

Histological Changes in the Accessory Reproductive Organs and Liver of Male Mice in Response to Short-term Treatment with an Estrogen Receptor Agonist

Yun Jeong Mo¹, Young Kuk Cho² and Hyun Wook Cho^{1*}

¹Department of Biology, College of Bio-industry Science, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-950, Korea

²Department of Laboratory Medicine, Seoyeong University, Gwangju 500-742, Korea

Received July 9, 2014 / Revised August 4, 2014 / Accepted October 16, 2014

In this study, the estrogen receptor agonist propyl pyrazole triol (PPT), which has high-affinity with the estrogen receptor alpha, was subcutaneously injected into adult male mice every 2 days for 8, 16 and 24 days, after which histological changes in accessory genital glands, including the prostate and seminal vesicle, and the liver were observed. The body and genital gland weights decreased in the PPT group relative to those of the control group. However, the liver weight was two times greater in the PPT group. The luminal area of the prostate and seminal vesicle organs was lower in the PPT group, and the epithelial cell height of the prostate was increased relative to that of the control. There were many secretory vacuoles in the supranuclear cytoplasm of epithelial cells in the seminal vesicles of the control group, but these were not observed in the PPT group. The short sinusoidal diameter of the liver was 147.0%, 198.7%, and 223.3% greater in the PPT group than in the control group after 8, 16, and 24 days of treatment, respectively. These results suggest that PPT administration affected the reproductive organs and the liver and that the histological changes increased in accordance with a rise in the concentration of PPT. Overall, the PPT treatment caused changes in the epithelial cell height and resulted in atrophy of the luminal area of the prostate, leading to altered fertility. The sinusoidal diameter of the liver dramatically increased in response to the administration of PPT, increasing the liver weight.

Key words : Liver, male mouse, PPT (propyl pyrazole triol), prostate, seminal vesicle

서 론

암컷호르몬으로 알려져 있는 에스트로겐은 암컷뿐만 아니라 수컷 내에서도 분비된다는 사실은 이미 1930년대에 밝혀져 있었지만[37], 에스트로겐이 어떠한 생리적 영향을 가지고 있는지는 논란이 있었고, 지금에 와서는 수컷 생식계에서 중요한 역할을 한다는 것이 많은 연구자들의 도움으로 밝혀져 있다[11, 12, 28, 36]. 수컷생식기관에서, 에스트로겐은 testosterone과 androstenedione이 aromatization을 통해 각각 estradiol과 estrone으로 전환되어 형성되는데, 이 과정을 중재하는 효소가 P450 mono-oxygenase 효소 복합체이다. P450 aromatase는 CYP19 유전자의 산물로서 최소 16개의 exon으로 구성되어 있으며, 사람의 경우 15번 염색체에 위치해 있다[18]. 에스트로겐의 농도는 정소의 정소낭(rete testis)에 있는 정소액과, 그리고 정액에 높은 농도로 존재한다고 알려져 있

으며, 또 에스트로겐은 2종류의 에스트로겐 수용체 알파(estrogen receptor alpha, ER α)와 에스트로겐 수용체 베타(estrogen receptor beta, ER β)의 매개 작용을 통해 기능을 나타낸다[13]. ER α 는 ESR1으로, ER β 는 ESR2로도 알려져 있다. 비록 ER α 와 ER β 의 구조가 비슷하지만, 주요한 이들 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)의 차이점은 ER α 가 결핍된 형질 전환된 생쥐는 불임이지만 ER β 가 결핍된 생쥐는 생식력을 갖고 있다는 점이다[17]. 생쥐의 경우, 정소의 Leydig 세포에는 ER α 와 ER β 가 같이 존재하지만 Sertoli 세포의 경우에는 ER α 가 없는 반면에 ER β 는 존재하는 것으로 보고되었고, 동물의 종류에 따라서, 그리고 연구자에 따라서 ER α 와 ER β 의 존재여부가 다르게 나타나기도 한다[2].

정액의 약 70%를 분비하는 정낭의 경우, 점막이 복잡하게 형성된 주름을 형성하고 있으며, 나머지 정액을 분비하는 전립샘의 경우에도 내강에 상피조직으로 덮여 있는 수많은 주름이 돌출되어 있는 수컷 부속생식샘이다. 정낭과 전립샘에도 ER이 존재하는데, 정낭에서는 상피와 기질부위에 ER α 가 아주 약하게 존재하지만 ER β 는 존재하지 않는다고 하였다[35]. 그리고 복부쪽 전립샘의 경우, ER α 와 ER β 가 상피조직에 약하게 존재하며, 기질부위에서는 아주 약하게 존재한다고 하였다. 따라서 이런 부속생식샘들도 에스트로겐이 기능을 발휘하는 기관이며 또한 에스트로겐의 영향을 받는다고 할 수 있다. ER

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3614, Fax : +82-61-750-3208

E-mail : hwcho@suncheon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 양은 조직마다 일정한 것이 아니라 에스트로겐 양에 따라서 늘어나거나 줄어들게 되며, 조직 내의 에스트로겐 수용체 발현율의 차이가 에스트로겐에 대한 반응성을 나타내는 것으로 볼 수 있다[32].

수컷에서 일어나는 에스트로겐의 기능을 알기 위해 ER 저해제인 ICI 182,780을 투여하여 수용체의 기능을 억제시켰을 때 나타나는 변화를 추적함으로써 에스트로겐의 역할을 간접적으로 연구하였다[4, 19]. 한편에서는 유전적으로 ER α 가 결핍된(estrogen receptor alpha knockout, α ERKO) 생쥐나, ER β 가 결핍된(estrogen receptor beta knockout, β ERKO) 생쥐를 사용하여 수컷 체내 에스트로겐의 기능을 연구하기도 하였다[13, 14]. ER은 혈관에도 존재하는 것으로 알려져 있는데, 간에 분포하는 혈관의 평활근 세포에 존재하기도 하며[34], 혈관의 내피세포에도 두 종류의 ER이 분포하는 것으로 밝혀져 있다[5]. 따라서 간에도 ER이 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 ER 촉진제인 propyl pyrazole triol (PPT)을 수컷 생쥐에 단기간 투여하여 정낭과 전립샘 및 간의 조직학적 변화를 확인하고자 하였으며, 또한 기존의 장기간 투여한 경우와 본 실험의 결과 변화를 서로 비교해 보고자 하였다. 본 실험에 사용된 PPT는 수용체 시험 결과, ER β 에 비해 ER α 와 410배 높은 친화성으로 결합하는 것으로 알려져 있다[29]. 이런 PPT에 의한 부속생식 및 간의 세포나 조직의 변화를 확인해 봄으로서 수컷 체내에서 일어나는 에스트로겐의 생리학 적 기능을 이해하는데 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

