

폐경기모델 백서 해마에서 식물성 에스트로젠에 의한 뇌-혈액장벽 유전자 occludin 발현의 변화

강한승 · 정경아¹ · 강희정 · 김다혜 · 안혜선¹ · 엄애선¹ · 계명찬*

한양대학교 생명과학과, ¹한양대학교 식품영양학과

Change in the Expression of Occludin, a Gene for Blood-Brain Barrier by Phytoestrogens in Hippocampus of Rat Model for Menopause

Han Seung Kang, Kyung Ah Jung¹, Hee Jung Kang, Da Hye Kim, Hae Sun Ahn¹, Ae Sun Om¹ and Myung Chan Gye*

Department of Life Science, ¹Department of Food and Nutrition, Hanyang University

Abstract – To elucidate the effect of phytoestrogens on the prevention of neurodegenerative disease in postmenopausal women, the expression of occludin which build up the blood-brain barrier was examined in hippocampus following oral administration of estrogen (E2), genistein, diadzein or combination of genistein and diadzein in ovariectomized (OVX) female rats. E2 significantly increased occludin mRNA level in OVX rat hippocampus, suggesting that estrogen is a physiological regulator for structural integrity of the blood-brain barrier in hippocampus. Following isoflavone diet for 4 weeks, there was significant increase in occludin mRNA level in hippocampus, suggesting that isoflavone diet may be effective for protection of structural integrity of blood-brain barrier in hippocampus from degenerative changes in estrogen deficiency.

Key words : occludin, brain, isoflavone, ovariectomy, rat

서 론

치매의 발생은 30대 중반부터도 시작될 수 있지만 대부분 고령에서 나타난다. 전체 치매 환자의 약 50~60%를 차지하는 알츠하이머질환(Alzheimer's disease, AD)은 남성보다 폐경 후 여성에서 2~3배 많이 발병한다(Molsa 1982). 따라서 성호르몬에 의한 뇌조직의 기능유전체학

적 변화가 퇴행적 뇌질환의 발병과 진행에 관여하는 것으로 추정된다(Gibbs 1998; Savaskan *et al.* 2001; Hatoya *et al.* 2003). 에스트로젠이 뇌기능에 미치는 영향은 신경전달 수용체 발현, 신경세포 흥분도, 신경전달물질 이용성을 조절하여 직접적으로 신경세포의 기능을 조절하거나(Gibbs 1998; Savaskan *et al.* 2001; Hatoya *et al.* 2003), 신경의 성장과 재생과정에서 시냅스 생성을 조절하며(Toran-Allerand *et al.* 1999), 외적인 손상에 대해 신경을 보호하는 효과(Behl *et al.* 1995; Schonknecht *et al.* 2001) 등이다. 역학적 연구에 따르면 호르몬 대체요법은 여성

*Corresponding author: Myung Chan Gye, Tel. 02-2220-0958, Fax. 02-2298-9646, E-mail. mcgye@hanyang.ac.kr

의 노인성 치매의 위험을 유의하게 낮추며, 정상적 인지 기능이 에스트로젠 감소에 의해 손상될 수 있으며, 난소 절제에 따른 인지기능 저하가 호르몬 대체요법에 의해 예방된다고 보고되어 갱년기 호르몬 대체요법의 주 적응증의 하나로 폐경 여성의 퇴행적 뇌질환의 예방과 개선이 부상되었다(Kim *et al.* 2000). 그러나 에스트로젠 요법은 자궁암이나 유방암 발생 등의 부작용으로 인해 치료법으로서 사용여부가 논란의 대상이 되고 있다(Ahn and Gye 2004). 에스트로젠 요법의 대안으로 식물성 에스트로젠을 이용한 식이요법 등이 탐색되고 있으며, 다양한 식물성 에스트로젠의 생리활성기능을 밝히기 위한 연구들이 다각적으로 진행 중이다. 뇌기능과 관련하여서도 폐경 후 여성들의 퇴행성 뇌질환을 보호하기 위한 한 방편으로 soy-based food의 사용 가능성이 부각되고 있다(Kim *et al.* 2000).

