

## 참개구리, 북방산개구리, 옴개구리 뇌에서 3가지 생식소 자극 호르몬 분비 호르몬(mGnRH, sGnRH, cGnRH II)의 분포

김정우 · 최완성\* · 김명옥\* · 권혁방 · 나철호 · 임옥빈

전남대학교 자연과학대학 생물학과, \*경상대학교 의과대학 해부학실

면역효소법을 이용하여 3종의 한국산 개구리, 참개구리(*Rana nigromaculata*), 옴개구리(*R. rugosa*), 북방산개구리(*R. dybowskii*)의 뇌에서 GnRH 뉴우런의 분포 부위와 GnRH의 종류 등을 연구하였다. 1차 항체로는 anti-rat GnRH, anti-salmon GnRH, anti-chicken II GnRH 항체를 사용하였다. 3종의 개구리에서 mGnRH, cGnRH II와 sGnRH가 모두 동정되었으나 3가지 항체에 대한 각 종의 면역 반응성은 종에 따라 달리 나타났다. mGnRH는 옴개구리와 참개구리에서, sGnRH는 북방산개구리에서 강한 면역 반응을 나타냈으며 cGnRH II는 3종의 개구리에서 중간 정도의 면역 반응을 나타냈다. 각각의 GnRH의 상대적인 양에는 차이가 있으나 일부 경우를 제외하고는 뇌의 동일한 지역에 분포하였다. 참개구리에서는 GnRH가 중격 내측핵(NMS), Broca band 핵(NDB)에 집단으로 분포하였다. 북방산개구리에서는 GnRH가 중격 내측핵, Broca band 핵에서 등쪽에서 배쪽으로 길게 선상으로 가장 협소하게 분포하였으며, 번식기와 직전(1월-3월)에만 면역 반응을 나타냈다. 옴개구리의 뇌에서 가장 광범위한 지역, 즉 중뇌의 중격 내측핵, Broca band 핵, 아래 교차 지역(SCA)과 간뇌에 GnRH 신경세포가 분포하였으며, 제3뇌실 맥락열기에서 mGnRH 신경세포가 처음으로 동정되었다. 3종에서 공통적으로 중격 내측핵과 Broca band 핵에서 유래한 신경섬유는 복측 시상하부를 거쳐 정중용기에 이르렀다. 이러한 결과는 GnRH가 뇌하수체에서 생식소 자극 호르몬의 분비 조절에 밀접한 관계가 있음을 뜻한다.

**KEY WORDS:** mGnRH, sGnRH, cGnRH II, 면역조직화학법, 개구리

포유동물에서 생식소 자극 호르몬 분비 호르몬(Gonadotropin Releasing Hormone: GnRH)은 암수 개체에서 뇌하수체로부터 생식소 자극 호르몬의 분비를 촉진하여 궁극적으로 생식소로부터의 스테로이드 성호르몬의 생성, 분비 및 생식세포의 성장과 발생을 유도하는 일련의 반응을 조절하는 것으로 잘 알려져있다.

왜지(Matsuo 등, 1971)와 양(Burgus 등, 1972)의 시상하부에서 GnRH가 처음으로 분리, 10개의 아미노산 서열이 밝혀진 이후 닭, 개구리, 연어, 떡장어 등에서 수종의 GnRH의

구조가 밝혀졌으며(Sherwood, 1986, King과 Millar, 1990), 개구리, 사람 등에서 새로운 형태의 GnRH가 추가 보고되었다(Gautron 등, 1991).

뇌에서 GnRH의 분포 연구가 많은 종에서 면역조직화학법으로 이루어졌다(Nozaki와 Kobayashi, 1979; Silverman, 1988). 공통적으로 GnRH 뉴우런의 신경세포체는 anterior preoptic area(APOA), hypothalamic area 등에 위치하고, 신경섬유는 이들 세포체로부터 기원하여 뇌의 배쪽 표면 가까이에서 뒤쪽을 향하면서 정중용기(median eminence)에 대부분 존재하였다(Alpert 등, 1976; Goos 등, 1976; Silverman 등, 1979; King과 Anthony,

본 연구는 1990년도 교육부 유전공학 연구비로 수행된 것임.

1984; Andersen 등, 1988; Rastogi 등, 1990; Muske와 Moore, 1990). 이는 GnRH가 뇌하수체 전엽으로부터 생식소 자극 호르몬 분비 조절에 관련되어 있음을 시사한다(Carmel 등, 1976; Clarke 과 Cummins, 1982). 그러나 종간에 또는 연구자간에 뇌에서의 GnRH의 분포 양상에 다소의 차이가 보고되었다.

면역학적 또는 크로마토그래피, 생물 점성, 수용체 결합 실험 등에 의한 연구 결과는 여러 종의 동물에서 2가지 이상의 GnRH가 함께 존재함을 시사한다. 개구리의 뇌에서는 mGnRH와 함께 cGnRH II, sGnRH가 존재하고(King 과 Millar, 1986; Sherwood 등, 1986) 최근 이들 3종과 구별되는(Hyp-9)LHRH가 확인되었다(Gautron 등, 1991).

또한 이들 GnRH는 변태과정에 따라 상대적인 양이나 분포 부위가 변화되는 것으로 보고되었다(Gautron 등, 1990; Muske 와 Moore, 1990; Rastogi 등, 1990). 이는 각기 다른 GnRH가 발생 단계에 따라 서로 다른 기능을 할 가능성을 시사한다.

위와같은 여러 결과들로 생각하면 여러 연구 논문에서의 분포 양상의 차이는 면역조직화학법에 사용한 1차 항체의 차이에서 기인할 수도 있고, 또는 실제로 종 특이성을 반영할 수도 있으며 한편으로는 발생 단계에 따른 GnRH의 상대적 양의 변화때문일 수도 있다.

여러 형태의 GnRH가 뇌의 여러 부위에 각기 다른 양으로 존재한다는 위와같은 면역조직화학적 연구 결과가 종간 차이거나 발생 시기에 따른 변화에 기인한다면 이는 각각의 GnRH가 뇌의 각 부위에서 서로 다른 독특한 역할을 할 가능성을 추측케 한다. 실제로, 어떤 GnRH는 뇌하수체로부터의 생식소 자극 호르몬의 분비를 촉진시키는 반면(Licht 등, 1987), 다른 부위에서는 GnRH가 신경전달물질 또는 신경조절물질로 작용하여 성적 행동을 활성화시키는 것으로(Moore 등, 1982) 보고되었다. 그러나 뇌에서의 여러 형태의 GnRH 존재의 기능상의 역할 및 의의는 아직도 확실치 않다.

뇌의 여러 부위에, 여러 종류의 GnRH의 분

포와 관련하여 GnRH의 기능을 보다 잘 이해하기 위해서는 여러 종류 GnRH의 분포 양상의 정확한 조사가 선결되어야 하겠다. 본 연구에서는 mGnRH, sGnRH, cGnRH II 각각에 대한 항체를 이용한 면역조직화학법으로 한국산 북방산개구리, 참개구리, 옴개구리 뇌에서 3종류 GnRH의 분포 양상을 비교 연구하였다.

