

노화촉진마우스의 텔로미어 함량 분석

이미랑·도경탁·한정주·문소현·강한석·김선구·신태순·이흥구·황대연¹·김용균²·손시환³·최니은³·김병우⁴·조병욱*

부산대학교 동물생명과학과, ¹부산대학교 바이오소재, ²부산대학교 생명환경화학과, ³진주산업대학교 동물생명과학과
⁴경상대학교 농업생명과학연구원

Received August 25, 2009 / Accepted October 21, 2009

Amount of Telomeric DNA on Lymphocytes in Senescence Mouse by Quantitative Fluorescence in situ Hybridization. Mi-Rang Lee, Kyoung-Tag Do, Jyung-Ju Han, So-Hyun Moon, Han-Seok Kang, Seon-Ku Kim, Teak-Soon Shin, Hong-Goo Lee, Dae-Yon Hwang¹, Yong-Gyun Kim², Sea-Hwan Sohn³, Na-Eun Choi³, Byeong-Woo Kim⁴ and Byung-Wook Cho*. *Department of Animal Science, College of Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea, ¹Department of biomaterial science, College of Life Science, Pusan National University, Miryang, 627-706, Korea, ²Department of Life science & Environmental Biotechnology, College of Life Science, Pusan National University, Miryang, 627-706, Korea, ³Department of Animal Science and Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea, ⁴Institute of Agriculture & Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea* - Telomeres, comprised of tandem repeats of TTAGGG sequences, are special nucleoprotein structures that protect and stabilize chromosome ends. These structures form the crux of the telomere concept of aging, senescence and genomic instability. The classic terminal restriction fragment (TRF) analysis to quantify the amount of telomeric DNA is disadvantageous in species containing ultra long telomeres like in mice (100Kb). In this study, we used a more sensitive quantitative fluorescence in situ hybridization (Q FISH) technique to quantify telomeric DNA, and used it as a biological aging marker in mice. 12 litters each of Senescence-Resistant (SAMR1) and -Prone (SAMP1) known as senescence accelerated mouse strains were purchased from Central Lab, Animal Inc. We quantified the amount of telomeric DNA using telomere specific DNA probes on the two strains of male mice at 8 weeks, 18 weeks and 26 weeks of age. The amount of telomeric DNA correlated with aging and age associated changes in body and organ weight between SAMR1 and SAMP1 strains of mice. These data suggest the usefulness of the amount of telomeric DNA as a biological aging marker in human aging studies.

Key words : Chromosome, telomere length, Q-FISH, aging, SAM mouse

서 론

텔로미어(Telomere)는 진핵생물의 염색체 최종말단부위에 위치하는 반복된 염기서열(TTAGGG)_n 구조를 지니고 있으며, 염색체 말단에 가해지는 여러 자극들로부터 유전자의 손상을 보호하는 등 세포내 유전자의 안전성 유지와 관련된 주된 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[1,5,6,13]. 포유동물의 경우 텔로미어 길이가 노화의 진행 정도를 알려주는 대표적인 지표로도 활용되고 있다[2]. 염색체 말단의 불완전한 DNA 복제가 세포분열을 저해시켜 세포노화를 유발한다는 사실이 밝혀지면서 텔로미어와 세포노화에 관한 많은 연구가 수행되어 왔다[12].

염색체말단구조의 상실이 세포노화와 관련이 있다는 최초의 실험적 증거는 인체 섬유아세포의 terminal restriction fragment (TRF)의 길이가 세포분열을 반복함에 따라 감소하고, 노인 세포의 텔로미어 길이가 어린이 세포의 그것보다 짧다는 점을 확인할 수 있었다. 즉, DNA 복제를 계속할수록

텔로미어의 길이가 감소하며 일정 길이 이하로 줄어들면 결국 세포분열을 멈추고 세포노화가 시작된다는 점을 시사한 바 있다[7]. 또한 복제양돌리의 텔로미어 길이가 현저하게 짧아서 1년생 돌리가 세포핵을 물려받은 어미양(6년생)과 같은 노화 상태인 조로현상이 나타났다는 사실로 텔로미어의 기능을 상징적으로 보여주었다[19]. 이러한 텔로미어 가설은 정상세포의 세포분열과 노화를 연결하는 중요한 분자기작으로 여겨왔다.

