

미성숙 암컷 흰쥐의 성 성숙에 미치는 genistein의 효과

상명대학교 생명과학전공*, 포천중문의과대학 대체의학대학원†, 인제대학교 의학대학 소아과학교실‡

이우철* · 이성호* · 안련섭† · 박미정‡

= Abstract =

Effect of genistein on the sexual maturation in immature female rats

Woocheol Lee*, Sung-Ho Lee, Ph.D.*, Ryun-Sup Ahn, Ph.D.† and Mi Jung Park, M.D.‡

Department of Life Science*, Sangmyung University, Seoul, Korea.

Graduate School of Complementary and Alternative Medicine†, Pochon CHA Medical University, Seoul, Korea.

Department of Pediatrics‡, College of Medicine, Inje University, Seoul, Korea

Purpose : Exposure to dietary phytoestrogens such as genistein during early childhood is a growing public health concern. We examined the effect of early exposure to genistein on sexual maturation in immature rats.

Methods : Weaning (3wk-old) Sprague-Dawley female rats were assigned to three groups (n=6 for each): fed by high dose of genistein (100 mg/kg/d), low dose of genistein (10 mg/kg/d) and control group. First vaginal opening (VO) day was observed. Structural alterations in the ovary and uterus were assessed by histologically. Expression of genes of ER α , ER β , and progesterone receptor (PR) in the ovary and uterus were investigated by RTPCR.

Results : High genistein group had earlier VO than control and low genistein group. Graafian follicles and corpora lutea were observed from the ovary of genistein-treated groups, while primary, secondary follicles and small atretic follicles were observed in the control group. Hypertrophy of luminal and glandular uterine epithelia were found in the genistein-treated groups while poor development of gland and fewer myometrial cell layers were evident in control group. In ovary, the transcriptional activities of ER α and ER β were higher in high genistein group than in controls. In uterus, the transcriptional activities of ER α , ER β and PR were higher in low genistein group than in controls.

Conclusion : Acute exposure to genistein during the prepubertal period could activate the reproductive endocrine system resulting in the early onset of puberty in female rats. Further clinical investigation on the effect of genistein on the sexual maturation in children is warranted. (Korean J Pediatr 2009;52:111-118)

Key Words : Genistein, Puberty, Ovary, Uterus, Onset of puberty

서 론

Isoflavone계 물질인 genistein은 내인성 생식 호르몬인 에스트로젠과 구조와 분자량이 유사하고 그 수용체(estrogen receptor α , ER α 와 estrogen receptor β , ER β)에 비록 친화력은 약하지만 에스트로젠 대비 ER α 에는 4%, ER β 에는 87%의 결합 친화력이 있으므로¹⁾ 식물성 에스트로젠 (phytoestrogen)이라

한다^{2,3)}. 실제 기능적인 면에서도 genistein은 에스트로젠과 유사한 세포 기능 조절상의 호르몬적 특성을 갖고 있기 때문에 내분비 장애물질(endocrine disrupting compounds, EDCs)에 포함되는데⁴⁾, 특히 전통적으로 아시아인들이 많이 섭취하는 콩류 음식에 풍부하다^{5,6)}.

콩에 약 0.1-0.4% 정도 함유되어 있는 isoflavone 물질들의 약리학적 성질들은 이미 여러 동물실험들을 통해 널리 알려진 사실인데³⁾, 특히 이를 다량 섭취하는 아시아인들의 유방암과 전립선암의 발생빈도가 서양인들에 비해 훨씬 낮다는 보고가 있다⁷⁾. 이러한 genistein의 발암 억제 효과 외에도 low density lipoprotein (LDL) 콜레스테롤 수준을 감소시키는 항 고지혈증 효과와 골다공증의 진행을 억제하고 동맥경화와 심장질환에 대한 예방 효과도 밝혀졌다^{8,9)}. 이처럼 genistein에 관해 과거에는 사람에게 유익한 효과들이 많이 연구되었지만 최근에는 암컷동물을 대상으로 생식 시스템에 미치는 부정적인 효과들에 대한 연구가

Received : 11 November 2008, Revised : 21 November 2008,

Accepted : 4 December 2008

Address for correspondence : Mi Jung Park, MD.

Department of Pediatrics, Inje University SanggyePaik Hospital.

761-1 Sanggye-dong, Nowon-gu, Seoul 139-707, Korea

Tel : +82-2-950-1075, Fax : +82-2-951-1246

Email : PMJ@paik.ac.kr

This work was supported by Grant from MSD, 2007 and Grant from Inje University, 2006.

발표되고 있다¹⁰⁾.

최근까지 genistein이 암컷 흰쥐의 생식계에 미치는 영향은 매우 다양한 결과로 보고된다. 신생쥐에 genistein (1 mg/kg/day)을 피하 주사한 모델에서는 사춘기가 앞당겨졌으며¹¹⁾, 모체의 임신 14일부터 신생아기까지 genistein (15 mg/kg/day)을 경구 투여한 모델에서는 사춘기 시작시기나 생식주기의 이상은 발견되지 않았고¹²⁾, 유사하게 모체의 임신 15일부터 자손 생후 11일까지 genistein을 경구 투여한 모델에서는 사춘기가 유의하게 촉진되었다는 보고¹³⁾도 있는 반면, 임신기 16일에서 20일까지 genistein (5 mg/kg)을 투여할 경우에는 대조군에 비해 자손의 질구 개방이 오히려 지연되었다는 보고도 있어 일치된 견해가 없다¹⁴⁾.

