

## Signaling of Insulin and GnRH

채 희 동 · 이 사 라

울산의대 서울아산병원

### 1. 서 론

세포나 조직이 정상적인 생리적 기능을 수행하기 위해서는 인슐린의 신호전달 (signaling)에 의해 정밀하게 조절되는 에너지 균형의 유지가 필수적인 바, 만약 자극이 과도하거나 세포가 반응을 하지 않게 되어 그 조절기능을 소실하게 되면, 세포나 조직 수준에서 병적 현상이 일어나게 된다. 생식기능의 조절은 뇌하수체의 gonadotrope가 분비하는 당단백호르몬, 즉 황체화호르몬 (luteinizing hormone, LH)과 난포자극 호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH)에 의해서 조절되는데, 이 호르몬의 분비는 일차적으로는 시상하부의 신경내분비 세포에서 박동성으로 분비되는 성선자극호르몬분비호르몬 (gonadotropin releasing hormone, GnRH)의 자극에 의해 조절되고, 이차적으로는 에스트로겐 상태에 따라 조절되는 성선 스테로이드 호르몬의 되먹임 기전에 의해 다시 조절된다.

그러므로 GnRH가 LH와 FSH를 분비하는 이 과정에 영향을 주는 모든 인자들이 생식기능을 조절하는 기능이 있다고도 볼 수 있는데, 특히 GnRH의 자극으로 LH가 분비되는 이 과정에 영향을 미치는 인자들에 대한 연구 중, 가장 주목을 받고 있는 인자 중의 하나인 인슐린유사성장인자 (insulin-like growth factor, IGF)-I에 대한 연구를 살펴보면, bovine anterior pituitary cell에 GnRH와 동시에 IGF-I을 처리했을 때, GnRH의 수용체의 수는 변화시키지 않으면서, LH의 분비를 증가시키며 또한, IGF-I을 estradiol (E2)과 함께 투여하게 되면 GnRH의 자극으로 E2가 분비되는 반응이 증가됨을 확인한 연구 결과가 보고된 바 있다.<sup>1</sup> 즉 뇌하수체의 GnRH neuron에는 IGF-I과 IGF-I 수용체가 동시에 발현되어 있으면서 neuron과 glial cell 자체에서 생산하는 central IGF-I이 바로 생식기능과 다른 신경내분비 기능을 서로 연결시켜 주는 역할을 하게 된다고 하였다.<sup>2</sup> 그러나, 한편으로는 쥐나 돼지의 뇌하수체 세포에 GnRH를 투여하기 수 시간 전, IGF-I으로 전처리해 보았지만, LH의 분비 과정에 아무런 영향을 끼치지 않았다고 보고한 연구도 있어,<sup>3</sup> GnRH가 LH 분비를 자극하는 과정에서 IGF-I이 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 아직 명확하지 않은 실정이다.

또, 표피성장인자 (epidermal growth factor, EGF)가 gonadotrope의 수용체를 조절하는 과정에 중요한 역할을 함으로써 생식기능에 영향을 미친다는 연구 결과도 있어, 즉 숨어 있는 GnRH 수용체 (cryptic GnRH receptor)를 드러나게 하거나, GnRH 수용체를 발현하는 세포들을 추가로 불러 모으는 기전, 아니면 세포분열을 촉진하는 효과 (mitogenic effect)를 나타냄으로써 GnRH의 자극에 대한 gonadotrope의 반응성을 강화시킨다고 보고하였다.<sup>4</sup> 이 외에도 2004년의 한 연구보고에 따르면, 뇌하수체의 정중 용기 (median eminence)의 glial cell과 주위 혈관의 혈관내피세포에서 분비하는 여러 인자들, 즉 TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ , Nitric Oxide 등의 작용이 조화를 이룬 neuro-glio-endothelial interaction이 가장 중요한 조절 기전이라

고 하였다.<sup>5</sup>

에너지 항상성과 생식기능과의 직접적인 관계는 고인슐린 혈증의 비만 Zucker rats에서 잘 관찰할 수 있었는데, 이들에서는 이들의 한 배 새끼 (littermates)와 비교했을 때, LH의 평균 농도와 박동성 분비시의 최고 농도치가 모두 감소되어 나타났다.<sup>6</sup> 게다가, 음식물 섭취와 생식기능과의 관계에 대한 방대한 연구 결과도 보고되어 있어 심한 음식물 섭취 제한이나 catabolic state, 심지어는 단기간의 칼로리 제한만으로도 포유류의 생식능력이 저해되어, Syrian hamsters, rats, ewes 등의 다양한 동물 모델에서 연구한 결과, 고농도의 인슐린 수치는 놀랍게도, 무배란 상태까지 유발할 정도로 LH의 분비를 심하게 저해시킬 수 있음이 밝혀졌다.<sup>7</sup>

인슐린에 관해서는, 생식기능에 대한 인슐린의 작용을 뒷받침하는 강력한 증거들이 많이 보고되었는데, 에너지 항상성과 생식능력에 대한 연관성은 예쁜꼬마선충 (*Caenorhabditis elegans*)과 노랑초파리 (*Drosophila melanogaster*)에서 많이 연구되어져 왔었고 인간에서는, 인슐린 수용체 homologues나 인슐린 수용체의 세포내 일차 표적의 돌연변이, 포유류의 인슐린 수용체 기질 군집 (insulin receptor substrate family, IRS family)들이 생식능력은 감소시키면서 지방의 축적을 야기하는 것으로 알려져 있다.<sup>8-11</sup> IRS 단백질은 인슐린이나 IGF-I의 자극에 반응하여 빠르게 tyrosine 기가 인산화되며, 포유류의 IRS 단백질은 적어도 4종류가 알려져 있는데, IRS-1, IRS-2가 가장 보편적으로 분포되어 있고, IRS-3는 지방조직에만 주로 분포하며, IRS-4는 흥선과 뇌, 신장에 발현된다. 이 중 IRS-2가 말초에서의 탄수화물 대사나  $\beta$ -cell function에 중요하며 이 pathway에 문제가 생기면 생식능력의 감소를 가져올 수 있다고 알려져 있다.

인슐린의 gonadotrope 기능에 대한 직접적인 역할은, 생쥐와 소의 뇌하수체 조직을 일차배양 (primary culture)한 것에서 연구되었는데, 여기서는 생체 내에서 시행되었던 연구 결과와는 정반대로, 인슐린은 GnRH의 자극에 의한 gonadotropin의 분비를 오히려 증가시킨다고 하였다.<sup>1,12-14</sup> 결국 인슐린이 gonadotropin 분비에 대해 어떠한 작용을 하는지에 대해서는 상충하는 연구 결과를 보이고 있다.

