

## 간세포 배양을 이용한 뱀장어 Vitellogenin 합성에 대한 웅성호르몬의 영향

권혁추·박홍양\*

선문대학교 자연과학대학 식량자원학과

### Induction of Vitellogenin Synthesis by Androgens in Cultured Hepatocytes of the Eel, *Anguilla japonica*

Kwon, Hyuk-Chu and Hong-Yang Park\*

Department of Food Resources, Sun Moon University, Chungnam, 336-840

#### SUMMARY

To establish whether or not androgens is responsible for the induction of vitellogenin(Vg) synthesis and secretion, primary hepatocytes prepared from immature eels were used. The results are follows:

1. Eel hepatocytes were prepared using a collagenase perfusion technique. The isolated cells attached efficiently to fibronectin-coated dishes and subsequently formed monolayers in serum-free medium. These cultures maintained in medium for 10 days with minimal cell loss.
2. Estradiol-17 $\beta$ (E<sub>2</sub>) alone was insufficient to induce Vg synthesis. The combination of E<sub>2</sub> with methyltestosterone(MT) markedly stimulated Vg synthesis. High Vg production occurred in MT concentration from 10<sup>-6</sup>~10<sup>-5</sup>M in the presence of E<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup>M). Testosterone and androsterone were also effective, but progesterone was not effective in inducing Vg synthesis. Neither MT alone nor testosterone and androsterone alone had any effect on Vg synthesis.
3. E<sub>2</sub>-primed hepatocytes showed Vg synthesis in both media with and without hormones 1 day after culture. In the cultures with the vehicle, MT, or progesterone, the rate of synthesis seemed to decrease with time. But the combination of E<sub>2</sub> and MT showed an intense increase in Vg synthesis. Hepatocytes isolated from E<sub>2</sub>-primed eels also required androgens for continuing of Vg synthesis.
4. These results demonstrate that androgens act together with E<sub>2</sub> in synthesis and secretion of eel Vg.

Key words : eel, hepatocyte culture, vitellogenin, androgens.

#### I. 서 론

난생동물에 있어서 Vitellogenin(Vg)은 卵黃形成  
期에 estrogen(E<sub>2</sub>)의 자극에 의해 肝臟에서 合成되어

\* 건국대학교 동물자원연구센터(Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University)

본 연구는 건국대학교 교내 연구비의 지원에 의하여 수행되었음.

지는 난황단백질의 前驅物質로서 난에 흡수되어 胚發達의 營養物質로서 중요한 役割을 한다. 조류, 파충류, 양서류 및 어류 등에서 Vg은 分離, 精製되어 그 生化학적 特性들이 밝혀져 왔으며, Vg합성에 관련하는 내분비 조절 및 혈중에 분비된 Vg이 난모세포로 흡입되어지는 과정에 대한 조직학적, 생화학적 및 분자생물학적 연구가 많이 행해져 왔다 (Ng와 Idler, 1983; Wallace, 1985; Gavaud, 1986; Mommsen과 Walsh, 1988; Vaillant 등, 1988).

Vg의 합성유도에 관한 *in vivo* 및 *in vitro* 실험이 많이 시도되어 왔는데, 난생동물의 암컷은 물론 수컷 및 미성숙개체에 외부로부터 E<sub>2</sub>를 투여하면 Vg은 합성되어지는 것으로 보고되었다 (Emmersen과 Petersen, 1976; Hara와 Hirai, 1978; Sundararaj 등, 1982). 또한 E<sub>2</sub> 이외의 다른 호르몬들의 Vg합성에의 관여가 보고되었는데, 개구리의 肝組織片을 이용한 실험에서 부신피질호르몬 및 갑상선 호르몬이 E<sub>2</sub>와의 공동작용에 의해 Vg을 합성한다고 했다 (Wangh, 1982; Wangh와 Schneider, 1982). 또한 뇌하수체 호르몬들, 특히 성장호르몬(GH)과 프로락틴(PRL) 등이 Vg합성에 직간접적으로 작용한다고 여러 동물에서 보고되어 왔으며 (Ho 등, 1985; Boehm 등, 1988; Paolucci, 1989; Burzawa-Gerard와 Dumas-Vidal, 1991; Carnevali 등, 1992; Kwon과 Mugiya, 1994), 음성호르몬의 과다투여에 의해서도 Vg합성이 유도되어진다고 보고했다 (Hori 등, 1979; Le Menn 등, 1980).

최근 Kwon 등(1993)은 무지개송어의 肝細胞 培養系를 확립하여 E<sub>2</sub>에 의한 Vg합성을 유도하였는데, 무지개 송어에서는 E<sub>2</sub> 이외의 갑상선호르몬 등은 Vg합성에 관여하지 않는 것으로 보고했다. 그러나 뱀장어 간세포배양 실험에 있어서 E<sub>2</sub>만으로는 Vg이 합성되지 않고, E<sub>2</sub>와 성장호르몬 및 프로락틴을 함께 첨가하여 배양하여야만 Vg합성이 유도되어진다고 보고했다 (Kwon과 Mugiya, 1994). 이와 같이 난생동물에서의 Vg합성은 다양한 내분비의 조절을 받고 있는 것으로 알려지고 있으나, 아직 밝혀지지 않은 많은 부분이 존재한다.

