

## 수컷 흰쥐의 시상하부-뇌하수체 축 호르몬 유전자 발현에 미치는 6-Hydroxydopamine(6-OHDA)의 영향

허현진<sup>1</sup> · 안련섭<sup>2</sup> · 이성호<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>상명대학교 생명과학전공, <sup>2</sup>차의과대학 대체의학대학원

### Effect of 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) on the Expression of Hypothalamus-Pituitary Axis Hormone Genes in Male Rats

Hyun Jin Heo<sup>1</sup>, Ryun Sup Ahn<sup>2</sup> and Sung Ho Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

<sup>2</sup>Graduate School of Complementary and Alternative Medicine, CHA Medical University, Seoul 135-913, Korea

**ABSTRACT** : A neurotoxin, 6-hydroxydopamine (6-OHDA) has been widely used to create animal model for Parkinson's disease (PD) due to its specific toxicity against dopaminergic (DA) neurons. Since DA signals modulate a broad spectrum of CNS physiology, one can expect profound alterations in neuroendocrine activities of both PD patients and 6-OHDA treated animals. Limited applications of 6-OHDA injection model, however, have been made on the studies of hypothalamus-pituitary neuroendocrine circuits. The present study was performed to examine whether blockade of brain catecholamine (CA) biosynthesis with 6-OHDA can make any alteration in the transcriptional activities of hypothalamus-pituitary hormone genes in adult male rats. Three-month-old male rats (SD strain) were received 6-OHDA (200  $\mu$ g in 10  $\mu$ l of saline/animal) by intracerebroventricular (icv) injection, and sacrificed after two weeks. To determine the mRNA levels of hypothalamus-pituitary hormone genes, total RNAs were extracted and applied to the semi-quantitative RT-PCRs. The mRNA levels of tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme for the catecholamine biosynthesis, were significantly lower than those from the control group (control:6-OHDA=1:0.72 $\pm$ 0.02AU,  $p$ <0.001), confirming the efficacy of 6-OHDA injection. The mRNA levels of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and corticotropin releasing hormone (CRH) in the hypothalamus from 6-OHDA group were significantly lower than those from the control group (GnRH, control:6-OHDA=1:0.39 $\pm$ 0.03AU,  $p$ <0.001; CRH, control:6-OHDA=1:0.76 $\pm$ 0.07AU,  $p$ <0.01). There were significant decreases in the mRNA levels of common alpha subunit of glycoprotein hormones (Cg $\alpha$ ), LH beta subunit (LH- $\beta$ ), and FSH beta subunit (FSH- $\beta$ ) in pituitaries from 6-OHDA group compared to control values (Cg $\alpha$ , control:6-OHDA=1:0.81 $\pm$ 0.02AU,  $p$ <0.001; LH- $\beta$ , control:6-OHDA=1:0.68 $\pm$ 0.04AU,  $p$ <0.001; FSH- $\beta$ , control:6-OHDA=1:0.84 $\pm$ 0.05AU,  $p$ <0.001). Similarly, the level of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) transcripts from 6-OHDA group was significantly lower than that from the control group (control:6-OHDA=1:0.86 $\pm$ 0.04AU,  $p$ <0.01). The present study demonstrated that centrally injected DA neurotoxin could down-regulate the transcriptional activities of the two hypothalamus-pituitary neuroendocrine circuits, i.e., GnRH-gonadotropins and CRH-ACTH systems. These results suggested that hypothalamic CA input might affect on the activities of gonad and adrenal through modulation of hypothalamus-pituitary function, providing plausible explanation for frequent occurrence of sexual dysfunction and poor stress-response in PD patients.

**Key words** : 6-OHDA, Hypothalamus-pituitary axis, GnRH-gonadotropins, CRH-ACTH, Parkinson's disease.

**요약** : 6-hydroxydopamine(6-OHDA)는 파킨슨 질환 동물 모델의 제조에 널리 사용되는 신경독소로 도파민성 뉴런에 대한 특이적인 독성을 나타낸다. 도파민 신호는 중추신경계의 광범위한 영역에서 생리 기능을 조절하는데, 이에 따라 파

킨슨병 환자와 6-OHDA를 처리한 동물들의 신경내분비 활성화에 극심한 변화가 있을 것으로 예상할 수 있다. 하지만 6-OHDA 주사 모델에서 시상하부-뇌하수체 신경내분

\* 교신저자: 서울시 종로구 홍지동 7 상명대학교 생명과학과. (우) 110-743, (전) 02-2287-5139, (팩) 02-2287-0070, E-mail: shlee@smu.ac.kr

