

트립토판이 스트레스 받은 쥐 뇌의 세로토닌과 오피에이트 수용체 결합에 미치는 영향

김은미 · 김해리

서울대학교 식품영양학과 생화학실험실

(Received July 18, 1991)

Effect of Tryptophan on Serotonin and Opiate Receptor Binding in Stressed Rats

Eun-Mi Kim and Harriet Kim

Biochemistry Lab. Dept. of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—Brain serotonin and its utilization was investigated on stressed rats after feeding high tryptophan diet for a month. High tryptophan fed rats displayed significantly higher level of serum tryptophan, brain tryptophan, serotonin (5-hydroxytryptamine: 5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) than the control diet fed rats. When rats were treated with 3 hour immobilization (IMMB) stress, serotonin turnover was slightly increased, but not statistically significant, in control diet group rats. However in high tryptophan diet rats, 3 hr IMMB stress resulted in statistically significantly ($p < 0.05$) decreased the serum tryptophan, brain tryptophan and 5-HT level. The concentration of 5-HIAA was significantly increased indicating accelerated utilization of the brain 5-HT of the high trp. fed rat. The utilization pattern of the serotonin was found to be similar among young and adult rats. Rats on a tryptophan enriched diet displayed higher coping ability to the stress as they exhibited smaller increment of corticosterone level. A possible involvement of opioid system was suggested in serotonin utilization by measuring total $^3[H]$ -naloxone binding in brain.

Keywords □ Serotonin, tryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid, opiate receptor.

생체가 Stress를 받으면 다양한 생리변화를 일으켜 이에 대응하게 된다. 신경과 내분비계의 변화가 일어나고 그에 따른 대사, 면역계의 변화는 물론 정신, 행동의 변화까지 따른다. 시상하부-뇌하수체-부신피질계의 활성이 증대되어 ACTH, corticosterone 분비가 증가한다. Epinephrine (ep.)나 Corticosterone들은 Stress의 종류, 강약, 기간 등에 상관없이 일관성있게 변화되므로 Stress hormone으로 잘 알려져 있다. 이 Stress hormone들이 중추신경계의 5-hydroxytryptamine(5-HT)에 의해 그 분비가 조절된다는 보고들이 다양한 방법으로 제시되었다. 즉 5-HT를 쥐의 hypothalamus에 직접 주사했을 때 Corticotrophin Releasing Factor(CRF) 분비가 증가함을 보여주는가 하

면,^{1,2)} 5-HT의 agonist quipazine을 투여하여 ACTH가 증가한 것을 보이거나 antagonist cinanserin을 주어 5-HT가 감소한 것을 보이기도 했다.³⁾

5-HT가 시상하부에서 분비되는 CRF 분비에 직접 또는 간접적으로 어떻게 작용하는지 그 기전은 알 수 없으나 5-HT releasing drug인 p-chloroamphetamine을 투여하였을 때 corticosterone 분비가 증가되었고⁴⁾ 역으로 혈액내 Corticosterone이 증가하였을 때 뇌의 5-HT 함량은 증가되었다.⁵⁾

5-HT 합성의 전구체인 트립토판이 혈액에서 뇌로 들어갈 때 뇌막의 barrier를 넘는데 phenylalanine, methionine, tyrosine, leucine, isoleucine, valine 등 중성아미노산들과 같은 transport system을 이용하

Table I—Effect of 3 hr immobilization and high tryptophan diet on serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid and tryptophan level in rat blood and brain

