

수컷 생쥐 생식기관의 형태에 미치는 에스트로겐 수용체 알파의 선택적 촉진제의 농도별 영향

한 지 연, 조 영 국¹, 조 현 옥*

순천대학교 생명산업과학대학 생물학과, ¹서강정보대학 임상병리과

Concentration Effect of Estrogen Receptor- α Selective Agonist on the Morphology of Reproductive Organs of the Male Mice

Ji Yeon Han, Young Kuk Cho¹, Hyun Wook Cho*

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

¹Department of Clinical Pathology, Seokang University, Gwangju 500-742, Korea

(Received March 7, 2011; Revised March 22, 2011; Accepted March 23, 2011)

ABSTRACT

Known as a female hormone, estrogen, has an effect on the male reproductive organs. The estrogen has to combine with the estrogen receptor to communicate a signal. Propyl pyrazole triol (PPT) is an estrogen receptor alpha selective agonist with a 410-, or 1,000-fold relative binding affinity for estrogen receptor alpha versus estrogen receptor beta. In this study, adult male mice were treated weekly with subcutaneously injections of PPT (0.01 mg, 0.1 mg, 1mg and 4 mg) suspended in castor oil (as control) for 8 weeks and observed histologically changes in testis, efferent ductule and epididymis. In the high concentrations of PPT 4 mg treatment group, a remarkable reduction was observed in the weight of the body, testis and epididymis. Microscopic examination revealed a reduction in seminiferous tubular diameter of the testis, and epithelial cell height of the epididymis in treated group during the experiment. In addition, as the diameter of the efferent ductule increased gradually, the height of epithelial cells was decreased. PPT 4 mg treatment group caused inhibition of spermatogenesis due to atrophied germinal epithelium in the testis, and decrease of adipocyte size attached to the epididymis. Sperm was not observed in the caudal epididymis of PPT 4 mg treated group. In conclusion, the injection of high concentrations of PPT into adult male mice induced physiological changes, such as an inhibition of spermatogenesis, and also histological changes within the reproductive organs.

Keywords : Estrogen receptor agonist, Testis, Efferent ductule, Epididymis, Fertility, Mouse

서 론

일반적으로 에스트로겐이 암컷 호르몬이라는 인식하에서

그 생식생리학적 기능에 대한 연구는 대부분 암컷 생식기관에서 활발히 수행되었다. 이렇게 암컷 호르몬으로 알려져 있는 에스트로겐이 수컷 생쥐의 생식 기관에서 존재가 밝혀진 것은 1930년대이며 (Burrows, 1935), 이후 에스트로겐이 수컷

이 논문은 순천대학교 2010학년도 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

의 정소, 부정소, 수출소관, 전립샘 등과 같은 수컷 생식계에도 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다(Hess et al., 1997; Taylor & Al-Azzawi, 2000; Cho et al., 2003).

생체 내 에스트로겐은 testosterone과 androstenedione이 aromatization을 통해 각각 estradiol과 estrone으로 전환되어 형성되는데, 이 과정을 중재하는 효소가 P450 mono-oxygenase 효소 복합체이다. P450 aromatase는 CYP19 유전자의 생산물로서 최소 16개의 exon으로 구성되어 있으며, 사람의 경우 15번 염색체에 위치해 있다(O'donnell et al., 2001). 이렇게 형성된 에스트로겐은 목표세포에 도달하여 단순확산에 의해 목표세포 내로 들어가, 핵 내에 존재하는 전사인자인 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)를 통하여 표적 유전자의 전사 활성도에 영향을 미침으로써 그 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다(Han et al., 1999). 1960년대 ER이 확인되었고(Toft & Gorski, 1966), 1990년대 중반에 각기 다른 염색체상에 존재하는 또 다른 형태의 ER이 밝혀졌다(Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Tremblay et al., 1997). 이에 따라 전자의 수용체를 ER 알파(estrogen receptor alpha, ER α), 후자를 ER 베타(estrogen receptor beta, ER β)라고 명명하게 되었다(Couse & Korach, 1999).

설치류에서 ER α 와 ER β 는 태아기, 신생아기, 사춘기, 성체에 이르기 까지 전 시기에 걸쳐 정소의 Leydig cell에서 발현되며(van Pelt et al., 1999; Nielsen et al., 2000), ER β 의 경우 정소세포로부터 사정된 정자까지의 거의 전 단계에서 발현된다고 하였다(Aquila et al., 2004; Delbes et al., 2004). 에스트로겐이 설치류 정자형성과정에 중요한 역할을 담당함은 잘 알려진 사실이다(O'Donnell et al., 2001). 또한 ER이 생식기능과 연관된 기관에만 존재하는 것이 아니라 다양한 기관이나 조직에도 분포한다. 사람의 경우, 거의 모든 기관계의 조직에 ER이 분포하는데, 중추신경계, 순환계, 소화계, 비뇨계 그리고 내분비계 및 호흡계 등의 세포와 조직에 ER이 존재하는 것으로 알려져 있다(Taylor & Al-Azzawi, 2000).

이러한 ER에 대하여 연구하는 것은 궁극적으로 동물 체내 에스트로겐의 기능을 규명하기 위한 방법의 일환이며 이를 위해 ER를 knock-out시킨 ERKO(estrogen receptor knock-out)와 같은 생쥐를 사용하거나(Couse & Korach, 1999; Hess, 2003) 혹은 ICI 182,780 같은 항에스트로겐을 투여하여 연구하기도 한다(Oliveira et al., 2001, 2003; Cho et al., 2003). 항에스트로겐은 ER과 경쟁적으로 작용하여 에스트로겐의 기능을 억제하는데 사용되며, 다양한 종류의 항에스트로겐 중 하나인 ICI 182,780은 ER과 작용하여 그 효과를 나타낸다. 또한 선택적 ER 조절제(selective estrogen receptor modulator, SERM)를 이용하여 에스트로겐의 효과를 이해하는데 많은 도움을 받고 있다(Kraichely et al., 2000; Cappon et al., 2004). SERM은 구조적으로 다양한 비스테로이드 ER 리간드이고 촉진제/억제제 활성을 갖고 있으며 ER과의 상호 작용을 통

해 활성을 나타낸다(Shiau et al., 1998). 특정 조직에 따라 효과가 다른 SERM의 단점을 극복하기 위하여 더 효과 있고 안전한 SERM을 개발하는 노력이 활발하게 진행되고 있다.

