

에스트로겐 수용체-알파 녹아웃 마우스에 발생한 난소 출혈다낭의 병리학적 특징과 출혈다낭에서의 에스트로겐 수용체-알파의 역할

손현진 · 김주현 · 이혜경
박미자 · 강동욱 · 고제명¹

을지대학교 의과대학 병리학교실
¹肯터키대학 생식과학부 임상과학교실

Pathologic Characteristics of Ovarian Hemorrhagic Polycyst in Estrogen Receptor-alpha (ER α) Knockout Mice and Roles of ER α in Hemorrhagic Polycyst

Hyun-Jin Son · Joo-Heon Kim · Hye-Kyung Lee · Mee-Ja Park
Dong-Wook Kang · Che-Myong Ko¹

Department of Pathology, Eulji University School of Medicine, Daejeon, Korea; ¹Division of Reproductive Sciences, Department of Clinical Sciences, University of Kentucky, Lexington, KY, USA

Background : Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrinopathy causing anovulation in women of childbearing age. It has been well established that estrogen receptor-alpha knockout (ER α KO) mice display several pathologic ovarian phenotypes of PCOS. The aims of this study were to determine ovarian pathology in new ER α KO mice using a Cre-loxP approach and intra-ovarian ER α function as regulating key aspects of PCOS. **Methods :** ER α KO mice, which were deficient in exon 3 of the ER α gene, were used. Immunohistochemical studies were done on ovaries of control and ER α KO mice using antibodies specific to ER α , ER β , inhibin- α , and α -smooth muscle actin (SMA), as well as histochemical staining using Sudan black-B. **Results :** All ovaries of ER α KO mice were larger than control mouse ovaries and displayed a disrupted theca-interstitial tissue organization, multiple atretic follicles and multiple hemorrhagic cysts. None of the ER α KO mouse ovaries showed a corpus luteum. In addition, heavy deposition of Sudan black-B positive foamy cells was seen. The theca externa of preantral immature follicles and hemorrhagic cysts showed strong expression of α -SMA. **Conclusions :** ER α KO mice show hemorrhagic polycystic ovaries and hyperplasia of the theca externa. This study demonstrates that the ER α is the functional key to the pathogenesis of PCOS.

Key Words : Polycystic ovary syndrome; Estrogen receptor-alpha knockout (ER α KO); Hemorrhagic polycysts; Immunohistochemistry

접수 : 2009년 11월 17일
게재승인 : 2010년 3월 15일

책임저자 : 강동욱
우 301-746 대전시 중구 용두동 143-5
을지대학교 의과대학 병리학교실
전화: 82-42-611-3454
Fax: 82-42-611-3459
E-mail: astrias@eulji.ac.kr

*이 논문은 학술진흥재단(KRF-2004-214-E00042) 지원에 의하여 수행된 것임.

다낭난소증후군(polycystic ovary syndrome, PCOS)은 Stein과 Leventhal¹이 다낭성 난소 비대와 동반된 무배란, 비만, 다모증 및 불임 증례를 보고 한 이후 Stein-Leventhal 증후군으로 더 잘 알려진 질환이다.² 또한 PCOS는 가임기 여성의 3-6% 그리고 배란 장애가 있는 불임 여성의 30-75%에서 발견되는 가장 흔한 여성의 내분비 질환으로² 50% 이상에서 비만을 동반하고, 제2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 및 죽상경화증의 위험성이 증가되어 있는 대사증후군의 임상소견을 보인다.^{3,4}

PCOS의 발병기전은 아직까지 뚜렷이 밝혀져 있지 않으나, 흔히 난포막-기질세포(theeca-interstitial cell)의 과대 자극반응으로 인한 안드로겐의 과다생산과 난포성숙의 장애를 일으키는

환경 요인 및 유전적 요인들이라고 알려져 있으며,³⁻⁷ 이러한 난포막-기질세포의 과대 자극반응을 유도하는 인자들은 인슐린과 인슐린 수용체(insulin receptor) 이상,⁸ 인슐린 유사성장인자 수용체(insulin-like growth factor receptor) 및 인슐린 수용체 기질단백(insulin receptor substrate) 이상⁸⁻¹⁰ 그리고 황체형성 호르몬(luteinizing hormone, LH)의 과다분비 및 스테로이드 호르몬과 수용체 이상^{11,12} 등이 거론되고 있다.

시상하부-뇌하수체-난소 축(hypothalamus-pituitary-ovary axis, HPO axis) 조절에 관련된 일련의 성호르몬, 특히 에스트로겐은 인체의 배란주기 혹은 동물의 발정주기를 조절하고, 난포의 생성, 성장, 배란 및 황체 형성에 중요한 역할을 하고 있

다.¹¹⁻¹⁴ 에스트로겐은 난소의 과립층세포에서 생성되어 주변 조직 또는 혈관을 통해 표적세포에 도달하여 표적세포 핵에 존재하는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)를 통하여 표적유전자의 전사 활성도에 영향을 준다.¹⁴⁻¹⁶ 그리고 대부분의 에스트로겐 기능은 전사인자인 ER α 와 ER β 를 통하여 표적세포 내 호르몬의 역할을 수행한다.^{16,17} 이 두 수용체는 각각 6번 염색체(6q25.1)와 14번 염색체(14q22-24)의 서로 다른 유전자 산물로서 에스트로겐에 대한 특이적 친화도가 매우 높다. 그러나 ER α 와 ER β 의 발현 위치가 조직마다 서로 다르거나, 발현 정도 역시 조직 및 기관에 따라 차이가 있다.¹⁴⁻¹⁷ 특히 난소에서 ER β mRNA의 발현은 주로 성장하는 난포 내의 과립층세포에서 강하게 발현되는 반면, 난소 내 ER α mRNA의 발현은 발현 자체가 불확실하고 저자마다 상이하게 보고되어 있다.^{18,19}

