[UCI]I804:24011-200000233010

*2006*년 *8*월

석사학위논문

실험적으로 정계정맥류를 유발한 쥐의 고환조직에서 세포고사와 *p53*, γ-*H2AX gene*의 발현

Apoptosis and expression of p53 and γ-H2AX gene in germ cells of varicocele rats

조선대학교 대학원

의학과

조 원 진

실험적으로 정계정맥류를 유발한 쥐의 고환조직에서 세포고사와 *p53*, γ-*H2AX gene*의 발현

Apoptosis and expression of p53 and γ-H2AX gene in germ cells of varicocele rats

*2006*년 *8*월 *25*일

조선대학교 대학원

의학과

조 원 진

실험적으로 정계정맥류를 유발한 쥐의 고환조직에서 세포고사와 *p53*, γ-*H2AX gene*의 발현

지도교수 김 철 성

이 논문을 석사학위신청 논문으로 제출함.

*2006*년 *5*월 *30*일

조선대학교 대학원

의학과

조 원 진

조원진의 석사학위논문을 인준함

위원장　조선 대학교　교수 장 대 수　인

위　원　조선 대학교　교수 김 철 성　인

위　원　조선 대학교　교수 노　준　인

*2006*년　*5*월　*30*일

조선대학교　대학원

목 차

도 목 차 ---------- *i*

ABSTRACT ---------- *1*

I. 서 론 ---------- *2*

II. 연구대상 및 연구방법 ---------- *3*

A. 동물 및 정계정맥류

B. 고환조직

C. 실험방법

1. 면역조직형광염색

2. western blotting

III. 결 과 ---------- *5*

IV. 고 찰 ---------- *6*

V. 결 론 ---------- *9*

참 고 문 헌 ---------- *10*

도 목 차

Fig. 1. Immunohistochemical staining for p53 in varicocele. It was found that the increased expression of p53 in 3, 4 weeks compared to control group. ———— 13

Fig. 2. Immunohistochemical staining for H2AX in varicocele. It was found that the increased expression of H2AX in 3, 4 weeks compared to control group. ——— 14

Fig. 3. Western blot analyses for p53 and H2AX in varicocele rats. ———— 15

ABSTRACT

Apoptosis and expression of p53 and γ-H2AX gene in germ cells of varicocele rats

Cho, Won-Jin

Advisor : Prof. Kim, Chul-Sung M.D., Ph.D

Department of Medicine,

Graduate School, Chosun University

Purpose : We explored the relationship between the expression of p53 and γ-H2AX gene in testicular germ cells of rats with experimental left varicocele (ELV) and apoptosis of germ cells.

Materials and method : A total of 16 adult male Sprague-Dawley rats were studied in 2 groups, namely group 1-12 with varicocele, group 13-16 with sham operation. The varicocele-induced rats underwent orchiectomy after 2, 3, 4 weeks and the sham operation rats underwent orchiectomy after 4 weeks. The sections of the left testis from each animal were studied. p53 and γ-H2AX gene expression were determined with immunohistochemistry and western blot.

Results : The p53 and γ-H2AX gene expression were began immunohistochemically at two weeks, remarkable at 3, 4 weeks. Although p53 expression in western blot was not clear at two weeks, but it was considerable at 3, 4 weeks compared with control. The γ-H2AX expression in western blot was considerable at two weeks, remarkable at 3, 4 weeks compared with control.

Conclusions : In the varicocele of rats increased expressions of p53 and γ-H2AX gene may faciliate apoptosis in the rat testis.

