

## 돼지에서 발정 주기 동안 자궁액 내의 단백질 패턴의 변화

이연주<sup>1</sup> · 송은지<sup>1</sup> · 이상희<sup>1</sup> · 정희태<sup>2</sup> · 양부근<sup>1</sup> · 박춘근<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 동물생명과학대학, <sup>2</sup>강원대학교 수의과대학

## Change of Protein Patterns in Uterine Fluid during Estrus Cycle in Pigs

Yeon-Ju Lee<sup>1</sup>, Eun-Ji Song<sup>1</sup>, Sang-Hee Lee<sup>1</sup>, Hee-Tae Cheong<sup>2</sup>,  
Boo-Keun Yang<sup>1</sup> and Choon-Keun Park<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Life Science, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea

<sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea

### ABSTRACT

An uterus is female reproductive tract organ that affected estrus cycle. During a various changes occur at uterus in estrus cycle, one of them is body fluids secretion be called uterine fluid. Therefore, the objective of this study was to investigate the changes of protein patterns using two-dimensional gel electrophoresis in uterus fluids during the follicular and luteal phases in estrus cycle of pigs. In changes of protein spots were confirmed during the follicular and luteal phases. The 136 spots were expressed in follicular phase, the 57 spots of them showed reproducibility. On the other hand, the 140 spots were expressed in luteal phase, the 73 spots of them showed reproducibility. Also, spots expressed in follicular phase were number 69 and 94 spots and spots expressed in luteal phase only were number 156, 157, 184~187, 190 and 191 spots. The spots which of higher expression levels in the luteal phase than in follicular phase were number 76 and 79 spots. In conclusion, the spots expressed in follicular and luteal phases were confirmed with difference levels and these differences are function of RNA resolving, protein synthesis and cytoskeletal architecture.

(Key words : Pig, Uterine fluid, 2-Dimensional electrophoresis, Estrus cycle, Protein patterns)

### 서 론

포유동물의 자궁은 정자 수송, 수정란 착상, 태아의 발달과 성숙 및 출산에 관여하는 기관으로 자궁 내막과 자궁 근층으로 나눌 수 있다. 자궁내막은 상피세포, 기질, 정맥과 자궁선으로 이루어져 있으며, 수정란의 착상이 일어나고, 자궁 근층은 혈관조직과 기질로 이루어져 자궁벽을 지지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 자궁은 성호르몬의 영향을 받게 되는데, estrogen에 의해 난자가 성숙하고, progesterone에 의해 황체 형성을 하는 발정주기에 따라 형태학적, 생리학적 변화가 발생한다. 생리학적 변화로는 수정체 분비물을 균형있게 해주는 AQP1(Skowronski 등, 2011)과 지질대사에 관여하는 orexin(Tadeusz Kaminski 등, 2013)등 단백질에 많은 변화가 일어나고, 형태학적 변화로는 내막의 두께와 혈관의 분포에 따라 붉은 빛을 띄는 정도의 차이가 발생한다. 자궁

내막 내 자궁선의 분포에서도 변화가 일어나는데, 난포기에서 황체기로 갈수록 자궁내막 두께의 증가에 따라 자궁선의 크기와 수의 증가와 함께 분비선을 구성하는 상피세포와 기질이 유사분열을 하며 함께 증가한다.

이런 자궁선은 수정란이나 태아의 발달 및 생존에 필수적인 물질의 이동 및 합성에 관여하며, 이에 따라 많은 종에서 자궁액에 대한 연구가 이루어졌다. 소에서 자궁액 단백질이 발정주기에 따라 변화하며, 혈청을 통해 이동된 후 자궁에서 합성 가능한 단백질을 발견하였으며(Alavi-Shoushtari 등, 2006), 돼지에서 발정주기에 따라 자궁 내막 내의 림프구, 호중구, 산호성 백혈구, 대식세포 등에서 침윤과 유통에 차이를 발견하였다(Kaeoket 등, 2001). 또한 양에서는 자궁 분비물이 착상 전의 배아에게 영양분을 공급한다는 것을 확인하였고(Ashworth 등, 1989), 사람의 생리주기에서 중간 분비기의 자궁액으로부터 다양한 단백질의 발현을 확인했다(Parmar 등, 2008). 이와 같은 연구 결과로부터 발정 주기에 따른 자궁액 내의 단백

\* 본 연구는 2013년도 강원대학교 학술연구조성비로 연구하였음 (과제번호 120131254).

