

수컷 흰쥐 생식기관에서의 세로토닌 수용체 아형 유전자 발현

이 성 호[†]

상명대학교 생물학과

Expression of Serotonin(5-HT) Receptor Isotypes in Reproductive Organs of Male Rat

Sung-Ho Lee[†]

Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

ABSTRACT : 5-Hydroxytryptamine(5-HT; serotonin) system has been implicated in the modulation of male sexual behaviors and the secretion of reproductive hormones. In human males, selective serotonin re-uptake inhibitors(SSRIs) are known to improve the major male sexual dysfunction, premature ejaculation, through the central nervous system-mediated pathways. As numerous hormone and local factors, 5-HT may have peripheral role in the regulation of male sexual function. The expression of 5-HT receptor subtypes in the target tissue, however, has not been explored yet. The present study was undertaken to test whether the 5-HT receptor subtypes are expressed in the reproductive tissues of male rat, especially in ejaculatory machinery such as seminal vesicle and vas deferens. To do this, reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and Southern blot analysis were employed. The transcripts for the 1A, 1B and 2C subtypes of 5-HT receptor were amplified in all the tested tissues. The present study demonstrated the expression of 5-HT receptor in the rat ejaculatory machinery, suggesting that 5-HT may play a pivotal role in the male sexual function via not only central pathway but also peripheral route. Further study on the receptor subtype-specific effect and their harmonized mode of action will be needed to establish the understanding of ejaculation mechanism and drug design.

Key words : Serotonin receptor isotypes, Gene expression, Rat ejaculatory machinery.

요 약 : 세로토닌(serotonin, 5-HT)은 아민류 가운데 카테콜아민과 더불어 중요한 체내 생리 및 행동 조절을 담당하는 신경 전달물질이다. 특히 'Prozac'으로 잘 알려진 항우울제는 5-HT의 세포내 재흡수를 선택적으로 억제하는 약물(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)로써 광범위하게 사용중인 약물인데, 알려진 부작용으로 사정 능력의 변화가 관찰된다. 이는 5-HT에 의한 성 행동 또는 성 기능 조절기작이 있음을 의미한다. 본 연구에서는 수컷 흰쥐의 성 행동 조절에 관여함이 잘 알려진 5-HT의 중추 신경계 수준에서의 작용 외에 말초 조직 수준에서 직접 작용이 가능한가의 여부를 검증하기 위해서 정소, 정관, 저정낭 등 수컷 흰쥐의 생식 기관들을 대상으로 5-HT 수용체 아형들의 유전자 발현 여부를 조사하였다. 적출된 뇌, 정소, 정관, 저정낭, 음경해면체 등의 장기에서 추출한 total RNA로 5-HT 수용체 각 아형들에 대한 RT-PCR을 시행한 결과, 대조군인 뇌는 물론 모든 생식 기관에서 다양한 5-HT 수용체 아형들의 mRNA 발현을 확인할 수 있었다. 특히 사정 반응을 담당하는 최종 장기인 저정낭과 정관에서, 지금까지 여러 연구 결과에서 사정 현상에 관여할 것으로 추정되어 온 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C} 수용체 아형들이 실제로 발현됨을 관찰하였다. 이 결과는 5-HT에 의한 성 행동 조절이 중추 신경계 수준에서는 물론 말초 조직 수준에서도 직접 가능함을 시사하는 것이다. 본 연구의 시도와 같이 5-HT의 다양한 작용기전에 대한 조사는 포유동물 성 행동에 대한 이해 증진과 더불어 성기능 이상의 부작용이 적은 새로운 항우울제의 개발로 연결될 수 있다고 판단된다.

