

생쥐에 있어서 성주기와 착상전 임신기간 중 Cytochrome P-450의 변화

이화여자대학교 의과대학

함윤애 · 김성례 · 홍영숙 · 성낙응

= Abstract =

Effect of Estrous Cycle and Preimplantation on Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 Levels in Mice

Y.A. Ham, S.R. Kim, Y.S. Hong, N.E. Sung

Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University

Cytochrome P-450 is sometimes called the microsomal carbon monoxide-binding pigment. It is present in the microsomal fraction of several animal tissues, and also in the mitochondrial fraction of adrenal cortex, but not in the mitochondria of other tissues. Cytochrome P-450, the liver microsomal drugmetabolizing enzyme is membrane-bound and fraction as multicomponent electron transport system for the metabolism of a variety of endogenous substrates (such as steroids, fatty acids, and bile acids) and exogenous substances (such as drugs, carcinogens, insecticides, and many other foreign compounds).

The effect of estrous cycle and preimplantation on the levels of hepatic microsomal cytochrome P-450 in mice were determined.

In effect of estrous cycle on microsomal cytochrome P-450 level, the most increment was at estrus. The content of cytochrome P-450 was increased significantly at pregnant Day 3 of preimplantation.

서 론

근래에 와서 사람을 포함한 포유동물의 생식주기는 뇌하수체호르몬과 생식소호르몬의 조화있는 분비와 작용에 의하여 조절되며, 특히 난소호르몬은 배아의 착상, 임신 유지 그리고 분만을 위한 환경여건을 갖추는데 필요한 필수호르몬으로 알려져 있으나 이 호르몬의 작용기전에 관해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 그리하여 이를 밝히려는 많은 연구가 진행되어, 발정주기(estrous cycle)에 따른 자궁조직의 미세구조¹⁾, 분비기능의 변화²⁾³⁾⁴⁾,

생식 수관내 분비액의 성분분석을 통하여 효소를 포함한 단백질, 그밖의 화학물질도 변화한다는 것⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾이 밝혀졌다.

한편 뇌하수체에서 분비되는 생식선자극호르몬의 영향을 받으면 난소내에서 여포세포들이 성숙되어 난자의 성숙을 유도, 배란시키며 난소내 estrogen 분비가 일어난다. 이때 자궁(follicular or proliferative phase)은 esithelial cell의 크기, ciliated cell의 수가 증가하며 lipid가 축적되고⁹⁾ epithelial cell과 stroma cell의 mitosis¹⁰⁾, 세포내 미세구조¹¹⁾, 자궁 분비액¹²⁾등이 현저히 증가하게 된다. 또 한편 뇌하수체호르몬의 영향은

받은 male rat에서 testicle의 microsomal cytochrome P-450의 activity가 증가한다는 보고¹³⁾가 있다. 이 cytochrome P-450은 hepatic micromal monooxygenase system의 terminal oxidase로 식이와 영양소, 체내 홀몬변화에 영향을 받으며¹⁴⁾¹⁵⁾ 스테로이드홀몬, 발암물질, 약물 또는 지방산등이 이 효소의 기질로 작용하는 것으로¹⁶⁾ 알려져 있다.

위의 사실로 미루어 스테로이드홀몬이 가장 많이 증가하며, 세포 분열이 왕성한 착상전 임신 제 4일까지의 cytochrome P-450의 변화, 그리고 이들 변화와 스테로이드홀몬 및 생식주기와 임신조절과의 관계를 밝히고자 본 실험을 시도하였다.

