

사람의 과배란 유도 후 난소 반응별 난포액 내 단백질 변화

이채식¹ · 이상찬¹ · 노용호¹ · 오대식¹ · 이용승² · 송은지² · 정희태³ · 양부근² · 박춘근^{2,*}

¹세화병원 불임연구소, ²강원대학교 동물생명과학대학, ³강원대학교 수의과대학

The Change of Protein Patterns in Follicular Fluid on Ovarian Response Following Controlled Ovarian Hyperstimulation (COH) of Human

Chae-Sik Lee¹, Sang-Chan Lee¹, Yong-Ho Rho¹, Dae-Sik Oh¹, Yong-Seung Lee², Eun-Ji Song², Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{2,*}

¹Infertility Institute, Saewha Hospital, Busan 607-843, Korea

²College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

It was conducted the experiment, divided into three groups as normal, poor and polycystic ovary syndrome, to detect the change of protein patterns in follicular fluid on ovarian response following controlled ovarian hyperstimulation for human IVF outcome. In the normal group, it was confirmed reproducible 57 spots in the detected total 81 spots. Then 1 spot was not found in the other groups. In the poor responder group, it was found reproducible 53 spots in the detected total 98 spots. 6 spots were down-regulation and 7 spots were up-regulation comparable with normal group. There were not 5 spots in poor responder group comparable with other groups. In the polycystic ovary syndrome group, it was expressed reproducible 53 spots in the detected total 80 spots and 3 spots were just expressed in this group. However, 4 spots were not found in polycystic ovary syndrome. 9 spots were up-regulation comparable with normal group. Significant up and down-regulation spots among the each groups were identified. The results were a cytosolic carboxypeptidase, a signal-induced proliferation-associated protein 1, a ceruloplasmin, a keratin(type II cytoskeletal 1), a polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2, a serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 4. It was identified that 8 spots, 6 kinds of protein are corresponded with NCBI database research, but 10 spots were failed in the identification. In conclusion, it has been confirmed change and expression of protein on the ovarian response following COH of human.

(Key words : 2-DE, COH, Follicular fluid, Proteins, Ovarian response, Human IVF)

서 론

1978년 영국에서 최초로 체외수정술을 통해 아기가 탄생한 이후 과배란 유도(COH; controlled ovarian hyperstimulation)를 통해 많은 난자를 획득하여 높은 임신율을 목적으로 체외수정이라는 불임 기술이 이용되고 있다. 사람의 체외수정술에 대한 성공 여부를 가늠할 수 있는 가장 큰 지표로 사용되고 있는 것은 여성의 나이 (Thomford 등, 1987; Faddy 등, 1992)이며, 혈액 내 estradiol 농도, 채취된 난자의 개수, 수정률, 배아이식, 기저 FSH 농도 등도 역시 많은 연구가들에 의해서 체외수정술의 성공 여부를 예측하는 신뢰성 있는 지표로 이용되고 있다 (Toner 등, 1991).

성공적인 체외수정을 위해서 적정수의 난자를 채취하고 높은 수정률 및 양질의 수정란을 획득할 수 있는 기대치가 증가하게 되며, 이를 바탕으로 배아를 이식함으로써 높은 임신율을 기대할 수 있다. 그러나 향상된 배양 조건과 배아 이식술을 통해 임신성공률이 향상되고 있음에도 불구하고, 생식선자극호르몬을 이용한 과배란 유도 시 채취된 난자의 수가 적은 저반응군 (poor responder)에서는 임신성공률이 낮은 것으로 조사되어 있다 (Loutradis 등, 2008). 그 중 난소 저반응군으로 분류될 수 있는 환자는 전체 불임환자 중 9~24%로 알려져 있으며 (Keay 등, 1997), 이들 저반응군은 체외수정 시 난자가 채취된다고 해도 공통적으로 난자 개수, 수정란의 질적 저하, 착상율의 저하 등의 불량한 예후를 가진다 (Tarlantzis 등, 2003). 일반적으로 저반응군은 연령 증가와 깊은 관련이 있으나,

* 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(Grant No. 109007-03)의 지원으로 수행된 연구 결과임.

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8600, E-mail: packck@kangwon.ac.kr

젊은 여성에서도 드물지 않게 관찰되고 있으며 (Fasouliotis 등, 2000), 이런 경우에 흔히 높은 기저 FSH 수치를 관찰할 수 있으나, 특별한 원인을 발견할 수 없는데도 불구하고 낮은 난소 반응을 보이는 경우도 있다 (Frattarelli와 Peterson, 2004).

무배란과 고안드로겐증을 특징으로 하는 내분비 질환인 다낭성 난소 증후군은 전체 가임기 여성의 약 5~10%에서 볼 수 있다. 발생 기전이 정확하게 밝혀져 있지는 않으나 여러 가지 임상 증상을 나타내는 증후군으로서, 무배란성 불임과 만성 고안드로겐증 및 인슐린 저항의 흔한 원인이 되고 있다. 인슐린 저항성은 진단 기준에는 속하지는 않으나, 다낭성 난소 증후군의 발생 및 치료와 밀접한 연관을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 인슐린의 지속적인 자극으로 인하여 난소에서 스테로이드 합성이 증가하게 되고, 성 호르몬 결합 단백질의 감소와 연관되어 고안드로겐증 등 병리적 상태가 유발된다. 다낭성 난소 증후군 환자에서 체질량 지수가 23 kg/m^2 이상인 경우 과배란 유도에 사용되는 FSH 용량 및 투여 기간은 증가되고, 착상률은 저하되는 것으로 나타나, 체질량지수는 다낭성 난소 증후군 환자들에서 체외수정시술의 결과에 영향을 미칠 수 있다(Jeon 등, 2009). 인슐린 저항성이 2형 당뇨병, 고혈압, 다낭성 난소 증후군, 대사 증후군 등과 관련이 있는데, 다낭성 난소 증후군 환자에 인슐린 감수성 약제인 metformin이나 troglitazone을 투여하여 인슐린 저항성을 교정함으로써 배란 기능과 월경 주기를 회복한다(Hwang 등, 2004).

