

무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 난소여포의 협막층 (Theca layers)을 통한 스테로이드 대사 분석

백해자 · 이택열

부산수산대학교 해양생물학과

난모세포성숙기(peripheral germinal vesicle stage)의 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)를 대상으로 방사성 표지 전구체(^3H -pregnenolone, ^3H - 17α -hydroxyprogesterone 그리고 ^3H -androstenedione)를 이용하여 *in vitro*에서 관찰한 협막세포층의 스테로이드 주 대사 경로는 다음과 같으며, pregnenolone \rightarrow 17α -hydroxypregnenolone \rightarrow 17α -hydroxyprogesterone \rightarrow androstenedione \rightarrow testosterone 이는 Δ^5 -스테로이드 경로의 존재가능성을 지적하고 있다.

KEY WORDS: Rainbow trout, steroid, theca, peripheral germinal vesicle stage, Δ^4/Δ^5 -pathway

경골어류의 난모세포 성숙은 여포층에서 생성 분비되는 스테로이드 호르몬에 의해 조절되고 있음이 잘 알려져 있다(Jalabert *et al.*, 1990). 이들 스테로이드 호르몬은 뇌하수체의 생식선자극호르몬에 의해 여포층에서 생성되는데, 최근 어류에 있어서 이들 생성과정을 밝히기 위한 *in vivo* 또는 *in vitro* 실험들이 많이 이루어지고 있다.

어류 난소에 있어서 주요 스테로이드 생성 세포에 관한 초미세 구조적 연구(Nicholls and Maple, 1972; Iwamatsu and Ohta, 1981)와 조직효소화학적 연구(reviewed by Fostier *et al.*, 1983)에 의해 간질세포(interstitial cell), 협막세포(theca cell) 그리고 과립세포(granulosa cell)들이 스테로이드 생성세포들로 보고되고 있다.

최근에는 난모세포를 둘러싸고 있는 협막층과 과립층을 분리하는 방법이 발달되어 *in vitro*에서 이들 각 조직층을 통한 스테로이드 생성부위를 더욱 상세히 보고하고 있다(Young *et al.*, 1986; Petrino *et al.*, 1989).

언어과 어류를 대상으로 각 세포층을 분리 배양하여 방사면역측정법(radioimmunoassay,

RIA)으로 난소의 주요 스테로이드 생성과정을 분석한 보고들(Nagahama, 1988; Nagahama and Yamashita, 1989)에 의하면 난황형성기(vitellogenesis)의 협막층은 estradiol- 17β 의 전구체인 androgens (androstenedione과 testosterone)을 생성하고(pregnenolone \rightarrow progesterone \rightarrow 17α -hydroxyprogesterone \rightarrow androgens), 이것이 과립층에서 estradiol- 17β 로 전환되며, 난모세포성숙기(oocyte maturation)의 협막층은 17α -hydroxy, 20β -dihydroprogesterone(17α , 20β OHP)의 전구체인 17α -hydroxyprogesterone(17α OHP)을 생성하여(pregnenolone \rightarrow progesterone \rightarrow 17α OHP) 과립층에서 17α , 20β OHP로 전환되는 것으로 보고되고 있다. 이 보고들은 협막층과 과립층 사이의 스테로이드 합성이 Δ^4 -스테로이드 경로를 통하여 이루어짐을 설명하고 있다. 따라서 지금까지 어류의 스테로이드 대사 분석에 Δ^4 -스테로이드를 전구체로 많이 사용해 왔다(Fostier *et al.*, 1983).

한편, 난황형성말기의 무지개송어를 대상으로 연구한 Van Bohemen과 Lambert(1978) 그리고 Lambert와 Van Bohemen(1979)는 Δ^5 -

스테로이드 경로의 중요성을 지적하였으며, Sangalang과 Freeman(1988) 역시 대서양산 연어(Atlantic salmon)에서 Δ^5 -경로의 존재가 능성을 보고하였다.

본 연구는 기 보고된 스테로이드 호르몬 생성 과정을 방사성 동위원소로 표지된 (^3H) 전구체를 사용하여 난모세포성숙기의 무지개 송어 협막층을 대상으로 재검토한 바, 일부 상이한 중간 대사과정이 밝혀졌기에 보고한다.

