

신경인성 발기부전의  
분자 기전

연세대학교 대학원  
의 학 과

신경인성 발기부전의  
분자 기전

지도 정 성 우 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함  
이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 8월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

황 학 수

# 황학수의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2006년 8월 일

## 감사의 글

어느덧 삼년하고 9개월이라는 세월이 흘러갔습니다. 짧았지만 길었던 또 힘들기도 했지만 즐거웠던 대학원 생활에서 아름다운 사람들과의 만남이 가장 소중한 것 같습니다. 지금에 와서 다시 돌이켜 보면 모든 것이 아름다운 추억의 한 순간이었던 것 같습니다. patch실험을 차근차근 가리키시던 정성우 교수님의 모습도 이젠 하나의 추억으로 남기면서 그 동안 이 못난 제자를 하나의 과학자로 키우시려고 온갖 심혈을 기울여 주셔서 감사의 마음을 이런 백지에나마 글을 적어 전합니다. 학업에서나 생활에서 힘들 때 항상 인자하게 따뜻한 격려와 관심을 주신 이중우 교수님, 공인덕 교수님께 감사드립니다. 본 논문의 결실을 위해 자신의 일처럼 안타까워 해주시고 많은 도움을 주신 지금은 스위스에 계시는 박규상 교수님께 감사의 글을 전합니다.

여러모로 부족한 저의 논문을 다독여 주시고 조언을 잊지 않으신 김성진 교수님, 조병필 교수님, 최재원 교수님께 진심으로 감사드립니다.

처음으로 기초실험을 시작하면서 많은 도움을 주셨던 선생님이자 친구와 같은 박병곤 선생님께 감사를 드리면서 지금은 미국에서 생활하고 있는 차승규 선생님께도 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 또한 대학원 공부를 하면서 동고동락을 하였던 그리고 실험에 아주 많은 도움을 준 원유진 선생님에게도 고마움을 전합니다. 항상 큰 누이 같았던 김나현 선생님, 그리고 가까운 친구와 같이 생활에서 항상 웃음만 주었던 최현경 선생님, 항상 조용히 불평을 들어 주던 곽은정 선생님, 바쁜 가운데도 항상 도움만 주었던 김민정 선생님에게도 감사의 마음을 전합니다.

저의 아름다운 추억 속에는 또한 원주의과대학 여러 선생님들의 모습이 자리를 잡고 있습니다. 특히, 우리 여러 조교 선생님들, 일일이 이름을 외울 수는 없지만 저에게 주었던 그 고마움을 이 글을 빌어 감사하다고 전하고 싶습니다.

그리고 이 못난 사위의 학업을 위해 늘 노심초사하시고 저희 딸 혜정이를 키우시느라 고생만 하신 장모님께 머리숙여 감사드립니다. 지금은 머나먼 곳에 계시지만 아마도 하늘같은 부모님의 사랑이 있었기에 오늘의 이 영광이 있지 않았나 생

각하면서 부모님께 큰 절을 올리고 싶습니다. 지금까지 이 동생의 학업을 위해 뒤  
바라지를 아끼지 않으신 형님, 형수님들과 누님, 매형께 감사의 마음을 전합니다.  
마지막으로 인생의 동반자로 슬플 때나 기쁠 때나 항상 나를 따라 준 사랑하는  
아내에게 정말 고마웠다고 전하며 부모의 사랑을 한동안 전화로만 느끼면서도 명  
랑하고 씩씩하게 자라난 내 생의 기쁨인 딸, 혜정에게 이 공을 돌립니다.

2006년 8월

저자 씀

# 차 례

표 차례 .....	iii
그림 차례 .....	iv
국문요약 .....	vi
제1장. 서론 .....	1
제2장. 재료 및 방법 .....	9
2.1. 실험동물제작 .....	9
2.1.1. 거세 쥐 모델 .....	9
2.1.2. 당뇨 쥐 모델 .....	9
2.2. 음경압 측정 .....	10
2.3. 단일 신경세포 분리 및 유지 .....	10
2.4. cDNA 마이크로어레이에 의한 유전자 발현 윤곽 확인 .....	11
2.5. 역전사 연쇄 중합반응 .....	12
2.6. 실시간 역전사 연쇄 중합반응 .....	12
2.7. <i>In vitro</i> 실험 .....	13
2.8. 전기생리학적 실험 .....	13
2.9. 세포내 활성산소 측정 .....	14
2.10. 실험용액 및 약물 .....	14
2.10.1. 실험용액 .....	14
2.10.2. 약물 .....	15
2.11. 데이터 분석 및 통계처리 .....	15
제3장. 결과 .....	21
3.1. 거세 쥐 모델의 평가 .....	21
3.2. cDNA 마이크로어레이 분석을 통한 유전자 발현의 조사 .....	25
3.3. 거세가 골반신경세포의 니코틴성수용체 발현 및 활성화에 미치는 영향 .....	29
3.3.1. 실시간 역전사 연쇄 중합반응 분석에 의한 니코틴성수용체	

발현의 변화 검증 .....	29
3.3.2. 거세가 골반신경세포의 니코틴성 아세틸콜린 채널의 활성화에 미치는 영향 .....	31
3.4 골반신경절에서 염증매개물질과 산화스트레스 물질의 역할 .....	37
3.4.1. 거세 쥐 골반신경절세포에서 염증매개물질의 발현 .....	37
3.4.2. 사이토카인이 골반신경세포의 니코틴성수용체 활성화에 미치는 영향 .....	37
3.4.3. 거세 쥐 골반신경절에서 활성산소종의 발현 .....	38
3.4.4. 과산화산소가 골반신경절세포의 니코틴성수용체 활성화에 미치는 영향 .....	38
3.4.5. 거세 쥐의 골반신경절에서 사이토카인 신호전달 인자들의 발현 변화 .....	38
3.5. 당뇨 쥐 모델의 결과 .....	48
3.5.1. 당뇨 쥐 모델 평가 및 음경압 측정 .....	48
3.5.2. 당뇨가 골반신경세포의 안드로젠수용체 발현에 미치는 영향 .....	50
3.5.3. 당뇨가 골반신경세포의 니코틴성수용체 발현에 미치는 영향 .....	52
3.5.4. 당뇨가 골반신경세포의 니코틴성수용체 활성화에 미치는 영향 .....	52
제4장. 고찰 .....	56
제5장. 결론 .....	65
참고문헌 .....	66
영문초록 .....	78

## 표 차 례

표 1. 신호전달인자의 역전사 중합 연쇄반응에 사용된 primer들 .....	19
표 2. 실시간 중합연쇄반응에 사용된 primer들 .....	20
표 3. 거세에 의해 발현이 변화된 신경기능 관련 유전자리스트 .....	28



## 그 립 차 례

그림 1. 수컷 흰쥐 주골반신경절(major pelvic ganglion)의 해부학적 위치모식도 .....	16
그림 2. 막전압 고정법에 의한 전류측정 장치의 모식도 .....	17
그림 3. 음경압 측정 장치의 모식도 .....	18
그림 4. 대조군, 거세군 및 거세 후 테스토스테론 투여군에서 골반신경자극에 유도 되 는 음경압 비교 .....	23
그림 5. 대조군, 거세군 및 거세 후 테스토스테론 투여군의 골반신경절에서 안드로젠수용체의 발현 비교 .....	24
그림 6. 골반신경조직에서의 거세에 의한 유전자 발현 변이 및 기능별 발현 변이 유전자 분류 .....	27
그림 7. 거세와 거세 후 테스토스테론 투여 한 쥐의 골반신경절 조직에서 니코틴성수용체 서브유닛의 발현 변화에 대한 실시간 역전사 연쇄중합반응분석 .....	30
그림 8. 거세가 골반신경절교감신경세포에서 니코틴성전류에 미치는 영향 .....	33
그림 9. 거세가 골반신경절부교감신경세포에서 니코틴성전류에 미치는 영향 .....	34
그림 10. 골반신경절교감신경세포에서 100 $\mu$ M ACh에 의해 유도된 전류의 크기 비교 .....	35
그림 11. 골반신경절부교감신경세포에서 100 $\mu$ M ACh 의해 유도된 전류의 크기 비교 .....	36
그림 12. 골반신경절 조직에서 거세에 의한 염증매개물질의 발현 변화 .....	40
그림 13. 골반신경절교감신경 세포에서 TNF- $\alpha$ 가 니코틴성 전류에 미치는 영향 .....	41
그림 14. 골반신경절부교감신경세포의 니코틴성전류에 미치는 TNF- $\alpha$ 처치 시간에 따른 영향 .....	42
그림 15. 골반신경절부교감신경세포의 니코틴성전류에 미치는 TNF- $\alpha$ 처치 농도에 따른 영향 .....	43

그림 16. 골반신경절부교감신경세포의 $IL-1\beta$ 처리 농도에 따른 영향 .....	44
그림 17. 골반신경조직에서 거세에 의한 활성산소종의 발현 증가 .....	45
그림 18. 골반신경절부교감신경세포에 니코틴성전류에 미치는 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 처리 농도에 따른 영향 .....	46
그림 19. 거세 쥐 골반신경절조직에서 STAT3와 NF- $\kappa$ B 발현 증가 .....	47
그림 20. 당뇨 쥐에서 몸무게, 혈당, 음경압 측정 결과 .....	49
그림 21. 당뇨 쥐 골반신경절에서 안드로젠수용체의 발현 변화 .....	51
그림 22. 당뇨에 의한 니코틴성수용체 서브유닛의 발현 변화 .....	53
그림 23. 당뇨가 골반신경부교감신경세포의 니코틴전류 효력에 미치는 영향 .....	54
그림 24. 골반신경절세포에서 ACh 단일 농도에 의해 유도된 니코틴성전류에 미치는 당뇨의 영향 .....	55
그림 25. 신경인성 발기부전의 분자적 기전 도식 .....	63
그림 26. 신경인성 발기부전에 관련된 신호전달 체계에 대한 모식도 .....	64

## 신경인성 발기부전의 분자 기전

골반신경절은 배뇨와 발기를 조절하는 중요한 자율신경절이다. 최근 보고에 의하면 안드로젠의 결핍이 발기부전을 일으킨다고 하였다. 현재 신경인성 발기부전의 기전으로 음경해면체에 분포된 *nitric oxide*(NO)를 함유한 신경의 수나 그 기능의 변화가 알려져 있다. 본 연구에서는 거세 쥐 모델에서 안드로젠의 결핍이 골반신경절의 기능을 변화시켜 유발하는 신경인성 발기부전을 평가하고 그 기전을 밝히려고 하였다. 절전 부교감신경인 골반신경에 전기(20 Hz, 10 V) 자극을 가하여 음경압을 측정하였을 때 거세 쥐 음경압은 대조군에 비하여 현저히 낮았으며 그것은 테스토스테론의 투여에 의해 대조군과 유사하게 유지되었다. 한편, 거세 쥐의 골반신경에서 얻은 cDNA의 마이크로어레이 결과 대조군에 비하여 니코틴성 아세틸콜린수용체 서브유닛의 발현이 감소된 것을 확인하였다. 실시간 역전사중합연쇄분석을 통해  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$  서브유닛의 발현이 거세 쥐의 골반신경절에서 많이 감소하였고 이러한 변화는 테스토스테론의 투여에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 거세 쥐에서 니코틴성 아세틸콜린수용체들의 변화는 이온전류 측정방법으로 측정하였을 때 니코틴성전류의 감소로 나타났으며, 이러한 전류의 감소 역시 테스토스테론 투여에 의해 억제되었다. 또한 거세에 의해 산화 스트레스가 증가하는지를 쥐 골반신경절에서 *hydroethidine* 방법으로 활성산소의 생성을 대조군과 비교하여 확인하였다. 그 결과 거세에 의해 골반신경절에서 활성산소가 증가되었고 활성산소 중의 하나인 과산화수소( $H_2O_2$ )를 24시간 전 처리하였을 때 골반신경절부교감신경세포에서 아세틸콜린에 의한 내향전류가 줄어든 것을 관찰하였다. 한편, 염증 매개물질인  $IL-\beta$ 와  $IL-6$  그리고  $TNF-\alpha$ 수용체의 발현도 거세 쥐의 골반신경절에서 증가하였다.  $IL-\beta$  혹은  $TNF-\alpha$ 를 골반신경절세포에 24시간 전 처리 한 결과 역시 아세틸콜린에 의한 니코틴성전류가 감소되었다.

이상의 결과로부터 신경인성 발기부전은 자율신경에서 니코틴성 아세틸콜린수용체 서브유닛의 발현이 감소되고 이에 따라 니코틴성전류가 감소됨으로 인해 신경과 신경, 신경과 효과기 사이의 시냅스전달을 억제하여 나타나는 것으로 생각된다. 한편, 남성호르몬의 결핍에 의해 거세 쥐 골반신경절에서 산화 스트레스나 염증 매개물질이 증가되고 이 요인들에 의해 신경인성 발기부전이 매개되는 것으로 사료된다.

---

핵심 되는 말 : 신경인성 발기 부전. 테스토스테론, 골반신경절, 니코틴성 아세틸콜린수용체, 산화스트레스, 염증매개 물질

# 신경인성 발기부전의 분자 기전

〈지도 정성우 교수〉

연세대학교 대학원 의학과

황 학 수

## 제1장 서 론

남성 성기능의 조절에는 자율신경인 골반신경절과 음경의 감각을 중추로 전달하는 체성 감각 신경으로 이루어지는 신경 회로가 정상적으로 기능하는 것이 매우 중요하다(Keast 등, 1999; Keast 등, 2000). 현재까지 생식 행위에 관련된 대뇌 및 변연계 등 중추 신경회로에 미치는 성 호르몬의 효과에 대해 연구는 많으나 음경을 직접 지배하는 내장성운동신경(visceral motor neuron)의 말초자율신경계, 즉 교감 및 부교감 신경절의 기능적 특성과 이들이 여러 가지 병적 상황에서 나타날 수 있는 기능적 가소성(functional plasticity)을 규명하는 연구는 거의 이루어지지 않고 있다(Kawata 등, 1994).

정상적인 음경발기(penile erection)는 일반적으로 정신적 발기(psychogenic erection)와 반사적 발기(reflexogenic erection)로 나눌 수 있고 모두 자율신경계에 의해 매개 된다. 정신적 발기는 시각, 청각, 상상 등의 자극이 대뇌중추를 자극하면 변연계 및 시상하부에 위치한 발기 중추, 천추의 절전 부교감신경이 차례로 활성화되어 골반신경절(pelvic ganglia)에 위치한 절후 부교감신경세포가 활성화 시키면

음경을 관류하는 혈관 및 음경해면체 평활근의 이완이 유발되어 나타난다. 반사적 발기는 음경으로부터의 체성 구심성(somatic afferent) 자극이 음부신경(pudendal nerve)과 후근 신경절(dorsal root ganglia)을 통해 천추에 전달되면 반사궁의 한 부분을 이루는 부교감 절전 및 절후신경이 차례로 활성화되어 발기반사가 일어난다. 반면 교감신경이 활성화되면 발기가 억제된다고 알려져 있는데 척추옆교감신경절(paravertebral sympathetic ganglia)과 척추전교감신경절(perivertebral sympathetic ganglia)인 하복내장신경총(hypogastric plexus)내의 교감절전신경세포가 골반신경절 내에 위치한 교감절후신경세포를 활성화시키면 음경혈관 및 음경해면체 평활근의 수축을 유도하여 발기가 억제되고 사정이 된다고 한다(Guiliano 등, 2004). 이상에서 보는 바와 같이 발기의 신경 조절에는 음경에 교감 및 부교감 신경을 직접 보내는 골반신경절의 역할이 매우 중요하다. 실제로 질병으로 인한 전립선 절제술(Walsh 등, 2000) 및 방광절제술(Walsh 등, 1982)에 의해 골반신경이 손상을 입게 되는데 이 경우에 발기부전이 일어나는 것이 관찰되었으며 특히, 이런 수술을 할지라도 골반신경 손상을 줄이면 발기부전이 적게 나타난다고 보고되고 있다(Zippe 등, 2004; Zippe 등, 2006).

이런 중요한 기능을 하는 골반신경절의 해부 및 조직학적 특징은 종(species)에 따라 많은 차이가 있으나, 대부분의 종에서는 작게 서로 연결된 신경절들이 복잡한 망상 구조를 하고 있다(Bradley 등, 1975; Janig 등, 1987). 인간에서는 비뇨 및 생식기를 지배하는 교감 및 부교감자율신경들이 이들 장기의 주변에서 골반신경총(pelvic plexus)을 형성하고 있다. 하지만 쥐(rat)에서는 그 구조가 비교적 단순하여 여러 자율신경세포들이 하나의 큰 신경절을 이루고 있는데, 수컷 쥐의 경우 이를 주골반신경절(major pelvic ganglia, MPG)이라 한다. 주골반신경절은 좌우 한쌍으로 전립선의 표면에 위치해 있고 하복신경(hypogastric nerve)으로부터 내려오는 절전교감 신경과 골반신경(pelvic nerve)으로부터 온 부교감신경의 지배를 받는다. 이와 같이 교감신경과 부교감신경세포가 같은 신경절내에 존재하는 것은 다른 자율신경절에서는 찾아 볼 수 없는 아주 독특한 형태이다(Dail 등, 1992; Keast 등, 1995; Keast 등, 1999). 주골반신경절은 방광, 전립선 및 음경등과 같은 비뇨, 생식계 기관과 하부의 직장(distal colon)을 지배하며(Longworthy 등, 1965; Dail 등,

1975; Keast 등, 1991; De Groat 등, 1993), 배뇨(micturition)나 발기(erection)와 같은 자율신경 반사를 조절한다(Zoubek 등, 1993). 특히 발기부전을 일으키는 병적 상태에서 골반신경절의 형태 및 기능의 변화가 보고 된 바 있기 때문에(Mills 등, 1992) 신경인성 발기부전을 연구하는데 골반신경절은 아주 유용한 모델 시스템이라 할 수 있다(Keast 등, 1999).

발기부전(erection dysfunction)은 남자가 모두 만족스러운 정도의 성행위를 할 수 있도록 발기가 충분하지 않거나, 발기가 되더라도 유지되지 못하는 경우가 전체 성생활의 25%이상 일어나는 경우를 말한다. 이러한 발기부전은 원인에 따라 크게 심인성(정신적 원인)과 기질성으로 구별할 수 있다. 기질성 요인으로 혈관계 이상, 신경계, 그리고 내분비계의 이상을 들 수 있다. 기질성 요인은 주로 노화, 흡연, 그리고 당뇨병, 고혈압과 같은 성인병에 의해 나타나며 이러한 요인들이 말초 신경병증(peripheral neuropathy)을 유도하여 신경인성 발기부전의 주요한 원인이 될 것이라고 한다(Cirino 등, 2005).

남성호르몬은 나이가 증가함에 따라 줄어든다고 한다(Okamura 등, 2005). 미국(Feldman 등, 1994)의 경우 40-70세 사이의 성인 남자의 약 52%가 발기부전을 겪고 있으며 그 심각성 정도는 나이에 비례하여 증가하는 것으로 알려져 있다(Laurence 등, 2000). 이러한 나이든 남성들은 더욱 많은 시간과 더욱 직접적인 자극이 있어야만 발기가 되는 것으로 알려지고 있는데(Wespes 등, 2002) 한국에서도 50세 이상 남성들이 59%가 발기부전으로 고민하고 있다고 한다. 이러한 발기부전에 Phosphodiesterase 5(PDE5) 억제제로 치료 할 뿐 만 아니라 남성호르몬 투여로도 치료하는데 PDE5 억제제인 비아그라(viagra)를 사용하는 동시에 테스토스테론 치료를 같이 하면 더욱 좋은 치료 효과가 있다고 한다(Shabsigh 등, 2004). 이전의 연구에 의하면 저남성호르몬증(hypogonadism)도 발기부전을 일으키고 남성호르몬의 투여에 의해 발기부전이 치료 된다는 임상적인 보고도 있다(Yassin 등, 2003; Greenstein 등, 2005; Yassin 등, 2005).

남성호르몬은 전체 순환량의 95%가 고환에서 만들어지고, 5%는 부신피질에서 만들어지고 있다. 이런 남성호르몬은 일반적으로 신경회로의 분화(differentiation), 성숙(maturation), 그리고 유지(maintenance)에 매우 중요한 역할을 하는 것으로

알려져 있다. 몇몇 보고에 의하면 남성의 고환을 외과수술로 제거한 경우나 전립선암 환자에게 항 남성호르몬(*antiandrogen*) 치료를 하였을 때 리비도(*libido*)를 상실할 뿐만 아니라 발기부전이 나타난다고 하였다(Rousseau 등, 1988; Shabsigh 등, 1997; Yildirim 등, 1997). 최근에 쥐 동물모델에서도 발기가 안드로젠(*androgen*)에 의존적이라고 확인되었다(Mills 등, 1996; Reilly 등 1997; Palesel 등, 2003). 그러나 현재까지 남성호르몬의 결핍(*androgen deficiency*)이 성기능의 장애를 일으키는지에 관한 연구는 음경조직에 국한되어 이루어지고 있고 발기를 조절하는 자율신경의 기능에 미치는 안드로젠의 효과와 그 작용기전은 거의 알려져 있지 않다. 한 연구에 의하면 안드로젠의 감소가 조직학적으로 골반신경세포의 크기와 세포수도 감소시킨다고 하였다(Keast 등, 1998). 또한 중추 신경계와 자율신경절에서 안드로젠의 수용체가 조직염색학적 방법으로 발견 되어 있는 것을 확인하였다. 특히, 골반신경절 조직에서 부 교감 신경에서 발견이 많이 되어있는 것을 확인되었고 안드로젠수용체가 음경에 분포 된 신경에 주로 분포되어 있다고 한다. 이런 안드로젠수용체는 거세에 의해 골반신경절에서 발견이 줄어든다고 보고되어 있다(Schirar 등, 1997; Watkins 등, 1999; keast 등, 1998). 하지만 이런 조직학적 변화가 신경기능에 어떤 영향을 미치는 지에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있고, 특히, 골반신경절의 기능에 관련된 즉 시냅스전달 및 흥분성에 관여 하는 이온 채널의 발현 및 그 기능의 변화에 대한 연구는 거의 이루어 지지 않고 있다.

