

**Human 성장호르몬을 도입한 Transgenic Rats의 작출과  
번식표현형에 관한 연구**  
**I. mWAP/hGH을 도입한 Rat의 Endogenous GH분비 변화와  
성성숙에 미치는 영향**

장규태 · 김성현 · 성환후\* · 주학진 · 박미령 · 윤창현  
경상대학교 축산진흥연구소

**Studies on Phenotype of Reproduction and Production  
of Human Growth Hormone(hGH) with Transgenic Rats**  
**I. Changes in Endogenous Growth Hormone Secretion and  
Onset of Puberty in hGH Transgenic Rats**

Chang, K. T., S. H. Kim, H. H. Seong\*, H. J. Chu, M. R. Park and C. H. Yun  
Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University

**SUMMARY**

A chimeric gene comprising murine whey acidic protein(mWAP) and human growth hormone (hGH) was used to produce transgenic rats express hGH and secrete it into the blood. Two lines of transgenic rats carrying the mWAP/hGH construct were established; High line was characterized by relatively high levels of serum hGH, and low line had relatively low levels. The secretory profiles of rat GH(rGH) as well as hGH, the transgene product, were obtained in transgenic males and females of low line; both hGH and rGH serum levels were flattened with no episodic fluctuations, and the overall mean concentration of rGH was significantly lower than in normal littermates. Although the animals of High line showed an acceles, as assessed by vaginal opening and occurrence of first ovulation, advanced by 7~8 days in both lines of animals. Accordingly, the body weight at puberty of low line transgenic females was much lower than that of normal littermates, indicating that continuous hGH expression could induce precocious puberty without enhancing the growth rate.

(Key words : Transgenic rat, hGH, rGH, Puberty)

**I. 서론**

본 연구는 GH(growth hormone)에 관한 여러 가지 축적된 자료들을 기초로 하여 공시동물로서는 rat

를 이용하였고, hGH(human growth hormone)을 유전자로 사용하였다. hGH은 RIA(radioimmunoassay)법에 의해 endogenous rGH(rat growth hormone)을 쉽게 구분할 수 있을 뿐만 아니라, rGH 수용체에 용이하게 결합되어 있어 rat에 아주 다양하

\* 축산기술연구소(National Livestock Research Institute)

게 작용하는 것으로 알려져 있다(Posner 등, 1974). Promotor로서는 mWAP(murine whey acid protein)을 사용하였는데, 대표적 조절기능으로 유즙내에 exogenous 단백질을 분비하는 것이 특징 중의 하나이며, 이와 관련한 형질전환된 mice에서 다수의 결과가 보고되어지고 있다(Archibald 등, 1990; Choo 등, 1989; Clark 등, 1989; Gordon 등, 1987; Pittus 등, 1988). WAP promotor는 설치류의 유즙내에 분비되는 유선특이단백질(Piletz 등, 1981)이며 lactogen 호르몬의 복합생성물질로서 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다(Topper 등, 1980). mWAP/hGH 유전자를 도입한 형질전환 mice는 유즙내에 hGH의 분비는 물론 혈액 내에서도 분비되어진다고 알려져 있다(Tojo 등, 1993). 또한, mWAP/hGH 유전자를 발현하는 mice에 있어서는 metallothionein promotor와 같은 다른 단백질 유전자의 조절인자와 hGH의 유전자를 발현하는 mice보다 혈중 hGH이 적게 분비되어진다는 보고도 있다(Tojo 등, 1993). 이러한 반면, 최근에는 혈중 고hGH 분비로 인한 출생후 대사 및 번식 장애가 일어난다는 결과들도 다수 있다(Palmiter와 Brinster, 1986; Orian 등, 1992; Pursel 등, 1989; Bartke 등, 1988). 그래서 WAP 유전자는 혈중내 GH를 적절한 농도로 분비하는 형질전환 동물을 생산하기 위한 적합한 promotor로서 평가되어지고 있다. 형질전환 rat의 작출 및 hGH 분비 pattern과 만성적으로 분비된 개체들의 체성장 등이 번식 현상에 미치는 현상에 관하여 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. mWAP/hGH gene의 준비

미세주입에 이용되어진 유전자의 준비는 Maniatis 등(1989)의 방법에 준하였으며, 우선 pWAPE 7.2 kbp neo vector로부터 mWAP genomic DNA를 Kpn I와 Eco RI의 제한 효소에 의하여 구조적 기능을 가지고 있는 4.6 kbp의 fragment를 회수하였다(Campbell 등, 1984). 회수한 fragment는 3-인산화 처리로 cohesive화 시키고 여기에 다시 Bam HI adaptor를 연결하였고, 그 다음 5'flanking 영역에 Eco RI site를 절단하였다. hGH의 유전자는 pMThGH vector로부터 Eco RI와 Bam HI 제한 효

소를 이용하여 2.1 kbp의 fragment를 준비하였다. 그리하여 최종적으로 Eco RI와 Bam HI site로 미리 준비되어진 pWAPE 4.6 kbp의 vector에 Eco RI와 Bam HI의 cloning site에 2.1 kbp hGH fragment를 연결함으로써 mWAP/hGH gene을 준비하였다(Fig. 1).

