

## 수컷 흰쥐에서 심근경색이 번식기능에 미치는 영향

태현진<sup>1</sup>, 문진희<sup>1</sup>, 유일정<sup>1</sup>, 박진호<sup>1</sup>, 이영훈<sup>2</sup>,  
안동춘<sup>3</sup>, 강형섭, 박영재<sup>1</sup>, 양홍현<sup>1</sup>, 김인식

헬스케어 사업단, <sup>1</sup>전북대학교 수의과대학 생체안전성연구소

<sup>2</sup>전북대학교 치과대학, <sup>3</sup>강원대학교 수의학과

**간추림** : 수컷 흰쥐에서 실험적 심근경색에 따른 번식기능의 변화를 규명하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 60일령의 수컷 흰쥐를 왼쪽관상동맥을 결찰하여 심근경색 모델을 만들었고 개흉하여 sham 대조군을 삼았다. 실험군은 심근경색 유발 후 1, 3, 5, 7, 14 및 30일에 희생시켰고 대조군은 개흉 후 30일에 희생시켰다.

심근경색의 크기는 planimetry 및 perimetry 법을 적용하여 측정하였다. 흰쥐의 고환은 2.5% glutaraldehyde를 이용하여 전신관류 고정하고 조직 처리과정을 거쳐 epon-araldite에 포매하였다. 초박절편기를 사용하여 1 μm로 절편한 다음 methylene blue로 염색하여 일반적인 조직의 변화상과 형태계측을 하였다. 고환을 배양한 후 황체형성호르몬 자극에 대한 고환내 테스토스테론 생성과 혈청내 테스토스테론 농도는 방사면역측정법을 적용하여 측정하였으며, 일반적인 방법에 따라서 정자생성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

관상동맥을 결찰한 실험군에서 평균 심근경색의 크기는 왼쪽심실의 29.5~33.5%이었다. 심근경색을 유발시킨 모든 실험군에서 고환 용적, 간질세포의 절대용적, 간질세포의 크기 및 고환 조직 당 간질세포의 총 숫자는 대조군과 비교하여 차이가 관찰되지 않았다. 심근경색 실험동물에서 혈청내 테스토스테론 농도, 황체형성호르몬 자극에 대한 고환내 테스토스테론 농도 및 1일 정자생성이 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다.

본 연구의 결과는 수컷 흰쥐에서 실험적 만성 심근경색은 번식기능에 해로운 영향이 없음을 알 수 있었다.

**찾아보기 낱말** : 심근경색, 수컷흰쥐, 번식기능

## 서론

심근경색(myocardial infarction)과 관련된 생체내 구조와 기능의 변화에 관한 상세한 정보를 얻기 위하여 여러 가지 다양한 실험동물에서 관상동맥(coronary artery)을 결찰 한 후에 심근경색을 유발시키는 심근경색 실험동물 모델이 오랜 기간 동안 이용되어 오고 있다. 심근경색 후에 왼쪽심실 기능 이상의 정도는 심근경색 크기와 직접적인 연관이

있어서 유사한 크기의 경색을 유발 할 수 있는 동물이 요구되는데 흰쥐에서 왼쪽내림관상동맥(left descending coronary artery)을 결찰하여 심근경색을 유발하는 방법이 최근까지도 가장 흔하게 적용되고 있다(Pfeffer 등 1991, Hearse와 Sutherland 2000, Muders와 Elsner 2000).

사람에서 심근경색과 성호르몬 사이의 연관성에 관하여 많은 연구자들에 의해서 폭 넓게 연구가 진행되어 오고 있으나 심근경색에서 특히, 남성호르몬의 역할에 관하여 여전히 많은 논란이 되고 있다(Cauley 등 1987, Eldrup 등 1987, Glueck 등 1993, Adams 등 1995, Alexandersen 등 1996). 테스토스테론은 고환내 간질세포에서 콜레스테롤로부터 합성

\*본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2005-000-10369-0) 지원으로 수행되었음.

