

## 환경 Stress에 의한 흰쥐노중 catecholamine의 변화

김 형 석

경희대학교 의과대학 예방의학교실

### Variations of Catecholamine Contents in Rat Urine by Environmental Stress

Hyung-Suk Kim

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

#### ABSTRACT

The word of stress came from Latin language as stringere and it was used in medical fields from 1935. According to Selye, all the biological bodies reveal physiological changes when some stimulation exceed normal levels, and consequently the pituitary gland and adrenal systems are activated. Jacob expressed that stress is the loss of homeostasis by physical, chemical, and emotional stimulation. When biological organisms receive extreme stress the amount of catecholamine excretion are increase.

Author investigated the catecholamine contents in rat urine after giving the low temperature stress, noise stress, and water immersion stress. The 24 hours rat urine was collected by adding 1 ml 6 N-HCl and the sample is passed through Bio-Rex 70 samples treatment column to extract catecholamine and detected the catecholamine with HPLC-fluorescence detector. The highest epinephrine concentration was 67.14 ng in water immersion stress condition and the dopamine concentration of 221.37 ng was shown in the low temperature stress condition.

#### 緒 論

Stress란 라틴어인 stringere에서 由來한 말로서 1935년 Hans Selye<sup>1)</sup>에 의하여 처음 의학에 사용되었다.

Selye에 의하면 생체에 미치는 刺戟이 一定한 强

度以上일 경우 生體는 그 자극의 종류에 관계없이 生理的變化를 일으키는데 이것을 stress라 하였고 이때 腦下垂體와 副腎系의 機能航進이 일어난다고 하였다. 한편 Jacobo등<sup>2)</sup>은 stress를 身體의 自然的平衡을 妨害하는 영향력인 物理化學的인 자극 및 感情障害에 의하여 生體의 恒常性(homeostasis)이 均衡을 일으킬때 일어나는 것이라고 表現하였다.

生物體는 外部環境의 극심한 변화가 있을때 항상성을 유지하기 위하여 神經內分泌學的인 生體反應을 일으켜 catecholamin의 분비량을 증가시킨다<sup>3~5)</sup>.

Oliver등<sup>6)</sup>은 stress에 의하여 나타나는 교감신경 흥분작용이 부신수질 추출물을 주사하였을 경우에도 同一하게 일어남을 기초로 catecholamine과 stress와의 관계가 주목을 끌게 되었고 stress와 內分泌系 및 catecholamine과의 3자 연관성을 확립하였다.

低溫環境에 대한 stress는 Strong등<sup>7)</sup>이, 高溫環境에 대한 stress는 Leppaluoto등<sup>8)</sup>, Bonfils등<sup>9)</sup>은 拘束時 胃潰瘍의 發生을, Goodall등<sup>10)</sup>은 浸水時 epinephrine의 分泌가 증가된다고 발표하는등 환경 stress에 대한 外國研究가 많이 시행되었다.

著者は 흰쥐를 대상으로 環境 stress가 catecholamine의 分泌量변화에 대한 영향을 알아보기 위하여 실험한 결과를 보고하는 바이다.

## 實驗方法

### 1. 실험동물 및 채뇨

실험동물은 體重 150~200 g되는 흰쥐를 암놈만을 대상으로 분말사료와 물을 충분히 공급하면서 대종공업사 제품인 쥐대사 실험장치에 5마리를 넣고 24시간동안의 尿를 채취하였다.

### 2. 수 침

흰쥐를 拘束裝置(4.5 cm<sup>H</sup>×5.5 cm<sup>W</sup>×14.4 cm<sup>L</sup>)에 넣고 고정시킨후 18°C±2되는 물에 넣고 1시간씩 4회 넣은후 24시간 동안의 尿를 채취하였다.

### 3. 저온환경 stress실험

냉장고속의 기온을 5°C로 조절하고 1日 8시간 동안 흰쥐를 넣은 후 쥐장에서 24시간동안의 尿를 채취하였다.

### 4. 소음 stress실험

흰쥐를 80 dB되는 환경에 8시간 露出시킨후 24시

간동안의 尿를 채취하였다.

## 5. 시료의 전처리

① 1.6 cm×15 cm되는 시험관에 시료 5 ml, ammonium acetate buffer 5 ml, 0.5 M NaOH 20.0 μl를 각각넣고 혼합한 후 pH 6.0~7.0이 되도록 0.5 M NaOH나 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 μl를 HPLC에 주입하였다.

