大韓不妊學會誌: 第32卷 第3號 2005
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 32, No. 3, 2005, 9

쥐의 초기 난포 발달에 관여하는 Cell Size Growth 및 CCN Family 유전자에 관한 연구

포천중문의과대학교 생명과학전문대학원[1], 차병원 여성의학연구소[2]

김경화[1] · 박창은[1,2] · 윤세진[2] · 이경아[1,2]

Characterization of Genes Related to the Cell Size Growth and CCN Family According to the Early Folliculogenesis in the Mouse

Kyeoung-Hwa Kim[1], Chang-Eun Park[1,2], Se-Jin Yoon[2], Kyung-Ah Lee[1,2]

Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University College of Medicine [1]Infertility Medical Center, CHA General Hospital[2]

Objectives: Previously, we sought to compile a list of genes expressed during early folliculogenesis by using cDNA microarray to investigate follicular gene expression and changes during primordial-primary follicle transition and development of secondary follicles (Yoon et al., 2005). Among those genes, a group of genes related to the cell size growth was characterized during the ovarian development in the present study.

Methods: We determined ovarian expression pattern of six genes related to the cell size growth (cyr61, emp1, fhl1, socs2, wig1 and wisp1) and extended into CCN family (connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma-overexpressed), ctgf, nov, wisp2, wisp3, including cyr61 and wisp1 genes. Expression of mRNA and protein according to the ovarian developmental stage was evaluated by *in situ* hybridization, and/or semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), and immunohistochemistry, respectively.

Results: Among 6 genes related to the cell size growth, cyr61 and wisp1 mRNA was detected only in oocytes in the postnatal day5 mouse ovaries. cyr61 mRNA expression was limited to the nucleolus of oocytes, while wisp1 was expressed in the cytoplasm and nucleolus of oocytes, except nucleus. cyr61 mRNA expression, however, was found in granulosa cells from secondary follicles. The rest 4 genes in the cell size growth group were detected in oocytes, granulosa and theca cells. Cyr61 and Wisp1 proteins were expressed in the oocyte cytoplasm from primordial follicle stage. Especially, Cyr61 protein was detected in pre-granulosa cells, Wisp1 protein was not. By using RT-PCR, we evaluated and decided that Cyr61 protein is produced by their own mRNA in pre-granulosa cells that was not detected by *in situ* hybridization. cyr61 and wisp1 genes are happen to be the CCN family members. The other members of CCN family were also studied, but their expression was detected in oocytes, granulose and theca cells.

Conclusions: We firstly characterized the ovarian expression of genes related to the cell size growth

주관책임자: 이경아, 우) 135-081 서울시 강남구 역삼1동 606-13, 포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소
Tel: (02) 3468-3440, Fax: (02) 563-2028, e-mail: leeka@ovary.co.kr
*이 논문은 2004년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2004-041-E00189).

and CCN family according to the early folliculogenesis. Cyr61 protein expression in the pre-granulosa cells is profound in meaning. Further functional analysis for cyr61 in early folliculogenesis is under investigation.

Key Words: Early folliculogenesis, Cell size growth, cyr61, wisp1, CCN family

포유류의 난소에 존재하는 제한된 수의 원시난포들은 태어날 때 성장이 정지되어 있는 상태로 존재하며, 이때 난자는 감수분열 전기의 diplotene 시기에 멈춰있는 상태다. 난포의 성장 과정은 난자와 난자 주변을 둘러싸고 있는 과립 세포 (granulosa cells)와 협막 세포 (theca cells)의 상호 협동 과정에 의해 이루어진다. 원시난포가 1차 난포로 성장을 재개하게 되면 난자를 둘러싸고 있는 몇 개의 pre-granulosa cell이 입방형으로 변화하게 되고, 휴면 상태의 난자 또한 성장을 시작하게 된다.[1] 여성의 가임기간 동안 몇 백 만개의 난포는 두 번의 선택 과정에 의해 400~500개의 난포만이 배란되고 나머지는 atresia라는 일종의 세포사멸 과정에 의해 소멸되게 된다.[2] 난포 발달 과정은 다양한 요소에 의해 조절이 되며 이 과정에서 처음으로 대두 되는 문제는 원시난포의 휴면 상태 유지와 성장 개시의 조절이 어떠한 방법으로 이루어지는가 하는 것이다.

