

# Relaxin Hormone의 직접적인 작용에 의한 돼지 유선상피세포의 발달과 세포외간 기질의 분해개조 촉진

민 계 식

진주산업대학교 미생물공학과

## Direct Action of Relaxin on the Pig Mammary Glands to Promote Development of the Alveoli and Remodeling of the Extracellular Matrix

G. S. Min

Department of Microbiological Engineering, Jinju National University

### ABSTRACT

Our previous studies demonstrated that relaxin in concert with estrogen promotes development of the mammary parenchyma during the last third of gestation in gilts, and the specific relaxin-binding sites were present in the mammary gland. This study was conducted to determine if relaxin-binding sites in the mammary gland were functional relaxin receptors. Three cycling cross-bred gilts were bilaterally ovariectomized on day 0 of the experiment. Beginning on day 15 and continuing through day 29 post-surgery, the gilt received an im. injection of estradiol benzoate at 12-hr intervals. Beginning on day 22 post-surgery, highly purified porcine relaxin was administered(1ug/hr) into the left fourth mammary gland from the anterior end via miniature osmotic pump. Physiological saline was administered to the right fourth mammary gland. The gilt was sacrificed on day 29 post-surgery and histological characteristics of the mammary parenchyma were examined. The mammary glands treated locally with saline showed little, if any, lobulo-alveolar development, whereas the mammary glands treated with relaxin showed not only marked lobulo-alveolar development but also prominent secretions in the alveoli. The saline-treated glands were characterized by relatively dense and highly organized collagen fiber bundles. Whereas, in the relaxin-treated mammary glands, collagen fiber bundles were dispersed and loosely organized. In conclusion, relaxin-binding sites in the mammary gland are functional relaxin receptors and relaxin acts directly on the pig mammary gland to promote development of the alveoli and remodeling of the extracellular matrix.

(Key words : Relaxin, Non-pregnant pig, Mammary gland, Development, Remodeling)

### I 서 론

Polypeptide Hormone, relaxin(6kd)은 progesterone과 함께 돼지에 있어서 황체로부터 합성, 분비되며 (Fields and Fields, 1985; Bagnell et al., 1990), 혈중 relaxin의 농도는 임신 6일째 약 150 pg/ml 로부터 서서히 증가하기 시작하여

110일째에는 약 10 ng/ml에 도달하고 분만시작 2~3일 동안에는 최대농도(50~250 ng/ml)에 도달하게 된다(Eldridge-White et al., 1989).

돼지에 있어서 혈액을 순환하는 relaxin은 임신 후반기간 동안에 중요한 내분비 환경의 구성 성분으로 알려져 있다. Relaxin은 자궁경관조직의 성장과 연화를 촉진함으로써(O'Day et al.,

Corresponding author : Gyesik Min, Department of Microbiological Engineering Jinju National University 150 Chilam-Dong Jinju-City, Gyeongsangnam-Do 660-758 Korea, Tel : 055-751-3396, Fax : 055-751-3399, E-mail : g-min@jinju.ac.kr.

1989) 자돈의 신속하고 안전한 분만을 유도할 뿐만 아니라(Nara et al., 1982) 유선조직의 소낭(lobulo-alveolar parenchymal tissue) 발달에 중요한 기능을 한다(Hurley et al., 1991).

특히 돼지에 있어서 유선조직의 발달은 자궁 경관에서의 마찬가지로 임신 약 80일째부터 급속도로 진행되기 시작한다(Kensinger et al., 1982; Eldridge-White et al., 1989). 혈중 relaxin의 농도가 증가하는 시기에 해당하는 임신 약 80일째부터 110일 사이에 유선세포조직은 대부분의 지방조직을 침투하여 parenchymal tissue로 대체하게 된다. 임신돈을 60~65 일째 되는 시기에 난소를 제거한 후 progesterone을 주사하여 임신을 유지시켰을 경우, 혈중 estrogen의 농도는 정상인데도 불구하고 유선의 lobulo-alveolar 발달은 거의 일어나지 못하였다(Buttle, 1988). Hurley 등(1991)은 돼지의 임신기간 중 80~110일 사이에 relaxin 호르몬이 유선조직의 성장촉진에 중요한 역할을 함을 보고한 바 있다. 임신 100일째 양쪽 난소 절제수술을 시행한 후 110일까지 progesterone만을 투여할 경우 유선의 발달은 극히 저조한 반면, progesterone과 순수 정제한 relaxin을 동시에 투여하였을 경우 유선의 발달은 난소 절제수술을 시행하지 않은 대조군과 거의 유사한 정도로 잘 진행되었다.

