

## 인간의 자궁에서의 Luteinizing Hormone (LH) 유전자 발현

이화여자대학교 의과대학 의학과 및 의과학연구소 분자생물학부,  
상명대학교 생물학과\*

김 성 레 · 이 성 호\*

### Expression of Luteinizing Hormone(LH) Gene in Human Uterus

Sung Rye Kim and Sung Ho Lee\*

*Department of Medicine and Division of Molecular Biology, Ewha Medical  
Research Center, College of Medicine, Ewha Womans University,  
Department of Biology, Sangmyung University\**

**Objectives:** Recent studies, including our own, demonstrated that the novel expression of LH gene in rat gonads and uterus, indicating that the local production and action of the LH-like molecule. In the present study, we investigated whether human uterus also expresses the LH gene.

**Design:** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplified the cDNA fragments coding LH $\beta$  polypeptide from human endometrium but not from myometrium. Presence of the transcripts for the  $\alpha$ -subunit in human endometrium was also confirmed by RT-PCR.

**Results:** Transcripts for LH $\beta$  subunit were detected in endometrial samples from women with endometriosis. The gene for LH/hCG receptor was expressed in both endometrium and myometrium, showing good agreement with previous studies. Increased level of LH $\beta$  transcript was determined in the endometrium from follicular phase compared to that from luteal phase.

**Conclusion:** Taken together, our findings demonstrated that 1) the genes for LH subunits and LH/hCG receptor are expressed in human uterus, 2) the uterine LH expression was changed during menstrual cycle, suggesting that the uterine LH may play a local role in the control of uterine physiology and function(s).

**Key Words:** LH and its receptor, Gene expression, Human uterus, Local regulator

포유류 뇌하수체 전엽에서의 follicle stimulating hormone (FSH)과 luteinizing hormone (LH)의 합성·분비는 시상하부로부터의 gonadotropin-releasing hormone (GnRH)에 의해 조절되며, 이들 생식소 자극호르몬은 생식소에 작용하여 성 스테로이드의 합성·분비와 생식세포 및 체세포의 분열과 분화 등 생식 현상 전반에 걸쳐 다양한 기능을 나타낸다. LH와 FSH는 thyroid stimulating hormone (TSH)과 chorionic gonadotropin (CG)과 더불어

glycoprotein hormone family에 속한다.<sup>1</sup> 이들 호르몬은 공통적으로 단일한  $\alpha$ -subunit 유전자 산물과 각기 독특한  $\beta$ -subunit 유전자 산물이 결합한 heterodimer로 작용하여 생리활성의 차이를 나타낸다.<sup>2</sup> 인간의 경우 LH와 분자구조와 기능이 대단히 유사하며 수용체를 공유하는 것으로 알려진 human Chorionic Gonadotropin (hCG)이 태반에서 발현함은 뇌하수체 이외의 조직에서도 LH 또는 LH-like molecule이 합성·분비될 가능성을 의미

한다. 실제로 최근 뇌하수체 외에 흰쥐의 생식소, 자궁 그리고 부정소에서도 LH 유전자가 발현됨이 보고되었다.<sup>3~6</sup> 인간을 비롯한 일부 포유류의 자궁에 LH/hCG 수용체가 존재한다는 증거들이 축적되어 왔으므로,<sup>7,8</sup> 자궁에서 LH가 발현할 경우 국부적으로 합성되어 수용체에 직접 작용하는 LH 또는 CG의 국부 조절기작이 존재함을 추정할 수 있다. 그런데 인간의 자궁에서 LH가 발현된다는 증거는 현재까지 제시된 바 없으며, LH/hCG 수용체의 경우에도 조직특이적 발현에 관한 논란이 계속되는 상황이다.<sup>9,10</sup> 본 연구자들은 LH 유전자가 인간의 자궁에서도 발현되는가를 조사하기 위하여 자궁내막(endometrium)과 자궁근막(myometrium) 조직에서 RNA를 추출하여 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 시행하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상과 조직의 채취

자궁내막과 근막층 자궁내막에 병변이 있거나 악성종양이 아닌 이유로 전자궁 적출술을 시행받거나 골반경 수술을 시행 받은 환자들에서 추출하였다. 환자들의 나이는 24~42세였으며, 정상 월경 주기를 보인 환자 가운데 월경중 또는 수술 전 호르몬제 치료를 받은 환자는 제외되었다. 자궁조직을 채취한 직후 혈액을 제거하기 위하여 Phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 즉시 즉시 RNA를 추출하였다.

