

## 항에스트로겐이 성체 수컷 마우스 수출소관의 형태적 변화에 미치는 효과

광주보건대학 · 물리치료과

김 명 훈

### Effects of the Antiestrogen on Morphologic Changes of efferent ductules of the Adult Male Mouse

Kim, Myung-Hoon, R.P.T., Ph.D.

*Dept. of Physical Therapy, Kwangju Health College*

#### -ABSTRACT-

This study was designed to investigate the function of estrogen in related with the effects of the antiestrogen on morphologic changes of efferent ductules of the adult male mouse. Estrogen is synthesized in the male reproductive system and is found in high concentrations in rete and seminal fluids. Adult male mice, 30 days old, were injected subcutaneously with ICI(5mg/mouse) once per week for 8 weeks. Tissues were fixed by vascular perfusion on days 8, 10, 12, 14, 16, 25 and 59 post-treatment.

The lumen of efferent ductules began to dilate from the day 8 and continued to the day 59 post-treatment. Epithelial cell height in the efferent ductules of the treated mice decreased all the time periods, compared to the control. Cell height in proximal region of the efferent ductules in the treated groups decreased most by 38%. Supranuclear cytoplasmic height in epithelial cell of the ducts also showed the decrease of 46%, 39% and 33% in proximal, conus and common regions in the treated groups, respectively.

ICI 182,780 treatment in the male mouse reproduced a similar morphological abnormalities that were observed in the efferent ductules of the  $\alpha$ ERKO mouse.

---

**Key words** : Antiestrogen

## I. 서론

에스트로겐은 여러 장기에서 그 기능이나 세포의 성장 및 분화에 관여하는 중요한 호르몬으로 유선, 자궁, 난소, 고환, 전립선과 같은 생식기관과 그리고 생식기관이 아닌 폐와 뇌 같은 부위에도 존재한다 (Couse et al., 1997). 특히 여러 종의 정자 속에서 고농도로 발견되며 (Carreau and Levallet, 1997), 뼈의 유지와 심맥 관계에 있어서도 생리적으로 중요한 역할을 하고, 안면홍조, 발한, 위축성 장염 등을 감소시키며, 골다공증, 심혈관계 질환의 발생을 예방하는 효과가 있다 (Hulley et al., 1998). 표적 장기에서, 에스트로겐은 DNA, RNA와 다양한 단백질 합성을 증가시킨다. 외부에서 에스트로겐을 지속적으로 투여함으로써, 생식과정을 조정하고 성호르몬의 생산을 지시하는 시상하부의 성선자극호르몬 방출호르몬과 뇌하수체 성선자극호르몬인 여포자극호르몬과 황체형성호르몬의 분비를 감소시키는 효과를 낼 수 있다 (Dorrington and Armstrong, 1975).

에스트로겐에 대한 세포반응은 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor)를 통해서 일어나는데 수출소관과 부정소에서의 에스트로겐 수용체들은 암컷의 자궁조직보다 더 많이 나타나고 있다 (Hess et al., 1997b). 이와 같은 보고들은 에스트로겐이 수컷 생식기관인 수출소관에서 중요한 작용을 하고 있음을 보여주는 것이다.

수출소관은 정소쪽에서부터 근위부 (proximal), 원추부 (conus), 원위부 (common)로 나누어지며, 정소에서 부정소까지 정자를 이동시키는 관으로서 수컷 생식기관에서는 유일하게 섬모상피를 가지는 생식관이다. 수출소관의 기능 중 하나인 정자의 수송은 불수의근의 수축에 의하며 섬모는 정자의 흐름을 역류시켜 흐름을 감소시키고, 용액의 농도를 증가시켜 정자를 농축시킨다는 보고 (Winet, 1980)가 있다. 이러한 농축은 정자가 부정소에 저장되는 동안 성숙과 생존율을 증가시키고 많은 양의 정자를 방출시켜 수정과 유전적 변이의 다양성을 증가시킨다 (Robaire

and Herms, 1988). 수출소관에서 재흡수 기능이 상실되면 부정소로 들어가는 정소액이 묽게 되어 불임이 초래된다 (Hess et al., 1997b).

