

황체화된 인간 과립세포에서 Apoptosis 관련 유전자인 bcl-2와 TRPM-2의 발현

연세대학교 의과대학 산부인과학교실

이병석 · 최은아 · 장경환 · 김진영 · 배상욱 · 박기현 · 조동제
이 국 · 김재욱 · 송찬호

The Expression of Apoptosis Related Genes bcl-2, TRPM-2 in Luteinized Human Granulosa Cells

B.S. Lee, E.A. Choi, K.H. Chang, J.Y. Kim, S.W. Bae, K.H. Park, D.J. Cho,
K. Lee, J.W. Kim and C.H. Song

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,
Yonsei University, Seoul, Korea*

= Abstract =

Apoptosis, programmed cell death, is posulated to occur in granulosa cells in ovarian follicular atresia. bcl-2 gene serves as protector from apoptosis and, thus, is associated with increased cell survival. TRPM-2 gene expression has been implicated as a trigger of apoptosis in rat prostate, uterus and mammary gland. Our objective was to determine if bcl-2 and TRPM-2 are expressed in luteinized human GC and, therefore, have regulatory functions for apoptosis in GC. Human GC were obtained via oocyte retrieval from the infertile patients stimulated with exogeneous gonadotropins while undergoing IVF. GC were isolated from follicular fluid using Percoll gradient centrifugation. The GC were further purified with anti-CD45 magnetic beads to remove contaminating WBC's. RT-PCR were performed to analyze the mRNA expression of bcl-2 and TRPM-2 in the GC. The PCR primers were designed to amplify a 195 bp fragment of bcl-2 and a 174 bp fragment of TRPM-2. The PCR products were electrophoresed on 4% agarose gel. Three separate experiments indicated that both bcl-2 and TRPM-2 are concurrently expressed in human GC. We cultured granulosa cells with FSH (1 ng/ml) for 1 day to investigate the relative changes of TRPM-2 mRNA level with RNase protection assay. When we cultured GC with serum free medium for 1 day TRPM-2 mRNA level increased with 1.3 fold, however it was decreased 0.64 fold with FSH. Therefore we conclude that bcl-2 and TRPM-2 are concurrently expressed and that the interaction of their products may be involved in GC apoptosis. And TRPM-2 may be regulated with FSH.

Key Words: Apoptosis, bcl-2, TRPM-2

서 론

여성은 70~200 만개의 난모세포를 가지고 태

어나나 사춘기가 되면 나머지는 퇴화되고 약 40만개의 난모세포만이 남는다 (Sadler, 1990). 그리고 월경이 시작되면 가임기간 동안 매주기마다 여러개의 난포가 recruit 되나 한 개만이 배란

되고 나머지는 퇴화된다. 따라서 궁극적으로 여자는 일생동안 400~500개의 난자만이 배란에 도달하게 된다. 배란후에는 황체가 생겨 기능을 하다가 황체용해가 일어나게 된다. 그렇다면 과연 이러한 난모세포의 소실, 난포의 퇴화와 황체용해가 어떠한 염증반응이나 조직 손상 없이 사라지고 퇴화되는 이유는 무엇일까? 최근에 이러한 일련의 생리적 복합 과정에 대한 연구가 apoptosis에 의한 것으로 가설화하고 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Apoptosis의 개념은 1972년 Kerr 등에 의해 일종의 생리적 형태의 세포사(死)로서 mitosis와 같이 조직 및 세포의 평형(homeostasis)을 이루는데 매우 중요한 일련의 생리적 현상으로 소개되었다. Apoptosis 혹은 programmed cell death는 조직의 remodeling 중에 일어나는 일반적인 일련의 생리적 과정으로 인지되고 있다. 특히 여성의 생식기중 난소와 자궁내막은 여성의 reproductive life동안 주기적으로 조직의 remodeling이 일어나는 역동적 조직으로서 apoptosis의 좋은 예로서 생각되어 지고 있다.

