

## 골든 햄스터의 생식내분비계에 미치는 멜라토닌의 영향

최 돈 찬\* · 우 대 균 · 임 시 내<sup>1</sup>

용인대학교 자연과학부, <sup>1</sup>국립독성연구원 유전독성과

### Effects of Melatonin on the Reproductive Endocrine System in Male Golden Hamsters

Donchan Choi\*, Daegyun Woo and Sinae Lim<sup>1</sup>

*Division of Natural Science, Yong-In University, Yongin 449-714, Korea*

*<sup>1</sup>Genetic Toxicology Department, National Institute of Toxicological Research, KFDA, Seoul 112-824, Korea*

**Abstract** - Photoperiod (length of light per day) is a major factor in regulating reproductive function in golden hamsters. The information of photoperiod is transmitted to the reproductive endocrine system by melatonin. Thus the effects of melatonin are investigated in male golden hamsters exposed to photoperiods. Paired testicular weights were markedly reduced in the animals housed in short photoperiod (SP,  $\leq 12$  hours day<sup>-1</sup>) and injected with melatonin in the evening, but not in long photoperiod (LP,  $\geq 12.5$  hours day<sup>-1</sup>) and injected with melatonin in the morning. The histological examination of regressed testes showed reduction of tubular lumen diameter including the numbers of cells and Leydig cell number. The mean values of both follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were also lowered in the sexually inactive animals than in the sexually active animals. Melatonin receptor was identified by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and its expression was examined in various tissues to scrutinize the action site of melatonin. It turned out 309 nucleotides and was definitely expressed in hypothalamus and pituitary including spleen, retina, and epididymis. And gonadotropin releasing hormone (GnRH) gene, which is a key element in regulating reproduction, was identified by RT-PCR but the expression of GnRH was not modified by the treatment of melatonin. Taken together, photoperiod via melatonin indirectly affects reproductive endocrine system, possibly through the release of GnRH, not the synthesis of GnRH.

**Key words** : reproductive activity, photoperiod, melatonin, golden hamster

### 서 론

온대지방에 서식하는 골든 햄스터는, 다수의 작은 포

유동물들과 마찬가지로 특정 계절에만 번식하는 생식 전략을 보인다. 골든 햄스터의 생식 능력은 여름에 왕성하지만 겨울에는 퇴화된다(Stetson and Watson-Whitmyre 1984). 즉, 번식에 필요한 에너지를 공급받을 수 있는 시기를 선택하기 때문에 어미와 새끼가 생존할 수 있다. 이들을 계절적 생식동물이라 한다. 이러한 계절적

\*Corresponding author: Donchan Choi, Tel. 031-330-2781, Fax. 031-330-2886, E-mail: dcchoi@eve.yongin.ac.kr

생식동물들이 사계절 동안 환경에서 받는 자극에는 광주기, 온도, 강우, 먹이 유용성 등등 여러 가지가 있는데, 이들 중 광주기가 햄스터의 생식능력을 결정한다고 알려졌다(Reiter 1980). 그 이유로 광주기는 매년 예측이 가능하지만 다른 환경요인들은 예측하기 어렵기 때문이다.

계절의 변화에 따른 햄스터의 생식능력 변화는 인공 조명 아래에서도 관찰할 수 있다. 조명시간을 여름과 같은 12.5시간 이상(장주기)으로 유지하면 생식능력이 유지 혹은 촉진되지만, 점등시간을 겨울과 같은 12시간 이하(단주기)로 줄여 8주 이상 방치하면 생식능력은 퇴화된다(Elliott 1976). 생식능력이 퇴화된 동물을 일정 기간 동안 12.5시간 이상의 빛에 노출시키면 다시 생식능력이 활성화된다. 즉, 하루에 12.5시간을 역치로 하여 그 이상의 빛을 받아야만 생식능력을 유지할 수 있다.

성적으로 성숙한 햄스터를 단주기로 이동시키면 성에 관계없이 생식능력이 퇴화된다. 햄스터 암컷의 발정주기가 변화되어 난소 내 성숙한 난자가 없고, 수컷에서는 정자가 형성되지 않는다. 생식능력이 감퇴된 동물들의 여포자극호르몬(follicle stimulating hormone, FSH)과 황체호르몬(luteinizing hormone, LH)은 현저히 낮다. 생식능력이 억제되는 현상은 송과선에서 분비되는 멜라토닌에 의해 결정된다(Choi 1996). 멜라토닌은 밤에만 분비되는 호르몬으로써, 낮에는 낮은 수준을 유지하지만 밤에는 다량 분비되어 높은 수준을 보인다(Rollag and Stetson 1981).

