

돼지 난자의 체내 및 체외 성숙시 Transducin-like Enhancer Protein 1(TLE-1) mRNA의 발현

장예진¹ · 김동우¹ · 이용승¹ · 정희태² · 양부근¹ · 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의과대학

TLE-1 mRNA Expression during *In Vivo* and *In Vitro* Maturation in Porcine Oocytes

Ye-Jin Jang¹, Dong-Woo Kim¹, Yong-Seung Lee¹, Hee-Tae Cheong²,
Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{1,*}

¹College of Animal Sciences and ²College Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

Transducin-like enhancer protein 1(TLE-1) is protein associated with cell proliferation. This study analyzed change of TLE-1 mRNA expression during *in vivo* and *in vitro* maturation in porcine oocytes. Oocytes and granulosa cells were collected from follicles of <2 mm, 2~6 mm and >6 mm in diameter in slaughtered pig's ovaries. Oocytes collected from follicles of 2~6 mm in diameter were used after *in vitro* maturation for 0, 10, 20 and 44 h. Cumulus cells and granulosa cells were collected after treatment with hyaluronidase. In results, TLE-1 mRNA expression in oocytes collected from follicle >6 mm in diameter is increased, TLE-1 RNA expression in cumulus cells and granulosa cells from follicles <2 mm, 2 mm 6 mm and >6 mm in diameter. However, there is no significant difference. On the other hand, TLE-1 mRNA expression from oocytes cultured for 10 h and 44 h is increased, TLE-1 mRNA in cumulus cells cultured for 10 h is significant increased($p<0.05$) than other culture periods. In conclusion, these results show that TLE-1 is expressed in all cell types of oocytes, cumulus cells and granulosa cells, and associated with oocyte maturation.

(Key words : *In vivo* / *In vitro* oocyte maturation, Granulosa cells, TLE-1 mRNA, Pig)

서 론

포유동물의 난소내 난포형성 과정동안 난자와 체세포 사이의 상호작용은 난자의 성숙을 위해 필수적이다. 특히 난포 내 과립막 세포는 배란 전후의 난포 형성 조절과 과립막 세포의 확산 조절, 유전자 발현의 조절 및 스테로이드 합성에 관여한다(Matzuk 등, 2002; Wang과 Roy, 2004). 이전의 많은 연구에서 난자는 난포 발달에 있어 다양한 측면으로 영향을 미치는 것으로 알려졌다(Vanderhyden, 1996; Erickson과 Shimasaki, 2001; Eppig 등, 2002; Matzuk 등, 2002). 또한, 과립막세포는 난자와 상호지향적인 정보 교환을 하고, 이는 난자와 난포의 기능과 발달을 위해 필수적이다(Eppig 등, 1997). 난자 특이적 성장인자인 GDF-9(Growth differentiation factor-9)는 쥐(Dong 등, 1996)와 랫트(Jaatinen 등, 1999), 사람(Aaltonen 등, 1999)과 영장류(Duffy, 2003)의 난자에서 선택적인 발현을 하는 것

으로 보고되었고, GDF-9의 역할은 초기 난포에서부터 2차 난포까지의 난자 형성 동안 과립막세포의 확장을 조절하고, 난포막세포를 증가시킨다(Nilsson과 Skinner, 2002). 암컷 쥐에서 GDF-9의 발현을 억제시키면 불임과 함께 난자 형성이 지연되거나 1차 난포 단계에서 중지된다(Dong 등, 1996; Juengel 등, 2004). GDF-9과 BMP-15(bone morphogenetic protein-15) 및 TGF- β 는 유사한 단백질 인자이며, 이러한 세 가지 인자들은 난소에서 유사한 발현 양상을 갖고 있다(Juengel 등, 2004). 특히 BMP-15가 체외에서 FSH-독립성 과립막세포 분화의 원인이 된다는 것이 보고되었다(Otsuka 등, 2000).

