

흰쥐에서 단백질 분해효소 저해제, Nexin-1의 조직 및 생식기관 특이적 유전자 발현

고정재^{1,2} · 김남근^{1,2} · 김진규¹ · 최명진¹ · 정형민^{1,2} · 서승엽³ · 김윤희⁴ · 이현환⁵ · 차광열^{1,2}

¹포천중문 의과대학교 기초의학연구소, ²차병원 여성의학연구소,
³공주대학교 생물학과, ⁴경희대학교 생물학과, ⁵외국어대학교 미생물학과

Tissue- and Reproductive Organ-specific Expression of Protease Nexin-1 in Sprague-Dawley Rat

Jung-Jae Ko^{1,2}, Nam-Keun Kim^{1,2}, Jin-Kyu Kim¹, Myoung-Jin Choi¹,
Hyung-Min Chung^{1,2}, Seung-Yeom Seo³, Yunhee Kim Kwon⁴,
Hyune-Hwan Lee⁵ and Kwang-Yul Cha^{1,2}

¹Institute of Medical Research, Pochon CHA University, Pochon 487-800

²Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul 135-081

³Department of Biology, Kongju University, Kongju 314-701

⁴Department of Biology, Kyung Hee University, Seoul 130-701

⁵Department of Microbiology, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 449-791, Korea

요 약 : Protease nexin-1 (PN-1)은 활성화 자리에 serine기를 갖는 단백질 분해 효소 즉, 트롬빈, 트립신, 플라스미노겐 활성화 효소 등의 작용을 억제한다. 본 연구에서는 흰쥐의 Sprague-Dawley 계통을 이용하여 조직별 mRNA 발현여부 및 정도를 조사하였다. PN-1의 발현이 나타난 조직은 뇌 (전뇌, 후뇌), 심장, 간, 폐, 난소, 난관 등이다. 이들 중 유전자 발현이 가장 높은 조직은 암컷의 전뇌 (forebrain) 였다. 특히, 생식기관들 중에서는 암컷의 난소와 난관에서만 발현이 관찰되는 등 PN-1 유전자는 성별에 따라 서로 다르게 발현됨이 확인되었다. 이러한 결과들로 미루어 PN-1은 여포 형성과정과 초기배 형성과정 등의 생식 및 발생작용과 관련이 있을 것으로 생각된다.

ABSTRACT : Protease Nexin-1 (PN-1) inhibits the activity of several serine proteases including thrombin, urokinase (uPA)-type plasminogen activator and trypsin. Tissue- and reproductive organ-specific mRNA levels of the PN-1 were investigated in Sprague-Dawley adult rat. PN-1 mRNA expression in rats was found in brain (forebrain, hindbrain), heart, liver, lung, ovary and oviduct. The level of PN-1 mRNA in male and female among the tissues was the highest in forebrain of the female. PN-1 expression in reproductive organs was found only in ovary and oviduct. These results suggest that PN-1 expression is dependent on the sex and may be related to folliculogenesis and early embryogenesis.

Key words : mRNA expression, Nexin-1, Protease inhibitor, Rat.

서 론

단백질 분해효소 저해제, protease nexin-1 (PN-1)은 thrombin과 urokinase (uPA)-type plasminogen activator를 포함한 serine protease들의 저해제로 알려져 있다. Urokinase-type plasminogen activator (uPA)는 plasminogen을 plasmin으로 전환시켜 주는 역할을 한다. Plasmin은 혈전용해 (fibrinolysis) 뿐만 아니라 배란, 배발생과정, 감염, 상처치

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (HMP-96-D-1-1032)의 지원으로 수행되었음.

유, neoplasia 같은 조직 재형성 (tissue remodeling)에서 매우 중요한 역할을 한다 (Strickland, 1976; Yagel et al., 1988). PA는 배아 (embryo)의 착상시기 동안 단백질 분해효소의 활성을 갖는다 (Khamisi et al., 1996; Rao et al., 1989). 지금까지 알려진 PN-1의 생리학적 작용은 신경세포의 성장, 노인성 치매 (alzheimer), 항암작용 (antitumor agent), 불임질환 등 인체의 다양한 여러 질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Beers 1975; Farrell & Cunningham, 1986; Yagel et al., 1988; Meier et al., 1989; Rosenblatt et al., 1989; Festoff et al., 1996; Hagglund et al., 1996).

