

## Regulation of Preimplantation Development of Mouse Embryos by Insulin and Tumor Necrosis Factor alpha

Myung Chan Gye, Hyun Joo Han  
Department of Biology, Kyonggi University

### 서론

착상전 초기배아는 모체로부터 기원되거나 자체적으로 생산된 다양한 성장인자와 호르몬에 의해 발생을 조절받는다. 인슐린은 척추동물과 무척추동물에서 광범위하게 발견되는 펩타이드이다 (Shi et al., 1994). 인슐린 신호는 인슐린 수용체에 전달된 후 인슐린 수용체 기질-1 (IRS-1)과 PKB & PKC로의 신호분기점인 phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)를 거쳐 단백질번역에 관계되는 Rsk (ribosomal S6 kinase)로 신호가 전달된다 (Yenush et al., 1997). Insulin은 생쥐 초기배아의 발생, 단백질합성 및 인산화, 유전자발현을 증가시키며 S6K의 활성을 증가시킨다 (Harvey et al., 1988; Gye et al., 2000). 한편 초기배아는 TNF $\alpha$  수용체를 발현하며, 당뇨병과 같은 병리적 조건하에서 모체 자궁내 TNF $\alpha$ 의 농도증가는 당뇨병 임신부에서 초기배아 손상과 관련된 것으로 제시되고 있다 (Pampfer et al., 1994). 본 연구에서는 초기배아에서 insulin과 TNF $\alpha$ 의 상호작용을 추적하고 당뇨병 임신부에서 배아의 손상을 억제하기 위한 insulin 치료법의 준거를 제시하기 위해 생쥐 초기배아를 대상으로 insulin 과 TNF $\alpha$  처리 효과를 발생률, 배아수, caspase-3 assay를 통해 조사하였으며 다양한 생물학적 활성분자 신호전달의 중요한 요소인 MAPK (Erk1/2) 활성의 변화를 추적하였다.

### 재료 및 방법

#### 발생률 및 세포수

과배란시킨 후 교배시킨 ICR 생쥐로부터 post hCG 83 hr 시기에 상실배를 수집하여 HTF (human tubal fluid) 배양액 (0.4 % insulin-free BSA)에서 40시간 동안 배양하면서 insulin (400 ng/ml), TNF $\alpha$  (50 ng/ml)를 처리하였다. 각 실험

군에서 post hCG 119hr 시기의 발생율을 기록하고 1% formalin 용액으로 고정된 포배시기의 배아를 Hoechst (1 ug/ml)로 염색한 후 배아 핵의 수를 계수하였다.

#### Caspase-3 활성의 측정

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 substrate를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 fluorescence spectrophotometer (ex 380 nm, em 460 nm)를 이용하여 형광을 측정하였다.

#### Immunoprecipitation

포배에 insulin 또는 TNF $\alpha$ 를 처리한 후 배아를 HTF (1% PVP)로 희석한 후 10ul ADB 용액 (20 mM MOPS pH 7.2, 25mM  $\beta$ -glycerol phosphate, 5mM EGTA, 1mM Na-orthovanadate, 1mM DTT)에 용해하였다. Protein A-agarose bead slurry 30 ul에 1ug Erk1/2 항체를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 진탕배양한 후 2회세척하였다. 배아추출물과 혼합하여 4 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 진탕배양한 후 2회세척하였다.

#### MAPK 활성 측정

Immune complex-protein A-agarose bead에 ADB를 넣고 MBP, PK inhibitor cocktail Mg-ATP와 [ $r$ - $^{32}$ P]-ATP를 첨가하여 30 $^{\circ}$ 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

#### 발생율, 포배당 세포 수

포배로 발생율은 insulin, 대조군, TNF $\alpha$  + insulin, TNF $\alpha$  처리군의 순으로 나타났다 (Fig. 1). 포배당 세포 수에서는 포배로 발생율은 insulin, 대조군, TNF $\alpha$  + insulin, TNF $\alpha$  처리군의 순으로 나타났다 (Fig. 2).

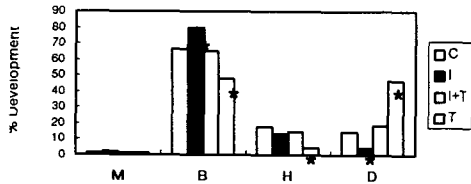


Fig. 1. Development of morula (posthCG 83hr) in the presence or absence of insulin and/or TNF $\alpha$  (50 ng/ml) at posthCG 119hr. M, morula; B, blastocysts; H, hatched; D, degenerated. \*, Significantly different from control (Chi square test,  $p < 0.05$ ).

