

임신쥐에 대한 옥시토신의 반응

배영훈 · 조징 · 박석천

조선대학교 의과대학 생물학교실

Responsiveness of Pregnant Rat Uterus to Oxytocin

Bai, Y. H., C. Cho and S. C. Pak

Research Division of Biological Science, College of Medicine,
Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

SUMMARY

In vivo contractile response of the uterus in the pregnant rat to oxytocin increases with advancing gestation. This increase coincides with an increase in uterine oxytocin receptor number. However, *in vitro* the change in uterine contractile response of the pregnant uterus to oxytocin with advancing gestation is not clear.

The purpose of the present study was to find out that the uterine response *in vitro* to oxytocin changes as delivery approaches. Secondly, to determine if the incubation of uterine tissue *in vitro* altered the uterine oxytocin receptor number and affinity and thus explain the ambiguity between the *in vivo* and *in vitro* results. The studies were performed on rats at days 15, 20 and 21 of pregnancy. *In vivo* the uterine contractile response to oxytocin was greater ($P < 0.05$) at day 21 compared to days 15 and 20 (E_{max} : 724.8 ± 88.9 , 130.0 ± 81.5 and 133.4 ± 53.4 , respectively).

This correlated with a significant increase ($P < 0.05$) in uterine oxytocin receptor number at day 21 (days 21, 15 and 20 : 540 ± 89 , 53 ± 24 , 89 ± 35 fmoles/mg protein, respectively). However, the K_{ds} at days 15, 20 and 21 did not differ ($P > 0.05$). Finally no difference ($P > 0.05$) in oxytocin receptor number or affinity was detected between incubated and non-incubated tissue.

The results of these studies suggest that either pre-oxytocin or post-oxytocin receptor factors are important in determining the uterine myometrial responsiveness to oxytocin.

(Key words : Oxytocin, Myometrial responsiveness, Pregnant uterus)

I. 서 론

임신말기에 *in vivo* 상태의 자궁이 체외에서 주입된 oxytocin에 대한 수축반응은 쥐 (Dawood 등, 1979), 영장류 (Dawood 등, 1979; Leake 등, 1981) 와 다른 동물들 (Fuchs와 Fuchs, 1960)에서 잘 나타나 있

다. 분만시기가 가까워질수록 자궁의 수축반응은 자궁 근층에서 oxytocin receptor 숫자의 증가와 밀접한 관련을 보이고 있다 (Fuchs 등, 1983; Fuchs 등, 1984; Riemer 등, 1986; Soloff 등, 1979). 그러나 *in vitro* 상태하에서는 이러한 밀접한 관련이 덜 분명하여, oxytocin의 역할이 확실하지 않는 경우도 있다 (Dawood 등, 1978; Padayachi 등, 1988). 여러 문

이 논문은 1995년도 조선대학교 학술논문연구비의 지원을 받아 연구되었음.

현에 나타난 불확실한 *in vivo*와 *in vitro* 사이의 관계를 보다 명확히 규명할 필요가 있다.

본 연구의 목적은 첫째, *in vivo* 상태에서 임신쥐의 자궁이 임신시기에 따라 oxytocin에 대한 그 수축 반응을 실제로 다르게 나타내 보이는가를 알아보고, 둘째, 임신시기별로 oxytocin receptor 숫자를 파악하여 본 연구 첫번째 목적의 결과와 어떤 밀접한 관련이 있는지 규명하는데 있다. 또한 자궁조직의 배양을 통해 *in vivo*와 *in vitro* 사이에 존재하는 불분명한 원인을 알아보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

임신된 Sprague-Dawley-derived Holtzman 쥐 (350~400g)를 사용했다. 조명시설이 되어있는 사육실 내에서 음식과 물을 자유로이 섭취할 수 있도록 했다.