따라서 본 연구는 Vg합성 메커니즘을 밝히기 위한 기초적 연구로서 초대배양 간세포를 이용하여 음성호르몬들이 뱀장어의 Vg합성에 미치는 영향에 대해 검

토했다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 간세포 분리

체중 200~250 g의 미성숙 뱀장어를 양만장에서 구입하여 사용하기 까지 수온 20℃의 담수에 수송하였다. 뱀장어 간세포의 調製는 Kwon과 Mugiya(1994)의 방법에 따랐다. 즉, 0.01%의 NaHCO<sub>3</sub>를 포함하는 0.1%의 MS 222로 마취한 후 복부를 절개하여 간을 적출하여 Ca<sup>2+</sup>-Ringer액 (120mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 23mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM HEPES, pH 7.4)을 간문맥을 통하여 5분간 관류하여 혈액 등의 불순물을 제거하였다. 다음에 collagenase (0.5mg/ml; Wako Pure Chemical Ind., Japan; Type IV)를 포함하는 Ca<sup>2+</sup>-free Ringer액으로 약 20분간 관류하여 간을 소화시켰으며, Ca<sup>2+</sup>과 Mg<sup>2+</sup>-free의 Ringer액 30ml을 주입하여 효소의 활성을 억제하였다. 소화된 간은 쓸개를 제거한 후 50ml의 Ca<sup>2+</sup>-free Ringer액에 넣어 수술용 가위로 가볍게 썰은 후 피펫팅에 의해 세포현탁액으로 만들었다. 나일론 거즈 또는 플랑크톤 네트를 이용해서 세포 현탁액을 50ml용 원심관내로 여과시켰다. 여과된 세포 현탁액을 600rpm을 90초간 원심분리에 의해 침전시켜 肝實質細胞 이외의 물질들을 제거하였다. 이러한 절차를 3번 반복하여 얻어진 펠렛화된 세포에 Ringer액을 첨가하여 10ml의 현탁액으로 하였다. 세포의 생존율은 Trypan Blue를 이용하여 판별하였으며, 세포수는 혈구 계산판을 이용하여 계산하였다.

### 2. 세포 배양

Dish당 3 × 10<sup>5</sup>개의 간세포를 3ml의 배양액과 함께 60mm의 플라스틱 petri dish (Falcon)에서 배양하였다. 배양액은 0.2μM bovine insulin (Sigma), streptomycin(100μg/ml)과 penicillin(70μg/ml)을 포함하는 William's E medium(Sigma)을 이용하였으며, 25℃에서 fibronectin이 coating된 dish를 사용하여 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>)에서 세포를 배양하였다. 각각의 호르몬을 포함하는 배양액은 24시간마다 교환하였다. 배양액 교환시 dish 및 세포들에 묻어 있는 호르몬들을 제거하기 위해 호르몬 침

가되지 않은 배양액으로 3번 씻어낸 후 교환하였다.

### 3. 호르몬 처리

Estradiol-17 $\beta$ , 17 $\alpha$ -methyltestosterone, testosterone, progesterone, androsterone 및 hydrocortisone acetate(Sigma) 등의 스테로이드 호르몬들은 모두 95% 알코올에, 소 성장호르몬(Sigma) 및 돼지 프로락틴(Chemicon Int., Inc.)은 0.7% NaCl에 용해하여 배양액에 첨가하였다. 스테로이드 호르몬을 용해하기 위해 사용된 알코올 농도는 배양액중 0.1%를 넘지 않도록 했다.

### 4. Vitellogenin의 精製 및 항혈청 준비

뱀장어 Vg은 Wiley 등(1979)의 방법에 따라 MgCl<sub>2</sub>-EDTA 침전법에 의해 분리했다. 먼저 Vg이 포함된 혈청을 얻기 위해 魚體重 kg당 5mg의 E<sub>2</sub>를 propyleneglycol에 용해하여 뱀장어의 복강에 주사하여 10일후에 尾部를 절단하여 혈액을 채취하였다. 원심분리에 의해 얻어진 5ml의 혈청에 20mM EDTA를 더한 후 NaOH로 pH를 7.7이 되게 조정한 후 0.5M MgCl<sub>2</sub> 1.6ml를 더해 2,500×g로 15분간 원심분리하였다. 얻어진 침전물에 1M NaCl를 포함하는 50mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액 3ml를 넣어 용해, 2,500×g로 30분간 원심분리한 후 상청에 25ml의 빙냉시킨 증류수를 더하여 다시 2,500×g 15분간 원심분리하였다. 침전물에 上記의 Tris-HCl 완충액 3ml로 용해하여 17시간 동안 같은 완충액을 이용하여 투석하였다. 보다 순수한 Vg을 정제하기 위해 Sepharose 6B column(0.02M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 2% NaCl and 0.1% NaN<sub>3</sub>)을 이용하였다.

정제된 Vg에 같은 양의 Freund's complete adjuvant를 혼합하여 油化(emulsion)시킨 후 토끼에 주사하였다. 항원은 1주일 간격으로 4회 주사하였으며, 최종주사 1주일 후에 토끼 귀의 정맥을 통하여 항혈청을 채취한 후, 같은 양의 미성숙 뱀장어 혈청을 넣어 4℃에서 20시간 반응시킨 흡수 항혈청을 만들어 사용시 까지 -20℃에 보관하였다.

### 5. Sample처리, 전기영동 및 immunoblotting

간세포 배양에 의해 합성 분리된 단백질은 trichloroacetic acid(TCA)로 농축시켜 전기영동에 이용하

였다. 그 절차를 간단히 설명하면, 배양 종료후 배양액을 수거하여 원심분리에 의해 세포 잔해물을 제거한 뒤 氷冷의 5% TCA를 5ml 넣어 3,000rpm 20분간 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 이 절차를 3회 반복하여 얻어진 침전물은 소량의 NaHCO<sub>3</sub>로 중화시킨 후 같은 양의 sample buffer(0.175M Tris-HCl, 8M urea, 1% SDS, and 0.5% 2-mercaptoethanol, pH 7.4)를 넣어 7.5%의 SDS-PAGE 전기영동(Laemmli, 1970)을 실시해 분석하였다.

Vg의 확인을 위하여 Garbar and Williams(1953)의 방법에 따라 0.05M barbital 완충액(pH 8.6)을 이용, 1%의 agarose 면역전기영동을 실시했다.

