

# 생쥐 난포의 체외배양 중 생식샘자극호르몬에 따른 미세리보핵산 발현 양상

서울대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>1</sup>, 서울대학교 의학연구원 인구의학연구소<sup>2</sup>

김용진<sup>1,2</sup> · 구승엽<sup>1,2\*</sup> · 김윤영<sup>2</sup> · 오선경<sup>2</sup> · 김석현<sup>1,2</sup> · 최영민<sup>1,2</sup> · 문신용<sup>1,2</sup>

## Profiles of microRNAs in Mice Follicles According to Gonadotropins during in vitro Culture

Yong Jin Kim<sup>1,2</sup>, Seung-Yup Ku<sup>1,2\*</sup>, Yoon Young Kim<sup>2</sup>, Sun Kyung Oh<sup>2</sup>,  
Seok Hyun Kim<sup>1,2</sup>, Young Min Choi<sup>1,2</sup>, Shin Yong Moon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, <sup>2</sup>Institute of Reproductive Medicine and  
Population, Medical Research Center, Seoul National University

**Objective:** MicroRNAs (miR) are known to repress target genes at post-transcriptional level and play important roles in development and maturation of cell. However, the expression profiles of miR during ovarian follicle maturation have not been fully elucidated. Here, we designed this study to investigate the expression profiles of miR in oocytes and granulosa cells (G-cells) after in vitro culture according to gonadotropins and adding hCG.

**Methods:** Ovaries from 12-day-old mice (C57BL6) were removed and preantral follicles were isolated and cultured in 20  $\mu$ L-drop of culture media with supplementation of either rFSH, rLH, or rFSH + rLH. After their full maturation, follicles were incubated with rhCG and rEGF. RNA was isolated from oocytes and G-cells, and real-time PCR were performed with primers of miR known to be expressed in the mouse ovary (mmu-miR-16, -miR-27a, -miR-126, -miR-721).

**Results:** FSH + LH group showed the highest ovulation and MII rates among gonadotropin groups. The profiles of miRs in oocytes and G-cells differed according to gonadotropin groups and adding hCG. The profiles of miRs showed divergent changes between oocytes and G-cells.

**Conclusion:** miR expression profiles are altered by gonadotropins and supplementation of hCG during in vitro maturation of murine follicles. Target gene study must be necessary to validate these findings. [Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(4): 265-274.]

**Key Words** MicroRNAs, Gonadotropins, In vitro culture, Mouse

난자의 성숙과정은 생식의학분야에 있어서 매우 중요한 연구대상이다. 생식샘자극호르몬 (gonadotropin)인 난포자극호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH)과 황체형성호르몬 (luteinizing hormone, LH)의 자극이 난포 및 난자의 발달에 중요한 역할을 한

다는 것과<sup>1,2</sup> 사람용모성생식샘자극호르몬 (hCG)을 이용한 실험을 통해 LH 쇄도 (surge)가 난자 성숙과 배란에 핵심작용을 한다는 것은<sup>3,4</sup> 주지의 사실이다. 그러나 이러한 호르몬 변화에 따른 난포 및 난자 성숙 조절 기전에 대해서는 아직 많은 부분이 명확하지 않다. 이러한 연구를 위해 사용될 수 있는 방법론으로 난포의 체외배양 실험모델을 들 수 있다. 최근 들어 난포 체외배양은 난자 성숙 및 난포 성장 조절의 용이성과 다양한 활용 가능성 때

주관책임자: 구승엽, 우) 110-744 서울특별시 종로구 연건동 28,

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

Tel: (02) 2072-1971, Fax: (02) 762-3599

e-mail: jyhsyk@snu.ac.kr

\*본 논문의 요지는 제 57차 대한생식의학회 추계학술대회에서 우수 포스터로 선정되었음.

문에 훌륭한 연구모델로 일부 활용되고 있다.<sup>5,6</sup>

미세리보핵산 (microRNA, miR)은 22 염기 이하 크기의 매우 작은 내인성 비암호 (noncoding) RNA로서 전사 (transcription) 억제 및 전달자 (messenger) RNA 분쇄 (cleavage)를 통하여 다른 유전자 발현을 조절한다고 알려져 있으며,<sup>7-10</sup> 유핵 세포에 있어서 염기서열 특징적인 유전자 조절을 설명하는 기전으로 최근 많은 관심을 모으고 있다.<sup>11</sup> 지금까지 여러 연구들을 통해 세포 내 신호 전달과정,<sup>12</sup> 세포자멸과정,<sup>13</sup> 대사과정,<sup>14</sup> 조직 형성 과정<sup>15</sup> 등 주로 세포의 조절기능에 많은 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 그 기능이 명확하게 이해되기까지는 아직 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 예상되고 있다. 소 (Bovine)을 이용한 최근 연구에서 미성숙 난자와 성숙 난자 사이에 miR 발현의 차이가 있음이 보고되어,<sup>16</sup> miR이 난자의 성숙과정 조절기전에 대한 이해에 있어서도 중요한 역할을 할 것으로 기대되나, 난자 및 난구세포에서의 호르몬에 따른 miR 양상의 변화에 대해서는 알려진 바가 없다.

