

Effects of Hydrocortisone Administrations on Expressions of Casein and Prolactin Receptor mRNAs in Mammary Glands of Mid-Lactation of Korean Goats

G. J. Jeon[†], J. Y. Kim¹, J. G. Choi, Y. H. Jung, J. J. Park, Y. J. Rhee, J. S. Woo, D. S. Seo¹, S. G. Hong¹ and W. J. Yu¹

Daekwanryung Branch, National Livestock Research Institute.

Hydrocortisone 투여가 비유중기 재래산양의 유단백질과 유선세포 Prolactin Receptor mRNA 발현에 미치는 영향

전기준[†] · 김재영¹ · 최재관 · 정영훈 · 박정준 · 이용준 · 우제석 · 서동석¹ · 홍승국¹ · 유옥준¹
축산기술연구소 대관령지소

SUMMARY

Glucocorticoid is activating mammary gland cells for lactating animals, resulting in increasing abilities of the milk synthesis. Expression of the prolactin receptor(PRL-R) in mammary gland cells was closely associated with milk production. To increase lactation ability for the Korean Native Goats at mid-lactation period, 0.05, 0.1, and 0.2 g of hydrocortisone was administrated with 5 ml of saline, and injected into vein. For the control, 5 ml of saline was administrated in to vein. After 24 H, the mammary gland tissue was collected, and mRNA expression rates were investigated for the alpha-casein and PRL-R using competitive PCR(polymerase chain reaction). There was no significant differences between treatment and control groups for the mRNA expression rate of PRL-R in mammary gland cells after 24 h of administration of hydrocortisone. The rate of mRNA expression for the alpha-casein was increased 37%, 630%, and 380% at 0.05, 0.1, and 0.2 g of hydrocortisone administration groups, respectively, comparing with control group. The results suggested that PRL-R mRNA expression of mammary gland cell by administration of hydrocortison was not significant, but increase of the alpha-casein mRNA expression my be differences of expression of functional proteins in the cell and expression patterns of protein secretion time to out of the cell. This study showed increase of alpha-casein mRNA expression by administration of hydrocortisone at mid-lactation period of Korean native goat.

(Key words : Korean native goat, alpha-casein, PRL-R, hydrocortisone, mammary gland)

서 론

부신피질 호르몬인 glucocorticoid는 포유동물에

서 유선조직의 분화 및 발달에 관여하며, 유선세포의 유합성 능력을 증가시킨다(Lee 등, 1995; Teysot and Houdebine, 1981). Glucocorticoid는 prolactin(PRL) 존재 하에서 상승작용으로 보다 많은 β -

¹ 한국화학시험연구원(Safety Research Center, Korea Testing and Research Institute for Chemical Industry)

[†] Correspondence : E-mail: jeon7257@rda.go.kr

유단백질과 α -lactalbumin의 합성을 증가시킨다(Ono and Oka, 1980).

뇌하수체 전엽에서 분비되는 PRL은 유합성과 비유유지를 위한 단백질 호르몬으로서(Christine 등, 1998), 표적세포막에 존재하는 PRL-R와 특이적으로 결합하여 생리적 기능을 수행한다. PRL-R 발현은 glucocorticoid에 의하여 증가되며(Phillips 등, 1997), progesterone에 의하여 억제된다(Ormandy & Sutherland, 1993). 유선세포의 PRL-R 발현은 비유개시와 비유유지에 필수 요인으로서 비유개시는 분만 직후 유선세포 PRL-R의 급격한 발현 증가와 더불어 일어난다. 임신 초기와 중기에 난소를 제거하여 progesterone 분비를 폐쇄하면, 유선세포 PRL-R 발현은 증가되며 비유가 개시된다(Mizoguchi 등, 1996; 1997). 비유기 유선세포의 PRL-R 발현장에는 유합성 능력결여로 비유가 일어나지 않는다(Sakai 등, 1994). 비유기 유선세포의 PRL-R 발현량과 유생산량은 동일한 유형의 증가 감소 곡선을 나타낸다. 비유개시와 함께 PRL-R과 유합성량이 증가하다가 감소한다(Jara-Almonte and White, 1972; Sakai 등, 1978). 생쥐 유선세포에서 유래한 HC11 세포주에서는 PRL-R 유전자 도입이 PRL의 자극 없이 β -유단백질 전사를 자극한다(Gourdou 등, 1996). 이상과 같이 비유기 유선세포의 PRL-R 발현은 유합성에 직접적인 영향을 미친다.