본 연구에서 한국산 3종의 개구리 모두에서 세 가지의 GnRH 호르몬의 존재가 확인되었다. 그러나 종간에 차이가 있어서 북방산개구리에서는 sGnRH가 주로 존재하였으며, 참개구리와 옴개구리에서는 mGnRH가 많이 존재하였으나, 종간에 또 한종 내에서 GnRH의 종류간에 분포 양상에 커다란 차이는 없었다.

## 재료 및 방법

### 실험 동물

한국산 개구리(북방산개구리: *Rana dybowskii*, 참개구리: *R. nigromaculata*, 옴개구리: *R. rugosa*) 3종을 광주 근교에서 채집하여 3일 이내에 실험을 수행하였다. 북방산개구리(40-50g)는 동면기 및 번식기(10월-4월)에 참개구리(40-45g)는 활동기(7월-10월)와 번식기(4월-5월)에 그리고 옴개구리(18-23g)는 번식기(6월-7월)와 동면기(10월-3월)에 걸쳐서 채집되었다. 본 실험에는 성체 암컷 개구리만을 사용하였다.

### 조직 준비

개구리의 척수를 파괴한 후(pithing), 해부대에 고정하고 복부를 절개하여 심장을 노출시키고, 심실을 통하여 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4(PBS)에 녹인 4% neutral buffered paraformaldehyde(4% NBP) 고정액을 관류시켜 뇌조직을 고정하였다. 관류 고정 후 뇌를 즉시 적출하여 동일 고정액으로 24-48시간동안 4°C에서 후고정(postfixation) 하였다. 고정된 조직을 30% sucrose(0.2M PBS에 녹임)에 담근 후 서서히 가라 앉혔다. 조직을 O.C.T

compound(American Optical)로 포매하여, Cryo-cut II(-20°C, American Optical, 851C)를 사용하여 10  $\mu$ m 두께의 횡단면, 수평 단면, 또는 시상단면 연속 절편을 얻었다. 절편을 1% gelatine 으로 코팅된 슬라이드 위에 thaw mount 한 후 슬라이드 상자에 넣어 -80°C에서 보관하면서 면역효소법을 시행하였다.

#### 면역조직화학법

매 10번째 또는 15번째의 연속 절편을 최대 6편까지 동일 슬라이드 위에 놓았으며, 3종의 개구리의 여러 개체에서 준비한 20-40개의 슬라이드를 동시에 염색하여 염색 처리에 의한 중간 또는 개체간 차이를 최소화하였다.

개구리 뇌조직에서 GnRH의 면역조직화학적 염색은 기본적으로 Avidin-Biotin-Complex (ABC) horseradish peroxidase 기술을 사용한 Hsu 등(1981)의 방법을 따랐다.

조직 절편을 0.02 M phosphate buffered saline, pH 7.4(PBS)로 10분씩 3회 세척하였다. 비특이 면역반응을 최소화하기 위해 normal goat serum을 50분 동안 처리 하였다. 그 후 3가지 GnRH 항체(PBS로 각각 1:500-1:800으로 희석)를 인접 조직 위에 처리하고, 4°C의 습윤 상자에서 12시간 동안 반응시켰다. GnRH를 동정하기 위하여 각 GnRH에 특이한 anti-salmon GnRH 항체(A6 1668, Judy A. King), anti-chicken II GnRH 항체(A6 1458, Judy A. King), anti-rat GnRH 항체(Incstar, Lot 8932025) 항체 등 3종의 GnRH 항체를 사용하였다.

항원-항체 복합체를 avidin-biotin-peroxidase 방법으로 발색시켰다. 조직을 PBS로 3회 10분간씩 세척한 후, endogenous peroxidase 활성을 억제하기 위하여 0.5% periodic acid를 3분간 처리하였다. Biotin 부착 제2항체(biotinylated goat anti-rabbit antisera, 1:250 in PBS)를 실온에서 50분 동안 처리하였다. 다시 PBS로 3회 10분간씩 세척하였다. ABC complex(ABC kit, Vectastain)로 1시간 동안 반응시킨 후 조직을

PBS로 2번 세척하고 0.02M PBS 완충액으로 다시 세척한 다음 정색 반응을 시행하였다. 조직을 0.05% diaminobenzidine, 0.04% NiCl, 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS 완충액에 10분간 반응시켜 GnRH를 발색시켰다. 탈수, 투명화를 거친 후 canada balsam으로 mount하였다.

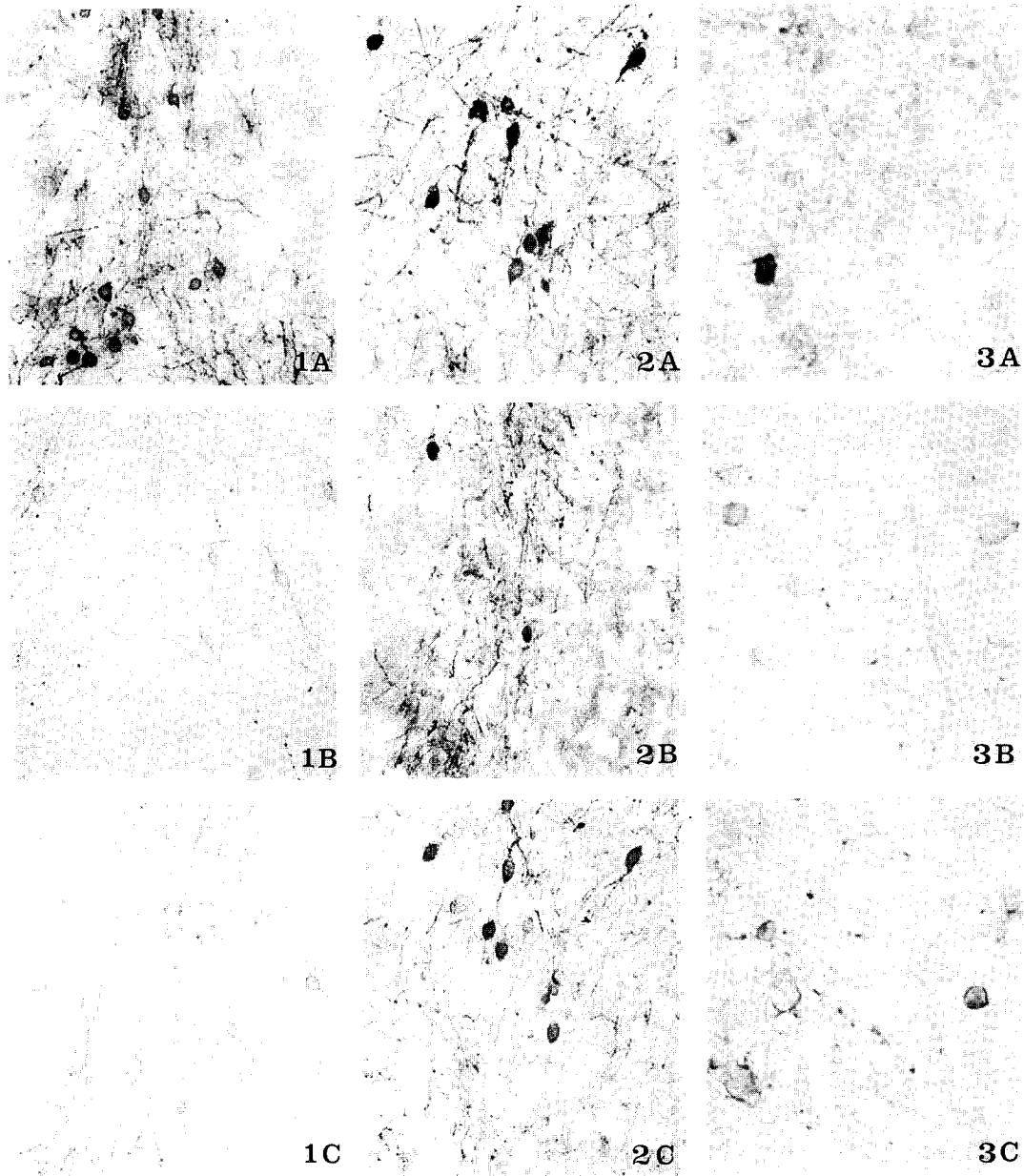
GnRH 신경세포체와 신경섬유는 흑갈색으로 발색되었다. 비특이 면역 반응에 의한 정색의 대조 실험으로 인접 조직을 (1) 1차 항체 또는 2차 항체없이 반응시키거나, (2) 합성된 GnRH (Sigma)와 1차 항체를 24시간 동안 반응시킨 후 1차 항체 대신 사용하거나 (3) anti-rabbit 2차 항체 대신 anti-mouse 항체를 처리하였다. 모든 대조 실험 조직에서는 정색 반응이 나타나지 않았다.

