

생쥐 난자 및 초기배아에서 Leptin 수용체 발현 및 Leptin에 의한 Mitogen Activated Protein Kinase 활성의 조절 및 난자의 성숙 조절

¹울산대학교 의과대학 산부인과; ²경기대학교 이과대학 생물학과

¹강병문 · ²한현주 · ²서혜영 · ¹홍석호 · ^{2*}계명찬

Expression of OB-R, Regulation of Mitogen Activated Protein Kinase Activity and Maturation by Leptin in Mouse Oocytes

¹Byung Moon Kang, ²Hyun Joo Han, ²Hye Young Seo, ¹Suk Ho Hong, ^{2*}Myung Chan Gye

¹Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ulsan University;

²Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyonggi University

Objective: To verify the expression of leptin receptor (OB-R) in oocytes and preimplantation embryos, the involvement of mitogen activated protein kinase (MAPK or Erk1/2) in the leptin signaling, and effect of leptin on the oocyte maturation in mice.

Method: RT-PCR analysis of OB-R was conducted in germinal vesicle (GV)-intact and MII stage oocytes, and 1, 2, 8-cell embryos and blastocysts. Germinal vesicle breakdown (GVB), polar body extrusion, monitored in the presence or absence of leptin (1 μ M). Following the leptin treatment, temporal changes in MAPK activity were verified by immunoprecipitation and in vitro kinase assay in MII oocytes.

Results: The expression of OB-R mRNA was found in GV and MII oocyte but not in the embryos. MAPK activity of the MII oocytes was significantly increased by brief incubation in the HTF supplemented with leptin (1 μ M). Priming of PD098059, a MEK inhibitor to leptin treatment attenuated the activation of MAPK by leptin in MII oocytes. Following 24 hrs of culture of the GV oocytes, leptin significant increased the GVB and 1st polar body extrusion.

Conclusion: This result suggested that functional interaction between leptin and OB-R resulted in potentiation of MAPK (Erk1/2) activity in MII oocytes through MEK activation and that leptin might be a local regulator of meiotic maturation of the mouse oocytes.

Key Words: Leptin, OB-R, MAPK, Oocytes, Mouse

Leptin은 *obese* 유전자의 산물로 주로 지방세포에서 발현되며 비만여성에서 그 혈중 농도가 높게 나타나며 대사조절을 통해 체중을 조절한다.¹ Leptin 수용체 (OB-R)는 leptin의 생물학적 효과를 매개하며 IL-6

type cytokine 수용체의 일종인 gp130 및 IGF 수용체와 유사한 구조를 갖는다. Alternative splicing의 결과로 다양한 변이형태의 수용체가 중추신경계 뿐 아니라 난자, 생식소를 포함한 다양한 조직에서 발현된

*교신저자: 계명찬, 우) 442-760 경기도 수원시 팔달구 이의동 산94-6 경기대학교 자연과학부 생물학과
Tel: 031) 249-9646, e-mail: mcgye@kuic.kyonggi.ac.kr
본 연구는 2000년 현대중앙병원 연구비 지원에 의한 것임.

다.²³ Leptin은 insulin에 의한 생리활성을 조절하거나 유사한 활성을 보이며⁴⁻⁷ 당뇨병 생쥐에서 변형된 수용체의 발현이 보고되어⁸ 비만 또는 당뇨 조건하에 insulin과 leptin에 의한 신호전달에 변형이 있을 것으로 추측되고 있다. Leptin 투여시 유전적 비만 생쥐 (ob/ob)의 남성불임이 구제되며⁹ 암컷 생쥐의 생식기능이 일찍 개시된다.¹⁰ 생식기관에서 다양한 leptin 수용체 isoform들의 발현이 확인되어³ leptin은 포유동물의 생식기능의 허용적 조절인자로 작동하는 것으로 추측되고 있다.¹¹