### 2. RNA와 DNA의 분석

#### (1) Total RNA 추출

자궁조직에서의 total RNA 추출은 Trizol 용액(GIBCO-BRL)을 사용하여 공급자의 방법에 따라 시행하였다.<sup>11</sup> 최종적으로 RNA pellet은 75% ethanol에 1회 씻어주고 공기중에 건조시킨 후 0.1% DEPC-water에 녹인 뒤 UV spectrophotometer로 A<sub>260</sub>: A<sub>280</sub>를 측정하여 정량하였다.

#### (2) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

추출한 RNA와 reverse transcriptase (SuperScript RT RNase H<sup>-</sup>; GIBCO-BRL)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR에서는 가급적 다른 exon 부분에 해당되는 20 base pair (bp) 크기의 5'과 3' primer 들을 제작하였고 (한국 바이오니아), 앞서 합성한

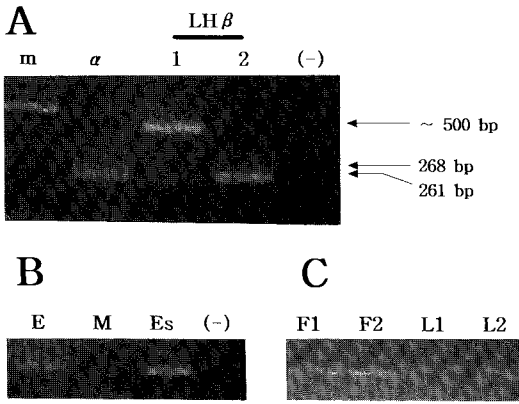
cDNA와 Taq DNA polymerase (Takara)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 각 PCR 반응 조건은 최초 94℃에서 2분간 denaturation을 1회 시행후 denaturation (94℃, 30초), annealing (54℃, 30초), elongation (72℃, 1분) 과정을 35회 반복 실시한 후 최종적으로 1회 extension (72℃, 10분)을 시행하였다. 최초의 PCR로 충분한 증폭이 일어나지 않을 경우 touchdown 방식, 즉 annealing 온도를 primer의 T<sub>m</sub> + 2℃부터 시작하여 1회 실시하고 이후의 cycle에서 차례로 0.3℃ 하강시켜 최종 40 cycle을 실시하였다. 반응산물의 크기는 전기영동 (2% agarose gel)후 ethidium bromide 용액으로 염색·확인하였다. 인간의 LH<sub>β</sub> subunit PCR에 사용한 primer의 염기서열은 exon 2에 위치하는 5'-AGC-CGCTTCGGCCATGGTGC-3' (sense)와 exon 3에 위치하는 5'-GTCCACACGACAGCTGAGA-3' (antisense)였으며,<sup>12</sup> α-subunit PCR에 사용된 primer는 5'-GCTCCTGATGTGCAGGATTG-3' (sense)와 5'-ACAAGTACTGCAGTGGCACC-3' (antisense)였다.<sup>13</sup> 인간의 LH/hCG 수용체 PCR에 사용된 primer는 5'-ATGCACAGTGGAGCCTTCC-3' (sense)와 5'-CTCCAGTGAAGTCAGTGTGC-3' (antisense)였다.<sup>14</sup>

#### (3) PCR 산물의 DNA sequencing

RT-PCR로 cDNA 산물이 정확히 증폭되었는가를 확인하기 위해서 반응산물을 전기영동으로 DNA extraction kit (Quigen) 분리한 후 dideoxy chain termination-PCR 방법을 기초로 제작된 PCR sequencing kit (한국 바이오니아)로 염기서열을 결정하고 이를 이미 보고된 유전자 염기서열과 비교·확인하였다.

## 결 과

인간의 LH subunit RT-PCR을 시행한 결과 자궁내막에서 추출한 RNA로부터 예상대로 261 bp의 α-subunit과 268 bp의 β-subunit cDNA fragment가 증폭되었다 (Figure 1A). LH<sub>β</sub> subunit의 경우에 보이는 약 500 bp의 band는 RNA 추출과정에서 오염된 genomic DNA로부터 증폭된 것이며 RNA 추출을 1회 더 시행한 시료에서는 나타나지 않았다. 또 PCR로 얻은 cDNA 산물들은 PCR-sequencing 방법으로 염기서열을 조사하여 각각 알려진 α와 β-subunit의 염기서열과 일치함을 확인하였다 (data not shown). 자궁내막, 자궁근막, 그리고 자궁내막중 환자로부터의 자궁내막 시료를 사용

