

백서에서 난소절제술 후 여성호르몬투여가 방광에 미치는 영향

The Effects of Estrogen on Detrusor Contraction and the Expression of Muscarinic Receptors in Ovariectomized Rats

Ho Young Chung, Jin Seok Chang, Se Hun Kim¹, Ki Hak Song, Young Seop Jang, Dong Seok Han

From the Departments of Urology and ¹Physiology, Konyang University College of Medicine, Daejeon, Korea

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the effects of estrogen on detrusor contraction and the expression of muscarinic receptors in ovariectomized rats.

Materials and Methods: 24 Sprague-Dawley female virgin rats (12 weeks old) were separated into three groups of 8 rats each. Group I served as a control group, group II was the ovariectomized only rats (Ovx group) and Group III was given estradiol benzoate (0.8mg/kg/day) subcutaneously for 7 consecutive days, beginning 1 week after ovariectomy (Ovx+E group). At the end of the experimental period, each rat was sacrificed and the urinary bladder was removed for contractile studies. The expressions of M₂ and M₃ receptors in the bladder epithelium and the muscle layer were investigated by performing immunofluorescent staining.

Results: The Ovx group showed a significantly decreased bladder contractile function on the KCl and carbachol-induced contractile tests, whereas the Ovx+E group showed increased contractility ($p < 0.05$). The Ovx+E group showed an increase of smooth muscle compared to the other groups. Ovariectomy induced a significant increase in the M₃ receptors density in the bladder body, as compared to the control group ($p < 0.05$) but there was no significant difference between the Ovx group and the Ovx+E group.

Conclusions: Bladder dysfunction of menopausal women is thought not to be related with the changes of muscarinic receptors. Our results suggest that the detrusor contractility of menopausal women might be improved after estrogen replacement therapy. (Korean J Urol 2008;49:1105-1111)

Key Words: Ovariectomy, Estrogens, Muscarinic receptors, Urinary bladder, Muscle contraction

대한비뇨기과학회지
제 49 권 제 12 호 2008

건양대학교 의과대학
비뇨기과학교실, ¹생리학교실

정호영 · 장진석 · 김세훈¹
송기학 · 장영섭 · 한동석

접수일자 : 2008년 7월 24일
채택일자 : 2008년 10월 10일

교신저자: 한동석
건양대학교 의과대학
비뇨기과학교실
대전시 서구 가수원동 685
☎ 302-718
TEL: 042-600-9225
FAX: 042-542-3790
E-mail: hds@dreamwiz.com

이 논문은 2006년도 건양대학교 명목 학술연구비의 지원에 의하여 이루어진 것임.

서론

폐경기 여성에서 여성호르몬의 부족으로 방광의 기능장애가 발생하는 경향이 있으며,¹ 여성호르몬의 변화가 뇨절박, 빈뇨, 저활동성 방광, 요도 및 골반 근육의 약화에 주된 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.² 이에 대해 여성호르몬(estrogen)은 여성 비뇨생식기의 생리적 유지에 필수적이며,^{3,4} 여성호르몬 대체치료가 복잡성요실금이 있는 폐경기

여성에게 방광경부 혈류량을 증가시킬 뿐만 아니라,⁵ 뇨절박 증상을 의미 있게 감소시킨다고 하였다.⁴

또한, 동물실험에서 난소절제에 의한 여성호르몬의 결핍이 점막의 위축, 평활근(smooth muscle) 세포의 퇴화, 혈류량의 감소 및 점막과 평활근의 저산소증을 유발하여 결국 방광 수축력을 감소시키지만, 여성 호르몬의 대체치료가 위와 같은 현상을 되돌릴 수 있다고 보고하고 있으며,^{6,8} 방광의 콜라겐 대비 평활근의 비율을 증가시킴으로써 방광의 수축력을 증가시킨다고 보고하고 있다.⁹

방광에는 무스카린 수용체 아형 중에서 M_2 , M_3 가 많으며, 방광의 수축에 중요한 역할을 한다고 하였으나,¹⁰ 여성 호르몬 대체치료가 이러한 무스카린 수용체에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 아직까지 논란의 여지가 있다.^{11,12}