† Corresponding author : Phone: +82-33-252-8689 E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

질 변화가 추측된다. 따라서 본 연구는 돼지에서 발정주기 동안 자궁으로부터 분리되는 단백질과, 그 변화를 확인하기 위해 프로테오믹스 기법을 이용하여 자궁액 내에 존재하는 단백질을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 자궁액 단백질 수급

돼지의 발정 주기 별 자궁액이 많은 자궁을 도축장에서 회수한 후 4°C 환경을 유지하면서 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 자궁은 0.85% 생리 식염수로 세척하여 자궁 광인대를 제거하고, 자궁각의 한쪽을 절단하여 자궁액을 회수하였다. 주기 별로 모인 자궁액은 동결 건조로 sampling하여 -80°C에 보관하였다. 고체화된 자궁액은 Mammalian Protein Extraction Reagent(M-per®, Thermo scientific, USA) 300  $\mu$ l를 첨가하고, Ultrasonic processor와 4°C Rotation을 3회 이상 반복하면서 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 4°C에서 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 -80°C에서 보관하였다.

### 이차원 전기영동

Bradford 법을 이용하여 총 단백질량이 750  $\mu$ g/ $\mu$ l가 되도록 정량하여 Clean-up kit(Amersham Biosciences, USA)를 이용해 단백질을 정제하고, Rehydration buffer(GE Healthcare, Sweden) 300  $\mu$ l에 녹였다. 이것을 18 cm인 NL3~11 IPG strip(GE Healthcare Bio-Sciences AB, USA)를 사용하여 20°C에서 16시간 동안 rehydration을 하였다. Isoelectric Focusing(IEF)는 Protean IEF cell(Bio-Rad)을 이용하여 500 V와 1,000 V에서 1시간, 8,000 V에서 4.5시간, 10,000 V에서 4시간으로 총 10.5시간을 채웠다. IEF를 마친 IPG strip을 equilibration buffer[1.5M Tris(pH 8.8), urea, glycerol, SDS, DDW] 2.5ml에 DTT(DL-Dithiothreitol, Sigma, Canada) 0.04g을 녹인 용액에 실온에서 15분간 침지 후, equilibration buffer 2.5 ml에 IAA(Iodoacetamide, Sigma, USA) 0.5 g을 녹인 용액에 실온에서 15분간 침지하였다. SDS-PAGE는 10% acrylamide gel [H<sub>2</sub>O, 30% acrylamide mix, 1.5M Tris, SDS, 10% ammonium persulfate, TEMED]에 IPG strip을 sample로 이용하여 300 V에서 50 mA로 6시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 CBB(Coomassie Brilliant Blue R, Sigma, China)를 이용하여 염색한 후, spot의 위치를 육안으로 검토하였다.

### 단백질 동정

특정한 spot에 위치한 gel 조각을 destaining 하기 위해 25 mM NH<sub>4</sub> bicarbonate(50% ACN)를 400  $\mu$ l씩 분주해 15분간 정치 후, 상층액을 제거하는 과정을 4회 반복한 뒤 10 mM NH<sub>4</sub> bicarbonate(50% ACN)를 40  $\mu$ l씩 분주하여 15분간 정치한 뒤 상층액을 제거하였다. Gel은 100

% CAN에 5분간 정치한 후, CAN을 제거하고 3~4시간 동안 speed-vac을 하여 건조시켰다.

