

흰쥐의 발정주기동안 난소내 Leptin 및 Leptin 수용체 발현의 주기적 변화에 관한 연구

김명신¹ · 양현원¹ · 권혁찬² · 김세광³ · 조동제³ · 윤용달^{4†}

서울여성병원 불임연구실, ¹을지의과대학교 생명과학연구소, ²봄여성병원 산부인과,
³연세대학교 산부인과학교실, ⁴한양대학교 생명과학과

Study on the Cyclic Change of Leptin and Its Receptor Expression during the Estrous Cycle of Rat

Myoungshin Kim, Hyunwon Yang¹, Hyuck Chan Kwon², Sei Kwang Kim³,
Dong Jae Cho³ and Yong-Dal Yoon^{4†}

Infertility Laboratory, Seoul Women's Hospital, Incheon 402-859, Korea

¹*Life Science Institute, Eulji University School of Medicine, Seoul 139-711, Korea*

²*Department of Obstetrics and Gynecology, Bom Women's Hospital, Gohyang 412-827, Korea*

³*Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University School of Medicine, Seoul 120-752, Korea*

⁴*Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea*

ABSTRACT : Leptin, a product of the obese gene, is associated not only with obesity but also with female reproductive function, but it has not yet been ascertained whether leptin acts directly on the ovary or indirectly via the hypothalamus-pituitary pathway. Therefore, the object of this study was to investigate the expression of leptin and its receptor in the rat ovary by immunohistochemistry and RT-PCR during the estrous cycle. Immunohistochemistry results showed that leptin was stained in the theca cells and in part of granulosa cells in atretic follicles, whereas leptin receptor was localized in the interstitial cells and ova in preantral follicles. In particular, leptin and its receptor in atretic follicles displayed more intensive staining compared to those in normal follicles. During the estrous cycle, the mRNA expression of leptin and its receptor in the ovary was detected by RT-PCR and estradiol, progesterone, and leptin levels in the serum was measured by ELISA. The leptin level in the serum on metestrous phase was significantly higher than that on estrous phase. Similar to leptin level, progesterone level increased on metestrous phase. Leptin mRNA was not detected throughout the estrous cycle, whereas leptin receptor mRNA was expressed on all phases of estrous cycle excepting the diestrous phase. These results suggest that leptin might be directly involved in the regulation of ovarian function in rat.

Key words : Estrous cycle, Leptin, Ovary, Progesterone, Rat.

요 약 : 비만유전자 산물인 leptin은 비만뿐만 아니라 여성의 생식 생리와 관련이 있는 것으로 보이나, 아직 이러한 leptin이 난소에 직접적으로 작용하는지 정확하게 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐 난소에서 leptin과 leptin 수용체의 발현을 면역조직화학방법으로 확인하고 발정주기에 따른 leptin과 leptin 수용체의 발현 양상을 RT-PCR 방법으로 조사하고자 하였다. 면역조직화학적 염색방법 결과 흰쥐 난소내에서 leptin은 협막세포와 폐쇄 난포의 일부 과립세포에 염색되었고, leptin 수용체는 협막세포, 간질세포와 난포강이 형성되지 않은 난포의 난자에 염색되었다. 특히 폐쇄 난포에서는 leptin과 leptin 수용체가 정상 난포에 비해 강하게 염색되었다. 흰쥐의 발정주기 동안 혈청내 estradiol, progesterone 및 leptin의 농도는 ELISA 방법으로 측정하였고, 난소내 leptin과 leptin 수용체의 mRNA 발현 양상은 RT-PCR 방법으로 조사하였다. 혈중 leptin 농도를 측정할 결과 estrous 시기에 비하여 metestrous 시기에 유의하게 증가하였고, 이 시기에 progesterone 농도가 함께 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Leptin mRNA는 모든 발정주기에서 발현되지 않았지만 leptin 수용체 mRNA는 diestrous 시기를 제외한 다른 발정주기에 모두 발현되었다. 이러한 결과는 leptin이 흰쥐 난소의 기능을 조절하는데 직접적으로 관여할 수 있다는 것을 제시하고 있다.

