

미성숙과 성숙한 흰쥐 고환에서의 Steroidogenic acute regulatory protein mRNA의 발현

고 필 옥 · 광 수 동

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소
(2000년 4월 14일 게재승인)

Expression of steroidogenic acute regulatory protein mRNA in immature and adult rat testes

Phil-ok Koh, Soo-dong Kwak

*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine,
Gyeongsang National University
(Accepted by Apr 14, 2000)*

Abstract : The synthesis of steroid hormone starts from cholesterol. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) acutely transfers cholesterol from the outer mitochondrial membrane to the inner in the early step of steroidogenesis. Many kinds of steroid hormone are mainly synthesized in adrenal gland, ovary, and testis. Among the steroid hormone, testosterone is synthesized in Leydig cells of the testis, the production of testosterone significantly increases in adult testis after puberty onset. Therefore, we think that the expression of StAR mRNA in testis will change according to the testicular development. The aim of this study is to determine the distribution of StAR mRNA in immature and adult rat testes and to confirm the functions of StAR in these testes. Thus, *in situ* hybridization was used in rat testes of the 2, 4, and 10 weeks of age.

StAR mRNA was expressed in Leydig cells. Positive signals of StAR mRNA were weakly detected in Leydig cells of the 2 weeks of age. But, StAR mRNA was strongly expressed in Leydig cells of the 4 and 10 weeks of age, where steroidogenesis actively occur. In our results, the pattern of StAR mRNA expression was similar to the pattern of testosterone production in immature and adult rat testes. In conclusion, we can suggest that StAR acts as an important factor to regulate the synthesis of testosterone in Leydig cells of the rat testis.

Key words : StAR mRNA, *in situ* hybridization, testis, rat.

서 론

스테로이드 호르몬의 합성은 콜레스테롤로부터 시작된다. 스테로이드 호르몬의 합성과정에서 콜레스테롤은 미토콘드리아의 안으로 이동하여 미토콘드리아 내막에 존재하는 cytochrome P450_{sc}에 의해 side chain이 잘려 pregnenolone으로 되고 그 다음 단계로 progesterone이 된다^{1,2}. Progesterone은 그 다음 단계로 cortisone, corticoid, aldosterone을 형성하게 되며, 최종적으로 17 α -hydroxyprogesterone과 testosterone을 거쳐 estrogen을 합성한다³. 이들 스테로이드 호르몬의 합성이 빠르게 이루어지기 위해서는 콜레스테롤을 신속하게 미토콘드리아의 안으로 이동시키는 작용기전이 필요하다. 이러한 신속한 스테로이드 합성에 관여하는 조절인자로서 steroidogenic acute regulatory protein (StAR)이 밝혀졌다⁴⁻⁷. StAR는 37kd 및 32kd의 전구물질로부터 형성되는 30kd의 인산화 단백질로서 콜레스테롤을 미토콘드리아의 외막에서 내막으로 신속하게 운반하는 역할을 한다^{8,9}.

스테로이드 호르몬은 부신피질, 난소의 황체와 난포, 고환의 사이질 세포에서 주로 합성된다. Progesterone은 황체에서, estrogen은 난포의 과립막세포에서, androgen은 난포막세포에서 생성되며 이들 성호르몬의 합성은 발정주기에 따라 다르며 난포의 성장과 퇴화에 따라 서로 달라진다. 또한 testosterone은 고환의 사이질세포에서 합성되며 정자의 성숙과 부속생식기관의 발달에 중요한 역할을 하며 활발한 testosterone의 합성은 성 성숙이 일어나기 위한 필수적인 조건으로 작용한다.

부신 및 성선세포에서 스테로이드 호르몬의 합성은 StAR 단백질 발현의 변화와 직접적으로 연결되어 있다¹⁰⁻¹². 특히 많은 양의 progesterone을 합성하는 난소 황체의 발달 정도에 따라 progesterone과 StAR의 발현양이 변화하였다. 소의 경우 성장초기의 황체에서는 StAR의 발현양이 비교적 적지만 progesterone의 생성이 활발하게 일어나는 활동기의 황체에서는 StAR의 발현양이 초기 황체에 비해 9~15배 증가하였고 progesterone의 생성이 감소하고 퇴화하는 시기의 황체에서는 StAR의 발현이 감소하였다¹³. 또한 양에서 prostaglandin F_{2 α} 로 황체의 퇴행을 인위적으로 유도하였을 때 StAR의 발현양은 현저히 감소되었다¹⁴. 그러므로 testosterone을 합성하는 고환에서도 StAR 발현양의 변화와 testosterone의 합성의 변

