

흰쥐의 구속 stress 에 의한 catecholamine 의 변화

김 형 석

경희대학교 의과대학 예방의학교실

Variation of Catecholamine Content in Rat Urine under the Immobilization Stress

Hynug-Suk Kim

Department of preventive Medicine School of Medicine Kyng Hee University

Abstract

The word of stress was used in the field of physics as a external force from 17th century, but the meaning of this stress had chaged to the internal and external demand for the human body in medical area. All the stumulants which make stress was called as a stressor.

When animals get stress glucose excreted from liver to adapt for the emergent state and some related hormone secrete convert protein and lipid to glucose for the purpose of energy supply to muscle. As a results heart rate, blood pressure, respiration rate are increased and muscle are strengthened. These physiological reactions ate controlled by autonomic nerve system under the control of hypothalamus in brain. Autonomic nerve system and endocri-nary system are react harmoiously to stress reaction. According to the stress reaction, ad-renomedullary system are stimulated, and epinephrine, morepinephrine are exceted.

Author experimented the effect of the immobilizational stress to rat by analyzing the variaition of catecholamine secrction, the Na concentration and the effect of the antistress effect by Panax Ginseng which is a traditional Korean herb medicine.

The concentration of the norepinephrine, epinephrin, and dopamin in normal rat are 0.578 ng/ml, 0.365 ng/ml, and 0.731 ng/ml respectively, but in the immobilized stress group the concentration were increased to 1.915 ng/ml, 0.854 ng/ml, and 2,361 ng/ml which show the high show the higher concentration of catecholamine to stressor.

I. 序 論

現代와 같은 산업화 사회에서는 stress 라는用語가 하루에도 여러번 사용되고 있으며 신문 방송을 통하여도 자주 보고 듣게되는 실정이다. Stress에 대한 정확한定義는 아직 없으나 stress라는 용어의 의미는 “外部로부터 동물에게 자극하는 여러가지 要求가 體內에서 해결되지 않을 때 이에 대응하는 心理的, 生理的, 行動的으로 나타나는 반응”이라고 表現할 수 있다.

Hans Selye¹⁾는 체외로부터 가해지는 각종 유해작용에 대응하는 체내의 방어의 총화라고 하였고 이때 발생하는 생물학적반응을 범적응증후군(general adaptation syndrome)으로 표현하였으며 여기에는 경고반응기, 저항기, 피로허탈기가 있다고 발표하였다.

Stress 반응을 일으키는 모든 刺戟을 stressor(스트레스 發生原)라고 부르는데 동물이 stress를 받으면 응급한 사항에 대처하기 위하여 肝臟에서 糖을 방출하고 호르몬이 분비되어 脂質과 蛋白質을 糖으로 변화시키게 함으로써 筋肉에 연료를 공급하게 하고 心搏動數, 血壓, 呼吸數가 증가하고 근육은 강직하게 된다. 한편 소화와 같은 긴급히 필요치 않은 활동은 정체되고 타액은 따르게 된다. 신체내의 자연적 진

통제인 endorphin이 분비되고 체표면 혈관은 축소되어 상처로 인한 출혈을 감소시키려 한다. 脾臟은 많은 赤血球를 방출하여 산소의 운반을 활발히 하고 骨髓에서는 白血球가 생산증가되어 세균감염을 막으려 한다.”

이상과 같은 생리적인 반응은 視床下部(hypothalamus)의 지배하에 자율신경에 의하여 조절된다. 시상하부는 응급시 자율신경과 腦下垂體(pituitary gland)를 지배하므로 이를 stress center라고 부르기도 한다. 自律神經계통과 內分泌계통은 stress 반응에 조화있게 대응한다. 즉 자율신경계는 副腎垂質을 자극하여 epinephrine과 norepinephrine, 부신피질을 자극하여 cortisol을 혈관에 방출시켜 신체 여러 기관의 세포에 있는 receptor와 반응하여 심박동수와 혈압을 상승시키고 肝에서 糖의 분비를 촉진시킨다. Hypothalamus는 뇌하수체로 하여금 2가지의 중요한 hormone을 분비하게 한다. 즉, 갑상선을 자극하여 더 많은 energy가 체내에 생성되게 하고 adrenocorticotrophic hormone(ACTH)으로 하여금 부신피질을 자극하여 corticosteroid를 분비케하여 그 결과 간장으로부터 glucose를 방출하도록 한다. 한편 ACTH는 신체의 다른 기관을 자극하여 30여종의 hormone을 방출케하는데 이들은 응급상태를

