

# 수컷 생쥐 부속 생식샘의 형태에 미치는 에스트로겐 수용체 $\alpha$ 의 선택적 효능제 propyl pyrazole triol의 영향

한 지 연, 조 현 우\*

순천대학교 생명산업과학대학 생물학전공

## Effects of Estrogen Receptor $\alpha$ -Selective Agonist Propyl Pyrazole Triol on the Morphology of Accessory Genital Glands of Male Mouse

Ji Yeon Han and Hyun Wook Cho\*

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

(Received January 7, 2009; Accepted March 5, 2009)

### ABSTRACT

This study investigated that exposure of male mice to estrogen receptor  $\alpha$ -selective agonist, 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)tris-phenol (PPT) induce morphological changes of accessory genital glands. The male reproductive organs were fixed and processed for light microscopy. The PPT induced decreases of ventral prostates, seminal vesicles and preputial glands weights with experimental time. The glandular lumen of ventral prostate was atrophied compared with control group. Type of epithelial tissues in the prostate was changed from simple columnar epithelium to stratified cuboidal or squamous epithelium. Treated group with the agonist showed that increased connective tissue underlying epithelium in the prostate and seminal vesicle. Especially, the glandular lumen of the seminal vesicle was contracted when PPT-treated animals were compared with control group. Secretion cells of preputial gland were smaller than that of control group. On week 8, PPT treatment caused decrease of epithelial cell height lining the lumen of preputial gland. These results provide information useful in researching the physiological function of estrogen mediated by estrogen receptor  $\alpha$  in male accessory genital gland.

**Keywords** : Estrogen receptor agonist, Male mouse, Accessory genital gland

### 서 론

에스트로겐은 암컷호르몬으로 알려져 있지만 실제로는 수컷 생식기관 내에서도 중요한 기능을 발휘하는 것으로 밝혀져 있다(Hess et al., 1997; Mäkelä et al., 2000; Hess, 2003).

이런 에스트로겐은 수용체를 통해 그 기능이 발현되게 된다. 즉 에스트로겐 호르몬이 목표 세포로 가서 그 세포에 있는 수용체와 비공유 복합체를 형성한다. 이어서 이 복합체가 핵에 존재하는 목표 유전자의 프로모터와 결합하고 전사 수준을 조절함으로써 에스트로겐이 기능을 나타내게 된다는 것이다(Han et al., 1999). 1960년대 에스트로겐 수용체 (estro-

이 논문은 순천대학교 학술연구비의 공모과제로 연구되었습니다.

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

gen receptor, ER)가 처음으로 확인된 이래 (Toft & Gorski, 1966) 오랫동안 이 수용체는 하나의 타입 형태로 존재하는 것으로 간주되어 왔으나, 1996년에 다른 타입의 ER이 흰쥐에서 확인되었다 (Kupier et al., 1996). 결과적으로 기존의 수용체를 에스트로겐 수용체 알파 (estrogen receptor alpha, ER $\alpha$ ), 나중의 1996년에 발견된 수용체를 에스트로겐 수용체 베타 (estrogen receptor beta, ER $\beta$ )라 부르게 되었다 (Couse & Korach, 1999; O'Donnell et al., 2001). 본 실험에 사용된 ER 효능제인 propyl pyrazole triol (PPT)은 수용체 알파 타입과 작용하는 선택적 ER 조절제의 한 종류이다. PPT는 ER $\beta$ 에 비해 ER $\alpha$ 와 410배 혹은 1,000배 이상의 높은 친화성을 나타내는 물질로 알려져 있다 (Stauffer et al., 2000; Sun et al., 2002).

생쥐의 전립샘, 정낭 등은 수컷 생식기관의 부속샘에 속하는데 이들 부속샘에 존재하는 ER을 면역조직화학적 (immunohistochemistry)으로 염색하여 수용체 존재 정도를 나타내기도 하였다 (Yamashita, 2004). 이 보고에 의하면 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 가 북부쪽 전립샘 (ventral prostate)의 상피 조직에 약하게, 그리고 기질 부위에는 아주 약하게 분포한다고 하였다. 또한 정낭의 경우, ER $\alpha$ 가 상피와 기질 부위 조직에 아주 약하게 존재하지만 ER $\beta$ 는 이 두 부위에 존재하지 않는다고 하였다. 따라서 이런 부속기관들도 에스트로겐의 직접적인 영향을 받을 수 있음을 제시하였다.

이처럼 ER이 부속 생식기관 내에 존재하는 것으로 보아 에스트로겐이 수컷 체내에서 어떤 역할을 하는 것으로 보이지만 아직까지는 그 기능에 대하여 많이 알려져 있지 않다. 에스트로겐 기능을 규명하기 위한 일환으로 연구자들은 유전적으로 형질 전환된 생쥐를 이용하기도 한다. 즉, 에스트로겐 수용체 알파가 결핍된 (estrogen receptor  $\alpha$  knockout,  $\alpha$ ERKO) 생쥐를 만들어서 연구하는데 (Couse & Korach, 1999) 이 경우, 불임이 유발되는 것으로 알려져 있다. 또한 항에스트로겐 (antiestrogen) 물질을 투여하고 이 때 나타나는 여러 가지 현상을 관찰하여 에스트로겐의 기능을 연구하기도 한다 (Cho et al., 2003; Oliveira et al., 2003). 본 연구에서는 이런 수컷 생식기관 내 에스트로겐의 기능을 규명하는데 기초 자료를 제공하기 위하여 ER 효능제인 PPT를 생쥐에 투여하여 이 때 나타나는 정낭, 전립샘 및 포피샘의 형태학적 변화를 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

평균 무게 22.4g의 10주령된 수컷 C57BL/6 생쥐를 사용하였다. 대조군과 처리군의 2군으로 각 군에 15마리를 배당

하였다. 처리군의 경우, ER 효능제인 PPT (4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)tris-phenol, Tocris Cookson Ltd., United Kingdom) 4 mg를 0.08 mL의 castor oil에 vortex로 희석한 다음 매주 1회씩 등쪽 목덜미에 피하주사 하였다. 투여한 PPT 4 mg (0.126 M)을 생쥐의 체중으로 환산하면 178.6 mg/kg이었다. 대조군의 경우, 0.08 mL의 castor oil만을 피하주사 하였다. 사육실은 23 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C와 습도 50 $\pm$ 5%를 유지하였으며 물과 사료는 무제한으로 공급하였다. 첫 투여한 후 3주, 5주, 8주째에 대조군과 PPT 처리군 각각 5마리씩을 사용하여 총 30마리를 희생하였다.