교신저자: 김인식(전북대학교 수의과대학 해부학교실)

전자우편: iskim@chonbuk.ac.kr

이 되고 혈청내 테스토스테론 농도는 성 성숙이 이루어지는 시기부터 어느 정도 일정하게 유지되다가 노화가 진행됨에 따라서 조금씩 감소되는 것으로 알려져 있다 (Saez 1994). 테스토스테론은 신경호르몬 요소를 통한 간접적인 기전 뿐 아니라 심장, 신장 및 혈관에 직접적인 영향을 미치는 기전에 의하여 혈압에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Dubey 등 2002). 심근경색과 테스토스테론과의 상관관계에 관한 지금까지의 연구 보고를 살펴보면 심근경색이 있는 남자에서 혈청 테스토스테론 농도가 큰 폭으로 낮게 관찰된 (Li 등 1998, English 등 2002) 반면에, 또 다른 보고에 의하면 심근경색과 테스토스테론 사이에 연관성이 없음을 보고하여 (Luria 등 1982, Cauley 등 1987, Hautanen 등 1994, Alexandersen 등 1996), 심근경색의 위험요인으로서의 테스토스테론의 영향 역시 여전히 논란이 되고 있다.

고환에서 호르몬 조절에 있어서 중요한 역할을 수행하고 있는 구조는 혈관-고환장벽 (blood-testis barrier)인데 심근경색의 경우에 혈관-고환장벽의 기능 이상을 초래하고 이로 인하여 이차적으로 고환 기능 장애를 초래하여 결국은 발기부전을 나타낼 수 있는 것으로 보고되어 있다 (Mizushima 등 1999). 이와 같이 심근경색과 관련하여 최근에 고환조직에서 혈관-고환장벽과 테스토스테론을 분비하는 세포인 간질세포의 변화가 중요하게 여겨지고 있으나 심근경색과 고환을 이루고 있는 각종 세포의 기능과의 상관관계에 대하여는 명확하게 알려져 있지 않다.

한편, 고환 (testis)은 다양한 세포의 종류들로 구성된 수컷 생식기관으로서 주로 정자형성을 담당하는 곱슬정세관 (seminiferous tubules)과 내분비기능을 담당하는 간질세포를 포함한 간질조직 (interstitium)으로 이루어져 있고 (Russel 등 1995, Ariyaratne와 Mendis-Handagama 2000, Kim 등 2002), 간질조직은 간질세포 (Leydig cell), 중간엽세포 (mesenchymal cells), 근모양세포 (myoid cell), 림프공간 (lymphatic spaces), 혈관 (blood vessels), 혈관내피세포 (vascular endothelial cell) 및 혈관주위세포 (pericytes)로 구성되어 있다 (Ewing과 Zirkin 1983, endis-Handagama 등 1987, 1988, Kim과 Yang 1999).

간질세포는 일반적으로 미분화된 중간엽세포에서 발생하는 것으로 알려져 있고 (Gondos 등 1980, Kerr 1988, Mendis-Handagama와 Ariyaratne 2001) 간질세포의 세포질내 미세구조에 존재하는 몇 가지 효소에 의하여 테스토스테론을 합성하여 분비하며 (Saez 1994, Payne과 Youngblood 1995), 이 호르몬은 정자발생의 조절, 부속생식기관 (accessory sex organs)의 유지 및 발기 기능 등을 포함한 수컷 생식계통에서 중요한 작용을 나타내고 있다 (Robert와 Delost 1978, Saez 1994).

이와 같이 심근경색과 수컷 생식기능과의 상호연관성에 관한 연구는 주로 사람에서 이루어져 있고 이러한 연구 대부분이 급성 심근경색시 테스토스테론 농도의 변화에 관한 결과에 국한되어 있어 이러한 연구의 문제는 수컷 생식기능의 전반적인 사항을 이해하는 데에는 적지 않은 어려움이 있는 것으로 사료된다. 또한 심근경색 실험동물 모델을 이용하여 수컷 생식기능과의 상호연관성에 관한 연구 보고는 접할 수 없다. 따라서 본 연구는 사람의 심근경색과 많은 부분에서 유사한 수컷 흰쥐 만성 심근경색 실험동물 모델을 이용하고 형태계측학적 방법, 방사면역측정법, 일반조직학적인 방법 등을 적용하여 일정한 시기별로 테스토스테론을 분비하는 세포인 간질세포의 용적치밀도 (volume density), 절대용적 (absolute volume), 평균용적 (average volume), 고환내 총숫자 (total number per testis) 등을 확인하고, 혈청 테스토스테론 농도, 고환내 testosterone 형성 능 및 1일 정자생성을 파악하여 심근경색이 수컷 생식기능에 미치는 영향을 구명하기 위하여 이 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