그러므로 쥐의 gonadotrope에서 L $\beta$ T2 세포선 (cell line)과 같은 gonadotrope 세포 모델이 개발된 것은 클론적으로 순수한 세포 군집을 이용하여, gonadotrope 세포의 조절에 관여하는 인자들에 대한 연구를 가능하게 해 준, 획기적인 발전이라 할 수 있다. 다시 말하자면, 유전자의 조절과 호르몬 signaling에 대한 연구는 이 연구 모델을 이용함으로써 연구가 훨씬 용이하게 되었다. 즉, 혼합 세포 주가 가졌던 교란 효과, folliculostellate cell의 과다 성장, 뇌하수체 조직을 일차배양 했을 때 나타나는 복잡한 endocrine, paracrine 상호작용 등의 영향들을 배제할 수 있게 되므로, 보다 정확한 연구가 가능하게 된 것이다.

이러한 L $\beta$ T2 세포선을 이용하여 인슐린이 gonadotropin의 분비 과정과 GnRH signaling에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보고자 하였던 연구 결과를 우선 간략하게 살펴보면, 인슐린이 LH 분비와 gonadotropin subunit promoter의 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 인슐린이 GnRH signaling을 억제하는 것은 mitogen activated protein kinase (MAP kinase) family 중의 하나인 세포외 수용체 signaling kinase (extracellular receptor kinase, ERK 1/2)의 활성화 정도 (amplitude)와 활성화 속도를 약화시켜 그 효과를 나타낸다는 것을 발견하게 되었다. 이러한 연구 결과에 근거하면, 인슐린이 생체내에서 gonadotropin의 생산에 억제 작용을 나타내는 기전이 인슐린의 GnRH signaling을 억제함으로써 gonadotrope에 대한 직접적인 억제 작용을 하기 때문이라고 추측해 볼 수 있게 된다.

위 단락에서 언급한 mitogen activated protein kinase (MAPK) family에 대해 간략하게 설명하자면,

MAPK란 성장인자 등이 세포막에 위치한 수용체를 활성화하면, 이 신호를 세포막으로부터 핵으로 전달함으로써 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달체계로써, 포유동물에서는 지금까지 3가지 (ERK, JNK/SAPK, p38) 이상이 발견되어 이들이 MAPK family를 이루고 있다. MAPK는 MAPKKK? MAPKK?MAPK로 연결된 protein kinase cascade를 통하여 활성화된 후, 여러 가지의 표적 유전자의 발현을 조절함으로써 세포 반응을 유발하게 되는데, 성장인자는 주로 ERK 경로를 활성화하고 자외선 등의 stress, 그리고 TNF 등의 염증성 cytokine은 주로 JNK와 p38의 경로를 활성화한다. 그러나 이 경로들은 완전히 독립된 것이 아니어서, 자극이나 세포의 종류에 따라서 여러 가지의 MAPK가 서로 다른 정도로 활성화되고, 이에 따라 서로 다른 기질을 서로 다른 정도로 인산화함으로써, 다양한 신호에 따르는 세포 반응의 특이성을 나타내는 것으로 추정된다. 또한 G 단백질의  $\alpha$  소단위 4가지 (Gi, Gq, Gs, G12)와  $\beta$ ,  $\gamma$  소단위 의 복합체가 모두 MAPK의 활성화 과정에 관여한다고 알려졌으며, G 단백질이 MAPK의 활성을 조절하는 기전은 신호의 종류와 세포의 종류에 따라서 다르다. G 단백질 신호경로가 이 MAPK를 활성화한다는 사실은 세포가 성장인자 뿐만 아니라 호르몬 등 G 단백질 신호전달계를 거치는 다양한 신호를 총괄하여 성장과 분화를 조절함을 의미하는 것이라고 할 수 있다.<sup>15</sup>

## II. 본론

### 1. Insulin receptor and IRS expression in L $\beta$ T2 cells

인슐린 signaling이 GnRH 작용에 어떠한 역할을 하는지를 알기 위해서는, 우선 인슐린 signaling에 필요한 요소들이 L $\beta$ T2 gonadotrope 세포선에 존재하고 있는지를 아는 것이 필요하다. 쥐의 뇌하수체에서 인슐린 수용체 (IR)에 대한 면역조직화학 분석을 하였더니, IR이 존재하긴 하나 gonadotrope에서는 고농도로 발현되지는 않았다. L $\beta$ T2 세포에 IR subunit이 존재하는 지를 입증하기 위해 exon 5-8을 포함하는 mature mRNA를 인식하는 primer를 사용하여 RT-PCR을 시행하였다 (Figure 1A).

또한, 인슐린을 처리하는 것이 IR $\beta$  subunit의 인산화 (phosphorylation)를 유도하는 지를 확인하기 위해 혈장성분이 포함되지 않은 세포배양액에서 L $\beta$ T2 cell을 하룻밤 동안 배양시켜 세포를 정지상태에 (quiescence) 이르게 한 후, 10 nM의 인슐린으로 3~5분간 처리하였고 이렇게 처리한 세포 추출물을 anti-IR $\beta$  antibody로 면역침착시키고 antiphosphotyrosine antibody로 Western blotting을 시행하였더니, 인슐린을 처리하자마자 IR의 tyrosyl기가 빠르게 인산화되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 1B).

IRS family member는 insulin signaling에서 중요한 역할을 하여, 세포내 kinase와 steroid에 의한 되먹임 조절 작용을 통한 인슐린 저항성 (insulin insensitivity) 측면에서 그 중요성을 가진다. 즉 이들이 인슐린의 작용에 결정적인 역할을 하기 때문에, 이들의 L $\beta$ T2 cell 내의 존재는 매우 중요하다고 할 수 있다. L $\beta$ T2 세포 전체의 RNA를 RT-PCR로 분석한 결과, L $\beta$ T2 cell에서 IRS-1과 IRS-2의 mRNA가 존재함을 알 수 있었다 (Figure 2A). Western blotting으로 추가 연구한 결과, L $\beta$ T2 cell에 IRS-1과 IRS-2의 단백질도 존재한다는 것이 확인되었다 (Figure 2B). IRS family는 인슐린이 인슐린 수용체 tyrosine kinase 가 tyrosyl기를 인산화하는 것을 매개하는 과정에서 일종의 발판역할을 하는 단백질이라 할 수 있다.

