

## Human 성장호르몬을 도입한 Transgenic Rats의 작출과 번식표현형에 관한 연구

### II. 형질전환된 Rats의 hGH수준이 번식표현형에 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 II. Different Reproductive Phenotypes Determined by hGH Levels 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

The effects of continuous human GH(hGH) secretion on the female reproduction was studied in adult female transgenic rats expressing the hGH gene with a mouse whey acid protein (mWAP) promoter. Two lines of transgenic female rats carrying the mWAP/hGH gene were established and used in the study. One was characterized by relatively high levels of serum hGH (high line), and the other had relatively low levels (low line).

1. High line female rats had recurring, pseudopregnancy-like estrous cycles accompanied by increased serum progesterone levels for 2 weeks after ovulation, and they were fertile.
2. In the rats, luteinization occurred spontaneously without cervical stimulation, probably due to high levels of serum hGH, which has prolactin (PRL)-like activity in the rat.
3. Low line female rats had recurring, regular 4-day estrous PRL surge following cervical stimulation were not detected and PRL secretion was not induced by a dopamine antagonist.
4. The ovarian tissue in this line had a much higher number of corpora lutea and grew much heavier than in normal littermates, suggesting impairment of PRL induced structural luteolysis. Suppression of PRL secretion in the low line rats was, at least in part, due to a marked decrease in the number of lactotrophs in the pituitary.

The present study shows that the serum hGH level plays a crucial role in regulating luteal function in female transgenic rats expressing the hGH gene.

(Key words : Transgenic rats, hGH, PRL, mWAP)

\* 축산기술연구소(National Livestock Research Institute)

## I. 서론

최근 여러 종류의 외인성 성장호르몬 유전자가 도입된 형질전환 mice에 관한 다수의 보고가 있는데, 이러한 보고들 중 hGH (Palmiter 등, 1983), rGH (Palmiter 등, 1982), 및 bGH (McGrane 등, 1988)의 유전자를 발현하는 개체들에는 거의 대부분 체성장물이 촉진된다고 하였다. 대부분의 형질 전환된 개체 중 수컷의 경우는 수정능력을 가지고 있지만 (Bartke 등, 1992), 반면 암컷의 경우에는 대체적으로 수태능력을 상실하고 있다고 보고되어지고 있다 (Palmiter 등, 1983; Naar 등, 1991; Bartke 등, 1988). 이러한 원인 중의 하나로서 Bartke 등(1988)은 특히 MT/hGH 유전자의 경우 prolactin의 저수준 분비로 인하여 황체가 제 기능을 하지 못하기 때문인 것으로 보고하고 있다. 그렇지만, 저수준의 hGH은 endogenous prolactin의 방출을 억제하는데는 다소 영향을 미치지 만 임신황체의 기능을 유지하는데는 영향을 미치지 못한다고 보고하고 있다.

본 실험에서는 hGH을 발현하는 high line과 low line의 phenotype을 이용하여 hGH이 prolactin의 제 기능 역할 및 번식 현상에 어느 정도 영향을 미치는지를 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

공시동물로서는 mWAP/hGH 유전자를 도입한 형질전환된 Wistar Immamichi strain (Tsuchiura, Imamichi Institute of Animal Reproduction, Japan) 으로서 9~17주령의 성숙한 두 계통의 female rat 이다. 혈중 hGH 수준이 상대적으로 낮은 low line female의 경우 인위적으로 분만을 유도할 수 있는지 50~65일령된 성숙한 정상적인 수컷으로부터 분리하여 낸 뇌하수체전엽 조직을 신장의 피막내에 이식하였다. 그리고 이러한 개체들에 자궁경관을 자극시킴으로써 위임신과 같은 발정주기를 나타나는 것을 확인한 후 발정전기 당일 정상적인 수컷과 합사시킴으로써 임신 유지 및 분만 여부를 관찰하였다. 동일령의 low line 및 정상적인 암컷 4마리씩 오전 10:00시에 dop-

amin 항원인 metoclopramide (Wako Chemicals, Tokyo)을 각각 3mg/5ml/kg를 투여한 후, 혈액 채취는 투여 전후 30분, 60분에 무마취상태에서 꼬리로부터 채취하였으며, 이로부터 2주 후 난소의 형태적 관찰을 실시하였다.

