

실온과 5°C 냉장고 환경에서 흰쥐 Catecholamine 분비에 관한 연구

경희대학교 의과대학 예방의학교실

홍 승 의 · 윤 태 영 · 김 형 석

= Abstract =

A Study on the Catecholamine under the Room Temperature and 5°C Refrigerator Environment in Rat

Seyng Eui Hong, Tai Young Yoon and Hyung Suk Kim

*Department of Preventive Medicine, School of Medicine,
Kyung-Hee University*

Under the extreme change of the environment, animals react physiologically to adapt to the stress and secrete catecholamines. Cold exposure is a kind of the environmental stress. Author tried to determine the amount of catecholamines in rat urine as a parameter of physiological response to cold stress. Urinary catecholamine was measured by using HPLC with fluorescence detector, cation exchange column prepacked with Bio-Rex 70 and ammonium pentaborate as catecholamine eluent. The amount of dopamine in normal state rat urine was 42.0 ng, but under the low temperature of 5°C, the dopamine amount was increased to 221.25 ng/5 ml.

Above findings are suggesting that catecholamine secretion, especially dopamine, increases in the stressful condition such as cold exposure.

I. 서 론

Stress란 신경내분비제로부터 특징적이고 동시적인 반응을 유발시키는 내적 또는 외적 원인의 생명을 위협하는 자극이라고 정의할 수 있다(Jacobo 등, 1984). 생물은 외부 환경의 극심한 변화가 있을 경우에 항상성을 유지하기 위해 신경내분비학적인 생체반응을 일으키며 그중 catecholamine의 자극 분비는 가장 예민한 반응중의 하나라고 알려져 있는데(Irwin, 1976), 이 hormone은 생명의 위협이 나타나기 전 정신적 위협으로만 혈중 농도가 증가했다(Callingham, 1975). Catecholamine의 자극분비와 stress의 관계에 관한 연구가 많이 있었다(Hoaki, 1982; Iimori, 1982; Schönig 등, 1984; Claustre 등, 1985; Little 등, 1985). 특히 Oliver와

Schaefer 등(1985)이 stress에 의해 나타나는 교감신경 흥분작용이 부신수질 추출물을 주사하였을 경우에도 동일하게 일어남을 발견한 것을 기초로, catecholamine과 stress와의 관계가 주목을 끌게 되었으며, stress와 내분비계와 catecholamine류의 3자 연관성을 확립하게 되었다.

환경 변화중 온도변화 stress에 대한 생체반응에 관한 연구중(Martha, 1985; Strong 등, 1985; Cassale 등, 1985; Knight 등, 1985) catecholamine과의 관계는 Leppälüoto 등(1986)은 지속적으로 sauna하는 사람에서 catecholamine이 증가했음을 보고하였고, Sato 등(1986)은 저온순화하는 쥐에서의 thyroid hormone과 catecholamine의 상호관계에 관하여 연구하였으며, O'Malley 등(1984)은 급속히 4°C 저온상태에 30분간 노출된 사람의 혈중 norepinephrine의 증가를 보고하면서 저

온에 의한 자극이 일반적인 stress 반응을 불러 일으키지 않는다고 주장하였다.

이에 저자들은 저온 환경하에서 쥐의 뇨중 catecholamine의 변화를 High Performance Liquid Chromatograph를 이용하여 측정해서, 저온 환경이 catecholamine분비에 미치는 영향을 규명하고자 본 연구를 시도하였다.

II. 실험 방법

1. 실험동물 및 채뇨

실험동물은 체중 150~200 gm되는 흰쥐를 암수 구별 없이 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 대종공업사 제품인 쥐대사실험장치에 5마리를 넣고 오전 10시부터 오후 6시까지의 뇨를 모았다.

2. 저온 환경

냉장고속의 기온을 5°C로 조절하고 오전 10시부터 쥐장을 30분간은 저온 환경, 즉 냉장고 속에 넣고 20분간은 대조군과 같은 실내환경속에 두는 것을 반복하면서 오전 10시부터 오후 6시까지의 뇨를 모았다.

3. 시료의 전처리

① 1.6 cm×15 cm되는 시험관에 시료 5 ml, ammonium acetate buffer 5 ml, 0.5 M NaOH 20.0 μ l를 각각 넣고 혼합한 후 pH 6.0~7.0이 되도록 0.5 M NaOH 나 1 M acetic acid를 0.1 ml씩 넣으면서 조절하였다.

② 상기를 Bio Rad사 제품인 Bio-Rex 70 column에 넣어 catecholamine이 column에 흡착되도록 하였다.