돼지에 있어서 이러한 유선조직(parenchyma)의 성장에 필수적인 호르몬의 요구는 잘 알려져 있지 않지만, 최소한 난소로부터 합성 분비되는 steroid hormones(estrogen, progesterone)이 relaxin의 유선발달 효과를 촉진하는 데 필요한 것으로 사료되고 있다. 이에 대한 예로서 Winn 등(1994)은 난소 절제수술을 한 비 임신돈을 사용하여 relaxin, estrogen, progesterone의 유선발달에 대한 개별적 효과 및 조합효과를 조사한 결과, estrogen과 progesterone 모두 relaxin의 유선조직 발달 촉진에 필요함을 보고하였다. 특히 relaxin은 estrogen과 공동으로 유선발달(mammary parenchyma)을 촉진하고, progesterone과 공동으로 유선조직을 둘러싸고 있는 세포외간 섬유사인 collagen 기질을 분해하여 섬유사의 조직성을 감소시키는 기능을 나타내

었다.

최근에는 면역조직화학적 방법을 이용하여 relaxin 특이적인 결합부위가 유선조직의 lobulo-alveolar 상피세포뿐만 아니라 유액도관 상피세포(lactiferous duct epithelial cells) 및 혈관세포에 존재함을 밝혀냄으로써 relaxin이 작용하는 세포적 기전을 이해하는 데 중요한 정보를 제공했을 뿐만 아니라 relaxin 수용체의 존재가능성을 시사하게 되었다(Min and Sherwood, 1996). 하지만 이러한 relaxin 결합부위가 기능적으로 활성을 가지고 있는지는 아직 뚜렷한 증거자료가 충분하지 않을 뿐 아니라, 유선에 대한 relaxin의 생리적 기능이 유선조직 내 표적세포에 직접 작용함으로써 일어나는지 혹은 다른 표적조직 세포를 통해 매개된 후 제 2차 혹은 3차적인 인자에 의해 간접적으로 유선조직세포에 작용하여 유선조직의 발달을 촉진하는지는 아직 명확히 밝혀져 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 유선조직에 있어서 이러한 relaxin 결합부위가 *in vivo*에서 생리적 기능을 가진 수용체로서의 역할을 하는지를 조사하고, 나아가 relaxin이 유선조직 표적세포에 직접 작용함으로써 유선의 발달과 세포외간 결합조직의 재구성의 촉진을 매개하는 지를 규명하고자 하였다.

## II 재료 및 방법

### 1. Relaxin의 정제

임신돈의 난소로부터 relaxin의 정제는 이전에 보고된 Sherwood와 O'Byrne(1974)에 의한 분리방법을 따랐다. 간단히 설명하면, 조직의 분쇄와 Acid-Acetone(0.15N HCl-70% Acetone)에 의해 조직세포 내의 단백질을 추출하고, 0.2M Ammonium Acetate에서 균질분쇄기를 이용하여 relaxin을 가용화 시킨 다음 Ultrafiltration(MWCO3,500) membrane을 통해 농축, Sephadex G50 Gel filtration Chromatography와 Carboxymethyl Cellulose 이온교환수지 column을 통해 차례로 relaxin을 순수 분리 정제하였다.

2. Relaxin의 생물학적 활성분석

분리 정제된 relaxin의 생물학적 활성을 조사하기 위해 이전에 보고된 Mouse interpubic ligament assay 방법을 사용하였다(Steinetz et al., 1960). 간단히 설명하면, 미 성숙된 virgin female 생쥐(18~20g)에 estradiol cyclopentylpropionate 을 s.c로 주입하여 estrogen priming을 한 다음 7 일째 되는 날 2 group으로 나눈 다음(20 mice/group) 생리식염수에 녹인 0.2ml의 repository vehicle(1% Benzopurpurine 4B) 혹은 분리 정제된 relaxin hormone을 vehicle에 섞은 다음 s.c로 주사하였다. Relaxin을 주사한 24시간 후 생쥐를 CO<sub>2</sub>에 의해 희생시킨 다음 접안렌즈 측미계가 장착된 해부현미경을 이용하여 골반근 사이의 길이(distance between the pubic bones)를 측정하였으며, vehicle control과의 차이를 Bliss (1952)에 의한 통계적 비교분석법을 사용하였다.

