

쥐 뇌의 progesterone대사에 미치는 연령의 효과

한범구 · 박인호 · 조도현*

아주대학교 생물공학과

초록 : 쥐 뇌에서 연령증가에 따른 progesterone의 대사에 대하여 연구하였다. 그 기초실험으로 생 후 5일된 암컷 쥐의 뇌를 균질기로 분쇄한 경우와 잘게 다진 경우의 실험에서 잘게 다진 경우가 더 좋은 활성을 보였으며 쥐뇌 0.3g, 30분의 표준 실험조건을 결정하였다. 그 결과로 5 α -환원효소의 경우 생후 5~14일에 가장 활성이 높았으며 점차적으로 감소하여 6주 이후에는 거의 일정한 활성을 나타내었다. 3 α -hydroxysteroid 산화·환원효소(3 α -HSOR)도 5 α -환원효소와 비슷한 형태의 활성을 보였다. 그러나 이때 3 β -HSOR의 활성은 연령에 따라 변화가 없이 거의 일정함을 알 수 있었다. 따라서 연령에 따른 5 α -환원대사산물 생성의 감소는 5 α -환원효소의 감소와 3 α -HSOR의 감소에 의하여 일어남을 알 수 있었다(1994년 11월 21일 접수, 1994년 1월 16일 수리).

서 론

쥐 뇌는 스테로이드 호르몬 대사가 매우 활발하게 일어나는 기관으로서 progesterone과 androgen을 5 α -환원, 3 α/β -hydroxy 산화·환원시키거나 에스트로젠화 시킨다.¹⁾ 최근에는 포유동물의 뇌가 주변 스테로이드 호르몬 생성기관의 영향을 받지 않고 스테로이드 호르몬 항상성을 유지하고 있다는 것이 밝혀져서 이를 neurosteroids라 명명하였고,²⁻⁴⁾ 뇌에서 이들 neurosteroids의 대사과정에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이 neurosteroids는 γ -aminobutyric acid(GABA)수용체를 통하여 쥐의 행동에 영향을 준다는 것이 밝혀졌다.⁵⁻⁸⁾ 또한, 뇌에서 progesterone의 대표적 대사산물인 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one(3 α -hydroxy-DHP)도 GABA수용체와 결합하여 염소이온(Cl⁻)의 흐름에 관여함은 물론 최면효과가 있음이 밝혀졌다.⁹⁻¹⁰⁾

포유동물의 뇌에서 progesterone대사에 관여하는 효소에 대한 연구는 주로 어떤 특정한 연령의 시료를 갖고 행하여졌다. 최근에는 태아에서부터 출생 후 4일 까지의 5 α -환원효소의 변이¹¹⁾와 뇌세포에서 5 α -환원효소 및 20 α -산화·환원효소의 변화,¹²⁾ 배양된 뇌세포에서 배양기간에 따른 전환효소의 변이,¹³⁾ 폐경기 쥐에서 5 α -환원효소의 활성측정¹⁴⁾ 등이 보고되었으나 뇌에서 연령에 따른 progesterone대사의 변화에 대하여는 보고된 바 없었다.

본 연구에서는 암컷 쥐의 뇌에서 progesterone대사가 출생후 초기에 증가를 보인 후 연령이 증가함에 따라 감소하며 이 대사의 감소는 5 α -환원효소와 3 α -hydroxysteroid 산화·환원효소(3 α -HSOR)의 효소작용의 감소에 기인함을 밝혔다.

재료 및 방법

실험동물 및 시약

Sprague-Dawley종의 암컷 쥐를 12시간씩 명·암이 교차하는 사육장에서 사육하여 사료 및 물은 항상 먹을 수 있게 하였다. 골은 쥐를 절두한 후 취하여 얼음이 채워져 있는 petri-dish에 보관하고 Potter-type균질기로 5회 왕복하여 total homogenates를 만들거나 면도날로 아주 잘게 균질하게 하여 그대로 평량하여 사용하였다. [4-¹⁴C]-progesterone(51.6 mCi/mmol)은 Amersham(영국)에서 구입하였으며 [4-¹⁴C]-5 α -pregnane-3,20-dione(5 α -DHP)와 [4-¹⁴C]-3 α -hydroxy-DHP는 쥐 간 homogenate을 이용하여 [4-¹⁴C]-progesterone으로 부터 합성하여 박층 크로마토그래피(TLC)와 고성능 액체 크로마토그래피로 정제하여 사용하였다.

