

뱀장어 Vitellogenin과 Estrogen 수용체 유전자 발현에 대한 성장호르몬 및 웅성호르몬의 영향

권혁추⁺ · 최성희 · 김은희 · 권준영

선문대학교 응용생물과학부

Effect of Growth Hormone and Androgen on Vitellogenin and Estrogen Receptor Gene Expression in the Japanese eel, *Anguilla japonica*

Hyuk-Chu Kwon⁺, Seong-Hee Choi, Eun-Hee Kim and Joon-Yeong Kwon

Division of Applied Biological Sciences, Sun Moon University, Asan 336-708, Korea

ABSTRACT : Vitellogenin(Vg) is a sex specific serum protein present in sexually maturing female blood of oviparous vertebrates. Estrogen(E₂) is a main inducer of hepatic Vg synthesis. We investigated the effects of androgen and growth hormone(GH) on regulation of Vg and estrogen receptor(ER) genes in Japanese eel. Immature eels(200~250 g) were given a single injection of E₂(5~5,000 μg/kg · bw) alone, or in combination with eel recombinant GH(eGH, 1~10 μg/kg) or methyltestosterone(MT, 1~5 mg/kg) and sacrificed 10 days after the hormone treatments. Expression levels of ER and Vg genes from the liver were determined by means of reverse transcription and polymerase chain reaction(RT-PCR). Administration of E₂ stimulated Vg gene expression in a dose dependent manner. Levels of Vg mRNA after the injection of E₂(500 μg/kg) with MT(5mg/kg) or eGH(10 μg/kg) were much higher than in that of E₂ alone(500 μg/kg). Whereas, injection of either vehicle, eGH (10 μg/kg) or MT(5mg/kg) alone did not induce the expression of Vg gene in the liver. ER mRNA was detected from the fish treated with vehicle alone. E₂ injection(5~500 μg/kg · bw) increased this ER expression but dose dependent response was not clear. Addition of MT(5mg/kg) or eGH(10 μg/kg) did not affect E₂-stimulated ER mRNA expression. This study confirms the necessity of E₂ as the primary factor for Vg gene expression and requirement of additional hormones such as MT or GH for the full expression of Vg mRNA, and suggests that the additive effect of MT or GH on Vg gene expression would be mediated by some unknown factors other than ER.

Key words : Eel, Vitellogenin, Estrogen receptor, Growth hormone, Androgen, RT-PCR.

요 약 : Vg은 난생 척추동물의 성숙한 암컷 혈청에 존재하는 성 특이 단백질로서 E₂에 의해 합성이 유도된다. 본 연구는 뱀장어 Vg과 ER 유전자 발현에 대한 androgen과 성장호르몬(GH)의 영향을 조사하였다. 미성숙 뱀장어(200~250g)에 E₂(5~5,000 μg/kg · bw), 뱀장어 recombinant GH(eGH, 1~10 μg/kg) 또는 methyltestosterone(MT, 1~5 mg/kg)를 각각 단독 또는 eGH 또는 MT와 혼합하여 주사한 후 10일 후에 샘플을 채취하였다. 간 ER과 Vg mRNA는 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. E₂에 의해 발현된 Vg 유전자는 농도 의존적으로 증가하였다. E₂(500 μg/kg)+MT(5mg/kg) 또는 E₂(500 μg/kg)+eGH(10 μg/kg)의 처리는 각각 E₂ 단독처리에 비해 높은 Vg mRNA의 발현을 유도하였다. eGH(10 μg/kg) 또는 MT(5mg/kg) 단독 처리는 Vg mRNA 발현을 유도하지 못했다. 한편 ER mRNA의 발현은 호르몬 처리에 관계없이 관찰되었다. Vg mRNA와 마찬가지로 ER mRNA의 발현도 E₂(5~500 μg/kg · bw) 처리에 의해 농도 의존적으로 증가하는 경향이 있었으나 통계적 유의차는 없었다. E₂(500 μg/kg)와 MT(5mg/kg) 또는 eGH(10 μg/kg)의 혼합투여 또한 E₂에 의해 유도된 ER mRNA 발현을 증가시키지 못했다.

결론적으로 Vg 유전자 발현에 있어서 E₂는 없어서는 안 되는 필수요소이지만 E₂ 자체만으로는 충분한 Vg 유전자를 발현하지 못하고 GH 또는 웅성호르몬 등의 도움이 필요하다. 또한 MT 또는 GH는 ER 유전자 발현에 영향을 미치지 못하며 다른 경로를 통해 Vg 유전자 발현에 관여하는 것으로 생각된다.

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행되었습니다(R05-2004-000-11425-0).