재료 및 방법

실험동물

성체에 해당하는 10주령 된 수컷 C57BL/6 생쥐 30마리를 사용하였다. 생쥐를 무작위적으로 대조군과 처리군으로 나누고, 각 군에 15마리를 할당하였다. 처리군의 경우 PPT (4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)tris-phenol, Tocris Cookson Ltd., United Kingdom) 4 mg을 castor oil 0.1 ml에 희석하여 이틀에 1회씩 등쪽 목덜미에 피하주사하였다. 대조군의 경우 castor oil 0.1 ml만 피하주사하였다. 이틀에 1회씩 4회 투여하고 2일이 지난 10일째에 대조군과 처리군 각각 5마리를 첫 번째 희생시켰다(4회 투여군). 그리고 이틀에 1회씩 8회 투여하고 2일이 지난 18일째에 각 군별로 5마리씩 두 번째 희생시켰다(8회 투여군). 마찬가지로 이틀에 1회씩 12회 투여하고 2일이 지난 26일째에 각 군별로 세 번째 희생시켰다(12회 투여군). 실험하는 동안 실험동물은 일정한 온도(22±2°C)와 상대습도(50±5%)가 유지되는 사육실에서 물과 먹이를 무제한 공급받았다. 모든 동물실험은 순천대학교 동물실험윤리위원회의 승인(SCNU IACUC-2013-12)을 받은 후에 수행하였다.

조직학적 처리

실험동물을 희생하기 위하여 먼저 헤파린 0.1 ml를 복강에 주입한 다음 sodium pentobarbital을 복강 주사하여 마취시킨 후 4% glutaraldehyde로 20분간 심장 관류하였다. 관류하여 희생시킨 다음 복부 전립샘과 정낭을 적출하여 지방을 제거하였으며, 여과지에 올려 물기를 제거한 후 무게를 측정하였다. 전립샘의 경우, 동물에 따라 형태가 다양한데 생쥐는 3개의 엽 즉, 앞 전립샘(anterior prostate, 또는 coagulating gland로도 알려져 있음), 배측 전립샘(dorsolateral prostate), 복부 전립샘(ventral prostate)으로 구성되어 있는데[1], 편의상 복부 전립샘만 실험재료로 사용하고 또 이 샘의 무게만 측정하였다. 정낭의 경우, 2개로 구성되어 있는데 각각의 무게를 측정 한 다음, 1개의 정낭 무게 평균값과 표준편차를 구하였다. 간의 경우에도 붙어 있는 지방을 제거하고 여과지에 올려 물기를 제거한 후 무게를 측정하였다. 그리고 조직연구에 적합한 크기로 전립샘과 정낭 및 간을 세절하였다. 이어서 0.01 M phosphate buffer로 세절한 전립샘과 정낭 및 간 조직을 수세하였다. 그 후 에탄올 탈수 과정을 거쳐 침투용액을 처리하고 마지막으로 JB-4에 조직을 포매하였다. 포매된 조직을 마이크로톰을 사용하여 2.5 μ m 두께의 조직절편을 제작하였다. 이 조직절편을 PAS-hematoxylin으로 이중 염색을 실시하였다. 염색과정은, 먼저 조직절편을 증류수에 10분, periodic acid에 15분, 증류수에 10분, Schiff 용액에 45분, sulfurous acid에 각각 5분씩 3회, 흐르는 물에 20분, hematoxylin에 35분, 마지막으로 흐르는 물에 10분을 두었다가 꺼낸 다음 건조시켰다. 염색이 완료된 후, permount로 봉입하여 영구 프레파라트를 완성하여 광학현미경으로 관찰하였다.

사진촬영 및 분석

현미경에 설치된 SPOT 디지털 카메라(Diagnostic Instruments사, Model No. 11.2 Color Mosaic)로 촬영하여 컴퓨터에 영상을 저장하였다. 분석은 Video Test Image Analysis System을 이용하였는데 복부 전립샘과 정낭의 경우, 생쥐 한 마리당 분비물이 들어 있는 내강을 둘러싸는 상피세포 30개의 높이를 각각 측정하여 비교하였다. 간에 미치는 영향을 확인하기 위해서 간 모세혈관인 굴모양혈관(sinusoid)의 짧은 쪽 직경을 생쥐 한 마리당 30회 측정하였다. 대조군과 각 PPT 투여군 간의 통계학적 처리는 MS-Office Excel 프로그램의 one-way ANOVA 방법을 이용하였으며, p 값이 0.05 보다 더 작을 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

결 과

무게 변화

전 실험기간에 걸쳐, 몸무게가 PPT 처리군이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Table 1). 대조군의 전립샘과 정낭 무

Table 1. Effects of PPT on body and organ weights

Body and organ weight	Group	Injection times		
		4	8	12
Body (g)	Control	25.2±1.0	25.1±0.6	24.8±0.8
	PPT	23.4±1.5	22.2±1.0*	21.5±1.1*
	(rate)	(-7.1%)	(-11.5%)	(-13.3%)
Ventral prostate (mg)	Control	9.5±1.0	9.9±1.1	11.0±2.2
	PPT	5.5±0.6*	5.5±0.1*	4.5±1.2*
	(rate)	(-42.1%)	(-44.4%)	(-59.0%)
Seminal vesicle (mg)	Control	83.6±6.0	119.0±7.0	128.7±12
	PPT	25.3±6.0*	18.9±4.0*	15.5±4.0*
	(rate)	(-69.7%)	(-84.1%)	(-87.9%)
Liver (g)	Control	2.0±0.2	2.1±0.4	2.0±0.2
	PPT	4.2±0.4*	4.3±0.5*	4.1±0.8*
	(rate)	(+110.0%)	(+104.7%)	(+105.0%)

Values represent mean ± SD.