본 실험에서 사용한 SERM의 한 종류인 PPT(propyl pyrazole triol)는 ER 촉진제로서 ER β 보다 ER α 와 410배 혹은 1,000배 높은 친화성으로 결합하는 것으로 알려져 있다(Stauffer et al., 2000; Sun et al., 2002). 수컷 생쥐 부속 생식샘과 암컷 생쥐의 생식기관에 미치는 PPT의 영향을 이미 보고한 바 있다(Han & Cho, 2009; Lee et al., 2009). 기존의 보고와 연관지어, 본 연구에서는 ER α 촉진제인 PPT를 장기간 농도별로 투여함으로써 PPT가 정소, 수출소관, 부정소에 미치는 생리학적이고 형태학적인 기초 자료를 제공하고자 한다. 에스트로겐의 농도별 영향을 확인함으로써, 에스트로겐이 수컷 생체 내에서 어떤 다양한 역할을 하고 있는지 그 기능을 규명하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 처리

실험동물은 10주령 된 평균체중 22g의 수컷 생쥐 C57BL/6를 (주)오리엔트 바이오 회사로부터 구입하여 사용하였다. 실험기간 동안 고품사료와 물을 무제한으로 공급하였다. 사육실은 22±2°C와 상대습도 50±5%를 유지 하였으며 조명시간은 12시간을 주기로 하였다.

성체 수컷 생쥐를 무작위로 대조군과 PPT 농도별 처리군으로 지정하였다. 처리군은 Tocris 회사의 PPT(4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)tris-pheol)를 농도에 따라 4군으로 나누었다. 농도별 4군의 경우, PPT를 0.01 mg, 0.1 mg, 1.0 mg 그리고 4.0 mg을 각각 castor oil 0.3 mL에 vortex로 희석한 다음 매주 1회씩 PPT 농도군 별로 등쪽 목덜미에 8주 동안 피하주사 하였다. 대조군의 경우 0.3 mL의 castor oil만을 매주 1회씩 8주 동안 피하주사 하였다.

대조군과 처리군의 생쥐는 투여 후 8주째에 생쥐를 관류시켜 희생 하였다. 즉, 8주째 대조군 4마리, PPT 0.01 mg 처리군 4마리, 0.1 mg 처리군 4마리, 1 mg 처리군 4마리, 4 mg 처리군 4마리로 도합 20 마리의 생쥐를 관류희생 하였다. 관류희생 할 때 생쥐 한 마리마다 헤파린(heparin) 0.1 mL를 먼저 주입하고 다음에 sodium pentobarbital 0.1 mL를 주입하여 마취 시켰다. 마취시킨 생쥐의 체중을 측정하였다. 그 후 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.4)에 용해한 4% glutaraldehyde를 생쥐의 좌심실에 관류용 바늘로 찔러 넣어 peristaltic pump로 20분간 관류시켰다.

관류희생 시킨 생쥐를 해부하고 필요한 기관을 적출하였다. 기관의 무게를 측정하기 위해 붙어 있던 지방조직을 최대한 제거하고, 이어서 각각의 기관을 여과지에 올려 물기를

제거한 다음 1개의 정소, 수출소관, 부정소 무게를 측정하였다. 적출한 기관 및 부정소에 붙어 있던 지방조직을 조직 표본으로 이용 할 때까지 관류용액과 동일한 4°C의 고정액에 보관 하였다. 절편을 만들기 위해, 조직을 0.01M phosphate buffer (pH 7.4)로 세척하고 vaccum을 이용하여 4°C의 70% (2회), 80% (1회), 95% (2회), 100% (3회) ethanol에 1시간 간격으로 탈수 시킨 후 infiltration solution에 24시간 동안 4회의 처리 과정을 거친 다음 glycol methacrylate에 포매하였다. 마이크로톰을 이용하여 2.5 µm 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, Schiff용액에 45분, sulfurous acid에 3회씩 각각 5분, 흐르는 물에 20분, hematoxylin에 35분, 그리고 마지막으로 흐르는 물에 10분을 두었다가 꺼낸 다음 35°C의 slide warmer에서 절편을 건조시킨 다음 Permount로 봉입하여 프레파라트를 완성하였다.

2. 사진촬영 및 분석

염색한 프레파라트를 현미경으로 관찰하고 현미경(Olympus BX50)에 설치된 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 각 기관을 측정하였다.

정소 세정관의 직경은 가운데를 중심으로 가장 짧은 직경, 즉 단경을 한 마리마다 30회 측정하였고, 정소를 둘러싸고 있는 백막(tunica albuginea)의 두께 역시 한 정소마다 30회 측정하였다.

수출소관의 변화를 확인하기 위해, 내강의 가장 짧은 직경, 즉 단경을 한 부정소마다 30회 측정하였다. 수출소관을 이루는 상피세포 높이 변화를 확인하기 위해 비섬모세포(non-ciliated cell)의 기저막에서부터 솔가장자리 (brush border)까지 높이를 역시 30회 측정하였다.

부정소의 머리 부분인 initial segment와 caput의 상피세포 높이를 한 부정소마다 30회 측정하였다. 정자의 농도변화를

확인하기 위해 부정소의 꼬리부분의 면적 2,500 µm²에 있는 정자의 두부 수를 30회 측정하였다. 지방조직의 변화를 알기 위해, 부정소에 붙어 있던 지방세포 30개의 면적을 측정하였다. 실험 결과의 통계학적 분석은 ANOVA Test를 이용하여 P value 0.05 미만을 의미 있는 것으로 판별하였다.

