

17 β -Estradiol에 의한 생쥐 자궁 내 Nesfatin-1/NUCB2 발현 조절

김진희¹ · 이경란¹ · 김현경¹ · 노소현¹ · 유혜민¹ · 문찬일² · 양현원^{1,*}

¹서울여자대학교 자연과학대학 생명환경공학과, ²한양대학교 의과대학 의생명연구원

17 β -Estradiol Regulates the Expression of Nesfatin-1/NUCB2 in Mouse Uterus

Jinhee Kim¹, Kyounggran Lee¹, Hyeonkyeong Kim¹, Sohyeon No¹, Hyemin Yoo¹,
Chanil Moon² and Hyunwon Yang^{1,*}

¹Dept. of Bioenvironmental Technology, College of Natural Sciences, Seoul Women's University,
Seoul 139-774, Korea

²Institute of Biomedical Science, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-792, Korea

ABSTRACT : Since nesfatin-1/NUCB2 involved in the control of appetite and energy metabolism was discovered for the first time in hypothalamus, many reports have shown its expression in various tissues. We also recently demonstrated that nesfatin-1/NUCB2 was expressed in the reproductive organs of mouse. However, no data exist on nesfatin-1/NUCB2 expression, regulation, and secretion in the uterus. Therefore, we examined the expression of nesfatin-1/NUCB2 in mouse uterus and the effects of PMSG and estrogen on its expression. NUCB2 mRNA expression in the uterus was determined by conventional and real-time PCR and nesfatin-1 protein expression was detected by western blotting. In immunohistochemistry staining, nesfatin-1 protein was localized at the epithelial cells of the uterine glands and endometrium. Nesfatin-1 protein binding sites were displayed at the epithelial cells of uterine glands and specific granulocytes including neutrophils. Additionally, to examine if the nesfatin-1/NUCB2 expression in the uterus is regulated by gonadotropin or estrogen, ovariectomized mice were treated with PMSG or 17 β -estradiol. The expression levels of NUCB2 mRNA in the uterus was significantly increased in the control mice after PMSG treatment, but not in the ovariectomized mice. In contrast, NUCB2 mRNA expression was dramatically increased in the ovariectomized mice after treatment with 17 β -estradiol. We report here for the first time that nesfatin-1/NUCB2 mRNA and protein express in the mouse uterus and its expression is regulated by estrogen secreted from the ovary, but not gonadotropin from the pituitary.

Key words : 17 β -estradiol, Nesfatin-1, NUCB2, PMSG, Uterus

요약 : 시상하부에서 생성되는 nesfatin-1/NUCB2가 음식물 섭취와 에너지 대사를 조절한다는 것이 보고된 이후로, 최근 생쥐의 난소와 자궁에서도 다량의 nesfatin-1/NUCB2가 발현된다는 사실이 새롭게 밝혀졌다. 그러나 생식기관에서 nesfatin-1/NUCB2 발현이 어떻게 조절되는지는 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 생쥐의 생식기관 중 자궁에서 nesfatin-1/NUCB2 발현이 어떠한 경로를 통하여 조절되는지를 알아보고자 난소를 제거한 암컷 생쥐에 성선자극호르몬과 17 β -estradiol을 각각 투여한 후 nesfatin-1/NUCB2 발현 정도를 조사하였다. 먼저 자궁 내 NUCB2 mRNA 발현을 conventional PCR과 real-time PCR 방법으로 확인하였으며, 아울러 western blot 방법으로 nesfatin-1 단백질의 발현을 관찰하였다. Nesfatin-1 단백질 발현 위치 및 결합 부위를 조사하기 위하여 면역조직화학염색을 수행한 결과, nesfatin-1 단백질은 자궁내막과 자궁샘을 둘러싼 상피세포에서 발현되었으며, nesfatin-1 단백질 결합 부위는 자궁샘을 둘러싼 상피세포와 호중구를 포함하는 특정 과립세포에서 관찰되었다. 난소를 제거한 암컷 생쥐에 성선자극호르몬을 투여한 결과, 자궁 내

NUCB2 mRNA 발현량은 대조군과 성선자극호르몬 투여군 사이에 차이가 없었으나, 같은 방법으로 난소를 제거한 암컷 생쥐에 17 β -estradiol을 투여한 결과, 대조군보다 17 β -estradiol 투여군에서 NUCB2 mRNA 발현량이

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

유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 자궁 내 nesfatin-1 단백질의 발현량 또한 NUCB2 mRNA 발현 양상과 유사하게 17β -estradiol 투여군에서 발현량이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과, 자궁 내 nesfatin-1/NUCB2 발현이 뇌하수체에서 분비되는 성선자극호르몬에 의해 조절 받기보다는 난소에서 분비되는 17β -estradiol에 의해 조절 받는다는 사실이 밝혀졌으며, 이러한 결과는 발정 주기에 따른 혈액 내 17β -estradiol 농도의 변화가 자궁 내 nesfatin-1 발현을 조절함으로써 nesfatin-1이 자궁내막 발달과 착상을 조절할 수 있는 국부조절인자로 작용할 수 있음을 제시하고 있다.

