

Estradiol-17 β 이 쥐간의 cAMP Phosphodiesterase 활성도에 미치는 영향

고신대학 의학부 해부학교실

우재형, 김순옥

Effects of Estradiol-17 β on cAMP Phosphodiesterase of Rat Liver

Jae Hyung Woo, Soon Ok Kim

*Department of Anatomy
Kosin Medical College, Pusan 602-030, Korea*

= Abstract =

cAMP phosphodiesterase is known as an enzyme which regulates intracellular cAMP concentration. This study was performed to know how estrogen has an effects on the cAMP phosphodiesterase of the rat liver.

The results are the followings.

1. cAMP phosphodiesterase activity increased about 2 times in estrogen-treated group than in control group.
 2. In control group, the portal area show higher activity than other areas.
 3. Endothelial cells and Kupffer's cells show higher activity than hepatocytes in both estrogen-treated and control groups.
- Between two group, found was not differences of cAMP phosphodiesterase activities of two cell types.

I. 서 론

cAMP는 모든 생물의 장기, 조직, 또는 세포에서 발견되었으며, 호르몬 작용에 있어서 2차 전달인자로서 세포대사에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{6, 16, 35)}

cAMP의 체내 농도는 질병, stress 및 약물 등의 외부적 요인에 의하여 변화되기도 하지만 호르몬 등과 같은 내부적 요인에 의하여도 다양하게 변화된다고 한다.^{2, 5, 22)} 이러한 변화는 cAMP농도를 조절하는 효소인 adenylate cyclase와 cAMP phosphodiesterase 활성도에 직접 또는 간접적으로 영향을 줌으로써 체내 cAMP농도를 조절하고 있는 것으로 알려져 있다.^{20, 25)} 특히 polypeptide 계 및 amine 계 호르몬은 표적장기의 세포막 외측에 존재하는 수용체와 결합하고, cAMP를 2차 전달인자로 하여 그의 고유한 작용을 일으키는데 cAMP는 세포질에서 cAMP-dependent protein kinase의 regulatory subunit와 결합함으로써 이 효소의 활성을 증가시켜서 세포분화 및 태아발육,¹³⁾ 암수생식생리,³⁰⁾ 탄수화물대사, 지방분해 및 핵산합성,²⁹⁾ 심장과 평활근의 운동^{15, 16)} 전신 및 국소호르몬과 효소의 분비,^{21, 28)} 중추 및 자율신경계의 기능,²³⁾ 등의 다양한 생물학적 기전에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.

이러한 cAMP를 통한 polypeptide계 및 amine계 호르몬의 작용기전과는 달리 estrogen, progesterone, androgen, glucocorticoid 및 mineralocorticoid 등과 같은 steroid계 호르몬은 화학적으로 매우 단순한 분자구조를 이루고 있으며 표적장기의 세포내로 직접 들어온 steroid계 호르몬은 세포질에 존재하는 수용체 단백질과 결합하고, 이들 결합체는 핵안으로 이행하여 DNA-dependent RNA polymerase의 활성을 증가시킨다고 한다.^{1, 4, 9, 17, 23, 27)} DNA-dependent RNA polymerase에 의하여 핵안의 DNA로부터 전사된 RNA는 세포질로 이행되어 단백질 합성을 통한 세포증식

과 대사에 관여함으로써 호르몬 고유의 기능을 발휘하게 된다고 한다.^{2, 7, 8, 10, 12)}

한편 난포호르몬 투여시에 자궁에서의 cAMP의 증가는 Szego와 Davis³⁶⁾에 의해 처음 보고 되었고, Kuehl 등²²⁾은 미성숙 및 난소 절제된 쥐에 estradiol-17 β 를 투여하였을 때, 자궁내에서의 cAMP는 감소하고 cGMP는 증가한다고 하였다. 그리고 Epstein 등¹¹⁾과 Gardner 등¹⁴⁾은 estrogen을 투여한 쥐 자궁에 있어서 cAMP phosphodiesterase의 활성도가 감소된다고 하였으며 Stancel 등³⁴⁾은 쥐의 성장도에 따라서 자궁 phosphodiesterase의 활성도가 감소된다고 하였으며 이것은 내재성 estrogen의 증가 때문일 것이라고 하였다.