최근 혈액 뿐 아니라 난포액, 과립세포와 난구세포, 난자 및 초기배아에 leptin의 존재가 확인되었다.¹²⁻¹⁴ 쥐의 미성숙 난자 및 성숙 난자에서 OB-R의 발현이 확인되었으며 MII oocytes에서 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)를 활성화하는 것으로 알려져 leptin이 난자의 성숙과 수정 초기발생에 조절적 기능을 수행할 가능성이 제시되었다.¹⁵ Leptin은 다양한 조직에서 STAT3 신호전달 뿐 아니라 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{5,16} MAPK family는 세포에 전달된 성장인자, 사이토카인, 호르몬, 신경전달물질 등의 extracellular signal 및 stress 신호전달 과정의 중요한 단백질 인산화효소군으로 다양한 MAPK kinase (MAPKK, MEK)에 의해 인산화되어 활성화되며 표적단백질의 serine/threonine 잔기를 인산화시킨다.¹⁷ MAPK 가운데 성장인자에 의한 신호전달 과정에는 MEK에 의해 활성화되는 Erk1/2의 활성화가 일어나며 세포의 생존과 증식, 분화를 조절한다.¹⁸ MAPK 상위의 신호전달은 다양한 수용체 하부의 신호전달체계의 crosstalk를 통해 복잡하게 연결된다. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)는 성장인자 및 cytokine 수용체 하부의 신호전달의 중요한 구성요소로 다양한 조직에서 leptin 수용체의 하부에서 PI3K를 활성화가 보고되었으며¹⁹ 이 신호전달은 하위의 MAPK 활성화 조절에 관여한다.^{5,6}

MAPK (Erk1/2)의 활성은 미성숙 난자에서는 낮게 유지되며, 난자 성숙 과정에서 증가하여 MII 난자에서는 활성화되어 방추사형성 및 감수분열의 정지에 관여한다.²¹⁻²⁴ 난포액내에는 다량의 leptin이 존재하므로²⁵ 난자의 성장과 성숙 과정에 leptin의 조절적 역할을 기대할 수 있다. 그러나 난포액내에 존재하는 lep-

tin의 농도는 난소반응의 감소 및 체외수정된 사람의 수정란의 질과 반비례 관계를 보이며^{25,26} 과립세포에서 insulin의 작용을 길항하여 gonadotrophin 자극에 의한 progesterone 생성을 저해한다.²⁷

현재까지 다양한 조직에서 성장인자, 사이토카인, 세포외기질의 세포 수용체 신호전달 과정에서 MAPK cascade의 활성화 과정이 연구되어 왔으나 포유동물의 난자 및 초기배아 세포를 대상으로 이들 다양한 활성분자들에 의한 신호전달에 관한 이해는 매우 미진하였다. 이는 난자의 성숙과 수정, 초기배아 발생을 조절하는 생물학적 활성분자들의 작용기작 규명과 다양한 활성분자들을 이용한 초기배아의 체외발생의 향상을 위한 체외배양 시스템의 개발에 중요하다. 다양한 조직에서 leptin에 의한 MAPK 활성화 조절에 대한 증거가 제시되었으나 난자를 대상으로 leptin에 의한 MAPK 활성의 변화 여부는 알려지지 않았다. 본 연구에서는 난포액내에 다량으로 존재하는 leptin의 생물학적 효과를 추적하기 위해 난자 및 초기배아를 대상으로 leptin 수용체의 발현을 조사하고 leptin이 난자 성숙에 미치는 영향 및 성숙 난자에서 leptin에 의한 MAPK (Erk1/2) 활성의 변화와 이 과정에서 관여하는 MEK의 관여 여부를 추적하였다.

연구대상 및 방법

1. 난자, 배아의 획득 및 배양

본 실험에서는 광주기를 명 14시간, 암 10시간으로 조절되는 사육실에서 사육된 생쥐 (ICR strain)로 암컷은 생후 6주 된 것을, 수컷은 생후 12주 이상 된 것을 사용하였다. 미성숙 난자를 획득하기 위해 4주령의 암컷 생쥐에 7.5 IU의 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, Follistan, USA)를 복강 주사한 후 46시간에 경추파괴 도살하여 난소를 추출하였다. 19 gage 주사침으로 난소내 성숙난포를 절개하여 난자-난구 복합체를 M2 배양액으로 방출시켰다. 0.1% hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 제거한 후 신선 배양액으로 수 회 세척하여 핵막의 존재를 확인하고 건강한 난자만을 다음 실험에 공시하였다. 성숙 (MII)난자의 획득을 위해 PMSG와 hCG (human chorionic gonadotrophin, Sigma, USA) 주사를 통한 과배란을 유도한 후 hCG 주사 후 14시간에 쥐를 도살하여 수란관을 적

출하였고 팽대부에서 난자-난구 복합체를 수확하였다. 앞서와 동일한 방법으로 난구세포를 제거하여 세척을 거친 후 잘 발달된 제1극체를 갖는 성숙 난자를 실험에 공시하였다. 초기배아를 획득하기 위하여 PMSG와 hCG를 46시간 간격으로 암컷 생쥐의 복강내에 주사하여 과배란을 유도한 뒤, 수컷 생쥐와 교미시키고 다음날 질전을 확인된 암컷에서 수란관 및 자궁을 분리하여 배양액을 관류 (flushing)를 통해 수확하였다.