Mendoza 등(2002)은 체외수정 후 임신에 성공한 여성과 실패한 여성의 난포액을 비교 분석한 연구에서 LH, growth hormone, prolactin, 17β -estradiol, insulin-like growth factor I 등이 임신에 성공한 여성에게서 실패한 여성에 비해 높은 농도를 보였고, interleukin-1은 오히려 낮은 농도를 나타났다고 보고한 바 있다. 난포액은 lipids, peptide hormones, growth factors 등의 다양한 생물학적 활성을 가진 물질들을 다량으로 함유하고 있다. 난포액의 화학적 구성 성분들은 난자의 성장 및 발달 정도를 반영할 수 있으며, 특정 성분들은 난포를 이루고 있는 세포들의 대사 활성도와 다양하고 특징적인 분비에 대한 지표로도 이용될 수도 있다(Nayudu 등, 1989). 난포액은 사람의 보조생식술에 있어서 난포의 성장과 난자의 수정에 중요한 역할을 담당(Kawano 등, 2004)하여 중요한 연구 대상으로 주목받고 있다. 과립막 세포와 협막 세포에서 분비된 몇몇 난포액 내 단백질들은 난포가 발달하는 동안 난자의 성숙을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 난포 형성에 관련된 단백질들을 동정하기 위한 중요한 재료로 이용되고 있다(Schweigert 등, 2006). 난포액 내의 몇몇 물질들은 수정과 수정 후 초기 배 발생과 관련한 생물학적 지표로 이용될 수도 있으며, 나아가 반복되는 체외수정시술 실패와 그와 관련된 과배란 유도 방법의 효과적인 개선에 도움을 줄 수 있다.

따라서 본 연구는 여성의 불임 요인 중 배란 장애와 관련하여 불임 치료를 위한 과배란 유도 후 난소 반응에 따라 정상군, 저반응군 그리고 다낭성 난소 증후군으로 나누어, 이 세 군의 난포액 내 단백질을 분석함으로써 증상에 대한 이해와 치료를 위한 계기를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

연구 대상

2010년 10월부터 2011년 2월까지 부산광역시 소재 불임전문병원에서 불임치료를 위해 성선자극호르몬으로 과배란 유도를 하고 체외수정시술을 실시한 불임부부를 대상으로 다낭성 난소 증후군을 가진 환자군 4명, 정상 소견의 환자군 4명, 저반응 환자군 4명을 대상으로 실험을 실시하였으며, 평균 연령은 각각 33.7세, 33.7세, 40.6세이었다. 실험 대상들은 과거 병력이 없고, 매독, 간염, HIV 검사 등에서 음성으로 나타났다. 다낭성 난소 증후군(polycystic ovary syndrome)의 진단은 2003년 ASRM/ESHRE Rotterdam consensus를 통해 설정된 'PCOS revised diagnostic criteria'에 따라 1) 희발월경 또는 무월경, 2) 임상적 또는 생화학적 검사 상 고안드로겐혈증, 3) 초음파 상 다낭성 난소의 세 가지 기준 중 2가지 기준을 만족하면서 동시에 비전형적 선천성 부신 과다 형성과 같은 다른 원인이 배제된 경우에 실험에 이용했다. 저반응군(poor responder)의 진단은 기저 난포자극 호르몬(basal FSH) 농도 12 mIU/ml 이상 또는 채취된 난자가 4개 이하 또는 hCG 투여일에 혈중 estradiol(E_2) 농도가 500 pg/ml 미만일 경우에 실험에 이용했다.

본 연구는 수정 방법(conventional IVF, conventional *in vitro* fertilization; ICSI, intracytoplasmic sperm injection), 채취된 난자의 개수, 배아 이식 실시 유무 및 개수, β -hCG 결과 등은 고려하지 않았다.

