

발정 주기중 흰쥐 자궁에서의 Luteinizing Hormone (LH)과 수용체 유전자 발현

이화여자대학교 의과대학 의학과 및 의과학연구소 분자생물학부, 상명대학교 생물학과*

김 성 레 · 이 성 호*

Expression of Luteinizing Hormone (LH) and Its Receptor Gene in Uterus from Cycling Rats

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**

Objective: There is increasing evidence for the expression of rat LH gene in several extrapituitary sites including testis and ovary. We also have demonstrated that the local LH expression in the rat epididymis and uterus, the major accessory sex organs in male and female reproductive system, respectively.

Design: The present study was undertaken to elucidate whether the gene for LH receptor is expressed in rat uterus and whether the expressions of uterine LH and its receptor are differentially regulated during estrous cycle. Presence of the transcripts for rat LH receptor in the rat uterine tissue were confirmed by touchdown reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: In LH β semi-quantitative RT-PCR, the highest expression level was shown in estrus stage. The level of LH receptor transcripts was also fluctuated during estrous cycle. In ovariectomized rats (OVX + Oil), the expressions of both uterine LH and LH-R were markedly reduced when compared to those from normal rats. Supplement with estradiol 17 β to the ovariectomized rats (OVX + E₂) restored the expression levels of LH and its receptor to the levels in uteri from normal rats.

Conclusion: Our findings indicated that 1) LH and its receptor gene are expressed in the rat uterus from cycling rats, 2) the expression of uterine LH and its receptor is mainly, if not all, under the control of ovarian sex steroid(s). These results suggested that the uterine LH may act as a local regulator with auto and/or paracrine manner, though the possibility that the pituitary LH may act directly on the regulation of uterine functions could not be discarded.

Key Words: LH and its receptor, Gene expression, Rat uterus, Reproductive cycle

포유류의 자궁은 사춘기 이후 가임 기간 동안 발정 주기에 따라 복잡하고 정교하게 조절되는 생식 호르몬의 영향하에 구조와 생리의 변화가

주기적으로 일어난다.¹ 발정 주기중 자궁 조직의 분화는 궁극적으로 시상하부-뇌하수체-난소의 호르몬 축에 의해 조절되고, 자궁은 난소 호르몬의

*Send Proofs to: 이성호, 서울시 종로구 홍지동 7, (우) 110-743, 상명대학교 생물학과
Tel: (02) 2287-5139, Fax: (02) 396-6133, E-mail: shlee@pine.sangmyung.ac.kr

주된 표적기관으로 이해되어 왔다. 본인 등은 주期中 자궁내막 (endometrium)에서 일어나는 급격한 세포 증식과 세포사는 생식 호르몬 가운데 난소로부터의 에스트로겐과 프로게스테론에 의해 직접적으로 촉발됨을 연구 발표한 바 있다.¹⁻³ 또 이들 성 스테로이드의 합성과 분비는 뇌하수체 전엽에서 분비되는 follicle stimulating hormone (FSH)과 luteinizing hormone (LH)에 의해 조절됨은 주지의 사실이다. 그런데 최근 LH 유전자가 뇌하수체 외에도 흰쥐의 정소와 난소에서 조직특이적으로 발현됨이 보고되었고,⁴⁻⁶ 특히 본 연구자들은 흰쥐 자궁에서의 LH 유전자 발현을 확인한 바 있다.⁷ 이는 뇌하수체 이외의 조직에서도 LH가 합성·분비되어 조직특이적으로 국부적인 조절 기능을 담당할 가능성을 시사하는 것이므로, 자궁의 분화와 생리 기능 조절의 이해를 위해 고전적인 GnRH-gonadotropin-steroid로 이어지는 생식 호르몬 축 개념에 추가로 조직특이적인 LH의 국부 조절 기작에 대한 이해가 요구되고 있다. 본 연구에서는 자궁내 LH의 생식·생리 기능 연구의 첫 단계로서 흰쥐 자궁을 재료로 1) 발정 주기중 LH와 그 수용체의 유전자 발현 양상을 측정하고, 2) 자궁내 LH와 그 수용체 발현을 조절하는 스테로이드 호르몬의 영향을 조사하기 위해 난소절제 (ovaryectomy, OVX) 후 에스트로겐 투여 효과를 조사하였다.

