

생쥐의 생식소 분화과정중 난소내 Gonadotropin-Releasing Hormone 유전자의 발현

윤성희 · 박철홍 · 이성호* · 윤용달

한양대학교 자연대 생물학과, *상명대학교 자연대 생물학과

Expression of Gonadotropin-Releasing Hormone Gene in Mouse Fetal Ovary during Gonad Differentiation

Sung-Hee Yoon, Chor-Hong Park, Sung-Ho Lee* and Yong-Dal Yoon

Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791

**Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea*

ABSTRACT

The hypothalamic peptide GnRH plays a central role in the regulation of the mammalian reproductive axis. Recent studies suggested that GnRH stimulates or inhibits the ovarian steroidogenesis and gametogenesis directly. Our previous report indicated that GnRH gene is expressed in adult rat ovary as well as in hypothalamus and that the expressed GnRH may induce the follicular atresia and apoptosis of ovarian granulosa cells in rat. Therefore, we studied whether GnRH gene is expressed in the mouse fetal ovary, when the germ cells are degenerating by apoptosis during gonad differentiation.

Mouse fetal gonads were obtained on the 12, 15, 18, and 20th day of gestation from the mother mice superovulated (10IU PMSG and 10IU hCG) and mated. The morphological changes of fetal ovaries were examined histochemically by hematoxylin-eosin staining. The fetal sex was confirmed by PCR methods for sexing. RT-PCR methods were used to examine the expression of GnRH gene and the sex steroid hormones were determined by conventional radioimmunoassays.

The levels of estradiol (E) and progesterone (P) were increased until 18th day of gestation and then E was decreased just before parturition. The morphological changes of fetal gonadal tissue sections showed the ovarian development and coincided with the result of PCR analysis for sexing using ovary- or testis- specific oligonucleotide primers. Immunoreactive GnRH in placenta was decreased gradually until the end of gestation but fetal brain and ovarian GnRH were increased. The level of GnRH gene expression was increased during fetal ovarian development from 12 till 18th day and decreased suddenly on 20th day just before birth. From these results, it is suggested that ovarian GnRH may play a regulatory role on the germ cell differentiation of fetal ovary.

Key words: GnRH, Mouse fetal ovary, Sexing, Gonad differentiation.

서 론

포유동물의 시상하부에서 분비되는 GnRH (Gonadotropin releasing hormone)는 뇌하수체의 GnRH receptor를 활성화시켜 뇌하수체 전엽으로부터 gonadotropin (GTH), 즉 follicle stimulating hormone (FSH)과 luteinizing hormone (LH)의 분비를 조절하고, FSH와 LH는 생식소 및 그 부속기관에 영향을 미침으로써 생식소의 기능을 조절한다.

GnRH는 난소의 기능을 억제 또는 자극 한다 (Hsueh & Jones, 1981; Sharpe, 1982). GnRH는 과립 세포의 cyclic nucleotide의 축적을 억제하고 (Knecht *et al.*, 1981), LH, prolactin (PRL), FSH, insulin-like growth factor I (IGF-I) 수용체 (receptor, Rc)의 농도를 감소시켜 스테로이드 합성, 난포의 성장, 배란을 억제한다. 다량의 GnRH를 외부에서 투여하면, 난포 발생과 배란을 억제한다 (Erickson *et al.*, 1985, 1994; Clayton, 1987; Billig *et al.*, 1994). 반면 GnRH와 GTH는 난소에서 자극 반응을 나타낸다. 즉, progesterone (P)의 합성을 촉진하고 배란을 유도한다 (Hsueh & Erickson, 1979; Hsueh *et al.*, 1988; Yoon *et al.*, 1989). 또한 난자의 감수분열을 촉진하고 (Hillensjo & LeMaire, 1980; Hsueh and Jones, 1981; Banka & Erickson, 1985; Yano *et al.*, 1997), 배양된 과립세포에서 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase를 자극한다 (Jones and Hsueh, 1981). 그리고 인지질로부터 arachidonic acid 방출을 자극하여, prostaglandin E와 F의 합성을 촉진하므로 배란을 유발한다 (Clark *et al.*, 1980; Corbin & Bex, 1981; Ekholm *et al.*, 1981, 1982; Dekel *et al.*, 1983, 1985).

이러한 난소내 GnRH의 억제 작용과 자극 작용은 과립 세포 (Jones *et al.*, 1980)와 황체 세포 (Harwood *et al.*, 1980a,b; Pieper *et al.*, 1981)에 있는 특정한 GnRH 결합 부위를 통해 난소에 직접 작용을 하는 것으로 알려져 있다. GnRH가 난소내 스테로이드 합성에

영향을 주는 것은 diacylglycerol-protein kinase-C 신호전달계를 통해 조절된다고 알려져 있다 (Fanjul *et al.*, 1992).

뇌하수체를 절제한 흰쥐 난소에서 GnRH antagonist의 작용을 근거로 하여 GnRH 또는 GnRH-like peptide가 난소에서 직접 생산되어 paracrine hormone으로 작용한다 (Birnbauer *et al.*, 1985; Aten *et al.*, 1986)고 가정되었고, 흰쥐 생식소에서 GnRH가 직접 생산된다는 것이 방사면역측정법과 수용체 결합 연구를 통해 밝혀졌다 (Jones *et al.*, 1980; Bhasin *et al.*, 1983; Aten *et al.*, 1986).

포유류의 GnRH 유전자는 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어 있으며, 그 크기는 대략 4.5 kilobase (kb)로 (Bond *et al.*, 1989) 이로부터 합성되는 단백질은 10개의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 이룬다. 난소의 GnRH & GnRH-like peptide의 존재를 연구하기 위해 oligonucleotide primer를 이용하여 short segments DNA를 효소로 증폭하여 합성하는 polymerase chain reaction (PCR) 방법이 도입되었다. 유전자의 조직 특이적 발현은 각기 다른 세포의 RNA로부터 만들어진 cDNA를 PCR 증폭하여 (Choi, 1990; Park *et al.*, 1990; Yoon *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1994), 성숙한 흰쥐 난소에서 GnRH의 발현을 확인할 수 있었다 (Oikawa, 1990; Goubau *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1994). 그러나 아직 생쥐 태아 난소에서의 GnRH 유전자의 발현 유무에 대해서는 보고되지 않았다. Goubau 등 (1992)에 따르면 시상하부의 GnRH mRNA와는 달리 흰쥐 난소의 mRNA는 완전한 과정을 거치지 않은 일차 전사체라고 하였다. Choi 등 (1994)은 GnRH 전사체와 그것의 변역된 산물의 정확한 세포적 위치를 흰쥐 난소 조직절편에서 *in situ* hybridization (ISH)과 immunohistochemistry (IHC)를 통해 살펴본 결과, GnRH의 전사체는 난포와 황체에서 나타나고, GnRH peptide는 간질세포, 난구세포, 과립 및 맥락막세포와 황체에 넓게 분포한다고 보고하였다. 또 Yoon 등 (1991)은 GnRH가 퇴화난포에서 발현된다고

보고하였다.