⁺교신저자: 충남 아산시 탕정면 갈산리 100, 선문대학교 응용생물과학부, (우) 336-708, (전) 041-530-2283, (팩) 041-530-2917, E-mail: hckwon@sunmoon.ac.kr

서 론

Vitellogenin(Vg)은 난생 척추동물의 성숙한 암컷 혈청에 나타나는 성 특이 단백질이다. 난소에서 분비된 estrogen(E₂)

은 간세포내 E₂ 수용체(ER)와 결합한 후 핵내 유전자를 활성화 시켜 Vg 단백질을 합성한다. 혈중으로 방출된 Vg은 발달중인 난에 유입되어 배의 영양물질로서 이용된다(Wal-lace, 1985; Mommsen and Walsh, 1988).

난생 척추동물에서 E₂가 Vg 합성을 유도하는 주된 호르몬으로 알려져 왔지만, 성장 호르몬, 프로락틴, 융성호르몬, glucocorticoids 및 갑상선 호르몬 등과 같은 여러 호르몬들이 Vg 합성에 직간접적으로 관여한다는 것이 보고되어 왔다(Hori *et al.*, 1979; Wangh and Schneider, 1982; Kwon *et al.*, 1993; Kwon and Mugiya, 1994; Kwon *et al.*, 2003). 특히 뇌하수체 호르몬인 성장호르몬(GH)과 프로락틴(PRL)의 Vg합성에의 관여는 양서류(Gobbetti *et al.*, 1985; Carnevali *et al.*, 1992; Carnevali *et al.*, 1995)와 파충류(Gerstle and Callard, 1972; Ho *et al.*, 1985)를 중심으로 시사되어 왔으나, 조류(Boehm *et al.*, 1988)와 어류(Kwon and Mugiya, 1994; Peyon *et al.*, 1996; Mosconi *et al.*, 2002)에서도 이러한 현상이 관찰되었다. 이들 동물 중 Vg 합성이 E₂ 만으로 유도되어지는 것, GH만으로 유도되어지는 것, E₂와 성장호르몬 모두에 의해 유도되어지는 것, E₂와 성장호르몬 공동작용으로 유도되어지는 것 등 다양한 형태의 유형이 관찰되어 왔다.

대부분의 어류들은 E₂만으로 Vg 합성이 유도되어지는 것으로 알려져 왔지만, 뱀장어의 Vg 합성은 E₂없이 GH나 PRL 단독으로는 Vg 합성을 유도하지 못한다. 뱀장어에 있어서 E₂ 단독에 의한 Vg 합성 능력은 매우 미미하며, GH 또는 PRL과 함께 존재할 때 합성능력이 향상되는 것이 관찰되어 왔다(Kwon and Mugiya, 1994; Peyon *et al.*, 1996).

또한 뇌하수체 호르몬 이외에 융성호르몬이 Vg 합성을 유도할 수 있는 것이 어류에서 관찰되어 왔다(Hori *et al.*, 1979; Le Menn *et al.*, 1980; Peyon *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 1998). 무지개 송어에서는 융성호르몬 단독으로 Vg 합성이 유도되어지지만(Mori *et al.*, 1998), 뱀장어의 경우 융성호르몬 단독으로는 Vg 합성이 유도되어지지 않고, E₂와 함께 존재할 때 유도되어진다(Kwon *et al.*, 2003).

이처럼 뱀장어 Vg 합성이 E₂뿐만 아니라 다른 여러 호르몬들, GH, PRL 및 androgen 등에 의해서도 조절되고 있다는 사실에도 불구하고 E₂, androgens 및 뇌하수체호르몬(GH와 PRL)들이 Vg 및 E₂ 유전자 발현에 미치는 영향과 이 호르몬들 사이의 상호작용에 대해서 아직까지 연구되지 않았다. 따라서 본 연구는 뱀장어 Vg과 E₂ 수용체 발현에 대한 E₂, androgen 및 GH의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 호르몬 처리

체중 200~250g의 미성숙 뱀장어(*Anguilla japonica*)를 양만장에서 구입하여 약 22°C의 담수에서 사육하였으며, 실험기간 동안 사료는 공급하지 않았다. 뱀장어에 estradiol-17β(E₂, Sigma), 17α-methyltestosterone(MT, Wako Pure Chemical, Japan)는 DMSO에, recombinant eel growth hormone(eGH, LG Chemical, Korea)은 0.7% NaCl에 녹여 단독 또는 혼합하여 복강에 1회 주사하였다. 대조구는 DM-SO만 주사하였다. 호르몬 처리 10일 후에 0.1% 2-penoxo-ethanol로 마취하여 혈액 및 간을 채취하였다. 혈액은 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었고, 간은 채취 즉시 액체질소에 넣어 얼린 후 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