본 연구는 genistein이 암컷 흰쥐의 사춘기 개시에 미치는 효과를 알아보기 위해, 동북아 인들의 통상적인 콩 섭취량에 기반한 생리적인 농도(10 mg과 100 mg/kg body weight, B.W.)¹⁵⁾의 genistein을 사춘기 전인 생후 21일부터 흰쥐의 질구 개방이 일어날 때까지 매일 경구 투여하는 모델을 채택하여, 생식 기관의 성숙 상태를 조사하며, 또한, 사춘기 개시와 여러 성 스테로이드 호르몬 수용체 유전자 발현간의 상관관계를 조사하기 위해, genistein에 의해 사춘기 개시가 교란된 상태에서 난소와 자궁의 에스트로겐 수용체(ER α 와 ER β)와 프로게스테론 수용체(PR)의 mRNA 수준을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 18-22°C로 일정하게 유지되는 온도와 일정한 광주기(12시간 조명, 12시간 소등) 그리고 먹이와 물의 접근을 자유롭게 한 상태(ad libitum)에서 사육한 Sprague-Dawley (SD) strain 흰쥐를 사용하였다.

생후 21일(38-44 g)의 미성숙한 암컷 흰쥐에 genistein (10 & 100 mg/kg B.W.; 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone, LC Laboratories, USA)을 각각 매일 경구 투여하였고, 대조군으로는 sesame oil (SESAME OIL, Sigma, USA)을 개체 당 200 μ L씩 경구 투여하였다(그룹 당 n=6). 전체 동물을 두 그룹으로 나누어진 그룹은 매일 오전 10시에 질구 개방 여부를 확인하였으며, 질구 개방이 일어난 경우 생리식염수를 사용한 질도말법(vaginal smear)으로 슬라이드에 도포한 질 상피세포를 현미경하에서 관찰하여 생식주기 중 estrus 시기에 나타나는 각질 세포(cornified cell)의 출현을 확인하였으며, 최초 100 mg 투여군의 질구 개방이 일어난 당일 오후 5시에 모든 그룹을 동시에 희생시켰다. 희생 후 즉시 난소, 자궁, 부신, 신장, 간, 비장, 흉선을 적출하여 각각의 무게를 측정하였고 난소와 자궁의 경우는 total RNA를 추출하고 좌측 일부는 4% paraformaldehyde (PFA; PARAFORMALDEHYDE, Merck, USA)로 고정하였다. 다른 한 그룹은 모든 그룹의 질구 개방일을 확인할 때까지 희생시키지 않고 최장 생후 34일

까지 매일 체중을 측정하였다.

2. 난소와 자궁의 조직학적 관찰

대조군과 실험군에서 얻은 난소와 자궁의 성적인 성숙 정도를 조사하기 위하여 4% PFA에 4°C, 24시간 고정된 조직을 에탄올(70%, 80%, 90%, 95%, 100%)로 탈수한 다음 파라핀으로 블록을 만든 후 조직절편기(HM350S, MICROM, GER)를 이용해 4-5 μ m 두께로 연속 절편을 얻었다. 조직 절편들은 gelatin 코팅된 슬라이드에 부착 후 hematoxylin-eosin으로 대조 염색하여 광학현미경(BX51, Olympus, JPN) 하에서 관찰하였다.

3. RNA 추출과 Semi-quantitative RT-PCR

조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method¹⁶⁾에 따라 추출하였다. 1 μ g의 total RNA를 주형으로 하고 0.5 μ g의 dT₂₀ primer를 포함하는 CycleScript RT PreMix (AccuPower™ CycleScript RT PreMix, Bioneer, KOR)를 사용하여 역전사 하였다. PCR 반응은 1 μ L의 역전사 산물을 주형으로 하여 각각의 전사물에 해당하는 primer (Bioneer, KOR)들과 Taq DNA polymerase (EX Taq, Takara, JPN)를 사용하였으며, 최종 반응 volume은 20 μ L이었다. Table 1은 본 실험에서 사용된 primer들의 염기서열과 annealing 온도를 표시한 것이다. PCR 산물은 전기영동으로 분리하였고 ethidium bromide로 염색 후 ImagerIII-1D main software (Bioneer, KOR)로 정량하였다. 정량을 위한 internal control PCR로는 GAPDH를 수행하였다.

4. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 SAS (version 8.2, SAS institute, Cary, NC, USA) 프로그램을 사용하였고, Kruskal-Wallis 검사에 의해 이루어졌으며, P값 0.05 미만을 유의하다고 판정하였다.