현재까지 후기 난포 발달에 관한 연구는 많이 진행되어 있는 반면 초기 난포 발달에 관한 연구는 그 의미가 매우 중요한 과정임에도 불구하고 상대적으로 미흡한 상태이다.[3,4] 본 연구실에서는 이전의 실험에서 원시난포와 1차 난포 그리고 2차 난포를 분리하고 cDNA microarray를 시행하여 초기 난포 발달 과정에 따라 다르게 발현하는 유전자의 목록을 얻었다.[5] 본 연구는 이렇게 얻어진 cell size growth에 관련된 유전자들과 이 유전자들 중 cyr61과 wisp1이 포함되어 있는 CCN family 유전자들이 원시난포 성장과 발달에 어떻게 연관되어 있는지 알아보기 위해 수행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 실험 동물 및 total RNA 분리

생후 1일, 5일, 2주령, 3주령, 그리고 4주령 된 ICR 생쥐의 암컷으로부터 얻은 난소에 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 용액을 넣고 균질화 시킨 후 상온에서 5분간 두었다가 15분 후 4℃에서 12,000 g로 20분간 원심분리한 뒤, RNA를 포함하는 무색의 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 여기에 동일한 양의 isopropanol과 15 μg/μl의 glycoblue (Ambion, Austin, TX) 1 μl를 첨가하여 상온에서 10분간 두었다가 4℃에서 12,000 g로 10분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 따라 버린 후 75% ethanol을 넣고 4℃에서 10분간 8,000 g로 원심분리하여, RNA 침전물을 공기 중에서 건조 시킨 후 DEPC 처리된 증류수로 용해시켜 사용 전까지 -70℃에 보관하였다.

2. *In situ* hybridization

생쥐 난소 조직을 4% paraformaldehyde에서 하루 동안 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하였으며, 파라핀 침투 조직은 5 μm 두께의 연속 절편을 슬라이드 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 부착하여 사용 전까지 4℃에서 보관하였다. RNA probe는 in vitro transcription kit (Promega, Madison, WI)을 이용하여 제작하였다. 이때 1 μg/μl DNA template (1 μl), 5X Trans buffer (4 μl), RNAsin (2 μl), T7 또는 SP6 RNA polymerase (2 μl), DIG RNA labeling mix (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; 2 μl), 100 mM DTT (2 μl) 및 DEPC-H_2O를 전체 20 μl가 되도록 첨가하여 37℃에서 6시간 이상 합성한 후, RNase-free DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 처리하였다. 합성된 RNA probe의 생성 효율을 확인하기 위하여 반응물 1 μl를 1% agarose gel에 전기 영동하여 확인하였다. Probe 반응물을 G-50 Columns (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ)으로 정제한 후 농도가 100 μg/ml이 되도록 Hybe buffer (50% formamid, 5X SSC, 1 μg/ml Torula yeast RNA, 100 μg/ml heparin, 1X Denhardt's solution, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 0.5 mM EDTA)로 희석하였다. 파라핀 절편 슬라이드를 Xylene에 처리하여 파라핀을 제거하고, 알코올 처리 과정과 D-PBS 용액에 세척한 후, 4% paraformal-

dehyde 용액으로 실온에서 10분간 재고정 하였다. 그리고 0.1 M triethanolamine (TEA) 용액으로 5분간 반응시키고, 0.25% acetic acid가 포함된 0.1 M TEA 용액으로 실온에서 10분간 처리하였다. 알코올 처리 과정을 거쳐 탈수시킨 후 Hybe buffer에 RNA probe를 희석하여 조직 위에 처리하였다. RNA probe를 처리한 후 조직이 마르지 않도록 파라 필름을 덮어서 65℃ humid chamber에서 하루 동안 반응시켰다. 이후 65℃로 예열된 2X SSC-50% formamide 용액으로 30분간 처리한 후 blocking reagent (20% sheep serum, 2% BMB; Boehringer Mannheim Blocking buffer)가 들어있는 MAB (100 mM maleic acid in 150 mM NaCl, pH 7.5) 용액으로 실온에서 1시간 반응시켰다. 여분의 용액을 제거하고 anti-DIG alkaline phosphatase-conjugated Fab antibody fragments (anti-DIG-AP, Roche, Indianapolis, IN, 1:1000)를 blocking reagent가 포함된 MAB 용액으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. MAB 용액으로 10분씩 4회 수세하고 BCIP-NBT (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)로 실온에서 1시간 발색시켰다. 발색 후 PBS로 수세하고, Nuclear Fast Red로 대조 염색 후 수용성 봉입제 (DAKO, Carpinteria, CA)로 봉입하였다.