서론

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-Watanable et al., 1994), NUCB2 만이 사람과 설치류에서 생리학적인 기능을 보이는 것으로 알려져 있다(Miura et al., 1992). NUCB2는 전사 후 과정을 거치면서 pro-hormone convertase (PC)-1/3에 의해 nesfatin-1, nesfatin-2, nesfatin-3가 만들어지며, 현재까지는 nesfatin-1에 대한 생리학적 기능만이 밝혀져 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 등 쪽핵과 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). 시상하부에서 발현되는 nesfatin-1은 PVN에 존재하는 신경세포의 막전위를 변화시켜 음식물 섭취를 조절하고(Price et al., 2008a), 또한 ARC 내 식욕 항진 신경세포에서 생성되는 neuropeptide Y(NPY)의 분비를 막아 식욕억제 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 소화기관, 지방세포에서도 다량 생성되는 것으로 보고하고 있다(Gonzalez et al., 2009; Stengel et al., 2009b). 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, 식

욕을 자극하는 단백질로 알려진 ghrelin이 분비되는 위 점막층 내 X/A-like 세포에서 nesfatin-1도 같이 발현되는 것이 확인되었다(Stengel et al., 2009a). 이렇게 생성된 nesfatin-1이 뇌에 작용하여 음식물 섭취를 줄이고, 아울러 위-십이지장의 운동성을 억제시킴으로써 식욕 억제 효과를 나타내는 것으로 보고하고 있다(Atsuchi et al., 2010; Stengel et al., 2009a). 최근에는 사람과 설치류의 지방조직에서도 nesfatin-1 단백질의 발현이 확인되었고, 특히 내장지방에서보다 피하지방에서 더 많이 분비되는 것으로 보고하고 있다(Ramanjaneya et al., 2010).

흥미롭게도 이러한 nesfatin-1 단백질이 생식기관에서도 발현되는 것이 최근에 밝혀졌다(Garcia-Galiano et al., 2010). 수컷의 생식기관인 정소의 Leydig 세포를 포함한 간질세포들에서 nesfatin-1이 염색되는 것이 확인되었으며(Garcia-Galiano et al., 2010), 간질세포에서 발현되는 nesfatin-1이 테스토스테론 합성과 연관이 있는 것으로 추측하고 있으나, 아직 그 역할은 명확히 알려지지 않고 있다. 또한 본 연구실에서도 수컷 생쥐의 생식기관인 정소와 부정소에서 nesfatin-1이 발현되고 nesfatin-1의 결합 부위가 존재한다는 것을 밝혔으며, 성선자극호르몬에 의해 정소와 부정소 내 nesfatin-1 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Kim et al., 2011). 뿐만 아니라, 암컷의 생식기관인 난소에서도 nesfatin-1 단백질이 발현되고 nesfatin-1의 결합 부위가 존재함을 확인하였으며, 아울러 성선자극호르몬에 의해 난소와 자궁에서 nesfatin-1의 발현이 증가한다는 것을 보고한 바가 있다(Kim et al., 2010). 그러나 암컷의 생식기관인 자궁을 대상으로 nesfatin-1 발현을 연구한 결과는 현재까지 보고된 바가 없으며, 또한 자궁에서 nesfatin-1 발현이 어떠한 호르몬에 의해 조절 받는지도 알려진 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 자궁에서 nesfatin-1 발현 여부를 조사하고, nesfatin-1의 결합 부위가 존재하는지를 확인하고자 하였다. 아울러 뇌하수체에서 분비되는 성선자극호르몬과 난소에서 분비되는 17β -estradiol을 각각 투여함으로써 어

며한 호르몬이 자궁 내 nesfatin-1 발현을 조절하는지 알아보
고자 하였다.

재료 및 방법

1. Conventional PCR에 의한 NUCB2 mRNA 발현 확인

5주령 ICR 계열 암컷 생쥐에서 시상하부, 뇌하수체, 위, 난소, 자궁을 획득하였다. 각 조직에 RNA isoplus(TaKaRa Bio, Shiga, Japan) 300 μ l를 첨가하고 조직분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄한 조직은 상온에서 5분간 방치하고 원심분리한 다음(14,000 rpm, 4°C, 20분), 상등액을 새 시험관에 옮겼다. 이에 chloroform(Sigma, St. Louis, MO) 60 μ l를 첨가하여 15초간 섞은 후 상온에서 10분간 방치한 다음, 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 15분). 상등액을 새 시험관에 옮긴 후 isopropanol(Sigma, St. Louis, MO) 150 μ l를 첨가하여 조심스럽게 혼합하고, 상온에서 10분간 방치한 다음 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 10분). 상등액을 제거하고, 75% ethanol 1 ml를 첨가하여 섞은 후 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 5분). 시험관에 남아있는 ethanol을 제거하고 DEPC(TaKaRa Bio, Shiga, Japan) 20 μ l를 넣어준 상태로 약 1분간 섞은 후 냉동 보관하였다. 추출한 total RNA의 양은 Nano-drop(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)을 이용하여 측정하였다. 각 조직으로부터 RNA를 추출하여 RT PCR(reverse transcription PCR) 방법으로 cDNA를 합성한 다음, β -actin(forward 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC-3'; reverse 5'-ATCGTGGGCCGCTCTAGGCACC-3')과 NUCB2(forward 5'-TTTGAACACCTGACCACCA-3'; reverse 5'-TGGICTTCGTGCTTCCTCTT-3') primer(BIONICS, Korea)를 이용한 conventional PCR을 실시하여 NUCB2 mRNA 발현 여부를 확인하였다.

