

## 생쥐 착상전 배아에서 산화적 스트레스에 의한 ATF4 유전자의 발현과 존재 부위

나원흠 · 강한승 · 어진원 · 계명찬 · 김문규<sup>†</sup>

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

### Expression and Localization of ATF4 Gene on Oxidative Stress in Preimplantation Mouse Embryo

Won-Heum Na, Han-Seung Kang, Jin-Won Eo, Myung-Chan Gye and Moon-Kyoo Kim<sup>†</sup>

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791

**ABSTRACT** : Reactive oxygen species(ROS) generated in cellular metabolism have an effect on cell maturation and development. In human reproductive tract, oxidative injury by ROS may induce female infertility. Also, oxidative injury may be responsible for developmental retardation and arrest of mammalian preimplantation embryos. Activating transcription factor 4(ATF4) is a member of the cyclic-AMP response element-binding(CREB) family of basic region- leucine zipper(bZip). ATF4 is known to regulate stress response to protect cell from various stress factors and inducer of apoptosis. The purpose of this study was to investigate whether ATF4 is involved in the defensive mechanism in oxidative stress condition during the development of mouse preimplantation embryos. To verify the expression of ATF4 in oxidative stress condition, 2-cell stage embryos were cultured in HTF media containing 0.1mM, 0.5mM or 1mM hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 1hr(2-cell), 8hr(4-cell), 17hr(8-cell), 24hr(morula), 48hr(early blastocyst) or 64hr(late blastocyst). The developmental rate decreased in the 0.1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated group compared with control group. In embryos treated with 0.5mM and 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed 2-cell block. As a results of the semi-quantitative RT-PCR analysis of SOD1, ATF4 and Bax gene expression, SOD1, ATF4 and Bax genes were increased in 0.1mM, 0.5mM, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated groups compared with control group. In 2-cell embryos, expression of SOD1, ATF4 and Bax genes were notably increased in 0.1mM, 0.5mM, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated groups compared with control group. Immunofluorescence analysis showed that ATF4 protein was localized at the cytoplasm of preimplantation embryos. The increase in ATF4 immunoreactivity was observed in the 0.1mM, 0.5mM, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated groups compared with control group. It suggests that oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces expression of ATF4 and may be involved in protection mechanism in preimplantation embryos from oxidative injury.

**Key words** : ROS, ATF4, SOD1, Bax, Oxidative stress, Preimplantation, Embryo.

**요 약** : 세포의 대사과정에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species : ROS)은 세포의 성숙과 발생 과정을 저해하며, 인간의 생식 수관에서 불임의 원인이 된다. 많은 세포생물학적 연구를 통해 ROS에 대한 세포 내의 보호 기작이 밝혀지고 있다. Activating transcription factor 4(ATF4)는 세포 내에서 산화적 스트레스를 비롯한 여러 스트레스 요인으로부터 세포를 보호하는 기작에 관여하는 중요한 인자로서, 스트레스에 의한 세포 사멸을 유도하는 유전자의 활성화와 관련이 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 착상 전 초기 배아의 발생 단계에서 ROS에 의한 산화적 스트레스가 배아의 발생에 영향을 준다는 보고와 관련하여 생쥐 초기배아에 산화적 스트레스 요인인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(hydrogen peroxide)를 처리한 후 ATF4 유전자의 발현 변화를 추적하였으며, ROS 방어에 관여하는 SOD1 유전자와 apoptosis 유전자인 Bax의 발현 양상을 함께 비교하였다. 또한 면역형광염색법을 이용하여 착상전 초기배아의 ATF4 단백질 발현 부위를 조사하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0.1 mM 농도로 처리한 2-세포기 배아에서는 처리 8시간 후인 4-세포기 단계부터 발생율이 감소하기 시작하였으며, 0.5 mM과 1.0 mM 농도에서는 배아의 발생이 진행되지 않았다. RT-PCR결과 SOD1 유전자의 발현은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 모든 그룹에서 처리 1시간째인 2-세포기 배아단계에서 대조군보다 증가하였으며, ATF4 유전자 역시 2-세포기 배아단계에서 발현이 증가하였다. Bax 유전자도 동일한 시기에 발현이 증가하였다. ATF4 단백질의 배아 세포 내 발현부위는 스트레스 방어 기작

이 주로 일어나는 세포질에서 많이 발현이 되었으며 포배기 배아에서는 내세포피(inner cell mass)부위 보다는 영양외배엽(trophectoderm)에서 발현됨을 확인하였다. 2-세포기 배아에서 ATF4 immunoreactivity는 모든 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>농도 처리군에서 대

<sup>†</sup> 교신저자: 서울시 성동구 행당동 17, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791, (전) 02-2220-0954, (팩) 02-2295-1960, E-mail : kimmk@hanyang.ac.kr

조근보다 증가하였다. 이상의 결과에서, 착상 전 초기 배아에서 ROS에 의해 ATF4 발현이 유도됨을 확인하였다. 따라서 산화적 스트레스에 대해 배아를 보호하기 위한 방어 기작에 ATF4가 관여하는 것으로 사료되며, 세포 사멸 유전자의 발현 과도 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다

