

흰쥐에서 발정주기에 따른 자발적인 췌장외분비의 변화

박형서 · 이태임 · 김세훈 · 박형진* · 양일석**

건양대학교 의과대학 생리학교실

*한림대학교 의과대학 생리학교실

**서울대학교 수의과대학 생리학교실

(2000년 11월 8일 게재승인)

Changes of spontaneous pancreatic exocrine secretion during the estrous cycle in rats

Hyung-seo Park, Tae-im Lee, Se-hoon Kim, Hyoung-jin Park*, Il-suk Yang**

Department of Physiology, College of Medicine, Konyang University

**Department of Physiology, College of Medicine, Hallym University*

***Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Accepted by November 8, 2000)

Abstract : Since the role of female sexual hormones on pancreatic exocrine secretion was not fully understood, this study was investigated to clarify the difference of spontaneous pancreatic exocrine responses during the estrous cycle and the roles of ovarian hormones on pancreatic exocrine secretion in the anesthetized female rats. Pancreatic juice was collected from the sequential 15-min samples, and then fluid and protein secretion were measured from the collected samples. The stages of estrous cycle were defined by staining the vaginal smear. The spontaneous pancreatic fluid and protein secretion were significantly increased during the diestrus stage compare to the corresponding value during the estrus stage. In the ovariectomized rat, spontaneous pancreatic exocrine secretion was significantly decreased compare to the value of female rat during the diestrus stage and was restored by subcutaneous injection of progesterone (50 mg/kg). This results suggest that the spontaneous pancreatic exocrine secretion of female rat is fluctuated according to the estrous cycle and progesterone released from ovary could stimulate the spontaneous pancreatic exocrine secretion of female rat.

Key words : pancreatic secretion, rats, estrous cycle, ovariectomy, progesterone

서 론

췌장의 외분비기능은 위산 중화에 필요한 중탄산 이온의 분비와 음식물 소화에 필요한 20여종의 소화효소 분비를 주 기능으로 하고 있다. 이러한 췌장의 외분비기능 조절은 일반적으로 자율신경계 및 위장관에서 분비되는 peptide 성 호르몬에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다^{1,4}. 특히 기초상태에서 분비되는 자발적인 췌장외분비 기능은 자율신경계에 의해 조절되는 것으로 보고되고 있다. 미주신경을 절단한 동물에서 자발적인 췌액분비 및 소화효소의 분비가 크게 감소한다는 보고

는 이러한 사실을 뒷받침 하는 근거로 볼 수 있다^{5,6}. 한편 임신한 개의 경우 자발적인 췌장외분비 기능이 임신하지 않은 개에 비하여 매우 높음이 관찰되면서 기초상태의 자발적인 췌장외분비 기능변화가 성선호르몬과 연관성이 있을 수 있음을 시사하였다⁷.

발정(월경)주기에 따라 생식기계의 기능변화 이외에도 위장관의 운동성 변화, 위배출 속도의 변화, 췌장의 내분비 기능 변화 등 다양한 소화기계의 기능변화가 수반되며 이는 난소에서 분비되는 steroid 성 성선호르몬과 밀접한 관련성이 있는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹⁰. 또한 사람에서 폐경기, 골다공증, 생리불순 및 난소절제술 이후

의 치료 목적이나 피임 등의 목적으로 steroid 성 성선호르몬의 투여가 이용되고 있는데^{11,12} 이러한 steroid 성 성선호르몬의 투여는 췌장염 발병율을 증가시키고 출혈성 췌장괴사를 유도하는 것으로 보고되고 있다^{13,14}. 이러한 결과로 미루어 보아 성선에서 분비되는 steroid 성 호르몬은 췌장의 외분비기능과도 밀접한 연관성이 있을 것으로 생각된다.