뇌에는 혈액으로부터 뇌조직으로 물질의 확산을 제한하는 확산장벽이 존재하며 혈액 내 단백질 등 거대분자가 뇌 및 뇌척수액 내부로 진입하는 것을 막는다(Rubin and Staddon 1999). 이로 인해 뇌(신경세포)를 표적으로 하는 여러 물질들이 뇌의 내부로 전달이 제한되고, 뇌는 독성 물질들로부터 보호된다. 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB)은 뇌조직의 혈관내피세포 사이의 밀착결합(tight junction, TJ)에 의해 형성된다(Kniesel and Wolburg 2000). 최근 난소절제 백서의 뇌조직에서 에스트로젠에 의해 BBB의 투과력이 감소하는 것으로 보고되어(Bake and Sohrabji 2004), 에스트로젠과 BBB의 구조적 기능적 변화 사이의 상관성이 있음이 지적되었다. BBB를 형성하는 TJ는 물질투과 정도가 매우 낮은 강력한 투과장벽으로 작동한다. 최근 TJ의 형성에 관여하는 중요한 구조유전자들이 밝혀지면서 다양한 호르몬, 약물, 식이소재에 의한 BBB 구조와 기능 조절에 관한 분자생물학적 메커니즘 규명과 이에 기반한 다양한 세라피 개발이 가능하게 되었다. 이들 TJ 유전자들 가운데 occludin은 분자량 60 kDa 단백질로 4개의 막관통 부위와 2개의 extracellular loop를 가지며, 인접 세포 표면의 occludin과 homophilic binding을 통해 밀착결합을 형성한다(Tsukita and Furuse 1998). 백서의 뇌조직에서 뇌-혈액 장벽의 형성에 관여하는 밀착결합 단백질의 일종인 occludin은 뇌-혈액 장벽인 뇌혈관 내피세포와 뇌척수액과 혈액 사이의 장벽인 맥락막층과 뇌실막에서 다량 발현된다(Roux *et al.* 2004). Stroke 등의 뇌손상이 발생한 경우 occludin 발현이 저하되며 이로 인한 확산장벽의 붕괴는 2차적인 뇌조직 손상을 유발한다(Bolton *et al.* 1998). 따라서 occludin은 2종류의 혈액-뇌조직 확산장벽인 BBB와 혈액-뇌척수액 확산장벽(blood-cerebrospinal

fluid barrier, BCSFB) 모두에서 중요한 구성요소이며 정상적인 뇌기능 발휘에 중요한 결정요인으로 사료된다. 본 연구에서는 식물성 에스트로젠을 이용한 폐경기 뇌조직의 퇴행적 변화의 예방과 개선을 위한 세라피 개발을 목적으로 난소절제 백서를 폐경기 모델로 estrogen과 식물성 에스트로젠의 일종인 genistein과 diadzein과 같은 isoflavone이 뇌의 해마조직에서 occludin 발현에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 난소절제 및 isoflavone 투여

8주령의 female Wistar rat을 구입하여 1주간의 적응 후 9주령에 ketamine hydrochloride (50 mg kg⁻¹) 마취 후 양측 난소를 제거하였다. 난소절제 후 체내에 순환하고 있는 에스트로젠이 생분해되어 배출될 수 있도록 1주간의 적응기를 거친 후 17beta estradiol (E2, 2 µg kg⁻¹ day⁻¹) genistein (G, 2 mg kg⁻¹), diadzein (D, 2 mg kg⁻¹), G+D mixture (1 mg each kg⁻¹ day⁻¹)을 4주간 경구투여 하였다. 기본 식이는 rodent chow (오리엔트, 5L79)를 공급하였다.

2. 뇌의 해부 및 시료채취

14주령에 도달한 후 백서에 ketamine hydrochloride (50 mg kg⁻¹)을 복강 주사하여 마취한 후 경추부를 절단하여 두부를 분리하였다. 해부가위로 두개골을 절개하고 뇌를 적출한 후 얼음 위에 올려놓고 뇌전체 또는 해마(hippocampus)를 획득하여 RNA 분석에 공시하였다.

