

생쥐 난소 내 Nesfatin-1/NUCB2 발현과 결합 부위 확인

김진희 · 윤미라 · 방소영 · 심지연 · 강희래 · 양현원[†]

서울여자대학교 자연과학대학 생명환경공학과

Expression of Nesfatin-1/NUCB2 and Its Binding Site in Mouse Ovary

Jinhee Kim, Mira Youn, Soyoung Bang, Jiyeon Sim, Heerae Kang and Hyunwon Yang[†]

Dept. of Bioenvironmental Technology, College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

ABSTRACT : It was recently reported that nesfatin-1/NUCB2, which is secreted from the brain, controls appetite and energy metabolism. The purpose of this research was to confirm whether or not the protein and its binding site should have been expressed in the mouse reproductive organs and to know the possible effects of nesfatin-1 on the reproductive function. Using the ICR female mouse ovary and uterus, the expression of NUCB2 mRNA was confirmed with the conventional PCR and the relative amount of NUCB2 mRNA in the tissues was analyzed with real-time PCR. Immunohistochemical staining was performed using the nesfatin-1 antibody to investigate the nesfatin-1 protein expression and the biotin conjugated nesfatin-1 to confirm the binding site for nesfatin-1 in the ovary. Furthermore, in order to examine if the expression of NUCB2 mRNA in the ovary and uterus is affected by gonadotropin, its mRNA expression was analyzed after PMSG administration into mice. As a result, the expression level of NUCB2 mRNA in the ovary and the uterus was as much as the expression level in hypothalamus. As a result of the immunohistochemical staining, nesfatin-1 proteins were localized at the theca cells, the interstitial cells, and some of the luteal cells. However, the granulosa cells in the follicles did not stain. Interestingly, the oocytes in the some follicles were stained with nesfatin-1. On the other hand, nesfatin-1 protein binding sites were displayed at the theca cells and the interstitial cells near the tunica albuginea. After PMSG administration the expression level of NUCB2 mRNA was increased in the ovary and the uterus. These results demonstrate that for the first time the nesfatin-1 and its binding site were expressed in the ovary and NUCB2 mRNA expression was controlled by gonadotropin, suggesting an important role in the reproductive organs as a local regulator. Therefore, further study is needed to elucidate the functions of nesfatin-1 on the reproductive organs.

Key words : Nesfatin-1, NUCB2, Ovary, PMSG, Uterus.

요 약 : 최근 시상하부에서 생성되는 nesfatin-1/NUCB2가 섭식과 에너지 대사를 조절한다는 사실이 새롭게 밝혀졌다. 본 연구에서는 이러한 단백질이 생쥐의 생식기관에서도 발현을 하는지, 그리고 그 수용체가 생식기관 내에 존재하는지를 확인함으로써 nesfatin-1이 생식기능에 미칠 수 있는 가능성을 알아보고자 하였다. 암컷 생쥐에서 난소와 자궁을 획득하여 conventional PCR 방법으로 NUCB2 mRNA 발현을 조사하였고, real-time PCR 방법으로 상대적인 NUCB2 mRNA 발현량을 비교 분석하였다. 난소 내 nesfatin-1 단백질의 발현 위치를 조사하기 위하여 nesfatin-1 항체를 이용한 면역조직화학염색법을 수행하였으며, biotin conjugated nesfatin-1을 이용하여 nesfatin-1 결합 부위를 확인하였다. 또한 생식소 내 NUCB2 mRNA 발현이 성선자극호르몬에 의해 영향을 받는지 알아보기 위해 PMSG 투여 후 NUCB2 mRNA 발현량을 조사하였다. 실험 결과, 생쥐의 난소와 자궁에서 확인된 NUCB2 유전자가 시상하부에서 만큼이나 많은 양이 발현되고 있었다. 면역조직화학적 염색 결과, nesfatin-1 단백질은 협막세포와 대부분의 기질세포에서 발현되었고, 일부 황체세포에서도 발현이 확인되었다. 반면, 난포 내 과립세포에서는 발현되지 않았으나, 특정 난포 내 난자에서는 발현됨을 확인하였다. 한편, nesfatin-1 단백질의 결합 부위는 난소 백막 주위의 기질세포와 협막세포에서 관찰되었다. 또한 PMSG 투여 후 난소와 자궁에서 NUCB2 mRNA의 발현이 유의하게 증가함을 확인하였다. 이상의 결과에서 난소 내 nesfatin-1 단백질의 발현

과 그 결합 부위의 존재는 nesfatin-1이 뇌에서 뿐만 아니라 생식기관에서도 국부조절인자로서 중요한 역할을 할 것으로 사료되며, 앞으로 생식기관에 미치는 nesfatin-1의 역할을 규명하기 위한 더 많은 연구가 필요하다고 판단된다.