### 2. 조직학적 처리

Sodium pentobarbital을 복강 주사하여 마취시킨 다음 이어서 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)에 용해한 4% glutaraldehyde로 20분 동안 심장 관류하여 희생시켰다. 관류 후에 북부쪽 전립샘, 정낭, 포피샘을 적출하여 동일한 관류액에 보관하였다. 무게를 구하기 위해 각각의 기관을 여과지에 올려 물기를 제거한 다음 좌우 2개의 북부쪽 전립샘 무게, 좌우 2개의 정낭 무게, 좌우 2개의 포피샘 무게를 측정하였다.

조직 절편을 만들기 위해, 기관들을 일반적인 에탄올 탈수 과정을 거친 다음 glycol methacrylate에 포매하였고 이어서 마이크로톰을 이용하여 2.5  $\mu$ m 두께의 절편을 만들었다. 이 절편을 periodic acid-Schiff (PAS)와 hematoxylin으로 이중 염색을 실시하였다. 이 염색과정은, 먼저 조직 절편을 다음 순서대로 증류수에 10분, periodic acid에 15분, 증류수에 10분, Schiff 용액에 45분, sulfurous acid에 3회씩 각각 5분, 흐르는 물에 20분, hematoxylin에 35분, 그리고 마지막으로 흐르는 물에 10분을 두었다가 꺼낸 다음 35 $^{\circ}$ C slide warmer에서 절편을 건조시킨 다음 Permount로 봉입하여 프레파라트를 완성하였다. 염색한 프레파라트를 현미경으로 관찰하고 현미경 (Olympus BX50)에 설치된 SPOT 디지털 카메라 (Diagnostic Instruments, Model No.11.2 Color Mosaic)로 촬영하여 컴퓨터에 영상을 저장하였다.

### 3. 통계적 처리

대조군과 처리군의 통계학적 처리는 Microsoft Office Excel 2007의 one-way ANOVA방법을 이용하였으며 p 값이 0.05보다 작을 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

## 결 과

전 실험기간 동안 처리군의 북부쪽 전립샘, 정낭, 포피샘의 무게가 대조군에 비해 감소되었다. 즉, 대조군 정낭 무게

의 경우, 3주, 5주 그리고 8주 동안 거의 변동 없이 0.20~0.24 g의 무게를 유지하였다. 그러나 PPT 처리군의 경우 전 실험기간 동안 대조군의 정량 무게가 0.02 g으로 나타나 약 10분의 1로 줄어드는 무게 감소를 보였으며 또한 대조군과

유의하게 차이를 나타내었다(Table 1). 전립샘과 포피샘의 경우, 5주째부터 처리군의 무게가 대조군에 비해 유의하게 감소되었다.

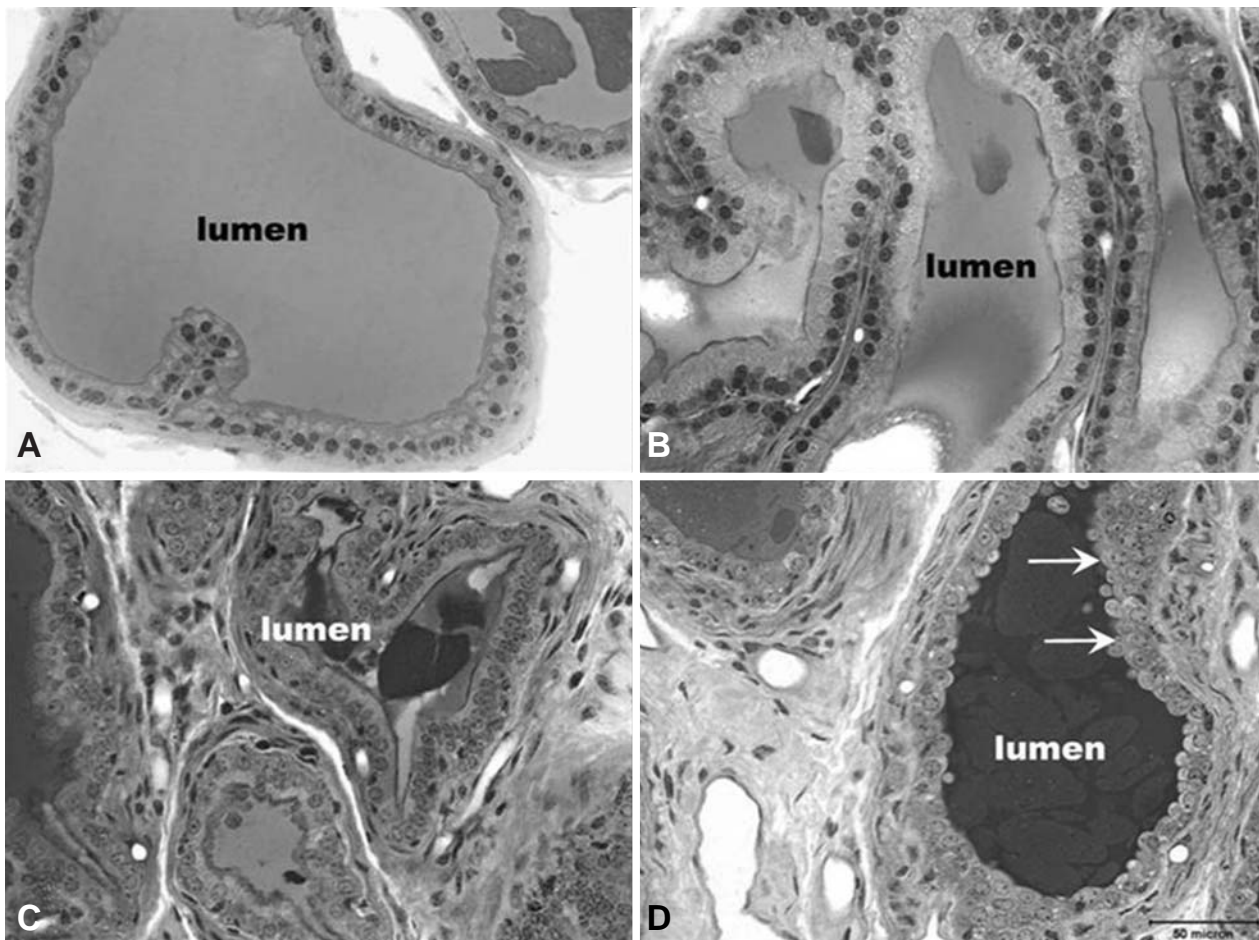
전립샘의 경우, 3주째 대조군에서 분비관의 내면을 구성하는 한 층의 세포로 구성된 원주상피조직이 잘 관찰되었다. 내강에는 PAS 양성물질이 고르게 있었으며 내강에는 또한 PAS에 강하게 염색되는 분비물 덩어리가 관찰되기도 하였다(Fig. 1). 이런 현상은 실험기간 내내 관찰되었다. 상피세포의 세포질에는 분비와 관련 있는 소포가 많이 관찰되었다. PPT 3주째 처리군에서는 내강에 PAS 양성물질이 관찰되었으며 내강이 축소되어 나타났다. 상피세포의 세포질 내 소포의 수는 거의 변화가 없었다. 처리군 5주째에서는 내강에 분비물 덩어리의 수가 증가하였다. 처리군 8주째의 경우, PAS에 대한 내강의 분비물 염색이 강하게 나타났다. 내강을 둘러싸는 상피세포의 형태가 원주에서 입방 모양이나 혹은 편평한 형태로 변화되었으며 또한 단층상피에