본 연구에서는 난소절제술을 시행한 처녀 백서에게 여성 호르몬 대체치료를 시행하였을 때 방광의 수축력의 변화 및 무스카린 수용체 아형의 분포변화를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험동물로는 생후 12주된 230-270g의 암컷 처녀 백서 (Sprague-Dawley) 24마리를 사용하였다. 대조군, 난소절제술 (ovariectomized; Ovx)군, 난소절제술 후 여성호르몬 치료 (ovariectomized and estradiol treated; Ovx + E)군으로 각각 8마리씩 나누어 실험하였으며, Ovx군과 Ovx + E군은 12주에 난소절제술을 각각 시행하였다. 마취는 ketamine 100mg/kg를 사용하였고 복강 내 투여 후 수술을 시행하였다. 양측 난소절제술은 복와위 (prone position)에서 0.5cm의 양측 subcostal incision을 통해 시행하였다. 호르몬대체치료는 estradiol benzoate 20mg/10ml 제제를 이용하였으며, 양측 난소절제술 후 1주일 뒤부터 1주일간 매일 0.1ml (0.8mg/kg)를 피하주사하였다.

2. 배뇨근 수축실험

12주령의 각 군에 속한 쥐를 난소절제술과 여성호르몬 치료 시행 후 경추탈골로 즉사시킨 뒤에 방광을 적출하였다. 적출한 방광을 실온에서 100% 산소로 포화된 HEPES 완충 정상생리용액 (NaCl 140mM, KCl 4mM, $CaCl_2$ 2mM, $MgCl_2$ 1mM, HEPES 5mM, glucose 11mM, pH 7.4) 속에서 10배 확대되는 stereoscope로 관찰하면서 주변 결합조직을 제거한 후 방광체부의 가장 넓은 부분에서 폭 2mm인 고리 모양의 실험절편을 제작하였다.

제작된 실험 절편을 100% 산소가 공급되며, 37°C가 유지되는 HEPES 완충 정상생리용액 (NaCl 140mM, KCl 4mM, $CaCl_2$ 2mM, $MgCl_2$ 1mM, HEPES 5mM, glucose 11mM, pH 7.4)으로 채워진 용량 50ml의 실험용기에 옮긴 후 등장성 장력변환기 (isometric force transducer)에 연결된 아날로그 기록기로 방광 수축을 기록하였다. 고리모양의 방광절편을 L모양의 스테인레스 hook에 걸어 예비실험에서 최대수축력을 보인 2g 장력을 준 후 1시간동안 안정화시킨 뒤에 수축실험을 진행하였다. 안정화 기간동안 30분 경과 후 HEPES 완충 정상생리용액을 1회 교환하였다.

1) 고농도의 포타슘용액에 의한 수축 반응: 막전압 의존성 칼슘이온통로를 직접적으로 활성화시키는 고농도 포타슘 50mM 용액을 투여하여 각 군 사이에 수축 차이가 있는지 관찰하였다. 수축반응 유발 후 5분 뒤 HEPES 완충 정상생리용액을 교환하여 세척하였고, 5분간 안정화 기간을 가진 뒤에 다시 수축 실험을 시행하였다.

2) Carbachol에 의한 수축 반응: 방광의 무스카린성 수용체를 자극하여 수축을 유발하기 위해 carbachol을 1×10^{-7} 부터 3×10^{-4} M까지 투여하여 각 군의 수축 차이를 비교하였다. 3×10^{-4} M까지 투여한 후 5분 뒤에 HEPES 완충 정상생리용액을 교환하여 세척하였고, 5분간 안정화 기간을 가진 뒤에 다시 수축 실험을 시행하였다.

3. 표본제작 및 면역형광염색

1) 표본제작: 적출된 방광의 체부 부분을 10% 중성 포르말린에 하루 동안 고정시키고 흐르는 물에 수세하여 고정제를 제거하고 탈수하였다. 투명화 과정 후에 paraffin에 포매하였으며, 조직블럭은 slide glass에 4 μ m 두께로 절편을 제작하여 부착시킨 후 H-E 염색 및 면역형광염색을 시행하였다.