재료 및 방법

프랑스 서북부지방 양어장에서 구입한 춘계 산란형(2월-4월) 무지개송어를 실험실내 사육수조로 옮겨 난모세포성숙기(peripheral germinal vesicle stage; Jalabert and Fostier, 1984a)의 암컷을 선별한 후 무균상태의 배양실로 옮겨 난소를 채취하였다.

협막층(Theca layers)의 분리 및 배양

세척액(TBSS; Trout balanced salt solution, Jalabert and Fostier, 1984b)이 담긴 petri dish에서 해부용 가위로 난소를 잘게 자른 후 가는 핀셋으로 결합조직과 혈관등을 제거시키면서 개개의 여포로 분리시킨 뒤, SWIM'S S-77(Gibco or Sigma) 용액으로 옮겨 유리봉으로 여포표면을 적당히 누름으로써 협막층이 분리되었다. 협막층에 남아있는 여분의 과립세포는 12°C 에서 4시간 동안 collagenase 효소처리(2mg/ml , 0.262 U/mg)를 함으로써 제거되었다. 무지개송어의 정소세포 배양(Loir, 1989)에 이미 사용된 바 있는 Leibovitz L15(Gibco) 배양액으로 분리된 협막층을 방사성 표지 전구체와 함께 12°C 에서 일정 시간(10분, 1시간 또는 24시간) 유지시킨 후, 1ml 에탄올로 배양을 정지시켰다.

실험과정 동안 필요한 모든 기구는 고압증기로 멸균시켰으며, 용액은 pH 7.7, 삼투압 300 milliosmol 로 조절한 후 Millipore($0.22\mu\text{m}$)로 여과시켰다.

스테로이드 추출

시료를 우선 80% 에탄올로 파쇄, 원심분리하여 에탄올 상등액을 따른 후 증발, 건조시켜 $500\mu\text{l}$ 증류수에 용해시킨 뒤 다시 5ml dichloromethane으로 2번 추출, 건조시켜 에탄올 $200\mu\text{l}$ 를 첨가하여 사용할 때 까지 -30°C 에서 보관하였다.

얇은막 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC)

실리카겔을 입힌 얇은막 지지체(60F²⁵⁴, Merck)을 사용하여, 추출한 스테로이드와 표준 스테로이드를 동시에 점적한 후 극성이 서로 다른 혼합전개용매(Table 1)속에 담긴 뒤 용매가 증발되지 않도록 밀폐시켰다. 일정 시간이 지난 후 전개용매가 표시선까지 이르렀을 때 얇은막을 끄집어내어 건조시킨 후 (2-3번 반복 전개), 자외선(254nm)을 쬐이거나 발색시약(phosphomolybdic acid)을 뿌려 대사물질의 반점을 확인하였다. 3cm 간격으로 각 반점을 잘라 스캐닝(radiochromatogram scanner, Packard 7222)함으로써 방사성 대사물질의 peak를 비교, 확인하였다. 필요할 경우, peak에 해당하는 실리카겔 밴드를 5ml 의 혼합용매(dichloromethane:methanol = 9:1)로 용리한 후 같은 방법으로 2차 크로마토그래피를 실시하였다.

방사성 표지 스테로이드

In vitro 배양시 전구체로 사용한 방사성 표지 스테로이드는 NEN 또는 Amersham에서 구입 후 TLC로 재정제하여 사용하였으며, 이들의 특징은 다음과 같다: $7\text{-}(n)\text{-}^3\text{H}\text{-pregnenolone}$ (0.48 TBq/mM), $4,7\text{-}^3\text{H}\text{-pregnenolone}$ ($0.47\text{-}0.407\text{ TBq/mM}$); $17\alpha\text{-hydroxy-1,2,6,7-}^3\text{H}\text{-progesterone}$ ($2.07\text{-}2.33\text{ TBq/mM}$); $1,2,6,7\text{-}^3\text{H}\text{-androstenedione}$ (3.07 TBq/mM).

비표지 스테로이드는 대사물 확인을 위한 표준시약(Sigma 또는 Steraloids)으로 사용되었다.

Table 1. Thin layer chromatographic solvent systems used in TLC.