3. Occludin mRNA의 semiquantitative RT-PCR 분석

뇌 해마조직의 total RNA는 TRIreagent (Molecular Research Center, Ohio)를 이용하여 분리하였다. cDNA 합성은 1 µg RNA를 이용하였고, MuLV Reverse Transcriptase (GeneAmp RNA PCR kit, Applied Biosystems, CA)로 제작하였다. Occludin fragment의 증폭은 5'-gctcagggaatattccacctca-3' (442 bp, GeneBank Acc. No. AB016425)과 5'-cacaagttttaacttccca-3'로 수행하였다. 대조유전자로 GAPDH를 사용하였고 5'-gaggaccaggtgtctctctg-3'과 5'-ggatggaattgtgaggaga-3'를 primer로 사용하였다(298 bp, GeneBank Acc. No. NM_017008). PCR cycle condition은 Ex Taq polymerase (Takara, Japan)를 사용하여 제조사의 protocol에 따라 시행하였다.

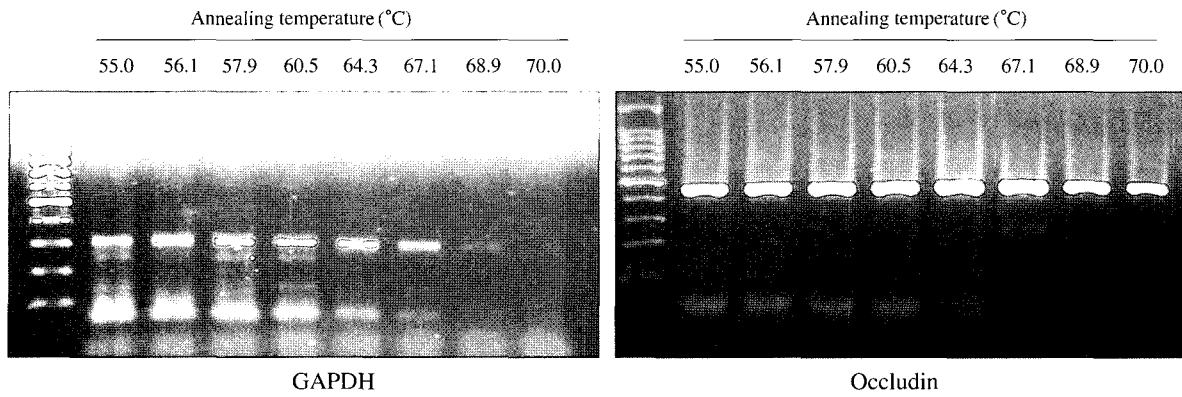


Fig. 1. Optimization of PCR annealing temperature for GAPDH and occludin in rat hippocampus.

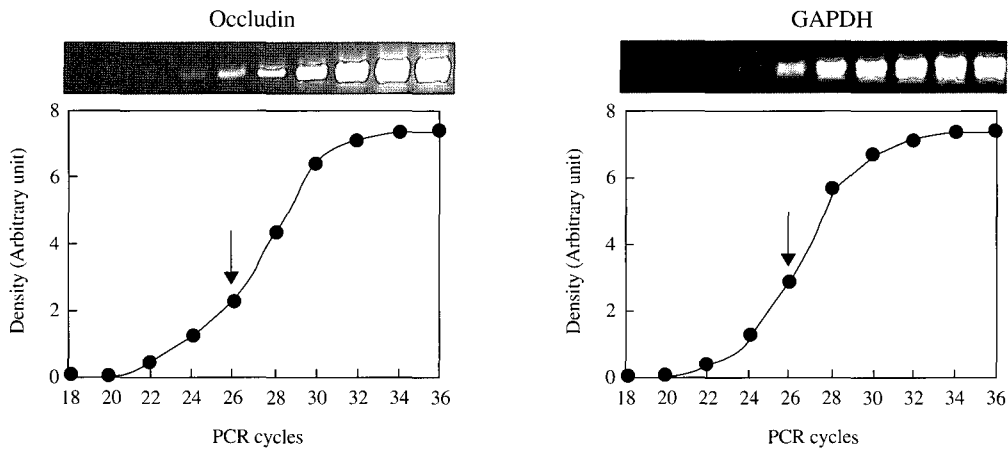


Fig. 2. Optimization of number of PCR cycle for GAPDH and occludin at optimized annealing temperature in rat hippocampus.