연구 대상 및 방법

1. 실험 동물

상명대 실험 동물 사육장에서 생후 3~5개월된 성숙한 흰쥐 (Sprague-Dawley strain)를 일정한 광주기 (12시간 조명, 12시간 소등)와 먹이와 물의 접근이 자유롭게 (*ad libitum*) 사육하였다. 발정 주기는 매일 오전 7시경 질 상피세포를 채취하여 현미경으로 세포 유형을 판정하였고, 2회의 정상적인 발정 주기를 보인 동물만을 실험에 사용하였다. 난소절제 실험 동물은 ether 마취하에서 난소를 적출한 후 1주일간의 회복기를 거쳐 sesame oil (Sigma) 또는 estradiol-17 β (235 μ g/ml, Sigma)이 들어있는 silastic capsule (Dow-Corning, 길이 12 mm, 내경 1.55 mm, 외경 3.125 mm)를 경부 피하에 이식하였다. 48시간 후 동물을 희생한 직후 조직을 얻어 즉시 RNA를 추출하였다.

2. RNA와 DNA의 분석

1) Total RNA 추출

조직에서의 RNA 추출은 acid phenol-guanidium isothiocyanate-chloroform 방법을 기초로 제작된 Trizol 용액 (GIBCO-BRL)을 사용하여 공급자의 방법에 따라 시행하였다.⁸ 최종 pellet은 75% ethanol에 씻어주고 건조시킨 후 0.1% DEPC-water에 녹인 뒤 UV spectrophotometer로 정량하였다.

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

추출한 RNA와 역전사효소 (SuperScript RT RNase H⁻; GIBCO-BRL)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 흰쥐 뇌하수체와 생식소에서 공통적으로 발현되는 LH 유전자의 exon 부분에 해당되는 각각 20 base pair에 해당하는 5'과 3' primer-용 oligomer들을 제작하고 (한국 바이오니아), 앞서 합성한 cDNA와 Taq DNA polymerase (Takara)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 각 PCR 반응 조건은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 denaturation을 1회 시행 후 denaturation (94 $^{\circ}$ C, 30초), annealing (54 $^{\circ}$ C, 30초), elongation (72 $^{\circ}$ C, 1분) 과정을 35회 반복 실시한 후 최종적으로 1회 extension (72 $^{\circ}$ C, 10분)을 시행하였다. 1회의 PCR로 충분한 증폭이 일어나지 않을 경우 touchdown 방식을 채택하여 annealing 온도를 최초 T_m + 2 $^{\circ}$ C부터 시작하여 1회 실시하고 이후의 cycle에서 차례로 0.3 $^{\circ}$ C 하강시켜 최종 40 cycle을 실시하였다. 반응 산물의 크기는 전기영동 (2% agarose gel) 후 ethidium bromide 용액으로 염색·확인하였다. PCR에 사용한 primer의 염기 서열과 반응 산물의 예상 크기는 Table 1에 기술하였다.^{9,10}

3) PCR 산물의 DNA sequencing

RT-PCR로 cDNA 산물이 정확히 증폭되었는가를 확인하기 위해서 DNA fragment들을 전기영동으로 분리한 후 dideoxy chain termination-PCR 방법을 기초로 제작된 PCR sequencing kit (한국 바이오니아)로 염기서열을 결정하였다.

결 과

성숙한 흰쥐의 자궁내 LH 수용체의 유전자 발현 조사에서 control 조직인 흰쥐의 난소와 정소는 물론 자궁에서 추출한 RNA로부터 공히 LH 수용체 transcript가 RT-PCR에 의해 증폭되었으며,

Table 1. Sequences of the PCR primers used in the present study

ID	Sequences	Product size (bp)	Ref.
LH β I (sense)	GTGCCGGCCTGTCAACGCAAC	306	5
II (antisense)	CAGCTCATTGGTTGAGTCCTG		
LH-R* I (sense)	GACACTCCAATGTGCTCCAG	460	9
II (antisense)	GAGCCATCCTCCGAGCATAA		
L 27 I (sense)	GAACATTGATGATGGCACCTCC	308	10
II (antisense)	ACCATTTGTTCTTCCCTGTCTTG		

The directions of the sequence are all 5' to 3'. LH-R*, LH receptor.

