

항산화제가 Bromopropane에 의해 손상된 돼지 과립막세포의 생존을, 원형질막 온전성 및 apoptosis에 미치는 영향

이승형¹, 박희우¹, 이상희¹, 정희태², 박춘근¹, 양부근^{1,†}

¹강원대학교 동물생명과학대학 ²강원대학교 수의과대학

Effects of antioxidants on viability, plasma membrane integrity and apoptosis in porcine ovarian granulosa cells damaged by bromopropane

Seunghyung Lee¹, Hee-Woo Park¹, Sang-Hee Lee¹, Hee-Tae Cheong²,
Choon-Keun Park¹ and Boo-Keun Yang^{1,†}

¹College of Animal Life Sciences and ²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea.

ABSTRACT

The purpose of this study was to examine the effects of taurine and vitamin E on ovarian granulosa cells damaged by bromopropane (BP) in pigs. We evaluated cell viability, plasma membrane integrity (PMI) and apoptotic morphological change in porcine ovarian granulosa cells. The cells were treated with 1-BP (0, 5.0, 10, and 50 μ M), 2-BP (0, 5.0, 10, and 50 mM), taurine (0, 5.0, 10, and 25 mM), and vitamin E (0, 100, 200, and 400 μ M) for 24 h. 10 μ M 1-BP and 50 μ M 2-BP inhibited viability and PMI, and induced apoptosis in porcine ovarian granulosa cells ($p < 0.05$). Cell viability and PMI were increased by taurine (10 and 25 mM) and vitamin E (100 and 200 μ M), and apoptosis decreased ($p < 0.05$). Finally, the porcine ovarian granulosa cells were co-treated with BPs (10 μ M), taurine (10 mM) and/or vitamin E (200 μ M). Cell viability and PMI in the co-treated cells were increased, and apoptosis was decreased. In conclusion, taurine and vitamin E can improve cell viability and inhibition of apoptosis in porcine ovarian granulosa cells damaged by bromopropane.

(Key word: bromopropane, taurine, vitamin E, viability, ovarian granulosa cell, porcine)

서 론

Bromopropane(BP)는 두개의 이성체인 1-bromopropane (n-propyl bromide, 1-BP) 및 2-bromopropane(isopropyl bromide, 2-BP)이 존재하며, 높은 휘발성과 낮은 가연성의 특징을 가진 물질이다(Ichihara, 2005). BP는 포유동물의 면역, 번식 및 신경계의 장애를 일으키며 최근에는 1-BP와 2-BP가 인간과 rat의 신경계에 독성을 미친다고 보고(Ichihara 등, 2002; Honma 등, 2003; Raymond 등, 2007; Mohideen 등, 2011)하였으며, 세포의 체외배양시 활성산소를 증가시킨다고 보고되었다(Wu 등, 2002; Subramanian 등, 2012). 이 중 1-BP은 대식세포 활성화와 관련된 신호전달 체계를 조절하며 쥐의 난소 장애를 일으킨다고 보고되었다(Yamada 등, 2003; Han 등, 2008). 또한 2-BP는 설치류의 발육을 감소시키며 난소의 기능 장애를 일

으켜 번식 효율을 감소(Kamijima 등, 1997; Nakajima 등, 1997)시키고, 정원세포와 원시난포 및 미성숙 난자에도 유해한 악영향을 미친다고 보고되었다(Omura 등, 1999; Yu 등, 1999).

활성산소는 세포내 산화스트레스를 유도하여 세포의 apoptosis의 pathway를 조절하여 세포를 사멸을 촉진시키는 물질로 알려져 있다. 대표적 산화물로 알려진 superoxide, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radicals의 과도한 생성은 세포의 손상, 질병의 증가, 면역 시스템의 저하, 심혈관 질환, 노화의 촉진 및 apoptosis를 유발한다고 알려져 있다(Simon 등, 2000). 과립막세포는 난포 내 존재하며, 뇌하수체에서 분비하는 FSH의 자극에 의해 estrogen을 분비하며 난포의 성장 난자의 성숙 및 배란에 영향을 미친다(Zhu 등, 2012). 적절한 수준의 활성산소는 과립막세포의 기능을 조절하여 난포의 성장

