

흰쥐 부정소에서 세포자연사에 미치는 Ethane 1,2-Dimethane Sulfonate(EDS)의 효과

손혁준·이성호[†]
상명대학교 생명과학전공

Effect of Ethane 1,2-Dimethane Sulfonate(EDS) on the Apoptosis in the Rat Epididymis

Hyeok-Jun Son and Sung-Ho Lee[†]

Dept. of Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

ABSTRACT : Ethane 1,2-Dimethane sulfonate(EDS), a toxin which specifically kills Leydig cells(LC), has been widely used to prepare the reversible testosterone(T) depletion rat model. Previous studies including our own clearly demonstrated that the dramatic weight loss of the T-dependent accessory sex organs such as epididymis and seminal vesicle in this 'LC knock-out' rats. These weight loss could be derived from massive and abrupt death of the cells via apoptotic process. The present study was performed to test the effect of EDS administration on the expression of some apoptotic genes in the rat epididymis. Adult male Sprague-Dawley rats(300~350 g B.W.) were injected with single dose of EDS(75 mg/kg, i.p.) and sacrificed on Weeks 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7. Tissue weights and the numbers of the epididymal sperm were measured. The transcriptional activities of the *bcl-2*, *bax*, Fas and Fas ligand(Fas-L) were evaluated by semi-quantitative RT-PCR. As expected, the weights and the sperm counts of epididymis declined progressively after the EDS treatment during Week 1 and 2. These decrements were discontinued with a gradual return towards normal during Weeks 5~7, although the maximal recoveries of the epididymal weights(71%) and sperm count(38%) were subnormal on Week 7. The initial level of *bcl-2* transcripts persisted to Week 6 then elevated significantly on Week 7. The level of *bax* transcripts significantly decreased on Week 6, and no remarkable change was found in the rest of the experimental period. The transcripts for the Fas in epididymis elevated during Weeks 1~2, returned to normal on Week 3, and the level persisted to the Week 7. Similarly, the level of Fas-L transcripts elevated during Weeks 1~3 and returned to normal after Week 4. Our results demonstrated the transient T depletion by EDS administration could induce the changes in expression of the apoptotic genes in rat epididymis. The activation of Fas and Fas-L in the epididymis of EDS-treated rats might be responsible for the initial apoptotic process and consequently the tissue damage and the sperm loss. Future studies will attempt to determine the precise molecular mechanism(s) of apoptosis in the rat epididymis.

Key words : Ethane 1,2-Dimethane sulfonate(EDS), Epididymis, Apoptosis, *bcl-2* and *bax*, Fas and Fas-L.

요약 : Ethane 1,2-Dimethane sulfonate(EDS)은 Leydig cells(LC)만을 선별적 사멸을 유도하는 약물로서 가역적인 테스토스테론 결핍 흰쥐 모델을 만드는데 널리 사용된다. EDS 투여에 의해 유도된 'LC 녹아웃' 흰쥐의 경우 부정소와 저정낭과 같은 테스토스테론 의존성 부속 생식기관들의 급격한 무게 감소가 초래됨이 이전의 연구들에서 보고되었는데, 이러한 무게 감소의 상당 부분은 세포자연사에 의한 것으로 보인다. 본 연구는 흰쥐 부정소에서 세포자연사 관련 유전자들의 발현에 미치는 EDS 투여 효과를 조사한 것이다. 성숙한 수컷 흰쥐(SD strain, 300~350 g B.W.)에 EDS(75 mg/kg, i.p.)를 1회 복강주사하고 주사 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 그리고 7주가 경과한 날 희생시켰다. 희생 직후 조직 무게와 부정소 미부의 정자수를 측정하였다. 부정소로부터 total RNA를 추출한 후 세포자연사 관련 유전자들 가운데 *bcl-2*, *bax*, Fas 그리고 Fas ligand(Fas-L)의 발현 변화를 semi-quantitative RT-PCR로 측정하였다. 예상한 바처럼, 부정소 무게와 정자 수는 EDS 주사 후 1~2주 동안에 급격히 감소하였다. 이후 어느 정도 회복하였지만, 최종적으로 주사 후 7주경 부정소 무게(71%)와 정자 수(38%) 모두 최초 수준에는 미달하였다. 부정소에서의 *bcl-2* 전사 수준은 주사 직후부터 6주 후까지 지속되다가 주사 후 7주에 유의하게 상승하였다. 또한 *bax* 전사 수준은 주사 후 6주에 유의하게 감소하였으며 나머지 전 기간 동안에는 별다른 차이가 없었다. 한편 Fas 전사 수준은 EDS 주사 후 1~2주간 상승하였다가 주사 후 3주부터 정상 수준으로 감소하여 7주까지 지속되었다. 유사하게, Fas-L의 전사 수준도 주사 후 1~3주 동안 상승하였다가 주사 후

* 본 연구는 상명대학교 자연과학연구소 연구비 지원(2006)을 받아 수행되었음.

