

흰쥐 뇌하수체 Gonadotropes와 Somatotropes에서의 Growth Hormone Releasing Hormone 유전자 발현

이 성 호
상명대학교 생물학과

Rat Gonadotropes and Somatotropes Express Growth Hormone Releasing Hormone Gene in the Pituitary

Sung-Ho Lee

Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

요 약 : Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH)은 척추동물의 시상하부로부터 합성, 분비되어 시상하부-뇌하수체간의 문맥계를 통해 뇌하수체 전엽에 작용하여 Growth Hormone (GH)의 분비를 촉진한다. 시상하부에서 발현되는 일부 Releasing Hormone들이 여러 시상하부의 조직에서도 검출되고 조직특이적인 기능을 수행한다는 사실이 여러 연구자들에 의해 밝혀졌다. 이러한 사실들을 배경으로 본 연구자는 GHRH가 흰쥐의 뇌하수체 전엽과 뇌하수체로부터 유래된 종양세포주들에서 발현될 가능성을 조사하였다. GHRH 펩타이드와 mRNA의 존재와 구조를 규명하기 위하여 뇌하수체와 배양 세포를 사용하여 GHRH immunocytochemistry, 방사면역측정법, GHRH PCR과 RNase protection assay를 시행하였다. Immunocytochemistry의 결과 gonadotrope (대형)와 somatolactotrope (중간형)로 추정되는 세포들에서 GHRH 염색이 나타났고, Somatolactotrope성 종양세포인 GH3 cell 추출물에서 immunoreactive GHRH가 방사면역측정법으로 검출되었다. 3' rapid amplification of cDNA end (3'-RACE)를 시행한 결과, 흰쥐 뇌하수체에 GHRH transcript가 존재하고, 그 3' end 부분이 다른 조직내의 GHRH와 동일함을 확인하였다. GHRH RT-PCR에서도 뇌하수체와 종양세포주들인 α T3 cell (gonadotrope성)과 GH3 cell에서 예상 산물들이 증폭되었다. RNase protection assay를 시행한 결과 난소절제에 의해 뇌하수체내 GHRH 유전자 발현이 증가됨을 확인하였다. 이상의 결과는 GHRH가 뇌하수체 전엽의 gonadotrope와 somatotrope에서 발현되고, paracrine 또는 autocrine 조절물질로 작용하여 GH 분비 외에도 뇌하수체 전엽 세포들의 분화와 분열 등에 관여함을 시사한다.

ABSTRACT : Several lines of evidence indicate that some neuropeptides classically associated hypothalamus have been found in pituitary gland, suggesting the existence of local regulation of pituitary function. Among the hypothalamic releasing hormones, genes for TRH and GnRH are expressed in the rat anterior pituitary gland. The present study was carried out to investigate the expression of the GHRH gene in rat anterior pituitary and the pituitary-derived cell lines. The presence of GHRH transcripts in pituitary tissue was shown by 3' rapid amplification of cDNA end (3'-RACE) analysis. In reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) study, GHRH cDNA fragments were amplified from two pituitary-derived cell lines, α T3 cells originated from mouse gonadotrope and GH3 cells from rat somatolactotrope. Immunoreactive GHRH was detected in large and medium-sized pituitary cells by immunocytochemistry. Significant amounts of GHRH-like molecules were found in the GH3 cell extracts. In RNase protection assay, the level of pituitary GHRH mRNA was augmented by ovariectomy. These results demonstrate that GHRH gene is expressed in the rat gonadotropes and somatotropes, and suggest that the pituitary GHRH could be participated in the paracrine and/or autocrine regulation of cell proliferation, as well as promoting growth hormone secretion.

Key words: Anterior pituitary, Gonadotrope, Somatotrope, GHRH expression.

서 론

척추동물의 시상하부 (hypothalamus)와 뇌하수체 (pitu-

itary)는 신경계와 내분비계가 정교하게 결합되어 생식, 발생, 성장, 각종 대사와 행동의 조절 등 다양한 생리현상을 주관하는 조직들로서, 현재까지 수십 종류의 신경펩타이드와 호르몬들이 이들에서 합성 분비됨이 알려져 있다. 이 가운데 44개의 아미노산으로 이루어진 Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH)은 시상하부에서 합성되고, 문맥계를 통

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비 (유전공학 GE 97-229)에 의하여 연구되었음.

해 뇌하수체 전엽의 somatotrope 또는 somatolactotrope에 작용하여 Growth Hormone (GH) 분비를 촉진한다 (Guillemin et al., 1982; Gick et al., 1984). 분비된 GH는 간을 비롯한 체내 여러 표적 기관에 작용하여 insulin-like growth factor-I (IGF-I)을 매개로 하는 세포의 성장, 대사와 혈당량 조절 등 여러 생리조절 기능을 수행하며, GH는 다시 IGF와 더불어 시상하부와 뇌하수체에 억제적 피이드백 작용을 하는 시상하부-뇌하수체-표적기관 (hypothalamus-pituitary-target organ)의 호르몬 축을 구성함이 잘 알려져 있다 (Mayo et al., 1995).