## 서 론

호기성 상태에서 세포들은 끊임없이 산소와 직면하게 되며, 산소는 세포의 생명 유지에 필요한 요소 중 하나이다. 그러나 활성 산소종(ROS : reactive oxygen species)이 생성되는 이러한 산소의 대사과정은 세포기능의 변형이라든지 세포의 생존에 위협을 줄 수 있는 요인으로 작용한다. ROS는 산소의 환원 과정에서 생성되는 super oxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical(OH)과 같은 물질들을 말하며, 이러한 산화물들은 세포에 스트레스를 주는 주요 원인이 된다(Agarwal, 2003; Wuenschell *et al.*, 2004). 산화적 스트레스는 백내장, 동맥경화, 암, 당뇨병, 내장기관 질환, 피부 노화, 알츠하이머 및 신경 질환과 관련이 있다고 보고되었다(Stohs, 1995; Ornoy *et al.*, 1999). 또한 사람에게 있어서 생식능력에 영향을 주어 남성과 여성의 정자의 질 및 생식수관에 영향을 미쳐 불임의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Sikka, 1996; Agarwal & Allamaneni, 2004; Agarwal & Said, 2005; Agarwal *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2005; Said *et al.*, 2005).

착상 전 초기배아 단계에서 ROS는 산화적 인산화(OXPHOS: oxidative phosphorylation), NADPH oxidase, xanthine oxidase와 같은 배아 내부에서 진행되는 대사작용과 효소작용을 통해 생성되며, 난포액이나 난관액으로부터 만들어진다(Guerin *et al.*, 2001; Pasqualotto *et al.*, 2004; Wiener-Megnazi *et al.*, 2004). 또한 자궁과 자궁내막조직에서도 스테로이드 호르몬에 의해 ROS가 생성이 되며, 산화적 스트레스에 대한 방어 기작이 일어난다고 보고되었다(Laloraya *et al.*, 1988; Nomura *et al.*, 1996; Jain *et al.*, 2000). 이전 연구에 의하면 착상 전 초기배아에서 OXPHOS 과정을 저해할 경우, ROS의 생성이 감소하여 착상전 초기배아의 발생에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 알려지고 있으며(Thompson *et al.*, 2000), 착상 전 초기배아에서 관찰되는 NADPH oxidase, xanthine oxidase와 같은 산화효소들의 활성을 저해할 경우, ROS의 생성이 감소하여 착상 전 초기배아의 발생에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(Filler & Lew, 1981; Guerin *et al.*, 2001). ROS에 의한 산화적 스트레스가 배아의 발생에 미치는 영향에 대해서는 여러가지

가 알려져 있는데, 생쥐 배아 발생에 중요한 기능을 하는 전사인자가 유전자 발현에 심각한 영향을 준다고 알려져 있으며(Agarwal *et al.*, 2005), 세포막에 손상을 주고(Aitken *et al.*, 1989; Halliwell & Chirico, 1993), 정상적인 배아의 발생을 저해하기도 하며(Guerin *et al.*, 2001; Harvey *et al.*, 2002), apoptosis를 유발한다는 결과도 있다(Yang *et al.*, 1998). 하지만 이러한 ROS의 영향에 대해 배아를 보호하기 위한 기작들도 동시에 작용하는 것으로 알려져 있다. 보호기작에는 생성된 ROS를 감소시켜 주기 위해 superoxide-dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GPX) 같은 antioxidant enzyme이 활동하게 되며(Harvey *et al.*, 1995; Mouata-sim *et al.*, 1999), 산화적 스트레스를 감소시키기 위한 여러 전사인자와 유전자들의 조절이 진행된다(Denney, 2004).

Activating transcription factor 4(ATF4)는 cyclic-AMP response element-binding(CREB) transcription factor family 중의 하나로서, 외부로부터 들어오는 스트레스에 반응하여 세포의 손상을 감소시키거나 apoptosis를 유발하는 특이적 유전자들을 활성화시키는 과정을 조절하는 전사인자이다(Harding *et al.*, 2000; Rutkowski & Kaufman, 2003; Vattem & Wek, 2004). ATF4는 산화적 스트레스(Harding *et al.*, 2003)를 비롯하여 영양소의 결핍(Siu *et al.*, 2002), 자외선의 노출(Jiang & Wek, 2005), 저산소증(Blais *et al.*, 2004)과 같은 주변 환경 조건에서 오는 스트레스를 줄여주기 위한 전사 인자로서 알려져 있다.

따라서 본 연구의 목적은 생쥐의 착상전 배아 발달 과정에서 산화적 스트레스를 가하였을 때 배아에서의 ATF4 및 antioxidant enzyme 유전자인 SOD1의 발현 양상을 살펴보고자 한다. 그리고 apoptosis 유전자인 Bax의 발현 양상도 알아봄으로써 ATF4와 Bax와의 상관관계에 대해서도 알아보고자 한다. 면역형광염색을 통하여 착상전 배아에서의 ATF4의 발현 양상과 존재 부위가 산화적 스트레스 상태에서 어떠한 변화를 나타내는지에 대해서도 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 배아의 획득

실험동물로 ICR계 생쥐를 사용하였으며, 광주기는 명

14시간, 암 10시간으로 하였으며, 물과 먹이를 충분히 공급하여 사육하였다. 암컷은 생후 6~8주, 수컷은 10~12주된 것을 사용하였다. 2-세포기 배아를 얻기 위해 암컷의 복강에 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma) 5 I.U.를 주사하고, 48 시간후에 human chorionic gonadotrophin (hCG, Sigma) 5 I.U.를 주사하여 과배란을 유도한 후 수컷과 합사시켰다. 다음날 질전이 확인된 암컷들을 hCG 주사 후 48 시간째에 도살하여 수란관과 자궁의 상반부를 적출하였다. HEPES-buffered M2 배양액이 담겨져 있는 조직배양접시에 적절한 수란관을 옮겨 담은 후 멸균한 파스퇴르 피펫을 이용해 배양액으로 관류시켜 배아를 수확하였다. 생쥐의 난관에서 얻은 2-세포기 배아 중에서 현미경 관찰에서 배아의 상태가 좋은 것을 선별하여 배양실험에 이용하였다.