조절하는 역할을 한다.

이와 같은 복잡하고 고유한 stress에 대한 대응양상을 Cannon²⁾은 fight-or-flight 이라고 하였다.

쥐를 구속하면 교감신경계와 부신수질 및 뇌하수체와 부신피질이 크게 활성화된다고 하였고^{4~6)} Kvetnansky⁷⁾에 의하면 쥐를 구속시 부신에서 분비되는 epinephrine은 시간이 경과되면서 차츰 감소된다고 하였으며, 혈장중 epinephrine 양은 계속 상승한다고 하였고 norepinephrine도 혈장과 뇨에서 증가됨이 밝혀졌다.⁸⁾ 한편 쥐에게 계속적으로 stress를 가하면 catecholamine의 분비증가가 계속된다고 하였다.⁹⁾

Bonfils 등¹⁰⁾에 의하면 구속시 胃潰瘍을 일으킨다고 하였다. Cooddall 등¹¹⁾은 생체가浸水되었을 때 epinephrine의 분비가 증가됨을 확인하였고 Frankenhaeuser와 Rissler¹²⁾은 생체에 전기자극을 주었을 때 정상시보다 epinephrine의 분비량이 3배이상 증가한다고 발표하였다.

저자는 쥐에서 구속 stress를 주었을 때 뇨중 catecholamine의 변화를 알아보기 위하여 흰쥐를 구속장치에서 실험한 결과를 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 실험동물 및 시료채취

흰쥐(Sprague-Dawley) 숫놈을 실험실 실온에서 2주간 충분한 사료와 식수를 공급하면서 적응시킨 후 쥐대사시험용 cage에 3마리씩 넣고 24시간동안의 뇨를 채취하

였다.

2. 구속실험

대중산업사에서 제작한 6×15×5 cm(폭, 길이, 높이)의 쥐 구속장치를 사용하여 하루에 1회 1시간 구속, 1일 3시간 구속 및 1일 2회 1시간씩(10시, 15시) 1주일간 구속 실험을 실시하였다.

3. Catecholamine의 분석

1) 시약

- metabisulphite : 10 g/L
- EDTA : 5 g/100 ml
- 3M Tris buffer(pH 8.5) : 36.3 g/100 ml
10 mM HCl
- internal standard solution : DHBA(di-hydroxy benzylamine) 10 mg을 10 mM HCl 100 ml에 용해시킨 후 100배 희석한다(1 μ/ml).
- NE(norepinephrine), EP(epinephrine), DOP(dopamine), DHBA의 standard solution : 각 시약 100 mg을 10 mM HCl 1 L에 용해시킨 후 100배 희석한다.(1 μ/ml).
- mobile phase : monochloroacetic acid 14.15 g, NaOH 4.65 g, octanesulfonic acid 400 mg을 물에 녹여 1 L로 한 후 pH를 3.3으로 한다.
상기액 930 ml에 ACN 70 ml를 넣어 mobile phase로 한다.

2) 시료의 전처리

1.5 ml polypropylene conical tube 에 뇨 1 ml, 10 g/L metabisulphite 50 μ l, 50 g/l 농도의 EDTA 50 μ l 를 넣고 혼화한다. 여기에 internal standard 50 μ l 와 3 M Tris buffer (pH 8.5) 50 μ l 를 넣은 후 alumina 20 mg 을 넣는다. 이 관을 5 분간 혼화한 후 상등액을 버린다. alumina 를 3 회 1.5 ml 의 물로 씻은 후 물층을 aspirator 로 제거한 후 0.1 M HClO₄ 100 μ l 를 넣고 5 분간 혼화한 후 원심분리시킨다. 상등액을 가만히 취하여 HPLC 에 주입한다.