서 론

세로토닌(serotonin, 5-HT)은 아민류 가운데 카테콜아민과 더불어 각종 체내 생리 및 행동 조절을 담당하는 주요한 신경

전달물질이다. 신경내분비학적으로 5-HT는 GnRH-LH-steroid axis에 영향을 미치고, gonadal steroid는 5-HT 합성과 5-HT 수용체 발현을 조절한다는 보고들이 있다(Arias et al., 1990; Genazzani et al., 1997). 수컷 흰쥐의 성적 성숙에 있어서 5-HT 합성 저해제를 처리할 경우 생후 30일과 34일에는 효과가 없었으나, 40일과 44일에는 현저한 정자수 감소와 내분비 기능 저하가 관찰되었다(Shishkina & Borodin, 1989). 5-HT의 국

[†]교신저자: 서울시 종로구 홍지동 7, 상명대학교 생물학과. (우) 110-743, (전) 02-2287-5139, (팩) 02-394-9583, E-mail: shlee@smu.ac.kr

부적인 합성과 역할에 관해서, 흰쥐 정소에서 5-HT이 정소내 혈류와 vasomotion을 국부적으로 조절하고(Collin et al., 1996) androgen 합성을 조절한다는 보고가 있으며(Csaba et al., 1998), 신경입력 외에도 Leydig cell이 직접 5-HT를 생합성하는 것으로 나타났다(Tinajero et al., 1993). 그러나 정소와 같은 말초 조직에서의 5-HT 합성, 수용체 아형과 신호전달기작에 대한 정보는 전무한 실정이다.

한편 'Prozac'으로 잘 알려진 항우울제는 5-HT의 세포내 재흡수를 선택적으로 억제하는 약물(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)이 주종이며 현재 광범위하게 사용중인 약물인데, 알려진 부작용으로 사정능력의 변화가 관찰된다. 이는 5-HT에 의한 성 행동 또는 성기능 조절 기작이 있음을 의미한다. 현재까지 성기능을 조절하는 중추신경계의 신경전달물질에 관해서는 'dopamine positive/5-HT negative hypothesis'가 일반적으로 수용되고 있다(Gonzalez et al., 1982; McIntosh & Barfield, 1984). 즉, dopamine은 수컷 동물의 성반응을 촉진하는데 반하여 5-HT은 성욕, 교미, 사정현상을 포함하는 동물의 성반응을 억제하는 것으로 알려져 있다. 성반응의 여러 성분 중 사정현상의 억제성 조절에 있어 5-HT이 가장 중요한 역할을 담당함이 추정된다. 이와 관련되어 현재까지 16종 이상의 다양한 5-HT 수용체 아형들이 동정되어 있으며 일부 수용체들의 역할이 규명되어 있다. 본 연구에서는 수컷 흰쥐의 성기능 조절에 있어서 5-HT의 중추 신경계 수준에서의 작용 외에 말초 조직 수준에서 직접 작용이 가능한가의 여부를 검증하기 위해서 정소, 정관, 저정낭 등의 생식 기관들을 대상으로 5-HT 수용체 아형들의 유전자 발현 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

상명대학교 실험동물사육장에서 일정한 조명(14시간 조명, 10시간 소등)과 먹이와 물이 자유롭게 공급되는 조건에서 사육한 흰쥐(Sprague-Dawley strain)중 성숙한 수컷(생후 5~7개월)을 사용하였다.

2. RNA와 DNA의 분석

1) Total RNA 추출

Total RNA는 easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit(iNtRON)의 protocol에 따라 추출하였다. 조직의 5 volume의 easy-BLUE™(iNtRON)를 넣어 조직을 분쇄하여 1.5ml의 microcentrifuge tube에서 20%의 chloroform(Sigma)을 넣은 후 혼

합하고 4°C 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 새로운 microcentrifuge tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol(Sigma)을 넣어 최소 1시간 동안 -20°C에서 보관하였다. RNA 추출물을 4°C 13,000rpm에서 30분간 원심분리하여 pellet 생성 후 상층액을 제거하였다. Pellet은 70% ethanol(Merck)로 2회 세척한 후 공기 중에서 건조시켰다. RNA가 완전히 건조되기 직전에 0.1% DEPC(Sigma) DW 20 µl에 녹여 -40°C에 보관하였다.

2) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

추출한 1 µg의 total RNA를 주형으로 하고 0.5 µg의 dT₂₅ primer를 사용하여 65°C에서 10분간 반응하여 RNA와 dT₂₅ primer를 결합시킨 후 AccuPower™ RT Premix (Bioneer)를 사용하여 역전사시켰다. 반응 혼합물의 최종 volume은 20 µl로 하고 42°C에서 2시간 동안 배양하였으며 이후 reverse transcriptase를 94°C에서 5분간 불활성화 시켜 -20°C에 보관하였다. Table 1은 본 실험에서 실행된 PCR에 사용된 5-HT 수용체 아형들의 primer 염기서열을 나타낸 것이다. PCR은 1 µl의 RT-product를 주형으로 하여 최종 반응 volume은 20 µl로 하였으며, i-PRE PCR Pre-Mix kit(iNtRON)을 사용하여 행하여졌다. 각 PCR 반응 조건은 최초 94°C에서 2분간 denaturation을 1회 시행 후 denaturation(94°C, 30초), annealing (54°C, 30초), elongation(72°C, 1분) 과정을 35회 반복 실시한 후 최종적으로 1회 extension(72°C, 10분)을 시행하였다. 정량적인 분석이 필요할 경우 housekeeper gene인 glyceraldehyde-3-

Table 1. List of primers used in the RT-PCRs.

Isotype	Product size (bp)	Nucleotide sequence
5-HT1A	595	5' primer : gatgtgttcagtttggccagg 3' primer : ggagcgtccaaggcgatggca
5-HT1B	629	5' primer : actacattaccaggactccat 3' primer : cagtgacctgtacatggtgg
5-HT2A	265	5' primer : catcctgtatgggtaccggt 3' primer : aaagaccttccaatcatcctg
5-HT2B	223	5' primer : aggctacatggccccctcccact 3' primer : tagggactgggatggcgatg
5-HT2C	351	5' primer : tatecctgtatgggactgag 3' primer : gttgatagcctgcatggtgc
5-HT7	332	5' primer : aggattttggctacacgac 3' primer : gaggaacacggcagccagca

phosphate dehydrogenase(GAPDH) PCR을 행하였다. 반응산물의 크기는 전기영동(2% agarose gel)후 ethidium bromide 용액으로 염색한 후 ImagerIII(Bioneer)를 사용하여 정밀 정량을 시행하였다.

3) PCR 산물의 Southern Blot Analysis

PCR 산물들은 전기 영동으로 분리한 후 Nytran filter에 옮긴 다음 internal primer를 사용한 Southern blot을 시행하여 진위를 결정하였다(Sambrook et al., 1989).

결과 및 고찰

본 연구에서 중추신경계는 물론 말초성 생식 기관에서도 5-HT 수용체 아형들의 유전자가 발현됨을 확인하였다(Fig. 1). 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C} 수용체 아형들에 대한 RT-PCR 결과 예상된 산물이 검출되었고 다시 이를 Southern blot으로 검증한 결과 원하는 cDNA 산물이었음이 증명되었다. 정량적으

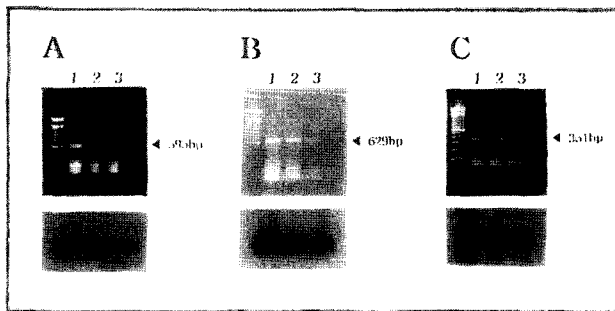


Fig. 1. RT-PCR for 5-HT receptor isotypes in the rat brain(1), seminal vesicle(2) and vas deferens(3). A, 5-HT_{1A} RT-PCR; B, 5-HT_{1B} RT-PCR; C, 5-HT_{2C} RT-PCR. M: marker(100bp DNA ladder).

Table 2. Comparison of transcriptional activities for 5-HT receptor isotypes in the rat reproductive tissues

	Brain	Seminal vesicle	Corpus callosum	Testis	Vas deferens
5HT1A	+++	++	++	+/-	++
5HT1B	+++	++	+++	+	+/-
5HT2A	++	+	+++	+/-	+
5HT2B	+	+	+	+	+/-
5HT2C	+++	++	++	+	+
5HT7	+++	+	++	+	+

The intensity of RT-PCR products were represented as +++ (strong), ++(moderate), +(weak), and +/- (faint).