Gel에 cold trypsin solution[NH<sub>4</sub> bicarbonate(pH 8.8), promega equencing grade modified trypsin 20  $\mu$ g/ml] 20  $\mu$ l를 30분간 완전히 흡수시킨 후, 37°C에서 16~24시간 동안 배양하였다. 배양된 gel 조각은 0.1 % trifluoroacetic acid(TFA) 35  $\mu$ l에 넣고 60분간 혼합하여 상층액을 회수하는 작업을 2회 반복하여 회수된 두 상층액을 혼합하여 speed-vac으로 완전히 건조 후, peptides를 추출하였다. 그 후, 0.1% TFA를 첨가하여 추출된 peptides를 용해하였다.

0.1% TFA, acetonitrile 혼합액과 0.1% TFA, acetonitrile, 물 혼합액으로 Zip-Tip을 통과시켜 resin으로 시료가 붙게 하였다. 그 후, 0.1% TFA, 물의 혼합액으로 Zip-Tip을 세척하였고, Zip-Tip으로부터 시료를  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid(0.3% TFA, 50% acetonitrile) 1.8  $\mu$ l에 용해하여 MALDI-TOF-TOF에 이용하였다.

MALDI-TOF-TOF는 applied biosystems voyager system 4372를 이용하였으며, 모든 결과는 matrix로  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid를 이용해 reflector-positive mode로 얻었다. MALDI-TOF-TOF를 통해 얻어진 스펙트럼은 MASCOT program으로 NCBI에서 database 검색을 실시하였다.

### 통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.2를 이용하여 General linear model(GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의차( $p < 0.05$ )를 검정하였다.

## 결 과

돼지 자궁액 내의 단백질 변화를 확인하기 위한 2차원 전기영동을 실시한 후 CBB로 염색한 gel을 육안 검토를 통해 분석한 이미지를 Fig. 1에 나타냈다. 돼지에서 난포기와 황체기의 자궁액 내에서 발현된 단백질 spot의 차이가 보였는데, 난포기에서는 총 136개의 spot을 확인하였으며 이중 57개의 spot이 재현성이 나타났으며, 황체기에서는 140개의 spot 중 73개의 spot이 재현성이 나타난 것을 확인하였다. 그 중 Fig. 2에서는 난포기와 황체기에서 서로 다른 spot이 나타났는데, 그 중 난포기에서는 68번, 69번 및 94번, 황체기에서는 156번, 157번, 184번, 185번, 186번, 187번, 190번 및 191번에서 확인되었다. 단백질은 MALDI-TOF-TOF와 NCBI database 검색을 이용하여 Ribonuclease HII, Exoribonuclease 2, Alpha-enolase, Alanine-tRNA ligase, Tropomyosin alpha-3 chain, Ribosome-recycling factor, Polyribonucleotide nucleotidyltransferase, Probable profoldin subunit 4에 해당하는 단백질을 확인하였다(Table 1). 또한, Fig. 3과 4에서는 난포기보다 황체기에서 77번과 79번 spot의 발현이 유의적으로 높게 나타난 것을 확인할 수 있었으며( $p < 0.05$ ), Table 2에서 해당 단백질의 이름과 정보를 나타냈다.

