

수컷 흰쥐 뇌하수체의 생식소자극호르몬 발현에 미치는 Ethane 1,2-Dimethane Sulfonate(EDS)의 효과

손혁준 · 김수웅¹ · 백재승¹ · 이성호[†]

상명대학교 생명과학전공, ¹서울대학교 의과대학 비뇨기과학교실

Effect of Ethane 1,2-Dimethane Sulfonate(EDS) on the Expression of Pituitary Gonadotropin in Male Rats

Hyeok-Joon Son, Soo Woong Kim¹, Jae-Seung Paick¹ and Sung-Ho Lee[†]

Department of Life Science, Sangmyung University

¹Department of Urology, Seoul National University College of Medicine

ABSTRACT : Ethane 1,2-dimethane sulfonate(EDS), a toxin which specifically kills Leydig cells(LC), has been widely used to prepare the reversible testosterone(T) depletion rat model. In the present study, we monitored the gene expression profiles of pituitary gonadotropins, LH and FSH, up to 7 weeks after EDS injection. Adult male Sprague-Dawley rats(300~350 g B.W.) were injected with a single dose of EDS(75 mg/kg i.p.) and sacrificed on weeks 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7. Total RNAs were purified from each pituitary, and the message levels of common alpha subunit(C α) of pituitary glycoprotein hormones, LH beta subunit(LH β), FSH beta subunit(FSH β) and GnRH receptor(GnRH-R) were evaluated by semi-quantitative RT-PCRs. The message levels of C α increased sharply during weeks 1-4, then return to the control level on week 5. The mRNA levels of LH β were elevated after week 2, reached the peak at week 4, then declined to the control level after week 5. The message levels of FSH β were elevated after week 2, reached the peak at week 3, then declined to the nadir at week 5. Similarly, the mRNA levels of GnRH-R were elevated after week 2, reached the peak at week 3, then gradually declined to the control level after week 5. The present study indicated that EDS treatment could induce reversible alterations in the transcriptional activities of gonadotropin subunits and GnRH-R in the anterior pituitary from male rats. EDS injection model might be useful to understand the mechanism of hormonal regulation of hypothalamus- pituitary neuroendocrine axis in male rats.

Key words : Ethane Dimethane Sulfonate(EDS), Pituitary, Gonadotropin subunits, Expression profiles.

요 약 : Ethane 1,2-dimethane sulfonate(EDS)은 Leydig cells(LC)만을 선별적 사멸을 유도하는 약물로서 가역적인 테스토스테론(testosterone, T) 결핍 흰쥐 모델을 만드는데 널리 사용된다. 본 연구에서는 수컷 흰쥐 뇌하수체의 생식소자극호르몬인 LH와 FSH의 발현에 미치는 EDS 투여 효과를 조사하였다. 성숙한 수컷 흰쥐(SD strain, 300~350 g B.W.)에 EDS(75 mg/kg, i.p.)를 1회 복강주사하고 주사 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 그리고 7주가 경과한 날 희생시켰다. 뇌하수체로부터 total RNA를 추출한 후 뇌하수체 glycoprotein hormone common alpha subunit(C α), LH beta subunit(LH β), FSH beta subunit(FSH β) 그리고 GnRH 수용체(GnRH-R)의 발현 변화를 semi-quantitative RT-PCR로 측정하였다. 그 결과, C α 전사수준은 주사 후 1주부터 급격히 상승하여 주사 후 4주까지 유의하게 높게 유지되다가 5주 후부터 control 수준으로 회귀하였다. LH β 전사 수준은 주사 후 2주부터 유의하게 상승하여 주사 후 4주에 최고 수준에 도달하였으며, 5주 후부터 control 수준으로 감소하였다. FSH β 전사수준은 주사 후 2주부터 유의하게 상승하여 주사 후 3주에 최고 수준에 도달하였으며, 4주 후부터 감소하여 5주 후에 최소치를 보였다. 유사하게, GnRH-R 전사 수준도 주사 후 2주부터 유의하게 상승하여 주사 후 3주에 최고 수준에 도달하였으며, 5주 후부터 control 수준으로 감소하였다. 본 연구는 EDS 주사에 의해 수컷 흰쥐 뇌하수체 전엽에서의 생식소자극호르몬 subunit들과 GnRH-R의 발현 변화가 가역적으로 유도될 수 있음을 보여준 것이다. EDS 주사 모델은 수컷 흰쥐에서의 시상하부-뇌하수체 신경내분비 축의 호르몬 조절에 대한 기작을 이해하는데 도움이 될 것이다.