3. Immunohistochemistry

ICR 생쥐의 생후 5일과 2주령 난소 조직을 10% neutrally buffered formalin에서 하루 동안 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하였으며, 파라핀 침투 조직은 5 μm 두께의 연속 절편을 슬라이드 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 부착하여 사용 전까지 4℃에서 보관하였다. 파라핀 절편 슬라이드를 Xylene에 처리하여 파라핀을 제거하고, 알코올 처리 과정을 거친 후, 3% H_2O_2가 포함된 methanol 용액으로 실온에서 20분간 방치하여 내인성 peroxidase 활성을 억제시킨다. Blocking buffer (DAKO, Carpenteria, CA)로 실온에서 15분간 처리한 후 Cyr61 항체 (H-78, sc-13100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa cruz, CA)와 Wisp1 항체 (H-57, sc-25441, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa cruz, CA)를 dilution buffer로 희석하여 실온에서 1시간 동안 처리하였다. PBS로 슬라이드를 세척하고, biotin이 부착된 2차 항체를 실온에서 20분간 처리한 후 streptavidin-biotin-peroxidase 혹은 alkaline phosphatase complex로 실온에서 20분간 반응시켰다. Peroxidase 활성은 AEC+ (DAKO, Carpenteria, CA)로 alkaline phosphatase 활성은 Nuclear Fast Red (DAKO, Carpinteria, CA)를 이용하여 발색하였다. 발색 후 멸균된 3차 증류수로 세척하고 hematoxylin으로 대조 염색 후 수용성 봉입제로 봉입하였다. 음성 대조군 슬라이드는 1차 항체를 처리하지 않은 dilution buffer로 반응시켰다.

4. 원시난포의 난자와 pre-granulosa cells이 포함된 somatic cell의 분리

생후 1일된 ICR 생쥐의 난소 10개에서 물리적·효소적인 방법으로 난자와 pre-granulosa cell이 포함된 somatic cell을 분리하였다.[6] 분리된 단일 세포를 하루 동안 배양하면 somatic cell은 배양 접시에 붙게 되는 반면 난자는 붙지 않아 분리가 용이하게 된다. 이렇게 원시난포에서 분리한 난자와 pre-granulosa cell이 포함된 somatic cell을 250 μl lysis/binding buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM DTT)에 용해하고 5분 후 Dynabeads mRNA Direct Kit를 이용해 mRNA를 추출하였다.[7] 전 처리된 20 μl의 dynabeads oligo (dT_{25})와 함께 실온에서 5분간 합성한 후, Dynal MPC-S (magnetic particle concentrator)에 의해 bead를 포획하고 2번의 세척 과정을 거친다. poly(A)+ RNAs는 10 μl Tris-HCl (10 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 첨가하고 65℃에서 2분간 방치한 후 정제된 mRNA를 얻은 즉시 semiquantitative RT-PCR을 수행하였다. 전체 반응 용액이 20 μl가 되도록 DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) (1 U/μl)이 처리된 total RNA에 oligo ($dT)_{20}$ (1 μl)를 첨가하여 70℃에서 10분간 수행하고, M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) 200 U/μl (1 μl), 5X RT buffer (4 μl) 10 mM dNTP (1 μl), DEPC-treated water (2 μl)를 첨가하여 42℃에서 1시간, 94℃에서 2분간 반응하여 역전사 반응을 수행하였다. PCR은 cDNA 1 μl에 각 유전자의 25 pmol forward/reverse primer (1 μl), 25 mM $MgCl_2$ (2 μl), 10X buffer (2 μl), 10 mM dNTP (0.4 μl), 5 U/μl Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI) (0.2 μl), 그리고 멸균된 3차 증류수로 전체 반응 용액을 20 μl으로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분,

94℃에서 40초, 각 annealing 온도에서 40초, 72℃에서 40초, 72℃에서 2분간 수행하였다. PCR 수행 후 최종산물 확인은 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 각 유전자의 발현을 분석하였다.

결 과

1. Cell size growth 관련 유전자

cDNA microarray 방법으로 얻어진 결과 중에서 cell size growth에 관련된 유전자는 9개 였으며 이들 중 3개의 유전자 (igfbp2, igfbp5, riken cDNA 2010308M01)를 제외한 6개의 유전자 (cyr61, emp1, fhl1, socs2, wig1, wisp1)를 대상으로 연구를 수행하였다. Heat map 결과, cyr61, fhl1, emp1, wig1, wisp1은 원시난포에서 2차 난포로 성장할 때까지 계속적으로 증가하는 반면 socs2의 경우에는 원시난포에서 1차 난포로 성장하는 시기에는 증가하나 1차 난포에서 2차 난포로 발달하는 시기에는 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 1).

