

난소 절제 흰쥐의 뇌와 부신에서의 Catecholamine Biosynthesizing Enzyme들의 전사에 미치는 Estrogen의 효과

유경신¹ · 이종화 · 최돈찬² · 이성호[†]

상명대학교 생물학과, ¹상명대학교 대학원 생명공학과,
²용인대학교 자연과학대학 자연과학부

Effects of Estrogen on the Transcriptional Activities of Catecholamine Biosynthesizing Enzymes in the Brain and Adrenal Gland of Ovariectomized Rats

Kyong-Shin Ryu¹, Jong Hwa Lee, Donchan Choi² and Sung-Ho Lee[†]

Department of Biology, Sangmyung University

¹Department of Life Technology, Sangmyung University Graduate School, Seoul 110-743, Korea

²Division of Natural Sciences, Yong-In University, Yongin, Geonggi-do 449-714, Korea

ABSTRACT : Dopamine(DA), norepinephrine(NE), and epinephrine(E) belong to a class of neurotransmitters known as catecholamine (CA) which are synthesized and secreted by mammalian brain and adrenal medulla. CAs regulate several behavior patterns connected with breeding, and regulate GnRH-gonadotropin hormone axis' vitality between hypothalamus-pituitary gland linking with reproduction freeze.

The present study examined effects of sex steroid hormone on the transcriptional activities of CA biosynthesis enzymes, tyrosine hydroxylase(TH), dopamine β -hydroxylase(DBH), and phenylethanolamine-N-methyl transferase(PNMT). Mature female rats were ovariectomized(OVX) and implanted with 17 β -estradiol(E₂; 500 μ g/ml) or sesame oil. Forty-eight hours after implantation all the animals were sacrificed. Total RNAs were extracted immediately and were applied to semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). The expression level of TH was appeared by hypothalamus > SNc > adrenal medulla orders in OVX+Oil group, and by SNc > hypothalamus > adrenal medulla orders in OVX+E₂ group. Treatment with E₂ significantly increased TH expression in SNc and adrenal medulla, but in hypothalamus, the reduced TH expression was observed. The expression level of DBH was appeared by adrenal medulla > SNc > hypothalamus orders in OVX+Oil group and in OVX+E₂ group. Administration of E₂ significantly reduced DBH expression in SNc, and increased in adrenal medulla. Two cDNA products, large(PNMT1) and small(PNMT2) species of 110bp difference, were amplified in SNc and hypothalamus, but only PNMT2 was observed in adrenal medulla. The PNMT2 expression level was in the order of adrenal medulla > hypothalamus > SNc in both OVX+Oil and OVX+E₂ group. The PNMT2 expression in SNc and adrenal medulla was significantly increased by E₂.

The present report demonstrated that estrogen effects on transcriptional activities for CA biosynthetic enzymes were tissue specific in adrenal medulla as well as different region of brain. These results suggest that it might be crucial relationship between the type of estrogen receptor and CA enzyme gene expression.

Key words : Estrogen, Catecholamine, Brain, Adrenal gland, Ovariectomized rats.

요약 : 포유동물에서 뇌와 부신에서 합성·분비되는 카테콜아민(Catecholamine, CA)계 신경전달물질인 dopamine(DA), norepinephrine(NE), epinephrine(E)은 체내 각종 생리현상의 조절에 필수적이며, 생식과 관련된 기능으로는 시상하부와 뇌하수체 사이의 GnRH-gonadotropin 호르몬 축의 활성을 조절함 외에도 번식과 연관된 여러 행동양식을 조절함이 잘 알려져 있다. 본 연구는 카테콜아민 생합성 효소인 tyrosine hydroxylase(TH), dopamine β -hydroxylase(DBH), phenylethanolamine-N-methyl transferase(PNMT)의 유전자 발현에 영향을 미치는 sex steroid의 영향을 조사하였다. 성숙한 암컷 흰쥐의 난소를 제거(ovariectomy, OVX)하고 1주 경과 후 실험군과 대조군에 각각 17 β -estradiol(E₂; 500 μ g/ml)이 들어 있는 silastic capsule과 sesame oil이 들어 있는 silastic capsule을 이식시키고 48시간 후에 희생시켰다. 채취된 조직에서 mRNA를