[†] 교신저자: 서울시 노원구 공릉2동 126번지, 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과. (우) 139-774, (전) 02-970-5662, (팩) 02-970-5974, E-mail: hwyang@swu.ac.kr

서 론

사람과 생쥐의 세포주에서 처음으로 확인된 nucleobindin 단백질은 현재까지 nucleobindin 1(NUCB1)과 nucleobindin 2(NUCB2) 두 종류가 있는 것으로 알려지고 있으며(Miura et al., 1992; Kanai & Tanuma et al., 1992; Barnikol-Watanabe et al., 1994), NUCB2 만이 사람과 설치류에서 생리학 적 기능을 보이는 것으로 보고하고 있다(Miura et al., 1992). NUCB2는 전사 후 과정을 거치면서 pro-hormone convertase (PC)-1/3에 의해 nesfatin-1, nesfatin-2, nesfatin-3가 만들어 지며, 현재까지는 nesfatin-1에 대한 생리학적 기능만이 밝혀져 있다. 즉, nesfatin-1을 흰쥐의 뇌로 주사할 경우 식욕이 억제되며, nesfatin-1에 대한 항체를 뇌에 주사할 경우에는 식욕이 증가하는 것으로 보고하고 있다(Oh-I et al., 2006). 이러한 nesfatin-1은 시상하부에 위치하고 있는 활꼴핵(arcuate nucleus, ARC), 뇌실결핵(paraventricular nucleus, PVN), 교차위핵(supraoptic nucleus), 시상하부외측야 및 미주신경 등쪽핵과 뇌간에 위치하고 있는 고립로핵(nucleus tractus solitarius)에서 발현하는 것으로 알려져 있다(Brailoiu et al., 2007; Foo et al., 2008; Fort et al., 2008; Kohno et al., 2008). 시상하부의 여러 신경핵에서 발현되는 nesfatin-1은 PVN에 존재하는 신경세포의 막전위를 변화시켜 섭식을 조절하고(Price et al., 2008a), 또한 ARC 내 식욕 항진 신경세포에서 생성되는 neuropeptide Y(NPY)의 분비를 막아 식욕 억제 효과를 나타낸다(Price et al., 2008b). 생쥐를 이용한 실험에서 5-hydroxytryptamine(5-HT)을 처리할 경우 5-HT_{2C} 수용체를 통해 시상하부에서 NUCB2 발현을 증가시키며, 이러한 NUCB2 증가가 leptin과 관계없이 독립적으로 식욕을 억제시킬 수 있는 것으로 보고하고 있다(Nonogaki et al., 2008).

한편, nesfatin-1은 뇌에서 뿐만 아니라 소화기관에서도 다량 생성되는 것으로 보고하고 있다(Gonzalez et al., 2009; Stengel et al., 2009a). 설치류의 소화기관을 대상으로 nesfatin-1 항체를 이용하여 nesfatin-1 발현을 조사한 결과, 이자섬, 위 내분비 세포, 십이지장 Brunner 선에서 다량 발현되는 것이 확인되었다(Zhang et al., 2010). 특히, 식욕을 자극하는 단백질로 알려진 ghrelin이 분비되는 위 점막층 내 X/A-like 세포에서 nesfatin-1도 같이 발현되는 것이 확인되었다(Stengel et al., 2009b). 이렇게 생성된 nesfatin-1이 뇌에 작용하여 음식 섭

취를 줄이고, 아울러 위-십이지장의 운동성을 억제시킴으로써 식욕 억제 효과를 나타내는 것으로 보고하고 있다(Atsuchi et al., 2010; Stengel et al., 2009a). 아울러 췌장에서도 인슐린이 분비되는 베타세포에서 nesfatin-1이 함께 발현된다는 것이 면역조직화학염색 방법으로 확인되었고(Gonzalez et al., 2009), 이러한 nesfatin-1은 베타세포의 기능 및 당뇨 질환과 연관이 있는 것으로 추측하고 있으나, 그 기능에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다(Foo et al., 2010). 이상의 결과들은 nesfatin-1이 뇌에서 뿐만 아니라 소화기관을 통해서도 섭식과 당대사 조절에 관여할 수 있음을 제시하고 있다.

최근에 사람과 설치류의 지방 조직에서 nesfatin-1 단백질의 발현이 확인되었고, 특히 내장지방에서 보다 피하지방에서 더 많이 분비되는 것으로 보고하고 있다(Ramanjaneya et al., 2010). 또한 지방세포주를 이용한 실험에서 지방 전구세포가 성숙된 지방세포로 분화되는 과정에서 nesfatin-1의 발현이 급격히 증가하는 것이 관찰되었다(Ramanjaneya et al., 2010). 더욱이 비만도가 심한 사람일수록 혈중 nesfatin-1 농도가 높은 것으로 보아(Ramanjaneya et al., 2010), 지방에서 분비되는 nesfatin-1이 leptin에 의존하지 않고 독립적으로 음식 섭식을 조절할 수 있음을 보여준다(Shimizu et al., 2009).