본 연구는 생쥐 난포의 체외배양을 통해 FSH, LH, FSH+LH 등의 gonadotropin과 hCG 첨가에 의한 난자 및 난구세포에서의 miR 발현 양상을 확인하기 위하여 시행되었다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

생후 12일된 생쥐 (C57BL6) 암컷 20마리의 난소를 적출한 후, 28-gauge 주사기 (Becton Dickinson & Co., Franklin Lake, NJ)를 이용하여 전동 난포 (preantral follicle)를 분리하였다 (Figure 1). 분리한 전동 난포를 현미경으로 관찰하여 난자가 중앙에서 관찰되고 주위의 난구세포가 완전하게 관찰되는 난포만을 수집하여 각 실험군별로 500개씩 체외배양을 시행하였다.

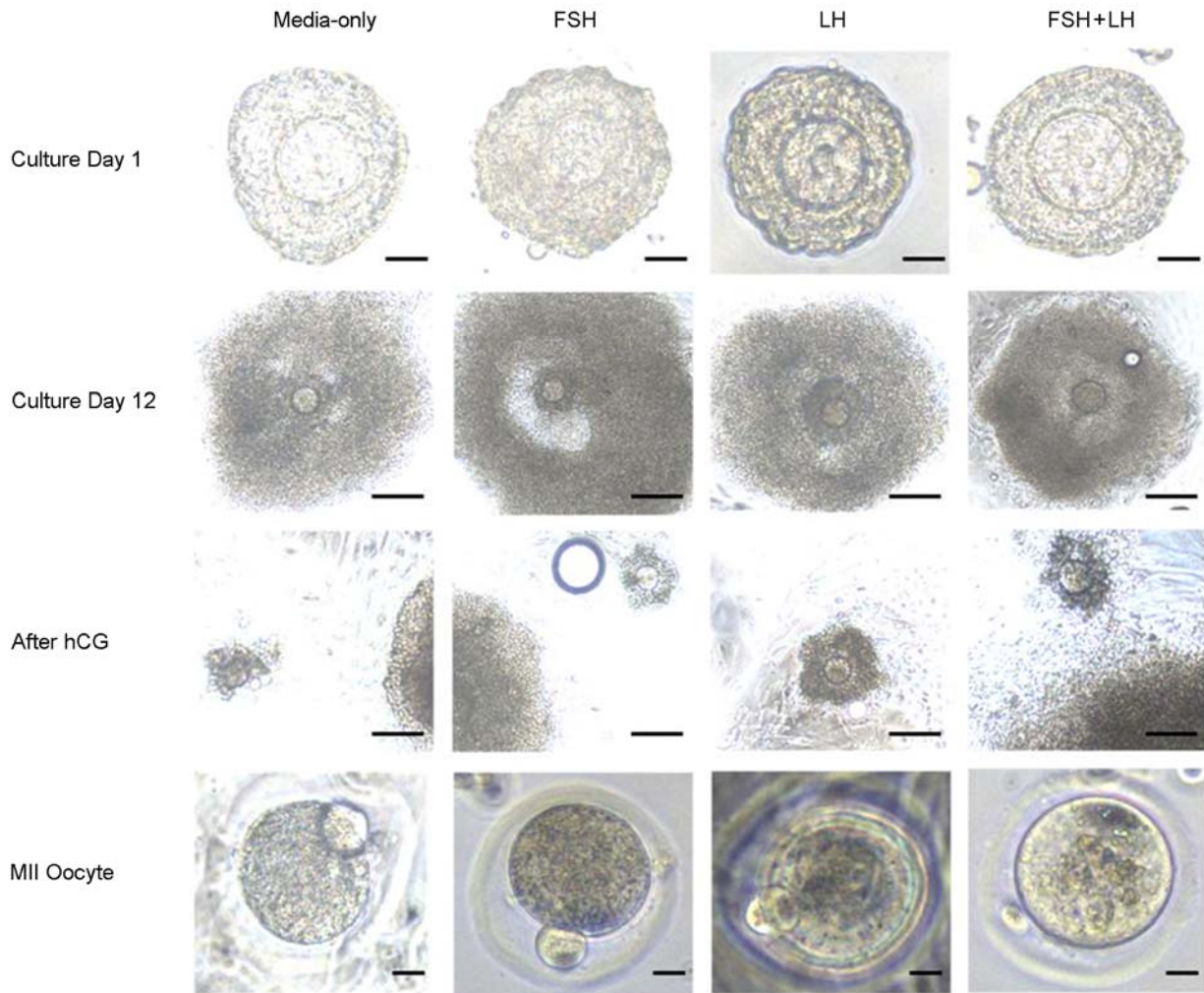
## 2. 연구 방법

### 1) 체외배양

배양접시 (Falcon 3002; 60×15 mm)에 20 µL의 배양액 점적 25개를 만들어 수집된 전동 난포를 각 배양액 group들로 무작위 배정 후, 한 점적당 한 난포씩 넣은 후 mineral oil로 덮고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 12일 간 배양하였다. 각 배양액 조성별 실험군은 insulin 10 µg/mL와 5% FBS를 첨가한 Opti-MEM medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 기본 배양액 군 (media-only, control group), 기본 배양액에 recombinant FSH (Gonal-F, Merck Serono)를 첨가한 군 (FSH group), 기본 배양액에 recombinant LH (Luveris, Merck Serono)를 첨가한 군 (LH group), 기본 배양액에 recombinant FSH와 recombinant LH를 같이 첨가한 군 (FSH+LH group)으로 나누었다. 각 실험군의 배양액 교체를 위하여 2일마다 각 점적에서 10 µL의 이전 배양액을 빼낸 후 10 µL의 새로운 배양액을 넣어주었다.