실험재료 및 실험방법

A. 실험동물 : 성주기(estrous cycle) 별로 cytochrome P-450의 변화를 관찰하기 위한 실험동물로 생후 2개월 된 A-strain 생쥐 체중 25~30g 되는 암컷을 사용하였다. 생쥐는 성주기가 정확한 것만 택하여 발정전기(proestrus), 발정기(estrus), 발정간기(metestrus), 발정후기(diestrus)로 분류하여 각 성주기당 네 마리씩 사용하였다. 착상전 임신기간의 cytochrome P-450의 변화를 관찰하기 위한 실험군으로는 성주기를 동시화(synchronizing)시키기 위하여 Pregnant mare serum(PMS, sigma) 5IU를 복강주사한 후 44~48시간 후에 Human chorionic gonadotrophin(HCG, sigma) 5IU를 복강주사하고 수정 능력이 있는 수컷과 동서시켰다. 임신 여부는 그 다음날 아침 질전 유무를 조사하여 질전이 있는 암컷(임신 제 1일)은 임신된 실험군, 질전이 없는 암컷은 임신이 안된 대조군으로 각각 사용하였다. 착상 준비기간 동안 cytochrome P-450의 활성을 측정하기 위해 임신 제 1일(Day 1), 임신 제 2일(Day 2), 임신 제 3일(Day 3), 임신 제 4일(Day 4)에 경추파열로 희생시킨 후 간조직을 적출하였다.

B. Microsomal fraction 분리 : 적출한 간조직을 ice-cold 0.25M-sucrose 용액으로 2번 씻은 후 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 25% homogenate 용액을 만들었다. 이 homogenate 용액을 centrifuge (Damon model IEC B-20A)를 사용하여 15,000×g에서 20분 동안 원심분리 시키고 상층액을 다시 15,000×g에서 10분 원심분리 시킨 다음 상층액을 ultracentrifuge(Beckman model L5-50)를 사용하여 105,000×g에서 1시간 원심분리 시켰다. 원심분리가 끝난 후 침전물을 0.25M-sucrose 용액으로 2~3회 씻어 준 다음 0.25M-sucrose 용액을 사용하여 1g/1ml가 되게 hom-

ogenate 용액을 만들어 사용하였다.

C. Microsomal cytochrome P-450과 protein 측정 방법 : microsomal cytochrome P-450 측정은 Omura와 Sato¹⁷⁾ 방법에 의하였고 protein은 Lowry¹⁸⁾ 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 성주기별로 본 cytochrome P-450의 변화 : 성주기별로 cytochrome P-450의 활성을 보면 Table 1과 같이 발정기(estrus)에 활성이 가장 높게 나타났다가 이 시기는 여포자극홀몬(FSH)의 영향을 받아 난소내 여포세포가 성숙되고 여포의 과립세포에서 estrogen이 분비되어 혈액 중 estrogen 농도가 가장 높은 시기이며, 이 estrogen이 뇌하수체에 자극을 주어 황체형성홀몬(LH)을 분비하여 배란이 일어나게 된다. 이러한 홀몬 변화는 자궁조직에도 영향을 주어 자궁 endometrium의 epithelial cell의 크기, ciliated cell의 수가 증가하며 endometrium에 lipid 축적이 일어남⁹⁾과 동시에 stroma cell의 mitosis¹⁰⁾, 자궁분비액¹²⁾의 현저한 증가현상이 나타난다. 이러한 변화에 의하여 cytochrome P-450의 활성을 높여주는 기질이 증가하게 되므로 다른 어떤 성주기보다 cytochrome P-450의 활성이 크게 증가한 것으로 생각되며, 뇌하수체홀몬의 영향을 받은 male rat에서 cytochrome P-450의 활성이 증가했다는 보고¹³⁾와 일치하는 결과라고 생각된다.

발정간기(metestrus)에는 cytochrome P-450의 활성이 감소하는 것을 관찰하였다. Matin등¹⁹⁾은 생쥐에서 배란 직후에는 progesterone이 분비되지 않는다고 했으며, Horrel등²⁰⁾은 토끼에서 배란 후 며칠동안은 progesterone 농도가 증가하지 않았다고 보고하였다. 또 사람에게서 배란 직후에는 estrogen이 현저히 감소한다는 Somerville²¹⁾의 보고 등으로 미루어 보아 이 시기는 배란 직후가 되어 홀몬 분비가 감소하므로 cytochrome P-450의 활성이 감소하는 것으로 생각된다.