### 2. 형질전환 rat의 생산

유전자 도입에 사용되어진 공시 동물은 Wistar Immamichi strain 으로서 실내 온도는  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 조명은 14L:10D (light 14h; dark 10h)로 조절하였고 자유 채식시켜 관리하였다.

4.6 kbp의 mWAP/hGH 유전자는 EcoRI제한효소로 digestion한 후 1% TAE agarose gel을 이용하여 분리, 정제하였으며, 농도는  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DNA로 정상적인 수정란의 응성전핵에 미세주입하였다. DNA가 미세주입된 수정란은 2-cell까지 발달된 수정란만을 선별하여 위임신 rat의 난관에 이식하였다. 태어난 산자 전체는 Southern Blotting(Southern, 1975)에 의하여 발현 여부를 확인하였다. 성숙된 형질전환개체를 정상적인 암컷과 교배하여 태어난 산자를 Southern blotting 방법에 의하여 형질전환 개체와 비형질전환 개체를 선별하여 본 실험에 사용하였다.

### 3. 형질전환개체의 분석

태어난 산자의 mWAP/hGH 유전자 발현 여부는, Orian 등(1992)의 방법에 따라 꼬리로 부터 genome DNA를 추출하여 hybridization하였으며, probe로써는 hGH 유전자내의 Pvu II의 1.2 kbp 단편(Fig. 1)을  $\text{P}_i[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  radio-labelling법에 의하여 Southern blotting 하였다.

### 4. 혈액 채취

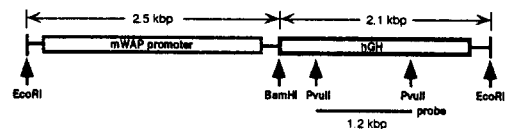


Fig. 1. Construct of mWAP/hGH gene introduced into rats

혈액 채취는 silastic cannula를 우경정맥을 통하여 우심방에 이식하였으며, 채취 전날 에테르 마취상태에서 외과적인 방법으로 cannula를 이식하였다. Endogenous rGH과 hGH분비 pattern을 조사하기 위하여 4시간에 걸쳐 매 20분마다 250~300  $\mu$ l씩 채취하였다.

### 5. 호르몬 측정

혈중 rGH 농도 측정은 NIDDK HDP(Hormone Distribution Program, Amersher, USA) Kit를 사용하여 2차 항체 RIA법에 의해 측정하였다. Standard는 NIDDK-rGH-RP-2에 의하여 산출하였으며, 3.75~240 ng/ml 이었다. 혈중 hGH농도는 시판용 Kit(Dinabot, Tokyo)와 함께 2차 항체 RIA법에 의해 측정하였고, Standard는 0.5 ng~80ng/ml 범위였다. rGH에 대한 항체는 standard의 용량 범위 내에서는 hGH과 제반응하지 않도록 설정하였다.

### 6. 뇌하수체 GH-positive cells의 조직면역학적 검토

형질전환된 두 계통의 개체에서 각각 5마리씩 뇌하수체를 적출하여 10%의 중성포르말린에서 고정시키고 다시 100% 알코올에서 탈수시킨 후 파라핀 고정하였다. 조직은 6  $\mu$ m의 두께로 절편하였고, GH에 의한 면역활성화된 cell의 수, 크기 및 전엽의 부피 환산은 Sasaki 등(1994)의 방법에 따랐다.

- 1) 형질전환 개체와 비형질전환 개체에서 분리된 뇌하수체의 전엽, 중엽, 후엽의 절편들을 rGH에 의한 항혈청과 동시에 조직면역학적으로 염색하였다.
- 2) 현미경용 슬라이드상의 조직 절편은 에탄올에서 sodium ethoxide로 Epon을 제거하였다.
- 3) 4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 침적시켜 osmium을 제거하였다.
- 4) PBS(Ca<sup>2+</sup> free)로 세척이 완료된 후 30분 동안 항혈청으로 처리하고, peroxidegoat, anti-rabbit 면역글로빈 G 혈청(SyMed Laboratories, Inc., San Francisco, CA)과 함께 배양하였다.
- 5) 슬라이드는 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유하고 있는 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 용액과 함께 30분 동안 배양한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

6) 배양이 끝난 슬라이드는 조직형태학적으로 분석하기 위하여 image 분석기(Cosmozzone-S, Nikon, Japan)상에서 측정하였다. 그리고 rGH 항혈청에 대한 면역활성을 가진 positive 세포들의 수치는 뇌하수체 전체 cell수에 대한 비율로서 계산하였다.