에스트로겐 수용체는 핵막에 존재하며 에스트로겐과 결합 후 핵속의 DNA에 달라붙어 황체호르몬 (progesterone) 수용체, 성장인자 등 여러 유전자의 발현에 관여하여 조직의 성장이나 분화에 영향을 미친다 (Hess et al., 2000). 이러한 에스트로겐 수용체 작용은 수컷의 생식력에 크게 작용하는데 사람의 유방암 치료제로 개발된 항에스트로겐 ICI 46,474, 164,384, 182,780 (Fawell et al., 1990)은 에스트로겐 수용체에 에스트로겐이 결합하는 것을 방해한다 (Wakeling et al., 1991). 즉 에스트로겐이 수용체와 결합하여 유방암 세포를 증식시키는데 에스트로겐과 분자구조가 유사한 항에스트로겐이 에스트로겐 수용체에 경쟁적으로 결합을 하고 이로 인해 에스트로겐이 기능을 나타내지 못하게 되며 따라서 암세포의 증식이 억제된다. 이와 같은 에스트로겐의 수용체 기작을 이해함으로써 항에스트로겐에 대한 임상연구가 촉발되었으며 항에스트로겐의 한 종류인 tamoxifen (ICI 46,474)을 유방암 치료에 사용하기도 하였다 (Lithelands and Jackson, 1988). 수컷 생식기관 내의 에스트로겐 기작 연구에는 유전적으로 에스트로겐 수용체 알파가 결여된 마우스 (estrogen receptor alpha knockout mouse,  $\alpha$ ERKO)를 이용하고 있다 (Korach et al., 1996). 에스트로겐 수용체 알파가 결여된 마우스의 생식기관은 정상형 마우스와 형태적인 차이를 보이는데 세정관 직경은 확장되어 있고, 수출소관의 상피세포의 높이가 48% 정도 감소되어 있다. 또한 수출소관의 관강 직경이 130-297%까지 팽창되어 있으며 (Hess et al., 1997b), 선조연은 소실되거나 짧아져 있다 (Hess et al., 1997a, 2000). 세포내 섭취와 관련되어 보이는 소포와 PAS로 염색된 리소솜 등도 크게 감소되어 나타난다 (Morales and Herms, 1986). 이 마우스는 사춘기 (20-40일)까지는 정상적인 정소를 가지고 있으나 사춘기가 지나면 정소의 퇴화가 유발된다. 그리고 150일 때에는 정소가

위축(Eddy et al., 1996)되는데 이는 수출소관 부위의 관강액 재흡수가 억제되어 그 결과 관강 분비물이 축적되고 이것이 정소쪽으로 역류되어 나타나는 현상으로 밝혀졌다(Hess et al., 1997a). 에스트로겐 수용체 알파가 결여된 마우스의 경우, 세정관의 형태적인 변화로 인해 정액이 비정상적으로 만들어지며, 수출소관 부위의 재흡수가 억제됨으로서 부정소내 정자수가 현저하게 감소되어 불임이 유발되는 것으로 알려져 있다(Korach et al., 1996).

본 연구의 목적은 수컷 생식기관 중 에스트로겐 수용체가 많이 존재하는 수출소관에서 암컷호르몬으로 알려진 에스트로겐이 어떤 작용을 하는지를 구명하는데 있다. 이를 수행하기 위해 에스트로겐과 구조가 유사하여 경쟁적 저해를 하는 항에스트로겐 물질 ICI 182,780을 마우스에 투여한 뒤 수출소관의 형태적 변화를 관찰하였다. ICI 182,780이 생식기관에 얼마나 빠르게 영향을 미치는지를 파악하기 위하여 투여 후 날짜별로 형태적 변화를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

생후 30일된 성체 수컷 C57BL/10 계통 마우스를 42마리 사용하였으며, 실험 기간동안 사료와 물은 무제한으로 공급하였다. 마우스를 무작위로 대조군과 처리군으로 나누고 59일 동안 주 1회씩 대조군의 마우스에는 castor oil 0.1ml를 피하 주사하였고, 처리군의 마우스에는 ICI 182,780을 0.1ml (ICI농도는 5mg에 해당함) 투여했다.

