



성체 수컷 생쥐에서 간장과 신장의 혈관 확장 및 세포 형태에 미치는 Propyl Pyrazole Triol의 영향

이은정 · 이유미 · 최은상¹ · 성치남 · 조현욱

순천대학교 자연과학대학 생명과학전공, ¹부산대학교 자연과학대학 생명과학부

Effects of Propyl Pyrazole Triol on the Blood Vessel-Dilation and Cellular Morphology of Liver and Kidney in Adult Male Mouse

Eun Jung Lee, Yu Mi Lee, Eun Sang Choe¹, Chi Nam Seong and Hyun Wook Cho

Department of Biology, College of Natural Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742

¹Department of Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Received September 22, 2006; Accepted December 9, 2006

ABSTRACT. The present study was designed to characterize the effects of estrogen receptor agonist (4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol, PPT) on liver and kidney in male mouse using a light microscopic analysis. PPT was subcutaneously given to adult male mice at a weekly dosage of 178.6 mg/kg in a volume 0.08 ml of vehicle for 3, 5 and 8 weeks. There were differences in body and organ weights between control and the treated groups. Body and kidney weights were decreased in treated group whereas, liver weight was increased. In microscopic observations, sinusoidal diameter in liver of treated group was increased 156%, 216% and 255% on week 3, 5 and 8 respectively. Compared to the control, diameter of proximal convoluted tubules in kidney was increased 37% and 43% on week 5 and 8 in treated group. Whereas, height of epithelial cells in the proximal tubules was reduced at all time points. These results suggest that microstructure of liver and kidney was changed by treatment of estrogen receptor agonist PPT in the male mice.

Keywords: Estrogen receptor, Propyl pyrazole triol, Liver, Kidney, Male mouse.

서 론

암컷호르몬으로 알려진 에스트로겐은 암컷의 난소, 난관, 자궁과 같은 생식계를 비롯한 여러 기관계에서 중요한 생리적 기능을 한다. 이런 에스트로겐이 수컷의 정소, 부정소, 수출소관, 전립선 등과 같은 수컷 생식계에서도 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀져 있다(Hess *et al.*, 1997; Taylor and Al-Azzawi, 2000; Cho *et al.*, 2003). 이와 같이 암컷과 수컷의 다양한 기관 내에서 에스트로겐은 세포 성장, 세포 분화, 단백질 합성, 탄수화물 이용 등

을 조절한다. 이런 에스트로겐의 작용은 특수한 세포내 수용체인 핵 수용체 그룹의 상호작용을 통해 매개된다(Pfaffl *et al.*, 2003).

1960년대 에스트로겐의 수용체가 확인된(Toft and Gorski, 1966) 이래 오랫동안 이 수용체는 한 가지 형태만 존재하는 것으로 간주되어 왔으나 1996년에 흰쥐에서 또 다른 형태의 에스트로겐 수용체가 밝혀졌다(Kuiper *et al.*, 1996). 이에 따라 전자의 수용체를 에스트로겐 수용체 알파(estrogen receptor alpha, ER α), 후자를 에스트로겐 수용체 베타(estrogen receptor beta, ER β)라고 명명하게 되었다(Couse and Korach, 1999). 이런 수용체의 기능을 보면, 에스트로겐은 신속히 목표 세포로 가서 에스트로겐 수용체와 비공유 복합체를 형성하고, 이 호르몬-수용체 복합체는 핵 속에서 목표 유전자의 promoter

Correspondence to: Hyun Wook Cho, Department of Biology, College of Natural Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea
E-mail: hwcho@sunchon.ac.kr

와 결합하여 궁극적으로 전사 수준을 조절함으로써 작용을 나타내게 된다는 것이다(Han *et al.*, 1999).

이와 같은 에스트로겐 수용체가 생식기능과 연관된 기관에만 존재하는 것이 아니라 다양한 기관이나 조직에도 분포한다. 사람의 경우, 거의 모든 기관계의 조직에 에스트로겐 수용체가 분포한다. 예를 들면 대뇌피질, 소뇌, 해마, 교 등과 같은 중추신경계, 심장, 대동맥, 관상동맥, 경동맥과 같은 순환계, 식도, 간장, 위, 소장, 대장과 같은 소화계, 신장, 방광과 같은 비뇨계 그리고 내분비계 및 호흡계 등의 세포와 조직에 에스트로겐 수용체가 존재하는 것으로 알려져 있다(Taylor and Al-Azzawi, 2000).

이런 수용체에 대하여 연구하는 것은 궁극적으로 동물체내 에스트로겐의 기능을 규명하기 위한 방법의 일환인데, 이를 위해 에스트로겐 수용체가 유전적으로 결핍된 생쥐를(Couse and Korach, 1999; Hess, 2003) 사용하거나, 혹은 ICI 182,780 같은 에스트로겐 수용체 저해제를 투여하여 연구하기도 한다(Cho *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2001, 2003). 또한 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator, SERM)를 이용하여 수용체의 생물학적 기능을 규명하기도 한다(Kraichely *et al.*, 2000). SERM은 구조적으로 다양한 비스테로이드성 에스트로겐 수용체의 리간드이며 동시에 agonist/antagonist 활성을 갖고 있다. 예를 들면 유방암 치료제로 사용되는 tamoxifen과 폐경 후 골다공증의 치료와 예방에 사용되는 raloxifene은 부분적인 ER α 의 agonist/antagonist 기능을 갖고 있으며 ER β 와 결합할 때는 순수한 agonist 기능을 가진다(Cignarella *et al.*, 2001). 따라서 SERM는 어떤 조직에서는 estrogen agonist 영향을 나타내며, 다른 조직에서는 estrogen antagonist 영향을 나타낸다.

이처럼 SERM은 에스트로겐 수용체와의 상호작용을 통해 활성을 나타내며(Shiau *et al.*, 1998), 이런 SERM 종류 중의 하나로서 본 실험에 사용한 PPT는 ER β 에 비해 ER α 와 410배의 높은 친화성으로 결합하는 것으로 알려져 있다(Stauffer *et al.*, 2000).