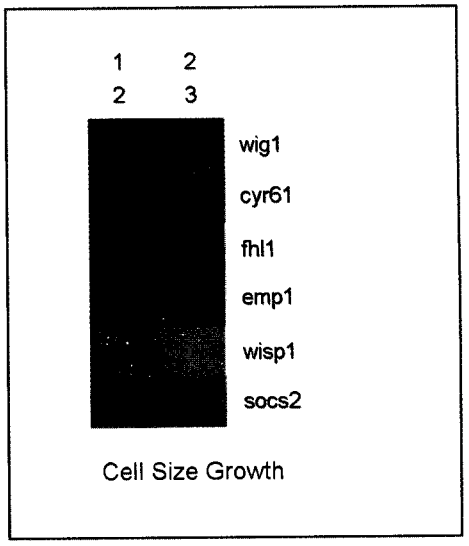

Figure 1. Heat map of genes related to the cell size growth obtained from the previous study (Yoon et al., 2005). Red indicates increase in expression, while green indicates decrease in expression. Numbers on the columns indicating primordial (1), primary (2), and secondary (3) follicles.

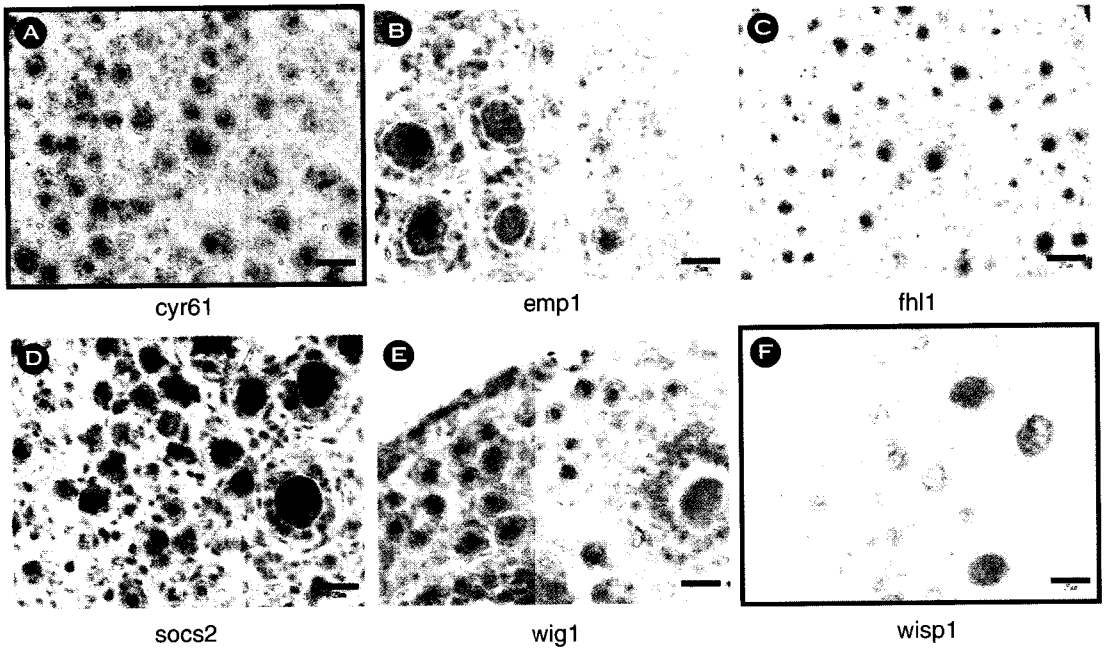

Figure 2. The expression pattern of genes related to the cell size growth in the postnatal day5 mouse ovaries by *in situ* hybridization. Sections were counterstained with nuclear fast red. **(A)** cyr61, **(B)** emp1, **(C)** fhl1, **(D)** socs2, **(E)** wig1, and **(F)** wisp1. Scale bars indicate 25 μm.