### 2) 배란 유도 및 난자 난구세포 복합체, 성숙난포 확인

12일 배양 후 각 난포의 성장 및 퇴행 (degeneration) 여부를 현미경으로 판단하였다 (Figure 1). 성장된 난포는 난포 내 공간이 충분히 부풀어 오르고 형태가 잘 유지되는 경우로 판단하였고, 난포 내 공간이 생성되지 않거나 커지지 않고, 난자 및 난구세포의 색이 어두어지거나 분절 (fragmentation)이 생성되고, 난구세포 없이 난자만 난포에서 분출되는 경우는 degeneration으로 판단하였다. 성장된 난포는 이전 배양액 10 µL를 제거하고 recombinant hCG (Ovidrel, Merck Serono)와 human epidermal growth factor (EGF)를 첨가한 기본 배양액 10 µL를 점적에 첨가하여 배란을 유도하였다. 배란은 hCG 첨가 36시간 후 배양 중이던 난포에서 분출되어 나온 난자 난구세포 복합체 (cumulus oocyte complex, COC)의 관찰 여부로 판단하였으며 (Figure 1), 각 군간 배란된 난포 및 COC의 유의한 형태적인 차이는 없었다. 각 군의 배란율 및 퇴행율, 배



**Figure 1.** Maturation of mouse follicle during in vitro culture (Culture day 1,  $\times 400$ , Bar=1.0  $\mu\text{m}$ ; Culture day 12 and after hCG,  $\times 40$ , Bar=10  $\mu\text{m}$ ; MII oocyte,  $\times 600$ , Bar=5.0  $\mu\text{m}$ ).

Yong Jin Kim. Profiles of microRNAs in Mice Follicles According to Gonadotropins during in vitro Culture. Korean J Reprod Med 2009.

란되지 않은 난포율은 배란된 난포 수, 퇴행된 난포 수, 배란되지 않은 난포 수를 각각 제외배양을 시행한 총 난포 수로 나누어 계산하였다. 분출된 COC에서 28-gauge 주사기를 이용하여 난자를 분리하여, 일차극체 (first polar body)와 배아소포 (germinal vesicle) 존재 여부로 이차중기 (metaphase II, MII)와 일차중기 (metaphase I, MI), 미성숙 난자 (GV)로 난자의 성숙도를 판단하였으며 (Figure 1), 각 군간 MII 및 MI, GV 난자의 유의한 형태적인 차이는 없었다. 각 군의 MII 및 MI, GV rate는 각각 MII, MI, GV의 수를 배란된 난포의 수로 나누

어 계산하였다.

### 3) Total RNA 추출

Total RNA은 hCG 첨가 전 성장된 난포와 hCG 첨가 후 MII 난자를 포함한 COC에서 추출하였다. hCG 첨가 전 성장된 난포에서의 total RNA 추출은 제외배양 12일째에 현미경으로 확인한 성장 난포를 28-gauge 주사기를 이용하여 난자와 난구세포로 분리하고, TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 각각 total RNA를 추출하였다. hCG 첨가 후 MII 난자를 포함한 COC에서의 total RNA 추출은 hCG 첨가 36시간 후 분출된 COC에

**Table 1.** List of primers used for real-time PCR

Primer	qRT-PCR
Mouse U6	CTCGCTTCGGCAGCACA
mmu-miR-16	CCCTAGCAGCACGTAAATATTGGCGA
mmu-miR-27a	GGTTCACAGTGGCTAAGTTCCGCAAA
mmu-miR-126	CCCCCATTATTACTTTTGGTACGCG
mmu-miR-721	CGCAGTGCAATTAAGGG

Yong Jin Kim. Profiles of microRNAs in Mice Follicles According to Gonadotropins during in vitro Culture. Korean J Reprod Med 2009.

서 28-gauge 주사기를 이용하여 난자와 난구세포로 분리하여 MII 난자로 확인된 COC의 난자와 난구세포도 TRIzol® Reagent를 이용하여 각각의 total RNA를 추출하였다.

**4) Poly A tailing 및 cDNA 합성**

추출된 total RNA는 상용 kit (The NCode™ VILO™ miRNA cDNA Synthesis Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 miR에 대한 Poly A tailing 및 cDNA 합성을 시행하였다. 간략히 설명하면, 10 pg의 total RNA를 5X Reaction Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 4 µl), 10X SuperScript® Enzyme Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 2 µl)와 혼합하여 37°C에서 60분, 95°C에서 5분 처리하여 합성하였다.

**5) 실시간 중합연쇄반응**

합성된 miR에 대한 cDNA는 상용 kit (EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 실시간 중합연쇄반응에 따른 정량적 분석을 시행하였다. 간략히 설명하면, 합성된 miR에 대한 cDNA 2 µl에 EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal 10 µl, 10 µM miR-specific forward primer 0.4 µl, 10 µM Universal qPCR Primer 0.4 µl, DEPC-treated water의 20-µl 혼합액을 만들어서 Rotor-gene instrument (Corbett Life Science, Sydney, New South Wales, Australia)를 이용하여 2분간 50°C, 2분간 95°C 처리 후, 95°C와 60°C로 각각 15초와 1분 동안 40회 반복하는 과정으로 중합연쇄반응을 시행하였다. 실시간 중합연쇄반응에 사용할 miR은 생쥐 난소에서

발현된다고 알려진 mmu-miR-16, -miR-27a, -miR-126, -miR-721 등의 시발체 (primer)를 합성하여 사용하였다 (www.microna.org, Table 1). 각 miR의 발현 정도는 U6 발현에 대한 비 (ct ratio)를 구한 후, 대조군에 대한 상대적인 발현 (Δ/Δ ct ratio)을 비교하였다.