결 과

1. 해마조직 occludin mRNA의 semiquantitative RT-PCR 분석의 최적화

백서 뇌 조직에서 밀착결합 유전자인 occludin mRNA의 발현에 대한 RT-PCR 정량적 분석을 위해 해마조직 cDNA를 재료로 annealing temp. 및 PCR cycle 수를 최적화한 결과 occludin의 annealing temp 56°C, PCR cycle수는 26 cycle, GAPDH의 annealing temp 62°C, PCR cycle수는 26 cycle에서 최적화 되었다(Figs. 1, 2).

2. 난소절제 백서 해마조직에서 occludin 유전자발현에 미치는 estrogen의 영향

난소절제 암컷 백서에서 2 µg kg⁻¹ day⁻¹의 E2를 4주

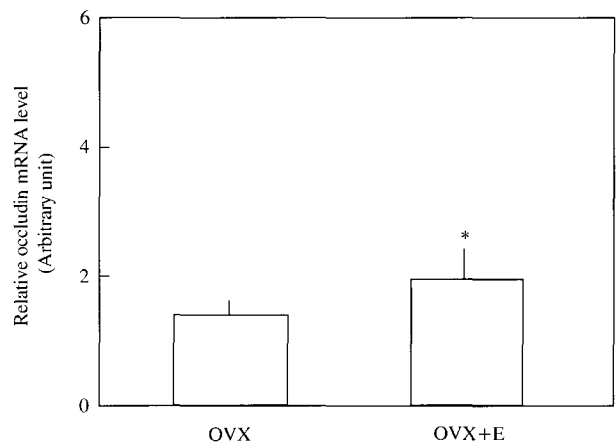


Fig. 3. Effect of estrogen on the expression of occludin mRNA in ovariectomized rat hippocampus. OVX, ovariectomy; E2, estrogen (2 µg kg⁻¹ day⁻¹, for 4 weeks). *, significantly different from OVX control by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

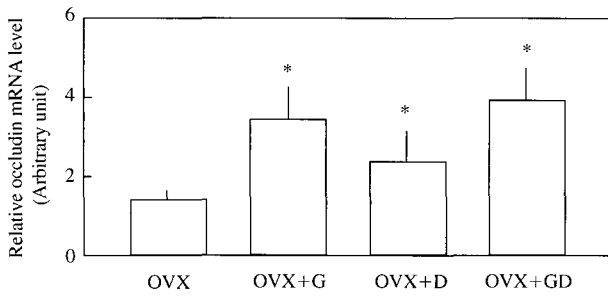


Fig. 4. Effect of isoflavone on the expression of occludin mRNA in OVX rat hippocampus. OVX, ovariectomy; G, genistein (2 mg kg⁻¹ day⁻¹, for 4 weeks); D, diadzein (2 mg kg⁻¹ day⁻¹ for 4 weeks); GD, genistein/diadzein (1 mg each kg⁻¹ day⁻¹ for 4 weeks). *, significantly different from OVX by Student's *t*-test (*p* < 0.05).

간 투여한 결과 해마조직에서 occludin mRNA 발현량이 유의적으로 증가하였다 (*p* < 0.05, Fig. 3).

3. 난소절제 백서의 해마조직에서 isoflavone 투여 후 occludin 발현의 변화

난소절제 암컷 백서에서 genistein, diadzein 단독 또는 복합 처리시 모두 해마 조직에서 occludin mRNA의 발현량이 vehicle 처리 대조군보다 유의적으로 높았다 (*p* < 0.05, Fig. 4).

논 의

난소절제 암컷 백서의 뇌의 해마조직에서 E2 투여는 occludin의 발현을 유의적으로 증가시켰다. 최근 이와 유사하게 난소절제 백서의 뇌조직에서 에스트로겐에 의해 BBB의 투과력이 감소하는 것으로 보고되어 에스트로겐이 BBB의 기능을 강화할 가능성이 지적되었다 (Bake and Soharabji 2004). 본 연구 결과 E2에 의한 BBB의 기능 강화에 occludin 발현의 증가가 관여할 것으로 사료된다.