이와 같이 포유동물의 난포 생성은 난자에서 분비되는 다양한 단백질 인자들에 의해 조절되고 있다. 이러한 단백질 인자들을 분석하기 위해 선행연구에서 2DE를 이용하여 난포 크기별 과립막세포 내 단백질 인자들을 분석한 결과, Wnt signal에 관여하며, 염증유발인자의 발현을 억제하는 것으로 알려진 TLE-1(Chen 등, 2000; Buscarlet

* 본 연구는 2010년 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2010-0021580)

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8627 E-mail: Parkck@kangwon.ac.kr

와 Stitani, 2007; Parkhurst, 1998; Fisher와 Caudy, 1998) 이 대난포의 과립막세포에서 발견되었다(채인순 등, 2009). 그러나, 아직까지 과립막세포내 TLE-1이 난포 발달과 난자 성숙에 관한 상관 관계는 완전히 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구는 돼지의 난포 성장 과정에서 난포 내 난자와 과립막세포 내 TLE-1의 mRNA 발현 변화를 규명하고, 난자 성숙에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

난포난자의 회수

도축 직후의 돼지에서 난소를 회수하여 37°C의 생리식염수에 침적하여 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난자와 난포액은 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 2 mm 미만, 2~6 mm 및 6 mm를 초과하는 난포로부터 각각 흡입하여 회수하였다.

과립막세포의 회수

회수한 난포액은 70 µm filter를 이용하여 난자를 제거하고, 10분간 800×g로 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 그 후 NH₄-Trisbuffer[Tris(T1503, Sigma), NH₄Cl, DDW, pH 7.6] 10 ml를 첨가하여 pipetting 후 5분간 800×g로 원심분리하여 상층액을 제거하는 방법을 3~4회 반복함으로써 혈구세포를 파괴, 제거시켰다. 그 후 과립막세포만 남은 것을 PBS로 2~3회 세척하여, 상층액을 회수한 후 -80°C 이하에 보관하여 이용하였다.

실험계획

실험 1

*In vivo*에서 TLE-1 mRNA 발현을 확인하고자 난포 크기별(2 mm 미만, 2~6 mm 및 6 mm 초과)에 따라 난자를 수집하였다. 각 처리구 당 20개씩 수집한 난자-난구세포 복합체에 hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 회수하였고, 1.5 ml 마이크로 튜브에서 각각 보관하였다.

실험 2

*In vitro*에서 TLE-1 mRNA 발현을 확인하고자 난포 크기 2~6 mm로부터 회수한 미성숙 난자를 각 처리구 당 20개씩 회수하여 TCM-199 배양액에서 0, 10, 22 및 44시간동안 38.5°C, 5% CO₂ 농도 하에서 배양하였고, 난구세포는 hyaluronidase를 처리하여 1.5 ml 마이크로 튜브에 샘플을 각각 수집하였다.

RT-PCR

RNA 추출은 AccPrep Viral RNA Extraction kit를 사용하여 제공된 protocol에 따라 column 방식으로 추출하였고, 추출된 RNA는 Accpower™ RT/PCR Premix kit와 TLE-1 reverse primer를 사용하여 cDNA를 합성하였으며, 사용된 Primer 조건은 Table 1과 같이 제작하여 사용하였다. RT 과정은 42°C에서 60min, 94°C 5 min간 실행하였다. 합성된 cDNA는 Table 2와 같은 PCR 과정을 통하

Table 1. Sequence of primer

Primer	Sequence	Product size
TLE-1	F 5'-CAAGCCCAGCATCTTTCTCA-3'	183 bp
	R 5'-CTCTGCATCGTGGTGCTTCT-3'	
GAPDH	F 5'-CCATCACTATCTTCCAGGAGCGTGAC-3'	285 bp
	R 5'-AAGTTGTCATGGATGACCTTGGCCA-3'	

Table 2. Condition of PCR

	Denature temperature	Anneal temperature	Extend temperature	Cycle
TLE-1	94°C	55°C	72°C	25
GAPDH	95°C	62°C	72°C	30

여 증폭시켰으며, 대조구로 GAPDH를 사용하였다. 증폭된 RT-PCR 산물은 2% agarose gel을 사용하여 60 V에서 60분간 전기영동 후 UV lamp상에서 확인하였다.

통계 처리

Multi gauge program(Fuji Photo Film Co., Ltd)을 사용하여 mRNA의 intensity를 측정하였고, SAS(version 9.1)에서 던칸 다중 검증 방식으로 신뢰 범위 95% 내로 유의적인 차이를 분석하였다.