[†]교신저자: 서울시 종로구 홍지동 7, 상명대학교 생물학과. (우) 110-743, (전) 02-2287-5139, (팩) 02-394-9585, e-mail: shlee@smu.ac.kr

추출한 후 semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 시행하였다. 그 결과로 (i) TH의 발현 정도는 OVX+Oil군에서는 시상하부 > Substantia nigra(SNc) > 부신 순으로, OVX+E₂군에서는 SNc > 시상하부 > 부신 순으로 나타났다. TH 발현에 미치는 estradiol의 효과로 SNc와 부신에서는 유의한 증가를 보인데 비해 시상하부에서는 유의한 감소를 관찰하였다. (ii) DBH 발현 정도는 OVX+Oil군과 OVX+E₂군에서 모두 부신 > SNc > 시상하부 순으로 나타났다. DBH 발현에 미치는 estradiol의 효과로 SNc에서는 유의한 감소를, 부신에서는 유의한 증가를, 그리고 시상하부에서는 감소하였으나 통계적 유의성이 없었다. (iii) PNMT의 발현의 경우 SNc와 시상하부에서는 이미 알려진 바와 같이 alternative splicing에 의해 110bp 차이의 크고 작은 두 형태의 cDNA(PNMT1과 PNMTs)가 증폭되었으나 부신에서는 작은 cDNA(PNMTs)만이 관찰되었다. PNMT1의 발현은 SNc가 시상하부보다 다소 높은 경향이었으나 유의성이 없었고, PNMTs의 발현 정도는 OVX+Oil군과 OVX+E₂군 모두에서 부신 > SNc > 시상하부 순으로 나타났다. PNMTs 발현에 미치는 estradiol의 효과로 SNc에서는 유의한 감소를, 부신에서는 유의한 증가를, 그리고 시상하부에서는 통계적 유의성은 없으나 증가하는 경향을 보였다.

본 연구에서는 카테콜아민 생합성 효소들의 유전자 발현의 조절에 미치는 estrogen의 영향이 세포기원이 neural crest cell 인 부신 수질은 물론 뇌의 상이한 지역간에서도 조직특이적임을 관찰하였다. 이러한 결과는 각 조직에서의 estrogen 수용체 유형의 차이, 작용 모드와 각 효소 유전자 발현 사이에 중요한 상관관계가 있음을 시사한다.

서론

포유동물의 대표적인 성호르몬인 estrogen은 시상하부 gonadotropin-releasing hormone(GnRH)과 뇌하수체 생식호르몬들의 합성과 분비는 물론 각종 성 행동 양식의 조절과 같은 뇌의 기능에 결정적인 영향을 미치는데, 이와 맞물려 다수의 신경전달물질의 합성과 분비에도 중요한 조절인자로 작용함이 알려져 있다(McEwen et al., 1997; McEwen & Alves, 1999). 한편 대표적인 신경전달물질인 카테콜아민(Catecholamine, CA)은 체내의 각종 생리현상의 조절에 필수적이며, 생식생리적으로는 시상하부-뇌하수체간 GnRH-gonadotropin 호르몬 축의 활성을 조절하는 기능 외에도 번식과 관련된 여러 행동양식을 조절함이 잘 알려져 있다(Genazzani et al., 1997). 따라서 estrogen과 CA 간에는 긴밀한 상호조절 관계가 형성되어 있음을 쉽게 예측할 수 있는데, 실제로 estrogen 수용체(ER α and ER β)가 시상하부나 뇌하수체 같이 직접적으로 신경내분비적으로 생식 기능을 조절하는 조직뿐만 아니라 substantia nigra(SNc), locus coeruleus(LC), 그리고 nucleus tractus solitarius 같은 CA 신경분포 지역에도 분포하고 있음이 보고되었다(Heritage et al., 1980; Haywood et al., 1999; Zhang et al., 2002).

