

백서 일차배양 Sertoli 세포에서 테스토스테론에 의한 에스트로겐 수용체 α 유전자 전사조절

건국대학교 의과대학 비뇨기과학교실¹, 대전 보건대학², 충남대학교 의과대학 생화학교실³, 암공동연구소⁴

양상국¹ · 윤경아² · 윤은진³ · 송경섭³ · 김종석³ · 김영래³ · 박종일^{3,4} · 박승길^{3,4} · 황병두^{3,4} · 임 규^{3,4}

Transcriptional Regulation of the Estrogen Receptor α Gene by Testosterone in Cultures of Primary Rat Sertoli Cells

Sang-Kuk Yang¹, Kyung-Ah Yoon², Eun-Jin Yun³, Kyoung-Sub Song³, Jong-Seok Kim³
Young-Rae Kim³, Jong-Il Park^{3,4}, Seung-Kiel Park^{3,4}, Byung-Doo Hwang^{3,4}, Kyu Lim^{3,4}

*Department of Urology¹, College of Medicine, Konkuk University;
Daejeon Health Sciences College²; and the Department of Biochemistry³,
College of Medicine, Cancer Research Institute⁴, Chungnam National University*

ABSTRACT

Background: We wanted to identify the presence of the estrogen receptor (ER) α in Sertoli cells and gain insight on the regulation of the ER α gene expression by testosterone in Sertoli cells. The transcriptional regulation of the ER α gene was investigated in primary Sertoli cell cultures by in situ hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Methods: Primary Sertoli cell culture was performed. The expression levels of ER α and ER β mRNA in Sertoli cells were detected by Northern blot, RT-PCR, immunocytochemistry and in situ hybridization.

Results: The ovary, testis and epididymis showed a moderate to high expression of ER α while the prostate, ovary and LNCap cells showed the ER β expression. ER α mRNA and protein were detected in the germ cells and Sertoli cells by in situ hybridization and immunocytochemistry. The level of ER α mRNA was gradually decreased in a time-dependent manner after testosterone treatment, and the changes of ER α mRNA were dependent on the concentration of testosterone. Androgen binding protein and testosterone-repressive prostate message-2 (TRPM-2) mRNA were reduced at 24 hour by estradiol, while the transferrin mRNA was not affected. ER α mRNA was strongly detectable in the testes of 7 days-old-rats, but it was gradually decreased from 14 to 21 days of age. The primary Sertoli cells also showed the same pattern. The ER α gene expression was also regulated by testosterone in the Sertoli cells prepared from the 14- and 21-day old rats.

Conclusions: These results suggest that ER α is transcriptionally regulated by testosterone and it may play some role in the Sertoli cells. (J Kor Soc Endocrinol 21:106-115, 2006)

Key Words: Estrogen receptor, Sertoli cell, Testosterone

서 론

호르몬들에 의한 정자발생의 조절은 Sertoli 세포를 통하여 일어나며, Sertoli 세포는 생식세포의 발생에 필요한 물질들을 공급하고 생식세포(germ cell)를 지지해 주기 때문에

접수일자: 2005년 4월 13일

통과일자: 2005년 8월 26일

책임저자: 임 규, 충남대학교 의과대학 생화학교실

Sertoli 세포의 기능과 분화가 정자발생(spermatogenesis)과 밀접히 관련되어 있다고 알려져 있다[1]. Sertoli 세포의 분화에 필수적인 호르몬들로는 펩티드 호르몬인 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone, FSH)과 steroid hormone인 테스토스테론이 알려져 있는데[1], 이들은 Sertoli 세포에서 transferrin[2], ceruloplasmin[3], androgen binding protein (ABP)[4,5] 뿐만 아니라 c-myc 등 세포성 암유전자[6-8], nerve growth factor receptor (NGFR) 등[9]의 여러 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 또한 인히빈(inhibin) [10], 인슐린양성장인자 I과 II[11], transforming growth factor- α 및 β (TGF- α 및 β)[12] 등의 성장인자들이 Sertoli 세포에서 검출되었지만, 고환에서 이들 표적세포 및 생리적 역할에 대해서는 알려져 있지 않다.

한편 에스트로겐은 일반적으로 여성의 성징을 나타내는 여성호르몬으로 알려져 있으나, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER) α 가 결여된 수컷 생쥐에서 수정능력이 없음으로, 남성에서도 중요하다고 알려져 있다[13]. 특히 에스트라디올-17 β 는 고환의 Sertoli 세포에서 테스토스테론으로부터 합성되고 고환의 정계정맥혈(spermatic vein)에서의 농도가 말초혈액보다 약 50배 높다[14]. 또한 Sertoli 세포에서 에스트라디올-17 β 의 합성은 FSH에 의해 유도되나 30일 이후 Sertoli 세포에서는 전혀 FSH 영향이 나타나지 않는다고 한다[15]. 에스트로겐은 사춘기 이전에 나타나는 Leydig cell의 발달이나 사춘기 이전에 나타나는 대사에 중요하리라 시사되고 있으나, 현재까지 Sertoli 세포에서의 기능에 대해서는 보고가 전무하며 에스트라디올-17 β 가 Sertoli 세포의 증식에 TGF- β 와 함께 분열촉진물질(mitogen)으로 작용할 가능성이 보고되었다[12]. 최근 ER이 고환에 존재할 가능성이 시사되고 있고[16], 고환기능은 뇌하수체에서 분비되는 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)과 FSH에 의하여 조절된다. 이중 LH는 Leydig cell에서의 테스토스테론 생성과 Sertoli 세포에서의 aromatase 활성 억제를 통한 에스트라디올-17 β 의 생성을 조절함으로써 Sertoli 세포와 생식세포의 기능조절에 관여하여[1-3,17], 정자형성 유지에 중요한 영향을

을 미치리라 생각되고 있다[1,14]. 그러나 Sertoli 세포에서 합성되는 에스트로겐의 Sertoli 세포에서의 기능은 보고가 전무하며, 에스트로겐이 Sertoli 세포에서 기능을 하기 위해서는 ER이 존재해야 함으로 Sertoli 세포에서의 ER의 동정 및 테스토스테론에 의한 조절을 밝히는 것은 매우 중요하다. ER에는 α 및 β subtype이 알려져 있으나 그 기능의 차이는 밝혀져 있지 않다[16].