## 6. 시약의 제조

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

② 1 M Acetic acid ; glacial acetic acid 5.7 ml를 H<sub>2</sub>O로 100 ml가 되게 한다.

③ 0.05 M HCl ; c-HCl 1 ml를 H<sub>2</sub>O 250 ml에 넣고 희석한다.

④ 0.03 M Ammonium acetate buffer ; 무수 ammonium acetate 2.3 gm을 H<sub>2</sub>O 800 ml에 넣고 Na<sub>2</sub>EDTA 1 gm을 넣은 후, 0.5 M NaOH로 pH 7.5±0.02가 되게 한다.

다시 H<sub>2</sub>O를 추가하여 전량이 1,000 ml가 되게 한다.

⑤ Elution buffer ; Ammonium pentaborate 20 gm을 H<sub>2</sub>O 1,000 ml에 용해시킨다.

⑥ 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>용액 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 68.05 gm을 H<sub>2</sub>O 400 ml에 녹인 후 500 ml로 하고 0.45 μm filter로 여과한다.

## 7. Catecholamine의 측정

시료와 표준액을 HPLC (High Performance Liquid Chromatograph)에 주입하여 chromatogram상의 peak height를 비교하여 catechol-

amine의 양을 측정한다.

이때 HPLC의 조건은 다음과 같다.

Instrument : 미국 Varian사제 Vista LC54

Column : Micro Pak MCH 30 cm×4 mm

Detector : Fluorescence  $\lambda_{exc}=200\text{ nm}$   
 $\lambda_{em}=380\text{ nm}$

Mobile Phase : 0.01 M perchloric acid :  
 ACN=99 : 1, 1 ml/min Column temperature : 30°C

**實驗結果 및 考察**

흰쥐에게 환경 stress를 주었을 때 尿로 배설되는 catecholamine의 양적 변화를 알아보기 위하여 catecholamine류에 속하는 epinephrine, nor-epinephrine, 및 dopamine의 표준혼합용액 (10 mg/l)

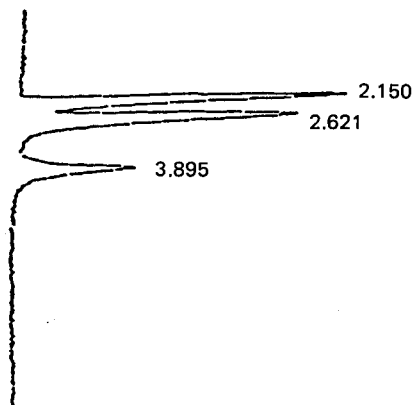
의 50  $\mu\text{l}$ 를 HPLC에 注入한 결과 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다.

즉, retention time(이하 R.T.로 표시함)이 2.150분, 2.621분 및 3.895분에서 각각 peak가 출현하였다. 이들 3개의 peak가 어느 성분인지를 확인하기 위하여 각각의 成分의 chromatogram을 얻은 결과 Fig. 2와 같이 R.T. 2.150의 peak는 norepinephrine 이었고 R.T. 2.621의 peak는 epinephrine의 peak이며 R.T. 3.895의 peak는 dopamine의 peak임을 확인할 수 있었다.

**1. 低溫 stress에 의한 catecholamine 분비량의 변화**

흰쥐 5마리씩을 1군으로 하여 대조군과 저온군으로 분리후 저온군을 5°C되는 냉장고에 넣어 5°C의 환경에 머물게 하면서 24시간 동안의 뇨를 채취

CHART SPEED 0.5 CM/MIN  
 ATTEN : 32 ZERO : 5% 5 MIN/TICK



TITLE : CATECHOLAMINE		10 : 23 3 SEP 87			
CHANNEL NO : 1		SAMPLE : CATECHOL	METHOD : CAT		
PEAK NO	PEAK NAME	RESULT	TIME (MIN)	HEIGHT COUNTS	SEP CODE
1.	norepinephrine	45.8424	2.150	8424	BV
2.	epinephrine	38.1911	2.621	7018	VB
3.	dopamine	15.9665	3.895	2934	BB
TOTALS		100.0000		18376	
MULTIPLIER : 1.00000					

Fig. 1. Chromatograms of catecholamine mixture (50  $\mu\text{l}$  of each 10 mg/l standard solution)