과배란 유도 및 난자 채취

저반응군의 과배란 유도를 위하여 GnRH antagonist 요법을 실시했으며, 나머지 두 군은 환자들의 상황이나 이전 체외수정시술 결과 등을 고려하여 GnRH antagonist 또는 GnRH agonist 요법을 선택적으로 사용하였다. 이 두 요법의 기본 원리는 조기 배란의 원인이 되는 LH surge를 막기 위한 것이다. GnRH antagonist 요법은 생리 3일째부터 과배란 유도를 위하여 성선자극호르몬(human recombinant FSH, Follitroph, LG 생명과학, Korea; Gonal-F, Serono, Switzerland; Puregon, Organon, Netherlands)을 환자에 따라 적절한 용량을 투여하거나, 반응에 따라 성선자극호르몬과 hMG(human menopausal gonadotropin, Pergoanl, Serono, Switzerland)를 병합하여 적절한 용량을 투여하였다. 혈중 estradiol 농도가 $200\sim 400 \text{ pg/ml}$ 이상일 경우나 초음파로 우세 난포의 직경이 14 mm 이상으로 확인된 날부터 GnRH antagonist(Cetrotide, Serono, Switzerland; Orglutran, Organon, Netherlands) 0.25 mg 을 hCG 투여일까지 매일 투여하였고, 지속적인 초음파 관찰로 우세 난포의 직경이 18 mm 이상이거나 3개 이상의 16 mm 난포가 관찰되면 hCG(Ovidrel, Serono, Switzerland)를 $10,000 \text{ IU}$ 를 투여하고 34~36시간 이후 흡입 펌프(Craft suction unit, Rocketmedical, England)의 음압을 120 mmHg 로 설정하고 질식 초음파를 이용하여 17 gauge 난자 채취용 바늘(Cook, Eight Mile Plains, Queensland, Australia)로 난자를 채취하였다. GnRH agonist 요법은 생리 21일째부터 GnRH agonist를 환자의 상황에 따라 투여약의 종류와 용량을 조절하여 hCG

투여일까지 매일 투여하였고, FSH 투여 및 난자 채취 과정은 GnRH antagonist 과정과 동일하게 실시하였다.

난포액 준비

난자 채취 시 함께 채취된 난포액에서 체외수정 시술에 이용할 난자를 회수하고 남은 난포액 중 육안으로 확인하여 혈액이 포함되지 않은 것만을 선택적으로 회수하여 1ml microcentrifuge tube(Sorenson, USA)에 분주한 후 4°C 14,000×g로 30분 동안 2회 원심분리를 실시하였고, 상층액을 회수하여 1ml microcentrifuge tube에 800 µl씩 분주한 후 분석에 이용할 때까지 -80°C 이하의 냉동고에 보관하였다.

이차원 전기영동

Clean-up kit(Amersham Biosciences, 80-6484-51, USA)를 이용해 단백질을 정제하고 Bradford method를 이용하여 총 단백질량이 300 µg/µl가 되도록 정량하여 Rehydration buffer(GE Healthcare, 71-5025-42AE, Sweden)에 용해하여 총 300 µl가 되도록 하였다. 이것을 18cm, pH 3~11 NL IPG strip(A, ersham Biosciences, 17-1234-01, Sweden)을 이용하여 20°C에서 16시간 동안 흡수시켰다. Isoelectric Focusing(IEF)는 Protean IEF cell(Bio-Rad)을 이용하여 hold 500 V에서 1시간, gradient 1,000 V에서 1시간, gradient 8,000 V에서 3시간, hold 8,000 V에서 1시간 30분 gradient 10,000 V에서 3시간, hold 10,000 V에서 55분으로 순차적으로 시행하였다. IEF가 끝난 IPG strip을 equalization buffer[1.5 M Tris(pH 8.8), urea, glycerol, SDS, DDW] 5 ml에 1,4-dithiothreitol(DTT) 0.08 g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 반응시킨 후, equalization buffer 5 ml에 Iodoacetamide(IAA) 0.1 g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 반응시켜 평형시켰다. SDS-PAGE는 10% acrylamide gel에 IPG strip을 sample로 이용하여 150 V에서 10분간, 50 mA에서 6시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 silver staining kit(GE healthcare Bio-Sciences AB, SE-751 84 Uppsala)을 이용하여 염색한 후 육안으로 검토하였고, 이미지 분석 프로그램인 Melanie 7로 분석하였다.

단백질 동정

Gel 조각을 destaining 하기 위해 25mM NH₄ bicarbonate(50% ACN)를 400 µl씩 분주해 15분간 침지시킨 후 상층액 제거 과정을 4회 반복한 뒤 10 mM NH₄ bicarbonate(50% ACN)를 40 µl씩 분주한 후 15분간 침지한 후 상층액을 제거하였다. Gel을 건조시키기 위해 100% ACN에 5분간 침지한 후, ACN을 제거하고 30~60분간 speed-vac하였다.

Gel에 cold trypsin solution[NH₄ bicarbonate(pH 8.8), promega equencing grade modified trypsin 20 µg/ml] 20 µl을 30분간 완전히 흡수시킨 후, 37°C에서 16~24시간 동안 배양하였다. 그 후, Gel 조각을 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) 35 µl에 넣고 60분간 진탕 혼합하여 상층액을 회수하는 작업을 2회 반복하였고, 회수된 두 상층액을 혼합하여 speed-vac으로 완전히 건조한 후 peptides를 추출하였다. 그 후, 0.1% TFA를 첨가하여 추출된 peptides를 용해하였다.

0.1% TFA, acetonitrile 혼합액과 0.1% TFA, acetonitrile, 물 혼합액으로 Zip-Tip (Zip-Tip C18, millipore)을 세척하였고, 0.1% TFA, 물 혼합액으로 Zip-Tip을 평형시킨 후, 0.1% TFA 10 µl에 녹인 시료를 pipetting으로 빠르게 Zip-Tip을 통과시켜 resin으로 시료가 붙게 하였다. 그 후 0.1% TFA, 물의 혼합액으로 Zip-Tip을 세척하였고, Zip-Tip으로부터 시료를 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (0.3% TFA, 50% acetonitrile) 1.8 µl에 용해하여 MALDI-TOF/MS에 이용하였다.

MALDI-TOF/MS는 applied biosystems voyager system 4372를 이용하였으며, 모든 결과는 matrix로 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid를 이용해 reflector-positive mode로 얻었다. MALDI-TOF/MS를 통해 얻어진 스펙트럼을 이용하여 MASCOT program으로 NCBI에서 database 검색을 실시하였다.

