

# 흰쥐에 있어서 LY-117018 및 Tamoxifen이 생식기관에 미치는 영향

서울대학교 수의과대학 생리학교실

박 경 식 · 권 종 국

— Abstract —

## Effects of LY-117018 and Tamoxifen on Reproductive Organ in Rats

Kyoung-Sik Park and Jong-Kuk Kwun

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

This study was carried out to investigate the effects of the antiestrogens, LY-117018 and tamoxifen on reproductive organ of ovariectomized immature rats and also to elucidate the mechanism of action of said compounds by bioassay.

Each of LY-117018, tamoxifen and estradiol-17 $\beta$  was administered to ovariectomized immature rats at various dose levels. Forty hours after drug administration, tested rats were sacrificed and uterine wet weight, DNA and RNA contents in uterine and liver tissues were investigated. At the same time, uterine wet weight was also investigated with some other rats treated with 125 $\mu$ g of LY-117018 together with increasing doses of tamoxifen.

Ovariectomized immature rats given 25 $\mu$ g single dose of each drug were sacrificed on Day 1, 2, 3, 4, and 5 after drug administration and uterine was weighed to estimate the duration of action of LY-117018 and tamoxifen.

The results were summarized as follows:

1. The administration of LY-117018 or tamoxifen to ovariectomized rats increased uterine wet weight and DNA and RNA contents in uterine tissues with more increase in tamoxifen groups, but no significant differences between groups treated at dose levels of 5 $\mu$ g or more of both drugs were observed. Estradiol-17 $\beta$  groups showed significant increases in each group ( $P < 0.01$ ).
2. The administration of LY-117018 or tamoxifen to each group significantly increased DNA and RNA contents in liver tissues with more increase in tamoxifen groups. Estradiol-17 $\beta$  groups showed no significant differences between treatment groups of 5 $\mu$ g or more.
3. Treatment with 125 $\mu$ g of LY-117018 together with various doses of tamoxifen resulted in more increase of uterine wet weight than treatment with a single dose of LY-117018 or tamoxifen.
4. Treatment with 0.2 $\mu$ g of LY-117018 or tamoxifen in ovariectomized rats decreased uterine wet weight, DNA and RNA contents in liver and uterine tissues compared with ovariectomized control.
5. The duration of effective action of LY-117018 and tamoxifen was 4 days or more.
6. There was significant difference ( $P < 0.001$ ) in uterine wet weight between Day 9 after ovariectomy (two days after LY-117018 or tamoxifen treatment) and Day 10 (63.7 $\pm$ 3.5mg, 39.2 $\pm$ 9.9mg, respectively).

### 서 론

Harper와 Walpole(1967)은 임신한 흰쥐와 생쥐

에 tamoxifen을 투여한 결과, 수정란 착상의 실패, 질상피세포의 각질화 방지, 자궁 무게의 증가 억제 등과 같은 강한 antiestrogen 작용이 있음을 알았다. 또한 tamoxifen은 동물에 따라서 효과가 상이하여

생쥐에서는 estrogen과 유사한 성질이 있고(Martin과 Finn, 1968; Terenius, 1971; Korach와 Ford, 1978; Korach, 1979), 병아리의 난관에서는 estrogen 길항제로 작용하기 때문에(Sutherland 등, 1977) tamoxifen의 작용에 대한 일관성 있는 설명은 어려웠던 까닭에 antiestrogen의 작용기전에 관한 연구가 활발히 진행되는 계기가 되었다.

한편, antiestrogen은 일반적으로 estrogen과 estrogen 수용체에 대하여 경쟁적으로 결합하므로써 antiestrogen 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Terenius, 1971; Rochefort 등, 1972; Jordan 등, 1977A, 1977B; Katzenellenbogen 등, 1978; Rochefort와 Borgna, 1981; Lazier와 Jordan, 1982). 그러나 tamoxifen은 estrogen 수용체가 존재하지 아니하는 화학적으로 안정된 배지에서도 효과적임을 Lippman 등(1976)은 보고하였고, Furr 등(1979)도 estrogen 수용체가 한정된 환자의 13%가 tamoxifen에 반응함을 관찰 보고하였다. 또한 핵에 estrogen-수용체 복합체와는 다른 antiestrogen-estrogen 수용체 복합체를 받아들이는 부위가 존재한다는 주장(Ruh와 Baudendistel, 1977)과 antiestrogen에 의한 estrogen 수용체의 핵내 전이는 estrogen에 의한 estrogen 수용체의 핵내 전이와는 다른 효과를 유발함에 의한다고 보고(Rochefort 등, 1979) 등도 있다. 근래에는 estrogen 수용체 불활성화에 의한 estrogen의 가역반응 방해이론(Robertson 등, 1981), antiestrogen의 세포별 반응차이론(McCormack과 Glasser, 1980; Markaverich 등, 1981) 등의 연구도 있다. 그러나 최근에 estrogen 수용체와는 다른 antiestrogen 결합부위의 존재를 주장하여 이것과 antiestrogen의 작용을 관련시켜서 설명하려는 보고가 대두되었다(Sutherland와 Foo, 1979; Sutherland 등, 1980; Faye 등, 1980; Gulino와 Pasqualini, 1982; Wincker 등, 1983; Welsh 등, 1984). Black과 Goode(1980, 1981)는 흰쥐에 그들이 합성한 새로운 antiestrogen인 LY-117018을 tamoxifen과 동시에 투여한 결과, LY-117018은 estrogen 수용체에 대하여 tamoxifen보다도 훨씬 친화성이 강함에도 불구하고 tamoxifen의 uterine weight 증가 효과를 억제하지 못함을 발견하였다. 그 결과를 토대로 antiestrogen의 작용기전을 estrogen 수용체제 내에서만 설명하려는 기존 이론에 이의를 제기하였다.

위에 기술된 여러 연구보고에서 살펴 본 바와 같이 각 동물에 있어서 antiestrogen의 효과, 그리고 antiestrogen의 작용기전과 관련하여 상당한 논란이 있어 왔다. 본 실험에서는 난소를 절제한 미성숙 흰쥐에 antiestrogen인 LY-117018과 tamoxifen을

단독 또는 복합투여한 후 자궁의 무게, 자궁 및 간장의 DNA 및 RNA 함량을 측정하고, 이들 약제들의 작용 지속시간등을 생물학적으로 상호 비교분석하여 미성숙 난소 절제된 흰쥐의 생식기에 있어서 이들 약제들의 효과를 조사함과 아울러 근래 논란이 되고있는 antiestrogen 결합부위의 존재를 확인하고 이것의 역할을 밝혀내고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

체중 50~70g의 22일령 미성숙 Sprague-Dawley 품종 흰쥐 암컷 440마리를 실험에 사용하였다. 이들은 본 대학 실험실 환경에 적응시켰으며, 실험개시 7일전부터 각 군당 10마리씩 대조군과 처리군으로 구분하여 1개의 사육장에 10마리씩 배치하였고, 실험동물용 표준펠렛사료(삼양사)와 물을 자유급식시켰다. 실험실 온도는  $23 \pm 5^\circ\text{C}$ 로 유지시켰다.