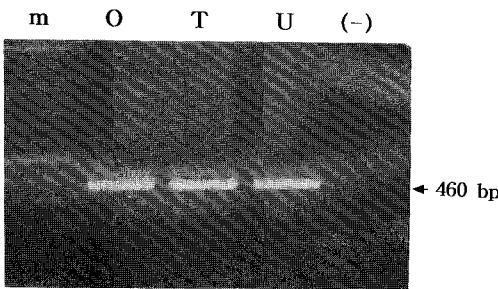


Figure 1. Presence of the transcripts for LH receptor in the rat uterus. PCR and electrophoresis were carried out as described in Materials and Methods. m, DNA size marker; O, ovary; T, testis; U, uterus; (-), negative control.

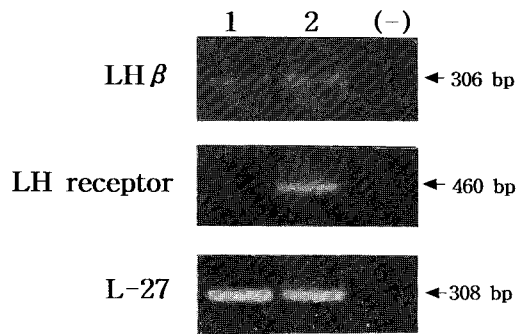


Figure 3. Effects of steroid deprivation and estradiol supplement on the expression of the uterine LH β and LH receptor. 1, OVX + oil group; 2, OVX + E₂ group; (-), negative control.

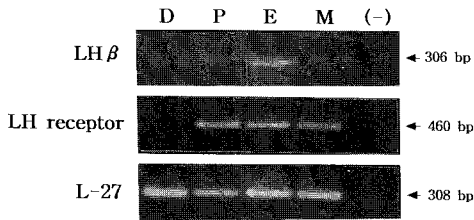


Figure 2. Changes in the level of LH β and LH receptor transcripts in the rat uterus during estrous cycle. D, diestrus; P, proestrus; E, estrus; M, metestrus; (-), negative control.

증폭된 cDNA의 크기는 예측한 바와 같이 460 bp 였다 (Figure 1). 예상된 크기보다 20~30 bp 큰 fragment의 경우 alternative splicing에 의해 형성되는 isoform일 가능성을 배제할 수 없다. 발정 주기중 흰쥐 자궁내 LH 유전자 발현 수준은 estrus stage에서 가장 높고 diestrus stage에서 가장 낮았다 (Figure 2). 한편 주기중 자궁내 LH 수용체 발

현은 proestrus와 estrus stage에서 높게 나타났고, 이후 감소하여 diestrus stage에서는 거의 검출되지 않았다 (Figure 2). PCR로 얻은 cDNA 산물들은 PCR-sequencing 방법으로 염기 서열을 조사한 결과 알려진 염기서열과 일치함을 확인하였고 (data not shown), 사용된 primer는 가능한 경우 각기 다른 exon내 서열을 사용하였으므로 본 연구 결과는 RNA 추출 과정에서 동반될 가능성이 있는 genomic DNA로부터 유래된 것이 아니라 역전사된 cDNA로부터 증폭된 것이다. 자궁내 LH와 LH 수용체 유전자 발현에 미치는 난소의 영향을 조사하기 위해 난소절제 후 오일 (OVX + Oil)을 처리한 결과 LH와 수용체 발현이 공히 급격히 감소하였으며, 에스트로겐 (OVX + E₂) 처리군에서 정상적인 발정 주기중의 발현 수준을 회복함을 관찰하였다 (Figure 3).

