大韓不妊學會誌: 第30 卷 第1 號 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 1, 2003, 3

Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor에 의한 생쥐 초기 배아 발생의 신호전달

경기대학교 생물학과[1], 울산대학교 산부인과[2], 한양대학교 생명과학과[3]

서혜영[1] · 정규회[1] · 강병문[2] · 계명찬[3]

Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor Signaling in Development of Mouse Embryos

Hyeyoung Suh[1], Kyu Hoi Chung[1], Byung Moon Kang[2], Myung Chan Gye[3]

[1]Department of Biology, Kyonggi University, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Colloge of Medicine, Ulsan University, [3]Department of Life Science, Hanyang University

Objective: Present study was aimed to verify the effect of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) in the preimplantation development of mouse embryos and the involvement of the mitogen activated protein kiase (MAPK) in the GM-CSF signaling.

Methods: Two-cell embryos were cultured for 96 h in the presence or absence of GM-CSF (0, 0.4, 2, 10 ng/ml) and PD98059, a MEK inhibitor (10 µM). Morphological development, cell number per blastocyst, and apoptotic nuclei, were eamined. MAPK activity of embryonic immunoprecipitate by MAPK (ERK1/2) antibody was measured by in vitro phosphorylation of myelin basic protein.

Results: At post hCG 122 h the embryonic development among the experimental groups was significantly different (p=0.018). The rate of blastocyst development and cell number per embryo were the highest in 2 ng/ml GM-CSF treatment group. The percent of apoptotic cells of the GM-CSF-treated embryos was the lowest among the group. In blastocysts, GM-CSF treatment transiently increased MAPK activity. PD098059 attenuated the effect of GM-CSF on the morphological development, increase in cell number per blastocyst, down regulation of apoptosis, and upregulation of MAPK activity, suggesting that activation of MAPK cascade possibly mediated the embryotropic effect of GM-CSF.

Conclusion: This result suggested that GM-CSF potentiated the development of preimplantation mouse embryos by activation of MAPK.

Key Words: GM-CSF, Signaling, Development, Apoptosis, MAPK, Mouse embryos

착상 전 초기 배아의 성장 발달은 oviduct나 uterus에 위치하는 epithelial cells로부터 분비되거나 자체적으로 생산된 사이토카인이나 growth factors에 의해 조절되어진다.[1~3] 인간을 포함한 많은 포유류 초기 배아는 자성생식수관에서 분비되는 대부분의 growth factors에 대한 수용체를 발현하며,[1,4] 다양한 growth factors과 사이토카인을 첨가한 배양액에서 많은 포유류와 사람의 포배 발달이 향상된다.[5~8] 이

주관책임자: 계명찬, 우) 133-792 서울특별시 성동구 행당동 17, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과
Tel: +82-2-2290-0958, Fax: +82-2-2298-9646, e-mail: mcgye@hanyang.ac.kr

본 연구는 2001년 한국과학재단 연구비 (2001-1-20500-020-1) 지원에 의한 것임.

런 사이토카인은 생식선 자극호르몬 및 성장인자와 함께 세포사이의 신호 단백질로써, 난소의 기능이나 배아 발달을 포함한 다양한 생식과정에 영향을 미치는 수많은 상호작용에 관여한다.[9~13]

Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)는 원래 골수 조혈세포의 분열과 분화에 관련된 활성화된 T-lymphocytes의 생산되는 사이토카인으로,[14] 난소에서도 합성되며 난포액에서 발견되며 합성률은 oestrous cycle을 지나 배란기 근처에서 최고치를 보인다.[15~19] GM-CSF 발현은 생식선 자극호르몬과 난소 스테로이드에 의해 조절되는데, uterine epithelial cells에서 oestradiol은 GM-CSF mRNA 발현과 단백질 분비를 촉진하는 반면 progesterone은 억제 효과를 가진다.[20] GM-CSF가 결핍된 생쥐에서 포배강 형성이 지연될 뿐 아니라 inner cell mass의 감소로 적은 수의 할구로 구성된 포배가 형성된다. 또한 태아 크기의 감소, 임신 후기 태아의 유산 및 출산 이후 태아의 사망률의 증가가 보고되고 있다.[13]

GM-CSF는 a subunit와 ß subunit로 이뤄진 heterodimeric receptor complex를 통해 표적세포에서 생물학적 효과를 발휘한다.[21] GM-CSF 수용체 a subunit는 GM-CSF와 low affinity로 결합하는 반면 ß subunit (ß$_c$)은 interleukin (IL)-5와 IL-3 receptor로도 역할하며[22] 단독으로는 GM-CSF와 결합하지 못하지만 GM-CSF와 a subunit 사이의 결합을 high affinity로 전환시켜 세포 내 신호전달에 관여한다.[21,23] GM-CSF 수용체 a subunit은 조혈계통 및 비조혈계통의 조직 모두에서 발현되는 반면 ß subunit의 발현은 조혈계통 및 내피세포에 국한된다. Ras / Raf /MEK / MAPK cascade를 통한 p90Rsk CREB, Elk-1과 같은 하위의 kinase와 transcription factors의 인산화 및 활성 조절은 세포증식에 중심적인 역할을 하며 extracellular stilmuli에 의존하는 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다.[24~29] GM-CSF는 다양한 세포들에서 MAPK를 활성화시키는 것으로 알려졌다.[30,31] 한편 apoptosis의 진행은 다양한 cytokines과 염증유발 매개자에 의해 가속화되거나 느려질 수 있다.[32~34] GM-CSF는 apoptosis를 저해 또는 지연시킨다.[33] 다양한 MAPK가 세포사 조절에 중요한 역할을 하는데, 일반적으로 p38 MAPK 활성은 세포사를 촉진하고 p40 MAPK인 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 활성은 세포사를 저해한다.[35~39]

