J. Korean Fish. Soc. 30(2), 282~290, 1997

한수지, 30(2), 282~290, 1997

뱀장어의 *in vitro* Vitellogenin 합성에 대한 Estradiol과 뇌하수체 호르몬의 영향

권 혁 추
선문대학교 식량자원학과

Effects of Estradiol and Pituitary Hormones on *in vitro* Vitellogenin Synthesis in the Eel, *Anguilla japonica*

Hyuk-Chu KWON
Dept. of Food Resources, Sun Moon University, Chung-Nam 336-840, Korea

Hepatocytes of *Anguilla japonica* have been prepared using a collagenase perfusion technique. The isolated cells attached efficiently to fibronectin-coated culture dishes and subsequently formed monolayers in serum-free medium. These cultures maintained in appropriate medium at least for 10 days with minimal cell loss.

The effects of estradiol and pituitary hormones on vitellogenin (Vg) synthesis were examined in primary hepatocyte culture of the immature eels. In fish, as in other oviparous vertebrates, estrogen is a major inducer of Vg synthesis. However, estradiol-17 β (E_2) alone was insufficient to induce Vg synthesis in cultures of eel hepatocytes. Combination of E_2 with growth hormone (GH) and/or prolactin (PRL) markedly stimulated Vg synthesis. Even in cultures exposed to E_2 or precultured without hormones for 8 days, E_2 alone could not fully induce Vg synthesis. The synthesis of Vg was dramatically increased when hepatocytes were cultured in medium supplemented with E_2+GH+PRL for 6 days. At this point, even though GH and/or PRL were eliminated from the medium, Vg synthesis was not influenced by these factors during culture of further 3 days. These results indicate that pituitary hormones, in particular GH and PRL, play important roles in the regulation of Vg synthesis in primary cultures of eel hepatocytes.

Key words : *Anguilla japonica*, vitellogenin, hepatocyte culture, estradiol, pituitary hormone

서 론

난생척추동물에 있어서 vitellogenin (Vg)은 雌性호르몬인 estradiol-17 β (E_2)의 자극에 의해 肝臟에서 합성되는 지질, 당, 인을 포함하는 고분자 단백질이다. 합성된 Vg은 血流를 통해 성숙중인 난모세포에 흡수되어 난황을 형성하며, 수정후 배발달의 영양물질로서 중요한 역할을 한다 (Ng and Idler, 1983; Wallace, 1985; Ho, 1987; Mommsen and Walsh, 1988).

조류, 파충류, 양서류 및 여러 魚種에서 Vg의 생화학적, 분자생물학적 특성이 밝혀져 오고 있으며 (Hara and Hirai, 1978; Gavaud, 1986; Vaillant et al., 1988), 이들 동물들의 암컷은 물론 수컷 및 미성숙 개체에 외부로부터 E_2를 투여하면 Vg은 합성되어 지는 것으로 보고되어 왔다 (Gerstle and Callard, 1972; Wangh and Knowland, 1975; Emmersen et al., 1976; Eliott et al., 1979; Sundararaj and Nath, 1981; Kwon et al., 1990). 또한 E_2 이외에 갑상선, 부신피질호르몬 및 웅성호르몬 등이 Vg합성에 간접적으로 관여함을 보고하였으며 (Hori et al., 1979; Le Menn, 1980; Wangh, 1982; Wangh and Schneider, 1982), 뇌하수체호르몬이 Vg합성에 중요한 역할을 한다는 연구가 조류 (Boehm et al., 1988), 파충류 (Callard et al., 1972; Ho et al., 1982; Ho et al., 1985; Paolucci, 1989), 양서류 (Gobbetti et al., 1985; Carnevali et al., 1992) 및 어류 (Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal, 1991) 등에서 발표되어져 왔다. 그러나 대부분의 연구들이 in vivo 또는 간조직 배양에 의해 이루어 졌으며, 본 연구에서와 같이 初代培養肝細胞를 이용하여 Vg의 합성유도를 시도한 연구는 많지 않다.

어류의 간세포배양은 mouse나 rat와는 달리 간세포를 부착시키고, 유지하는데 필요한 기질 및 배양조건 등의 미비로 간세포배양법의 확립에 어려움을 겪어 왔다.

최근 Kwon et al. (1993)과 Kwon and Mugiya (1994)는 무지개 송어 및 뱀장어의 간세포 배양계를 확립하여 Vg 합성을 유도하고, 효소면역측정법을 이용하여 배양액에 합성분비된 Vg을 직접 측정하는 등 (Kwon et al., 1990) 어류의 Vg합성 메카니즘을 명확하게 밝히기 위한 여러 가지 편리한 방법들을 개발해 왔다. 이들은 무지개 송어의 세포배양 실험에있어서는 갑상선 호르몬 등 다른 내분비의 영향없이 E_2만으로 Vg이 합성되어 지나 (Kwon

et al., 1993), 뱀장어 경우는 E_2만으로 Vg합성은 충분치 못하고, E_2와 성장호르몬 및 프로락틴과의 공동작용에 의해 합성 분비된다는 것을 시사한 바 있다 (Kwon and Mugiya, 1994). 이처럼 뱀장어의 Vg합성이 E_2만으로 합성되어 지지 않는다는 사실은 상당히 흥미있는 것이다. 그러나 E_2만으로 Vg이 합성되어 지지않는 이유가 배양세포의 상태, 호르몬을 처리하는 시기 및 세포내에 존재하는 내인성 요소들에 대한 영향을 받고 있는지 검토되어야 한다.