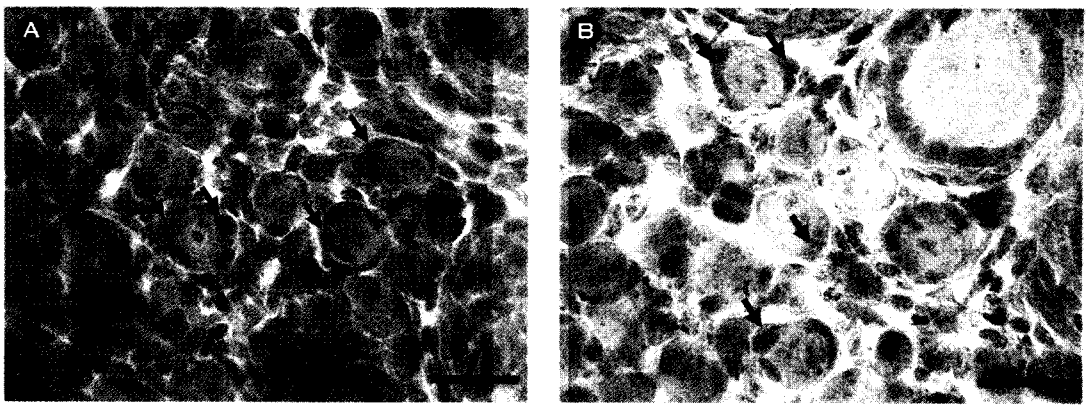

Figure 3. The expression pattern of Cyr61 (**A**) and Wisp1 (**B**) protein in the postnatal day5 mouse ovaries by immunohistochemistry. Sections were counterstained with hematoxylin. Cyr61 protein was expressed in pre-granulosa cells (red arrow). Wisp1 protein was not detected in pre-granulosa cells of the primordial follicle (black arrow), but detected in granulosa cells from primary follicle stage (yellow arrow). Scale bars indicate 25 μm.

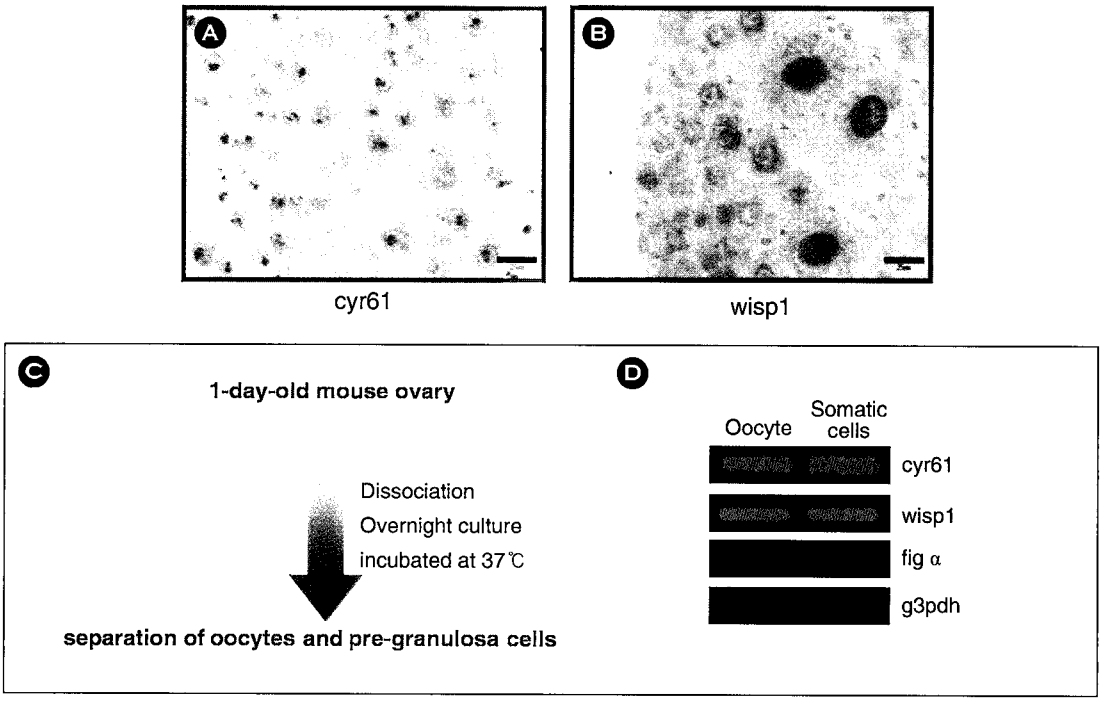

Figure 4. The expression pattern of cyr61 and wisp1 mRNA. cyr61 (**A**) and wisp1 (**B**) mRNA was detected only in oocytes in the postnatal day5 mouse ovaries by *in situ* hybridization. (**C**) The experimental scheme to obtain dissociated oocytes and somatic cells including pre-granulosa cells from neonatal ovaries. (**D**) Relative abundance of cyr61 and wisp1 mRNA in oocytes and somatic cells including pre-granulosa cells from neonatal ovaries by RT-PCR. Expression of the fig α, oocyte specific gene, was measured to confirm the complete separation of oocyte from somatic cell. The expression of g3pdh was used as an internal standard.