[†] 교신저자: 서울시 종로구 홍지동 7, 상명대학교 생명과학전공. (우) 110-743, (전) 02-2287-5139, (팩) 02-2287-0070, E-mail: shlee@smu.ac.kr

후 7주에 유의하게 상승하였다. 또한 *bax* 전사 수준은 주사 후 6주에 유의하게 감소하였으며 나머지 전 기간 동안에는 별다른 차이가 없었다. 한편 Fas 전사 수준은 EDS 주사 후 1~2주간 상승하였다가 주사 후 3주부터 정상 수준으로 감소하여 7주까지 지속되었다. 유사하게, Fas-L의 전사 수준도 주사 후 1~3주 동안 상승하였다가 주사 후

4주부터 정상 수준으로 복구하였다. 본 연구의 결과는 EDS 주사가 흰쥐 부정소에서 세포자연사 관련 유전자 발현을 유도할 가능성을 보여준 것이며, 특히 Fas와 Fas-L 유전자 활성이 초기 세포자연사 유도 과정에 중요하고, 그 결과로 부정소 무게 감소와 정자 수 감소가 초래되는 것으로 추정된다.

서론

Alkylating sulfonate계 물질인 ethane 1,2-dimethane sulfonate(EDS)는 1960년대 중앙 치료 목적의 화학요법에 사용 가능 여부를 조사하는 과정에서 불임 유발 효과가 있음이 최초로 보고되었다(Jackson & Jackson, 1984). 구체적으로, 수컷 흰쥐에 EDS를 1회 주사(75~100 mg/kg dose)했을 때 주사 후 24시간 이내에 75%, 3일 이내에 100%의 레이디그 세포(Leydig cell, LC)의 사멸이 일어나며, 이에 따라 주사 후 6시간부터 혈중 테스토스테론 수준의 감소가 시작되어 주사 후 10 일경에는 검출되지 않는다(Morris *et al.*, 1986). 따라서 주사 후 1주째부터 안드로겐 의존적인 조직들의 손상과 정자 형성과정 정지가 유도되는데, 순차적으로 완전한 불임, 수정능 저하, 수정능 회복이 일어나고 부정소, 전립선 그리고 저정낭의 일시적인 위축과 회복이 관찰된다(Jackson & Jackson, 1984). 이러한 효과들로 인하여 EDS는 정소 제거(orchidectomy or castration) 모델과 함께 테스토스테론 결핍(testosterone depletion) 모델로 널리 사용되어 왔다(Sriraman *et al.*, 2005).

포유동물의 부정소는 정자 수송, 성숙 그리고 저장하는 기능을 담당하므로 생식능력의 유지에 매우 중요한 부속 생식기관이다(Bedford, 2004). 정소로부터 이동한 운동성이 없는 미성숙한 정자들은 내강에 독특한 미세환경이 형성된 부정소 도관을 통해 수송되는 과정을 거치면서 운동성과 완전한 수정능을 갖는 정자로 성숙하게 된다(Turner, 1995). 한편, 부정소 미부와 수정관(vas deferens) 부위에는 사정이 일어나기 전까지 수정능이 있는 정자들이 상당 기간 -종에 따라 수일에서 수주까지 - 생존하면서 저장된다(Setchell *et al.*, 1993). 이러한 부정소의 분화, 유지 그리고 기능조절은 전립선이나 저정낭과 같은 다른 수컷 부속 생식기관들과 마찬가지로 정소로부터의 안드로겐에 의존적임은 주지의 사실이다. 따라서 LC를 선택적으로 사멸시켜 안드로겐 결핍을 유도하는 EDS 주사 모델은 부정소의 분화 또는 기능 조절을 이해하는데 상당한 강점이 있음에도 불구하고 현재까지 적용된 연구는 드물다.

EDS 주사에 의한 흰쥐 부정소의 위축과 회복은 주로 LC 사멸-테스토스테론 결핍에 의한 간접적인 현상으로 이해되었다(Jackson & Jackson, 1984). 그러나 제한된 수의 연구이지만 EDS가 흰쥐 부정소에 직접 작용한다는 보고가 있다(Klinefelter *et al.*, 1990, 1992). 그런데, 부정소를 비롯한 수컷 부속 생식기관들의

위축 기작에 대한 구체적인 연구는 이루어지지 않았다. 본 연구자들은 EDS 주사에 의해 부속 생식기관들에서도 세포자연사가 일어나리라고 가정하고, 성숙한 흰쥐 수컷의 부속 생식기관 가운데 특히 부정소에 미치는 EDS의 조직 손상 효과와 세포자연사 관련 유전자 발현에 미치는 상관관계를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 일정한 온도와 광주기(18~22°C; 12시간 조명, 12시간 소등)와 먹이와 물의 접근을 자유롭게 한 상태(*ad libitum*)에서 사육한 흰쥐(Sprague-Dawley strain)를 사용하였다. 성숙한 수컷 흰쥐(300~350 g B.W.; 생후 120~150일)에 vehicle(DMSO:DW=1:3 volume)에 녹아 있는 EDS(75 mg/kg B.W.)를 1회 복강주사하였으며, 대조군은 vehicle(2 mL/kg B.W.)만 주사하였다. EDS는 기 보고된 방법(Jackson & Jackson, 1984)을 따라 합성하였다. 각각 1주 단위로 7주까지 주사 후 희생시킨 후 부정소 무게를 측정하였고, 측정 직후 조직 내 total RNA를 추출하였다.