† Correspondence: Boo-Keun Yang
Tel: +82-33-250-8623
E-mail: bkyang@kangwon.ac.kr

과 난자의 성숙에 도움을 주지만 과도할 경우 과립막세포의 생존율을 감소시키거나 apoptosis를 유발한다고 보고되어 있다(Zhu 등, 2012). 따라서 세포의 체외 배양 시 발생한 활성산소의 유해한 영향을 제거 또는 경감시키는 항산화제를 이용하여 과립막세포의 생존 기전 및 apoptosis를 억제하는 결과가 보고되었다(Tilly 등, 1995).

Taurine과 vitamin E는 항산화제로 알려진 대표적인 물질로써, taurine은 세포의 원형질막 안정성 및 심혈관 기능을 개선(Higuchi 등, 2012)하며, vitamin E는 체내에서 지용성으로 흡수되고 세포 원형질막의 활성산소를 생산을 억제할 수 있는 물질로 알려져 있다(Herrera 등, 2001). 따라서 본 연구에서는 과립막세포에 1-BP, 2-BP, taurine 및 vitamin E를 처리하여 세포의 생존능력을 평가한 후, 1-BP 및 2-BP에 의해 손상된 과립막세포에 항산화제인 taurine 및 vitamin E를 첨가하여 세포의 생존율, 원형질막 손상 정도 및 apoptosis의 진행 여부를 평가하였다.

재료 및 방법

실험동물은 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인(No: KIACUC-09-0139)받은 윤리적이고 과학적인 절차에 따라서 수행하였으며, 본 실험에 사용된 시약은 특별히 언급하지 않는 한 Sigma-Aldrich의 시약을 사용하였다

1. 돼지 과립막세포의 채취 및 1-BP, 2-BP, taurine 및 vitamin E 처리

돼지 난소는 6개월령의 도축된 돼지에서 채취하여 37°C의 생리식염수 용액에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반 한 후 실험에 이용하였다. 실험실로 운반 된 난소는 37°C로 예열 시킨 PBS용액 및 70% ethanol로 2회 세척한 후 직경이 5 mm 이상인 난포에서 26-gauge 주사바늘을 이용하여 난포액을 흡입한 후 PBS-PVA(polyvinyl alcohol) 용액과 혼합한 후 420×g에서 5분간 원심 분리하여 과립막세포를 분리하였다 이 후 적혈구를 제거하기 위하여 0.9% ammonium chloride를 분주한 뒤 420×g으로 5분간 원심 분리하였다 상층액이 제거된 과립막세포는 10% Fetal cell serum(FCS, Collaborative Research)과 100 IU/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 함유된 DMEM용액(Gibco)으로 2회 세척 후 6.0×10^6 cells/mL의 농도로 배양접시(Falcon)에 분주 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 이 후 과립막세포는 6.0×10^6 cells/ml농도로 계대 배양 후 monolayer가 형성된 것을 확인한 뒤 실험에 이용하였다. 과립막세포에는 0, 5, 10, 50 µM 1-BP와 2-BP, 0, 5, 10, 25 mM taurine 및 0, 100, 200, 400 µM의 vitamin E를 배양

액에 첨가하여 24시간 동안 배양 후 세포의 생존능력을 검증하였다. 또한 과립막세포에 10 µM 1-BP 또는 2-BP와 함께 10 mM taurine과 200 µM vitamin E를 24시간 동안 처리하여 BP에 의해 손상된 과립막세포에서의 taurine과 vitamin E의 효능을 검증하였다.

