

흰쥐 자궁과 부정소에서 Luteinizing Hormone (LH) 유전자 발현

상명대학교 생물학과*, 제주대학교 의과대학 조직학교실

이 성 호* · 이 영 기

Expression of Luteinizing Hormone (LH) Gene in Rat Uterus and Epididymis

Sung Ho Lee* and Youngki Lee

Department of Biology, Sangmyung University, Seoul, Korea*, Department of Histology,
College of Medicine, Cheju National University, Cheju, Korea

= Abstract =

Recent studies clearly demonstrated that the novel expression of LH gene in the rat testis, and suggested the local action of the LH-like molecule. The present study was performed to analyze the expression of LH genes in the rat accessory reproductive organs. Expression of LH subunit genes in the rat uterus and epididymis was demonstrated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and specific LH radioimmunoassay (RIA). The LH β transcripts in these organs contained the published cDNA structure, the pituitary type exons 1-3, which encoded the entire LH β polypeptide. Presence of the transcripts for the α -subunit in the rat reproductive tissues were also confirmed by RT-PCR. In the LH RIA, significant levels of LH were detected in crude extracts from the rat ovary, uterus and epididymis. The competition curves with increasing amount of tissue extracts were parallel with those of standard peptide, indicating that the immunoreactive LH-like materials in these tissues are similar to authentic pituitary LH molecule. In rat epididymis, the highest amount of immunoreactive LH was detected in corpus area. Our findings demonstrated that the genes for LH subunits are expressed in the rat accessory reproductive organs, and suggested that these extrapituitary LH may act as a local regulator with auto and/or paracrine manner.

Key Words: LH, Gene expression, Uterus, Epididymis, Local regulator

서 론

척추동물의 시상하부에서 분비되는 gonadotropin-releasing hormone (GnRH)은 문맥계를 통해 뇌하수체 전엽에 작용하여 gonadotropin, 즉 follicle stimulating hormone (FSH)과 luteinizing hormone (LH)의 합성·분비를 촉진한다. 이들 FSH와 LH

는 생식소의 기능을 조절하는 가장 중요한 내분비 요인으로 알려져 왔는데, 최근 흰쥐의 정소와 난소에서도 LH 유전자가 조직특이적으로 발현됨이 보고되었다 (Zhang *et al.*, 1995a,b; Lee, 1998). 또한 흰쥐 태아에서 뇌하수체에서의 LH 유전자 발현이 시작되기 이전에 정소에서 LH가 합성되어 steroidogenesis에 영향을 미침이 보고되었는데 (El-Ghani *et al.*, 1998), 이는 정소형 LH가 뇌하수

*교신저자: 이성호, 서울특별시 종로구 홍지동 7, 상명대학교 생물학과 (우) 110-743 전화: (02) 2287-5139
팩스: (02) 396-6133, e-mail: shlee@pine.sangmyung.ac.kr

체형과는 다른 조직특이적 발현기작을 통해 생식소 및 부속 생식기관의 분화에 작용할 가능성을 의미한다. 따라서 생식소와 부속 생식기관의 분화와 기능 조절을 정확히 이해하기 위해서는 기존의 시상하부-뇌하수체-생식소를 잇는 호르몬 축의 개념과 더불어 생식소 및 부속 생식기관에서 발현되는 국부적 조절요인들의 기능에 대한 이해가 필수적이라 할 수 있다. 실제로 인간의 경우 LH와 분자 구조 및 기능이 대단히 유사한 human Chorionic Gonadotropin (hCG)이 태반에서 발현되어 progesterone 합성·분비를 조절함은 주지의 사실이며 (Griffin and Ojeda, 1995), 이는 생식소 이외의 조직에서도 LH-like molecule이 합성·분비될 가능성을 강력히 시사하는 것이다. 본 연구자들은 흰쥐를 재료로 암·수의 부속 생식기관인 자궁과 부정소에서의 LH 유전자 발현 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

상명대 실험 동물 사육장에서 사육하는 생후 25 일된 미성숙한 흰쥐 (Sprague-Dawley strain) 암컷에 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG; 15 IU/rat, Sigma)를 복강 주사하여 인위적으로 성적성숙을 유도하였다 (Lee *et al.*, 1994). 또한 성숙한 수컷 (생후 4개월 전후)을 희생시켜 부정소를 추출하였다. 동물을 희생한 직후 조직을 얻어 즉시 RNA를 추출하거나 LH 방사면역측정법을 실시하기 위해 분쇄하기 직전까지 -70°C에 보관하였다.