결 과

1. 체중 및 생식기관의 무게변화

SERM의 한 종류인 ERα 촉진제 PPT를 8주 동안 투여하여 수컷 생쥐의 체중을 확인한 결과 대조군과 PPT 0.01 mg, 0.1 mg 처리군의 차이가 보이지 않았으나, 고농도 PPT 4 mg 처리군의 경우 투여기간이 길어질수록 대조군에 비해 유의하게 감소되었다. PPT 4 mg 투여군의 경우, 외부 형태적으로

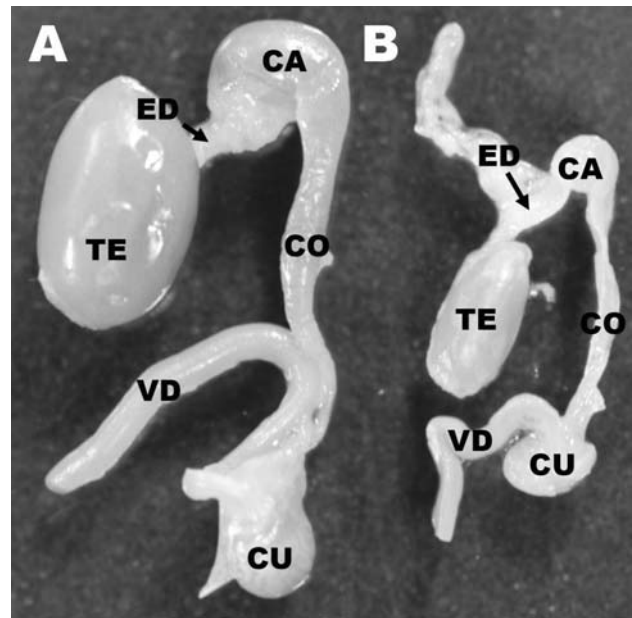


Fig. 1. Photographs of the male reproductive organs treated with castor oil (control, A) and PPT 4 mg (B) on week 8 post treatment. The PPT treated organs were atrophied markedly. CA, caput epididymis; CO, corpus epididymis; CU, caudal epididymis; ED, efferent ductule; TE, testis; VD, vas deferens.

Table 1. Effects of PPT on body and reproductive organ weight on week 8 post treatment

| Parameter | Control | PPT Group | | | |
|------------------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | | 0.01 mg | 0.1 mg | 1.0 mg | 4.0 mg |
| Body weight (g) | 30.7 ± 1.3 | 23.6 ± 0.5 | 24.4 ± 0.5 | 22.5 ± 1.2* | 21.2 ± 2.1* |
| Testis weight (mg) | 88.2 ± 5.4 | 76.5 ± 5.8 | 76.0 ± 5.0 | 69.5 ± 6.6 | 18.0 ± 3.1* |
| Efferent ductule weight (mg) | 2.5 ± 1.0 | 2.3 ± 0.5 | 2.9 ± 0.8 | 2.3 ± 0.4 | 3.5 ± 2.8* |
| Epididymis weight (mg) | 42.8 ± 4.5 | 32.7 ± 1.0 | 33.3 ± 0.7 | 30.1 ± 0.8 | 9.1 ± 0.4* |

Values represent mean ± SD.

*P < 0.05 compared with control group

Table 2. Testis morphology of control and PPT treated mice

| Parameter | Control | PPT Group | | | |
|---|------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | | 0.01 mg | 0.1 mg | 1.0 mg | 4.0 mg |
| Seminiferous tubular diameter (μm) | 199.9 \pm 10.1 | 192.7 \pm 10.2 | 189.0 \pm 9.6 | 185.7 \pm 8.7* | 90.1 \pm 4.6* |
| Thickness oftunica albuginea (μm) | 19.1 \pm 2.5 | 22.3 \pm 4.0 | 19.1 \pm 2.2 | 20.2 \pm 1.9 | 55.7 \pm 4.8* |

Values represent mean \pm SD.