통칭 흑염소라고 불리는 재래산양은 우리나라 고유의 가축으로서 한우와 더불어 한국을 대표하는 고유 축산자원이다. 재래산양은 전통적으로 고기를 보양식품으로 이용한다. 재래산양의 생산성에 있어서 어미의 산유량 부족이 생산성 저하의 주요 요인이다(배, 1992). 본 실험은 비유기 유선세포의 PRL-R 발현 조절에 의한 유합성 향상을 위한 일환으로, 비유 중기의 재래산양에 hydrocortisone을 투여하여 유선세포의 PRL-R와 α -유단백질 유전자 발현량을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

임신한 초산의 재래산양 12두를 구입하여 축산

기술연구소 대관령 지소에서 실험기간 동안 사육하였다. 분만 당일을 비유 0일로 하여 비유 35일령에 대조구 3두에 생리식염수 5 ml을 정맥투여하였고, 처리구는 hydrocortisone 0.05, 0.1, 0.2 g을 5 ml 생리식염수에 용해하여 각각 3두의 재래산양에 정맥투여하였다. 투여 24시간 후에 외과적 수술을 수행하여 유선조직을 약 2 g씩 채취하였다.

2. 시약 및 재료

Hydrocortisone(H4001)은 Sigma사 제품을 구입하였으며, Takara 사의 competitive DNA construction kit(#RR017)을 구입하여 competitive DNA 합성에 이용하였다. RNA는 Trizol(Life Technologies, Inc.)을 사용하여 유선조직에서 추출하였다. 역전사효소, DNA 중합효소와 dNTP는 GibcoBRL 사의 제품을 구입하여 사용하였다. 역전사에서는 Takara 사의 hexa-deoxyribonucleotide mixture random primer를 이용하였다.

3. 역전사와 PRL-R와 α -유단백질의 competitive DNA 합성

재래산양으로부터 채취한 유선조직을 Trizol를 이용하여 RNA를 분리하여서, 1.25 μ g RNA와 100 pmol random primer을 넣어서 65°C에 5분간 결합(annealing) 하였다. 3분간 얼음에 넣은 후 0.1 M DTT, first single-strand buffer, 20 mM dNTP와 역전사효소를 넣고 37°C에서 90분간 cDNA로 역전사하였다. Competitive DNA 합성은 competitive DNA construction kit에 제공된 λ -phage DNA 일부분인 430염기의 양말단 20개의 염기에 산양 PRL-R의 cDNA 상단부위로부터 241~260염기(acatcagcagaggagatgc)와 780~799염기(agatatcacagcctctctgcg)가 연결된 primer를 제작하였다. PRL-R competitive DNA 제작용 sense primer는 5'-ACATCAGCAC AGAGGAATGCGTACGGTCATCATCTGACAC-3'이고 antisense primer는 5'-GCGAGAAGGCTGTGATA-TCTTGGGAGTAAGCGTATTGCTA-3'이다.

PRL-R competitive DNA 제작용 primer를 사용하여 λ -phage DNA를 PCR 하면, 양말단에 산양의 PRL-R 염기를 포함한 470염기의 PRL-R competitive DNA가 합성된다. α -유단백질의 competitive

DNA에도 PRL-R competitive DNA와 같은 방법으로 합성하였으며, 사용된 sense primer는 5'-AA-CATGTCTCCTCCAGTGAGGTACGGTCATCATCTGACAC-3' 이고, antisense primer는 5'-CAAC-AGTCTTGAGATACTGGTGGGAGTAAGCGTATTGCTA-3'로 PCR하여 430염기쌍의 α -유단백질 competitive DNA를 합성하였다.