비 회로에 관한 연구들은 전무한 실정이다. 본 연구는 6-OHDA에 의한 뇌 카테콜아민 합성의 차단이 성체 수컷 흰쥐의 시상하부-뇌하수체 호르몬 유전자들의 전사 활성화에 일으키는 변화를 조사한 것이다. 생후 3개월의 수컷 흰쥐(SD strain)에 개체 당 200  $\mu\text{g}$ 의 6-OHDA를 10  $\mu\text{l}$ 의 생리식염수에 녹여 뇌실 내 주사(icv)하였고, 2주 후에 모든 실험동물들을 희생시켰다. 시상하부-뇌하수체 호르몬 유전자들의 mRNA 수준을 조사하기 위해 total RNA를 추출하여 반-정량적 RT-PCR을 시행하였다. 카테콜아민 생합성에서 속도조절효소로 작용하는 tyrosine hydroxylase(TH)의 경우 6-OHDA군에서 대조군에 비해 유의한 발현 감소가 나타났고(대조군:6-OHDA군=1:0.72 $\pm$ 0.02AU,  $p$ <0.001), 이를 통해 6-OHDA 주사의 효력을 확인하였다. 시상하부에서 gonadotropin-releasing hormone(GnRH)과 corticotropin releasing hormone(CRH)의 mRNA 수준은 6-OHDA군이 대조군에 비해 유의하게 낮았다(GnRH, 대조군:6-OHDA군=1:0.39 $\pm$ 0.03AU,  $p$ <0.001; CRH, 대조군:6-OHDA군=1:0.76 $\pm$ 0.07AU,  $p$ <0.01). 뇌하수체에서 glycoprotein hormone들의 공통적인 alpha subunit(Cg  $\alpha$ )과 LH beta subunit(LH- $\beta$ ) 그리고 FSH beta subunit(FSH- $\beta$ )의 mRNA 수준의 경우 모두 6-OHDA군에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다(Cg  $\alpha$ , 대조군:6-OHDA군=1:0.81 $\pm$ 0.02AU,  $p$ <0.001; LH- $\beta$ , 대조군:6-OHDA군=1:0.68 $\pm$ 0.04AU,  $p$ <0.001; FSH- $\beta$ , 대조군:6-OHDA군=1:0.84 $\pm$ 0.05AU,  $p$ <0.01). 이와 유사하게, 6-OHDA군에서의 뇌하수체 adrenocorticotrophic hormone(ACTH) 전사 수준 역시 대조군에 비해 유의하게 낮았다(대조군:6-OHDA군=1:0.86 $\pm$ 0.04AU,  $p$ <0.01). 본 연구는 중추신경계로의 도파민 신경독소 주입에 의해 두 가지의 시상하부-뇌하수체 신경내분비 회로인 GnRH-성선자극호르몬 회로와 CRH-ACTH 회로의 전사 활성화가 하향 조정됨을 증명하였다. 이러한 결과는 시상하부로의 CA 입력은 시상하부-뇌하수체 기능 조절을 통해 생식소와 부신의 활성화에 영향을 미침을 시사하는 것으로, 파킨슨병 환자들에게서 빈번하게 발생하는 성 기능 장애와 열악한 스트레스 반응을 설명할 단서를 제공한다.

## 서 론

특정 뉴런에 선택적인 신경독소를 사용한 실험동물 모델은 뇌 병리생리학 연구에 큰 기여를 해왔는데, 그 가운데 6-hydroxydopamine(6-OHDA)는 뇌에 직접 주사할 경우 도파민(dopamine, DA) 뉴런에 대한 선택적인 독성을 나타내므로 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD) 동물 모델의 제조에 널리 사용되고 있다(Kostrzewa & Jacobowitz, 1974; Deumens et al., 2002). 이 모델은 PD 발병 기작을 규명하고 카테콜아민 뉴런의 생존/지속 연장을 위한 직접적인 약물과 세포치료법 개발 및 스테로이드 보충요법(steroid replacement therapy)이나 운동요법과 같은 보조 치료법을 개발하는 연구에 많이 이용되어 왔지만, 운동 기능 조절과 같은 PD에 직접적으로 관련된 측면을 제외한 여타 뇌 생리 분야, 특히 시상하부-뇌하수체 호르몬 조절 축의 활성화 조절과 관련된 연구에는 극히 제한적으로 사용되었다.