Immunoblot법은 앞서 발표된 Kwon 등(1993)의 서술에 따라 행하였다. 먼저 SDS-PAGE후, cellulose막에 옮겨진 단백질을 4,000배로 희석된 뱀장어 Vg 항체로 4℃ 16시간 반응시킨 후, 제2항체(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate, Bio-Rad)로 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 항원, 항체 복합체는 기질(HRP color development reagent, Bio-Rad)에 의해 가시화되어졌다.

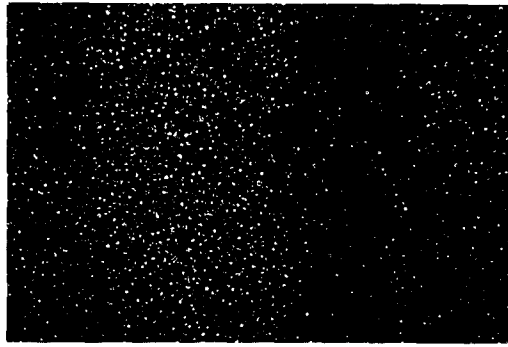
## III. 결 과

### 1. 간세포배양

Fig. 1에 collagenase에 의해 분리된 간세포의 위상차 현미경상을 나타냈다. 분리된 직후의 간세포는 球狀의 형태를 나타내는데 배양 1일째까지 이러한 모습을 보였으며 배양후 3일 정도가 되면 伸展하여 세포 내의 핵도 확실히 확인할 수 있고, 세포간의 경계도 명료하게 관찰할 수 있었다. 세포의 伸展은 배양액의 교환에 의해 촉진되어 Fig. 1과 같이 단층(monolayer)을 형성하였다. 이때 세포간의 경계는 불분명하게 되는데 세포들은 이러한 상태로 적어도 10일간은 양호한 상태를 유지했다. 그 후 세포는 서서히 dish면으로 부터 벗겨져 사멸되어 갔다.

분리된 간세포의 생존률은 trypan blue 염색법에 의해 90%이상인 것으로 나타났으며, 마리당 3 × 10<sup>8</sup> 개의 세포가 얻어졌다.

### 2. In vitro Vg합성에 대한 E<sub>2</sub>, GH 및 PRL의 영향

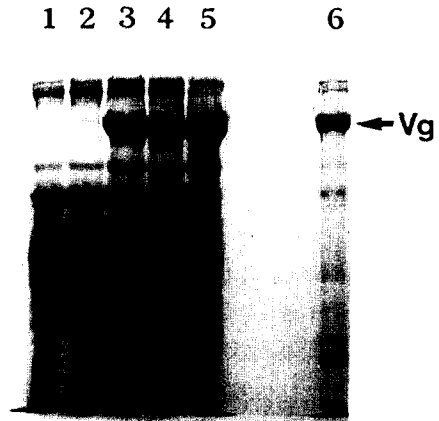


**Fig. 1.** Phase-contrast micrograph of primary culture of eel hepatocytes 4 days after culturing on fibronectin-coated dishes. Hepatocytes were cultured in Williams' medium E containing 5% FBS and  $0.2\mu\text{M}$  insulin for 2 days and then they were cultured in serum-free medium.  $\times 202$ .

간세포에  $\text{E}_2$ , GH 및 PRL을 각각 또는 함께 첨가하여 배양을 실시하여 Vg합성에 대한 영향을 조사하였다. 호르몬 첨가 5일째에 배양액을 수거하여 SDS-전기영동에 의해 분석한 결과를 Fig. 2에 나타냈다.  $\text{E}_2$ , GH 및 PRL을 각각 단독으로 첨가한 배양에서는 Vg은 합성되어지지 않았다. 그러나  $\text{E}_2$ 에 GH 및 PRL을 함께 첨가하여 배양한 dish들에서는 Vg이 다량으로 합성 분비되었다. 간세포 배양에 의해 합성 분비된 Vg은 *in vivo*에서  $\text{E}_2$ 주사한 뱀장어의 혈청중의 Vg polypeptide와 전기영동상에서 같은 이동도를 나타냈다.

### 3. *In vitro* Vg합성에 대한 methyltestosterone의 영향

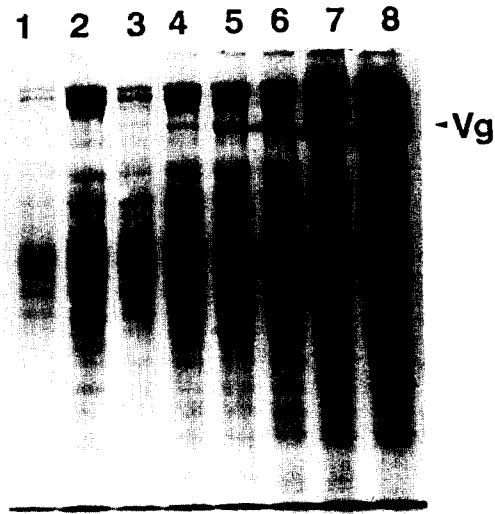
Vg합성에 대한 합성스테로이드인  $17\alpha$ -methyltestosterone(MT)의 영향을 Fig. 3에 나타냈다.  $\text{E}_2$  ( $10^{-6}\text{M}$ )에  $10^{-9}\sim 10^{-5}\text{M}$ 의 MT를 함께 첨가하여 5일간 배양한 결과, Vg의 합성능은 첨가한 MT의 농도에 비례하여 증가하였는데  $10^{-6}\sim 10^{-5}\text{M}$ 의 MT의 첨가에서는 보다 많은 Vg의 합성이 유도되었다. 이때  $\text{E}_2$  또는 MT 단독 첨가한 배양에서는 Vg은 합성되어지지 않았다.



