

감마선 조사 랫트의 고환에서 fibronectin의 발현

정진우 · 김희철 · 김정태 · 안미정 · 이지영 · 신태균

제주대학교 생명자원과학대학 수의학과
제주대학교 방사선응용과학연구소

*690-756 제주도 제주시 제주대학로 66번지
제주대학교 생명자원과학대학 수의학과
전화 : 064-754-3363 Fax : 064-756-3354,
E-mail : shint@cheju.ac.kr

Expression of Fibronectin in the Testis of Rats with Irradiation

Jin-Woo Jeong, Hee-Chul Kim, Jeong-Tae Kim,
Mee-Jung Ahn, Jee-Young Lee and Tae-Kyun Shin*

*Department of Veterinary Medicine and
Applied Radiological Science Research
Institute, Cheju National University, Jeju
690-756, Republic of Korea*

Abstract

The expression of fibronectin was studied in the rat testis after irradiation to understand whether fibronectin is involved in the degenerative processes of rat testis with gamma irradiation (8 Gy). Histological findings showed that tissue damage in the testis was occurred after irradiation. Western blot analysis showed that the expression of fibronectin significantly increased at day 9 post-irradiation ($p < 0.05$). Immunohistochemically, fibronectin was constitutively immunostained in some interstitial cells, Sertoli cells, myoid cells, spermatogonia, and spermatocytes. The expression of fibronectin

was increased in some spermatogonia, and spermatocytes after irradiation compared with those of non-irradiated control testis. These findings suggest that fibronectin is one of factors which are influenced by gamma irradiation, and that increased fibronectin plays a role in the mediation of cellular interaction and/or tissue remodeling in the testis with irradiation induced damage.

Key words : fibronectin, germ cell, irradiation, testis

서 론

생체에 어느 정도 이상의 방사선을 조사하면 이온화작용에 의하여 생체 내의 세포조직이 파괴되며, 체내 호르몬 변화, 유전적인 변이, 면역기능 변화 등이 일어난다 (Lebaron-Jacobs 등 2004; Sokolov 등 2005). 특히 조혈장기와 생식장기에서 예민하게 방사선 영향을 받는다 (Grigoryev 등 1972). 생식기 장기중 하나인 고환에서는 방사선 조사의 정도에 따라 정세관 및 정자수가 감소하여 무정자증까지 초래하는 것으로 알려져 있다 (Maiti 등 2001). 이러한 방사선에 의한 손상 과정 중에 다양한 단백질의 변화가 있지만, 아직까지 알려진 바가 극히 적다.

조직을 구성하는 많은 세포들은 분비된 단백질과 다당류인 세포간질에 의해 둘러싸여 있다. 세포간질은 조직과 기관에서 성장, 재건, 상처 회복과 같은 중요한 역할을 한다 (Hay 1993; Raghov 1994). 고환에서는 지지세포, 근육성세포, 간질세포, 정자세포사이의 세포-세포 상호작용은 정자형성과정에 필수적이다 (Yazama 등 1997). 이들 고환성세포들은 간질조직의 중요한 구성요소로 나타나는 세포간질 분자를 통하여 상호작용을 한다 (Yazama 등 1997). 또한 세포간질 분자들은 지지세포와 근육성세포의 분화, 정자세포의 성장등에 관여한다 (Davis 등 1990; Yazama 등 1997). 세포간질 분자는 collagen, laminin, heparan sulfate

proteoglycan, fibronectin 등이 있다. 세포간질 분자 중 fibronectin은 랫트의 고환에서 출생 후 15 일령까지 증가하여 가장 높게 발현하며 그 후로 조금씩 감소한다고 알려졌다 (Skinner 등 1989). 그렇지만 고환의 병리적 상태에서 정자형성 과정에 중요한 세포간질 분자에 대한 조사는 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 랫트에서 방사선조사 후 세포간질 단백질의 변화를 관찰하고자, 일차적으로 방사선 조사 후 시간 경과에 따라 고환 내 fibronectin이 어떻게 변하는지 Western blot과 면역조직화학을 이용하여 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 방사선조사

수컷 6주령의 Sprague-Dawley 랫트를 중앙실험동물 (서울)로부터 분양 받아 표준사육방법으로 사육공시하였다. 실험군은 chloral hydrate (375mg/kg)를 복강내 주사하여 마취 후, 방사선 조사기 (Theratron-780 teletherapy unit)를 사용하여 ^{60}Co 감마선 (선량률: 1.33 Gy/min) 8Gy로 1회 점진 조사하였다. 대조군은 chloral hydrate (375mg/kg)를 복강내 주사하여 마취만 하였다.