2. 생존율

Trypan blue exclusion test를 이용하여 과립막세포의 생존율을 측정하였다. 과립막 세포는 trypsin- EDTA를 처리하여 단일 세포로 분리시킨 후 PBS로 1회 세척 후 실험에 이용하였다. 세척된 과립막세포 부유액과 동량의 0.4% Trypan blue 용액을 혼합하여 3분간 실온에서 염색을 실시한 후 도립현미경(Nikon, Japan)의 400배 배율에서 염색유무에 따라 과립막 세포의 생존율을 측정하였다. 염색 되지 않은 세포는 살아있다고 판단하였으며, 청색으로 염색 된 세포는 사멸하였다고 판단하였으며, 처리 구 당 500개 이상의 세포를 측정하여 평균값을 계산한 뒤 생존율을 측정하였다

3. 원형질막 온전성 검사

과립막세포의 원형질막 온전성 검사는 Hoechst 33342(HO)와 propidium iodide(PI)을 이용한 이중 형광염색법을 실시하여 측정하였다. 단일 세포로 분리된 과립막세포는 0.5 mg/ml PI로 5분간 염색을 실시한 후 0.5 mg/mL HO로 10분간 배양한 후 형광현미경(Zeiss, Axioskop, Germany)의 460/500 nm 파장을 이용하여 세포의 원형질막을 측정하였다. 파란색으로 염색되어 있는 세포를 원형질막이 온전한 세포로 판정하였으며, 붉은색으로 염색된 세포는 원형질막이 손상된 세포로 판정하였으며, 처리구 당 500개 이상의 세포를 측정하여 평균값을 계산한 뒤 원형질막의 온전성을 측정하였다

4. Apoptotic morphological change

과립막세포의 apoptosis의 진행 여부를 측정하기 위하여 Acridine orange(AO)와 ethidium bromide(EB) 용액을 이용한 분석방법을 실시하였다. 100 µg/mL AO와 EB가 동량의 비율로 섞인 염색액 10 µL을 250 µL의 세포 부유액에 최종농도가 2×10^6 세포/mL가 되도록 혼합시킨 후 37°C에서 10분간 염색을 실시하였다. 이 후 형광현미경(Zeiss)의 460/500 nm 파장을 이용하여 100배의 배율에서 형광 염색 상태에 따라 apoptosis의 진행 여부를 판정하였다. 세포의 apoptosis의 진행 여부는 균일하게 초록색으로 염색 된 세포를 apoptosis가 진행되지 않은 세포를 Live(L), 초록색과 밝은 초록색이 포함된 핵을 나타낸 세포를 Early Apoptosis(EA), 오렌지 색으로 염색된 세포를 Late Apoptosis(LP) 또는 necrosis 세포로 판정하였으며, 처리 구 당 500개 이상의 세포를 측정하여 평균값을 계

산한 뒤 apoptotic morphological change를 측정하였다.

5. 통계처리

본 실험의 결과는 SAS 9.4를 이용하여 General liner mode(GLM)을 적용하여 Duncan 다중검정에 의하여 유의차를 검정하였다.

결과

Bromopropane(1-BP, 2-BP)에 의한 돼지 과립막세포의 손상

1-BP 또는 2-BP의 농도 의존적에 따라 돼지 과립막세포의 생존율(viability) 및 원형질막 온전성(plasma membrane integrity, PMI)은 감소하였고, apoptosis는 증가하였다(Table 1 및 2). 특

히 10과 50 μ M의 1-BP(Table 1)와 2-BP(Table 2)는 유의적으로 생존율과 원형질막 온전성을 감소시켰으나($p < 0.05$), 5 μ M 이하의 1-BP와 2-BP에 의해 생존율과 원형질막은 감소하지 않았다. 하지만 과립막세포의 5 μ M 이상의 1-BP와 2-BP를 첨가하였을 때 apoptosis가 완료된 세포의 비율(Late apoptosis)이 유의적으로 증가된 것을 확인하였다($p < 0.05$). 따라서 본 실험에서는 과립막세포에 10 μ M의 1-BP와 2-BP를 처리하여 항산화제인 taurine과 vitamin E의 능력을 검증하였다

Taurine이 돼지 과립막세포의 생존율, 원형질막 온전성 및 apoptosis에 미치는 영향

배양 기간 동안의 Taurine이 세포의 생존율, 원형질막 온전성 및 apoptosis진행 정도에 미치는 영향을 Table 3에 나타내었다. 10과 25 mM에서는 대조구에 비하여 유의적으로 생존율

Table 1. Effects of 1-BP on viability, plasma membrane integrity (PMI) and apoptotic morphology change in porcine granulosa cells in pigs