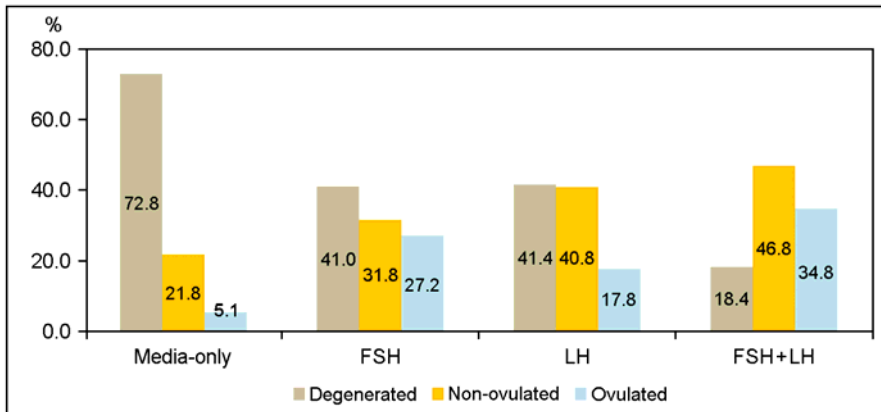
**3. 통계 분석**

본 연구는 각기 다른 개체군을 이용하여 3회 실험하였으며, 각 수치는 Pearson's chi-square와 Fisher's test, Mann-Whitney test 등을 이용하여 통계 처리하였고,  $p > .05$ 인 경우에 유의한 것으로 판단하였다.

**결 과**

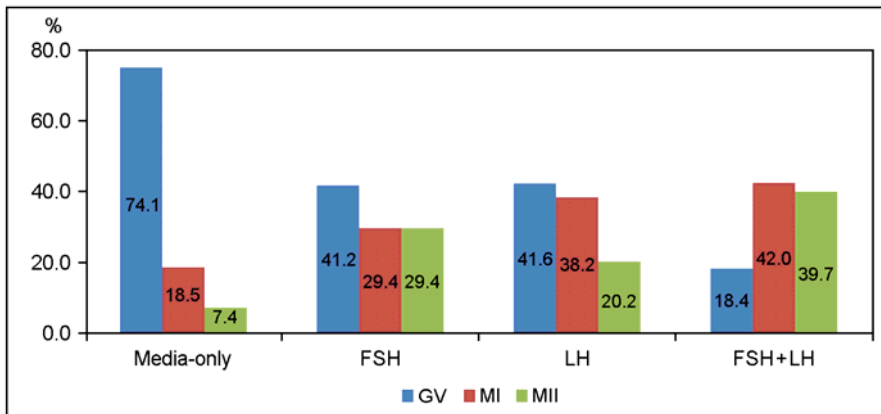
FSH+LH군에서의 배란율은 34.8% (174/500)로 대조군 (5.4% [27/500],  $p < .001$ ), FSH군 (27.2% [136/500],  $p = .006$ ), LH군 (17.8% [89/500],  $p < .001$ )에 비해 유의하게 높았다 (Figure 2). Degeneration rate도 FSH+LH군에서 18.4% (92/500)로 대조군 (72.8% [364/500],  $p < .001$ ), FSH군 (41.0% [205/500],  $p < .001$ ), LH군 (41.4% [207/500],  $p < .001$ )에 비해 유의하게 낮았다. FSH+LH군에서의 MII 생성율은 39.7% (69/174)로 대조군 (7.4 [2/27],  $p < .001$ ), FSH군 (29.4% [40/136],  $p = .039$ ), LH군 (20.2% [18/89],  $p = .001$ )에 비해 유의하게 높았다 (Figure 3).

난포 성장 중 대조군에 대한 각 gonadotropin군 난자의 상대적 miR 발현은 FSH군에서는 mmu-



**Figure 2.** Comparisons among control (media-only), FSH, LH, and FSH+LH groups in rates of degenerated, fully-grown without ovulation, and ovulated follicle of in vitro culture after hCG supplementation.

*Yong Jin Kim. Profiles of microRNAs in Mice Follicles According to Gonadotropins during in vitro Culture. Korean J Reprod Med 2009.*



**Figure 3.** Comparisons among control (media-only), FSH, LH, and FSH+LH groups in rates of MII, MI and GV in ovulated COC.