Solvent systems	Ratio	Systems Number	Separated steroid
Benzene : Acetone	80:20	I	17 α 20 β OHP/ T+17 α OHP5/ 17 β OHP+P5/ A4
Chloroform : Ethanol	95:5	II	T/17 α OHP5/ 17 α OHP
Benzene : Ethanol	90:10	III	T/17 α OHP/A4

*Steroid abbreviations: pregnenolone (P5); 17 α -hydroxypregnenolone (17 α OHP5); progesterone (P4); 17 α -hydroxyprogesterone (17 α OHP); 17 α -hydroxy, 20 β -dihydro-progesterone (17 α , 20 β OHP); androstenedione (A4); testosterone (T).

결과 및 고찰

*In vitro*내 물질대사 연구에 있어서 배양시간의 선택은 중요대사물 파악에 결정인자로 작용할 수 있다(Weusten *et al.*, 1987). 따라서 예비 실험으로 전구체를 첨가한 후 대사물 출현 가능한 배양시간을 알아보기 위하여 ml당 5개의 협막조직을 방사성표지 전구체와 함께 일정한 시간(10분, 60분) 동안 배양시킴과 동시에 첨가한 스테로이드의 분포를 알아보기 위해 배양액과 조직을 따로 분리시켜 분석한 결과(System I, 3x), 첨가한 대부분의 스테로이드가 배양액에서 발견되었다(Table 2). 10분 동안의 배양은 ³H-P5 또는 ³H-17 α OHP로 부터 대사물을 형성하는데 충분한 시간이 아닌 것 같았다(Fig. 1, 2). 그러나 60분 후에는 ³H-pregnenolone (³H-P5)으로 부터 17 α OHP5, 17 α OHP와 미확인대사물(?), androstenedione으로 추측) (Fig. 3)이, 그리고 ³H-17 α OHP에서 testosterone(T)과 androstenedione(A4)이 생성되었다(Fig. 4). 이들 androgens은 2차 TLC (System III)를 거쳐 재확인되었다(Fig. 5). 그림 1과 3에 표시된 peak 2, 3 그리고 4에 해당하는 스테로이드의 R_f값은 각각 0.49, 0.59 그리고 0.64로 동시에 전개시킨 표준 스테로이

드의 R_f값 (각각 0.49, 0.59, 0.65)과 거의 일치하였다.

Fig. 1 4에서처럼 협막조직과 배양액을 분리시켜 정성분석한 결과, 대사물 형성에 대한 차이점이 발견되지 않았으므로, 이후의 분석은 분리시키지 않고 함께 실시하였다.

다른 대사물 생성 가능성을 확인하기 위해 전 실험과 같은 방법으로 비교적 오랜 시간 즉, 24 시간 배양 결과 ³H-P5의 대사물로서 testosterone 과 androstenedione이 추가 생성되었

Table 2. Distribution of extractable radioactivity (free steroids) between the theca and the medium.

100%=Radioactivity added

Tritiated precursor	Incubation time (min.)	Medium (%)	Theca (%)
Pregnenolone	10	82	18
	60	85	15
17 α -hydroxyprogesterone	10	92	8
	60	85	15

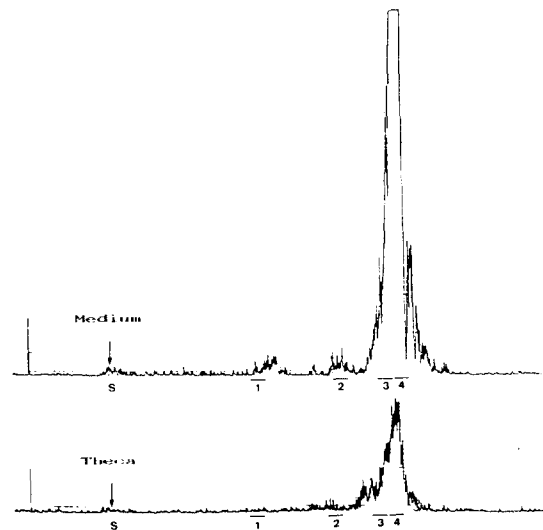


Fig 1. TLC radiochromatogram of pregnenolone metabolites produced by isolated theca layers (5 theca/ml) after exposure to ³H-pregnenolone (380 pmoles/ml) for 10min. S-starting line; 1, 17 α -hydroxy, 20 β dihydroprogesterone (17 α , 20 β OHP); 2, 17 α -hydroxypregnenolone (17 α OHP5); 3, 17 α -hydroxyprogesterone (17 α OHP); 4, pregnenolone (P5).

