

암컷 마우스 생식기관의 형태에 미치는 에스트로겐 수용체 촉진제의 영향

이 은 정¹, 한 지 연, 조 현 옥*

¹한스 바이오메드(주), 순천대학교 생명산업과학대학 생물학전공

Effects of Estrogen Receptor Agonist on Morphology in the Female Mouse Reproductive Organs

Eun Jung Lee¹, Ji Yeon Han and Hyun Wook Cho*

¹Hans Biomed Corp., Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

Department of Biology, College of Bio-industry Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

(Received October 14, 2009; Accepted December 23, 2009)

ABSTRACT

Estrogens induce pronounced structural and functional changes in male and female reproductive system, but the exact mechanisms of estrogen are not fully understood. In relation to estrogen's function, the present study was designed to identify effects of estrogen receptor agonist, 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)tris phenol (PPT) in the reproductive organ of the female mouse. The PPT was subcutaneously given to adult female mice at a weekly dosage of 3 mg in a volume 0.06 mL of vehicle for 3, 5 or 8 weeks whereas controls received weekly injections of the castor oil vehicle. Effects of PPT on reproductive organs were analyzed using a light microscope. PPT induced decreases of body, ovary and adipose tissue weights with experimental time. Ovary diameter of PPT treatment group was reduced as compared with control group. The number of Graffian follicle and corpus luteum was reduced in PPT treatment group. The luminal diameter of uterus was increased in relation with decrease of myometrium and endometrium height by PPT administration. The number of uterine glands was decreased by PPT treatment. These data indicate that PPT treatment induced morphological change of female reproductive organs resulting in alteration of fertility.

Keywords : Agonist, Estrogen receptor, Mouse, Ovary, Uterus

서 론

동물체 내에서 스테로이드 호르몬인 에스트로겐에 의해 조직의 발생, 분화, 골의 교체, 심혈관계 및 행동 등이 영향을 받는다(Kuiper et al., 1998). 일반적으로 에스트로겐은 암컷호

르몬으로 알려져 있지만 수컷 내에서도 다양한 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다(Hess et al., 1997). 체내에서 에스트로겐에 대한 생물학적인 반응은 특별히 높은 친화력을 갖는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)가 발현되는 세포에서 일어난다. ER은 핵에 존재하고 있으며 에스트로겐과 결합 후 핵 속의 DNA에 달라붙어 프로게스테론 수용체와 성장인

이 논문은 순천대학교 2009년도 학술연구비 공모과제로 연구되었음.

* Correspondence should be addressed to Dr. Hyun Wook Cho, Department of Biology, College of Bio-industry Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea. Ph.: (061) 750-3614, Fax: (061) 750-3208, E-mail: hwcho@suncheon.ac.kr

자 등 여러 유전자의 발현에 관여하여 조직의 성장이나 분화에 영향을 미친다(Hess et al., 2000). 일반적으로 에스트로겐 반응은 두 가지 즉, 에스트로겐 수용체 알파(estrogen receptor alpha, ER α)와 베타(estrogen receptor beta, ER β)를 통하여 매개된다(Kuiper & Gustafsson, 1997). 이러한 ER α 와 ER β 는 조직에 특이하게 발현된다. ER α 가 난소나 자궁, 질, 유선과 같은 주요 암컷 생식기관에 발현되는 반면에, ER β 는 정소나 전립선과 같은 수컷의 생식기관과 난소에서 각각 발현된다고 알려져 있다(Mosselman et al., 1996; Muramatsu & Inoue, 2000). 그러나 발현정도의 차이는 있지만 일반적으로 두 수용체는 암컷과 수컷의 생식기관에 같이 존재하는 것으로 보인다. 이러한 ER α 와 ER β 는 유전자 조절에 있어서도 다른 역할을 하는 것으로 알려져 있다. ER은 에스트로겐과 결합하면 입체구조변화가 생겨 표적유전자(target gene)에 결합할 수 있게 되며(Murdoch & Gorski, 1991; Fritsch et al., 1992), 두 수용체 세포 내에서 어떠한 기작을 통해서 신호를 조절하고 영향을 주는가에 대해서는 크게 두 가지 형태로 나누어 볼 수 있다. 하나는 수용체 결합 복합체를 이룬 후 핵 내 작용을 통한 세포 내 전사를 조절하는 과정이고, 다른 하나는 게놈과는 무관한 비핵 작용이다(Luconi et al., 2002; Simoncini et al., 2004).

동물 체내 에스트로겐의 기능을 규명하기 위해 에스트로겐 수용체 알파가 유전적으로 결핍된(α estrogen receptor knockout, α ERKO) 마우스를 사용하거나(Couse & Korach, 1999; Hess, 2003) 혹은 ICI 182, 780 같은 에스트로겐 수용체 저해제를 투여하여 연구하기도 한다(Oliveira et al., 2001, 2003; Cho et al., 2003). 다양한 종류의 항에스트로겐(anti-estrogen) 중 하나인 ICI 182, 780은 에스트로겐 수용체의 여러 단계에서 작용하여 그 효과를 나타낸다. ICI 182, 780은 경쟁적으로 에스트로겐과 작용하여 에스트로겐이 수용체에 결합하는 것을 방해함으로써 항에스트로겐 작용을 나타내는 것으로 알려져 있지만 그 자세한 기작은 잘 모르고 있다(Dudley et al., 2000). 또한 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator, SERM)를 이용하여 수용체의 생물학적 기능을 규명하기도 한다(Kraichely et al., 2000). SERM은 구조적으로 다양한 비스테로이드 ER 리간드이며 agonist/antagonist 활성을 갖고 있다. 또한 SERM은 에스트로겐 수용체와의 상호작용을 통해 활성을 나타낸다(Shiau et al., 1998). SERM/ER 복합체와 co-activator 및 co-repressor 단백질과의 상호작용을 통해 매개되는 post-receptor에 의해 ER을 포함하고 있는 조직에서 조직-선택적 효과가 나타나는 것으로 이해되고 있다(Onate et al., 1995; Mak et al., 1999; Hall & Korach, 2002). 본 실험에서 사용한 SERM인 PPT(Propyl pyrazole triol)는 에스트로겐 수용체 촉진제로서 높은 친화성을 나타내는데, 연구에 의하면 PPT는 ER β 보다 특히 ER α 와 410배의 높은 친화성으로 결합하는 것으로 알

려져 있다(Stauffer et al., 2000).

