

체외에서 돼지 황체화 과립막세포의 스테로이드 호르몬 생산에 미치는 Relaxin과 Insulin의 영향

이명섭 · M. Shamim Hossein · 이창규¹ · 강성근* · 이병천 · 황우석
서울대학교 수의과대학

Effects of Relaxin and Insulin on Porcine Granulosa-lutein Cell Steroidogenesis *In Vitro*

M. S. Lee, M. S. Hossein, C. K. Lee¹, S. K. Kang^{*}, B. C. Lee and W. S. Hwang
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

SUMMARY

To investigate the influence of relaxin and insulin on the ovarian steroid secretion of porcine granulosa cells, we used porcine granulosa cells partially luteinized in a primary culture and examined the production of progesterone and 17 β -estradiol. Porcine granulosa cells were cultured in the presence of serum for 48 h after attachment and subsequently in the absence of serum for 24 h. To confirm the dose dependency of relaxin or insulin, various concentrations (10, 100, 1000 ng/ml) of relaxin or insulin were added in the medium for the last 24 h, respectively. To investigate the combinational effect of relaxin and insulin, 100 ng/ml relaxin and/or 100 ng/ml insulin were added in the medium for the last 24 h in the presence or absence of luteinizing hormone (100 ng/ml). The medium was collected and used for radioimmunoassay to measure the production of progesterone and 17 β -estradiol. Relaxin or insulin increased the production of progesterone by dose dependency, respectively while they had no effect of the production of 17 β -estradiol. Relaxin (100 ng/ml) and/or insulin (100 ng/ml) significantly increased the production of progesterone in the presence of luteinizing hormone while they had no effect of the production of 17 β -estradiol. In conclusion, relaxin and/or insulin increased the progesterone secretion of porcine granulosa-lutein cells *in vitro* while had no effect on the production of 17 β -estradiol and had no synergism on the effects. The effects of relaxin and/or insulin on the production of progesterone were augmented by the presence of luteinizing hormone.

(Key words : relaxin, insulin, granulosa-lutein cell, progesterone, 17 β -estradiol)

서 론

Relaxin은 insulin-like growth factor (IGF) family의 일원으로 체외, 체내 모두에서 생식계 조직의 성장을 촉진한다. 돼지 난포에서는 과립막세포와

협막세포의 성장을 유도하는데 DNA의 합성과 세포 증식을 통해 이루어진다 (Zang과 Bagnell, 1993; Zang과 Bagnell, 1994). Relaxin과 insulin의 구조적 유사성을 통해 (Schwabe와 McDonald, 1977) 상승 효과에 대한 연구가 제기되었는데 흰쥐와 사람 지

* 본 연구는 과기부 최고과학자 지원기금, Biogreen(21-1000520030100000)과 수의과학연구소의 지원으로 수행되었음
¹ 서울대 농업생명과학대학

[†] Correspondence : E-mail : kangsn@snu.ac.kr

방세포에서 relaxin은 insulin binding과 포도당 전달을 강화시키고 (Olefsky 등, 1982; Jarrett 등, 1984) 3T3-L1 cell line에서 insulin의 포도당 흡수 효과를 증진시켜 형태학적 변화를 일으키지만 그 자신은 포도당 전달에 효과가 없었다 (Pawlina 등, 1989). 이러한 연구를 통해 relaxin이 insulin-like family의 다른 인자들과 상호작용하여 과립막세포의 성장에 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었다.

한편, 난포의 성장과 성숙은 과립막세포의 성장과 분화에 의존하며 체외에서 난포 과립막세포의 성장과 분화를 연구하기 위한 단일층 배양의 이용은 많은 관심을 받고 있다. 이러한 모델을 통해 돼지 난포 과립막세포 성장에 관련된 relaxin과 insulin의 촉진 작용이 보고되었고 (Zang과 Bagnell, 1993), 체외에서 스테로이드의 생산에 관한 보고도 있었다 (Denkova 등, 1998). 그러나 황체기 과립막세포에서 relaxin과 insulin의 단일 혹은 상호작용에 대한 연구는 없었으며 relaxin은 대형 황체 세포에서 합성 및 저장되고 주된 기능이 임신 유지 및 출산에 관여하므로 (Hansel 등, 1987) 난포의 성장보다는 황체기 이후의 스테로이드 생산에 대한 작용이 더욱 중요하다고 할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 성숙기 돼지 난포에서 과립막세포를 분리하고 체외에서 혈청 존재 하에 배양하여 황체기로 분화를 유도하였고 relaxin과 insulin을 각각 또는 병합 처리하여 스테로이드 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 황체호르몬의 존재가 미치는 영향에 대해서도 조사하였다. 먼저 용량 의존성을 검사하기 위하여 농도별로 처리하여 progesterone (P4)와 17 β -estradiol (E2) 농도를 조사하였고 병합하여 상호 작용을 조사하되 황체 호르몬의 존재와 비존재 시 각각의 결과를 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 돼지 난포 과립막세포의 분리와 배양