* : $p < 0.05$ compared with control group

-; Decrease. +; Increase.

게는 실험이 진행될수록 증가하는 경향을 보였다. 그러나 PPT 처리군의 경우, 전립샘과 정낭 모두 무게가 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 4회 PPT를 투여한 전립샘의 경우, 대조군에 비해 42.1%의 무게 감소비율을 보였으며 투여 횟수가 많은 12회 투여군의 경우 59.0%의 감소비율을 나타내었다. 대조군에 대한 투여군 정낭의 무게는 감소비율이 더욱 커졌다. 즉, 4회 투여군의 정낭 무게 감소비율은 대조군에 비해 69.7%이었고, 8회 투여군의 경우 84.1%, 12회 투여군은 87.9%로 급격하게 감소하였다(Table 1). 생식기관과 반대로 간의 무게는 대조군에 비해 4회, 8회, 12회 투여군 간의 무게는 각각 2배가 넘는 110.0%, 104.7%, 105.0%의 증가를 보였다.

전립샘의 형태적 변화

대조군 전립샘의 경우, 단층원주상피세포가 내강을 둘러싸고 있었으며, 내강에는 PAS염색에 양성반응을 보이는 붉게 염색된 분비물이 가득 차 있었다(Fig. 1A). 내강의 가장자리 주변에는 PAS에 아주 강하게 염색되는 전립샘들(prostatic concretion)이 관찰되기도 하였다. 대조군의 내강 상피세포 평균 높이는 4회째의 경우 16.7 μm , 8회째는 17.4 μm , 12회째는 14.4 μm 이었다(Table 2). PPT 투여군의 경우, 대조군에 비해 내강의 면적이 감소되었고, PAS에 염색되었던 분비물이 약하게 염색되거나(4회 투여군) 또는 그 이후 투여군의 경우 내강에 분비물이 축적되지 않는 것으로 관찰되었다. 8회째 경우에는 간혹 전립샘들이 대조군에 비해 수도 많았고 PAS에 강하게 염색되기도 하였다. 내강의 면적이 줄어든 반면에 상피세포 높이는 각각 4회(Fig. 1B) PPT 투여군의 경우 17.6 μm , 8회(Fig. 1C)는 18.2 μm , 12회(Fig. 1D)는 16.9 μm 로 나타나, 대조군에 비해 각각 5.3%, 4.5%, 17.3%로 증가하였다(Table 2). 대조군의 상피세포 자유표면 부위가 편평한데 비해 투여군의 자유표면 부위는 내강 쪽으로 볼록하게 돌출되어 나타나기도 하였다.

정낭의 형태적 변화

정낭의 경우, 전립샘과 비슷하게 전 처리기간에서 대조군의 내강을 둘러싸고 있는 상피세포가 단층으로 배열되어 있으며 내강에 PAS에 양성으로 염색이 나타났(Fig. 2A). 내강의 중심부위 보다, 상피세포의 자유표면과 접하는 내강 부위가 PAS에 더 강하게 염색되어 나타났다. 반면에 처리군에서는 투여 후 4회째(Fig. 2B)에 해당하는 정낭에서부터 내강이 거의 보이지 않을 정도로 축소되었으며, 그에 따라 분비물도 거의 찾아볼 수 없었다. 세포의 전체적인 형태도 전립샘과 비슷한 변화

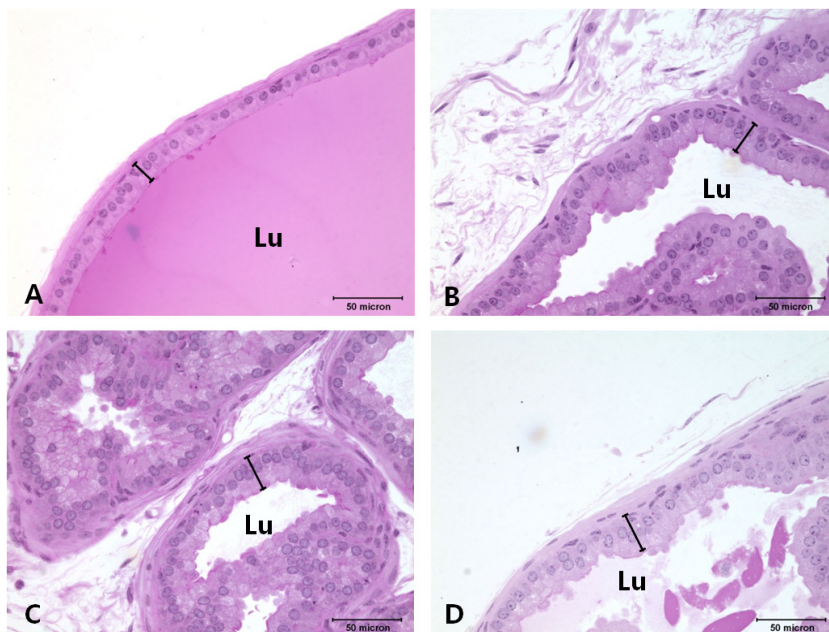


Fig. 1. Photomicrographs of ventral prostate from control (A), and PPT treated group of 4(B), 8(C) and 12(D) injection times. Black line indicates the epithelial cell height of ventral prostate. The lumen (Lu) of PPT group shows greatly reduced PAS staining (B-D), or several prostatic concretion (D). Lumen was also atrophied resulting with irregular epithelial cell height in PPT treated group. Bars size = 50 μm .