대조군과 처리군의 마우스는 처리 후 8, 10, 12, 14, 16, 25, 59일자에 마우스 한 마리당 heparin 0.1ml (100 unit)를 먼저 주입하고 다음에 ketamine (마우스 체중 10g에 대하여 ketamine 1mg의 농도)과 xylazine(마우스 체중 10g에 대하여 0.1mg 농도)을 혼합 주입하여 마취시키고, 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)에 용해한 4% glutaraldehyde를 마우스의 좌심실에 관류용 바늘을 찔러 넣어 peristaltic pump로 20분간 관류시켰다. 각 희생 날짜마다 각

군 당 3마리의 마우스를 배정하였다. 조직 처리 과정에서 수출소관을 적출하여 차후 조직 표본으로 이용할 때까지 4°C의 동일한 관류 용액에 보관하였으며, 현미경 관찰을 위해서는 조직을 cacodylate buffer(pH 7.4)로 세척하고 ethanol에 탈수시켜 glycolmethacrylate로 포매하였다. 조직을 2.5 $\mu$ m 두께로 잘라서 35°C에서 건조시키고, Mayer의 hematoxylin으로 이중 염색하고 permount로 봉입하였다.

조직절편은 현미경에 부착된 Spot-2 디지털 카메라로 촬영하여 Photoshop 소프트웨어 5.5 버전에 저장하여 날짜별로 3개의 대조군과 ICI 처리군 절편을 촬영해 저장한 영상을 Scion Image Software로 분석하였다. 마우스마다 2-6개의 수출소관을 측정하였다. 관강은 절단 절편의 최대 직경을 측정하였다. 세포의 높이는 마우스마다 수출소관의 경우 30개 비섬모 세포의 기저막에서부터 미세용모 끝까지 측정하였다. 핵상 세포질의 높이는 30개 비섬모세포내에서 세포내의 핵위 정점에서부터 미세용모 끝까지를 측정하였다. 대조군과 처리군은 Student's t-test로 분석하였으며, P< 0.05일 때 유의성 있는 것으로 간주하였고, 분석한 자료는 평균  $\pm$  SEM으로 나타내었다.

## III. 결과 및 고찰

근위부, 원추부, 원위부의 수출소관 관강 직경은 처리 후 8일째부터 세 부위 모두 팽창되기 시작하여 (Fig. 1-3), 근위부의 관강 직경의 평균은 대조군과 ICI 처리군에서 각각 60.6 $\pm$ 7.2 $\mu$ m과 111.5 $\pm$ 14.4 $\mu$ m으로 나타났으며, 원추부에서 45.5 $\pm$ 4.2 $\mu$ m와 79.5 $\pm$ 5.3 $\mu$ m, 원위부에서 35.8 $\pm$ 3.7 $\mu$ m와 61.6 $\pm$ 4.2 $\mu$ m로 처리군의 관강 직경의 팽창이 나타났는데 처리 후 경과 기간이 지남에 따라 원위부는 대체로 증가하는 양상을 보이지만 원추부는 아주 다르게 나타나고 있다. 특히 원추부에서 12일째와 59일째는 유의성이 없지만 14일째와 25일째의 두 군과의 차이는 각각 2.7배와 3.4배의 차이를 보여 주고 있으며, 근위부에서도 14일째와

25일째에 2.3배와 2.5배로 다른 일자에 비해 관강 직경이 커졌으며, 원위부에서는 두 부위와는 다르게 비슷한 비율로 증가되었다. 에스트로겐 수용체 알파가 결여된 마우스의 실험에서 수출소관 관강 직경이 근위부, 원추부, 원위부에서 각각 130%, 78%, 297%가 증가되었으며(Hess et al., 2000), 본 실험의 85%, 75%, 71%의 증가와는 차이를 보여주고 있다. 이러한 ICI 처리 후와  $\alpha$ ERKO 마우스의 정소망과 수출소관의 관강 직경의 팽창은 정자의 발생에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