결 과

사람의 불임치료를 위한 과배란을 유도한 후 난소의 반응에 따른 난포액 내 단백질 양상을 확인하기 위해 난소의 반응에 따라 정상군, 다낭성 난소 증후군, 저반응군의 세 군으로 나누어 이차원 전기영동을 실시한 후 silver 염색을 한 이미지는 Fig. 1에서 나타났다.

정상군에서는 총 81개의 spots을 확인하였고, 그 중 57개의 spots에서 재현성을 보였다. 그 가운데 1번 spot은 다른 두 군에서는 확인되지 않았고, 정상군에서만 확인되었다.

저반응군에서는 총 98개의 spots 중 53개의 spots만이 재현성을 보였다. 저반응군만 가지고 있는 spot은 없었으며, 48번, 49번, 50번, 51번, 52번, 53번의 6개 spots은 정상군과 비교하여 단백질량이 감소한 것으로 분석되었고, 36번, 67번, 82번, 83번, 84번, 88번, 90번의 7개 spots은 정상군과 비교하여 단백질량이 증가한 것으로 분석되었으며, 1번, 34번, 35번, 54번, 55번, 56번의 6개 spots은 다른 두 군에서 모두 발견되거나 한 군에서만 발견되었으나, 저반응군에서는 발견되지 않았다. 그러나 저반응군에서 발견되지 않은 34번, 35번, 54번, 55번, 56번의 5개 spots은 다른 두 군에서 나타났으나, 재현성을 보이지는 않았다.

다낭성 난소 증후군에서는 총 80개의 spots 중 53개의 spots이 재현성을 나타냈다. 다낭성 난소 증후군에서만 확인된 spots은 117번, 118번, 130번 spots이었으며, 48번, 49번, 50번, 51번, 52번, 53번, 82번, 83번, 84번의 9개의 spots은 정상군과 비교하여 단백질량이 증가한 것으로 분석되었고, 정상군과 비교하여 단백질량이 감소한 spots은 발견되지 않았다. 1번, 36번, 67번, 90번의 4개 spots은 다른 두 군에서 모두 발견되거나 한 군에서만 발견되었으나, 다낭성 난소 증후군에서는 발견되지 않았다.

48번, 49번, 50번, 51번, 52번, 53번의 6개 spots에 대한 세 군 간의 단백질량의 증감에 유의적 차이를 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 다낭성 난소 증후군에서 가장 높은 단백질량을 확인할 수 있었고, 그 다음은 정상군이었으며 저반응군에서 단백질량이 가장 낮은 것으로 나타났다(Fig. 2). 다낭성 난소 증후군에서는 발견되지 않고, 정상군과

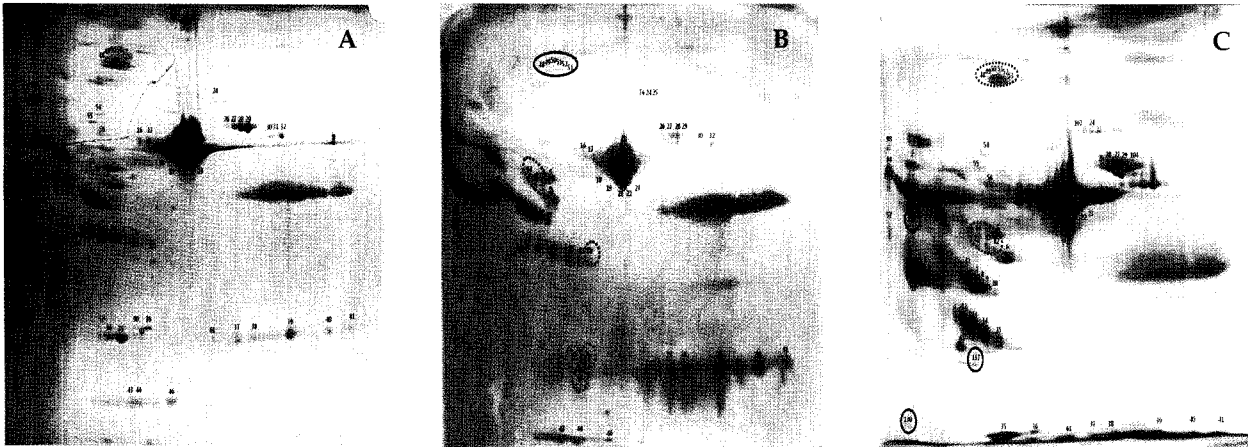


Fig. 1. The image of 2-DE protein patterns of normal (A), poor response (B) and polycystic ovary syndrome (C) follicular fluid following COH for human IVF outcome. A: A circle indicates that is just discovered in normal response compared with poor response and PCOS. B: A circle indicates down-regulated protein quantity compared with normal response. Dotted circles show up-regulated proteins quantity compared with normal response. C: A circles indicate that they are just discovered in PCOS compared with normal response and poor response. Dotted circles show up-regulated proteins quantity compared with normal response.

