

Estradiol Valerate에 의해 유도된 다낭성난소와 CHO세포에서 NGF발현

최백동, 정순정, 정문진, 임도선¹, 이수한², 김승현³,
고아라³, 김세은³, 강성수³, 배춘식^{3,*}
조선대학교 치과대학 구강조직발생학교실, ¹을지대학교 치위생학과,
²건국대학교 수의과대학, ³전남대학교 수의과대학

Expression of NGF in Estradiol Valerate-Induced Polycystic Ovary and CHO Cells

Baik-Dong Choi, Soon-Jeong Jeong, Moon-Jin Jeong, Do-Seon Lim¹,
Soo-Han Lee², Seung-Hyun Kim³, Ara Go³, Se-Eun Kim³,
Seong-Soo Kang³, Chun-Sik Bae^{3,*}

Department of Oral Histology and Developmental Biology, School of Dentistry,
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

¹Department of Dental Hygiene, Eulji University, Gyeonggi 461-713, Korea

²College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

³College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received May 17, 2011; Revised June 20, 2011; Accepted June 22, 2011)

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is hormonal imbalance condition as the endocrine and metabolic disorder that induces the infertility and various complications in reproductive age women. Estradiol valerate (EV) is used hormone replacement therapy in menopausal women and is reported that excessive administration of EV induces the PCOS. Nerve growth factor (NGF) is the factor to regulate the survival and maturation of developing neuronal cell and is also synthesized in ovary. And NGF is overexpressed in EV-induced polycystic ovary (PCO) as previously reported. Therefore, this study examined the possibility of NGF as can be used the biological marker in diagnosis of PCOS, the hormonal imbalance condition, using PCO and CHO (chinese hamster ovarian) cell lines. The concentration of EV treatment is optimized a 1 mg as not influence on the proliferation of CHO cell but 2 mg and 3 mg of EV treatment have the inhibition effect at initial stage. The morphological change was not observed in CHO cell after dose dependent manner treatment of EV. Expression of NGF mRNA and protein is significantly increased at 30 min after EV treatment in CHO cells compared to that of control. And NGF protein expression is strongly increased in PCO tissue, which observed many follicular cysts compared to normal ovary tissue. Taken together, overexpression of NGF may be act as a molecule to induce an abnormal development of follicle, suggesting that NGF can be used as a biological marker in diagnosis of PCOS.

Keywords : CHO cell, Estradiol Valerate, NGF, PCO, Rat

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2006-521-E00126).

* Correspondence should be addressed to Dr. Chun-Sik Bae, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Puk-gu, Gwangju 500-757, Korea. Ph.: (062) 530-2876, Fax: (062) 530-2809, E-mail: csbae210@chonnam.ac.kr

서 론

다낭성 난소증후군(polycystic ovary syndrome, PCOS)은 가임기 여성에서 일어나는 가장 흔한 내분비 및 대사장애이다(Vaitukaitis, 1983). PCOS는 난소에서 난포발달, 스테로이드생성 그리고 배란에 관여하는 다양한 호르몬과 성장인자들의 생성 및 분비에 영향을 끼침으로써 무배란과 무월경에 의한 불임을 유발하고, 안드로겐 농도과다 및 내분비계 이상을 일으켜 여드름, 비만 그리고 당뇨병 같은 합병증도 일으킨다(Lara et al., 1993; Franks, 1995; Balen, 1999).

신경성장인자(nerve growth factor, NGF)는 발생 중인 신경세포의 생존과 성숙을 조절하는 인자로서, 피부의 각질세포, 멜라닌세포 그리고 평활근 세포와 같은 비신경성 세포뿐만 아니라 정소, 난소, 뇌하수체, 흉선 등과 같은 내분비 조직에서 분비되는 것으로 알려졌다(Sofroniew et al., 2001). NGF는 통증유발, 신경가소성 및 염증성 인자의 배출에 중요한 역할을 하고, 아토피성 피부염의 표지인자로 알려졌다(Snider, 1994; Toyoda et al., 2004). 또한 NGF는 간세포암종의 진행에 관여하고, 자궁내막증과 염증성 질환인 류마티스관절염 부위에서 비정상적으로 발현하였다(Tokushige et al., 2006; Tokusashi et al., 2009; Seidel et al., 2010). 난소에서 NGF는 난포막 세포에서 주로 합성되고, 교감신경에 의한 난소기능의 조절에 관여한다(Lara et al., 1990; Dissen et al., 1996).

