

돼지 정자내 Phospholipids Hydroperoxide Glutathione Peroxidase와 Heparin-Binding Protein의 발현 수준과 번식 능력의 관계

오신애¹ · 신차균^{2,3} · 유영아¹ · 한경수¹ · 방명걸^{1,3,*}

¹중앙대학교 산업과학대학 동물자원과학과, ²산업과학대학 생명공학과, ³생명환경연구원

Relationship between the mRNA Expression Levels of Sperm Phospholipids Hydroperoxide Glutathione Peroxidase and Heparin-Binding Protein, and *In-Vivo* Fertility in Boars

Shin-Ae Oh¹, Cha-Gyun Shin^{2,3}, Young-Ah You¹, Kyung-Soo Han¹ and Myung-Geol Pang^{1,3,*}

¹Department of Animal Science and Technology, ²Department of Biotechnology, and ³BET Research Institute, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the relationship between the mRNA expression levels of sperm phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) and heparin-binding protein (HBP), and *in-vivo* fertility in boars. The farrowing rate was not correlated with litter size. Sperm PHGPx mRNA expression level of the larger litter size (over 10) group (2,414.7±400.7) was high that of smaller litter size (below 8) group (1,875.8±311.2). Sperm HBP mRNA expression level was also higher in the larger litter size (2,255.9±360.8) group than the smaller litter size (2,155.4±378.0). However, significant differences were not observed. Sperm PHGPx mRNA level was correlated positively with litter size ($r=0.206$). Because the expression levels of PHGPx and HBP are not strongly correlated with *in-vivo* fertility, PHGPx and HBP can not be considered a predictive measure for fertility in boars.

(Key words : Phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase, Heparin-binding protein, Sperm fertility)

요 약

본 연구는 정자 내의 phospholipid hydroxide glutathion peroxidase (PHGPx) mRNA 발현 수준, heparin-binding protein (HBP) mRNA 발현 수준, 수태율 그리고 산자수 사이의 관계를 조사하고자 실시하였다. 수태율과 산자수 사이에 있어서 상관관계는 나타나지 않았다. PHGPx mRNA 발현 수준에 있어 산자수가 10두 이상 군에서 (2,414.7±400.7) 8두 미만 군보다 (1,875.8±311.2) 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. HBP mRNA 발현 수준에 있어서도 산자수 10두 이상 군에서 (2,255.9±360.8) 8두 미만 군보다 (2,155.4±378.0) 약간 높은 결과를 보였으나, 유의적인 차이는 인정되지 않았다. PHGPx mRNA 발현 수준과 산자수 사이의 관계는 ($r=0.206$) 정 의 상관관계를 보였으나, 유의한 상관관계는 나타나지 않았다. 본 실험의 결과, PHGPx와 HBP의 발현수준이 수태율, 산자수와 유의한 상관관계를 보이지 않았기 때문에 PHGPx와 HBP가 정자의 수정능력을 예측하기에는 미흡한 면이 있다.

서 론

Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx)는 생체막의 과산화 반응시 1차적으로 생성되는 과산화 지질을 직접적으로 환원시키는 항산화 효소로서 핵에 있어서는 leukotrienes의 생산 조절에 관여하고 미

토콘드리아에 있어서는 전자 전달계로부터 생성되는 활성 산소와 과산화 지질을 제거함으로써 세포 사멸을 방지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Ursini 등, 1982; Brigelius-Flohe 등, 1994; Imai 등, 1998). 최근 마우스의 PHGPx 유전자가 분리되어 그 구조가 밝혀졌으며, PHGPx가 체내 대부분의 조직에서 발현되지만 특히 정소에서 가장 높게 발현하고, 주로 정자 발생 단계

* 본 연구는 한국학술진흥재단 연구비(KRF-2004-042-F00013)의 지원으로 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-31-670-4841, E-mail: mgpang@cau.ac.kr

에서 높은 발현을 보이고 있음이 보고된 바 있다 (Roveri 등, 1992; Nam 등, 1997; Nam 등, 1998). 따라서, PHGPx는 정소에서 주로 정자 발생에 관여하는 항산화 효소로서 활성 산소로 인한 손상으로부터 정자를 보호하고, 응성의 수정 능력 보존에 핵심적 역할을 수행하는 것으로 보여진다. 따라서 최근 PHGPx가 수정 능력 관련 지표로서 관련이 있음을 이용하여 PHGPx가 수정 능력을 예견하는 지표로 사용할 수 있다고 제시되고 있다 (Imai 등, 2001; Foresta 등, 2002).