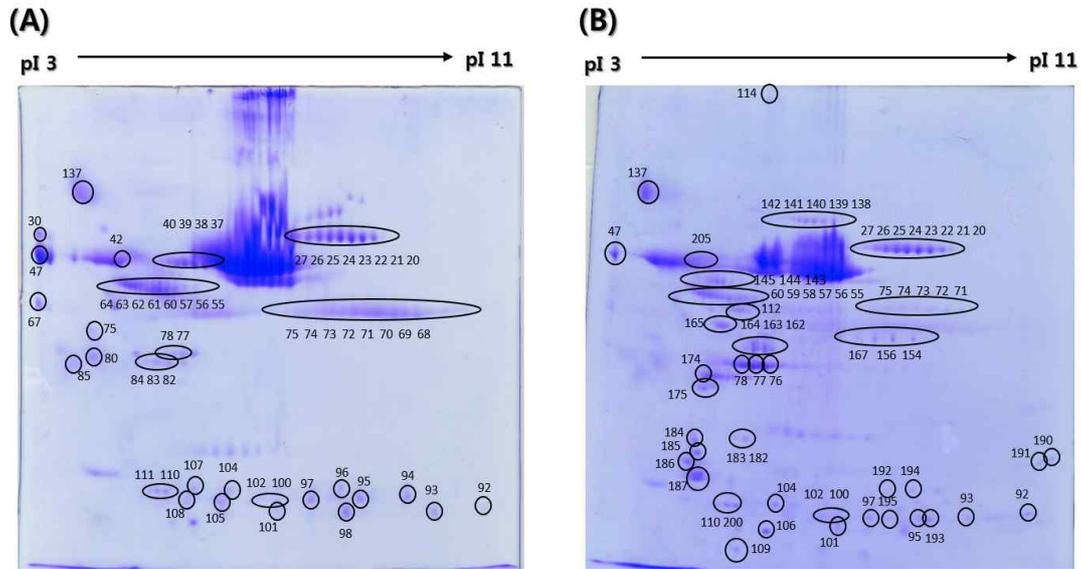


Fig. 1. 2-DE images of protein isolated from uterine fluid of follicular (A) and luteal (B) phases in pigs.

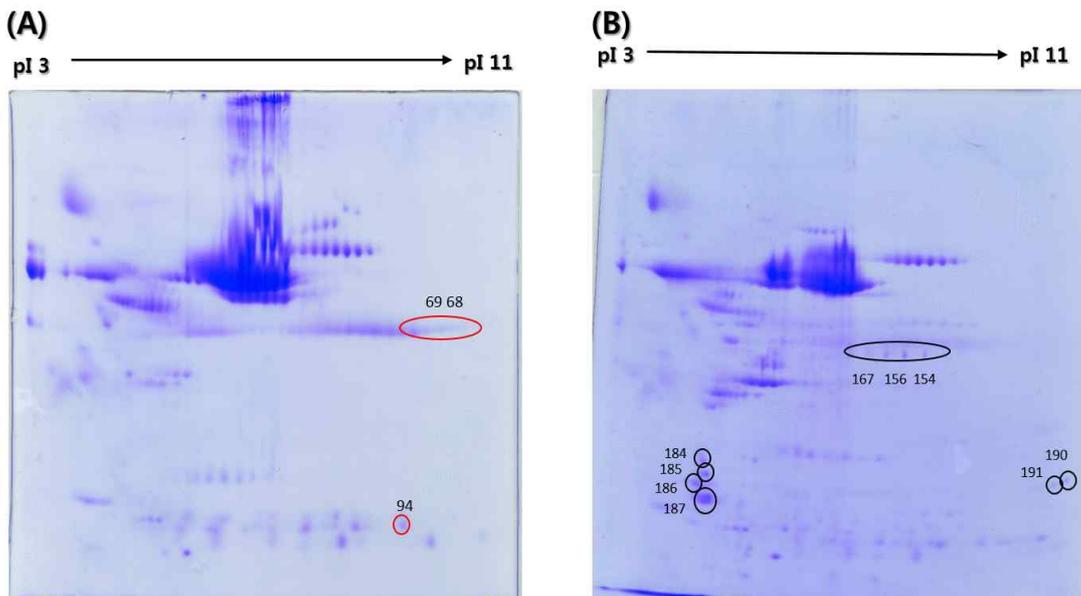


Fig. 2. Differentially expressed spot of protein isolated from uterine fluid of follicular (A) and luteal (B) phases in pigs.