아울러 최근에는 GnRH 수용체의 유전자가 흰 쥐 및 사람 난소내 과립세포, 황체세포, 난자 등에서 검출되고, 또 발견된다고 알려져왔다 (Pieper *et al.*, 1981; Deckel *et al.*, 1988; Peng *et al.*, 1994; Bauer-Dantoin & Jameson, 1995). GnRH 수용체는 흰쥐의 폐쇄난포에서도 검출되었다 (Kogo *et al.*, 1995). GnRH는 과립세포의 apoptotic cell death를 유발하며 (Billig *et al.*, 1994), insulin-like growth factor binding protein 4 생성을 촉진하여 난포가 퇴화하도록 한다고 보고되었다 (Erickson *et al.*, 1994).

위와 같은 사실들은 태자 난소에서 발생과정중 증식되고 다시 소멸하는 germ cell loss가 태자 난소의 국부 조절인자들에 의해 programmed cell death가 일어난다는 보고들 (Coucovanis *et al.*, 1993; Pesce, 1993, 1994; Tilly 1996)과 더불어 태자에서 생식소 분화중 일어나는 germ cell loss가 국부적인 GnRH유전자의 발현 때문일 가능성을 시사한다.

그러므로, 본 연구는 생쥐 태자에서 난소가 발생하는 기간중 GnRH의 유전자가 발현할 것인지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 대한실험동물 사육장에서 공급받은 8주령 ICR 생쥐를 사용하였다. 공급후 14시간/10시간 (light/dark) 조명 조건에서 3~4일간 적응시키고, 먹이와 물을 충분히 공급하여 실험에 사용하였다.

2. 실험 재료의 획득

배란시기를 동일하게 유도하기 위하여 5 IU의 pregnant mares' serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 함유한 phosphate buffered saline 200 μ l를 복강주사한 후 48시간후에 5 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)를 주사하였고, 수컷과 합사시

켰다. 다음날 질전 (vaginal plug)을 확인하고 이날을 1일로 하여 각각 12, 15, 18, 20일에 임신된 쥐를 경추도살하였다. 심장천개 (cardiac puncture)에 의해 혈액을 채취하고 자궁내에 있는 태자를 획득하였다. 태자에서의 난소와 정소의 정확한 판정을 확인하기 위해 태자를 10% neutral buffered formalin solution에 고정시켜 두었다. 태자의 성감별을 위한 genomic DNA PCR를 위해 태자의 두부 등 일부 조직을 DNA를 추출할 때까지 액체질소에 급속냉동시켜 -70°C 저온 냉동기에 보관해 두었다. 태자의 생식소에서 GnRH의 발현을 보기 위해 현미경하에서 난소를 분리하여 Chomczynski & Sacchi (1987)의 방법에 따라 RNazol™B (Biotech, Houston, TX)에 모아 곧바로 RNA를 추출했다.

3. 생쥐 태자의 조직학적 관찰

태자 난소의 형태적 변화를 관찰하기 위해 조직화학적인 준비를 하였다.

10% NBF에 고정해 둔 태자를 알콜 처리 과정을 거쳐 탈수시키고, xylene에 투명화시킨 후 paraffin (Paraplast, Monoject)를 침투시켜 포매시켰다. 그런 후 박편절단기 (Microtome, Lipshaw)를 사용하여 5 μ m 두께로 절편하였다. 절편을 xylene 처리 과정을 통해 절편으로부터 paraffin을 제거하고, 알코올 처리 과정을 거쳐 물로 세척한 후 hematoxylin으로 핵을, eosin으로 세포질을 염색하였다. 그리고 알코올 처리 과정과 xylene을 거쳐 Canada balsam (Wako)으로 봉입하여 영구표본으로 제작하였다.

4. 방사면역측정법을 통한 스테로이드 호르몬 및 GnRH의 정량

본 실험에 사용된 시약중 스테로이드 호르몬의 표준시료, GnRH, anti-GnRH 그리고 thimerosal, gelatin, NaCl, 2,2'-p-phenylene-bis [5-phenyloxazole] (POPOP), 2,5-diphenyloxazole (PPO) 등의 시약은 Sigma 제품을 사용하였고, toluene, Triton X-100은 Polyscience 제품을 사용하였다. 그 외에 dextran

T-70은 Pharmacia 제품을, charcoal (Norit A)은 Amend 제품을, diethyl ether는 Merck 제품을 사용하였다. 추적자로 사용한 1,2,6,7-³H-progesterone과 2,4,6,7,16-³H-estradiol은 New England Nuclear (NE-N, 부경사)에서 구입하여 사용하였다.

방사면역측정법 (radioimmunoassay, RIA)은 Yoon (1981)의 방법에 따랐다. 본 실험에서 항원인 estradiol (E)-6-carboxymethyloxime (CMO)-bovine serum albumin (BSA)과 progesterone (P)-11-hemisuccinate (HS)-BSA를 이용하여 Vaitukaitis (1981)의 방법으로 본 연구실에서 생산한 항혈청을 사용하였다. Progesterone의 교차 반응율은 estrone과 1.7%, cortisol, testosterone (T)와는 0.0001% 이하였다. 표준곡선을 이용한 정확도 (accuracy)검사에서 P의 정확도는 $r=0.995$ 였고, 감도 (sensitivity)는 2.925pg/ml이었다. P의 내정도관리 (withinassay variation, WAV)의 변이계수 (coefficient of variation, CV)는 3.6% (QC1), 5.7% (QC2), 6.1% (QC3)이고, 외정도관리 (betweenassay variation, BAV)의 변이계수는 6.3% (QC1), 5.3% (QC2), 8.9% (QC3)이었다. Estradiol의 교차 반응율은 P와 T 모두 0.0002%이었다. E의 정확도는 $r=0.999$ 이었고, 감도는 6.40pg/ml이었다. E의 WAV/CV는 각각 3.8% (QC1), 2.8% (QC2), 5.1% (QC3)이었고, BAV/CV는 8.2% (QC1), 6.9% (QC2), 11.6% (QC3)이었다.

