

Estradiol valerate에 의해 유발되는 다낭성난소증후군의 Nerve Growth Factor 변화

김세은[†] · 임성철^{*†} · 정문진^{**} · 최백동^{**} · 김승현 · 고아라 · 서승용^{*} · 강성수 · 문창종 · 김종춘 · 김성호 · 배춘식¹
전남대학교 수의과대학, *조선대학교 의과대학 병리학교실, **조선대학교 치과대학 구강조직학교실

(게재승인: 2011년 4월 11일)

Expression of Nerve Growth Factor in Estradiol Valerate-induced Polycystic Ovary Syndrome

Se-Eun Kim[†], Sung-Chul Lim^{*†}, Moon-Jin Jeong^{**}, Baik-Dong Choi^{**}, Seung-Hyun Kim, A-Ra Ko,
Seung-Yong Seo^{*}, Seong-Soo Kang, Chang-Jong Moon, Jong-Choon Kim, Sung-Ho Kim and Chun-Sik Bae¹

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

**Department of Pathology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju 501-825, Korea*

***Department of Oral Histology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-825, Korea*

Abstract : A form of polycystic ovary (PCO) resembling some aspects of the human PCO syndrome (PCOS) can be induced in rats by a single injection of estradiol valerate (EV). An increase in sympathetic outflow to the ovary precedes, by several weeks, the appearance of cysts, suggesting the involvement of a neurogenic component in the pathology of this ovarian dysfunction. To test the hypotheses that the change in sympathetic tone is related to an augmented production of hippocampal and/or ovarian nerve growth factor (NGF), and that this abnormally elevated production of NGF contributes to the induction of PCOS induced by EV. The animals were sacrificed after PCOS induction and the ovaries and hippocampus were sectioned and compared to the normal control. The expression of NGF was measured by immunohistochemical staining and Western blot analysis in the ovaries and hippocampus. EV-induced PCOS showed significant increase of ovarian NGF expression. Immunohistochemical expression of NGF was confined to the follicular cells and interstitial cells. Hippocampal NGF expression was not significantly changed. In conclusion EV-induced PCOS was related to the ovarian sympathetic activation which was mediated by NGF.

Key words : Polycystic ovary syndrome, estradiol valerate, nerve growth factor, ovary, hippocampus.

서 론

여성에서 고안드로겐혈증(hyperandrogenemia)의 가장 흔한 원인인 다낭성난소증후군(polycystic ovary syndrome, PCOS)은 다모증, 여드름, 남성형 탈모증 등과 함께 배란장애로 불임을 초래한다(22). 또한 당뇨병, 대사증후군 및 자궁내막암 등의 발생 위험이 증가한다(14). PCOS는 가임기 여성의 5~10%에서 나타나며(6), PCOS가 있는 성인여성의 50~60%가 비만이 있어(11) 최근 증가하고 있는 비만과 PCOS 유병율의 증가와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. PCOS의 발생기전은 아직 명확하지 않으나 몇몇 연구에 따르면 교감

신경활성의 증가와 관련이 있다는 보고가 있다(4,16,17,20). 인체에 발생하는 PCOS에 대한 병태생리연구에서 배란주기가 정상적인 난소보다 배란주기에 문제가 있는 PCOS 난소에서 카테콜아민 신경섬유의 분포가 더 치밀하다는 사실을 이를 뒷받침한다(12).

PCOS의 발생기전 및 치료법 개발에 관한 연구는 여러 가지 실험동물 모델을 통하여 진행되고 있으며(5,19), 인간의 PCOS에 가장 가까운 모델을 찾는데 노력을 하고 있으나 estradiol valerate (EV)를 이용한 연구가 대표적이다. 임상에서 EV는 피임, 갱년기 증상 치료나 난소절제 후 에스트로겐 결핍 증상의 개선에 사용되며(13,26), 배란주기에 문제가 없는 암컷 랫드에 EV를 1회 근육주사 후 60일이 경과하면 다낭성난소(polycystic ovary, PCO)가 발생하는데(5), 이는 형태학적으로는 물론 내분비학적으로도 인체에 발생하는 PCOS와 유사한 공통점이 있다(25).

[†]These two authors contributed equally to this work

¹Corresponding author.

