

외인성 성선자극호르몬 분비호르몬이 수컷 골든 햄스터의 생식능력에 미치는 영향: 개체 분석

최 돈 찬[†] · 조 병 남¹

용인대학교 환경생명학부, ¹가톨릭대학교 생물학과

Effects of Foreign GnRH cDNA on Reproductive Activity in Male Golden Hamsters: Analysis of Individuals

Donchan Choi[†] and Byung-Nam Cho¹

Division of Environmental and Biological Sciences, Yong-In University

¹*Department of Life Science, The Catholic University of Korea*

ABSTRACT : Gonadotropin releasing hormone(GnRH), which is secreted from the hypothalamus, has a pivotal role in the reproduction of mammals. Golden hamsters are seasonal breeding mammal and their sexual activity is determined by photoperiod(length of light per day). Long photoperiod(LP, ≥ 12.5 hours of light) maintains the reproductive activity and short photoperiod(SP, ≤ 12 hours of light) suppresses it. In order to investigate in detail, the sexual activity was individually examined in SP-housed male golden hamsters received a vector at three different concentrations which contains rat GnRH cDNA. The gonadal regression was significantly($P < 0.05$) accelerated by the highest concentrations of the vector at 8 and 10 weeks after the treatment in comparison to the other groups. In the light of pulsatile release of GnRH in maintaining reproductive activity, the vector containing GnRH cDNA might secrete the GnRH in a constant high level. These results suggest that the GnRH-containing vector might desensitize the anterior pituitary, leading to acceleration of testicular regression.

Key words : Reproduction, Testicular weight, Golden hamster, Gonadotropin releasing hormone.

요 약 : 성선자극호르몬 분비호르몬은 시상하부에서 분비되며, 포유동물의 생식에 중추적인 역할을 담당한다. 골든 햄스터는 계절적으로 번식하는 포유동물이며, 생식 활동은 광주기(하루 중 낮의 길이)에 의해 결정된다. 장주기(12.5 시간 이상의 빛)는 생식 능력을 유지시키지만, 단주기(12시간 이하의 빛)는 생식 기능을 억제한다. 성선자극호르몬 분비호르몬과 광주기의 상호 관계를 자세히 조사하기 위하여 랫트 성선자극호르몬 분비호르몬 cDNA를 포함하는 벡터를 여러 농도로 골든 햄스터의 수컷에 주입하고 단주기에 유지하여 생식 활동을 개별적으로 조사하였다. 벡터를 고농도로 처리한 그룹의 골든 햄스터는 기타 실험 그룹에 비해 정소 퇴화가 의미있게($P < 0.05$) 가속되었다. GnRH의 맥동적 분비가 생식 능력을 유지하는 관점에서 보면, GnRH-cDNA를 포함하는 벡터는 GnRH를 일정하게 고농도로 분비했다고 사료된다. 이 결과는 GnRH를 포함하는 벡터가 뇌하수체 전엽을 desensitization시켜 정소 퇴화를 가속시켰음을 암시한다.

서 론

은대지방에 서식하는 골든 햄스터는 작은 포유동물로서 계절적으로 번식한다. 춘분이 지나면서 번식 능력을 갖게 되어 여름에는 번식 능력이 왕성하지만, 추분을 지나면서 번식 능력이 퇴화되어 겨울에는 전혀 번식하지 않는다(Stetson & Watson-Whitmyre, 1984). 다시 봄이 되어 춘분을 지나면서 생

식 능력을 부여받는다. 이러한 연주기는 환경에서 오는 다양한 인자 중에 광주기에 의해 결정된다고 확립되었다(Reiter, 1980). 계절에 따른 햄스터의 생식능력 변화는 인공조명으로 조정되는 사육실에서도 관찰된다. 여름의 광주기와 유사하게 조명 시간을 12.5 시간 이상(장주기)으로 조정하면 생식능력이 유지되지만, 조명 시간을 겨울처럼 12 시간 이하(단주기)로 낮추어 8 주 이상 방치하면 생식능력은 사라진다(Choi, 1996; Elliott, 1976). 생식능력이 퇴화된 동물을 일정 기간 동안 12.5 시간 이상의 빛에 노출시키면 다시 생식능력을 회복한다. 즉, 하루에 12.5 시간 이상의 빛을 받아야만 생식능력이 유지 또는 회복될 수 있다. 단주기가 유도하는 생식능력의 퇴화는 성숙한 햄스터의 경우 성에 관계없이 일어난다.