본 연구에서는 암컷의 난소와 자궁에 주로 ER α 가 많이 분포한다는 점에 주목하여 SERM의 하나로서 ER α 촉진제인 PPT를 장기간 투여하여 암컷 생쥐 생식기관의 형태학적 변화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 PPT 투여

실험동물은 10주령 된 체중 16~18g의 암컷 마우스 C57BL/6를 (주)오리엔트바이오 회사로부터 구입하여 사용하였다. 실험기간 동안 고품사료와 물을 무제한으로 공급하였다. 사육실은 22 \pm 2 $^{\circ}$ C와 상대습도 50 \pm 5%를 유지하였으며 조명시간은 12시간을 주기로 하였다. 30마리의 마우스를 무작위로 대조군 15마리와 처리군 15마리로 지정하였다. 처리군은 Tocris 회사의 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)tris phenol (PPT) 3mg이 들어있는 castor oil 0.06mL를 매주 1회씩 마우스의 등 쪽에 피하주사 방법으로 투여하였다. 마우스의 체중당 PPT 투여농도로 환산하면 178.6mg/kg이었다. 대조군은 PPT가 들어 있지 않은 castor oil 0.06mL 만을 피하주사하였다.

2. 관류 고정

대조군과 처리군의 마우스는 주입 후 3주, 5주, 8주째에 각각 대조군 5마리, 처리군 5마리씩 도합 30마리를 관류 고정시켜 희생하였다. 관류 고정방법은 마우스 한 마리마다 헤파린 0.1mL를 먼저 주입하고 다음에 sodium pentobarbital 0.1mL를 주입하여 마취시켰다. 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4)에 용해한 4% glutaraldehyde를 마우스의 좌심실에 관류 고정용 바늘로 찔러 넣어 peristaltic pump로 20분간 관류 고정시켰다. 암컷 마우스의 생식기관인 난소, 자궁을 적출하여 조직을 표본으로 이용할 때까지 4 $^{\circ}$ C의 동일한 관류 고정용액에 보관하였다.

3. 각 기관과 지방조직의 무게 측정 및 조직처리

난소와 자궁을 비롯한 생식기관에 붙어 있는 지방조직을 조심스럽게 모두 떼어낸 다음, 이어서 각 난소, 자궁과 같은 기관을 분리하고 여과지에 올려서 물기를 제거한 후 각 기관의 무게를 측정하였다. 지방에 미치는 PPT의 영향을 확인하기 위해 8주째의 생식기관에 붙어 있던 지방조직을 떼어낸 다음 여과지에 올려서 물기를 제거하고 지방조직의 무게를 측정하였다. 각 기관의 조직을 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4)로 세척하고 4 $^{\circ}$ C의 vacuum 상태에서 70% (2회), 80% (1회), 95% (2회), 100% (3회) ethanol에 1시간 간격으로 탈수 시

킨 후, infiltration solution에 처리한 다음 glycol methacrylate (JB-4)에 포매하였다. 암컷 마우스 생식기관인 난소 및 자궁은 microtome을 이용하여 2.5 μ m 두께의 절편을 만들어 슬라이드에 올리고 35°C slide warmer위에서 건조시켰다. 염색방법은 periodic acid Schiff (PAS)-hematoxylin를 사용하였다. PAS-hematoxylin 염색방법은 증류수에 10분, periodic acid에 15분, 증류수에 10분, schiff reagent에 45분, sulfurous acid에 5분씩 3회, 흐르는 증류수에 20분, hematoxylin에 35분, 흐르는 증류수에 10분간 두었다가 35°C slide warmer 위에서 건조시킨 다음 permount로 봉입하였다.

4. 여포 및 황체의 수 관찰

난소의 단면 안에 있는 여포의 수를 조사하였다. 즉, 가장 크고 성숙한 상태의 여포인 그라프여포(Graafian follicle)의 수를 현미경으로 관찰하면서 조사하였다. 여포에서 난자를 방출한 뒤에 변화한 황체의 수도 난소의 단면에서 관찰하였다.

5. 사진촬영 및 분석

광학현미경(Olympus BX50)에 부착된 SPOT camera (Diagnostic Instruments사의 Model No. 11.2 Color Mosaic)를 이용하여 조직을 저배율에서 고배율로 촬영한 다음 Video Test Image Analysis System을 이용하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 난소의 장경(long diameter)은 가운데를 중심으로 하여 긴 쪽을 한 마리 당 4번 측정하였는데 이를 통해 난소의 크기 변화를 확인하였다. 자궁내막층의 측정은 횡단면과 종단면에서 한 마리당 4군데를 측정하였다. 자궁근육층의 측정도 자궁내막층과 마찬가지로 한 마리당 4군데를 측정하였다.

