

성선 자극 호르몬에 의해 유도된 인간 난소내 세포사멸된 난자에서의 StAR 단백질의 발현

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과*,
울지의과대학 산부인과학교실[†], 서울여성병원 불임연구실[‡]
김세광 · 박철홍* · 양현원[†] · 김명신[‡] · 정경아
배상욱 · 박기현 · 조동제 · 윤용달* · 송찬호

=ABSTRACT=

Expression of Steroidogenic Acute regulatory (StAR) Protein during Oocyte Apoptosis in the Gonadotropin-Stimulated Human Ovary

Sei Kwang Kim, M.D., Cheol Hong Park, M.S.*, Hyunwon Yang, Ph.D.[†],
Myoung Shin Kim, M.S.[‡], Kyung Ah Chung, M.D., Sang Wook Bai, M.D.,
Ki Hyun Park, M.D., Dong Jae Cho, M.D., Yong-Dal Yoon, Ph.D.*,
and Chan Ho Song, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University, College of Medicine,
Department of Life Sciences, Hanyang University, College of Natural Sciences*,
Department of Obstetrics and Gynecology, Ulji University, College of Medicine[†],
Infertility Clinic, Seoul Women's Hospital[‡]*

Objective : To determine the distribution and expression of steroid acute regulatory (StAR) protein in human oocyte and embryo in relation to apoptosis.

Methods : Immuno-labelling and confocal microscopy were applied to examine the localization of StAR protein in human oocytes and embryos. Western blot analysis was also used for qualitative and quantitative assessment of StAR protein expression.

Results : There were lipid droplet accumulation in fragmented human oocytes and embryos. StAR protein (30 kDa) expression was detected in human oocytes and embryos. The level of StAR protein expression was lower in the fragmented group than the normal group.

Conclusion : The present study provides evidence for involvement of StAR protein in the apoptosis of fragmented oocytes and embryos during in vitro fertilization (IVF) program as well as in the normal development of human oocytes and embryos.

Key Words : StAR protein, Apoptosis, Human oocyte, Embryo

체외수정 시술 시 과배란 유도를 통해 배란된 난자 또는 배아의 분절화 (fragmentation) 현상은 배아 발달과 착상 및 임신 예후에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며^{1,2} 전체 배아 가운데 절반 이상에서 관찰될 정도로 흔히 발생하는 현상이다.^{3,4}

배아 분절화 현상이 형태학적인 면에서 세포사멸

(apoptosis)과 매우 유사하다고 보고된 이후 분절화는 배아의 약 75%에서 세포사멸과 직접적인 관계가 있음을 확인하였다.⁵

세포사멸의 기전이 실행 수준에서 미토콘드리아와 관련이 있음은 이미 밝혀졌으나, Bax, Bcl-2와 같은 미토콘드리아 관련 단백질들이 생식세포의 사멸에 관여하고

접수일 : 2002. 8. 27.
주관책임자 : 김세광

* 본 논문은 2001학년도 연세대학교 의과대학 일반교수 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

있다는 사실이 밝혀진 것은 최근의 일이다.^{6,7} 이들 단백질들은 미토콘드리아의 외막 및 내막에 존재하며 세포사멸의 과정중 proapoptotic agents 또는 antiapoptotic agents로 기능하는데⁸ 이들 중 일부는 스테로이드 합성 과정에도 관여하는 것으로 알려졌다. 특히 스테로이드 합성세포의 경우 세포사멸의 과정중 스테로이드 합성이 억제되는 것으로 밝혀지면서 세포사멸과 스테로이드 생합성 조절 단백질의 관련 여부가 주목을 받고 있다.

일반적으로 스테로이드 생성세포에서 미토콘드리아 외막에 존재하는 콜레스테롤과 지방체, 그리고 원형질막 성분은 미토콘드리아 내막으로 이동하게 되는데, 이곳에는 콜레스테롤을 프레그네놀론으로 전환하는 cytochrome P₄₅₀ side chain cleavage enzyme (P₄₅₀SCC)이 존재하고 있다. 이러한 이동과정에는 부가적으로 특정 단백질의 생합성이 필요한 것으로 알려져 있다.^{9,12} 이제까지 스테로이드 생합성 과정에서 조절 기능을 담당하는 단백질이 무엇인지 확실히 규명되지는 않았으나 현재까지의 연구 결과 steroidogenic acute regulatory (StAR) protein이 중요한 조절 단백질로 생각되고 있다.