**Table 1.** Effects of PPT on weight of right and left seminal vesicles, ventral prostates and preputial glands throughout 3, 5 and 8 weeks post administration

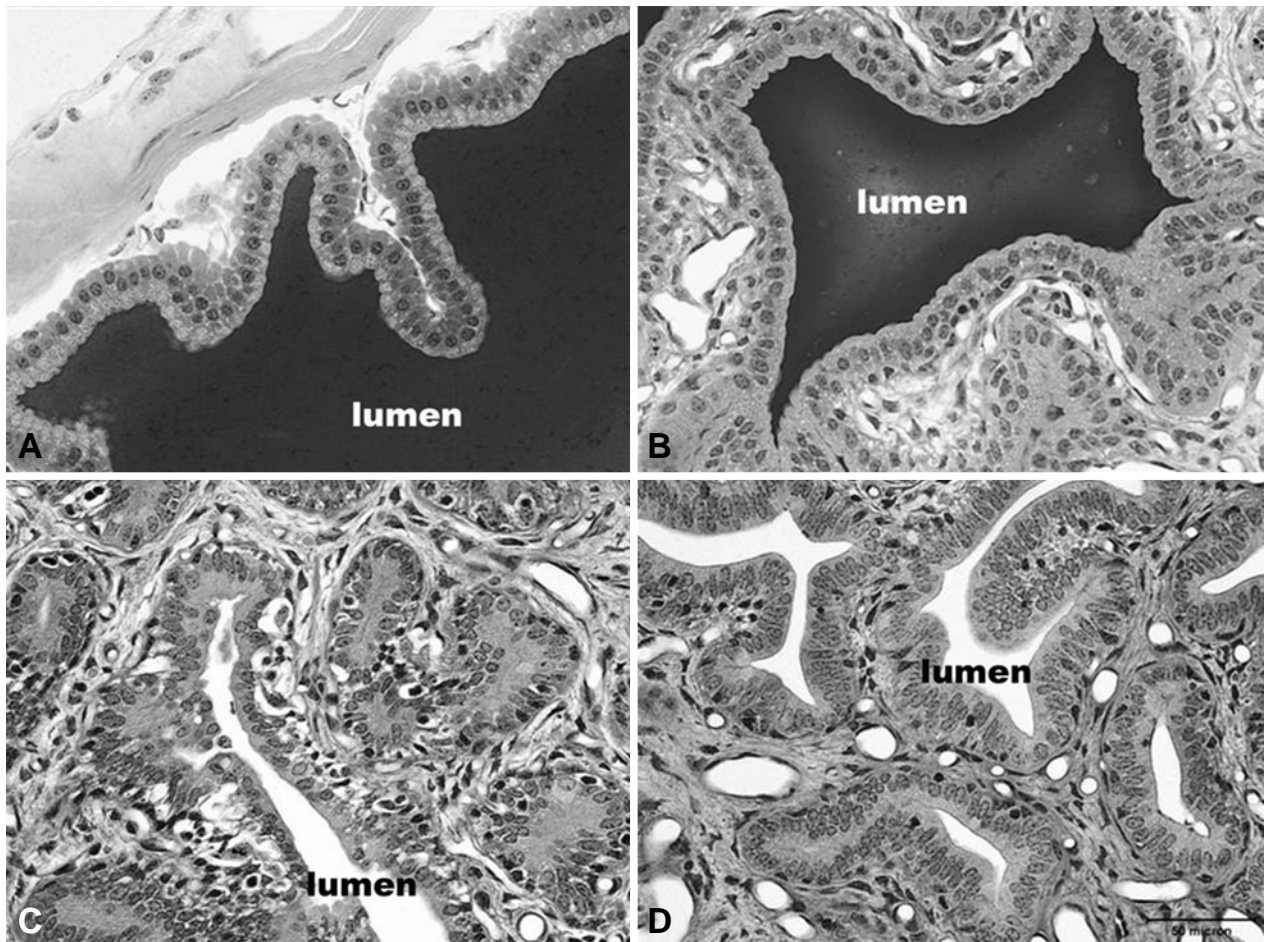
Weight	Group	Week post treatment		
		3	5	8
Ventral prostate (mg)	Control	7.20±1.48	9.62±2.90	8.96±0.99
	PPT	4.87±1.77	2.34±0.42*	2.25±0.31*
Seminal vesicle (g)	Control	0.20±0.04	0.20±0.04	0.24±0.02
	PPT	0.02±0.00*	0.02±0.00*	0.02±0.00*
Preputial gland (mg)	Control	56.30±5.44	65.44±0.19	84.06±4.05
	PPT	41.24±4.52	48.46±3.93*	35.90±2.69*

Values represent mean ± SD.

\*p<0.05 compared with control group



**Fig. 1.** Histologies of the ventral prostate from control on week 3 (A), and PPT treated groups at weeks 3 (B), 5 (C) and 8 (D) posttreatment. Lumen of prostate was narrowed in the treated group compared with control. Therefore, epithelial cells lining the lumen were compacted in the treated mouse. Type of epithelial tissues was changed from simple columnar epithelium to stratified cuboidal or squamous epithelium (arrows) on week 8 post treatment. Connective tissue underlying epithelium was increased on week 5 and 8 post treatment. Bar size indicates 50  $\mu$ m.