Table 1. Primer Sets for Quantitative RT-PCR Analyses

Gene	Sequences of nucleic acid	Product size (bp)	AT (°C)
ER α	F 5'-GTCGATTCCGCATGATGAAC R 5'-AATGTGCTGAAGTGGAGCTG	435 bp	63
ER β	F 5'-ACCACCGAATGCCAAGTTCT R 5'-GCAGGCTCTAAGGATGTAAC	414 bp	63
PR	F 5'-CAGCATGTCTGTCTGAGAAAG R 5'-TATAGCATCTGTCCACTGAC	472 bp	61
GAPDH	F 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG R 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG	576 bp	50

Abbreviations : ER α , estrogen receptor alpha; ER β , estrogen receptor beta; PR, progesterone receptor; F, forward; R, reverse; AT, annealing temperature

결 과

Genistein에 의한 각 투여군의 체중 변화를 추적한 결과 생후 21일부터 34일까지 대조군과 genistein 투여군과의 유의적인 체중 차이는 나타나지 않았으며(Fig. 1), 생후 34일에 각각의 무게는 genistein 100 mg군 97.58±5.70 g, genistein 10 mg군 94.42±4.77 g, 그리고 대조군은 95.60±4.72 g 이었다(Table 2). 암컷 흰쥐의 사춘기 개시 지표로 널리 이용되는 질구 개방 일을 비교한 결과 대조군(34.17±3.31일) 및 genistein 10 mg군(32.29±3.95일)에 비하여 genistein 100 mg군(27.25±1.75일, $P<0.01$)에서는 유의하게 질구개방이 촉진되었다(Fig. 2).

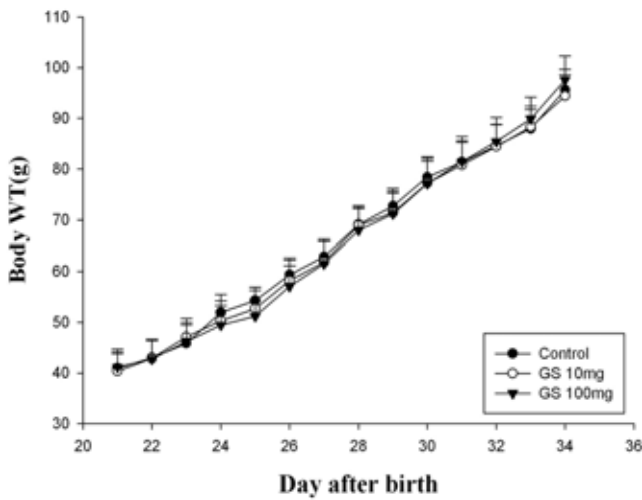


Fig. 1. Changes in body weight during the 2-week of genistein administration.

Table 2. Reproductive Parameters and Common Organ Weights in the Immature Rats Treated with Genistein (n=6 per group)

	Control	10 mg GS	100 mg GS
BW (g) at 34-day age	95.60±4.72	94.42±4.77	97.58±5.70
Vaginal opening day	34.17±3.31	32.29±3.95	27.25±1.75 [†]
Tissue weights (mg/g BW)			
Combined ovaries	0.31±0.05	0.35±0.06	0.40±0.08*
Combined uterus	0.69±0.41	0.77±0.27	1.44±0.32 [†]
Spleen	4.05±1.30	4.63±1.20	4.48±0.95
Thymus	3.26±0.72	2.65±0.54 [†]	2.03±0.61 [‡]
Combined adrenals	0.31±0.08	0.36±0.14	0.39±0.13
Combined kidneys	12.01±0.32	12.23±1.13	13.41±1.29*
Liver	42.01±2.39	44.78±7.70	41.95±3.99

Values are expressed as mean±S.E.
 Abbreviations: BW, body weight, GS, genistein
 * $P<0.05$ compared to control
[†] $P<0.01$ compared to control
[‡] $P<0.001$ compared to control

난소와 자궁의 체중 대비 무게를 측정된 결과 genistein 100 mg군은 대조군에 비해 난소($0.40±0.08$ mg/g vs $0.31±0.05$ mg/g, $P<0.05$)와 자궁($1.44±0.32$ mg/g vs $0.69±0.41$ mg/g, $P<0.01$) 모두 유의하게 높았다(Fig. 3A & B). 다른 장기무게에서는 흉선과 신장만이 유의한 경향을 보였는데(Table 2) 흉선의 경우 모든 genistein 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 낮았고 (genistein 100 mg군, $2.03±0.61$ mg/g, $P<0.001$; genistein 10 mg군, $2.65±0.54$ mg/g, $P<0.01$ vs 대조군, $3.26±0.72$ mg/g), 신장의 경우는 genistein 100 mg군에서만 유의하게 높았다($13.41±1.29$ mg/g vs 대조군 $12.01±0.32$ mg/g, $P<0.05$).