Estradiol valerate (EV)는 폐경기 여성의 호르몬 치료에 사용되는 에스트로겐 대체물질 중 하나로서 과다하게 투여할 경우 PCOS를 유발하는 것으로 알려져 있다(Dören, 2000). EV에 의해 유도된 다낭성난소(polycystic ovary, PCO)의 내부에는 많은 수의 신경섬유들이 존재하고, 이것은 교감신경의 과민반응과 연관되어 있다고 알려졌다(Stener-Victorin et al., 2003). PCOS 여성은 황체형성호르몬과 난포자극호르몬 비율이 정상 여성보다 높아 난포낭과 같은 비정상적 난포가 발달하고, 이것은 무배란의 원인이 된다(Taylor et al., 1997). EV 처리는 난소에서 NGF와 NGF 수용체를 과발현시킴으로써 교감신경 발달의 신경전달물질인 노르에피네프린의 분비를 과도하게 촉진시키는데, 이로 인해 난소의 스테로이드성 호르몬 분비가 비정상적으로 증가하여 난포낭 형성이 유발될 것으로 보고됐다(Barria et al., 1993; Lara et al., 2000). 따라서 본 연구에서는 호르몬 불균형 상태인 PCOS의 난소에서 NGF의 발현 양상을 정상 난소와 비교하여 PCO의 생물학적 표지인자로서의 가능성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. CHO 세포의 배양

햄스터 난소 세포주인 CHO 세포를 2×10^5 수로 60 mm 배

양 접시에 접종하고 5% CO₂ 농도를 유지하는 배양기에서 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)과 1X antibiotic-antimycotic solution (Gibco BRL), 1X non-essential amino acid solution (Gibco BRL)을 첨가하여 사용하였다.

2. MTT assay

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 분석을 위해, CHO 세포는 5×10^4 cells/mL의 농도로 96-well 배양 접시에 각각 분주하였다. 다음날까지 세포를 배양한 후 12시간 동안 serum starvation한 다음, EV (SIGMA, USA)를 농도 별(1 mg, 2 mg, 3 mg) 그리고 시간 별로(6시간, 12시간, 24시간) 각각 처리했다. 이 후 PBS에 0.5% 농도로 희석한 MTT solution (SIGMA) 20 μ L를 첨가하여 3시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 다음 MTT 용액을 제거하고, DMSO (dimethylsulfoxide, SIGMA) 0.2 mL를 첨가한 후, 590 nm에서 흡광도를 측정했다. EV는 Sesame oil (SIGMA)에 녹여 처리하였고, oil만 처리한 것을 oil 대조군으로 사용하였다.

3. 세포형태 관찰

시간 별 EV 처리에 의한 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 CHO 세포를 2×10^5 수로 60 mm 배양 접시에 접종하고, 다음날까지 배양하였다. 12시간 동안 serum starvation한 다음 EV 1 mg을 각각 처리하여 30분, 1시간, 3시간 그리고 6시간 후 광학현미경(Olympus, JPN)을 통해 관찰하였다.

4. PCO 유도

무게가 190~210 g이고 4일 간격으로 성주기를 보이는 7주령된 암컷 Sprague-Dawley 흰쥐(Samtako Bio, KOR)에 EV 4 mg을 근육주사하고, 60일 후 PCO가 확인된 것을 실험에 사용하였다. 사육 및 실험 전 기간 동안 사육환경을 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 10\%$ 로 유지하고 12시간의 명암주기가 유지되는 실내에서 사료와 식수를 자유로이 공급하였다. 본 실험은 전남대학교 실험동물윤리 지침에 의하여 specific pathogen free (SPF) 수준의 동물사육시설을 이용하였다.

5. 총 RNA추출과 역전사중합효소반응

(Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction)

세포로부터 총 RNA 추출은 Tri reagent (MRC Inc, USA)를 이용하였고 방법은 제조회사에서 제공된 설명서를 참고하였다. 총 RNA 1 μ g을 상보성 DNA (Complementary DNA, cDNA) 합성을 위해 AccuPower RT Premix (Bioneer, KOR)

에 첨가하여 역전사(Reverse-Transcription, RT) 반응을 하였고, AccuPower PCR Premix (Bioneer)에 합성된 cDNA 1 µL를 첨가하여 중합효소반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하였다. NGF 특이적 프라이머인 Forward: 5'-CTT CAG CAT TCC CTT GAC AC-3', Reverse-5'-TGA GCA CAC ACA CGC AGG C-3', 그리고 대조 발현군인 Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) 프라이머인 Forward: 5'-CCA TGG AGA AGG CTG GG-3', Reverse: 5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'을 제작하여(Bioneer) PCR 반응에 사용하였다. 반응조건은 NGF가 30 cycles, 94°C 40초, 64°C 40초, 72°C 40초이고, GAPDH는 30 cycles, 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초로 각각 설정하였다. PCR 반응 후 생산물은 0.5X Tris-Borate-EDTA buffer (TBE buffer)에 Ethidium bromide (SIGMA)가 첨가된 1.5% 농도의 아가로스겔에 전기영동한 후 Gel-Doc (BioRad Laboratories, USA)에서 확인하였다. 전기영동 후 확인된 NGF 밴드 크기는 582 bp이고 GAPDH는 199 bp였다. 각 밴드의 밀도 측정 및 정량은 Science Lab Image Gauge (FUJI FILM, JPN) 프로그램을 이용하였다.