**Fig. 2.** Histologies of the seminal vesicle from control on week 3 (A), and PPT treated groups at weeks 3 (B), 5 (C) and 8 (D) posttreatment. Lumen of seminal vesicle was narrowed in the treated group compared with control. PAS-positive materials in the lumen of seminal vesicle were not appeared at weeks 5 and 8 posttreatment. The nucleus shape of epithelial cells surrounding lumen was changed from round to spindle types in the treated group. Bar size indicates 50  $\mu$ m.

서 중층상피로 변한 부위가 나타나기도 하였다.

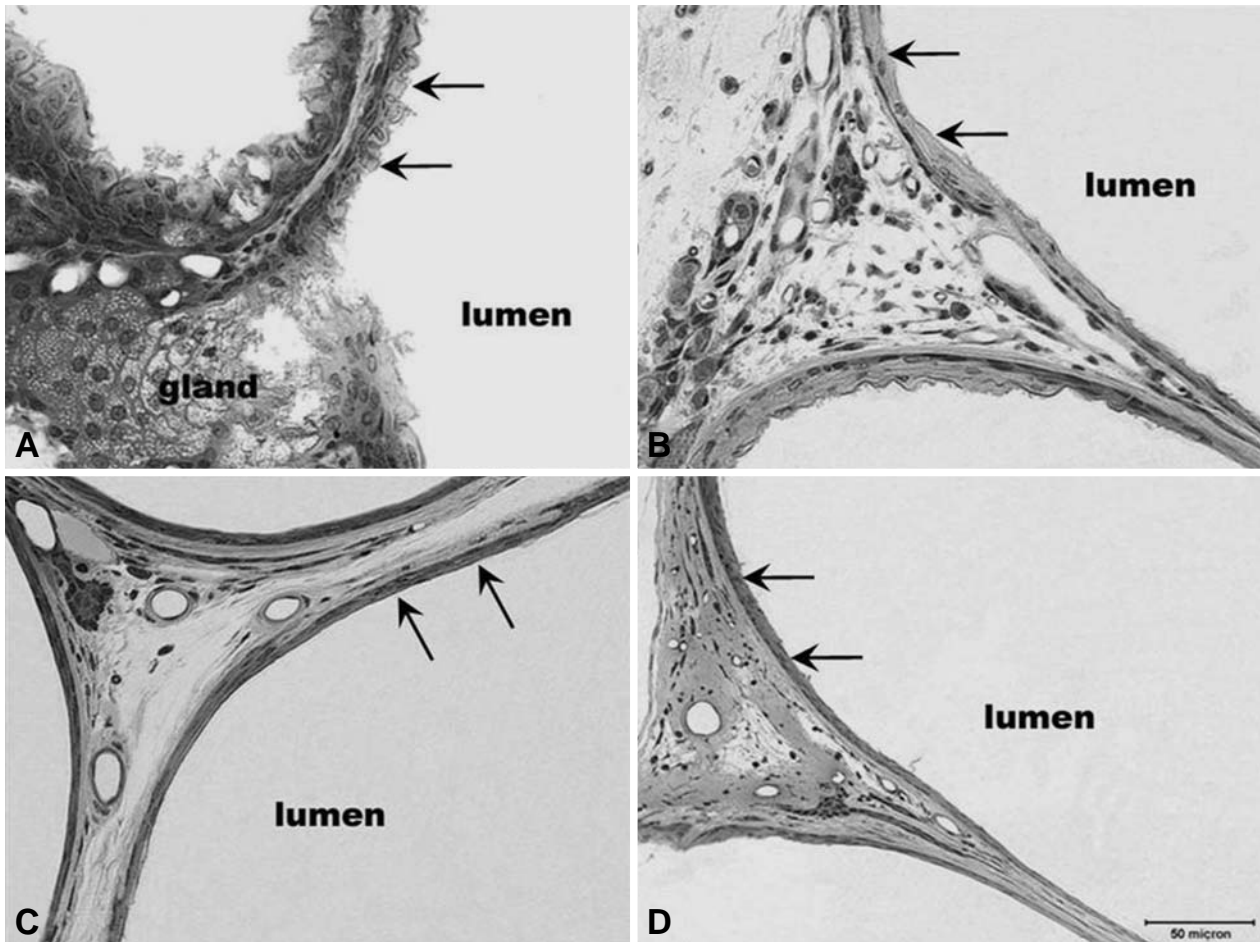
정낭조직을 현미경으로 관찰한 결과, 3주째 대조군의 경우 분비성 상피세포로 둘러싸인 관의 내강에는 실험염색 방법인 PAS에 양성으로 염색되는 물질이 고르게 분포되어 있었다 (Fig. 2). 상피세포의 세포질에는 이들 분비물을 분비하는데 관계있는 소포 (vesicle)가 풍부하게 분포되어 있었다. 그리고 상피세포의 핵은 비교적 원형으로 나타났다. 이런 대조군 정낭의 현미경 양상은 8주째까지 그대로 유지되었다. PPT로 처리한 정낭의 경우, 3주째 정낭 안쪽 관의 내강에는 PAS에 양성으로 염색되는 물질이 감소되어 나타났다. 또한 내강이 좁아지고 따라서 상피조직이 구불구불하게 변화되어 나타났다. 상피세포의 핵 모양도 길쭉한 타원형으로 변화되었으며 상피세포의 세포질 내 소포의 수도 감소되어 나타났다. 처리군 5주와 8주째는 정낭의 내강에 PAS 양성물질이 나타나지 않았으며 내강의 면적이 점점 감소되었다. 시간이 길어질수록 상피세포의 핵이 더욱 길쭉하게

변화되었으며 상피세포 내 소포가 관찰되지 않았다.

대조군 포피샘의 경우, 내강을 둘러싸는 상피조직 아래에 샘을 구성하는 샘조직이 잘 발달되어 있었다. 그리고 샘을 구성하는 세포의 세포질에는 분비와 관련 있는 소포들이 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 3). 처리군 3주째의 경우, 내강이 대조군에 비해 확대되고 내강 주위의 상피세포 높이가 감소되었다. 상피조직 아래의 샘 조직들은 퇴화 위축되었다. 처리군 5주와 8주째의 경우, 포피샘의 내강이 더욱 확대되었으며 상피세포의 높이도 감소되었다. 처리군 정낭의 샘 조직은 퇴화 위축되어 거의 관찰되지 않았다.