흰쥐에서 PN-1 유전자는 Gloor 등 (1986)에 의해 cloning

되었으며, 뇌조직에서는 발생단계별로 발현이 조절되나, 간, 심장, 비장 등에서는 발현되지 않는 현상이 보고되었고, 뇌종양 환자의 조직에서는 발현이 증가함이 관찰되었다 (Rosenblatt et al., 1987; Sommer et al., 1987; Rao et al., 1990; Citron, 1996). 그러나, 방사선 (X-ray) 처리된 척수 (spinal cord)에서는 PN-1 단백질 발현이 감소된다는 보고가 있다 (Rao et al., 1993). 최근들어 human에서 2가지 형태 즉, α PN-1 과 β PN-1이 밝혀졌으며, β PN-1은 α PN-1의 310 번째에 arginine이 첨가되면서 뒷부분에 missense mutation을 갖는다 (McGrogan et al., 1988). 이들 둘은 모두 thrombin 과 urokinase의 저해제로 작용한다. 그리고, α PN-1은 이미 보고된 바 있는 glial-derived neurite promoting factor와 염기서열이 동일하며, 최근에는 사람의 태반조직에서도 발현이 보고된 바 있다 (White et al., 1993).

그러나, 지금까지 흰쥐의 암컷과 수컷의 각 조직 및 생식기관에서의 PN-1의 발현을 연구한 논문은 아직 없다. 그러므로, 본 연구에서는 흰쥐의 각 조직에서의 발현 유무, 특히 생식작용에 관여하는 조직에서의 PN-1의 발현을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 각 조직의 채취와 RNA분리

실험동물인 흰쥐 (Sprague-Dawley strain)를 도살한 뒤 외과적으로 개복하고 먼저 에탄올과 0.1% DEPC 처리된 증류수로 실험동물을 철저히 세척한 다음 멸균 소독된 수술도구를 사용하여 장기를 적출하였다. 장기의 적출은 전뇌 (forebrain), 후뇌 (hindbrain), 심장 (heart), 신장 (kidney), 간 (liver), 폐 (lung), 근육 (skeletal muscle), 비장 (spleen), 정소 (testis), 부정소 (epididymis), 정낭 (seminal vesicle), 정관 (vas deferens), 난소 (ovary), 난관 (oviduct) 및 자궁 (uterus) 조직을 적출하였으며, 이들 조직은 멸균된 eppendorf tube에 넣고 즉시 액화질소에 넣어 냉동시켰으며, 사용 전까지 -70°C 의 저온 냉동고에 보관하였다.

각각의 조직은 single-step RNA isolation 방법 (Chomczynski and Sacchi, 1987)을 기초로 제작된 TRIzol 용액 (Gibco-BRL)을 조직의 무게 100 mg당 1 ml을 넣고 분쇄한 후, 4°C 에서 5분간 방치하였다. 여기에 전체 부피의 1/5에 해당하는 chloroform을 넣고 다시 4°C 에서 5분간 방치한 후, 12,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 취한 후, 이와 동일한 분량의 isopropyl alcohol를 넣고 4°C 에서 10분간 방치하였다. 이것을 4°C , 12,000 rpm에서 5

분간 원심분리하여 RNA 침전물 (pellet)을 얻었다. 이어서 RNA 침전물을 75% 에탄올로 세척한 후, 공기 중에서 완전히 건조시키고 DEPC 처리된 증류수로 녹여서 -70°C 에 보관하였다.

2. 역 전사 및 중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)

분리된 total RNA를 분광광도계로 정량하여 $2 \mu\text{g}$ 을 취한 후, 이를 65°C 에서 10분간 변성 (denaturation) 시켰다. 변성된 RNA에 nexin primer #1 (5'-ATCTGAGAATTCATGTCCCAGCTCAACTCT-3')과 nexin primer #2 (5'-AGCTAGGAATCTTCAGGGCTTGTTAC-3')를 각각 25 pmol씩 넣고 DEPC-treated water로 전체 부피 20 μl 를 맞춘 후, RT-PCR premix (Bioneer)와 함께 혼합하여 RT-PCR을 실행하였다. 42°C 에서 1시간 역 전사 반응시켜 cDNA를 합성한 후, 합성된 cDNA를 주형으로 PCR을 실시하였다. PCR은 다음과 같은 조건으로 실행하였다. 먼저 95°C 에서 6분간 DNA 전(前)변성 (predenaturation)을 1회 실행하였고, 94°C 에서 40초간 DNA 변성 (denaturation), 57°C 에서 1분간 서냉복원 (annealing), 그리고 72°C 에서 1분 20초간 신장 (extension)을 30회 실행한 후, 72°C 에서 5분간 DNA 후(後)신장 (post-extension)을 거친 다음 4°C 에 보관하였다.