## 고찰

본 연구는 돼지에서 자궁에서 분비되는 자궁액을 난포기와 황체기로 나누어 각 주기별 단백질 발현을 차이를 이차원 전기영동과 MALDI-TOF-TOF를 실시하였다. 이차원 전기영동 후 주기별 전기영동 결과에서 재현성을 나타내는 spot 중 난포기와 황체기에서 각각 따로 나타나는 spot과 유의적으로 발현량의 차이가 나타나는 spot 만을 선별하여 분석 및 동정하였다. 난포기 자궁액의 단백질

분석에서는 재현성을 나타낸 57개의 spot 중 황체기에서는 나타나지 않은 69번과 94번 spot에 대한 동정을 실시하였으며(Table 1), 검색 결과는 69번 spot은 Ribonuclease HIII로, 94번 spot은 Exoribonuclease II로 나타났다. Ribonuclease HIII는 핵산 내부 가수분해 효소로 DNA를 손상시키는 ribonucleotide를 제거한다는 결과가 있었으며(Ochiai 등, 2005), Exoribonuclease II는 mRNA의 분해와 polyribonucleotide를 단일가닥으로 가수분해하는 기능을 확인하여 단백질 생합성 증가에 영향을 미칠 것으로 추측된다. 또한, 황체기에서 높은 발현량을 보였지만,

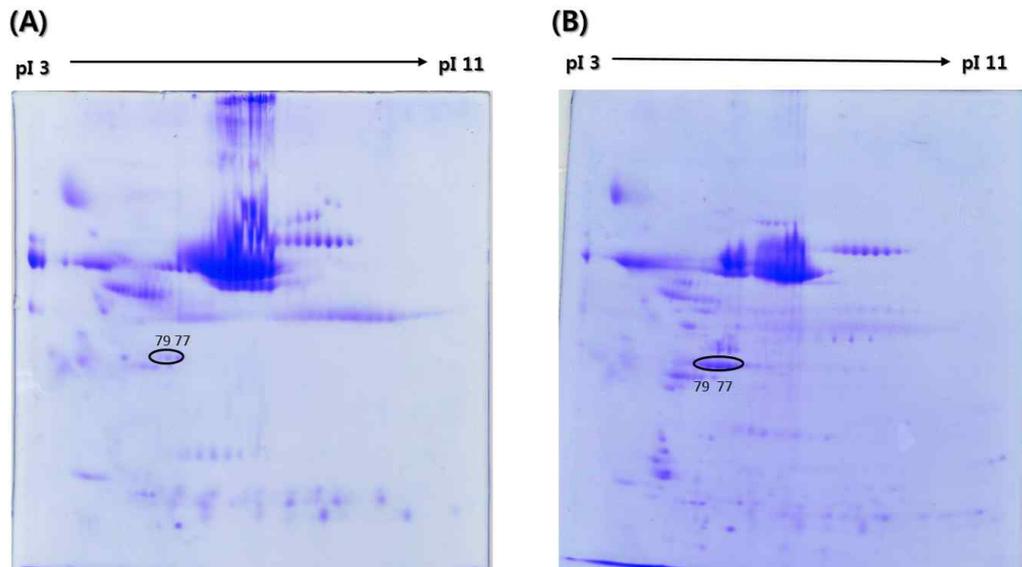


Fig. 3. Up and down-regulated protein expression isolated from uterine fluid of follicular (A) and luteal (B) phases in pigs.

Table 1. Information of protein isolated in uterine fluid during follicular and luteal phases in pigs

Phase	Spot No.	Protein name	Cov. (%)	Accession No.	Mass	pI
Follicular	69	Ribonuclease HII	53	Q2P4B9	26,705	6.71
	94	Exoribonuclease 2	31	A4WAX5	72,928	5.56
	156, 157	Alpha-enolase	42	P04764	47,440	6.16
	184	Alanine-tRNA ligase	19	P61707	97,750	5.56
Luteal	185	Tropomyosin alpha-3 chain	41	Q63610	20,217	4.75
	186, 187	Ribosome-recycling factor	63	B8FGE3	20,859	5.49
	190	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	26	Q5L5B4	76,460	5.41
	191	Probable prefoldin subunit 4	47	Z9M9C4	14,717	4.46

Table 2. Information of up-regulated protein of uterine fluid during luteal phases in pigs

