

중추 노르아드레날린성 신경계 및 황체호르몬 분비 촉진호르몬에 대한 테스토스테론의 영향

고홍숙 · 김경진* · 박종세** · 고광호

서울대학교 약학대학, *자연과학대학, **한국과학기술원 도핑콘트롤센터

(Received July 12, 1991)

Effect of Testosterone on Central Noradrenergic Nervous System and LHRH

Hong Sook Koh, Kyungjin Kim*, Jongsei Park** and Kwang Ho Ko

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Doping Control Center, KIST, Seoul 136-791, Korea

Abstract—Relationship between noradrenergic nervous system activity and luteinizing hormone releasing hormone(LHRH) content mediated by testosterone in hypothalamus was tested. Three groups of adult male animals were prepared; (1) Intact; (2) Castration+Vehicle (Cast+V); (3) Castration+Testosterone (Cast+T). Silastic capsule containing vehicle or testosterone was implanted into neck region of animals two weeks following castration. Norepinephrine content, alpha-adrenergic receptor binding characteristics using H³-WB4101, and content of LHRH by LHRH RIA procedure were determined. Testosterone replacement to castrated male rats augmented the content of norepinephrine and LHRH. Testosterone replacement increased the alpha-adrenergic receptor density but did not change alpha-receptor affinity. The data from the present study suggest that increase in LHRH content by testosterone may be positively coupled to the activity of central noradrenergic nervous system.

Keywords □ Testosterone, noradrenergic nervous system, LHRH, hypothalamus.

뇌는 스테로이드 성호르몬의 중요한 표적기관이며, 스테로이드 성호르몬은 신경조절물질과 신경 펩타이드의 합성과 분비를 조절하는 neuromodulator로 알려져 있다.

카테콜아민의 길항약 처리가 배란 전의 황체호르몬(LH; luteinizing hormone) 분비를 억제한다고 보고한 이래^{1,2)} 카테콜아민-LHRH-LH-스테로이드의 생식내분비 축의 연계성이 보고되었으며,^{3,4)} 이러한 스테로이드의 feed-back 역할이 amine류의 중추성 신경전달물질을 경유한다는^{2,5)} 현상은 이미 기정사실화되어 있다. 이러한 현상 중에서 신경계와 펩타이드 호르몬의 상호 조절기전이 규명되지 않은 것으로서 LHRH(luteinizing hormone releasing hormone;

10 amino acids)와 카테콜아민성 신경계의 상관성이 있다. 흰쥐 암컷에서 프로제스테론을 처리시 노르에피네프린 함량이 LHRH 증가와 더불어 야기되는 것으로 보아⁶⁾ 스테로이드 호르몬의 LHRH에 대한 영향은 일차적으로 카테콜아민 신경계를 경유할 가능성이 있다.

에스트로젠은 노르에피네프린의 분비를 증가시킨다는 보고⁷⁾가 있으며 흰쥐 암컷의 estrous cycle 각 단계에 따라 시상하부의 노르에피네프린 수용체가 변화한다는 보고^{8,9)}도 있다. 또한 스테로이드 호르몬의 처리는 신경전달물질의 수용체의 밀도 혹은 친화도에 영향을 미친다는 보고¹⁰⁾도 있다. 남성호르몬인 테스토스테론이 시상하부 LHRH 신경활성에 변화를 주고

있음¹¹⁾은 밝혀져 있으나 테스토스테론이 직접적으로 LHRH 신경에 영향을 주는지 또는 노르아드레날린성 신경계를 통한 간접적 효과인지에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다. 테스토스테론이 시상하부에 존재하는 LHRH 신경에 미치는 영향이 노르아드레날린성 신경계를 경유하여 나타난다면, 테스토스테론에 의한 노르아드레날린성 신경계 활성변화를 예측할 수 있고 이 경우 신경전달물질인 노르에피네프린의 함량변화, 노르에피네프린수용체의 변화 등도 시상하부 조직에서 관찰될 가능성을 예상할 수 있다.