서 론

본 연구는 보건복지부 보건유전체사업(01-PJ10-PG6-01GN13-0002)의 지원에 의하여 이루어졌음.

[†]교신저자: 서울시 종로구 홍지동 7 상명대학교 생명과학전공 (우) 110-743, (전) +82-2-2287-5139, (팩) +82-2-2287-0070, E-mail: shlee@smu.ac.kr

시상하부-뇌하수체-정소를 잇는 호르몬 축(hypothalamus-pituitary-testis hormonal axis)이라는 개념은 고등 포유동물 수컷에서 일어나는 생식현상의 조절을 이해하는 데 필수적

인 것으로 받아들여져 왔다(Matsumoto & Bremner, 1987). 상기한 축 상의 주요 구성 호르몬들은 각각 GnRH-생식소 자극호르몬(gonadotropin; LH와 FSH)-sex steroid(testosterone, T)이며, 특히 정소에서 분비되는 T가 나타내는 시상하부와 뇌하수체 호르몬들에 대한 음성 되먹임 조절(negative feedback)에 의해 호르몬 축 전체가 폐쇄 고리(closed loop)가 됨은 잘 알려진 사실이다(Gooren, 1989). 따라서 정소 절제(orchidectomy, ORX)후 스테로이드 보충 모델은 수컷에서의 시상하부-뇌하수체 신경내분비 활성을 이해하는데 광범위하게 채택된 방법론이었다(Zanisi & Messi, 1991). 그러나 생식 관련 호르몬 축의 활성을 조절하는 정소 요인으로는 T 외에도 펩타이드성 물질인 inhibin 등이 존재함이 잘 알려졌는데(Rivier *et al.*, 1990), 이는 널리 사용되고 있는 ORX 후 스테로이드 보충 모델의 한계를 시사한다.

Ethane 1,2-dimethane sulfonate(EDS)는 1960년대에 중앙 치료 목적으로 사용 가능한지 여부를 조사하는 과정에서 불임 유발 효과가 있음이 알려진 alkylating sulfonate계 물질이다(Jackson & Jackson, 1984). EDS가 정소 내 Leydig cells(LC)만의 선별적 사멸을 유도하는 약물임이 밝혀진 이래 가역적인 테스토스테론 결핍 흰쥐 모델을 만드는데 널리 사용되어왔다(Sriraman *et al.*, 2005). EDS 주사 후 1주째부터 안드로겐 의존적인 조직들의 손상과 정자 형성 과정이 정지되는데, 순차적으로 완전한 불임, 수정능 저하, 수정능 회복이 일어나고 부정소, 전립선 그리고 저정량의 일시적인 위축과 회복이 관찰되었다(Jackson & Jackson, 1984; Jeon *et al.*, 2005). 이러한 부속 생식기관들의 위축이 EDS 주사에 의한 세포자연사 촉발에 기인함이 보고된 바 있다(Son & Lee, 2006). EDS 주사 효과에 관해 특히 정소에서의 LC 자연사 및 분화의 분자적 기작에 대해 활발히 수행된 것에 비해 시상하부-뇌하수체 호르몬 축에 미치는 효과는 거의 조사된 바가 없다. 생식소자극호르몬 발현이나 분비에 미치는 EDS 주사 효과는 전반적으로 ORX 효과와 유사한 경향을 보이면서 강도는 상대적으로 낮았는데, 측정이 주사 후 3주까지에 그쳤으므로 주사 효과의 가역성을 증명하는 데 한계가 있었다(Tena-Sempere *et al.*, 1993; Gromoll *et al.*, 1993).

