

# Testosterone 처리한 미성숙 무지개송어 뇌하수체의 세포배양계에서 생식소자극호르몬 분비에 대한 Activin의 효과

김대중\* · 한창희\*\* · 會田勝美\*\*\*

\*국립수산진흥원 태안수산종묘배양장, \*\*동의대학교 자연과학대학 생물학과,

\*\*\*일본 동경대학 농학생명과학연구과 수권생물학과

## Effects of Activin on Testosterone-primed Immature Rainbow Trout Gonadotropin Release *in vitro*

Dae-Jung KIM\*, Chang-Hee HAN\*\* and Katsumi AIDA

\*Tae'an Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Tae'an, Chungnam, 357-940, Korea

\*\*Department of Biology, Dong-Eui University, Pusan, 614-714, Korea \*\*\*Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agriculture and Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo, 113, Japan

The present studies were conducted to evaluate the effects of activin-A on gonadotropins (GTHs) release in testosterone-treated immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. The administration of testosterone elevated pituitary level of GTH II but not of GTH I. In this study using primary cultures of dispersed pituitary cells in static incubation, dose-dependent increases in GTH II release was observed in the activin-treated group at day 3 of incubation (long-term incubation), but not at day 1 of incubation (short-term incubation). Dopamine, a potent inhibitor of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-stimulated GTH II release in rainbow trout, was only partially effective in decreasing activin-induced GTH II release. Furthermore, salmon GnRH (sGnRH)-stimulated GTH II release was not potentiated by the pretreatment with activin. However, the control mechanisms of GTH I release by activin and other hormones were not observed in the all tested experiments. The results of these studies support the contention that in contrast with the usual stimulatory effects of activin on GTH release in mammals, activin exerts long-term stimulatory actions on GTH II release in rainbow trout. The control mechanism of GTH I release, however, is a question that remains to be elucidated.

Key words: teleost, testosterone, pituitary cell culture, GTHs, activin-A, GnRH, dopamine

### 서 론

어류의 생식내분비계는 다른 척추동물과 마찬가지로 시상하부-뇌하수체-생식소계에 의해서 강하게 지배를 받고 있다. 그중 뇌하수체에서 생성되는 생식소자극호르몬 (gonadotropin; GTH) 은 어류에서 1종류만이 존재하여 배란·배정에 관계되는 전과정을 조절한다고 여겨왔다 (Fontaine and Dufour, 1987). 최근 정제기술의 발달로 연어과 어류의 뇌하수체에서 2종류의 GTH가 분리·정제되어 다른 척추동물과 마찬가지로 어류에 있어서도 2종류의 GTH가 존재하는 것이 밝혀지게 되어 새롭게 동정되어진 것을 GTH I, 전부터 존재하던 것을 GTH II 라고 명명하였다 (Suzuki *et al.*, 1988a, b; Swanson *et al.*, 1991).

연어과 어류에 있어서 2종류 GTH에 관한 내분비학적 연구가 진전되어, GTH I (FSH-like)은 생식소 발달의 초기 난황축적 및 정자형성 단계에, GTH II (LH-like)는 후기의 난성숙 및 배정시에 합성·분비되는 것이 밝혀졌다 (Suzuki *et al.*, 1988a, b; Swanson *et al.*, 1991). 또한 연어과 이외의 어종, 잉어 (*Cyprinus carpio*) (Van der Kraak *et al.*, 1992), 참돔 (*Pagrus major*) (Tanaka *et al.*, 1993) 및 눈다랑어 (*Thunnus obesus*) (Okada *et al.*, 1994)에서도 2종류 GTH의 화학적 동정이 연구 되었지만, 어류의 GTH 분비조절기구에 관한 연구의 대부분은 GTH II에 관한 것 뿐이며, 금붕어 (*Carassius auratus*)와 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*)의 연구결과를 보면, gonadotropin-releasing hormone (GnRH)와 dopamine (DA)에 의해서 분비조절 작용을 받고 있는 것이 밝혀졌다 (Peter *et al.*, 1991; Kim

*et al.*, 1995).

최근 포유류의 난포액에서 inhibin과 activin이 분리·정제되어, rat의 뇌하수체 전엽세포에 있어서 inhibin은 FSH의 세포내 함량 및 배양액중의 농도를 감소시키며, 역으로 activin은 증가시키는 것이 *in vitro* 실험에서 밝혀졌다 (Katayama 1995). 어류에 있어서도, 금붕어의 genomic DNA로부터 activin  $\beta$ A와  $\beta$ B를 클론화하여 염기서열을 조사한 결과, 다른 척추동물들과 높은 상동성을 나타내었다 (Gharib *et al.*, 1990; Ge *et al.*, 1993). 따라서 activin은 척추동물의 생식에 관해서 어떤 중요한 생물학적 역할을 발휘하며, 또한 어류의 GTH I이 고등척추동물의 FSH와 같은 생리적 역할을 한다면, 어류에 있어서도 activin의 자극에 의해서 GTH I 이 분비조절될 가능성이 존재한다고 생각된다. 비록 어류 GTH 분비조절에 있어서 activin의 영향에 관한 연구는 난소의 발달이 비동시발생형의 다회 산란어인 금붕어에서 이루어졌으나, 동시발생형이며 년 1회 산란어인 연어과 어류와는 난소 발달양식의 차이에 의해서 activin은 GTH의 분비조절 및 생리적 역할도 금붕어와는 다르다고 추측되어진다.

따라서 본 연구에서는 어류의 GTH 분비조절 기구를 구명하기 위하여 testosterone (T)을 경구투여한 미성숙한 무지개 송어의 뇌하수체를 세포배양하여, GTH I과 II의 분비조절에 관한 activin의 영향을 조사했다. 미성숙한 무지개 송어의 뇌하수체내에는 GTH II 함량이 낮기 때문에 T에 의해서 뇌하수체내 GTH II 함량이 증가하는 현상을 이용했다 (Crim *et al.*, 1981; Crim and Evans 1983). 그러나 T에 대한 GTH I의 영향에 관한 연구도 아직 밝혀져 있지 않기 때문에 이것도 동시에 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

미성숙한 암·수 무지개 송어 (체중: 약 100 g)를 14°C에 순치하여 실험어로 사용했다.