#### 결과

3가지 GnRH 항체, anti-mGnRH, anti-sGnRH, anti-cGnRH II 항체를 이용한 면역조직화학법으로 한국에 서식하는 3종의 개구리, 음개구리, 참개구리, 북방산개구리 뇌에서 3가지 형태의 GnRH 생성 신경세포 및 신경섬유를 동정하였다.

3종의 개구리 모두에서 3종의 GnRH 가 모두 동정되었다(Fig. 1, 2, 3). 그러나 개구리 뇌에서 3가지 GnRH, mGnRH, sGnRH, cGnRH II 의 상대적인 양은 종에 따라 다르게 나타났으며, GnRH 신경세포체의 수는 뇌의 부위 및 계절에 따라 뚜렷한 차이를 나타냈다.

Fig. 1, 2, 3은 각기 다른 항체와 반응시킨 바로 연속된 인접 절편의 사진으로, 각기 mGnRH, sGnRH, cGnRH II 항체와 반응시킨 10  $\mu$ m의 이웃 절편의 결과를 비교하면 계속되는 인접 절편에서 세가지 항체에 면역 반응을 나타내는 세포체의 위치가 서로 다르고, 서로 다른 GnRH와 GnRH 항체간의 상호 반응성이 낮기때문에(논의 참조) 이 결과는 세가지 다른 형태의 GnRH 신경세포가 동일 부위에 존재하고 있음을 뜻한다.



**Fig. 1.** Localization of mGnRH-, cGnRH II- and sGnRH-immunoreactive perikarya and fibers in *R. rugosa*, illustrating sympatric distribution of mGnRH-, cGnRH II- and sGnRH-immunoreactive neurons in the nucleus medialis septi. A, B, C are adjacent serial sections of brain treated with different antibody. A: mGnRH. B: cGnRH II. C: sGnRH. (250 ×)

**Fig. 2.** Localization of mGnRH-, cGnRH II- and sGnRH-immunoreactive perikarya and fibers in *R. nigromaculata*. Cross sections of brain tissue of frog, illustrating syl-localization (sympatric localization) of mGnRH-, cGnRH II- and sGnRH-immunoreactive neurons in the nucleus medialis septi. A: mGnRH. B: cGnRH II. C: sGnRH. (250 ×)

**Fig. 3.** Localization of mGnRH-, sGnRH- and cGnRH II-immunoreactive perikarya and fibers in *R. dybowskii* at the breeding season. Sagittal sections of brain tissue of frog, A, B, C are adjacent serial sections of brain treated with different antibody. A: mGnRH. B: cGnRH II. C: sGnRH. (500 ×)

Fig. 1, 2, 3과 Table 1에서 보는 바와 같이 참개구리와 움개구리에서는 mGnRH가 가장 강하게 면역반응을 나타냈고, 북방산개구리에서는

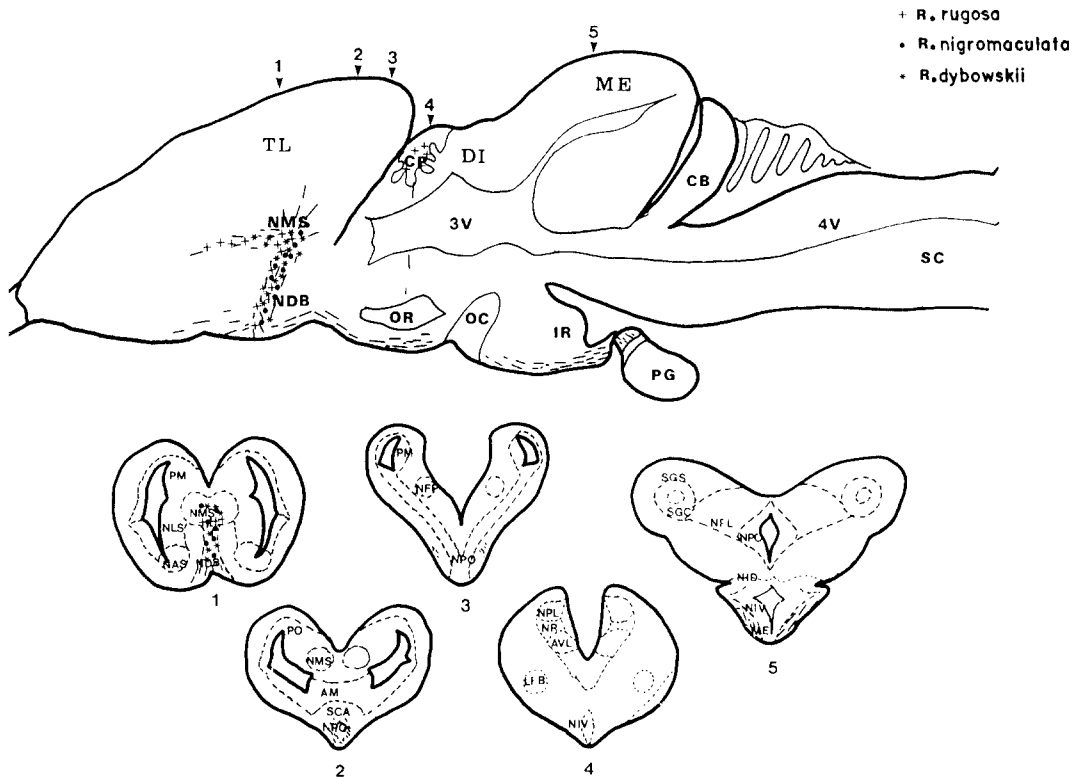
**Table 1.** Species variations in relative immunoreactivity of GnRHs in frog.