실험적으로 난소와 부신을 절제한 흰쥐와 기니피에서 췌장내 단백질 함량 및 amylase 함량의 감소, 소화효소 분비소포의 감소, 췌장 소엽간 간격의 증가 등의 변화가 관찰되었다¹⁵⁻¹⁷. 이러한 결과들은 암컷의 성선에서 분비되는 성선호르몬이 췌장외분비 기능을 조절할 수 있음을 의미한다. 그러므로 본 연구에서는 이에 대한 체계적인 연구를 진행하고자 마취한 암컷 흰쥐를 이용하여 발정주기에 따른 자발적인 췌장외분비의 차이를 관찰하고 성선호르몬이 자발적인 췌장외분비 기능에 미치는 효과를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구에서 실험동물은 생명공학연구소(KRIBB) 실험동물자원실에서 분양받은 체중 250-300 g의 Sprague-Dawley 계 암컷 흰쥐 56마리를 이용하였다. 실험동물은 25% urethane(Sigma, USA)을 체중 100 g 당 0.7 ml 복강내 주사하여 마취를 유도하였다. 실험을 마친 후 과량의 urethane을 정맥주사하여 실험동물을 희생시켰다. 실험동물은 실험시작 24시간 전부터 금식시켰으며 물만을 공급하였다.

발정주기의 판별

발정주기는 Montes와 Luque¹⁸의 방법에 따라 질도말법을 이용하여 판별하였다. 생리식염수를 적신 면봉을 질내에 삽입하고 질구주변을 가볍게 닦아낸 후 이를 슬라이드 글라스위에 고르게 도포하여 Wright 염색을 실시한 후 현미경으로 관찰하여 발정주기를 판별하였다. 발정기는 현저한 각화상피세포의 출현소견이 보이는 시기로 판정하였으며, 발정후기는 각화상피세포의 감소와 백혈구의 출현소견을 보이는 시기로 판정하였다. 휴지기는 다량의 백혈구와 함께 유핵상피세포의 출현소견을 보이는 시기로 판정하였고 발정전기는 현저한 유핵상피세포의 출현소견을 보이는 시기로 판정하였다.

수술적 처치

마취한 흰쥐의 복강을 개방한 후 췌장액을 채취하기 위하여 십이지장의 총췌담관 개구부에 폴리에틸렌관(의

경 0.61 mm, 내경 0.28 mm, Clay-Adams, USA)을 삽입하였으며 순수한 췌장액을 채취하기 위하여 다른 폴리에틸렌관을 간 아래 부위의 담관에 삽입하여 공장부위로 우회시켰다. 또한 위산이 십이지장 내로 유입되는 것을 방지하기 위하여 유문부를 결찰하였다. 생리식염수를 적신 거즈를 수술부위에 덮은 후 방열판을 이용하여 실험이 끝날 때까지 체온을 37°C로 유지시켜 주었다. 필요에 따라 실험시작 일주일 전에 실험동물을 Ketamine (0.4 mg/kg, i.p., Yuhan, Korea)과 Xylazine hydrochloride (0.2 mg/kg, i.m., Yuhan, Korea)로 마취한 후 양측의 난소를 절제하여 실험에 사용하였다.

췌장액 및 소화효소의 분비 측정

수술 처치 후 30분간의 회복기를 거친 후 1시간 동안 매 15분마다 분비되는 췌장액을 채취하였다. 실험은 각 발정주기별 실험군, 난소를 절제한 실험군, 난소절제 후 β -estradiol 및 progesterone을 투여한 실험군에서 반복하였다. β -estradiol(25 μ g/kg, Sigma, USA)과 progesterone (50 mg/kg, Sigma, USA)은 corn oil(Sigma, USA)에 용해하여 하루에 1번씩 이틀간 피하로 주사하였다¹⁹. 췌액 분비량은 3.8 μ l/cm의 용적을 갖는 microtube를 이용하여 환산하였고 소화효소의 분비량은 Park 등²⁰의 방법에 따라 췌장액내의 단백질량을 분광광도계(Jasco, Japan)를 이용하여 파장 280 nm에서의 흡광도를 측정하고 소혈청 알부민(Sigma, USA)의 표준곡선에 대입하여 환산하였다.

측정치의 통계적 처리

본 실험에서 얻은 모든 측정치는 평균 \pm 표준오차로 제시하였다. 평균의 차이는 Student's *t* test를 이용하여 통계적으로 검정하였으며 유의수준은 5%로 하였다.