이에 저자는 Sertoli 세포의 기능과 정자발생과의 관련성을 규명하기 위해 먼저 일차배양 Sertoli-spermatogenic cell을 동시배양하여 생식세포 및 Sertoli 세포에서 발현되는 ER α mRNA 및 단백질을 *in situ* cytohybridization과 면역세포화학법으로 각각 동정하였다. 그리고 테스토스테론에 의한 Sertoli 세포에서의 ER α 의 전사조절을 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 등의 방법으로 검색하는 한편, 연령에 따른 ER α 유전자발현의 양상과 Sertoli 세포에서 에스트라디올-17 β 에 의한 ABP 및 TRPM-2 유전자의 발현을 검색하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 백서 고환으로 부터 Sertoli 세포의 일차배양

Sertoli 세포의 일차배양은 Dorrington 등[16]의 방법에 기초한 Lim 등[18]의 방법에 준하여 시행하였다. 즉 생후 21일된 Sprague-Dewley계 백서(1회 5마리씩)에서 고환을 적출한 후 이를 HBSS (HANKS' balanced salt solution, pH 7.6)로 세척한 다음 1~2 mL의 HBSS에 녹아있는 0.25% trypsin을 가해 가위로 잘게 자른 후 약 75 mL의 0.25% trypsin이 담긴 삼각 플라스크에 넣은 후, 여기에 75 μ L의 DNase I (1 μ g/mL) 을 가하고 항온조(32~33 $^{\circ}$ C)에서 10~15 분 동안 진탕(72 rpm)하였다. 이를 원심관에 옮겨 5분간 방치한 후 상층액을 제거하고, 침전물에 50 mL의 collagenase (1 mg/mL in HBSS, pH 7.6)용액과 50 μ L의 DNase I (1 μ g/mL)을 가하여 상기 조건으로 15~20분 동안 진탕하였다.

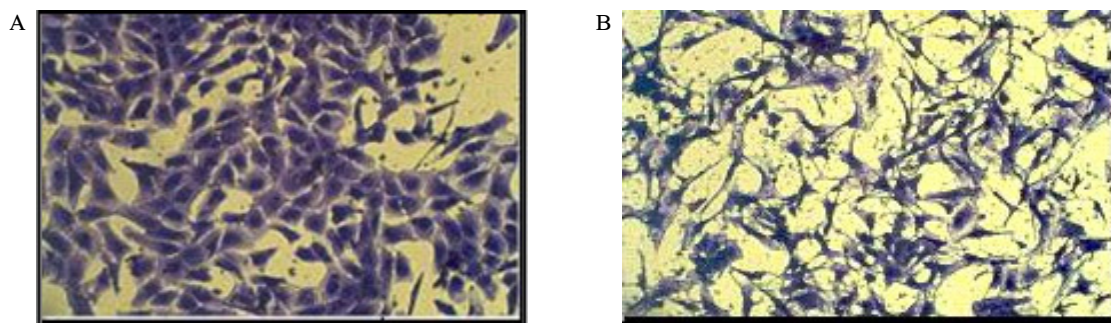


Fig. 1. Morphology of primary Sertoli cell and peritubular cell. Sertoli cell and peritubular cell culture was performed as described in Materials and Methods. A, Sertoli cells; B, peritubular cells ($\times 400$)[18].

다시 이를 원심관에서 5분간 방치한 후, 침전물에 fetal bovine serum (FBS) 1~2 mL을 가하여 collagenase를 불활성화시키고, 10% FBS가 포함된 Minimum Essential Medium (MEM) 배지를 적당량 가해 세포들을 분리시켰다. 10% FBS가 포함된 MEM 배지를 100% 배양접시에 가한 다음 적당량의 세포 현탁액을 분주하여, 5% CO₂-incubator (37°C)에서 하룻밤 배양한 후 혈청이 포함되어 있지 않은 MEM 배지로 교환해 줌으로서 Sertoli-spermatogenic cell coculture를 하였다. Sertoli 세포만을 배양하기 위해서는 24~48시간 배양한 후 세포에 20 mM Tris-buffer (pH 7.4)으로 2분간 처리함으로써 생식세포를 떼어내었으며 적당한 시간 배양한 다음 이 Sertoli 세포를 본 실험에 사용하였다 (Fig. 1A). 일차배양한 Sertoli 세포들에 peritubular cell이 존재하는지 여부를 Pena 등[19]의 방법으로 매번 검색하였으며, 본 실험에 사용한 Sertoli 세포에 peritubular cell이 거의 혼입되어 있지 않음을 확인하였다(1% 미만). Peritubular cell (Fig. 1B)의 일차배양은 Lim 등[9]의 방법으로 시행하였다.

2. Total RNA 조제

Total RNA는 Ultraspec kit (Biotecx Lab. Inc., USA)을 이용하여 분리하였다. 즉 각 약물을 처리한 Sertoli 세포를 일정시간 배양한 후에 배지를 제거하고 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 mL씩을 가해 세포를 수집하였다. 그런 다음 Ultraspec II 용액을 일정량 가하여 세포를 용해시킨 후, 4°C에서 5분간 방치한 후 0.1배 용량의 chloroform 용액을 가하고 진탕혼합하였다. 이를 다시 4°C에서 5분간 방치하고, 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 취한 후 이에 0.5배 용량의 isopropyl alcohol을 가하고, 다시 이것에 Ultraspec II resin을 0.05배 용량을 가하여 진탕혼합하고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 이때 얻은 침전물을 70% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰으며, 이를 DEPC 처리한 증류수를 가해 침전물을 녹여 resin에 결합되어 있는 RNA를 용출시켰다. 이때 얻은 total RNA 농도를 260 nm에서 측정하고 사용할 때 까지 50% ethanol 용액에서 -70°C에 보관하였다.

3. Northern blot hybridization

Northern blot hybridization은 Virca 등[20]의 방법을 변개한 Lim 등[7]의 방법으로 시행하였다. 즉, 10~50 µg의 total RNA를 formaldehyde와 formamide용액 하에서 65°C에서 15분간 변성시킨 후 5분간 급냉각하고 formaldehyde가 포함된 1.2% agarose gel에서 전기영동을 시행하였다. RNA를 gel로부터 nylon membrane에 16~24시간 정도 transfer하고 RNA를 membrane에 UV-cross linker를 이용하여 고정

시킨 후, hybridization 용액(50 mM PIPES, 100 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, 5% SDS)으로 60°C에서 30분간 prehybridization 시킨 후, 용액을 버리고 10⁶ cpm/mL의 probe가 포함된 새로운 hybridization용액을 가하여 같은 온도에서 하룻밤 hybridization하였다. Hybridization이 끝나면 5% SDS가 포함된 1×SSC로 60°C에서 5분간 세척하고 다시 같은 용액으로 15분씩 2회 더 세척한 후 autoradiogram 하였다. 이때 사용한 probe으로는 ABP cDNA가 포함된 pSP65-ABP[4]를 EcoR I으로 절단하여 얻은 0.65와 0.75 kb DNA fragment, pSP65Tf[20]를 Pst I과 Hinc II로 절단하여 얻은 688 bp의 transferrin cDNA fragment 및 pT17TRPM-2[21]를 EcoR I으로 절단하여 얻은 1.7 kb cDNA fragment를 electroelution한 다음 random primed DNA labeling kit로 ³²P labeling[22]한 것을 사용하였다.