2. 정자 수 측정

우측 부정소 미부를 정자 수 측정에 사용하기 위해 30 mL의 sperm counting media(0.25% sodium azide, 0.05% trion X-100, 0.9% NaCl)에 넣고 잘게 자른 후 균질화하였다. 분쇄액(10 µL)을 hemacytometer 상에서 현미경으로 관찰하여 정자 수를 측정하였으며, 오차를 최소화하기 위해 3회 반복하여 계산하여 평균하였다.

3. 부정소의 조직학적 관찰

대조군과 실험군에서 얻은 부정소를 paraformaldehyde(4%)에 고정한 후 ethanol로 탈수하고 파라핀 포매 후 5~7 µm 두께로 연속 절편을 얻었다. 조직 절편들은 hematoxylin-eosin으로 대조 염색하여 광학현미경(Olympus)으로 관찰하였다.

4. RNA 추출과 Semi-quantitative RT-PCR

조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 방법(Chomczynski & Sacchi, 1987)에 따라 추출하였다. 1 µg의 total RNA를 주형으로 0.5 µg의 dT₂₀

primer와 AccuPower™ RT PreMix(Bioneer)를 사용하여 최종 반응 volume 20 μ L로 역전사하였다. PCR 반응은 1 μ L의 역전사 산물을 주형으로 하여 각각의 전사물에 해당하는 primer들과 Taq DNA polymerase(Takara)를 사용하였다. Table 1은 본 실험에서 사용된 primer들의 염기 서열과 예상 산물 크기(bp)를 표시하였다. PCR 산물은 전기영동으로 분리하였고, ethidium bromide로 염색후 Imager III-1D main software (Bioneer)로 정량하였다. 정량을 위한 internal control PCR에서는 GAPDH primer를 사용하였다.

5. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 one-way ANOVA에 의해 P -value 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. EDS 주사에 의한 부정소 무게 변화와 미부 정자 수의 변화

예상한 바처럼, EDS 주사 후 흰쥐 부정소 무게는 1주에서 3주까지 급속히 감소하다가 4주부터 증가하여 5주 이후 회복되는 경향을 보였으나 최종적으로 정상군의 71% 수준에 머물렀

으며, 부정소 미부의 정자 수는 주사 1주 후부터 급감하여 주사 4주경에 최소치에 도달한 후 주사 5주부터 증가하였지만 최종적으로 정상군의 38% 수준이었다(Table 2).

조직학적으로, EDS 주사 후 시간이 경과됨에 따라 부정소 도관의 내강 쪽 상피세포층의 손상이나 과소증식 상태(hypoplastic)가 유도되었다가 어느 정도 원상태로 회복됨이 관찰되었고, 내강에는 정자육아종(sperm granuloma)이나 극소수의 정자만이 존재하다가 회복됨이 나타났다(Fig. 1 A~H).

2. EDS 주사에 의한 부정소에서의 세포자연사 관련 유전자 발현의 변화

EDS 주사 후 세포자연사에 길항적(antiapoptotic)인 *bcl-2*의 부정소 내 전사 수준은 주사 직후부터 6주 후까지 비슷하게 유지되다가 7주 후에 유의하게 상승하였다($p < 0.05$, Fig. 2A). 한편, 세포자연사를 유도하는(proapoptotic)인 *bax*의 전사 수준은 EDS 주사 후 6주에 유의하게 감소하였고 나머지 전 기간 동안에는 별다른 차이가 없었다($p < 0.05$, Fig. 2B).

