大韓不妊學會誌: 第29卷 第1號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 1, 2002, 3

동결보존이 생쥐 난소 조직 내 Heat Shock Protein 90의 발현에 미치는 영향

삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실[1], 성신여자대학교 발생학 연구실[2]

이선희[1,2] · 박용석[1] · 염혜원[1] · 송견지[1] · 한상철[1] · 배인하[2]

Effect of Cryopreservation on the Heat Shock Protein 90 Expression in Mouse Ovarian Tissue

Sun-Hee Lee[1,2], Yong Seog Park[1], Hye-Won Yeum[1], Gyun Jee Song[1], Sang Chul Han[1], In-Ha Bae[2]

[1]Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center, Seoul 100-380; [2]Department of Biology, Graduate School of Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea

Objective: Heat shock protein family is related to protective mechanism of cells by environmental changes. This study was performed to evaluate the effect of cryopreservation on the heat shock protein 90 (Hsp90) expression in mouse ovarian tissue.

Methods: Cryopreservation of mouse ovarian tissue was carried out by slow freezing method. The mRNA level of Hsp90 expression in both fresh and cryopreserved mouse ovarian tissue was analyzed by RT-PCR. The protein expression of Hsp90 was evaluated by Western blot analysis and immunohistochemistry.

Results: The mRNA and protein of Hsp90 were expressed in both fresh and cryopreserved mouse ovarian tissue. The amount of Hsp90 mRNA was increased in cryopreserved ovarian tissue after 60 and 90 minutes after thawing and incubation. The amount of Hsp90 protein was increased in the cryopreserved ovarian tissue after 6 hours of the incubation in Western blot analysis. In immunohistochemical study, Hsp90 protein was localized in cytoplasm of oocytes and granulosa cells. Significant level of immunoreactive Hsp90 protein was detected in theca cells contrast to the weak expression in ovarian epithelial cells.

Conclusion: This results showed the increase of Hsp90 expression in both mRNA and protein level in the cryopreserved mouse ovarian tissue. It can be suggested that Hsp90 may play a role in the protective or recovery mechanism against the cell damage during cryopreservaion.

Key Words: Heat shock protein 90, Cryopreservation, Mouse ovarian tissue

난소 조직의 동결보존은, 난소를 잃거나 난소의 기능을 소실할 수 있는 암 환자의 화학 또는 방사선 치료로부터 난소를 보존할 수 있으며, 치료 후에 임신의 기회를 다시 제공해 줄 수 있는 매우 유용

주관책임자: 이선희, 우) 100-380 서울특별시 중구 묵정동 1-19, 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7649, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: ivflees0729@daum.net
*이 연구는 2001년도 제일의료장학재단의 연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

한 방법이다.[1,2] 동결-융해한 난소 조직을 체외배양하여 성숙된 난자를 얻거나,[3] 난소 조직을 동종 혹은 이종의 개체에 이식하는 방법을 통하여 성숙 난자를 얻은 후 배우자의 정자와 수정시켜 임신에 성공할 수 있다.[4,5] 이와 같이 난소 조직의 동결보존은 유용한 방법이지만, 동결-융해 과정에서 난소 조직은 동결보호제, 급격한 온도 변화, 그리고 삼투압 차이 등에 의해 세포 생리 기작, 세포막, 그리고 세포 소기관 등이 손상을 입게 된다.[6]

살아있는 모든 유기체는 외부의 온도 변화나 독성 물질 등과 같은 다양한 스트레스로부터 그들의 항상성을 유지하기 위하여 특정 단백질의 합성을 증가시키는데, 그 중 대표적인 것이 heat shock proteins (Hsps)이다.[7,8] Hsps는 박테리아에서 인간까지 매우 잘 보존되어 있는 단백질로 1962년 초파리에서 처음 관찰되었다. Hsps는 일종의 molecular chaperone으로서 단백질의 folding, assembly, 그리고 transport와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.[9] 또한 Hsps는 온도 변화, 반응족 산소, 감염, 물리적 충격, 방사선 그리고 독성 물질과 같은 외부의 변화와 스트레스에 대한 방어 작용으로 세포 내에서 합성되며, 스트레스에 의한 손상으로 변형된 단백질의 3차 구조를 회복시켜 주는 과정에 관여한다고 알려져 있다.[10~13]

