

성숙백서에서 남성호르몬 결핍과 보상에 따른 음경해면체 및 발기력의 변화

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실, 이화여자대학교 의과대학 비뇨기과학교실*

최영득 · 박진아 · 정우식* · 최형기

=Abstract=

Effects of Androgen Deprivation and Replacement on the Penis and Erectile Function in the Adult Rat

Young Deuk Choi, Jin Ah Park, Woo Sik Chung* and Hyung Ki Choi

From the Department of Urology, Yonsei University and Ewha Womans University*
College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Androgen plays an important role during penile development and is essential for libido in the male, but its role in the regulation and maintenance of the erectile response has been controversial. We investigated the effects of castration and androgen replacement on penile erection in the adult rat.

Materials and Methods: Adult male Sprague Dawley rats were divided into three groups: control, castration, and androgen replacement after castration. Androgen (testosterone, DHT) was administered for 7 days at week 1, 2, 3, and 4 after castration. The intracavernosal pressure was recorded after submitting the rats to cavernous nerve stimulation. The percentages of cells in the penis expressing Ki-67 (proliferative index) and of apoptotic cells, assessed by morphologic analysis (apoptotic index), were analyzed. Nitric oxide synthase (NOS) activity was measured by the arginine-citrulline conversion ratio, and expression of nNOS and eNOS was determined by Western blot analysis.

Results: After castration, a significant increase was noted in the apoptotic index, with a decrease in the expression of nNOS and eNOS. Replacement of androgen increased the proliferative index and the expression of nNOS and eNOS. Castration also induced a reduction in NOS activity and erectile function in response to cavernous nerve stimulation; NOS activity and erectile function were restored with androgen replacement.

Conclusions: These results suggested that the penile tissue and NOS activity of the adult rat are affected by the androgen milieu and that androgens such as testosterone and DHT play a direct role in the erectile function at the level of the erectile tissue.

Key Words: Penis, Androgen, Apoptosis, Proliferation, Nitric oxide

서 론

남성호르몬은 중추신경, 척수반사, 음경에 작용하여 음경발기를 조절한다. 중추신경을 통한 효과로 성선기능저하증환자의 성활동과 동물의 교접행위에 관한 실험에서

교신저자: 최영득, 연세대학교 의과대학

영동세브란스병원 비뇨기과

서울시 강남구 도곡동 146-92 ☎ 135-270

전화 : 02) 3497-3474

* 본 연구는 1998년도 연세대학교 학술연구비 (신임교수)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

남성호르몬은 대뇌에 작용하여 성욕 증대와 함께 음경발기를 향상시킨다 (1-4). 척수반사작용에 대해서는 교환제거시 척수 음경운동신경원과 골반주신경절의 음경발기신경전달인자가 감소하고 더불어 음경반사반응이 약화되며, 남성호르몬 보충시 이의 신경전달인자 및 음경반사작용이 회복됨이 보고되어 남성호르몬이 발기반사에 작용함을 알 수 있다 (5-10).

남성호르몬이 음경에 미치는 영향에 대해 Lin 등은 개에서 교환제를 제거하여도 발기력에 영향이 없어 남성호르몬이 음경에서는 특별한 작용이 없음을 보고하나 (3), 다른 실험에서 교환제거나 항남성호르몬제 투여시 해면체

평활근은 발기유발제에 대한 반응이 약해지며, 남성호르몬 보충시 발기력이 회복된다는 보고가 많다 (10-15).

조직의 기능은 세포증식과 세포고사의 균형에 의해 이루어진다. 남성호르몬의 영향을 받는 고환에서는 정상적으로 세포고사가 일어나며 남성호르몬 감소시 세포고사가 증가되고, 남성호르몬 보충시 세포증식이 일어난다 (16). 전립선에서는 남성호르몬이 세포고사를 억제하여 세포증식을 유도하는데 남성호르몬 결핍시 세포고사가 야기된다 (17,18). 따라서 남성호르몬은 남성생식기에서 세포고사와 세포증식을 조절하는 물질로 여겨지며 음경에서도 세포고사와 세포증식의 조절인자로 작용할 것으로 추측된다.

음경발기는 해면체평활근의 이완에 의한 현상으로서 비아드레날린성 비콜린성 신경전달물질과 해면체 내피세포에서 분비되는 이완물질이 음경발기에 중요한 역할을 하며, 이는 nitric oxide (NO)로 여겨진다 (19,20). NO가 음경발기의 주 매개체로 알려지면서 음경 NO에 대한 남성호르몬 역할이 연구되고 있다 (21-24). 그러나 남성호르몬이 음경 NO에 영향을 미치지 않는다는 보고도 있고 (25) 신경인성 NO와 내피세포인성 NO간에 역할에도 차이가 있어 남성호르몬이 음경 NO에 미치는 작용을 명확히 정립하기는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 남성호르몬이 사춘기 이후의 음경해면체에 미치는 역할을 규명하고자, 성숙한 백서에서 고환제거로 남성호르몬 결핍을 유도하고 일정기간 경과 후 남성호르몬을 보충하여, 남성호르몬 결핍과 결핍시기에 따른 남성호르몬 보충에 의한 음경발기력의 생리적 변화를 확인하며, 더불어 남성호르몬 변화에 따른 음경해면체의 세포고사 및 세포증식을 관찰하고, 남성호르몬이 음경발기의 주 매개체로 알려진 음경해면체 NO의 신경인성 및 내피세포인성 NO에 미치는 효과를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 남성호르몬 결핍 유발과 보충

350~450 gm의 Sprague-Dawley계 수컷 백서 360마리를, 대조군, 양측 고환제거군, 양측 고환제거 일정기간 후 남성호르몬 보충군으로 나누었다. 고환적출은 ketamine (35 mg/kg) 마취하에 하복부 절개로 시행하였고, 남성호르몬 결핍 기간은 1, 2, 3, 4주로 하였다. 남성호르몬 보충은 testosterone propionate (TP) 혹은 dihydrotestosterone propionate (DHT)를 3.0 mg씩 sesame oil 0.1 ml에 용해시켜 고환제거 1, 2, 3, 4주 후에 1주일간 하복부 피하에 매일 주사하였다. 대조군은 가수술만을 시행하였고, 고환제거군과 함께 sesame oil만을 주사하였으며, 일부 결과 보충을 위하여 상황에 따른 남성호르몬 결핍 기간과 남성호르몬 보충 기간을 추가로 병행 시행하였다.