DA 뉴런 사멸로 인한 DA 고갈과 작용 감소를 보충하는 것이 현재의 PD 치료 목표이므로 경구투여시 뇌혈관 장벽을 통과할 수 있는 DA 생합성 과정의 전구물질인 levodopa나 DA agonist(예, bromocriptine 또는 2-bromo-alpha-ergocryptine)들이 널리 사용되고 있다(Ramaker & van Hilten, 2000; Stacy & Galbreath, 2008). DA이 뇌하수체 전엽의 lactotrope로 부터의 prolactin(PRL) 분비를 억제하는 내인성 시상하부 요인

이라는 점에서 이들 약물은 PRL 분비 억제를 야기하여 궁극적으로 PRL과 관련된 시상하부-뇌하수체-표적기관의 활성화 전체에 영향을 미치며(Ben-Jonathan & Hnasko, 2001), 역으로 PD에서 뇌내 DA 신호 부족은 PRL 분비 상승과 그에 따른 생리 기능 조절의 변화를 초래할 수 있다(Otake et al., 1994). 또한 운동 기능 조절 능력 상실이라는 PD의 주 증상 외에도 성기능 장애, 우울증, 수면장애 등 부수적인 증상들을 고려할 때 다수의 신경(내분비)회로의 교란과 전신적인 조절 기능 변화를 예상할 수 있으나(Carrasco & van de Kar, 2003; Calne & Kumar, 2008), 이에 대한 연구는 매우 부족한 상태이다.

따라서 본 연구는 전신적인 내분비 생리 조절이라는 관점에서 시상하부 DA와 norepinephrine(NE) 고갈이 생식호르몬 조절 축(시상하부-뇌하수체-생식소)과 스트레스 호르몬 조절 축(시상하부-뇌하수체-부신)의 활성화 변화를 초래하리라 가정하고, 6-OHDA를 시상하부에 주입하는 흰쥐 모델을 사용하여 시상하부-뇌하수체 신경내분비 회로들에서 GnRH-gonadotropin 그리고 CRH-ACTH의 발현 양상을 전사 수준에서 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 일정한 온도와 광주기

(18~22°C; 12시간 조명, 12시간 소등), 먹이와 물 섭취가 자유로운 상태(*ad libitum*)에서 사육한 Sprague-Dawley(SD) strain 흰쥐를 사용하였다. 생후 3개월(250~300 g B.W)된 성숙한 수컷 흰쥐에 개체 당 5 mg/kg의 Zoletil(Virbac, France)을 복강 주사하여 마취시켰다. 우측 lateral ventricle(LV; coordinates: anterior-posterior, -0.4 mm; lateral, ±1.4 mm; dorsoventral, -3.8 mm)에 약물을 미세 주입하기 위해 마취된 흰쥐를 뇌정위고정장치(stereotaxic instrument, Stoelting, USA)를 이용하여 두부를 편평하게 고정시킨 후, 피부를 절개하여 두개를 노출시키고 rat brain atlas(Paxinos & Watson, 1998)를 참조하여 bregma를 기준으로 후방 0.4 mm, 외측 1.4 mm의 위치에 micromotor drill(Foredom, USA)를 이용하여 천공을 만들었다. 뇌정위 고정 장치에 Hamilton 주사기(Hamilton Co, USA)를 부착하여 천공을 통해 삽입하여 대뇌 표면에서 3.8 mm의 깊이로 위치시키고 6-OHDA(200 µg in 10 µl saline/rat)을 1 µl/min의 속도로 주입하였으며, 대조군에는 vehicle로 사용된 saline을 동량 주입하였다. 미세 주입 위치인 LV는 효과적인 시상하부 CA 고갈을 야기하는 부위를 기존의 보고들을 참고로 선정하였다(Selvage et al., 2004; Monda et al., 2007). 모든 실험동물들은 투여 후 2주간의 회복기를 거

친 후, 오후 6시에 일괄적으로 희생시켰다.

## 2. RNA 추출과 Semi-Quantitative RT-PCR

시상하부 조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 방법(Chomzynski & Sacchi, 1987)에 따라 추출하였다. 1 µg의 total RNA를 주형으로 oligo d(T)<sub>15</sub> primer를 포함한 maxime RT premix(iNtRON, Korea)를 사용하여 최종반응 volume 20 µl로 역전사하였다. PCR 반응은 1 µl의 역전사 산물을 주형으로 하여 각각의 전사물에 해당하는 primer들과 Taq DNA polymerase(Takara, Japan)를 사용하였다. Table 1은 본 실험에서 사용된 primer들의 염기서열과 annealing 온도를 표시하였다. PCR 산물은 전기영동으로 분리하였고, ethidium bromide로 염색 후 imager III-1D main software(Bioneer, Korea)로 정량하였다. 정량을 위한 internal control PCR에서는 GAPDH primer를 사용하였다.