GnRH type	species		
	<i>R. rugosa</i>	<i>R. nigromaculata</i>	<i>R. dybowskii</i>
mammal	++	++	+
chicken II	+	+	+
salmon	+	+	++

Plus (+) signs indicate relative immunoreactivity of different GnRHs in frog brains of three species. ++: heavy reaction, +: moderate reaction

sGnRH가 강한 면역반응을 나타냈으며, cGnRH II는 모든 종에서 중간 정도의 면역반응을 나타냈다. 3종의 개구리에서 GnRH의 상대적인 분포양의 차이는 년중 계절에 관계없이 일정하게 유지되었으므로 각기 다른 항체와 반응시킨 결과를 별도로 신지 않았다.

3종의 개구리 뇌에서 mGnRH-, sGnRH-, cGnRH II-면역성 신경세포의 분포 양상이 Fig. 4에 나타나 있으며, GnRH-면역성 조직과 면역반응성 신경세포체와 신경섬유의 상대적인 수를 Table 2에 표시하였다. 3종의 개구리 뇌에서 mGnRH-, sGnRH-, cGnRH II-면역성 신경세포는 그 상대적인 양에는 차이가 있으나 동일 지역에 분포 하기때문에 분리하여 표시하지 않았다. 가장 많이 분포하는 GnRH의 종류에 따



**Fig. 4.** Schematic illustrations of the distribution of GnRH-immunoreactive perikarya and fibers in frontal and sagittal sections of the frog brain. GnRH-immunoreactive perikarya are represented by plus signs (+), stars (\*), dots (·) and the fibers by minus signs(-). The density of these symbols means the density of immunoreactivity. Since mGnRH-, sGnRH- and cGnRH II-immunoreactive cells were localized at the same area in the brain, mapping of the three neuropeptides was not be described separately. 1, 2, 3, 4 and 5 are frontal sections through the corresponding points marked over the sagittal diagram. See list of abbreviations in Table 2.

**Table 2.** Localization and relative abundance of GnRH-immunoreactive perikarya and fibers in different frog species. + and # indicates mGnRH in *R. rugosa* and *R. nigromaculata* and \* indicate sGnRH in *R. dybowskii*, respectively. The number of sign represents the density of the GnRH-immunoreactive perikarya or fibers.

Structure	Perikarya			Fibers		
Telencephalon						
Pallium mediale (PM)	-	-	-	-	-	-
Nucleus medialis septi (NMS)	+++	##	* *	++	##	* *
Nucleus lateralis septi (NLS)	-	-	-	-	-	-
Nucleus accumbens septi (NAS)	-	-	-	-	-	-
Nucleus of the diagonal band of Broca (NDB)	+++	##	* *	++	##	* *
Amygdala, pars medialis (AM)	-	-	-	-	-	-
Nucleus entopeduncularis (NEP)	-	-	-	-	-	-
Subcommissural area (SCA)	+	-	-	+	#	*
Diencephalon						
Nucleus preopticus (NPO)	-	-	-	++	#	*
Area ventralis anterior thalami (NVA)	-	-	-	-	-	-
Nucleus posterolateralis thalami (NPL)	-	-	-	-	-	-
Area ventrolateralis thalami (AVL)	-	-	-	-	-	-
Nucleus rotundus (NR)	-	-	-	-	-	-
Choroid plexus of 3rd ventricle (CP)	+	-	-	+	-	-
Nucleus infundibularis ventralis (NIV)	-	-	-	-	-	-
Nucleus infundibularis dorsalis (NID)	-	-	-	-	-	-
Optic tract (OT)	-	-	-	+	#	*
Median eminence (ME)	-	-	-	++	##	* *
Mesencephalon						
Stratum griseum superficiale tecti (SGS)	-	-	-	-	-	-
Stratum griseum centrale tecti (SGC)	-	-	-	-	-	-
Hypophysis						
Pars nervosa (PN)	-	-	-	-	#	-
Pars intermedia (PI)	-	-	-	-	-	-
Pars distalis (PD)	-	-	-	-	-	-

+: *R. rugosa*, #: *R. nigromaculata*, \*: *R. dybowskii*

라 참개구리와 옴개구리에서는 mGnRH-, 북방산개구리에서는 sGnRH-면역성 신경세포의 위치 및 상대적인 양을 도시하였다.

본 논문에 쓰인 해부학상의 명칭은 Kelami와 Branitenberg(1969)가 개구리(*R. esculanta*)의 뇌 각 부분에 부여한 용어를 적용하였다. Figure 들에 있는 준말과 본디말이 Table 2에 기술되어 있다.

대조군로 실험한 1차 항체 또는 2차 항체 없이 반응시킨 절편에서는 면역반응이 관찰되지 않았으며, 합성된 GnRH(Sigma)와 1차 항체를 24시간 동안 반응시킨 후 1차 항체 대신 사용한

조직에서도 또한 염색 반응이 없었으며 결과는 사진에 실지 않았다.

공통의 항원 결정기를 가진 유사한 분자와의 교차 반응성을 완전히 배제할 수는 없기때문에 면역반응 물질을 GnRH 또는 GnRH 유사체라 하는 것이 타당하겠으나 이 논문에서는 GnRH 라고 간단히 기술하였다.

#### 옴개구리(*Rana rugosa*)

옴개구리 뇌에서 GnRH 신경세포체는 계절에 관계없이 3종의 개구리 중에서 가장 광범위하게 분포하였다. 인접 조직 절편에 각각 다른 형태의

GnRH 항체를 처리한 결과 cGnRH II와 sGnRH에 비하여 mGnRH에 대하여 강한 면역 반응을 나타냈다(Fig. 1 A, B, C). 그러나 ME에서는 3가지의 항체 모두에 대해 강한 반응성을 나타냈다.

GnRH 신경세포체는 종뇌(telencephalon)의 nucleus medialis septi(NMS)에 집단으로 앞에서 뒤쪽으로 기둥을 형성하면서 분포하였고 nucleus of the diagonal band of Broca(NDB) 근처에서 등쪽에서 배쪽으로 길게 이어지면서 분포하였다(Fig. 1, Fig. 4). sub-commissural area(SCA)에서도 몇개의 신경세포체가 존재하였다. 특별히 이 종에서는 번식기(7월)에 간뇌(diencephalon)의 제3뇌실 맥락 열기에서 mGnRH 신경세포체가 처음으로 발견되었다(Fig. 5). NMS와 NDB에 존재하는 GnRH 신경세포체는 모두 난형(ovoid)이거나 방추형(양극성: bipolar)이었다.