흥미롭게도 이러한 nesfatin-1 단백질이 생식기관에서도 발현되는 것이 최근에 밝혀졌다(Garcia-Galiano et al., 2010). 즉, nesfatin-1 항체를 이용하여 생쥐의 정소를 염색한 결과 Leydig 세포를 포함한 간질세포들에서 염색되는 것이 확인되었다(Garcia-Galiano et al., 2010). 간질세포에서 발현되는 nesfatin-1이 testosterone 합성과 연관이 있는 것으로 추측하고 있으나, 아직 그 역할이 명확히 알려지지 않고 있다. 더욱이 암컷의 생식기관을 대상으로 nesfatin-1 발현을 연구한 결과는 현재까지 보고된 바 없다. 따라서 본 실험에서는 nesfatin-1 단백질이 암컷 생쥐의 생식기관에서 발현되는지, 그리고 그 결합 부위가 생식기관 내에 존재하는지를 확인하고, 아울러 생식선자극호르몬에 의해 nesfatin-1 발현이 조절 받는지를 조사함으로써 nesfatin-1이 생식기관에 미칠 수 있는 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. Conventional PCR에 의한 NUCB2 mRNA 발현 확인

6주령 ICR 계열 생쥐에서 대뇌, 시상하부, 뇌하수체, 위,

심장, 비장, 폐, 난소, 자궁 및 근육을 획득한 다음 각 조직에 RNA isoplus(TaKaRa, Japan) 300 μ l 를 첨가하여 조직분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 상온에서 5분간 방치하고 원심분리(14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 20분)한 다음, 상등액을 새 시험관에 옮겼다. 여기에 chloroform(Sigma, USA) 60 μ l를 첨가하여 15초간 섞은 후 상온에서 10분간 방치한 다음, 원심분리하였다(14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15분). 상등액을 따서 새 시험관에 옮긴 후 isopropanol(Sigma, USA) 150 μ l를 첨가하였고 위 아래로 조심스럽게 혼합한 다음, 상온에서 10분간 방치한 후 원심분리하였다(14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분). 상등액을 제거하고, 75% ethanol(Sigma, USA) 1 ml를 첨가하여 섞은 후 원심분리하였다(14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5분). Tube에 남아 있는 75% ethanol을 제거하고 DEPC(TaKaRa, Japan) 물을 넣어준 상태로 약 1분간 섞은 후 냉동 보관하였다. 추출한 total RNA의 양은 Nano-drop(Thermo Fisher Scientific Inc., USA)을 이용하여 측정하였다. Total RNA 3 μ g을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 즉, Total RNA 3 μ g과 Oligo dT 2.5 μ l를 넣고 DEPC 물로 총 부피를 10 μ l 맞춰준 다음, 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. 반응시킨 시료에 10X RT buffer 7 μ l, dNTP 2 μ l, mixture 1 μ l와 DEPC 물 10 μ l 넣은 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후 72 $^{\circ}$ C에서 15분 반응시켰다. 합성된 cDNA를 template DNA로 하여 β -actin forward 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC-3'; reverse 5'-ATCGTGGGCCGC TCTAGGCACC-3'과 NUCB2 forward 5'-TTTGAACACC TGAACCACCA-3'; reverse 5'-TGGTCTTCGTGCTTCCTC TT-3' primers(BIONICS, Korea)를 이용한 conventional PCR을 실시하였다. NUCB2 mRNA 발현 여부를 확인하기 위하여 6X loading dye 2 μ l와 DNA 10 μ l를 100 V에서 30분간 전기영동한 후 EtBr로 20분 동안 염색한 다음 UV하에서 관찰하였다.

2. Real-time PCR에 의한 NUCB2 mRNA 발현량 분석

위 방법으로 생쥐의 대뇌, 시상하부, 뇌하수체, 위, 심장, 간, 소장, 비장, 폐, 흉선, 난소, 자궁, 지방 및 근육에서 획득한 cDNA를 이용하여 NUCB2 mRNA 발현 정도를 real-time PCR 방법으로 분석하였다. 즉, cDNA에 NUCB2 forward 5'-AAAACCTTGGCCTGTCTGAA-3'; reverse 5'-CATCG ATAGGAACAGCTTCCA-3' primer(BIONICS, Korea)와 SYBR Green I(Roche, Switzerland)을 넣고 Light Cycler 480

(Roche, Switzerland)으로 NUCB2 유전자의 발현량을 분석하였다. 대조유전자로는 GAPDH forward 5'-TTGATGGC AACAACTCTCCAC-3'; reverse 5'-CGTCCCGTAGAC AAAATGGT-3'(BIONICS, Korea) 사용하였고, GAPDH 발현 정도를 기준으로 NUCB2 유전자의 상대적인 발현량을 계산하였다.