한편 시상하부성 분비호르몬들 가운데 일부가 뇌의 다른 지역외에도 생식소, 자궁, 태반 등에서 발현되고, 이러한 시상하부의 지역 (extrahypothalamic region)에서 autocrine 또는 paracrine 조절인자 기능을 수행함이 밝혀져 있다 (Pfaff et al., 1994; Richards, 1994; Gnassi et al., 1997; Zoumakis et al., 1997). 최초 GHRH는 말단비대증 (acromegaly) 환자의 췌장암 조직으로부터 분리된 펩타이드였으며, 이는 GHRH가 시상하부의 조직에서도 발현될 수 있는 가능성을 처음부터 시사하는 것이었다 (Guillemin et al., 1982). 현재까지 GHRH 유전자가 태반 (Margioris et al., 1990), 정소 (Berry & Pescovitz, 1990), 난소 (Bagnato et al., 1992), 임파구 (Weigent et al., 1991)에서 발현됨이 보고되었다.

뇌하수체의 경우 일부 전엽 세포들에서 시상하부성 분비호르몬인 TRH와 GnRH가 발현됨이 알려져 있고 (Houben & Deneff, 1994), 특히 human GHRH 유전자를 과다발현하는 형질전환 생쥐의 뇌하수체와 인간의 뇌하수체 전엽에서 발견되는 거의 모든 선종 (adenoma)에서 GHRH mRNA와 펩타이드가 존재함이 보고되었다 (Mayo et al., 1988; Levy & Lightman, 1992; Rauch et al., 1995).

뇌하수체 전엽 세포들의 발생, 분화와 소멸은 뇌하수체 외부의 여러 조직들로부터의 입력 외에도 뇌하수체내 조절 물질들에 의해 역동적으로 조절되리라 예상된다. 상기한 사실들을 종합해 볼 때 GHRH가 척추동물의 뇌하수체에서 발현되어 세포 분화와 증식의 조절 등 현재까지 인지되지 않은 조직특이적 기능을 담당할 가능성이 높은 것으로 추정된다. 그러나 현재까지 정상적인 뇌하수체 전엽에서의 GHRH 유전자 발현과 조절 기작에 관한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구자는 뇌하수체 전엽에서의 GHRH 유전자 발현과 세포 유형간의 상관관계를 규명하기 위해 뇌하수체와 이로부터 유래된 종양 세포주들을 재료로 GHRH 펩타이드의 존재와 분포를 방사면역측정법 (Radioimmunoassay, RIA)과 immunocytochemistry 방법으로, GHRH transcript의 존재는 3'

-Rapid amplification of cDNA end (3'-RACE)와 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법으로 조사하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험 동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 흰쥐 (Sprague-Dawley strain)를 14시간:10시간 (light : dark) 광주기 하에서 *ad libitum* 조건으로 사육하였다. 경추파열법으로 동물을 희생한 후 즉시 뇌하수체 전엽만을 얻어 trypsin 처리후 단일 세포들로 분리를 시행하거나 실험 직전까지 -70°C 에 보관하였다.

2. 세포 배양

뇌하수체 전엽을 멸균된 면도칼로 잘게 자른 후 trypsin (0.25%, Sigma)을 처리하여 단일 세포들로 분리하였다. 종양 세포주 (αT3 cell과 GH3 cell; from Dr. K. J. Catt, USA)는 바로 배양액으로 희석후 원심분리하여 세포를 냉동 보관할 때 처리되었던 DMSO 성분을 제거한 뒤 사용하였다. 정상 또는 종양 세포들 (2×10^6 cells/well)은 37°C 배양기 (95% air, 5% CO_2)에서 10% fetal bovine serum과 항생제 (100 U/ml penicillin과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose form, Sigma)으로 배양하였다. 48시간 동안 전배양 후 본 실험을 위한 배양에서는 serum-free DMEM으로 교체하고, 여기에 효과 측정을 위한 적절한 시약들을 처리하였다.