따라서 본 연구는 뱀장어 Vg합성에 대한 뇌하수체 호르몬의 영향을 보다 명확히 하기 위한 연구로써 특히 간세포내에 존재하는 내인성 호르몬들의 영향, 즉 세포내에 Vg합성을 억제하는 요소 또는 호르몬들이 존재하는지에 대해 조사하기위해 세포를 장기간 preculture하거나 E_2만으로 장기간 처리하여 배양하였을 경우, 뇌하수체호르몬이 Vg합성에 어떤 영향을 미치는지에 대해 검토했다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

체중 200~250 g의 뱀장어를 양식장 및 수산물 시장에서 구입하여 즉시 사용하거나 수온 20℃의 담수에서 적응후 실험에 이용하였다. 사육기간 동안 사료는 급이하지 않았다. 암수의 구별은 하지않았으며, 이들의 생식소는 모두 육안으로 판별하기 어려울 정도의 미성숙개체 였다.

2. 간세포 분리

뱀장어의 간세포 분리는 Kwon and Mugiya (1994)의 방법을 다소 수정하여 행하여졌다. 즉, 0.01%의 $NaHCO_3$를 포함하는 0.1%의 MS 222로 마취한 후 복부를 절개하여 간을 적출하여 Ca^{++} -Ringer액 (120mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM KH_2PO_4, 23 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, pH7.4)을 간문맥을 통하여 5분간 관류하여 혈액등의 불순물을 제거하였다. 다음에 collagenase (0.5 mg/ml; Wako Pure Chemical Ind., Japan; Type Ⅳ)를 포함하는 Ca^{++} -free Ringer액으로 약 20분간 관류하여 간을 소화시켰으며, Ca^{++}과 Mg^{++} -free의 Ringer액 30 ml을 주입하여 효소의 활성을 억제하였다. 소화된 간은 쓸개를 제거한 후 50 ml의 Ca^{++} -free Ringer액에 넣어 수술용 가위로 가볍게 썰은 후 피펫팅에 의해 세포현탁액으로 만들었다. 나일론 망 또는 플랑크톤 망을 이용해서 세포현탁액을 50ml용 원심관내로 여과 시켰다. 여과된 세포현탁액을 50× g로 90초간 원심분리시켜 肝實質細胞 이외의 물질들을 제거하였다. 이러한 절차를 3번 반복하여 얻어진 펠렛트화된 세포에 Ringer액을 첨가하여 10 ml의 현탁액으로 하였다. 세포의 생존율은 trypan blue를 이용하여 판별하였으며, 세포수는 혈구 계산판을 이용하여 계산하였다.

3. 세포 배양

dish당 3×10^5개의 간세포를 3 ml의 배양액과 함께 60 mm의 플라스틱 Petri dish (Falcon)에서 배양하였다. 배양액은 0.2 μM bovine insulin, streptomycin (100 μg/ml)과 penicillin (70 μml)을 포함하는 William's E medium을 이용하였으며, 25℃에서 fibronectin이 coating된 dish를 사용하여 CO_2 incubator (5% CO_2, 95% O_2)에서 세포를 배양하였다. 각각의 호르몬을 포함하는 배양액은 24시간마다 교환하였다. 배양액 교환시 dish 및 세포들에 묻어 있는 호르몬들을 제거하기 위해 호르몬 무첨가배양액으로 3번 씻어낸 후 교환하였다.

4. 호르몬 처리

estradiol-17 β (Sigma)는 95% 알콜에, 소 성장호르몬 (Sigma) 및 돼지 프로락틴 (Chemicon Int., Inc.)은 0.65% NaCl에 용해하여 배양액에 첨가하였다. 스테로이드 호르몬을 용해하기 위해 사용된 알콜 농도는 배양액중 0.1%를 넘지 않도록 했다.

5. Vitellogenin의 精製 및 항혈청 준비

뱀장어 Vg은 Wiley et al. (1979)의 방법에 따라 $MgCl_2$-EDTA 침전법에 의해 분리했다. 먼저 Vg이 포함된 혈청을 얻기위해 魚體重 Kg당 5 mg의 E_2를 propyleneglycol에 용해하여 뱀장어의 복강에 주사한 뒤 10일후에 尾部를 절단하여 혈액을 채취하였다. 원심분리에 의해 얻어진 5 ml의 혈청에 20 mM EDTA를 첨가하여 NaOH로 pH를 7.7이 되게 조정한 후 0.5 M $MgCl_2$ 1.6 ml를 더해 2,500× g로 15분간 원심분리하였다. 얻어진 침전물에 1 M NaCl를 포함하는 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충액 3 ml를 넣어 용해, 2,500× g로 30분간 원심분리한 후 상층액에 25 ml의 빙냉시킨 증류수를 더하여 다시 2,500× g 15분간 원심분리하였다. 침전물에 上記의 Tris-HCl 완충액 3 ml로 용해하여 17시간 동안 같은 완충액을 이용하여 투석하였다. 보다 순수한 Vg을 정제하기 위해 Sepharose 6B column (0.02M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 2% NaCl and 0.1% NaN_3)을 이용하였다.

정제된 Vg에 같은 양의 Freund's complete adjuvant를 혼합하여 乳化 (emulsion)시킨 후 토끼에 주사하였다. 항

원은 1주일 간격으로 4회 주사하였으며, 최종주사 1주일 후에 토끼 귀의 정맥을 통하여 항혈청을 채취한 후, 같은 양의 미성숙 뱀장어 혈청을 넣어 4℃에서 20시간 반응시킨 흡수 항혈청을 만들어 사용시 까지 -20℃에 보관하였다.

6. Sample처리 및 전기영동

간세포 배양에 의해 합성 분비된 단백질은 trichoroacetic acid (TCA)로 농축시켜 전기영동에 이용하였다. 그 절차를 간단히 설명하면, 배양종료후 배양액을 수거하여 원심분리에 의해 세포 잔해물을 제거한 뒤 氷冷의 5% TCA를 5 ml 넣어 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 이 절차를 3회 반복하여 얻어진 침전물은 소량의 $NaHCO_3$로 중화시킨후 같은양의 sample buffer (0.175M Tris-HCl, 8M urea, 1% SDS, and 0.5 % 2-mercaptoethanol, pH 7.4)를 넣어 7.5%의 SDS-PAGE 전기영동 (Laemmli, 1970)을 실시해 분석하였다. Vg의 확인을 위하여 Grabar and Williams (1953)의 방법에 따라 0.05 M barbital 완충액 (pH 8.6)을 이용, 1%의 agarose 면역전기영동을 실시했다.