### 2. 혈액채취 및 호르몬 측정

Progesterone 측정을 위하여 2주 동안 무마취 상태에서 꼬리로부터 매일 오전 10:00시에 혈액을 채취하였고, 항혈청 progesterone은 Matsuyama 등(1990)의 방법에 따랐다. Prolactin 분석은 발정전기일 05:00시에 인위적으로 자궁경관을 자극하여 당일 17:00시에 도살하여 혈액을 채취하였다. 혈청 prolactin 농도는 NIDDK HDP (Hormone Distribution Program, USA) Kit를 사용하여 2차 항체를 이용한 RIA법에 의하여 측정하였다. Endogenous rPRL 측정은 NIDDK-rPRL-RP3를 사용하였고, standard는 0.5~64 ng/ml로서, 64 ng/ml 이상인 sample은 2.5~10배 희석하여 사용하였다.

### 3. 뇌하수체 PRL-positive cells의 조직면역학적 검토

High line, low line 및 비형질전환 개체의 산자들 중 각각 5마리씩 뇌하수체를 채취하여 10%의 중성포르말린에 고정시킨 후 알코올에 탈수시켜 파라핀으로 고정하여 6  $\mu$ m의 두께로 절편하였다. PRL 면역활성화된 cell수, 크기, 비율 그리고 전엽의 부피 측정은 Sasaki 등(1994)의 방법에 준하였다. 1) 형질전환 및 비형질전환 개체로부터 분리한 전엽, 중엽, 후엽의 절편들은 rPRL의 항혈청으로 염색 고정한 후, 2) 현미경용 슬라이드상의 조직절편은 ethanol에서 sodium ethoxide로 Epon을 제거하였다. 3) 4% 과산화수소에 침적시켜 osmium을 제거하였다. 4) PBS(Ca<sup>2+</sup> free)로 세척한 후 30분 동안 항혈청으로 처리하였고, peroxide-goat, anti-rabbit 면역글로빈G 혈청 (Sy-med Laboratories, Inc., San Francisco, CA)과 함께 배양하였다. 5) 슬라이드는 0.005% 과산화수소를 함유하고 있는 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 용액과 함께 30분 동안 배양한 후 광학현미경 하에서 관찰하였다. 6) 배양이 끝난 슬라이드는 조직형태학적으로 분석하기 위하여 image 분석

기(Cosmozone-S, Nikon, Japan) 상에서 측정하였고, 면역활성을 가진 positive 세포핵의 수치는 뇌하수체 전체 cell수에 대한 비율로서 계산하였다.

#### 4. 통계처리

전 실험과정의 Data 통계처리는 t-test의 ANOVA 방법으로, 유의수준  $P < 0.05$  및  $P < 0.01$ 로 검증하였다.

### III. 결과 및 고찰

공시된 rat는 혈중 고탄hGH( $468.3 \pm 153.5$  ng/ml) 과 저hGH ( $21.37 \pm 1.15$  ng/ml) 분비 수준을 나타내는 형질전환 개체로 혈중 progesterone 농도는 Fig. 1에서 나타낸 바와 같으며 high line의 경우 발정주기가 연장되어지는 현상이 나타났지만 low line은 4