2. *In vivo* oxytocin assay

임신 15일 (n=7), 20일 (n=5) 그리고 21일째 (n=5) 되는 쥐 자궁이 oxytocin에 보이는 반응을 측정하기 위한 실험은 여러 문헌 (Bisset 등, 1966; Sawyer 등, 1980)에 바탕을 두고 있다. 모든 쥐들은 chloral hydrate (500 mg/kg)를 복강으로 주입하여 마취하였다. Oxytocin (Calbiochem, La. Jolla, CA)을 주입하기 위한 polyethylene cannula (PE-50)를 하나는 목정맥에, 그리고 자궁 수축상태를 측정하기 위한 다른 하나의 cannula (PE-50)는 끝에 balloon을 달고 그 안에는 물을 채워 자궁속에 넣었다. 자궁내 압력 변화는 polygraph (Grass Instruments, Quincy, USA)를 사용하여 측정하였다. 주입된 oxytocin (100 mU)에 의해 보이는 자궁수축의 반응은 20분 동안 integration 되었으며 그 이후에는 10분간 또는 자궁수축이 baseline으로 내려갈 때까지 휴식을 취하게 하였다. Oxytocin 주입에 의해 야기된 실제 자궁압력은 oxytocin 주입이후 생성된 압력에서 자연적 압력을 뺀 값을 취하였다. *In vivo* oxytocin assay에 의해 나온 data를 가지고 Emax (maximal response)와 PD₂ (negative log of ED₅₀)을 계산하였으나 oxytocin receptor 숫자와 kd는 컴퓨터 프로그램 (Mc-

pherson, 1985; Munson과 Rodbard, 1980)에 의해 그리고 나머지 data는 ANOVA (Norusis, 1988)에 의해 분석되었다.

3. Oxytocin receptor assay

임신 15일 (n=5), 20일 (n=5) 그리고 21일 (n=5)째 되는 쥐 자궁을 사용하여 oxytocin receptor 숫자를 측정하였으며 이것은 다른 논문 (Nissenson 등, 1980)에 나와 있는 실험방법에 근거하였다. Chloroform을 사용하여 쥐들을 희생시킨 후 자궁을 채취하였다. 결합조직과 태아 및 태반조직을 분리한 다음 자궁조직만을 작은 조각으로 잘라 dry ice로 냉각시킨 후, 차후 분석할 때까지 -70℃의 냉동기에 보관하였다. 그리고 냉동된 자궁조직을 분쇄하고 초원심분리기를 이용한 원심분리와 10%/35%의 sucrose gradient에 의해 oxytocin receptor가 분포되어 있는 membrane을 분리해냈다. 이 membrane은 10%/35%의 sucrose 사이에 형성되었다. 이 receptor assay는 30℃하에서 30분동안 ³H-OT (NewEngland Nuclear, 37.1 Ci/mmol)와 cold oxytocin (Calbiochemical)의 competing saturation에 의해 실행하였다. Ultraclear mini tube (5×41 mm)를 이용하여 원심분리를 하여 생긴 membrane은 1.0 N의 NaOH에 45℃에서 30분간 용해시켰다. 이 용해된 물질을 liquid scintillation counting fluid와 함께 넣어져 counter를 이용해 dpm을 측정하였다.

4. 자궁조직 배양

임신 15일째 되는 쥐를 희생시켜서 자궁조직을 곧바로 냉동시키거나, 아니면 organ bath에 3시간 동안 배양시킨 후 냉동시켜 차후에 receptor assay를 하여 receptor 숫자를 비교하였다.

III. 결 과

In vivo oxytocin assay를 통해 얻어진 dose-response curve는 Fig. 1에, 그리고 E_{max}와 PD₂값은 Table 1에 나와 있다. Oxytocin 주입에 보이는 자궁의 E_{max}는 임신 21일째가 가장 높았으며 (P<0.05) 임신 15일과 20일째 자궁은 그 수치가 거의 비슷했다. 그러나 PD₂값은 3개군의 임신날짜 사이에 어떤 차이

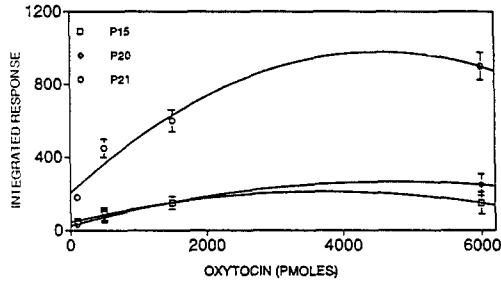


Fig. 1. This figure illustrates the *in vivo* uterine contractile dose-response curve to oxytocin in rats at days 15, 20 and 21 of pregnancy. The E_{max} at day 21 was significantly higher ($p < 0.05$) than at days 15 and 20. All data are mean \pm SEM. N = 7, 5 and 5 for days 15, 20 and 21, respectively

Table 1. *In vivo* uterine response to oxytocin at pregnancy days 15, 20 and 21 in the rat

| Day | N | PD ₂ | E _{max} |
|--------|---|-----------------|------------------|
| P - 15 | 5 | 9.4 \pm 0.4 | 130.0 \pm 81.5 |
| P - 20 | 5 | 9.2 \pm 0.2 | 133.4 \pm 53.4 |
| P - 21 | 7 | 9.5 \pm 0.3 | 724.8 \pm 88.9 |

* Significantly different ($P < 0.05$) from days 15 and 20.