돼지 난소는 도축장에서 수집하여 penicillin G (100 U/ml, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO)와 streptomycin sulphate (100 mg/ml, Sigma-Aldrich Corp)가 포함되어 있는 생리적 식염수에 담아 30-

35 °C에서 2시간 내에 실험실로 이동하였다. 3~6 mm 직경의 난포만을 18G 바늘이 장착된 5ml 주사기로 흡입하여 침전을 위해 난포액을 5분 동안 37 °C에서 정치하였다. 침전물을 제거하고 30분 더 정치하여 균일한 크기의 난포 과립막세포를 얻었다. 상층액은 거의 대부분 단일 세포여서 폐기하고 세포피만을 배양접시로 옮겼다. 해부현미경으로 관찰하면서 난자와 난자-난구복합체, 기타 이물질을 모두 제거하였고 인산완충액으로 수회 원심 세척하였다. 23G 바늘이 장착된 1ml 주사기로 세포피를 분해하고 세포 농도를 결정하기 위해 혈구세포판으로 계수하였다.

분리된 과립막세포를 2.5×10^6 /well의 농도로 10% FBS가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL Grand Island, NY, USA)액에 재 부유시켜 24well 배양접시 (Becton Dickinson and Co, Franklin Lakes, NJ)에 넣어 5% CO₂ 및 37 °C의 조건에서 배양하였다. 16시간 후 배양접시에 부착됨을 확인하고 10% FBS가 포함된 신선한 DMEM 액으로 배지를 교환하였다. 48시간 계속 배양하여 황체화를 유도하였고 형태학적으로 황체화를 확인하였다. 48시간 후 FBS가 포함되지 않은 무혈청 DMEM 액으로 배지를 교환하고 24시간 배양하였다.

2. 약제의 처리와 호르몬 분석

모든 약제는 무혈청 배지의 사용시 첨가하였다. 본 실험에 사용된 relaxin은 민계식 고수 (진주대)로부터 증정받았다. Relaxin과 insulin (Sigma-Aldrich Corp)은 각각 10, 100, 1,000 ng/ml의 농도로 처리하여 농도 의존성을 조사하였다. 병합실험에서는 각각 100 ng/ml의 농도로 사용하였고 황체호르몬 (100 ng/ml, Sigma-Aldrich Corp)을 처리한 경우와 비처리한 경우로 나누어 각각 조사하였다. 최종 배양 후 배지를 수집하여 RIA 법 (radioimmunoassay)으로 P4와 E2를 조사하였다. 항체가 흡착되어 있는 tube는 ICN Biomedicals사 (Costa Mesa, CA) 제품을 사용하였다.

3. 통계분석

실험구 간 통계학적 유의성을 판정하기 위하여

Prizm 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) 를 이용하였다. 일원 분산분석 (one-way ANOVA) 에 이은 Tukey test를 실시하였고 P 값이 0.05 이하일 때 통계학적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. Relaxin과 Insulin의 농도별 처리 효과

Relaxin을 10 (R10), 100 (R100), 1000 (R1000) ng/ml의 농도로 처리했을 때 농도의 증가에 따라 P4의 생산이 증가하였는데 1,000 ng/ml (R1000)에서 통계학적으로 유의적인 차이를 보였다. E2의 생산에는 영향이 없었다 (Fig. 1).