3. 돼지의 난소제거 수술 및 호르몬 처리

정상적인 생리주기를 가진 3마리의 생후 7개월 된 잡종돼지에 대하여 양쪽 난소를 모두 제거하는 양측난소절제수술(Bilateral ovariectomy)을 실시하였다(day 0). 수술 전 먼저 kg 체중에 대하여 5 mg의 Telazol(A. H. Robinsons co.,

Richmond, VA, U.S.A.)과 2 mg의 Rompum (Mobay Corp., Shawnee, KS, U.S.A.)을 목 부분에 근육 주사하여 전신마취를 시킨 다음, 각 개체에 대해 10mg의 atropine sulfate(Anpro Pharmaceutical, Arcadia, CA, U.S.A.)를 근육 주사하였다. 수술시간동안 0.5~3%의 halothane(Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ, U.S.A.)과 2 Liter의 Oxygen/min을 기도를 통해 계속 주입함으로써 안정된 마취를 유지하였다. 수술은 복부절개(ventral laparotomy)에 의한 양측난소절제수술(bilateral ovariectomy)을 시행하였으며 수술 직후 3일 동안 매일 5 ml의 procaine penicillin G( $3 \times 10^5$  U/ml; Pfizer Inc., New York, NY, U.S.A.)을 목 부분에 근육주사 하였다.

난소 절제수술 후 15일부터(day 15) 29일(day 29)까지 각 개체별로 1 mg의 estradiol benzoate (Sigma Chemical Co., St. louis, MO, U.S.A.)를 2 ml의 옥수수 기름에 가용화시켜 12시간 간격으로 근육주사를 실시하였다. 수술 후 22일째 부터(day 22) 순수 정제된 relaxin을 miniature osmotic pump(Alzet Model 2002)를 통하여 몸의 anterior end로부터 왼쪽부위의 4번째 유선에 일정한 속도(1 ug/hr)로 주입하기 시작하였으며, 동일한 개체의 오른쪽 부위의 4번째 유선에는 vehicle control로서 생리적 식염수를 같은 종류의 osmotic pump를 통해 주입하였다. 본 실험

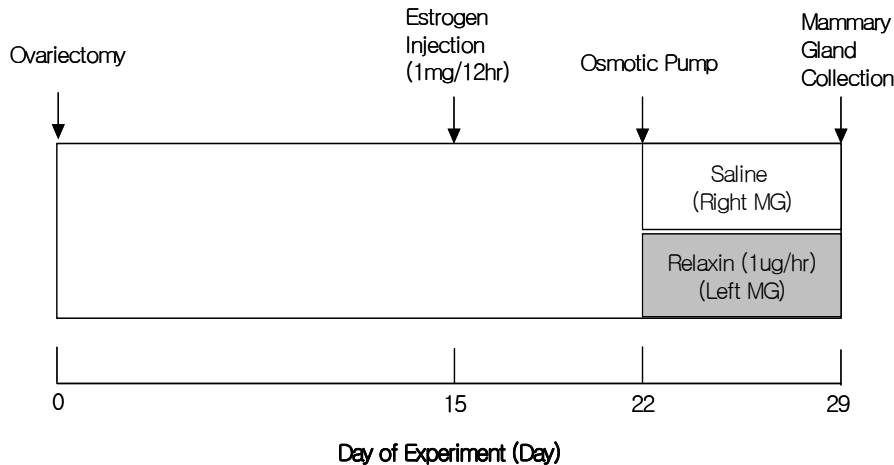


Fig. 1. Diagram of the experiment design. Estrogen dose is indicated per injection basis. MG, The anterior fourth mammary Gland. See Materials and Methods for details.

에 사용된 relaxin의 주입량은 혈중으로 유입되는 호르몬의 양을 최소화하는 범위 내에서 선정되었다. 위의 호르몬 처리 regimen을 요약하면 Fig. 1과 같다.

#### 4. 조직의 추출 및 Gomori's Trichrome 염색에 의한 조직학적 분석

조직학적 특징의 분석을 위한 유선조직의 시료는 일반적인 조직검사 방법에 따라 진행되었다. 난소 절제술 후 29일째 되는 날(day 29) 각 개체를 희생하여 젖꼭지의 base로부터 1 cm 떨어진 지점에서 osmotic pump의 위치로부터 가까운 parenchyma 조직을 채취하여 약 5-mm cube으로 자른 다음, 즉시 10% neutral-buffered formalin에서 최소 48시간 동안 처리 고정하였다. 고정된 각 조직 시료를 연속적인 고농도의 ethanol에서 탈수한 다음, xylene(Anatech, Battle Creek, MI, U.S.A.)으로 clear 처리를 하였으며 건조된 조직을 진공상태에서 Tissue Prep 2 embedding medium(Fisher Scientific, Fairlane, NJ, U.S.A.)에서 embedding 하였다. Polycut E 절편기를 사용하여 각 유선조직 시료로부터 6-um 두께의 5절편(절편 간 두께간격: 24um)을 획득한 다음 Weigert's iron hematoxylin과 함께 Gomori's one-step trichrome stain으로 염색하여 microscope slide coverslip으로 mounting 하였다. 호르몬 처리에 의한 유선조직의 특징분석은 Olympus AH-2 광학현미경을 이용하여 lobulo-alveolar의 발달과 세포외간 섬유사인 collagen의 정렬정도를 조직학적 관점에서 조사하였다.