2. RNA 추출, 역전사, 및 DNA 증폭 (RT-PCR)

특별한 경우를 제외하고는 모든 용액은 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)에 전 처리된 증류수를 사용하였다. 수확한 난자 및 배아 100 mg 당 1 ml의 Trizol (Gibco BRL)을 첨가하여 마쇄하였다. 상층액에 sodium acetate (pH 7.4)와 ethanol을 첨가하여 침전물 획득하였다. 75% ethanol 200 μ l를 첨가하여 세척한 후 상층액을 버리고 진공건조기로 증발시킨 후 증류수에 녹여 -20°C에서 보관한다. 역전사반응은 1 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM dithiothreitol, 1 unit/ μ l RNasin 및 0.4 μ g oligo dT12-18 (Pharmacia)를 함유한 pH 8.3, 20 μ g 25 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂에서 시행하였다. Gene Amps 사의 thin-walled tube에 5 units of AMV reverse transcriptase XL (Takara)를 첨가하여 DNA thermal cycler (Takara 4800)로 옮겨 42°C에서 1시간 동안 시행하였다. 반응이 끝난 후 99°C에서 5분간 가열한 후 얼음에 정치하였다. 준비된 cDNA는 바로 PCR에 사용하거나 -20°C에 보관하였다. OB-R primer의 염기서열은 수용체 단백질의 intracellular domain을 암호화하고 있는 부위의 염기서열 5'-GAAGATGATGGAATGAAAGTG-3'와 5'-GAGCAGTAGGACACAAGAGG-3'¹⁵로 하고, mRNA의 상대적인 양을 측정하기 위한 대조유전자인 β -actin primer는 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCAACCA-3'와 3'-GGGGGACTTGGGATTCCGGTT-5'로 하였다. 이들 primer를 사용하여 증폭하면 OB-R은 237 bp, β -actin은 539 bp의 증폭산물을 얻게 된다. OB-R cDNA의 증폭은 최초 94°C에서 1분간 시행한 후 94°C 30sec, 62°C 30sec, 72°C 30sec로 40 cycles을 수행한 후 72°C에서 10분 동안 반응하였다. PCR반응 조건은 최종 25 μ l에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM 각 dNTP, 25 pmol forward primer, 25

pmol reverse primer, 1.25 units of Taq DNA polymerase으로 조정하였다. PCR반응 후 PCR산물을 확인하기 위하여 2% agarose gel electrophoresis를 수행한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

3. 난자 leptin 처리 및 난자 성숙 유도

HTF에 0.4% BSA를 함유한 배양액을 기본 배양액에 leptin (R&D, USA)을 100 및 1000 nM농도로 처리한 후 배양액을 배양접시 (plastic dishes, Corning; 60 x 15 mm)위에 20 μ l씩 위치하고 paraffin oil을 덮어 5% CO₂와 95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기에서 전배양한 후 난자를 정치하여 24시간 동안 배양하였다. 배양을 시작한 후 3시간 간격으로 핵막붕괴 및 제1극체 방출을 해부현미경 시야에서 검정하였으며 배양 결과는 chi square test (Excell program)로 유의성을 검증하였다. Leptin에 의한 난자의 MAPK 활성화변화를 조사하기 위하여는 100 nM leptin을 처리하였으며 MEK의 관련 여부 추적을 위해 leptin 처리 10분전에 MEK 억제제인 PD098059를 10 μ M농도로 처리하였다.

4. 난자의 MAPK (Erk1/2) 면역침강물의 준비

Leptin (100 nM)을 처리한 난자는 HTF (with 0.1% PVP)에 3회 세척한 후 buffer A (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM Na₃VO₄, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 50 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium β -glycero phosphate, 0.1 mM PMSF, 1 μ g/ml of aprotonin, pepstatin, leupeptin abd 1 μ M Microcystin)로 옮겨 lysis와 함께 초음파 분쇄하였다 (Spectronic, USA). 4°C, 10,000 g에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취해 면역침강에 공시하였다. Rabbit anti-Erk1/2 항체 (Upstate, 1:100 dilution)를 protein A Sepharose beads (Upstate, USA)와 혼합하여 60분간 정치하였다. 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 0.5 M NaCl 용액으로 2회 세척한 후 난자의 추출물과 혼합하여 90분간 4°C에서 진탕배양하였다. 면역복합체 - protein A Sepharose bead를 PBS (with 0.05% BSA)로 2회 세척한 후 MAPK 활성측정에 공시하였다.

5. Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) 활성측정

Assay dilution buffer (ADB, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM β -glycero phosphate, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 mM MOPS, pH 7.2)에 준비한 5 μ l substrate solution (myelin basic protein, final concentration 50 μ M), 5 μ l kinase inhibitor cocktail (20 μ M H7, 2 μ M H8, and 20 μ M R24571), 5 μ l magnesium-ATP solution, 5 μ l γ -[32 P] ATP (10 μ Ci/ μ l), 5 μ l 면역침강물을 혼합한 반응액을 37°C에서 10분간 배양하였다. 얼음에 정치하여 반응을 종결한 후 원심분리하여 20 μ l의 상층액을 취해 p81 phosphocellulose paper에 점적하였다. 0.75% phosphoric acid 용액으로 3회 세척한 후 건조시킨 PC paper를 scintillation counting vial에 옮긴 후 enhancer cocktail 용액을 넣어 방사선량을 측정하였다. MAPK 기질이 들어간 반응물의 선량에서 기질이 들어 있지

않은 상태의 반응물의 선량을 제한 값을 효소활성으로 계산하였다. C.P.M. 값은 시료별로 증폭하여 측정하였고 3회에 걸친 실험을 통해 얻어진 평균값을 계산하였다. MAPK 활성의 차이는 Student's *t*-test로 분석하였다.

결 과

1. 난자는 leptin의 수용체를 발현한다

미성숙 (GV) 난자, 성숙 (MII) 난자, 수정란, 2, 8, 포배로부터 추출한 total RNA의 역전사물질로부터 OB-R의 발현을 확인하기 위해 다양한 splicing variants를 공통적으로 확인할 수 있는 intracellular domain에 해당하는 primer를 사용하여 PCR증폭하여 조사한 결과 난자에서 237 bp의 역전사 증폭물을 확인되었으나 수정란 이후 시기의 초기배아에서는 확인되지 않았다 (Figure 1).

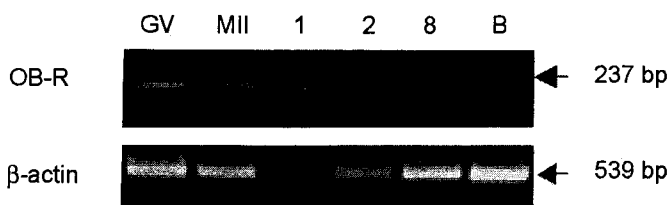


Figure 1. The expression of OB-R in mouse oocytes. RNA isolated from oocytes was subjected RT-PCR, and was analyzed for leptin receptor (OB-R) expression. RT-PCR of β -actin mRNA which served an internal control.

Table 1. The effect of leptin on the maturation of mouse oocytes

Leptin (nM)	Incubation time	No. of oocytes	GV (%)	GVB (%)	1st PB (%)	Activated (%) ¹	Deg. (%)
0	6	82	17 (20.7)	65 (79.3)			
100	6	83	10 (12.1)	73 (87.9)*			
1000	6	86	8 (9.3)	78 (90.7)**			
0	24	82	15 (18.3)	41 (50.0)	23 (28.5)	1 (1.2)	2 (2.4)
100	24	83	10 (12.1)	44 (53.0)	29 (34.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
1000	24	86	8 (9.3)	42 (48.8)	36 (41.9)**	0 (0.0)	0 (0.0)

geminal vesicle intact (GV) oocytes collected by follicle puncture 46 hrs post PMSG. After removing the follicle cells, the oocytes were incubated in the human follicular fluid (HTF) media in the presence or absence of leptin (100 and 1000 nM) for 24 hrs. Germinal vesicle breakdown (GVB) and extrusion of 1st polar body (1st PB) were monitored. Data are from four independent trials. ¹, pathogenetically activated oocytes among the mature (MII) oocytes; *, significantly different from control ($p < 0.05$). **, significantly different from control ($p < 0.01$)

2. Leptin에 의한 생쥐 성숙 난자내 MAPK 활성의 변화

hCG 주사 후 14시간에 채취한 MII 시기의 난자에 leptin을 처리하여 MAPK의 활성변화를 추적한 결과 처리 후 1분 후부터 유의한 증가가 확인되어 10분에

1.6배로 증가하여 최고치를 보였다 (Figure 2).