## 2. 배아의 배양

배양액으로는 human tubal fluid (HTF, SAGE)를 사용하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 2-세포기 배아를 대조군과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 실험군(0.1mM, 0.5mM, 1.0mM)으로 나누어 배양하였다. 배양 후 1시간 (2-cell embryo), 8시간 (4-cell embryo), 17시간 (8-cell embryo), 24시간 (morula), 48시간 (early blastocyst), 65시간 (late blastocyst)째에 대조군 및 실험군에서 배아를 획득하여 PBS 용액으로 3회 수세한 후 20개의 배아를 TRI Reagent 300 µL가 담겨져 있는 1.5mL tube에 넣은 후, -80°C에 보관하였다.

## 3. Total RNA 추출

TRI Reagent에 보관된 배아가 잘 분쇄되도록 15초 동안

vortexing을 수행하였다. Chloroform 60 µl를 첨가하여 잘 섞어준 후 4°C 14,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 1.5mL tube에 분주하였다. 상층액에 isopropanol 100 µL를 넣고 잘 섞어준 다음 4°C 14,000rpm에서 10분간 원심분리를 시행하여 total RNA 침전물을 얻었으며, 침전물은 75% Et-OH 1mL로 침전물을 행군 후, 건조시켰다. 건조된 RNA 침전물은 DEPC(diethyl pyrocarbonate, Sigma) 처리한 증류수에 용해하여 실험에 사용하였다.

## 4. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

Total RNA는 95°C에서 5분간 가열한 후, 10×RNA PCR buffer 4 µL, 25mM MgCl<sub>2</sub> 8 µL, 10mM dNTP mixtures 4 µL, 50 µmol Oligo dT 0.5 µL, RNase inhibitor 10U, MULV reverse transcriptase 50U을 혼합하여 최종 volume 40 µL로 42°C에서 60분 동안 반응하여 cDNA를 합성하였다. PCR 반응은 Taq DNA polymerase 1U, 10×RNA PCR buffer 2 µL, 2.5mM dNTP mixtures 1.6 µL, primer 40 pmol과 cDNA 2 µL를 넣은 후 volume을 20 µL로 맞춘 후 PCR을 수행하였다. PCR에 사용한 primer 들은 바이오니아 (대전, 한국)에서 합성하여 사용하였다 (Table 1). PCR 반응에서 annealing 온도는 ATF4, rpL7(65°C), Bax(58°C), SOD1 (59.5°C)로 설정하였으며, 반응 횟수는 ATF4(44회), rpL7 (38회), bax(36회) SOD1(36회)로 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, densitometric analysis 과정을 거쳐 발현양을 비교 분석하였다.

## 5. 면역 형광 염색 분석(Immunofluorescence Analysis)

대조군과 실험군의 배아를 acid tyrode solution(Sigma)

Table 1. The primer sequence for RT-PCR and the size of their amplification products

|      | Gene    | Primer sequence               | Product size(bp) |
|------|---------|-------------------------------|------------------|
| rpL7 | Forward | 5'-TCAATGGAGTAAGCCCAAAG-3'    | 246bp            |
|      | Reverse | 5'-CAAGAGACCGAGCAATCAAG-3'    |                  |
| ATF4 | Forward | 5'-GCCCCACAACATGACCGAGA-3'    | 265bp            |
|      | Reverse | 5'-CCAACATCCAATCTGTCCCG-3'    |                  |
| BAX  | Forward | 5'-GCAAACACTAGAAGAGGGCAACC-3' | 161bp            |
|      | Reverse | 5'-CGGCGAATTGGAGATGAACTG-3'   |                  |
| SOD1 | Forward | 5'-TGAAAGCGGTGTGCGTGCTGAAG-3' | 329bp            |
|      | Reverse | 5'-GGAATGCTCTCCTGAGAGTGAGA-3' |                  |

에 15초간 배아를 노출시켜서 배아의 투명막을 제거하였다. 투명막을 제거한 배아는 1×PBS에 녹여진 2% paraformaldehyde에 옮기고 4°C에서 1시간 동안 고정하였다. 고정된 배아는 0.1% BSA가 첨가된 1×PBS에 5분간 3회 수세를 한 후, permeabilization buffer(1% BSA, 0.1% Triton X-100 in 1×PBS)에 넣고 4°C에서 30분간 처리하였다. 이 후 Blocking buffer(1% BSA in 1×PBS)로 옮겨 4°C에서 30분간 처리한 후, ATF4 primary antibody를 0.1% BSA가 첨가된 1×PBS에 1:20으로 희석하여 4°C에서 12시간 처리하였다. 0.1% BSA가 첨가된 1×PBS에 5분간 3회 수세한 후, FITC-conjugated secondary antibody를 0.1% BSA가 첨가된 1×PBS에 1:50으로 희석하여 4°C에서 4시간 동안 처리하고 미리 준비해 놓은 dot slide에 0.1% BSA가 첨가된 1×PBS 10 μL를 분주한 후 배아를 옮겨 넣고 cover glass를 덮은 후 건조시켰다. 면역 형광 염색을 통한 발색의 확인은 FLUOVIEW FV300 Confocal Laser Scanning Microscope(Olympus)를 통해서 확인하였으며, immunoreactivity 측정은 FLUOVIEW FV300 Image Analysis program(Olympus)을 이용하였다.