Insulin을 10 (I10), 100 (I100), 1000 (I1000)

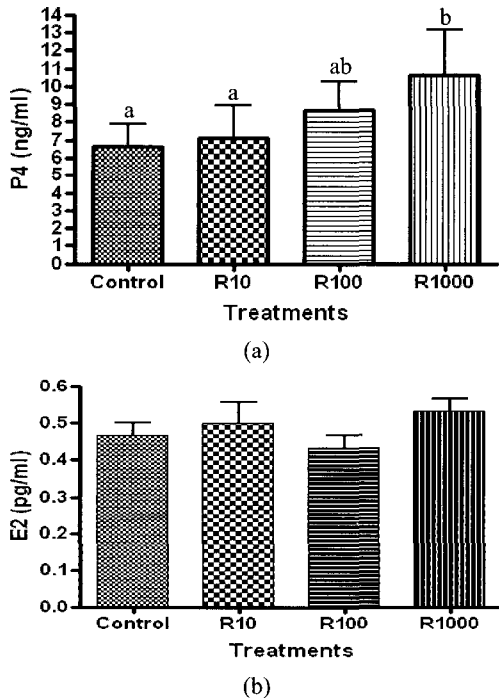


Fig. 1. Effect of relaxin on (a) progesterone (P4) and (b) 17 β -estradiol (E2) production in porcine granulosa-lutein cells *in vitro*. ^{ab} significantly ($P < 0.05$) different among the groups with different superscripts. Data represent the mean \pm SEM of three individual experiments. Treatments: R10 (10 ng/ml), R100 (100 ng/ml), R1000 (1000 ng/ml).

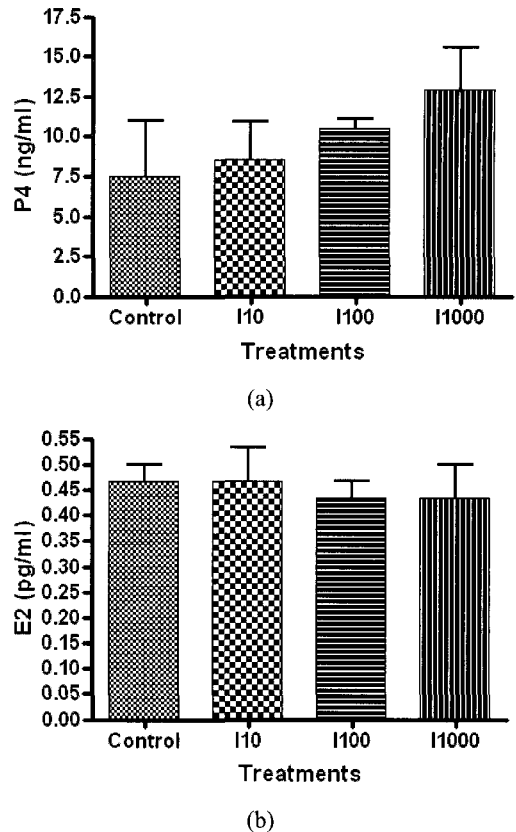


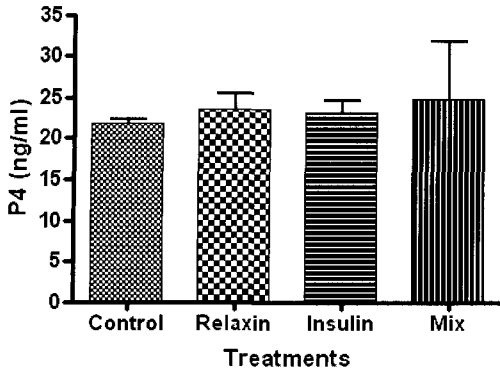
Fig. 2. Effect of insulin on (a) progesterone (P4) and (b) 17 β -estradiol (E2) production in porcine granulosa-lutein cells *in vitro*. Data represent the mean \pm SEM of three individual experiments. Treatments: I10 (10 ng/ml), I100 (100 ng/ml), I1000 (1000 ng/ml)

ng/ml의 농도로 처리했을 때 농도의 증가에 따라 P4의 생산이 증가하였는데 통계학적으로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. E2의 생산에는 영향이 없었다 (Fig. 2).