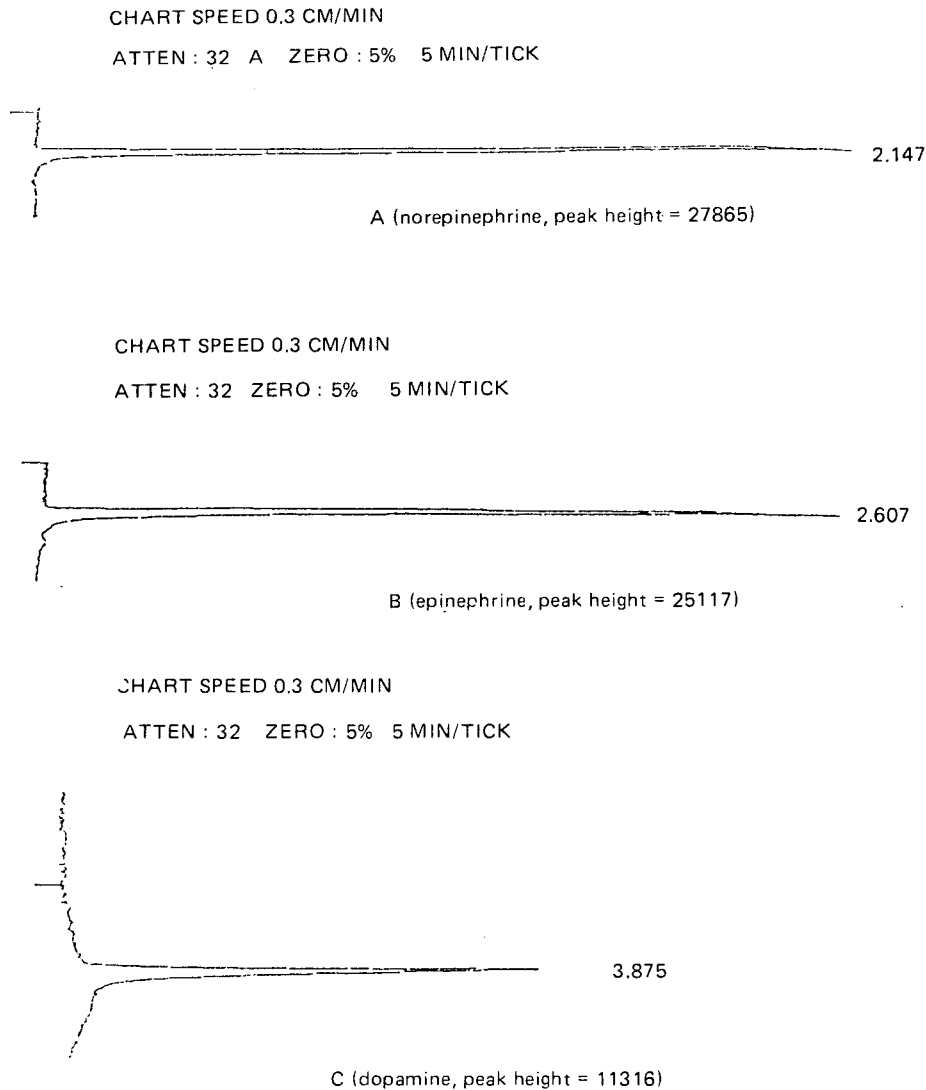


Fig. 2. Chromatograms of catecholamines (50  $\mu$ l of 10 mg/l)

A: norepinephrine  
B: epinephrine  
C: dopamine

catecholamine의 함량을 측정한 결과 Table 1과 같이 정상흰쥐노증 epinephrine의 함량은 26.01 ng 이었고 低温환경하에서는 35.17 ng으로서 epinephrine의 분비량이 약간 증가하였다. 그러나 정상 상태하의 흰쥐노증 dopamine의 함량은 42.87 ng이었으나 저온환경하에서는 221.37 ng으로 정상시보다 약 5배 정도 dopamine의 함량이 많이 배출되었

다.

Avakian등<sup>11)</sup>은 흰쥐에 대한 한냉 stress 실험에서 정상혈장중 epinephrine의 함량은 0.64 ng이었으나 저온환경하에 혈장중에는 0.98 ng으로 증가하였다고 보고하였다. Epinephrine의 함량차이가 있는 것은 본 실험에서 5마리를 1군으로 실험하였고 Avakian등은 시료가 혈장이고 본 실험에서는 노를

**Table 1. Epinephrine and Dopamine Concentration in the Control and Low Temperature State Rat Urine.**

Environment	Epinephrine (ng)	Dopamine (ng)
Normal	26.01±0.36	42.87±2.24
Low Temperature	35.17±1.47	221.37±3.77

시료로 사용하였기 때문이다.