ICI를 처리한 결과 수출소관의 상피세포의 높이는 모든 부위에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4-6). 처리 후 경과 기간 동안 대조군 상피세포 높이의 평균은 근위부, 원추부, 원위부에서 각각  $16.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ,  $13.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ,  $12.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , 처리군의 상피세포 높이의 평균은 세 영역  $10.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ,  $8.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ,  $9.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 로 38%, 36%, 30%로 줄어들었다. 에스트로겐 수용체 알파가 결여된 마우스의 상피세포 높이는 정상형 마우스보다 근위부에서 76% 감소를 보여주고 있다(Lee et al., 2000). 핵상 세포질의 높이는 처리군에서 유의성 있게 줄어들었으며, 상피세포 높이의 절반 길이였다(Fig. 7-9). 핵상 세포질 높이의 평균은 대조군의 근위부, 원추부, 원위부에서  $8.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ,  $6.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ,  $6.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ , 처리군에서  $4.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ,  $4.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ,  $4.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 로 각각 46%, 39%, 33% 감소되어 상피세포 감소와 비슷한 비율로 감소되었으며, 상피세포 높이에서와 같이 근위부에서 가장 많은 감소를 보여주고 있다. 처리군 상피의 핵상 세포질의 높이가 줄어들어 따라서 세포핵의 모양은 처리군의 원형 혹은 원형기둥 형태에서 평면 형태로 변화하였다.

수출소관의 세 부위, 즉 근위부, 원추부, 원위부 중에서도, 근위부에 있는 비섬모 상피세포가 다른 두 부위에 있는 상피세포보다 더 ICI의 영향을 많이 받는 것으로 본 실험에서는 나타났다. 즉 근위부의 세포의 높이, 핵상 세포질 높이가 다른 두 부위에 있는 세포의 것보다 감소되었다. 이러한 결과는 근위부에서 관강내 용액이 가장 많이 재흡수되고(Jones

and Jurd, 1987),  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase 활성이 높다는 보고(Ilio and Hess, 1994)와 일치하는 것이다.

본 실험에서의 ICI 처리 후 수출소관의 형태적인 변화가 새끼를 가질 수 없는  $\alpha$ ERKO 마우스와 비슷하며, 또한 Mahato 등(2000)의 “대리 부?(surrogate father)로서의 역할을 하는 정상형의 수컷의 수출소관에  $\alpha$ ERKO의 생식질 세포를 이식하였을 때 새끼를 낳을 수 있다는 연구 결과는  $\alpha$ ERKO 마우스 불임은 수출소관을 포함한 유출관내의 에스트로겐 활동이 차단됨으로써 생기는 것임을 시사해 준다.

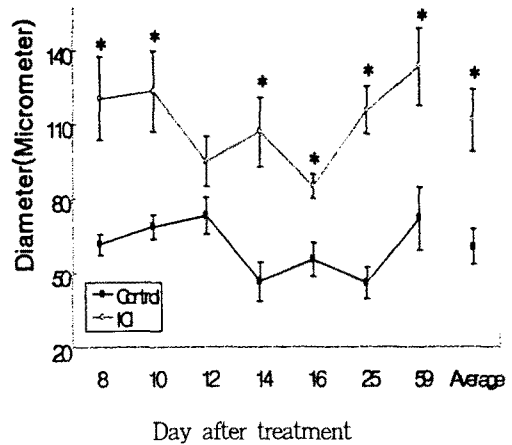


Fig. 1. Luminal diameter in the proximal region of the efferent ductules from control and ICI-treated groups on each day after treatment. Significant differences (\*) between control and treated groups at each timepoint are noted ( $p < 0.05$ ).