3. Leptin에 의한 생쥐 성숙 난자내 MAPK 활성을 증가와 MEK 활성 의존성

MAPK 활성화 신호전달 과정을 확인하기 위해 MAP kinase kinase (MEK) 억제제인 PD098059를 전

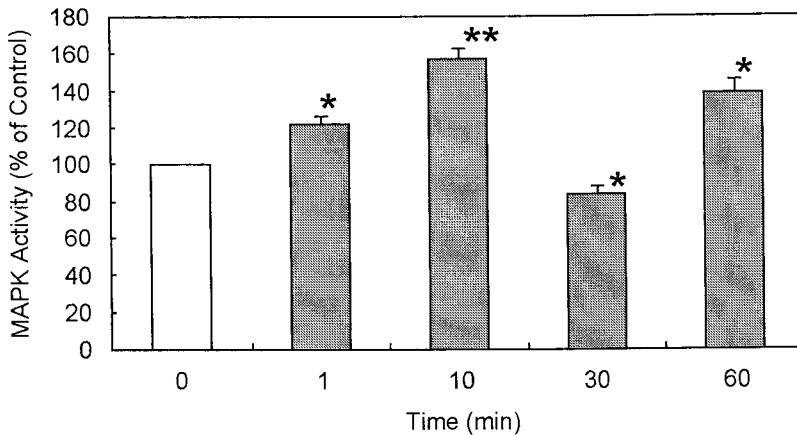


Figure 2. Temporal changes in MAPK activity by leptin in mouse oocytes. MII oocytes collected following the induction of superovulation. After removing the follicle cells by brief incubation in the 0.1% hyaluronidase solution, the oocytes were placed in the HTF media and subjected to leptin treatment (100 nM). Subsequently, oocytes were lysed in assay RIPA buffer and subjected to immunoprecipitation (IP) using Erk1/2 antibodies at varying time after leptin treatment (1, 10, 30, 60 min). Following the IP immune complexes were subjected to kinase assay using myelin basic protein as kinase substrate according to manufacturer's instruction (see Materials and Methods). Data were normalized by the control (T0) oocytes. Error bars are SD (n=3). *, significantly different from control (T0); **, significantly different from others (by Student's *t*-test).

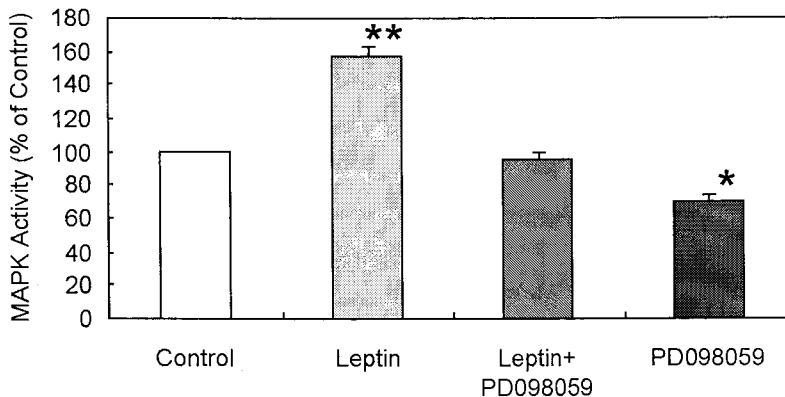


Figure 3. The effect of PD098059 on the activation of MAPK by leptin in mouse oocytes. GV- and MII oocytes were incubated in HTF containing leptin (100 nM) for 10 min and subjected to IP and kinase assay. To verify the regulation of MAPK activation by MEK, PD098059 (10 μ M), a MEK inhibitor was treated to oocytes 10 min before leptin treatment. Error bars are SD (n=3). *, significantly different from control ($p < 0.05$); **, significantly different from others ($p < 0.05$) by Student's *t*-test.

처리한 후 leptin을 30분간 처리하여 MAPK 활성을 측정하였을 때 대조군 (PD098059 비처리군)의 MAPK의 활성 보다 유의하게 감소하였다 (Figure 3).

