

웅성호르몬에 의한 무지개송어의 vitellogenin 유전자 발현

권혁추 · 윤종만* · 이종영**

선문대학교 응용생물과학부
*군산대학교 해양생명의학과
**게이오대학 의학부 분자생물학교실

Expression of Vitellogenin Gene by Androgens in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*

Hyuk Chu Kwon, Jong Man Yoon* and Jong Young Lee**

Division of Applied Biological Sciences, Sun Moon University, Asan 336-840, Korea

*Department of Marine Biomedical Science, Kunsan National University, Kunsan, 573-702, Korea

**Department of Molecular Biology, Keio University, Tokyo, Japan

The effects of estrogen and androgens on Vg gene expression were examined in primary hepatocyte culture and livers of the immature male trout. Specific primers of Vg cDNA were designed with already reported Vg gene nucleotide sequences. PCR product was sequenced and verified with Vg cDNA of rainbow trout. Total RNA was extracted from the cultured hepatocytes and livers of steroid-treated rainbow trout and then it was analyzed by reverse transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. The Vg mRNA and Vg protein synthesis were increased in rainbow trout *in vivo* and *in vitro* with E₂ and methyltestosterone (MT). There were dose and time-related effects of E₂ and MT on vitellogenesis. Androgens such as progesterone, androsterone and testosterone also stimulated Vg mRNA expression *in vitro*. The results show that androgens as well as E₂ can induce expression of Vg mRNA in trout *in vivo* and *in vitro*.

Key words : Rainbow trout, Hepatocyte culture, Vitellogenin mRNA, Androgens

서 론

난생척추동물에 있어서 난황형성기의 난모세포는 난황 단백질의 전구물질인 Vitellogenin (Vg)을 혈류로부터 흡수 축적함으로써 급속히 성장한다. Vg은 estrogen (E₂)의 작용에 의해 간장에서 합성되는 고분자 glycolipophosphoprotein이다(Wallace, 1985; Mommsen and Walsh, 1988). 외인성의 E₂에 의해 암컷뿐만 아니라 수컷 그리고 미성숙 개체에서도 Vg이 합성 유도되어 지는 것으로부터 어류의 Vg유전자발현에 영향을 미치는 호르몬의 조절작용을 이

해하는데 귀중한 정보를 제공해 왔다(Tata and Smith, 1979; Tenniswood et al., 1983; Vaillant et al., 1988; Marilley et al., 1998). 또한 최근 심각하게 사회문제화되고 있는 dioxins, PCB 및 bisphenol A 등과 같은 환경호르몬에 대한 biomaker로서 Vg에 대한 연구는 매우 활발하다(Sumputer and Jobling, 1995; Ren et al., 1996).

E₂가 Vg합성을 조절하는 주된 호르몬이지만, 부신피질 호르몬과 갑상선호르몬이 Vg합성에 E₂와 공동으로 작용하는 것이 개구리에서 밝혀졌으며(Wangh, 1982; Wangh and Schneider, 1982), 성장호르몬과 프로락틴 등 뇌하수

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

체호르몬들이 Vg합성에 직간접적으로 작용하는 것이 조류(Boehm et al., 1988), 파충류(Ho et al., 1985), 양서류(Paolucci, 1991; Carnevali et al., 1992), 어류(Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal, 1991; Kwon and Mugiya, 1994; Carnevali et al., 1995) 등에서 보고되어 왔다. 또한 E₂ 이외에 천연 및 합성 여성스테로이드 호르몬들이 Vg합성을 유도하는 것이 금붕어(Hori et al., 1979)와 goby(Le Menn et al., 1980) 등에서 관찰되었으나, 메기(Sundararaj and Nath, 1981)에서는 Vg합성을 유도하지 못했다. 그리고 최근 권과 박(1996)은 뱀장어의 *in vitro* 실험에서 testosterone 과 androsterone 등을 E₂와 함께 첨가하여 Vg합성을 유도하였으나, progesterone은 Vg합성을 자극하지 못했다. 이처럼 난생동물의 Vg합성을 조절하는 내분비물질들에 대한 많은 연구에도 불구하고 아직 밝혀지지 않은 부분이 존재한다.

본 연구에서는 송어의 간세포배양을 이용하여 Vg mRNA 발현에 영향을 미치는 내분비물질들, 특히 여성호르몬들에 대해 검토하였다.