### Testosterone의 경구투여

T처리군은 시판중인 송어용 펠렛 1 kg에 대해서 25 mg의 T을 녹인 ethanol용액 100 ml을 뿌려서, 18시간 실온에서 건조시켜 제조한 펠렛을 투여하였다. 대조군에서는 ethanol용액 만을 뿌려서 건조시킨 펠렛을 투여하였다. 펠렛은 매일 체중의 1.5%의 사료공급률이 되도록 1일에 2회로 나누어서 30일간 투여하였다. 앞선 실험에서 30일간 T를 경구투여한 미성숙 무지개 송어의 뇌하수체 세포내의 GTH II 함량이 최고치에 도달했다 (Kim, 1997). 본 실험에서도 T를 30일간 경구투여한 미성숙한 무지개송어의 뇌하수체를 이용하였다.

### Hormone

Activin-A (erythroid differentiation factor: EDF)는 Ajinomoto社 중앙연구소의 Eto박사로부터 제공받았다. salmon gonadotropin releasing hormone (sGnRH)는 Peninsula Laboratories (Belmont, CA, USA)로 부터, 그리고 dopamine는 Sigma社의 것을 사용하였다.

### 뇌하수체 세포의 배양

실험어는 2-phenoxyethanol (200 ppm)을 이용해서 마취시킨후, 뇌하수체를 빠르게 적출해서 빙냉상태의 Hank's balanced salt solution [HBSS (Gibco Lab., New York, USA); 25 mM HEPES, 4 mM NaHCO<sub>3</sub> and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic agent (Gibco Lab.), pH 7.5]에 침적시켰다. 그 후 HBSS 완충액으로 3회 씻은 뒤, 멸균시킨 면도날로 잘게 단편으로 만들었다. 뇌하수체 단편은 20 mg collagenase (Sigma, St. Louis, USA)가 포함된 10 ml HBSS의 배양플라스크 (Wheaton Instruments, New Jersey, USA)에 옮겨서, 15°C에서 75분간 분산시켰다. 그 동안 silicon처리한 피펫으로 뇌하수체 단편을 강하게 흡입·배출을 반복함으로써 세포분리를 촉진시켰다. 그 후, 0.04% DNase I (Boehringer Mannheim, GmbH)용액을 첨가시켜, 15분간 배양했다. 분산시킨 세포를 50 μm의 nylon mesh로 여과하여 150×g로 5분간 원심분리해서 세포를 회수했다. 회수한 세포를 25 mM HEPES, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10% fetal bovin serum (FBS; Gibco Lab.)가 포함된 RPMI-1640 (pH 7.5; Sigma) 배양액에 현탁했다. 세포수는 hemocytometer로 계산하였으며, 뇌하수체 1개당 T투여군에서는 약 4×10<sup>5</sup> 세포, 대조군에서는 약 1.2×10<sup>5</sup> 세포를 얻었다. 세포생존율은 40 μl의 세포현탁액을 0.01 M PBS buffer (pH 7.5)에 용해시킨 0.1% trypan blue (Sigma) 10 μl와 혼합해서 계산하였으며, 세포생존율은 91 ± 1% 였다.

### 세포배양

세포현탁액을 2.5×10<sup>5</sup> cells/ml로 조정해서, 0.1% poly-L-lysine

(Sigma)으로 코팅한 48 well-plate (Sumitomo Co., Tokyo, Japan)에 500 μl씩 분주했다. 그 이후, FBS가 포함된 RPMI-1640 배양액으로 18°C, 3일간 preincubation해서 세포를 well-plate에 부착시켰다. 그 후, 0.1% BSA가 내포된 RPMI-1640 (25 mM HEPES, 4 mM NaHCO<sub>3</sub> and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic agent, pH 7.5) 배양액을 500 μl씩 분주하여 씻은 뒤, FBS가 없는 새로운 RPMI-1640 배양액 (25 mM HEPES, 4 mM NaHCO<sub>3</sub> and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic agent, pH 7.5)으로 교환하였다. 실험내용에 따라서 각 호르몬을 투여하여 18°C에서 배양했다. 실험종료후, 세포생존율은 90 ± 1%였으며 배양액은 원심분리 (150×g, 15 min)시킨 후 상층액을 채취하여 -40°C에 보관하였다.

### 실험 Design

실험 1. Activin의 단시간 (24시간) 투여에 의한 GTH I과 II 분비

미성숙 무지개 송어에 30일간 T을 투여한군과 대조군의 뇌하수체 세포를 제각기 18°C에서 3일간 preincubation하는 동안 세포를 well에 부착시켰다. 그 후, 0.1% BSA가 함유된 RPMI-1640 배양액으로 씻은 뒤, 각 농도 (10<sup>-11</sup>~10<sup>-7</sup> M)의 activin과 단일 농도 (10<sup>-8</sup> M)의 sGnRH를 제각기 투여하여 18°C에서 24시간 배양시켜 배양액에 분비된 GTH I과 II의 분비량을 RIA로 측정했다.

실험 2. Activin의 장시간 (3일간) 투여에 의한 GTH I과 II 분비

미성숙 무지개 송어에 30일간 T을 투여한군과 대조군의 뇌하수체 세포를 제각기 18°C에서 3일간 preincubation하는 동안, 각 농도 (10<sup>-11</sup>~10<sup>-7</sup> M)의 activin으로 미리 전처리 했다. 그 후, 0.1% BSA가 함유된 RPMI-1640 배양액으로 well에 부착된 세포를 씻은 뒤, 새로운 RPMI-1640 배양액으로 교환하여 18°C에서 24시간 배양시켜 뇌하수체 세포에서 방출된 GTH I과 II 분비량을 RIA로 측정했다. 한편 sGnRH 처리군은 T투여군과 대조군의 뇌하수체 세포를 제각기 3일간 preincubation한 후에 0.1% BSA가 함유된 RPMI-1640 배양액으로 씻고, 18°C에서 24시간 배양시키는 동안 단일 농도의 sGnRH (10<sup>-8</sup> M)를 처리하여 뇌하수체 세포에서 방출된 GTH I과 II 분비량을 RIA로 측정했다.