2. Cell size growth 관련 유전자의 *in situ* hybridization 발현 양상

생후 5일령 ICR 생쥐 난소에서 6개 유전자에 대한 *in situ* hybridization 결과, cyr61과 wisp1 두 유전자는 난자에서만 발현하는 것을 관찰하였다. 세부적으로 살펴보면, cyr61은 난자의 인과 과립 세포에서 발현하였고 wisp1은 난자의 핵을 제외한 인과 세포질에서 발현하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 cyr61의 경우에는 14일령 생쥐 난소에 존재하는 2차 난포의 과립 세포의 인에서만 발현하는 것을 관찰하였다 (data not shown). 그러나 나머지 네 개의 유전자 (emp1, fhl1, socs2, wig1)는 난자와 과립 세포에서 모두 발현하는 것으로 나타났고 (Figure 2) 더 발달된 난포에서는 협막 세포에서도 발현하는 것을 관찰하였다.

3. Cyr61과 Wisp1 단백질 발현

위의 *in situ* hybridization 연구 결과에 따라, Cyr61과 Wisp1 단백질의 발현 양상을 알아 보기 위해서 immunohistochemistry를 수행하였다. Cyr61의 경우, 원시난포 내 난자의 세포질에서 높게 발현하였고, 특히 pre-granulosa cell에서 강하게 단백질이 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3A). Wisp1의 단백질은 원시난포의 난자 세포질에서는 발현을 확인하였지만 Cyr61과는 다르게 pre-granulosa cell에서 발현을 관찰할 수 없었으며 1차 난포의 과립 세포에서부터 발현이 나타나기 시작하였다 (Figure 3B).

4. Semiquantitative RT-PCR

Pre-granulosa cell에서 발현하는 Cyr61 단백질의 근원을 알아 보기 위해 생후 1일자 생쥐 난소에서

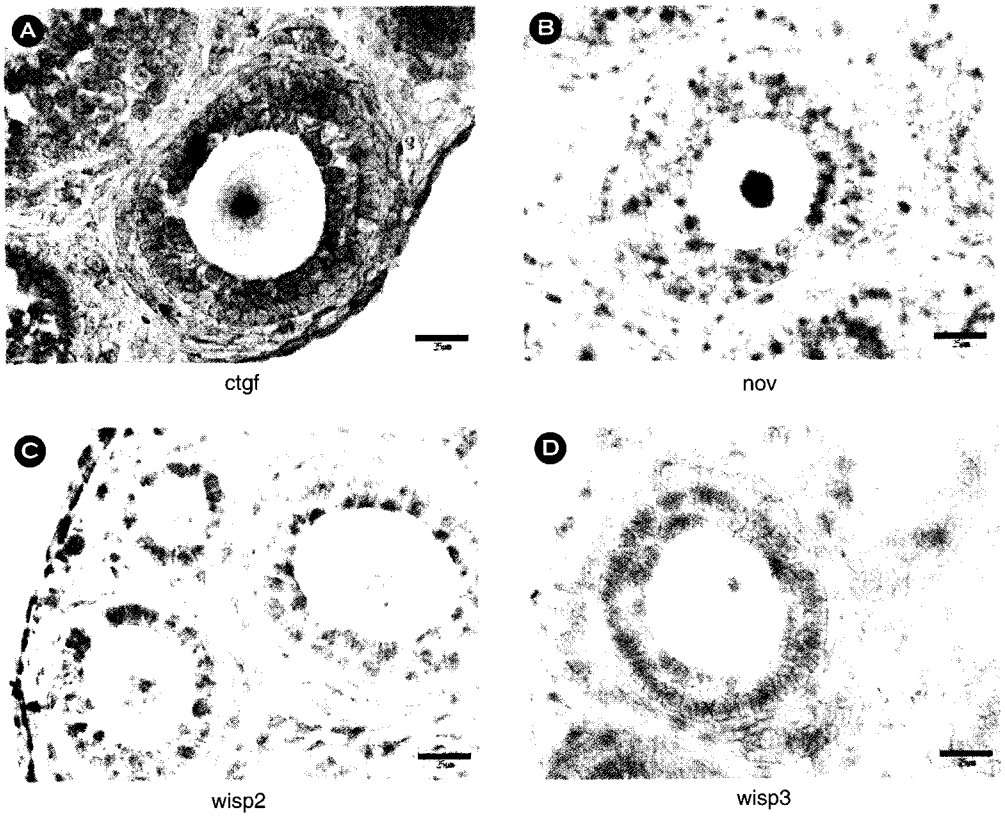

Figure 5. The expression pattern of genes of the CCN family in the postnatal day5 mouse ovaries by *in situ* hybridization. Sections were counterstained with nuclear fast red. **(A)** ctgf, **(B)** nov, **(C)** wisp2, and **(D)** wisp3. Scale bars indicate 25 μm.