Apoptosis가 일어날 때는 새로운 messenger RNA의 발현이 필요한 능동적 작용으로서 이에 관련된 유전자들이 보고되고 있다. 세포가 Apoptosis를 수행하는 과정에서 능동적 유전자 발현이 필요하다는 것은 특성 단백질과 mRNA의 합성이 세포의 사망을 선행한다는 증거로 지지되고 있다(Owens *et al*, 1991; Palumbo & Yeh, 1995). 또한 여러 가지 호르몬, 성장인자, cytokines 등이 난포성숙의 조절인자이므로 이들이 death signals 또는 survival signals를 전달하여 Apoptosis 관련 유전자를 활성화시키는 것으로 추정된다.

호르몬과 growth factors 등에 의해 활성화되는 유전자와 활성화되는 순서(sequence)는 아직도 불확실하나 여러 가지 Apoptosis와 관련된 유전자들로는 bcl-2 유전자계, Fas와 TRPM-2 등이 난소에 표현되므로 이러한 유전자들이 세포의 죽음과 삶을 조절하는데 역할을 한다는 것을 말하여 주고 있다.

그중에서도 특히 bcl-2는 apoptosis를 방해하고, fas, TRPM-2 등은 apoptosis를 유도하는 유전자로 알려져 있다. 따라서 저자들은 시험관 아기 시술 시 채취한 난소의 과립세포에서 apoptosis 관련 유전자인 bcl-2와 TRPM-2의 발현 유무를 조사하고 인간 과립세포배양을 통해 난포성숙에 관여

하는 FSH가 TRPM-2 유전자의 조절유무에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1) 인간 난소과립세포의 준비

과립세포는 시험관 아기 시술을 위해 hMG + FSH (3명), GnRH analogue + hMG (6명)로 과배란 유도를 시행한 환자들을 대상으로 난자 채취 시 획득한 난포액으로부터 과립세포를 분리하였다. 분리 과정은 다음과 같다. 채취한 난포액을 50 ml tube에 분주한 후 2000 r.p.m에서 10분간 원심분리 하고 상층액을 제거하고, 얻어진 분획을 RPMI 배양액을 넣어 부유시킨 후 50% percoll 용액위에 넣어 1500 r.p.m에서 30분간 원심분리 한 후 적혈구와 분리된 구획에서 과립세포를 얻어 내어 RPHI 배양액을 섞어 회석 시킨 후 10분간 1500 g에서 10분간 원심분리 시켰다. 획득한 분획을 Tissue culture media (30% FCS PBS 용액)을 섞은 후 27 Gauze needle을 통해 anti-CD 45 magnetic immunobeads가 들어있는 Magnetic holder에 10분간 방치하여 (3차례) 백혈구를 제거한 후 과립세포를 획득하였다.

2) Total RNA 준비

획득한 과립세포에서 RNA를 획득하기 위해 Trisol 을 이용하였다. 즉, 2 ml Eppendorf tube에 있는 과립세포에 1 ml 의 Trisol을 넣어 세포를 파괴시킨 후 200 ml의 Chloroform을 넣고 약 15초간 흔들고 실온에서 3분간 방치 후 4℃에서 12500 r.p.m으로 원심분리 한 후 상층액을 얻었다. 상층액에 1 ml의 75% alcohol을 넣어 9000 r.p.m에 5분간 원심분리하여 세척한 후 분획을 37℃에서 말린 후 증류수에 섞어, -70℃에 보관하였다.

3) RT-PCR

2 µl의 (1 mg/ml) oligodt 와 1mg 의 total RNA를 섞은후 총 용량이 22 µl가 되도록 증류수를 넣은 후 PCR 기계에 넣어 68℃에 2분, 25℃에 10분을 방치한다. 그리고, HRT 5 x buffer, DTT, DNTP의 master mix를 섞은 후 reverse transcriptase로 cDNA를 만든다. 그 후 황체화된 과립세포에서 준비된 cDNA를 증폭하기 위해 bcl-2의 primer로 5'-CTGTGGATGACTGAGTACCTGAAC-3', 3'-CTTGTGGCCCAGGTATGCACCCAG-5'를 사용