한일실험동물센터 (Hanil Animal Laboratory Co.)에서 60일령의 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley rats)를 구입하여 사료와 물을 자유급식 시키는 조건으로 사육하면서 실험에 사용하였다.

## 2. 심근경색 모델과 수술처치

구입한 실험동물은 왼쪽 관상동맥을 결찰 하여 심근경색을 인위적으로 유발하였다. 요약하면, 마취 20분전에 atropine (0.05 mg/kg)을 피하주사한 뒤 펜 토바비탈 (70 mg/kg, B.W)을 복강내 주사하여 마취 하였다. 마취된 흰쥐를 supine position으로 눕히고 삼판을 하고 인공호흡기 (rodent ventilator, model 683, Havard)를 연결하여 호흡을 유지시켰다. 왼쪽 넝쿨늑살사이를 개흉하여 심장을 노출시키고 심장막을 열고 심장의 왼쪽 심방귀, 심실, 동맥원뿔이 뚜렷이 관찰되도록 노출 시킨 다음 동맥원뿔과 왼쪽 심방귀 사이에 주행하는 원뿔결심실사이가지 (paracanal interventricular branch) 위치를 찾아 curved needle과 7~10 polypropylene을 이용하여 완전히 결찰하였다. 결찰부위 아래쪽 왼쪽심실 색이 변하는 것을 확인하여 적절한 결찰이 되었는지 확인하고 흉벽과 피부를 각 층별로 봉합하고 소독을 하여 일정한 시간이 지난 후에 (1, 3, 5, 7, 14 및 30일, n=13 마리/group) 실험동물을 희생시켜 실험에 사용하였다. 심근경색에 대한 Sham 대조군을 (n=13마리) 위해 개흉을 하여 심장을 노출 시키고 심장막을 열고 흉곽을 닫은 후 30일령에 희생시켜 대조군으로 삼았다.

## 3. 심근경색의 크기 측정

각 실험군의 동물 (n=8마리/group)에 8% chloral hydrate solution (4 mL/100 g BW)을 복강 주사하여 마취한 후 혈청내 테스토스테론 농도를 측정하기 위하여 후대정맥에서 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 -20°C에 보관하였다. 왼쪽고환은 시험관내 고환조직 배양을 하기 위하여 사용하였고 오른쪽 고환은 1일 정자생성을 측정하기 위하여 사용하였다.

심근경색의 크기를 측정하기 위하여 수술 후 1일 및 3일에는 심장을 Evans blue-triphenyltetrazolium chloride로 염색하여 planimetry 법을 적용하여 심근경색의 크기를 측정하였다. 수술 후 5일부터 30일령까지는 심장을 10% neutral buffered formalin에 고정 한 후 파라핀에 포매하고 Rotary microtome (Shandon)을 사용하여 6 $\mu$ m 두께의 절편을 제작하여 H-E

염색을 실시하고 perimeter법을 적용하여 각각 실험군의 심근경색의 크기를 측정하였다 (Pfeffer 등 1991, Ahn 등 2003).