재조합체 GM-CSF를 첨가한 배양액에서 인간의 2-, 4-세포기 배아의 포배 발달이 유의하게 증가되며,[40] 생쥐의 1-cell, 2-cell, 8-cell 및 포배에서 GM-CSF 수용체 mRNA가 발현된다.[41] GM-CSF에 의한 세포증식 및 분화, apoptosis 조절과 관련된 대부분의 연구는 세포주를 이용하여 수행되어져 왔으나 포유류의 초기 배아를 대상으로 GM-CSF에 의한 형태적 발생 조절 이외에 apoptosis 조절 기능 및 GM-CSF의 생물학적 효과가 발휘되는 신호 전달 기작은 확인되지 않았다. 본 연구에서는 GM-CSF에 의한 배아 발생 조절 기작 규명의 일환으로 생쥐 초기 배아를 모델로 GM-CSF 및 MEK 억제제 처리에 따른 배아의 형태발생, 할구 수 변화, apoptosis 분석과 함께 MAP kinase 활성의 변화를 추적하였다.

연구 재료 및 방법

1. 실험동물

삼육실험동물 (Osan, Korea)에서 공급받은 ICR strain의 생쥐 암컷 6주령 및 수컷 12주령을 사용하였다. 물과 먹이를 충분히 공급하였고 하루 주광 12 h 조건하에서 사육하였다.

2. 시약

본 실험에 사용된 배양액으로 human tubal fluid media (HTF)를 사용하였으며 배양액에 첨가된 BSA는 insulin-free BSA (Sigma, U.S.A)를 사용하였다. Recombinant mouse GM-CSF (Sigma, USA)와 MEK inhibitor인 PD98059 (Sigma, USA)를 사용하였다. MAPK immunoprecipitation kinase assay kit는 Upstate Biotechnology Institute (USA)에서, [?-^{32}P]ATP는 Amersham Pharmacia에서 구입하였으며, apoptosis 분석을 위한 Apoptaq kit는 Intergen (U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

3. 배아의 수획 및 배양

암컷 생쥐의 복강에 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) (Sigma, St. USA)를 주사 후 48 h에 human chorionic gonadotropin (hCG) (Sigma, St, USA) 5 IU를 주사하여 과배란을 유도한 후 교미

시켰다. 익일 오전 copulation plug 형성을 육안 확인한 후 hCG 주사 후 48 h에 경추탈골 도살하여 수란관을 적출하였다. 난관내로 배양액을 관류하여 2-세포기 배아를 수집하였다. 회수된 배아는 배양접시 (plastic dish, 60 mm ×15 mm, falcon 3002)에 mineral oil (light, Sigma)로 덮힌 배양액 30 μl에서 배양하였으며, 전 과정을 37℃, 5% CO_2와 95% 공기가 공급되는 배양기 (Forma Scientific, Model 3546) 내에서 진행하였다. 기본 배양액으로는 0.4% insulin-free BSA (Sigma, U.S.A)를 첨가한 HTF (human tubal fluid) (Quinn et al., 1985)를 사용하였고, hCG 주사 후 122 h 동안 배양하면서 GM-CSF (0, 0.2, 2, 10 ng/ml)과 PD98059 (10 μM)를 단독 또는 복합 처리하였다. 배아의 발생단계는 12 h 별로 관찰하여 2-, 4-, 8-cell, morula (M), early blastocyst (EB), late blastocyst (LB), hatching and hatched (H), degeneration (D)로 구분하였고 post-hCG 122 h에 관찰된 배아의 발달 단계는 8-cell 이하 (<8C), M, EB, LB, H, D로 정리하였다. MAPK 활성변화를 추적하기 위해서는 hCG 주사 후 96시간에 자궁으로부터 수획한 포배를 이용하여 2 ng/ml 농도의 GM-CSF를 처리한 후 시간별 MAPK 활성의 변화를 추적하는 한편 PD98059와 복합적으로 처리한 후 MAPK 활성의 변화를 추적하였다.

4. 발생율 및 세포 수 측정

각 실험군에서 post-hCG 122 h에 상실배, 포배형성, 부화, 퇴화된 배아를 계수한 후 포배 및 부화중에 있는 배아를 회수하여 0.1% polyvinyl pyrrolidone (PVP, Sigma)이 첨가된 0.8% sodium citrate (Sigma)에 5분간 정치시킨 후, Cannoy's 용액 (acetic acid : ethanol = 1 : 3)으로 고정한 후 상온에서 건조하여 표본을 제작하였다. Phosphate buffered saline (PBS)에 1분간 정치한 후 Hoechst 33258 용액 (1 μg/ml in PBS)으로 30초간 염색한 후 PBS로 세척한 후 wet mount로 제작하였다. Epifluorescence microscope (Olympus BX50)하에서 관찰하고 사진기록한 후 할구수를 계수하였다.