### 7. 성숙 개체에 대한 고찰

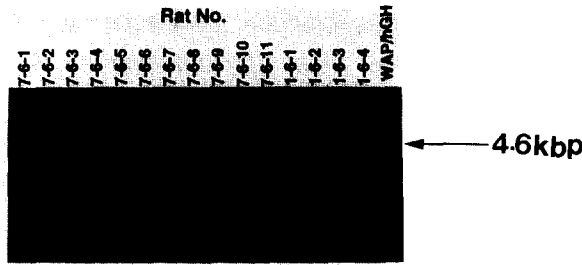
형질전환된 개체와 정상적인 개체간에 태어난 산자의 체중을 측정하였고 매일 오전 vaginal opening을 관찰하였다(Urbanski와 Ojeda 1987). 정상적인 배란 여부를 관찰하기 위하여 vaginal opening후 매일 vaginal smear상을 체크하여 1회째의 발정주기인 metestrous II 기에 편측 난소를 적출하여 황체의 유무를 확인하였다.

### 8. 통계처리

전 실험 과정의 Data 통계 처리는 t-test의 ANOVA 방법으로, 유의 수준 P<0.05 및 P<0.01로 검증하였다.

## III. 결과 및 고찰

mWAP/hGH 유전자를 미세주입하여 2-cell까지 발달한 수정란만을 10마리의 recipients에 이식하여 53마리의 산자를 얻었고, 분만된 개체의 꼬리로부터 genomic DNA를 추출하여 Southern blotting(Fig. 2)을 실시한 결과 두 마리의 수컷(No. 7-6-3, 7-6-5)에서 mWAP/hGH positive 현상이 나타났고, RIA법에 의해 혈중 hGH이 분비되어지는 것을 확인하였다. 본 연구를 수행하기 위하여 두 마리의 형질전환 수컷을 이용하여 정상적인 암컷과 교미시켜 F2 세대를 얻었다. No7-6-3, 7-6-5의 개체로부터 태어난 형질전환된 개체들은 Table 1에 나타난 바와 같이 혈중 hGH이 높은 것을 high line, 낮은 개체를 low line으로 구분하여 공시하였다. High line의 경우는 생후 9주령에 급격한 체성장을 나타내었고, low line은 정상적인 rat와 거의 유사하게 나타났다. Low line을 정상 개체와 체성장을 비교해볼 때 유의차(P<0.05)는 인정되지 않았지만, vaginal opening 및 체중을 high line과 비교한 경우 유의차(P<0.01)가 인정되었다.



**Fig. 2. Analysis of DNA from transgenic rats for WAP/hGH sequence.** DNA(10 $\mu$ g) from rats was resticted with Eco RI electrophoresed on 0.8% agarose gel, transferred to nylonmenbrance and hybridized with the random promed Pvu II probe shown in Fig. 1. WAP/hGH(con-struct for transgene as a positive control

정상적인 rat의 혈중 rGH의 변화와 low line의 혈중 hGH 및 rGH의 변화는 Fig. 3, 4에 나타난 바와 같다. 정상적인 암컷에서는 혈중 rGH이 불규칙적인 pulse상이 나타났으나 수컷에서는 3시간 간격으로 약 15분 정도 pulse상이 지속적으로 발생되었다. 반면, Fig. 3에서는 암컷에서 관찰된 것보다는 낮지만 잦은 빈도를 보인다. 이러한 결과들은 Painson과 Tannenbaum(1991)이 보고한 결과들과 거의 유사하였으며, 형질전환 개체는 Fig. 4와 같이 정상적인 rat에서 볼 수 있는 pulse상은 관찰되지 않았다. 평균 혈중 rGH 수준은 Table 1에서 보는 바와 같이 정상적인 수컷에 비해 매우 낮게 나타났으며, 형질전환된 암컷은 간혹 낮은 pulse상을 나타냈을 뿐만 아니라 endogenous