본 연구는 에스트로겐 수용체 알파 효능제인 PPT가 수컷 생쥐 간장과 신장의 혈관 확장 및 세포 형태에 미치는 영향을 알아보기 위해 수행하였다. 이 결과는 에스트로겐이 간장과 신장에서 어떤 생리적이고 기능적인 역할을 하는지 이해하는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 10주령 된 평균 체중 22.4 g의 수컷 생쥐

C57BL/6를 샘타코(Samtaco)회사로부터 구입하여 사용하였다. 30마리를 대조군과 처리군의 2군으로 나누고 각 군에 15마리를 배당하였다. 처리군은 Tocris 회사의 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol(PPT) 4 mg 이(0.126 M에 해당되며 체중에 대한 투여농도는 178.6 mg/kg임) 들어있는 castor oil 0.08 ml를 주 1회 등 쪽에 피하주사 방법으로 투여하였다. 대조군 생쥐에는 PPT가 들어 있지 않은 같은 양의 0.08 ml castor oil을 피하주사 하였다. 실험기간 동안 고형사료와 물을 무제한으로 공급하였다. 사육실은 22 \pm 2°C와 상대습도 50 \pm 5%를 유지하였으며 조명시간은 12시간을 주기로 하였다. 처리군의 생쥐는 PPT 투여 후 3주, 5주, 8주 후에 각각 5마리씩 sodium pentobarbital로 마취시키고 체중을 측정하였다. 이어서 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.4)에 용해한 4% glutaraldehyde용액으로 20분간 peristaltic pump를 이용한 관류 방법으로 희생시켰다. 대조군도 처리군과 마찬가지로 3주, 5주, 8주 후에 각각 5마리씩 같은 방법으로 체중을 측정하고 관류하여 희생시켰다.

간장 및 신장(좌우 신장 2개)을 적출하여 각각 무게를 측정하고 관류 시에 사용한 4% glutaraldehyde 용액에 포매할 때까지 보관하였다.

조직처리

간장 및 신장을 0.01 M phosphate buffer(pH 7.4)로 24시간 수세하였다. 조직을 농도 순서대로 에탄올에 담아서 탈수를 한 다음 glycol methacrylate에 포매 하였다. 포매한 조직을 마이크로톰을 이용하여 2.5 μ m 두께의 절편을 만들었다. 만든 절편을 periodic acid-Schiff(PAS)와 hematoxylin으로 이중염색 하고 Permount로 봉입하여 프레파라트를 만들었다.

현미경 관찰

간장 및 신장의 조직 프레파라트를 광학현미경(Olympus, BX50)으로 관찰하고 현미경에 부착된 SPOT 디지털 카메라(Diagnostic Instruments사의 Model No. 11.2 Color Mosaic)로 촬영하여 컴퓨터에 저장하였다. 먼저, 간장의 경우 3주, 5주, 8주 후에 희생시킨 각각의 간 조직에 있는 굴모양혈관(sinusoid)의 직경을 측정하였다. 굴모양혈관은 1 마리의 생쥐 간장 조직 절편에서 얻은 프레파라트에서 임의로 50개의 직경을 측정하고 그 평균값과 표준편차를 구하였다.

신장의 경우, 3주, 5주, 8주 후에 희생시킨 각각의 조직에서 근위세뇨관(proximal tubule)의 직경과 근위세뇨관을 형성하는 상피세포의 높이를 측정하였다. 근위세뇨관도 간장의 경우와 마찬가지로 1마리의 생쥐에서 50개의

직경을 측정하고 그 평균값을 구하였다. 근위세뇨관의 상피세포 높이도 50개의 세포를 대상으로 측정하였다. 대조군에 대한 PPT 투여를 한 처리군 간의 유의한 차이는 t-test를 이용하였으며 $p < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

결 과

대조군의 체중은 3주, 5주, 8주 후에 희생시켰을 때 각각 25.83 g, 26.92 g, 30.69 g으로 나타나 실험 기간이 길어질수록 증가한 반면에, PPT 처리군은 3주, 5주, 8주 후에 각각 24.52 g, 23.90 g, 21.18 g으로 나타나, 대조군에 비해 각각 5%, 11% 및 31% 감소하는 경향을 보였다(Table 1). 그러나 대조군과 처리군 체중의 유의한 차이는 투여 후 8주 때에 나타났다.

대조군의 간장 무게는 투여 후 5주 후에 약간 감소한 경우를 제외하고는 8주 후에 다시 증가하였다(Table 1). 처리군의 간장 무게는 실험기간 내내 증가하였다. 간장 무게에 있어서 대조군과 처리군의 유의한 차이는 전 실험 기간에 걸쳐 나타났다. 즉, 3주째에 대조군 간장의 무게는 2.09 g으로 그리고 처리군은 4.28 g으로 나타나 간장의 무게가 105% 증가하였으며 5주째의 경우에는 대조군 간장 무게 1.72 g, 그리고 처리군은 4.32 g으로 나타나 결과적으로 151% 증가하였다. 마지막 실험 기간인 8주 후 간장의 무게는 대조군에서 2.32 g 그리고 처리군에서 5.03 g으로 나타나 117% 증가하였다.

대조군 간장을 광학현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1A에 나타나 있다. PPT 투여군의 경우 실험기간이 길어질수록 간장의 모세혈관인 굴모양혈관이 확장되어 나타났다(Fig. 1B). 통계적으로 보았을 때 3주 후 희생시킨 굴모양혈관 직경의 경우, 대조군에 비해 처리군의 직경이 156% 증가되었다(Fig. 2). 5주군의 경우 처리군의 굴모양혈관 직경이 216% 증가하였다. 그리고 8주군의 경우 대조군 굴모양혈관 직경은 $9.49 \mu\text{m}$, 처리군은 $33.73 \mu\text{m}$ 로 나타나 결과적으로 대조군에 비해 처리군 굴모양혈관의 직경