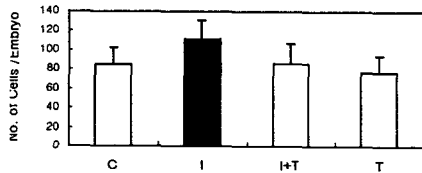


Fig. 2. Changes in cells per blastocyst in the presence or absence of insulin and/or TNF $\alpha$  (50 ng/ml). Bar = SD ( $n = 3$ ). (Student's t-test,  $p < 0.05$ ).

#### TNF $\alpha$ 에 의한 caspase-3 활성의 변화

포배 내 caspase-3의 활성은 TNF $\alpha$  농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 3). TNF $\alpha$ 에 의한 배아 사멸 과정에서 caspase-3의 활성화를 통한 apoptosis 기작이 관여함을 알 수 있다.

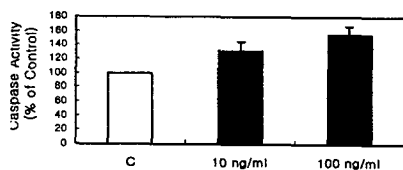


Fig. 3. Effect of TNF $\alpha$  on the caspase-3 activity of blastocysts. Bar = SD ( $n = 2$ ).

#### Insulin과 TNF $\alpha$ 에 의한 MAPK 활성변화

TNF $\alpha$ 는 처리한 농도 의존적으로 배아 내 MAPK활성을 유의하게 감소시켰다 (Fig. 4). Insulin 단독처리시 처리 후 10분에 MAPK 활성이 10% 증가하였으며 TNF $\alpha$ 를 전처리군 및 단독처리군의 MAPK 활성은 대조군보다도 유의하게 낮았다 (Fig. 5). 따라서 insulin에 의한 MAPK활성의 증가를 통한 배아의 형태발생 및 세포증식 촉진효과 및 사멸억제 효과가 TNF $\alpha$ 에 의해 길항됨을 알 수 있으며 이는 당뇨병 조건하에서 상승된 TNF $\alpha$ 에 의한 배아의 손상과 그 대응책으로서 insulin의 사용이 적절할 수 있는 증거로 활용될 수 있을 것이다.

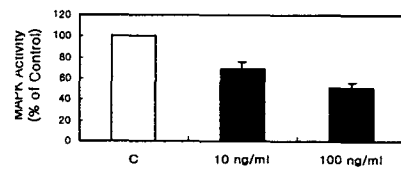


Fig. 4. Changes in MAPK activity by TNF $\alpha$ . Blastocysts were treated with TNF $\alpha$ . IP complex using the Erk1/2 antibody RIPA lysates of embryos was subjected to in vitro phosphorylation kinase assay. Data are mean + SD ( $n = 2$ ).

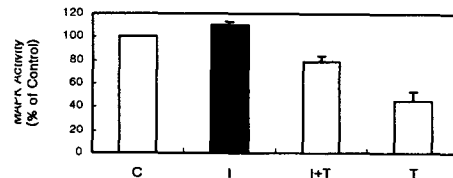


Fig. 5. Changes in MAPK activity by insulin and/or TNF $\alpha$ . Blastocysts were treated with insulin and/or TNF $\alpha$  (50 ng/ml). Data are mean + SD ( $n = 2$ ).

### 요약

생쥐 착상전 초기배아에서 insulin과 tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )에 의한 배아의 형태발생, 세포증식, apoptosis 및 MAPK활성의 변화를 조사하였다. Insulin에 의해 형태발생 및 포배당 세포수가 증가되었으며 TNF $\alpha$  처리시 유의하게 감소하였다. TNF $\alpha$  전처리시 insulin에 의한 발생 및 세포수 증가 촉진효과가 상쇄되었으며 TNF $\alpha$ 는 배아내 caspase-3의 활성을 증가시켰다. Insulin은 단시간내에 포배에서 mitogen activated protein kinase (MAPK or Erk1/2)의 활성을 증가시켰다. TNF $\alpha$ 는 포배내 MAPK의 활성을 감소시켰다. Insulin 처리 전 TNF $\alpha$ 를 전

처리한 경우 insulin에 의한 MAPK 활성의증가가 상쇄되었다. 배발생을 촉진하는 인슐린 신호전달 과정은 MAPK cascade를 경유하며 TNF $\alpha$ 를 경유한 신호전달과 crosstalk이 존재하는 것으로 사료된다.

#### 참고문헌

Harvey MB, Kaye PL (1988) Endocrinology 122: 1182-1184.

Yenush L, White MF (1997) Bioessays 19: 491-500.

Schultz GA, Hogan A, Watson AJ, Smith RM, Heyner S (1992) Reprod Fertil Dev 4: 361-371.

Shi CZ, Collins HW, Buettger CW, Garside WT, Matschinsky FM, Heyner S (1994) Mol Reprod Dev 37: 398-406.

Gye MC, Nah H, Kim MK (2000) Dev Reprod 4: 29-35.

Pampfer S, Wu YD, Vanderheyden I, De Hertogh R (1994) Endocrinology 134: 206-212.