

## 인간 난소의 과립 세포 배양 중 Leptin이 스테로이드 생성에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 아주대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>1</sup>

김세광 · 김명신<sup>1</sup> · 황경주<sup>1</sup> · 권혁찬<sup>1</sup> · 조동제

### Effect of Leptin on the Steroidogenesis of Cultured Human Granulosa Cells

Sei Kwang Kim, Myoung Shin Kim<sup>1</sup>, Kyung Joo Hwang<sup>1</sup>,  
Hyuck Chan Kwon<sup>1</sup>, Dong Jae Cho

Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of  
Medicine, Seoul, Department of Obstetrics and Gynecology,  
Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea<sup>1</sup>

**Objective:** To elucidate the location of leptin and leptin receptors of ovary specimens obtained from patients undergoing hysterectomy by immunohistochemical staining and to determine the effect of leptin on the steroidogenesis of cultured granulosa cells.

**Method:** In the culturing process of the granulosa cells, FSH (1 IU/ml) and leptin (50 ng/ml), IGF-I (50 ng/ml) was administered to each study group (Group I: FSH; Group II: FSH, leptin; Group III: FSH, IGF-I; Group IV: FSH, IGF-I, leptin), and the levels of estradiol, progesterone, androstenedione in the culture media was measured by radioimmunoassay. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA with Scheffe test.

**Results:** The results showed that leptin and leptin receptors were both found to be strongly stained in granulosa and theca cells, and also in some interstitial cells. Leptin receptors were also observed in cultured granulosa cells. While there was no statistically significant difference in the androstenedione concentrations between the groups, estradiol concentrations was significantly decreased in Group IV ( $2202.0 \pm 151.14$  pg/ml) compared to Group III ( $2859.0 \pm 122.6$  pg/ml), and progesterone concentrations were also significantly decreased in Group II ( $4696.3 \pm 190.6$  ng/ml) and Group IV ( $4517 \pm 206.78$  ng/ml) compared to Group III ( $5546.0 \pm 179.5$  ng/ml).

**Conclusion:** The study result of this study suggest that leptin is directly involved in the regulation of ovarian functions, in particular steroidogenesis.

**Key Words:** Leptin, Leptin receptor, Granulosa cell, Steroidogenesis

현대 사회에서는 여러 가지 요인으로 인하여  
비만 여성이 증가하고 있으며, 이러한 비만 여성  
에서 생리 불순, 무월경, 다낭성 난소 증후군, 불  
임 등 생식 기능에 이상을 쉽게 볼 수 있다. 비만

이 어떠한 기전으로 생식 기능에 이상을 유발시  
켜 질환으로 발전시키는지에 관한 연구는 지난  
여러 해 동안 진행되고 있으나 아직 불분명한 상  
태에 있다. 최근의 연구에서 leptin은 비만 여성에

주관책임자: 김세광, 연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 서울시 서대문구 신촌동 134번지 120-752  
Tel: 02-361-5499, Fax: 02-313-8357

연구비 지원 근거: 이 논문은 1998년 연세대 의과대학 교수 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

서 혈중 농도가 증가한다는 사실이 밝혀지면서 비만 관련 질환과 leptin과의 상관 관계에 대한 연구가 활발해지고 있다. Leptin은 167개의 아미노산으로 구성된 단백질로 지방 조직에서 생성되어 혈액으로 분비되며<sup>14</sup> 분비된 leptin은 뇌, 췌장, 생식 기관에 분포하고 있는 leptin 수용체와 결합하여 작용을 나타낸다. Leptin 수용체는 cytokine receptor superfamily에 속하며, long form과 short form의 이성체가 존재하는데,<sup>19</sup> 난소에는 이러한 두 가지 이성체가 모두 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup> 이러한 leptin은 일반적으로 생체 내에서 신진 대사 조절과 식욕 억제에 따른 체중 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있으며, 또한 leptin의 혈중 농도는 체지방 양, 인슐린, corticosterone, 음식 섭취, circadian rhythm과 같은 여러 가지 인자들의 영향을 받는 것으로 보고되고 있다.<sup>15-17</sup>