본 연구에서는 테스토스테론이 생성되는 흰쥐의 수컷을 사용하여 세 가지 동물군, 즉 1. 정상 동물, 2. 거세된 동물, 3. 거세시키고 일정기간 후에 테스토스테론을 재공급 받은 동물, 으로 준비하고 각 군에서의 실험결과를 비교 관찰하였다.

각 동물 군에서 테스토스테론이 체내에 공급될 때와 안될 때에 시상하부 내에서 다음 세 가지 현상을 관찰하였다: 1. 노르에피네프린의 함량, 2. ³H-WB4101에 대한 alpha-수용체의 결합 특성 및 3. LHRH의 함량. 이러한 세 가지 현상의 결과에서 테스토스테론에 의한 LHRH 함량변화를 관찰할 수 있다면, 그 변화가 노르에피네프린의 함량변화 및 alpha-수용체의 결합 특성변화와 수반하는지 여부를 파악하여 노르아드레날린성 신경계와 LHRH 신경의 상관성 기전을 규명하고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기—시약 중에서 testosterone, atenolol bitartrate salt, pargyline, bovine serum albumin, dithiothreitol은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO)에서 구입하였고, ³H-WB4101과 WB4101은 Amersham International Plac.(Amersham, UK)에서, Aquasol은 NEN Research Products에서 각각 구입하였다.

또한 Trisma, HCl, folin-ciocalteu reagent 등은 시중에서 구입할 수 있는 최고 순도의 것이었고 물은 모두 탈이온된 이차증류수를 사용하였다. 수용체 결합 실험시 사용하는 Tris-HCl buffer는 conc. HCl로 pH 7.7을 맞추었다.

실험동물—서울대학교 실험동물 사육장에서 공급 받은 200 내지 250 그램의 성숙한 Sprague-Dawley

rat 웅성을 사용하였다. 실험동물은 1주 이상 실험실 조건에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 필요한 수술 및 뇌 절제는 오전 10시를 전후하여 시행하였다.

실험 전처리—200~250g의 성숙한 S.D. 웅성쥐를 사용하여 실험군을 1) 정상군(Intact), 2) 정소절제군(CAST+V), 3) 테스토스테론 처리군(CAST+T)의 3군으로 나누고 실험기간 동안 충분한 양의 사료와 물을 공급하였다. 거세시키고 생체내부의 테스토스테론 효과가 충분히 제거되었다고 믿어지는 2주 후에¹²⁾ 결정체의 테스토스테론을 채운 silastic capsule(길이 3 cm, 내경 0.062 in., 외경 0.125 in.)을 쥐의 경부에 삽입하였다. 이를 4일간¹²⁾ 서서히 방출시켜 정상동물 수준의 테스토스테론 농도가 체내에 유지되게 한 후 쥐를 단두 치사시켜 시상하부를 적출하였다. 시상하부는 preoptic area-anterior hypothalamic-mediobasal hypothalamus(POA-AH-MBH)로 구획하여 적출하였다.¹³⁾

노르에피네프린의 영향—적출분리한 시상하부를 formic acid/acetone(15/85) 20배 용량에 넣어 균질화시키고 이를 1500g에서 10분간 원심분리하였다.¹⁴⁾ 얻어진 상등액을 heptane/chloroform (8/1) 3배 용량과 함께 섞고 원심분리하여 수층만을 취하였다. 이를 N₂ stream 하에서 말리고 -20°C에서 저장했다가 사용시 mobile phase 40 μl에 녹이고 이 중 20 μl를 HPLC-ECD system에 적용시켰다. mobile phase 조성은 0.1 M citric phosphate buffer(pH 3.5), sodium octyl sulfate 0.01%, methanol 9%로 이루어지며 flow rate는 1.0 ml/min이고 산화전위는 0.65 V에 맞추었다.

