

흰쥐 난소내 Leptin 및 Leptin 수용체의 발현

김명신¹ · 양현원¹ · 권혁찬¹ · 황경주¹ · 윤현숙² · 박금자³ · 김세광⁴ · 윤용달²

¹아주대학교 의과대학 산부인과학교실, ²한양대학교 생물학과,

³박금자 산부인과, ⁴연세대학교 의과대학 산부인과학교실

Expression of Leptin and Its Receptor in Rat Ovary

Myoung-Shin Kim¹, Hyun-Won Yang¹, Hyuck-Chan Kwon¹, Kyung-Joo Hwang¹,
Hyun-Sook Yoon², Keum-Ja Park³, Sei-Kwang Kim⁴ and Yong-Dal Yoon²

¹Department of OB/GYN, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-749

²Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791

³Park Women's Clinic, Seoul 150-070

⁴Department of OB/GYN, College of Medicine, Yonsei University, Seoul 135-270, Korea

요 약 : 비만유전자 산물인 leptin은 지방 조직에서 생성되어 혈액으로 분비되며, 신진대사, 식욕, 체열 등을 조절하여 비만의 억제 조절 물질로 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한 leptin은 비만 뿐만 아니라 생식 생리와도 관련이 있는 것으로 보이며, 이러한 leptin의 작용이 난소에 직접적인지 혹은 시상하부나 뇌하수체를 매개로 하는지는 아직 정확하게 밝혀지지 않고 있으며, 난소에서의 leptin 및 leptin 수용체의 발현 양상에 대한 연구 또한 미진한 상태에 있다. 따라서 본 연구는 생후 3주령과 8주령의 흰쥐 난소에서 leptin과 leptin 수용체의 발현 양상을 면역조직화학방법과 RT-PCR 방법으로 조사하였다. 면역조직화학방법 결과 3주령과 8주령 흰쥐 모두에서 leptin은 협막세포와 폐쇄 난포의 일부 과립세포에 염색되었고, leptin 수용체는 협막세포, 간질세포와 난포강이 형성되지 않은 난포의 난자에 염색되었다. RT-PCR 결과 3주 및 8주 흰쥐 난소에서 leptin mRNA는 모두 발현되지 않은 반면, leptin 수용체 mRNA는 모두 발현되었다. 결론적으로 leptin mRNA가 난소에서 발현되지는 않지만, 면역조직화학방법으로 leptin의 발현을 확인하였고, leptin 수용체는 난소에서 RT-PCR 방법과 면역조직화학방법으로 모두 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 혈액에서 난소 내로 유입된 leptin이 협막세포, 간질세포와 난자의 leptin 수용체에 결합하여 난소의 생리적 기능을 조절할 수 있는 것으로 사료된다.

ABSTRACT : Leptin, the product of the obese gene, is produced by adipose tissue and is known to be a hormone concerned with regulation of appetite and metabolism. Recent reports have shown that leptin is associated not only with obesity but also with female reproduction, but it has not yet been ascertained whether leptin acts directly on the ovaries or indirectly via the hypothalamus or pituitary pathway. The object of this study is to determine the expression of leptin and its receptor in the ovaries of 3 and 8 weeks old rats by immunohistochemistry and RT-PCR. In the ovaries of 3 and 8 weeks old rats, leptin was stained in the theca cells and portions of granulosa cells of atretic follicles, whereas leptin receptors was stained in interstitial cells and ova of preantral follicles. The RT-PCR results showed that leptin receptor mRNA was expressed in the ovaries of both immature and adult rats, while leptin mRNA was not. In conclusion, leptin mRNA was not expressed in the ovaries, however, leptin was detected by immunohistochemistry. Compared to leptin itself, leptin receptors in the ovaries were ascertained by both RT-PCR and immunohistochemistry. These results suggest that leptin is related to the regulation of the physiological functions of the ovaries.

Key words : Leptin, Leptin receptor, Ovary, Immunohistochemistry.