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-000-00158-0) 지원으로 수행되었음.

[†]교신저자: 경기도 용인시 삼가동 470. (우) 449-714, (전) 031-330-2781, (팩) 031-330-2886, E-mail: dcchoi@yongin.ac.kr

생식능력이 퇴화된 동물의 경우, 암컷 난소에서는 성숙한 난자를 관찰할 수 없고, 수컷 정소에서는 성숙한 정자가 보이지 않는다. 또한, 혈중 성선자극호르몬, 즉 여포자극호르몬과 황체형성호르몬은 생식능력이 왕성한 햄스터와 비교할 때 생식능력이 감퇴된 동물들에서 뚜렷하게 낮다(Pickard & Silverman, 1979). 사람, 원숭이, 흰쥐를 비롯한 포유동물에서와 마찬가지로, 골든 햄스터의 생식 관련 호르몬들도 생식 기능이 왕성하면 맥동적으로 분비되지만, 생식 기능이 퇴화되면 그렇지 못하다는 보고가 있다(Levine & Duffy, 1988; Swann & Turek, 1988). 뇌하수체에서 분비되는 성선자극호르몬은 시상하부에서 분비되는 성선자극호르몬 분비호르몬(gonadotropin releasing hormone, GnRH)에 의해 결정된다. 즉 성선자극호르몬의 분비양상은 성선자극호르몬 분비호르몬의 양상을 반영한다.

성선자극호르몬 분비호르몬은 대뇌의 시상하부에서 생성되어, 문맥을 통하여 뇌하수체로 분비되는 호르몬으로, 생식 기능을 조절하는 핵심 물질이다. 뇌하수체 전엽은 이 호르몬의 영향을 받아서 성선자극호르몬인 여포자극호르몬과 황체형성호르몬을 동시에 분비한다(Udagawa et al., 2002). 이 호르몬들은 생식소에 작용하여, 수컷의 정소에서는 정자를 생성시키거나 또는 암컷의 난소에 작용하여 난자를 성숙 및 배란시킴과 동시에 각각의 성별에 맞는 성스테로이드 호르몬들을 분비하게 한다. 이 스테로이드 호르몬들은 시상하부 및 뇌하수체에 음성되먹임 작용으로 성선자극호르몬 분비호르몬과 생식호르몬의 분비를 조절한다.

그렇지만, 생식 능력은 성선자극호르몬 분비호르몬의 분비 양상에 따라 변경된다. 즉 생식 기능이 활성화되어 정자를 왕성하게 만들어내는 포유동물의 내분비계는 성선자극호르몬 분비호르몬이 맥동적으로 분비되며, 그에 따라 성선자극호르몬들도 맥동적으로 분비되지만, 생식 기능이 퇴화되어 정자가 없는 동물들의 생식 관련 호르몬들은 맥동적으로 분비되지 않을 뿐 아니라 전반적으로 낮다.

따라서 본 연구는 성선자극호르몬 분비호르몬 유전자를 발현시키는 벡터를 제작하고, 수컷 골든 햄스터에 투여하여, 생식 능력에 미치는 광주기의 효과와 관련지어 개체별로 추적하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

장주기에 8주 이상 사육한 골든 햄스터(*Mesocricetus auratus*) 수컷을 실험동물로 사용하였다. 골든 햄스터 수컷은 정소

가 외부로 돌출되어 있으므로, 동물을 희생시키지 않고도 생식능력의 변화를 용이하게 개체별로 추적하여 관찰할 수 있는 장점이 있기 때문에 실험동물로 선택하였다. 실험동물은 항온(22±1 °C) 및 항습(50%)이 유지되는 용인대학교 동물 사육실에서 타이머가 장착된 형광등을 사용하여 14 시간 조명 및 10시간 소등(14L/10D)의 장주기에 유지되었다. 외부의 빛을 차단하기 위해 모든 창문엔 검은색 커튼을 달고 환풍기를 설치하였다. 실험에 사용된 동물들은 모두 별도의 사육함에 유지되었다. 장주기는 이미 언급한 광주기를 사용하였고, 단 주기는 10시간 조명 및 14시간 소등(10L/14D)으로 설정하였다. 사육함도 빛을 완전히 차단시켰고, 통풍을 위해 환풍기를 설치하였다. 사료와 물은 조명시간 중에 충분히 공급하였다. 각 실험동물들은 귀에 표시하여 개별적으로 추적하였다.