5. TUNEL

Post-hCG 122 h에 배양을 종료하고, 포배 및 부화중인 배아를 선별하여 0.1% PVP가 첨가된 0.8% sodium citrate 용액에 15분 이상 정치시킨 후 slide glass 위에 배아를 올렸다. Cannoy's 용액 (acetic acid : ethanol = 1 : 3)을 떨구어 고정한 후 PBS에서 5분간 정치시키고 15분 동안 protease K (20 μg/ml)를 처리하였다. Endogenous peroxidase 활성의 억제를 위해 3% hydrogen peroxide (H_2O_2)에서 5분간 정치시킨 후 PBS로 5분간 2회 세척하였다. 세척한 슬라이드는 Apoptaq equilibration buffer에서 5분간 정치시킨 후, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme 용액 (TdT enzyme solutoin : reaction buffer = 3 : 7)을 도포한 후 cover glass로 덮고 humidity chamber에 넣어 37℃에서 1시간 배양하였다. TdT enzyme 반응의 종료를 위해 stop/wash buffer에 넣어 10분간 정치한 후 PBS로 1분간 4회 세척했다. Anti-digoxigenin IgG (peroxidase conjugate) 용액을 도포한 후, cover glass를 덮고 상온에서 humidity chamber에 넣어 30분간 배양시켰다. PBS에서 2분간 3회 세척하였다. Peroxidase substrate인 3,3'diaminobenzidine substrate (DAB, Dako, U.S.A)를 도포하여 1분간 발색시켰다. PBS로 수 회 세척하여 발색을 종료한 후, hematoxyline 용액 (Sigma, U.S.A) 으로 counter staining하였다. PBS로 세척 후 70, 80, 90, 100% ethanol series를 각각 10분간 수행하고, xylene에 10분씩 2번 정치한 후 canada balsam 용액을 이용하여 영구표본으로 제작하였다. 각 실험군 별로 청색으로 보이는 정상의 핵과 갈색으로 염색된 apoptotic nuclei를 계수하여 apoptotic nuclei index (no. of TUNEL-positive nuclei / total no. of nuclei)를 구하였다.

6. Immunoprecipitation 및 MAPK 활성 측정

처리한 배아를 HTF (0.1% PVP)로 세척한 후 10 μl assay dilution buffer (ADB, 20 mM MOPS pH 7.2, 25 mM ß-glycerophosphate. 5 mM EGTA, 1 mM Na-orthovanadate, 1 mM DTT)에 용해하였다. Protein A-agarose bead (Santacruz, CA, USA) slurry 30 μl에 1 μg Erk1/2 항체 (Upstate, NY, USA)를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 진탕배양한 후 buffer A (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM sodium orthovanadate, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 50 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium ß-glycerophosphate and 0.1%

Table 1. The effect of GM-CSF on the morphological development of 2-cell embryos *in vitro*

Post-hCG	GM-CSF (ng/ml)	No. of embryos	No. of embryos (%)						
			<8C	M	EB	LB	H	>B	D
122 hr	0	65	4 (6.16)	10 (15.38)	6 (9.23)	29 (44.61)	5 (7.69)	40 (61.54)	11 (16.92)
	0.4	63	0	9 (14.29)	8 (12.70)	34 (53.97)	7 (11.11)	49 (77.78)	5 (7.93)
	2*	67	0	9 (13.43)	2 (2.99)	37 (55.22)	14 (20.90)	53 (79.11)	5 (7.46)
	10	69	0	16 (23.19)	5 (7.25)	29 (42.03)	11 (15.94)	45 (65.22)	8 (11.59)

The embryonic development among the experimental groups was significantly different (p=0.018) by Pearson chi square test. *, Significantly different from other groups by one way ANOVA and Duncan test

complete TM)로 2회 세척하였다. 배아추출물과 혼합하여 4°C에서 2시간 동안 진탕배양한 후 buffer A로 2회 세척하였다. Immune complex-protein A-agarose bead에 ADB를 넣고 3회 세척한 후, 14,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리한 immuno-complex의 상층액을 제거한 후, ADB, MAPK substrate cocktail (2 mg/ml myelin basic protein in ADB), protein kinase inhibitor cocktail (Upstate, NY, USA), Mg-ATP cocktail (75 mM magnesium chloride와 500 µM ATP in ADB)과 [?-^{32}P]-ATP (specific activity 5 µCi/mol, Amersham, USA)를 첨가하여 30°C에서 20분간 반응한 후 얼음에 정치하여 반응을 종결한 후 phosphocellulose paper에 점적하였다. 1% phosphoric acid에서 3회, ethanol로 2회 세척한 후 건조시키고 PC paper 상의 방사선량을 scintillation counter를 이용하여 측정하였다. Kinase 활성은 기질 첨가군-기질 비첨가군의 방사선량으로 계산하였다.