서 론

비만유전자 산물인 leptin은 지방 조직에서 생성되며, 신진대사, 식욕, 체열 등을 조절하는 비만의 억제 조절 물질로 알

려져 있다 (Leroy et al., 1996). 이러한 leptin의 혈중 농도는 체지방량과 비례해서 증가하며, 인슐린, corticosterone, 음식 섭취, circadian rhythm 같은 여러 가지 인자들의 영향을 받는 것으로 보고되고 있다 (Saladin et al., 1995; Sileker et al., 1996; Sinha et al., 1996). 특히 비만 여성에서 정상 체중의 여성보다 혈중 leptin 양이 증가된 양상을 보이며 (Brzechffa et al., 1996), 이와 같이 비만 여성에서 leptin 양이 증가하는

이 논문은 1998년 교육부지정 지역거점연구소(한양대 자연과학연구소, 윤용달) 특정연구비에 의하여 일부 연구되었음

것은 증가된 leptin이 뇌에 작용하여 신진 대사를 촉진시키고, 식욕은 감퇴시켜 체지방 증가를 억제시킴으로써 비만을 조절하기 위함으로 생각된다. 그러나 이러한 leptin의 증가에도 불구하고 비만인 상태가 지속되는 것은 증가된 leptin에 대한 뇌의 음성 피드백 (negative feedback) 작용이 정상적으로 이루어지지 않아 일어나는 것으로 생각할 수 있으며, 또한 혈중 leptin 양의 급격한 증가로 인해 leptin 수용체가 하향조절 (downregulation) 되거나 혹은 신호전달체계 (signal transduction)에 결함이 생겨 유발될 수 있는 것으로 보인다.

이러한 leptin은 비만 뿐만 아니라 생식 질환과도 관련이 있는데, 대표적으로 다낭성 난소 증후군을 나타내는 여성에서 정상 여성보다 높은 혈중 leptin 농도를 보인다 (Brzechffa et al., 1996). 또한 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). 그러나 이러한 leptin의 작용이 난소에 직접적인지 혹은 시상하부나 뇌하수체를 매개로 하는지는 아직 정확하게 밝혀지지 않았으며, 특히 난소에서 leptin 및 leptin 수용체의 발현 양상에 대한 연구는 매우 미진하다. 난소에서 leptin 수용체의 발현이 RT-PCR 방법으로 보고되기는 하였으나 (Zamorano et al., 1997), 난소에서 발현되는 그 정확한 위치에 대해서는 아직 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구는 생후 3주령의 미성숙 흰쥐 난소와 8주령의 성숙 흰쥐 난소에서 leptin과 leptin 수용체의 발현을 RT-PCR 방법으로 확인하고, 그 발현되는 위치를 면역조직화학방법으로 조사하고자 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 아주대학교 동물 사육실에서 광주기를 명 14/암 10 시간으로 유지시키고 물과 먹이를 충분히 공급하면서 사육한 3주령과 8주령의 흰쥐 (Sprague-Dawley) 암컷을 사용하였다. 3주령과 8주령의 흰쥐 암컷의 난소를 채취하여 한쪽 난소는 RNAzol™B에 넣어 RT-PCR 전까지 -70℃ 저온 냉동기에 보관하였고, 다른 쪽 난소는 면역조직화학방법을 위해 4% paraformaldehyde에 고정하였다.

2. RNA 추출

Total RNA를 추출하기 위하여 1 ml의 RNAzol™B (Tel-Test Inc.)에 담긴 난소를 얼음 위에서 homogenizer로 균질화하였다. 균질화된 현탁액 1 ml에 0.1 ml chloroform을 넣어 15초간 잘 섞어준 후 12,000 g로 4℃에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하고 있는 무색의 수용액층을 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 15분간 얼음 위에서 RNA를 침전시킨다. 다시 12,000 g로 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 75% ice-cold ethanol로 세척하여 10~15분간 진공상태에서 건조시켰다. 건조된 침전물은 diethylpyrocarbonate (DEPC) -treated water 혹은 nuclease-free water에 용해시켜 60℃에서 15분간 배양한 후 260 nm/280 nm에서의 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 측정 한 다음 저온 냉동기에 보관하였다.