3. 면역조직화학염색법에 의한 Nesfatin-1 단백질 발현 및 결합 부위 확인

생쥐 난소에서 nesfatin-1 단백질의 발현 위치와 nesfatin-1 결합 부위를 확인하기 위하여 난소를 고정된 후 파라핀과 냉동 절편을 만들어 면역조직화학염색법으로 염색을 수행하였다. 즉, 생쥐에서 난소를 획득한 후 난소 주위의 지방을 제거하고 4% paraformaldehyde(Sigma, USA) 용액에서 1시간 동안 고정하였다. 고정된 난소 조직을 70%, 80%, 90%, 100% ethanol에 각각 30분씩 순차적으로 담가둔 후, 깨끗한 100% ethanol에 넣어 약 24시간 동안 보관하였다. 보관된 난소 조직을 1차 xylene, 2차 xylene에 각각 1시간씩 넣고, 이어 xylene와 파라핀(50%:50%) 혼합 용액에 2시간, 100% 파라핀 용액에 2시간 담가두었다. 파라핀이 침투된 난소를 형틀에 넣고 파라핀으로 포매하여 블록을 만든 다음 절편기를 이용하여 10 μ m 두께로 조직을 잘라 염색에 사용하였다. 난소의 냉동절편을 만들기 위해 획득한 난소를 20% sucrose 용액에 넣고 약 24시간 동안 4 $^{\circ}$ C 보관하였다. 용기에 O.C.T compound(Embedding Medium, Sakura, Belgium)를 적당량 채우고, 탈수시킨 난소 조직을 기포가 생기지 않도록 주의하여 넣었다. 이를 액체질소로 급속 냉각시켜 블록을 제작하고, 냉동 조직 절편기를 이용하여 10 μ m 두께로 조직을 잘라 염색에 사용하였다.

위 방법으로 준비된 난소의 파라핀 절편을 이용하여 면역조직화학염색법으로 nesfatin-1 단백질의 발현 위치를 조사하였다. 난소 절편이 부착된 슬라이드를 100% xylene와 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol로 3분간 단계적으로 처리한 후 흐르는 물로 세척하였다. 세척된 난소 조직은 PBS 용액에 5분간 처리한 다음, 1:50으로 희석된 anti-rabbit nesfatin-1 항체(PHOENIX Inc., USA)에 24시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. PBS 용액으로 세척하고 1:400로 희석된 Alexa fluor 594 anti-rabbit IgG(Jackson immunoresearch laboratory, USA) 항체와 상온에서 1시간동안 반응시킨 다음, 증류수로 세척하고

DAPI(Sigma, USA)로 대조염색을 수행하였다.

한편, 난소의 냉동절편을 사용하여 nesfatin-1 단백질의 결합 부위를 조사하였다. 난소의 냉동 절편이 붙어있는 슬라이드를 PBS 용액에 담가 O.C.T compound를 제거한 다음 1% paraformaldehyde 용액에서 5분간 고정시켰다. PBS 용액으로 세척한 후 1:500으로 희석된 biotin conjugated nesfatin-1 (PHOENIX Inc., USA)와 1시간 동안 상온에서 반응시켰으며, 다시 PBS 용액으로 세척한 후 1:500으로 희석된 Alexa fluor 594 streptavidin(Invitrogen, USA)으로 반응시켰다. 증류수로 세척하고 DAPI(Sigma, USA)로 대조염색을 수행하였으며, 형광 mounting 용액(fluorescent mounting media, Dako, Denmark)으로 봉입한 후 형광 현미경(Axioskop2, Carl Zeiss, Germany) 하에서 난소를 관찰하였다.

4. PMSG 투여에 따른 NUCB2 mRNA 발현 분석

6주령 ICR계열 암컷 생쥐의 복강에 PMSG(Pregnant mare serum gonadotropin, Sigma, USA)를 5 unit(100 μ l)를 투여하였으며, 대조군으로는 생리식염수 만을 100 μ l 투여하였다. 투여 24시간 후에 난소와 자궁을 획득하여 real-time PCR 방법으로 NUCB2 mRNA 발현을 조사하였다.

5. 통계학적 분석

각 실험군 당 다섯 마리의 생쥐를 사용하였으며, 모든 유전자의 발현 정도는 Mean \pm SEM으로 표시하였다. 통계학적 유의성 검정은 student *t*-test 방법을 사용하였으며, 대조군과 실험군을 비교하여 *p* 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 체내 다양한 기관에서 NUCB2 유전자 발현 확인

체내 다양한 기관에서 NUCB2 유전자의 발현을 확인하기 위하여 먼저 conventional PCR 방법으로 NUCB2 mRNA 발현 여부를 조사하였다. 분석한 모든 기관, 즉 대뇌, 시상하부, 뇌하수체, 위, 심장, 비장, 폐, 난소, 자궁 및 근육에서 NUCB2 유전자의 발현을 확인하였다(Fig. 1A). Conventional PCR 방법으로 확인된 NUCB2 mRNA의 발현을 정량적으로 분석하기 위하여 real-time PCR을 수행한 결과, 흥미롭게도 시상하부에서보다 뇌하수체에서 더 많은 발현량을 보였으며,

소화기관인 위에서도 다량의 NUCB2 mRNA가 발현하고 있음을 확인하였다. 특히, 생식기관인 난소와 자궁에서도 시상하부와 위에서 만큼이나 많은 양이 발현하고 있음을 확인할 수 있었다. 반면, 근육 조직에서는 거의 발현되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1B).