사람의 텔로미어는 15~25 kb 정도이며 정상적인 인체 내 각 조직들은 시간이 지남에 따라 텔로미어의 유의적 감소 양상을 보인다. 반면 마우스의 경우 이의 길이가 약 100 kb 이상으로 보고되고 있고 텔로미어 감소주기가 더 짧기 때문에 노화에 대한 연구에 많이 이용되고 있다[11,16,18,20]. 그러나 마우스의 경우 기존의 TRF 방법으로 텔로미어의 분석은 긴 텔로미어 길이에 따른 유실과 blotting 하는 동안 DNA의 소실이 생겨 빈번한 오류가 발생함으로 적합한 방법이 아닌 것으로 판단된다. 한편 염색체상에 직접 텔로미어 부위를 인지할 수 있는 Fluorescence in situ Hybridization (FISH) 방법을 이용하여 이의 함량을 측정할 수 있는 양적형광접합보인

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5515, Fax : +82-55-350-5519
E-mail : bwcho@pusan.ac.kr

법(quantitative fluorescence *in situ* hybridization, Q-FISH)은 염색체뿐만 아니라 간기세포에서도 분석이 가능하고, 분석에 소요되는 시간이 짧고, 상대적으로 정확한 측정치를 제공함으로써 최근 다양한 실험에서 널리 이용되고 있다[3,10,14,15].

본 실험에 이용된 Senescence Accelerated Mouse (SAM)는 노화촉진모델마우스로 인간의 노화 연구에 활용할 수 있는 최적의 포유 동물모델로 간주되고 있다. SAM mouse는 탈모, 피모광택 감퇴, 안구 주위 병변, 백내장, 척추만곡 증가, 면역 반응 저하 및 수명단축과 같은 노화의 생리적 특징을 나타내며, 노화현상이 4~6개월령부터 관찰되고, 11~12개월령에는 극심한 노화 현상을 보이며 사망에 이르는 것으로 보고되고 있다[9,17].

SAM mouse를 이용한 다양한 노화 관련 연구들이 수행되고 있으나 이들의 텔로미어 함량과 노화 간에 대한 연관성 연구는 거의 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 노화촉진모델 마우스의 체 성장 양상을 살펴보고 또한 양적형광접합보인법을 이용하여 성장단계별 telomeric DNA 함유량을 분석함으로써 노화와의 연관성을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 동물

노화촉진모델 마우스의 성장 단계별 체중 및 장기의 변화 그리고 텔로미어의 양적 분석을 위해 Senescence-Resistant (SAMR1) 계통과 Senescence-Prone (SAMP1) 계통 수컷 각 12마리씩 구입 공시하였다 (㈜중앙실험동물, 대전). 첫 1~2주간 사육실 환경을 시킨 뒤 specific pathogen free (SPF)상태에서 온도 $23\pm 1^\circ\text{C}$, 습도 40~60%에서 사육하였고, 체중증가량과 사료 및 음수섭취량은 매주 수요일 오전 10시에 측정하였다. 모든 실험은 부산대학교 실험동물윤영위원회(IACUC)의 승인을 받아 본 위원회의 관리 지침에 준하여 수행하였다.

장기중량 및 채취

장기채취는 실험군별 각 3마리씩을 8, 18, 26주령 그리고 30주령에 채취하였다. 마우스를 개복한 후 뇌, 폐, 심장, 간, 위, 신장, 비장, 췌장, 정소를 떼어내고 각 장기들의 무게를 측정 후 -79°C 냉동고에 보관하였다.

FISH를 위한 조직 및 혈액 표본 제작

실험군(SAMP1계통)과 대조군(SAMR1계통)의 백혈구 세포 표본의 제작은 실험군별 각 3마리의 심장에서부터 약 500 μl 의 혈액을 채취하여 백혈구만 순수 분리하였고, 이러한 혈액 세포들은 0.06 M KCl용액을 이용하여 실온에서 15분간 저장 처리하였다. 저장처리가 끝나면 혼합된 고정액(3 methanol : 1 acetic acid)을 10방울정도 첨가한 후 원심분리 시키고, 상기

고정액을 이용하여 2회 반복 처리 후 슬라이드 표본을 제작하였다.