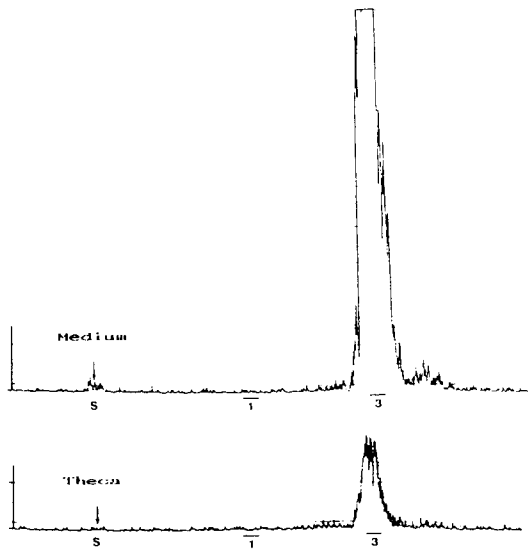


Fig. 2. TLC radiochromatogram of 17α OHP metabolites produced by isolated theca layers (5 theca/ml) after exposure to ^3H - 17α OHP (88.7 pmoles/ml) for 10min. S-starting line; 1, 17α , 20β OHP; 3, 17α OHP.

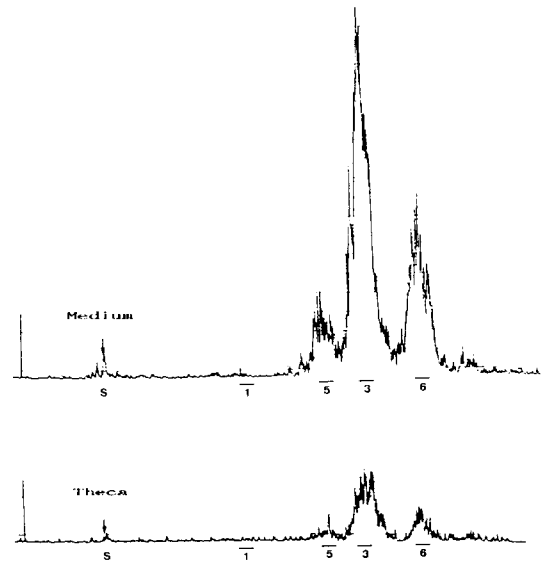


Fig. 4. TLC radiochromatogram of 17α OHP metabolites produced by isolated theca layers (5 theca/ml) after exposure to ^3H - 17α OHP (88.7 pmoles/ml) for 60min. 1, 17α , 20β OHP; 3, 17α OHP; 5, testosterone (T); 6, androstenedione (A4).

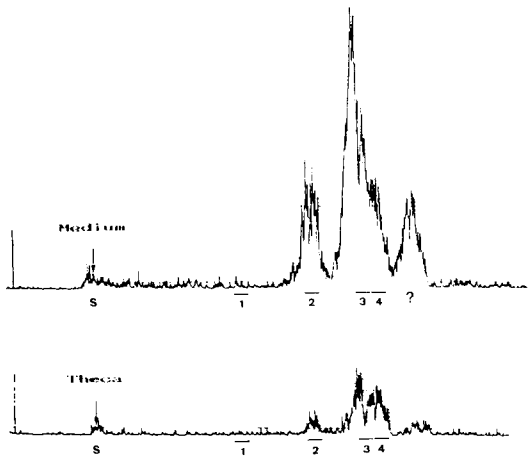


Fig. 3. TLC radiochromatogram of pregnenolone metabolites produced by isolated theca layers (5 theca/ml) after exposure to ^3H -pregnenolone (380 pmoles/ml) for 60min. 1, 17α , 20β OHP; 2, 17α OHP; 3, 17α OHP; 4, P5.