2. Western Blot에 의한 Nesfatin-1 단백질 발현 확인

5주령 ICR 계열 암컷 생쥐에서 시상하부, 뇌하수체, 위, 난소, 자궁을 획득하였다. 각 조직에 EDTA homogenization buffer(0.606 g Tris-Base, 0.876 g NaCl, 0.036 g EDTA, 100 μ l Tween20, 100mM PMSF) 300 μ l를 넣고 분쇄 후, 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 20분). 추출한 단백질 양은 BCA 단백질 정량법을 통해 SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로

측정하였다. 정량한 단백질은 5% mercaptoethanol, 5X SDS sample loading buffer와 섞어 95°C에서 5분간 끓였다. 이를 12% SDS-PAGE gel에 넣고 1X Tris-Glycine SDS Running buffer(KOMABIOTECH, Korea)로 전기영동한 후, PVDF membrane(Amersham: GE health-care, Buckinghamshire, England)에 옮겨 24시간 동안 4°C에 보관하였다. Membrane을 ponceau-S로 염색하고 헹구낸 다음, 3% Casein/PBS Blocking Solution(KOMABIOTECH, Korea)으로 실온에서 2시간 처리한 후 rabbit anti-rat nesfatin-1 antibody(Phoenix Pharmaceuticals, INC., Burlingame, CA)와 anti-mouse β -actin antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Paso Robles, CA)로 실온에서 한 시간 처리하였다. 이어 goat anti-rabbit IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Paso Robles, CA)와 donkey anti-mouse IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Paso Robles, CA)로 각각 한 시간 동안 처리한 후, ECL plus Western Blotting Detection Reagents(Amersham; GE health-care, Buckinghamshire, England)를 이용하여 상대적인 단백질 발현량을 확인하였다.

3. Real-time PCR에 의한 NUCB2 mRNA 발현량 분석

획득한 시상하부, 뇌하수체, 위, 난소, 자궁 조직으로부터 RNA를 추출하고, cDNA를 합성한 후에 NUCB2 mRNA의 발현 정도를 real-time PCR 방법으로 분석하였다. NUCB2(forward 5'-AAAACCTTGGCCTGTCTGAA-3'; reverse 5'-CATCGATAGGAACAGCTTCCA-3') primer(BIONICS, Korea)와 SYBR green(Roche, Basel, Switzerland)을 넣고, Light Cycler 480(Roche, Basel, Switzerland)으로 NUCB2 유전자의 발현량을 분석하였다. 대조유전자로는 18S(forward 5'-GTCTGTGATGCCCTTAGATG-3'; reverse 5'-AGCTTATGACCCGCACCTTAC-3')를 사용하였고, 18S 유전자의 발현 정도를 기준으로 NUCB2 유전자의 상대적인 발현량을 계산하였다.

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

ICR 계열 암컷 생쥐에서 획득한 자궁을 4% Paraformaldehyde 용액에 넣어 1시간 동안 고정시켰다. 고정된 자궁 조직을 70%, 80%, 90%, 100% ethanol에 각각 30분씩 순차적으로 담가둔 후, 100% ethanol에 넣어 24시간 동안 보관하

였다. 보관한 자궁 조직을 1차 xylene, 2차 xylene에 각각 1시간씩 담아두고, 이어 xylene과 파라핀(50%:50%) 혼합 용액에 2시간, 100% 파라핀 용액에 2시간 동안 담가두었다. 파라핀이 침투된 자궁 조직을 틀에 넣고 파라핀으로 포매하여 블록을 만든 다음, 절편기를 이용하여 10 μm 두께로 잘라 슬라이드글라스에 붙여두고 염색에 사용하였다.

위 방법으로 준비한 자궁의 조직 절편을 가지고 면역조직화학염색 방법으로 nesfatin-1 단백질의 발현 위치를 조사하였다. 조직 절편을 100% xylene, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol로 3분씩 처리한 후 흐르는 물로 세척하였다. 세척된 자궁 조직은 증류수와 PBS buffer에 각각 5분씩 넣어둔 다음, peroxidase Blocking Reagent(Dako, Glostrup, Denmark)로 10분간 반응시켰다. Washing buffer로 세척한 후에 2% horse serum(Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA)을 첨가하여 상온에서 20분 동안 blocking 하였다. Washing buffer로 다시 세척해 준 다음, rabbit anti-rat nesfatin-1 antibody(Phoenix Pharmaceuticals, INC., Burlingame, CA)를 떨어뜨리고 필름으로 덮어 1시간 동안 반응시켰다. 반복 세척 후, biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA)를 떨어뜨리고 필름으로 덮어 30분 동안 반응시킨 다음, ABC Elite(Streptavidin-HRP)(Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA)를 떨어뜨리고 조직의 색 변화를 관찰하면서 10분간 처리하였다. Hematoxylin(Sigma, St. Louis, MO)으로 염색한 후, 탈수를 위해 70%, 80%, 95%, 100% ethanol과 xylene을 처리하였다. Permount(Thermo Fisher Scientific Inc., Watham, MA) 용액을 떨어뜨린 후 커버글라스로 덮고, 광학현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 nesfatin-1 단백질이 자궁의 어느 위치에서 발현하는지를 관찰하였다.