또한 Lee와 Reed²⁴⁾은 사람의 임파구에 난포호르몬 적용시 cAMP 농도가 증가함을 보고하였으며 이는 난포호르몬의 cAMP phosphodiesterase 억제작용에 의한 것으로 추정하였다. Sim과 Chantraksri³²⁾는 쥐의 성주기에 따른 adenylate cyclase와 cAMP phosphodiesterase의 활성도를 측정한 결과 난포호르몬 분비가 왕성한 발정전기에 이들 효소의 활성도가 모두 낮음을 보고하였다.

이상의 사실을 통해 볼 때 체내에 cAMP 농도는 호르몬 등의 내적요인에 의해 변하며 adenylate cyclase와 cAMP phosphodiesterase의 활성을 조절함으로써 이와 같은 반응을 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 저자들은 난소를 절제한 쥐와 난소 절제 후 estrogen을 투여한 쥐의 간장 cAMP phosphodiesterase 활성도를 비교함으로써 간장에서는 estrogen에 의하여 cAMP phosphodiesterase 활성도가 어떻게 영향을 받는지를 조사하여 소견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

생후 3개월 정도의 체중 150~200gm 되는 임신경험이 없는 건강상태가 양호한 Sprague-Dawley계 흰쥐 암컷을 3마리씩 한 사육장에 넣어 실험동물용 사료와 물을 자유로이 먹이면서 자연채광 하에서 실험 전 15일간 적응사육한 후 사용하였다.

2. 난소절제 수술

흰쥐를 ether로 전신 마취시키고 nembutal (sodium pentobarbital, 50ml/kg body weight)를 복강내로 주사하여 전신마취시킨 후 복부의 하중상선으로 절개하여 양측난소와 수란관 부위를 절찰한 후 난소를 절제하였다. 수술이 끝난 후 24시간 동안 절식시켰으며 수술 후 15일 후에 실험에 사용하였다.

3. Estradiol-17 β 투여

난소를 절제한 흰 쥐는 난소 절제 대조군과 난소절제 후 estrogen 투여군으로 구분하였다. 난소절제 후 estrogen 투여 군에는 estradiol-17 β (Sigma)를 propyleneglycol, 증류수 및 ethanol을 각각 4.5:4.5:1(V/V)의 비율로 혼합한 용매에 녹여 쥐 마리당 0.1ml(10 μ g)씩을 매일 오후 18:00~18:30 사이에 1회씩 5일간 근육주사하였다.

4. 간장조직의 분리 및 조직화학적 염색

쥐를 단두술(decapitation)로 즉시 희생시킨 뒤 전복벽을 개봉한 후 일정부위의 간장조직을 절취하였다. 절취한 간장조직은 즉시 -12℃에서 10 μ m으로 냉동절편하여 다음과 같은 조직화학적 염색을 시행하였다. Shanta 등의 방법에 따라 0.05M Tris maleate buffer(pH7.62) 100ml에 기질인 cyclic 3', 5'-AMP, 1.44mM, magnesium chloride

10mM, lead acetate 2mM, snake venom(Crotalus Atrox) 1mg을 혼합한 용액에 37℃ 항온기내에서 1시간 30분 동안 반응시켰다.

5. 간장 Homogenate의 조제

상기와 같이 적출한 간장조직의 일부의 무게를 잰 후 잘게 세절하였다. 이 조직무게의 3배에 해당하는 10.9% sucrose용액(in Tris-HCl-MgCl₂ Buffer)을 가하여 glass homogenizer로 균질화시켰다. 균질화된 시료를 5℃에서 3,000rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 5℃에서 냉장보관하여 효소 활성도 측정을 하였다.

6. cAMP phosphodiesterase의 활성도 측정

cAMP phosphodiesterase의 활성도를 Friel 등의 방법에 준하여, cAMP의 3'-O-phosphate bond가 가수분해될 때 유리되는 proton(H⁺)에 의한 phenol red의 흡광도 변화를 분광광도계(Perkin-Elmer spectrophotometer, Model 402)로 측정하였다. 즉, cAMP(1.9mM), phenol red(1.25 μ M), MgCl₂(5mM)가 함유된 Tris-HCl 완충액(pH7.8) 2.8ml에 Tris-HCl 완충액 0.2ml를 가한 것을 blank 용액으로, 상기 완충용액에 간장 homogenate 0.2ml를 첨가한 것을 시료액으로 하였다. 반응속도는 blank용액과 시료용액을 30℃에서 10분간 반응시킨 후 560nm에서의 흡광도를 측정하여 단위시간당 흡광도의 변화(ΔA 560nm/min/mg of protein)로 표시하였다. 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법에 의하여 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 측정하였다.