PD₂ : negative log of ED₅₀ molar concentration

E_{max} : maximal response

도 보이지 않았다 ($P > 0.05$). 또 다시 각 임신 날짜별로 다른 자궁을 이용하여 receptor assay (Fig. 2)를 한 결과 21일째의 자궁이 15일과 20일째의 자궁에 비해 oxytocin receptor 농도가 훨씬 높았다 ($P < 0.05$). 그에 반해 Kd value는 3개군 사이에 어떤 차이도 없었다 ($P > 0.05$).

자궁조각이 oxytocin에 보이는 *in vivo*와 *in vitro* 사이의 상이점을 규명하기 위해 임신 15일째 임신 쥐 자궁을 채취한 후 3시간동안 배양한 후 얻어진 oxytocin receptor 숫자는 배양하지 않고 얻어진 oxytocin receptor 숫자와 어떤 차이도 보이지 않았으며 ($P > 0.05$) 그 결과는 Fig. 3에 나타나 있다.

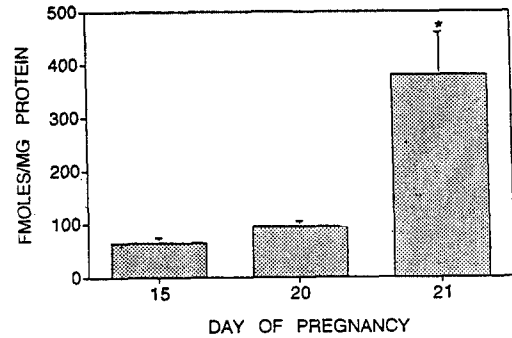


Fig. 2. This figure shows the oxytocin receptor number in uterine tissue membranes from days 15, 20 and 21 of pregnancy in the rat. The number of receptors per mg of protein was higher ($p < 0.05$) at day 21 compared to days 15 and 20 of pregnancy. These results correlate with the uterine contractile dose-response curve shown in Fig. 1. All data are mean \pm SEM

N = 5 in all days of pregnancy

IV. 고 찰

본 연구의 *in vivo* assay에서 얻어진 결과는 여러 논문들 (Dawood 등, 1979; Fuchs와 Fuchs, 1960; Fuchs와 Poblete, 1970; Fuchs 등, 1983.; Leake 등, 1981; Riemer 등, 1986; Soloff 등, 1979)에서 규명된 결론 즉, 임신말기의 쥐 자궁이 oxytocin에 보이는 수축반응이 가장 민감하고 또한 oxytocin receptor 숫자가 가장 높다는 것과 일치하고 있다. 임신말기에 나타나는 oxytocin에 대한 자궁의 수축반응 증가는 자궁의 oxytocin receptor 숫자의 증가와 그 맥을 같이 하고 있으며 이것이 바로 자궁의 수축반응 증가의 한 요인이라고 할 수 있다.

일반적으로 자궁의 smooth muscle을 수축하게 하는 oxytocin은 진통을 유발시키기 위해 널리 이용되어 왔다. Oxytocin에 의해 유발된 진통과 자연적 진통 사이에 어떤 차이도 없었기 때문에 지난 수십년 동안 진통은 oxytocin의 분비에 의한 것이라고 인식되어 왔다. 그러나 전 임신기간동안에 걸쳐 maternal cir-

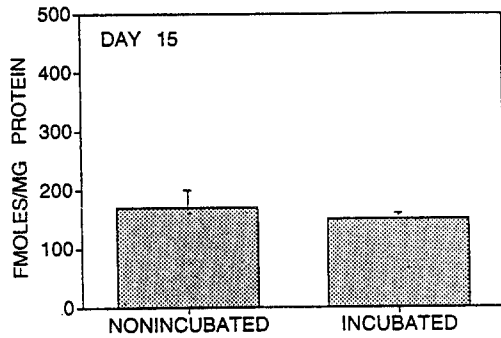


Fig. 3. This figure demonstrates the effects of incubating uterine tissue from day 15 of pregnancy for 3 hours on the uterine membrane oxytocin receptor number. No differences ($p > 0.05$) were found between incubated and non-incubated tissue. All data are mean \pm SEM