따라서 본 연구는 스테로이드 생합성의 조절 요소인 StAR 단백질이 인간 난자에도 존재하는지 여부를 먼저 알아보고, 체외수정 과정에서 흔히 관찰되는 인간 분절화 난자의 세포사멸 현상과 StAR 단백질의 상관 관계도 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 난자의 획득

불임을 원인으로 불임클리닉에 내원하여 보조생식술을 시술받고 있는 환자를 대상으로, 난자 공여에 동의를 표명한 환자 20명에서 채취된 난자 가운데 정상적으로 배아이식에 사용되고 남은 잉여 난자 72개를 본 실험에 이용하였다.

2. TUNEL staining

난자 또는 배아를 분절화를 보이는 난자와 정상 난자로 구분하고 각 군마다 5개씩 난자에서 *in situ* apoptosis detection kit (TUNEL kit, PharMingen)를 사용하여 세포사멸을 확인하였다. 먼저 배아를 phosphate buffered saline (PBS, Gibco)으로 세척한 다음 endogenous peroxidase를 불활성화시키기 위하여 3% H₂O₂가 포함된 메탄올에 10분간 처리하고, anti-digoxigenin-peroxidase로 30분간 반응시켰다. 그런 다음 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Research Genetics)으로 2분간 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 2분간 대조염색을 실시하였다. 탈수를 마친 슬라이드는 xylene으로 투명화 시키고 canada balsam으로 봉입하여

영구표본을 제작하였다.

3. Neutral lipid staining with Oil Red O

배아를 10% NBF (neutral buffered formalin, Sigma)에서 약 10분간 고정한 후 PBS (phosphate buffered saline)로 충분히 세척하고 Oil Red O 염색 용액에 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 배아는 잉여의 염색액을 제거하기 위하여 PBS로 세척한 후 슬라이드에 올리고 mounting medium (Sigma)으로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

4. Western blot analysis of StAR protein

각 군마다 5개씩의 난자를 각 1.5 ml microcentrifuge tube에 담은 후 protease inhibitors (1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mg/l leupeptin, 2 mg/l aprotinin)를 포함한 lysis buffer (10 mM Tris, 250 mM sucrose, 100 mM EDTA, pH 7.4) 500 μ l를 넣고 ice에서 homogenizer로 1,200 rpm에서 30회 균질화 하여 용해시켰다. 용해된 세포를 100,000 xg에서 30분간 원심분리하여 미토콘드리아 분획을 얻은 다음 sample buffer (25 mM Tris-HCl, 1% SDS, 5% b-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue)에 녹여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Bio-Rad)를 수행하였다.

전기영동이 끝난 후 gel을 분리하여 transfer buffer (48 mM Tris-HCl, 39 mM glycine, 0.037% SDS, 20% methanol)에서 nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech)에 전이시켰다. Membrane을 ponceau S 용액에 5분간 염색한 후 2-3회 증류수로 세척하여 여분의 염색액을 제거한 다음 5% skimmed milk를 포함한 TBS (10 mM Tris, 0.2 M NaCl, 0.1% Tween-20)에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBS로 여러번 세척하였다. 세척된 membrane을 internal control protein인 tubulin 및 StAR에 대한 일차 항체와 각각 1시간 동안 반응시킨 후 TBS로 세척한 다음 HRP (horse radish peroxidase)로 표지된 이차 항체와 1시간 반응시켰다. TBS로 여러번 세척한 후 ECL (enhanced chemi-luminescence, Amersham Pharmacia Biotech) reagent로 1분간 반응시켰다. 반응이 완료된 membrane을 암실에서 X-ray film에 10초 동안 노출시켜 band를 확인하였으며, StAR 단백질의 상대적인 발현 정도는 internal control protein인 tubulin의 density와 비교하여 정량하였다.

5. Immunofluorescence confocal microscopy of StAR protein

실험에 사용한 난자 및 배아는 투명대를 얇게 하기 위하여 70% acidic Tyrode's solution (pH 2.1~2.5)에 현미경으로 검경하면서 20초 정도 노출시켰다. 난자 및 배아는 10% NBF (neutral buffered formalin, Sigma)에서 약 10분

간 고정한 후 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하고 비특이적 결합을 막기 위해 2% BSA (bovine serum albumin)가 첨가된 PBS에서 10분간 반응시켰다. 각 배아는 StAR protein에 대한 일차항체 (BD PharMingen)와 상온에서 1시간 동안 반응시키고, PBS로 세척한 다음 FITC로 표지된 이차항체로 상온에서 빛을 차단시킨 상태로 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 배아는 PBS로 세척하여 슬라이드에 올리고 mounting medium (Sigma)으로 봉입한 다음 형광현미경으로 관찰하였다.