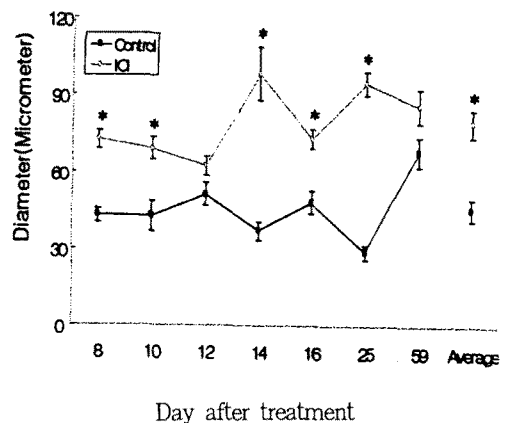


Fig. 2. Luminal diameter in the conus region of the efferent ductules from control and ICI-treated groups on each day after treatment. Significant differences(\*) between control and treated groups at each time point are noted( $p < 0.05$ ).

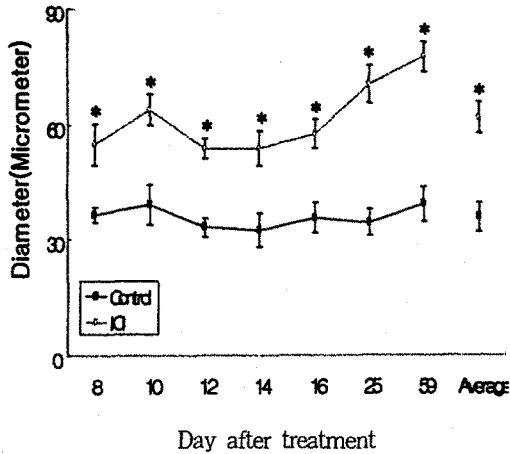


Fig. 3. Luminal diameter in the common region of the efferent ductules from control and ICI-treated groups on each day after treatment. Significant differences(\*) between control and treated groups at each time point are noted( $p < 0.05$ ).

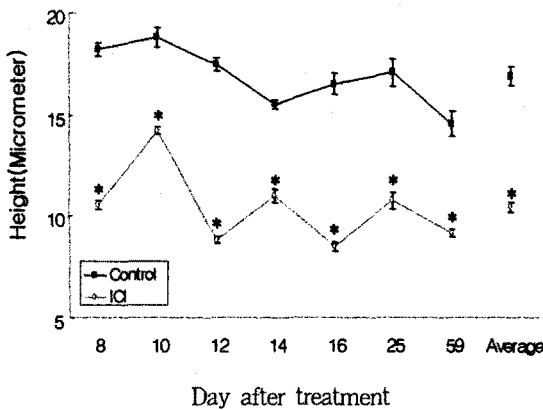


Fig. 4. Epithelial cell height in the proximal region of the efferent ductules from control and ICI-treated

groups on each day after treatment. Significant differences(\*) between control and treated groups at each time point are noted( $p < 0.05$ ).

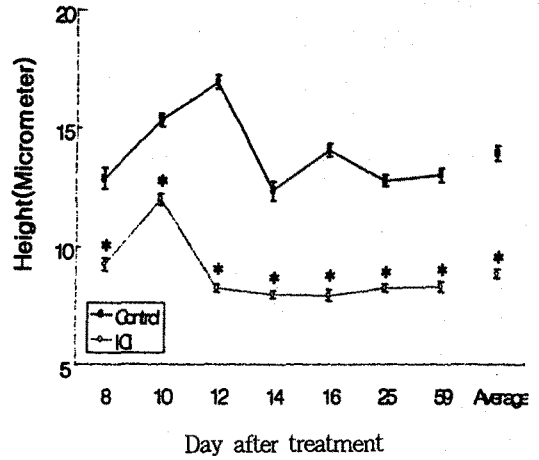


Fig. 5. Epithelial cell height in the common region of the efferent ductules from control and ICI-treated groups on each day after treatment. Significant differences(\*) between control and treated groups at each time point are noted( $p < 0.05$ ).