### 난소 절제 수술

Ketamine(유한양행)을 마리당 0.1~0.15ml(5~7.5 mg)씩 복강내에 주사하여 전마취시킨 후 난소 절제수술에 임하도록 하였다. 적출부위는 요추 부위를 1cm 절개하여 피부와 근육을 분리하고 최후 늑골 뒤에서 양측을 절개하여 난소와 난관을 결찰한 후 난소를 절제하였다(Waynforth, 1980).

### 시 약

Estradiol-17 $\beta$ (Sigma 사), DNA(Salmon testis, Sigma 사), tamoxifen(1-(4- $\beta$ -dimethylamino-ethoxyphenyl)-1, 2-diphenylbut-1-ene)(I. C. I 사), LY-117018(6-hydroxy-2-(p-hydroxyphenyl)-benzo-(b)thien-3-yl-p-(2-(1-pyrrolidinyl) ethoxyphenyl ketone)(Eli Lilly research laboratory), glacial acetic acid, diphenylamine, trichloroacetic acid(Hayashi 사), 그리고 ethanol 및 염산, 황산등은 시약급을 사용하였다. 또한 완충액은 Tris-EDTA buffer (Ph; 7.4)를 사용하였다.

### 약물투여

낙화생 기름 0.1ml 중에 각 약제 함량을 0.2, 1, 5, 25, 125. 그리고 625 $\mu\text{g}$  농도가 되도록 하여 투여하였으며, 작용 지속시간 측정은 각 약제를 25 $\mu\text{g}$ 씩 적용하였다. 대조군은 낙화생 기름만 마리당 0.1ml 피하주사하였다.

### 자궁무게 측정 및 간장적출

**Table 1.** Effects of LY-117018, tamoxifen and estradiol-17 $\beta$  on uterine wet weight in ovariectomized immature rats (mg, mean  $\pm$  S.D.)

Treatment	No. of rats	Dose ( $\mu$ g/rat)					
		0.2	1	5	25	125	625
LY-117018	10	44.7 $\pm$ 5.8 <sup>a)</sup>	56.8 $\pm$ 5.4	62.5 $\pm$ 5.1 <sup>a)</sup>	67.7 $\pm$ 11.8 <sup>a)</sup>	79.2 $\pm$ 10.2	65.0 $\pm$ 11.5
Tamoxifen	10	48.0 $\pm$ 6.4 <sup>b)</sup>	64.7 $\pm$ 6.1	89.2 $\pm$ 12.5 <sup>b)</sup>	94.2 $\pm$ 11.2 <sup>a,c)</sup>	101.9 $\pm$ 10.6 <sup>a,c)</sup>	109.3 $\pm$ 16.0 <sup>c)</sup>
Estradiol-17 $\beta$	10	75.5 $\pm$ 4.8 <sup>a)</sup>	84.0 $\pm$ 4.5	96.3 $\pm$ 2.6	109.0 $\pm$ 6.1	129.7 $\pm$ 11.2	135.0 $\pm$ 7.7

Uterine wet weight was checked 40 hours after treatment with the compounds and mean uterine wet weight of ovariectomized control rats was 58.0  $\pm$  2.2mg.

<sup>a)</sup> P < 0.001 vs. related controls(40h).

<sup>b)</sup> P < 0.01 vs. related controls(40h).

<sup>c)</sup> a, a, c) No significant difference each other.

난소절제 1주일후 약물을 투여하였으며, 자궁무게 및 DNA, RNA 측정용으로 투여 40시간만에, 작용 지속시간 측정용으로는 1, 2, 3, 4, 5일째 각 실험군에서 10마리씩 희생시켜, 3분 이내에 간장과 자궁을 채취하였다. 채취한 자궁은 즉시 중량을 측정하였고, 간장과 자궁은 DNA 및 RNA 함량 측정을 위하여 질소 냉동기에 보관하였다.

#### DNA 및 RNA의 정량

DNA, RNA 함량은 자궁과 간장을 잘게 절편으로 만들어 각 시료에 Tris-EDTA 완충액(Ph; 7.4)을 넣어 glass homogenizer(Con-Torque, Eberbach)로 0°C~4°C의 온도를 유지하면서 15초간 마쇄하고 10초간 쉬는 방법으로 반복하여 균질화하였다. DNA와 RNA는 Schneider법(1953)으로 정량하였다.

1ml의 분석시료에 10% TCA 2.5ml를 가하고 4°C에서 1시간 동안 방치시킨 후 4,000g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 따로 모으고 그 침전물에 20% TCA 2.5ml를 넣고 교반후 위의 과정을 반복하였다. 얻은 침전물 및 분리한 상층액에 대하여 95% ethanol 5ml를 각각 가하고 질소냉동기에서 하룻밤을 방치시킨 후 두 용액을 합하여 8,000g에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 침전물에 5% TCA 2ml를 가한 후 95°C 수조에서 15분간 가온하고 다시 원심분리하여 상층액 각 1ml를 취하여 DNA정량을 위하여는 diphenylamine용액을, RNA정량을 위해서는 orcinol용액을 별도로 처방하여 각 3ml씩 가하고 교반한 후 끓는 물에서 20분간 처리하고 실온에서 서서히 식힌 후 spectrophotometer(Beckman DU-8-B)를 이용하여 DNA 측정은 600nm에서, RNA 측정은 670nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### LY-117018 및 tamoxifen의 작용지속시간 측정

난소 절제수술을 받은 후 7일된 미성숙 원쥐에 LY-117018 및 tamoxifen을 마리당 각각 25 $\mu$ g씩 미하주사한 후 1, 2, 3, 4 및 5일에 희생시켜 자궁의 무게를 측정하였다.

#### 통계 처리

본 실험에서 얻은 성적은 t-검정과 t-검정으로 처리하였다.

#### 결 과

난소 절제된 원쥐에서 LY-117018, tamoxifen 및 estradiol-17 $\beta$ 의 투여농도에 따른 자궁무게의 변화.

**Table 2.** Effects of LY-117018, Tamoxifen and estradiol-17 $\beta$  on DNA and RNA contents in uterine tissues of ovariectomized immature rats( $\mu$ g/uterus, mean $\pm$ S.D.)