**Fig. 2.** Induction of Vg synthesis by  $\text{E}_2$ , GH and PRL in eel hepatocyte cultures. Hepatocytes were cultured for 5 days with  $\text{E}_2$ , either alone or in combination with GH and/or PRL. The media were changed every 24h. Spent media were analyzed by 7.5% SDS-PAGE. Lanes 1, vehicle; 2,  $\text{E}_2(10^{-6}\text{M})$ ; 3,  $\text{E}_2(10^{-6}\text{M})+\text{GH}(50\text{ng/ml})$ ; 4,  $\text{E}_2(10^{-6}\text{M})+\text{PRL}(100\text{ng/ml})$ ; 5,  $\text{E}_2(10^{-6}\text{M})+\text{GH}(50\text{ng/ml})+\text{PRL}(100\text{ng/ml})$ ; 6,  $\text{E}_2$ -treated eel serum; Vg, vitellogenin.

### 4. *In vitro* Vg합성에 대한 기타 스테로이드들의 영향

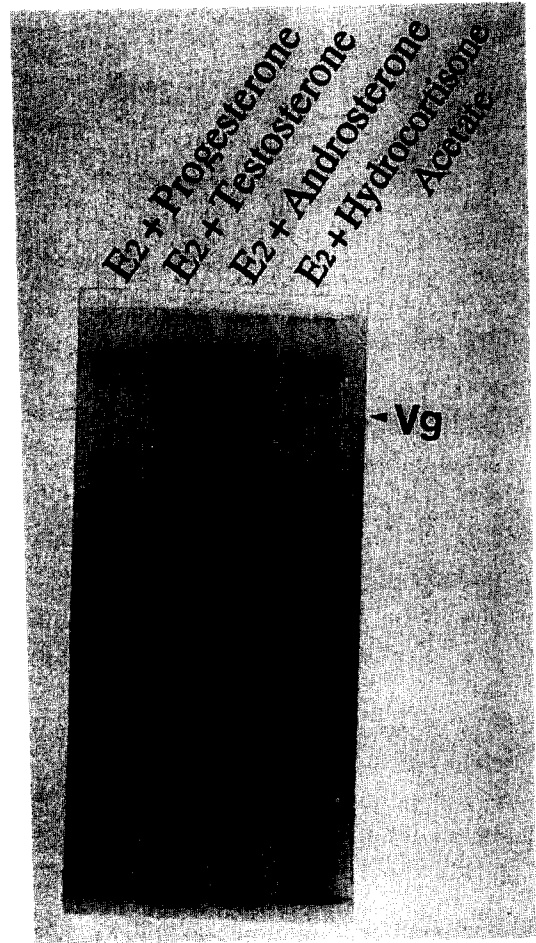
Fig. 4에 progesterone( $10^{-6}\text{M}$ ), androsterone ( $10^{-6}\text{M}$ ), testosterone( $10^{-6}\text{M}$ ) 및 hydrocortisone( $10^{-6}\text{M}$ ) 등을  $\text{E}_2(10^{-6}\text{M})$ 와 각각 또는 함께 첨가하여 Vg합성에 대한 영향을 나타냈다. 호르몬 첨가 5일째의 SDS-전기영동 결과,  $\text{E}_2$ 와 androsterone 및 testosterone을 함께 첨가한 배양에서 Vg이 합성되어지는 것이 관찰되었다. 그러나 androsterone은 testosterone에 비해 약한 Vg합성능을 나타냈으며, progesterone은 Vg합성에 영향을 미치지 않았다. 한편 어류에 있어서 중요한 부신피질(어류의 間腎腺에 해당) 스테로이드인 hydrocortisone은 미약하지만 Vg의 합성을 유도했다. 배양액에  $\text{E}_2$ 를 포함하지 않고 androsterone, testosterone 및 hydrocortisone을 단독으로 첨가한 배양에서는 Vg의 합성은 일어나지 않았다.



**Fig. 3. Induction of Vg synthesis by MT in eel hepatocyte cultures.** Hepatocytes were cultured for 5 days with  $E_2$  and MT (from  $10^{-9}$  to  $10^{-6}M$ ). Lanes 1, vehicle; 2, MT ( $10^{-6}M$ ); 3,  $E_2(10^{-6}M)$ ; 4,  $E_2(10^{-6}M)$  + MT ( $10^{-9}M$ ); 5,  $E_2$  + MT ( $10^{-9}M$ ); 6,  $E_2$ +MT ( $10^{-7}M$ ); 7,  $E_2$ +MT ( $10^{-6}M$ ); 8,  $E_2$ +MT ( $10^{-5}M$ ). The media were changed every 24h. Spent media analyzed by 7.5% SDS-PAGE. Vg, vitellogenin.

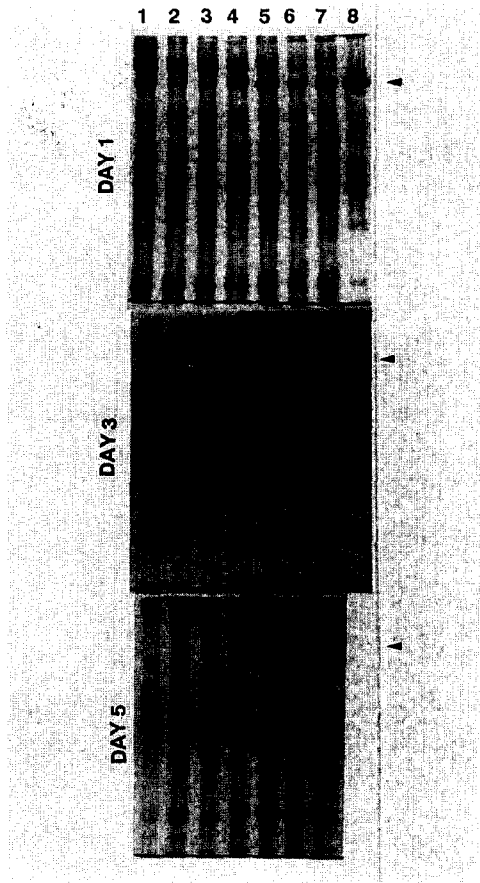
### 5. *In vivo*에서 $E_2$ 처리된 간세포 배양에서의 MT, GH 및 PRL의 영향