*Yong Jin Kim. Profiles of MicroRNAs in Mice Follicles According to Gonadotropins during in vitro Culture. Korean J Reprod Med 2009.*

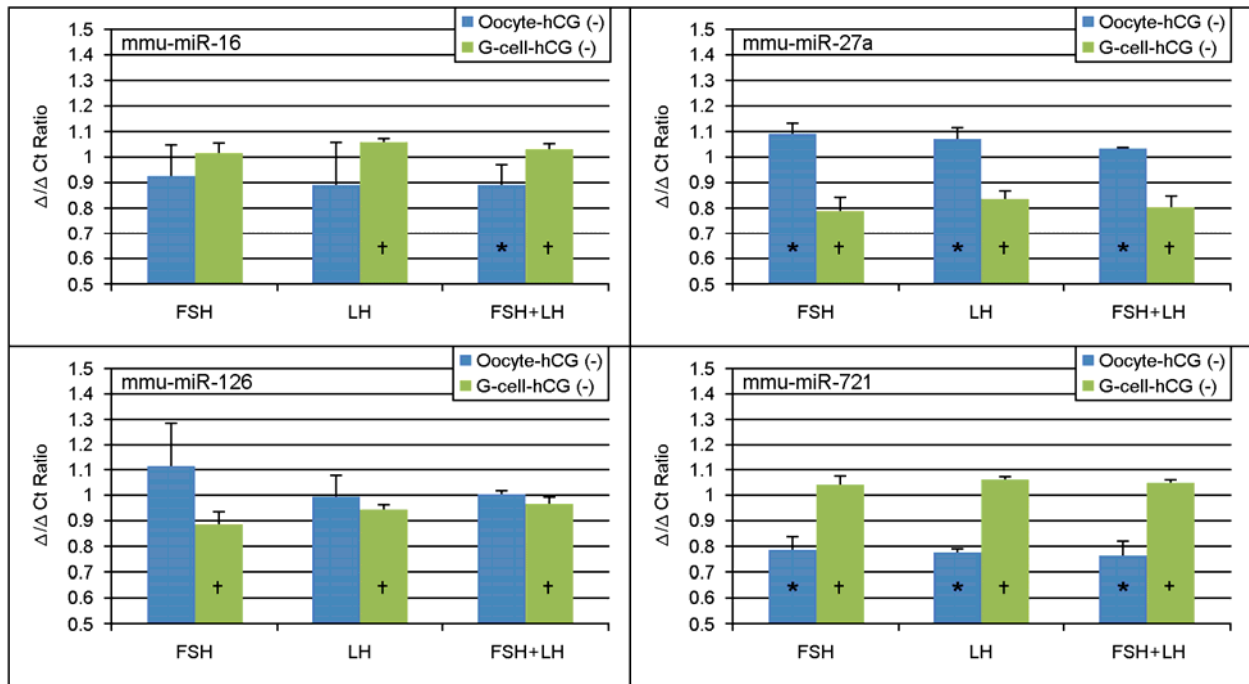
miR-27a, LH군에서는 mmu-miR-27a, FSH+LH군에서는 mmu-miR-27a가 유의하게 증가하였고, FSH군과 LH군에서 mmu-miR-721, FSH+LH군에서 mmu-miR-16, -miR-721이 유의한 감소하였다 (Figure 4). 같은 시기의 난구세포에서는 대조군에 비해 FSH군에서는 mmu-miR-721, LH군과 FSH+LH군에서는 mmu-miR-16, -miR-721이 유의하게 증가하였고, 모든 군에서 mmu-miR-27a, -miR-126이 유의한 감소를 보였다.

hCG 첨가 후의 난자에서의 miR 변화는 대조군에 비해 FSH군에서는 mmu-miR-16, -miR-27a, LH군에서는 mmu-miR-16가 유의하게 증가하였고, FSH+LH군에서는 유의한 증가를 보인 miR이 없었다 (Figure 5). 또한, FSH군과 LH군에서 각각 mmu-miR-721이 유의하게 감소하였고, FSH+LH군에서는 mmu-miR-126, -miR-721 등이 유의하게 감소하였다.

같은 시기에, 대조군에 대한 각 gonadotropin군 난구세포의 상대적 miR 발현은 FSH군에서는 mmu-miR-16, -miR-27a, -miR-126, -miR-721, LH군에서는 mmu-miR-16, -miR-126, -miR-721, FSH+LH군에서는 mmu-miR-721이 유의하게 증가하였고, LH군에서는 mmu-miR-27a이 유의하게 감소하였으나, FSH군과 FSH+LH군에서는 유의한 감소를 보인 miR이 없었다.