6. 면역학적 단백질 검출법 (western blotting)

세포로부터 NGF 단백질의 발현을 분석하기 위하여 면역학적 단백질 검출법을 사용하였다. 세포에 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 2 mM Na₃VO₄, 2 mM Na₄P₂O₇, 50 mM NaF, 2 mM EDTA (pH 7.4) 그리고 단백질분해효소 억제제인 leupeptin과 aprotinin을 첨가한 NP-40 lysis buffer를 이용하여 세포질 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 30 µg씩 각각 같은 양을 정량하여 실험에 사용하였고 SDS 12%-polyacrylamide 겔을 이용하여 전기영동을 시행하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose 막으로 이동시킨 후, blocking solution (1X phosphate buffered saline, PBS+5% skim milk)에서 1시간 동안 실온 반응을 한 뒤에 세척 후, 새로운 blocking solution에 1차 항체인 anti-rabbit NGF (Abcam, UK) 항체와 anti-mouse-β-actin (SIGMA) 항체를 각각 1:2,500 비율로 처리하고 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 다음으로 세척 후 HRP (horseradish-peroxidase)가 연결된 goat-anti-rabbit 또는 goat-anti-mouse 2차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:10,000 비율로 처리하고 ECL (Amershampharmacia, UK) 용액을 이용하여 발색시킨 후 chemiluminescence film (Amershampharmacia)을 이용하여 현상하였다. 현상 필름에 나타난 NGF 밴드의 크기는 27 kDa 이고 β-actin은 42 kDa으로 각각 확인되었다. 현상 후 나타난 단백질 밴드의 밀도 측정 및 정량은 Science Lab Image Gauge (FUJI FILM) 프로그램을 이용하였다.

7. 조직절편 제작

흰쥐 무게 100 g 당 0.2 mL의 염산케타민 (Yuhan, KOR)과

0.08 mL의 럼폰 (Bayerkorea, KOR) 혼합액을 대퇴부에 근육 주사하여 마취한 후 개복하고, 난소를 적출했다. 적출한 난소는 즉시 고정액 (4% paraformaldehyde, in 1X PBS)에 옮기고 4°C에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 1X PBS용액으로 2시간 세척하고, 70%, 80%, 90%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV 에탄올 처리를 하여 탈수하였으며, 자일렌으로 투명화 과정을 거친 후 파라핀을 침투시켜 포매하였다. 파라핀 포매된 조직을 Leica 820 (Leica Instruments products, GER)을 이용하여 6 µm 두께로 절편을 만든 후 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate (SIGMA)로 코팅된 유리 슬라이드에 올리고 37°C 신전기 위에서 하루 동안 건조하였다.

8. 면역조직화학적 염색 (Immunohistochemistry)

준비된 조직표본을 자일렌 I, 자일렌 II, 자일렌 III에 순서대로 5분씩 처리하여 탈파라핀을 하고 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올에 각각 5분씩 단계적으로 함수하였다. 1X PBS 완충액으로 조직표본을 5분씩 세 번 세척 후, 10 mM sodium citrate 완충액 (pH 6.0)으로 99°C에서 20분간 처리하였다. 그 후 PBS로 조직표본을 5분씩 세 번 세척한 후 1차 blocking으로 과산화수소수가 포함된 완충액 (0.6% H₂O₂ in Methanol)을 20분간 상온에서 조직표본 위에 처리하였다. 다시 PBS로 조직표본을 5분씩 세 번 세척하고 normal goat serum (Vector Lab, USA) 15 µL를 1X PBS 1 mL에 희석한 용액을 20분간 상온에서 처리하는 2차 blocking을 수행하였다. Normal goat serum 희석 용액을 간단히 제거하고 새로운 normal goat serum 희석 용액에 NGF 항체 (Abcam)를 1:500의 비율로 희석하여 4°C에서 16시간 동안 처리하였다. 다음 날, 1X PBS로 10분간 두 번 세척 후 2차 항체인 goat-anti-rabbit IgG (Vector Lab)를 1:200 비율로 동일 용액에 희석하여 조직표본 위에 상온에서 20분간 처리하였다. 다음으로 1X PBS로 10분간 2회 세척 후, 사용하기 30분전 1X PBS 용액에 희석한 ABC 시약 (Vector Lab)을 조직표본 위에 20분간 반응시켰다. 다시 1X PBS로 10분간 2회 세척 과정을 거치고 0.05% DAB (Deaminobenzidine Tetrahydrochloride; Vector Lab)를 이용하여 발색시킨 후 조직표본을 2차 증류수에 10분간 세척하였다. 대조염색으로 Hematoxylin (Samchun Chemical, KOR)을 사용해 15초간 염색 하였고, 다시 2차 증류수에 세척한 후 조직표본에 탈수, 투명 및 봉입 과정을 수행하였다. 염색된 조직표본은 광학현미경 (Carl Zeiss, GER)을 통해 관찰하였다.