III. 결 과

대조군의 간조직에 있어서 cAMP phosphodiesterase의 활성반응(activity)은 간소엽 전반에 중등도의 반응을 나타내나 특히 문맥아

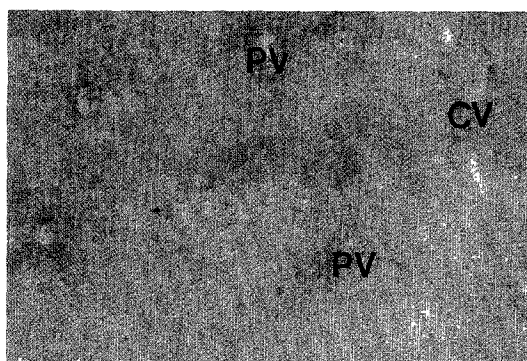


Fig. 1. Rat liver, control group. Portal area shows higher cAMP phosphodiesterase activity than other areas which shows moderate activity. PV: portal vein, CV: central vein. ($\times 40$)

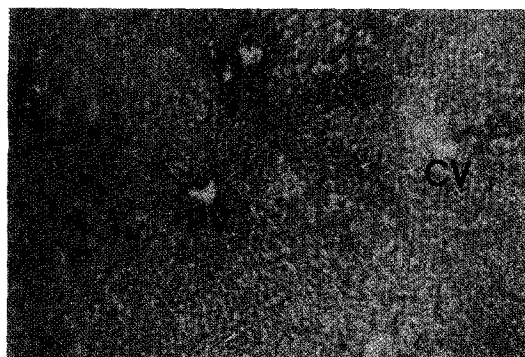


Fig. 2. Rat liver, estrogen-treated group. Hepatic lobule shows diffuse higher activity than control group. PV: portal vein, CV: central vein. ($\times 40$)

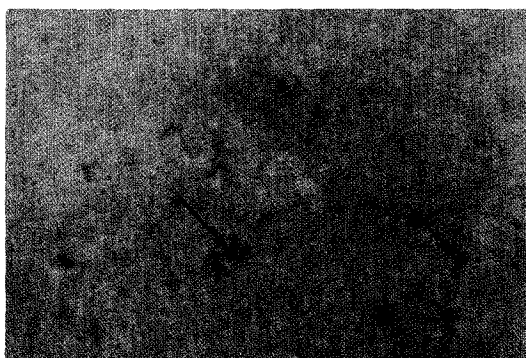


Fig. 3. Rat liver, control group. Arrows indicates Kupffer's cells which show higher activity than hepatocytes. ($\times 100$)

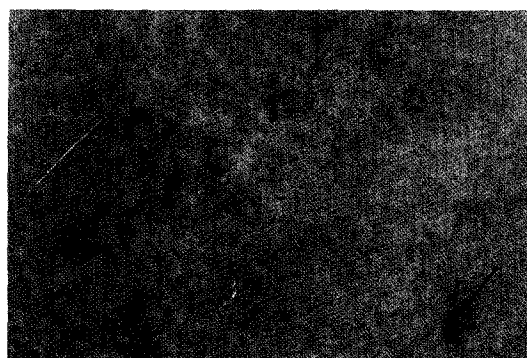


Fig. 4. Rat liver, estrogen-treated group. Arrow indicates Kupffer's cells which show high activity similar to those in control group. ($\times 100$)

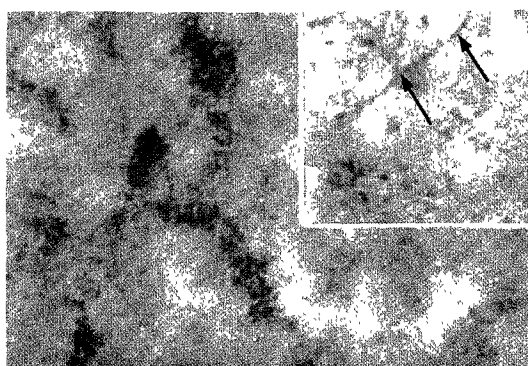


Fig. 5. Rat liver, control group. K's indicate Kupffer's cells which show high activity. In box, arrows indicate endothelial cells showing high activity. ($\times 400$)