4. 역전사 효소 중합연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

Sertoli 세포에서 발현되는 ER α 와 β mRNA 발현을 검색하기 위해 Grandien 등[23]의 방법에 따라 RT-PCR을 시행하여 그 mRNA양을 검색하였다. 즉 1 µg의 total RNA를 65°C에서 5분간 가열 변성시키고 얼음에 급냉시킨 후 8 µL의 10×RT buffer (0.5 M Tris-Cl, 0.5 M KCl, 0.1 M DTT, 0.05 M MgCl₂, pH 8), 4 µL 10×dNTP (2.5 mM dATP, 2.5 mM dTTP, 2.5 mM dCTP, 2.5 mM dGTP), oligo-dT₁₅ (100 pmol) 1 µL, 40 U의 RNase inhibitor, 10 U reverse transcriptase를 가하고 총반응액이 40 µL 되도록 한 후 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하고 4°C로 급냉각시켜 PCR에 이용하였다. 이들 cDNA를 증폭시키기 위해 10 µL 10×PCR buffer (0.1 M Tris-Cl, 0.5 M KCl, 0.015 M MgCl₂, pH 8.0), 10 µL 10×dNTP (2.5 mM dATP, 2.5 mM dTTP, 2.5 mM dCTP, 2.5 mM dGTP), 100 pmole의 upstream primer, 100 pmole downstream primer, 2 U의 Taq DNA polymerase를 가해 총반응액이 100 µL 되도록 하여 PCR을 시행하였다. ER α 의 PCR 증폭 조건은 94°C에서 1분 denaturation, 57°C에서 2분 annealing, 72°C에서 3분 extension 조건으로 하였고 ER β 의 PCR 증폭 조건은 94°C에서 1분 denaturation, 60°C에서 2분 annealing, 72°C에서 3분 extension하였다. 그 다음 MJ Thermocycler (MJ-Research)에서 반복시켰으며, 증폭된 DNA 산물 20 µL을 1 µg/mL etidium bromide가 포함된 1.2% agarose gel 상에서 전기영동시킨 후 band를 확인하였다. ER α 의 upstream primer로 5'-AATTCTGACAATCGACGCCAG-3', downstream primer로 5'-GTGCTTCAACATTCTCCCTCCTC-3'를, ER β 의 upstream primer는 5'-TTCCCGCGCAGCACCAG

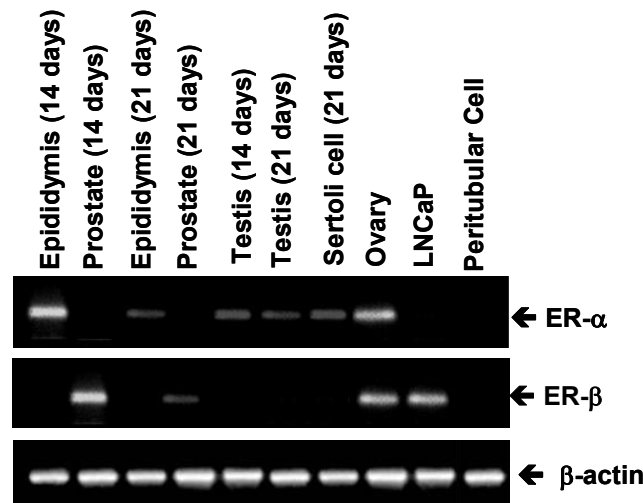


Fig. 2. Rat tissue and cell distribution of ER α and ER β mRNA. The ER α and ER β mRNA levels were measured by RT-PCR. RT-PCR products were separated on 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. The other assays were performed as described in Materials and Methods.

TAACC-3', downstream primer는 5'-TCCCTCTTTGCGTTTGGACTA-3'을 각각 사용하였다.

5. 면역세포화학적 염색 (Immunocytochemistry)

Sertoli/spermatogenic coculture에서 ER의 면역세포화학적 염색은 Van Etten 등[24]의 방법을 변개하여 시행하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척하고 3% paraformaldehyde로 고정한 후 다시 PBS로 세척하였다. 이를 blocking solution (TBST에 2% BSA, 5% goat serum이 포함된 것)으로 1시간 동안 blocking한 후 3회 세척하고 나서 ER의 monoclonal antibody (H222)로 반응시킨 후 TBST로 세척하고 coverslip으로 밀봉시켜 검경하였다.

6. *In situ* hybridization

Sertoli 세포에서 ER α 의 *in situ* hybridization은 Heiles 등[25]의 방법을 변개한 Lim 등[9]의 방법에 따라 시행하였다. 배양된 Sertoli 세포를 5 mM MgCl₂가 포함된 phosphate buffered saline (PBS)으로 15분간 2번 처리하고 계속해서 0.1 M glycine이 포함된 0.2 M Tris-Cl (pH 7.4)로 5분간 처리하였다. 이 세포들을 4% paraformaldehyde로 30분간 고정한 다음 0.5% Triton X-100이 포함된 PBS로 처리하였다. 이를 다시 50% formamide가 포함된 2×SSC로 60℃에서 10분간 반응한 다음 신속히 냉각시켰다. Prehybridization은 hybridization 용액(50% formamide, 2×SSC, 10% dextran sulfate, 0.5 mg/mL heat denatured salmon sperm DNA 및 5×Denhardt solution)을 가하여 42℃에서 1시간 동안 시행하였다. Hybridization은 가열하여 변성시킨

digoxigenin-labeled probe이 포함된 새로운 hybridization 용액으로 하룻밤 시행하였다. Probe의 비특이 결합을 제거하기 위해 2×SSC에서 0.5×SSC로 상온 및 37℃에서 수차례 세척한 다음 2시간 동안 blocking agent (2% normal sheep serum, 0.3% Triton X-100 in digoxigenin I buffer)로 blocking한 다음 digoxigenin buffer I (100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7.5)으로 세척하였다. Digoxigenin antibody-alkaline phosphatase conjugate 용액(1:500 희석)으로 2시간 동안 처리하고 digoxigenin buffer I 및 III(100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9.5)로 계속 세척하였다. 발색은 BCIP/NBT로 암실에서 적당시간 시행하였으며 buffer IV (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0)로 반응을 중지시키고 현미경으로 검경하였다. 이때 사용한 probe으로 ER α cDNA[26]가 포함된 plasmid를 EcoR I으로 절단하여 얻은 2.1 kb DNA fragment를 각각 electroelution 하여 random primed DNA labeling kit로 digoxigenin을 label한 것을 사용하였다.