Estrogen 수용체는 난소 등에서 주로 발현되는 α isoform과 뇌조직 등에서 발현되는 β isoform이 존재한다. 뇌조직의 신경세포와 신경교세포, 혈관내피세포, 맥락막층, 뇌실상피 등은 모두 estrogen receptor를 발현한다 (Kuiper *et al.* 1997; Nilsson and Gustafsson 2000, 2002; Ardel *et al.* 2005). 따라서 estrogen의 결합 시 이들 조직에서 occludin 유전자발현의 변형을 추측할 수 있다. 아직까지 occludin 유전자의 전사조절부위에 estrogen responsive element (ERE)의 존재여부는 확인되지 않아, estrogen에 의한 occludin 발현의 증가효과가 직접적 전

사조절에 의한 것인지 알 수 없다. 또한 estrogen은 표적 세포에서 c-fos 등의 초기반응 유전자의 전사를 유발한다 (Weisz and Rosales 1990). 이들 전사조절인자들은 다시 후위의 유전자발현을 유도하므로 estrogen에 의한 occludin 발현의 변화가 이러한 2차적인 효과인지의 여부는 불분명하다. 또한 occludin 발현의 estrogen 의존성이 이들 조직에서 estrogen 수용체를 경유한 직접적인 효과 인지 또는 뇌-난소 축에 작용하는 feedback 제어 시스템의 교란에 따른 신경내분비계의 교란에 따른 systemic effect인지의 여부 또한 불확실하다.

식물성에스트로젠들은 인간 등 동물체내에서 ERs에 결합하여 estrogen-responsive gene 발현에 영향을 미친다. Isoflavone류 식물성에스트로젠들은 ERα와 ERβ에 결합할 수 있으며, weak agonist로 작용하며 (Collins-Burow *et al.* 2000) 신체 내부의 E2과 경쟁적으로 ER에 결합하며 estrogen-responsive genes의 발현을 유도한다 (Kuiper *et al.* 1998). 그러나 식물성에스트로젠들은 E2와 비교할 때 미약한 (1/100~1/1,000) 수준의 활성을 갖는다 (Collins-Burow *et al.* 2000). Genistein과 diadzein 등의 isoflavone들은 2종의 estrogen receptor 수용체 중 α form보다 β isoform에 대한 친화력이 높다 (Harris *et al.* 2005). Genistein은 ERβ와 ERα와의 결합력은 estradiol의 1/3과 1/1,000 수준이다 (Kuiper *et al.* 1998). 뇌조직에서 발현되는 estrogen receptor는 주로 β form이므로 본 연구에서 확인된 isoflavone의 효과는 ERβ와의 상호작용에 의한 것으로 추측된다. 이들 isoflavone 투여 후 나타난 occludin 발현의 증가는 이들 phytoestrogen이 천연 estrogen의 효과와 유사하게 ERβ에 작용하여 나타난 것으로 사료된다.

Estrogen에 반응하는 다양한 조직에서 occludin 발현에 미치는 estrogen의 효과는 농도와 시간에 따라 biphasic effect를 발휘한다. 특히 human vascular endothelial cells에서 estrogen은 저농도 (1 pM)에서는 occludin 단백질발현을 증가시키지만, 고농도 (1 μM)에서는 감소시키며, occludin mRNA level은 농도에 의존적으로 감소한다 (Ye *et al.* 2003). Human cervical epithelial cells에서 estrogen은 occludin 유전자의 전사보다는 단백질합성 또는 post-translational modification에 영향을 미치며, 저농도 (1~10 nM)에서는 65 kDa form의 발현을 증가시키며 고농도 (100 nM)에서는 50 kDa form의 발현을 증가시킨다 (Zeng and Gorodeski 2004). 폐경기 증후군을 치료, 개선하기 위한 목적으로 estrogen 요법을 시행하는 과정에서 유방암, 자궁암 등의 발병빈도가 높게 나타나는 이유는 이러한 biphasic effect에 기인할 가능성이 있다. 따라서 에스트로젠을 이용한 폐경기 호르몬 대체요법에서는 적