E-mail : csbae210@chonnam.ac.kr

Nerve growth factor (NGF)는 신경지배를 직접 받는 세포는 물론 피부의 상피 및 간엽조직, 말초신경과 관련된 Schwann 세포 및 섬유모세포 등에서 합성되며 교감신경 및 감각뉴런 (sensory neuron)과 같은 effector 조직에서는 신경지배기(time of innervations) 전후에 가장 높은 농도에 도달한다(24). CNS에서 NGF에 민감한 신경(neuron)은 해마(hippocampus)에 많이 존재하며(24), 난소의 경우는 난포벽(follicular wall)을 구성하는 세포와 난소 간질세포(interstitial cell)에서 주로 생산되며, 난소에 연결되는 교감신경 분지의 발생, 발달 및 기능은 난소의 NGF 생산 능력에 의해 크게 영향을 받는다(9).

저자들은 PCOS의 발생기전을 좀 더 알아보고자 랫드에 EV를 주사하여 PCOS 질환동물 모델을 만든 후 해마 및 난소조직을 대상으로 NGF 변화를 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

4일 간격의 월경주기를 보이며 체중이 190~210 g인 7주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드 20마리를 (주)샘타코 Bio Korea (Osan, Korea)에서 구입하였고 실험실 환경적응을 위하여 1주간 예비사육 후 실험을 실시하였다. 본 실험은 전남대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 표준작업지침서에 따라 수행되었으며 사육실 조건은 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 5\%$ 의 상대 습도와 12시간의 명암주기를 유지하고 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험동물은 estradiol valerate (EV) 투여군과 oil 대조군으로 나누고 각 군마다 10마리씩 배치하였다.

다낭성난소의 유발

EV 투여군은 4 mg의 EV (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)를 0.2 mL의 sesame oil (Sigma, USA)에 용해시켜 1회 근육주사 하였고 oil 대조군은 sesame oil을 0.2 ml 근육주사 하였다.

면역조직화학적 검사

난소와 해마 조직을 적출한 후 10% 완충 중성 포르말린에 고정 후 제작한 파라핀 포매 조직을 $4 \mu\text{m}$ 두께로 박절하여 X-tra™슬라이드에 부착하여 xylene에 탈 파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액(10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세하였다. 조직절편내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 일차항체인 rabbit anti-mouse NGF monoclonal antibody (clone 2.5 s, Serotec, Kidlington, Oxford, UK)를 4°C 에서 24시간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 Histostain-Plus kits, broad spectrum (Zymed, San

Francisco, CA, USA)을 이용하여 비오틴이 함유된 이차항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 tris 완충액으로 수세하고, peroxidase가 결합된 streptavidin 용액을 10분간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척 후 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC) kit, SK-4200 (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 발색하였다. Mayor's hematoxylin으로 대조염색을 시행하였고, universal mount로 봉입하였다.

대조군으로 부신 수질이 포함된 조직을 양성대조로 삼았으며, 음성대조군으로 일차항체 대신 tris 완충액을 썼다.

면역학적 단백질 검출법(Western blot analysis)

난소와 해마 조직으로부터 NGF 단백질의 발현을 분석하기 위하여 면역학적 단백질 검출법을 사용하였다. 난소와 해마 조직은 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 2 mM Na_3VO_4 , 2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50 mM NaF, 2 mM EDTA (pH 7.4)와 단백질분해효소 억제제인 leupeptin과 aprotinin을 첨가한 NP-40 lysis buffer를 이용하여 총 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Dc Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 30 mg씩 같은 양을 정량하여 실험에 사용하였고 SDS 12%-polyacrylamide겔을 이용 전기영동을 통해 단백질을 분리했다. 분리한 단백질은 nitrocellulose 막으로 이동시킨 후, 5% skim milk in PBS-T를 이용하여 차단시켰고 PBS-T로 15분간 3번 세척 후, anti-rabbit NGF 항체(Abcam, UK)를 5% skim milk in PBS-T에 1:2,500으로 희석하여 넣고 4°C 에서 다음날까지 반응시켰다. 다음으로 PBS-T로 15분간 3번 세척하고 HRP (horseradish-peroxidase)가 붙어있는 goat-anti-rabbit 2차 항체 (Santa cruz biotechnology Inc, USA)를 5% skim milk in PBS-T에 1:10,000으로 희석하여 넣고 실온에서 1시간 동안 처리한 후 ECL (Amershampharmacia, UK)을 이용하여 발색시킨 후 현상하였다. 현상 후 나타난 단백질 밴드는 Science lab Image Gauge (FUJI FILM, JAP) 프로그램을 이용, anti-mouse β -actin 항체(Sigma, USA) 밴드를 대조군으로 하여 각 밴드의 밀도를 측정하여 정량하였다.