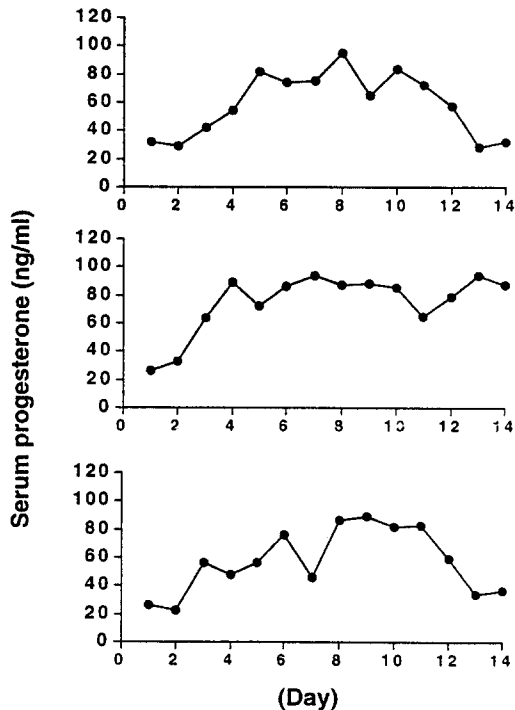
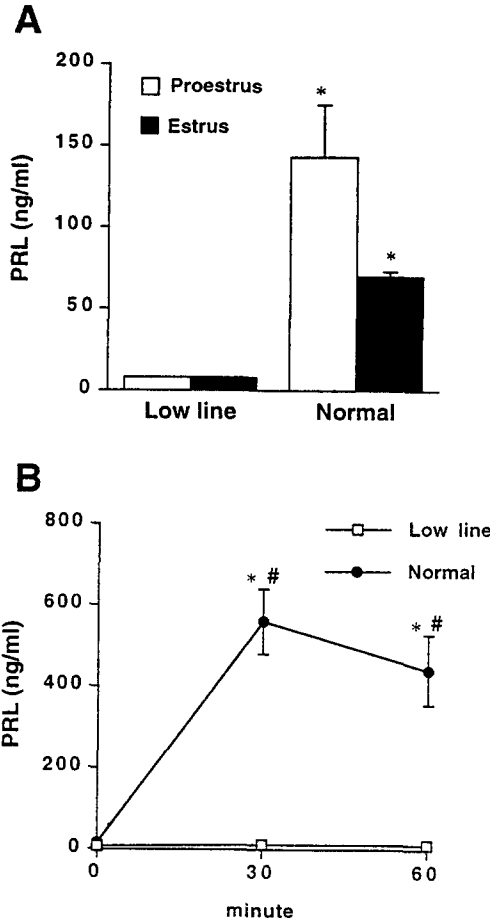


Fig. 1. Representative serum progesterone changes in High line female transgenic rats. Day 0 is defined as the days of ovulation as predicted by vaginal smear

일의 정상적인 발정주기를 나타내었음에도 불구하고 불임현상을 나타내었다. 이러한 개체들에 있어서 교미는 물론 자궁경관 자극에 의한 위임신도 유도되지 않았다. 인위적인 경관 자극을 받은 proestrous 오후 및 estrous 당일 오전 정상적인 개체에서 나타나는 PRL surge 현상을 관찰할 수 없었다. 정상적인 개체에 dopamin 항원인 metoclopramide를 투여하면 반드시 아주 높은 PRL surge가 나타났지만 low line은 이러한 처치를 실시함에도 전혀 나타나지 않았다(Fig. 2). 이들 개체들의 난소무게를 살펴본 결과 low line( $160.3 \pm 18.3$  mg), high line( $45.2 \pm 11.2$  mg) 및 정상적인 개체( $38.7 \pm 2.25$  mg) 순으로 나타났고 Fig. 3에서 보는 바와 같이 low line에서 아주 많은 황체가 관찰되었다. 또 다른 반면, 뇌하수체를 이식받은 low line 4마리 중 3마리가 위임신과 같은 상태의 발정주기를 보여, 발정기에 교배 시킨 결과  $9.0 \pm 1.5$ 의 산자를 얻을 수 있었다.

