

미성숙한 암컷 흰쥐 시상하부의 신경회로에 미치는 Genistein의 직접 작용 : 에스트로겐 수용체 베타아형 경로?

허 현 진 · 이 성 호[†]

상명대학교 그린생명과학과

Direct Action of Genistein on the Hypothalamic Neuronal Circuits in Prepubertal Female Rats : Estrogen Receptor Beta(ER β) Pathway?

Hyun-Jin Heo and Sung-Ho Lee[†]

Dept. of Green Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

ABSTRACT : Some phytoestrogens in soy and red wine, for example, might have beneficiary rather than adverse effects. In particular, dietary soy intake seems to be highly correlated with protection of breast cancer, osteoporosis and cardiovascular disorders. However, questions persist on the potential adverse effects of the main soy constituent genistein (GS) on female reproductive physiology. Previously we found that prepubertal exposure to GS could activate the reproductive system of immature female rats leading to precocious puberty onset, and intracerebroventricularly (ICV) injected GS could directly activate hypothalamic kisspeptin-GnRH neuronal circuits in adult female rats. The present study was performed to examine the hypothalamus-specific GS effects in prepubertal female rats and which subtype of estrogen receptor is mediated in this GS effect. Prepubertal female rats (PND 30) were anaesthetized, treated with single dose of GS (3.4 μ g/animal), and sacrificed at 2 hrs post-injection. To determine the transcriptional changes of reproductive hormone-related genes in hypothalamus, total RNAs were extracted and applied to the semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). ICV infusion of GS significantly lowered the transcriptional activities of mTOR (1:0.361 \pm 0.058 AU, p <0.001) but increased that of GAD67 (1:1.285 \pm 0.099 AU, p <0.05), which are known to act as an upstream modulator of kisspeptin and GnRH neuronal activities in the hypothalamus, respectively. GS administration enhanced significantly the mRNA levels of KiSS-1(1:1.458 \pm 0.078 AU, p <0.001), and exerted no effect on the mRNA level of kisspeptin receptor GPR-54 (1:1.29 \pm 0.08 AU). GnRH gene expression was significantly decreased in GS-treated group compared to control group (1:0.379 \pm 0.196 AU, p <0.05). There was no difference in the mRNA level of ER α in the GS-treated group compare to control group (1:1.180 \pm 0.390 AU, Fig. 3A). However, icv infusion of GS significantly increased the transcriptional activities of ER β (1:4.209 \pm 0.796 AU, p <0.01, Fig. 3B). Taken together, the present study indicated that the acute exposure to GS could directly alter the hypothalamic GnRH modulating system in prepubertal female rats. Our study strongly suggested the involvement of ER β pathway in GS's hypothalamus-specific action, and this idea is consistent with the GS's well-known ER β -mediated protective action in breast cancer.

Key words : Genistein (GS), Intracerebroventricular injection, Prepubertal female rat, GnRH system, ER β

요 약 : 콩이나 적포도주의 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)은 건강에 부정적이기보다는 긍정적인 효과를 갖는 것으로 알려져 있는데, 특히 콩류 섭취는 유방암이나 골다공증, 그리고 심혈관계 질환 예방과 높은 상관관계가 있는 것으로 보인다. 그러나 콩류, 특히 그 주성분인 genistein(GS)이 상기한 긍정적인 효과 외에도 여성의 생식계에 잠재적으로 부정적인 영향을 미칠 가능성에 대한 의문이 계속되어왔다. 선행 연구에서 본 연구자들은 사춘기 전에 genistein(GS)을 경구 투여

했을 때 암컷 흰쥐의 생식계가 활성화되어 사춘기 개시가 조기에 유도되고, 암컷 성체에 GS를 뇌척내로 미세주입했을 때 kisspeptin-GnRH 뉴런회로 활성화가 일어남을 관찰하였다. 본 연구에서는 사춘기 전 암컷 흰쥐에서

[†] 교신저자: 서울시 종로구 홍지동 7 상명대학교 그린생명과학과. (우) 110-743, (전) 02-2287-5139, (팩) 02-2287-0070, E-mail: shlee@smu.ac.kr