Hsps는 분자량에 따라 small Hsp, Hsp60, Hsp70, Hsp90, 그리고 Hsp110으로 구분된다.[14] Hsp90은 거의 대부분의 조직 내에서 발현되는 중요한 단백질로서 스트레스가 없을 때에도 일정하게 발현되어 다양한 생리학적 기능에 관여하고,[15] 스트레스에 대해서는 보호 작용을 하는 것으로 알려져 있다.[11,16] Liu 등[17]은 1994년 IMR-90 세포 (human diploid fibroblast cell)를 동결-융해한 후 체외배양 하였을 때 Hsp90의 발현이 증가됨을 보고하였다. 그 동안 동결-융해 과정에서 나타나는 Hsp90 발현 변화에 대한 세포 수준에서의 연구는 있었으나, 조직에 대한 연구는 아직 미진한 상태이다. 동결-융해 과정에서 받는 스트레스에 의해 난소 조직은 세포 수준에서보다는 더욱 손상을 많이 받을 수 있으며, 이러한 손상을 회복하는 과정에서 Hsp90이 관여할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 동결-융해 과정에서 난소 조직이 받는 손상에 대한 회복 기작의 하나로 Hsp90의 관여 여부를 확인하기 위하여, 동결-융해 후 난소 조직 내 Hsp90 발현 양상의 변화를 mRNA와 단백질 수준에서 조사하였다.

연구 대상 및 방법

1. 실험 동물 및 난소의 준비

본 실험에서는 명기 14시간과 암기 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이를 충분히 공급하여 사육한 4주령의 ICR 계통 암컷 생쥐를 사용하였다. 4주령 암컷 생쥐를 경추이탈 (cervical dislocation)로 희생시킨 후, 개복하여 양측 난소를 적출하였다. 적출된 난소는 Dulbeccols-phosphate buffered saline (D-PBS; Gibco, USA)에서 수술용 칼을 이용하여 1 mm^3 크기로 절단하였다.

2. 생쥐 난소 조직의 동결 및 융해

난소 조직의 동결보존은 다음과 같이 시행하였다. 절단된 난소 조각들을 ice-cold 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco)-PBS에 1.5 M dimethtyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA)와 0.1 M sucrose (Sigma)가 녹아있는 동결 배양액에 15분간 정치하여 동결보호제의 침투를 용이하게 하였다. 각 cryogenic vial 당 4개의 난소 절편을 넣어 자동세포동결기 (CryoMagic, 맥코이교역, Korea)에서 완만 동결을 실시하였다. 난소 조직의 동결 과정은 0℃에서 시작하였는데, 0℃에서 -7℃까지 분당 -2℃씩 온도를 하강시키고, -7℃에서 약 5분간 정치하였다. 이때 액화질소에 넣어 두었던 핀셋을 이용하여 seeding을 실시하였다. 다시 -7℃에서 -40℃까지는 분당 -0.3℃씩 온도를 하강시키고, -40℃에서 -140℃까지는 분당 10℃씩 하강시킨 후, -196℃ 액화질소 탱크에 넣어 보관하였다.

난소 조직의 융해 방법은 액화질소 탱크로부터 cryogenic vial을 회수하여, 상온에서 30초간 방치한 후, 37℃ water bath에서 2분간 융해를 실시하였다. 수확한 난소 절편은 1.5 M DMSO, 1 M DMSO, 0.5 M DMSO 10% FBS-PBS에서 순차적으로 세척하여 동결보호제가 제거되도록 한 후, 다시 10% FBS-PBS에서 3회 세척하였다.

3. 난소 조직의 체외배양

배양액은 ?-minimum essential medium (?-MEM; Gibco)에 $NaHCO_3$ (Sigma) 2.2 g/L, penicillin G (Sigma) 0.06 g/L, streptomycin sulfate (Sigma) 0.1 g/L를 첨가하여 제조하고, 10% FBS, insulin (Sigma) 5 ?g/ml, sodium selenite (Sigma) 2 ?g/ml, transferrin (Sigma) 10 ?g/ml와 folligon (MIT medical, Korea) 1 IU/ml는 사용할 때마다 첨가하였다.

난소 조직의 배양은 Transwell insert (Costar, USA)에서 실시하였다. Cluster plate에는 2.6 ml, transwell insert에는 1.5 ml의 배양액을 넣어 24시간 동안 전배양 (5% CO_2, 95% air; 100% humidity; 37℃)을 실시한 후, 각각의 plate에 8개의 난소 절편을 넣어 배양하였다.

