

## 환취 난소 및 부신에서 Steroidogenic Acute Regulatory Protein mRNA의 발현에 관한 연구

김명옥 · 황미정\* · 백원영\* · 고필옥\*\* · 곽수동\*\* · 이혜경\*\*\* · 소재목\*\*\* · 최완성  
경상대학교 의과대학 해부학교실, \*산부인과학 교실, \*\*수의과대학 조직학교실,  
\*\*\*전남대학교 자연과학대학 생물학과

## Identification of Steroidogenic Acute Regulatory Protein mRNA in the Rat Ovary and Adrenal Gland

Myeong-Ok Kim, Mi-Jung Hwang\*, Won-Young Baik\*, Phil-Ok Koh\*\*, Soo-Dong Kwak\*\*,  
Hye-Kyung Lee\*\*\*, Jaemog Soh\*\*\*, and Wan-Sung Choi

Department of Anatomy, \*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine

\*\*Department of Histology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-280

\*\*\*Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

**요 약** : 스테로이드 호르몬의 합성은 콜레스테롤로부터 시작되고 Steroidogenic acute regulatory protein(StAR)은 스테로이드의 합성과정에서 콜레스테롤을 미토콘드리아의 안으로 신속하게 운반하는 역할을 한다. 스테로이드 호르몬은 난소, 부신, 고환에서 합성되며 본 연구에서는 환취 난소와 부신에서 StAR mRNA의 발현 양상을 *in situ* hybridization 기법을 이용하여 조사하였다. 난소의 경우 StAR mRNA는 프로게스테론을 분비하는 황체에서 강한 발현을 보였고 앤드로젠을 분비하는 난포막세포에서도 약한 발현을 보였으며 에스트로젠을 분비하는 과립막세포에서는 발현되지 않았다. 황체에서도 황체의 발달 정도에 따라 차이를 보였고 성장한 황체에서는 강한 발현을 보인 반면, 퇴화하는 황체에서는 약한 발현을 보였다. 부신에서 StAR mRNA는 피질에서 강한 발현을 보였고 수질에서는 발현되지 않았다. 특히, 피질의 토리층에서보다 다발층과 그물층에서 강한 발현을 보였다. 난소와 부신에서 StAR mRNA는 스테로이드 호르몬의 종류에 따라서 발현 양상이 달랐고 스테로이드 호르몬 합성의 초기 단계에 관여함을 알 수 있었다.

**ABSTRACT** : The synthesis of steroid hormone starts from cholesterol. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transfers cholesterol acutely from the outer mitochondrial membranes to the inner in the early step of steroidogenesis. Many kinds of steroid hormones are mainly synthesized in adrenal gland, ovary and testis. The purpose of this study is to determine the distribution of StAR mRNA in the rat ovary and adrenal gland and to confirm the functions of StAR in these organs. In the ovary, StAR mRNAs were strongly expressed in the corpus luteum, where progesterone is synthesized, and these were weakly expressed in the theca layer of follicles, where androgen is synthesized. However, StAR mRNAs were not detected in the estrogen producing granulosa cells of growing follicles. In the corpus luteum, StAR mRNA was expressed differentially with the developmental stages of corpus luteum. In the adrenal gland, StAR mRNAs were strongly localized in the zona fasciculata and zona reticularis, where glucocorticoid is mainly synthesized. StAR mRNAs were weakly expressed in the zona glomerulosa, where mineralcorticoid is synthesized. StAR mRNAs were not detected in the adrenal medulla. In our results, StAR mRNAs were expressed differentially in the steroidogenic cells of ovary and adrenal gland according to the types of steroid hormones, and the stages of corpus luteum development. We conclude that StAR is involved in the steroidogenesis at the very early step of steroid synthesis cascade.