## 고 찰

ER 효능제인 PPT를 성체 수컷 생쥐에 1주일 간격으로 피하주사하고, 투여 3주, 5주, 8주 후에 각각 희생시켜 복부



**Fig. 3.** Histologies of the preputial gland from control on week 3 (A), and PPT treated groups at weeks 3 (B), 5 (C) and 8 (D) posttreatment. The treated mouse showed total atrophy of glands in the organ of preputial gland on week 8 post treatment. Epithelial cell height (arrows) lining the lumen was decreased in the treated group. Bar size indicates 50  $\mu$ m.

쪽 전립샘, 정낭, 포피샘과 같은 부속 생식샘 기관의 조직학적 변화를 광학현미경으로 관찰하였다. 실험기간 동안 이들 PPT 투여군의 세 기관은 무게가 감소하는 경향을 보였으며 또한 시간이 갈수록 대조군에 비해 유의하게 무게가 감소되었다. 이에 따라 투여군의 기관을 구성하는 상피조직, 결합조직과 같은 구조에도 변화가 관찰되었다.

일반적으로 생쥐의 전립샘은 상피조직과 기질세포로 구성된 샘 기관이며 호르몬에 의해 조절된다. 전립샘은 방광을 중심으로 여러 개의 엽으로 구성되어 있고 그 붙어 있는 위치에 따라 복부쪽 전립샘, 등쪽 전립샘 (dorsal prostate), 옆쪽 전립샘 (lateral prostate) 그리고 앞쪽 전립샘 (anterior prostate) 엽으로 구분한다. 그리고 이 엽에 따라 에스트로겐과 안드로겐과 같은 호르몬에 대한 민감성이 서로 다른 것으로 알려져 있다 (Risbridger et al., 2001; Jarred et al., 2002). 즉, 복부쪽 전립샘은 안드로겐에 좀 더 민감하고 앞쪽 전립샘은 에스트로겐에 좀 더 민감한 것으로 되어 있다. 흰쥐와

생쥐를 실험재료로 사용하는 경우, 다루기 쉬운 복부쪽 전립샘을 많이 사용하는데 본 실험에서도 마찬가지로 복부쪽 전립샘을 재료로 사용하였다.

실험동물로 많이 사용되는 성체 흰쥐를 재료로 한 실험에서, 전립샘과 정낭의 상피조직에  $ER\beta$ 의 mRNA가 강하게 나타났지만 기질 부위에는 나타나지 않았고  $ER\alpha$ 의 mRNA는 단지 전립샘의 분비관을 둘러싸는 섬유근육층 조직에만 존재하는 것으로 보아 전립샘과 정낭의 상피조직에는  $ER\beta$  타입이 우세하게 존재한다고 하였다 (Mäkelä et al., 2000). 흰쥐 전립샘의 상피조직에  $ER\beta$ 가 우세하게 나타난다는 앞의 결과는 in situ hybridization 방법을 이용한 초기 실험에서도 확인된 바가 있다 (Kuiper et al., 1996). 이처럼 흰쥐의 경우,  $ER\beta$ 가 전립샘 내 상피조직에 우세하게 분포하지만 이  $ER\beta$ 에 의한 생물학적 기능은 아직 잘 모르고 있다 (Taylor et al., 2006). 하지만 생각해 볼 수 있는 것은 상피 세포에 있는  $ER\beta$ 가 기능을 나타내기 위해서는 전립샘의 기질 세포에 있

는 ER $\alpha$ 의 발현이 필요한 것이 아닌가 하는 점이다(Prins et al., 2001). 또 하나는 테스토스테론이 ER $\beta$ 의 조절에 관여하고, 이렇게 조절된 ER $\beta$ 가 이어서 테스토스테론 수용체의 전립샘 성장 작용을 조절하는 것이 아닌가 여겨진다는 것이다(Nilsson et al., 2001). 또 다른 보고에 의하면 ER $\beta$ 가 생쥐의 복부쪽 전립샘 상피세포 분화를 조절하는데, 만약 ER $\beta$ 가 결핍된 생쥐의 경우 상피조직의 과증식 및 불충분한 분화가 야기 된다고 하였다(Imamov et al., 2004).

흰쥐와 생쥐를 동시에 사용하여 비교 실험한 결과, 항체를 이용하여 특정세포를 면역 염색하는 방법을 이용한 실험에서, 생쥐의 복부쪽 전립샘의 상피세포에는 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 가 약하게 존재하지만 흰쥐의 경우, 같은 부위 세포에 ER $\alpha$ 는 존재하지 않은 반면에 ER $\beta$ 는 강하게 존재한다고 하였다(Pelletier et al., 2000; Yamashita, 2004). 흰쥐와는 다르게 성체 생쥐의 경우, 전립샘에 존재하는 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 의 mRNA 평균 발현 정도는 서로 유사하다고 하였으며(Couse et al., 1997; Couse & Korach, 2004) 그 결과 두 종류의 수용체 분포 농도는 유사한 것으로 보인다. 따라서 이런 보고들처럼 같은 기관 내에서도 에스트로겐 수용체 타입의 농도 분포가 서로 다른 것은 동물의 종에 의한 차이로 여겨진다(Mäkelä et al., 2000). 이런 결과는 종과 조직에 따라 에스트로겐 수용체의 분포가 다를 수 있다는 사실을 나타내며, 따라서 수컷 생식기관 내에서 에스트로겐의 생리학적 작용을 파악하는 데에 이 결과를 고려해야 한다는 것을 알 수 있다.

발생 중일 때와 성체 시기 동안의 전립샘에서 에스트로겐의 증식작용은 주로 ER $\alpha$ 를 통하여 일어나는 것으로 알려져 있다(Prins et al., 2001). 그러나 이런 수용체를 통하지 않고도 에스트로겐이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 즉, 유방암 세포주인 MCF-7을 이용한 실험에서 에스트로겐 수용체 매개 작용을 통하지 않고 고농도의 에스트로겐이 세포 증식을 억제하였으며 반대로 낮은 농도의 에스트로겐은 세포 증식을 자극하였다고 하였다(LaVallee et al., 2002). 이런 결과처럼 수용체를 매개하지 않고 어떤 방식으로 에스트로겐이 조직학적 변화를 유발하는 지에 대하여는 잘 모르고 있다.