6. 통계

실험 결과의 통계학적 분석은 ANOVA Test를 이용하여 P value 0.05 미만($P < 0.05$)을 의미 있는 것으로 판별하였으며 자료 값은 평균±표준편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 체중, 난소 및 지방조직의 무게

본 연구에서는 ER α 촉진제인 PPT를 투여하여 암컷 생쥐 생식기관의 형태학적 변화에 미치는 에스트로겐 수용체 촉진제의 영향을 알아보고자 하였다. 그 결과 외형적인 변화에서는 크게 대조군과 처리군의 차이가 보이지 않았으나, 처리군의 평균 체중과 난소의 무게가 대조군에 비해 감소되는 경향을 보였다(Table 1). 특히 난소의 경우, 5주째에 대조군

Table 1. Body and ovary weight from control and PPT-treated mice throughout 3, 5 and 8 weeks post treatment

Weight	Type	Week post treatment		
		3	5	8
Body (g)	Control	18.5±2.12	18.7±0.98	20.6±1.28
	PPT-treated	17.8±1.56	18.5±1.41	18.9±1.81
Ovary (mg)	Control	3.2±1.3	4.3±1.6	3.7±0.4
	PPT-treated	1.8±0.7	1.6±0.2*	2.4±1.5

Values represent mean ± SD.

* $p < 0.05$ compared with control group

난소의 무게(4.3 mg)가 처리군 무게(1.6 mg)에 비해 유의하게 감소되었다. 육안을 통해서 생식기관에 붙어 있던 지방의 변화도 뚜렷하게 관찰되었다. 즉 대조군에서는 지방 때문에 잘 관찰되지 않았던 자궁이 처리군에서는 지방조직이 감소되고 또 크기가 커져서 확연하게 들어났다(Fig. 1). 8주째 생식기관 주변 지방조직의 무게는 대조군이 0.71 g, 처리군이 0.12 g으로 각각 나타나, 처리군이 대조군 무게의 16.9% 수준으로 감소되었다(Fig. 2).

ER α 촉진제인 PPT를 장기간 투여한 결과 대조군에 비해 처리군에서 여러 가지 변화가 유발되었다. 즉, 체중, 난소와 지방조직의 무게가 감소되는 경향을 보였으며 이 현상은 실험기간 내 지속되었다. 이러한 변화 중 체중 감소와 연관된 체내 호르몬의 역할에 대하여 많은 보고가 있다. 에스트로겐 물질은 체중 감소를 유발하는 것으로 알려져 있는데(Cook et al., 1998; Goyal et al., 2001), 에스트로겐에 의해 먹이 소비가 감소되거나 혹은 섭취된 음식물의 체내 이용 감소와 같은 복합적인 요소에 의해 체중이 줄어드는 것으로 보고하였다(Laudenslager et al., 1980; Cook et al., 1998). 다른 보고에서도 ER α 를 통해 에너지 소비에 대한 에스트라디올(E2)의 영향이 조절되며, 또한 E2/ER α 신호가 에너지 소비의 조절에 중요하다고 보고되었다(Heine et al., 2000). 또 에스트로겐은 열 생산율을 증가시킬 수 있는데, 에스트로겐이 생산되지 않는 난소절제된 쥐의 경우, 열 생산율이 감소되며 이는 E2가 ER α 를 통해 에너지 소비를 증가시킨다는 것이라고 하였다. 그리고 음식 섭취를 관장하는 뇌 부위에서 에스트로겐이 조절자처럼 작용하여 체중을 감소시킬 수 있는 것으로 보고하였다(Wade & Heller, 1993). 구체적으로 에스트로겐은 시상하부의 ventromedial nucleus (복내측핵)에 직접적으로 작용한다는 보고가 있으며 *in vivo*에서 에스트로겐은 비만유전자의 발현을 억제시킨다는 보고도 있다(Shimizu et al., 1997). 본 실험에서도 실험기간 동안 생쥐의 체중이 감소되는 경향을 보였는데 이는 ER α 촉진제인 PPT를 통해 먹이 소비가 감소되었거나 혹은 PPT가 뇌 부위에서 에스트로겐 조절자처럼 작용하여 체중의 감소가 일어난 것이 아닌가 여겨진다.

PPT를 장기간 투여한 결과 본 실험에서 난소의 무게가 감

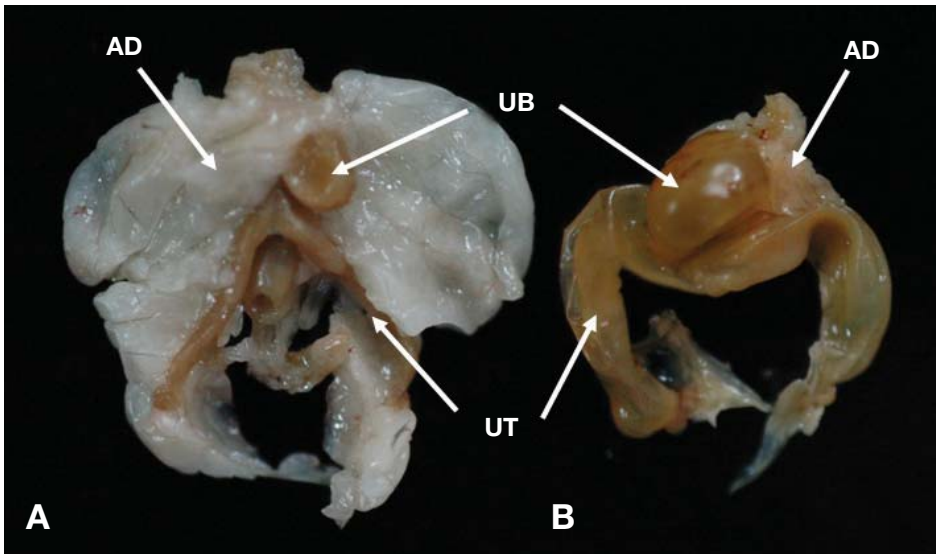


Fig. 1. Comparison of female reproductive organ of control (A) and PPT-treated (B) mice on week 8 post treatment. AD, Adipose tissue; UB, Urinary bladder; UT, Uterus.