효소 활성측정

5 α -환원효소와 3 α -HSOR은 [4-¹⁴C]-progesterone과 [4-¹⁴C]-3 α -hydroxy-DHP를 각각 기질로 하여 다음과 같이 측정하였다. 각 해당기질 100,000 dpm(276 nano gram)을 10 ml의 Dulbecco Minimum Essential배지(MEM)에서 잘게 다진 쥐 골을 0.3g, 0.6g, 1.0g을 취한 후 진탕시키면서 시간별로 반응시켰다. 쥐 골 균질액은 MEM을 가한 후 Potter-Elvehjem균질기로 5회 상·하 운동을 시킨 후에 잘게 다진 골의 무게에 해당하는 각각의 무게를 취하여 동일한 조건으로 행하였다.

대사산물의 분리 동정

반응 후 ethyl acetate를 20 ml를 가하여 진탕 후 상등액을 취하여 3회 추출하여 건조시킨 후 이를 90%

찾는말 : progesterone, 5 α -reductase, 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase (3 α -HSOR), rat brain, age

*연락처자

에탄올에 녹여 C-18 Sep-Pak(Waters)을 통과시켜 cholesterol 및 cholesterol ester등을 제거하여¹⁵⁾ 박층 크로마토그래피(TLC)를 하였다. Silica gel GF254로 코팅된 plate를 diisopropyl ether로 1차 전개한 후 건조시킨 다음 동일 방향으로 diisopropyl ether-acetone(4:1, v/v)으로 전개하였다. X-ray film으로 autoradiography를 하여 표품(progesterone, 5 α -DHP, 3 α -hydroxy-DHP, 3 β -hydroxy-DHP, 20 α -hydroxy-progesterone)에 해당하는 부분을 절단하여 정량하였다. Progesterone분획 부분은 3 α / β -hydroxy-DHP의 존재를 확인하기 위하여 에탄올로 추출하여 건조시킨 후 pyridine-acetic anhydride(1:1, v/v)에서 하룻 밤을 반응시킨 후 다시 동일한 방법으로 TLC를 행하였다. 정량적인 분석을 위하여서는 표품에 해당하는 부분을 5 ml scintillation혼합액이 들어있는 용기에 넣은 뒤 Packard 1600TR로 5분간 방사선량을 측정하였다.

결 과

전환물의 확인

표품으로 사용된 스테로이드의 Rf값은 Table 1과 같다. Progesterone, 3 β -hydroxy-DHP, 3 α -hydroxy-DHP의 Rf값이 각각 0.70, 0.70, 0.75로서 불충분하여 이들 분획을 pyridine-acetic anhydride 혼합액에서 acetylation시킨 후의 Rf값은 각각 0.70, 0.85, 0.95으로 나타나 progesterone으로부터 이들 두 대사산물을 분리, 정량할 수 있었다. TLC상의 각 대사산물의 radioactivity회수율은 95 \pm 3%로 나타났으며 표준실험조건(시료 0.3 g, 반응시간 30분)에서 progesterone을 기질로 사용하였을 경우에는 5 α -DHP와 3 α -hydroxy-DHP만이 검출되었고 3 β -hydroxy-DHP와 20 α -hydroxy-progesterone은 검출되지 않았으며 5 α -DHP를 기질로 하였을 경우에는 3 α -hydroxy-DHP와 3 β -hydroxy-DHP가 생성되었다.