9. 통계분석

모든 실험은 3번 반복했고, 실험 결과 값의 통계적 분석을 위해 Excel 2007 프로그램 (Microsoft, USA)을 이용하여 표준편차 및 Student *t*-test를 수행하였다. Student *t*-test 분석에

서 $p < 0.05$ 는 통계학적으로 유의적 차이가 있음을 의미한다.

결 과

1. EV처리가 CHO 세포 증식에 미치는 영향

조직 내 NGF의 발현을 확인하기 전에 CHO 세포주에 대한 EV의 세포독성을 알아보기 위해 세포증식 지표실험인 MTT 분석을 수행하였다. CHO 세포에 1 mg부터 3 mg까지의 농도 범위를 정하여 EV를 처리하고, MTT 분석을 위해 흡광도를 측정하였다. 결과, 6시간 후 EV 1 mg 처리군은 정상군에 비해 흡광도 값이 떨어졌지만, oil 대조군과 비슷하였다. 하지만 2~3 mg 처리군의 흡광도 값은 6시간 후 정상군과

oil 대조군에 비해 유의하게 낮았다(Fig. 1A).

2. EV 처리가 CHO 세포의 형태에 미치는 영향

세포독성에 유효농도인 EV 1 mg을 CHO 세포에 처리 후 세포의 형태학적 변화 유무를 광학현미경을 통해 시간대별로 관찰하였다. EV 처리 후 30분, 1시간, 3시간 그리고 6시간 후에 세포와 정상군의 형태적 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

