

산란계의 뇌하수체 세포배양에서 Prolactin의 생성에 관계하는 Protein Kinase C의 역할

선 상 수

전남대학교 동물자원학과

The Role of Protein Kinase C for Prolactin Secretion in Chicken Primary Pituitary Cell Culture

Sang Soo Sun

Department of Animal Science, Chonnam National University, Kwangju, Korea 500-757

ABSTRACT

A series of experiments were conducted to investigate the role of protein kinase C(PKC) as a second messenger in vasoactive intestinal peptide (VIP) mediated prolactin secretion. Primary pituitary cells (10⁶ cells /treatment) were separated from laying hens and incubated in M-199 with 5% chicken serum and 5% fetal calf serum. The VIP(0.1 μM) treatment enhanced prolactin secretion into media upto 9-fold during 48-h incubation. The phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a PKC agonist, increased prolactin secretion upto 2-fold at 0.1 nM PMA (P<0.01), and the prolactin secretion was not significantly higher than this concentration. Staurosporine (ST; 1.0 μM), a PKC antagonist, decreased by 70% of 0.1 μM VIP-stimulated prolactin secretion and by 48% of 10 nM PMA-stimulated prolactin secretion (P<0.01). However, pituitary cell prolactin content did not differ in any treatment (P>0.05). In conclusion, these results indicate that the PKC second messenger system is involved in VIP-stimulated prolactin release in chicken primary pituitary cell culture.

(Key words : chicken, prolactin, VIP, PKC, pituitary cell)

서 론

Prolactin은 동물의 생리작용 뿐만 아니라 동물의 행동습관과 젖생산에 중요한 호르몬이다. 특히 가금의 就巢 시기에 prolactin의 혈중농도가 현저히 증가하고 난생산을 중지하는 기작이 있다. 이 시기에 vasoactive intestinal peptide (VIP) 혈중농도 또한 증가하여 prolactin의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다. Prolactin의 합성과 분비는 시상하부, 뇌하수체 및 여러 주변 조직들에서 기인하는 많은 요인들에 의하여 조절된다. VIP는 시상하부와 뇌하수체 전엽에서

생성·분비되며, 뇌하수체 기능 조절에 기여하는 것으로 알려져 있다 (Toni 등, 1992; Arnaout 등, 1986; Hagen 등, 1986).

호르몬들은 체내의 각 세포에 작용하기 위하여 신호 전달 체계를 밀접하게 관련되어 있다. 호르몬 즉 제1차 신호전달 물질은 혈류를 타고 각 기관에 도착하여 세포막에 존재하는 각각의 수용체에 정보를 전달하고, 세포막내의 여러 경로 즉 제2차 신호전달 물질 (c-AMP, cGMP, Ca²⁺, diacylglycerol, protein kinase 등)을 통하여 핵속의 유전자에 까지 그 신호를 전달한다 (Greengard, 1978; Robinson, 1991). 신호를 받은 DNA는 필요한 단백질을 합성한다. 세포내에

서 일어나는 이러한 일련의 신호전달 체계는 독특하며 여러 다른 물질들과 상호 긴밀한 연관을 가지고 있다.

Protein kinase C (PKC)는 호르몬, 성장인자, 신경 전달물질 등에 의하여 기인되는 신호를 세포 내부로 전달하는 과정에서 중요한 역할을 담당한다(Berridge, 1987). 그러나, 가금의 뇌하수체 세포에서의 VIP로부터 prolactin에 이르는 신호전달 체계는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. 최근 포유류에서의 연구에 의하면 VIP는 Ca^{2+} /calmodulin, PI, cAMP/PKA, DAG/PKC, arachidonic acid 등의 다양한 제2차 전달계와 관련이 있다고 알려지고 있다 (MacLeod 등, 1988; Neill과 Nagy, 1994). 그러므로, 본 연구는 VIP의 prolactin 생성을 촉진하는 과정에서 제2차 신호전달 물질로서 PKC의 역할을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 뇌하수체 세포의 분리