한편, *bcl-2/bax*와는 다른 경로로 세포자연사를 유도하는 Fas와 Fas-L의 EDS 주사 후 부정소 내 전사 수준을 조사한 결과, Fas의 경우 주사 후 1~2주간 상승하였다가 3주 후부터 정상 수준으로 복귀하여 이후 7주 후까지 지속되었고($p < 0.05$, Fig. 3A),

Table 1. Primer sets for semi-quantitative RT-PCR analysis

Name of the gene	Sequence of primers	Size of fragment
FAS	5'-AGC ATC TCT GAG GGT TTG GA 3'-AGT GGT CAC AGA GAG AAG CA	339 bp
FAS-ligand	5'-CCA ATT GAG CCA CAA AGA CC 3'-AGA TGA TGC CAA TGG GAC AC	385 bp
<i>bcl-2</i>	5'-CTA CGA GTG GGA TAC TGG AG 3'-TCC ACA GAG CGA TGT TGT CC	420 bp
<i>bax</i>	5'-CTA CGA GTG GGA TAC TGG AG 3'-ATC TTC TTG CAG ATG GTG AG	484 bp
GAPDH	5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG 3'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	570 bp

Table 2. Changes in the epididymal sperm counts after administration of EDS(75 mg/kg B.W., single dose, i.p.)

	Control	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week	6 week	7 week
Sperm count ($\times 10^6$)	143.31 \pm 32.65	12.67 \pm 12.81**	3.75 \pm 3.90**	7.71 \pm 3.89**	7.61 \pm 9.21**	28.71 \pm 19.96**	30.13 \pm 21.78**	56.55 \pm 18.80*
Epididymis (g)	1.15 \pm 0.20	0.62 \pm 0.10**	0.43 \pm 0.06**	0.47 \pm 0.07**	0.50 \pm 0.06**	0.77 \pm 0.13**	0.78 \pm 0.12**	0.78 \pm 0.55*

Values are expressed as mean \pm S.E.(n=6).

* Significantly different from control group, $p < 0.05$.

** Significantly different from control group, $p < 0.01$.

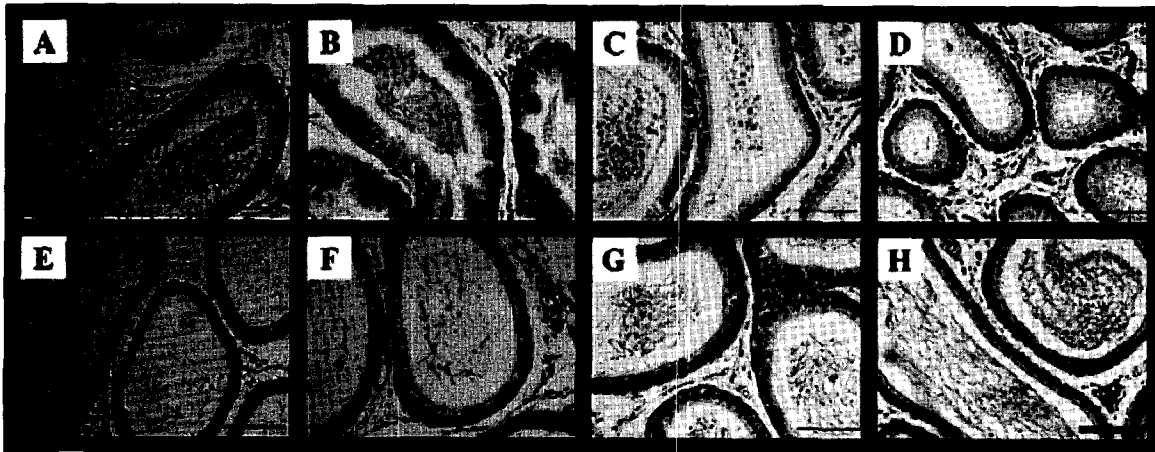


Fig. 1. Representative light micrographs of the epididymis from EDS-treated rats. A, control(0 week); B to H, week 1 to 7. The tissue sections were stained with hematoxylin-eosin. Magnification, $\times 200$. Bar=1 μ m.

