagishita M (1994) EXS 1994; 70: 179-190.

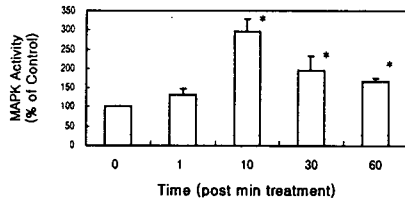


Fig. 5. Temporal changes in MAPK activity by GFR-Matrigel. Blastocysts were treated with GFR-Matrigel (0.5%) and subjected to I.P. and in vitro phosphorylation assay. Data are mean + SD (n = 3)

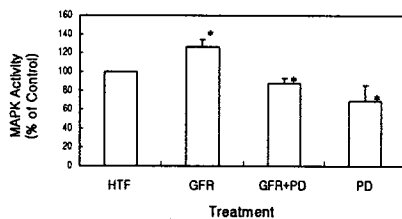


Fig. 6. Changes in MAPK activity by GFR-Matrigel . Blastocysts were treated with Matrigel (0.5%). Data are mean + SD (n = 3).

요약

착상전 초기배아에서 용해된 Matrigel에 의한 배아의 형태발생, 세포증식, apoptosis 및 MAPK활성의 변화를 조사하였다. Matrigel (0.5%)을 첨가한 배양액에서 체외배양된 2-세포기 배아의 형태발생 및 포배당 세포수가 증가되었으며 (GF>GFR>control) 포배의 TUNEL 양성 할구 및 배아내 caspase-3의 활성이 감소되었다 (GF<GFR<control). GFR-Matrigel은 포배내 MAPK의 활성을 단시간에 증가시켰으며 MEK의 저해제인 PD098059는 GFR-Matrigel의 효과를 억제하였다. Matrigel에 의한 배발달 조절 과정에 MAPK cascade의 활성화를 포함하는 전형적인 MAPK (Erk1/2) 신호전달 과정이 관여하는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bozzo C, Bellomo G, Silengo L, Tarone G, Altruda F (1997) Exp Cell Res 237: 326-337.
 Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Science 285: 1028-1032.
 Shim C, Kwon HB, Kim K (1996) Mol Reprod Dev 44: 44-55.
 Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH (1993) 119: 1175-1186.