3. CHO 세포에서 EV 처리에 의한 NGF mRNA 및 단백질 발현

EV 1 mg 처리 후 CHO 세포에서 NGF mRNA 발현은 EV 처리 30분 후에 대조군에 비해 2.2배로 유의성 있게 증가하

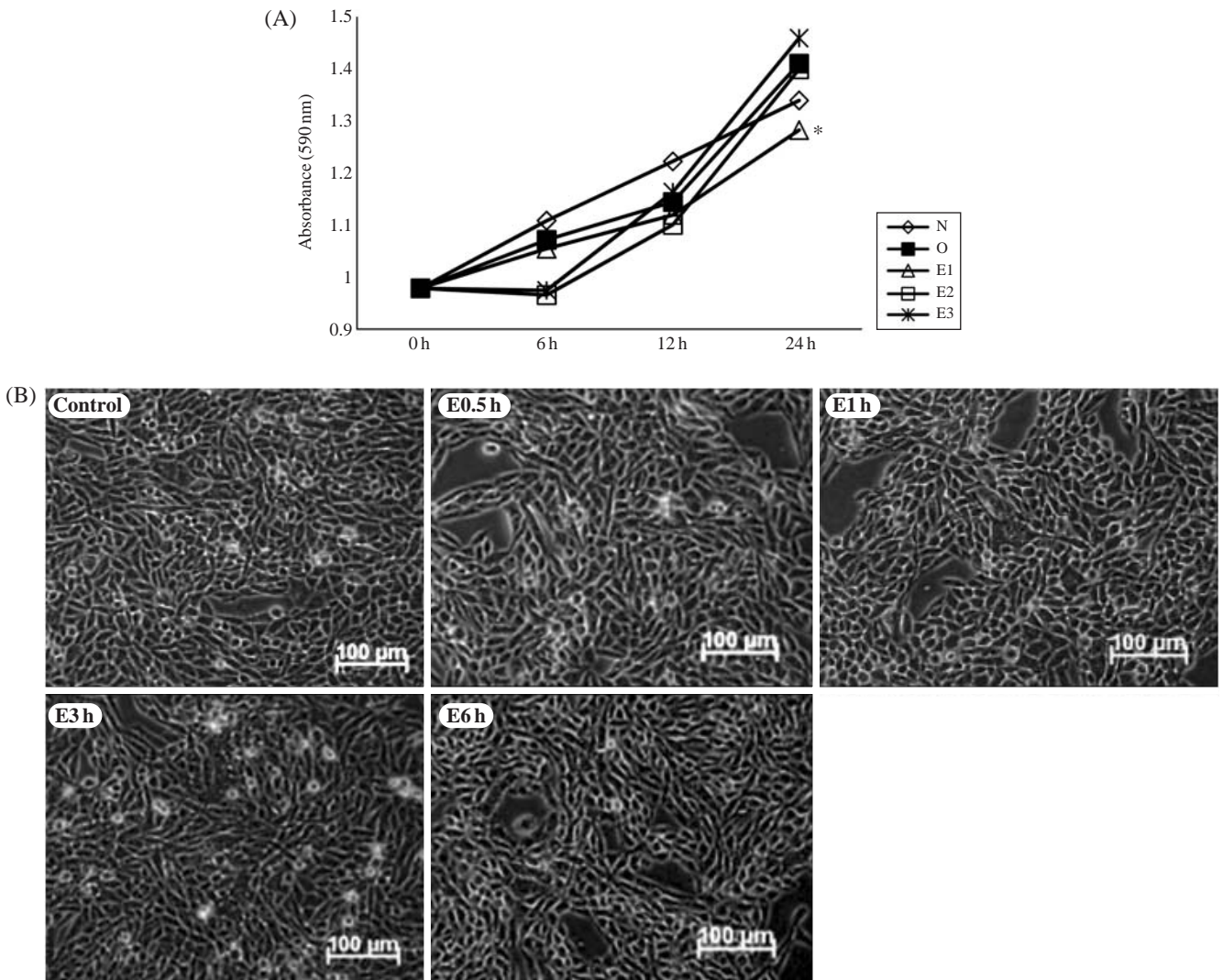


Fig. 1. The effect of EV on the proliferation and morphological change of CHO cell line. (A) After 6 h, a 2 mg and 3 mg of EV treatment decreased the proliferation of CHO cell compared to normal or oil control. But 1 mg of EV treatment presents a similarly to normal and oil control in CHO cells (N: normal; O: oil control; E1: 1 mg of EV treatment; E2: 2 mg of EV treatment; E3: 3 mg of EV treatment). (B) The morphological aspect of EV treated CHO cell. There was no morphological change after 1 mg of EV treatment in CHO cells. Bars indicate 100 μm.

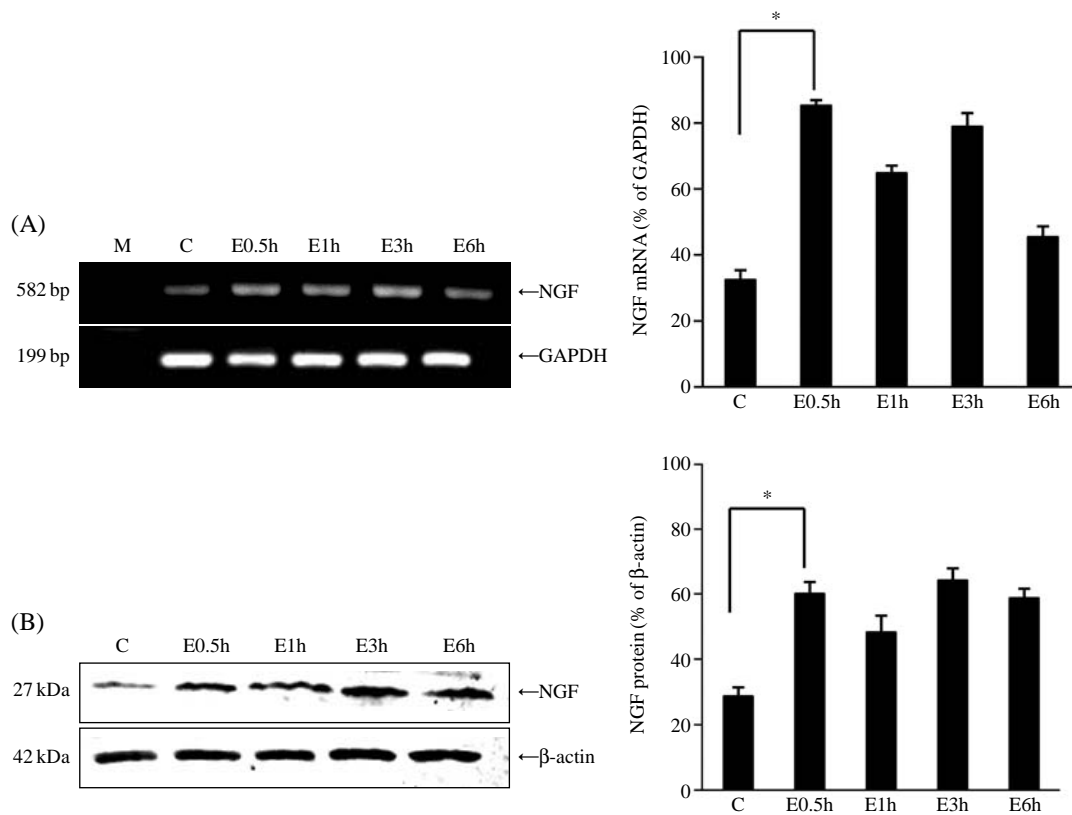


Fig. 2. The effect of EV on the NGF mRNA and protein expression in CHO cells. (A) In CHO cells, the expression of NGF mRNA was significantly increased at 30 min after treatment of EV compared to control. (B) The expression of NGF protein was significantly increased at 30 min after treatment of EV compared to control as well as expression of NGF mRNA.

