

19-norandrostenedione이 흰쥐 정소내 스테로이드 대사에 미치는 영향

한양대학교 자연과학대학 생물학과

김정욱 · 윤용달

Effect of 19-norandrostenedione on Steroidogenesis in Rat Testis

Jeong-Wook Kim and Yong-Dal Yoon

Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University

= Abstract =

19-norandrostenedione(19-NORA) is known as an intermediate in the metabolic pathway from androstenedione to estrone. Administration of esterified 19-nortestosterone, anabolic steroid, reduces serum gonadotropin and testosterone concentration, and results in reversible azoospermia in men. 19-NORA have been isolated from testis, but its function in testis is not clear yet. Therefore, this study was designed to determine the effect of 19-NORA on steroidogenesis and on spermatogenesis.

19-NORA was administrated by single intratesticular injection to adult male rats weighing 350-400g in dose of 1 mg/50 μ l. The serum and testis were collected on 1, 3, 7, 12, 48hr after injection. The histological differences in testis were observed by routine paraffin method. The concentrations of testosterone and estradiol in serum and in left testis were determined by the conventional radioimmunoassays. One hour after 19-NORA treatment, serum concentrations of testosterone and estradiol increased significantly, compared to those of pre-treated(0hr) group, and reduced gradually to the control level on 7 hour after injection. The concentration of testosterone in left testis increased slightly 1 hour after injection, and estradiol level increased significantly($p < 0.05$). Also, testosterone and estradiol level of control group revealed no difference with pre-treated(0hr) group. Gonad index, structure of seminiferous tubules, and the number of step 7th spermatid were similar to control group.

The present study suggests that the elevation of testosterone level results from increment of estradiol followed by the rapid metabolism of 19-NORA at 7 hour after injection, and then testosterone concentration may be recovered to control level by feedback mechanism of hypothalamus-hypophysis-testis axis.

서 론

44-Androstenedione(A)과 testosterone(T)으로 부터의 estrogen 생합성은 3단계의 hydroxylation과정을 거쳐 이루어지며(Akhtar et

본 연구는 1992년도 교육부 기초과학육성연구비 지원(BSRI-94-4437)에 의한 것임.

al., 1982), 이 과정은 C-19₁, C-19₂, 2 β 의 위치에서 순서대로 일어나 19-hydroxyandrostenedione(19-OHAD), 19-oxoandrostenedione(19-oxoAD), estrone등과 같은 물질을 만들어 낸다(Fishman & Goto, 1981). 이러한 aromatization과정은 aromatase라는 효소 복합체가 관여한다(Silberzahn et al., 1988). 19-norandrogen들도 aromatization과정중에 존재하는

중간 대사물질로서, androstenedione으로부터 19-norandrostenedione(19-NORA), 19-nortestosterone(19-NORT)을 거쳐 estrone으로 바뀐다. 돼지의 난포내 과립세포에 aromatase inhibitor인 4-hydroxyandrostenedione을 처리하면 19-NORA의 합성이 *in vitro*상태에서 저해된다는 사실은 이들이 위의 과정중에 중간 대사물질로 존재한다는 것을 뒷바침해준다(Khalil et al., 1987).

19-NORA는 Short(1960)에 의해 암말의 난포액에서 처음 발견되었으며, 19-norandrogen이 androgen의 aromatization과정에서 중간대사물질로 존재할 것이라고 추론하였다. 19-NORA가 처음 발견된 이후 19-norandrogen은 사람(Dehennin et al., 1987)과 말(Short, 1961; Silberzahn et al., 1985)의 난포액, 그리고 원숭이 태반의 마이크로솜(Milewich & Axelod, 1979), 암말의 난포벽과 황체(Mahajan & Samuels, 1974)등의 생식기관에 존재한다고 알려졌다. 또한 돼지(Ruokonen & Vihko, 1974)와 종마(Dumasia et al., 1985)의 정소, 사람의 전립선(Farnsworth, 1966)등 웅성 생식소에도 존재한다고 보고되었다. 그리고 생식기관이 아닌 종마(stallion)의 소변(Houghton et al., 1984), 생쥐의 신장(Sulcova et al., 1979), 개의 뇌하수체(Osawa & Yarborough, 1983)등의 배양시에도 합성된다고 보고되고 있다. 그러나 아직까지 이들의 생리학적 의미성은 미지의 상태이다.

한편 19-norandrogen들은 anabolic steroid로 이용되어 왔는데, 최근 운동선수들의 복용으로 문제가 되고 있는 19-nortestosterone(19-NORT)은 사람(Brooks et al., 1979)과 소(Jansen et al., 1985) 그리고 말(Jondorf & Moss, 1977)에서 anabolic preparation과정중에 사용된다. 사람에게 ester화된 19-NORT를 처리하면 혈청내 gonadotropin과 testosterone의 농도가 저하되고, 결국은 회복성 무정자증(reversible azoospermia)을 유발한다(Belkien et al., 1985). 그러므로 최근에는 Luteinizing Hormone Releasing Hormone(LHRH)와 함께 투여하여 피임제로 사용되기도 하였다(Clayton, 1987).

19-NORA는 돼지 난포액내에 다량 존재하며(Khalil et al., 1987), *in vitro*상태에서는 돼지 난자의 성숙을 억제한다고 보고되었다(Daniel et al., 1986). 그러나 생식소에서의 19-NORA

의 생물학적 역할은 아직 불분명한 상태이다.