4. PRL-R와 α -유단백질 mRNAs의 발현량 측정
PRL-R의 competitive PCR에 사용된 sense primer는 5'-ACATCAGC ACAGAGGAATGCGT-3'이고, antisense primer는 5'-GCGAGAAGGCTGTGATATCT-3'이다. PCR결과 PRL-R는 559 염기쌍을 나타내고 PRL-R의 competitive DNA는 430염기쌍이 된다. α -유단백질의 competitive PCR에 사용된 sense primer는 5'-AACATGTCTCCTCCAGTGAG-3'이고, antisense primer는 5'-CAACAGTCTTGAGATACTGG-3'이다. α -유단백질의 competitive PCR결과 α -유단백질은 540염기쌍을 이루고, α -유단백질의 competitive DNA는 430염기쌍을 나타낸다. 같은 튜브에 1 μ l PRL-R cDNA와 일련의 일정량 competitive DNA(10fg~1ng)를 넣어서 PCR를 수행하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성(denaturation), 52 $^{\circ}$ C에서 30초간 결합(annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 60초간 신장(extension) 과정을 1주기(cycle)로 33회 실시하였으며, 전기영동 후 ImageMaster-TM으로 PRL-R와 competitive DNA 밴드 농도를 측정하였다. α -유단백질의 competitive PCR도 PRL-R competitive PCR와 동일하게 수행하였다.

5. 통계분석

Duncun's multiple 방법으로 유의차를 비교 조사하였다.

결과 및 고찰

비유기별 유선조직의 PRL-R 발현은 비유중기 이후에 감소되기 시작되며, PRL-R 감소와 더불어 비유량도 감소하기 시작하였으며(Kim, 1996), 비유중기 재래산양에 hydrocortisone을 투여하여 유선조직의 PRL-R 발현을 증가시킴으로써 유생산량을 증가시키기 위하여 투여시기를 비유중기로 결정하였다.

Competitive PCR은 유전자 발현을 상대량과 절대량 모두 측정할 수 있는 훌륭한 도구이다(Mizoguchi 등, 1996). 측정의 정확성은 목표 유전자와 비교대상인 competitive DNA에 의존한다. PRL-R competitive DNA는 λ -phage DNA에 PRL-R의 상단부위로부터 241~260염기와 780~799염기를 연결시키므로서 PRL-R과 competitive DNA를 동일한 primer로 PCR할 수 있다. α -유단백질 competitive DNA도 PRL-R과 동일한 방법으로 상단부위로부터 71~90 염기와 591~610염기를 λ -phage DNA 양 말단에 결합시켜서 α -유단백질과 competitive DNA에 동일한 primer 결합부위를 마련한다.

1×10^{-6} ~1ng 농도별 competitive DNA와 1 μ l PRL-R cDNA를 동일 튜브에 넣고 PCR를 실시하였다. PRL-R cDNA와 competitive DNA가 0.1pg에서 약 1:1의 밴드농도를 나타낸다(Fig. 1). Competitive DNA 표준값으로 0.1pg으로 하여서 모든 PRL-R 발현량 조사에 이용하였다.

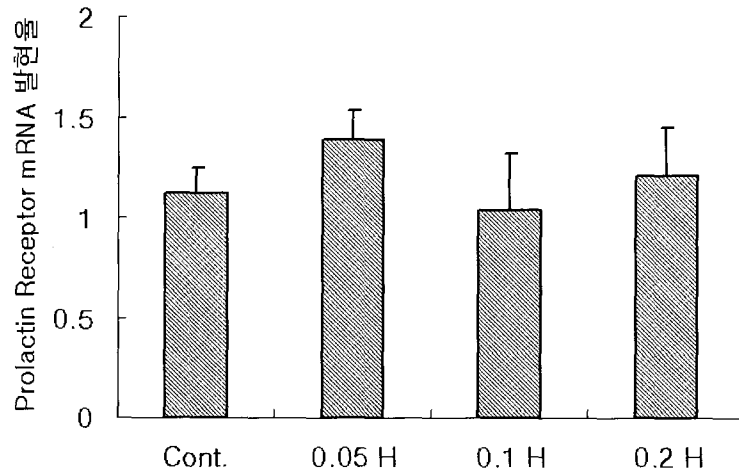


Fig. 1. Comparison of PRL-R to a series of competitive DNA concentrations.