2) 면역형광염색: 제작된 표본의 탈파라핀화 및 함수화를 위해 xylene I, II에 각 10분씩 반응시킨 후 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올에 순차적으로 각각 5분씩 반응시켰다. 항원을 노출시키기 위하여 1x sodium citrate buffer 용액에 담가 3분간 극초단파오븐 (microwave oven)으로 전처리하고, 0.01M (pH 7.4) PBS로 10분씩 3번 세척 후 비특이적인 반응을 없애고자 10% 정상 당나귀 혈청 (normal donkey serum, Jackson immunoresearch Laboratories, Inc, USA)으로 1시간 동안 37°C에서 항온처리 하였다. 그리고 1차 항체인 rabbit M_2 monoclonal antibody (1:50, sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA)와 goat M3 polyclonal antibody (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)로 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤, 0.01M (pH 7.4) PBS로 10분씩 3번 세척하였다. 2차 항체로는 donkey anti-rabbit IgG-TR (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), donkey anti-goat IgG-FITC (1:50, R&D immunoresearch Laboratories, Inc., USA)를 사용하여 37°C의 암실에서 30분 동안 반응시켰고, 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA)이 함유된 0.01M PBT로 30분씩 2회 세척한 후 PBS로 20분씩 15회 세척하였다. 염색이 끝난 슬라이드는 mounting media (Dako, Carpinteria, USA)를 이용하여 봉입하였다.

3) 영상분석: 조직에서 M_2 , M_3 의 면역염색 강도의 평가는 각 군마다 다섯 장의 슬라이드를 분석하였으며, 각각의 슬라이드마다 점막 상피층과 근육층에서 최소한 3군데 이상

면역염색 강도를 측정하여 평균값을 구하였고, 이는 공초점 레이저 주사현미경 (Zeiss LSM, Jena, Germany)과 영상분석장치를 이용하여 측정하였다.

4. 연구결과와 분석

수축 실험 시 각각의 약물에 의한 최초 2-3회의 수축반응 평균값을 구하여 각 군 사이의 차이를 비교하였고 통계적 분석은 SPSS (version 13.0)를 사용하였고 Kruskal-Wallis test와 Mann-Whitney U test를 이용하여 분석하였으며 p값이 0.05 미만인 경우에만 통계학적으로 의미 있는 것으로 정하였다.

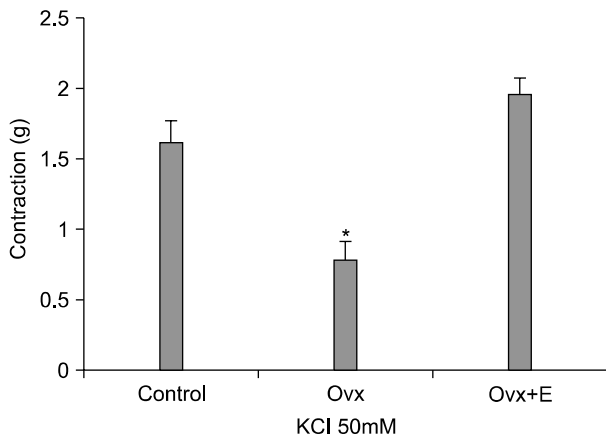


Fig. 1. KCl 50mM induced contractile response of the rat bladder. The ovariectomized (Ovx) group showed a decreased contractile response to KCl 50mM compared with the control group and the Ovx+estradiol treated (Ovx+E) group. Each bar is the mean±SE. *: significantly different from the control group and the Ovx+E group ($p < 0.05$).

결 과

막전압 의존성 칼슘이온통로를 직접적으로 활성화시키는 고농도 포타슘 50mM 용액을 투여하여 각 군의 수축반응을 비교한 결과 대조군이 1.61 ± 0.16 g이었고 Ovx군은 0.78 ± 0.13 g으로 가장 작은 수축반응을 나타냈으며 Ovx+E군이 1.96 ± 0.12 g으로 가장 큰 수축반응을 나타냈다. Ovx군은 대조군과 Ovx+E군에 비하여 통계학적으로 의미가 있는 낮은 수축반응을 보였으며 ($p < 0.05$), 대조군과 Ovx+E군은 통계학적으로 의미 있는 수축반응의 차이는 보이지 않았다 ($p > 0.05$) (Fig. 1).

방광의 무스카린성 수용체를 자극하여 수축을 유발하기

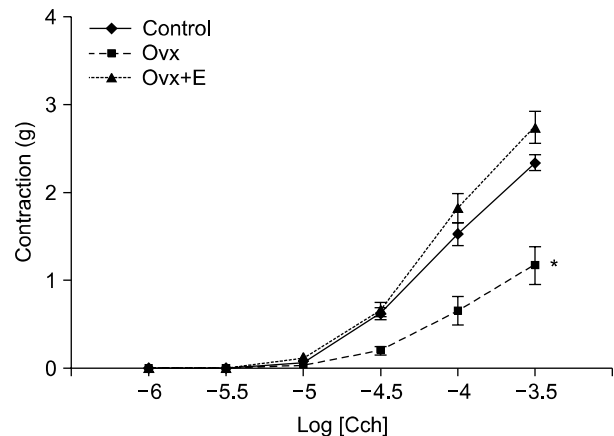


Fig. 2. Carbachol (Cch) induced contractile responses of the rat bladder. The ovariectomized (Ovx) group showed decreased contractile responses to Cch, as compared with the control group and the Ovx+estradiol treated (Ovx+E) group. Values are plotted as means±SE. *: significantly different from the control group and the Ovx+E group ($p < 0.05$).