역전사중합효소반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

난소와 해마 조직을 적출한 후 Tri reagent (MRC Inc, Montgomery Rd, CIN, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. Superscript one-step reverse transcriptase (Invitrogen, USA)는 추출한 총 RNA 1 mg 으로부터 cDNA를 합성하기 위해 사용되었고, Ex Taq polymerase (TaKaRa Korea, Seoul, KOR)를 이용하여 Rat NGF PCR 반응을 수행하였다. Rat NGF 특이적 프라이머인 F-5'-CTTCAGCATTCCTG ACAC-3', R-5'-TGAGCACACACACGCAGGC-3', 크기: 592 bp를 제작하여(21) PCR을 수행하였으며 PCR 반응 후 생산물은 ethidium bromide가 첨가된 1.5% 아가로스 겔에 전기영동 후 UV를 조사하여 확인하였다. 전기영동을 통한 PCR 생산물의 양은 시각화된 밴드의 밀도를 통해 정량하기 위해

GAPDH 프라이머 F-5'-CCATGGAGAAGGCTGGG-3, R-5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3', 크기: 199 bp를 대조군으로 이용하여 수행했다. 랫드의 NGF PCR 수행 조건은 94°C 40초, 64°C 40초, 72°C 40초로 28주기였고 GAPDH는 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초로 29주기였다. 모든 PCR 반응에서 초기 변성 온도와 마지막 신장 온도는 각각 94°C 5분과 72°C 5분으로 하였다. 각 밴드의 밀도 측정은 Science lab Image Gauge (FUJI FILM, JAP) 프로그램을 이용하여 수행하였다.

통계처리

수치는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 측정된 항목의 결과에 대한 통계분석은 Student's t-test와 다중비교를 위한 Bonferroni 검정법을 사용하였다. 또한 p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

면역조직화학적 검사

난소는 oil 대조군의 경우 간질세포 및 협막세포에 약한 NGF 양성소견을 보이는 세포가 관찰되었다. 그러나, EV 투여군의 경우 많은 황체세포, 난포막세포 및 간질세포가 강한 NGF 양성소견을 보였다(Fig 1).

해마는 oil 대조군의 경우 신경세포에서 중등도의 NGF 양성소견을 보이는 세포가 관찰되었다. EV 투여군의 경우도 NGF 양성소견은 신경세포에서만 관찰되었으며 NGF 염색강

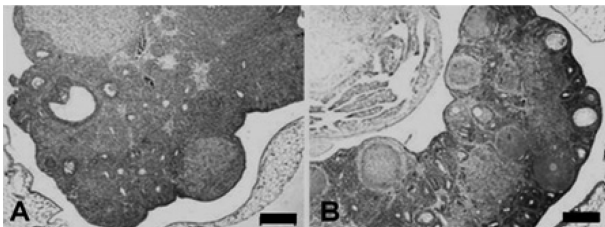


Fig 1. Immunohistochemical expression of NGF in ovary. A: Normal control group. Mild to moderate expression of NGF in the follicular cells and stromal cells. B: EV-treated PCO group. Strong expression of NGF in the follicular cells and stromal cells. ABC method, counterstained by hematoxylin. Scale bars = 100 μ m.

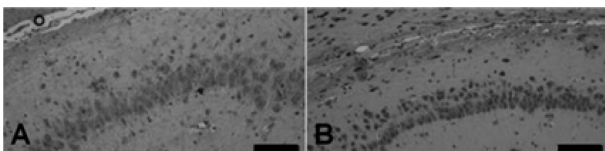


Fig 2. Immunohistochemical expression of NGF in hippocampus. A: Normal control group. Moderate expression of NGF in neurons of the hippocampus. B: EV-treated group. The intensity of NGF immunoreactivity in neurons of the hippocampus was slightly increased in the EV-treated PCO group. ABC method, counterstained by hematoxylin. Scale bars = 200 μ m.

도는 대조군과 큰 차이는 없었다(Fig 2).

NGF mRNA의 발현

난소 내 NGF mRNA의 발현은 oil 대조군보다 EV 투여군에서 유의성 있게 높았으나($p < 0.05$), 해마에서는 NGF mRNA의 발현이 유의성 있는 변화를 보이지 않았다(Fig 3).