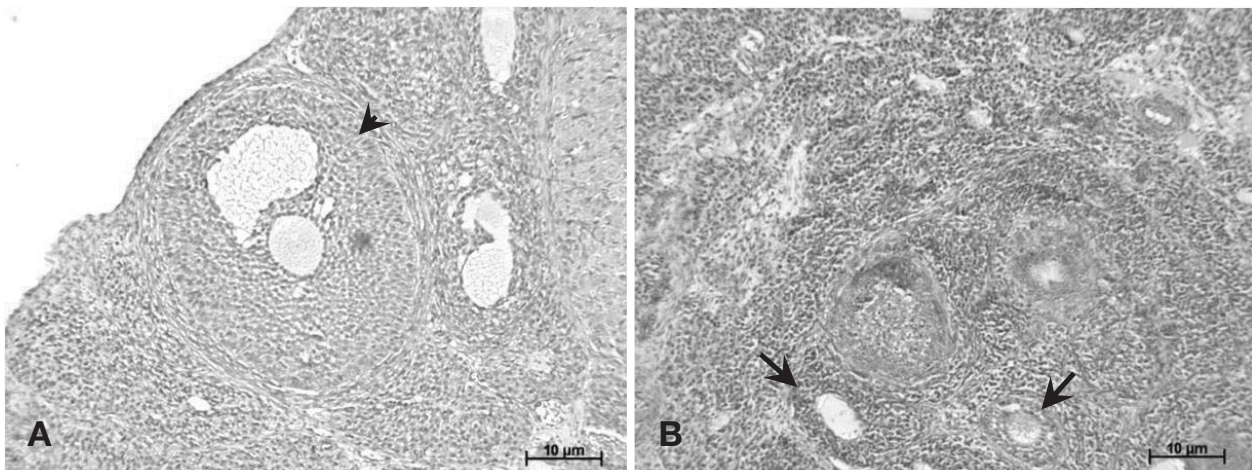


Fig. 3. Differential expression of NGF between normal ovary and PCO. The NGF protein was strongly expressed in PCO (B) compared to normal (A) ovary. NGF protein was localized dominantly medullar from cortex in PCO. Arrowhead indicates the mature follicle and arrows indicate follicular cysts. Bars indicate 10 μ m.

였다 ($p < 0.05$). NGF mRNA 발현은 3시간까지 증가하였으나 6시간 후에는 3시간째에 비해 2배 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2A). CHO 세포에서 NGF 단백질 발현은 EV 처리 30분

후에 2.1배로 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.05$). NGF 단백질 발현은 3시간째까지 mRNA 발현 양상과 유사했으나 6시간째 발현은 3시간째와 차이가 없었다 (Fig. 2B).

4. PCO에서 NGF 단백질 발현

정상난소에서는 발생 중인 난포동난포 및 성숙난포가 관찰되었으나 PCO에서는 난포동난포 및 성숙난포의 수는 적었고, 다수의 난포낭이 확인됐다. NGF 단백질 발현은 정상난소에 비해 PCO에서 증가했고, 발현 부위는 난소의 피질부로부터 수질부 쪽으로 집중되었다(Fig. 3).

고 찰

스테로이드 호르몬 중 하나인 에스트로젠은 난포형성 시 세포증식을 증가시켜 난포발달을 촉진할 뿐만 아니라 다양한 종류의 세포증식과 분화를 조절한다(Ferin et al., 1997). 난소가 제거된 흰쥐에 에스트로젠을 처리하면 자궁내막 조직에서 세포증식지표 인자인 cyclin D1, D3, E 그리고 A의 단백질 발현을 증가시켰다(Zhuang et al., 2001). 또한 에스트로젠은 자궁내막암 및 유방암세포의 증식을 증가시켰다(Creasy et al., 1992; Li et al., 2011). 그런데 생쥐에 에스트로젠 1 mg을 처리하면 4일 후에 흉선세포 수가 운반체만 투여한 군에 비해 유의성 있게 감소했고, 에스트로젠 처리는 직장암세포의 증식을 억제시켰다(Do et al., 2002; Proto et al., 2011). 또한 난소를 제거한 원숭이에 합성에스트로젠 중 하나인 conjugated equine estrogens (CEE)만을 처리하면 유방의 소엽파리세포에서 대조군에 비해 caspase-3 단백질 발현을 증가시켜 세포사멸을 촉진시켰다(Corner et al., 2005). 또한 EV 2 mg을 처리한 흰쥐 난포 과립층세포의 세포사멸은 증가하였다(Shirwalkar et al., 2007). 본 연구에서도 CHO 세포에 EV를 2 mg과 3 mg을 각각 처리하고, 6시간 후 세포증식이 대조군 또는 oil 대조군에 비해 감소하였다. 하지만, 1 mg 처리 시 대조군 및 oil 대조군과의 세포증식에 대한 차이는 없었다. 또한 EV 1 mg을 처리한 후 시간에 따른 세포의 형태적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 과도한 EV 처리는 CHO 세포의 증식을 초기에 억제하는 것으로 생각된다. 또한 난포액에서 포피성장인자(epidermal growth factor, EGF) 농도는 PCOS 여성이 정상 여성보다 높았고, 난포동난포의 성장을 억제하였다(Artini et al., 2007). 염증성 사이토카인인 종양괴사인자(tumor necrosis factor α , TNF α)의 난포액 농도는 PCOS 여성이 정상여성보다 높았고, 난자성숙을 방해하였다(Amato et al., 2003). 또한 시상하부 피질세포와 각질세포에 TNF α 를 처리하면 NGF mRNA 발현 및 분비가 증가하였다(Taishi et al., 2008; Takaoka et al., 2009). 따라서 EV 처리가 CHO 세포에서 NGF 발현 증가를 유도하는 것으로 보아 NGF 과발현은 PCO 형성과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다.