## 6. 통계적 검정

각각의 실험은 5회 반복하여 수행하였다. 배아의 발생율, RT-PCR 산물의 densitometric analysis와 면역 형광염색의 immunoreactivity 의 통계적 분석을 위해서는 Student *t*-test를 이용하였다. 이때  $p < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 산화적 스트레스가 생쥐의 착상 전 배아 발생에 미치는 영향

산화적 스트레스 인자인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생쥐의 착상 전 배아의 배양액에 0.1mM, 0.5mM, 1.0mM의 농도로 처리를 하여 각각의 실험군을 대조군과 발생 단계별로 비교하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에 따른 배아의 형태학적 변화는 대조군 및 0.1mM 농도에서는 정상적으로 발생을 하는 것으로 나타났으나, 0.5mM, 1.0mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 배아의 발생은 처리 1시간째부터 할구의 크기가 대조군에 비해 현저히 감소하며 발생이 진행되지 않았다(Fig. 1). 대조군과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1mM 농도에서의 배아의 발생율은 1시간째인 2-세포기 상태에서는 모든 배아가 정상적인 형태를 유지하고 있었으나, 8시간째인 4-세포기에 이르면 0.1mM 농도의 실험군에서 2-cell block의 현상이 관찰되었고, 대조군의 91.1%보다 낮은 81.8%의 발생율을 나타내었다(Table 2). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 17시간째인 8-세포기에서

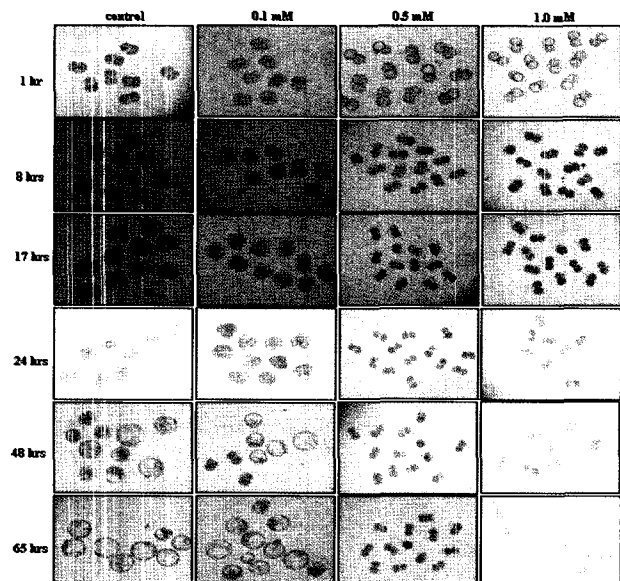


Fig. 1. Effect of hydrogen peroxide on development of mouse embryos. As oxidative stress factor, 0.1mM, 0.5mM, 1.0mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were treated in control media.

Table 2. Effect of hydrogen peroxide on development of the preimplantation mouse embryos *in vitro*

| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treatment | Total embryo | Embryo development (%) |                |                 |                 |                     |                    |
|---|--------------|------------------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|
|   |              | 1 hr (2-cell)          | 8 hrs (4-cell) | 17 hrs (8-cell) | 24 hrs (morula) | 48 hrs (early Bla.) | 65 hrs (late Bla.) |
| Control                                 | 319          | 319 (100) <sup>a</sup> | 288 (91.1)     | 268 (84.6)      | 261 (83.5)      | 244 (77.5)          | 242 (77.5)         |
| 0.1mM                                   | 319          | 319 (100) <sup>a</sup> | 257 (81.8)     | 231 (66.8)      | 200 (60.8)      | 191 (60.9)          | 186 (59.2)         |
| 0.5mM                                   | 319          | 319 (100) <sup>a</sup> | N/D            | N/D             | N/D             | N/D                 | N/D                |
| 1.0mM                                   | 319          | 319 (100) <sup>a</sup> | N/D            | N/D             | N/D             | N/D                 | N/D                |

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  by Student's *t*-test.

The basic culture medium (control) was HTF.

Bla. : blastocyst.

N/D : None development.

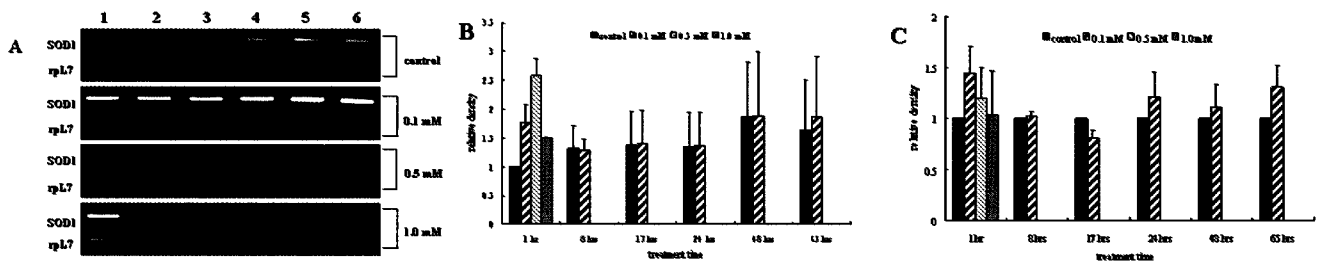
처리 65시간째인 후기 포배기에 이르기까지 대조군은 77.5%의 발생율을 유지하였으며, 0.1mM 처리군에서는 59.2%의 발생율이 나타났다.