**Key words** : *in situ* hybridization, StAR mRNA, Ovary, Adrenal gland, Rat.

## 서 론

스테로이드 호르몬의 합성은 콜레스테롤로부터 시작되며, 콜레스테롤은 미토콘드리아의 안으로 이동하여 미토콘드리

아 내막에 존재하는 cytochrome P450<sub>sc</sub>에 의해 결사슬이 잘려 프레그네놀론으로 되고 그 다음 단계로 프로게스테론이 된다(Churchill & Kimura, 1979; Simpson & Boyd, 1996). 프로게스테론으로부터는 차례로 코티졸, 코르코스테론, 알도스테론을 형성하게 되며 최종적으로 17 $\alpha$ -히드록시프로게스테론과 테스토스테론을 거쳐 에스트로젠을 합성한다 (Strayer, 1995). 이러한 스테로이드 호르몬의 합성과정에서 미토

콘드리아 안으로 콜레스테롤을 이동시키는 과정은 rate-limiting 단계로서 스테로이드 호르몬의 합성이 빠르게 이루어지기 위해서는 콜레스테롤을 신속하게 미토콘드리아의 안으로 이동시키는 메카니즘이 필요하다. 콜레스테롤을 미토콘드리아의 외막에서 내막으로 신속하게 운반하는 역할은 30Kd의 인산화 단백질인 Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR)의 매개에 의해 이루어진다 (Stoco et al, 1991; Clark et al, 1994; Lin et al., 1995).

스테로이드 호르몬의 합성은 부신 피질, 난소의 황체와 난포, 고환의 사이질세포에서 주로 일어난다. 부신의 피질에서 스테로이드 합성을 살펴보면 미네랄코르티코이드는 토리층에서, 글루코코르티코이드는 다발층과 그물층에서 생성이 된다. 한편, 난소에서 프로게스테론은 황체에서, 에스트로겐은 난포의 과립막세포에서, 안드로겐은 난포막세포에서 생성되며, 이 성호르몬의 합성은 발정주기에 따라 다르고 또한 난포의 성장과 퇴화에 따라 달라진다. Epstein과 Orme-Johnson (1991)은 StAR 단백질의 발현이 부신 및 성선세포에서 스테로이드 합성의 활성도와 직접적으로 관련이 있다고 보고하였고 따라서 여러 단계를 거치는 각종 스테로이드 호르몬 합성에 관여하는 StAR의 발현에도 차이가 있을 것으로 추정된다.

최근, StAR는 생쥐 (Clark et al, 1994; 1995; Bossmann et al., 1996)에서 클로닝되었고 주로 생쥐를 실험동물로 사용하여 연구되었지만 본 연구에서는 흰쥐를 실험재료로 사용하여 난소와 부신에서 StAR mRNA의 발현 양상을 *in situ* hybridization 기법을 이용하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험동물은 Sprague-Dawley계 흰쥐 (체중 250 gm)를 사용하였다. 조직을 채취하기 위하여 ketamine hydrochloride (케타라, 50 mg/ml)과 xylazine (룸폰, 20 mg/ml)을 체중 100 gm당 0.15 ml 및 0.05 ml씩 섞은 용액을 복강내 주사하여 마취시킨 후, 심장을 통하여 RNase free 4% neutral buffered paraformaldehyde로 난소와 부신을 관류고정하였다. 관류고정한 난소 및 부신은 채취하여 동일 고정액에 12 시간 후고정하고 4°C에서 20% sucrose에 침전시킨 후 동결절편기를 사용하여 10  $\mu$ m 두께의 동결절편을 제작하여 *in situ* hybridization을 수행하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) StAR cDNA의 subcloning과 probe preparation

본 실험에 사용할 probe 제작을 위해 558 bp 크기의 rat StAR cDNA fragment를 (Lee et al., 1997) EcoR I 과 Sal I 으로 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 SP6 (sense) 혹은 T7 (antisense) RNA polymerase로 전사시켜 <sup>35</sup>S-UTP로 방사표지된 antisense RNA probe와 sense인 reference RNA probe를 각각 합성하고 Sephadex G-50 Nick column으로 각각 분리하여 cpm 값이 가장 높은 RNA probe를 얻었으며 이것을 다시 polyacrylamide gel로 확인한 다음 probe로 사용하였다.