당뇨 환자의 50% 이상에서 발기부전이 나타나는데 아직 그 원인이 구체적으로 무엇인지 정확히 알려져 있지 않다(Levine 등, 2000). 과거에 발표된 연구를 바탕으로 추론해보면 인슐린 결핍이나 인슐린작용에 대한 저항성으로 인해 높아진 혈당이 발기를 조절하는 신경회로의 구조와 기능의 변화를 초래하는 것으로 생각된다. 실제로 당뇨병(*diabetes mellitus*) 환자의 뇌조직의 부검(*autopsy*)연구와 자기공명상 연구에 의하면 뇌조직의 위축(*atrophy*)이 오는 등의 나이든 노인에서 볼 수 있는 구조적 변화가 일찍 나타난다고 하였고, 자율신경에서도 이와 비슷한 신경병증이 나타난다고 한다(Biessels 등, 2002). 한편 고령화나 당뇨병에서 공통적으로 나타나는 인지나 기억 같은 뇌기능의 감소는 신경의 조직 및 기능 가소성에 의해 야기되는데 특히, 신경의 주 기능인 시냅스 전달의 변화에 의하여 나타난다



고 알려져 있다(Segovia 등, 2001). 이와 같은 신경기능의 변화는 흥분성과 시냅스 전달에 중요한 기능 단백질(예, 전압의존 이온 채널, 신경 전달물질의 수용체, 시냅스 단백질, 신호전달 단백질, 인산화 효소 등)의 발현의 변화와 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다(Biessels 등, 2002). 같은 원리에 의하여 당뇨병에 있어서 나타나는 발기부전도 중추신경계에서 볼 수 있는 신경기능의 가소성이 자율신경계에도 나타나서 분자 및 세포수준에서 야기되는 변화로 설명할 수 있을 것으로 생각되나 이에 대한 실험적 증명은 아직 이루어지지 않고 있다. 일부 보고에 의하면 당뇨병 환자의 혈장 내 남성호르몬이 감소되어 있고 남성호르몬을 투여하면 인슐린 저항성도 낮아지고 발기부전의 치료효과가 있다고 하였다(Barrett-Connor, 등 1992; Holmang 등, 1992; Zhang 등, 2006). 과거의 이러한 연구 내용을 종합해보면 노화 및 당뇨병에서 공통적으로 남성호르몬의 감소가 나타났으며 이에 따른 신경의 가소성의 방향과 그 기능적 변화가 많이 일치함을 알 수 있으며 자율신경 시냅스는 절전(ganglionic neuron)과 신경과 골반신경절 신경세포사이, 그리고 절후(postganglionic) 골반신경과 효과기(즉, 음경) 사이에 시냅스가 존재하는데 이들 시냅스에서의 전기적신호의 전달은 모두 니코틴성 아세틸콜린수용체에 의해 매개된다. 이전의 보고에 의하면 니코틴성 수용체는 GABA<sub>A</sub>, glycine 및 5-HT<sub>3</sub> 수용체들과 마찬가지로 5개의 서브유닛( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) 으로 구성된 오합체구조의 이온통로이다. 니코틴성 서브유닛들 사이에 위치한 두 개의 리간드-결합 부위(ligand-binding site)에 두 분자의 아세틸콜린이 부착하면 수용체가 활성화 되어 이온통로를 개방(open) 상태로 되게 하고 그 통로로 통해 양이온들이 이동하게 되는데, 이에 따라 막 전압이 탈분극 되고 흥분전달이 가능하게 된다. 여기서 양이온은 주로 Na<sup>+</sup>의 유입과 K<sup>+</sup>의 유출이지만 Ca<sup>2+</sup>의 유입도 적지 않다고 한다. 신경에 발현되는 니코틴성 아세틸콜린수용체는 수용체 서브유닛의 조합에 따라 "duplex"( $\alpha/\beta$ ) 혹은 "triplex"( $\alpha_x\alpha_y\beta$  혹은  $\alpha\beta_x\beta_y$ )로 구성된다고 한다(De Biasi 등, 2002). 인간에서는 8개  $\alpha$ 서브유닛( $\alpha 2-7$ ,  $\alpha 9$ , 및  $\alpha 10$ )과 세 개의  $\beta$ 서브유닛( $\beta 2-4$ )이 클로닝 되었으나 이들이 조합이나 기능에 대해서는 명확히 알지 못하고 있다. 자율신경절세포로부터는  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  및  $\beta 4$  서브유닛이 클로닝 된 바 있다.(De Biasi 등, 2002; Skok 등, 2002; Tassonyi 등, 2002). 최근에 골반신경절에 주

로 발현되는 니코틴성수용체는 교감 및 부교감 신경에서 동일하게  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  및  $\beta 4$  서브유닛으로 구성되어 있음이 분자생물학적 및 약리학적방법으로 확인된 바 있다(Park 등, 2006).

니코틴성 아세틸콜린수용체는 빠른 흥분성 시냅스 후 전위(excitation postsynaptic potential, EPSP)발생을 매개하고 또 절후 자율신경세포의 흥분성을 조율함으로써, 골반신경절의 비뇨, 생식기 및 하부 장관의 기능 조절에 핵심적인 역할을 수행한다(De Groat 등, 1976; Gallagher 등, 1982). 만약 이러한 니코틴성수용체의 자가항체가 형성되어 있으면 자율신경병증(autonomic neuropathy)가 유발되고, 이로 인해 소변배설장애(urinary retention)나 발기부전이 흔하게 초래된다고 보고된 바 있다(Vernino 등, 1998; Vernino 등, 2000). 특히 니코틴성수용체  $\alpha 3$  서브유닛을 knock-out시킨 마우스에서는 출생 후 2일 이내에 심한 방광 확장과 함께 요실금이 나타나며, 1주 이상 생존한 경우에도 방광 감염이 지속되거나 요석이 나타난다고 하였다(Xu 등, 1999; De Biasi 등, 2000). 또한, 거대방광-작은 결장-장 연동저하증후군환자의 경우 심한 장 확장과 기능성 장 폐색을 보이는데 면역화학적 검사 결과 환자에게 니코틴성수용체의  $\alpha 3$  서브유닛 발현이 적거나 발현되지 않고 있음이 보고되었다(Anneren 등, 1991; Richardson 등, 2001). 이러한 보고들에 근거하여 본 연구에서는 니코틴성수용체의 발현과 활성의 감소는 자율신경절에서 니코틴성 시냅스 흥분성전달을 억제하여 발기부전을 유발할 것이라는 가설을 세울 수 있었다.

현재 국내외적으로 발기부전에 대한 기전 연구와 치료는 주로 여러 기질성 요인들 중인 혈관계이상에 초점을 맞추어 진행되어 왔다. 또한, 발기를 매개하는 데는 음경해면체 혈관의 내피세포 및 부교감신경종말에서 분비되는 nitric oxide(NO)는 Vasoactive intestinal polypeptide(VIP) 나 아세틸콜린과 같이 혈관평활근을 이완 시킨다. 음경혈관 및 음경해면체의 평활근에서 NO는 guanylate cyclase를 활성화시켜 GTP를 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)로 전환시키고, cGMP는 이것에 특이적인 protein kinase를 활성화시켜 특정 단백질의 인산화를 일으킨다. 이에 따라 평활근의 칼슘채널을 억제함으로써 원형질 내 칼슘이 endoplasmic reticulum(ER)내로 회수되어 세포 내 칼슘 농도가 하강하고 그 결과

혈관 평활근의 이완을 유도하여 발기를 일으키는 것이다(Lue 등, 2000). 음경이 이완되는 동안 cGMP는 phosphodiesterase type 5(PDE 5)에 의해 GMP로 가수분해되는데, sildenafil(Viagra)은 PDE 5의 작용을 억제함으로써 세포 내 cGMP의 농도를 유지시켜 발기를 지속케 한다. 이러한 연구 결과에 의해 비아그라(Viagra)라는 phosphodiesterase 5(PDE5) 억제제가 개발 되어 발기부전 치료에 많이 사용되고 있다.

하지만 비아그라는 혈관계이상에 의한 발기부전에는 80%이상의 환자에게서 효과를 보여주지만 당뇨병에서와 같이 내분비계-신경계 이상에서 올 것으로 추측되는 발기부전의 경우는 약 50%의 효과만 보여주고 있다. 그 이유는 비아그라는 음경해면체 및 혈관평활근의 이완을 오래 유지함으로써 발기시간을 늘려주는 것이 주작용이기 때문에 신경에 의해 조절되는 발기 그 자체에는 직접적인 영향이 없기 때문이다. 즉 말초 신경병증으로 인하여 자율신경에서의 시냅스 흥분성이 억제되어 신경전달물질(Ach, NO, VIP등)의 분비가 감소된 경우에는 발기부전에 대한 비아그라의 역할이 적다는 것을 설명한다.

## 연구목적

전술한바와 같이 기질성 발기부전은 혈관계 및 신경계이상으로 나타나는데 이중 신경계 발기부전에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 특히, 발기에 관련된 중요한 요소인 자율신경계의 기능성 감소성에 대한 연구는 블랙박스로 남아 있다. 따라서 본 연구의 목적은 첫째, 거세 모델과 당뇨 쥐모델을 만들어 신경인성 발기부전 이 형성되었음을 평가하고 둘째, 내분비계 이상이 초래된 이들의 변화가 정상 발기를 조절하는 말초자율신경계, 즉 골반신경절의 세포에 기능적 변화를 초래하여 발기부전을 일으킬 것이란 가설을 세우고 이를 증명하고자 하는 것이었다. 구체적으로 자율신경계의 주기능인 시냅스 전달과 흥분성에 관련된 니코틴성 아세틸콜린수용체의 발현 및 기능의 변화를 세포나 분자 수준에서 규명하여 신경기능의 감소성이 발기 부전의 중요한 요인임을 증명하고자 하는 것이다. 또한, 신경

병증을 유발하는 사이토카인이나 산화스트레스의 생성을 골반신경절에서 측정하고 이들이 골반신경절세포에 미치는 영향을 조사하였다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 2.1. 실험동물 제작

모든 동물은 실험동물에 대한 대한의학회 실험동물 지침서(2000. 3. 대한의학회)의 가이드라인을 준수하였고 12시간 낮/밤 사이클이 되는 동물실험실에서 동일한 조건으로 사육하였다.

#### 2.1.1. 거세 쥐 모델

출생 후 3주령(100-150 g)의 수컷 쥐(Sprague-Dawley, S/D)를 대조군(Sham), 거세군, 거세 후 테스토스테론 투여군 세 군으로 나누어 ketamine(50 mg/kg) 및 xylazine(10 mg/kg)의 복강 주사로 마취시킨 후 수술을 시행하였다. 대조군은 거세를 제외한 모든 수술 과정을 거세군과 동일하게 거쳤다. 거세 후 테스토스테론 투여군에는 매주 (10 mg/kg)씩 테스토스테론을 피하에 주사하였다. 테스토스테론은 참기름(Sesame oil, 오뚜기, 한국)에 용해시켜 사용하였다. 대조군은 참기름만 주사하였다. 수술 후 4주 동안 사육하여 실험에 사용하였다. 혈청 테스토스테론은 한국녹십자에 의뢰하여 측정하였다.

#### 2.1.2. 당뇨 쥐 모델

출생 후 8주령(250-300 g) 수컷 쥐에게 제II형 당뇨를 유발하는 streptozotocin(STZ, 70 mg/kg)으로 혹은 동량의 citrate buffer를 복강에 주사하고 3 일후 혈당을 측정하여 300 mg/dl 이상이면 당뇨로 간주하고 실험에 사용하였다. 당뇨가 확인된 쥐를 두 군으로 나누었는데 한 군에는 인슐린(insulin 10 IU/마리)을 매일 8주 동안 주사하였다. 이때 일정한 기간 마다 꼬리 정맥혈을 채취하여 혈당을 측정함으로써 당뇨병 혹은 인슐린 작용을 확인하였다. 당뇨가 확인 된 후 8주 동안 사육하여 실험에 사용하였다. 혈당은 아큐-체크센서 컴포트 글루코즈(Roche, Germany)kit를 사용하여 측정하였다.

## 2.2. 음경압 측정

거세 및 당뇨병에서 각각 5마리씩 무작위 추출한 후 sodium pentobarbital (50 mg/kg)을 복강 내에 주사하여 마취 후, 체온을 37℃로 유지시키는 발열 받침대에 고정하였다. 개복하여 골반신경절을 확인 한 뒤, 절전 부교감 신경(efferent input)인 골반신경(pelvic nerve)에 백금 전극을 장착하고 이를 stimulator(Harvard Apparatus, state USA)와 연결하였다. 다음 음경을 덮은 피부를 전부 박리하여 귀두부와 음경해면체 부위를 노출시키고, 음경해면체를 축지하면서 음경해면체 내에 헤파린(heparin 25 IU/ml)이 포함 된 생리식염수로 채운 26 Gauge 주사바늘을 삽입한 후 이를 pressure transducer에 연결하고 polygraph와 Macintosh, power, Lab(MacLab, USA)에서 음경압을 기록하였다. 먼저 기저해면체 내압을 측정한 후 골반신경(pelvic nerve)을 전기적으로 자극(16 Hz frequency, 5 mses duration, 4 V)하여 음경압을 측정하였다(그림 3). 대기압에 노출 시 혈액이 뒤로 밀려 나옴을 관찰하여 주사바늘의 끝이 해면체내에 위치하여 있음을 확인하였다. 골반신경의 전기 자극은 60초간 시행하였다. 자극 후 5~10초에 음경압이 급격히 증가하였으며 자극이 끝난 후엔 음경압이 빠른 속도로 감소하였다. 반응정도는 수차례 반복 자극 시에도 비슷하였다.

만일 골반신경 자극에 의하여 발기가 되지 않는 경우 papaverine을 직접 음경해면체에 투여하여 발기부전이 신경인적 요소인지 아니면 음경해면체 요소에 의해 일어나는지를 확인하였다.

## 2.3. 단일 신경세포 분리 및 유지

수컷 S/D 쥐를 sodium pentobarbital(50 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 뒤, 즉시 개복하여 전립선의 외측에 위치한 골반신경절(그림1)을 적출하고, 이를 차가운(4℃) Hanks' balanced salt 용액(GibcoBRL, Liketechnologies, USA)으로 옮겼다. 수초를 벗기고 작은 틈새를 낸 후 이를 0.6 mg/ml collagenase(type D), 0.1 mg/ml trypsin 과 0.1 mg/ml DNase type I을 함유한 6 ml 의 modified Earle's balanced salt 용액(EBSS, pH 7.4)이 들어있는 25cm<sup>2</sup>배양플라스크로 옮긴 후 1시

간 동안 35°C에서 빠른 속도(100 *strokes/min*)로 흔들면서 배양하였다. 배양 직전 배양 플라스크 내로 95% O<sub>2</sub>~5% CO<sub>2</sub>를 약 2분간 공급하였다. 이때 EBSS에는 3.6 g/L 의 *glucose*와 10 mM HEPES를 포함시켰다. 배양 후 신경세포들은 10 초간 세계 흔들어서 단일 신경세포로 분리한 후 1% *glutamine*, 1% *penicillin-streptomycin*, 그리고 10% fetal bovine serum(FBS)(Biowhittaker, Cambren, USA)가 포함되어 있는 minimal essential media(MEM)(GibcoBRL, Liketechnologies, USA)를 8 ml 정도 넣어 *trypsin*을 비활성화 시켰다. 임상용 원심분리기(Hanil, Korea)를 이용하여 1,200 rpm의 속도로 5분간 원심분리해서 세포를 두 번 씻어내고 분리된 단일 신경세포들을 MEM에 재 부유(*resuspend*)시킨 뒤, poly-L-lysine으로 코팅되어 있는 35 mm 폴리스티렌 배양접시(Corning, NY, USA)에 *plating* 하였다. 이를 37°C 세포 배양기(Humidified CO<sub>2</sub> incubator; 95% air-5% CO<sub>2</sub>)에서 사용 때까지 배양하였다.

#### 2.4. cDNA 마이크로어레이에 의한 유전자 발현 윤곽 확인

분리된 골반신경절을 RNA degradation 방지를 위해 즉시 RNAlater (Sigma, USA)에 옮겨 지방 조직과 수초를 제거하고 Trizol reagent(Ivitrogen, Carlsbad CA, USA)를 사용하여 총 RNA를 분리한 후 정량 및 품질을 확인하였다. RiboAMP RNA Amplification Kit(GeneAMP, USA)를 사용하여 소량의 RNA를 마이크로어레이에 필요한 양 만큼(50 µg) 증폭시킨 후 준비된 각 RNA와 oligodT primer를 70°C에서 10분 반응시킨 후 buffer, dNTP, DTT, Superscript II와 대조군에는 Cy3-dCTP를, 실험군에는 Cy5-dCTP를 각각 넣어 42 °C에서 2시간 반응 시킨 후 스타용액을 넣고 다시 65 °C에서 10분간 반응하여 표지된 cDNA를 합성하였다. 표지된 각각의 cDNA를 sodium acetate와 ethanol을 첨가하여 -20°C에서 30분간 방치시킨 후 원심 분리하여 정제한 후 적당량의 hybridization solution에 녹였다. Cy3와 Cy5로 labeling 된 각각의 cDNA를 잘 섞어 끓는 물에 2분간 변성 (*denaturation*)시켰다. 변성된 혼합 cDNA를 45 °C에서 20분간 반응시킨 후 기포가 생기지 않도록 조심스럽게 쥐 백금 13K 마이크로어레이 슬라이드에 로딩한 후 커

버글라스를 덮고 코니칼튜브에 조심스럽게 넣은 후 뚜껑을 잘 닫고 hybridization 오븐에 넣어 습도를 유지한 상태로 62 °C에서 12~15시간 반응시켰다. 2x SSC, 1x SSC, 0.2x SSC 세척액의 순서로 hybridized chip을 세척한 후 800 rpm에서 3분간 원심 분리하여 슬라이드를 건조 시켰다. 마이크로어레이 스캐너(GenePix Personal 4100A, Exon Instrument)를 이용하여 건조된 슬라이드를 스캐닝한 후 분석하였다 (GenoCheck, Korea).

## 2.5. 역전사 연쇄 중합반응(RT-PCR)

분리한 골반신경절로부터 guanidinium thiocyanate-phenol-choloroform추출 방법을 이용하여 총 RNA를 분리하였다(Chomczynski 및 Sacchi, 1987). 먼저 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 용해시킨 다음 페놀 및 클로로포름을 가하여 얼음위에 15분 이상 세워두었다. 이를 4 °C에서 10,000 xg로 15분간 원심 분리한 후 상층액을 조심스럽게 취하여 동량의 이소프로페놀과 잘 섞은 뒤 -20 °C에서 1시간 이상 세워두어 RNA를 침전시켰다. 다시 4 °C에서 10,000 xg로 15분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었으며, 이를 다시 75 % 에타놀로 씻어낸 후 원심 분리하여 RNA 샘플을 얻었다.

정량한 1 µg의 RNA를 1 mM dNTP, 50 µM oligod(T), 20 U RNase inhibitor와 50 U murine leukemia virus reverse transcriptase(Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA)와 함께 37 °C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이어 역전사 연쇄중합반응은 선택한 여러 primer들을 이용하여 적당한 조건에서 이루어졌다. 역전사 연쇄중합반응 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.5 % agarose gel에 전기 영동하여 관찰하였다. 양성 대조군으로는 쥐의 뇌 조직에서 총 RNA를 분리하여 실험에 사용하였다. 특정 primer는 표1에 도시하였다.

## 2.6. 실시간 역전사 연쇄 중합반응(Real-time PCR)

총 RNA의 분리와 cDNA합성은 전술한바와 같고 내부대조군(Internal control)은  $\beta$ -actin의 cDNA를 PCR로 증폭시켰다 (2.5를 참조). 합성된 총 cDNA 50 µg과 1X



QUANTITECT SYBR Green PCR Master Mix, 0.5  $\mu$ M primer pairs를 섞어 역전사 연쇄 중합반응 반응 혼합물을 제작하였다. 준비된 역전사 연쇄중합반응 반응 혼합물을 95  $^{\circ}$ C 15 분 동안 예열(preheating)한 후 95  $^{\circ}$ C에서 15초, 60  $^{\circ}$ C에서 30초, 72  $^{\circ}$ C에서 60초의 주기로 55회 반복 실시간 역전사 연쇄중합반응을 수행하고 (Rotor-Gen 3000 thermal cycler, Corbett Research, USA) 55  $^{\circ}$ C에서 99  $^{\circ}$ C까지의 온도로 용해곡선을 그려 primer의 특이성을 확인하였다. 실시간 역전사 연쇄중합반응 결과는  $\beta$ -actin으로 보정하고 2-CT 방법으로, 먼저 역치(CT)를 정한 후  $\Delta T(\text{대조군, 거세}) = \text{CT}(\text{수용체}) - \text{CT}(\beta\text{-actin})$ 으로 구하고 다시  $2^{\Delta\Delta T(\text{receptor})} = \Delta T(\text{cast}) - \Delta T(\text{sham})$ 를 구한 후 2의 제곱수로 하여 몇 배 변화 되었는지 분석하여 상대적 정량하였다(Lvsk 등 2001). 특정 primer는 표2에 도시하였다.