6. 통계적 분석

각 실험군은 3회 이상 실시하여 그 결과를 one-way ANOVA 방법으로 통계적 유의성을 검증하였으며, P값이 0.05보다 낮은 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. TUNEL staining

실험군 당 각 5개의 난자 및 배아를 TUNEL 방법으로 염색한 결과 분절이 없는 군에서는 거의 형광염색이 관찰되지 않았으나 분절을 보이는 군에서는 TUNEL staining 결과 진한 형광 염색이 관찰되었다 (Fig. 1).

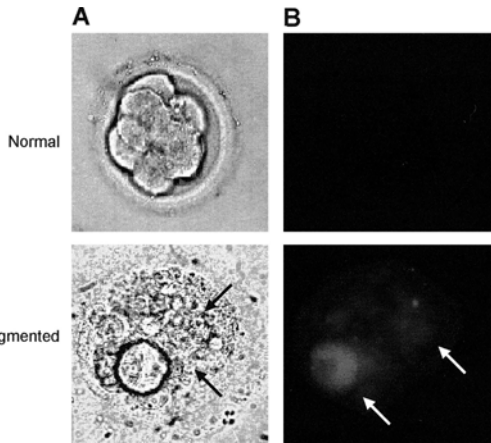


Fig. 1. Detection of apoptosis in human embryos using TUNEL staining. Normal (top) and fragmented (bottom) embryos were stained with fluorescence in situ apoptosis detection kit. Arrows indicate fragmentations in light (A) or fluorescence (B) microscopic view.

2. Lipid staining with Oil Red O solution

중성 지질에 선택적인 염색을 보이는 Oil Red O 염색 결과 분절을 보이는 군에서 세포질 내 lipid droplet 부위에 붉은색으로 염색된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나

이러한 염색은 분절이 없는 군에서는 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

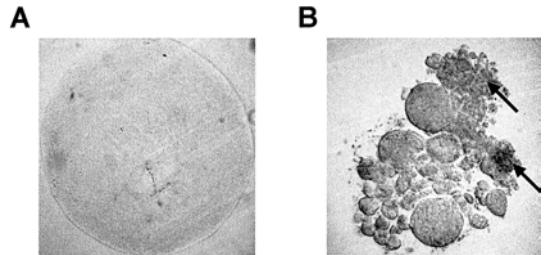


Fig. 2. Detection of the presence of lipid droplets in human embryos by Oil Red O staining Normal and fragmented human embryos were stained with Oil Red O in panel B, lipid droplets (arrows) show red color. Non-fragmented embryo (A).

3. StAR protein의 western blot analysis

스테로이드 호르몬 생성에 필요한 콜레스테롤 운반 관련 미토콘드리아 단백질, StAR protein의 발현을 정상적인 난자와 분절화를 보이는 난자를 대상으로 western blot을 통해 확인하였다.

StAR protein은 모든 난자에서 검출되었다. 그 동안 스테로이드 생성이 활발한 부신을 포함 다른 조직에서는 이들 protein의 존재가 보고되었으나, 인간 난자내 존재 여부는 본 실험을 통하여 처음 밝혀지는 것이다.

StAR protein의 경우 기준에 보고된 다른 조직에서와 동일한 분자량 30 kDa의 영역에서 검출되었다. Tubulin을 internal control로 하여 StAR protein 발현의 상대적인 수준을 Scion Image Program을 통하여 분석한 결과, 분절을 보이는 난자군 (0.41±0.05)에서 보다 분절을 보이지 않는 정상 난자군 (1.77±0.53)에서 StAR protein의 발현이 더 높게 나타났다 (P<0.001, Fig. 3).