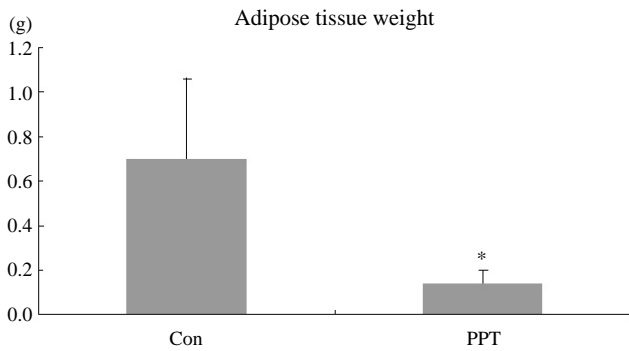


Fig. 2. Adipose tissue weight from control and PPT-treated groups on week 8 post treatment. Significant difference (*) between control and PPT-treated groups is noted ($p < 0.05$). The data indicate mean \pm SD.

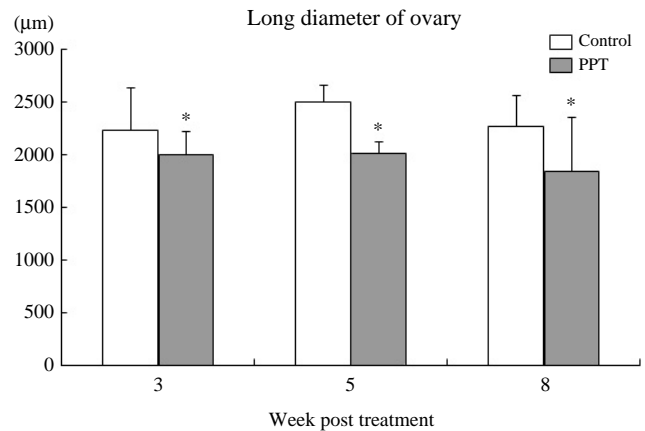


Fig. 3. Long diameter of ovary from control and PPT-treated groups on week 3, 5 and 8 post treatment. Significant differences (*) between control and PPT-treated at each time point are noted ($p < 0.05$). The data indicate mean \pm SD.

소되었는데 이와 연관된 내용으로서, GnRH-Agonist만을 투여한 경우 난소의 무게가 유의하게 감소하였고, 여포내 세포 자연사가 증가한 것이 관찰 되었으며 강소형성, 여포 및 황체의 비율은 감소하였다고 보고되었다(Hong et al., 2003). 즉, 다량의 GnRH-Agonist 투여가 뇌하수체의 기능을 방해하여 생식샘자극호르몬의 분비를 억제시키고 이로 인하여 난소내 여포의 발달이 억제되었기 때문인 것으로 보고되었는데 본 실험에서도 대조군에 비해 처리군에서 성숙여포의 수가 감소하였다. 이것은 ER α 촉진제인 PPT로 인해 에스트로겐이 과발현되고 이로 인하여 뇌하수체에 negative feedback 효과를 나타내어 여포의 수도 감소되고 동시에 난소의 무게도 감소된 것이 아닌가 생각된다.

지방과 에스트로겐이 관련된 기존 보고에 의하면, 출생 후 9개월과 12개월 사이의 α ERKO 수컷 마우스의 부정소에 붙어 있는 백색 지방조직 무게가 대조군에 비해 139% 증가되

었는데, 그 이유는 지방세포의 수와 크기가 증가하기 때문이라고 보고하였다. 즉, 지방세포 수가 증가하는 것은 줄기조직(mesenchyme)-전지방세포(pre-adipocyte)-지방세포 시스템의 분화에 의한 것이라고 하였다. 그 외에도 난소를 제거한 마우스나 에스트로겐을 투여받은 마우스의 경우, 지방세포의 크기가 변화됨으로써 지방조직 무게변화도 유발된다고 하였다(Heine et al., 2000). 이런 면에서 보면 ER α 가 지방세포에서도 발현되는 것은 당연하다고 할 수 있다(Dahlman-Wright et al., 2006). 따라서 에스트로겐은 먹이섭취를 감소시키며 또한 지방분해를 증가시킴으로써 이로 인해 지방조직이 감소되는 것으로 이해되고 있다. 이처럼 지방조직의 무게 변화에 에스트로겐과 ER α 가 매우 밀접한 관계를 맺고 있다는 사실을 파악할 수 있다. 본 실험의 투여 후 8주째에 희생시