화가 상관관계가 있을 것으로 생각되며 성 성숙이 일어나기 전인 미성숙 흰쥐와 성숙한 흰쥐의 고환에서 testosterone의 합성 및 StAR의 발현에도 상관관계가 있을 것으로 추정된다. 따라서 본 연구에서는 2주령의 미성숙한 흰쥐와 4주령의 성 성숙이 일어나기 시작하는 시기의 흰쥐, 10주령의 성숙한 흰쥐의 고환을 사용하여 StAR mRNA의 발현양상을 *in situ* hybridization 기법을 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 : 고환에서 StAR mRNA의 발현양상을 조사하기 위한 실험동물군으로 2주령, 4주령, 10주령의 Sprague-Dawley계 흰쥐의 수컷 15수를 사용하였고 양성대조군으로 10주령의 암컷 5수를 사용하였다. 조직을 채취하기 위하여 ketamine hydrochloride(케타라, 50mg/ml, 유한양행)와 xylazine(덱폰, 20mg/ml, 바이엘)을 체중 100g당 7.5mg 및 1mg이 함유된 용액을 복강내 주사하여 마취시킨 후 심장을 통하여 RNase free 4% neutral buffered paraformaldehyde로 관류고정하였다. 실험군의 고환과 양성대조군의 난소를 채취하여 동일 고정액에 12시간 후고정하고 4℃에서 20% sucrose에 침전시킨 후 동결절편기를 사용하여 10 μ m 두께의 동결절편을 제작하여 *in situ* hybridization을 수행하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

실험방법 :

1) StAR cDNA의 subcloning과 probe 제작 : 본 실험에 사용할 probe 제작을 위해 558bp 크기의 rat StAR cDNA fragment를 EcoR I과 Sal I으로 잘라 pGEM-4Z vector에 삽입하였다. QIAGEN plasmid midi kit를 이용하여 많은 양의 Plasmid DNA를 얻은 후 SP6-EcoR I-[5'-StAR cDNA-3']-Sal I-T7의 map을 기준으로 제한효소, Sma I (antisense)과 Nco I(sense)를 사용하여 template DNA plasmid를 만들었다. 이어 T7(antisense) 혹은 SP6(sense) RNA polymerase로 전사시켜 ³⁵S-UTP로 표지된 antisense RNA probe와 sense RNA probe를 *in vitro* transcription kit(Promega, Madison, USA)를 이용하여 제작하였다. 이들 probe를 Sephadex G-50 Nick column(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)으로 각각 분리하여 cpm 값이 가장 높은 RNA probe를 얻었으며 이것을 다시 polyacrylamide gel로 확인한 다음 probe로 사용하였다.

2) *In situ* hybridization : *In situ* hybridization은 Ang-

erer *et al*¹⁵과 Duello *et al*¹⁶의 방법에 따라 수행하였으며 전 과정에서 RNase free한 상태로 진행하였다. -70℃에 보관되어 있던 조직절편을 PBS(0.1M, pH 7.4)로 세척한 후 0.001% proteinase K 처리, acetylation 과정을 거친 후 prehybridization buffer(50% deionized formamide, 10% 5M NaCl, 1% 50×Denhardt's solution, 0.5% 1M Tris(pH 8.0), 0.1% 0.5M EDTA(pH 8.0), 23% Dextran sulfate)에 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이어 0.4% 1M DTT, 1% yeast tRNA(10mg/ml)에 ³⁵S-UTP로 표지된 StAR riboprobe(1×10⁵cpm/slide)를 첨가하고 이것을 조직절편 위에 직접 점적한 다음 cover glass를 덮고 습윤상자에 넣어 60℃에서 24시간동안 hybridization 시켰다. 반응후 세척과정으로 4×SSC, 2×SSC로 세척한 후 RNase A(20µg/ml)를 10분간 처리하고 65℃에서 0.1×SSC로 30분간 세척하고 탈수과정을 거쳐 autoradiographic emulsion(NTB2, Eastman Kodak Co., New York, USA)으로 coating 하고 암상자에 넣어 4℃에서 14일동안 표지된 probe의 방사선이 감광되도록 노출시켰다. 그 후 D-19 developer(Eastman Kodak Co., New York, USA)로 현상시키고 rapid fixer로 고정한 후 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경과 암시야 현미경하에서 관찰하였다.