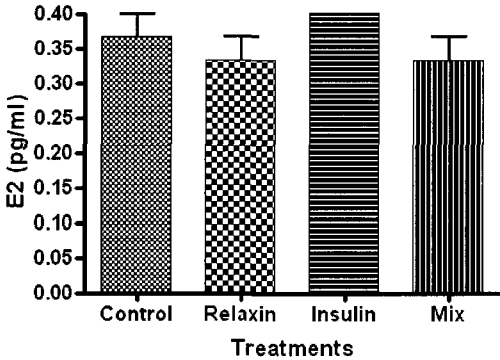
2. Relaxin과 Insulin의 병합 처리와 황체호르몬의 영향

Relaxin (100 ng/ml)과 insulin (100 ng/ml)을 단독 또는 병합하여 처리하였을 때 P4의 생산에는 통계학적으로 유의성 있는 결과는 나타나지 않았다. 또한 E2의 생산에도 별다른 영향이 없었다 (Fig. 3).

Relaxin과 insulin을 무혈청 배지에 첨가할 때 황



(a)



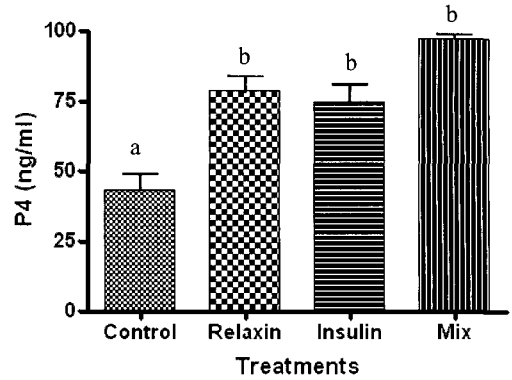
(b)

Fig. 3. Effect of relaxin (100 ng/ml) and/or insulin (100 ng/ml) on (a) progesterone (P4) and (b) 17 β -estradiol (E2) production in porcine granulosa-lutein cells *in vitro*. Data represent the mean \pm SEM of three individual experiments. Mix means relaxin plus insulin.

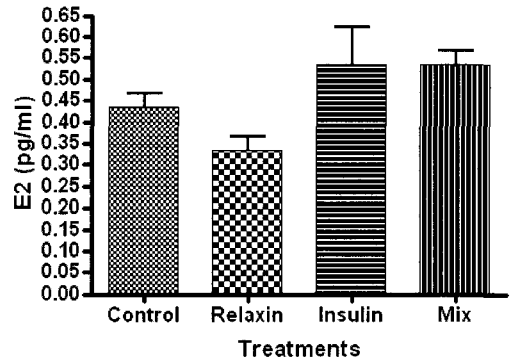
체호르몬 (100 ng/ml)을 처리한 경우, relaxin과 insulin 처리구에서 P4의 생산이 유의적으로 증가함을 보였다. 또한 병합한 경우에도 대조구보다 P4의 생산이 유의적으로 증가하였으나 병합에 의한 상승 효과는 나타나지 않았다. E2의 생산에는 아무런 영향이 없었다 (Fig. 4).

고 찰

Relaxin은 임신과 출산외에도 많은 작용을 하는 polypeptide hormone으로 알려져 있는데 (Pawlina 등, 1989; McGovern 등, 1992; Peaker 등, 1995; Bani 등, 1995; Cheah 등, 1995; Banisacchi 등,



(a)



(b)

Fig. 4. Effect of relaxin (100 ng/ml) and/or insulin (100 ng/ml) on (a) progesterone (P4) and (b) 17 β -estradiol (E2) production in the presence of luteinizing hormone in porcine granulosa-lutein cells *in vitro*. ^{a,b} significantly ($P < 0.05$) different among the groups with different superscripts. Data represent the mean \pm SEM of three individual experiments. Mix means relaxin plus insulin.

1995), 난포 과립막세포의 기능을 조절한다. 한편, 황체기에 황체화 과립막세포에서는 스테로이드 호르몬 생성 효소의 발현이 증가되고 특히 P4의 생산이 우월하게 된다. 체외에서의 과립막세포의 구조적, 기능적인 분화는 여러 인자들에 의해 유도되는데 혈청을 첨가하면 최초 24시간 내에 기질에의 부착과 섬유아 세포 형태로 모양이 변하는 것을 관찰할 수 있으며 다음 48시간이 지나면 도로 모양의 상피세포 형태로 변화하고 P4의 생산이 대수적으로 증가한다 (Pescador 등, 1999; Murphy와