본 연구에서는 수컷 흰쥐에 EDS 주사 후 뇌하수체에서 glycoprotein hormone common alpha subunit($C\alpha$), LH beta subunit(LH β), FSH beta subunit(FSH β) 그리고 GnRH 수용체(GnRH-R) 발현을 최장 7주까지 조사하여 EDS 주사 효과의 가역성 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 일정한 온도와 광주기(18~22°C; 12시간 조명, 12시간 소등)와 먹이와 물의 접근을 자유롭게 한 상태(*ad libitum*)에서 사육한 흰쥐(Sprague-Dawley strain)를 사용하였다. 성숙한 수컷 흰쥐(300~350 g B.W.; 생후 120~150일)에 vehicle(DMSO:DW=1:3 volume)에 녹아 있는 EDS(75 mg/kg B.W.)를 1회 복강 주사하였으며, 대조군은 vehicle(2 ml/kg B.W.)만 주사하였다. EDS는 이전에 보고된 방법(Jackson & Jackson, 1984)을 따라 합성하였다. 각각 1주 단위로 7주까지 희생시킨 후 뇌하수체를 적출하여 total RNA를 추출하였다.

2. RNA 추출과 Semi-quantitative RT-PCR

조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 방법(Chomczynski & Sacchi, 1987)에 따라 추출하였다. 1 ug의 total RNA를 주형으로 0.5 ug의 dT₂₀ primer와 AccuPower™ RT PreMix(Bioneer)를 사용하여 최종 반응 volume 20 ul로 역전사하였다. PCR 반응은 1 ul의 역전사 산물을 주형으로 하여 각각의 전사물에 해당하는 primer들과 Taq DNA polymerase(Takara)를 사용하였다. Table 1은 본 실험에서 사용된 primer들의 염기 서열과 예상 산물 크기(bp)를 표시하였다. PCR 산물은 전기영동으로 분리하였고, ethidium bromide로 염색 후 ImagerIII-1D main software(Bioneer)로 정량하였다. 정량을 위한 internal control PCR에서는 GAPDH primer를 사용하였다.

3. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 one-way ANOVA에 의해 P-value 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

EDS 주사에 의한 뇌하수체 전엽에서의 $C\alpha$ 전사 수준 변화는 다른 측정 대상들이 주사 후 2주부터 유의하게 상승한 데 비해 주사 후 1주부터 바로 급격히 상승하여 최대치를 보였으며(control vs 1W=1.00 vs 2.45±0.26, $p<0.01$), 이후 주사 후 4주까지 control에 비해 유의하게 높게 유지되다가 5주 후부터 control 수준으로 회귀하였다(Fig. 1). LH β 발현의 경우 주사 후 1주부터 상승하는 경향을 보였으나 주사 후 2주부터 유의하게 상승하였고(control vs 2W=1.00 vs 1.93±0.67, $p<0.05$) 주사 후 4주에 최고 수준에 도달하였으며(control vs 4W=1.00 vs 4.33±0.47 $p<0.05$), 5주 후부터

Table 1. Primer sets for semi-quantitative RT-PCR analysis

Name of the gene	Sequence of primers	Size of fragment
<i>Cα</i>	5'-ATA CTT CTC CAA GCT GGG TG	294bp
	3'-CGA CAC TCA GTG CCA TCG CA	
LH β	5'-ATG GAG AGG CTC CAG GGG CT	424bp
	3'-CAG AAG AGG AGA AGG CGG GG	
FSH β	5'-CAT CCT ACT CTG GTG CTT GA	304bp
	3'-GTC ACT ATC ACA CTT GCC AC	
GnRH-R	5'-AGC CTA GAG CAC AGA CAG AA	540bp
	3'-GTG CTG TTG GTC TGT ATA GG	
GAPDH	5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG	570bp
	3'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	