## 2.7. *In Vitro* 실험

분리된 골반신경절세포에  $\text{H}_2\text{O}_2$ (Sigma, USA), rat IL- $\beta$ , rat TNF- $\alpha$ (Endogen, Woburn; USA)등을 24시간 전처치하여 니코틴성 아세틸콜린 전류의 변화를 조사하였다. TNF- $\alpha$ 를 10 ng/ml와 50 ng/ml으로 24시간 전 처치하여 최적농도를 찾은 후 50 ng/ml으로 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 전 처치하여 그 작용의 최적시간을 찾았다. 이후에는 최적시간 및 최적농도로 실험을 하였다.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 IL- $\beta$ 도 위와같은 방법으로 테스트하였다. Rat IL- $\beta$ , rat TNF- $\alpha$ 는 유효기간이 짧기 때문에 bovine serum albumin(BSA) 2.5 mg을 PBS용액 1 ml 용해시키고 그 용액에 TNF- $\alpha$  혹은 IL- $\beta$ 를 용해시켜 분장하여 -70  $^{\circ}$ C에 보관하여 사용하였다.

## 2.8. 전기생리학적 실험

이온 전류는 전형적인 전세포이온전류 측정방법(whole-cell patch-clamp) 방법으로 기록하였다(Hamil 등, 1981). 전극은 Corning 7052 borosilicate 유리모세관(외경-1.65 mm, 내경-1.2 mm, Garnaer Glass Co, Claremont, CA, USA)로부터 P-97 Flaming-Brown micropipette puller (Sutter, Instrument Co, USA)를 사용하여 만들었다. 만들어진 전극은 Sylgard 184로 코팅을 하고 microforge로 열처리하여 다

듬었고, 전극내부에 용액을 채웠을 때는 저항이 2~3 MΩ이 되는 것을 사용하였다. 세포가 들어 있는 배양접시를 도립현미경(Nikon)위에 올려놓고, 세포외액을 중력에 의하여 약 1~2 ml/min 속도로 관류되도록 하였다. 세포막의 전기용량(membrane capacitance)과 직렬 저항(series resistance)은 patch-clamp amplifier(Axonpatch 1D, Axon Instruments, Foster city, CA, USA)에 내장된 기능으로 80 % 이상 보정하였다. 전압의 자극프로토콜 및 니코틴 전류기록은 ITC-18아날로그/디지털 전환기(Instrutech, Port Washington, NY, USA)가 연결된 맥킨토시 컴퓨터에 정착되어 있는 S5(Stephen R, Ikeda 박사 제작) 프로그램을 이용하였다. 니코틴성전류는 2-5 kHz 고대역 필터링(-3 dB: four-pole Bessel)한 뒤, 컴퓨터의 하드디스크에 저장하였고, IGOR PRO(Wave-Metrics, Lake Oswego, OR, USA)로 분석하였다. 모든 실험은 실온(20~22 °C)에서 실행하였다. 본 실험에 사용된 측정 장치는 그림2에 도식적으로 나타내었다.

## 2.9. 세포내 활성산소 측정

Hydroethidine(HET)(Sigma-Aldrich, Fluka, USA)을 20 % DMSO(Dimethyl sulfoxide)로 용해한 후 0.1 M phosphate buffer solution(PBS)에 1 mg/ml 되게 준비하였다. 준비된 용액을 마취된 쥐 꼬리정맥에 0.3 ml 주입하고 30분 후 골반신경절을 분리하였다. 분리한 신경절은 PBS로 잘 씻어 낸 후 Gel/Mount mounting 용액에 담겨서 -70 °C에 보존하였다. 골반신경절 조직은 두께가 20 μm 두께의 얇은 절편을 하여 커버슬립에 옮겼다. 이 조직은 형광현미경(Olympus BH2-RFCA) 장치로 형광을 측정하였다. 형광은 FITC로 측정하는데 즉, ET가 480 nm와 505 nm 의 빛으로 번갈아 가며 여기(excitation)시켰을 때 535 nm emission)로 방출되는 형광강도를 측정하였다.

## 2.10. 실험용액 및 약물

### 2.10.1 실험 용액

니코틴성 아세틸콜린 전류의 측정을 위해 사용된 전극 내 용액(internal

solution)의 조성(mM)은 30 KCl, 100 K<sup>+</sup>-gluconate, 10 HEPES, 10 glucose, 10 EGTA, 10 Tris-phosphocreatine, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 5 MgATP, 0.3 Na<sub>2</sub>GTP (pH 7.2, 293 mOsm/kg.H<sub>2</sub>O)이며 세포외 관류액 조성(mM)은 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 10 glucose (pH7.4, 320 mOsm/kg.H<sub>2</sub>O)이었다.

### 2.10.2. 약물

Collagenase D는 (Rhoche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)에서, Trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals(Indianapolis, IN, USA)로부터 구입하였고 아세틸콜린, DNase type I 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 세포 배양에 필요한 모든 배지 및 약물은 GibcoBRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 테스토스테론은 Tokyo kasei kogyo co. LTD( KITA-KU, TOKYO, JAPAN)에서, Streptozotocin은 Wako chemicals USA, Inc(Wako, Richmond, USA)에서 구입하였다. 약물은 7-array-polyethylene tube와 연결된 가스크로마토 그래프용 모세관 끝을 신경세포의 100 μm 이내에 위치하도록 하여 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

## 2.11. 데이터 분석 및 통계처리

모든 데이터 분석과 그래프 구성을 위해 IGOR 프로그램을 사용하였다. 농도-반응 곡선(concentration-response curve)은 Prism 4.0 software(Graphpad software Inc, San Diego, CA, USA)를 사용하여 Hill 공식, 즉  $I_{ACh} = \text{Max}I / (1 + IC_{50} / [ACh])^{-1}$ 을 사용하여 EC<sub>50</sub>를 구하였다. 전류의 크기는 peak점에서 측정하였고 세포막 전기 용량(C<sub>m</sub>)은 20 ms, 10 mV 과분극 자극을 가한 뒤 얻은 용량전류(capacitative current)의 면적을 측정하는 IGOR 매크로를 사용하여 구하였다. 모든 결과는 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 통계적인 의미는 Student t-검정(Unpaired)으로 확인하였다. p < 0.05인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

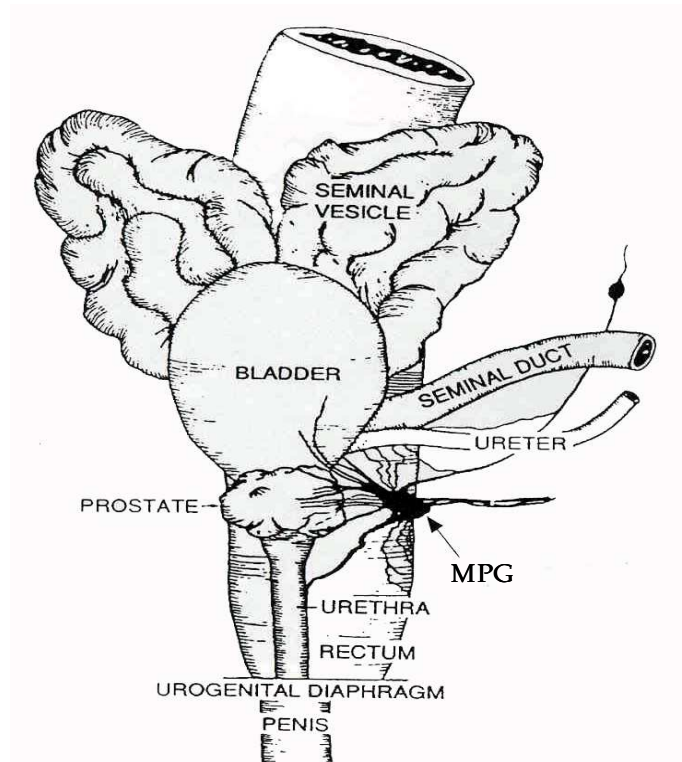


그림 1. 수컷 쥐 (SD) 주골반신경절(major pelvic ganglion)의 해부학적 위치 모식도. 전립선의 외측에 위치한 좌우 한 쌍의 골반신경절을 적출하여 실험에 사용하였다. 화살로 표시된 것이 MPG 이다.

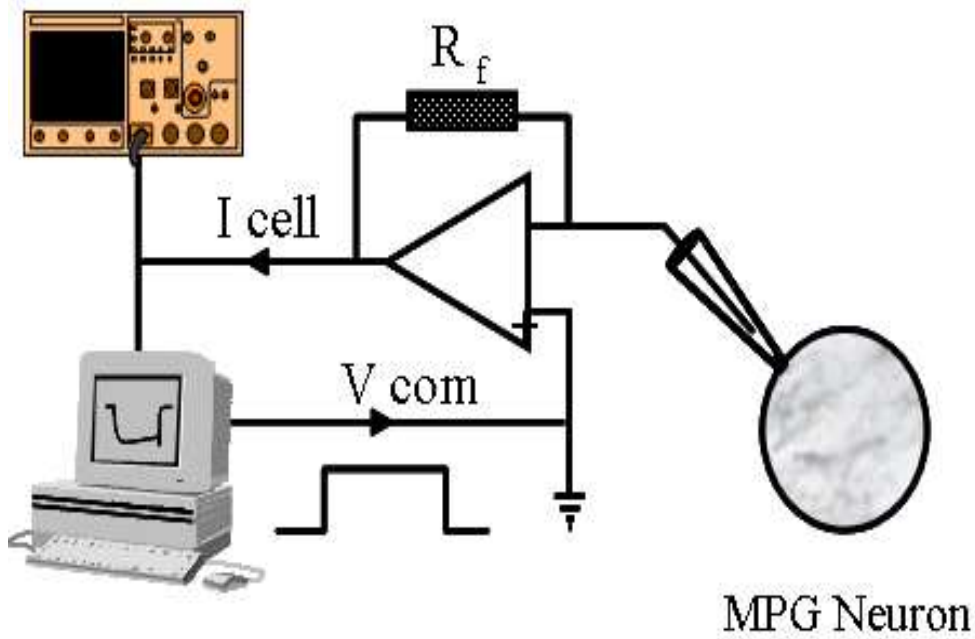


그림 2. 막전압 고정법에 의한 이온 채널 측정 장치의 모식도. Patch-clamp 전용 software(S5)를 이용하여 만든 펄스프로토콜로 고정하고자 하는 전압( $V_{com}$ )을 A/D converter(ITC-18)를 거쳐 아날로그 신호로 바꾸어 패치 피펫을 통하여 세포에 전달하고 세포막에 존재하는 이온채널의 활성 정도에 따라 변화하는 전압을 영점(null)하기 위해 증폭기(Axo-1D)를 통하여 흘려주는 전류( $I_{cell}$ )를 다시 디지털로 전환하여 컴퓨터의 하드디스크에 저장하였다.

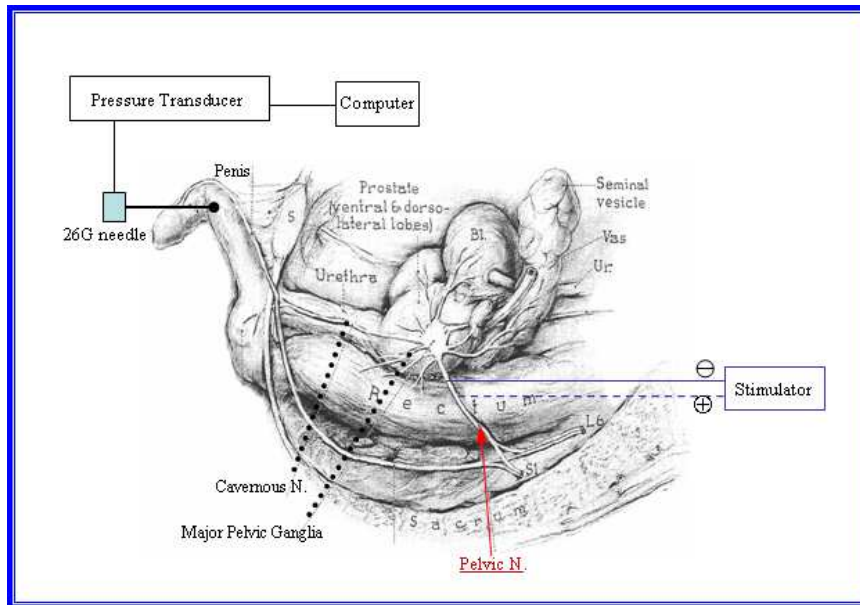


그림 3. 음경압 측정 장치 모식도(Nervous control of the urogenital system, Maggi, 1993). 절전 부교감 신경(efferent input)인 골반신경(penile nerve)에 백금 전극을 장착하고 이를 stimulator와 연결한다. 다음 음경을 덮은 피부를 전부 박리하여 귀두부와 음경해면체 부위를 노출시키고, 음경해면체를 촉지하면서 음경해면체 내에 헤파린(heparin 25 IU/ml)이 포함 된 생리식염수로 채워진 26 Gauge 주사바늘을 삽입한 후 이를 pressure transducer에 연결하고 polygraph와 MacLab에서 음경압을 기록하였다. 골반신경(pelvic nerve)을 전기적으로 자극(16 Hz frequency, 5 ms duration, 4 V)하여 음경압을 측정하였다.

표 1. 신호전달 인자의 역전사 연쇄중합반응에 사용된 primer들

Primer	Sequence (5' to 3')	Size (bp)
STAT3	Sense AAG GACATC AGT GGC AAG	715
	Antisense ACA GGC GGA CAG AAC ATA G	
NF- $\kappa$ B	Sense CCC CCT GAG AAA GAA ACA CA	209
	Antisense AGC ATC TTC ACA TCT CCC GTA	
$\beta$ -actin	Sense ATG GTG GGT ATG GGT CAG AA	250
	Antisense TCC ATA TCGTCC CAG TTG GT	

표 2. 실시간 역전사 연쇄중합반응에 사용된 primer들

Primer		Sequence (5' to 3')	Size (bp)
<i>nAChR</i> $\alpha 3$	Sense	CC AAG ACA TCA CGT ACT CG	98
	Antisense	CAC AGT GAG GAA GGA GAT GA	
<i>nAChR</i> $\alpha 5$	Sense	GT GCT CGT CTC TCT GAC TG	101
	Antisense	TGG TGA ACA CCA AGT ACT CC	
<i>nAChR</i> $\beta 4$	Sense	CTC TGC TCC AGT GTC ATT TC	94
	Antisense	TGG TGA ACA CCA AGT ACT CC	
IL-1 $\beta$	Sense	CAC CTC TCA AGC AGA GCA CAG	79
	Antisense	GGG TTC CAT GGT GAA GTC AAC	
IL-1 receptor	Sense	CAT TCA GAC ACC TCC AGC AGT TC	116
	Antisense	ACC CAGAGC GTA TCA TCC TTC AC	
IL-6	Sense	TCC TAC CCC AAC TTC CAA TGC TC	80
	Antisense	TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG CC	
IL-6 receptor	Sense	AAG CAG GTC CAG CCA CAA TGT AG	80
	Antisense	CCA ACT GAC TTT GAG CCA ACG AG	
TNF- $\alpha$	Sense	AAA TGG GCT CCC TCT CAT CAG TTC	111
	Antisense	TCT GCT TGG TTT GCT ACG AC	
TNF- $\alpha$ receptor	Sense	TGA AAC AAC ACT TCA GAC ACC GTG	83
	Antisense	AGG CAT GAT TGC AGA TGG TTC CAG	
Androgen receptor	Sense	ACC CTC CCA TGG CAC ATT TT	120
	Antisense	TTG GTT GCC ACA CAG CAG CAC AG	
$\beta$ -actin	Sense	CCT CGT GGT GAT TCA GGT TT	149
	Antisense	TGT CAC ATG GAT GGA GCT GT	



## 제 3 장 결 과

### 거세 쥐 모델에서의 결과

#### 3.1. 거세 쥐 모델의 평가

본 연구의 중심 가설 중의 하나인 “내분비계의 이상, 특히 남성호르몬의 감소가 발기를 지배하는 자율신경 기능의 가소성을 조절 한다”는 것을 증명하기 위해 거세 쥐 모델(castrated rat model)을 만들었다. 남성호르몬 중 대표적인 테스토스테론(testosterone)은 전체 순환량의 95%가 고환의 Leydig 간질세포에서 만들어지고, 5%는 부신피질에서 만들어지기 때문에 고환을 제거하면 혈장 테스토스테론의 현저한 감소를 유발할 수 있다. 나이가 3 주령 된 S/D 쥐의 고환을 제거한 후 4 주 후에 테스토스테론의 혈청함량(serum testosterone)을 측정한 결과  $18 \pm 1$  pg/ml( $n=6$ )로 대조군  $391 \pm 23$  pg/ml( $n=4$ ) 보다 현저히 감소되었다.

이러한 테스토스테론의 감소 효과가 신경인성 발기부전으로 나타나는지 여부를 음경을 지배하는 골반신경을 자극하고 음경압을 측정하여 확인하였다. 음경 발기압은 대조군에서 음경압이  $77.6 \pm 1.7$  mmHg( $n=10$ ) 인 반면, 거세군(castration)에서는  $28.6 \pm 4.4$  mmHg( $n=5$ )로 나타났다. 형태적으로도 특히 음경의 굵기 역시 테스토스테론 및 음경압처럼 현저히 감소해 있었다. 거세 후 테스토스테론을 10 mg/kg 씩 매주 투여 한 군(cast+T)에서는 신경자극에 의한 음경압이  $65.1 \pm 4.6$ mmHg( $n=5$ )로 대조군에 근접하여 회복되었으며(그림 4), 음경의 굵기 역시 거세군에 비해 현저히 증가하였다. 대조군과 거세 쥐의 해면체에 papaverine(0.2 ml, 농도 5 mg/ml)을 직접 투하면 각각  $55.1 \pm 4.6$  mmHg( $n=3$ ),  $44.5 \pm 5.3$  mmHg( $n=3$ )로 통계적으로 유의한 차이( $p > 0.05$ )를 나타내지 않았다.

한편, 혈중 테스토스테론이 감소되면 안드로젠수용체(androgen receptor) 발현의 감소가 동반된다고 보고되어 있기 때문에 실시간 역전사 연쇄중합반응방법으로 테스토스테론의 수용체인 안드로젠수용체의 발현 정도를 골반신경절에서 측정 한 결과 거세 모델에서 현저히 감소되었고, 테스토스테론 투여에 의하여 어느 정

도 감소가 억제됨을 알 수 있었다. 거세군에서 안드로젠수용체 발현은 대조군에 비하여  $0.17 \pm 0.04 (n=3)$ 배 감소하였고 테스토스테론 투여군은 대조군에 비해  $0.61 \pm 0.04 (n=3)$ 로 나타났다(그림 5).

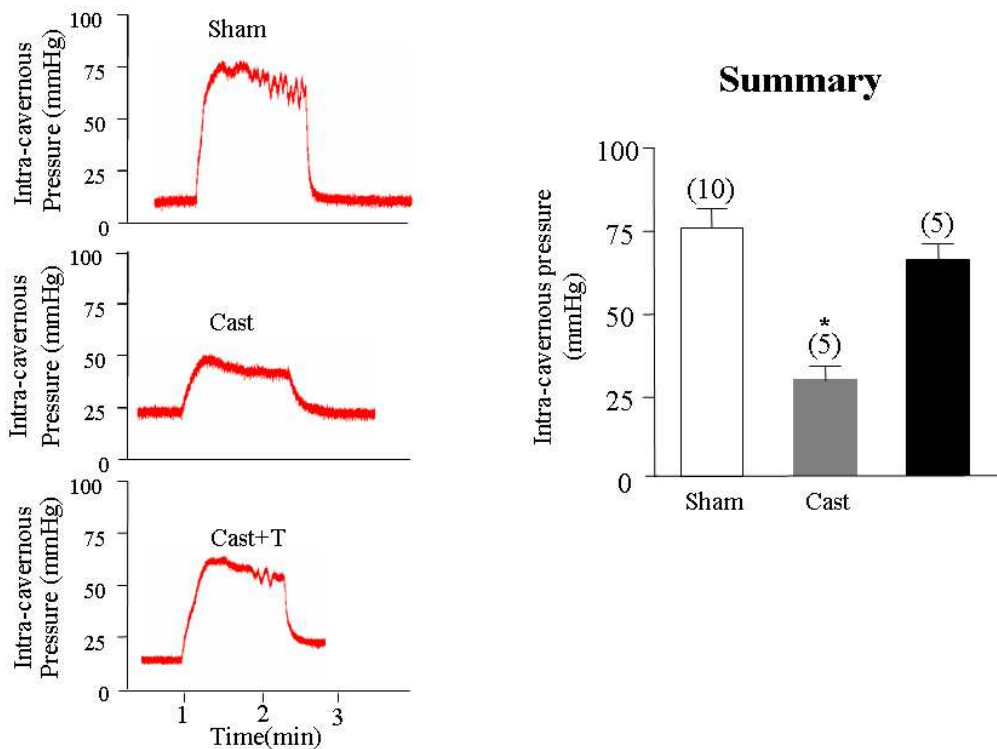


그림 4. 대조군(Sham), 거세군(Cast) 및 거세 후 테스토스테론 투여군(Cast+T)에서의 골반신경 자극에 의해 유도되는 음경압 비교. A는 대조군, 거세군 및 거세 후 테스토스테론을 투여군에서 음경압 측정 시 기록이고, B는 그 결과를 요약한 것이다. 결과는 평균±표준오차로 나타내었고, 통계적인 유의성은 one-way ANOVA방법을 사용 한 후 Student t-검정(Unpaired)를 사용하여 통계적 유의성을 검사하였다. 괄호 안의 수는 실험동물 개수를 가리킨다. \*  $p < 0.05$ .