Treatment	No. of rats	Dose( $\mu$ g/rat)					
		0.2		1		5	
		DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA
LY-117018	10	171 $\pm$ 14 <sup>a)</sup>	351 $\pm$ 53 <sup>a)</sup>	191 $\pm$ 18	613 $\pm$ 34	230 $\pm$ 37	943 $\pm$ 33
Tamoxifen	10	209 $\pm$ 10 <sup>a)</sup>	460 $\pm$ 29	276 $\pm$ 17	808 $\pm$ 62	345 $\pm$ 32 <sup>b)</sup>	1,483 $\pm$ 75
Estradiol-11 $\beta$	10	270 $\pm$ 12 <sup>a)</sup>	648 $\pm$ 18 <sup>a)</sup>	330 $\pm$ 21	990 $\pm$ 30	432 $\pm$ 23	1,814 $\pm$ 46

Treatment	No. of rats	Dose( $\mu$ g/rat)					
		25		125		625	
		DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA
LY-117018	10	280 $\pm$ 17	1,288 $\pm$ 18	300 $\pm$ 13	1,200 $\pm$ 35	316 $\pm$ 18	1,264 $\pm$ 32
Tamoxifen	10	367 $\pm$ 23 <sup>b)</sup>	1,553 $\pm$ 47 <sup>b)</sup>	387 $\pm$ 11 <sup>c)</sup>	1,548 $\pm$ 43 <sup>d, e)</sup>	392 $\pm$ 32 <sup>c)</sup>	1,521 $\pm$ 35 <sup>e)</sup>
Estradiol-17 $\beta$	10	429 $\pm$ 13	1,867 $\pm$ 14	471 $\pm$ 11	2,119 $\pm$ 25	492 $\pm$ 8	2,263 $\pm$ 39

DNA and RNA contents in uterine tissues were checked 40 hours after treatment with the compounds and mean DNA and RNA contents in uterine tissues of ovariectomized control rats were 236 $\pm$ 12 $\mu$ g, 472 $\pm$ 26 $\mu$ g respectively.

<sup>a)</sup> P<0.001 vs. related controls(40h).

<sup>b, c, d, e)</sup> No significant difference each other.

난소 절제된 미성숙 흰쥐에 각 약제의 투여 농도를 달리하여 피하주사 후, 40시간에 자궁을 적출하여 무게를 측정된 결과는 표 1 과 같았다.

LY-117018을 투여한 경우 최소 투여량인 0.2 $\mu$ g 투여군에 있어서는 자궁무게가 44.7 $\pm$ 5.8mg으로 난소 절제 대조군의 자궁무게 58.0 $\pm$ 2.2mg에 비하여 현저히 감소하였다(P<0.001). 투여농도 증가에 따라서 자궁무게는 평균적으로 증가하는 경향을 나타내었으나, 5 $\mu$ g과 25 $\mu$ g 그리고 625 $\mu$ g 투여군간에는 유의한 차이가 나타나지 아니하였다.

Tamoxifen을 투여한 경우에는 0.2 $\mu$ g 투여군에 있어서 자궁무게가 48.0 $\pm$ 6.4mg으로 난소 절제 대조군보다 감소하였다(P<0.01). 투여농도 증가에 따라서 자궁무게는 평균적으로 점증하는 경향을 나타내었으나 5 $\mu$ g이하에는 투여군간에 유의한 차이가 없었다.

그리고 각 처리 경우 LY-117018 투여군에 비하여 tamoxifen투여군이 자궁무게에 있어서 더 많은 증가를 나타내었다(P<0.01).

Estradiol-17 $\beta$ 를 투여한 경우에는 0.2 $\mu$ g 투여 경우 자궁무게가 75.5 $\pm$ 4.8mg으로 난소 절제 대조군보다 자궁무게가 증가하였으며(P<0.001), 투여농도가 증가함에 따라서 투여군간에 유의한 자궁무게의 증가가 있었다. 그러나 125 $\mu$ g과 625 $\mu$ g 투여군간에는 유의한 차이가 관찰되지 아니하였다.

또한 각 투여농도에 있어서 LY-117018이나 tamoxifen보다 더 많은 자궁무게의 증가가 관찰되었다

(P<0.01).

난소 절제된 흰쥐에서 LY-117018, tamoxifen 및 estradiol-17 $\beta$ 의 투여농도에 따른 자궁조직중 DNA 및 RNA 함량 변화.

난소 절제된 미성숙 흰쥐에 각 약제의 농도를 달리하여 피하주사한 후 40시간에 자궁을 적출하여 자궁조직중의 DNA 및 RNA 함량을 측정된 결과는 표 2와 같았다.

자궁조직중 DNA 함량변화에 관하여는 LY-117018을 투여한 경우 0.2 $\mu$ g 투여군에서는 자궁조직중 DNA 함량이 171 $\pm$ 14 $\mu$ g으로 난소 절제 대조군의 236 $\pm$ 12 $\mu$ g에 비하여 현저히 감소된 결과를 나타내었다(P<0.001). 그리고 투여농도가 증가함에 따라서 DNA 함량은 유의성 있게 증가하였다(P<0.05).

Tamoxifen을 투여한 경우에는 0.2 $\mu$ g 투여군에서는 자궁조직중 DNA 함량이 209 $\pm$ 10 $\mu$ g으로서 대조군의 236 $\pm$ 12 $\mu$ g에 비하여 유의하게 감소하였다(P<0.001).

그리고 투여농도를 증가시킬 때 따라 DNA 함량은 평균적으로 증가하는 경향을 보였으나, 5 $\mu$ g과 25 $\mu$ g 투여군간 그리고 125 $\mu$ g과 625 $\mu$ g 투여군간에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

또한, 각 투여농도에 있어서 tamoxifen 투여군에서 LY-117018 투여군보다 증가된 DNA 함량을 보였다(P<0.001).

Estradiol-17 $\beta$ 를 투여한 경우에는 0.2 $\mu$ g 투여군에서는 DNA 함량은 270 $\pm$ 12 $\mu$ g으로 대조군 236 $\pm$

**Table 3.** Effects of LY-117018, tamoxifen and estradiol-17 $\beta$  on DNA and RNA contents in liver tissues of ovariectomized immature rats ( $\mu\text{g}/\text{liver}$ , mean  $\pm$  S.D.)