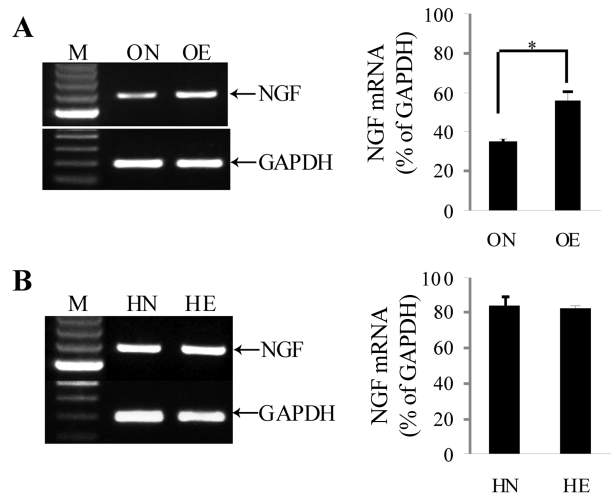


Fig 3. NGF mRNA levels of ovary (A) and hippocampus (B) in control and PCO rats treated with EV. NGF mRNA increased in the EV-treated PCO group. Values are given as mean \pm SD ($n = 3$ in each experimental group) normalized to GAPDH. A representative RT-PCR is shown at left. M, DNA marker; ON, ovary of oil control; OE, ovary of EV group; HN, hippocampus of oil control; HE, hippocampus of EV group; * $p < 0.05$ vs. oil control group.

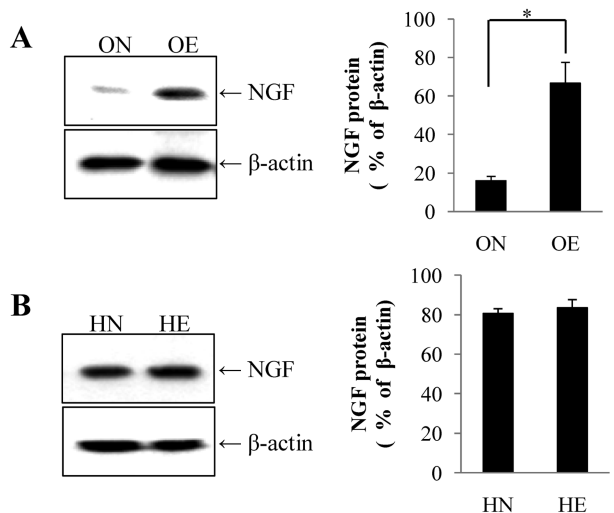


Fig 4. NGF protein levels of ovary (A) and hippocampus (B) in control and PCO rats treated with EV. Protein level of NGF was higher in the EV-treated PCO group than in the oil control group. Values are mean \pm SD ($n = 3$ in each experimental group) normalized for β -actin. A representative Western blot is shown at left. M, DNA marker; ON, ovary of oil control; OE, ovary of EV group; HN, hippocampus of oil control; HE, hippocampus of EV group; * $p < 0.05$ vs. oil control group.

NGF 단백질의 발현

Western blot을 통한 NGF 단백질의 발현을 조사한 결과 난소 내에서의 NGF는 oil 대조군 보다 EV 투여군에서 유의성 있게 높게 나타났으나($p < 0.05$), 해마에서는 NGF 단백질 발현이 유의성 있는 변화를 보이지 않았다(Fig 4).