지금까지 생식소에 대한 androgen의 역할을 연구하는 데는 근육주사, 혈관주사, 복강주사, 경구투여 등으로 androgen을 투여하는 방법이 이용되어 왔다. 그러나 이러한 방법들은 그 반응이 일정하지 않고 또한 처리 후 혈액내 testosterone 및 dihydrotestosterone의 농도가 갑자기 증가했다가 감소함으로 지속적인 androgen의 농도 유지가 어려웠다. 그리고 이들의 작용은 거의 모두 직접적이 아닌 체내대사 후에 생기는 androgen 대사물질들의 작용이라고 알려졌다. 그러므로 이들이 직접적으로 또 지속적으로 정자의 형성에 미치는 영향은 연구하기 불가능하였다. 최근 사람에서는 transdermal testosterone substitution therapy(TTS) 방법이 개발되어(Bals-Pratsch et al., 1986; Ahemed et al., 1988), 일정량의 testosterone을 유지할 수 있게 되었으나, 작은 실험동물에서는 처리방법이 어려워 새로운 방법이 개발되어야 한다. 최근 Russel등(1987)은 흰쥐 등 작은 실험동물의 정소에 극소량의 물질을 투여하여 정소내 세포의 반응성을 조사하는 방법을 개발하였다. 이 방법은 정소내 주입된 물질이 정소의 림프계(lymphatics)를 통해 분산됨으로 세정관에 미치는 영향을 연구하기 좋고 또 *in vivo*상태에서의 정소내 정세포의 변화와 내분비계에 미치는 영향을 같이 연구할 수 있을 것으로 판단된다.

그러므로 본 실험에서는 과량의 19-NORA를 정소에 직접 처리하여 혈청내 혹은 정소내 스테로이드 호르몬의 농도변화와 정소내 스테로이드대사에 미치는 영향을 조사함으로써 estrogen 생합성과정의 중간대사물질인 19-NORA의 생리학적 역할을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

실험재료는 대한 실험기기 동물센터에서 공급받은 생후 10-12주된 흰쥐(Sprague-Dawley)의 수컷으로 체중이 350-400g인 건강한 것을 한양대학교 사육실에서 물과 먹이를 충분히 공급한 상태로 2주간 하루 14시간 조명하고 10시간 암흑 상태로 적응시켜 사용하였다.

2) 호르몬 및 시약

흰쥐의 정소내로 투여된 19-norandrostene-

dione(Sigma)은 순도 높은 sesame oil(Sigma)에 녹여 사용하였다.

방사면역측정법에 사용한 추적자(tracer)는 1, 2, 6, 7-³H-testosterone(spec. act. 88.5Ci/mmol, Amersham)과 2, 4, 6, 7-³H-estradiol(spec. act. 98Ci/mmol, Amersham)로서 순수하게 재분리하기 위하여 Sephadex LH-20(Pharmacia Fine Chem. Co.)을 사용하였다. LH-20(6g)을 30ml의 전개용매(cyclohexane:chloroform:ethyl alcohol=15:2:4, V/V/V)에 용해한 후, 1cm(D)×30cm(L)의 column을 제작하여 충전하였다. 각각의 추적자를 50 μ Ci씩 conical tube(Pyrex)에 옮기고 37 $^{\circ}$ C 정온수조에서 질소 개스를 공급하면서 증발시켰다. 각 시료는 다시 500 μ l의 전개용매에 녹인 후 column에 전개하였다. 각각은 1ml씩의 분획으로 받고 순수 정제된 추적자 분획을 증발시킨 후 90% ethyl alcohol로 희석하여 보관하였다.

Testosterone(T)의 항혈청은 testosterone-3-⁰-carboxymethyl-oxime(CMO)를 Erlanger등(1959)의 방법을 이용하여 Bovine serum albumin(BSA)에 접합시킨 후 토끼에 주사하여 면역반응을 유발시켜 항체를 생산하였다. 생산된 T의 항혈청은 최종적으로 1:70,000으로 희석하여 사용하였으며, Estradiol의 항혈청은 Estradiol-6-CMO-BSA를 사용, 토끼에서 얻은 항혈청을 최종적으로 1:105,000으로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 실험 계획

Sesame oil 10ml에 200mg의 19-NORA를 24시간 동안 충분히 녹여 상온에 보관하였다. 이것을 25마리의 흰쥐 우측 정소에 1mg/50 μ l씩 직접 정소내로 주사(intratesticular injection)하였다. 또한 대조군으로 25마리의 흰쥐 정소에 50 μ l의 sesame oil만을 주사하였다. 주사후 1, 3, 7, 12, 48시간에 혈액과 정소를 채취하였다.

Ether마취하에서 cardiac puncture방법으로 채취한 혈액을 상온에 1시간, 4 $^{\circ}$ C에 24시간 방치한 후 원심분리(Heraeus Christ, refrigerated centrifuge, 3,000rpm, 30 min)하여 얻은 혈청은 testosterone과 estradiol의 정량을 위하여 -60 $^{\circ}$ C 저온냉동기(So-Low Environmental Equip. Co.)에 보관하였다.

정소는 혈액 채취 후 즉시 적출하였으며, 적출한 정소의 길이(L)와 폭(W)은 caliper로 측정하였고, 무게는 Sartorius analytical balance(2007 MP6)로 측정하였다. 정소의 용적은 Weinbauer등(1985)이 사용한 공식($W \times L \times \pi/6$)을 이용하였으며, 생식소지수(Gonad Index, GI)는 정소 적출후 정소표면의 물기를 제거하기 위해 흡수지위에 약 30초간 방치한 후 무게를 달아서 체중으로 나눈 값에 100을 곱하여 산출하였다.