재료 및 방법

공시어 및 *in vivo* 호르몬처리

체중 80-150g의 무지개 송어를 인근 양식장에서 구입하여 수온 15°C에서 사육하였다. E₂ 및 methyltestosterone (MT)은 propylene glycol에 용해하여 미성숙 개체에 주사하였으며, 각 실험구당 30마리씩 각각의 호르몬(5mg/kg · body weight)을 투여하여 24시간 마다 5마리씩 sampling하여 혈액을 채취하였으며, 해부에 의하여 암수를 구별하였다. 원심에 의하여 혈청을 분리한후 사용할때까지 -20°C에 보관하였다. 간은 채취후 액체 질소에 처리한후 즉시 사용하거나 -70°C에 보관한후 사용하였다.

cDNA의 합성 및 RT-PCR

EMBL data bank에 등록되어 있는 송어 Vg gene의 염기배열 정보를 이용하여 약 600 bp의 cDNA를 증폭시킬 수 있도록 P3 (5' -atccacgaactgtgctgttcag gctgtt-3')과 P4 (5' -gtgagagctttggccacgacagttctgg-3') primer를 설계하였다. 호르몬을 투여하지 않은 수컷 송어와 E₂ 투여후 5일만에 걸쳐 24시간 마다 간조직을 적출하였고, 이들 간조직 0.2g으로부터 total RNA extraction kit 및 mRNA extrac-

tion kit (Pharmacia, U.S.A.)를 이용하여 mRNA만을 추출 · 정제하였다. 추출 · 정제된 mRNA 2 μ g과 100ng의 합성된 primer P4를 혼합하여 70°C에서 10분간 가열 · 냉각 후, 이 반응액에 AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase)를 첨가하여 41°C에서 1시간 반응시켜, first strand cDNA를 합성하였다 (Life Sciences, U.S.A.).

호르몬을 투여하지 않은 송어의 간으로부터 합성한 cDNA를 주형으로 P3/P4 primer를 각각 1 μ M 혼합하여 95°C에서 30초, 52°C에서 30초, 72°C에서 30초 반응을 30회 실시한 후, 72°C에서 1분간의 신장반응을 실시하였다. RT-PCR 증폭산물 5 μ l를 1% agarose gel에 전기영동하여 DNA의 증폭여부를 확인하였다. PCR에 의해 증폭된 PCR 증폭 산물을 T-vector (Promega社)에 삽입하여 대장균 JM109로 형질전환 후, plasmid DNA를 추출하였다 (Sambrook et al., 1989). 이들 plasmid DNA는 Sanger의 didoxy sequencing 방법을 응용한 Automated Sequencer로 염기배열을 결정하였고, 결정된 염기배열을 이미 보고된 무지개 송어의 Vg와 비교하여, PCR에 의해 증폭된 DNA 단편이 송어의 Vg cDNA임을 확인하였다. E₂ 처리된 송어 간으로부터 합성한 cDNA를 주형으로, P3와 P4 primer로 RT-PCR을 실시하였다.

간세포배양 및 호르몬 처리

송어 간세포의 제조는 Kwon et al. (1993)의 방법에 따랐다. 즉, 0.01%의 NaHCO₃를 포함하는 0.01%의 MS 222로 마취한 후 복부를 절개하여 간을 적출하여 Ca⁺⁺-Ringer액 (120mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.25mM KH₂PO₄, 23mM NaHCO₃, 10mM HEPES, pH7.4)을 간분맥을 통하여 5분간 관류하여 혈액 등의 불순물을 제거하였다. 다음에 collagenase (0.5mg/ml; Wako Pure Chemical Ind., Japan; Type IV)를 포함하는 Ca⁺⁺-free Ringer액으로 약 20분간 관류하여 간을 소화시켰으며, Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺-free의 Ringer액 30ml을 주입하여 효소의 활성을 억제하였다. 소화된 간은 쓸개를 제거한 후 50ml의 Ca⁺⁺-free Ringer액에 넣어 수술용 가위로 가볍게 썰은 후 피펫팅에 의해 세포 현탁액으로 만들었다. 나일론 거즈를 이용해서 세포 현탁액을 50ml용 원심관내로 여과 시켰다. 여과된 세포 현탁액을 600rpm을 90초간 원심분리에 의해 침전시켜 간실질 세포 이외의 물질들을 제거하였다. 이러한 절차를 3번 반

복하여 얻어진 펠렛화된 세포에 Ringer액을 첨가하여 10 ml의 현탁액으로 하였다. 세포의 생존율은 Trypan Blue 를 이용하여 판별하였으며, 세포수는 혈구 계산판을 이용하여 계산하였다.

dish당 3×10^5 개의 간세포를 3ml의 배양액과 함께 60 mm Petri dish (Falcon)에서 배양하였다. 배양액은 $0.2 \mu\text{M}$ bovine insulin (Sigma), streptomycin($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)과 penicillin ($70 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 포함하는 L-15 배양액(Hazleton Biologics Inc)을 이용하였으며, 25°C 에서 CO_2 incubator($5\% \text{CO}_2$, $95\% \text{O}_2$)를 이용하여 세포를 배양하였다. 각각의 호르몬을 포함하는 배양액은 24시간마다 교환하였다. 배양액 교환시 dish 및 세포들에 묻어 있는 호르몬들을 제거하기 위해 호르몬 첨가되지 않은 배양액으로 3번 씻어낸 후 교환하였다.