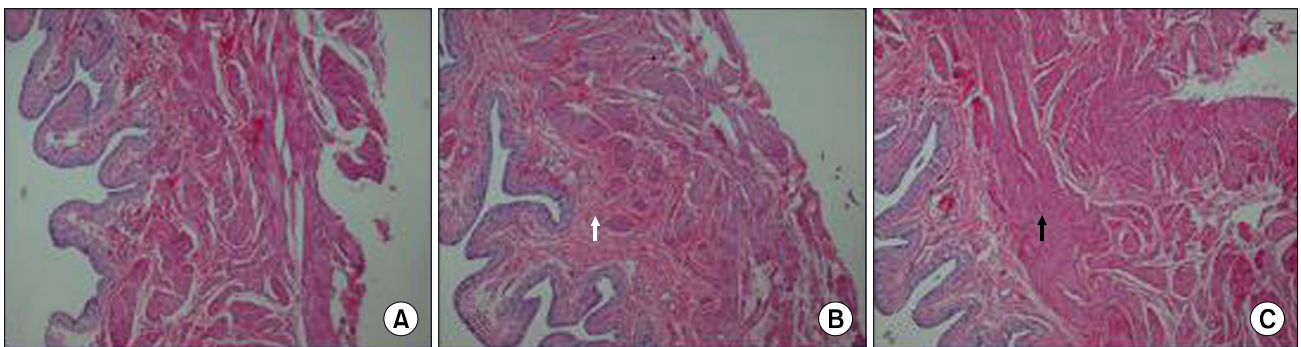


Fig. 3. Representative photomicrographs showing staining of the control group (A), the Ovx group (B) and the Ovx+E group (C). The connective tissue in the Ovx group was markedly increased (white arrow) more than that in the control group and the Ovx+E group. Smooth muscle hypertrophy was observed in the Ovx+E group (black arrow) (H&E stain, original magnification, $\times 40$).

위해 carbachol을 1×10^{-7} 부터 3×10^{-4} M까지 투여하여 각 군의 수축 차이를 비교하였을 때 모든 군에서 1×10^{-5} M 농도 투여시 수축반응이 시작되었고, 그 이후 농도 의존적인 배뇨근 수축이 유발됨을 확인하였다. 3×10^{-4} M 농도에서 각 군의 수축 반응을 비교한 결과 대조군이 2.33 ± 0.09 g이었고 Ovx군은 1.17 ± 0.22 g으로 가장 작은 수축반응을 나타냈으며 Ovx+E군이 2.74 ± 0.17 g으로 가장 큰 수축반응을 나타냈다. Ovx군은 대조군과 Ovx+E군에 비하여 통계학적으로 의미가 있는 낮은 수축반응을 보였으며 ($p < 0.05$), 대조군과 Ovx

+E군은 통계학적으로 의미 있는 수축반응의 차이는 보이지 않았다 ($p > 0.05$) (Fig. 2).

방광의 결합조직 대비 평활근의 비율에 대하여 형태학적 정성 (quality) 분석 결과 Ovx+E군이 대조군과 Ovx군에 비해 방광 평활근이 증가해 있었다 (Fig. 3).

무스카린 수용체 아형 (M_2 , M_3)을 면역형광염색하여 분석한 결과 M_2 수용체는 Ovx+E군이 대조군 및 Ovx군에 비해 점막 상피층과 근육층에서 그 발현이 의미 있게 증가되어 나타났으며 ($p < 0.05$), Ovx군과 대조군 사이에는 통계학적

Table 1. Comparisons of the M_2 receptor expression among the three groups

Group	Density of M_2 receptor	
	Epithelial layer	Muscle layer
Control	82.2 ± 3.7	55.4 ± 2.1
Ovx	94.2 ± 4.1	56.2 ± 1.5
Ovx+E	$113.2 \pm 6.0^*$ [†]	$63.6 \pm 2.3^*$ [†]

Ovx: ovariectomized group, Ovx+E: ovariectomized and estradiol treated group. Each value represents the mean \pm SE, *: Ovx+E vs. Ovx ($p < 0.05$), [†]: Ovx+E vs. control ($p < 0.05$)