## 3. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's *t*-test에 의해 *p* 값이 0.05보다 작은 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

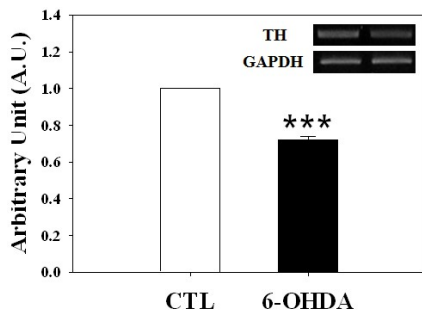
**Table 1. Primer sequences for semi-quantitative RT-PCR analyses**

| Gene  | Accession number | Primer sequence   | Product size (bp) | AT (°C) |
|-------|------------------|---|-------------------|---------|
| GAPDH | NM_017008        | F 5'- CCATCACCATCTTCCAGGAG<br>R 5'- CCTGCTTCACCACCTTCTTG  | 576               | 50      |
| TH    | NM_012740        | F 5'- ATTGCAGAGATTGCCTTCCA<br>R 5'- CGCTGGATACGAGAGGCATA  | 743               | 62      |
| GnRH  | NM_012767        | F 5'- TTCCATCACAAGCTTTCAGG<br>R 5'- GTGTGACACACTCGTTATTC  | 234               | 62      |
| Cgα   | BC_063160        | F 5'- ATACTTCTCCAAGCTGGGTG<br>R 5'- CGACACTCAGTGCCATCGCA  | 294               | 60      |
| LH-β  | NM_012858        | F 5'- ATGGAGAGGCTCCAGGGGCT<br>R 5'- CAGAAGAGGAGAAGGCCGG   | 425               | 68      |
| FSH-β | BC_168724        | F 5'- CCATGATGAAGTCGATCCAG<br>R 5'- CTTATGGTCTCGTACACCAG  | 304               | 63      |
| CRH   | NM_031019        | F 5'- CGCAGCCGTTGAATTTCTTG<br>R 5'- TGGCCAAGCGCAACATTTC   | 469               | 60      |
| ACTH  | BC_058443        | F 5'- ATGCCGAGATTCTGCTACAG<br>R 5'- AGCTCCCTCTTGAACCTCTAG | 497               | 60      |

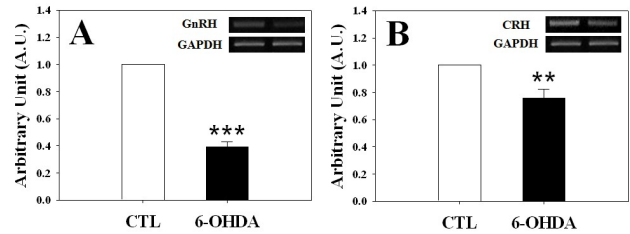
F: forward, R: reverse, AT.: annealing temperature.

## 결 과

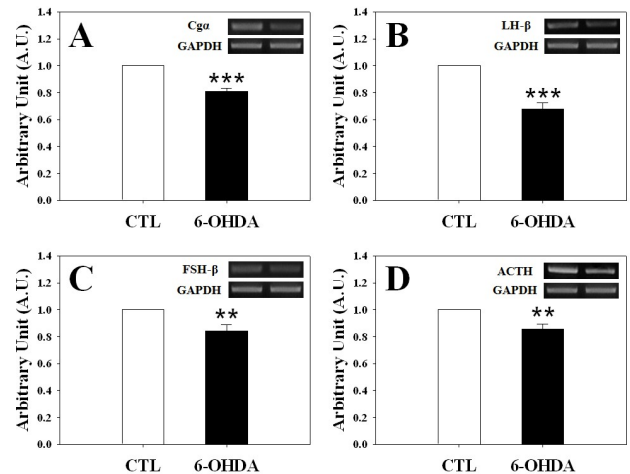
성체 수컷 흰쥐에 개체 당 200  $\mu\text{g}$ 의 6-OHDA를 뇌실 내 주사(10  $\mu\text{l}$ )하고 2주후 시상하부와 뇌하수체에서의 호르몬 유전자 발현의 변화를 정량적 RT-PCR로 측정하였다. 시상하부에서의 CA 생합성에서 속도조절 효소로 작용하는 TH mRNA 수준을 조사한 결과, 6-OHDA군에서의 발현 수준이 대조군에 비해 유의하게 낮았다(대조군:6-OHDA군=1:0.72 $\pm$ 0.02AU,  $p<0.001$ , Fig. 1). 이 결과는 본 연구에서 선정된 LV에 미세주입한 6-OHDA에 의해 효과적으로 시상하부 CA 생합성이 저해됨을 의미한다. 시상하부에서의 GnRH mRNA 수준을 조사한 결과, 6-OHDA군에서 대조군에 비해 유의한 발현 감소가 나타났고(대조군:6-OHDA군=1:0.39 $\pm$ 0.03AU,  $p<0.001$ , Fig. 2A), 이와 유사하게 시상하부에서의 CRH mRNA 수준 역시, 6-OHDA군이 대조군에 비해 유의하게 낮았다(대조군:6-OHDA군=1:0.76 $\pm$ 0.07AU,  $p<0.01$ , Fig. 2B). 시상하부 GnRH의 입력을 받는 뇌하수체 전엽에서의 *Cg $\alpha$* 와 LH- $\beta$  그리고 FSH- $\beta$  mRNA의 발현양상을 조사한 결과, *Cg $\alpha$* 의 경우 6-OHDA군에서의 발현 수준이 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며(대조군:6-OHDA군=1:0.81 $\pm$ 0.02AU,  $p<0.001$ , Fig. 3A), LH $\beta$ 의 발현 수준 역시 6-OHDA군이 대조군에 비