*P < 0.05 compared with control group

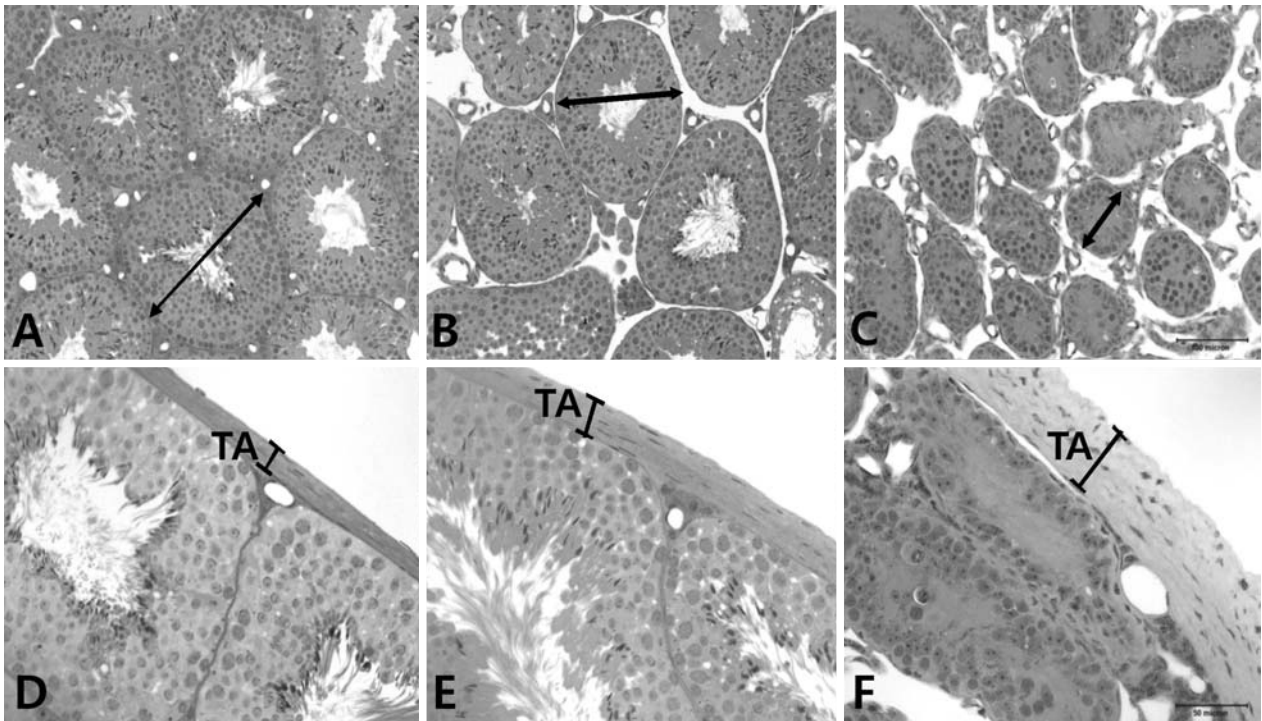


Fig. 2. Micrographs of testis from control (A, D), PPT 1 mg (B, E) and PPT 4 mg treated groups (C, F) on week 8 post treatment. Double arrow indicates the shortest seminiferous tubular diameter. In the PPT 4 mg treated group, germinal epithelium of the seminiferous tubule was markedly atrophied, but the thickness of the tunica albuginea (TA) was increased. Bar size=100 μm (A, B, C) or 50 μm (D, E, F).

도 정소와 부정소의 위축이 두드러지게 관찰되었다(Fig. 1). 생식기관을 외부 형태학적으로 관찰한 결과 대조군의 경우 생식기관은 지방조직에 둘러싸여 보호되는 반면, 고농도의 PPT처리군의 경우 지방조직이 축소되어 나타났다. 생식기관의 무게를 측정된 결과 마찬가지로 정소와 부정소의 경우 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였고, 반면에 수출소관의 경우 PPT 4 mg 투여군에서 무게가 유의하게 증가 되었다(Table 1).

2. 정소의 조직학적 변화

실험기간 중 대조군과 PPT 처리군의 정소의 조직학적 변화를 표로 나타내었다(Table 2). 투여군의 경우, 정자형성을 하는 세정관의 크기를 비교하기 위해 세정관의 단면 직경을

측정한 결과, 세정관의 직경이 PPT 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 2). 이를 조직학적으로 관찰한 결과, 세정관의 경우 PPT의 농도를 4mg처럼 고농도로 투여함에 따라 세정관이 크게 위축되었으며 정자를 형성하는 생식상피 세포들이 퇴화하고, 정자형성이 일어나지 않았다(Fig. 2C, F). 정소를 둘러싸고 있는 백막의 경우, 세정관이 위축되는 것과는 다르게 PPT의 농도를 증가시키기에 따라 두께가 증가 되었다.

3. 수출소관의 조직학적 변화

실험기간 중 대조군과 PPT처리군의 수출소관의 조직학적 변화를 표로 나타내었다(Table 3). 투여군의 경우, 수출소관의 내강의 직경을 측정된 결과 농도 의존적으로 증가하는

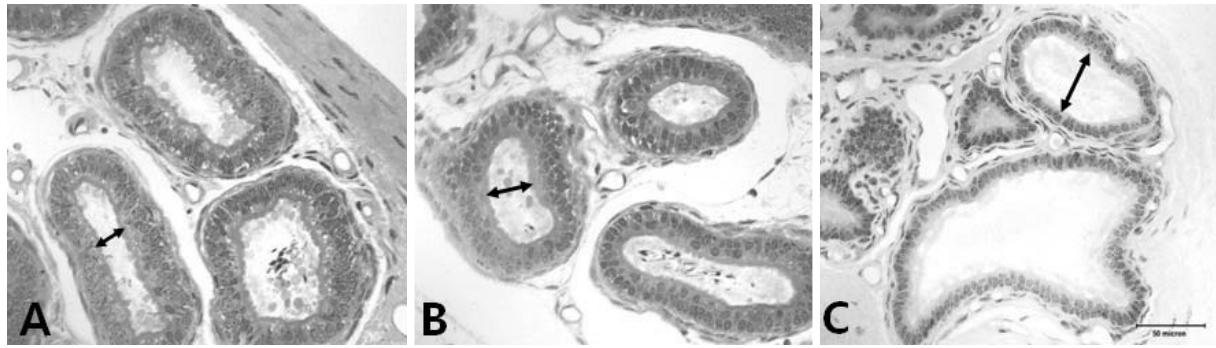


Fig. 3. Micrographs of efferent ductule from control (A), PPT 1 mg (B) and PPT 4 mg (C) treated groups on week 8 post treatment. The tubular diameter(double arrow) was remarkably increased in the PPT 4 mg treated group. The height of the epithelial cell was gradually reduced in the experiment. Bar size=50 µm.