조직학적인 검정을 위해 우측 정소를 10% neutral buffered formalin용액에 고정하였다. Alcohol series(50-100%)를 거쳐 탈수하고 xylene으로 투명(clearing)한 후 파라핀(Monocryl Scientific Co.)을 침투시켜 포매하였다. 파라핀에 포매한 재료는 4 $^{\circ}$ C에서 박편절단기(microtome, Lipshaw)를 사용하여 8 μ m 두께로 절단하였으며, hematoxylin-eosin으로 2중 염색하였다. 세정관상피주기(seminiferous epithelium cycle)중 VII단계(Leblond & Clermont, 1952)의 정자형성과정중에 있는, 직경 200-230 μ m이며 장축과 단축의 비가 1.2이하인 횡절단된 세정관을 광학현미경(Olympus, CHB, $\times 400$)으로 관찰하여 정세포의 수를 계수하였다. 또한 좌측 정소는 스테로이드 호르몬의 정량을 위하여 -60 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2) 방사면역측정법에 의한 testosterone과 estradiol의 정량

Testosterone 및 estradiol의 정량은 기존의 방사면역측정법을 이용하였다(Yoon, 1981). -60 $^{\circ}$ C 저온 냉동기에 보관했던 좌측 정소는 4 $^{\circ}$ C를 유지한 상태에서 15ml의 생리식염수(saline)와 함께 분쇄기로 3회에 나누어 분쇄한 후 통합하여 15ml의 시료를 만들었다. 이 분쇄된 시료를 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 3,000rpm으로 원심분리하여 정소내 스테로이드 호르몬 농도의 정량을 위해 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액 100 μ l를 취하여 혈청내 스테로이드 호르몬 정량시와 같은 방법으로 diethyl ether로 추출한 후 3ml의 GPBS로 녹여 RIA로 정량하였다.

실험에서 testosterone과 estradiol의 농도를 방사면역측정법으로 정량하는 과정에서의 정도관리 제원은 다음과 같았다. 회수율(recovery ratio)은 testosterone의 경우 72.93 \pm 0.93%였고 estradiol은 76.44 \pm 2.40% 정도를 나타내었으며, 감도(sensitivity)는 testosterone에서

13-60pg/ml, estradiol에서는 5-20pg/ml를 나타내었다. 표준곡선(standard curve)을 이용하여 계산한 정확도(accuracy)는 testosterone의 경우 첨가량(X)과 측정치량(Y)과의 상관관계는 $Y=1.02X-1.92(r=0.998)$ 를 나타냈으며 estradiol의 경우는 $Y=1.04X+1.46(r=0.992)$ 을 나타내었다. 그리고 각 assay의 정밀도(precision)는 testosterone의 경우 내정도 관리(intraassay variation)의 변이계수(coefficient of variation, CV)값이 4.98%(QC 1), 7.55%(QC 2)였으며, estradiol의 경우 4.38%와 2.80%를 나타내었다. 한편 testosterone의 의정도관리(interassay variation)의 CV값은 9.81%, 11.60%, estradiol의 CV값은 2.82%를 나타내었다. Testosterone-3-CMO-BSA를 사용하여 만든 항혈청에 대한 교차반응도는 5 α -DHT가 14%, 5 α -androstenediol이 6%, androstenedione이 0.8%, 기타 스테로이드와는 0.01% 이하였으며, estradiol-6-CMO-BSA를 사용하여 얻은 항혈청에 대한 교차반응도는 estrone

이 1.7%, testosterone, cortisol등 기타 스테로이드와는 0.0001% 이하를 나타내었다.

3) 스테로이드 호르몬의 농도계산

스테로이드 호르몬의 농도는 logit-log transformation을 이용하여 RIA Data Reduction Program(Jaffe, 1985)을 이용하여 계산하였다.

3. 통계검정

통계학적 유의성은 Student's t-test방법을 사용하였으며 p값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 하였다.

결 과

1. 정소내 조직학적 변화

19-NORA 투여 후 48시간까지 정소의 조직학적 변화는 거의 발견할 수 없었으며 세정관 상피주기 제Ⅶ단계의 정세포수도 대조군에 비해 유의한 차이를 발견할 수 없었다(표 1). 그러나 전체적인 구조에서 세정관들 사이의 틈

Table 1. Change of step VII spermatid numbers after single intratesticular injection of 19-norandrostenedione

Group	Time after injection(hour)					
	0	1	3	7	12	48
Oil control*	214.25 ±22.95	185.75 ±13.65	209.25 ±16.13	195.00 ±19.06	195.67 ±27.54	201.50 ±14.18
19-NORA*	214.25 ±22.95	195.17 ±18.85	227.00 ±15.10	182.67 ±22.86	199.83 ±18.30	199.50 ±14.34

Above values are expressed as mean \pm SD of step VII seminiferous tubules (=5~10) in cross sectioned right testis.

*Oil control group were injected sesame oil(50 μ l) only. *19-NORA group were injected 19-norandrostenedione(1mg/50 μ l).