5 α -환원효소 및 3 α -HSOR의 측정

생 후 5일된 쥐 골 시료를 Potter-type으로 균질화시켰을 경우(total homogenates) 보다 면도칼로 잘게 다진 경우가 5 α -환원대사산물의 생성량이 동일한 시료의 무게와 반응시간에서 2~3배 가량 높음을 보여준다(Fig. 1).

Table 1. Rf value of the reference steroids on the TLC plate. The plates precoated with silica gel GF254 were developed successively in the following solvents. 1st solvent: diisopropyl ether 2nd solvent: diisopropyl ether-acetone(4:1, v/v)

compounds	Rf value	
	no treatment	acetylation
progesterone	0.70	0.71
5 α -DHP	0.81	0.81
3 α -hydroxy-DHP	0.75	0.95
3 β -hydroxy-DHP	0.70	0.87
20 α -hydroxy-progesterone	0.57	not determined

DHP: dihydroprogesterone

따라서 본 실험에는 total homogenates 대신에 잘게 절단한 시료를 사용하기로 하였다. 시료의 무게별, 반응시간별로 0.3 g, 0.6 g, 1.0 g의 경우 모두 45분까지는 반응시간에 비례하여 5 α -환원 대사산물(5 α -DHP와 3 α -hydroxy-DHP)이 생성됨을 보였다(Fig. 1). 5 α -DHP생성과 3 α -hydroxy-DHP생성을 나누어 조사하면 Fig. 2A, 2B와 같다. 5 α -DHP의 생성은 모든 시료에서 반응시간이 60분까지는 정비례로 증가한 후 50~80 ng에서 더 증가하지 않았으며(Fig. 2A), 반면에 3 α -hydroxy-DHP는 240분까지도 정비례하여 증가하였으며 이때 상관계수(r)는 0.3 g일 때 r=0.98, 0.6 g에서는 r=0.96, 1.0 g에서는 r=0.99를 보였다(Fig. 2B). 이상의 결과에서 5 α -환원효소와 3 α -HSOR의 활성은 시료 0.3 g, 30분의 반응시간을 표준 반응조건으로 정하였다. 이때, 총 5 α -환원대사산물은 기질 progesterone(276 ng)의 7~12%의 범위에 있다.

연령의 효과

5 α -환원효소와 3 α / β -HSOR의 활성은 생 후 부터 14일 사이에 가장 편차가 컸으며 3주 부터는 아주 작은 편차를 보였다(Fig. 3, Fig. 4). [4-¹⁴C]-progesterone을 기질로 하여 측정된 5 α -환원효소의 활성은 생 후 5~14일 사이에 38 ng/0.3 g-30분의 최대치를 나타낸 후 서서히 감소하여 180일 경에는 최대활성의 1/4정도 수준으로 저하가 되었다(Fig. 3). [4-¹⁴C]-5 α -DHP를 기질로 하여 측정된 3 α -HSOR의 경우에도 생 후 5~14일 사이에 90 ng/0.3 g-30분으로 최대 활성을 나타내고 그 후 감소하여 180일 경에 최대활성의 1/3수준이었다(Fig. 4). 그러나 [4-¹⁴C]-

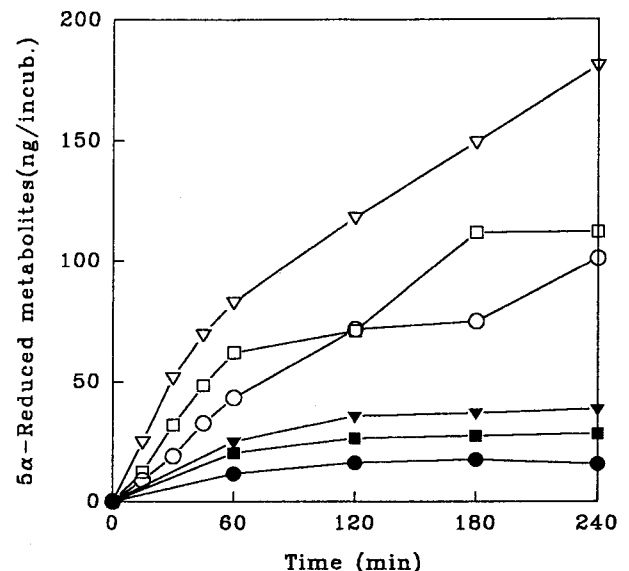


Fig. 1. Effect of sample preparation, of incubation time, and of tissue weight on the formation of total 5 α -reduced metabolites from progesterone.