#### 2) *In situ* hybridization

*In situ* hybridization은 Duello (1993) 등의 방법에 따라 수행하였으며 전 과정에서 RNase free한 상태로 진행하였다. -70°C에 보관되어 있던 조직절편을 PBS (0.1 M, pH 7.4)로 세척한 후 0.001% proteinase K 처리, acetylation 과정을 거친 후 prehybridization buffer (65% deionized formamide, 10% 5 M NaCl, 1% 50×Denhardt's solution, 0.5% 1 M Tris (pH 8.0), 0.1% 0.5M EDTA (pH 8.0), 23% Dextran sulfate)에 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 이어 0.4% 1 M DTT, 1% yeast tRNA (10 mg/ml)에 <sup>35</sup>S-labeled StAR riboprobe (1×10<sup>5</sup> cpm/slide)를 첨가하고 이것을 조직절편 위에 직접 점적한 다음 cover glass를 덮고 습윤상자에 넣어 60°C에서 24 시간 동안 hybridization 시켰다. 반응 후 washing 과정으로 4×SSC, 2×SSC로 세척한후 RNase A (20  $\mu$ g/ml)를 10분간 처리하고 65°C에서 0.1×SSC로 30분간 세척하고 탈수과정을 거쳐 autoradiographic emulsion (NTB<sub>2</sub>, Kodak)으로 coating하고 암상자에 넣어 4°C에서 14일 동안 표지된 probe의 방사선이 감광되도록 노출시켰다. 그 후 D-19 developer로 현상하고 rapid fixer로 고정한 후 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경과 암시야현미경에서 관찰하였다.

## 결 과

흰쥐의 난소와 부신에서 방사선 동위원소로 표지된 riboprobe를 이용한 *in situ* hybridization histochemistry 방법으

로 STAR mRNA의 발현을 조사하였다.

1. 난소에서의 STAR mRNA 발현

난소에서는 황체에서 가장 강한 양성반응세포를 관찰할 수 있었다. 황체 내의 대부분의 세포에서 강한 STAR mRNA 발현이 관찰되었는데 이들은 상호 밀집되어 황체 내의 커다란 집단으로 나타나고 있었다(Figs. 1A and 2A). STAR mRNA는 황체의 성장에 따라 발현의 차이를 보여 황체의 크기가 작고 황체세포의 분포가 균일한 활동기 황체의 경우에는 강한 발현이 관찰되었고(Figs. 1A and 2A) 황체의 크기가 크고 황체세포의 분포가 균일하지 못한 퇴화기의 황체에서는 비교적 약한 발현이 관찰되었다 (Figs. 1A and 2A). 또

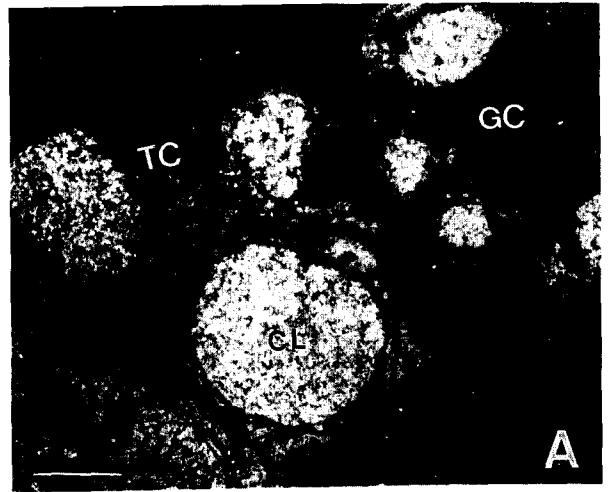


Fig. 2. Expression of STAR mRNA in the rat ovary by *in situ* hybridization.

A, Dark-field photomicrograph. Positive signals were seen on the corpus luteum and theca layer. B, Bright-field photomicrograph. Positive signals were seen on the corpus luteum CL : corpus luteum, TC : theca cell, GC : granulosa cell. The bars represent 300 $\mu$ m in A and B.