Estradiol- 17β , 17α -methyltestosterone, testosterone, progesterone 및 androsterone (Sigma) 등의 스테로이드 호르몬들은 모두 95% 알콜에 용해하여 배양액에 첨가하였다. 스테로이드 호르몬을 용해하기 위해 사용된 알콜 농도는 배양액중 0.1%를 넘지 않도록 했다.

배양 종료후 배양액을 제거하고, 3ml의 PBS를 첨가하여 실리콘 고무로 가볍게 긁어 세포를 수거하였으며, PBS로 3회 세척한 후 mRNA를 추출하였다.

결 과

In vivo Vg합성에 대한 E_2 및 MT의 영향

E_2 를 투여한 수컷 송어 혈청의 SDS-전기영동 분석결과를 Fig. 1에 나타냈다. 예상대로 Vg은 E_2 자극에 의해 합성 유도되었다. Vg합성량은 E_2 투여 24시간까지 적은 양으로 나타났으나 48시간부터 증가하기 시작하여 120시간후에는 많은 양의 Vg이 관찰되었다. Fig. 2에는 E_2 와 같은 양의 17α -MT를 투여하여 관찰한 결과, E_2 주사한 개체와 마찬가지로 17α -MT에 의해서도 Vg합성이 유도되었는데, E_2 주사와 같이 48시간후부터 명확한 Vg의 전기영동상을 관찰할 수 있으나 120시간까지의 관찰기간중 크게 증가하지 않았다.

또한, 본 연구에서 송어의 Vg mRNA의 전사량 변화를 알아보기 위하여 작성한 primer를 이용하여 약 600 bp의 PCR 증폭산물을 확인하였고, 이 PCR 증폭산물의 염기배열을 결정한 결과, 이미 보고된 송어의 Vg 유전자의 exon 영역과 모두 일치하였다. 따라서 P3/P4 primer에 의해 증

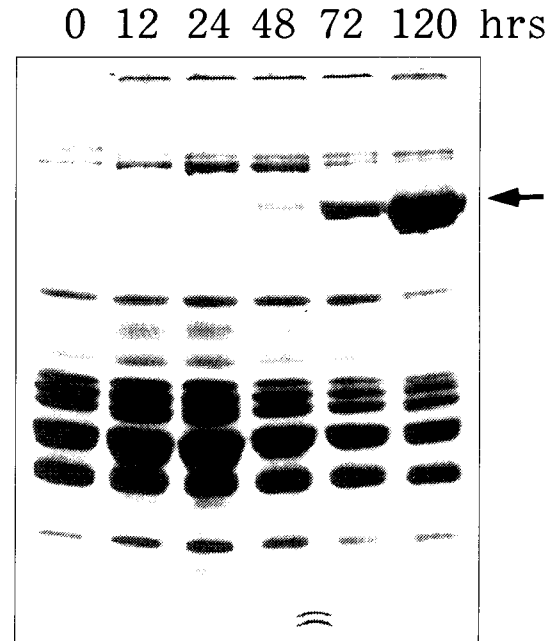


Fig. 1. SDS-PAGE(10%) of sera from E_2 -treated rainbow trout. Fish were given a single intraperitoneal injection of E_2 dissolved in propylene glycol at a dose of $5\text{mg}/\text{kg}$ body weight. The arrow indicates vitellogenin.