2. 실험방법

1) 조직채취 및 혈중 testosterone 측정

남성호르몬 결핍과 보충이 완료된 후 ketamine 마취하에, 복부대정맥에서 5 ml 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 영하 20℃에 냉동보관 후 DPC's Coat-A-Count testosterone RIA kit (Diagnostic Products Co., LA, CA, USA)를 이용하여 혈중 testosterone을 측정하였다. 음경을 절제하고 조직학적 검사를 위한 조직은 10%의 포르말린에 고정하고, 파라핀으로 포매 후 종방향으로 3 μm의 연속절편을 만들어 silane coating slide에 붙였다. Western blot 및 NOS 활성도 측정을 위한 조직은 액화 질소에 동결시켜 영하 70℃에 보관하였다.

2) 세포고사 및 세포증식의 관찰

세포고사는 terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 방법을 사용하였다. 파라핀포매조직을 xylene으로 탈랍하고 100% ethanol과 80%, 50% ethyl 알코올로 함수시키고, proteinase K (60 μm/ml)로 37℃에서 10분간 처리 후 equilibration buffer로 씻은 뒤, Apotag kit (Apop Tag in situ apoptosis detection kit, Oncor, Gaithersburg, Maryland, USA)를 사용하여 염색하였다. 즉 labelling safe buffer에 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 섞어 37℃에서 90분 동안 배양하고, anti-digoxigenin alkaline phosphatase를 작용시키고 nitroblue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate로 발색하였다. 대조염색은 0.3% nuclear fast red로 시행하였고, 음성대조군으로는 TdT를 제외하고 증류수로 염색하였다.

세포증식은 Ki-67 면역염색을 시행하였다. 파라핀포매조직을 xylene으로 탈랍하고 알코올에 탈수시킨 후 3% H₂O₂에 처리하였다. 10 mM sodium citrate buffer에 담구어 전자렌지에 가열하고 TBS으로 세척하였다. 일차항체로 monoclonal Anti-Ki-67 (Immunotech, Westbrook, ME, USA)을 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시키고, ABC 방법으로 biotin이 부착된 이차항체에 30분간 반응시켰다. 이후 streptavidin에 30분간 부착시키고 AEC (3-aminoethyl carbazole)로 발색하였다. Harris hematoxylin으로 대조염색하였다.

3) 해면체신경자극에 의한 음경발기의 측정

Ketamine (35 mg/kg) 마취하에 복부 절개하여 전립선 후 측벽에 위치한 음경해면체신경에 2 mm 간격의 백금전극을 설치한 후 electric stimulator (STM100A, Biopac system, Santa barbara, CA, USA)에 연결하였다. 음경포피를 절개하고 음경해면체내에 26 G 바늘을 유치하고 차등증폭기 (DA100, Biopac system, Santa barbara, CA, USA)에 연결하여 data acquisition (MP 100, Biopac system, Goleta, CA, USA)으로 해면체내압을 측정하였다. 해면체신경자극에 의한 음경발기의 반응은 동일 자극 (frequency: 2 Hz, threshold: 3 Volt)을 시행하였으며, 자료는 data analysis program (Acqknowledge 3.2 program, Biopac system, Santa barbara, CA,

USA)으로 분석하였고, 최대해면체내압과, 해면체내압의 증가가 시작되는 시점에서 최대해면체내압에 도달되는 데 까지 걸리는 시간 (Lag time), 음경해면체의 압력변화의 초기 팽창도 (fill rate, slope)를 비교하였다.

4) 음경해면체 NOS 활성도 측정

NOS활성도는 citrulline측정으로 관찰하였다. 조직을 homogenate buffer (0.32 M sucrose, 20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 5 mg phenyl methyl sulfonyl fluoride)로 균질화하고, 0.45 mM CaCl₂, 1 mM NADPH 용액과 ¹⁴C-L-arginine을 첨가한 후 37℃에서 30분 반응시키고, ice-cold HEPES/EDTA buffer를 첨가하고 반응액을 cation-exchange column에 적용시켜 ¹⁴C-L-arginine으로부터 ¹⁴C-L-citrulline을 분리시켜, 추출된 ¹⁴C-L-citrulline의 radioactivity를 β counter로 측정하였다. NOS 활성도는 전환된 ¹⁴C-L-citrulline의 radioactivity를 반응액에 첨가한 ¹⁴C-L-citrulline의 total radioactivity로 나눈 전환 백분율로 표시하였다 (단위: % conversion/mg protein).

5) 신경인성 NO와 내피세포인성 NO의 변화

음경해면체의 신경인성 NO와 내피세포인성 NO의 변화는 Western blot 분석을 이용하였다. 조직 gm당 5배의 0.1 M PBS를 가하여 균질액을 만들고, 원심분리 (12,000 g, 30분)하여 상층액을 사용하였다. Sample 10 μl를 취하여

separating gel은 7.5%, stacking gel은 5%로 만들어 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다. 표본에 SDS와 β-mercaptoethanol이 포함된 6×sample buffer를 넣고 100℃에서 3분간 가열 후 gel에 loading하고 130 V에서 약 1시간 30분 동안 Protein mini gel system (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)을 이용하여 전기영동하였다. SDS-PAGE로 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride 막에 전이하고 blocking solution (5% skim milk/TBST)으로 내인성 인자를 차단하였다. 일차항체로 polyclonal anti nNOS (neural NOS; Transduction Lab., Lexington, KY, USA), polyclonal anti eNOS (endothelial NOS; Affinity Bioreagents Inc., Golden, NJ, USA)를 사용하였으며, blocking solution 5 ml에 각각 1:250, 1:500으로 희석하여 1시간 동안 배양하였다. 1% Tween20/TBS로 세척하고 horse radish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG antibody를 blocking solution으로 희석하고 실온에서 배양하였다. TBST로 세척 후 chemiluminescent substrate로 처리하고 현상하였다. Low molecular prestained marker를 이용하여 nNOS는 155 KDa, eNOS는 140 KDa에서 확인하였다.