Key Words: Apoptosis, Varicocele, p53, γ-H2AX

I. 서 론

정계정맥류는 남성불임의 가장 흔한 원인으로 수술로 치료 가능한 질환이지만 현재까지 발생기전 및 불임을 일으키는 정확한 병태생리는 밝혀지지 않고 있다. 가능한 원인으로 호르몬의 이상, 고환의 온도상승, 신독물의 역류 그리고 변화된 동맥혈류 등이 정계정맥류를 가진 남성의 생식능에 유해한 영향을 끼친다고 제시되어 왔지만[1] 궁극적으로 세포고사가 관여 하였을 거라 여겨지고 있다.[2-4] 정자발생은 정조세포가 유사분열과 감수분열의 연속적인 과정을 거치면서 성숙된 정자로 분화하는 매우 복잡한 과정이다.[5] 그러나 모든 배아세포가 이러한 과정을 거치는 것은 아니며 최대 50%의 배아세포가 정상적인 정자발생과정 중에 자연퇴화를 일으켜 정자형성과정을 조절하는 중요한 요인으로 작용한다.[6] 이때 세포고사가 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 정세관에서 배아세포의 제거 및 정상 고환에서 생리적 마모까지 세포고사가 관여하는 것으로 여겨지고 있다.[5] 세포고사는 생체의 정상적인 발달과 항상성의 유지에 중요한 역할을 담당하며 종양, 후천성 면역질환, 퇴행성 신경장애, 동맥경화증 및 심근질환 같은 여러 가지 질병의 병인에 관여하는 것으로 알려지고 있다.[7] 이때 세포고사를 조절하는 단백질로 p53이 작용 하리라 여겨지고 있다. nuclear phosphoprotein p53은 17번 chromosome의 단완에 위치하는 p53 gene에서 생산되는데 WT p53은 특히 DNA의 손상에 반응하여 DNA repair동안에 cell cycle을 억제시키거나 세포고사를 조정하는데 작용함으로써 손상된 DNA를 갖은 세포의 비정상적 증식을 억제하는데 중요한 작용을 한다.[8] DNA 기본 구조가 핵산염기 (nucleic acid base)의 반복적인 단위로 구성되듯이, 크로마틴 (chromatin)의 기본적인 구조는 뉴클레오솜 (nucleosome)이 형성한다. nucleosome은 DNA 147개의 염기와 8개 histone 단백질 분자로 구성된 중심부로 이루어져 있다. 이들 DNA 염기들이 중앙의 histone들을 1과 7/10 바퀴정도를 감고 있으며, 중앙 histone은 각각 2개의 H_2A, H_2B, H_3, H_4로 이루어진 100 kDa인 단백복합체를 이루고 있다.[9] 각각의 histone은 histone-histone과 histone-DNA 결합에 작용하는 공모양영역 (globular domain) 그리고 COOH와 NH2-말단의 꼬리부위 (tail motif)로 구성되어 있다. DNA손상 및 수복 반응에 있어서 H_2AX의 역할은 여러 논란이 계속되고 있지만 지금까지 알려진 바로는, DNA 손상 형태 중 가장 빈번하게 발생하는 DNA 이중가닥절단 (double strand breaks; DSBs)에 대한 발생유무를 검출하는 가장 유용한 방법으로 여겨지고 있다.

본 연구는 실험쥐에서 정계정맥류를 유발하여 고환의 세포고사와 불임과의 연관관계를 p53 및 H_2AX 단백질 발현을 통해 알아보고자 한다.

II. 대상 및 방법

A. 동물 및 정계정맥류

16마리의 생후 12주령 Sprague-Dawley 백서를 pentobarbital (3mg/100g)으로 복강마취 후 복부정중절개를 통하여 좌측신장으로 접근한 후 대정맥과 연접한 좌신정맥을 부분적으로 결찰 하였다. 이때 좌신정맥과 평행하게 0.8mm probe을 대고 난 다음 3-0 silk로 결찰을 시도한 후 probe을 제거하고 신정맥의 직경을 50%로 감소시켜 총 12마리의 정계정맥류 군으로 삼았다. 4마리의 백서를 마취하에 복부정중절개를 통하여 좌측신정맥을 만진 다음 다시 봉합하여 대조군으로 삼았다.

