

흰쥐의 시구하부에서 GnRH mRNA의 발현에 미치는 N-메틸-D,L-아스파라긴산(NMA)의 영향

남정학, 김정실, 박철해

동물의 번식과정은 뇌하수체에서 분비되는 성선자극호르몬(FSH, LH)에 의하여 조절되며 이것은 시구하부에서 분비되는 고나도리베린(GnRH)에 의하여 조절된다.

글루타민산의 협동체인 N-메틸-D,L-아스파라긴산(NMA)을 일정한 조건하에서 적용하면 여러가지 집짐승종들에서 뇌하수체의 FSH와 LH의 분비를 증가시킨다는것이 밝혀졌다.[3]

현재 우리 나라에서는 NMA를 동물의 번식조절에 리용한 자료는 있지만 NMA가 시구하부에서 GnRH의 유전자발현에 미치는 영향을 밝힌 자료는 없다.

이로부터 우리는 흰쥐의 시구하부에서 GnRH mRNA의 발현에 미치는 NMA의 영향을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

NMA는 실험실에서 D,L-아스파라긴산을 메틸화하여 가루제제로 만든것(순도 90%)[1]을 리용하였다.

실험은 몸질량이 (156.7 ± 9.3) g인 흰쥐(《Wistar》)수컷을 정상대조무리와 시험무리로 나누고 시험무리는 다시 4개의 무리로 나누어 진행하였다.

정상대조무리($n=3$)는 0.85% 생리적식염수 0.5mL를 꼬리정맥에 주사한 다음 15min후에 대가리를 잘라 시구하부를 떼냈다. 시험무리 1($n=3$)은 생리적식염수에 푼 NMA를 몸질량 1kg당 10mg의 용량으로 꼬리정맥에 주사한 다음(0.5mL) 15min후에, 시험무리 2($n=3$)는 30min후에, 시험무리 3($n=3$)은 45min후에 시험무리 4($n=3$)는 60min후에 대가리를 잘라 시구하부를 떼냈다. 매개 무리에서 떼낸 3개의 시구하부는 합쳐서 하나의 시료로 리용하였다.

떼낸 시구하부에서 총RNA를 Trizol법[2]으로 분리하고 cDNA합성키트(《Hiscript II》, 1st Strand cDNA Synthesis Kit)를 리용[2, 4]하여 한오리 총cDNA를 합성하였다. 다음 β -악틴 프라이머와 GnRH프라이머를 리용하여 PCR를 진행하고 겔도크(《ST5》)를 리용하여 1% 아가로스겔전기영동상을 분석하였다.

결과 및 논의

각이한 시험무리들에서 분리한 한오리 총cDNA를 주형으로 하여 미리 설계한 β -악틴 프라이머(상류 5'-AACTGGGACGATATGGAGAAG-3', 하류 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3')를 넣고 PCR를 진행한 다음 DNA증폭산물을 1% 아가로스겔에서 전기영동하였다. 나노핵산, 단백질정량장치(《ND-2000》)를 리용하여 매 시료들의 cDNA농도를 측정하였다. 측정결

과 cDNA농도는 정상대조무리에서 1 237.7ng/ μ L, 시험무리 1에서는 1 234.1ng/ μ L, 시험무리 2에서는 1 099.9ng/ μ L, 시험무리 3에서는 1 131.5ng/ μ L, 시험무리 4에서는 1 280.9ng/ μ L였다.

다음 총cDNA농도측정값에 기초하여 매 시료들의 β -악틴 cDNA증폭산물량이 일치하도록 PCR에서 주형으로 리용하는 시료량을 정상대조무리는 2.1 μ L, 시험무리 1은 2.1 μ L, 시험무리 2는 2.4 μ L, 시험무리 3은 2.3 μ L, 시험무리 4는 2.0 μ L로 재조절하고 다시 프라이머를 넣고 PCR를 진행한 결과는 그림 1과 같다.

PCR조건은 95°C 5min에서 1회전→95°C 30s, 49°C 30s, 72°C 45s에서 45회전이다.

그림 1에서 보는바와 같이 모든 시험무리들에서 β -악틴 cDNA증폭산물량이 일치하였다.