로는 세 아형 공히 대뇌 피질(cerebral cortex) > 저정낭 > 정소 순이었다. 여타 5-HT 수용체 아형들에까지 확장하여 발현 정도를 조사한 결과 아형별로 조직특이적인 발현 차이가 관찰되었다(Table 2). 즉, 뇌를 제외했을 경우, 음경 해면체(corpus callosum)에서의 발현이 아형 전반에 걸쳐 왕성하였고, 다음이 저정낭이었고, 정관과 정소에서의 발현이 상대적으로 낮았다. 이 결과는 사정현상을 직접적으로 담당하는 장기인 저정낭과 정관에서, 지금까지 연구결과 사정현상에 관여할 것으로 추정되어 온 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C} 수용체 아형들이 발현되고 그 발현 정도가 차이가 있음을 최초로 증명한 것이다.

5-HT는 G-protein coupled receptor에 의하여 세포에 작용하는 것으로 밝혀졌으며, 현재까지 모두 7개의 family(5-HT₁~5-HT₇)에 속하는 16종의 아형이 확인되었다(Hoyer et al., 1994). 5-HT_{1A}는 연구가 가장 많이 진행된 수용체 아형으로써, 주로 중추신경계에 많이 분포하며 7개의 transmembrane domain을 지닌 G-protein coupled receptor로 밝혀졌다. 5-HT₁에는 5-HT_{1A}에서 5-HT_{1F}까지 5개 이상의 수용체 아형이 동정되었지만, 최근 인간에서 5-ht1E 및 5-ht1F가 새로이 cloning 되었으며, 이들은 모두 adenylate cyclase의 활성을 억제하는 것으로 밝혀졌다(McAllister et al., 1992; Adham et al., 1993; Lovenberg et al., 1993). 이들의 agonist는 응성 성행위의 촉진, 혈압 강하 및 음식 섭취량의 증가 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 우울증의 치료 효과를 지니는 것으로 추정되고 있다. 5-HT₂에 속하는 3개의 아형들(5-HT_{2A-C})은 phosphatidylinositol의 가수분해를 촉진하는 세포 내 신호전달체계를 갖는다(Hoyer et al., 1994). 본 연구 결과처럼 조직에 따라 다수의 5-HT 수용체 아형을 갖을 수 있으므로, 5-HT의 작용의 경우 각 아형들을 통한 동시다발적으로 상이한 조합의 신호전달체 활성화 혹은 억제과정을 거쳐 조직특이적인 반응이 일어날 것으로 예상된다.

성기능 이상은, 특히 남성의 경우, 삶의 질에 지대한 영향을 미친다. 부부간의 관계는 물론이고, 개인적으로는 자존심과 생활 활력의 저하 등에 의한 사회적인 고립에 이르게되는 등 심리적 장애로까지 발전할 수 있다. 남성 성기능 이상 중 가장 흔한 유형은 조루증으로 연령에 관계없이 약 30%의 남성에서 나타난다(Derogatis, 1980). 조루증은 가장 흔한 남성 성기능 이상의 유형임에도 불구하고 그 동안 조루증을 하나의 독립된 질환으로 인식하고 과학적으로 접근하여 해결하려는 노력들이 전무한 실정이다.

성기능에 미치는 5-HT의 역할이 주목받게 된 것은 항우울제로 사용되어 온 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressants,

TCAs)와 SSRI 복용 환자들에서 약물의 부작용으로 사정 지연 효과가 빈발한다는 보고로부터 비롯된다. 사정 현상에 관여하는 중추신경계 5-HT의 역할에 대한 구체적 증거는 아래와 같다. 첫째, 5-HT_{1A} 수용체 아형 길항제(agonist)인 8-OH-DPAT를 흰쥐에 투여하면 흰쥐의 중추신경계에서 5-HT neurotransmission을 감소시키고 사정 반응이 촉진되어 인간의 조루증과 유사한 상태를 유발한다(Ahlenius et al., 1989). 둘째, 척수의 반사성 발기추추를 억제하는 기능을 담당하는 연수 nucleus paragigantocellularis(nPGi)로부터의 하행신경(descending neuron)의 대부분은 5-HT 신경세포이다(McKenna, 1988).