다음 발정후기(diestrus)에는 cytochrome P-450의 활성이 발정간기보다 증가현상을 보이고 있다. 이 시기에는 난소 내에서 배란된 여포세포가 황체화되어 progesterone 분비가 왕성해지며 또한 estrogen이 이차적으로 증가하는 시기이므로 발정간기보다 cytochrome P-450의 활성이 증가한 것으로 생각된다.

발정전기(proestrus)에는 cytochrome P-450의 활성이 다시 감소함을 나타내고 있다. 발정전기에는 난소가 수정되지 않은 경우, 황체화되어 proestrogen을 분

Table 1. Effect of estrous cycle on microsomal cytochrome P-450 levels

Estrous cycle	Cytochrome P-450 (nmole/0.1ml liver microsomes)	Cytochrome P-450 (n mole)/1mg protein
Proestrus	2.93±0.30	0.065±0.006
Estrus	5.27±1.04	0.096±0.018
Metestrus	4.23±0.08	0.069±0.013
Diestrus	2.82±0.32	0.077±0.010

비하던 여포세포가 퇴화한다. 그리고 발정기 준비단계로 미성숙 상태에 있던 여포세포들이 다시 성장하기 시작하므로 estrogen만 분비되며, 자궁 역시 증식하기 시작하는 early proliferative stage이므로 cytochrome P-450의 활성이 감소하는 것으로 생각된다.

2. 착상전 임신기간 중 cytochrome P-450의 변화

착상전 임신기간 중 cytochrome P-450의 변화는 Table 2와 같이 임신 일수가 증가함에 따라 효소의 활성이 증가하여 임신 제 3일에 가장 높았고 임신 제 4일에는 다시 떨어졌다. 임신 제 1일에는 수정된 난자가 수란관 상부(ampulla)에 있으며 2~4 세포기 배아로 분화하고 임신 제 2일에는 8~16 세포기 배아로 분화한다. 임신 제 3일은 상실배(morula)가 되며 이때 비로소 자궁에 들어가게 된다. 그리고 임신 제 4일이 되면 포배(blastula)가 되며 자궁에 착상하게 된다. 이와같이 수정된 배아가 분화를 하며 자궁에 도달하게 될 동안 자궁조직에는 현저한 변화가 일어나게 된다. 특히 임신 제 3일에 배아가 자궁에 이르게 되면 endometrium의 epithelial cell, ciliated cell, stroma cell 등이 활발히 분열을 시작하고 uterine lumen의 단백질 양이 증가한다²²⁾²³⁾. 또한 생쥐에서 교배 후 93시간 내에 embryonic metabolism이 현저히 증가하는데 이것은 자궁내 어떤 macromolecules의 존재에 의해 조절

Table 2. Effect of preimplantation on microsomal cytochrome P-450 levels

	Cytochrome P-450 (nmole/0.1ml liver microsomes)	Cytochrome P-450 (nmole)/Protein (mg)
Control(non-pregnant)	2.47±0.82	0.113±0.051
Pregnant		
Day 1	2.18±0.57	0.115±0.101
Day 2	3.02±0.24	0.112±0.039
Day 3*	4.38±1.53	0.189±0.067
Day 4	3.30±0.52	0.115±0.017

* Statically significant(P<0.001) against control group.

된다고 보고하였다²⁴⁾²⁵⁾. 이와같이 임신 제 3일은 자궁과 배아의 대사활동이 활발하게 일어나는 시기이므로 cytochrome P-450의 활성이 크게 증가한 것으로 생각된다.

그러나 임신 제 4일은 착상이 일어나는 시기이나 cytochrome P-450의 활성이 대조군과 같게 나타난 것은 이미 자궁내 환경이 착상시킬 준비를 끝냈으므로 cytochrome P-450의 활성이 더 이상 증가하지 않은 것으로 생각된다.

이상의 결과로 성주기 및 임신기간 중 cytochrome P-450의 활성은 estrogen, 뇌하수체출몰과 밀접한 관계가 있다고 사료된다.