ER α -녹아웃(ER α -knockout, α ERKO or ER α KO) 마우스는 아로마타제 녹아웃(aromatase knockout) 마우스와 함께 배란 장애, 불임 및 혈액 내 LH 증가를 일으킬 수 있어 생식기 내 ER α 의 기능 연구와 PCOS 발병기전에 중요한 자료를 제공하고 있다.^{11,12,20-22} 기존의 ' α ERKO' 마우스는 ER α 유전자의 엑손 2에 neo 유전자를 침가하여 ER α 를 제거한 마우스로서 ER α 기능 연구에 많이 사용되었지만, 일부 에스트로겐의 의존 전사능력이 존재하는 불완전한 모델로 밝혀졌다.^{14,21} 최근 Bridges 등²³과 Lee 등²⁴은 기능적으로 보다 완벽하게 ER α 를 제거하기 위하여 'Cre/loxP' 방법을 이용한 세포-특이 ER α KO 마우스 모델을 제시하였다. 이 마우스는 ER α 유전자 엑손 3의 intron에 투입된 flox 염기 배열과 Cre 효소의 재조합 특성을 이용하여 배아 시기에 특이세포의 ER α 를 제거한 세포-특이 ER α KO 마우스 모델이다.^{21,23,24} 저자들은 이를 응용하여 난자에서 선택적으로 ER α 를 제거한 마우스와 flox 염기 배열을 가진 마우스(ER α ^{flox/flox})를 교배하여 Dupont 등²¹이 만든 ER α KO 마우스와 동일한 ER α KO 마우스를 생산하였다. Dupont 등²¹은 ER이 제거된 마우스의 생식기에서 관찰되는 일반적인 형태학적 특징을 발표했으나, 아직까지 교배를 통한 ER α KO 마우스에서 난소 출혈다낭의 자세한 조직학적 소견과 면역조직화학염색 및 조직화학 염색 연구결과는 없는 실정이다. 이에 저자들은 새로운 ER α KO 마우스를 본 연구의 실험 재료로 사용하여 ER α KO 마우스 난소의 출혈다낭을 확인하고, 조직-병리학적 소견을 통한 PCOS의 발병기전을 이해하며, 난소 구성세포의 ER 단백 발현 및 ER α 의 난소 내 역할을 문헌 고찰과 함께 규명하고자 한다.

재료 및 방법

ER α KO 마우스 생성

Dr. Ko's Lab에서 ER α KO 마우스 생성을 위해 ER α ^{flox/flox} 마우스(Dr. Chambon's Lab., Strasburg, France)²¹와 Zp3^{Cre}

마우스(Jackson Lab., Bar Harbor, ME, USA)를 교배하여 얻어진 난자-특이 ER α KO (oocyte-specific ER α KO, ER α ^{flox/flox} Zp3^{Cre}) 마우스를 주조자 동물로 사용하였는데, 이에 이용된 실험 과정은 실험동물 관리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 권고안에 따라 수행하였다. 즉 교배를 위한 환경은 14시간의 낮 주기와 10시간의 야간 주기를 주어 주야 리듬을 유지시키면서 지속적인 먹이와 물을 공급하였다. 우선 ER α ^{flox/flox} Zp3^{Cre} 암컷 마우스와 ER α ^{flox/flox} 수컷 마우스를 1차 교배하여 암수 각각 ER α ^{flox/-}의 교접종을 얻은 후, 암수 각각의 ER α ^{flox/-}를 교차 교배하여 ER α KO (ER α ^{-/-}) 마우스를 얻거나, ER α ^{flox/flox} Zp3^{Cre}의 암컷 마우스와 ER α ^{flox/-}의 수컷 마우스를 교배하여 ER α KO 마우스를 얻었다. 이때 교배하여 얻어진 마우스는 유전자 형을 알기 위하여 마우스 귀를 천공하고 천공된 조직으로 Easy-DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 DNA를 축출한 후 polymerase chain reaction (PCR)을 시행하였다. 그리고 3개의 시발체 조합으로 ER α 의 결손(ER α)과 loxP 염기 서열(34 bp)의 존재를 확인하였으며, Cre-P1와 Cre-P85의 조합으로 Cre 재조합 효소의 유무를 확인하였다. 이때 사용된 시발체의 염기서열은 Table 1에 정리하였다.

난자 및 과립층세포 내의 분리와 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

정상적인 발정주기를 지닌 대조군 마우스에 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 IU를 주사하고 48시간이 경과한 다음 hCG (Sigma) 5 IU를 추가 주사하고 20시간이 지난 후에 마우스 난소를 적출하였다. 적출한 난소에서 배란 전단계의 난포를 도립현미경(CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)으로 확인한 다음, 25 gauge 바늘 끝으로 난포를 천자하여 난자, 과립층세포 및 난포막-기질세포를 분리하였다. 각 구성세포의 자세한 분리방법은 Ko 등²⁵이 사용한 실험 방법을 참고하였다. 각각의 얻어진 세포의 RNA를 얻기 위하여 Trizol (Sigma) 방법을 이용하였고, 역전사 효소와 무작위 육합시발체를 이용하여 RT-PCR 결과를 얻었다. 이때 inhibin- α 는 과립층세포의 정상대조를 위하여 사용하였다. RT-PCR 시 발체의 염기서열은 다음과 같다. ER α , (F) 5'-gaa cgg gaa gct cac tgg cat ggc-3'/(R) 5'-tga ggt cca cca tgt tgc tg-

Table 1. ER α and Cre primer sequences with polymerase chain reaction annealing temperature

Primer	Sequence	T _A (°C)
ER α -P1	5'-tg ccc gat aac aat aac at-3'	53
ER α -P2F	5'-gtg tca gaa aga gac aat-3'	53
ER α -P3	5'-ggc att acc act tct cct ggg agt ct-3'	53
Cre-P1	5'-gga cat gtt cag gga tcg cca ggc g-3'	55
Cre-P85	5'-gtg aaa cag cat tgc tgt cac tt-3'	55

ER, estrogen receptor; T_A, annealing temperature.