2. 난소 내 Nesfatin-1 단백질 발현 및 결합 부위 확인

난소 내 nesfatin-1 단백질 발현 부위를 확인하기 위하여 난소 절편을 이용하여 면역조직화학적 염색을 수행한 결과, nesfatin-1 단백질은 난포를 둘러싸고 있는 협막세포와 대부분의 기질세포에서 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 2a, 2b). 아울러 일부 황체세포에서 nesfatin-1 단백질 발현을 확인할 수 있었으나(Fig. 2f), 난포 내 과립세포에서는 nesfatin-1 단백질의 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 흥미롭게도 난자에서 nesfatin-1 단백질 발현을 확인할 수 있었는데, 난포의 발달 상태에 따라 염색 정도가 달리 관찰되었다(Fig. 2b, 2e). 난소 내에서 nesfatin-1 단백질이 결합하는 부위가 어디인지를 확인하기 위하여 표식자가 부착된 nesfatin-1을 이용하여 염색

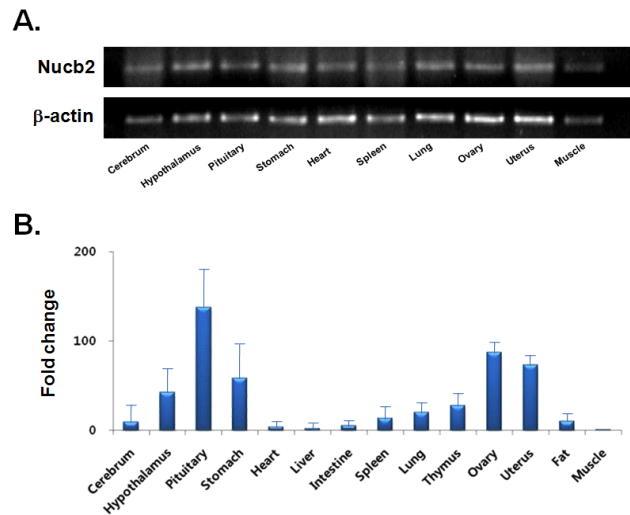


Fig. 1. The expression levels of nesfatin-1 mRNA in various tissues of female mice. (A) Nesfatin-1 mRNA expression in various tissues included ovary and uterus was confirmed by conventional PCR. (B) The expression levels of nesfatin-1 mRNA in various tissues were analyzed by real-time PCR. The expression levels of NUCB2 mRNA in the ovary and the uterus were as much as the expression level in hypothalamus. All data are represented as Mean \pm SEM(n=3).

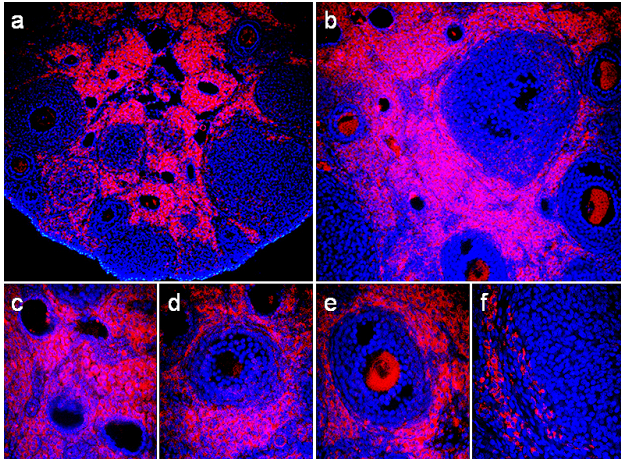


Fig. 2. The localization of nesfatin-1 protein in the mouse ovary. (A) Ovarian sections were stained with nesfatin-1 antibody to localize nesfatin-1 protein. Nesfatin-1 protein was expressed in the theca cells around the follicles, the interstitial cells, and some of the luteal cells, but the granulosa cells in the follicles did not stain. Interestingly, the oocytes in the some of the follicles were stained with nesfatin-1. a, b; original magnification, 100×. c, d, e, f; original magnification, 200×.

을 수행하였다. 염색 결과, 난소 백막 주위의 험막세포와 기질세포에서 nesfatin-1 단백질 결합 부위가 존재함을 확인하였다(Fig. 3).

3. PMSG에 의한 NUCB2 mRNA 발현의 증가

NUCB2 mRNA 발현이 생식선 자극호르몬의 영향을 받는 지 알아보기 위하여 5unit의 PMSG를 복강에 투여하고 24시

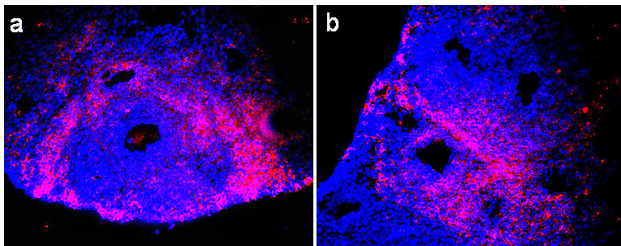


Fig. 3. The localization of nesfatin-1 binding sites in the mouse ovary. Ovarian section was stained with biotin conjugated nesfatin-1 to observe the nesfatin-1 binding sites. Nesfatin-1 protein binding sites were displayed at the theca cells and the interstitial cells near the tunica albuginea. a, b; original magnification, 200×.