Table 2. Epithelial cell height in genital organs and sinusoidal diameter in liver of control and PPT treated groups

Parameter (μm)	Group	Injection times		
		4	8	12
Epithelial cell height in ventral prostate	Control	16.7±2.7	17.4±3.0	14.4±2.0
	PPT	17.6±2.7*	18.2±2.6*	16.9±2.2*
	(rate)	(+5.3%)	(+4.5%)	(+17.3%)
Epithelial cell height in seminal vesicle	Control	21.2±2.9	19.0±2.5	19.0±2.9
	PPT	21.5±2.9	20.3±2.2*	16.6±2.5*
	(rate)	(+1.8%)	(+6.8%)	(-12.6%)
Sinusoidal diameter in liver	Control	8.5±1.2	8.0±1.4	7.6±1.1
	PPT	21.0±4.5*	23.9±5.6*	24.5±8.3*
	(rate)	(+147.0%)	(+198.7%)	(+223.3%)

Values represent mean ± SD.

**p*<0.05 compared with control group.

-; Decrease. +; Increase.

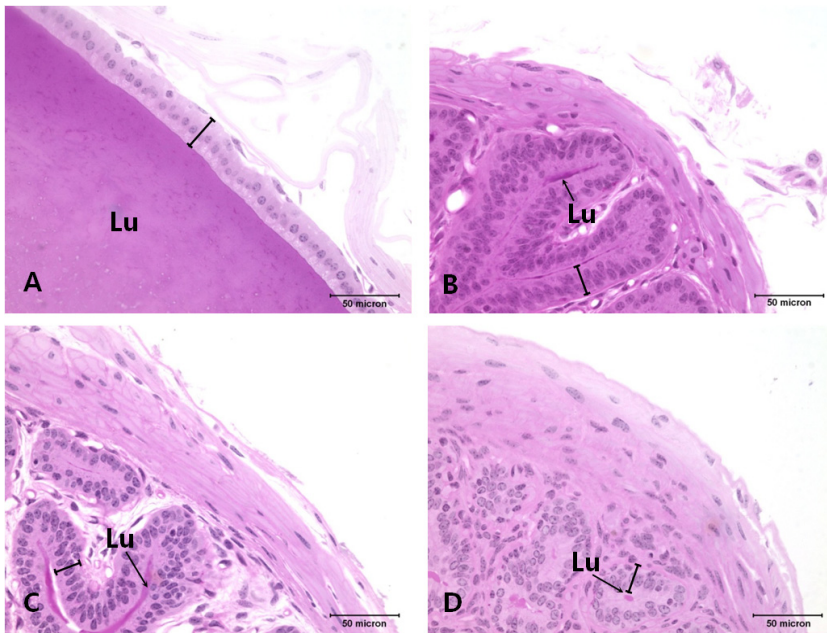


Fig. 2. Photomicrographs of seminal vesicle from control (A), and PPT treated group of 4(B), 8(C) and 12(D) injection times. Black line indicates the epithelial cell height of seminal vesicle. Lumens of control group (A) show strong positive PAS staining however, PPT group (B-D) indicate the greatly reduced lumen. Bars size = 50 μm.

양상이 관찰되었다. 편평하게 배열되어 있는 대조군 상피세포와 달리 처리군 상피세포는 불규칙한 형태로 변했으며 자유표면 또한 일정하지 않았다(Fig. 2). 정낭의 내강을 둘러싸는 대조군 상피세포 높이는 4회(Fig. 2B), 8회(Fig. 2C), 12회(Fig. 2D) 군에서 각각 21.2 μm, 19.0 μm, 19.0 μm 인데 비해 투여군의 경우 4회째와 8회째에 각각 21.5 μm, 20.3 μm로 나타나 증가한 반면에, 12회째에는 16.6 μm로 나타나 대조군에 비해 감소하였다(Table 2). 대조군 상피세포의 자유표면 방향에 가까운 핵 위쪽 세포질(supranuclear cytoplasm)에 많은 분비소포들이 관찰되었으나(Fig. 3A), PPT 투여군 상피세포에서는 감소되어 거의 나타나지 않았다(Fig. 3B).

간 조직의 형태적 변화

대조군 간 조직의 경우, 대부분 굴모양혈관의 직경이 작게 관찰되었고, 간세포의 세포질에 있는 글리코겐 과립들이 PAS 염색에 진하게 염색되어 관찰된 반면에(Fig. 4A), PPT 투여군에서는 글리코겐 과립의 염색이 약하게 관찰되었다. 대조군 간세포 내 크고 작은 지방방울이 존재하였으나 투여군에서는 그 수가 감소되었다. 투여군의 굴모양혈관에 중성호성백혈구(neutrophil)나 적혈구가 관찰되기도 하였다. 8회 투여군(Fig. 4C)의 굴모양혈관 직경이 증가하면서 상대적으로 간세포가 위축되어 길쭉한 형태로 나타났고, 굴모양혈관내 적혈구의 수도 증가되어 나타났다. 그리고 투여군에서는 간세포내 지방방울이 잘 관찰되지 않았다. 투여군 4회(Fig. 4B), 8회(Fig. 4C), 12회(Fig. 4D)의 간에 있는 모세혈관인 굴모양혈관의 직경 비

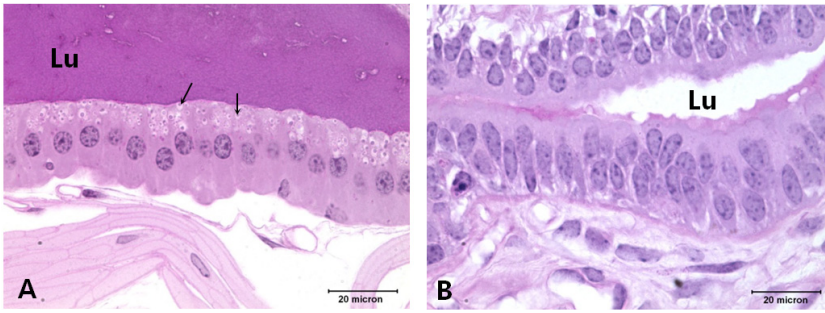


Fig. 3. Higher magnification of seminal vesicle from control (A), and PPT treated group of 8(B) injection times. Single arrows indicate the secretory vacuoles in the supranuclear cytoplasm of epithelial cell. The secretory vacuoles were not observed in the PPT treated group compared with control group. Lu; Lumen. Bars size = 20 μ m.