본 실험의 경우 전립샘 분비물이 생성되어 저장되어 있는 내강이 투여군에서는 축소되어 나타났으며 내강을 둘러싸는 상피세포의 형태가 대조군의 원주 모양에서 투여군에서는 입방 형태로 변화되어 나타났다. 또 상피조직의 일부 부분에서는 원래의 단층 구조에서 두층 혹은 그 이상의 층수 구조로 변화되기도 하였다. 이런 상피조직의 변화는 에스트로겐을 투여하여 실험한 기존의 논문에서도 보고되고 있다. 즉, 에스트로겐은 단독으로 혹은 안드로겐과 상호작용하여 전립샘의 비정상적인 성장이나 혹은 악성적인 상태를 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다(Cunha et al., 2001). 즉, 에스트로겐은 전립샘의 성장과 분화에 억제와 자극 효과 2가

지를 모두 나타낸다고 하였다(Lau et al., 1998). 고농도의 에스트로겐은 in vivo와 in vitro 모두에서 전립샘 성장을 저해하는 것으로도 알려져 있다(Taylor et al., 2006). 즉, 전립샘을 기관배양(organ culture)하는 실험에서, PPT가 전립샘 성장을 저해하고 샘의 조직을 파괴하여 상피조직과 기질 부위의 세포 분화를 변화시키는 것으로 나타났다. 이와 유사하게 출생 초기의 흰쥐 전립샘을 재료로 기관배양하면서 고농도의 에스트로겐을 투여하는 경우에도 전립샘의 성장이 억제된다고 하였다(Jarred et al., 2000). 생쥐에 3주 동안 합성 에스트로겐인 diethylstilbestrol (DES)을 투여하면 전립샘의 원주상피조직이 편평상피조직으로 바뀌게 되며 여기에는 ER $\alpha$ 가 진밀하게 관여한다고 하였다(Cunha et al., 2001; Risbridger et al., 2001). 또한 전립샘의 경우, 단층 원주상피조직에서 중층 편평상피 조직으로 변화한다고 하였는데, 이런 보고는 본 실험의 결과와 유사한 양상을 나타내었다.

보통 글리코겐, 점액물질과 같은 탄수화물이 PAS 염색법에 자색으로 염색되어 나타나는데 본 실험에서는 대조군 전립샘 내강에 PAS에 염색되는 물질이 고르게 분포되어 있었다. 투여군에서는 내강의 PAS 양성 물질이 대조군에 비해 더 강하게 염색되어 나타났는데 이는 PPT에 의해 전립샘 분비물 성분이나 양이 변화되었다는 것을 말한다. 즉, PPT에 의해 분비물을 분비하는 내강 주위의 상피세포에 변화가 유발되고 이로 인해 분비물 성분에 변화가 일어난 것이 아닌가 여겨진다.

ER $\beta$ 는 정낭, 전립샘을 구성하는 상피세포에 많이 존재하지만 ER $\alpha$ 는 이들 기관에 존재하지 않는다고 하였다(Saunders et al., 1997; Lau et al., 1998; Mäkelä et al., 2000). 이와는 다르게 면역세포염색을 이용한 방법에서, 생쥐 정낭 상피세포에 ER $\alpha$ 가 매우 약하게 나타난 반면 ER $\beta$ 는 나타나지 않았고, Wistar 흰쥐 정낭 상피세포의 경우, 이와 반대로 ER $\alpha$ 는 나타나지 않았고 ER $\beta$ 는 매우 약하게 나타났다고 하였다(Yamashita, 2004). 그러나 Sprague-Dawley (SD) 흰쥐의 경우에 정낭의 상피세포에 ER $\alpha$ 가 확인되기도(Pelletier et al., 2000) 하였는데 이처럼 수용체의 분포에 차이가 나는 것은 사용한 실험동물의 계통이나 혹은 실험기법에 따른 차이로 보인다.

본 실험에서 대조군 정낭을 현미경으로 관찰해 보면 내강 주위를 따라서 단층으로 된 상피조직이 잘 관찰되었다. 그러나 PPT 투여군에서는 내강의 면적이 실험기간이 길어질수록 점점 좁아졌고 상피세포의 핵도 원형에서 타원형 혹은 길쭉한 모양으로 변화되었다. 그리고 대조군에 비해 정낭의 무게도 실험기간이 길어질수록 점점 감소되었다. 기관 무게와 연관된 보고로는 DES를 성체 수컷 흰쥐에 투여했을 때도 정낭의 무게가 감소되었다고 하였는데(Goyal et al., 2001) 이는 본 실험과 같은 결과를 나타내었다. 따라서 고농도의 에스트로겐을 성체 수컷에 투여하면 정낭을 비롯

한 정소, 부정소, 전립샘 등의 기관 무게 감소와 더불어 테스토스테론 농도도 감소되는 것으로 알려져 있다(Kanet et al., 1999). 그러나 저농도의 DES를 투여할 경우, 오히려 자극효과를 나타내어 정소를 비롯한 정낭의 무게가 증가하는 것으로 알려져 있다(Goyal et al., 2003). 즉 10 µg의 고농도 DES를 흰쥐에 투여하면 정소나 정낭의 무게가 감소하였고 1 ng의 저농도 DES를 투여하면 이들 기관의 무게가 증가하였다고 하였다. 본 실험의 경우, 한번에 PPT 4 mg을 투여하였기 때문에 아주 고농도로 주입된 셈이며 따라서 고농도 DES 투여처럼 정낭의 조직에 억제 효과를 나타낸 것으로 보인다. 또한 생식기관의 기능을 위축시키거나 파괴하는 에스트로겐의 작용은 실험동물의 계통에 따라 다르게 나타난다고 하였다. 즉 SD 계통의 흰쥐가 Wistar 계통의 흰쥐에 비해 에스트로겐의 작용에 덜 민감하여 영향을 적게 받는 것으로 밝혀져 있다(Goyal et al., 2003). 이런 면에서 보면 실험을 할 때 혹은 실험결과를 해석할 때 투여하는 물질의 농도, 실험동물의 종류 등이 중요한 고려 대상이 될 수 있음을 의미한다.