2. 성선자극호르몬 분비호르몬 벡터 제작 및 플라스미드 정제

흰쥐의 성선자극호르몬 분비호르몬 유전자(rGnRH)를 제한효소 *EcoRI*로 절단하여 cytomegalovirus(CMV) promoter가 내장된 pcDNA3 vector의 *EcoRI* 부위에 삽입하였다(그림 1, A). 그 후 *EcoRI*를 처리하여 1.5% agarose gel에서 전기영동을 하였고, 571bp를 얻어서 GnRH cDNA의 삽입을 확인하였다(그림 1, B lane 3). 그리고 *HindIII*를 처리하여 5.8kbp와 128bp의 단편을 얻어 올바른 방향으로 삽입된 것을 확인하였다(그림 1, B lane 4). 박테리아를 배양하기 위하여 Luria-Bertaini(LB) 배양액(1 리터 당 10g Bacto-tryptone, 5g Bacto-yeast extract, 5g NaCl, pH 7.5)에 agarose를 1.5% 넣어 고압 고온으로 멸균시켰다. 그 배양액이 55°C로 냉각되었을 때 ampicillin (50µg/ml)을 넣고 배지를 만들었다. 그 배지에서 박테리아를 16시간 이상 배양하였다. 콜로니를 선택하여, ampicillin(50µg/ml)을 포함한 LB 배양액이 들어있는 플라스크에 집종시킨 후 shaking incubator에서 37°C, 120 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 플라스미드 DNA는 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)를 이용하여 추출하였다. 배양된 박테리아를 1.5ml microcentrifuge tube에 넣어 원심분리를 세 번 반복하여 농축하였다. 침전물을 RNase A가 첨가된 buffer P1을 250µl씩 첨가하여 현탁한 후, buffer P2를 250µl 첨가하여 섞은 후 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 컬럼으로 옮기고, 다시 13,000 rpm, 4°C에서 1분간 원심분리하였다. 이때 컬럼을 통해 걸러진 용액은 버리고, 컬럼에 0.5ml의 buffer PB를 컬럼에 넣고 다시 한번 전 단계와 같이 원심분리하여 아래로 걸러진 용액을 버리고 컬럼에 buffer PE를 0.75ml씩 넣어 원심분리하고 걸러진 용액을 버렸다. 그리고 filter에 남

아 있을 수 있는 buffer PE를 완전히 제거하기 위해 다시 한번 원심분리한 후 용액을 버리는 단계를 한번 더 반복하였다. 각 컬럼을 통해 정제된 플라스미드를 모두 합쳤다. 정제된 플라스미드를 확인하기 위해 0.8% agarose gel상에서 전기영동을 실시하였다. 추출한 플라스미드의 크기는 λ DNA/*Hind* III를 사용하여 결정하였다. 제한효소 *Pvu*II로 절단하여 플라스미드를 조사하였다. 플라스미드의 농도는 spectrophotometer(Varian, Cary 300 Bio)를 사용하여 260nm의 파장에서 OD값을 측정하여 결정하였다. 추출된 플라스미드는 2mg/ml의 농도로 결정되었다.

3. 실험군 및 벡터 투여

실험동물들을 장주기(14L/10D) 및 단주기(10L/14D)로 조정된 동물사육함으로 옮겼다. 각 실험군에 4~6마리를 배정하였다. 모든 동물들은 10주 동안 정소의 용적을 측정하였다. 성선자극호르몬 분비호르몬 유전자를 삽입하여 제작한 벡터를 세 그룹(고농도; 20 μ g/ml, 중농도; 5 μ g/ml, 저농도; 2 μ g/ml)으로 나누었다. 벡터는 각각의 농도를 목덜미와 등 사이에 2주 간격으로 100 μ l씩 피하주사하였다. 이들 농도는 참고할 만한 자료가 없어 임의로 선택하였다. 벡터를 투여하지 않은 단주기 동물들을 대조군으로 하였다.

