

Bcl-2의 저해제 처리에 따른 돼지 수정란의 배발달 능력, 세포 사멸 및 소포체 스트레스 양상

홍주희 · 민성훈 · 이에녹 · 손형훈 · 연지영 · 박흠대 · 구덕본[†]

대구대학교 공과대학 생명공학과

Effect of Bcl-2 Inhibitor Treatment on Embryo Developmental Competence, Apoptosis and ER-stress in Pigs

Joo-Hee Hong, Sung-Hun Min, Enok Lee, Hyeong-Hoon Son, Ji-Yeong Yeon, Humdai Park and Deog-Bon Koo[†]

Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-714, Korea

ABSTRACT

The key regulators of apoptosis are the interacting protein of the Bcl-2 family. Bcl-2, an important member of this family, blocks cytochrome C release by sequestering pro-apoptotic BH3-only proteins such as Bid, Bad, Bax and Bim. The pro-survival family members (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) are critical for cell survival, since loss of any of them causes cell death in certain cell type. However, its role during early porcine embryonic development is not sufficient. In this study, we traced the effects of Bcl-2 inhibitor, ABT-737, on early porcine embryonic development. We also investigated several indicators of developmental potential, including gene expression (apoptosis-related genes) and apoptosis, which are affected by ABT-737. Porcine embryos were cultured in the PZM-3 medium with or without ABT-737 for 6 days. In result, significant differences in developmental potential were detected between the embryos that were cultured with or without ABT-737 (14.7 ± 3.0 vs $30.3 \pm 4.8\%$, $p < 0.05$). TUNEL assay showed that the number of containing fragmented DNA at the blastocyst stage increased in the ABT-737 treated group compared with control (4.7 vs 3.7, $p < 0.05$). The mRNA expression of the pro-apoptotic gene Bax increased in ABT-737 treated group ($p < 0.05$), whereas expressions of the anti-apoptotic Bcl-2 family members (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) decreased ($p < 0.05$). Also, expressions of the ER stress indicator genes (GRP78, XBP-1 and sXBP-1) increased in ABT-737 treated group ($p < 0.05$). In conclusion, Bcl-2 is closely associated with of apoptosis- and ER stress-related genes expressions and developmental potential in pig embryos.

(Key words : Bcl-2 inhibitor, Developmental ability, Apoptosis, ER-stress, Pig)

서 론

B cell lymphoma(Bcl)-2는 구조적으로 4개의 Bcl-2 homology domain (BH1, BH2, BH3, BH4)을 가지고 있고, 세포 사멸을 촉진(Bax, Bak, Bid, Bad), 억제(Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) 및 다양한 암세포에서 과잉 발현되는 조절인자로 알려져 있다(Lieber 등, 2011). 특히 Bcl-2는 C-terminal 부근에 미토콘드리아의 외막 막과 결합할 수 있는 domain을 가지고 있어, 이 부분을 통해 세포질에서 미토콘드리아로의 위치 이동이 가능하고, 미토콘드리아에 있는 cytochrome C를 세포질로 분출시킨다. 따라서 Bcl-2는 cytochrome C의 세포질로의 분비를 제어하거나 Bax의

미토콘드리아로의 이동을 억제하여 사멸을 조절한다. 또한 소포체에서는 세포질 내의 칼슘의 항상성을 유지함으로써 세포 사멸을 조절하는 역할을 한다(Harnois 등, 1997; Okaro 등, 2001; Danial, 2007; Hermanson 등, 2009).

소포체 스트레스(Endoplasmic reticulum stress: ER-stress)는 비정상적인 단백질들이 소포체에 축적되었을 때 발생한다. 이러한 스트레스로 인해 소포체는 기능 이상을 초래하게 되고, 이러한 소포체를 정상상태로 되돌리기 위해 Unfolded Protein Response(UPR) 과정을 유도한다(Xu 등, 2005). 비정상적인 단백질이 축적되면 칼슘 의존 분자 chaperone인 GRP78이 소포체 스트레스 센서 단백질들에서 분리되면서 방출되고, 그에 따라 센서단백질들의 응집이 일어나고 각각의 신호단백질들이 각자의 경로

* 이 논문은 2010년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2010-0020964).