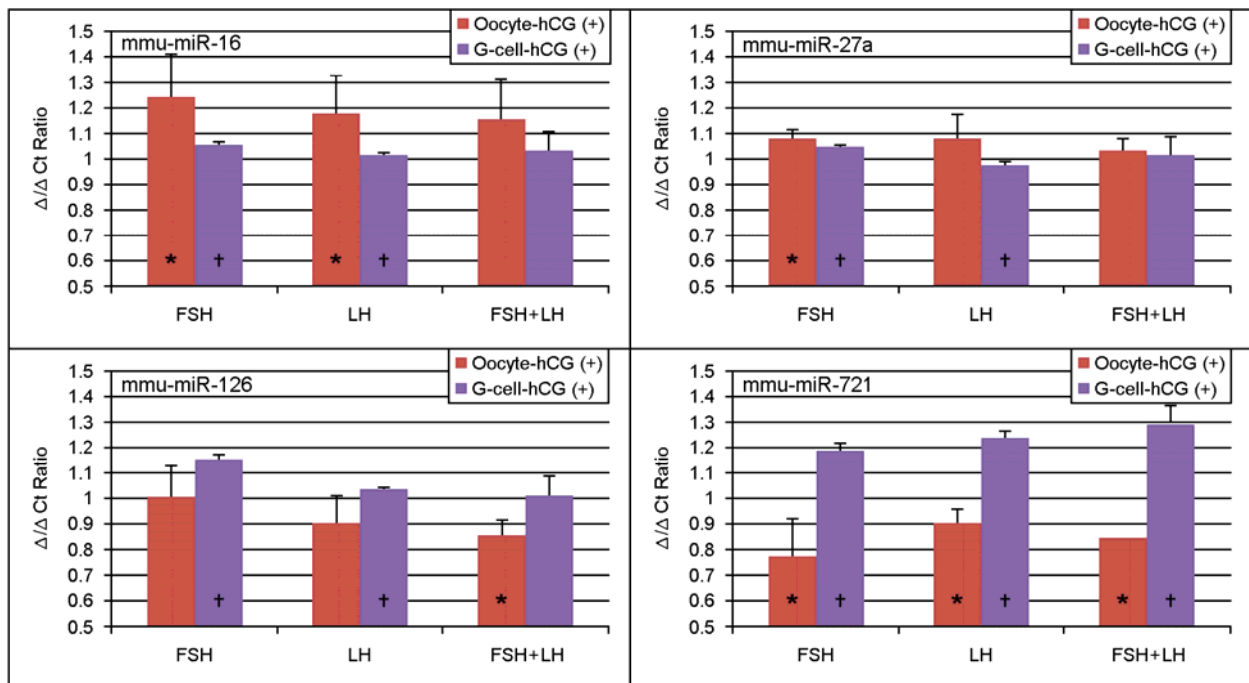
### 고 찰

본 연구는 생쥐 난포배양 중 gonadotropin의 종류에 따라 난자 및 난구세포에서의 miR 발현 양상의 차이를 확인하는 것을 목적으로 하였다. 본 연구의 결과는 gonadotropin에 따라 생쥐 난포는 배양 중 miR 발현의 양상에 차이를 보이며, 이러



**Figure 4.** Comparisons in profiles of miRs in oocytes and G-cells among FSH, LH, and FSH+LH groups after hCG supplementation corrected by control (media-only) group, bar=SD, \* $p < .05$  in oocyte; † $p < .05$  in G-cells

Yong Jin Kim. Profiles of microRNAs in Mice Follicles According to Gonadotropins during *in vitro* Culture. Korean J Reprod Med 2009.



**Figure 5.** Comparisons in profiles of miRs in oocytes and G-cells among FSH, LH, and FSH+LH groups after hCG supplementation corrected by control (media-only) group, bar=SD, \* $p < .05$  in oocyte; † $p < .05$  in G-cells

Yong Jin Kim. Profiles of microRNAs in Mice Follicles According to Gonadotropins during *in vitro* Culture. Korean J Reprod Med 2009.

한 차이는 남자와 난구세포간에도 다르고, hCG에 의한 성숙 유도에 따라서도 그 양상이 변화한다는 것을 보여주었다. 이러한 miR의 변화와 목표 유전자 발현의 변화간의 연관성에 대한 추후 연구가 필요하지만, 결론적으로 남자의 성숙과정이 miR의 변화와 연관되어 있다는 가설이 가능할 것으로 사료된다.

본 연구의 FSH+LH군의 배란율 및 남자 성숙률은 이전 연구의 결과와 유사하다.<sup>17</sup> 본 연구결과는 FSH+LH군에서 가장 높은 배란율 및 MII 생성율을 보여, FSH군 및 LH군에 비해 더 적절한 생쥐 난포배양 조건임을 증명하였다. 이러한 결과는 생쥐 난포배양의 조건에 대한 많은 이전 연구들과 상응하는 것이다.<sup>18-21</sup> FSH와 LH는 각각 난포배양 시 중요한 성장인자이나,<sup>18,19</sup> 두 gonadotropin이 동시에 첨가될 때가 가장 적절한 배양 조건이며,<sup>20</sup> 남자의 성숙률도 향상되는 것으로 알려져 있다.<sup>21</sup> 그러나, 본 연구 결과를 통해 이미 성숙과정을 마친 경우 현미경 관찰하의 난포와 MII의 형태는 구간 유의한 차이가 없음을 알 수 있었다. 즉, 적절한 배양 조건에 비해 낮은 효율의 배양 조건에서 성장한 난포와 그 남자의 경우도 형태학적인 관찰로는 구분할 수 없었다. 형태학적인 관찰에 의한 남자의 능력 (competence) 평가 방법은 가장 보편적으로 사용되기는 하나 한계가 있다.<sup>22</sup> 본 실험에서도 형태학적인 차이가 없는 각 구간 남자 및 난구세포 사이에 miR 발현 양상에 차이가 있음을 알 수 있었다. 그러나, 남자의 능력 평가에서의 miR의 의의에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구 결과는 유전자 발현의 내인적 조절인자로 알려진<sup>23</sup> miR의 동적 변화를 매개로 gonadotropin에 따른 남자 및 난구세포의 유전자 발현이 조절될 수 있음을 시사한다. 수정 (fertilization) 이후 착상전배아의 발달과정 중에는 전체 miR 발현 양의 증가와 함께 다양한 miR의 변화가 있다고 보고되었으나,<sup>24</sup> 난포 성장기의 남자 및 난구세포 성숙과정에서의 miR 변화에 대해서는 아직 많은 연구가 필요한 실정이다. 특히 LH surge에 의한 남자 및