1-BP (μ M)	Viability (%)	PMI (%)	Apoptotic morphology change (%)		
			Live	Early apoptosis	Late apoptosis
0	94.1 \pm 0.8 ^a	84.5 \pm 0.8 ^a	60.2 \pm 0.9 ^a	20.2 \pm 0.7 ^b	19.5 \pm 0.9 ^d
5	92.3 \pm 0.9 ^a	82.1 \pm 0.5 ^a	55.7 \pm 0.7 ^b	21.2 \pm 0.9 ^b	23.0 \pm 1.3 ^c
10	87.0 \pm 0.9 ^b	77.1 \pm 1.0 ^b	47.0 \pm 1.1 ^c	22.1 \pm 0.6 ^{a,b}	30.8 \pm 1.0 ^b
50	81.8 \pm 1.0 ^c	72.2 \pm 1.4 ^c	39.3 \pm 1.9 ^d	27.2 \pm 3.4 ^a	36.7 \pm 1.3 ^a

^{a-d} Different superscripts within same column are significantly differ, $p < 0.05$. Values presented here are the mean \pm S.E.M of three experiments.

Table 2. Effects of 2-BP on viability, plasma membrane integrity (PMI) and apoptotic morphology change in porcine granulosa cells in pigs

2-BP (μ M)	Viability (%)	PMI (%)	Apoptotic morphology change (%)		
			Live	Early apoptosis	Late apoptosis
0	92.8 \pm 1.2 ^a	84.5 \pm 1.6 ^a	60.6 \pm 1.4 ^a	18.2 \pm 2.1	21.1 \pm 1.2 ^c
5	90.7 \pm 0.9 ^{ab}	81.1 \pm 1.6 ^{ab}	56.5 \pm 0.9 ^b	19.4 \pm 1.2	24.0 \pm 1.2 ^c
10	88.1 \pm 1.0 ^b	77.8 \pm 1.3 ^b	47.0 \pm 1.5 ^c	21.5 \pm 1.1	31.4 \pm 1.1 ^b
50	84.7 \pm 1.3 ^c	72.7 \pm 1.7 ^c	41.3 \pm 1.2 ^d	20.2 \pm 1.0	37.7 \pm 0.7 ^a

^{a-d} Different superscripts within same column are significantly differ, $p < 0.05$. Values presented here are the mean \pm S.E.M of three experiments.

Table 3. Effects of taurine on viability, plasma membrane integrity (PMI) and apoptotic morphology change in porcine granulosa cells in pigs

Taurine (mM)	Viability (%)	PMI (%)	Apoptotic morphology change (%)		
			Live	Early apoptosis	Late apoptosis
0	79.1 \pm 1.3 ^b	73.3 \pm 1.5 ^b	63.6 \pm 1.2 ^b	19.0 \pm 1.5 ^a	17.3 \pm 0.9
5	82.3 \pm 1.2 ^{ab}	76.7 \pm 1.5 ^{ab}	68.0 \pm 1.7 ^{ab}	15.4 \pm 0.8 ^b	16.5 \pm 1.5
10	85.7 \pm 1.0 ^a	80.4 \pm 1.4 ^a	69.4 \pm 2.5 ^a	14.2 \pm 0.7 ^b	16.3 \pm 2.7
25	83.2 \pm 1.3 ^a	79.2 \pm 1.3 ^a	69.6 \pm 1.3 ^a	14.0 \pm 0.8 ^b	16.3 \pm 1.7

^{a,b} Different superscripts within same column are significantly differ, $p < 0.05$. Values presented here are the mean \pm S.E.M of three experiments.

및 원형질막 온전성이 유의적으로 증가되었으며, apoptosis가 진행되지 않은 세포(Live)가 유의적으로 증가되었다($p < 0.05$). 또한 apoptosis가 진행되는 세포의 비율(Early apoptosis)은 유의적으로 감소하였으나 apoptosis가 완료된 세포의 비율은 유의적인 차이가 나타나지 않았다

Vitamine E가 돼지 과립막세포의 생존율, 원형질막 온전성 및 apoptosis에 미치는 영향

Table 4는 Vitamin E에 의한 과립막세포의 생존율, 원형질막 온전성 및 apoptosis의 변화에 대한 결과이다. 100 및 200 μ M의 Vitamin E는 과립막세포의 생존율, 원형질막 온전성 및 apoptosis가 진행되지 않은 세포에 유의적인 영향을 미치지

않았지만, 400 μ M의 Vitamin E는 생존율, 원형질막 온전성 및 apoptosis가 진행되지 않은 세포의 비율을 유의적으로 감소시켰다($p < 0.05$).