결 과

1. 성선조직 및 세포에서 RT-PCR에 의한 ER α mRNA의 동정

난소, 부고환, 고환, 전립선 등의 조직과 Sertoli 세포, LNCaP cell 등에서 ER α 및 ER β mRNA 발현을 RT-PCR로 동정한 결과 ER α 는 난소, 고환, 부고환, Sertoli 세포에서는 강하게 발현되지만, 전립선, LNCaP cell, peritubular cell에서는 거의 발현되지 않았다. 그러나 ER β 는 난소, 전립선, LNCaP cell에서는 발현되지만 Sertoli 세포, 고환 등

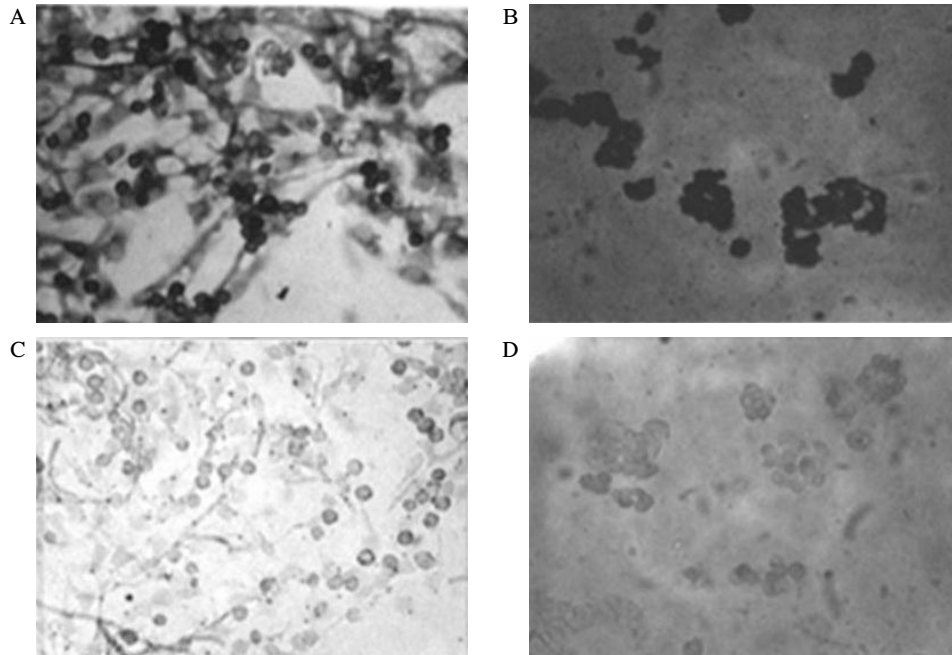


Fig. 3. Identification of ER α mRNA in primary Sertoli-spermatogenic coculture and peritubular cells by *in situ* hybridization. The Sertoli, spermatogenic cells and peritubular cells were hybridized to ER α cDNA probes labeled with digoxigenin-labeled dUTP by random prime DNA labeling kit. A, Sertoli/spermatogenic cocultures hybridized with ER α cDNA; B, Sertoli1 spermatogenic cocultures hybridized with pBR322; C, MCF-7 cells hybridized with ER α cDNA; D, MCF-7 cells hybridized with pBR322.

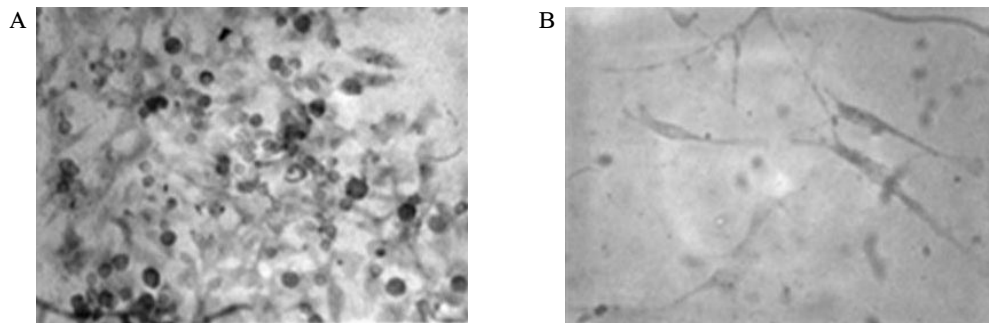


Fig. 4. Immunocytochemistry of ER in the Sertoli/spermatogenic cells (A) and mouse embryo fibroblast 10T1/2 cells (B). Immunostaining was performed by avidin-biotin complex method using monoclonal antibody against human estrogen receptor (H222).

에서는 거의 발현되지 않았다(Fig. 2).

2. Sertoli 세포에서 *In situ* hybridization에 의한 ER α 의 동정

Sertoli 세포에 ER α mRNA가 존재함이 RT-PCR에 의해 검출되었으므로 백서 고환으로부터 배양한 Sertoli/spermatogenic cell coculture와 유방암 세포주인 MCF-7 cell에도 ER α mRNA가 존재하는지를 확인하기 위해 *in situ* hybridization을 시행하였다. ER α mRNA는 Sertoli 세포와 정모 세포에서 검출되었으며(Fig. 3A), positive control로 사용된 MCF-7 세포에서도 존재함을 알 수 있었다(Fig. 3B). 본 실험에서 negative control로 pBR322를 사용한 바 pBR322

에 의해서는 Sertoli/spermatogenic cell (Fig. 3C)과 MCF-7 cell (Fig. 3D)에서 전혀 발색하지 않았다. 이는 ER α 유전자가 Sertoli 세포 및 생식세포에서 발현됨을 시사한다.