*본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-1-20700-002-3)지원으로 수행되었음.

*공동 제1저자: 양현원

†교신저자: 서울시 성동구 행당동 산 17, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791, (전) 02-2290-0955, (팩) 02-2294-0955. E-mail: ydyoon@hanyang.ac.kr.

서 론

비만유전자 산물인 leptin은 지방 조직에서 생성되며, 신진 대사, 식욕, 체열 등을 조절하는 비만의 억제 조절 물질로 알려져 있다(Zhang et al., 1994). Leptin은 식욕 억제 효과와 지방 대사에 관한 관심에서 연구되어 왔지만(Weigle et al., 1995), 최근에는 생식 기능에도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Chehab et al., 1996). 유전적으로 비만인 생쥐(*ob/ob* mouse)는 불완전한 형태의 leptin을 생산하거나 또는 전혀 leptin mRNA를 생산하지 못하는데(Zhang et al., 1994), 이러한 생쥐는 비만뿐만 아니라 불임을 동반한다(Bray & York, 1979). 또한 비만인 생쥐 암컷에 leptin을 주사하면 혈중 LH가 증가하고, 난소 및 자궁의 무게가 증가하면서 생식 기능이 향상되는 것으로 보고하고 있다(Barash et al., 1996).

Leptin 수용체는 class I cytokine 수용체에 속하는데(Nakashima et al., 1997), 전사(transcription) 후 splicing 단계에서 long form과 short form의 여러 가지 이성체를 만들어낸다(Lee et al., 1996; Tartaglia, 1997). 흰쥐에서는 3가지 종류의 이성체가 밝혀졌는데 OB-Rb는 long form으로 신호를 전달할 수 있는 domain을 가지고 있는 반면, OB-Ra, OB-Rc 및 OB-Rd는 세포내 신호 전달 domain이 없는 short form의 이성체이고 OB-Re는 수용성 이성체이다(Takaya et al., 1996). Leptin은 수용체에 결합해서 수용체가 활성화되면 STAT(signal transducers and activators of transcription)가 leptin의 세포내 신호 전달을 매개한다고 밝혀졌지만(Nakashima et al., 1997) 난소에서 leptin의 신호 전달 기전은 아직 밝혀지지 않았다.

Leptin과 leptin 수용체의 발현에 대한 많은 연구가 이루어져 왔는데, Zamorano 등(1997)은 흰쥐의 시상하부, 뇌하수체, 정소, 난소, 자궁에서 leptin 수용체의 발현을 RT-PCR 방법과 Northern blotting으로 확인하여 leptin이 생식 기관에서 직접적으로 혹은 간접적으로 기능을 나타낼 것이라는 가능성을 제시하였다. 그러나 이러한 결과들은 단지 leptin과 leptin 수용체의 mRNA의 발현을 확인한 결과들이었다. 또한 난소 내에서 발현되는 leptin 수용체의 위치에 대한 연구도 난소내 각 부분의 세포들을 분리해서 leptin 수용체의 발현 여부를 관찰한 결과이고(Cioffi et al., 1997) 전체 난소의 조직학적인 연구는 미진한 상태이다.

따라서 본 연구는 흰쥐 난소에서 발정주기에 따른 leptin과 leptin 수용체의 발현을 RT-PCR 방법으로 확인하고 그 발현되는 위치를 면역조직화학방법으로 조사하고자 시행하였다. 또한 스테로이드 호르몬의 농도와 leptin과의 상관 관계를 알

아보고자 흰쥐의 발정주기별로 혈중 스테로이드 호르몬과 leptin의 변화 양상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 광주기를 명 14 시간/암 10 시간으로 유지시키고 물과 먹이를 충분히 공급하면서 사육한 8 주령의 성숙 흰쥐(Sprague-Dawley) 암컷을 사용하였다. 발정주기를 확인하기 위하여 매일 일정한 시간에 질 상피세포 검사를 시행하여, 발정주기가 2주기 이상 지속된 개체에서 각 주기별로 체중을 측정하고 후 심장에서 혈액을 채취하여 원심분리한 후 혈청을 leptin 및 스테로이드 호르몬 정량 전까지 -70°C 저온 냉동기에 보관하였다. 또한 난소를 채취하여 한 쪽 난소는 Trizol™(Gibco BRL Life Sciences, Carlsbad, CA, USA)에 넣어 RT-PCR 전까지 -70°C 저온 냉동기에 보관하였고, 다른 쪽 난소는 면역조직화학방법을 위해 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)에 고정하였다.