### 2. 착상전 배아에서 ATF4, Bax, SOD1 유전자의 발현 양상

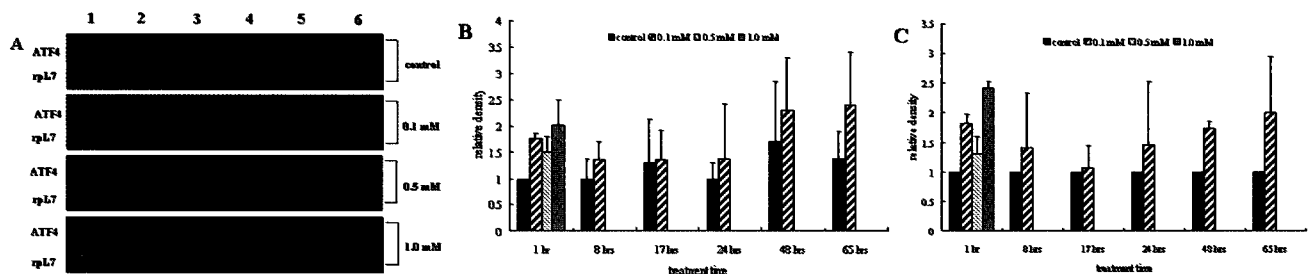
착상 전 배아의 발생 단계에서 산화적 스트레스 인자인 발현이 확인되지 않았다(Fig. 2). ATF4와 Bax 유전자도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 1시간째인 2-세포기 단계에서 발현이 증가하는 것으로

나타났으며, 역시 0.5mM, 1.0mM을 처리한 경우에는 4-세포기 이후에는 발현이 확인되지 않았다(Fig. 2). ATF4와 Bax 유전자도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 1시간째인 2-세포기 단계에서 발현이 증가하는 것으로 나타났으며, 역시 0.5mM, 1.0mM을 처리한 경우에는 4-세포기 이후에는 발현이 확인되지 않았다(Fig 3, 4).

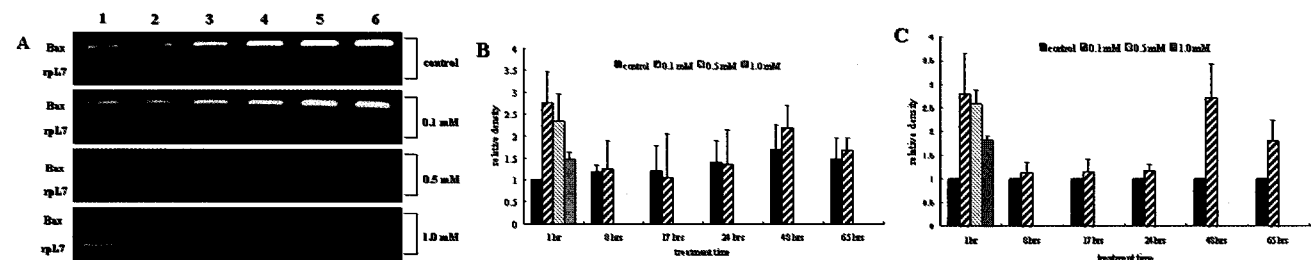
### 3. 면역 형광 염색 분석에 의한 ATF4 단백질의 발현 존재 부위 확인