주요 카테콜아민으로는 dopamine(DA), norepinephrine(NE), 그리고 epinephrine(E)이 있고, 이들 카테콜아민의 생합성 과정에는 여러 가지의 생합성 효소들이 관여하고 있는데, tyrosine hydroxylase(TH)는 L-tyrosine을 dihydroxyphenylalanine(DOPA)로, dopamine beta(β)-hydroxylase(DBH)는 DA를 N으로, phenylethanolamine-N-methyl transferase(PNMT)는 NE를

E로 전환시킨다(Cooper et al., 1996). 그런데 estrogen이 카테콜아민 생합성 과정의 rate-limiting enzyme인 TH의 유전자 발현에 미치는 영향은 광범위하게 연구되어 왔으나, DBH와 PNMT에 관한 연구는 극히 미비한 실정이다. 또 연구의 대부분이 뇌의 각 지역별로 면역조직화학법을 사용한 것으로서 생합성 효소들의 유전자 수준의 연구는 거의 이루어지지 않았다. 본 연구는 난소절제(ovariectomized) 후 estradiol(E₂) 또는 oil을 처리한 흰쥐 모델을 채택하여 DA neuron이 밀집한 뇌의 SNc와 생식내분비의 중추로써 DA와 NE 신경들이 존재하는 시상하부-preoptic area(POA), 그리고 말초성이지만 E의 최대 분비 조직인 부신에서의 TH, DBH, PNMT의 유전자 발현의 변화를 semi-quantitative RT-PCR로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 일정한 광주기(12시간 조명, 12시간 소등)와 먹이와 물의 접근이 자유롭게 사육한 생후 8주에서 12사이(200~250g)의 성숙한 암컷 흰쥐 (Sprague-Dawley strain)를 사용하였다. 난소절제술을 시행하고 일주일 후 실험군에는 17 β -estradiol(500 μ g/0.1ml sesame oil, Sigma)이 포함된 silastic capsule (Dow-Corning)을 넣어주고 대조군에는 동량의 sesame oil이 포함된 capsule을 넣어준 후 48시간 후 희생시키고, 즉시 조직을 얻어 total RNA를 추출하였다.

2. RNA와 DNA의 분석

1) Total RNA 추출

Total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method (Chomzynski & Sacchi, 1987)에 기초하여 제작된 easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit(iNtRON)의 protocol에 따라 추출하였다. 최종 pellet은 75% ethanol에 씻어주고 건조시킨 후 0.1% DEPC-water에 녹인 뒤 UV spectrophotometer로 정량하였다.

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

추출한 RNA중 1 μg를 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 반응시켰고, 이후 reverse transcriptase를 94°C에서 5분간 불활성화시켜 -20°C에 보관하였다. Table 1은 본 실험에서 실행된 PCR에 사용된 TH, DBH, PNMT, 그리고 GAPDH의 sense와 antisense primer들의 염기 서열을 나타낸 것이다. 일반적으로 PCR은 1 μl의 RT-product를 주형으로 하여 최종 반응 volume을 20 μl로 하였다. 각각의 전사물에 해당하는 primer들과 i-PRE PCR Pre-Mix kit (iNtRON)을 사용하여 수행하였으며, 각각의 PCR에 대한 최적 조건을 Table 2에 표시하였다. PCR은 DNA thermal cycler (MJ Research)를 사용하였다. PCR 산물들은 1.5% agarose gel(FMC Bioproduct)로 전기영동하여 분리하였고 0.5 μg/ml의 etidium bromide(Bioneer)로 염색하여 UV하에서 관찰하였으며, Imager III(Bioneer)를 사용하여 각각의 밴드 강도를 정밀 측정하였다.