광주기 정보는 다단계 경로를 통해 송과선에 도달한다. 눈의 망막을 통해 수용된 빛의 정보는 retinohypothalamic track을 통해 시상하부의 한 부위인 suprachiasmatic nucleus (SCN)로 전달된다. SCN은 시상하부의 다른 부위인 paraventricular nucleus (PVN)로 신호를 보내고 PVN은 척수를 경유하여 superior cervical ganglion (SCG)으로 보낸다. SCG은 혈관을 따라가는 신경을 통하여 송과선에 다다른다. 눈에서 송과선에 이르는 과정 각각에서 분비되는 신경전달물질들은 아직 밝혀진 것이 많지 않다. 멜라토닌 합성에 영향을 주는 요인은 송과선 안쪽에 위치하는 신경말단부에서 분비되는 norepinephrine이다(Dodge and Badura 2001). 송과선은 사람의 경우 대뇌와 간뇌 사이 깊은 곳에 위치하고, 골든 햄스터의 경우 뇌와 두개골 사이에 움푹 패인 곳에 위치한다(Reiter 1981). 한편 햄스터의 송과선을 제거하면 광주기와는 무관하게 생식능력이 유지된다. 따라서 생식능력에 미치는 광주기의 효과는 송과선에서 분비되는 멜라토닌에 의해 중재됨을 알 수 있다.

멜라토닌(N-acetyl-5-methoxytryptamine)은 오래

전에 소의 송과선에서 분리되었다(Lerner *et al.* 1958). 멜라토닌은 송과선 세포에서 여러 효소의 작용으로 트립토판을 변형시켜 만든다(Sugden 1989). 송과선에서 생성되는 멜라토닌은 문맥계가 존재하지 않기 때문에 즉시 혈관으로 분비된다(Maywood *et al.* 1991; Maywood *et al.* 1993). 포유동물에서 송과선과 혈액에서의 멜라토닌 수준은 밤의 길이에 비례한다(Stetson and Watson-Whitmyre 1986). 동물을 장주기에 단주기로 이동시켰을 때, 송과선내 증가된 멜라토닌이 점진적으로 길어진다(Hastings *et al.* 1987). 멜라토닌 수준이 높은 밤에 동물을 빛에 노출시키면, 송과선내 멜라토닌 합성이 갑자기 중지되어 송과선 조직과 혈액에서 멜라토닌 수준이 급강하한다. 이 결과는 빛이 멜라토닌 생성을 조절함을 의미한다.

멜라토닌은 그 수용체를 경유하여 생식 능력에 영향을 발휘하는 것으로 생각된다. 멜라토닌 수용체는 처음에 개구리 피부 세포에서 동정되었다(Ebisawa *et al.* 1994). 이어서, 멜라토닌 수용체의 각기 다른 길이가 햄스터(Reppert *et al.* 1994), 생쥐(Roca *et al.* 1996), 쥐, 그리고 사람(Reppert *et al.* 1995)을 포함하는 일부 척추동물에서 확인되었다. 이 수용체는 G protein-coupled 수용체로 밝혀졌다. 그러나 골든 햄스터에서는 극히 일부만 동정되었다. 멜라토닌은 생식 이외에 다른 기능도 보이기 때문에 멜라토닌 수용체가 발휘되는 해부학적 위치가 절실히 요구되고 있다. 궁극적으로 멜라토닌은 생식내분비계를 최상위에서 조절하는 gonadotropin releasing hormone (GnRH) 신경에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

본 연구는 수컷 골든 햄스터에서 광주기 및 멜라토닌이 생식에 미치는 효과를 검증하고, 멜라토닌 수용체가 발휘되는 조직 특이성을 파악하고, 멜라토닌이 GnRH 합성에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물로는 장주기에 8주 이상 사육한 골든 햄스터(*Mesocricetus auratus*) 수컷을 사용하였다. 실험동물은 항온(22±1°C), 항습(50%)이 유지되는 용인대학교 동물 사육실의 동물 사육함에서 타이머가 장착된 형광등을 사용하여 14시간 조명 10시간 소동(14L:10D)의 장주기에 유지하였다. 외부로부터 들어오는 빛을 차단하기 위해 모든 창문에 검은색 커튼을 달고 환풍기를 설치하였다. 단주기의 동물들도 별도의 사육함을 만들어

**Table 1.** Experimental groups. LP (14L : 10D, 14 hours of lights : 10 hours of darkness) indicates long photoperiod, SP (10L : 14D, 10 hours of lights : 14 hours of darkness) short photoperiod

Group	Photoperiod	Treatment	Time	Note
1	LP	Melatonin	AM	
2	LP	Vehicle	AM	LP: 14L : 10D SP: 10L : 14D
3	LP	None		
4	LP	Melatonin	PM	AM: 4h after lights on
5	LP	Vehicle	PM	PM: 2h before lights off
6	SP	None		

10시간 조명 14시간 소등(10L : 14D)의 조건하에서 사육하였다. 사육함도 빛이 완전히 차단됨은 물론이고, 통풍을 위해 환풍기를 설치하였다. 먹이와 물은 점등시에 충분히 공급하였다. Table 1과 같이 장주기와 단주기로 실험군을 나누는 후 장주기의 동물은 다시, 오전과 오후에 멜라토닌 혹은 vehicle을 투여하는 네 그룹으로 나누었다. 오전의 멜라토닌과 vehicle 투여는 점등 4시간 후에 수행하였고, 오후의 투여는 소등 2시간 전에 실행하였다.