좌측 첫 번째는 100 bp DNA marker이다. Competitive DNA 농도는 좌측 두 번째에서부터 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 , 1×10^{-1} , 1×10^{-2} pg이며, cDNA에는 1 μ l씩 동일량을 사용하였다. 윗 밴드는 PRL-R이고, 아랫 밴드는 competitive DNA이다.



(A)



(B)

Fig. 2. Expression levels of PRL-R mRNA treated by a dose-dependent hydrocortisone.

A : Competitive PCR 산물의 전기영동 결과로서, 좌측 첫번째는 100bp DNA marker이고, 3개씩 대조구인 생리식염수 투여구, 0.05g hydrocortisone 투여구, 0.1g hydrocortisone 투여구, 0.2g hydrocortisone 투여구이다.

B : 전기영동결과의 밴드 농도를 측정하여서 PRL-R 발현율을 나타냈다. Cont: 생리 식염수 투여구, 0.05 H: 0.05g hydrocortisone 투여구, 0.1H: 0.1g hydrocortisone 투여구, 0.2H: 0.2g hydrocortisone 투여구이다.

0.1pg competitive DNA를 모든 cDNA 표본 1 μ l 과 동일한 튜브에 넣은 후 PRL-R 발현량을 PCR하였다(Fig. 2A). Hydrocortisone 투여구에서 PRL-R 발현율이 높은 경향을 보이나 유의한 차이는 없었다(Fig. 2B). Hydrocortisone은 혈류로 분비되면 몇 분 내에 특정 mRNA를 발현시킨다. PRL-R mRNA 발현은 세포 내 환경에 의하여 빠른 시간 내에 진행되어서 6시간 이내에 최대 발현율을 보이고 이후 발현량은 급격히 감소한다(Kim 등, 1997).

이러한 발현양상은 호르몬 수용체와 같은 세포 내에서 기능적 단백질의 경우는 필요시 짧은 시간

내에 전사과정이 일어나며, 이후에는 소모된 양의 단백질을 보충할 만큼의 최소한 양만을 전사한다. 세포 내 단백질 수준의 PRL-R은 *in vivo*에서 생리적 소요량의 약 2배 수준으로 발현되어 있다(Etoh and Sakai, 1994; Sakai, 1991; 1994). 기능적 단백질과 mRNA의 발현양상의 차이가 hydrocortisone 투여 24시간 후에 유선조직에서 PRL-R mRNA 발현에서 생리식염수 대조구와 hydrocortisone 투여구와의 차이가 없는 원인으로 사료된다. 시간대별 PRL-R mRNA와 단백질 발현조사는 앞으로 수행되어야 할 것이다.

1×10^{-6} ~10ng 농도별 competitive DNA와 1 μ l



Fig. 3. Comparison of alpha-casein to a series of competitive DNA concentrations.

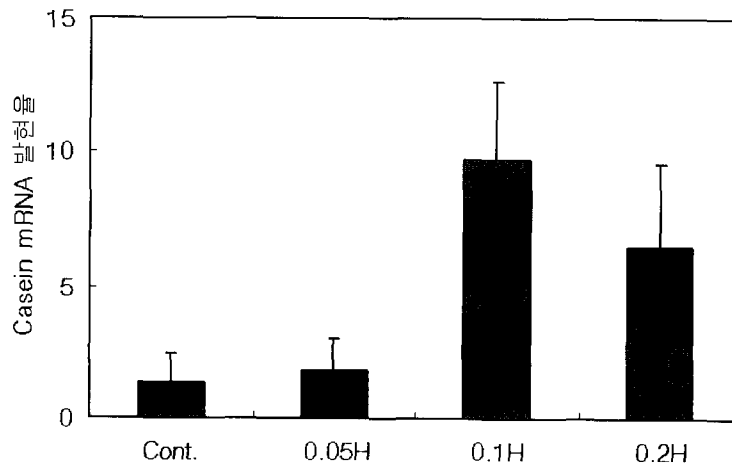
좌측 첫 번째는 100bp DNA marker이다. Competitive DNA 농도는 좌측 두 번째에서부터 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 , 1×10^{-1} pg이며, cDNA에는 $1 \mu\text{l}$ 씩 동일량을 사용하였다. 윗 밴드는 α -유단백질이고, 아랫 밴드는 competitive DNA이다.