3. GHRH Immunocytochemistry과 방사면역측정법

흰쥐의 뇌하수체 전엽세포에서의 immunoreactive GHRH의 세포내 분포는 Rat GHRH antiserum (Peninsula, USA)과 Immunohistochemistry detection kit (Amersham)를 사용하여 조사하였다. Chamber slide (Falcon, USA)에서 3일간 배양하여 부착시킨 세포들을 1% BSA가 포함된 PBS용액으로 세척한 뒤 1% glutaraldehyde용액으로 고정시키고, 4% Normal rabbit serum이 포함된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0) 용액으로 12시간 동안 반응시켰다. 여기에 Anti-GHRH serum (1:2000 dilution)을 가하고 4°C 에서 12시간 반응시킨 뒤 immunogold silver staining kit (AuroProbe™ LM과 Intense™ M)를 사용하여 GHRH positive 세포들을 광학현미경 하에서 확인하였다. 배양한 뇌하수체 종양 세포주들을 0.1 N HCl (10 vol) 용액으로 분쇄하고 원

심분리 (10,000×g) 후 상층액을 얻어 세포내 GHRH 함량을 측정하였다. GHRH의 함량의 측정은 rat GHRH radioimmunoassay kit (Peninsula, USA)를 사용하여 제공자의 방법을 따라 수행하였다.

4. RNA와 DNA 분석

1) Total RNA 추출

조직과 배양한 세포로부터의 RNA 추출은 acidic guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 방법 (Chomzinsky and Sacchi, 1987)을 기본으로 제작된 Trizol solution (GIBCO)을 사용하여 시행하였다. 최종 pellet은 75% ethanol로 세척하고 건조시킨 후 DEPC-water에 녹인 뒤 UV spectrophotometer로 정량하였다. Poly (A) RNA가 필요한 경우는 Dynabead Oligo d (T) (Dynal, USA)를 사용하여 농축 분리하였다.

2) RNase protection assay (RPA)

GHRH RNase protection assays는 RPA II kit™ (Ambion, USA)를 사용하여 수행하였다. 사용된 ³²P-UTP로 방사표지된 GHRH antisense RNA probe는 5% urea-polyacrylamide gel을 사용하여 최대 예상 크기의 부분만을 분리 추출하여 각 조직에서 얻은 RNA와의 tube hybridization에 사용하였다.

3) 3'-RACE와 RT-PCR

RNA를 reverse transcriptase (RNase H⁻ SuperScript II RT, GIBCO)와 oligo d (T)₂₅ primer를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 역전사한 cDNA와 Taq DNA polymerase (Takara)를 사용하여 PCR을 수행한 뒤, 그 산물의 크기를 2% agarose gel을 사용한 전기영동으로 확인하였다. 3'-RACE와 RT-PCR에서 사용된 primer의 염기 서열은 알려진 흰쥐 시상하부형 GHRH cDNA 염기서열 (Mayo et al., 1984)을 참고로 제작하였으며 (Korea Bioneer), 3'-RACE에서는 5'-catgaacaggcagcaagg-3' (sense primer in exon 3)과 oligo d(T)₂₅ primer (in poly (A) tail region)였으며, RT-PCR에서는 5'-ggtcagtgggacctgagccag-3' (sense primer in exon 1)과 5'-gagggctcaagcctccgctga-3' (antisense primer in exon 5)였다. PCR 반응 조건은 최초 94°C에서 2분간 denaturation을 1회 시행 후 denaturation (94°C, 30초), annealing (52°C, 30초), elongation (72°C, 1분) 과정을 35회 반복 실시하였고 최종적으로 1회 extension (72°C, 10분)을 시행하였다.

4) Southern blot assay과 partial DNA sequencing

PCR과 3'-RACE로 정확한 산물이 증폭되었는가 여부는 전기영동 후 Southern blot assay를 시행하거나, PCR 산물을 PCR based dideoxy chain termination 방법으로 염기 서열을 조사하여 원하는 반응이 일어났음을 확인하였다.

결 과

1. 뇌하수체 전엽세포와 GH3 세포내에 분포하는 immunoreactive GHRH의 검출

GHRH immunocytochemistry에서 1차 항체로 normal rabbit serum을 사용했을 때는 항원-항체반응이 검출되지 않았으나 (Fig. 1A), anti-rat GHRH antiserum (Peninsula, 1:2000 dilution)을 처리했을 때 다수의 세포에서 세포막 부분보다는 세포질에서 고루 항원-항체반응이 검출되었으며 특히 gonadotrope로 추정되는 크기가 큰 세포들과 somatotrope 또는 lactotrope로 추정되는 중간 크기 세포들이 GHRH positive로 나타났다 (Fig. 1B). 검출된 GHRH가 시상하부에서 분비되어 뇌하수체 세포에 결합할 가능성과 배양액내 포함된 serum으로부터 유래될 가능성은 뇌하수체 세포를 48시간 preincubation 후 3회의 철저한 세척 과정을 거친 후 다시 serum-free media로 배양하였으므로 배제되었다. 흰쥐 somatolactotrope로부터 유래된 GH3 cell 추출물을 농도별로 처리한 후 GHRH 방사면역측정법을 수행한 실험에서 dose replacement curve와 GHRH standard curve가 평행함을 보이므로 immunoreactive GHRH가 GH3 cell내에 존재함이 증명되었다 (Fig. 2). 한편 생쥐의 gonadotrope로부터 유래된 것으로 추정되는 αT3 cell 추출물을 사용한 방사면역측정법에서는 GH3 cell 추출물을 사용한 경우보다 훨씬 적은 수준만이 검출되었는데, 이는 실험에서 사용된 흰쥐에 대한 GHRH antiserum의 생쥐 GHRH 펩타이드에 대한 affinity가 훨씬 낮기 때문으로 해석된다 (data not shown).

