

# 폐경 쥐 모델에서 두류 섭취에 따른 자궁의 비타민 D 수용체의 발현

김태희<sup>1</sup> · 박준식<sup>1</sup> · 이해혁<sup>1</sup> · 이우석<sup>1</sup> · 정수호<sup>1</sup> · 박용순<sup>2</sup> · 변동원<sup>3</sup>

<sup>1</sup>순천향대학교 부천병원 산부인과, <sup>2</sup>한양대학교 생활과학대학 식품영양학교실, <sup>3</sup>순천향대학교병원 내분비내과

## Expression of Vitamin D Receptor by Pulse Consumption in the Uterus of Menopausal Mouse Model

Tae-Hee Kim, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>, Junsik Park, M.D.<sup>1</sup>, Hae-Hyeog Lee, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>, Woo Seok Lee, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>, Soo-Ho Chung, M.D.<sup>1</sup>, Yongsoon Park, Ph.D.<sup>2</sup>, Dong Won Byun, M.D., Ph.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Soonchunhyang University Bucheon Hospital, Bucheon; <sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University; <sup>3</sup>Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University Hospital, Seoul, Korea

**Objectives:** Phytoestrogen-containing pulse supplements have beneficial effects on postmenopausal symptoms, but how such effects are achieved is unclear. This study investigates the effects of pulse consumption on the menopausal changes in ovariectomized rats.

**Methods:** Female Sprague-Dawley rats were either sham operated (Sham; n = 3) or surgically ovariectomized (n = 13). The Sham group was fed the regular AIN-93M diet. Ovariectomized group was divided into 3 sub-groups and fed AIN-93M containing soybean (n = 5), mung bean (n = 3), or cowpea (n = 5) for 10 weeks. At the end of the experiment, all rats were sacrificed, and the uterus was harvested, rinsed, and weighed. Expressions of vitamin D receptor (VDR), estrogen receptor (ER)  $\beta$ , and ezrin in uterus were evaluated by immunohistochemistry.

**Results:** VDR was highly expressed in the uterus of rat, irrespective of ovariectomized state. VDR was more definitely expressed in the uterus of ovariectomized groups than the sham-operated group. There were no significant differences in expression of ER  $\beta$ . However the expression of ezrin was highly expressed in the cowpea group compared to sham group ( $P = 0.044$ ).

**Conclusion:** This study suggested that legumes diet may concern menopausal changes via VDR and ezrin. The result may partly explain the beneficial effects of VDR on menopausal symptoms. Further study is necessary to study the detailed mechanisms of VDR and ezrin on the menopausal changes in the uterus. (**J Korean Soc Menopause 2013;19:1-8**)

**Key Words:** Menopause, Receptors calcitriol, Uterus

폐경 후에 호르몬의 변화로 인해 많은 여성 질환이 발생할 수 있으며, 이에 대해서 호르몬 치료뿐만 아니라 호르몬 대체 음식이나 영양제에 대한 관심도 증가되고 있다. 두류는 한국, 일본, 중국 및 타이완 등 아시아 전 지역에서 재배

되는 주요 작물 중 하나로 전 세계적으로 많은 국가의 전통 식에서 널리 이용되고 있으며, 저지방 작물로 단백질, 섬유질, 다양한 미세 영양소 및 식물내재영양소의 좋은 공급원으로 알려져 있다.<sup>1,2</sup> 두류의 대표적인 플라보노이드 성분 중

Received: August 3, 2012 Revised: September 5, 2012 Accepted: September 7, 2012

Address for Correspondence: Yongsoon Park, Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, 17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

Tel: +82-2-2220-1205, Fax: +82-2-2292-1206, E-mail: yongsoon@hanyang.ac.kr

Copyright © 2013 by The Korean Society of Menopause

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

하나인 이소플라본 (isoflavone)은 폐경 이후 여성의 골다공증 예방에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>3-5</sup> 따라서 이소플라본을 함유한 캡슐 및 알약 등이 시중에 판매되고 있고, 이소플라본이 다량 함유된 식품인 두류의 섭취의 증가가 폐경 증상 완화에 도움을 줄 것이라고 기대되고 있다.

최근 폐경 증상의 완화와 골다공증 예방을 위한 대체 치료로 비타민 D가 주목을 받고 있다. 비타민 D의 수용체 (vitamin D receptor, VDR)는 신장, 뼈 모세포, 부갑상선, 췌장의 섬세포, 뇌세포, 유방 상피 등에 존재하여, 체내의 칼슘과 인 대사를 조절할 뿐만 아니라 세포의 정상적인 성장과 분화에 관여하며, 암세포의 성장을 억제시키고 면역 작용을 조절하여 특정 감염이나 자가 면역성 질환 등을 방지하는 역할을 하며 신경 근육조직의 정상 기능 유지, 생식 능력 조절, 부갑상선이나 췌장의 호르몬의 생성과 작용을 조절하기도 하는 등 다양한 생체 기능을 조절하는 역할을 수행한다.<sup>6,7</sup>