의 시상하부 특이적인 GS 투여 효과와 이에 관여하는 에스트로겐 수용체 아형($ER\alpha$ 과 $ER\beta$)을 조사하였다. 사춘기 전 암컷 흰쥐(SD strain, PND 30)를 마취시킨 후 GS($3.4 \mu\text{g}/\text{animal}$)를 1회 뇌실내로 미세 주입하고, 2시간 후 희생시켰다. 시상하부내 생식조절 유전자 발현을 조사하기 위해, RNA를 추출한 후 semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 시행하였다. GS 투여는 KiSS-1 유전자 발현의 상위조절자인 mTOR($1:0.361\pm 0.058 \text{ AU}$, $p<0.001$) 발현을 유의하게 감소시켰고, GnRH 분비의 상위조절자인 GAD67($1:1.285\pm 0.099 \text{ AU}$, $p<0.05$) 발현을 유의하게 증가시켰다. GS 투여는 KiSS-1($1:1.458\pm 0.078 \text{ AU}$, $p<0.001$) mRNA 수준을 유의하게 증가시켰지만, kisspeptin 수용체인 GPR-54 ($1:1.29\pm 0.08 \text{ AU}$) mRNA 수준은 변화가 없었고, GnRH($1:0.379\pm 0.196 \text{ AU}$, $p<0.05$)의 경우는 유의하게 감소시켰다. GS 투여군에서 $ER\alpha$ ($1:1.180\pm 0.390 \text{ AU}$) 발현은 대조군 대비 차이가 없었지만, $ER\beta$ ($1:4.209\pm 0.796 \text{ AU}$, $p<0.01$) 발현은 유의하게 증가했다. 본 연구결과와 사춘기 전 암컷 흰쥐에서 GS의 단기 노출이 시상하부의 GnRH 조절시스템을 직접 변화시킴을 보여준 것으로, 이러한 GS의 시상하부 특이적 효과에 $ER\beta$ 경로가 관여함을 강력히 시사한다. 이는 잘 알려진 $ER\beta$ 경로를 매개로 하는 GS의 유방암 억제 효과와 일치한다.

서 론

지난 수십 년 간 연구자들은 다수의 환경 물질들이 인간과 야생동물들의 정상 내분비 기능을 교란할 수 있음을 발견하였는데, 이러한 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemical, EDC)들에 노출되면 흔히 발생 및 생식독성이 야기된다(Hoyer, 2001; Lyons, 2006). 반면, 콩이나 적포도주의 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)의 경우 EDC로 분류되지만, 건강에 긍정적인 효과를 갖는 것으로 보인다(Whitsett & Lamartiniere, 2005). 이들 가운데 특히 콩류 섭취는 유방암이나 골다공증, 그리고 심혈관계 질환 예방과 높은 상관관계가 있는 것으로 보인다(Goldwyn et al., 2000). 그러나 콩류의 경우 그 주성분인 genistein(GS)이 상기한 긍정적인 효과 외에도 여성의 생식계에 잠재적으로 부정적인 영향을 미칠 가능성에 대한 의문이 계속되어왔다(Lamartiniere et al., 1998; Jefferson et al., 2007).

선행 연구에서 본 연구자들은 사춘기 전에 GS를 경구 투여했을 때 암컷 흰쥐의 생식계가 활성화되어 조기 사춘기가 유도되고, 암컷 성체에 GS를 뇌실내(intracerebroventricular, ICV) 미세주입했을 때 kisspeptin-GnRH 뉴런 회로의 활성화가 일어남을 관찰하였다(Lee & Lee, 2006a; Lee & Lee, 2010). 이러한 결과들은 GS 노출에 따라 암컷 사춘기 개시 시점이 변화할 수 있으며, 적어도 시상하부가 GS의 표적조직이 될 수 있고, GS의 에스트로겐성 효과가 전형적인 장기적인 것이 아닌 단기적으로 나타날 수 있음을 보여준 것이다. 한편, 본 연구자들은 GS 경구 투여에 의한 흰쥐 자궁과 난소에서의 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER) 발현이 아형- $ER\alpha$ 와 $ER\beta$ -별로 상이함을 관찰하였다(Lee & Lee,

2006b). 논란의 여지는 아직 남아있으나, 최근의 연구들은 GS의 항암효과와 뇌에 미치는 작용이 $ER\beta$ 를 매개함을 지지한다(McCarty, 2006; Chrzan & Bradford, 2007; Gingerich & Krukoff, 2005). 그러나 현재까지 생식조절과 관련된 시상하부 특이적인 GS의 작용이 어떤 ER 아형을 매개로 일어나는지는 조사된 바가 없다.