2. RNA 추출

Total RNA를 추출하기 위하여 1ml의 Trizol™에 담긴 난소를 얼음 위에서 homogenizer로 균질화하였다. 균질화된 현탁액 1ml에 0.1ml chloroform을 넣어 15초간 잘 섞어준 후 $12,000 \times g$ 로 4°C 에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하고 있는 무색의 수용액층을 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 15분간 얼음 위에서 RNA를 침전시켰다. 다시 $12,000 \times g$ 로 4°C 에서 15분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 75% ice-cold ethanol로 세척하여 10 ~ 15분간 진공상태에서 건조시켰다. 건조된 침전물은 diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water에 용해시켜 60°C 에서 15분간 반응시킨 후 260nm/280nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 측정하였다.

3. RT-PCR

RNA $1 \mu\text{g}$ ($10 \mu\text{l}$)을 10mM Tris-HCl(pH 8.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 5mM MgCl₂, 10mM dNTP mixture, 1U의 RNase inhibitor, 50pmole의 random 9mer, 15U의 AMV-reverse transcriptase(Promega Corp., Madison, WI, USA)를 포함하는 $15 \mu\text{l}$ 의 반응 buffer와 혼합시켰다. 이러한 반응 혼합물을 PCR Thermal Cycler 480(TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)으로 옮겨 상온에서 10분, 42°C 에서 75분, 95°C 에서 5분간 가열하여 reverse transcription(RT) 반응을 시켰다. PCR 증폭을 위하

여 50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 2mM MgCl₂, 각각 10mM의 dNTP mixture, 1.25U의 Taq polymerase(TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)와 각각 50pmole의 3'과 5'의 primer를 5 μl의 RT 산물과 혼합하여 총 50 μl의 반응 혼합물을 만들었다.

Leptin의 primer는 5'-CACCAAAACCCTCATCAAGACC-3'와 5'-CAGCCTGCTCAAAGCCACCACC-3'(Vydelingum et al., 1995)를 사용하였고, short form leptin 수용체의 primer는 5'-ATGACGCAGTGTACTGCTG-3'와 5'-GTGGCGAGTCAAGTGAACCT-3'(Zamorano et al., 1997)을 사용하였으며 각각의 반응 산물은 360bp와 357bp이다. 각각의 혼합물은 50 μl의 mineral oil을 넣어 표면을 덮은 후 PCR Thermal Cycler 480에서 증폭시켰다. Predenaturation은 94°C에서 5분간 실시하였고, 총 35 cycles를 94°C에서 1분, 58°C에서 2분, 72°C에서 2분간 반응시킨 후 72°C에서 10분간 postelongation 반응을 시행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후에 0.5% ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator (ULTRA-LUM, INC., Claremont, CA, USA)로 관찰하였다.

4. 면역조직화학방법

4% paraformaldehyde에 고정된 난소는 파라핀으로 포매한 후 5 μm 두께의 절편을 만들어 통상의 탈 파라핀 과정과 합수 과정을 수행하였다. 절편 슬라이드를 3% H₂O₂ 용액에 5분간 전 처리하여 조직에 남아 있는 peroxidase를 제거한 후 1:100으로 희석된 leptin과 leptin 수용체에 대한 각각의 일차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 1시간 동안 상온의 항습 chamber에서 반응시킨 후 LSAB kit(DakoCytomation, Glostrup, Denmark)에 들어 있는 이차 항체와 streptavidin-peroxidase를 각각 15분간 처리하였다. 슬라이드를 Tris buffered saline(TBS)으로 씻은 후 diaminobenzidine(Dako Cytomation A/S, Glostrup, Denmark)을 이용하여 발색시켰고 Mayer's hematoxylin(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)으로 대조 염색하였다.