폐경이 되면 체내의 에스트로겐 농도가 감소하게 되고, 생리학적인 변화가 각 조직에서 발생하게 된다. 이로 인한 폐경 증상과 더불어 골다공증, 심혈관 질환, 비뇨 생식기 위축의 발생이 증가하게 된다. 하지만 체내의 각 조직에서 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor, ER)의 발현에 대한 연구는 아직 미미한 상태이다. 몇몇 학자들은 ER  $\alpha$ 의 발현이 혈중 에스트로겐의 농도와 연관이 있다고 주장하는 반면에, 또 다른 학자들은 호르몬 보충 치료에도 불구하고 폐경 후에는 ER  $\beta$ 의 발현이 감소된다고 주장한다. 이에 난소 절제 쥐 동물 ER 특이 조절제 (selective estrogen-receptor modulators, SERM)을 이용한 ER 발현과 에스트로겐의 혈중 농도간의 상관관계를 규명하고자 하는 연구가 이루어 지고 있다.

체내에서 에스트로겐에 대한 생물학적인 반응은 오로지 특별히 높은 친화력을 갖는 ER가 발현되는 세포에서만 일어난다. 1996년 흰쥐로부터 새로운 ER가 분리 동정된 후, 사람에게서도 발견되어 두번째 에스트로겐 수용체, 즉 ER  $\beta$ 의 존재가 확인되었고,<sup>8</sup> 이전에 존재하던 ER은 ER  $\alpha$ 로 구분하였다.<sup>9,10</sup> ER  $\alpha$ 는 난소나 자궁, 질 유선과 같은 주요 여성 생식기관에 발견되는 반면에, ER  $\beta$ 는 고환이나 전립선과 같은 남성의 생식기관과 난소에서 발현된다고 알려져 있다.<sup>8,11</sup>

ER은 핵막에 존재하고 있으며 에스트로겐과 결합 후 핵속의 DNA에 결합하여 여러 유전자의 발현에 관여하여 조직의 성장과 분화에 영향을 미친다.<sup>12</sup> 이와 함께 ER  $\beta$ 가 발견되면서 먼저 규명된 ER  $\alpha$ 와 더불어 활발한 연구가 이루어지게 되었다.<sup>13</sup> 일반적으로 에스트로겐의 반응은 두 가지의 다른 수용체 ER  $\alpha$ 와 ER  $\beta$ 를 통하여 매개된다고 알려져 있다.<sup>14</sup> 두 수용체가 세포 내에서 어떠한 기전으로 신호를 전달하고

작용하는가에 대해서는 크게 두 가지 형태로 나누어 볼 수 있다. 하나는 수용체 결합 복합체를 이룬 핵 내 작용을 통한 세포 내 전사를 조절하는 과정이고, 다른 하나는 게놈과는 무관한 비핵 작용이다. 하지만 아직도 ERs의 작용기전이 완전히 규명되지는 못하였다. ER의 작용기전 규명을 통해 ER  $\alpha$ - 그리고 ER  $\beta$ -특이적인 리간드의 개발과 폐경 증후군, 유방암과 같은 질환의 새로운 치료제 개발이 기대된다.

Ezrin, radixin, moesin (ERMs), merlin family는 밴드 4.1 superfamily의 subfamily를 이루며 세포막-세포골격 관련 단백질로서 인산화를 통하여 활성화되면 세포막과 actin에 기초한 세포골격 사이를 연결하며 세포의 형태를 조절하는데 중요한 역할을 한다.<sup>15</sup> 종양 억제제의 역할을 하는 것으로 알려진 merlin을 제외한 ERM family 중 ezrin은 세포의 골격에 중요한 역할을 하는 물질로 막-세포골격 상호작용을 조절하는 물질이다.<sup>16</sup> 이는 세포의 생존, 유착, 이동, 침윤능에도 관여한다고 알려져 있으며,<sup>17</sup> 최근의 연구에 의하면 ezrin은 암의 전이에 있어서 중요한 역할을 담당하고,<sup>18</sup> 횡문근육종, 췌장암, 난소암 종양의 진행에도 관여한다고 알려져 있다.<sup>19</sup> Song 등<sup>20</sup>은 난소암 세포주에서 에스트로겐의 영향에 의한 ezrin 발현 양상을 확인하고자 하였고, estradiol (E2)에 의해 난소암 세포주에서 ezrin이 과발현 됨을 확인하였다. 이 효과는 SERM에 의하여 상쇄되었고, 이로 인해 암 전이에 중요한 역할을 담당하는 ezrin의 발현이 에스트로겐의 영향을 받음이 알려졌다. 또한 Smith 등<sup>21</sup>은 rat에게 E2를 투여하였더니 자궁내 ezrin의 발현이 증가하였음을 보고하였다.

구체적인 작용 기전은 아직 불분명하지만, 에스트로겐이 ezrin의 발현에 영향을 미친다는 사실은 에스트로겐의 혈중 농도가 낮아지는 폐경 상태에서 ezrin이 영향을 받을 수 있다는 가능성 시사한다.