한편, 자궁 조직 절편을 가지고 nesfatin-1 단백질의 결합 부위를 조사하였다. 파라핀을 제거한 후, 증류수와 PBS buffer에 각각 5분씩 넣어둔 다음 FITC-conjugated nesfatin-1(Phoenix Pharmaceuticals, INC., Burlingame, CA)을 조직 절편에 떨어뜨리고 1시간 30분 동안 처리하였다. PBS buffer로 세척한 후, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole; Sigma, St. Louis, MO)(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 염색을 진행하였다. Mounting(Vector laboratories, INC., Burlingame, CA) 용액을 떨어뜨린 후 커버글라스로 덮고, 형광현미경(Axioskop2, CarlZeiss, Germany)으로 자궁 내 nesfatin-1 단백질의 결합 부위 존재 여부 및 위치를 관찰하였다.

5. PMSG 및 17 β -estradiol 투여에 따른 Nesfatin-1/NUCB2 발현 분석

3개월령 ICR 암컷 생쥐의 난소제거수술을 시행하였다. 각 생쥐의 체중에 따른 마취제를 투여한 후 수술을 시행하였으며, 이를 후 PMSG 5 unit/100 μl (Pregnant mare serum gonadotropin, Sigma, St. Louis, MO)을 복강 투여하고, 약 24시간 후의 자궁을 획득하였다. 한편, 난소제거수술 2주 후에 난소를 제거한 생쥐와 난소제거수술을 하지 않은 생쥐에 17 β -estradiol 30 ng/100 μl (Sigma, St. Louis, MO)을 투여하고, 약 24시간 후 자궁을 획득하였다.

6. 통계학적 분석

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

결 과

1. 자궁에서 Nesfatin-1/NUCB2 발현 확인

생쥐 자궁에서 NUCB2 유전자의 발현을 확인하기 위하여 먼저 conventional PCR 방법으로 NUCB2 mRNA 발현 여부를 조사하였다. 자궁을 포함한 분석한 모든 기관, 즉 시상하부, 뇌하수체, 위, 난소에서 NUCB2 유전자의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 한편, western blot 방법으로 자궁에서 nesfatin-1 단백질의 발현을 확인한 결과, 뇌하수체와 난소 및 자궁을 포함하는 생식기관에서 많은 양의 단백질이 발현되는 것을 확인하였으며, 특히 난소에서보다 자궁에서 뇌하수체만큼 다량의 nesfatin-1 단백질이 발현하고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 아울러, real-time PCR 방법으로 각 기관에서 NUCB2 mRNA 발현량을 분석한 결과에서도 nesfatin-1 단백질 발현 양상과 유사함을 확인하였다(Fig. 1C).

2. 자궁 내 Nesfatin-1 단백질 발현 및 결합 부위 확인

자궁 내 nesfatin-1 단백질 발현 부위를 확인하기 위하여 자궁 조직 절편을 이용하여 면역조직화학염색법으로 염색을 수행한 결과, nesfatin-1 단백질은 자궁내막과 자궁샘을 둘러싼 상피세포에서 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한