4. 조직학적 연구 (Histological study)

조직학적 관찰을 위해 난소 절편을 10% formalin에 24시간 고정하였고, 흐르는 물에서 2시간 동안 조직을 씻어준 후, 50%, 60%, 70%, 80%, 그리고 90% ethyl alcohol (EtOH)에서 각각 1시간씩 1회, 100% EtOH에서는 1시간씩 2회 담가 두어 탈수하였다. Xylene과 EtOH이 1 : 1로 섞여진 용액에서 1시간, xylene에서 1시간씩 2회의 치환 과정을 실시하였다. 60℃ 오븐에서, paraffin과 xylene을 1 : 1로 섞은 용액에 조직을 24시간 동안 정치하였고, 다시 100% paraffin에 24시간 정치하여 포매하였다. Microtome을 이용하여 포매 조직을 5 ?m 두께로 잘라 절편을 제작하였다. 조직 절편을 slide glass (Fisher, USA) 위에 붙이고약 30℃의 slide warmer에서 24시간 정치하였다.

조직 절편을 염색하기 위해 xylene에서 3분씩 3회 두어 paraffin을 제거하였고, 100% EtOH에서 1분씩 2회, 90%에서 60%까지 각 1분씩 처리하여 수화 과정을 실시하였다. 조직 절편을 증류수에 15분 담가 둔 후, haematoxylin에서 5분간 염색하고, 흐르는 물에서 1분간 씻어준 후, acid alcohol (HCl + EtOH)에 4회 침적시키고, 흐르는 물에서 다시 1분간 씻어주었다. EA-50에서 3분간 염색한 후, 80% EtOH, 90% EtOH에서 각각 1분씩, 100%에서는 1분씩 2회 처리하였다. Xylene에서 3분씩 3회 처리하고 Permount (Fisher)로 mounting 한 후 현미경을 이용하여 관찰하였다.

5. RNA 추출과 역전사-효소중합 반응 (RT-PCR)

1) RNA 추출

동결-융해 전후의 난소 조직을 각각 0, 30, 60, 그리고 90분간 체외배양하고 RNA를 추출하였다. 전체 RNA는 Trizol reagent (Gibco)을 사용하여 추출하였으며, RNA의 정량은 spectrophotometer를 사용하여 260 nm에서 시행하였다.

2) Reverse transcription (RT)

반응 혼합물은 RNA 5 ?g, 5X reaction buffer (50mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol (DTT)) 8 ?l, 10 mM dNTPs 4 ?l, 10 pmol Oligo $(dT)_{15}$ 10 ?l, RNA inhibitor (RNAsin) 1 ?l, murine leukaemia virus (MuLV) reverse transcriptase (Promega, USA) 1 ?l, 그리고 diethyl pyrocarbonate (DEPC)-DW를 넣어 전체 부피가 40 ?l가 되도록 하였다. 여기에 mineral oil 한 방울을 넣은 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 65℃에서 10분, 37℃에서 60분, 그리고 95℃에서 5분 동안 역전사 반응을 시행하여 cDNA를 만든 후 4℃에 보관하였다.

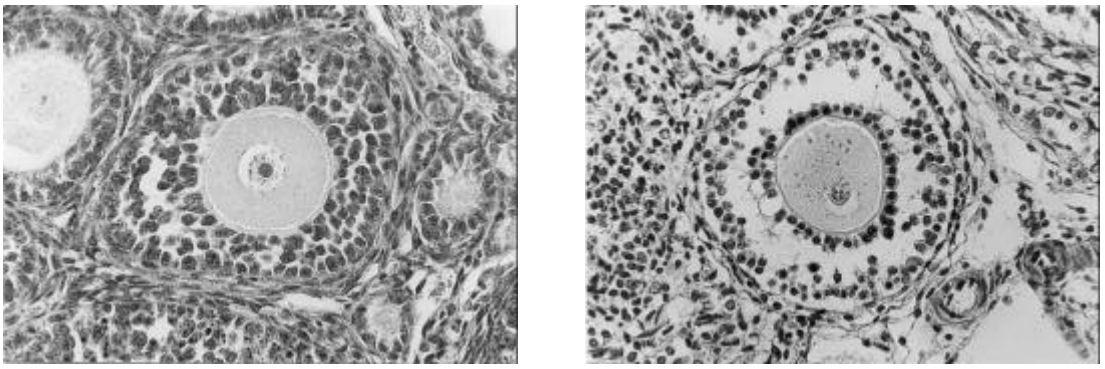
3) Polymerase chain reaction (PCR)