2. 간의 Total RNA 추출

각 실험어로부터 얻어진 간조직에 Trizol(MRC Inc.) 2 mL를 넣고 얼음 위에서 homogenizer로 균질화시킨 후, 400 μL의 chloroform을 첨가하고 잘 섞어준 다음 15분간 안정시켜서 원심분리하였다(4°C, 12,000×g, 15분). 원심분리 후 RNA를 포함하고 있는 상등액에서 600 μL를 뽑아내어 1 mL의 isopropanol을 첨가하고 잘 섞은 후 -20°C에서 overnight시킨 다음 원심분리하였다(4°C, 12,000×g, 15분). 원심분리 후 상등액을 모두 버리고 얻어진 RNA pellet을 75% ethanol을 이용하여 3회에 걸쳐 세정한 후 건조시켰다. 얻어진 RNA pellet을 nuclease free water에 녹여 분석에 사용하였다. 추출된 RNA의 농도는 GeneQuant(Biochrom Ltd., Cambridge, England)를 이용해 측정하였으며, 분석시까지 -70°C에 보관하였다.

3. RT-PCR

각각의 실험어로부터 추출한 total RNA 2 μg과 oligo (dT)₁₅ primer(Promega) 1 μL, M-MLV Reverse Transcriptase(Promega) 1 μL를 사용하여 일련의 cDNA들을 합성하였다. Vg의 primer는 5'-CTGCTGCTTGTAAATGTTG-3'(forward)와 5'-GGAAGGCAATTTCTTGACCA-3'(reverse)(Okumura *et al.*, 2002)를 사용하였고, ER의 primer는 5'-CAC-AATGGCTACTGC-3'(forward)와 5'-CACAAACCC A-GGGATCTT-3'(reverse)(Todo *et al.*, 1996)를 사용하였으며 house keeping gene으로서 알려진 GAPDH의 primer는 5'-CCCTGAAGGTTGTCAGCAAT-3'와 5'-GTATCC

CAGAATGCCCTTCA-3'를 각각 forward와 reverse용으로 제작하여(GeneBank AB07021) 사용하였으며, 각 primer set들의 반응산물은 405 bp, 441 bp 및 405 bp이다. 각각의 primer set와 위에서 얻어진 cDNA들을 이용하여 Vg, ER 및 GAPDH 유전자들의 발현량을 조사하기 위한 PCR을 실시하였다. 분석에 사용된 PCR 조건을 간단히 정리하면 다음과 같다. 각 반응물을 94°C에서 5분간 pre- denaturation시켰고, 총 35 cycles을 94°C에서 1분, 58°C에서 2분, 72°C에서 2분간 반응시킨 후, 72°C에서 6분간 post- elongation시켰다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후 0.5% ethidium bormide로 염색하여 Image analysis system(Kodak)을 이용하여 분석하였다. 데이터는 one-way ANOVA로 분석하였다($P < 0.05$).

결 과

1. E₂에 의한 Vg과 ER 유전자 발현

뱀장어 체중 당 5~5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 E₂를 복강에 주사하여 10일후에 간을 적출한 후 total RNA를 추출하여 RT-PCR에 의해 Vg과 estrogen 수용체(ER)의 유전자 발현을 조사하였다(Fig. 1). 간에서 Vg 유전자의 발현은 E₂ 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상에서 발현이 나타났으며, 주사한 E₂의 농도에 따라 증가하여, 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서 매우 높은 발현이 관찰되었다. 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 저농도의 E₂ 주사에서 Vg 유전자는 발현되지 않았다

ER 유전자는 vehicle만 투여한 그룹에서도 낮은 발현이 관찰되었다. E₂의 농도(5~5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)에 따른 ER 유전자의 발현량은 vehicle 처리에 비해 높은 경향이 있었으나 E₂와 vehicle 처리간 또는 E₂ 농도별 처리에 있어서 통계적 유의 차는 없었다.

2. Vg 및 ER 유전자 발현에 대한 MT의 영향

17 α -methyltestosterone(MT, 1~5mg/kg · bw)를 단독 또는 E₂(500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ · bw)와 함께 뱀장어에 1회 주사하였다. 주사 10일후에 뱀장어의 간을 적출해 RNA를 추출하여 RT-PCR을 시행한 결과를 Fig. 2(A)에 나타내었다. MT(5 mg/kg) 단독 투여에서 Vg 유전자 발현은 관찰되지 않았으나, MT(5mg/kg)를 E₂(500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)와 함께 투여하였을 경우 E₂(500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)만 투여했을 때보다 높은 Vg 발현량을 보였다. 낮은 농도의 MT(1mg/kg) 투여에서는 상승적 Vg 유전자 발현을 나타내지 못했다.