③ Column에 ammonium acetate buffer 5 ml를 넣어 세척하였다.

④ Elution buffer 6 ml를 넣어 catecholamine을 유출시켜 이중 50 μ l를 HPLC에 주입하였다.

4. 시약의 제조

① 0.5 M NaOH; NaOH 2 gm을 증류수 80 ml에 녹인 후 100 ml까지 물로 채운다.

② 1 M acetic acid; Glacial acetic acid 5.7 ml을 H₂O로 100 ml가 되게 한다.

③ 0.05 M HCl; c-HCl 1 ml를 H₂O 250 ml에 넣고 희석한다.

④ 0.03 M ammonium acetate buffer; 무수 ammonium acetate 2.3 gm을 H₂O 800 ml에 넣고 Na₂EDTA 1 gm을 넣은 후, 0.5 M NaOH로 pH 7.5±0.02가 되게 한다. 다시 H₂O를 추가하여 전량이 1,000 ml가 되게 한다.

⑤ Elution buffer; ammonium pentaborate 20 gm을 H₂O 1,000 ml에 용해시킨다.

⑥ 1 M KH₂PO₄용액; KH₂PO₄ 68.05 gm을 H₂O 400 ml에 녹인 후 500 ml로 하고 0.45 μ m filter로 여과한다.

5. Catecholamine의 측정

시료와 표준액 (mg/l)을 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph)에 주입하여 chromatogram 상의 peak height를 비교하여 catecholamine의 양을 측정한다. 이때 HPLC의 조건은 다음과 같다.

Instrument; 미국 Varian사제 Vista LC 54

Column; Micro Pak MCH 30 cm×4 mm

Detector; Fluorescence λ_{exc} =200 nm

λ_{em} =380 nm

Mobile Phase; 0.01 M perchloric acid;

ACN=99: 1, 1 ml/min

Column temperature; 30°C

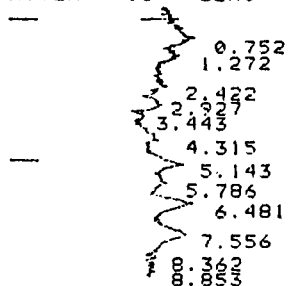
III. 실험 결과

실험동물인 흰쥐 5마리씩을 1군(group)으로 하여 rat cage에 넣은 후 8시간동안 뇨를 채취하여 이 가운데 5 ml를 사용하여 대조군 뇨중 catecholamine의 양을 측정하였다.

대조군 뇨의 chromatogram인 Fig. 1에서 catecholamine의 양을 구하기 위해 peak의 높이인 height를 기준으로 삼아 표준물질의 catecholamine과 비교하여 측정하였다. Fig. 1에서 peak의 수는 5개로서 이 가운데 catecholamine 표준물질과 retention time이 같은 peak는 5.143분과 7.556분이었으며 전자는 epinephrine 이고 후자는 dopamine이었다.

저온 환경인 5°C에 흰쥐 실험군을 폭로시키면서 8시간 동안 뇨를 채취하여 이중 5 ml를 취해 시료의 전처리후 HPLC에 50 μ l를 주입하여 Fig. 3과 같은 chromatogram을 얻었다.

CHART SPEED 0.5 CM/MIN
 ATTEN: 16 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



TITLE: 12:56 13 OCT 85

CHANNEL NO: 2 SAMPLE: CATECHOL METHOD: CAT

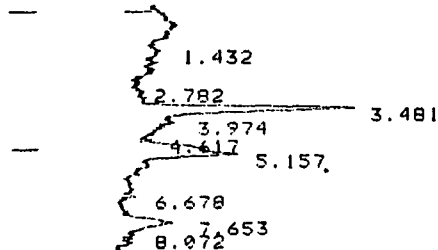
PEAK NO	PEAK NAME	RESULT	TIME (MIN)	HEIGHT COUNTS	SEP CODE
1		12.3926	4.315	404	VV
2		24.4172	5.143	796	VV
3		14.3252	5.786	467	VV
4		26.8405	6.481	875	VV
5		22.0245	7.556	718	VV

TOTALS: 100.0000 3260

MULTIPLIER: 1.00000

Fig. 1. Chromatogram of the normal rat urine for the detection of catecholamine (5ml of rat urine).