Age	Diet	Stress	Serum($\mu\text{g/ml}$)		Brain($\mu\text{g/g}$ wet wt.)		
			Tryptophan	Tryptophan	5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-HT
Young (30 days)	Control	Control	14.48 \pm 1.38	4.56 \pm 0.56	0.697 \pm 0.052	0.371 \pm 0.039	0.532 \pm 0.045
		Stress	11.76 \pm 1.04	4.62 \pm 0.26	0.674 \pm 0.075	0.453 \pm 0.041 ^a	0.672 \pm 0.065 ^a
	High Trp.	Control	69.57 \pm 4.75 ^a	8.05 \pm 0.53 ^a	0.946 \pm 0.052 ^a	0.636 \pm 0.062 ^a	0.672 \pm 0.052
		Stress	44.32 \pm 3.14 ^b	7.17 \pm 0.24 ^b	0.875 \pm 0.046 ^b	0.779 \pm 0.060 ^b	0.890 \pm 0.061 ^b
Adult (80 days)	Control	Control	14.07 \pm 1.29	4.23 \pm 0.31	—	—	—
		Stress	12.76 \pm 1.24	3.88 \pm 0.32	—	—	—
	High Trp.	Control	52.26 \pm 4.04 ^a	10.77 \pm 1.07 ^a	—	—	—
		Stress	34.24 \pm 2.78 ^b	8.69 \pm 0.78 ^b	—	—	—

a: Significantly different from control diet non-stressed group ($p < 0.05$)

b: Significantly different from control diet, stressed group ($p < 0.05$)

므로 혈액내 트립토판의 농도 뿐 아니라 이들 아미노산들의 농도비가 중요하다.

트립토판에서 5-HT로 합성될 때 rate limiting enzyme인 Trp. hydroxylase는 기질과 보통 포화되어 있지 않으므로 뇌의 트립토판 농도가 증가하면 5-HT 농도도 증가한다.

Stress를 받으면 트립토판의 brain uptake는 증가한다.¹⁸⁾ 뿐만 아니라 Kuldeep 등⁶⁾은 acute Stress와 Chronic Stress 때 모두 opiate peptides가 증가하였다고 보고하였고 그 증가한 양은 5-HT에 의해 변화됨이 보고되었다.^{7,8)}

트립토판 uptake와 5-HT 합성, Stress와 5-HT, Stress와 Opioid System 관련성 등이 전부 부분적으로 실험되었는 바 본 연구실에서는 한 생체내에서 일어나는 연속적이고 전체적 반응을 약리적 용량이 아니고 트립토판을 식이로 장기간 섭취시켰을 때 스트레스 상황에서 5-HT 농도변화와 opiate system에 미치는 영향을 실험하였다.

실험재료 및 방법

실험동물과 식이—Sprague-Dawley 숫쥐 한군($n = 18$)은 생후 30일 되어 희생시킬 때까지 4주간 동안 3.5% 트립토판 보강식을 주었다. 또 S.D. 숫쥐 한군($n = 18$)은 생후 7주까지 고품사료로 키우다가 3.5% 트립토판 보강식을 4주간 준 후 80일째 희생시켰다. 각 군은 같은 수로 정상식을 주어 control군으로 사용하였다. 사육장은 12시간씩 명암이 조절되며 온도 20°C, 습도 55%로 유지시켰고 물과 식이는 자유로이

섭취하도록 하였다.

Stress와 시료 수집—Stress군은 8×15 cm 원통형 병에서 직립형으로 서 있게 하는 Immobilization Stress를 3시간 동안 받게 한 후 곧 절두하여 희생시켰다. 희생 후 즉시 뇌를 적출하여 냉동보관하고 혈액은 원심분리하여 분석에 사용하였다. 정상군이나 Stress군 모두 일정한 시간에 처리하였다.

뇌와 혈액에서 트립토판 농도 측정—뇌와 혈액에서 트립토판 정량은 먼저 단백질을 제거한 후 Denkla와 Dewey⁹⁾ 방법을 변형시켜 280 nm, activation, fluorescence 360 nm에서 형광도를 측정하는 Shimadzu DR-3 Spectrofluorometry로 분석하였다.

Opioid receptor binding assay—mu-receptor antagonist인 ³H-naloxone을 opiate ligand로 사용하여 Pert and Snyder 방법¹⁰⁾으로 radiobinding assay를 수행하였다.

Corticosterone 농도 측정—혈장 중의 corticosterone binding protein을 먼저 제거한 후 corticosterone-3CMO-BSA를 토끼에 면역시켜 생산된 항체를 사용하였다. tracer로는 1,2,6,7-³H-corticosterone을 사용하였다. dextran coating charcoal 흡착법으로 분리한 후 scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다.