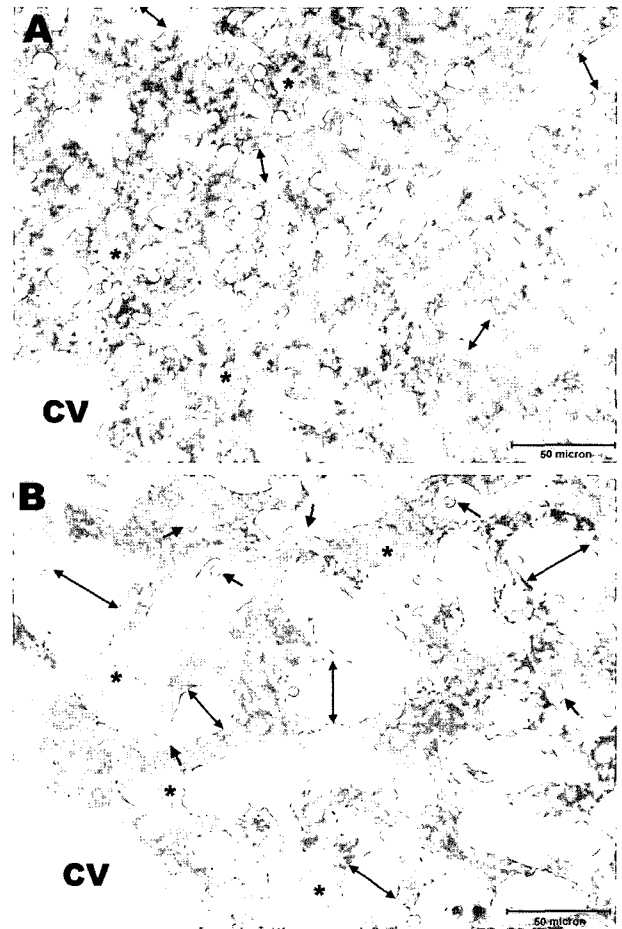


Fig. 1. Representative histological liver section on week 8 post treatment from control (A) and PPT treated mice (B). These micrographs illustrate central vein (CV), principle cells of the liver, hepatocytes and sinusoids. Control sinusoidal capillaries have a narrow diameter (double arrows), however PPT treated capillaries are dilated (double arrows). Arrows indicate inflammatory cells containing neutrophils in the sinusoid. The nuclei of hepatocytes were rounded morphology (asterisks) in control but were oval or spindle type in PPT treated group (asterisks). Bar size = 50 μm .

이 255% 증가되었다. 굴모양혈관에는 염증과 관련된 증성호성 백혈구 등이 적혈구와 함께 관찰되었다(Fig. 1B).

Table 1. Effects of PPT on body, liver and kidney weight

Parameter (g)	Group	Week post treatment		
		3	5	8
Body weight	Control	25.83 \pm 1.43	26.92 \pm 0.84	30.69 \pm 1.31
	PPT-treated	24.52 \pm 1.18	23.90 \pm 1.77	21.18 \pm 2.09*
Liver weight	Control	2.09 \pm 0.71	1.72 \pm 0.22	2.32 \pm 0.42
	PPT-treated	4.28 \pm 1.07*	4.32 \pm 0.21*	5.03 \pm 0.13*
Kidney weight	Control	0.23 \pm 0.03	0.26 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02
	PPT-treated	0.18 \pm 0.01*	0.21 \pm 0.02*	0.21 \pm 0.02*

Data are means \pm SD. * $p < 0.05$.

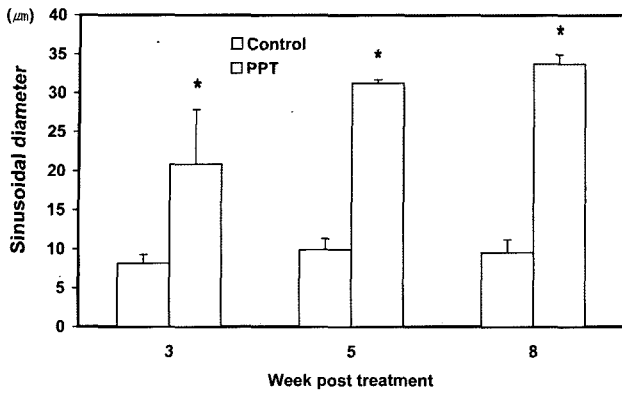


Fig. 2. Effects of PPT on sinusoidal diameter of liver. The sinusoidal lumen was dilated significantly at all time points. The data indicate means \pm SD. Significant differences (*) between control and treated at each time point are noted ($p < 0.05$).

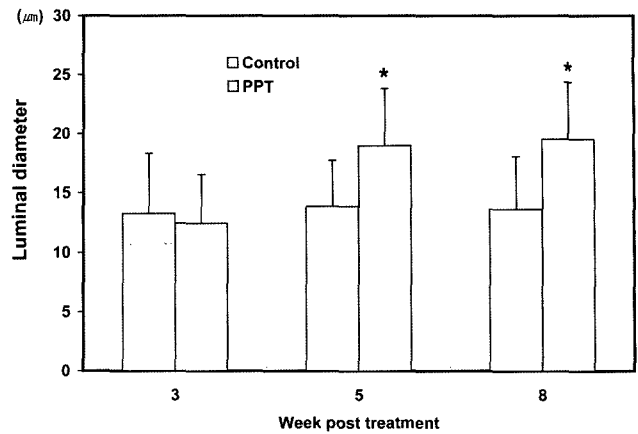


Fig. 4. Effects of PPT on luminal diameter of proximal tubule in kidney. On 5 and 8 week post treatment, there was a significant decrease (*) in the luminal diameter between control and treated groups ($p < 0.05$). The data indicate means \pm SD.

간장의 주된 조직을 구성하는 간세포의 경우, PPT 처리군에서는 핵의 직경이 대조군에 비해 증가하였고, 간세포의 세포질은 퇴화되어 나타났다.

왼쪽과 오른쪽에 있는 신장 1개의 평균 무게를 측정한

결과는 Table 1에 있다. 처리군의 신장 무게는 대조군 신장 무게보다 감소되었다. 즉 처리군 신장의 무게는 대조군에 비해 3주째에 22%, 5주째에 19%, 그리고 8주째에