Treatment	No. of rats	Dose ( $\mu\text{g}/\text{rat}$ )					
		0.2		1		5	
		DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA
LY-117018	10	8,001 $\pm$ 675 <sup>a)</sup>	16,002 $\pm$ 181 <sup>b)</sup>	9,182 $\pm$ 528	23,494 $\pm$ 505	10,098 $\pm$ 365 <sup>c)</sup>	36,372 $\pm$ 2,483 <sup>d)</sup>
Tamoxifen	10	8,486 $\pm$ 387	17,396 $\pm$ 341 <sup>b)</sup>	10,212 $\pm$ 688	26,259 $\pm$ 878	11,980 $\pm$ 650 <sup>e)</sup>	40,332 $\pm$ 1,318 <sup>f)</sup>
Estradiol-17 $\beta$	10	9,003 $\pm$ 1,053	19,357 $\pm$ 555	10,698 $\pm$ 566	29,831 $\pm$ 1,191	14,607 $\pm$ 2,518 <sup>g)</sup>	52,673 $\pm$ 5,990 <sup>h)</sup>
Treatment	No. of rats	Dose ( $\mu\text{g}/\text{rat}$ )					
		25		125		625	
		DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA
LY-117018	10	11,143 $\pm$ 550 <sup>c, d)</sup>	36,672 $\pm$ 643 <sup>e, f)</sup>	12,026 $\pm$ 294 <sup>g)</sup>	43,698 $\pm$ 3,210 <sup>h)</sup>	13,244 $\pm$ 672	50,327 $\pm$ 2,915
Tamoxifen	10	13,321 $\pm$ 355 <sup>c, d)</sup>	46,967 $\pm$ 1,322 <sup>e, f)</sup>	14,012 $\pm$ 326 <sup>g)</sup>	49,155 $\pm$ 899 <sup>h)</sup>	14,875 $\pm$ 422	54,962 $\pm$ 2,835
Estradiol-17 $\beta$	10	14,935 $\pm$ 2,659 <sup>c, d)</sup>	53,572 $\pm$ 4,304 <sup>e, f)</sup>	16,014 $\pm$ 2,883 <sup>g)</sup>	54,067 $\pm$ 3,658 <sup>h)</sup>	15,427 $\pm$ 2,234	56,066 $\pm$ 4,838 <sup>i)</sup>

DNA and RNA contents in the liver tissues were checked 40 hours after treatment with the compounds and mean DNA and RNA contents in liver tissues of ovariectomized control rats were 8,693  $\pm$  349  $\mu\text{g}$ , 18,256  $\pm$  291  $\mu\text{g}$  respectively.

<sup>a)</sup>  $P < 0.01$  vs. related controls(40h), <sup>b)</sup>  $P < 0.001$  vs. related controls(40h), <sup>c)</sup>  $P < 0.001$ , <sup>d)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>e)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>f)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>g)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>h)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>i)</sup>  $P < 0.01$  No significant difference each other.

12  $\mu\text{g}$ 에 비해 현저히 증가되었으며( $P < 0.001$ ). 5  $\mu\text{g}$ 과 25  $\mu\text{g}$  투여군간에 유의한 차이가 없었던 것을 제외하고는 각 투여군간에 있어서 투여농도를 증가시킴에 따라서 DNA 함량이 현저히 증가하였으며( $P < 0.001$ ), 아울러 각 투여농도에 있어서 LY-117018 또는 tamoxifen 투여 경우보다 estradiol-17 $\beta$  투여 경우 현저히 DNA 함량이 증가하였다( $P < 0.001$ ).

자궁조직중 RNA 함량의 변화에 관하여는 LY-117018을 투여한 경우 0.2  $\mu\text{g}$  투여군에서는 RNA 함량이 351  $\pm$  53  $\mu\text{g}$ 으로서 난소 절제 대조군의 472  $\pm$  26  $\mu\text{g}$ 보다 감소되었다( $P < 0.001$ ). 그리고 투여농도를 증가시킴에 따라서 RNA 함량도 증가하였으며, 각 투여군 간에는 유의한 차이가 있었다( $P < 0.01$ ).

Tamoxifen을 투여한 경우에는 0.2  $\mu\text{g}$  투여군에서는 RNA 함량이 460  $\pm$  29  $\mu\text{g}$ 으로서 대조군에 비해 유의한 차이는 없었으며, 투여농도를 증가시킴에 따라서 RNA 함량도 평균적으로 증가하였으나, 25  $\mu\text{g}$  농도와 125  $\mu\text{g}$  농도간 그리고 125  $\mu\text{g}$  농도와 625  $\mu\text{g}$  농도간에는 유의한 차이가 없었다. 또한, 각 처리농도 경우 tamoxifen 투여군이 LY-117018 투여군보다 RNA 함량이 증가되었다( $P < 0.001$ ).

Estradiol-17 $\beta$ 를 투여한 경우에는 0.2  $\mu\text{g}$  투여군에서는 RNA 함량이 648  $\pm$  18  $\mu\text{g}$ 으로 대조군보다도 현저히 증가하였으며( $P < 0.001$ ), 투여농도를 증가시킴에 따라서 RNA 함량도 증가하여 투여군간에 유의한 차이가 있었다( $P < 0.01$ ).

그리고, 각 투여농도에 있어서 LY-117018 또는 tamoxifen 투여 경우보다 estradiol-17 $\beta$  투여 경우 현저한 RNA 함량의 증가를 관찰할 수 있었다( $P < 0.001$ ).

난소 절제된 흰쥐에서 LY-117018, tamoxifen 그리고 estradiol-17 $\beta$ 의 투여농도에 따른 간장조직중의 DNA 및 RNA 함량의 변화.

난소 절제된 미성숙 흰쥐에 각 약제를 피하주사한 후 40시간에 간장을 적출하여 간장조직중의 DNA 및 RNA 함량을 측정하 결과 표 3과 같았다.

간장조직중 DNA 함량의 변화에 관하여는 LY-117018을 투여한 경우 0.2  $\mu\text{g}$  투여군에서는 DNA 함량이 8,001  $\pm$  675  $\mu\text{g}$ 으로서 대조군 8,693  $\pm$  349  $\mu\text{g}$ 에 비하여 현저한 감소가 있었으나( $P < 0.01$ ), 투여농도를 증가시킴에 따라서 각 투여군간에 유의성 있는 증가가 있었다( $P < 0.01$ ).

Tamoxifen을 투여한 경우에는 0.2  $\mu\text{g}$  투여군에서는 8,486  $\pm$  387  $\mu\text{g}$ 으로서 대조군과 비교할 때 유의한 차이는 관찰되지 아니하였고, 투여농도를 증가시킴에 따라서 각 투여군간에 유의한 증가가 관찰되었다( $P < 0.01$ ). 각 투여농도 경우 LY-117018 투여 경

Table 4. The influence of LY-117018 on uterotropic activity of tamoxifen in ovariectomized immature rats(mean±S.D.)