Phase	Spot No.	Protein name	Cov. (%)	Accession No.	Mass	pI
Luteal	77	Actin-1	32	P35432	42143	5.31
	79	Actin, cytoplasmic 1	43	Q6QAQ1	42052	5.29

난포기에서 발현된 77번, 79번 spot 모두 세포골격 섬유 중의 하나인 actin 계열의 단백질로 세포 형태구성과 세포 질 분열에 관여하며, 세포간 혹은 세포와 세포 외 기질간의 결합이나 신호 전달하는 기능을 가지기 때문에, 자궁 내벽의 두께가 증가하는 황체기에서 높게 나타나는 것으로 추측된다(Table 2).

황체기에서 발현된 단백질은 난포기에서 발현된 단백질보다 많은 spot이 나타났으며, 이에 대한 분석 및 동정은 재현성을 나타낸 73개의 spot 중 황체기에서만 나타난

spot을 선발하여 실시하였다(Table 1). 황체기에서 확인한 단백질들은  $\alpha$ -enolase, Alanine-tRNA ligase, Tropomyosin alpha-3 chain, Ribosome-recycling factor, Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 그리고 Probable prefoldin subunit 4로 확인되었다. 이들 단백질들의 기능은 황체기의 자궁이 임신을 유지하기 위해 필수적인 탈락막화 변화와 관련 지어볼 수 있었다(Ivanna Ihnatovych 등, 2009). 정상적인 탈락막화가 일어나기 위해선 황체형성호르몬의 분비가 필수적이다. 이는 황체기의 시작으로 황체형성호

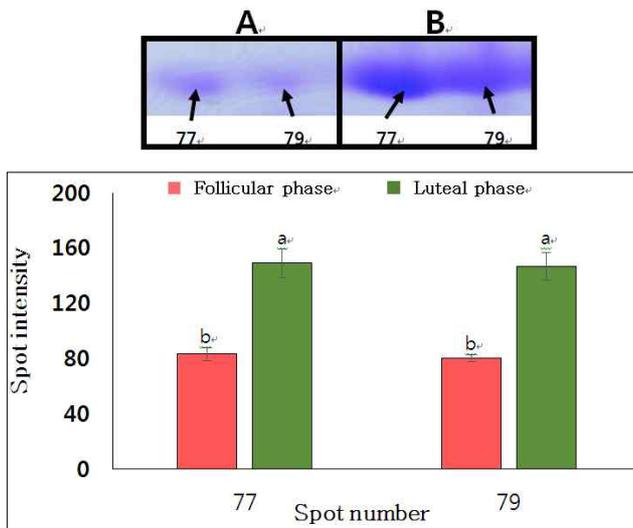


Fig. 4. Image analysis of up-regulated protein in follicular and luteal phases in porcine uterine fluid ( $p < 0.05$ ).

르문과 함께 Actin으로 세포 골격의 재구성이 일어나게 되는데, 이 과정에서 Polyribonucleotide nucleotidyltransferase가 polyribonucleotide를 단일가닥으로 가수분해하면서 이를 돕는 polynucleotide 가수분해 효소의 작용으로 세포 골격 생성시 필요한 핵산 성분의 공급을 돕고(Thomson 등, 2005),  $\alpha$ -enolase가 당분해 효소로 작용하여 필요한 에너지를 공급한다(Wistow 등, 1988). 또한 세포 골격 재구성에서 단백질 형성 과정에서 tRNA에 alanine의 부착을 돕는 Alanine-tRNA ligase(Hanne 등, 2004)와 초기 polypeptide의 사슬에 결합하고 단백질 구조를 접어 입체적인 구조를 갖게 하는 Probable prefoldin subunit 4(Jones 등, 1999)의 작용이 예상된다. Actin의 세포골격 재구성에서 영향을 미치는 단백질이 더 있는데, 이는 Tropomyosin alpha-3 chain으로 세포 골격의 얇은 필라멘트인 actin filament에 붙으며, 골격구조의 안정화와 관련이 있다고 발표하였다(Miyado 등, 1997). 또한 myosin은 actin filament system을 보호 및 기능을 도우며, actin filament의 허용 및 억제작용을 한다. 이런 과정을 거쳐 세포 골격 재구성을 포함한 단백질 생합성의 종료 시에는 Ribosome-recycling factor가 리보솜 방출을 조절하고, 번역시 번역효율 증가의 가능성을 제거하였다(Lucas, 2008).