결 과

Fig. 1은 *In vivo* 상태에서 실험한 결과로 난포 크기별 난자의 TLE-1 mRNA 발현량과 intensity값을 나타냈다. TLE-1의 mRNA 발현량을 확인한 결과, 직경 2 mm 미만과 2~6 mm의 난포 내 난자의 intensity값은 0.09±0.19과 0.06±0.02로 발현량이 매우 낮았으며, 직경 6 mm 초과하는 난포로부터 회수한 난자는 0.96±0.04로 유의적으로 높은 결과를 나타냈다($p < 0.05$). 난포 크기별 난자의 난구세포에서 발현되는 TLE-1 mRNA량은 모든 크기의 난포 내 난구세포에서 TLE-1 mRNA가 발현되는 것을 확인하였고, 난포 직경 2 mm 미만(0.18±0.08)과 6 mm 초과의 난포로부터 회수한 난자의 난구세포(0.25±0.05)보다 난포 직경 2~6 mm로부터 회수한 난자의 난구세포(0.26±0.03)에서 많이 발현되었으나, 유의차는 인정되지 않았다(Fig. 2). 또한, Fig. 3에서 난포 크기별 난자의 과립막세포에서 발현되는 TLE-1 mRNA량으로 모든 크기의 난포 내 과립막세포에서 TLE-1 mRNA가 발현되는 것을 확인하였으며, 난포 직경 2~6 mm로부터 회수한 난자의 과립막세포(0.65±0.06)에서 가장 많은 발현량을 나타냈고, 2 mm 미만의 난포 내 난자의 과립막세포(0.47±0.14)에서 가장 적은 발현량을 보였으나, 유의차는 인정되지 않았다.

In vitro 상태의 실험에서 Fig. 4는 미성숙난자를 체외 성숙 시 측정된 TLE-1 mRNA 발현량으로 체외성숙 배양

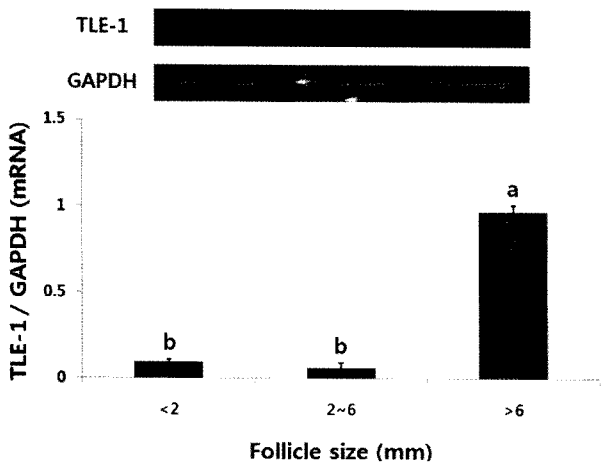


Fig. 1. Expression of TLE-1 mRNA in porcine oocytes from different follicle ($p<0.05$).

0시간(0.16 ± 0.01) 및 22시간(0.07 ± 0.03)보다 10시간(0.87 ± 0.03)과 44시간(0.94 ± 0.2)에서 유의적으로 높은 발현량을 나타냈다($p<0.05$). 그러나 성숙 0시간과 22시간 또는 10시간과 44시간 동안 배양한 난자 사이에서 유의차는 인정되지 않았다. Fig. 5는 난자 내 난구세포의 배양시간에 따른 TLE-1 mRNA 발현량을 나타낸 것으로, 체외성숙 배양 10시간 이후부터 증가하였으며, 0시간 배양시에 비해 유의적으로 높은 발현량을 나타냈다($p<0.05$).

고찰

본 연구는 돼지에서 난포직경에 따라 난자, 난구 및 과립막세포 내 TLE-1 mRNA 발현과 난자의 체외성숙 시 난자와 난구세포에서 TLE-1 mRNA의 발현을 측정하였다. 그 결과, TLE-1 mRNA는 난자, 난구 및 과립막세포 모두 발현되는 것을 확인하였고, 난포직경 6 mm 초과

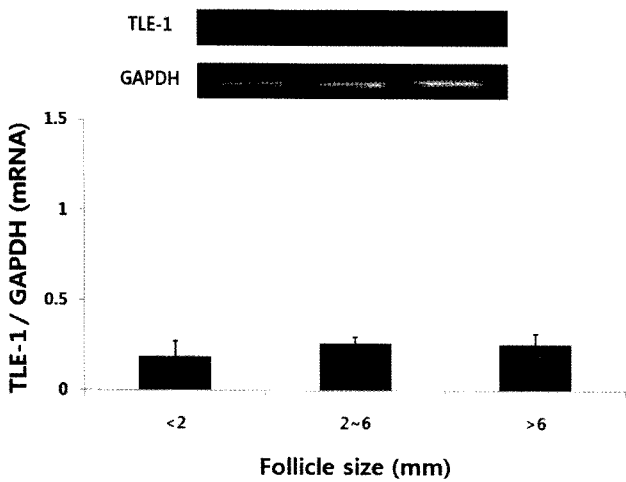


Fig. 2. Expression of TLE-1 mRNA in cumulus cells of porcine oocytes from different follicle size ($p<0.05$).