Bromopropane에 의해 손상된 돼지 과립막세포에서 taurine과 vitamin E 효과

10 mM Taurine과 200 μ M의 Vitamin E를 10 μ M의 1-BP와 2-BP와 함께 과립막세포에 24시간동안 배양하였을 때 세포의 생존율, 원형질막 온전성 및 apoptosis에 미치는 영향을 Table 5와 Table 6에 나타내었다. 10 μ M 1-BP 처리는 과립막세포의 생존율 및 원형질막 온전성을 유의적으로 감소시켰으며, apoptosis가 완료된 세포의 비율이 유의적으로 증가하였다

Table 4. Effects of vitamin E on viability, plasma membrane integrity (PMI) and apoptotic morphology change in porcine granulosa cells in pigs

vitamin E (μ M)	Viability (%)	PMI (%)	Apoptotic morphology change (%)		
			Live	Early apoptosis	Late apoptosis
0	86.5 \pm 1.3 ^a	76.7 \pm 1.4 ^a	57.1 \pm 1.2 ^{ab}	22.3 \pm 2.4	20.5 \pm 1.6 ^{ab}
100	87.6 \pm 1.3 ^a	79.8 \pm 1.4 ^a	59.3 \pm 1.6 ^a	22.4 \pm 2.3	17.6 \pm 1.4 ^b
200	88.5 \pm 1.1 ^a	78.4 \pm 2.2 ^a	59.3 \pm 2.0 ^a	22.6 \pm 2.9	18.0 \pm 1.1 ^b
400	82.1 \pm 1.5 ^b	71.4 \pm 2.0 ^b	53.7 \pm 1.0 ^b	21.5 \pm 2.0	24.6 \pm 2.1 ^a

^{a,b} Different superscripts within same column are significantly differ, $P < 0.05$. Values presented here are the mean \pm S.E.M of three experiments.

Table 5. Effects of taurine on viability, plasma membrane integrity (PMI) and apoptotic morphology change in 1-Bromopropane-treated porcine granulosa cells in pigs

Treatment	Viability (%)	PMI (%)	Apoptotic morphology change (%)		
			Live	Early apoptosis	Late apoptosis
Control	93.2 \pm 1.0 ^a	80.5 \pm 1.5 ^a	63.6 \pm 1.6 ^a	16.2 \pm 0.7	21.2 \pm 1.7 ^b
1-BP	82.8 \pm 1.1 ^b	72.7 \pm 1.9 ^b	47.9 \pm 1.6 ^b	16.3 \pm 0.7	35.8 \pm 1.4 ^a
1-BP+T	85.7 \pm 1.3 [*]	74.7 \pm 2.0 [*]	46.7 \pm 1.5 [*]	13.4 \pm 0.6	39.8 \pm 1.1
1-BP+Vit E	88.1 \pm 1.1 [*]	78.8 \pm 0.9 [*]	58.1 \pm 0.6 [*]	17.6 \pm 0.6	24.2 \pm 0.4 [*]

1-BP, 10 μ M 1-Bromopropane; T, 10 mM Taurine; Vit E, 200 μ M Vitamin E. ^{a,b} Different superscripts shows a significant difference between Control and 1-BP treated group ($P < 0.05$), ^{*} Asterisk shows a significant difference between 1-BP- and antioxidants-treated groups ($P < 0.05$).