5. TUNEL 방법에 의한 세포자연사 판정

난소내 세포자연사를 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling(TUNEL) 방법에 의한 *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag; Intergen, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하였다. 4% paraformaldehyde에 고정된 난소는 파라핀으로 포매한 후 5 μm 두께의 절편을 만들어 통상의 탈 파라핀 과정과 합수 과정을 수행하였다. 절편 슬라이드를 3% H₂O₂ 용액에 5분간

전처리하여 조직에 남아 있는 peroxidase를 제거한 후 ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 5분간 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase를 첨가한 후 37°C에서 90분간 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 반응 정지 완충액을 상온에서 10분간 처리한 후 TBS로 3번 세척하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase로 37°C에서 30분간 처리한 후 TBS로 세척하고 DAB를 이용하여 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

6. 혈액내 Leptin 및 스테로이드 호르몬 농도 측정

혈액 내 leptin, estradiol, progesterone 농도는 각각 Mouse Leptin Quantikine M EIA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN USA), Active Estradiol DSL-10-4300 EIA kit(Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA), Active Progesterone DSL-10-3900 EIA kit(Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA)를 이용한 효소면역측정법으로 정량하였다.

7. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA 방법을 사용하였으며 p 값이 0.05보다 적은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 난소내 Leptin 및 Leptin 수용체 단백질의 발현

Leptin은 협막세포와 간질세포에 염색되었고(Fig. 1a, b) 황체세포(Fig. 1c)에서 강한 염색 정도를 보였다. 특히 정상 난포에서와는 달리 난포 폐쇄가 진행되는 일부 난포의 과립 세포에서 강한 발현을 나타내었다(Fig. 1b). Leptin 수용체는 대부분의 난포에서 협막세포와 간질세포에 염색되었고, 특히 난포강이 형성되지 않은 난포 내 난자(Fig. 1e)에서 강하게 염색되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 황체세포에는 염색되지 않았다(Fig. 1g).

2. 폐쇄 난포에서의 Leptin 및 Leptin 수용체의 발현

폐쇄 난포에서 과립 세포의 세포자연사가 많이 관찰되었고(Fig. 2a), leptin 및 leptin 수용체도 많이 발현되었다(Fig. 2b, c). 이에 비해 과립 세포의 세포자연사가 거의 발현되지 않은 건강한 난포에서는(Fig. 2a) leptin 및 leptin 수용체의 발현이 약하게 나타났다(Fig. 2b, c).