3. Sertoli 세포에서 면역세포화학적 염색법에 의한 ER 단백질 동정

ER이 Sertoli 세포에서 존재하는지를 밝히기 위해 ER의 단일클론항체로 면역세포화학적 염색을 시행하였다. Sertoli 세포를 PBS로 씻고 혈청이 포함되어 있지 않은 MEM 배지로 교환한 다음 실험방법에 따라 면역세포화학적 염색을 시행한 바 Sertoli 세포 뿐만 아니라 정모세포에서 ER의 단

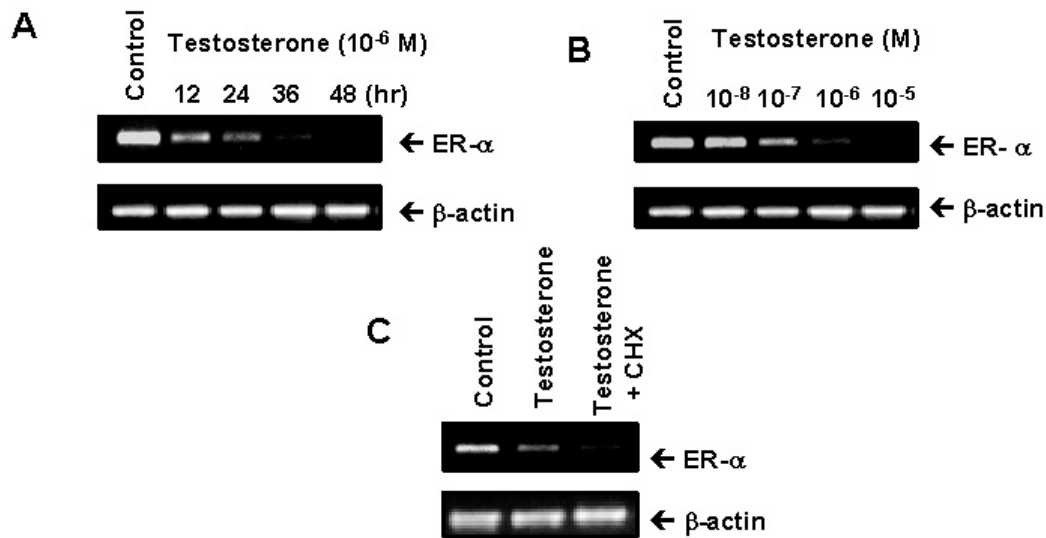


Fig. 5. Effect of the testosterone on the expression of *ER α* mRNA in the primary Sertoli cell culture, and effect of cycloheximide (CHX) on the testosterone-dependent repression of *ER α* mRNA levels. The Sertoli cell cultures were prepared from testes of 21-day-old rats. On the third day of cultures, the cells were rinsed and preincubated with fresh medium for 30 minutes. A, Testosterone (10⁻⁶ M) was added at time zero, and incubation continued up to 48 hrs. At times indicated, the cells were harvested and total RNA was prepared. B, Various concentration of testosterone (10⁻⁵~10⁻⁸ M) were added and the cells were incubated for 24 hours. C, The cells were treated for 12 hours with 10⁻⁶ M testosterone. Cycloheximide at a concentration of 5 μ g/mL was added at 33 hours of incubation. The *ER α* mRNA level was measured by RT-PCR. Two separate experiments were performed repeatedly.

백발현이 나타났으나(Fig. 4A), mouse fibroblast 10T1/2세포에서는 전혀 검출되지 않았다(Fig. 4B).

4. Sertoli 세포에서 테스토스테론에 의한 *ER α* 유전자 발현의 조절

1) 시간경과에 따른 테스토스테론에 의한 *ER α* 유전자 발현

Sertoli 세포에서 테스토스테론에 의한 *ER α* 발현의 조절을 규명하기 위해 먼저 시간경과에 따른 *ER α* mRNA를 검색하였다. Sertoli 세포를 PBS로 씻고 혈청이 포함되어 있지 않은 MEM 배지로 교환해 준 다음 30분 후 10⁻⁶ M 농도의 테스토스테론으로 처리하고 12, 24, 36, 48시간에 total RNA를 조제하여 RT-PCR로 *ER α* mRNA양의 변화를 검색한 바 대조군에서 *ER α* mRNA가 발현되었으나 *ER α* mRNA는 테스토스테론 처리 후 12시간부터 점차 감소하다가 36시간 후에는 거의 검출되지 않았다(Fig. 5A).

2) 테스토스테론 농도에 따른 *ER α* 발현의 변화

테스토스테론에 의한 *ER α* 유전자 발현 조절과 테스토스테론 농도와의 관련성을 규명하기 위해 일차배양된 Sertoli 세포에 테스토스테론을 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M의 농도로 각각 처리한 다음 24시간 후 total RNA를 조제하여 RT-PCR로 *ER α* mRNA 농도의 변화를 검색한 바 테스토스테론 농도가 증가함에 따라 *ER α* mRNA 양은 점차 감소하였다(Fig.

5B). 이는 Sertoli 세포에 존재하는 *ER α* 유전자 발현은 테스토스테론 농도에 따라 조절됨을 시사한다.

3) 테스토스테론에 의한 *ER α* 유전자 발현조절에 대한 cycloheximide의 영향

본 실험에서 Sertoli 세포를 테스토스테론으로 처리했을 때 *ER* mRNA가 감소한 바 그 기전을 밝히기 위해 일차배양 Sertoli 세포에 단백질합성 억제제인 cycloheximide를 처리하여 그 영향을 검색하였다. Sertoli 세포를 10⁻⁶ M 테스토스테론과 5 μ g/mL의 cycloheximide로 처리한 후 total RNA를 조제하였는데 이때 테스토스테론은 12시간 처리하였으며, cycloheximide는 RNA 조제 3시간 전에 첨가하였다. 대조군, 테스토스테론 단독 처리군, 테스토스테론과 cycloheximide 병용처리군에서 각각 total RNA를 조제하여 RT-PCR로 *ER α* mRNA양을 검색한 바, 테스토스테론에 의해 부분적으로 감소한 *ER α* mRNA양은 cycloheximide 처리로 완전히 감소하였다(Fig. 5C).

5. Sertoli 세포 특이 유전자 발현에 대한 에스트라디올-17 β 의 영향

일차배양 Sertoli 세포를 10⁻⁶ M 에스트라디올-17 β 로 처리하고 시간경과에 따라 total RNA를 조제하여 Northern blot hybridization으로 ABP, transferrin, TRPM-2 등의 유

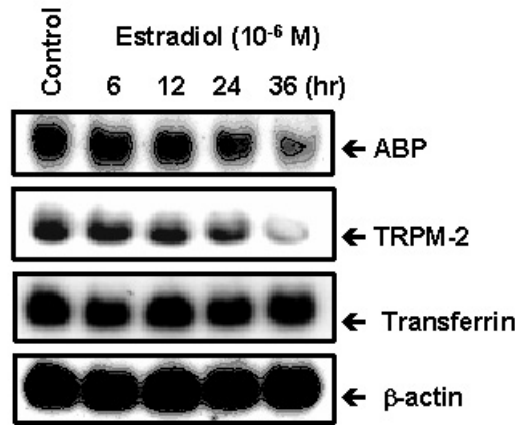


Fig. 6. Effect of estradiol-17 β on the expression ABP, TRPM-2 and transferrin mRNAs in the primary Sertoli cell culture. On the third day of culture, Sertoli cells were rinsed and preincubated with fresh medium for 30 minutes. Estradiol-17 β (10^{-6} M) was added at time zero and incubation continued up to 36 hours. At the indicated times cells were harvested and total RNA was extracted. ABP, TRPM-2 and transferrin mRNAs were measured by Northern blot hybridization.