현재 비만과 leptin에 관한 연구는 대부분 leptin 또는 leptin 수용체 유전자의 변이를 가진 실험 동물을 이용하여 진행되고 있다. ob/ob 생쥐는 불완전한 형태의 leptin을 생산하거나, 또는 leptin mRNA를 전혀 생산하지 못하며,<sup>22</sup> 이러한 생쥐에 leptin을 주사하면 체지방이 감소하면서 체열이 상승하고 더불어 음식 섭취가 줄어들면서 체중이 감소하게 된다.<sup>6,12</sup> 이러한 leptin에 의한 체중 감소 효과는 ob/ob 생쥐에서 보여지는 것만큼은 아니지만, 정상 생쥐에서도 비슷한 결과를 보여준다.<sup>6,12</sup> 그러나 leptin 수용체에 대한 유전자 변이를 가진 db/db 생쥐나 Zucker (fa/fa) 흰쥐에서는 leptin에 대한 반응이 나타나지 않는다. 한편 ob/ob 생쥐에서는 비만뿐만 아니라 당뇨, 불임 등의 증상을 동반하며 이러한 생쥐 암컷에 leptin을 주사하면 혈중 LH가 증가하고, 난소 및 자궁의 무게가 증가하면서 난소 및 자궁의 기능이 향상되는 것으로 보고하고 있다.<sup>17</sup>

이와 같이 leptin은 비만뿐만 아니라 생식 기능에도 직접적으로 영향을 미치는 것으로 생각되며 특히 다낭성 난소 증후군을 보이는 여성에서 정상 여성 보다 혈중 leptin 농도가 높다는 보고<sup>5</sup>는 이러한 사실을 뒷받침해 주고 있다. 또한 최근 연구에서 Cioffi 등<sup>8</sup>은 leptin 수용체가 인간의 난소에서 발현되는 것을 Northern Blot 방법으로 보고하였고, Zamorano 등<sup>21</sup>은 leptin 수용체가 흰쥐 난소에서 발현되는 것을 RT-PCR 방법으로 보고하였다. 또한 Hardie 등(1997)은 여성의 생리주기에 따

른 leptin 농도의 변화를 보고하였는데, 황체에 leptin 농도가 증가하며 이는 여성의 성호르몬과 관련이 있는 것으로 보여진다. 이러한 보고들을 종합해 볼 때 leptin은 난소 기능에 직접적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

그러나 이전의 연구에서는 leptin 수용체의 발현 유무만을 보고하였을 뿐이고, leptin 수용체가 정확하게 난소 내 어느 위치에서 발현되는지에 대해서는 아직까지 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 면역조직화학 (immunohistochemistry) 방법으로 난소 내에서 leptin과 leptin 수용체가 발현되는 위치를 확인하고자 하였다. 또한 leptin이 난소 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 과립세포를 배양하면서 leptin을 처리하여 leptin이 스테로이드 호르몬 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 난소 조직의 준비

아주대학교 병원 산부인과를 내원한 정상적인 생리주기 (28~32일)를 갖는 가임기 환자로서 자궁근종으로 전자궁적출술을 시행한 환자에서 환자의 동의를 얻은 후 난소의 일부를 채취하였다. 난소는 채취 직후 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하여 적혈구를 제거한 후 4% paraformaldehyde에 24시간 고정하여 면역조직화학 방법에 사용하였다.