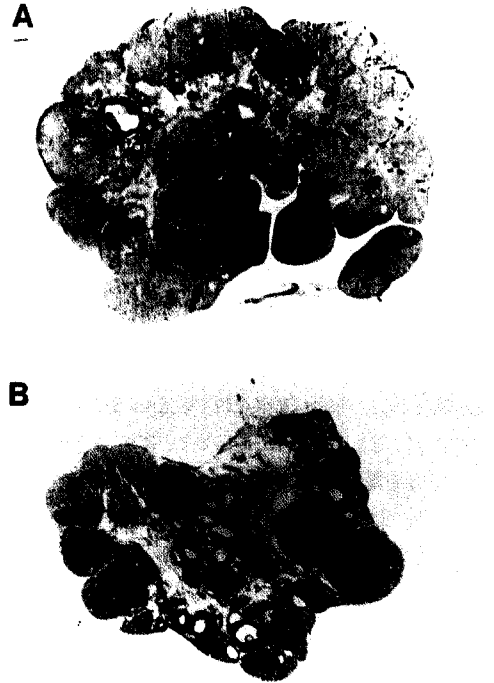
뇌하수체에 있어서 anti-PRL의 조직면역학적 관찰로서는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 prolactin을 분비하는 PRL positive cell수는 양계통(high 및 low line) 모두 감소하는 현상으로 나타났다. prolactin 면역반응으로 전체적인 positive수 및 비율에 관해서는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 양계통 모두 정상적인 개체와 비교해 볼 때 각각 25%, 33%로서 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았고, 수치로 환산한 비는 유의적( $P < 0.01$ )으로 감소하는 현상으로 나타났다.

High line의 경우 혈중 progesterone 농도의 증가 때문인지 발정주기가 다소 연장되어지는 현상을 나타내었는데, 이러한 결과는 bGH을 도입한 형질전환된 개체의 경우 황체형성 및 유지에 전혀 영향을 미치지 않는다고 보고(Cecim 등, 1995)한 결과와는 대조적이었다. 형질전환된 mice의 경우 bGH이 단지 GH에 대해서만 activity를 가지고 있을 뿐 PRL에 대해서는 영향을 미치지 않는다고 하였다. 그리고 성장호르몬의 수용체를 통하여 황체기능을 자극을 할 수 없는 것으로 보고하고 있으며, 반면 hGH를 발현하는 형질전환 rat의 경우 hGH은 prolactin 수용체 뿐만 아니라 endogenous GH의 수용체에도 영향을 미치는 것으로 보고하고 있다(Posner 등, 1974). 비록, hGH에 대한 endogenous GH에 대한 기능적 역할을 무시할 수는 없지만, 고탄hGH 분비 rat에 있어서 황체기능의 자극



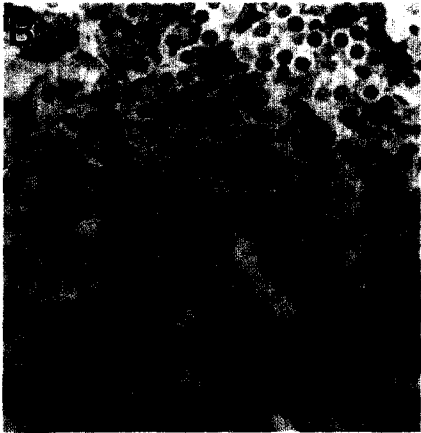
**Fig. 2.** (A) PRL levels in Low line transgenic rats and normal littermates at 1700h on proestrous day and at 0500h on estrous day. Cervical stimulation was given at 1800h on proestrous day. Each column represents the mean  $\pm$  SE (Low line, n=4; Normal, n=4). \* different from the transgenic rats ( $p < 0.05$ ). (B) PRL responses to metoclopramide in the Low line transgenic rats (n=4). #, different from their respective 0 min controls ( $p < 0.01$ ). \*, different from the transgenic rats ( $p < 0.01$ )

은 hGH가 rPRL 수용체에 결합되어 이런 현상을 가져올 수 있다고 보고(Posner 등, 1974)한 내용과 유



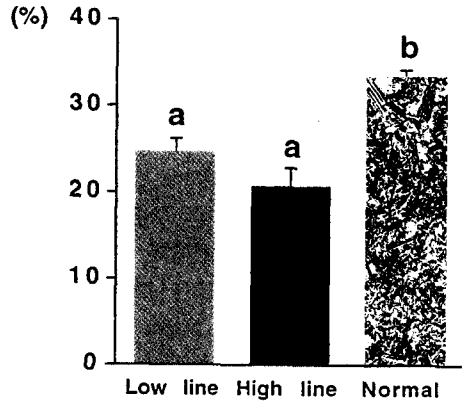
**Fig. 3.** Histology of the ovary in the Low line transgenic rat (a) and normal littermate (b). Note the heavily accumulated corpora lutea in the ovary of the transgenic rat ( $\times 13$ )