수용체 결합실험—적출분리한 25~30마리의 시상하부의 무게를 재고 10 mM dithiothreitol을 포함하는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.7, 25°C) 40배 용량을 넣고 균질화하였다. 균질액은 1000g에서 원심분리하고 상등액을 취하여 4°C에서 5000g(24000 rpm)로 10분간 원심분리하여 침전을 얻었다. 침전을 10 mM DTT를 함유한 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.7, 25°C)에 현탁시켜 다시 50000g로 10분간 원심분리하였다. 이 때의 침전을 원 조직무게의 60배 용량의 50 mM Tris-HCl buffer로 재현탁시켜 수용체 결합실험에 사용하였다. 최종 현탁액은 단백질 함량이 약 600 μg/ml가 되도록 하였다.

수용체 결합실험으로는 U'Prichard 등 방법을 개량

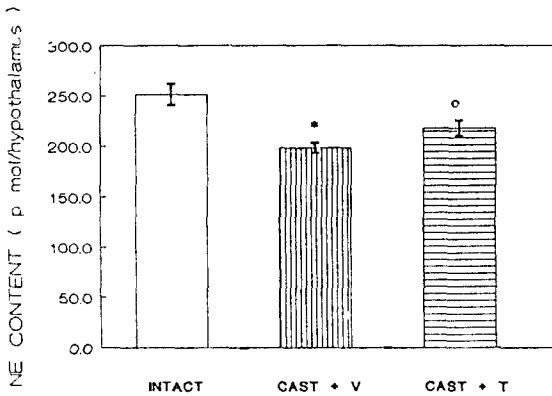


Fig. 1—Effect of testosterone on norepinephrine(NE) content in the rat hypothalamus.

Each bar represents the mean ± S.E.M. of the data from 4 replicates. Each experiment was carried out using hypothalami pooled from 2 rats.

CAST+V; Vehicle treatment after castration.
 CAST+T; Testosterone treatment after castration.

*; $p < 0.01$ compared with INTACT.

○; $p < 0.01$ compared with CAST+V.

하였다. radioligand로서는 H^3 -WB4101(15Ci/mmol)을 Coligand로서는 WB4101을 사용하였다. 반응 종결 후에 반응액을 Whatman GF/B filter를 이용해 감압 여과하였다. filter는 냉각한 4 ml의 Tris-HCl buffer로 2회 세척 후 aquasol에 넣어 liquid scintillation spectrometer로 방사선량을 측정하였다. 모든 실험은 triplicate로 시행하였고 결과 분석은 scatchard plot에 의하며 이 때의 직선에서 k_d 와 B_{max} 를 구하였다.¹⁵⁾

LHRH의 정량—적출분리한 시상하부를 정량 전에 0.1 N phosphate buffer와 2 N NaOH로써 pH 6.3~7.5로 적정 후 2000g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하여 방사면역 측정법 (radioimmunoassay)을 시행하였다.¹⁶⁾ LHRH의 방사요오드화는 Na^{125} (SA, 17Ci/mg, NEN)을 사용하여 chloramine-T 방법으로 행하였다. 방사표지된 LHRH의 분리는 Sephadex G-25 Fine column을 사용하였다. LHRH Antiserum은 CRR-11-13-72(Ramirez, U of I)를 0.05 M EDTA-PBS-NRS에 용해하여 최종 희석비율은 1:250,000으로 적정 후 사용하였다.