MT가 ER 유전자의 발현에 미치는 영향을 Fig. 2(B)에 나타내었다. MT를 E₂와 함께 투여했을 때 Vg mRNA의 발현

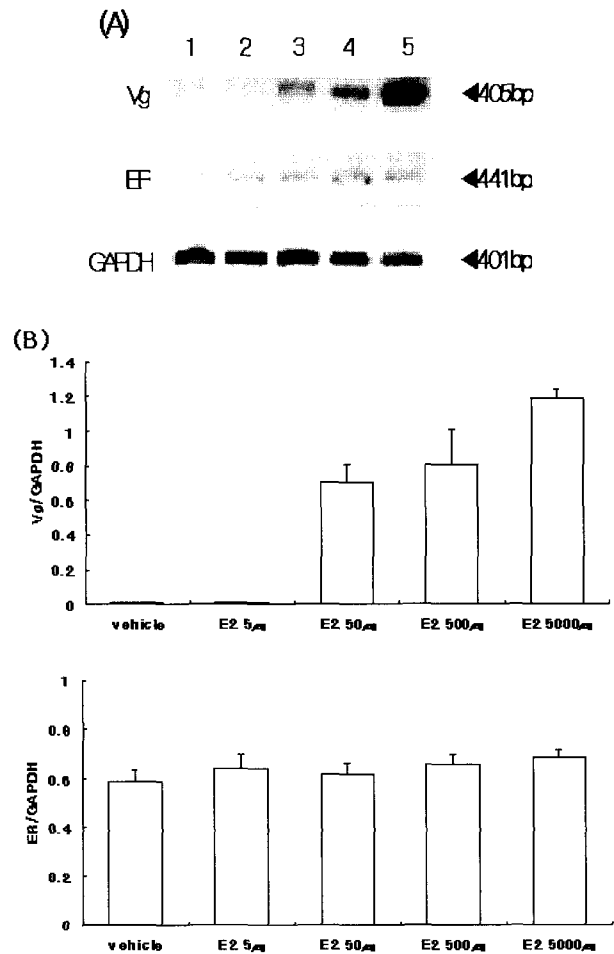


Fig. 1. Vitellogenin(Vg) and estrogen receptor(ER) mRNA expression by estradiol-17 β (E₂) in eel liver. Eels were given a single injection of E₂ and sacrificed 10 days after hormone treatment. (A) RT-PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel. Lanes 1, vehicle; 2, E₂ 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ · bw; 3, E₂ 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ · bw; 4, E₂ 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ · bw; 5, E₂ 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ · bw. (B) Relative amount of Vg and ER mRNA was normalized with the level of GAPDH mRNA. The RT-PCR product was scanned and analyzed by image analysis system. Data represent means of three individual experiments and error bars represent the SE.

은 유의적으로 증가하였으나, ER mRNA의 발현에 있어서는 E₂와 MT를 같이 처리한 군과 E₂ 단독 처리 간에 유의적 차이를 나타내지 못했다.

3. Vg 및 ER 유전자 발현에 대한 GH의 영향

뱀장어 체중 당 eGH(1, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ · bw)를 단독 또는 E₂ (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ · bw)와 함께 1회 주사하여 10일후에 간을 적출하여 RNA 추출 후 RT-PCR을 실시한 결과를 Fig. 3에 나타

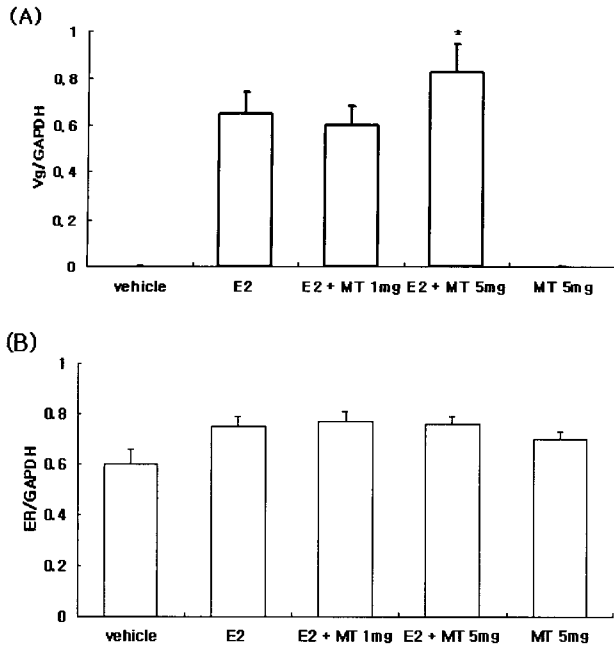


Fig. 2. Effects of 17 α -methyltestosterone(MT) on vitellogenin(Vg) and estrogen receptor(ER) expression in eel liver. Eels were given a single injection of estradiol-17 β (E₂, 500 μ g/kg \cdot bw), MT (1~5 mg/kg \cdot bw) alone or combinations of MT and sacrificed 10 days after hormone treatment. Differences in the mRNA levels were estimated by using RT-PCR. Relative amount of Vg and ER mRNA was normalized with the level of GAPDH mRNA. Data represent means of three individual experiments and error bars represent the SE. Asterisk indicates statistically significant difference to the E₂ treatment ($p < 0.05$).