결 과

방사선 동위원소로 표지된 riboprobe를 이용한 *in situ* hybridization histochemistry 방법으로 2주령, 4주령, 10주령의 미성숙과 성숙한 흰쥐의 고환에서 StAR mRNA의 발현을 조사하였다. 먼저 실험에 사용된 ³⁵S-UTP 표지된 StAR riboprobe를 검정하기 위해서 양성대조군으로 흰쥐 난소를 이용하여 StAR mRNA의 발현양상을 조사하였다. 대조군의 난소에서는 황체에서 StAR mRNA에 대한 강한 양성반응세포가 관찰되었고 황체의 발달정도에 따

라 StAR의 발현양에도 변화가 있음을 확인하였다. 황체의 크기가 작고 황체세포의 분포가 균일한 활동기 황체에서 StAR mRNA는 강한 양성반응을 나타내었으며 황체의 크기가 크고 황체세포의 분포가 균일하지 못한 퇴화기 황체에서 StAR mRNA는 비교적 약한 양성반응을 나타내었다(Fig 1a). 그러나 sense probe를 사용한 음성대조군에서는 StAR mRNA에 대한 양성반응세포가 관찰되지 않았다(Fig 1b). 난소의 황체에서 강한 StAR mRNA의 발현은 다른 연구자들의 보고^{13,14}와 일치하므로 본 실험에 사용한 StAR riboprobe가 정확한 probe임을 증명해주었다.

흰쥐 고환에서 StAR mRNA는 사이질세포에서 발현되었으며 이들의 발현양상은 고환의 성숙정도에 따라 다른 차이를 보였다. 성 성숙이 일어나기 전인 2주령의 고환에서는 정세관의 크기가 매우 작았으며 사이질세포에서 StAR mRNA 발현이 아주 약하게 관찰되었다(Fig 2a, 2b). 성 성숙이 일어나기 시작하는 4주령의 고환에서는 정세관의 크기가 2주령의 정세관의 크기보다 커졌지만 정세관 내의 정자발생은 관찰되지 않았다. 그러나 이들 고환의 사이질세포에서는 StAR mRNA의 강한 양성반응세포를 관찰할 수 있었다(Fig 3a, 3b). 또한 성숙한 10주령의 고환에서는 정세관 내의 정자의 발생과정을 관찰할 수 있었고 사이질세포에서 StAR mRNA의 강한 양성반응세포를 관찰할 수 있었다(Fig 4a, 4b). 흰쥐 고환에서 StAR mRNA의 양성반응은 모두 사이질세포의 세포질에서 관찰되었고 정자발생세포, 정자세포, 지지세포 등 정세관벽을 구성하는 세포들에서는 관찰되지 않았다. 흰쥐 고환의 발달정도에 따른 StAR mRNA의 발현은 Table 1과 같이 4주령에서 가장 강하였고 그 다음은 10주령, 2주령 순으로 발현되었고 그의 정세관의 벽을 구성하는 정자발생단계별의 세포와 지지세포에서는 발현

Table 1. Expression of StAR mRNA in the rat testes by *in situ* hybridization

Cells in testis	Rat age		
	2 weeks	4 weeks	10 weeks
Leydig cells	+	+++	++
Sertoli cells	-	-	-
Spermatogenic cells	-	-	-

Signal intensity; -, none; +, weak; ++, intense; +++, very intense.

되지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 StAR mRNA가 testosterone를 합성하는 흰쥐 고환의 사이질세포에서 주로 발현됨을 확인하였다. 특히 StAR mRNA는 testosterone의 합성이 활발한 4주령과 10주령의 성숙한 고환의 사이질세포에서 강하게 발현되었고 2주령의 미성숙한 흰쥐의 고환에서는 약하게 발현되어 고환의 사이질세포에서 StAR mRNA 발현의 변화에 따른 testosterone 합성의 변화와 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

Epstein과 Orme-Johnson¹²은 StAR 단백질의 발현이 부신 및 성선 세포에서 스테로이드 합성의 활성도와 직접적으로 관련이 있다고 보고하였다. 황체의 조직학적 소견에서 progesterone의 생성이 활발한 시기는 황체세포가 균일하고 progesterone의 생성이 감소하는 시기의 황체세포는 불균일한 것으로 알려져 있다¹²⁻¹⁴. 본 연구에서 양성대조군의 조직으로 난소를 사용하였는데 StAR mRNA는 황체의 크기가 작고 황체세포의 분포가 균일하며 progesterone의 합성이 활발하게 일어나는 활동기의 황체에서 강하게 발현되었고 황체의 크기가 커지고 황체세포의 분포가 균일하지 못한 퇴화기의 황체에서는 약하게 발현되어 황체의 발달정도에 따라 StAR의 발현에 차이가 있음을 확인하였다. 따라서 황체의 발달정도에 따른 progesterone 생성에 StAR가 관여한다는 것을 알 수 있었다.