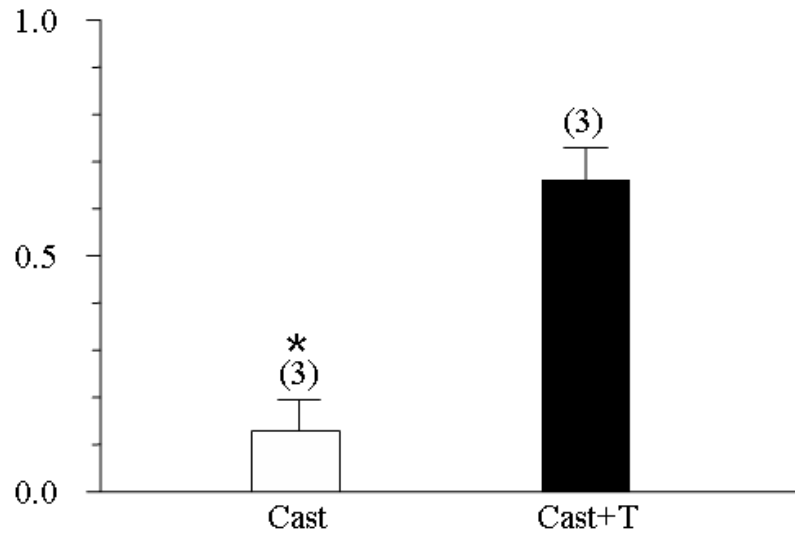


그림 5. 대조군(Sham), 거세군(Cast) 및 거세 후 테스토스테론 투여군(Cast+T)의 골반신경절에서 안드로젠수용체의 발현 비교. 결과는 comparative  $2^{-\Delta\Delta ct}$ 법으로 분석하였는데 거세 군에서 안드로젠수용체의 발현이 감소되었고 거세 후 테스토스테론 투여 군에서는 현저히 증가하였다. 골반신경절 조직에서 Trizol reagent를 사용하여 RNA를 분리하여 cDNA로 합성한 후 PCR 증폭하였다. 반응 조건은 95 °C에서 15분 전 처리하고 95 °C에서 15초, 60 °C에서 30초, 72 °C에서 60초 주기로 55회 반복하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타냈고 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다. \* p<0.05

### 3.2. cDNA 마이크로어레이 분석을 통한 유전자 발현 율곽 조사

거세가 쥐의 골반신경조직에서의 유전자 발현에 미치는 영향을 cDNA 마이크로어레이분석을 통하여 대조군(Sham)과 비교하여 확인 하였다. 각 조직 군에서 추출한 총 RNA의 정량과 품질을 확인한 후 Ambion사의 MessageAMP II aRNA Kit을 사용하여 증폭하였다. 증폭된 RNA 샘플은 역전사 과정을 통하여 fluorescent dCTP가 *incorporation*된 cDNA를 합성하였으며 이것을 cDNA 칩에 *hybridization*을 실시하였다. 사용한 마이크로어레이 칩은 Genocheck사의 백금biochip Rat 13K cDNA chip으로 기능이 잘 알려진 2,913개의 유전자와 기능이 잘 알려지지 않은 10,471개의 EST 유전자로 이루어져 있다. DNA chip 결과의 분석 과정은 *scanning*을 통하여 얻어진 spot의 *signal intensity* 수치 데이터를 사용하여 *global normalization*과 *intensity-dependent normalization*을 실시하였다. 그림6A와 그림6B는 각각 *hybridization* 후 칩의 이미지와 2 fold 발현의 변화를 보여주는 유전자들의 *scatter plot*을 나타낸 것이다. 거세 후 4주에 전체 13K 유전자들 중에서 2-fold 이상 발현 증가 또는 감소된 유전자의 수는 각각 40개와 251개로 발현이 감소된 유전자수가 훨씬 많았다.

그림6C에서 보여주는 바와 같이 발현이 변화된 유전자를 기능적으로 분류한 결과 세포 대사 및 세포 성장에 관련된 유전자가 현저히 감소하였다. 특히, 세포사멸(*cell death*)에 관련된 유전자는 오히려 증가하는 경향이 있는 데 이러한 결과는 거세에 의한 골반신경절에서 신경세포 수의 감소와 관련 있을 것으로 추측된다. 무엇보다도 중요한 것은 신경기능에 중요한 이온채널, 시냅스 전달, 신호 전달에 관련된 유전자가 많은 수는 아니지만 감소된 것이었다.

이전의 다른 연구결과 (Huang 등 2004)로부터 유전자들의 발현의 변화 폭이 크지 않더라도 (즉, *fold change* < 2), 기능의 변화가 크게 나타날 수 있음을 확인하였기 때문에 cDNA 마이크로어레이 결과에서 1.5이상의 발현 변화가 있는 신경기능 관련 유전자를 선별하였다(표 3). 이들 유전자 중 골반 자율신경계에서 시냅스 전달을 매개하는 니코틴성수용체 서브유닛의 발현이 감소된 것이 확인되어 이

후의 실험에서는 니코틴성수용체의 발현 변화를 검증하고 기능의 변화를 조사하였다.

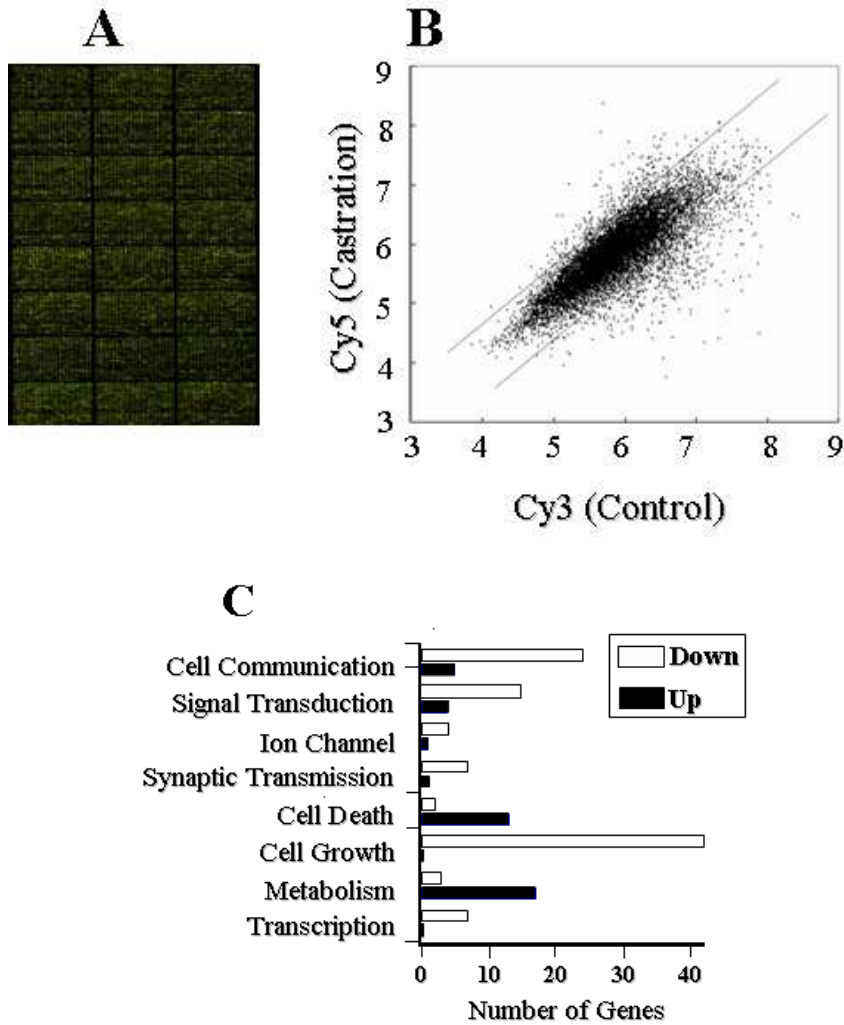


그림 6. 골반신경조직에서 거세에 의한 유전자 발현 변이 및 기능별 발현 변이 유전자 분류. A는 hybridization 후 칩의 이미지, 및 B는 hybridization 후 2 fold 발현의 변화를 보여주는 유전자들의 scatter plot을 나타낸 것이다. 분석하여 얻어진 intensity (Cy5/Cy3)를 x, y로 하며 이와 같은 차트를 통하여 유의한 유전자를 확인하는데 이 차트를 scatter plot이라고 하며 대부분 45°의 기울기를 나타낸다. 두 선 안에는 ratio가 1인 유전자들이고 선 밖에는 변화된 기능 유전들이다. C는 발현이 변화된 것을 기능 유전자들을 선별하여 나타낸 것이다. 발현이 증가된 기능 유전자 수는 40개이고 감소된 유전자 수는 251개로 나타났다.

표 3. 거세에 의해 발현이 변화된 신경기능 관련 유전자리스트

<i>Ontology</i>	<i>Accession No.</i>	<i>Gene Name</i>	<i>Fold</i>
Ion Channel and Synaptic	AI145571	Nicotinic receptor, alpha 5	-1.6
	AA875206	Ubiquilin 1	-4.5
Transmission	AJ029309	NMDA2D, glutamate receptor	-1.9
	AA957304	GABA <sub>A</sub> receptor-associated protein	-2.1
	AI145393	Syntaxin binding protein	-2.7
	AJ070040	Monoamine oxidase A	-2.2
	AA956149	Neurexin 1	-2.1
	AA996551	Vesicular inhibitory amino acid transporter	-1.6
	AJ072060	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> pump, α 1	-3.7
	Ca <sup>2+</sup> Signaling	AJ045449	LPA receptor
AI172620		Erythropoietin receptor	-1.9
AA964716		IP3 receptor 3	-1.6
AA858958		14-3-13 protein, gamma subunit	-4.0
AA858957		14-3-13 protein, theta subunit	-2.4
AA859448		Calreticulin	-1.6
Receptor & G-protein	AA858510	prostaglandin E receptor	-3.7
	AJ072098	Neuotensin 2 receptor	-1.6
	AA955255	Gproein α <sub>o</sub> subunit	+1.6
	AA925099	PDGF, alpha subunit	+1.6
	AA819128	G protein beta 2 subunit	-1.6
	AA901297	G protein beta 5 subunit	+2.0
	AA899129	G protein gamma 8 subunit	-1.6
	AA817948	Small G protein, Rac 1(Rho family)	-1.9
Hormone & growth Factor	AJ029586	Cholecystokinin	-2.5
	AA963258	Insulin-like growth factor	-1.6
	AA924677	Insulin-like growth factor binding protein 2	-2.6
	AA819611	Insulin-like growth factor binding protein 3	+2.2



### 3.3. 거세가 골반신경세포의 니코틴성수용체 발현 및 활성화에 미치는 영향

#### 3.3.1. 실시간 역전사 연쇄중합반응 분석에 의한 니코틴성수용체의 발현 변화 검증

cDNA microarray 분석 결과 거세에 의해 골반신경절에서 니코틴성수용체  $\alpha 5$  서브유닛의 발현이 감소되는 것이 확인되었기 때문에 거세에 의한 신경인성 발기 부전은 발기를 지배하는 부교감 신경에서 니코틴성수용체의 발현감소에 의한 시냅스 전달의 억제에 기인한다는 가설을 세울 수 있었다. 최근의 연구에서 골반 자율신경절에서의 발현되는 니코틴성수용체는 주로  $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ 의 서브유닛으로 구성되어 있는 것이 역전사 연쇄중합반응과 약리학적 방법으로 확인되었다(Park 등, 2006). 본 연구에서 사용한 cDNA 칩에는 니코틴성수용체 서브유닛 한 종류만 포함되어 있어  $\alpha 5$  서브유닛의 변화만 확인 할 수 있었기에 실시간 역전사연쇄중합 반응으로 골반신경절 조직에 함유된 주요한 니코틴성수용체  $\alpha 3\alpha 5\beta 4$  서브유닛의 발현 변화를 구체적으로 조사하였다(그림7). 그 결과는 골반신경절에서  $\alpha 3$ 는 -1.98 배( $0.24 \pm 0.01$ ),  $\alpha 5$ 는 1.65배( $0.27 \pm 0.01$ ),  $\beta 4$ 는 1.54배( $0.37 \pm 0.03$ )로 서브유닛의 발현이 각각 현저히 감소하였음을 알 수 있었다. 이러한 발현의 변화는 테스토스테론을 투여에 의해 니코틴성수용체 서브유닛인  $\alpha 3$ 는 1.2배( $0.66 \pm 0.02$ ),  $\alpha 5$ 는 1.37배( $0.54 \pm 0.07$ ),  $\beta 4$ 는 1.24배( $0.68 \pm 0.03$ )로 발현의 감소가 억제되는 것을 보여 주었다.

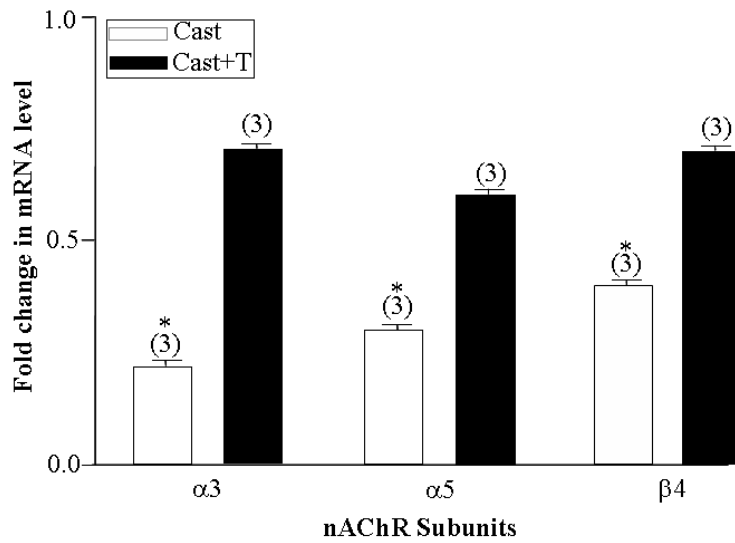


그림 7. 거세와 거세 후 테스토스테론 투여한 쥐의 골반신경절 조직에서 니코틴성수용체 서브유닛의 발현 변화에 대한 실시간 역전사 연쇄중합반응 분석. 결과는 comparative  $2^{-\Delta\Delta ct}$ 법으로 분석하였는데 거세 군(□)에서 α3, α5, β4 서브유닛의 발현이 현저히 감소하였음을 알 수 있다. 골반신경절 조직에서 Trizol reagent를 사용하여 RNA를 분리하여 cDNA로 합성한 후 사용하였다. 반응 조건은 95℃에서 15분 전 처리하고 95℃에서 15초, 58℃에서 30초, 72℃에서 60초 주기로 55회 반복하였다. 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다. 모든 데이터는 평균±표준오차로 나타냈고 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다. \* p<0.05

### 3.3.2. 거세가 골반신경세포의 니코틴성 아세틸콜린 채널의 활성화에 미치는 영향

거세 쥐 모델의 골반신경절세포에서 니코틴성수용체 서브유닛의 발현 감소로 인해 이온채널 활성화의 감소가 나타나는 지를 전기생리학적 방법으로 확인하였다. 전형적인 전세포이온전류 측정방법(whole-cell patch-clamp) 방법으로 막전압을 -60mV로 고정시킨 상태에서 ACh의 투여에 의해 유도되어진 니코틴성전류를 관찰하였다. 골반신경절세포에서 교감신경세포는 부교감신경세포에 비해 전류용량이 크고 GABA에 의한 Cl<sup>-</sup> 전류가 크게 나오고 T-형 칼슘전류가 있는 것이 그의 특성이다. 부교감신경세포는 5-HT에 의한 전류가 생성되는 것이 특성이라 한다. 대조군 골반신경절교감신경세포는 세포막 전류용량(C<sub>m</sub>, 57.1±2.9 pA/pF)이고 GABA(100 μM)에 의한 평균전류밀도(69.9±7.9 pA/pF)로 크게 나타났으며 T-형 칼슘전류밀도(3.7±0.5 pA/pF)로 나타났고 거세군 골반신경절교감신경세포에서는 전류용량(C<sub>m</sub>, 37.1±6.1 pA/pF)이고 GABA(100 μM)에 의한 평균전류밀도(49.9±10.3 pA/pF)가 크게 나타났으며 T-형 칼슘전류(2.7±1.0 pA/pF)도 나타났다. 거세군에서 대조군에 비해 전류의 밀도는 줄어들었지만 고유한 특성은 그대로 나타났다. 대조군 골반신경절부교감신경세포는 세포막 전류용량(C<sub>m</sub>, 20.8±2.1 pA/pF)이고 5-HT(100 μM)에 의한 평균전류밀도(91.9±15.9 pA/pF)가 크게, GABA에 의한 평균전류밀도(24.9±2.1 pA/pF)이고 T-형 칼슘전류는 나타나지 않았다. 거세군에서 골반신경절부교감신경세포는 세포막 전류용량(C<sub>m</sub>, 19.8±1.1 pA/pF)이고 5-HT(100 μM)에 의한 평균전류밀도(54.9±9.9 pA/pF)로 대조군보다 적지만 그래도 크게 나타났고, GABA에 의한 전류와 T-형 칼슘전류는 나타나지 않았다. 이러한 두 신경세포간의 특성의 차이를 이용하여 대조군(Sham), 거세군(Cast), 거세 후 테스토스테론 투여 군(Cast+T)의 골반신경절교감신경세포에서 니코틴성 아세틸콜린 채널의 아세틸콜린 농도-반응(dose-response relationship)관계를 Hill equation에 의해 fitting 하여 그림8에 나타내었다. 10 μM부터 10 mM로 Ach농도가 증가함에 따라 유발되는 니코틴성전류의 밀도도 비례하여 증가하였는데 대조군(EC<sub>50</sub> 225 μM), 거세군(EC<sub>50</sub> 201 μM) 및 거세 후 테스토스테론 군(EC<sub>50</sub> 200 μM)사이에 아세틸콜린의 채널의 활성화에 대한 역가(potency)의 차이는 나타나지 않았지만(One-way ANOVA, p>0.05) 그 효력(efficacy)은 거세군(612±145 pA/pF, n=5)에서 대조군

(809±57 pA/pF, n=6) 및 거세 후 테스토스테론 군(881±80 pA/pF, n=8) 보다 통계적으로 유의하게 낮았다(p<0.05). 그림 9에서는 골반신경절부교감신경절세포에서의 아세틸콜린의 농도-반응관계를 나타내었는데 대조 군(163 μM), 거세 군(178 μM) 및 거세 후 테스토스테론 투여 군(186 μM), 즉 세 군 간에 역가 차이(p>0.05)는 거의 없었지만 그 효력은 대조군(450±57 pA/pF, n=15), 거세군(268±55 pA/pF, n=16) 및 거세 후 테스토스테론 투여군(480±56 pA/pF, n=7)으로 나타났다. 교감신경 세포(24%)와 비교하여 부교감신경세포(40%)에서 그 낮은 정도가 현저하였다. 그림 10에서 골반교감신경세포에서 역가보다 낮은 농도, 즉 100 μM ACh에 의한 니코틴성전류의 밀도는 대조군에 비해 약간의 감소는 있었지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이에 반해 부교감 신경에서 ACh에 의해 유도되는 전류밀도는 대조군과 거세 군에서 각각 151±22 pA/pF(n=14)과 74±15 pA/pF(n=19)으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P<0.05). 거세 후 테스토스테론 투여 군에서는 122±8 pA/pF(n=11)로 거세군에 비해 전류 밀도가 현저하게 높았다(그림11).