Fig. 5에는 뱀장어 魚體內에  $E_2$  (1mg/kg · body wt.)를 주사하여 일주일 후에 간을 채취, 세포를 분리하여 배양한 실험으로서, Vg합성에 대한  $E_2$ , MT, GH 및 PRL과의 단독 또는 co-culture의 영향을 나타냈다. 배양 1일째의 간세포로부터 Vg 합성은 호르몬 첨가 유무에 관계없이 모든 배양에서 관찰되었는데, ethanol만이 첨가된 control과 progesterone 및 MT의 단독 첨가구에서는 새로운 Vg의 합성은 관찰되지 않고, 오히려 배양시간과 더불어 Vg의 합성은 점차 감소되어 갔으며 배양 3일후 부터는 전혀 검출되



**Fig. 4. Induction of Vg synthesis by various steroids in eel hepatocyte culture.** Hepatocytes were cultured for 5 days with  $E_2$  ( $10^{-6}M$ ), either alone or in combination with progesterone ( $10^{-6}M$ ), testosterone ( $10^{-6}M$ ), androsterone ( $10^{-6}M$ ) and hydrocortisone ( $10^{-6}M$ ), respectively. The media were changed every 24h. Spent media were analyzed by 7.5% SDS-PAGE. Vg, vitellogenin.

지 않았다.  $E_2$  단독 첨가구에서의 Vg합성은 배양시간과 함께 점차 감소되어 갔으나 배양 5일째까지도 배지에서 Vg의 합성이 관찰되었다(Fig. 5, lane 4). 그러나  $E_2$ +MT 및  $E_2$ +GH+PRL들을 함께 첨가한 배양에서는 Vg의 합성은 점차 증가하였으며, 배양 5일



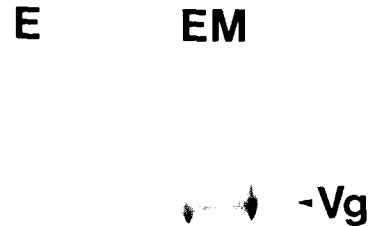
**Fig. 5.** SDS-PAGE of Vg synthesized by cultured hepatocytes prepared from  $E_2$ -primed eels. The media were changed every 24h. Spent media were analyzed by 7.5% SDS-PAGE on Days 1, 3 and 5 in culture, respectively. Lanes 1, vehicle; 2, progesterone( $10^{-6}M$ ); 3, MT( $10^{-6}M$ ); 4,  $E_2(10^{-6}M)$ ; 5,  $E_2(10^{-6}M)$  + MT( $10^{-6}M$ ); 6,  $E_2(10^{-6}M)$  + GH(50ng/ml) + PRL (100 ng/ml); 7,  $E_2(10^{-6}M)$  + GH(50ng/ml) + PRL (100ng/ml) + MT( $10^{-6}M$ ); 8,  $E_2$ -treated eel serum. arrows indicate the position of vitellogenin.

째까지 많은 양의 Vg합성이 관찰되었다. 또한  $E_2$  +GH+PRL을 함께 첨가한 배양보다  $E_2$ +GH+PRL+MT의 배양에서 더 많은 양의 Vg이 합성되었

다.

### 6. *In vitro*에서 합성 분비된 Vg의 확인

세포배양에서 MT에 의해 합성 분비된 Vg은 immunoblot법에 의하여 확인하였는데, Fig. 6과 같이 정제한 뱀장어 Vg 항혈청에 대해 면역화학적으로 염색되었으며, 또한 면역전기영동의 분석에서도 Fig. 7과 같이 Vg 항혈청에 반응하였는데, 이는 뱀장어 혈청 Vg과 같이 단일 침강선을 나타내어, MT에 의하여 Vg이 합성 분비되었음이 확인되었다.



**Fig. 6.** Immunoblot of proteins secreted in eel hepatocyte cultures. After SDS-PAGE, proteins were blotted on a nitrocellulose membrane and immunostained with antiserum against eel Vg. E, proteins secreted in hepatocyte culture with  $E_2(10^{-6}M)$ ; EM,  $E_2(10^{-6}M)$  + MT( $10^{-7}M$ ).



**Fig. 7. Immunoelectrophoresis of Vg secreted by androgens in cultured hepatocytes in eel. a-Vg; antiserum to purified eel Vg, S, E<sub>2</sub>-treated eel serum; M, Vg secreted by androgens in culture of hepatocytes.**

#### IV. 고찰

난생척추동물에 있어서 Vg합성이 E<sub>2</sub>의 직접적인 영향 아래 있음이 많은 생체내 실험을 통하여 밝혀져 왔다(Emmersen과 Petersen, 1976; Elliott 등, 1979; Sundararaj 등, 1982; van Bohemen 등, 1982; Kwon 등, 1990). 그러나 E<sub>2</sub> 이외에 Vg합성에 관여하는 내분비들의 명확한 연구를 위해 생체외 실험 즉, 肝組織片 또는 肝細胞 배양 실험들이 많이 행하여져, Vg의 합성은 E<sub>2</sub>, 갑상선 및 뇌하수체 호르몬들 등 여러 호르몬들의 작용에 의해 유도되어 진다는 것이 조류(Boehm 등, 1988), 파충류(Ho 등, 1985), 양서류(Wangh과 Knowland, 1975; Carnevali 등, 1992) 및 어류(Maitre 등, 1986; Burzawa-Gerard와 Dumas-Vidal, 1991; Kwon과 Mugiya, 1994) 등에서 보고되었다. 이처럼 Vg합성을 조절하는 내분비에 대한 연구에 있어서 특히 초대 배양 간세포의 이용은 매우 적절하게 이용되어지고 있다.