3) 분석기기

기기명 : HPLC(high performance liquid chromatography), Varian Co. Vista 5020

Column : Supelcosil LC-18, 7.5 cm \times 4.6 mm, Supelco Inc., U.S.A.

Detector : Electrochemical Detector, Taccussel, France.

range—100 nA, potential—790 nV Ag/AgCl electrode

Flow Rate : 1 ml/min

III. 실험결과

뇨중 catecholamine 을 HPLC-ECD(High Performance-Liquid-Chromatography, Electrochemical Detector)로 측정하기 위하여 epinephrine, norepinephrine, dopamine, DHBA 의 표준용액 10 μ l 를 HPLC 에 주입한 결과 Fig. 1 과 같은 chromatogram 을 얻었다.

즉 norepinephrine 의 Retention Time(이하 RT 로 표시함)은 4.196 분이었고, epinephrine 의 RT 는 5.196 분이었고, internal

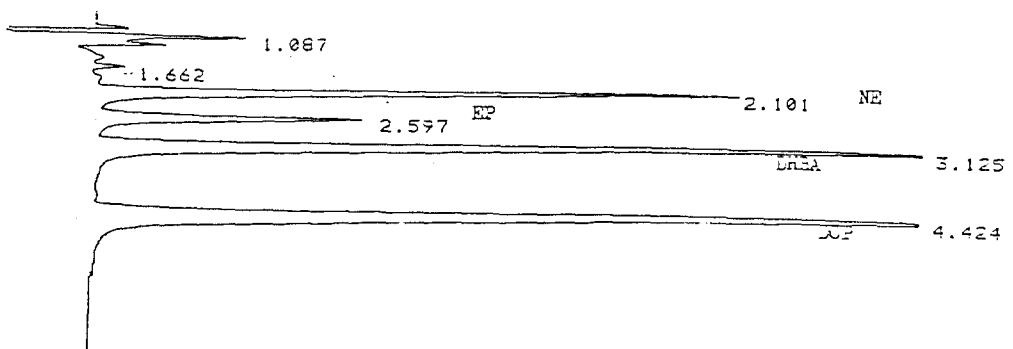


Fig. 1. Chromatogram of catecholamine standard solution. Injection volume is 10 μ l of 0.25 μ g/ml each.

NE : norepinephrine

EP : epinephrine

DHBA : dihydroxy benzylamine

DOP : dopamine

standard인 DHBA의 RT는 5.797분이었으며, dopamine의 RT는 7.646분이었다. 다음에 계산되는 catecholamine의 함량계산은 Fig. 1에 나타난 RT와 peak height count를 기준으로 internal standard(내부표준물)법으로 시행하였다.

흰쥐에게 구속 stress를 주었을 때 노중 catecholamine의 변화를 알아보기 위하여 우선 정상적인 흰쥐를 쥐대사용 cage에 넣은 후 24시간의 뇨를 채취후 norepinephrine(이하 NE로 표시함), epinephrine(이하 EP로 표시함), dopamine(이하 DOP로 표시함)을 측정된 결과 Table 1과 같은 성적을 얻었다. 즉 정상 흰쥐 노중 NE의 함량은 0.578 ± 0.121 ng/ml였고 EP의 함량은 0.365 ± 0.120 ng/ml였으며 DOP의 함량은 0.731 ± 0.085 ng/ml였다.

흰쥐를 1일 1시간씩 拘束 후 24시간동안의 노중 norepinephrine의 분비량은 1.26 ng/ml였고 epinephrine의 분비량은 0.508

ng/ml였으며 dopamine의 분비량은 0.883 ng/ml로서 이들의 농도는 정상흰쥐의 농도보다 높은 수치를 보였다.