난소에서 NGF는 배란 시 난포막을 이루는 세포간의 분리 과정을 촉진시킴으로써 난포파열에 관여한다(Dissen et al.,

1996). 그런데 NGF를 과발현시킨 neural progenitor cells을 난소에 이식했을때 혈중 에스트로젠 농도가 대조군에 비해 증가했고, 정상 난포동난포 수는 감소했다(Dissen et al., 2000). 또한 PCOS 여성 난포액과 난포의 과립세포 배양액 내에 NGF 농도는 정상 여성에 비해 높았고, 난포막세포에서 NGF를 과발현하도록 조작한 생쥐의 배란은 정상 생쥐에 비해 감소했으며, 폐쇄 난포동난포 수가 증가했다. 또한 NGF를 과발현시킨 생쥐의 난포 과립세포의 세포사멸과 난포낭 형성은 대조군에 비해 크게 증가했다(Dissen et al., 2009). 흰쥐 난소에서 NGF mRNA 발현 및 단백질 분비는 EV 처리에 의해 크게 증가했고, 시간이 지날수록 점점 감소했다. 또한 EV 처리 시 전체 난포동난포 수는 감소했으나 NGF 항체를 주입하면 다시 정상 수준으로 회복됐다(Lara et al., 2000; Pak et al., 2009). 본 연구에서도 CHO 세포에 EV를 처리하면 NGF mRNA 및 단백질 발현이 대조군에 비해 30분 후에 크게 증가했고, 세포 수도 초기에 감소하였다. 또한 EV 처리에 의해 PCOS가 유발된 흰쥐 난소에서 성숙난포와 난포동난포는 정상군에 비해 적은 수가 관찰됐으나 NGF 단백질 발현은 크게 증가했다. NGF 과발현은 교감신경계를 과도하게 활성화시켜 혈중 생식샘자극호르몬과 황체형성호르몬에 대한 반응을 비정상적으로 증가시킴으로써 다낭성난소 증후군을 유발시키는 것으로 보고됐다(Dissen et al., 2009).

따라서 이상의 결과들을 종합하면 EV 처리 후 난소에서 유도되는 NGF 과발현은 비정상적 난포발달을 유도하는 인자로 작용할 것으로 보이며, 다낭성난소 진단 시 표지인자로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Amato G, Conte M, Mazziotti G, Lalli E, Vitolo G, Tucker AT, Bellastella A, Carella C, Izzo A: Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles. *Obstet Gynecol* 101 : 1177-1182, 2003.
- Artini PG, Monteleone P, Toldin MRP, Matteucci C, Ruggiero M, Cella V, Genazzani AR: Growth factors and folliculogenesis in polycystic ovary patients. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2 : 215-223, 2007.
- Balen AH: The pathogenesis of polycystic ovary syndrome: the enigma unravels. *Lancet* 354 : 966-967, 1999.
- Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE: Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 133 : 2696-2703, 1993.
- Conner P, Register TC, Skoog L, Tani E, von Schoultz B, Cline JM: Expression of p53 and markers for apoptosis in breast tissue during long-term hormone therapy in cynomolgus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 193(1) : 58-63, 2005.
- Creasy GW, Kafrisen ME, Upmalis D: Review of the endometrial