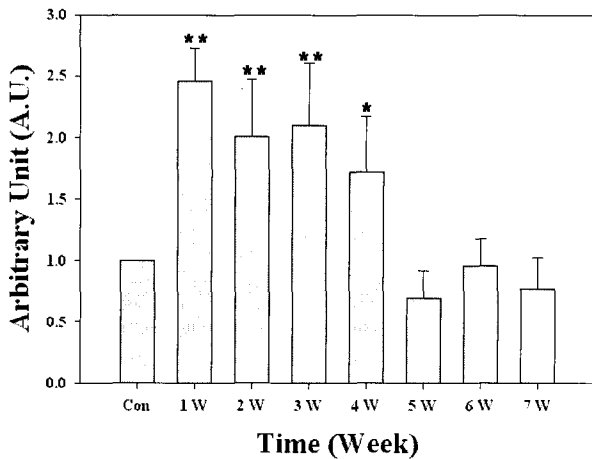


Fig. 1. Semi-quantitative RT-PCR of the transcripts for common alpha subunit (*Cα*) in the pituitary from rats treated with EDS(75 mg/kg BW). Each bar is the mean±SEM of repeated experiments(n=4~7). The asterisks indicate significant differences from control values (* $P<0.05$; ** $P<0.01$) by one way ANOVA.

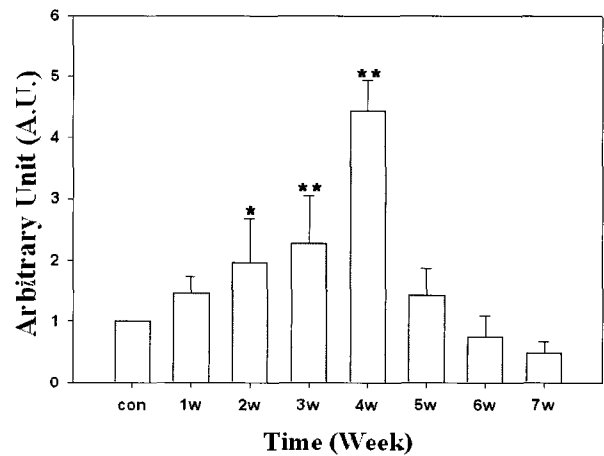


Fig. 2. Semi-quantitative RT-PCR of the transcripts for LH beta subunit(LHβ) in the pituitary from rats treated with EDS(75 mg/kg BW). Each bar is the mean±SEM of repeated experiments(n=4~7). The asterisks indicate significant differences from control values(* $P<0.05$; ** $P<0.01$) by one way ANOVA.

control 수준으로 감소하였다(Fig. 2). FSH β 전사 수준의 경우도 주사 후 1주부터 상승 경향을 보였으나 2주부터 유의하게 상승하였고(control vs 2W=1.00 vs 2.65±0.75, $p<0.01$), 주사 후 3주에 최고 수준에 도달하였으며(control vs 3W=1.00 vs 3.55±0.95, $p<0.01$), 주사 후 4주부터 감소하여 주사 5주후에 최소치를 보였다(Fig. 3). 유사하게, GnRH-R 전사 수준도 주사 후 2주부터 유의하게 상승하였고(control vs 2W=1.00 vs 2.75±0.97, $p<0.01$), 주사 후 3주에 최고 수준에 도달하였으며(control vs 3W=1.00 vs 3.93±1.45, $p<0.01$), 주사 5주부터 control 수준으로 감소하였다(Fig. 4).

본 연구는 EDS 주사에 의해 수컷 흰쥐 뇌하수체 전엽에서의 생식소 자극호르몬 subunit들과 GnRH-R의 발현 변화가 가역적으로 유도될 수 있음을 보여준 것으로서, 향후 포유동물의 시상하부-뇌하수체 신경내분비 축 활성을 연구하는데 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다. 포유동물의 번식과 관련된 시상하부-뇌하수체-생식소 호르몬 축의 연구에서, 특히 암컷의 경우, 생식소 절제(gonadectomy) 스테로이드 보충 모델(steroid supplement model)은 강력한 연구 방법으로 사용되어 왔다(Gooren, 1989; Mercer, 1990; Shupnik & Schreihofner, 1997). 그런데, 이 모델은 (i) 생식소 절제 후 내재적인 sex steroid 제거 기간 설정의 차이(2일에서 최장 1개월), (ii) sex steroid의 보충량의 차이, (iii) 투여 방법의 차