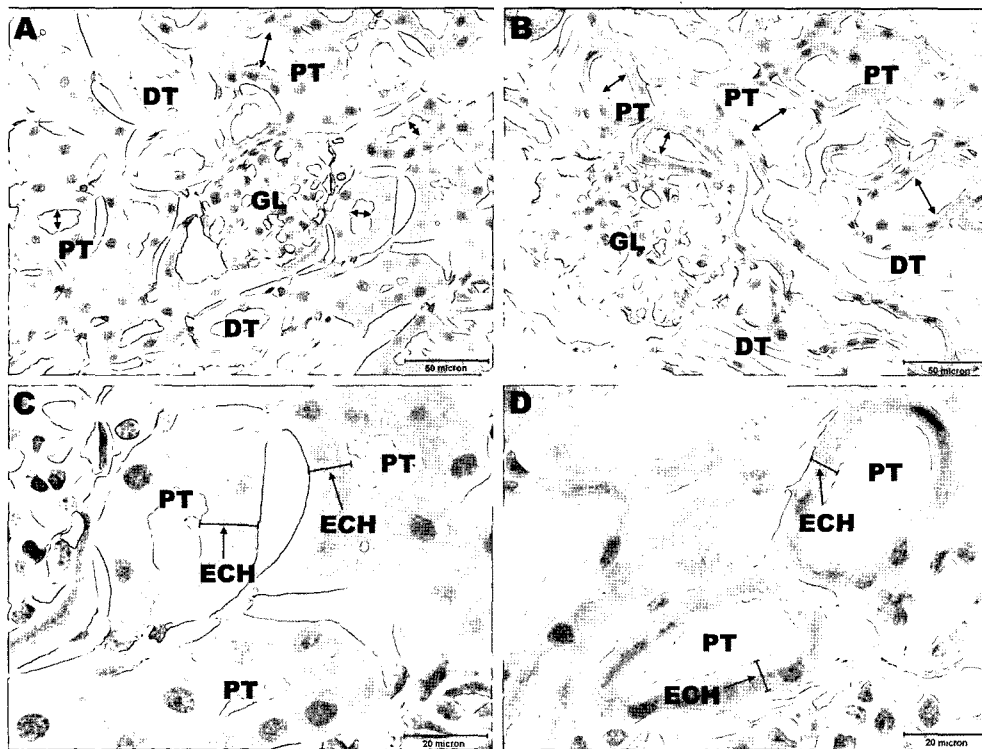


Fig. 3. Representative histological kidney section on week 8 post treatment from control (A and C) and PPT treated mice (B and D). Photomicrographs of a renal cortex showing a glomerulus (GL), proximal tubules (PT) and distal tubules (DT). Luminal diameter (double arrows) of proximal tubule was increased in PPT group comparing with that of control group. In the PPT group, epithelial cell height (ECH) was shortened compared to that of control. Bars represent 50 μ m (A and B) and 20 μ m (C and D).

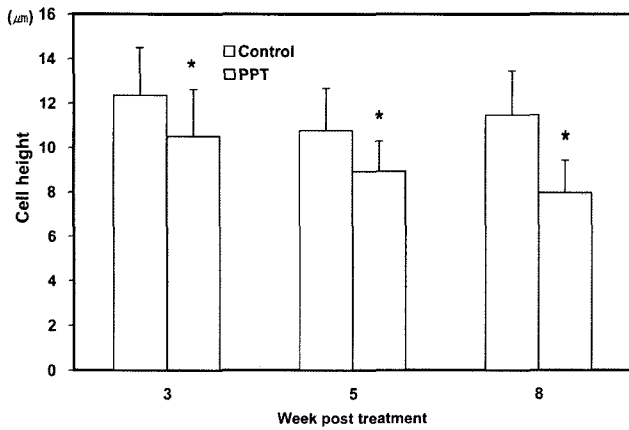


Fig. 5. Effects of PPT on epithelial cell height of proximal tubule in kidney. The cell height was decreased throughout the treatment period. Significant differences (*) between control and treated at each time point are noted ($p < 0.05$). The data indicate means \pm SD.

22% 감소하였으며 모두 유의한 차이를 보였다.

신장의 경우, 사구체와 근위세뇨관이 있는 피질 부위를 중점적으로 관찰하였다(Fig. 3). 신장의 피질에 있는 근위세뇨관 내강의 직경을 측정하였는데 3주의 경우, 대조군에 비해 처리군의 직경이 6% 감소하였다. 그러나 5주와 8주의 경우, 대조군에 비해 처리군 근위세뇨관 내강의 직경이 각각 37%와 43% 증가하였으며 또한 대조군과 유의한 차이를 보였다(Fig. 4). 근위세뇨관을 구성하는 상피세포 높이도 측정하였다(Fig. 3). 통계적으로 보면, 대조군에 비해 처리군의 근위세뇨관 상피세포 높이가 3주, 5주, 8주에 각각 15%, 17%, 30% 감소하였으며 또한 이 수치는 대조군과 유의한 차이를 보였다(Fig. 5). 마찬가지로 처리군에서, 사구체를 둘러싸고 있으며 근위세뇨관의 시작 부위인 보우만 주머니의 두께도 감소되어 나타났다. 대조군 근위세뇨관의 상피세포 핵은 원형이었으나(Fig. 3C) 처리군의 핵 모양은 타원형이나 혹은 방추형으로 변화되었다(Fig. 3D).

고 찰

에스트로젠은 암컷호르몬으로 알려져 있지만 실제적으로는 암컷과 마찬가지로 수컷 내에도 존재하며 또 생리적 과정을 조절하는 데에 중요한 역할을 수행한다. 여타 호르몬처럼 에스트로젠도 세포에 있는 수용체와 결합하여 생리적 활성을 나타내는데, 에스트로젠의 수용체는 알파($ER\alpha$)와 최근에 확인된 베타($ER\beta$)로 나누어진다.

이 수용체는 비스테로이드성 리간드와 높은 친화성으로 결합할 수 있다. 많은 종류의 리간드가 호르몬 치료제(축

진제-억제제가 혼합되어 있으며 조직 특이적 활성을 갖고 있다) 로 개발되어 있으며, 폐경기 호르몬 치료, 생식 조절 및 유방암의 예방과 치료 등에 이용되고 있다(Stauffer *et al.*, 2000). 이런 리간드의 특이적 약리작용 때문에 리간드를 SERM이라고 한다(Grese and Dodge, 1998).

SERM은 에스트로젠 수용체와 결합함으로써 에스트로젠 수용체의 입체적 구조 변화를 유발하며, 이로 인해 에스트로젠 수용체는 co-activator 및 co-repressor 단백질과 상호작용할 수 있게 되고 결과적으로 분화를 하는 유전자 발현을 나타내게 된다(Cappon *et al.*, 2004). 자궁과 유방과 같은 서로 다른 조직에서는 다른 co-activator 및 co-repressor 단백질이 발현될 수 있으며, 이로 인해 SERM이 다양한 작용을 나타내게 된다.

본 실험에서 사용한 PPT는 에스트로젠 수용체에 친화성을 가진 SERM의 일종이다. PPT는 $ER\beta$ 보다 주로 $ER\alpha$ 에 작용하는 효능제이며 $ER\alpha$ 에 대하여 estradiol보다 높은 친화성을 갖고 있다. 따라서 PPT는 처음으로 보고되는 $ER\alpha$ 에 특이적인 효능제이다(Stauffer *et al.*, 2000).

본 실험의 PPT 투여 용량을 정하는데 있어서 Frasar *et al.*(2003)의 방법을 참고하였다. 이들은 생쥐 자궁에 있는 프로그스테론 수용체와 안드로젠 수용체 및 자궁의 무게에 미치는 PPT 영향을 농도별로 조사하였는데 생후 20일된 생쥐 1마리에 매일 PPT 농도 0.02~0.5 mg을 피하 주사로 투여했을 때 유의하게 영향을 미쳤던 PPT 농도는 0.1 mg과 0.5 mg 이라고 하였다. 이 때 1주일간 생쥐 1마리가 받은 PPT 용량은 0.7 mg과 3.5 mg이 된다. 본 실험에서는 생후 70일된 생쥐를 사용하였으므로 앞의 문헌을 토대로 1주일마다 생쥐 1마리에 4.0 mg(178.6 mg/kg)의 PPT를 투여하였다. PPT 투여기간은 Cho *et al.*(2003)의 방법을 참고하여 설정하였다.