GnRH 신경섬유는 이들 신경세포체로부터 기원하여 앞쪽, 뒤쪽, 그리고 등쪽, 배쪽으로 다발을 이루면서 NMS에서 NDB쪽을 향하고 있었다. 신경섬유 다발은 계속 이어져 배쪽의 표면 가까이 분포하면서 꼬리쪽을 향하고 있었으며 optic recess(OR) 전방에서 양쪽으로 갈라지고 제3뇌실의 choroid plexus에서 기원되어 배쪽을 향해 내려오는 신경섬유들과 합쳐져 median eminence(ME)에서 종결되었다(Fig. 6). 또 lateral ventricle(LV)의 배쪽 부위에서도 GnRH 항체에 양성 반응을 나타냈다.

#### 참개구리(*Rana nigromaculata*)

참개구리에서는 옴개구리에서 보다 협소한 부위에서 신경세포체가 분포하였다. GnRH 신경세포체는 옴개구리 뇌에서의 분포와는 달리 종뇌의 NMS에서 앞에서 뒤쪽으로 기둥을 형성하지 않고 NDB 근처에서 등쪽에서 배쪽으로 길게 분포되었으며 그외의 다른 지역에서는 발견되지 않았다(Fig. 7a). 신경섬유들은 이들 신경세포체에서 기원하여 ME 쪽을 향하고 있었으며(Fig. 7b), 뇌하수체 후엽에서도 약한 면역반응이 나타났다(Fig. 7c). 인접 절편의 각각 다른 GnRH

항체에 대한 면역반응에서도 옴개구리와 같이 mGnRH가 sGnRH나 cGnRH II보다 훨씬 강한 반응성을 나타냈다(Figs. 2A, B, C).

#### 북방산개구리(*Rana dybowskii*)

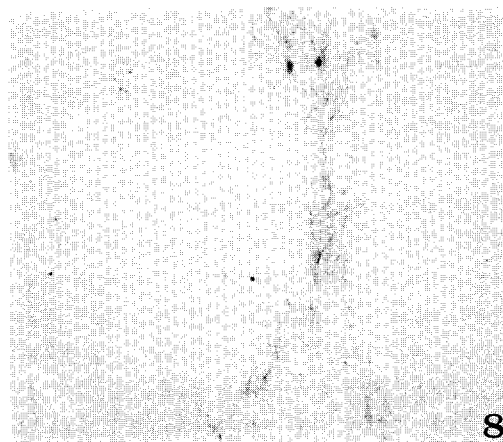
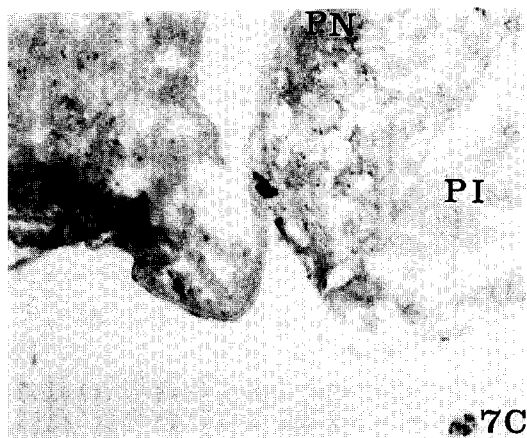
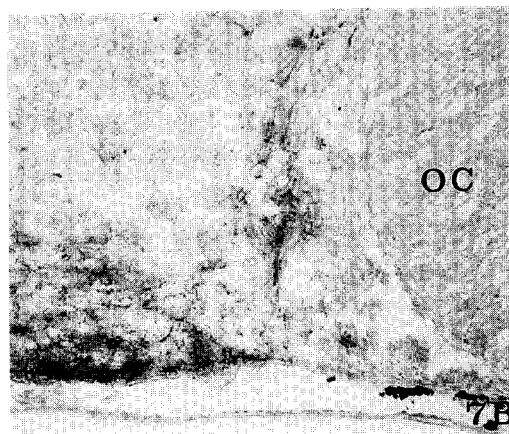
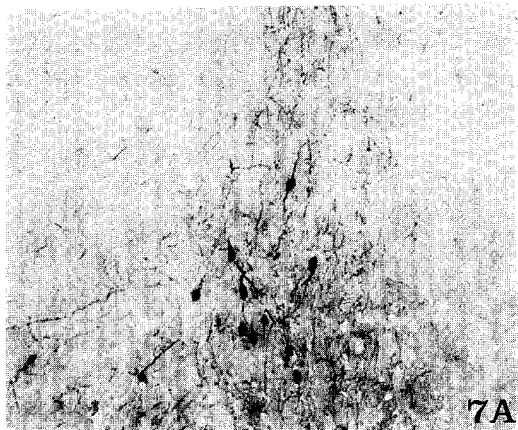
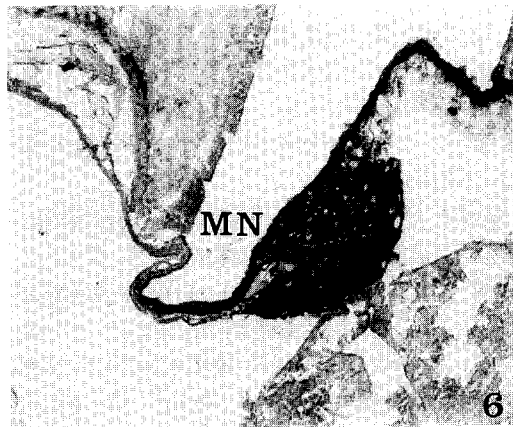
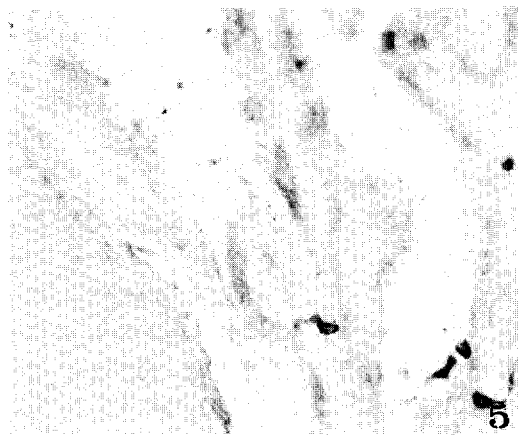
북방산개구리는 3종의 개구리중에서 가장 협소한 지역에서 그리고 특정 시기인 번식기 및 직전 시기(1월말-3월)에만 GnRH 면역반응을 나타냈다. 적은 수의 GnRH 신경세포체가 종뇌의 NMS와 NDB 지역에 등쪽에서 배쪽으로 길게 분포하였으며 신경섬유들은 이 지역에서 X 형태를 취하였으며 ME에서 종결되었다(Fig. 8). 다른 종에 비하여 신경섬유의 발달도 미비했다. 3가지의 항체에 대한 반응성에서는 sGnRH가 mGnRH나 cGnRH II보다 뚜렷하게 강한 반응성을 나타냈다(Figs. 3A, B, C).