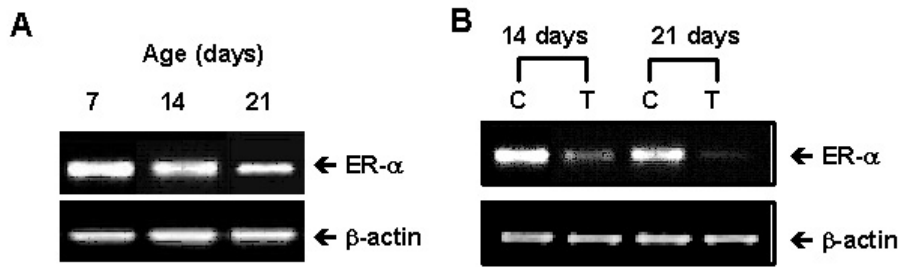


Fig. 7. Changes of ER α mRNA level in testes (A) and testosterone-dependent repression of ER α mRNA levels in Sertoli cells (B) according to age. A, Total RNA was prepared from 7-, 14-, and 21-day-old rat testes. B, The primary Sertoli cell cultures were prepared from 14- and 21-day-old rat testes. Testosterone (10^{-6} M) was added on the third day after plating and total RNA was prepared. ER α mRNA levels were measured by RT-PCR.

전자 발현을 검색한 바 ABP 및 TRPM-2 mRNA는 에스트라디올 처리한 다음 24시간 후에 신속히 감소하였으나 transferrin mRNA양은 전혀 변화가 없었다(Fig. 6).

6. 연령에 따른 ER α mRNA양의 변동

백서 성장에 따른 고환에서의 ER α mRNA 양의 변화를 검색하기 위해 7, 14, 21일령 백서에서 고환을 각각 적출한 후 total RNA를 조제하여 ER α mRNA양을 RT-PCR로 측정 한 바 ER α mRNA는 7일령에서는 강하게 발현되다가 14일, 21일령으로 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다(Fig. 7A). 또한 테스토스테론에 의한 ER α mRNA 변동이 연령에 따라 어떻게 다른가를 밝히기 위해 14일령, 21일령 고환으로부터 Sertoli 세포를 일차배양한 다음 ER α mRNA 양을 RT-PCR로 측정 한 바 14일령, 21일령의 고환으로부터 배양한 Sertoli 세포에 테스토스테론을 처리했을 때 ER α mRNA양은 연령과는 무관하게 steady state보다 각각 감소하였다(Fig. 7B).

고 찰

말의 고환 알코올추출물에서 에스트로겐 활성을 나타내는 물질이 있다는 보고된 이래로 고환에서 에스트로겐 합성이 알려졌다[26]. 정계정맥혈에서의 에스트라디올-17 β 농도는 말초혈액 보다 50배 이상 높으며 고환에서 분비되는 에스트라디올의 양은 전체의 약 25%를 차지한다고 한다[14]. 미성숙한 고환에서의 에스트로겐양은 Sertoli 세포의 mitotic activity와 밀접히 관련되어 있으며, 또한 Sertoli 세포에서 TGF- β 의 분비를 증가시켜 DNA 합성에도 필수적이라고 보고되었다. 그러나 고환에서 합성된 에스트라디올-17 β 가 Sertoli 세포에 자가분비(autocrine)로 작용할 수 있는지에 대해서는 Sertoli 세포에서 ER의 존재가 확인되지 않았기에 불명확했다. 최근 고환에 ER α 가 존재함이 RT-PCR에 의해 시사되었으나[17], 일차배양 Sertoli 세포에서의 존재 및 발현조절에 대해서는 알려진 것이 전무하다. 본 실험에서 ER α 는 난소 Sertoli 세포, 고환, 부고환 등

에서 발현되나 ER β 는 난소, 전립선, LNCaP cell 등에서 발현됨이 규명되었는 바 이는 Kuiper 등[27]의 성적과 잘 일치하였다. ER에는 ER α 및 β subtype이 알려져 있으나 그 기능의 차이는 밝혀져 있지 않았다. 최근 Albrecht 등 [28]은 fetal baboon의 Sertoli 세포에서 ER α 보다 ER β 가 발현된다고 하여 ER α 가 발현된다는 백서의 본 성적과는 상이하였는데, 이는 Albrecht 등[28]이 태아 조직을 사용하였고 또한 종이 다르기 때문이라 생각되며 앞으로 더 많은 실험이 요구된다고 하겠다. 또한 본 실험에서 난소에는 ER α 및 ER β 가 모두 존재하나 ER α 는 고환에서, ER β 는 전립선에서 존재함으로 이는 ER α 및 ER β 가 각 조직에서 특이적으로 그 기능을 나타내리라 생각된다.

ER α mRNA가 Sertoli 세포뿐만 아니라 생식세포에도 존재하는지 Sertoli-spermatogenic cell coculture에서 *in situ* hybridization으로 동정되었으며, 또한 ER α 단백질의 존재는 ER 단일클론항체를 이용한 면역세포화학법으로 확인되었다. 본 실험에서 사용한 monoclonal antibody (H222)는 ER β 와 교차반응을 하지 않으므로[16], Sertoli 세포에서 발현되는 ER 단백질은 ER α 이라고 생각된다. 이는 Sertoli 세포에서 합성되는 에스트라디올-17 β 가 Sertoli 세포에 직접 작용하여 그 기능을 나타낼 수 있을 뿐만 아니라(autocrine function), 생식세포 등 ER α 를 가지고 있는 다른 세포들에도 작용(paracrine function)할 가능성을 시사한다.