3. 발정 주기별 체중 변화

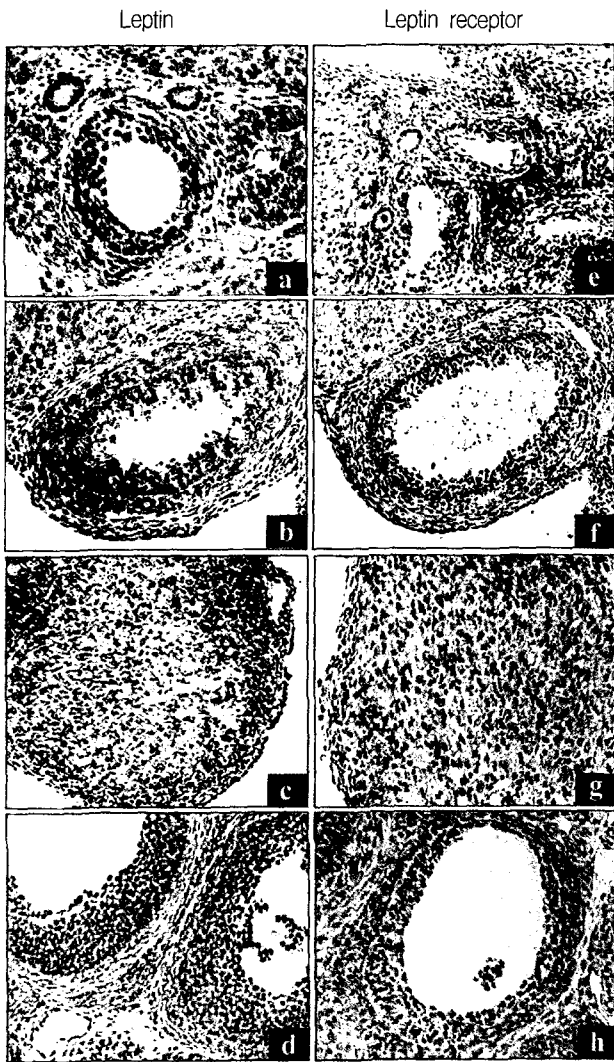


Fig. 1. Expression of leptin and its receptor in primordial and secondary follicles(a, e), antral follicle(b, f), and corpus luteum(c, g) of adult rat ovary. Negative control(d, h). CL, corpus luteum; gc, granulosa cells; tc, theca cells. Arrows indicate primordial follicles. Original magnification, $\times 200$.

Table 1. Changes of body weights during the estrous cycle of rats

Groups	Body weights
Diestrus(n=16)	215.00 \pm 13.10
Proestrus(n=18)	205.500 \pm 6.27
Estrus(n=11)	206.00 \pm 10.67
Metestrus(n=15)	201.00 \pm 8.12

Data are expressed as the mean \pm SEM.

혈중 leptin 농도의 변화가 체중에서 기인한 것인지를 알아보기 위하여 각 주기별 개체의 체중을 측정된 결과, 각 주기별로 유의한 차이는 나타나지 않았다(Table 1).

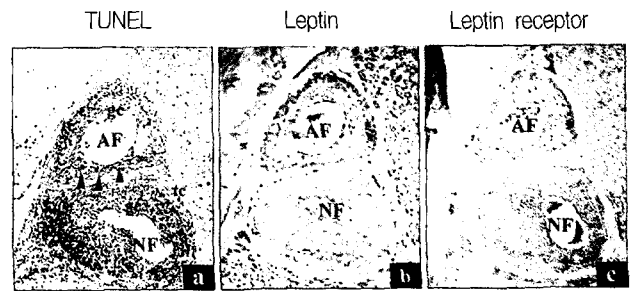


Fig. 2. Expression of leptin and its receptor in atretic and normal follicles of adult rat ovary. AF, atretic follicle; NF, normal follicle; gc, granulosa cells; tc, theca cells. Arrow heads indicate apoptotic cells. Original magnification, $\times 200$.

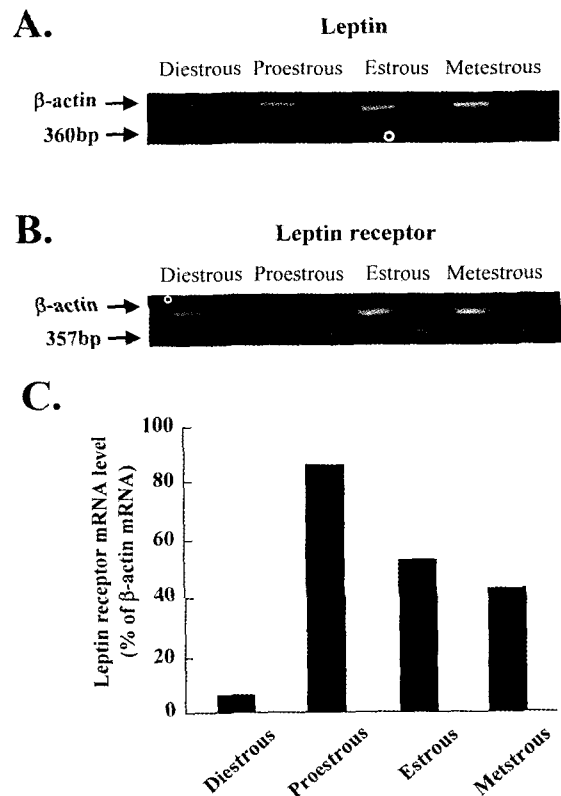


Fig. 3. RT-PCR analysis for the expression of leptin(A) and its receptors(B, C) in the ovaries during the estrous cycle of rats.