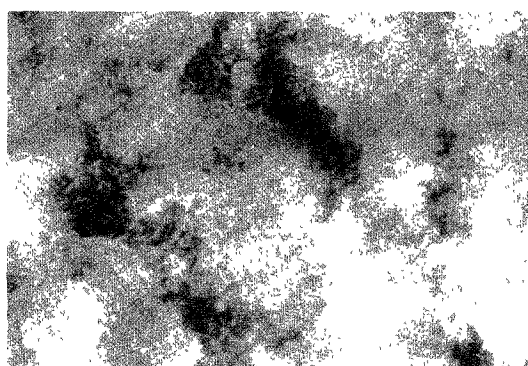


Fig. 6. Rat liver, estrogen-treated group. K's indicate Kupffer's cells showing high activity. ($\times 400$)

(portal area)에서 강하게 나타나며(Fig. 1) 드물게는 중심정맥(central vein) 주변에서도 약간 강한 반응을 나타낸다. 문맥야의 혈관 그리고 가끔씩 중심정맥의 내피세포(endothelial cells)에서도 강한 활성반응이 나타난다. (Fig. 5의 box 안) 특이한 것은 간의 대식세포인 Kupffer's cell에서 강한 활성반응을 보이는 것이다. (Fig. 3, 5) cAMP phosphodiesterase의 활성도 측정결과 최대반응속도가 0.0015mm/min/mg of protein 이었다. 실험군(estrogen 투여군)에 cAMP phosphodiesterase 활성반응은 비교적 간소엽 전체에서 균등한 활성도를 보이는 것 같으나 대조군보다 전반적으로 강한 활성반응을 나타낸다(Fig. 2). 혈관이 있는 간소엽의 중심부와 주변부는 대조군에서처럼 활성도의 구별이 뚜렷하지 않게 나타난다. (Fig. 2) Kupffer's cell과 내피세포에서의 활성반응은 대조군과 별 차이없이 나타난다(Fig. 4, 6). cAMP phosphodiesterase의 활성도 측정결과 최대반응 속도가 0.0036mm/min/mg of protein이었다.

IV. 고 찰

glucagon, insulin 등의 polypeptide계 호르몬과 epinephrine 등의 amine계 호르몬은 cAMP 농도를 조절하는 효소인 adenylate cyclase와 cAMP phosphodiesterase 활성도에 영향을 미쳐서 체내 cAMP 농도를 조절하고 있다.^{20, 25)} 간장에서는 insulin이 cAMP phosphodiesterase를 활성화시켜서,¹⁸⁾ 또 adenylate cyclase의 활성을 억제하여¹⁹⁾ 간세포의 cAMP 농도에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 그러나 estrogen이 간장의 cAMP phosphodiesterase에 어떻게 영향을 미치는지는 조사되어 있지 않다. estrogen이 쥐 자궁에서는 cAMP phosphodiesterase의 활성도가 감소된다고^{14, 34)} 하였고 steroid 호르몬을 사람의 임파구에 적용하였을 때 steroid 호르몬이 직접 cAMP phosphodiesterase의 활성을 억제하여 세포내

cAMP 농도를 높인다²⁴⁾고 하였다. 그러나 본 실험에서는 오히려 estrogen 처리군에서 간세포의 cAMP phosphodiesterase의 활성도가 더 강하게 나타났다. 이것은 다른 장기에 있어서의 결과와 상반되는 것으로 대사관계 등의 다른 요인에 의한 것인지 알 수 없다. cAMP의 세포내 농도측정, adenylate cyclase의 활성도, 그외 전자현미경적 연구가 더 추가되어야 좀 더 정확한 원인을 알 수 있을 것으로 사료된다. 대조군(estrogen 비투여군)에서 관찰되는 특이한 점은 문맥야(portal area)에서 좀 강한 양성반응을 보이는 것인데 이것은 estrogen 투여군에 나타난 결과와 비교해 볼 때 cAMP phosphodiesterase가 혈류와 어느 정도 관계있는 것이 아닌가 하는 추측을 해 볼 수 있다. 이러한 양상이 estrogen 투여군에서 뚜렷이 나타나지 않는 것은 간소엽 전역에 전반적으로 cAMP phosphodiesterase의 활성도가 증가되었기 때문인 것으로 사료된다.