치료를 받고있지 않는 주요 우울증 장애 환자들에서의 성기능 이상 유병률은 20~40%로 보고되고 있으며, 항우울제의 복용으로 이러한 유병률은 거의 45%에 이른다(Shabsigh et al., 1998). 항우울제는 일반적으로 여러 신경전달체계에 관여하므로 다양한 부작용이 문제점으로 지적되어 왔다. 그러므로 최근에는 우울증에 주로 관여하는 신경전달물질인 5-HT 경로에 선택적으로 작용하는 fluoxetine, paroxetine, sertraline 등의 SSRIs가 개발되어 널리 이용되고 있다(Waldinger et al., 1998). 이러한 5-HT계 항우울제의 심각한 부작용 중 가장 흔한 것이 사정의 지연이며 심지어는 극치감의 소실(anorgasmia)까지 야기할 수 있다. 실제로 이러한 성기능에 대한 SSRIs 계통 약제의 부작용은 우울증 환자가 약제를 잘 복용하지 않는 중요한 이유 중의 하나로도 거론되고 있다(Shabsigh et al., 1998). 이러한 맥락에서 볼 때 본 연구에서의 시도와 같이 5-HT의 말초 조직에서의 직접적인 작용에 대한 가능성에 대한 조사는 포유동물 성기능에 대한 이해 증진과 더불어 성기능 이상의 부작용이 적은 새로운 항우울제의 개발로 연결될 수 있다고 판단된다.

인용문헌

- Adham N, Borden LA, Schechter LE, Gustafson EL, Cochran TL, Vaysse PJJ (1993) Cell-specific coupling of the cloned human 5-HT_{1F} receptor to multiple signal transduction pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 348:566-575.
- Ahlenius S, Larsson K, Arvidsson LE (1989) Effects of stereoselective 5-HT_{1A} agonists on male rat sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 33:691-695.
- Arias P, Szwarcfarb B, de Rondina DC, Carbone S, Sverdlík R, Moguilevsky JA (1990) *In vivo* and *in vitro* studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in prepubertal and peripubertal female rats. *Brain Res* 523:57-61.
- Collin O, Damber JE, Bergh A (1996) 5-Hydroxytryptamine - a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. *J Reprod Fertil* 106:17-22.
- Csaba Z, Csernus V, Gerendai I (1998) Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis. *J Neuroendocrinol* 10:371-376.
- Derogatis LR (1980) Etiologic factors in premature ejaculation. *Med Aspects Hum Sexuality* 14:1168-1176.
- Genazzani AR, Lucchesi A, Stomati M, Catarsi S, Genazzani AD, Criscuolo M, Petraglia F (1997) Effects of sex steroid hormones on the neuroendocrine system. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2:63-69.
- Gonzales G, Mendoza L, Ruiz J, Torrejon J (1982) A demonstration that 5-hydroxytryptamine administered peripherally can affect sexual behavior in male rats. *Life Science* 31:2775-2781.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ (1994) VII international union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203.
- Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA (1993) A novel adenylyl-cyclase activating serotonin receptor(5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11:449-458.
- McAllister G, Charlesworth A, Snodin C, Beer MS, Noble AJ, Middlemiss DN (1992) Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5-HT_{1E}) : a fifth 5-HT₁-like subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5517-5521.
- McIntosh TK, Barfield RJ (1984) Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. II. Dopamine and the post-ejaculatory refractory period. *Behav Brain Res* 12:267-273.
- McKenna KE (1988) Central control of penile erection. *Int J Impot Res* 10:S25-S34.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shabsigh R, Klein LT, Seidman S, Kaplan SA, Lehrhoff BJ, Ritter JS (1998) Increased incidence of depressive symptoms

in men with erectile dysfunction. *Urology* 2:848-852.

Shishkina GT, Borodin PM (1989) Involvement of brain serotonin in regulation of sexual maturity in male rats. *Neurosci Behav Physiol* 19:145-149.

Tinajero JC, Fabbri A, Ciocca DR, Dufau ML (1993) Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology* 133:3026-

3029.

Waldinger MD, Berendsen HH, Blok BF, Oliver B, Holstege G (1998) Premature ejaculation and serotonergic antidepressants-induced delayed ejaculation: the involvement of the serotonergic system. *Behav Brain Res* 92:11-18.