간세포 배양은 Vg의 합성에 대한 연구뿐 아니라 독성, 당대사 및 지질대사 등을 밝히는데 매우 유용하게 사용되고 있으나, 어류 간세포 배양은 뱀장어, 송어, 잉어 등 몇 종에서만 배양법이 확립되어 있다. 그것은 간세포가 부착해서 살아가는데 필요한 기질이 어류마다 다르기 때문에 각 어종에 적합한 기질에 대한 개발이 되어 있지 않은 것에 원인이 있다. 이 같이 세포배

양의 어려움 때문에 *in vitro*에서의 어류 Vg합성의 내분비 조절에 관한 연구가 진전되지 못하고 있었으나, 최근 Kwon 등(1993)이 송어의 간세포 배양을 이용하여 E<sub>2</sub>에 의해 Vg를 합성하는데 성공하였다. 이 연구에서 개구리의 Vg합성에 있어서는 갑상선 호르몬이 E<sub>2</sub>의 합성을 향상시킨다고 하였으나 송어에서는 이 호르몬은 Vg합성에 영향을 미치지 않는다는 것이 밝혀졌다. 또한 이러한 배양계를 이용하여 Kwon과 Mugiya(1994)는 뱀장어 Vg합성기구의 연구에서 GH 또는 PRL 등의 뇌하수체 호르몬들이 뱀장어의 Vg합성을 유도하는데 E<sub>2</sub>와 함께 작용하는 것을 알아냈다. 이처럼 어류의 Vg합성에는 종 특이성을 갖고 있으며, 특히 뱀장어의 경우는 다양한 내분비 조절을 받고 있는 것으로 보여, 보다 다각적인 내분비 연구가 요구된다.

어류의 암컷 血中에 E<sub>2</sub>는 성숙이 진행됨에 따라 양적으로 증가하는 것이 여러 어종에서 보고되어 왔다(Sundararaj 등, 1982; Scott와 Sumpter, 1983; Ueda, 등, 1984). 이때 progesterone 및 testosterone 등의 여성호르몬도 E<sub>2</sub>와 더불어 혈중에 다량으로 분비되어진다. 이들 여성호르몬들의 생리적 역할에 대해서는 불분명하다. 더욱이 이들 호르몬들의 Vg의 합성 및 난황형성과의 관계에 대해서는 거의 연구되어 있지 않지만, Hori 등(1979)이 금붕어에 다량의 여성호르몬인 합성 methyltestosterone (MT)을 魚體 丙에 투여하여 Vg를 합성 유도하였는데, 유도된 Vg 단백질은 E<sub>2</sub>를 투여하여 합성한 그것과 전기영동적 pattern 및 면역학적 반응에 있어서 동일하다고 보고했다. 또한 ethynyltestosterone와 methylandrostenediol 역시 MT와 같은 Vg합성능력을 가지나 testosterone, dihydrotestosterone 및 methyl-dihydrotestosterone 등은 이들 호르몬보다 덜 효과적인 것으로 나타났다. Le Menn 등(1980)도 방향화 되어 있지 않는 여성호르몬인 17β-hydroxy-5α-androstan-3-one(DHT)을 goby에 다량 투여하여 Vg합성을 유도했다. 그들은 비방향화 여성호르몬인 DHT를 사용하여 Vg를 합성하므로써, 여성호르몬이 간에서 여성호르몬인 E<sub>2</sub>로 전환되어 Vg의 합성에 관계한다는 사실을 부인했다. 이 실험에서 E<sub>2</sub>와 DHT 모두 E<sub>2</sub> 수용체를 포화량까지 유도할 수 있었으나, Vg 합성량에 있어서 DHT는 E<sub>2</sub>에 비해 훨씬 적었다. Hori 등

(1979)과 Le Menn(1980) 등의 연구에서 공통적인 것은 실험에 사용된 음성호르몬들은 모두 소량의 생리적 농도에서는 Vg을 유도해 내지 못하고, 많은 양(1mg/g·BW 주사)을 사용하여 약리적인 효과에 의하여 Vg이 합성되었다는 점이다. 그러나 본 연구에서와 같이 간세포 배양계를 이용한 *in vitro* 실험에서 Vg합성량은 첨가한 MT의 농도에 의존하였으나,  $10^{-9}$ M의 저농도의 MT에서도 Vg이 유도되어 다량의 MT를 필요로 하는 *in vivo* 실험(Hori 등, 1979; Le Menn 등, 1980)과는 차이를 나타냈다. 또한 뱀장어의 경우, MT 단독 또는 그 이외의 음성스테로이드들 단독으로는 Vg의 합성은 유도되어지지 않고, E<sub>2</sub>의 첨가가 반드시 필요한 것으로 나타났다. 따라서 E<sub>2</sub>는 Vg을 합성을 유도하지는 못하지만 E<sub>2</sub>수용체 및 Vg합성 유전자를 활성화하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다. 또한 testosterone과 androsterone 모두 Vg합성능을 나타냈는데 E<sub>2</sub>의 전구체인 testosterone이 androsterone보다 강한 활성을 보여 이는 E<sub>2</sub>로 전환되어지는 음성 스테로이드의 대사 순서(생합성 과정)와 Vg합성능과 관계가 있음을 시사해 주는 것이다. 또한 MT (Fig. 3)는 testosterone (Fig. 4)보다 더 많은 Vg을 합성하여 합성스테로이드가 천연의 스테로이드 보다 훨씬 강한 Vg합성능을 나타냈다. 한편 progesterone의 경우는 Vg합성능을 나타내지 않았는데 이는 Hori 등(1979)과 Le Menn 등(1980)의 연구에서도 같은 결과를 보였다. 부신피질 스테로이드인 hydrocortisone도 testosterone과 androsterone에 비해 미약하지만 Vg을 합성하는 것으로 나타나 이에 대한 구체적인 연구가 뒤따라야 할 것이다.