7. DNA 정량

간세포내 DNA의 정량은 Wilder와 Stanley (1983)의 방법에 따라 0.3N NaOH로 37℃에서 75분간 그리고 2 N의 perchloric acid로 90℃에서 20분간 반응시킨후 DNA를 추출하여 Munro and Fleck (1966)의 UV흡수법에 의해 분석하였다.

결 과

1. 간세포의 형태학적 관찰

collagenase에 의해 분리된 간세포의 위상차 현미경상을 보면 (Fig. 1), 분리된 직후의 간세포는 Fig. 1A와 같이 球狀의 형태를 나타내는데 배양 1일째까지 이러한 모습을 보였으며 배양후 2일 정도가 되면 간세포들은 서로 伸殿하여 밀착하게 된다. 이 시기에는 세포내의 핵을 확실히 확인할 수 있고, 세포간의 경계도 명료하게 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B). 세포의 伸殿은 배양액의 교환에 의해 촉진되어 Fig. 1C와 같이 세포들끼리 서로 연결되어 單層 (monolayer)을 형성하였다. 이때 세포간의 경계는 불분명하게 되는데 세포들은 이러한 상태로 적어도 2주간은 양호한 상태를 유지했다. 그 후 세포들은 서서히 死滅되어 갔다.

배양시간에 따른 세포 수의 변화를 DNA의 양으로 나타냈는데, Fig. 2에서와 같이 배양 1일째에 dish당 DNA의 양은 약 75 μg으로 배양 3일째 까지 거의 같은 수준을 유지하였다. 배양시간 경과에 따라 완만하게 감소하여 배양 7일째에는 약 58 μg이였다. 이처럼 배양시간에 따른 DNA양의 급격한 감소는 없는 것으로 보아 세포상태는 양호한 것으로 나타났다.

2. *in vitro* Vg합성에 대한 E_2, GH 및 PRL의 영향

분리된 뱀장어 간세포로부터 Vg합성유도에 관여하는 뇌하수체 호르몬들의 영향을 조사하기 위해 E_2, GH 및

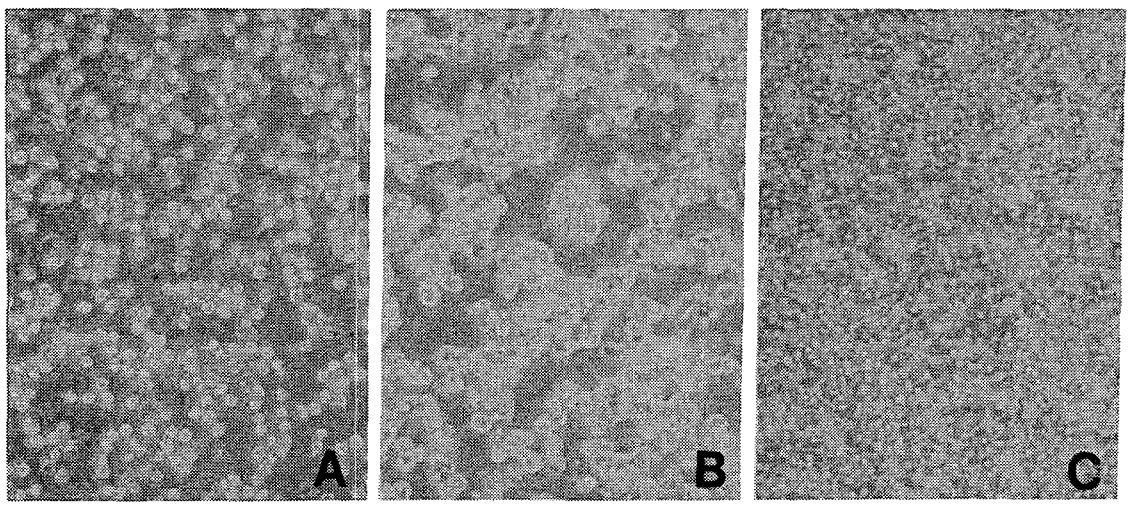

Fig. 1. Phase contrast micrographs of eel (*A. japonica*) hepatocytes in serum-free medium on fibronectin-coated dishes. Hepatocytes were cultured in William's E medium containing 0.2 μM bovine insulin, streptomycin (100 μg/ml) and penicillin (70 μg/ml). A, suspension of freshly isolated cells; B, 2 days culture before change of medium; C, confluent monolayer of eel hepatocytes.

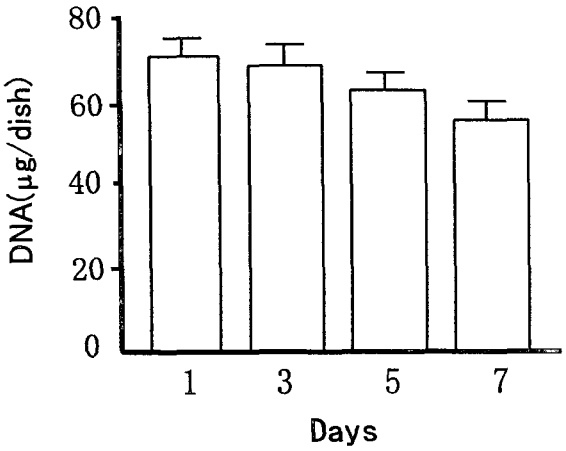

Fig. 2. Hepatocyte DNA content per dish during 7 days culture. Cell cultures were plated at a density of 3×10^5 cell/cm² on 60 mm petridishes. The media were changed every 24 hr. On the indicated days, the media was removed, the plates rinsed several times with phosphate buffered saline and the attached cells analyzed for DNA as described in materials and methods. Results expressed as the mean of data obtained from triplicate plates. Bars represent standard deviation.