Table 6. Effects of vitamin E on viability, plasma membrane integrity (PMI) and apoptotic morphology change in 2-Bromopropane-treated porcine granulosa cells in pigs

Treatment	Viability (%)	PMI (%)	Apoptotic morphology change (%)		
			Live	Early apoptosis	Late apoptosis
Control	82.2 \pm 0.8 ^a	64.8 \pm 0.8 ^a	48.1 \pm 1.3 ^a	27.4 \pm 2.0	24.4 \pm 1.3 ^b
2-BP	61.1 \pm 1.1 ^b	45.3 \pm 1.2 ^b	28.6 \pm 0.9 ^b	31.3 \pm 3.5	39.9 \pm 2.6 ^a
2-BP+T	76.2 \pm 1.1 [*]	60.3 \pm 0.9 [*]	36.7 \pm 0.6 [*]	27.7 \pm 2.1 [*]	35.4 \pm 1.0
2-BP+Vit E	79.5 \pm 2.1 [*]	62.6 \pm 2.5 [*]	45.8 \pm 2.4 [*]	27.3 \pm 2.5 [*]	26.7 \pm 0.8 [*]

2-BP, 10 μ M 2-Bromopropane; T, 10 mM Taurine; Vit E, 200 μ M Vitamin E. ^{a,b} Different superscripts shows a significant difference between Control and 1-BP treated group ($P < 0.05$), ^{*} Asterisk shows a significant difference between 2-BP- and antioxidants-treated groups ($P < 0.05$).

(Table 5, $p < 0.05$). 또한 1-BP에 10 mM Taurine과 200 μ M Vitamin E첨가는 과립막세포의 생존율과 원형질막 온전성을 유의적으로 증가시켰으며 apoptosis가 진행되지 않는 세포의 비율을 유의적으로 증가시켰다(Table 5, $p < 0.05$).

10 μ M 2-BP 처리는 과립막세포의 생존율 및 원형질막 온전성을 유의적으로 감소시켰으며 apoptosis가 완료된 세포의 비율이 유의적으로 증가하였다(Table 6, $p < 0.05$). 또한 2-BP에 10 mM Taurine과 200 μ M Vitamin E첨가는 2-BP 10 mM 처리구에 비해 과립막세포의 생존율, 원형질막 온전성 및 apoptosis가 진행되지 않는 세포의 비율을 유의적으로 증가시켰으며, apoptosis가 진행되고 있는 세포의 비율을 유의적으로 감소시켰다(Table 6, $p < 0.05$).

고찰

포유동물에 있어 bromopropane은 면역, 신경 및 번식 시스템을 손상 시킨다고 알려져 있으며 특히 1-BP에 노출된 쥐의 경우 꼬리가 없는 정자의 수가 증가하였으며 2-BP에 노출된 rat에 경우에는 두부가 기형인 정자가 증가하였다는 보고가 있다(Zhang 등, 2013). 따라서 포유동물에 bromopropane의 노출은 번식 시스템에 악영향을 미친다고 판단된다 본 연구에서는 1-BP 및 2-BP와 같은 bromopropane 가 돼지 과립막세포에 미치는 영향에 대하여 연구를 실시하였다 실제로 1-BP와 2-BP는 과립막세포의 생존율과 원형질막을 손상시켰을 뿐 아니라 apoptosis를 유도하는 것을 확인하였고 이러한 결과는 bromopropane은 암컷의 번식 시스템에 악영향을 미친다는 것을 간접적으로 확인하였다 하지만 과립막세포에서의 bromopropane에 대한 정확한 메커니즘은 아직까지 보고되지 않았다 C2C12 세포주에서는 1,2-dibromopropane에 의하여 세포의 kinase와 c-Jun N-terminal kinase가 억제되었으며, bromopropane은 세포의 ERK/JNK 작용 기전을 조절하였다(Jeong 등, 2014). 따라서 C2C12 세포에서와 마찬가지로 bromopropane은 ERK/JNK의 신호를 조절하여 과립막세포에 손상을 주었을 것이라 생각된다. 또한 1-BP는 쥐의 대식세포에서 cyclooxygenase-2 mRNA 및 단백질을 증가시켰으며 Akt 및 MAP 인산화효소를 활성화시킨다는 보고가 있다(Han 등, 2012). 즉 1-BP는 세포에서 ERK/JNK, Akt/ERK 및 p38 MAP 조절하여 과립막세포의 생존율 및 원형질막 온전성을 감소시켰으며, apoptosis를 증가시켰다고 판단된다.