저반응군에서만 발견된 36번, 67번, 90번의 3개 spots에 대한 단백질량의 증감에 있어서 정상군에 비해 저반응군에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 것으로 조사되었다(Fig. 3). 세 군에서 모두 발견된 87번, 88번의 2개 spots 중 87

번 spot은 이미지 분석 결과, 단백질량이 정상군이 가장 적었고, 그 다음은 저반응군, 그리고 다낭성 난소 증후군이 가장 많은 것으로 조사되어졌으나 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 88번 spots은 다낭성 난소 증후군의 단백질량이 가장 많았고 정상군이 가장 낮았으며, 유의적 ($p < 0.05$) 차이를 보였다(Fig. 4). 82번, 83번, 84번 3개 spots의 단백질량에서도 유의적 차이를 ($p < 0.05$) 보였고, 다낭성 난소 증후군이 유의적으로 ($p < 0.05$) 가장 높게 나타났으며, 정상군이 가장 낮게 나타났다 (Fig. 5).

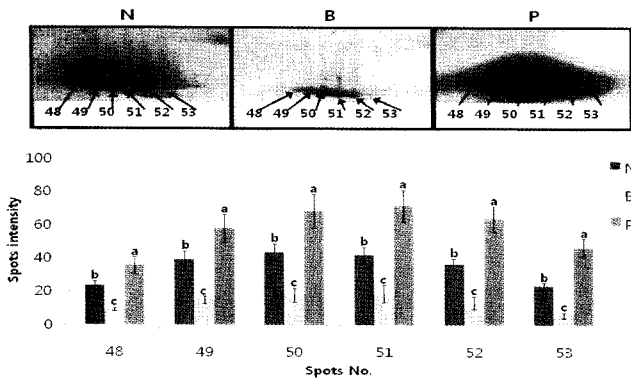


Fig. 2. Up and down-regulated protein expression of spot No. 48-53 among normal response(N), poor response(B) and PCOS(P) follicular fluid following COH for human IVF outcome. ($p < 0.05$)

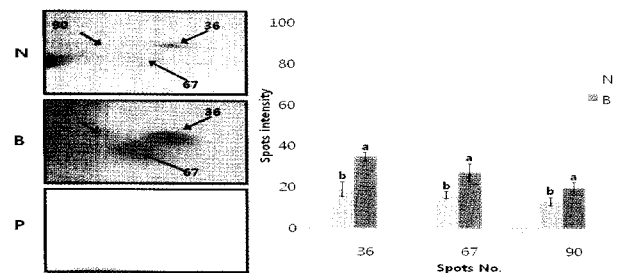


Fig. 3. Up and down-regulated protein expression of spot No. 36, 67 and 90 among normal response(N), poor response(B) and PCOS(P) follicular fluid following COH for human IVF outcome. ($p < 0.05$)

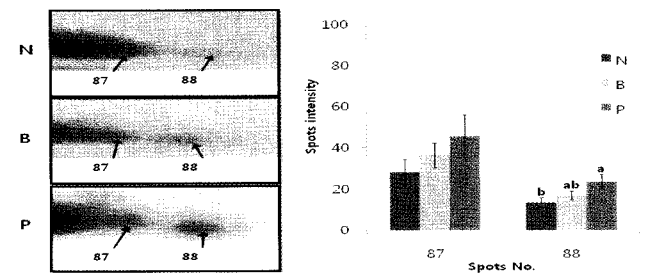


Fig. 4. Up and down-regulated protein expression of spot No. 87 and 88 among normal response(N), poor response(B) and PCOS(P) follicular fluid following COH for human IVF outcome. ($p < 0.05$).

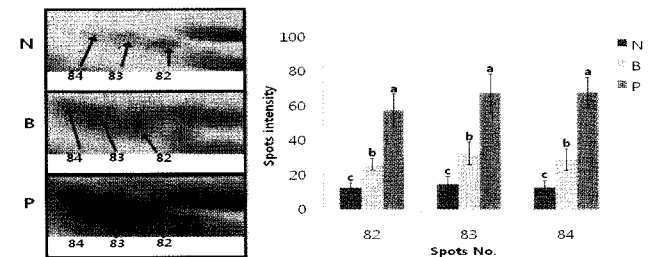


Fig. 5. Up and down-regulated protein expression of spot No. 82, 83 and 84 among normal response(N), poor response(B) and PCOS(P) follicular fluid following COH for human IVF outcome. ($p < 0.05$)

Table 1. Profiled proteins of follicular fluid from normal response, poor response and PCOS following COH for human IVF outcome

Spot No.	Protein name	Accession No.	Score	Coverage (%)	M.W. (Da)	pI
1	Cytosolic carboxypeptidase	Q8NEM8	2612	7.4	116012	9.0
49	Signal-induced proliferation-associated protein 1	Q96FS4	5113	10.9	112150	6.2
50	Ceruloplasmin	P00450	68583	8.1	122206	5.4
51	Ceruloplasmin	P00450	1.81e+6	11.2	122206	5.4
82	Keratin, type II Cytoskeletal 1	P04264	1.11e+8	28.7	66039	8.1
90	Keratin, type II Cytoskeletal 1	P04264	4.44e+10	38.4	66039	8.1
117	N-acetylgalactosaminyl-transferase 2	Q10471	223	5.1	64733	8.6
118	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 4	Q6NUP7	1294	8.8	99456	8.0

PCOS, polycystic ovary syndrome.

COH, controlled ovarian hyperstimulation.

IVF, *in vitro* fertilization.

각 실험군에서 재현성을 가진 spots 중 단백질량의 증감에 있어서 유의적 차이를 보이는 1번, 36번, 48번, 49번, 50번, 51번, 52번, 53번, 67번, 82번, 83번, 84번, 87번, 88번, 90번, 117번, 118번, 130번의 18개 spots을 선별하여 MALDI-TOF/MS와 NCBI database 검색을 이용하여 동정하였다.