난자와 pre-granulosa cell로 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. cyr61과 wisp1의 발현을 관찰한 결과, 두 유전자 모두 원시난포의 난자에서는 물론이고 *in situ* hybridization에서 발견되지 않았던 pre-granulosa cell에서도 발현함을 관찰 할 수 있었다 (Figure 4).

5. CCN family 관련 유전자의 *in situ* hybridization 발현 양상

생후 5일자 난소의 난자에서 발현을 관찰한 cyr61과 wisp1은 흥미롭게도 두 유전자 모두 CCN family의 유전자이다. CCN family에는 두 유전자 외에도 ctgf, nov, wisp2, wisp3가 포함되어 총 여섯 개의 유전자로 구성되어 있다.[8] 그래서 CCN family에 포함되어 있는 다른 유전자들의 난소 내 발현을 관찰하였다.

cyr61과 wisp1을 제외한 CCN family의 나머지 유전자 (ctgf, nov, wisp2, wisp3)에 대한 *in situ* hybridization 수행 결과, 네 개의 유전자 모두 모든 발달 단계의 난자와 과립 세포에서 mRNA가 발현하고 있는 것을 알 수 있었다 (Figure 5).

고찰 및 결론

생쥐 난소의 난포는 태어날 때 원시난포의 상태로 존재하며, 생후 이 원시난포들은 1차 난포로 성장을 시작하며 생후 5일이 지나면 그 이후 단계의 난포로 발달하게 된다. 원시난포가 1차 난포로 성장을 재개하게 되면 난자를 둘러싸고 있는 납작한 모양의 pre-granulosa cell이 입방형으로 변화하게 되고, 휴면 상태의 난자 또한 성장을 시작하게 된다.[1] 즉, 난포 발달 과정 동안에는 난자와 과립 세포 그리고 과립 세포와 과립 세포간의 연계가 매우 중요하다.[9] 이러한 발달 단계를 갖는 생쥐 난소에서 *in situ* hybridization 결과 5일령 ICR 생쥐 난소에서 cyr61과 wisp1 두 유전자는 난자에서만 mRNA가 발현하는 것으로 관찰되었다. 그러나 cyr61은 더 발달된 난포의 과립 세포 인에서도 발현하는 것을 관찰하였다. 또 1일령 ICR 생쥐 난소를 난자와 somatic cell이 포함되어 있는 pre-granulosa cell로 분리하여 RT-PCR을 수행한 결과 두 유전자 모두 *in situ* hybridization에서 발견 되지 않았던 pre-granulosa cell에서도 발현함을 관찰할 수 있었다. RT-PCR 방법은 RNA가 합성 및 증폭되어 적은 양이 존재하더라도 발견 가능하기 때문에 *in situ* hybridization 방법으로 확인하지 못한 것을 확인 가능하게 한 것으로 사료된다.[10] 즉, RT-PCR 방법이 *in situ* hybridization 방법보다 세포 내 RNA를 발견하는데 있어 더 예민한 기술이기 때문에 이러한 결과가 얻어진 것으로 사료된다. 두 단백질의 난소 내 발현 양상을 관찰한 결과, 두 단백질 모두 원시난포의 난자 세포질에서 발현하였다. 한편 Cyr61은 pre-granulosa cell에서도 단백질이 발현하는데 반해 Wisp1은 mRNA가 존재함에도 불구하고 단백질은 발현하지 않은 것을 알 수 있었다. 그렇기 때문에 난자와 pre-granulosa cell에서 Cyr61 단백질이 초기 난포 발달에 있어서 난자 성장과 pre-granulosa cell의 변화 및 분화에 중요한 역할을 수행할 것이라 사료된다.

cyr61과 wisp1 두 유전자는 흥미롭게도 모두 CCN family의 유전자임을 알게 되었다. CCN family는 두 유전자 외에도 ctgf, nov, wisp2, wisp3가 포함되어 총 여섯 개의 유전자로 구성되어 있다.[8] CCN family 유전자에는 38개의 conserved한 cysteine 잔기와 N-terminal secretory signal이 존재하며 IGFBP (insulin-like growth factor binding protein), VWC (Von Willebrand type C), TSP1 (thrombospondin type 1), CT (C-terminal) 등 4개의 공통된 domain을 가지고 있다.[11] 이 중 wisp2만 CT domain을 갖고 있지 않다. CCN family는 estrogen이나 progesterone 같은 호르몬 혹은 transforming growth factor-β (TGF-β)나 bone morphogenetic proteins (BMPs) 같은 성장 요인에 의해 유도되며 세포 표면에 존재하는 integrin과 상호작용한다.[12] 세포 내 기능을 살펴보면 세포 증식, 부착, 이동, 분화, 상처 재생, 혈관 형성 등 다양한 과정에 관계되어 있다고 보고되어 있다.[13]