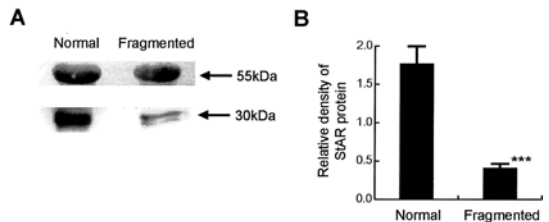


Fig. 3. Western blot analysis of StAR protein expression in normal and ragmented human embryos. (A) Electrophoretogram of western blot analysis of StAR protein (30 kDa) and tubulin (55 kDa) as an internal control. (B) Relative levels of StAR proten expression were calculated by Scion-Image Program®. Values are the mean±SEM. ***, P<0.001 compared with normal.

4. StAR protein의 immuno-labelling 및 confocal microscopy

StAR protein에 대한 일차항체와 이에 대한 형광부착 이차항체를 반응시킨 후 confocal microscopy로 StAR protein의 난자내 존재 여부를 확인하였다.

StAR protein은 난자 및 배아의 핵을 제외한 세포질 전체에 걸쳐 골고루 분포하고 있음을 확인하였으며, 그 발현 정도는 분절을 보이는 난자군에서 보다 분절을 보이지 않는 정상 난자군에서 더 진하게 나타났다 (Fig. 4).

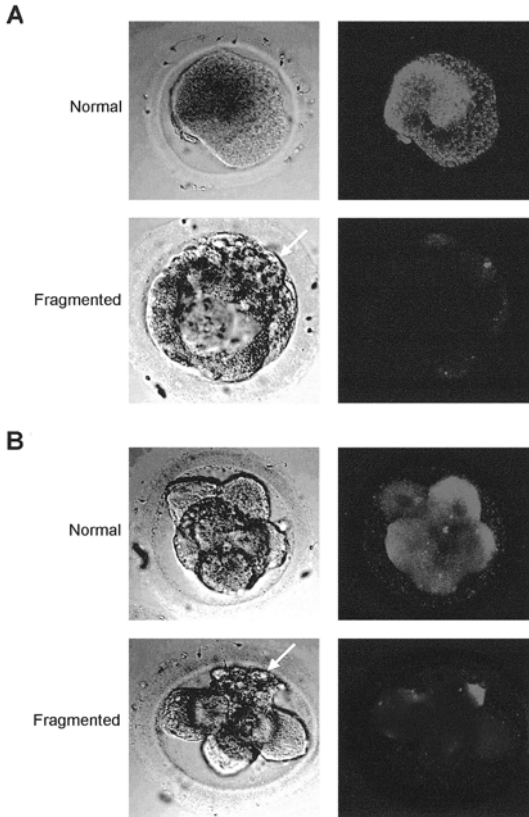


Fig. 4. Localization of StAR protein in normal and fragmented human oocytes and embryos using fluorescence immunostaining. A and B, Unfertilized normal (top) and fragmented (bottom) human embryo. Light (left) and fluorescence (right) microscopic images. Arrows indicate fragmentation.

고찰

세포사멸 (apoptosis)이란 세포 내에서 이를 유발하는 신호에 의하여 발생하는 능동적인 세포사 (cell death) 과정으로 수동적 세포사인 괴사 (necrosis) 현상과는 구별되며, 형태적으로도 많은 차이점이 있다.¹³

세포사멸에 영향을 미치는 다양한 인자들로는 Fas, Fas ligand (FasL), Bax, Bcl-2,⁸ 그리고 스테로이드 호르몬 (steroid hormones), 성장인자 (growth factors), 싸이토카인 (cytokines) 등이 있는 것으로 알려져 있다.^{14,15}

StAR protein은 mitochondria에 존재하는 30 kDa의 분자량을 갖는 phosphoprotein으로서,¹⁶⁻²¹ 스테로이드가 생성되는 미토콘드리아 내막 P450 scc 효소로 콜레스테롤을 이동시킴으로써 생식소 내 스테로이드 생성과정에 필수적인 기능을 담당하는 단백질이다.²²⁻²⁵

최근 StAR 유전자를 제거한 knockout mice 수컷에서 안드로겐 생합성 감소와 더불어 정자의 성숙이 억제되고 생식세포가 apoptosis에 의해 사멸되는 양상이 관찰되었다. 또한 StAR knockout mice 암컷에서는 난포 성숙이 억제되면서 조기 난소 성숙부전에 이르게 되는 것으로 보고되었다.²⁶ 이처럼 세포사멸에 따른 기능 이상이 StAR 단백질과 관련이 있으며, 이는 스테로이드 생성 과정에 관여하는 StAR의 역할에 영향을 주었기 때문으로 생각되고 있다.²⁷