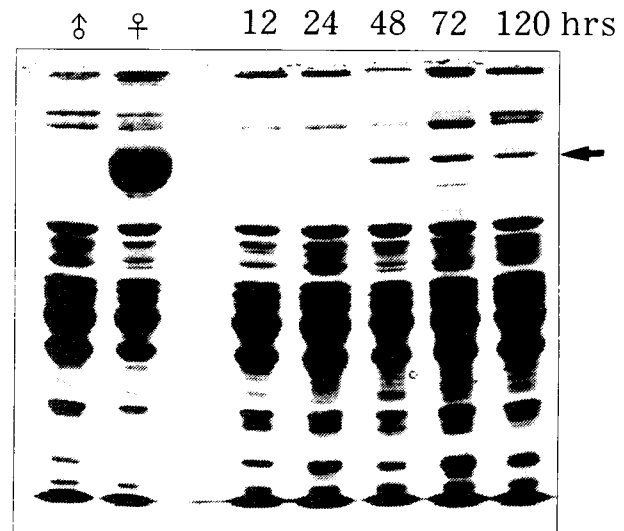


Fig. 2. SDS-PAGE(10%) of sera from MT-treated rainbow trout. Fish were given a single intraperitoneal injection of MT dissolved in propylene glycol at a dose of $5\text{mg}/\text{kg}$ body weight. ♂, male serum; ♀, mature female serum. The arrow indicates vitellogenin.

폭되는 PCR 산물이 Vg cDNA임을 예측할 수 있으며, 이러한 PCR 증폭산물의 양적 변화를 이용하여 Vg mRNA의 전사량 변화를 예측하였다.

우선, 송어에 E₂ 및 17 α -MT를 투여한 후, 송어의 간에서 Vg mRNA의 전사량 변화를 RT-PCR법으로 조사한 결과를 Fig. 3과 4에 나타냈다. 간조직에서의 Vg mRNA의 전사량 변화가 E₂투여 후 12시간부터 나타나기 시작하여 시간과 더불어 증가하였으나, 120시간이후에는 다소 감소하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 또한 17 α -MT 투여 후, 간 조직에서의 Vg mRNA 변화는 단백질 합성에서와 같이 24시간후 부터 전사량이 증가하기 시작하여 120시간까지 계속되었고, 이는 E₂를 투여한 후의 Vg mRNA의 전사량 변화와 유사하였다(Fig. 4).

In vitro Vg mRNA발현에 대한 E₂ 및 MT의 영향

배양 간세포에 E₂ (10⁻⁸~10⁻⁶M)와 17 α -MT (10⁻⁸~10⁻⁶M)를 각각 첨가하여 이들 호르몬들의 Vg mRNA 발현에 대한 영향을 조사하였다. 호르몬 첨가 48시간 후에 간세포를 수거하여, 이들 배양 간세포로부터 합성한 cDNA를 주형으로 RT-PCR법을 이용하여 분석한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. *in vivo* 실험에서와 같이 E₂ 및 17 α -MT를 첨가

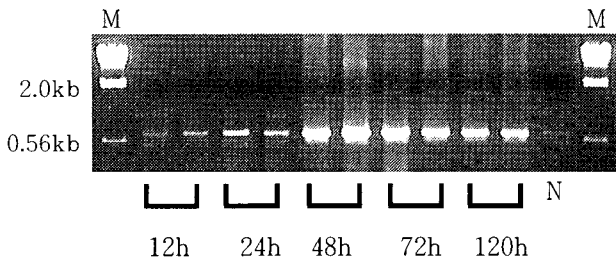


Fig. 3. Time course of Vg mRNA expression in livers of E₂-treated rainbow trout detected by RT-PCR. PCR products were electrophoresed with 1% agarose gel. Fish were treated with 5mg/kg E₂. M; lamda DNA marker which was digested with restriction enzyme *Hind* III.

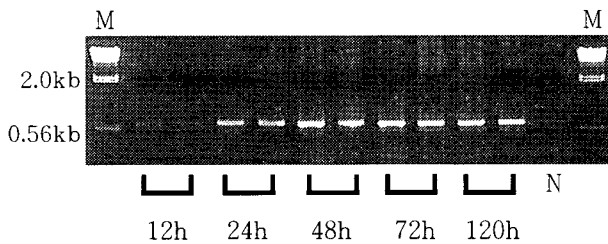


Fig. 4. Time course of Vg mRNA expression in livers of MT-treated rainbow trout detected by RT-PCR. PCR products were electrophoresed with 1% agarose gel. Fish were treated with 5mg/kg MT. M; lamda DNA marker which was digested with restriction enzyme *Hind* III.

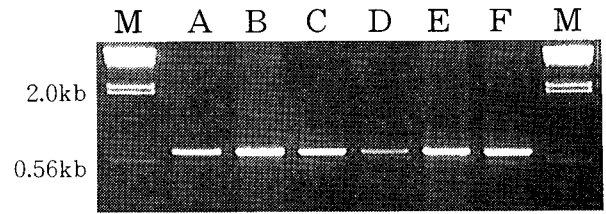


Fig. 5. The change of Vg mRNA levels in cultured hepatocytes following the treatment of E₂ or MT for 48hrs. Lanes A-C, E₂-treated cultures: A(10⁻⁸M), B(10⁻⁷M), C(10⁻⁶M); Lanes D-F, MT-treated cultures: D(10⁻⁸M), E(10⁻⁷M), F(10⁻⁶M). M; lamda DNA marker which was digested with restriction enzyme *Hind* III.