7. 통계처리

모든 실험은 3~4회 수행하였으며, 발생율은 Chi square test (?^{2}-test)로 분석하여 전체적인 유의성을 검정하였고 각 실험군 사이의 발생율의 차이는 각 발달 단계 (<8C, EB, LB, H, D)를 점수화한 후 one way ANOVA 로 실험 결과의 전체적인 유의성을 분석한 후 post hoc Duncan test를 시행하여 실험군간의 유의성을 분석하였다. 포배 당 할구 수, apoptotic index, MAP kinase 활성은 one way ANOVA 및 Duncan test로 분석하였다. 모든 통계분석의 결과는 $p < 0.05$일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 발생율

GM-CSF를 농도별 (0, 0.4, 2, 10 ng/ml)로 첨가한 2-세포를 배양하여 post-hCG 122 h에 배아의 발생율을 Chi square test로 검정한 결과 처리에 따른 유의한 차이가 확인되었다 (p=0.018). 포배 이상 (EB, LB, H)으로 발달한 배아의 비율은 2 ng/ml의 GM-CSF 처리군에서 79.1%로 대조군 (64.6%), 0.4 ng/ml 처리군 (77.8%), 10 ng/ml 처리군 (65.1%) 보다 높았다. 특히 부화 중 또는 부화한 배아의 비율은 2 ng/ml의 GM-CSF 처리군에서 20.9%로 대조군 (7.7%), 0.4 ng/ml 처리군 (11.1%), 10 ng/ml 처리군 (15.9%) 보다 높았다. 반면 퇴화된 배아의 비율은 2 ng/ml의 GM-CSF 처리군에서 7.5%로 대조군 (16.9%), 0.4 ng/ml 처리군 (7.9%), 10 ng/ml 처리군 (11.6%) 보다 낮았다 (Table 1). 따라서 이 후 실험에는 GM-CSF의 농도를 2 ng/ml으로 고정하였다.

GM-CSF의 효과가 MEK 억제제 처리에 의해 감쇄되는지를 조사하기 위해 2-세포기 배아를 GM-CSF 단독 처리군 (2 ng/ml with 0.1% DMSO), PD-98059 단독 처리군 (10 µM with 0.1% DMSO), GM-CSF와 PD98059 공동 처리군으로 나누어 배양하였으며 대조군에도 0.1% DMSO를 처리하였다. Post-hCG 122 h에 각 군에서 관찰된 배아의 발생을 단계별로 구분하여 Chi square test로 검정한 결과 처리에 따른 유의한 차이가 확인되었다 (p=0.006) (Table 2). 부화를 진행중이거나 부화된 배아의 비율은 대조군에 비해 GM-CSF 처리군에서 75.3%로 제일 높았으

Table 2. Blastocyst development of mouse embryos in the presence or absence of GM-CSF and PD98059

Post-hCG	Treatment	No. of embryos	No. of embryos (%)						
			<8C	M	EB	LB	H	>B	D
122 hr	Control	92	2 (2.2)	10 (10.9)	7 (7.6)	32 (34.8)	15 (16.3)	54 (58.7)	26 (28.3)
	GM-CSF$^{\#,*}$	97	4 (4.2)	6 (6.2)	9 (9.3)	34 (35.1)	30* (30.9)	73 (75.3)	14 (14.4)
	PD98059$^{\#\#}$	73	6 (8.2)	4 (5.5)	4 (5.5)	19 (26.0)	9 (12.3)	32 (43.8)	31 (42.5)
	PD + GM	86	4 (4.7)	8 (9.3)	6 (7.0)	30 (34.9)	10 (11.6)	46 (53.5)	28 (32.6)

The embryonic development among the experimental groups was significantly different (p=0.006) by Pearson chi square test. *, Significantly different from others by one way ANOVA and Duncan test. $^{\#}$, 2 ng/ml; $^{\#\#}$, 10 μM. 0.1% DMSO was included in all groups

Table 3. The effect of GM-CSF on the cell number of blastocysts

Treatment	No. of embryos	No. of blastomere per blastocyst
Control	24	73.8±10.4
GM-CSF (0.4 ng/ml)	26	75.4±10.7
GM-CSF (2 ng/ml)	24	83.5±9.5*
GM-CSF (10 ng/ml)	25	77.2±10.3

The cell number per embryo among the experimental groups was significantly different by one way ANOVA (p=0.01). *, Significantly different from others by Duncan test. Data are mean ± SD

며 PD98059 처리군에서 43.8%로 가장 낮았다. GM-CSF와 PD98059를 함께 처리한 실험군의 발생율은 비처리 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 배아의 퇴화율은 GM-CSF 처리군에서 가장 낮았으며, 저해제 처리군에서 대조군에 비해 약 14% 높게 나타났다. GM-CSF와 PD98059를 함께 처리한 실험군은 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다 (Table 3).

2. 포배 당 세포 수

Post-hCG 122 h에 2-세포기부터 배양한 포배 및 부화 또는 부화중인 배아의 세포 수를 조사한 결과 GM-CSF 농도별 처리 결과 2 ng/ml에서 대조군 배아에 비해 유의하게 세포 수가 증가하였다 (Table 3). MEK 저해제를 처리한 실험 결과 GM-CSF, 대조군, GM-CSF + PD98059, PD98059 처리군 순으로 나타났으며 이때도 GM-CSF 처리군의 세포 수는 다른 군과 비교하여 유의하게 많았다 (Table 4).