**Fig. 1. Semi-quantitative RT-PCR analysis of TH expression in the hypothalamus from the rats.** RT-PCR analyses showing the lower expression level of TH mRNA when the rats were treated with 6-OHDA by icv injection compared with control group. GAPDH was used as an internal control. Semi-quantitative RT-PCR was carried out as described in 'Materials and Methods'. A typical pattern (inset gel photo) of RT-PCR result is presented from five replicate experiments. Values are expressed as mean $\pm$ S.E. \*\*\*, Significantly different from control group,  $P<0.001$ .



**Fig. 2. Semi-quantitative RT-PCR analysis of GnRH (A) and CRH (B) expressions in the hypothalamus from the rats.** RT-PCR analyses showing the lower expression level of GnRH (A) and CRH (B) mRNAs when the rats were treated with 6-OHDA by icv injection compared with control group. Values are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=5). \*\*, Significantly different from control group,  $P<0.01$ . \*\*\*, Significantly different from control group,  $P<0.001$ .



**Fig. 3. Semi-quantitative RT-PCR analysis of *Cg $\alpha$*  (A), LH- $\beta$  (B), FSH- $\beta$  (C) and ACTH (D) expressions in the pituitaries from the rats.** RT-PCR analyses showing the lower expression level of *Cg $\alpha$*  (A), LH- $\beta$  (B), FSH- $\beta$  (C) and ACTH (D) mRNAs when the rats were treated with 6-OHDA by icv injection compared with control group. Values are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=5). \*\*, Significantly different from control group,  $P<0.01$ . \*\*\*, Significantly different from control group,  $P<0.001$ .

해 유의하게 낮았다(대조군:6-OHDA군=1:0.68 $\pm$ 0.04AU,  $p<0.001$ , Fig. 3B). 또한, FSH- $\beta$  전사 수준의 경우도 6-OHDA 뇌실 내 주사에 의해 유의하게 감소하였다(대조군:6-OHDA군=1:0.84 $\pm$ 0.05AU,  $p<0.01$ , Fig. 3C). 유사하게, 시상하부

CRH의 입력을 받는 뇌하수체 전엽의 ACTH 전사 수준도 6-OHDA군에서의 발현 수준이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(대조군:6-OHDA군=1:0.86±0.04AU,  $p<0.01$ , Fig. 3D).

## 고 찰

본 연구는 6-OHDA 주사로 시상하부-뇌하수체 신경내분비 회로 가운데 GnRH-gonadotropin과 CRH-ACTH 유전자 발현이 *in vivo* 조건에서 유의하게 감소함을 최초로 증명한 것이다. 선조체 도파민계(mesostriatal dopaminergic system)는 추체 외로 운동(extrapyramidal motor)의 조절에 매우 중요하며, 이 시스템의 손상이 PD의 발병과 증상 악화에 직접적으로 연관된 잘 알려진 사실이다(Parmer & Zinder, 2002; Deumens et al., 2002). CA 중 특히 DA 뉴런에 대한 신경독소인 6-OHDA는 뇌에 주사하였을 때, 주요 CA 입력인 NE와 DA의 결핍을 유도할 수 있다(Grünblatt et al., 2000). 대조적으로, 6-OHDA를 복강 내에 주사할 경우 말초 조직 내에서 화학적인 말초자율신경절제(chemical sympathectomy)를 유도하지만 중추신경계의 NE 뉴런에는 영향을 미치지 않는데, 이는 6-OHDA가 뇌-혈관 장벽(blood-brain barrier)을 통과하지 못하기 때문이다(Kostrzewa & Jacobowitz, 1974). 이처럼 뇌 내로 직접 주입해야 한다는 사용상의 불편함을 지니고 있음에도 불구하고, 선택적이고 효과적인 신경독소 작용 때문에 6-OHDA 실험동물 모델은 PD 관련 연구에 매우 유용하다.