## 2. 멜라토닌 투여

멜라토닌 (Sigma chemical Co.)은  $15 \mu\text{g animal}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 의 농도로 희석하여 준비하였다. 멜라토닌은 물에 대한 용해도가 낮으므로 100% 알코올(HPLC grade, Tedia Company, Inc)로 용해한 후, 알코올의 총 농도가 10%가 되도록 증류수로 희석하여 사용하였다. 목덜미와 등 사이에 피하주사로  $100 \mu\text{l}$ 씩 10주간 매일 동일한 시각에 멜라토닌을 투여하였다. Vehicle을 처리한 실험군은 멜라토닌을 희석하는데 사용한 알코올을 증류수로 10%가 되도록 희석하여 역시 10주간  $100 \mu\text{l}$ 씩 매일 피하주사로 투여하였다. 멜라토닌 용액은 갈색병에 보관하였고 일주일간 투여할 양만 만들어 사용하였다.

## 3. 정소무게 측정

10주간 투여 과정에서 2주에 한번씩 생식능력의 변화를 관찰하기 위해 정소의 무게를 측정하였다. 정소 무게는 laparotomy 방법을 통하여 크기를 측정하여 결정하였다. 햄스터를 ethyl ether (Tedia Company, Inc.)로 마취시킨 후, 정소 부위를 70% 알코올로 소독하여 돌출시켰고, 수술용 가위로 외피만 절개하였다. 지방과 부정소

를 제외한 정소만 돌출시켜 vernier calipers (Mitutoyo corporation, N20)로 장경과 단경을 측정하였다. 정소의 용적을 측정한 후 절개된 외피는 autoclip (MikRon Precision, Inc.)으로 봉하였다. 장반경과 단반경의 측정값은 장구식 (Formular for a prolate spheroid,  $\text{Vol} = 4/3$  (장반경) (단반경)<sup>2</sup>)을 이용하여 무게로 환산하였다 (Watson-Whitmyre and Stetson 1985). Laparotomy와 장구식에 의한 정소의 무게 측정은 동물을 희생시키지 않고 생식능력의 유, 무를 가늠하게 해주는 편리하고 경제적인 방법이다.

## 4. 채혈과 호르몬 분석

10주간의 실험 후에 cardiac puncture 방법으로 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을  $4^\circ\text{C}$  냉장실에 8시간 동안 방치한 후 원심 분리 (5,000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min)하여 상층액만 취하여 혈청을 분리하였다. 혈청은  $-20^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다. 분리한 혈청 내의 생식 호르몬 (FSH, LH)의 농도를 방사면역측정법 (Biocode S.A.)으로 결정하였다.

## 5. 정소의 조직학적 검사

10주간의 멜라토닌 투여 실험이 끝난 후 정소를 조직학적으로 검사하여 정소의 정자발생단계를 조사하였다. 조직학적 검사는 cryostat (Bright Instrument Co., Ltd.)를 사용하였다. 먼저 정소를 cryostat의 내부에 있는  $-45^\circ\text{C}$ 의 freezer plate에서 조직이 상하지 않도록 embedding oil과 함께 냉동시켰다. 그 후 내부가  $-26^\circ\text{C} \sim -22^\circ\text{C}$ 로 냉각되어 있는 상태에서 정소 조직을  $5 \mu\text{m}$ 두께로 박편하여 절편을 slide glass에 밀착시켰다. 그 상태로 100% methanol에 5분간 방치하여 고정시킨 후 embedding oil을 제거하기 위해 흐르는 물에 약 30초간 수세하였다. 수세가 끝난 후 염색하기 위하여 hematoxylin (Allied chemical Co.)에 6분간 방치했다. 염색액의 잔여물을 제거하기 위해 물로 2~3번 수세한 후 0.5% HCl alcohol에서 탈색과정을 거쳤다. 다시 물로 2~3번 수세 후 0.5% ammonia water에서 중화하였다. 흐르는 물에 5분간 방치한 후 세포질을 염색하기 위해 Eosin Y (Sigma chemical Co.)에 2분간 방치했다. 다시 물로 수세한 후 70%, 80%, 95%, 100% 알코올 순으로 3분씩 방치해 단계적 탈수과정을 거쳤다. 그 후 각각 3분씩 세 번의 xylene (Sigma chemical Co.) 처리를 통해 남아 있는 불순물을 제거하였다. 마지막으로, 염색이 완료된 조직위에 가열하여 녹인 canada balsam (Sigma chemical Co.)을 한방울 떨어뜨리고 cover glass로 덮어 mounting과

정까지 모두 마친 후 완성된 조직을 광학현미경으로 관찰하였다.