Treatment( $\mu\text{g}/\text{rat}$ )	No. of rats	Uterine wet weight(mg)
Intact control	10	102.3 ± 77.4
Ovariectomized control	10	58.0 ± 2.2
TAM(0 $\mu\text{g}$ )	10	79.2 ± 10.2
TAM(0.2 $\mu\text{g}$ )	10	96.4 ± 11.8
TAM(1 $\mu\text{g}$ )	10	102.7 ± 13.1
TAM(5 $\mu\text{g}$ )	10	110.7 ± 11.2
TAM(25 $\mu\text{g}$ )	10	104.5 ± 12.2
TAM(125 $\mu\text{g}$ )	10	97.3 ± 14.4

AM; tamoxifen

The test rats were dosed with LY-117018 at 125  $\mu\text{g}/\text{rat}$ .

보다 DNA 함량의 증가가 있었다.

Estradiol-17 $\beta$ 를 투여한 경우에는 0.2  $\mu\text{g}$  투여군에는 9,003 ± 1,053  $\mu\text{g}$ 으로서 대조군보다 증가된 DNA 함량을 보였으며, 5  $\mu\text{g}$  농도 이상의 투여군에 있어서는 투여군간에 유의한 차이는 관찰되지 아니하였다.

간장조직중 RNA 함량의 변화에 관하여는 LY-17018을 투여한 경우 0.2  $\mu\text{g}$  투여군에서는 RNA 함량이 16,002 ± 181  $\mu\text{g}$ 으로서 난소 절제 대조군 3,256 ± 291  $\mu\text{g}$ 과 비교할 때 유의한 감소가 인정되었고(P < 0.001) 투여농도 증가에 따라 유의한 RNA 함량의 증가가 관찰되었다(P < 0.01).

Tamoxifen을 투여한 경우에는 0.2  $\mu\text{g}$  투여군에서 17,396 ± 341  $\mu\text{g}$ 으로서 대조군보다 유의한 감소가 인정되었고(P < 0.001). 투여농도 증가에 따라서 RNA 함량의 유의한 증가가 관찰되었다(P < 0.01). 각 투여농도 경우 LY-117018 투여경우 보다 RNA 함량이 증가하였다(P < 0.01).

Estradiol-17 $\beta$ 를 투여한 경우에는 0.2  $\mu\text{g}$  투여군에서는 19,357 ± 555  $\mu\text{g}$ 으로 대조군과 비교시 유의한 증가가 인정되었고(P < 0.001). 5  $\mu\text{g}$  농도 이상 투여군에서는 투여군간에 유의한 차이가 관찰되지 아니하였다.

난소 절제된 흰쥐에서 LY-117018 과 tamoxifen 을 동시투여시 자궁무게의 변화

난소 절제된 미성숙 흰쥐에 125  $\mu\text{g}$ 의 LY-117018 후 작가 다른 농도의 tamoxifen 을 점증시키면서 동시 투여후 40시간에 적출된 자궁무게의 변화를 측정하여 표 4의 결과를 얻었다. 125  $\mu\text{g}$ 의 LY-117018 단일투여 경우에는 79.2 ± 10.2mg으로 난소 절제

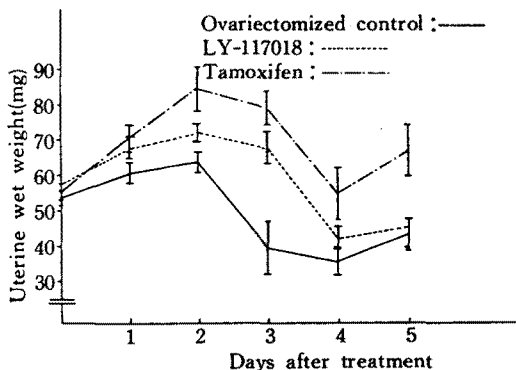


Fig. 1. Effect of LY-117018(25  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) or tamoxifen(25  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) on uterine wet weight in ovariectomized immature rats at various time. Each point represents the mean for ten observations. Vertical lines indicate standard deviation.

대조군 (58.0 ± 2.2mg)에 비하여 현저히 자궁무게가 증가하였다(P < 0.001).

125  $\mu\text{g}$ 의 LY-117018과 0.2  $\mu\text{g}$ 의 tamoxifen을 동시 투여한 경우에는 자궁무게가 96.4 ± 11.8mg으로 LY-117018만 125  $\mu\text{g}$  단독투여한 경우에 비하여 증가하였으며(P < 0.01), tamoxifen만 0.2  $\mu\text{g}$  단독 투여한 경우(48.0 ± 6.4mg)에 비하여서도 현저히 증가하였다(P < 0.001).

또한 125  $\mu\text{g}$ 의 LY-117018과 1  $\mu\text{g}$ 의 tamoxifen을 동시에 투여한 경우에도 자궁무게가 102.7 ± 13.1mg으로서 LY-117018만 125  $\mu\text{g}$ . 또는 tamoxifen만 1  $\mu\text{g}$ 을 단독투여한 경우(64.7 ± 6.1mg)에 비하여 증가하였다(P < 0.01, P < 0.001).

이러한 경향은 125  $\mu\text{g}$ 의 LY-117018과 5  $\mu\text{g}$ 의 tamoxifen을 동시에 투여한 경우에도 동일한 결과였다(P < 0.001, P < 0.01).

그러나 125  $\mu\text{g}$ 의 LY-117018과 25  $\mu\text{g}$  또는 125  $\mu\text{g}$ 의 tamoxifen을 동시에 투여한 경우(104.5 ± 12.2mg, 97.3 ± 14.4mg)에는 LY-117018만 125  $\mu\text{g}$  단일 투여 경우보다는 자궁무게의 증가를 보였으나(P < 0.001, P < 0.01), tamoxifen만 25  $\mu\text{g}$  또는 125  $\mu\text{g}$  단독 투여한 경우(94.2 ± 11.2mg, 101.9 ± 10.6mg)와 비교하여서는 유의한 차이가 없었다.

#### LY-117018 및 tamoxifen의 작용 지속시간

LY-117018 및 tamoxifen의 작용 지속시간을 간접적으로 측정하기 위하여 난소절제 미성숙 흰쥐에 25  $\mu\text{g}$ 의 LY-117018 또는 tamoxifen을 각각 투여하여 투여일로부터 1, 2, 3, 4 및 5일에 적출된 자궁무게를 측정하여 Fig. 1의 결과를 얻었다.

난소절제 대조군경우 난소절제 9일 즉, 약제처

리 2일에 자궁의 무게가  $63.7 \pm 3.5\text{mg}$ 이었고, 10일에는  $39.2 \pm 9.9\text{mg}$ 으로 9일에 비하여 현저한 자궁 무게가 감소가 관찰되었다( $P < 0.001$ ).