2. 뇌하수체 GHRH transcript의 존재 확인

흰쥐의 시상하부, 생식소, 태반에서 발현되는 GHRH transcript에 공통적으로 존재하는 부분중 exon 3의 일부와 oligo d (T)₂₅를 각각 5'과 3' primer로 사용한 3'-RACE에서 생식소, 태반, 뇌하수체에서 추출한 RNA로부터 공히 258 bp 크기의 증폭 산물이 검출되었는데, 이 결과는 이들 조직에 존재하는 GHRH transcript의 3' 부분인 exon 3 이하에서 poly (A) tail 부분까지가 동일함을 의미한다 (Fig. 3). 한편

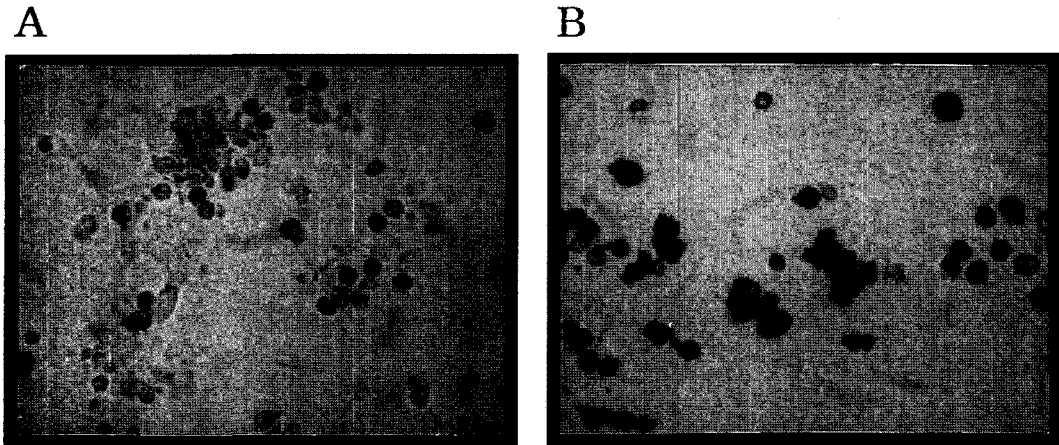


Fig. 1. GHRH immunocytochemistry. In this study, normal rabbit serum (A) and anti-rat GHRH antiserum (B) were used as primary antibody. Secondary antibodies (anti-rat goat serum, from Vector) and immunogold silver staining kit (AuroProbe™ LM과 Intense™ M) were employed for color detection. Magnification, ×400.

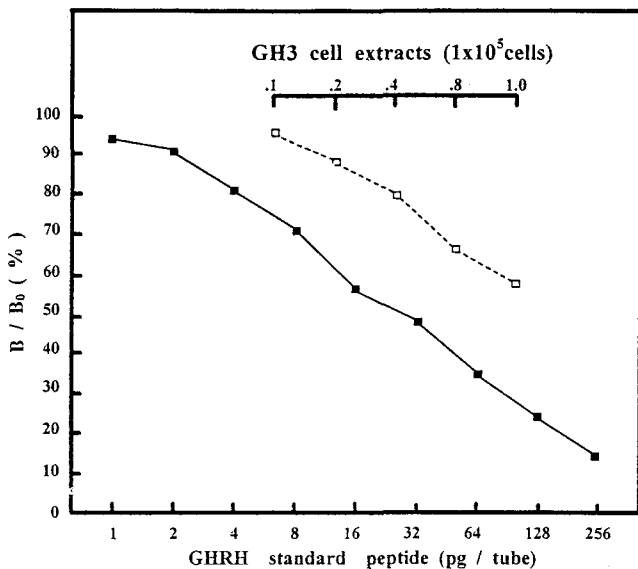


Fig. 2. GHRH radioimmunoassay (RIA) parallelism. Competition curve with increasing amounts of GH3 cell extracts was parallel to GHRH standard curve with known amount of GHRH peptide. Cells were homogenized in 0.1 N HCl (10 vol). After centrifugation (at 10,000×g for 10 min), the supernatant was neutralized with 1 N NaOH prior to GHRH RIA.