β -악틴을 리용하여 시험무리들에서 유전자전사수준을 일치시킨 다음 GnRH유전자의 프라이머(상류 5'-TTGATCCTCTCCTTGCCCATC-3', 하류 5'-GCCGCTGTTGTTCTGTTGACTG-3')로 PCR를 진행하고 cDNA증폭산물을 전기영동하였다.(그림 2) PCR조건은 95°C 5min에서 1회전→95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 45s에서 45회전이다.

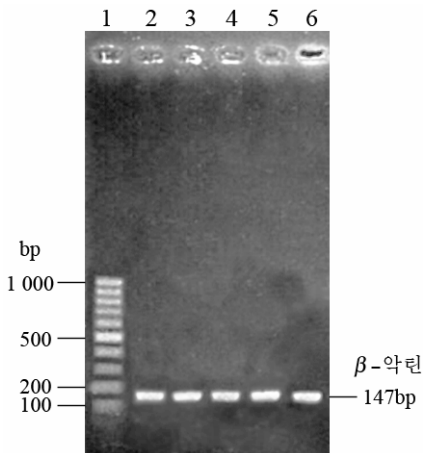


그림 1. β -악틴 cDNA증폭산물의 전기영동상

1-100bp 분자크기표식자, 2-정상대조무리, 3-시험무리 1, 4-시험무리 2, 5-시험무리 3, 6-시험무리 4

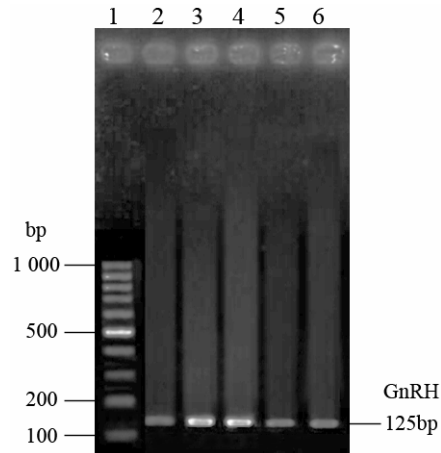


그림 2. GnRH cDNA증폭산물의 전기영동상

1-100bp 분자크기표식자, 2-정상대조무리, 3-시험무리 1, 4-시험무리 2, 5-시험무리 3, 6-시험무리 4

그림 2에서 보는바와 같이 시험무리 1과 시험무리 2에서 정상대조무리에 비하여 cDNA증폭산물의 띠가 진하게 나타났으며 시험무리 1에서 더 진하게 나타났다. 시험무리 3과 시험무리 4에서는 정상대조무리와 거의 비슷한 cDNA증폭산물의 띠가 나타났다. 이것은 NMA를 몸질량 1kg당 10mg의 용량으로 흰쥐에 주사한 후 15min과 30min에 흰쥐의 시구하부에서 GnRH유전자가 정상대조무리보다 많이 발현되고 특히 주사후 15min에 GnRH유전자발현이 최대 된다는것을 보여준다. 또한 NMA주사후 45min과 60min에는 GnRH유전자발현이 정상대조무리와 차이가 없다는것을 보여준다. 이것은 또한 혈청속 FSH/LH함량을 증가시키는 NMA의 작용은 흰쥐의 시구하부에서 GnRH유전자발현수준의 증가에 의하여 나타나며 GnRH유전자발현량은 NMA주사후 15min과 30min후에 높아지는데 특히 15min후에 최대 된다는것을 보여준다.

맺 는 말

NMA는 흰쥐의 시구하부에서 주사후 15min과 30min에 GnRH mRNA발현을 증가시키는데 특히 주사후 15min만에 최대로 된다.

참 고 문 헌

- [1] 김정실 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 3, 59, 주체106(2017).
- [2] A. C. Gore et al.; Endocrinology, 134, 2026, 1994.
- [3] M. J. Estienne et al.; Journal of Animal Science, 78, 2, 365, 2000.
- [4] Sheng Zhao et al.; Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 316, 4, 2015.

주체108(2019)년 4월 5일 원고접수

Effect of *N*-Methyl-D,L-Aspartic Acid(NMA) on the Expression of GnRH mRNA in the Hypothalamus of Rats

Nam Jong Hak, Kim Jong Sil and Pak Chol Hae

GnRH mRNA levels in the hypothalamus of male rats is increased at 15min and 30min after 5mg/kg NMA injection and particularly becomes maximum at 15min.

Key words: NMA(*N*-methyl-D,L-asparate), GnRH, gene expression