

## 성장호르몬방출호르몬에 대한 반응성을 보이는 뇌하수체 GH3 세포에서 G단백 돌연변이에 의한 소마토스타틴 수용체 mRNA의 변화

경희대학교 의과대학 약리학교실

김은희 · 손숙진 · 이민아 · 서상희 · 주성희 · 이 담 · 정현주 · 정지창 · 박승준

### Changes in Somatostatin Receptor mRNA Levels by G Protein Mutation in GH3 Cells Which Show Responsiveness to Growth Hormone-Releasing Hormone

Eun-Hee Kim, Sook-Jin Sohn, Min-A Lee, Sang-Hee Seo, Sung-Hee Ju,  
Dahm Lee, Hyun-Ju Chung, Jee-Chang Jung, Seung-Joon Park

Department of Pharmacology, Kyunghee University School of Medicine, Seoul 130-701, Korea

#### ABSTRACT

**Backgrounds:** GH3 cells lack growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) receptors. In this study, GH3 cells permanently transfected with human GHRH receptor cDNA (GH3-GHRHR cells), were established in order to examine the effects of GHRH and G protein mutation (*gsp* oncogene) on the levels of somatostatin receptor mRNA.

**Methods:** GH3 cells were permanently transfected with a plasmid expressing human GHRH receptor cDNA. The GHRH receptor mRNA was detected by RT-PCR. The responsiveness to GHRH was evaluated using a GHRH binding assay, Western blot analysis, Northern blot analysis, and measurements of the intracellular cAMP levels and GH release. Cells were transiently transfected with the *gsp* oncogene, and then treated with GHRH or octreotide for 4h. The sst1 and sst2 mRNA levels were measured using real-time RT-PCR analyses.

**Results:** GHRH receptor mRNA was detected in the GH3 cells permanently transfected with human GHRH receptor cDNA. The GHRH binding assay showed that GHRH was bound to the GH3-GHRHR cells. The GHRH treatment increased the intracellular cAMP levels, GH release, GH mRNA levels, and MAPK activity, as well as the levels of sst1 and sst2 mRNA. Transient expression of the *gsp* oncogene for 48h increased the cAMP, GH release, and levels of sst1 and sst2 mRNA. In the *gsp*-transfected GH3-GHRHR cells, GHRH stimulation resulted in decreases in the magnitude of the increase in the levels of sst1 and sst2 mRNA compared to those transfected with a control vector. Octreotide treatment did not alter the levels of sst1 and sst2 mRNA in either the control or *gsp*-transfected cells.

**Conclusion:** These results suggest that GH3 cells permanently transfected with the GHRH receptor are useful in the *in vitro* studies on the actions of GHRH. The *gsp* oncogene was shown to increase the levels of sst1 and sst2 mRNA in GH3 cells, but these findings are unlikely to be the major mechanism by which *gsp*-positive pituitary tumors show a greater response to somatostatin. The discrepancy between the *in vivo* and these *in vitro* results should be examined further (J Kor Soc Endocrinol 20:323~333, 2005).

**Key Words:** Somatostatin receptor, G protein mutation, GHRH receptor, GH3 cells, cAMP

접수일자: 2005년 3월 10일

통과일자: 2005년 4월 25일

책임저자: 박승준, 경희대학교 의과대학 약리학교실

\* 이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단(KRF-2002-0015-EP0056) 및 대한내분비학회 연구비(2003년도 연구보상)의 지원에 의하여 연구되었음.

## 서 론

시상하부에서 합성 분비되는 소마토스타틴은 뇌하수체 성장호르몬 분비세포로부터의 성장호르몬의 분비를 억제하며[1] 또한 성장호르몬 분비 종양의 일부에서도 그 분비를 억제할 수 있다고 알려져 있다[2~4]. 실제로 임상에서 말단 비대증 환자의 성장호르몬 분비 억제를 위해 쓰이는 장시간형 소마토스타틴 유도체인 octreotide에 대한 반응은 환자마다 많은 차이를 보이며 약 55% 정도에서만 현저한 억제반응을 보인다고 서양의 연구[5~10]나 국내의 연구[11]에서 보고되어 있다. 소마토스타틴이나 octreotide에 대한 반응성의 저하는 종양조직 내 소마토스타틴 수용체 농도의 저하와 관련이 있다고 가정되어 왔으나[12,13], 소마토스타틴 결합능이나 소마토스타틴에 의한 억제정도가 octreotide에 대한 반응도와 약한 상관관계를 보이고 있는데 이는 소마토스타틴 수용체가 여러 가지 아형을 가지고 있기 때문이라고 추정되고 있다[14]. 소마토스타틴과 특이적으로 결합하는 소마토스타틴 수용체는 억제성 G 단백질(Gi) 결합 수용체이며 현재 5가지 아형(ss1-5)의 유전자가 보고되어 있다[15~19]. 사람의 뇌하수체 종양에서는 sst4를 제외한 모든 아형이 발현이 된다[20~22]. 이중 sst2와 sst5는 octreotide에 대한 친화력이 특히 높은 것으로 알려져 있고[23], 거의 모든 뇌하수체 종양에서 발현된다고 알려져 있으나, 그 발현 정도는 종양에 따라 차이가 많으며[20,21], 그 농도가 증가하면 소마토스타틴에 대한 반응성이 좋아진다고 알려져 있다[12,13].

한편 G 단백질 돌연변이(*gsp* 종양유전자)를 가진 종양은 그렇지 않은 종양보다 소마토스타틴이나 그 유도체에 대한 반응이 우수하다고 국내[24]·외[25]의 연구를 통해 알려져 있으나 그 기전은 밝혀져 있지 않다. 이상의 소견으로부터 *gsp* 종양유전자를 가진 종양에서는 소마토스타틴 수용체가 많이 발현되어 있을 것이고 이로 인해 소마토스타틴에 대한 반응성이 좋아졌으리라는 가정을 할 수 있다. AtT-20 세포에서 sst2의 발현은 forskolin에 의해 증가된다는 보고[26]는 위 가정을 간접적으로 뒷받침하는 증거로 생각할 수 있다.

한편 저자 등은 1) 성장호르몬을 분비하는 뇌하수체종양 세포주인 GH3 세포에서의 sst2의 발현은 세포 내 cAMP의 증가를 초래하는 여러 자극들에 의해 증가[27]되며, 2) GH3 세포에 G 단백질 돌연변이 유전자를 일시적으로 혹은 영구히 발현시키면 세포 내 cAMP의 생성량이 증가하고 sst2의 전사가 증가하며[28], 3) 정상 쥐 뇌하수체 일차배양세포에서 sst2가 성장호르몬 방출호르몬(growth hormone-releasing hormone, GHRH)과 forskolin에 의해 그 발현이 증가됨을 보고[29]한 바 있다. 이상의 결과는 *gsp* 종양유전자를 가진 종양의 소마토스타틴 수용체 유전자와 그 단백질의 발현이 증가되어 소마토스타틴이나 그 유사체에 대한 반응이 좋아졌

음을 시사하는 것으로 위 가설을 뒷받침하는 결과이다. 그러나 최근의 국내[30]·외[31] 보고에 의하면 뇌하수체 종양에서는 이러한 관계가 성립되지 않았으므로 GH3 세포에서 얻은 결과를 임상적으로 적용할 수 없었다.