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-850-6557, E-mail: dbkoo@daegu.ac.kr

를 따라 UPR을 유도하여 소포체 chaperone 생산이나 소포체 연관의 분해반응을 유도하고 세포 사멸을 일으킨다 (Rao와 Bredesen, 2004; Shen 등, 2004; Schroder와 Kaufman, 2005).

일반적으로 기존의 보고에 따르면 항 세포 사멸을 유도하는 Bcl-2 집단은 암세포의 생존에 있어서 중요한 역할을 하며(Yamaguchi 등, 2011), 이것을 억제하는 ABT-737의 처리가 림프종과 같은 종양세포에서 세포 사멸을 유도한다고 알려져 왔으며, 이 저해제가 세포에서 소포체의 기능을 방해하고, 소포체 스트레스 반응인자인 ATF4의 발현을 증가시킨다는 보고가 있었다(Traini 등, 2010). ABT-737의 작용기전은 Bcl-2 BH3 domain 모방체로 Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W의 소수성 홈에 특이적으로 높은 친화력을 가지며, 많은 B 림프구 종양 세포주에서 독성을 나타내었으며, 인간의 폐암에 지속적인 억제를 유도(Oltersdorf 등, 2005)하고, 항 세포 사멸 인자의 기능을 저해하고 Bax와 Bak 같은 단백질들을 활성화시켜 세포 사멸 경로를 활성화하는 것으로 알려져 있다(Zong 등, 2001; Reuland 등, 2011). 포유동물 수정란의 생존에 있어서 Bcl-2 family들의 발현이 중요하다고 알려져 있으며(Allaman-Pillet 등, 2011), 이를 억제시켰을 때 수정란의 발달과 생존, 세포 사멸 등에 있어서 어떠한 상관 관계가 있는지 확인할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 돼지 체외 수정란 배양시 Bcl-2 저해제인 ABT-737의 첨가에 따른 배 발달 양상과 착상 전 배반포 단계에서의 세포 사멸 정도를 조사하였다. 또한, ABT-737이 세포 사멸 관련 유전자들과 소포체 스트레스 관련 유전자들의 발현 양상 차이를 검토하였다.

재료 및 방법

배양액

난소로부터 미성숙 난포란 회수 및 세척용 배지는 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes)에 3 mg/ml BSA를 첨가한 Tyroid's lactate(TL)-Hepes 용액(Prather 등, 1995)을 사용하였다. 돼지 미성숙 난포란 체외성숙 배지는 108.73 mM NaCl, 4.78 mM KCl, 25.07 mM NaHCO₃, 1.19 mM KH₂PO₄, 5.55 mM glucose, 7 mM taurine, 5 mM hypotaurine, 1 mM glutamine, 1.19 mM MgSO₄ · 7H₂O, 1.7 mM CaCl₂ · 2H₂O, 100 IU/ml penicillin G로 구성된 North Carolina State University(NCSU) 23 용액(Petters와 Wells, 1993)에 10% 난포액, 0.57 mM cysteine, 10 IU/ml PMSG, 10 ng/ml β-mercaptoethanol, 10 ng/ml EGF, 10 IU/ml hCG을 첨가하여 사용하였다. 체외수정용 배지는 113.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 20 mM trizma, 11 mM glucose, 7.5 mM CaCl₂ · 2H₂O, 5 mM sodium pyruvate로 구성된 modified Tris-buffered medium(mTBM) 용액(Abeydeera와 Day, 1997)에 2.5 mM caffeine Sodium Benzoate와 1 mg/ml BSA를 첨가하여 사용하였다. 체외배양용 배지는 108 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.35 mM KH₂PO₄, 25.07 mM NaHCO₃, 1 mM glutamine, 5 mM hypotaurine, 0.4 mM MgSO₄, 0.2 mM sodium pyruvate, 2 mM calcium

lactate, 2% BME, 1% MEM, 0.05% gentamycin으로 구성된 Porcine Zygote medium(PZM) 3 용액(Yoshioka 등, 2002)에 0.3% BSA를 첨가하여 사용하였다.