Heparin-binding protein (HBP)은 정장에 존재하는 단백질 그룹의 하나로, 정자 사출시 정자 막의 표면에 부착되지만 정소상체 정자의 막 표면에 극히 적은 양이 존재하며 (Miller 등, 1990), HBP는 정소상체 정자의 수정능 획득과 투명대 결합 능력을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Arangasamy 등, 2005). HBP은 음성 부생식선에서 생산되어 정장으로 분비되며, 사출시에 정자에 결합되며, 정소상체 정자에 HBP를 처리하였을 때 정자는 heparin에 의해 수정능 획득이 유도되어 침체 반응을 일으키게 된다 (Miller 등, 1990). 즉, HBP는 사출 정자의 표면에 많이 존재하고 있으며, HBP는 정자가 lysophosphatidylcholine에 반응하게 하여 침체 반응을 일으키게 하는 역할을 한다. 따라서, HBP는 수정 능력에 영향을 줄 수 있는 하나의 부생식선 단백질이라고 할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 돼지에 있어 산자수와 수태율을 정자의 수정 능력 지표로서 활용하여, 산자수와 수태율에 따른 PHGPx와 HBP의 수준을 분석하였으며, 이들 사이의 상관관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

표본의 수집

수정 능력을 평가하기 위하여 최소 5회 이상 2~3산자의 번식모돈에게 인공수정을 실시한 수태지 (평균 22.46회)를 선발하여 정액을 채취하였다. 산자수와 수태율 기록은 (주)다비육종으로부터 제공받았다.

PHGPx와 HBP mRNA 분석을 위한 RT-PCR

약 10^8 개의 돼지 정자에서 oligo dT resin (Oligotex Direct mRNA kit, Qiagen)을 이용하여 mRNA를 정제하였다. 돼지 정자를 600 μ l의 guanidine thiocyanate 완충용액에 현탁하고, 액체 질소를 사용하여 동결과 해빙을 반복하고, 균질기로 분쇄하였다. 분쇄용액에 1.2 ml의 ODB 완충용액 (20 mM TrisCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% SDS)을 넣고, 원심분리하여 상등액을 다른 용기에 옮겼다. Oligotex 현탁액 70 μ l를 첨가하고, 실온에서 10분간 방치 후에 원심분리 하였다. 상등액은 버리고, pellet를 guanidine thiocyanate 완충 용액과 ODB 완충 용액으로 순차적으로 세척하고, spin column에 충전하였다. OW 완충 용액(10 mM TrisCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)으로 세척하고, mRNA를 5 mM TrisCl (pH 7.5)로 추출하였다.

반정량적인 RT-PCR은 0.5 μ g의 mRNA, 10 pmol primer를 사용하여 Qiagen One Step RT-PCR kit를 이용하

여 수행하였다. PCR primer는 NCBI Genebank database의 염기 서열을 기초로 하여 제작하였다. 돼지 PHGPx (accession number X76009)의 forward primer의 염기 서열은 5-ATTTGGATCCTTCAGCAAGATCTGTGTGAA-3이고, reverse primer의 염기 서열은 5-TTTTTTTTTTTTTTTAAGCTTGCACGGCAGGTCCTTCTC-3이다. 돼지 HBP (p31 형태, accession number NM213950)의 forward 염기 서열은 5-ACGCGGATCCATGGCGAAGTCCAAGAA-CCAC-3이고, reverse priemr 염기 서열은 5-TTTTTTTT-TTAAGCTTCTATTGTGGAGCTTTTGTGGG-3이다. 반응액은 50°C에서 30분간 cDNA를 합성한 후, HotStar Taq DNA 중합효소를 이용하여 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 증폭과정을 20~40 회 반복하여 수행하였다. 20회, 30회 40회 각 주기에서 일정량의 증폭 반응액을 수집하여, 1.2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하고 ImageMaster VDS로 촬영하였다. 각 시료에서 증폭된 DNA 밴드들의 정량적인 분석은 내부 대조군으로 β -actin 유전자의 증폭된 정도를 기준으로 하여 실시하였다. 증폭된 DNA의 양은 PCR 밴드의 강도를 Total Lab software (Nonlinear Dynamics Ltd)를 사용하여 정량화하여 비교 분석하였다. 각 실험은 3번 반복 실시하여 평균값으로 표시하였다.

통계 분석

통계 분석은 통계 분석 프로그램 (SPSS Version 12.0)을 이용하여 ANOVA와 Pearson 상관계수를 분석하였다.