PRL을 각각 또는 함께 첨가하여 5일간 배양하였다. Fig. 3에서와 같이 각각의 호르몬을 첨가하여 배양한 후 배지를 수거하여 SDS-PAGE 전기영동에 의해 분석한 결과, E_2, GH 및 PRL을 각각 단독으로 첨가한 배양에서 Vg의 합성은 유도되어 지지 않았다. 그러나 E_2와 GH 또는 E_2와 PRL을 함께 첨가하여 배양하면 Vg은 다량으로 합성 분비되어 졌다. 이처럼 뱀장어의 Vg합성을 유도하기 위해서는 뇌하수체 호르몬들이 반드시 필요한 것으로 관찰되었다. *in vitro*에서 합성분비된 Vg은 *in vivo*에서 E_2 주사한 뱀장어 혈청 중의 Vg polypeptide (Fig. 3, lane 8)와 전기 영동상 같은 이동도를 나타내었고, Fig. 4에서와 같이 Vg항혈청을 이용한 면역전기영동에 의해 이것이 Vg임이 확인되었다.

간세포를 분리하여 세포내에 존재하는 호르몬 및 다른 요소들의 영향을 제거 또는 감소시키기 위하여 호르몬의 첨가없이 8일간 배양한 후 E_2, E_2+GH 및 E_2+PRL을 각각 첨가하여 Vg합성 유도에 대해 조사한 결과를 나타냈다 (Fig. 5). 8일간의 前培養後, E_2만을 첨가하여 다시 배양하였으나 배양 2일째까지 Vg합성은 유도되어 지지 않았다. 그러나 E_2+GH 또는 E_2+PRL을 첨가한 배양에서는 배양 1일째까지 Vg합성은 전기영동 분석에서는 관찰되지 않았으나, 배양 2일째에는 Vg의 합성이 관찰되었다.

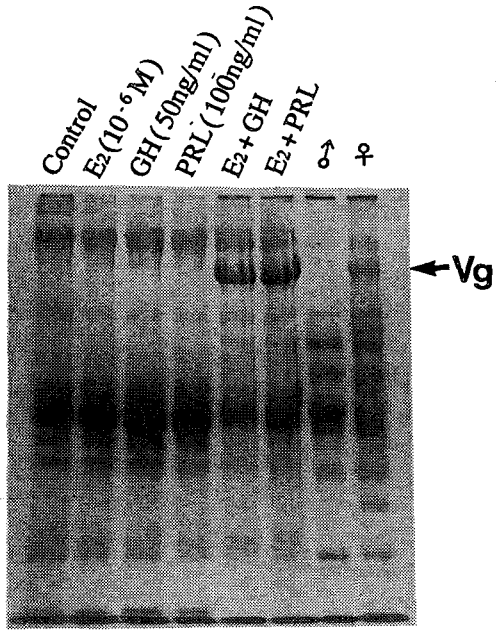

Fig. 3. Induction of Vg synthesis in eel hepatocyte cultures. Hepatocytes were cultured for 5 days with E_2 (10^{-6} M), GH (50 ng/ml) and PRL (100 ng/ml), either alone or in combination with E_2. Spent media were collected and precipitated with cold TCA. The precipitates were analyzed by 7.5% SDS-PAGE. ♂, intact serum; ♀, E_2-treated serum; Vg, vitellogenin.

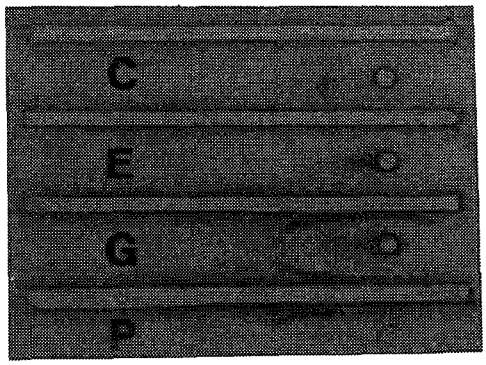

Fig. 4. Immunoelectrophoresis of Vg secreted by cultured hepatocytes in eel. The troughs were filled with anti-vitellogenin serum. C, Vehicle; E, E_2 alone; G, E_2+GH; P, E_2+PRL.

호르몬 첨가없이 8일간 배양하여 내인성의 요소가 거의 제거되었다고 생각되는 시점에서 각종 외인성 호르몬들을

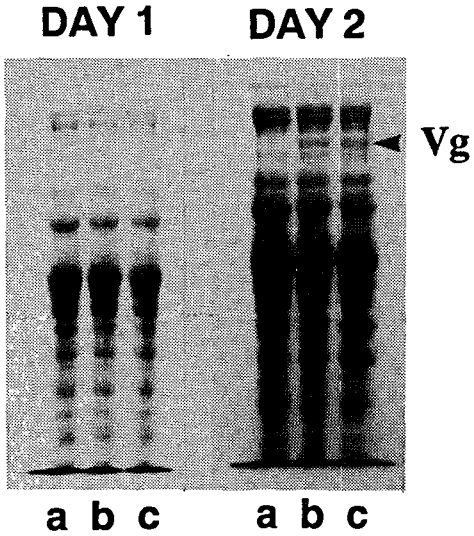

Fig. 5. Effects of preculture of hepatocytes on the induction of Vg synthesis. Hepatocytes were precultured for 8 days, and then either vehicle (a), E_2 (10^{-6}M)+GH (50 ng/ml) (b) or E_2 (10^{-6}M)+PRL (100 ng/ml) (c) was added to the media, respectively.