CHART SPEED 0.5 CM/MIN
 ATTEN: 16 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



TITLE: 12:47 13 OCT 85

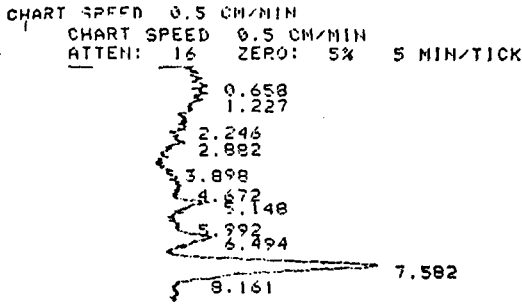
CHANNEL NO: 2 SAMPLE: CATECHOL METHOD: CAT

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT	TIME (MIN)	HEIGHT COUNTS	SEP CODE
1		45.8312	3.481	3562	BV
2		4.1559	3.793	323	VV
3		4.9665	3.924	386	VV
4		5.8672	3.974	456	VV
5		4.3103	3.989	335	VV
6		4.1945	4.079	326	VV
7		19.6881	5.157	1530	VB
8		10.9882	7.653	854	BV

TOTALS: 99.9999 7772

MULTIPLIER: 1.00000

Fig. 2. Chromatogram of the norepinephrine, epinephrine and dopamine standard solution (50 ul of mg/l)



TITLE:		12:15 13 OCT 85			
CHANNEL NO: 2	SAMPLE: CATECHOL	METHOD: CAT			
PEAK NO	PEAK NAME	RESULT	TIME (MIN)	HEIGHT COUNTS	SEP CODE
1		4.0401	0.990	302	VV
2		4.5217	4.182	338	VV
3		4.4415	4.672	332	VV
4		10.6355	5.148	795	VV
5		5.2174	5.301	390	VV
6		9.1639	6.494	685	BV
7		6.7960	6.606	508	VV
8		4.6288	6.686	346	VV
9		50.5552	7.582	3779	VV
TOTALS:		100.0000		7475	
MULTIPLIER: 1.00000					

Fig. 3. Chromatogram of the rat urine after exposure to 5°C air temperature.

즉, retention time 7.852분에서 peak height가 3.779로 나타나 대조군의 노보다도 5배 이상의 dopamine이 검출되었다.

한편 epinephrine은 retention time인 5.148분에서 peak height가 795로서 epinephrine의 변화는 별로 없었으며 norepinephrine은 검출되지 않았다.

저온 환경하에서 catecholamine의 변화는 Table 1과 같다.

Table 1. Comparison of the peak height of the rat urine among standard, normal and low temperature (5 ml urine)

Sample	Norepinephrine [3.4]	Epinephrine [5.1]	Dopamine [7.5]
Standard	3562 (50.00ng)	1530 (50.00ng)	854 (50.00ng)
Normal	—	796 (26.01ng)	718 (42.04ng)
Low temp	—	795 (25.98ng)	3779 (221.25ng)

() : catecholamine contents
 [] : retention time in minutes

즉, 대조군 노중 dopamine의 함량은 42.04 ng이었으나 5°C의 냉장고 환경에 폭로된 실험군의 노중 dopamine 함량은 221.25 ng으로 저온환경의 폭로에 의해 catecholamine의 함량은 약 5.3배정도 증가하였다.

IV. 고찰

Hans Selye(1946)는 stress를 정의함에 있어서 세단계의 반응으로 표현하였는데, 첫단계는 놀람(alarm)이고, 둘째단계는 반항(resistance), 세째단계는 허탈(exhaustion)이라 하였다. 놀람 단계에서 교감신경 및 부교감신경은 stress에 적응하기 위하여 함께 협동하며, 놀람 상태와 반항단계에서 체내 energy가 소모되면서 허탈 상태로 들어간다.

Stress가 인체에 미치는 영향에 대해 많은 발표가 있는데 그 가운데 Cannon(1939)은 고양이를 개의 전면에 놓았을때 고양이의 노중 epinephrine 분비가 증가함을 보고하였고, Shun등(1969)은 고온 환경하에서 thyroid activity가 저하된다고 하였으며 Hoaki(1982)는 쥐의 구속실험에서 norepinephrine과 3-methoxy-4-hydroxy

phenyl thylene glycol의 변화를 관찰하였으며, Iimori (1982)는 stress가 쥐의 뇌내 norepinephrine 대사에 미치는 영향을 발표하였다.

1960년대 이후 catecholamine의 분해산물인 vanilyl-mandelic acid(VMA), nor-metanephrine 및 metanephrine 등을 측정하는 방법이 알려졌으며, 이들 화합물들은 뇨중에 norepinephrine, epinephrine보다 다량 존재하고 있다. 많은 연구실에서는 뇨중 catecholamine과 이들의 대사산물을 동시에 검출하고 있다. 이 catecholamine과 그 대사물을 측정함에는 alumina 추출법보다는 ion-exchange법이 더 좋은 결과를 나타내고 있다(Jackman, 1984; Maruta 등, 1984; Neidhart, 1983; Smedes, 1982).