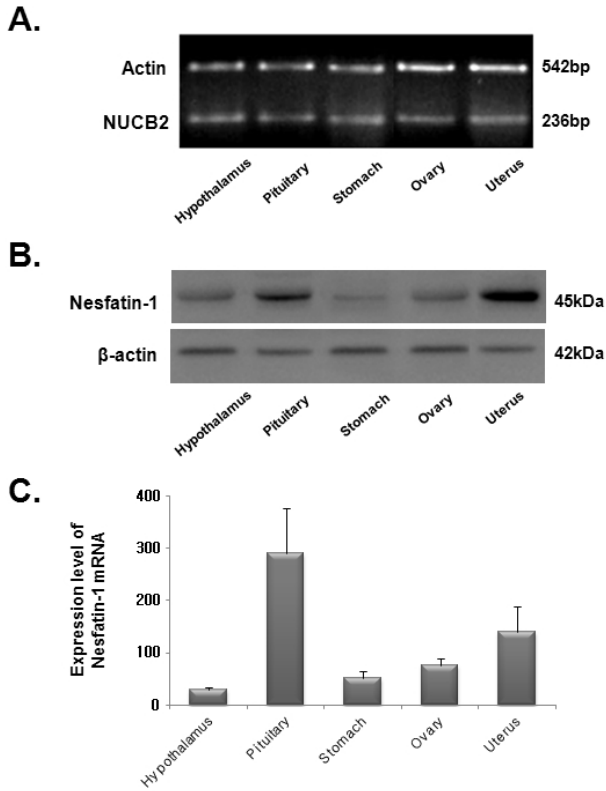


Fig. 1. The expression levels of nesfatin-1/NUCB2 in various tissues of female mice. (A) NUCB2 mRNA expression in various tissues including the ovary and uterus was confirmed by conventional PCR. (B) Nesfatin-1 protein expression in various tissues including the uterus was detected by western blotting. (C) The levels of NUCB2 mRNA expression in various tissues including the uterus were analyzed by real-time PCR. All data are represented as Mean±SEM (n=5).

자궁 내에서 nesfatin-1 단백질이 결합하는 부위가 어디인지를 확인하기 위하여 자궁 조직 절편에 형광 표식자가 부착된 nesfatin-1을 이용하여 염색을 수행하였다. 염색 결과, 자궁 샘을 둘러싼 상피세포와 호중구를 포함하는 특정 과립세포에서 nesfatin-1 단백질 결합 부위가 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

3. PMSG 및 17β-estradiol에 의한 Nesfatin-1/NUCB2 발현 조절

Nesfatin-1/NUCB2 발현이 생식선자극호르몬과 17β-estradiol에 영향을 받는지 알아보기 위하여 난소를 제거한 쥐에

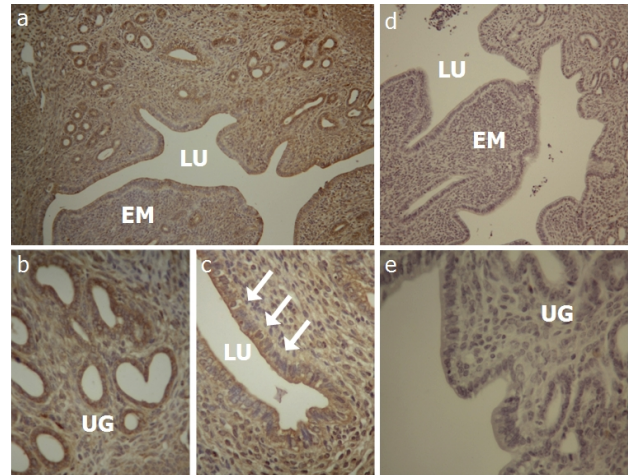


Fig. 2. The localization of nesfatin-1 in mouse uterus. Uterus section was stained with nesfatin-1 antibody to localize nesfatin-1 protein. Nesfatin-1 was expressed on the epithelial cells of endometrium and uterine glands. Especially, the epithelial cells surrounding the lumen were more stained. a: 100×; b, c: 400×; d, e: Negative control (d: 100×; e: 400×).

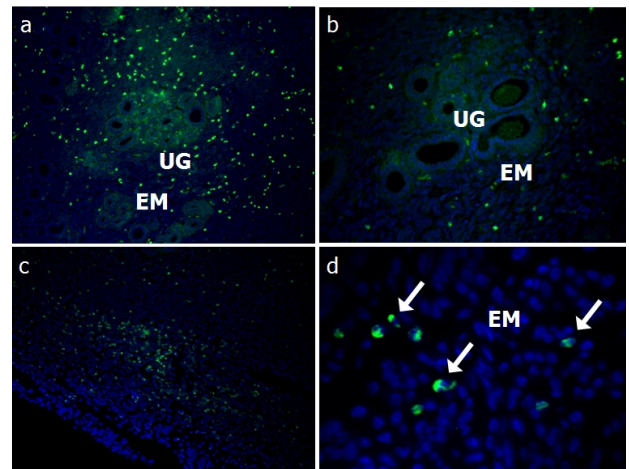


Fig. 3. The localization of nesfatin-1 binding sites in mouse uterus. Uterus section was stained with FITC-conjugated nesfatin-1 to observe the nesfatin-1 binding sites. Nesfatin-1 binding sites were localized in the epithelial cells of uterine glands. Interestingly, granulocytes like neutrophil in the endometrium were stained with FITC-conjugated nesfatin-1. a, c: 100×; b: 400×; d: 1,000×.