### 2. 과립 세포의 배양

과립 세포는 체외 수정 및 배아 이식 시술 (IVF-ET)을 시행하는 환자로부터 난자를 채취하는 과정에서 얻어 사용하였다. 난소의 과배란 유도는 FSH (Metrodin, Sereno)와 hMG (IVF-M, LG Chem. Co. Korea) 또는 GnRH $\alpha$  (Buserelin acetate; Superfact, United Kingdom)와 FSH/hMG를 병용하여 시행하였다. 난포의 성장은 질식 초음파와 호르몬 측정으로 확인하였으며 난포의 크기가 18 mm 이상이거나 난포당 estradiol (E<sub>2</sub>)의 수준이 300~400 pg/ml 이상인 경우 hCG (Pergonal, Sereno) 10,000 IU를 주사하여 배란을 유도하였고 주사후 35~36시간에 질식 초음파로 난포를 확인하면서 질벽을 통하여 난포액을 채취하였다.

각각의 난포에서 추출된 난포액은 배양 접시에 옮기고 해부 현미경하에서 난자를 수집한 다음

난자의 상태를 판정한 후 배양액에 옮겨 배양하였다. 이후 난포액 내에 존재하는 과립 세포들을 채취하였으며 배양액에 옮긴 후 혈구 세포를 분리하기 위해 과립 세포가 들어 있는 배양액 1 ml 을 40% percoll 3 ml 위에 조심스럽게 올려놓고 300 g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 과립 세포들은 중간에 층을 형성하게 되며 혈구 세포들은 바닥에 가라앉는다. 과립 세포들을 채취하여 배양액으로 3번 세척한 다음 0.1% collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 가 들어 있는 배양액으로 옮겨 주었다. 37°C 배양기에서 30분 경과 후 과립 세포들을 26 G 주사 바늘을 이용하여 여러 번 흡입과 배출을 해줌으로써 뭉쳐져 있던 세포 덩어리를 날개의 세포들로 분리시킨 다음 heamocytometer를 이용하여 세포수를 계산하였다. 생존율을 측정하기 위하여 trypan blue를 사용하여 염색한 후 염색되지 않은 세포의 수를 계산하고 생존율을 측정하였다. 배양에 사용한 세포는 생존율이 70% 이상을 보이는 것으로 배양액 1 ml 당 100,000개의 세포를 넣어 배양하였다.

준비된 과립 세포들은 4-well culture plate (Nunc Inc., Naperville, IL, USA)에 1 well (배양액 1 ml) 당 100,000개의 세포를 넣어 37°C에서 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO BRL)에 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO BRL)과 2 mM L-glutamine (GIBCO BRL), 100 U/ml penicillin (GIBCO BRL), 100 µg/ml streptomycin (GIBCO BRL)을 첨가하여 사용하였고 각 실험군 (Group I: FSH; Group II: FSH, leptin; Group III: FSH, IGF-I; Group IV: FSH, IGF-I, leptin)에 따라 FSH (1 IU/ml), IGF-I (50 ng/ml), leptin (50 ng/ml)을 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 배양액을 스테로이드 호르몬 정량 전까지 -70°C에 보관하였다.

또한 배양된 과립 세포에서 leptin 수용체의 발현을 관찰하기 위하여 과립 세포를 chamber slide (Nunc Inc., Naperville, IL, USA)에 배양하였다.

### 3. 면역조직화학 방법

4% paraformaldehyde에 고정된 난소는 paraffin 으로 포매한 후 5 µm 두께의 절편을 만들어 통상의 탈파라핀 과정과 염색 과정을 수행하였다. 절편 슬라이드를 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 5분간 전처리하여

조직에 남아 있는 peroxidase를 제거한 후 leptin (Y-20)과 leptin 수용체 (N-20)에 대한 일차 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA)로 1시간 동안 상온의 항습 chamber에서 반응시킨 후, LSAB Plus kit (Dako A/S, Glostrup, Denmark)에 들어 있는 biotinylated IgG와 streptavidin-peroxidase를 각각 15분간 반응시켰다. 슬라이드를 diaminobenzidine (DAB, DAKO A/S, Glostrup, Denmark)을 이용하여 발색시켜 Mayer's hematoxylin 으로 대조 염색하였다.