rGH의 분비가 억제되는 현상(Fig. 4)을 나타냈다. 또한 형질전환된 암컷과 수컷 양자 모두 혈중에서 뚜렷한 hGH 수준 변화(Fig. 4)는 없었으나 전체 평균치(Table 1)는 수컷이 암컷보다 다소 낮은 수준이었다. 뇌하수체전엽에 있어서 GH-Positive cell수를 조직면역화학적으로 분석한 결과, GH를 분비하는 somatotrophs의 수치 비율(Fig. 5)은 비형질전환 개체보다 형질전환 개체에서 그 수가 적을 뿐만 아니라 비율치도 유의적으로( $P < 0.01$ ) 낮게 나타났다(Fig. 6). 비형질전환 및 형질전환 rat의 vaginal opening 및 체중과의 상관 관계는 각각 Fig. 7에서 나타난 바와 같다. 비형질전환 rat의 평균 발정일령은  $36.8 \pm 0.3$ 일(F<sub>1</sub> generation)이었고, 반면 high line과 첫 발정이 개시된 후의 황체는 모든 개체에서 관찰되었다(normal, high line, low line). Mice의 경우 mWAP/hGH 유전자 도입시는 대부분 체성장률이 증가한다고 보고하고 있는데(Palmiter 등, 1983), 본 연구에 있어서도 high line의 경우 성성숙 개시전에 체성장이 급격히 증가하는 현상을 나타냈는데 이 현상은 hGH이 rat의 성장 촉진에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그러나, low line의 경우에는 비형질전환 rat와는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 exogenous hGH 분비량이 endogenous rGH 분비량보다 적은 것에 기인한 것으로 오히려 endogenous rGH에 지배되는 것으로 사료된다. GH는 여러 mechanism을 통하여 조절되며, 수컷의 경우 뇌하수체의 직접적인 작용에 의해 조절된다고 알려져 있다(Lanzi와 Tannenbaum, 1992; Abe 등, 1983; Willoughby 등, 1980). 200  $\mu$ g/day의 hGH를 인위적으로 투여하면, 혈중 hGH 수준은 250ng/ml 이상으로 증가되고, 이로 인하여

**Table 1. Features of transgenic rats produced in this study**

	Sex	Serum hGH(ng/ml)	Serum rGH(ng/ml)	Relative growth ratio
High line	male	157.0 $\pm$ 9.69	NA	1.350++
	female	468.3 $\pm$ 153.5*	NA	1.788++
Low line	male	11.03 $\pm$ 0.91	24.76 $\pm$ 2.20	0.968
	female	21.37 $\pm$ 1.15**	17.29 $\pm$ 1.67	1.068+
Normal	male	ND	75.16 $\pm$ 15.20	1
	female	ND	92.54 $\pm$ 47.20	1

ND; Not detected, NA; Not available \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. male rats of the same line; + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$  vs. sex matched normal littermates.

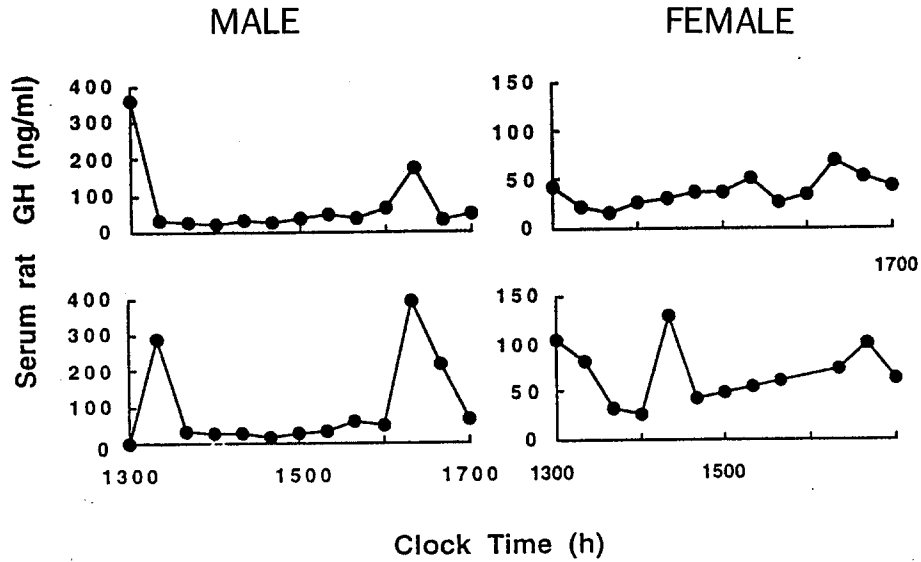


Fig. 3. Representative individual profiles of serum fGH changes for 4th in normal male normal male (left panel) and female (right panel) rats