### III 결 과

#### 1. 정제된 relaxin의 mouse interpubic ligament bioassay

순수 정제된 relaxin 호르몬은 vehicle control에 비하여 강한 생물학적 활성을 나타내었다. Vehicle control을 주입하였을 때의 mouse interpubic ligament의 평균길이는  $0.7(\pm 0.07)$ mm 인

데 반해 1 ug의 정제된 relaxin을 처리하였을 때의 평균길이는  $2.4(\pm 0.17)$ mm로 나타났다 (Fig. 2).

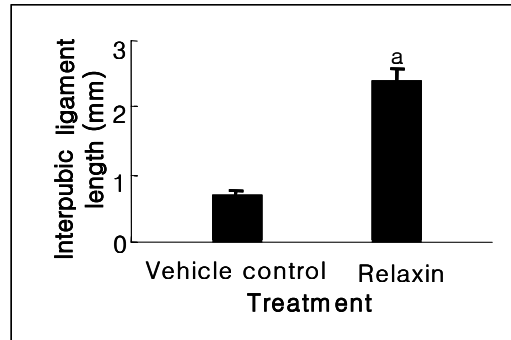


Fig. 2. Mouse interpubic ligament length(mean  $\pm$  SE; n=20) following a single injection(1 ug) of highly purified porcine relaxin(relaxin) in 0.2 ml of 1% benzopurpurine 4B in physiological saline and 0.2ml of 1% benzopurpurine 4B only(vehicle control). a,  $p < 0.05$  vs. vehicle control.

#### 2. 유선발달의 조직학적 분석

Relaxin의 vehicle control인 생리적 식염수가 처리된 유선조직 시료 중에서 대표적으로 trichrome 염색된 조직절편이 Fig. 3에 나타나 있다. 조직학적으로, 생리식염수로 처리된 유선조직에 있어서는 lobulo-alveolar의 발달이 거의 일어나지 않았을 뿐만 아니라 alveolar sac과 유액도관(lactiferous duct)이 함몰된 상태로 milk을 생산할 수 있거나 분비된 흔적을 거의 찾아볼 수 없었다. 또한 세포외간 섬유사인 collagen의 density가 매우 높고 잘 조직화되어 있으며 compact한 bundle 구조를 띠고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

이와는 달리, 동일한 개체 내에서 osmotic pump에 의한 소량(1 ug/hr)의 relaxin이 지엽적으로 처리된 반대편 유선조직의 대표적 염색절편의 조직학적 특징은, 상당한 lobulo-alveolar의 발달을 보여주고 있을 뿐만 아니라 alveolar sac과 유액도관 내에 milk의 생산과 분비가 각각 일어나고 있음을 알 수 있다(Fig. 4). 또한 세포외간 섬유사 collagen bundle은 느슨한 구조로