본 연구에서는 암컷 흰쥐 시상하부에서의 GS 투여 효과와 이에 관여하는 ER 아형($ER\alpha$ 과 $ER\beta$)을 조사하였다. 이를 위해 실험동물로는 에스트로겐성 물질의 입력 효과가 잘 나타나면서도 생식주기 단계의 혼동을 피할 수 있는 미성숙한 사춘기 직전 암컷 흰쥐모델(생후 30일)을 사용하였다. 또한 경구 투여나 복강 및 피하주사 투여에 의한 전신적인 효과(systemic effect)를 배제하고, 시상하부 특이적인 작용을 조사하기 위해 GS를 제3뇌실내 미세주입하는 모델을 사용하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 $18\sim 22^\circ\text{C}$ 로 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. 실험동물의 사육 및 처치는 식품의약품안전청(KFDA) 가이드라인에 따라 상명대학교 실험동물위원회의 승인하에 수행되었다.

2. 뇌실내 미세주입[Intracerebroventricular(ICV) Micro-injection]

생후 30일된 암컷 흰쥐를 Zoletil50(5 mg/kg; Virbac, France)을 1회 복강 주사하여 마취시키고, stereotaxic apparatus (Stoelting, USA)에 고정하였다. 주사할 부위의 털을 제거한 뒤 피부를 절개하고, 치과용 드릴로 주입할 부위의 두개골을 천공하였다. GS(3.4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$; LC laboratories, USA) 또는 vehicle(0.9% saline solution with 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ascorbic acid)을 제3뇌실(0.92 mm posterior and 1.4 mm right to bregma; 3.2 mm below the dura)로 주입하였다. 주입은 26-gauge cannula와 연결된 Hamilton microsyringe(10 μl)를 사용하여 5초당 0.5 μl 속도로 하였으며, 투여용량은 이전 논문들을 참고하여 결정하였다(Misztal et al., 2008; Lee & Lee, 2010). 주입한지 2시간이 경과한 후 동물을 희생시켰으며, 시상하부를 즉시 채취하여 solution D(4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium citrate, 0.5% sarkosyl and 0.1M 2-mercaptoethanol) 용액으로 분쇄 후 즉시 RNA 추출 전까지 -70°C 에 보관하였다.

3. RNA 추출과 Semi-quantitative RT-PCRs

조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method(Chomczynski & Sacchi, 1987)에 따라

Table 1. Primer sets for semi-quantitative RT-PCR analyses

Gene	Nucleic acid sequence	Product size(bp)	AT (°C)
mTOR	F 5'-TGG ACA CGA ACA AGG ATG AC	391	62
	R 5'-GAC AGC ATG TGG CAA GAA AC		
GAD67	F 5'-CAG CCA GAC AAG CAG TAT GA	404	60
	R 5'-GAG ATG ACC ATC CGG AAG AA		
GPR54	F 5'-ACT GTC AGC CTT AGC ATC TG	599	63
	R 5'-TGC TGT AGG ACA TGC AGT GA		
KiSS-1	F 5'-ACT GGC AAA AAT GGC ACC TG	272	66
	R 5'-AGT TGT AGG CTG ACA TGT CC		
GnRH	F 5'-CGC TGT TGT TCT GTT GAC TG	234	61
	R 5'-GCT TCC TCT TCA ATC AGA CG		
ER α	F 5'-TCA TGG AGT CTG CCA AGG AG	378	61
	R 5'-GTG TGC TTG ATC ACA AGT GG		
ER β	F 5'-CAC GTC ACC CAC ATC ACT AA	270	62
	R 5'-CCC AGA TGC TAG GGT ACA TG		
GAPDH	F 5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG	570	50
	R 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG		

F, forward; R, reverse; AT, annealing temperature.

추출하였다. 1 μg 의 total RNA를 주형으로 하고 0.5 μg 의 dT₂₀ primer와 AccuPower™ RT PreMix(Bioneer)를 사용하여 역전사하였다. PCR 반응은 1 μl 의 역전사 산물을 주형으로 하여 각각의 전사물에 해당하는 primer들과 Taq DNA polymerase(Takara)를 사용하였으며, 최종 반응 volume은 20 μl 였다. Table 1은 본 실험에서 사용된 primer들의 염기서열과 annealing 온도를 표시한 것이다. PCR 산물은 전기영동으로 분리하였고 ethidium bromide로 염색한 후 Imager III-1D main software(Bioneer)로 정량하였다. 정량을 위한 internal control PCR로는 GAPDH primer를 사용하여 수행하였다.

4. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's *t*-test에 의해 이루어졌으며, *P*-value 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

시상하부 KiSS-1 유전자 발현의 상위조절자로 알려진 mammalian target of rapamycin(mTOR; Roa et al., 2009)의 경우 GS를 1회 미량으로 미세주입 후 2시간 경과 뒤 유의하게 감소하였다(1:0.361 \pm 0.058 AU, *p*<0.001, Fig. 1A). 반면, 시상하부 GnRH 분비의 상위조절자인 glutamic acid decarboxylase(GAD67; Kasuya et al., 1999)의 경우는 GS 투여에 의해 유의하게 증가하였다(1:1.285 \pm 0.099 AU, *p*<0.05, Fig. 1B).

한편, 시상하부 KiSS-1 유전자 발현은 GS 투여에 의해 유의하게 증가하였지만(1:1.458 \pm 0.078 AU, *p*<0.001, Fig. 2A), 그 수용체인 GPR-54는 GS 투여에 의해 증가하는 경향은 있었으나 유의성은 없었다((1:1.21 \pm 0.523 AU, Fig. 2B). 반면, GnRH 발현은 GS 투여에 의해 유의하게 감소하였다(1:0.379 \pm 0.196 AU, *p*<0.05, Fig. 2C).

시상하부 ER 아형들의 발현 변화에 관하여, GS 미세주입 군에서 ER α 발현은 대조군에 대비하여 유의한 변화가 없었으나(1:1.180 \pm 0.390 AU, Fig. 3A), ER β 발현은 GS 투여에 의해 대조군 대비 유의하게 상승하였다(1:4.209 \pm 0.796 AU, *p*<0.01, Fig. 3B).

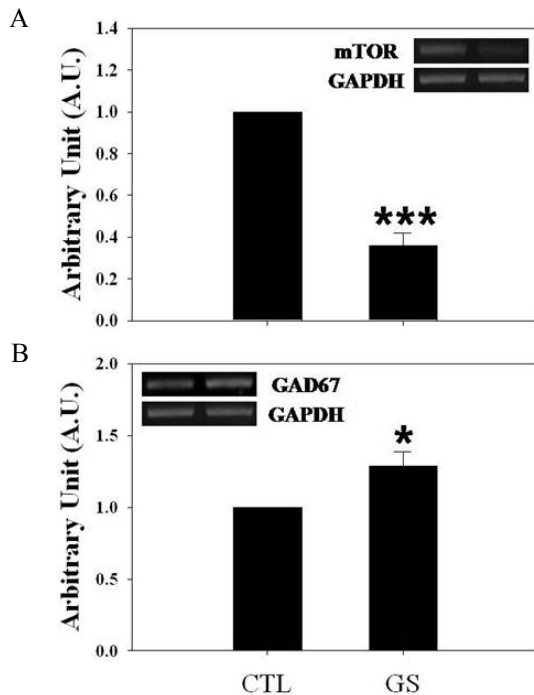


Fig. 1. Effects of GS icv infusion on the expression of mTOR and GAD67 in the rat hypothalamus. In this and following two figures, two separate control groups were applied. Single dose of GS (3.4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) or vehicle (0.9% saline solution with 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ascorbic acid) was intracerebroventricularly administrated into prepubertal female rats (PND 30). A, The relative ratio of mammalian target of rapamycin (mTOR) transcript levels in hypothalamus of each groups, respectively; B, The relative ratio of glutamic acid decarboxylase (GAD67) transcript levels in hypothalamus 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, $p<0.001$; CTL, control (vehicle); GS, genistein.