Table 2. Comparisons of the M_3 receptor expression among the three groups

Group	Density of M_3 receptor	
	Epithelial layer	Muscle layer
Control	121.6 ± 8.2	62.2 ± 1.3
Ovx	$156.0 \pm 2.4^*$	$70.4 \pm 3.4^*$
Ovx+E	$164.8 \pm 7.3^*$ [†]	$76.0 \pm 1.5^*$ [†]

Ovx: ovariectomized group, Ovx+E: ovariectomized and estradiol treated group. Each value represents the mean \pm SE. *: Ovx vs. control ($p < 0.05$), [†]: Ovx+E vs. control ($p < 0.05$)

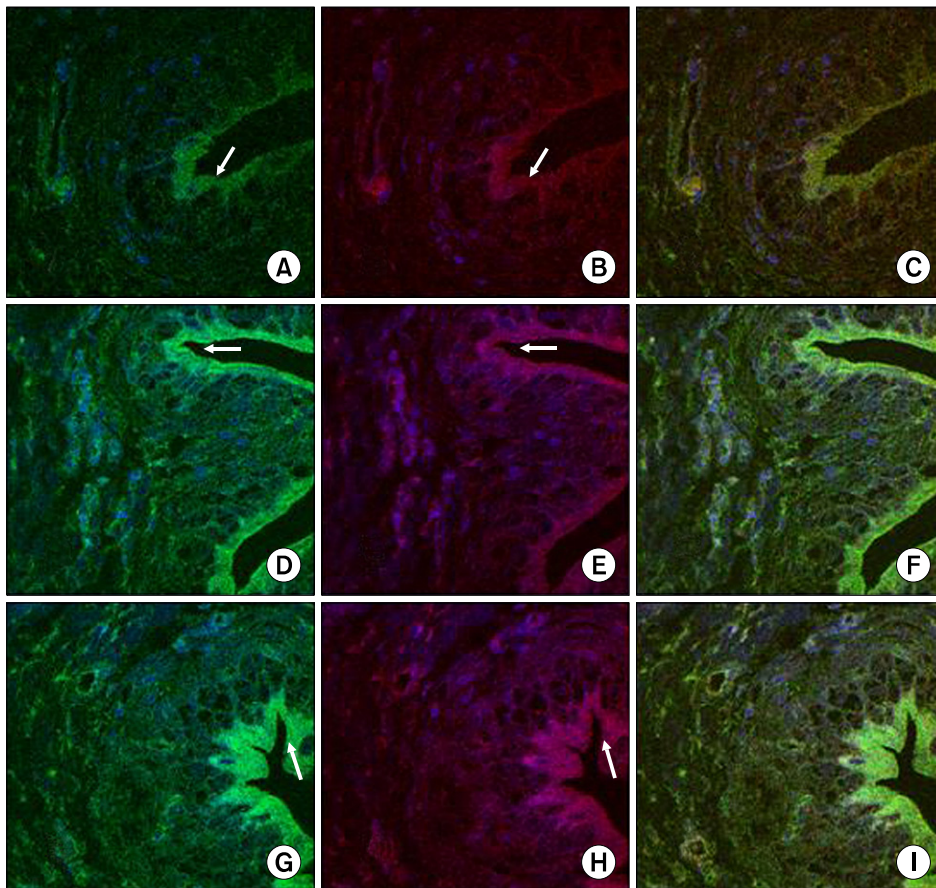


Fig. 4. Comparisons of the M_3 and M_2 receptor expressions among the three groups on the immunofluorescent study. The expressions of M_3 (green) and M_2 (red) were showed in the control group (A, B), the Ovx group (D, E) and the Ovx+E group (G, H). Merged images of the M_3 and M_2 were showed in the control group (C), the Ovx group (F) and the Ovx+E group (I). The M_3 receptor expressed in the epithelial area (arrow), and the M_2 receptor had a similar pattern. The M_3 receptor was more strongly expressed in the Ovx+E and Ovx groups than that in the control group. The M_2 receptor was more strongly expressed in the Ovx+E group than that in the Ovx group and the control group (original magnification, x400).

으로 의미 있는 발현의 차이는 없었다 (Table 1) (Fig. 4).