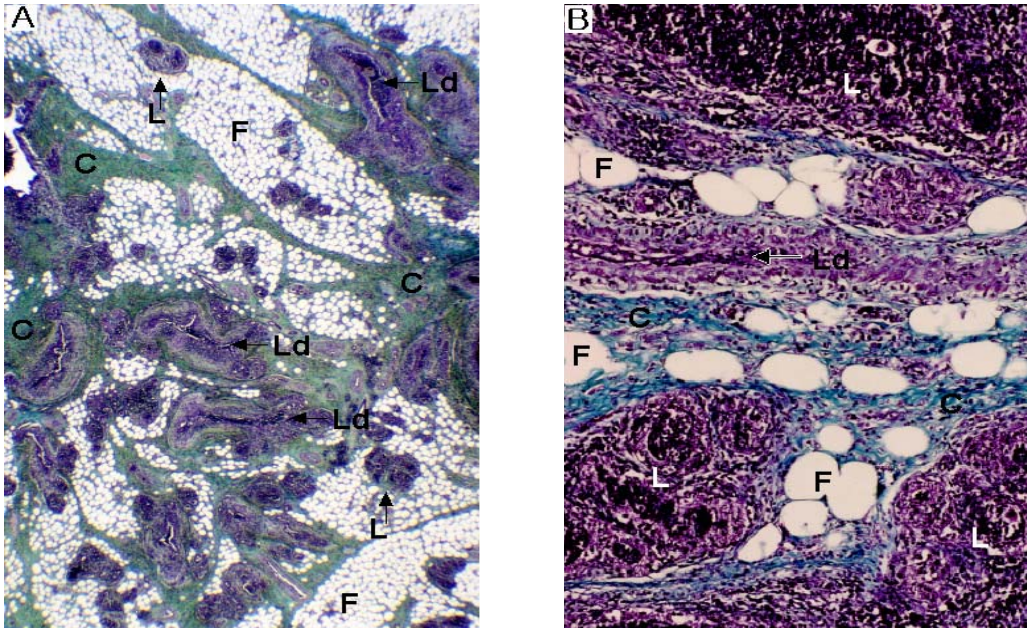


Fig. 3. Representative micrographs of mammary parenchymal tissue treated locally with physiological saline via osmotic pump. Note the predominant fat cells replaced for the parenchymal tissue and closed lobulo-alveolar structures. C, Collagen; L, Lobule; Ld, Lactiferous duct; F, Fat cell. Photograph B(x255) is a higher magnification of a region in A(x115).

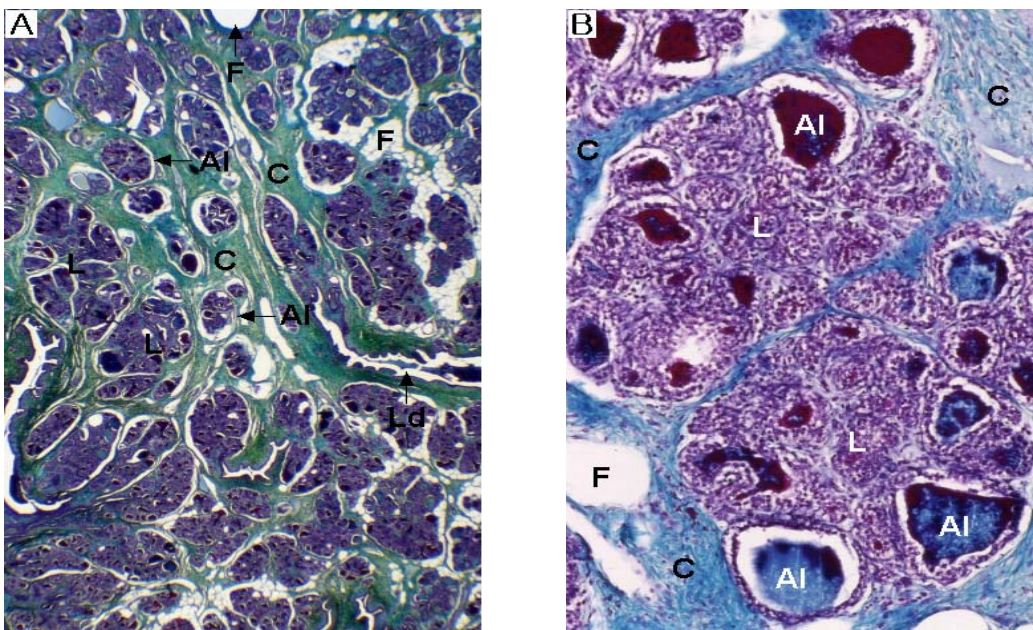


Fig. 4. Representative micrographs of mammary parenchymal tissue treated locally with highly purified porcine relaxin(1 ug/hr) via osmotic pump. Note the prominent secretions in the alveoli. C, Collagen; L, Lobule; Ld, Lactiferous duct; Al, Alveolus; F, Fat cell. Photograph B(x255) is a higher magnification of a region in A(x115).



덜 조직화 되어 있고 vehicle control에 비해 상대적으로 낮은 density를 보여주고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

#### IV 고 찰

임신돈(Hurley et al., 1991)과 비 임신돈(Winn et al., 1994)을 이용한 이전의 실험으로부터 나온 결과와 일치하게, 본 연구의 결과 relaxin이 유선조직의 발달을 촉진하는 데 중요한 역할을 함을 보여주었다. 또한 이전의 연구결과 estrogen이 없는 상태에서는 relaxin은 유선조직의 발달에 거의 영향을 미치지 않았다는 사실(Winn et al., 1994)과 estrogen 만으로서는 기능적으로 충분한 유선으로서의 lobulo-alveolar 구조의 발달을 가져오지 못한다는 결과(Buttle, 1988; Winn et al., 1994)는 본 연구에서 얻어진 estrogen이 prime된 ovariectomized 비 임신돈에서 relaxin이 상당한 lobulo-alveolar structure의 발달을 보여주고 있을 뿐만 아니라 세포외간 섬유사 collagen bundle의 유연화와 느슨한 조직화에 중요한 기능을 한다는 결과와 일치한다고 할 수 있다. 이 결과는 또한 estrogen이 처리된 생쥐에 있어서 최대의 유선조직의 발달을 촉진시킬 수 있는 것은 relaxin hormone이라는 이전의 보고(Bani and Bigazzi, 1984; Bani et al., 1991)와도 일치할 이룬다.