α -유단백질 cDNA를 동일 튜브에 넣고 PCR를 수행하였다. α -유단백질 cDNA와 competitive DNA가 1~10pg에서 약 1:1의 밴드농도를 나타냈다(Fig. 3). Competitive DNA 표준값으로 10 또는 100pg으로 하여서 모든 α -유단백질 발현량 조사에 이용하였다.

α -유단백질은 10 또는 100pg competitive DNA를 모든 cDNA 표본 $1 \mu\text{l}$ 과 동일한 튜브에 넣은 후 PCR하였다(Fig. 4A). α -유단백질 mRNA 발현은 대조구에 비교하여 0.05g hydrocortisone 투여구가 0.3배, 0.1g 투여구가 6배, 0.2g 투여구가 3배 증가하였다(Fig. 4B). 유단백질과 같이 세포외부로 분



(A)



(B)

Fig. 4. Expression levels of alpha-casein mRNA treated by a dose-dependent hydrocortisone.

A : Competitive PCR 산물의 전기영동 결과로서, 좌측 첫 번째는 100 bp DNA marker이고, 3개씩 대조구인 생리식염수 투여구, 0.05 g hydrocortisone 투여구, 0.1 g hydrocortisone 투여구, 0.2 g hydrocortisone 투여구이다.

B : 전기영동결과의 밴드 농도를 측정하여서 α -유단백질 발현율을 나타냈다.

Cont : 생리식염수 투여구, 0.05H: 0.05 g hydrocortisone 투여구, 0.1H: 0.1g hydrocortisone 투여구, 0.2H: 0.2 g hydrocortisone 투여구이다.

비되는 단백질 mRNA 발현은 세포 내 기능성 단백질과는 다른 발현양상을 나타냈다.

분비성 단백질은 단백질 발현과 mRNA 발현양상이 동일하다(Kim, 1996; Jara-Almonte and White, 1972). 그러므로, 분비성 단백질은 mRNA 발현이 높으면 단백질도 높게 발현된다.

본 실험결과 비유중기 재래산양에 0.05, 0.1과 0.2g hydrocortisone 농도별 투여는 유선세포 PRL-R mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았으나, 투여 농도에 따라서 α -유단백질의 mRNA 발현은 증가시켰다. 본 실험에서 생략된 PRL-R와 α -유단백질의 시간별 발현양상과 단백질 수준에서의 발현양상은 앞으로 수행하여야 할 과제이다.

적 요

Glucocorticoid는 비유기 동물의 유선세포 prolactin receptor(PRL-R) 발현을 증가시키며, 전반적인 유선세포의 융합성 작용을 활성화시킴으로 융합성 능력을 증진시킨다. 유선세포 PRL-R 발현량 증가는 유생산량 향상과 밀접한 관계를 갖는다. 본 실험은 비유중기의 재래산양의 융합성 능력을 향상시키고자, 0.05, 0.1과 0.2 g hydrocortisone을 5ml의 생리식염수에 현탁하여, 정맥투여하고 유선세포 PRL-R와 α -유단백질 mRNAs 발현량을 조사하였다. 대조구로는 5ml의 생리식염수를 정맥투여하였다.