위와 같이 RT-PCR을 실시하여 증폭된 1.2kb PCR 산물을 얻었다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 확인하였다.

결 과

1. 흰쥐의 각 조직별 PN-1의 발현

분리된 RNA를 이용하여 RT-PCR 방법으로 nexin-1의 유전자 발현을 확인한 결과 수컷에서는 전뇌, 후뇌, 심장 그리고 폐조직에서 그 발현이 관찰되었다 (Fig. 1). 그리고, 암컷에서는 전뇌, 후뇌, 심장 그리고, 간조직에서 각각 그 발현이 확인되었다 (Fig. 2). 폐조직에서는 암컷, 간조직에서는 수컷에서만 각각 발현이 관찰되었다 (Fig. 1 & 2). 그리고, 신장, 근육, 비장조직에서는 PN-1의 발현이 전혀 관찰되지 않았다. 암컷과 수컷의 각 조직 중 전뇌에서의 발현이 가장 높게 나타났다 (Fig. 1 & 2). 또한, 수컷보다는 암컷의 장기에서 PN-1의 발현이 다소 강하게 나타남이 관찰되었다.

2. 생식기관 (reproductive organs)에서의 PN-1의 발현

수컷으로부터 정소, 부정소, 정관, 정낭을 얻은 다음, 이로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR 방법으로 PN-1의 발현을

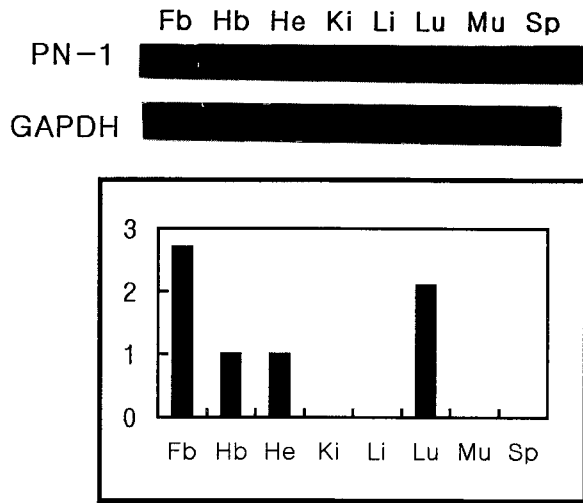


Fig. 1. Expression of PN-1 in male organs of Sprague-Dawley rat by RT-PCR. Relative amount of PN-1 was normalized with the level of GAPDH mRNA and the level was calculated by laser densitometer. Abbreviations: Fb; Forebrain, Hb; Hindbrain, He; Heart, Ki; Kidney, Li; Liver, Lu; Lung, Mu; Muscle, Sp; Spleen.

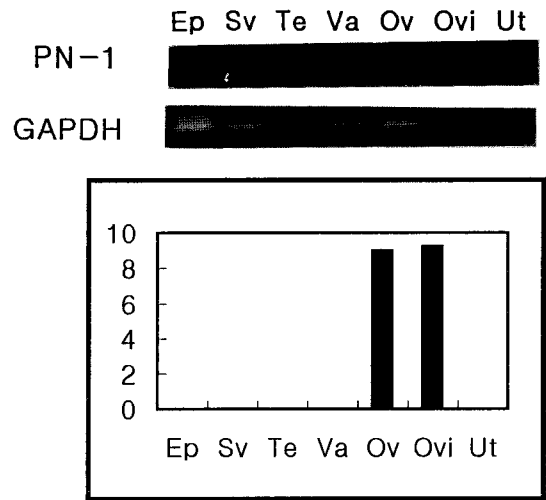


Fig. 3. Expression of PN-1 in reproductive organs of Sprague-Dawley rat by RT-PCR. Relative amount of PN-1 was normalized with the level of GAPDH mRNA and the level was calculated by laser densitometer. Abbreviations: Ep; Epididymis, Sv; Seminal vesicle, Te; Testis, Va; Vas deferens, Ov; Ovary, Ovi; Oviduct, Ut; Uterus.