임신한 돼지에 있어서, 유선의 발달과 임신 80일 이후 일어나는 혈중의 증가된 relaxin, estrogen, 그리고 progesterone 사이에 밀접한 시간적 상관관계가 존재한다(Kensinger et al., 1982; Eldridge-White et al., 1989). 이러한 3가지 호르몬의 profile 중 대부분의 유선조직의 발달에 직접적으로 영향을 미치는 것은 본 연구와 이전의 연구 결과에서 보여주었듯이 estrogen과 relaxin의 공동작용에 기인하는 것으로 사료된다. 특히 Estrogen에 의하여 relaxin의 유선발달 촉진효과를 증대시키는 현상은 relaxin에 대한 수용체의 발현을 증가시킴으로써 초래될 가능성이 있을 것으로 사료된다. 이를 뒷받침해주는 근거로서, 돼지의 자궁근육조직 세포와 자궁경관조직 세포에서 estrogen에 의해 relaxin 수

용체를 유도할 뿐만 아니라, 생쥐의 자궁근육 조직 세포에서도 estrogen에 의한 relaxin 수용체의 발현 증가가 보고된 바 있다(Mercado-Simmen et al., 1982a; Mercado-Simmen et al., 1982b). 이전의 연구보고에 의하면 돼지의 임신기간 중 높은 농도를 유지하는 progesterone 또한 유선의 발달에 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 알려져 있다. 임신 후반기간 중 progesterone은 특히 relaxin과 공동으로 작용하여 세포외간 기질 섬유사 단백질에 해당하는 collagen 분자의 조직성과 밀도를 완화해 줌으로써 유선세포가 주위 연결조직 matrix로 용이하게 침투하여 성장을 잘 할 수 있도록 도와주는 역할을 하는 것으로 제시되고 있다(Winn et al., 1994). 본 연구의 결과 progesterone이 배제된 상태에서도 relaxin에 의해 어느 정도 extracellular matrix의 remodelling 과정이 일어나는 것으로 보아 progesterone은 collagen의 조직성과 밀도의 완화에 대한 relaxin의 효과를 한층 촉진하는 생리적 기능을 하는 것으로 사료된다. 따라서 estrogen과 relaxin은 유선조직(mammary parenchyma)의 성장과 발달을 촉진시키는 기능을 하는 반면, progesterone과 relaxin은 extracellular matrix 내 collagen 섬유사의 조직성과 밀도의 완화에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다.

본 실험에서 사용된 osmotic pump에 의한 relaxin의 조직 내 유출 양(1 ug/hr)은 혈중으로의 유입을 배제 할 수는 없지만, 다른 relaxin 표적조직에 영향을 미칠 만큼의 높은 혈중농도에는 도달하지 못한 것으로 사료된다. 이를 뒷받침하는 증거로서, 동일한 개체 내에서 한 부위의 유선조직에 지엽적으로 투여한 relaxin hormone이 직접적으로 주입된 부위에서는 조직학적 변화가 나타났지만 처리되지 않은 떨어진 다른 부위의 동일한 유선조직에서는 변화효과가 나타나지 않았다는 점과, 이전의 보고된 연구에서 보여주었듯이 250 ug의 relaxin을 6시간마다 근육주사를 한 후에도 2~8 ng/ml의 낮은 혈중농도를 유지하였다(O'Day et al., 1989). 따라서 향후 다른 조직에 대해서도 relaxin에 의한 직접적인 local effect를 조사하고자 할 경우에 기준이 되는 주입 dose로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

Relaxin이 어떠한 세포적인 기전에 의해 자궁경관과 유선조직 등과 같은 기관에서 생리적 효과를 나타내는 지는 아직 상세히 알려져 있지 않다. 이에 대한 이해를 진보시키기 위해 사용된 접근방법으로, 최근에는 면역조직화학적 실험방법을 통해 relaxin hormone이 유선조직 세포(mammary gland parenchyma cells)에 직접적으로 작용하여 lobulo-alveolar의 발달을 촉진할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다. 즉, mouse interpubic ligament 분석법에 의해 unmodified porcine relaxin과 거의 동일한 정도로 생물학적 활성이 있는 것으로 규명된 biotinylated porcine relaxin을 probe으로 사용하여 유선조직 절편에 incubation 시켰을 때, lobulo-alveolar 구조 및 유액도관(lactiferous duct)의 상피세포(epithelial cells) 뿐만 아니라 혈관세포에서 relaxin의 특이적이고 포화 가능한 결합을 관찰할 수 있었다(Min et al., 1996). 따라서 relaxin과 특이적으로 결합하는 유선조직 상피세포는 relaxin receptor를 함유하고 있으며 이러한 결합에 의해 최소한 부분적으로 relaxin의 생리적 효과를 매개할 가능성이 있는 것으로 추정되었다. 그러나 이러한 결과는 유선조직 세포에 존재하는 relaxin 결합부위가 기능적으로 활성을 지닌 relaxin 수용체(functional relaxin receptor)인지 혹은 relaxin hormone이 유선조직 세포에 직접적으로 작용하여 lobulo-alveolar의 발달을 촉진하는 지에 대한 직접적인 증거를 제공하기는 어렵다.