각각 PMSG와 17β-estradiol을 투여하고 24시간 후 자궁에서 NUCB2 mRNA 발현을 real-time PCR 방법으로 조사하

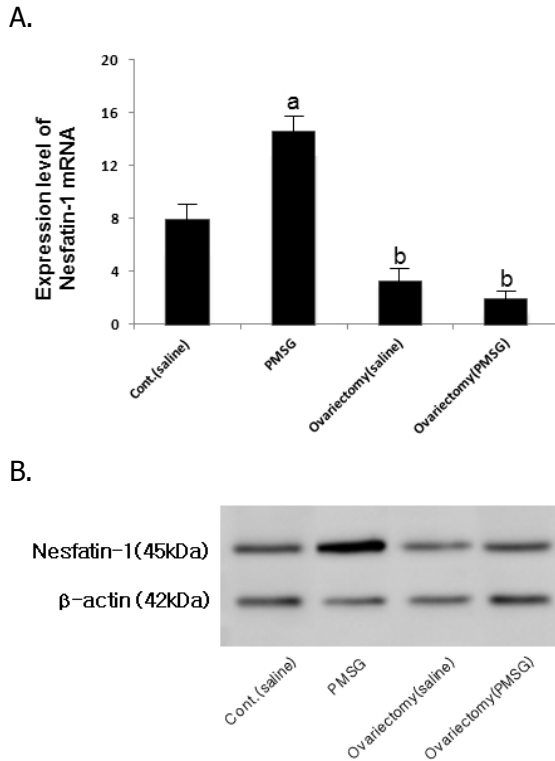


Fig. 4. The expression levels of nesfatin-1 mRNA in the uterus after PMSG treatment. (A) The levels of nesfatin-1 mRNA expression were analyzed by real-time PCR. Nesfatin-1 mRNA expression was increased in the uterus about 3 times after PMSG treatment compared with non-treated controls. However, the nesfatin-1 mRNA expression was decreased in the ovariectomized mice regardless PMSG treatment. (B) The expression amount of nesfatin-1 protein in the uterus was analyzed by western blotting. The pattern of nesfatin-1 protein expression was similar to nesfatin-1 mRNA expression. All data are represented as Mean \pm SEM (n=3). a,b indicate $p < 0.01$ vs. control.

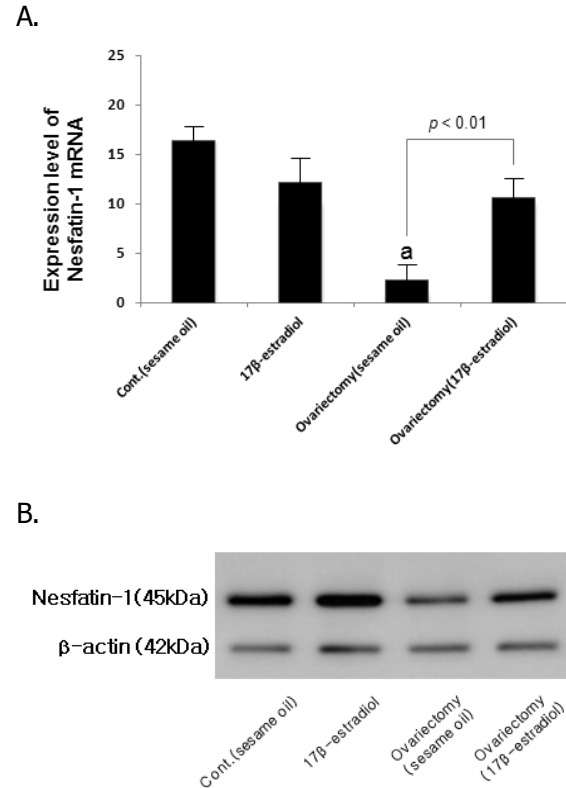


Fig. 5. The expression levels of nesfatin-1 mRNA in the uterus after 17 β -estradiol treatment. (A) The levels of nesfatin-1 mRNA expression were analyzed by real-time PCR. Nesfatin-1 mRNA expression was decreased in the uterus of ovariectomized mice, but it expression level was dramatically increased about 10 times after 17 β -estradiol treatment. (B) The expression of nesfatin-1 protein in the uterus was investigated by western blotting. The pattern of nesfatin-1 protein expression was similar to nesfatin-1 mRNA expression. All data are represented as Mean \pm SEM (n=3). a indicates $p < 0.01$ vs. control.

였으며, nesfatin-1 단백질을 western blot 방법으로 관찰하였다. 생식선자극호르몬인 PMSG를 투여한 경우, 자궁 내 NUCB2 mRNA 발현량이 대조군과 차이를 보이지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 반면, 17 β -estradiol을 투여한 경우에는 NUCB2 mRNA 발현량이 대조군에 비하여 유의하게 증가함을 관찰할 수 있었다($p < 0.01$)(Fig. 5A). 아울러, 자궁 내 nesfatin-1 단백질의 발현 양상은 각각의 실험군 모두에서 NUCB2 mRNA의 발현 양상과 유사함을 확인하였다(Fig. 4B, 5B).

논 의

최근에 그 기능이 조금씩 밝혀지고 있는 nesfatin-1/NUCB2는 처음으로 그 역할이 규명된 시상하부에서 뿐만 아니라, 지방조직, 소화기관인 위와 췌장, 그리고 정소, 부정소, 난소를 포함하는 생식기관에서도 발현되는 것으로 보고하고 있다(Garcia-Galiano et al., 2010; Oh-I et al., 2006; Stengel et al., 2009b; Kim et al., 2010; Kim et al., 2011). 이에 본 연구에서는 ICR 계열 암컷 생쥐의 생식기관인 자궁에서 nesfatin-1/

NUCB2 발현을 확인하고, 자궁 내 nesfatin-1 단백질의 발현 위치와 결합 부위를 확인하였다. 또한 자궁 내 nesfatin-1 발현이 뇌하수체에서 분비되는 성선자극호르몬에 의해 조절 받는지, 난소에서 분비되는 에스트로겐에 의해 조절 받는지를 조사함으로써 nesfatin-1이 암컷 생쥐의 생식 기능에 미칠 수 있는 가능성을 확인하고자 하였다.