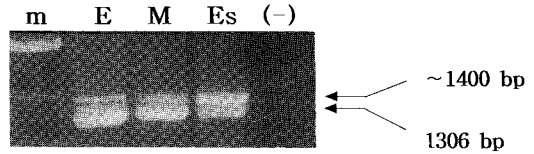


**Figure 1.** Detection of the transcripts for LH subunits in human endometrium. **A**; PCRs for amplification of  $\alpha$ -subunit and LH $\beta$  cDNA. m, DNA size marker, 1, RT using single extracted RNA sample; 2, RT using double extracted RNA; (-), negative control. **B & C**: human LH $\beta$  PCR. m, DNA size marker; E, endometrium; M, myometrium; Es, endometriosis; F1 and F2, samples form follicular phase; L1 and L2, samples from luteal phase;

한 LH $\beta$  PCR에서 자궁근막 시료에서는 증폭이 일어나지 않았다 (Figure 1B). 한편 월경 주기에 따른 자궁내막 시료에서의 LH $\beta$  PCR에서는 luteal phase에서 보다 follicular phase에서 더 높은 발현이 나타났다 (Figure 1C). 인간의 LH/hCG 수용체 PCR에서는 세 시료 모두에서 1306 bp의 cDNA 산물이 증폭되었다 (Figure 2).

## 고찰

최근 인간과 설치류에서 정상인 자궁에서도 GnRH 유전자가 발현한다는 보고들과 흰쥐의 자궁에서 LH 유전자가 발현된다는 보고를 바탕으로,<sup>6,15,16</sup> 본 연구자들은 인간의 자궁에서도 LH 유전자가 발현할 가능성을 조사하였으며, 그 결과로 인간의 자궁, 특히 내막조직에서 LH 유전자가 발현됨을 보였다. 인간의 경우 뇌하수체 이외의 조직에서의 LH 유전자 발현에 관한 연구는 현재까지 보고된 바 없으나, LH의 agonist인 hCG에 대해서는 비교적 소상히 연구되어 있다. 영장류를 대상으로 하는 연구들에서, 포배로부터 합성되는 CG에 의해 착상을 위한 자궁내막의 증식 등의 반응이 유도되며, 이후 태반으로부터의 CG에 의해 corpus luteum의 유지와 프로제스테론 분비가 자극된다.<sup>17</sup> 한편 인간의 자궁내막과 근막에 LH/



**Figure 2.** Amplification of LH/hCG receptor cDNA by RT-PCR using human uterine RNAs. m, DNA size marker; E, endometrium; M, myometrium; Es, endometriosis; (-), negative control.

수용체가 존재한다는 보고들이 있으나,<sup>7</sup> 수용체의 발현에 관해서는 논란이 계속되고 있다. 적어도 인간의 자궁형 LH/hCG 수용체는 자궁 특이적인 전사 조절기작의 존재에 의해 cDNA 서열이 생식소형과 다소 차이가 있음이 보고되었다.<sup>9</sup> <sup>18</sup> 본 연구에서의 결과는 인간의 자궁에서도 LH/hCG 수용체가 발현한다는 보고와 일치하며 alternative splicing에 의한 isoform이 존재할 가능성을 시사한다.

인간의 자궁은 내막과 근막으로 대별되며, 자궁내막 조직은 내강 상피세포, 선상피세포, 기질세포 등으로 이루어져 있다. 자궁내막 세포들은 주로 난소로부터 주기적으로 분비되는 스테로이드 호르몬들에 의해 세포 증식과 사멸 그리고 체반 생리 기능들이 조절되며, 이에 따라 생리기, 증식기, 배란기, 분비기로 나누어 지는 자궁주기를 보이게 된다. 최근의 연구 결과들은 이러한 자궁주기의 조절에 성 스테로이드 외에도 성장인자들 (growth factors)과 cytokine 등의 국부적인 여러 인자들이 관여함을 보여주고 있다.<sup>19</sup> GnRH와 더불어 LH가 생식소에서 세포자연사 (apoptosis)의 조절에 영향을 미치는 것으로 보아 인간의 자궁에서 발현되는 LH 역시 자궁내막에서의 세포자연사와 세포주기의 조절에 관여하리라 예상된다.<sup>20,21</sup> 주기중 Follicular phase와 luteal phase의 자궁내막에서 상이한 LH 발현 양상을 보인 본 연구의 결과는 생리 주기에 따라 아마도 난소로부터의 스테로이드에 의해 자궁에서의 LH의 발현이 조절됨을 시사하는 것이다. 자궁내막증은 생식 연령인 여성의 10~15%에서 발생하는 질환으로 현재까지 발생 원인과 기작 그리고 치료에 대한 연구가 확립되지 않은 상태이다. 본 연구에서 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 LH와 그 수용체가 발현됨을 보였는데, 이러한 시도가 자궁내막증의 치료와 관련된 기존의 GnRH analog 처리와 같은 호르몬 요법의 이론적인 근거와 개선에 활용될