활성산소는 세포의 손상과 apoptosis를 유발하는 주요한 물질 중 하나이기 때문에 활성산소의 감소는 과립막세포의 생존율, 원형질막 온전성을 상승시키며 apoptosis를 억제할 수

있는 중요한 요인이된다 실제로 항산화제는 암컷의 번식 효율을 향상시킨다고 알려져 있으며 특히 난포의 성장 및 난자의 성숙과 관련이 있는 과립막세포에서의 산화 충격 및 활성산소의 감소는 성공적인 배란 및 수정을 위한 필수적인 조건이다(Zhu 등, 2012). 일반적으로 난자 성숙과 수정란 발달에 있어 항산화제는 free radical을 제거하는 역할(Walker 등, 1992)을 하여, 체외 배양 체계에서의 수정란 발달을 증가시키는 결과가 보고되었다(Van Soom 등, 2002). 또한 활성산소의 억제는 세포의 성장과 항상성을 유지하기 위한 필수적인 요소라고 보고하였다(Lonergan 등, 1999). 본 연구에서 역시 항산화제인 taurine과 vitamin E를 이용하여 실험을 실시하였으며, 그 결과 과립막세포의 배양기간동안의 항산화제의 첨가는 세포의 생존율 및 원형질막 온전성을 증가시켰으며, apoptosis를 감소시켰다. 실제로 taurine과 vitamin E는 동결 과정에 의해 손상된 세포의 생존율과 원형질막 온전성을 향상(Liu 등, 2015)시켰으며, taurine은 세포의 항산화 효소 중 하나인 superoxide dismutase를 조절하여 원시생식세포를 보호한다고 보고되었다(Higuchi 등, 2012). 본 실험에서 역시 산화 충격을 유발하는 bromopropane에 의해 과립막세포는 생존율 및 원형질막 온전성이 감소하였고, apoptosis가 증가하였다. 이는 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione의 활성을 bromopropane이 억제 시켜 과립막세포의 악영향을 미쳤다고 판단된다. 또한 bromopropane에 의해 감소된 과립막세포의 생존율과 원형질막 온전성 및 apoptosis의 증가는 taurine과 vitamin E에 의해 생존율 및 원형질막 온전성을 증가시켰고 apoptosis를 억제하였다.

결론적으로 항산화제인 taurine 및 vitamin E은 bromopropane에 의해 증가된 활성산소를 억제하여 과립막세포의 생존능력을 향상시켰다고 판단되며, 이러한 결과는 bromopropane에 의해 손상을 입은 암컷의 번식 시스템을항산화제인 taurine과 vitamin E에 의해 개선할 수 있다고 판단된다

사사

본 연구는 2015년도 강원대학교 지원사업(No. 520150149)에 의해 수행되었으며, 2015년 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(NRF-2015R1C1A1A01054393).

REFERENCES

Han EH, Kim JY, Kim HK, Hwang YP and Jeong HG. 2008. o,p'-DDT induces cyclooxygenase-2 gene expression in