본 연구자들은 폐경 후 두류 섭취가 자궁에 미치는 영향을 분자생물학적인 측면에서 접근해 보고자 하였다. 이에 폐경 후의 쥐모델을 이용하여 폐경 후 두류의 섭취가 자궁 내에서 VDR, ER 그리고 ezrin의 발현의 차이에 어떤 영향을 미치는지 확인해 보았다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 동물

9주령의 female Sprague-Dawley rats (Orient Bio Inc., Seongnam, Korea) 16마리를 이용하였다. 1주간의 적응기를 거친 후 적응기 마지막 날 수술을 시행하였다. 3마리는 Sham operation을 시행하여 대조군으로 사용하였고, 13마리

는 양쪽 난소절제술을 시행하였다. 사육온도는  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도는 50–60%로 유지하였고, 12시간의 암명주기로 독립적인 케이지에서 사육하였다.

## 2. 수술

1주간 적응기를 거친 후 적응기 마지막 날 무게를 측정하고 0.15 mL/kg의 Rompun (Bayer Animal Health Co., Suwon, Korea)와 0.075 mL/kg의 Zoletil 50 (Virbac Laboratories, Carros Cedex, France)를 복강내 투여하여 마취하였다. 양쪽 등 부위에서 1 cm 정도로 피부, 복근 및 복막을 절개하고 난소를 노출시켜 난소를 절제하고 견사 및 nylon사로 복막, 복근 및 피부를 봉합하여 폐경 동물모델 제작한다. 수술 후 Baytril 25 (Bayer Korean Ltd., Ansan, Korea)를 전신 투여하였다. 그 후 Sham-control군은 복막절개까지만 같은 방법으로 시행한 후 난소를 절제하지 않은 채로 다시 봉합하는 대조 수술을 시행한다.<sup>22</sup>

## 3. 식이 및 실험 계획

Sham-control 군에게는 AIN-93M diet ( $n = 3$ )를 공급하였고, 난소 절제한 rat을 3군으로 나누어 실험 식이를 공급하였다 (OVX-SB; [ $n = 5$ , soybean], OVX-MB; [ $n = 3$ , mung bean], OVX-CP; [ $n = 5$ , cowpea]). 실험식은 국내산 두류(대두, 녹두, 동부)를 하루 동안 수침한 후 trypsin inhibitor의 활성을 저해하기 위해  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 가압증자하여 건조시킨 뒤 분말화하여 식이 제조 시 첨가한다 (AIN-93M diet에 두류를 각각 300 g/kg diets 넣고 AIN 93M diets 조성을 수정하여 탄수화물 : 단백질 : 지방 비율을 65 : 15 : 20으로 맞추어 준다).

각 군마다 다른 실험 식이를 공급하고, 10주간 사육한다. 마지막 주에 sacrifice 하여 자궁을 적출하고 무게를 측정한다. 적출한 자궁에서 VDR, ER  $\beta$ , Ezrin의 발현을 면역조직화학염색을 통해 확인한다.

## 4. 면역조직화학염색

적출된 자궁의 파라핀 포매조직을 4에서  $5 \mu\text{m}$  두께로 박절하고 xylene으로 5분간 3회 탈파라핀 과정을 거친 후 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시킨다. 그 후 조직 절편 내의 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기 위해 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리한 후 증류수로 세척한 다음 50 mM Tris 완충용액 (Tris buffered saline, TBS; pH 7.5)으로 수세후 비특이성 반응을 제거하기 위해 30분간 염소혈청으로 처리하고, 여분의 용액을 제거한다. 그리고 일차항체인 VDR, ezrin, ER  $\beta$

와 실온에서 2시간 작용시킨다. 이후 TBS로 5분간 3회 수세한 다음 biotin이 부착된 이차항체 (1 : 300, Zymed Co.)에 20분간 작용 후, 통상적인 avidin-biotin complex법으로 염색한다. 발색제는 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)를 사용하고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한다. 면역염색된 사진의 강도는 Image J (Version 1.45x; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 분석하여 음성 대조군에 대한 비율로 표현하였다.

## 5. 통계분석

자료는 평균  $\pm$  표준편차로 표현하였다. Sham군과 난소 절제군에서의 면역조직화학염색 결과를 비교하는데 ANOVA test with post hoc analysis를 사용하였다. 통계처리는 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고  $P < 0.05$ 를 통계학적으로 유의한 것으로 보았다

# 결 과

## 1. 체중과 장기 무게

초기 체중과 마지막 체중 그리고 자궁과 피하지방의 무게를 Table 1에 제시하였다. 난소 절제군의 마지막 체중과 피하지방의 무게는 난소 비절제군보다 통계적으로 더 무거웠고 ( $P = 0.007$ ,  $P < 0.001$ ) 자궁의 무게는 난소 절제군이 통계적으로 더 적게 측정되었다 ( $P < 0.038$ ).

## 2. 자궁의 면역조직화학염색 결과

전체적으로 보면, 난소 절제 여부와 관계없이 자궁에서는 VDR가 통계적으로 높은 수준으로 발현됨을 알 수 있었다 (Fig. 1). 난소를 절제한 쥐의 자궁은 난소를 보존한 쥐보다 위축되었음에도 VDR는 뚜렷하게 발현됨을 알 수 있었다 (Fig. 2).