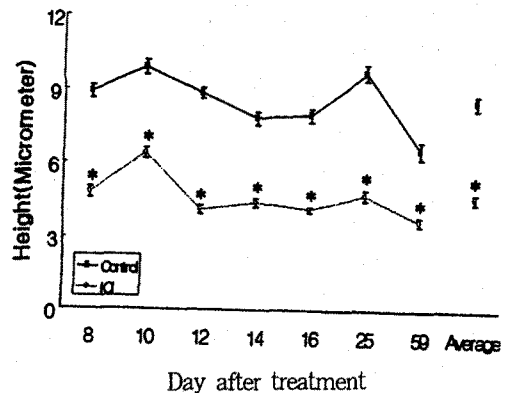


Fig. 6. Epithelial cell height in the common region of the efferent ductules from control and ICI-treated groups on each day after treatment. Significant differences(\*) between control and treated groups at each time point are noted( $p < 0.05$ ).

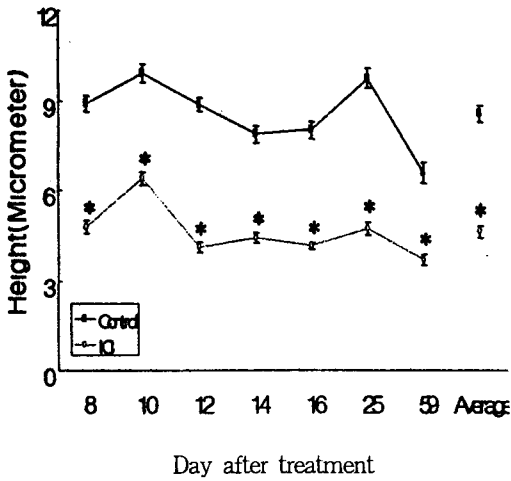


Fig. 7. Supranuclear cytoplasmic height in the proximal region of the efferent ductules from control and ICI-treated groups on each day after treatment. Significant differences(\*) between control and treated groups at each time point are noted( $p < 0.05$ ).

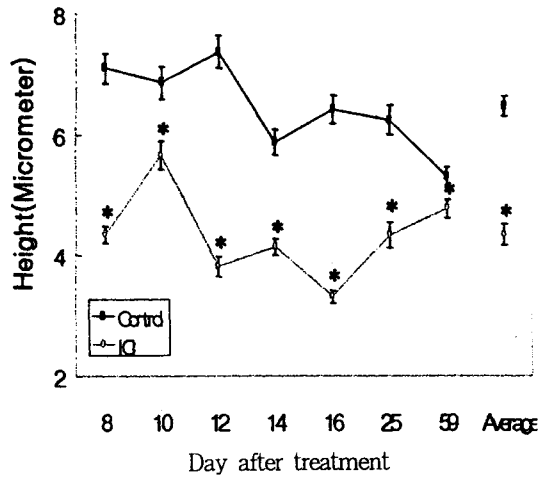


Fig. 9. Supranuclear cytoplasmic height in the common region of the efferent ductules from control and ICI-treated groups on each day after treatment. Significant differences(\*) between control and treated groups at each time point are noted( $p < 0.05$ ).

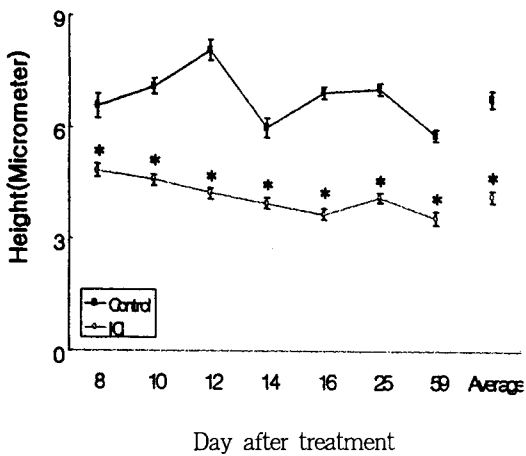


Fig. 8. Supranuclear cytoplasmic height in the conus region the efferent ductules from control and ICI-treated groups on each day after treatment. Significant differences(\*) between control and treated groups at each time point are noted( $p < 0.05$ ).