정상적인 뇌하수체 전엽 조직, αT3 cell과 GH3 cell에서 추출한 RNA와 시상하부형 exon 1 (sense) 및 공통형 exon 3 (antisense) primer를 사용한 RT-PCR에서 시행한 결과, 이들 세포들에서도 GHRH가 발현됨을 확인하였다 (Fig. 4). GHRH RNase protection assay를 시행한 결과 난소를 제거

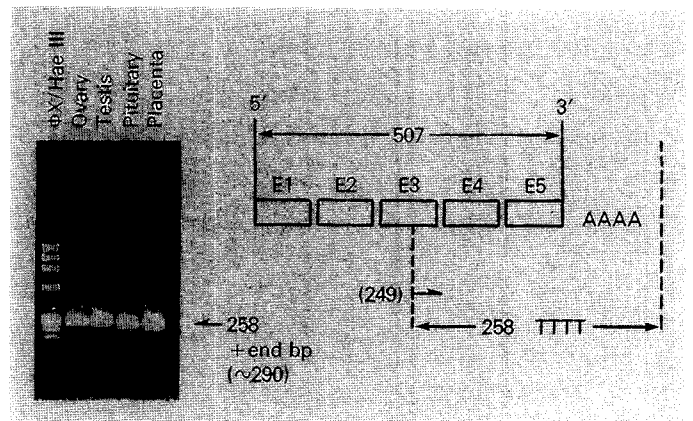


Fig. 3. GHRH 3' Rapid amplification of cDNA end (3'-RACE). See 'Materials and Methods' for detail.

한 쥐의 뇌하수체 GHRH transcript의 양이 정상인 경우보다 높게 나타났다 (Fig. 5). 앞서의 결과 (Fig. 1과 4)에서 보여진 바와 같이 뇌하수체 GHRH의 발현이 gonadotrope에서 상당 부분 일어나므로 난소절제후의 gonadotrope 수의 증가에 의해 뇌하수체 GHRH transcript의 수준이 상승하는 것으로 추정된다.

논 의

지난 10여년간 고전적인 의미에서의 여러 시상하부 분비 호르몬들에 대한 연구 경향은 호르몬 함량이나 분비의 변화 수준의 연구에서 유전자 구조와 발현 조절 기작의 조사로 진전되었고, 연구 대상도 시상하부의 조직들로 확대되어 분비

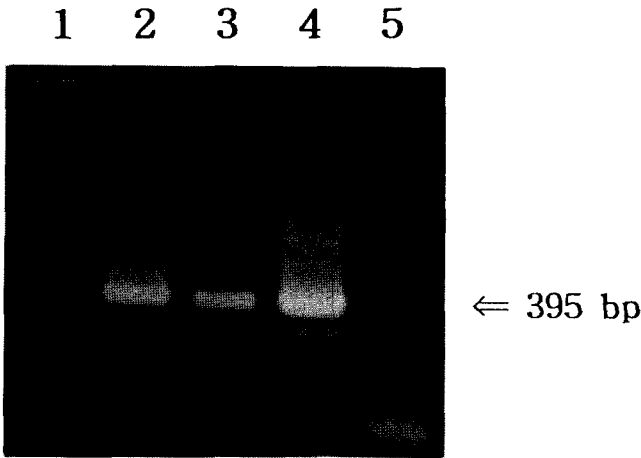


Fig. 4. GHRH RT-PCRs. Sense (within the hypothalamic exon 1) and antisense (within the exon 5) primers were used in this study. Lane 1, DNA size marker; lane 2, pituitary; lane 3, GH3 cells; lane 4, α T3 cells; and lane 5, PCR without RT for negative control.

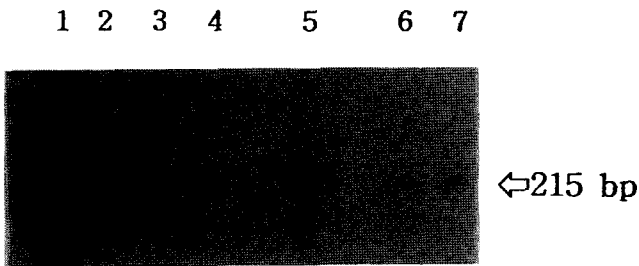


Fig. 5. GHRH RNase protection assay (RPA). Lane 1, ³²P-UTP labeled GHRH RNA probe; lane 2, with placental RNA; lane 3, with testicular RNA; lane 4, with ovarian RNA; lane 5, with hypothalamic RNA; lane 6, with pituitary RNA from intact female rat; and lane 7, with pituitary RNA from ovariectomized rat.