으며 (Fig. 6), androstenedione에 해당하는 peak가 상대적으로 낮게 나타났다 (Fig. 6, 7). 이는 androstenedione이 testosterone으로 전환되는 것으로 사료된다. 그림 6에 표시된 peak

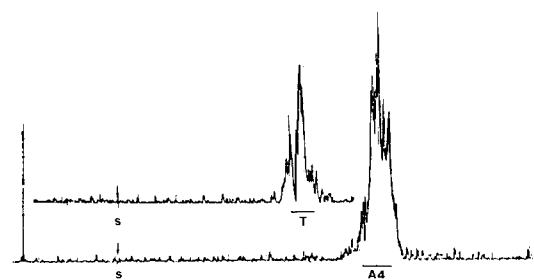


Fig. 5. Rechromatography of testosterone (T) and androstenedione (A4) from peaks 5 and 6 as shown in fig. 4-medium.

2와 peak 3 + 4의 대사물 동정은 2차 TLC (System II, 2x)를 거쳐 이루어졌다 (Fig. 8).

Androstenedione으로 부터 다른 대사물 생성여부를 알아보기 위해 ml당 10개의 협막조직에 ^3H -androstenedione을 첨가하여 1시간 배양 후 관찰한 바 testosterone만이 형성됨을 알 수 있었다 (Fig. 9).

Fig. 10은 본 실험결과를 바탕으로 협막조직층의 스테로이드 대사경로를 나타낸 것이다. Pregnenolone 또는 17α OHP 전구체로 부터

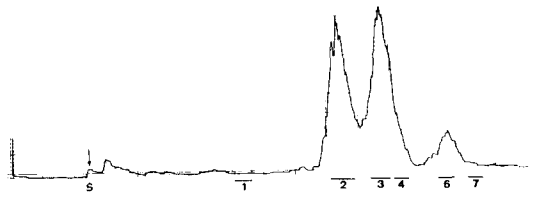


Fig. 6. TLC radiochromatogram of pregnenolone metabolites produced by isolated theca layers (5 theca/ml) after exposure to ³H-pregnenolone (150 pmoles/ml) for 24 hours. Extraction was performed in theca with medium. 1, 17 α , 20 β OHP; 2, 17 α OHP+testosterone; 3, 17 α OHP; 4, P5; 6, androstenedione; 7, progesterone

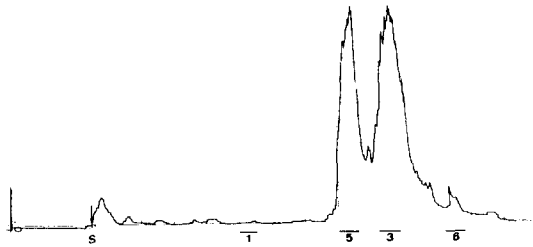


Fig. 7. TLC radiochromatogram of 17 α OHP metabolites produced by isolated theca layers (5 theca/ml) after exposure to ³H-17 α OHP (31 pmoles/ml) for 24 hours. Extraction was performed in theca with medium. 1, 17 α , 20 β OHP; 3, 17 α OHP; 5, testosterone; 6,

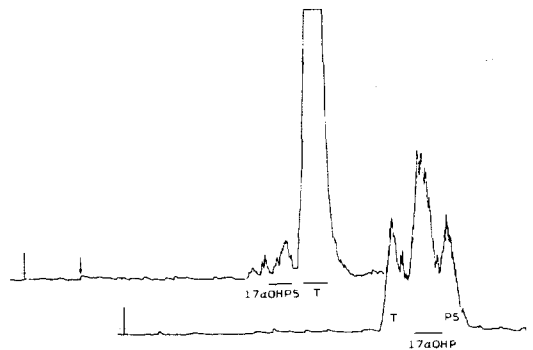


Fig. 8. Rechromatography of peaks 2 and 3 + 4 as shown in fig. 6.

17 α OHP와 androgens의 합성은 방사면역측정으로 관찰한 Young등(1986)과 Wright와 Zhao (1988), 그리고 Nagahama(1988)등의 보고와 일치하였으나, 대사과정중 이들이 밝힌 progesterone의 형성은 관찰되지 않았다.