3. 결과판정 및 자료분석

핵염색이 기대되는 Ki-67, 세포고사 염색 판정은 4부위

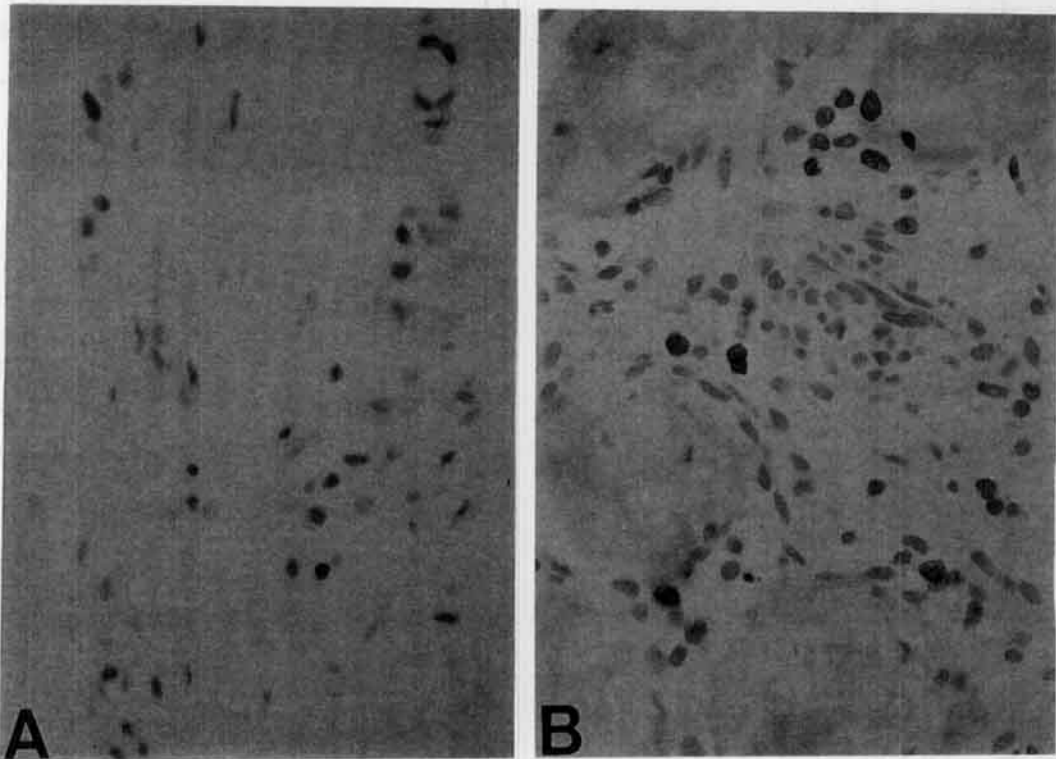


Figure 1. Positive nuclear staining of apoptosis and Ki-67 antigen in the adult rat penis. **A.** Longitudinal sections for apoptotic cell death using an in situ DNA fragmentation labelling system (Apotag kit). At 7 days after castration. Extensively labeled nuclei are seen. (x400) **B.** Longitudinal sections for Ki-67 antigen immunostaining indicating proliferative cells. At 7 days after the administration of testosterone to a castrated rat. Many positive staining are seen. (x400).

즉 외중축 백막, 내환상 백막, 평활근이 풍부한 근위부 해면체, 평활근이 상대적으로 적은 원위부 해면체로 구분하여 각 부위에 대해 무작위로 5군데를 선정하여 고배율에

서 핵에 뚜렷하게 염색되는 세포를 합산한 백분율을 구하여 지수로 이용하였다.

결과는 컴퓨터의 Excel 및 SPSS 7.5를 이용하여 평균과 표준오차를 구하였으며, 시기변화에 따른 차이는 one-way analysis of variance를, 남성호르몬 결핍과 보충의 차이는 student's t test를 이용하여 $p < 0.05$ 일 때 유의있는 것으로 판정하였다.

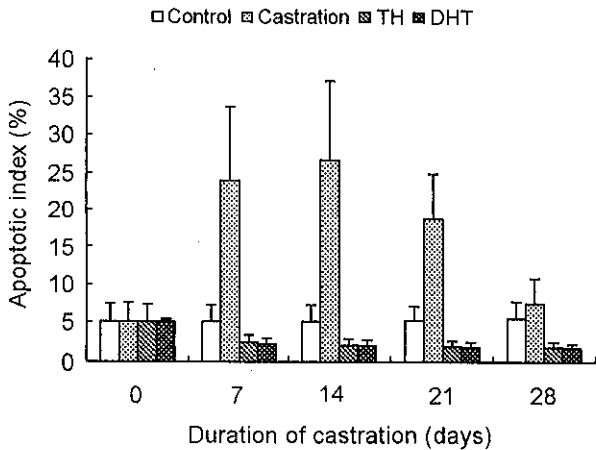


Figure 2. Effect of castration and androgen replacement on the apoptotic index (AI) in the adult rat penis. AI is increased after castration and decreased with androgen replacement. Values represent the mean percentage of cells that showed positive labelling of DNA fragmentation detected in situ DNA fragmentation labelling system. Each bars represent the mean \pm SEM. Day means the duration of castration. Control: Intact control (n=35), Castration: Orchiectomy bilateral (n=35), TH: Testosterone replacement after orchiectomy (n=35), DHT: Dihydrotestosterone replacement after orchiectomy (n=35).

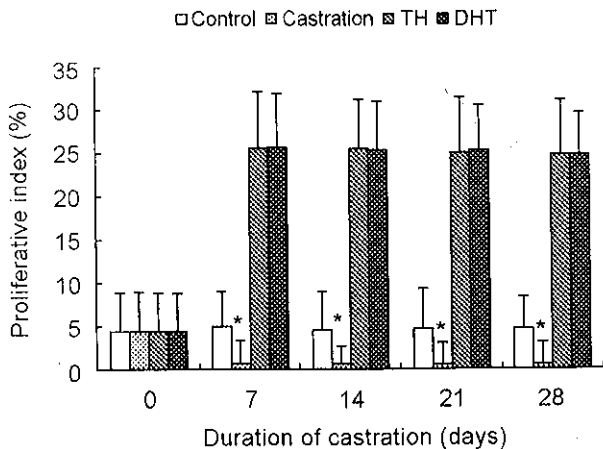


Figure 3. Effect of castration and androgen replacement on the proliferative index (PI) in the adult rat penis. PI is decreased after castration and increased with androgen replacement. Values represent the mean percentage of cells that exhibit positive immunostaining for the Ki-67 nuclear antigen. Vertical bars are SEM. *: $p < 0.05$, significant difference between control and castration group. Day means the duration of castration. Control: Intact control (n=35), Castration: Orchiectomy bilateral (n=35), TH: Testosterone replacement after orchiectomy (n=35), DHT: Dihydrotestosterone replacement after orchiectomy (n=35).