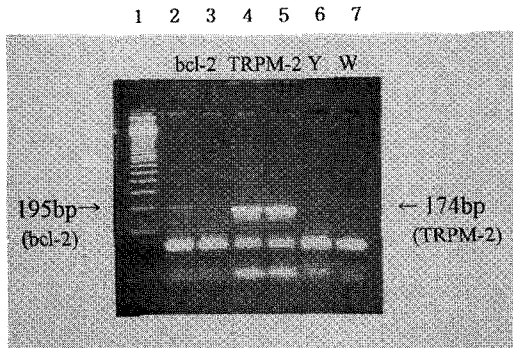


Fig. 1. RT-PCR of total RNA from human granulosa cells using bcl-2 and TRPM-2 specific primers. The predicted 195-bp fragment of bcl-2 (lane 2, 3) and 174-bp fragment of TRPM-2 (lane 4,5) for the RT-PCR products are seen. Lane 1 is 100-bp marker, lane 6,7 are yeast and water respectively as negative control.

하여 195 bp 분절을 TRPM-2에 대한 primer는 5'-TGGCCTCTGGGAAGAGTGTAAGCC-3', 3'-TCTCCAGCAGG GAGGGGTTCGATGCGGTC-5'를 사용하여 174 bp 분절을 증폭하였다.

4) Ribonuclease Protection Assay (RPA)

TRPM-2의 C-DNA clone을 plasmid vector인 pBluescript II SK (Stratgene, La Jolla, CA)에 sub-clone하고 제한효소인 EcoR1을 TRPM-2의 antisense 분절을 만들기 위해 사용하였다. 그리고 각각 T7,T3 RNA 중합효소를 사용하여 254 bp의 antisense 분절을 만들었다. riboprobe의 합성을 위해 SP6-T7 transcription kit (Boehringer Mannheim)와 α -³²P CTP (SA, >3000 ci/mmol.L; Dupont), RNase inhibitor (40,000 U/ml; promega, Madison, WI)를 사용하였다. probe는 5% acrylamide-8mol/L urea gel을 통해 순수 분리하였고 잘라진 gel은 3시간 동안에 걸쳐 분리하였다. antisense probe (1×10^5 cpm)와 15 μ g의 total RNA를 45C에 overnight hybridization하였다. RNase-A와 RNase T1을 single stranded RNA를 없애기 위해 hybridization 혼합물에 넣었고 RNA와 결합한 bcl-2, TRPM-2 편절을 분리하기 위해 5% acrylamide-8 mol/L urea gel electrophoresis를 시행하였다.

결 과

난소 과립 세포로부터 채취한 RNA를 이용 Reverse transcriptase로 cDNA를 만들고 이를 이용

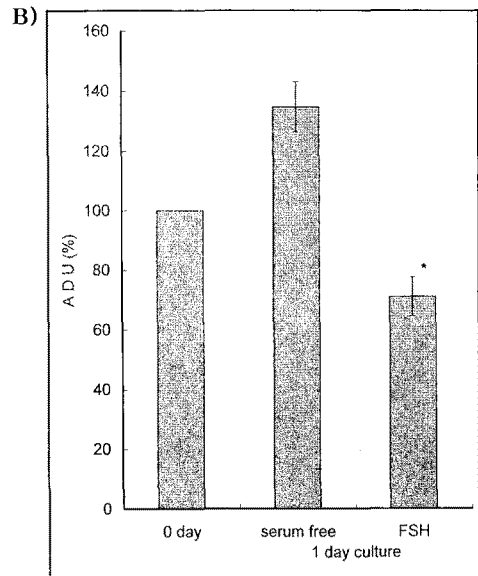
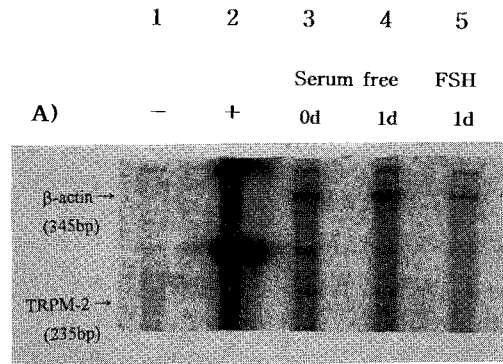


Fig. 2. A) RNase protection assay of TRPM-2 mRNA expression in human granulosa cells treated with FSH (1 ng/ml). One transcript (235 bp) for TRPM-2 was detected in lane 3,4,5. Differences in sample loading were corrected by normalization to human beta-actin (345 bp). Lane 1 is negative control, lane 2 is positive control. B) A representative autoradiograph and arbitrary densitometric units (ADU) after normalization are shown. *significant at $p < 0.05$.