## 고찰

### GnRH의 종류

개구리 뇌에 mGnRH, sGnRH, cGnRH II 등 세가지 GnRH 호르몬이 동일 부위에 존재함이 본 연구에서 밝혀졌다. 본 실험에서는 세가지 GnRH에 특이한 3가지 항체를 각각 바로 인접 연속 절편(10  $\mu$ m 두께)에 처리하여 GnRH 면역 반응성 신경세포체의 위치를 비교 분석하였다. 연속 절편에서 각각 다른 항체에 대하여 면역 반응을 나타내는 신경세포체의 위치가 서로 다른 결과는 본 연구에 쓰인 mGnRH, sGnRH, cGnRH II 항체는 다른 종류의 GnRH와는 반응하지 않았음을 보여주고, 본 결과는 개구리의 뇌의 동일 부위에 3가지 다른 형태의 GnRH 생성 신경세포가 있음을 뜻한다.

방사면역법을 이용한 3가지 anti-GnRH 항체의 반응성 실험 결과, anti-cGnRH II(1458)와 mGnRH나 cGnRH I 사이의 교차 반응도(cross-reactivity)는 2-3%이고, sGnRH(1668)와 다른 알려진 GnRH 들과의 교차 반응도는 1% 미만(Dr. J.A. King, 자료 제공)이므로 한가지 GnRH가 비특이(non-specific) 교차





반응에 의하여 염색되었을 가능성은 배제된다.

여러 종류의 GnRH가 여러 종의 척추동물에 존재하는 것은 이미 잘 알려진 사실이다(King과 Millar, 1990). Chromatography 상의 특성 또는 면역학상의 특성에 근거하여 한 종 내에도 여러 형태의 GnRH가 존재할 것이라는 예측이 있었다. 조류, 파충류, 어류에서 2종 이상의 GnRH가 존재함이 밝혀졌다(Miyamoto 등, 1984; Powell 등, 1986; Gautron 등, 1990; Lovejoy 등, 1991). 개구리, 도롱뇽 등 양서류 뇌에서는 mGnRH(Rivier 등, 1981), salmon GnRH(Sherwood 등, 1986), chicken GnRH II(King과 Millar, 1986)가 이미 동정되었으며, 태반, 부신, 중추 신경계 등에서도 GnRH가 발견되었다. 본 연구에서 3가지 anti-GnRH 항체를 사용한 면역조직화학방법으로 개구리 뇌에서 세가지 GnRH 신경세포가 동일 부위에 동시에 존재함이 처음으로 확실하게 밝혀졌다.

그러나 연속 절편 조직에서 세가지 GnRH의 반응성은 각기 다르게 나타났다. 참개구리와 옴개구리의 뇌에서는 mGnRH가 북방산개구리의 뇌에서는 sGnRH가 강한 면역 반응성을 보였다(Table 1). 개구리의 종에 따라 우점 GnRH의 종류가 다른 이유와 의의는 알 수 없다. 개구리에는 각기 다른 GnRH에 해당하는 세가지 이상의 GnRH 유전자가 있을 가능성도 있으며, 유전자는 하나이나 종에 따라, 조직 부위에 따라 또는 발생 단계에 따라 RNA processing의 차이에 의하여 다양한 종류의 GnRH가 발현되었을 가능성도 있다(Andreadis 등, 1987; Schwarz 등, 1988)

#### GnRH 신경세포의 분포

면역조직화학적 연구 결과, 종간에 또는 논문간에 차이는 있지만 공통적으로 GnRH 신경세포체는 anterior preoptic area(APOA)에 위치하고 신경섬유가 이들 신경세포체로부터 유래하여 뇌의 배쪽 표면 가까이 위치하면서 정중 용기까지 뻗어있는 것이 밝혀졌다(Alpert 등, 1976; Goos 등, 1976; Andersen 등, 1988; Muske와 Moore, 1990). 그 외에 *Rana esculenta*에서 후각 망울, 내측 중격부, 전시각 교차앞구역, 깔대기, 피개 등 뇌의 여러 부위에서도 GnRH 신경세포체가 동정되었다(Rastogi 등, 1990).

본 연구에 사용한 한국산 개구리 3종에서도 여타 결과와 마찬가지로 종뇌의 NMS, NDB, APOA에서 GnRH 신경세포체와 신경섬유가 발견되었다. 번식기에는 이외에도 종뇌의 SCA에서 신경세포체가 간뇌의 시각교차앞핵, 시신경교차로와 정중 용기부에서 신경섬유가 발견되었다. 그러나 후각 망울, 깔대기, 내측 중격부에서는 GnRH가 동정되지 않았고, 반면에 옴개구리 뇌의 제3뇌실에서 mGnRH가 동정되었으며(Fig. 6) 참개구리의 뇌하수체 신경엽에서도 GnRH-면역 반응성이 나타났다(Fig. 4). 뇌하수체 신경엽에서의 GnRH의 분포는 또한 2종의 개구리, *R. pipiens*(Alpert 등, 1976)와 *R. esculenta*(Rastogi 등, 1990)에서 보고되었다.

옴개구리에서 최초로 GnRH 신경세포체가 제3뇌실 맥락열기에서 동정되었다. 이것은 GnRH 신경세포의 분포 경로에 있어서 기존의 보고들에서 알려진 전뇌-시상하부-뇌하수체 경로 뿐만 아니라 시상상부-시상하부-뇌하수체 축의 또다른

**Fig. 5.** Photomicrographs of brain sections showing GnRH neurons in *Rana rugosa*. Immunostainig of mGnRH neurons was appeared at the choroid plexus of third ventricle. (125×)

**Fig. 6.** Photomicrographs of sagittal section through the median eminence and pituitary showing dense immunostaining of mGnRH in median eminence in *Rana rugosa*. (125×)

**Fig. 7.** Photomicrographs of brain sections showing localization of mGnRH neurons in *Rana nigromaculata*. (A) Cross section through the anterior preoptic area corresponding at the point 1 of Fig. sGnRH-immunoreactive perikarya are distributed in NMS-NDB and fiber arised from them formed a dorsoventral column, (B) Sagittal section through the preoptic area and optic nerve. A bundle of GnRH fibers was seen in the hypothalamic area, which runs caudally to the pituitary. (C) Sagittal section through median eminence and pituitary. (125×)

**Fig. 8.** Photomicrographs of sGnRH-immunoreactive neurons in NMS-NDB in *R. dybowskii* at the breeding season. It is noted that the GnRH neurons formed dorso-ventral columnn as 'X' near the midline of the telencephalon. (125×)

경로가 존재함을 의미한다.