결 과

평균 산자수를 8두 미만, 8두 이상 10두 미만 그리고 10두 이상 세 개의 군으로 나누어 그에 따른 수태율과 PHGPx mRNA 그리고 HBP mRNA 발현 수준을 측정하였다. Table 1에서 보는 결과와 같이 수태율, PHGPx 그리고 HBP 모두 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 그러나 PHGPx mRNA 발현 수준에 있어 산자수 10두 이상의 (2,414.7 \pm 400.7)에서 다른 군 (1,825.8 \pm 311.2과

Table 1. Results of farrowing rate, PHGPx mRNA and HBP mRNA expression level followed by the litter size

| Litter size | Farrowing rate (%) | PHGPx | HBP |
|-------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Low (n=7) | 97.4 \pm 2.6 | 1,825.8 \pm 311.2 | 2,155.4 \pm 378.0 |
| Mid (n=10) | 97.4 \pm 1.8 | 1,872.6 \pm 345.0 | 1,476.1 \pm 359.2 |
| High (n=8) | 92.6 \pm 4.8 | 2,414.7 \pm 400.7 | 2,255.9 \pm 360.8 |

Data are expressed as mean \pm SE.

Low: litter size <8.

Mid: 8 \leq litter size <10.

High: litter size \geq 10.

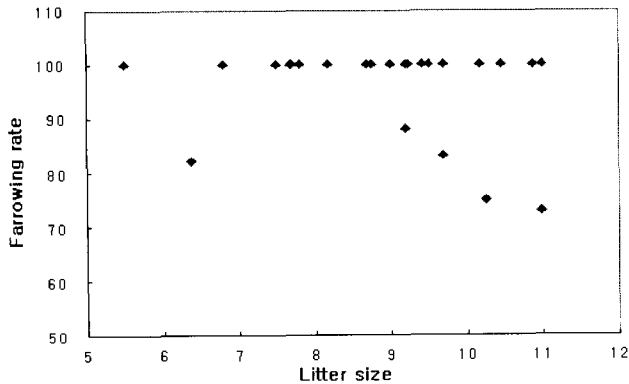


Fig. 1. Correlation between farrowing rate and litter size. Pearson's correlation coefficient = -0.174.

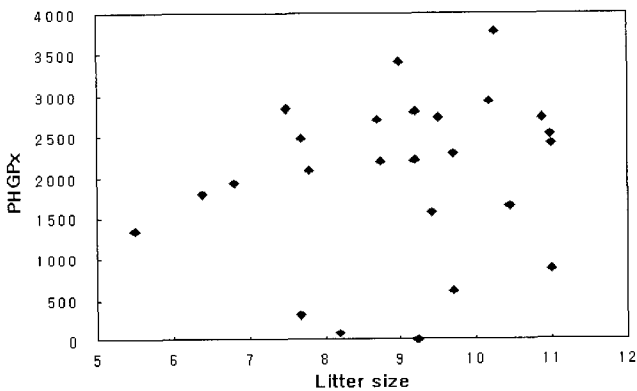


Fig. 2. Correlation between PHGPx mRNA expression level and litter size. Pearson's correlation coefficient = 0.206.

1,872.6±345.0)보다 발현량이 높게 나타났다.

산자수와 수태율과의 관련성을 보기 위한 상관관계를 나타낸 결과는 Fig. 1과 같다. 산자수와 수태율과의 상관관계에 있어 Pearson 상관계수는 -0.174였으며, 유의한 상관관계는 나타나지 않았다.

Fig. 2는 산자수와 PHGPx mRNA 발현 수준과의 상관관계를 나타낸 그래프이다. 산자수와 PHGPx mRNA 발현 수준 사이의 상관관계에 있어 Pearson 상관계수는 0.206이었으며, 산자수가 높아짐에 따라 PHGPx mRNA 발현 수준이 높아지는 경향을 보였으나, 유의한 상관관계는 입증되지 않았다.

Fig. 3은 산자수와 HBP mRNA 발현 수준과의 상관관계를 나타낸 그래프이다. 산자수와 HBP mRNA 발현 수준 사이의 상관관계에 있어 Pearson 상관계수는 -0.005이었으며, 산자수와 HBP mRNA 발현 수준 사이에 유의한 상관관계는 나타나지 않았다.