본 연구에서 apoptosis의 지표로 널리 사용되는 TUNEL staining을 통하여 인간 난자 및 배아의 분절화가 apoptosis에 의해 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Oil Red O staining을 통한 세포질 내 지질 분포 확인 결과 난자 및 배아의 분절화가 세포질내 지질 소적 (lipid droplet)의 축적을 야기한다는 사실을 확인할 수 있었다. 이는 흰쥐, 소와 돼지를 포함한 다른 동물들에서의 경우에서의 기존 보고 결과²⁸⁻³⁰와 동일함을 알 수 있었다. 이처럼 분절화를 보이는 난자 및 배아의 세포질내 지질 축적은 세포사멸의 경로에서 미토콘드리아의 기능 이상으로 스테로이드 생합성을 포함한 지질 대사과정이 장애를 입은 결과로 생각된다.

Suzuki 등은 인간 난소 내 과립세포가 아닌 미성숙 난자에서 δ 5-3 b-hydroxysteroid dehydrogenase (δ 5-3 b-HSD)와 17 b-hydroxysteroid dehydrogenase (17 b-HSD)의 활성을 검출하고 내재성 프로게스테론 (P₄)과 에스트라디올 (E₂)의 존재를 확인함으로써 난자 내 스테로이드 생합성 기능이 난자의 성숙, 배란, 수정, 그리고 초기 발달 과정에 중요한 영향을 미친다고 보고하였다.³¹ 본 연구 결과 스테로이드 생성에 관여하는 StAR protein이 난자 및 배아에서 검출되었음은 난자 및 배아에 스테로이드 생합성 능력이 존재하고 있음을 시사한다고 볼 수 있다. 아울러 분절화를 보이는 apoptotic 난자 또는 배아에서는 StAR protein의 발현이 미약한 반면 분절화를 보이지 않는 정상적인 난자 및 배아의 경우 왕성하게 나타나는 것으로 보아 StAR protein이 배란 후 난자 및 배아의 정상적인 발생에 필수적으로 중요한 역할을 수행할 것으로 보이며, 분절화를 보이는 난자 및 배아에서는 apoptosis 과정의 조절자로서 기능할 것으로 추론된다.

- 참고문헌 -

- Juriscicova A, Ian R, Alessandro F, Robert FC, Sue V. Effect of maternal age and conditions of fertilization on programmed cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 139-45.
- Alikani M, Cohen J, Tomkin G. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836-42.
- Flechon JE, Kopečný V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote* 1998; 6: 183-91.
- Van Blerkom J, Davis PW, Samuel A. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum Reprod* 2001; 16: 719-29.
- Juriscicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 93-8.
- Thompson WE, Powell JM, Whittaker JA, Sridaran R, Thomas KH. Immunolocalization and expression of prohibitin, a mitochondrial associated protein within the rat ovaries. *Anat Rec* 1999; 256: 40-8.
- Choongkittaworn NM, Kim KH, Danner DB, Griswold MD. Expression of prohibitin in rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1993; 49: 300-13.
- Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1997; 124: 1-6.
- Fergusson JJ. Puromycin and adrenal responsiveness to adrenocorticotropic hormone. *Biochim Biophys Acta* 1962; 57: 616-7.
- Fergusson JJ. Protein synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. *J Biol Chem* 1963; 238: 2754-9.
- Garren LD, Ney RL, Davis WW. Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by ACTH in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA* 1965; 78: 4704-7.
- Garren LD, Davis WW, Crocco RM. Puromycin analogs: action of adrenocorticotropin hormone and the role of glycogen. *Science* 1966; 152: 1386-8.
- Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif* 1992; 25: 241-50.
- Owens GP, Hahn WE, Cohen J. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4177-88.
- Hsueh AJW, Billig H, Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine reviews* 1994; 15: 707-24.
- Krueger RJ, Orme-Johnson NR. Acute adrenocorticotropin hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. *J Biol Chem* 1994; 258: 10159-67.
- Pon LA, Hartigan JA, Orme-Johnson NR. Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis: rapid accumulation of a phosphoprotein. *J Biol Chem* 1986; 261: 13309-16.
- Pon LA, Orme-Johnson NR. Acute stimulation of corpus luteum cells by gonadotropin or adenosine 3'5'-monophosphate causes accumulation of a phosphoprotein concurrent with acceleration of steroid synthesis. *Endocrinol* 1988; 123: 1942-8.
- Stocco DM, Kilgore MW. Induction of mitochondrial proteins in MA-10 Leydig tumor cells with human choriogonadotropin. *Biochem J* 1988; 249: 95-103.
- Epstein LF, Orme-Johnson NR. Regulation of steroid hormone biosynthesis: Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 19739-45.
- Stocco DM, Sodeman TC. The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem* 1991; 266: 19731-8.
- Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning, and expression of a novel LH-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells: characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 1994; 269: 28314-22.
- Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss III JF, Lin D, Miller WL, et al. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92: 4778-82.
- Lin D, Sugawara T, Strauss III JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, et al. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995; 267: 1828-31.
- Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 1996; 17: 221-44.
- Hasegawa T, Zhao L, Caron KM, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, et al. Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1462-71.
- Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, Clark BJ, Paolo Sassone-Corsi EL, Zeleznik AJ, et al. Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the camp response-element binding protein family. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 184-99.
- Adrienne EC, Peter WF, Michael JD, Joseph EA, Charlotte EF. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 2001; 64: 1375-85.
- Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* 2000; 63: 1245-52.
- 김문규, 이양환, 김종흡, 윤용달. 돼지 난소내 여포의 폐쇄에 따른 미세구조의 변화에 관한 연구. *동물학회지* 1987; 30: 351-70.
- Suzuki S, Endo Y, Fujiwara T, Tanaka S, Iizuka R. Cytochemical study of steroid-producing activities of human oocytes. *Fertil Steril* 1983; 39: 683-9.