Q-FISH

Telomeric DNA probe 제작

텔로미어 접합 특이 probe 제작을 위하여 (CCCTAA)₇으로 구성된 42mers 단일 oligomers를 primer로 이용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 수행하고, 증폭된 산물을 PCR-DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 digoxigenin labeling을 하였다.

FISH

본 연구에서 수행한 형광접합보인법(fluorescence *in situ* hybridization; FISH)은 먼저 슬라이드 표본을 RNase (Sigma-Aldrich) 처리 후 Hybridization 용액(13 μl formamide, 5 μl hybridization buffer, 2 μl (100 ng/ μl , human telomeric DNA probe; Roche)을 떨어뜨리고 72°C 에서 5분간 변성(denaturation)하고 38.5°C 에서 12시간 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 $2\times$ SSC로서 72°C 에서 5분간 처리하고 PN buffer (0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40; Roche)로 2분간 처리하였다. 형광 접합 탐지를 위하여 P-4i-digoxigenin-fluorescein (FITC; Roche)으로 38.5°C 에서 30분간 반응시키고 PN buffer로 세척한 후 암소에서 건조시켰다. 배경염색은 propidium iodide solution (PI; Sigma-Aldrich)을 이용하였으며 형광 접합 발현 양상은 PI와 FITC 파장대의 검출 필터를 부착한 형광현미경(Model AX-70 with WIB filter, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

Telomeric DNA 함량 분석

처리된 슬라이드를 형광현미경으로 관찰한 후 100배의 대물렌즈 하에서 평균 5개의 간기 핵을 한 프레임으로 촬영하고 개체 당 최소 100개 이상의 세포에 대하여 이미지 분석 프로그램(Image analyzer program, MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 핵 대비 telomeric DNA 분포량을 계산하였다.

통계 분석

노화촉진 마우스의 성장 단계별 조직 및 체중의 변화량과 세포내 텔로미어 함량을 비교 분석하기 위하여 SAS 통계 패키지(ver, 11.0, USA)를 이용하였고, 성장 단계별 조직 및 체중의 변화량은 T-test, 텔로미어 함량 분석은 GLM/Duncan 법에 의해 $p < 0.05$ 의 유의 수준에서 유의성 검증을 수행하였다.

결과 및 고찰

노화촉진마우스의 주령별 체중 및 장기무게

본 실험은 SAMP1 마우스를 이용하여 노화의 진행 단계별

Table 1. The body weight and body weight gain in SAMR1 and SAMP1 mouse

	mice	Age (wk)			
		8	18	26	30
Average Body Weight (g)	SAMR1	30.00±0.29	36.83±2.52	42.17 ^a ±0.93	40.00±0.50
	SAMP1	30.17±0.17	44.67±1.59	46.67 ^b ±1.30	40.33±0.17
Body Weight Gain (g/week)	SAMR1	1.67±0.29	0.68±0.27	0.67±0.26	-0.63±0.25
	SAMP1	2.11±0.15	1.45±0.16	0.25±0.26	-1.59±0.29

The values are Means (T-test)±S.E

^{a,b} Values with different superscript within same column significantly differ ($p > 0.05$)

조직의 변화 양상을 살펴보고자 성장 단계별 체중 및 장기무게를 측정 조사하였다. 주령별 마우스의 체중과 증체량을 Table 1에 제시하였고, 이들의 변화양상을 Fig. 1에 나타내었다. 성장 단계별 체중의 변화 양상을 살펴보면 대조군인 SAMR1의 경우 26주까지 일정한 속도로 체중이 증가하는 반면 SAMP1은 대조군에 비해 성장 초기부터 비교적 빠른 증가 현상을 나타내었고, 26주령을 전후로 유의적인 체중 감소 현상이 관찰되었다. 두 실험군의 증체량을 분석한 결과 노화촉진마우스인 SAMP1의 경우 대조군에 비해 비교적 높게 나타났으며, 26주령을 전후로 대조군에 비해 빠른 속도로 감소하는 양상 역시 확인 할 수 있었지만 유의적인 통계치는 관찰되지 않았다. 또한 사료섭취량과 음수량에 있어서 두 그룹 간 차이는 보이지 않아 실험 결과에서 제외시켰다.