고찰

다낭성난소증후군(PCOS)에서 난소변화의 특징은 양측 난소가 커지고 많은 수의 난포낭(follicular cyst)이 피질부에 나타나며, 내분비 교란에 의하여 초래되는 여러 증상과 함께 배란장애로 불임을 일으키게 된다(3,8,15,23). 그러나 난소의 양성 변화가 어떤 기전에 의하여 초래되는지는 아직 정확하게 알려진 바가 없다. Gonadotropin surge가 오랜 기간 동안 사라지게 되면 PCO가 초래된다는 가설(10)이 있는데, 이는 다양한 PCO 모델에 따라 기초 gonadotropin 수준(basal gonadotropin level)이 현저하게 다양하다는 사실이 이 가설을 지지해주며 이는 배란신호(ovulatory signal)를 받지 않은 커다란 이차난포(secondary follicle)가 단순히 낭(cyst)으로 멈춘 것으로 해석되었다. 그러나 EV 처치에 의하여 유발된 PCOS 질환모델의 경우 월경주기가 사라지고 무배란성으로 전환된다는 것은 황체호르몬(luteinizing hormone, LH) surge가 사라진다는 것인데, EV 처치 후 28일간 어떤 동물에서도 난포낭이 관찰되거나 난포낭 생성단계(precystic follicle)의 소견을 확인 할 수 없는 등 gonadotropin surge의 소실이 PCO의 원인일 것이라는 가설에는 여러 가지로 논란의 소지가 있다(5). EV에 의하여 유발된 PCO는 인간의 PCOS와 유사한 점이 많은데 이 질환모델 실험동물을 통하여 난소의 난포낭이 형성되기 수주 전에 난소로의 교감신경 출력(sympathetic outflow)이 유의하게 증가함을 관찰하고 PCOS의 발생기전에 신경계통이 관여한다는 사실을 알게 되었다(16). 난소의 기능은 난포성장, 스테로이드 분비, 배란을 조절하는 호르몬과 난소 내 여러 신호에 의하여 동시에 조절되는데, 최근의 연구 보고 등에 따르면 교감신경 지배가 난포성장(7,18)은 물론 난소의 스테로이드 합성(1,2)에 중요한 역할을 한다는 것이다. PCOS는 매우 복합적인 질환으로 말초의 교감신경 활성의 변화가 주요 원인으로 작용하였을 가능성이 있으며(17), 시상하부-뇌하수체(hypothalamic-pituitary) 축의 결함에 의하여 발생하는 점을 고려하면 중추신경계의 변화도 한 몫을 담당하였을 것으로 판단된다(11,20).

NGF는 신경세포 발생(neurogenesis)은 물론 신경세포의 성장 및 기능유지, 회복 등과 밀접한 관련이 있는 신경축진물질(neurotrophin)이다(27). 따라서 교감신경의 활성변화에 이상이 초래되면 NGF의 변화가 초래될 것으로 판단되어 PCOS 질환동물 모델을 통하여 PCOS 유발 전 후의 중추와 말초의 NGF 변화를 관찰하는 것은 매우 큰 의미가 있을 것으로 판단하였다. 본 연구의 경우 중추신경계의 변화는 NGF에 민감한 뉴런이 매우 풍부한 것으로 알려진 해마(24)를 관찰대상으로 하였으며, 말초의 경우는 해당 질환의 주된 표적장기인

난소를 대상으로 관찰하였다. 해마의 경우는 면역조직화학적 염색을 통하여 비교한 결과 PCOS 유발 전에 비하여 PCOS 유발군에서 NGF 양성인 신경세포(neuron)가 더욱 더 강하고 흔하게 관찰되는 경향을 보였으나 Western blot 분석결과 그 차이는 유의하지 않았다. 그러나 난소의 경우 PCOS 유발 전에 면역조직화학적으로 난포세포를 중심으로 약하게 발현되던 NGF는 PCOS 유발군에서 난포세포는 물론 간질세포에서도 강하게 발현되었으며 Western blot 분석결과 유의한 차이를 보였다. 즉, EV는 주로 난소의 난포 및 간질세포가 NGF를 다량 분비하게 하고, 이는 상난소신경(superior ovarian nerve)을 통하여 난소의 교감신경 출력을 높여 PCOS를 유발하였을 것으로 추측된다. 이와 같은 소견은 랫드에서 EV에 의해 유발된 PCO는 난소내 NGF의 합성증가와 NGF 수용체의 낮은 친화성(affinity)이 주된 원인이며, 난소를 지배하는 복강신경절 노르아드레날린성 신경원(celiac ganglion noradrenergic neurons)의 선택적 활성화에 의해 난포낭의 발달이 좌우되며, PCO가 발생된 랫드에 항NGF 혈청을 넣거나 저친화성 NGF 수용체가 있는 경우 이 수용체에 대한 antisense oligodeoxynucleotide를 난소에 주입하면 월경주기가 회복되고 배란이 유도됨을 확인하였다는 보고(16)와 일맥상통하는 결과이다. 또한 PCOS 발생에서 NGF 조절에 중추신경계, 특히 해마의 관여는 크지 않은 것으로 판단된다. 결국 조직이나 혈청내 존재하는 NGF의 양을 측정하여 PCOS를 객관적으로 진단 하거나 치료시술 후 추적관찰에 이용할 수 있을 것으로 판단되며, NGF 항체나 NGF 수용체의 친화성을 증가시키는 방법 등을 통하여 정확한 치료법 연구가 가능할 것으로 판단된다.