Table 1. Oligonucleotide sequences of the primers used in PCRs for amplification of specific fragment of TH, DBH, PNMT and GAPDH mRNA

Gene	Sequence of primers	cDNA product
TH	5' primer : 5'-ATT GCA GAG ATT GCC TTC CA-3' 3' primer : 5'-CGC TGG ATA CGA GAG GCA TA-3'	742bp
DBH	5' primer : 5'-GCA TCC GTC TAC ACT ACA CA-3' 3' primer : 5'-GCA GAG GTC TTG TTA CAG TG-3'	666bp
PNMT	5' primer : 5'-GTC TGG ACA GGT CCT CAT TG-3' 3' primer : 5'-ATG ATG TAG GTG CGA AGG TC-3'	563bp
GAPDH	5' primer : 5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3' 3' primer : 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'	576bp

Table 2. Optimal conditions of RT-PCRs used in this study

Gene	Reaction condition			Number of cycle
	Denature	Annealing	Extension	
TH	94°C 1min	62°C 1min	72°C 1min	35
DBH	94°C 1min	60°C 1min	72°C 1min	35
PNMT	94°C 1min	58°C 1min	72°C 1min	35
GAPDH	94°C 30sec	50°C 30sec	72°C 30sec	35

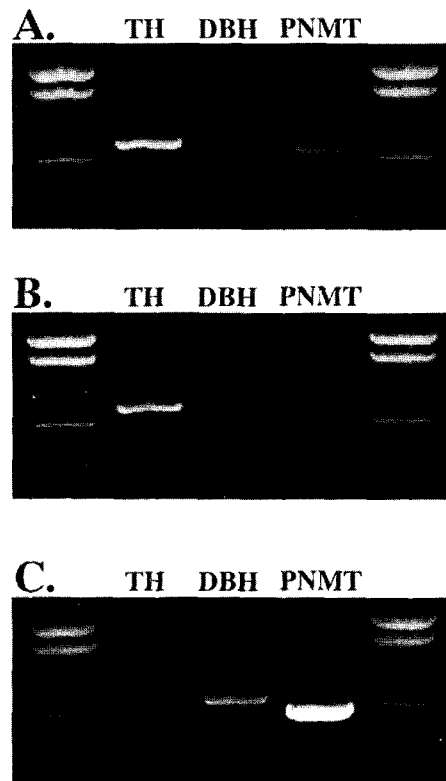


Fig. 1. Detection of transcripts for tyrosine hydroxylase(TH), dopamine β-hydroxylase (DBH) and phenylethanolamine N-transferase(PNMT) in the rat catecholamine producing tissues. (A), substantia nigra; (B), hypothalamus; (C), adrenal medulla.

결과 및 고찰

암컷 흰쥐 뇌의 SNc와 시상하부, 그리고 부신 수질에서 CA 생합성 효소인 TH와 DBH, 그리고 PNMT의 유전자 발현을 확인하기 위해 PCR을 수행한 결과 예상대로 TH는 742bp, DBH는 666bp의 PCR 산물이 관찰되었다(Fig. 1). PNMT 전사체는 alternative splicing에 의해 110bp정도의 intron2를 포함하는 PNMTI과 이를 포함하지 않는 PNMTs 두 종류가 존재하는 것이 이미 알려져 있다(Unsworth et al., 1999). 본 연구에서

RAT PNMT GENE

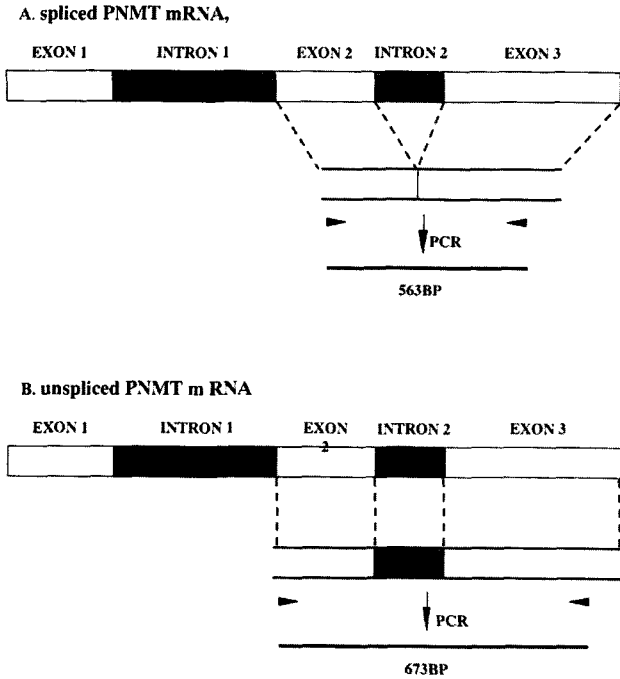


Fig. 2. Organization of the rat PNMT gene. The cartoon exhibited the design of the primers used in this study for the amplification of intron-retained and spliced PNMT mRNA.