Dobias, 1999). P4의 생산에는 미토콘드리아 내막에 있는 P450 side chain cleavage (P450scc) 효소와 활면 소포체에 있는 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) 효소의 작용이 관여하는데, 황체기 P4의 생산에 중요한 단계는 두 효소가 생산속도를 조절하는 과정보다는 cholesterol이 미토콘드리아 내부로 이동하는 과정이 주요하다고 알려져 있다. 또한 황체기 스테로이드의 생산에 중요한 단백질로 steroidogenic acute regulatory protein (StAR)을 들 수 있는데 insulin과 IGFs는 과립막세포와 협막세포가 체외에서 황체화될 때 StAR의 출현을 촉진하고 성선자극 호르몬에 의해 유도된 StAR의 발현을 증대시킨다 (Pescador 등, 1999; Lavoie 등, 1999). 최근의 연구에 의하면 황체호르몬과 insulin이 상승작용하여 체외에서 분화된 돼지 난포 과립막세포에 의한 P4 생산을 촉진한다고 알려졌으며 이러한 상승작용은 난포 과립막세포의 low-density lipoprotein (LDL) receptor, StAR과 P450scc 유전자 발현에 의해 이루어진다고 보고되었다 (Sekar 등, 2000). 이러한 보고는 relaxin이 황체기 과립막세포의 스테로이드 생산에 미치는 영향에 insulin과 황체호르몬의 상호 작용을 검토할 필요성이 있음을 제안한다.

본 연구에서는 황체화 과립막세포에서 relaxin과 insulin을 농도별로 단독 처리하였을 때 황체화 돼지 과립막세포의 P4와 E2 생산에 대해 조사하였다 (Fig. 1, 2). Relaxin의 경우에는 P4의 생산에 있어 1,000 ng/ml에서 통계학적 유의성을 관찰할 수 있었으며 insulin의 경우에는 P4의 생산에 있어 통계학적 유의성을 관찰할 수 없었으나 두 약제 모두 전반적으로 용량 의존성이 나타남을 알 수 있었다. E2의 생산에서는 별다른 영향이 없어 전반적으로 효과가 없다고 사료된다. 이러한 결과는 황체화 과립막세포에서 P4의 생성 기전과 E2의 생성 기전이 다름에 따라 기인하는데 E2의 생산에는 인접한 황체화 협막세포로부터 대사기질인 androstenedione이 지속적으로 공급되어야만 하고 P4의 생산에 필요한 cholesterol은 황체화 과립막세포내에서 충분히 대사되기 때문이다 (Havelock 등, 2004). 또한 병합하여 처리한 경우 (relaxin, 100ng/ml; insulin, 100 ng/ml), P4의 생산에 병합에 의

한 상승 효과는 나타나지 않았으며 황체호르몬 (100 ng/ml)의 존재 시 단독과 병합 처리구 모두에서 P4의 생산이 통계학적으로 유의하게 증가하였다. E2의 생산에는 모든 인자의 단독 및 병합에 의한 영향이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 황체화 과립막세포에서 황체호르몬이 StAR, P450scc 유전자 발현을 통해 P4의 생산을 증대시켜 relaxin과 insulin과 상승 작용하기 때문이다. E2의 생산에는 대사기질의 결핍에 의해 별다른 영향이 없음을 알 수 있었다 (Fig. 3, 4).

결론적으로 체외에서 황체화가 유도된 돼지 황체화 과립막세포의 스테로이드 호르몬 생산에 있어서 relaxin과 insulin의 효과는 P4 생산에 나타나며 E2의 생산에는 별다른 영향이 없었다. 이러한 효과는 약제의 용량이 증가함에 따라 증가하였고 병합 처리에 의한 상승 효과가 나타나지 않았다. 또한 황체호르몬은 relaxin과 insulin 처리구 모두에서 P4의 생산을 유의적으로 증가시켰다. 이러한 결과를 통하여 황체기 난포 과립막세포에서 스테로이드 호르몬의 생산에 relaxin과 insulin의 자극 효과를 검증하였고 황체호르몬에 의한 relaxin 및 insulin 작용의 증대를 관찰할 수 있었다.