4. 발정 주기별 난소내 Leptin 및 Leptin 수용체 mRNA의 발현

발정 주기별로 leptin과 leptin 수용체의 발현을 RT-PCR 방법으로 조사한 실험에서 leptin mRNA는 모든 발정 주기에서 발현되지 않았다(Fig. 3A). Leptin 수용체 mRNA는 diestrus 시기에는 발현되지 않았지만, proestrus, estrus, metestrus

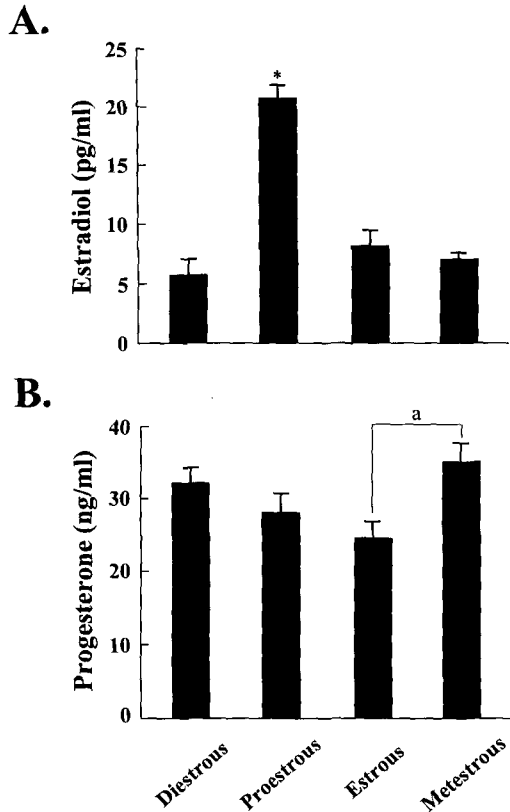


Fig. 4. Concentrations of estradiol(A) and progesterone(B) in serum during the estrous cycle of rats. Data points represent the mean±SEM. *, $p < 0.05$ compared to concentrations of estradiol on diestrous, estrous, and metestrous phases. a, $p < 0.05$ compared to concentration of estradiol on the estrous phase.

시기에는 모두 발현되었다(Fig. 3B, C).

5. 혈액내 Leptin 및 스테로이드 호르몬 농도

각 주기별 leptin 농도의 변화를 측정하고, leptin의 농도 변화가 스테로이드 호르몬의 변화 양상과 어떤 관계가 있는지를 알아보기 위해서 각 주기별로 혈중 leptin 및 estradiol, progesterone의 양을 정량하였다.

Estradiol은 다른 시기에 비해 proestrous 시기(21.6 ± 6.4 pg/ml)에 유의하게 증가하였다가 estrous(8.4 ± 1.7 pg/ml), metestrous(7.1 ± 4.5 pg/ml), diestrus(5.5 ± 1.2 pg/ml) 시기에 점차적으로 감소하는 경향을 보였다($p=0.035$)(Fig. 4A). Progesterone 농도는 proestrous(26.4 ± 10.6 ng/ml), estrous(24.0 ± 3.3 ng/ml), diestrous 시기(32.5 ± 5.9 ng/ml)에 비해 metestrous(33.8 ± 11.1 ng/ml) 시기에 유의하게 증가하였다($p=0.041$)(Fig. 4B).