실험 3. Activin의 자극에 의한 GTH II 분비량의 dopamine (DA)처리에 의한 영향

30일간 T을 경구투여한 미성숙 무지개 송어의 뇌하수체 세포만을 18°C에서 3일간 preincubation할 때, 10<sup>-7</sup> M의 activin을 미리 전처리 했다. 그 후, 0.1% BSA가 함유된 RPMI-1640 배양액으로 well에 부착된 세포를 씻은 뒤, 새로운 RPMI-1640 배양액으로 교환하여 18°C에서 24시간 배양시킬때 activin으로 전처리한 실험구에 DA (10<sup>-6</sup> M)을 처리하여 배양액중에 방출된 GTH I과 II 분비량을 RIA로 측정했다. 한편 sGnRH 처리군은 18°C에서 3일간 preincubation한 후, 0.1% BSA가 함유된 RPMI-1640 배양액으로 well에 부착된 세포를 씻은 뒤, 새로운 RPMI-1640 배양액으로 교환하여 sGnRH (10<sup>-8</sup> M)와 DA (10<sup>-6</sup> M)을 동시 투여하여 18°C에서 24시간 배양시키는 동안 방출된 GTH I과 II 분비량을 RIA로 측정했다.

**실험 4. Activin으로 전처리한 뇌하수체 세포에 있어서 sGnRH에 의한 GTH I과 II분비**

30일간 T를 경구투여한 미성숙 무지개 송어의 뇌하수체 세포만을 18°C에서 3일간 preincubation할 때, 10<sup>-7</sup> M의 activin을 미리 전처리 했다. 그 후, 0.1% BSA가 함유된 RPMI-1640 배양액으로 well에 부착된 세포를 씻은 뒤, 새로운 RPMI-1640 배양액으로 교환하여 18°C에서 24시간 배양시킬때 activin을 전처리한 실험구에 10<sup>-8</sup> M의 sGnRH를 처리하여 뇌하수체 세포에서 방출된 GTH I과 II 분비량을 RIA로 측정했다.

**Radioimmunoassay (RIA)**

배양액 및 뇌하수체 세포추출물 중의 GTH I과 II의 농도를 각각의 RIA계에 의해 측정했다. GTH I에 관해서는, 日本 北里大學 水産學部の Kawauchi 교수로부터 제공받은 연어 GTH I을 standard 및 표식 hormone으로, 항체는 Kawauchi 교수로부터 제공받은 연어 GTH I의 β subunit는 日本 東京大學 水族生理學研究室에서 제작한 것을 이용했다. GTH II에 대해서는 東京大學 水族生理學研究室에서 사용되어온 RIA계를 이용했다 (Kobayashi et al., 1987). <sup>125</sup>I 표지 GTH I과 II의 제작 및 assay방법은 Kobayashi et al., (1987)과 Kim (1997)의 방법에 따랐다. GTH I의 RIA계에 있어서 GTH II의 교차율은 9.6%였고, GTH II의 RIA계에 있어서 GTH I의 교차율은 2.1%였다. GTH I의 RIA계에 있어서 intra- 및 interassay의 변동계수는 7.0% (n=4), 11.5% (n=4)였다. GTH I과 II 각각의 RIA계에 있어서 GTH를 내포한 배양액 및 뇌하수체 세포 추출물과의 경합곡선은 상대결합율 (B/Bo) 50%부근에 있어서 표준곡선과 각각 평행하였다 (평행선 검정: 2×2점법, P<0.05). 그리고 혈중 T농도는 Lou et al. (1984)의 방법에 따라서 측정했다.

**통계학적 분석**

통계처리는 분산분석후, Duncan's new multiple range test를 사용하여 분석하였다. 대조군과 T투여군에 있어서, 혈중 T농도 및 GTH I과 II의 뇌하수체 세포내 (2.5×10<sup>5</sup> cells/ml) 함량의 차이는 각각 Student's t test 또는 Cochran-cox test를 사용하여 분석하였다.

**결 과**

미성숙한 무지개송어에 30일간 T투여한 후, 혈중 T농도 (Fig. 1 A) 및 뇌하수체 세포내 GTH I과 II 함량의 변화 (Fig. 1B)를 나타냈다. 그 결과, T투여에 의해서 혈중 T농도와 뇌하수체 GTH II 함량은 대조군 보다 급격히 증가하였다. 그러나 양 실험군 (T투여군과 대조군)에 있어서 GTH I 함량의 유의한 변화는 없었다.