B. 고환조직

정계정맥류군은 술 후 14일, 21일, 28일에 봉합부위를 다시 절개하여 각각 4마리씩 좌측 고환조직을 적출하였다. 대조군은 술 후 28일에 고환조직을 적출하였으며 적출한 고환조직을 가지고 면역조직형광염색 및 western blot을 시행하였다.

C. 실험방법

1. 면역조직형광염색 : 파라핀 포매 조직을 4μm 두께의 박편으로 자르고 슬라이드에 고정하였다. 조직을 xylene으로 탈파라핀화하고 재 수화 시킨 다음 내인성 과산화효소 활성도를 제거하기 위해 표본을 PBS와 0.3% Triton X-100으로 20분간 담근 후 인산염완충식염수로 세척하였다. 비특이적 결합을 억제하기 위해 10% normal horse serum(Vector Laboratoies, Burlingame, CA, USA)에 1시간동안 실온상태에서 반응시켰다. 4C의 습성용기에서 일차 항체와 함께 하룻밤 동안 반응시켰다. 일차항체로는 p53(1:100 in PBS; Santa Cruz biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 mouse monoclonal 항체와 g-H2AX (1:100 in PBS, Upstate, NY, USA)에 대한 rabbit polyclonal 항체를 사용하였다. 4C로 PBS로 씻어낸 다음 발색제로는 Alexa Fluor 488(horse anti-rabbit, 1:100, Molecular probe, Eugene, OR, USA)와 Alexa Fluor 555(horse anti-rabbit, 1:100, Molecular probe, Eugene, OR, USA)를 이용했다. 이차항체를 배양한 다음 조직을 2-3시간동안 씻어냈다. 음성대조군은 일차항체 대신 인산염완충식염수를 사용하였다.

2. Western blotting : 고환조직을 인산염완충식염수로 세척하고 용해 완충액 (20 mM Hepes, PH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM-glycerol phosphate, 1% triton X-100, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 g/ml leupeptin, 10 /ml aprotinin, 1 mM Na3VO4, and 5 mM NaF)으로 30분 동안 0°C에 용해시켰다. 단백질 농도는 Bio-Rad dye-binding microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용해서 결정하였다. 20g의 단백질을 10% SDS polyacrylamide gels로 전기영동 시켰다. 단백질들은 Hybon ECL membranes (Amersham-Phamacia, Biotech)으로 얼룩지게 하였으며 immunoblotting은 p53(1:100 in PBS; Santa Cruz biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA)과 γ-H_2AX(1:100 in PBS, Upstate, NY, USA)을 이용해서 실시하였다. 얼룩진 단백질은 enhanced chemiluminescence detect system (iNtRON, Biotech., Seoul, Korea)을 이용해서 탐색되었다.

III. 결과

정계정맥류를 유도한 군과 대조군에서 p53의 및 γ-H_2AX의 발현정도를 확인하기 위해 면역조직화학염색과 western blot을 시행하였다. (Figure 1,2,3) 대조군의 고환조직은 sham operation 4주뒤에 조직을 획득하여 검사하였다. 정계정맥류 유도 2주째부터 면역조직형광염색에서 p53과 γ-H_2AX의 발현이 관찰되기 시작하였으며 3주, 4주로 그 유도기간이 길어지면서 그 발현정도는 더욱 명확하였다. 또한 western blot에서도 2주째에는 명확하지 않았으나 3주째부터는 대조군에 비해 명확한 p53의 발현을 확인할 수 있었으며, γ-H_2AX의 경우 2주째부터 대조군에 비해 명확한 발현을 확인할 수 있었다.