체외성숙, 수정 및 배양

도축장에서 회수한 돼지의 난소를 75 μg/ml penicillin G와 50 μg/ml streptomycin이 첨가된 생리식염수 용액에 옮겨 25~30°C 온도를 유지하여 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 난소는 멸균된 37°C의 생리식염수로 3번 이상 세척한 뒤, 난포의 직경이 3~6 mm 정도 되는 것을 18 게이지 주사바늘이 부착된 주사기로 흡입한 후 실험 현미경 하에서 난포란을 회수하였다. 회수한 난포란은 TL-Hepes 용액으로 3회 세척한 뒤 NCSU-23에서 3회 이상 세척하였다. 난포란은 체외성숙용 배지에서 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 22시간 동안 배양한 후, 다시 PMSG와 hCG가 첨가되지 않은 배지에서 추가적으로 22시간 배양하여 체외성숙을 유도하였다. 체외수정용 정액은 다비육종 회사로부터 돼지 액상 정액을 구입하였으며, 체외수정용 정자는 PBS 용액과 1:1로 혼합한 후 100×g에서 3분간 원심분리를 통하여 3회 세척하고, swim-up 방법으로 고효율 정자를 회수하여 준비하였다. 체외성숙이 완료된 난포란은 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TL-Hepes 용액에서 pipetting을 통해 난구세포를 제거하고, mTBM 용액으로 3회 세척한 다음 체외수정용 배지 48 μl 소적에 난자를 15개씩 넣은 후 정자의 최종농도가 1.5×10⁵ spermatozoa/ml가 되도록 정자를 주입하여 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 동안 배양함으로써 체외수정을 유도하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 난구세포를 제거한 후 체외배양용액으로 3회 세척하여 체외배양용액 50 μl 소적에 30개씩 넣어 38.5°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 수정란의 관찰은 배양 2일째에 난할율을 확인하였으며, 배양 6일째 배반포 형성을 관찰하였다. ABT-737의 처리는 체외배양 전체 과정 동안 수행하였다.

TUNEL Assay

TUNEL kit는 *In Situ* Cell Death Detection Kit(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하였으며, 혼합은 1:9의 비율로 희석하였다. 체외수정 후 배양 7일째 생산된 배반포를 0.1% polyvinylpyrrolidone(PVP)이 첨가된 PBS 용액으로 3회 세척한 후 4% formaldehyde가 첨가된 PBS 용액에 침지시켜 4°C에서 1시간 고정시켰다. 고정된 배반포를 PVP-PBS 용액으로 3회 세척하여 0.1% Triton X-100이 첨가된 PBS 용액에 다시 침지시켜 4°C에서 30분간 냉장 보관한다. 그리고 PVP-PBS 용액으로 3회 세척하여 TUNEL kit를 혼합한 용액에 침지시켜 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양 후 PVP-PBS 용액으로 3회 세척한 후 DAPI가 첨가된 10 μl mounting medium으로 고정된 배반포를 옮겨 형광현미경(Olympus, Japan)으로 배반포의 전체 세포수와 세포 사멸 수를 조사하였다.