Table 4. The effect of GM-CSF and PD98059 on the cell number of blastocysts

Treatment	No. of embryos	No. of blastomere per blastocyst
Control	33	86.85±15.01
GM-CSF$^{\#}$	31	98.42±16.01*
PD98059$^{\#\#}$	29	82.76±16.57
PD + GM	30	85.50±14.75

The cell number per embryo among the experimental groups was significantly different by one way ANOVA (p=0.001). *, Significantly different from others by Duncan test. $^{\#}$, 2 ng/ml; $^{\#\#}$, 10 μM. 0.1% DMSO was included in all groups. Data are mean ± SD

Table 5. The effect of GM-CSF and PD98059 on the apoptosis of blastocysts

Treatment	No. of embryos	Apoptotic index
Control	8	22.55±10.06
GM-CSF$^{\#}$	9	11.20±9.35*
PD98059$^{\#\#}$	10	34.72±9.66
PD + GM	5	25.41±8.22

The apoptotic index was calculated by TUNEL positive nuclei / total number of nuceli. Apoptotic index among the experimental groups was significantly different by one way ANOVA (p=0.001).
$^{\#}$, 2 ng/ml; $^{\#\#}$, 10 μM. 0.1% DMSO was included in all groups. *, Significantly different from others by Duncan test. Data are mean ± SD

3. 포배에서 일어난 Apoptosis

대조군, GM-CSF 처리군, PD98059 처리군, 그리

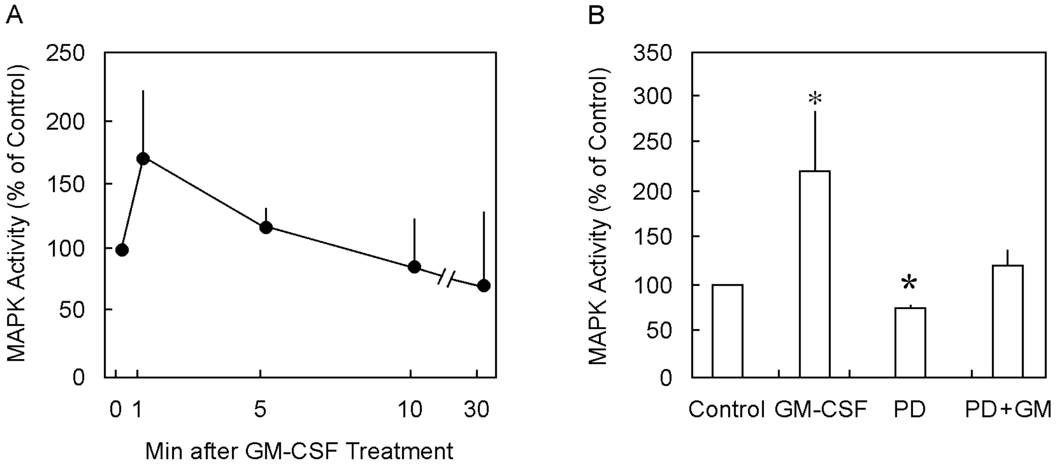

Figure 1. Effect of GM-CSF on the MAPK activity of the mouse embryos. **(A)** Transient activation of MAPK by GM-CSF in the mouse blastocysts. Blastocysts collected from uterus were treated with GM-CSF (2 ng/ml) for 1~30 min. Following the lysis of whole embryo, RIPA lysates of embryos was subjected to immunoprecipaitation by the MAPK (Erk1/2) antibody and in vitro phosphorylation of mylein basic protein. **(B)** MAPK activity of the blastocysts treated with GM-CSF and / or PD98059. Blastocysts were pre-treated with PD98059 (10 μM in DMSO) for 10 min and subjected to GM-CSF (2 ng/ml) treatment for 1 min. DMSO (0.1%) was included in all groups. MAPK activity among the experimental groups was siginificantly different by one way ANOVA (p=0.002). *, Significantly different from control by Duncan test. Error bar = SD (n=4).

고 GM-CSF와 PD98059를 함께 처리한 실험군의 배아를 포배시기까지 배양한 후 TUNEL 방법으로 apoptosis를 조사하였다. 실험 결과 대조군에 비해 GM-CSF 처리한 배아에서 apoptotic nuclei의 비율이 유의하게 낮았다 ($p<0.05$). 반면 PD98059 단독 처리군의 apototic nuclei의 비율은 대조군 보다 유의하게 높았다 ($p<0.05$). PD98059를 단독 처리한 배아와 비교하였을 때 GM-CSF과 공동 처리한 배아내 apoptotic nuclei 비율은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 5).

4. GM-CSF에 의한 MAPK 활성변화

MAPK 활성을 측정하기 위한 GM-CSF 처리시간을 조사하기 위해 2 ng/ml 농도의 GM-CSF를 시간별로 처리하여 비교하였다. 그 결과 GM-CSF 단독 처리 후 1분만에 MAPK 활성이 약 50% 이상 증가하였고 이 후 서서히 감소하였다 (Figure 1A). 따라서 이 후의 실험에서는 GM-CSF 처리시간을 1분으로 결정하였다. 대조군, GM-CSF 단독 처리군, PD-98059 단독 처리군, GM-CSF와 PD98059 공동 처리군 배아의 MAPK 활성을 조사한 결과 GM-CSF 처리군의 MAPK 활성은 대조군 보다 유의하게 높았다 ($p<0.05$). PD98059 단독 처리군의 MAPK 활성은 대조군 보다 유의하게 낮았다 ($p<0.05$) (Figure 1B). 또한 GM-CSF와 저해제 공동 처리군의 MAPK 활성은 대조군과 유의한 차이가 없었다.