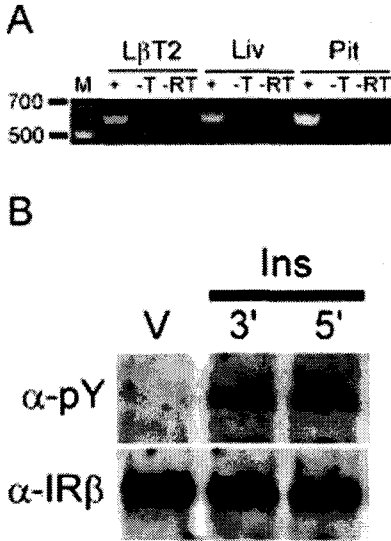


Figure 1. Expression of insulin receptor in LβT2 cells and activation by insulin

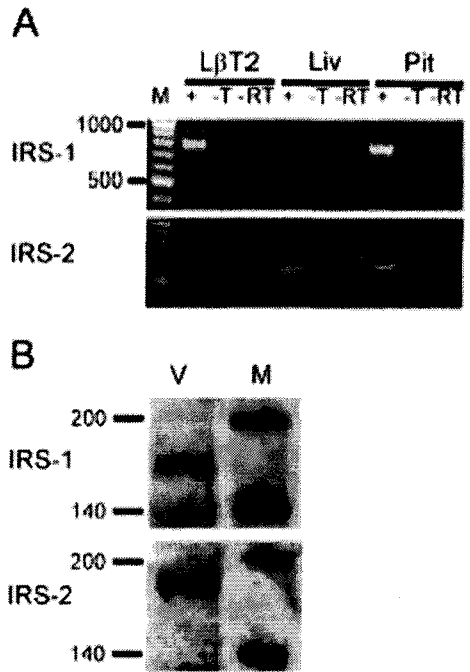


Figure 2. Expression and insulin activation of IRS family members in LβT2 cells

## 2. Insulin inhibits GnRH-induced LH secretion

이제까지의 수많은 동물 모델에서의 연구 및 임상 관찰에서, 인슐린이 gonadotropin 생산에 억제 작용을 한다고 보고했던 것과는 반대로, 뇌하수체 세포의 일차배양 연구 결과는 인슐린이, 인슐린 단독 작용 또는 IGF-I과의 상호 작용으로 GnRH가 LH의 분비를 자극하는 과정에 오히려 촉진 작용을 나타낸다고 결론지어졌다. 그렇지만 일차배양이란, 다양한 여러 내분비 세포들이 포함되어 있을 뿐 아니라, 많은 수의 folliculostellate cell들이 같이 존재하므로 이들이 배양세포가 자라는 속도를 금방 따라잡아서, GnRH에 대한 반응을 억제하는 역할을 하기 때문에 이러한 변수들을 감안해야만 한다. 특히 folliculostellate cell들은 follistatin을 분비해서 activin/inhibin autocrine system을 변화시킴으로써 GnRH signaling을 붕괴시킬 수도 있기 때문에 더더욱 그 결과에 혼란을 줄 수 있다.

일차배양과는 다르게, LβT2 cell은 gonadotrope에서 얻은 클론 군집으로써, 다른 세포 군집에서 생산된 분비인자의 영향을 받지 않을 수 있게 된다. 물론, 비록 생체내 조건에서는 이들 세포들이 문맥 순환 (portal circulation)에 매우 근접하여 위치하므로 다른 세포들이 분비하는 인자들이 여기에 축적되는 것이 제한되지만, 정적인 일차배양의 조건에서는 이러한 조건들을 피할 수 없게 되므로 일차배양에서는 이러한 혼란 변수들을 배제하기 힘들다. 이러한 효과들을 배제하기 위해 GnRH가 LH 분비를 자극하는 과정에서의 인슐린의 작용에 대한 연구를 LβT2 cell을 사용하여 연구하였다. 즉 10 nM 인슐린으로 16시간 전처리 한 군과 30분 전처리 한 군으로 나누어 인슐린의 작용을 실험한 바, LβT2 cell을 인슐린으로 전처리한 다음, vehicle 또는 10 nM GnRH와 5분간 배양하고 그 상층 부유액을 추출하여

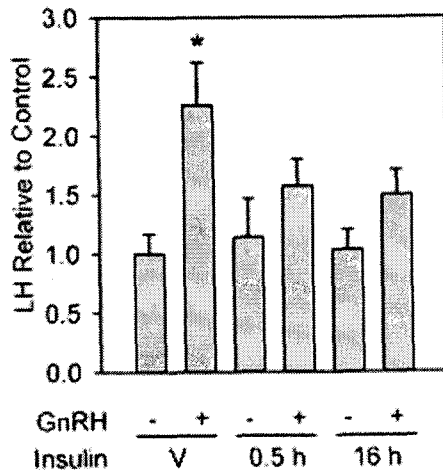


Figure 3. Insulin inhibits GnRH-induced LH release from LβT2 cells

면역방사계수 측정법 (immunoradiometric assay)으로 LH 성분을 분석하였다.

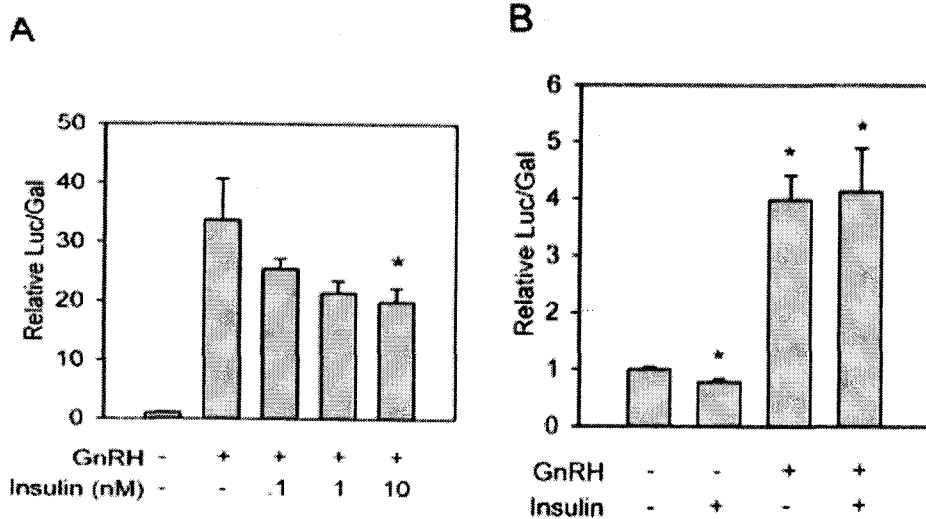
인슐린 전처치를 16시간 한 군과 30분 한 군 둘 다에서 인슐린은 GnRH가 LH 분비를 자극하는 과정을 억제하는 것이 확인되었고, 이 결과는 생체내에서의 인슐린의 영향을 보고한 다른 연구 결과들과 일치하는 것이었다.