호르몬들의 조직특이적인 유전자 발현과 국부 조절기능들이 밝혀져 왔다. 포유류의 시상하부 GHRH mRNA의 크기는 약 0.75 Kb로 추정되고 있다 (Mayo et al., 1995). 흰쥐 시상하부형의 GHRH 유전자는 크기가 약 10 Kb 정도인 단일 유전자이고 5개의 exon으로 존재하는데, 이 중 exon 3과 4의 일부에 GHRH 펩타이드 서열이 coding되어 있고 그 GHRH 펩타이드 전구체 (preprohormone)는 약 103~108개의 아미노산으로 구성되리라 예상된다 (Mayo et al., 1984). 시상하부형 GHRH 유전자는 흰쥐, 생쥐, 인간에서 공통 TATA box와 CCAAT box를 포함한 전형적인 프로모터를 갖는다 (Mayo et al., 1995). 최근 homologous recombination technology (gene knock-out)를 사용하여 *Hox* family

의 일원으로 분류되는 *Gsh-1* homeobox 유전자를 파손시킨 생쥐에서 시상하부 GHRH 유전자 발현이 사라지는데, 흥미롭게도 뇌하수체 gonadotrope의 LH와 FSH 분비능 또한 극도로 저하되어 불임이 유발됨이 보고되었다 (Li et al., 1996). 전사조절물질인 *Gsh-1* 유전자가 흰쥐 뇌하수체에서도 발현되므로 시상하부형은 물론 뇌하수체형 GHRH 발현의 조절이 공통 *Gsh-1* homeobox protein에 의해 조절되는 것으로 보인다 (Lee et al., 1998). 한편 흰쥐 시상하부에서의 GHRH 유전자 발현에 미치는 생식소 스테로이드의 영향으로 testosterone은 촉진적이고 estrogen은 억제적인 효과를 미친다 (Zeitler et al., 1990). 난소절제 (ovariectomy)를 시행할 경우 난소로부터 분비된 estrogen에 의한 억제적 신호의 소멸로 인하여 뇌하수체 전엽내 gonadotrope 수가 증가하고 이어서 혈중 LH의 분비가 급격히 상승함은 주지의 사실이다 (Karla & Karla, 1983). 본 연구에서 RNase protection assays는 뇌하수체 GHRH 유전자 발현이 시상하부에서의 마찬가지로 난소 스테로이드에 의해 조절되고 그 발현 산물이 생식 현상의 조절에 관여할 가능성을 보여 주었다.

시상하부의 조직들에서 발현되는 GHRH transcript의 크기는 조직특이성을 보이며 이로부터 전사되는 GHRH 펩타이드의 크기도 시상하부형보다 다양한데, 이러한 사실은 세포 기원이 다르고 생리적으로 상이한 조건하에 있는 각 조직들이 각기 다른 방식으로 GHRH 유전자를 작동시킴을 시사한다 (Margioris et al., 1990; Berry & Pescovitz, 1990; Weigent et al., 1991; Bagnato et al., 1992). 흰쥐의 태반형 GHRH mRNA는 시상하부형과 유사한 크기 (0.7 0.8 Kb)이지만 그 발현에 사용되는 프로모터는 시상하부형으로부터 5' 방향으로 10 Kb 정도 떨어져 위치한 TATA box가 없는 유형이며, POU gene family의 하나인 *Oct-1* homeobox protein에 대한 consensus binding sequence들을 포함한다 (Gonzalez-Crespo and Boronat, 1991; Mayo et al., 1995). 또 흰쥐 정소에서의 GHRH 발현은 태반형 프로모터와 다시 이로부터 5' 방향으로 700 bp 정도 떨어진 곳에 위치한 정소 특이적인 프로모터가 동시에 사용되며, 이때 정소형 프로모터에 의한 1.75 Kb 크기의 mRNA가 주로 전사되며 추가로 몇 개의 alternative splicing variant들이 존재함이 보고되었다 (Srivastava et al., 1995). 이와 같이 시상하부의 조직들은 상이한 프로모터와 전사조절부위를 갖음으로써 조직특이적인 전사개시부위와 5' UTR 부분을 갖는 여러 유형의 transcript를 생산하는 것으로 추정된다. 본 연구자 등은 흰쥐 뇌하수체 GHRH transcript의 크기가 알려진 시상하부형이나 자궁형의 크기와 유사한 약 0.75 Kb이고, 5'-RACE 실험을

통해 흰쥐 뇌하수체에서 3개의 독특한 GHRH 유전자의 프로모터가 작동하여 상이한 전사개시부위와 5' UTR 부분을 갖는 3개 유형의 transcript가 존재할 가능성과 그 중 시상하부형이 가장 많이 존재할 가능성을 보고한 바 있다 (Lee et al., 1995, 1998). 이와 같은 흰쥐의 뇌하수체 전엽에서의 GHRH 유전자 발현에 사용되는 프로모터와 그 조절에 관한 분자생물학적 연구는 흥미로운 주제가 될 것이다.