고찰

대다수의 EDC와는 달리, 일부 phytoestrogen 류의 건강에 미치는 효과에 대한 관심이 점차 높아지고 있다. 논란의 여지는 있으나, 콩에 많이 포함된 isoflavone계 물질인 GS의 경우 식품으로 섭취시 유방암 예방, 골다공증 예방, 심혈관계 질환 예방, 비만 예방, 폐경후 증상 개선 등 다양한 효용이 있다고 보고되어왔다(Goldwyn et al., 2000; Fitzpatrick, 2003; Whitsett & Lamartiniere, 2005). 리간드 결합후 효과가 나타나기까지의 시간이 긴 고전적인 ER α 보다 신속한

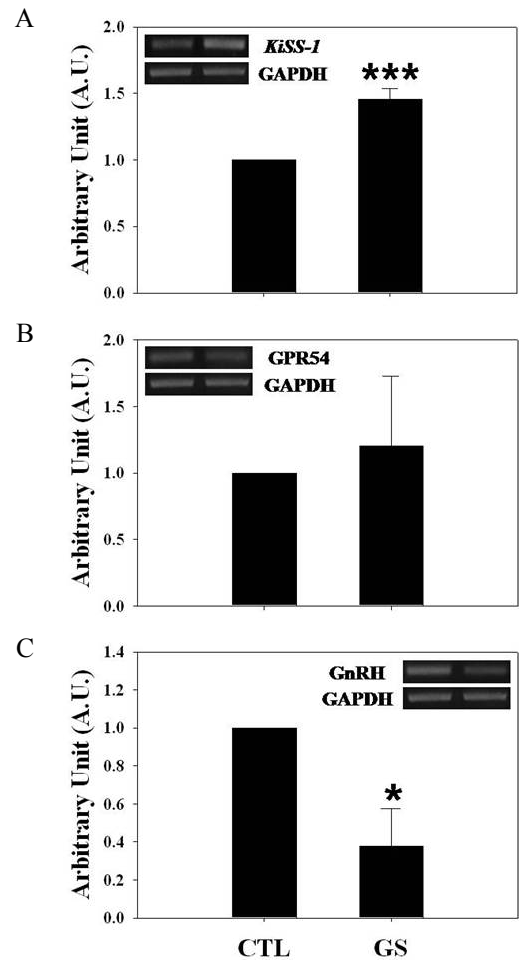


Fig. 2. Effects of GS icv infusion on the expression of KiSS-1, GPR54, and GnRH in the rat hypothalamus. A, The relative ratio of *KiSS-1* transcript levels in hypothalamus of each groups, respectively; B, The relative ratio of GPR54 transcript levels in hypothalamus of each groups, respectively; C, The relative ratio of GnRH transcript levels in hypothalamus of each groups, respectively. Injection and semi-quantitative RT-PCR were 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, $p<0.001$.

반응을 매개하는 것으로 보이는 ER β 에 GS가 작용할 가능성이 여타 EDC나 phytoestrogen들에 비해 상대적으로 높다는 점, 즉 생리적인 수준의 GS 농도에 의한 ER β 작용이 가능하므로 GS가 생체에 미치는 영향과 작용기작에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다(McCarthy, 2006). 아시아, 특히 우리나라의 경우 식사용 콩 소비량이 월등히 높아서 GS 혈중 수준이 작용가능한 nM 수준에 쉽게 도달한다는 사실

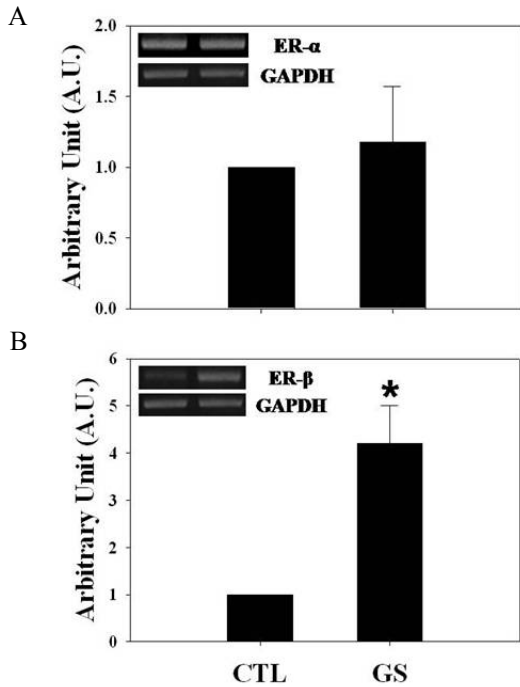


Fig. 3. Effects of GS icv infusion on the expression of ER α and ER β in the rat hypothalamus. A, The relative ratio of estrogen receptor α -subtype (ER α) transcript levels in hypothalamus of each groups, respectively; B, The relative ratio of estrogen receptor β -subtype (ER β) transcript levels in hypothalamus of each groups, respectively. Injection and semi-quantitative RT-PCR were carried out as described in 'Materials and Methods'. Bars are mean \pm S.E. (n=6). *Significantly different from control group, $p < 0.05$.