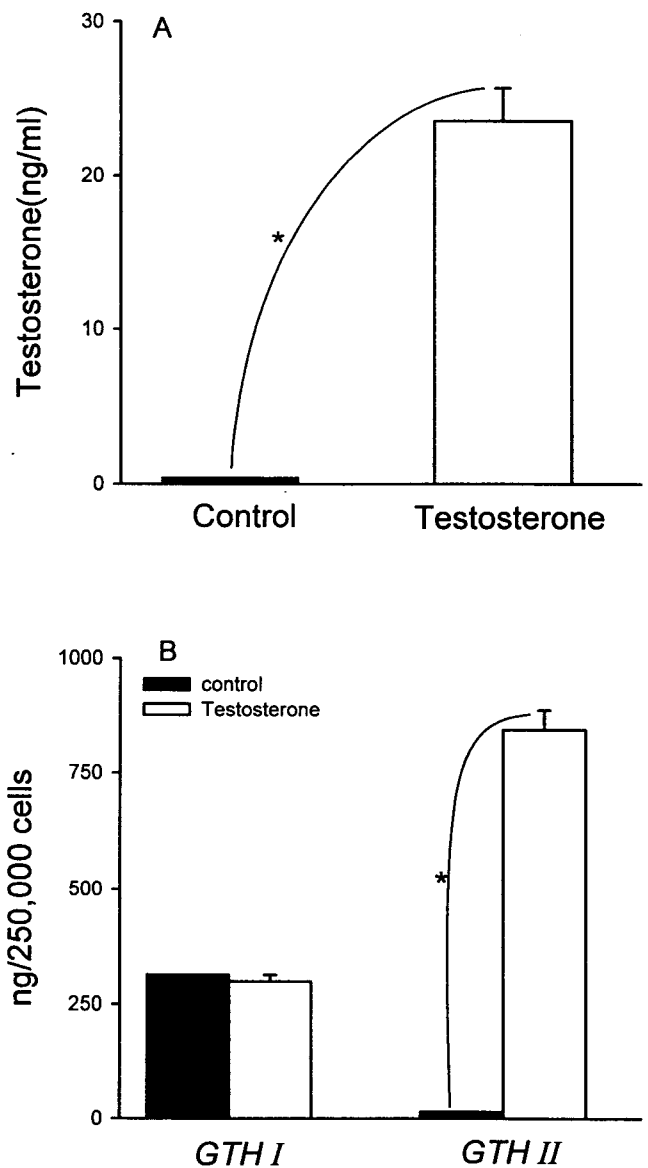
**실험 1: Activin의 단시간 (24시간) 투여에 의한 GTH I과 II 분비량의 변화**

T투여군과 대조군의 뇌하수체 세포배양계에 있어서 activin의 단시간 (24시간) 투여에 의한 GTH I과 II 분비량의 변화를 Fig. 2에 나타냈다. 그 결과, T투여군과 대조군의 GTH I과 II의 분비량은 각 농도 (10<sup>-11</sup>~10<sup>-7</sup> M)의 activin 투여에 의해서 제각기

영향을 받지 않았다. 한편 단일 농도의 sGnRH (10<sup>-8</sup> M)를 처리한 실험구에서는 양 실험군의 GTH I과 대조군의 GTH II 분비량의 변화는 sGnRH의 자극에 의해서 영향을 받지 않았으나, T투여군의 GTH II 분비량의 변화는 sGnRH의 자극에 의해서 급격히 증가했다.

**실험 2: Activin의 장시간 (3일간) 투여에 의한 GTH I과 II 분비량의 변화**

T투여군과 대조군의 뇌하수체 세포배양계에 있어서 activin의 장시간 (3일간) 투여에 의한 GTH I과 II 분비량의 변화를 Fig. 3



**Fig. 1. Plasma testosterone (T) levels (A, n=20) and GTH contents (B, n=8) following treatment with T 25 µg/g diet for 4 weeks. Data are expressed as the mean ± SE. Point marked '\*' is significantly different from control for P<0.01.**

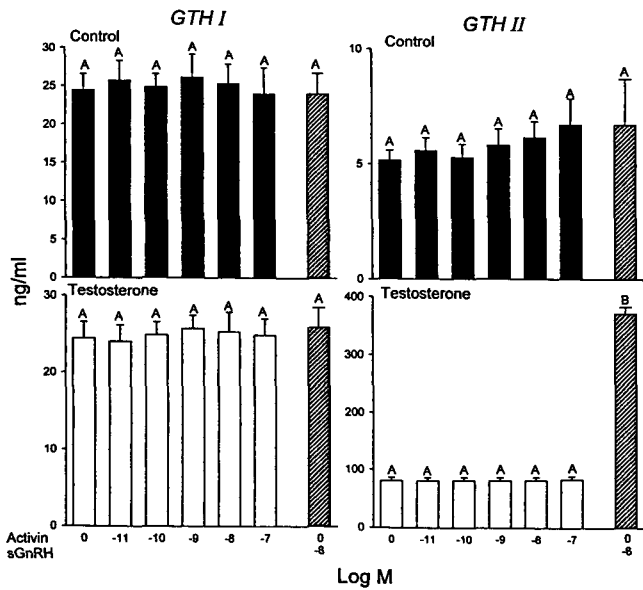


Fig. 2. Short term effects of activin-A on GTH I and II release from cultured pituitary cells of T-treated fish and untreated fish. Enzymatically dispersed rainbow trout pituitary cells were preincubated 3 days, washed, and then exposed to different doses of activin and sGnRH ( $10^{-8}$ M) for 24 h. Values are the mean  $\pm$  SE of six replicates. A significant difference ( $P < 0.05$ , by Duncan's multiple range test) was observed between points indicated by different letters.

에 나타냈다. 그 결과, T투여군에 있어서 GTH II 분비량은 저농도 ( $10^{-11} \sim 10^{-8}$  M)의 activin의 전처리에 의해서 영향을 받지 않았으나, 고농도 ( $10^{-7}$  M)의 activin 전처리에 의해서 유의하게 증가했다. 또한 T투여군에 있어서  $10^{-8}$  M의 sGnRH 자극에 의해서도 GTH II 분비량은 급격히 증가했다. 그러나 대조군의 GTH II 분비량과 양 실험군의 GTH I 분비량은 activin과 sGnRH에 의해서 영향을 받지 않았다.

실험 3: Activin의 자극에 의한 GTH II 분비량의 DA처리에 의한 영향

T투여군의 뇌하수체 세포를 이용하여 activin으로 전처리한 세포에서 분비된 GTH II 분비량의 DA ( $10^{-6}$  M) 처리에 의한 영향을 Fig. 4에 나타냈다. 그 결과, activin ( $10^{-7}$  M)의 자극에 의해서 분비된 GTH II 분비량은 DA에 의해서 부분적으로 억제되었으나, sGnRH ( $10^{-8}$  M)의 자극에 의해서 분비된 GTH II 분비량은 DA에 의해서 완전히 억제되었다. 그러나, GTH I 분비량은 DA에 의해서 영향을 받지 않았다.