본 실험에서는 PPT를 투여하는 기간이 길어질수록 투여군의 생쥐 체중이 점점 감소되었다. 이와 관련된 보고에 의하면, 비스테로이드성 SERM인 lasofoxifene으로 처리한 수컷 흰쥐는 모든 그룹에서 체중이 감소되었으며 먹이 섭취가 감소되었다는 것이다(Cappon *et al.*, 2004). 또 고농도의 17β -estradiol에 흰쥐를 노출시키면 체중이 감소되는데 이는 식이섭취량의 감소 및 먹이 효율의 감소와 같은 복합적 요인에 의해 일어나는 것으로 보고되었다(Cook *et al.*, 1998). 이런 체중 감소는 주로 체내 지방의 감소에 의한 것으로 알려져 있다(Wade and Heller, 1993). 또 다른 연구에 의하면 estradiol 이나 혹은 estradiol 유사물질인 tamoxifen이 음식섭취를 관장하는 뇌 부위에서 에스트로젠 조절인자처럼 작용하여 체중을 감소시킨다는 것이다(Wade *et al.*, 1993).

여러 가지 기작으로 설명을 하지만 확실한 사실은

SERM이 에스트로겐 수용체를 통해 체중 감소 작용을 나타낸다는 것이다(Cappon *et al.*, 2004). 이와 관련된 연구로는 난소절제를 한 흰쥐에 ER α 효능제인 PPT를 투여했을 때와, 또 ER β 효능제인 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile(DPN)을 투여했을 때의 경우를 비교해 보면, PPT를 투여했을 때는 유의하게 체중이 감소되었지만 DPN의 경우에는 체중이 감소되지 않은 것으로 보아 체중이 감소되도록 하는 에스트로겐의 영향은 ER α 를 통해 매개된다고 하였다(Roesch, 2006). 이 보고에 의하면, PPT가 먹이 섭취를 감소시키는 다른 하나의 기작은 포만 호르몬인 cholecystokinin에 대한 뇌의 민감성을 증가시켜 식이섭취량이 감소됨으로써 이루어진다는 것이다. 즉, 흰쥐에 14일 동안 액상의 먹이를 급여하였을 경우 대조군(sham)은 약 1200 ml의 먹이를 섭취한 반면에 PPT 투여군은 약 850 ml의 먹이를 섭취하였다는 것이다. 이처럼 섭취량이 적어서 자연히 체중이 감소된다는 것이다. 또 다른 기작은 에스트로겐이 leptin 호르몬에 대한 뇌의 민감성을 강화시켜서 체중이 감소된다는 것이다. 이런 여러 가지 이론을 종합해 볼 때, 에스트로겐이 체중을 감소시키는 것은 에스트로겐 수용체(cholecystokinin과 leptin에 작용하는)를 포함하는 여러 요소에 의해 매개된다고 할 수 있다. 본 실험에서도 실험기간이 길어질수록 체중이 더 많이 감소되었는데(8주에 31% 감소) 이런 결과도 PPT에 의한 생쥐의 먹이 섭취 감소, 체내의 지방 감소 및 신경계의 먹이섭취를 관장하는 부위에 대한 PPT의 영향 등의 여러 가지 복합적인 요인에 의한 것으로 여겨진다.

간장의 경우, 인체의 간세포에는 ER α 가 존재하지만 ER β 는 존재하지 않는다고 하였다(Taylor and Al-Azzawi, 2000). 그러나 간문맥에는 ER α 와 ER β 가 동시에 존재하는 것으로 알려져 있다. 간문맥과 같이 혈관에 존재하는 에스트로겐 수용체 분포에 대한 다양한 보고에 의하면, 에스트로겐 수용체는 간장, 췌장 및 장에 분포하는 혈관의 평활근 세포의 핵에 존재하고 있으며(Winborn *et al.*, 1987), 또한 혈관의 내피세포에도 ER α 와 ER β 가 동시에 분포(Couse and Korach, 1999) 하는 것으로 알려져 있다. 이런 사실을 확인하기 위해, 실험적으로 에스트로겐을 흰쥐에 투여하면 혈관의 내강이 확장된다고 하였다(Radzikowska *et al.*, 2001). *In vitro* 실험에 따르면, 배양된 흰쥐 간장의 굴모양혈관 내피세포에 에스트로겐 수용체가 많이 존재하고 있으며, 에스트로겐이 이 굴모양혈관 내피세포에서 평활근 세포를 이완시키는 일산화질소(nitric oxide) 합성을 촉진하고(Sakamoto *et al.*, 2001; Yokomori *et al.*, 2001) 또 이 일산화질소가 혈관을 확장시킨다는 것이다(Farhat *et al.*, 1996). 일산화질소는 혈관의 신장력 뿐만 아니라 평활근 세포의 증식을 조절하는

기능을 갖고 있다. 따라서 에스트로겐은 혈관에 있는 민무늬근의 수축 조절 능력이 있으면서 내피세포에서 분비되는 일산화질소 발생을 조절할 수 있다.

이런 면에서 보면, 에스트로겐은 혈관확장인자이고 혈압저하유발 인자이며, 또한 일산화질소 합성을 촉진하거나 혹은 직접적으로 혈관의 평활근에 작용하여 혈관을 이완시킬 수 있다(White, 2002). 한편으로, 에스트로겐은 prostacyclin과 일산화질소 합성을 자극함으로써 그리고 cyclooxygenase-유래 산물, 활성적인 산소 물질, angiotensin II, endothelin-1과 같은 혈관 수축 인자의 생성을 감소시킴으로써 사람과 실험동물에서 혈관확장을 촉진한다(Tostes *et al.*, 2003). PPT를 투여한 본 실험에서도 간장의 굴모양혈관의 직경이 3주에 156%, 5주에 216%, 8주에 255% 증가하였다. 이런 결과는 *in vitro*에서와 마찬가지로 *in vivo* 상태에서도 PPT가 굴모양혈관의 내피세포에 작용하여 굴모양혈관을 확장시킨 것으로 보인다.