배양된 과립 세포는 배양액을 제거한 후 PBS로 3회 세척한 다음 4% PFA (paraformaldehyde in PBS)로 10 분간 고정하였다. 고정된 과립 세포를 PBS로 5분씩 3회 세척하였으며 이후의 방법은 고정된 난소의 면역조직화학 방법과 동일하게 수행하였다.

### 4. 배양액 내 스테로이드 호르몬의 측정

배양액 내 estradiol, progesterone, androstenedione 은 각각 ESTRADIOL maia (Biochem Immuno System, Inc., USA), Active Progesterone DSL-3900 (DSL Inc., USA), Direct Androstenedione (DPC, Inc., USA)를 이용한 방사면역측정법 (RIA, radioimmunoassay)으로 정량하였다.

### 5. 통계 분석

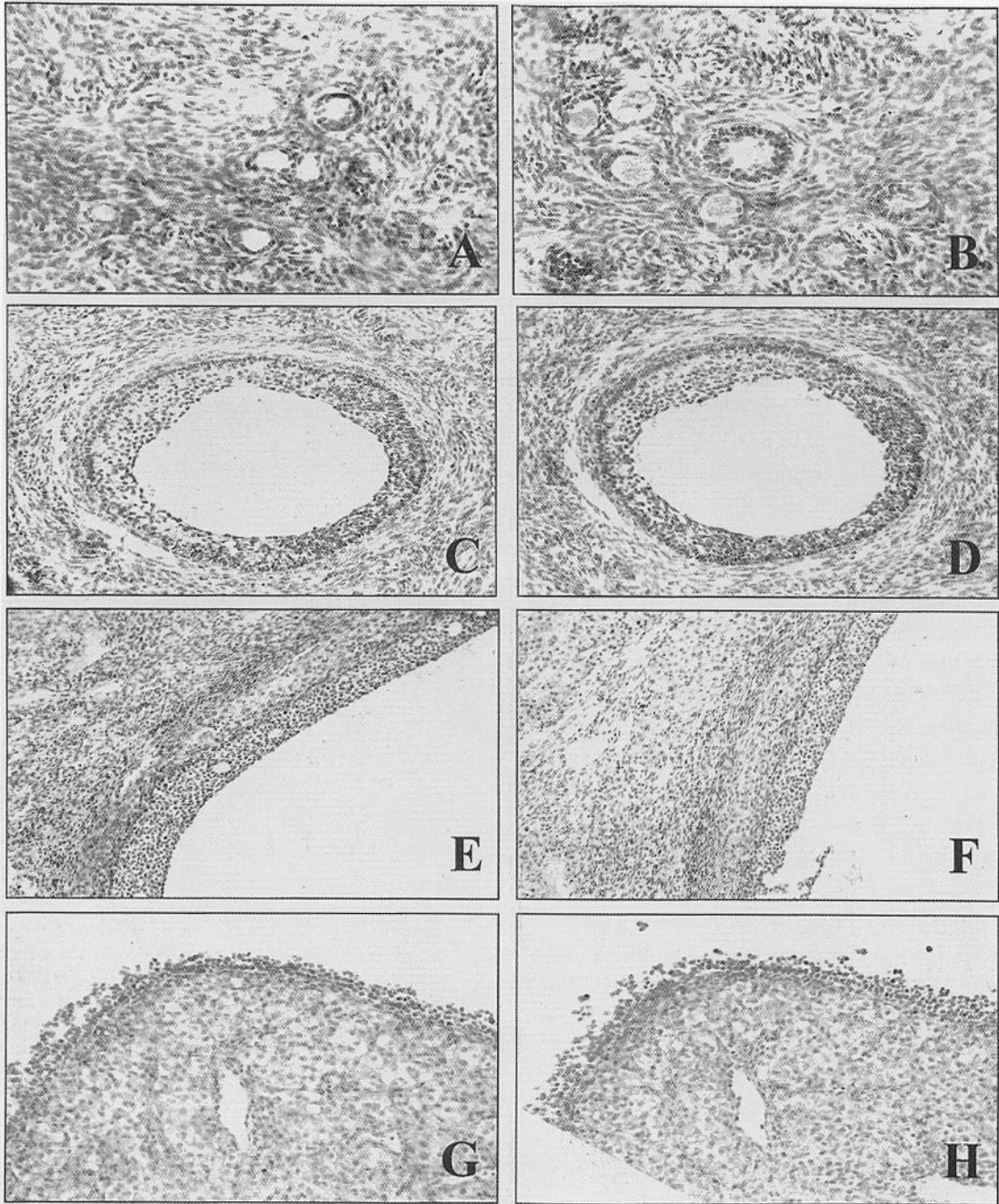
통계학적 유의성 검증은 one-way ANOVA with Scheffe test 방법을 사용하였으며, p 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 면역조직화학 방법에 의한 leptin과 leptin 수용체의 발현