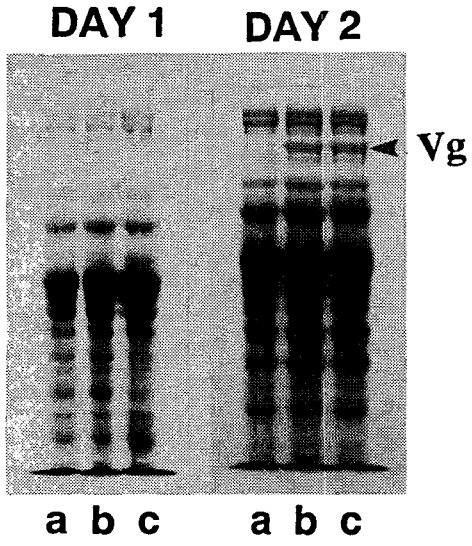

Fig 6. Effects of E_2-exposure on the induction of Vg synthesis. Hepatocytes were exposed to E_2 for 8 days, and then replaced with E_2 (10^{-6} M) (a), E_2 (10^{-6}M)+GH (50 ng/ml) (b) or E_2 (10^{-6}M)+PRL (100 ng/ml) (c), respectively.

첨가하여 Vg합성 유도를 시도한 결과, E_2만으로는 Vg의 합성유도는 일어나지 않고, GH 또는 PRL과 함께 첨가하여야만 합성되어 지는 것으로 나타났으며, 간세포내

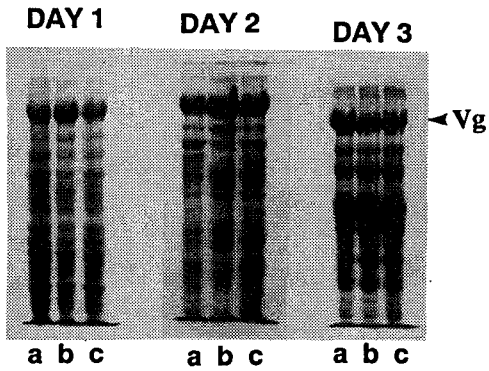

Fig. 7. Effects of hormone withdrawal on Vg synthesis. Hepatocytes were cultured in media containing E_2 (10^{-6}M)+(GH (50 ng/ml)+PRL (100 ng/ml) for 6 days, and then replaced with media containing vehicle (a), E_2 (10^{-6} M) (b) and E_2+GH+PRL (c), respectively.

의 내인성의 요소 및 호르몬의 영향은 관찰되지 않았다.

8일간에 걸쳐 E2만으로 배양한 후 각각 E_2, E_2+GH 및 E_2+PRL을 첨가하여 2일간 다시 배양한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 총 10일간 E_2만을 첨가하여 배양하였을때 Vg의 합성량은 E_2 첨가없이 배양한 것에 비해 전기영동상 뚜렷한 차이를 나타내지는 못했지만 미약하나마 증가된 것이 관찰되었다. (Figs. 5a, 6a). 이러한 차이는 Figs. 5b, c와 6b,c의 비교에서와 같이 E_2+GH 또는 E_2+PRL를 첨가한 배양에서 일정기간 E_2노출된 배양은 호르몬 없이 preculture된 배양에 비해 더 많은 Vg합성을 E_2노출된 배양은 호르몬 없이 preculture된 배양에 비해 더 많은 Vg합성을 보여 E_2에 장기간 노출이 Vg합성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그러나 본 실험 결과에는 나타내지 않았으나 이 경우 E_2의 농도를 증감시켜도 Vg의 합성량의 변화는 없었으며, E_2만으로 8일간 배양한 후, GH 또는 PRL만을 첨가하여 다시 2일간 배양하여도 뚜렷한 Vg의 합성은 보이지 않았으며, 강력한 Vg합성에는 역시 E_2+GH 또는 E_2+PRL의 동시첨가가 요구되었다.

Fig. 7에 E_2+GH+PRL을 함께 첨가하여 6일간 배양한 후 각각 호르몬 無添加, E_2단독 및 E_2+GH+PRL을 첨가하여 다시 3일간 배양한 결과를 나타냈다. E_2+GH 또는 PRL을 함께 첨가하여 배양하면 Fig. 3 (lane 5, 6)에서와 같이 Vg이 다량으로 합성 분비되었다. 이처럼 Vg이 왕성하게 합성되어 지는 시점에서도 계속해서 GH 및 PRL 등의 뇌하수체 호르몬이 필요한가에 대한 조사에서 배양액으로부터 GH와 PRL을 제거했을 경우 즉, 호르몬 무첨가, E_2단독첨가 및 E_2+GH+PRL 공동첨가와의 비교에

서 합성된 Vg양은 3일간의 배양에서는 호르몬의 종류 및 첨가유무에 관계없이 커다란 차이를 나타내지 않았다. 따라서 Vg이 왕성하게 합성·분비되어질때에는 Vg의 합성에 필요한 더 이상의 외인성 호르몬은 필요치 않는 것으로 나타났다.

고 찰

Vitellogenin합성에 어떠한 호르몬 및 요소들이 관여하는가를 연구하는데는 初代培養肝細胞를 이용하는 것이 매우 유용하다. 지금까지 *in vitro*에서 Vg합성 관련 내분비 연구를 위해 肝의 조직배양법이 주로 이용되어 왔으나 (Wangh and Knowland, 1975; Wangh and Schenider, 1982; Ho et al., 1985; Carnevali and Mosconi; 1992, Carnevali et al., 1992), 초대배양간세포를 이용한 Vg합성 유도실험은 일부의 난생동물에서만 행해져 왔다 (Maitre et al., 1986; Boehm et al., 1988; Kwon et al., 1993). 세포배양 기술의 발달로 Vg합성 메카니즘에 대한 많은 새로운 사실들이 밝혀지고 있다. 본 연구에서와 같이 뱀장어의 Vg 합성은 E_2 및 뇌하수체호르몬들의 공동작용에 의해서 유도되어 지는 현상은 어류에 있어서 처음으로 밝혀진 것으로서 매우 흥미있는 현상이다.