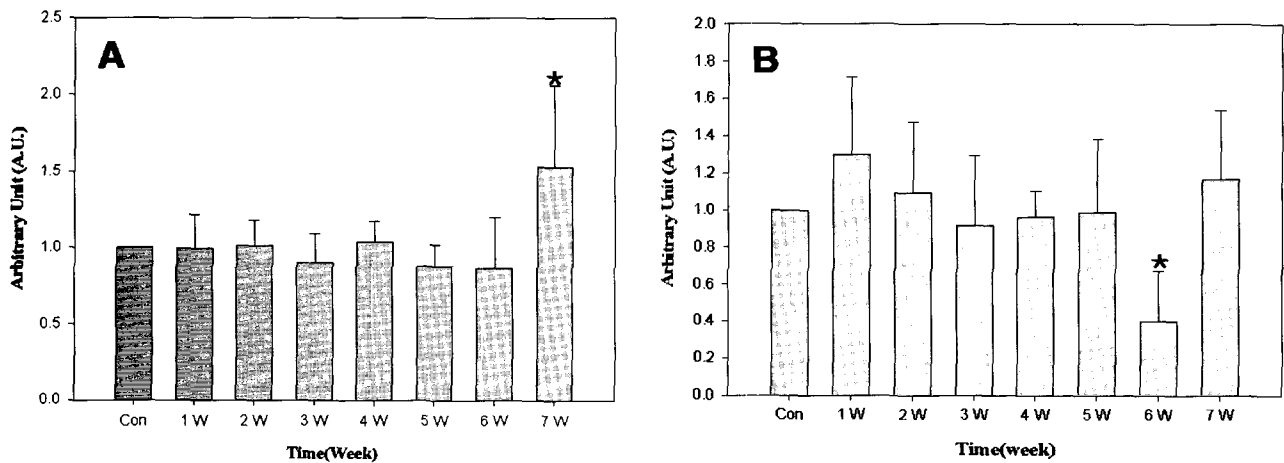


Fig. 2. Semi-quantitative RT-PCRs of the transcripts for *bcl-2*(A) and *bax*(B) in the epididymis from rats treated with EDS. Each bar is the mean \pm SEM of repeated experiments(n=4~7). The asterisks indicate the significant differences from control values(*, $p < 0.05$) by one-way ANOVA.

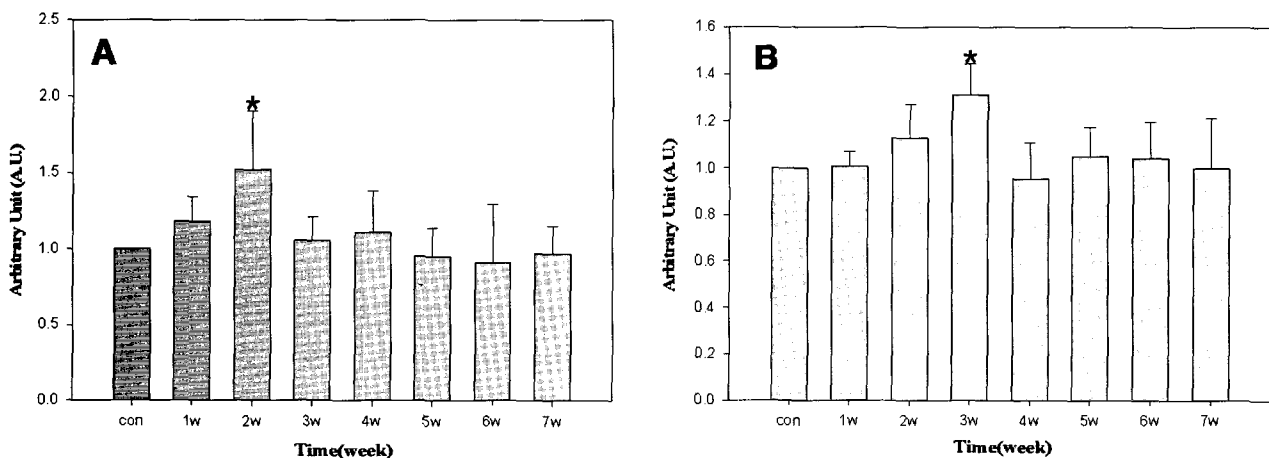


Fig. 3. Semi-quantitative RT-PCRs of the transcripts for Fas(A) and Fas-L(B) in the epididymis from rats treated with EDS. Each bar is the mean \pm SEM of repeated experiments(n=4~7). The asterisks indicate the significant differences from control values(*, $p < 0.05$) by one-way ANOVA.

유사하게 Fas-L의 전사 수준도 주사 후 1~3주 동안 상승하였다가 주사 후 4주부터 정상수준으로 복귀하였다($p < 0.05$, Fig. 3B).