난구세포의 변화는 성숙과정에 있어서 핵심 단계이며 이후 남자의 수정능과도 밀접한 관계를 갖기 때문에,<sup>25</sup> 이 시기의 miR 변화는 종자세포 (germ cell)의 발달과정을 이해하는데 매우 중요하다고 할 수 있겠다. 본 연구에서 관찰되었듯이 남자 성숙과정 중의 miR 발현 양상은 매우 다양하다. 특히, gonadotropin에 의한 성장과정 중의 mmu-miR-721와 hCG 첨가 후의 mmu-miR-27a 및 -miR-721 등이 남자와 난구세포간에 대상적인 (reciprocal) 증감 양상을 나타낸다는 것은 흥미로운 결과라고 할 수 있다. 이러한 현상은 난포의 성장과정에서 남자와 난구세포간의 일부 유전자의 발현이 miR 발현을 통해 상호 대응되는 양상이 있음을 함의한다. 이러한 각 miR 증감의 방향과 의미에 대해서는 실제 목표 유전자 발현의 변화를 통한 추후 연구가 필요할 것이다. 이때에는 대부분의 miR이 조절 대상으로 예상되는 목표 유전자 수가 매우 많기 때문에, 발현을 확인할 목표 유전자의 선택이 매우 중요하다고 할 수 있겠다.

본 연구에서는 생쥐 난소에서 발현되는 것으로 알려진 miR 중에서 4가지 (mmu-miR-16, -miR-27a, -miR-126, -miR-721)의 발현 양상을 살펴보았다. mmu-miR-16는 세포주기의 중요한 조절인자로 알려진 cyclin E1 및 cyclin D1의 발현을 감소시킨다고 보고되었는데,<sup>26,27</sup> 본 연구결과에서는 gonadotropin에 의한 난포 성장 중 남자에서는 감소, 난구세포에서는 증가하는 추세이나, hCG 첨가 후 배란된 남자에서는 증가하는 추세를 보였다. 또한 남자와 난구세포 사이에는 대상적인 변화방향을 보였다. mmu-miR-27a는 조혈세포들의 발달 및 성장, 분화의 주 조절인자로 알려진 Runx1 발현의 전사 후 (post-transcriptional) 단계 하향조절 (down regulation)한다고 알려져 있는데,<sup>28</sup> 본 연구에서는 성장 중과 hCG 첨가 이후 모두 증가의 양상을 보였고, 성장 중에 더 유의한 증가 양상을 보였다. 미세혈관의 내피세포에서도 발현되는 것으로 알려진 mmu-miR-126은<sup>29</sup> 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor)의 발현 증가와 관련 있다



고 보고되었는데,<sup>30</sup> 난자에서는 hCG 첨가 후 감소하는 양상으로 본 연구결과에서 나타났다. 신경계 및 수정 후 배아의 발달 및 분화에 관련된 것으로 처음 보고된 mmu-miR-721은<sup>24,31</sup> 본 연구결과 수정 전 gonadotropin 및 hCG의 영향에 의해서는 감소된다는 것을 확인할 수 있었다. miR 생성에 중요한 역할을 담당하는 리보핵산분해효소인 Dicer에 대한 유전자결손 실험을 통해 miR 생성이 차단되는 경우 난포생성에 장애가 있을 수 있다는 이전 연구는<sup>32</sup> 본 연구에서 나타난 miR의 역동적 발현 변화가 난자 성숙과정을 조절한다는 가능성을 뒷받침한다고 할 수 있을 것이다.

본 연구는 몇 가지 제한점을 가지고 있다. 첫째로 miR의 발현 양상이 gonadotropin군과 hCG 첨가에 따라 변화한다는 것은 확인하였으나 이러한 각각의 miR 증감과 난포 성장과의 관련성을 명확히 설명할 수 없었다. 이는 추후 각 miR의 세포 내 첨가 실험을 통해 확인해야 할 것으로 사료된다. 둘째는, hCG 첨가 전 난자의 분석에 있어서 형태학적으로 충분히 성장한 난포에서만 miR을 측정하였으나, 이러한 난자들의 이후 성숙능에 차이가 있었을 가능성을 배제할 수 없다는 것이다.

결론적으로 생쥐 난자의 배양 중 miR의 발현 양상은 gonadotropin의 종류 및, hCG에 의한 난자의 성숙에 따라 변화하며, 난구세포에서의 miR의 변화 양상과도 다르다. 이는 miR의 발현 양상이 난자 및 난포의 성장과정 및 성숙여부에 따라 변화되며 세포 성장에 대한 조절기능을 수행할 수 있음을 시사하는 것이며, 추후 목표 유전자 연구를 통한 증거가 필요할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 서울대학교병원 (0520080040 [2008-4578])과 보건복지가족부 (Korea Health 21 R&D project, 01-PJ10-PG6-01GN13-0002)의 지원을 받았다.

### 참고 문헌

1. Vegetti W, Alagna F. FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 684-94.
2. Zhang M, Ouyang H, Xia G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 399-409.
3. Kawashima I, Okazaki T, Noma N, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. *Reproduction* 2008; 136: 9-21.
4. Humaidan P, Papanikolaou EG, Tarlatzis BC. GnRH $\alpha$  to trigger final oocyte maturation: a time to reconsider. *Hum Reprod* 2009; 24: 2389-94.
5. Fan L, Ling J, Ma X, Cui YG, Liu JY. Involvement of HSP10 during the ovarian follicular development of polycystic ovary syndrome: Study in both human ovaries and cultured mouse follicles. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25: 392-7.
6. Hasegawa A, Kumamoto K, Mochida N, Komori S, Koyama K. Gene expression profile during ovarian folliculogenesis. *J Reprod Immunol* 2009; 83: 40-4.
7. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
8. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33.
9. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-5.
10. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005; 132: 4645-52.
11. Heo I, Kim VN. Regulating the regulators: posttranslational modifications of RNA silencing factors. *Cell* 2009; 139: 28-31.
12. Lai EC, Tam B, Rubin GM. Pervasive regulation of Drosophila Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev* 2005; 19: 1067-80.
13. Xu P, Vernooij SY, Guo M, Hay BA. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003; 13: 790-5.
14. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432: 226-30.