산란계로부터 분리한 뇌하수체는 즉시 M-199, 5% chicken serum(CS), 5% fetal calf serum (FCS)으로 구성되어 있는 조직 보존배지에 넣었다. 뇌하수체 세포들은 수정된 trypsin/neuraminidase 방법 (Hopkins와 Farquhar, 1973)을 이용하여 분리하였다. 잘게 절단된 뇌하수체 조직들은 Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB)용액 (50× amino acid minimum Eagle, 2.5 mg/mL glucose, 3 mg/mL BSA, 0.3 mg/mL glutamine sulfate, 100 μg/mL gentamicin)에서 세척하였다. 뇌하수체 조직들은 Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 들어있지 않는 KRB 용액에서 trypsin과 neuraminidase 효소를 이용하여 분해하였다. 세포 부유물은 여과하여 큰 조직은 분리하고, 400 g에서 15분간 원심분리하였다. 上澄용액은 부어내고 잔여 세포 펠렛을 세포 배양배지에 부유시켰다. 완전히 분리된 세포들은 실리콘으로 코팅된 삼각 플라스크에서 처음 24시간 동안 예비배양하였다 (38.5°C, 5% CO₂, 95% air). 배양 후 세포 부유물은 400 g에서 5분간 원심분리하고, 세포 펠렛은 세포 배양배지에 다시 부유시킨다. 세포 생존능력은 trypan blue색소 추출법으로 염색한 후, hemocytometer에서 살아있는 세포

와 죽어있는 세포의 숫자를 세어 결정하였다.

2. 세포배양 및 호르몬 처리

분리된 뇌하수체 세포들은 (약 10⁶/mL) 1 mL 배양배지 (M-199, 5% FCS, 5% CS)로 세포배양관에서 48시간 배양하였다. 호르몬들(VIP, PMA, staurosporine)은 배양배지에 직접 100배로 희석하여 처리하였다. 48시간 처리후 세포부유물은 400 g에서 15분간 원심분리하여 上澄용액은 prolactin 분석을 위하여 -20°C에 보관하였다.

3. 실험계획

1) 실험 1

세포배양 시간이 prolactin 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 분리된 뇌하수체 세포들은 10⁻⁷M VIP 처리하에 0, 24, 48, 72시간 동안 배양하였다.

2) 실험 2

PKC 촉진물질인 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)가 prolactin 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 분리된 세포들은 0, 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸, 10⁻⁶M PMA 처리하에 실험 1의 결과에 따라 48시간 동안 배양하였다.

3) 실험 3

PKC 억제물질인 staurosporine (ST)이 prolactin 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 분리된 세포들은 먼저 1.0 μM ST을 처리한 후, 100 nM VIP와 10 nM PMA를 각각 처리하여 48시간 동안 배양하였다.

4. 방사성 면역 분석법에 의한 prolactin 분석

세포배양 배지와 세포 sample의 prolactin은 Proudman과 Opel (1981)방법에 의하여 분석하였다.

5. 통계분석

모든 data는 SAS(1985)의 general linear model (GLM)로 분석하였다. 각각의 data점들은 3회 실험, 실험당 4반복의 평균치와 표준편차로 나타내었다. 각