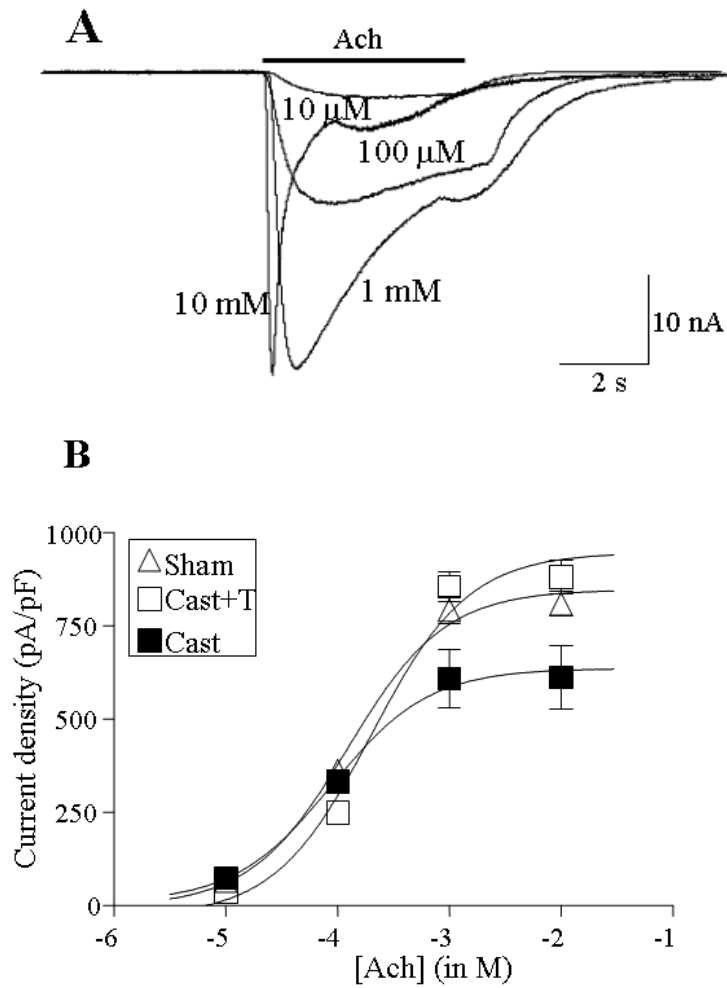


그림 8. 거세가 콜반신경절교감신경세포에서 니코틴성전류에 미치는 영향. A. Ach에 의한 니코틴성전류의 모양. ACh(10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM)에 의해 유도되는 전류의 크기를 측정하였는데 ACh농도가 증가함에 따라 유발되는 니코틴성전류의 크기도 증가하였다. B. ACh농도와 전류밀도 상관관계. 막 전압을 -60mV로 고정시키고 여러 농도의 아세틸콜린에 의해 유도된 전류밀도를 Hill 공식 즉,  $I_{ACh} = \text{Max}I / (1 + IC_{50} / [ACh])^{-1}$ 으로 관찰하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. ACh이 채널의 활성화에 미치는 효력(efficacy)은 거세 군에서 대조군 및 거세 후 테스토스테론 투여군 보다 낮았다.

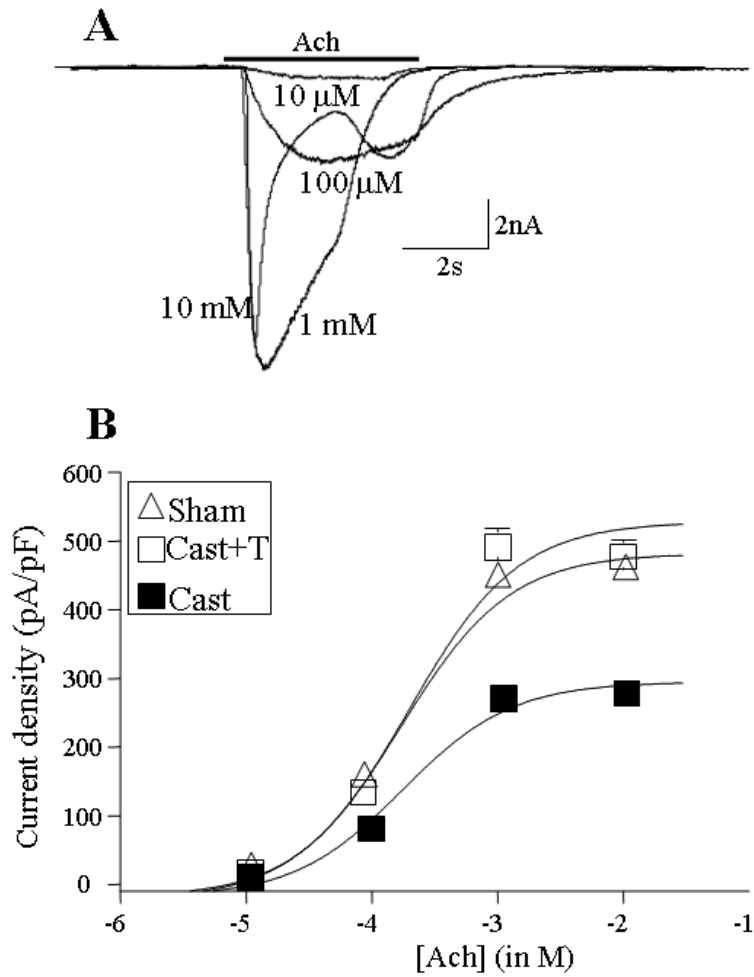


그림 9. 거세가 골반신경절부교감신경세포에서 니코틴성전류에 미치는 영향. A. Ach에 의한 니코틴성전류의 모양. 골반신경절부교감신경세포에서 ACh(10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM)에 의해 유도되는 전류의 크기를 측정하였는데 ACh농도가 증가함에 따라 유발되는 니코틴성전류의 크기도 증가하였다. B. ACh농도와 전류밀도 상관관계. 막 전압을 -60mV로 고정시키고 여러 농도의 아세틸콜린에 의해 유도된 전류밀도를 Hill 공식 즉,  $I_{ACh} = \text{Max}I / (1 + IC_{50} / [ACh])^{-1}$ 으로 관찰하였다. 모든 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였다. ACh이 채널의 활성화에 미치는 효력 (efficacy)은 거세 군에서 대조군 및 거세 후 테스토스테론 투여군 보다 낮았다. ( $p < 0.05$ ).

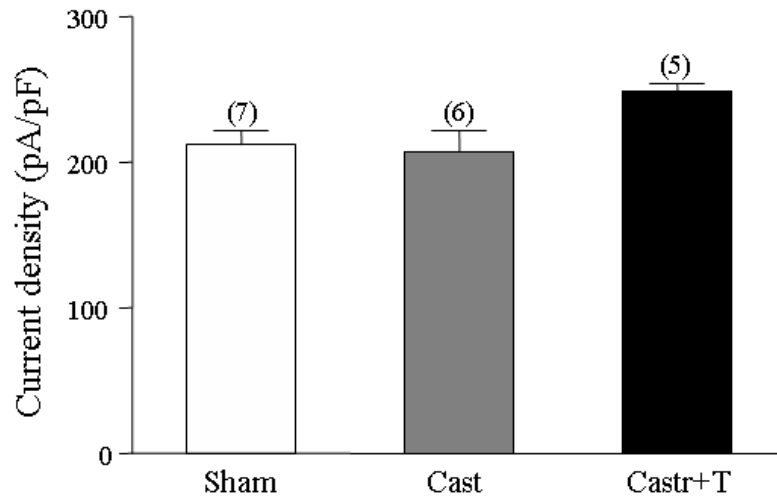


그림 10. 골반신경절교감신경세포에서 100  $\mu\text{M}$  ACh에 의해 유도된 전류의 크기 비교. 교감신경세포에서 막 전압을 -60 mV로 고정시킨 상태에서 100  $\mu\text{M}$  ACh에 의해 유도된 전류를 관찰하였고, 전류 최대값에서의 밀도크기를 대조군, 거세군, 거세 후 테스토스테론 투여 군에서 비교하였는데 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 괄호 안에는 실험 한 세포수이다.

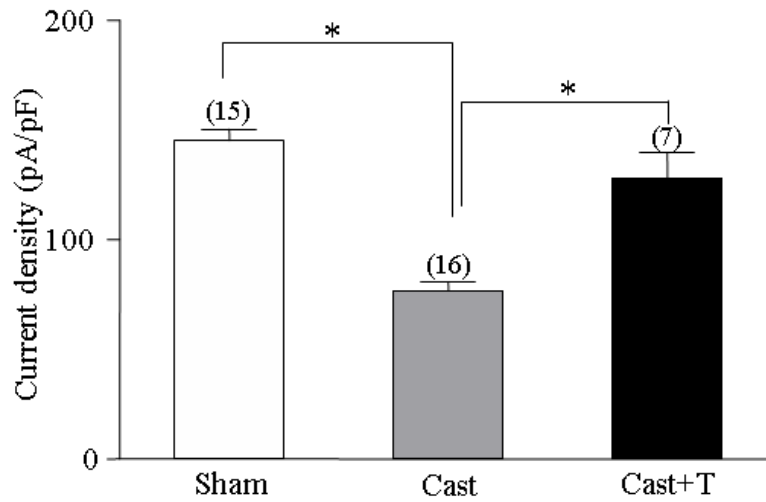


그림 11. 골반신경절부교감신경세포에서 100  $\mu$ M ACh에 의해 유도된 전류의 크기 비교. 부교감신경세포에서 막 전압을 -60 mV로 고정시킨 상태에서 100  $\mu$ M ACh에 의해 유도된 전류를 관찰하였고, 전류 최대값에서의 밀도크기를 대조군, 거세 군, 거세 후 테스토스테론 투여 군에서 비교하였는데 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 괄호 안에는 실험 한 세포수이다. \* $p < 0.05$ .



### 3.4 골반신경절세포에서 염증매개물질과 산화 스트레스 물질의 역할

#### 3.4.1. 거세 쥐 골반신경절에서 염증매개물질의 발현

노화, 당뇨, 스트레스 등 병태생리학적 상황은 내분비계 및 면역계의 변화를 초래하여 자율신경기능의 이상을 초래한다는 가설의 일부를 검증하였다. 이를 위해 먼저 거세 쥐의 골반신경절세포에서 전 염증매개체(*pro-inflammatory mediator*)인 사이토카인(*cytokine*) 및 그 수용체의 발현 변화가 나타나는지 실시간 역전사 연쇄 증합반응으로 확인하였다. 그 결과 대조군에 비해 거세 군에서 대표적인 사이토카인  $IL-1\beta$ 의 발현이 약 4배( $n=3$ ) 정도 증가하였고,  $IL-6$  수용체와  $TNF-\alpha$  수용체의 경우 각각 약 2.3배( $n=3$ ) 및 6배( $n=3$ ) 증가하였다(그림12).

#### 3.4.2. 사이토카인이 골반신경세포에서 니코틴성수용체 활성화에 미치는 영향

대표적 염증매개 물질들 중 하나인  $TNF-\alpha$ 를 50 ng/ml를 각각 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 처리하였을 때 부교감신경에서 니코틴성전류는 시간 의존적으로 감소하였는데 특히 24시간에서 현저히 감소하였다. 평균적으로 6시간 전처리 후 대조군과 실험군의 평균 전류 밀도는 각각  $160\pm 47$  pA/pF( $n=6$ )과  $138\pm 36$  pA/pF( $n=10$ ), 12시간 처리 후 각각  $57\pm 7$  pA/pF( $n=10$ )과  $37\pm 6$  pA/pF( $n=10$ ), 24시간 처리 후 각각  $51\pm 10$  pA/pF( $n=8$ )과  $17\pm 3$  pA/pF( $n=8$ ), 48시간 처리 후  $47\pm 15$  pA/pF( $n=4$ )과  $39\pm 15$  pA/pF( $n=4$ )이었다(그림14). 하지만, 교감신경절세포에서는  $TNF-\alpha$ 에 의한 ACh 전류의 크기에는 영향을 주지 않았다(그림13). 부교감신경세포에서 10 ng/ml 와 50 ng/ml  $TNF-\alpha$ 를 각각 24시간 처리하였을 때 평균 니코틴성 전류 밀도는 각각  $23\pm 8$  pA/pF( $n=3$ ) 및  $18\pm 3$  pA/pF( $n=8$ )으로 대조군( $61\pm 14$  pA/pF( $n=6$ ))보다 현저히 감소하였고 50 ng/ml  $TNF-\alpha$ 처리후 전류의 억제 10 ng/ml  $TNF-\alpha$ 로 처리 하였을 때보다 더 크게 나타났다(그림 15). 다른 염증매개 물질인  $IL-1\beta$ 를 여러 농도로 24시간 처리한 후 골반신경절부교감신경세포에서 전류를 측정하였는데 10 ng/ml( $23\pm 4$  pA/pF,  $n=10$ ) 혹은 50 ng/ml( $12\pm 6$  pA/pF,  $n=6$ )에서 니코틴성전류가 모두 대조군( $49\pm 7$  pA/pF,  $n=9$ )에 비하여 농도 의존적으

로 유의하게 감소하였다(그림 16).

### 3.4.3. 거세 쥐 골반신경절에서 활성산소의 발현 변화

테스토스테론의 감소가 산화스트레스를 일으킬 것이라는 가설을 증명하기 위하여 거세 쥐 골반신경절세포에서 산화스트레스 인자인 활성산소의 발현의 변화를 hydroethidine라는 형광물질을 이용하여 측정하였다. Hydroethine는 산화되면 ethidium(ET)로 되는데 HET 산화는 O<sub>2</sub>에 의해서 일어난다고 한다(Bucana 등, 1986; Rothe 등, 1990). HET는 특정 DNA와 결합하여 조직에 고정되는 능력을 가지고 있어서(Bucana 등, 1986) 신경에서 활성산소에 관련된 연구에 많이 사용되고 있다. Hydroethine 0.3 mg을 골반신경절 분리 30분전에 꼬리 정맥으로 주입하였다. 골반신경절 조직은 20 µm section 한 후 형광현미경에서 관찰하였는데 대조군에 비해 거세 후 골반신경절 조직에서 형광을 나타내는 골반신경의 수가 더욱 많은 것을 관찰 할 수 있었다(그림17).

### 3.4.4. 과산화수소가 골반신경세포에서 니코틴성수용체 활성화에 미치는 영향

대표적 활성산소종의 하나인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 골반신경세포에 24시간 전처리 하였을 때 부교감 신경에서 니코틴성전류는 농도 비례하여 감소하였고 평균 전류 밀도는 각각 대조군, 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치군, 및 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치군에서 각각 78.5±15 pA/pF (n=4), 62±16 pA/pF(n=5), 36±9 pA/pF(n=9)으로 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 전 처리하였을 때 대조군에 비해 니코틴성전류가 통계적으로 유의하게 억제되었다(그림 18).

### 3.4.5. 거세 쥐의 골반신경절에서 사이토카인 신호전달 인자들의 발현변화

전염증매개체들은 세포막에 있는 JAK/STAT 신호전달체계를 통하여 세포핵 내에 유전자발현 변화를 조절한다고 알려져 있다((Jain 등, 2005; Lorraine 등, 1999). 본 연구에서의 거세 쥐 골반신경절에서 염증매개물질 증가가 특정 세포 내 신호전달체계를 활성화 할 것이라는 가설을 가지고 신호전달에 관여하는 중요한 요소인 STAT3와 NF-κB 발현을 역전사 연쇄증합반응 방법으로 확인하였다. 그 결과 거세 쥐 골반신경절 조직에서 STAT3 발현은 대조군에 비하여 mRNA의 발현이

현저히 증가하였으나 NF-κB 발현의 증가는 미약하였다. 거세 후 테스토스테론을 투여 한 군에서는 STAT3와 NF-κB 발현 정도가 대조군과 비슷하게 회복되었다. 여기서 양성 대조군은 정상 쥐 뇌 조직을 사용하였다.

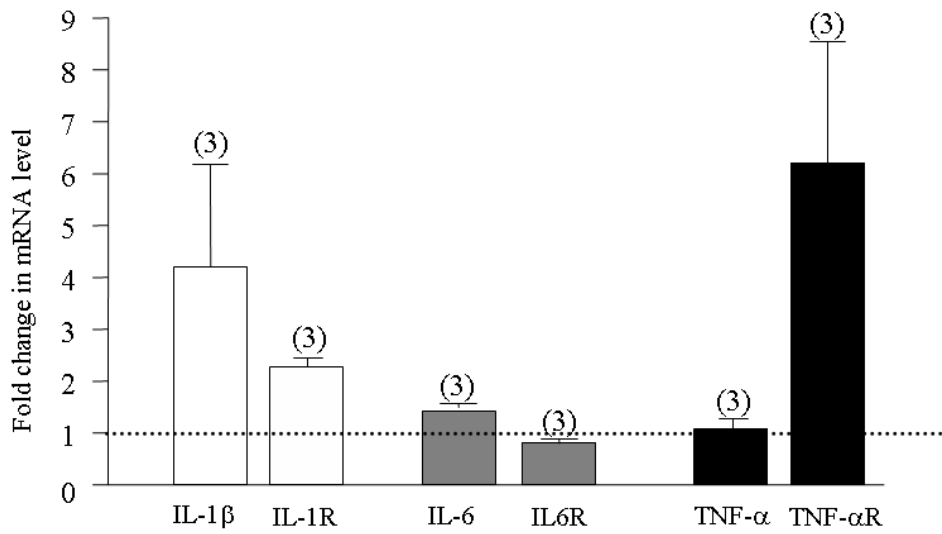


그림 12. 골반신경절 조직에서 거세에 의한 염증매개물질의 발현 변화. 결과는 comparative  $2^{-\Delta\Delta ct}$ 법으로 분석하였는데 거세 군에서 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 수용체의 발현이 현저히 증가하였다. IL-1R는 IL-1의 수용체, IL-6R은 IL-6의 수용체, TNF-αR는 TNF-α의 수용체를 가리킨다. 골반신경절 조직에서 Trizol reagent를 사용하여 RNA를 분리하여 cDNA로 합성한 후 사용하였다. 반응 조건은 95 °C에서 15분 전 처리하고 95°C에서 15초, 58 °C에서 30초, 72 °C에서 60초 주기로 55회 반복하였다. 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다. 모든 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. \* p<0.05.

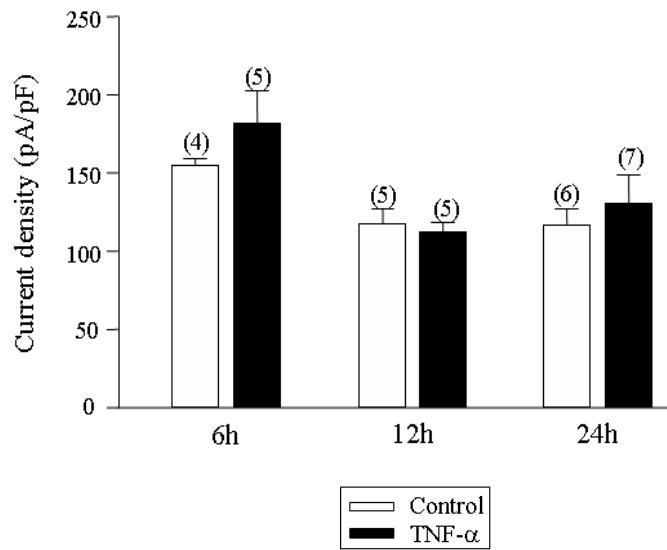


그림 13. 골반교감신경세포에서 TNF- $\alpha$ 가 니코틴성전류에 미치는 영향. 막 전압을 -60 mV로 고정시킨 상태에서 100  $\mu$ M ACh의 투여에 의해 골반교감신경세포에서 유도되어진 전류밀도를 관찰하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다.

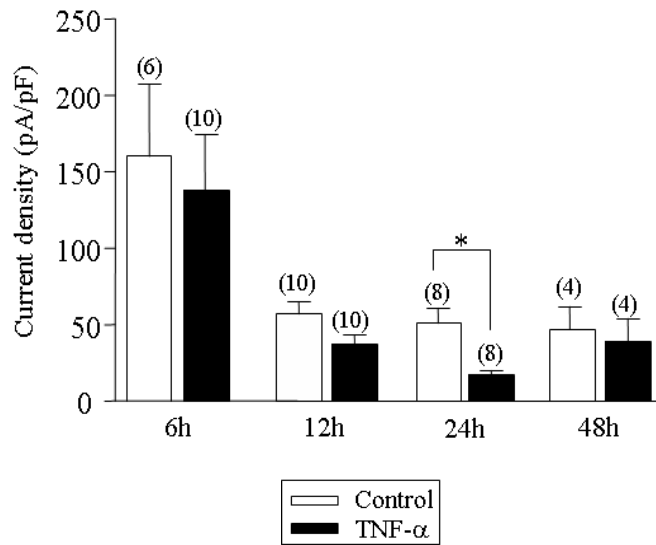


그림 14. 골반부교감신경세포에서 니코틴성전류에 미치는 TNF- $\alpha$  처치 시간에 따른 영향. 막 전압을 -60 mV로 고정시킨 상태에서 100  $\mu$ M 아세틸콜린의 투여에 의해 유도되어진 전류를 측정하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다. 부교감신경절세포에서는 TNF- $\alpha$ 에 의한 ACh 전류의 크기는 24시간 처치하였을 때 현저히 감소하였다. \* p<0.05.

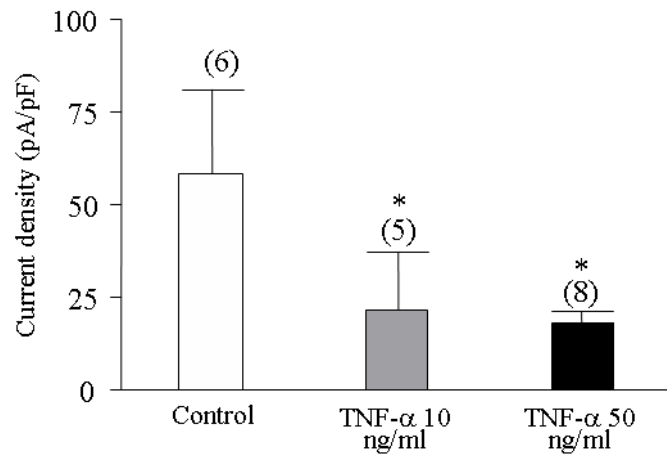


그림 15. 골반부교감신경세포에서 니코틴성전류에 대한 TNF- $\alpha$  처치 농도에 따른 영향. TNF- $\alpha$ 를 24시간 전 처치 후 막 전압을 -60 mV로 고정시킨 상태에서 100  $\mu$ M 아세틸콜린의 투여에 의해 유도되어진 니코틴성전류를 측정하였다. 골반부교감신경세포에서는 TNF- $\alpha$ 에 의한 ACh 전류의 크기는 10 ng/ml와 50 ng/ml 처치하였을 때 각각 현저히 감소하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다. \*  $p < 0.05$ .