수 있기를 기대한다. 자궁 LH의 국부적인 기능에 대한 연구는 자궁의 생리와 기능의 조절에 대한 이해를 증진시키는데 도움이 될 것이다. 그러므로 자궁내 LH/hCG 수용체에 작용하는 자궁형 LH와 뇌하수체형 LH 또는 hCG에 의한 조절의 공통점이나 차별성에 대한 연구는 흥미로운 주제가 될 것이며, 이를 위해 자궁형 LH에 대한 분자적인 분석이 선행되어야 할 것으로 사료된다. 이상의 결론으로 본 연구는 인간의 자궁에서 LH가 국부적으로 합성되어 자궁의 생리와 기능을 조절할 가능성을 시사하는 것이다.

### 참 고 문 헌

1. Albanese C, Colin IM, Crowley WF, Ito M, Oestell RG, Weiss J, Jameson JL. The gonadotropin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51: 23-58.
2. Ryan RJ, Chalesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Keutmann HT. The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. *FASEB J* 1988; 2: 2661-9.
3. Zhang FP, Markkula M, Toppari J, Huhtaniemi I. Novel expression of luteinizing hormone subunit genes in the rat testis. *Endocrinology* 1995; 136: 2904-12.
4. Zhang FP, Rannikko A, Huhtaniemi I. Isolation and characterization of testis-specific cDNAs for luteinizing hormone  $\beta$ -subunit in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 858-65.
5. Lee SH. Expression of luteinizing hormone (LH) subunit genes in the rat ovary. *Kor J Fertil Steril* 1998; 25: 199-205.
6. Lee SH, Lee YK. Expression of luteinizing hormone (LH) gene in rat uterus and epididymis. *Kor J Fertil Steril* 1999; 26: 157-61.
7. Ziecik AJ, Derecka-Reszka K, Rzczudlo SJ. Extragonadal gonadotropin receptors, their distribution and function. *J Physiol Pharmacol* 1992; 43(Suppl 1): 33-49.
8. Lin J, Lei ZM, Lojun S, Rao CV, Satyaswaroop PG, Day TG. Increased expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene in human endometrial carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1483-91.
9. Stewart EA, Sahakian M, Rhoades A, Van Voorhis BJ, Nowak RA. Messenger ribonucleic acid for the gonadal luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor is not present in human endometrium. *Fertil Steril* 1999; 71: 368-72.
10. Rao CV. No mRNAs for the LH/hCG receptor in human endometrium? *Fertil Steril* 1999; 72: 374-5.
11. Chomzynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
12. Talmadge K, Vamvakopoulos NC, Fiddes JC. Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature* 1984; 307: 37-40.
13. Fiddes JC, Goodman HM. Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1979; 281: 351-6.
14. Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, Igarashi M. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1049-54.
15. Dong KW, Marcelin K, Hsu MI, Chiang CM, Hoffman G, Roberts JL. Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene in human uterine endometrial tissue. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 893-8.
16. Ikeda M, Taga M, Sakakibara H, Minaguchi H, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Gene expression of gonadotropin-releasing hormone in early pregnant rat and steroid hormone exposed mouse uteri. *J Endocrinol Invest* 1996; 19: 708-13.
17. Ojeda SR. Female reproductive function. In: Griffin JE, Ojeda SR. editor. *Textbook of endocrinology*. 3rd ed. UK: Oxford University Press; 1995. p. 164-200.
18. Tsai-Morris CH, Geng Y, Buczko E, Dufau ML. A novel human luteinizing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 288-

- 91.
19. Simmen FA, Simmen RCM. Peptide growth factors and proto-oncogenes in mammalian conceptus development. *Biol Reprod* 1991; 44: 1-5.
20. Billig H, Furuta I, Hsueh AJW. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in rat ovary : Biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 1994; 134: 245-52.
21. Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJW. Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995; 136: 5-12.
-