한 간세포에서 Vg mRNA 발현의 증가를 확인하였으나, Vg mRNA의 전사량은 E₂ 및 17 α -MT 모두 농도를 달리 하여도 커다란 차이를 나타내지는 않았다.

In vitro Vg mRNA 발현에 대한 기타 스테로이드 호르몬의 영향

Vg mRNA의 발현량에 대한 progesterone(10⁻⁶M), androsterone(10⁻⁶M) 및 testosterone (10⁻⁶M)의 영향을 조사하였다. 호르몬 첨가 48시간후에 배양간세포로부터 합성한 cDNA를 주형으로 RT-PCR법에 의한 분석한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 첨가된 스테로이드 호르몬들 모두에서 Vg mRNA의 발현량의 변화가 관찰되었으며, Vg mRNA의 전사량은 progesterone과 androsterone 보다 testosterone에서 다소 높게 나타났다.

고찰

어류를 비롯하여, 양서류, 파충류 및 조류 등 난생척추

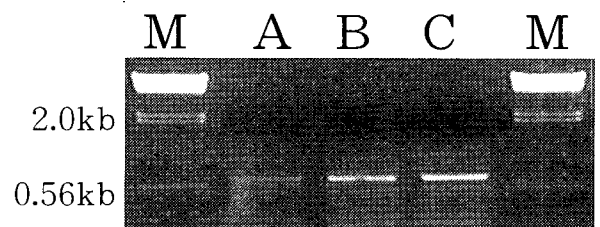


Fig. 6. Expression of Vg mRNA by androgens in cultured hepatocytes of rainbow trout. Hepatocytes were cultured for 48hrs with hormones. Lane A, progesterone (10⁻⁶M); B, androsterone (10⁻⁶M); C, testosterone (10⁻⁶M). M; lamda DNA marker which was digested with restriction enzyme *Hind* III.

동물의 Vg은 E₂에 의해 합성되어 지는 것이 *in vivo* 실험을 통하여 밝혀져 왔다(Emmersen and Petersen, 1976; Elliott et al., 1979; Sundararaj et al., 1982; van Bohemen et al., 1982; Kwon et al., 1990). 그러나 E₂ 이외에 Vg합성에 영향을 미치는 내분비들에 대한 연구가 *in vitro* 실험 즉, 肝組織片 또는 肝세포 배양을 통하여 많이 행하여져, 갑상선호르몬, 성장호르몬 및 프로락틴 등 여러 호르몬들이 관여한다는 것이 계속 보고되어 오고 있다(Wangh and Knowland, 1975; Ho et al., 1985; Maitre et al., 1986; Boehm et al., 1988; Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal, 1991; Carnevali et al., 1992; Kwon and Mugiya, 1994). 최근 Kwon 등(1993)이 송어의 간세포 배양을 이용하여 E₂에 의해 Vg을 합성하였다. 이 연구에서 양서류의 Vg합성에 있어서는 갑상선 호르몬이 E₂의 승效能을 향상시킨다고 하였으나 송어에서는 이 호르몬은 Vg합성에 영향하지 않는다는 것이 밝혀졌다. 또한 이러한 배양계를 이용하여 Kwon과 Mugiya(1994)는 뱀장어 Vg합성연구에서 E₂ 단독으로는 Vg을 합성하지 못하고, GH 또는 PRL 등의 뇌하수체 호르몬들과 E₂와의 공동작용에 의해 뱀장어의 Vg합성을 유도한다는 사실을 알아냈다. 이처럼 어류의 Vg합성에는 다양한 내분비 조절을 받고 있는 것으로 나타났다.

어류의 암컷 혈중에 성성숙이 진행됨에 따라 progesterone 및 testosterone 등의 웅성호르몬이 E₂와 더불어 혈중에 다량으로 분비되어 진다(Sundararaj et al., 1982; Scott and Sumpter, 1983; Ueda, et al., 1984). 이때 이들 웅성호르몬들의 생리적 역할은 불분명한 부분이 많고, 더욱이 이들 호르몬들의 Vg의 합성 및 난황형성과의 관계에 대해서는 거의 연구되어 있지 않다.