Ⅳ. 고찰

정계정맥류는 정색내의 고환정맥이 비정상적으로 확장되고 굴곡된 질환으로 남성의 약 15%에서 발견되며 원발성 남성불임환자의 35%, 속발성 남성불임환자의 81%에서 발견된다.[9]

정계정맥류의 발생위치에 대해 Greenberg 등[10]은 좌측에서 발생하는 경우가 78%, 양측성으로 오는 경우가 20%, 우측에서 발생하는 경우가 2%라고 하였으며, 좌측에서 호발 하는 원인으로는 우측정계정맥이 하대정맥에 개구하는데 비해 좌측은 신정맥에 직각으로 개구하고 우측에 비해 길이가 길고 정맥판이 없는 경우가 많으며 대동맥과 상장간동맥 사이에서 압박을 받기 쉽기 때문이다.[11-12]

비록 정계정맥류와 남성불임에 대한 연관관계는 1856년 Carling에 의해 처음으로 논의되었지만 아직까지 정확한 기전은 밝혀지지 않고 있다. 몇몇 연구에서 고환의 온도상승, 신장과 부신에서 독성물질의 역류, 정맥혈의 정체로 인한 정자생성세포의 저산소증, 호르몬의 불균형 등이 정계정맥류를 가진 남성의 생식능에 유해한 영향을 끼친다고 보고되고 있다.[1] 그러나 현재 이러한 것들이 세포고사를 일으키지만 이것을 조절하는 단백질은 아직 밝혀져 있지 않으며, 세포고사가 정계정맥류의 감정자증과 연관이 있을 거라 여겨지고 있다.[2-4]

1972년 Kerr 등[13]에 의해 처음으로 묘사된 세포고사는 생체의 정상적인 발달과 항상성의 유지에 중요한 역할을 담당하며 종양, 후천성 면역질환, 퇴행성 신경장애, 동맥경화증 및 심근질환 같은 여러 가지 질병의 병인에 관여하는 것으로 알려지고 있다. 또한 비뇨기계의 악성 및 양성질환들도 부적절한 세포고사의 활성에 의해서 발생한다고 알려져 있으며 정상적인 정자형성 과정을 조절하는 중요한 요인으로도 작용하며 감정자 등과 같은 불임환자에서 세포고사가 의의 있게 증가함을 보고하였다.[2-4] Caruso 등[14]은 실험적으로 정류고환을 유발한 쥐의 고환조직에서 세포고사가 증가한다고 보고하였으며, Barqawi 등[15]도 실험적으로 정계정맥류를 발생시킨 쥐에서 sham operation한 군과 비교한 결과 수술 후 14일째부터 동측의 AI(apoptotic index)가 의미있게 증가하였다고 보고하였다. 또한 Simsek 등[16]은 정계정맥류로 인해 고환조직의 손상이 야기된 환자에서 세포고사가 중요한 역할을 담당한다고 하면서 세포고사가 정자형성 부전에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. Kilinc 등[17]은 정계정맥류에서 세포고사가 증가하는 이유를 실험적 varicocele rat에서 renal vein의 surgical manipulation이 염증을 만들고 이것이

생식세포의 세포고사를 야기했을 거라 주장하면서 정계정맥류와 세포고사와의 연관관계를 부인하였다. Fujisawa 등[2]은 정상인 남자와 정계정맥류를 가진 불임 환자의 고환을 조직검사 하여 AI를 비교한 결과 도리어 환자군 에서 세포고사의 정도가 더 감소한다고 보고하였다. 이에 최근에는 세포고사와 관련된 많은 유전자 산물에 대한 연구가 진행되고 있으며 이러한 연구를 통하여 세포고사와 고환조직의 손상에 대한 연관성을 확인하고 있는 실정이다.