한 난포의 과립막 세포에서는 양성반응세포가 관찰되지 않았고 난포막세포에서는 약한 signal이 관찰되었다 (Figs. 2A). Sense RNA probe를 사용한 negative control에서는 STAR mRNA의 signal이 관찰되지 않았다(Figs. 1B and 2B).

2. 부신에서의 STAR mRNA의 발현

부신피질에서는 강한 양성반응세포가 관찰되었지만 수질에서는 양성 반응세포가 관찰되지 않았다 (Figs. 3A and 3B). 특히 피질 내에서는 토리층에서보다 다발층과 그물층에서 더욱 강한 signal이 관찰되었다 (Fig. 3A). Sense RNA probe를 사용한 negative control에서는 STAR mRNA의 sig-

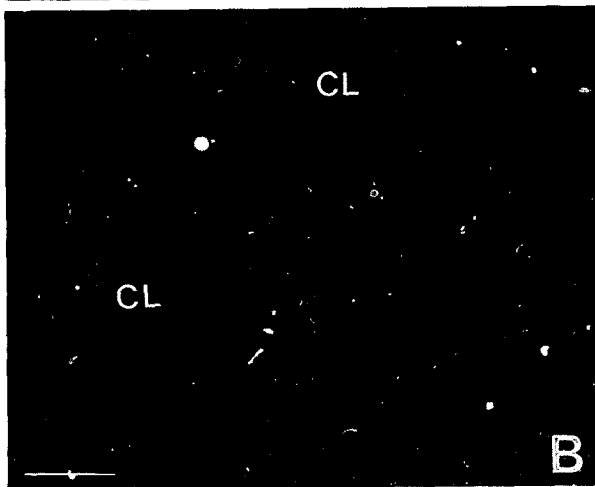
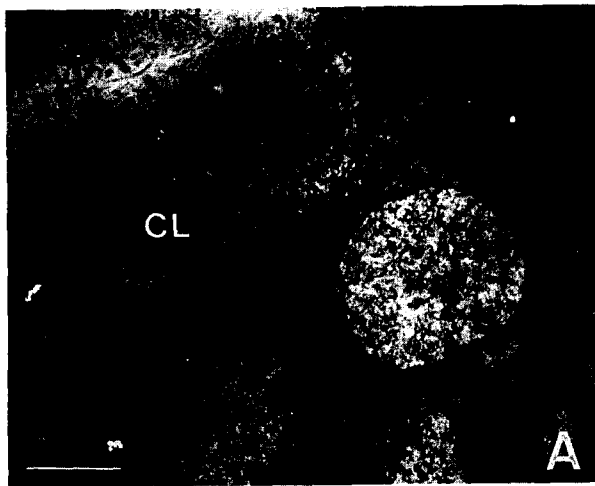
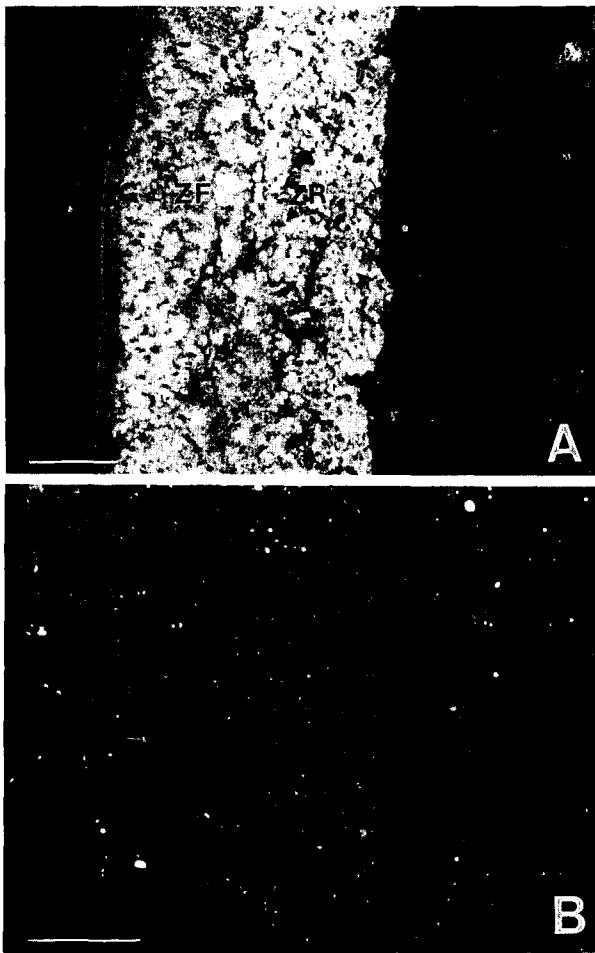