Table 2. Change of testis weight and volume after single intratesticular injection of 19-norandrostenedione

Time after injection(hour)	Group			
	Oil control		19-NORA (1mg/50 μ l)	
	Weight(g)	Volume(ml)*	Weight(g)	Volume(ml)*
0	3.55 \pm 0.36*	2.68 \pm 0.11*	3.55 \pm 0.36	2.68 \pm 0.11
1	3.63 \pm 0.21	2.88 \pm 0.18	3.38 \pm 0.27	2.35 \pm 0.25
3	3.14 \pm 0.44	2.64 \pm 0.27	3.33 \pm 0.20	2.66 \pm 0.14
7	3.48 \pm 0.31	2.92 \pm 0.17	3.30 \pm 0.22	2.65 \pm 0.15
12	3.54 \pm 0.20	2.89 \pm 0.26	3.62 \pm 0.28	2.85 \pm 0.18
48	3.32 \pm 0.48	2.75 \pm 0.31	3.65 \pm 0.20	2.88 \pm 0.13

*Data are expressed as the mean \pm SD. Above values of testis weight and volume are sum of right and left testis values.

*Testis volume are calculated by width(W) \times length(L) \times π /6.

Table 3. Effect of 19-norandrostenedione on gonad index in male rat

Group	Time after injection(hour)					
	0	1	3	7	12	48
Oil control*	0.84 ±0.07	0.93 ±0.12	0.93 ±0.29	0.94 ±0.11	0.96 ±0.07	0.80 ±0.12
19-NORA #	0.84 ±0.07	0.93 ±0.08	0.92 ±0.06	0.90 ±0.09	0.88 ±0.07	0.93 ±0.04

Gonad index(mean ± SD, %) represents [testis weight(g)/body weight(g)] × 100.

*Oil control group were injected sesame oil(50 μl) only.

#19-NORA group were injected 19-norandrostenedione(1mg/50 μl).

이 약간씩 벌어져 있음을 알 수 있었다.

2. 정소의 형태학적 변화

19-NORA를 주사한 후 좌측과 우측 정소의 용적 및 무게는 처리전에 비해 유의한 차이는 없었으며 sesame oil만을 주사한 대조군에서도 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다(표 2).

3. 생식소 지수(Gonad Index, GI)

생식소 지수는 19-NORA 처리군의 경우 12시간까지 약간의 증가를 보였으나 그후 감소하는 경향을 보였다. 그러나 처리전에 비해 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 그리고 sesame oil만을 주사한 대조군에서도 유의한 차이는 발견할 수 없었다(표 3).

4. 스테로이드 호르몬의 농도변화

1) 혈청내 testosterone과 estradiol의 농도 변화

19-NORA를 주사하기 전 testosterone의 혈청내 농도는 $2.58 \pm 1.26 \text{ ng/ml}$ 이었는데 주사후 1시간에 sesame oil만을 처리한 대조군에 비해 급격하게 증가($13.27 \pm 2.86 \text{ ng/ml}$, $p < 0.05$)하였으나, 3시간후 부터는 감소($3.93 \pm 0.67 \text{ ng/ml}$, $p < 0.05$)하기 시작하여 7시간 이후부터는 대조군과 거의 같은 수준을 나타냈다(그림 1).

혈청내 estradiol농도는 19-NORA 주사후 1시간에 처리 전($15.76 \pm 7.06 \text{ pg/ml}$)보다 거의 6배 가량 급격히 증가($106.50 \pm 24.52 \text{ pg/ml}$, $p < 0.05$)하였다. 3시간후 부터는 감소($51.04 \pm 11.58 \text{ pg/ml}$, $p < 0.05$)하여 12시간 이후에는 대조군과 큰 차이가 없었다(그림 2). 대조군에서는 testosterone의 경우처럼 유의한 차이를 보이지 않았으나 처리전에 비해서는 대체적으로 낮은 수준을 나타내었다.

2) 정소내 testosterone과 estradiol의 농도 변화

좌측 정소마쇄현탁액내 testosterone의 농도

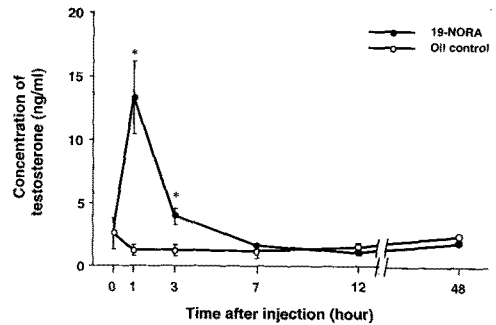


Fig. 1. Serum concentration of testosterone in male rat after single intratesticular injection of 19-norandrostenedione(1mg/50 μl). Solid line with closed circles represents the experimental group. Solid line with open circles represents the control group. Vertical lines on the closed & open circles mean the standard deviation.

*; $p < 0.05$, different from oil control group, in the 95% confidence level.

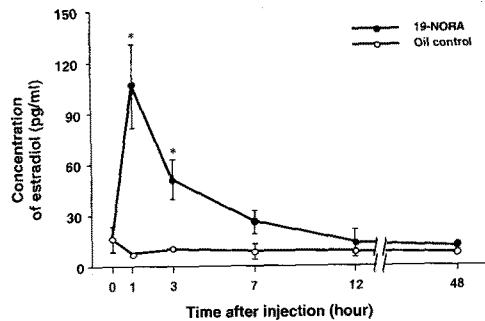


Fig. 2. Serum concentration of estradiol in male rat after single intratesticular injection of 19-norandrostenedione(1mg/50 μl). Solid line with closed circles represents the experimental group. Solid line with open circles represents the control group. Vertical lines on the closed & open circles mean the standard deviation.

*; $p < 0.05$, different from oil control group, in the 95% confidence level.