결론

EV에 의하여 유발되는 PCOS 발생 기전에 관여할 것으로 추정하였던 교감신경 활성화는 중추신경계보다는 주로 말초에서 작용하는 것으로 판단되며 NGF가 중요한 역할을 하는 것으로 파악되었다. 그러므로 향후 교감신경 활성화와 관련된 PCOS 연구는 중추보다는 말초단위에서 집중적인 연구가 필요할 것으로 판단되며 NGF를 이용한 PCOS의 진단 및 치료적 접근이 필요하다고 생각된다.

감사의 글

"이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임"(KRF-2006-521-E00126).

참고 문헌

1. Adashi EY, Hsueh AJW. Stimulation of beta 2-adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 1981; 108: 2170-2178.

2. Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 1982; 110: 1124-1132.
3. Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2434-2438.
4. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 1993; 133: 2696-2703.
5. Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod* 1986; 35: 647-655.
6. Chen BY. Acupuncture normalizes dysfunction of hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Acupunct Electrother Res* 1997; 22: 97-108.
7. Curry Jr TE, Lawrence Jr IE, Burden HW. Ovarian sympathectomy in the guinea pig. *Cell Tissue Res* 1984; 236: 257-263.
8. Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4006-4011.
9. Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Les Dees CW, Lara HE, Ojeda SR. A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology* 1996; 137: 198-209.
10. Farookhi R, Hemmings R, Brawer JR. Unilateral ovariectomy restores ovulatory cyclicality in rats with a polycystic ovarian condition. *Biol Reprod* 1985; 32: 530-540.
11. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; 28: 853-861.
12. Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski K. Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril* 2001; 75: 1141-1147.
13. Jensen JT. Evaluation of a new estradiol oral contraceptive: estradiol valerate and dienogest. *Expert Opin Pharmacother* 2011; 11: 1147-1157.
14. Jones GL, Hall JM, Balen AH, Ledger WL. Health-related quality of life measurement in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2008; 14(1): 15-25.
15. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3078-3082.
16. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 2000; 141: 1059-1072.
17. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 1993; 133: 2690-2695.
18. Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 1990; 126: 364-375.
19. Lee JC, Pak SC, Lee SH, Lim SC, Bai YH, Jin CS, Kim JS, Na CS, Bae CS, Oh KS, Choi BC. The effect of herbal medicine on nerve growth factor in estradiol valerate-induced polycystic ovaries in rats. *Am J Chin Med* 2003; 31: 885-895.
20. Lobo RA. The role of neurotransmitters and opioids in polycystic ovarian syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1988; 17: 667-683.
21. Lobos E, Gebhardt C, Kluge A, Spanel-Borowski K. Expression of nerve growth factor (NGF) isoforms in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF. *Endocrinology* 2005; 146: 1922-1929.
22. Martin KA, Chang RJ, Ehrmann DA. Evaluation and treatment of hirsutism in premenopausal women: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1105-1120.
23. Moran C, Tena G, Moran S, Ruiz P, Reyna R, Duque X. Prevalence of polycystic ovary syndrome and related disorders in Mexican women. *Gynecol Obstet Invest* 2010; 69: 274-280.
24. Rush RA, Mayo R, Zettler C. The regulation of nerve growth factor synthesis and delivery to peripheral neurons. *Pharmac Ther* 1995; 65: 93-123.
25. Parra C, Fiedler JL, Luna SL, Greiner M, Padmanabhan V, Lara HE. Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrous cycle and in the development of estradiol valerate-induced polycystic ovary. *Reproduction* 2007; 133: 147-154.
26. Zacharieva S, Kirilov G, Kalinov K, Shigarminova R, Nachev E, Orbetzova M, Atanassova I. Effect of different hormone replacement therapy regimens on circadian blood pressure profile and active renin in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2002; 16: 461-467.
27. Zhu W, Cheng S, Xu G, Ma M, Zhou Z, Liu D, Liu X. Intranasal nerve growth factor enhances striatal neurogenesis in adult rats with focal cerebral ischemia. *Drug Deliv* 2011; 18: 338-343.