=국문초록=

목적 : 인간 난자 및 배아의 퇴화에 따른 미토콘드리아 내 StAR 단백질의 존재 여부 및 변화 양상을 알아보고자 하였다.

연구 방법 : 여성 불임 환자에서 보조생식술을 통해 채취된 난자 가운데 정상 난자와 분절화를 보이는 난자를 구분하여 TUNEL 염색 방법으로 세포사멸 여부를 확인하고, immuno-labelling 방법을 적용하여 StAR 단백질 발현 정도를 측정함으로써 난자의 분절화에 따른 StAR protein의 관련 여부를 확인하였다.

결과 : StAR 단백질의 발현 여부를 Western blot 분석을 통해 확인한 결과 StAR 단백질이 난자에서도 검출되는 것으로 나타났다. StAR 단백질의 발현은 분절화를 보이는 난자에서 보다 정상 난자에서 더 높게 나타났다. StAR 단백질에 대한 일차 항체와 이에 따른 형광 부착 이차 항체를 반응시킨 후 confocal microscopy로 StAR 단백질의 난자내 존재 여부를 알아보았다. StAR 단백질은 난자의 세포질 전체에서 진한 발색을 보여 해당 단백질이 세포질에 골고루 존재하는 것으로 확인되었다. 또한 상대적인 발현 양상은 분절화를 보이는 난자 및 배아에서 보다 정상의 난자 및 배아에서 더욱 큰 것으로 확인되었다.

결론 : 체외수정 과정에서 흔히 관찰되는 인간 난자 및 배아의 분절화 현상은 apoptosis의 지표로 널리 사용되는 TUNEL staining을 통한 실험 결과 apoptosis에 의해 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 난자 및 배아의 분절화가 세포질 내 지질 소적 (lipid droplet)의 축적을 동반한다는 사실을 확인할 수 있었으며 이러한 분절화 난자 및 배아에서의 세포질내 지질 축적은 세포사멸의 경로에서 미토콘드리아의 기능 이상으로 스테로이드 생합성을 포함한 지질 대사 과정에 이상이 발생하여 생긴 결과로 보인다. 스테로이드 생성에 관여하는 StAR protein이 난자 및 배아에서 검출되는 사실은 난자 및 배아에 스테로이드 생합성 능력이 존재하고 있음을 시사한다고 볼 수 있다. 아울러 StAR protein이 분절화를 보이는 apoptotic 난자 또는 배아에서 보다 분절화를 보이지 않는 정상적인 난자 및 배아의 경우 강하게 나타나는 것으로 보아 StAR protein이 배란 후 난자 및 배아의 정상적인 발생에 필수적인 중요한 역할을 수행할 것으로 보이며, 분절화를 보이는 난자 및 배아에서는 apoptosis 과정의 조절자로서 기능할 것으로 생각된다.

중심단어 : 미토콘드리아, 퇴화난자, 세포사멸, StAR 단백질