이와같은 GnRH 분포에 대한 면역조직화학적 연구 결과의 차이는 개구리의 뇌에 수종의 GnRH가 존재하나 이제까지의 연구가 특정한 종류의 GnRH에 대한 항체만을 사용한 까닭일 가능성이 있다. 본 연구에서는 동일 종 동일 개체에 3종의 항체를 사용하여 그 결과를 비교 분석하였다. 본 결과 비록 종간에 주된 GnRH의 종류에는 차이점이 있으나 3종류의 GnRH가 뇌의 여러 부위에서 함께 분포하므로 사용된 1차 항체의 차이에 의하여 상이한 결과가 초래되었을 가능성은 희박하다. 그러나 종에 따라 특정 부위에서 특정한 GnRH가 분포하고(Figs. 4, 5), 발생 단계 또는 계절에 따라 상이한 GnRH가 나타날 가능성도 있으므로 사용된 항체 종류에 의하여 서로 다른 결과가 얻어졌을 가능성도 완전히 배제할 수는 없다.

많은 연구자들이 개구리, 금붕어 등 여러 척추동물에서 HPLC나 방사면역측정방법에 의한 연구 결과로 조직 부위에 따른(site-specific) 상이한 GnRH의 분포 가능성을 제시하였다(Eiden 등, 1982; Yu 등, 1988). 이에 첨가하여 각 GnRH는 생물학적 활성이 다르고, 발생 단계에 따라 각 GnRH의 양이나 각 GnRH의 상대적인 양이 변화되는 점(Muske와 Moore, 1990; Rastogi 등, 1990) 연구자간의 분포 차이가 종 특이성(species-specific) 또는 부위에 따른(site-specific) 특정 GnRH의 특정 기능을 의미할 수도 있다.

### GnRH 기능

시상하부-뇌하수체-생식소로 이어지는 일련의 내분비계가 흰쥐, 사람 등 내적 생식 주기를 갖는 포유동물의 생식 주기 및 생식세포 성숙 조절 계라는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 그러나 계절적인 생식 주기를 나타내는 동물들에서는 생식 주기와 내분비계 또는 계절과 내분비계간의 상관 관계에 대한 연구는 많지 않았다.

3종의 개구리에서 공통적으로 GnRH 신경세포체는 APOA에 위치하고 이들 신경세포체로부터 유래한 신경섬유가 정중 융기까지 뻗어있는

것은 GnRH가 포유동물이나 마찬가지로 뇌하수체에서 생식소 자극 호르몬의 분비에 관여되어 있음을 시사한다. 본 실험에서 밝혀진 3종의 GnRH 모두 차이는 있으나 생식소 자극 호르몬 분비 촉진 기능이 있음이 보고되었다(Millar와 King, 1988).

본 연구에 사용한 북방산개구리 뇌에서는 GnRH 신경세포체가 여포난자가 자발적인 성숙(Kwon 등, 1989) 현상을 보이는 번식 전기와 번식기에 해당되는 특정 시기(1-3월)에만 나타나고, 다른 2종에서도 번식기에 면역 반응성이 강하게 나타났으며 GnRH 신경세포체와 신경섬유의 수가 뚜렷하게 증가하였다(Im 등, 1994). 이와 유사하게 *R. esculenta*에서 계절적인 GnRH 양의 변화가 보고되었다(Rastogi 등, 1990). 이러한 결과들은 개구리에서 GnRH가 난자 성숙, 생식 기능 또는 번식기 조절과 밀접한 연관을 갖고 있음을 의미한다. 즉, 계절적인 번식기를 갖는 개구리에서도 GnRH-gonadotropins-sex steroids의 상호 작용에 의하여 생식주기가 조절되는 흰쥐, 사람 등에서의와 마찬가지로 GnRH가 생식주기 조절의 주요 요인임을 강하게 암시한다. 그러나 개구리 뇌에서 발견되는 3종의 GnRH의 각각의 기능과 생식 주기 조절에 있어서의 역할은 밝혀진 것이 없다.

본 연구에 사용한 한국산 개구리 3종에서 번식기에는 종뇌의 NMS, NDB, SAPA 외에도 SCA에서 신경세포체가, 간뇌의 시각교차앞핵, 시신경교차로와 정중 융기부에서 신경섬유가 발견되었다. 이는 계절에 따라 뇌의 부위에 따라 GnRH가 서로 상이한 역할을 할 가능성을 제시한다.

그 외에 후각 망울, 내측 중격부, 전시각교차 앞구역, 깔대기, 피개(Rastogi 등, 1990)와 제3뇌실 백락열기, 뇌하수체 신경엽(본 연구) 등에서도 GnRH-면역 반응성이 나타났으나 이들 부위에서 GnRH의 기능은 알려지지 않았다.

참개구리에서 번식기(4-5월)외에도 활동기(7월-10월)와 동면 초기에도 GnRH-면역 반응성을 나타내는 점과 움개구리에서 다른 두 종의 개구리와는 달리 전뇌의 넓은 지역에 GnRH 신경

세포체가 분포하고 계절적인 차이에 변화의 폭이 적은 점은 GnRH가 생식 기능 외에도 신경조절자 혹은 신경전달 물질로서의 기능을 동시에 수행할 것으로 생각된다(Moore 등, 1982; Millar와 King, 1988).

그러나 3종의 GnRH가 부위에 관계없이, 상대적으로 양이 변함없이 개구리 뇌의 여러 부위에 함께 분포하는 기능상의 이유는 분명하지 않다.

### 사사

Anti-sGnRH antisera와 anti-cGnRH II antisera를 보내주신 Judy A. King(South Africa) 박사님에게 감사를 드립니다.