이와 같이 GH3 세포에서의 결과와 생체 내에서의 결과가 상이한 이유는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. GH3 세포에서 *gsp* 종양유전자의 발현에 의해 cAMP가 증가하고 소마토스타틴 수용체 유전자의 발현이 증가하였다 하더라도 시상하부의 조절을 받고 있는 생체 내에서는 성장호르몬의 분비조절에 관여하는 GHRH 및 소마토스타틴에 의해 소마토스타틴 수용체 유전자의 발현이 영향을 받을 가능성이 있다. 그러므로 본 연구에서는 *gsp* 종양유전자가 발현된 GH3 세포에서 GHRH 혹은 소마토스타틴 자극에 의한 소마토스타틴 수용체의 변화를 알아보고자 하였다. 그러나 GH3 세포는 GHRH로 자극했을 경우 성장호르몬의 분비반응과 성장호르몬 mRNA 합성반응을 자극하지 못하는 것으로 알려져 있다[32]. 이는 GH3 세포가 GHRH에 대한 반응을 매개하는 GHRH 수용체를 가지고 있지 않은 것을 시사하고 있다. 따라서 본 연구에서는 GH3 세포에 GHRH 수용체를 영구히 발현시켜 GHRH에 대한 반응성이 회복된 GH3 세포를 사용하여 *gsp* 종양유전자에 의한 소마토스타틴 수용체 유전자의 변화를 관찰하고, GHRH 혹은 octreotide에 의한 소마토스타틴 수용체 유전자 발현의 변화를 관찰하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 플라스미드

사람의 GHRH 수용체 cDNA를 포함하는 플라스미드 벡터는 Dr. Mayo (Northwestern University, Chicago, IL, USA)로부터 기증 받았다. *gsp* 종양유전자를 발현하는 플라스미드 벡터는 Simian virus의 촉진자를 dehydrofolate 유전자에 연결시킨 pSV2-dhfr (이하 pSV2로 약함)이었다. 이 플라스미드의 dehydrofolate 유전자 대신 Gas 유전자의 코돈 201의 arginine이 histidine으로 치환된 cDNA를 연결시킨 pSV2-Gas-R201H (이하 201로 약함)와 코돈 227의 glutamine이 leucine으로 치환된 cDNA를 연결시킨 pSV2-Gas-Q227L (이하 227로 약함)을 활성형 돌연변이로 사용하였으며, 야생형의 Gas cDNA를 연결시킨 pSV2-Gas-wt (이하 wt로 약함)를 대조군으로 사용하였다. 이상의 G 단백질 발현 벡터는 Dr. Loeffler (Institute de Physiologie et de Chimie Biologique, Strasbourg, France)로부터 기증받았다.

### 2. 세포배양 및 유전자 주입

GH3 세포는 American Type Culture Collection (ATCC) 으로부터 구입하였다. 배양액은 10%의 fetal bovine serum,

100 U/mL의 penicillin 및 100 µg/mL의 streptomycin을 함유한 DMEM/Ham's F-12 배지를 사용하였다. GHRH 수용체 유전자를 영구적으로 발현하는 GH3 세포를 확립하기 위하여 FuGene 6 transfection reagent (Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN, USA)를 이용한 유전자 영구 주입을 시행하였다. 유전자 주입 3일 후 5개의 배양접시에 나누어 400 µg/mL 농도의 G418 (geneticin)이 함유된 배지에서 4주간 배양하였다. 이 과정을 통해 선택된 세포를 GH3-GHRH 세포라 명명하였으며, RT-PCR을 통해 GHRH 수용체의 발현을 확인하였다. 사람의 GHRH 수용체 cDNA (GenBank Accession No. L01406)의 증폭을 위해 사용된 시발체의 염기서열은 sense primer: 5'-GGG TGA ACT TTG GGC TTT TTC TCA-3', antisense primer: 5'-TTC ATT GTT GCC ATC CTC TAC TGC-3'이었다. G 단백질 돌연변이를 발현하는 플라스미드 벡터는 FuGene 6 transfection reagent를 이용한 일시적 유전자 주입을 시행하였다.

### 3. GHRH 결합검사

GH3-GHRH 세포를 <sup>125</sup>I-labeled GHRH-(1-44) amide (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 및 10<sup>-12</sup>M~10<sup>-7</sup>M의 GHRH-(1-44) amide (Sigma, St.Louis, MO, USA)로 4시간 동안 처리하였다. 감마 카운터 (United Technologies Packard, Downers Grove, IL)를 이용하여 <sup>125</sup>I 방사능을 측정하여 GHRH의 GHRH 수용체에 대한 결합 정도를 측정하였다.

### 4. Western 블롯

GH3-GHRH 세포를 hGHRH(1-44) (10 nM) 혹은 갑상선자극호르몬 방출호르몬 (thyrotropin releasing hormone, TRH; 양성대조군으로 사용) (100 nM)으로 처리한 후 10분 후에 단백질을 추출하여 12% SDS-PAGE 겔에 전기영동하였다. 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성을 측정하기 위해 1차 항체인 rabbit anti-phospho-p44/p42 (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 결합시켰다. 2차 항체는 antirabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:5000)를 사용하였으며, enhanced chemiluminescence system (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 Kodak (Rochester, NY, USA) X-Omat 필름에 감광하였다.

### 5. Northern 블롯을 이용한 성장호르몬 유전자 발현의 측정

RNA는 Tri reagent protocol을 이용하여 추출하였다. 단 수용액 층을 Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1; pH 5.2)로 한 번 더 추출하여 RNA의 순도를 높였다. RNA

는 isopropanol로 침전시킨 후 70% 알콜로 세척하고 공기 중에서 말린 후 DEPC 처리 물에 녹였다. RNA의 농도는 OD 260/280 nm에서 흡광도계를 이용하여 정량하였다.

성장호르몬 유전자의 발현은 이미 보고된 방법[33]을 따라 Northern 블롯을 이용하여 측정하였다. 간단히 서술하면, 1% 한천-1.2% formaldehyde 겔에 2 µg의 RNA를 전기영동한 후 Nytran membrane (Schleicher and Cshuell, Keene, NH, USA)으로 전이하였다. <sup>32</sup>P-CTP로 표지된 성장호르몬 및 β-actin riboprobe와 함께 50% formamide 존재하에 65°C에서 12시간 이상 보합반응을 실시하였다. Riboprobe는 T7 RNA polymerase 인식서열을 가지고 있는 시발체를 이용한 PCR을 통해 제작하였으며 자세한 제작 방법은 이미 보고되어 있다[33]. Antisense primer의 5' 끝에 T7 RNA polymerase 인식서열을 달아 RT-PCR 결과 생성된 PCR 산물을 riboprobe 제작의 주형으로 사용할 수 있게 하였다. Riboprobe의 제작을 위해 사용된 특이적인 시발체의 서열은 다음과 같다. 성장호르몬 (GenBank Accession No. V01237); sense; 5'-CTG GCT GCT GAC ACC TAC AAA-3', antisense; 5'-CAG GAG AGC AGC CCA TAG TTT-3', β-actin (GenBank Acc. No. X03672); sense; 5'-ATG GGT CAG AAG GAC TCC TAC G-3'; antisense; 5'-AGT GGT ACG ACCAGA GGC ATA C-3'이었다.

### 6. cAMP 및 성장호르몬 농도의 측정

배양액 내 성장호르몬의 농도는 방사면역측정 키트 (Amersham)를 이용하여 측정하였다. 세포 내 cAMP의 측정을 위해 0.1 N HCl을 함유한 95% 에탄올 용액에 세포를 용해시킨 후 cAMP 측정용 키트 (Diasorin)를 사용하여 생산자의 방법에 따라 방사면역측정법으로 측정하였다.

### 7. Real-time RT-PCR에 의한 소마토스타틴 수용체 유전자 발현의 측정

RNA 1 µg을 Gibco사의 Superscript Preamplification System for First Strand Synthesis와 random primer를 이용하여 지시서대로 역전사반응을 실시하였다. 생성된 cDNA는 sst1, sst2 및 β-actin에 특이적인 시발체를 이용하여 PCR을 시행하였다. sst1 및 sst2의 발현량은 β-actin의 발현량으로 보정한 후 각 값은 100%로 설정된 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. PCR은 real-time PCR machine인 Roche의 LightCycler를 사용하였으며, 자세한 실험방법 및 시발체의 서열은 이미 보고되어 있다[33].