4. 정소 무게 및 생식능력 지수 결정

실험 과정에서 10주 동안 2 주마다 개복수술로 정소의 용적을 측정하였고, 무게로 환산하였다. 햄스터를 ethyl ether로 일시적으로 마취시킨 후 정소의 돌출 부위를 70% 알코올로 소독하여 수술용 가위로 외피만 절개하였다. 지방과 부정소를 제외한 정소만 돌출시켜 vernier calipers(Mitutoyo corporation, N20)로 장반경과 단반경을 측정하였다. 정소의 용적을 측정한 후 절개된 외피는 autoclip(MikRon Precision, Inc.)으로 봉하였다. 장경과 단경의 측정값은 장구식(Formular for a prolate spheroid, Vol = 4/3(장경/2)(단경/2)²)을 이용하여 무게로 환산하였고(Watson-Whitmyre & Stetson 1985). 좌·우측 정소 무게를 합하여 paired testicular weight(PTW)로 칭하였다.

장구식으로 결정된 정소의 무게를 체중(body weight, BW)으로 나누어(PTW(g)/BW(g) \times 100) 생식능력 지수(% reproductive index)로 나타냈다. 생식능력 지수는 SAS 8.2(2002) 프로그램을 사용하여 95%의 유의수준으로 통계적인 유의성을 검증하였다. 각 그룹 내 시간에 따른 생식능력 지수의 통계적인 유의성은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 적용하였으며, 같은 시간 내 생식능력 지수의 그룹 간 차이는

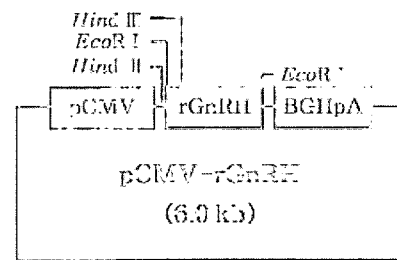
Duncan's multiple range test를 적용하였다.

결 과

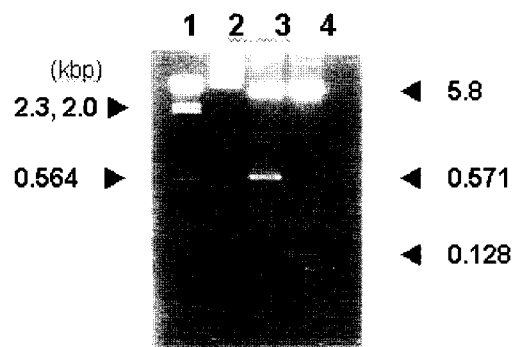
그림 1은 성선자극호르몬 분비호르몬이 삽입된 vector가 제대로 제작되었음을 보인 결과이다. *Eco*RI을 처리하여 571 bp를 얻어서 GnRH cDNA의 삽입을 확인하였고(그림 1, B lane 3), *Hind*III를 처리하여 5.8 kbp와 128 bp의 단편을 얻어 올바른 방향으로 삽입된 것을 확인하였다(그림 1, B lane 4).

성선자극호르몬 분비호르몬 벡터를 투여하는 10주 동안 생식능력 지수의 변화를 그림 2에 나타내었다. 예상한 바와 같이, 장주기에 10주 동안 유지된 대조군 동물들의 생식능력 지수는 평균 약 2.5 내외로 그대로 유지되었지만, 단주기에 노출된 대조군 동물들의 생식능력 지수는 시간에 따라 감소

A



B



1. λ *Hind* III marker
2. pCMV-rGnRH
3. pCMV-rGnRH/ *Eco*RI
4. pCMV-rGnRH/ *Hind*III

Fig. 1. pCMV-rGnRH construct(A) and a representative photograph of plasmid cut by restriction enzymes(B). 1, λ DNA/*Hind*III marker; 2, plasmid of pCMV-rGnRH; 3, pCMV-rGnRH cut by *Eco*RI; 4, pCMV-rGnRH cut by *Hind*III.