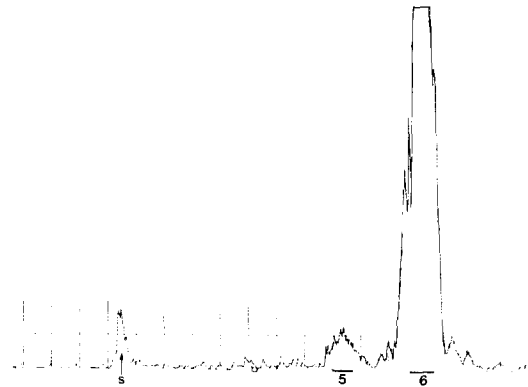


Fig. 9. TLC radiochromatogram of androstenedione metabolites produced by isolated theca layers (10 theca/ml) after exposure to ³H-androstenedione (60 pmoles/ml) for 1hr. 5, testosterone; 6, androstenedione.

이것은 서론에서 이미 언급한 바와 같이 Δ^4 -스테로이드 경로 (pregnenolone \rightarrow progesterone)보다는 Δ^5 -스테로이드 경로 (pregnenolone \rightarrow 17 α OHP5)의 중요성을 지적해 주는 것 같다. 난모세포성숙기 (peripheral germinal vesicle stage)의 협막층에는 역시 estrogens이 관찰되지 않았으며, 난황형성기 (vitellogenesis)에서도 마찬가지로였다 (미발표 자료). 따라서, 협막층에는 aromatase가 존재하지 않음을 알 수 있었으며 (Kagawa *et al.*, 1982), Fig. 10의 대사경로로 보아 17 α -hydroxylase, 3 β hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD), C_{17,20} lyase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β HSD) 등의 효소 활성의 존재를 알 수 있었다.

어떤 조직의 스테로이드 형성 포텐셜을 분석하는데 있어서 방사성 원소표지 전구체의 사용은 여러 종류의 대사물을 연속적으로 나타낼 수 있으므로 대사물 추적과 동정 (identification)에 방사면역측정법보다 특징적인 것 같으며, 사용한 전구체의 효력은 조직속에 존재하고 있는 효소의 활성도에 따라 다르게 나타나는 것 같다.

어류의 난모세포 성숙조절에 대한 스테로이드 작용 메카니즘 규명을 위해서는 여포 발달 상태에 따른 각 세포수준 (theca, granulosa, oocyte)에서 다양한 전구체를 선택 (특히 Δ^5 -스

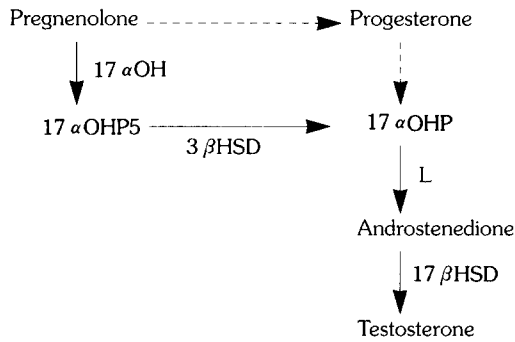


Fig. 10. Principal metabolic pathway detected in theca layers (peripheral germinal vesicle stage) after metabolic studies with radiolabelled precursors.