은 GS 관련 연구의 중요성과 높은 응용 가능성을 시사한다 (Messina et al., 2006).

상기한 GS 섭취의 효용에도 불구하고, 본질적으로 체내 에스트로겐의 표적조직, 작용기작 및 시공간적인 효과가 매우 다양하다는 점과 GS가 약한 에스트로겐성 물질(agonist)이라는 점은 신중한 접근을 요한다. 특히 생식과 관련된 연구들에서 그러한데, 생후 1~5일의 새끼에 GS(1 mg/kg/day)를 피하 주사한 흰쥐 모델에서는 사춘기 개시의 지표인 질구 개방(vaginal opening, VO)이 비정상적으로 생후 28일에 일어나 대조군보다 약 7일 정도 앞당겨졌고, 사춘기 이후에는 생식주기 중 발정기가 길어지거나 지속되었고, 생후 60일에서는 난소의 무게가 유의하게 감소하고, 성행동 이상이 관찰되었다(Kouki et al., 2003). 또 모체의 임신기 15일부터 새끼의 생후 11일까지 GS를 경구 투여한 모델에서는 사춘기가 유의하게 촉진되었고, 생후 8주 후에는 생식주기 이상이

발견되었다(Takagi et al., 2004). 반면, 임신기 16일에서 20일까지 GS(5 mg/kg)를 매일 투여할 경우에는 대조군에 비해 질구개방이 지연되었다는 보고도 있다(Levy et al., 1995). 이전 연구에서 본 연구자들은 이유기가 지난 생후 25일부터 GS를 매일 투여한 결과, 질구개방이 생후 31.2 \pm 0.6일 그리고 대조군에서는 생후 35.3 \pm 0.7일에 일어남을 관찰하였는데, 이 결과는 출생 직후 피하주사 모델(Kato et al., 2003)과 유사한 것이다(Lee & Lee, 2006a). 또한 GS 경구 투여후 생후 32일에 난소와 자궁에서의 ER α 와 ER β mRNA 수준을 조사한 결과, 난소에서는 두 아형 모두 GS군이 높은 경향만을 보였으나, 자궁에서는 GS군이 모두 유의하게 높았다(Lee & Lee, 2006b). 이는 조직간 GS 반응의 차이를 시사하는 것이다. 본 연구에서는 GS icv 투여에 의해 시상하부 ER β 발현이 유의하게 상승하지만 ER α 발현은 변화가 없음을 관찰하였으며, 면역조직화화법을 사용한 조사결과도 이와 일치한다(data not shown). 이 결과는 시상하부 특이적인 GS 작용기작이 ER β 를 매개할 가능성을 시사한다.

생식관련 조직 가운데 상위조직인 시상하부와 뇌하수체에서의 GS 작용에 대해서는 상대적으로 연구가 부족하며, 기존의 결과들도 일부는 불일치한다. 생후 5~7일된 흰쥐로부터 얻은 시상하부 슬라이스 배양 실험에서 에스트로겐(1nM) 또는 GS(0.1 μ M) 처리에 의해 paraventricular nucleus(PVN) 지역의 endothelial nitric oxide synthase(eNOS) 발현이 상승하고, neuronal nitric oxide synthase(nNOS) 발현이 감소하였는데, 저자들은 이러한 효과가 ER β 의존적임을 시사하였다(Gingerich & Krukoff, 2005). 한편, 시상하부에서의 생식조절 유전자 발현에 있어서 GS의 관련성에 대한 연구가 최근 보고되었다. 신생아기 암컷 흰쥐에 GS(10 mg/kg BW)를 피하투여할 경우, 제3뇌실의 주변인 organum vasculosum of the lamina terminalis(OVLT) 부위에서 GnRH와 Fos 형태로 이중염색된 뉴런 수가 유의하게 감소하였고, anteroventral periventricular(AVPV) 부위에서 면역염색된 kisspeptin 뉴런 수가 유의하게 감소하였지만, arcuate nucleus(ARC) 부위의 면역염색된 kisspeptin 뉴런 수는 GS 투여에 의해 변화가 없었는데, 에스트로겐 또는 ER α agonist[propyl-pyrazoletriol(PPT); 1 mg/kg bw] 투여에 의해서 유의하게 감소하였다(Bateman et al., 2008). 이 결과는 위치한 부위에 따라 kisspeptin 뉴런들의 반응이 상이하며, GS에 의한 KiSS-1 유전자 활성화 조절이 ER α 경로로 방해되고, 따라서 GnRH 뉴런