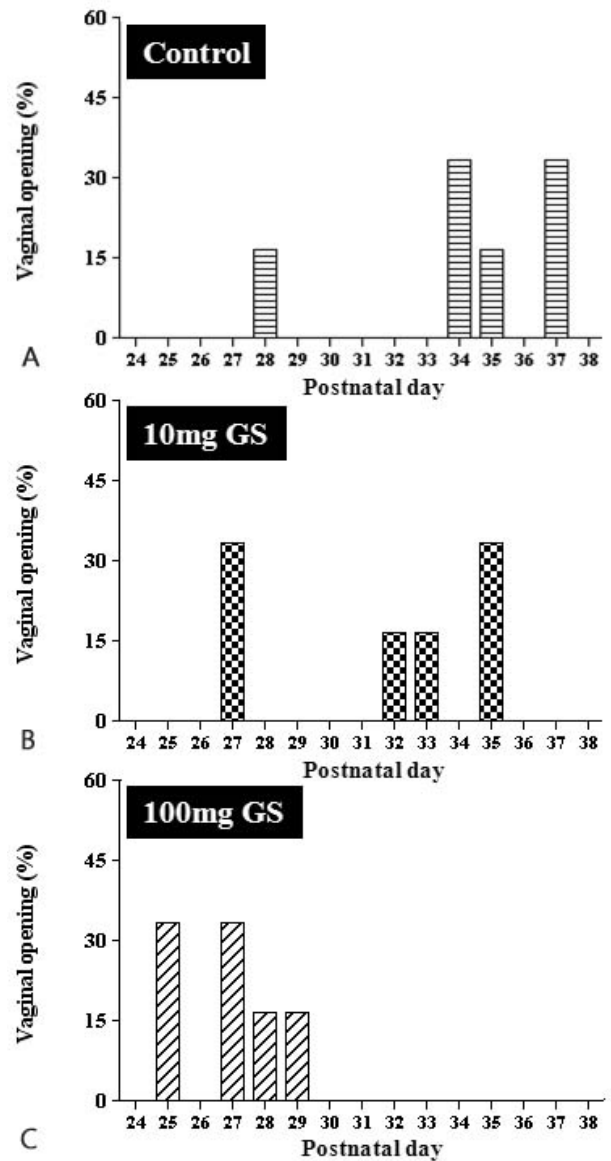


Fig. 2. Dates of vaginal opening (expressed as a percentage of total number of animals per experimental group) in the immature rats treated with genistein.

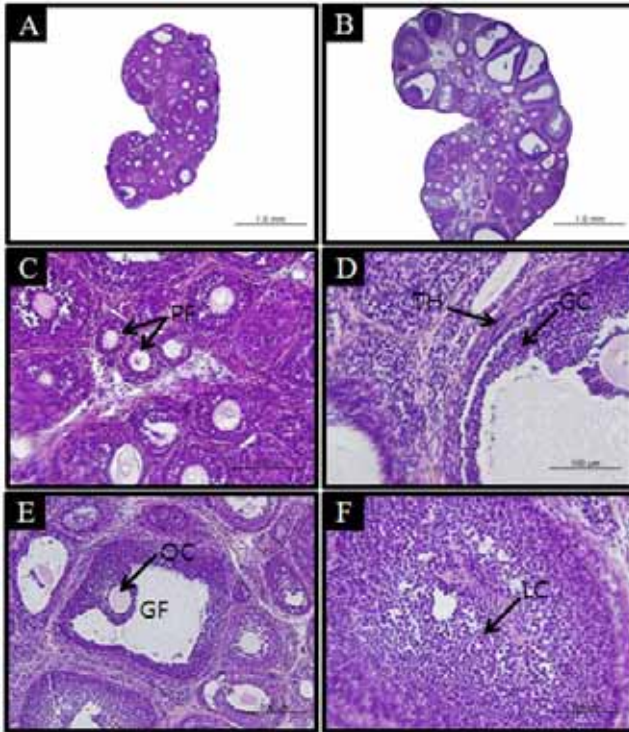


Fig. 3. Microphotographs of ovaries from controls and genistein-treated animals when vaginal opening was occurred in 100 mg group genistein (at PND 28 days). Stained with hematoxylin and eosin. A and B, ovaries from treated with vehicle and 100 mg GS ($\times 40$); C, primary and secondary follicles in control group ($\times 400$); D and E, Graafian follicles in 100 mg genistein group (D, $\times 400$; E, $\times 200$); F, corpus luteum in 100 mg genistein group. Abbreviations: PF, primordial follicle; TH, theca cell; GC, granulosa cell; OC, oocyte; GF, graafian follicle; LC, lutein cell.

조직학적인 연구 결과에서, 대조군의 난소는 작고 미성숙한 1차와 2차 난포들이 주로 관찰된 것에 비해 genistein 100 mg군에서는 난소 성숙의 지표가 되는 그래프 난포와 황체가 다수 관찰되었고(Fig. 3), 자궁의 경우 genistein 투여군에서는 내막층 상피(luminal epithelium), 내막층과 근막층은 물론 상피층까지 잘 발달된 과다 성장(hypertrophy) 상태와 함께 분비선 수의 증가가 나타났으나 대조군에서는 모든 세포층과 분비선의 발달이 미약한 상태였다(Fig. 4).

암컷 성 성숙 개시의 지표가 되는 ER α , ER β , 그리고 PR의 mRNA 수준을 조사한 결과 난소의 경우 ER α 는 모든 genistein 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 높았고(10 mg, $P < 0.01$; 100 mg, $P < 0.01$), ER β 는 100 mg군($P < 0.05$)에서 유의하게 높았으며, PR은 genistein 10 mg군과 100 mg군 모두 유의하게 높았다(각각 $P < 0.01$). 자궁의 경우는 ER α (10 mg, $P < 0.01$; 100 mg, $P < 0.05$)와 PR (10 mg, $P < 0.05$; 100 mg, $P < 0.01$)은 모든 genistein 투여군에서 유의한 증가를 보였고, ER β 의 경우 GS 10 mg군에서만 유의하게 높았다($P < 0.01$, Fig. 5).