절한 투여량과 기간에 대한 실정이 중요하다. 역학연구에 따르면 다량의 isoflavonoid을 섭취한 경우 유방암 (McCann *et al.* 2002), 전립선암, 갑상선암 (Horn-Ross *et al.* 2002), 난소암 (McCann *et al.* 2003), 대장암의 발병빈도가 유의적으로 낮은 것으로 보고되었다 (American Institute for Cancer Research 1997). Genistein은 유선조직이나 (Murrill *et al.* 1996), 유방암 (Fritz *et al.* 1998), 전립선 (Mentor-Marcel *et al.* 2001; Fritz *et al.* 2002) 등의 조직에서 estrogen antagonist로도 작용하는 것으로 보고되었다. 또한 genistein은 세포막에 존재하는 ER을 통한 non-genomic effect를 갖는 반면 daidzein은 이러한 효과를 갖지 않는다.

본 연구 결과 난소절제 백서의 해마조직에서 밀착결합 유전자인 occludin의 발현은 estrogen에 의해 조절을 받으며 폐경기 여성에서 호발하는 퇴행성 뇌질환의 병인유전자로서의 가능성이 제시된다. 난소절제 백서에서 phytoestrogen 2종 (genistein, daidzein)의 투여 시 occludin 발현이 증가(회복)됨을 확인하여 isoflavone류 식물성 에스트로젠이 혈액-뇌 확산장벽의 퇴행적 변화를 예방 및 개선하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

적 요

폐경기 여성은 동령 남성보다 퇴행적 뇌질환의 빈도가 유의적으로 높으며 이를 예방개선하기 위한 목적으로 에스트로젠 대체요법이 시행되고 있으나 유방암과 자궁암 유발 위험성이 제시되고 있어 콩류 등에 다량 함유되어 있는 phytoestrogen류인 isoflavone을 이용한 대체요법 개발이 활발하다. 밀착결합에 의해 제공되는 혈액-뇌 확산장벽은 뇌의 항상성 조절에 중요한 역할이 있으며 다양한 뇌질환에서 변형이 일어난다. 본 연구는 난소절제 백서 모델에서 폐경기 여성의 퇴행적 뇌질환의 원인으로 혈액-뇌 확산장벽의 변형과 isoflavone의 효과를 검색하였다. 8주령 암컷 백서를 난소절제한 후 4주간 estrogen 또는 isoflavone을 투여한 후 해마조직에서 밀착결합 유전자의 일종인 occludin 발현을 조사하였다. E2는 occludin mRNA 발현을 유의하게 증가시켰으며, genistein, diadzein 등의 isoflavone 투여 시 occludin mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다. Occludin은 폐경기 여성 호발성 퇴행성 뇌질환의 병인유전자 가능성이 제시되며 isoflavone은 occludin의 발현을 증가시켜 에스트로젠 결핍에 따른 혈액-뇌 확산장벽의 변형을 예방하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 학술진흥재단의 협동연구과제 (KRF-2003-042-C00419) 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- Ahn HS and MC Gye. 2004. Endocrine-mimicking phytoestrogens: health effects and signaling. *Korean J. Environ. Biol.* 22:479-486.
- Ardelt AA, LD McCullough, KS Korach, MM Wang, DH Munzenmaier and PD Hurn. 2005. Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor-alpha in a rodent experimental stroke model. *Stroke* 36:337-341.
- Bake S and F Sohrabji. 2004. 17beta-estradiol differentially regulates blood-brain barrier permeability in young and aging female rats. *Endocrinology* 145:5471-5475.
- Behl C, M Widmann, T Trapp and F Holsboer. 1995. 17beta-estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216:473-482.
- Bolton SJ, DC Anthony and VH Perry. 1998. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 86: 1245-1257.
- Collins-Burow BM, ME Burow, BN Duong and JA McLachlan. 2000. Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and -independent mechanisms. *Nutr. Cancer* 38:229-244.
- Fritz WA, IE Eltoum, MS Cotroneo and CA Lamartiniere. 2002. Genistein alters growth but is not toxic to the rat prostate. *J. Nutr.* 132:3007-3011.
- Fritz WA, J Wang and CA Lamartiniere. 1998. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 19: 2151-2158.
- Gibbs RB. 1998. Impairment of basal forebrain cholinergic neurons associated with aging and long-term loss of ovarian function. *Exp. Neurol.* 151:289-302.
- Harris DM, E Besselink, SM Henning, VL Go and D Heber. 2005. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha or beta mediated responses in transfected breast cancer cells. *Exp. Biol. Med.* 230:558-568.
- Hatoya S, R Torii, D Kumagai, K Sugiura, N Kawate, T