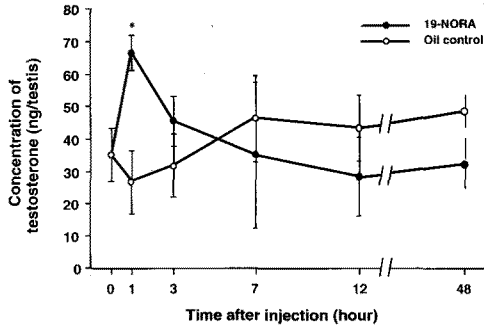


Fig. 3. Change of intratesticular testosterone in male rat after single intratesticular injection of 19-norandrostenedione(1mg/50 μ l). Solid line with closed circles represents with experimental group. Solid line with open circles represents the control group. Vertical lines on the closed & open circles mean the standard deviation. *; $p < 0.05$, different from oil control group, in the 95% confidence level.

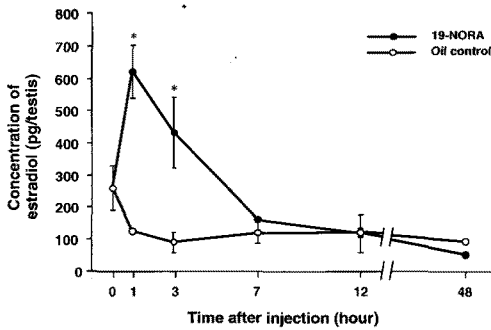


Fig. 4. Change of intratesticular estradiol in male rat after single intratesticular injection of 19-norandrostenedione(1mg/50 μ l). Solid line with closed circles represents the experimental group. Solid line with open circles represents the control group. Vertical lines on the closed & open circles mean the standard deviation. *; $p < 0.05$, different from oil control group, in the 95% confidence level.

변화를 그림 3에 나타내었다. 정소내 testosterone의 농도는 19-NORA 주사후 1시간에 sesame oil만을 처리한 대조군(26.80 ± 9.68 ng/ml)에 비해 유의하게 증가(66.62 ± 5.43 ng/ml, $p < 0.05$)하였으나 3시간 이후에는 감소하여 7시간 이후 대조군보다 다소 낮은 농도를 유지하였다. 한편 대조군에서는 7시간후 부터 약간 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

좌측 정소내 estradiol의 농도 변화를 보면 (그림 4) 주사후 1시간에 대조군에 비해 유의

하게 증가(621.05 ± 82.34 pg/ml, $p < 0.05$)하였으나 7시간 이후부터는 대조군 수준으로 감소하였다. 또한 대조군에서는 3시간까지만 다소 낮은 수준을 나타내었으나 7시간 이후에는 정상수준을 유지하였다.

고 찰

19-norandrostenedione(19-NORA)은 돼지와 말 등 포유류의 난포액(Khalil and Walton, 1985; Silberzahn et al., 1985)과 정소마쇄액(Dumasia et al., 1985)내에 존재하는 주요 스테로이드라고 알려져 있으나, 혈청내에서는 아직까지 거의 발견되지 않았으며, 말의 정소에서 19-NORA는 estradiol로의 aromatization 과정중에 중간대사물질로 검출된다(Silberzahn et al., 1988). 이러한 결과들은 19-NORA가 정소내에서 androstenedione으로부터 estradiol로의 생합성과정에서 중간대사물질로 존재할 가능성을 시사한다(Dintinger et al., 1989).

본 실험에서 19-NORA를 정소에 직접 투여하여 그에 따른 혈청과 정소내에서의 스테로이드 호르몬의 대사과정을 조사한 결과, 주사후 1시간에 혈청과 정소내 testosterone과 estradiol농도가 급격히 증가하였다. Sesame oil에 oil red-0를 녹여 주사한 호르몬이 정소내로 퍼져가는 속도를 관찰한 예비실험 결과, 주사후 약 30분 만에 정소 전체로 퍼져나가는 것으로 보아 주사후 1시간 정도가 경과하면 19-NORA가 정소전체로 퍼져 생리학적 작용이 시작될 것으로 사료된다. 그러나 생식소 지수와 정소의 용적에는 큰 영향을 주지 않았다. 이것은 호르몬을 단 한번만 처리하였고 처리후 짧은 시간(48시간)안에 혈청과 조직을 적출했기 때문에 스테로이드 호르몬의 농도, 즉 생리적 작용에는 영향을 줄 수 있어도 형태적인 변화에는 영향을 줄 수 없었기 때문이라고 사료된다.

호르몬의 투여방법에 있어서 지금까지 널리 쓰여왔던 근육주사(Vicente et al., 1989)나, 복강주사(Yoon & Yang, 1988)가 아닌, 직접 정소내로 주사(intratesticular injection)하는 방법을 이용하였다. Russel등(1987)은 위의 방법을 확립하였는데 정소에 주사할 수 있는 물질의 최대 용적이 50 μ l이하 이며, vehicle로는 생리식염수나 sesame oil등이 적당하고, ethyl alcohol은 정소의 조직에 나쁜 영향을 줄 수

있다고 보고하였다. 그러므로 본 실험에서도 주사용적을 50 μ l로 하여 sesame oil에 호르몬을 녹여 투여하였는데, sesame oil에 의한 정소내 기능적, 형태적 변화는 나타나지 않았다. 또한 50 μ l 투여시에는 정소외로 유출되는 투여액은 없었고, 정소내 상흔 역시 발견할 수 없었다. 그러나 주사후 3-7시간 내에 정소 및 혈청내 호르몬의 농도가 급격히 변화하는 것으로 보아 19-NORA가 정소내 스테로이드 생합성의 과정에 직접적으로 영향을 주는 것을 판단된다.