3. RT-PCR

RNA 1 µg (10 µl)을 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mixture, 1 U의 RNase inhibitor, 50 pmole의 random 9mer, 15 U의 AMV-reverse transcriptase (Promega)를 포함하는 15 µl의 반응 buffer와 혼합시켰다. 이러한 반응 혼합물을 PCR Thermal Cycler 480 (TaKaRa)으로 옮겨 상온에서 10분, 42℃에서 75분, 95℃에서 5분간 가열하여 reverse transcription (RT) 반응을 시켰다. PCR 증폭을 위하여 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 각각 10 mM의 dNTP mixture, 1.25 U의 Taq polymerase (TaKaRa)와 각각 50 pmole의 3'과 5'의 primer를 5 µl의 RT 산물과 혼합하여 총 50 µl의 반응 혼합물을 만들었다.

Leptin의 primer는 5'-CACAAAACCCTCATCAAGACC-3'와 5'-CAGCCTGCTCAAAGCCACCACC-3'(Vydellingum et al., 1995)를 사용하였고, leptin 수용체의 primer는 5'-ATGACGCAGTGACTGCTG-3'와 5'-GTGGCGA-GTCAAGTGAACCT-3' (Zamorano et al., 1997)를 사용하였으며 각각의 반응 산물은 360 bp와 357 bp이다. 각각의 혼합물은 50 µl의 mineral oil을 넣어 표면을 덮은 후 PCR Thermal Cycler 480 (TaKaRa)에서 증폭시켰다. Predenaturation은 94℃에서 5분간 실시하였고, 총 35 cycles을 94℃에서 1분, 58℃에서 2분, 72℃에서 2분간 반응시킨 후 72℃에서 10분간 postelongation 반응을 시켰다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후에 0.5% ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator (Ultra Lum, Carson, USA)로 관찰하였다.

4. 면역조직화학방법

4% paraformaldehyde에 고정된 난소는 paraffin으로 포매한 후 5µm 두께의 절편을 만들어 통상의 탈파라핀 과정과 함수 과정을 수행하였다. 절편 슬라이드를 3% H₂O₂ 용액에 5분간 전처리하여 조직에 남아 있는 peroxidase를 제거한 후 leptin (Y-20)과 leptin receptor (K-20)에 대한 일차 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)로 1시간 동안 상온의 항습 chamber에서 반응시킨 후, LSAB (Dako)에 들어 있는 2차 항체와 streptavidin을 각각 15분간 처리하였다. 슬라이드를 TBS로 씻은 후 diaminobenzidine (DAB, DAKO)을 이용하여 발색시켜 methylene blue로 대조 염색하였다.

결 과

1. RT-PCR에 의한 leptin 및 leptin 수용체의 발현

Leptin mRNA는 3주와 8주 흰쥐 난소에서 모두 발현되지 않았으며, leptin 수용체 mRNA는 3주와 8주 흰쥐 난소 모두에서 357 bp의 band를 나타냈다 (Fig. 1).

2. 면역조직화학방법에 의한 leptin 및 leptin 수용체의 발현

3주 흰쥐 난소에서 leptin은 협막세포와 일부 폐쇄 난포의 과립세포에서 염색되었다 (Fig. 2A, B). Leptin 수용체는 협막세포와 간질세포, 그리고 난자에 염색되었는데, 특히 난자는 난포강이 형성되지 않은 난포의 난자에는 염색되는 반면, 이미 난포강이 형성된 난포의 난자는 전혀 염색되지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2C, D).