역전사 반응에 의해 만들어진 cDNA 2 ?l, *Taq* polymerase (Boehringer Mannherim, Germany) 5 U/?l, 2 mM dNTP 2 ?l, 10X reaction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$) 2 ?l, DW 9.9 ?l, 10 pmol primer 2 ?l (Bioneer, Korea)를 PCR tube에 넣고 Robo cycler gradient 90 (Stratagene, USA)을 이용하여 38 cycles의 PCR을 실시하였다. PCR에서 얻어진 결과물은 2% agarose gel에서 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 UV 하에서 관찰하였다. 이때 mouse ?-actin gene product는 positive control로 사용되었다.

6. Western blot 분석

1) 단백질 추출 및 정량

동결-융해 전후의 난소 조직을 체외에서 0, 3, 6, 그리고 9시간 배양 후 다음과 같은 방법으로 단백질을 추출하였다. 난소 조직 4절편 당 lysis buffer (0.25 M Tris-HCl pH 7.4, 0.5% NP-40, 20 ?M Leupeptin,



A B

Figure 1. Comparison of follicles derived from fresh- and cryopreserved-mouse ovarian tissue. **A.** Follicle in fresh-ovarian tissue. The follicle has an intact spherical follicle with small space between granulosa cells and spherical oocyte. **B.** Follicle in cryopreserved-ovarian tissue. The follicle shows lack of granulosa cells and its theca cells are pulled away from the follicle edge and vacuolated.

4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) 100 ?l를 넣은 후 균질분쇄기로 수회 분쇄하였다. 4℃, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액만을 eppendorf tube에 회수하였다. 상층액을 10 ?l씩 분주하여 액화질소에서 재빨리 얼린 후 -70℃에서 보관하였다. 전기영동을 시행하기 직전에 단백질을 얼음 속에서 녹인 후, Bradford method (Bradford, 1976)로 단백질의 양을 정량하였다.[18]

2) 전기영동

단백질을 2X sodium dodesyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sample buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 10% glycerol, 0.025% bromophenol blue, 5% ?-mercaptoethanol)와 1 : 1로 넣은 후 98°℃에서 5분간 끓였다. 준비한 sample을 8% SDS-PAGE gel에 loading 한 후, 100 mV에서 3시간 전기영동을 실시하였다.

3) Transfer

전기영동 후 gel은 transfer buffer (39 mM glycine, 48 mM Tris base, 0.037% SDS, 20% methanol)로 채워진 transfer kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 10 mV에서 nitrocellulose membrane (Amersam, USA)으로 4°℃ cold room에서 12시간 동안 transfer하였다.

4) Antibodies 처리

Transfer 후 nitrocellulose membrane은 blocking solution (5% skim milk, TBS-T buffer (20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0.1% tween 20)에서 2시간 blocking 한 후, TBS-T buffer로 nitrocellulose membrane을 세척하였다. Hsp90에 대한 1차 항체인 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruze Biotechnology)를 TBS-T buffer로 1 : 3,000로 희석한 것에 nitrocellulose menbrane을 넣고 1시간 동안 처리하고, TBS-T buffer로 15분씩 3회 세척하였다. 이후 2차 항체인 peroxidase-conjugated horse anti-rabbit IgG (Jackson Immuno research, USA)를 TBS-T buffer로 1 : 5,000으로 희석한 것에 nitrocellulose membrane을 넣고 1시간 처리한 뒤, TBS-T buffer로 15분씩 3회 세척하였다. 반응이 끝난 nitrocellulose membrane에 ECL detection solution (Amersham)을 분사한 후 X-ray film에서 3분간 노출시키고 현상하여 band를 확인하였다.