2. 조직표본 준비와 조직 검사

조직채취는 대조군으로 chloral hydrate로 마취한 랫트와, 실험군으로 감마선 조사 후 1일, 4일, 9일째 희생하여 각 일자별 3마리씩 ether로 마취하여 희생시켜 정소를 채취하였다. 채취한 조직의 일부는 Western blot을 위해 -70°C 냉동고에 보관하였고, 일부 조직은 통상적인 방법에 따라 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 고정된 조직은 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5 μm 의 두께로 조직절편을 만들어 H-E염색을 실시하였다.

3. Western blot analysis

정소내의 단백질 양적 분석을 위해 시간 경과에 따라 분리된 정소조직을 leupeptin (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), PMSF (1 mM), aprotinin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 등의 protease

inhibitor가 포함된 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40 (polyoxyethylene [9] p-t-octyl phenol)의 buffer에서 완전히 균질화 한 후, 14,000 g로 20분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 상층액으로부터 단백질을 정량한 후 12.5% sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel에서 전기 영동하고, gel 상의 단백질밴드를 다시 nitrocellulose transfer membranes (Schleicher and Schuell, Keene, NH)에 100V에서 2시간 동안 이동시켰다.

Fibronectin을 확인하기 위해 rabbit polyclonal anti-fibronectin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)을 1차 항체로 이용하였다. 2차 항체로는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 60분간 반응시켰다. 또한 fibronectin의 면역반응을 확인한 membrane을 mouse anti-beta-actin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)으로 재면역반응 시켜 모든 샘플의 단백질이 동량으로 전기영동 되었는지 확인하였다. 면역반응이 끝난 membrane은 Amersham ECL reagents (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK)로 1분간 반응시켜, X-ray 필름에 노출시키고, 그 결과를 densitometer (MGS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)로 측정하였다. 그리고 Western blot의 결과는 *post-hoc* Student-Newman-Keuls' procedure for multiple comparisons를 이용하여 유의성을 검정하였다.

4. 면역조직화학

실험군과 대조군의 정소 조직절편은 파라핀을 제거하고, 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H_2O_2 가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰으며, 각 조직을 비특이적 반응을 방지하기 위해 10% normal goat serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체로 rabbit polyclonal anti-fibronectin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 실온에서 1시간 이상 반응시킨 후 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 45분간 반응시켰다. 이어서 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit (Vector Laboratories,

Burlingame, CA)로 실온에서 45분간 반응시켰다. 각 단계가 끝나고 PBS(pH 7.4)로 5분간 3회 충분히 세척했으며, 면역반응이 끝난 조직 절편은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 활용하여 발색시켰다. 그리고 hematoxylin 용액으로 대조염색을 한 후, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰했다.

결과 및 고찰

1. 방사선 조사 후 랫트의 육안적 소견과 조직 검사 결과

랫트에 8Gy의 방사선 조사 후 시간이 경과함에 따라 고환의 크기 및 무게가 감소하는 것을 관찰할 수 있었고, 이는 이미 보고된 결과와 일치하였다 (Maiti 등 2001). 고환에 나타나는 조직학적 병변은 대조군인 정상 고환에서는 특이 소견이 관찰되지 않았다 (Fig. 1A). 랫트에 8Gy의 방사선 조사 후 9일째 정소조직에서는 간질조직내 많은 삼출물이 관찰되었고, 정소세포층과 지지세포 사이가 분리되었고 (arrows), 정세관내 공포화 (arrowheads)가 관찰되었다 (Fig. 1B, C).