### 3. Insulin inhibits GnRH-induced transcription

인슐린은 LβT2 cell에서 당단백호르몬의 합성 및 분비 과정 모두를 감소시킬 수 있다. GnRH를 단 시간 처리하면 당단백호르몬에서 공통적인 α subunit의 전사 (transcription)와 LH, FSH에 고유한 β subunit의 전사가 모두 증가한다.<sup>16</sup> 그렇다면 인슐린이 당단백호르몬의 α subunit 유전자의 전사에 어떠한 영향을 미치는 지를 알기 위해, α subunit 유전자를 1.8 kbp의 인간 α subunit 유전자 촉진자 (promoter)와 transfection 시켰다. Transfected cell을 10 nM GnRH로 6시간 동안 자극하기 전에 0.1, 1, 10 nM의 인슐린으로 30분간 전처리 한 결과, transcription 반응이 대조군의 60% 수준까지 용량-비례 관례로 감소하였다 (Figure 4A).

또한, 인슐린의 LHβ subunit 유전자 발현에 대한 영향을 알기 위해, 수용체 유전자를 쥐의 1.8 kb LHβ subunit reporter의 transcriptional control과 일시적으로 반응시키자, 인슐린으로 30분간 전처리 한 후, 0.1, 1, 10 nM GnRH으로 6시간 자극했을 때 LHβ promotor의 활성화에는 아무런 변화를 보이지 않았다. 그러나 10 nM의 인슐린으로 16시간 전처리한 군에서는 LHβ promotor의 활성이 대조군의 70% 수준까지 감소하는 것이 확인되었으며 (Figure 4B), 10 nM GnRH의 자극에 대해서는 유의한 변화를 확인할 수 없었다.

다른 연구자들의 최근 보고에 따르면, GnRH를 4시간 정도, 단기간 처리했을 때 LH 단백질의 합성이 증가한다고 하였으나<sup>17</sup> 본 연구자가 최근 연구한 결과에서는, LH 합성이 급성으로 증가하는 것은 gonadotropin mRNA의 합성이 급성으로 증가하기 때문이라기 보다는 GnRH가 cap-dependent translation



**Figure 4.** Insulin inhibits GnRH activation of the glycoprotein hormone subunit promoter and basal LH $\beta$  subunit promoter activity in L $\beta$ T2 cells. Insulin inhibits GnRH-induced translation.

을 활성화 시키기 때문이라고 생각된다.<sup>18</sup>

즉, 인슐린이 LH의 합성과 분비를 억제하는 것은 부분적으로 translational activity를 억제하기 때문이라고 볼 수 있다. GnRH가 cap-dependent translation을 유도하는 과정에서 인슐린이 어떠한 영향을 미치는지를 알기 위해, 앞서 기술한 bicistronic reporter gene의 활성화에 미치는 인슐린의 영향을 연구하였다.<sup>19</sup>

이 reporter는 2개의 독립적으로 번역된 해독틀 (translated reading frame)을 인코딩하는 단일 전사물 (transcript)의 합성을 지시하는 역할을 한다. 그 첫번째 해독틀은 cap-dependent translation의 개시 이전에 의해 translation되며, reporter mRNA의 5'cap 부분에 번역개시인자 (translation initiation factor)가 부착되는 것에 의한 조절 이전에 민감하게 반응한다. 두번째 해독틀은 첫번째 해독틀과는 독립적으로 translation되며, murine cardiovirus encephalomyocarditis virus에서 얻은 internal ribosomal entry site (IRES)를 경유하여 translation 된다. Cap-dependent translation의 활성도의 증가를 측정하기 위해 reporter gene의 발현 비율을 비교하였다.

Bicistronic reporter로 transfection 시킨 L $\beta$ T2 cell을 0.1, 1, 10 nM의 인슐린으로 30분간 전처리 한 후, 10 nM GnRH pulse로 4시간 동안 30분 간격으로 co-treatment 시켰더니, bicistronic reporter의 활성이 용량 의존적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었고, 이 최대 효과는 1 nM의 인슐린으로 처리한 경우에서 나타났다 (Figure 5). 즉 이 결과를 보면, 인슐린이 GnRH가 매개하는 cap-dependent translational activity를 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

#### 4. Insulin inhibits GnRH activation of ERK

이상의 결과는 GnRH가 매개하는 당단백 subunit의 전사 (transcription)와 번역 (translation) 과정이 인슐린에 의해 억제될 수 있다는 것을 시사한다. 당단백호르몬의 유전자의 전사를 조절하는 기전은

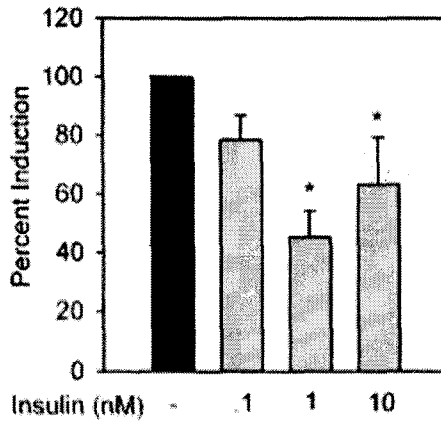


Figure 5. Insulin inhibits GnRH-induced activation of cap-dependent translation

상당히 판이해서  $\alpha$  subunit의 전사는 MAP kinase family 중의 하나인 ERK 1/2의 신호에 달려 있는가 하면, LH  $\beta$  subunit의 전사는 ERK 1/2과 calcium/calmodulin kinase II를 통한 칼슘신호전달체계 (calcium signaling cascades)의 조절을 동시에 받는다.<sup>20-23</sup> L $\beta$ T2 cell에서 GnRH에 의한 translation의 활성화는 ERK 1/2 signaling의 억제 작용에 민감한데, 그 이유는 cap-dependent translation의 개시가 MAP kinase interacting kinase 1에 의존적이기 때문이다.<sup>18</sup> 인슐린은 IRS 신호전달체계를 통해 ERK 1/2를 활성화시키고, GnRH는 protein kinase C 관련 경로로 ERK 1/2를 활성화 시킨다. 그래서 인슐린과 GnRH는 ERK 1/2를 활성화 시키는 이 단계에서 상호 작용하는 것일 수 있다. L $\beta$ T2 cell에서 인슐린이 ERK 1/2를 인산화 (phosphorylation)시키는 정도를 측정하여 인슐린이 활성화시키는 강도를 측정하였으나 강한 활성화를 야기하지는 않았고 (Figure 6A), 그 최대 반응은 10 nM 농도의 인슐린을 처리한 지 30분 후에 나타났다, 이는 대조군과 비교했을 때 3배 정도 강한 반응이었다. 이렇게 중등도로 활성화되었다는 것은 인슐린이 야기한 IR 또는 IRS의 활성화 증가가 ERK의 폭발적인 활성화를 일으키기에는 충분치 못했다는 것을 의미한다.