에스트로겐에 의해 유발되는 간장의 혈관 질환은 간자반병(peliosis hepatis)과 맥관염(vasculitis) 등과 같은 질병인데(Radzikowska *et al.*, 2001), 간자반병은 간장의 확장된 굴모양혈관과 관련이 있으며 이 때 굴모양혈관은 뚜렷하고 증식하는 내피세포로 구성되어 있다(Edwards *et al.*, 2002). 본 실험에서도 굴모양혈관의 직경이 확장되고 동시에 염증과 관련 있는 호중성 백혈구(neutrophil)가 굴모양혈관 내에 많이 관찰되었는데 이런 결과로 볼 때 PPT도 간장의 염증을 유발할 수 있을 것으로 생각된다.

간장에 있는 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)는 지방 축적과 대사에 관여하는 유전자를 활성화시키는데 수컷 생쥐에 이런 PPAR γ 를 주입한 경우에는 간장에 지방이 축적되어 간장의 무게가 증가한다고 하였다(Uno *et al.*, 2006). 그리고 에스트로겐은 이런 PPAR γ 를 활성화시키기도 한다(Ma *et al.*, 1998). 본 실험에서 간장의 경우, 대조군에 비해 PPT 투여군의 간장 무게가 실험기간 내내 유의하게 증가하였다. 즉, 대조군에 비해 PPT 투여군의 간장 무게가 105%(3주), 151%(5주), 117%(8주)로 증가하였다. 본 실험의 에스트로겐 수용체 효능제인 PPT를 투여했을 때 간장의 무게가 증가하였는데, 이와 관련하여 간세포 내 지방축적과 같은 요인으로 볼 수도 있지만 굴모양혈관 직경의 확장과도 긴밀한 연관성이 있는 것으로 사료된다. 즉, PPT 투여로 인해, 굴모양혈관의 직경이 증가되고(8주의 경우 255% 증가) 이로 인해 간장의 외부 형태적 크기가 증대되었으며, 이 굴모양혈관에 관류시의 관류액이 저장되어 있어서 간장의 무게가 증가한 것이 아닌가 여겨진다.

간장과 에스트로겐 수용체의 생리적인 연관성에 대한 보고로서, 콜레스테롤 담석(cholesterol gallstone)이 남

성에 비해 여성에서 더 흔하게 발생하는 것으로 보아 에스트로겐이 이 담석형성에 연관이 있는 것으로 추정되고 있다. 이를 확인하기 위한 실험에서, 에스트로겐 수용체 저해제인 ICI 182,780을 투여했을 때 완벽하게 담석형성이 억제되었으며, 또 반대로 선택적인 ER α 효능제인 PPT는 간장의 콜레스테롤 분비를 증가시켰고 이는 담즙에 콜레스테롤이 과포화 되어 결국 담석형성으로 연결된다고 하였다(Wang *et al.*, 2004). 그러나 본 실험에서는 콜레스테롤 농도나 담석형성에 미치는 에스트로겐 수용체의 기능적인 면에 대한 실험을 수행하지 못하였기 때문에 추후 보충 실험을 통해 이 부분에 대한 자료를 확보할 수 있을 것으로 사료된다.

에스트로겐이 다양한 종류의 세포에 영향을 미쳐 세포의 형태적 구조를 변화시킨다는 것은 잘 알려져 있다. 유방암 세포를 재료로 한 실험에서, 에스트로겐이 세포의 세포골격이나 모양 혹은 미세융모의 길이에 영향을 미친다고 하였으며(Sapino *et al.*, 1986; Wakeling *et al.*, 1989), 또 에스트로겐이 자궁 상피세포의 성장과 증식을 자극하여 상피세포의 높이를 증가시킨다고 하였다(Sato *et al.*, 2002; Sibonga *et al.*, 2003). 본 실험의 PPT투여군의 경우, 신장의 근위세뇨관 상피세포는 그 세포 높이가 실험기간인 3주, 5주, 8주에 각각 15%, 17%, 30% 감소하였다. 이런 결과는 에스트로겐 수용체가 신장에 분포하고 있음을 나타내며, 이 수용체를 통해 에스트로겐이 근위세뇨관 상피세포 높이를 억제하였다는 것을 알 수 있다. 이처럼 자궁과 다르게 PPT투여군에서 세포의 높이가 감소되는, 즉 서로 상반되는 작용을 나타내는 것은 다른 SERM의 기능에서도 볼 수 있다. 즉, benzothiothiophene SERM인 raloxifene은 뼈와 혈청 지질(serum lipid)에 대하여는 효능제로서 작용을 하지만 유방과 자궁 조직에는 저해제로 작용한다고 보고되었다(Cohen *et al.*, 2000). 이렇게 조직 특이적으로 SERM의 작용이 나타나는 면에 대하여 앞으로 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다. 본 실험의 신장을 재료로 한 경우에는 PPT가 효능제로서 작용하였다고 보기 보다는 근위세뇨관의 상피세포 높이를 감소시키는 저해제로서 작용을 한 것으로 보인다. 또 상피세포의 높이가 감소됨으로써 상대적으로 근위세뇨관 내강의 직경이 증가되었으며, 이와 동시에 상피세포의 핵 모양도 원형에서 타원형이나 방추형으로 변화되었다.

세포의 모양과 같은 형태적 변화 외에도, 여러 가지 이온, 예를 들면 근위세뇨관과 원위세뇨관의 Ca²⁺와 Na⁺ 이온의 재흡수에도 에스트로겐이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Brunette and Leclerc, 2001). 이런 보고는 근위세뇨관과 마찬가지로 사구체와 원위세뇨관에도 ER α

가 존재하는 것을 나타내지만 본 실험에서는 PPT에 의한 원위세뇨관의 형태학적 변화를 찾기가 어려웠다.

한편으로, 호르몬의 농도에 따라 서로 다른 작용이 나타나기도 하는데, 토끼의 신장 근위세뇨관 세포 배양 실험에 의하면 17 β -estradiol의 농도가 10⁻¹⁰M이나 10⁻⁹M처럼 낮은 농도에서는 근위세뇨관의 세포 수가 증가하였지만, 10⁻⁸M이나 10⁻⁷M처럼 17 β -estradiol의 농도가 높아지면 오히려 세포 수가 감소된다고 하였다(Han *et al.*, 1999). 본 실험에서 투여한 PPT의 농도는 0.126 M이었으며 이는 *in vivo* 상태에서도 상당히 고농도에 해당되고, 이와 같은 PPT의 고농도에 의해서 근위세뇨관의 상피세포 높이가 영향을 받았을 것으로 생각된다. 이런 근위세뇨관 상피세포의 높이 감소와 같은 영향이 PPT의 농도에 의해서인지, 혹은 신장과 같은 조직 특이성에 따라서 나타나는 것인지는 추후의 실험을 통해 확인될 수 있을 것으로 여겨진다.