## 4. 고환조직표본제작

고환조직을 관류고정 (n=4마리/group)하기 위하여 대조군과 실험군을 8% chloral hydrate solution (4 mL/100 g BW)을 복강 주사하여 마취한 후 체중을 측정하고 혈액이 응고하는 것을 방지하기 위하여 heparin (Sigma, 100,000 Unit) 150 IU/kg를 복강내에 주입하였다. 10분 후에 복강을 절개하고 오른쪽 고환을 적출하여 chemical balance (Sartorius, Germany)를 이용하여 무게를 측정하고 sucrose를 사용하여 부양법 (flotation method)으로 비중 (specific gravity)을 측정하고 고정 전의 고환용적 (fresh testis volume)을 산출하였다 (고환용적=고환무게/고환비중). 이 후 왼쪽심실을 절개하여 cutdown tube를 오름 대동맥에 삽입하고 오른쪽 심방귀를 절개하여 방혈시킨 후 0.9% 생리식염수를 사용하여 전신의 혈관을 1~2분 동안 세척하였고 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4)로 대체하여 약 40분 동안 전신 관류고정 하였다. 고환의 고정 후 용적을 측정하기 위하여 고환을 적출한 후 무게를 측정하여 고정 후의 고환용적 (fixed testis volume)을 산출하였다. 조직표본 제작을 위하여 고환을 2~3 mm로 세절하여 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 12시간 동안 고정한 후 1% osmium tetroxide로 2시간 동안 고정하고 alcohol로 탈수하고 Epon-812로 포매하여 각 개체 당 블록 20개씩을 제작하였다.

## 5. 광학현미경관찰

초박절편기 (ultramicrotome, Leica ultracut-s, Austria)를 이용하여 1 $\mu$ m로 절편을 제작하고 1% methylene blue-azure II로 염색, canada balsam으로 봉입하여 고환 간질조직을 구성하고 있는 간질세포, 중간엽세포, 림프공간, 혈관, 혈관주위세포, 혈관내피세포 및 근모양세포를 광학현미경 (Leica, DMRBE, Germany)에서 관찰하였다.

## 6. 형태계측

### 1) 고환조직 구성물의 용적치밀도

Point Counting 법을 적용 (Mendis-Handagama와 Ewing 1990, Kim 등 2002), 121 point ocular grid를 장착한 광학현미경을 이용하여 point와 만나는 각 구조물 (곱슬정세관, 간질조직 및 간질세포)의 수를 네 모서리와 가운데, 즉 5부위를 측정하였으며 각 개체 당 최소 50부위에서 최대 100부위를 중복되지 않게 측정하였다. 이것을 전체 point (121×5)로 나누어 각 고환조직 구성물의 용적치밀도 (volume density: volume per unit,  $v: v\%$ )를 구하였다.

$Vv\%$  of a component = number of points on the component × 100 / total number of points on the testis tissue

### 2) 고환조직 구성물의 절대용적

이미 구해진 용적치밀도 (volume density)와 고환 용적 (fresh testis volume)을 이용해서 절대용적 (absolute volume)을 다음과 같은 공식에 의해서 구하였다 (Mendis-Handagama 등 1987, 1988, Mendis-Handagama와 Ewing 1990, Kim 등 2002).

Absolute volume of testicular component = volume density of the component × fresh testis volume

여기서 고환의 용적은 고환의 무게와 비중으로부터 구하였다.

### 3) 고환 단위용적 당 간질세포의 수

Floderus (Mendis-Handagama 등 1987, 1988, Kim 등 2002) 방정식 ( $Nv = Na / (T + D - 2h) \times (1 - S_T)$ )을 적용하여 numerical density ( $Nv$ , defined as the number of cells per unit volume of testis)를 계산하였다. 이 공식에서  $Na$ 는 단위면적 당 각 세포핵의 숫자 (단위면적 =  $48520.8 \mu m^2$ ),  $D$ 는 평균 핵 직경,  $T$ 는 평균 절편 두께,  $S_T$  (total shrinkage = histologic correction factor)는 총 고환조직의 고정 전, 고정 후, 표본제작 후의 총 수축량,  $h$ 는 가장 작다고 생각되는 핵의 높이이며 이는 보통 평균 핵 직경의 10% 정도이다 (Mori와 Christensen 1980). 단위면적 당 간질세포핵의 숫자와 핵의 크기는 조직 표본에서 5부위를 중

복되지 않도록 선택하여 영상분석기 (image analyzer system, Leica Q500MC, Germany)를 이용하여 측정하였다. 고환 당 간질세포의 총 숫자 (total number)는 단위 용적 당 간질세포의 수에 각 고환의 용적을 곱하여 구하였다 (total number = numerical density × fresh testis volume) (Mendis-Handagama 등 1987, 1988, Mendis-Handagama와 Ewing 1990, Kim 등 2002).