### 참고문헌

- Andreadis, A., M.E. Gallego and B. Nadal-Ginard, 1987. Generation of protein isoform diversity by alternative splicing: mechanistic and biological applications. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**: 207-242.
- Alpert, L.C., J.R. Brawer, I.M.D. Jackson and S. Reichlin, 1976. Localization of LHRH in neurons in frog brain (*Rana pipiens* and *Rana catesbeiana*). *Endocrinology* **93**: 910-921.
- Andersen, A.C., J.M. Danger, A. Fasolo, O. Kah, M.C. Tonon, and H. Vaudry, 1988. Immunohistochemical localization of gonadotropin-releasing-hormone-associated peptide in the brain of the frog. *J. Comp. Neurol.* **273**: 241-251.
- Burgus, R., M. Butcher, M. Amoss, N. Ling, M. Monohan, J. Rivier, R. Fellows, R. Blackwell, W. Vale and R. Guillemin, 1972. Primary structure of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) of ovine origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 278-282.
- Carmel, P.W., S. Araki and M. Ferin, 1976. Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Endocrinology* **99**: 243-248.
- Clarke, I.J. and J.T. Cummins, 1982. The temporal relationship between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* **111**: 1737-1739.
- Eiden, L.E., E. Loumaye, N. Sherwood and R.L. Eskay, 1982. Two chemically and immunologically distinct forms of luteinizing hormone-releasing hormone are differentially expressed in frog neural tissues. *Peptides* **3**: 323-327.
- Gautron, J.-P., E. Pattou, K. Bauer and C. Kordon, 1991. (Hydroxyproline) luteinizing hormone-releasing hormone: a novel peptide in mammalian and frog hypothalamus. *Neurochem. Int.* **18**: 221-235.
- Goos, H.J.Th., P.J.M. Ligtenberg, and P.J.W.J. van Oordt, 1976. Immunofluorescence studies on gonadotrophin releasing hormone (GRH) in the forebrain and the neurohypophysis of the green frog, *Rana esculenta*. L. *Cell Tissue Res.* **168**: 325-333.
- Hsu, S.M., L. Raine and H. Fanger, 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 577-580.
- Im, W.-B., J.-W. Kim, W.S. Choi, D.G. Bai, M.-S. Kim and H.B. Kwon, 1994. Reproductive cycle-related changes in GnRH immunoreactivity in the brain of three congeneric species of frog. *Kor. J. Zool.* (in press)
- Kemali, M. and V. Braitenberg, 1969. "Atlas of the frog's Brain." Springer-Verlag, Berlin/New York.
- King, J.A. and E.L.P. Anthony, 1984. LHRH neurons and their projections in humans and other mammals: species comparisons. *Peptides* **5(suppl)**: 195-207.
- King, J.A. and R.P. Millar, 1986. Identification of His<sup>5</sup>-Trp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-GnRH (chicken GnRH II) in amphibian brain. *Peptides* **7**: 827-834.
- King, J.A. and R.P. Millar, 1990. Genealogy of the GnRH family. *Prog. Comp. Endocrinol.* 54-59.
- Kwon, H.B., Y.K. Lim, M.J. Choi and R.S. Ahn, 1989. Spontaneous maturation of follicular oocytes in *Rana dybowskii* *in vitro*: Seasonal influences, progesterone production, and involvement of cAMP. *J. Exp. Zool.* **152**: 190-199.
- Licht, P., D.A. Porter and R.P. Millar, 1987. Specificity of amphibian and reptilian pituitaries for various forms of gonadotrophin-releasing hormone *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **66**: 248-255.
- Lovejoy, D.A., W.H. Fischer, D.B. Parker, J.E. McRory, M. Park, V. Lance, P. Swanson, J.E. Rivier and N.M. Sherwood, 1991. Primary structure of two forms of gonadotropin-releasing hormone from brains of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Regulatory Peptides* **33**: 105-116.
- Matsuo, J., Y. Baba, R.M.G. Nair, A. Arimura and A.V. Schally, 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-

- releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**: 1334-1339.
- Millar, R.P. and J.A. King, 1988. Evolution of gonadotropin-releasing hormone: multiple usage of a peptide. *News in physiological Sciences* **3**: 49-53.
- Miyamoto, K., Y. Hasegawa, M. Nomura, M. Igarashi, K. Kangawa, and H. Matsuo, 1984. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3874-3878.
- Moore, F.L., L.J. Millar, S.P. Spielvogel, T. Kubiak, and K. Folkers, 1982. Luteinizing hormone-releasing hormone involvement in the reproductive behavior of a male amphibian. *Neuroendocrinology* **35**: 212-216.
- Muske, L.E. and F.L. Moore, 1990. Ontogeny of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone neuronal systems in amphibians. *Brain Res.* **534**: 177-187.
- Nozaki, M. and H. Kobayashi, 1979. Distribution of LHRH-like substance in the vertebrate brain as revealed by immunohistochemistry. *Arch. Histol. Jpn.* **42**: 201-209.
- Powell, R.C., R.P. Millar and J.A. King, 1986. Diverse molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in an elasmobranch and a teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**: 77-85.
- Rastogi, R.K., M.D. Meglio, and L. Iela, 1990. Immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone in the frog (*Rana esculanta*) brain: Distribution pattern in the adult, seasonal changes, castration effects, and developmental aspects. *Gen. Comp. Endocrinol.* **78**: 444-458.
- Rivier, J., C. Rivier, D. Branton, R.P. Millar, J. Spiess and W. Vale, 1981. HPLC purification of ovine CRF, rat extrahypothalamic brain somatostatin and frog brain GnRH. In: *Peptides: Synthesis, Structure-Function* (Rich D.H. and Gross E. eds), pp. 771-776. Pierce Chemical Co., Rockford, IU.
- Schwarz, T.L., B.L. Tempel, D.M. Papazian, Jan, Y.N. and L.Y. Jan, 1988. Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*. *Nature* **331**: 137-142.
- Sherwood, N.M. 1986. Evolution of a neuropeptide family: gonadotrophin-releasing hormone. *Amer. Zool.* **26**: 1041-1054.
- Sherwood, N.M., R.T. Zoeller, and F.L. Moore, 1986. Multiple forms of gonadotropin-releasing hormone in amphibian brains. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**: 313-322.
- Silverman, A.J., 1988. The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry. In: E. Knobil and J.D. Neill (eds.), *The Physiology of Reproduction*. Ravan Press, New York, pp. 1283-1304.
- Silverman, A.J., L.C. Krey and E.A. Zimmerman, 1979. A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks in mammals. *Biol. Reprod.* **20**: 98-110.
- Yu, K.L., N.M. Sherwood and R.E. Peter, 1988. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides* **9**: 625-630.

(Accepted February 19, 1994)

---

**Localization of Gonadotropin Releasing Hormone (mGnRH, sGnRH and cGnRH II) in the Brain of three species of Frog, *R. nigromaculata*, *R. dybowskii* and *R. rugosa***

Jeong-Woo Kim, Wan Sung Choi\*, Myeong Ok Kim\*, Hyuk Bang Kwon, Chul Ho Ra and Wook-Bin Im (Dept. Biol., Coll. Nat. Sci., Chonnam Natl. Univ., Kwangju and \*Dept. Anatomy, Coll. Med., Gyeongsang Natl. Univ., Chinju)

Using immunohistochemical techniques with different antisera against mGnRH, sGnRH and cGnRH II, the distribution of different GnRHs was studied in the brain of three species of frog, *Rana nigromaculata*, *R. dybowskii* and *R. rugosa*. The data presented here demonstrate the co-localization of the three types of GnRH, such as mGnRH, cGnRH II and sGnRH at the same brain areas in three species of frog. Through all brain areas mGnRH immunoreactivity is the strongest among three variants in *R. nigromaculata* and *R. rugosa* whereas sGnRH is the strongest in *R. dybowskii*. cGnRH II showed medial immune reactivities in all frog species. In *R. nigromaculata* GnRH neurons were localized mainly in nucleus medialis septi (NMS) and nucleus diagonal band of Broca (NDB) regions. In *R. dybowskii* GnRH perikarya distributed in NMS and NDB formed narrow band. Especially the GnRH immunoreactivity was appeared only in ovulation period. In *R. rugosa* GnRH perikarya were distributed on a wide range of brain areas, NMS, NDB and subcommisural area. In addition GnRH neurons were appeared at the choroid of third ventricle. In three species of frog, axonal projections arised from NMS and NDB appeared through the ventral hypothalamus to the median eminence, indicating implication in the regulation of the gonadotropin secretion from the pituitary.