5) Optical density 측정 및 통계 처리

동결-융해 과정을 3회 반복한 후 각 실험에서 얻어진 단백질을 이용하여 Western blot을 실시하였다. 현상된 film에서 각 band의 density를 densitometer (microplate autoreader EL311SX, Bio-Tek instruments)를 이용하여 595 nm에서 측정하여 배양 시간 별로 density의 차이를 관찰하였다. 각 실험 값들의 통계적 유의성은 Student's t-test를 이용하였고, p값이 0.01 보다 작은 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

7. 면역조직화학법 (Immunohistochemistry)

준비된 난소 절편 슬라이드를 100% xylene에서 5

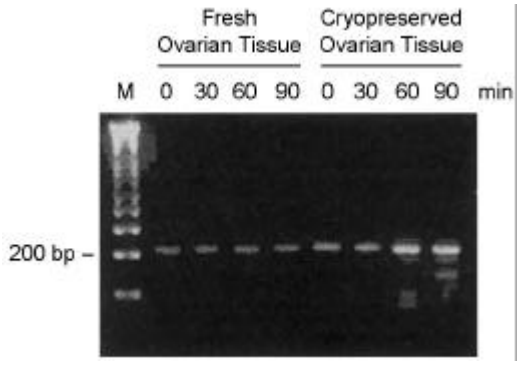


Figure 2. Temporal changes in Hsp90 expression from fresh- and cryopreserved-mouse ovarian tissue cultured in vitro: A RT-PCR study. RT-PCR products Hsp90 in fresh- and cryopreserved-ovarian tissue (218 bp). M; 100 bp ladder marker.

분씩 2회, 100%, 95%, 70% EtOH에서 각각 5분씩 2회 hydration 시킨 후, 증류수에 5분간 정치하였다. 준비된 sodium citrate buffer (10 mM pH 6.0)에서 120℃, 20분간 autoclave하였다. 상온에서 충분히 식혀준 후 0.3% H_2O_2가 들어있는 methanol에 10분간 endogenous peroxidase를 제거하였다. Pap pen으로 난소 조직 주위를 그린 후 blocking solution (5% NGS (normal goat serum), 1% Triton X-100)을 떨어뜨린 후 미리 준비해 둔 습윤 chamber에 넣어 1시간 동안 incubation하였다. PBS로 세척 후, Hsp90에 대한 1차 항체인 rabbit polyclonal IgG를 1:80로 blocking solution에 희석하여 난소 조직에 떨어뜨린 후 2시간 동안 chamber에서 incubation하고, PBS로 15분간 2회 세척하였다. Biotinylated anti-mouse and anti-rabbit IgG (DAKO, USA)를 두세 방울 떨어뜨리고 40분 동안 chamber에서 incubation하고 PBS에서 15분간 2회 세척하였다. Streptavidin-HRP (DAKO)을 두세 방울 떨어뜨리고 40분 동안 chamber에서 incubation 시킨 후, PBS로 10분간 2회 세척하였다. 3,3'-diaminobenzidine solution (DAB substrate/chromogen system; DAKO)을 떨어뜨린 후 10분간 발색시켰다. 증류수로 10분간 세척하고, PBS에 잠깐 정치 후 haematoxylin (Sigma)으로 2~3분간 counter staining하였다. 증류수에 5~10분간 넣어둔 후, 80%, 95%, 100%, 그리고 xylene에서 10초씩 2회 hydration하고, Permount를 이용하여 mounting 한 후 현미경 하에서 관찰하였다.

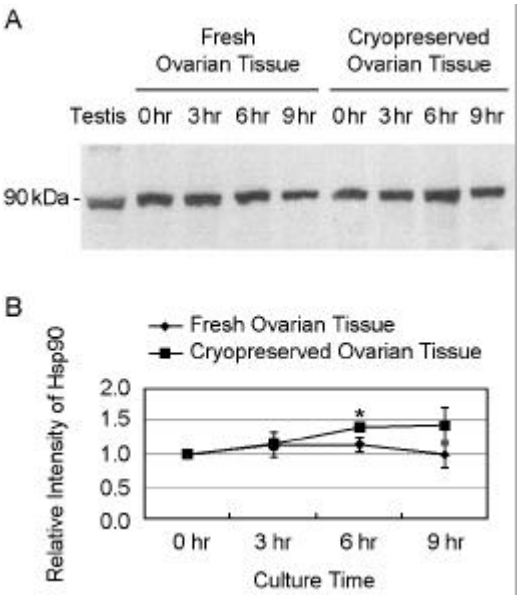


Figure 3. Time course experiment for assessment of Hsp90 translational activities: An wes tern blot study. **A.** Temporal expression of Hsp90 from fresh- and cryopreserved-ovarian tissue. **B.** Relative optical density of Hsp 90. $^{*}p<0.01$

결 과

1. 동결-융해 과정이 난소 조직 내 난포의 형태학적 변화에 미치는 영향

동결 전후의 난소 조직을 관찰한 결과, 동결-융해한 난소 조직 내에서 손상 받은 난포의 수가 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 손상 받은 난포들은 난포 내 난자를 둘러싼 막이 손상되어 찌그러진 형태를 보이고 있으며, granulosa cell의 손실이 많고, 세포 사이의 결합이 소실된 형태로 관찰되었다 (Figure 1).