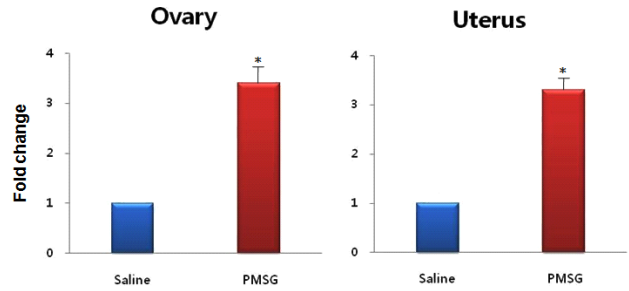


Fig. 4. The expression levels of nesfatin-1 mRNA in the ovary and uterus after PMSG administration. The amounts of nesfatin-1 mRNA expression were analyzed by real-time PCR. The nesfatin-1 mRNA expression was increased in the ovary and the uterus about 3 times after PMSG administration. All data are represented as Mean±SEM(n=5). *, $P < 0.05$ versus control.

간 후에 난소와 자궁에서 NUCB2 mRNA 발현을 real-time PCR 방법으로 조사하였다. 생리식염수만을 투여한 대조군과 비교해 볼 때 PMSG를 투여한 실험군의 난소와 자궁에서 NUCB2 mRNA의 발현이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

논 의

최근에 그 기능이 조금씩 밝혀지고 있는 nesfatin-1은 처음으로 그 역할이 규명된 시상하부에서 뿐만 아니라, 소화기관인 위와 췌장 그리고 지방 조직과 정소에서도 nesfatin-1의 발현을 보고하고 있다(Garcia-Galiano et al., 2010; Oh-I et al., 2006; Stengel et al., 2009b). 이에 본 연구에서는 암컷 생식기관인 난소와 자궁을 대상으로 NUCB2 mRNA의 발현을 확인하고, 난소 내 nesfatin-1 단백질의 발현 위치와 nesfatin-1의 결합 위치를 조사하여 nesfatin-1이 생식기능에 미칠 수 있는 가능성을 확인하고자 하였다.

먼저 난소와 자궁을 포함한 생쥐 내 다양한 기관에서 conventional PCR 방법으로 NUCB2 유전자의 발현을 확인한 결과, 분석한 모든 기관에서 NUCB2 mRNA가 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 각 기관에서 발현되고 있는 NUCB2 mRNA의 양이 어느 정도인지 conventional PCR 방법으로 정확히 분석하기에는 문제가 있었다. 이를 해결하기 위하여 real-time PCR 방법으로 각 기관의 NUCB2 mRNA 발현량을 정량적으로 분석한 결과, 여러 기관에서 발현되는 NUCB2

mRNA 양의 차이를 확인할 수 있었다. 현재까지 알려진 바에 의하면 시상하부에 존재하는 여러 신경핵에서 NUCB2가 다량으로 발현되는 것으로 밝혀졌으나(Oh-I et al., 2006), 본 연구에서 확인한 결과 시상하부에서보다는 뇌하수체에서 더 많은 양이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 최근 흰쥐의 시상하부와 뇌하수체를 대상으로 nesfatin-1 단백질과 NUCB2 mRNA의 발현을 조사한 논문에서도 시상하부의 여러 신경핵 부위와 더불어 뇌하수체에서 NUCB2이 다량 발현된다고 보고하고 있다(Foo et al., 2008; Goebel et al., 2009). 이러한 결과는 아마도 시상하부에 의해 뇌하수체의 NUCB2 발현이 조절될 수 있다는 것을 시사하고 있으며, nesfatin-1 단백질은 뇌하수체에 분비되는 다른 호르몬들과 마찬가지로 체내 다양한 기관을 표적으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구 결과, 위에서 발현되는 NUCB2 mRNA 양이 시상하부에서 발현되는 양보다 많은 것으로 확인됐다. 위에서 NUCB2 mRNA가 발현된다는 것은 이미 잘 알려진 사실로써 본 연구 결과와 일치하고 있으며, 그 기능을 밝히기 위해 현재 다양한 연구들이 진행되고 있다. 현재까지 밝혀진 바로는 흰쥐의 위 점막층에 존재하는 내분비 세포에서 nesfatin-1을 합성하며, 위 내분비 세포 중에서도 ghrelin을 분비하는 것으로 알려진 X/A-like 세포에서 nesfatin-1도 같이 합성하는 것으로 밝혀졌다(Stengel et al., 2009b). 아울러 흰쥐를 절식시키면 위에서 발현되는 NUCB2 mRNA 양이 감소되는 것으로 보아(Stengel et al., 2009b), nesfatin-1은 체내 에너지 대사를 조절하는 조절자로서 영양 상태에 따라 발현이 조절되는 것으로 보인다. 또한 위에서 분비되는 nesfatin-1은 소화기관에 작용하는 국부 조절 인자로 위와 십이지장의 운동성을 억제시킴으로써 식욕 억제 효과를 나타내는 것으로 보고하고 있다(Atsuchi et al., 2010).