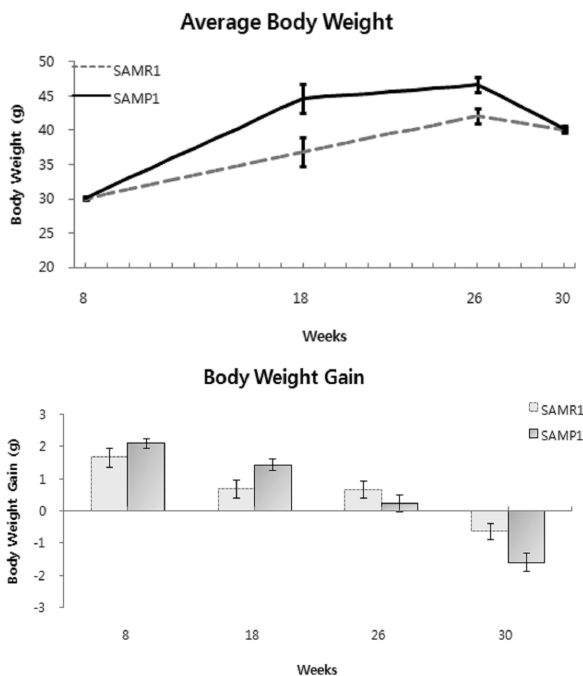


Fig. 1. The growth pattern of body weight in SAMR1 and SAMP1. By 26 weeks of age there was difference in the growth pattern between the R and P group. The body weight on SAMP1 mouse rapidly increased before the 18 weeks and decreased after the 26 weeks.

Takeda 등[17]은 SAMP1과 SAMR1 마우스들은 14주령부터 성장 속도가 빨라지며 체중이 증가하는 양상을 보이다 28주령을 전후로 SAMP1이 SAMR1에 비해 성장속도가 현저히 떨어지며 노화가 진행된다는 결과를 발표한 바 있다. 본 연구의 실험 결과들도 상기 보고된 결과들과 유사한 양상을 나타냈다. 즉, 노화촉진 마우스로 육종된 SAMP1의 경우 26주령을 전·후로 대조군에 비해 노화가 급격히 진행되는 것으로 가정하고, 이러한 체중의 변화가 노화의 진행 지표임을 시사한다.

각 주령별 체중의 변화에 따른 장기들의 변화양상을 확인하기 위해 주령별 각 장기인 뇌, 심장, 폐, 위, 간, 비장, 췌장, 신장 및 정소를 적출하여 무게를 측정 조사하였다. 이상의 통계적 분석 결과로서 각 장기에서는 유의적 차이는 보이지 않았지만, 간(liver)의 경우 노화촉진마우스군이 대조군에 비해 26주령을 전후로 무게가 증가하는 양상을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2). 노화의 진행이 다른 장기들의 무게 변화에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 판단은 어려운 것으로 사료되어 향후 30주령 이후 장기간에 걸친 조사와 조직별 유전자 발현양상의 분석이 요구되는 사항이다.

노화촉진마우스의 주령별 텔로미어 함량 분석

마우스의 성장단계별 텔로미어 함량을 분석하기 위해 혈액을 이용한 표본 제작을 수행하고, telomeric DNA probe로서

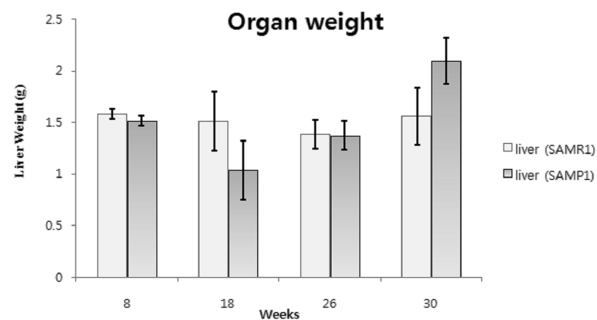


Fig. 2. Changes in liver weight along with age. In both the SAMR1 and SAMP1 group the liver weight increases with advancing age, but the increases is more remarkable in the SAMP1 group. Bars represent means±SE.