Total 5 α -reduced metabolites were consisted of 5 α -DHP and 3 α -hydroxy-DHP. The minced tissues of the 5-day old female rat were shown in open symbols. The corresponding total homogenates were shown in filled symbols. (○, ●), 0.3 g; (□, ■), 0.6 g; (▽, ▾), 1.0 g.

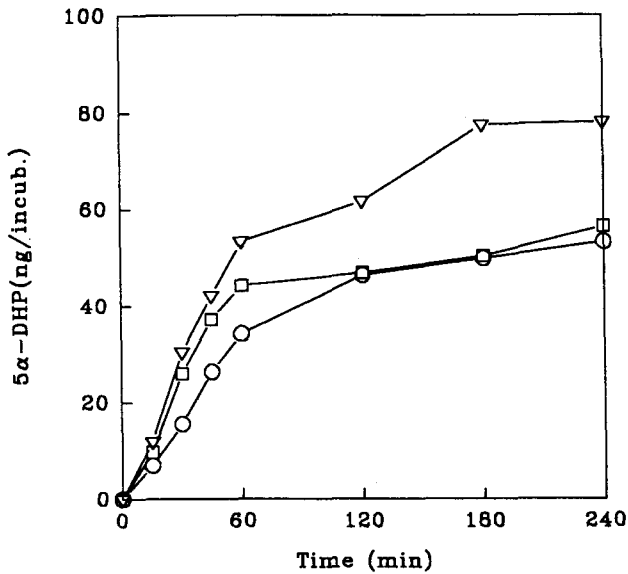


Fig. 2A. Formation of 5 α -DHP from progesterone in the minced tissues of the 5-day old female rat brain. 5 α -DHP fraction from the first TLC was directly counted in 5 ml of the scintillation cocktail. (○), 0.3 g; (□), 0.6 g; (▽), 1.0 g.

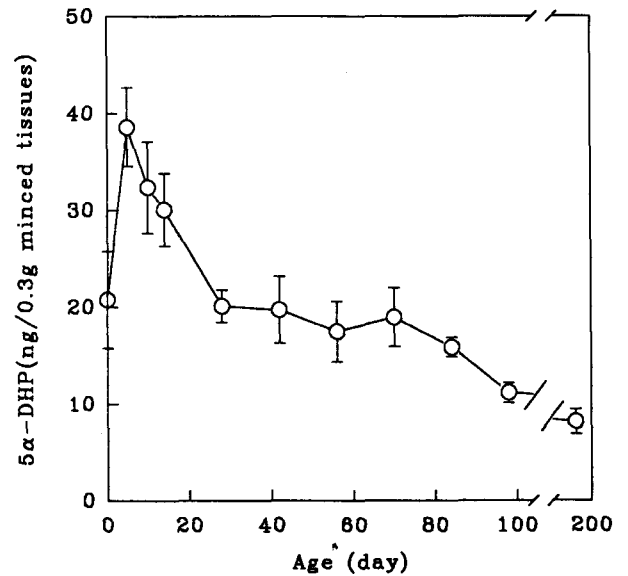


Fig. 3. Formation of 5 α -DHP from progesterone in minced tissues of female rat brain. The incubation was done with 0.3 g of minced tissues of the brain from 2~4 rats of each age. Error bar represents the range of 3 incubations.