RNA 합성과 Real-time Quantitative PCR

Dynabeads mRNA direct kit(DYNAL; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 제공된 방법에 따라 처리구당 20개의 배반포로부터 RNA를 분리해낸 후 8 μl RNA, 50 ng/μl Random hexamer, 10 mM dNTP mix, 10× RT

Table 1. Primer sequences used for real-time RT-PCR analysis

Gene	Primer sequences	Annealing temperature(°C)	Product size (bps)
Bcl-2	F- AGGGCATTTCAGTGACCTGAC R- TGGATCCAAGGCTCTAGGTG	60	242
Bcl-XL	F- AGGGCATTTCAGTGACCTGAC R- TGGATCCAAGGCTCTAGGTG	60	242
Bcl-W	F- GGAGCTGGTGGTTGACTTTC R- CTAGGTGGTCATTAGGTAAGG	60	518
Bax	F- AAGCGCATTGGAGATGAACT R- CGATCTCGAAGGAAGTCCAG	60	251
GRP78	F- TGGACCTTTTCCGTTCTACC R- AGCCTCATCTGGGTTTATGC	59	185
sXPB-1	F- AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC R- TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG	58	485 (unspliced) 463 (spliced)
β -actin	F- CTCCTCCAGCCCTCCTTCTCT R- GGCCTAGAGGTCCTTCTCTGAT	60	104

buffer, 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, 40 U/ μ l RNase OUT, 200 U/ μ l superscript III RT가 포함된 총 20 μ l의 혼합물에서 cDNA를 얻기 위해 65°C에서 5분, 50°C에서 50분, 85°C에서 5분 반응 후 4°C에 유지하였다. 이렇게 확보한 cDNA를 주형으로 PCR을 수행하였다. Real-time RT-PCR은 Stratagene MX 3000P QPCR System(San Diego, CA, USA)을 이용하였고, SYBR Green (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)에 합성한 cDNA 2 μ l와 primer를 첨가하여 최종 양이 20 μ l가 되도록 하였다. 실험에 사용된 primer들은 Table 1에 제시하였다. Real-time RT-PCR 증폭 프로그램은 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 먼저 95°C에서 10분 동안 pre-incubation 과정을 거친 후 95°C에서 40초 동안 denaturation 후 60°C에서 40초 동안 annealing을 거치고, 72°C에서 45초 동안 elongation의 과정을 45 사이클 반복하도록 조작하였다.

통계학적 분석

본 연구에서 수행된 각각의 실험은 적어도 3회 이상 반복하였다. 모든 퍼센트 데이터는 means \pm SD로 나타내었으며, 배반포 발달율과 세포수, mRNA의 발현과 관련된 데이터는 one-way ANOVA와 Student's *t*-test를 이용하여 유의차를 검증하였다. $p < 0.05$ 일 때 유의차를 인정하였다.

결과 및 고찰

체외 발달 및 배반포의 세포 사멸 양상에 있어서 ABT-737 처리 효과

암세포에서 비정상적으로 많은 발현을 나타내는 Bcl-2는 암세포의 생존에 관여한다. 항 세포 사멸 Bcl-2 집단에서 Bcl-2는 Bid, Bad, Bax, Bim과 같은 세포 사멸 유도 BH3 단일 단백질을 격리시킴으로써 cytochrome c의 방

출을 막아 세포 사멸을 억제시키는 데 중요한 역할을 한다(Warmann 등, 2008). 또한, 이전 연구에서 ABT-737의 처리가 암세포에서 세포 사멸을 유도한다고 보고되었으나, 돼지의 초기배 발생과 관련된 보고는 아직 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 체외에서 생산된 수정란에서 항 세포 사멸 Bcl-2 집단(Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w)의 저해제인 ABT-737을 농도별로 처리했을 때의 배 발달과 배반포 단계에서 세포 사멸 양상을 비교 조사하였다(Table 2). 결과로서 대조군과 처리군 간의 난할율은 유사하게 나타났다. 그러나 배반포 발달율에 있어서 대조군과 비교했을 때, 모든 처리군에서 유의적으로 낮은 발달율을 볼 수 있었다($p < 0.05$). 이러한 결과를 통해 돼지의 체외 수정란의 발달에 있어서 항 세포 사멸 Bcl-2 집단의 저해로 착상 전 배반포의 발달이 감소된다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과에 의거하여 이후 실험에서는 ABT-737의 농도를 2 μ M로 고정하여 사용하였다.