시상하부에서 CA 신경 말단들이 GnRH 뉴런과 시냅스를 형성하여 GnRH 분비를 자극하고, 이 신경회로에 난소로부터의 스테로이드 호르몬에 의한 피드백이 일어나 뇌하수체 전엽의 LH와 FSH 분비가 조절됨을 규명한 것은 신경내분비학의 태동기에 거둔 성공적인 업적 중 하나이다(Advis et al., 1980; Negro-Vilar et al., 1982; Kalra & Kalra, 1985). 이와 같은 시상하부-뇌하수체 신경내분비 회로의 활성 조절을 이해하는데 6-OHDA 주사 흰쥐 모델을 사용한 고전적인 연구들이 큰 공헌을 했다. 예를 들어, 난소 절제 후 스테로이드를 보충한 미성숙한 흰쥐 또는 정상 암컷 흰쥐에 6-OHDA를 시상하부 NE의 신경 입력 경로인 ventral noradrenergic tract(VNAT) 부위에 주사할 경우 프로그스테론에 의해 유도되는 LH와 FSH 분비 증가는 물론 proestrus 시기의 LH surge도 차단됨이 보고되었다(Martinovic & McCann, 1977).

또한, 시상하부 NE 입력을 지속적으로 차단하기 위해 6-OHDA를 시상하부 내에 이식한 난소 절제 후 스테로이드를 보충한 미성숙한 흰쥐에서, 특히 preoptic-anterior hypothalamic area(POA-AH)와 suprachiasmatic nucleus(SCN) 부위에서의 NE 고갈과 GnRH 함량 감소, 그리고 혈중 LH와 FSH 감소가 일어났다(Simpkins & Kalra, 1979). 이후 NE 입력에 의해 시상하부 GnRH의 분비뿐만 아니라 유전자 발현도 증가함이 *in vitro* 기관 배양 실험을 통해 증명되었는데, 6-OHDA 처리는 농도와 시간 의존적으로 NE 분비를 감소시켰으며, 2.5 시간 배양 후 GnRH mRNA 수준을 유의하게 감소시켰고, NE( $1 \times 10^{-6}$ M)을 추가로 처리할 경우 정상 수준으로 회복하였다(Kim et al., 1993). 동 연구자들은 난소 절제 후 스테로이드 보충 흰쥐 모델을 사용하여 dopamine  $\beta$ -hydroxylase(D $\beta$ H)의 억제제로 알려진 diethyldithiocarbamic acid(DDC, 500 mg/kg)를 복강 주사했을 때 프로그스테론 처리에 의해 증가하였던 시상하부 NE 함량, GnRH mRNA 수준 그리고 GnRH 분비능(*ex vivo*)이 유의하게 감소함을 증명하였다(Kim et al., 1994). 본 연구에서는 6-OHDA를 *in vivo*로 성체 수컷 흰쥐에 주사한 경우로, GnRH 뉴런의 활성화에 미치는 억제적 효과는 상기한 *in vitro* 6-OHDA 처리 결과 및 *in vivo* DDC 처리 결과와 잘 부합하며, 추가로 그 억제적 효과가 뇌하수체 gonadotropin 발현에도 반영됨을 증명하였다(Fig. 2A, Fig. 3A,B,C).

임상적으로, 치료를 받지 않은 PD 환자들의 야간 혈중 PRL 수준이 유의하게 증가하고, 반대로 야간 GH 수준이 유의하게 낮았는데 비해 주야간 혈중 ACTH와 cortisol 수준은 지속적으로 저하됨이 밝혀졌는데, 이는 PD 환자 시상하부의 신경내분비 활성 교란이 뇌하수체 기능에 영향을 준 것으로 추정되었다(Bellomo et al., 1991). PD 환자들의 시상하부 이상 기능은 TRH와 levodopa 반응 검사에서도 나타났는데, 치료 전에는 TRH에 반응한 혈중 PRL 수준이 유의하게 높았으며, 치료 중에는 혈중 TSH와 PRL 수준의 유의한 상승이 관찰되었다(Otaka et al., 1994). 시상하부 DA가 뇌하수체 PRL 분비에 억제적 신호임은 잘 알려진 사실이므로 점진적으로 DA 고갈이 진행되는 PD 환자들에서 PRL 분비가 교란됨은 당연한 것이었으며, TRH 주사에 대한 반응의 차이 등을 미루어 볼 때 여타 신경내분비 회로의 교란도 충분히 예상되었다. 실제로 실험동물을 사용한 연구에서, bromocriptine 투여에 의해 흰쥐 부신으로부터의 glucocorticoid 분비가 저