신장의 피질 부위에 있는 사구체의 내피세포에서 합성되는 일산화질소가 감소되고 사구체의 혈관사이 세포(mesangial cell)의 증식이 증가하면 사구체경화증(glomerulosclerosis)에 걸리는데 17 β -estradiol은 일산화질소 합성을 촉진하여 이런 질병을 완화시킬 수 있다. 즉, *in vitro* 실험에서 17 β -estradiol은 에스트로겐 수용체와 작용하여 내피세포에서 일산화질소 합성을 촉진함으로써, 그리고 17 β -estradiol의 대사산물인 2-hydroxyestradiol과 2-methoxyestradiol 이 에스트로겐 수용체와 무관하게 사구체의 혈관사이 세포 증식을 억제함으로써, 사구체경화증을 완화시킬 수 있다고 하였다(Xiao *et al.*, 2001). 난소를 절제한 *in vivo* 실험에서도 흰쥐에 17 β -estradiol을 12개월간 투여하면 사구체 경화증을 완화시킬 수 있다고 하였다(Maric *et al.*, 2004). 위의 보고처럼 본 실험에서도, PPT에 의해 사구체 모세혈관의 내피세포에서 일산화질소가 합성되어 모세혈관 내강이 확장될 것으로 기대하였으나 광학현미경 관찰결과로는 대조군의 모세혈관과의 뚜렷한 차이를 발견하기가 어려웠다. 기존의 보고된 결과나 혹은 본 실험에서 간장의 굴모양혈관의 확장 결과와 다르게 나온 이번 사구체 모세혈관의 결과에 대하여는 전자현미경을 이용한 관찰과 같은 다른 정밀한 실험이 요구되며 따라서 추후에 더 많은 논의가 필요한 것으로 사료된다.

이런 PPT와 같은 SERM에 의해 혈중 호르몬의 변화도 유발되는 것으로 보고되었다. 즉, estradiol(E2)의 자극을 받아 뇌하수체에서 프로락틴(prolactin)이 합성되고 분비되는 것은 이미 잘 알려져 있는데, 이런 사실을 바탕으로 생쥐에 PPT(에스트로겐 수용체 알파 효능제)를 피하주사하면 자궁의 무게변화, 프로게스테론과 안드로겐 수용체

mRNA 발현의 변화, 등과 더불어 혈청 프로락틴의 유의한 증가가 유발된다고 하였다. 그러나 에스트로겐 수용체 베타 효능제인 DPN을 투여했을 때는 혈청 프로락틴의 유의한 증가(변화)를 유발하지 못하였다고 하였다(Frasor et al., 2003). 또 다른 SERM 인 raloxifene을 생쥐에 투여하였을 때 대조군에 비해 혈중 황체형성호르몬의 농도가 4~7배 증가하고 이와 더불어 난소의 변화도 유발된다고 하였다(Cohen et al., 2000). 이처럼 SERM에 의해 혈청 호르몬의 농도도 변하고 동시에 특정 기관의 형태가 변화되는 것을 알 수 있다. 그런데 본 실험에서는 PPT에 의한 간장의 굴모양혈관 직경의 변화 혹은 신장의 근위세뇨관 상피세포의 변화 등과 같은 구조적 부분에 대하여 실험하였다. 이와 같은 구조 변화와 동시에 야기되는 혈청 호르몬 농도 변화와 같은 부분에 대하여는 추후 실험을 통해 보완할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 보면, 에스트로겐 수용체 효능제인 PPT에 의해 생쥐의 체중이 감소되었다. 그리고 PPT에 의해 간장의 무게와 간장 내 굴모양혈관의 직경도 유의하게 증가되었다. 굴모양혈관 내에는 염증과 관련 있는 호중성 백혈구가 관찰되었다. 신장의 경우, PPT에 의해 신장의 무게가 유의하게 감소되는 경향을 보였으며, 또한 보우만 주머니의 두께를 포함하는 근위세뇨관 상피세포의 높이도 유의하게 감소되었다. 상피세포의 높이가 감소됨으로서 상대적으로 근위세뇨관의 직경은 유의하게 증가하였다. 동시에 근위세뇨관 상피세포의 높이가 감소됨에 따라 세포의 핵 모양이 원형에서 타원형이나 혹은 방추형으로 변화되었다. 따라서 에스트로겐 수용체 알파 효능제인 PPT는 수컷 성체 생쥐의 간장과 신장의 현미경적 구조에 영향을 미쳤으며, 이 결과는 성체 수컷 생쥐의 간장과 신장에서 에스트로겐이 나타내는 여러 가지 생리적 기능을 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 순천대학교 학술연구비 공모과제 및 BK21 전남지역 생물유래 항감염성 소재개발팀의 지원으로 연구되었음.

참고문헌

- Brunette, M.G. and Leclerc, M. (2001): Effects of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. *J. Endocrinol.*, **170**, 441-450.
- Cappon, G.D., Horimoto, M. and Hurtt, M.E. (2004): Reproductive toxicity assessment of lasofoxifene, a selective estrogen receptor modulator (SERM), in male rats. *Birth Defects Res., (Part B)* **71**, 142-149.
- Cho, H.W., Nie, R., Carnes, K., Zhou, Q., Sharief, N.A.Q. and Hess, R.A. (2003): The antiestrogen ICI 182,780 induces early effects on the adult male mouse reproductive tract and long-term decreased fertility without testicular atrophy. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **1**, 57.
- Cignarella, A., Paoletti, R. and Puglisi, L. (2001): Direct Effects of estrogen on the vessel wall. *Med. Res. Rev.*, **21**, 171-184.
- Cohen, I.R., Sims, M.L., Robbins, M.R., Lakshmanan, M.C., Francis, P.C. and Long, G.G. (2000): The reversible effects of raloxifene on luteinizing hormone levels and ovarian morphology in mice. *Reprod. Toxicol.*, **14**, 37-44.
- Cook, J.C., Johnson, L., O'Connor, J.C., Biegel, L.B., Krams, C.H., Frame, S.R. and Hurtt, M.E. (1998): Effects of dietary 17 beta-estradiol exposure on serum hormone concentrations and testicular parameters in male Crl:CD BR rats. *Toxicol. Sci.*, **44**, 155-168.
- Couse, J.F. and Korach, K.S. (1999): Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine Rev.*, **20**, 358-417.
- Edwards, R., Colombo, T. and Greaves, P. (2002): Have you seen this? peliosis hepatis. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 521-523.
- Farhat, M.Y., Lavigne, M.C. and Ramwell, P.W. (1996): The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.*, **10**, 615-624.
- Frasor, J., Barnett, D.H., Danes, J.M., Hess, R., Parlow, A.F. and Katzenellenbogen, B.S. (2003): Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) α activity by ER β in the uterus. *Endocrinol.*, **144**, 3159-3166.
- Grese, T.A. and Dodge, J.A. (1998): Selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Curr. Pharm. Des.*, **4**, 71-92.
- Han, H.J., Jung, J.C. and Taub, M. (1999): Response of primary rabbit kidney proximal tubule cells to estrogens. *J. Cell. Physiol.*, **178**, 35-43.
- Hess, R.A. (2003): Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **1**, 52.
- Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.H., Bahr, J., Korach, K.S. and Lubahn, D.B. (1997): A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, **390**, 509-512.
- Kraichely, D.M., Sun, J., Katzenellenbogen, J.A. and Katzenellenbogen, B.S. (2000): Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor- α and estrogen receptor- β : Correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinol.*, **141**, 3534-3545.
- Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J. (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5925-5930.
- Ma, H., Sprecher, H.W. and Kolattukudy, P.E. (1998): Estrogen-induced production of a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand in a PPAR γ -expressing tissue. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30131-30138.
- Maric, C., Sandberg, K. and Hinojosa-Laborde, C. (2004): Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17 β -estradiol in the aging Dahl salt sensitive