HPLC(High Performance Liquid Chromatograph)를 이용하면 amine류에 화학적 변화를 주지 않고 직접 norepinephrine, epinephrine 및 dopamine을 측정할 수 있는데 이때 검출기로는 fluorescence detector나 electrochemical detector를 사용한다(Tsuchiya 등, 1986; Gerlo 등, 1985). 뇨중 catecholamine을 측정함에 있어서 최근에는 1회용인 Bio-Rex 70이라는 수지(resin)를 담은 cation exchange column을 사용함으로써 뇨중 약 염기성 amine류를 흡착한다. 흡착된 amine류를 특수한 유출액인 ammonium pentaborate를 사용함으로써 norepinephrine, epinephrine 및 dopamine을 흘러 보낸다.

Ashoff(1979)는 plasma hormone의 양은 circadian rhythm(생리주기)와 관련이 있다고 하였고, Westerink 등(1986)은 catecholamine의 circadian rhythm을 측정하였는데 오전 3시경에 낮은 농도를 보이다가 오전중에 서서히 오르다 12시경에서 오후 3시경에 가장 낮은 농도를 보이다 증가하여 저녁 9시경에 최고 농도를 나타내었다. 또 인체에 있어서 epinephrine은 정신적 활동이나 stress와, norepinephrine은 신체적 활동과 더 연관성이 있다는 보고가 있다(Sanchez 등, 1980; Fibiger 등, 1984).

본 연구에서 대조군의 뇨중 epinephrine은 26.01 ng, dopamine은 42.04 ng이 검출되었으나 norepinephrine은 검출되지 않은 것은 실험방법상의 차이등 여러가지 원인이 있겠다. 본 연구에서와 같이 저온 stress에 의해 catecholamine의 분비가 증가하는 것을 receptor-coupled feedback mechanism과 관련이 있다는 보고가

있으며(Langer, 1980), O'Malley(1984)는 저온은 일반적인 stress반응을 일으키지 않고 교감신경계만을 특이하게 자극시켰다고 보고하였다.

본 연구는 다음과 같은 제한점을 갖고 있다.

1) 저온 stress를 주기 위해 5°C 냉장고에 실험군을 둠으로써 저온환경이외의 요소 예를 들면 신선한 공기 공급의 부족, 빛의 차단, 소리의 차단과 같은 stress를 줄 수 있는 다른 요인을 제거하지 못하였다.

2) Table 1에서 구한 실험군과 대조군의 catecholamine양은 HPLC에서 나타난 height를 이용하여 standard solution의 height와 비교하여 구한 것이므로 뇨 전체의 농도가 아니며, 실험군과 대조군의 일정한 양의 뇨속에 포함된 catecholamine량을 비교하는 것에만 목적을 두었다.

3) 흰쥐 각 개체간에 catecholamine분비량에 차이가 있는데(Westerink 등, 1986), 5마리를 한 group으로 하여 뇨를 모아 catecholamine의 양을 측정함으로써 개체간 오차를 무시하였다. 이 방법은 실험에 필요한 양의 뇨를 채취하기 위하여 부득이한 방법이었다고 생각되나 좀더 적절한 방법이 모색되어야 하겠다.

4) 가설을 증명하기 위해, 실험설계과정에서 짝있는 실험과 같은 통계학적 방법을 사용할 수 있는 방법을 구상하지 못하였다.

본 연구는 앞으로의 연구에 기초적인 연구결과이며 이상과 같은 제한점들은 다음 연구에서는 좀더 극복되리라 생각하며, 이러한 제한점을 내포하였으나 저온인 5°C 냉장고 환경에서의 실험군에서 대조군보다 5배 정도의 catecholamine의 분비량이 증가한 결과에서 저온 stress가 catecholamine분비에 주된 영향을 미쳤으리라 사려된다.

V. 결 론

저온 환경이라는 stress가 동물의 catecholamine분비에 미치는 영향을 알기 위하여 흰쥐를 5°C 냉장고 환경하에 두면서 뇨중 catecholamine의 분비상태를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 정상 상태에서의 흰쥐의 뇨중 epinephrine의 함량은 26.01 ng이었고 dopamine의 함량은 42.04 ng이었다.

2) 저온 환경인 5°C 냉장고 환경에 폭로된 흰쥐의 뇨

중 dopamine의 함량은 221.5 ng으로 대조군 뇨의 함량보다 약 5.3배나 많은 양이 검출되었다.