Steroid 호르몬의 작용기전은 유전자 전사조절을 통하여 이루어지고 있다. 테스토스테론도 그 수용체와 결합하여 여러 가지 단백질의 전사단계 뿐만 아니라 전사 후 단계의 조절에도 관여하리라 보고되고 있다. 본 실험에서 Sertoli 세포를 테스토스테론으로 처리했을 때 ER α mRNA는 시간 경과에 따라 점차 감소한 바, 이는 ER α 유전자발현이

Sertoli 세포에서 테스토스테론에 의해 조절될 수 있음을 시사한다. ER α 유전자 발현기전을 추구하기 위해 단백질합성 억제제인 cycloheximide를 처리하였을 때 ER α mRNA 양은 점차 감소였다. 이는 테스토스테론에 의한 ER 유전자 전사조절에는 새로운 단백질합성이 요구되리라 생각된다.

Sertoli 세포에서 합성되어 분비되는 중요한 단백질로는 ABP[4,5], transferrin[20], TRPM-2[22] 등이 있으며 이들은 Sertoli 세포에서 테스토스테론 등 호르몬 작용에 대한 중요한 marker로 이용되고 있다. 즉 테스토스테론은 Sertoli 세포에서 ABP등의 합성 및 분비를 증가시킨다고 보고되어 있음으로 Sertoli 세포에서 ER이 기능을 하는지를 Northern blot으로 검색한 바 에스트라디올-17 β 처리 후에는 테스토스테론과는 달리 ABP mRNA가 점차 감소하여 상반된 결과를 얻었다. 이는 Sertoli 세포에서 테스토스테론의 기능이 aromatase를 억제하여 에스트라디올-17 β 합성을 억제한다는 Verhoeven 등[26]의 보고뿐만 아니라, ER α 발현을 억제한다는 본 실험성적을 감안할 때 에스트라디올-17 β 는 테스토스테론과는 달리 ABP 유전자 전사를 억제하리라 시사된다. 따라서 Sertoli 세포에서 합성된 에스트라디올-17 β 가 Sertoli 세포에 있는 ER α 에 작용하여 그 기능을 나타내는 등 자기분비 기능을 할 수 있으리라 생각된다.

Sertoli 세포는 태생기, 신생기에서 세포증식이 왕성하며 14일령 이후에는 그 증식이 감소하다가 21일령 이후에는 증식이 멈추고 분화가 유도된다고 한다[29]. Sertoli 세포에서 FSH에 의한 에스트라디올-17 β 합성은 5일령 및 10일령에서는 크게 증가하지만 30일령에서는 거의 영향이 없으나 남성호르몬은 Sertoli 세포에서 aromatase 활성을 억제하여 에스트라디올-17 β 합성을 억제한다고 알려져 있다[26]. 또한 에스트로겐 합성은 정자형성의 첫 번째 파동이 시작되

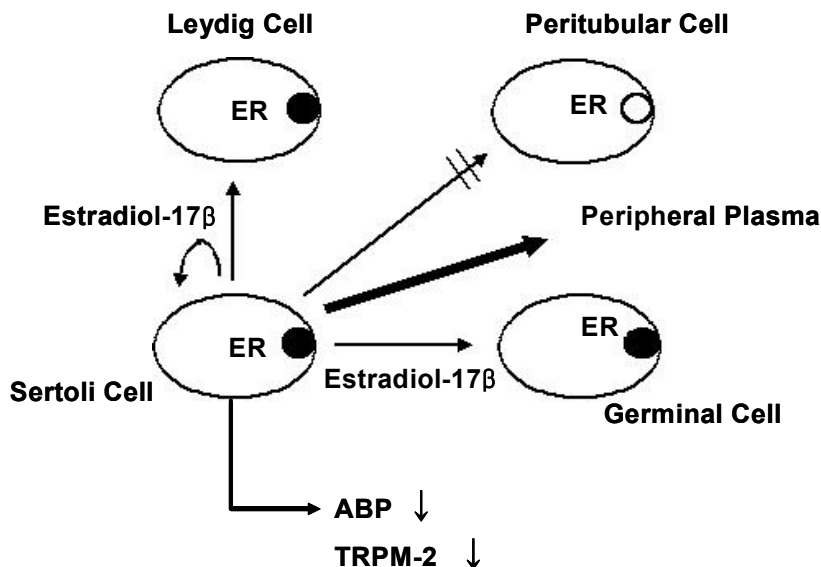


Fig. 8. Possible model of autocrine/paracrine function of testicular estradiol-17 β in testis.

기 전에 최대치에 이르며 이는 prepubertal development 과정 중 중요하다고 한다[15]. 본 실험에서 먼저 고환에서 연령에 따라 ER α mRNA를 검색했을 때 ER α mRNA는 7일령에서 가장 높았는 바 이는 prepubertal rat에서 합성된 에스트라디올-17 β 의 작용이 ER α 유전자 발현으로 강하게 일어나며 이는 에스트라디올-17 β 가 TGF- β 와 더불어 미성숙 Sertoli 세포의 증식을 조절한다는 보고[12,30]와 일치하였다. 테스토스테론에 의한 ER α 조절과 Sertoli 세포 증식 및 분화와의 관련성을 검색하기 위해 14일령, 21일령 고환에서 Sertoli 세포를 배양하여 ER α 발현에 대한 테스토스테론의 영향을 검색한 바 ER α 는 14일령, 21일령에서 모두 감소하였다.

따라서 본 실험결과 Sertoli 세포에서 테스토스테론에 의한 ER α 유전자 발현 조절은 에스트라디올에 의해 ABP 및 TRPM-2 유전자 전사가 억제되는 점을 고려할 때 Sertoli 세포 기능과 밀접히 관련되어 있으며 Sertoli 세포에서 합성되는 에스트라디올-17 β 는 Sertoli 세포에도 직접 작용하여 기능을 나타낼 뿐만 아니라, 생식세포 등에 대한 paracrine hormone으로도 작용할 수 있을 것으로 생각된다(Fig. 8).

요 약

연구배경: 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)는 α 및 β subtype이 있으나 그 기능의 차이는 밝혀져 있지 않다. 본 실험에서 일차배양 Sertoli 세포에 ER α 가 존재함을 확인하고 테스토스테론에 의한 ER 유전자 조절기전을 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

방법: Sertoli 세포의 일차배양은 Lim 등의 방법에 따라 시행하였다. Sertoli 세포에서 발현되는 ER α 와 β mRNA 발현을 검색하기 위해 Northern blot과 RT-PCR을 시행하였다. 세포에서 ER α 와 β mRNA 및 단백질 검색은 *in situ* hybridization과 면역세포화학법으로 각각 동정하였다.