生體內에서 tyrosine이 대사되어 dopamine, norepinephrine 및 epinephrine이 생성되는데 본 실험에서는 뇨중 dopamine과 epinephrine만이 검출되었고 norepinephrine이 검출되지 않은 것은 측정기술상의 문제인지 아니면 분해속도가 빨라 epinephrine으로 변화되었는지는 계속 추궁할 문제이다.

### 2. 소음 stress에 의한 catecholamine 분비량의 변화

90 dB의 소음을 1日 8시간 폭로시킨 흰쥐의 뇨중 epinephrine 및 dopamine의 분비량은 Table 2와 같이 epinephrine의 뇨중 함량은 정상시 26.01 ng 이었으나 소음에 폭로시에는 30.46 ng 이었고 dopamine의 정상분비량은 42.87 ng이었으나 소음에 폭로시에는 83.64 ng이었다.

**Table 2. Epinephrine and Dopamine Concentrations in Rat Urine which were exposed to 90 dB Noise.**

Environment	Epinephrine (ng)	Dopamine (ng)
Normal	26.01+0.36	42.87+2.24
90 dB Noise	30.46+0.74	83.64+1.27

### 3. 浸水 stress에 의한 catecholamine 분비량의 변화

흰쥐를 固定틀에 넣은 후 浸水(수온 18°C) 실험 후 24시간 동안의 뇨를 채취하여 epinephrine과 dopamine의 함량을 측정하여 보니 Table 3과 같았

**Table 3. Epinephrine and Dopamine Concentrations in Rat Urine under the Water Immersion Condition.**

Environment	Epinephrine (ng)	Dopamine (ng)
Normal	26.01+0.36	42.87+2.24
Water Immersion	67.14+3.42	118.94+4.57

다.

침수시 고정틀에 고정되어 있으면서 체온보다 낮은 물에 들어가므로 二重 stress를 받으리라고 생각된다. Epinephrine의 배설량은 67.14 ng이었고 dopamine의 배설량은 118.94 ng이었다. 위의 3가지 stress하에서 epinephrine이 가장 많이 배설된 stress는 침수이었고 dopamine이 가장 많이 배설된 stress는 저온 stress이었다.

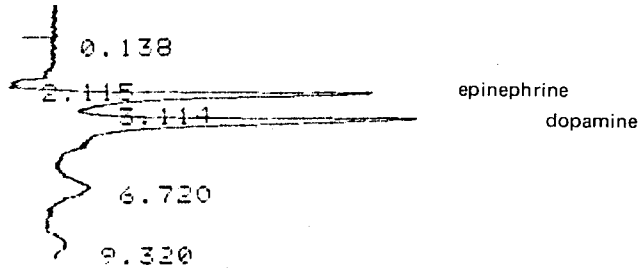
Cannan<sup>12)</sup>은 환경 stress에 의하여 자율신경과 내분비선이 주축이 되며 항상성을 유지한다고 하였고 생체에 미치는 자극이 一定한 강도 이상이 될 경우에는 傷害의으로 작용하여 生理的變化를 일으키는데 이때 體內에는 catecholamine의 분비가 증가한다고 하였다. 온도, 습도, 기압, 소음, 기류등의 환경 stress가 교감신경을 흥분시켜 catecholamine의 분비를 촉진한다는 발표가 있고<sup>13,14)</sup> Kety는 catecholamine이 정서변화와 밀접한 관계가 있다고 하였다.

本 研究에서도 환경 stress에 속하는 저온, 소음 및 침수에 관한 실험에서 정상치보다 epinephrine과 dopamine의 분비량이 증가하는 것은 확실히 교감신경의 흥분으로 인한 生體的, 生理的 적응한계를 넘어 catecholamine이 분비하는 것이 確實하다.