다른 장기이긴 하지만 Singer와 Ariano³³⁾는 mouse의 폐포세포(alveolar cell)에서 cAMP phosphodiesterase의 활성반응이 모세혈관의 내피세포에서 전반적으로 양성반응을 보이고 폐포 대식세포(alveola macrophage)는 일정한 반응을 보이지 않는다고 하였다. 본 실험에서도 내피세포(endothelial cell)와 간의 대식세포인 Kupffer's cell에서의 cAMP phosphodiesterase의 활성반응은 높게 나타났다. Kupffer's cell에서의 양성반응은 세포에 따라 조금씩 반응정도의 차이는 관찰되나 큰 차이는 나타내지 않고 있다. 또한 이러한 양상은 estrogen 투여군과 대조군 간의 차이점이 별로 관찰되지 않는다. 이것은 전자현미경적으로 더 연구하여야 할 것으로 생각되며 단지 lysosome을 많이 함유하는 세포가 cAMP phosphodiesterase의 활성도를 강하게 나타낸다³¹⁾고 하는 사실로 미루어 estrogen에 별 관계없이 나타나는 양상이라 할 수 있겠다.

V. 요약 및 결론

쥐의 간장에 있어서 estrogen이 cAMP phosphodiesterase의 활성도에 어떻게 영향을 미치는가를 알아보기 위해 난소를 절제한 쥐와 난소 절제 후 estrogen을 투여한 쥐의 간장 cAMP phosphodiesterase의 활성도를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. estrogen 투여군이 대조군 보다 약 2배 이상의 활성반응을 보였다.
2. 대조군에서는 문맥야에서, 간소엽의 다른 부분보다 더 강한 활성반응을 보였다.
3. estrogen 투여군이나 대조군에서 모두 내피세포와 Kupffer's cell은 강한 활성을 보였으나 두 군에서의 차이점은 관찰되지 않았다.

이상과 같은 사실로 미루어 estrogen이 간세포에서 cAMP phosphodiesterase의 활성반응을 높이며 내피세포와 Kupffer's cell에는 별 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Anderson JN, Peek EJ, Clark JH : Estrogen induced uterine responses and growth : Relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei. *Endocrinology* 96 : 160, 1975
2. Angles G, Worcel M : Variations in c-GMP and c-AMP levels in rat uterine smooth muscle induced by carbachol. PGF_{2a} and changes in ionic composition. *Brit J Pharmacol* 54 : 236, 1975
3. Barker KL, Nielson MG, Warren JC : Estrogen control of uterine carbohydrate metabolism : Factors affecting glucose utilization. *Endocrinology* 79 : 1069, 1966
4. Barry J, Gorski J : Uterine ribonucleic acid polymerase : Effect of estrogen on nucleotide incorporation in to 3' chain termini. *Biochemistry* 10 : 2384, 1971
5. Bhalla RC, Sanborn BM, Koreaman SG : Hormonal interactions in the uterus : Inhibition of isoproterenol induced accumulation of c-AMP by oxytocin and prostaglandins. *Proc Acad Sci* 69(1) : 3761, 1972
6. Bolton TB : Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 59(3) : 606, 1979
7. Bronson FH, Bamilton TH : A comparison of nucleic acid synthesis in the mouse oviduct and uterus : Interactions between estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 6 : 160, 1972
8. Conti CJ, Gimenez-Conti IB, Zerbc GO, Gerschenson LE : Differential effects of estradiol-17 β and progesterone on the proliferation of glandular and luminal cells of rabbit uterine epithelium. *Biol Reprod* 24 : 643, 1981
9. Davies P, Syne JS, Nicholsin RI : Effects of estradiol and the antiestrogen tamoxifen on steroid hormone receptor concentration and nuclear ribonucleic acid polymerase activities in rat uteri. *Endocrinology* 105 : 1336, 1979
10. De Angelo AB, Gorski J : Role of RNA synthesis in the estrogen induction of a specific uterine protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 66 : 693, 1970
11. Epstein RM, Pledger WJ, Gardner EA, Stancel GM, Thomson WJ, Strada SJ : Activation of mammalian cyclic AMP phosphodiesterases by trypsin. *Biochem Biophys Acta* 527 : 442, 1978
12. Fencel MM, Vilee CA : Effects of RNA from estradiol-treated immature rats on protein synthesis in immature uteri. *Endocrinology* 88 : 279, 1971