p53은 정상세포의 성장과 분화 그리고 기능에 필수적인 요소는 아니나 DNA의 손상이 발생한 경우 G1 단계에서 cell cycle을 정지시켜 DNA 합성이 발생하는 S 단계로의 진입을 막아 DNA 복구를 유도하거나 손상이 심한 경우 세포고사를 유도한다. 또한 대부분의 인간에서 발생하는 악성종양의 경우 p53 유전자의 돌연변이나 p53에 발암성 단백질이 결합함으로써 p53 유전자가 불활성화 되어 있음을 보이고 있어 p53은 비정상세포의 증식을 억제하고 세포의 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. DNA 손상이 가벼울때 WT p53은 cell cycle을 정지시켜 DNA 복구를 하며, DNA 손상이 심할때는 WT p53이 세포고사를 야기시킨다고 보고하였다.[18] 이를 토대로 p53 단백질의 발현 정도를 확인함으로써 DNA 손상의 정도 및 세포고사의 정도를 가늠해 볼 수 있다. Scheinman 등[19]은 경동맥에 손상을 받은 쥐에 p53을 활성화시킴으로써 조직의 세포고사가 의의 있게 증가함을 보고하였으며, Darnton 등[20]은 비정상 p53의 발현을 확인함으로써 특히 발암성 질환의 초기 진단에 임상적인 의의를 갖을 수 있다고 제시하였다. 또한, Kilinc 등[17]은 정상대조군과 sham operation 군 모두와 비교해 정계정맥류군 에서 p53의 발현이 의미 있게 증가하였다고 하면서 p53의 발현이 비정상 정자형성을 반영한다고 보고하였다. 저자의 경우도 sham operation 군과 비교하여 정계정맥류 군에서 p53의 발현이 현저히 증가하였으며 특히 3주와 4주에 발현이 두드러졌고, 이것으로 정계정맥류로 인한 고환세포의 손상이 발생되고 이와 더불어 세포고사가 증가되어 불임의 원인이 될 수 있음을 추측했다. 물론 정계정맥류의 원인이 정확히 밝혀지지는 않았으며 서로 상반된 결과를 보이는 연구들도 다수 발표되고 있어 좀더 추가적인 연구가 필요하겠으며 향후 정계정맥류 교정 후 세포고사와 p53의 발현이 감소하는지 여부를 파악함과 동시에 다른 유전자 산물을 밝히는 연구도 필요할 것으로 생각된다.

H_2AX는 H_2A histone의 종류중의 하나로 DNA 손상시의 역할을 William[22] 등에 의해 처음으로 제시되었는데, 세포가 이온화된 방사선에 의해 노출될 때 H_2AX는 인산화된

것을 밝혀냈다.[21] 특히 double-strand breaks(DSB) 주위의 염색질에 과도하게 인산화되었다. Rogakou 등[22]은 세포가 세포고사로 DNA가 double-strand breaks(DSB) 될 때 H2AX는 serine 139에서 인산화된다고 보고하였다. 본 연구에서도 실험적으로 정계정맥류를 만든 쥐에서 3주와 4주에 H_2AX 발현 및 p53이 증가한 것으로 보아 DNA 손상이 발생하였으며 이것으로 인해 세포고사가 발생하여 불임이 생기지 않았나 여겨진다.

V. 결론

정계정맥류의 원인이 정확히 밝혀지지는 않았으나 본 연구의 경우 p53과 H_2AX 발현이 증가된 것으로 세포고사와 정계정맥류에 의한 불임과의 연관관계를 예측할 수도 있겠다. 그러나 세포고사에 대해 서로 상반된 결과를 보이는 연구들도 다수 발표되고 있어 좀더 추가적인 연구가 필요할 것으로 여겨지며, 이러한 세포고사를 조절하는 단백질이나 복구하는 단백질에 대한 연구도 필요할것으로 여겨진다.