위에서 서술한 바와 같이 지금까지 Vg 합성에 미치는 내분비조절에 관한 연구들은 모두 단백질 합성을 조사한 것으로 Vg mRNA의 전사량 변화에 대한 연구는 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 송어를 이용하여 특히 웅성스테로이드의 Vg합성 및 Vg mRNA의 발현에 미치는 영향을 조사한 바, 웅성스테로이드들이 Vg합성에 직접 관여하는 것이 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통해 명백하게 밝혀졌다. Hori 등(1979)은 금붕어에 다량의 웅성호르몬인 합성 methyltestosterone (MT) 을 어체에 투여하여 Vg을 합성 유도하였는데, 유도된 Vg 단백질은 E₂를 투여하여 합성한 그것과 전기영동적 pattern 및 면역학적 반응에 있어서 동일하다고 보고했다. 또한 ethynyltestosterone와

methylandrostenediol 역시 MT와 같은 Vg합성능력을 가진 testosterone, dihydrotestosterone 및 methyl-dihydrotestosterone 등은 이들 호르몬 보다 덜 효과적인 것으로 나타났다. Le Menn 등(1980)도 방향화 되어 지지 않는 웅성호르몬인 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one(DHT)을 goby에 다량 투여하여 Vg합성을 유도했다. 그들은 비방향화 웅성호르몬인 DHT를 사용하여 Vg을 합성하므로써, 웅성호르몬이 간에서 여성호르몬인 E₂로 전환되어 Vg의 합성에 관계한다는 사실을 부인했다. 이 실험에서 E₂와 DHT 모두 E₂ 수용체를 포화량까지 유도할 수 있었으나, Vg 합성량에 있어서 DHT는 E₂에 비해 훨씬 적었다. Hori 등(1979)과 Le Menn(1980) 등의 연구에서 공통적인 것은 실험에 사용된 웅성호르몬들은 모두 소량의 생리적 농도에서는 Vg을 유도해 내지 못하고, 많은 양을 사용하여 약리적인 효과에 의하여 Vg이 합성되었다는 점이다. 그러나 본 연구에서와 같이 간세포 배양계를 이용한 *in vitro* 실험에서 Vg합성량은 첨가한 MT의 농도에는 의존하였으나, 10⁻⁹M의 저농도의 MT에서도 Vg이 유도되어 다량의 MT를 필요로 하는 *in vivo* 실험(Hori, et al., 1979; Le Menn et al., 1980)과는 차이를 나타냈다. 최근 권과 박(1996)은 뱀장어의 간세포배양계를 이용하여 Vg합성에 대한 웅성호르몬의 영향을 조사하였는데, 합성 또 천연의 웅성스테로이드들 단독으로는 Vg의 합성은 유도되어 지지 않고, E₂의 첨가가 반드시 필요한 것으로 나타났다. 따라서 E₂는 뱀장어 Vg의 충분한 합성을 유도하지는 못하지만 E₂수용체 및 Vg합성 유전자를 활성화하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다. 본 실험에서 MT이 외에 progesterone, testosterone과 androsterone 모두 Vg 합성능을 나타냈는데 E₂의 전구체인 testosterone이 androsterone과 progesterone 보다 강한 활성을 보여 이는 E₂로 전환되어 지는 웅성 스테로이드의 생합성 과정이 Vg합성능과 관계가 있음을 시사해 주는 것이다. 또한 MT는 testosterone보다 더 높은 Vg합성을 보여 합성스테로이드가 천연의 스테로이드 보다 훨씬 강한 Vg합성능을 나타냈다. 한편 progesterone의 경우는 금붕어(Hori 등, 1979) 및 goby(Le Menn 등, 1980) 및 뱀장어(권과 박, 1996) 등에서는 Vg합성능을 나타 내지 않았는데, 송어에서는 검토된 다른 스테로이드에 비해 미약하지만 Vg mRNA의 발현이 확인되었다.