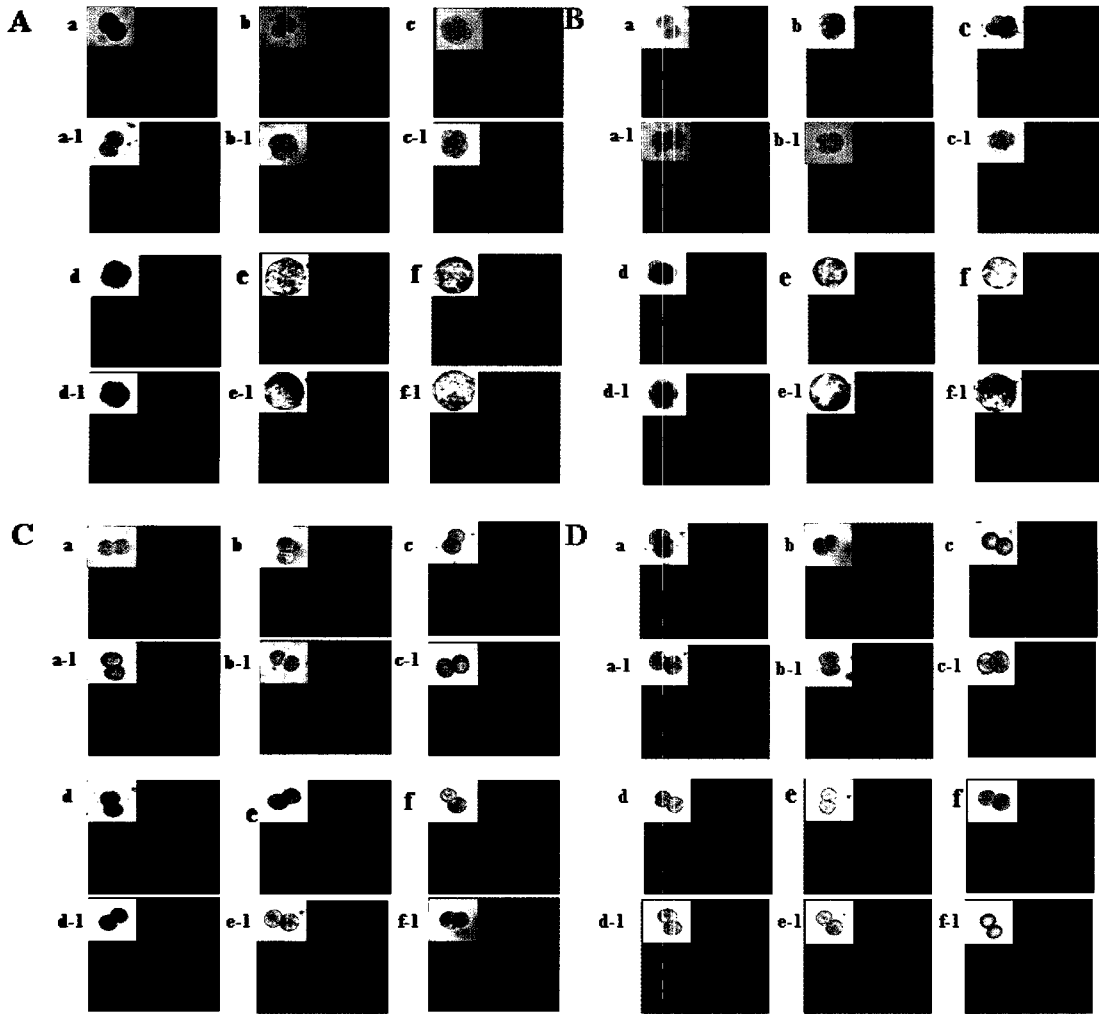
**Fig. 2. Expression of SOD1 gene in preimplantation embryos by RT-PCR.** (A) Gel electrophoresis of the RT-PCR. (B) The relative ratio of SOD1 gene compare with 2-cell control group. (c) The relative ratio of SOD1 gene compare with control of each group. Lane 1, 2-cell embryos(treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1hr); Lane 2, 4-cell embryos(8hr); Lane 3, 8-cell embryos(17hr); Lane 4, morula(24hr); Lane 5, early blastocysts(48hr); Lane 6, late blastocysts(65hr). Data are expressed as mean±SD.



**Fig. 3. Expression of ATF4 gene in preimplantation embryos by RT-PCR.** (A) Gel electrophoresis of the RT-PCR. (B) The relative ratio of ATF4 gene compare with 2-cell control group. (c) The relative ratio of ATF4 gene compare with control of each group. Lane 1, 2-cell embryos(treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1hr); Lane 2, 4-cell embryos(8hr); Lane 3, 8-cell embryos(17hr); Lane 4, morula(24hr); Lane 5, early blastocysts(48hr); Lane 6, late blastocysts(65hr). Data are expressed as mean±SD.



**Fig. 4. Expression of Bax gene in preimplantation embryos by RT-PCR.** (A) Gel electrophoresis of the RT-PCR. (B) The relative ratio of Bax gene compare with 2-cell control group. (c) The relative ratio of Bax gene compare with control of each group. Lane 1, 2-cell embryos (treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1hr); Lane 2, 4-cell embryos(8hr); Lane 3, 8-cell embryos(17hr); Lane 4, morula(24hr); Lane 5, early blastocysts(48hr); Lane 6, late blastocysts(65hr). Data are expressed as mean±SD.

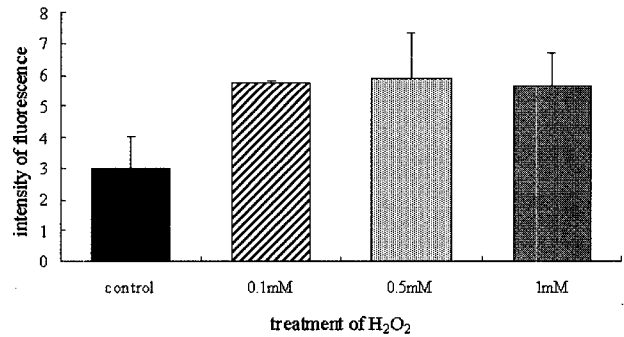


**Fig. 5. Immunolocalization of ATF4 in mouse embryos of treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) embryos cultured without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (B) embryos cultured with 0.1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (C) embryos cultured with 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (D) embryos cultured with 1.0mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. a(2-cell), b(4-cell), c(8-cell), d(morula), e(early-blastocysts), and f(late-blastocysts) are negative controls. a-1, b-1, c-1, d-1, e-1, and f-1 are labeled with ATF4 antibody.