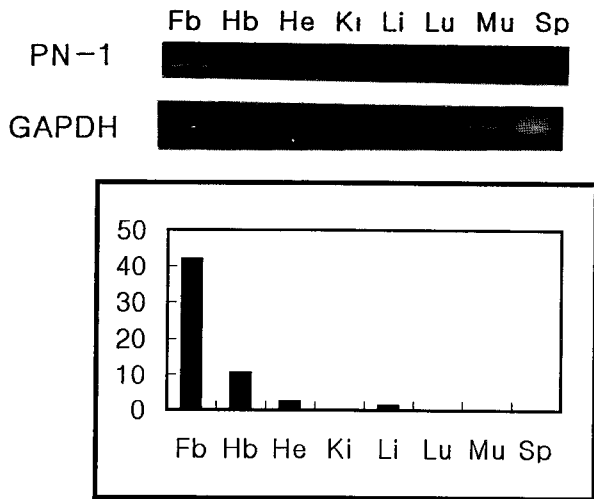


Fig. 2. Expression of PN-1 in female organs of Sprague-Dawley rat by RT-PCR. Relative amount of PN-1 was normalized with the level of GAPDH mRNA and the level was calculated by laser densitometer. Abbreviations: Fb; Forebrain, Hb; Hindbrain, He; Heart, Ki; Kidney, Li; Liver, Lu; Lung, Mu; Muscle, Sp; Spleen.

관찰한 결과 수컷의 생식기관에서는 PN-1이 발현되지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 암컷으로부터 난소, 난관, 자궁 조직으로부터 RNA를 분리하여 PN-1의 발현을 조사한 결과 이들 중 난소와 난관조직에서 거의 동일한 수준의 발현이 확

인되었다. 따라서, PN-1은 실험동물인 흰쥐에 있어서 수컷에 비해 암컷에서 높은 발현이 나타났다. 또한 생식기관중 난소, 난관 등과 같은 암컷 생식기관에서는 PN-1이 발현되지만, 수컷 생식기관인 정소, 부정소, 정관, 정낭조직에서는 전혀 발현되지 않음을 확인할 수 있었다.

고 찰

흰쥐의 전뇌, 후뇌조직에서 1.2 Kb의 뚜렷한 band가 관찰된 반면 다른 조직에서는 PN-1 band가 비교적 희미하거나 발견되지 않아서 PN-1은 흰쥐의 각 조직 중에서 뇌조직에서 강하게 발현되는 반면 다른 조직에서는 발현정도가 낮거나, 발현이 없음을 알 수 있었다. 아울러 암컷과 수컷 조직에서의 차이를 관찰하였을 때 암컷 조직에서 PN-1의 발현이 약간 높게 나타났다. 이러한 성별에 따른 PN-1의 발현은 매우 흥미로운 사실이다. 암·수 모두 전뇌에서의 유전자 발현이 후뇌에서 보다 높게 나타났으며, 수컷에서는 폐조직에서 그리고, 암컷에서는 간 조직에서 PN-1이 각각 발현되어 성별에 따른 조직 간의 발현양상에 차이가 발견되었다 (Fig. 1 & 2).

한편, 정소, 부정소, 정관, 정낭과 같은 수컷의 생식기관에서 분리한 RNA와 난소, 난관과 자궁 등의 암컷의 생식기관에서 분리된 RNA를 이용하여 PN-1의 발현을 조사한 결과를 보면 수컷의 생식기관에서는 PN-1의 발현이 없는 반

면 암컷의 생식기관에서는 난소와 난관조직에서 강한 PN-1의 발현이 관찰되었다 (Fig. 3). 그러나, 자궁조직에서는 PN-1의 발현이 검출되지 않았다. 따라서, PN-1은 생식세포 발생기관 중에서 수컷 생식세포의 생산과 사출 (ejaculation)에는 크게 작용하지 않을 것으로 생각된다. 그러나, 난소와 난관조직에서는 PN-1의 발현이 검출된 것으로 보아 여포형성과정 (folliculogenesis)과 초기 배발생과정 (early embryogenesis)에 PN-1이 관여할 것으로 추정된다.