난소에서 leptin (Figure 1A, C, E, G)과 leptin 수용체 (Figure 1B, D, F, H)는 모두 과립 세포 (granulosa cells)와 협막 세포 (theca cells), 일부 간질 세포 (interstitial cells)에서 염색되었다.

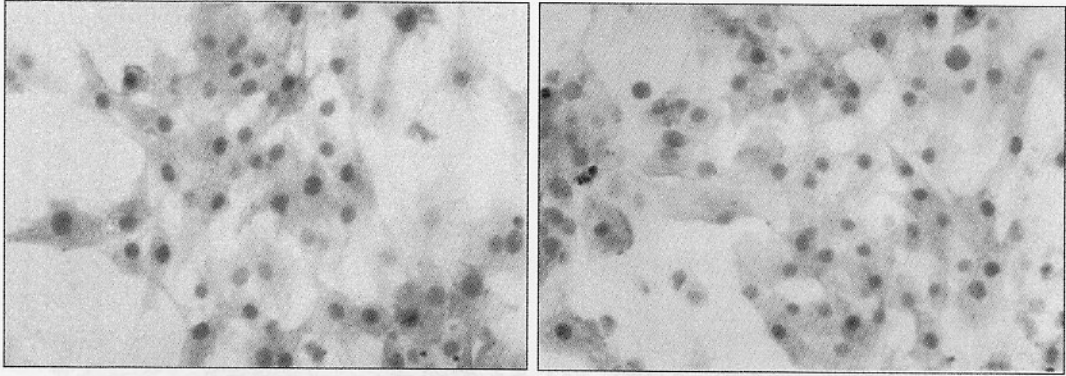
특히, 난포강이 형성되기 이전의 난포 (preantral follicle) 내 난자에서는 leptin 수용체가 강하게 발현된 반면 (Figure 1B), leptin은 발현되지 않았다 (Figure 1A). 또한 일부 폐쇄 난포 (atretic follicle) (Figure 1E, F, G, H)에서는 건강한 난포 (Figure 1C, D)에 비하여 leptin과 leptin 수용체가 모두 강한 발현 양상을 나타냈다.



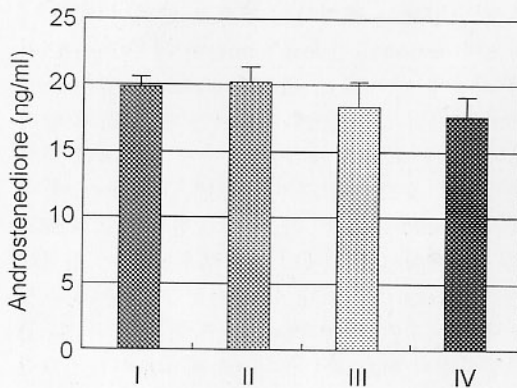
**Figure 1.** Immunohistochemical staining of leptin (A, C, E, G) and its receptors (B, D, F, H) in the ovaries of human. Tissue sections of human ovaries were incubated with leptin and its receptor primary antibodies. Sections were washed and then incubated with biotinylated secondary antibody and streptavidin-peroxidase. The immunoreaction was visualized by diaminobenzidine. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin ( $\times 400$ ).