2. 동결-융해 과정이 난소 조직 내 Hsp90 mRNA 발현에 미치는 영향

동결하지 않은 난소 조직과 동결-융해 과정을 거친 난소 조직을 각각 0, 30, 60, 그리고 90분간 체외 배양하면서 시간에 따른 Hsp90 mRNA의 발현을 비교 관찰하였다. 각 조직으로부터 mRNA를 추출하여 RT-PCR을 시행한 결과 동결하지 않은 난소 조직에서는 유의한 변화를 보이지 않은 반면, 동결-융해

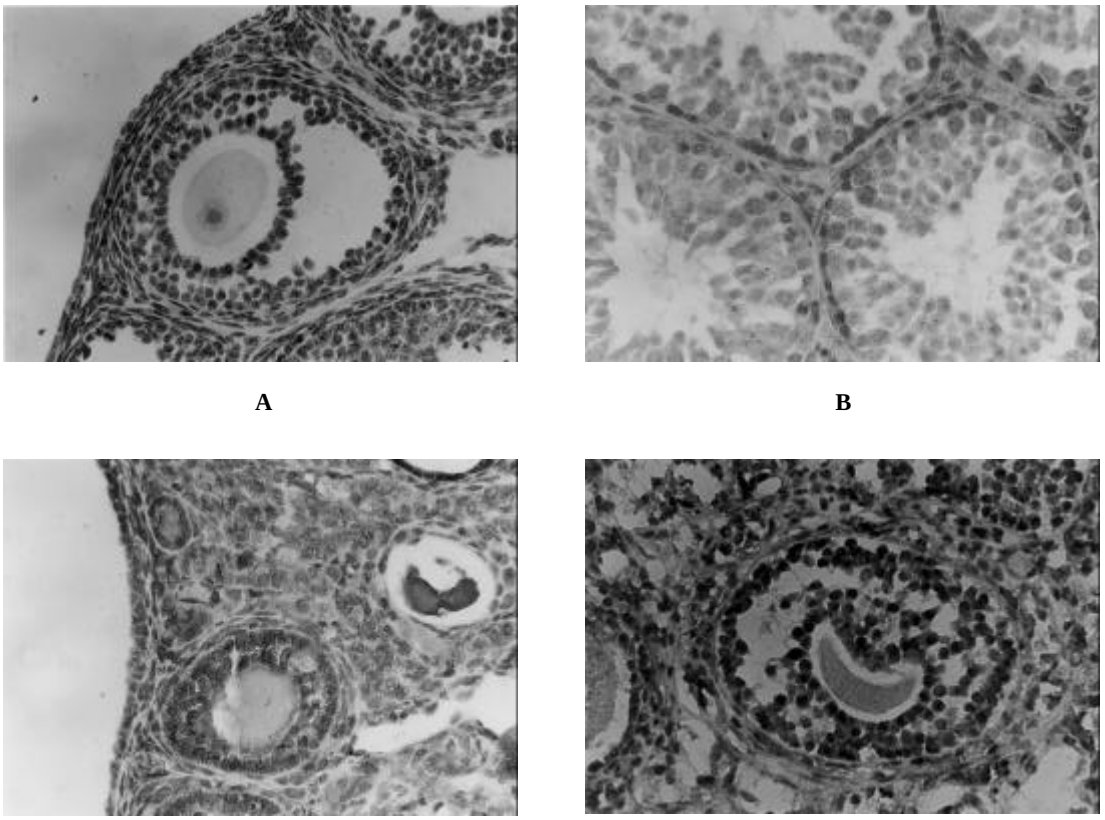


Figure 4. Immunohistochemical localization of Hsp90 in follicles of fresh- and cryopreserved-mouse ovarian tissue. **A.** Negative control without primary antibody. **B.** Positive control - testicular tissue. **C.** Follicle in fresh-ovarian tissue. **D.** Follicle in cryopreserved-ovarian tissue.

과정을 거친 난소 조직에서는 체외배양 60분에서 90분까지 Hsp90 mRNA의 증가를 관찰할 수 있었다 (Figure 2).