3': Inhibin- α , (F) 5'-gct ttc cct ctg ttg acc cac-3'/(R) 5'-aga tgt tga ggg cag ctc gat-3'.

ER α KO 마우스 난소조직 관찰 및 면역조직화학염색

대조군과 ER α KO 마우스의 난소를 적출하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정시킨 후 통상의 방법에 따라 파라핀포매 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E) 염색과 Sudan black-B 염색을 시행하였다. 염색이 완성된 슬라이드는 디지털 카메라(DP70, Olympus)가 부착된 현미경(BX51, Olympus)으로 조직 소견을 관찰하였다.

난소의 면역조직화학염색을 위하여 ER α KO 마우스의 조직 절편을 4 μ m 두께로 세절 후 ProbeOn Plus 슬라이드에 부착 시켜 건조하고, 탈파라핀한 후 함수하였다. 그리고 항원의 노출을 용이하게 하기 위하여 완충액(0.01 M citrate buffer, pH 6.0/target retrieval solution, pH 8.0)을 이용하여 120°C 가압 멸균기에서 10분간 전처리하였다. 그리고 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에서 10분간 처리한 후, 조직 내의 항원과 비특이적 단백 결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다. 이때 일차항체는 ER α (mouse monoclonal 1D5, ready to use, Dako, Carpinteria, CA, USA), ER β (1:200, mouse monoclonal PPG5/10, Dako), inhibin- α (1:50, mouse monoclonal M3609, Dako), α -smooth muscle actin (SMA: 1:50, mouse monoclonal α sm-1, Novocastra, Newcastle, UK)로, ER β 는 4°C에서 하룻밤 일차항체에 반응시켰고 나머지 항체는 실온에서 1시간 동안 부착시켰다. Envision detection system (Dako)을 이용하여 이차항체를 10분간 반응

시킨 후, DAB/AEC를 이용해 발색시키고, Meyer's hematoxylin으로 대조염색하였다. 이때 ER α 와 ER β 의 염색은 핵에 진하게 염색되었을 때를 양성으로 판단하였고, 세포질에 염색되었더라도 핵에 염색되지 않았을 경우는 음성으로 판단하였다. 그리고 inhibin- α 과 α -SMA는 세포질에 염색되었을 때를 양성 반응으로 판단하였다.

결과

ER α KO 마우스 생성

ER α KO 마우스 생성을 위해 우선 ER α ^{flx/flx} Zp3^{Cre}의 암컷 마우스와 ER α ^{flx/flx}의 수컷 마우스를 교차 교배하여 ER α ^{flx/-} 마우스를 얻었다. ER α ^{flx/Zp3^{Cre} 마우스는 난자-특이 ER α KO로서 난자의 ER α 만 선택적으로 녹아웃된 마우스이다. 따라서 ER α ^{flx/flx} Zp3^{Cre} 마우스는 난자의 표현형이 ER α ^{flx/-}이므로 수컷 ER α ^{flx/flx}와 교배하여 100%의 ER α ^{flx/-} 마우스를 만들었다. ER α ^{flx/-} 마우스끼리 교차 교배하면 멘델의 법칙에 따라 25%의 ER α KO 마우스를 얻을 수 있었고, ER α ^{flx/flx} Zp3^{Cre}의 암컷 마우스와 ER α ^{flx/-}의 수컷 마우스를 교배시켰을 때, 50%의 ER α KO 마우스를 얻을 수 있었다. ER α 제거 방법의 도식적 전략과 ER α KO 마우스의 표현형 결과는 Fig. 1과 같다.}