이와 같이, 주난포기에서 발현된 단백질들의 기능을 미루어 보아 다음 단계로의 발달을 도울 수 있는 단백질을 포함하는 것으로 추측된다. 또한 황체기에서 발현된 단백질들은 황체기 단계에서 발생하는 탈락막화 현상의 진행에 필요한 기능을 지닌 단백질인 것으로 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구 수행시 단백질 분석에 도움을 주신 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Ashworth CJ, Wilmut I, Sales DI (1989): Effect of the stage of the oestrous cycle and the frequency of sample collection on the composition of ovine uterine fluids. *Anim Reprod Sci* 21:213-221.
- Henne A, Bruggemann H, Raasch C, Wiezer A, Hartsch T, Liesegang H, Johann A, Lienard T, Gohl O, Martinez-Arias R, Jacobi C, Starkuviene V, Schlenczek S, Dencker S, Huber R, Klenk HP, Kramer W, Merkl R, Gottschalk G, Fritz HJ (2005): The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J Biotechnol* 22:547-553.
- Ihnatovych I, Livak M, Reed J, Lanerolle P, Strakova Z (2009): Manipulating actin dynamics affects human *in vitro* decidualization. *Biol Reprod* 81:222-230.
- Hook J, Lemckerk F, Schevzov G, Fath T, Gunning P (2011): Functional identity of the gamma tropomyosin gene: Implications for embryonic development, reproduction and cell viability. *Bio Architecture* 1:49-59.
- Kaeoket K, Persson E, Dalin AM (2001): The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Anim Reprod Sci* 65:95-114.
- Skowronski MT, Frackowiak L, Skowronska A (2011): Expression of aquaporin 1 in the pig peri-ovarian vascular complex during the estrous cycle and early pregnancy. *Reprod Biol* 11:210-223.
- Miyado K, Sato M, Taniguchi S (1997): Transformant-related expression of a low-molecular-mass tropomyosin isoform TM5/TM30nm in transformed rat fibroblastic cell lines. *J Cancer Res Clin* 123:331-336.
- Ochiai H, Inoue Y, Takeya M, Sasaki A, Kaku H (2005): Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* suggests contribution of large number of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *Jpn Agric* 39:275-287.
- Alavi-Shoushtari SM, Asri-Rezai S, Abshenas J (2006): A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: A comparison with the serum proteins. *Anim Reprod Sci* 96:10-20.
- Kaminski T, Nitkiewicz A, Smolinska N (2013): Changes in plasma orexin A and orexin B concentrations during the estrous cycle of the pig. *Peptides* 39:175-177.
- Thomson NR, Yeats C, Bell K, Holden MT, Bentley SD, Livingstone M, Cerdeno-Tarraga AM, Harris B, Doggett J (2005): The chlamydomonas abortus genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome* 15:629-

- 640.
12. Parmar T, Sachdeva G, Savardekar L, Katkam RR, Nimbkar-Joshi S, Gadkar-Sable S, Salvi V, Manjramkar DD, Meherji P, Puri CP (2008): Protein repertoire of human uterine fluid during the mid-secretory phase of the menstrual cycle. *Hum Reprod* 23:379-386.
  13. Wistow GJ, Lietman T, Williams LA, Stapel SO, de Jong WW, Horwitz J, Piatigorsky J (1988): Tau-crystallin/alpha-enolase : one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. *Cell Biol* 107: 2729-2736.

(Received: 28 August 2013/ Accepted: 2 September 2013)