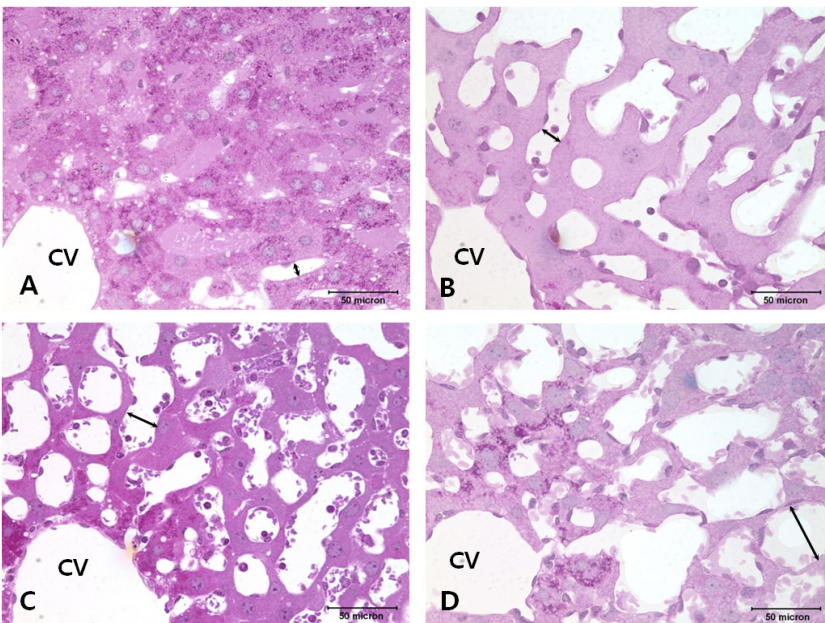


Fig. 4. Photomicrographs of liver from control (A), and PPT treated group of 4(B), 8(C) and 12(D) injection times. Double arrow indicates the shortest sinusoidal diameter. PPT group shows the enlarged sinusoid. CV; Central vein. Bars size = 50 μ m.

율은 대조군에 비해 147.0%, 198.7%, 223.3%로 급격하게 증가하였다(Table 2).

고찰

본 실험에서는 에스트로젠 수용체 촉진제인 PPT의 단기간 투여에 따른 생쥐 수컷 부속생식샘 및 간의 무게, 그리고 조직학적 변화를 기간별로 관찰하였다. 투여한 PPT 4 mg의 농도는 생쥐의 생활활동에 영향을 미치지 않으면서 생식기관을 비롯한 다양한 장기에 뚜렷한 조직학적 변화를 유발하였던 기존의 ER 촉진제나 억제제 투여 결과를[4, 10, 15] 참고하여 결정되었다. 그리고 기존의 1주일에 1회씩 동일한 농도의 PPT를 8주(56일)까지 상대적으로 장기간 투여한 결과와, 본 실험의 이틀에 1회씩 PPT를 12회(24일)까지 상대적으로 단기간 투여한 결과를 서로 비교해 보고자 하였다.

PPT 투여군의 경우, 간을 제외하고 체중, 정낭, 전립샘의 무게가 대조군에 비해 감소하였다. 성체 수컷 생쥐에 PPT 4 mg을 1주에 1회씩 투여하고 3주, 5주, 8주 후에 희생한 보고에 의하면[15], 생쥐의 평균 체중이 대조군에 비해 각각 5.0%,

11.2%, 30.9%로 감소하였다고 하였다. 본 실험에서도 4회, 8회, 12회로 투여 횟수가 많아질수록 각각 7.1%, 11.5%, 13.3%로 체중이 감소되는 경향을 나타내었다. 기존 보고처럼 1주일에 1회 투여하는 장기간의 실험이 아닌, 이틀에 1회씩 짧은 기간 투여한 경우에도 PPT에 의해 체중이 감소되는 결과가 나타났다. PPT에 의한 이런 체중 감소에 대한 설명은, 신경계 내에서 포만 호르몬(cholecystokinin)에 대한 민감성을 높이거나, 또는 leptin 호르몬에 대한 뇌의 민감성을 높여 식이섭취량이 감소되고 이로 인해 체중이 감소된다는 것이다[24]. 그리고 에스트로젠이나 또는 ER 촉진제를 투여했을 때 식이섭취량이 감소되고 체중이 감소되는 것은 ER β 보다는 ER α 를 통해 호르몬 작용이 나타나는 것으로 밝혀졌다[27]. ER은 유전자의 전사를 조절하는 핵 수용체(nuclear receptor)로 알려져 있었지만 최근에는 세포막에도 존재한다는 것이 밝혀졌다[16, 26]. 핵에 있는 ER의 단독 매개작용에 의해 먹이와 물의 섭취량이 감소되는 것이 아니라 이런 세포막 ER의 작용과 더불어 먹이 섭취가 감소되는 것으로 보고되었다[26]. 본 실험에서도 핵에 있는 ER, 그리고 세포막에 있는 ER의 매개작용을 촉진하는 PPT에 의해 먹이 감소로 인하여 체중 감소로 연결된 것이 아닌가

여겨진다.

본 실험의 복부 전립샘 무게도 PPT 투여 횟수에 따라 각각 42.1%(4회), 44.4%(8회), 59.0%(12회) 감소되었다. 투여기간이 길어질수록 전립샘의 샘포 내강이 축소되거나 거의 없어지는 위축현상이 심화되었는데, 그 결과 대조군에 비해 투여군의 무게가 감소된 것으로 보인다. 4 mg의 PPT를 1주일에 1회씩 투여한 기존 실험에서는 3주, 5주, 8주 후에 희생한 생쥐 복부 전립샘 무게가 각각 32.3%, 75.6%, 74.8%의 비율로 감소되었다[10]. ER α 가 복부 전립샘의 관분지(ductal branching)형성에 기여하는 것처럼, 전립샘의 성장과 발생에 안드로겐 및 에스트로겐과 이들의 수용체에 의해 조절된다는 것은 잘 알려져 있다[3, 20]. 대조군에 비해 투여군 전립샘의 경우 내강이 축소되었으며, 내강 내 PAS에 대한 양성 물질도 감소되거나 사라졌다. 그러면서 내강을 둘러싸는 상피세포의 높이가 증가되었는데(4회 투여 5.3%, 8회 투여 4.5%, 12회 투여 17.3%로 각각 증가), 이런 현상은 내강을 차지하고 있던 용액이 감소되면서 상피에 미치는 압력이 줄어들고 이런 이유로 세포의 높이가 증가된 것이 아닌가 여겨진다. 기존의 1주일에 1회씩 4 mg의 PPT를 투여한 실험에서도[10] 전립샘의 내강이 축소되고, 또한 단층원주상피에서 중층입방상피로 변화된 부위도 관찰된다고 하였는데 본 실험의 경우와 유사하였다.