- Hiromichi, T Sawada and T Inaba. 2003. Expression of estrogen receptor α and β genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. *Neurosci. Lett.* 347:131-135.
- Horn-Ross PL, KJ Hoggatt and MM Lee. 2002. Phytoestrogens and thyroid cancer risk: the San Francisco Bay Area thyroid cancer study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11:43-49.
- Kim H, H Xia, L Li and J Gewin. 2000. Attenuation of neurodegeneration-relevant modifications of brain proteins by dietary soy. *Biofactors* 12:243-250.
- Kniesel U and H Wolburg. 2000. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol.* 20:57-76.
- Kuiper GG, B Carlsson, K Grandien, E Enmark, J Haggblad S Nilsson and JA Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138:863-870.
- Kuiper GG, JG Lemmen, B Carlsson, JC Corton, SH Safe, PT van der Saag, B van der Burg and J-A Gustafsson. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139:4252-4263.
- McCann SE, KB Moysich, JL Freudenheim, CB Ambrosone and PG Shields. 2002. The risk of breast cancer associated with is dietary lignans differs by CYP17 genotype in women. *J. Nutr.* 132:3036-3041.
- McCann SE, JL Freudenheim, JR Marshall and S Graham. 2003. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *J. Nutr.* 133:1937-1942.
- Mentor-Marcel R, CA Lamartiniere, I-E Eltoum, NM Greenberg and A Elgavish. 2001. Genistein in the diet reduces the incidence of poorly differentiated prostatic adenocarcinoma in transgenic mice (TRAMP). *Cancer Res.* 61:6777-6782.
- Murrill W, N Brown, J Zhang, P Manzillo, S Barnes and CA Lamartiniere. 1996. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis* 17:1451-1457.
- Molsa PK, RJ Marttila and UK Rinne. 1982. Epidemiology of dementia in a Finnish population. *Acta Neurol. Scand.* 65:541-552.
- Nilsson S and JA Gustafsson. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res.* 2:360-366.
- Nilsson S and JA Gustafsson. 2002. Biological role of estrogen and estrogen receptors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37:1-28.
- Roux KJ, SA Amici and L Notterpek. 2004. The temporospatial expression of peripheral myelin protein 22 at the developing blood-nerve and blood-brain barriers. *J Comp Neurol.* 474:578-588.
- Rubin LL and JM Staddon. 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Ann. Rev. Neurosci.* 22:11-28.
- Savaskan E, G Olivieri, F Meier, R Ravid and F Muller-Spahn. 2001. Hippocampal estrogen beta-receptor immunoreactivity is increased in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 908:113-119.
- Schonknecht P, J Pantel, K Klinga, M Jensen, T Hartmann, B Salbach and J Schroder. 2001. Reduced cerebrospinal fluid estradiol levels are associated with increased beta-amyloid levels in female patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 307:122-124.
- Toran-Allerand CD, M Singh and G Jr Setalo. 1999. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol.* 20:97-121.
- Tsukita S and M Furuse. 1998. Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes Cells* 3:569-573.
- Weisz A and R Rosales. 1990. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 18:5097-5106.
- Ye L, TA Martin, C Parr, GM Harrison, RE Mansel and WG Jiang. 2003. Biphasic effects of 17-beta-estradiol on expression of occludin and transendothelial resistance and paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 196:362-369.
- Zeng R, X Li and GI Gorodeski. 2004. Estrogen abrogates transcervical tight junctional resistance by acceleration of occludin modulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:5145-5155.

Manuscript Received: January 4, 2006

Revision Accepted: April 24, 2006

Responsible Editorial Member: Kap Joo Park
(Konkuk Univ.)