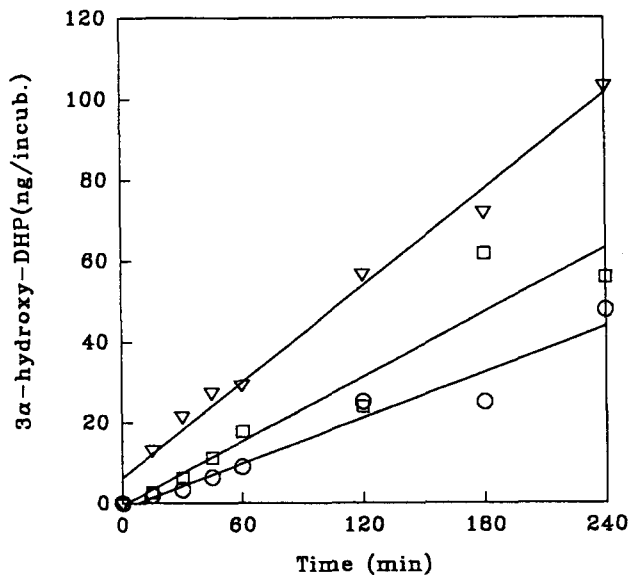


Fig. 2B. Formation of 3 α -hydroxy-DHP from progesterone in the minced tissues of the 5-day old female rat brain. The fraction containing progesterone and 3 α / β -hydroxy-DHP from the first separation was eluted and acetylated before the second TLC separation. (○), 0.3 g; (□), 0.6 g; (▽), 1.0 g.

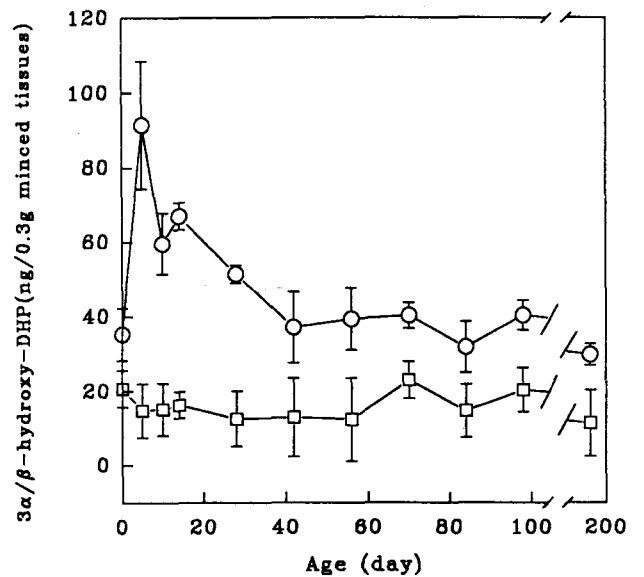


Fig. 4. Formation of 3 α / β -hydroxy-DHP from 5 α /DHP in minced tissues of the female rat brain. The incubation was done with 0.3 g of minced tissues of the brains from 2~4 rats of each age. (○) 3 α -hydroxy-DHP, (□) 3 β -hydroxy-DHP. Error bar represents the range of 3 incubations.

5 α -DHP를 기질로 하였을 때에 생성된 3 β -hydroxy-DHP의 생성에 관여하는 3 β -HSOR의 활성은 연령에 따른 변화가 없이 약 20 ng/0.3 g-30분의 일정한 수준을 유지하고 있음을 보였다(Fig. 4).

고찰

Potter-type 균질기에서 균질화된 시료보다 면도칼로

잘게다진 시료에서 더 높은 progesterone이 전환된 것은 progesterone 대사에 관여하는 5 α -환원효소와 3 α -HSOR가 microsome 효소로써¹⁶⁻¹⁸⁾ 균질화처리시 이들 기관이 파괴되기 때문으로 생각되며 반면에 잘게다진 조직을 사용한 경우가 더 생체환경에 가까운 것으로 생각되어진다.