대부분의 난생척추동물들에 있어서 E_2는 Vg합성에 있어서 주된 유도물질로서 알려져 있으며, E_2 투여에 의해 Vg합성에 따른 많은 변화들이 간 및 혈청중에 나타나게 되는데, 간의 비대 및 중량의 증가, 간세포내 총DNA양의 증가, 혈중 총단백질과 인단백질의 증가, 혈중 칼슘 및 마그네슘 등이 증가한다 (Mommsen and Walsh, 1988). Vg합성에 관여하는 내분비들은 E_2 이외에 갑상선호르몬과 부신피질호르몬 등이 간접적인 영향을 미치는 것으로 밝혀져 왔으며, 뇌하수체 호르몬이 Vg합성에 직접적으로 관여한다는 사실이 처음 파충류 (Callard et al., 1972)에서 보고되었다. 이 실험에서 E_2처리한 도마뱀의 肝重量, 간의 총DNA함량 및 혈중 단백질농도에 있어서 대조구에 비해 현저한 증가를 보였다. 반면에 뇌하수체를 적출한 도마뱀에 E_2 및 GH를 각각 주사한 개체들에 있어서는 이들 수치들은 커다란 증가를 보이지 못했으나, E_2와 GH를 함께 주사한 개체들에 있어서는 이 수치들은 뇌하수체를 적출하지 않은 도마뱀에 E_2처리한 개체들과 마찬가지로 현저한 증가를 보여 GH가 Vg합성에 직접 관여한다는 사실을 시사했다. 이와 유사한 연구가 거북이에서도 행해졌으며 (Ho et al., 1982), 또한 이 연구 그룹들은 (Ho et al., 1985) 거북의 간조직을 배양하여 Vg합성에 대한 GH의 영향을 조사하였는데, 암컷의 간조직에 E_2를 첨가하여 배양하면 Vg이 합성되어지나, 수컷의 간조직배양에서는 E_2 또는 E_2+GH를 함께 첨가하여도 Vg합성은 유도되어지지 않았다. 이들 호르몬 이외에 조직배양시 혈청 (Fetal Calf Serum)의 첨가 유무에 관계없이 PRL, FSH, LH 및 각종 스테로이드 호르몬을 첨가하여도 Vg은 합성되지 않았다. 그러나 뇌하수체를 적출하여 7일후의 수컷 개체로부터의 간조직배양에서는 E_2와 GH를 함께 첨가하면 Vg이 합성 유도되어 진다는 사실을 알아내 수컷 거북이의 뇌하수체내에 Vg합성을 억제하는 인자의 존재를 시사했다. 양식 뱀장어를 이용한 본 연구에 있어서는 육안으로 암수의 구별을 할 수 없을 정도의 미성숙 개체여서 Vg합성에 대한 암수의 차이는 조사하지 못했다. 그러나 초대배양 간세포를 분리하여 혈청을 포함하지 않고 8일간 preculture하여 세포내 외인성 요소들이 감소되었거나 거의 없다고 판단되는 시점에서 실험을 시행하여 외인성 억제물질들에 대한 가능성을 조사하였으나 E_2와 GH에 의한 Vg합성에 대한 영향은 없는 것으로 나타났다. Carnevali and Mosconi (1992)는 개구리의 無血清培地를 이용한 肝組織배양에서 E_2 및 개구리 뇌하수체 추출물 각각에 의해 Vg합성을 유도하였으며, Carnevali 등 (1992)은 같은 배양계를 이용하여 E_2는 물론 포유류 및 개구리 의 GH만으로도 Vg이 합성되어 지는 것을 관찰했다. 개구리의 Vg은 거북이에서와 달리 암수 모두에서 합성이 유도되어 지며, 뇌하수체 및 GH만으로 유도되어진다고 보고했다. 이때 E_2와 GH 모두에서 합성을 유도할 수 있으나 반응의 정도는 암수 및 계절에 따라 다른 양상을 나타낸다고 했다. Boehm 등 (1988)은 수탉의 간세포 배양시 그 자신의 혈청을 포함하는 배지에서 E_2의 존재유무와 관계없이 GH 또는 PRL만으로 Vg을 합성할 수 있었다. 이는 본 연구에서와 같이 無血清배지를 사용한 세포배양에서는 GH 또는 PRL만으로는 Vg이 합성되어 지지 않는 뱀장어와는 다른 결과를 가져와 혈청내에는 많은 未知의 요소들이 존재하는 것으로 생각된다. 뇌하수체 호르몬 중 PRL이 Vg합성에의 관여는 거북이 (Ho et al., 1985)에서는 없는 것으로 나타났으나, 뱀장어와 수탉에서 직접 관여한다는 사실은 무척 흥미롭다. 이것은 GH와 PRL이 아미노산 배열에 있어 매우 유사하고, 양서류, 조류 및 쥐 등에서 GH와 유사한 생리활성을 가지기 때문인 것으로 생각된다 (Nicoll, 1986). 그러나 Ng et al. (1991)이 뱀장어 (*A. japonica*)의 간세포에 PRL 수용체의 존재를 보고하여 적어도 뱀장어에 있어서의 PRL은 Vg합성에 대해 GH와는 별도의 경로를 통해 관여할 가능성이 있다고 보여진다.