또한 배양된 과립 세포의 면역조직화학적 염색 결과, leptin 수용체가 발현되는 것을 확인하였다

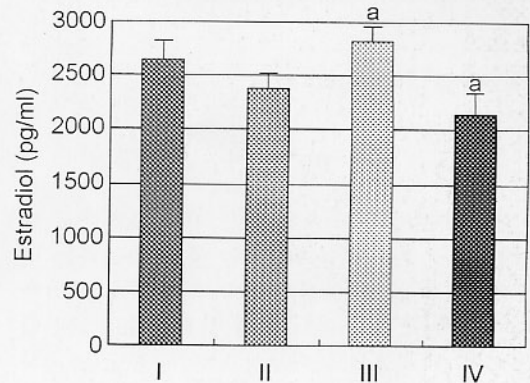
(Figure 2).



**Figure 2.** Immunohistochemical staining of leptin receptors in cultured human granulosa cells. The granulosa cells were obtained in connection with IVF, and cultured on chamber slide. The slides were incubated with leptin receptor primary antibodies. The slides were washed and then incubated with biotinylated secondary antibody and streptavidin-peroxidase. The immunoreaction was visualized by diaminobenzidine. The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin ( $\times 400$ ).



**Figure 3.** Effect of leptin on androstenedione production by granulosa cells. The granulosa cells were obtained in connection with IVF and cultured (100,000 cells/ml) in DMEM containing FSH (1 IU/ml), for 48 hours, in presence and absence of IGF-I (50 ng/ml) with and without leptin (50 ng/ml). Androstenedione in the medium was measured by RIA. The data are the mean  $\pm$  SEM of 6 experiments.



**Figure 4.** Effect of leptin on progesterone production by granulosa cells. The granulosa cells were obtained in connection with IVF and cultured (100,000 cells/ml) in DMEM containing FSH (1 IU/ml), for 48 hours, in presence and absence of IGF-I (50 ng/ml) with and without leptin (50 ng/ml). Progesterone in the medium was measured by RIA. The data are the mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. a;  $p < 0.05$ .

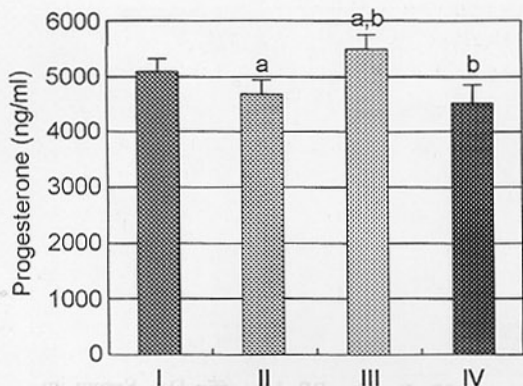
## 2. 배양액 내 스테로이드 호르몬 농도

배양액 내 androstenedione의 농도는 각 실험군 별로 유의한 차이가 없었다 (Figure 3).

Estradiol은 group I ( $2694.2 \pm 191.0$  pg/ml)에 비해 group II ( $2404.6 \pm 103.2$  pg/ml)에서 약간 감소하였으나 통계학적인 유의성은 없었으며, group IV ( $2202.0 \pm 151.1$  pg/ml)는 group III ( $2859.0 \pm 122.6$  pg/ml)에 비해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 또한

group I에 비해 group III에서 estradiol의 농도가 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다 (Figure 4).

Progesterone은 group I ( $5163.2 \pm 136.4$  ng/ml)에 비해 group II ( $4696.3 \pm 190.6$  ng/ml)에서 약간 감소하였으나 통계학적인 유의성은 없었으며, group III ( $5546.0 \pm 179.5$  ng/ml)에 비해 group II와 group IV ( $4517.5 \pm 206.8$  ng/ml)에서 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 또한 group I에 비해 group III에서 progesterone의 농도가 증가하였으나 통계학적인 유



**Figure 5.** Effect of leptin on estradiol production by granulosa cells. The granulosa cells were obtained in connection with IVF and cultured (100,000 cells/ml) in DMEM containing FSH (1 IU/ml), for 48 hours, in presence and absence of IGF-I (50 ng/ml) with and without leptin (50 ng/ml). Estradiol in the medium was measured by RIA. The data are the mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. a, b;  $p < 0.05$ .