고 찰

최근 재조합체 GM-CSF에서 배양된 human 2, 4-cell 배아가 blastocyst stage까지 2배 이상의 발달율을 보이며,[40] 생쥐 초기 배아에서의 GM-CSF의 수용체 (a-subunit) mRNA는 1-cell, 2-cell, 8-cell 및 포배에서 발현된다.[41] 본 실험에서 post-hCG 48시간에 2-세포기 배아에 GM-CSF를 농도별 (0, 0.4, 2, 10 ng/ml)로 처리하여 post-hCG h까지 배양한 결과 2 ng/ml 농도의 GM-CSF 첨가군의 발생율과 배아 당 세포 수가 대조군에 비해 증가함을 보여 선행 연구 결과들과 일치하였다.[41,42] 2 ng/ml 농도는 생쥐에서 보고된 착상 직전 자궁 내강액의 GM-CSF 농도와 유사하다 (Robertson et al., 2001). 반면 저농도 (0.4 ng/ml)에서는 유의한 발생촉진 효과가 관찰되지 않았

고, 고농도 (10 ng/ml)의 GM-CSF 처리 시에도 유의한 발생율의 증가는 관찰되지 않았다. 이와 유사하게 다른 종류의 세포주에서도 고농도의 GM-CSF 처리시 생물학적 효과의 저감현상이 보고되었다.[43]

배아 발달을 촉진하는 GM-CSF의 효과발현 기작으로 배아의 할구세포 내 MAPK 활성화 과정이 관여하는지의 여부를 확인하기 위해 MEK 저해제인 PD98059를 이용하여 MAPK cascade의 활성화를 억제한 결과 GM-CSF에 의한 배아 발달 촉진 및 할구 수의 증가 효과가 상쇄됨을 확인하였다. 배아는 자체적으로 다양한 peptide 호르몬, 성장인자와 사이토카인을 생성하며 생성된 생물학적 활성분자들은 autocrine 및 paracrine 기작으로 배아의 세포분열 및 형태발생 프로그램을 정교히 조절한다.[44] 또한 초기 배아에 내재하는 MAPK 활성은 포배기로 갈수록 증가한다.[45] 따라서 GM-CSF를 첨가하지 않은 상태에서도 내재적으로 생성된 활성분자에 의해 MAPK의 활성화가 유지되었을 것으로 추측된다. 이와 유사하게 선행 연구들에서도 배아의 발생을 촉진하는 insulin이 배아의 MAPK 활성화를 유발하는 것으로 보고되었다.[45,46] 따라서 PD98059를 처리할 경우 배아 자체적으로 작동하는 생물학적 활성분자-수용체-MAPK 활성화 신호전달이 억제되고 그 결과 발생의 저해 및 사멸 효과가 나타날 수 있을 것이다. 또한 PD98059를 전처리한 경우 GM-CSF에 의한 발생촉진 효과가 감쇄되므로 GM-CSF에 의한 배아 발생촉진 효과 발현에 MAPK의 활성화가 수반됨을 뒷받침한다. 특히 GM-CSF 처리시 배아의 퇴화가 현저히 감소하는 반면 PD98059를 처리하여 MAPK 활성화를 억제하면 배아의 퇴화가 증가하므로 배아자체적 요인들 뿐 아니라 첨가된 GM-CSF에 의한 MAPK 활성화가 배아의 생존에 중요하며, 배아에 내재하는 MAPK의 기본적인 활성 또한 배아의 생존을 보장하는 장치로 작동하는 것으로 사료된다. TUNEL 방법으로 배아 내의 apoptotic nuclei를 확인한 결과에서도 GM-CSF에 의한 apoptosis 억제, PD98059에 의한 apoptosis 촉진 및 GM-CSF에 의한 억제 효과의 감쇄현상을 확인하였다. 포배에서 일어나는 배아세포의 사멸은 비정상 세포를 제거하여 착상 이후 진행되는 기관형성 단계에 정상적인 할구세포를 참여시키기 위한 보장장치로 작동한다.[47] 생쥐의 경우 60~100개의 세포로 구성된 포배기에 자연적인 apoptosis wave가 일어나고 특히 inner cell mass에서 두드러진다.[48] 발생중인 배아의 주변에 존재하는 다양한 peptide 호르몬, 사이토카인 및 growth factors는 배아의 apoptosis를 조절한다.[48~50] 이와 유사하게 다른 종류의 세포에서도 GM-CSF는 Ras - Raf-1 / ERK1 / 2 pathway의 활성화를 유발하는 것으로 알려져 있으므로[24,25,28,29] 생쥐 초기 배아에서 GM-CSF에 의한 배아 발달 및 apoptosis 억제, 생존향상 효과는 생물학적으로 보존된 기작임을 알 수 있다.