사하였다. 이와 같은 현상은 이식된 뇌하수체에 분비된 prolactin의 영향으로 배란이 일어난 뒤 자연적 황체 형성을 보이는데, 뇌하수체를 이식받은 rat에서 볼 수 있는 현상과 유사하다고 하였다(de Greef 등, 1978). High line과는 대조적으로 low line 에 있어서는 4일의 정상적인 발정주기를 보였지만 수태는 이루어지지 않았고, 자연요미나 인위적인 경관자극에도 위임신은 이루어지지 않았다. 이러한 결과에 대해서는 두 가지 요인으로 나누어 살펴볼 수 있는데, 첫째는 low line의 경우 혈중 hGH 수준이 배란 후 황체기능 형성에 직접적 요인이 될 수 없었다는 점과, 둘째 요인으로서 PRL surge 일어나지 않기 때문인 것으로 사료된다. 왜냐하면, 이러한 개체들에 있어 수컷의 뇌하수체를 신장의 피막하에 이식하였을때 PRL이 분비되

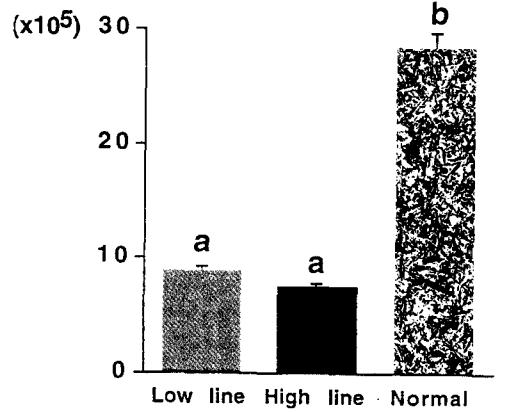


**Fig. 4.** Pituitary cells immunoreactive with antisera to PRL in control (A), High line (B) and Low line (C) female rats. Nuclei are stained with hematoxylin. Immunoreactive cells were stained brown ( $\times 750$ )

**Percentage**



**Number**



**Fig. 5.** Percentages and numbers of PRL positive cells in pituitary tissue. Each column represents the mean  $\pm$  SE (Low line, n=5; High line, n=5; Normal, n=5). Values with different superscripts are significantly different each other ( $p < 0.05$ )

있고, 또한 임신의 유지는 물론 정상개체와 동등한 위 임신이 유도되었다. 이러한 결과로서 PRL surge 출현은 물론 이전의 혈중 hGH에 의해 기능이 억제되었던 황체의 기능이 회복되었다. 인위적 자궁경관 자극을 받은 low line은 proestrous 오전 및 estrous 오후에 자연발생적으로 출현되어야 할 PRL surge는 일어나지 않았다. 그리고 dopamin 수용체 항원 metoclopramide 투여하였음에도 이런 현상은 전혀 기대할 수

없었다. 결국 저 hGH 분비 rat에 있어서 PRL surge가 불임의 원인이라고 사료되어진다. 또한 이러한 계통에 있어 비정상적인 난소 무게증가는 아마도 여러 번의 축적된 PRL surge의 미출현 현상으로서, 구조적 황체 퇴행의 유도실패가 주요 원인이라고 보고(Wuttke 등, 1971)한 내용과 거의 일치하고 있다. 그러나 고 hGH rat의 경우에 있어서는 대조구와 유사한 난소의 무게 증가를 보였는데 이는 혈중 hGH 수준에 의하여 구조적 황체 퇴행을 유도한 것으로 사료된다.

뇌하수체 전엽에 대한 조직면역학적인 검토로서는 양계통 lactotrops와 somatotrops cell수가 유의적으로 감소하여( $P < 0.05$ ) 있었는데, 이러한 원인이 PRL surge의 주요한 실패 요인으로 생각된다. Lactotrops의 정상적인 분화과정은 exogenous hGH의 도입 유전자로 인하여 불규칙한 endogenous rGH 과 rPRL 영향에 의한 것으로 사료되어지며, 본 연구에서 나타난 결과는 hGH을 도입한 형질전환된 mice에서도 유사한 다수의 보고가 있다(Bartke 등, 1988; Milton 등, 1992). 한편, MT/hGH을 발현하는 형질전환 mice의 혈중 hGH의 수준은 PEPCK/hGH 유전자를 발현하는 형질전환 mice에 비하여 혈중 hGH수준이 대단히 높고 임신도 가능하다고 한 보고(Milton 등, 1992)가 있는데, 이러한 보고들과 본 연구 결과를 비교하면 혈중 hGH의 높고 낮음에 대한 황체기능의 반응은 mice와 rat간에 유사한 점이 많은 것으로 사료된다.