단백질 함량의 측정—시상하부에서의 단백질 정량

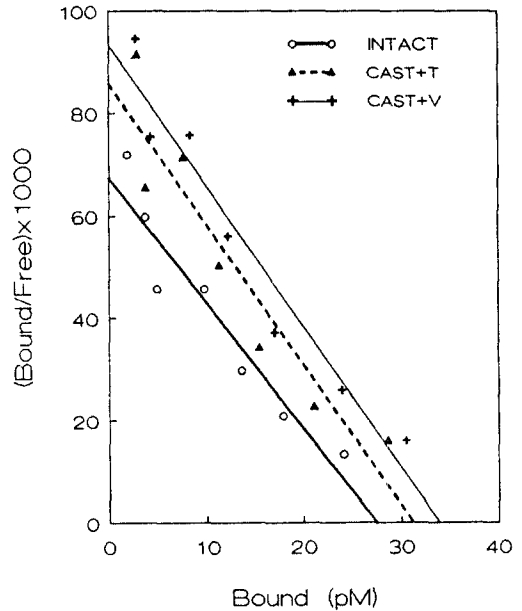


Fig. 2—Scatchard plot analysis of the H^3 -WB4101 binding to alpha adrenergic receptor in the hypothalamic membrane preparations derived from either INTACT, CAST+V or CAST+T treated rats.

Each point represents the mean of the data from 3 replicates. Each experiment was carried out using hypothalami pooled from 25 rats.

CAST+V; Vehicle treatment after castration.
 CAST+T; Testosterone treatment after castration.

은 Lowry *et al*¹⁷⁾ 방법으로 실시하였다.

결과 및 고찰

혈중 테스토스테론의 농도—혈중의 테스토스테론 농도를 방사면역 측정법으로 측정한 결과 정상군은 2.02 ± 0.18 ng/ml, 정소절제군은 0.12 ± 0.02 ng/ml, 정소절제 후 테스토스테론 처리군은 1.88 ± 0.52 ng/ml의 함량을 나타내었다.

테스토스테론에 의한 노르에피네프린의 함량변화—Fig.1에서 보는 바와 같이 노르에피네프린 함량은 정상군에 비해 현저히 감소하였으며, 테스토스테론 재공급시에 이러한 감소현상이 회복되었다.

Table I—Effect of testosterone on the binding of alpha-adrenergic receptor in the rat hypothalamus.

Condition	B_{max} (f mol/mg tissue protein)	K_d (nM)
INTACT	118.0	0.37
CAST+V	95.2	0.41
CAST+T	107.4	0.36

B_{max} and K_d are calculated from scatchard plot analysis. Each binding experiment was run in triplicate. Each experiment was carried out using hypothalami pooled from 25~30 rats.

CAST+V; Vehicle treatment after castration.

CAST+T; Testosterone treatment after castration.

정소절제군에 테스토스테론을 재공급했을 때의 노르에피네프린의 회복정도가 정상수준에 완전히 도달하지 못하는 것으로 보아 외부에서 공급한 테스토스테론과 생체 내부에 있던 테스토스테론의 효능에 차이가 나타나고 있으며 이에 대한 이유는 다음 두 가지 가능성으로 생각할 수 있다.

첫째, 혈중 테스토스테론의 농도는 정소를 절제한 후 외부에서 테스토스테론을 넣어 주었을 경우에 1.88 ng/ml로 정상동물군의 2.02 ng/ml의 약 90% 수준에 머물렀다. 즉 이식된 테스토스테론 자체의 맥동적 분비 부족이 그 원인일 가능성이 있다. 둘째, 테스토스테론의 충분한 효과 발현을 위해서는 정소 내에 존재하는 다른 인자가 필요할 가능성을 생각할 수도 있다. 이러한 경우라면 정소를 절제한 동물에 외부에서 테스토스테론을 재공급하더라도 정소내에 존재하는 다른 인자들이 모두 제거된 상태이므로 재공급된 테스토스테론의 효과가 충분히 발현되지 않았을 가능성이 있기 때문이다.

테스토스테론에 의한 alpha-수용체의 변화—Table I에 나타난 바와 같이 H^3 -WB4101을 사용한 수용체 결합 실험결과는 앞의 노르에피네프린 함량변화와 그 양상이 유사하다. 즉, 정소절제시 약 20% 감소되었던 수용체 수(B_{max})는 테스토스테론 처리시 다소 증가하였다. 그러나 수용체 친화력(K_d)은 정소를 절제시킨 경우 또는 정소절제 후에 테스토스테론을 재공급시킨 경우가 정상군에 비해 큰 변화를 나타내지 않았다.