웅성호르몬들이 Vg을 합성하는 것에 대해 Hori 등(1979)은 다음과 같이 고찰했다. 첫째로 웅성호르몬들이

과도하게 존재할때 이들 호르몬들은 E₂ 수용체에 쉽게 결합하게 된다. 다시말해, E₂ 수용체는 스테로이드 호르몬들에 대해 덜 특이적이다. 둘째로 음성호르몬들은 먼저 스테로이드 대사효소들의 활성화를 유도한다. 즉, NADPH-cytochrome c reductase 등과 같은 효소가 음성호르몬 투여에 의해 활성화되어 지고, 다시 이들 효소에 의해 음성호르몬들이 E₂로의 전환을 유도한다고 가정했다. 그러나 앞에서 이미 언급한 바와 같이 Le Menn 등(1980)은 이 문제에 대해 비방향화 음성호르몬을 사용하여도 Vg이 합성되어 지는 것을 보고하여 음성스테로이드가 E₂로 전환되어 Vg합성을 유도한다는 가능성을 부정하였다. 따라서 어류의 Vg합성에 영향을 미치는 음성호르몬들에 대한 연구는 연구자와 어종에 따라 다양하게 나타나기 때문에 보다 구체적이고 종합적인 연구가 뒤따라야 할 것이다. 또한 현재 본 연구실에서는 자성 및 음성호르몬뿐만아니라, 뇌하수체계 호르몬들이 Vg mRNA발현에 관여하는지에 대한 연구가 진행중에 있어, Vg합성에 대한 내분비적 조절에 대한 많은 정보를 제공할 것으로 기대된다.

요 약

자성 및 음성스테로이드 호르몬들이 Vg 유전자발현에 영향을 미치는지를 미성숙 무지개송어의 배양간세포 공간을 이용하여 조사하였다. 이미 보고된 송어의 Vg gene의 염기배열을 참고로 Vg cDNA 단편(600 bp)을 증폭시키 수 있는 primer들을 작성하였다. 이들 primer를 이용하여 증폭된 PCR 산물의 염기배열을 결정하여 송어의 Vg cDNA임을 확인하였고, RT-PCR법을 이용하여 배양간세포 그리고 E₂ 및 MT 처리된 송어의 간으로부터 Vg mRNA의 전사량 변화를 조사하였다. 호르몬 처리된 간세포 및 송어의 간에서 추출한 total RNA를 이용하여 RT-PCR법으로 분석한 결과 *in vivo*, *in vitro* 실험 모두에서 E₂ 또는 MT처리된 간세포 및 송어의 간으로부터 Vg mRNA와 Vg 단백질합성이 유도되었고, 이들의 증가 경향은 처리된 호르몬 농도 및 시간에 의존하고 있음이 밝혀졌다. 또한 progesterone, androsterone 그리고 testosterone 등의 음성호르몬들도 Vg mRNA의 전사를 유도하고 있다는 것이 시사되었다. 이와같은 결과로부터 E₂ 뿐 아니라 음성스테로이드들도 Vg mRNA의 발현을 유도하고 있음이 송어의 *in vivo* 또는 *in vitro* 실험에 의해서 확인되었다.

참 고 문 헌

- Boehm, K.D., R.L. and J. Ilan, 1988. Induction of vitellogenin in primary monolayer cultures of cockerel hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 85 : 3450-3454.
- Burzawa-Gerard, E. and A. Dumas-Vidal, 1991. Effects of 17 β -estradiol and carp gonadotropin on European silver female eel (*Anguilla anguilla* L.) employing a homologous radioimmunoassay for vitellogenin. Gen. Comp. Endocrinol., 84 : 264-276.
- Carnevali, O., G. Mosconi, K. Yamamoto, T. Kobayashi, S. Kikuyama and A.M. Polzonetti-Magni, 1992. Hormonal control of *in vitro* vitellogenin synthesis in *Rana esculenta* liver: Effects of Mammalian and Amphibian growth hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 88 : 406-414.
- Carnevali, O., MG. Sabbieti, G. Mosconi, A.M. Polzonetti-Magni, 1995. Multihormonal control of vitellogenin mRNA expression in the liver of frog, *Rana esculenta*. Mol. Cell. Endocrinol. 114 : 19-25.
- Emmersen, B.K. and I.M. Petersen, 1976. Natural occurrence, and experimental induction by estradiol-17 β , of a lipophosphoprotein (Vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*, L.). Comp. Biochem. Physiol., 55B : 315-321.
- Elliott, J.A.K., N.R. Bromage, C. Whitehead, 1979. Effect of estradiol-17 β on serum calcium and vitellogenin levels in rainbow trout. J. Endocrinol., 83 : 54-55.
- Ho, S.M., L.J. Wangh and I.P. Callard., 1985. Sexual differences in the *in vitro* induction of vitellogenesis in the turtle: Role of the pituitary and growth hormone. Comp. Biochem. Physiol., 81B : 467-472.
- Hori, S.H., T. Kodama and K. Tanahashi, 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. Gen. Comp. Endocrinol., 37 : 306-320.
- Kwon, H.C., S. Hayashi and Y. Mugiya, 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol., 104B : 381-386.
- Kwon, H.C. and Y. Mugiya, 1994. Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*. Gen. Comp. Endocrinol., 93 : 51-60.
- Kwon, H.C., A. Hara, Y. Mugiya and J. Yamada, 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in white spotted charr, *Salvelinus leucomaenis*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 41 : 162-