먼저 난소와 자궁을 포함한 생쥐의 다양한 기관에서 conventional PCR과 real-time PCR 방법으로 NUCB2 유전자의 발현을 확인한 결과, 분석한 모든 기관에서 NUCB2 mRNA가 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 각 기관에서 발현되는 nesfatin-1/NUCB2 양을 conventional PCR 방법으로 정확히 분석하기에는 문제가 있으므로, 이를 해결하기 위하여 real-time PCR 방법과 western blot 방법으로 각 기관에서 NUCB2 mRNA와 nesfatin-1 단백질 발현을 정량적으로 분석하였다. 그 결과, 자궁에서 뇌하수체만큼 다량의 NUCB2 mRNA와 nesfatin-1 단백질이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 앞선 연구에서 보고된 바와 같이, 암컷 생쥐의 생식 기관인 난소와 자궁에서 nesfatin-1/NUCB2가 발현되고, 그 결합부위가 난소 내에 존재한다는 사실을 통하여 nesfatin-1이 생식기능을 조절할 수 있는 국부조절인자로서 중요한 역할을 할 것이라고 판단할 수 있었다(Kim et al., 2010). 이와 관련하여, 본 연구에서 확인된 자궁 내 NUCB2 mRNA의 발현이 어떠한 의미를 가지고 있는지를 알아보기 위하여, 자궁 내 nesfatin-1 단백질의 발현 부위를 조사하였다. Nesfatin-1 항체를 이용하여 면역조직화학염색법으로 자궁 내 nesfatin-1 단백질의 발현 부위를 조사한 결과, 자궁내막과 자궁샘을 둘러싼 상피세포에서 주로 관찰되었다. 자궁 내 상피세포에서 발현되는 nesfatin-1 단백질이 자궁 기능에 어떠한 영향을 미치는지는 아직 알 수 없으나, nesfatin-1이 자궁 전반에 걸쳐 발현되는 것으로 보아 자궁의 기능 조절에 국부조절인자로 관여할 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 NUCB2 mRNA와 nesfatin-1 단백질이 자궁 내에서 발현된다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 nesfatin-1 단백질이 자궁에 기능적으로 작용하기 위해서는 nesfatin-1 단백질이 그 수용체와 결합할 수 있어야 한다. 현재 nesfatin-1에 대한 많은 연구들이 진행되고 있으나, 그 수용체와 세포 내 신호 전달 기전에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 최근 발표된 연구 결과에 따르면 nesfatin-1은 흰쥐의 시상하부 내 신경세포에 작용하여 protein kinase A를 활성화시키면서

Ca²⁺ 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 nesfatin-1 수용체의 정확한 구조와 기능은 밝혀지지 않고 있다. 따라서 현재로서는 nesfatin-1 단백질 수용체의 항체를 이용하여 nesfatin-1의 결합 부위를 확인하는 것은 불가능하므로, 본 연구에서는 이를 대신하여 FITC-conjugated nesfatin-1을 이용한 면역조직화학염색을 수행하였다. 염색 결과, 자궁샘을 둘러싼 상피세포와 특정 과립세포에 nesfatin-1이 결합되는 것을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 이러한 특정 과립세포를 확대 관찰한 결과, 이들이 호중구임을 확인할 수 있었다(본 연구 결과에 포함되지 않았음). 호중구는 자궁내막의 붕괴와 회복에 중요한 기능을 하는 세포로서(Kaitu'u-Lino et al., 2007), 발정주기에 따라 호중구가 혈액에서 자궁내막으로 스며드는 것으로 알려져 있으며(Steffl et al., 2010), 호중구의 수 또한 발정주기에 따라 증감한다고 보고되어 있다(Sonoda et al., 1998). 이러한 호중구에 nesfatin-1 단백질의 결합 부위가 존재한다는 사실은 nesfatin-1 단백질이 자궁 내에 존재하는 호중구와 결합하여 자궁의 기능을 국부적으로 조절할 수 있음을 시사하고 있다.

더 나아가 본 연구에서는 암컷 생쥐의 자궁 내 nesfatin-1/NUCB2 발현이 어떠한 호르몬에 의하여 조절되는지 알아보려고 하였다. 난소를 제거한 암컷 생쥐에 PMSG와 17 β -estradiol을 각각 투여한 후, 자궁을 획득하여 nesfatin-1/NUCB2 발현을 조사하였다. 그 결과, 난소를 제거한 다음 PMSG를 투여한 암컷 생쥐의 경우에는 자궁 내 nesfatin-1/NUCB2 발현이 대조군과 비교하였을 때 거의 변화하지 않음을 확인할 수 있었다. 동일한 방법으로 난소를 제거한 암컷 생쥐에 17 β -estradiol을 투여한 후 자궁의 nesfatin-1/NUCB2 발현을 확인한 결과, 난소를 제거한 암컷 생쥐의 자궁 내 nesfatin-1/NUCB2 발현이 대조군에 비해 유의하게 증가하는 것을 관찰하였다. 이와 같은 결과는 뇌하수체에서 분비되는 성선자극호르몬보다 난소에서 분비되는 에스트로겐에 의해 자궁 내 nesfatin-1/NUCB2의 발현이 더 직접적인 영향을 받는다는 것을 의미한다.