생체내에 미리 E<sub>2</sub>를 주사하여 Vg이 활발하게 합성되고 있는 배양간세포를 이용하였을 경우에도 MT 및 progesterone의 단독 첨가는 더 이상의 새로운 Vg합성을 유도하지 못하고 배양시간과 더불어 감소하여 갔으나, E<sub>2</sub>와 MT를 함께 첨가 배양한 경우는 E<sub>2</sub>를 투여하지 않은 간을 사용했을 때와 같이 다량의 Vg을 합성하였으며 그 양은 배양시간에 따라 증가되었다. 이처럼 *in vivo*에서 E<sub>2</sub>에 의해 Vg이 합성되어지고 있는 도중의 간세포를 사용하여도, 뱀장어의 지속적인 Vg합성을 위해서는 E<sub>2</sub>와 MT 등의 음성스테로이드가 반드시 동시에 필요한 것으로 나타났다. 또한 GH와 PRL

이 뱀장어의 Vg합성을 위해 E<sub>2</sub>와 공동작용을 하는 것은 이미 발표되었으나(Kwon과 Mugiya, 1994), MT의 첨가가 E<sub>2</sub>+GH+PRL에 영향을 미치는가를 조사한 실험에서 E<sub>2</sub>+GH+PRL보다 E<sub>2</sub>+GH+PRL+MT의 배양에서 더 많은 Vg을 합성분비하는 것으로 보아 음성호르몬이 GH 및 PRL의 작용과는 별도의 합성능을 갖고 있는 것으로 생각된다.

음성호르몬들이 Vg을 합성하는 것에 대해 Hori 등(1979)은 다음과 같이 고찰했다. 첫째로 음성호르몬들이 과도하게 존재할 때 이들 호르몬들은 E<sub>2</sub> 수용체에 쉽게 결합하게 된다. 다시 말해, E<sub>2</sub> 수용체는 스테로이드 호르몬들에 대해 덜 특이적이다(less specific). 둘째로 음성호르몬들은 먼저 스테로이드 대사효소들의 활성화를 유도한다. 즉, NADPH-cytochrome c reductase 등과 같은 효소가 음성호르몬 투여에 의해 활성화되어지고, 다시 이들 효소에 의해 음성호르몬들이 E<sub>2</sub>로의 전환을 유도한다고 가정했다. 그러나 앞에서 이미 언급한 바와 같이 Le Menn 등(1980)은 이 문제에 대해 비방향화 음성호르몬을 사용하여도 Vg이 합성되어지는 것을 보고하여 음성스테로이드가 E<sub>2</sub>로 전환되어 Vg합성을 유도한다는 가능성을 부정하였다. 또한 본 연구에서와 같이 MT의 단독 첨가에서는 Vg이 합성되어지지 않는 등 간장에서 음성스테로이드의 E<sub>2</sub>로의 전환에는 다소 부정적인 면이 있다. 따라서 규명 Vg 합성의 내분비적 조절을 밝히기 위해 스테로이드호르몬 수용체 및 Vg합성 조절 유전자에 대한 보다 구체적인 연구가 뒤따라야 할 것이다.

## V. 적 요

본 실험은 난황단백의 전구물질인 Vg의 합성 및 분비에 대한 호르몬 조절 기구를 조사하기 위하여 실시하였다. 특히 음성호르몬들이 Vg 합성에 직접 관여하는지를 뱀장어의 肝細胞培養을 이용하여 검토한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Collagenase perfusion법에 의해 분리한 간세포의 위상차 현미경 관찰에서, fibronectin coating된 dish에 분리된 직후의 간세포는 球狀의 형태를 나타냈으나 배양 3~4일 후에는 완전한 단층(monolayer)을 형성하여 적어도 배양 10일까지 양호한 상태를 유지하였다.



2. 뱀장어의 Vg합성은 E<sub>2</sub>만으로는 유도되어지지 않았으나, E<sub>2</sub>와 여성호르몬인 MT를 함께 첨가한 배양에서 Vg의 합성이 유도되어졌다. 분비된 Vg의 양은 첨가한 MT농도에 의존하였는데 10<sup>-6</sup>M~10<sup>-5</sup>M에서 높은 Vg합성을 보였다. 또한 testosterone과 androsterone도 Vg합성 능력을 갖는 것으로 나타났으나, progesterone은 효과를 나타내지 못했다. 이들 여성스테로이드들의 단독 첨가에서는 모두 Vg합성능을 나타내지 못했다.
3. 뱀장어 생체내에 E<sub>2</sub>를 투여하여 일주일 후에 간을 채취하여 세포배양한 실험에서, 호르몬들의 첨가유무에 관계없이 배양 1일후에 간세포로부터 Vg이 합성 분비되어졌다. E<sub>2</sub> 및 MT를 각각 첨가하여 배양할 경우에는 새로운 Vg합성은 유도되어지지 않고 오히려 배양시간과 더불어 감소되어 갔다. 그러나 E<sub>2</sub>와 MT를 함께 첨가한 배양에서는 많은 양의 Vg이 합성되어 배양시간에 따라 증가되어 갔다. 따라서 지속적인 Vg의 합성을 위해서는 E<sub>2</sub>와 MT를 함께 첨가하여야 하는 것이 확인되었다.
4. 결론적으로 뱀장어의 Vg은 E<sub>2</sub> 단독으로는 합성이 되어지지 않고 E<sub>2</sub>와 여성호르몬의 공동작용에 의해 유도되어진다. 또한 MT 등의 여성호르몬들은 뇌하수체호르몬들과는 별도의 Vg합성능을 갖거나, 이들 호르몬들에 대한 첨가적인 작용을 하는 것으로 나타났다.