시상하부의 조직들은 GHRH 유전자 산물을 각기 조직 특이적인 용도로 이용한다. 태반 GHRH는 주로 cytotrophoblast, giant trophoblast와 labyrinth에서 발현되며 fetal growth hormone과 placental lactogen의 분비를 조절하는 것으로 보인다 (Margioris et al., 1990). 정소에서는 Leydig 세포와 생식세포에서 발현되는데, 스테로이드 합성 및 분비 조절 기능이 확인되었고, Sertoli 세포의 기능 조절 및 정자형성 과정의 조절에도 관여하리라 예상된다 (Ciampani et al., 1992; Srivastava et al., 1993). 흰쥐의 난소에는 GHRH 또는 Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)에 대한 수용체가 존재하며, GHRH가 특히 granulosa 세포들에서 발현되어 스테로이드 합성과 분비를 조절함이 보고되었다 (Moretti et al., 1990). GHRH와 VIP는 Glucagon/Secretin family에 속하며 GHRH의 경우 VIP 수용체에도 작용할 수 있는데, 실제로 흰쥐의 GHRH와 VIP에 대한 수용체의 아미노산 및 염기 서열은 대단히 유사하다 (Mayo, 1992). 따라서 뇌하수체 GHRH도 GHRH 수용체 뿐만 아니라 VIP 수용체에도 결합하여 작용할 가능성이 있으므로, GHRH가 somatotrope에만 선택적으로 작용하여 GH 분비를 촉진한다는 기존의 설에 GHRH가 VIP 수용체를 갖는 다른 유형의 전엽 세포의 활성 조절에도 관여할 가능성을 추가하여야 할 것이다.

GHRH의 조직 특이적인 발현과 기능이 존재함에도 불구하고 모든 조직에서 GHRH가 공통적인 기능, 즉 세포분열을 촉진하는 mitogen으로 작용할 가능성이 대단히 높다. 인간의 GHRH 유전자를 과다발현하는 형질전환 생쥐는 생후 8개월후 정상인 생쥐의 것보다 약 5배로 비대해진 뇌하수체 (hyperplastic pituitary)를 갖게 되고 궁극적으로 10배 이상으로 비대해진 종양으로 진행되는데, 이 생쥐의 뇌하수체 전엽과 뇌장 등에서 다량의 GHRH 펩타이드, 특히 여러 고분자형들이 존재함이 보고되었다 (Mayo et al., 1988; Frohman et al., 1990). 또한 인간의 뇌하수체에서 발견되는 선종 가운데 다수에서 GHRH mRNA가 검출되고, HPLC를 사용한 연구에서는 각각의 뇌하수체 전엽 선종의 종류에 따라 특이한 유형의 고분자형 GHRH 펩타이드들이 존재함이 보고되었다 (Levy & Lightman, 1992; Rauch et al., 1995). 이러한

결과들은 GHRH가 뇌하수체에서의 호르몬 분비 조절 기능은 물론 세포 분화와 증식 과정에 중요한 역할을 담당할 가능성을 시사하는 것인데, 실제로 GHRH가 발현되는 태반, 정소, 난소, 임파구 등 역시 모두 세포 분열이 왕성하며 극적인 분화가 일어나는 조직들이다. 뇌하수체 종양세포주인 GH3와 α T3 세포에서 GHRH가 발현됨을 보인 본 연구에서의 결과는 정상적인 흰쥐 뇌하수체 추출물과 trypsin 처리로 분리한 뇌하수체 전엽세포 추출물 및 세포배양 후 얻은 배양액에서도 GHRH가 검출됨을 확인한 기존의 보고 (Lee et al., 1995)와 더불어 GHRH가 정상 뇌하수체 전엽은 물론 전엽 선종에서 공히 세포 분열의 조절에 관여할 가능성을 강력히 시사한다. 이러한 관점에서 볼 때 뇌하수체 GHRH 유전자 발현과 조절 및 조직 특이적 기능에 대한 연구는 조직과 세포 분화 기작에 관한 발생학 및 내분비학적 이해를 증진시키는 데 기여하리라 예상된다. 주로 multiple endocrine neoplasia (MEN) 증상에 의해 나타나는 뇌하수체 adenoma의 경우 체내 다른 부위의 악성 종양과는 달리 hormone-dependent neoplasia 단계를 거쳐 종양으로 진전되는데, 방사선 치료나 외과적 수술로 제거한 후에도 다시 재발한다. 따라서 응용적인 측면에서 뇌하수체 GHRH의 유전자 발현과 조절에 관한 연구는 뇌하수체 adenoma의 원인과 치료법을 연구하는 데도 유용할 것이다.