적 요

Relaxin과 insulin이 돼지 난포 과립막세포의 스테로이드 호르몬 분비에 미치는 영향을 연구하기 위하여 체외에서 황체화된 과립막세포에서 progesterone과 17 β -estradiol의 생산을 조사하였다. 돼지 난포 과립막세포를 혈청 존재하에 배양접시에 부착 후 48시간 동안 체외배양하고 무혈청 배지에서 24시간 배양하였다. Relaxin과 insulin의 용량 의존성을 확인하기 위하여 다양한 농도 (10, 100, 1,000 ng/ml)를 각각 무혈청 배지에 첨가하였다. 병합 효과를 알아보기 위하여 100 ng/ml relaxin과 100 ng/ml insulin을 단독 혹은 병합하여 처리하였는데 황체호르몬 (100 ng/ml)을 처리한 경우와 처리하지 않은 경우 모두를 조사, 분석하였다. 최종 배양이 끝난 배양액을 수집하여 RIA법으로 progesterone과 17 β -estradiol의 농도를 조사하였다. Relaxin과 insulin은 용량이 증가될수록 progesterone의 생

산을 증가시켰으나 17 β -estradiol의 생산에는 아무런 영향이 없었다. 병합실험에서는 relaxin과 insulin 단독 또는 병합시 황체호르몬 존재 하에서 progesterone의 생산을 증가시켰으나 17 β -estradiol의 생산에는 아무런 영향이 없었다. 결론적으로 relaxin과 insulin은 돼지 황체화 과립막세포의 progesterone 분비를 증가시키지만 17 β -estradiol의 생산에는 효과가 없었으며 병합에 의한 상승효과는 없었다. Progesterone 생산에 미치는 relaxin과 insulin의 효과는 황체호르몬의 존재에 의해 증대되었다.

참고문헌

- Bani D, Masini E, Bello MG, Bigazzi M and Sacchi TB. 1995. Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 55:5272-5275.
- Banisacchi T, Bigazzi M, Bani D, Mannaioni PF and Masini E. 1995. Relaxin-induced increased coronary flow through stimulation of nitric oxide production. *Brit. J. Pharmacol.*, 116:1589-1594.
- Cheah SH, Ng KH, Jongalingam VT and Ragavan M. 1995. The effects of oestradiol and relaxin on extensibility and collagen organisation of the pregnant rat cervix. *J. Endocrinol.*, 146:331-337.
- Denkova RTz, Zvetkova EB, Martinova IS and Christov IA. 1998. *Endocrine Regulation*, 32: 33-41.
- Hansel W, Alita HW, Dowd JP and Yang X. 1987. Control of steroidogenesis in small and large luteal cells. *Austral J. Biol. Sci.*, 40:331-347.
- Havelock JC, Rainey WE and Carr BR. 2004. Ovarian granulosa cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 228:67-78.
- Jarrett JC, Ballejo G, Saleem TH, Tsibris JM and Spellacy WN. 1984. The effect of prolactin and relaxin on insulin binding by adipocytes from pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 149: 250-255.
- Lavoie HA, Garmey JC and Veldhuis JD. 1999. Mechanisms of insulin-like growth factor I augmentation of follicle-stimulating hormone-induced porcine steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity in granulosa cells. *Endocrinology*, 140:146-153.
- McGovern PG, Goldsmith LT, Schmidt CL, Von Hagen C, Linden M and Weiss G. 1992. Effects of endothelin and relaxin on rat uterine segment contractility. *Biol. Reprod.*, 46:680-685.
- Murphy BD and Dobias M. 1999. Down-regulation of follicle-stimulating hormone receptor mRNA by homologous and heterologous ligands during luteinization of porcine granulosa cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 53:198-207.
- Olefsky JM, Sackow M and Kroc RL. 1982. Potentiation of insulin binding and insulin action by purified porcine relaxin. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 380:200-215.
- Pawlina W, Larkin LH and Frost SC. 1989. Effect of relaxin on differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Endocrinology*, 125:2049-2055.
- Pescador N, Stocco DM and Murphy BD. 1999. Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biol. Reprod.*, 60:1453-1461.
- Schwabe C and McDonald JK. 1977. Relaxin: a disulfide homolog of insulin. *Science*, 197:914-915.
- Sekar N, Garmey JC and Veldhuis JD. 2000. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450 scc) enzyme. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 159:25-35.
- Zang Q and Bagnell CA. 1993. Relaxin stimulation

of porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis *in vitro*: Interaction with insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 132:1643-1650.

Zang Q and Bagnell CA. 1994. Trophic actions of relaxin on porcine theca cells: Interactions with

insulin and insulin-like growth factor-I *in vitro*. *Endocrine J.*, 2:349-355.

(접수일: 2005. 2. 20 / 채택일: 2005. 4. 6)