4. 미성숙 난자의 성숙에 미치는 leptin의 효과

미성숙 (GV) 난자의 체외성숙 유도과정에서 leptin의 효과를 조사하였다. 6시간 배양한 후 대조군과 leptin 처리군 사이에 미성숙 난자로부터 일어난 핵막 붕괴 사건에 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.05$) (Table 1). 24시간 배양한 후 대조군과 leptin 처리군 사이에 난자로부터 제1극체 방출에는 유의한 ($p < 0.01$) 차이가 있었다 (Table 1).

고 찰

1. 난자 및 초기배아에서 leptin 수용체 발현의 발생학적 조절

난자 및 초기배아에서 OB-R의 발현을 RT-PCR로 조사한 결과 미성숙 및 성숙 난자에서 확인되었으나 수정란 이후 초기배아에서는 확인되지 않았다 (Figure 1). 생쥐 난자에서 leptin 수용체의 mRNA가 검출이 보고되어¹⁵ 본 실험 결과와 일치하지만 사람의 난자 및 초기배아에서 leptin 및 그 수용체 단백질의 존재가 보고되었다.¹² 본 실험 결과 초기배아에서 수용체 mRNA의 발현이 확인되지 않으므로 난자 및 배아내에 존재하는 leptin 수용체 단백질의 존재는 주로 모계 전사물로부터 번역된 단백질로 사료된다. 많은 종류의 모계 전사물들이 난자의 성장과 성숙 과정에서 난자내에 축적되며 수정과 초기발생을 거치는 동안 소진되며 이들 중 일부는 수정란 유전자의 활성화 이후 본격적으로 발현된다.^{28,29} 본 연구 결과 OB-R mRNA의 발현이 난자에서만 확인되므로 수정란 및 초기배아에서는 OB-R의 mRNA가 신생되지 않고 수정 이후 초기배아에서 소진되며, 난자내에 존재하던 OB-R 단백질이 초기배아내에 존재하는 것으로 사료된다. 그러나 초기배아 발생 과정에서 잔존하는 수용체 단백질에 의한 생물학적 효과가 발휘될 가능성을 배제할 수 없을 것이다. 본 연구 과정에서 OB-R의 발현을 확인하기 위해 사용한 primer 염기서열은 OB-R의 다양한 splicing variants를 공통적으로 확인할 수 있는 intracellular domain에 해당하는 primer를 사용하였으므로

차 후 다양한 길이의 intracellular domain을 갖는 splicing variants들의 발현에 대한 확인이 요구된다.

2. Leptin은 제2감수분열 중기의 생쥐 난자내 MAPK 활성을 증가시킨다

MII 시기의 난자의 경우 전반적인 protein kinase의 활성은 매우 높으며 MAPK 활성은 감수분열의 재개와 아울러 증가하여 MII 시기에는 매우 높은 활성을 보이는데 이는 MII 시기에 2차로 감수분열을 정지하는 것과 밀접한 관계가 있다.²² 본 실험 결과 배란된 성숙 난자에 leptin을 처리한 결과 MAPK의 활성이 처리 1분 후부터 유의하게 증가하여 10분에 1.6배로 증가하여 최고치를 보였다 (Figure 2). 이는 leptin 수용체를 통한 leptin 신호전달 과정에서 MAPK (Erk1/2)의 활성화가 일어남을 의미한다. 이와 유사하게 다양한 조직에서 다양한 leptin을 포함한 성장인자와 사이토카인에 의해서 MAPK (Erk1/2)의 활성화가 발생한다.^{5,16} 따라서 MII 시기의 성숙 난자내 leptin 수용체를 통한 MAPK의 활성화는 다른 조직에서 일어나는 leptin 신호전달과 유사하게 진행됨을 알 수 있다. Leptin에 의한 성숙 난자의 MAPK 활성의 증가는 2차 감수분열 중기에 있는 난자의 염색체 행동 또는 난자의 활성화 억제 등 세포주기의 조절에 관여할 가능성을 암시하며 난포액 및 배란 후 난관내 leptin의 생리적 의미를 짐작케 한다. Leptin은 성숙 난자에서 STAT-3의 활성화를 유발한다.¹⁵ 다양한 종류의 cytokine과 growth factor에 의해 활성화되는 STAT3³⁰의 전사조절 활성은 MAPK 또는 mTOR (mammalian Target of Rapamycin)에 의해 조절된다.^{31,32} 아직까지 MII 난자에서 leptin에 의한 STAT3의 활성화 과정에 MAPK에 의한 조절에 대한 구체적인 정보가 없으므로 확인이 필요할 것이다. MII 난자에서 MAPK 활성은 단백질 합성 및 인산화에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다.^{21,22} 따라서 leptin에 의한 이러한 MAPK 활성의 변화가 난자내에 신생된 MAPK의 단백질의 증가에 의한 것인지 불분명하므로 추가적인 확인이 요구된다.