2. 방사면역측정법 (Radioimmunoassay, RIA)

조직내 LH 함량 측정은 1 N acetic acid (10 vol)으로 분쇄한 조직을 원심분리하여 얻은 상층액을 1 N HCl로 acidify한 후 측정하였다. Chloramine-T 방법을 사용하여 I¹²⁵(NEN)로 방사표지한 LH reference peptide (NIDDK, Bethesda, USA)와 anti-rat LH antiserum (최종 희석 1:200,000)을 사용하여 제공자의 방법 (72 hour protocol)을 시행하였다 (Lee *et al.*, 1994).

3. RNA와 DNA의 분석

1) Total RNA 추출

조직에서의 RNA 추출은 acid phenol-guanidium isothiocyanate-chloroform 방법 (Chomczynski and Sacchi, 1987) 방법을 기초로 제작된 Trizol 용액 (GI-

BCO-BRL)을 사용하여 공급자의 방법에 따라 시행하였다. 최종 pellet은 75% ethanol로 씻어주고 건조시킨 후 0.1% DEPC-water에 녹인 뒤 UV spectrophotometer로 정량하였다.

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

추출한 RNA와 reverse transcriptase (SuperScript RT RNase H⁻; GIBCO-BRL)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 흰쥐 LH 유전자의 공통적인 exon 부분에 해당되는 각각 20 base pair에 해당하는 5'과 3' primer용 oligomer들을 제작하고 (한국 바이오니아), 앞서 합성한 cDNA와 Taq DNA polymerase (Takara)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 각 PCR 반응 조건은 최초 94°C에서 2분간 denaturation을 1회 시행 후 denaturation (94°C, 30초), annealing (54°C, 30초), elongation (72°C, 1분) 과정을 35회 반복 실시한 후 최종적으로 1회 extension (72°C, 10분)을 시행하였다. 반응산물의 크기는 전기영동 (2% agarose gel)후 ethidium bromide 용액으로 염색·확인하였다. PCR에 사용한 primer의 염기서열로 LH β subunit는 5'-GTGCCGGCCTGTCAACGCAAC-3' (sense)와 5'-CAGCTCATTGGTTGAGT-CCTG-3' (antisense)였으며, α -subunit는 5'-ATAC-TTCTCCAAGCTGGGTGC-3' (sense)와 5'-CGAC-ACTCAGTGCCATCGCAG-3' (antisense)였다 (Godine *et al.*, 1982; Zhang *et al.*, 1995b).

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

흰쥐 생식기관내 LH 유전자 발현 조사에서 흰쥐의 뇌하수체는 물론 자성 생식기관인 난소와 자궁 그리고 웅성 생식기관인 정소와 부정소에서 추출한 RNA로부터 모두 LH β subunit transcript 부분이 RT-PCR에 의해 증폭되었으며, 증폭된 cDNA의 크기는 예측한 바와 같이 306 bp로 나타났다 (Fig. 1A). 한편 α -subunit transcript에 대한 PCR을 시행한 결과 사용한 생식기관들 모두에서 예상대로 294 bp 크기의 cDNA가 증폭되었다 (Fig. 1B). PCR로 얻은 cDNA 산물들은 PCR-sequencing 방법