8주 흰쥐 난소에서 leptin은 3주에서와 비슷하게 협막세포

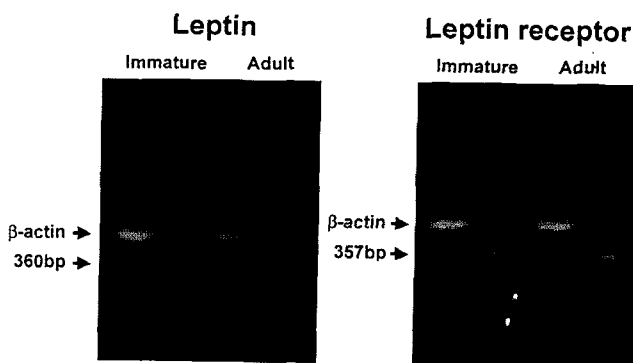


Fig. 1. RT-PCR analysis for the expression of the leptin and leptin receptor in the ovaries of immature (3 weeks old) and adult (8 weeks old) rats.

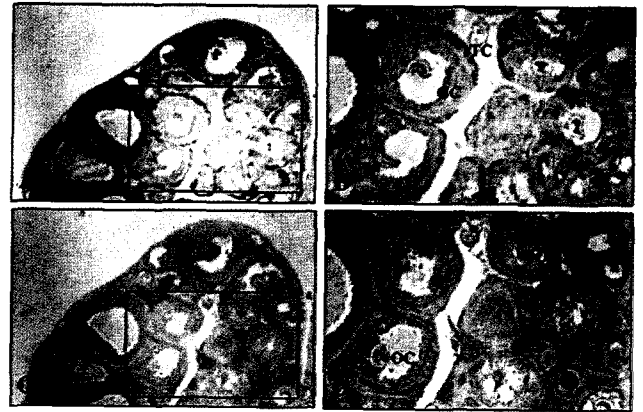


Fig. 2. Immunohistochemistry of leptin (A, B) and its receptor (C, D) in the ovaries of immature (3 weeks old) rats. Tissue sections of rat ovaries were incubated with leptin and its receptor primary antibodies. Sections were washed and then incubated with biotinylated secondary antibody and anti-goat conjugated to biotin. The immunoreaction was visualized by diaminobenzidine. Sections were counterstained with methylene blue. GC, granulosa cells; OC, oocytes; TC, theca cells. Magnification: A, C, ×100; B, D, ×400.

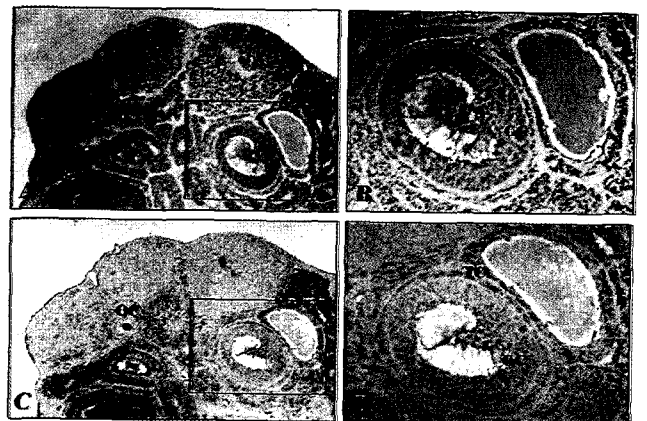


Fig. 3. Immunohistochemistry of leptin (A, B) and its receptor (C, D) in the ovaries of adult (8 weeks old) rats. Tissue sections of rat ovaries were incubated with leptin and its receptor primary antibodies. Sections were washed and then incubated with biotinylated secondary antibody and anti-goat conjugated to biotin. The immunoreaction was visualized by diaminobenzidine. Sections were counterstained with methylene blue. GC, granulosa cells; LC, luteal cells; OC, oocytes; TC, theca cells. Magnification: A, C, ×100; B, D, ×400.

에서 염색되었고, 황체세포에서 강한 염색 정도를 보였다

(Fig. 3A, B). Leptin 수용체는 leptin과는 달리 황체세포에는 전혀 염색되지 않았고, 3주에서와 마찬가지로 협막세포와 간질세포, 그리고 난포강이 형성되기 이전의 난포내 난자에 강하게 염색되었다 (Fig. 3C, D).