6. 유전자 동정

1) 역전사 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

기존의 보고된 햄스터의 멜라토닌 수용체 유전자 서열 및 GnRH 핵산 서열을 조사하여 보존된 서열을 primer로 사용하였다. 햄스터의 다양한 조직에서 AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform) 방법으로 total mRNA (messenger ribonucleic acid)를 추출하였다(Chomczynski and Sacchi 1987). 그 total mRNA를 template로 하여 역전사 PCR (PCR cycle: stage 1; 94°C에서 3분, stage 2; 94°C에서 50초, 55°C에서 50초, 72°C에서 90초, stage 3; 72°C에서 10분) 방법으로 complementary DNA를 합성하였다(Feinberg and Vogelstein 1984; Seong and Kim 1996). 합성된 RT-PCR 산물들을 agarose gel에서 크기를 확인한 후 기초과학지원연구소에 의뢰하여 핵산 서열을 결정하였다.

2) Total mRNA 추출

Total RNA는 AGPC 방법으로 추출하였다. 각 조직은 D 용액 (4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7), 0.5% N-lauroyl sarcosine, 그리고 0.1 M 2-mercaptoethanol)에서 균질화되었다. 이 시험관에 2 M sodium acetate (pH 4), water-saturated phenol, 그리고 chloroform-isoamyl alcohol mixture (49:1) 등이 부가되었다. 얼음에서 냉각시킨 후 원심분리하여 알코올로 침전시켰다. 75% 알코올로 세척한 뒤 RNA 침전물을 진공 하에서 건조하였고, 멸균된 증류수에 녹였다. RNA 양은 스펙트로포토미터 (A<sub>260</sub>)에서 정량화되었다.

결과 및 고찰

광주기와 멜라토닌이 골든 햄스터의 생식 활동에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 10주 동안 광주기와 멜라토닌을 처리하여 2주 간격으로 조사한 정소의 무게 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 장주기에 유지된 동물 중에서 어떠한 처리도 하지 않은 장주기 대조군(LP-control)과 오전 멜라토닌 처리군(Mel-AM)과 오전 및 오후에 vehicle (Vehicle-AM과 Vehicle-PM)을 처리한 군들은 10주간의 실험 끝에 생식 능력이 왕성한 정소 무게를 보였다. 그러나 단주기로 이동시켜 10주 동안 키운 단주기 대조군(SP-control)과 장주기에서 멜라토닌을 오후에

Table 2. Changes of LH and FSH. LP; 14L : 10D, SP; 10L : 14D

	Reproductive activity	
	Active	Inactive
LH (ng ml <sup>-1</sup> )	3.4 ± 1.45	0.9 ± 0.93
FSH (ng ml <sup>-1</sup> )	31.3 ± 0.40	2.3 ± 0.41

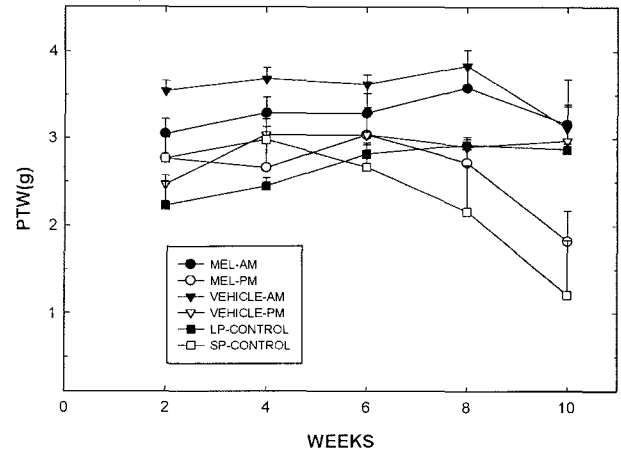
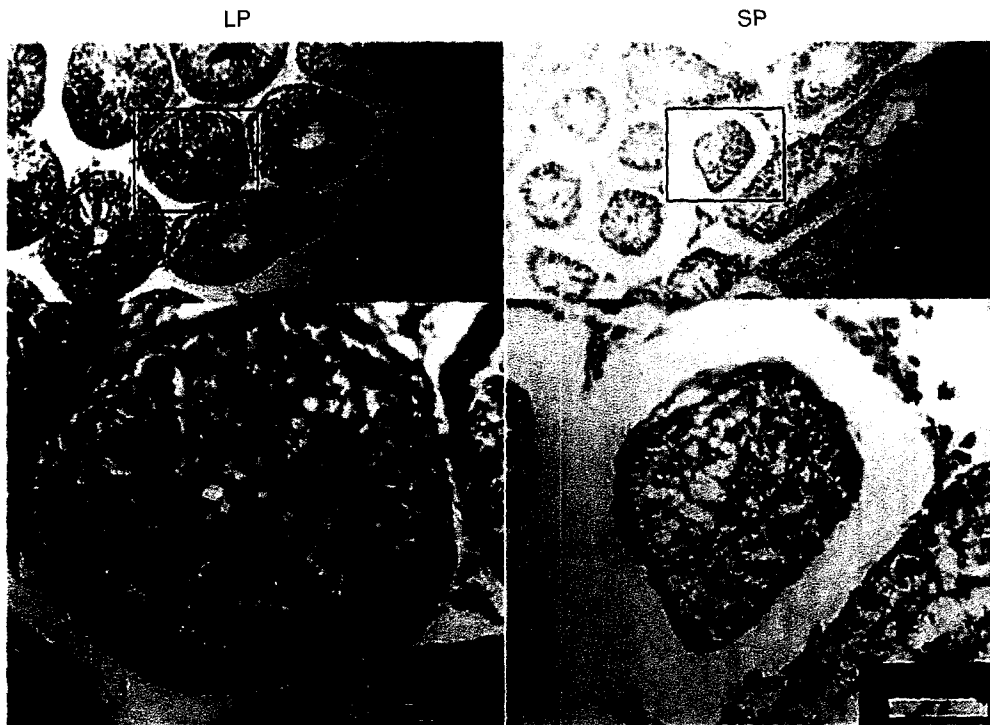