Kwon and Mugiya (1994)는 뇌하수체를 적출한 미성숙

뱀장어(*A. japonica*)에 E_2를 주사하여 7일후에 Vg합성 유무를 조사하였으나 Vg합성은 유도되어 지지 않았다. 이러한 결과는 뱀장어 Vg합성에 뇌하수체 호르몬들이 관여하고 있다는 것을 시사하는 것이다. 한편 Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal (1991)은 유럽뱀장어(*A. anguilla*)의 Vg합성에 대한 뇌하수체의 영향을 조사하기 위해 대조(미수술군) 및 뇌하수체 적출개체에 각각 E_2를 약 2개월 동안 주 2~3회의 장기간 투여하였다. 합성분비된 Vg양은 대조구가 약 783.4 μg/ml인데 비하여 뇌하수체 적출개체에서는 21.3 μg/ml로 약 37배나 낮은 결과를 나타내 유럽뱀장어에 있어서도 Vg합성에 뇌하수체호르몬의 영향을 받는 것으로 보여진다. 본 연구에서 보여진대로 약 10일간 E_2만을 첨가하여 배양하였을 경우 적은 양이지만 Vg합성 반응을 보이는 것은 장기간의 E_2처리가 Vg합성에 다소 영향을 미치지만 뇌하수체호르몬의 협력없이는 정상적인 합성은 이루어 지지 않는 것으로 판단된다. 또한 E_2로 장시간 배양한 세포에 E_2없이 GH 및 PRL만을 첨가하여 배양하여도 Vg합성은 유도되어 지지 않는 것으로 보아 뱀장어 Vg합성에는 반드시 E_2와 뇌하수체 호르몬들이 동시에 작용하는 것으로 생각된다.

Vg이 왕성하게 합성되어지는 시점에서 GH 및 PRL 등의 뇌하수체 호르몬들을 배양액으로 부터 제거하여도 단기간에는 Vg합성양에 커다란 변화를 보이지 않았는데, 이는 여러 어종의 *in vivo*에서 관찰되어 지는 것과 같이 Vg합성에 필요한 혈중 E_2의 최고치는 혈중 Vg의 최고치보다 시기적으로 다소 앞서는 것이 일반적인 현상이며, Vg이 peak에 달하는 시기에서는 E_2의 혈중농도는 저하하기 시작하는 것으로 보아 Vg이 왕성하게 합성되어지는 시점에서는 Vg합성에 관여하는 호르몬들은 더 이상 필요치 않는 것으로 보여진다(Sundararaj et al., 1982; Udea et al., 1984).

이와 같이 뱀장어의 Vg합성에는 여러가지 호르몬들이 관여하고 있어 다른 호르몬 및 요소에 대한 검토가 이루어져야 할 것이다. 또한 보다 명확한 Vg합성 메카니즘을 밝히기 위하여 Vg 조절 유전자 및 호르몬 수용체에 대한 연구가 뒤따라야할 것이다.

요 약

Vitellogenin 합성 메카니즘을 밝히기 위한 연구의 일환으로써, 뱀장어의 肝細胞培養系를 이용하여 Vg합성에 대한 E_2 및 뇌하수체호르몬들의 영향에 대해 조사하였다.

일반적으로 어류를 비롯한 난생 척추동물들의 Vg은 E_2의 자극에 의해 간장에서 합성분비되어 지나 뱀장어 Vg은 E_2만으로는 충분한 합성은 이루어 지지 않았다. 그러나 E_2와 GH 및 PRL을 함께 첨가하면 Vg합성이 활발하게 유도되어 지는 것이 관찰되었다. E_2만으로 Vg이 합성되어 지지 않는다면 세포내에 Vg합성 및 E_2의 활성을 억제하는 내인성 요소들이 있을 것으로 생각되어 세포를 8일간 호르몬 첨가없이 preculture하여 시행하였으나, E_2만으로 Vg합성은 유도되어 지지 않고 GH 및 PRL의 도움이 필요했다. 또한 E_2만으로 10일간 배양하여 장기간 E_2로 노출시켜 Vg합성에 대한 영향을 조사한 바, 약 10일간의 E_2노출에 의해 Vg합성은 전기영동상의 확인에 의해 양적으로 다소 증가하는 것이 관찰되었으나 E_2+GH 및 E_2+PRL의 첨가에 비해 현저한 차이를 나타내어 뱀장어의 Vg합성 유도에는 뇌하수체 호르몬들이 직접 관련되는 것으로 나타났다. 또한 E_2+GH+PRL을 함께 첨가하여 6일간 배양하여 Vg이 왕성하게 합성되어 질때에도 계속해서 GH 및 PRL들이 필요한가를 조사하였는데, 3일간 관찰한 결과 Vg의 합성 정도는 GH 및 PRL 등의 첨가유무에 커다란 차이를 나타내지 않았다.

참 고 문 헌

Boehm, K.D., R.D. Hood, and J. Ilan. 1988. Induction of vitellogenin in primary monolayer cultures of cockerel hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 85, 3450~3454.

Burzawa-Gerard, E. and A. Dumas-Vidal. 1991. Effects of 17 β-estradiol and carp gonadotropin on European silver female eel (*Anguilla anguilla* L.) employing a homologous radioimmunoassay for vitellogenin. Gen. Comp. Endocrinol., 84, 264~276.

Callard, I.P., S.H. Banks and W.L. Banks, Jr. 1972. Hepatic protein and nucleic acid content in *Dipsosaurus dorsalis* following hypophysectomy and treatment with estradiol-17 β and growth hormone. Comp. Biochem. Physiol., 41B, 503~510.

Carnevali, O and G. Mosconi. 1992. *In vitro* induction of vitellogenin synthesis in *Rana esculenta*: Role of the pituitary. Gen. Comp. Endocrinol., 86, 352~358.

Carnevali, O and G. Mosconi, K. Yamamoto, T. Kobayashi, S. Kikuyama and A.M. Polzonetti-Magni. 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.