VI. 참고문헌

1. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. Hum Reprod Update 2001;7:473-81

2. Fujisawa M, Hiramine C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. World J Urol 1999;17:296-300

3. Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipschultz LI, Kim ED. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. J urol 1997;158:1791-3

4. Ku J, Shim HB, Kim SW, Paick JS. The role of apoptosis in the pathogenesis of varicocele. Br J Urol 2005;96:1092-6

5. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. Rev Reprod 1999;4:38-47

6. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. Anat Rec 1978;190:905-26

7. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysilogical conditions. J Gastroenterol Hepatol 2000;15:109-20

8. Fisher DE. The p53 tumor suppressor: critical regulator of life and death in cancer. Apoptosis 2001;6:7-15

9. Gorelick JI, Goldstein M. Loss of infertility in men with varicocele. Fertil Steril 1993;59:613-6

10. Greenberg SM, Lipschultz LI, Wein AJ. Experience with 425 subfertile male patients. J Urol 1978;119:507-12

11. Sayfan J, Halevy A, Oland J, Nathan H. Varicocele and left renal vein compression. Fertil Steril 1984;41:411-7

12. Schneck FS, Abnormalities of the testes and scrotum and their surgical management. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Vein AJ, editors. Campbell's urology. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 1998;2384
13. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in kinetics. Br J cancer 1972;26:239-57
14. Caruso A, Walsh R, Ross L, Trummer H, Meachan R. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. J Urol 1999;161:280
15. Barqawi A, Caruso A, Meacham RB. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. J Urol 2004;171:501-3
16. Simsek F, Turkeri L, Cevik I, Bircan K, Akdas A. Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. Arch Esp Urol 1998;51:947-50
17. Kilinc F, Guvel S, Kayaselcuk F, Aygun C, Egilmez T, Ozkardes H. p53 expression and apoptosis in varicocele in the rat testis. J urol 2004;172:2475-8
18. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 1992;358:15-6
19. Scheinman M, Ascher E, Kallakuri S, Hingorani A, Gade P, Sherman M, et al. p53 gene transfer to the injured rat carotid artery promotes apoptosis. Surgery 1999;126:863-8
20. Darnton SJ. Demystified... p53. Mol Pathol 1998;51:248-53
21. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phophorylation on serine 139. J Biol Chem 1998;273:5858-68
22. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. J Biol Chem 2000;275:9390-5

Fig. 1. Immunohistochemical staining for p53 in varicocele. It was found that the increased expression of p53 in 3, 4 weeks compared to control group.