### 4) 간질세포의 평균 용적

간질세포의 평균용적 (average volume)은 간질세포의 용적치밀도를 단위용적 당 세포의 수 (numerical density)로 나누어 구하였다 (Mendis-Handagama 등 1987, 1988, Mendis-Handagama와 Ewing 1990, Kim 등 2002).

Average cell volume = volume density / numerical density of each cell type

## 7. 시험관내 고환 조직 배양

신속하게 왼쪽 고환을 적출하여 무게를 측정하고 피막 (capsule)을 제거한 후 무게를 측정하고 2 mL medium (Krebs-Ringer bicarbonate solution, pH 7.4)에 황체형성호르몬 자극에 대한 고환내 테스토스테론 생성을 알아보기 위하여 황체형성호르몬 (oLH-26, NIH, Bethesda, MD, U.S.A) 100 ng/mL을 첨가하고 산소탱크를 이용하여 10분 동안 처리한 후 0.004 g/mL의 glucose를 첨가하고 20 mL scintillation vials에 담아 34°C shaking water bath (90 shaking/minute)에서 3시간 동안 배양하고 원심 분리한 후 상층액만을 채취하여 -70°C에 보관하였다.

## 8. 방사면역활성측정

혈청 및 배양액내 테스토스테론 농도는 RIA kit (Coat-A-Count; DPC, Los Angeles, CA)를 구입하여 측정하였다. 사용한 kit 항체의 dehydrotestosterone과 androstenedione에 대한 cross-reactivity는 각각 2.8%와 0.5%이었고 기타 스테로이드 호르몬은 0.02%이었다.

## 9. 고환조직 당 1일 정자생성

Cooke 등(1991)의 방법을 적용하여 대조군 및 실험군에서 일일정자생성을 측정하기 위하여 오른쪽 고환을 적출하고 무게를 측정한 후 백막(tunica albuginea)을 제거하고 0.05% (vol/vol) Triton X-10과 0.25% M thimerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)이 혼합된 50 mL 생리식염수에서 semi-micro Waring Blender를 이용하여 2분간 균질화시켰다. 정자생성은 이 용액 0.2 mL를 4% trypan blue가 혼합된 0.8 mL 생리식염수에 희석하여 측정하였다. 정소조직 당 평균정자 생성을 측정하기 위하여 이 용액 10  $\mu$ L를 혈구계(hemocytometer)로 광학현미경하에서 평균 5회 측정하였다. 이러한 방법으로 얻어진 수치는 고환조직 당 총 정자 수를 얻기 위하여 적용하였다. Sprague-Dawley rat에서 균질화할 때 생존하는 step 17~19 정자세포(stage IV~VIII)는 정자형성기간 동안 평균 6.3일 정도 생존하는 것으로 알려져 있어(Cooke 등 1994), 1일 정자생성을 측정하기 위하여 고환조직 당 총 정자수를 6.3으로 나누어 구하였다.

## 10. 통계처리

본 실험에서 얻어진 자료는 mean  $\pm$  SEM으로 표시하였고 유의성 검정은 Student's t-test로 처리하였다.

## 결 과

### 1. 심근경색의 크기

왼쪽내림관상동맥 결찰 후 1일(Fig. 1)과 5일(Fig. 2)에 Evans blue-TTC 염색한 결과 심근경색이 일어난 부위(화살표)와 정상적인 심근의 부위(화살표머리)가 명확하게 구분이 되어 관찰되었다. 관상동맥 결찰 후 1일에 왼쪽심실의 30.2  $\pm$  1.4%가 경색이 유발되었고 3, 5, 7, 14 및 30일 후에 각각 29.5  $\pm$  2.1, 33.5  $\pm$  1.9, 32.3  $\pm$  2.4, 32.1  $\pm$  2.9% 및 31.8  $\pm$  2.2%로 시간 경과에 따른 심근경색 크기의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