고찰

최근에 알려지고 있는 leptin이란 물질이 특이하게 비만인 여성에서 혈액내 다량 존재한다는 사실이 밝혀지면서 leptin에 대한 관심이 높아지고 있다. Leptin은 167개의 아미노산으로 구성된 단백질로 지방 조직에서 생성되어 혈액으로 분비되며 (Leroy et al., 1996), 혈액내로 분비된 leptin은 뇌, 췌장, 생식 기관 등에 분포하고 있는 leptin 수용체와 결합하여 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Cioffi et al., 1996).

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. 또한 인간에서도 체외수정 시술시 얻은 난자와 과립세포에서 leptin과 leptin 수용체의 발현이 보고되고 있다 (Cioffi et al., 1997; Karlsson et al., 1997). 그러나 이러한 결과들은 난소내 leptin과 leptin 수용체의 발현을 확인하기는 하였으나, 그 발현되는 정확한 위치에 대한 보고는 미진한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 면역조직화학방법으로 난소에서 발현되는 leptin과 leptin 수용체의 정확한 위치를 알아보려고 하였다.

Leptin은 3주와 8주령의 협막세포와 일부 폐쇄 난포의 과립세포에서 염색되었고, 특히 8주에서는 황체에 강하게 염색되었다. 협막세포와 과립세포에서 발현되는 leptin은 스테로이드 호르몬 생성에 관여하는 것으로 보여진다. 흰쥐의 과립세포를 체외에서 배양하면서 leptin을 처리하면 17 β -estradiol의 생성이 감소하고 (Zachow & Magoffin, 1997), 양의 협막세포를 배양하면서 leptin을 처리하면 progesterone과 androstenedione의 생성이 감소한다는 보고 (Spicer & Francisco, 1998)와 체외수정 시술시 얻은 인간의 과립세포를 배양하면서 leptin을 처리하면 estradiol 생성이 감소한다는 보고 (Karlsson et al., 1998)는 이러한 leptin의 기능을 제시하고 있다. 또한 leptin과 leptin 수용체가 정상 난포보다는 폐쇄 난포에서 더 많이 발현되는 양상은 leptin의 스테로이드 호르몬 생성 억제 작용을 간접적으로 보여주고 있다. 그러나 황체세포에서는 leptin은 발현되지만, leptin 수용체는 전혀 발현되지 않는 결과로 보아 황체세포에서 염색되는 leptin은

스테로이드 호르몬 생성에 관여하는 것이 아니고 단순히 지질 대사의 산물인 것으로 사료된다.

Leptin 수용체는 cytokine receptor superfamily에 속하며 서로 다른 세포내 domain을 갖는 여러 종류의 이성체가 존재하는 것으로 알려져 있다 (Tartaglia et al., 1995; Cioffi et al., 1996). 세포내 domain이 긴 long form만이 세포내 신호 전달 과정에 관여하고, 세포내 domain이 짧은 short form은 아직 그 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않다 (Baumann et al., 1996; Cioffi et al., 1996; Ghilardi et al., 1996). 난소에는 이러한 두 가지 이성체가 모두 존재하는 것으로 알려져 있는데 (Cioffi et al., 1997), long form에 비해 short form이 훨씬 더 많이 발현된다고 보고되었다 (Karlsson et al., 1997). 따라서 난소에서 상대적으로 많이 발현되는 short form은 세포내 신호 전달 기능을 가질 것으로 보여지며, short form만을 발현하는 간세포를 배양하면서 leptin을 처리했을 때 leptin이 인슐린의 작용을 억제한다는 보고 (Cohen et al., 1996)는 이러한 가설을 뒷받침 해준다.