- murine macrophages: role of AP-1 and CRE promoter elements and PI3-kinase/Akt/MAPK signaling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233:333-342.
- Han EH, Yang JH, Kim HK, Khanal T, Do MT, Chung YC, Lee KY, Jeong TC and Jeong HG. 2012. 1-Bromopropane up-regulates cyclooxygenase-2 expression via NF- κ B and C/EBP activation in murine macrophases. *Food Chem. toxicol.* 50:1616-1622.
- Herrera E and Barbas C. 2001. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.* 57:43-56.
- Higuchi M, Celino FT, Shimizu-Yamaguchi S, Miura C and Miura T. 2012. Taurine plays an important role in the protection of spermatogonia from oxidative stress. *Amino Acids* 43:2359-2369.
- Honma T, Suda M and Miyagawa M. 2003. Inhalation of 1-bromopropane causes excitation in the central nervous system of male F344 rats. *Neurotoxicology* 24:563-575.
- Ichihara G, Miller J, Ziolkowska A, Itohara S and Takeuchi Y. 2002. Neurological disorders in three workers exposed to 1-bromopropane. *J. Occup. Health* 44:1-7.
- Ichihara G. 2005. Neuro-reproductive toxicities of 1-bromopropane and 2-bromopropane. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78:79-96.
- Jeong HM, Choi YH, Jeong HG, Jeong TC and Lee KY. 2014. Bromopropane compounds inhibit osteogenesis by ERK-dependent Runx2 inhibition in C2C12 cells. *Arch. Pharm. Res.* 37:276-283.
- Kamijima M, Ichihara G, Yu X., Xie Z, Kitoh J, Tsukamura H, Maeda K, Nakajima T, Asaeda N, Hisanaga N and Takeuchi Y. 1997. Ovarian toxicity of 2-bromopropane in the non-pregnant female rat. *J. Occup. Health* 39: 144-149.
- Liu Q, Wang X, Wang W, Zhang X, Xu S, Ma D, Xiao Z, Xiao Y and Li J. 2015. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream sperm cryopreservation. *Fish Physiol. Biochem.* 41:413-422.
- Loneragan P, O'Kearney-Flynn and Boland MP. 1999. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology* 51:1565-1576.
- Mohideen SS, Ichihara G, Ichihara S and Nakamura S. 2011. Exposure to 1-bromopropane causes degeneration of noradrenergic axons in the rat brain. *Toxicology* 285:67-71.
- Nakajima T, Shimodaira S, Ichihara G, Asaeda N, Kumazawa T, Iwai H, Ichikawa I., Kamijima M, Yu X, Xie Z, Kondo H and Takeuchi Y. 1997. 2-Bromopropane-induced hypoplasia of bone marrow in male rats. *J. Occup. Health* 39: 228-233.
- Omura M, Romero Y, Zhao M and Inoue N. 1999. Histopathological evidence that spermatogonia are the target cells of 2-bromopropane. *Toxicol. Lett.* 104:19-6.
- Raymond LW and Ford MD. 2007. Severe illness in furniture makers using a new glue: 1-bromopropane toxicity confounded by arsenic. *J. Occup. Environ. Med.* 49:1009-1019.
- Simon HU, Haj-Yehia A, and Levi-Schaffer F. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 5:415-418.
- Subramanian K, Mohideen SS, Suzumura A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M, Jin S, Zhang, L, Huang Z, Ichihara S, Kitoh J and Ichihara G. 2012. Exposure to 1-bromopropane induces microglial changes and oxidative stress in the rat cerebellum. *Toxicol.* 302:18-24.
- Tilly JL and Tilly KI 1995. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 136:242-252.
- Van Soom A, Yuan YQ, Peelman LJ, De Matos DG, Dewulf J and Laevens H. 2002. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology* 57:1453-1465.
- Walker SK, Heard TM and Seamark RF. 1992. In vitro culture of embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology* 37:111-126.
- Wu X, Faqi AS, Yang J, Pang B, Ding X, Jiang X, and Chahoud I. 2002. 2-Bromopropane induces DNA damage, impairs functional antioxidant cellular defenses, and enhances the lipid peroxidation process in primary cultures of rat Leydig cells. *Reprod. Toxicol.* 16:379-384.
- Yamada T, Ichihara G, Wang H, Yu X, Maeda KI, Tsukamura H, Kamijima M, Nakajima T and Takeuchi Y. 2003. Exposure to 1-bromopropane causes ovarian dysfunction in rats. *Toxicol. Sci.* 71:96-103.
- Yu X, Kamijima M, Ichihara G, Li W, Shibata E, Hisanaga N and Takeuchi Y. 1999. 2-Bromopropane causes ovarian dysfunction by damaging primordial follicles and their oocytes in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*

159:185-193.

Zhang Q, Zheng RZ, Zhang ZH, Yang LS, Wang H, Ning H and Huang F. 2013. Effects of bromopropane exposure on expression of DNA methyltransferases and level of histone acetylation in testis of male rats. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 31:92-95.

Zhu L, Yuan H, Guo C, Lu Y, Deng S, Yang Y, Wei Q, Wen L and He Z. 2012. Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase 3 and

caspase 9 dependent mitochondrial signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 227:1814-1820.

Received March 21, 2016, Revised April 11, 2016,
Accepted June 22, 2016