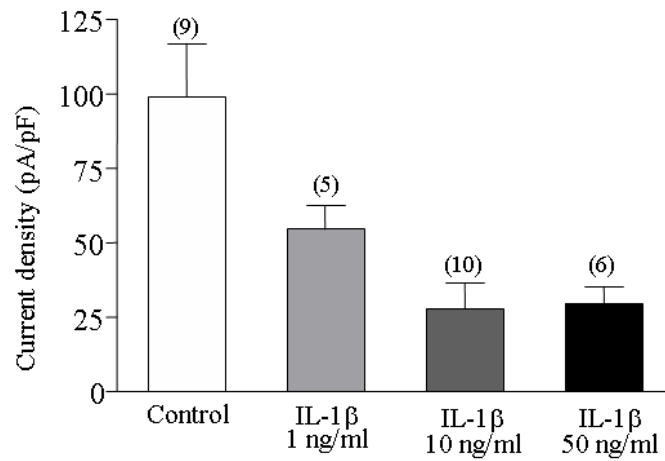
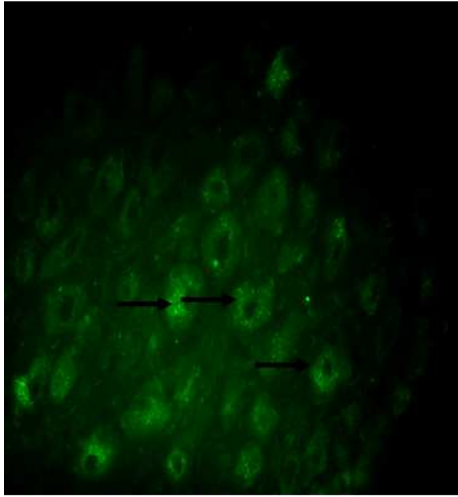


그림 16. 골반신경절부교감신경세포에서  $IL-1\beta$  처치 농도에 따른 영향. 막 전압을  $-60$  mV로 고정시킨 상태에서  $100$   $\mu$ M 아세틸콜린의 투여에 의해 유도되어진 전류를 관찰하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 괄호 안에는 실험 한수를 나타낸다. \*  $p < 0.05$  부교감신경절세포에서는  $IL-1\beta$ 에 의한 ACh 전류의 크기는  $10$  ng/ml 처치하였을 때 제일 많이 감소하였다.

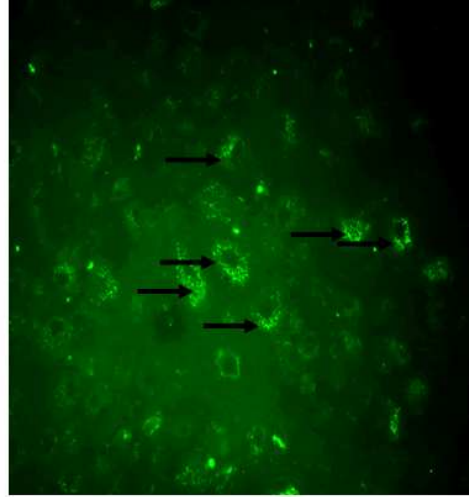


**A**



Sham

**B**



Cast

그림 17. 골반신경절조직에서 거세에 의한 활성산소종 발현 증가. 형광물질인 hydroethidine이 골반신경세포내에 발현된 ROS와 반응하여 발색되는 것을 화살표로 표시하였다. 대조군(Sham)은 거세(Cast)로 표시하였다. 거세군에서 대조군에 비해 증가된 양상을 보였다.

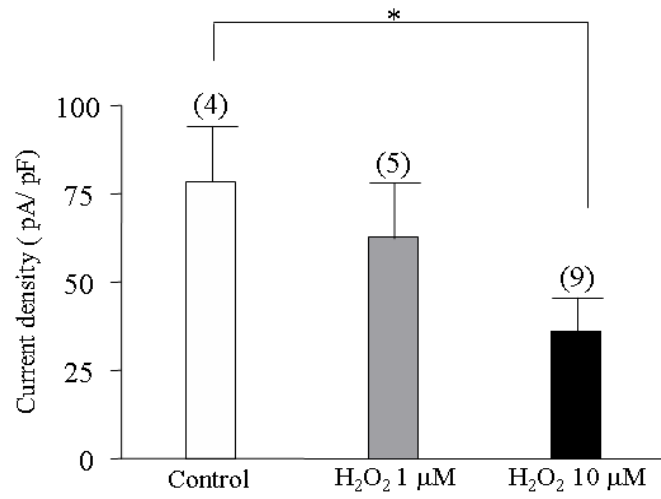


그림 18. 골반부교감신경세포의 니코틴성전류에 미치는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치 농도에 따른 영향. 골반부교감신경세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 ACh 전류의 크기는 10 μM 처치 하였을 때 통계적으로 유의하게 감소하였다. 막 전압을 -60 mV로 고정시킨 상태에서 100 μM 아세틸콜린의 투여에 의해 유도되어진 전류를 관찰하였다. 모든 데이터는 평균±표준오차로 표시하였다. 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다. \*P<0.05.

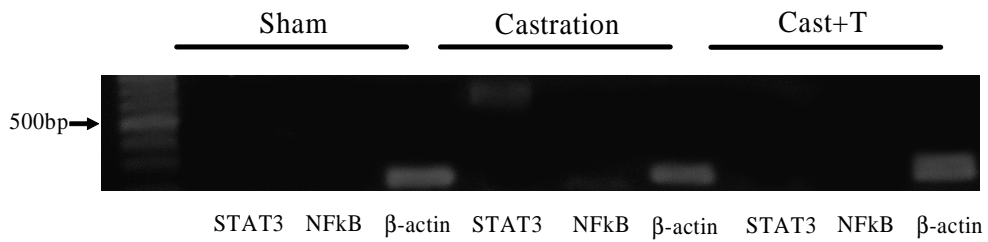


그림 19. 거세 쥐 골반신경절조직에서 STAT3와 NF-κB 발현 증가. 사이토카인 신호전달체계에서의 중요한 요소들인 STAT3와 NF-κB 발현 변화를 확인하기 위해, 대조군, 거세 군 및 거세 후 테스토스테론 투여 군에서 골반신경절 조직으로부터 총 RNA를 분리한 후 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄중합 반응을 실시하였다. 대조군으로 β-actin을 사용하였으며, 증폭 산물의 크기는 STAT3(715 bp), NF-κB(209 bp), β-actin(250 bp)이다. 역전사 연쇄중합반응 조건은 94 °C 30초, 55 °C 30초, 72 °C 30초로 35 cycle반응시켰다.

### 3.5. 당뇨 쥐 모델에서의 결과

#### 3.5.1. 당뇨 쥐 모델 평가 및 음경압 측정

당뇨 쥐 모델은 8주령 S/D 쥐에 streptozotocin(70 mg/kg, i.p)을 투여하여 만들었다. 투여 후 일정한 시간 간격으로 혈당을 측정하였는데 혈당이 300 mg/dl 이하인 쥐는 실험에서 제외하였고 인슐린 투여군도 혈당이 일정하게 100 mg/dl 아래로 유지되지 않으면 실험에서 제외하였다. 당뇨 확인 후 8 주 사육하여 실험을 실시하였다. 8 주 후 당뇨 쥐 평균 몸무게는 대조군에 비하여 현저히 감소하였는데 평균 몸무게는 대조군 및 당뇨 쥐에서 각각  $557 \pm 11$  g( $n=10$ ) 과  $258 \pm 22$  g( $n=10$ )이었다(그림 20A). 혈당 수치는 당뇨 쥐에서 ( $446 \pm 30$  mg/dl,  $n=10$ )으로 대조군 ( $88 \pm 20$  mg/dl,  $n=10$ )에 비하여 아주 높게 유지되었다(그림 20B). 이러한 고혈당이 발기부전을 유발하는지를 알아보기 위해 골반신경을 자극하여 음경압을 측정하였다(구체적인 것은 거세 쥐 모델 참조). 음경압 역시 당뇨 쥐에서 ( $60 \pm 2$  mmHg,  $n=3$ )에서 대조군에서는 ( $76 \pm 3$  mmHg,  $n=4$ )이었고 t-검정 결과( $p < 0.05$ ) 유의하게 감소하였다.

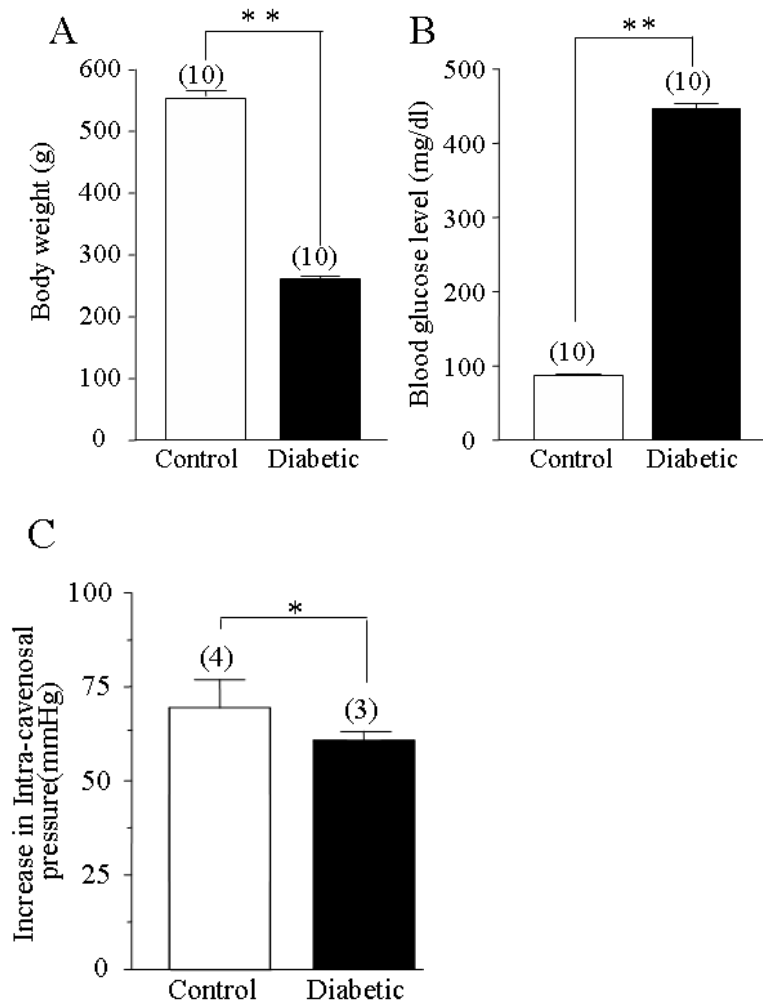


그림 20. 당뇨 쥐에서 몸무게, 혈당, 및 음경압의 측정 결과. A는 대조 군과 당뇨군 간의 몸무게 비교이다. B는 대조군과 당뇨군 간의 혈당 비교이다. C는 대조군과 당뇨군 간의 음경압 크기 비교이다. 모든 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 괄호 안에 수는 실험한 동물 마리수이다. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$

### 3.5.2. 당뇨 쥐 모델에서 안드로젠수용체 발현의 변화.

당뇨에 의하여 혈중 테스토스테론이 감소한다는 많은 보고가 되어 있고 당뇨성 발기부전에서 안드로젠 투여로 좋은 효과를 보고 있다는 임상적인 결과를 토대로 안드로젠수용체의 발현의 변화를 골반신경절 조직에서 실시간 역전사 연쇄중합반응(그림 21) 방법으로 측정하였다. 그 결과 당뇨 쥐( $0.35 \pm 0.12$ ,  $n=3$ )에서 감소되었고 인슐린 투여에 의하여 그 감소가 억제되었다( $0.84 \pm 0.14$ ,  $n=3$ ).

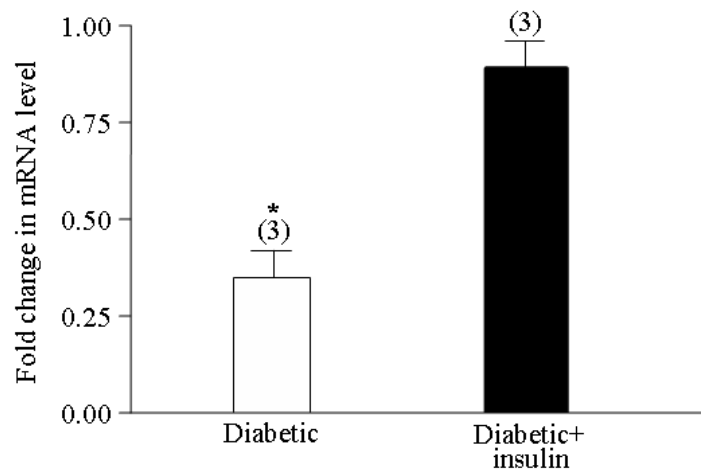


그림 21. 당뇨 쥐 골반신경절에서 안드로젠수용체의 발현의 변화. 결과는 comparative  $2^{-\Delta\Delta ct}$ 법으로 분석하였는데 당뇨군에서 안드로젠수용체가 현저히 감소하였다. 골반신경절 조직에서 Trizol reagent를 사용하여 RNA를 분리하여 cDNA로 합성한 후 사용하였다. 반응 조건은 95 °C에서 15분 전 처리하고 95 °C에서 15초, 60 °C에서 30초, 72 °C에서 60초 주기로 55회 반복하였다. 모든 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다. \* p<0.05.

### 3.5.3. 당뇨가 골반신경세포의 니코틴성수용체 발현 미치는 영향

니코틴성수용체 아형들 중 골반신경절조직에서 주로 발현되는 서브유닛들을 당뇨 모델에서 실시간 역전사연쇄증합반응으로 그 발현 변화를 확인하였다. 그 결과 당뇨 쥐에서  $\alpha 3(0.36 \pm 0.12)$ ,  $\alpha 5(0.47 \pm 0.10)$  및  $\beta 4(0.32 \pm 0.06)$  서브유닛의 발현이 감소되었으며 인슐린 투여시  $\alpha 3(0.56 \pm 0.15)$ ,  $\alpha 5(0.71 \pm 0.16)$  및  $\beta 4(0.70 \pm 0.17)$  서브유닛의 발현 감소가 유의하게 억제되었다(그림 22).

### 3.5.4. 골반신경세포에서 당뇨가 니코틴성전류에 미치는 영향

당뇨 모델의 골반신경절세포에서 니코틴성수용체 서브유닛의 발현 감소로 인해 이온채널 활성의 감소가 나타나는 지를 전기생리학적 방법으로 확인하였다. 전형적인 전세포이온전류 측정방법(whole-cell patch-clamp) 방법으로 막전압을  $-60\text{mV}$ 로 고정시킨 상태에서 아세틸콜린의 투여에 의해 유도되어진 전류를 관찰하였다. 그림 23은 골반신경절부교감신경세포에서 니코틴성 아세틸콜린채널의 아세틸콜린 농도-반응(dose-response relationship)관계를 나타낸 것으로 AChshd도( $10 \mu\text{M}$ - $10 \text{mM}$ )에 따른 니코틴성전류의 밀도를 측정하였다. ACh에 의해 유발되는 내향전류의 밀도는 농도 의존적으로 증가하였고 대조군( $\text{EC}_{50} 166 \mu\text{M}$ )과 당뇨 군( $\text{EC}_{50} 138 \mu\text{M}$ )의 두 그룹 사이의 아세틸콜린의 채널의 활성화에 대한 역가(potency) 차이는 나타나지 않았지만 그 효력(efficacy)은 당뇨 군에서 대조군 보다 유의하게 감소되었다(그림 23). 당뇨 군과 대조군 골반신경세포에서 ACh  $100 \mu\text{M}$ 에 의한 니코틴성전류의 크기를 비교하여 보았다. 이때 유발되는 내향전류의 밀도는 대조군에 비해 당뇨 군의 교감신경세포에서 약간의 증가는 있었지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 교감신경세포에서 평균적인 전류밀도는 각각 대조군 및 당뇨 군에서 각각  $125 \pm 22 \text{ pA/pF}(n=4)$ ,  $180 \pm 36 \text{ pA/pF}(n=6)$ 이었는데 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 부교감신경에서는 평균적인 전류의 밀도는 대조군과 거세군에서 각각  $142 \pm 37 \text{ pA/pF}(n=9)$  과  $93 \pm 16 \text{ pA/pF}(n=8)$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다( $p < 0.05$ )(그림 24).



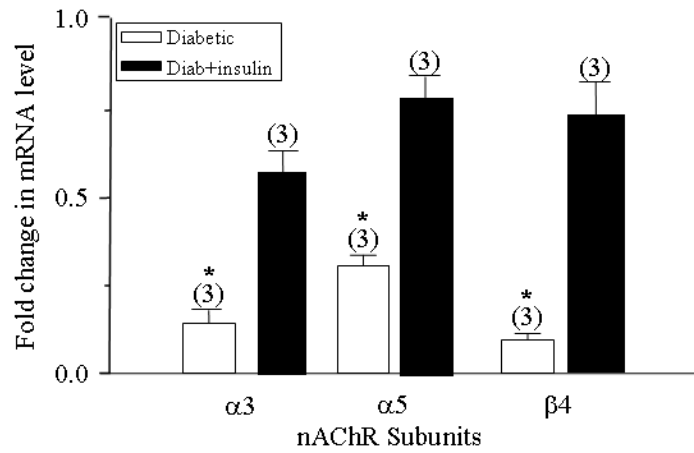


그림 22. 당뇨에 의한 니코틴성수용체의 서브유닛 발현 변화. 선택된 primer로 실시간 역전사연쇄중합반응방법으로 측정하였다. 결과는 comparative  $2^{-\Delta\Delta ct}$ 법으로 분석하였는데 당뇨군 군에서  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$  서브유닛의 발현이 현저히 감소하였음을 알 수 있었다. 골반신경절 조직에서 Trizol reagent를 사용하여 RNA를 분리하여 cDNA로 합성한 후 사용하였다. 반응 조건은 95 °C에서 15분 전 처리하고 95 °C에서 15초, 60 °C에서 30초, 72 °C에서 60초 주기로 55회 반복하였다. 모든데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며 괄호 안에는 실험 한 수를 나타낸다. \* p<0.05

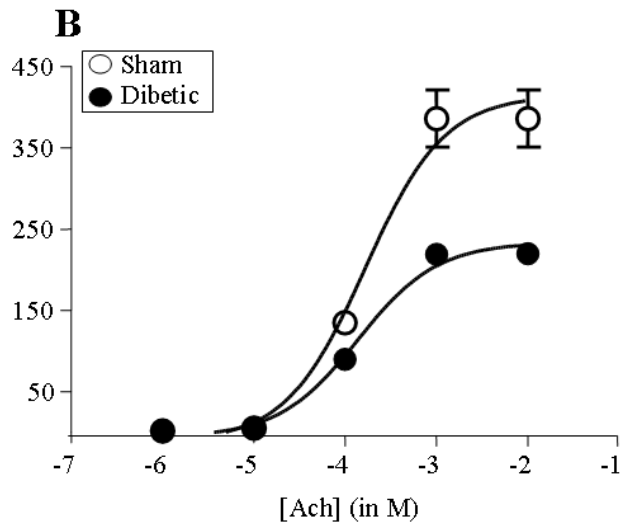
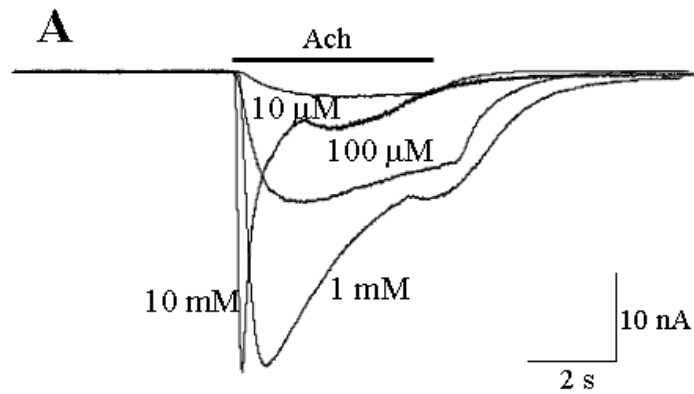


그림 23. 당뇨가 골반신경절부교감신경세포에서 니코틴성전류의 효력에 미치는 영향. A는 ACh농도와 전류밀도 상관관계. 골반신경절부교감신경세포에서 ACh(10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM)에 의해 유도되는 전류의 크기를 측정하였는데 ACh 농도가 증가함에 따라 유발되는 니코틴성전류의 크기도 증가하였다. B는 부교감신경세포에서 막 전압을 -60 mV로 고정시켰다. 여러 농도의 아세틸콜린의 투여에 의해 유도된 전류밀도를 Hill 공식으로 즉,  $I_{ACh} = \text{Max}I / (1 + IC_{50}/[ACh])^{-1}$ 으로 관찰하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 대조 군, 거세 군, 및 거세 후 테스토스테론 투여군 사이에서 ACh이 채널의 활성화에 미치는 효력(efficacy)은 거세 군에서 다른 두군 보다 현저히 낮았다( $p < 0.05$ ).