Table 3. Efferent ductule morphology of control and PPT treated mice

| Parameter | Control | PPT Group | | | |
|---|----------|-----------|----------|----------|-----------|
| | | 0.01 mg | 0.1 mg | 1.0 mg | 4.0 mg |
| Tubular diameter of efferent ductule (µm) | 37.8±7.3 | 40.4±7.4 | 40.3±7.6 | 41.2±8.3 | 49.3±9.3* |
| Epithelial cell height (µm) | 19.5±1.1 | 18.6±2.6 | 18.1±1.0 | 18.2±1.5 | 13.6±1.5* |

Values represent mean±SD

*P<0.05 compared with control group

Table 4. Epididymis morphology of control and PPT treated mice

| Parameter | Control | PPT Group | | | |
|-------------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0.01 mg | 0.1 mg | 1.0 mg | 4.0 mg |
| Cell height of initial segment (µm) | 59.3±11.8 | 56.0±2.4 | 53.1±2.4* | 50.7±3.2* | 21.9±1.8* |
| Cell height of caput (µm) | 32.2±0.9 | 28.8±1.4* | 28.3±1.2* | 28.0±1.5* | 16.1±1.9* |
| Sperm number of cauda | 91.8±10.3* | 83.1±8.9* | 82.0±8.4* | 79.2±9.2* | ND |

Values represent mean±SD, ND; Not detected

*P<0.05 compared with control group

경향을 보였고, 상피세포의 높이는 유의하게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 3). 대조군의 경우 주변의 평활근이 얇고, 상피세포 위쪽에 미세섬모가 존재하며, 상피세포의 핵 위쪽 세포질에 있는 vesicle이 잘 관찰되었지만, PPT의 농도가 높아짐에 따라 수출소관의 내강이 증가하였고 상대적으로 상피세포의 높이는 감소되었다(Fig. 3B, C). 또한 처리군의 상피세포의 세포질 내 vesicle이 감소하거나 소실되었다.

4. 부정소와 지방조직의 조직학적 변화

실험기간 중 대조군과 PPT처리군의 부정소의 조직학적 변화를 표로 나타내었다(Table 4). 부정소의 머리 부분인 initial segment부위를 조직학적으로 관찰한 결과, PPT의 농도를 증가시킴에 따라 상피세포의 높이가 감소되었다(Fig. 4). Initial segment부위에 특징적으로 나타나는 상피세포의 부동모(stereocilia) 높이가 감소되었고, PPT 4 mg 투여군의

경우 부동모가 거의 위축되어 소실되었다(Fig. 4C).

부정소의 initial segment부위 아래에 있는 머리 부분인 caput을 조직학적으로 관찰한 결과, PPT의 농도가 높아짐에 따라 내강에 존재하는 정자두부가 관찰되지 않았으며(Fig. 5), initial segment부위와 마찬가지로 caput을 이루는 상피세포의 높이가 감소 되었다.

부정소의 꼬리부분을 조직학적으로 관찰한 결과, PPT 4 mg 처리군에서 정자두부가 관찰되지 않았고, 부정소관의 내강이 크게 위축되었다(Fig. 6). 정자의 두부 수를 측정된 결과, 농도 의존적으로 감소되었고, PPT 4 mg 처리군의 경우, 부정소관의 내강에 정자가 축적되지 않았다(Fig. 6C). 생식기관 주변 지방조직을 조직학적으로 관찰한 결과(Fig. 7), 지방세포의 크기가 대조군에 비해, PPT의 농도가 고농도로 됨에 따라 점차 감소되었다(Table 5).

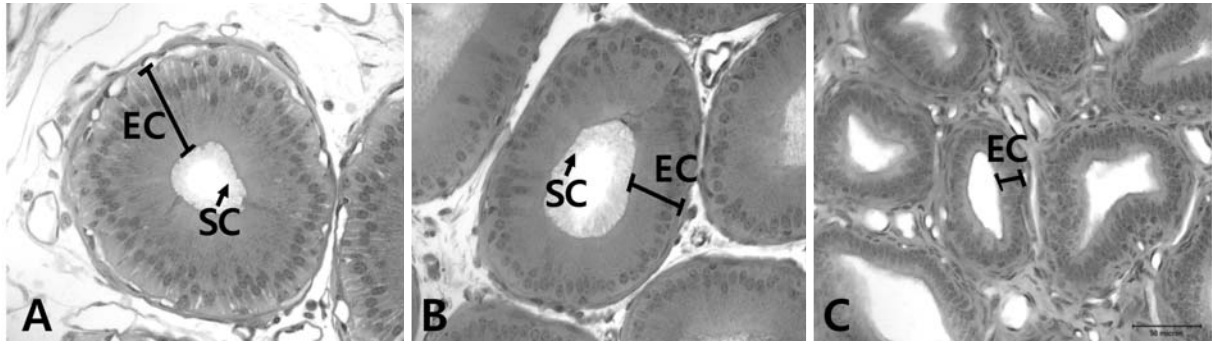


Fig. 4. Micrographs of the initial segment region of the epididymis from control (A), PPT 1 mg (B) and PPT 4 mg (C) treated groups on week 8 post treatment. The height of the epithelial cell (EC) was gradually reduced in the experiment. Stereocilia (SC) were disrupted in the PPT 4 mg treatment groups. Bar size=50 µm.

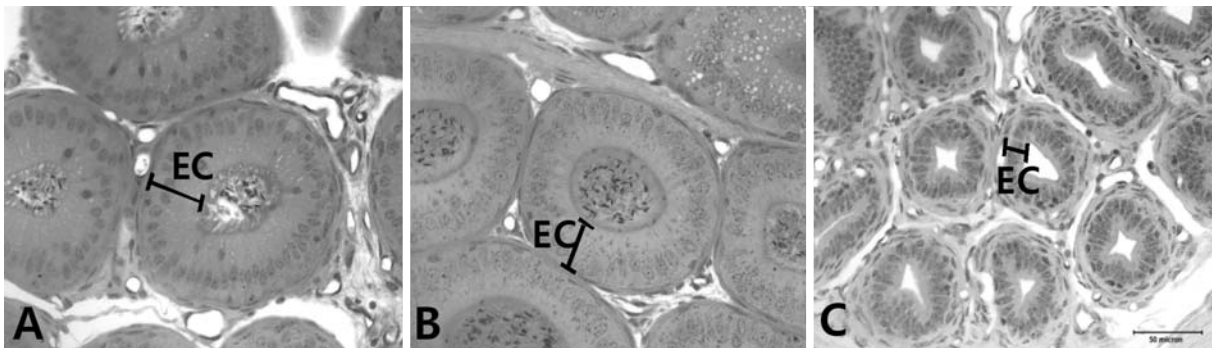


Fig. 5. Micrographs of the caput region of the epididymis from control (A), PPT 1 mg (B) and PPT 4 mg (C) treated groups on week 8 post treatment. The height of the epithelial cell (EC) was reduced significantly over the experimental period. Sperms were not detected in the lumens of the epididymal tubules of the PPT 4 mg treated group. Bar size=50 µm.