M₃ 수용체는 Ov_x+E군이 대조군에 비해 점막 상피층과 근육층에서 그 발현이 의미 있게 증가되어 나타났다 ($p < 0.05$). Ov_x군 역시 대조군에 비해 점막 상피층과 근육층에서 통계학적으로 의미 있는 발현증가가 있었다 ($p < 0.05$) (Table 2) (Fig. 4).

고 찰

양측 난소절제술을 시행 받은 쥐는 통상적으로 폐경기 여성의 동물 모델로 사용되고 있으나^{13,14} 방광에 관련된 연구는 부족한 상태이다. 폐경기 이후 많은 여성들이 배뇨장애를 가지고 있으며 이러한 환자에게 여성호르몬 대체치료를 시행하는 것에 대해서는 논란이 많다.^{5,7,14} 양측 난소절제술 후 여성호르몬 대체치료를 시행 받은 경우 carbachol에 의한 방광의 수축반응이 양측 난소절제술만 시행 받은 경우보다 감소하였다는 보고가 있으나,¹⁴ 많은 다른 연구들이 양측 난소절제술 후 여성호르몬 대체치료가 방광의 수축반응을 증가시킨다고 보고하였다.^{1,6-8} 본 연구결과에서 양측 난소절제술 후 여성호르몬 대체치료가 고농도의 포타슘 용액과 carbachol에 의한 방광의 수축반응을 증가시켰으며, 양측 난소절제술은 위와 같은 약물에 대한 방광의 수축반응을 감소시켰다.

여성호르몬의 결핍이 방광의 구조에 미치는 영향에 대해 Aikawa 등⁷은 양측 난소절제술 후 여성호르몬 대체치료가 방광평활근의 비대를 유발한다고 보고하였고 Susset 등¹⁵은 사 후 부검에서 50세 여성이 남성과 젊은 여성에 비해 방광의 콜라겐이 증가하였으며 이러한 구조적 변화가 방광의 수축력 저하, 순응도의 감소, 콜린성 자극에 대한 감각의 변화를 유발하여 여성에게서 배뇨곤란을 야기한다고 하였다. 여성호르몬이 방광의 구조적 변화를 유발하는 기전에 대해 Lin 등¹⁶은 여성호르몬이 방광평활근 내의 혈관신생을 유발하여 방광 내의 혈류를 증가시키며 방광평활근의 비대를 초래한다고 보고하였고, Blacher 등¹⁷은 여성호르몬의 대체치료가 섬유모세포의 증식을 막고 혈관과 심장의 콜라겐 침착을 막는다고 하였으며, 방광에서도 혈관, 심장, 유사한 기전으로 콜라겐 침착을 억제할 것으로 추측한다. 이번 연구에서 방광의 평활근과 결합조직의 정량적인 분석은 시행하지 않았지만 형태학적인 정성분석을 시행한 결과에서 다른 정량분석을 시행한 연구결과와^{7,18} 유사하게 양측 난소절제술 후 여성호르몬 대체치료를 시행 받은 군이 다른 군에 비해 방광평활근이 증가되었고, 이와 같은 결과는 여성호르몬 대체치료가 방광의 수축반응을 증가시킨다는 결과를 뒷받침해주며, 폐경기 여성의 저활동성 방광

에 대해 여성호르몬 대체치료를 시행하는 근거가 될 수 있을 것으로 생각한다.

콜린성 신경계는 배뇨에 있어 일차적인 역할을 하며 콜린성 무스카린 수용체는 방광전체에 분포하지만 방광체부가 기저부에 비해 그 밀도가 더 높다.¹⁹ 방광평활근에서 무스카린 수용체 아형 중 M₂, M₃가 많으며¹⁰ M₂가 M₃에 비해 그 밀도가 3-10배 더 높으나,²⁰ M₃가 아세틸콜린에 의한 방광 수축의 주된 역할을 한다.²¹ M₃수용체를 자극하면 pertussis toxin-insensitive G protein을 통해 phospholipase C를 활성화시켜 phosphatidylinositol을 가수분해하여 세포 내의 칼슘을 유동화 (mobilization)시켜 수축을 유도하며, M₃ 선천성 억제 쥐는 비선택적 무스카린 작용제인 carbachol에 대해 방광수축이 전혀 없거나 매우 약하게 나타난다고 한다.²² M₂는 억제성 G 단백을 통하여 adenylate cyclase를 억제하여 베타 아드레날린성 작용에 의해 방광을 이완시키는 cyclic AMP가 생성되는 것을 막아 방광수축을 유도하지만, M₂ 선천성 억제 쥐는 M₃ 선천성 억제 쥐와는 달리 비선택적 무스카린 작용제인 carbachol에 대해 대조군에 비해 약간 감소한 수축반응을 보인다고 한다.²³