구속시간에 따르는 catecholamine의 분비량을 비교하기 위하여 대조군, 1일 1시간 구속, 1일 1시간씩 2회 구속, 1일 3시간 구속결과를 표로 관찰한 결과 Table 2와 같이 3시간 구속실험에서 catecholamine의 분비량이 가장 높았고, 다음은 1일 1시간 2회 구속이었으며, 1일 1회 1시간 구속시가 가장 낮은 catecholamine의 분비량을 나타냈다.

즉, 1일 1회 한시간씩 구속시킨 흰쥐의 노중에는 norepinephrine의 분비량 1.614 ng/ml였으며 epinephrine의 분비량은 0.597 ng/ml였고, dopamine의 분비량은 1.848 ng/ml였으며, dopamine의 분비량은 2.361 ng/ml였다.

Table 1. Catecholamine Content in Normal Rat Urine(unit : ng/ml)

No.	NE	EP	DOP
1	0.62	0.59	0.74
2	0.54	0.24	0.66
3	0.41	0.37	0.87
4	0.74	0.29	0.64
5	0.49	0.34	0.78
6	0.67	0.36	0.69
M \pm SD	0.578 ± 0.121	0.365 ± 0.120	0.731 ± 0.085

NE : norepinephrine

EP : epinephrine

DOP : dopamine

M \pm SD : mean \pm standard deviation

Table 2. Variation of Catecholamine Content in Immobilized Rat Urine which were kept 1 Hour per Day (unit : mg/l)

No.	NE	EP	DOP
1	1.49	0.42	0.99
2	1.28	0.41	1.07
3	1.01	0.59	0.57
4	1.37	0.61	0.84
5	1.54	0.47	0.78
6	1.88	0.55	1.05
M±SD	1.262* ±0.265	0.508* ±0.086	0.883* ±0.192

NE : norepinephrine

EP : epinephrine

DOP : dopamine

M±SD : mean±standard deviation

* : $p < 0.05$

Table 3. Comparison of Catecholamine Contents in Rat Urine under the Various Immobilized Status(unit : m/ml)

Catecholamine	Control	1 Hour IM	1 Hour Twice IM	3 Hour IM
NE	0.578 ±0.121	1.262* ±0.265	1.614* ±0.424	1.915* ±0.342
EP	0.365 ±0.120	0.508* ±0.086	1.597* ±0.126	0.854* ±0.315
DOP	0.731 ±0.085	1.873* ±0.192	1.848* ±0.438	2.361* ±0.563