해됨이 보고된 바 있고(Kan et al., 2003), 중추신경계에서 6-OHDA 주사에 의한 CA 고갈이 GnRH 뉴런 외에 다른 시상하부 뉴런의 활성화에도 영향을 미침이 보고되었다. 흰쥐 시상하부 측내실행(paraventricular nucleus, PVN) 부위에 6-OHDA를 주입할 경우 시상하부 내의 NE 고갈이 일어나며, 이때 세로토닌 수용체(5-HT1A) agonist인 8-OH-DPAT에 의해 유도되는 ACTH와 corticosterone 분비 증가가 유의하게 감소함이 보고되었다(Weidenfeld et al., 2002). 이 결과들은 부신피질의 glucocorticoid 분비 조절에 잘 알려진 중추신경계의 5-HT 신경입력 외에도 시상하부 CA 신경입력이 관여함을 지지한다(Carrasco & van de Kar, 2003). 본 연구 결과는 *in vivo* 6-OHDA 주입에 의해 흰쥐 시상하부에서 CRH mRNA 그리고 뇌하수체 ACTH mRNA 수준이 감소함을 처음으로 증명한 것으로(Fig. 2B, Fig. 3D), 상기한 보고와 함께 스트레스-부신기능 변화-퇴행성 뇌질환의 연결고리에서 CA이 고갈되는 PD에서 왜 우울증이 자주 동반되는가에 대한 설명의 단초가 될 수 있다. 더욱이, 시상하부 CRH 뉴런의 과다 분비/과다활성은 PD나 우울증을 비롯한 여러 퇴행성 신경질환들과 깊은 상관관계가 있고 이들 질환의 진단에 응용될 수 있을 것으로 기대되고 있다(Florio et al., 2007). 한편, 흰쥐 내측전뇌다발(medial forebrain bundle)에 6-OHDA를 주사하면 2~4주 후 편도체(amygdala)에서의 CRH 발현은 감소하였지만, 배부 분계선조 침대핵(bed nucleus of the stria terminalis, BST), 시상하부의 paraventricular nucleus(PVN), 그리고 대뇌피질에서는 변화가 없었다(Day et al., 2002). 이 결과와 본 연구와의 차이는 6-OHDA의 투여 위치에 따른 신경 독성 작용 범위나 경로의 차이와 뇌 부위별 CRH 발현 조절 기작의 차이에 기인하는 것으로 보인다.

대표적인 PD 유형은 55세 이상에서 나타나는 sporadic type으로, 아직도 정확한 발병 기작은 규명되지 않고 있지만, 스트레스는 주요한 발병 원인 또는 PD 진전을 가속화시키는 요인으로 알려져 있다(Metz, 2007). 즉, 스트레스는 중추신경계에 손상을 누적시켜 서서히 PD와 같은 퇴행성 신경 질환들의 개시와 가속화를 야기하여 PD의 경우 운동 기능을 급격히 저하시키는 것으로 추론되는데, 신경내분비적으로는 스트레스가 신경 가소성을 조절하는 부신피질호르몬(예, cortisol) 분비와 중추 신경계 표적세포의 수용체 발현을 조절하여 DA 뉴런 손상이 일어나는 것으로 설명된다. 그런데, 난소와 부신으로부터의 스테로이드 호르몬들간의 상호작용에 의해 뇌하

수체의 gonadotropin 분비 조절이 일어난다는 점에서(Mahesh & Brann, 1992), 스트레스에 의한 부신피질의 내분비 기능 이상은 필연적으로 생식 호르몬 분비 이상을 초래하게 될 것으로 예측된다. 55세 이상 노년기에 발생하는 sporadic PD와는 달리 성적인 활성이 높고 직장에서 왕성한 활동을 할 연령대(21~40세)에 발병하는 young onset Parkinson's disease (YOPD)의 경우에 나타나는 성기능 장애나 작업 불능-실직 등으로 이어지는 우울증은 삶의 질을 급격히 악화시킨다(Salgado-Pineda et al., 2005; Calne & Kumar, 2008). 따라서 본 연구에서와 같이 6-OHDA과 같은 신경독소를 투여하는 퇴행성 신경질환 관련 실험동물 모델을 사용하여 다양한 신경내분비 회로의 활성 변화와 전신적인 규모에서 잘 알려진 시상하부-뇌하수체-표적기관들의 기능의 변화를 조사하는 것은 특히 노인 인구의 증가와 함께 대표적인 노화 관련 퇴행성 뇌질환인 PD의 제 증상에 대한 이해와 발병 기작, 진단과정, 치료법 개발 등 임상적 응용의 기초 자료로써 가치가 있다고 판단된다.