인슐린과 GnRH가 둘 다 ERK pathway를 경유하여 작용한다고 생각한다면, 인슐린이 ERK의 활성화를 조절함으로써 GnRH의 활성을 억제할 가능성이 있다고 추측할 수 있고, 이를 검증하기 위해, L $\beta$ T2 cell을 10 nM GnRH로 자극하기 전, 인슐린의 농도를 점차 증가시키면서 30분간 전처리 해보았다. 인슐린 전처치시 GnRH의 자극으로 ERK가 활성화되는 정도가 전처치한 인슐린의 농도에 비례하여 약화되는 것이 확인되었으며, 10 nM의 인슐린을 전처치하면 대조군에 비해 약 50% 정도만 ERK가 활성화되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 6B). 즉 인슐린을 전처치하게 되면, GnRH가 매개하는 ERK의 활성화에 상가 (additive) 작용이나 상승 (synergic) 작용을 하는 것이 아니라, 길항 (antagonistic) 작용을 하는 것이며, 이는 ERK-dependent translation과  $\alpha$  subunit의 전사과정에 억제효과를 나타낸다는 결과와도 일치하는 것이다.

### 5. Insulin alters the rate of ERK activation by GnRH

이상의 결과로 볼 때, 인슐린은 L $\beta$ T2 cell에서 ERK의 활성화 과정에서 GnRH의 탈감작화 (desen-

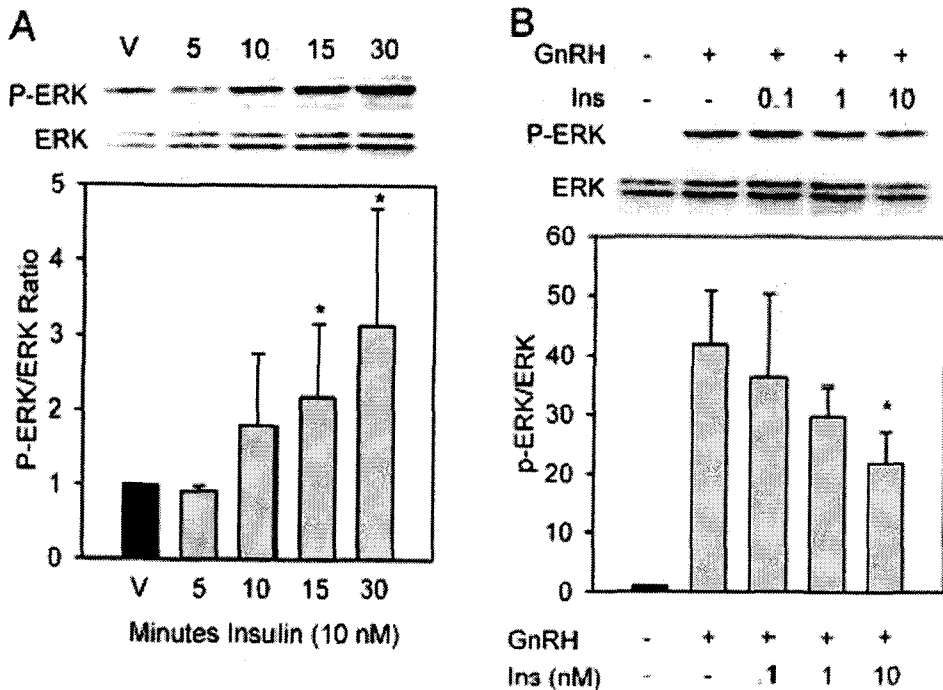


Figure 6. Insulin inhibits GnRH activation of ERK

sitization)를 유발한다고 할 수 있다. 물론 ERK의 활성화를 완전히 차단하는 것은 아니지만, 확실히 활성도의 의미 있는 감소를 보이며, 이는 transcription과 translation 과정의 활성도가 감소하는 것으로 알 수 있다. 호르몬의 자극에 대한 ERK 활성화의 반응에 대한 최근의 논문을 보면, 자극의 강도는 그 세포의 이후 호르몬 자극에 대한 감수성에도 영향을 끼치는 것으로 밝혀졌다. ERK의 조절에 관해 이렇게 설명하는 모델에서 가장 중요한 요소는, 처음 호르몬으로 자극받는 당시, 다양한 정도의 자극에 따라 ERK가 phosphorylation되고 dephosphorylation되는 그 속도에 있다.<sup>24</sup> 즉 이 사실을 인슐린이 GnRH에 의한 ERK의 활성도를 감소시키는 측면에 적용해 보면, 아마도 인슐린이 ERK가 phosphorylation되고 dephosphorylation되는 그 속도를 변화시켜 그 작용을 나타내는 것일 수 있다. 이를 위해 LβT2 cell에 인슐린, GnRH, 그리고 인슐린과 GnRH를 동시에 처리했을 때 각각 ERK가 활성화 되는 속도를 측정하였다. 그 결과, 10 nM 인슐린으로 처리했을 때는 ERK 1/2이 최대로 활성화되는 데 걸리는 시간이 약 30분이었던 반면, 동일한 조건에서 GnRH를 처리했을 때에는 ERK 1/2이 최대 10배 정도로 활성화되는 데 5분밖에 걸리지 않았다 (Figure 7). 반면에, LβT2 cell에 GnRH로 자극을 주기 30분 전에 인슐린으로 전처리 했더니 각 5분, 10분 후에 그 ERK가 활성도를 비교했을 때, GnRH를 단독 투여한 경우의 약 54%, 51% 정도로만 활성화 되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 30분 후에는 GnRH의 자극효과가 감소하여, GnRH를 단독으로 처리한 군과 GnRH와 인슐린을 함께 투여한 군에 있어서 ERK 활성도에 차이가 없었다. 인슐린으로 전처리 했을 때 최대로 활성화되는 시점이 30분으로, 즉 활성화 되는데 더 많은 시간이 필요했다는 사실은, GnRH가 단시간에 ERK를 phosphorylation시키는 작용을 인슐린이 변화시켰다는 것을 의미한다.