24시간 후 유선조직을 채취하여 α -유단백질과 PRL-R mRNA 발현량을 competitive PCR(polymerase chain reaction)로 발현량을 조사하였다. Hydrocortisone 처리 24시간 후 재래산양 유선세포의 PRL-R mRNA 발현량은 대조구의 PRL-R mRNA 발현량과 유의한 차이가 없었다. α -유단백질 mRNA 발현은 대조구에 비하여 0.05g hydrocortisone 투여구는 37%, 0.1g hydrocortisone 투여구는 630%, 0.2g hydrocortisone 투여구는 386% 증가하였다. Hydrocortisone 처리에 의한 유선세포 PRL-R mRNA 발현에 변화가 없었으나 α -유단백질 mRNA 발현 증가는 세포 내 기능성 단백질 발현과 세포 외부로 분비되는 단백질의 시간에 따른 발현양상의 차이인 것으로 사려된다. 본 연구에서 비유중기 재래

산양에 hydrocortisone 투여는 α -유단백질 mRNA 발현을 증가시키는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Christine B, Goffin V, Edery, M, Binart N and Kelly PA. 1998. Prolactin(PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 19:225-268.
- Etoh D and Sakai S. 1994. Mechanism of prolactin action the dissociation of prolactin from rabbit mammary gland receptor. *B.B.R.C.*, 202:1395-1399.
- Gourdou I, Gabou L, Paly J, Kermabon A, Belair L and Djiane J. Development of a constitutively active mutant form of the prolactin receptor, a member of the cytokine receptor family. *Mol. Endocrinol.*, 10:45-56.
- Jara-Almonte M and White JM. 1972. Milk production in laboratory mice. *J. Dairy Sci.*, 55: 1502-1505.
- Kim JY. 1996. Effects of accumulation of milk on the expression of PRL receptor and casein genes in the mouse mammary gland at different stages of lactation. Tokyo University Ph. D. Theme.
- Kim JY, Mizoguchi Y, Yamaguchi H, Enami J and Sakai S. 1997. Removal of milk by suckling acutely increases the prolactin receptor gene expression in the lactating mouse mammary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 131:31-38.
- Lee PPH, Darcy KM, Shudo K and IP MM. 1995. Interaction of retinoids with steroid and peptide hormones in modulating morphological and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells. *Endocrinology*, 136:1718-1730.
- Mizoguchi Y, Kim JY, Sasaki T, Hama T, Sasaki M, Enami J and Sakai S. 1996. Acute expression of the PRL receptor gene after ovariecto-

- my in midpregnant mouse mammary gland. *Endocrine J.*, 43:537-544.
- Mizoguchi Y, Kim JY, Enami J and Sakai S. 1997. The regulation of the prolactin receptor gene expression in the mammary gland of early pregnant mouse. *Endocrine J.*, 44:53-58.
- Ono M and Oka T. 1980. The differential actions of cortisol on the accumulation of α -lactalbumin and casein in midpregnant mouse mammary gland in culture. *Cell*, 19:473-480.
- Ormandy CJ and Sutherland RJ. 1993. Mechanisms of prolactin receptor regulation in mammary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 91:C1-C6.
- Phillips ID, Anthony RV, Butler TG, Ross JT and McMillen IC. 1997. Hepatic prolactin receptors gene expression increases in the sheep fetus before birth and after cortisol infusion. *Endocrinology*, 138:1351-1354.
- Sakai S. 1991. Effect of hormones on dissociation of prolactin from the rabbit mammary gland prolactin receptor. *Biochem. J.*, 279:461-465.
- Sakai S. 1994. Negative cooperativity in the prolactin-receptor interaction in the rabbit mammary gland: Action of high prolactin concentration. *J. Dairy Sci.*, 77:433-438.
- Sakai S, Enami S, Nandi S and Banerjee MR. 1978. Prolactin receptor on dissociated mammary epithelial cells at different stages of development. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 12:285-298.
- Sakai S, Mizuno M, Harigaya T, Yamamoto K, Mori T, Coffey RJ and Nagasawa H. 1994. Cause of failure of lactation in mouse mammary tumor virus/human transforming growth factor α -transgenic mouse. *P.S.E.B.M.*, 205: 236-242.
- Teyssot B and Houdebine L. 1981. Role of progesterone and glucocorticoids in the transcription of the β -casein and 28-S ribosomal genes the rabbit mammary gland. *Eur. J. Biochem.*, 114: 597-607.
- 배대식. 1992. 염소(혹염소). 내외출판사. 11-46.

(접수일: 2002. 8. 1/ 채택일: 2002. 11. 20)