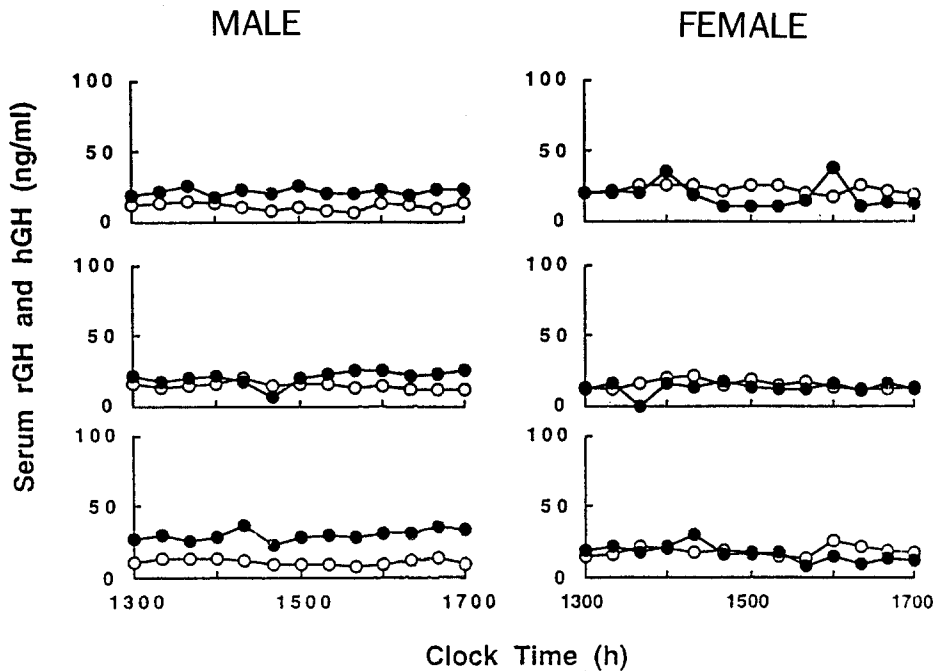


Fig. 4. Representative individual profiles of serum rGH (closed circle) and hGH (open circle) changes for 4th in Low line transgenic male (left panel) and female (right panel) rats

MALE

FEMALE

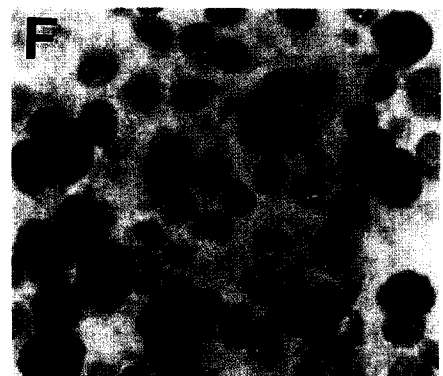
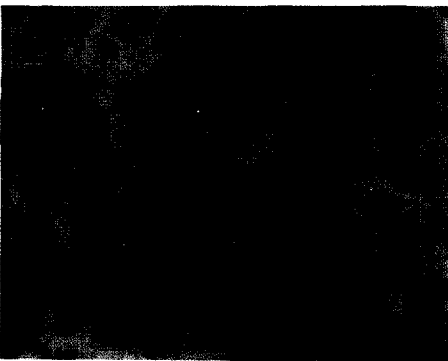
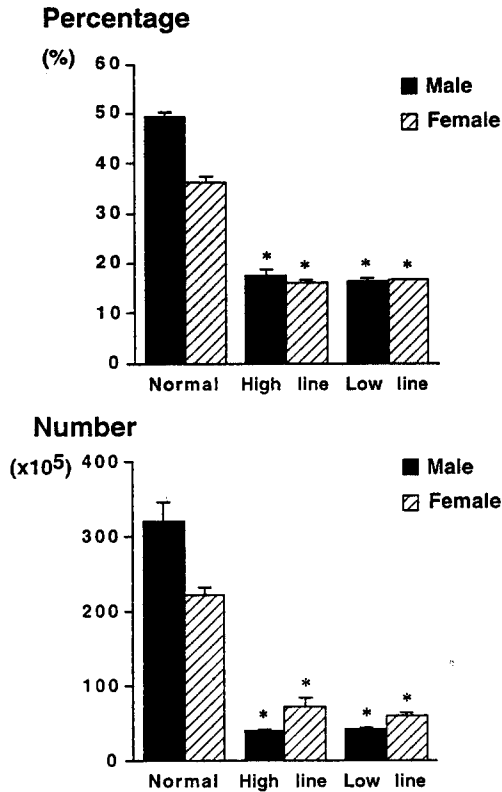
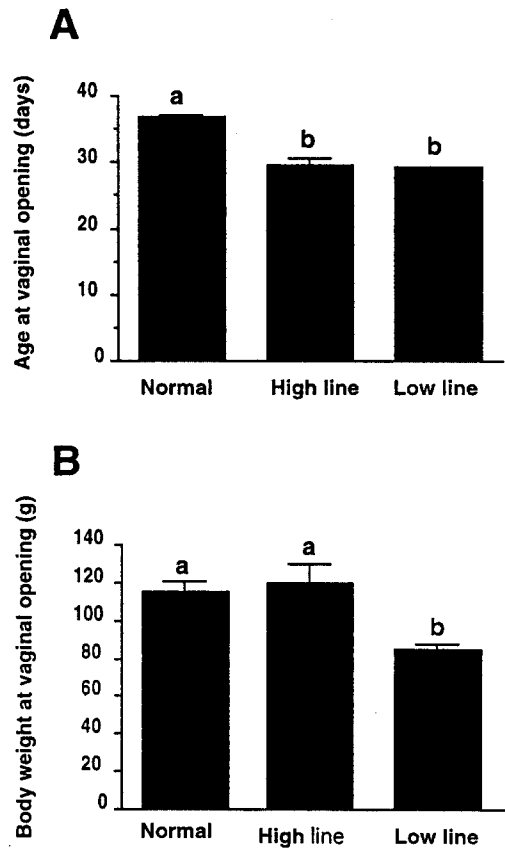