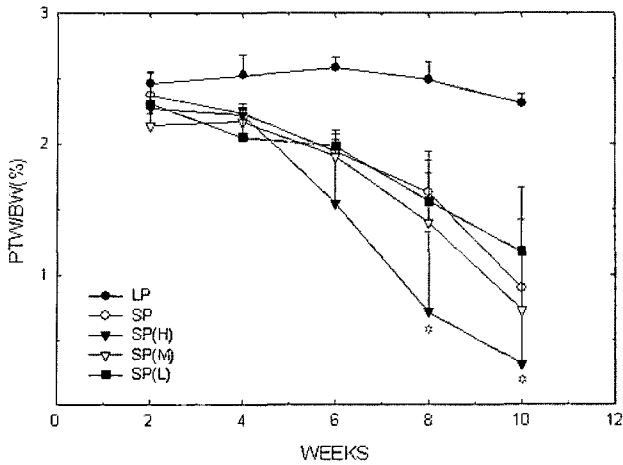


Fig. 2. Changes of reproductive indices along with time. Animals were housed in each photoperiod and administered with the vector containing foreign GnRH gene. Testicular weight were measured in the intervals of 2 weeks for 10 weeks. PTW, paired testicular weight; BW, body weight; LP, long photoperiod(14L/10D); SP, short photoperiod (10L/14D); H, 20μg/ml; M, 5μg/ml; L, 2μg/ml. Values are means ± SEM. *, significantly different(P<0.05, ANOVA) from the other groups at the time points.

하였다. 단주기에 유지된 대조군의 생식능력 지수는 8주부터 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)가 나타나기 시작하였으며, 10주에는 완전히 퇴화하였다. 저농도와 중간농도의 벡터를 투여 받은 동물들의 생식능력 지수도 단주기 대조군과 마찬가지로 8주부터 통계적으로 유의한(P<0.05) 차이가 나타나기 시작하여 10주에는 더 심화되었다. 그러나 고농도의 벡터를 투여 받은 동물들은 처리 후 6주째부터 통계적으로 유의한(P<0.05) 차이가 나타났고, 그 이후 더 심화되었다. 처리 후 6주째 각 그룹간의 차이는 유의하지 않았다. 8주와 10주에, 벡터를 저농도와 중간농도로 투여 받은 동물들의 정소는 단주기 대조군 동물들과 동일한 양상으로 퇴화되는 정도를 보였다. 그러나 벡터를 고농도로 투여 받은 동물들은 다른 모든 그룹의 동물들보다 그 퇴화 정도가 의미있게(P<0.05) 가속되었다.

각 실험군에서 나타난 생식능력 지수 결과를 더 자세히 파악하기 위하여 실험군에 있는 각 개체들을 추적하였다(Fig. 3~7). 장주기에 10주 동안 유지되어 생식 기능을 항상 지닌 동물들의 생식능력 지수는 2~3이었다(Fig. 3, 6마리). 개개의 개체들에서 일정하지 않고 약간의 기복이 관찰된 점은, 무게를 결정하기 위한 용적 측정상의 오차로 생각된다. 따라서 골든 햄스터의 경우, 정소의 무게가 이 범위 내에 있다면 생식 능력을 갖췄다고 사료된다. 단주기 대조군에 속하는 동물

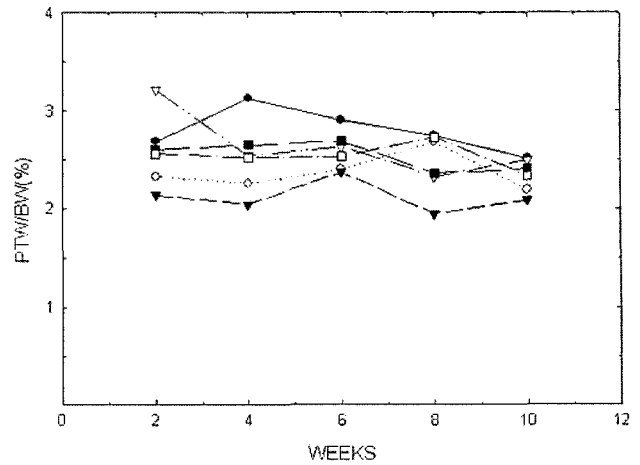


Fig. 3. Changes of reproductive indices along with time in the animals kept in LP(14L/10D). Animals were housed in LP. Testicular weights were measured by laparotomy in the intervals of 2 weeks for 10 weeks.