실험 4: Activin으로 전처리한 뇌하수체 세포에 있어서 sGnRH자극에 의한 GTH I과 II 분비량의 변화

T투여군의 뇌하수체 세포를 이용하여 activin으로 전처리한 세포에 있어서 sGnRH 자극에 의한 GTH I과 II 분비량의 변화를 Fig. 5에 나타냈다. 그 결과, activin ( $10^{-7}$  M)으로 전처리한 실험

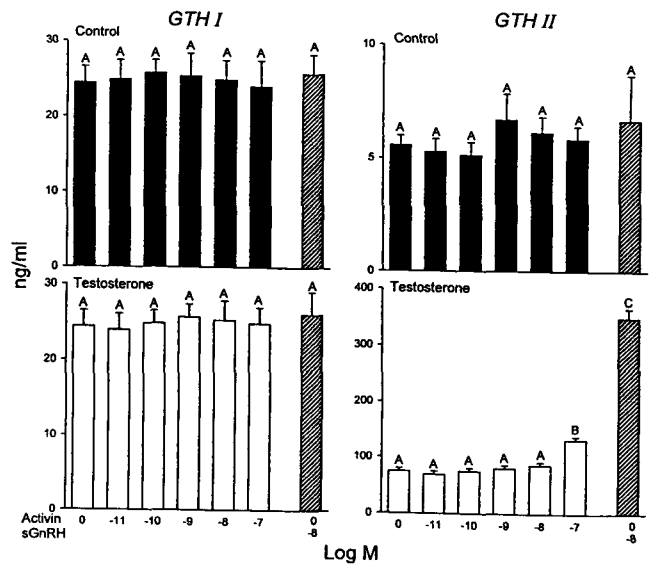


Fig. 3. Long term effects of activin-A on GTH I and II release from cultured pituitary cells of T-treated fish and untreated fish. Enzymatically dispersed rainbow trout pituitary cells were preincubated 3 days, and then exposed to different doses of activin, and washed. Cells were further incubated in fresh medium without activin for 24 h, and amounts of GTHs secreted into the fresh medium during 24 h incubation were assayed. Cells treated with sGnRH were preincubated 3 days, washed, and then exposed to sGnRH ( $10^{-8}$  M) for 24 h. Amounts of GTHs secreted into the fresh medium during 24 h incubation were assayed. Values are the mean  $\pm$  SE of six replicates. Presentation of statistical significance is as in Fig. 2.

구와 sGnRH ( $10^{-8}$  M)로 단독처리한 실험구의 GTH II 분비량은 제각기 대조구보다 유의하게 증가 하였으나, activin으로 전처리한 well에 sGnRH를 투여한 실험구에 있어서 GTH II 분비량은 sGnRH의 단독투여에 의한 GTH II 분비량과의 유의한 차는 없었다. 또한, GTH I은 activin으로 전처리한 실험구, sGnRH로 단독처리한 실험구 및 activin으로 전처리한 well에 sGnRH를 투여한 실험구 모두에 있어서 GTH I 분비량의 변화는 나타나지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 T를 경구투여한 미성숙한 무지개송어의 뇌하수체 세포배양계를 이용하여, GTH I과 II의 분비조절에 관한 activin의 영향에 관하여 조사했다. 그 결과, T의 positive feedback에 의해서 뇌하수체내 GTH II 함량의 증가 뿐만아니라 activin, GnRH, DA에 대한 감수성이 증가되어, activin과 salmon type GnRH (sGnRH)의 자극에 의해서 제각기 GTH II 분비량이 증가하였다. 그러나, sGnRH 자극에 의한 GTH II 분비량은 DA에 의해 완전히 억제되었지만, activin 자극에 의한 GTH II 분비량은

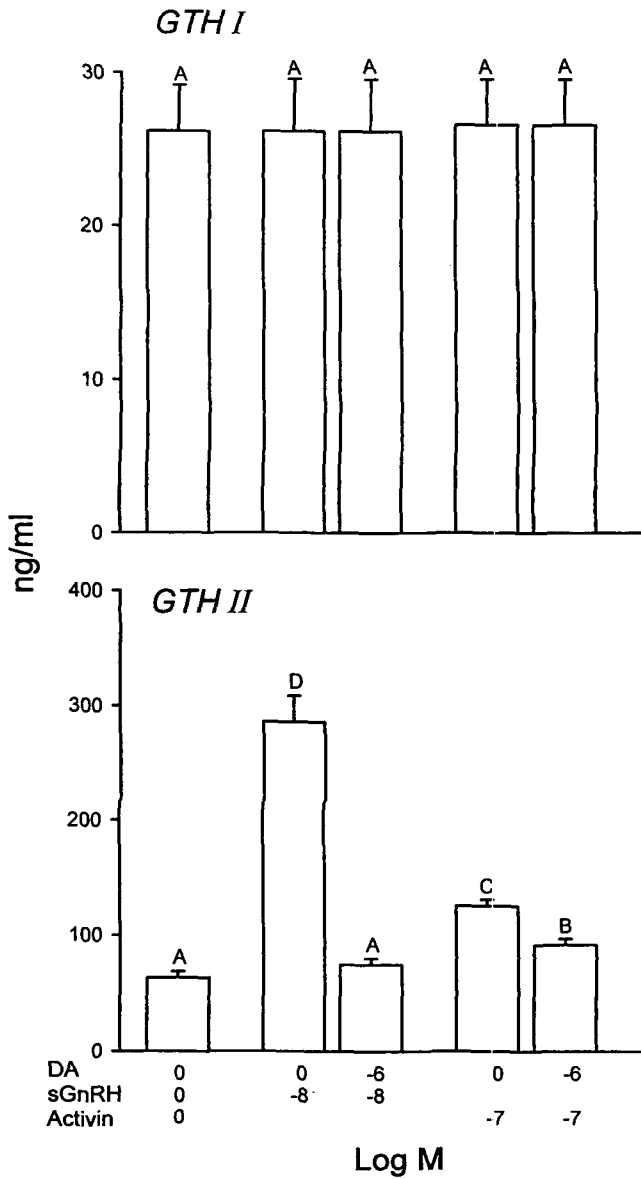


Fig. 4. Effects of dopamine (DA) on sGnRH- and activin-induced GTHs release from cultured pituitary cells of T-treated fish. Cells were pretreated with activin ( $10^{-7}$  M) for 3 days (preincubation) and washed. Then, cells were further incubated in fresh medium without activin for 24 h either in the presence or absence of DA ( $10^{-6}$  M). Cells treated with sGnRH were preincubated 3 days, washed, and then exposed to sGnRH ( $10^{-8}$  M) for 24 h. Amounts of GTHs secreted into the fresh medium during 24 h incubation were assayed. Values are the mean  $\pm$  SE of six replicates. Presentation of statistical significance is as in Fig. 2.