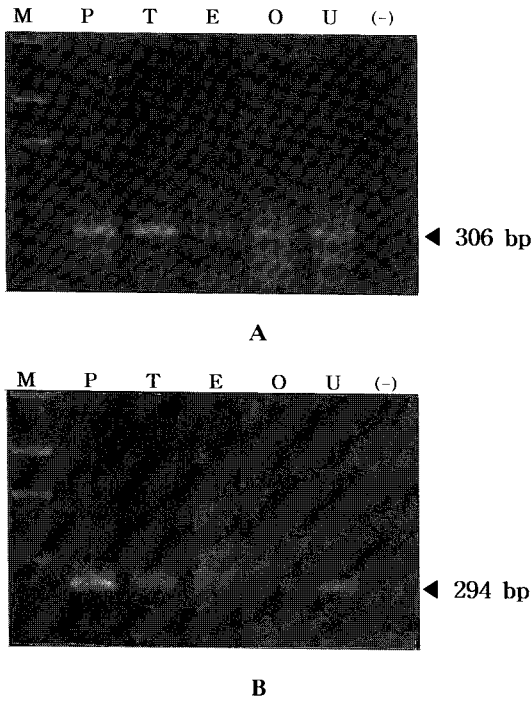


Fig. 1. Detection of the transcripts for rat LH subunits in the rat reproductive tissues by RT-PCR. PCR and electrophoresis were carried out as described in Materials and Methods. **A;** Amplification of cDNA fragments coding the LH β regions commonly found in the rat pituitary and testis. **B;** Amplification of cDNA fragments from the α -subunit transcripts. M, DNA size marker; P, pituitary; T, testis; E, epididymis; O, ovary; U, uterus; (-), negative control.

으로 염기서열을 조사하여 각각 알려진 α 와 β -subunit의 염기서열과 일치함을 확인하였다 (data not shown). LH 펩타이드의 존재를 규명하기 위해 난소, 자궁 그리고 부정소 추출물을 사용한 LH RIA를 시행한 결과, 모든 조직에서 공히 LH standard curve와 competition curve간에 평행함을 보임으로써 이들 조직내에 immunoreactive LH-like 펩타이드가 존재함을 증명하였다 (Fig. 2). 생식기관내 LH 함량은 뇌하수체내 함량의 1/10 이하로 낮았고, 자궁의 경우 농축한 homogenate를 사용하였으며 다른 모든 조직 샘플내 LH 함량은 RIA 검출한계내에서 검출되었다. 성숙한 흰쥐 부정소의 경우 corpus 부분의 LH 함량이 가장 높았고 (41.5 pg/mg), caudal (27.8 pg/mg)과 caput (24.2 pg/mg)순으로 나타났다 (Fig. 3).

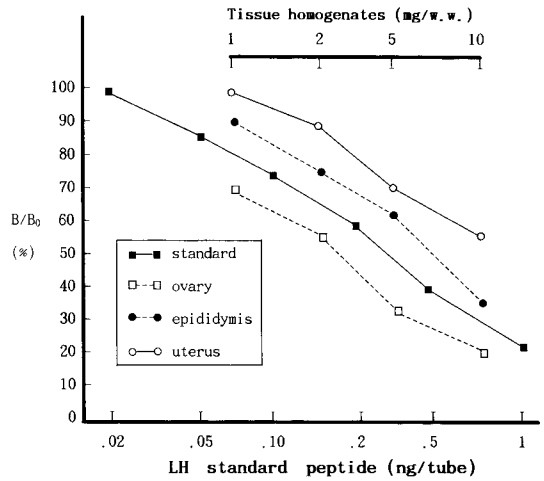


Fig. 2. LH RIA parallelism with increasing amounts of LH standard and the tissue extracts, indicating the presence of immunoreactive LH-like molecules in the rat ovary. In this experiment, ovaries and uteri from immature rats (Day 25) and epididymis from adult rats (4 months old) were used.

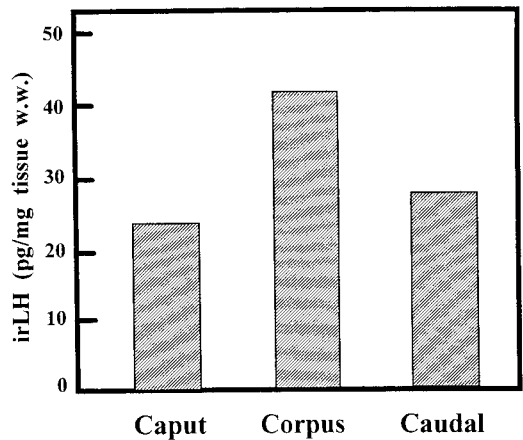


Fig. 3. LH RIA for measuring the rat epididymal LH contents. Caput, corpus and caudal part of epididymis from adult rats (4 months old) were homogenized, centrifuged and the resulting supernatant were used in RIA.