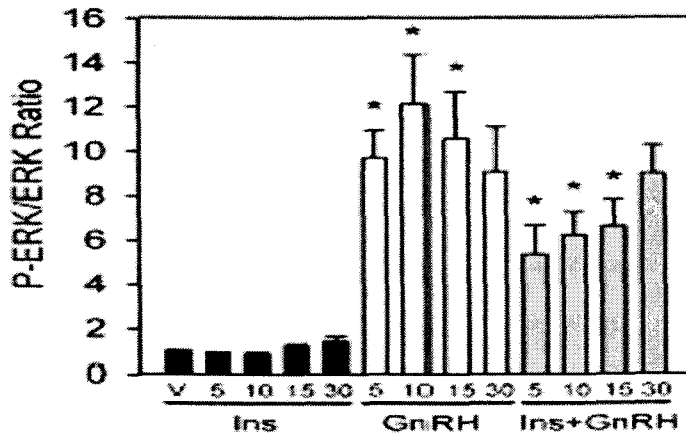


Figure 7. Insulin inhibits the time and level of maximal ERK activation by GnRH

적합한 생식기능 (reproductive fitness)과 에너지 항상성간의 조화는 gonadotrope에 대한 다양한 신호 체계의 동시 다발적인 조절기능에 달려 있으며, 인슐린은 LH 분비와 gonadotropin 유전자의 발현에 억제 작용이 있을 것으로 추측되고 있다. 즉 인슐린이 GnRH가 LH의 분비를 자극하는 과정, gonadotropin  $\alpha$  subunit 유전자의 전사 과정, 그리고 cap-dependent translation의 과정에 고유한 작용이 있을 것으로 생각되며, 또한 인슐린이 LH  $\beta$  subunit의 촉진부위 (promoter)의 기저 활성도도 감소시키며, 인슐린의 GnRH signaling에 대한 간섭효과는, MAP kinase family에 속하는 ERK 1/2을 표적으로 하며, GnRH가 ERK 1/2를 활성화 하는 정도와 최대로 활성화 되는 데 걸리는 시간 둘 다에 영향을 준다는 것을 확인하였다.  $\alpha$  subunit의 cap-dependent translation 및 transcription은 ERK pathway를 통한 GnRH의 조절을 받게 되며, 이 두 과정의 활성화는 모두 인슐린의 작용으로 약화된다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, GnRH가 ERK를 활성화시키는 과정은 인슐린의 영향을 받으리라고 가정해 볼 수 있다.

전형적으로, 인슐린 수용체는 Grb-Sos-Ras 신호복합체계를 통해 ERK를 활성화시키는데, 이 Grb-Sos-Ras 신호복합체계는 IRS family 중의 하나와 연관되어, 인슐린 수용체 tyrosine kinase의 활성도를 증가시키게 된다. GnRH 수용체는 G단백을 매개로 하는 phospholipase 활성을 유도하고, 뒤이어 protein kinase C, Ras, Raf를 활성화시켜서 ERK를 활성화시킨다.<sup>17,27,28</sup> 즉 ERK는 GnRH와 인슐린 사이의 공통 신호체계이며 이것이 상호조절의 포인트라고 할 수 있다. 그러나 인슐린 자체도 L $\beta$ T2 cell에서 ERK를 약하게 활성화시키는 작용을 하는데, 어떻게 GnRH가 ERK를 활성화 시키는 과정은 약화시키는지에 대한 의문은 아직 남아 있다.

이에 대한 하나의 가설로는, 인슐린이 그 cascade를 충분히 활성화시켜 Ras 같은 중간매개물들 (intermediates)이 IRS 신호복합체계에 공급되면, 이들 중간매개물이 protein kinase C 신호전달체계 쪽으로 접근하지 못하도록 한다는 설이 있고, 또 하나의 가설은, 인슐린 투여를 갑자기 하는 것이 GnRH가 LH 분비를 자극하는 과정을 억제하는 것일 수 있다는 것이다. 즉 인슐린은 단순히 ERK에만 작용하는 것이 아니라, 보다 다양한 신호체계에 영향을 끼쳐 작용을 나타내는 것일 수 있다. 인슐린은 IRS 중간매개물 뿐 아니라 G-단백을 통해서도 작용한다고 알려져 있으며, 3T3-L1 지방세포에서 G-단백이 결합된 수용체 signaling을 이종탈감작 (heterologous desensitization) 시킬 수도 있음이 보고된 바

있다.<sup>29,30</sup> 즉, 인슐린은 G-단백 중간매개물 차원에서 GnRH 수용체 signaling의 탈감작을 유발할 수 있고, 이것이 GnRH signaling의 전반적인 억제를 야기할 수 있다. 이러한 가능성 들을 완전히 정립하기 위해서는 신호체계에서의 중간매개물들이 특정 신호전달체계로 공급되는 과정과 인슐린과 GnRH의 G-단백 활성화에 일으키는 변화를 면밀히 연구하여야 하겠다.

인슐린의 말초조직에서의 작용에 관한 대부분의 연구에서는 근육조직과 지방조직, 즉 말초에서 당의 소비에 주로 관여하는 이들 조직에서의 인슐린 역할에 관해 다루고 있다. 그러나 인슐린은 당 소비에 관여하지 않는 조직에서도 지대한 영향을 끼치고 있어서 다양한 동물 모델에서 연구한 결과, LH 농도가 혈장 인슐린 농도와는 반비례 관계에 있음이 증명되었다. IRS-2에 대한 유전자 결손 마우스 (knockout mice)는 특정 gonadotrope의 결여와 gonadotrope 군집의 감소가 야기되는 것이 밝혀져 있다.<sup>31</sup> IRS-2의 암컷 knockout mice는 가임력 (fecundity)이 감소하고 음식 섭취가 증가하며 비만하다는 것이 밝혀졌으며, 이 knockout mice에 LH를 보충해 주면, 생식능력이 부분적으로나마 복원되는 것으로 보아 이 mice는 LH 생산에 문제가 발생했다는 것을 의미할 수 있다.<sup>31</sup> 물론 이러한 생식능에 있어서의 문제가 비정상적인 발달에 따른 문제라는 것을 배제하지는 못하며, 게다가 이 knockout mice에서 IRS-1과 IRS-3가 계속 존재하면 인슐린에 대한 gonadotrope의 반응을 변화시킬 수 있을 지도 불확실하다. 그럼에도 불구하고, 일단 IRS-2 knockout mice가 생식능력에 문제가 생긴다는 것은 에너지 항상성과 생식능력간의 상호작용이 뇌하수체 차원에서 이루어진다는 가설을 뒷받침해 주는 결과라 할 수 있다.