난소 내 구성세포의 ER 발현 및 inhibin- α 단백 발현

난소 내 구성세포의 ER α mRNA 발현 유무를 알아보기 위

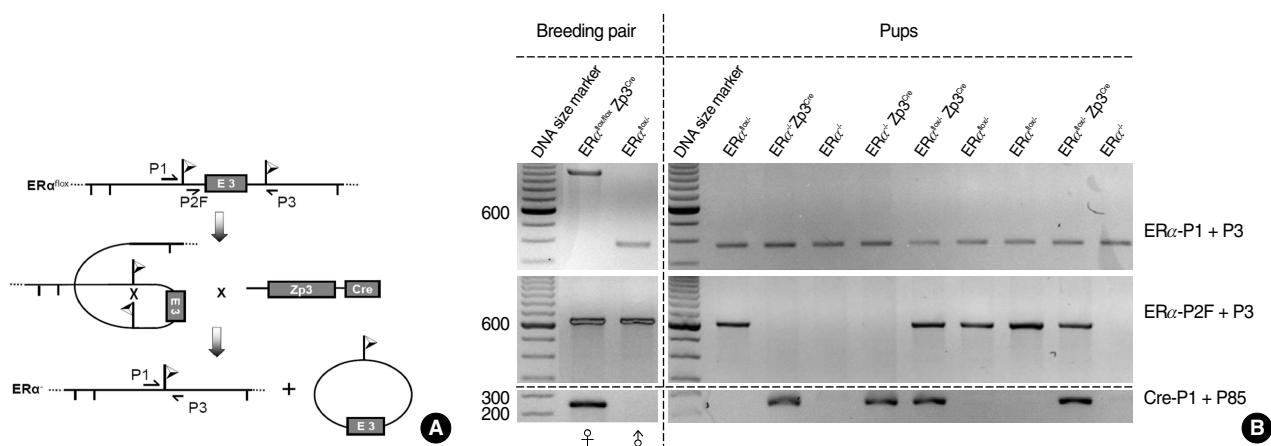


Fig. 1. Strategy of targeted deletion of exon 3 of the estrogen receptor alpha (ER α) gene and generation of ER α ^{flx/-} mice from ER α ^{flx/flx} Zp3^{Cre} and ER α ^{flx/-} mice. Schematic strategy of targeted deletion of exon 3 (E3) of the ER α gene is shown (A). E3 (nucleotide 655 bp to 845 bp) is shown as a box. Zp3 comes from zona pellucida protein 3. After recombination of the homologous sites, Cre deletes 'floxed' E3 (ER α ^{flx}) by site-specific recombination. Ear biopsy is used to obtain genomic DNA samples for genotyping (Fig. 2B). Primer combinations of ER α -P1 + ER α -P3 and ER α -P2F + ER α -P3 are used to determine the presence or absence of the loxP sequence (lox or wt) and deletion of exon 3 (ER α ^{-/-}). The presence of Cre recombinase is determined using primers Cre-P1 and Cre-P85. Note that half of the offspring is ER α ^{-/-} in this mating.

하여 생후 2달 이상의 대조군 마우스 난소의 과립층세포와 난자를 따로 분리하여 RT-PCR을 시행한 결과, 성숙한 마우스 난소는 과립층세포 및 난자에서 ER α mRNA의 발현이 있음을 확인하였다(data 생략). 그러나 면역조직화학염색 결과, ER α 의 단백 발현은 주로 난포막-기질세포와 생식상피세포의 핵에서 관찰되었고 과립층세포와 난자에서는 ER α 단백 발현이 없었다(Fig. 2A-C).

난소 내 ER β 단백 발현은 성장하는 난포의 과립층세포, 난포막-기질세포 및 생식상피세포의 핵에 양성반응을 보여 ER α 보다 광범위한 반응을 보였다(Fig. 2D-F). 또한 inhibin- α 는 ER β 와 같이 과립층세포에서 강양성 발현을 보였다. 그러나 ER β 가 핵에서 양성반응을 보인 반면 inhibin- α 는 세포질과 세포막에서

강한 단백 발현을 보였고, 난포막-기질세포와 생식상피에서는 음성반응을 보였다(Fig. 2G-I).

ER α KO 마우스의 출혈다낭 난소 형성

ER α KO 마우스의 난소 내 출혈다낭의 생성 및 조직학적 특징을 알아보기 위하여 대조군과 ER α KO 마우스 난소조직을 관찰한 결과 생후 1달 미만의 미성숙 ER α KO 마우스에서는 고도의 난소 질환은 없었으나(Fig. 3A, B), 생후 20일 전후에서 출혈성 난포가 생성되기 시작하였다(Fig. 3D, E). 생후 2달이 경과한 ER α KO 마우스는 난소다낭 형성으로 인하여 난소의 크기가 대조군에 비해 2배 이상 커져 있었으며 황체 형성은 관찰되