양측 난소절제술 후 여성호르몬 대체치료가 방광의 무스카린 수용체의 발현에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 아직까지 논란의 여지가 있다. Levin 등¹¹은 4일간 여성호르몬 치료를 시행한 결과 암컷 토끼의 방광에서 무스카린수용체의 밀도가 증가하였다고 보고하였으나, Shapiro¹²는 암컷 토끼에서 양측 난소절제술 후 3주간 여성호르몬 대체치료를 시행한 결과 대조군과 양측 난소절제술만 시행한 군에 비해 방광의 무스카린 수용체의 밀도가 감소하였다고 보고하였으며, Matsumoto 등²⁴은 암컷 쥐에서 12주간 여성호르몬 치료를 시행한 결과 방광의 M₃수용체 mRNAs가 대조군에 비해 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 양측 난소절제술 후 7일간 여성호르몬 대체치료를 시행하였고 여성호르몬 대체치료를 시행 받은 군이 나머지 두 군에 비하여 M₃, M₂수용체의 밀도가 증가하였으며 단기간 여성호르몬 치료를 시행한 Levin 등¹¹의 실험결과와 유사하게 나타났다.

본 연구는 12주령의 처녀 백서를 대상으로 하였고 Diep과 Constantinou²⁵는 본 연구처럼 양측 난소절제술 시행 후 1주일 뒤부터 여성호르몬 대체치료를 시행한 결과 젊은 쥐는 성숙한 쥐에 비해 난소절제술 후 외부에서 주입하는 여성호르몬에 대한 방광수축력의 회복이 떨어진다고 보고하였으며, 젊은 쥐는 여성호르몬 대체치료를 한 군이 대조군보다도 수축력이 낮게 나타났다. 그러나 본 연구결과는 젊은 쥐를 사용하였음에도 불구하고 위의 연구 결과와 다르게 OV_x+E군의 수축력이 대조군보다도 증가한 것으로 나

타났다. Palea와 Angel¹⁴은 본 연구보다 더 짧은 5일간 여성 호르몬 대체치료를 시행하였으며 결과는 본 연구와 다르게 OVx+E군이 OVx군에 비해 수축력이 감소한 것으로 나타났다. 본 실험이 기존의 연구와 유사하게 실험하였음에도 불구하고^{14,25} 결과가 다 다르게 나타나는 것은 여러 원인이 있겠지만 그 이외의 다른 연구와^{1,6-8,11} 유사하게 결과가 나타난 것을 고려한다면 실험이 잘못된 것은 아니라고 생각한다.

이번 실험결과만으로 폐경기 여성에게서 여성호르몬 대체치료와 M₂, M₃수용체 변화와의 관계에 대해 결론내리기는 어려우며 본 연구에서 난소절제술이 방광의 M₃수용체 발현을 증가시키는 것으로 나타났으나 반대의 결과를 보고한 연구도 있고,²⁴ 난소절제술이나 여성호르몬대체치료가 방광의 무스카린 수용체변화와 무관하다는 보고가 있으므로²⁶ 이에 대해 좀 더 많은 연구가 필요하리라 생각한다.

결 론

여성호르몬 대체치료의 효과에 대해 결론을 내리기는 어렵지만 폐경기 여성에게서 나타나는 방광의 기능장애는 다른 연구결과와 비교해 볼 때 M₂, M₃ 수용체의 변화와 별다른 관계가 없을 것으로 생각하며, 폐경기 여성에게서 나타나는 방광의 기능장애에 대해 시행되는 여성호르몬 대체치료는 방광의 수축반응을 증가시켜 저활동성방광증상 개선에 도움이 될 것이라고 생각한다. 그러나 폐경기 여성의 방광의 기능장애에 대한 여성호르몬 대체치료의 결과에 대해 아직까지 논란의 여지가 있는 부분이 많이 있으므로 좀 더 많은 연구와 실험이 필요하리라 생각한다.