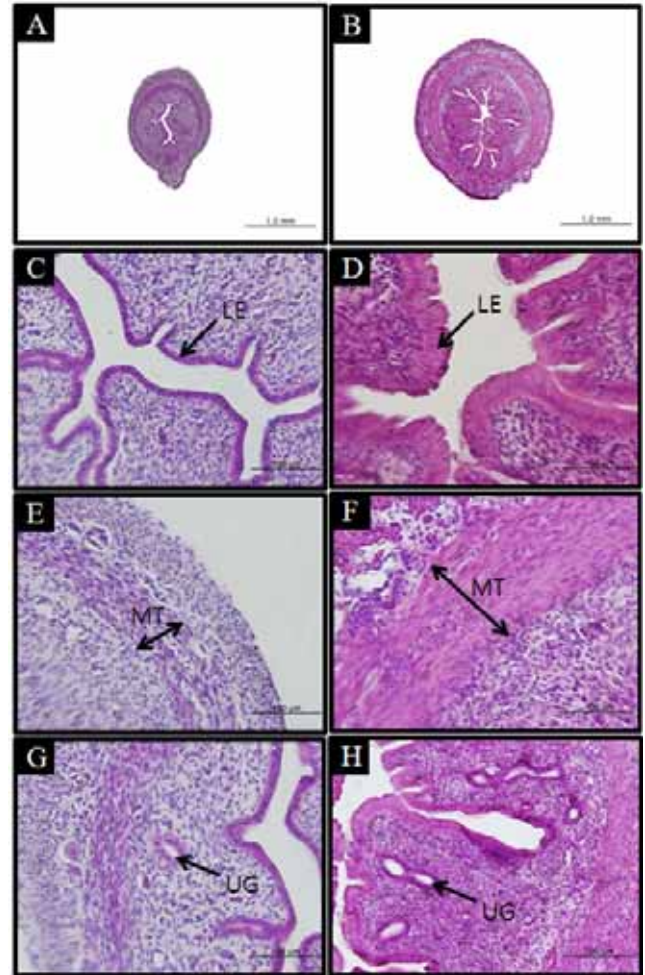


Fig. 4. Microphotographs of uteri from controls and genistein-treated animals when vaginal opening was occurred in 100 mg group genistein (at PND 28 days). Stained with hematoxylin and eosin. A and B, uteri from treated with vehicle and 100 mg genistein ($\times 40$); C and D, uterine lumen in control and 100 mg genistein group; E and F, myometrium layer in control and 100 mg genistein group; G and H, uterine glands in control and 100 mg genistein group. Abbreviations: LE, luminal epithelium; MT, myometrium; UG, uterine gland.

고찰

본 연구에서는 내분비계 장애물질 가운데 에스트로겐과의 분자 구조의 유사성과 에스트로겐 수용체와의 결합친화도가 높은¹⁾ genistein을 에스트로겐에 민감한 시점인 사춘기 이전의 생후 21일부터 농도별로 투여하여 사춘기 개시에 미치는 영향과 그에 관련된 성 성숙 지표 유전자들의 변화양상을 조사한 것이다. 20세기 후반부터 내분비계 장애물질들이 생식 내분비계에 미치는 영향들이 널리 연구되어 왔으며^{2, 14, 26)}, 근래에는 특히 생식기관의 분화와 성성숙과 관련된 연구들이 많이 수행되고 있다. 그런데, 연구대상 물질, 투여농도와 시기, 투여방법과 대상 등에 따라