PN-1 mRNA는 뇌에서 가장 많이 발현되었고, 뇌 중에서도 전뇌 (forebrain)에서의 발현이 후뇌 (hindbrain)에서 보다 훨씬 높게 나타났다. Gloor 등 (1986)은 PN-1이 흰쥐에서 뇌 조직에서만 발현되는 것으로 보고하였고, Wagner 등 (1993)은 원숭이에서 역시 PN-1이 뇌 조직에서만 발현됨을 보고하였다. 그러나, Mansuy 등 (1993)은 생쥐 (mouse)에서 뇌 조직 외에 폐, 근육, 흉선, 심장, 신장, 정소 및 정낭 등의 생식기관까지 널리 발현하고 있음을 보고하였다. 그러나, 본 연구 결과 흰쥐 (rat)에서는 뇌, 심장, 폐, 간, 난소와 난관조직에서 발현이 확인되어 생쥐에서의 연구 결과들과는 상당한 차이가 드러났다. 특히, 지금까지 흰쥐 및 생쥐에서 보고된 바 없는 난소와 난관조직에서의 PN-1의 발현으로 미루어 PN-1이 배란 (ovulation), 배아 (embryo)의 착상과 유산 (abortion) 등과도 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한, 생쥐에서 관찰되는 정낭 (seminal vesicle) 조직에서의 발현이 흰쥐에서는 관찰되지 않았다. 그러나, 흰쥐와 다른 동물들 간의 이러한 조직별 유전자 발현의 차이가 생식 및 생리작용과 어떤 관계가 있는지는 아직 알 수 없다.

특히, 배란과정을 전후해 uPA와 PN-1이 동시에 높게 발현되었으며, cumulus cell에서는 uPA가 낮게 발현되고, PN-1은 높게 발현되어 난자 (oocyte)의 배란을 억제하고 있음이 확인되었다 (Peng et al., 1993; Canipari et al., 1995; Li et al., 1997; Ny et al., 1997). 또한, human의 태반 (placenta), 융모막 (chorion), 양막 (amnion) 및 탈락막 (decidua)에서의 발현이 확인되어 태아의 착상과정과 밀접히 관련되어 있을 것으로 추정된다 (White et al., 1993). 최근에는 uPA의 발현이 human의 8-cell에서부터 시작되어 blastocyst 시기에 더욱 증가하는 것이 확인되었다 (Khamisi et al., 1996). 또한, PCOS (polycystic ovarian syndrome) 환자에서 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)의 활성이 약 2배 높게 나타남이 보고되었다 (Atiomo et al., 1998). 생쥐에서 tPA (tissue-type plasminogen activator)와 uPA를 동시에 knockout 시킨 쥐에서는 배란율이 26% 떨어졌으며, 둘 중 하나를 knockout 시킨 경우는 배란율이 정상과 동일하였다

(Leonardsson et al., 1995). 또한, tPA 또는 PAI-1을 knockout 시킨 경우는 plasmin의 활성도가 정상을 유지하였으나, uPA를 knockout 시킨 경우는 plasmin의 활성이 정상의 10% 정도만을 유지하였다. 그러나, 이때 배란율은 정상개체와 차이가 없는 것이 밝혀졌다 (Ny et al., 1997). 그러므로, 배란 전에 이미 배란시 필요한 양을 훨씬 초과하는 plasmin의 생산이 이루어지는 것으로 생각된다.

결론적으로, PN-1이 조직 특이적으로 발현되었으며, 특히 생식기관 중 난소와 난관에서만 발현되어 암컷의 생식작용인 배란, 착상 및 유산 등의 과정에 밀접하게 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한, 정상시기에는 발현되지 않는 흰쥐 자궁 (uterus) 조직에서의 PN-1 발현이 임신시에는 어떻게 조절되는지, PCO에 의한 불임환자에서의 발현 등이 효소의 배란과 착상에 관련된 보다 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

인용문헌

- Atiomo WU, Bates SA, Condon JE, Shaw S, West JH, Prentice AG (1998) The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 69(2):236-241.
- Beers WH (1975) Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell* 6(3):379-386.
- Canipari R, Epifano O, Siracusa G, Salustri A (1995) Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Dev Biol* 167(1): 371-378.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Citron BA, Ratzlaff KT, Smirnova IV, Festoff BW (1996) Protease nexin (PNI) in mouse brain is expressed from the same gene as in seminal vesicle. *J Mol Neurosci* 7:183-191.
- Farrell DH, Cunningham DD (1986) Human fibroblasts accelerate the inhibition of thrombin by protease nexin. *Proc Natl Acad Sci* 83:6858-6862.
- Festoff BW, Smirnova IV, Ma J, Citron BA (1996) Thrombin, its receptor and protease nexin 1, its potent serpin, in the nervous system. *Seminar in thrombosis and*