도 SNc와 시상하부에서 PNMT RT-PCR 산물이 정확히 110bp 차이가 나는 673bp와 563bp의 두 종류의 밴드가 확인되었으며(Fig. 1A와 1B; Fig. 2), 부신 수질에서는 PNMTs 만이 존재함을 확인하였다(Fig. 1C). 실험에 사용된 조직 모두에서 TH, DBH, 그리고 PNMT의 유전자가 발현되었다. 그렇지만 SNc와 시상하부에서는 DBH나 PNMT에 비해 TH 유전자 발현이 상대적으로 높게 나타났으며, 부신에서는 PNMT 발현이 돋보였다. 이 결과는 TH가 뇌의 CA 신경세포에서 rate limiting enzyme라는 사실을 지지하며, E의 분비가 왕성한 수질에서 NE를 E로 전환시키는 PNMT의 유전자 발현이 상대적으로 왕성해야 하기 때문인 것으로 설명된다.

난소로부터의 자극, 특히 estrogen이 TH, DBH, PNMT 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 난소절제 후 스테로이드 보충 모델을 사용하였다. E₂을 처리하였을 때, TH 유전자 발현은 SNc와 부신에서는 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나, 시상하부에서는 대조군에 비해 0.5배 정도 감소하였다(Fig. 3). DBH 유전자 발현의 경우 역시 SNc와 부신에서는 E₂ 처리에 의해 발현이 증가하였지만 유의성은 없었고, 시상하부에서는 변화가 없었으며, 또한 시상하부에서의 DBH

발현 자체도 다른 두 조직에 비해 훨씬 낮은 수준이었다(Fig.

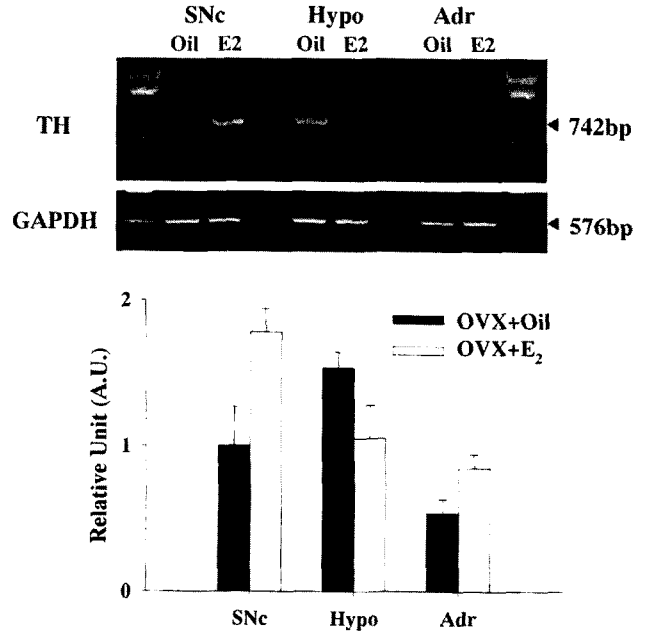


Fig. 3. Effect of estradiol-supplement on the changes in transcriptional activities of tyrosine hydroxylase(TH). SNc, substantia nigra; Hypo, hypothalamus; Adr, adrenal gland. Bars indicate the mean value (\pm S.E.) of repeated experiments (n=3).