내었다. eGH(10 μ g/kg) 단독 투여는 Vg 유전자 발현을 유도하지 못했으나, E₂와 함께 처리했을 때 E₂ 단독 처리한 것보다 높은 Vg 유전자가 발현되었다. 1 μ g/kg 저농도의 eGH 처리에서는 상승적 Vg 유전자 발현 효과가 나타나지 않았다. eGH 처리에 의한 ER 유전자의 발현은 E₂ 단독처리에 비해 유의적 차이를 나타내지 못했다(data not shown).

고찰

난생 척추동물에서 E₂ 이외에 다른 여러 호르몬들이 Vg 합성에 관여한다는 것이 시사되어 왔는데(Ho *et al.*, 1985; Boehm *et al.*, 1988; Carnevali *et al.*, 1992; Mosconi *et al.*, 2002), 뱀장어 *Anguilla japonica* 및 *Anguilla anguilla*에서도 E₂에 의한 Vg 합성을 유도하는데 GH 또는 PRL의 역할이 매우 중요하다는 것이 관찰되었다(Kwon and Mugiya,

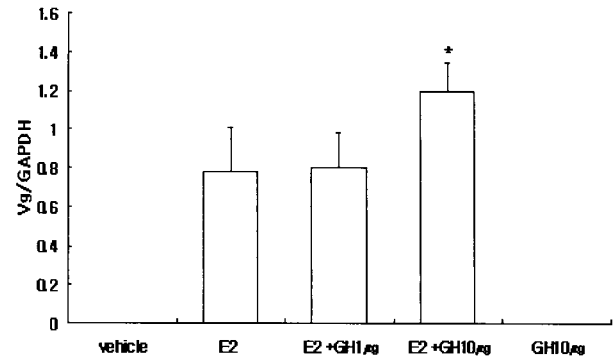


Fig. 3. Effects of recombinant eel growth hormone(eGH) on vitellogenin(Vg) expression in eel liver. Eels were given a single injection of estradiol-17 β (E₂, 500 μ g/kg \cdot bw), alone or combinations of eGH(1~10 μ g/kg \cdot bw) and sacrificed 10 days after hormone treatment. Differences in the mRNA levels were estimated by using RT-PCR. Relative amount of Vg mRNA was normalized with the level of GAPDH mRNA. Data represent means of three individual experiments and error bars represent the SE. Asterisk indicates statistically significant difference to the E₂ treatment ($p < 0.05$).

1994; Peyon *et al.*, 1996; Kwon *et al.*, 2003). 뱀장어를 이용한 앞선 연구 및 본 연구에서처럼 E₂는 분명 Vg 합성에 없어서는 안 되는 필수 호르몬이지만, GH 부재시 E₂ 단독으로는 충분한 Vg 유전자 발현을 유도하지 못하였다. 또한 E₂ 부재시 GH의 단독처리는 Vg 유전자를 발현하지 못하였다. 이 결과들로부터 뱀장어 Vg 합성에 있어서 GH는 E₂와 공조적인 역할을 하지만, 그 자체만으로는 직접 Vg 합성을 유도하지 못하며, E₂는 Vg 합성에 필수 호르몬이지만 GH 등 다른 요소들의 도움 없이는 충분히 그 역할을 수행하지 못한다는 것이 확실히 밝혀졌다.

한편 여성호르몬이 Vg 합성에의 직접 관여가 금붕어의 *in vivo* 실험을 통해 보고되어 왔다(Hori *et al.*, 1979). 그러나 여성호르몬에 의한 *in vivo* Vg 합성은 생리적 농도에 비해 1,000배 이상의 약리적 농도에 의해 유도되었다. 그 후 간세포 배양에 의한 *in vitro* 실험을 통해 여성호르몬의 생리적 농도에 의해서도 Vg 합성이 유도되어질 수 있는 것이 뱀장어와 무지개 송어에서 밝혀졌다(Kwon and Park, 1996; Peyon *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2000). 어류 *in vivo* Vg 합성은 여성스테로이드의 종류 및 어종에 따라 다소 다른 결과를 보여 왔다. 금붕어와 무지개 송어에서는 MT, dehydroepiandrosterone(DHEA)와 androstenedione 등의 androgen에 의해 Vg이 유도되었으나(Hori *et al.*,