본 연구에서 leptin 수용체는 협막세포와 간질세포, 그리고 난자에 염색되었는데, 난포강이 형성되지 않은 난포의 난자에는 염색되는 반면, 이미 난포강이 형성된 난포의 난자는 전혀 염색되지 않는 것을 확인할 수 있었다. Leptin 수용체의 발현이 난포강 형성 유무에 따라 다르게 나타나는 결과에서 leptin이 난포 발달 과정에서 중요한 조절 물질로 작용할 것이라는 가설을 제시할 수 있다. 그러나 leptin이 난포 발달을 억제하는 작용을 하는 것인지 아니면 반대로 난포 발달을 자극하는 것인지에 대해서는 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

아직까지 난소에서 leptin의 기능에 대해서는 정확하게 알려진 것이 없지만, 스테로이드 호르몬 생성에 관여하는 것으로 보여진다. ob/ob mice에 leptin을 주사하면 난소에서 cholesterol의 side chain cleavage와 17 α -hydroxylase mRNA의 발현이 상향조절 (upregulation)된다는 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.

또한 흰쥐의 과립세포를 배양하면서 leptin을 처리했을 때 스테로이드 호르몬 생성이 감소하는 것은 leptin이 IGF-1의

작용을 억제하기 때문이라고 한다 (Zachow & Magoffin, 1997). IGF-1은 헤파세포와 과립세포에 결합하여 스테로이드 호르몬 합성을 직접적으로 조절하는 중요한 물질로써 또한 과립세포의 세포자연사 (apoptosis)를 억제하는 것으로 알려지고 있다 (Barres et al., 1992). 따라서 과립세포에서 leptin에 의한 IGF-1 작용의 억제 효과는 스테로이드 호르몬 합성의 억제 효과와 더불어 과립세포에 세포자연사를 유발시켜 난포의 기능을 저하시킬 것으로 사료되며, 본 연구에서 폐쇄 난포에서 leptin과 leptin 수용체가 많이 발현되는 것은 이러한 가설을 뒷받침 해준다고 할 수 있다.

결론적으로 본 연구에서는 leptin mRNA는 흰쥐 난소에서 발현되지는 않았지만, 면역조직화학방법으로 leptin의 발현을 확인하였고, leptin 수용체는 RT-PCR 방법과 면역조직화학방법으로 모두 발현을 확인하였으며, 이러한 결과는 leptin이 난소에서 직접 생성되는 것은 아니지만 외부에서 생성된 leptin이 난소의 생리적 기능을 조절한다는 것을 시사한다고 사료되며 난소에서 leptin의 정확한 기능에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

인용문헌

- Barash IA, Cheung CC, Weigle S, Ren H, Kabigting EB, Kuiper JL, Clifton DK, Steiner RA (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144-3147.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46.
- Baumann H, Morella KK, White DW, Demski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA (1996) The full-length leptin receptor has signaling capacities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8374-8378.
- Bray GA, York DA (1979) Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autocrine and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* 59:719-809.
- Brzechffa PR, Jakimiuk AJ, Agarwal SK, Weitsman SR, Buyalos RP, Magoffin DA (1996) Serum immunoreactive leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4166-4169.
- Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR (1996) Novel B219/OB receptor isoforms: Possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nature Med* 2:585-589.
- 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.
- Cohen B, Novick D, Rubinstein M (1996) Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274:1185-1188.
- Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC (1996) Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6231-6235.
- Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS, Carlsson B (1997) Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4144-4148.
- Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Freidman JM, Ailhaud G, Dani C (1996) Expression of ob gene in adipose cells. *J Biol Chem* 271:2365-2368.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Stales B, Auwerx J (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-529.
- Sileker LJ, Sloop KW, Suface LP, Kriaucinus A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW (1996) Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 271:5301-5304.
- Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriaucinas A, Stephens YW, Magosi S, Marco C, Caro JF (1996) Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 97:1344-1347.
- Spicer LJ, Francisco CC (1998) Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 58:207-212.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 81:1271-1275.

- 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.
- 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, Freidman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its homologue. *Nature* 372:425-432.