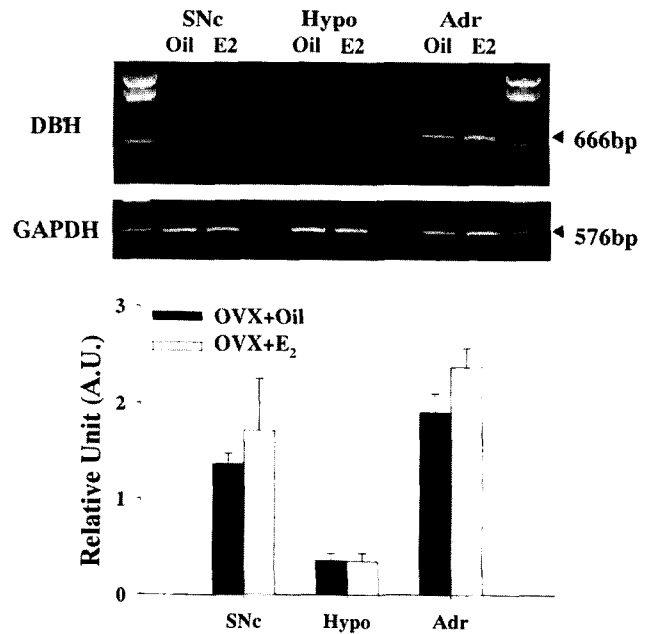


Fig. 4. Effect of estradiol-supplement on the changes in transcriptional activities of dopamine β -hydroxylase (DBH). SNc, substantia nigra; Hypo, hypothalamus; Adr, adrenal gland. Bars indicate the mean value (\pm S.E.) of repeated experiments (n=3).

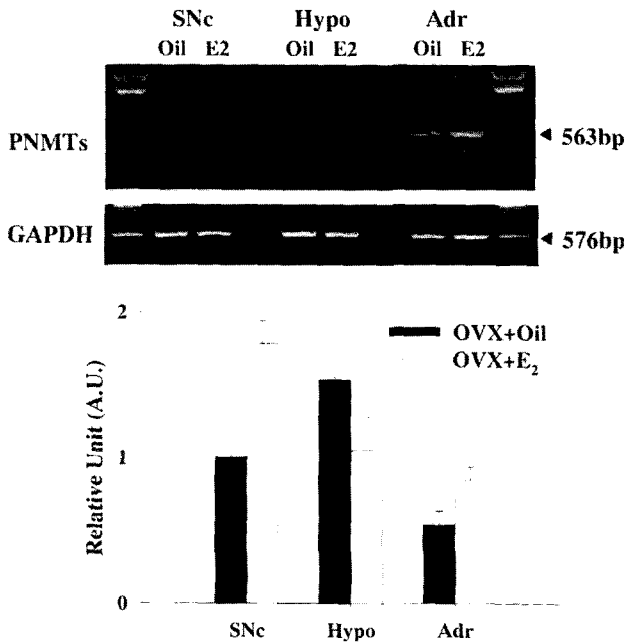


Fig. 5. Effect of estradiol-supplement on the changes in transcriptional activities of small phenylethanolamine N-methyl transferase(PNMTs). SNc, substantia nigra; Hypo, hypothalamus; ADR, adrenal gland. Bars indicate the mean value(±S.E.) of repeated experiments(n=3).