1979; Shilling and Williams, 2000), 틸라피아에서는 MT에 의해 Vg 유전자 발현이 억제되었다(Lazier *et al.*, 1996). 또한 비방향화 androgen인 dihydrotestosterone(DHT)는 문절망둑에서 Vg 합성이 유도되어지지만(Le Menn *et al.*, 1980), 무지개 송어에서는 오히려 Vg 합성을 감소시켰다(Shilling and Williams, 2000). 어류의 배양 간세포를 이용한 실험에서도 Vg 합성에 대한 androgen의 영향은 유도 시간, 호르몬 농도, 심지어 같은 종내에서도 어류의 종류에 따라 다르게 나타났다. 무지개 송어 간세포 배양실험에서 Vg mRNA가 10^{-6} M의 testosterone 또는 androstenedione을 첨가한 후 24 시간내에 유도되지 않았으나(Vaillant *et al.*, 1988), 같은 종을 사용한 다른 연구에서는 10^{-6} M의 testosterone 또는 androstenedione에서 Vg mRNA가 합성되었으며, 게다가 10^{-9} M의 훨씬 낮은 농도에서도 24시간 후에 유도되었다(Mori *et al.*, 1998).

본 연구는 *in vivo*에서 뱀장어 Vg 유전자 발현에 대한 androgen의 영향을 조사하였는데, MT 단독으로는 Vg 유전자는 발현되지 않았다. 앞에서 언급된 것처럼 뱀장어의 Vg 합성은 E₂ 단독으로는 유도되기 어렵고, GH 등의 뇌하수체 호르몬과의 협동작용에 의해 유도되어지는 것처럼 MT 또한 E₂와의 협동작용에 의해 Vg 유전자를 발현시켰다. 우리나라 및 일본에 서식하는 뱀장어 *Anguilla japonica*의 경우, MT 및 기타 음성스테로이드 단독으로는 *in vivo* 및 *in vitro* 모두 Vg 합성 효과가 없었으나, E₂와 함께 처리하면 유도되어졌다(Kwon *et al.*, 2005). 반면에 유럽 뱀장어에서는 androgen 단독으로 *in vivo* Vg 합성을 유도하지 못했으나, *in vitro* 실험에서 testosterone과 5 α -androstane-3 β , 7 α -diol에 Vg 합성이 관찰되었다 (Peyon *et al.*, 1997). 그러나 이 실험의 경우, Vg 합성을 위해서 *in vivo* E₂-primed된 암컷 뱀장어로부터 얻은 간세포를 사용하였고, 더욱이 10일 동안 E₂로 미리 배양된 간세포를 사용하였기 때문에 Vg 합성이 순수한 androgen에 의해 유도된 것인지 명확하지 않다. 뱀장어 종류에서 androgen 단독으로 Vg 합성이 유도되어지는지 논란의 여지는 있지만, 우리나라 및 유럽 뱀장어에서 E₂ 단독에 의한 Vg 합성은 미미하고 androgen을 함께 처리함으로써 왕성한 Vg이 합성되어지는 것은 공통으로 관찰되었다.

대부분의 어종의 Vg 합성은 E₂에 의해 유도되어진다. 뱀장어의 경우는 E₂만으로는 Vg 합성이 매우 미미하다. E₂ 이외에 GH 및 androgen 등의 다른 요소들이 필요하다. 그러나 뱀장어에서 E₂는 절대적으로 Vg 합성에 필요한 요소이다. 따라서 뱀장어 Vg 합성 메커니즘을 밝히기 위해서는 E₂와 특이적으로 결합하는 E₂ 수용체(ER)에 대한 연구가 필요하

다. Vg 유전자 발현은 ER과 밀접한 관련이 있으며, 일반적으로 간내 ER의 양은 투여된 E₂ 농도에 따라 증가하게 된다는 연구가 여러 어종에서 보고되었다(Lazier *et al.*, 1985; Green, 1990; Pakdal *et al.*, 1991; Flouriot *et al.*, 1996). Paolucci(1989)는 도마뱀에서 GH가 간의 ER 수준에 영향을 미쳐서 Vg 합성 조절에 기여한다고 하였다. 그는 이 연구에서 GH가 E₂-ER 조절에 시너지 효과를 발휘한다고 제안하였다. 또한 거북이에서 GH가 직접 간 ER의 양적 증가를 조절하는 작용이 있음이 관찰되었다(Ho *et al.*, 1989). 뱀장어를 이용한 본 연구에서 E₂ 농도에 따라 ER mRNA가 증가되는 것을 관찰하였으나, GH가 직접 ER 유전자를 발현시키지 못했으며, E₂에 의한 ER mRNA의 발현에 GH의 상승 효과도 관찰하지 못했다.