### 8. 통계

모든 데이터는 평균 ± 표준오차로 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성은 two-tailed Student's t-test를 이용하였으며 P값이 0.05 이하이면 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. GH3-GHRHR 세포의 확립 및 특성 확인

GH3-GHRHR 세포와 야생형의 GH3 세포로부터 RNA를 추출하여 GHRH 수용체의 발현여부를 RT-PCR을 통해 확인하였다. Fig. 1(A)에 나타난 바와 같이 GH3-GHRHR 세포에서는 GHRH 수용체의 발현을 확인할 수 있었던 반면 야생형의 GH3 세포에서는 GHRH 수용체의 발현을 확인할 수 없었다.

GHRH의 GHRH 수용체에 대한 결합 정도를 측정하기 위하여 GHRH 결합검사를 시행하였다. 양성대조군으로는 수컷 쥐의 일차배양된 뇌하수체 전엽세포를 사용하였다. Fig. 1(B)에 제시된 바와 같이 GHRH는 GH3-GHRHR 세포에서 GHRH 수용체와 효과적으로 결합하였다. 반면에 야생형의 GH3 세포에서는 GHRH 결합을 관찰할 수 없었다.

GH3-GHRHR 세포를 GHRH (10, 100 nM) 혹은 forskolin (10  $\mu$ M; 양성대조군으로 사용)으로 30분 동안 자극하여 세포 내 cAMP 농도를 측정하였다. Fig. 1(C)에 제시된 바와 같이 GH3-GHRHR 세포에서는 GHRH 및 forskolin 자극에 의해 cAMP 농도가 각각 약 4배 및 8배 증가되었으나, 야생형의 GH3 세포에서는 forskolin만 cAMP 농도를 증가시켰을 뿐 GHRH는 아무런 변화를 일으키지 못하였다 (결과 제시 안함). 이 결과는 GH3 세포에 발현된 GHRH 수용체를 통한 신호전달 기전이 정상적으로 일어나고 있음을 가리키는 것이라고 할 수 있다.

GH3-GHRHR 세포에서 GHRH 자극에 대한 성장호르몬의 분비 작용이 제대로 나타나는가를 알아보기 위해 야생형의 GH3 세포, GH3-GHRHR 세포, 그리고 일차배양된 뇌하수체 전엽 세포에 GHRH (10 nM)를 처리하고 15, 30, 60 분 후에 배양액 내의 성장호르몬의 농도를 측정하였다. Fig. 1(D)에 나타난 바와 같이 GHRH 처리에 의해 GH3-GHRHR 세포에서는 성장호르몬의 분비가 현저히 증가하였다. 이 결과는 GH3 세포 내에 발현된 GHRH 수용체를 통한 신호전달 기전이 제대로 작동하여 성장호르몬을 분비시켰음을 가리키고 있다.

GH3-GHRHR 세포를 GHRH (10 nM) 혹은 dexamethasone (10  $\mu$ M; 양성대조군으로 사용)으로 처리한 후 3일간 배양한 후 RNA를 추출하여 성장호르몬 mRNA의 변화를 Northern 블롯을 통해 측정하였다. 성장호르몬 mRNA는 10 nM의 GHRH 자극에 의해 3일째에 그 발현이 증가하였다 [Fig. 1(E)].

GH3-GHRHR 세포를 GHRH (10 nM) 혹은 TRH (100 nM)로 처리한 후 10분 후에 단백질을 추출하여 MAPK의 활성 (phospho-p44/p42)을 Western 블롯을 통해 측정하였다. Fig. 1(F)에 나타난 바와 같이 GH3-GHRHR 세포에서는 GHRH 자극에 의해 MAPK 활성이 현저히 증가하였다.

저자 등은 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 forskolin을 GH3 세포에 처리하면 sst1 및 sst2의 발현이 현저히 증가함을 보고한 바 있다[34]. GH3-GHRHR 세포에서 GHRH의 자극에 의한 cAMP의 증가가 forskolin 처리 시와 비슷한 양상의 변화를 유발하는가를 알아보기 위해 GHRH (10nM)를 4시간동안 처리한 후 RNA를 추출하여 sst1과 sst2의 발현 변화를 관찰하였다. Fig. 1(G)에 제시된 바와 같이 GHRH는 forskolin보다는 그 증가폭이 작았으나 sst1과 sst2의 발현을 유의하게 증가시켰다.

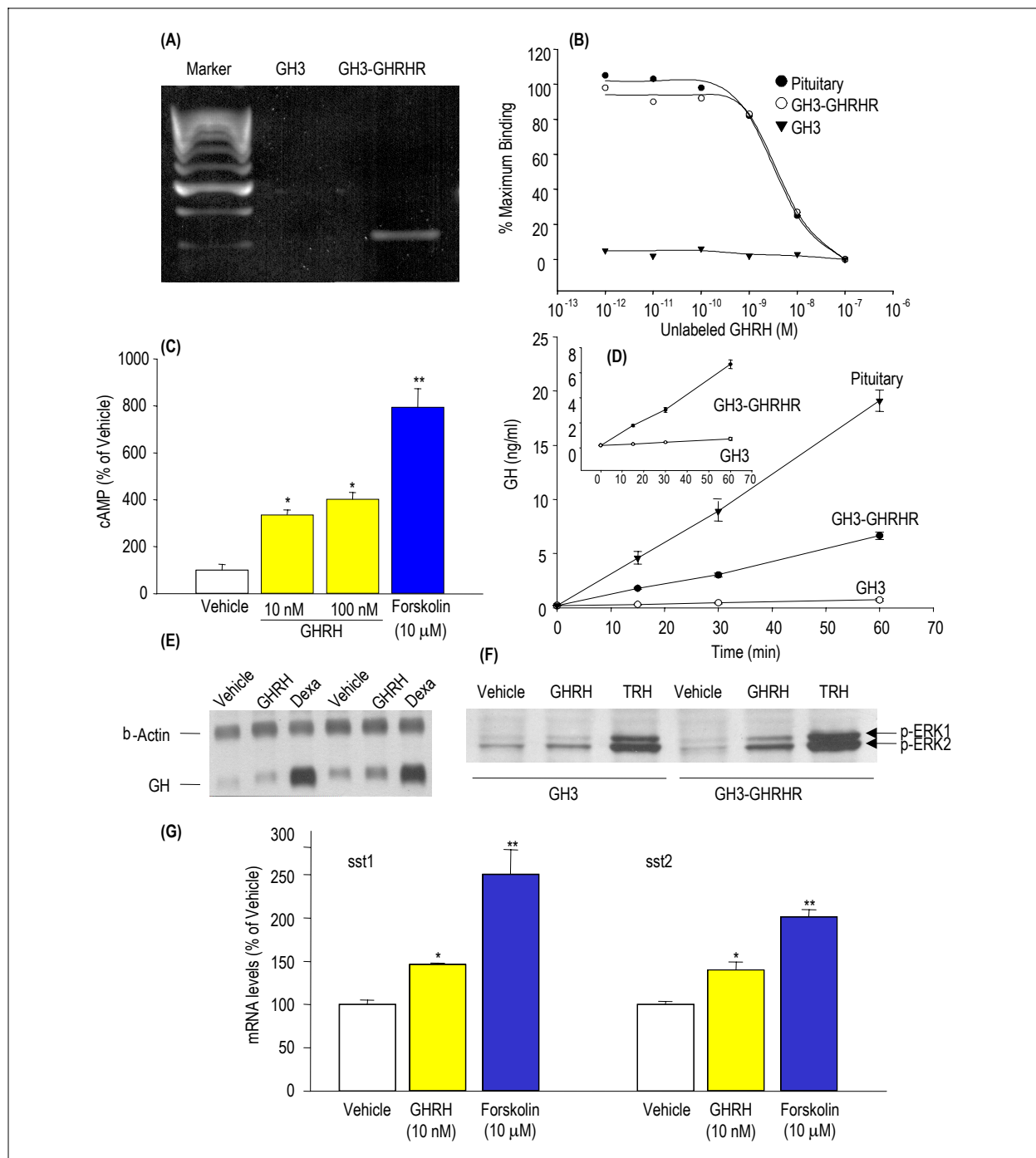
### 2. GH3-GHRHR 세포에서 G 단백질 돌연변이 유전자의 영향