결과: *In situ* hybridization으로 Sertoli 세포 및 생식세포에서 ER α mRNA의 존재가 확인되었으며 면역세포화학법(immunocytochemistry)로 ER 단백질이 동정되었다. ER α mRNA는 난소, 고환, Sertoli 세포, 생식세포에서, 그리고 ER β 는 난소, 전립선, LNCaP cell에서 각각 강하게 발현되었다. ER α 유전자발현은 테스토스테론에 의하여 시간경과에 따라 점차 감소하였으며 또한 이는 테스토스테론 농도에 의존하여 나타났다. 테스토스테론에 의한 ER α 유전자의 발현은 cycloheximide에 의해 감소되었다. 에스트라디올-17 β 에 의해 Sertoli 세포의 ABP와 TRPM-2 mRNA는 24시간 이후부터 점차 감소하였으나 transferrin mRNA는 영향받지 않았다. ER α mRNA 양은 7일령 고환에서는 강하게 검출되었으나 14일, 21일령에서는 점차 감소하였고 일차배양 Sertoli 세포에서도 같은 결과를 나타내었으며 연령

에 관계없이 테스토스테론에 의해 ER α 유전자 발현이 억제되었다.

결론: 이상의 결과로 ER α 는 테스토스테론에 의해 전사조절이 억제되며 에스트로겐에 의해 ABP 등의 발현이 억제됨으로 Sertoli 세포의 기능조절에 ER α 도 중요한 역할을 하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Means AR, Dedman JR, Tash JS, Tindall DJ, van Sickle M and Welsh MJ: *Regulation of the testis Sertoli cell by follicle stimulating hormone*. *Ann Rev Physiol* 42:59-70, 1980
2. Skinner MK, Schitz SM, Anthony CT: *Regulation of Sertoli cell differentiated function: Testicular transferrin and androgen-binding protein expression*. *Endocrinology* 124:3015-3024, 1989
3. Skinner MK, Griswold MD: *Sertoli cells synthesize and secrete a ceruloplasmin-like protein*. *Biol Reprod* 28:1225-1229, 1983
4. Joseph DR, Hall SH, French FS: *Identification of complementary DNA clones that encode rat androgen binding protein*. *J Androl* 6:392-395, 1985
5. Lim K, Yoon SJ, Lee MS, Byun SH, Kweon GR, Kwak ST, Hwang B: *Glucocorticoid regulation of androgen binding protein expression in primary Sertoli cell cultures from rats*. *Biochem Biophys Res Commun* 17:490-494, 1996
6. Hall SH, Joseph DR, French FS, Conti M: *Follicle-stimulating hormone induces transient expression of the protooncogene c-fos in primary Sertoli cell cultures*. *Mol Endocrinol* 2:55-61, 1988
7. Lim K, Yoo JH, Kim KY, Kweon GR, Kwak ST, Hwang BD: *Testosterone regulation of protooncogene c-myc expression in primary Sertoli cell cultures from prepubertal rats*. *J Androl* 15:543-550, 1994
8. Lim K, Hwang BD: *Follicle-stimulating hormone transiently induces expression of protooncogene c-myc in primary Sertoli cell cultures of early pubertal and prepubertal rat*. *Mol Cell Endocrinol* 111:51-56, 1995
9. Lim K, Lee JI, Kwak ST, Lee MS, Hwang BD: *Testosterone downregulates expression of the β -nerve growth factor receptor gene in primary Sertoli cell cultures*. *Kor J Biochem* 26:91-98, 1994
10. Morris PL, Vale WW, Cappel S, Bardin CW: *Inhibin production by primary Sertoli cell enriched cultures:*

- Regulation by follicle-stimulating hormone, androgens and epidermal growth factor. Endocrinology* 122:717-725, 1988
11. Smith EP, Dickson BA, Chernauek SD: *Insulin-like growth factor binding protein-3 secretion from cultured rat Sertoli cells: dual regulation by follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. Endocrinology* 127:2744-2751, 1990
 12. Skinner MK, Takacs K, Coffey RJ: *Transforming growth factor- α gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. Endocrinology* 124:845-854, 1989
 13. Korach KS: *Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. Science* 266:1524-1527, 1994
 14. Baird DT, Galbraith A, Fraser IS, Newsam JE: *The concentration of oestrone and oestradiol 17- β in the spermatic venous blood in man. J Endocrinol* 57:285-288, 1973
 15. Dorrington JH, Khan SA: *Steroid production, metabolism and release by Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD eds. The Sertoli cell. pp538-549, Clearwater, Cache River Press, 1993*
 16. Dorrington JH, Roller NF, Fritz IB: *Effects of follicle stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations. Mol Cell Endocrinol* 3:57-70, 1975
 17. Huggenvik J, Idzerda RL, Haywood L, Lee DC, McKnight GS, Griswold MD: *Transferrin messenger ribonucleic acid: molecular cloning and hormonal regulation in rat Sertoli cells. Endocrinology* 120:332-340, 1987
 18. 임규, 박청, 윤경아, 윤은진, 박종일, 박승길, 황병두: *Sertoli 세포의 생리기능 및 호르몬에 의한 조절 대한내분비학회지* 18:120-136, 2003
 19. Pena SD: *A new technique for the visualization of the cytoskeleton in cultured fibroblasts with Coomassie blue R250. Cell Biol Int Rep* 4:149-153, 1980
 20. Virca GD, Northemann W, Shiels BR, Widera G, Broome S: *Simplified Northern blot hybridization using 5% sodium dodecyl sulfate. Biotechniques* 8:370-371, 1990
 21. Collard MW, Griswold MD: *Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. Biochemistry* 26:3297-3303, 1987
 22. Feinberg AP, Vogelstein B: *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem* 132:6-13, 1983
 23. Grandien K, Backdahl M, Ljunggren O, Gustafsson JA, Berkenstam A: *Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. Endocrinology* 136:2223-2229, 1995
 24. Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D: *The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. Cell* 58:669-678, 1989
 25. Heiles HB, Genersch E, Kessler C, Neumann R, Eggers HJ: *In situ hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses (HPV 16/18) in HeLa and SiHa cells. Biotechniques* 6:978-981, 1988
 26. Verhoeven G, Cailleau J: *Prolonged exposure to androgens suppresses follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in rat Sertoli cell cultures. Mol Cell Endocrinol* 57:51-60 1988
 27. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA: *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . Endocrinology* 138:863-870, 1997
 28. Albrecht ED, Billiar RB, Aberdeen GW, Babischkin JS, Pepe GJ: *Expression of estrogen receptors α and β in the fetal baboon testis and epididymis. Biol Reprod* 70:1106-1113, 2004
 29. Koike S, Sakai M, Muramatsu M: *Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. Nucleic Acids Res* 15:2499-2513, 1987
 30. O'donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER: *Estrogen and spermatogenesis. Endocrinol Rev* 22:289-318, 2001