결 과

흰쥐의 발정주기에 따른 자발적인 췌장외분비 변화

Fig 1과 Fig 2에 제시한 바와 같이 마취한 발정기 암컷 흰쥐는 52.82 \pm 8.02 μ l/kg/hr의 췌액과 3.73 \pm 0.46 mg/kg/hr의 소화효소를 분비하였다. 발정후기의 췌액 분비량과 소화효소 분비량은 각각 68.40 \pm 9.51 μ l/kg/hr와 5.64 \pm 0.75 mg/kg/hr로 발정기에 비하여 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. 그러나 휴지기 암컷 흰쥐는 93.23 \pm 11.32 μ l/kg/hr의 췌액과 8.60 \pm 0.64 mg/kg/hr의 소화효소를 분비하여 발정기에 비하여 유의하게($P < 0.05$) 높은 수치를 나타내었으며 발정전기에서는 61.38 \pm 6.59 μ l/kg/hr의 췌액과 5.43 \pm 1.10 mg/kg/hr의 소화효소를 분비하여 다시 감소하는 경향을 나타내었다.

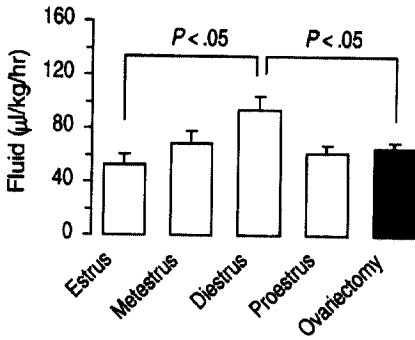


Fig 1. Spontaneous pancreatic fluid secretion during the estrous cycle in anesthetized rats. Each bar represents the mean \pm SE of data from 7 experiments. Spontaneous pancreatic fluid secretions is significantly ($P < 0.05$) increased during the diestrus stage compare to corresponding values during the estrus stage.

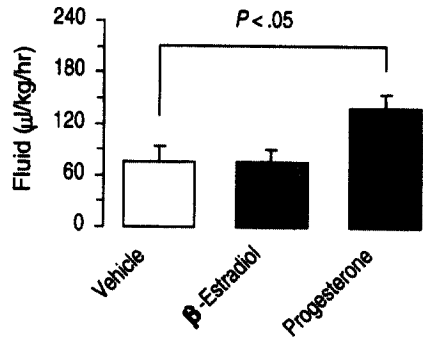


Fig 3. Effects of β -estradiol and progesterone on spontaneous pancreatic fluid secretion of ovariectomized rats. Each bar represents the mean \pm SE of data from 7 experiments. Subcutaneous injection of progesterone results in significant ($P < 0.05$) increase the spontaneous fluid secretion. However, β -estradiol does not modify the spontaneous fluid secretion.

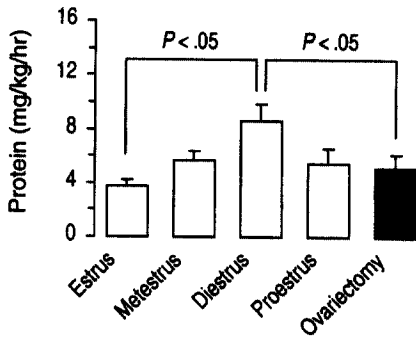


Fig 2. Spontaneous pancreatic protein secretion during the estrous cycle in anesthetized rats. Each bar represents the mean \pm SE of data from 7 experiments. Spontaneous pancreatic protein secretions is significantly ($P < 0.05$) increased during the diestrus stage compare to corresponding values during the estrus stage.

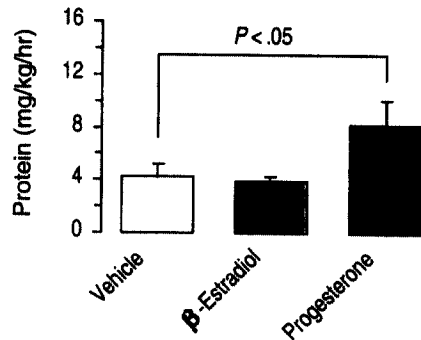


Fig 4. Effects of β -estradiol and progesterone on spontaneous pancreatic protein secretion of ovariectomized rats. Each bar represents the mean \pm SE of data from 7 experiments. Subcutaneous injection of progesterone results in significant ($P < 0.05$) increase the spontaneous protein secretion. However, β -estradiol does not modify the spontaneous protein secretion.