IM : immobilized

NE : norepinephrine

EP : epinephrine

DOP : dopamine

* $p < 0.05$

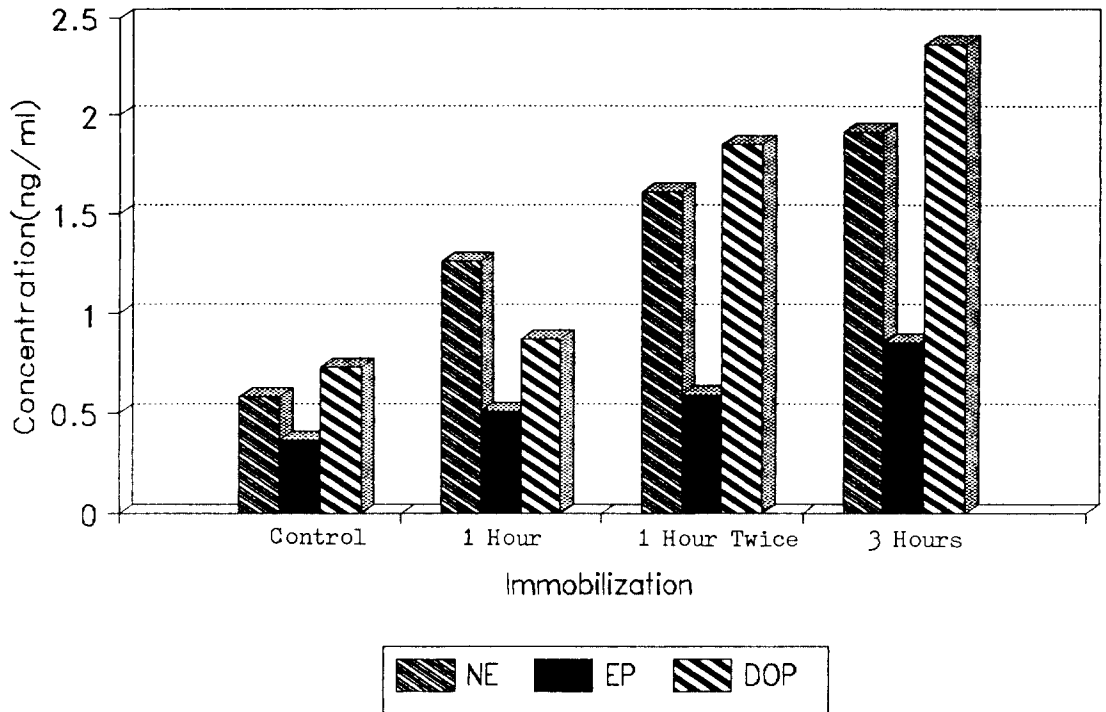


Fig. 2. Comparison of the catecholamine contents in rat urine under the immobilized status

IV. 考 察

Stress 와 관련이 있는 3 가지 중요한 hormone 은 catecholamine, adrenocorticotropin(ACTH), 및 glucocorticoid 라고 Axelrod¹³⁾ 는 발표하였다. 뇌하수체로부터 ACTH 의 분비는 시상하부에서 유래되는 corticotropin releasing factor(CRF)인 peptide hormone 에 의하여 좌우된다. 뇌하수체에서 분비된 ACTH 는 부신피질을 자극하여 glucocorticoid 를 합성하게 한다.

여러 가지 응급상태에서 sympathetic-adrenomedullary system 의 활성화는 반세기전

부터 알려지고 있으나 만성 stress 나 계속적인 stress 에 대한 적응에 있어서 catecholamine 의 역할에 대하여는 아직 잘 알려지지 않고 있다. Kvetnansky 등¹⁴⁾ 은 stress 실험에 혈액중 catecholamine 을 측정함에 있어 Peuler and Johnson²²⁾ 방법을 이용하였고, 뇌, 신장, 심장의 catecholamine 은 von Euler and Lishajko²³⁾ 방법에 의한 fluorometric 법에 의하여 측정하였는데, 본 연구에서는 흰쥐의 뇨를 대상으로 HPLC-ECD 방법으로 실험하였다.

한편 이들은 catecholamine-synthesizing enzyme 의 활동을 알아 보기 위하여 tyrosine hydroxylase(TH), dopamine-b-hydroz-

ylase(DbH), phenylethanolamine-N-methyltransferase(PNMT) 등을 검사하였다. 장기간 쥐를 구속하였을 때 신장에 있는 adrenaline 과 noradrenaline 의 함량은 대조군과 급성 stress 를 가한 group 에 비하여 크게 증가하였다. 하루에 150 분씩 30 회를 구속시킨 쥐의 혈액중 catecholamine 의 함량은 한번 구속실험한 쥐보다도 크게 높음을 발표하였다. 저자가 실시한 본 연구에서도 하루 1 시간씩 1 회 구속실험을 실시한 실험에서는 noradrenaline 의 분비량이 1.262 ng/ml 로서 정상 흰쥐의 뇨중 norepinephrine 의 함량인 0.578 ng/ml 보다 상승하였으나 1 일 1 시간씩 2 회 구속실험을 실시한 실험에서는 norepinephrine 의 분비량이 1.614 ng/ml 로서 1 일 1 회 구속보다 norepinephrine 의 분비량이 증가하였으며 1 일 3 시간 구속시에는 norepinephrine 의 분비량이 1.915 ng/ml 로서 본 실험을 실시한 가운데 가장 높은 수치를 보였다. 한편 epinephrine 의 분비량도 구속 시간에 따라서 증가하고 있는데 epinephrine 의 분비량을 보면 정상시 0.365 ng/ml, 1 일 1 회 구속시에는 0.508 ng/ml, 1 시간씩 2 회 구속시에는 0.597 ng/ml, 1 일 3 회 구속시에는 0.854 ng/ml 로 구속이 증가됨에 따라 epinephrine 의 분비량이 증가함은 Kvetnansky 등의 실험결과와 일치한다.