결 과

1. 고환제거 및 남성호르몬 보충에 따른 호르몬 변화

고환제거 전 혈청 testosterone은 3.49 ng/ml였으며, 고환제거 1일에는 0.68 ng/ml로 감소하였고, 4주까지 감소한 상태로 유지되었다. 고환제거에 따른 혈중 testosterone의 감소는 TP를 보충한 결과 고환제거 기간에 관계없이 정상대조군 수준으로 회복되었다. 고환제거 후 DHT를 보충한 결과 혈중 testosterone의 상승은 없었으며, 고환제거군과 유사하였다.

2. 남성호르몬이 음경해면체의 세포고사 및 세포증식에 미치는 영향

음경해면체의 세포고사는 TUNEL 방법의 염색에서 핵이 진하게 염색되어 관찰되었다 (Figure 1). 정상대조군의 백막 및 해면체에서 일부 세포고사가 나타났으며, 이리

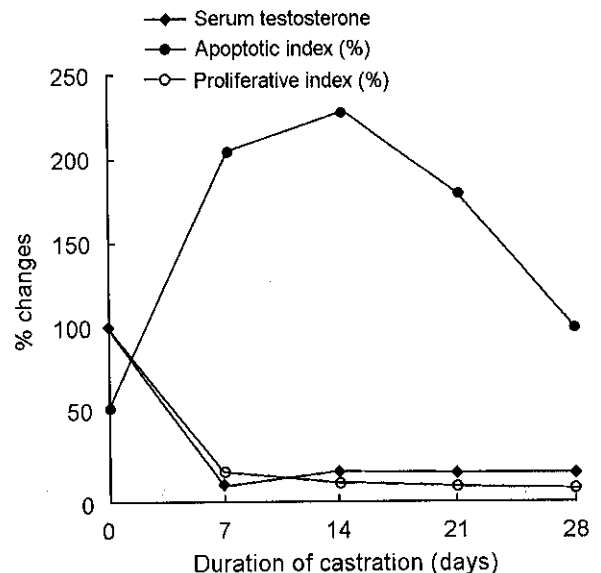


Figure 4. Relative percentage changes of serum testosterone, apoptotic index, and proliferative index rate against time after castration in the adult rat penis. The decrease in serum testosterone, proliferative index rate is concomitant with an increase in the apoptotic index. Values represent the mean percentage of each values referred to the respective intact control series determination.

한 세포고사는 고환제거 3~4일에 최고로 도달하였고 이후 14일에 증가하였다가 감소하였다 (Figure 2). 고환제거로 나타난 세포고사는 TP나 DHT를 보충한 경우 소실되었고, TP와 DHT 보충에 대한 정도를 비교하면 TP를 보충한 경우와 DHT를 보충한 경우 유의적인 차이는 없었다 ($p>0.05$) (Figure 2).

정상대조군의 음경해면체에서 Ki-67의 발현이 나타났으며 (Figure 1), 고환제거 3일부터 모든 부위에서 소실되어 28일까지 지속되었다 (Figure 3). 고환제거 후 남성호

르몬을 보충한 결과 Ki-67의 발현은 백막과 해면체에서 모두 발현되었다. 발현 정도는 정상대조군보다 강하였으나 ($p<0.01$) 고환제거 기간이나, TP 및 DHT에 따른 유의적인 차이는 없었다 ($p>0.05$) (Figure 3).

남성호르몬과 음경해면체 세포의 변화를 살펴보면 고환제거로 혈중 testosterone이 감소하면 음경해면체에서 세포증식은 감소하고 세포고사가 증가하였고, 남성호르몬을 보충하면 음경해면체에서는 세포고사가 감소하고 세포증식이 증가하였다 (Figure 4).