FISH를 수행한 후 이미지 분석 프로그램(image analyzer program; MetaMorph®)을 이용하여 8, 18 및 26주령 텔로미어의 상대적 함량을 분석하였다. 주령별 간기 핵 내 대표적인 텔로미어의 분포양상을 Fig. 3에 제시하였다. 분석 결과 노화촉진 계통(SAMP1) 및 노화억제계통(SAMR1) 모두에서 주령이 증가함에 따라 텔로미어 함량이 점진적으로 감소하는 것이 관찰되었으며, 모든 주령에서 SAMP1이 SAMR1에 비해 낮은 텔로미어 함유율을 보였다(Table 2). 특히, SAMP1의 경우 텔로미어 함량이 26주령에 유의적으로 급격히 감소되는 양상을 보임에 따라 앞서 체중의 변화양상과 더불어 이 시점이 노화의 개시점으로 사료된다(Fig. 4).

일반적으로 발육, 성장 단계별 텔로미어는 노화의 진행에 따라 단축되지만 각 장기 및 기관별 세포에서의 텔로미어 길이 및 단축속도는 모두 다른 양상으로 나타난다[4,8]. 마우스의 경우 인간의 수명에 비해 1/30에 지나지 않지만 의외로 마우스의 텔로미어는 인간의 것보다 길다. 따라서 마우스의 경우 텔로미어 함량분석법은 조직 및 기관의 세포에서 측정하는

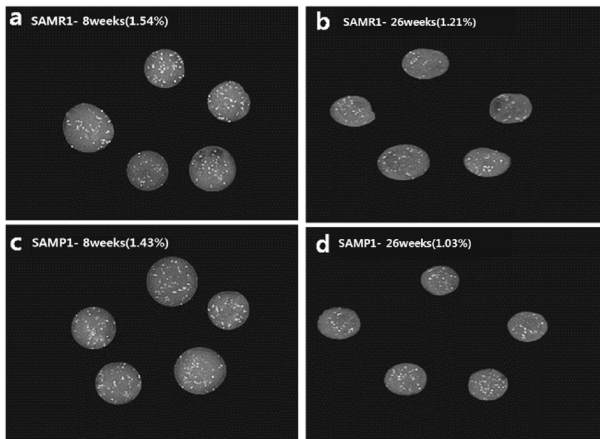


Fig. 3. Distribution of telomeres on interphase nuclei in SAMP1 mice and SAMR1 mice lymphocytes by FISH using telomeric DNA probe. (a) Lymphocytes from 8 wk SAMR1 containing 1.54% telomeric DNA, (b) Lymphocytes from 26 wk SAMR1 containing 1.21% telomeric DNA, (c) Lymphocytes from 8 wk SAM P1 containing 1.43% telomeric DNA, (d) Lymphocytes from 26 wk SAMP1 containing 1.03% telomeric DNA

Table 2. Amount of telomeric DNA in SAMR1 and SAMP1 mouse lymphocytes

Strain	Age (wk)		
	8	18	26
SAMR1	1.54±0.05	1.43±0.05	1.29 ^a ±0.04
SAMP1	1.43±0.05	1.40±0.04	1.05 ^b ±0.04

The values are Means (T-test)±S.E

^{a,b} Values with different superscript within same column high significantly differ ($p < 0.001$)

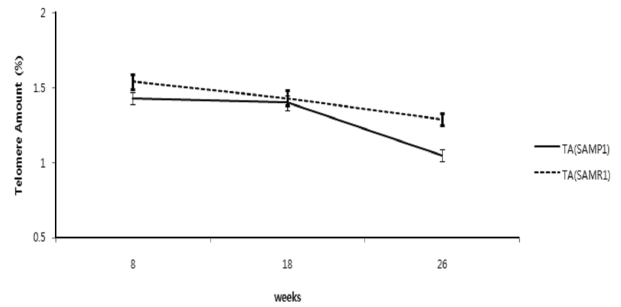


Fig. 4. The amount of telomeric DNA in SAMR1 has no obvious changes from 8 to 26 wk, and no significance in 8, 18, 26 wk age. However, telomeric DNA in SAMP1 has remarkable changes from 8 to 26 wk age, which just accords with other signs when SAMP1 comes into accelerated aging phase from 26 wk.