난소절제가 흰쥐의 자발적인 췌장외분비에 미치는 영향

난소를 절제한 흰쥐는 $64.79 \pm 5.04 \mu\text{l/kg/hr}$ 의 췌액과 $5.11 \pm 0.99 \text{ mg/kg/hr}$ 의 소화효소를 분비하여 난소를 절제하지 않은 후지기 흰쥐의 췌액 분비량과 소화효소 분비량에 비하여 유의하게 ($P < 0.05$) 낮았으나 발정전기, 발정기 및 발정후기 암컷 흰쥐의 췌액 분비량 및 소화효소 분비량과는 유의한 차이를 나타내지 못하였다(Fig 1과 Fig 2).

β-estradiol 및 progesterone이 난소를 절제한 흰쥐의 자발적인 췌장외분비에 미치는 영향

난소를 절제한 흰쥐에 vehicle 만을 투여한 경우 75.39

$\pm 17.65 \mu\text{l/kg/hr}$ 의 췌액과 $4.27 \pm 1.00 \text{ mg/kg/hr}$ 의 소화효소를 분비하여 난소를 절제한 흰쥐와 유의한 차이가 없었다. 그러나 난소를 절제하고 progesterone을 투여한 흰쥐의 경우에는 Fig 3과 Fig 4에 제시한 바와 같이 $138.45 \pm 16.99 \mu\text{l/kg/hr}$ 의 췌액과 $8.19 \pm 1.91 \text{ mg/kg/hr}$ 의 소화효소를 분비하여 vehicle 투여군에 비하여 유의하게 ($P < 0.05$) 높았으며, 난소를 절제하고 β-estradiol을 투여한 흰쥐의 경우에는 $75.57 \pm 14.34 \mu\text{l/kg/hr}$ 의 췌액과 $3.93 \pm 0.33 \text{ mg/kg/hr}$ 의 소화효소를 분비하여 vehicle 투여군과 유의한 차이를 나타내지 못하였다.

고 찰

본 실험결과 마취한 암컷 흰쥐의 자발적인 췌장외분비기능은 발정주기에 따라 변화하는 것을 알 수 있었다. 즉 휴지기 동안에는 발정기에 비하여 췌액 분비량 및 소화효소 분비량이 높았다. 또한 난소를 절제한 암컷 흰쥐의 자발적인 췌장외분비 기능은 난소를 절제하지 않은 휴지기 암컷 흰쥐에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어보아 기초상태에서 분비되는 흰쥐의 자발적인 췌장외분비 기능과 난소에서 분비되는 steroid 성 호르몬이 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있다. Rosenberg 등은 혈중 progesterone 수치가 높게 유지되는 임신말기의 개에서 기초상태의 자발적인 췌장외분비 기능이 높게 유지됨을 보고한 바 있다. 그러나 이러한 발정주기 혹은 임신에 따른 자발적인 췌장외분비 기능의 변화가 난소에서 분비되는 steroid 성 호르몬에 의한 결과인지에 대한 직접적인 증거는 제시되지 않고 있다.

그러므로 본 실험에서 이를 확인하고자 난소를 절제한 암컷 흰쥐에 β -estradiol 또는 progesterone을 투여하고 자발적인 췌장외분비의 변화를 관찰해 보았다. 그 결과 β -estradiol은 마취한 암컷 흰쥐의 자발적 췌액 분비량 및 소화효소 분비량에 영향을 미치지 못한 반면 progesterone은 자발적 췌액 분비량 및 소화효소 분비량을 크게 증가시켰다. 몇몇 보고에 의하면 난소와 부신을 동시에 절제한 동물에서 췌장내 단백질 및 소화효소의 함량이 감소하며, 소화효소 분비세포가 고갈되고, 소엽간 간격이 증가하는 등의 변화가 관찰되었다¹⁵⁻¹⁷. 본 연구에서 소화효소의 함성에 미치는 progesterone의 역할에 대해서는 직접적인 증거를 제시하지 못하였지만 자발적인 췌장외분비 기능이 progesterone에 의해서는 크게 증가하나 β -estradiol에 의해서는 변화가 없었던 결과와 발정기에 비하여 휴지기에 자발적인 췌장외분비 기능이 높게 유지된 결과를 종합하여 보면 흰쥐의 자발적 췌장외분비 기능에 progesterone이 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 생각된다.