하지만 ER  $\beta$ 가 자궁에서 뚜렷하게 발현된다고 보기는 힘들었다.

실험 식이의 차이를 기준으로 살펴보았을 때 (Fig. 3), 녹두가 첨가된 식이를 제공한 군에서 VDR의 발현은 증가하고, ER  $\beta$ 와 Ezrin의 발현은 난소 보존군에 비해서도 감소해 있음을 알 수 있었다. 하지만 Ezrin에서만 난소 보존군과 녹두가 첨가된 식이를 제공한 군 사이에 통계적인 차이를 확인할 수 있었다 ( $P = 0.044$ ). 동부와 대두의 발현은 통계적으로 난소 보존군과 큰 차이를 보이지 않았다.



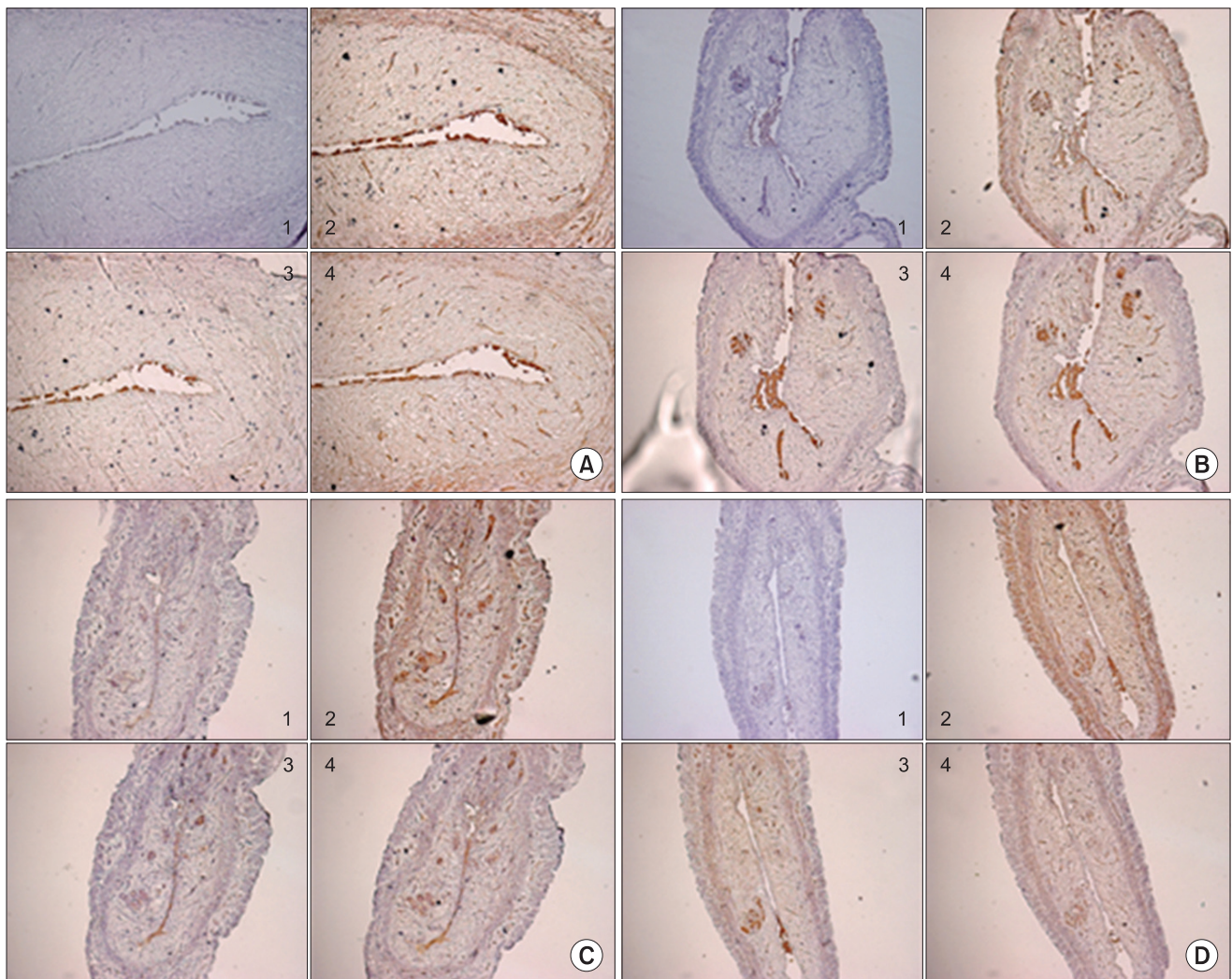
**Table 1.** Body weight, and organ weight