에서 8주에 퇴화과정을 겪는 동물이 한 마리 나타났으며, 10주에는 모두 퇴화를 겪었다(Fig. 4, 6마리). 저농도로 벡터를 투여한 결과는 Fig. 5 (5마리)에 나타났다. 처리 후 8주에 1마리에서 퇴화 현상이 나타나기 시작하여 10주에는 심화되었다. 나머지 4마리 중에 3마리에서 퇴화현상이 관찰되었지만, 1마리는 생식능력을 유지하였다. 중간 농도로 벡터를 투여한 결과는 Fig. 6 (5마리)에 나타났다. 처리 후 8주에서 1마리가 퇴화현상을 보였으며 10주에는 모두 퇴화하였다. 고농도로 벡터를 투여한 결과는 Fig. 7 (4마리)에 나타났다. 처리 후 6주부터 퇴화 현상이 나타나기 시작하여(1마리) 8주에는 모두

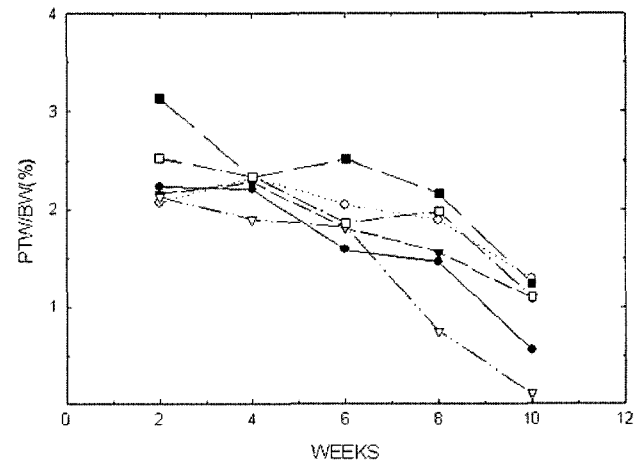


Fig. 4. Changes of reproductive indices along with time in the animals housed in SP(10L/14D). Intact animals were housed in SP. Testicular weights were measured by laparotomy in the intervals of 2 weeks for 10 weeks.

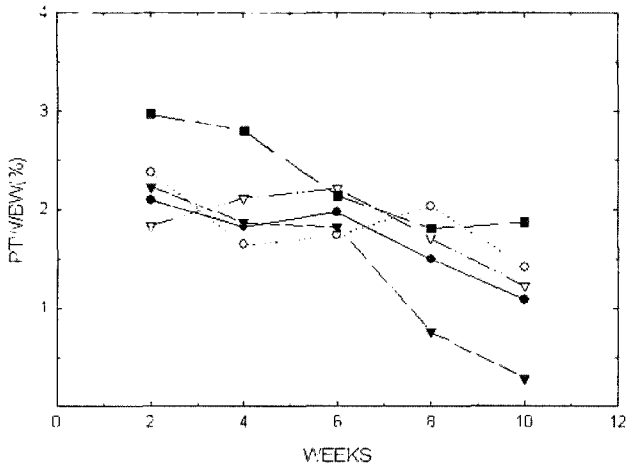


Fig. 5. Changes of reproductive indices along with time in the animals received low concentration of vector and housed in SP(10L/14D). Testicular weights were measured by laparotomy in the intervals of 2 weeks for 10 weeks.

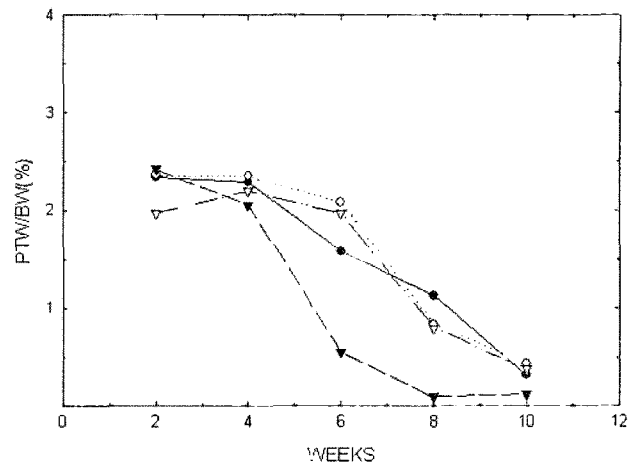


Fig. 7. Changes of reproductive indices along with time in the animals received high concentration of vector and housed in SP(10L/14D). Testicular weights were measured by laparotomy in the intervals of 2 weeks for 10 weeks.