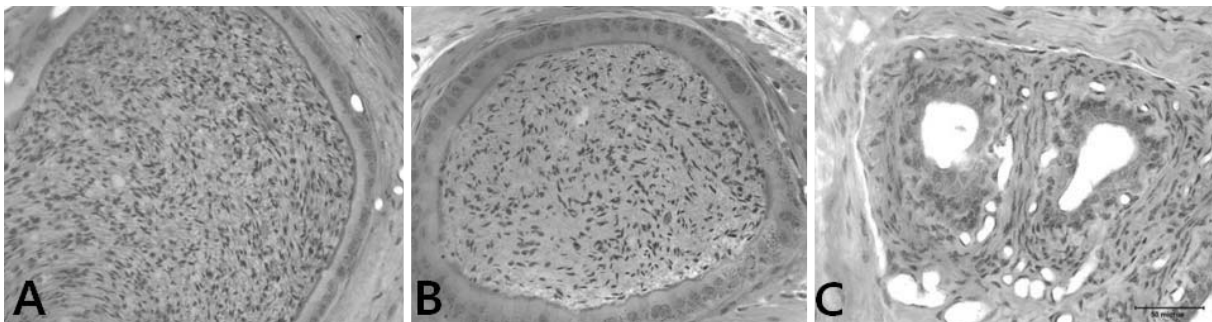


Fig. 6. Micrographs of the caudal region of the epididymis from control (A), PPT 1 mg (B) and PPT 4 mg (C) treated groups on week 8 post treatment. The sperm numbers of the treated group were gradually reduced in the experiment, and were not accumulated in the lumens of the epididymal tubules in the PPT 4 mg treated group. Bar size=50 µm.

Table 5. Effects of PPT on adipose tissue attached to the epididymis at week 8 post treatment

| Parameter | Control | PPT Group | | | |
|-----------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| | | 0.01 mg | 0.1 mg | 1.0 mg | 4.0 mg |
| Adipocyte size (µm ²) | 2659.4±235.1 | 1993.9±197.2* | 1994.1±312.6* | 1578.9±120.6* | 878.3±240.1* |

Values represent mean ± SD.

*P<0.05 compared with control group

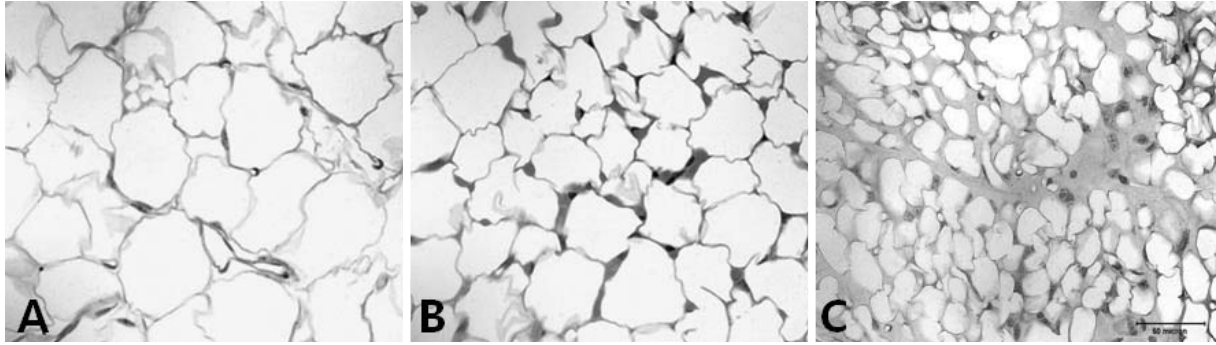


Fig. 7. Micrographs of adipose tissue attached to the epididymis from control (A), PPT 1 mg (B) and PPT 4 mg (C) treated groups on week 8 post treatment. The adipocyte size was dramatically reduced in the 4 mg treated group. Bar size=50 µm.

고 찰

본 실험에서 사용한 PPT는 처음으로 보고된, 그리고 특이적으로 ER에 친화성을 가진 SERM의 한 종류로 ER β 보다 주로 ER α 에 작용하는 촉진제이고 ER α 에 대하여 estradiol 보다 높은 친화성을 가지고 있다 (Stauffer et al., 2000).

PPT 투여 용량을 정하는데 있어서 (Frasor et al., 2003)의 방법을 참고하였는데 암컷 생쥐에 1주일간 유의하게 영향을 미쳤던 PPT 농도는 0.7 mg과 3.5 mg이었다. 본 실험에서는 수컷 생쥐의 농도별 PPT 영향을 알아보기 위해 저농도 0.01 mg부터 고농도 4.0 mg을 피하주사 하였다. PPT 투여 기간은 기존의 방법과 (Cho et al., 2003) 정소 독성을 검색하기 위한 시험기간에 대해서 유럽연합과 미국에서는 최소 2주간이 필요한 것을 참고 하였다 (Sakai et al., 2000).

본 실험에서 PPT를 장기간 투여한 결과 농도가 높아질수록 처리군의 체중이 대조군에 비해 감소되는 경향을 보였으며, PPT 1 mg과 4 mg 투여군에서는 유의하게 감소되었다. 이는 기존에 보고된 것처럼 에스트로젠 물질이 체중감소를 유발하는 것으로 보고된 결과와 유사하다 (Cook et al., 1998; Goyal et al., 2001). 또한 에스트로젠의 영향으로 인해 먹이 소비가 감소되고 (Cook et al., 1998), 음식 섭취를 관장하는 뇌 부위에 에스트로젠이 조절자처럼 작용하여 체중감소가 일어나는데 (Wade & Heller, 1993), 위와 같은 복합적인 요인에 의해 본 실험에서 수컷 생쥐의 체중의 감소가 일어난 것으로 사료된다.