본 연구에서 기존에 알려진 뇌와 소화기관에서 뿐만 아니라 생식기관인 난소와 자궁에서도 많은 양의 NUCB2 유전자가 발현되고 있음을 확인하였다. 현재까지 생쥐의 난소와 자궁에서 NUCB2의 발현을 보고한 논문은 없으며, nesfatin-1 단백질이 생식 기능에도 중요한 요소로 작용할 수 있음을 시사하고 있다. 이에 본 연구에서 확인된 난소 내 NUCB2 mRNA의 발현이 어떤 의미를 가지고 있는지를 알아보기 위하여, 먼저 난소 내 nesfatin-1 단백질의 발현 부위를 조사하였다. Nesfatin-1 항체를 이용하여 난소 내 nesfatin-1 단백질 발현 부위를 확인한 결과, nesfatin-1 단백질은 협막세포, 기질세

포, 일부 황체세포에서 발현되었다. 아직 난소 내 생성되는 nesfatin-1 단백질이 난소 기능에 어떤 영향을 미치는지 알 수 없으나, 협막세포에서 주로 발현되는 것으로 보아 스테로이드 호르몬 합성에 관여할 것으로 추측한다. 최근 발표된 한편의 논문에서 정소 내 간질세포 및 Leydig 세포에서 nesfatin-1 단백질이 발현되는 것을 면역조직화학염색법으로 확인한 결과가 있었다(García-Galiano et al., 2010). 이러한 결과는 협막세포와 기능이 비슷한 Leydig 세포에서 nesfatin-1 단백질의 발현을 확인했다는 면에서 본 연구 결과를 뒷받침한다고 할 수 있겠다. Nesfatin-1 염색 결과에서 흥미롭게도 난자에서 nesfatin-1 단백질 발현을 확인할 수 있었는데, 난포의 발달 상태에 따라 염색 정도가 달리 관찰되었다. 즉, 초기 난포에서보다는 성숙된 난포에 존재하는 난자에서 염색되는 경향을 보였다. 아직 난자 내에서 발현되는 nesfatin-1이 어떤 의미를 가지고 있는지 알 수 없으나, 난자의 성장과 연관이 있는 것으로 보이며, 난자의 세포자연사와도 연관이 있을 것으로 사료된다.

이상에 결과에서 NUCB2 유전자와 nesfatin-1 단백질이 난소 내에서 발현된다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 nesfatin-1 단백질이 난소에 작용하기 위해서는 nesfatin-1 수용체와 결합하여야 한다. 현재 nesfatin-1에 대한 많은 연구들이 진행되고 있으나, 그 수용체와 세포내 신호전달 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 최근 발표된 연구 결과에 따르면 nesfatin-1은 흰쥐 시상하부 내 신경세포에 작용하여 protein kinase A을 활성화시키면서 Ca 이온을 방출시키는 것으로 보고하고 있다(Brailoiu et al., 2007). 이러한 결과는 nesfatin-1 수용체가 G-protein coupled 수용체라는 것을 의미하고 있으나(Brailoiu et al., 2007), 아직까지 정확한 nesfatin-1 수용체의 구조와 기능은 밝혀지지 않고 있다. 따라서 nesfatin-1 수용체의 항체를 이용하여 nesfatin-1 수용체 발현 부위를 확인하는 것은 불가능하며, 본 연구에서는 이를 대신해서 biotin conjugated nesfatin-1을 이용한 염색을 수행하였다. 염색 결과, 난소 백막 주위의 협막세포와 기질세포에 nesfatin-1이 결합되는 것을 확인할 수 있었다.

난소 내 협막세포는 황체화 호르몬 자극에 의해 cholesterol을 androstenedione으로 전환시켜 분비시킨다. 분비된 androstenedione은 난포막을 통과하여 과립세포로 이동하며, FSH 자극으로 인해 과립세포 내에서 estradiol로 전환되어 분비된다. 이러한 일련의 스테로이드 호르몬 생성 과정에 있

어서 중요한 역할을 하는 협막세포는 LH 수용체뿐만 아니라 Activin A 수용체(Duleba et al, 2001), angiopoitin 수용체(Hayashi et al, 2003), BMP 수용체(Brankin et al, 2005), IGF-1 수용체(Voge et al, 2005) 등 다양한 수용체를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 협막세포는 Activin A(Silva et al, 2004), ADAMTS(Madan et al, 2003), IGF-1(Armstrong & Hogg, 1996), angiopoitin(Hayashi et al, 2003), BMP(Erickson & Shimasaki, 2003) 등 여러 종류의 단백질을 합성·분비하면서 난포 발달 및 난소의 기능을 국부적으로 조절하는 것으로 알려져 있다. 이러한 협막세포에서 nesfatin-1 단백질이 발현되고, 또한 nesfatin-1의 결합 부위가 존재한다는 것은 nesfatin-1이 난소 내 존재하는 nesfatin-1 수용체와 결합하여 난소의 기능을 국부적으로 조절할 수 있음을 시사한다.

한편, 생식기관에서 발현되는 NUCB2 유전자가 생식선자극호르몬에 의해 영향을 받을 수 있는지를 알아보기 위해 PMSG 투여 후 생쥐 난소와 자궁에서의 NUCB2 mRNA 발현량을 조사한 결과, PMSG 투여 후 난소와 자궁에서 NUCB2 mRNA 발현량이 급격히 증가한 것을 알 수 있었다.