에스트로겐 투여에 의해서도 전립샘의 내강을 둘러싸는 원주상피세포가 중층평상피로 변화된다고 하였는데[6, 23] 이때 ER α 가 긴밀하게 참여한다고 하였다. 또한 에스트로겐은 전립샘 질병의 원인으로 추정되고 있으며, 성체 설치류의 전립샘 세포에 과형성, 형태변이, 케라틴화를 일으킨다는 연구 결과가 있다. 또한 원숭이, 개, 사람에서도 종마다 차이는 있으나 전립샘 상피에 이상성장을 일으킨다고 보고된 바 있다[21]. 본 실험에서는 대체적으로 투여횟수가 증가할수록 투여군 전립샘 내강 내 PAS 양성물질의 농도가 감소되었다. 이런 현상은 내강 주위 상피세포에서 전립샘액(prostatic fluid)이 분비되는데 PPT에 의해서 상피세포가 변화되면서 나타난 현상이 아닌가 생각된다. 보고에 의하면, PPT에 의해 전립샘 성장이 저해되고, 전립샘 조직이 파괴됨으로서 상피조직과 기질부위의 세포 분화가 변화된다는 것이다[30]. 그리고 실험 결과에서, 전립샘 상피세포의 형태가 변화한 것과 에스트로겐 투여 시 전립샘 상피세포의 형태 변화는 비슷한 맥락으로 보인다. 이 결과로 생각해 볼 때, PPT 투여는 생쥐의 전립샘에 있어 고농도의 에스트로겐에 노출된 것과 같은 영향을 주는 것으로 생각된다.

본 실험에서 전 실험기간 동안 특히 가장 많은 무게 감소를 보인 기관은 정낭으로 4회, 8회, 12회 투여군에서 각각 69.7%, 84.1%, 87.9%의 높은 비율로 감소하였다. PPT 투여군에서는 정낭의 내강이 축소되고, 또 PAS에 염색되었던 분비물도 거의 나타나지 않으면서 전체적으로 정낭이 위축되었는데 그런 이유 때문에 무게 감소가 유발된 것으로 보인다. 4 mg의 PPT를

1주일에 1회씩 투여한 기존 실험에서는 3주, 5주, 8주 후에 희생한 생쥐 정낭 무게가 각각 90.0%, 90.0%, 91.6%의 높은 비율로 감소되었다[10]. 본 실험과 기존의 보고된 내용을 비교해 보면 정낭의 무게 감소에 더 많은 영향을 미치는 요인은 PPT의 투여횟수 보다 투여기간이 더 긴 경우에 영향을 많이 받았음을 알 수 있다. 본 실험에서 투여군 정낭의 내강이 축소되고, 분비물의 감소가 두드러지게 나타난 것은 상피세포의 핵 위쪽 세포질에 있는 분비 소포가 감소한 것과 관련 있는 것으로 보인다. α ERKO와 β ERKO, 그리고 에스트로겐 수용체가 녹아들지 않은 일반 생쥐에게 합성 에스트로겐인 diethylstilbestrol (DES)을 투여하여 정낭의 변화를 관찰한 실험 결과에 따르면, 고농도의 에스트로겐 투여는 정낭에 독성 영향을 미친다. 이 실험에서 합성 에스트로겐 DES 투여 효과는 α ERKO에서는 나타나지 않았으며, β ERKO와 일반 생쥐에서는 정낭의 내강이 수축하는 등 PPT를 투여한 효과와 비슷한 영향을 준 것으로 나타났다[33]. 결론적으로 에스트로겐이 정낭에 미친 독성 효과는 주로 ER α 에 의존하는 것으로 보인다고 하였다. PPT는 수용체 ER β 보다 ER α 에 더 높은 친화력을 보인다는 점을 상기하면 전립샘에서와 마찬가지로, PPT 투여가 정낭에 있어 고농도의 에스트로겐에 노출된 것과 같은 영향을 준 것으로 보인다.

성체 수컷 흰쥐에 합성 DES를 투여 했을 때 정낭의 무게 감소가 일어났지만[8], 저농도로 DES를 투여할 경우에는 오히려 정낭의 무게가 증가하였다고 보고되었다[9]. 즉, DES를 1 ng의 저농도로 투여하면 정낭의 무게가 증가하였고, 10 μ g의 고농도로 DES를 투여하면 억제효과를 나타내어 오히려 무게가 감소된다고 하였는데, 본 실험처럼 고농도인 4 mg의 PPT를 투여한 경우에는 본래의 촉진효과 보다는 억제효과를 나타낸 것이 아닌가 생각된다. 정낭 내강 주위의 상피세포 높이가 4회, 8회 투여까지는 각각 1.8%, 6.8% 증가하다가 12회 투여군에서는 세포 높이가 12.6%로 감소되었다. 전립샘과 다르게 마지막 투여군의 정낭 세포 높이가 감소한 것은 가장 많이 감소한 정낭 무게와 관련되어 있는 것 같다. 즉 누적된 PPT 투여에 의해 내강이 거의 없어져서 반대편 상피세포끼리 서로 맞닿기도 하였는데 이런 급격한 정낭의 변화, 그리고 전립샘의 경우처럼 PPT에 의한 전립샘의 상피조직과 기질 부위의 세포변화가 유발된 것처럼[30], PPT의 누적된 투여에 의한 정낭 상피세포의 변화 등에 의해서 정낭의 상피 세포 높이가 줄어든 것이 아닌가 여겨진다.