DA에 의해 부분적으로 억제되었다. 한편, GTH I은 본 실험에서 이용된 호르몬의 자극에 의해 영향을 받지 않았다.

일반적으로 미성숙한 연어과 어류에 aromatizable androgen 혹은 estrogen을 복강내로 투여하면 positive feedback에 의해 뇌하

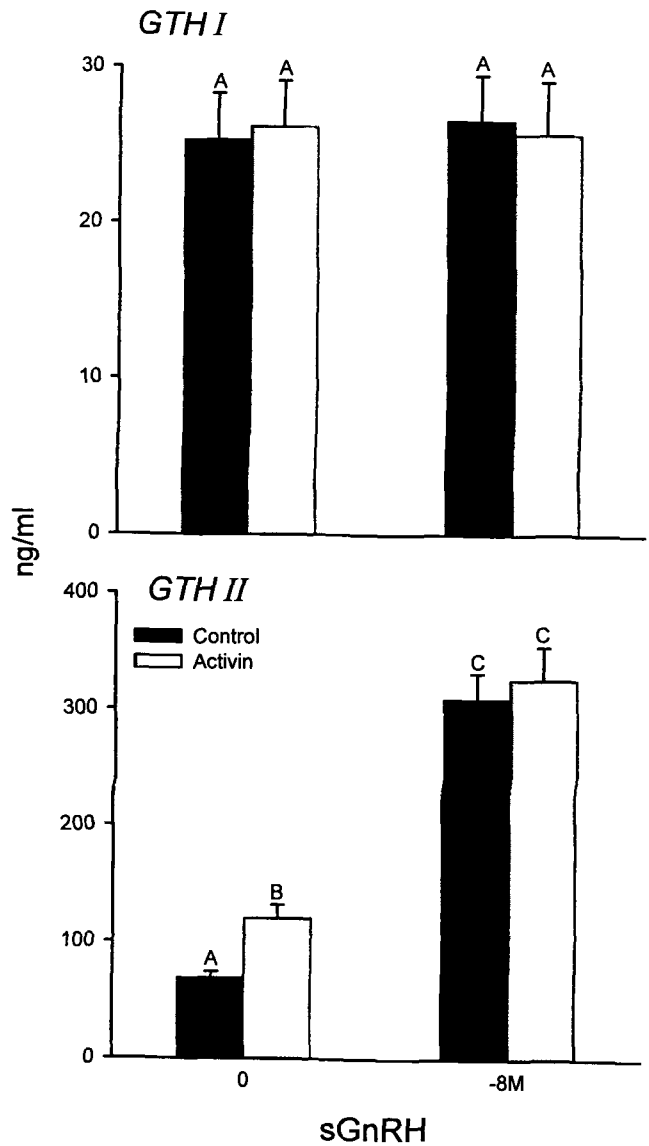


Fig. 5. Responsiveness of activin-treated cells to sGnRH from cultured pituitary cells of T-treated fish. Cells were cultured with or without activin ( $10^{-7}$  M) for 3 days (preincubation) and then further incubated in fresh medium without activin for 24 h either in the presence or absence of sGnRH ( $10^{-8}$  M). Values are the mean  $\pm$  SE of six replicates. Presentation of statistical significance is as in Fig. 2.

수체 GTH II 함량이 증가한다고 보고했다 (Crim *et al.*, 1981; Crim and Evans, 1983). 그러나, Swanson and Dickhoff (1988)와 Mal *et al.* (1989)는 은연어, *Oncorhynchus kisutch*의 치어에 T와 estradiol- $17\beta$  ( $E_2$ )을 제각기 복강주사하면 GTH II의 뇌하수체내 함량과 세포수가 급격히 증가하지만, GTH I의 변화는 없었다고 보고했다. Amano *et al.* (1994)도 미성숙한 masu salmon, *Oncorhynchus masou*에  $17\alpha$ -methyltestosterone 경구투여에 의해 뇌하

수체내 GTH II $\beta$  함량은 증가하는 것에 비해서, GTH I $\beta$  함량은 영향을 받지 않았다고 보고했다. 본 연구에서도, 미성숙한 무지개송어에 T의 경구투여시 뇌하수체내 GTH I 함량은 변화가 없는 것에 비해서, GTH II 함량은 현저하게 증가했다. 이러한 결과로부터, 2종류 GTH는 서로 다른 합성기구에 의해 조절된다고 생각되어진다.