뇌의 serotonin과 5-HIAA 농도 측정—뇌를 acid field cold butanol로 균질화한 후 추출하여 O-phthaldehyde로 반응시킨 후 형광도를 360 nm와 470 nm에서 측정하여 serotonin과 5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA) 농도를 동시에 정량하는 Curzon(1)의 방법을 사용하였다.



Fig. 1—Effect of 3 hr immobilization and high tryptophan diet on the difference of brain and serum tryptophan

□ Con.Con., □ Con.Str., □ Trp.Con., □ Trp.Str.

a: significantly different from control diet group. ($p < 0.05$)

b: significantly different from high tryptophan control. ($p < 0.05$) ($n = 6$ per group)

통계처리—측정치들은 평균± 표준편차로 나타내었고 Student t-test로 유의 수준을 검정하였다.

결과 및 고찰

혈액내 트립토판 농도변화—4주 동안 3.5% 트립토판 보강식을 섭취한 쥐의 혈청 트립토판 농도는 30일된 쥐의 경우 정상식이군의 4.8배 증가하였다 (Table 1).

80일된 쥐도 3.7배 증가하였으나 Stress를 받으면 증가폭은 떨어져서 각각 3.76배와 2.68배였다. 3시간 Immobilization Stress는 트립토판 농도를 감소시켰으나 고 트립토판 식이를 먹인 군에서만 유의적인 감소가 있었다. 이는 아놀드 등¹²⁾이 쥐에게 트립토판을 주사했을 때 총 혈청트립토판 농도가 증가하였다는 보고와 일치한다.

혈액내에서 트립토판은 거의 대부분 알부민과 결합하여 순환된다. 또한 지방산이 증가할 경우 알부민 결합 트립토판은 감소하고 상대적으로 자유트립토판이 증가한다. 혈액내에 자유트립토판 농도가 증가하므로 뇌로의 흡수가 증가한 것을 볼 수 있다.

뇌의 트립토판, serotonin 및 5-HIAA 함량변화—뇌 트립토판 농도는 정상식이군에 비해 트립토판 보강식이군이 어린쥐와 어른쥐 모두 유의적으로($p < 0.05$)

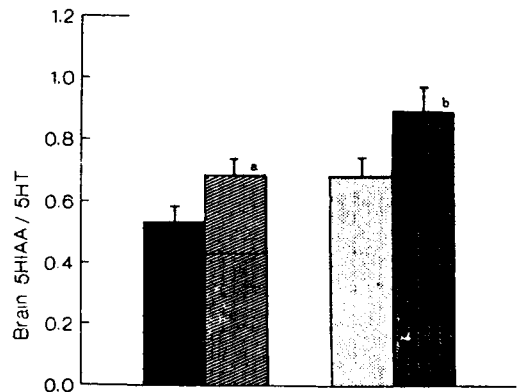


Fig. 2—Effect of 3 hr immobilization and high tryptophan diet on the concentration of 5HIAA/5HT ratio in rat brain

□ Con.Con., □ Con.Str., □ Trp.Con., □ Trp.Str.

a: significantly different from control diet group. ($p < 0.05$)

b: significantly different from high tryptophan control. ($p < 0.05$) ($n = 6$ per group)

증가하였다. 혈청 트립토판과 뇌 트립토판 농도 차이를 보면(Fig. 1) 어린쥐의 경우 정상식이군과 트립토판 보강식이군 모두 스트레스받은 군이 정상군에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 감소하였다. 어린쥐는 유의적 차이는 없었으나 트립토판 보강식이군의 스트레스받은 군은 정상군에 비해 혈청 트립토판과 뇌 트립토판 차이가 유의적으로($p < 0.05$) 감소하였다. Fernstrom과 Wurtman,¹³⁾ Knott과 Curzon¹⁴⁾ 등도 혈액내 트립토판 농도증가가 뇌의 트립토판 농도를 증가시켰다고 보고하였다.