쥐 뇌에서 progesterone의 대사에 대한 연령의 영향에

대한 체계적 연구는 보고된 바가 없으나 쥐 뇌에서 testosterone 대사는 성체가 될 때 까지 점진적으로 감소함이 보고된바 있다.¹⁹⁾ 이는 progesterone이 여성호르몬이고 testosterone이 남성호르몬이나 두 호르몬 모두 3-keto- Δ^4 구조를 갖고 있으므로 뇌에 존재하는 5 α -환원효소 isozyme²⁰⁾이 Δ^4 -이중결합에 작용하고 3 α -HSOR이 작용하는 부위가 Δ^4 -3-keto이기 때문에 연령에 따라 progesterone과 testosterone이 비슷한 양상으로 대사가 저하되는 현상을 나타낸다고 생각된다. 또한 뇌에서 progesterone 5 α -환원에 대하여 testosterone이 경쟁적저해제로 작용함이 보고되어서^{4,20)} 이러한 추측을 뒷받침해 주고 있다. 이와같은 쥐 뇌에서의 5 α -환원대사산물의 생성능력이 연령에 따라 감소하는 것은 5 α -환원효소의 활성 감소 뿐 만 아니라 3 α -HSOR의 활성감소가 결합되어 있음을 보여준다(Fig. 3, 4).

현재로서는 progesterone의 대사산물인 3 α -hydroxy-DHP이 생후 5~14일 사이에 증가한 후 감소하는데 대한 생리적인 의미를 알기는 힘들다. 그러나 3 α -hydroxy-DHP가 GABA_A수용체에 결합하여 Cl⁻ ion channel에 관여함이 밝혀졌고,²¹⁻²²⁾ 또한 쥐 뇌에서의 GABA농도는 성체가 될 때 까지 증가함이 보고되어²³⁾ 이 기간중에 GABA의 역할을 보강시키거나 대신하는 것으로 사료된다. 이러한 가능성으로 최근의 연구에서 stress를 받은 쥐뇌의 3 α -hydroxy-DHP의 양이 증가하여 stress를 해소시킨다는 결과가 보고되었다.¹⁰⁾ 이들의 관계를 더 규명하기 위하여는 뇌에서의 3 α -hydroxy-DHP의 농도를 측정하여 GABA의 농도와 비교하면 명백해 질 것이다. 반면에 3 β -hydroxy-DHP의 생성은 연령에 따라 변이가 거의 없으므로 이 화합물의 뇌에서의 역할은 더 연구해야할 과제이다.

참 고 문 헌

- McEwen, B. S., P. G. Davis, B. Parsons and D. W. Pfaff (1979) The brain as a target for steroid hormone action. *Ann. Rev. Neurosci.* **2**, 65-112.
- Corpéchet, C., P. Robel, M. Axelson, J. Sjövall and E. E. Baulieu (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4704-4707.
- Corpéchet, C., M. Synguelakis, S. Talha, M. Axelson, J. Sjövall, R. Vihko, E. E. Baulieu, and P. Robel (1983) Pregnenolone and its sulfate esters in the rat brain. *Brain Research* **270**, 119-125.
- Robel, P., E. Bourreau, C. Corpéchet, D. C. Dang, F. Halberg, C. Clarke, M. Haug, M. L. Schlegel, M. Synguelakis, C. Vourch and E. E. Baulieu (1987) Neurosteroids: 3 β -hydroxy- Δ^5 -derivatives in rat and monkey brain. *J. Steroid Biochem.* **27**, 649-655.
- Akwa, Y., J. Young, K. Kabbadj, M. Sancho, D. Zucman, C. Vourch, I. J. Testas, Z. Y. Hu, C. L. Goascogne, D. H. Jo, C. Corpéchet, P. Simon, E. E. Baulieu, and P. Robel