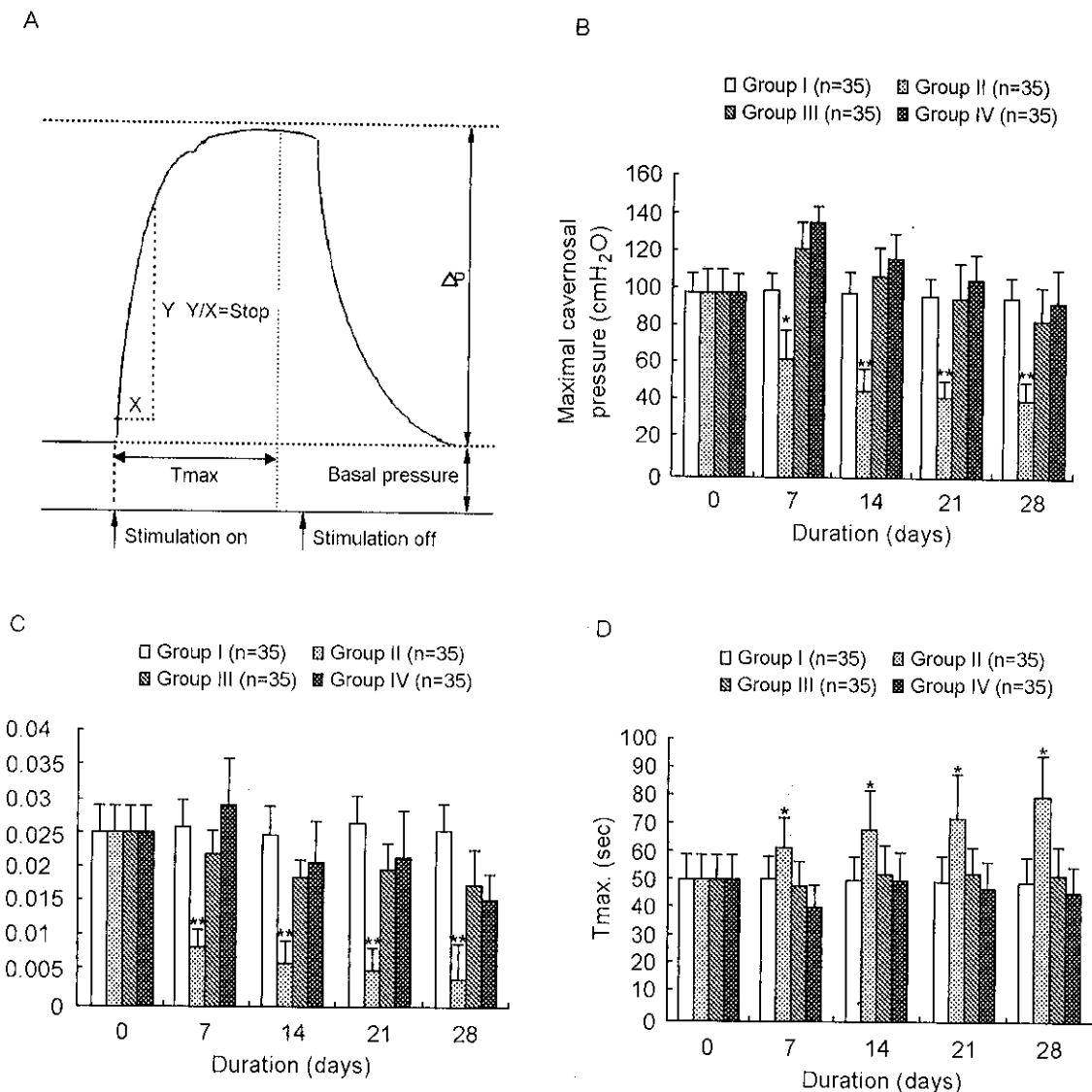


Figure 5. The effect of androgen on the erectile response. **A.** Schematic drawing shows the increase in intracavernous pressure induced by unilateral cavernous nerve stimulation (2 Hz, 3 Volts) in the rat. The increase in pressure is described in terms of: (1) ΔP , intracavernous pressure defined as the maximal pressure obtained by the stimulation minus the basal pressure before stimulation; (2) T_{max} , defined as the time to reach the maximal pressure; and (3) The slope of the initial, ascending part of the increase in pressure (y/x). **B.** ΔP , **C.** The slope, **D.** T_{max} . The magnitude of the erectile response declines significantly after castration. The decreased erectile responses are recovered after the administration of androgen. Each bar is the mean \pm SEM. Analysis of significance was compared with control (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$). Group I: intact control ($n=35$), Group II: castration ($n=35$), Group III: castration + testosterone propionate ($n=35$), Group IV: castration + DHT ($n=35$). Day means the duration of castration.

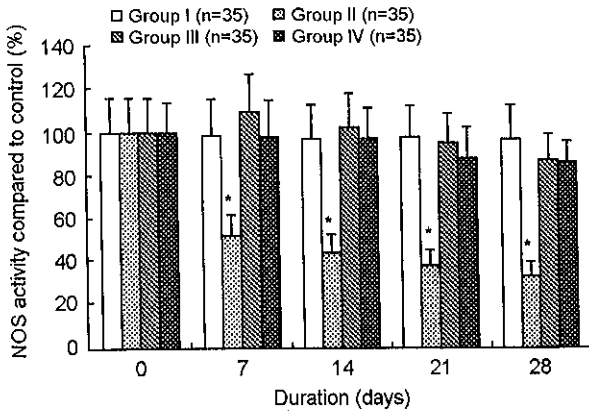


Figure 6. Effect of castration and androgen replacement on the NOS enzyme activity in the cytosol fraction from the rat penis. The supernatants of the homogenates were obtained from each rats. Aliquots were assayed for the 14 C-labeled L-arginine/citrulline conversion and for protein content. NOS specific activity was expressed per gram of tissue (% conversion/mg protein). All values are expressed as mean \pm SEM of each values referred to the respective intact control series determination. Analysis of significance was compared with intact control (*: $p < 0.01$). Group I: intact control (n=35), Group II: castration (n=35), Group III: castration + testosterone propionate (n=35), Group IV: castration + DHT (n=35). Day means the duration of castration.

3. 남성호르몬이 해면체신경자극에 의한 음경발기에 미치는 영향

각 군에서 동일한 강도로 해면체신경자극을 시행한 결과 정상대조군에서 최대해면체내압이 88.52 ± 7.86 cmH₂O였으며, 고환제거군에서는 시간이 경과함에 따라 최대해면체내압이 감소하여 고환제거 2주에는 45.67 ± 12.45 cmH₂O였으며, 이후 감소된 상태로 유지되었다 (4주: 38.34 ± 12.45 cmH₂O) (Figure 5B). 남성호르몬 결핍에 따른 최대해면체내압의 감소는 TP와 DHT를 보충함으로써 회복되었으나 고환제거에 따른 기간이 길수록 회복력이 약해졌고, DHT가 TP보다 강하였다 (Figure 5B).

최대해면체내압에 도달되는 시간은 정상대조군의 경우 평균 49.95 sec.였으나 고환제거에 따라 유의있게 연장되었다. 이러한 연장은 TP와 DHT를 투여함으로써 회복되었으며, DHT의 경우 대조군보다도 더욱 감소되었다 (Figure 5C). 음경해면체의 압력변화의 초기 팽창도는 정상대조군의 경우 0.025였으나 고환제거에 따라 감소하였고, TP나 DHT를 보충함으로써 회복되었다 (Figure 5D).

4. 남성호르몬 변화가 음경해면체의 NOS 활성도에 미치는 영향

NOS 활성도는 정상대조군에 비해, 고환제거 7일째 51.7%로 감소하였고, 고환제거 28일째 32.67%로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.01$) (Figure 6). 고환제거에 따른 NOS 활성도 감소는 TP와 DHT를 보충한 결과 정상대조군 수준으로

회복되었다 (Figure 6). 남성호르몬 변화에 따른 음경해면체의 NOS 활성도의 변화는 해면체신경자극에 의한 최대해면체내압의 변화와 비슷한 양상이었다.

5. 남성호르몬 변화가 음경해면체의 nNOS, eNOS에 미치는 영향

고환제거에 따라 음경해면체 nNOS의 발현이 감소하였으며, 이는 고환제거 기간에 따라 점차 감소하는 양상을 보였고, NOS 활성도 측정과 유사하였다 (Figure 7). 고환제거에 따라 음경해면체의 eNOS 발현도 감소하였으며, 이도 고환제거 기간에 따라 점차 감소하는 양상을 보였다 (Figure 7). 남성호르몬의 변화에 따른 nNOS와 eNOS간의 유의있는 차이는 보이지 않았다 (Figure 7). 고환제거에 따른 음경해면체의 nNOS와 eNOS의 발현 감소는 남성호르몬을 보충함에 따라 정상수준으로 회복되었다 (Figure 7).