Fig. 1. Changes of paired testicular weight (PTW) by melatonin and photoperiod.

투여받은 동물(Mel-PM)들은 생식소가 퇴화되어 정소 무게가 현저하게 감소하였다. 이 결과는 기존의 결과와 일치한다(Stetson and Watson-Whitmyre 1986). 이 결과를 토대로 생식능력을 보존한 동물과 생식 능력이 퇴화된 동물로 구분하여 채취된 혈액에서 호르몬을 분석하였다. 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 생식능력이 유지된 동물에서는 혈중 FSH와 LH의 농도가 높았으나, 생식능력이 퇴화된 동물에서는 그 농도가 매우 낮게 나타났다. 즉, 생식호르몬의 농도가 높게 유지된 동물은 왕성한 생식능력을 보였으나 그 호르몬의 농도가 낮게 유지되는 동물은 생식능력이 퇴화하였다. 이 결과들은 단주기가 유도하는 생식 기능 퇴화가 송과선에서 분비되는 멜라토닌 투여로 재현되었고, 즉 광주기의 정보가 멜라토닌을 경유하여 발휘됨을 확인하였다. 또한 이러한 생식 기능의 변화는 생식 호르몬의 변화를 유도하여 일어나는 것으로 생각된다. 따라서, 광주기의 정보에 의해 생식 호르몬의 분비가 조절되며, 이로 인해 생식능력이 조절됨을 검증할 수 있었다.

10주간의 실험이 끝난 후 정소를 조직학적으로 조사하여 정소내의 세포를 광학현미경하에서 관찰하였다. Fig. 2는 생식 능력에 따른 정소내 세포관의 변화를 보여준다. 왼쪽의 사진들은 생식능력을 보유하고 있는 동



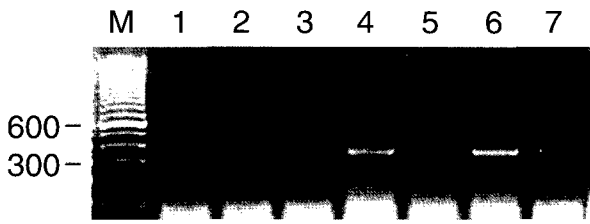
**Fig. 2.** Histological examination of testes. Left pictures show reproductively active testes and right ones reproductively inactive testes. upper panels; Mag.  $\times 100$ , lower panels; Mag.  $\times 400$ . LP; 14L: 10D, SP; 10L: 14D.

물의 정소를 관찰한 것이고 오른쪽의 사진들은 생식능력이 퇴화된 동물의 정소를 관찰한 것이다. 생식능력이 있는 동물의 경우, 세정관의 직경이 평균  $280\mu\text{m}$ 로 컸으며, 서로 인접해 있었다. 반면에, 생식능력이 퇴화된 동물의 정소에는 세정관들이 드물게 분포하였고, 직경도 평균  $160\mu\text{m}$ 로 생식능력이 있는 동물의 세정관에 비해 가늘었다. 또 정소를 고배율(400배)로 관찰하였을 때, 생식능력을 보유한 동물의 세정관은 내부가 생식세포로 가득 차 있는 반면, 능력이 사라진 동물의 세정관은 가장자리에만 생식세포가 드물게 분포되어 있었다. 생식능력이 있는 동물의 세정관에서는 정원세포와 그 안쪽으로 일차 정세포, 이차 정세포, 정자세포, 그리고 정자가 모두 관찰되었으며 세포층이 5~9층으로 두텁게 보였다. 세정관의 내강에서는 정자들이 관찰되었으며, 정자의 세포핵은 내강의 가장자리에 위치하고 정자의 꼬리들은 내강 중심 쪽을 향해 있었다. 반면에, 생식능력이 퇴화된 정소는 세정관 내의 모든 세포들이 가장자리에만 드물게 분포되어 있었다. 일차 정원세포와 정세포는 관찰되었으나, 그 안쪽에 위치하는 이차 정세포와 정자세포 그리고 정자는 관찰되지 않았고, 세정관 내의 세포층도 2~4층으로 생식능력이 있는 동물들보다 그 층 수가 적게 관찰되었다. 따라서 단주기 처리와 오후 멜라토닌 처

리로 정자형성과정이 억제되어 세포들 수가 감소한 것으로 나타났고, 그 결과로 세정관의 굵기가 감소하였다고 생각된다.