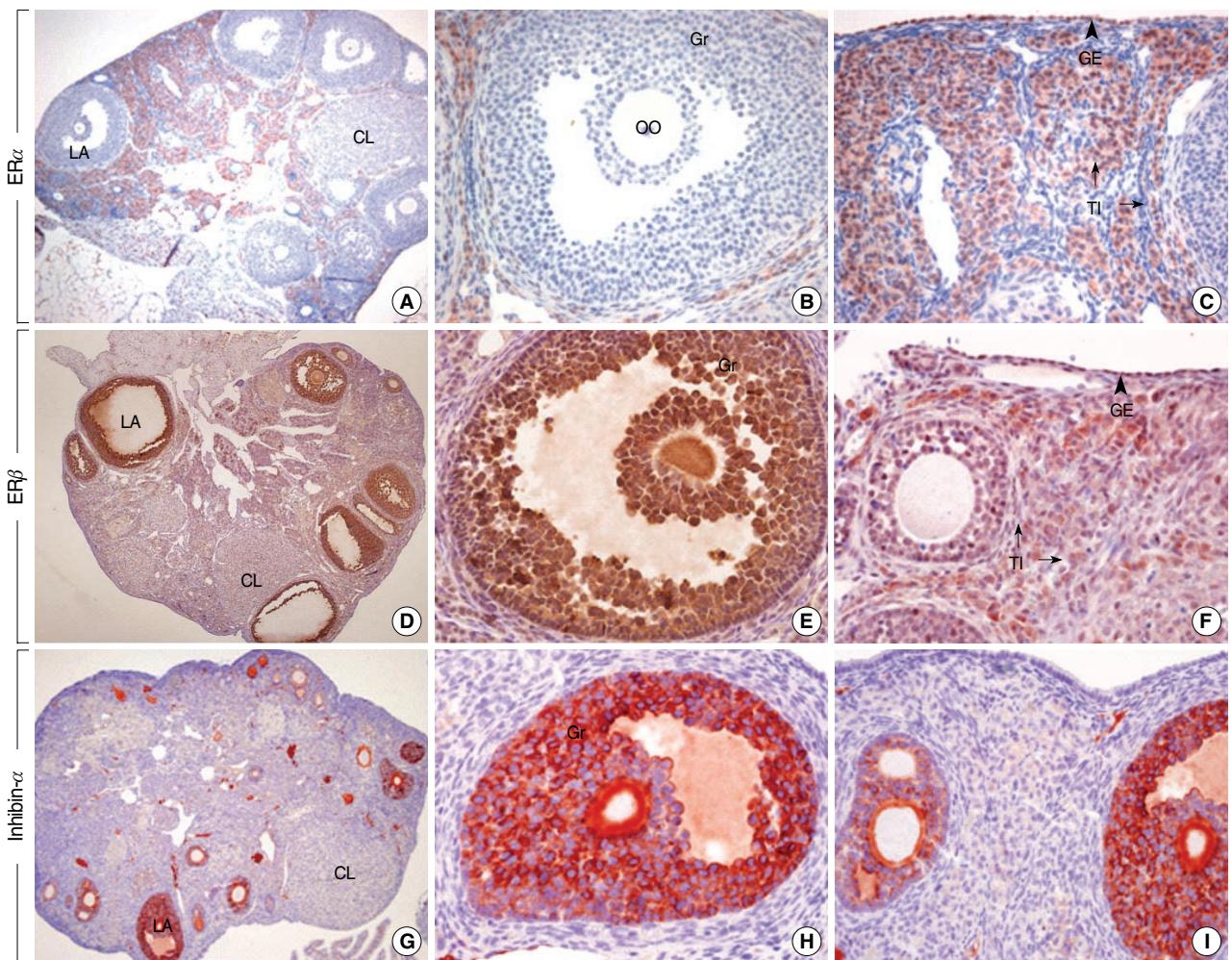


Fig. 2. Ovarian immunohistochemical staining of estrogen receptor alpha (ER α), ER β , and inhibin- α . Ovaries of 2-month-old control mice are examined by immunohistochemistry. Note that positive ER α expression is seen in the nuclei of the theca-interstitial cells and germinal epithelium, while the expression in the oocyte and granulosa cells is not prominent (A-C). ER β expression is seen in the nuclei of the granulosa cells, theca-interstitial cells and germinal epithelium (D-F). Inhibin- α is expressed in cytoplasm of the granulosa cells (G-I). An arrowhead indicates germinal epithelium and arrows indicate theca-interstitial cells.

LA, large antral follicle; CL, corpus luteum; Gr, granulosa cell; OO, oocytes; GE, germinal epithelium; TI, theca-interstitial cell.