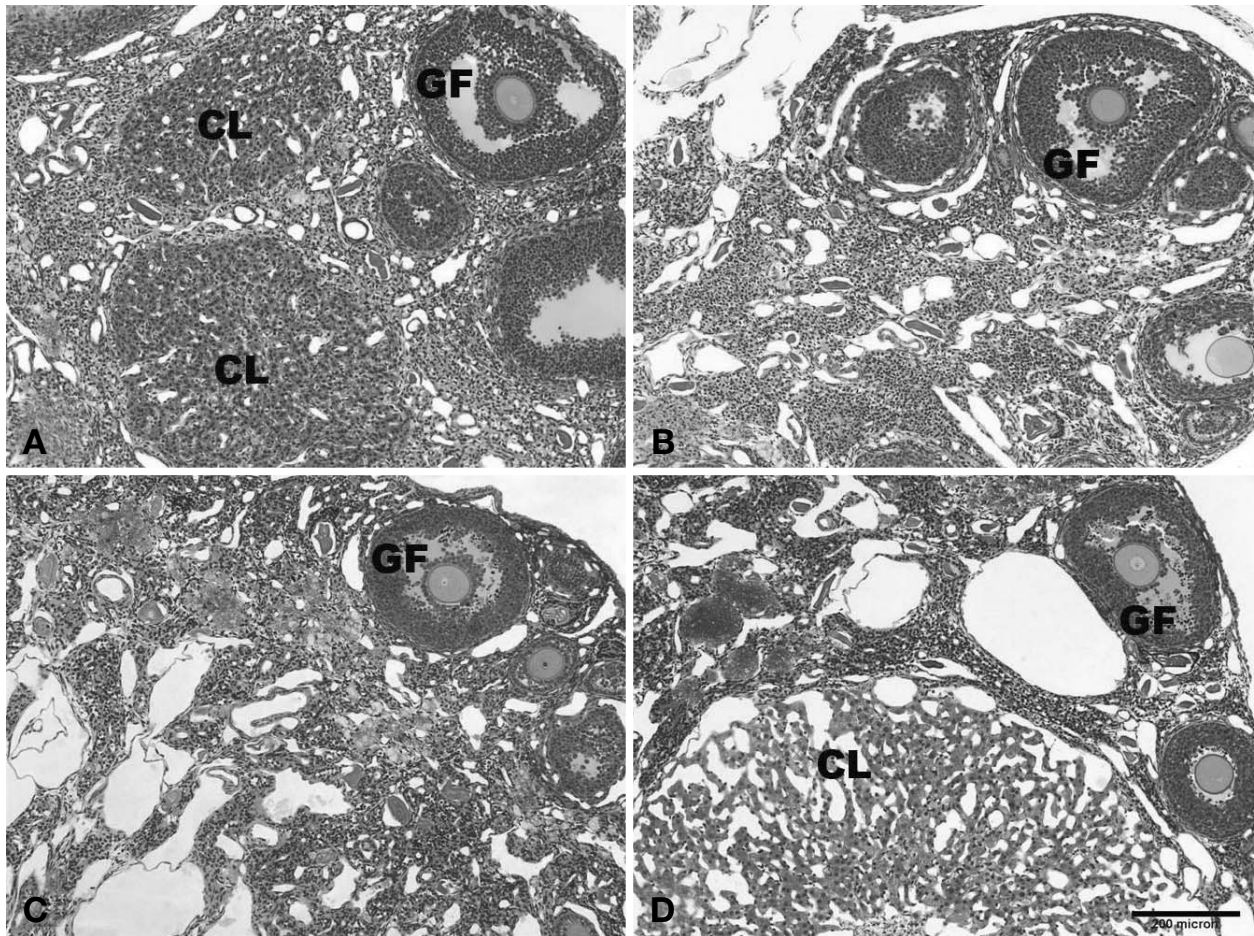


Fig. 4. Photomicrographs of ovary from control on week 3 (A), and PPT treated groups at weeks 3 (B), 5 (C) and 8 (D) post treatment. CL, Corpus luteum; GF, Graafian follicle. Bar bar=200 μ m.

킨 마우스의 경우, 투여군의 생식기관에 붙어 있던 지방조직의 무게가 대조군 무게의 16.9% 수준으로 감소되었는데, 이 결과는 지방조직의 감소에 PPT가 positive한 영향을 미쳤으며 또한 이 작용에 ER α 가 긴밀하게 연관되어 있다는 앞의 사실을 뒷받침해 준다.

2. 난소의 조직학적 변화

난소를 조직학적으로 관찰한 결과 난소의 크기(장경)는 처리군이 대조군에 비하여 감소되었고(Fig. 3). 그라프여포 수의 경우도 대조군 3주(2.1개), 5주(0.9개), 8주(1.0개)에 비하여 각각의 처리군 3주(0.3개), 5주(0.4개), 8주(0.5개)에서 볼 수 있는 것처럼 유의하게 감소되었다(Table 2). 또한 황체의 수 경우에도 대조군 3주(3.7개), 5주(3.8개), 8주(3.1개)에 비하여 각각의 처리군 3주(1.2개), 5주(0.7개), 8주(1.5개)에서 유의성 있게 감소되었다. 본 실험처럼 단일절편에서 여포 및 황체의 수를 관찰한 경우, 실제 3차원 공간에 분포하는 이들의 수가 왜곡되어 나타날 수 있는데 편의상 기존의 다른 보

Table 2. Number of Graafian follicle and corpus luteum in control and PPT-treated groups throughout 3, 5 and 8 weeks post treatment

Week post treatment	Type	Graafian follicle	Corpus luteum
3	Control	2.1 \pm 2.0	3.7 \pm 1.9
	PPT-treated	0.3 \pm 0.6*	1.2 \pm 1.2*
5	Control	0.9 \pm 1.1	3.8 \pm 1.9
	PPT-treated	0.4 \pm 0.5*	0.7 \pm 0.9*
8	Control	1.0 \pm 0.8	3.1 \pm 1.2
	PPT-treated	0.5 \pm 0.5*	1.5 \pm 1.6*

Values represent mean \pm SD.

*p<0.05 compared with control group

고에서처럼 절편에서 나타난 여포 및 황체의 수를 측정하여 나타내었다.

ER α 가 결핍된 쥐에서는 난소의 여포형성은 일어났지만 비정상적으로 나타났으며 그 수도 대조군에 비해 적다고 하였다(Rosenfeld et al., 2000). 이는 난소의 여포형성 및 배란에 ER α 외에 ER β 도 어느 정도의 영향을 주는 것이 아닌가

여겨진다. 본 실험에서는 ER α 와 친화력을 가진 PPT로 인해 그라프여포의 수가 감소되었다. ER이 결핍되어 여포성숙이 억제된 앞의 기존보고처럼 본 실험의 고농도 PPT 투여 때문에 촉진역할보다는 PPT가 오히려 억제 역할을 한 것이 아닌가 생각되지만 추후 보완된 실험을 통해 규명해야 할 것으로 보인다.