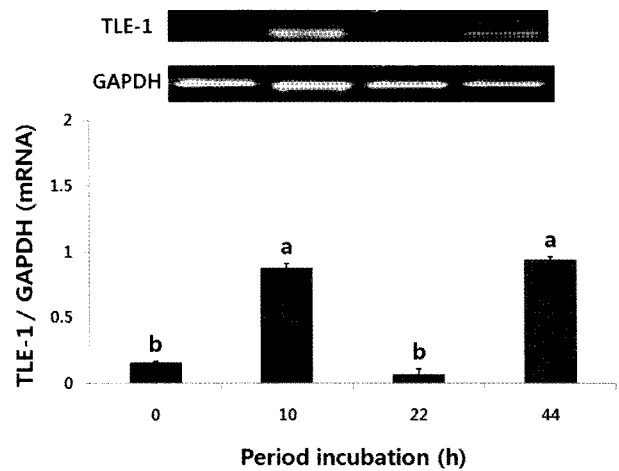


Fig. 4. Expression of TLE-1 mRNA during *in vitro* maturation of porcine oocytes ($p<0.05$).

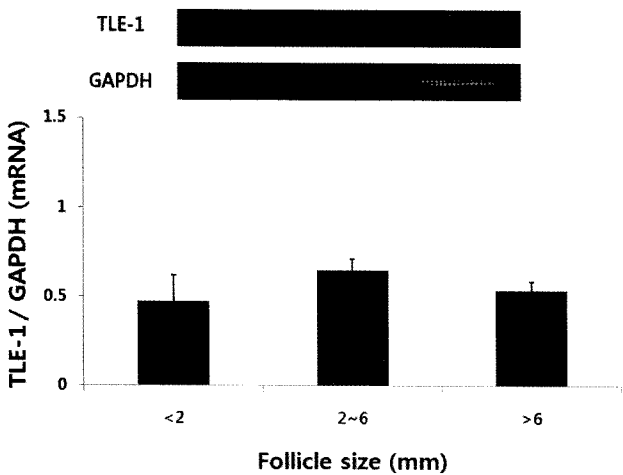


Fig. 3. Expression of TLE-1 mRNA in porcine granulosa cells from different follicle size ($p<0.05$).

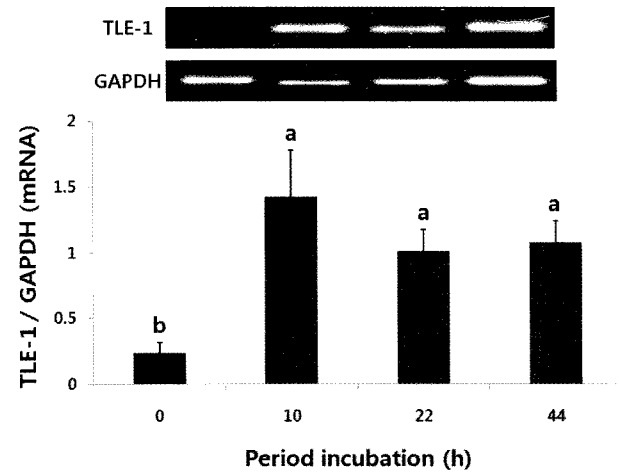


Fig. 5. Expression of TLE-1 mRNA during *in vitro* maturation of porcine cumulus cells ($p<0.05$).

난소 내 난자에서 유의적으로 높은 발현을 확인할 수 있었다. 이 시기는 난자의 감수분열을 통한 난자 성숙이 이루어지는 시기로 TLE-1 mRNA 발현량이 증가하는 것으로 보아 TLE-1이 난자 성숙과 관련이 있을 것이라 추측된다. 또한, 난자의 감수분열을 유도하기 위해 체외성숙을 시킨 결과, 난자는 10시간과 44시간 배양 시 유의적으로 높은 TLE-1 mRNA의 발현을 확인할 수 있었고, 난구세포 또한, 10시간 배양 이후 TLE-1의 발현이 유의적으로 증가됨을 볼 수 있었다. 이와 같은 결과는 난자 성숙이 시작되는 시기에 TLE-1의 발현이 증가됨을 볼 수 있었고, 이러한 TLE-1은 Wnt signal에 관여하는 단백질로, Wnt signal은 배아의 발생과 성체의 형태 발달, 몸의 형태화, 축 형성, 세포의 이동 및 증식에 관여하는 것으로 보고되었고(Chen 등, 2000; Buscarlet와 Stitani, 2007; Parkhurst, 1998; Fisher와 Caudy, 1998), 세포증식에 관여하는 TLE-1이 난자 성숙과 난구세포 성숙 간에 영향을 미치는 것으로 추측되었다.