따라서 생식소내 호르몬의 영향을 알아보기 위하여는 sesame oil을 vehicle로 하여 직접 정소내로 주사(intratesticular injection)하는 방법이 적당하다고 생각된다. 그러나 우측 정소에만 직접적으로 호르몬을 투여하였기 때문에 좌측 정소에 대한 호르몬의 영향은 우측 정소에 대한 영향과 다른 양상을 나타냈다고 볼 수 있다. 그러므로 혈청과 좌측 정소내의 스테로이드 호르몬의 반응 양상이 다를 수 있다고 생각된다.

그리고 본 실험에서 19-NORA 처리후 정소 및 혈청내 estradiol의 농도가 1-3시간에 증가한 것은 스테로이드 생합성 과정에서 19-NORA가 estradiol합성 전단계에 존재하는 중간 대사물질임으로 estradiol의 생합성이 증가된 결과로 해석된다. 이러한 사실은 말의 정소(Dintinger et al., 1989)와 돼지의 간질세포(Leydig cell) 배양시(Raesside et al., 1988)에도 관찰되어 위의 사실이 뒷받침된다.

한편 혈청내 testosterone양이 증가하는 기작은 몇가지 가정이 유추된다. 첫째는 androstenedione과 testosterone으로부터의 estradiol 합성경로에서 중간대사물질로 존재하는 19-NORA가 정소내에 과량으로 투여되었으므로, testosterone대신 19-NORA가 우측 정소내의 간질세포에서 estradiol을 다량 생산하여 혈류로 방출하고(Ryan et al., 1986) testosterone이 축적될 가능성이 있다. 그리고 두번째로 long-term feedback의 작용기작을 들 수 있다. 즉 우측 정소내에 증가된 estradiol은 뇌하수체와 시상하부의 수용체에 부착되는 비율이 높아질 것이다. 이러한 억제적 음성되먹임 기작(suppressive negative feedback mechanism)이 일어난 후 다시 음성되먹임 회복기(recovery phase of negative feedback)가 되어 혈중 스테로이드 수준이 감소하게 되면 다시 LH의 수준은

증가할 것이다(Jack G, 1987). 이에 따라 정소내의 간질세포가 자극을 받아 testosterone의 분비가 왕성하게 되어 testosterone의 수준이 증가하게 될 가능성이 있다. 또한 다량의 testosterone을 처리하면 장시간에 걸친 음성되먹임 기작에 의해 LH와 FSH(Follicle stimulating hormone)농도를 모두 감소시킨다는 보고도 있다(Matsumoto, 1990). 그러나 위의 자세한 되먹임 기작은 아직까지 정확한 근거가 제시되어 있지 못함으로 단정지을 수는 없다. 그리고 또 3시간여의 짧은 시간에 되먹임 작용의 작동여부는 본 실험의 결과로는 유추하기 어렵다고 판단된다.

혈청내 testosterone농도가 19-NORA 주사후 3시간 쯤에 급격히 감소하여 7시간째에는 정상군보다 다소 낮은 수준으로 떨어진 것은 혈액내를 순환하고 있던 다량의 testosterone이 대사과정을 통해 배출된 것으로 생각된다. 또한 증가된 testosterone은 되먹임 작용에 의해 LH의 분비를 억제하고, 간질세포의 testosterone생산 및 분비를 막아 정상군보다 더 낮은 농도로 떨어지는 것으로 판단된다(Kerr & Sharpe, 1986; Grizard et al., 1987).

한편 dihydrotestosterone enanthate와 testosterone enanthate를 복강 주사했을 경우에도 혈청내 testosterone의 농도가 본 실험 결과와 유사하게 증가후 감소(Yoon & Yang, 1988)하는 것으로 보아 본 실험에서도 주사후 오랜 시간이 지난 후에는 생식소 지수나 정세포수를 변화시켰을 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 19-NORA의 신진대사율이나 작용기간에 관해서는 더 연구되어야 한다. 그리고 좌측 정소내 estradiol의 증가는 미처 대사되지 못한 여분의 19-NORA가 혈류를 돌아 좌측 정소로 이동하여 Sertoli cell에서 aromatization과정에 의해 estradiol의 분비를 촉진시켰을 것으로 추측된다. 좌측 정소내 estradiol 농도의 경우 testosterone의 경우처럼 1시간에 증가한 후 감소하기 시작하여 48시간이 지날 때까지 정상농도 이하로 떨어져 회복되지 않았는데 이는 estradiol의 증가에 따라 inhibin에 의해 FSH의 분비가 감소(De Jong, 1988)하여 Sertoli cell내에서 testosterone의 estradiol로의 전환을 막았기 때문으로 추정된다. 그리고 본 실험의 결과, 19-NORA 처리시 7-48시간에는 좌측 정소내 testosterone과 estradiol의 농도가 감소된 것으로 보아 동 기간내

전반적인 스테로이드 생산율이 저하된 것으로 추정된다. 그러므로 19-NORA의 장기적 효과는 더 연구되어야 할 것으로 판단된다.