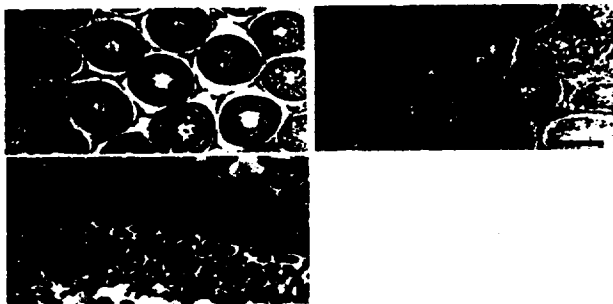


Fig. 1. Histological findings in the rat testis. There were no histological changes in the normal control rat testis (A). At day 9 post-irradiation of rat testis (B, C) showed intertubular edema, and desquamation of germinal cells. Hematoxylin-eosin staining. Scale bar represents: in A and B, 120µm; in C, 30µm.

2. Fibronectin의 Western blot 결과

Fibronectin은 대조군과 실험군의 고환조직에서 발현이 확인되었으며, 그 분자량은 약 220 kDa 이었다 (Fig. 2). 대조군인 정상 고환조직에서 fibronectin은 약하게 발현하였다 (Density fibronectin ratio/mm² value [mean±SE], 0.267 ± 0.072). 실험군인 방사선을 조사 후 1일째 (0.526 ± 0.037)와 4일째 (0.351 ± 0.201) fibronectin의 발현이 정상조직에 비하여 증가하였지만 유의성은 없었다. 방사선 조사 후 9일째에는 정상조직에 비하여 유의성 있게 증가하였다 (0.636 ± 0.136, p<0.05).

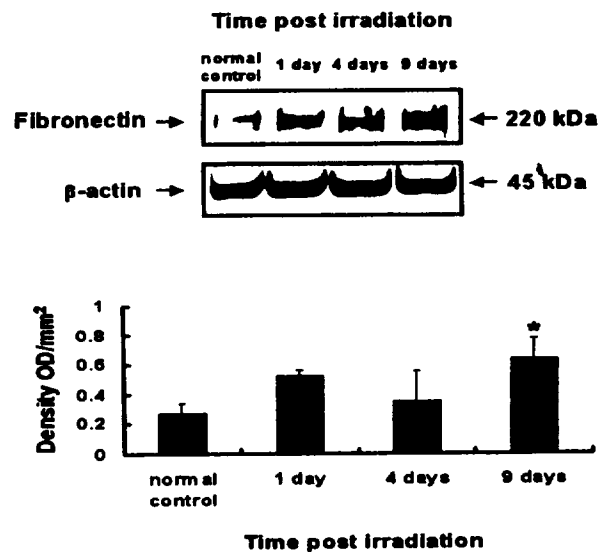


Fig. 2. Western blot analysis of fibronectin in the normal testis and at days 1, 4, and 9 post-irradiation. Each photo depicts representative data from three different experiments. Upper photograph: a representative photograph of the Western blot analysis of fibronectin and beta-actin. Bar graphs: fibronectin band increased significantly at day 9 after irradiating, as compared to those of the normal controls. The relative expression of fibronectin was calculated from three samples after normalization to beta-actin expression. Data are means ± SE (n=3 samples at each time points). *p<0.05, compared with the normal controls.

3. Fibronectin의 면역조직화학 결과

Fibronectin의 면역반응은 정상 고환에서 간질세포, 근육성세포, 지지세포, 정조세포, 정모세포에서 발현하였고, 특히 정조세포와 정모세포에서 발현이 다른 세포보다 강하였다 (Fig. 3A). 8Gy 조사 후 9일의 고환에서 fibronectin은 간질조직내 일부 세포와 정세관내 정모세포에서 정상 고환조직보다 강하게 발현하였다 (Fig. 3B).