30일된 쥐의 경우 3.5% 트립토판을 4주간 먹었을 때의 뇌의 트립토판 농도가 4.56 $\mu\text{g/g}$ 뇌에서 8.05 $\mu\text{g/g}$ 으로 증가하였다.

이러한 뇌 트립토판의 증가는 곧 뇌 Serotonin 증가로 연결됨을 볼 수 있으며 Stress를 받았을 때 5-HT는 더 많이 대사되어 대사산물인 5-HIAA가 크게 증가했음을 볼 수 있다. 스트레스를 받을 때 뇌에서 세라토닌은 더 많이(132%) 분해되었다. 트립토판을 식이로 보충하여 혈액과 뇌의 트립토판이 충분하고 뇌의 Serotonin이 높을 때는 그 Serotonin의 89%까지 분해되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2).

보통 일반 식이를 할 경우 또 Stress 상황이 아닐

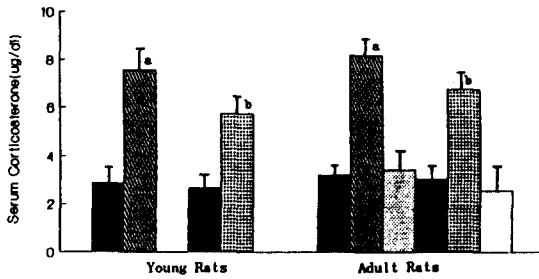


Fig. 3—Effect of 3 hr immobilization and high tryptophan diet on the concentration of corticosterone in rat serum

□ Con.Con, □ Con.Str, □ Con.Rec, □ Trp.Con, □ Trp.Str, □ Trp.Str.

a: Significantly different from control diet group. ($p < 0.05$)

b: Significantly different from high tryptophan control. ($p < 0.05$) ($n = 9$ per group)

때 53.2% 정도의 Serotonin이 대사산물로 분해되는 것으로 나타났다.

스트레스받을 때 뇌 Serotonin 농도변화에 대하여는 상반된 보고들이 있다. Culman¹⁵⁾은 Stress 때 뇌 5-HT가 감소하지 않았다고 보고하는가 하면 Dunn¹⁶⁾은 footshock Stress 후에 5-HIAA 농도가 증가한다고 하였다.

최근 Fernstrom 등¹⁷⁾은 tetralin 유도체가 쥐 뇌의 5-HT 축적에 미치는 영향을 연구하면서 트립토판으로 먼저 뇌의 5-HT를 증가시켰다.

본 실험에서는 정상식이군과 트립토판 보강식이군 모두 다 5-HIAA가 증가한 것으로 나타났다. 이런 실험결과들은 스트레스의 종류, 강도, 반복성 등 실험조건에 따라 차이가 있는 것으로 보이며 data들을 비교할 때 유의해야 할 점으로 생각된다.

High tryptophan 식이와 corticosterone 농도변화—스트레스시 corticosterone 증가는 시상하부-뇌하수체-부신피질계(HPA)의 활성화에 의해 분비되는 것으로 생체가 스트레스를 얼마나 받았는지 나타내는 지표로 쓰이고 있다. 3시간 restraint Stress를 받은 군이 정상군보다 30일, 80일된 쥐 다 2.5배 이상 Corticosterone이 증가하였다(Fig. 3).

5-HT는 HPA에 직접 간접으로 관여하는 것으로 알려졌는데 Buckingham¹⁸⁾ 등은 5-HT를 쥐의 시상하부에 주사하여 CRF 분비를 촉진시켰고 5-HT ago-

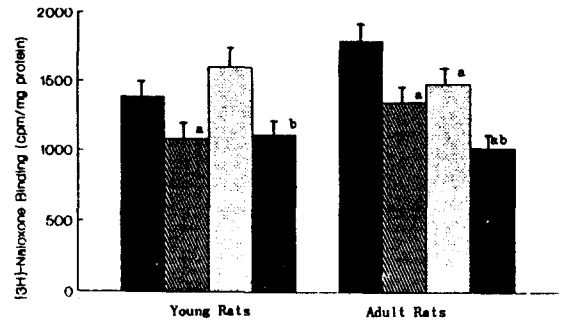


Fig. 4—Effect of 3 hr immobilization and high tryptophan diet on $^3\text{[H]}$ -naloxone binding of rat brain