의성은 없었다 (Figure 5).

## 고 찰

비만유전자 산물인 leptin은 지방 조직에서 생성되며, 신진대사, 식욕, 체열 등을 조절하는 비만의 억제 조절 물질로 알려져 있다.<sup>14</sup> 이러한 leptin은 비만뿐만 아니라 생식 질환과도 관련이 있는데, 대표적으로 다낭성 난소 증후군을 나타내는 여성에서 정상 여성보다 높은 혈중 leptin 농도를 보인다.<sup>5</sup> 또한 유전적으로 비만인 생쥐 (ob/ob mouse)는 불완전한 형태의 leptin을 생산하거나 또는 전혀 leptin mRNA를 생산하지 못하는데,<sup>22</sup> 이러한 생쥐는 비만뿐만 아니라 불임을 동반한다.<sup>4</sup>

Zamorano 등<sup>21</sup>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 인간의 난소에서도 leptin과 leptin 수용체의 발현이 보고되고 있다.<sup>9,13</sup> 그러나 이러한 결과들은 난소내 leptin과 leptin 수용체의 발현을 확인하기는 하였으나, 그 발현되는 정확한 위치는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 면역조직화학 방법으로 난소에서 발현되는 leptin과 leptin 수용

체의 정확한 위치를 알아보려 하였다.

Leptin과 leptin 수용체는 모두 과립 세포 (granulosa cells)와 험막 세포 (theca cells), 일부 간질 세포 (interstitial cells)에서 염색되었다. 험막 세포와 과립 세포에서 발현되는 leptin은 스테로이드 호르몬 생성에 관여하는 것으로 보여진다. 흰쥐의 과립 세포를 체외에서 배양하면서 leptin을 처리하면  $17\beta$ -estradiol의 생성이 감소하고,<sup>20</sup> 양의 험막 세포를 배양하면서 leptin을 처리하면 progesterone과 androstenedione의 생성이 감소한다는 보고<sup>18</sup>는 이러한 leptin의 기능을 제시하고 있다. 또한 일부 폐쇄 난포에서는 건강한 난포에 비하여 leptin과 leptin 수용체가 모두 강한 발현 양상을 나타냈는데, 이러한 결과는 leptin의 스테로이드 호르몬 생성 억제 작용을 간접적으로 보여주고 있다.

Leptin 수용체는 cytokine receptor superfamily에 속하며 서로 다른 세포내 domain을 갖는 여러 종류의 이성체가 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>8,19</sup> 세포내 domain이 긴 long form만이 세포내 신호 전달 과정에 관여하고, 세포내 domain이 짧은 short form은 아직 그 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.<sup>3,8,11</sup> 난소에는 이러한 두 가지 이성체가 모두 존재하는 것으로 알려져 있는데,<sup>9</sup> long form에 비해 short form이 훨씬 더 많이 발현된다고 보고되었다.<sup>13</sup> 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<sup>13</sup>는 이러한 가설을 뒷받침해 준다.

본 연구에서는 난포강이 형성되기 이전의 난포내 난자에서는 leptin 수용체가 강하게 발현된 반면, 난포강이 형성된 난포의 난자에서는 발현되지 않았다. Leptin 수용체의 발현이 난포강 형성 여부에 따라 다르게 나타나는 결과에서 leptin이 난포 발달 및 난자 성숙에 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  $17\alpha$ -hydroxylase mRNA의 발현이 upre-

gulation된다는 보고<sup>21</sup>는 leptin이 스테로이드 호르몬 생성에 관여한다는 것을 보여주고 있다. 그러나, 난포 세포를 배양하면서 leptin을 처리하면 스테로이드 호르몬 생성이 감소한다는 보고<sup>13,18,20</sup>는 오히려 leptin이 스테로이드 호르몬 생성을 억제하는 작용을 나타내는 상반된 결과를 보여준다.