고찰

본 연구에서 흰쥐 정소와 난소에서의 LH transcript 검출은 기존의 보고와 일치하는 것이며 (Zhang *et al.*, 1995a; Lee, 1998), 자궁과 부정소에서의

검출은 본 연구에서 최초로 확인한 결과이다. 이와 더불어 LH RIA 결과는 흰쥐 생식기관에서 LH의 α 와 β -subunit에 대한 전사물질로부터 α 와 β -subunit 폴리펩타이드가 동시에 합성·결합되어 생리 활성을 갖는 온전한 LH가 만들어질 수 있음을 보여주는 것이다. 본 연구 결과에서 뇌하수체 이외의 조직내 LH 함량은 뇌하수체에서 보다 훨씬 낮은 수준이었으나, 내분비적으로 원거리에서 표적 기관에 작용하는 뇌하수체형 LH와는 달리 부속 생식기관에서 합성되는 LH의 경우 국부적으로 작용하므로 뇌하수체형 LH 보다 상대적으로 낮은 수준으로도 충분히 생리 조절기능을 담당할 수 있는 것으로 보인다.

지난 10여년간 생식과 관련된 내분비학 분야의 연구 경향은 호르몬 함량과 분비의 변화 수준의 조사에서 유전자 구조와 발현 조절기작의 탐구로 진전되었고, 연구 대상도 체내 여러 조직들로 확대되어 조직특이적인 호르몬 유전자 발현과 국부적인 조절기능 조사로 확대되었다. 생식에 관련된 호르몬과 국부 조절요인들 중에는 생식기관에서의 GnRH 발현에 대해 많은 연구가 수행되었다. 10개의 아미노산으로 구성되는 펩타이드 호르몬인 GnRH는 시상하부에서 합성·분비되어 뇌하수체 전엽에서의 gonadotropin 합성과 분비를 촉진함 외에도 생식소에서 국부적으로 합성되어 (i) steroidogenesis 조절, (ii) 배란 유도, (iii) 난자 성숙 (oocyte maturation) 촉진, (iv) 생식소 국부 조절요인들의 생합성 및 분비조절, (v) 세포자연사 (apoptosis) 유도 등 다양한 기능을 담당함이 알려져 있다 (Hsueh *et al.*, 1994; Richards, 1994; Gnassi *et al.*, 1997). 부속 생식기관 가운데 흰쥐의 태반, 저정낭 (seminal vesicle), 그리고 자궁에서도 GnRH가 발현됨이 이미 보고된 바 있으며 (Khodr and Siler-Khodr, 1980; Izumi *et al.*, 1985; Ikeda *et al.*, 1996), 특히 태반의 경우 GnRH에 의해 chorionic gonadotropin의 분비가 조절됨이 알려져 있다 (Siler-Khodr *et al.*, 1986). 그런데 시상하부와 뇌하수체에서의 GnRH-LH 유전자 발현과 조절에 관한 연구가 상당한 진전을 보임에 반해 기타 조직에서 이들의 유전자 발현에 관한 연구는 미미한 실정이다. 본 연구의 결과에서 GnRH가 발현됨이 알려진 생식기관에서 LH가 발현된다는 사실은 포유동물의 생식현상의 조절에서 시상하부-뇌하수체로부터의 GnRH와 LH에 의한 내분비 (endocrine) 조절 방식 외에도 생식기관에서의 GnRH와 LH에 의한 auto-

crine 또는 paracrine 조절 방식이 존재할 가능성을 강력하게 시사하는 것이다. LH는 특히 생식소에서 합성되는 GnRH와 함께 국부적인 회로 (circuitry)를 형성하여 다양한 생리 조절기능을 나타낼 것으로 추정되는데, 생식소형 LH의 경우 직접적으로 작용하거나 GnRH의 발현과 분비 활성의 조절을 통해 간접적으로 작용하리라 예상된다. 자궁과 부정소에서 합성되는 LH의 경우는 더욱 흥미로운 경우인데, 이들 조직에서 합성된 LH가 모세혈관을 경유하거나 확산에 의해 인접 세포들의 활성을 조절하는지 혹은 분비선에 의해 자궁액과 부정소액 형태로 강소에 분비 (excretion)되는가의 여부를 현재 조사중이다.