활성도 변화할 가능성을 시사한다. 본 연구자의 선행 연구들과 이번 연구에서는 GS 경구 투여(미성숙)와 ICV 투여(성숙 및 미성숙)에 의해 전체 시상하부 KiSS-1 mRNA가 공히 유의하게 상승함을 관찰하였으나(Lee & Lee, 2010), 이들 연구에서 시상하부 조직을 더 세분화하지는 않았다.

뇌하수체에서의 GS 작용의 경우, 체외배양(hemipituitary) 중 GS(100 μ M) 투여시 LH와 FSH 분비가 유의하게 상승하였다(Johnson et al., 1995). 그런데 생후 2년의 암컷 양의 경우 본 연구와 동일한 ICV 경로로 GS(10 μ g/100 μ l/hr, total 5 hr)를 투여했을 때, 면역염색된 뇌하수체 LH 세포 수는 감소, FSH 세포 수는 불변, ER α 세포 수는 유의하게 증가한 반면, *in situ* hybridization에 의한 염색의 경우 LH 세포 수는 유의하게 증가, FSH 세포 수는 불변이었으며, LH 세포의 경우 ER α 공동염색이 GS 처리에 의해 증가하였으나, FSH 세포에서는 증가하지 않았다(Polkowska et al., 2004). 동 연구자들은 또한 혈중 LH가 최초 6시간까지 대조군에 비해 상승한 뒤 이후 biphasic 양상을 보임을 관찰하였다(Wojcik-Gładysz et al., 2005). 뇌하수체 역시 ER 아형들을 발현하므로, GS가 뇌하수체에 직접적인 영향을 미칠 수 있을 것이지만, 배양시 투여농도로 100 μ M은 특히 ER β 에 대한 경우 약리적인 수준으로 보인다(Wozniak et al., 2005). 위의 ICV GS 투여 실험에서 저자들은 시상하부 요인들에 대해서는 조사하지 않았으므로, 결과 해석상에 한계가 있다. 한편, 본 연구진이 이전에 수행한 성체 흰쥐에 ICV 경로로 GS를 투여한 결과와 본 실험에서 사춘기 전 흰쥐에 투여한 결과를 비교해보면, (i) GAD67와 KiSS-1의 경우 두 실험모델에서 동일하게 유의한 상승을, (ii) GPR54의 경우 성체에서는 유의한 상승, 사춘기전 동물에서는 상승 경향이지만 유의성이 없었고, (iii) GnRH의 경우 성체에서는 유의한 상승, 사춘기전 동물에서는 유의한 하락이었다. GnRH 발현상의 차이는 이전 실험에 사용한 성체가 생식주기상으로 Proestrus 상태였고, 금번 실험에 사용한 생후 30일 흰쥐의 경우 Diestrus 상태에 가깝다는 점과 투여기간(3시간 vs 2시간)의 차이에 따른 것으로 추론된다. 따라서 향후 GS 투여 조건을 더욱 세분화하고, ER 특이적인 유사체를 병용투여하는 조사가 필요하다고 사료된다.

결론적으로, 본 연구는 사춘기전 암컷 흰쥐에서 GS의 미량 단기노출에 의해 시상하부내의 GnRH 조절시스템이 직접 변화됨을 보여주었으며, 이러한 GS의 시상하부 특이적 효과에 ER β 경로가 관여할 가능성을 강력히 시사한다. 이

는 잘 알려진 ER β 경로를 매개로하는 GS의 세포분열 억제(예, 유방암 억제) 효과와 일치한다.

감사의 글

본 연구는 상명대학교 교내연구비 지원(SHL, 2009년)으로 수행되었음.