□ Con.Con, □ Con.Str, □ Trp.Con, □ Trp.Str.

a: Significantly different from control diet group. ($p < 0.05$)

b: Significantly different from high tryptophan control. ($p < 0.05$) ($n = 6$ per group)

nist인 quipazine을 투여하여 ACTH 분비가 증가되었으며 antagonist cinanserin을 투여하였을 때는 감소시켰다.

5-HT가 ACTH, CRF, Corticosterone 농도를 어느 수준에서 어떤 양상으로 조절하는지 알 수 없으나 HPA 활성을 촉진시킴을 알 수 있다. 본 연구에서 4 주간 고 트립토판 식을 주었을 때는 약물주사에 의한 보고와는 달리 트립토판 보강식이군의 스트레스받은 군이 정상식이군의 스트레스군에 비해 Corticosterone 증가폭이 둔화되었다(Fig. 3).

본 실험만으로도 그 원인을 알 수 없으나 트립토판 보강식이가 스트레스를 덜 받도록 하는 효과가 있음을 나타낸다 하겠다.

Opiate receptor binding—3시간 동안 Immobilization Stress를 받으면 어린쥐나 어른쥐 다 ^3H -naloxone binding(cpm/mg brain protein)이 유의적으로 ($p < 0.05$) 감소하였다(Fig. 4).

트립토판 보강식이군이 Stress를 받으면 Opiate receptor binding 감소폭은 더 커서 트립토판 보강식에 의하여 Opioid peptides 분비가 촉진되었음을 간접적으로 시사한다.

Haring 등⁷⁾과 Dellavedova⁸⁾ 등은 5-HT가 POMC gene에서 유되는 α -endorphine 분비를 증가시킨다고 하였고 트립토판의 진통효과가 보고되었는데 본 실

험에서 트립토판 보강식이 Opiate Receptor Binding을 감소시킴으로 뇌의 5-HT 농도증가(Table 1) 결과와 함께 endogenous Opioid peptides들이 트립토판과 5-HT에 의해 조절됨을 보여준다 하겠다.

결 론

본 연구는 트립토판을 식이로 보강하였을 때 Stress를 받은 생체가 어떻게 뇌의 Serotonin 대사에 영향을 미치는지 알아보기 위해 수행되었다. 3.5% 트립토판 보강식을 S.D. 쥐에게 4주간 주었고 Immobilization Stress를 3시간 동안 받게 한 후 뇌와 혈액에서 트립토판, Serotonin 그 대사물질 5-Hydroxylindolacetic acid(5-HIAA)를 측정하였고 Opiate receptor binding 정도를 측정하여 아래와 같은 결론을 얻게 되었다.

1. 트립토판 보강식이군은 정상식이군에 비해 혈액내 총 트립토판 농도와 뇌의 트립토판, 5-HT 및 5-HIAA 농도가 모두 유의적으로 증가하였다.

2. 트립토판 보강식은 Stress받은 쥐 뇌의 Serotonin 대사를 촉진하였으며 정상식이군에 비하여 5-HIAA/5-HT 비율이 유의적으로 증가하였다.

3. 어린쥐와 어른쥐 사이에는 트립토판, 5-HT 및 5-HIAA 농도변화는 의미있는 차이를 보이지 않았다.

4. 정상식이군이나 트립토판 보강식이군이 다 스트레스를 받으면 Corticosterone 분비가 증가되었으나 트립토판 보강식이군은 그 증가폭이 적어 트립토판 보강이 Stress를 완화시키는 효과가 있음을 나타내었다.

5. ³H-naloxone binding 정도는 정상식이군이나 트립토판 보강식이군이나 다 Stress를 받으면 유의적으로 감소하였다.