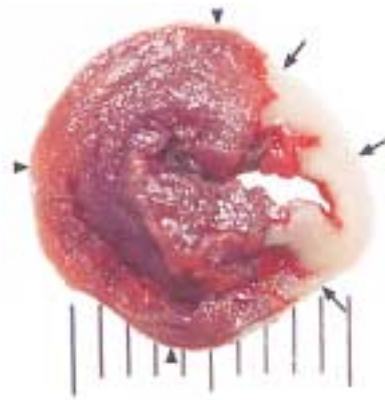


Fig. 1. Size of myocardial infarction at 1 day after ligation of left anterior descending coronary artery. Arrows=infarction area; Arrow heads=non-infarction area. Evans blue-TTC stain.

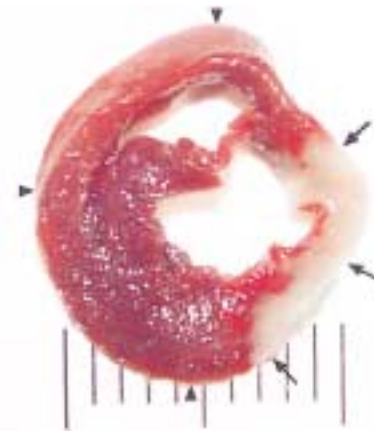
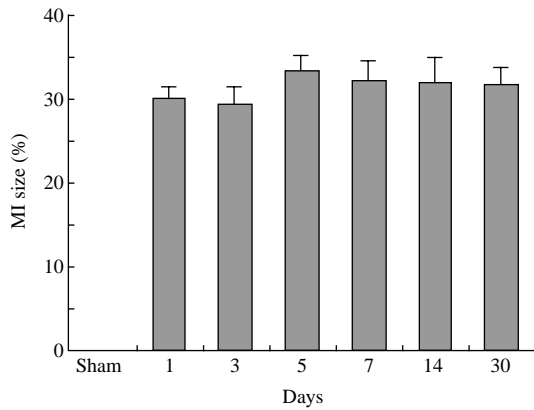


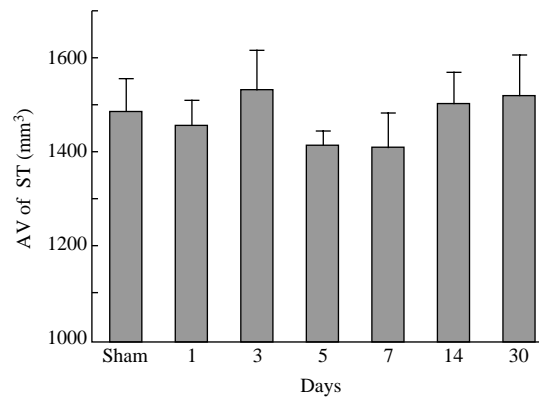
Fig. 2. Size of myocardial infarction at 5 day after ligation of left anterior descending coronary artery. Arrows=infarction area; Arrow heads=non-infarction area. Evans blue-TTC stain.

### 2. 고환용적

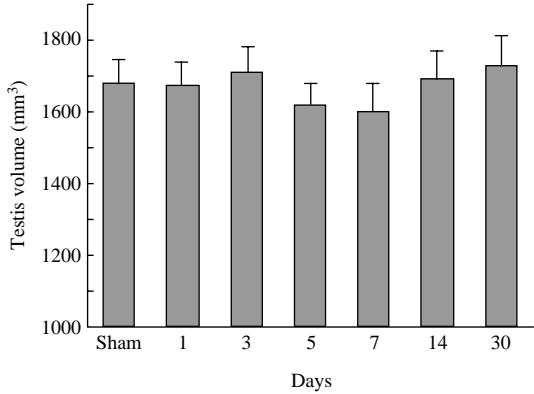
심근경색을 유도한 흰쥐에서 7일 후에 고환용적은 1,607  $\pm$  78로 가장 낮았고 30일 후에 1,736  $\pm$  81로 가장 높게 관찰되었으나 대조군에서 고환용적은 1,682  $\pm$  72 mm<sup>3</sup>으로 전 실험군에서 대조군과 비교하면 차이가 없었다(Fig. 4).