LY-117018 투여군 경우에는  $25\mu\text{g}$ 의 LY-117018 투여후 1일의 자궁무게는  $68.3 \pm 4.1\text{mg}$ 으로서 난소절제 대조군 ( $61.1 \pm 3.8\text{mg}$ )과 비교하여 유의한 증가가 있었다( $P < 0.001$ ). 투여후 2일에는 투여군과 대조군의 자궁무게가 각각  $71.8 \pm 3.5\text{mg}$  및  $63.7 \pm 3.5\text{mg}$ ( $P < 0.001$ ), 3일에는  $68.3 \pm 6.1\text{mg}$ 과  $39.2 \pm 9.9\text{mg}$ ( $P < 0.001$ ), 그리고 4일에는  $42.1 \pm 4.8\text{mg}$ 과  $36.7 \pm 5.8\text{mg}$ ( $P < 0.05$ )으로서 투여군이 대조군에 비하여 유의한 자궁무게의 증가를 나타내었고, 한편 5일에는 각각  $44.9 \pm 4.8\text{mg}$ 과  $42.9 \pm 6.4\text{mg}$ 으로서 투여군과 대조군간에 유의한 차이를 관찰할 수가 없었다.

Tamoxifen 투여군 경우에는 투여후 1일에 투여군과 대조군의 자궁무게는 각각  $70.7 \pm 4.8\text{mg}$  및  $61.1 \pm 3.8\text{mg}$ 이었고, 2일에는 각각  $84.6 \pm 8.0\text{mg}$  및  $63.7 \pm 3.5\text{mg}$ , 3일에는 각각  $78.6 \pm 6.4\text{mg}$  및  $39.2 \pm 9.9\text{mg}$ , 4일에는  $55.2 \pm 9.6\text{mg}$ 과  $36.7 \pm 5.8\text{mg}$ , 그리고 5일에는  $67.7 \pm 9.0\text{mg}$  및  $42.9 \pm 6.4\text{mg}$ 으로 5일까지도 tamoxifen 투여군이 대조군보다 자궁무게에 있어서 현저한 증가를 보여주었다(각 경우  $P < 0.001$ ).

## 고 찰

### LY-117018, tamoxifen 및 estradiol-17 $\beta$ 의 투여 농도에 따른 자궁무게, 자궁 및 간장조직중 DNA, RNA 함량 변화분석

Martin과 Finn(1966), Terenius(1971)등은 생쥐에 있어서 tamoxifen의 estrogen과 유사한 효과 발현을 보고한 바 있으며, Catelli등(1980), Binart등(1982)은 병아리 난관에 있어서 progesterone 존재 하에서의 tamoxifen의 estrogen과 유사한 효과에 관하여 보고하였다.

본 실험에서 난소를 제거한 미성숙 흰쥐에 LY-117018 또는 tamoxifen을 각각 단독으로 투여하여 자궁무게, 자궁 및 간장조직중의 DNA, RNA 함량을 조사하여 본 결과 두약제 모두 estrogen과 유사한 효과를 나타내었다. 그러나 자궁에 대한 반응에 있어서는 두 약제 모두 결과적으로 투여농도 증가에 따른 투여군간에 유의한 차이가 없거나, 있는 경우에도 estradiol-17 $\beta$  투여 경우와는 다른 경향을 보였다. 즉, LY-117018이나 tamoxifen을  $5\mu\text{g}$  또는  $25\mu\text{g}$ 농도 이상으로 투여한 경우에는 반응증가 추세의 둔화를 보인 반면, estradiol-17 $\beta$  투여 경

우에는 각 처리군간에 유의성 있는 차이를 보이며서 점진적으로 증가하는 경향을 보였다(Table 1, 2). 한편, 간장조직에 있어서는 LY-117018이나 tamoxifen 투여군간에 간장조직중의 DNA 및 RNA 함량이 각각 유의한 차이로 점진적인 증가를 보인 반면에 estradiol-17 $\beta$  투여 경우에는  $5\mu\text{g}$ 농도이상 투여 경우에는 각 투여군간에 유의한 차이를 보이지 아니하였다(Table 3). 그리고 복합투여 경우에는 두 약제중 어느 한 약제의 단독투여 경우보다도 평균적으로 자궁무게가 증가한 경향을 볼 수가 있었다(Table 4). 따라서 상기의 두 약제단독 또는 복합투여시 효과 발현상태, 그리고 estrogen 수용체에 대한 친화성 강도와 antiestrogen 고유의 estrogen과 유사한 효과의 강약은 무관한 것으로 나타난 본 실험결과를 고려할 때 새로운 antiestrogen 결합부위가 존재하는 것으로 생각된다. Antiestrogen 결합부위의 존재에 관한 동일의견의 다른 보고서들이 있다(Ber Brauch등 1982, Sudo등 1983, Clark등 1983, Wirneker등 1983, Murphy등 1984). 그리고 LY-117018 또는 tamoxifen의 estrogen과 유사한 효과는 바로 이 두 약제와 antiestrogen 결합 부위와의 작용에 의한 것으로 사료된다.

두 약제 복합투여 경우에 있어서 LY-117018과  $125\mu\text{g}$  투여하고 tamoxifen을  $20\mu\text{g}$  또는  $125\mu\text{g}$  복합투여한 다음 그 결과를 tamoxifen  $25\mu\text{g}$  또는  $125\mu\text{g}$  농도를 단독투여한 경우와 비교하여 볼 때 유의한 증가를 보이지 아니하였는데(Table 4). 이 경우 두 약제 복합투여시 tamoxifen 일방의 효과라고 하는 주장도 있으나(Black과 Goode, 1981), 본 실험의 결과로 보아 자궁내 antiestrogen 결합부위의 함량에 관련되는 것으로 생각된다.

난소를 절제한 미성숙 흰쥐의 자궁을 경과일별로 적출하여 무게를 측정된 결과 난소 절제후 9일과 10일간의 자궁무게가 서로 유의한 차이를 보였는데 이는 난소 제거 9일째 즉, 약제처리 2일경까지도 체내에 estrogen이 존재함을 뜻하며(Fig. 1), 이러한 결과는 다른 연구결과와도 일치하고 있다(Liddle와 Melman, 1974; Butchner등, 1974; Campbell등 1977; Hung과 Barker, 1979; Quarby등, 1982).

난소를 절제한 흰쥐에 LY-117018 또는 tamoxifen의 단독투여 실험에서 본 약제들의  $0.2\mu\text{g}$  농도 투여시에는 자궁무게, 자궁조직중 DNA 함량 그리고 간장조직중 RNA 함량이 난소 절제 대조군에서보다 감소된 추세를 보였는데 이는 난소 절제 9일까지 존재하는 체내 estrogen에 대한 본 약제들의 estrogen 길항작용을 뜻하며, estrogen 수용체 범위에서의 작용에 기인되었던 것으로 사료

다. 또한 감소 경향에 있어서 LY-117018이 tamoxifen보다도 더욱 뚜렷하였는데, estrogen 수용체에 대한 친화성이 tamoxifen보다 LY-117018이 더욱 강한 때문이었던 것으로 생각된다 (Rochefort 등, 1979).