- rat. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, 1546-1556.
- Oliveira, C.A., Carnes, K., Franca, L.R. and Hess, R.A. (2001): Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat. *Biol. Reprod.*, **65**, 913-920.
- Oliveira, C.A., Nie, R., Carnes, K., Franca, L.R., Prins, G.S., Saunders, P.T.K. and Hess, R.A. (2003): The antiestrogen ICI 182,780 decreases the expression of estrogen receptor-alpha but has no effect on estrogen receptor-beta and androgen receptor in rat efferent ductules. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **1**, 75.
- Pfaffl, M.W., Lange, I.G. and Meyer, H.H.D. (2003): The gastrointestinal tract as target of steroid hormone action: Quantification of steroid receptor mRNA expression (AR, ER α , ER β and PR) in 10 bovine gastrointestinal tract compartments by kinetic RT-PCR. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **84**, 159-166.
- Radzikowska, E., Maciejewski, R., Janicki, K., Madej, B. and Wojtowicz, Z. (2001): The relationship between estrogen and the development of liver vascular disorders. *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska*, **56**, 189-193.
- Roesch, D.M. (2006): Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol. Behavior*, **87**, 39-44.
- Sakamoto, M., Ueno, T., Nakamura, T., Hashimoto, O., Sakata, R., Kin, M., Ogata, R., Kawaguchi, T., Torimura, T. and Sata, M. (2001): Estrogen upregulates nitric oxide synthase expression in cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.*, **34**, 858-864.
- Sapino, A., Pietribiasi, F., Bussolati, G. and Marchisio, P. (1986): Estrogen- and tamoxifen-induced rearrangement of cytoskeletal and adhesion structures in breast cancer MCF-7 cells. *Cancer Res.*, **46**, 2526-2531.
- Sato, T., Wang, G., Hardy, M.P., Kurita, T., Cunha, G.R. and Cooke, P.S. (2002): Role of systemic and local IGF-I in the effects of estrogen on growth and epithelial proliferation of mouse uterus. *Endocrinol.*, **143**, 2673-2679.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A. and Greene, G.L. (1998): The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95**, 927-937.
- Sibonga, J.D., Lotinun, S., Evans, G.L., Pribluda, V.S., Green, S.J. and Turner, R.T. (2003): Dose-response effects of 2-methoxyestradiol on estrogen target tissues in the ovariectomized rat. *Endocrinol.*, **144**, 785-792.
- Stauffer, S.R., Coletta, C.J., Tedesco, R., Nishiguchi, G., Carlson, K., Sun, J., Katzenellenbogen, B.S. and Katzenellenbogen, J.A. (2000): Pyrazole ligands: Structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor- α selective agonists. *J. Med. Chem.*, **43**, 4934-4947.
- Taylor, A.H. and Al-Azzawi, F. (2000): Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J. Mol. Endocrinol.*, **24**, 145-155.
- Toft, D. and Gorski, J. (1966): A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 1574-1581.
- Tostes, R.C., Nigro, D., Fortes, Z.B. and Carvalho, M.H.C. (2003): Effects of estrogen on the vascular system. *Brazilian J. Med. Bio. Res.*, **36**, 1143-1158.
- Uno, K., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Imai, J., Hasegawa, Y., Gao, J., Kaneko, K., Iwasaki, H., Ishihara, H., Sasano, H., Inukai, K., Mizuguchi, H., Asano, T., Shiota, M., Nakazato, M. and Oka, Y. (2006): Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Sci.*, **312**, 1656-1659.
- Wade, G.N. and Heller, H.W. (1993): Tamoxifen mimics the effect of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. *Am. J. Physiol.*, **264**, R1219-1223.
- Wade, G.N., Gray, J.M. and Blaustein, J.D. (1993): Effects of estrogens and antiestrogens on eating behavior, metabolism, and energy balance. *Oncol.*, **7**, 61-68.
- Wakeling, A.E., Newbould, E. and Peters, S.W. (1989): Effects of antiestrogens on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *J. Mol. Endocrinol.*, **2**, 225-234.
- Wang, H.H., Afdhal, N.H. and Wang, D.Q. (2004): Estrogen receptor alpha, but not beta, plays a major role in 17 β -estradiol-induced murine cholesterol gallstones. *Gastroenterol.*, **127**, 239-249.
- White, R.E. (2002): Estrogen and vascular function. *Vascular Pharmacol.*, **38**, 73-80.
- Winborn, W.B., Sheridan, P.J. and McGill, H.C.Jr. (1987): Sex steroid receptors in the stomach, liver, pancreas, and gastrointestinal tract of the baboon. *Gastroenterol.*, **92**, 23-32.
- Xiao, S., Gillespie, D.G., Baylis, C., Jackson, E.K. and Dubey, R.K. (2001): Effects of estradiol and its metabolites on glomerular endothelial nitric oxide synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension*, **37**, 645-650.
- Yokomori, H., Oda, M., Ogi, M., Kamegaya, Y., Tsukada, N. and Ishii, H. (2001): Endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 are co-localized in sinusoidal endothelial fenestrae. *Liver*, **21**, 198-206.