본 연구에서 배양액 내 androstenedione의 농도는 각 실험군 별로 유의한 차이가 없었는데, 이는 양의 협막 세포를 배양하면서 leptin을 처리하면 androstenedione의 생성이 감소한다는 보고<sup>18</sup>와는 일치하지 않는다. Estradiol과 progesterone은 group IV에서 group III에 비해 유의하게 감소하였는데, 이는 원위의 과립 세포를 배양하면서 leptin을 처리했을 때 스테로이드 호르몬 생성이 감소한다는 보고<sup>20</sup>와 일치한다. Leptin의 스테로이드 호르몬 생성 억제 효과는 leptin이 IGF-1의 작용을 억제하기 때문인 것으로 사료된다. IGF-1은 협막 세포와 과립 세포에 결합하여 스테로이드 호르몬 합성을 직접적으로 조절하는 중요한 물질로써 또한 과립 세포의 세포자연사 (apoptosis)를 억제하는 것으로 알려지고 있다.<sup>2</sup> 따라서 과립 세포에서 leptin에 의한 IGF-1 작용의 억제 효과는 스테로이드 호르몬 합성의 억제 효과와 더불어 과립 세포에 세포자연을 유발시켜 난포의 기능을 저하시킬 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 인간 난소내 과립 세포와 협막 세포에서 면역조직화학 방법으로 leptin과 leptin 수용체의 발현을 확인하였는데 이러한 결과는 leptin이 난소의 생리적 기능을 직접적으로 조절한다는 것을 시사한다고 할 수 있으며 특히 스테로이드 호르몬 생성에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한 과립 세포를 배양하면서 leptin을 처리하면 estradiol과 progesterone의 생성이 억제되는 결과는 이러한 leptin의 기능에 대한 가설을 뒷받침해 준다고 할 수 있다.

## 참 고 문 헌

1. Barash IA, Cheung CC, Weigle S, Ren H, Kabisiting EB, Kuiper JL, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137: 3144-7.
2. Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, et al. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte

lineage. *Cell* 1992; 70: 31-46.

3. Baumann H, Morella KK, White DW, Demski M, Bailon PS, Kim H, et al. The full-length leptin receptor has signaling capacities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8374-8.
4. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* 1979; 59: 719-809.
5. Brzechffa PR, Jakimiuk AJ, Agarwal SK, Weitsman SR, Buyalos RP, Magoffin DA. Serum immunoreactive leptin concentrations in Women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4166-9.
6. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269: 546-9.
7. Chhab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; 12: 318-20.
8. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, et al. Novel B219/OB receptor isoforms: Possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nature Med* 1996; 2: 585-9.
9. Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 567-72.
10. Cohen B, Novick D, Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 1996; 274: 1185-8.
11. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6231-5.
12. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269: 543-6.

13. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, et al. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4144-8.
14. Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Freidman JM, Ailhaud G, et al. Expression of ob gene in adipose cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 2365-8.
15. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Stales B, et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 1995; 377: 527-9.
16. Sileker LJ, Sloop KW, Suface LP, Kriaucinus A, LaQuier F, Manetta J, et al. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 1996; 271: 5301-4.
17. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriaucinas A, Stephens YW, Magosi, et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 1996; 97: 1344-7.
18. Spicer LJ, Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 1997; 58: 207-12.
19. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 29: 1263-71.
20. Zachow RJ, Magoffin DA. Direct intraovarian effects of leptin: Impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 $\beta$  production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1997; 138: 847-50.
21. Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorich LP, Bhat GK, Brann DW. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 1997; 65: 223-8.
22. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Freidman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.