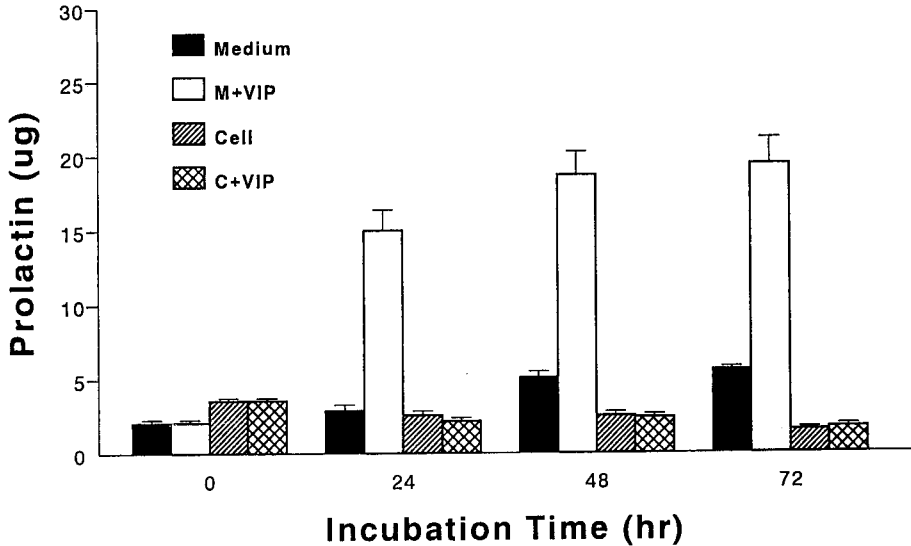


Figure 1. Effect of incubation time on prolactin secretion by VIP stimulation. Chicken primary pituitary cells (10^6 cells/tube) were incubated with or without $0.1 \mu\text{M}$ VIP for 0, 24, 48, 72 hrs in M-199. Each point represents mean \pm SEM of three separate experiments with four replicate incubation (M+VIP: medium after VIP treat; C+VIP: cell after VIP treat).

실험의 data는 Duncan(1955)의 다중검정법으로 평균간 유의성을 분석하였다.

결 과

분리된 뇌하수체 세포들을 100 nM VIP 처리하여 0, 24, 48, 72시간 동안 배양한 결과에 의하면, prolactin의 세포 배양액내 분비는 VIP의 처리에 의하여 약 9 배 증가하였다 (Figure 1). 세포배양 배지로의 prolactin 방출은 VIP처리 24시간 이후에 $2.3 \mu\text{g} / 10^6 \text{ cell}$ 로부터 $20.7 \mu\text{g} / 10^6 \text{ cell}$ 로 유의적으로 증가하였다 ($P < 0.01$). 그러나 prolactin의 방출량은 48시간 배양과 72시간 배양 사이에는 변화가 없었다. 세포 내부에 남아있는 prolactin의 양은 세포배양 시간에 따라 약간 감소하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 세포내에 잔류하는 prolactin의 양은 VIP의 처리에 의하여 배양후 24, 48시간 까지 약간 감소하였으나, 72시간 배양에서는 조금 증가하는 경향을 보였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때, VIP는 가끔 뇌하수체 세포배양에서 prolactin의 생성과 방출을 촉진하는

것으로 보인다.

PKC 촉진물질인 PMA가 prolactin 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 분리된 세포들은 $0, 10^{-12}, 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-6} \text{M}$ PMA 처리하에 48시간 동안 배양하였다. Prolactin생성은 0.1 nM PMA 처리구에서 무처리구에 비하여 $17.2 \mu\text{g} / 10^6 \text{ cells}$ 로서 2배 증가하였고 ($P < 0.01$), 그 이상의 농도인 10 nM $1 \mu\text{M}$ 처리구에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Figure 2). 세포내에 존재하는 prolactin의 양은 비록 유의적인 차이는 보이지 않았지만 PMA 처리 수준에 따라 감소하는 경향을 보였다. 또한 prolactin 생성량이 무처리구에 비하여 1.0 pM PMA처리구에서 약간 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다.

PKC 억제물질인 ST가 prolactin 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 분리된 세포들은 먼저 $10 \mu\text{M}$ ST를 처리하여 PKC 활성을 억제한 후, 100 nM VIP와 10 nM PMA를 각각 48시간동안 처리하였다 (Figure 3). Prolactin 생성은 대조구에 비하여 VIP 처리구에서는 30% 이하로 감소하였고, PMA 처리구에서는 50% 이하로 감소하였다 ($P < 0.01$). 이 수준