것보다 비교적 텔로미어 길이가 일정하게 측정되는 백혈구 세포에서의 분석이 더 적합할 것이라 사료된다. 더불어 텔로미어 함유량이 연령과 높은 부의 상관성을 보이고, 노화촉진 계통에서 유의적으로 낮은 함유율을 보임으로서 텔로미어가 노화와 직접적인 관련이 있는 훌륭한 생물학적 지표임을 다시 한번 입증하였고 형광접합보인법을 이용한 텔로미어의 상대적 함량 분석법이 마우스의 텔로미어 양상을 분석하는데 정확한 지표로서 매우 유용하게 활용될 수 있음을 제시한다.

결론적으로 노화촉진 모델로 알려진 SAMP1 마우스는 성장이 진행됨에 따라 대조군인 SAMR1과 비교하여 26주를 전·후로 비교적 빠른 성장 후 급격히 성장 속도가 지연되는 것을 확인하였고, SAMP1 마우스의 백혈구 세포내의 텔로미어 함량분석 결과 동 시기에 급격한 텔로미어의 감소 양상을 나타냄으로 본 시점부터 생리적 노화 현상이 급격히 진행되는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2008~2010)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Blackburn, E. H. 1991. structure and function of telomeres. *Nature* **350**, 569-573.
- Blackburn, E. H. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661-73.
- Gan, Y., Engelke, K. J., C. A. Brown, and J. L. S. Au. 2001. Telomere amount and length assay. *Pharmaceutical Res.* **18**, 1655-1659.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413.
- Greider, C. W. 1991. Telomeres. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**,

- 444-451.
6. Greider, C. W. 1999. Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* **97**, 419-22.
 7. Harley, C. B., A. B. Futcher, and C. W. Greiter. 1990. Telomere shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.
 8. Harley, C. B. 1991. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Rev. Mutat Res* **256**, 271-282.
 9. Hosokawa, M., Kasai, R., Higuchi, K., Takeshita, S., Shimizu, K., Hamamoto, H., Honma, A., Irino, M., K. Toda, and A. Matsumura. 1984. Grading score system : a method for evolution of the degree of senescence in senescence accelerate mouse (SAM). *Mech Aging Dev.* **26**
 10. Hultdin, M., E. Gronlund, K. Norrback, and E. Eriksson-Lindstrom. Just T, Roos G, 1998. Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3651-3656.
 11. Kipling, D. and H. J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**, 400-402.
 12. Olovnikov, A. 1973. A theory of marginotomy. *J. Theor. Biol.* **41**, 181-181.
 13. Pathak, S., A. S. Multani, C. L. Furlong, and S. H. Sohn. 2002. Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells, and cancer. *Int. J. Oncology* **20**, 637-641.
 14. Slijepcevic, P. 2001. Telomere length measurement by Q-FISH. *Methods Cell sci.* **23**, 17-22.
 15. Sohn, S. H., H. J. Jung, and D. S. Choi. 2008. Amount of telomeric DNA on Pig lymphocytes by Quantitative fluorescence in situ hybridization. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **50**, 465-474.
 16. Starling, J. A., J. Maule, N. D. Hastie, and R. C. Allshire. 1990. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6881-6888.
 17. Takeda, T., M. Hosokawa, S. Takeshita, M. Irine, K. Higuchi, T. Matsushita, Y. Tomita, K. Yasuhira, H. Hamamoto, K. Shimizu, M. Ishii, and T. Yamamuro. 1981. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev.* **17**, 183-194.
 18. Weng, N. P. and R. J. Hodes. 2000. The role of telomerase expression and telomere length maintenance in human and mouse. *J. Clinial Immunology.* **20**, 257-267.
 19. Wilmut, A. E., W. A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature* **385**, 810-813.
 20. Zijlmans, J. M., U. M. Martens, S. S. Poon, A. K. Roap, H. J. Tanke, R. K. Ward, and P. M. Lansdrop. 1997. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7423-7428.