## VI. 인용문헌

1. Boehm, K. D., R. L. and J. Ilan. 1988. Induction of vitellogenin in primary monolayer cultures of cockerel hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 85 : 3450-3454.
2. Burzawa-Gerard, E. and A. Dumas-Vidal. 1991. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and carp gonadotropin on European silver female eel (*Anguilla anguilla* L.) employing a homologous radioimmunoassay for vitellogenin. Gen. Comp. Endocrinol. 84 : 264-276.
3. Carnevali, O. and G. Mosconi, K. Yamamoto, T. Kobayashi, S. Kikuyama and A. M. Polzonetti-Magni. 1992. Hormonal control of *in vitro* vitellogenin synthesis in *Rana esculenta* liver: Effects of Mammalian and Amphibian growth hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 88 : 406-414.
4. Emmersen, B. K. and I. M. Petersen. 1976. Natural occurrence, and experimental induction by estradiol-17 $\beta$ , of a lipophosphoprotein (Vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*, L.). Comp. Biochem. Physiol. 55B : 315-321.
5. Elliott, J. A. K., N. R. Bromage and C. Whitehead. 1979. Effect of estradiol-17 $\beta$  on serum calcium and vitellogenin levels in rainbow trout. J. Endocrinol. 83 : 54-55.
6. Gavaud, J. 1986. Vitellogenesis in lizard *Lacerta vivipara* jacquin. I. Purification and partial characterization of plasma vitellogenin. Gen. Comp. Endocrinol. 63 : 1-10.
7. Grabar P. and C. A. Williams. 1953. Methode permettant l'etude conjuguee des proprietes electrophoretiques et immunochimiques d'un melange de propeins. Application au serum sanguin. Biochem. Biophys. Acta. 10 : 193-194.
8. Hara, A. and H. Hirai. 1978. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout(*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 59B : 339-343.
9. Ho, S. M., L. J. Wangh and I. P. Callard. 1985. Sexual differences in the *in vitro* induction of vitellogenesis in the turtle: Role of the pituitary and growth hormone. Comp. Biochem. Physiol. 81B : 467-472.
10. Hori, S. H., T. Kodama and K. Tanahashi. 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. Gen. Comp. Endocrinol. 37 : 306-320.
11. Kwon, H. C., S. Hayashi and Y. Mugiya. 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 $\beta$

- in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. 104B : 381-386.
12. Kwon, H. C. and Y. Mugiya. 1994. Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*. Gen. Comp. Endocrinol. 93 : 51-60.
  13. Kwon, H. C., A. Hara, Y. Mugiya and J. Yamada. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in white spotted charr, *Salvelinus leucomaenis*. Bull. Fac. Fish, Hokkaido Univ. 41 : 162-180.
  14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature 227 : 680-685.
  15. Le Menn, F., H. Rochefort and M. Garcia. 1980. Effect of androgen mediated by the estrogen receptor of fish liver: vitellogenin accumulation. Steroids 35 : 315-328.
  16. Maitre, J.-L., Y. Valotaire and C. Gu-guen-Guillouzo. 1986. Estradiol-17 $\beta$  stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biology* 22 : 337-343.
  17. Mommsen, T. P. and P. J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In "Fish Physiology" (W. S. Hoar and D. J. Randall, Eds.), Vol. XIA, pp. 347-406. Academic Press, San Diego.
  18. Ng, T. and D.R. Idler. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In "Fish Physiology" (W. S. Hoar and D. J. Randall, Eds.), Vol. IXA, pp. 373-404. Academic Press, San Diego.
  19. Paolucci, M. 1991. Estradiol receptor in the lizard liver (*Podarcis s. sicula*). Seasonal changes and estradiol and growth hormone dependence. Mol. Cell. Endocrinol. 66 : 101-108.
  20. Scott, A. P. and J. P. Sumpter. 1983. A comparison of the female reproductive cycles of autumn-spawning and winter-spawning strains of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Gen. Comp. Endocrinol. 52 : 79-85.
  21. Sundararaj, B. I., S. V. Goswami and V. J. Lamb. 1982. Role of testosterone, estradiol-17 $\beta$ , and cortisol during vitellogenin synthesis in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Block). Gen. Comp. Endocrinol. 48 : 390-397.
  22. Ueda, H., O. Hiroi, A. Hara, K. Yamauchi and Y. Nagahama. 1984. Changes and serum concentrations of steroid hormones, thyroxine, and vitellogenin during spawning migration of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Gen. Comp. Endocrinol. 53 : 203-211.
  23. Vaillant, C., C. Le Guellec, F. Pakdel and Y. Valotaire. 1988. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. Gen. Comp. Endocrinol. 70 : 284-290.
  24. Van Bohemen Ch. G., J. G. D. Lambert, H. J. Th. and P. G. W. J. van Oordt. 1982. Estrogen and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocrinol. 46 : 81-92.
  25. Wallace, R. A. 1985. Vitellogenin and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In "Developmental Biology" (L. Browder, Ed.), Vol. 1, pp. 127-177. Pergamon, New York.
  26. Wangh, L. J. 1982. Glucocorticoids act together with estrogens and thyroid hormones in regulating the synthesis and secretion of *Xenopus* vitellogenin, serum albumin, and fibrinogen. Dev. Biol. 89 : 294-298.
  27. Wangh, L. J. and A. J. Knowland. 1975. Synthesis of vitellogenin in cultures of male and female frog liver regulated by estradiol treatment *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 72 : 3121-3175.

28. Wangh, L. J. and W. Schneider. 1982. Thyroid hormones are corequisites for estradiol-17 $\beta$  *in vitro* induction of *Xenopus* vitellogenin synthesis and secretion. *Dev. Biol.* 89 :

287-293.

29. Wiley, H. S., L. OpreSCO and R. A. Wallace. 1979. New methods for purification of vertebrate vitellogenin. *Anal. Biochem.* 97 : 48-53.