3. 동결-융해 과정이 난소 조직 내 Hsp90 단백질 발현에 미치는 영향

동결 전후의 난소 조직을 각각 체외에서 0, 3, 6, 그리고 9시간 동안 배양한 후 단백질을 추출하여 western blot analysis를 실시하였다. 동결하지 않은 난소 조직을 체외배양 하였을 때 Hsp90 단백질 발현은 커다란 차이를 보이지 않았으나, 동결-융해 과정을 거친 난소 조직에서는 체외배양 6시간째 Hsp90 단백질 발현이 유의하게 증가함을 관찰할 수 있었다 (Figure 3A). 동결-융해 과정을 3회 반복 후, 각 난소 조직으로부터 단백질을 추출하여 Western blot analysis를 실시하였다. 실험 결과에서 얻어진 band의 density를 측정한 후 통계 처리한 결과 ($p < 0.01$) 체외배양 6시간에 Hsp90 단백질 발현이 유의하게 증가함을 확인하였다 (Figure 3B).

4. 난소 조직 내 Hsp90 단백질 발현 부위 확인

실험 방법의 검증을 위한 negative control로 primary antibody를 처리하지 않은 난소 조직 내 모든 세포에서 특정 부위에 염색이 관찰되지 않음을 확인하였다 (Figure 4A). 또한 positive control로서 정소 조직을 사용하여, 정소 조직 내 생식 세포의 세포질에서 Hsp90 단백질이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 4B). 난소 조직 절편에서 Hsp90 antibody를 사용하여 면역조직화학법을 실시한 결과, 동결하지 않은 난소 조직 내 난포의 난자와 granu-

losa cell 세포질에서 Hsp90 단백질이 발현되는 것을 관찰하였다 (Figure 4C). 난포 이외의 부위에서는 theca cell의 세포질에서 Hsp90 단백질의 발현이 관찰되었으나, 난소 조직의 표피에서는 거의 발현되지 않는 것을 관찰하였다 (Figure 4C). 동결-융해 후 6시간 동안 체외배양한 난소 조직에서 역시 난포 내 난자의 세포질과 granulosa cell의 세포질에서 Hsp90 단백질의 발현을 관찰하였다 (Figure 4D). 또한, 난소 조직의 theca cell의 세포질에서 Hsp90 단백질의 발현을 관찰할 수 있었고, 난소 조직의 표피 세포에서는 Hsp90 단백질의 발현을 거의 관찰할 수 없었다 (Figure 4D).

고 찰

본 연구에서는 난소 조직의 동결-융해로부터 받는 손상에 대한 회복 기작의 하나로 Hsp90이 작용하는지 여부를 조사하기 위하여, 동결 전후의 난소 조직을 각각 체외배양하면서 Hsp90 발현 양상의 변화를 관찰하였다. 동결-융해시킨 난소 조직과 동결하지 않은 난소 조직을 각각 0, 30, 60 그리고 90분간 체외에서 배양하였을 때, 동결하지 않은 난소 조직에서는 Hsp90 mRNA의 발현 양상에서 별다른 차이를 관찰할 수 없었으나, 동결-융해시킨 난소 조직에서는 60분과 90분에 Hsp90 mRNA 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 2). 증가된 Hsp90 mRNA가 단백질 합성에 이용되었는지 알아보기 위하여 Western blot analysis를 시행하였다. 동결하지 않은 난소 조직과 동결-융해한 난소 조직을 각각 0, 3, 6, 그리고 9시간 동안 체외에서 배양한 후 Hsp90 단백질의 발현 변화를 관찰하였다. 동결하지 않은 난소 조직에서 별다른 변화를 관찰할 수 없었던 것에 비하여 동결-융해시킨 난소 조직에서는 체외배양 6시간에 Hsp90 단백질의 증가를 관찰할 수 있었다 (Figure 3). 이는 증가된 Hsp90 mRNA가 단백질 합성에 이용되었음을 보여주고 있으며, 동결-융해 과정에서 받는 자극과 스트레스에 의한 난소 조직의 손상 회복 기작으로 Hsp90 단백질이 관여할 수 있다는 가능성을 뒷받침할 수 있는 결과라고 사료된다.

아직까지 Hsp90의 정확한 작용 기작에 대해서는 알려지지 않았으나, 동결-융해 과정 동안 받게 되는 외부 자극으로 인하여 단백질이 변성되고, 부적절한 형태를 이루게 되거나, 세포 내 물질 대사 이상이 발생되었을 때, 항상성 유지를 위하여 Hsp90의 발현이 증가되는 것으로 생각된다. Hsp90 단백질이 난소 조직 내에서 발현되는 부위를 확인하기 위하여 면역조직화학법을 실시한 결과, 난소 조직 내 난자, granulosa cell, 그리고 theca cell의 세포질에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 4).