황체는 배란 후 여포로부터 형성되는 일시적인 내분비샘으로 초기 임신의 수립과 유지에 필수적이며, 동물이 임신하지 않으면 황체는 퇴화를 일으켜 정상적인 발정주기를 회복하여 새로운 배란여포가 발육되도록 한다. 황체는 황체형성 호르몬의 배란 전 과분비로 인해 성숙여포가 파열되고 난자가 방출된 후 여포 벽이 찌그러지고 주름이 잡히면서 모세혈관이 침투해 들어가면서 형성된다. 또한 성숙황체 시기까지 구조적 및 기능적으로 성숙하다가 그 후에는 퇴화하기 시작한다(Senturk et al., 1999). 여포와 황체에 미치는 PPT의 영향에 관한 연구로, 갓 태어난 암컷 마우스에 5일마다 피하주사 방법으로 체중 g 당 PPT 25 μ g의 농도로 주입하고 30일 후에 희생시켜 관찰하면 난소에서 다난자 여포(polyovular follicle)를 볼 수 있으며, 13주 후에 희생시킨 난소의 경우 무배란이 유발되고 그 결과 황체도 형성되지 않는다고 하였다(Nakamura et al., 2008). 본 실험의 경우에는 실험기간 내내 투여된 황체의 수가 대조군에 비해 유의하게 감소되어 나타났다. 그런 면에서 보면 본 실험의 경우, 1주일마다 피하주사 방법으로 성체 체중 g 당 PPT 200 μ g의 높은 농도로 주입하였기 때문에 앞의 기존보고와는 결과가 다르게 나온 것으로 사료된다. ER α 에 의해 성공적인 배란과 황체형성이 유발되면서 정상적인 성숙과정이 일어나는데, ER α 유전자가 파괴된 암컷 마우스 경우에는 이런 정상적 성숙 즉, 배란이 일어나지 않고 황체형성도 일어나지 않았다고

하였다(Schomberg et al., 1999). 이러한 이유로서 난소의 여포막 세포(theca cell)와 과립 세포(granulosa cell)에 있는 황체형성 호르몬 수용체와 기능적으로 상호작용하는 순환 중의 황체형성 호르몬의 농도가 높아서 나타난 현상으로 설명하기도 하였다. 본 실험의 경우, 뇌하수체에서 분비되는 황체형성 호르몬 농도를 적절하게 유지하는 estradiol의 negative feedback 효과에 ER α 가 필수적인데(Couse et al., 2003), 이 ER α 가 작용하지 않음으로 해서 황체형성 호르몬 농도가 높아지고 따라서 정상적인 성숙과정이 일어나지 않는 것으로 보인다.

3. 자궁의 조직학적 변화

수정란이 자궁에 잘 착상할 수 있도록 도와주는 자궁샘의

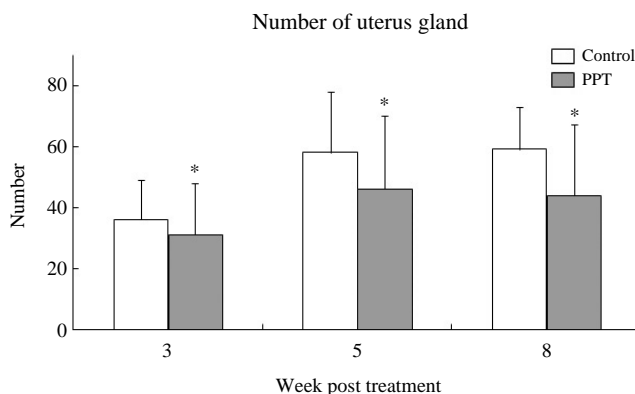


Fig. 5. Number of uterus gland in uterus from control and PPT-treated groups on week 3, 5 and 8 post treatment. Significant differences (*) between control and PPT-treated at each time point are noted ($p < 0.05$). The data indicate mean \pm SD.

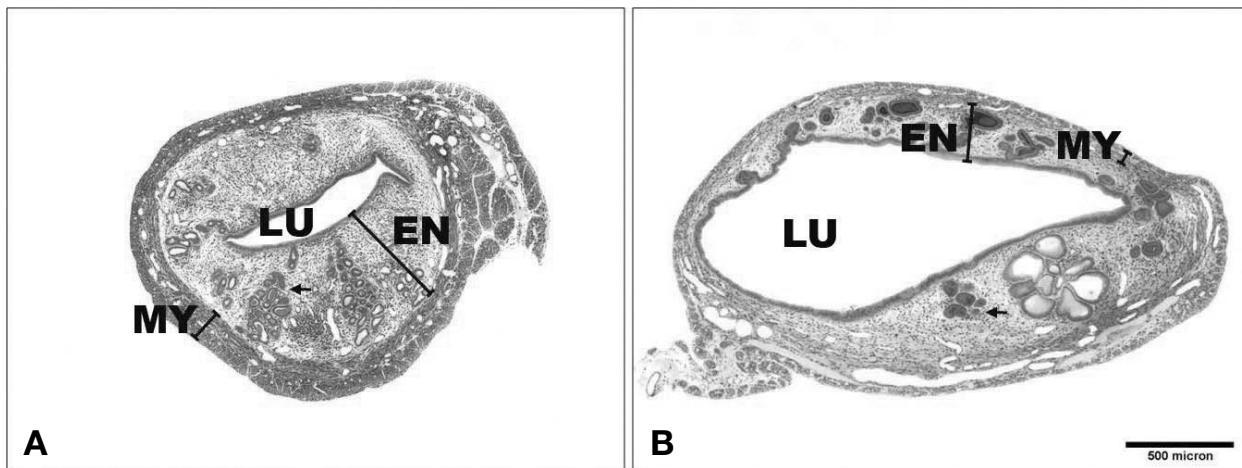


Fig. 6. Photomicrographs of cross-sectioned uterus from control (A) and PPT-treated (B) groups on week 8 post treatment. The number of uterus gland (arrows) was decreased in the treated group. PPT induced the decrease of endometrium (EN) and myometrium (MY) height. However, lumen (LU) was increased. Bar bar=500 μ m.