GM-CSF 처리 1분 후 MAPK 활성이 급격히 증가함을 확인하였다. 증가된 MAPK 활성은 처리 후 30분까지 서서히 감소하였다. 이처럼 증가된 MAPK의 활성이 시간에 지남에 따라 감소하는 것은 GM-CSF 수용체가 속하는 receptor tyrosine kinase (RTK)의 일반적인 특징으로 새로운 ligand 자극의 수용 및 수용체의 과활성화에 따른 암세포로의 전환 등 세포 특성의 변형을 억제하기 위한 보장장치로 작동한다.[51] 따라서 포배에서 GM-CSF 처리시간에 따른 MAPK 활성의 변화 양상은 수용체 활성의 down-modulation 및 수용체하위의 신호전달에 관여하는 인자들에 의한 MAPK 활성의 negative feedback regulation을 반영하는 결과로 추측된다.[43] 향 후 GM-CSF 수용체의 활성화에 대한 단백질 수준의 실험적 증거가 요구된다. 한편 포배에 PD98059를 전처리한 후 GM-CSF를 처리하면 MAPK 활성이 증가되지 않는다. 이는 GM-CSF가 전형적인 MAPK cascade의 활성화를 유발함을 직접적으로 증명한다. 또한 앞서 PD98059 전처리시 GM-CSF에 의한 배아의 발생, 할구 수 증가 및 apoptosis 억제 효과가 감쇄되는 기작으로 MAPK 활성화가 관여하며 이들 사이에는 양성적 상관성이 있음을 보여준다.

결론적으로 GM-CSF는 생리적 농도에서 체외 발달 중인 생쥐 초기 배아의 형태 발달과 세포 수의 증식 효과 및 apoptosis 억제 효과를 가지며 이러한 효과발현 기작에는 MAPK 활성화를 수반하는 신호전달 과정이 관여함을 알 수 있었다. 이는 자성생식수관내에 존재하며 생식주기에 따라 발현에 양적변화를 보이는 GM-CSF가 배아의 발달 및 생존에 정교한 조절자로 작용함을 확인시켜줄 뿐 아니라 이러한 효과가 생물학적으로 보존된 기작을 통해 발현됨

을 알 수 있다. 또한 수정란의 체외배양법의 향상을 위해 배양액 첨가물로 GM-CSF의 이용을 가능케 하는 실험적 증거로 활용될 수 있을 것이다.

사사

통계분석에 도움을 주신 김상현 박사님 (한양대)께 감사드립니다.

참고문헌

1. Pampfer S, Arceci RJ, Pollard JW. Role of colony stimulating factor-I (CSF-I) and other lymphohematopoietic growth factors in mouse pre-implantation development. Bioessays 1991; 13: 535-40.
2. Schultz GA, Hogan A, Watson AJ, Smith RM, Heyner S. Insulin, isulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. Reprod Fertil Dev 1992; 4: 361-71.
3. Robertson SA, Seamark RF, Guilbert LJ, Wegmann TG. The role of cytokines in gestation. Crit Rev Immunol 1994; 14: 239-92.
4. Sharkey AM, Dellow K, Blayney M, Macnamee M, Charnock-Jones S, Smith SK. Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. Biol Reprod 1995; 53: 974-81.
5. Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. Hum Reprod 1996; 11: 191-6.
6. Kane MT, Morgan PM, Coonan C. Peptide growth factors and preimplantation development. Hum Reprod Update 1997; 3: 137-57.
7. Lighten AD, Moore GE, Winston RM, Hardy K. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical *in-vitro* fertilization culture. Hum Reprod 1998; 13: 3144-50.
8. Martin KL, Barlow DH, Sargent IL. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. Hum Reprod 1998; 13: 1645-52.
9. Adashi EY. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology the emerging role of resident ovarian cells of the white blood series. Endocrine Reviews 1990; 11: 454-64.
10. Kaye PL, Harvey MB. The role of growth factors in preimplantation development. Prog Growth Factor Res 1995; 6: 1-24.
11. de Moraes AA, Hansen PJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of *in vitro* produced bovine embryos. Biol Reprod 1997; 57: 1060-5.
12. Martal J, Chene N, Camous S, Huynh L, Lantier F, Hermier P, Haridon R, Charpigny G, Charlier M, Chaouat G. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. Reprod Fertil Devel 1997; 9: 355-80.
13. Robertson SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR, Seamark RF. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. Biol Reprod 1999; 60: 251-61.
14. Ruef C, Coleman DL. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. Rev Infect Dis 1990; 12: 41-62.
15. Brännström M, Norman RJ, Seamark RF, Robertson SA. Rat ovary produces cytokines during ovulation. Biol Reprod 1994; 50: 88-94.
16. Zhao Y, Rong H, Chegini N. Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue. Biol Reprod 1995; 53: 923-30.
17. Jasper MJ, Brännström M, Olofsson JI, Petrucco OM, Mason H, Robertson SA, Norma RJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: presence in human follicular fluid, protein secretion and mRNA expression by ovarian cells. Mol Hum Reprod 1996;

2: 555-62.