고 찰

EDS의 LC 특이적 세포살상 효과는 중간 차이가 있는데, 흰쥐와 햄스터 등 일부 소동물에는 효과가 있지만 생쥐와 메추라기에서는 효과가 없으며, 일부 어류에서는 오히려 정소 활성의 증가가 일어나고, 흰쥐에서의 EDS 효과조차도 연령 간에 차이가 있음이 보고되었다(Laskey *et al.*, 1994; Kelce *et al.*, 1991; Onyango *et al.*, 2001). 흰쥐의 생식조직들 간에도 EDS 주사에 대해 상이한 반응을 나타낼 가능성이 있다. 본 연구에서 혈중 테스토스테론 수준이 완전히 회복된 시기에도 부정소의 무게와 정자 수는 각각 71%와 38% 수준에 머무른데 비해, 이전 연구에서 EDS 주사 후 정소와 저정낭의 무게 회복이 공히 90% 이상임이 관찰되었다(Jeon *et al.*, 2005). 이러한 부정소의 저조한 조직 손상 회복률은 i) 테스토스테론 결핍을 야기하는 EDS의 간접적인 작용에 대한 조직간 반응 차이와 ii) EDS의 부정소 내 직접적인 작용에 기인하는 것으로 추정된다. 전자의 경우, 조직간 안드로겐 반응성의 차이, 즉 안드로겐 수용체 또는 5 α -reductase 발현 차이가 주 요인으로 보이지만, 테스토스테론이 에스트로겐의 전구물질이라는 점에서 아로마타아제와 에스트로겐 수용체 유형과 발현의 정량 및 정성적인 차이도 배제할 수 없다. 실제로, EDS 주사로 유도되는 안드로겐 수용체 발현이 정소, 부정소 및 전립선에서 달리 조절됨이 보고되었고(Blok *et al.*, 1992), 유사하게 5 α -reductase 억제제인 Finasteride 효과의 조직간 차이(van Rooijen *et al.*, 1997), 그리고 EDS 주사 후 안드로겐과 에스트로겐 투여에 의한 유전자 발현의 조직간 차이가 보고되었다(Turner *et al.*, 2001). EDS의 직접적인 효과를 지지하는 연구로는, 흰쥐 부정소 조직배양에 EDS를 투여할 경우 농도 의존적으로 정자의 운동성 감소, 부정소 상피세포의 단백질 분비 감소, 정자 막 단백질 감소가 나타나고(Klinefelter *et al.*, 1992), 정소의 생식세포 감소가 일어나기 훨씬 이전인 EDS 주사 3일 후 미부 부정소의 기저부 상피 두께와 도관 직경의 변화, 투명세포(clear cell)의 소실과 leukocyte의 침투가 관찰되었다(Liu *et al.*, 1993). 또한 EDS 주사에 의한 부정소 미부 정자의 수정능 감소가 정소로부터의 테스토스테론 분비 감소와는 무관하다는 보고가 있었다(Klinefelter *et al.*, 1994). EDS가 부정소에 미치는 직접적인 효과의 구체적인 작용기작에 대한 연구와 더불어 저정낭과 전립선 등의 부속 생식기관에서의 EDS 작용에 대한 비교 연구는 유용한 정보를 제

공할 것이다.

EDS 주사 모델은 단 1회 복강주사로 LC가 선별적으로 사멸하고 이어 LC 전구세포들이 이를 보충하는 기작을 통해 정소의 안드로겐 생합성 및 분비 능력의 가역적인 손상과 회복을 유도할 수 있기 때문에 정소 절제 모델보다 더 유용한 측면이 있다(Sriraman *et al.*, 2005). 그런데 EDS의 효과에 대한 연구는 주로 정소 수준에서 이루어져서, 정자 형성과정의 조절, LC와 생식세포의 자연사(apoptosis) 유발 기작 그리고 LC 전구세포의 분화조절 기작에 대한 연구들이 주로 수행되었다(Sharpe *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 2000a, b; Sriraman *et al.*, 2005). 이에 비해 부정소, 저정낭, 전립선과 같은 부속 생식기관에 미치는 EDS의 영향에 관한 연구는 매우 빈약한 수준이다. 이는 생식 현상에 있어서의 정소가 갖는 중요성 외에도 부속 생식기관의 분화와 기능조절이 절대적으로 정소로부터의 요인, 특히 안드로겐 의존적이라는 개념 하에 있기 때문에 부차적인 관심 대상으로 간주되어 왔기 때문으로 사료된다. 포유동물의 부정소에서 정자는 성숙과정을 거쳐 운동성 등 완전한 수정 능력을 갖게 되고 사정까지 비교적 장기간 생존이 유지되는데, 최종적으로 비정상 또는 사정되지 않은 오래된 정자의 제거가 일어나야 한다. 여기에는 세포자연사 기작과 부정소 내 상피세포나 대식세포에 의한 흡수 기작이 작용할 것으로 추정되지만 연구가 미진한 실정이다(Jones, 2004). EDS 투여 후 관찰되는 흰쥐의 부정소 위축에는 체세포 뿐만 아니라 생식세포의 사멸도 포함되므로 부정소의 정자 수 감소와 회복은 발생학적인 측면은 물론 출생조절과 관련한 응용 측면에서도 매우 흥미로운 주제가 될 것이다.

EDS 주사 후 다양한 유형의 세포들에서 자연사가 촉발되는데, 당연히 가장 먼저 LC에서 일어난다. 이러한 LC의 세포 자연사의 분자 수준에서의 기작으로는 성숙한 LC에 자연사에 길항적(antiapoptotic)인 p53이나 Bcl-2 패밀리는 무관하고 자연사를 유도하는(proapoptotic) Fas와 Fas-L 경로의 활성화가 관여하는 것으로 보고되었으며(Taylor *et al.*, 1998, 1999). LC 생존인자로 하는 stem cell factor(SCF)의 억제도 부분적으로 성숙한 LC 자연사에 기여하는 것으로 보인다(Yan *et al.*, 2000a). 이에 비해 EDS에 의한 정원세포와 정모세포의 세포 자연사는 Bcl-2 패밀리 분자들이 관여하는데, 먼저 Bcl-w와 Bax 또는 Bak 각각과의 결합체 비율이 자연사 유도에 결정적이라고 보고되었고(Yan *et al.*, 2000b). 녹아웃 생쥐 모델을 사용한 연구에서 정원세포의 자연사에 Bax가 결정적으로 관여함이 보고되었다(Russell *et al.*, 2002). 한편 정소 내 생식세포의 자연사에 Fas가 관여한다는 주장도 있다(Nandi *et al.*, 1999). EDS 주사에 의해 정소 내 여러 유형의 세포에서 일어