세포 사멸은 항암치료에서 중요한 요소로 보고되고 있으며(Adesina 등, 2009), 포유동물 배반포 내의 세포 사멸의 증가는 체외배양 환경을 판단하는 중요한 표지자 역할을 한다(Betts와 King, 2001). 본 실험에서는 ABT-737 처리에 의한 배반포의 발달율의 감소에 따라 세포 사멸의 양상에서도 변화를 나타내는지 TUNEL 분석을 통해 DNA fragmentation을 확인하였다(Table 3, Fig. 1). 그 결과, 대조군에 비해 ABT-737을 처리한 배반포에서 TUNEL 양성 반응의 핵 수가 유의하게 높게 나타났다(3.7 ± 1.5 vs. 4.7 ± 2.4 , $p < 0.05$). 이와 같은 결과가 세포 사멸 관련 유전자의 발현에서도 연관이 되는지를 확인하기 위해 세포 사멸 관련 유전자인 Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W 및 Bax mRNA의 발현수준을 Real-time RT-PCR을 통해 검증하였다. 대조군과 ABT-737 처리군에서 항 세포 사멸 Bcl-2 집단의 mRNA 발현을 비교하였을 때, ABT-737 처리군에서 모두 유의적으로 발현이 낮게 나타났으나(Fig. 2, $p < 0.05$), Bax mRNA의 발현은 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 3, $p < 0.05$). 이러한 결과는 ABT-

Table 2. Effect of various concentrations of ABT-737 on developmental ability of porcine embryos *in vitro*

Group	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of blastocysts
Control	145	126 (86.9±9.1)	44 (30.3±4.8) ^a
ABT-737 (1 μM)	152	135 (88.8±9.4)	29 (19.1±3.1) ^b
ABT-737 (2 μM)	150	133 (88.7±10.0)	22 (14.7±3.0) ^b
ABT-737 (5 μM)	144	125 (86.8±9.7)	21 (14.6±2.6) ^b

Data are the mean±SD. Values with different superscript letters within a column differ significantly ($p<0.05$).

Table 3. Effect of ABT-737 on apoptotic pattern of porcine blastocysts

Group	No. of blastocysts	No. of nuclei	
		DAPI	TUNEL
Control	21	59.5±15.3 ^a	3.7±1.5 ^a
ABT-737 (2 μM)	26	35.7±15.7 ^b	4.7±2.4 ^b

Data are the mean±SD. Values with different superscript letters within a column differ significantly ($p<0.05$).

737의 처리가 배반포의 질적 수준을 감소시키고, 돼지 수정란의 체외 발달 과정에서 항 세포 사멸 Bcl-2 집단의 억제제가 세포 사멸 관련 유전자들의 발현에 영향을 미쳐 궁극적으로 초기배에서 세포 사멸이 증가함을 제시한다.

소포체 스트레스 관련 유전자들의 발현에 있어서 ABT-737 처리 효과

소포체의 항상성은 세포의 기능과 생존에 있어서 중요하다. 칼슘 저장의 불균형을 포함한 작은 환경적인 변화들이 소포체 내에서 단백질의 접힘 능력과 같은 기능에 영향을 미치게 되고, 그로 인해 비정상적인 단백질이나

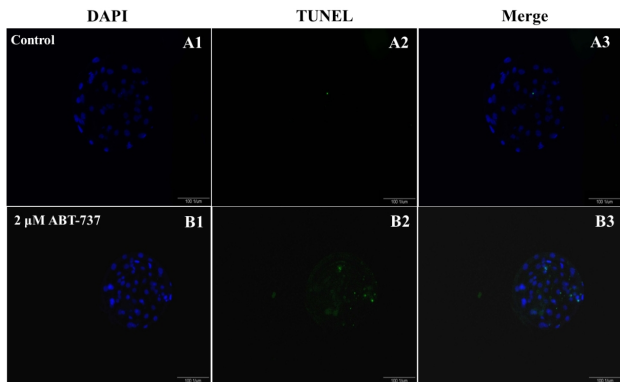


Fig 1. Epifluorescent images of porcine blastocysts undergoing apoptosis *in vitro*. A1, B1) DAPI (blue), A2, B2) TUNEL reaction (green), and A3, B3) colocalization with DAPI appears sky-blue. Scale bars=100 μm.