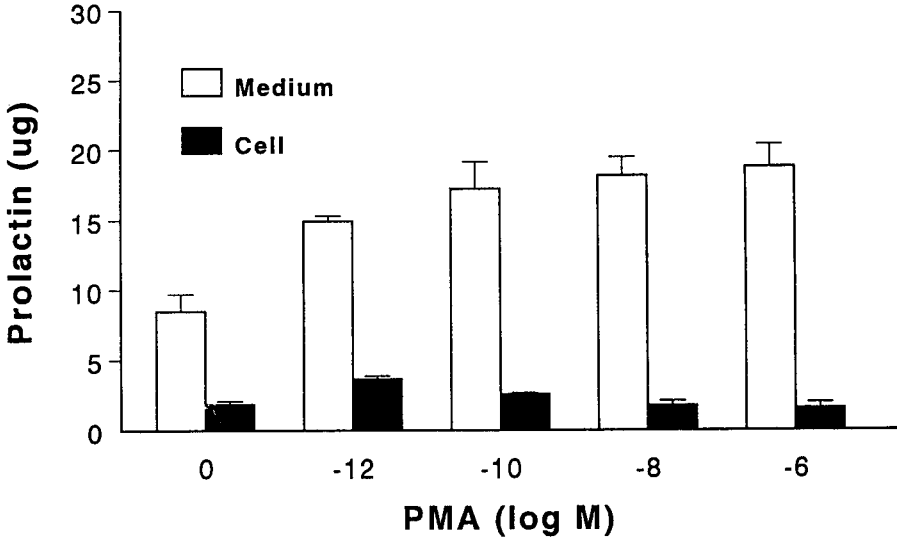


Figure 2. Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a PKC agonist, on prolactin secretion. Chicken primary pituitary cells (10^6 cells /tube) were incubated with 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M VIP for 48hrs in M-199. Each point represents mean \pm SEM of three separate experiments with four replicate incubation.

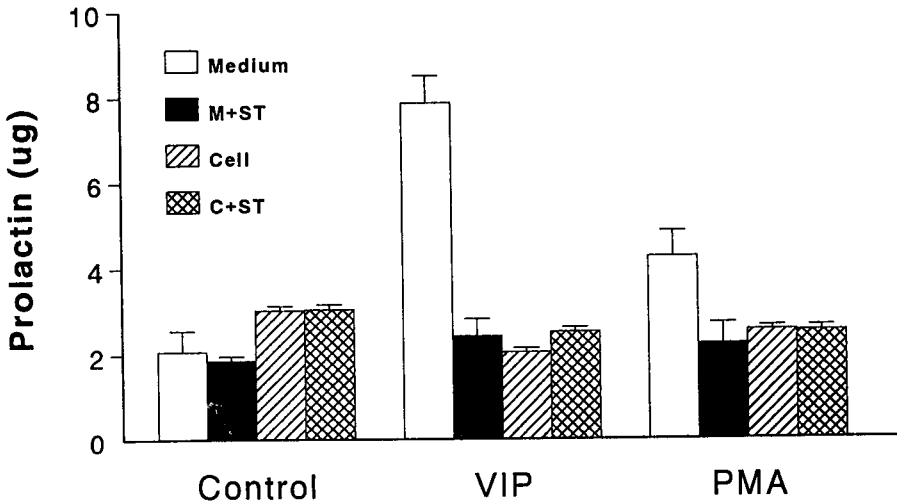


Figure 3. Effect of staurosporine (ST), a PKC antagonist, on prolactin secretion. Chicken primary pituitary cells (10^6 cells /tube) were treated with 1.0uM ST for 30 min and then challenged with or without 100nM VIP or 10 nM PMA for 48hrs in M-199. Each point represents mean \pm SEM of three separate experiments with four replicate incubation (M+ST: medium after ST; C+ST: cell after ST treatment).

은 대조구에 비하여 약간 높지만 유의적인 차이는 없었다. 세포내 prolactin 함량은 두 가지 처리에서 모두 유의적인 차이는 보이지 않았고, 대조구에 비하여 오히려 감소하는 경향을 보여주고 있다.

고 찰

가금에 있어서 VIP는 prolactin 생성에 특이하게 작용하고 촉진하는 것으로 알려져 있다 (El Hala-wani 등, 1990; Pitts 등, 1994). 본 연구에 의하면 VIP는 prolactin 생성을 9배 이상 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 VIP가 상위기관인 시상하부에서 생성되어 뇌하수체에 작용하여 prolactin의 생성을 촉진하는 것으로 보여진다. 본 연구에서는 *in vitro* 세포배양에 의한 것이지만 다른 *in vivo* 실험의 결과에서도 유사하게 나타나고 있다. Maurer 등(1989)은 VIP를 산란중인 칠면조에 투여한 결과 prolactin 혈중농도가 증가하였다고 보고하였다. 또한 VIP를 정맥 주사한 경우에도 유사한 결과를 보였다. 이와는 반대로, 뇌하수체 세포내 prolactin 함량이 감소한 것은 VIP에 의하여 prolactin 함량이 증가하지만 방출량도 또한 증가한 것으로 여겨진다.