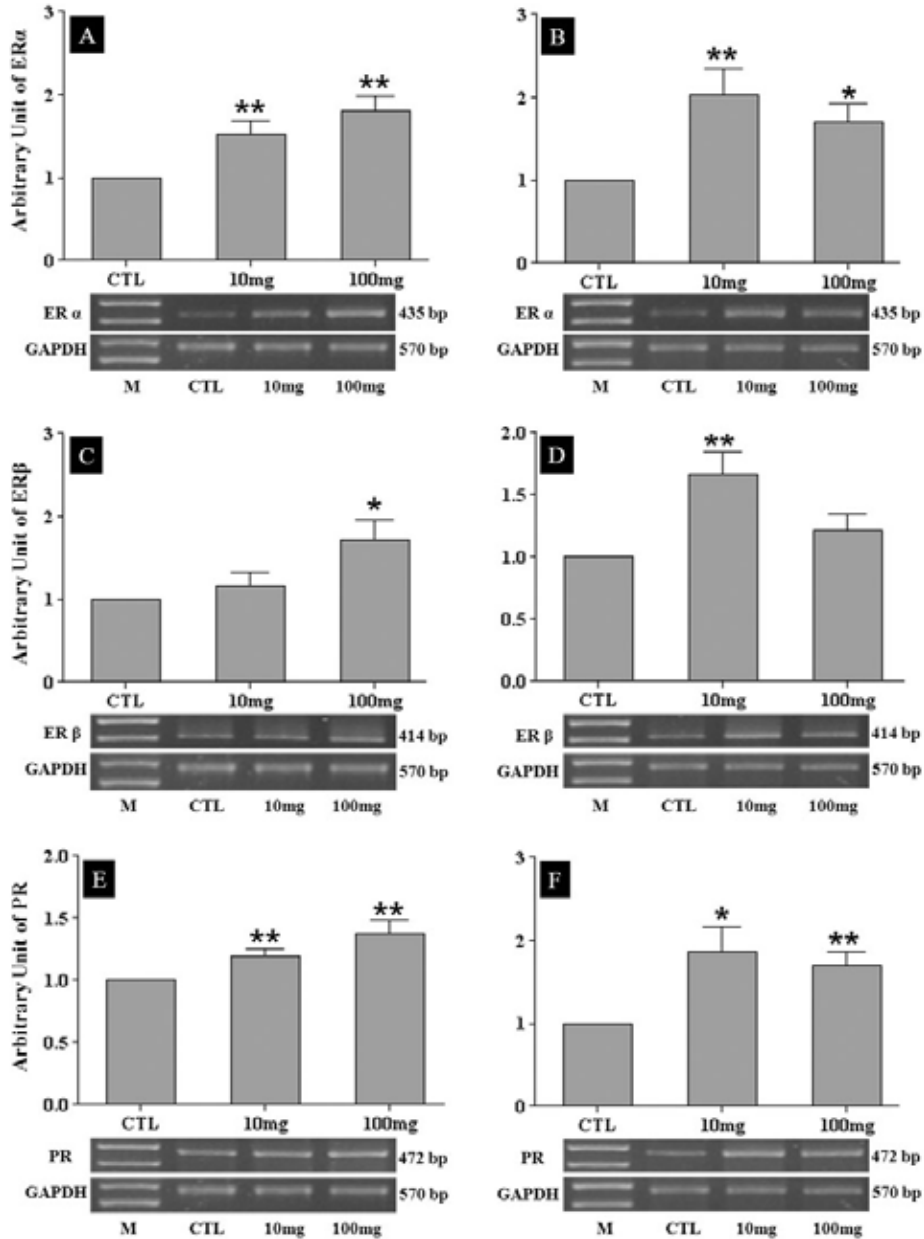


Fig. 5. Effects of prepubertal genistein administration on the expression of estrogen receptor α , estrogen receptor β , and progesterone receptor when vaginal opening was occurred in 100 mg group. Genistein in the rat ovaries and uteri. A & B, The relative ratio of estrogen receptor α transcript levels in ovary and uterus of each groups, respectively; C & D, The relative ratio of estrogen receptor β transcript levels in ovary and uterus of each groups, respectively; E & F, The relative ratio of progesterone receptor transcript levels in ovary and uterus of each groups, respectively. Semi-quantitative RT-PCR was carried out as described in 'Materials and Methods'. Bars are mean \pm S.E. (n=6).*, Significantly different from control group, $P < 0.05$; **, Significantly different from control group, $P < 0.01$; M, marker; CTL, control (vehicle); 10 mg, 10 mg/kg/day; 100 mg, 100 mg/kg/day.

상이한 연구결과들이 보고되기도 한다. 사춘기 개시의 예를 들자면, bisphenol A를 임신기 모체 부터 이유기의 자손까지 환경에 경구 투여한 모델에서 사춘기 개시 시기에 영향을 주지 않았다는 보고¹⁷⁾가 있는가 하면, 자손의 출생 직후 피하 주사한 모델에서

사춘기가 촉진되었다는 보고¹¹⁾가 있으며, 임신기 모체에 출산 까지 경구 투여한 경우 자손들의 사춘기가 지연되었다는 보고도 있어 매우 다양하였는데¹⁸⁾ 본 연구결과에서 미성숙 어린쥐에서 genistein 경구투여후 사춘기 개시가 촉진되었다. 이러한 결과는

genistein 투여군에서 난소와 자궁의 무게 증가와 잘 부합되는데 (Table 2), 이때 난소와 자궁의 세포분열 촉진은 transforming growth factor α (TGF α)나 epidermal growth factor (EGF) 신호 체계를 경유하는 것으로 추정된다. 이유직전인 생후 16, 18, 20일의 흰쥐에 genistein (500 mg/kg B.W.)을 투여할 경우 자궁 상피세포들의 과도성장(hypertrophy)이 나타나고, EGF와 그 수용체 발현이 증가하고, TGF α 는 감소한 이전 보고와 일치하며¹⁹⁾, 유사하게 genistein 투여에 의해 흰쥐 유선에서의 TGF α 와 EGF 수용체 발현이 증가함이 보고된 바 있다²⁰⁾. 본 연구의 조직학적 분석 결과에서 상기한 세포분열 촉진의 결과로 genistein 투여군의 경우 자궁의 근막, 내강측 상피 그리고 외측 상피 등의 세포층이 두터워졌고 분비선의 상피층 두께와 수가 늘어났으며, 난소 또한 그라프씨 난포들의 성숙과 황체형성 증가가 발견되었다(Fig. 3, 4). 이유기 직후 genistein의 단기 노출에 의한 자궁세포 증식 촉진과정 역시 TGF α 와 EGF 신호전달에 의해 매개될 가능성이 있는 것으로 사료된다.