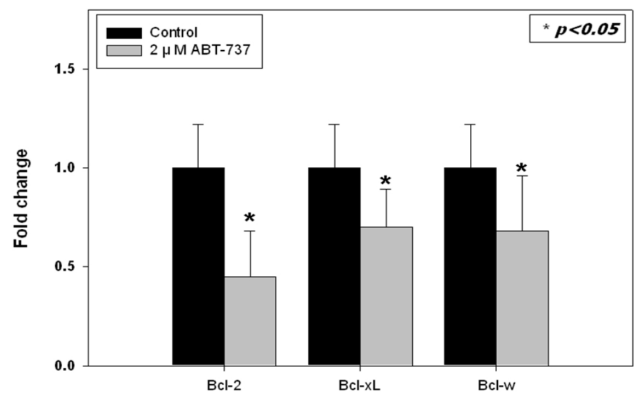


Fig 2. Relative mRNA expression of Bcl-2 family genes in the porcine blastocyst stage determined using real-time RT-PCR. The experiment was repeated three times. β-actin was used as an internal standard. Data are the mean±SD.

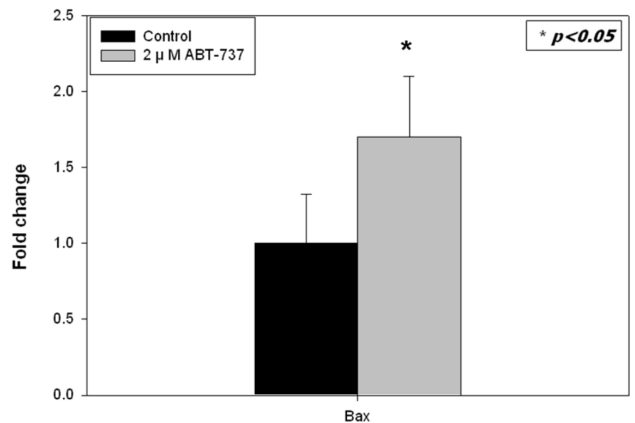


Fig 3. Relative mRNA expression of apoptosis-related gene (Bax) in the porcine blastocyst stage determined using real-time RT-PCR. The experiment was repeated three times. β-actin was used as an internal standard. Data are the mean±SD.

미성숙된 단백질들의 축적을 야기한다. 이와 같은 이유로 단백질 접힘 공정과정과 공정능력 사이의 불균형으로 인해 소포체 스트레스를 유발하게 되며, 이 소포체 스트레스는 여러 가지 질병의 발병 원인이 될 수 있다(Kaufman, 1999). ABT-737의 처리가 세포에서 소포체의 기능

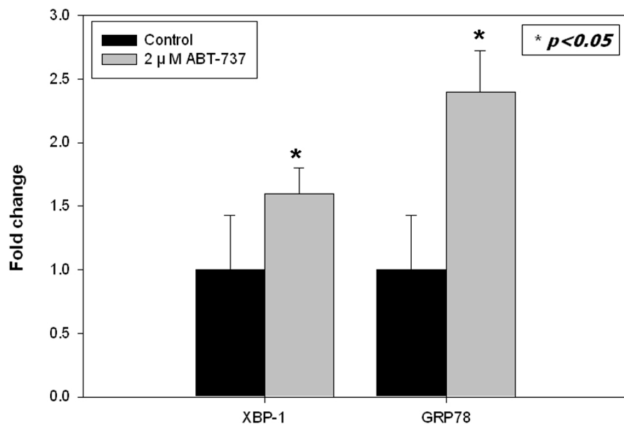


Fig 4. Relative mRNA expression of ER stress-related genes in the porcine blastocyst stage determined using real-time RT-PCR. The experiment was repeated three times. β -actin was used as an internal standard. Data are the means \pm SD.