본 연구에 의하면 PMA는 PKC 신호전달체계를 이용하여 prolactin생성을 증가시키는 것으로 나타났다. 가금의 뇌하수체에서 prolactin의 생성에 adeny-late cyclase (AC) 활성 증가, phosphoinositide 변환, Ca^{2+} 농도의 변화 등의 제 2차 전달계 등이 관계하지만 (Shull과 Gorski, 1986; Schimatsu 등, 1981), 본 연구에 의하면 PKC를 이용한 신호 전달계도 직접적으로 관여하고 있는 것으로 보인다. 이는 아마도 특이 VIP 수용체가 cAMP와 결합을 이루어 복합체로서 작용하는 것으로 사료된다. 포유류의 연구결과들을 종합하여 보면 VIP를 정맥주사하면 세포내 AC 활성과 cAMP 수준이 5배 이상 증가한다고 한다(Reimer 등, 1994). 사람의 경우에서도 prolactin 합성과 방출에 PKC 신호전달 체계가 관여되어 있다고 보고되어 있다. 그러나 이러한 PKC 외에도 VIP에 의하여 MAP kinase 활성이 증가될 수도 있고 (Okumura 등, 1994), DAG의 활성이 촉진되는 다른 경로를 이용할 수 있다는 것을 배제할 수 없다.

VIP와 PMA의 동시처리에 의한 상승작용이 없는 것으로 미루어 볼 때, 이는 prolactin 생성에 같은 신호전달 체계를 이용하고 있다고 생각된다. 유전자 발현에 관한 한 더욱 더 조사를 해보아야 하겠지만, 다른 연구에 의하면 쥐의 lactotroph 세포에서 12-O-tetradecanolyphorbol 13-acetate 처리에 의하여 prolactin 유전자 발현이 완전히 억제되는 것을 볼 수 있다 (Chuang 등, 1993). 본 연구에서도 PKC 억제제인 ST 처리에 의하여 가금의 뇌하수체 세포배양에서 prolactin의 생성이 억제되었고, 이러한 억제효과는 VIP나 PMA의 촉진효과를 제거했다. 유사한 효과가 가금의 granulosa 세포에서도 보고되었다. 결론적으로 VIP와 PMA는 가금의 뇌하수체 세포배양에서 prolactin의 생성을 촉진하고, ST는 억제하여 PKC 신호전달 체계와 관련을 맺고 있는 것으로 보인다.

적 요

본 연구는 산란계의 뇌하수체 세포배양에서 VIP에 의한 prolactin 생성 촉진과정에서 PKC의 역할을 규명하기 위하여 수행되었다. 제1차 뇌하수체 세포 (10^6 세포/처리)는 산란계에서 분리하여 배양배지 (M-199, 5% chicken serum, 5% fetal calf serum)에서 배양하였다. 0.1 μ M VIP를 처리한 결과 prolactin 생성은 48시간까지 9배 수준으로 유의적으로 증가하였고 ($P < 0.01$), 그 이후에는 유의적인 변화가 없었다. PKC 촉진제인 PMA를 48시간 처리한 결과 처리수준에 따라 prolactin 생성은 증가하여 0.1 nM 수준에서 유의차가 인정되었고 ($P < 0.01$), 그 이상의 수준에서는 유의차가 없었다. PKC 억제제인 staurosporine을 1.0 μ M 수준에서 30분 동안 전처리하여 PKC 신호전달 체계를 억제한 후에 0.1 μ M VIP와 10 nM PMA로 활성화 시켰으나 각각 70%와 48%의 prolactin 생성의 감소효과를 나타냈다 ($P < 0.01$). 또한 위의 모든 실험에서 세포내의 prolactin 함량에는 변화가 없었다 ($P > 0.05$). 결론적으로 산란계의 제1차 뇌하수체 세포배양에서 VIP에 의한 prolactin의 생성촉진 과정에 PKC를 이용한 제2차 신호전달 체계가 관여하고 있는 것으로 보여진다.