그러므로 본 연구를 통해 나타난 결과는 이에 대한 직접적인 정보를 제공하는 중요한 증거가 된다. 결론적으로, 유선조직 세포에 존재하는 relaxin 결합부위는 기능적으로 활성을 지닌 relaxin receptor이며, 또한 유선조직 세포가 relaxin hormone에 대한 직접적인 표적세포로 작용하여 임신말기에 나타나는 유선발달 촉진의 생리적 효과를 매개하는 것으로 사료된다.

## V 요 약

돼지에 있어서 약 115일간의 임신 기간 중 마지막 40일 동안에 유선 내에서 유액도관(duct), 분비소엽(lobules), 분비낭포(alveoli) 등의

parenchyma 조직이 현저하게 발달하게 되는데, 이는 단백질 호르몬 relaxin과 estrogen의 공동작용에 기인하여 촉진되는 것으로 알려져 있다. 최근에는 면역조직화학적 실험방법을 통해 relaxin hormone이 유선조직 세포(mammary gland parenchyma cells)에 직접적으로 작용하여 lobulo-alveolar의 발달을 촉진할 수 있는 가능성을 시사하였다. 즉 Relaxin에 특이적이고 포화 가능한 Relaxin의 결합부위가 lobulo-alveolar 구조 및 유액도관(lactiferous duct)의 상피세포(epithelial cells)뿐만 아니라 혈관세포에서도 존재함을 관찰하였다. 본 연구의 목적은 유선조직 세포에 존재하는 relaxin 결합부위가 기능적으로 활성을 지닌 relaxin 수용체(functional relaxin receptor)인지를 규명하고 동시에 relaxin hormone이 유선조직 세포에 직접적으로 작용하여 lobulo-alveolar의 발달을 촉진하는 지에 대한 직접적인 증거를 제공하는 데 있다. 정상적인 생리주기를 가진 3마리의 생후 7개월 된 잡종돼지에 대하여 양쪽 난소를 모두 제거하는 양측난소 절제술(Bilateral ovariectomy)을 실시하였다(day 0). 난소 절제술 후 15일부터(day 15) 29일(day 29)까지 각 개체별로 estradiol benzoate(1 mg/2 ml Corn oil)를 12시간 간격으로 근육주사 하였다. 시술 후 22일째부터(day 22) 순수 정제된 relaxin을 miniature osmotic pump를 통하여 몸의 anterior end로부터 왼쪽부위의 4번째 유선에 일정한 속도(1 ug/hr)로 주입하기 시작하였으며, 동일한 개체의 오른쪽 부위의 4번째 유선에는 동일한 방법으로 생리적 식염수(대조군)를 주입하였다. 난소 절제술 후 29일째(day 29) 각 개체를 희생하여 젖꼭지의 base로부터 1 cm 떨어진 지점에서 osmotic pump의 위치로부터 가까운 parenchyma 조직 시료를 채취하여 약 5-mm cube으로 자른 다음 조직학적 분석을 위한 일반적 조직시료 처리과정을 시행하였다. 조직절편을 Weigert's iron hematoxylin과 함께 Gomori's one-step trichrome stain으로 염색한 다음 Olympus AH-2 광학현미경을 이용하여 lobulo-alveolar의 발달과 세포외간 섬유사인 collagen의 밀도와 정렬정도를 조사하였다. 생리식염수로 처리된 유선조직에 있어서는 lobulo-alveolar의 발달

이 거의 일어나지 못한 반면, relaxin을 처리한 유선조직은 lobulo-alveolar의 현저한 발달을 보였을 뿐만 아니라 분비낭포(alveoli) 내에서는 두드러진 분비물이 존재하였다. 또한 식염수로 처리된 유선조직에서는 비교적 조밀하고 매우 잘 발달된 collagen 섬유사 묶음을 가진 세포외간 기질의 특징을 보였으나, relaxin 호르몬이 처리된 유선조직에서는 collagen 섬유사가 비교적 분산되어 있고 느슨하며 덜 조밀한 구조적 특징을 나타내었다. 결론적으로, 본 연구의 결과는 유선조직 내의 특이적 relaxin 결합세포가 기능적으로 활성을 지닌 relaxin 수용체를 함유하고 있으며, relaxin hormone이 유선조직 세포에 직접적으로 작용함으로써 lobulo-alveolar의 발달을 촉진함을 보여준다.