생쥐 자궁내막의 변화는 스테로이드호르몬인 에스트로겐과 프로게스테론에 의해 의존적으로 조절된다(Evans et al., 1990; Walmer et al., 1992). 에스트로겐은 발정주기에 따라 순환적인 분비량을 보이는데, 생쥐의 경우에는 4~5일을 주

기로 4단계의 발정주기를 가지며, 이 중 에스트로겐이 가장 높은 시기는 발정전기부터 발정기 사이이다(Walmer et al., 1992; Fata et al., 2001). 이러한 발정주기에 따른 자궁 내 nesfatin-1/NUCB2 발현량의 변화를 분석한 결과, 각 시기에 따라 nesfatin-1의 발현이 유의하게 차이가 있음을 확인할 수 있었으며, 특히 에스트로겐이 높은 시기인 발정기에서 nesfatin-1/NUCB2 발현량이 크게 증가하는 것을 알 수 있었다(본 연구 결과에 포함되지 않았음).

본 연구 결과, ICR 계열 암컷 생쥐의 생식기관인 자궁에서 다량의 nesfatin-1/NUCB2가 발현된다는 것을 처음으로 밝혔으며 또한, nesfatin-1 단백질과 그 결합 부위가 자궁 내에 존재한다는 것을 확인하였다. 더 나아가 난소제거수술을 한 암컷 생쥐에게 성선자극호르몬과 17β -estradiol을 투여한 결과, 성선자극호르몬은 자궁 내 nesfatin-1/NUCB2 발현에 영향을 미치지 못했으나, 17β -estradiol을 투여한 경우 nesfatin-1/NUCB2의 발현이 유의하게 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 자궁에서 nesfatin-1/NUCB2의 발현은 뇌하수체에서 분비되는 성선자극호르몬에 의해 조절받기보다는 난소에서 분비되는 17β -estradiol에 의해 직접적인 영향을 받는다는 사실을 밝혔다. 이러한 결과는 발정주기에 따른 혈액 내 17β -estradiol 농도의 변화가 자궁 내 nesfatin-1 발현을 조절함으로써 nesfatin-1이 자궁내막 발달과 착상을 조절할 수 있는 국부조절인자로 작용할 수 있음을 제시하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2010년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. R11-2008-044-03003-0)과 일반연구자-기초연구지원 연구업(No. 2011-0004575).

인용문헌

- 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.
- Evans GS, Gibson DF, Roberts SA, Hind TM, Potten CS (1990) Proliferative changes in the genital tissue of female mice during the oestrous cycle. *Cell Tissue Kinet* 23:619-635.
- Fata JE, Chaudhary V, Khokha R (2001) Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17β -estradiol during the estrous cycle. *Biol Reprod* 65:680-688.
- 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, Salvat 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.
- Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S (2009) Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 381:643-648.
- Kaitu'u-Lino TJ, Morison NB, Salamonsen LA (2007) Neutrophil depletion retards endometrial repair in a mouse model. *Cell Tissue Res* 328:197-206.
- Kanai Y, Tanuma S (1992) Purification of a novel B cell growth and differentiation factor associated with lupus syndrome. *Immunol Lett* 32:43-48.
- Kim JH, Kim HS, Kim SM, Yang HJ, Cho HH, Hwang SP, Moon CI, Yang HW (2011) Expression of nesfatin-1/NUCB2 and its binding site in mouse testis and epididymis. *Dev Reprod* 3:249-256.

- Kim JH, Youn MR, Bang SY, Sim JY, Kang HR, Yang HW (2010) Expression of nesfatin-1/NUCB2 and its binding site in mouse ovary. *Dev Reprod* 4:287-295.
- 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.
- 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-HT_{2C} 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 neurones. *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, Randeve HS (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.
- Sonoda Y, Mukaida N, Wang JB, Shimada-Hiratsuka M, Naito M, Kasahara T, Harada A, Inoue M, Matsushima K (1998) Physiologic regulation of postovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine (s). *J Immunol* 160:6159-6165.
- Steffl M, Telgen L, Schweiger M, Amselgruber WM (2010) Estrous cycle-dependent activity of neutrophils in the porcine endometrium: possible involvement of heat shock protein 27 and lactoferrin. *Anim Reprod Sci* 121:159-166.
- 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.
- Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL & Nelson KG (1992) Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* 131:1458-1466.
- Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y (2010) Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol* 16:1735-1741.

(Received 23 November 2011, Received in revised form 10 December 2011, Accepted 14 December 2011)