어류에 있어서 androgen이 Vg 합성을 유도하는데 어떠한 경로를 통하여 이루어지는가에 대한 연구는 분명하지 않다. 금붕어와 송어에서 고농도의 androgen은 ER에 쉽게 결합할 수 있다(Hori *et al.*, 1979; Pelissero *et al.*, 1993). Peyon *et al.*(1997)도 뱀장어 *Anguilla anguilla*에서 Vg 합성을 위한 androgen의 작용이 antiestrogen인 tamoxifen에 의해 억제되는 것을 관찰하여 androgen이 ER에 결합함으로써 Vg 합성을 유도한다고 주장하였다. Shilling and Williams(2000)은 *in vivo*에서 송어에 DHEA와 androstenedione 등의 E₂로의 전환이 가능한 방향화 androgen을 주사하여 혈중 Vg과 E₂의 증가를 관찰하였다. 따라서 Vg과 E₂의 증가는 androgen이 E₂로의 전환을 통해 일어난다고 제안하였다. 그러나 문절망둑에 비방향화 androgen인 dihydrotestosterone(DHT)를 투여하여 Vg이 합성되는 것이 관찰되었고(Le Menn *et al.*, 1980), 틸라피아 간세포 배양실험에서도 같은 결과가 발표되었다(Kim *et al.*, 2003). 또한 여러 어종(Trant *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003)에서 간내에 방향화 효소의 존재를 부정하여 androgen이 E₂로의 전환에 의한 Vg 합성은 의문의 여지가 많다. 최근 Kwon 등(2005)은 뱀장어 Vg 합성에 있어서 antiandrogen인 flutamide를 이용하여 androgen에 의한 Vg 합성 저해를 관찰하여 androgen이 androgen receptor(AR)를 경유하여 Vg 합성을 유도한다고 제안하였다. 본 연구와 앞선 연구로부터 뱀장어 Vg 합성에 있어서 E₂는 필수요소이고 androgen은 충분한 Vg 합성을 위한 첨가적인 요소로서 androgen이 AR과 결합하여 Vg 유전자 전사 조절 부위에 결합하여 Vg 합성이 유도되어질 것으로 생각된다.

결론적으로 뱀장어 *Anguilla japonica*에서 Vg 합성을 위해서 E₂의 존재는 반드시 필요하고, MT와 GH는 E₂에 의한

Vg mRNA의 합성을 증가시키는 역할을 재차 확인할 수 있었지만, GH와 MT는 E₂ 수용체의 유전자 발현에 어떠한 영향도 미치지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 추후 GH, androgen 및 E₂가 뱀장어 Vg 합성에 어떻게 영향을 미치는가를 밝히기 위해 이들 호르몬들에 의한 AR 유전자 발현 등을 포함하여 보다 심도있는 연구가 뒤따라야 할 것이다.