혈장내 GnRH는 6배의 methanol로 추출하였다. 태반, 난소 및 뇌의 조직은 0.1 N HCl을 첨가하고 분쇄하였으며, 중화시킨 후 원심분리 (3,000×g, 30 min, Minifuge)로 상등액을 분리한 후 위와 같이 추출하였다. 추출액은 질소가스하에서 공기건조하였으며 RIA buffer에 녹여 보관하였다. 혈청과 뇌의 추출효율은 88.4%이었으며, 태반의추출효율은 80.4%이상이었다. 표준시료는 synthetic GnRH (Sigma), 항체는 LHRHBSA를 토끼에 면역주사한 anti-LHRH (Sigma, L8391)을 200배 희석하여 사용하였고, 이중항체 면역측정법을 원용하였다. ¹²⁵I로 표지된 추적자를 사용하였고, 최소 측

정치는 1.5pg/tube 이었다. 20pg, 50pg, 300pg 각각의 WAV는 9.5, 6.7, 4.3% 이었고, BAV는 9.8, 7.7, 5.4% 수준이었다.

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA with t-test 방법을 사용하였으며 p값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

5. PCR를 이용한 생쥐 태자의 성결정

Genomic DNA PCR방법으로 태자의 암·수 구별을 하였다.

Genomic DNA추출은 Gross-Bellard 등 (1973)의 방법을 사용하였다. 냉동된 조직을 상온에서 녹인 후 1ml homogenation buffer [0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA (pH 8.0), 0.3 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 M sucrose]를 넣어 조직을 균질화하였다. 이 현탁액에 62.5 μl의 10% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma)를 넣어 65℃ 항온수조에서 30 분간 배양하였다. 여기에 8 M potassium acetate (Sigma) 35 μl를 넣어 4℃에서 1 시간동안 배양한 후, refrigerated microcentrifuge (Vision Scientific Co.)로 5,000×g, 10 분간 원심분리하였다. 분리된 수용액을 새로운 tube에 옮긴 후, 동량의 saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1, v:v:v)과 동량의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1, v:v)로 각각 추출하였다. DNA추출물이 포함되어 있는 상층액을 새로운 시험관에 옮기고 100% ice-cold ethanol를 가하여 1 시간 이상 저온냉동기에서 침전시켰다. 그 후 4℃에서 30분간 14,000×g로 원심분리한 후, 1 ml의 80% ethanol로 세척하고, 시료를 공기중에서 말린 후 100 μl TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 용해시켰다. DNA 농도는 UV/VIS spectrophotometer (Pharmacia)를 사용하여 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

PCR은 Daehan Medical Co.의 capillary PCR 기기로 실시하였다. 성결정을 위한 PCR의 primer (Cui *et al.*, 1993)는 다음과 같았다. pYMT2/B를 encoding하

는 생쥐의 Y chromosome 위에 있는 testis-specific gene (TSG)의 primer (A)와 남자 투명대(ZP3)의 83-85 KDa glycoprotein을 encoding하는 조절 유전자로 사용된 ovary-specific gene (OSG)의 primer (B)는 각각 5 pmol씩 사용하였으며, 그 염기배열 순서는 다음과 같았다.

- A : ① 5'-TTTCTCACAGTTGGAAGGAAGGTA-3'
 ② 3'-CCTCGAGATGTCACCTCTGTCCTA-5',
 B : ① 5'-TGTTGGCTTTTGCCGGGTGGAAGT-3'
 ② 3'-CTATGGCTGCACCAGTCCAAGTTG-5'.

추출해낸 0.1 µg / µl의 genomic DNA에 농도가 각각 200 M인 dNTP 1 µl, 10X PCR buffer 1 µl, TSG ①, ②와 OSG ①, ② 각각 1 µl, sterilized water 2 µl와 0.5 U / µl인 Taq DNA polymerase (Promega) 1 µl를 넣어 섞은 후 capillary에 넣었다. Pre-denaturation 반응을 94°C에서 30 초간 실시한 후 annealing 반응은 55°C에서 5 초, elongation 반응은 72°C에서 15초, denaturation 반응은 94°C에서 5 초를 40 회한 후에 post-elongation 반응을 72°C에서 30 초간 실시하였다. 반응이 끝난 후 PCR product는 2% agarose gel (Seakem LE, FMC)에 100 V에 35 분간 전기영동한 후에 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator (Ultra Lum, Carson, USA)로 관찰하였다. 암컷의 PCR 산물은 203 bp이고, 수컷의 산물은 151 bp이었다.

6. RT-PCR에 의한 GnRH 유전자의 발현 양상 분석

Total RNA를 추출해내기 위해서 RNAzol에 넣어둔 난소를 Tissue tearor (Biospec Products)로 균질화시킨 후, 12,000 g로 15 분간 원심분리하여 RNA를 포함하고 있는 무색의 수용액층을 뽑아내었다. 여기에 동일한 양의 isopropanol을 첨가하고 15 분간 4°C에 저장한 후, 15 분간 4°C에서 12,000 g로 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 따라버린 후 75% ethanol을 넣고 4°C에서 8 분간 7500 g로 원심분리하였다. RNA 침전물을 건조시킨 후 DEPC-treated water에 용해시켜 60°C에서 15 분간 배양하여 저온냉동기에 보관하였

다.

Reverse transcription (RT) 반응에는 1 µg의 total RNA가 사용되었다. RT system (Promega)은 20 µl 반응으로 사용되었다. 25 mM MgCl₂ 4 µl, 10X buffer (10 mM Tris · HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100) 2 µl, RNasin 1 U, AMV (Avian myeloblastosis virus) reverse transcriptase 15 U, oligo (dT)₁₅ primer 0.5 µg, total RNA 1 µg를 넣은 후 RNase-free water로 총반응 용액을 20 µl로 맞추었다. 이렇게 섞은 용액을 1 시간 동안 42°C에 두었다가, RNA-cDNA hybridization을 깨기 위해 5 분동안 99°C에서 끓인 다음 4°C에서 5 분간 저장한 후 사용전까지 저온냉동기에 저장해 두었다.

PCR에 사용된 GnRH primer (Azad *et al.*, 1991)로는 첫 GnRH exon의 5'의 끝에 있는 5'-CACTATGGTACCAGCGGGG-3'과 3번째 exon의 5'end 근처의 5'-AGAGCTCCTCGCAGATCCCTAACA-3'가 사용되었고, PCR에 의해 증폭되는 fragment는 375 bp이었다.