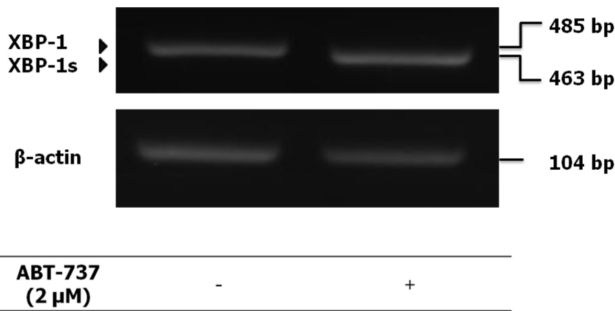


Fig 5. ER stress-related gene (XBP-1) expression in porcine blastocysts derived from ABT-737 treated embryos.

을 방해하고, 소포체 스트레스 반응인자인 ATF4의 발현을 증가시킨다는 보고가 있었다(Traini 등, 2010). 따라서 돼지 초기배에서 ABT-737 처리에 따른 소포체 스트레스 관련 유전자의 발현 양상을 분석하였다. 소포체 스트레스의 표지 인자인 XBP-1과 GRP78의 mRNA의 발현을 확인한 결과, 대조군에 비해 ABT-737 처리군에서 두 유전자 모두 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 4, $p < 0.05$). 특히 소포체 스트레스가 지속되면 UPR의 센서 중 하나인 IRE1이 활성화되면서 intron이 제거된 짧은 형태의 sXBP-1 mRNA가 발현된다. 돼지 초기배에서 ABT-737의 처리가 소포체 스트레스를 유발하여 sXBP-1의 mRNA가 발현되는지 확인하기 위해 RT-PCR 분석을 통해 확인한 결과, 대조군과 비교했을 때 ABT-737 처리군에서 sXBP-1의 발현이 확인되었다(Fig. 5, $p < 0.05$). 결론적으로, ABT-737의 처리에 의해 돼지 초기배에서 소포체 스트레스가 유발되었음을 의미하며, 이는 포유동물 초기배에서 Bcl-2의 역할은 소포체 스트레스 관련 유전자의 발현과 밀접한 상관 관계가 있음을 제시한다.

결론

본 연구에서 돼지 수정란의 체외 배양시 Bcl-2의 저해

제인 ABT-737의 처리가 배반포 생성율과 배반포의 질적 측면에 있어서 영향을 미침을 확인하였다. 또한, ABT-737의 처리가 배반포 단계에서 세포 사멸 양상반응을 보이는 핵 수의 증가를 야기하고, 항 세포 사멸 유전자 Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W의 발현을 감소시키고, 세포 사멸 유전자인 Bax의 발현을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 ABT-737에 의해서 소포체 스트레스의 지표자인 GRP78과 XBP-1의 유전자의 발현과, 소포체 스트레스 상황에서만 나타나는 sXBP-1의 발현을 확인하였다. 이를 통해 본 연구에서는 돼지 수정란의 체외 발달에서 Bcl-2의 저해는 돼지 수정란의 세포 사멸을 유도할 뿐만 아니라, 소포체 스트레스를 유발함으로써 착상 전 배반포의 질적 수준을 감소시킨다는 것을 제시한다.

결론적으로, 포유동물의 수정란의 체외배양 시 Bcl-2 저해제(ABT-737)의 처리가 배반포 생성율에 영향을 미친다는 것을 확인하였으며, 배반포의 질적 수준의 지표가 되는 세포수에서도 차이점을 확인할 수 있었다. 또한, 저해제의 처리로 인한 세포 사멸 핵수의 증가가 확인되었다. 그에 따른 세포 사멸 유전자와 항 세포 사멸 유전자의 mRNA 발현에서도 유의적인 차이를 나타내었다. 이를 통해 포유동물 수정란의 체외배양 과정에서 Bcl-2의 저해는 포유동물 수정란의 정상적인 발달을 방해하고, 질적 수준을 현저히 감소시키며, 소포체의 기능장애를 유발함을 확인하였다. 따라서 Bcl-2는 배반포의 생존율 및 질적 수준을 유지함으로써 체외에서 생산된 배아의 발달능력에 있어 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다.