고찰

연구결과 성숙백서에서 고환제거 후 시간이 경과함에 따라 해면체신경자극에 의한 음경발기력이 유의있게 감소하고, 남성호르몬 보충으로 남성호르몬 결핍 기간에 관계없이 해면체신경자극에 의한 음경발기력이 회복됨으로 보아, 남성호르몬이 음경해면체에 작용하여 음경발기에 직접적인 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 이러한 남성호르몬 변화에 따른 음경발기에 대한 연구는 동물의 생체 내의 실험에서도 일부 확인되고 있다 (10-15).

조직의 기능은 세포증식과 세포고사의 균형에 의해 이루어진다. 본 연구에서 남성호르몬에 따른 음경해면체의 세포유지에 관해 관찰한 결과 고환제거에 따라 음경해면체의 세포고사가 유발되고, 남성호르몬 결핍 상태에서 남성호르몬을 보충하면 남성호르몬 결핍시기에 관계없이 음경해면체의 세포증식이 나타났다. 음경해면체의 세포고사는 음경해면체신경을 절단한 경우에 보고되고 있다 (26,27). 본 연구에서는 남성호르몬이 세포고사에 미치는 영향을 관찰한 것으로서 음경해면체에서 세포고사는 정상대조군의 경우 백막 및 해면체에 일부 나타났으며, 고환제거시 증가하였는데 초기 3일째에는 주로 collagen이 풍부한 백막에서 나타났고, 시간이 지날수록 근세포와 내피세포가 풍부한 해면체로 진행되었다. 남성호르몬이 음경해면체의 세포증식에 미치는 영향에 대하여 관찰한 결과 정상대조군의 음경해면체에서 세포증식이 일부 나타났으며, 고환제거 3일 이후 모든 부위에서 세포증식은 소실되었다. 고환제거 후 남성호르몬을 보충한 결과 음경해면체의 모든 부위에서 세포증식이 나타났으며, 발현 정도는 정상대조군보다 강하였다. 따라서 성숙백서의 음경해면체에서 남성호르몬은 세포증식 및 세포고사를 조절함을 알 수 있고 일부 최근의 보고에서도 확인되고 있다 (24,28).

음경발기는 해면체평활근의 긴장력에 의해 조절되는

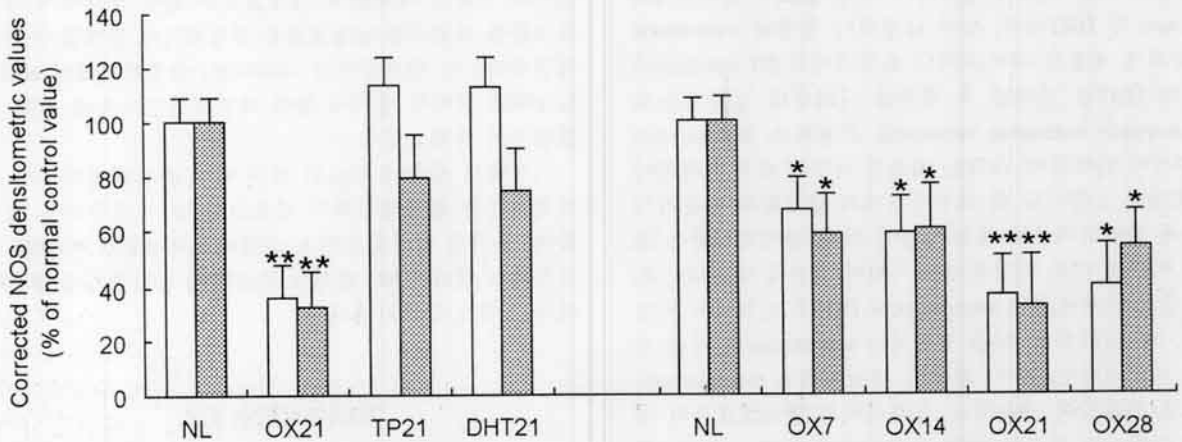
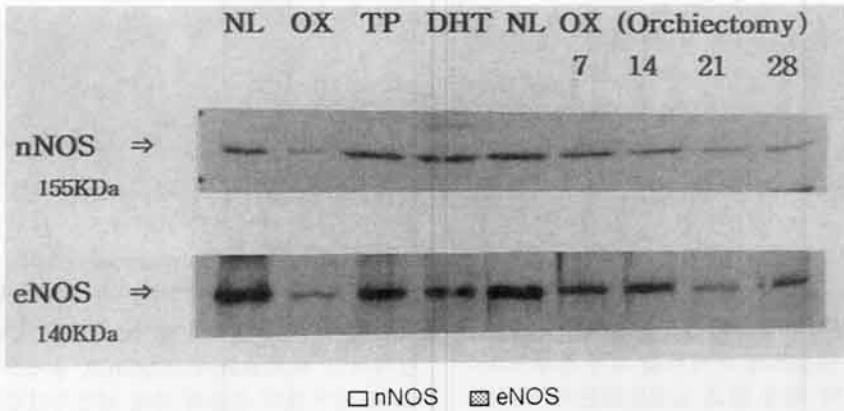


Figure 7. Effect of castration and androgen replacement on the content of NOS (nNOS and eNOS) in the cytosol fraction from the rat penis. The supernatants of the penile homogenates were submitted to Western blot analysis with anti-rabbit polyclonal NOS antibody and detection by a chemoluminescence reaction. Top: Western blot analysis of NOS in the rat penis tissue. An immunoreactive nNOS band at 155 KDa and eNOS band at 140 KDa was detected. Bottom: densitometric analysis of the top nNOS 155 KDa and eNOS 140 KDa band. Mean and SEM of densitometric values (absorbance/ μ g protein) are expressed as % of normal control. Analysis of significance was compared with control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$). NL: Intact control (n=35), OX: castration (n=35), TP: Testosterone replacement after orchiectomy (n=35), DHT: Dihydrotestosterone replacement after orchiectomy (n=35). Numerics means the duration of castration.