인용문헌

- Boehm KD, Hood RL, Ilan J (1988) Induction of vitellogenin in primary monolayer cultures of cockerel hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3450-3454.
- Carnevali O, Mosconi G, Yamamoto K, Kobayashi T, Kikuyama S, Polzonetti-Magni AM (1992) Hormonal control of *in vitro* vitellogenin synthesis in *Rana esculenta* liver: effects of mammalian and amphibian growth hormone. *Gen Comp Endocrinol* 88:406-414.
- Carnevali O, Sabbieti MG, Mosconi G, Polzonetti-Magni AM (1995) Multihormonal control of vitellogenin mRNA expression in the liver of frog, *Rana esculenta*. *Mol Cell Endocrinol* 114:19-25.
- Flouriot G, Pakdel F, Valotaire Y (1996) Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 124:173-183.
- Gerstle JF, Callard IP (1972) Reproduction and estrogen-induced vitellogenesis in *Dipsosaurus dorsalis*. *Comp Biochem Physiol* 42A:791-801.
- Gobbetti A, Polzonetti-Magni A, Zerani M, Carnevali O, Botte V (1985) Vitellogenin hormonal control in the green frog, *Rana esculenta*: Interplay between estradiol and pituitary hormones. *Comp Biochem Physiol* 82A: 855-858.
- Green S (1990) Modulation of oestrogen receptor activity by oestrogens and anti-oestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:747-751.
- Ho SM, Wangh LJ, Callard IP (1985) Sexual differences in the *in vitro* induction of vitellogenesis in the turtle: Role of the pituitary and growth hormone. *Comp Biochem Physiol* 81B:467-472.
- Hori SH, Kodama T, Tanahashi K (1979) Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgen. *Gen Comp Endocrinol* 37:306-320.
- Kim BH, Takemura A, Kim SJ, Lee YD (2003) Vitellogenin synthesis via androgens in primary cultures of tilapia hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 132:248-255.
- Kwon HC, Hayashi S, Mugiya, Y (1993) Vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol* 104B:381-386.
- Kwon HC, Mugiya Y (1994) Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*. *Gen Comp Endocrinol* 93:51-60.
- Kwon HC, Park HY (1996) Induction of vitellogenin synthesis by androgens in cultured hepatocytes of the eel, *Anguilla japonica*. *Korean J Animal Repord* 20: 259-269. (In Korean)
- Kwon HC, Yoon JM, Lee JY (2000) Expression of vitellogenin gene by androgens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J of Aquaculture* 13:79-85. (In Korean)
- Kwon HC, Choi SH, Kim YC, Son SO, Kwon JY (2003) Involvement of androgens and growth hormone in the synthesis of vitellogenin in Japanese eel(*Anguilla japonica*). *Fish Physiol Biochem* 28:351-352.
- Kwon HC, Choi SH, Kim YC, Son SO, Kwon JY (2005) Androgen action on hepatic vitellogenin synthesis in the eel, *Anguilla japonica* is suppressed by an androgen receptor antagonist. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96: 175-178.
- Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ (2001) Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Repord Dev* 59:359-370.
- Lazier CB, Lonergan K, Mommsen TP (1985) Hepatic estrogen receptors and plasma estrogen-binding activity in the Atlantic salmon. *Gen Comp Endocrinol* 57:234-245.
- Lazier CB, Langley S, Ramsey NB, Wright JM (1996) Androgen inhibition of vitellogenin gene expression in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol* 104:321-329.

- Le Menn F, Rochefort H, Garcia M (1980) Effect of androgen mediated by estrogen receptor of fish liver: Vitellogenin accumulation. *Steroids* 35:315-328.
- Mommsen TP, Walsh PJ (1988) Vitellogenesis and oocyte assembly. In "Physiology" (W.S. Hoar and DJ Randall, Eds.), Vol. XIA, pp. 347-406. Academic Press, San Diego.
- Mori T, Matsumoto H, Yokota H (1998) Androgen-induced vitellogenin gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:133-141.
- Mosconi G, Carnevali O, Habibi HR (2002) Hormonal mechanisms regulating hepatic vitellogenin synthesis in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:673-678.
- Okumura H, Todo T, Adachi S, Yamauchi K (2002) Changes in hepatic vitellogenin mRNA levels during oocyte development in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Gen Comp Endocrinol* 125:9-16.
- Pakdel F, Feon S, Le Gac L, Le Menn F, Valotaire Y (1991) *In vitro* estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. *Mol Cell Endocrinol* 75:205-212.
- Paolucci M (1989) Estradiol receptor in the lizard liver (*Poodarcis s. sicula*). Seasonal changes and estradiol and growth hormone dependence. *Mol Cell Endocrinol* 66: 101-108.
- Pelissero C, Flouriat G, Foucher JL, Bennetau B, Duno-gues J, Le Gac F, Sumpter JP (1993) Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes, an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:2263-272.
- Peyon P, Baloche S, Burzawa-Gerard E (1996) Potentiating effect of growth hormone on vitellogenin synthesis induced by 17β -estradiol in primary culture of female silver eel (*Anguilla anguilla* L.) hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 102:263-273.
- Peyon P, Baloche S, Burzawa-Gerard E (1997) Investigation into the possible role of androgens in the induction of hepatic vitellogenesis in the European eel: *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiol Biochem* 16:107-118.
- Shilling AD, Williams DE (2000) The non-aromatizable androgen, dihydrotestosterone, induces antiestrogenic responses in the rainbow trout. *J Steroid Biochem* 74: 187-194.
- Todo T, Adachi S, Yamauchi K (1996) Molecular cloning and characterization of Japanese eel estrogen receptor cDNA. *Mol Cell Endocrinol* 119: 37-45.
- Trant JM, Lehrter J, Gregory T, Nunez S, Wunder J (1997) Expression of cytochrome P450 aromatase in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61:393-397.
- Vaillant C, Le Guellec C, Pakdel F, Valotaire Y (1988) Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 70: 284-290.
- Wallace RA (1985) Vitellogenin and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. In "Developmental Biology" (L. Browder, Ed.), Vol. 1, pp.127-177. Pergamon, New York.
- Wangh LJ, Schneider W (1982) Thyroid hormones are corequisites for estradiol- 17β *in vitro* induction of *Xenopus* vitellogenin synthesis and secretion. *Dev Biol* 89:287-293.