수컷의 조직 무게와 수컷의 생식력의 변화는 그 전에 연구한 SERM의 결과와 일치하였다 (Cappon et al., 2004). 성체 수컷 흰쥐에서 SERM은 주로 수컷 생식기관의 무게 변화, 생식력 감소, 수컷 생식 행동 억제 등을 유발하며 때로는 정자형성 변화와 연관된 수컷 생식기관의 위축을 유발한다 (Cook et al., 1998; Goyal et al., 2001). 본 실험에서도 PPT에 의해 정소와 부정소가 위축되었는데, 특히 4 mg 농도에서는

이들 생식기관의 무게가 급격하게 감소되었다. 정소의 경우, 세정관 내 생식상피가 PPT의 영향으로 위축되거나 소실되어, 세정관의 직경이 감소됨과 동시에 정소의 무게도 줄어든 것으로 사료된다. 부정소의 경우에도 부정소관을 이루는 상피세포가 위축되었는데 이로 인해 무게가 감소된 것으로 여겨진다. 이에 비해 수출소관의 무게는 변화가 뚜렷하지 않았으며 4 mg 농도에서는 오히려 대조군에 비해 PPT 투여군의 무게가 증가하였다. 이는 수출소관의 내강이 PPT에 의해 팽창되었는데 이로 인한 결과로 보여진다.

수출소관 내강의 팽창은 ER 저해제인 ICI 182,780을 투여하였을 때도 나타나는데 (Cho et al., 2003; Oliveira et al., 2003), 이는 ER 저해제로 인해 수출소관의 내강의 용액이 재흡수 되지 못하여 내강이 팽창된다고 하였는데, 본 실험의 PPT 4 mg 고농도 투여군에서도 내강의 팽창이 관찰되었다. 이는 ER저해제 혹은 촉진제를 고농도로 투여하면 유사한 양상, 즉 내강의 용액 재흡수를 방해한다는 것을 암시한다고 볼 수 있다. PPT 고농도 투여로 인하여 수출소관의 내강 내에 있던 재흡수 되지 못한 용액의 압력 때문에 상피세포 높이가 감소된 것으로 보인다. 정소를 둘러싸는 결합조직인 백막은 PPT의 영향으로 그 두께가 증가되었다. 이런 백막의 경우, 정소 내 세정관의 위축 때문에 이차적으로 두께가 증가된 것인지 혹은 백막 자체에 ER이 존재하여 PPT의 작용을 직접적으로 받아서 증가한 것인지는 추후 실험을 통해 확인 할 수 있을 것으로 보인다.

부정소에 붙어 있던 지방조직을 관찰한 결과 PPT 농도가 증가함에 따라 지방세포의 크기(면적)가 줄어들었다. 일반적으로 에스트로젠은 지방조직을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 이와 연관된 내용으로, ER α 가 결핍된 (α ERKO) 수컷 마우스를 실험재료로 하여 관찰한 결과, 지방조직의 무게가 139~185% 증가되었고, 지방세포 크기는 대조군에 비해 20% 증가하였다고 하였다 (Heine et al., 2000). 이들에 의하면 대조군과 α ERKO마우스 모두 에너지 섭취는 동일하였으나, 에너지 소비가 α ERKO마우스에서 11%나 감소하였으며, 따

라서 에너지 소비의 감소가 비만에 결정적인 요소라고 하였다. 즉 α ERKO마우스의 경우, ER α 결핍으로 인해 에스트로겐이 작용을 하지 못하고 이로 인해 섭취한 에너지의 소비가 줄어들어 비만이 유발되었다는 것이다. 본 실험의 경우, ER α 촉진제인 PPT로 인해 α ERKO마우스와 반대로 에너지 소비가 증가되어 지방세포의 크기가 감소된 것으로 사료된다.

장기간에 걸쳐 독성을 나타낼 정도로 아주 고농도로 합성 에스트로겐을 투여하면 세정관 내 정자형성이 억제되고, 동시에 세정관의 위축이 유발되는 것으로 알려져 있다. 이와 연관되어 생후 11주된 성체 수컷 흰쥐에 매일 합성 에스트로겐인 ethinylestradiol을 10 mg/kg의 고농도로 경구투여하면, 정소에서 생성되는 정자의 수가 투여 후 3주째부터 급격하게 감소하고 4주째는 더 감소된다고 하였다. 또한 부정소 꼬리 부위에 저장되는 정자가 투여 후부터 감소되기 시작하여 3주째가 되면 거의 저장되지 않는다고 하였다(Kaneto et al., 1999). 본 실험에서도 PPT의 농도가 증가할수록 부정소 꼬리 부위에 저장되는 정자의 수가 감소되었으며, 특히 4 mg 투여 시에는 정자가 전혀 관찰되지 않았다. 정소에서도 생식상피가 대부분 소실되어 정자형성이 일어나지 않았다. 이런 면에서 보면 이미 보고된 합성 에스트로겐을 고농도로 투여하는 것과, 본 실험의 ER 촉진제를 고농도로 투여했을 때 나타나는 결과는 유사하다고 할 수 있다. 합성 에스트로겐의 투여로 인하여 시상하부-뇌하수체에 negative feedback이 유발되고 이와 연관되어 혈장 내 테스토스테론, 황체형성호르몬, 여포형성호르몬의 농도가 감소되어 정자형성이 줄어드는 것으로 생각되고 있다(Kaneto et al., 1999). 본 실험의 경우에는 고농도의 PPT가 직접적으로 정소의 세정관에 영향을 미쳐 정자형성이 일어나지 않는 것으로 사료된다.