cultivation에 oxytocin이 존재하고 있다는 것이 널리 알려지게 되었고 진통의 마지막 단계에만 급격히 그 양이 증가된다는 것이 밝혀지게 되었다. 그리하여 분만을 일으키는 실제적인 요인은 oxytocin의 분비가 아니라 자궁근층이 oxytocin에 보이는 그 sensitivity의 증가라는 학설이 대두되게 되었다. 본 연구 또한 이 결론을 강력히 뒷받침하고 있다. Soloff 등(1979)이 1979년에 임신쥐를 사용하여 oxytocin receptor가 분만직전에 진통이 동반되면서 그 숫자가 급격히 증가된다는 것을 보여준 이래 수많은 논문들이 같은 결론에 이르고 있다. Fuchs 등(1983)은 쥐의 임신말기에 일어나는 최대의 oxytocin receptor 숫자는 진통시기의 oxytocin에 대한 자궁의 sensitivity 증가와 밀접하게 관련되어 있다고 주장했다. 비록 Lefebvre 등(1992)이 분만시기가 가까워질수록 oxytocin mRNA가 증가된다고 했지만 여전히 oxytocin 그 자체가 분만시기에 나타나는 자궁의 활동에 미치는 영향은 미미하다고 할 수 있다.

비록 본 연구에서는 *in vivo*의 data를 제시하고 있지는 않지만 쥐의 자궁근층을 다루는 논문들은 많이 있다. Crankshaw(1987)의 연구에 의하면 임신 15일째의 쥐의 자궁은 임신말기에 채취한 자궁처럼 oxy-

tocin에 대한 수축반응을 보여 그 최대수축력에는 큰 차이가 없었다. 이 결과와는 대조적으로 Tuross 등(1987)의 연구는 쥐의 자궁이 임신기간이 말기에 가까워질수록 oxytocin에 대한 sensitivity가 증가했으며 Emax는 임신 15일째와 말기 사이의 시기에서 최대치를 보였다고 했다. 이러한 차이들에 대한 설명에는 *in vitro* 실험시에 쓰이는 buffer에 들어가는 각 ion들의 존재 유무 (Chan과 Kelly, 1967), gap junction의 증가 (Garfield 등, 1978), 그리고 gap junction과 steroid hormone과의 관계 등으로 접근할 수 있다. 또 다른 간과할 수 없는 요인으로는 세포내에서 일어나는 세포내 calcium 양의 변화라고 할 수 있다. 그 밖의 여러 요인들이 *in vitro* 상태의 근육에 영향을 미쳐 *in vivo* 상태내에서는 일어나지 않는 현상들이 발생하여 *in vitro* 상태하의 자궁근층이 oxytocin에 대한 반응에 민감할 수도 그렇지 않을 수도 있다.

결론적으로 임신시기가 말기에 가까워질수록 쥐의 자궁은 oxytocin에 대한 수축반응이 증가하는 것을 보여주었으며 이것은 자궁 oxytocin receptor 숫자의 증가와 밀접하게 관련이 있었다. 또한 *in vitro* 상태로 얻어진 자궁의 조직을 배양했을 때와 하지 않았을 때 oxytocin receptor 숫자에서는 그 어떤 차이도 보이지 않았다.

V. 적 요

임신쥐의 자궁이 *in vivo* 상태에서 보이는 oxytocin에 대한 수축반응은 분만시기가 가까워질수록 증가하며 이것은 receptor 숫자 증가와 비례하고 있다. 그러나 *in vitro* 상태에서 임신쥐의 자궁이 oxytocin에 보이는 수축반응은 분만시기 진행과 더불어 꼭 비례하는 것만은 아니다. 본 연구의 목적은 *in vivo* 상태에서 실제로 임신쥐의 자궁이 임신시기별로 oxytocin에 대한 수축반응을 다르게 나타내 보이는가를 확인하고 나아가 자궁조직을 배양하여 oxytocin receptor 숫자에 어떤 영향을 미치는지를 알아봄으로써 *in vivo*와 *in vitro* 사이에서 존재하는 약간의 애매모호함에 과학적인 접근을 시도하였다. 임신시기별로 다른 쥐들을 사용한 첫번째 실험에서 임신 21일째의 자궁이 oxytocin에 대해 보이는 수축반응은 임신 15일과 20일째

의 자궁이 보이는 반응에 비해 현저히 컸으며 이것은 임신 21일째의 자궁이 보이는 oxytocin receptor 숫자의 증가와 그 맥을 같이 했다. 그러나 kd value는 세 임신 시기별로 큰 차이를 보이지 않았다. 그리고 배양된 자궁조직과 비 배양한 자궁조직 사이에서의 oxytocin receptor 숫자 차이는 없었다.