- (1991) Neurosteroids: Biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **40**, 71-81.
- Baulieu, E. E. and P. Robel (1990) Neurosteroids: A new brain function?. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **37**, 395-403.
- Majewska, M. D. (1992) Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor metabolism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology* **38**, 379-395.
- Majewska, M. D., N. L. Harrison, R. D. Schwartz, J. L. Barker and S. M. Paul (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* **232**, 1004-1007.
- Brann, D. W., C. D. Putnam and V. B. Mahesh (1990) γ -Aminobutyric acid A receptors mediate 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one induced gonadotropin secretion. *Endocrinology* **126**, 1854-1859.
- Purdy, R. H., A. L. Morrow, P. H. Moore JR. and S. M. Paul (1991) Stress-induced elevations of γ -aminobutyric acid type A receptor active steroids in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4553-4557.
- Lephart, E. D., S. Andersson and E. R. Simpson (1990) Expression of neural 5 α -reductase activity during prenatal development in the rat. *Endocrinology* **127**, 1121-1128.
- Melcangi, R. C., F. Celotti, M. Ballabio, P. Castano, R. Massarelli, A. Poletti and L. Martini (1990) 5 α -Reductase activity in isolated and cultured neuronal and glial cells of the rat. *Brain Research* **516**, 229-236.
- Barnea, A., A. Hajibeigi, J. M. Trant and J. I. Mason (1990) Expression of steroid metabolizing enzymes by aggregating fetal brain cells in culture: A model for developmental regulation of the progesterone 5 α -reductase pathway. *Endocrinology* **127**, 500-502.
- Hodges, D. R. and H. J. Karavolas (1992) Pituitary progesterin-metabolizing enzyme activities in the aged female rat. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **41**, 79-84.
- Jo, D. H., M. A. Abdallah, J. Young, E. E. Baulieu and P. Robel, (1989) Pregnenolone, dehydroepiandrosterone, and their sulfate and fatty acid esters in the rat brain. *Steroids* **54**, 287-297.
- Baulieu, E. E. and P. A. Kelly (1990) Hormones from molecules to disease. p.391~420, Herman Publishers in Arts and Science, France.
- Cheng, Y. J. and H. J. Karavolas (1975) Subcellular distribution and properties of progesterone(Δ^4 -steroid) 5 α -reductase in rat medial basal hypothalamus. *J. Biol. Chem.* **250**, 7997-8003.
- Rommerts, F. F. G. and H. J. Van Der Molen (1971) Occurrence and localization of 5 α -reductase, 3 α - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in hypothalamus and other brain tissues of the male rat. *Biochim. Biophys. Acta* **248**, 489-502.
- Massa, R., S. Justo and L. Martini (1975) Conversion of testosterone into 5 α -reduced metabolites in the anterior pituitary and in the brain of maturing rats. *J. Steroid Biochem.* **6**, 567-571.

20. 김대진 (1994) 쥐 뇌에서 지방산에 의한 steroid 5 α -reductase의 저해에 대한 연구. 아주대학교 석사학위 논문.
21. Holzbauer, M., M. K. Birmingham, A. F. DeNicola and J. T. Oliver (1985) *In vivo* secretion of 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one. A potent anaesthetic steroid by the adrenal gland of the rat. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **22**, 97-102.
22. Kavaliers, M and J. P. Wiebe (1987) Analgesic effects of the progesterone metabolite, 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one, and possible modes of action in mice. *Brain Research* **415**, 393-398.
23. Roberts, E., P. J. Harman and S. Frankel (1951) γ -Aminobutyric acid content and glutamine decarboxylase activity in developing mouse brain. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **78**, 799-803.

Age-Dependent Progesterone Metabolism in the Rat Brain.

Beom Ku Han, In Ho Park and Do Hyun Jo*(*Department of Biotechnology, Ajou University*)

Abstract : The effect of age on the metabolism of progesterone was studied in the rat brain. Metabolic activity was more active in minced tissues than total homogenates. The activity of progesterone 5 α -reductase(s) was increased during postnatal periods(between 5 and 14 days after birth) and thereafter steadily decreased up to the one-fourth level of the fetus. When 5 α -dihydroprogesterone was incubated with brain tissues of various ages, the change in the activity of 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase(3 α -HSOR) was similar to that of 5 α -reductase(s). These results suggest that the reduced formation of total 5 α -reduced metabolites was due to the decreased activities of 5 α -reductase(s) and 3 α -HSOR. However the level of 3 β -HSOR remained constant regardless of the age.

*Corresponding author