pSV2, wt, 201 그리고 227을 GH3-GHRHR 세포에 주입한 후 24시간, 48시간, 그리고 72시간 후에 측정된 세포 내 cAMP의 농도는 Fig. 2에 제시되어 있다. 201과 227은 모두 48시간 그리고 72시간 경과 후에 cAMP를 현저히 증가시켰다. 201에 의한 증가가 227에 의한 증가보다 더 현저한 것으로 나타났다. cAMP 농도가 가장 많이 증가한 것으로 나타난 48시간 경과 후에 배양액 내 성장호르몬의 농도를 측정하였으며, 이는 Fig. 3에 제시되어 있다. 배양액 내로 분비된 성장호르몬의 농도는 201과 227의 발현에 의해 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 G 단백질 돌연변이 주입 48시간 경과 후의 소마토스타틴 수용체의 발현 변화는 Fig. 4에 제시되어 있는 바와 같이 sst1과 sst2는 201과 227의 발현에 의해 유의하게 증가하였다.

*gsp* 종양유전자 주입 48시간 후에 GHRH 혹은 octreotide 자극에 의한 sst1 및 sst2 유전자의 발현 변화를 조사하였다. Fig. 5 (위 패널)는 GHRH 자극에 의한 sst1 및 sst2의 발현변화를 나타내고 있다. GHRH 자극에 의해 sst1의 발현은 모든 군에서 유의하게 증가하였다. 증가 정도는 pSV2에서 가장 현저하게 나타났다. sst2는 GHRH 자극에 의해 pSV2와 wt에서 현저한 증가를 보인 반면 201과 227에서는 유의한 증가에 이르지 못하였다. 한편 octreotide 자극에 의해서는 sst1 및 sst2 유전자의 발현은 유의한 변화를 보이지 않았다 (Fig. 5 아래 패널).

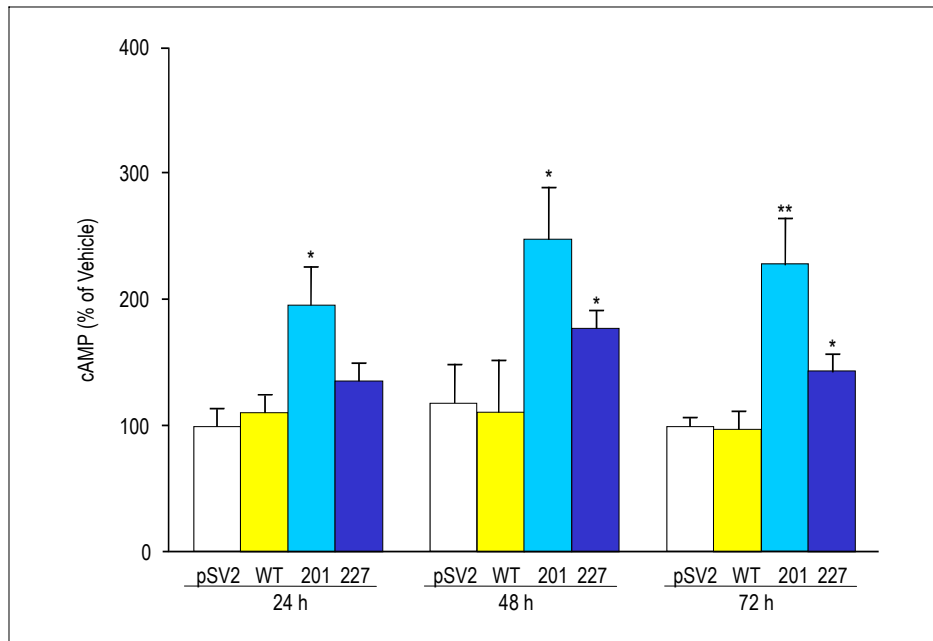
## 고 찰

GH3 세포는 쥐의 뇌하수체 종양으로부터 유래한 성장호르몬과 유즙분비호르몬을 생산 분비하는 세포주로서 호르몬의 분비기전, 신호전달 기전, 소마토스타틴 수용체 등의 발현의 조절기전의 연구에 쓰여 온 세포이다[35], GHRH 수용체를 가지고 있지 않아 GHRH에 대한 반응을 보이지 않는 세포이다[32]. 본 연구에서는 GHRH에 대한 반응성을 회복시키고자 GH3 세포에 GHRH 수용체를 영구 주입하여 GHRH 수용체를 발현하는 GH3 세포를 확립하였다. GH-

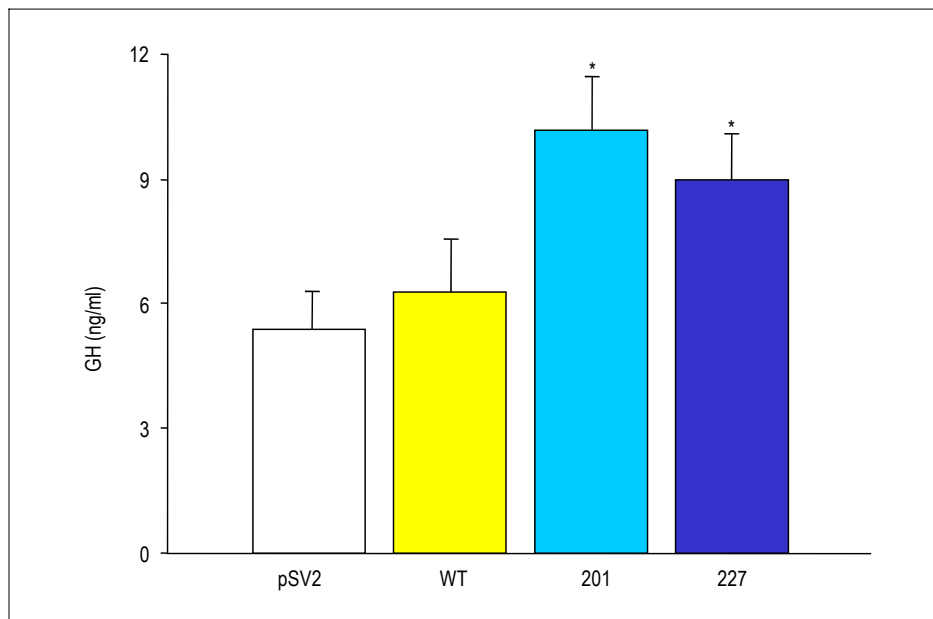


**Fig. 1.** Characteristics of GH3 cells permanently transfected with human GHRH receptor cDNA (GH3-GHRHR cells).

(A) RT-PCR analysis of GHRH receptor mRNA in wild-type GH3 and GH3-GHRHR cells. GHRH receptor mRNA was only detected in GH3-GHRHR cells. (B) Binding assay of GHRH to GHRH receptors in wild-type GH3, GH3-GHRHR, and primary cultured rat anterior pituitary cells.  $^{125}$ I-labeled and increasing concentrations of unlabeled hGHRH (1-44) amide were added to cells. Results are expressed as a percentage of the maximum specific binding. (C) Intracellular cAMP levels in response to GHRH (10, 100 nM) and forskolin (10  $\mu$ M). (D) GH response to GHRH (10 nM) in wild-type GH3, GH3-GHRHR, and primary pituitary cells. GH levels were measured 15, 30, and 60 min after adding GHRH. (E) Effects of GHRH (10 nM) and dexamethasone (10  $\mu$ M) on GH mRNA levels in GH3-GHRHR cells. Cells were treated with GHRH and dexamethasone for 72h. GH mRNA levels were measured by Northern blot assay. (F) MAPK activation in GH3-GHRHR cells. Western blot analysis was performed using rabbit anti-phospho-p44/p42 MAPK. TRH was used as a positive control. (G) Effects of GHRH (10 nM) and forskolin (10  $\mu$ M) on sst1 and sst2 mRNA levels in GH3-GHRHR cells. Cells were incubated with GHRH and forskolin for 4h. Sst1 and sst2 mRNA levels were measured by real-time RT-PCR. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ .



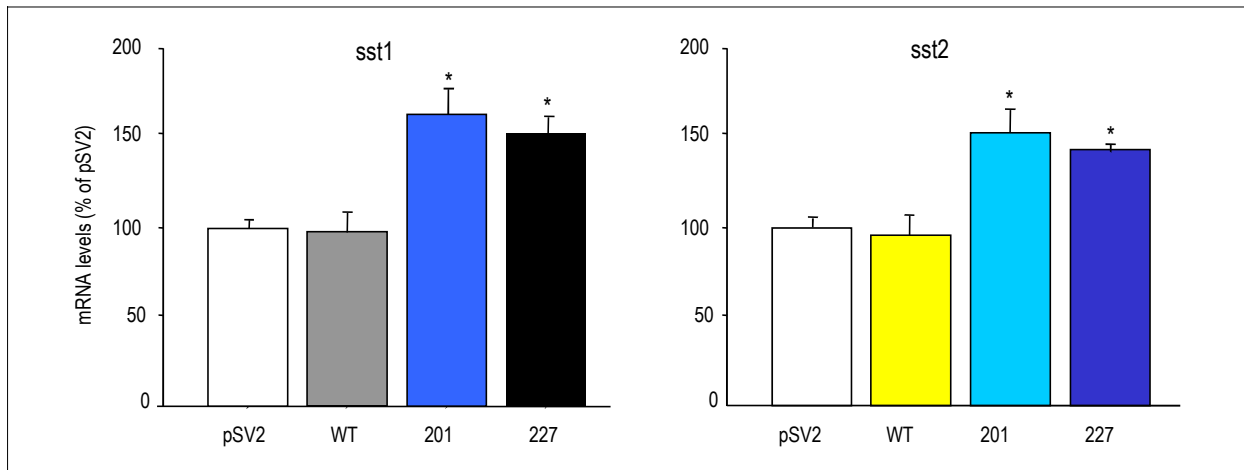
**Fig. 2.** Effect of transient transfection of gsp oncogenes into GH3-GHRHR cells on intracellular cAMP levels. Cells were transfected with pSV2, pSV2-wt (wt), pSV2-as-R201H (201), and pSV2-as-Q227L (227) and incubated for 24h, 48h, and 72h. Intracellular cAMP levels were measured by RIA. Results are expressed as a percent of pSV2 controls (Mean  $\pm$  S.E.; n=4 wells from two independent experiments). \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ .



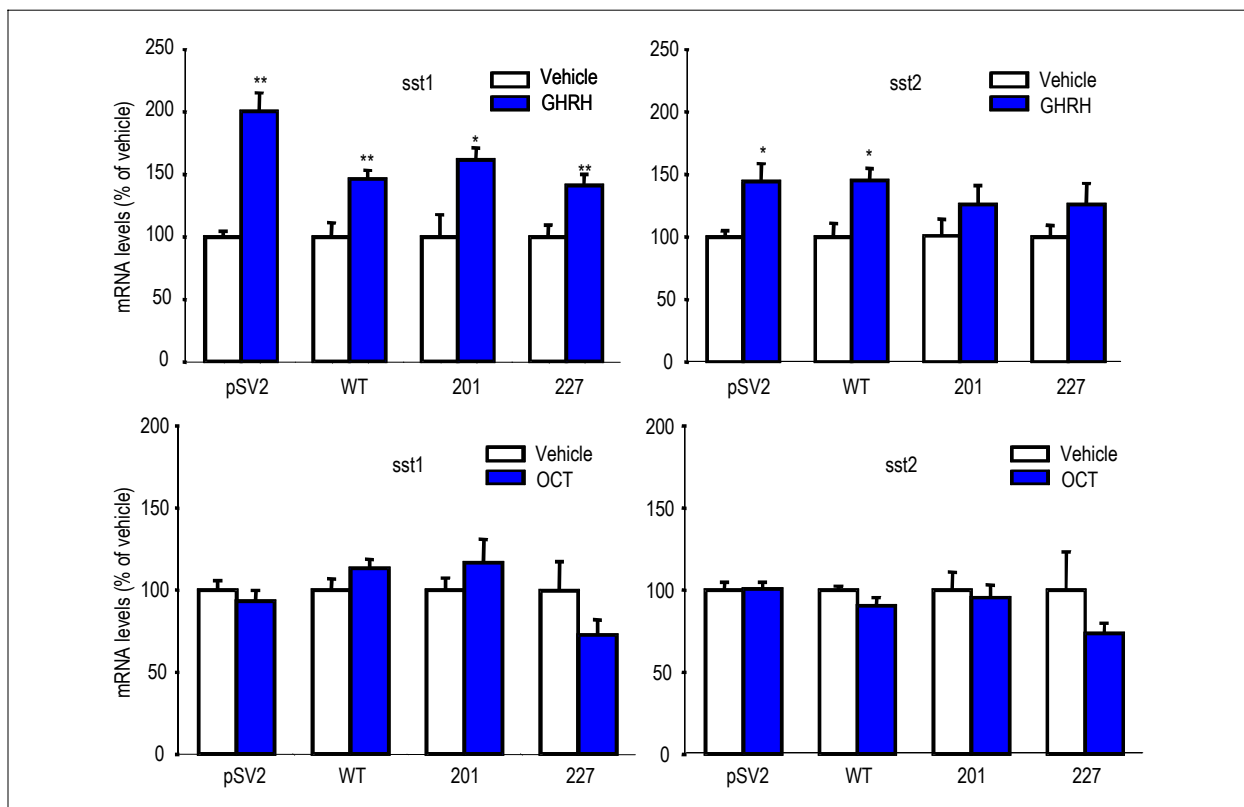
**Fig. 3.** Effect of transient transfection of gsp oncogenes into GH3-GHRHR cells on GH release. Cells were transfected with pSV2, pSV2-wt (wt), pSV2-as-R201H (201), and pSV2-as-Q227L (227) and incubated for 48h. GH levels were measured by RIA. Data are expressed as Mean $\pm$ S.E. (n=4 wells from two independent experiments). \*,  $P < 0.05$ .

RH 수용체를 영구히 발현하는 GH3 세포는 투여된 GHRH와 효과적으로 결합하였으며, GHRH 자극에 의해 세포 내 cAMP 신호전달계가 활성화 되어 성장호르몬의 분비 및 유

전자 발현을 증가시켰다. GHRH 자극은 또한 세포 내 MAPK 경로를 활성화시켜 ERK1/2의 인산화를 촉진하였다. 이상의 결과는 GHRH 수용체를 발현하는 GH3 세포는 GH-



**Fig. 4.** Effect of transient transfection of gsp oncogenes into GH3-GHRHR cells on sst1 and sst2 mRNA levels. Cells were transfected with pSV2, pSV2-wt (wt), pSV2-as-R201H (201), and pSV2-as-Q227L (227) and incubated for 48h. Sst1 and sst2 mRNA levels were measured by real-time RT-PCR assay. Receptor mRNA levels were adjusted by  $\beta$ -actin and expressed as a percent of pSV2 controls (Mean  $\pm$  S.E.; n=4 wells from two independent experiments). \*,  $P < 0.05$ .



**Fig. 5.** Effects of GHRH and octreotide stimulation on sst1 and sst2 mRNA levels in GH3-GHRHR cells transfected with pSV2, pSV2-wt (wt), pSV2-as-R201H (201), and pSV2-as-Q227L (227). Transfected cells were incubated for 48h and stimulated with GHRH (10 nM) and octreotide (10 nM) for 4h. Sst1 and sst2 mRNA levels were measured by real-time RT-PCR assay. Receptor mRNA levels were adjusted by  $\beta$ -actin and expressed as a percent of pSV2 controls (Mean  $\pm$  S.E.; n=4 wells from two independent experiments). \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ .

RH에 대한 반응성을 회복하여 일차 뇌하수체 세포의 대응으로 GHRH의 작용연구에 유용하게 쓰일 수 있음을 시사한다고 하겠다.

말단비대증 환자의 성장호르몬 분비의 억제를 위해 실제 임상에서 널리 쓰이는 장시간 소마토스타틴 유사체인 octreotide에 대한 성장호르몬의 억제반응은 환자에 따라 현저한

차이를 보이는데 이러한 반응성의 차이를 설명하기 위해 여러 가지 연구가 이루어져 왔다. Octreotide에 대한 우수한 반응성을 보이는 종양은 그 세포막의 소마토스타틴 수용체 농도가 그렇지 않은 종양보다 현저히 높다는 보고[12,13]와 G 단백질 돌연변이 유전자를 가진 종양에서 소마토스타틴에 대한 성장호르몬의 분비 억제가 더 현저하다는 사실[24,25]로부터 저자 등은 G 단백질 돌연변이 유전자를 가진 종양은 그렇지 않은 종양보다 소마토스타틴 수용체의 발현이 증가되어 있을 것이고 그로 인해 소마토스타틴에 대해 우수한 성장호르몬의 억제반응을 보일 것이라는 가정을 하게 되었다. 저자 등은 GH3 세포에서 세포 내 cAMP의 증가를 초래하는 각종 자극은 sst2 유전자의 발현을 증가시키며[27], *gsp* 종양유전자를 GH3 세포에서 일시적으로 발현시켰을 때 세포 내 cAMP의 생성량과 sst2의 발현이 증가함을 보고하였다[28]. 또한 *gsp* 종양유전자를 영구히 발현하는 GH3 세포에서도 세포 내 cAMP의 생성량과 sst2 유전자의 발현이 증가됨을 관찰하였으며[34], 본 연구에서도 이를 확인하였다. 또한 sst1의 발현 역시 *gsp*의 발현에 의해 증가됨을 관찰하였다. 이 결과는 *gsp* 종양유전자를 발현하는 종양에서 sst1 및 sst2의 발현이 증가되어 소마토스타틴에 대한 반응이 더 좋아질 것임을 시사하는 것이나, 실제로 뇌하수체 종양에서 *gsp* 종양유전자를 가진 종양과 그렇지 않은 종양에서의 sst2와 sst5의 발현은 유의한 차이를 관찰하지 못하였다[30]. Barlier 등의 보고[31]도 G 단백질 돌연변이를 가진 종양과 가지지 않은 종양 간에 sst2 발현에 차이가 없다고 하여 우리의 결과와 일치하였다.

이러한 차이는 시험관 내에서 *gsp* 종양유전자가 sst1 및 sst2 유전자의 발현을 증가시켰다 하더라도 시상하부의 조절을 받고 있는 생체 내에서는 성장호르몬의 분비조절에 관여하는 여러 인자들에 의해 소마토스타틴 수용체 유전자의 발현이 영향을 받을 가능성이 있기 때문인 것으로 생각된다. 소마토스타틴 수용체의 발현은 소마토스타틴[36]과 GHRH [29]에 의해 조절될 수 있기 때문에 말단비대증 환자의 시상하부로부터 분비되는 소마토스타틴과 GHRH의 문맥혈 내 농도의 변화에 따라 소마토스타틴 수용체의 발현이 변화할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 시상하부의 조절호르몬의 영향을 받고 있는 뇌하수체 세포의 상태를 유사하게 재현하고자 GH3 세포에 GHRH 수용체를 발현하게 하여 GHRH에 대한 반응성을 회복시켰다. 이 세포에 G 단백질 돌연변이를 발현시킨 후 GHRH 및 octreotide 자극에 의한 sst1 및 sst2 mRNA의 변화를 관찰하였다. GHRH 자극에 의한 sst1 유전자의 발현은 pSV2에서 가장 현저한 증가를 보인 반면 *gsp* 종양유전자가 발현된 상태에서는 그 증가폭이 둔화되는 양상을 보였다. 한편 *gsp* 종양유전자 발현시의 sst2 유전자 발현은 GHRH 자극에 의한 유의한 변화를 보이지 않았다. 이 결과는 G 단백질 돌연변이에 의해 이미

세포 내 cAMP의 농도가 증가되어 있는 상태에서는 더 이상의 cAMP 증가에 대한 sst1 및 sst2 mRNA의 반응이 둔화되었다는 것을 시사한다.

G 단백질 돌연변이는 정상적인 GTP 가수분해에 필요한 GTPase의 기능을 상실시킴으로써 지속적으로 GTP가 G $\alpha$ s에 결합되도록 하여 이 단백을 활성화시킨다[37,38]. 이로 인해 adenylyl cyclase가 지속적으로 활성화되고 세포 내 cAMP의 농도가 지속적으로 증가하게 되므로 G 단백질 돌연변이를 가진 종양의 경우 세포 내 cAMP의 기저치가 높으며, GTP나 sodium fluoride를 이용하여 G 단백을 자극하여도 cAMP 생성이 더 이상 증가되지 않는다고 한다[39]. 또한 G 단백질 돌연변이 유전자를 GH3 세포에 주입한 후에 forskolin 등으로 cAMP를 증가시켜도 cAMP에 의한 전사활성의 증가가 관찰되지 않는다는 사실이 보고되어 있다[40]. 또한 저자 등은 G 단백질 돌연변이 유전자가 발현되었을 때에는 forskolin에 의한 sst2 유전자 발현의 증가폭이 야생형에 비해 감소된다는 사실을 보고한 바 있다[28,34].

한편 octreotide 자극에 의해서는 G 단백질 돌연변이의 발현과 상관없이 sst1 및 sst2 유전자 발현의 변화를 관찰할 수 없었다. 저자 등의 미발표 결과에 의하면, 쥐에 octreotide를 투여한 후 뇌하수체 소마토스타틴 수용체 유전자 발현의 변화를 조사하여 보면 sst1 및 sst2 유전자의 발현은 현저히 감소되나, 뇌하수체 일차배양세포를 이용한 실험에서는 이 변화를 관찰할 수 없었다. 이 결과는 소마토스타틴이 sst1 및 sst2의 합성을 직접적으로 조절하는 것이 아니라 GHRH의 작용을 길항함으로써 간접적으로 그 작용을 나타낸다는 것을 시사한다.

소마토스타틴 수용체중 sst1, sst2, 그리고 sst5가 성장호르몬 억제반응의 매개에 관여하는 것으로 알려져 있다. 소마토스타틴 수용체-선택적 효현제를 이용한 연구결과에 의하면 sst1/5와 sst2에 선택적인 효현제는 기저 및 cAMP 자극에 의한 성장호르몬의 분비를 효과적으로 억제함이 보고되어 있다[41,42]. 소마토스타틴에 의한 성장호르몬의 억제반응에 있어서 sst1의 중요성은 sst1 유전자를 제거한 생쥐를 이용한 연구에서 확인되었다[43]. 이상의 보고는 sst1, sst2, sst5의 소마토스타틴에 의한 성장호르몬 분비 억제반응에 있어서의 중요성을 뒷받침하는 결과이다. 그러나 뇌하수체 성장호르몬 분비세포에서의 수용체 발현정도는 sst2 및 sst5가 sst1보다 훨씬 많이 발현되므로[44~46], 양적인 면에 있어서는 sst2 및 sst5가 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.