- hemostasis 22:267-271.
- Gloor S, Odink K, Guenther J, Nick H, Monard D (1986) A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. *Cell* 47:687-693.
- Hagglund AC, Ny A, Liu K, Ny T (1996) Coordinated and cell-specific induction of both physiological plasminogen activators creates functionally redundant mechanisms for plasminogen formation during ovulation. *Endocrinology* 137:5671-5677.
- Khamsi F, Armstrong DT, Zhang X (1996) Expression of urokinase-type plasminogen activator in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 2 (4):273-276.
- Leonardsson G, Peng XR, Liu K, Nordstrom L, Carmeliet P, Mulligan R, Collen D, Ny T (1995) Ovulation efficiency is reduced in mice that lack plasminogen activator gene function: functional redundancy among physiological plasminogen activators. *Proc Natl Acad Sci* 92(26):12446-12450.
- Li M, Karakji EG, Xing R, Fryer JN, Carnegie JA, Rabbani SA, Tsang BK (1997) Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor during ovarian follicular development. *Endocrinology* 138(7):2790-2799.
- Mansuy IM, Putten HVD, Schmid P, Meins M, Botten FM, Monard D (1993) Variable and multiple expression of protease nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development. *Development* 119:1119-1134.
- McGrogan M, Kennedy J, Ping L, Hsu C, Simonsen R, Baker JB (1988) Molecular cloning and expression of two forms of human protease Nexin I. *Biochemistry* 5:172-177
- Meier R, Spreyer P, Ortmann R, Harel A, Monard D (1989) Induction of glia-derived nexin after lesion of a peripheral nerve. *Nature* 342:548-550.
- Ny A, Nordstrom L, Carmeliet P, Ny T (1997) Studies of mice lacking plasminogen activator gene function suggest that plasmin production prior to ovulation exceeds the amount needed for optimal ovulation efficiency. *Eur J Biochem* 244(2):487-493.
- Peng XR, Hsuhh AJ, Ny T (1993) Transient and cell-specific expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen-activator-inhibitor type 1 results in controlled and directed proteolysis during gonadotropin-induced ovulation. *Eur J Biochem* 214(1):147-156.
- Rao JA, Baker JB, Morantz RA, Kimler B, Evans R, Festoff BW (1990) Serpin inhibitors of urokinase and thrombin in normal rat brain and the 9L brain tumor: evidence for elevated expression of protease Nexin I-like inhibitor and a novel sodium dodecyl sulfate-activated tumor antithrombin. *Cancer Res* 50:5039-5044.
- Rao JS, Kahler CB, Baker JB, Festoff BW (1989) Protease nexin I, a serpin, inhibits plasminogen-dependent degradation of muscle extracellular matrix. *Muscle & Nerve* 12:640-646.
- Rao JS, Kono S, Rayford A, Ang KK, Feng Y, Monard E, Sawaya R (1993) Decreased levels of glia-derived nexin/protease nexin I in irradiated rat spinal cord *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 195:853-858.
- Rosenblatt DE, Cotman CW, Nieto-Sampedro M, Rowe JW, Knauer DJ (1987) Identification of a protease inhibitor produced by astrocytes that is structurally and functionally homologous to human protease nexin-I. *Brain Res* 415:40-48.
- Rosenblatt DE, Geula C, Mesulam MM (1989) Protease nexin immunostaining in Alzheimer's disease. *Am Neurol Assoc* 26:628-634.
- Sommer J, Gloor SM, Rovell GF, Hofsteenge J, Nick H, Meier R, Monard D (1987) cDNA sequence coding for a rat glia-derived nexin and its homology to members of the serpin superfamily. *Biochemistry* 26:6407-6410.
- Strickland S, Reich E (1976) Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parital endoderm. *Cell* 9:231-240.
- Wagner SL, Van Nostrand WE, Lau AL, Farrow JS, Suzuki M, Bartus RT, Schuppek R, Nguyen A, Cotman CW, Cunningham DD (1993) Co-distribution of protease nexin-1 and protease nexin-2 in brains of non-human primates. *Brain Res* 626(1-2):90-98.
- White EA, Baker JB, McGrogan M, Kito PA (1993) Protease nexin 1 is expressed in the human placenta.

Thromb Hemost 69:119-123.

Yagel S, Parhar RS, Jeffrey JJ, Lala PK (1988) Normal nonmetastatic human trophoblast cells share *in vitro*

invasive properties of malignant cells. J Cellular Physiol 136:455-462.