고 찰

포유동물 암컷의 생식 현상이 시상하부-뇌하수체-난소를 잇는 호르몬 축에 의해 주로 조절됨은 주지의 사실로서, 시상하부에서 분비되는 gonadotropin-releasing hormone (GnRH)에 의해 뇌하수체 전엽의 follicle stimulating hormone (FSH)과 luteinizing hormone (LH)의 합성·분비가 촉진되고 이들 FSH와 LH에 의해 난소의 다양한 기능이 조절된다. 한편 난소의 생식 주기와 맞물려 자궁에서의 주기적인 구조와 생리의 변화가 일어나는데, 주로 난소로부터의 스테로이드 호르몬 입력에 의해 조절된다고 알려져 왔다.¹ 최근의 연구들에서 자궁내에서 insulin-like growth factor (IGF)와 같은 성장인자들과 cytokine들이 발현되어 스테로이드 호르몬의 영향하에서 또는 상호 작용을 통해 국부적인 조절 기능을 담당함이 보고되었다.¹¹ 따라서 자궁내 세포 증식과 세포사의 기작에 대한 이해는 자궁내 국부적인 인자들에 대한 분석이 필수불가결한 조건이 된다. 본 연구에서 흰쥐의 자궁에서 LH는 물론 그 수용체에 대한 transcript가 존재함을 관찰하였는데, 이는 흰쥐의 경우 자궁내 high affinity, low capacity의 LH/hCG 결합 부위가 존재한다는 기존의 보고를 지지하는 것이다.¹² 또한 국부적으로 합성된 LH는 물론 뇌하수체로부터의 LH도 자궁에 직접 작용할 수 있으므로 자궁이 난소 뿐만 아니라 뇌하수체의 직접적인 표적기관이 될 수 있음을 시사한다. 인간의 자궁에서는 내막층 (endometrium)과 근막층 (myometrium) 모두에서 LH/hCG 수용체가 발현되고 그 cDNA 서열이 생식소에서 발현되는 유형과 다소 차이가 있음이 보고되었는데,¹² 이는 자궁 특이적인 전사개시부위와 alternative splicing 기작의 존재에 기인하는 것으로 추정된다.^{13,14}

가임 기간 동안 자궁내막은 주기적으로 급격한 세포 증식과 세포 사멸 양상을 보이므로 세포분열과 세포자연사의 기작을 연구하는데 좋은 재료가 된다. 이론의 여지없이, 자궁 주기를 조절하는 가장 강력한 요인은 난소로부터의 에스트로겐과 프로게스테론으로서, 이들은 각각 자궁내막 세포의 분열 촉진과 세포사 유도를 야기한다.^{1~3} 본 연구에서는 자궁의 LH와 그 수용체 유전자 발현이 공히 발정 주기중 성적 활성이 고조된 상태인 proestrus 또는 estrus 시기에 높게 나타났는데, 이

는 자궁에서의 LH system이 난소의 스테로이드 호르몬에 의해 조절될 가능성을 시사하는 것이다. 즉 자궁에서의 LH 발현 양상은 난소에서의 스테로이드 합성과 분비가 증가하여 자궁으로의 충분한 입력이 있는 후 증가되는 것으로 보인다. 실제로 본 연구 결과는 자궁의 LH와 수용체 발현이 난소절제 후 성 스테로이드가 제거된 동물 (OVX + Oil)에서 격감하였다가 에스트로겐을 투여한 동물 (OVX + E₂)에서 정상 수준으로 회복하였으므로, 이들 유전자 발현, 특히 수용체의 발현이 에스트로겐 의존적임을 증명하였다.

자궁과 태아로부터 유래되는 태반에서 GnRH는 물론 LH와 분자 구조 및 기능이 대단히 유사한 CG (chorionic gonadotropin)가 발현되고 시상하부-뇌하수체에서의 GnRH-LH circuitry와 유사한 GnRH-CG system이 존재함이 보고되었다.¹⁵ 흰쥐의 자궁에서도 GnRH와 그 수용체가 발현된다는 증거들이 있으므로 자궁내 GnRH-LH 조절 기작이 존재할 가능성이 높은 것으로 추정된다.¹⁶ 지난 20여년간의 연구 결과로 시상하부-뇌하수체 이외의 생식기관에서 발현되는 GnRH 역할에 대해서는 비교적 상세히 알려져 있으나, LH의 경우는 최근에서야 뇌하수체 이외 조직에서의 발현이 확인되었으므로 제한적인 정보만이 가용한 상태이다. 흰쥐 정소에서 발현되는 LH의 경우 정자형성 과정에서 원형 정세포 (round type spermatid)에서 특이적으로 발현하므로 정자완성과정 (spermiogenesis)에서 조절 기능을 나타내리라 추정될 뿐이다.⁴ 더욱이 자궁에서 발현되는 GnRH와 LH의 기능에 대한 정보는 전무한 상태인데, 생식소에서 이들 호르몬이 세포자연사 (apoptosis)의 조절에 영향을 미친다는 보고들로 미루어 보아 자궁내막에서의 세포자연사의 조절에 관여하리라 예상된다.^{17,18}