인용문헌

- Bateman HL, Patisaul HB (2008) Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology* 29:988-997.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Chrzan BG, Bradford PG (2007) Phytoestrogens activate estrogen receptor beta1 and estrogenic responses in human breast and bone cancer cell lines. *Mol Nutr Food Res* 51:171-177.
- Fitzpatrick LA (2003) Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas* 44(supp 11):S21-S29.
- Gingerich S, Krukoff TL (2005) Estrogen modulates endothelial and neuronal nitric oxide synthase expression via an estrogen receptor beta-dependent mechanism in hypothalamic slice cultures. *Endocrinology* 146:2933-2941.
- Goldwyn S, Lazinsky A, Wei H (2000) Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns. *Drug Metabol Drug Interact* 17:261-289.
- Hoyer PB (2001) Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochem Pharmacol* 62:1557-1564.
- Jefferson WN, Padilla-Banks E, Newbold RR (2007) Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: genistein as an example. *Mol Nutr Food Res* 51:832-844.
- Johnson MS, Wolbers WB, Noble J, Fennell M, Mitchell R (1995) Effect of tyrosine kinase inhibitors on luteinizing

- hormone-releasing hormone (LHRH)-induced gonadotropin release from the anterior pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 109:69-75.
- Kasuya E, Nyberg CL, Mogi K, Terasawa E (1999) A role of gamma-amino butyric acid (GABA) and glutamate in control of puberty in female rhesus monkeys: effect of an antisense oligodeoxynucleotide for GAD67 messenger ribonucleic acid and MK801 on luteinizing hormone-releasing hormone release. *Endocrinology* 140:705-712.
- Kouki T, Kishitake M, Okamoto M, Oosuka I, Takebe M, Yamanouchi K (2003) Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. *Horm Behav* 44:140-145.
- Lamartiniere CA, Zhang JX, Cotroneo MS (1998) Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am J Clin Nutr* 68(suppl):1400S-1405S.
- Lee K-Y, Lee S-H (2006a) Effect of genistein on the onset of puberty in female rats. *Dev Reprod* 10:55-61.
- Lee K-Y, Lee S-H (2006b) Effects of endocrine disruptors on the expression of estrogen receptors in ovary and uterus from immature rats. *Dev Reprod* 10:255-261.
- Lee W, Lee S-H (2010) Direct action of genistein on the hypothalamic neuronal circuits in female rats. *Dev Reprod* 14:35-41.
- Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL Jr (1995) The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:60-66.
- Lyons G (2006) Viewpoint: Policy requirements for protecting wildlife from endocrine disruptors. *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1:142-146.
- McCarty MF (2006) Isoflavones made simple - genistein's agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. *Med Hypotheses* 66:1093-1114.
- Messina M, Nagata C, Wu AH (2006) Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer* 55:1-12.
- Misztal T, Górski K, Romanowicz K (2008) Differential endocrine response in rams to intracerebroventricular infusion of genistein. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68:43-50.
- Polkowska J, Ridderstråle Y, Wańkowska M, Romanowicz K, Misztal T, Madej A (2004) Effects of intracerebroventricular infusion of genistein on gonadotrophin subunit mRNA and immunoreactivity of gonadotrophins and oestrogen receptor-alpha in the pituitary cells of the anoestrous ewe. *J Chem Neuroanat* 28:217-224.
- Roa J, Garcia-Galiano D, Varela L, Sánchez-Garrido MA, Pineda R, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Romero M, Aguilar E, López M, Gaytan F, Diéguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M (2009) The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology* 150:5016-5026.
- Takagi H, Shibutani M, Lee KY, Lee HC, Nishihara M, Uneyama C, Takigami S, Mitsumori K, Hirose M (2004) Lack of modifying effects of genistein on disruption of the reproductive system by perinatal dietary exposure to ethinylestradiol in rats. *Reprod Toxicol* 18:687-700.
- Whitsett TG, Lamartiniere CA (2006) Genistein and resveratrol: mammary cancer chemoprevention and mechanisms of action in the rat. *Expert Rev Anticancer Ther* 6:1699-1706.
- Wójcik-Gładysz A, Romanowicz K, Misztal T, Polkowska J, Barcikowski B (2005) Effects of intracerebroventricular infusion of genistein on the secretory activity of the GnRH/LH axis in ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci* 86:221-235.
- Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS (2005) Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca^{2+} fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect* 113:431-439.

(Received 29 April 2011, Received in revised form 22 May 2011, Accepted 16 June 2011)