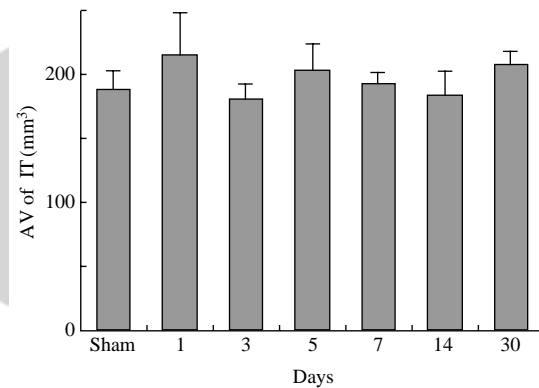
**Fig. 3.** Mean myocardial infarct size (%) in rats at various time intervals postinfarction. Values are means  $\pm$  SEM.



**Fig. 5.** Absolute volume of seminiferous tubule ( $\text{mm}^3$ ) at 30 day after sham ligation and at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery (mean  $\pm$  SEM).



**Fig. 4.** Testis volume ( $\text{mm}^3$ ) at 30 day after sham ligation and at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery (mean  $\pm$  SEM).



**Fig. 6.** Absolute volume of interstitium ( $\text{mm}^3$ ) at 30 day after sham ligation and at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery (mean  $\pm$  SEM).

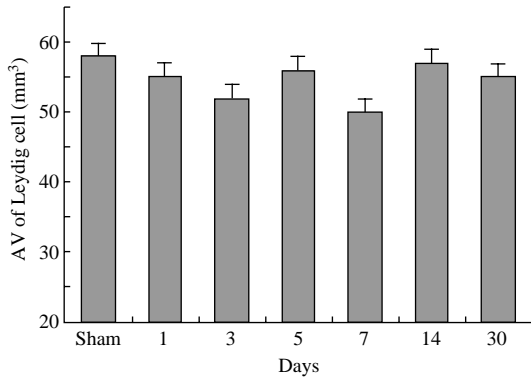
### 3. 곱슬정세관, 간질조직 및 간질세포의 절대용적

곱슬정세관, 간질조직 및 간질세포의 용적치밀도에 고회용적을 곱하여 얻어진 각각의 구성물에 대한 절대용적은 Figs. 5~7과 같다. 대조군에서 곱슬정세관과 간질조직의 절대용적은 각각  $1,493 \text{ mm}^3$ ,  $189 \text{ mm}^3$ 으로 관찰되었다. 심근경색 흰쥐에서 곱슬정세관의 절대용적은  $1,414 \sim 1,537 \text{ mm}^3$ 이었고 간질조직의 절대용적은  $181 \sim 215 \text{ mm}^3$ 으로 관찰되어 대조군과 비교하여 전 실험군에서 유의성 있는 변화

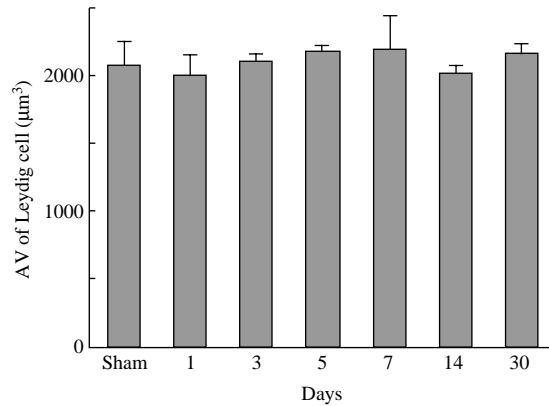
는 없었다. 또한 간질세포의 용적 치밀도를 대조군과 실험군을 비교하여 본 결과 차이가 없었다.