바, 비아드레날린성 비콜린성 신경전달물질과 해면체 내피세포에서 분비되는 이완물질이 음경발기의 중심인 해면체평활근의 이완에 중요한 역할을 한다. 현재 음경발기에 관여하는 신경전달물질이나 해면체 내피세포에서 분비되는 이완물질로 NO, VIP (vasoactive intestinal peptide), CGRP (calcitonin gene-related peptide) 등이 있으나, NO가 해면체평활근 이완의 주 매개체로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 남성호르몬 변화에 따른 음경의 신경전달물질의 변화를 관찰하고자 이중 음경발기의 주 매개체로 알려진 음경의 NO의 변화에 대해서도 관찰하였다. NO는 평활근을 이완시키는 자극들이 내피세포의 수용체에 작용하거나 비아드레날린성 비콜린성 신경이 자극되면 생체내에서 NOS에 의해 L-arginine으로부터 NO와 L-citrulline으로 변환되어 생성된다. NOS 활성도와 남성호르몬의 관계에 대해 Zavara 등 (21)은 고환제거 5일째 음경해면체의 NO가 36% 감소하며, 10일째 63% 감소하여 고환제거 30일

에는 83%까지 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서도 각 군에서 정상대조군에 비해 NOS 활성도가 고환제거 7일째 51.7%로 감소하였고, 고환제거 28일째 32.67%로 감소하였으며, 남성호르몬 보충시 정상대조군 수준으로 회복되었는데 이러한 변화는 해면체신경자극에 의한 최대해면체 내압의 변화와 비례하였다. 따라서 남성호르몬은 음경해면체의 NO의 분비를 조절하여 음경발기에 관여함을 알 수 있다.

NO의 형태에는 신경인성 NO와 내피세포인성 NO가 관여하리라 여겨진다. 이 두형태에 관한 연구는 밝혀진 바 없으나 본 연구결과 혈중 testosterone이 감소함에 따라 음경해면체의 nNOS와 eNOS의 발현이 모두 감소하였고, 남성호르몬 보충시 nNOS와 eNOS의 발현이 모두 정상수준으로 회복되었다. 또한 남성호르몬 변화에 따라 nNOS와 eNOS간에 유의있는 차이는 보이지 않았다. 따라서 남성호르몬은 음경해면체의 nNOS와 eNOS에 모두 작용하여

음경발기에 영향을 미침을 알 수 있었다.

남성호르몬 결핍이 NO외의 신경전달인자에 미치는 영향에 대해서도 일부 연구되어, 남성호르몬이 아드레날린성 및 푸린성 자극에 영향을 미치고, 평활근 배양에서 남성호르몬이 아드레날린성 수용체의 발현을 조절하며, 고환제거시 토끼 해면체는 acetylcholine이나 VIP에 대한 이완력이 감소된다는 보고가 있다 (8,29-31). 따라서 남성호르몬 변화에 따른 NO이외의 인자에 대한 병용연구와 이들간의 비교연구도 요구된다.

남성호르몬으로 androstenedione, dehydroepiandrosterone, androstene-3 β 17-diol은 혈중으로 분비되는 양이 전체 testosterone의 10% 정도밖에 되지 않고 남성호르몬의 역가도 1/10 정도이다. 따라서 성인에서 가장 중요한 형태는 testosterone 및 DHT이다. 성인 남성에서 혈중의 testosterone는 자체로 작용을 나타내거나 조직내에서 5 α reductase에 의하여 DHT로 전환된 후 작용을 나타낸다. 일반적으로 testosterone은 leutenizing hormone을 조절하고, wolffian duct의 형성에 관여하며, DHT는 체조직 성장에 매우 효과적이어서 태아의 요생식동 및 외부생식기의 남성화와 사춘기시 성숙에 관여하며 성욕에는 영향이 적다. 남성호르몬은 조직과 기관에 따라 다양하게 대사되어 작용을 나타내는데, 전립선과 피부에서는 testosterone이 DHT로 전환되어 사용되며, 뇌, 뇌하수체, 신장 등에서는 testosterone이 직접 작용을 나타내지만, 피부, 전립선, 정낭에서는 testosterone이 DHT로 전환되어 사용되나, 음경에서의 남성호르몬의 작용에 대해서는 확실치 않다. 음경성장에 있어 남성호르몬 중 testosterone보다 DHT가 더 중요하며, 전립선에서도 testosterone보다는 DHT가 더욱 강하며, DHT가 testosterone보다 남성호르몬수용체에 반응하는 친화력이 2배 정도 크고, 노화현상이 진행될수록 testosterone의 DHT 전환율이 감소하며, 최근 해면체신경자극에 의한 음경발기 및 NO 매개성 음경발기에도 DHT가 더 큰 역할을 한다는 보고 (10,19) 등이 있어 본 연구에서는 testosterone과 DHT의 음경발기에 미치는 효과를 조사하였다. 본 연구 결과 남성호르몬 감소에 따른 음경해면체의 세포고사 및 세포증식 변화, NOS 활성도 변화, nNOS와 eNOS에서 TP와 DHT투여에 따른 회복의 정도를 비교한 결과 TP와 DHT에 의의 있는 차이는 나타나지 않았다. 그러나 해면체신경자극에 의한 음경발기력에 미치는 영향을 관찰한 결과 고환제거 후 DHT보충시 최대해면체내압, 최대해면체내압에 도달되는 시간, 음경해면체의 압력변화의 초기 팽창도 등의 발기력 회복에서 DHT가 TP보다 강하였다. 그러나 본 연구결과 통계학적 의의는 없으나 NOS 활성도나 nNOS 및 eNOS의 발현에서 DHT투여시 TP보다 약하였다. 이에 본 연구에서는 이의 원인에 대해서는 확인할 수 없었으며, 이에 해면체평활근 및 elastin의 변화, 음경조직내 TP 및 DHT 농도, 5 α reductase 역할에 대한 연구, 호르몬변화에 따른 음경의 DNA 및 mRNA 변화, DHT 역할, 음경발기에 관여하는 기타 신경전달인자 등에 대한 보충 연구 등이 더 필요

한 것으로 생각된다.