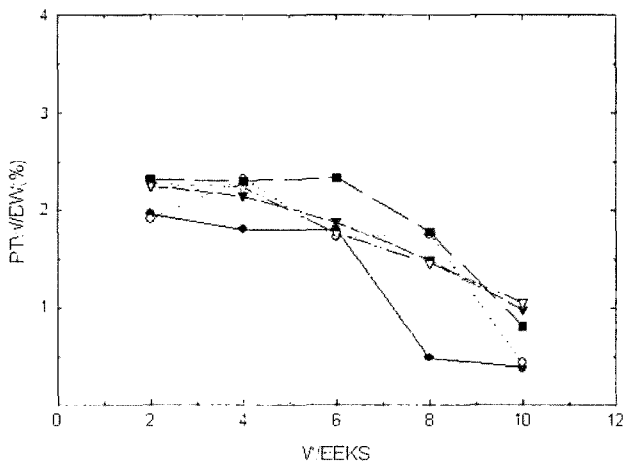


Fig. 6. Changes of reproductive indices along with time in the animals received middle concentration of vector and housed in SP(10L/14D). Testicular weights were measured by laparotomy in the intervals of 2 weeks for 10 weeks.

퇴화하였다. 10주에는 모든 동물들의 생식 능력이 완전히 퇴화되었다.

고 찰

성선자극호르몬 분비호르몬을 포함하는 벡터를 고농도로 투여 받은 동물들은 단주기 대조군 동물들보다 그 퇴화 정도가 더 가속되었다. 이 결과는 성선자극호르몬 분비호르몬이 효과를 나타냈다는 점에서 시사하는 바가 크다. 만일 벡터로 삽입된 성선자극호르몬 분비호르몬 유전자가 발현되지 않았

다면 벡터를 투여한 모든 동물들의 퇴화 정도는 단주기 대조군과 동일하여야 한다. 본 연구의 결과는 성선자극호르몬 분비호르몬이 벡터로부터 만들어져 그 영향을 발휘하고 있다고 볼 수 있다.

성선자극호르몬 분비호르몬은 시상하부에서 생성 및 분비되어 뇌하수체에서 생식호르몬 분비를 촉진한다(Levine & Duffy, 1988; Pitteloud et al., 2002; Udagawa et al., 2002). 따라서 성선자극호르몬 분비호르몬이 주입한 벡터에 의해 분비되었다면, 단주기가 유도하는 생식 퇴화를 막아서 정소의 퇴화는 일어나지 않았어야 한다. 현재의 결과는 반대 양상을 보여, 오히려 생식 기능 퇴화가 가속되었다. 이 결과는 생체에서는 호르몬이 맥동적으로 분비되는 특성에 기인한다고 사료된다. 생체에서 성선자극호르몬 분비호르몬은 맥동적으로 분비되고, 그에 따라 뇌하수체의 성선자극호르몬 분비세포들도 황체형성호르몬과 여포자극호르몬을 맥동적으로 분비하여 생식 기능을 유지 및 촉진시킨다. 따라서 벡터에 의해 분비된 성선자극호르몬 분비호르몬은 맥동적으로 분비된 것이 아니라 지속적으로 같은 양을 분비시켰다고 보아야 타당할 것이다. 이러한 해석은 사용된 벡터의 특징상 성선자극호르몬 분비호르몬 유전자를 활성화시키는 특정 물질이 존재하지 않기 때문으로 생각된다. 또한 그 양은 투여한 벡터의 농도에 의존적일 것으로 생각된다. 따라서 저농도와 중농도에서는 그 양이 효과를 발휘하지 못하였으나, 고농도에서는 분비되는 성선자극호르몬 분비호르몬의 양이 지속적으로 높았기 때문으로 추정된다. 이러한 해석은 뇌하수체에 있는 성선자극호르몬 분비세포의 desensitization, 즉 성선자극호르