본 연구의 결과는 GHRH 수용체를 발현하는 GH3 세포는 GHRH에 대한 반응성을 회복하여 GHRH의 작용 연구에 유용하게 쓰일 수 있음을 시사한다고 하겠다. 본 연구에서는 *gsp* 종양유전자의 발현에 의한 GH3 세포의 세포 내 cAMP 농도, 성장호르몬 분비, 그리고 sst1 및 sst2 유전자



발현의 증가를 확인하였으나, 이 소견이 *gsp*(+) 뇌하수체 종양에서 관찰할 수 있는 우수한 소마토스타틴에 대한 반응성을 설명할 수 있는지는 아직 확실하지 않은 것으로 사료된다. *gsp* 종양유전자의 발현으로 인해 세포 내 cAMP 및 소마토스타틴 수용체 유전자의 기저발현량이 증가되어 있는 상태에서는 GHRH 자극에 대한 반응성이 둔화되는 양상을 보였다. 그러나 GH3 세포는 쥐 뇌하수체 종양에서 유래한 세포주로서 정상조직 및 사람의 종양조직에서 일어나는 반응을 대변하지 못할 가능성이 있다. 따라서 저자 등은 현재 정상 쥐의 일차배양된 뇌하수체 세포 및 사람의 뇌하수체 종양 일차배양 세포를 이용한 연구를 진행 중에 있다. 아울러 소마토스타틴 유전자의 발현이 세포막에 발현되는 소마토스타틴 수용체 단백질의 양과 일치하지 않을 가능성이 있으므로 세포막에 발현되는 소마토스타틴 수용체 단백질의 양을 측정하는 것이 필요하리라 생각된다.

## 요 약

**연구배경:** *gsp* 종양유전자를 가진 성장호르몬 분비 뇌하수체 종양이 소마토스타틴에 대한 성장호르몬 분비반응이 더 좋은 이유는 소마토스타틴 수용체 유전자의 발현이 증가되어 있을 가능성이 있다. GH3 세포를 이용한 연구에서는 *gsp* 종양유전자의 발현에 의해 소마토스타틴 수용체 유전자 발현이 증가하여 위 가정을 뒷받침하였으나 사람의 종양조직을 이용한 연구는 상이한 결과를 나타내었다. 생체 내에서는 성장호르몬의 분비조절에 관여하는 여러 인자들에 의해 소마토스타틴 수용체 유전자의 발현이 영향을 받을 가능성이 있으므로 *gsp* 종양유전자가 발현된 GH3 세포에서 GHRH 자극에 의한 변화를 알아볼 필요가 있다. 그러나 GH3 세포는 GHRH 수용체를 가지고 있지 않기 때문에 GHRH의 작용을 알아보기에는 부적합하다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 GH3 세포에 GHRH 수용체를 발현시켜 GHRH에 대한 반응성이 회복된 GH3 세포를 사용하여 *gsp* 종양유전자에 의한 소마토스타틴 수용체 유전자의 변화를 관찰하고, GHRH 및 octreotide에 의한 *sst1* 및 *sst2* 유전자 발현의 변화를 관찰하였다.

**방법:** 사람의 GHRH 수용체 유전자를 발현하는 플라스미드 벡터를 GH3 세포에 주입하여 GHRH 수용체를 영구적으로 발현하는 세포를 만들었다. RT-PCR 방법으로 GHRH 수용체 mRNA의 발현을 조사하였고, GHRH 결합검사, luciferase 활성 검사, Western blot, Northern blot, cAMP 농도 및 성장호르몬 농도의 측정을 통해 GHRH에 대한 반응을 조사하였다. *gsp* 종양유전자를 발현시킨 후 GHRH 및 octreotide로 자극하여 *sst1* 및 *sst2* 유전자의 발현을 real-time RT-PCR을 이용하여 측정하였다.

**결과:** GHRH 수용체 유전자를 주입한 세포에서는 GH-

RH 수용체 mRNA가 발현되었다. GHRH 결합검사 결과, GHRH는 GHRH 수용체와 효과적으로 결합하였다. GHRH 자극에 의해 세포내 cAMP 농도, 성장호르몬 분비, 성장호르몬 mRNA, MAPK 활성, *sst1* 및 *sst2* 유전자 발현 등이 증가하였다. *gsp* 종양유전자의 발현에 의해 세포 내 cAMP 농도, 성장호르몬 분비, *sst1* 및 *sst2* 유전자 발현이 증가하였다. G 단백질 돌연변이 유전자의 발현에 의해 GHRH에 의한 *sst1* 및 *sst2* 유전자 발현의 증가폭은 감소하였으나, octreotide는 *sst1* 및 *sst2* 유전자 발현에 유의한 변화를 일으키지 않았다.

**결론:** GHRH 수용체를 발현하는 GH3 세포는 GHRH에 대한 반응성을 회복하여 GHRH의 작용연구에 유용하게 쓰일 수 있음을 시사한다. GH3 세포에서의 *gsp* 종양유전자의 발현은 *sst1* 및 *sst2* 유전자 발현을 증가시켰으나, 이 소견이 G 단백질 돌연변이를 가진 뇌하수체 종양에서 관찰되는 소마토스타틴에 대한 우수한 반응성의 주요한 기전은 아닌 것으로 사료된다. 본 연구의 결과와 사람의 종양조직을 이용한 연구의 결과가 상이한 이유에 대해서는 더 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Hall R, Besser GM, Schally AV, Coy DH, Evered D, Goldie DJ, Kastin AJ, McNeilly AS, Mortimer CH, Phenekos C, Tunbridge WM, Weightman D: Action of growth-hormone-release inhibitory hormone in healthy men and in acromegaly. *Lancet* 2:581-584, 1973
2. Yen SS, Siler TM, Devane GW: Effect of somatostatin in patients with acromegaly. Suppression of growth hormone, prolactin, insulin and glucose levels. *N Engl J Med* 290:935-938, 1974
3. Oppizzi G, Botalla L, Verde G, Cozzi R, Liuzzi A, Chiodini PG: Homogeneity in the growth hormone-lowering effect of dopamine and somatostatin in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 51:616-619, 1980
4. Pieters GF, Romeijn JE, Smals AG, Kloppenborg PW: Somatostatin sensitivity and growth hormone responses to releasing hormones and bromocriptine in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 54:942-948, 1982
5. Lamberts SWJ, Uitterlinden P, Verschoor L, van Dongen KJ, Del Pozo E: Long-term treatment of acromegaly with the somatostatin analogue SMS 201-995. *N Engl J Med* 313:1576-1580, 1985
6. Lamberts SW, Oosterom R, Neufeld M, Del Pozo E: The somatostatin analogue SMS 201-995 induces long-acting inhibition of growth hormone secretion without