13. Friedman DL : Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation. *Physiol Rev* 56(4) : 652, 1976
14. Gardner EA, Thomson WJ, Strada SJ, Stancel GM : Characterization of soluble uterine cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemistry* 17 : 2975, 1978
15. George WJ, Polson JB, O'Toole AG, Goldberg ND : Elevation of guanosin 3'-5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA* 66(2) : 398, 1970
16. Goldberg ND, Walseth TF, Stephenson JH, Krick TP, Graft G : 018 labeling of guanosine monophosphate upon hydrolysis of c-GMP by phosphodiesterase. *J Biol Chem* 255(21) : 10344, 1980
17. Gorski J : Early effects on the activity of uterine ribonucleic acid polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 239 : 889, 1964
18. Heyworth CM, Wallace AV, Houslay MD : Insulin and glucagon regulate the activation of two distinct membrane in hepatocytes : *Biochem J* 214 : 99, 1983
19. Heyworth CM, Houslay MD : Insulin exerts actions through a distinct species of guanine nucleotide regulating protein inhibition of adenylate cyclase : *Biochem J* 214 : 547, 1983
20. Houslay MD, Marchmont RJ : The insulin-stimulated c-AMP phosphodiesterase binds to a single class of protein sites on the liver plasma membrane. *Biochem J* 198 : 703, 1981
21. Kawakami M, Kimura F : Stimulation of c-AMP in anterior pituitary glands in vivo by synthetic GnRH. *Endocr* 106(2) : 626, 1980
22. Kuehl FA, Ham EA, Zanetti ME, Sanford CH, Nicol SE, Goldberg ND : Estrogen-related changes in uterine guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 : 1866, 1974
23. Kupferman I : Role of cyclic nucleotides in excitable cells. *Ann Rev Physiol* 42 : 629, 1980
24. Lee TP, Reed CE : Effects of steroids on the regulation of the levels of c-AMP in human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 78(3) : 998, 1977
25. Loten E, Francis SH, Corbin JD : Proteolytic solubilization and modification of hormone-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* 255(16) : 7838, 1980
26. Marshall JM : Effects of catecholamine on the smooth muscle of the female reproductive tract. *Ann Rev Pharmacol* 13 : 19, 1973
27. Millette RL, Trotter CD : Initiation and release of RNA by DNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 66 : 701, 1970
28. Metz S, Fujimoto W, Robertson RP : Modulation of insulin secretion by cyclic AMP and prostaglandin E : The effects of theophylline, sodium salicylate and bolbut amide. *Metabolism* 31 10 : 1014, 1982
29. Posternak T : Cyclic AMP and cyclic GMP. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 15 : 23 1974
30. Sanborn BM, Heindel JJ, Robinson GA : The role of cyclic nucleotides in reproductive processes. *Ann Rev Physiol* 42 : 37, 1980
31. Sakai T, Makino H : Increased activity of cyclic AMP phosphodiesterase from frozen-thawed rat liver : *Biochem Bio-*

- phys Acta, 522 : 477, 1978
32. Sim MK, Chantraksri U : Rat uterine contractability and the activities of uterine adenylate cyclase and phosphodiesterase during the estrus cycle. *Biochem Pharmacol* 22 : 1417, 1973
33. Singer AL, Ariano MA : Localization of cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase in mouse alveolar cells. *J Histochem Cytochem* 29 : 1372, 1981
34. Stancel GM, Thomson WJ, Strada SJ : Cyclic nucleotide phosphodiesterase in uterine development. *Mol Cell Endocrinol* 3 : 283, 1975
35. Sutherland EW, Butcher RW : Cyclic AMP in biologic materials. *J Biol Chem* 237(4) : 1244, 1962
36. Szego CM, Davis JS : Adenosine 3', 5'-monophosphate in rat uterus. : Acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 58 : 1711, 1967
-