	Sham (n = 3)	OVX (n = 13)	OVX-SB (n = 5)	OVX-MB (n = 3)	OVX-CP (n = 5)	Total (n = 16)	P*
Initial BW (g)	204.0 ± 2.65	202.23 ± 4.95	202.60 ± 6.39	202.67 ± 4.04	201.60 ± 4.88	202.56 ± 4.59	0.565
Final BW (g)	275.3 ± 22.56	311.85 ± 17.33	304.40 ± 17.08	323.33 ± 11.60	312.40 ± 19.31	305.00 ± 22.91	0.007*
Uterus weight (mg)	515.33 ± 145.51	99.23 ± 17.41	108.20 ± 13.81	99.33 ± 22.19	90.20 ± 16.42	177.25 ± 176.64	0.038*
Subcutaneous fat weight (g)	3.70 ± 0.80	8.16 ± 1.39	7.26 ± 1.12	9.35 ± 1.82	8.34 ± 0.87	7.34 ± 2.17	< 0.001*

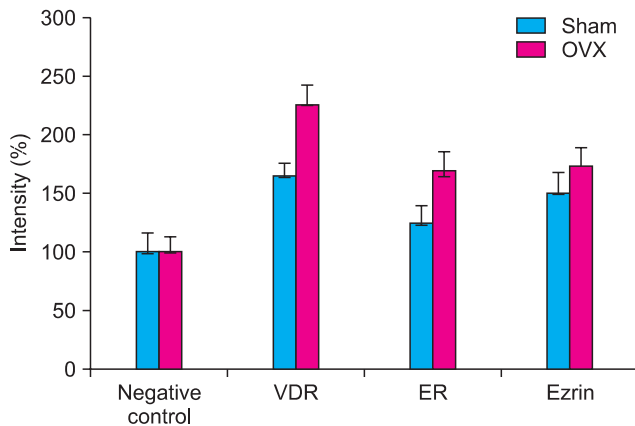
Values are expressed as means ± SD.

\*Significantly different between the Sham and OVX groups by t-test.

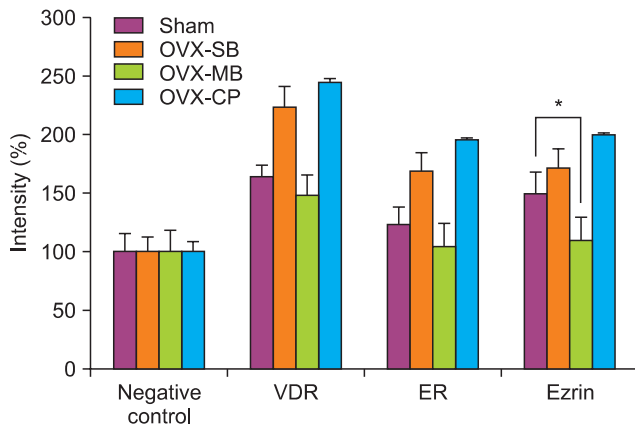
OVX: ovariectomy, BW: body weight, OVX-SB: ovariectomized and the intake of soybean, OVX-MB: ovariectomized and the intake of mung bean, OVX-CP: Ovariectomized and the intake of cowpea



**Fig. 1.** Localization of vitamin D receptor, ezrin, and estrogen beta receptor in the uterus of rats. Immunohistochemistry was performed as described in the Material and Methods section. (A) Sham control, (B) OVX-SB, (C) OVX-MB, (D) OVX-CP. A negative control shows any immunoreactivity without a primary antibody treatment. 1: negative control, 2: vitamin D receptor, 3: ezrin, 4: Estrogen receptor beta. Magnification: x 100. OVX-SB: ovariectomized and the intake of soybean, OVX-MB: ovariectomized and the intake of mung bean, OVX-CP: ovariectomized and the intake of cowpea.



**Fig. 2.** Immunoreactivity of vitamin D receptor, estrogen receptor and ezrin in rat's uterus were measured by Image J. Semi-quantitative intensity of immunoreactivity in sham-operated rats (Sham) and ovariectomized rats (OVX) were compared.



**Fig. 3.** Immunoreactivity of VDR, ER, and ezrin in rat's uterus were measured by Image J. Immunoreactive ezrin expression was significantly lower in OVX-MB group than Sham control group (t-test, \* $P = 0.04$ ). VDR: vitamin D receptor, ER: estrogen receptor, OVX-SB: ovariectomized and the intake of soybean, OVX-MB: ovariectomized and the intake of soybean, OVX-CP: ovariectomized and the intake of soybean.

## 고 찰

VDR가 설치류의 생식기관인 자궁내막에서 estrous cycle 동안 발현된다는 것이 mice를 이용한 동물실험 연구에서 밝혀졌다.<sup>23</sup> 비타민 D는 지용성 스테로이드 호르몬의 한 종류로 다른 스테로이드 호르몬과 대사과정 및 세포내 작용기전이 매우 유사하다. 그 동안 비타민 D의 칼슘과 인의 항상성을 조절 기능은 잘 알려져 있었다. 하지만 최근 비타민 D 대사물질이 세포의 성장과 분화에도 관여한다는 연구들이 많

이 보고되고 있다.