#### IV. 요약

본 연구는 수컷 생식기관내 에스트로겐 작용을 구명하기 위한 과정의 일환으로 항에스트로겐 물질인 ICI 182,780을 투여하고, 이로 인한 수출소관의 형태적 변화를 관찰하였다.

대조군과 처리군 간에 수출소관의 관강 직경은 처리 후 8일째에 팽창하기 시작하여 59일째까지 지속되었고, 처리군 마우스의 수출소관내의 상피세포 높이는 대조군과 비교해 볼 때, 처리 후 경과기간내 감소되었다. 상피세포 높이가 최대로 감소된 곳은 처리된 마우스 수출소관의 근위부로 38% 감소하였으며, 수출소관 상피세포내의 핵상 세포질의 높이는 처리군 마우스의 근위부, 원추부, 원위부에서 각각 46%, 39%, 33% 감소된 것으로 나타났다.

항에스트로겐, ICI 182,780을 수컷 마우스에 투여한 본 실험에서,  $\alpha$ ERKO 유전자 변형 동물에서 관찰되었던 것과 유사한 생식기관의 형태적 변화가 나타났

다. 즉 항에스트로겐이 에스트로겐 수용체와 결합하여 에스트로겐의 기능을 차단하고 이로 인해 수축소관의 관강 분비물 재흡수가 억제되어 분비물이 축적됨으로써 다양한 형태적 변화가 초래된 것으로 사료된다. 따라서 수컷 생식기관내의 중요한 에스트로겐 기능중의 하나는 수축소관 부위의 분비물 재흡수 작용이라고 할 수 있다.

### 참 고 문 헌

- Carreau S, Levallet J. Cytochrome P450 aromatase in male germ cells. *Folia Histochem Cytobiol*, 35:195-202, 1997.
- Couse JF, Lindzey J, Grandien K, et al. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER alpha-knockout mouse. *Endocrinology*, 138:4613-4621, 1997.
- Dorrington JH, Armstrong DT. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17 $\beta$  synthesis in cultured Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72:2677-2681, 1975.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, et al. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*, 137:4796-4805, 1996.
- Fawell SE, White R, Hoare S, Sydenham M, et al. Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the 'pure' antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:6883-6887, 1990.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, et al. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 390:509-512, 1997a.
- Hess RA, Bunick D, Lubahn DB, et al. Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. *J Androl*, 21:107-121, 2000.
- Hess RA, Gist DH, Bunick D, et al. Estrogen receptor ( $\alpha$  and  $\beta$ ) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J Androl*, 18:602-611, 1997b.
- Hulley S, Grady D, Bush T, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *J Am Med Assoc*, 19:608-613, 1998.
- Igdoura SA, Hermo L, Rosenthal A, et al. Nonciliated cells of the rat efferent ducts endocytose testicular sulfated glycoprotein-1 (SGP-1) and synthesize SGP-1 derived saposins. *Anat Rec*, 235:411-424, 1993.
- Ilio KY, Hess RA. Structure and function of the ductuli efferentes. *Microsc Rec Tech*, 29:432-467, 1994.
- Jones RC, Jurd KM. Structural differentiation and fluid reabsorption in the ductuli efferentes testis of the rats. *Aust J Biol Sci*, 40:79-90, 1987.
- Korach KS, Couse JF, Curtis SW, et al. Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res*, 51:159-186, 1996.
- Litherland S, Jackson IM. Antiestrogens in the management of hormone-dependent breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 15:183-194, 1988.
- Mahato D, Goulding EH, Korach KS, et al. Spermatogenic cells do not require estrogen receptor-alpha for development or function. *Endocrinology*, 141:1273-1276, 2000.
- Morales C, Hermo L. Intracellular pathways of

- endocytosed transferrin and non-specific tracers in epithelial cells lining the rete testis of the rat. *Cell Tissue Res*, 245:323-330, 1986.
- Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E and Neill J(eds.). Raven Press, New York, Vol. 1, 1988.
- Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res*, 51:3867-3873, 1991.
- Winet H. On the mechanism for flow in the efferent ducts. *J Androl*, 1:303-311, 1980.