#### IV. 적 요

mWAP/hGH를 발현하는 성숙된 형질전환 암컷의 경우 만성적인 hGH분비가 생식기관내 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에서는 두 계통의 형질전환 rat을 이용하였다. 이들 중 혈중 hGH농도가 높은 High line과 혈중농도가 낮은 Low line 계통이다.

1. High line 암컷은 위임실패된 경우와 비슷한 양상으로 혈중  $P_4$  농도가 증가하여 장주기(12~14일)형의 발정주기였으나, 수태는 가능하였다.
2. 또한 High line의 경우 혈중 고 hGH 분비는 PRL과 유사한 작용을 하는 것으로 인위적인 경관 자극없이도 황체 퇴행을 유도하였다.
3. 반면, Low line의 경우 PRL surge 현상은 전혀

관찰할 수 없었고, 또한 dopamin 항원인 metoclopramide 투여에도 불구하고 PRL surge는 전혀 유기되지 않았다.

4. Low line의 경우 황체가 정상적인 개체에 비하여 비대하였고 또한 그 수도 많이 존재하였다. 이러한 원인은 황체 퇴행을 유도하는 PRL의 기능의 손실에 의한 것으로서, 뇌하수체에서 lactotrophs의 수가 현저히 감소했기 때문인 것으로서 hGH를 발현하는 형질전환 암컷의 경우 혈중 hGH농도는 황체기능조절에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

#### V. 인용문헌

1. 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.
2. Bartke, A., E. M. Naar, L. Johnson, M. R. May, M. Cecim, J. S. Yun and T. E. Wanger. 1992. Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm production and male reproductive performance in four line of transgenic mice. *J. Repr. & Fert.*, 95(1):109-118.
3. Cecim, M., J. Kerr and A. Bartke. 1995. Infertility in transgenic mice over expressing the bovine growth hormone gene : Luteal failure secondary to prolactin deficiency. *Biol. Reprod.*, 52:1162-1166.
4. De Greef, W. J. and G. H. Zeilmaker. 1978. Regulation prolactin secretion during the luteal phase in the rat. *Endocrinology*, 102: 1190-1198.
5. McGrane, M. M., J. Devente, J. Yun, J. Bloom, E. Park, A. Wynshaw-Boris, T. Wagner, F. M. Rottman and R. W. Hanson. 1988. Tissue specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruv-

- ate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, 263: 11443-11451.
6. Milton, S., M. Cecim, Y. S. Li, J. S. Yun, T. E. Wanger and A. Bartke. 1992. Transgenic female mice with high human growth hormone levels are fertile and capable of normal lactation without having been pregnant. *Endocrinology*, 131:536-538.
  7. Naar, E. M., A. Bartke, S. S. Majumdar, F. C. Buonomo, Y. S. Yun and T. E. Wagner. 1991. Fertility of transgenic female mice expressing bovine growth hormone or human growth hormone variant genes. *Biol. Reprod.*, 45:178-187.
  8. Palmiter, R. D., G. Norstedt, R. E. Gelinas, R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1983. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222:809-814.
  9. 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.
  10. 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 adenohypophysial cells. *Anat. Rec.*, 240:255-260.
  11. Wuttke, W. and J. Meites. 1971. Luteolytic role of prolactin during estrous cycle of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137:988-991.
  12. Yamauchi, J., J. Takahara and T. Ofuji. 1977. Effect of metoclopramide on rat prolactin secretion *in vivo*. *Life Sci.*, 20:1581-1583.  
(접수일자 : 1998. 4. 30. / 채택일자 : 1998. 6. 10.)