

흰쥐시구하부의 GHRH mRNA상대발현량에 미치는 N-메틸-D,L-아스파라긴산(NMA)의 영향

김정실, 박철해, 남정학

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《축산을 발전시키기 위하여서는 집짐승종자문제와 먹이문제를 풀고 사양관리를 개선하며 수의방역대책을 철저히 세워야 합니다.》

동물의 성장과정은 뇌하수체에서 분비되는 성장호르몬(GH)에 의하여 조절되며 GH의 합성과 분비는 시구하부에서 분비되는 성장호르몬방출호르몬(GHRH)에 의해 조절된다.

N-메틸-D,L-아스파라긴산(NMA)은 시구하부의 글루타민산접수체의 한 종류인 N-메틸-D-아스파라긴산(NMDA)접수체에 흥분성물질로 작용하여 GHRH와 성선자극호르몬방출호르몬(Gn-RH)의 분비를 촉진시켜 뇌하수체전엽에서 GH와 성선자극호르몬의 분비를 강화시킨다[2, 3, 5]는것이 밝혀졌다.

현재까지 우리 나라에서 NMA를 동물의 성장조절에 리용한 자료는 있지만 NMA의 중추성작용물질배를 분자적수준에서 밝힌 자료는 없다.

이로부터 우리는 흰쥐의 시구하부에서 GHRH mRNA의 상대발현량에 미치는 NMA의 영향을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

실험은 몸질량이 156.7 ± 9.3 g인 흰쥐(《Wistar》) 수컷 15마리를 정상대조무리와 4개의 시험무리로 나누어 진행하였다. NMA는 실험실에서 D,L-아스파라긴산을 메틸화하여 가루제제로 만든것[1]을 리용하였다.(순도 90%)

정상대조무리에 대해서는 0.85% 생리적식염수 0.5mL를 꼬리정맥에 주사한 다음 15min 후에 대가리를 잘라 시구하부를 떼냈다. 시험무리에 대해서는 생리적식염수에 푼 NMA를 몸질량 1kg당 10mg을 꼬리정맥에 0.5mL 주사한 다음 시험무리 1에서는 15min후, 시험무리 2에서는 30min후, 시험무리 3에서는 45min후, 시험무리 4에서는 60min후에 대가리를 잘라 시구하부를 떼냈다. 매 무리에서 떼낸 3개의 시구하부는 합쳐서 하나의 시료로 리용하였다.

떼낸 시구하부에서 총RNA를 Trizol법[4]으로 분리하고 cDNA합성키트(《M-MLV RTase》)를 리용하여 한오리cDNA를 합성[2, 4]하였다. 다음 β -악틴프라이머와 GHRH프라이머를 리용하여 PCR를 진행하고 겔도크(《ST5》)를 리용하여 아가로즈겔전기영동을 하였다.

리용한 프라이머와 PCR조건은 다음과 같다.

β -악틴프라이머 : 정방향 5'-AACTGGGACGATATGGAGAAG-3'
역방향 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'
GHRH프라이머: 정방향 5'-CCTGCTCCTGCCAGCCTTAAG-3'
역방향 5'-GCGGGACACTGTGCAGTTGTG-3'

PCR는 95°C에서 5min동안 초기변성하고 95°C에서 30s 변성, 55°C에서 30s 아닐링, 72°C에서 45s 증폭과정을 45회 반복한 다음 72°C에서 10min동안 최종연장하는 방법으로 진행하였다.

결과 및 논의

각이한 시험무리들에서 떼낸 시구하부로부터 총RNA를 분리하고 1% 아가로스겔을 리용하여 전기영동을 하였다. 결과 밝게 보이는 2개의 띠가 나타났는데 이 띠들은 28S, 18S rRNA에 해당하는것이다.(그림 1)

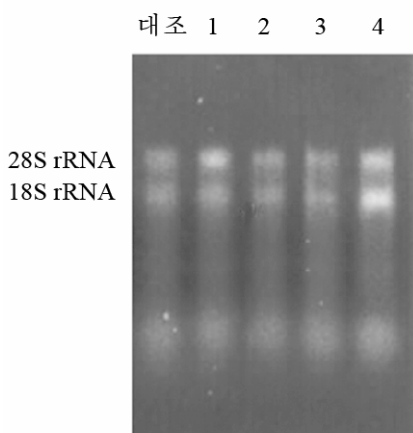


그림 1. 흰쥐시구하부로부터 분리한 총RNA의 아가로스겔전기영동상
대조-대조무리, 1-시험무리 1, 2-시험무리 2, 3-시험무리 3, 4-시험무리 4

매 시료로부터 분리한 총RNA농도를 나노핵산단백질정량장치(《ND-2000》)로 측정 한 결과는 표 1과 같다.