반면 정소의 조직학적 면을 살펴보면 주사 후 48시간이 경과할 때까지 세정관의 형태나 정자형성과정 제Ⅶ단계의 정세포수의 변화가 거의 없음을 알 수 있었다. 이는 흰쥐의 경우 정자형성과정의 I 단계부터 XⅣ 단계까지 걸리는 시간이 대략 52일 정도가 소요됨(Clermont & Harvey, 1965)으로 단기간내의 영향이 거의 없었을 것으로 생각된다. 그러나 같은 호르몬을 장시간에 걸쳐 투여하면 약 12주 후에 정세포수는 감소한다. 또한 GnRH antagonist 치료로 감소된 정소무계가 19-NORA의 투여로 현저하게 보상되었고, 감소된 FSH의 분비를 촉진하며, 정자형성과정을 억제한다는 보고도 있다(Yoon et al., 1990). 이러한 결과는 19-NORA가 직접 정자형성과정에 영향을 주는 것이 아니라 FSH의 분비를 증가시킴으로써 정자형성과정에 간접적으로 작용할 것이라는 가정 등을 고려해 볼 때 19-NORA의 직접적인 효과와 작용기작은 장·단기간에 걸쳐 다를 수 있음을 시사해 준다.

위의 결과들을 종합해 볼 때 19-NORA는 estradiol 합성과정중에 존재하는 중간대사물질로서 혈청 및 좌측 정소내 estradiol 농도를 증가시킨다. 그리고 testosterone 농도도 같이 증가하며 시상하부-뇌하수체-정소축(Hypothalamus-hypophysis-testis axis)의 되먹임 기작에 의하여 주사 후 7시간 이후부터 정상수준으로 회복되는 것으로 생각된다. 또한 19-NORA는 단시간에는 기능적인 변화를 일으켜 스테로이드 대사에 영향을 주나, 형태적인 면이나 조직학적인 면에는 영향을 줄 수 없다고 추론된다. 따라서 장시간에 걸쳐 처리하여 정소내 스테로이드 대사나 정자형성과정을 알아보는 연구가 행해져야 할 것으로 사료된다. 또한 48시간 후 testosterone이나 estradiol의 농도가 감소하는 것으로 보아 응용적인 측면에서 남성 피임제 개발에도 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 생식소내 국부 조절 호르몬의 직접적인 영향을 알아보는 방법에 있어서 본 실험에서 행한 정소에 직접 주사(intratesticular injection)하는 방법이 적당할 것으로 판단된다.

앞으로 19-NORA가 정소내 스테로이드 호르몬의 생합성과정이나 정자형성과정에 미치

는 영향을 정확히 알아보기 위해서는 저농도와 고농도의 19-NORA를 좌측과 우측 정소에 모두 처리하여 장시간에 걸쳐 연구되어야 할 것이며 정소내에서의 19-NORA의 metabolic clearance rate, 19-NORA와의 교차반응도, 그리고 혈청과 정소내의 정확한 농도가 측정되어야 한다고 생각된다.

인 용 문 헌

- Ahemed SR, Boucher AE, Manni A, Santen RJ, Bartholomew M, Demers LM: Transdermal testosterone therapy in the treatment of male hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 66, 546-551.
- Akhtar M, Calder MR, Corina DL, Wright JN: Mechanistic studies on C-19 demethylation in oestrogen biosynthesis. *Biochem J* 1982, 201, 569-580.
- Bals-Pratsch M, Knuth VA, Yoon YD, Nieschlag E: Transdermal testosterone substitution therapy for male hypogonadism. *Lancet* 1986, ii, 943-946.
- Belkien L, Schürmeyer T, Hano R, Gunnarsson PO, Nieschlag E: Pharmacokinetics of 19-nortestosterone esters in normal men. *J Steroid Biochem* 1985, 22, 623-629.
- Brooks RV, Jeremiah G, Webb WA, Wheller M: Detection of anabolic steroid administration to athletes. *J Steroid Biochem* 1979, 11, 913-917.
- Clayton RN: Gonadotropin releasing hormone: From physiology to pharmacology. *Clin Endocrinol(Oxf)* 1987, 26, 361-365.
- Clermont Y, Harvey SC: Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology* 1965, 76, 80-89.
- Daniel SAJ, Khalil MW, Armstrong DT: 19-norandrostenedione(4-estrene-3, 17-dione) inhibits porcine oocyte maturation in vitro. *Gamete Res* 1986, 13, 173-184.
- Dehennin L, Jondet M, Scholler R: Androgen and 19-norsteroid profiles in human preovulatory follicles from stimulated cycles: An isotope dilution-mass spectro-