고 찰

PHGPx mRNA의 수준

인간의 정자를 reactive oxygen species (ROS)에 노출시키면 지질, 핵산 그리고 sulfhydryl protein의 산화가

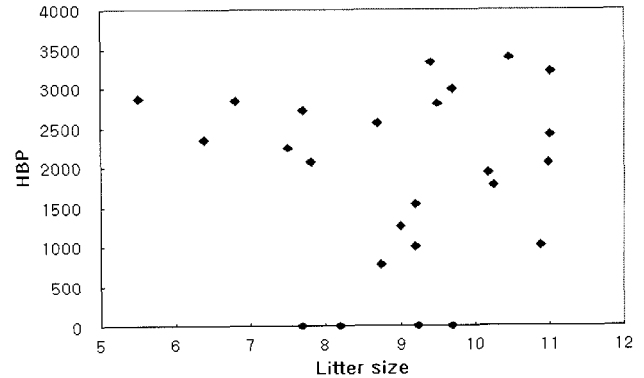


Fig. 3. Correlation between HBP mRNA expression level and litter size. Pearson's correlation coefficient = -0.005.

발생하고 이로 인하여 정자는 정상적인 기능을 잃게 된다 (Aitken 등, 1995; Griveau 등, 1995; Mammoto 등, 1996; Aitken 등, 1998; Twigg 등, 1998). 또한, Aziz 등 (2004)은 ROS 생산이 정자의 정상적 형태 그리고 침체와 정의 상관관계가 있음을 보고한 바 있다. 정자가 투명대가 존재하는 난자를 침투하는데 있어 침투율이 감소하는 것은 발생된 ROS가 정자의 조숙한 수정능 획득이나 침체 반응을 야기하는 화학적 변화로 설명될 수 있을 것이나, 이를 조절하는 근원적인 기작은 아직 분명하지 않다. 그러나 이것은 수정능 획득 과정을 개시하고 진행시키는데 있어 ROS가 필수적이라는 것을 시사한다. 간단히 수정능 획득은 일련의 생리학적 산화 과정으로 정의할 수 있다 (O'Flaherty 등, 1999). Hsu 등 (1999)은 흰쥐 정소상체 정자를 hydrogen peroxide로 처리할 경우 조숙한 침체반응 (premature acrosome reaction)을 겪게 되므로 난자 침투 능력이 감소됨을 보고하였다. 즉, 정자에 있어 과도한 활성 산소는 오히려 산화를 촉진시켜 정자의 수정능 획득을 저해하는 큰 요인 중의 하나가 된다.

PHGPx는 활성 산소에 노출된 생체막을 보호하는 역할을 하는 중요한 selenoprotein이다 (Ursini 등, 1982). PHGPx의 역할은 정자 미부의 형태학적인 변화와 관련된 구조적 단백질과 같은 역할을 하며 (Wu 등, 1979), 인간의 정자에서 PHGPx 발현량의 감소 현상은 정상 남성보다 정자회소무력증 (oligoasthenozoospermia)을 지닌 불임 남성에서 흔히 관찰됨을 보고한 바 있다 (Imai 등, 2001). Foresta 등 (2002)은 정자의 운동성의 감소는 PHGPx 함량의 감소와 함께 급격히 일어나며, PHGPx는 정자의 구조적 형태 유지를 위해 필수 불가결한 요소이고, 정자의 운동성과 생존 능력에 모두 영향을 미친다고 보고하였다. 또한, 몇몇 연구에서 PHGPx는 수정 능력과 관련된 변수로서, PHGPx는 정자의 수정 능력을 예견할 수 있는 지표로 이용할 수 있다고 하였다 (Nayerina 등, 2004).

그러나 본 연구의 결과에서 산자수와 PHGPx 발현량의 사이에 있어서 상관관계에 있어 상관계수가 0.206으로 유의성을 나타내지는 않았으나, 산자수가 10두 이상인 그룹에서 발현량은 10두 이하인 두 그룹의 발현량보다 높은 수치를 나타내었다. 또한, 비록 유의적인 상관관계를 나타내지는 않았으나, 대부분의 경우 높은 산자수 구역에서 낮은 산자수 구역보다 PHGPx의 발현량이 높게 나타

나고 있음을 볼 수 있었다. 즉, PHGPx의 발현량이 산자수에 따라 증가하는 경향을 나타내고 있음을 볼 수 있었다. 따라서, 이와 같은 결과는 PHGPx가 정자를 활성 산소로부터 보호하여 수정 능력을 보존하는데 간접적인 도움을 주는 것으로 사료된다.

Heparin Binding Protein mRNA의 수준

정장에는 HBP, clusterins, heat shock proteins, acrosin 등과 같은 수정능과 관련된 분자생물학적인 marker들이 많이 포함되어 있으며, 정장내 단백질은 정자의 사출시 정자 표면에 부착하며, 정자의 특성을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Bellin 등, 1994).