Kuhn-velten *et al*¹⁷이 흰쥐 고환의 발달단계에 따른 testosterone 합성량의 변화를 조사한 바 4주령부터 10주령까지의 testosterone 생성량은 미성숙한 흰쥐에서 보다 8.7배 증가하였으며 androgen 합성에 중요한 효소인 cytochrome P-450인 mitochondrial cholesterol monooxygenase(P-450(csc))와 microsomal steroid-17 α -monooxygenase(P-450(c17a))도 각각 8.3배, 24.5배 증가하였다. 이들의 결과는 성 성숙이 개시되는 4주령 이후의 흰쥐 고환에서 testosterone의 합성이 증가되었고 이는 cytochrome P-450(csc)와 P-450(c17a)의 증가에 의해서 일어남을 보여주었으며 4주령과 10주령의 흰쥐 고환의 사이질세포에서 StAR mRNA의 발현량이 2주령의 미성숙한 흰쥐에서 보다 증가한 본 연구의 결과와 일치함을 보여주었다. 특히 본 연구에서는 10주령의 사이질세포에서 보다 4주령의 사

이질세포에서 더 강력한 StAR mRNA의 양성반응을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 성 성숙이 개시되는 4주령의 고환에서 정자의 성숙과 부속생식기관의 발달에 중요한 역할을 하는 testosterone의 합성이 더 활발하게 일어남과 관련이 있음을 나타내고 있다.

최근 Kanzaki와 Morris¹⁸은 고환의 사이질세포에서 성장호르몬이 StAR, 3 β -HSD(3 β -hydroxysteroid dehydrogenase), androgen 등의 생성을 증가시켜 스테로이드 호르몬의 합성을 증가시킨다고 보고하였다. 성장호르몬과는 반대로 TNF α (tumor necrosis factor alpha)는 돼지 고환의 사이질세포에서 미토콘드리아의 cytochrome p450scc의 생성을 감소시키고 StAR mRNA와 단백질 발현을 감소시켜 testosterone의 합성을 감소시켰다¹⁹. 또한 lipopolysaccharide의 투여는 생쥐 고환의 사이질세포에서 StAR의 발현을 감소시켰고 testosterone의 생성을 감소시켰다²⁰. 따라서 고환의 사이질세포에서 testosterone의 생합성은 StAR 단백질 발현의 변화와 관련이 있다고 믿어진다.

본 연구에서는 미성숙과 성숙한 흰쥐 고환에서 StAR mRNA 발현의 변화를 조사한 바 고환의 사이질세포에서 일어나는 testosterone의 합성은 StAR mRNA 발현의 정도와 밀접한 관계가 있음을 추정할 수 있었다.

결 론

스테로이드 호르몬의 합성은 콜레스테롤로부터 시작되며 steroidogenic acute regulatory protein(StAR)은 스테로이드의 합성과정에서 콜레스테롤을 미토콘드리아의 안으로 신속하게 운반하는 역할을 한다. 본 연구에서는 스테로이드 호르몬의 합성량이 다른 미성숙한 2주령과 성숙한 4주령, 10주령의 흰쥐 고환을 대상으로 StAR mRNA의 발현양상을 *in situ* hybridization 기법을 이용하여 조사하였다.

흰쥐 고환에서 StAR mRNA는 testosterone을 분비하는 사이질세포에서 강하게 발현되었다. 특히 미성숙한 2주령의 고환에서는 StAR mRNA가 약하게 발현되었고 testosterone의 합성이 활발하게 이루어지는 4주령과 10주령의 성숙한 흰쥐 고환에서는 StAR mRNA가 강하게 발현되어 StAR mRNA 발현의 변화는 testosterone 합성량의 변화와 일치하였다. 이상에서 미성숙과 성숙한 흰쥐에서 StAR가 고환의 사이질세포에서 testosterone의 합성에 중요한 인자로 작용함을 알 수 있었다.