신경계의 신경전달물질 분비가 감소하면 이 전달 물질에 대한 시냅스 후 수용체에는 일반적으로 과민화

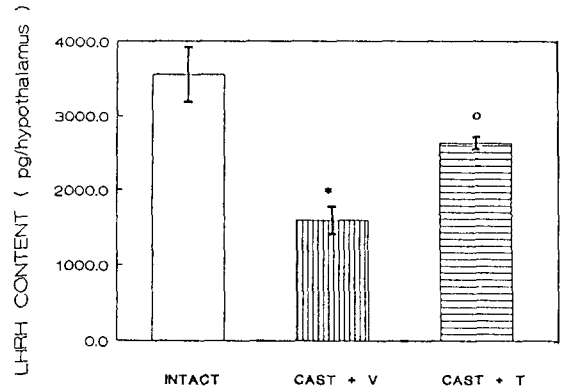


Fig. 3—Effect of testosterone on LHRH content in the rat hypothalamus.

Each bar represents the mean±S.E.M. of the data from 8 replicates.

CAST+V; Vehicle treatment after castration. CAST+T; Testosterone treatment after castration.

*; $p < 0.01$ compared with INTACT.

○; $p < 0.01$ compared with CAST+V.

(supersensitization)가 나타나며 이 결과는 수용체의 양적 증가로서 관찰될 수 있다.¹⁹⁾ 정소절제시에 노르에피네프린의 양이 감소했으므로 이에 대한 수용체는 과민화 반응에 의해 증가될 것을 예측할 수 있다. 그러나 본 실험의 결과에서 테스토스테론의 체내 함량 증감이 노르에피네프린의 증감과 아울러 H^3 -WB4101로 측정된 시냅스 후 alpha-수용체의 증감을 각각 유발시켰다. 따라서 본 실험에서의 alpha-수용체의 증감현상은 노르아드레날린성 신경말단에서의 신경전달물질의 양적변화와 관련된 현상의 결과로 해석할 수 있는 가능성은 희박하다. 오히려 테스토스테론이 노르아드레날린성 신경말단 이외에도 alpha-아드레날린성 수용체가 분포하고 있는 신경세포에도 직접 영향을 미친 결과를 나타낸 것이라고 생각할 수 있다.

테스토스테론에 의한 LHRH 함량변화—Fig. 3에서 보는 바와 같이 정상군에 비해 정소절제군은 LHRH 함량이 현저히 낮았으며, 테스토스테론의 재공급시에는 정상군의 80% 수준으로 다시 증가되었다. 이는 앞에서 행한 노르에피네프린의 함량이나 alpha-아드레날린성 수용체 수의 변화양상과 유사하였다.

본 연구에서 정소절제시와 테스토스테론 재공급시 시상하부에서의 LHRH 함량변화, 노르에피네프린의

함량변화 및 alpha-아드레날린성 수용체의 밀도변화의 결과는 테스토스테론이 LHRH의 조직내 함량증가를 촉진시키고, 이러한 촉진작용은 노르아드레날린성 신경계에 대한 촉진적 자극을 경유할 가능성이 높음을 암시한다. 그러나 테스토스테론이 LHRH 신경과 노르아드레날린성 신경계에 각기 따로 자극을 줄 가능성을 배제할 수는 없다고 생각된다.

결 론

1. 정소절제한 웅성쥐에 테스토스테론을 투여했을 경우, 정소절제에 의해 감소되었던 시상하부에서의 노르에피네프린의 함량과 alpha-아드레날린성 수용체의 수가 증가되었다.
2. 테스토스테론은 또한 정소절제시 감소되었던 LHRH의 양도 증가시켰다.
3. 테스토스테론에 의해 야기되는 시상하부에서의 노르아드레날린성 신경활성의 변화는 LHRH 함량변화와 수반되어 나타나므로 이들 두 가지 변화현상이 상호 연계되었을 가능성이 있다.