최근 호르몬대치요법의 대안으로 식물성 에스트로겐 요법 (phytoestrogen therapy)이 관심을 끌고 있다.<sup>24,25</sup> 식물성 에스트로겐 성분이 많이 포함된 식사를 하는 동양의 폐경 여성이 서양 여성보다 안면홍조와 같은 폐경 증상이 더 적고, 관상동맥질환과 골다공증의 발생률뿐만 아니라 유방암, 자궁내막암 발생률도 더 낮다고 보고되었다.<sup>26</sup> 실험실내 연구와 동물 실험 연구를 통해, 식물성 에스트로겐 가운데 콩 (soybean)에 다량 함유되어 있는 이소플라본은 화학구조가 여성호르몬 E2와 비슷하고 효과는 E2보다 약하지만 동일한 기능을 한다는 것이 밝혀짐에 따라 유사 여성호르몬으로 불리게 되었다.<sup>27</sup> 이에 자연 호르몬 (natural hormone)인 식물성 에스트로겐으로 호르몬 대치 요법 (Hormone replacement therapy, HRT)을 대체할 가능성을 확인하기 위해 폐경기 여성을 대상으로 폐경 증상 완화, 콜레스테롤 저하작용, 골다공증 예방 같은 이소플라본의 에스트로겐성 효과를 밝히려는 임상 연구가 활발히 이루어지고 있다.<sup>28</sup> 그러나 아직 연구의 결과들은 일관성이 없으며 그 작용 기전도 명확하게 밝혀져 있지 않아 이소플라본이 과연 효과적으로 호르몬 대치 요법을 대체할 수 있는지 논란이 되고 있다.

우리 나라 중년 여성이 가장 선호하는 폐경 건강 관리 방법은 식생활을 통한 방법이다.<sup>29</sup> 서양에서는 다양한 콩식품을 이용하여 이소플라본의 효과를 알아내기 위한 연구를 진행하고 있으나 콩식품에 대한 순응도가 낮아 연구 결과 해석에 어려움이 있다.<sup>30</sup> 반면에 전통적으로 콩섭취 문화권인 우리 나라에서는 이소플라본 추출물을 이용한 연구만 있을 뿐 일상적으로 섭취 가능한 콩식품을 활용한 실험 연구는 찾아볼 수 없었다.<sup>31</sup>

두류의 항산화 비타민 및 무기질, 기타 생리활성 물질은 혈당 조절과 지질대사 조절 작용이 있어 이상지혈증, 당뇨병, 심혈관계 질환과 같은 만성질환의 예방 및 관리에 중요한 역할을 한다.<sup>32,33</sup> 따라서 두류가 여러 방향에서 재평가 되기 위해서 연구를 통한 근거가 중요한 시점이다. 대두에는 genistein, daidzein 등의 이소플라본이 다량 함유되어 있으며, 이소플라본-rich soy, 이소플라본-poor soy, whey protein의 섭취를 24주간 비교한 연구에서도 이소플라본-rich soy가 폐경여성의 골밀도 (bone mineral density [BMD])와 bone mineral content [BMC]) 감소를 유의하게 억제하였다.<sup>34</sup>

비타민 D는 폐경기에 골다공증의 예방과 치료제로 알려져 있으나,<sup>35</sup> 질 위축 증상의 완화에도 도움을 주는 것으로 보고되었다.<sup>36</sup> 또한 비타민 D는 난소에서 에스트로겐 생합성을 촉진한다고 알려져 있다. 그리고 비 칼슘성 비타민 D



유사체로 전처치한 혈관세포에서 ER  $\alpha$ 의 증가와 ER  $\beta$ 의 감소를 보였다.<sup>37</sup> 그리고 VDR도 E2-매개성 강화의 양상을 보여 E2와 비타민 D 사이에는 상승작용이 있다고 보여진다.<sup>38</sup> 비타민 D는 에스트로겐의 합성을 촉진한다고 한다. 또한 비타민 D와 콩에 들어있는 이소플라본이 폐경여성의 신체적인 증상을 완화시키는데 도움을 준다고 알려져 있다. 하지만 이 물질들의 정확한 작용 기전은 알려지지 않았다.

본 실험은 최근 호르몬 대체 요법의 대체 물질로 관심을 받고 있는 식물성 에스트로겐의 식품을 통한 섭취가 폐경 시 여성 생식기의 위축과 퇴화에 분자생물학적으로 어떠한 영향을 미칠지 확인하고자 하였다. 특히, 최근 폐경 증상의 대안적 치료제로서 주목을 받고 있는 비타민 D가 에스트로겐의 영향을 받아 여성 생식기의 변화에 중심적인 역할을 할 것이라는 가정하에 VDR의 자궁내 발현, 폐경 여부에 따른 차이 그리고 식물성 에스트로겐이 함유된 두류의 섭취에 따른 차이에 주안점을 두었다. 그 이외에 추가적으로 에스트로겐의 직접적인 작용과 세포의 구조적인 변화와 기능의 변화를 알아보기 위해 ER와 Ezrin의 발현 차이도 확인해 보았다.