결 론

남성호르몬이 성인 음경발기에 미치는 역할을 확인하고자 성숙한 백서에서 고환제거로 남성호르몬 결핍을 유도하고 기간에 따른 testosterone과 DHT 보충을 시행하여 남성호르몬이 음경해면체에 미치는 영향을 관찰한 결과, 고환제거에 따라 혈청 testosterone은 감소하며, 음경해면체에서는 세포고사가 유발되고, 음경해면체의 nNOS 및 eNOS 단백질의 감소와 함께 해면체신경자극에 의한 음경발기의 저하가 나타났다. 남성호르몬 결핍 상태에서 남성호르몬을 보충하면 남성호르몬 결핍시기에 관계없이 음경해면체에서는 세포증식이 나타나고, 음경해면체의 nNOS 및 eNOS 단백질 증가와 함께 해면체신경자극에 의한 음경발기가 회복되었다.

이상에서 성숙이 완료된 성인 백서 음경해면체에서 남성호르몬은 음경해면체의 세포고사 및 세포증식을 조절하며, 동시에 남성호르몬은 음경해면체평활근 이완의 주 매개체로 알려진 NO 발현을 조절하여 음경발기에 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

REFERENCES

- 1) Rogers CH, Alheid G. Relationship of sexual behavior and castration to tumescence in the male rat. *Physiol Behav* 1972; 9: 581-4.
- 2) Davidson JM. Hormone and sexual behavior in the male. *Hosp Pract* 1975; 10: 26-9.
- 3) Lin SN, Yu PC, Huang JK, Yang MCM, Chang LS, Chai CY, et al. Castration may not affect the penile erection ability in terms of peripheral neurocavernous mechanism in dogs. *J Urol* 1990; 143: 172-4.
- 4) Heaton JP, Varrin SJ. Effects of castration and exogenous testosterone supplementation in an animal model of penile erection. *J Urol* 1994; 151: 797-800.
- 5) Davidson JM, Stefanick ML, Sachs BD, Smith ER. Role of androgen in sexual reflexes of the male rat. *Physiol Behav* 1978; 21: 141-6.
- 6) Melvin JE, McNeil TH, Hamil RW. Biochemical and morphological effects of castration on the postorganozational development of the hypogastric ganglion. *Dev Brain Res* 1988; 38: 131-9.
- 7) Collins WF, Seymour AW, Klugewicz SW. Differential effect of castration on the somal size of pudendal motoneurons in the adult male rat. *Brain Res* 1992; 577: 326-30.

- 8) Holmquist F, Persson K, Bodker A, Andersson KE. Some pre- and postjunctional effects of castration in rabbit isolated corpus cavernosum and urethra. *J Urol* 1994; 152: 1011-6.
- 9) Matsumoto A, Arai Y, Prins GS. Androgenic regulation of androgen receptor immunoreactivity in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus of male rats. *J Neuroendocrinol* 1996; 8: 553-9.
- 10) Lugg JA, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Dihydrotestosterone is the active androgen in the maintenance of nitric oxide-mediated penile erection in the rat. *Endocrinology* 1995; 136: 1495-501.
- 11) Muller SC, Hsieh JT, Lue TF, Tanagho EA. Castration and erection. an animal study. *Eur Urol* 1988; 15: 118-24.
- 12) Mills TM, Wiedmeier VT, Stopper VS. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod* 1992; 46: 342-8.
- 13) Mills TM, Stopper VS, Wiedmeier VT. Effects of castration and androgen replacement on the hemodynamics of penile erection in the rat. *Biol Reprod* 1994; 51: 234-8.
- 14) 김종기, 최영득, 정우식, 최형기. 토끼에서 남성호르몬의 결핍이 음경해면체 평활근 이완에 미치는 영향. *대한비뇨학회지* 1997; 38: 1033-8.
- 15) 최영득, 정우식. 거세된 토끼에서 남성호르몬투여가 음경의 nitric oxide synthase에 미치는 영향. *대한비뇨학회지* 1999; 40: 106-12.
- 16) Hsueh AJ, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm. Res* 1996; 51: 433-55.
- 17) Colombel MC, Buttyan R. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. *Methods Cell Biol* 1995; 46: 369-85.
- 18) Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Rittmaster RS. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J Clin Invest* 1996; 98: 2558-63.
- 19) Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 1992; 326: 90-4.
- 20) Lugg JA, Gonzalez-Cadavid NF, Rajfer J. The role of nitric oxide in erectile function. *Am Soc Androl* 1995; 16: 2-4.
- 21) Zavara P, Sioufi R, Schipper HM, Begin LR, Brock GB. Nitric oxide mediated erectile activity is a testosterone dependent event: a rat erection model. *Int J Impot Res* 1996; 7: 209-19.
- 22) 정희창, 문기학, 박동춘, 이연창, 박종민, 허근, 등. Role of nitric oxide in penile erection. *Yonsei Medical J* 1997; 38: 261-9.
- 23) Reilly CM, Zamorano P, Stopper VS, Mills TM. Androgenic regulation of NO availability in rat penile erection. *J Androl* 1997; 18: 110-5.
- 24) Shabsigh R. The effects of testosterone on the cavernous tissue and erectile function. *World J Urol* 1997; 15: 21-6.
- 25) Garban H, Marquez D, Cai L, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Restoration of normal adult penile erectile response in aged rats by long-term treatment with androgens. *Biol Reprod* 1995; 53: 1365-72.
- 26) Klein L, Miller M, Buttyan R, Raffo AJ, Buchard M, Devris G, et al. Apoptosis in the rat penis after penile denervation. *J Urol* 1997; 158: 626-30.
- 27) 김수용, 김기동, 백재승. 발기부전에 대한 denervation의 영향: 백서음경해면체 평활근세포의 apoptosis와 관련된 발기능의 저하. *대한남성과학회지* 1998; 16: 35-40.
- 28) 최성, 류현열, 윤종병, 연수경. 성숙백서에서 테스토스테론이 음경 및 부성기에 미치는 영향. *대한비뇨학회지* 1997; 38: 783-92.
- 29) Kaya T, Sarioglu Y, Gasu OC, Yildirim S, Yildirim K. Effect of additional testosterone on purinergic responses in isolated rabbit corpus cavernosum strips. *Pharmacol Res* 1998; 37: 227-32.
- 30) Phillippe M, Saunders T, Bangalore S. A mechanism for testosterone modulation of alpha-1 adrenergic receptor expression in the DDT1 MF-2 smooth muscle myocyte. *Mol Cell Biochem* 1991; 100: 79-90.
- 31) Baba K. Effects of testosterone on smooth muscle in the isolated rabbit corpus cavernosum penis. *Jpn J Urol* 1993; 84: 1783-90.