한 PCR 산물을 Ethidium-bromide 4% gel 전기영동하였다. 194 bp 크기의 bcl-2 분절과 174 bp 크기의 TRPM-2 분절이 발현되었고 negative control인 yeast 와 물은 발현되지 않았다 (Fig. 1). 난소 과립세포 배양액에 FSH를 1 ng/ml 첨가하여 하루간 난소 과립세포를 배양한 후 TRPM-2 gene의 변화를 알아보려고 하였다. β -actin을 internal control로 사용하였고, 345 bp 크기의 β -actin과 235 bp 크기의 TRPM-2 gene이 발현되었고

serum free 배양액에 하루 배양시 TRPM-2 gene의 발현이 증가하였으며 이를 densitometer로 측정하면 약 1.3배 증가하였으며 FSH를 첨가하고 1일간 배양시 TRPM-2 gene의 발현이 0.56 배로 의외로 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 2).

고 찰

Apoptosis는 특이한 생리적 자극물질의 변화로 세포가 죽어가는 일종의 생리적 과정을 의미한다. Apoptosis의 생화학적 특성은 Ca^{++} - Mg^{++} 에 의한 endonuclease의 활성화로 DNA가 180-200 bp로 잘려 gel 상에 ladder-like한 유형을 나타나게 되는 것이다 (Peitsch *et al*, 1993). 이러한 Apoptosis는 세포의 분화 및 분열뿐 아니라 조직의 발달과 유지에 매우 필요한 생리적 과정이다. 세포가 Apoptosis로 가기 위해서는 능동적으로 유전자의 발현과 단백질이 분비되어야만 세포사로 갈 수 있다는 개념이 제시되었고 (Owens *et al*, 1991; Palumbo/Yeh), apoptosis와 관련된 유전자들이 밝혀지기 시작하였다. 특히 이러한 Apoptosis와 관련된 유전자들로서는 bcl-2 gene family, fas, TRPM-2, ⁵³p 등이 작용하는 것으로 보고되고 있다 (Collard & Griswold, 1987; Watanabe *et al*, 1992; Lowe *et al*, 1993) 특히 bcl-2 gene family 중 bcl-2 와 bcl-xL은 Apoptosis를 방해하는 유전자로 반면에 bax와 bcl-xS는 apoptosis를 유발하는 유전자로 알려져 있다 (Vaux *et al*, 1992; Hengartner & Horvitz, 1994). Tilly (1995) 등은 성선 자극 호르몬으로 자극한 쥐의 난소에서 bcl-2가 발현됨과 함께 cell death repressor에 대한 cell death inducer gene에 대한 비가 세포의 죽음과 삶에 영향을 준다고 보고하므로서 bcl-2가 cell death repressor의 역할을 한다고 보고하였다. 또한 bcl-2 유전자가 결핍된 쥐의 난소에서 퇴행된 난자의 수가 많고 primordial follicle 과 같은 구조를 갖지 않는 oocyte가 많이 나타나는 것을 보고하므로서 bcl-2 유전자가 정상적인 primordial follicle을 encoding 하는데 중요한 역할을 한다고 제시하였다 (Ratts *et al*, 1995).

쥐의 퇴화된 ventral prostate에서 cloning된 TRPM-2 gene (Legar *et al*, 1987)은 apoptosis에 대한 역할이 아직 확실치 않으나 미성숙 쥐에서 PMSG를 투여하고 hCG 투여후 48시간후에 난소에서 TRPM-2 유전자의 발현이 확인되었고 (Kaynard *et al*, 1992), 퇴화된 antral, preantral follicle에