## 인용문헌

- Advis JP, McCann SM, Negro-Vilar A (1980) Evidence that catecholaminergic and peptidergic (luteinizing hormone-releasing hormone) neurons in suprachiasmatic-medial preoptic, medial basal hypothalamus and median eminence are involved in estrogen-negative feedback. *Endocrinology* 107:892-901.
- Bellomo G, Santambrogio L, Fiacconi M, Scarponi AM, Ciuffetti G (1991) Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, growth hormone and prolactin in patients with untreated Parkinson's disease. *J Neurol* 238:19-22.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22:724-763.
- Calne SM, Kumar A (2008) Young onset Parkinson's disease. *Practical management of medical issues. Parkinsonism Relat Disord* 14:133-142.
- Carrasco GA, Van de Kar LD (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463:235-272.
- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of

- RNA isolation by RNA guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Day HE, Vittoz NM, Oates MM, Badiani A, Watson SJ Jr, Robinson TE, Akil H (2002) A 6-hydroxydopamine lesion of the mesostriatal dopamine system decreases the expression of corticotropin releasing hormone and neurotensin mRNAs in the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 945:151-159.
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175:303-317.
- Florio P, Zatelli MC, Reis FM, degli Uberti EC, Petraglia F (2007) Corticotropin releasing hormone: a diagnostic marker for behavioral and reproductive disorders? *Front Biosci* 12:551-560.
- Grünblatt E, Mandel S, Youdim MB (2000) Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann N Y Acad Sci* 899:262-273.
- Kalra SP, Kalra PS (1985) Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr Rev* 4:311-351.
- Kan SF, Kau MM, Low-Tone Ho L, Wang PS (2003) Inhibitory effects of bromocriptine on corticosterone secretion in male rats. *Eur J Pharmacol* 468:141-149.
- Kim K, Lim IS, Cho BN, Kang SS, Lee BJ, Choi KH, Chung CH, Lee CC, Cho WK, Wuttke W (1993) A partial blockade of catecholaminergic neurotransmission with 6-hydroxydopamine decreases mRNA level of gonadotropin releasing hormone in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 58:146-152.
- Kim K, Lee BJ, Cho BN, Kang SS, Choi WS, Park SD, Lee CC, Cho WK, Wuttke W (1994) Blockade of noradrenergic neurotransmission with diethyldithiocarbamic acid decreases the mRNA level of gonadotropin-releasing hormone in the hypothalamus of ovariectomized, steroid-treated prepubertal rats. *Neuroendocrinology* 59:539-544.
- Kostrzewa RM, Jacobowitz DM (1974) Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Rev* 26:199-288.
- Mahesh VB, Brann DW (1992) Interaction between ovarian and adrenal steroids in the regulation of gonadotropin secretion. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:495-513.
- Martinovic JV, McCann SM (1977) Effect of lesions in the ventral noradrenergic tract produced by microinjection of 6-hydroxydopamine on gonadotropin release in the rat. *Endocrinology* 100:1206-1213.
- Metz GA (2007) Stress as a modulator of motor system function and pathology. *Rev Neurosci* 18:209-222.
- Monda M, Viggiano A, Viggiano A, Viggiano E, Messina G, Tafuri D, De Luca V (2007) Sympathetic and hyperthermic reactions by orexin A: role of cerebral catecholaminergic neurons. *Regul Pept* 139:39-44.
- Negro-Vilar A, Advis JP, Ojeda SR, McCann SM (1982) Pulsatile luteinizing hormone (LH) patterns in ovariectomized rats: involvement of norepinephrine and dopamine in the release of LH-releasing hormone and LH. *Endocrinology* 111:932-938.
- Otake K, Oiso Y, Mitsuma T, Hirooka Y, Adachi K (1994) Hypothalamic dysfunction in Parkinson's disease patients. *Acta Med Hung* 50:3-513.
- Parmer RJ, Zinder O (2002) Catecholaminergic pathways, chromaffin cells, and human disease. *Ann N Y Acad Sci* 971:497-505.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fourth edition. Academic Press Inc. San Diego.
- Ramaker C, van Hilten JJ (2000) Bromocriptine versus levodopa in early Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2000(3):CD002258.
- Salgado-Pineda P, Delaveau P, Blin O, Nicoullon A (2005) Dopaminergic contribution to the regulation of emotional perception. *Clin Neuropharmacol* 28:228-237.
- Salvage DJ, Lee SY, Parsons LH, Seo DO, Rivier CL (2004) A hypothalamic-testicular neural pathway is influenced by brain catecholamines, but not testicular blood flow. *Endocrinology* 145:1750-1759.

Simpkins JW, Kalra SP (1979) Blockade of progesterone-induced increase in hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone levels and serum gonadotropins by intrahypothalamic implantation of 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 170:475-484.

Stacy M, Galbreath A (2008) Optimizing long-term therapy for Parkinson disease: levodopa, dopamine agonists, and treatment-associated dyskinesia. *Clin Neuropharmacol* 31:51-56.

Weidenfeld J, Feldman S, Itzik A, Van de Kar LD, Newman ME (2002) Evidence for a mutual interaction between noradrenergic and serotonergic agonists in stimulation of ACTH and corticosterone secretion in the rat. *Brain Res* 941:113-117.

---

(received 19 October 2009, received in revised form 13 November 2009, accepted 15 November 2009)