3. Leptin에 의한 제2감수분열 중기의 생쥐 난자내 MAPK 활성을 증가는 MEK의 활성화에 의존한다

성숙 난자에 MAP kinase kinase (MEK) 억제제인 PD098059를 전처리한 후 leptin을 10분간 처리하여

MAPK 활성을 측정하였을 때 대조군 (PD098059 비처리군)의 MAPK의 활성 보다 유의하게 감소하였다 (Figure 3). 이는 leptin에 의해 MAPK cascade가 활성화되는 것을 의미한다. MAPK family는 난자 성숙 과정에서 G2-M transition을 유도하며 cytostatic factor (CSF) 및 spindle assembly checkpoint-induced M-phase arrest의 유지에 작용하며 *Xenopus* 난자에서 CSF에 의해 유도되는 MII 정지 및 spindle assembly checkpoint는 PD098059에 의해 해지된다.³³ 따라서 성숙 난자에서 MEK를 경유한 MAPK 활성의 유지 또는 증가는 난자의 자발적인 활성화 방지에 역할이 있는 것으로 추측할 수 있다.

4. 난자 성숙에 미치는 leptin의 효과

난구세포를 제거한 미성숙 (GV) 난자의 체외성숙 유도과정에서 leptin은 처리한 농도 영역 (100, 1000 nM)에서 난자의 핵막붕괴 및 제1극체의 방출사건을 촉진하였다. 본 실험에서 조사한 것 보다 훨씬 더 높은 농도에서 leptin의 효과가 발생할 수 있으나 이는 난포액 및 혈중 leptin의 생리적 농도 (10~16 ng/ml = 1 μ M)를 훨씬 초과하므로 고려하지 않았다.^{14,34} 이는 leptin 수용체를 통한 신호가 미성숙 난자의 성숙에 영향을 미칠 수 있는 조절요인으로 작동하는 것으로 사료된다.

체외성숙을 통해 제1극체를 형성한 난자에서 염색체의 이상이 빈번히 관찰되는데 주로 난포액과는 다른 부적절한 배양조건에 기인한다. 이를 극복하기 위해 성숙난포액 또는 난포액내에 존재하는 성장인자 등의 다양한 생물학적 활성분자들을 첨가한 배양액에서 난자의 성숙을 유도하려는 시도가 진행되어 그 효과가 입증되었으며 이들 중 일부는 수정과 발생의 잠재력을 증가시킨다.³⁵⁻⁴² 아직까지 제한된 성장인자 및 사이토카인을 대상으로 난자의 성숙에 미치는 영향이 조사되고 있으나 난자에서 수용체의 발현이 확인된 생물학적 활성분자의 경우 난자의 성숙 뿐 아니라 비정상적인 활성화를 통해 결국 사멸에 이르는 현상의 방지기능에 대한 역할도 고려되어야 할 것이다.

결 론

생쥐 난자에서 leptin 수용체의 발현을 조사하고

leptin에 의한 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 활성변화 및 신호전달, 난자 성숙에 미치는 leptin의 영향을 조사하였다. RT-PCR을 통해 미성숙 (GV) 난자, 성숙 (MII) 난자, 수정란, 2, 8, 포배에서 OB-R의 발현을 조사한 결과 난자에서 237 bp의 역전사 증폭물이 확인되었으나 수정란 이후 시기의 초기배아에서는 확인되지 않았다. MII 시기의 성숙 난자에서 leptin 처리에 의해 MAPK 활성이 증가됨을 확인하였다. MAPK kinase (MEK)억제제인 PD098059를 전처리 한 경우 leptin에 의한 MAPK 활성의 변화를 확인할 수 없었다. Leptin은 난구세포를 제거한 미성숙 난자의 난자의 핵막붕괴 및 제1극체 방출을 증가시켰다. 이상의 결과에서 생쥐의 난자는 leptin의 수용체 mRNA를 발현하며 leptin은 성숙 난자에서 MEK에 의존적으로 MAPK의 활성을 증가시키는 것으로 보아 MII 정지상태의 유지에 효과가 있는 것으로 사료된다. 난자내 leptin 신호전달 과정이 다른 조직과 유사한 형태로 보존되어 있으며 leptin 수용체를 통한 신호가 미성숙 난자의 성숙에 조절요인으로 작동하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-3.
2. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83: 1263-71.
3. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, et al. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nature Med* 1996; 2: 585-9.
4. Cohen B, Novick D, Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 1997; 274: 1185-8.
5. Berti L, Gammeltoft S. Leptin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells by activation of ERK2. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 157: 121-30.