Stress 를 계속 쥐에게 주면 혈장내 catecholamine 의 분비량은 계속 증가하는데 이것은 각 조직에 catecholamine 을 많이 공급하기 때문이다. 그러나 여러번 계속적으로 stress 를 주면 catecholamine 이 감소하

는데 그 이유는 대뇌의 조절기관에서 적응하기 때문인 것으로 예측된다. Dopamine 의 분비도 stress 하에서 증가하는데 stress 의 첫단계에서 혈장 dopamine 은 주로 adrenal medulla 에서 증가되고, 두번째 단계에서는 peripheral sympatheticus 에서 증가된다. 쥐를 계속적으로 구속하면 간장에서 catechol-o-methyl transferase 의 활성이 급격히 감소하다가 차츰 상승한다. 계속적인 구속 stress 는 말단조직, 혈액, 뇨 및 뇌에 있어서 catecholamine 의 분해가 감소되기 때문이다. 실험결과 생체내에서 stress 하에 catecholamine 합성이 증가되었고 tyrosine hydroxylase, dopamine-b-hydroxylase 및 phenylethanolamine-N-methyltransferase 활성이 증가됨이 증명되었다.²³⁾ 한편 catecholamine 의 증가는 catechol-o-methyltransferase 의 활성이 감소되어 catecholamine 분해가 감소되는 이유도 있다.

구속 stress 를 장기간 주면 부신수질의 무게가 증가한다고 하는데 이것은 급성 stress 보다 계속적인 stress 가 부신수질의 활동을 활발하게 하기 때문인 것으로 생각된다. Kvetnansky 에 의하면 1 일 150 분간 2 회 흰쥐에게 구속 stress 를 준 결과 대조군이나 급성 stress 를 준 군보다도 신장에 norepinephrine 과 epinephrine 의 함량이 훨씬 증가한다고 하였다. 한편 뇨에서도 catecholamine 과 epinephrine 의 증가가 현저하였다고 하였다. 이와 같이 부신과 교감신경이 통하는 말단기관, 뇨 등에 catecholamine 의 증가는 sympathetic-adrenomedullary system 의 적응을 의미하며 계속

적인 구속 stress 에 대하여 부신수질이 catecholamine 을 합성하는 능력을 보여주는 것이다. 또한 다르게 표시된 labeled precursor 법에 의하여 Kvetnansky 등은 tyrosine 이 먼저 dopa 로 바뀌고 다음 norepinephrine 으로 변한다는 것을 확인하였다. Tizabi 등²⁵⁾은 쥐를 14 일 동안 서로 싸우게 하였을 때 뇨중 epinephrine 과 norepinephrine 의 분비량이 증가하였다고 하였고 Moreau 등²⁶⁾은 1 일 1 시간 9 주간 수영을 시킨 결과 epinephrine 의 분비량이 증가한다고 하였고 새를 90 일간 1 일 30 분씩 구속시킨 결과 catecholamine 의 분비량이 증가하였다고 보고하였다.²⁵⁾