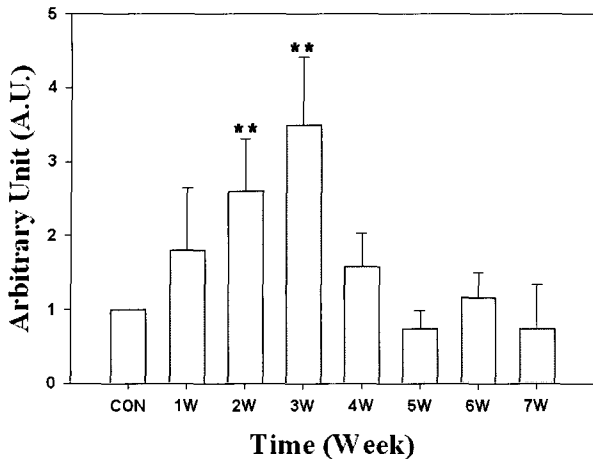


Fig. 3. Semi-quantitative RT-PCR of the transcripts for FSH beta subunit (FSH β) in the pituitary from rats treated with EDS(75 mg/kg BW). Each bar is the mean \pm SEM of repeated experiments(n=4~7). The asterisks indicate significant differences from control values(** $P<0.01$) by one way ANOVA.

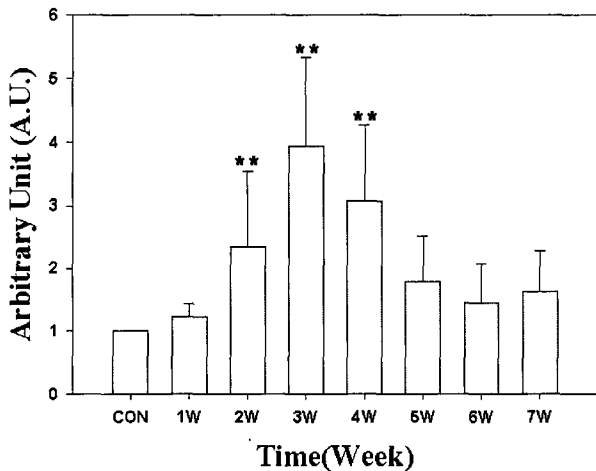


Fig. 4. Semi-quantitative RT-PCR of the transcripts for GnRH receptor(GnRH-R) in the pituitary from rats treated with EDS(75 mg/kg BW). Each bar is the mean \pm SEM of repeated experiments(n=4~7). The asterisks indicate significant differences from control values(** $P<0.01$) by one way ANOVA.

이(예, silastic capsule vs daily injection), (iv) 투여 기간의 차이(48시간에서 최장 7일) 등의 문제점들이 내재하므로 적용 조건에 따라 연구 결과가 상이할 가능성이 대단히 높다. 그 외에도 T에서 dihydrotestosterone(DHT) 또는 에스트로겐(E)로의 전환 정도가 표적조직 별로 큰 차이가 있을 수 있으므로 실제에 가까운 *in vivo* 상황을 만들기 위해서는 해당 효소에 대한 억제제를 동시에 투여해야 하는 번거로움이 있

을 수 있다. 마지막으로 대표적인 nonsteroid 요인인 inhibin 과 같은 다양한 생식소 요인들을 고려해 볼 때, 단지 sex steroid 만을 보충해서는 실제 *in vivo* 상황을 재현하기 어렵다는 점이다(Dalkin *et al.*, 1990). 이러한 측면에서 볼 때, EDS 주사 모델은 단 1회 복강주사로 성숙한 LC만을 선별적으로 사멸시키고 이어 LC 전구세포들이 보충하는 기작을 통해 정소의 안드로겐 생합성 및 분비 능력의 가역적인 손상과 회복을 유도할 수 있기 때문에 정소 절제 모델보다 실제 *in vivo* 상황에 가깝고 유용한 측면이 있다(Sriraman *et al.*, 2005).