6. Kim YB, Uotani S, Pierroz DD, Flier JS, Kahn BB. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology* 2000; 141: 2328-39.
7. Zhao Y, Kreger DO, Brannian JD. Serum leptin concentrations in women during gonadotropin stimulation cycles. *J Reprod Med* 2000; 45: 121-5.
8. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JJ, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; 379: 632-5.
9. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997; 138: 1190-3.
10. Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 1997; 275: 88-90.
11. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137: 3144-7.
12. Antczak M, Van Blerkom J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 1067-86.
13. Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 467-72.
14. Mantzoros CS, Cramer DW, Liberman RF, Barbieri RL. Predictive value of serum and follicular fluid leptin concentrations during assisted reproductive cycles in normal women and in women with the polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 539-44.
15. Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumoto N, Takeda T, Yamaguchi M, et al. Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 480-4.
16. Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y. Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 765-8.
17. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 211-8.
18. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80: 179-85.
19. Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, Haring HU. Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia* 1997; 40: 1358-62.
20. Attoub S, Noe V, Pirola L, Bruyneel E, Chastre E, Mareel M, et al. Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J* 2000; 14: 2329-38.
21. Sobajima T, Aoki F, Kohmoto K. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 389-94.
22. Verlhac MH, de Pennart H, Maro B, Cobb MH, Clarke HJ. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1993; 158: 330-40.
23. Choi T, Fukasawa K, Zhou R, Tessarollo L, Borror K, Resau J, et al. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 7032-5.
24. de Vantery Arrighi C, Campana A, Schorderet-Slatkine S. A role for the MEK-MAPK pathway in

- okadaic acid-induced meiotic resumption of incompetent growing mouse oocytes. *Biol Reprod* 2000; 63: 658-65.
25. Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, Graham L, Danforth D, Huey S, et al. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril* 1999; 72: 1024-6.
 26. Butzow TL, Moilanen JM, Lehtovirta M, Tuomi T, Hovatta O, Sieberg R, et al. Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3135-9.
 27. Brannian JD, Zhao Y, McElroy M. Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum Reprod* 1999; 14: 1445-8.
 28. Bachvarova R, De Leon V. Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Dev Biol* 1980; 74: 1-8.
 29. Flach G, Johnson MH, Braude PR, Taylor RS, Bolton VN. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J* 1982; 1: 681-6.
 30. Heim MH. The Jak-STAT pathway: cytokine signaling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res* 1999; 19: 75-120.
 31. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. 1995; *Cell* 82: 241-50.
 32. Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol* 2000; 10: 47-50.
 33. Cross DA, Smythe C. PD 98059 prevents establishment of the spindle assembly checkpoint and inhibits the G2-M transition in meiotic but not mitotic cell cycles in *Xenopus*. *Exp Cell Res* 1998; 241: 12-22.
 34. Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, et al. Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *Biol Chem* 2000; 275: 11348-54.
 35. Smitz J, Cortvrindt R, Hu Y. Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotrophin improves meiotic progression in mouse follicle-enclosed oocyte culture. *Hum Reprod* 1998; 13: 664-9.
 36. Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 1996; 54: 1420-9.
 37. Downs SM. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biol Reprod* 1989; 41: 371-9.
 38. Puscheck EE, Patel Y, Rappolee DA. Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-4, but not FGFR-3 is expressed in the pregnant ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 132: 169-76.
 39. Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A, Watanabe S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 109-16.
 40. Zhao H, Luo L, Liu Y. Experimental study on the effect of insulin-like growth factor-I on maturation fertilization and cleavage of murine oocytes in vitro. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1997; 32: 586-8.
 41. Fedorushchenko AN, Koval' TI, Khamidov DK. The effect of a nerve growth factor from different biological sources on the spontaneous maturation of mouse oocytes and on the parthenogenetic activation of pronucleus formation. *Tsitologija* 1996; 38: 1211-6.
 42. Fedorushchenko AN, Koval TI, Khamidov DK. The effect of in-situ nerve growth factor from different

biological sources on the reinitiation of mouse
oocyte meiotic maturation in culture and on parthe-

nogenetic activation. *Ontogenez* 1999; 30: 453-5.