포유동물의 LH와 FSH는 뇌하수체의 thyroid stimulating hormone (TSH)과 태반의 chorionic gonadotropin과 더불어 glycoprotein hormone family에 속한다 (Albanese *et al.*, 1996). 이들은 α 와 β -subunit로 구성되는데, 단일한 α -subunit가 공통적으로 사용되는데 비해 각 호르몬마다 독특한 β -subunit가 결합하여 생리 활성의 차이를 나타낸다 (Ryan *et al.*, 1988). 흰쥐 정소형 LH β subunit의 경우 적어도 3개의 정소특이적인 프로모터에 의해 발현이 유도되어 전사물질에 정소형 5' untranslated region (UTR) 부분이 포함되므로 전사물질의 크기 (3.2, 2.4, 0.86 kb)가 뇌하수체형 (0.8 kb)보다 큼이 보고되었다 (Zhang *et al.*, 1995b). 흰쥐 정소에서 발현되는 LH의 경우 정자형성과과정에서 원형 정세포 (round type spermatid)에서 특이적으로 발현되는 것으로 보아 정자완성과과정 (spermiogenesis)에서 미지의 조절기능을 나타내리라 예상되지만 자세한 정보는 전무하다 (Zhang *et al.*, 1995b). 상동기관인 흰쥐 난소에서의 LH 유전자 발현은 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) 주사에 의해 생리적으로 조절되는데 (Lee, 1998), 난소형 LH의 기능 역시 전혀 알려진 바 없다. 이러한 관점에서 생식기관에서의 LH 유전자 발현의 조절기작에 대한 분자적인 연구와 더불어 LH의 국부적인 기능에 대한 조사는 대단히 흥미로운 연구 주제라 사료된다.

결 론

본 연구는 흰쥐의 부속 생식기관에서의 LH 유전자 발현과 폴리펩타이드의 존재 여부를 조사한 것이다. 이를 위해 LH subunit들에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)을 시행하였고, 생식기

관내 LH 함량을 방사면역측정법으로 정량하였다. 뇌하수체와 정소에서 공통적으로 존재하는 LH β subunit의 exon에 해당되는 primer를 사용하여 RT-PCR을 시행한 결과 흰쥐 난소, 자궁, 부정소에서 뇌하수체, 정소와 같이 306 bp band가 확인되었고, LH, FSH, TSH 그리고 hCG에서 공통적으로 발현되는 α -subunit의 전사물질도 PCR에 의해 증폭되었다. 방사면역측정법에서는 LH standard curve와 난소, 자궁, 부정소 추출물을 사용한 curve가 동일하게 sigmoid 형태를 보임으로서 흰쥐 생식기관내에 immunoreactive LH가 존재함이 증명되었다. 이상의 결과는 흰쥐의 LH가 생식소 외에도 자궁과 부정소에서 발현되어 이들 조직에서 국부적인 조절인자로 작용함을 시사하는 것이다.

참 고 문 헌

- 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.
- Chomzynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162, 156-159.
- El-Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaniemi I: Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod* 1998, 58, 116-123.
- Godine JE, Chin WW, Habener JF: Alpha subunit of rat pituitary glycoprotein hormones: primary structure of the precursor determined from the nucleotide sequence of cloned cDNAs. *J Biol Chem* 1982, 257, 8368-8371.
- Gnessi L, Fabbri A, Spera G: Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: An integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 1997, 18, 541-609.
- Griffin JE, Ojeda SR: Textbook of endocrinology 3rd ed. UK: Oxford University Press; 1995.
- Hsueh AJW, Billig H, Tsafirri A: Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 1994, 15, 707-724.
- 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(11), 708-713.
- Khodr GS, Siler-Khodr TM: Placental luteinizing hormone releasing factor and its synthesis. *Science* 1980, 207, 315-317.
- Lee SH: Expression of luteinizing hormone (LH) subunit genes in the rat ovary. *Kor J Fertil Steril* 1998, 25(2), 199-205.
- Lee SH, Song ES, Yu SK, Kim C, Lee DK, Cho WS, Kim K: Temporal changes in ovarian gonadotropin releasing hormone mRNA levels by gonadotropins in the rat. *Mol Cells* 1994, 4, 39-44.
- Richards J: Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 1994, 15, 725-751.
- Ryan RJ, Chalesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Keutmann HT: The glycoprotein hormones: Recent studies of structure-function relationships. *FASEB J* 1988, 2, 2661-2669.
- 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(2), 245-254.
- 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* 1995a, 210, 858-865.
- Zhang FP, Markkula M, Toppari J, Huhtaniemi I: Novel expression of luteinizing hormone subunit genes in the rat testis. *Endocrinology* 1995b, 136, 2904-2912.