본 실험에서 catecholamine의 측정법으로 HPLC에 Fluorescence 검출기를 연결하여 측정하였으나 Anderson을 위시하여 여러 논문에서는 ECD (electrochemical detector)를 사용하여 감도가 높은 결과치를 얻었으며<sup>15,16)</sup> 本實驗에서는 Fig. 3과 같이 epinephrine과 dopamine의 peak만이 검출되었으나 ECD를 사용한 논문중에는 vanillylmandelic acid, serotonin등도 측정되고 있으며

CHART SPEED 0.3 CM/MIN

ATTEN : 32 ZERO : 5% 5 MIN/TUCK



TITLE : CATECHOLAMINE

15 : 15 31 AUG 87

CHANNEL NO : 1

SAMPLE : CATEOHOL

METHOD : CAT

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT	TIME (MIN)	HEIGHT COUNTS	SEP CODE
1		47.7605	2.644	8328	VV
2		2.5004	3.114	436	VV
3		47.4852	3.821	8200	BB
4		2.2538	9.320	393	BB
TOTALS :		99.9999		17437	
MULTIPLIER : 1.00000					

Fig. 3. Chromatograms of the rat urine which received a stress.

로 이에대한 관심도 가져야 되겠다. 한편 본 실험에서 이용한 환경 'stress' 이외에도 고온, 전기자극, 기류등에 대한 실험도 시행되면 좋겠고 흰쥐의 뇨 뿐만 아니라 stress를 받고 있는 사람들의 뇨를 대상으로 연구하는 것도 흥미있는 연구과제라고 생각된다.

### 결 론

환경 stress와 catecholamine과의 관계를 알아보기 위하여 흰쥐를 대상으로 저온, 소음 및 수침 stress를 주면서 뇨를 채취하여 catecholamine을 측정 한 결과 다음과 같은 결론을 얻게 되었다.

1. 환경 stress를 줌으로써 정상뇨보다 epinephrine과 dopamine의 분비량은 증가되었는데 epinephrine은 침수실험에서 67.14 ng으로 가장 많은량이 검출되었고 dopamine은 저온 stress에서 221.37 ng으로 가장 많은량이 검출되었다.

2. Catecholamine 성분중 norepinephrine은 검출되지 않았고 不分明한 peak가 2~3개씩 나타났다. 이것은 catecholamine의 분해산물이라고 추정된다.

### REFERENCES

- Selye, H.: Stress, Canada Acta. pp. 5-13 (1950)
- Jacobo, W., et al: Adrenomedullary response to maximal stress in humans. *Am. J. Med.*, **77**, 779 (1984)
- Callingham, B.A.: Catecholamines in blood. *Handbook of Physiology*. Baltimore, Williams and Wilkins. p.427 (1975)
- Hoaki, Y.: Effect of repeated immobilization stress on noradrenalin turnover in the brain region. *J. of Kurme Med. Soc.*, **45**, 12 (1982)
- Schonig, A., et al: Release of endogeneous catecholamines in the myocardium of rat. *Circ. Res.*,

- 55, 689 (1984)
6. Oliver, G. and Schaefer, E.A.: The physiological effects of the suprarenal capsules. *J. Physiol.* **18**, 230 (1985)
  7. Strong, L.H., et al: Metabolic and vasomotor insulative responses occurring on immersion in cold water. *J. Appl. Physiol.*, **58**, 964 (1985)
  8. Leppaluto, J., et al: Endocrine effects of repeated sauna bathing. *Acta Physiol. Scand.*, **128**, 467 (1986)
  9. Bonfils, S. and Lambling, A.: Pathophysiology of peptic ulcer. Mc Gill Univ. Press. Montreal. p. 153 (1963)
  10. Goodall, M. and Graveline, D.E.: Urinary adrenaline and noradrenaline response to stimulated weightless state. *Am. J. Physiol.*, **206**, 431 (1964)
  11. Avakian, E.V., Horvath, S.M., and Colburn, R. W.: Influence of age and cold stress on plasma catecholamine levels in rats. *J. of Autonomic Nervous System*, **10**, 127 (1984)
  12. Cannon, W.B.: The wisdom of body, Norton & Co. Inc., New York (1932)
  13. 신상구, 윤엽, 최종상, 박근조, 박정구 : Gravitational stress에 대한 교감신경 부신계 반응에 관한 연구. *항공의학* **28**권, 1호 (1980)
  14. 吉田敬一 : 騒音이 生體에 주는 영향. *公衆衛生*, **46**, 436 (1982)
  15. Anderson, G.M.: Liquid chromatographic determination of urinary catecholamines after one-step alumina extraction. *J. of Chromat.*, **424**, 373 (1988)
  16. Peaston, R.T.: Routine determination of urinary free catechoamine HPLC with electrochemical detection. *J. of Chromat.*, **424**, 263 (1988)