- effects of estrogens and progestins. *Obstet Gynecol Surv* 47(9) : 654-678, 1992.
- Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, Mayer C, Mayerhofer A, Ojeda SR: Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology* 150(6) : 2906-2914, 2009.
- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Dees WL, Lara HE, Ojeda SR: A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology* 137 : 198-209, 1996.
- Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martinez-Serrano A, Ojeda SR: Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 141(3) : 1073-1082, 2000.
- Do Y, Ryu S, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Role of death receptor pathway in estradiol-induced T-cell apoptosis in vivo. *Toxicol Sci* 70(1) : 63-72, 2002.
- Dören M: Basic principles of hormone replacement therapy in the postmenopause. *Ther Umsch* 57(10) : 628-634, 2000.
- Ferin M, Jewelewicz R, Warren M: *Menstruační cyklus*. Grada Publishing, Praha, pp. 80-83, 1997.
- Franks S: Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 333 : 853-861, 1995.
- Lara HE, Disson GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR: An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 141 : 1059-1072, 2000.
- Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR: Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133(6) : 2690-2695, 1993.
- Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR: Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 126 : 364-375, 1990.
- Li HJ, Wang LY, Qu HN, Yu LH, Burnstock G, Ni X, Xu M, Ma B: P2Y(2) receptor-mediated modulation of estrogen-induced proliferation of breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 338 (1-2) : 28-37, 2011.
- Pak SC, Kim SE, Oh DM, Shim KM, Jeong MJ, Lim SC, Nah SY, Park SH, Kang SS, Moon CJ, Kim JC, Kim SH, Bae CS: Effect of Korean red ginseng extract in a steroid-induced polycystic ovary murine model. *Arch Pharm Res* 32(3) : 347-352, 2009.
- Proto MC, Gazzerri P, Di Croce L, Santoro A, Malfitano AM, Pisanti S, Laezza C, Bifulco M: Interaction of endocannabinoid system and steroid hormones in the control of colon cancer cell growth. *J Cell Physiol* doi: 10.1002/jcp.22727, 2011.
- Seidel MF, Herguijuela M, Forkert R, Otten U: Nerve growth factor in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 40(2) : 109-126, 2010.
- Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A: Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles. *Mol Cell Endocrinol* 272(1-2) : 22-37, 2007.
- Snider WD: Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77(5) : 627-638, 1994.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC: Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24 : 1217-1281, 2001.
- Stener-Victorin E, Lundeberg T, Cajander S, Aloe L, Manni L, Waldenström U, Janson PO: Steroid-induced polycystic ovaries in rats: effect of electro-acupuncture on concentrations of endothelin-1 and nerve growth factor (NGF), and expression of NGF mRNA in the ovaries, the adrenal glands, and the central nervous system. *Reprod Biol Endocrinol* 1 : 33-40, 2003.
- Taishi P, Churchill L, De A, Obal F Jr, Krueger JM: Cytokine mRNA induction by interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Brain Res* 1226 : 89-98, 2008.
- Takaoka K, Shirai Y, Saito N: Inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha enhances nerve growth factor production in human keratinocytes, HaCaT cells. *J Pharmacol Sci* 111(4) : 381-391, 2009.
- Taylor AE, McCourt B, Martin KA, Anderson EJ, Adams JM, Schoenfeld D, Hall JE: Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82 : 2248-2256, 1997.
- Tokusashi Y, Asai K, Tamakawa S, Yamamoto M, Yoshie M, Yaginuma Y, Miyokawa N, Aoki T, Kino S, Kasai S, Ogawa K: Expression of NGF in hepatocellular carcinoma cells with its receptors in non-tumor cell components. *Int J Cancer* 114 : 39-45, 2005.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS: High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis. *Hum Reprod* 21 : 782-787, 2006.
- Toyoda M, Nakamura M, Makino T, Hino T, Kagoura M, Morohashi M: Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 147(1) : 71-79, 2002.
- Vaitukaitis JL: Polycystic-ovary syndrome-what is it? *N Engl J Med* 309 : 1245-1246, 1983.
- Zhuang YH, Sarca D, Weisz A, Altucci L, Cicatiello L, Rollerova E, Tuohimaa P, Ylikomi T: Cell type-specific induction of cyclin D and cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1) expression by estrogen in rat endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78(2) : 193-199, 2001.

< 국문 초록 >

다낭성 난소증후군(polycystic ovary syndrome, PCOS)은 내분비 및 대사장애로 호르몬 불균형 상태를 야기하여 가임기 여성의 불임 및 여러 합병증을 유발한다. 폐경기 여성의 호르몬대체 치료에 사용되는 estradiol valerate (EV)는 과다 투여 시 PCOS를 유발하는 것으로 알려졌다. 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)는 발생 중인 신경세포의 생존과 성숙을 조절하는 인자로 난소에서도 합성되고, EV 처리에 의해 유도된 다낭성난소(poly-cystic ovary, PCO)에서 발현이 크게 증가하는 것으로 보고됐다. 따라서 본 연구에서는 난소유래 세포인 CHO 세포주와 다낭성

난소를 이용해 호르몬 불균형 상태인 PCOS 진단 시 NGF가 생물학적 표지인자로서 사용될 수 있는 가능성을 규명하고자 하였다. CHO 세포에 EV 2mg과 3mg 처리는 초기에 세포증식을 억제했으나 1mg 처리는 영향을 미치지 않음으로써 실험 시 최적농도로 사용하였다. 하지만 농도별 EV 처리에 따른 CHO 세포의 형태학적 차이는 관찰되지 않았다. CHO 세포에 EV 처리 후 NGF

mRNA 및 단백질 발현은 대조군에 비해 30분 후 크게 증가하였고, 다수의 난포낭이 관찰된 PCOS 조직에서도 정상군에 비해 크게 증가하였다. 따라서 이상의 결과들을 종합하면 EV 처리 후 난소에서 유도되는 NGF 과발현은 비정상적 난포발달을 유도하는 인자로 작용할 것으로 보이며, 다낭성난소 진단 시 표지인자로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다.