## VI 사 사

본 연구는 과학기술부 한국과학재단 지정 동물생명산업지역협력연구센터(과제번호 : R12-2002-053-01002-0)의 연구지원에 의해 이루어진 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## VII 인용 문헌

1. Bagnell, C. A., Tashima, L., Tsark, W., Ali, S. M. and McMurry, J. P. 1990. Relaxin gene expression in the sow corpus luteum during the cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology*. 126:2514-2520.
2. Bani, G. and Bigazzi, M. 1984. Morphological changes induced in mouse mammary gland by porcine and human relaxin. *Acta. Anat.* 119:149-154.
3. Bani, G., Bigazzi, M. and Bani, S. T. 1991. Relaxin as a mammatropic hormone. *Exp. Clin. Endocrinol.* 10:143-150.
4. Bliss C. L. 1952. The statistics of Bioassay. Academic Press, N.Y., N.Y., U.S.A.
5. Buttle, H. L. 1988. Role of the ovaries in inducing mammogenesis in pregnant pigs. *J. Endocrinol.* 118:41-45.
6. Eldridge-White, R., Easter, R. A., Heaton, D. M., O'Day, M. B., Petersen, G. C., Shanks, R. D., Tarbell, M. K. and Sherwood, O. D. 1989. Hormonal control of the cervix in pregnant gilts. I. Changes in the physical properties of the cervix

- correlate temporally with elevated serum levels of estrogen and relaxin. *Endocrinology*. 125:2996-3003.
7. Fields, P. A. and Fields, M. J. 1985. Ultrastructural localization of relaxin in the corpus luteum of the nonpregnant, pseudopregnant, and pregnant pig. *Biol. Reprod.* 32:1169-1179.
8. Hurley, W. L., Doane, R. M., O'Day-Bowman, M. B., Winn, R. J., Mojonner, L. E. and Sherwood, O. D. 1991. Effect of relaxin on mammary development in ovariectomized pregnant gilts. *Endocrinology*. 128:1285-1290.
9. Kensinger, R. S., Collier, R. J., Bazer, F. W., Ducsay, C. A. and Becker, H. N. 1982. Nucleic acid, metabolic and histological changes in gilt mammary tissue during pregnancy and lactogenesis. *J. Anim. Sci.* 54:1297-1308.
10. Mercado-Simmen, R. C., Bryant-Greenwood, G. D. and Greenwood, F. C. 1982. Relaxin receptor in the rat myometrium: regulation by estrogen and relaxin. *Endocrinology*. 110:220-226.
11. Mercado-Simmen, R. C., Goodwin, B., Uno, M. S., Yamamoto, S. Y. and Bryant-Greenwood, G. D. 1982. Relaxin receptors in the myometrium and cervix of the pig. *Biol. Reprod.* 26:120-128.
12. Min, G. and Sherwood, O. D. 1996. Identification of specific relaxin-binding cells in the cervix, mammary glands, nipples, small intestine, and skin of pregnant pigs. *Biol. Reprod.* 55:1243-1252.
13. Nara, B. S., Welk, F. A., Rutherford, J. E., Sherwood, O. D. and First, N. L. 1982. Effect of relaxin on parturition and frequency of live births in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 66:359-365.
14. O'Day, M. B., Winn, R. J., Easter, R. A., Dziuk, P. J. and Sherwood, O. D. 1989. Hormonal control of the cervix in pregnant gilts. II. Relaxin promotes changes in the physical properties of the cervix in ovariectomized hormone-treated pregnant gilts. *Endocrinology*. 125:3004-3010.
15. Sherwood, O. D. and O'Byrne, E. M. 1974. Purification and characterization of porcine relaxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 160:185-196.
16. Steinetz, B. G., Beach, V. L., Kroc, R. L., Stasilli, N. R., Nussbaum, R. E., Nemith, P. J. and Dun, R. K. 1960. Bioassay of relaxin using a reference standard: A simple and reliable method utilizing direct measurement of interpubic ligament formation in mice. *Endocrinology*. 67:102-115.
17. Winn, R. J., Baker, M. D., Merle, C. A. and Sherwood, O. D. 1994. Individual and combined effects of relaxin, estrogen, and progesterone in ovariectomized gilts. II. Effects on mammary development. *Endocrinology*. 135:1250-1255.

(접수일자 : 2004. 5. 13. / 채택일자 : 2004. 8. 10.)