HBP는 정장에 존재하는 단백질 그룹의 하나로, 정자 사출시 정자 막의 표면에 부착되지만 정소상체 정자의 막 표면에 극히 적은 양이 존재하며 (Miller 등, 1990), HBP는 정소상체 정자의 수정능 획득과 투명대 결합 능력을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Arangasamy 등, 2005). Manjunath과 Sairam (1987)은 정낭선에서 분비되는 정장의 주요한 세가지 산성 단백질의 집합물로 BSP 단백질을 보고한 바 있으며, Chandonnet 등 (1990)은 이것을 정장 HBP라고 밝혔다.

BSP 단백질의 정자 막에의 결합은 heparin의 binding site의 수를 증가시켜 주며, BSP protein은 cholesterol 유출을 도와 정자의 수정능 획득을 촉진시키고 난관 안에서 heparin-like glycosaminoglycans 또는 고농도의 lipoproteins과의 상호작용에 영향을 끼친다고 보고한 바 있다 (Therein 등, 1999; Floman과 First, 1988; Visconti 등, 1998). Bellin 등 (1994)은 기전은 정확하지 않으나, 정자 막에 부착된 HBP와 정장 내의 HBP가 정자의 수정 능력과 관련이 있으며, 정자막에 존재하는 HBP와 정자의 수정능 획득, 침체 반응 그리고 뒤이어 일어나는 난자와의 수정 능력에 영향을 주고 있다고 보고하였다.

그러나, 본 연구에서는 산자수의 높고 낮음에 대하여 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 평균 산자수가 10두 이상인 그룹에 있어서 HBP의 수준이 다른 그룹에 비하여 약간 높은 수치를 나타내었고 산자수와 상관계수에 있어서 유의한 상관관계는 보이지 않았다. 이러한 결과는 HBP는 수정 능력에 영향을 줄 수 있는 하나의 부생식선 단백질이지만 HBP mRNA 수준만으로 복잡한 정자의 수정 능력을 대변하기에는 미흡한 면이 있다.

인용문헌

- Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HWG, Irvine DS (1995): Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod* 10:2061-2071.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS (1998): Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59:1037-1046.
- Arangasamy A, Singh LP, Ahmed N, Ansari MR, Ram GC (2005): Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 90:243-254.
- Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2004): Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 81:349-354.
- Bellin ME, Hawkins HE, Ax RL (1994): Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J Anim Sci* 72:2441-2448.
- Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Blocker H, Gross G, Kiess M, Kloppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Ursini F, Wingender E, Flohe L (1994): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: genomic DNA, cDNA, and reduced amino acid sequence. *J Biol Chem* 269:7342-7348.
- Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P (1990): Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 26:313-318.
- Florman HM, First NL (1988): Regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev Biol* 128: 464-473.
- Foresta C, Flohe L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M (2002): Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod* 67:967-971.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Lelannou D (1995): Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 103:17-26.
- Hsu PC, Hsu CC, Guo YL (1999): Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zona pellucida. *Toxicology* 139:93-101.
- Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y (1998): Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 273:1990-1997.
- Imai H, Suzuki K, Ishizaka K (2001): Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol Reprod* 64:674-683.
- Mammoto A, Masumoto N, Tahara M, Ikebuchi Y, Ohmichi M, Tasaka K, Miyake A (1996): Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol Reprod* 55:1063-1068.
- Manjunath P, Sairam MR (1987): Purification and

- biochemical characterization of major acidic proteins (BSP-A1 BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *J Biochem* 241:685-692.
16. Miller DJ, Winer MA, Ax RL (1990): Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 42:899-915.
 17. Nam SY, Nakamuta N, Kurohmaru M, Hayashi Y (1997): Cloning and sequencing of the mouse c-DNA encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene* 198:245-249.
 18. Nam SY, Fujisawa M, Kim JS, Kurohmar M, Hayashi Y (1998): Expression pattern of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in mouse testis. *Biol Reprod* 58: 1272-1276.
 19. Nayernia K, Diaconu M, Aumuller G, Wennemuth G, Schwandt I, Kleene K, Kuehn H, Engel W (2004): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: expression pattern during testicular development in mouse and evolutionary conservation in spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 67:458-464.
 20. O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT (1999): Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 52:289-301.
 21. Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F (1992): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis; gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Bio Chem* 267:6142-6146.
 22. Therein I, Moreau R, Manjunath P (1999): Bovine seminal plasma phospholipid binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 61:590-598.
 23. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ (1998): Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 13:1429-1436.
 24. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C (1982): Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta* 710:197-211.
 25. Visconti PE, Kopf GS (1998): Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:1-6.
 26. Wu AS, Oldfield JE, Shull LR, Cheeke PR (1979): Specific effect of selenium deficiency on rat sperm. *Biol Reprod* 20:793-798.
- (접수일자: 2007. 4. 30 / 채택일자: 2007. 6. 1)