뇌하수체 전엽에서의 생식소 자극호르몬의 분비와 발현에 관한 연구에서 EDS 주사 모델을 사용한 연구는 대단히 드물다. ORX 모델이나 EDS 주사 모델에서 혈중 T 농도는 공히 1일 만에 감소하고 그 수준이 ORX 모델에서는 지속되지만, EDS 모델에서는 주사 후 14일부터 상승하기 시작하였다. 혈중 LH의 경우, ORX 모델과 EDS 모델 공히 T에 의한 음성 되먹임 작용의 소실로 증가하는데, ORX 모델에서는 계속 21일 후까지 지속적으로 상승하는 데 비해 EDS 모델에서는 14일 후에 최고치를 보인 후 21일 후에 다시 최저치를 보였다. 이는 보충된 LC에 의해 합성 및 분비된 T의 음성 되먹임 작용이 재개되었기 때문으로 사료되며, EDS 주사의 가역적인 효과를 시사한다(Tena-Sempere *et al.*, 1993). 한편, 유전자 발현에 있어서는 ORX 모델과 EDS 주사 모델 모두 $C\alpha$ 와 LH β subunit의 발현을 상승시킴에 비해 FSH β subunit의 경우, ORX 모델은 상승하였고, EDS 주사 모델에서는 바뀌지 않았다(Gromoll *et al.*, 1993). 본 연구에서는 EDS 주사에 의해 비록 최고치가 나타나는 시기는 차이가 있으나, $C\alpha$, LH β , FSH β subunit 모두 상승하였다(Fig. 1~3). 이러한 차이는 EDS 주사 모델에서 회생시킨 시기가 상이한 것이 일차적인 원인으로 사료된다. 한편 본 연구자들의 이전 연구에서 혈중 LH 수준은 EDS 주사 후 2주에 가장 높았는데(Jeon *et al.*, 2005), 이와 같은 LH subunit 유전자 발현과 호르몬 분비간의 괴리 및 $C\alpha$ 와 LH β 발현 조절 간, 또는 LH β 와 FSH β 발현 조절 간의 괴리 내지 불일치는 ORX 모델이나 GnRH 유도체 주사 모델에서도 이미 관찰된 바 있다. 즉, LH의 합성과 분비가 FSH 보다 훨씬 더 T 의존적임이 보고된 바 있는데, 아마도 각 subunit의 전사후 조절(posttranslational modification)의 차이에 기인하는 것으로 추정하였다(Iliff-Sizemore *et al.*, 1990). 한편, ORX 후 T 보충에 대한 반응은 $C\alpha$ 가 가장 빨리 상승했다가 급감하였으며, GnRH antagonist를 투여했을 때 FSH β 의 발현 감소가 급격하게 일어나는 데 비해 다른 subunit의 발현 감소는 서서히 일어

남이 보고되었다(Paul *et al.*, 1990). 이는 각 유전자의 프로모터 활성 조절에 있어서의 상이성에서 초래될 가능성을 강력히 시사한다(Curtin *et al.*, 2001). 흰쥐 뇌하수체 전엽세포의 체외배양 모델에서는 더욱 복잡한 결과들이 도출되었는데, T 처리에 의해 FSH β mRNA가 증가함에 비해 C α 와 LH β mRNA는 유의하게 감소하였고, GnRH 투여에 대한 반응도 맥동적(pulsatile) 투여와 지속적(chronic) 투여의 경우 큰 차이가 나타났다(Winters *et al.*, 1992). 이와 같은 여러 실험모델들의 문제점들을 고려해 볼 때 EDS 주사 모델을 사용한 *in vivo* 또는 *in vitro* 상태의 연구에 대한 실효성을 진지하게 재검토해 볼 필요가 있다. 한편, 뇌하수체 전엽에서의 GnRH-R 발현의 경우, EDS 주사후 3주경 control에 비해 4배 가량 발현이 증가하였는데, 이는 ORX 후 3주경 3.8배 발현이 상승했다는 이전 보고와 일치하였다(Lerrant *et al.*, 1995).

결론적으로 본 연구에서 사용한 EDS 주사 모델이 흰쥐 뇌하수체 전엽에서 생식소자극호르몬 발현과 GnRH-R 발현의 조절기작을 연구함에 있어서 보다 *in vivo* 상황을 잘 반영할 가능성을 시사한다. 이는 EDS 주사 모델에서 T 결핍과 보상이 가역적이고, ORX 모델에서처럼 단순히 T 보충만으로는 제공할 수 없는 정소에서의 다양한 조절 인자들이 어느 정도 유지되거나 회복되는 상태이기 때문이다. 따라서 EDS 주사 모델은 정소 자체는 물론 T에 의한 음성 되먹임 표적인 시상하부-뇌하수체 신경내분비 축의 조절에 대한 기작을 이해하는데 도움이 될 것이다.