그 결과, 정상군에서만 발견된 1번 spot은 cytosolic carboxypeptidase로 확인되었고, 49번 spot은 signal-induced proliferation-associated protein 1로 동정되었으며, 50번, 51번 spots은 ceruloplasmin, 82번, 90번 spots은 keratin, type II cytoskeletal 1과 일치했으며, 117번 spot은 polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2로 확인되었고, 118번 spot은 serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 4와 일치하였다(Table 1).

NCBI database로 검색한 18개 spots 중 8개 spots, 6종류의 단백질에서 일치하는 것으로 조사되었으나, 36번, 48번, 52번, 53번, 67번, 83번, 84번, 87번, 88번, 130번의 10개 spots은 동정에 실패하였다.

고찰

본 연구는 불임치료를 위해 GnRH agonist와 GnRH antagonist 방법으로 과배란을 유도한 후 난소 반응에 따라 정상군, 저반응군 및 다낭성 난소 증후군의 세 군으로 나누어 각 반응별 난포액 내 단백질 변화를 분석하기 위해 이차원 전기영동과 MALDI-TOF/MS를 실시하였다. 이차원 전기영동 후 각각의 실험군에서 재현성 있는 spots

만을 비교하였고, 그 중 각 실험군 간에 유의적으로 단백질량의 증감이 있는 spots만을 선별하여 분석 및 동정하였다.

정상군에서만 확인된 1번 spot은 MALDI-TOF와 NCBI database 검색 결과, cytosolic carboxypeptidase(CCP)과 일치하는 것으로 확인되었는데, 이 효소는 주로 세포 내에서 tubulin 합성에 관여하는 metalloproteinase로 효소의 각 subunit에 1개의 아연 이온을 가지고 있다. 신경세포와 근육세포가 분화하는 동안 alpha-tubulin C-말단의 tyrosine 잔여체 제거에 CCP가 직접적으로 관여하며, 그 조절 기전에 대한 연구가 있다(Webster 등, 1992). 쥐에서 CCP군 중 CCP-5의 과다발현이 microtubule polyglutamylation의 손실에 영향을 미친다는 연구도 있다(Kimura 등, 2010). Song과 Fricker(1996)는 소의 뇌하수체와 쥐의 뇌 세포를 이용한 실험에서 Metalloproteinase D(CPD)의 특징과 분포, 그리고 세포막을 통과하는 단백질을 만드는데 명백한 역할을 한다는 결과를 보고하였으며, Varlamov와 Fricker(1998)는 뇌하수체 전엽에서 유래된 corticotroph인 AtT-20 세포를 이용한 실험에서 metalloproteinase D(CPD)가 trans-Golgi network에 위치하며 세포 내의 수송과 관련이 있을 것으로 보고하였다.

저반응군에서 정상군, 다낭성 난소 증후군에 비해 유의적으로 단백질량에 감소를 보인 49번 spot은 database 검색 결과, signal-induced proliferation-associated protein 1(SPA-1)과 일치하였다. SPA-1은 주로 핵막 주변에 위치하고 있으며, Rap1A, Rap1B(저분자량 GTP 결합 단백질 Ras 족, 암 유발 유전자)의 2개 단백질을 조절하는데, Rap1 단백질은 신호를 받아 GDP가 결합한 불활성형에서

GTP가 결합한 활성형으로 전환되는데, 이때 SPA-1은 이 반응에서 GTPase 활성인자로 작용한다. SPA-1은 조혈모 전구세포에서 Rap1GTPase를 활성화시키는 주요한 단백질로 Ishida 등(2003)은 SPA-1 결핍을 조작한 쥐의 실험에서 사람의 만성, 급성 골수성 백혈병과 빈혈 및 골수 이형성 증후군과 같은 골수성 질환 양상을 보이는 것을 확인하였으며, 또한 SPA-1이 결핍된 쥐에서 비정상적인 Rap1GTP 축적이 나타났다. 그리고 SPA-1 gene이 회복되면 Rap1GTP 축적과 백혈병 유발소의 소멸을 확인하였고, SPA-1가 종양 억제 기능을 가지고 있는 것으로 보고하였다. 또한 Kometani 등(2004)은 Rap1은 세포 부착과 증식을 조절하는데 매우 중요한 역할을 하며, 쥐의 림프 조혈 조직에서 SPA-1이 결핍되면 T-cell 면역 결핍이 일어난다는 것을 확인하였고, Rap1과 SPA-1은 사람의 조혈모 악성 종양의 조절을 위한 독특한 분자 표적을 제공할 수 있다고 발표하였다.

50번, 51번 spots은 NCBI nr database 검색 결과, ceruloplasmin과 일치하였다. Ceruloplasmin은 일종의 ferroxidase로 한 분자당 6~7개의 구리가 결합되어 있는 당단백질이다. 적혈구에서 α -globulin 분획에 속해 있으며, 혈액에서 구리의 수송을 담당하고, 활성산소의 방출 없이 철의 산화작용과 이온의 세포막 수송에 관여한다. 쥐의 실험을 통해 ceruloplasmin이 간, 맥락총, 난황낭, 태반과 정소에 위치하며, 감염, 상처로 인해 ceruloplasmin의 농도가 증가하며(Aldred 등, 1987), ceruloplasmin이 티오바르비탈산 시험과 총 지질 과산화물 측정을 통해 저밀도 지질단백질의 산화 작용에 직접적으로 관여하며, 혈액과 혈관벽의 저밀도 지질단백질의 산화에 부분적으로 관여할 것으로 생각된다(Ehrenwald 등, 1994). Ceruloplasmin이 잠재적 산화촉진제의 활성을 보일 수 있고, 저밀도 지질단백질의 산화적 변형물을 야기할 수 있는데, 산화촉진제 활성은 이 ceruloplasmin의 구조와 밀접하다. 그리고 ceruloplasmin은 심혈관계 질환의 비의존적 위험요소일 수 있다(Fox 등, 1995).