Fig. 5. Pituitary cells immunoreactive with antisera to rGH in control(A, D), High line (B, E) and Low line (C, F), male (left panel) and female (right panel) rats. Nuclei are stained with hematoxylin. Immunoreactive cells were stained brown ( $\times 750$ )



**Fig. 6. Percentages and numbers of rGH positive cells in pituitary tissue in transgenic and normal rats. Each column represents the mean  $\pm$  SE (Normal, n=5; High line, n=5; Low line, n=5). \* P < 0.01 compared with normal rats**

endogenous rGH의 분비가 완전히 억제되는 것으로 보고되었다(Lanzi와 Tannenbaum, 1992). 그러나, 수컷 개체에 exogenous hGH 100  $\mu$ g/day를 투여한 경우, 혈중 hGH 수준이 150~200 ng/ml로 증가되었고 이로 인한 일시적인 rGH 분비 억제는 가능하나 완전히 억제하지는 못하였다(Willoughby 등, 1980). Low line 수컷의 경우, 혈중 hGH 수준이 10ng/ml으로도 endogenous rGH 분비를 어느 정도 억제할 수 있었다. GH의 분비를 억제하기 위하여 요구되는 exogenous hGH 혈중 수준 차이로서는 인위적 투여 및 형질전환체로부터 만성적인 분비에 의해서 GH이 다른 작용 형태를 가진다는 것을 암시하고 있



**Fig. 7. Age in days (A) and body weight (B) at vaginal opening in normal and transgenic female rats. The data represent mean  $\pm$  SE. Values having the same superscript are not significantly different ( $p > 0.01$ ). Normal rats(n=6) High line transgenic rats(n=3); Low line transgenic rats(n=8)**

다. GH의 분비를 조절하는 메카니즘은 시상하부로부터 GHRF(growth hormone release factor)의 분비억제와 somatostatin(somatotrophin releasing inhibitor factor)의 자극에 기인하는 것으로 보고되고 있다(Lanzi와 Tannenbaum, 1992; Clark 등, 1988; Conway 등, 1985).

형질전환개체에서 혈중 rGH의 농도가 낮게 나타나는 것은 somatotrophs의 억제작용 때문인 것으로 사

료된다. Billestrup등(1986)은 GH-RF 는 somatotrophs 의 endo 및 paracrine 형태로 작용하므로 결국 somatostatin에 의해 일시적 또는 경시적으로 억제된다고 보고하였다. 그리고 high line과 low line 양자 모두 정상적인 것에 비해 성성숙개시가 빨랐지만, low line의 암컷 경우 성성숙 도달시의 체중이 정상적인 개체보다 오히려 가벼웠는데, 이는 exogenous hGH 도입이 성장률의 변동에 관계없이 성성숙을 유도할 수 있는 것으로 나타났다. 이와 관련된 결과로서, 성성숙개시는 체중과 상당히 관련이 있다고 보고한 (Ofeda 와 Urbanski, 1988) 내용과 다소 차이가 있지만, 대사 인자들이 성성숙의 개시에 직접 또는 간접적으로 관여한다는 이와 유사한 보고도 있다(Ojeda 및 Urbanski, 1988; Hiney등, 1991).

이상과 같이 보고되어진 내용들을 종합해 볼 때, 본 실험에 공시된 low line 암컷의 경우에 있어서 상기의 보고 내용들과는 다소 차이가 있으나 이는 exogenous hGH의 도입으로 인한 steroid성 hormone과 관련한 요인들이 작용하여 이러한 현상을 유도하는 것으로 사료된다.