17 α OH; 17 α -hydroxylase

3 β HSD; 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase

L; C_{17,20}-lyase

17 β HSD; 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase

테로이드) 하여 세포사이의 성 스테로이드 합성 경로를 파악함과 동시에 Δ^5 와 Δ^4 -대사경로의 생리적인 중요성을 비교 관찰해야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Fostier, A., B. Jalabert, R. Billard, B. Breton, and Y. Zohar, 1983. The gonadal steroids. In "Fish Physiology", Vol IX/A: Reproduction (W.S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson, eds.), Academic Press, New York. pp. 277-372.
- Iwamatsu, T. and T. Ohta, 1981. On a relationship between oocyte and follicle cells around the time of ovulation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Jpn.* **54**: 17-29.
- Jalabert, B. and A. Fostier, 1984a. The follicular sensitivity *in vitro* to maturation-inducing hormones in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Role of oestradiol-17 β . *Aquaculture*, **43**: 1-11.
- Jalabert, B. and A. Fostier, 1984b. The modulatory effect *in vitro* of oestradiol-17 β , testosterone or cortisol on the output of 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ovarian follicles stimulated by the maturational gonadotropin s-GtH. *Reprod. Nutr. Develop.* **24**: 127-136.
- Jalabert, B., A. Fostier, B. Breton, and C. Weil, 1990. Oocyte maturation in vertebrates. In: "Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications", Vol. 3 (Pang, PKT and Schreiman eds), Academic Press. New York.
- Kagawa, H., G. Young, S. Adachi, and Y. Nagahama, 1982. Estradiol-17 β production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of the thecal and granulosa cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **47**: 440-448.
- Lambert, J. G. D. and Ch. G. Van Bohemen, 1979. Steroidogenesis in the ovary of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during the reproductive cycle. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.* **45**: 414-420.
- Loir, M., 1989. Trout sertoli cells and germ cells in primary culture: I. Morphological and ultrastructural study. *Gamete Res.* **24**: 151-169.
- Nagahama, Y., 1988. Cyto differentiation of ovarian follicle cells during oocyte growth and maturation. In "Regulatory Mechanisms in Developmental Processes" (G. Eguchi, T. S. Okada and L. Saxen, eds.), pp. 9-14. Elsevier Sci. Pub. Ireland, Ltd.
- Nagahama, Y. and M. Yamashita, 1989. Mechanisms of synthesis and action of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost maturation-inducing substance. *Fish. Physiol. Biochem.* **7**: 193-200.
- Nicholls, T. J. and G. Maple, 1972. Ultrastructural observations on possible sites of steroid biosynthesis in the ovarian follicular epithelium of two species of cichlid fish, *Cichlasoma nigrofasciatum* and *Haplochromis multicolor*. *Z. Zellforsch.* **128**: 317-335.
- Petrino, T. R., M. S. Greeley, K. Selman, Y.-W.P. Lin, and R.A. Wallace, 1989. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. II. Production of 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone, testosterone, and 17 β -estradiol by various components of the ovarian follicle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**: 230-240.
- Sangalang, G. and H. C. Freeman, 1988. *In vitro* biosynthesis of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one by the ovaries, testes and head kidneys of the atlantic salmon *Salmo salar*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**: 406-415.
- Van Bohemen, Ch. G. and J. G. D. Lambert, 1978. Steroidogenesis in the ovary of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Endocrinol.* **80**: 37-38.
- Weusten, J. J. A. M., A. G. H. Smals, J. A. Hofman, P. W. C. Kloppenborg, and T. J. Benraad, 1987. Early time sequence in pregnenolone metabolism to testosterone in homogenates of human and rat testis. *Endocrinology* **120**: 1909-1913.
- Wright, R. S. and W.-X. Zhao, 1988. Steroid release from separated theca and granulosa layers of atlantic salmon (*Salmo salar*) ovarian follicles: The effects of a purified salmon gonadotropin preparation. *Fish.*

Physiol. Biochem. **5**: 131-139.
Young, G., S. Adachi, and Y. Nagahama, 1986. Role of ovarian thecal and granulosa layers in gonadotropin-induced synthesis of a salmonid maturation-inducing

substance(17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one). *Dev. Biol.* **118**: 1-8.

Analysis of steroid metabolism in the ovarian theca layers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

Hea-Ja Baek and Taek-Yuil Lee (Department of Marine Biology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea)

Ovarian theca layers of *Oncorhynchus mykiss*, at the peripheral germinal vesicle stage, were incubated *in vitro* with radioactive pregnenolone (P5), 17 α -hydroxyprogesterone (17 α OHP) or androstenedione (A4). Pregnenolone was metabolized to 17 α -hydroxy pregnenolone (17 α OHP5), 17 α OHP, A4 and testosterone (T).

On the other hand, 17 α OHP into androstenedione and testosterone, and androstenedione into testosterone only.

This result suggests the following pathway leading from pregnenolone to testosterone without progesterone being an intermediate : P5 \rightarrow 17 α OHP5 \rightarrow 17 α OHP \rightarrow androstenedione \rightarrow testosterone.