멜라토닌은 그 수용체를 경유하여 효과를 발휘함이 이미 알려져 있기 때문에, 멜라토닌 수용체가 발현되는 부위를 시상하부 및 뇌하수체를 비롯하여 각종 장기에서 조사하였다. RT-PCR 산물은 재료를 DNase로 처리하면 나타났으나, 재료를 RNase로 처리하면 나타나지 않았다. 또한 mRNA없이 수행하였을 때 RT-PCR 산물이 나타나지 않았기 때문에 오염되지 않았음을 알 수 있었다. 멜라토닌 수용체의 RT-PCR 산물이 동정되었고, 그 크기는 예상한대로 전기영동 상에서 300 염기보다 약간 위에서 나타났다(Fig. 3). 이 RT-PCR 산물을 기초과학연구원 연구소로 보내 핵산 서열을 결정하였다(Fig. 4). 동정된 멜라토닌 수용체 핵산의 수는 309 염기였고, 이 염기 서열로부터 기존의 보고된 서열과 비교하여, 아미노산을 추정한 결과 또한 Fig. 4에 나타났다. 추정된 아미노산의 수는 102개였다.

햄스터에서 추출한 다양한 조직을 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과는 Table 3에 나타났다. 멜라토닌 수용체가 발현되는 정도의 차이가 있기 때문에 본 연구에서는 발현 유무만 결정하였다. 멜라토닌 수용체는 생식과 관



**Fig. 3.** A representative profile of melatonin receptor detected by RT-PCR. Some tissues examined in the golden hamsters were represented. M: 100 bp marker, lane 1: cerebellum, lane 2: retina, lane 3: spleen, lane 4: hypothalamus, lane 5: liver, lane 6: pituitary, lane 7: muscle.

```

c aagtagcaccgactctacagtaacaagaat 31
  K Y D R L Y S N K N 10
tccctctgctacgtggttctgatatgggtg 61
  S L C Y V F L I W V 20
ttgacgctagtcgccatcatgccaacctg 91
  L T L V A I M P N L 30
caaaccggaactctccagtatgatccccgg 121
  Q T G T L Q Y D P R 40
atctactcctgtaccttcacacagctctgtc 151
  I Y S C T F T Q S V 50
agctcgggtgacacgatagcagtggtgggt 181
  S S A Y T I A V V V 60
ttccatttcctgctgcctatgattatcgtc 211
  F H F I V P M I I V 70
atcttctgctacttaagaatctggatcctgx 241
  I F C Y L R I W I L 80
gttcttcagggtccgacggagggtgaaacc 271
  V L Q V R R R V K P 90
gacagcaaaccagactgaagccacaggac 301
  D S K P R L K P Q D 100
ttcagg aa 309
  F R 102
    
```

**Fig. 4.** Nucleotide and deduced amino acid sequence of melatonin receptor gene identified in golden hamster. Small alphabetic letters shows nucleotides and large alphabetic letters amino acids. Amino acids are symbolized by a single letter.

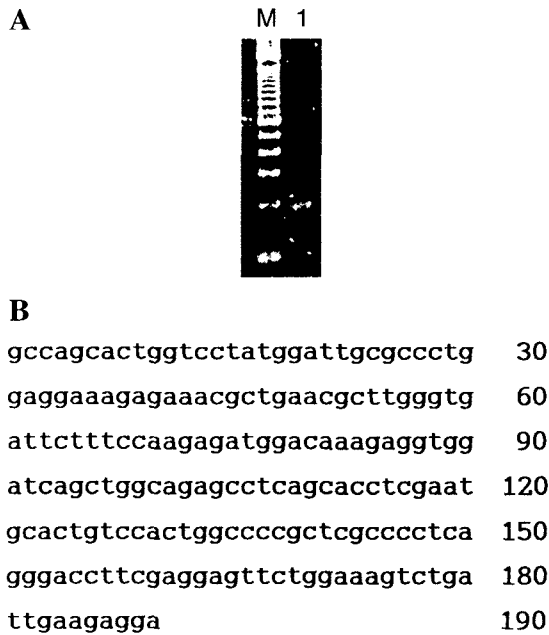
런된 시상하부와 뇌하수체를 비롯하여, 소뇌, 망막, 지라, 부정소에서 확실하게 반복적으로 나타났지만, 간과 콩팥

**Table 3.** Tissue specificity of melatonin receptors detected by RT-PCR in golden hamsters. Only presence and absence of bands were determined. +: detected, +/-: doubtful, -: non-detected.