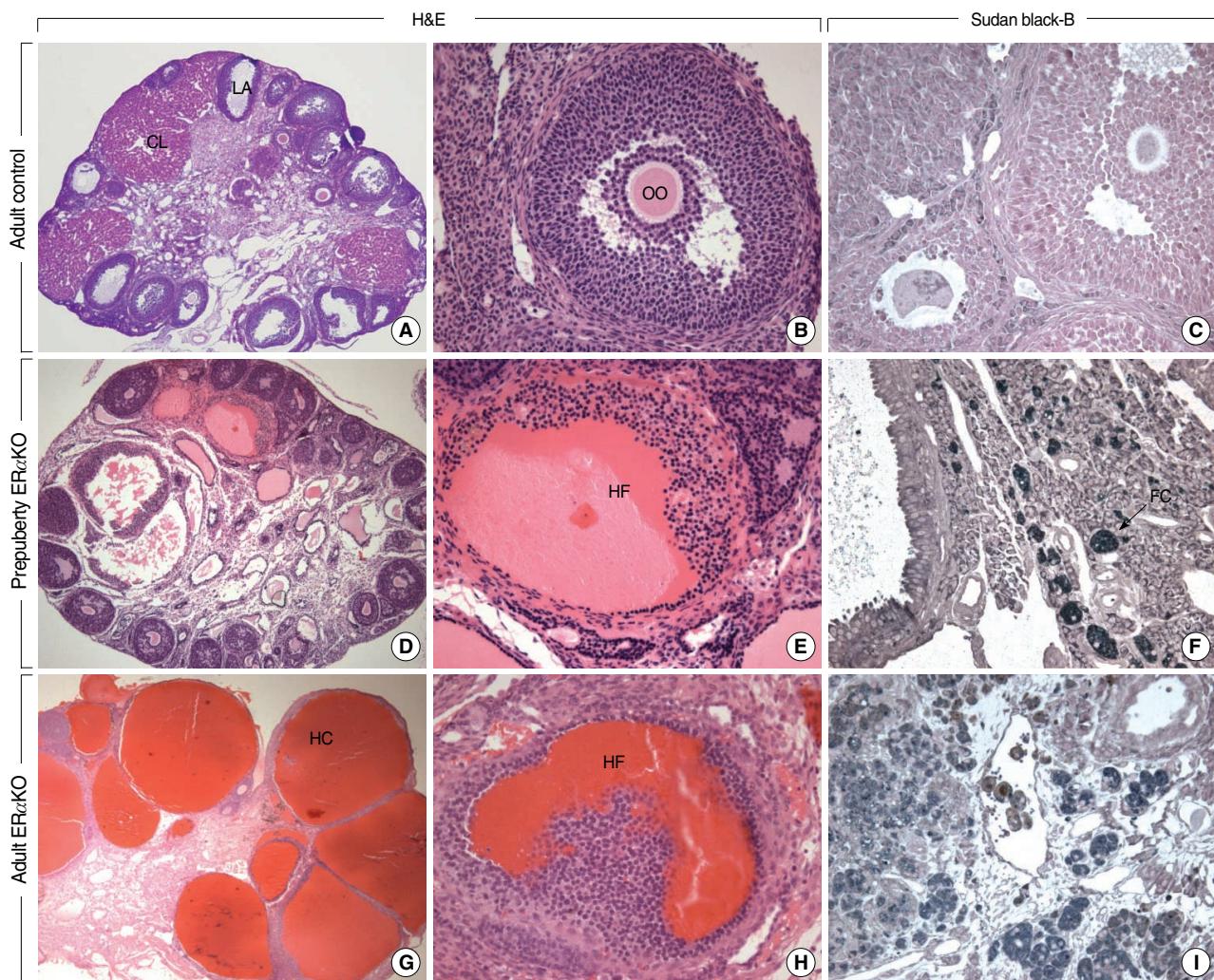


Fig. 3. Ovarian histology and Sudan black-B staining of control, prepubertal and adult estrogen receptor-alpha knockout (ER α KO) mice. While no multiple hemorrhagic cysts are seen in the ovary of a 2-month-old control mouse (A-C), multiple dilated cysts filled with red blood cells are seen in the ovary of a 2-month-old adult ER α KO mouse (G-I). Several dilated hemorrhagic follicles, atretic follicles and loose theca-interstitial tissue are also seen in the ovary of a 22-day-old prepubertal ER α KO mouse (D-F). Ovaries show multifocal infiltrations of foamy cells in the interstitial tissue (F, I). An arrow indicates foamy cells in Sudan black-B stain.

지 않았다. 구성된 낭의 크기는 매우 다양하였고, 난소의 표면에 도달할수록 낭의 크기가 커져 있었으며, 낭의 내부에는 혈액으로 채워진 출혈다낭이었다(Fig. 3G, H). 그리고 ER α KO 마우스 난소의 난포막-기질세포는 나이가 들수록 포밀세포의 수가 증가하였고, 포밀세포의 세포질은 Sudan black-B에 강하게 염색되었다(Fig. 3F, I).

ER α KO 마우스 출혈다낭의 기질화 및 난포외막세포의 과다증식

ER α KO 마우스의 난소 내 출혈다낭의 난포외막세포 증식을

알아보기 위하여 ER α KO 마우스 난소에 α -SMA 면역조직화 학염색을 시행한 결과, ER α KO 마우스 난소의 난포외막세포층은 대조군과 비교하여 두껍고 치밀하였다. 또한 대조군 난소의 난포외벽은 1-2층의 얇은 난포외막세포층으로 구성되었으나 (Fig. 4A, B), 생후 1달 미만의 ER α KO 마우스의 난소는 미성숙 소난포가 주로 피질에 밀집되어 있으면서 α -SMA에 강양성 발현을 보이는 난포외막세포의 과다증식이 관찰되었다(Fig. 4C, D). 그리고 대조군과 같은 연령대의 ER α KO 마우스의 난소는 치밀하게 난포외막세포층으로 둘러싸여 있었으며, 기질화된 출혈다낭의 소견이 관찰되었다(Fig. 4E, F).

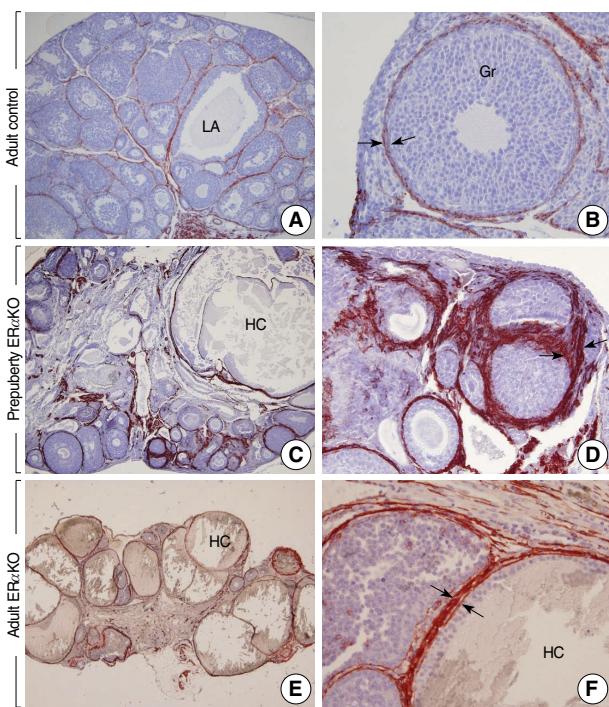


Fig. 4. Ovarian α -smooth muscle actin (SMA) staining of control, prepubertal and adult estrogen receptor-alpha knockout (ER α KO) mice. Follicles are well formed and surrounded by a few theca externa cells in the ovary of a 3-month-old control mouse (A, B). Note that α -SMA positive-theca external layers are increased and tightly packed in the preantral and perifollicular wall of the hemorrhagic cysts from a 22-day-old prepubertal ER α KO mouse (C, D) and a 2-month-old ER α KO mouse (E, F). The mirror arrows indicate theca externa.

LA, large antral follicle; Gr, granulosa cells; HC, hemorrhagic cyst.