한편, MT/hGH 유전자를 발현하는 형질전환 mice의 경우, hGH 유전자는 시상하부를 경유하여 LH와 FSH의 분비를 자극한다고 보고하였고(Chandrashekar 등, 1988; Steger 등, 1990) 성성숙의 개시는 LH-RH의 신경분비세포에 의해 유도되어진다는 것이다(Urbanski와 Ojeda, 1987). GH는 GH수용체를 통하여 작용 및 조절되어지는데, 이러한 수용체는 LH-RH를 조절하는 신경세포 발달이나 activity를 지배하는데 이는 GH수용체가 시상하부의 중추용기 부분에 존재하기 때문인 것으로 보고하였다(Fraser 등, 1990). 이러한 근거중의 하나로 hGH는 rat의 prolactin 수용체와 결합되어질 수 있다는(Boutin 등, 1988) 보고가 있으며, hGH가 prolactin의 수용체를 통하여 기능적으로 작용할 수 있다는 가능성으로서는 전혀 무시할 수는 없는데, 조기 성성숙을 유도하기 위한 rat에 dopamin 수용체 inhibitor에 의하여 유도된 혈중 prolactin분비는 조기 발정을 유지할 수 있다고 하였다(Advis와 Ojeda, 1978). 그리고 Tang 등(1993)은 MT/hGH를 분비하는 형질전환된 mice를 이용하여 hGH 유전자가 LH-RH와 미지의 조절 메카니즘을 경유하여 FSH- $\beta$  및 LH- $\beta$ 의 발현을 촉진한다

는 사실을 보고하였다. 이러한 메카니즘 역시 조기성성숙과 관련이 있을 것으로 사료되어지며, 본 실험하에 이용된 hGH는 조기 성성숙개시 유도 및 조절 메카니즘에 대한 보다 적극적 연구가 요망되어진다. 이상과 같이 설명한 바와 같이 형질전환된 rat에서 hGH가 endogenous GH 분비 pattern을 변화시킬 수도 있으며, 또한 암컷에 있어서는 조기 성성숙을 유도할 수 있는 주요한 인자로 작용되어지는 것으로 나타났다.

## IV. 적 요

mWAP(murine whey acidic protein)와 hGH(human growth hormone)융합유전자를 사용하여 두 계통의 형질전환 rats를 생산하였다. 혈중 hGH의 농도가 높게 나타나는 high line과 낮게 나타나는 low line로 구분하였다. Low line의 암컷과 수컷 모두 hGH와 rGH의 분비 형태가 pulse상이 거의 없는 저저치 현상으로 나타났으며, 정상적인 산자보다 rGH 농도는 낮게 나타났다. High line의 경우 성장율이 높았지만, low line의 경우는 정상적인 개체와 비슷한 체성장을 보였다. 그럼에도 불구하고 양 계통 모두 성성숙 시기가 정상적인 것에 비해 7~8일 정도 빠르게 나타났다. Low line의 경우 성성숙시 정상적인 개체에 비해 체중이 현저히 낮은데, 이와 같은 사실로 미루어 exogenous hGH의 발현이 체성장의 가속화에 상관없이 성성숙 개시를 조기 유도하는 것으로 사료된다.

## V. 인용문헌

1. Abe, H., M. E. Molitch., Wky J. J. Van and L. E. Underwood, 1983. Human growth hormone and somatomedin C suppress the spontaneous release of growth hormone in unanesthetized rats. *Endocrinology*, 113:1319-1324.
2. Advis, J. P. and S. R. Ojeda. 1978. Hyperprolactinemia-induced precocious puberty in the female rats:ovarian site of action. *Endocrinology*. 103:924-927.
3. Archibald, A. L., M. McClenaghan, V. Hor-



- nsey, J. P. Simons and A. J. Clark. 1990. High-level expression of biologically active human  $\alpha_1$ -antitrypsin in the milk of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:5178-5182.
4. Bartke, A., R. W. Stegar, S. L. Hodges, T. A. Parkening, T. J. Collins, J. S. Yun and T. E. Wanger. 1988. Infertility in transgenic female mice with human growth hormone expression : Evidence for luteal failure. *J. Exp. Zool.*, 248:121-128.
  5. Billestrup, N., L. W. Swanson and W. Vale. 1986. Growth hormone releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:6854-6857.
  6. Boutin, J. M., C. Jolicoeur, H. Okamura, J. Gagnon, M. Edery, M. Shirota, D. Banville, I. Dusanter-Fourt, J. Djiane and P. A. Kelly. 1988. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell*, 53:69-77.
  7. Campbell, S. M., J. M. Rosen, L. Hennigshausen, U. Strech-Jurk and A. E. Sippel. 1984. Comparison of the whey acidic protein genes of the rat and mouse. *Nucleic Acid. Res.*, 12:8685-8697.
  8. Chandrashekar, V., A. Bartke and T. E. Wanger. 1992. Neuroendocrine function in adult female transgenic mice expressing the human growth hormone gene. *Endocrinology*, 130:1802-1808.
  9. Choo, K. H., K. Rephael, W. Mcadam and M. G. Peterson. 1989. Expression of active human blood clotting factor IX in transgenic mice. *Nucleic Acid. Res.*, 15:871-884.
  10. Clark, A. J., H. Bessos, J. O. Bishop, P. Brown, S. Harris, R. Lathe, M. McClenaghan, C. Prowse, J. P. Simons, C. B. A. Whitelaw and I. Wilmot. 1989. Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, 7:487-492.
  11. Clark, R. G., L. M. S. Carlsson, and I. C. A. F. Robson, 1988. Growth hormone(GH)secretion in the conscious rat : negative feedback of GH its own release. *J. Endocrinology*, 1119:201-209.
  12. Conway, S., S. M. McCann and L. Krulich. 1985. On the mechanism of growth hormone autofeedback regulation : Possible role of somatostatin and growth hormone-releasing factor. *Endocrinology*, 117:2284-2292.
  13. Fraser, R. A., D. Attardo and S. Harvey. 1990. Growth hormone receptors in hypothalamic and extra-hypothalamic tissues. *J. Mol. Endocrinology*, 5:231-238.
  14. Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. I. Plotkin, J. A. Barbosa and F. H. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:7380-7384.
  15. Hiney, J. K., S. R. Ojeda and W. L. Dees. 1991. Insulin-like growth factor I :A possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology*, 54:420- 423.
  16. Lanzi, R. and G. S. Tannenbaum. 1992. Time course and mechanism of growth hormone's negative feedback effect on its own spontaneous release. *Endocrinology*, 130:780-788.
  17. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. In : (eds) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
  18. Ojeda, S. R. and H. F. Urbanski. 1988. Puberty in the rat. In:Knobil E, Neill JD (eds) *The physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1699-1737.
  19. Orian, J. M., C. S. Lee., L. M. Weiss and M. R. Brandon. 1989. The expression of a metallothionein-ovine Growth Hormone fus-