#### LY-117018 및 tamoxifen의 작용 지속시간

기존의 estrogen 수용체계내에서 antiestrogen의 작용을 설명하려는 입장에서, estrogen에 대한 길항작용을 위하여 monohydroxytamoxifen보다 많은 양의 LY-117018이 요구되는 것은 LY-117018 효과의 지속성이 짧기 때문으로 LY-117018과 tamoxifen을 동시 투여할 때에는 tamoxifen의 estrogen과 유사한 효과를 LY-117018이 억제하지 못하게 된다는 보고가 있다 (Jordan과 Gosden, 1983). 그러나 Black과 Goode(1981)은 지속성 estrogen에 대한 LY-117018의 길항능력에 관하여 긍정적 보고를 한 바가 있다.

본 실험에서 두 약제의 작용시간을 측정하여 보았던 바 LY-117018은 투여후 4일까지 난소 절제 대조군과 비교하여 자궁무게의 유의한 차이를 보여 적어도 4일까지도 작용가능한 약제로 인정되어 (Fig. 1) 기존이론을 작용시간 차이등으로 설명하려는 이론은 본 실험결과로 보아 다소 이해하기 힘든 면이 있었다.

앞으로 antiestrogen 결합부위의 본체, estrogen 수용체와의 차이점, 그리고 흰쥐와 생쥐에 있어서 본 약제들의 각 다른 효과발현등이 본체들의 작용기전과 관련하여 더 구체적으로 구명되어야 하리라고 본다.

#### 결 론

본 실험은 난소를 절제한 미성숙 흰쥐의 생식기관에 대한 antiestrogene인 LY-117018과 tamoxifen의 효과 및 작용기전을 알아보기 위하여 수행하였다.

미성숙 난소 절제된 흰쥐에 LY-117018, tamoxifen 그리고 estradiol-17 $\beta$ 를 0.2, 1, 5, 25, 125, 및 625 $\mu$ g을 단일투여한 후 40시간만에 자궁 및 간장을 적출하여 자궁무게와 DNA, RNA 함량을 측정하였으며, 125 $\mu$ g의 LY-117018과 함께 투여량을 달리 하여 tamoxifen을 동시투여한 후 40시간에 자궁무게를 측정하였다. 그리고 난소 절제된 흰쥐에 각 약제를 25 $\mu$ g 단독 투여후 1, 2, 3, 4, 그리고 5일에 자궁을 적출하여 작용 지속시간을 측정하였다.

본 실험의 결과는 다음과 같다.

1. LY-117018 또는 tamoxifen의 투여는 자궁무게, 자궁조직중 DNA 및 RNA 함량의 증가를 일으키며, tamoxifen이 더욱 큰 증가를 일으켰으며, 두 약제 모두에 있어서 5 $\mu$ g이상의 투여 경우 각 투여군간에 대체로 유의한 차이가 없었다. Estradiol-17 $\beta$  투여 경우에는 각 투여군간에 유의한 차이로 증가하였다 ( $P < 0.001$ ).

2. LY-117018 또는 tamoxifen 투여 경우 간장조직중의 DNA 및 RNA의 함량은 각 투여군간에 유의성 있게 증가되었으며, tamoxifen의 경우 더욱 그 증가 효과가 컸다. Estradiol-17 $\beta$  투여 경우에는 5 $\mu$ g농도 이상의 투여군간에 유의한 차이는 없었다.

3. LY-117018 125 $\mu$ g에 tamoxifen 0.2, 1, 5, 25 및 125 $\mu$ g의 작용량을 동시 투여하였을 때 LY-117018 또는 tamoxifen 단독투여의 경우보다도 증가된 자궁무게가 관찰되었다.

4. 자궁무게 또는 DNA 및 RNA 함량에 있어서 0.2 $\mu$ g의 LY-117018 또는 tamoxifen을 투여한 경우에는 난소 절제된 대조군보다도 감소하였다.

5. LY-117018 및 tamoxifen의 작용 지속시간은 모두 4일 이상이였다.

6. 난소 제거 9일 (투약후 2일)에 자궁무게는 63.7  $\pm$  3.5mg으로서 10일에 39.2  $\pm$  9.9mg과는 현저한 차이가 있었다 ( $P < 0.001$ ).

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, LY-117018 또는 tamoxifen은 난소 절제된 미성숙 흰쥐에서 antiestrogenic effect 또는 estrogenic effect를 나타내었는데 estrogen 길항제로서의 작용은 estrogen 수용체에 대한 estrogen과의 경쟁적 결합에 의하고 estrogen과 유사한 작용은 estrogen 수용체와는 별개의 antiestrogen 결합부위와의 결합에 의하는 것으로 생각된다.

#### REFERENCES

- Ben-Brauch, G., Scheiber, G. and Socolovsky, M.: Cooperativity pattern in the interaction of the antiestrogen drug clomiphene with the muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.*, 21: 287-297, 1982.
- Binart, N., Mester, J., Baulieu, E.E. and Catelli, M.G.: Combined effects of progesterone and tamoxifen in the chick oviduct. *Endocrinology*, 111: 7-16, 1982.
- Black, L.J. and Goode, R.L.: Uterine bioassay of tamoxifen, trioxifene and a new estrogen antagonist (LY-117018) in rats and mice. *Life*