82번, 90번 spots은 keratin, type II cytoskeletal 1과 일치하였다. 일반적으로 이 단백질은 머리털, 손톱, 피부 등 상피 구조의 기본을 형성하는 단백질로 알려져 있는데, protein kinase C와 같은 인산화 효소와 integrin beta-1과 활성화된 protein kinase C 수용체에 결합하여 암 유전자인 Src를 조절할 수 있다. 선천성 손발톱경고증은 상피조직 이상으로 매우 드문 상염색체 우성 질환이며, 손발톱 결합, 수상족저 각화증, 난포성 과각화증, 구강 상피 각화증을 가지는데, 이들 환자에서 type II keratin gene의 변이를 관찰할 수 있다(Bowden 등, 1995).

117번 spot은 polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase(GalNAc-transferase) 2와 일치하였다. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2는 O-결합형 올리고당 합성의 최초 반응을 촉매하는 기능을 가지고 있다. 간 질환을 앓고 있는 환자에서 galactosyltransferase의 혈장 내 농도가 증가하는데, 간 외의 질환에서는 정상적인 수준을 나타낸다. 그러나 GalNAc-transferase는 간 질환 환자에서 증가하지 않는다(Kim 등, 1972). 세포 내에서 O-glycosylation의 개시가 GalNAc-transferase에 의해 조절된다(Wandall 등, 1997). GalNAc-transferase 일종인 GalNAc-T9은 뇌에서 발견되며 O-glycosylation을 촉매한다(Toba 등, 2000).

118번 spot은 serine/threonine-protein phosphatase 4 (Ser/Thr-pp4) regulatory subunit 4와 일치하였다. Ser/Thr-protein phosphatase는 흥분성 조직의 세포막에서 이온(Ca^{2+} , Na^+ , K^+) 채널에 관여하며(Herzig와 Neumann, 2000), T 세포의 세포표면항원인 CD28과 CTLA-4의 활성화에 관여하는데, Ser/Thr-protein phosphatase 종류인 PP-2A는 CD28의 tyrosine 인산화반응을 음성적으로 조절하며, 오키다 산을 처리한 Jurkat leukemia T 세포 또는 음성음성돌연변이 조작을 통해 T 세포의 활성을 증가시켰을 때 억제된 PP2A 활성은 CD28에 의해 유도되고, CD28 및 CTLA-4와 같은 세포막 표면 수용체와 serine/threonine phosphatases 사이의 상호작용은 세포 활성화와 관련된 세포 내 신호전달 경로를 변환하는 특이한 기작을 대표한다(Chung 등, 2000). 또한 serine/threonine protein phosphatase는 항세포사 단백질인 Bcl-2와 Bcl-X, 그리고 세포사 유도 단백질인 BAD을 이용한 실험을 통해 protein phosphatases인 PP1, PP2A, PP2B에 의해 BAD가 탈인산화되어 세포사를 개시하게 된다는 연구도 있다(Klumpp와 Kriegstein, 2002). 최근 연구 보고에 의하면 Histone deacetylase 3(HDAC3) 활성이 serine/threonine protein phosphatase 4에 의해 조절되며(Zhang 등, 2005), 초기 배발생, 세포 증식, 세포사, 생물학적 주기와 암 등에 대한 serine/threonine protein phosphatases의 조절에 대한 관심이 증가하고 있다(Gallego와 Virshup, 2005).

본 연구에서 NCBI nr로 검색한 18개 spots 중 8개 spots, 6종류의 단백질에 대한 이전의 연구들이 있으나, 난포 및 난자의 발달과 관련된 연구는 찾을 수 없었다. 그리고 NCBI nr 검색 결과 일치하지 않은 10개 spots에 대해서는 아직 동정되지 않은 새로운 단백질일 가능성과 충분하지 못한 해당 단백질량, 그리고 MALDI-TOF 전처리 과정에서의 조작 오류에 대한 가능성을 가지고 있으며, 향후 연구가 더욱 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 난포액 내 단백질 이차원 전기영동 분석과 단백질 spot의 펩타이드 분석을 위한 장비의 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소와 공동실험실습관에 감사드립니다.