Emmersen, B.K. and I.M. Petersen. 1976. Natural occurrence, and experimental induction by estradiol-17 β, of a lipophosphoprotein (Vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*, L.). Comp. Biochem. Physiol., 55B, 315~321.

Eliott, J.A.K., N.R. Bromage and C. Whitehead. 1979. Effect of estradiol-17 β on serum calcium and vitellogenin levels in rainbow trout. J. Endocrinol., 83, 54~55.

Gavaud, J. 1986. Vitellogenesis in lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. I. Purification and partial characterization of plasma vitellogenin. Gen. Comp. Endocrinol., 63, 1~10.

Gerstle, J.F. and I.P. Callard. 1972. Reproduction and estrogen-induced vitellognesis in *Dipsosaurs dorsalis*. Comp. Biochem. Physiol., 42A, 791~801.

Gobbetti, A., A. Polzonetti-Magni, M. Zerani, O. Carnevali and V. Botte. 1985. Vitellogenin hormonal control in the green frog, *Rana esculenta*: Interplay between estradiol and pituitary hormones. Comp. Biochem. Physiol., 82A, 855~858.

Grabar P. and C.A. Williams. 1953. Méthode permettant l' étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochem. Biophys. Acta., 10, 193~194.

Hara, A. and H. Hirai. 1978. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 59B, 339~343.

Ho, S.M. 1987. Endocrinology of vitellogenin. In *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*, D.O. Norris, and R.E. Jones, Eds., Plenum, New York. pp. 144~169.

Ho, S.M., S. Taylor and I.P. Callard. 1982. Effect of hypophysectomy and growth hormone on estrogen-induced vitellogenesis in the freshwater turtle, *Chrysemys picta*. Gen. Comp. Endocrinol., 48, 254~260.

Ho, S.M., L.J. Wangh and I.P. Callard. 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, S.H., T. Kodama and K. Tanahashi. 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. Gen. Comp. Endocrinol., 37, 306~320.

Kwon, H.C., S. Hayashi and Y. Mugiya. 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol., 104B, 381~386.

Kwon, H.C. and Y. Mugiya. 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, H.C., A. Hara, Y. Mugiya and J. Yamada. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in white spotted charr, *Salvelinus leucomaenis*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 41, 162~180.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature, 227, 680~685.

Le Menn, F., H. Rochefort and M. Garcia. 1980. Effect of androgen mediated by the estrogen receptor of fish liver: Vitellogenin accumulation. Steroids, 35, 315~328.

Maitre, J.-L., Y. Valotaire and C. Guguen-Guillouzo. 1986. Estradiol-17 β stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. In Vitro, 22, 337~343.

Mommsen, T.P. and P.J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In *Fish Physiology* W.S. Hoar and D.J. Randall, Eds., Vol. XIA, Academic Press, San Diego. pp. 347~406.

Munro, H.N. and A. Fleck. 1966. Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. Analyst, 91, 78~88.

Nicoll, C.S. 1986. Role of prolactin in water and ion balance in vertebrates. In *Prolactin* R.B. Jaffe, Ed. American Elsevier, New York. pp. 127~166.

Ng, T. and D.R. Idler. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In *Fish Physiology* W.S. Hoar and D.J. Randall, Eds., Vol. IXA, Academic Press, San Diego. pp. 373~404.

Ng, T.B., T.Y. Hui and C.H.K. Cheng. 1991. Presence of prolactin receptors in eelliver and carp kidndy and growth hormone receptors in eel liver. Comp. Biochem. Physiol., 99A, 387~390.

Paolucci, M. 1991. Estradiol receptor in the lizard liver (*Podarcis s. sicula*). Seasonal changes and estradiol and growth hormone dependence. Mol. Cell. Endocrinol., 66, 101~108.

Sundararaj, B.I. and P. Nath. 1981. Steroid-induced synthesis of vitellogenin in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Gen. Comp. Endocrinol., 43, 201~219.

Sundararaj, B.I., S.V. Goswami and V.J. Lamb. 1982. Role of testosterone, estradiol-17 β, and cortisol during vitellogenin synthesis in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Block). Gen. Comp. Endocrinol. 48, 390~397.

Ueda, H., O. Hiroi, A. Hara, K. Yamauchi and Y. Nagahama. 1984. Changes and serum concentrations of steroid hormones, thyroxine, and vitellogenin during spawning migration of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Gen. Comp. Endocrinol., 53, 203~211.

Vaillant, C., C. Le Guellec, F. Pakdel and Y. Valotaire. 1988. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. Gen. Comp. Endocrinol., 70, 284~290.

Wallace, R.A. 1985. Vitellogenin and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In *Developmental Biology* L. Browder, Ed., Vol. 1, Pergamon, New York. pp. 127~177.

Wangh, L.J. 1982. Glucocorticoids act together with estrogens and thyroid hormones in regulating the synthesis and secretion of *Xenopus* vitellogenin, serum albumin, and fibrinogen. Dev. Biol., 89, 294~298.

Wangh, L. J. and A.J. Knowland. 1975. Synthesis of vitellogenin *in cultures of male and female frogliver* regulated by estradiol treatment *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3121~3175.

Wangh, L.J. and W. Schneider. 1982. Thyroid hormones are corequisites for estradiol-17 β *in vitro* induction of *Xenopus* vitellogenin synthesis and secretion. Dev. Biol., 89, 287~293.

Wilder, I.B. and J.G. Stanley. 1983. RNA-DNA ratio as an index to growth in salmonid fishes in the laboratory and in streams contaminated by carbaryl. J. Fish Biol., 22, 165~172.

Wiley, H.S., L. Opresco and R.A. Wallace. 1979. New methods for purification of vertebrate vitellogenin. Anal. Biochem., 97, 48~53.

1996년 10월 9일 접수
1997년 3월 7일 수리