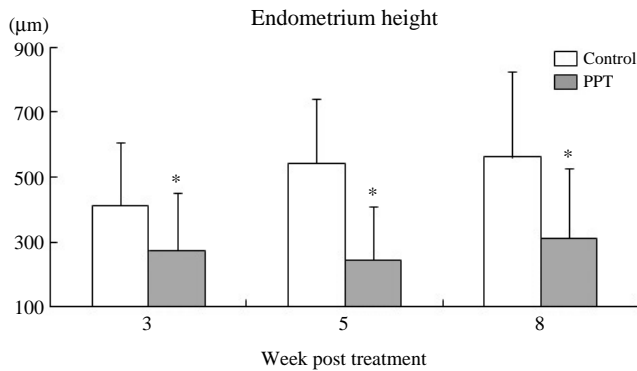


Fig. 7. Endometrium height of PPT group was decreased significantly throughout the treatment period. Significant differences (*) between control and PPT-treated at each time point are noted ($p < 0.05$). The data indicate mean \pm SD.

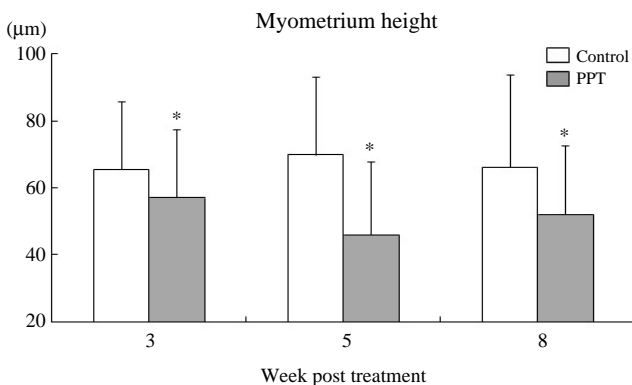


Fig. 8. Myometrium height of PPT group was decreased significantly throughout the treatment period. Significant differences (*) between control and PPT-treated at each time point are noted ($p < 0.05$). The data indicate mean \pm SD.

수가 처리군에서는 대조군에 비해 감소되었으며 (Fig. 5), 자궁 내강 (lumen)이 대조군에 비해 확장되어 관찰되었다 (Fig. 6). 내막층, 근육층과 장막층의 3층으로 구성되어 있는 자궁의 조직학적 구조를 잘 관찰할 수 있었으며, 3개의 층 중에서 처리군 내막층을 측정된 결과 3주에서는 대조군의 65% 수준으로 감소하였고, 5주에서 45% 수준, 8주에서는 55% 수준으로 각각 내막층의 두께가 감소되었다 (Fig. 7). 처리군 근육층을 측정된 결과 3주에서 대조군의 86% 수준으로 감소하였고, 5주에서 64% 수준, 8주에서 78% 수준으로 각각 근육층의 두께가 감소되었다 (Fig. 8). 자궁의 내막층과 근육층의 두께 감소로 인해서 투여군의 자궁 내강이 확대되어 나타났다 (Fig. 6).

생쥐의 자궁은 사람의 자궁과는 다르게 Y자인 쌍렬자궁 (bipartite uterus) 형태를 하고 있어서 많은 수의 새끼를 임신할 수 있다. 수정된 수정란이 자궁에 잘 착상할 수 있도록 자궁샘이 분비물을 분비하여 도와준다. 본 실험의 경우, PPT

처리군에서 내막층에 있는 자궁샘의 수가 실험기간 내내 유의하게 감소되었고 내막층 자체의 두께도 줄어들어서 수정란 착상이나 임신 유지에 좋지 않은 영향을 줄 것으로 생각된다. 연구자들에 의하면 성체 마우스 자궁에서 ER β mRNA가 겨우 확인될 정도로 약하게 존재하는데, 이렇게 ER β 가 적게 분포하는 것으로 볼 때 마우스 자궁에서 ER β 가 어떤 중요한 역할을 하지 않으며, 따라서 ER α 가 마우스의 자궁에서 에스트로겐 작용을 매개하는데 중요한 형태인 것으로 보고되었다 (Couse & Korach, 1999). 따라서 자궁에 존재하는 ER의 주된 타입이 ER α 라고 하였는데 (Nakamura et al., 2008), 본 실험에서 자궁의 내막층 두께도 투여한 PPT에 의해 감소된 것으로 보인다. 이와 관련된 보고에 의하면, 갓 태어난 암컷 마우스에 5일마다 피하주사 방법으로 체중 g 당 PPT 25 μ g의 농도로 주입하고 15주 후에 희생시킨 마우스의 경우, PPT는 자궁의 환상근 분해를 유발하므로 자궁의 크기가 줄어든다고 하였다 (Nakamura et al., 2008). 본 실험에서도 실험기간 내내 감소된 근육층 두께가 관찰되었는데 앞의 보고에서처럼 PPT로 인해 자궁의 근육이 분해되어 나타난 결과로 보여진다.

결론적으로, 본 연구에서 ER α 촉진제인 PPT를 장기간 투여하여 암컷 마우스 생식기관을 관찰한 결과, 투여 초기에서부터 난소에서는 여포형성이 일어나지만 그라프여포의 수가 감소되는 경향을 보였으며, 생식기관 주위에 붙어 있던 지방조직도 감소되었다. 또한 실험기간 내내 자궁에서는 자궁의 내막층과 근육층의 두께 및 자궁샘의 수가 감소되었는데, 이러한 결과로 볼 때 고농도로 PPT를 투여할 경우, 형태학적이고 조직학적으로 유발되는 생식기관 변화 때문에 생식력 감소 혹은 불임과 같은 현상이 일어날 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Cho HW, Nie R, Carnes K, Zhou Q, Sharief NAQ, Hess RA: 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, 2003.
- Cook JC, Johnson L, O'CONNOR JC, Biegel LB, Krams CH, Frame SR, Hurtt ME: 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, 1998.
- Couse JF, Korach KS: Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine Rev* 20 : 358-417, 1999.
- Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS: Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ER α but not ER β . *Mol Endocrinol* 17 :