PPT 4회 투여 초기부터 간의 무게가 급격하게 증가되어 (110.0%) 실험 끝인 12회 투여까지 증가된 상태(105.0%)로 유지되었다. 이런 현상은 기존의 4 mg의 PPT를 1주일에 1회씩 투여한 기존 실험에서는 3주, 5주, 8주 후에 희생한 생쥐의 간 무게가 104.7%, 151.1%, 116.8%의 비율로 증가된 현상과 유사하다[15]. 전립샘과 정낭과 같은 부속생식샘과 다르게 간의 무게가 증가한 것은 간의 모세혈관인 굴모양혈관이 PPT에

의해 확장되고 그 혈관 내에 관류액과 같은 액체가 들어 있어서 나타난 현상으로 생각된다. 기존의 보고에 의하면, 에스트로겐이 혈관 확장과 관련이 있는 것으로 잘 알려져 있다. 실험적으로 에스트로겐을 흰쥐에 투여하면 혈관의 내강이 확대되는 것으로 밝혀져 있다[22]. 즉, 에스트로겐은 흰쥐 간의 굴모양혈관 내피세포에서 일산화질소 합성을 촉진하는데[25], 이 일산화질소에 의해 혈관이 확장된다는 것이다[7]. 그리고 에스트로겐은 angiotensin II, endothelin-1과 같은 혈관수축 인자의 생성을 감소시켜 혈관을 확장시킨다[31]. 본 실험에서 4회, 8회, 12회 PPT 투여 시 각각, 147.0%, 198.7%, 223.3%의 급격한 비율로 굴모양혈관의 직경이 증가되었다. 이런 현상은 1주일에 1회씩 PPT를 3주, 5주, 8주 동안 투여한 기존 실험에서도 각각 156%, 216%, 255%로 굴모양혈관의 직경이 증가하였다[15]. 기존의 보고처럼, 에스트로겐 투여로 인해 혈관의 확장이 유발된다고 하였는데, 본 실험의 경우 간의 굴모양혈관 직경이 2배 이상으로 커진 것은 ER 촉진제인 PPT가 에스트로겐 투여와 같은 효과를 나타낸 것으로 생각된다. 그리고 간의 경우, 이들에 1회씩 투여한 본 실험보다 1주일에 1회씩 PPT를 투여한 기존 실험에서 굴모양혈관의 직경이 더 증가되었는데, 이 이유는 PPT가 1주일 동안 충분히 영향을 미칠 정도로 투여 기간이 길어서 굴모양혈관 직경에 더 크게 영향을 미친 것으로 보인다.

결론적으로 이들에 1회씩 PPT를 투여한 단기간의 실험에서도 생식력 차이와 연관될 수 있는 부속생식샘, 그리고 간의 조직학적 변화가 유발되었다. PPT 투여 횟수가 늘어날수록 기관의 무게 및 상피세포나 굴모양혈관에 미치는 영향이 증가되어 나타났다. 부속생식기관 및 간의 무게에 미치는 영향을 기존의 일주일에 1회씩 PPT를 투여한 경우와 본 실험의 이들에 1회씩 PPT를 투여한 결과를 비교해 보면, 투여한 누적 PPT 용량이 같더라도 PPT를 투여한 기간이 더 길수록 생식기관과 간 같은 장기들이 더 많은 영향을 받는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 순천대학교 학술기반조성비로 연구되었음.

References

- Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A. A., Sciavolino, P. J., Kim, M., Desai, N., Young, P., Norton, C. R., Gridley, T., Cardiff, R. D., Cunha, G. R., Abate-Shen, C. and Shen, M. M. 1999. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* **13**, 966-977.
- Carreau, S. and Hess, R. A. 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 1517-1535.
- Chen, M., Yeh, C. R., Chang, H. C., Vitkus, S., Wen, X. Q., Bhowmick, N. A., Wolfe, A. and Yeh, S. 2012. Loss of epithelial estrogen receptor α inhibits estrogen stimulated prostate proliferation and squamous metaplasia via *in vivo* tissue selective knockout models. *J Pathol* **226**, 17-27.
- Cho, H. W., Nie, R., Carnes, K., Zhou, Q., Sharief, N. A. Q. and Hess, R. A. 2003. 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.
- Couse, J. F. and Korach, K. S. 1999. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* **20**, 358-417.
- Cunha, G. R., Wang, Y. Z., Hayward, S. W. and Risbridger, G. P. 2001. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reprod Fertil Dev* **13**, 285-296.
- Farhat, M. Y., Lavigne, M. C. and Ramwell, P. W. 1996. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* **10**, 615-624.
- Goyal, H. O., Braden, T. D., Mansour, M., Williams, C. S., Kamaleldin, A. and Srivastava, K. K. 2001. 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.
- Goyal, H. O., Robateau, A., Braden, T. D., Williams, C. S., Srivastava, K. K. and Ali, K. 2003. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biol Reprod* **68**, 2081-2091.
- Han, J. Y. and Cho, H. W. 2009. 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.
- Hess, R. A., Bunick, D. and Bahr, J. 2001. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract—a review. *Mol Cell Endocrinol* **178**, 29-38.
- Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. H., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S. and Lubahn, D. B. 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* **390**, 509-512.
- Hess, R. A., Fernandes, S. A. F., Gomes, G. R. O., Oliveira, C. A., Lazari, M. F. M. and Porto, C. S. 2011. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *J Androl* **32**, 600-613.
- Joseph, A., Shur, B. D., Ko, C., Chambon, P. and Hess, R. A. 2010. Epididymal hypo-osmolality induces abnormal sperm morphology and function in the estrogen receptor α knockout mouse. *Biol Reprod* **82**, 958-967.
- Lee, E. J., Lee, Y. M., Choe, E. S., Seong, C. N. and Cho, H. W. 2006. Effects of propyl pyrazole triol on the blood vessel-dilation and cellular morphology of liver and kidney in adult male mouse. *Toxicol Res* **22**, 365-373.
- Micevych, P. and Dominguez, R. 2009. Membrane estradiol signaling in the brain. *Front Neuroendocrinol* **30**, 315-327.
- Nie, R., Zhou, Q., Jassim, E., Saunders, P. T. and Hess, R. A. 2002. Differential expression of estrogen receptors α and β in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. *Biol Reprod* **66**, 1161-1168.
- O'Donnell, L., Robertson, K. M., Jones, M. E. and Simpson, E. R. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* **22**, 289-318.