이상의 결론으로 본 연구에서는 1) 흰쥐 자궁에서 LH 수용체가 발현되고, 2) 발정 주기중 자궁내 LH와 LH 수용체 발현이 LH의 경우 estrus stage에서, LH 수용체의 경우 proestrus와 estrus stage에서 높게 발현되며, 3) 난소절제 후 자궁내 LH와 그 수용체 발현은 급격히 감소하였으나 에스트로겐 처리에 의해 정상 발정 주기 수준으로 회복함을 관찰하였다. 이상의 결과는 흰쥐의 자궁에서 LH와 그 수용체가 국부 조절인자로 작용할 가능성과 발정 주기에 따라 특히 난소로부터의 스테로이드에 의해 주로 발현이 조절됨을 시사하는 결과이다.

참 고 문 헌

1. Ojeda SR, Female reproductive function. In: Griffin JE, Ojeda SR. editor. Textbook of endocrinology. 3rd ed. UK: Oxford University Press; 1995; 164-200.
2. Kim SR. The Effects of ovarian steroid hormones on the alkaline phosphate activity in the luminal epithelium and stromal cells of early pregnancy rat uterus. J Kor Research Institute for better living 1986; 37: 183-93.
3. Kim SR. The Effect of the ovarian steroid hormone on the differentiation of the pseudopregnant rat uterus. Kor J Fertil Steril 1995; 22: 155-61.
4. Zhang FP, Markkula M, Toppari J, Huhtaniemi I. Novel expression of luteinizing hormone subunit genes in the rat testis. Endocrinology 1995; 136: 2904-12.
5. Zhang FP, Rannikko A, Huhtaniemi I. Isolation and characterization of testis-specific cDNAs for luteinizing hormone β -subunit in the rat. Biochem Biophys Res Commun 1995; 210: 858-65.
6. Lee SH. Expression of luteinizing hormone (LH) subunit genes in the rat ovary. Kor J Fertil Steril 1998; 25: 199-205.
7. Lee SH, YK Lee. Expression of luteinizing hormone (LH) gene in rat uterus and epididymis. Kor J Fertil Steril 1999; 26: 157-61.
8. Chomzynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-9.
9. McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Koehler M, Rosembly N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. Lutropin-choriogonadotropin receptor: An unusual member of the G protein-coupled receptor family. Science 1989; 245: 494-9.
10. Tanaka T, Kuwano Y, Ishikawa K, Ogata K. Nucleotide sequence of cloned cDNA specific for rat ribosomal protein L27. Eur J Biochem 1988; 173: 53-6.
11. Simmen FA, Simmen RCM. Peptide growth factors and proto-oncogenes in mammalian conceptus development. Biol Reprod 1991; 44: 1-5.
12. Ziecik AJ, Derecka-Reszka K, Rzucidlo SJ. Extragonadal gonadotropin receptors, their distribution and function. J Physiol Pharmacol 1992; 43 (4 Suppl 1): 33-49.
13. 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.
14. Tsai-Morris CH, Geng Y, Buczko E, Dufau ML. A novel human luteinizing hormone receptor gene. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 288-91.
15. Siler-Khodr TM, Khodr GS, Valenzuela G, Rhode J. Gonadotropin-releasing hormone effects on placental hormones during gestation: I. Alpha-human chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin and human chorionic somatomammotropin. Biol Reprod 1986; 34: 245-54.
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. 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.
18. 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.