Leptin은 metestrous 시기(1391.8 ± 338.9 ng/ml)에서 estrous 시기(746.1 ± 158.3 pg/ml)에 비해 통계적으로 유의하게 증가

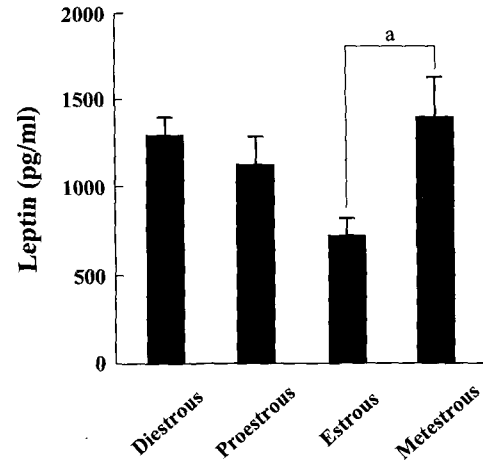


Fig. 5. Concentrations of leptin in serum during the estrous cycle of rats. Data points represent the mean±SEM. a, $p < 0.05$ compared to concentration of estradiol on the estrous phase.

하였고($p=0.025$), proestrous(1081.9 ± 501.9 pg/ml), diestrous 시기(1243.5 ± 371.9 pg/ml)에 비해서도 높은 경향을 보이지만 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 5).

고 찰

Leptin은 처음에는 비만을 조절하는 호르몬으로만 생각되어 왔으나(Zhang et al., 1994), 최근에는 여러 조직에 분포하고 다양한 기능을 가지는 물질로 밝혀졌다(Mantzoros & Moschos, 1998; Messinis & Milingos, 1999). 본 연구에서는 leptin의 여러 가지 기능 중 난소에 미치는 영향에 대한 연구로서 난소내에서의 leptin과 leptin 수용체의 발현 위치를 알아보고 발정주기에 따른 leptin과 leptin 수용체의 발현 변화를 조사하고자 하였다.

본 연구 결과 leptin은 협막세포와 일부 폐쇄 난포의 과립세포에서 염색되었고, 특히 황체에 강하게 염색되었다. 이러한 난소 내 leptin의 발현은 스테로이드 호르몬 생성에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추측된다. 황체의 과립세포를 제외하고 배양하면서 leptin을 처리하면 17β -estradiol의 생성이 감소하고(Zachow & Magoffin, 1997), 양의 협막세포를 배양하면서 leptin을 처리한 경우 progesterone과 androstenedione의 생성이 감소한다는 보고(Spicer & Francisco, 1998)는 이러한 난소 내 leptin의 기능을 뒷받침하고 있다. 또한 *ob/ob* 생쥐에 leptin을 주사하면 난소에서 cholesterol의 side chain cleavage와 17α -hydroxylase mRNA의 발현이 상향 조절된다는 보고(Zamorano et al., 1997)는 leptin이 스테로이드 호르몬 생성에

관여한다는 것을 보여주고 있다. 그러나 난포세포를 배양하면서 leptin을 처리하면 스테로이드 호르몬 생성이 감소한다는 보고(Zachow & Magoffin, 1997; Spicer & Francisco, 1998; Karlsson et al., 1997)는 오히려 leptin이 스테로이드 호르몬 생성을 억제하는 작용을 나타내는 상반된 결과를 보여준다. 이렇게 leptin의 작용이 상반되게 나타나는 것은 leptin이 생리적인 농도에서 작용하는 기전과 생리적 농도 이상일 때 작용하는 기전이 서로 다르기 때문인 것으로 사료된다.

한편, 본 연구 결과 황체세포에서 leptin은 발현되지만, leptin 수용체는 발현되지 않는 것으로 보아 황체세포에서 발현되는 leptin은 스테로이드 호르몬 생성에 관여하는 것이 아니고 단순히 지질 대사의 산물인 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 leptin 수용체는 leptin 발현과 유사하게 협막세포와 간질세포에서 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 특히 난포강이 형성되지 않은 난포의 난자에 강하게 염색되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 leptin이 난자의 초기 성장 과정에 중요한 조절 물질로 작용할 것이라는 것을 시사하고 있다. 그러나 leptin이 난자의 성장을 억제하는 작용을 하는 것인지 아니면 반대로 난자의 성장을 촉진시키는 것인지에 대해서는 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