Tissues	Expression
Hypothalamus	+
Pituitary	+
Cerebellum	+
Retina	+
Thyroid gland	-
Liver	+/-
Spleen	+
Adrenal gland	-
Kidney	+/-
Heart	-
Pancreas	-
Urinary bladder	-
Lung	-
Skin	-
Muscle	-
Testes	+/-
Epididymis	+
Seminal vesicle	-

과 정소에서는 일관성 있게 발견되지 않았다. 생식과 관련된 장소 이외의 조직에서 멜라토닌 수용체가 발견된 점은 멜라토닌이 광범위한 다른 작용이 있음을 시사하고 이와 관련된 보고가 있다. 즉 멜라토닌은 사람에게 있어서 수면주기 조절, 생체리듬 조절 등의 기능과 관련된 호르몬으로 밝혀졌다 (Pierpaoli and Regelson 1996; Zhdanova *et al.* 2001). 시차가 큰 지역으로 이동했을 때 생기는 신체의 변화인 시차증 치료책으로 멜라토닌을 복용하면 증상이 없어진다는 보고가 있다 (Pierpaoli and Regelson 1996). 노인들의 불면증 치료에 도움을 주며, 나이 먹은 동물들의 위축된 생활 리듬을 향상시킨다는 사실이 보고되고 있다 (Lagared *et al.* 2001). 또한 철새의 이동, 생체 시계에 따른 동물들의 행동과도 관련있다고 알려져 있다 (Bently 2001). 이 밖에도 멜라토닌은 암, 노화억제, 치매 등에 탁월한 효능을 지니고 있다는 임상보고서가 발표되고 있다 (Pierpaoli and Regelson 1996; Futagami *et al.* 2001).

시상하부와 뇌하수체가 본 연구와 관련 있는 생식내분비계의 주축인 GnRH 신경계를 포함하고 있는 점을 감안할 때, 멜라토닌이 이 부위에서 발견된 점은 멜라토닌이 생식내분비계에 작용한다고 추정할 수 있다. 따라서 GnRH 유전자의 발현을 조사하였다. 동정된 GnRH 유전자의 RT-PCR 산물을 Fig. 5A에 나타냈다. 동정된 GnRH 유전자의 핵산 수는 190 염기였다 (Fig. 5B). 멜라토닌이 GnRH 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기



**Fig. 5.** RT-PCR product of GnRH gene (A) and Nucleotide sequence (B) of GnRH gene in golden hamster. M; 100 bp marker, lane 1; GnRH.

위하여 본 실험에서 수행한 실험군에서 각각 GnRH 유전자의 발현양상을 조사하였으나, 차이를 발견하지 못하였다. 따라서, 골든 햄스터의 경우에 생식 능력과 GnRH 유전자의 발현은 상관관계가 희박한 것으로 나타났다. 그렇지만 포유동물에서 GnRH가 생식 능력을 조절하는 관점에서 생각할 때, 멜라토닌이 GnRH 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않지만, 생성된 GnRH의 분비에 영향을 끼칠 수 있음을 배제할 수 없다. 생식능력이 퇴화된 햄스터에서 시상하부내 GnRH 농도가 높다고 보고한 결과는 이를 뒷받침한다(Jackson *et al.* 1984).

위의 결과를 종합해 볼 때, 광주기의 정보는 송과선에서 분비되는 멜라토닌을 통하여 생식내분비계로 전달됨을 알 수 있다. 생식을 조절하는 핵심 물질이 시상하부에서 분비되는 GnRH임을 감안할 때, 멜라토닌이 중재하는 광주기 정보는 간접적으로 GnRH 신경에 영향을 발휘하여 생식 능력을 조절하는 것으로 사료된다.

## 적 요

광주기(하루 중 빛의 길이)는 골든 햄스터의 생식을 조절하는 주된 요인이다. 광주기 정보는 멜라토닌을 통하여 생식 내분비계로 전달된다. 따라서 멜라토닌이 생식에 미치는 효과를 여러 광주기에 노출시킨 햄스터에

서 조사하였다. 단주기(하루 중 12시간 이하의 조명)에 노출시킨 동물들과 저녁에 멜라토닌을 주사한 동물들의 정소 무게는 현저하게 줄어들었으나, 장주기(하루 중 12.5시간 이상의 조명)에 유지된 동물과 오전에 멜라토닌을 투여한 동물들의 정소 무게는 줄어들지 않았다. 퇴화된 정소를 조직학적으로 조사한 결과, 세정관 직경이 감소되었고, 세정관내 세포수가 두드러지게 줄어들었다. 또한 생식 능력이 퇴화된 동물의 혈중 여포자극호르몬과 황체호르몬의 수준도 생식 능력을 보유하고 있는 동물에 비해 뚜렷하게 감소하였다. 멜라토닌 수용체가 역전사 polymerase chain reaction으로 동정되었고 조직특이성 또한 조사하였다. 동정된 멜라토닌 수용체는 309 염기였으며, 시상하부와 뇌하수체를 포함하는 다양한 장기에서 발현되었다. 생식을 조절하는 핵심 물질인 gonadotropin releasing hormone (GnRH) 유전자의 발현 또한 동정되었다. 그러나 멜라토닌 처리와 광주기 처리는 GnRH 유전자 발현에 영향을 미치지 않았다. 종합하면, 광주기의 효과는 멜라토닌을 경유하여 발휘되며, 멜라토닌은 GnRH 유전자의 발현보다는, 생성된 GnRH의 분비에 영향을 미쳐 생식내분비계에 간접적으로 작용함을 알 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 2000년 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2000-015-DP0356).