조기 사춘기의 출현은 궁극적으로 난소와 자궁에서의 성 스테로이드 호르몬 수용체 발현의 조절을 동반하는데²¹⁾, 임신기 모체의 11일부터 20일까지 genistein (1-100 mg/kg BW)을 흰쥐에 투여했을 때 임신 20일 암컷 태아의 자궁과 난소에서 PR의 발현이 최대 5.7배까지 농도 의존적으로 증가함이 보고되었다²²⁾. 본 연구결과 또한 genistein 투여군에서 ER과 PR이 유의하게 증가하였는데, ER의 아형인 ER α 와 ER β 발현에 미치는 영향은 조직 특이적인 것으로 보인다(Fig. 5). 즉 본 연구의 난소에서 얻은 결과와는 달리 흰쥐 시상하부 paraventricular nucleus (PVN)의 경우는 genistein 투여에 의해 ER β 발현은 증가하지만 ER α 발현의 변화는 없다는 보고가 있다²³⁾. 또한 본 결과에서 난소의 ER 발현 양상은 10 mg과 100 mg의 genistein 투여에 의해 유의하게 증가하였고 PR 또한 모든 genistein 투여군에서 유의한 증가가 있었으며, 자궁의 경우는 특이적으로 저농도인 10 mg genistein 투여에 의해 ER과 PR이 유의적인 증가를 보였다(Fig. 5). HepG2세포를 이용한 *in vitro* 시험에서 genistein은 ER α 와 ER β 발현에 모두 농도 의존적인 영향을 나타낸다는 보고가 있다²⁴⁾. Ovariectomy (OVX) 모델에서 genistein이 유선의 PR의 발현을 증가시킨다는 보고가 있으며²⁵⁾, 암컷 흰쥐의 생후 16, 18, 20일에 genistein (500 mg/kg B.W.)을 투여하면 21일에 자궁에서의 PR 발현의 증가, ER α 발현 감소 그리고 ER β 발현 증가가 관찰된 보고²¹⁾가 있다. 대다수의 연구에서 ER β 와 PR은 genistein 노출에 의해 발현 증가를 보이지만 ER α 의 경우는 연구자들에 따라 결과가 상이하다. 난소에서의 ER 아형간 발현 조절에 있어서 genistein 농도별로 차이가 나타나는 것은 최근 보고된 저농도 bisphenol A 노출에 의한 biphasic 효과와 유사한 기작에 의한 것으로 추정된다²⁶⁾.

본 연구에서 난소와는 달리 genistein 10 mg 투여군의 자궁에서 ER과 PR mRNA 수준이 유의하게 상승한 것은 genistein이 농도 특이적 그리고 조직 특이적으로 작용할 가능성을 보여주

는 것으로, 향후 genistein의 농도별 효과와 시상하부-뇌하수체-난소-자궁 축에서의 GnRH, LH, ER α 와 ER β 등 사춘기 개시 및 생식기능에 영향을 미치는 요인들 간의 자세한 상호 관련에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Genistein은 혈관 신생(angiogenesis) 억제²⁷⁾와 platelet-derived growth factor (PDGF)와 EGF에 의해 유도되는 c-fos 발현의 억제 등²⁸⁾을 통해 항암 효과를 나타내며, 폐경기 이후 여성들의 골다공증, 심혈관계 질환이나 유방암 발병을 예방하는 등 긍정적인 효과가 많다. 한편, 아직 아동에서 genistein과 사춘기 조숙증의 연관성을 분석한 연구는 매우 드문 실정인데^{29, 30)} 본 연구 결과에서 보인 바처럼 성호르몬에 매우 민감한 사춘기 이전 시기에 고용량의 genistein 노출은 부정적인 효과를 초래할 가능성이 있음을 암시하며, 조기 사춘기 개시를 일으킬 가능성이 있거나 생식기관 무게 감소로 이어지는 고농도의 genistein 노출뿐만 아니라 스테로이드 호르몬 수용체의 발현 양상 변화에서 나타나는 저농도의 genistein 노출 또한 성숙에 영향을 줄 잠재적인 위험성은 있을 수 있다. 본 연구에 사용된 흰쥐의 경우 생후 21일에서 사춘기 개시까지의 기간은 사람에서 4-10세 정도에 해당하는데, 본 연구결과가 만약 인간에게도 적용된다면 사춘기 이전의 여자 아동들이 식물성 에스트로겐 역할을 다량의 콩류 식품을 섭취할 경우 조기 사춘기 개시 또는 성 호르몬 조절 축의 이상 등을 가져올 가능성을 고려할 수 있다. 본 연구에서는 타 연구자들보다 상대적으로 저농도(10 mg/kg/day)를 사용했지만 그 이하의 농도에서도 생식 축의 활성 변화가 생기는데 대해서는, 보다 다양하고 세분화된 농도, 투여경로, 투여시기 등 다양한 변수를 포함한 추후 연구가 필요하며, genistein이 에스트로겐 유사물질로 작용하여 조기 사춘기 개시를 유도하는 하위단계의 분자적 메커니즘에 대한 이해가 아직 불충분하므로 전체 생식 축 상에서 각종 전사조절인자들에 미치는 영향 조사가 추후 필요할 것으로 사료된다.

요 약

목적 : 어린시기에 genistein과 같은 식물성 에스트로겐의 섭취가 사회적 관심사로 대두되고 있다. 본 연구에서는 어린 쥐에서 genistein에 노출이 사춘기 개시 및 생식기관에 미치는 영향을 알아 보았다.

방법 : 이유기(3주령) 암컷 흰쥐를 저용량 genistein (10 mg/kg/day), 고용량 genistein (100 mg/kg/day), 대조군의 세 그룹(각 그룹 당 n=6)으로 나누고 첫 번째 질구 개방이 확인되는 날까지 농도별로 각각 경구 투여하였다. 질구 개방일을 확인하고 생식기관의 무게를 측정하며 난소와 자궁에서 ER α , ER β , PR 유전자들의 발현양상을 RT-PCR을 이용해 비교하였고, 난소와 자궁의 구조적 이상을 확인하기 위해 조직학적 분석을 실시하였다.