이러한 결과는 자궁의 근층이 oxytocin에 보이는 수축반응의 강도를 결정짓는 어떤 요인이 oxytocin receptor에 작용하고 있다는 것을 암시하고 있다.

VI. 인용문헌

1. Bisset, G. W., J. Haldar and J. E. Lewin. 1966. Actions of oxytocin and other biologically active peptides on the rat uterus. Mem. Soc. Endocrinol., 14:185-198.
2. Chan, W. Y. and W. Kelly. 1967. A pharmacologic analysis on the significance of the chemical functional groups of oxytocin to its oxytocic and on the effect of magnesium on the *in vitro* and *in vivo* oxytocic activity of neurohypophyseal hormones. J. Pharm. and Exp. Therapeutics, 156:150-158.
3. Crankshaw, D. J. 1987. The sensitivity of the longitudinal and circular muscle layers of the rat's myometrium to oxytocin *in vitro* during pregnancy. Can. J. Physiol. Pharmacol., 65:773-777.
4. Dawood, M. Y., K. S. Raghavan and C. Pciask. 1978. Radioimmunoassay of oxytocin. J. Endocrinol., 76:261-270.
5. Dawood, M. Y., O. Ylikorkala, D. Trivedi, and F. Fuchs. 1979. Oxytocin in maternal circulation and amniotic fluid during pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., 49:429-434.
6. Fuchs, A. R. and F. Fuchs. 1960. The effect of oxytocic substances upon the rabbit uterus *in situ*. Acta Physiol Scand., 49:103-107.
7. Fuchs, A. R. and V. F. Poblete, JR. 1970. Oxytocin and uterine function in pregnant and parturient rats. Biol. Reprod., 2: 387-401.
8. Fuchs, A. R., S. Periyasamy, M. Alexandrova, and M. Soloff. 1983. Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids. Endocrinology, 113:742-749.
9. Fuchs, A. R., F. Fuchs, P. Husslein, and M. S. Soloff. 1984. Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition. Am. J. Obstet. Gynecol., 150:734-741.
10. Garfield, R. E., S. M. Sims, M. S. Kannan, and E. E. Daniel. 1978. Possible role of gap junctions in activation of myometrium during parturition. Am. J. Physiol., 235:168-179.
11. Leake, R. D., R. E. Weitzman, T. H. Glatz, and D. A. Fisher. 1981. Plasma oxytocin concentrations in men, nonpregnant women, and pregnant women before and during spontaneous labor. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53:730-733.
12. Lefebvre, D. L., A. Giaid, H. Bennett, R. Laviviere, and H. H. Zingg. 1992. Oxytocin gene expression in rat uterus. Science, 256:1553-1555.
13. Mcpherson, G. 1985. Analysis of radioligand binding experiments J. Pharmacol. Methods, 14:213-228.
14. Munson, P. J. and D. Rodbard. 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Anal. Biochem., 107:220-239.
15. Nissenson, R. A., G. Flouret and O. Hechter. 1980. Oxytocin receptors coupled to uterine contractions in estrogen-dominated uterus. Biochem. Biophys. Acts., 628:209-219.
16. Norusis, M. J. 1988. Statistical Software Base Manual, SPSS Inc, Chicago.

17. Padayachi, T. R., J. Norman, K. Dhavaraj, M. Kemp and S. M. Joubert. 1988. Serial oxytocin levels in amniotic fluid and maternal plasma during normal and induced labor. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 95:888-893.
 18. Riemer, R. K., A. C. Goldfien, A. Goldfien and J. M. Roberts. 1986. Rabbit uterine oxytocin receptors and *in vitro* contractile response: abrupt changes at term and the role of eicosanoid. *Endocrinology*, 119:699-709.
 19. Sawyer, W. H. J. and Haldar, D. Gazis et al. 1980. The design of effective *in vivo* antagonists of rat uterus and milk ejection response to oxytocin. *Edocrinology*, 106:81-91.
 20. Soloff, M. S., M. Alexandrova and M. J. Fernatrom. 1979. Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation. *Science*, 204:1313-1315.
 21. Tuross, N., M. Mahtani and J. M. Marshall. 1987. Comparison of effects of oxytocin and prostaglandin $F_{2\alpha}$ on circular and longitudinal myometrium from pregnant rat. *Biol. Reprod.*, 37:348-355.
- (접수일자 : 1998:2. 22. / 채택일자 : 1998. 3. 20.)