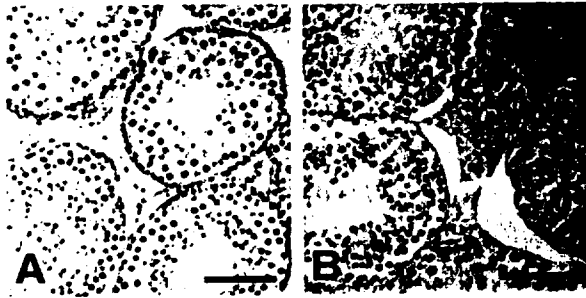


Fig. 3. Immunostaining of fibronectin in the testis of normal controls (A) and irradiating rats on day 9 post-injury (B). In the normal control testis (A), fibronectin was expressed constitutively in some interstitial cells, Sertoli cells, myoid cells, spermatogonia, and spermatocytes. In the testis on day 9 post-irradiation (B), fibronectin immunoreactivity was increased in spermatogonia, and spermatocytes. Counterstained with hematoxylin. The scale bars represent 100 μ m.

조직을 구성하는 많은 세포들은 분비된 단백질과 다당류인 세포간질에 의해 둘러싸여 있다. 세포간질은 조직과 기관에서 성장, 재건, 상처 회복과 같은 중요한 역할을 한다 (Hay 1993; Raghov 1994). 세포간질 단백질 중 하나인 fibronectin은 고환조직 성장과 밀접하게 관련이 있다 (Skinner 등 1989). 본 연구에서는 랫트에서 방사선조사 후 세포간질 단백질의 변화를 관찰하고자, 방사선 조사 후 시간 경과에 따라 고환 내 fibronectin의 변화를 Western blot과 면역조직화학을 이용하여 관찰하였다. 실험 결과 방사선 조사 후 9일에서 fibronectin이 정상 고환보다 유의적으로 증가하

며, 주된 양성세포는 정조세포와 정모세포인 것을 알 수 있었다. 따라서 랫트의 정소에 방사선 8Gy 조사 후 고환의 구성세포들의 손상 및 세포와 세포사이의 세포간질에도 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 또한 이들 세포에서 분비된 fibronectin과 같은 세포간질 단백질은 손상된 고환의 재건에 관여하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 제주대학교 방사선응용과학연구소의 연구비 지원에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

- Davis CM, Papadopoulos V, Sommers CL, Kleinman HK, Dym M. Differential expression of extracellular matrix components in rat Sertoli cells. *Biol Reprod.* 1990, 43, 860-869.
- Grigoryev YG, Markelov BA, Popov VI, Akhunov AA, Tsessarskaya TP, Ilyukhin AV, Fyodorova NL, Burkovskaya TE, Shafirkin AV. Physiological and hematological effects of chronic irradiation. *Life Sci Space Res.* 1972, 10, 147-154.
- Hay ED. Extracellular matrix alters epithelial differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 1993, 5, 1029-1035.
- Lebaron-Jacobs L, Wysocki J, Griffiths NM. Differential qualitative and temporal changes in the response of the hypothalamus - pituitary - adrenal axis in rats after localized or total-body irradiation. *Radiat Res.* 2004, 161, 712-722.
- Maiti S, Meistrich ML, Wilson G, Shetty G, Marcelli M, McPhaul MJ, Morris PL, Wilkinson MF. Irradiation selectively inhibits expression from the androgen-dependent *Pem* homeobox gene promoter in sertoli cells.

- Endocrinology. 2001, 142, 1567-1577.
- Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. FASEB J. 1994, 8, 823-831.
- Skinner MK, Stallard B, Anthony CT, Griswold MD. Cellular localization of fibronectin gene expression in the seminiferous tubule. Mol Cell Endocrinol. 1989, 66, 45-52.
- Sokolov MV, Smilenov LB, Hall EJ, Panyutin IG, Bonner WM, Sedelnikova OA. Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. Oncogene. 2005, 24, 7257-7265.
- Yazama F, Esaki M, Sawada H. Immunocytochemistry of extracellular matrix components in the rat seminiferous tubule: electron microscopic localization with improved methodology. Anat Rec. 1997, 248, 51-62.