

O-2 흰쥐 난소내 Leptin 및 Leptin 수용체의 발현

김명신^{*}, 양현원, 윤현숙¹, 권혁찬, 김세광², 윤용달¹
아주대학교 산부인과, 한양대학교 생물학과¹, 연세대학교 산부인과²

서 론

Leptin은 167개의 아미노산으로 구성된 단백질로 지방 조직에서 생성되어 혈액으로 분비된다(Leroy et al., 1996). 혈액 내로 분비된 leptin은 뇌, 췌장, 생식 기관 등에 분포하고 있는 leptin 수용체와 결합하여 작용을 나타낸다. Leptin 수용체는 cytokine receptor superfamily에 속하며, long form과 short form의 이성체가 존재하는데(Tartaglia et al., 1995), 난소에는 이러한 두 가지 이성체가 모두 존재하는 것으로 알려져 있다(Cioffi, et al., 1997).

이러한 leptin의 혈중 농도는 체지방 양과 비례해서 증가하며, 인슐린, corticosterone, 음식 섭취, circadian rhythm과 같은 여러 가지 인자들의 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(Saladin et al., 1995; Sileker et al., 1996; Sinha et al., 1996).

이러한 leptin은 비만뿐만 아니라 생식 질환과도 관련이 있는데, 대표적으로 다낭성 난소 증후군을 나타내는 여성에서 정상 여성보다 높은 혈중 leptin 농도를 보인다(Brzechffa et al., 1996). 또한 유전적으로 비만인 생쥐(ob/ob mouse)는 불완전한 형태의 leptin을 생산하거나, 또는 leptin mRNA를 전혀 생산하지 못하는데(Zhang et al., 1994), 이러한 ob/ob 생쥐는 비만뿐만 아니라, 당뇨, 불임 등의 증상을 동반한다(Bray et al., 1979).

이러한 생쥐 암컷에 leptin을 주사하면 혈중 LH가 증가하고, 난소 및 자궁의 무게가 증가하면서 난소 및 자궁의 기능이 향상되는 것으로 보고하고 있다(Barash et al., 1996). 그러나 이러한 leptin의 작용이 난소에 직접적인지 혹은 시상하부나 뇌하수체를 매개로 하는지는 아직 밝혀지지 않았으며, 난소에서의 leptin 및 leptin 수용체의 발현 양상에 대한 연구는 매우 미진하다. 따라서 본 연구의 목적은 흰쥐의 난소내 leptin과 leptin 수용체의 발현 양상을 면역조직화학방법과 RT-PCR 방법으로 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

생후 3 주령, 8 주령의 Sprague-Dawley계통의 흰쥐 암컷에서 난소를 적출하여 면역조직화학방법과 RT-PCR 방법으로 leptin 및 leptin 수용체의 발현을 관찰하였다. 면역조직화학방법을 위해 난소를 4.5% paraformaldehyde에 고정하여 paraffin으로 포매한 후 5 μm 두께의 절편을 만들어 통상의 탈파라핀 과정과 탈수 과정을 수행하였다. Leptin에 대한 1차항체(γ-20, Santa Cruz

Biotechnology)와 leptin 수용체에 대한 1차항체(K-20, Santa Cruz Biotechnology)로 1시간 동안 반응시킨 후, biotinylated mouse anti-goat 2차항체(DAKO)와 streptavidin-peroxidase로 각각 30분씩 반응시킨 다음 DAB로 발색시켜 관찰하였다.

RT-PCR에서 leptin의 sense primer와 antisense primer는 각각 5'-M13-forward-GCATTGGGGAACCCCTGT-3'(nucleotides 3-20)과 5'-AGCACCCAGGGCTGAGGT-3'(nucleotides 502-485)을 사용하고, leptin 수용체의 sense primer와 antisense primer는 각각 5'-TAGAATTCCTCGAAGTTAA-3'(nucleotides 2358-2378)과 5'-CGTGATTTCTTCAGGAA-3'(nucleotide 3217 -3199)를 사용하였다.

결과 및 논의

면역조직화학방법에 의한 난소내 leptin 및 leptin 수용체 염색 결과 먼저 3주 흰쥐 난소에서 leptin은 혈막세포와 일부 폐쇄 난포내 과립세포에서 염색되었다(Fig. 1, A).