PCR 반응 mixture에는 GnRH primer 각각 1 µl와 10× reaction buffer 1 µl, dNTP mixture (각 200 M) 1 µl, sterilized water 4 µl, 0.5 U Taq polymerase 1 µl, RT 반응이 끝난 cDNA 1 µl가 포함되었다. 잘 섞은 10 µl의 용액을 capillary로 옮겨준 다음 PCR을 실시하였다. Predenaturation 반응을 94°C에서 30 초한 후에 annealing 반응은 55°C에서 5 초, elongation 반응은 72°C에서 15 초, denaturation 반응은 94°C에서 5 초를 40 회한 후에 postelongation 반응을 72°C에서 30 초동안 실시하였다. PCR product는 2% agarose gel (Seakem LE, FMC)에 전기영동한 후에 ethidium bromide로 염색하여 transilluminator로 확인하였다.

GnRH의 발현 정도는 densitometer로 측정하였다. 전기영동한 gel의 Polaroid 사진을 Micro-Tack scanner로 scanning한 후에 Cream program (Kem-En-Tec Software System, Denmark)을 이용하여 분석하여 그 결과를 arbitrary unit (AU)로 환산하였다.

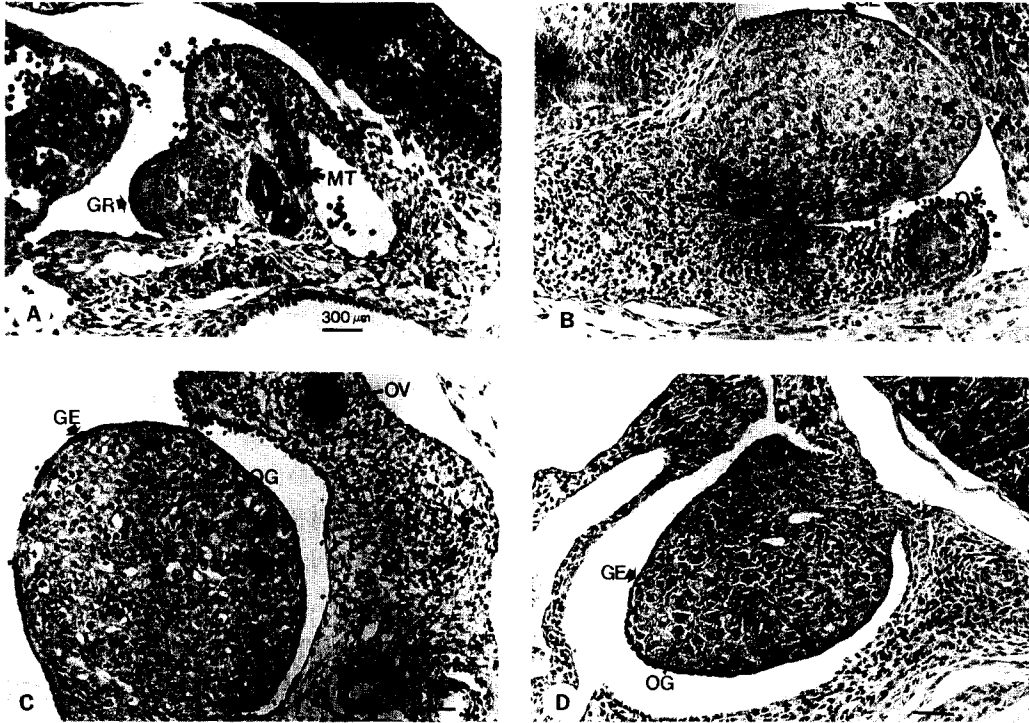


Fig. 1. Microphotographs of fetal ovarian development in mouse fetus.

The ovarian tissue sections were stained with hematoxylin-eosin ($\times 400$). A, 12 day, B, 15 day, C, 18 day, D, 20 day old fetal ovary. GE: germinal epithelium; GR: genital Ridge; MT: mesonephric tubule; OG: oogonium; OV: oviduct

결 과

1. 생쥐 태자 난소의 발달에 따른 조직학적 변화

12, 15, 18, 20일째의 생쥐 태자를 고정한 후 조직 절편을 hematoxylin-eosin으로 염색하여 관찰한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

12일째의 태자에는 간과 intestinal loop에 인접하여 중신관 (mesonephric duct, MT)이 있고 위심강으로 뻗어나온 생식용기 (genital ridge, GR)가 관찰되었으며 (Fig. 1-A), 이 GR에는 수많은 생식세포들이 위치하고 있었다. 15일 이후의 난소는 성숙한 생쥐와 비교하여 위치는 동일하나 그 형태는 아직 미분화 상태이었다. 15일에는 둥근 핵을 가지는 난원세포 (oogonia)와 난세포 (oocyte)가 거의 동일하게 분포하고 있었다. 18, 20

일에서는 다양한 단계에 있는 난자가 관찰되었다. 특히 18일과 20일의 난자의 핵에는 핵응축이 일어난 난자를 많이 관찰할 수 있었다 (Fig. 1-C,D).

2. 모체 혈청내 스테로이드 호르몬의 농도 변화

태자의 발생 과정 동안 모체의 스테로이드 호르몬 변화를 알아보기 위해 임신한 모체의 혈청내 스테로이드 호르몬의 농도 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다.

Estradiol의 농도는 임신 후 12일째에는 57.2 ± 5.7 , 15일째에는 1.2배, 18일째에는 2.1배로 증가했고, 20일째에는 47.6 ± 8.7 pg/ml로 감소하였다. Progesterone의 농도는 임신 후 12일째에는 19.1 ± 3.5 ng/ml이었으나, 15일에는 59.6 ± 7.3 ng/ml로 현저히 증가하여 18일까지 유지되었으나 20일에는 31.2 ± 1.3 ng/ml로 다시 감소하였다.

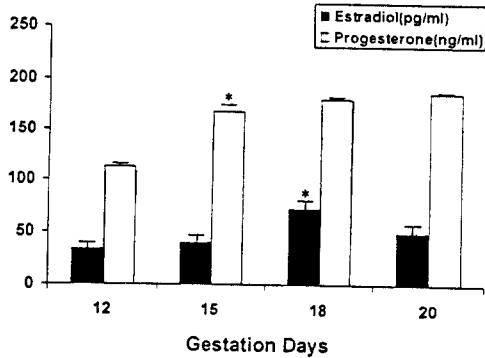


Fig. 2. Changes of estradiol (A) and progesterone (B) of maternal serum during pregnancy in mouse.