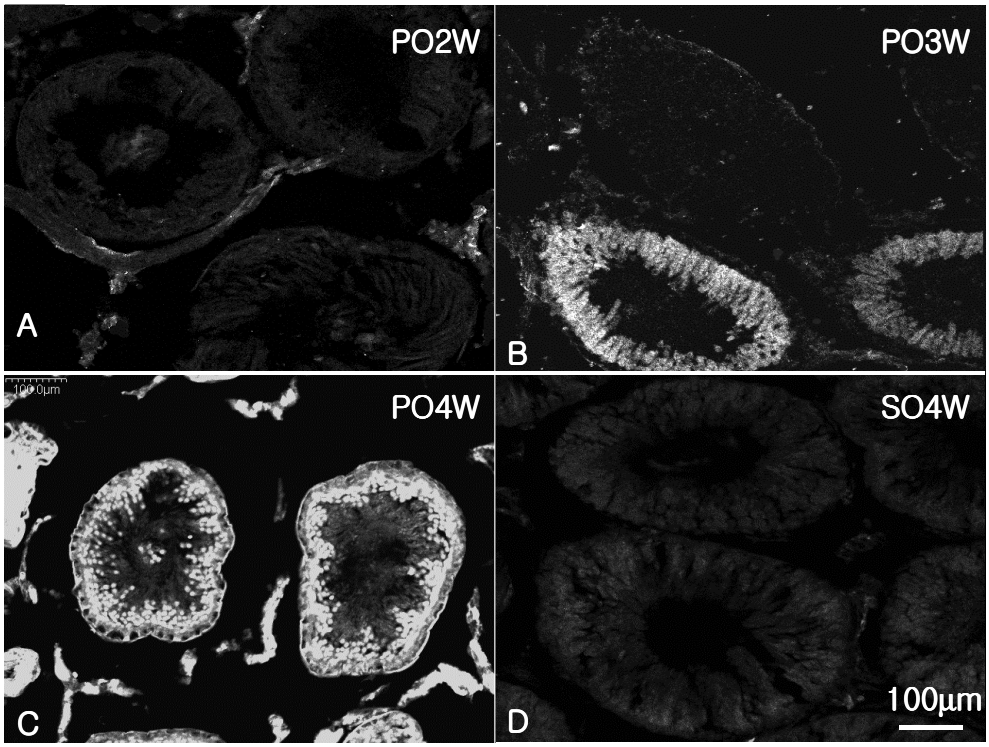

Fig. 2. Immunohistochemical staining for H_2AX in varicocele. It was found that the increased expression of H_2AX in 3, 4 weeks compared to control group.

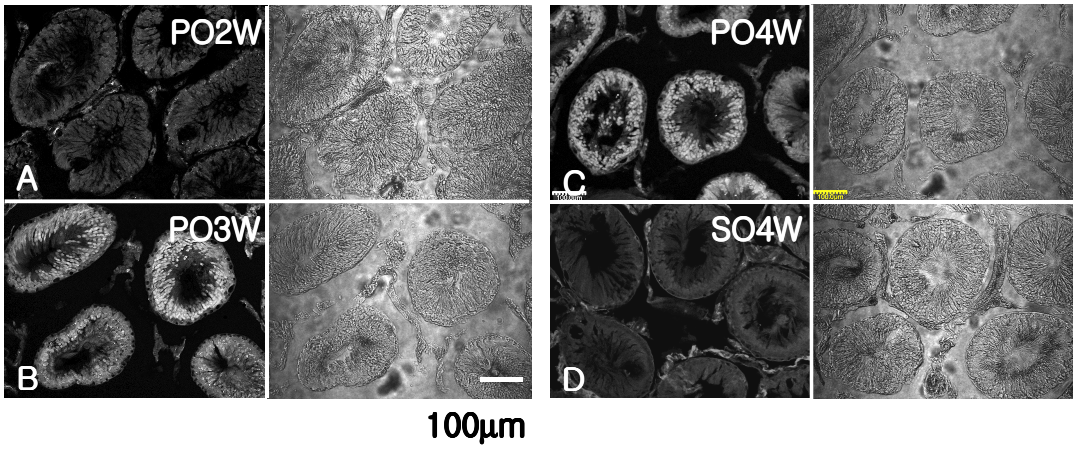
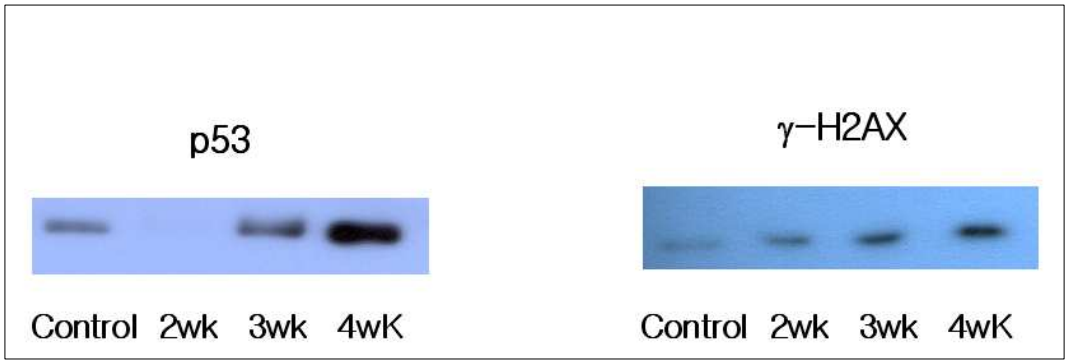
Fig. 3. Western blot analyses for p53 and H_2AX in varicocele rats.