몬 분비세포에 있는 성선자극호르몬 분비호르몬 수용체의 down regulation에 의한다고 사료된다. 그러나 본 실험에서는 기술적인 문제 때문에 혈중 여포자극호르몬 및 황체호르몬 수준을 측정하지 않았다. 맥동적인 분비 양상을 파악하기 위해서 혈액을 일정 시간 동안 연속적으로 채취하여야 하지만, 골든 햄스터는 크기가 작아서 측정할 수 있는 분량의 혈액을 채취하기는 용이하지 않다. 따라서 벡터의 효과를 혈중 여포자극호르몬 및 황체호르몬 수준을 통해 정량적으로 파악하기는 어렵다. 그러나 성선자극호르몬 분비호르몬 유전자를 포함한 벡터가 통계적으로 유의한 효과를 나타냈으므로 호르몬이 분비되었음을 추정할 수 있고, 또한 단주기가 유도하는 생식기능 퇴화를 가속시켰음을 알 수 있었다.

수컷 골든 햄스터를 사용한 본 결과는 고농도의 호르몬으로 계속 자극하면 수용체들이 내화과정을 겪는다는 기존의 결과와 일치하며(D'Occhio et al., 2000; D'Occhio et al., 1999), 다른 동물에서도 일어날 가능성을 시사하고 있다. 현재 내화과정에 관한 연구는 인간의 체외수정시 견강한 난자를 얻기 위한 과배란 유도 방법 연구에 많은 정보를 제공하고 있으며(Hashizume et al., 2001), 앞으로 정자형성과정 연구에도 적용될 수 있으리라고 사료된다. 또한 본 실험의 결과는 벡터를 사용한 생체실험 가능성을 보여주고 있다.

인용문헌

- Choi D (1996) Reproductive physiology of pineal hormone melatonin. *Korean J Zool* 39:337-351.
- D'Occhio MJ, Aspdena WJ (1999) Endocrine and reproductive responses of male and female cattle to agonists of gonadotropin-releasing hormone. *J Reprod Fert Suppl* 54:101-114.
- D'Occhio MJ, Fordyce G, Whyte TR, Aspdena WJ, Trigg TE (2000) Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Anim Reprod Science* 60-61:433-442.
- Elliott JA (1976) Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. *Fed Pro* 35:2339-2346.
- Hashizume T, Yang WH, Clay CM, Nett TT (2001) Internalization rates of murine and ovine gonadotropin-releasing hormone receptors. *Biol Reprod* 64:898-903.
- Levine JE, Duffy MT (1988) Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats. *Endocrinology* 122:2211-2221.
- Pickard GE, Silverman AJ (1979) Effects of photoperiod on hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone in the male hamster. *J Endocrinol* 83:421-428.
- Pitteloud N, Hayes FJ, Dwyer A, Boepple PA, Lee H, Crowley WF Jr (2002) Predictors of outcome of long-term GnRH therapy in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4128-4136.
- Reiter RJ (1980) Photoperiod : Its importance as an importance as an impeller of pineal and seasonal reproductive rhythms. *Int J Biomet* 24:57-63.
- Stetson MH, Watson-Whitmyre M (1984) Physiology of the pineal and its hormone melatonin in annual reproduction in rodents. In: Reiter RJ (ed.), *The pineal Gland*. Raven Press, New York, pp 109-153.
- Swann JM, Turek FW (1988) Transfer from long to short days reduces the frequency of pulsatile luteinizing hormone release in intact but not in castrated male golden hamsters. *Neuroendocrinology* 47:343-349.
- Udagawa K, Takeda M, Hosaka M, Kubota Y, Ogawa T (2002) Recovery of spermatogenesis by high dose gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in rat cryptorchis testis after orchiopexy. *J Urol* 168:1279-1283.
- Watson-Whitmyre M, Stetson MH (1985) A mathematical method for estimating paired testes weight from in situ testicular measurements in three species of hamster. *Anat Rec* 213:473-476.