착상전 배아의 발생 과정에서 ATF4 단백질의 발현 부위를 면역형광 염색하여 confocal immunofluorescent microscopy를 통해 확인하였다. 배아의 세포질에서 ATF4 단백질이 발현되었으며, 포배기 배아에서는 영양외배엽(trophectoderm)부위에서 발현되는 것을 관찰하였다(Fig. 5). 또한 immunoreactivity를 측정할 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 대조군에 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 후 1시간째인 2세포기 실험군에 있어서 ATF4 단백질의 발현이 조금 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

**고 찰**

본 연구에서는 생쥐의 착상 전 초기 배아에서 산화적 스트



**Fig. 6. Immunofluorescence intensity of ATF4 in 2-cell stage (traeted with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1hr).** The bars indicate the mean and SD of the intensity; n=5 for each group.

레스가 발생에 미치는 영향과 스트레스 관련 유전자들의 발

현을 확인하였으며, 면역형광 염색을 통해 ATF4 단백질의 발현 부위를 확인하였다.

산화적 스트레스가 생쥐의 초기 배아 발생에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 배양액에  $H_2O_2$ 를 0.1mM, 0.5mM, 1.0mM 농도로 처리하여 2-세포기에서 후기 포배기까지 배양하였다. 대부분의 포유류에 있어서 성숙된 난자가 배란되는 시기에는 RNA 합성이 중지되고, 제 2 감수분열 중지상태에 있게 된다. 생쥐에서는 수정 후 전핵시기에서 2-세포기로 전이되는 동안에 전사적인 활성이 다시 시작되고 후기 2-세포기까지는 배아의 염색체로부터 모든 RNA들이 전사된다(Clegg & Piko, 1983; Schultz, 1993). 이러한 mRNA 수준에서의 양적, 질적 변화는 배아의 발생에서 중요하기 때문에, 이 시기의 ROS에 의한 산화적 스트레스는 배아 발생을 저해한다고 알려져 있다(Guerin *et al.*, 2001). 본 연구 결과 0.5 mM, 1.0mM의 고농도로  $H_2O_2$ 를 처리하여 배아를 배양한 경우에는 모든 배아의 발생이 2-세포기에서 멈추고 더 이상 발생이 진행되지 않았으며 0.1mM 농도에서도 대조군에 비하여 발생율이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1).

ATF4는 세포 내의 스트레스 반응 기작을 조절하는 중요한 전사인자이다(Hai & Hartman, 2001). 세포 내에 스트레스가 가해지면 eukaryotic initiation factor-2(eIF2)가 인산화되고 이어서 ATF4가 활성화 되어진다. 여러 다양한 스트레스로부터 온 신호는 몇 가지 다른경로를 통해 eIF2로 전달이 되고 이 신호의 전달 매개체로서 ATF4가 작용하는 것이다(Hai & Hartman, 2001). 지금까지 알려진 바로는 ATF4의 활성화는 endoplasmic reticulum 내에서 생기는 비정상적인 구조의 단백질을 제거하기 위한 유전자를 활성화시키는 binding luminal protein(BiP)를 조절하며(Ma *et al.*, 2002), apoptosis를 일으키는 유전자를 조절하는 cyclic- AMP element binding protein homologous protein(CHOP)과 스트레스 반응 기작의 negative control 기능을 하여 ATF4의 발현을 감소시켜 주는 growth arrest and DNA damage gene(GADD34)를 활성화 시킨다고 알려져 있다(Harding *et al.*, 2000). 이러한 ATF4 작용 기작은 세포 내의 세포질과 소포체에서 주로 일어나는 것으로 알려져 있다(Harding *et al.*, 2003).

본 연구에서는 2-세포기 시기의 배아를 획득하여 배양액에  $H_2O_2$ 를 처리한 후, 시간의 경과에 따라 배아를 채취하여 SOD1 유전자의 발현양상을 살펴보았다. 대조군에 있어서 SOD1의 발현이 2-세포기 시기에서부터 포배기 시기까지 발현됨을 확인하였으며, 2세포기 이후 포배기 시기에 가장 많이 발현이 되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이러한 양상은

기준에 보고된 내용과 일치하였다(Mouatassim *et al.*, 1999).  $H_2O_2$ 를 처리한 실험군을 대조군과 비교해 보면  $H_2O_2$ 를 한 시간 처리한 군에서 SOD1의 발현이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 이것은 ROS에 의한 산화적 스트레스의 영향이 이 시기에 가장 많이 가해졌다는 것을 의미한다. 또한 ATF4 유전자의 발현 역시  $H_2O_2$ 를 한 시간 처리한 군에서 대조군에 비해 증가가 되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 배아 내에서 산화적 스트레스에 대한 반응이 즉각적으로 일어난다는 것을 의미할 수 있다. 또한 apoptosis 유전자인 Bax 역시 ATF4와 동일한 시기에 발현이 증가되는 것을 볼 때, Bax 역시 ATF4와 함께 산화적 스트레스의 방어 기작에 관련이 있을 것으로 사료된다(Fig. 4).

면역 형광 염색 분석을 통한 ATF4 단백질의 발현 부위를 확인한 결과 배아의 세포질에서 주로 발현이 되는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이것은 ATF4의 작용 위치가 세포질과 소포체라는 사실과 일치한다고 볼 수 있으며(Harding *et al.*, 2003), 특이적으로 포배기에서 내세포피(inner cell mass)보다는 영양외배엽(trophectoderm)에서 많이 발현이 되는 것으로 나타났다. ROS에 의한 산화적 스트레스를 많이 받을 경우, 태반 형성이 정상적으로 이루어지지 않는다는 이전의 연구 결과(Myatt & Cui, 2004)를 보면 태반을 형성하게 될 영양외배엽 세포에서 ATF4가 많이 존재한다는 사실은 태반의 발생 및 ROS에 의한 산화적 스트레스에 ATF4가 관여하리라 생각된다.