V. 結 論

흰쥐를 구속하면서 뇨중 catecholamine 의 분비량 변화를 알아보기 위하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상 흰쥐의 뇨중 norepinephrine 의 분비량은 0.578 ng/ml 였고 epinephrine 은 0.365 ng/ml, dopamine 은 0.731 ng/ml 였다.
2. 흰쥐를 1 시간동안 구속시 norepinephrine 의 분비량은 1.262 ng/ml, epinephrine 은 0.508 ng/ml, dopamine 은 0.883 ng/ml 였으나 3 시간 구속시에는 norepinephrine 이 1.915 ng/ml, epinephrine 이 0.854 ng/ml, dopamine 이 2.361 ng/ml 로 3 시간 구속인 경우가 1 시간보다 더 많은 stress 를 받는 사실을 catecholamine 의 분비량으로 확인

하였다.

이상과 같은 실험결과를 미루어보아 흰쥐를 구속시에는 catecholamine 의 분비량이 증가함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Selye, H. : The stress life(rev.ed.). New York. Van Nostrand Reinhold, 459, 462, 463. 1979.
2. Atkinson, R.L. : Introduction to psychology, 9 th ed. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, pp.460~487, 1987.
3. Cannon, W.B. : Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage. New York Appleton. 462, 1929.
4. Kvetnansky, R. and Mikulaj, L. : Endocrinology, 87, 738~745, 1979.
5. Kvetnansky, R. et al : Endocrinology, 103, 1868~1874, 1978.
6. Mikulaj, L. : Catecholamines and stress. Pergamon Press, Oxford, pp. 445~455, 1976.
7. Kvetnansky, R. : Recent progress in catecholamines under stress. Elsevier North Holland, Inc. pp.7~18, 1980.
8. McCarty, R. and Kopin, I. J. : Hormones and Behavior. 11, 248~257, 1978.
9. Ostman, S.I. : Acta Physiol. Scand., Suppl. 477, Oxford, p.1~118, 1979.
10. Bonfils, S. and Lambling, A. : Pathophysiology of peptic ulcer., McGill Univ. Press, Montreal. p.153, 1963.

11. Goodall, M.M. and Graqueline, D.E. : Urinary adrenaline and noradrenaline response to simulated weightless state. *Am. J. Physiol.*, 206, 431, 1964.
12. Frankenhaeuser, M. and Rissler, A. : Catecholamine output during relaxation and anticipation. *Percept. Mot. Skills*, 30, 745, 1970.
13. Axelrod, Julius : The relationship between the stress hormones, catecholamine, ACTH and glucocorticoids. *Stress, The Role of Catecholamines and Other Neurotransmitters*, Vol. 1, Gordon and Breach Science Pub. 3-13, 1983.
14. Kvetnansky, R., et al. : Plasma catecholamines in rats during adaptation to intermittent exposure to different stressors. *Stress, the role of catecholamines and other neurotransmitters*. Vol. I. ed. by Earl Usdin, Gordon and Breach Science Pub. p. 538, 1984.
15. Peuler, J.D. and Johnson, G.A. : Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine. *Life Sci.*, 21, 625~636, 1977.
16. von Euler, U.S. and Lishajko, F. : Improved technique for the fluorimetric estimation of catecholamines. *Acta Physiol. Scand.*, 51, 348~355, 1961.
17. Molinoff, P.B., Weinshiboum, R and Akxelrod, J. : A sensitive enzymatic assay for dopamine-b-hydroxylase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178, 425~431, 1971.
18. Tizabi, Y., Kopin, I.J., Maengwyn, G.D. and Thoa, N.B. : Attack induced changes in response to decapitation of plasma catecholamines of victim mice. *Psychopharmacol. Commun.* 2, 391~402, 1976.
19. Moreau, D., Guillard, J.C., Noirot, P. and Malval, M. : Nutritional, cardiac and adrenergic changes induced by swimming training in rats. *J. Physiol.* 75, 755~764, 1979.
20. Jurani, M., Nvota, J., Vyboh, P., and Boda, K. : Effect of stress on plasma catecholamines in domestic birds. *Elsevier-North Holland, New York*, pp. 285~290, 1980.