- Sciences*, 26:1453-1458, 1980.
- Black, L.J. and Goode, R.L.: *Evidence for biological action of the antiestrogens, LY-117018 and tamoxifen by different mechanisms. Endocrinology*, 109:987-989, 1981.
- Butchner, R.L., Colline, W.E. and Fugo, N.W.: *Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone, and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4 day estrus cycle of the rat. Endocrinology*, 94:1704-1806, 1974.
- Campbell, C.S., Schwartz, N.B. and Gorskifirlit, M.: *The role of adrenal and ovarian steroids in the control of serum LH and FSH. Endocrinology*, 101:162-173, 1977.
- Catelli, M.G., Binart, N., Elkik, F. and Baulieu, E.E.: *Effect of tamoxifen on oestradiol and progesterone-induced synthesis of ovalbumin and conalbumin in chick oviduct. Eur. J. Biochem.*, 107:165-172, 1980.
- Clark, J.H., Winneker, R.C., Guthrie, S.C. and Markaverich, B.M.: *An endogenous ligand for the triphenylethylene antiestrogen binding site. Endocrinology*, 113:1167-1169, 1983.
- Faye, J.C., Lasserre, B. and Bayard, F.: *Antiestrogen specific, high affinity saturable binding sites in rat uterine cytosol. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93:1225-1231, 1980.
- Furr, B.J., Patterson, J.S., Richardson, D.N., Slater, S.R. and Wakeling, A.L.: *Pharmacological and biochemical properties of drugs substance. American Pharmaceutical Association. Vol. 2. pp. 335-399, 1979.*
- Gulino, A. and Pasqualini, J.R.: *Heterogeneity of binding sites for tamoxifen and derivatives in estrogen target and nontarget fetal organs of guinea-pig. Cancer Res.*, 42:1913-1921, 1982.
- Harper, M.J.K. and Walpole, A.L.: *A new derivative of triphenylethylene: Effect on implantation and mode of action in rats. J. Reprod. Fertil.*, 13:101-119, 1967.
- Hung, T.T., Barker, K.L.: *Regulation of uterine responsiveness to injected estradiol in nutritionally stressed ovariectomized rats by adrenal-derived estradiol. Endocrinology*, 104:1608-1616, 1979.
- Jordan, V.C., Collins, M.M., Rowsby, L. and Prestwich, G.: *A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antiestrogenic activity. J. Endocrinol.*, 75:305-316, 1977A.
- Jordan, V.C., Dix, C.J., Rowsby, L. and Prestwich, G.: *Studies on the mechanism of action of the nonsteroidal antiestrogen tamoxifen(I.C.I. 46, 474) in the rat. Mol. Cell. Endocrinol.*, 7:177-192, 1977B.
- Jordan, V.C. and Gosden, B.: *Inhibition of the uterotrophic activity of estrogens and antiestrogens by the short acting antiestrogen LY-117018. Endocrinology*, 113:463-468, 1983.
- Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., Ferguson, E.R. and Krauthammer, N.: *Antiestrogen interaction with uterine estrogen receptors. J. Biol. Chem.*, 253:697-707, 1978.
- Korach, K.S. and Ford, E.B.: *Estrogen action in the mouse uterus: An additional nuclear event. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83:827-838, 1978.
- Korach, K.S.: *Estrogen action in the mouse uterus: Characterization of the cytosol and nuclear receptor system. Endocrinology*, 104:1324-1332, 1979.
- Lazier, C.B. and Jordan, V.C.: *High affinity binding of antiestrogen to the chick liver nuclear oestrogen receptor. Biochem. J.*, 206:387-394, 1982.
- Liddle, G.W. and Melman, K.L.: *The adrenals. In: William K H ed: Textbook of endocrinology. Saunders Philadelphia. P. 233-253. 1974.*
- Lippman, M., Bolan, G. and Huff, K.L.: *The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long term tissue culture. Cancer Res.*, 36:4595-4601, 1976.
- Markaverich, B.M., Upchurch, S., McCormack, S.A., Glasser, S.R. and Clark, J.H.: *Differential stimulation of uterine cells by nafoxidine and clomiphene: Relationship between nuclear estrogen receptors and type II estrogen binding sites and cellular growth. Biol. Reprod.*, 24:171-181, 1981.
- Martin, L. and Finn, C.A.: *Hormonal regulation of cell division in epithelial and connective tissues of the mouse uterus. J. Endocrinol.*, 41:363-373, 1968.

- McCormack, S.A. and Glasser, S.R.: *Differential response of individual uterine cell types from immature rats treated with estradiol. Endocrinology*, 106:1634-1649, 1980.
- Murphy, P.R., Butts, C. and Lazier, C.B.: *Triphenylethylene antiestrogen-binding sites in cockerel liver nuclei: Evidence for an endogenous ligand. Endocrinology*, 115:420-426, 1984.
- Quarmby, V.E., Fox-Davis, C., Swaisgood, M.H. and Korach, K.S.: *Estrogen action in the mouse uterus: Adrenal modulation of receptor levels. Endocrinology*, 110:1208-1218, 1982.
- Robertson, D.W., Wei, L.L., Hayes, J.R., Carlson, K.E., Katzenellenbogen, J.A. and Katzenellenbogen, B.S.: *Tamoxifen aziridines: Effective inactivators of the estrogen receptor. Endocrinology*, 109:1298-1300, 1981.
- Rochefort, H., Lignon, F. and Capony, F.: *Effect of antiestrogens on uterine estradiol receptors. Gynecol. Invest.*, 3:43-55, 1972.
- Rochefort, H., Garcia, M. and Borgna J.L.: *Absence of correlation between antiestrogenic activity and binding affinity for the estrogen receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88:351-357, 1979.
- Rochefort, H. and Borgna, J.L.: *Differences between oestrogen receptor activation by estrogen and antiestrogen. Nature*. 292:257-259, 1981.
- Ruh, T.S. and Baudendistel, L.J.: *Different nuclear binding sites for antiestrogen and estrogen-receptor complex. Endocrinology*, 100:420-426, 1977.
- Schneider, W.C.: *Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. Methods in Enzymology*, 3:680-684, N.Y., 1953.
- Sudo, K., Monsma, F.J.Jr. and Katzenellenbogen, B.S.: *Antiestrogen-binding sites distinct from the estrogen receptor: Subcellular localization, ligand specificity, and distribution in tissues of the rat. Endocrinology*, 112:425-434, 1983.
- Sutherland, R., Mester, J. and Baulieu, E.E.: *Tamoxifen is a potent "pure" antiestrogen in chick oviduct. Nature*, 267:434-435, 1977.
- Sutherland, R.L. and Foo, M.S.: *Differential binding of antiestrogens by rat uterine and chick oviduct cytosol. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91:183-191, 1979.
- Sutherland, R.L., Murphy, L.C., Foo, M.S., Green, M.D., Whybourne, A.M. and Krozowski, Z.S.: *High affinity antiestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. Nature*, 288:273-275, 1980.
- Terenius, L.: *Structure-activity relationships of antiestrogens with regard to interaction with 17 $\beta$ -oestradiol in the mouse uterus and vagina. Acta Endocrinol.*, 66:431-447, 1971.
- Waynforth, H.B.: *Special surgical operations. In: Experimental and surgical technique in the rat. (Ed.) H.B. Waynforth, Academic Press, N. Y.*, 1980.
- Welsh, T.H.Jr., Jia, X.C., Jones, P.B.C., Zhuang, L. and Hsueh, A.J.W.: *Disparate effects of triphenylethylene antiestrogens on estrogen and progesterin biosyntheses by cultured rat granulosa cells. Endocrinology*. 115:1275-1282, 1984.
- Winneker, R.C., Guthrie, S.C. and Clark, J.H.: *Characterization of a triphenylethylene-antiestrogen binding site on rat serum low density lipoprotein. Endocrinology*, 112:1823-1827, 1983.