- ion gene in transgenic mice does not impair fertility but results in pathological lesion in the liver. *Endocrinology*, 124:455-463.
20. Painson, J. C. and G. S. Tannenbaum. 1991. Sexual dimorphism of somatostatin and growth hormone-releasing factor signaling in the control of pulsatile growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 128: 2858-2866.
  21. Palmiter, R. D., G. Norstedt, R. E. Gelinás, R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1983. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222: 809-814.
  22. Palmiter, R. D. and R. L. Brinster. 1986. Germ-line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.*, 20:465-499.
  23. Piletz, J. E., M. Heinlen and R. E. Ganschow. 1981. Biochemical characterization of a novel whey protein from murine milk. *J. Biol. Chem.*, 256:11509-11516.
  24. Pittus, C. W., L. Henninghausen, E. Lee, H. Westphal, E. Nicols, J. Vitale and K. Gordon. 1988. A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in the transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:5874-5878.
  25. Posner, B. I., P. A. Kelly, R. P. C. Shiu, R. Paud and H. G. Friesen. 1974. Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology*, 95:521-531.
  26. Pursel, V. G., C. A. Pinkert, K. F. Miller, D. J. Blot, R. G. Campbell, R. D. Palmiter, R. L. Brinster and R. E. Hammer. 1989. Genetic engineering of livestock. *Science*, 244:1281-1288.
  27. Sasaki, F., T. Kawai and M. Ohta. 1994. Immunohistochemical evidence of neurons with GHRH or LHRH in the arcuate Nucleus of male mice and their possible role in the postnatal development of adenohipophysical cells. *Anat. Rec.*, 240:255-260.
  28. Southern, E. 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517.
  29. Steger, R. W., A. Bartke, T. A. Parkening, T. Collins, J. S. Yun and T. E. Wagner. 1990. Neuroendocrine function in transgenic male mice with human growth hormone expression. *Neuroendocrinology*, 52:106-111.
  30. Tang, K., A. Bartke, C. S. Gardiner, T. E. Wagner and J. S. Yun. 1993. Gonadotropin secretion, synthesis and gene expression in human growth hormone transgenic mice and in ames dwarf mice. *Endocrinology*, 132: 2518-2524.
  31. Tojo, H., M. Tanaka, A. Matsuzawa, M. Takahashi and C. Tachi. 1993. Production and characterization of transgenic mice expression a hGH fusion gene driven by promoter of mouse whey acidic protein putatively specific to mammary gland. *J. Repro. Develop.*, 39:145-155.
  32. Topper, Y. J. and C. S. Freeman. 1980. Multiple hormone interaction in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.*, 60:1049-1106.
  33. Urbanski, H. F. and S. R. Ojeda. 1987. Activation of luteinizing hormone-releasing hormone release advances the onset of female puberty. *Neuroendocrinology*, 46:272-276.
  34. Willoughby, J. O., M. Menadue, P. Zeegers, P. H. Wise and J. R. Oliver. 1980. Effects of human growth hormone on the secretion of rat growth hormone. *J. Endocrinol.*, 86:165-169.
- (접수일자 : 1998. 4. 30. / 채택일자 : 1998. 6. 10.)