(색인: protein kinase C, prolactin, VIP, 산란

계, 뇌하수체)

사 사

이 논문은 1994년 전남대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

인용문헌

Arnaout MA, Garthwaite TL, Martinson DR, Hagen TC 1986 Vasoactive intestinal polypeptide is synthesized anterior pituitary tissue. *Endocrinol* 119: 2052-2057.

Berridge MJ 1987 Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem* 56:159-193.

Chuang TT, Caccavelli L, Kordon C, Enjalbert A 1993 Protein kinase C regulation of prolactin gene expression lactotroph cells: involvement in dopamine inhibition. *Endocrinol* 132:832-838.

El Halawani ME, Silsby JL, Mauro LJ 1990 Enhanced vasoactive intestinal peptide-induced prolactin secretion from anterior pituitary cells of incubating turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Gen Comp Endocrinol* 80:138-145.

Greengard P 1978 Phosphorylated proteins as physiological effectors. *Sc* 199:146-152.

Hagen TC, Arnaout MA, Scherzer WJ, Martinson DR, Garthwaite TL 1986 Antisera to vasoactive intestinal polypeptide inhibit basal prolactin release from dispersed anterior pituitary cells. *Neuroendoc* 43:641-645.

Hopkins CR, Farquhar MG 1973 Hormone secretion by cells dissociated from rat anterior pituitaries. *J Cell Biol* 59:276-303.

MacLeod RM, Judd AM, Spangelo BL, Ross PC, Jarvis WD, Login IS 1988 Systems that regulate prolactin release. In: PRL Gene

Family and Its Receptors. Elsevier Sci Pub, K. Hoshino, editor, Pages 13-27.

Maurer RA 1989 Both isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit can activate transcription of the prolactin gene. *J Biol Chem* 264:6870- 6873.

Neill JD, Nagy GM 1994 Prolactin secretion and its control. In: *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed, E Knobil and JD Neill ed, Raven Press, Pages 1833-1860.

Okumura N, Miyatake Y, Takao T, Tamaru T, Nagai K, Okada M, Nakagawa H 1994 Vasoactive intestinal peptide induces differentiation and MAP kinase activation in PC12h cells. *J Biochem* 115:304-308.

Pitts GR, Youngren OM, Silsby JL, Foster LK, Foster DN, Rozenboim I, Phillips RE, El Halawani ME 1994 Role of vasoactive intestinal peptide in the control of prolactin-induced turkey incubation behavior. I. Acute infusion of vasoactive intestinal peptide. *Biol Reprod* 50:1344-1349.

Proudman JA, Opel H 1981 Turkey prolactin: Validation of a radioimmunoassay and measurement of changes associated with broodiness. *Biol Reprod* 25:573-580.

Reimer R, Odes HS, Muallem R, Schwenk M, Beil W, Sewing KFR 1994 Cyclic adenosine monophosphate is the second messenger of prostaglandin E₂ and vasoactive intestinal polypeptide-stimulated active bicarbonate secretion by guinea-pig duodenum. *Scand J Gastroenterol* 29:153-159.

Robinson PJ 1991 The role of protein kinase C and its neuronal substrates dephosphin, B-50, and MARKCKS in neurotransmitter release. *Mol Neurobiol* 5:87-130.

SAS Institute 1985 SAS[®] User's Guide: Statistics, 5th ed, Cary, NC.

Shimatsu A, Kato Y, Matsushita N, Katakami

H, Yanaihara N, Imura H 1981 Immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in rat hypophysial portal blood. *Endocrinol* 108:395-398.

Shull JD, Gorski J 1986 The hormonal regulation of prolactin gene expression: an examination of mechanisms controlling prolactin synthesis and the possible relationship of

estrogen to these mechanisms. *Vitamins and Hormones* 43:197-249.

Toni R, Kakucska I, Mosca S, Marrama P, Lechan RM 1992 Hypothyroidism increases vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactivity and gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinol* 131:976-978.