Data are expressed as mean±SEM (n=5). Estradiol and progesterone levels were measured by RIAs in sera of pregnant mice at 12, 15, 18, 20th day of gestation. *, statistically different from control (P<0.05).

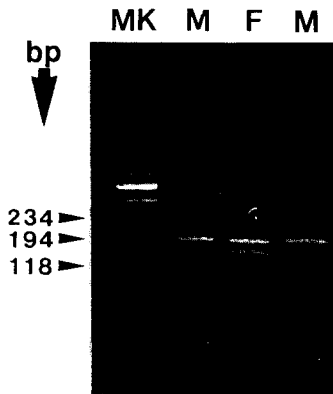


Fig. 3. Electrophoretic analysis of PCR product for sex determination.

PCR products are electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide and viewed on UV transilluminator. MK: PhiX174 DNA Hae III marker, M: male specific product (151 bp), F: female specific product (203 bp).

3. 생쥐 태자의 성 결정

생식소에 의해 성구별이 힘들 경우에는 태자의 생식소를 제외한 나머지 조직으로부터 genomic DNA를 추출한 후에, PCR방법으로 증폭시키고, PCR 산물을

2% agarose gel에 전기영동한 후, UV transilluminator로 관찰하였다. 증폭된 단편의 크기는 PhiX174/HAE III marker (Promega)로 비교 측정하였다. 암컷의 증폭단편은 203 bp이었고, 수컷의 증폭단편은 151 bp이었다 (Fig. 3). 이 결과를 근거로 아직 생식소의 성분화가 미완성 시기인 성별을 판정할 수 있었다. 또한 12 일의 난소내 세포가 난원 세포임을 확인하였다.

4. 생쥐 태자 난소의 발달에 따른 GnRH 유전자의 발현 양상

성체에서 난소 기능에 주요한 역할을 하는 GnRH 유전자가 태자에서 발현되는지를 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다 (Fig. 4, 5). 임신후 12, 15, 18, 20 일째의 태자 난소에서 total RNA를 추출한 후 RT-PCR방법으로 GnRH 유전자의 발현을 조사한 결과를 (Fig. 4)에 나타내었다. GnRH mRNA의 발현정도를 β-actin의 발현정도에 비교하여 AU로 나타낸 결과 12 일에는 23.25, 15 일에는 39, 18 일에는 64.3, 20 일에는 26.3이었다. 즉 12 일에서 18 일까지 점진적으로 GnRH mRNA의 발현이 증가하였다가 20 일에는 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

5. 모체의 혈장과 태반, 태자의 뇌부 및 난소내 GnRH의 변화

태자의 뇌부 및 난소내 immunoreactive GnRH (iGnRH)가 모체에서 생성되었는지 또는 태자에서 발현되었는지를 확인하기 위하여 혈장 및 조직내 GnRH 함량을 정량하여 Fig. 6에 나타내었다. 모체의 혈장내 농도는 임신말기에서 출산때까지 10~11 pg/ml 수준에서 큰 변화가 없었다. 한편 태반 조직내 iGnRH의 농도는 임신말기로 진행하면서 13 pg/mg단백질 수준에서 3 pg/mg단백질 수준으로 현저한 감소가 일어나는 것으로 측정되었다. 그리고 13 일 태자와 난소내 iGnRH농도는 전무하였으나, 임신말기와 출산기까지 현저하게 증가하였다 (P<0.01). 난소내 함량은 15개체중 4개체에서 3.8±0.2 수준이었으나, 20일에는 4배 정도 증

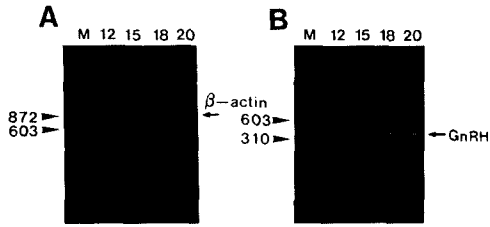


Fig. 4. Electrophoretic analysis of RT-PCR products for GnRH mRNA expressed in fetal ovary during ovarian development.

One microgram of total RNA was reversely transcribed in 20 μ l reaction. One microliter product of RT reaction was amplified by using a capillary PCR machine. PCR products were visualized by UV transillumination. M: PhiX174 DNA Hae III marker. The numerals indicate gestation day. A, actin expression as a control (764 bp) B, GnRH transcript (375 bp).

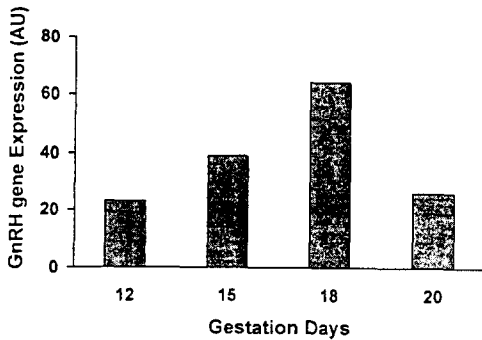


Fig. 5. GnRH gene expression pattern during fetal ovarian development in mouse.

Data are expressed in arbitrary unit. One microgram of total RNA was reversely transcribed in 20 μ l reaction. One microliter product of RT reaction was amplified by using a capillary PCR machine. PCR products were visualized by UV transillumination. The gel was scanned and analyzed by densitometer. The numerals indicate the gestation day.

가하였다가 약간 감소하는 경향을 보였다.

고 찰

시상하부에서 분비되는 GnRH는 뇌하수체 문맥계로

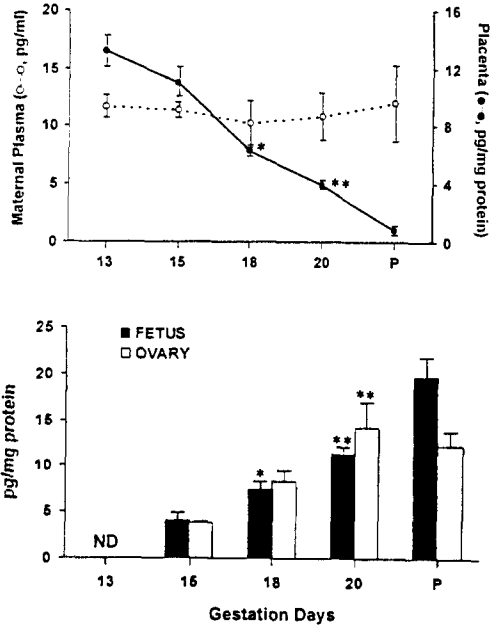


Fig. 6. Changes of immunoreactive GnRH in maternal plasma and placental tissues of mice (upper panel), and those of brain parts and ovary of fetus (lower panel).

iGnRH levels were determined by RIA using commercial antibody. Data are expressed mean \pm SEM (n=6). *(P<0.05) and ***(P<0.01), statistically different from the mean of levels of 13th day samples (upper) and of 15th day sample (lower panel).