최근 들어 steroid 성 호르몬의 염색체 외적(nongenomic) 효과와²¹⁻²³ 세포막에 존재하는 progesterone의 결합부위가 뇌²⁴, 정자²⁵, 혈관평활근²⁶ 등에서 관찰되면서 이들의 기능에 대한 관심이 증대되고 있다. 현재까지 췌장의 외분비세포인 선포세포의 세포막에 이러한 결합부위가 존재하는지에 대해서는 확실한 증거가 제시되지 않고 있으나 정상적인 사람의 췌장 선포세포에서 progesterone 수용체가 관찰된 결과²⁷로 미루어보아 progesterone이 췌장외분비 기능을 조절할 가능성은 매우 높은 것으로 생각된다. 한편 progesterone의 수용체가 췌장의 내분비세

포에도 존재하며^{28,29}, progesterone은 흰쥐의 췌장에서 insulin의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다^{28,30}. 이미 잘 알려진 바와 같이 췌장의 내분비부와 외분비부 사이에는 문맥구조(islet-acinar portal system)가 존재하며³¹, 이로 인하여 내분비부에서 분비된 insulin은 췌장외분비 기능에 촉진적인 영향을 미친다³². 따라서 본 실험에서 progesterone이 insulin의 분비를 증가시킴으로 인하여 이차적으로 췌장외분비 기능을 촉진하였을 가능성도 존재한다. 이러한 실험결과들과 본 실험결과를 종합하여 보면 흰쥐의 난소에서 분비되는 progesterone은 자발적인 췌장외분비 기능의 촉진적인 조절인자로 작용할 가능성이 매우 높은 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 마취한 흰쥐에서 발정주기에 따른 자발적인 췌장외분비의 변화를 관찰하고 자발적 췌장외분비에 미치는 성선호르몬의 역할을 규명하고자 실험을 실시한 결과 마취한 암컷 흰쥐에서 자발적인 췌장외분비 기능은 발정주기에 따라 변화하여 휴지기의 췌액분비와 소화효소분비는 발정기에 비하여 유의하게 증가하였다. 난소를 절제한 암컷 흰쥐의 경우 휴지기에 비하여 췌장외분비가 유의하게 감소하였으나 발정전기, 발정기 그리고 발정후기와는 유의한 차이가 없었다. 난소를 절제한 암컷 흰쥐에 progesterone을 투여하면 자발적인 췌장외분비 기능이 다시 증가하는 경향을 나타내었으나 β -estradiol에 의해서는 영향을 받지 않았다. 이러한 실험결과로 미루어보아 암컷 흰쥐의 경우 발정주기에 따라 자발적인 췌장외분비의 변화가 있으며 난소에서 분비되는 progesterone은 흰쥐의 자발적인 췌장외분비에 촉진적인 영향을 미치는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Holst JJ. Neural regulation of pancreatic exocrine function. In Go VLW *et al*, ed *The pancreas, biology, pathophysiology, and disease*, 2nd ed, Raven press, New York: 381-402, 1993.
- Chey WY. Hormonal control of pancreatic exocrine secretion. In Go VLW *et al*, ed *The pancreas, biology, pathophysiology, and disease*, 2nd ed, Raven press, New York: 403-424, 1993.
- Park HS, Lee YL, Kwon HY, *et al*. Significant cholinergic role in secretin-stimulated exocrine secretion in isolated rat pancreas. *Am J Physiol*, 274:G413-G418, 1998.
- Park HS, Kwon HY, Lee YL, *et al*. Role of GRPergic neurons in secretin-evoked exocrine secretion in isolated rat pancreas. *Am J Physiol*, 278:G557-G562, 2000.