나는 자연사에 대한 분자 수준의 기작이 비교적 상세한 밝혀진 데 비해, 부속 생식기관의 자연사 기작에 대해서는 연구된 바가 거의 없다. 따라서 EDS 주사 모델과 유사한 테스토스테론 결핍 모델인 정소 제거 모델과 특유의 수출관 결찰(efferent duct ligation) 모델을 사용한 연구들은 흰쥐 부정소에서 세포자연사 기작을 이해함에 유용할 것이다. 정소제거 후 2~6일 후 흰쥐 부정소에서 세포자연사를 촉진되며 안드로겐 보충은 정소 제거에 의한 효과를 상쇄함이 알려졌고, 결찰 모델에서 부정소의 두부(caput), 체부(corpus), 미부(caudal)의 주세포(principal cell)의 반응이 각각 상이함이 보고되었다(Robaire & Fan, 1998). 세포자연사 유도 경로에 관한 연구로, 정소를 제거한 Fas-deficient lpr과 Fas ligand-deficient gld 두 녹아웃 생쥐의 모든 부속생식기관에서의 세포자연사 지표들을 조사한 결과 대조군과 유의한 차이가 없음이 관찰되어 적어도 안드로겐 결핍에 의한 부속 생식기관에서의 세포자연사에 Fas와 Fas-L이 크게 관여하지 않는다고 보고되었다(Sugihara *et al.*, 2001). 한편 외과적 수술로 생쥐 부정소 미부만을 복강에 두어 높은 체온 상태에서 세포자연사를 유도하는 연구에서, 혈중 안드로겐 수준이나 부정소 내 p53과 heat shock protein(hsp-25와 hsp-70)의 변화는 없이 Bax와 Bcl-2 단백질이 유도되는 것으로 보아 이들이 생쥐의 부정소에서의 세포자연사에 관여하리라고 추정되었다(Jara *et al.*, 2002). 본 연구에서는 EDS 주사후 급격한 부정소 조직 손상과 정자 감소가 일어나는 초기 1~3주에 Fas와 Fas-L의 발현이 유의하게 상승하였고, bcl-2와 bax의 경우는 오히려 후기인 6주에 각각 유의한 상승과 하락이 일어났다. 이에 대한 해석으로, 정소 제거 모델과는 달리 EDS 주사는 직접적으로 부정소에 작용하여 조직 손상과 정자 사멸을 초래하고(Liu *et al.*, 1993; Klinefelter *et al.*, 1992, 1994), 이때 안드로겐에 비의존적으로 Fas와 Fas-L 경로를 통한 세포자연사가 일어난다고 추정할 수 있지만, 좀더 세밀한 연구가 필요하다.

결론적으로 본 연구는 EDS 주사 후 흰쥐 부정소에서 세포자연사와 관련된 유전자들의 발현이 변화함을 보여준 것으로써, 특히 부정소에서의 Fas와 Fas-L 유전자 활성화 증가가 세포자연사 유도 과정에 중요하며 결과적으로 부정소 무게 감소와 정자 수 감소가 야기됨을 시사한다. EDS 주사 모델은 테스토스테론 결핍과 보상이 일어나는 과정이 가역적이고, 단순히 테스토스테론 보충만으로는 제공할 수 없는 정소에서의 다양한 물질 생산과 분비 등이 상당 부분 유지되는 상태이기 때문에 정소 자체는 물론 연구가 별로 진척되지 않은 부속생식기관들의 세포자연사와 분화에 관해 많은 정보를 제공할 수 있을 것이다.