에스트로겐이 정소와 부정소에서 기능을 보인다는 점을 과거에는 예상할 수 없었으나, 정소 내 aromatase의 존재와 정소, 수출소관 및 부정소에서의 ER 존재가 밝혀지면서 개연성이 확보되었다. 특히 ER이나 aromatase가 정자형성의 거의 전 과정에서 발현된다는(O'Donnell et al., 2001; Carreau et al., 2003)점은 노화가 진행되면서 동반되는 정자 수 감소가 에스트로겐의 생산 및 작용 변화와 연관될 가능성이 있다고 볼 수 있다.

결론적으로, 본 연구에서 ER α 촉진제인 PPT를 장기간 투여하여 농도 별로 수컷 생쥐 생식기관을 현미경으로 관찰한 결과, 저농도의 PPT 처리군에서는 정자형성이 일어나고 생식기능이 정상적인 반면에, 4 mg과 같은 고농도의 PPT 처리군에서는 정자를 형성하는 세포들의 퇴화와 수출소관의 재흡수 이상으로 내강이 팽창되었다. 또한 처리군의 부정소의 수축과 부정소관을 구성하는 상피세포의 높이가 유의하게 감소되었고, 부정소 꼬리 부위에서는 정자가 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 볼 때 고농도의 PPT를 장기간 투여할 경

우, 생식기관의 조직학적 변화로 인해 생식력이 감소되거나 혹은 불임이 유발될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A, Rago V, Ando S: Estrogen receptor (ER) alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 89 : 1443-1451, 2004.
- Burrows H: Pathological conditions induced by oestrogenic compounds in the coagulating gland and prostate of the mouse. *Am J Cancer* 23 : 490-512, 1935.
- Cappon GD, Horimoto M, Hurtt ME: Reproductive toxicity assessment of lasofoxifene, a selective estrogen receptor modulator (SERM), in male rats. *Birth Defects Res (Part B)* 71 : 142-149, 2004.
- Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S: Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1 : 35, 2003.
- 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.
- Delbes G, Levacher C, Pairault C, Racine C, Duquenne C, Krust A, Habert R: Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinol* 145 : 3395-3403, 2004.
- Frasor J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF, Katzenellenbogen BS: Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) α activity by ER β in the uterus. *Endocrinol* 144 : 3159-3166, 2003.
- 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.
- Han HJ, Jung JC, Taub M: Response of primary rabbit kidney proximal tubule cells to estrogens. *J Cell Physiol* 178 : 35-43, 1999.
- Han JY, Cho HW: Effects of estrogen receptor α -selective agonist propyl pyrazole triol on the morphology of accessory genital glands of male mouse. *Korean J Microscopy* 39 : 17-25, 2009.
- 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, Gist DH, Bunick D, Lubahn DB, Farrell A, Bahr J, Cooke PS, Greene GL: Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J Androl* 18 : 602-611, 1997.
- 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.
- 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 GC, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 5925-5930, 1996.
- Lee EJ, Han JY, Cho HW: Effects of estrogen receptor on morphology in the female mouse reproductive organs. *Korean J Microscopy* 39 : 301-309, 2009.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R: ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392 : 49-53, 1996.
- Nielsen M, Bjornsdottir S, Hoyer PE, Byskov AG: Ontogeny of oestrogen receptor α in gonads and sex ducts of fetal and newborn mice. *J Reprod Fertil* 118 : 195-204, 2000.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER: Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22 : 289-318, 2001.
- 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.
- Sakai T, Takahashi M, Mitsumori K, Yasuhara K, Kawashima K, Mayahara H, Ohno Y: Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats : overview of the studies. *J Toxicol Sci* 25 : 1-21, 2000.
- 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.
- 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.
- Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS: Antagonists selective for estrogen receptor alpha. *Endocrinol* 143 : 941-947, 2002.
- Taylor AH, Al-Azzawi F: Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 24 : 145-155, 2000.
- Toft D, Gorski J: A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 55 : 1574-1581, 1966.
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V: Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor- β . *Mol Endocrinol* 11 : 353-365, 1997.
- van Pelt MM, de Rooij DG, van der Burg B, van der Saag PT, Gustafsson JA, Kuiper GJM: Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinol* 140 : 478-483, 1999.
- 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 >

암컷호르몬으로 알려져 있는 에스트로겐이 실제로는 수컷 생식기관에도 영향을 미친다. 에스트로겐은 수용체와 결합하여 그 작용을 나타낸다. Propyl pyrazole triol (PPT)은 에스트로겐 수용체 베타에 비해 상대적으로 알파에 410배 혹은 1,000배 더 높은 선택적 친화성으로 결합하는 에스트로겐 수용체 알파 촉진제이다. 본 연구에서는 성체 수컷 생쥐를 대상으로 castor oil에 각각 0.01 mg, 0.1 mg, 1 mg, 4 mg의 농도로 희석한 PPT를 1주에 1회씩 8주 동안 피하주사 하였다. 대조군은 castor oil을 주 1회씩 동일한 기간 동안 생쥐에 피하주사 하였다. 정소, 수출소관, 부정소의 조직학적 변화를 현미경으로 관찰하였다. PPT 4 mg의 고농도 투여군에서는 체중, 정소, 부정소의 무게가 뚜렷하게 감소되었다. 실험 기간 동안 PPT에 의해 세정관의 직경, 부정소의 상피세포 높이가 감소되었다. 부정소에 붙어 있던 지방세포의 크기는 PPT에 의해 줄어들었다. PPT 4 mg 투여군의 경우, 부정소의 꼬리 부위에 저장되는 정자가 관찰되지 않았다. 결론적으로 고농도의 PPT 투여로 인해 성체 수컷 생쥐의 정자형성 억제와 같은 생리학적 변화가 유발되었고 동시에 생식기관의 조직학적 변화도 유발되었다.