고찰

여성 생식 · 내분비계의 중요한 일련의 과정은 호르몬의 영향을 받은 난소에서 생성된 난포가 성장한 후 수정을 위해 배란 과정을 거쳐 황체를 형성하고 이를 유지하는 것이다.^{3,4} 에스트로겐은 이러한 여성 생식 기능에 핵심적인 역할을 하고 있으며, 대부분의 기능들은 핵 내 전사인자인 ER을 통하여 이루어진다.¹⁴⁻¹⁷ ER은 최근까지 α 형, β 형, γ 형 등이 보고되어 있고, 난소에서는 ER α 와 ER β 가 대표적인 수용체로 알려져 있으나, ER γ 형은 아직 기능이 잘 밝혀져 있지 않다.²⁶ ER α 는 난소에서 주로 상피세포와 난포막-기질세포에서 단백 발현되며, 난자 및 과립층세포에서의 발현 여부는 보고자에 따라 이견이 있어 아직까지 이를 세포에서의 수용체 존재 여부가 확실치 않다.^{18,27} 본 연구에서는 과립층세포와 난자의 RT-PCR 결과 ER α 의 mRNA 발현 여부를 확인할 수 있었다. 면역조직화학염색에서 ER α 단백 발현은 주로 생식상피와 난포막-기질세포의 핵에서 양성으로 발현되었으나, 과립층세포와 난자에서 ER α 의 단백 발현은 관찰

되지 않았다. 이는 난자와 과립층세포 내 에스트로겐의 의존 ER α 전사능력이 미약하거나 잠재되어 있을 것으로 추정된다. 여러 저자들은 난소에서 ER β 가 높이 발현되고, 주로 성장하는 난포의 과립층세포에서 강하게 단백 발현되기 때문에 난포의 발생, 성숙 그리고 배란에 주된 역할을 한다고 보고하였다.^{17-19,28} 본 연구도 같은 결과를 보였다. 결론적으로 ER β 의 단백 발현은 난포 내의 과립층세포 뿐만 아니라 ER α 단백 발현과 같이 생식상피세포와 난포막-기질세포에서도 발현됨을 알 수 있었다. 따라서 ER α 와 ER β 의 난소 내 발현은 상당부분 공유되어 있고, 발현 정도는 동물에 따라 차이가 보고되어 있어^{18,27} 두 수용체의 기능은 상호보완 및 경쟁 기능이 존재할 것으로 생각한다.

기존의 엑손 2를 표적으로 ER α 를 제거한 'ER α KO' 마우스는 생식내분비에서 에스트로겐 호르몬의 역할 및 ER α 의 기능을 탐구하는 데 유용하게 사용되었으나, 시상하부의 생식샘자극 호르몬(gonadotropin releasing hormone), 난포자극 호르몬(follicular stimulating hormone), LH 및 에스트로겐과 프로제스테론 등 HPO axis의 영향을 받는 호르몬들의 간섭 및 불균형을 초래할 수 있어, 난소 내의 ER α 기능을 파악하는 데 간섭 현상이 있었다.^{11,12,14,22} 그러나 'Cre-loxP' 방법을 이용하여 ER α 유전자 엑손 3을 타깃으로 한 새로운 'ER α KO' 마우스 모델은 보다 쉬운 방법으로 교배를 통해 얻을 수 있고, 과립층세포 및 난포막-기질세포 등 특정 세포에서 선택적으로 ER α 를 제거할 수 있어 난소 내 특정 세포의 ER α 기능을 밝힐 수 있으며, HPO axis의 영향을 받는 스테로이드 호르몬 간의 간섭 현상을 배제 할 수 있다는 장점이 있다.^{21,23} 본 실험에 사용된 ER $\alpha^{flox/flox}$ Zp3^{Cre} 마우스와 ER $\alpha^{flox/-}$ 마우스를 교배시켰을 때 50%의 ER α KO 마우스를 얻을 수 있음을 확인하였는데, 이는 ER α 유전자 엑손 3을 타깃으로 한 난자특이-ER α KO 마우스에서 Cre 재조합 효소가 난자가 가지고 있던 ER α 유전자를 결손시킴으로써 완벽한 ER α KO 마우스를 만들어 내고 있음을 알 수 있었다.

또한 사춘기 전 ER α KO 마우스 난소의 조직검사에서 원시난포의 생성은 잘 유지되어 있었으나, 크기가 작은 난포들이 난소 피질 부분에 밀집되어 있었고 드물게 출혈성 난포형성이 시작되어 성인 연령기의 ER α KO 마우스에서 PCOS와 같이 무배란과 불임이 나타나고 고도의 출혈다낭, 난포막-기질세포의 부설, 성숙난포의 형성부전 등이 관찰되었다. 이는 PCOS 환자의 대부분이 가임기의 젊은 여성에게서 그 표현형이 나타나는 경우와 같이 ER α KO 마우스에서도 사람과 같은 연령 때의 표현형 및 증상이 시작됨을 알 수 있었다.³⁷ 따라서 ER α 는 난소의 난포 발생보다는 난포의 유지와 성숙, 배란 및 황체 형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 향후 ER β KO 마우스와 ER $\alpha\beta$ KO 마우스를 이용한 ER α 와 ER β 의 난소 내 역할 규명이 기대된다.

ER α KO 마우스에서 관찰되는 다낭은 혈액이 가득 찬 출혈다낭으로서 PCOS의 비출혈성 난포다낭과는 차이가 있다. 즉 육안 및 조직학적으로 낭의 크기가 풍선 모양으로 매우 커져 있었음에도 파열에 의한 출혈다낭의 소견은 관찰되지 않았고, α -SMA

면역조직화학염색에서 출혈다낭을 둘러싸고 있는 난포외막층은 대조군보다 두꺼워져 있어 낭을 구성하고 있는 벽이 단단히 기질화되어 있음을 알 수 있었다.²⁹ 특히 출생 후 1달 미만의 미성숙 ER α KO 마우스의 난소피질에 미성숙 소난포가 밀집되어 있으면서 난포외막층의 과다증식이 관찰되었고, 나이가 많아질수록 난포가 퇴화되어 출혈낭으로 대치됨을 알 수 있었다. 이 결과 ER α KO 마우스 난소낭의 원인이 평활근 분화를 보이는 난포외막세포의 과다증식과 난포의 성숙장애 및 배란장애가 원인으로 작용했을 가능성이 높다고 생각되지만, 출혈을 일으키는 발병기전을 밝히기 위해서는 더 많은 관찰이 필요하다.