감사의 말씀

본 연구는 과학재단 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

문 헌

- 1) Everett, J.W.: Neuroendocrine aspect of mammalian reproduction. *Ann. Rev. Physiol.* **31**, 383(1969).
- 2) Sawyer, C.H.: The Seventh Stevenson Lecture: Brain amines and pituitary gonadotropin secretion. *Can. J. Physiol. & Pharmacol.* **57**, 667(1979).
- 3) Barraclough, C.A. and Wise, P.M.: The role of catecholamine in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion. *Endocr. Rev.* **3**, 91(1981).
- 4) Ramirez, V.D., Feder, H.H. and Sawyer, C.H.: The role of brain catecholamine in the regulation of LH secretion: A critical inquiry. *Frontiers in Neuroendocrinology* **8**, 27(1984).
- 5) Lengsfeld, M., Morano, I., Gauten, U., Gauten, D. and Ruegg, J.C.: Gonadectomy and hormone replacement changes systolic blood pressure and ventricular myosin isoenzyme pattern of spontaneous hypertensive rats. *Cir. Res.* **63**, 1090(1988).
- 6) Ramirez, V.D., Kim, K. and Pluzen, D.: Progesterone action on the LHRH and the nitrostriatal dopamine neuronal systems. *Recent. Progr. Hormone Res.* **41**, 421(1985).
- 7) Paul, S.M., Axelrod, J., Saavedra, J.M. and Skolnick, P.: Estrogen induced efflux of endogenous catecholamines from the hypothalamus in vitro. *Brain Res.* **178**, 499(1979).
- 8) Wilkinson, M., Herbon, H., Pearce, M. and Wilson, C.: Radioligand binding studies on hypothalamic noradrenergic receptors during the estrous cycle or after steroid injection in ovariectomized rats. *Brain Res.* **168**, 652(1979).
- 9) Bottiglieri, D.F., Morse, C.A., Baker, S.P., Crews, F.T., Sumners, C. and Raizada, M.K.: Increased expression of α_1 -adrenergic receptors in the hypothalamus of spontaneous hypertensive rats. *Brain Res.* **439**, 187(1988).
- 10) Weiland, N.G. and Wise, P.M.: Estrogen alters the diurnal rhythm of alpha 1-adrenergic receptor densities in selected brain regions. *Endocrinology* **121**, 1751(1987).
- 11) Kalra, S.P. and Kalra, P.S.: Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rats. *Endocr. Rev.* **4**, 311(1983).
- 12) Kalra, S.P. and Kalra, P.S.: Discriminative effects of testosterone on hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone levels and luteinizing hormone secretion in castrated male rats: Analyses of dose and duration characteristics. *Endocrinology* **111**, 24(1982).
- 13) Kim, K. and Ramirez, V.D.: In vitro luteinizing hormone releasing hormone(LHRH) release from superfused rat hypothalami: Site of action of progesterone and effect of estrogen priming. *Endocrinology* **116**, 252(1985).
- 14) Co, C., Smith, J.E. and Rane, J.D.: Use of a single compartment LCEC cell in the determinations of biogenic amine content and turnover. *Pharmac. Biochem. Behav.* **11**, 89(1979).

- 15) Burt, D.R.: Criteria for receptor identification. In: Neurotransmitter receptor binding. 2nd ed., Yamamura, H.I., Enna, S.J. and Kuhar, M.J. Raven Press, New York, pp.41-60(1985).
- 16) Nett, T.M., Akbar, A.M. and Niswender, G.D.: A radioimmunoassay for gonadotropin releasing hormone in serum. *J. Clin. Endocrinol.* **36**, 880(1973).
- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265(1951).
- 18) McEwen, B.A., Davis, P.G., Parson, B. and Pfaff, D.W.: The brain as a target for steroid hormone action. *Ann. Rev. Neurosci.* **65**, 112(1979).
- 19) Moore, K.E. and Thornburg, J.E.: Drug induced dopaminergic supersensitivity. *Adv. Neurol.* **9**, 93 (1975).