인용문헌

- Bagnato A, Moretti C, Ohnishi J, Frajese G, Catt KJ (1992) Expression of the growth hormone releasing hormone gene and its peptide product in the rat ovary. *Endocrinology* 130:1097-1102.
- Berry SA, Pescovitz OH (1990) Ontogeny and pituitary regulation of testicular growth hormone releasing hormone-like messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 127:1404-1411.
- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Ciampani T, Fabbri A, Isidori A, Dufau ML (1992) Growth hormone-releasing hormone is produced by rat Leydig cell in culture and acts as a positive regulator of Leydig cell function. *Endocrinology* 131:2785-2792.
- Frohman LA, Downs TR, Kashio Y, Brinster RL (1990) Tissue distribution and molecular heterogeneity of hu-

- man growth hormone-releasing factor in the transgenic mouse. *Endocrinology* 127:2149-2156.
- Gick GG, Zeytin FN, Brazeau P, Ling NC, Esch FS, Bancroft C (1984) Growth hormone-releasing factor regulates growth hormone mRNA in primary cultures of rat pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1553-1555.
- Gnessi L, Fabbri A, Spera G (1997) Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis : an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 18:541-609.
- Gonzalez-Crespo S and Boronat A (1991) Expression of the rat growth hormone releasing hormone gene in placenta is directed by an alternative promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8749-8753.
- Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehenberg WB (1982) Growth hormone releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218:585-587
- Houben H, Deneff C (1994) Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 15:547-582.
- Karla SP, Karla PS (1983) Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr Rev* 4:311-351.
- Lee SH, Cesnaj M, Ohnishi J, Moretti C, Catt KJ (1995) Expression of GHRH gene in the rat pituitary gland. 77th Annual meeting of the Endocrine Society. Washington DC, USA. Abstr. P3:125.
- Lee SH, Cesnaj M, Ohnishi J, Moretti C, Frajese G, Catt KJ (1998) Expression of Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) gene in the rat pituitary gland : a hormonal language using in cross-talk between anterior pituitary cells. *in preparation*.
- Levy A, Lightman SL (1992) Growth hormone-releasing hormone transcripts in human pituitary adenomas. *J Clin Endo Metab* 74:1474-1476.
- Li H, Zeitler PS, Valeriys MT, Small K, Potter SS (1996) *Gsh-1*, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *EMBO J* 15:714-724.
- Margioris AN, Brockmann G, Bohler HCL, Grino M, Vamvakopoulos N, Chrousos GP (1990) Expression and localization of growth hormone releasing hormone messenger ribonucleic acid in rat placenta : *in vitro* secretion and regulation of its peptide product. *Endocrinology* 126:151-158.
- Mayo KE (1992) Molecular cloning and expression of pituitary-specific receptor for growth hormone releasing hormone. *Mol Endocrinol* 6:1743-1744.
- Mayo KE, Cerelli GM, Rosenfeld MG, Evans RM (1984) Characterization of cDNA and genomic clones encoding the precursor to rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Science* 314:464-467.
- Mayo KE, Godfrey PA, Suhr ST, Kulik DJ, Rahal JO (1995) Growth hormone-releasing hormone : synthesis and signaling. *Rec Prog Horm Res* 50:35-73.
- Mayo KE, Hammer RE, Swanson LW, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM (1988) Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol Endocrinol* 2:606-612.
- Moretti C, Bagnato A, Solan N, Frajese G, Catt KJ (1990) Receptor mediated actions of growth hormone releasing factor on granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 127:2117-2126.
- Pfaff DW, Schwanzlerl-Fukuda M, Parhar IS, Lauber AH, McCarthy MM, Kow LM (1994) GnRH neurons and other cellular and molecular mechanisms for simple mammalian reproductive behaviors. *Rec Prog Horm Res* 49:1-25.
- Rauch C, Li JY, Croissandeau G, Berthet M, Peillon F, Pagesy P (1995) Characterization and localization of an immunoreactive growth hormone-releasing hormone precursor form in normal and tumoral human anterior pituitaries. *Endocrinology* 136:2594-2601.
- Richards JA (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15:725-751.
- Srivastava CH, Breyer PR, Rothrock JK, Peredo MJ, Pescovitz OH (1993) A new target for growth hormone-releasing hormone action in rat: the Sertoli cell. *Endocrinology* 133:1478-1481.
- Srivastava CH, Monts BS, Rothrock JK, Peredo MJ, Pescovitz OR (1995) Presence of spermatogenic-specific promoter in the rat growth hormone-releasing hormone gene. *Endocrinology* 136:1502-1508.
- Weigent DA, Riley JE, Galin FS, LeBoeuf RD, Blalock JE

- (1991) Detection of growth hormone and growth hormone-releasing hormone-related messenger RNA in rat leukocytes by the polymerase chain reaction. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:643-648.
- Zeitler P, Argente J, Chowen-Breed JA, Clifton DK, Steiner RA (1990) Growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in the hypothalamus of the adult male rat is increased by testosterone. *Endocrinology* 127:1362-1368.
- Zoumakis E, Makrigiannakis A, Margioris AN, Stournaras C, Gravanis A (1997) Endometrial corticotropin-releasing hormone. its potential autocrine and paracrine actions. *Ann NY Acad Sci* 828:84-94.