대조군 난소에서 기질세포 사이로 황체화 난포세포와 모양이 유사한 소량의 포말세포의 출현이 관찰되었는데, ER α KO 마우스에서는 이것이 보다 광범위하고 다량으로 관찰되었고 Sudan black-B 염색 결과 강하게 염색되었다. 이러한 포말세포의 출현은 LH 과다분비에 의한 황체화 기질세포 혹은 노화의 단계로 보고된 바 있는데,³⁰ 차후에 이를 세포 내용물의 호르몬 발현 연구가 필요하다고 생각된다.

이상과 같이 'Cre/loxP' 방법을 이용하여 생성된 ER α KO 마우스의 난소 출혈다낭과 난포외막세포의 과다증식은 PCOS 환자의 난소에서 관찰되는 특징적인 난포다낭 및 난포막과대형성(hyperthecosis)과 유사한 소견임을 알 수 있었다. 난포외막세포의 증식은 난포막-기질세포의 과대자극반응을 초래하여 안드로겐의 과다생산을 일으키는 원인으로 생각되며, 스테로이드계 호르몬 또는 수용체 이상 특히 ER α 의 기능 이상이 PCOS의 발병기전에 중요한 역할을 하고 있다고 생각한다. 이에 본 연구자는 ER α 와 ER β 의 기능 연구 및 난포막-기질세포에서의 안드로겐 호르몬 측정 계획이 있다.

참고문헌

- Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol 1935; 29: 181-91.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2009; 1039-40.
- Franks S, McCarthy MI, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. Int J Androl 2006; 29: 278-85.
- Gabrilove JL. The pathogenesis of the polycystic ovary syndrome: a hypothesis. Endocr Pract 2002; 8: 127-32.
- Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Androgen actions and the ovary. Biol Reprod 2008; 78: 380-9.
- Kimura S, Matsumoto T, Matsuyama R, et al. Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. Trends Endocrinol Metab 2007; 18: 183-9.
- Xita N, Tsatsoulis A. Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 1660-6.
- Dunaif A, Wu X, Lee A, Diamanti-Kandarakis E. Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 281: E392-9.
- Gdansky E, Diamant YZ, Laron Z, Silbergeld A, Kaplan B, Eshet R. Increased number of IGF-I receptors on erythrocytes of women with polycystic ovarian syndrome. Clin Endocrinol (Oxf) 1997; 47: 185-90.
- Giudice LC. The insulin-like growth factor system in normal and abnormal human ovarian follicle development. Am J Med 1995; 98: 48S-54S.
- Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. Reproduction 2003; 125: 143-9.
- Schomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, et al. Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. Endocrinology 1999; 140: 2733-44.
- Ko C, Gieske MC, Hudgins-Spivey S, Bridges P, Lee S. Estrogen in female reproductive axis: positive estrogen feedback to pituitary. Korean J Reprod Med 2007; 34: 207-17.
- Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Eddy EM, Schomberg DW, Korach KS. Disruption of the mouse oestrogen receptor gene: resulting phenotypes and experimental findings. Biochem Soc Trans 1995; 23: 929-35.
- Taniguchi F, Couse JF, Rodriguez KF, Emmen JM, Poirier D, Korach KS. Estrogen receptor-alpha mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17a1 (cytochrome P450, steroid 17alpha-hydroxylase/17,20 lyase) expression. FASEB J 2007; 21: 586-95.
- Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors: an overview. J Intern Med 1999; 246: 133-8.
- Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. Endocrinology 2005; 146: 3247-62.
- Yang P, Wang J, Shen Y, Roy SK. Developmental expression of estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta in the hamster ovary: regulation by follicle-stimulating hormone. Endocrinology 2004; 145: 5757-66.
- Méndez MC, Chávez B, Echeverría O, Vilchis F, Vázquez Nin GH, Pedernera E. Evidence for estrogen receptor expression in germ cell and somatic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. Cell Tissue Res 1999; 298: 145-52.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disrupt-

- tion of the cyp19 gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 6965-70.
21. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. Development 2000; 127: 4277-91.
22. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr Rev 1999; 20: 358-417.
23. Bridges PJ, Koo Y, Kang DW, et al. Generation of Cyp17iCre transgenic mice and their application to conditionally delete estrogen receptor alpha (Esr1) from the ovary and testis. Genesis 2008; 46: 499-505.
24. Lee S, Kang DW, Hudgins-Spivey S, et al. Theca-specific estrogen receptor-alpha knockout mice lose fertility prematurely. Endocrinology 2009; 150: 3855-62.
25. Ko C, In YH, Park-Sarge OK. Role of progesterone receptor activation in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide gene expression in rat ovary. Endocrinology 1999; 140: 5185-94.
26. Takeda Y, Liu X, Sumiyoshi M, Matsushima A, Shimohigashi M, Shimohigashi Y. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR γ among the human reproductive tissues: predominant expression of type-1 ERR γ isoform. J Biochem 2009; 146: 113-22.
27. Pelletier G, Labrie C, Labrie F. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. J Endocrinol 2000; 165: 359-70.
28. Britt KL, Findlay JK. Estrogen actions in the ovary revisited. J Endocrinol 2002; 175: 269-76.
29. Santini D, Ceccarelli C, Leone O, et al. Smooth muscle differentiation in normal human ovaries, ovarian stromal hyperplasia and ovarian granulosa-stromal cells tumors. Mod Pathol 1995; 8: 25-30.
30. Cheng G, Weihua Z, Mäkinen S, et al. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. Biol Reprod 2002; 66: 77-84.