Fig. 1. Dark-field photomicrograph for STAR mRNA in the rat ovary by *in situ* hybridization.

Anti-sense (A) and sense RNA probes (B) were used for *in situ* hybridization. A, Positive signals were seen on the corpus luteum. B, Positive signal was not seen on the corpus luteum in negative control by sense probe. CL : corpus luteum. The bars represent 300 $\mu$ m in A and B.



**Fig. 3. Distribution of StAR mRNA in the rat adrenal gland by *in situ* hybridization.**

A, Dark-field photomicrograph. Positive signals were seen in adrenal cortex, especially zona fasciculata and zona reticularis. B, Positive signal was not seen in negative control by sense probe. ZG : zona glomerulosa, ZF ; zona fasciculata, ZR : zona reticularis. The bars represent 300 $\mu$ m in A and B.

nal이 관찰되지 않았다 (Fig. 3B).

## 고 찰

본 연구에서는 StAR mRNA가 스테로이드 호르몬의 생성 조직인 흰쥐 난소의 황체와 부신의 피질에서 주로 발현됨을 확인하였다. 특히, 난소에는 프로게스테론의 분비가 많은 황체세포에서 강한 양성반응세포가 관찰되었다. 황체에서 StAR mRNA 발현은 황체의 크기가 작고 황체세포의 분포가 균일한 활동기의 황체에서 강하게 나타났고 황체의 크기가

커지고 황체세포의 분포가 균일하지 못한 퇴화기의 황체에서는 발현이 감소되어 황체의 발달 정도에 따라 StAR 발현에 차이가 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 소의 경우 성장 초기의 황체에서는 StAR mRNA의 발현이 비교적 낮지만 활동기 황체에서는 StAR mRNA와 단백질 발현이 초기 황체에 비해 9-15배 높고, 퇴화하는 황체에서는 감소된다는 보고 (Pescador et al., 1996)와 일치한다. Juengel 등 (1995)은 PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 로 황체의 퇴화를 유도하여 PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  투여 12시간 경과시 StAR mRNA가 50% 감소함을 보고하였다. Hartung 등 (1995)은 뇌하수체를 제거하면 황체의 StAR mRNA 발현량이 감소하고 황체자극 호르몬인 LH를 투여하면 StAR mRNA와 프로게스테론이 원래상태로 회복됨을 보여 StAR 단백질이 LH가 프로게스테론을 합성하는 단계에 관여함을 시사하였다. 본 연구에서도 황체 형성시기에 따른 StAR 발현량의 변화가 스테로이드 호르몬 합성양상과 연관되어 있음을 추측할 수 있었다. 한편, 난포의 난포막에서는 StAR mRNA의 발현이 약하게 관찰되었으나 과립막세포에서는 발현을 전혀 관찰을 할 수 없었다. 난포막과 과립막세포는 각각 엔드로젠과 에스트로젠의 스테로이드 호르몬을 생성하지만 에스트로젠의 합성은 콜레스테롤로부터 프로게스테론, 엔드로젠을 거친 스테로이드 호르몬 합성의 마지막 단계에서 이루어지므로 초기에 신속하게 콜레스테롤을 미토콘드리아 안으로 이동시키는 StAR와는 직접적인 관계에 있지 않은 것으로 사료되며 StAR는 콜레스테롤을 미토콘드리아 안으로 신속하게 운반하는 첫 단계인 프레그레놀론과 프로게스테론의 합성에 주로 관여한다고 생각할 수 있다.