5. Henriksen FW. Effe of vagotomy or atropine on the canine pancreatic response to secretin and pancreozymin. *Scand J Gastroenterol*, 4:137-144, 1969.
6. MacGregor JL, Meyer JH. Gastric emptying and pancreatic and biliary secretion after vagotomy and pyloroplasty. *Gastroenterology*, 105:33-51, 1975.
7. Rosenberg V, Rudick J, Robbiou M, et al. Pancreatic exocrine secretion during and after pregnancy. *Ann Surg*, 181:47-50, 1975.
8. Chen TS, Doong ML, Chang FY, et al. Effects of sex steroid hormones on gastric emptying and gastrointestinal transit in rats. *Am J Physiol*, 268:G171-G176, 1995.
9. Moore J, Barlow D, Jewell D, et al. Do gastrointestinal symptoms vary with the menstrual cycle? *Br J Obstet Gynaecol*, 105:1322-1325, 1998.
10. Escalante Pulido JM, Alpizar Salazar M. Changes in insulin sensitivity, secretion and glucose effectiveness during menstrual cycle. *Arch Med Res*, 30:19-22, 1999.
11. Tzingounis VA, Perdikaris AG, Lioutas G, et al. Subcutaneous hormone replacement therapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 49:64-66, 1993.
12. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocrinol Rev*, 18:71-106, 1997.
13. Davidoff F, Tishler S, Rosoff C. Marked hyperlipidemia and pancreatitis associated with oral contraceptive therapy. *N Engl J Med*, 289:552-555, 1973.
14. Rao KN, Eagon PK, Okamura K, et al. Acute hemorrhagic pancreatic necrosis in mice. Induction in male mice treated with estradiol. *Am J Pathol*, 109:8-14, 1982.
15. Grossman A, Bector AM, Lane B. Dependence of pancreatic integrity on adrenal and ovarian secretions. *Endocrinology*, 85:956-959, 1969.
16. Grossman A, Bector AM, Band P, et al. Role of steroids in secretion-modulating effect of triamcinolone and estradiol on protein synthesis and secretion from the rat exocrine pancreas. *J Steroid Biochem*, 19:1069-1081, 1983.
17. Beaudoin AR, St-Jean P, Proulx J, et al. Influence of steroids on the exocrine pancreas: presence of laminated bodies in the acinar lumen following castration and adrenalectomy. *Pancreas*, 4:219-227, 1989.
18. Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat*, 133:192-199, 1988.
19. Lu CC, Tsai SC, Wang SW, et al. Effects of ovarian steroid hormones and thyroxine on calcitonin secretion in pregnant rats. *Am J Physiol*, 274:E246-E252, 1998.
20. Park HJ, Lee YL, Kwon HY, et al. Pancreatic exocrine secretion in response to median raphe stimulation in anesthetized rats. *Pancreas*, 10:407-412, 1995.
21. Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*, 59:365-393, 1997.
22. Watson CS, Gametchu B. Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc Soc Exp Biol Med*, 220:9-19, 1999.
23. Schmidt BM, Gerdes D, Feuring M, et al. Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol*, 21:57-94, 2000.
24. Ramirez VD, Zheng J, Siddique KM. Membrane receptors for estrogen, progesterone, and testosterone in the rat brain: fantasy or reality. *Cell Mol Neurobiol*, 16:175-198, 1996.
25. Falkenstein E, Heck M, Gerdes D, et al. Specific progesterone binding to a membrane protein and related nongenomic effects on Ca²⁺ - fluxes in sperm. *Endocrinology*, 140:5999-6002, 1999.
26. Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, et al. Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 229:86-89, 1996.
27. Targarona EM, Pons MD, Gonzalez G, et al. Is exocrine pancreatic cancer a hormone-dependent tumor? A study of the existence of sex hormone receptors in normal and neoplastic pancreas. *Hepatogastroenterology*, 38:165-169, 1991.
28. El Seifi S, Green IC, Perrin D. Insulin release and steroid-hormone binding in isolated islets of langerhans in the rat: effects of ovariectomy. *J Endocrinol*, 90:59-67, 1981.
29. Winborn WB, Sheridan PJ, McGill HC Jr. Localization of progestin receptors in the islets of Langerhans. *Pancreas*, 2:289-294, 1987.
30. Ashby JP, Shirling D, Baird JD. Effect of progesterone on insulin secretion in the rat. *J Endocrinol*, 76:479-486, 1978.
31. Williams JA, Goldfine ID. The insulin-pancreatic acinar axis. *Diabetes*, 34:980-986, 1985.
32. Lee YL, Kwon HY, Park HS, et al. The role of insulin in the interaction of secretin and cholecystokinin in exocrine secretion of the isolated perfused rat pancreas. *Pancreas*, 12:58-63, 1996.