분비되어 뇌하수체 전엽의 gonadotroph 세포에 있는 막수용체 (RC)와 결합하여 표적 세포로 하여금 gonadotropin의 합성과 분비를 유도한다. GnRH 수용체 (GnRHr)는 태반, 몇몇 암세포, 신경계 생식소 특히 난소에 존재한다 (Jones *et al.*, 1980; Whitelaw *et al.*, 1992; Peng *et al.*, 1994)

이미 본 실험에 사용한 GnRH의 RT-PCR 방법은 Yoon 등 (1991)과 Choi 등 (1994)에 의해 GnRH의 mRNA임을 보고한 바 있으므로, 본 실험에서의 결과를 생쥐 태자 난소에서의 GnRH 유전자의 발현으로 해석하였다. Capillary RT-PCR 방법을 사용하여 생쥐 태자 난소에서 GnRH 유전자의 발현이 난소의 분화가 진행됨에 따라 즉 12~18 일까지 증가하는 것을 보아

GnRH가 난소의 분화에 직·간접적으로 관계하는 것을 알 수 있었다. Capillary RT-PCR 방법의 사용은 생쥐 태자 난소에서 아주 적은 양으로 발현되는 GnRH mRNA를 증폭시킬 수 있는 아주 민감한 검출 방법으로 판단된다. 태자 난소에서의 GnRH mRNA의 발현이 기능적인 GnRH의 발현을 입증하는 것은 아닐지라도 본 실험의 결과는 태자 난소에서 GnRH가 발현된다는 첫 번째 보고이다. 아울러 GnRH가 태자 난소에서 만들어져 난소의 분화 및 난소내 germ cell의 발생에 auto-crine 또는 paracrine hormone으로 작용할 것이라는 가설이 제기되어진다. 그리고 출생을 앞두고 발현이 감소하는 것은 난소의 분화 및 난소내 세포의 발생을 완결한 후 일시적인 정지상태가 된 것이라 가정된다.

과립세포에 대한 GnRH의 작용은 난포의 성숙 상태에 따라 다르다. 배란전 난포에 있어서는 난자 성숙(Hillensjo & LeMaire, 1980)과 난포 파열(Ekholm *et al.*, 1981)을 유도하는 자극 작용을 한다. 그러나 더 작은 난포에서는 GnRH가 주로 억제 작용을 나타낸다. 즉 스테로이드 합성과 GTHRC 농도를 감소시킨다(Hsueh & Jones, 1981; Yano *et al.*, 1997). GnRH agonist가 과립세포에서 세포자연사를 유발(Billig *et al.*, 1993, 1996)하고 난포퇴화의 징표인자인 IGF-BP(insulin-like growth factor-binding protein IV) 및 맥락막세포(theca-interstitial cell)에 의해 생성된 paracrine factor인 TGF α , KGF, HGF 등의 생산을 자극(Erickson *et al.*, 1994)한다. 또한, GnRH는 흰쥐 난소에서 난포 퇴행분화를 유발시킨다. Billig 등(1993)에 의하면 estrogen은 난포의 퇴화를 억제하고 androgen은 난포의 퇴화를 유도하는데, 이로 미루어 GnRH에 의한 난포의 퇴화 작용은 steroidogenesis의 조절과 세포자연사를 통해 이루어지는 것으로 여겨지고 있다. 즉 GnRH가 steroidogenesis에 대한 gonadotropin의 작용을 억제하고 steroidogenic enzyme의 작용을 조절한다(Kimura, 1992). Kakar 등(1994)이 steroidogenic tissue(난소, 정소, 부신)에서 RT-PCR방법으로 GnRH receptor mRNA의 존재를

확인한 것은 이를 뒷받침한다. 본 연구 결과도 GnRH 발현에 의한 생식세포의 세포자연사 유발 가능성을 뒷받침한다. Wray 등(1989)에 따르면 GnRH mRNA를 발현하는 세포는 생쥐에서 배발생 11.5일에 후각 상피 세포에서 감지된다. 이러한 연구 결과들은 시상하부 이외의 조직이나 기관에서 합성 및 분비되는 GnRH가 국부 조절인자로서, 특히 난소에서도 발현되어 난소세포의 형태적, 기능적 변화를 유발할 것으로 가정된다.

난자형성과정은 태자 발생의 이른 시기에 시작된다. 난원세포는 extragonadal origin을 가진 적은 수의 stem cell(primordial germ cell)에서 기원한다. 배발생 8 일째의 생쥐 태자에서는 15~100 개의 primordial germ cell이 생기고 yolk sac endoderm과 allantois에서 발견되며 germ cell이 passive transport에 의해 후장(hind gut)의 내배엽 상피세포로 이동하는 것이 9일의 태자에서 발견된다. 10 일과 11 일의 태자에서는 ameoboid movement에 의해 genital ridge의 dorsal mesentery로 이동하는 것을 알 수 있다. Gonadal sex differentiation은 12 일과 13 일의 태자에서 활발히 일어난다. 13 일의 태자에서는 sex cord에 거의 모든 세포들이 활발히 분열하는 oogonia로 전환하고 있는 분화 중인 난소를 가진다. 이때 전체 생식원세포수(total germ cell pool)가 결정될 것으로 판단된다. 14 일에는 난소내 생식세포들이 oogonia와 oocyte로 거의 동일하게 분열하고 있다. 17 일의 태자에서는 제 1 감수분열 전기의 다양한 단계에 있는 oocyte를 가진다. 또한 난원 세포가 제 1차 감수분열을 하는 동안 난모세포는 대량으로 퇴행분화를 일으킨다(Yoon, 1990).

GnRH는 난소내 과립세포의 세포자연사를 유발한다. 즉 미성숙 및 성숙한 개체의 난포를 세포자연사에 의해 퇴행분화를 일으킬 것이라 가정 된다. 본 연구의 결과로 보아 난모세포가 가장 많이 증식되는 18 일에 GnRH가 가장 많이 발현되었다가 20 일에 감소하는 것은 난모세포가 퇴화하는 시기와 일치한다. 이 시기에 염색질이 핵 주변부에 밀리고(chromatin margination), 절편화(fragmentation)되며, 결국 핵응축이 일어난다. 또한

세포는 응축 (cellular condensation)되고, transglutaminase 발현과 같은 세포사망의 증후가 생긴다 (Coucovanis *et al.*, 1993; Pesce *et al.*, 1993; Pesce & DeFelici, 1994). 이러한 결과와 본 실험의 결과를 종합하여 볼 때 GnRH가 난소내 세포의 퇴행분화를 유발할 것이라는 가설도 제기된다.