위와 같은 결론을 종합해 볼 때 트립토판 보강은 Stress를 완화시켰고 쥐 뇌의 Serotonin 대사를 촉진시켰으며 Opiate system이 관련되었음을 시사하였다.

감사의 말씀

본 연구는 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모 과제 학술 연구조성비에 의하여 이루어졌음을 감사드립니다.

문 헌

- 1) Jones, M.T., Hillhouse, E.W. and Burden, J.: Effect of various putative neurotransmitters on the secretion of corticotrophin releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro. A model of the neurotransmitter involved. *J. Endocri.* **69**, 1(1976).
- 2) Buckingham, J.C. and Hodges, J.R.: Hypothalamic receptors influencing the secretion of corticotrophin releasing hormone in the rat. *J. Physiol.* **290**, 421(1979).
- 3) Bruni, J.F., Hawkins, R.L. and Yen, S.S.C.: Serotonergic mechanism in the control of β -endorphin and ACTH release in male rats. *Life Sci.* **30**, 1247 (1982).
- 4) Fuller, R.W. and Snood, H.D.: Effect of serotonin releasing drugs on serum corticosterone concentration in rats. *Neuroendocrinology* **31**, 96(1980).
- 5) Van Loon, G.R., Shum, A. and De Souza, E.B.: Triphasic changes in plasma ACTH concentration and brain serotonin synthesis rate following adrenalectomy in rats. *Neuroendocrinology* **34**, 90(1982).
- 6) Kuldeep, K.V. and Tejwani, C.A.: Food deprivation induced changes in the level of opioid peptides in the pituitary and brain of rat. *Life Sci.* **38**, 197 (1986).
- 7) Haring, L.G., Yang, H.Y., Govoni, S. and Costa, E.: Elevation of Met-enkephalin and β -endorphin hypothalamic content in rats receiving anorectic drugs; Difference between D-fenfluramine and D-amphetamine. *Neuropharmacology* **21**, 141(1982).
- 8) Dellavedova, L., Parenti, M., Tirone, F. and Gropetti, A.: Interactions between serotonergic and enkephalinergic neurons in rat striatum and hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* **85**, 29(1982).
- 9) Denckla, W.D. and Dewey, H.K.: The determination of tyrtophan in plasma, liver and urine. *J. Lab & Med.* **69**, 160(1967).
- 10) Pert, C.B., and Snyder, S.H.: *Properties of Opiate-receptor binding in rat brain. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A)* **70**, 2243(1973).
- 11) Curzon, G. and Green, A.R.: Regional and subcellular changes in the concentration of 5-hydroxytry-

- ptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the brain caused by hydrocortisone, D.L-a-methyl tryptophan, L-kynurenine and immobilization. *Br. J. Pharmacol.* **43**, 39(1971).
- 12) Arnold, M.A. and Fernstrom, J.D.: L-Tryptophan injection enhances pulsatile growth hormones secretion in the rat. *Endocrinology* **108**, 331(1981).
 - 13) Fernstrom, J.D. and Wurtman, R.J.: Brain serotonin content; Physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science* **174**, 914(1971).
 - 14) Knott, L. and Curzon, G.: Free tryptophan in plasma and brain tryptophan metabolism. *Nature* **239**, 452(1972).
 - 15) Culman, J., Kiss, A. and Kvetnansky, R.: Serotonin and tryptophan hydroxylase in isolated hypothalamic and brain stem nuclei of rats exposed to acute and repeated immobilization stress. *Exp. Clin. Endocrinol.* **83**, 28(1984).
 - 16) Dunn, A.J.: Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after fooshock stress. *Life Sci.* **42**, 853 (1988).
 - 17) Fernstrom, M.H., Massondi, M.S. and Fernstrom, J.D.: Effect of 8-hydroxy-2(di-n-propylamino)-tetralin on the tryptophan-induced increase in 5-hydroxytryptophan accumulation in rat brain. *Life Sci.* **47**, 283(1990).
 - 18) Wurtman, R.J., Hefti, F. and Nelamed, E.: Precursor control of neuro transmitter synthesis. *Pharmac. Rev.* **32**, 315(1981).