Legends for figures

- Fig 1. Dark-field photomicrographs for StAR mRNA in the rat ovary by *in situ* hybridization. Positive signals were detected on the corpus luteum (1a). No positive signals were detected on the corpus luteum in negative control with sense probe. CL: corpus luteum. Bars represent 250 μ m in 1a and 1b.
- Fig 2. Expression of StAR mRNA in the rat testis of the 2 weeks of age by *in situ* hybridization. Dark-field photomicrograph (2a) and bright-field photomicrograph (2b), Positive signals were weakly detected in Leydig cells. Scale bars: a; 250 μ m, b; 50 μ m.
- Fig 3 and 4. Localization of StAR mRNA in the rat testes of the 4 weeks (3a and 3b) and 10 weeks (4a and 4b) of age. Dark-field photomicrographs (3a and 4a) and bright-field photomicrographs (3b and 4b), Positive signals were strongly detected in Leydig cells (Arrows). Scale bars: 3a and 4a; 250 μ m, 3b and 4b; 50 μ m.

참 고 문 헌

1. Churchill DF, Kimura T. Topological studies of cytochrome P450_{scc} and P450_{11 β} in bovine adrenocortical inner mitochondria membranes. *J Biol Chem*, 254: 10443-10448, 1979.
2. Simpson ER, Boyd GS. The cholesterol side chain cleavage system of the adrenal cortex a mixed function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 24:10-17, 1996.
3. Stryer L. Biosynthesis of membrane lipids and steroids. 4th ed. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Com., New York, pp 702-709, 1995.
4. Krueger RJ, Orme-Johnson NR. Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein. *J Biol Chem*, 258:10159-67, 1983.
5. Pon LA, Hartigan JA, Orme-Johnson NR. Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein. *J Biol Chem*, 261:13309-16, 1996.
6. Stocco DM, Sodeman TC. The 30Kd mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are pressed from precursors. *J Biol Chem*, 266:19731-19738, 1991.
7. Clark BJ, Soo SC, Caron KM, et al. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Molecular Endocrinology*, 9:1346-1355, 1995.
8. Stocco DM. A StAR search: implications in controlling steroidogenesis. *Biol Reprod*, 56:328-36, 1997.
9. Clark BJ, Wells J, King SR, et al. Purification, cloning and expression of a novel LH-induced mitochondrial protein from the MA-10 mouse Leydig tumor cells; characterization of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. *J Biol Chem*, 269:28314-28322, 1994.
10. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, et al. Role of the steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 267:1828-1831, 1995.
11. Jefcoate CR, McNamara BC, DiBartolomeis MJ. Control of steroid synthesis in adrenal fasciculata cells. *Endocr Res*, 12:315-50, 1986.
12. Epstein LF, Orme-Johnson NR. Regulation of Steroid hormone biosynthesis; identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells. *J Biol Chem*, 266: 19739-19745, 1991.
13. Pescador N, Soumano K, Stocco DM, et al. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol Reprod*, 55:485-491, 1996.
14. Juengel JL, Meberg BM, Turizillo AM, et al. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology*, 136:5423-5429, 1995.
15. Angerer LM, Cox KH, Angerer RC. Demonstration of tissue-specific gene expression by *in situ* hybridization. *Methods Enzymol*, 152:649-61, 1987.
16. Duello TM, Tsai SJ, Van Ess PJ. *In situ* demonstration and characterization of progesterone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in first trimester human placentas. *Endocrinology*, 133:2617-2623, 1993.
17. Kuhn-Velten N, Bos D, Schermer R, et al. Age-dependence of the rat Leydig cell and Sertoli cell function. Development of the peripheral testosterone level and its relation to mitochondrial and microsomal cytochromes P-450 and to androgen-binding protein. *Acta Endocrinol*, 115:275-81, 1987.
18. Kanzaki M, Morris PL. Growth hormone regulates steroidogenic acute regulatory protein expression and steroidogenesis in Leydig cell progenitors. *Endocrinology*, 140:1681-6, 1999.
19. Mauduit C, Gasnier F, Rey C, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits Leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression. *Endocrinology*, 139:2863-8, 1998.
20. Bossmann BH, Hales KH, Li X, et al. Acute *in vivo* inhibition of testosterone by endotoxin parallels steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in Leydig cells. *Endocrinology*, 137:4522-4525, 1996.
21. King SR, Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, et al. Steroid production after *in vitro* transcription, trans-

lation, and mitochondrial processing of protein products of complementary deoxyribonucleic acid for

steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology*, 136:5165-76, 1995.