현재까지 Cyr61 단백질은 platelet-derived growth factor (PDGF)와 basic fibroblast growth factor (bFGF)에 의해 유도되어 세포 표면에 존재하는 $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_6\beta_1$ 같은 integrin과 작용하여 세포와 세포 혹은 세포와 기질 간의 상호 작용이나 세포 증식 등의 역할을 수행하는 것으로 보고되어 있다.[14~16] Pdgf는 5종류의 리간드와 3종류의 수용체가 존재하며 A, B, C 동종이합체와 AB 이종이합체는 αα 수용체와 결

합하는 반면 B, D 동종이합체는 ββ 수용체와 결합하여 역할을 수행한다.[17] 본 연구실에서 수행된 이전 연구 결과 pdgfc는 원시난포의 성장을 유도하였다.[5] 따라서 이 시기에 발현하는 pdgf 및 cyr61이 서로 상호 작용하여 원시난포를 성장과 발달에 중요한 역할을 수행할 것이라 추측할 수 있다.

CCN family는 IGFBP domain을 가지고 있어 Ctgf와 Nov의 경우, 실제 Igfbp에 비해 100~1000배 정도 낮은 효율이지만 Igf와 결합한다고 보고되어 있다.[18,19] Cyr61의 경우는 아직까지 Igf와 결합한다는 보고는 없으나[20] Igf는 초기 난포 발달은 물론 후기 난포 발달에도 중요한 기능을 수행한다고 보고되어 있기 때문에[21] 이에 연관되어서 CCN family의 역할을 배제할 수 없다. 그리고 cyr61 유전자 적중(knockout) 생쥐의 경우 태반 발달과 혈관 형성에 이상이 생겨 배아 발달 단계에서 치사하는 것으로 보고되어 있어 cyr61이 혈관 형성에 매우 중요한 역할을 수행하고 있음을 제시한다.[22]

결론적으로 본 연구 결과, pre-granulosa cell에서의 cyr61 mRNA 및 단백질 발현이 초기 난포 발달 단계에서 매우 중요한 의미를 가질 것으로 사료되며 추후 cyr61의 실질적인 기능 분석에 대한 연구가 진행 되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev Cytol 1991; 124: 43-101.
2. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 2000; 21: 200-14.
3. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. Mol Cell Endocrinol 2000; 163: 53-60.
4. Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Anim Reprod Sci 2003; 78: 135-63.
5. 인쇄중: Yoon SJ, Kim KH, Chung HM, Choi DH, Lee WS, Cha KY, Lee KA. Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary and secondary follicles. Fertil Steril. In press 2005.
6. Eppig JJ, Wigglesworth K. Development of mouse and rat oocytes in chimeric reaggregated ovaries after interspecific exchange of somatic and germ cell components. Biol Reprod 2000; 63: 1014-23.
7. Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, et al. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. Biol Reprod 2001; 65: 309-17.
8. Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. FEBS Lett 1993; 327: 125-30.
9. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 5; 99: 2890-4.
10. Cooper GM, Hausman RE. The cell a molecular approach. 3nd ed. Washington: ASM press; 2004.
11. Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. Endocr Rev 1999; 20: 189-206.
12. Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package. J Endocrinol 2003; 178: 169-75.
13. Perbal B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. Mol Pathol 2001; 54: 57-79.
14. Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. Exp Cell Res 1999 10; 248: 44-57.
15. Perbal B, Brigstock DR, Lau LF. Report on the second international workshop on the CCN family of genes. Mol Pathol 2003; 56: 80-5.
16. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. Endocr Rev 1999; 20: 761-87.
17. Mariani S, Basciani S, Arizzi M, Spera G, Gnessi L. PDGF and the testis. Trends Endocrinol Metab 2002; 13: 11-7.
18. Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins

(IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 12981-6.

19. Burren CP, Wilson EM, Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. Binding properties and distribution of insulin-like growth factor binding protein-related protein 3 (IGFBP-rP3/NovH), an additional member of the IGFBP Superfamily. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 1096-103.
20. Perbal B. The CCN family of genes: a brief history. Mol Pathol 2001; 54: 103-4.
21. Monget P, Bondy C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol 2000; 163: 89-93.
22. Mo FE, Muntean AG, Chen CC, Stolz DB, Watkins SC, Lau LF. CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. Mol Cell Biol 2002; 22: 8709-20.