한편, 부신에서는 피질에서 StAR mRNA가 강하게 발현되었고 수질에서는 발현되지 않았다. 이는 스테로이드 호르몬의 합성이 이루어지는 피질에서만 StAR mRNA가 발현됨을 의미하며 소의 부신 피질에서 StAR의 발현을 보고한 Elliott 등 (1993)의 결과 및 흰쥐 부신피질의 다발층 세포에서 StAR의 발현을 보고한 Epstein 등 (1991)의 결과와 일치하고 있다. 본 연구의 결과에서 부신 피질의 토리층, 다발층, 그물층에서 StAR mRNA의 발현에 차이가 있었고 그물층과 다발층이 토리층보다 강한 양성반응을 나타냄을 알 수 있었다. 토리층에서 합성되는 미네랄코르티코이드는 콜레스테롤로부터 프로게스테론, 17 $\alpha$ -히드록시프로게스테론, 11-데옥시코르티코스테론과 코르티코스테론, 알도스테론의 단계를 거쳐 스테로이드 호르몬 합성의 마지막 단계에서 이루어진다.

그러므로 스테로이드의 호르몬의 합성 초기 단계에서 콜레스테롤을 미토콘드리아 안으로 신속하게 운반하는 StAR는 미네랄코르티코이드 합성과 직접적으로는 연관되어 있지

않은 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구결과는 스테로이드 합성이 일어나는 난소의 황체와 부신에서 StAR mRNA가 강하게 발현하는 것을 보임으로서, StAR가 스테로이드 합성에 관여함을 알 수 있었다. 또한, 황체의 발달 정도에 따라 StAR mRNA의 발현이 변하는 것을 관찰함으로써 황체의 발달 정도에 따른 프로그스테론의 분비가 StAR에 의해 조절된다는 것을 알 수 있었고 스테로이드 호르몬의 종류에 따라 StAR의 발현이 다름을 알 수 있었다.

## 인용문헌

- Bossmann BH, Hales KH, Li X, Liu Z, Stocco DM, Hales DB (1996) Acute *in vivo* inhibition of testosterone by endotoxin parallels steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in leydig cells. *Endocrinology* 137 (10) :4522-4525.
- Churchill DF, Kimura T (1979) Topological studies of cytochrome P450<sub>scc</sub> and p450<sub>11 $\beta$</sub>  in bovine adrenocortical inner mitochondria membranes. *J Biol Chem* 254:10443-10448.
- Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM (1994) 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.
- Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM (1995) Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Molecular Endocrinology* 9:1346-1355.
- Duello TM, Tsai SJ, Van Ess PJ (1993) *In situ* demonstration and characterization of progonaotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in first trimester human placentas. *Endocrinology* 1333:2617-2623.
- Elliott ME, Goodfriend TL, Jefcoate CR (1993) Bovine adrenal glomerulosa and fasciculata cells exhibit 28.5-kilodalton proteins sensitive to angiotensin, other agonists, and atrial natriuretic peptide. *Endocrinology* 133:1669-1677.
- Epstein LF, Orme-Johnson NR (1991) 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.
- Hartung S, Rust W, Balver M, Ivell R (1995) Molecular cloning and *in vivo* expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. *Biochem Biophys Res Commun* 215:646-653.
- Juengel JL, Meberg BM, Turizillo AM, Nett TM, Niswender GD (1995) Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology* 136 (12) :5423-5429.
- Lee HK, Ahn RS, Kwan HB, Soh J (1997) Nucleotide sequence of rat steroidogenic acute regulatory protein complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 230:528-532.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL (1995) Role of the steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267:1828-1831.
- Pescador N, Soumano K, Stocco DM, Price CA, Murphy BD (1996) Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 55:485-491.
- Simpson ER, Boyd GS (1996) The cholesterol side chain cleavage system of the adrenal cortex a mixed function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 24:10-17.
- Stocco DM, Sodeman TC (1991) 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.
- Stryer L (1995) Biosynthesis of membrane lipids and steroids. 4th ed. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Com., New York, pp. 702-709.