REFERENCES

1. Keane DP, O'Sullivan S. Urinary incontinence: anatomy, physiology and pathophysiology. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2000;14:207-26
2. Lin AD, Levin R, Kogan B, Whitbeck C, Chichester P, Sokol R, et al. Estrogen induced functional hypertrophy and increased force generation of the female rabbit bladder. Neurorol Urodyn 2006;25:473-9
3. Simunic V, Banovic I, Ciglar S, Jeren L, Pavicic Baldani D, Sprem M. Local estrogen treatment in patients with urogenital symptoms. Int J Gynaecol Obstet 2003;82:187-97
4. Zullo MA, Plotti F, Calcagno M, Palaia I, Muzii L, Mancini N, et al. Vaginal estrogen therapy and overactive bladder symptoms in postmenopausal patients after a tension-free vaginal tape procedure: a randomized clinical trial. Menopause 2005;12:421-7
5. Tsai E, Yang C, Chen H, Wu C, Lee J. Bladder neck circulation by Doppler ultrasonography in postmenopausal women with urinary stress incontinence. Obstet Gynecol 2001;98:52-6
6. Zhu Q, Ritchie J, Marouf N, Dion SB, Resnick NM, Elbadawi A, et al. Role of ovarian hormones in the pathogenesis of impaired detrusor contractility: evidence in ovariectomized rodents. J Urol 2001;166:1136-41
7. Aikawa K, Sugino T, Matsumoto S, Chichester P, Whitbeck C, Levin RM. The effect of ovariectomy and estradiol on rabbit bladder smooth muscle contraction and morphology. J Urol 2003;170:634-7
8. Parekh MH, Chichester P, Lobel RW, Aikawa K, Levin RM. Effects of castration on female rabbit bladder physiology and morphology. Urology 2004;64:1048-51
9. Fleischmann N, Christ G, Sclafani T, Melman A. The effect of ovariectomy and long-term estrogen replacement on bladder structure and function in the rat. J Urol 2002;168:1265-8
10. Andersson KE. Advances in the pharmacological control of the bladder. Exp Physiol 1999;84:195-213
11. Levin RM, Shofer FS, Wein AJ. Estrogen-induced alterations in the autonomic responses of the rabbit urinary bladder. J Pharmacol Exp Ther 1980;215:614-8
12. Shapiro E. Effect of estrogens on the weight and muscarinic cholinergic receptor density of the rabbit bladder and urethra. J Urol 1986;135:1084-7
13. Longhurst PA, Kauer J, Leggett RE, Levin RM. The influence of ovariectomy and estradiol replacement on urinary bladder function in rats. J Urol 1992;148:915-9
14. Palea S, Angel I. The effect of ovariectomy on the contractile response of the rat isolated detrusor muscle and urethra. Life Sci 1997;61:PL21-6
15. Susset JG, Servot-Viguiere D, Lamy F, Madernas P, Black R. Collagen in 155 human bladders. Invest Urol 1978;16:204-6
16. Lin AD, Mannikarottu A, Kogan BA, Whitbeck C, Chichester P, Leggett RE, et al. Estrogen induces angiogenesis of the female rabbit bladder. J Endocrinol 2006;190:241-6
17. Blacher J, Dabire H, Promies JP, Safar ME, Stimpel M. Long-term cardiovascular effects of high "osteoprotective" dose levels of 17-beta estradiol in spontaneously hypertensive rats. Cardiovasc Drugs Ther 2000;14:303-7
18. Juan YS, Mannikarottu A, Kogan BA, Leggett RE, Whitbeck C, Chichester P, et al. The effect of low-dose estrogen therapy on ovariectomized female rabbit bladder. Urology 2008;71:1209-13
19. Longhurst PA, Uvelius B. Pharmacological techniques for the in vitro study of the urinary bladder. J Pharmacol Toxicol Methods 2001;45:91-108
20. Wang P, Luthin GR, Ruggieri MR. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. J Pharmacol Exp Ther 1995;273:959-66

21. Longhurst PA, Leggett RE, Briscoe JA. Characterization of the functional muscarinic receptors in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 1995;116:2279-85
 22. Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, et al. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9579-84
 23. Stengel PW, Gomeza J, Wess J, Cohen ML. M₂ and M₄ receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:877-85
 24. Matsumoto M, Watanabe T, Miyagawa I. Effects of long-term estradiol treatment on the contractile response to muscarine and muscarinic receptor subtypes in the bladder of aged female rats. *Biomed Res* 2008;28:309-14
 25. Diep N, Constantinou CE. Age dependent response to exogenous estrogen on micturition, contractility and cholinergic receptors of the rat bladder. *Life Sci* 1999;64:279-89
 26. Liang W, Afshar K, Stothers L, Laher I. The influence of ovariectomy and estrogen replacement on voiding patterns and detrusor muscarinic receptor affinity in the rat. *Life Sci* 2002; 71:351-62
-