3) 위의 실험결과로 보아 저온환경이 흰쥐에 영향을 주어 뇨중 catecholamine의 상승을 초래했음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Aschoff, J. *Circadian rhythms, general features and endocrinological aspects*. *Endocrine Rhythms*, N.Y. Raven Press, 1979, pp. 1-62
- Carruthers M. *Biochemical responses to stress in the environment*. *Proc Roy Soc Med* 1975; 68:429-430
- Cassale G et al. *Beta-endorphine and cold pressor test in the aged*. *Gerontology* 1985; 31(2):101-105
- Callingham BA. *Catecholamines in blood*. *Handbook of physiology*. Baltimore: Williams & Wilkings, 1975, pp. 427-445
- Cannon WB. *The wisdom of the body*. sec. ed. N.Y., W. Norton Co., 1939
- Claustre J et al. *Free, glucuronide, and sulfate catecholamines in the rat: Effect of hypoxia* *J Appl Physiol* 1985; 59(1):12-17
- Fibiger W et al. *Relationship between catecholamines in urine and physical and mental effort*. *Int J Psychophysiol* 1984; 1:325-333
- Gerlor E et al. *High performance liquid chromatographic assay of free norepinephrine, epinephrine, dopamine, vanilylmandelic acid and homovanillic acid*. *J Chromatogr* 1985; 343(1):9-20
- Hoaki Y. *Effect of repeated immobilization stress on noradrenaline turnover in the rat brain region*. *J of Kurme Med Soc* 1982; 45:12
- Iimori K. *Changes in noradrenaline metabolism in rat brain regions by psychological stress*. *J of Kurme Med Soc* 1982; 45:6
- Irwin JK. *Catecholamine, adrenal hormones, and stress*. *Hospital Practice*. 1976, pp. 49-55
- Jackman GP. *J Chromatog* 1984; 308 : 301
- Jacobo W et al. *Adrenomedullary response to maximal stress in humans*. *Am J Med* 1984; 77(5):779-784
- Knight DR et al. *Urinary responses to cold temperature during water immersion*. *Am J Physiol* 1985; 248(5):560-6
- Langer SZ. *Presynaptic regulation of the release of catecholamines*. *Pharmac Rev* 1980; 32:337-354
- Leppälüoto J et al. *Endocrine effects of repeated sauna bathing*. *Acta Physiol Scand* 1986; 128(3):467-470
- Little RA et al. *Plasma catecholamine concentrations in acute stage of stress and trauma*. *Arch Emerg Med* 1985; 2(1):46-74
- Mruta K et al. *Clin Chem* 1984; 30:1271
- Nabeshima et al. *Responses of the pituitary adrenal system of mice to an environment of high temperature*. *Res Commun in Chem Path and Pharm* 1982; 38:1
- Neidhart B. *Anal Chem* 1983; 315:232
- Olive G, Schaefer EA. *The physiological effects of the suprarenal capsules*. *J Physiol* 1985; 18:230
- O'Malley BP et al. *Circulating catecholamine, thyrotrophine, thyroid hormone and prolactin responses of normal subjects to acute cold exposure*. *Clin Endocrinol* 1984; 21(3):285-291
- Sato T et al. *Thyroid hormone-catecholamine interrelationship during cold acclimation in rats. Compensatory role of catecholamine for altered thyroid states*. *Acta Endocrinol* 1986; 113(4):536-542
- Sanchez J et al. *Sex differences in the sympatho-adrenal response to isometric exercise*. *Eur J Appl Physiol* 1980; 45:147-154
- Schönig A et al. *Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of rat*. *Circ Res* 1984; 55(5):689-701
- Selye H. *The general adaptation syndrome and the disease of adaptation*. *J Clin Endocrinol* 1946; 6: 117
- Shun A, Johnson GE, Flattery KV. *Am J Physiol* 1969; 211:1164
- Smedes F et al. *Simple and fast solvent extraction system for selective and quantitative isolation of adrenaline, noradrenaline and dopamine from plasma and urine*
- Strong LH et al. *Metabolic and vasomotor insulative responses occurring on immersion in cold water*. *J Appl Physiol* 1985; 58(3):964-977
- Tsuchiya H et al. *High performance liquid chromatographic determination of urinary catecholamines by pre-column solid-phase dansylation on alumina*. *Anal Biochem* 1986; 155(1):28-33
- Martha EH. *Effect of cutaneous denervation of face and trunk on thermoregulatory responses to cold in rats*. *J Appl Physiol* 1985; 58(2):376-383
- Westerink BH et al. *Circadian variation of catecholamine excretion in rats*. *Neuropharmacology* 1986;25(11):1255-1262