결론적으로, 본 연구는 발현량이 적은 생쥐 태아 난소에서 RT-PCR 방법을 사용하여 GnRH mRNA의 발현을 처음으로 확인하였고, 또 면역측정법으로 감지되는 iGnRH를 검출하였다. 이것은 난소의 생식세포 분화와 퇴행분화에 GnRH가 작용할 것이라는 가설을 제시하는 결과라고 판단된다.

요 약

GnRH는 시상하부에서 합성 및 분비되어 뇌하수체 전엽으로부터 FSH와 LH의 분비를 유도하고, 생식소 및 그 부속기관에 직·간접적으로 영향을 미친다. 최근 GnRH가 시상하부의 난소에서도 국부적으로 발현되며 난소의 기능을 억제 및 자극하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 GnRH 유전자가 난소의 발생 과정중 발현되는지를 알아보고자 하였다.

성숙한 8주령 생쥐에 5 IU의 PMSG, 5 IU의 hCG를 주사하여 과배란을 유도하였다. 질전이 확인된 날을 1일로 하여 12, 15, 18, 20 일째 생쥐를 경추과피하여 도살한 후 혈액을 채취하였다. 태아 난소의 조직변화를 조직절편상에서 검경하고, 태아의 난소를 제외한 조직으로는 DNA를 추출하여 성별을 결정하였다. 그리고 GnRH 유전자의 발현정도는 RT-PCR을 통해 측정하고, 혈청내 스테로이드 호르몬과 태반, 뇌의 GnRH의 변화는 방사면역측정법으로 정량 분석하였다.

생쥐 태아 12 일째에 위심강으로 뺀어나온 genital ridge가 관찰되고, 수많은 germ cell이 관찰되었다. 15 일 이후의 난소는 형태적으로는 아직 미분화 상태이나, 둥근 핵을 가진 oogonia와 oocyte가 거의 동일하게 분포하고 있었다. 18, 20 일에서는 다양한 단계에 있는 난

자가 관찰되었다. 태아 난소의 조직관찰과 PCR을 통한 암·수 구별이 일치하는 것을 확인하였다. 모체 혈청내 progesterone과 estradiol의 농도는 12 일에 비해 15, 18 일에 현저히 증가하였고 ($P < 0.05$), 20 일에는 현저히 감소하였다 ($P < 0.05$). GnRH 유전자의 발현양상을 RT-PCR방법과 densitometry 방법으로 조사한 결과, 12 일에는 23.3, 15 일에는 39.2, 18 일에는 64.3, 20 일에는 26.3이었다. 즉 12일에서 18 일까지는 지속적으로 증가하였다가, 20 일에는 감소하였다. 태반의 GnRH농도는 임신후기로 진행하면서 현저히 감소하였고, 난소와 뇌의 함량은 점진적으로 증가하였다. 이 결과로 보아 GnRH 유전자는 난소의 분화가 진행될수록 발현량이 증가하여 난소의 분화에 관계할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Aten RF, Williams AT, Behrman HR (1986): Ovarian gonadotropin-releasing hormone-like protein (s): demonstration and characterization. *Endocrinology* 118: 961-967.
- Azad N, Emanuele NV, Halloran MM, Tentler J, Kelley MR (1991): Presence of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) mRNA in rat spleen lymphocytes. *Endocrinology* 128: 1679-1681.
- Banka CL, Erickson GF (1985): Gonadotropin-releasing hormone induces classical meiotic maturation in subpopulations of atretic preantral follicles. *Endocrinology* 117: 1500-1507.
- Bauer-Dantoin AC, Jameson JL (1995): Gonadotropin releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during rat estrous cycle. *Endocrinology* 136: 4432-4438.

- Bhasin S, Heber D, Peterson M, Swerdoff D (1983): Partial isolation and characterization of testicular GnRH-like factor. *Endocrinology* 112: 1144-1146.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW (1993): Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 133: 2204-2211.
- Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJW (1996): Gonadal cell apoptosis: Hormone-regulated cell demise. *Human Reprod Update* 2: 103-117.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW (1994): Gonadotropin releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: Biochemical and *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 134: 245-252.
- Birnbaumer L, Shakabi N, Rivier J, Vale W (1985): Evidence for a physiologic role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology* 116: 1367-1370.
- Bond CT, Hayflick JS, Seeburg PH, Adelman JP (1989): The rat gonadotropin-releasing hormone: SH locus: Structure and Hypothalamic expression. *Mol Endocrinol* 3: 1257-1262.
- Choi WS (1990): Studies on identification and expression of GnRH mRNA in the rat brain and gonads. Seoul National Univ. Dissertation, Seoul National Univ.
- Choi WS, Lee SH, Shim C, Cho BN, Baik SH, Yoon YD, Lee CC, Kim K (1994): Expression and cellular localization of gonadotropin-releasing hormone in the rat. *Mol Cells* 4: 267-272.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Isolation of RNA by the RNazol B method. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Clark MR, Thibier C, Marsh JM, LeMaire WJ (1980): Stimulation of prostaglandin accumulation by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology* 107: 17-23.
- Clayton RN (1987): Gonadotropin releasing hormone: Its actions and receptors. *J Endocrinol* 120: 11-19.
- Corbin A, Bex FJ (1981): Luteinizing hormone releasing hormone agonists induce ovulation in hypophysectomized proestrous rats: Direct ovarian effect. *Life Sci* 29: 185-192.
- Coucovanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG, Jones PP (1993): Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res* 209: 238-247.
- Cui KH, Putland RA, Seemark RF, Matthews CD (1993): Precise sex selected births of mice following single cell embryo biopsy and Y-linked testis-specific gene analysis. *Human Reprod* 8: 621-626.
- Dekel N, Sherizly I, Tsafirri A, Naor Z (1983): A comparative study of the mechanism of action of luteinizing hormone and gonadotropin releasing hormone analog on the ovary. *Biol Reprod* 28: 161-171.
- Dekel N, Sherizly I, Phillips DM, Nimrod A, Zilberstein M, Naor Z (1985): Characterization of the maturational changes induced by a GnRH analogue in the rat ovarian follicles. *J Reprod Fertil* 75: 461-466.
- Dekel N, Lewysohn O, Ayalon D, Hazum E (1988):