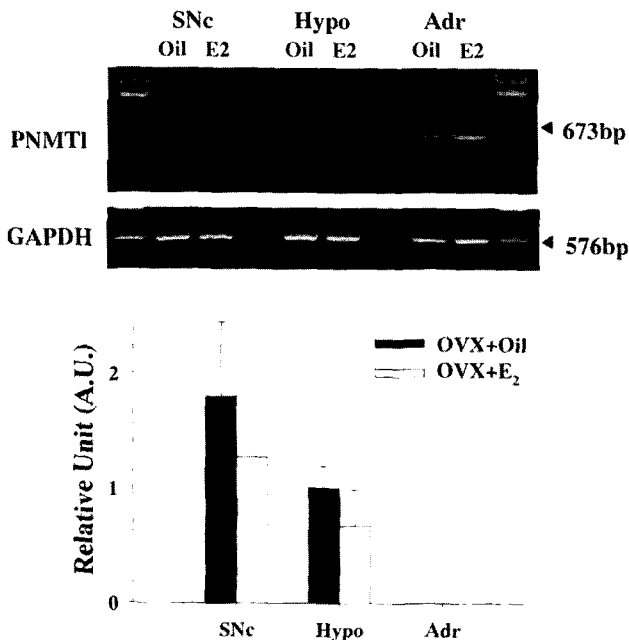


Fig. 6. Effect of estradiol-supplement on the changes in transcriptional activities of large phenylethanolamine N-methyl transferase(PNMTI). SNc, substantia nigra; Hypo, hypothalamus; ADR, adrenal gland. Bars indicate the mean value(±S.E.) of repeated experiments(n=3).

4). 한편 PNMT를 조직별로 PCR한 결과, SNc와 시상하부에서는 두 개의 alternative splicing 밴드가 모두 나타났으나 부신에서는 PMNTs만이 나타났으며, E₂ 처리시 SNc와 부신에서는 발현이 증가하였으나 시상하부에서는 감소하였다(Fig. 5). Oil 처리군에서 PNMTI의 유전자 발현은 시상하부에서보다 SNc에서 높게 나타났으며, E₂를 처리한 후 SNc와 시상하부 모두에서 PNMTI의 유전자 발현량이 감소하였다(Fig. 6).

포유동물 암컷의 경우 발정주기 중 각종 생식 호르몬들의 분비양상 변화와 같은 생리적인 변화 외에도 수컷에 대한 반응 차이와 같은 행동의 변화가 관찰된다. 이는 발정주기-신경전달물질 활성-생식 호르몬의 분비 양상과 성 행동(sexual behavior) 양식 사이에 긴밀한 상호 관련성이 있음을 의미하는 것이다. 특히 estrogen이 뇌의 여러 지역에서 생식이나 성적행동과 관련된 작용을 조절하며 신경질환의 원인 등과 깊이 연관되어 있음이 보고되었다(McEwen et al., 1997; McEwen & Alves, 1999; Fink et al., 1998). 흰쥐의 경우 체중 측정 시 또는 발정주기를 확인하기 위한 vaginal smear test를 시행할 경우 개체간 반응의 명확한 차이가 나타난다. 즉 높은 정서반응을 보이는 개체의 경우 hypothalamus-preoptic area 지역에서 5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)와 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)의 함량과 5-HIAA/serotonin 비율의 증가가 관찰되며 striatum 지역에서의 DOPAC과 DOPAC/DA 비율의 증가가 난소에서의 estrogen의 합성 분비가 낮은 시점인 diestrus-2 시기에만 관찰되었고, estrus 시기에는 striatum 지역에서 serotonin의 증가는 보이나 DA와 DOPAC/DA 비율은 감소하였다(Sfikakis et al., 1988). 시상하부의 DA 신경세포는 E₂ 또는 adenylate cyclase 활성제인 forskolin을 처리하였을 때 TH의 활성이 감소하였다(Arbogast & Hyde, 2000). 난소를 제거한 흰쥐와 원숭이의 locus coeruleus(LC)에서는 estrogen 투여에 의해 최초 몇 시간 동안은 TH mRNA가 높은 수준으로 증가하였다가 원상으로 회복됨이 관찰되었다(Pau et al., 2000). 이러한 현상들은 estrogen의 효과가 잘 알려진 24시간 이상 소요되는 genomic effect 외에도 뇌의 위치에 따라서 간접적으로 TH 등의 신경유전자의 전사를 조절하는 early response gene인 c-fos에 바로 영향을 주어 활성을 조절할 수 있음을 의미한다(Jennes et al., 1992; Nappi et al., 1997; Arrieta et al., 2000). 한편 정소를 제거한 흰쥐에 E₂를 처리하였을 때 nucleus tractus solitarius와 LC의 CA 신경세포에서 TH의 활성이 뚜렷하게 증가하였으므로, 이들 조직에서의 TH 발현에 미치는 estrogen의 효과가 적어도 성 특이적이지 않은 보편적인 것임을 의미한다(Liaw et al., 1992). 기타의 CA 생합성 조절 효소들의 유전자 발현의 경우, 암컷 흰쥐의 LC에서는 E₂

에 의해 DBH mRNA가 뚜렷하게 증가하였으며(Serova et al., 2002), 대뇌 기저부에서는 교미에 의한 자극으로 PNMT가 증가하는 것이 알려져 있다(Yang & Voogt, 2001).