생후 2일째의 흰쥐 수컷을 대상으로 하여 이들 간격으로 DES를 12일째까지 피하주사 후에 희생시켜 조직학적으로 관찰해 보면 정낭 상피조직의 양이 감소되어 있다고 보고하였다(Williams et al., 2001). 비록 성체가 아닌 신생 흰쥐에 투여하여 얻은 결과이지만 본 실험의 PPT 투여군에서 얻은 성적인 내강이 축소됨으로서 내강 주위에 있는 정낭 상피조직이 줄어든 결과와 유사한 양상을 보였다고 할 수 있다. 성체 수컷 생쥐(BALB/c)를 거세하고 16일 후에 정낭의 상피세포가 원주에서 입방 모양으로 변화됨과 동시에 이런 세포로 구성된 상피조직도 위축되는 것으로 보아 검출되지 않을 정도로 낮은 농도의 테스토스테론과 연관 있을 것으로 보고하였다. 즉, 거세로 인해 테스토스테론 합성이 안 되고 이에 따라 상피세포의 apoptosis가 유발되어 상피조직이 위축되는 것으로 보고하였다(Tsuji et al., 1998). 이와 반대로 αERKO 수컷 생쥐의 경우, 초기(4~5개월)의 실험기간에 비해 말기(18~22개월)로 갈수록 정낭의 무게가 증가하였다. 이런 현상은 αERKO 수컷 생쥐의 경우 혈청 테스토스테론 농도가 증가되어 있는데(Jarred et al., 2002) 이 테스토스테론 호르몬이 지속적으로 정낭에 자극을 가하여 나타난 결과로 보인다고 하였다(Couse & Korach, 1999). 이와 유사한 결과로서, 성체 수컷 흰쥐에 테스토스테론을 투여하였을 때도 정낭의 무게가 증가된다는 것이 알려져 있다(Gonzales et al., 2005). 호르몬 농도 변화와 관련된 보고에 의하면, 성체 수컷 흰쥐에 10일 동안 매일 estradiol을 피하주사한 실험의 경우에도 생식력 감소뿐만 아니라 전립샘과 정낭의 무게가 유의하게 감소되고 혈청 테스토스테론 농도도 76.5%가 감소되었다고 하였다(Aleem et al., 2006). 생후 2일째부터 이들 간격으로 12일째까지 DES를 흰쥐에 피

하주사한 다음 성체 시기인 75일~90일경에 희생시켜 정소의 무게를 측정해 보면 대조군에 비해 유의하게 감소되고 또한 혈장 테스토스테론 농도도 감소된다고 하였다(Atanasova et al., 1999). 생후 초기에 DES를 투여하면 성체가 되어도 생식력과 함께 테스토스테론 농도가 감소가 된다는 것은 다른 연구자들에 의해서도 밝혀져 있다(Goyal et al., 2004). 에스트로겐을 투여한 기존의 보고된 결과와 본 실험에서처럼 ER 효능제인 PPT를 투여한 결과를 조직학적인 내용 면에서 보면 같은 양상을 보였기 때문에 PPT에 의해 테스토스테론 농도가 감소될 것으로 예상되지만 추후 이 호르몬 농도 실험을 통해 좀 더 명확하게 확인할 수 있을 것으로 생각된다. 이런 결과로 볼 때 정낭 조직은 에스트로겐과 테스토스테론의 영향을 모두 다 받는 것으로 보인다. 전립샘 투여군의 경우에는 내강에 PAS 양성물질이 강하게 염색되어 나타났는데 이와 반대로, 투여 후 5주와 8주 정낭의 내강에는 PAS 양성물질이 나타나지 않았다. 이처럼 분비샘 기관 종류에 따라 PPT에 의해 다르게 영향을 받는 것으로 보인다.

포피샘은 단순 관-포상샘 (simple tubuloacinar gland)이며 전분비 방식으로 분비물을 배출하는 샘 기관이다(Ago et al., 1995). 본 실험에서는 PPT에 의해 포피샘의 무게도 감소되고 내강 주위 상피세포 높이도 감소되었다. 또한 분비물을 합성하여 분비하는 상피조직 아래의 샘 조직도 퇴화 위축되었다. 이런 변화와 연관된 보고로는 세포의 대사조절, 분화, 증식, 세포막 기능의 조절 등에 중요한 역할을 하는 ornithine decarboxylase 효소가 있는데, 이 효소의 활성을 변화시켜서 형질 전환된 생쥐의 경우, 포피샘의 조직학적 구조가 변화된다고 하였다(Kilpeläinen et al., 2001). 즉, 형질 전환된 생쥐의 경우, 포피샘의 샘 조직이 흔적적으로 되거나 혹은 내강과 접하는 상피조직이 다층화 되고 각화되기도 한다고 보고하였다. 본 실험과 조직학적 결과는 유사하지만 이런 효소와 ER 효능제와의 관련성은 현재로서는 확인할 수 없는 형편이다.

결론적으로, ER 효능제인 PPT를 성체 수컷 생쥐에 고농도로 투여하면 전립샘, 정낭, 포피샘 같은 부속 생식샘의 무게 감소가 유발되며, 특히 상피와 같은 조직에서 위축되는 효과가 관찰되었다. 이 결과는 합성 에스트로겐을 고농도로 투여했을 때 나온 기존의 보고와 유사하였다. 따라서 본 실험의 ER 효능제 투여와 기존의 에스트로겐 투여로 인한 수컷 생식기관의 조직학적 변화는 유사하였다고 할 수 있다. PPT에 의한 이런 조직학적 변화를 분석함으로써 에스트로겐이 성체 수컷 생식기관 내에서 수용체 알파의 매개에 의해 나타내는 여러 가지 생리학적 기능, 예를 들면 부속 생식샘의 상피를 구성하는 세포의 분화와 골격구조, 분비물의 양 조절, 수컷 생식력 등을 이해하는 데에 본 실험의 결과들이 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 고농도

의 ER 효능제 투여는 조직학적으로 부속샘의 비정상적 상태를 유발하는 것으로 나타나, 실험 시에 PPT 농도가 중요한 고려 대상이 될 수 있음을 제시하고 있다.