- Receptors for gonadotropin releasing hormone are present in rat oocytes. *Endocrinology* 123: 1205-1207.
- Ekholm C, Hillensjo T, Isaksson O (1981): Gonadotropin-releasing hormone agonists stimulate oocyte meiosis and ovulation in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 108: 2022-2024.
- Ekholm C, Clark MR, Magnusson C, Isaksson O, LeMaire WJ (1982): Ovulation induced by a gonadotropin releasing hormone analog in hypophysectomized rats involves prostaglandins. *Endocrinology* 110: 288-290.
- Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C (1985): The ovarian androgen producing cells: A review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 6: 371-399.
- Erickson GF, Li D, Sadrkhanloo R, Liu XJ, Shimasaki S, Ling N (1994): Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone: stimulation of insulin-like growth factor-binding protein-IV and atresia. *Endocrinology*. 134: 1365-1372.
- Fanjul LF, Deniz A, Quintana J, Santana P, Gonzalez J, Estevez F, Ruiz de Galavieta CM (1992): Diacylglycerol rather than Ca^{2+} mediates GnRH inhibition of FSH induced steroidogenesis in ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 198-204.
- Goubau S, Bond CT, Adelman JP, Misra V, Hynes MF, Schultz GA, Murphy BD (1992). Partial characterization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene transcript in the rat ovary. *Endocrinology* 130: 3098-3100.
- Gross-Bellard M, Oulet P, Chambon P (1973): Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. *Eur J Biochem* 36: 32-38.
- Harwood JP, Clayton RN, Catt KJ (1980a): Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. I. Properties and inhibition of luteal cell function. *Endocrinology* 107: 407-413.
- Harwood JP, Clayton RN, Chen TC, Knox G, Catt KJ (1980b): Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. II. Regulation and effects on ovarian development. *Endocrinology* 107: 414-421.
- Hillensj T, LeMaire WJ (1980): Gonadotropin-releasing hormone agonists stimulate meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes *in vitro*. *Nature* 287: 145-146.
- Hsueh AJW, Erickson GF (1979): Extrapituitary action of gonadotropin-releasing hormone: Direct inhibition of ovarian steroidogenesis. *Science* 204: 854-855.
- Hsueh AJW, Jones PBC (1981): Extrapituitary actions of gonadotropin releasing hormone. *Endocrine Rev* 2: 437-461.
- Hsueh AJW, Liw XX, Cajander S, Peng XR, Dahl K, Kristensen P, Ny T (1988): Gonadotropin releasing hormone induces ovulation in hypophysectomized rats: Studies on ovarian tissue -type plasminogen activator activity, messenger ribonucleic acid content, and cellular localization. *Endocrinology* 122: 1486-1495.
- Jones PBC, Conn PM, Marian J, Hsueh AJW (1980): Binding of gonadotropin-releasing hormone agonist to rat ovarian granulosa cells. *Life Sci* 27: 2125
- Jones PBC, Hsueh AJW (1981): Direct stimulation of ovarian progesterone-metabolizing enzyme by gonadotropin-releasing hormone in cultured granulosa cells. *J Biol Chem* 256:1248-

1254.

- Kakar SS, Grantham K, Musgrove LC, Devor D, Sellers JC, Neill JD (1994): Rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. Tissue expression and hormonal regulation of its mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 101: 151-157.
- Kimura A (1992): Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on steroidogenesis in human and rat ovaries. *Acta Obst Gynaec Jpn*, 44: 1261-1268.
- Knecht M, Katz MS, Catt KJ (1981): Gonadotropin-releasing hormone inhibits cyclic nucleotide accumulation in cultured rat granulosa cells. *Nature* 256: 34-36.
- Kogo H, Kudo A, Park MK, Mori T, Kawashima S (1995): *In situ* detection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor mRNA expression in the rat ovarian follicles. *J Exp Zool* 272: 62-68.
- Oikawa M, Dargon C, Ny T, Hsueh AJW (1990): Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin-messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology*. 127: 2350-2356.
- Park O-K, Gugneja S, Mauo KE (1990): Gonadotropin-releasing hormone gene expression during the rat estrous cycle: Effects of pentobarbital and ovarian steroids. *Endocrinology* 127: 365-372.
- Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PCK (1994): Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa cells. *Endocrinology* 135: 1740-1746.
- Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M (1993): Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 118: 1089-1094.
- Pesce M, De Felici M (1994): Apoptosis in mouse primordial germ cells: A study by transmission and scanning electron microscope. *Anat Embryol* 189: 435-440.
- Pieper DR, Richards JS, Marshall JC (1981): Ovarian gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptors: Characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology* 108: 1148-1155.
- Sharpe RM (1982): Cellular aspects of the inhibitory actions of LH-RH and its agonists. *Nature* 286 : 12-14.
- Tilly JL (1996): Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1: 162-172.
- Vaitukaitis JI (1981): Production of antisera with small dose of immunogen: Multiple intradermal injection. *Methods Enzymol* 73: 46-52.
- Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smyth CD, Hillier SG (1995): Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovary. *Endocrinology* 136: 172-179.
- Wray S, Nieburgs A, Elkabes S (1989): Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: Evidence of an embryonic origin in the olfactory placode. *Dev Brain Res* 46: 309-318.
- Yano T, Yano N, Matsumi H, Morita Y, Tsutsumi O, Schally AV, Taketani Y (1997): Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs on the rat ovarian follicle development *Horm Res* 48 (Suppl3): 35-41.

- Yoon YD (1981): The homonal levels of the short luteal phase in Korean women: (I) LH, FSH, estradiol and progesterone. *J Basic Sci* 1: 154-166.
- Yoon YD, Lee CJ, Chun EH, Lee JY (1989): Changes in steroid receptor number of and bioactivity of gonadotropin in the follicular fluid of porcine ovarian atretic follicles: (I) Bioavailable testosterone. *Korean J Zool* 32: 281-289.
- Yoon YD (1990): Mechanism of follicular atresia: (I) Morphological and functional changes. *Kor J Embryo Transfer* 5: 1-20.
- Yoon YD, Choi WS, Kim K, Lee JY (1991): Effects of intragonadal regulatory hormones on ovarian follicular atresia: (I) Gonadotropin releasing hormone. In: *Current Themes in Comparative Endocrinology*. (ed) Saxena RN, New Dehli, pp 207-208.