본 연구 결과 ATF4 유전자는 생쥐의 착상 전 발생 단계 동안 발현이 되며, 산화적 스트레스를 받은 직후에 ATF4 유전자의 발현이 증가하는 것을 볼 때, 산화적 스트레스에 ATF4가 방어 기작으로 관여하는 것으로 사료된다.

세포의 대사 활동에 있어서 산소는 필수 불가결한 존재이며, 그 과정에서 생성되는 ROS 역시 피해갈 수 없는 위협요인이라고 할 수 있다. ROS는 태양의 자외선이나 약의 복용과 같은 외부로부터 유발될 뿐만 아니라 체내 호르몬에 의해서도 ROS가 생성되어(Jain *et al.*, 2000) 인체에 악영향을 미칠 수 있다. 현재 ROS에 의한 산화적 스트레스에 대한 연구는 다방면에서 진행되고 있지만, 착상 전 초기 배아 단계에서의 연구는 많이 진행되고 있지 않다. 따라서 ROS에 대한 연구는 매우 중요하며 앞으로 연구해야 할 부분이 많다고 생각된다.

## 인용문헌

Agarwal A (2003) Role of reactive oxygen species in the

- pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79:829-843.
- Agarwal A, Allamaneni SS (2004) Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 9:338-347.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3:1-20.
- Agarwal A, Said TM (2005) Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 95:503-507.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 40:183-197.
- Blais JD, Vasilisa Filipenko V, Meixia Bi, Heather P, Harding, David Ron, Koumenis C, Wouters BG, Bell JC (2004) Activating transcription factor 4 istranslationally regulated by hypoxic stress. *Mol Cell Biol* 24:7469-7482.
- Clegg KB, Piko L (1983) Poly(A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly(A)<sup>+</sup> RNA in early mouse embryos. *Dev Biol* 95:331-341.
- Dennery PA (2004) Role of redox in fetal development and neonatal disease. *Antioxid Redox Signal* 6:147-153.
- Filler R, Lew KJ (1981) Developmental onset of mixed-function oxidase activity in preimplantation mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6991-6995.
- Guerin P, Mouatassim SE, Menezo Y (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7:175-189.
- Hai T, Hartman MG (2001) The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273:1-11.
- Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57:715-725.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek H, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6:1099-1108.
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron R (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11:619-633.
- Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Schulez GA, Watson AJ (1995) Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol Reprod* 53:532-540.
- Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG (2002) REDOX regulation of early embryo development. *Reprod* 123:479-486.
- Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D (2005) Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod* 20:2014-2020.
- Jain S, Saxena D, Kumer GP, Laloraya M (2000) NADPH dependent superoxide generation in the ovary and uterus of mice during estrous cycle and early pregnancy. *Life Sci* 66:1139-1146.
- Jiang HY, Wek RC (2005) GCN2 phosphorylation of eIF2 activates NF- $\kappa$ B in response to UV irradiation. *Biochem J* 385:371-380.
- Laloraya M, Pradeep KG, Laloraya MM (1988) Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of *Rattus norvegicus* and induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutropin. *Biochim Biophys Res Commun* 157:146-153.
- Ma Y, Brewer JM, Diehl JA, Hendershot LM (2002) Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* 318:1351-1365.
- Mouatassim SE, Guerin P, Menezo Y (1999) Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod* 5:720-725.
- Myatt L, Cui X (2004) Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 122:369-382.
- Nomura T, Sasaki J, Mori H, Sato EF, Watanabe S, Kanda S, Matsuura J, Watanabe H, Inoue M (1996) Expression of manganese superoxide dismutase mRNA in reproduc-



- tive organs during the ovulatory process and the estrous cycle of the rat. *Histochem Cell Biol* 105:1-6.
- Ornoy A, Zaken V, Kohen R (1999) Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos *in vitro*: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology* 60:376-386.
- Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI (2004) Effect of oxidative stress in follicular fluid in the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril* 81:973-977.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ (2003) All loads lead to ATF4. *Dev Cell* 4:442-444.
- Said TM, Aziz N, Sharma RK, Jones IL, Thomas AJ, Agawal A (2005) Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian J Androl* 7:121-126.
- Schultz RM (1993) Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 15:531-538.
- Sikka SC (1996) Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1:8-86.
- Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chan H, Kilberg MS (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* 277:24120-24127.
- Stohs SJ (1995) The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 6:208-224.
- Thompson JG, McNaughton C, Gasparrini B, McGowan LT, Tervit HR (2000) Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. *J Reprod Fertil* 118:47-55.
- Vattem KM, Wek RC (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *PNAS* 101:11269-11274.
- Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S, Reznick AZ, Ishai D, Lahav-Baratz S, Shiloh H, Koifman M, Dirnfeld M (2004) Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermachemiluminescence assay correlate with outcome parameters in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 3:1171-1176.
- Wuenschell C, Kunimi M, Castillo C, Marjoram P (2004) Nicotine-responsive genes in cultured embryonic mouse lung buds: interaction of nicotine and superoxide dismutase. *Pharmacol Res* 50:341-350.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 11:998-1002.