—References—

- 1) Tachi, C., Tachi, S. and Linder, H.R.: Modification by progesterone of oestradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis, and oestradiol distribution in the rat uterus. *J. Reprod. Fert.* 31, 59—76, 1972.
- 2) Finn C.A. and J.R. Hincliffe: Histological and histochemical analysis of the formation of implantation chambers in the mouse uterus. *J. Reprod. Fert.* 9, 301—309, 1965.
- 3) Nisson, O.: Correlation of structure to function of the luminal cell surface in the uterine epithelium of mouse and man. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 56, 803—808, 1962.
- 4) Smith, D.M. and J.D. Biggers: The estrogen requirement for implantation and the effect of its does on the implantation response in the mouse. *J. Endocrin.* 41, 17—29, 1968.
- 5) Aldeen, K.A.M.: The influence of oestrogen and proesterone on the distribution of alkaline phosphatase in the mouse uterine endometrium. *J. Endocrin.* 46, 406, 1970.
- 6) David, A., B.G. Brachett, C.R. Gascia and L. Mastroianni, Jr.: Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the fallopian tube. *J. Reprod. Fert.* 19, 285—293, 1969.
- 7) Iritani, A., Nishikawa, Y., W.R. Gomes and N.L. VanDemark: Secretion rate and chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits. *J. Anim. Sci.*, 33, 829—838, 1971.
- 8) Lutwak-Mann, C.: The rabbit blastocyst and

- its environment; Physiology and biochemical aspects. In the Biology of the Blastocyst. Ed. R.J. Blandau, Univ. of Chicago press, Chicago and London, pp243—260, 1971.
- 9) Gompell: Structure fine des mitochondries de la cellule glandulaire endometriale humaine au cours du cycle menstruel. *J. Microsc.* 3, 427—436, 1964.
 - 10) Noyes, R.W., Hertig, A.T. and Rock, J.: Dating the endometrial biopsy. *Fert. Steril.* 1, 3—25, 1950.
 - 11) Cavazos, F. and Lucas, F.V.: Giant lysosomes and their associated structure in the normal human endometrium. *Amer. J. Obst. Gynec.* 106, 434—446, 1970.
 - 12) Long, J.A. and Evans, H.M.: The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.* 6 ; 1—148, 1922.
 - 13) Raymond, H. Menard, S.A. Latif, and John L. Purvis: The intratesticular localization of Cytochrome P-450 and cytochrome P-450-dependent enzymes in the rat testis. *Endo.* 97, 1587, 1975.
 - 14) Conney, H: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.*, 19, 317—364, 1967.
 - 15) Miller, O.N.: Nutrition and drug metabolism. *Fed. Proceedings*, 35, 13, 2459—2485, 1976.
 - 16) C. Heidelberger: Chemical carcinogenesis *Ann. Rev. Biochem.* 44, 79, 1975.
 - 17) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 237, 1964.
 - 18) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
 - 19) Mortin, L., Finn, C.A. and Trinder, G.: Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study. *J. Endocr.* 56, 133—144, 1973.
 - 20) Horrel, E., Major, P.W., Kilpatrick, R. and Smith, B.M.: Progestational steroids during pseudo-pregnancy in the rabbit. *J. Endocr.* 55, 89—96, 1972.
 - 21) Somerville, B.W.: Daily variations in plasma levels of progesterone and oestradiol throughout the menstrual cycle. *Amer. J. Obst. Gynec.* 111, 419—426, 1971.
 - 22) Surani, M.A.H.: Uterine luminal proteins at the time of implantation in Rats. *J. Reprod. Fert.* 48, 141—145, 1976.
 - 23) Pratt, H.P.M: Uterine proteins and the activation of embryos from mice during delayed implantation. *J. Reprod. Fert.* 50, 1—8, 1977.
 - 24) McLaren, A: "Blastocyst activation" in Regulation of mammalian. *Reprod. Eds.* S.J. Segal, R. Crozier, P.A. Corfman and P.G. Concliffe, C.C. Thomas, Springfield, Illinois, p.321—328, 1973.
 - 25) Finn, C.A. and McLaren, A.: A Study of the early stage of implantation in mice. *J. Reprod. Fert.* 13, 259—267, 1967.