- 1039-1053, 2003.
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson J: International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58 : 773-781, 2006.
- Dudley MW, Sheeler CQ, Wang H, Khan S: Activation of the human estrogen receptor by the antiestrogens ICI 182,780 and tamoxifen in yeast genetic systems: Implications for their mechanism of action. *PNAS* 97 : 3696-3701, 2000.
- Fritsch M, Leary CM, Furlow JD, Ahrens H, Schuh TJ, Mueller GC, Gorski J: A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain. *Biochem* 31 : 5303-5311, 1992.
- Goyal HO, Braden TD, Mansour M, Williams CS, Kamaleldin A, Srivastava KK: Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biol Reprod* 64 : 927-934, 2001.
- Hall JM, Korach KS: Analysis of the molecular mechanisms of human estrogen receptors alpha and beta reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens. *J Biol Chem* 277 : 44455-44461, 2002.
- Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS: Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *PNAS* 97 : 12729-12734, 2000.
- Hess RA: Estrogen in the adult male reproductive tract. *Reprod Biol Endocrinol* 1 : 52, 2003.
- Hess RA, Bunick D, Lubahn DB, Zhou Q, Bouma J: Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. *J Androl* 21 : 107-127, 2000.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Korach KS, Lubahn DB: A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390: 509-512, 1997.
- Hong S, Yang H, Kim MR, Lee CH, Hwang KJ, Kwon HC, Yoon YD: Effects of GnRH agonist administered to mouse on apoptosis in ovary and production of estradiol and progesterone. *Dev Reprod* 7 : 49-56, 2003.
- Kraichely DM, Sun J, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS: 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, 2000.
- Kuiper G, Gustafsson JA: The novel estrogen receptor-beta subtype: Potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and antiestrogens. *FEBS Lett* 410 : 87-90, 1997.
- Kuiper G, Lemmen J, Carlsson B, Corton J, Safe S, Saag P, Burg B, Gustafsson J: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinol* 139 : 4252-4263, 1998.
- Laudenslager ML, Wilkinson CW, Carlisle HJ, Hammel HT: Energy balance in ovariectomized rats with and without estrogen replacement. *Am J Physiol* 238 : R400-405, 1980.
- Luconi M, Forti G, Baldi E: Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80 : 369-381, 2002.
- Mak HY, Hoare S, Henttu PM, Parker MG: Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface. *Mol Cell Biol* 19: 3895-3903, 1999.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R: ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 329 : 49-53, 1996.
- Muramatsu M, Inoue S: Estrogen receptors: How do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun* 270 : 1-10, 2000.
- Murdoch FE, Gorski J: The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 78 : C103-108, 1991.
- Nakamura T, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T: Estrogen receptor subtypes selectively mediate female mouse reproductive abnormalities induced by neonatal exposure to estrogenic chemicals. *Toxicol* 253 : 117-124, 2008.
- Oliveira CA, Carnes K, Franca LR, Hess RA: Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat. *Biol Reprod* 65 : 913-920, 2001.
- Oliveira CA, Nie R, Carnes K, Franca LR, Prins GS, Saunders PTK, Hess RA: 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, 2003.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Sci* 270 : 1354-1357, 1995.
- Rosenfeld CS, Murray AA, Simmer G, Hufford MG, Smith MF, Spears N, Lubahn DB: Gonadotropin induction of ovulation and corpus luteum formation in young estrogen receptor- α knockout mice. *Biol Reprod* 62 : 599-605, 2000.
- Schomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE, Korach KS: Targeted disruption of the estrogen receptor- α gene in female mice: Characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinol* 140 : 2733-2744, 1999.
- Senturk LM, Seli E, Gutierrez LS, Mor G, Zeyneloglu HB, Arici A: MCP-1 expression in human corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 5 : 697-702, 1999.
- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL: The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95 : 927-937, 1998.
- Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N, Mori M: Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154 : 285-292, 1997.
- Simoncini T, Mannella P, Fomari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR: Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothe-

lial cells. Steroids 669 : 537-543, 2004.

Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA: Pyrazole ligands: Structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor- α -selective agonists. J Med Chem 43 : 4934-4947, 2000.

Wade GN, Heller HW: Tamoxifen mimics the effect of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. Am J Physiol 264 : R1219-1223, 1993.

< 국문 초록 >

에스트로겐은 수컷과 암컷의 생식기관 내에서 구조적이고 기능적인 변화를 유발하지만 그 정확한 기작에 대하여는 잘 알려져 있지 않다. 에스트로겐의 기능과 연관지어, 본 연구에서는 암

컷 생식기관 내에서 에스트로겐 수용체 촉진제인 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)tris phenol (PPT)의 작용을 확인하고자 하였다. 성체 암컷 마우스에 castor oil 0.06 mL에 PPT 3 mg 농도로 희석한 용액을 1주일에 1회씩 3주, 5주, 8주 동안 각각 피하주사 하였으며, 대조군에는 castor oil 0.06 mL만을 투여하였다. 광학현미경을 이용하여 생식기관에 대한 PPT의 영향을 분석하였다. PPT에 의해 실험기간 동안 체중, 난소 및 지방조직의 무게가 감소되었다. PPT 투여군에서는 대조군에 비해 난소의 직경이 감소되었으며, 난소 내 그라프여포와 황체의 수도 감소되었다. 자궁의 경우, PPT에 의해 근육층과 내막층의 높이가 감소함에 따라 내강이 증가되었다. 또한 자궁샘의 수도 감소되었다. 이런 결과들로 볼 때 PPT에 의해 암컷 생식기관의 형태학적 변화가 유발되고 이로 인해 생식력에도 변화가 있을 것으로 보인다.