결과 : 고용량 genistein 투여군은 저용량군 및 대조군에 비해 질구 개방일이 유의하게 촉진되었다. RT-PCR결과, ER α , ER β , PR의 전사활성은 genistein에 노출된 쥐들의 난소와 자궁

에서 유의하게 증가하였다. 그래프 난포와 황체는 genistein 투여군의 난소에서만 발견되었고, 대조군의 난소에서는 1차, 2차 난포들과 작은 미성숙 난포들만이 관찰되었다. Genistein 처리군의 자궁에서도 내막층 근막층 및 상피층이 과다성장상태였으나 대조군에서는 모든 세포층과 분비선이 미약하게 발달하였다.

결론: 결론적으로, 사춘기 이전 시기에 비교적 단기간의 genistein 노출이라도 미성숙 암컷 흰쥐에서 생식 내분비 활성을 일으켜 조기 사춘기와 성 스테로이드 호르몬 수용체의 발현 양상 변화를 초래할 수 있으며, genistein의 노출이 아동기 성성숙에 미치는 영향에 대한 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol* 1997;138:863-70.
- Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, Heck HA. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol Sci* 1999;51:236-44.
- Magee PJ, Rowland IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 2004;91:513-31.
- Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1183-6.
- Fitzpatrick LA. Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas* 2003;44 Suppl 1:S21-9.
- Micheal McClain R, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Edwards JA, Bausch J. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food Chem Toxicol* 2006;44:56-80.
- Sarkar FH, Li Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev* 2002; 21:265-80.
- Goldwyn S, Lazinsky A, Wei H. Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns. *Drug Metabol Drug Interact* 2000;17:261-89.
- Suthar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Pharmacological activities of genistein, an isoflavone from soy (Glycine max): part I - anti-cancer activity. *Indian J Exp Biol* 2001; 39:511-9.
- Jefferson WN, Padilla-Banks E, Newbold RR. Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: Genistein as an example. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:832-44.
- Kato H, Ota T, Furuhashi T, Ohta Y, Iguchi T. Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod Toxicol* 2003;17:283-8.
- Hughes CL, Liu G, Beall S, Foster WG, Davis V. Society for experimental biology and medicine effects of genistein or soy milk during late gestation and lactation on adult uterine organization in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229:108-17.
- Takagi H, Shibutani M, Lee KY, Lee HC, Nishihara M, Uneyama C, et al. Lack of modifying effects of genistein on disruption of the reproductive system by perinatal dietary exposure to ethinylestradiol in rats. *Reprod Toxicol* 2004;18: 687-700.
- Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL Jr. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208:60-6.
- Messina M, Nagata C, Wu AH. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer* 2006;55:1-12.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- Yoshida M, Shimomoto T, Katashima S, Watanabe G, Taya K, Maekawa A. Maternal exposure to low doses of bisphenol A has no effects on development of female reproductive tract and uterine carcinogenesis in donryu rats. *J Reprod Dev* 2004;50:349-60.
- Tinwell H, Haseman J, Lefevre PA, Wallis N, Ashby J. Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol Sci* 2002;68:339-48.
- Brown NM, Lamartiniere CA. Genistein regulation of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor expression in the rat uterus and vagina. *Cell Growth Differ* 2000;11:255-60.
- Brown NM, Wang J, Cotroneo MS, Zhao YX, Lamartiniere CA. Prepubertal genistein treatment modulates TGF-alpha, EGF and EGF-receptor mRNAs and proteins in the rat mammary gland. *Mol Cell Endocrinol* 1998;144:149-65.
- Cotroneo MS, Wang J, Eltoum IA, Lamartiniere CA. Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. *Mol Cell Endocrinol* 2001;173:135-45.
- Naciff JM, Jump ML, Torontail SM, Carr GJ, Daston JP, Overmann GJ, et al. Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicol Sci* 2002;68:184-99.
- Patisaul HB, Melby M, Whitten PL, Young LJ. Genistein affects ER beta- but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology* 2002;143:2189-97.
- Borradaile NM, Dreu LE, Wilcox LJ, Edwards JY, Huff MW. Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochem J* 2002;366:531-9.
- Hertrampf T, Degen GH, Kaid AA, Laudenbach-Leschowsky U, Seibel J, Di Virgilio AL, et al. Combined Effects of Physical Activity, Dietary isoflavones and 17beta-estradiol on movement drive, body weight and bone mineral density in ovariectomized female rats. *Planta Med* 2006;72:484-7.
- Sonnenschein C, Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;65:143-50.

- 27) Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2690-4.
- 28) Tripathi YB, Lim RW, Fernandez-Gallardo S, Kandala JC, Guntaka RV, Shukla SD. Involvement of tyrosine kinase and protein kinase C in platelet-activating-factor-induced c-fos gene expression in A-431 cells. *Biochem J* 1992;286:527-33.
- 29) Zung A, Glaser T, Kerem Z, Zadik Z. Breast development in the first 2 years of life: an association with soy-based infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46:191-5.
- 30) Wolff MS, Britton JA, Boguski L, Hochman S, Maloney N, Serra N, et al. Environmental exposures and puberty in inner-city girls. *Environ Res* 2008;107:393-400.