GDF-9은 세포성장에 관여하는 인자로 쥐(Dong 등, 1996)와 랫트(Jaatinen 등, 1999), 사람(Aaltonen 등, 1999)과 영장류(Duffy, 2003)의 난자에서 선택적인 발현을 하는 것으로 보고되었다. GDF-9의 역할은 초기 난포에서부터 2차 난포까지의 난자 형성 동안 과립막세포의 확장을 조절하고, 난포막세포를 증가시킨다(Nilsson과 Skinner, 2002). 암컷 쥐에서 GDF-9의 발현을 억제시키면 불임과 함께 난자 형성이 지연되거나 1차 난포 단계에서 중지된다(Dong 등, 1996; Juengel 등, 2004). 이러한 결과로 볼 때 TLE-1은 난자의 성숙과 난구세포의 증식에 연관이 있을 것으로 추측된다. 이와 같은 연구 결과를 종합하면, 본 연구에서 난자의 체외배양 22시간에서 TLE-1 mRNA가 감소하는 결과는 난자의 성숙시기 중 특정시기에 TLE-1이 발현된다는 것을 볼 수 있었는데, 앞으로 난자의 핵형 분석과 면역 염색을 통해 난소 내 TLE-1의 발현 분포를 분석할 필요가 있다.

선행연구에서 돼지 난포 발달 시 과립막세포에서 발현되는 단백질 변화를 분석하였다. 그 결과, 난포 직경이 6 mm 초과인 난소 내 과립막세포에서 TLE-1이 발현되는 것을 볼 수 있었다. TLE-1은 세포증식과 연관이 있는 단백질로 난자 성숙과 연관이 있음을 확인하기 위해 본 연구에서는 돼지 난자의 체내, 체외 성숙 동안 TLE-1 mRNA 발현의 변화를 분석하였다. 그 결과, 체내성숙 난자는 난포 직경 6 mm 초과인 난소 내 난자에서 TLE-1 mRNA가, 유의적으로 높게 발현됐으며, 난구세포와 과립막세포에서는 모든 크기의 난포에서 TLE-1 mRNA가 발현했지만, 유의적인 차이는 나지 않았다($p < 0.05$). 체외 성숙 10시간과 44시간 배양했을 때 난자가 유의적으로 높은 결과를 보였으며, 난구세포는 체외 성숙 10시간 배양 이후 유의적으로 높은 결과를 보였으며($p < 0.05$), 이와 같은 결과는 TLE-1이 난자 성숙과 연관이 있음을 보여준다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 TLE-1 mRNA 분석에 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

인용문헌

1. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O (1999): Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2744-2750.
2. Buscarlet M, Stifani S (2007): The 'Marx' of Groucho on development and disease. *Trends Cell Biol* 17:353-361.
3. Chen G, Courey AJ (2000): Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene* 249:1-16.
4. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM (1996): Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531-535.
5. Duffy DM (2003): Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle throughout the periovulatory interval. *Biol Reprod* 69:725-732.
6. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL, Hirao Y (1997): Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger rionucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod* 56: 976-984.
7. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL (2002): The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Science* 99(5):2890-2894.
8. Erickson CF, Shimasaki S (2001): The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* 76(5):943-949.
9. Fisher AL, Caudy M (1998): Groucho proteins: transcriptional co-repressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev* 12:1931-1940.
10. Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E, Ritvos O (1999): Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol Cell Endocrinol* 156:189-193.
11. Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR, McNatty KP (2004): Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim Reprod Sci* 82-83:447-460.
12. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ (2002): Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296:2178-2180.
13. Nilsson EE, Skinner MK (2002): Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod* 67:1018-1024.

14. Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S (2000): Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275(50):39523-39528.
15. Parkhurst SM (1998): Groucho: making its Marx as a transcriptional co-repressor. *Trends Genet* 14:130-132.
16. Vanderhyden BC (1996): Oocyte-secreted factors regulate granulosa cell steroidogenesis. *Zygote* 4(4):317-321.
17. Wang J, Roy SK (2004): Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: Modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 70:577-585.
18. 채인순, 장동민, 정희태, 양부근, 박춘근 (2009): 돼지 난포 발달 시 과립막 세포에서 발현되는 단백질의 변화. *한국동물번식학회* 33(3):183-187.
(접수일자: 2011. 2. 26 / 채택일자: 2011. 3. 3)