인용문헌

1. Aldred AR, Grimes A, Schreiber G, Mercer JF (1987): Rat ceruloplasmin. Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis. *J Biol Chem* 262:2875-2878.
2. Bowden PE, Haley JL, Kinsky A, Rothnagel JA, Jones DO, Turner RJ (1995): Mutation of a type II keratin gene(K6a) in pachyonychia congenita. *Nat Genet* 10:363-365.
3. Chung E, Fisher TS, Morgan RW, Robbins MD, Duerr JM, Vander Heiden MG, Gardner JP, Ham-

- bor JE, Neveu MJ, Thompson CB (2000): The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13:313-322.
4. Ehrenwald E, Chisolm GM, Fox PL (1994): Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest* 93:1493-1501.
 5. Fasouliotis SJ, Simon A, Laufer N (2000): Evaluation and treatment of low responders assisted reproductive technology: a challenge to meet. *J Assist Reprod Genet* 17:357-373.
 6. Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E (1995): Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci* 56:1749-1759.
 7. Frattarelli JL, Peterson E (2004): Effect of androgen levels on *in vitro* fertilization cycles. *Fertil Steril* 81: 1713-1714.
 8. Gallego M, Virshup DM (2005): Protein serine/ threonine phosphatases: life, death and sleeping. *Curr Opin Cell Biol* 17:197-202.
 9. Herzig S, Neumann J (2000): Effects of serine/threonine protein phosphatase on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80:173-210.
 10. Hwang KR, Choi YM, Choi DS, Baek KH, Jeon HW, Bae KB, Son YS, Ku SY, Jee BC, Suh CH, Kim SH, Kim JG, Moon SY (2004): Effect of metformin treatment and insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome. *Korean J Obstet Gynecol* 47:1949-1953.
 11. Ishida D, Kometani K, Yang H, Kakugawa K, Masuda K, Iwai K, Suzuki M, Itohara S, Nakahata T, Hiai H, Kawamoto H, Hattori M, Minato N (2003): Myeloproliferative stem cell disorders by deregulated Rap1 activation in SPA-1 deficient mice. *Cancer Cell* 4:55-65.
 12. Jeon GH, Kim CH, Kim EG, Kim SR, Kim SH, Chae HD, Kang BM (2009): The effect of body mass index of on the outcome of *in vitro* fertilization and embryo transfer in patients with polycystic ovary syndrome. *Korean J Obstet Gynecol* 52:75-82.
 13. Kawano Y, Fukuda J, Nasu K, Nishida M, Narahara H, Miyakawa I (2004): Production of macrophage inflammatory protein-3 α in human follicular fluid and cultured granulosa cells. *Fertil Steril supplement* 3 82:1206-1211.
 14. Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM (1997): Assisted conception following poor ovarian response to gonadotropin stimulation. *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 104:521-527.
 15. Kim YS, Perdomo J, Whitehead JS, Curtis KJ (1972): Glycosyltransferases in human blood. II. Study of serum galactosyltransferase and N-acetylgalactosaminyltransferase in patients with liver diseases. *J Clin Invest* 51:2033-2039.
 16. Kimura Y, Kurabe N, Ikegami K, Tsutsumi K, Konishi Y, Kaplan OI, Kunitomo H, Iino Y, Blacque OE, Setou M (2010): Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases(CCPs). *J Biol Chem* 285:22936-22941.
 17. Klumpp S, Kriegelstein J.(2002): Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Curr Opin Pharmacol* 2:458-462.
 18. Kometani K, Ishida D, Hattori M, Minato N (2004): Rap1 and SPA-1 in hematologic malignancy. *Trends Mol Med* 10:401-408.
 19. Loutradis D, Vomvolaki E, Drakakis P (2008): Poor responder protocols for *in-vitro* fertilization: options and results. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20:374-378.
 20. Mendoza C, Ruiz-Requena, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J (2002): Follicular fluid markers of oocyte development potential. *Hum Reprod* 17:1017-1022.
 21. Nayudu PL, Lopata A, Jones GM, Gook DA, Bourne HM, Sheather SJ, Brown TC, Johnston WI (1989): An analysis of human oocytes and follicles from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics. *Hum Reprod* 4: 558-567.
 22. Schweiger FJ, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U, Dudenhausen JW (2006): Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum Reprod* 21:2960-2968.
 23. Song L, Fricker LD (1996): Tissue distribution and characterization of soluble and membrane-bound forms of metalloproteinase D. *J Biol Chem* 271: 28884-28889.
 24. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J (2003): Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systemic review. *Hum Reprod Update* 9:61-76.
 25. Thomford PJ, Jelovsek FR, Mattison DR (1987): Effect of oocyte number and rate of atresia on the age of menopause. *Reprod Toxicol* 1:41-51.
 26. Toba S, Tenno M, Konishi M, Mikami T, Itoh N, Kurosaka A (2000): Brain-specific expression of a novel human UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase(GalNAc-T9). *Biochim Biophys Acta* 1493:264-268.
 27. Tonear JP, Philput CB, Jones GS, Muasher SJ (1991): Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of *in vitro* fertilization performance than age. *Fertil Steril* 55:784-791.
 28. Varlamov O, Fricker LD (1998): Intracellular trafficking of metalloproteinase D in AtT-20 cells: localization to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface. *J Cell Sci* 111:887-885.
 29. Wandall HH, Hassan H, Mirgorodskaya E, Kristensen AK, Roepstorff P, Bennett EP, Nielsen PA, Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Clausen H (1997): Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl-D-galactosa-

- mine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3. *J Biol Chem* 272: 23503-235014.
30. Webster DR, Modesti NM, Bulinski JC (1992): Regulation of cytoplasmic tubulin carboxypeptidase activity during neural and muscle differentiation: characterization using a microtubule-based assay. *Biochemistry* 31:5849-5856.
31. Zhang X, Ozawa Y, Lee H, Wen YD, Tan TH, Wadzinski BE, Seto E (2005): Histone deacetylase 3(HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes* 19:827-839.

(접수일자: 2011. 8. 17 / 채택일자: 2011. 8. 24)