인간에서는 인슐린 저항성과 이에 대한 보상작용으로 유발되는 고인슐린 혈증이 생식기능의 변화를 포함한 수많은 병태생리의 기본이 되어,<sup>32-34</sup> 가령 인슐린 저항성은 다낭성난소증후군 (PCOS)의 병태생리의 한 부분으로, 즉 과도한 안드로겐 생산, 만성 무배란, 고인슐린혈증, 제 2형 당뇨병으로 이환이 잘 되는 것 등을 특징으로 하는, 난소기능의 문제로 야기되는 이 질환의 발생기전에 있어 중요한 부분을 차지한다. PCOS는 또한 thiazolidinedione insulin sensitizer의 주작용 표적인 PPAR $\gamma$  유전자의 다형성과도 관련이 있는데,<sup>37</sup> 즉 이러한 연관성은 이 질환에서 인슐린 감수성과 생식능력의 저하라는 두 문제가 병태생리기전 면에서 서로 연결되어 있다는 것을 시사하는 것이다. 또한 PCOS 여성에서 LH의 평균치 및 진폭변조 (pulse amplitude)는 체질량지수 (BMI) 및 고인슐린혈증의 정도와 강한 반비례관계에 있다는 것을 보고한 논문들이 있는데,<sup>38,39</sup> 이것은 인슐린의 증가와 인슐린 저항성이 gonadotropin의 합성, 분비를 변화시킨다는 것을 암시하고 있다.

또한 GnRH를 박동성으로 투여 하는 방법으로 배란유도치료를 받은 무배란 여성을 대상으로 한 연구 결과는, gonadotrope가 인슐린의 주 작용 표적이라는 것을 시사하였다.<sup>40</sup> 즉 배란유도가 성공적으로 이루어진 여성은 그렇지 않은 여성에 비해 공복 혈장 인슐린 수치가 낮았으며 인슐린 감수성도 보다 높았던 반면, 반응을 잘 하지 않는 여성에서는 처음 LH 분비 정도도 낮고 반복적인 GnRH의 투여에도 LH 분비가 잘 되지 않았다. 또한 높은 체질량지수, 상승된 공복 혈장 인슐린 수치, 인슐린 저항성의 존재 등도 반응이 좋지 않은 것과 관련이 있었다. 남성에서는 성선기능저하증 (hypogonadism)이 비만, 고인슐린혈증 및 제 2형 당뇨병과 관련있는 것이 밝혀져,<sup>41</sup> 정상체중의 남성과 비만인 남성 모두에서 diazoxide로 인슐린을 억제하게 되면 혈장 LH 수치가 상승하는 것이 관찰되었는데,<sup>42</sup> 이는 인슐린이 LH의 분비를 감소시키는 작용이 있음을 시사한다. 이 현상은 PCOS 여성에게 hyperinsulinemic-euglycemic clamp으로 인슐린을 투여하는 동안에는 순환 LH 수치가 감소함이 확인된 연구 결과와 일치하는 것이다.<sup>43</sup> 이상의 많은 연구 결과들은 고인슐린혈증이 gonadotropin의 분비를 억제한다는 가설

을 뒷받침한다고 할 수 있겠다.

### III. 결 론

포유동물의 생식기능은 시상하부의 GnRH의 박동성 분비의 자극을 받아 뇌하수체의 성선자극호르몬 분비세포 (gonadotrope)에서 분비되는 성선자극 당단백호르몬, 즉 LH와 FSH에 의해 조절된다. 인슐린은 여러 동물 모델에서 정상 생식기능을 위해 중요하다고 밝혀져 왔으며, 동물 모델 및 인간을 대상으로 한 수많은 연구에서 LH 농도와 혈액내 인슐린 농도는 역비례 관계에 있다는 것을 보고하였는데, 즉 이것은 인슐린이 뇌하수체의 LH 생산을 조절할 수 있다는 것을 시사한다. 아마도 이 작용은 gonadotrope에 대한 인슐린의 직접적인 작용에 의한 것으로 보이며, 이러한 결과로 LβT2 세포에 인슐린을 처리했을 때 GnRH가 LH 분비를 자극하는 과정이 억제되는 것이 확인되었다. 또한 인슐린은 GnRH가 매개하는 당단백 아형 유전자의 촉진부 (glycoprotein subunit gene promotor)의 활성화, LHβ 아형 유전자 촉진부 (LHβ subunit gene promotor)의 활성화, cap-dependent 전사과정의 활성을 촉진하는 작용을 약화시킨다. 마지막으로 인슐린은 GnRH가 MAP kinase family 중의 하나인 ERK 1/2를 활성화하는 과정을, 시간-용량 의존적 방식으로 약화시킬 수 있는 것으로 생각된다. 이상에서 인슐린은 GnRH의 작용에 대하여 직간접적인 억제효과를 미침으로써 생식 생리에 연관되어 있을 것으로 추측되고 있다. 물론 실제 체내에서는 GnRH의 분비가 실험 조건과 동일하지 않고, 또한 생식 생리에 미치는 여러 요인들은 서로 복잡하게 얽혀있어 어느 한 두가지의 기전이나 물질들의 작용만으로 모두를 설명할 수는 없다. 향후 이러한 인슐린과 GnRH의 상호 작용에 대하여 분자생물학적인 더욱 진일보한 연구를 통하여 생식기능 조절에 대한 이해와 함께 불임증의 치료에도 많은 발전이 있으리라고 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Hashizume T, Kumahara A, Fujino M, Okada K. Insulin-like growth factor I enhances gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from bovine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 2002; 70: 13-21.
2. Daftary SS, Gore AC. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med* 2005; 230(5): 292-306.
3. Kanematsu T, Irahara M, Miyake T, Shitsukawa K, Aono T. Effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-pituitary axis in vitro. *Acta Endocrinol* 1991; 125: 227-33.
4. Childs GV, Unabia G. Epidermal growth factor and gonadotropin-releasing hormone stimulate proliferation of enriched population of gonadotropes. *Endocrinology* 2001; 142: 847-53.
5. Beauvillain JC, Prevot V. Hypothalamic glial cells and endothelial cells as key regulators of GnRH secretion. *J Soc Biol* 2004; 198: 68-72.
6. Todd BJ, Ladyman SR, Grattan DR. Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion but not luteinizing hormone surge in leptin resistant obese Zucker rats. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 61-8.
7. Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 2004; 81: 289-317.