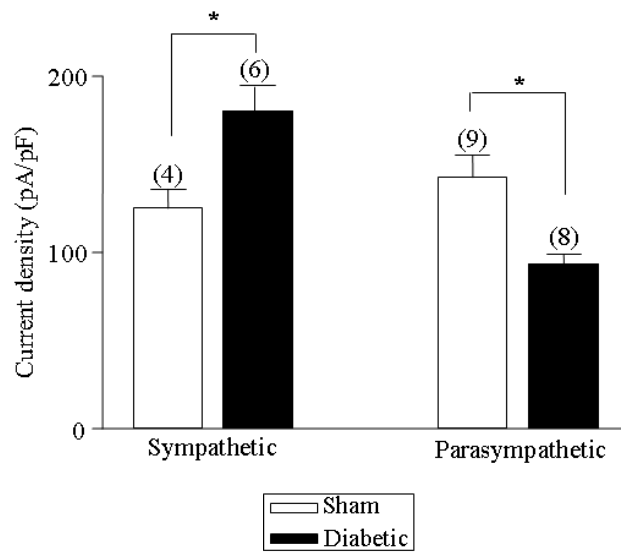


그림 24. 골반신경절세포에서 ACh 단일 농도에 의해 유도된 니코틴성전류에 미치는 당뇨의 영향. 골반신경절교감신경세포에서 ACh 100  $\mu$ M 의해 유도된 전류의 밀도를 대조군과 당뇨군을 비교하였는데 그 전류가 오히려 커지는 양상을 보였고 부교감 신경세포에서는 당뇨군이 대조군에 비해 평균전류 밀도가 감소하였다. 부교감 신경세포에서 막 전압을 -60 mV로 고정시킨 상태에서 100  $\mu$ M 아세틸콜린의 투여에 의해 유도되어진 전류를 관찰하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며 괄호안의 수자는 실험한 세포수이다. \* $p < 0.05$ .

## 제 4장 고찰

음경발기에 Nitric oxide(NO)가 주요 매개 물질이라고 1992년에 알려진 이후 특히 1998년에 비아그라라는 발기치료제가 개발되었으며 현재까지 발기부전에 대한 연구는 더욱 활발하게 진행되고 있다(Toda 등, 2005). NO는 하나의 신경전달물질로서 음경해면체 분포된 부교감, 골반신경의 말단 또는 혈관내피세포로부터 유리되는데 음경혈관 및 음경해면체의 평활근에 존재하는 *guanylate cyclase*를 활성화시켜 cGMP의 농도를 증가시키고 평활근의 칼슘채널을 억제함으로써 이완을 유도하여 발기를 일으키는 데, 이때 비아그라는 cGMP를 분해하는 효소인 PDE5를 억제함으로써 cGMP농도를 지속적으로 높여주고 평활근이 이완이 오래동안 지속되게 하여 발기를 장시간 유지하는 작용기전을 가지고 있다. 이전의 연구에 의하면 발기에 중요한 NO 역시 거세에 의해 뇌 조직에서 발현이 적어지고 남성호르몬의 투여에 의해 다시 회복된다고 보고 되었다(Du 등, 1999). 거세에 의해 중추신경이나 음경해면체에서 NO의 발현의 감소가 발기부전 중의 하나임이 많은 연구를 통해 알려져있으나 자율신경에서의 연구는 이루어 지지 않고 있다.

남성성기능의 중요과정은 발기(erection) 및 사정(ejaculation)이며, 이중 전자는 부교감 신경, 후자는 교감 신경이 지배하고 있다. 따라서 자율신경계의 부교감신경이 흥분되어 그 말단에서 NO, VIP 및 아세틸콜린이 분비되면서 음경해면체 혈관을 이완시켜 발기가 일어나게 되는데 자율신경기능의 이상으로 인하여 흥분성이 감소하거나 시냅스 전달이 잘 되지 않으면 발기부전이 올 수 있다. 이러한듯 신경인성 발기부전의 원인은 자율신경병증(*autonomic neuropathies*)으로 추측되어 지나 있으나, 아직 이와 관련된 연구는 거의 되어 있지 않다.

본 연구의 목적은 노화 및 당뇨병과 같은 성인병에서 일어날 수 있는 발기부전이 음경을 지배하는 자율신경 기능의 이상으로도 일어난다는 가설을 증명하고, 구체적으로 자율신경기능이상의 기전을 세포 및 분자수준에서 규명함으로써 신경인성 발기부전을 치료하고 회복시키는 방법을 제시하는 것이었다. 이를 위해 발기부전을 일으키는 질병 모델을 개발하여 평가하였고, 골반 자율신경절세포에서

cDNA 마이크로어레이로 변화된 기능단백질을 선별하였으며 이러한 cDNA 마이크로어레이로 선별된 기능 단백질은 실시간 역전사 연쇄중합반응을 이용하여 최종 검증하였다. 여기서 선별된 기능단백질은 세포대사 및 세포성장에 관련된 유전자의 감소가 현저하였고 특히, 세포사(cell death)에 관련된 유전자는 증가 하였는데 다른 연구팀의 결과에 의하면 거세 후 골반신경절 및 음경 피부에 분포하는 L6 척수신경의 후근신경절신경세포의 크기가 대조군에 비하여 전반적으로 감소되어 있음을 관찰되었고, 이러한 변화는 테스토스테론 투여로 대조군과 유사하게 회복되었는데 이로부터 거세에 의해 골반신경절에서 신경세포가 줄어든다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서는 남성 호르몬의 감소가 발기를 지배하는 자율신경기능의 가소성을 조절할 것 이라는 가설을 세우고 주요 남성호르몬 분비 조직인 고환을 제거한 거세 쥐 모델을 만들었다. 거세 후 혈장 중 테스토스테론의 농도와 동반하여 골반신경절에서의 안드로젠수용체의 발현도 감소되었음을 확인하였다(그림5). 거세 쥐 모델이 신경인성 발기부전을 연구하는데 적합한지를 절전 부교감신경인 골반신경을 전기적으로 자극했을 때 유도되는 음경압을 측정하여 평가한 결과 신경인성 발기부전의 연구에 적절한 모델임을 입증하였으며 앞으로 유사한 연구에 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 쥐에서 측정 된 음경압(*intracavernous pressure*)변화가 발기능력을 평가하는 좋은 지표가 됨은 이미 다른 연구에서 입증되어 있으며 (Chen 등, 1992) 발기에 관여하는 절후 신경인 음경해면체신경뿐 아니라 절전신경인 골반신경의 전기적 자극 역시 동일하게 발기현상을 유발한다는 사실이 보고된 바 있다(Qinlan 등, 1989). 특히, 절전신경인 골반신경 자극 시의 반응은 골반신경절에서의 시냅스 전달기능을 반영할 수 있게 되어 본 실험 목적과 부합되었다. 이전의 보고에서 전기 자극에 의한 음경압이 거세에 의해 현저히 저하되고, 테스토스테론의 투여에 회복되어짐을 보고하였는데(Traish 등, 1999), 이는 본 연구 결과와 일치하였다(그림4). 그 기전에 관해서는 테스토스테론이 음경해면체의 *nitric oxide synthase* 활성을 증가시킨다는 보고가 있고(Park 등, 1999), 거세에 의해서 음경해면체와 골반신경절에서 *nitric-oxide synthase* 활성을 줄이고 테스토스테론의 투여에 의해 그 활성이 다시 회복된다고 보고하였다(Seo 등, 1999; Schirar 등,

1997).

신경인성 발기부전이 생기는 원인을 골반신경의 기능적인 측면에서 본다면 ① 부교감골반신경의 기능 부전, ② 교감골반신경 기능의 항진, ①②가 동시에 나타나거나, 또는 부교감과 교감 골반신경기능의 부전이 동시에 나타날 경우로 생각할 수 있다. 골반신경절의 기능 부전을 알아보기 위해 시냅스 흥분성전달에 관여하는 니코틴성수용체를 실시간 역전사 연쇄증합반응으로 발현변화를 조사하여 보았다. 최근에 골반신경절의 니코틴성수용체는 주로  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , 및  $\beta 4$ 서브유닛으로 구성되었다고 보고되었다(Park 등, 2006). 따라서 본 연구에서 실시간 역전사 연쇄증합반응은 주로 이 세가지 서브유닛의 발현의 감소를 확인하였다.

자율신경절 중 유일하게 골반신경절에는 교감과 부교감 신경세포가 혼재하여 있는데 이 두 세포는 형태적 및 전기생리학적 특성에 차이가 있으며, 이를 기준으로 세포를 분류할 수 있다. 교감신경세포는 부교감신경세포에 비해 세포(세포용량으로 측정)의 크기가 비교적 크고, T 형 칼슘채널과 CI<sup>-</sup>를 투과하는 GABA채널을 발현하고 있다. 이러한 특성들을 기준으로 세포들을 분류한 후 아세틸콜린에 의한 전기생리학적 특성을 확인한 결과 음경의 발기를 일으키는 부교감골반신경에서 선택적으로 아세틸콜린에 의한 니코틴성전류의 감소가 뚜렷하였지만 교감신경세포에서는 그 변화가 미미하였다. 골반신경절에서 조직면역염색 실험에 의하면 특히 음경해면체 분포되어 있는 부교감신경세포에서 교감신경보다 안드로젠수용체의 밀도가 높다고 하였다(Keast 등, 1998). 이러한 안드로젠수용체 분포의 차이가 교감신경과 부교감신경에서 전기생리학적 효과(즉, 니코틴성전류감소 여부)의 차이를 나타내지 않았나 생각된다.

니코틴성 아세틸콜린수용체는 빠른 흥분성 시냅스 후 전위를 초래하고 또 절 후 자율신경세포의 흥분성을 조율함으로써, 골반신경절의 비뇨생식기 및 하부 위장관 기능 조절에 핵심적인 역할을 수행한다고 잘 알려져 있다(De Groat 등, 1976; Gallagher 등, 1982). 이러한 니코틴성수용체에 대한 자가항체가 형성되면 자율신경병증(autonomic neuropathy)이 일어나고, 이로 인해 소변 배설장애(urinary retention)나 발기부전이 흔하게 초래된다고 보고된 바 있다(Vernino 등, 1998; Vernino 등, 2000). 특히 니코틴성수용체  $\alpha 3$  서브유닛을 knock-out시킨 마우

스에서는 출생후 2일 이내에 심한 방광 확장과 함께 요실금이 나타나며, 1주 이상 생존한 경우에도 방광 감염이 지속되거나 요석이 나타난다고 하였다(Xu 등, 1999; De Biasi 등, 2000). 또한, 거대방광-작은 결장-장 연동저하증후군(MMHIS) 환자의 경우 심한 확장과 기능성 장 폐색을 보이는데 면역화학적 검사 결과 환자에게 니코틴성수용체의  $\alpha 3$  서브유닛 발현이 적거나 발현되지 않고 있음이 보고되었다.(Anneren 등, 1991; Richardson 등, 2001). 이러한 보고는 니코틴성수용체의 발현과 활성의 감소가 병태적인 상황을 유발한다는 것을 알려주고 니코틴성수용체의 중요한 기능을 시사한다 하겠다. 그리하여 본 연구에서 관찰된 골반신경세포의 니코틴성 수용체를 이루고 있는  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , 및  $\beta 4$ 서브유닛의 발현 변화가 병태적인 상황을 유발하게 되고 이러한 변화가 니코틴성 시냅스 전달의 억제를 일으켜 발기부전이 일어날 것이라고 사료된다.

한 보고에 의하면 신경인성 발기부전의 원인은 신경병증(neuropathy)에 의한 것이라고 제시되었다(Bleustein 등, 2002). 신경병증이란 신경이 손상되어 그 신경기능의 이상을 유발하는 것을 이르는데 발기부전에서는 시냅스 흥분성전달이 늦어져 신경전달물질의 분비가 억제되는 것이 그 원인이라 한다(Jackson, 2004). 이런 신경병증은 당뇨병환자에서 많이 연구되어 있는데 그 원인에는  $IL-\beta$ 나  $TNF-\alpha$ 와 같은 염증매개체들의 증가 등을 들 수 있다(Murphy 등, 1995; Katsuki 등, 1998; Lechleintner 등, 2000). 말초신경계에서는 대식세포, 림프구, 비만세포, 슈만세포 및 신경세포에서 사이토카인이 생성되어 분비되는데  $TNF-\alpha$ 를 신경에 주입하면 Wallerian 변성이 되어 신경성 흥분성 전달이 안된다고 한다(Vinik 등, 2003). 이는 염증매개물질이 과도 생성되면 신경병을 유발한다는 실험적 증거가 될 수 있다. 또한, 연구에 의하면 남성호르몬은 인간내피세포 세포 혹은 쥐 복부 전립선상피세포에서 염증매개체의 분비를 조절한다고 보고되어 있다(Asirvatham 등, 2005; Norata 등, 2006). 본 연구에서 거세 쥐의 음경압 측정 시 골반신경을 자극하여 측정하였을 뿐만 아니라 음경해면체에 papaverine을 직접 주입하여 대조군과 거세 쥐의 음경압을 측정하였는데 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이런 결과는 골반신경절에서 신경병증 또는 기능 이상이 일어났다는 것을 간접적으로 증명한다. 한편, 골반신경절세포에서 염증매개체의 발현을 조사하여 보았는데  $IL-1\beta$ ,

IL-6, TNF- $\alpha$  수용체의 발현이 증가되었다. 이러한 결과로 보아 거세로 인한 남성 호르몬의 감소가 골반신경의 신경병증을 일으켰고 이러한 신경병증에 의한 발기부전은 이들 사이토카인이 매개할 것으로 추측하게 되었다. 이를 뒷받침하는 결과로는 전 염증매개체인 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 골반신경절세포의 니코틴성 채널의 활성을 감소시키는 것을 확인하였는데 더욱 흥미있는 사실은 이들이 골반신경절부교감신경세포에서 그 활성이 현저히 감소되었다는 것이다. 왜 사이토카인이 골반신경의 유형에 따라 효력의 차이를 나타내었는지 그 기전은 아직 밝히지 못하고 있다. 이전의 보고에 의하면 쥐 상경신경절(SCG)세포에 TNF- $\alpha$ 를 처치하면 니코틴성 전류가 증가한다고 하였고(Soliven 등, 1995), 쥐 심장근육세포에서 TNF-a가 L-형 칼슘채널을 억제한다고 하였다(Krown 등, 1995). 이런 보고에 의해 염증매개체가 조직마다 세포마다 다른 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다. 따라서 거세나 당뇨에 의한 염증매개체 증가는 골반신경부교감세포와 음경사이의 니코틴성시냅스전달을 억제함으로써 발기부전을 일으키는 한 요인임을 알수 있으며 염증매개체의 생성을 억제한다면 신경인성발기부전의 치료에 도움이 될 것으로 사료된다.

골반신경세포내에서 전염증매개체의 신호전달에 중요한 인자인 STAT3와 NF- $\kappa$ B의 발현이 증가되었으므로 이들에 의한 기능 유전자, 특히, 니코틴성 아세틸콜린수용체 발현에 미치는 영향을 구체적으로 밝히는것이 필요할것이다.

현재 알려진바에 의하면 당뇨병의 고혈당이 여러 세포 및 조직에 산화스트레스를 주어 많은 합병증을 초래하게 되며, 이러한 합병증들이 항산화 약물에 의해 완화되어짐이 보고 된 바 있다(Nishikawa 등, 2000). 더욱이 산화스트레스는 발기부전을 일으키고 항산화제에 의해 완화된다고 하였다(Azadzoi 등, 2006). 최근에  $\beta$ -amyloid peptide에 의한 산화스트레스가 니코틴성수용체의 발현과 이온 전류를 억제한다는 사실이 확인되었다(Qi 등, 2005). 또한, 남성호르몬은 신경세포에서의 산화스트레스를 낮추어 주는 작용을 가지고 있다고 보고되어 있고(Ahlbom 등, 1999)  $\beta$ -amyloid peptide 의 신경 독성 작용도 완화시킨다고 하였다(Magdalenia 등, 2004). 그리하여 거세 쥐 골반신경절에서 산화스트레스 인자인 활성산소종의 생성이 대조군보다 많은것을 확인하였고 활성산소의 한 종류인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 전 처치에 의해 니코틴성전류가 골반신경절부교감신경세포에서 감소되었다는 사실은 신경



인성 발기부전의 주요요인이 세포내 산화스트레스의 증가임을 강력히 시사하였다. 한 보고에 의하면 산화스트레스는 PC12세포에서 니코틴성 수용체의 발현을 억제한다고(Guan 등, 2001) 하는데 이는 본 연구의 이와 같은 결과를 더욱 확신시켜 준다.

당뇨 환자의 50%에서 발기부전이 나타나는데 아직 그 원인이 무엇인지 잘 모르고 있고(Levine 등, 2000), 이러한 발기부전은 인슐린 투여나 특정 단백질(예, *insulin like growth factor*) 발현으로 회복됨을 관찰하였다(Yamanaka 등, 2003; Christ 등, 2004; Ahn 등, 2005). 본 연구와 관련하여 주목할만한 연구결과는 당뇨병에서 혈장 내 테스토스테론이 감소되어있다는 것이다(Ando 등, 1984; Zietz 등, 2000). 혈장 내 테스토스테론을 직접 측정하지 못하였지만 골반신경절 조직에서 안드로젠수용체의 발현이 줄어든 것을 확인하였다(그림21). 이러한 안드로젠수용체 발현의 감소는 혈장 남성호르몬의 감소로 인한 것이라고 생각되며 임상적으로 테스토스테론은 당뇨병에 의해 일어나는 발기부전을 치료하는 효과가 있음이 확인되었다(Zhang 등, 2006). 지속적인 혈당의 증가 및 안드로젠수용체의 감소 등의 변화로 부터 본 연구에 사용 된 당뇨 쥐 모델은 성공적인 것으로 보아지만 거세 쥐 모델에 비교하여 음경압의 변화가 현저한 감소가 나타나지 않았다. 이는 본 연구에서 당뇨 유발후 8 주의 기간이 자율신경병증과 이와 관련된 신경인성 발기부전을 일으키기에는 짧기 때문으로 생각되며 앞으로의 12 주이상의 당뇨병 모델에서 연구가 이루어지면 명확한 결과를 얻을 것이다. 또한, 골반신경절세포에서 안드로젠수용체의 발현이 감소되어 있어서 테스트론의 투여가 당뇨병에서의 발기부전을 회복시킬수 있을 것으로 생각되지만 본 연구에서 당뇨 쥐에 인슐린 투여와 테스토스테론 투여에 인한 음경압을 측정하지 못하였기 때문에 인슐린이나 테스토스테론의 투여에 의한 효과는 앞으로 검증되어야 할것이다. 이상의 논의에서 보는바와 같이 당뇨 쥐에서의 연구는 미흡한 점이 일부 있지만 중요하고 근본적인 결과는 당뇨 쥐 모델에서도 거세쥐에서의 결과와 마찬가지로 골반신경절에서 니코틴성  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  및  $\beta 4$  서브유닛의 발현이 감소되며 니코틴성수용체의 활성화도 부교감신경에서 줄어든다는 것이다. 즉, 두 종류의(즉, 거세 및 당뇨) 발기부전 모델에서 골반신경의 기능성 변화가 같은 경향으로 나타났다는 것이 본 연구에

큰 의미를 부여한다 하겠다.

본 연구의 결과를 요약하면 거세 또는 당뇨에 의해 유발되는 신경인성 발기부전의 분자적 기전은 남성호르몬인 테스토스테론의 감소로 음경을 지배하는 골반 자율신경에서 니코틴성수용체의 발현 및 활성의 저하로 인해 니코틴성 시냅스전달이 억제되고, 절후골반신경세포의 흥분성의 감소로 음경으로의 시냅스전달이 원활히 이루어 지지 않을것이다(그림 25). 따라서 앞으로 골반신경의 니코틴성수용체가 신경인성 발기부전의 치료법 및 치료제 개발에서 주요 표적점(target)이 될것이다. 한편, 남성호르몬의 감소는 염증매개체 및 산화스트레스에 관련된 신호전달체계를 통하여 혹은 직접 유전자 발현의 감소를 유발할 것으로 생각되고 앞으로 이와 관련된 더욱 구체적인 신호전달 과정을 분자 세포수준에서 명확히 규명해할 것이다(그림 26).

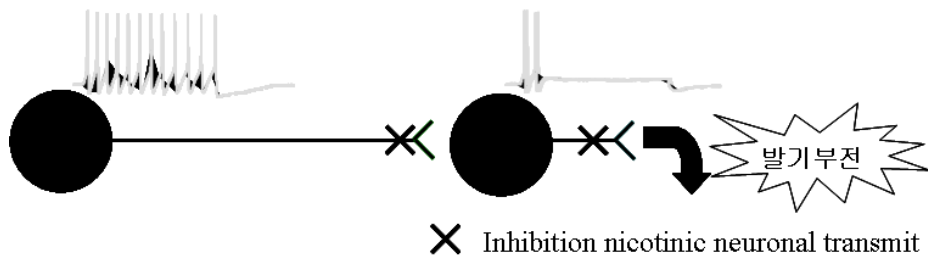


그림 25. 신경인성 발기부전의 분자적 기전 도식. 골반신경절에서 니코틴성수용체의 발현이 감소되어 절전 절후 시냅스 흥분성 전달이 억제 되어 신경인성 발기부전이 일어난다.