인용문헌

- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Curtin D, Jenkins S, Farmer N, Anderson AC, Haisenleder DJ, Rissman E, Wilson EM, Shupnik MA (2001) Androgen suppression of GnRH-stimulated rat LH β gene transcription occurs through Sp1 sites in the distal GnRH-responsive promoter region. *Mol Endocrinol* 15:1906-1917.
- Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Suhr A, Marshall JC (1990) Gonadal regulation of gonadotropin subunit gene expression: evidence for regulation of follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid by nonsteroidal hormones in female rats. *Endocrinology* 127:798-806.
- Gooren L (1989) Androgens and estrogens in their negative feedback action in the hypothalamo-pituitary-testis axis: site of action and evidence of their interaction. *J Steroid Biochem* 33:757-761.
- Gromoll J, Weinbauer GF, Simoni M, Nieschlag E (1993) Effects of antiandrogens and ethane dimethane sulpho-nate (EDS) on gene expression, free subunits, bioactivity and secretion of pituitary gonadotrophins in male rats. *Mol Cell Endocrinol* 91:119-125.
- Iloff-Sizemore SA, Ortolano GA, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Krueger KA, Marshall JC (1990) Testosterone differentially modulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid responses to gonadotropin-releasing hormone pulse amplitude. *Endocrinology* 127:2876-2883.
- Jackson CM, Jackson H (1984) Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the anti-spermatogenic action of ethane dimethanesulphonate. *J Reprod Fertil* 71:393-401.
- Jeon Y, Kim SW, Paick JS, Lee SH (2005) Effect of ethane 1,2-dimethane sulfonate(EDS) on the testicular expression of steroidogenesis-related genes and epididymal sperm count in the adult rat. *Kor J Androl* 23:17-23.
- Lerrant Y, Kottler ML, Bergametti F, Moumni M, Blumberg-Tick J, Counis R (1995) Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin beta-subunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology* 136:2803-2908.
- Matsumoto AM, Bremner WJ (1987) Endocrinology of the hypothalamic-pituitary-testicular axis with particular reference to the hormonal control of spermatogenesis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1:71-87.
- Mercer JE (1990) Pituitary gonadotropin gene regulation. *Mol Cell Endocrinol* 73:C63-67.
- Paul SJ, Ortolano GA, Haisenleder DJ, Stewart JM, Shupnik MA, Marshall JC (1990) Gonadotropin subunit messenger RNA concentrations after blockade of gonadotropin-releasing hormone action: testosterone selectively increases follicle-stimulating hormone beta-subunit messenger RNA by posttranscriptional mechanisms.

- Mol Endocrinol 4:1943-1955.
- Rivier C, Meunier H, Roberts V, Vale W (1990) Inhibin: role and secretion in the rat. *Recent Prog Horm Res* 46:231-257.
- Shupnik MA, Schreihof DA (1997) Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J Androl* 18:341-344.
- Son H-J, Lee SH (2006) Effect of ethane 1,2-dimethane sulfonate(EDS) on the apoptosis in the rat epididymis. *Dev Reprod* 10:203-209.
- Sriraman V, Anbalagan M, Rao AJ (2005) Hormonal regulation of Leydig cell proliferation and differentiation in rodent testis: a dynamic interplay between gonadotrophins and testicular factors. *Reprod Biomed Online* 11: 507-518.
- Tena-Sempere M, Pinilla L, Aguilar E (1993) Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone secretion in male rats orchidectomized or injected with ethylene dimethane sulfonate. *Endocrinology* 133:1173-1181.
- Winters SJ, Ishizaka K, Kitahara S, Troen P, Attardi B. (1992) Effects of testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130: 726-734.
- Zanisi M, Messi E (1991) Sex steroids and the control of LHRH secretion. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:155-163.