혈중 스테로이드 호르몬 농도와 leptin 농도와의 연관성을 알아보기 위하여 발정주기에 따라 estradiol, progesterone 및 leptin 농도의 변화를 조사하였다. 혈중 leptin 농도는 metestrus 시기에 가장 높게 나타났는데, 이는 여성의 생리주기에 황체기때 혈중 leptin 농도가 증가하는 이전의 연구 결과와 일치하였다(Hardie et al., 1997). 즉, 황체기때 난포기에 비해 혈중 leptin 농도가 증가하는데, 이때 leptin 농도는 progesterone 농도와 비례 관계를 보인다. 황체기때 leptin 농도가 증가하는 이유는 아직 불분명하지만 아마도 progesterone이 지방세포를 자극하여 leptin의 생성을 촉진시키는 것으로 생각하고 있다(Hardie et al., 1997). 또한 동물 실험에서 estrogen이 leptin 분비에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌는데 난소를 절제할 경우 혈중 leptin 농도가 감소하나 스테로이드 호르몬을 투여하면 다시 회복된다는 보고가 있었다(Shimizu et al., 1997; Chu et al., 1999). Messinis 등(1999; 2000)의 연구에 의하면 양쪽 난소를 모두 절제한 여성에서 혈중 leptin 수치가 감소하는데, 이때 estrogen만을 투여했을 때는 별 다른 효과가 없었지만 estrogen과 progesterone을 함께 투여하는 경우에 leptin의 감소를 방지할 수 있다고 한다.

결론적으로 본 연구에서는 leptin mRNA는 흰쥐 난소에서 발현되지는 않았지만 면역조직화학방법으로 leptin의 발현을 확인하였고, leptin 수용체는 RT-PCR 방법과 면역조직화학방

법으로 모두 발현을 확인하였다. 이러한 결과는 leptin이 난소에서 직접 생성되는 것은 아니지만 외부에서 생성된 leptin이 난소의 생리적 기능을 조절할 수 있다는 것을 제시하고 있다. 또한 leptin의 발현에 스테로이드 호르몬이 직접적으로 영향을 미칠 수 있는 것으로 사료되며, 난소에서 leptin의 정확한 기능에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

인용문헌

- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuiper JL, Clifton DK, Steiner RA (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144-3147.
- Bray GA, York DA (1979) Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* 59:719-809.
- Chehab FF, Lim ME, Lu R (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12:318-320.
- Chu SC, Chou YC, Liu JY, Chen CH, Shyu JC, Chou FP (1999) Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci* 64: 2299-2306.
- Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR (1997) The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 3:467-472.
- Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P (1997) Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol* 47:101-106.
- Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B (1997) Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4144-4148.
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-635.
- Mantzoros CS, Moschos SJ (1998) Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clin Endocrinol* 49:551-567.
- Messinis IE, Kariotis I, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K

- (2000) Treatment of normal women with oestradiol plus progesterone prevents the decrease of leptin concentrations induced by ovariectomy. *Hum Reprod* 15:2383-2387.
- Messinis IE, Milingos SD (1999) Leptin in human reproduction. *Hum Reprod Update* 5:52-63.
- Messinis IE, Milingos SD, Alexandris E, Kariotis I, Kollios G, Seferiadis K (1999) Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. *Hum Reprod* 14:913-918.
- Nakashima K, Narazaki M, Taga T (1997) Overlapping and distinct signals through leptin receptor (OB-R) and a closely related cytokine signal transducer, gp130. *FEBS Lett* 401: 49-52.
- Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N, Mori M (1997) Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154: 285-292.
- Spicer LJ, Francisco CC (1998) Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 58:207-212.
- Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Nakao K (1996) Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs-identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun* 225:75-83.
- Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 6093-6096.
- Vydelingum S, Shillabeer G, Hatch G, Russell JC, Lau DC (1995) Overexpression of the obese gene in the genetically obese JCR:LA-corpulent rat. *Biochem Biophys Res Commun* 216:148-153.
- Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C, Kuijper JL (1995) Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* 96: 2065-2070.
- Zachow RJ, Magoffin DA (1997) Direct intraovarian effects of leptin: Impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 β production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138:847-850.
- Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorich LP, Bhat GK Brann DW (1997) Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 65:223-228.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its homologue. *Nature* 372:425-432.