이러한 연구 결과는 뇌하수체에서 분비되는 생식선자극호르몬에 의해 난소 내 NUCB2의 발현이 조절 받을 수 있음을 의미하며, 생리주기에 따른 난소와 자궁의 변화와도 연관이 있을 것으로 사료된다.

본 연구 결과에서 암컷 생쥐의 생식기관인 난소와 자궁에서 NUCB2 mRNA가 다량 발현된다는 것을 확인할 수 있었고, 더욱이 nesfatin-1 단백질과 그 결합 부위가 난소 내에 존재한다는 것을 처음으로 밝혔다. 또한, 생식선자극호르몬이 난소와 자궁에서 발현되는 NUCB2 mRNA의 양을 증가시킬 수 있다는 사실을 밝혔다. 이러한 연구 결과는 nesfatin-1이 시상하부에서 식욕을 조절하는 기능뿐만 아니라 생식기관에서도 생식기능을 조절할 수 있는 국부 조절 인자로서 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 앞으로 난소, 자궁 및 난자를 포함한 생식기관 내에서 발현하고 있는 nesfatin-1 단백질의 기능을 밝히기 위하여 더 많은 연구가 요구된다.

감사의 글

본 논문은 2010학년도 서울여자대학교 교내 학술특별연구비 지원을 받아 작성되었습니다.

인용문헌

- Armstrong DG, Hogg CO (1996) Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II and type-I IGF receptor gene expression in the ovary of the laying hen. *J Reprod Fertil* 106:101-106.
- Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai K, Ataka K, Tsai M, Koyama K, Sato Y, Kato I, Fujimiya M, Inui A (2010) Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroscience* 21:1008-1011.
- Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Gotz H, Henkel T, Karabinos A, Kratzin H, Barnikol HU, Hilschmann N (1994) Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375:497-512.
- Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ (2007) Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 148:5088-5094.
- Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG (2005) BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 29:593-604.
- Duleba AJ, Pehlivan T, Carbone R, Spaczynski RZ (2001) Activin stimulates proliferation of rat ovarian thecal-interstitial cells. *Biol Reprod* 65:704-709.
- Erickson GF, Shimasaki S (2003) The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 5:1-9.
- Foo KS, Brauner H, Ostenson CG, Broberger C (2010) Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: Distribution and relationship to glycaemic state. *J Endocrinol* 204: 255-263.
- Foo KS, Brismar H, Broberger C (2008) Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience*

156:563-579.

- Fort P, Salvert D, Hanriot L, Jégo S, Shimizu H, Hashimoto K, Mori M, Luppi PH (2008) The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 155:174-181.
- García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M (2010) Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 45:281-290.
- Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NW, Taché Y (2009) Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett* 452:241-246.
- Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S (2009) Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 381:643-648.
- Hayashi KG, Acosta TJ, Tetsuka M, Berisha B, Matsui M, Schams D, Ohtani M, Miyamoto A (2003) Involvement of angiotensin-converting enzyme system in bovine follicular development and atresia: messenger RNA expression in theca interna and effect on steroid secretion. *Biol Reprod* 69:2078-2084.
- Kanai Y, Tanuma S (1992) Purification of a novel B cell growth and differentiation factor associated with lupus syndrome. *Immunol Lett* 32:43-48.
- Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T (2008) Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 149:1295-1301.
- Madan P, Bridges PJ, Komar CM, Bristain AG, Rajamahendran R, Fortune JE, MacCalman CD (2003) Expression of messenger RNA for ADAMTS subtypes changes in the periovulatory follicle after the gonadotropin surge and during luteal development and regression in cattle. *Biol Reprod* 69:1506-1514.
- Miura K, Titani K, Kurosawa Y, Kanai Y (1992) Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem Biophys Res Commun* 187:375-380.
- Nonogaki K, Ohba Y, Sumii M, Oka Y (2008) Serotonin systems upregulate the expression of hypothalamic NUCB2 via 5-HT2C receptors and induce anorexia via a leptin-independent pathway in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 372:186-190.
- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M (2006) Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 443:709-712.
- Price CJ, Hoyda TD, Samson WK, Ferguson AV (2008a) Nesfatin-1 influences the excitability of paraventricular nucleus neurons. *J Neuroendocrinol* 20:245-250.
- Price CJ, Samson WK, Ferguson AV (2008b) Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res* 1230:99-106.
- Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK et al. (2010) Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: A novel depot specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology* 151:3169-3180.
- Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M (2009) Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 150:662-671.
- Silva JR, van den Hurk R, van Tol HT, Roelen BA, Figueiredo JR (2004) Gene expression and protein localization for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J Endocrinol* 183:405-415.
- Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y (2009a) Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: Role as regulators of food intake and body weight.

Peptides 31:357-369.

Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NW (2009b) Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 150:232-238.

Voge JL, Aad PY, Santiago CA, Goad DW, Malayer JR, Allen D, Spicer LJ (2004) Effect of insulin-like growth factors (IGF), FSH, and leptin on IGF-binding-protein mRNA expression in bovine granulosa and theca cells:

quantitative detection by real-time PCR. *Peptides* 25: 2195-2203.

Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y (2009) Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol* 16:1735-1741.

(received 5 December 2010, received in revised form 19 December 2010, accepted 20 December 2010)