어류에 있어서 GTH I 분비에 영향을 끼치는 native GnRH (연어과 어류에 있어서는 salmon type GnRH와 chicken-II type GnRH 2종류가 존재)의 영향에 관한 보고는 아직까지 없다. 그러나 Swanson *et al.* (1989)은 silver salmon 치어의 (체중: 약 30 g) 뇌하수체 조직배양계에 GnRH analogue (GnRHa)을 투여하면 GTH I 분비가 촉진되어, GnRH에 의해 GTH I 분비조절의 가능성을 제시했다. 그러나, 본 실험의 결과는 Swanson *et al.* (1989)이 보고한 결과와는 일치하지 않았다. 그 이유로는, (1) native GnRH와 GnRHa의 생물학적 활성의 차이 (2) 뇌하수체의 조직배양계와 세포배양계의 차이 (3) GTH I assay계의 차이 등에 의한 원인이라고 추측된다. 한편, 포유류의 FSH와 LH의 분비조절은 시상하부에서 생성되는 GnRH에 의해 직접적인 영향을 받고 있다. 그 중 FSH는 생식소 유래의 peptide성 호르몬인 inhibin에 의해서는 억제적으로, activin에 의해서는 촉진적으로 조절 되어진다고 보고하였다 (Gharib *et al.*, 1990). 이러한 포유류에서의 결과를 토대로, 어류에서도 activin과 inhibin의 GTH 분비조절에 관한 연구가 시작되어 포유류 유래의 난포액, activin, inhibin (Ge *et al.*, 1992)과 금붕어 (*Carassius auratus*)의 난소에서 추출한 peptide성질의 인자 (Ge and Peter, 1994)들이 금붕어의 뇌하수체 세포배양계에서 GTH II 분비를 촉진시킨다고 보고하였다. 또한 금붕어의 genomic DNA로부터 activin  $\beta$ A와  $\beta$ B를 클론화하여 염기서열을 조사한 결과, 인간 activin  $\beta$ A와  $\beta$ B에 대해서 제각기 78%와 94%의 높은 상동성을 나타내어 (Ge *et al.*, 1993), 척추동물의 생식에 관련해서 어떤 중요한 생물학적 역할을 발휘하는 peptide성 호르몬이라고 추측했다. 그러나, 금붕어에서는 포유류의 FSH와 유사한 생리기능을 가진 GTH I의 assay계가 확립되어 있지 않기 때문에, activin과 inhibin이 GTH I 분비조절에 어떠한 영향을 끼치는지 밝혀지지 않았다. 본 연구에서도, T를 경구투여한 미성숙한 무지개 송어의 뇌하수체를 이용한 세포배양계에서 activin은 GTH II 분비를 촉진 시켰으나, GTH I 분비에는 영향을 끼치지 않았다. 따라서, 어류에 있어서 activin의 GTH 분비조절에 관한 기능은 다른 척추동물에서의 분비조절 기능과는 서로 다른 개념으로 분비조절 되어진다고 추측된다.

한편, 어류에 있어서 steroid 호르몬의 투여에 의해 GnRH (Crim *et al.*, 1981; Trudeau *et al.*, 1993b; Kim, 1997)와 DA (Trudeau *et al.*, 1993a; Kim *et al.*, 1995)에 대한 감수성이 발현되어, GTH II 분비를 조절한다는 것이 알려져 있다. 그러나 아직 어류에서는 steroid 호르몬과 activin의 상호작용에 관한 연구 결과는 없지만, 본 연구에서 T를 경구투여한 미성숙한 무지개 송어의 뇌하수체는 GnRH와 DA에 대한 감수성을 발현시켰을 뿐만 아니라 activin에 대한 감수성도 발현되어 GTH II 분비를 촉진시켰다. 또한, 이러한 activin에 의한 GTH II 분비는 GnRH에 의한 분비

와는 서로 다른 양상을 나타내었다. 즉, sGnRH는 단기간 (24시간) 투여에 의해서도 GTH II 분비가 촉진되었으나, activin은 장기간 (3일간) 투여에 의해서만 촉진되어졌다. 그러나, activin과 sGnRH의 상호작용에 의한 GTH II 분비의 증폭현상은 나타나지 않았다. 또한, sGnRH의 자극에 의한 GTH II 분비량은 DA에 의해서 완전히 억제되었지만, activin의 자극에 의해서 분비된 GTH II는 DA에 의해서 부분적으로 억제되었다. 이러한 결과는 금붕어의 뇌하수체 세포배양계에서도 activin은 GTH II 분비 촉진에 대해서 GnRH 보다도 긴 시간이 소요되며, DA에 의해서도 부분적으로 억제되어진다고 보고하였다 (Ge *et al.*, 1992). 더욱이, 금붕어의 *in vivo* 및 *in vitro*계에서 DA는 기초적인 GTH II 분비량 뿐만아니라 GnRH의 자극에 의한 GTH II 분비량을 억제하여, GTH II 분비에 관해서 DA의 강한 억제계가 존재한다고 보고하였다 (Peter *et al.*, 1991). 그러나 무지개 송어에 있어서는 단지 GnRH의 자극에 의한 GTH II 분비량이 DA에 의해서 억제되고, 이러한 DA 억제계의 강도는 성숙 단계에 따라서 증가하지만 난황형성기에 가장 강한 것으로 밝혀졌으며, 또한 미성숙 무지개 송어에 steroid 호르몬 (T or E<sub>2</sub>)을 투여하면 DA 억제계가 발현되어 GnRH의 자극에 의한 혈중 GTH II 분비를 억제한다고 보고하였다 (Linard *et al.*, 1995; Kim, 1997). 따라서, 무지개 송어의 GTH II 세포에는 activin에 대한 특이적인 수용체가 GnRH에 대한 수용체와는 독립적으로 존재하여, 이러한 두가지 peptide성 호르몬은 서로 다른 세포내 정보전달계를 통해서 GTH II 분비를 조절한다고 생각되어진다.

## 요 약

본 연구에서는 GTH I과 II의 분비조절기구를 밝히기 위하여 T를 경구투여한 미성숙 무지개 송어의 뇌하수체 세포배양계를 이용하여, activin에 의한 GTH I과 II의 분비량을 RIA로 조사하였다. 그 결과, T의 positive feedback에 의해 뇌하수체내 GTH II 함량이 증가하였으나, 뇌하수체내 GTH I 함량은 T에 의해 영향을 받지 않았다. 이러한 뇌하수체를 이용한 세포배양 실험에서, 장시간 (3 일간)의 activin 처리에 의해 GTH II 분비량은 증가 하였지만, 단시간 (24시간)의 activin 처리에 의해 GTH II 분비량은 영향을 받지 않았다. 또한 activin의 자극에 의해서 분비된 GTH II 분비량은 DA에 의해 부분적으로 억제 되었지만, sGnRH의 자극에 의해서 분비된 GTH II는 DA에 의해 완전히 억제 되었다. activin의 자극에 의해서 분비된 GTH II는 부분적으로 억제 되었다. 그러나 activin으로 전처리에 의해 방출된 GTH II 분비량은 sGnRH 자극에 의한 증폭현상은 나타나지 않았다. 한편 GTH I 분비는 본 실험에서 사용된 호르몬에 의해서 영향을 받지 않았다.