Gerner와 Schneider[19]는 Hela cell이 약 42℃ 약한 열에 노출된 후, 열에 대한 내성을 얻게 됨을 보고하였다.[19] 42℃ 정도의 온도에 노출된 후 37℃에서 회복기를 거치면서 Hsps의 발현이 증가되는 것을 관찰하였고, 발현이 증가된 Hsps는 차후에 세포가 받게 되는 열에 대한 보호 작용을 하는 것으로 보고하였다. 그리고 Liu[17]는 IMR-90 세포를 4℃에서 1시간 이상 노출시키고 37℃에서 회복기를 주었을 때 Hsp90과 Hsp70의 발현이 현저히 증가됨을 보고하였다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때 난소 조직을 동결보존하기에 앞서 동결보호제나 낮은 온도에 먼저 노출시키고 회복기를 주면 Hsps의 발현을 증가되어, 낮은 온도와 동결호보제 등에 대한 내성을 획득할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 내성의 획득이 동결-융해로 인해 난소 조직이 받는 손상에 대한 회복 기작에 중요한 역할을 할 수도 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아, Hsp90은 생물체가 다양한 외부 자극과 스트레스에 노출되었을 때 세포의 치명적인 손상을 방지하는 생존 능력에 관여하는 중요 단백질로, 난소 조직의 동결-융해 과정에서 받는 손상에 대한 회복 기작에도 관여할 것으로 생각된다. 따라서 동결-융해 과정에서 난소 조직이 받는 손상을 최소화하기 위해 동결-융해 조건을 최적화하고 안정화시키기 위한 연구가 더욱 활발히 진행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Gosden RG, Rutherford AJ, Norfolk DR. Transmission of malignant cells in ovarian grafts. Hum Reprod 1997; 12: 403-5.

2. Donnez J, Bassil S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. Hum Reprod Update 1998; 4: 248-59.
3. Hartshorne GM. In vitro culture of ovarian follicles. Rev Reprod 1997; 2: 94-104.
4. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts at -196℃. Hum Reprod 1994; 9: 597-603.
5. Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. Hum Reprod 1997; 12: 101-6.
6. Fuller BJ, Rubinacci A, Geboes K, De Loecker W. The bioenergetics of mitochondria after cryopreservation. Cryobiology 1989; 26: 333-40.
7. Neuer A, Mele C, Liu HC, Rosenwaks Z, Witkin SS. Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development in vitro. Hum Reprod 1998; 13: 987-90.
8. Huang HC, Lee WC, Lin JH, Huang HW, Jian SC, Mao SJT, et al. Molecular cloning and characterization of porcine cDNA encoding a 90-kDA heat shock protein and its expression following hyperthermia. Gene 1999; 226: 307-15.
9. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. Nature 1987; 328: 378-9.
10. Lindquist S. The heat shock response. Annu Rev Biochem 1986; 55: 1151-91.
11. Curci A, Bevilacqua A, Fiorenza MT, Mangia F. Developmental regulation of heat-shock response in mouse oogenesis: identification of differentially responsive oocyte classes during graafian follicle development. Dev Biol 1991; 144: 362-8.
12. Wiech H, Buchner J, Zimmermann R, Jakob U. Hsp90 chaperones protein folding in vitro. Nature 1992; 358: 169-70.
13. Park SH, Lee SJ, Chung HY, Kim TH, Cho CK, Yoo SY, et al. Inducible heat-shock protien 70 is involved in the radioadaptive response. Radiat Res 2000; 153: 318-26.
14. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. Annu Rev Genet 1988; 22: 631-77.
15. Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, Suzuki K, Yahara I. Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, Hsp90. J Biol Chem 1991; 266: 10099-103.
16. Jakob U, Buchner J. Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. Trends Biochem Sci 1994; 19: 205-11.
17. Liu AYC, Bian H, Huang LE, Lee YK. Transient cold shock induces the heat shock response upon recovery at 37℃ in human cells. J Biol Chem 1994; 269: 14768-75.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
19. Gerner EW, Schneider MJ. Induced thermal resistance in HeLa cells. Nature 1975; 256: 500-2.