- 180.
- Kwon H. and H. Y. Park, 1996. Induction of vitellogenin synthesis by androgens in cultured hepatocytes of the eel, *Anguilla japonica*. Korean J. Animal Reprod., 20 : 259-269 (in Korean)
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227 : 680-685.
- Le Menn, F., H. Rochefort. and M. Garcia, 1980. Effect of androgen mediated by the estrogen receptor of fish liver: vitellogenin accumulation. Steroids, 35 : 315-328.
- Maitre, J.-L., Y. Valotaire and C. Guguen-Guillouzo, 1986. Estradiol-17 β stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. In Vitro Cell. Dev. Biol., 22 : 337-343.
- Marilley, D., D. Robyr, C. Schild-poulter and W. Wahli, 1998. Regulation of the vitellogenin gene B1 promoter after transfer into hepatocytes in primary cultures. Mol. Cell. Endocrinol., 141 : 79-93.
- Mommsen, T.P. and P.J. Walsh., 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In "Fish Physiology" (W.S. Hoar and D.J. Randall, Eds.), Vol. XIA, pp.347-406. Academic Press, San Diego.
- Paolucci, M., 1991. Estradiol receptor in the lizard liver (*Podarcis s. sicula*). Seasonal changes and estradiol and growth hormone dependence. Mol. Cell. Endocrinol., 66 : 101-108.
- Ren L., SK. Lewis and JJ. Lech, 1996. Effects of estrogen and nonylphenol on the post-transcriptional regulation of vitellogenin gene expression. Chem. Biol. Interact., 100 : 67-76.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Press.
- Scott, A.P. and J.P. Sumpter, 1983. A comparison of the female reproductive cycles of autumn-spawning and winter-spawning strains of rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*). Gen. Comp. Endocrinol., 52 : 79-85.
- Sumpter JP. and S. Jobling, 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ. Health Perspect, 7 : 173-178.
- Sundararaj, B.I. and P. Nath, 1981. Steroid-induced synthesis of vitellogenin in the catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Gen. Comp. Endocrinol., 43 : 201-210.
- Sundararaj, B.I., S.V. Goswami and V.J. Lamb, 1982. Role of testosterone, estradiol-17 β , and cortisol during vitellogenin synthesis in the catfish, *Heteropneustes fossilis*(Bloch). Gen. Comp. Endocrinol., 48 : 390-397.
- Tata, J.R. and D.F. Smith, 1979. Vitellogenesis : A versatile model for hormonal regulation of gene expression. Rec. Prog. Horm. Res., 35 : 47-95.
- Tenniswood, M.P.R., P.F. Searle, A.P. Wolffe and J.R. Tata, 1983. Rapid estrogen metabolism and vitellogenin gene expression in *Xenopus* hepatocyte cultures. Mol. Cell Endocrinol., 30 : 329-345.
- Ueda, H., O. Hiroi, A. Hara, K. Yamauchi and Y. Nagahama, 1984. Changes and serum concentrations of steroid hormones, thyroxine, and vitellogenin during spawning migration of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Gen. Comp. Endocrinol., 53 : 203-211.
- Vaillant, C., C. Le Guellec, F. Pakdel and Y. Valotaire, 1988. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. Gen. Comp. Endocrinol., 70 : 284-290.
- Van Bohemen Ch. G., J.G.D. Lambert, H.J.Th. and P.G.W.J. van Oordt, 1982. Estrone and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocrinol., 46 : 81-92.
- Wallace, R.A., 1985. Vitellogenin and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In "Developmental Biology"(L. Browder, Ed.), Vol. 1, pp. 127-177. Pergamon, New York.
- Wangh, L.J., 1982. Glucocorticoids act together with estrogens and thyroid hormones in regulating the synthesis and secretion of *Xenopus* vitellogenin, serum albumin, and fibrinogen. Dev. Biol., 89 : 294-298.
- Wangh, L. J. and A.J. Knowland, 1975. Synthesis of vitellogenin in cultures of male and female frog liver regulated by estradiol treatment *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 : 3121-3175.
- Wangh, L.J. and W. Schneider, 1982. Thyroid hormones are corequisites for estradiol-17 β *in vitro* induction of *Xenopus* vitellogenin synthesis and secretion. Dev. Biol., 89 : 287-293.