표 1. 분리한 총RNA의 농도

	적용량 $/(mg \cdot kg^{-1})$	주사후 죽인 시간/min	핵산농도 $/(ng \cdot \mu L^{-1})$	A_{260}/A_{280}
대조무리	—	15	329.7	1.89
시험무리 1	10	15	315.5	1.83
시험무리 2	10	30	263.2	1.74
시험무리 3	10	45	294.6	1.78
시험무리 4	10	60	334.8	1.92

$n=3$

표 1에서 보는바와 같이 A_{260}/A_{280} 값은 대조무리와 시험무리들에서 각각 1.89, 1.83, 1.74, 1.78, 1.92로서 표준RNA(1.8~2.0)에 가깝다.

분리한 총RNA를 주형으로 역전사효소를 리용하여 한오리cDNA를 합성하고 나노핵산단백질정량장치(《ND-2000》)를 리용하여 매 시료들의 cDNA농도를 측정하였다.(표 2)

cDNA농도에 기초하여 매 시료들의 β -악틴cDNA증폭산물량들이 일치하도록 PCR반응에서 형틀로 리용하는 시료량을 정상무리의 경우에는 $2.0\mu L$, 시험무리 1의 경우에는 $2.1\mu L$, 시험무리 2의 경우에는 $2.4\mu L$, 시험무리 3의 경우에는 $2.3\mu L$, 시험무리 4의 경우에는 $2.1\mu L$ 로 정하고 β -악틴프라이머와 GHRH프라이머를 리용하여 PCR반응을 진행한 다음 증폭산

표 2. 합성한 cDNA 농도

	적용량 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	주사후 죽인 시간/min	핵산농도 ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	A_{260}/A_{280}
대조무리	—	—	1247.7	1.71
시험무리 1	10	15	1244.1	1.68
시험무리 2	10	30	1099.9	1.64
시험무리 3	10	45	1131.5	1.65
시험무리 4	10	60	1280.9	1.73

n=3

물을 전기영동하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 시험무리 1과 시험무리 2, 시험무리 3에서 대조무리에 비하여 cDNA 증폭산물의 띠가 진하게 나타났으며 시험무리 2에서 가장 진하게 나타났다. 시험무리 4에서는 정상대조무리와 거의 비슷한 cDNA 증폭산물의 띠가 나타났다.

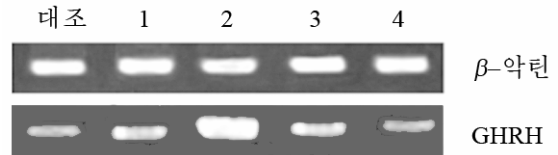


그림 2. GHRH cDNA 증폭산물의 전기영동상
대조-대조무리, 1-시험무리 1, 2-시험무리 2,
3-시험무리 3, 4-시험무리 4

실험결과들은 NMA를 몸질량 1kg당 10mg의 용량으로 흰쥐에 주사한 후 15min과 30min, 45min에 흰쥐의 시구하부에서 GHRH mRNA가 정상보다 많이 발현되고 특히 주사후 30min만에 GHRH mRNA 상대발현량이 최대로 된다는 것을 보여준다. 또한 NMA 주사후 60min에는 GHRH mRNA 상대발현량이 정상과 차이가 없었다. 이것은 혈청내 GH 함량을 증가시키는 NMA의 작용이 흰쥐의 시구하부에서 GHRH mRNA의 증가에 의하여 나타나는데 GHRH mRNA 상대발현량은 NMA 주사후 15~45min 사이에 높아지며 특히 30min 후에 최대로 된다는 것을 보여준다.

이로부터 NMA가 시구하부의 NMDA 접수체를 통하여 GHRH mRNA의 상대발현량을 높이며 GHRH의 합성과 분비를 자극하여 뇌하수체에서 GH의 합성과 분비를 촉진하는 방식으로 동물의 성장에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

맺는 말

NMA는 흰쥐의 시구하부에서 주사후 15min부터 45min 사이에 GHRH mRNA 발현을 증가시키는데 특히 주사후 30min만에 최대로 된다.

참고 문헌

- [1] 김정실 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 3, 59, 주체106(2017).
- [2] M. J. Estienne et al.; J. Anim. Sci., 74, 2, 597, 1996.
- [3] M. J. Estienne et al.; J. Anim. Sci., 78, 2, 365, 2000.
- [4] Ana Zuley Ruiz; R. Bras. Zootec., 43, 4, 183, 2014.
- [5] A. N. Noha et al.; Gene Report, 11, 150, 2018.

Effects of *N*-Methyl-D,L-Aspartate(NMA) on the Relative Expression Levels of GHRH mRNA in the Hypothalamus of Rats

Kim Jong Sil, Pak Chol Hae and Nam Jong Hak

The relative expression levels of GHRH mRNA in the hypothalamus of rats increased between 15min and 45min after 5mg/kg b. w. NMA injection and particularly GHRH mRNA level was maximum at 30min after NMA injection.

Keywords: *N*-methyl-D,L-aspartate(NMA), GHRH, gene expression