18. Jasper MJ, Norman RJ, Robertson SA. Tissue compartment specific mRNA expression of the GM-CSF cell signalling system in the mouse ovary. Proc Aust Soc Reprod Biol 1997; 28: 82.
19. Tamura K, Tamura H, Kumasaka K, Miyajima A, Suga T, Kogo H. Ovarian immune cells express granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) during follicular growth and luteinization in gonadotrophin-primed immature rodents. Mol Cell Endocrinol 1998; 142: 153-63.
20. Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-marcrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. Biol Repord 1996; 54: 183-96.
21. Park LS, Martin U, Sorensen R, Luhr S, Morrissey PJ, Cosman D, Larsen A. Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 4295-9.
22. Miyajima A, Mui AL, Ogorochi T, Sakamaki K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor, interleukin-3, and interleukin-5. Blood 1993; 82: 1960-74.
23. Kitamura T, Hayashida K, Sakamaki K, Yokota T, Arai K, Miyajima A. Reconstitution of functional receptors for human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSF): evidence that the protein encoded by the AIC2B cDNA is a subunit of the murine GM-CSF receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 5082-6.
24. Okuda K, Sanghera JS, Pelech SL, Kanakura Y, Hallek M, Griffin JD, Drunker BJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor induce rapid tyrosine phosphorylation of p42 and p44 MAP kinase. Blood 1992; 79: 2880-7.
25. Bashey A, Healy L, Marshall CJ. Proliferative but not nonproliferative responses to granulocyte colony-stimulating factor are associated with rapid activation of the p21ras/MAP kinase signalling pathway. Blood 1994; 83: 949-57.
26. Sharp LL, Schwarz DA, Bott CM, Marshall CJ, Hedrick SM. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. Immunity 1997; 7: 609-18.
27. Smithgall TE. Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation. Pharmacol Rev 1998; 50: 1-19.
28. Kvon EM, Maribeth A, Raines MA, Blenis J, Sakamoto KM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulation results in phosphorylation of cAMP response element-binding protein through activation of pp90RSK. Blood 2000; 95: 2552-8.
29. McCubrey JA, May WS, Duronio V, Mufson RA. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. Leukemia 2000; 14: 9-21.
30. Tilton B, Andjelkovic M, Didichenko SA, Hemmings BA, Thelen M. G-protein-coupled receptors and Fc?-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. J Biol Chem 1997; 272: 28096-101.
31. McLeish KR, Knall C, Ward RA, Gerwins P, Coxon PY, Klein JB, Johnson GL. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-a and GM-CSF. J Leukocyte Biol 1998; 64: 537-45.
32. Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. J Leukocyte Biol 1993; 54: 283-8.
33. Wei S, Liu JH, Epling-Burnette PK, Gamero AM, Ussery D, Pearson EW, Elkabani ME, Diaz JI, Djeu JY. Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J Immunol 1996; 157: 5155-62.
34. Kettriz R, Gaido ML, Haller H, Luft FC, Jennette CJ, Falk RJ. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-a-mediated apoptosis of human neutrophils. Kidney Int 1998; 53: 84-91.

35. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JUK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 1995; 270: 1326-31.
36. Widmann C. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis: a turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. J Biol Chem 1998; 273: 7141-7.
37. Jarpe MB, Widmann C, Knall C, Schlesinger TK, Gibson S, Yujiri T, Fanger GR, Gelfand EW, Johnson GL. Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death. Oncogene 1998; 17: 1475-82.
38. Frasch SC, Nick JA, Fadok VA, Bratton DL, Worthen GS, Henson PM. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. J Biol Chem 1998; 273: 8389-97.
39. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. Biochem J 1998; 333: 291-300.
40. Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote human blastocyst development *in vitro*. Hum Reprod 1999; 14: 3069-76.
41. Robertson SA, Sjoblom Cecilia, Jasper MJ, Norman RJ, Seamark RF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murin preimplantation embros. Biol Reprod 2001; 64: 1206-15.
42. Kim DH, Ko DS, Lee HC, Lee HJ, Kang HG, Kim TJ, Park WI, Kim SS. Effect of GM-CSF on the embryos development and the expression of implantation related genes of mouse embryos. Kor J Fertil Steril 2002; 29: 83-90.
43. Cannistra SA, Groshek P, Garlick R, Miller J, Griffin JD. Regulation of surface expression of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor in normal human myeloid cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 93-7.
44. Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 4756-60.
45. Nah H, Gye MC. Regulation of ribosaomal S6 kinase and MAPK activity by insulin in the preimplantation mouse embryos. Proc 10th Ann Conf Kor Soc Devel Biol 2000; p. 31-2.
46. Gye MC, Han HJ, Choi JK. Regulation of preimplantation development of mouse embryos by insulin and tumor necrosis factor alpha. Dev Reprod 2001; 5: 101-6.
47. Weil M, Jacobson MD, Coles HSR. Constitutive expression of the machinery for programmed cell. J Cell Biol 1996; 133: 1053-9.
48. Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. Mol Hum Reprod 1997; 3: 919-25.
49. Gye MC, Nah HY, Kim MK. Involvement of PI3 kinase in insulin signaling during preimplantation development of mouse embryos. Dev Reprod 2000; 4: 29-35.
50. Hardy K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. J Endocrinol 2002; 172: 221-36.
51. Attila K, Agota A, Judit J, Anna B, Robert G, Andras S, Maria M. Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involved in GM-CSFinduced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells. Cellular Signalling 2001; 13: 743-54.