이상의 결과들을 종합해보면, GTH I과 II는 서로 다른 합성기구에 의해 조절되며, T에 의해 GnRH, activin 그리고 DA 수용체의 감수성이 발현되어 GTH II 분비를 조절하였다. 그러나 GTH I의 분비조절 기구는 차후 계속해서 연구되어야 할 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구를 수행하는 데 있어서 호르몬을 제공해 주신 日本 北里大學 水産學部の Kawauchi 교수와 日本 Ajinomoto社 중앙연구소의 Eto 박사에게 감사드리며, 본 논문을 검토해 준 김 명희 박사에게도 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Amano, M., S. Hyodo, A. Urano, N. Okumoto, S. Kitamura, K. Ikuta, Y. Suzuki and K. Aida. 1994. Activation of salmon gonadotropin-releasing hormone synthesis by 17 $\alpha$ -methyltestosterone administration in yearling masu salmon, *Oncorhynchus masou*. Gen. Comp. Endocrinol., 95, 374~380.
- Crim, L.W., R.E. Peter and R. Billard. 1981. Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones. Gen. Comp. Endocrinol., 44, 374~381.
- Crim, L.W. and D.W. Evans. 1983. Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. Biol. Reprod., 29, 137~142.
- Fontaine, Y.A. and S. Dufour. 1987. Current-status of LH-FSH-like gonadotropin in fish. In: Proc. of the 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada, pp. 48~56.
- Ge, W., J.P. Chang, R.E. Peter, J. Vaughan, J. Rivier and W. Vale. 1992. Effects of porcine follicular fluid, inhibin-A, and activin-A on goldfish gonadotropin release in vitro. Endocrinol., 131, 1922~1929.
- Ge, W., W.J. Gallin, C. Strobeck and R.E. Peter. 1993. Cloning and sequencing of goldfish activin subunit genes: Strong structural conservation during vertebrate evolution. Biochem. Biophys. Res. Commun., 193, 711~717.
- Ge, W. and R.E. Peter. 1994. Evidence for non-steroidal gonadal regulator(s) of gonadotropin release in the goldfish, *Carassius auratus*. Zool. Scien., 11, 717~724.
- Gharib, S.D., M.E. Wierman, M.A. Shupnik and W.W. Chin. 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. Endocrine Reviews, 11, 177~199.
- Katayama, T. 1995. Studies on activin action in the pituitary gland. Ph. D. Thesis, The Univ. of Tokyo, pp. 13~28.
- Kim, D.J., M. Amano, M. Kobayashi, Y. Suzuki and K. Aida. 1995. Dopaminergic regulation of the release of gonadotropin from dispersed pituitary cells of testosterone-treated immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Proc. of the Japan Society for Comparative Endocrinology, No 10, Shizuoka, Japan, pp. 60.
- Kim, D.J. 1997. Endocrinological studies on regulation of gonadotropin secretion from the pituitary gland in the rainbow trout. Ph. D. Thesis, The Univ. of Tokyo, pp. 29~41.
- Kobayashi, M., K. Aida, H. Sakai, T. Kaneko, K. Asahina, I. Hanyu and S. Ishii. 1987. Radioimmunoassay for salmon gonadotropin. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 995~1003.
- Linard, B., S. Bennani and C. Saligaut. 1995. Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol., 99, 192~196.
- Lou, S.W., K. Aida, I. Hanyu, K. Sakai, M. Nomura, M. Tanaka and S. Tazaki. 1984. Endocrine profiles in the females of a twice-annually spawning strain of rainbow trout. Aquaculture, 43, 13~22.
- Mal, A.O., P. Swanson and W.W. Dickhoff. 1989. Immunocytochemistry of the developing salmon pituitary gland. Am. Zool., 29, 94A.
- Okada, T., I. Kawazoe, S. Kimura, Y. Sasamoto, K. Aida and H. Kawauchi. 1994. Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). Int. J. Peptide Protein Res., 43, 69~80.
- Peter, R.E., V.L. Trudeau and B.D. Sloley. 1991. Brain regulation of reproduction in teleosts. Bull. Inst. Zool. Academic Sinica Monograph, 16, 89~118.
- Suzuki, K., Y. Kawauchi and Y. Nagahama. 1988a. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. Gen. Comp. Endocrinol., 71, 292~301.
- Suzuki, K., A. Kanamori, Y. Nagahama and H. Kawauchi. 1988b. Development of salmon GTH I and GTH II radioimmunoassays. Gen. Comp. Endocrinol., 71, 459~467.
- Swanson, P. and W.W. Dickhoff. 1988. Effects of exogenous gonadal steroids on gonadotropin I and II in juvenile coho salmon. Am. Zool., 28, 55A.
- Swanson, P., M. Bernard, M. Nozaki, K. Suzuki, H. Kawauchi and W.W. Dickhoff. 1989. Gonadotropin I and II in juvenile coho salmon. Fish Physiol. Biochem., 7, 169~176.
- Swanson, P., K. Suzuki, H. Kawauchi and W.W. Dickhoff. 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. Biol. Reprod., 44, 29~38.
- Tanaka, H., H. Kagawa, K. Okuzawa and K. Hirose. 1993. Purification of gonadotropins (PmGTH I and II) from red seabream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for PmGTH II. Fish Physiol. Biochem., 10, 409~418.
- Trudeau, V.L., B.D. Sloley, A.O.L. Wong and R.E. Peter. 1993a. Interactions of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin-II secretion in the goldfish. Gen. Comp. Endocrinol., 89, 39~50.
- Trudeau, V.L., C.K. Murthy, H.R. Habibi, B.D. Sloley and R.E. Peter. 1993b. Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. Biol. Reprod., 48, 300~307.
- Van der Kraak, G., K. Suzuki, R.E. Peter, H. Itoh and H. Kawauchi. 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. Gen. Comp. Endocrinol., 85, 217~229.

1998년 12월 9일 접수

1999년 3월 12일 수리