인용문헌

1. Abeydeera LR, Day BN (1997). *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48 (4):537-544.
2. Adesina AM, Lopez-Terrada D, Wong KK, Gunaratne P, Nguyen Y, Pulliam J, Margolin J, Finegold MJ (2009): Gene expression profiling reveals signatures characterizing histologic subtypes of hepatoblastoma and global deregulation in cell growth and survival pathways. *Hum Pathol* 40:843-853.
3. Allaman-Pillet N, Oberson A, Munier F, Schorderet DF (2011): The Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737 promotes death of retinoblastoma cancer cells. *Ophthalmic Genet In press*.
4. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001): Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276:11615-11623.
5. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001): BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8:705-711.
6. Cory S, Huang DC, Adams JM (2003): The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncol*

- gene 22:8590-8607.
7. Danial NN (2007): BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* 13:7254-7263
 8. Harnois DM, Que FG, Celli A, LaRusso NF, Gores GJ (1997): Bcl-2 is overexpressed and alters the threshold for apoptosis in a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* 26:884-890.
 9. Hermanson D, Addo SN, Bajer AA, Marchant JS, Das SG, Srinivasan B, Al-Mousa F, Thomas DD, Leblen TW, Xing C (2009): Dual mechanisms of sHA 14-1 in inducing cell death through endoplasmic reticulum and mitochondria. *Mol Pharmacol* 76:667-678.
 10. Kaufman RJ (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13:1211-1233.
 11. Lieber J, Eicher C, Wenz J, Kirchner B, Warmann SW, Fuchs J, Armeanu-Ebinger S (2011): The BH₃ mimetic ABT-737 increases treatment efficiency of paclitaxel against hepatoblastoma. *BMC Cancer* 11: 362.
 12. Okaro AC, Deery AR, Hutchins RR, Davidson BR (2001): The expression of antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 in benign, dysplastic, and malignant biliary epithelium. *J Clin Pathol* 54:927-932.
 13. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dingess J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH (2005): An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435:677-681.
 14. Petters RM, Wells KD (1993): Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 48:61-73.
 15. Prather RS, Boice ML, Gibson J, Hoffman KE and Parry TW. 1995. *In vitro* development of embryos from sinclair miniature pigs: A preliminary report. *Theriogenology*. 43:1001-1007.
 16. Rao RV, Bredesen DE (2004): Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol* 16:653-662.
 17. Reul SN, Goldstein NB, Partyka KA, Cooper DA, Fujita M, Norris DA, Shellman YG (2011): The combination of BH3-mimetic ABT-737 with the alkylating agent temozolomide induces strong synergistic killing of melanoma cells independent of p53. *PLoS One* 6:e24294.
 18. Schroder M, Kaufman RJ (2005): ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569:29-63.
 19. Shen X, Zhang K, Kaufman RJ (2004): The unfolded protein response-a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat* 28:79-92.
 20. Traini R, Ben-Josef G, Pastrana DV, Moskatel E, Sharma AK, Antignani A, Fitzqerald DJ (2010): ABT-737 overcomes resistance to immunotoxin-mediated apoptosis and enhances the delivery of pseudomonas exotoxin-based proteins to the cell cytosol. *Mol Cancer Ther* 9:2007-2015.
 21. Warmann SW, Frank H, Heitmann H, Ruck P, Herberts T, Seitz G, Fuchs J (2008): Bcl-2 gene silencing in pediatric epithelial liver tumors. *J Surg Res* 144:43-48.
 22. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005): Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115:2656-2664.
 23. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001): BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15: 1481-1486.
 24. Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 66(1):112-119.
(접수일자: 2012. 8. 28 / 채택일자: 2012. 9. 17)