## 참 고 문 헌

- Bently GE. 2001. Unraveling the enigma : the role of melatonin in seasonal processes in birds. *Microsc. Res. Tech.* 53:63-71.
- Choi D. 1996. Reproductive physiology of pineal hormone melatonin. *Korean J. Zool.* 39:337-351.
- Chomczynski P and N Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Dodge JC and LL Badura. 2001. Norepinephrine dialysate levels in the hypothalamic paraventricular nucleus : influence on photoperiod driven prolactin levels in the female Siberian hamster. *Neuroendocrinol.* 73:102-110.
- Ebisawa T, S Karne, MR Lerner and SM Reppert. 1994. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA 91:6133-6137.
- Elliott JA. 1976. Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. *Fed. Pro.* 35:2339-2346.
- Feinberg AP and B Vogelstein. 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137:266-267.
- Futagami M, S Sato, T Sakamoto, Y Yokoyama and Y Saito. 2001. Effect of melatonin on the proliferation and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 82: 544-549.
- Hastings MH, AP Walker and J Herbert. 1987. Effect of asymmetrical reductions of photoperiod on pineal melatonin, locomotor activity and gonadal condition of male Syrian hamsters. *J. Endocrinol.* 114:221-229.
- Jackson FL, JJ Heindel, JP Preslock and AS Berkowitz. 1984. Alterations in hypothalamic content of luteinizing hormone-releasing hormone associated with pineal-mediated testicular regression in the golden hamster. *Biol. Reprod.* 31:436-445.
- Lagared D, B Chappuis, PF Billaud, L Ramont, F Chauffard and J French. 2001. Evaluation of pharmacological aids on physical performance after a transmeridian flight. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33:628-634.
- Lerner AA, JD Case, Y Takahashi, TH Lee and W Mori. 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80:2587.
- Maywood ES, MH Hastings, M Max, E Ampleford, M Menaker and AS Loudon. 1993. Circadian and daily rhythms of melatonin in the blood and pineal gland of free-running and entrained Syrian hamsters. *J. Endocr.* 136:65-73.
- Maywood ES, JO Lindsay, J Karp, JB Powers, LM Williams, L Titchener, FJP Ebling, J Herbert and MH Hastings. 1991. Occlusion of the melatonin-free interval blocks the short day gonadal response of the male Syrian hamster to programmed melatonin infusions of necessary duration and amplitude. *J. Neuroendocr.* 3:331-337.
- Pierpaoli W and W Regelson. 1996. The Melatonin Miracle; Nature's age-reversing, disease-fighting, sex-enhancing hormone. G.K. Hall & Co., Thorndike, Maine pp. 438.
- Reiter RJ. 1980. Photoperiod: Its importance as an importance as an impeller of pineal and seasonal reproductive rhythms. *Int. J. Biomet.* 24:57-63.
- Reiter RJ. 1981. The mammalian pineal gland: Structure and Function. *Amer. J. anatomy.* 162:287-313.
- Reppert SM, C Godson, CD Mahle, DR Weaver, SA Slauenhaupt and JF Gusella. 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel<sub>1b</sub> melatonin receptor. *Pros. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8734-8738.
- Reppert SM, DR Weaver and T Ebisawa. 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian response. *Neuron.* 13:1177-1185.
- Roca AL, C Godson, DR Weaver and SM Reppert. 1996. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel<sub>1a</sub> melatonin receptor. *Endocrinology.* 137:3469-3477.
- Rollag MD and MH Stetson. 1981. Ontogeny of the pineal melatonin rhythm in golden hamsters. *Biol. Reprod.* 24: 311-314.
- Seong JY and K Kim. 1996. Measurement of GnRH mRNA levels by northern blot hybridization assay and competitive RT-PCR in the rat preoptic area. *Neurosci. Protocols.* 96-020-01-17.
- Stetson MH and M Watson-Whitmyre. 1984. Physiology of the pineal and its hormone melatonin in annual reproduction in rodents. In *The pineal gland*, edited by Reiter RJ. Raven Press, New York, pp. 109-153.
- Stetson MH and M Watson-Whitmyre. 1986. Effects of exogenous and endogenous melatonin on gonadal function in hamsters. *J. Neural Transm.* 21(Suppl):55-80.
- Sugden D. 1989. Melatonin synthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 45:922-932.
- Watson-Whitmyre M and MH Stetson. 1985. A mathematical method for estimating paired testes weight from in situ testicular measurements in three species of hamster. *Anat. Rec.* 213:473-476.
- Zhdanova IV, RJ Wurtman, MM Regan, JA Taylor, JP Shi and OU Leclair. 2001. Melatonin treatment for age-related insomnia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:4727-4730.

(Received 11 April 2002, accepted 24 July 2002)