결과를 살펴보면, ER의 발현은 난소 보존 여부와 상관없이 발현에 큰 차이가 없었다. Cavallini 등<sup>39</sup>에 의하면 폐경 후 쥐의 질에서 ER  $\alpha$  messenger ribonucleic acid (mRNA)의 발현은 폐경 전과 큰 차이가 없으나 ER  $\beta$  mRNA는 현격하게 감소하였다. 물론 본 연구는 자궁에서의 ER  $\beta$ 의 발현만을 직접 보았고, mRNA와 실제 수용체의 발현은 차이가 있을 가능성도 있지만, 다른 한편으로는 두류의 섭취가 실험 결과의 차이를 낳았을 가능성을 배제할 수 없다.

한편, Ezrin의 발현을 살펴본 결과 에스트로겐의 결핍으로 난소 절제 쥐에서 자궁내 Ezrin의 발현이 감소해 있었다. 이를 통해 Ezrin이 자궁에서 기능적, 구조적으로 중요한 역할을 할 가능성이 있음을 추론해 볼 수 있다.

하지만, VDR은 실험 조건에 관계없이 자궁 내에서 뚜렷하게 발현되고, 오히려 난소 절제군에서 통계적으로 유의하지는 않았지만 더 높게 발현되는 것으로 나타났다. 비타민 D가 자궁에서 중요한 역할을 하고 있음을 시사해 주는 소견으로 생각되며, 난소 절제군에서 에스트로겐의 결핍에 대한 보상으로 비타민 D의 발현이 증가되어 있을 가능성을 고려해 볼 수 있는 소견이다.

두류의 섭취에 따른 차이를 살펴보면 녹두가 에스트로겐의 작용을 오히려 방해하여 VDR의 발현을 자극하고, 구조적으로 Ezrin의 발현이 감소되어 있을 가능성이 있다.

결론적으로, 이번 연구는 폐경 쥐 모델을 이용하여 최근에 주목을 받고 있는 식물성 에스트로겐이 포함된 두류의

체계적인 연구의 필요성과 자궁에서의 비타민 D와 Ezrin의 역할의 가능성을 보여주었다. 이번 연구는 향후 두류 섭취로 인한 폐경 증상 완화 치료의 가능성을 분자생물학적인 관점에서 살펴보았다는데 의의가 있다. 하지만 VDR, ER  $\beta$  그리고 ezrin의 폐경 후 자궁에서의 역할에 대한 자세한 기전을 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 연구는 2012년 대한폐경학회 청화 학술상으로 진행된 과제입니다. 본 연구에는 어떠한 이해의 충돌도 관여하지 않았습니다.

## 참고문헌

1. Anderson JW, Smith BM, Washnock CS. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 464S-74S.
2. Messina MJ. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 439S-50S.
3. Chen YM, Ho SC, Lam SS, Ho SS, Woo JL. Soy isoflavones have a favorable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: a double-blind, randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4740-7.
4. Chiechi LM, Secreto G, D'Amore M, Fanelli M, Venturelli E, Cantatore F, et al. Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial. *Maturitas* 2002; 42: 295-300.
5. Harkness L. Soy and bone. Where do we stand? *Orthop Nurs* 2004; 23: 12-7.
6. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 353-73.
7. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 4-8.
8. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53.
9. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4258-65.
10. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ,