서 선택적으로 표현되므로서 TRPM-2는 난포의 퇴화에 관여하는 것으로 제시되었다 (Sanders *et al*, 1993). 본 연구에서는 인간의 난소 과립세포에서도 bcl-2 gene 과 TRPM-2 gene이 발현되므로서 bcl-2 와 TRPM-2 gene이 난소의 과립세포의 apoptosis에 관여하는 것으로 추정된다. 특히 TRPM-2 gene은 쥐의 난소에서 apoptosis를 유발한다고 보고되었으나 인간에서는 아직 Apoptosis에 관한 역할이 확실치 않다. apoptosis를 방지하는데 있어서 어떤 인자가 가장 중요한 지를 결정하기는 어려우나 난포의 생활력 유지에 gonadotropin이 중요한 인자라고 가정할 수 있다. 특히 FSH는 LH receptor를 유도하여 과립막세포가 LH에 반응케하고 aromatase를 활성화시켜 과립막세포에서 gap junction의 수를 증가시켜 세포 영양물질 교환경로를 제공하기도 한다. 그래서 과립세포의 cellular metabolism을 변화시켜 세포의 죽음을 예방하기도 한다. 따라서 난포의 운명을 좌우하는데 가장 영향력이 큰 FSH가 과연 TRPM-2를 조절하는지를 알아보려고 하였고, 본 연구에서 FSH는 in vitro에서 인간 과립세포 배양 1일후 대조군과 비교하였을 때 TRPM-2의 발현을 억제하는 것으로 나타나므로서 난포 및 과립세포의 성장인자로 가장 중요한 인자로 알려진 FSH가 apoptosis를 유발하는 유전자인 TRPM-2 유전자의 발현을 억제시키므로서 TRPM-2 유전자가 난소 과립세포의 Apoptosis에 작용하는 것을 뒷받침 할 수 있다고 생각한다. 따라서 Apoptosis는 난포 퇴화의 기전으로 여겨지며 bcl-2와 TRPM-2 유전자는 인간난포 퇴화에 관여하는 것으로 추측되나 인간 난포에서 bcl-2와 TRPM-2의 정확한 기능 및 조절인자에 대해서는 더 많은 실험이 필요할 것으로 사료되며 본 실험에서는 과자극된 과립 세포를 실험대상으로 하였는데 자극받지 않은 세포를 대상으로 하였을 때 어떠한 다른변화가 있을지는 본 연구만으로는 알수없을 것이며 임상적으로 좋은질의 난자를 채취하고 임신성공율을 높이는데 있어 난소 과립세포의 apoptosis가 임신 성공률을 높이는데 매우 관계가 깊을 것으로 사료된다.

결 론

인간 난소 과립 세포에서 apoptosis 관련 유전자인 bcl-2 와 TRPM-2가 발현되고 난포의 성장

을 촉진하는 FSH에 의해 apoptosis를 유발하는 TRPM-2 유전자의 mRNA level이 감소하므로서 인간 난포의 성장 및 퇴화는 apoptosis 기전에 의한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Collard MW, Griswold MD: Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochem* 1987, 26, 3297.
- Hengartner MD, Horvitz HR: *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homology of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 1997, 76, 665.
- Kaynard AH, Periman LM, Simard J, Melner MH: Ovarian 3-hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat. *Endocrinology* 1992, 130, 2192-2200.
- Leger JG, Montpetit ML, Tenniswood MP: Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 147, 196-203.
- Lowe SW, Schmitt SW, Smith SW, Osborne BA, Jacks T: p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993, 362, 847-849.
- Owens GP, Hahn WE, Cohen J: Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. *Mol Cell Biol* 1991, 11, 4177-4188.
- Peitsch MC, Polzar B, Stephan H: Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* 1993, 12, 371-377.
- Palumbo A, Yeh J: Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. *J Soc Gynecol Invest* 1995, 2, 565-573.
- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL: Ablation of bcl-2 gene expression decreases the number of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 1995, 136, 3665-3668.
- Sadler TW: Langman's medical embryology 6th edi. Williams & Wilkins, Baltimore. 1990, pp10-12.
- Sanders SL, Kaynard AH, Melner MH: Localization and expression of sulfated glycoprotein-2 (SGP-2) mRNA in the rat ovary. 75th Annual meeting of the Endocrine Society Las Vegas, Abstract No. 1632, 1993.
- Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnston AL: Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: eqine chorionic gonadotropin mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1995, 136, 232-241.
- Vaux DL, Weissman IL, Kim SK: Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992, 258, 1955-1956.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N: The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992, 148, 1274-1279.