인용문헌

- Bedford JM (2004) Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79:429-460.
- Blok LJ, Bartlett JM, Bolt-De Vries J, Themmen AP, Brinkmann AO, Weinbauer GF, Nieschlag E, Grootegoed JA (1992) Effect of testosterone deprivation on expression of the androgen receptor in rat prostate, epididymis and testis. *Int J Androl* 15:182-198.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Jackson CM, Jackson H (1984) Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatogenic action of ethane dimethanesulphonate. *J Reprod Fertil* 71:393-401.
- Jara M, Esponda P, Carballada R (2002) Abdominal temperature induces region-specific p53-independent apoptosis in the cauda epididymidis of the mouse. *Biol Reprod* 67:1189-1196.
- Jeon Y, Kim SW, Paick JS, Lee SH (2005) Effect of ethane 1,2-dimethane sulfonate(EDS) on the testicular expression of steroidogenesis-related genes and epididymal sperm count in the adult rat. *Kor J Androl* 23:17-23.
- Jones R (2004) Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. *Biol Reprod* 71:1405-1411.
- Kelce WR, Zirkin BR, Ewing LL (1991) Immature rat Leydig cells are intrinsically less sensitive than adult Leydig cells to ethane dimethanesulfonate. *Toxicol Appl Pharmacol* 111:189-200.
- Klinefelter GR, Laskey JW, Roberts NR, Slott V, Suarez JD (1990) Multiple effects of ethane dimethanesulfonate on the epididymis of adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 105:271-287.
- Klinefelter GR, Roberts NL, Suarez JD (1992) Direct effects of ethane dimethanesulphonate on epididymal function in adult rats. An *in vitro* demonstration. *J Androl* 13:409-421.
- Klinefelter GR, Laskey JW, Perreault SD, Ferrell J, Jeffay S, Suarez J, Roberts N (1994) The ethane dimethanesul-

- fonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis. *J Androl* 15:318-327.
- Laskey JW, Klinefelter GR, Kelce WR, Ewing LL (1994) Effects of ethane dimethanesulfonate (EDS) on adult and immature rabbit Leydig cells: comparison with EDS-treated rat Leydig cells. *Biol Reprod* 50:1151-1160.
- Liu X, Temple-Smith PD, Risbridger GP (1993) Acute effects of ethane dimethane sulfonate (EDS) on the structure of the cauda epididymidis in the rat: selective destruction of clear cells in the proximal cauda region. *Reprod Fertil Dev* 5:295-306.
- Morris ID, Phillips DM, Bardin CW (1986) Ethylene dimethanesulfonate destroys Leydig cells in the rat testis. *Endocrinology* 118:709-719.
- Nandi S, Banerjee PP, Zirkin BR (1999) Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas? *Biol Reprod* 61:70-75.
- Onyango DW, Wango EO, Werner G (2001) Epididymal epithelial cell involution following a single intraperitoneal administration of ethane dimethanesulfonate in the goat (*Capra hircus*). *Toxicol Appl Pharmacol* 175:19-27.
- Robaire B, Fan X (1998) Regulation of apoptotic cell death in the rat epididymis. *J Reprod Ferti Suppl* 53:211-214.
- Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM (2002) Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod* 66:950-958.
- Setchell BP, Sanchez-Partida LG, Chairussyuhur A (1993) Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: a review. *Reprod Fertil Dev* 5:601-612.
- Sharpe RM, Maddocks S, Kerr JB (1990) Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *Am J Anat* 188:3-20.
- Sriraman V, Anbalagan M, Rao AJ (2005) Hormonal regulation of Leydig cell proliferation and differentiation in rodent testis: a dynamic interplay between gonadotrophins and testicular factors. *Reprod Biomed Online* 11:507-518.
- Sugihara A, Yamada N, Tsujimura T, Iwasaki T, Yamashita K, Takagi Y, Tsuji M, Terada N (2001) Castration induces apoptosis in the male accessory sex organs of Fas-deficient *lpr* and Fas ligand-deficient *gld* mutant mice. *In Vivo* 15:385-390.
- Taylor MF, Woolveridge I, Metcalfe AD, Streuli CH, Hickman JA, Morris ID (1998) Leydig cell apoptosis in the rat testes after administration of the cytotoxin ethane dimethanesulphonate: role of the Bcl-2 family members. *J Endocrinol* 157:317-326.
- Taylor MF, de Boer-Brouwer M, Woolveridge I, Teerds KJ, Morris ID (1999) Leydig cell apoptosis after the administration of ethane dimethanesulfonate to the adult male rat is a Fas-mediated process. *Endocrinology* 140:3797-3804.
- Turner TT (1995) On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J Androl* 16:292-298.
- Turner KJ, Morley M, MacPherson S, Millar MR, Wilson JA, Sharpe RM, Saunders PT (2001) Modulation of gene expression by androgen and oestrogens in the testis and prostate of the adult rat following androgen withdrawal. *Mol Cell Endocrinol* 178:73-87.
- van Rooijen JH, Ooms MP, Weber RF, Brinkmann AO, Grootegoed JA, Vreeburg JT (1997) Comparison of the response of rat testis and accessory sex organs to treatment with testosterone and the synthetic androgen methyltrienolone(R1881). *J Androl* 18:51-61.
- Yan W, Kero J, Huhtaniemi I, Toppari J (2000a) Stem cell factor functions as a survival factor for mature Leydig cells and a growth factor for precursor Leydig cells after ethylene dimethane sulfonate treatment: implication of a role of the stem cell factor/c-Kit system in Leydig cell development. *Dev Biol* 227:169-182.
- Yan W, Samson M, Jegou B, Toppari J (2000b) Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. *Mol Endocrinol* 14:682-699.