- Jenkins NA, Labrie F, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 353–65.
11. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007; 87: 905–31.
12. Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 52.
13. McDonnell DP, Chang CY, Norris JD. Capitalizing on the complexities of estrogen receptor pharmacology in the quest for the perfect SERM. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 949: 16–35.
14. Kuiper GG, Gustafsson JA. The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 1997; 410: 87–90.
15. Hiscox S, Jiang WG. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J Cell Sci* 1999; 112 Pt 18: 3081–90.
16. Curto M, McClatchey AI, Ezrin...a metastatic determinant? *Cancer Cell* 2004; 5: 113–4.
17. Athanasopoulou A, Aroukatos P, Nakas D, Repanti M, Papadaki H, Bravou V. Decreased ezrin and paxillin expression in human urothelial bladder tumors correlate with tumor progression. *Urol Oncol* 2011.
18. Khanna C, Wan X, Bose S, Cassaday R, Olomu O, Mendoza A, et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med* 2004; 10: 182–6.
19. Hunter KW. Ezrin, a key component in tumor metastasis. *Trends Mol Med* 2004; 10: 201–4.
20. Song J, Fadiel A, Edusa V, Chen Z, So J, Sakamoto H, et al. Estradiol-induced ezrin overexpression in ovarian cancer: a new signaling domain for estrogen. *Cancer Lett* 2005; 220: 57–65.
21. Smith PM, Cowan A, Milgram SL, White BA. Tissue-specific regulation by estrogen of ezrin and ezrin/radixin/moesin-binding protein 50. *Endocrine* 2003; 22: 119–26.
22. Baeza I, De Castro NM, Giménez-Llort L, De la Fuente M. Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J Neuroimmunol* 2010; 219: 90–9.
23. Zarnani AH, Shahbazi M, Salek-Moghaddam A, Zareie M, Tavakoli M, Ghasemi J, et al. Vitamin D3 receptor is expressed in the endometrium of cycling mice throughout the estrous cycle. *Fertil Steril* 2010; 93: 2738–43.
24. Adlercreutz H, Hämäläinen E, Gorbach S, Goldin B. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. *Lancet* 1992; 339: 1233.
25. Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Atteritano M, et al. Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 839–47.
26. Roach VJ, Cheung TF, Chung TK, Hjelm NM, Waring MA, Loong EP, et al. Phytoestrogens: dietary intake and excretion in postmenopausal Chinese women. *Climacteric* 1998; 1: 290–5.
27. Pan Y, Anthony MS, Binns M, Clarkson TB. A comparison of oral micronized estradiol with soy phytoestrogen effects on tail skin temperatures of ovariectomized rats. *Menopause* 2001; 8: 171–4.
28. Lu LJ, Tice JA, Bellino FL. Phytoestrogens and healthy aging: gaps in knowledge. A workshop report. *Menopause* 2001; 8: 157–70.
29. Song AR. A study on management of menopause of climacteric women. *J Korean Soc Menopause* 1997; 3: 140–60.
30. Knight DC, Howes JB, Eden JA, Howes LG. Effects on menopausal symptoms and acceptability of isoflavone-containing soy powder dietary supplementation. *Climacteric* 2001; 4: 13–8.
31. Lee SK. Study on the impact of isoflavone in hormonal profiles during the menstrual cycle and in the postmenopausal parameters in Korean women [Doctoral Dissertation]. Seoul: Yonsei University; 2001.
32. Adams MR, Golden DL, Register TC, Anthony MS, Hodgins JB, Maeda N, et al. The atheroprotective effect of dietary soy isoflavones in apolipoprotein E-/- mice requires the presence of estrogen receptor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1859–64.
33. Lichtenstein AH. Approaches to reducing cardiovascular disease risk: food or pills? *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 1–3.
34. Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 844–52.
35. Francis RM, Boyle IT, Moniz C, Sutcliffe AM, Davis BS, Beastall GH, et al. A comparison of the effects of alfacalcidol treatment and vitamin D2 supplementation on calcium absorption in elderly women with vertebral fractures. *Osteoporos Int* 1996; 6: 284–90.
36. Yildirim B, Kaleli B, Düzcan E, Topuz O. The effects of postmenopausal vitamin D treatment on vaginal atrophy. *Maturitas* 2004; 49: 334–7.
37. Somjen D, Kohen F, Gayer B, Knoll E, Limor R, Baz M, et al. A non-calcemic vitamin D analog modulates both nuclear and putative membranous estrogen receptors in cultured human vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89–90: 397–9.

38. Nashold FE, Spach KM, Spanier JA, Hayes CE. Estrogen controls vitamin D3-mediated resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling vitamin D3 metabolism and receptor expression. *J Immunol* 2009; 183: 3672-81.
39. Cavallini A, Dinaro E, Giocolano A, Caringella AM, Ferreri R, Tutino V, et al. Estrogen receptor (ER) and ER-related receptor expression in normal and atrophic human vagina. *Maturitas* 2008; 59: 219-25.

## 국문초록

**연구목적:** 식물성 에스트로겐이 포함된 두류 섭취는 폐경 증상 완화에 효과가 있다. 하지만 이런 효과가 어떻게 일어나는지는 명확하지 않다. 본 연구는 폐경 쥐 모델에서 폐경 후 변화에 두류가 미치는 영향을 살펴보았다.

**연구재료 및 방법:** Female Sprague-Dawley rats 16마리를 이용하였다. 3마리는 Sham operation을 시행하여 대조군으로 사용하였고, 13마리는 양쪽 난소절제술을 시행하였다. Sham군에게는 AIN-93M diet (n = 3)를 공급하였고, 난소 절제 한 rat을 세군으로 나누어 두류가 포함된 실험 식이를 공급하였다. 각 군마다 다른 실험 식이를 공급하고, 10주간 사육하였다. 마지막 주에 sacrifice하여 자궁을 적출하고 무게를 측정하였다. 적출한 자궁에서 비타민 D 수용체 (vitamin D receptor, VDR), 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor, ER)  $\beta$ , ezrin의 발현을 면역조직화학염색을 통해 확인해 보았다.

**결과:** VDR은 폐경상태와 관계없이 자궁내에서 뚜렷하게 발현하였다. 오히려 난소를 절제한 군에서 VDR이 더 뚜렷하게 발현하고 있었다. ER  $\beta$ 의 발현은 차이가 없었다. 하지만 녹두가 포함된 식이를 제공한 군에서 ezrin의 발현이 증가해 있었다 ( $P = 0.044$ ).

**결론:** 이번 연구는 향후 두류 섭취로 인한 폐경 증상 완화 치료의 가능성을 분자생물학적인 관점에서 살펴보았다는데 의의가 있다. 하지만 VDR, ER  $\beta$  그리고 ezrin의 폐경 후 자궁에서의 역할에 대한 자세한 기전을 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

**중심단어:** 폐경, 비타민 D 수용체, 자궁