8. Tissenbaum HA, Ruvkun G. An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1998; 148(2): 703-17.
9. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 1997; 389: 994-9.
10. Hsin H, Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* 1999; 399: 362-6.
11. Bohni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, et al. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 1999; 97: 865-5.
12. Adashi EY, Hsueh AJ, Yen SS. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology* 1981; 108: 1441-9.
13. Soldani R, Cagnacci A, Yen SS. Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II enhance basal and gonadotrophin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from rat anterior pituitary cells in vitro. *Eur J Endocrinol* 1994; 131: 641-5.
14. Xia YX, Weiss JM, Polack S, Diedrich K, Ortmann O. Interactions of insulin-like growth factor-I, insulin and estradiol with GnRH-stimulated luteinizing hormone release from female rat gonadotrophs. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 73-9.
15. Cakir Y, Ballinger SW. Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: the role of MAPK. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7: 726-40.
16. Jorgensen JS, Quirk CC, Nilson JH. Multiple and overlapping combinatorial codes orchestrate hormonal responsiveness and dictate cell-specific expression of the genes encoding luteinizing hormone. *Endocr Rev* 2004; 25: 521-42.
17. Liu F, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, Webster NJ. GnRH activates ERK1/2 leading to the induction of c-fos and LHbeta protein expression in LbetaT2 cells. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 419-34.
18. Nguyen KA, Santos SJ, Kreidel MK, Diaz AL, Rey R, Lawson MA. Acute regulation of translation initiation by gonadotropin-releasing hormone in the gonadotrope cell line LbetaT2. *Mol Endocrinol*. 2004; 18: 1301-12.
19. Sosnowski R, Lawson MA, Mellon PL. Activation of translation in pituitary gonadotrope cells by gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Endocrinol* 2000; 14: 1811-9.
20. Haisenleder DJ, Burger LL, Aylor KW, Dalkin AC, Marshall JC. Gonadotropin-releasing hormone stimulation of gonadotropin subunit transcription: evidence for the involvement of calcium/calmodulin-dependent kinase II (Ca/CAMK II) activation in rat pituitaries. *Endocrinology* 2003; 144: 2768-74.
21. Haisenleder DJ, Ferris HA, Shupnik MA. The calcium component of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone subunit 26 gene transcription is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II. *Endocrinology* 2003; 144: 2409-16.
22. Weck J, Fallest PC, Pitt LK, Shupnik MA. Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 451-7.
23. Weck J, Anderson AC, Jenkins S, Fallest PC, Shupnik MA. Divergent and composite gonadotropin-releasing

- hormone-responsive elements in the rat luteinizing hormone subunit genes. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 472-5.
24. Bhalla US, Ram PT, Iyengar R. MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science* 2002; 297: 1018-23.
  25. Childs GV, Unabia G. Epidermal growth factor and gonadotropin-releasing hormone stimulate proliferation of enriched population of gonadotropes. *Endocrinology* 2001; 142: 847-53.
  26. Leblanc P, L'Heritier A, Kordon C. Cryptic gonadotropin-releasing hormone receptors of rat pituitary cells in culture are unmasked by epidermal growth factor. *Endocrinology* 1997; 138: 574-9.
  27. Liu F, Austin DA, Webster NJ. Gonadotropin-releasing hormone desensitized LbetaT2 gonadotrope cells are refractory to acute protein kinase C, cyclic AMP, and calcium-dependent signaling. *Endocrinology* 2003; 144: 4354-65.
  28. Liu F, Usui I, Evans LG, et al. Involvement of both Gq/11 and Gs proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in Lbeta T2 cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 32099-108.
  29. Dalle S, Imamura T, Rose DW, et al. Insulin induces heterologous desensitization of G-protein-coupled receptor and insulin-like growth factor I signaling by downregulating beta-arrestin-1. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6272-85.
  30. Imamura T, Vollenweider P, Egawa K, et al. G alpha-q/11 protein plays a key role in insulin-induced glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6765-74.
  31. Burks DJ, de Mora JF, Schubert M, et al. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 2000; 407: 377-82.
  32. Gabbitas B, Canalis E. Bone morphogenetic protein-2 inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-5 in bone cell cultures. *Endocrinology* 1995; 136: 2397-403.
  33. Groop LC, Tuomi T. Non-insulin-dependent diabetes mellitus: a collision between thrifty genes and an affluent society. *Ann Med* 1997; 29: 37-53.
  34. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 2003; 52: 1210-4.
  35. Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril* 2002; 77: 1095-10527.
  36. Livingstone C, Collison M. Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102: 151-66.
  37. Hara M, Alcoser SY, Qadir A, Beiswenger KK, Cox NJ, Ehrmann DA. Insulin resistance is attenuated in women with polycystic ovary syndrome with the Pro(12)Ala polymorphism in the PPAR gamma gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 772-5.
  38. Arroyo A, Laughlin GA, Morales AJ, Yen SS. Inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome: influence of adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3728-33.
  39. Taylor AE, McCourt B, Martin KA, et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2248-56.
  40. Gill S, Taylor AE, Martin KA, Welt CK, Adams JM, Hall JE. Specific factors predict the response to pulsatile gonadotropin-releasing hormone therapy in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:

2428-36.

41. Betancourt-Albrecht M, Cunningham GR. Hypogonadism and diabetes. *Int J Impot Res* 2003; 15 Suppl 4: S14-20.
42. Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 359-72.
43. Patel K, Coffler MS, Dahan MH, et al. Increased luteinizing hormone secretion in women with polycystic ovary syndrome is unaltered by prolonged insulin infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5456-61.
44. Delegeane AM, Ferland LH, Mellon PL. Tissue-specific enhancer of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene: Dependence on cyclic AMP-inducible elements. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 3994-4002.
45. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988; 334: 320-5.
46. Wang X, Campbell LE, Miller CM, Proud CG. Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *Biochem J* 1998; 334(Pt 1): 261-7.
47. Box GEP, Cox DR. An analysis of transformations. *J Royal Statistical Soc Ser* 1964; 26: 211-52.