19. Oliveira, C. A., Nie, R., Carnes, K., Franca, L. R., Prins, G. S., Saunders, P. T. K. and Hess, R. A. 2003. The antiestrogen ICI 182,780 decreases the expression of estrogen receptor- α but has no effect on estrogen receptor β and androgen receptor in rat efferent ductules. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 75.
20. Omoto, Y. 2008. Estrogen receptor-signaling in growth of the ventral prostate: Comparison of neonatal growth and postcastration regrowth. *Endocrinology* **149**, 4421-4427.
21. Prins, G. S. and Korach, K. S. 2008. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* **73**, 233-244.
22. Radzikowska, E., Maciejewski, R., Janicki, K., Madej, B. and Wojtowicz, Z. 2001. The relationship between estrogen and the development of liver vascular disorders. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med* **56**, 189-193.
23. Risbridger, G. P., Wang, H., Frydenberg, M. and Cunha, G. 2001. The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: Proliferation of cells with basal cell phenotype. *Endocrinology* **142**, 2443-2450.
24. Roesch, D. M. 2006. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* **87**, 39-44.
25. Sakamoto, M., Ueno, T., Nakamura, T., Hashimoto, O., Sakata, R., Kin, M., Ogata, R., Kawaguchi, T., Torimura, T. and Sata, M. 2001. Estrogen upregulates nitric oxide synthase expression in cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* **34**, 858-864.
26. Santollo, J., Marshall, A. and Daniels, D. 2013. Activation of membrane-associated estrogen receptors decreases food and water intake in ovariectomized rats. *Endocrinology* **154**, 320-329.
27. Santollo, J., Wiley, M. D. and Eckel, L. A. 2007. Acute activation of ER decreases food intake, meal size, and body weight in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R2194-R2201.
28. Sharpe, R. M. 1998. The role of estrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab* **9**, 371-377.
29. Stauffer, S. R., Coletta, C. J., Tedesco, R., Nishiguchi, G., Carlson, K., Sun, J., Katzenellenbogen, B. S. and Katzenellenbogen, J. A. 2000. Pyrazole ligands: Structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor- α selective agonists. *J Med Chem* **43**, 4934-4947.
30. Taylor, R. A., Cowin, P., Couse, J. F., Korach, K. S. and Risbridger, G. P. 2006. 17 β -estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ER α or ER β . *Endocrinology* **147**, 191-200.
31. Tostes, R. C., Nigro, D., Fortes, Z. B. and Carvalho, M. H. C. 2003. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res* **36**, 1143-1158.
32. Tsai, C. L. and Liu, T. K. 1992. Up-regulation of estrogen receptors in rabbit osteoarthritic cartilage. *Life Sci* **50**, 1727.
33. Walker, V. R., Jefferson, W. N., Couse, J. F. and Korach, K. S. 2012. Estrogen receptor- α mediates diethylstilbestrol-induced feminization of the seminal vesicle in male mice. *Environ Health Perspect* **120**, 560-565.
34. Winborn, W. B., Sheridan, P. J. and McGill, H. C. Jr. 1987. Sex steroid receptors in the stomach, liver, pancreas, and gastrointestinal tract of the baboon. *Gastroenterology* **92**, 23-32.
35. Yamashita, S. 2004. Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **279**, 768-778.
36. Yasuhara, F., Gomes, G. R., Siu, E. R., Suenaga, C. I., Maróstica, E., Porto, C. S. and Lazari, M. F. 2008. Effects of the antiestrogen fulvestrant (ICI 182,780) on gene expression of the rat efferent ductules. *Biol Reprod* **79**, 432-441.
37. Zondek, B. 1934. Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion. *Nature* **133**, 209-210.

초록 : 에스트로겐 수용체 촉진제의 단기 처리에 따른 수컷 생쥐 부속 생식기관 및 간의 조직학적인 변화

모윤정¹ · 조영국² · 조현욱^{1*}

(¹순천대학교 생명산업과학대학 생물학과, ²서영대학교 임상병리과)

에스트로겐 수용체 알파에 높은 친화성을 갖고 있는 수용체 촉진제인 propyl pyrazole triol (PPT)을 성체 수컷 생쥐에 이틀 간격으로 8일, 16일, 24일 동안 피하주사방법으로 투여하였다. 현미경으로 부속 생식샘인 전립샘과 정낭, 그리고 간의 조직학적 변화를 관찰하였다. 대조군에 비해, PPT 투여군의 체중과 생식샘의 무게는 감소하였지만 간의 무게는 오히려 증가하였다. PPT 투여군에서 전립샘과 정낭의 내강 면적이 축소되었다. PPT 투여군 전립샘의 상피세포 높이는 대조군에 비해 증가하였다. 정낭의 경우, 상피세포의 핵 위쪽 세포질에 있는 분비 소포가 대조군에서는 나타났지만, PPT 군에서는 잘 관찰되지 않았다. 대조군에 비해 PPT 투여군 간의 굴모양혈관 직경이 투여횟수에 누적적으로 147.0%, 198.7%, 223.3%의 비율로 증가되었다. 이런 결과는 PPT 투여로 인해 생식기관과 간의 조직 구조가 영향을 받으며, 그 조직학적 변화는 투여회수에 따라 더 심하게 나타났다. 결론적으로 이틀에 한번씩 투여한 PPT에 의해서 생식력 변화와 관련 있는 생식기관의 상피세포 높이 변화가 일어났고, 내강의 크기가 위축되었다. 간의 굴모양혈관 직경이 급격하게 확대되었으며, 이 결과는 간의 무게 증가로 이어졌다.