- rebound hypersecretion in acromegalic patients. J Clin Endocrinol Metab* 60:1161-1165, 1985
7. Lamberts SW, Zweens M, Verschoor L, Del Pozo E: *A comparison among the growth hormone-lowering effects in acromegaly of the somatostatin analog SMS 201-995, bromocriptine, and the combination of both drugs. J Clin Endocrinol Metab* 63:16-19, 1986
8. Jackson IM, Barnard LB, Lamberton P: *Role of a long-acting somatostatin analogue (SMS 201-995) in the treatment of acromegaly. Am J Med* 81:94-101, 1986
9. Chiodini PG, Cozzi R, Dallabonzana D, Oppizzi G, Verde G, Petroncini M, Liuzzi A, Del Pozo E: *Medical treatment of acromegaly with SMS 201-995, a somatostatin analog: a comparison with bromocriptine. J Clin Endocrinol Metab* 64:447-453, 1987
10. Ho KY, Weissberger AJ, Marbach P, Lazarus L: *Therapeutic efficacy of the somatostatin analog SMS 201-995 (octreotide) in acromegaly. Ann Intern Med* 112:173-181, 1990
11. 양인명: 한국인 말단비대증 환자의 현황 및 임상 양상. *대한내분비학회지* 9:290-306, 1994
12. Ikuyama S, Nawata H, Kato K-I, Ibayashi H, Nakagaki H: *Plasma growth hormone responses to somatostatin (SRIH) and SRIH receptors in pituitary adenomas in acromegalic patients. J Clin Endocrinol Metab* 62:729-733, 1986
13. Reubi JC, Landolt AM: *The growth hormone responses to octreotide in acromegaly correlate with adenoma somatostatin receptor status. J Clin Endocrinol Metab* 68:844-850, 1989
14. Bertherat J, Chanson P, Dewailly D, Dupuy M, Jaquet P, Peillon F, Epelbaum J: *Somatostatin receptors, adenylate cyclase activity, and growth hormone (GH) response to octreotide in GH-secreting adenomas. J Clin Endocrinol Metab* 77:1577-1583, 1993
15. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S: *Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. Proc Natl Acad Sci USA* 89:251-255, 1992
16. Kluxen F, Bruns C, Lubbert H: *Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA. Proc Natl Acad Sci USA* 89:4618-4622, 1992
17. Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M: *Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. Proc Natl Acad Sci USA* 89:11151-11155, 1992
18. Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, KAgimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S: *Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. Mol Endocrinol* 6:2136-2142, 1992
19. O'Carroll A-M, Loliat SJ, Konig M, Mahan LC: *Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin28. Mol Pharmacol* 42:939-946, 1992
20. Greenman Y, Melmed S: *Expression of three somatostatin receptor subtypes in pituitary adenomas: evidence for preferential SSTR5 expression in the mammosomatotroph lineage. J Clin Endocrinol Metab* 79:724-729, 1994
21. Greenman Y, Melmed S: *Heterogeneous expression of two somatostatin receptor subtypes in pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab* 78:398-403, 1994
22. Miller GM, Alexander JM, Bikkal HA, Katznelson L, Zervas NT, Klibanski A: *Somatostatin receptor subtype gene expression in pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab* 80:1386-1392, 1995
23. Patel YC, Srikant CB: *Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). Endocrinology* 135:2814-2817, 1994
24. Yang I, Park S, Ryu M, Woo J, Kim S, Kim J, Kim Y, Choi Y: *Characteristics of gsp-positive growth hormone-secreting pituitary tumors in Korean acromegalic patients. Eur J Endocrinol* 134:720-726, 1996
25. Spada A, Arosio M, Bochicchio D, Bazzoni N, Vallar L, Bassetti M, Faglia G: *Clinical, biochemical, and morphological correlates in patients bearing growth hormone-secreting pituitary tumors with or without constitutively active adenylyl cyclase. J Clin Endocrinol Metab* 71:1421-1426, 1990
26. Patel YC, Greenwood M, Kent G, Panetta R, Srikant CB: *Multiple gene transcript of the somatostatin receptor SSTR2: Tissue selective distribution and cAMP regulation. Biochem Biophys Res Commun* 192:288-294, 1993
27. 박승준, 양인명, 엄교숙, 임성빈, 정주호, 정지창, 고계창, 김영설, 최영길: *GH3세포에서 세포내 cAMP에 의한 소마토스타틴 수용체 유전자 2의 전사단계에서의 발현증가. 대한내분비학회지* 13:24-33, 1998
28. 양인명, 박승준, 장호강, 이군자, 오승준, 김성운, 김진

- 우, 김영설, 최영길: *Gsa* 유전자의 돌연변이가 쥐의 소마토스타틴 수용체 유전자의 발현에 미치는 효과. 대한내분비학회지 14:657-666, 1999
29. Park S, Kamegai J, Johnson TA, Frohman LA, Kineman RD: *Modulation of pituitary somatostatin receptor subtype (sst1-5) messenger ribonucleic acid levels by changes in the growth hormone axis. Endocrinology* 141:3556-3530, 2000
30. 양인명, 우정택, 김성운, 김진우, 김영설, 최영길, 박승준, 김국기: 성장호르몬 분비성 뇌하수체 선종에서 소마토스타틴 수용체 제2아형 및 제5아형 유전자 발현. 대한내분비학회지 12:508-571, 1997
31. Barlier A, Pellegrini-Bouiller I, Gunz G, Zamora AJ, Jaquet P, Enjalbert A: *Impact of gsp oncogene on the expression of genes coding for Gs alpha, Pit-1, Gi alpha, and somatostatin receptor 2 in human somatotroph adenomas: involvement in ortreotide sensitivity. J Clin Endocrinol Metab* 84:2759-2765, 1999
32. Zeytin FN, Gick GG, Brazeau P, Ling N, Mclaughlin M, Bancroft C: *Growth hormone (GH)-releasing factor does not regulate GH release or GH mRNA levels in GH3 cells. Endocrinology* 114:2054-2059, 1984
33. Park S, Sohn S, Kineman RD: *Fasting-induced changes in the hypothalamic-pituitary-GH axis in the absence of GH expression: lessons from the spontaneous dwarf rat. J Endocrinol* 180:369-378, 2004
34. 박철영, 양인명, 김은희, 손숙진, 류미숙, 우정택, 김성운, 김진우, 김영설, 최영길, 박승준: *Gsa* 돌연변이 유전자를 영구히 발현하는 GH3 세포 주에서 소마토스타틴 수용체 유전자 및 *Gi2a*, *pit-1a* 유전자의 발현. 대한내분비학회지 17:170-182, 2002
35. Perez FR, Casabiell X, Camina JP, Zugaza JL, Casanueva FF: *cis-unsaturated free fatty acids block growth hormone and prolactin secretion in thyrotropin-releasing hormone-stimulated GH3 cells by perturbing the function of plasma membrane integral proteins. Endocrinology* 138:264-272, 1997
36. Bruno JF, Xu Y, Berelowitz M: *Somatostatin regulates somatostatin receptor subtype mRNA expression in GH3 cells. Biochem Biophys Res Commun* 202:1738-1743, 1994
37. Cassel D, Selinger Z: *Activation of turkey erythrocyte adenylate cyclase and blocking of the catecholamine-stimulated GTPase by guanosine 5'-(gamma-thio) triphosphate. Biochem Biophys Res Commun* 77:868-873, 1977
38. Der CJ, Finkel T, Cooper GM: *Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. Cell* 44:167-176, 1986
39. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L: *GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. Nature* 340:692-696, 1989
40. Gaiddon C, Boutillier AL, Monnier D, Mercken L, Loeffler JP: *Genomic effects of the putative oncogene Gs-a. Chronic transcriptional activation of the c-fos proto-oncogene in endocrine cells. J Biol Chem* 269:22663-22671, 1994
41. Rohrer SP, Hayes E, Berk SC, Hutchins SM, Shen D-M, Xiong Y, Parma R, Foor P, Mitra SW, Degrado SJ, Shu M, Klopp JM, Cai SJ, Blake A, Chan WW, Pasternak A, Yang L, Patchett A, Smith RG, Chapman KT, Schaeffer JM: *Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. Science* 282:737-740, 1998
42. Shimon I, Taylor JE, Dong JZ, Bitonte RA, Kim S, Morgan B, Coy DH, Culler MD, Melmed S: *Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. J Clin Invest* 99:789-798, 1997
43. Kreienkamp H-J, Akgün E, Baumeister H, Meyerhof W, Richter D: *Somatostatin receptor subtype 1 modulates basal inhibition of growth hormone release in somatotrophs. FEBS Lett* 462:464-466, 1999
44. Day R, Dong W, Panetta R, Kracier J, Greenwood MT, Patel YC: *Expression of mRNA for somatostatin receptor (sstr) types 2 and 5 in individual rat pituitary cells. A double labeling in situ hybridization analysis. Endocrinology* 136:5232-5235, 1995
45. Kumar U, Laird D, Srikant CB, Escher E, Patel YC: *Expression of the five somatostatin receptor (SSTR15) subtypes in rat pituitary somatotropes: quantitative analysis by double-label immunofluorescence confocal microscopy. Endocrinology* 138:4473-4476, 1997
46. Mezey E, Hunyady B, Mitra S, Hayes E, Liu Q, Schaeffer J, Schonbrunn A: *Cell specific expression of the sst2A and sst5 somatostatin receptors in the rat anterior pituitary. Endocrinology* 139:414-419, 1998