- metry study. *J Steroid Biochem* 1987, 26, 399-405.
- De Jong FH: Inhibin. *Physiological reviews* 1988, 68, 555-607.
- Dintinger T, Gaillard JL, Zwain I, Bouhamidi R, Silberzahn P: Synthesis and aromatization of 19-norandrogens in the stallion testis. *J Steroid Biochem* 1989, 32, 537-544.
- Dumasia MC, Houghton E, Jackiw M: Identification of endogenous C-18 neutral steroids in stallion testis by GC-MS. *J Endocr(Suppl)* 1985, 107(abstr. 135).
- Erlanger BF, Borek G, Beiser SM, Lieberman S: Steroid - protein conjugates: II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone. *J Biol Chem* 1959, 234, 1090-1096.
- Farnsworth WE: Metabolism of 19-nortestosterone by human prostate. *Steroids* 1966, 8-10.
- Fishman J, Goto J: Mechanism of estrogen biosynthesis. *J Biol Chem* 1981, 256, 4466-4471.
- Grizard G, Azzaoui A, Boucher D: Testosterone, androstenedione, progesterone and 17 α -hydroxy progesterone in plasma and testes of immature rats under basal conditions and after hCG stimulation: Effect of bilateral cryptorchidism. *J Steroid Biochem* 1987, 25, 703-711.
- Houghton E, Copey J, Dumasia MC, Haywood PE, Moss MS, Teale P: The identification of C-18 neutral steroids in normal stallion urine. *Biomed Mass Spectrom* 1984, 11, 96-99.
- Jack G: Androgens. In: Anthony WN, Gerald L, eds. *Hormones*. Florida: Academic Press, 1987, 12, 483-513.
- Jansen EHJM, Van den Berg RH, Zomer G, Stephany RW: A specific radioimmunoassay for the detection of 19-nortestosterone in urine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985, 23, 145-150.
- Jondorf WR, Moss MS: On the detectability of anabolic steroids in horse urine. *Br J Pharmac* 1977, 60, 297-298.
- Kerr JB, Sharpe RM: Effects and interactions of LH and LHRH agonist on testicular morphology and function in hypophysectomized rats. *J Reprod Fert* 1986, 76, 175-192.
- Khalil MW, Morley P, Glasier MA, Armstrong DT: The aromatase inhibitor, 4-hydroxyandrostenedione inhibits the formation of 19-norandrostenedione by porcine granulosa cells in vitro. *Steroids* 1987, 50, 635-636.
- Leblond CP, Clermont Y: Spermatogenesis of rat, mouse, hamster, and guinea pig as revealed by the "periodic acid-Fuchsin sulfuric acid" technique. *Am J Anat* 1952, 90, 167-215.
- Matsumoto AM: Effect of chronic testosterone administration in normal men: Safety and efficacy of high dosage testosterone and parallel dose-dependent suppression of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and sperm production. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 70, 282-287.
- Mahajan DK, Samuels LT: The steroidogenic ability of various cell types of the equine ovary. *Steroids* 1974, 24, 713-730.
- Milewich L, Axelrod LR: Testosterone metabolism by placental microsomes from baboons. Identification of 19-nortestosterone and 19-nor-4-androstenedione. *J Steroid Biochem* 1979, 10, 241-243.
- Osawa Y, Yarborough C: Non-aromatizing androgen C10-19 lyase: Biosynthesis of 19-norandrostenedione by dog adrenal. *Endocrinology(Suppl)*. 112(abstr. 664).
- Raeside JI, Renaud RL, Friendship RM: Aromatization of 19-norandrogens by porcine Leydig cells. *J Steroid Biochem* 1988, 32, 729-735.
- Reznik Y, Herrou M, Dehenin L, Leymarie M, Leymarie P: Rising plasma levels of 19-nortestosterone throughout pregnancy: Determination by radioimmunoassay and validation by gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 1987, 64, 1086-1088.

- Ruokonen A, Vihko R : Steroid metabolism in testis tissue : concentrations of unconjugated and sulfated neutral steroids in boar testis. *J Steroid Biochem* 1974, 5, 33-38.
- Russel LD, Saxena NK, Weber JE : Intratesticular injection as a method to assess the potent toxicity of various agents and to study mechanisms of normal spermatogenesis. *Gamete Res* 1987, 17, 43-56.
- Ryan PL, Friendship RM, Raeside JI : Impaired estrogen production by Leydig cells of the naturally retained testis in unilaterally cryptorchid boars and stallions. *J Androl* 1986, 7, 100-104.
- Short RV : Identification of 19-norandrostenedione in follicular fluid. *Nature* 1960, 189, 232.
- Short RV : Steroids concentrations in the follicular fluid of mares at various stages of the reproductive cycle. *J Endocr* 1961, 22, 153-163.
- Silberzahn P, Dehennin L, Zwain I, Reiffsteck A : Gas-chromatography-mass spectrometry of androgens in equine ovarian follicles at ultrastructurally defined stages of development : Identification of 19-nortestosterone in follicular fluid. *Endocrinology* 1985, 117, 2176-2181.
- Silberzahn P, Gaillard JL, Quincey D, Dintinger T, A1-Tmimi I : Aromatization of testosterone and 19-nortestosterone by a single enzyme from equine testicular microsomes : Differences from human placental aromatase. *J Steroid Biochem* 1988, 29, 119-125.
- Sulcova J, Rafter J, Starka L : 19-nortestosterone in mouse kidney. *Endocr Exp* 1979, 13, 225-235.
- Vicente DS, Josue GF, Fernando L, Everardo R, Alfredo UA, Fernando V : Absorption of dihydrotestosterone (DHT) after its intramuscular administration. *Fertil Steril* 1989, 51, 493-497.
- Weinbauer GF, Marshall GR, Nieschlag E : New injectable testosterone ester maintains serum testosterone on castrated monkeys in the normal range for four months. *Acta Endocrinol* 1985, 113, 128-132.
- Yoon YD : The hormonal levels of the short luteal phase in Korean women : (I) LH, FSH, estradiol and progesterone. *J Basic Sci* 1981, 1, 154-166.
- Yoon YD, Chun EH, Yang HW, Kim JM : Effect of 19-norandrostenedione on the spermatogenesis in rat testis. *Kor J Fertil Steril* 1990, 17, 21-29.
- Yoon YD, Yang HW : Effect of dihydrotestosterone enanthate on the serum levels of testosterone and dihydrotestosterone and volume of testis in male mice. *Korea J Zool News Letter* 1988, 5, 4.