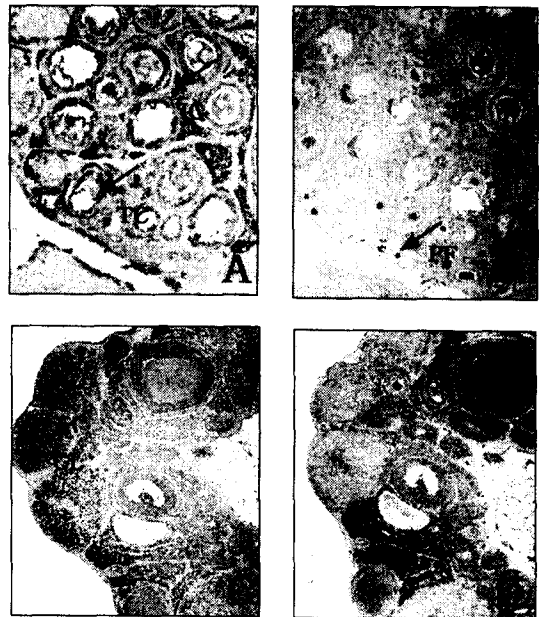


Fig. 1 Leptin and leptin receptor localization in the ovary by immunohistochemistry. AF=atretic follicle; SF= secondary follicle; PF=primary follicle; CL=corpus luteum; TC=theca cells; IC=interstitial cells

반면 leptin 수용체는 난자와 간질세포에서 염색되는 것을 확인할 수 있었고, 특히 난포강이 형성되기 이전의 난포에 있는 난자에서 진하게 염색되었다(Fig. 1, B). 한편 8주 흰쥐 난소에서 leptin은 3주에서와 비슷한 양상으로 협막세포에서 염색된 것을 알 수 있었고, 특히 황체세포와 난포강이 형성되지 않은 난포내 과립세포에서 염색되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1, C). Leptin 수용체는 3주에서와 마찬가지로 간질세포와 난자에 염색되는 것을 알 수 있었고, 또한 8주 leptin 발현양상과 비슷하게 난포강이 형성되지 않은 난포내 과립세포에서 염색되는 것을 확인할 수 있었으나, 황체세포에는 염색되지 않았다(Fig. 1, D).

RT-PCR 결과 3주 및 8주의 흰쥐 난소에서 leptin 및 leptin 수용체의 발현을 확인할 수 있었다.

최근 비만 유전자 산물인 leptin이 생식 생리에도 관련이 있다는 보고는 많이 있었지만, 난소에서의 leptin 및 leptin 수용체 발현양상을 직접적으로 관찰한 보고는 아직 없었다. 본 연구에서는 미성숙 흰쥐 및 성숙 흰쥐의 난소에서 leptin 및 leptin 수용체의 발현을 면역조직화학방법과 RT-PCR방법으로 확인하였다.

지금까지 알려진 난소내 leptin의 작용으로 leptin이 과립세포에 작용하여 스테로이드 호르몬 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Zachow & Magoffin, 1997).

일반적으로 과립세포에 FSH가 작용하여 만들어진 IGF-1은 과립세포에 작용하여 스테로이드 호르몬 합성을 활성화시키며 세포 생존에 필요한 중요한 요소로 작용하는데, 이러한 IGF-1의 작용은 leptin이 과립세포에 존재하는 leptin 수용체에 결합함으로써 억제되는 것으로 알려져 있다. 본 실험 결과 폐쇄난포에서 leptin과 leptin 수용체의 발현을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 볼 때 leptin은 난포의 폐쇄 기작에 중요한 역할을 할 것으로 사료되나, 아직까지 난소에서 leptin의 직접적인 역할에 대해서 정확하게 밝혀진 것이 없으므로 연구해 나가야 할 과제라고 생각된다.

참고문헌

- Barash IA, Cheung CC, Weigle S, Ren H, Kabigting EB, Kuiper JL, Clifton DK, and Steiner RA (1996) *Endocrinology* 137: 3144-3147.
- Brzechffa PR, Jakimiuk AJ, Agarwal SK, Weitsman SR, Buyalos RP, and Magoffin DA (1996) *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4166-4169.
- Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Freidman JM, Ailhaud G, and Dani C (1996) *J Biol Chem* 271: 2365-2368.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, and Freidman JM (1994) *Nature* 372: 425-432.