본 연구에서는 CA 생합성 효소들의 유전자 발현 조절에 미치는 estrogen의 영향이 세포기원이 neural crest cell인 부신 수질은 물론 뇌의 상이한 지역간에서도 조직특이적임을 관찰하였다. 이러한 결과는 각 조직에서의 estrogen 수용체 유형의 차이, 작용 모드와 각 효소 유전자 발현 사이에 중요한 상관관계가 있음을 시사한다.

인용문헌

- Arbogast LA, Hyde JF (2000) Estradiol attenuates the foskoline-induced increase in hypothalamic tyrosine hydroxylase activity. *Neuroendocrinology* 71:219-227.
- Arrieta I, Camacho-Arroyo I, Mendoza-Rodriguez CA, Cerbon MA (2000) *c-fos* gene expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of defeminized rats. *Hippocampus* 10:483-491.
- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (1996) *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. New York: Oxford University Press.
- Fink G, Sumner BE, McQueen JK, Wilson H, Rosie R (1998) Sex steroid control of mood, mental state and memory. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:764-775.
- 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.
- Haywood SA, Simonian SX, van der Beek EM, Bicknell RJ, Herbison AE (1999) Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. *Endocrinology* 140:3255-3263.
- Heritage AS, Stumpf WE, Sar M, Grant LD (1980) Brainstem catecholamine neurons are target sites for sex steroid hormones. *Science* 207:1377-1379.
- Jennes L, Jennes ME, Purvis C, Ness M (1992) *c-fos* expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrus cycle and after steroid hormone treatments. *Brain Res* 586:171-175.
- Liaw JJ, HE JR, Hartman RD, Barraclough CA (1992) Changes in tyrosine hydroxylase mRNA levels in medullary A1 and A2 neurons and locus coeruleus following castration and estrogen replacement in rats. *Mol Brain Res* 13:231-238.
- McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Rev* 20:279-307.
- McEwen BS, Alves SE, Bulloch K, Weiland NG (1997) Ovarian steroids and the brain: Implications for cognition and aging. *Neurology* 48:58-65.
- Nappi RE, Bonneau MJ, Rivest S (1997) Influence of the estrus cycle on *c-fos* and CRH gene transcription in the brain of endotoxin-challenged female rats. *Neuroendocrinology* 65:9-46.
- Pau KY, Hess DL, Kohama S, Bao J, Pau CY, Spies HG (2000) Oestrogen upregulates noradrenaline release in the medio-basal hypothalamus and tyrosine hydroxylase gene expression in the brainstem of ovariectomized rhesus macaques. *J Neuroendocrinol* 12:899-909.
- Serova L, Rivkin M, Nakashima A, Sabban E (2002) Estradiol stimulates gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat locus coeruleus. *Neuroendocrinology* 75:193-200.
- Sfikakis A, Papadopoulou-Daifotis Z, Sfikaki M, Messari J (1998) Monoaminergic dysregulation on diestrus-2 and estrus through high emotional reactivity. *Pharmacol Biochem Behav* 60:285-291.
- Unsworth BR, Hayman GT, Carroll A, Lelkes PI (1999) Tissue-specific alternative mRNA splicing of phenylethanolamine N-methyltransferase(PNMT) during development by intron retention. *Int J Devl Neuroscience* 17:45-55.
- Yang SP, Voogt JL (2001) Mating-activated brainstem catecholaminergic neuron in female rat. *Brain Res* 894:159-166.
- Zhang JQ, Cai WQ, Zhou DS, Su BY (2002) Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. *Brain Res*. 935:73-80.