15. Sokol NS, Ambros V. Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev* 2005;19:2343-54.
16. Tesfaye D, Worku D, Rings F, Phatsara C, Tholen E, Schellander K, et al. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. *Mol Reprod Dev* 2009; 76: 665-77.
17. Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. Correlation of somatic cell steroid secretion and quality of generated oocytes after in-vitro stimulation of mouse follicles. *J Assist Reprod Genet* 2006; 23: 191-8.
18. Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum Reprod* 1997; 12: 759-68.
19. Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod* 1998; 13: 1292-302.
20. Eppig JJ. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biol Reprod* 1991; 45:824-30.
21. Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. In vitro culture and in vitro maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertil Steril* 2002; 77: 373-83.
22. Patrizio P, Fragouli E, Bianchi V, Borini A, Wells D. Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reprod Biomed Online* 2007; 15: 346-53.
23. Lynn FC. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 452-9.
24. Yang Y, Bai W, Zhang L, Yin G, Wang X, Wang J, et al. Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Dev Dyn* 2008; 237: 2315-27.
25. Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 297-305.
26. Wang F, Fu XD, Zhou Y, Zhang Y. Down-regulation of the cyclin E1 oncogene expression by microRNA-16-1 induces cell cycle arrest in human cancer cells. *BMB Rep* 2009; 42: 725-30.
27. Salerno E, Scaglione BJ, Coffman FD, Brown BD, Baccharini A, Fernandes H, et al. Correcting miR-15a/16 genetic defect in New Zealand Black mouse model of CLL enhances drug sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 2684-92.
28. Feng J, Iwama A, Satake M, Kohu K. MicroRNA-27 enhances differentiation of myeloblasts into granulocytes by post-transcriptionally downregulating Runx1. *Br J Haematol* 2009; 145: 412-23.
29. Larsson E, Fredlund Fuchs P, Heldin J, Barkefors I, Bondjers C, Genove G, et al. Discovery of microvascular miRNAs using public gene expression data: miR-145 is expressed in pericytes and is a regulator of Fli1. *Genome Med* 2009; 1: 108.
30. Liu B, Peng XC, Zheng XL, Wang J, Qin YW. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer* 2009; 66: 169-75.
31. Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Granda B, Rathjen T, Dalmy T. Identification of new central nervous system specific mouse microRNAs. *FEBS Lett* 2006; 580: 2195-200.
32. Lei L, Jin S, Gonzalez G, Behringer RR, Woodruff TK. The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice. *Mol Cell Endocrinol* 2009.

## = 국문초록 =

**목적:** 미세리보핵산 (microRNA, miR)은 전사 후 (post-transcriptional) 단계에서 목표 유전자 (target gene)의 발현을 억제하여 세포의 발달과 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 난포의 성장과정 중의 miR 발현 양상에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 존 연구는 생쥐 난포의 체외배양 후 생식샘자극호르몬 (gonadotropin) 과 사람용모성생식샘자극호르몬 (hCG) 첨가에 따른 난자와 난구세포에서의 miR 발현 양상을 살펴보고자 수행되었다.

**연구방법:** 생후 12일된 생쥐 (C57BL6)의 난소 적출 후, 전동 난포 (preantral follicle)를 분리하여 무작위로 20  $\mu$ L 점적의 배양액만 있는 군 (control group), 재조합 난포자극호르몬을 첨가한 군 (FSH group), 재조합 황체형성호르몬을 첨가한 군 (LH group), FSH와 LH를 같이 첨가한 군 (FSH+LH group)으로 나누어 배양하였다. 난포가 충분히 성장하였을 때, 다시 hCG를 첨가한 군 (hCG (+) group)과 첨가하지 않은 군 (hCG (-) group)으로 나누어 hCG (-) group에서 난자와 난구세포를 각각 분리하여 RNA를 추출하였다. 36시간 후, 배란된 난자 난구세포 복합체 (cumulus oocyte complex, COC)에서 난자와 난구세포를 각각 분리하여 RNA를 추출하고, mmu-miR-16, -miR-27a, -miR-126, -miR-721 등의 miR에 대한 primer를 이용하여 실시간 중합연쇄반응을 시행하였다.

**결과:** 배란율과 MII 난자 생성율은 다른 군들에 비해 FSH+LH군에서 유의하게 높았다. 각 군내의 난자와 난구세포 사이에서도 miR 발현 양상의 차이가 관찰되었다. 또한, 난자와 난구세포에서의 miR 발현 양상은 각 군간 차이가 있었으며, hCG (+)군과 hCG (-)군간에도 차이를 나타냈다.

**결론:** 생쥐 난포의 체외배양 중 난자 및 난구세포에서의 miR 발현 양상은 gonadotropin의 종류 및 난자의 성숙도에 따라 다르다. 이러한 결과는 표적 유전자의 발현에 대한 추후 연구를 통한 확인이 필요할 것으로 사료된다.

**중심단어:** 미세리보핵산, 생식샘자극호르몬, 체외배양, 생쥐