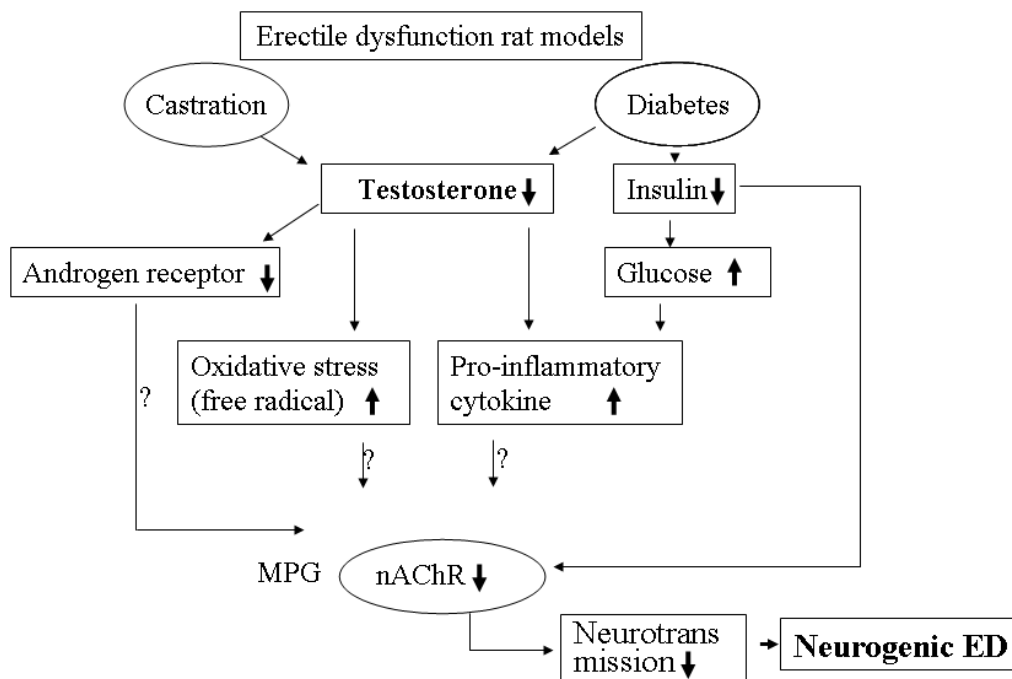


그림 26. 신경인성 발기부전에 관련된 신호전달 체계에 대한 모식도

## 제 5 장 결 론

신경인성 발기부전 모델 쥐에서 발기부전의 분자기전을 규명하는 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 신경인성 발기부전 동물모델로 거세 쥐 와 당뇨병 쥐를 제작하여 골반신경의 자극에 의한 음경 압을 측정한 결과 거세 쥐에서 크게 감소되었고, 이는 남성호르몬의 투여로 회복 되었다. 당뇨 쥐에서도 음경압의 감소정도는 거세 쥐의 그것보다 낮았지만 대조군에 비해 유의하였다.

2. 발기부전 모델에서 골반신경의 니코틴성수용체의 주요 서브유닛인  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$ 의 발현이 현저히 감소되었고 니코틴성전류도 현저한 감소가 나타났다. 이러한 변화는 거세 쥐 모델에서 테스토스테론의 투여에 의해 완화되었다.

3. 남성호르몬의 감소로 인해 골반신경세포에서  $IL-1\beta$ 와  $TNF-\alpha$ 수용체 발현이 증가되었으며 이러한 전 염증매개물질에 의해 *in vitro* 실험에서 니코틴수용체 활성이 억제되었다.

4. 남성호르몬의 감소는 골반신경에서 화성산소종을 증가시켰으며 이러한 산화스트레스는 니코틴성수용체 활성을 억제하였다.

이상의 연구결과를 통하여 신경인성 발기부전은 음경을 지배하는 골반 자율신경에서 니코틴성수용체의 발현과 활성의 저하로 인해 니코틴성 시냅스 전달이 억제되고, 이에 따른 절후신경세포의 흥분성의 감소에 의해 나타날 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

Ahlbom E, Grandison L, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Ceccatelli S. Androgen treatment of neonatal rats decreases susceptibility of cerebellar granule neurons to oxidative stress *in vitro*. *Eur J Neurosci*. 1999, 11(4):1285-91

Ahn GJ, Sohn YS, Kang KK, Ahn BO, Kwon JW, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. The effect of PDE5 inhibition on the erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Impot Res* 17:134-141

Ando S, Rubens R, Rottiers R. Androgen plasma levels in male diabetics. *J Endocrinol Invest*. 1984, 7(1):21-4

Ando S, Yu RK. Fatty acid and long-chain base composition of gangliosides isolated from adult human brain. *J Neurosci Res*. 1984, 12(2-3):205-11

Annern G, Meurling s, Olsen L. Megacystis-microcolon-intestinal hypoperistasis syndrome(MMIHS), an autosomal recessive disorder: clinical reports and review of the literature. *Am J Med Genet*. 1991, 41:251-254

Asirvatham AJ, Schmidt M, Gao B, Chaudhary J. Androgens regulate the immune/inflammatory response and cell survival pathways in rat ventral prostate epithelial cells. *Endocrinology*. 2006, 147(1):257-71

Azadzoï KM, Schulman RN, Aviram M, Siroky MB. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *J Urol*. 2006,

175(3 Pt 1):1175-6

Barrett-Connor E. Lower endogenous androgen levels and dyslipidemia in men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1992, 117(10):807-11

Bialek M, Zaremba P, Borowicz KK, Czuczwar SJ. Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Pol J Pharmacol*. 2004, 56(5):509-18

Biessele GJ, Van der Heide LP, Kamal A, Bleys R.L.A.W, and Gispen WH. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol*. 2002, 441:1-14

Bleustein CB, Arezzo JC, Eckholdt H, Melman A. The neuropathy of erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2002 14(6):433-9

Bradely WE, Timm GW, Scott FB, Cystometry IV. Neuromuscular transmission in urinary bladder. *Urology* 1975, 6: 520-524

Bucana C, Saiki I, Nayar R. Uptake and accumulation of the vital dye hydroethidine in neoplastic cells. *J Histochem Cytochem*. 1986, 34(9):1109-15.

Chen KK, Chan JYH, Chang LS, Chen MT, Chan SHH. Intracavernous pressure as an experimental index in a rat model for the evaluation of penile erection. *J Urol*. 147:1124-1128

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987,

62(1):156-9.

Christ GJ, Day N, Santizo C, Sato Y, Zhao W, Sclafani T, Bakal R, Salman M, Davies K, Melman A. Intracorporal injection of hSlo cDNA restores erectile capacity in STZ-diabetic F-344 rats in vivo. *Am J Physiol* 2004, **287**:1544-1553

Cirino G, Fusco F, Imbimbo C, Mirone V. Pharmacology of erectile dysfunction in man. *Pharmacol Ther.* 2006, **111**(2):400-23.

Dail WG. autonomic innervation of male reproductive genitalia In: the autonomic nervous system, Vol. 2, Nervous control of the urogenital system edited by Maggi CA, *Harwood Academic Publishers, London.* 1992, 69-101

Dail WG, Evan AP, Eason HR. the major ganglion in the pelvic plexus of the male rat: a histochemical and ultrastructural study. *Cell tissue Res.* 1975, **159**:49-62

De Biasi M. Nicotinic mechanisms in the autonomic control of organ systems *J Neurobiol.* 2002 Dec;**53**(4):568-79.

De Groat WC, Booth AM. neural control of penile erection. In: Nervous control of the urogenital system, edited by Maggi CA, *Harwood Academic Publishers, London.* 1993, 467-524

De Groat WC, Saum WR. Synaptic transmission in parasympathetic ganglia in the urinary bladder of the cat. *J Physiol* 1976, **256**: 137-158

Du J, Hull EM. Effects of testosterone on neuronal nitric oxide synthase and



tyrosine hydroxylase. *Bran Res.* 1999, 836:90-98

Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol.* 1994, 151(1):54-61.

Felix B, Catalin D, Miolan JP, Niel JP. Effects of testosterone on the electrical properties and niconic transmission of the major pelvic and coeliac ganglion neurons. *J neuroendocrinology.* 2001 13:193-198

Francois G and Oliver R. Neural control of erection. *Physio. Behav.* 2004, 83:189-201

Gallagher JP, Griffith WH, Shinnick-Gallagher P. Cholinergic transmission in cat parasympathetic ganglia. *J Physiol* 1982, 332:473-486

Greenstein A, Mabjeesh NJ, Sofer M, Kaver I, Matzkin H, Chen J. Does sildenafil combined with testosterone gel improve erectile dysfunction in hypogonadal men in whom testosterone supplement therapy alone failed?. *J Urol* 173:530-532

Guan ZZ, Zhang X, Mousavi M, Tian JY, Unger C, Nordberg A. Reduced expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptors during the early stages of damage by oxidative stress in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 2001, 15;66(4):551-8.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981, 391(2):85-100

Holmang A, Bjorntorp P. The effects of testosterone on insulin sensitivity in male rats. *Acta Physiol Scand.* 1992, 146(4):505-10.

Holmang A, Niklasson M, Rippe B, Lonroth P. Insulin insensitivity and delayed transcapillary delivery of insulin in oophorectomized rats treated with testosterone. *Acta Physiol Scand.* 2001, 171(4):427-38

Huang XZ, Won YJ, Park BG, Cho BP, Lee JW, Jeong SW. Nerve injury alters profile of receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> channel modulation in vagal afferent neurons of rat nodose ganglia. *Neurosci Lett.* 2004, 364(3):189-94.

Jackson G. Sexual dysfunction and diabetes. *Int J Clin Pract.* 2004, 58(4):358-62.

Jänig W, McLachlan EM. Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev.* 1987, 1332-1404

Kawata M, Yuri K, and Morimoto M. Steroid hormone effects on gene expression, neuron structure, and differentiation. *Horm. Behav.* 1994, 28:477-482

Keast JR Effects of testosterone on pelvic autonomic pathways: progress and pitfalls. *J. Auton. Nerv. Sys.* 2000, 79:67-73

Keast JR. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience.* 1995, 66: 655-662

Keast JR. Patterns of co-existence of peptides and differences of nerve fibre types associated with noradrenergic and non-noradrenergic (putative cholinergic)

neurons in the major pelvic ganglion of the male rat. *Cell Tissue Rev.* 1991, **266**:405-415

Keast JR, Saunders RJ. Testosterone has potent, selective effects on the morphology of pelvic autonomic neurons which control the bladder, lower bowel and internal reproductive organs of the male rat. *Neuroscience.* 1998, **85**(2):543-56

Keast JR. The autonomic nerve supply of male sex organs - an important target of circulating androgens. *Behav. Brain Res.* 1999, **105**:81-92

Keast JR. Unusual autonomic ganglia: connections chemistry, and plasticity of pelvic ganglia. *Int Rev Cytol.* 1999, **193**: 1-69

Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> current and Ca<sup>2+</sup> transients. *FEBS Lett.* 1995 **27**:376(1-2):24-30

Levine LA. Diagnosis and treatment of erectile dysfunction. *Am J Med* **2000** **109**:3S-12S

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **2001**, **25**(4):402-8.

Lue TF. Erectile dysfunction. *N Engl J Med.* **2000**, **342**(24):1802-13.

Mills TM, Reilly CM, and Lewis RW. *Androgens and penile erection: a review. J Androl.* 1996, 17: 633-638

Mills TM, Wiedmeier VT, Stopper VS. *Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. Biol Reprod.* 1992, 46: 342-348

Norata GD, Tibolla G, Seccomandi PM, Poletti A, Catapano AL. *Dihydrotestosterone decreases tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cells. J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91(2):546-54.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi SL, Matsumura T, Kaneda Y, Yoshida MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature* 2000, 404:787-790

Palese MA, Crone JK, Burnett AL. *A castrated mouse model of erectile dysfunction. J Androl.* 2003, 24(5):699-703

Park KH, Kim SW, Kiim KD, Paick JS. *Effects of androgens on the expression of nitric oxide synthase mRNA in rat corpus cavernosum. BJU International.* 1999, 83:327-333

Park KS, Cha SK, Kim MJ, Kim DR, Jeong SW, Lee JW, Kong ID. *An alpha3beta4 subunit combination acts as a major functional nicotinic acetylcholine receptor in male rat pelvic ganglion neurons. Pflugers Arch.* 2006 May 20

Qi XL, Xiu J, Shan KR, Xiao Y, Gu R, Liu RY, Guan ZZ. Oxidative stress induced by beta-amyloid peptide1-42 is involved in the altered composition of cellular membrane lipids and the decrease expression of nicotinic receptor in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochemistry International* 2005, 46:613-621

Qinlan DM, Nelson RJ, Partin AW, Kim NN, Mostwin JL, Walsh PC. The rat as a model for the study of penile erection. *J Urol.* 141:656-661

Reilly CM, Stopper VS, and Mills TM. androgens modulate the alpha-adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle in the corpus carvernosum. *J Androl* 1997, 18: 26-31

Richardson CE, Morgan JM, Jasani B, Green JT, Rhodes J, Williams GT, Lindstrom J, Wonnacott S Thomas GA, Smith V. Megacystis-microcolon-intestina-l hypoperistasis syndrome and the absence of the alpha-3 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Gastroenterology.* 2001, 121: 350-357

Rousseau L, Dupont A, Labrie F, and Couture M. Sexually changes in prostate cancer patients receiving antihormpnal therapy combining the antiandrogen flutamide with medical(LHRH agonist) or surgical castration. *Arch Sex Behav.* 1988, 17: 87-98

Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescin. *J Leukoc Biol.* 1990 47(5):440-8.

Seo SI, Kim SW, Paick JS. The effects of androgen on penile reflex, erectile

response to electrical stimulation and penile NOS activity in the rat. *Asian J Androl.* 1999, 1(4):169-74.

Schirar A, Chang C, Rousseau JP Localization of androgen receptor in nitric oxide synthase- and vasoactive intestinal peptide-containing neurons of the major pelvic ganglion innervating the rat penis. *J Neuroendocrinol.* 1997, 9(2):141-50

Schirar A, Bonnefond C, Meusnier C, Devinoy E. Androgens modulate nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression in neurons of the major pelvic ganglion in the rat. *Endocrinology.* 1997, 138(8):3093-102.

Segovia G, Porras a, Del Arco A, and Mora F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Aging Dev.* 2001, 122: 1-29

Shabsigh R. The effects of testosterone on the cavernous tissue and erection. *Word J Urol.* 1997, 15: 21-26

Soliven B, Wang N. Tumor necrosis factor-alpha regulates nicotinic responses in mixed cultures of sympathetic neurons and nonneuronal cells. *J Neurochem.* 1995, 64(2):883-94.

Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol Ther.* 2005, 106(2):233-66

Trish AM, Park K, Dhir V, Kim NN, Moreland rB, Goldstein I. Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. *Endocrinology.* 1999, 140:1861-1868

Vernino S, Adamski J, Kryzer TJ, Fealey RD, Lennon VA. Neuronal nicotinic ACh receptor antibody in subacute autonomic neuropathy and cancer related syndromes. *Neurolog.* 1998, 50:1806-1813

Vernino S, Low PA, Fealey RD, Stewart JD, Farrugia G, Lennon VA. Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. *New Engl J med.* 2000, 343:847-855

Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care.* 2003, 26(5):1553-79.

Wespes E. Erectile dysfunction in the ageing man. *Curr Opin Urol* 2000, 10:625-628.

Watkins TW, Keast JR. Androgen-sensitive preganglionic neurons innervate the male rat pelvic ganglion. *Neuroscience.* 1999, 93(3):1147-57

Walsh PC, Donker PJ. Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. *J Urol* 1982, 128: 492-497.

Walsh PC, Marschke P, Ricker D, Burnett AL. Patient-reported urinary continence and sexual function after anatomic radical prostatectomy. *Urology* 2000, 55:58-61.

Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, Patrick J, Role LW, De Biasi M, Beaudet AL. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the  $\alpha 3$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1999, 96:5746-5751

Yamanaka M, Shirai M, Shiina H, Tamaka Y, Tsujimura A, Matsumiya K, Matsumiya K, OKuyama A, Dahiya R. Diabetes induced erectile dysfunction and apoptosis in penile crura are recovered by insulin treatment in rats. *J Urol* **2003**, 170:291-297

Yassin A, traish A, Saad F, Diede HE. Combination therapy of tadalafil and testogel in hypogonadal nonresponders. *In J Impot Res.* **2003**, 15:27

Yassin ASF. Modulation of erectile function with long acting testosterone injection(Nebido) I.m. in hypogonadal patients with ED. Case report. *Int J Androl.* **2005**, 28:53

Yildirim MK, Yildirim s, U사무 T, Sarioglu Y and Yalman Y. Effects of castration of isolated corpus carvenousum from rabbit. *Br J Urol.* 1997, 79: 964-970

Zhang XH, Filippi S, Morelli A, Vignozzi L, Luconi M, Donati S, Forti G, Maggi M. Testosterone restores diabetes-induced erectile dysfunction and sildenafil responsiveness in two distinct animal models of chemical diabetes. *J Sex Med.* **2006**, 3(3):573

Zhang XH, Filippi S, Morelli A, Vignozzi L, Luconi M, Donati S, Forti G, Maggi M. Testosterone restores diabetes-induced erectile dysfunction and sildenafil responsiveness in two distinct animal models of chemical diabetes. *J Sex Med.* **2006**, 3(3):573.

Zhang XH, Filippi S, Morelli A, Vignozzi L, Luconi M, Donati S, Forti G, Maggi M. Testosterone restores diabetes-induced erectile dysfunction and



sildenafil responsiveness in two distinct animal models of chemical diabetes. *J Sex Med* 2006, 3(2):253-64.

Zietz B, Cuk A, Hugl S, Buttner R, Straub RH, Bauer B, Daffner P, Scholmerich J, Palitzsch K. Association of increased C-peptide serum levels and testosterone in type 2 diabetes. *Eur J Intern Med* 2000, 11(6):322-328

Zippe C, Nandipati K, Agarwal A, Raina R. Sexual dysfunction after pelvic surgery. *Int J Impot Res* 2006, 18: 1-18

Zippe C, Raina R, Massanyi EZ, Agarwal A, Jones JS, Ulchaker J and Klein EA. Sexual function after male radical cytotomy in a sexually active population. *Urology* 2004, 64: 682-686.

Zoubek J, Somogyi GT, De Groat WC, A comparison of inhibitory effects of neuropeptide Y on rat urinary bladder, urethra and vas deferens. *Am j Physiol* 1993, 265: R537-543

## ABSTRACT

# A Molecular Mechanism Underlying the Neurogenic Erectile Dysfunction

Huang, Xue Zhu

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeong Seong Woo)

Major pelvic ganglion(MPG) neurons are implicated in the autonomic reflexes such as penile erection and mituration. Several studies have demonstrated that deprivation of androgen causes erectile dysfunction(ED). Among neuronal mechanisms underlying the ED suggested until now, the most plausible one might be reduction in the number of NO containing fibers innervating the corpus cavernosum. In attempt to address whether the androgen-dependent neurogenic ED arises from functional alterations in the MPG neurons, the castrated and were streptozotocin induced diabetic rat models used. To evaluate erectile dysfunction, the intracavernous pressure was measured after electrical stimulation(20 Hz, 10 V) of the preganglionic pelvic nerve. As shown before, the castrated rat showed significantly impaired erectile function, which was completely prevented by intramuscular injection of testosterone. In the diabetic rat models, the intracavernous pressure was significantly reduced than compared with the in the control rats. To probe functional proteins regulated by castration, cDNA microarray analysis was performed. Analysis of expression

profiles revealed down-regulation of a certain nicotinic acetylcholine(nACh) receptor subunit which may result in attenuation of ganglionic synaptic transmission. Real-time PCR confirmed down-regulation of nAChR  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5 and  $\beta$  4 subunits in the MPG neurons of castration and diabetic rat models. The alteration in gene expression was consistent with electrophysiological measurement of nicotinic currents in the MPG neurons. Compared with the control rats, the efficacy of acetylcholine(ACh) to evoke nicotinic current was significantly reduced in the MPG neurons of the two types of rat models. To test if castration increases oxidative stress and/or pro-inflammatory cytokines which may affect expression and function of nAChRs in the MPG neurons. As measured using the hydroethidine method, the *in situ* production of superoxide was prominent in the MPG neurons of the castrated rats when compared with that of the sham control. Consistent with this finding, the nAChR current density was significantly attenuated following 24 hr treatment of the MPG neurons with such as hydroperoxide, a reactive oxygen species(ROS) in addition to the increased ROS, real-time PCR analysis revealed that castration significantly enhanced expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-6 as well as TNF- $\alpha$  receptors in the MPG neurons. When measured in the MPG neurons treated with IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$ , nAChR currents were significantly attenuated. Taken together, these results suggest that the selective down-regulation of neuronal nicotinic receptors contributes to the androgen-dependent neurogenic erectile dysfunction and increased production of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines may cause down-regulation of nAChR in the MPG neurons of the castrated and diabetic rats.

---

Key words: erectile dysfunction, testosterone, major pelvic ganglia, nicotinic acetylcholine receptors, oxidative stress, pro-inflammation mediator