## 참 고 문 헌

- Ago A, Gonda T, Kawakami K, Sahata H: Morphological studies on preputial gland of mice. 1. Light and transmission electron microscopic observations of preputial gland in male mice. *Exp Anim* 43 : 645-649, 1995.
- Aleem M, Padwal V, Choudhari J, Balasinor N, Parte P, Gill-Sharma MK: Estradiol affects androgen-binding protein expression and fertilizing ability of spermatozoa in adult male rats. *Mol Cell Endocrinol* 253 : 1-13, 2006.
- Atanassova N, McKinnell C, Walker M, Turner KJ, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM: Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinol* 140 : 5364-5373, 1999.
- 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.
- 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, Korach KS: Estrogen receptor- $\alpha$  mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract. *Toxicol* 205 : 55-63, 2004.
- Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS: Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinol* 138 : 4613-4621, 1997.
- Cunha GR, Wang YZ, Hayward SW, Risbridger GP: Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reprod Fertil Dev* 13 : 285-296, 2001.
- Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, Fernandez G, Yucra S, Rubio J, Yi P, Gasco M: Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 3 : 5, 2005.
- 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.
- Goyal HO, Braden TD, Williams CS, Dalvi P, Williams JW, Srivastava KK: Exposure of neonatal male rats to estrogen induces abnormal morphology of the penis and loss of fertility. *Reprod Toxicol* 18 : 265-274, 2004.
- Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K: Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biol Reprod* 68 : 2081-2091, 2003.
- Han HJ, Jung JC, Taub M: Response of primary rabbit kidney proximal tubule cells to estrogens. *J Cell Physiol* 178 : 35-43, 1999.
- Hess RA: Estrogen in the adult male reproductive tract. *Reprod Biol Endocrinol* 1 : 52, 2003.
- 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.
- Imamov O, Morani A, Shim GJ, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, Gustafsson JA: Estrogen receptor  $\beta$  regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *PNAS* 101 : 9375-9380, 2004.
- Jarred RA, Cancilia B, Prins GS, Thayer KA, Cunha GR, Risbridger GP: Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development. *Endocrinol* 141 : 3471-3477, 2000.
- Jarred RA, McPherson SJ, Bianco JJ, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP: Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice. *Trends in Endocrinol & Metabolism* 13 : 163-168, 2002.
- Kaneto M, Kanamori S, Hishikawa A, Kishi K: Epidermal sperm motion as a parameter of male reproductive toxicity: sperm motion, fertility, and histopathology in ethinylestradiol-treated rats. *Reprod Toxicol* 13 : 279-289, 1999.
- Kilpeläinen PT, Saaremies J, Kontusaari SI, Järvinen MJ, Peralta Soler A, Kallionen MJ, Hietala OA: Abnormal ornithine decarboxylase activity in transgenic mice increases tumor formation and infertility. *IJBCB* 33 : 507-520, 2001.
- Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS* 93 : 5925-5930, 1996.
- Lau KM, Leav I, Ho SM: Rat estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$ , and progesterone receptor mRNA expression in various prostatic lobes and microdissected normal and dysplastic epithelial tissues of the Noble rats. *Endocrinol* 139 : 424-427, 1998.
- LaValle TM, Zhan XH, Herbstritt CJ, Kough EC, Green SJ, Pribluda VS: 2-methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Cancer Res* 62 : 3691-3697, 2002.
- Mäkelä S, Strauss L, Kuiper G, Valve E, Salmi S, Santti R, Gustafsson JA: Differential expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol Cell Endocrinol* 164 : 109-116, 2000.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA: Mechanism of estrogen action. *Physiol Rev* 81 : 1535-1565, 2001.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER: Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Rev* 22 : 289-318, 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. *Rep-*



- rod Biol Endocrinol 1 : 75, 2003.
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F: Localization of oestrogen receptor  $\alpha$ , oestrogen receptor  $\beta$  and androgen receptors in the rat reproductive organs. J Endocrinol 165 : 359-370, 2000.
- Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS: Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor  $\alpha$ : Studies with  $\alpha$ ERKO and  $\beta$ ERKO mice. Cancer Res 61 : 6089-6097, 2001.
- Risbridger GP, Wang H, Frydenberg M, Cunha G: The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: Proliferation of cells with basal cell phenotype. Endocrinol 142 : 2443-2450, 2001.
- Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR: Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualized by immunohistochemistry. J Endocrinol 154 : R13-16, 1997.
- 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- $\alpha$ -selective agonists. J Med Chem 43 : 4934-4947, 2000.
- Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS: Antagonists selective for estrogen receptor  $\alpha$ . Endocrinol 143 : 941-947, 2002.
- Taylor RA, Cowin P, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP: 17 $\beta$ -estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ER $\alpha$  or ER $\beta$ . Endocrinol 147 : 191-200, 2006.
- Toft D, Gorski J: A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. PNAS 55 : 1574-1581, 1966.
- Tsuji M, Terada N, Sugihara A, Tsujimura T, Donjacour AA, Cunha GR: Later onset of apoptosis in the bulbourethral glands after castration compared to that in the seminal vesicles. J Steroid Biochem Mol Biol 67 : 113-118, 1998.
- Williams K, Fisher JS, Turner KJ, McKinnell C, Saunders PTK, Sharpe RM: Relationship between expression of sex steroid receptors and structure of the seminal vesicles after neonatal treatment of rats with potent or weak estrogens. Environ Health Perspect 109 : 1227-1235, 2001.
- Yamashita S: Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. Anat Rec 279A : 768-778, 2004.

### < 국문초록 >

본 연구에서는 에스트로겐 수용체 알파 효능제인 propyl pyrazole triol (PPT)을 수컷 생쥐에 투여하였을 때 부속 생식샘의 조직학적 변화가 유발되는지를 조사하였다. 광학현미경으로 조사하기 위해 수컷 생식기관을 고정, 탈수, 포매, 절편 과정을 거쳐 프레파라트를 완성하였다. PPT에 의해 복부쪽 전립샘, 정낭, 포피샘의 각 무게는 실험기간에 따라 감소되었다. 투여군의 경우, 복부쪽 전립샘의 샘 조직 내강은 위축되었다. 전립샘 상피조직의 형태가 단층 원주상피에서 중층 입방 상피 혹은 편평상피로 변화되었다. 투여군 전립샘과 정낭의 상피조직 아래에 있는 결합조직은 증가되었다. 특히, 투여군 정낭의 내강이 대조군에 비해 위축되었다. 포피샘의 투여군 8주에서 상피세포 높이가 감소되었다. 수컷 내에서 에스트로겐 수용체 효능제의 이런 영향을 파악함으로써 생식기관 내 에스트로겐의 생리학적 기능을 이해하는데에 도움을 줄 것으로 사료된다.