### 4. 고회조직 당 간질세포의 총 숫자 및 간질세포의 평균용적

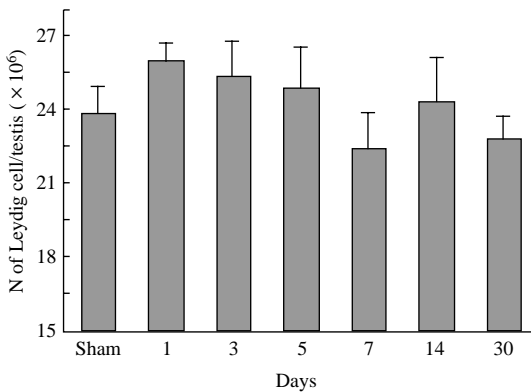
고환 단위용적 당 세포 수에 고회용적을 곱하여 얻어진 고회조직 당 간질세포의 총 숫자는 대조군



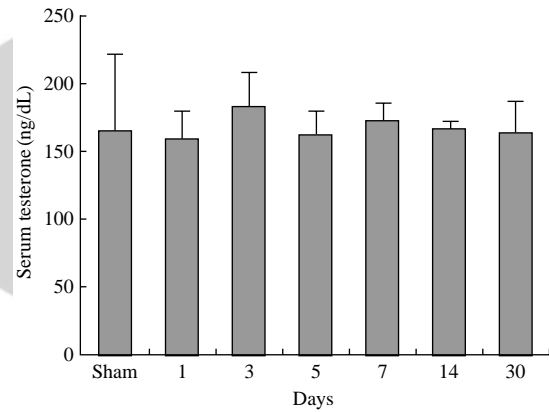
**Fig. 7.** Absolute volume of Leydig cell (mm<sup>3</sup>) at 30 day after sham ligation and at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery (mean  $\pm$  SEM).



**Fig. 9.** Average volume (μm<sup>3</sup>) of a Leydig cell at 30 day after sham ligation and at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery (mean  $\pm$  SEM).



**Fig. 8.** The number of Leydig cell per testis ( $\times 10^6$ ) at 30 day after sham ligation and at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery (mean  $\pm$  SEM).

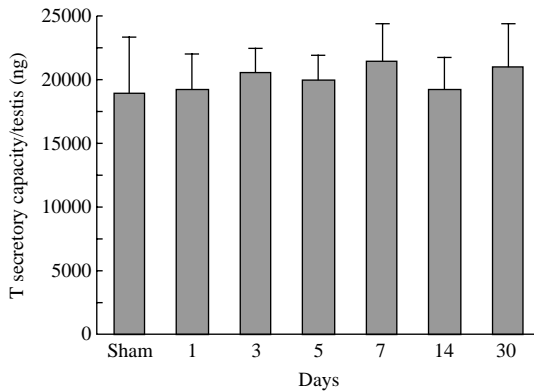


**Fig. 10.** Mean serum testosterone (ng/dL) at 30 day after sham ligation and at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery (mean  $\pm$  SEM).

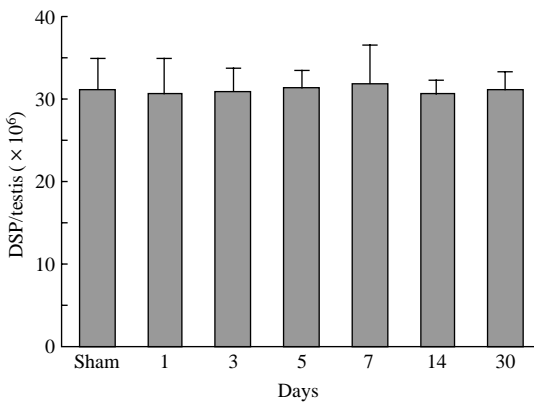
에서  $23.8 \times 10^6$ 이었으며 심근경색 실험군에서는  $22.4 \sim 25.9 \times 10^6$ 으로 대조군과 차이가 없었다 (Fig. 8). 간질세포의 평균용적은 대조군에서  $2,078 \mu\text{m}^3$ 이었고 심근경색 후 1일에 가장 작았고 7일 후에 가장 크게 관찰되었으나 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 9).

##### 5. 혈청내 테스토스테론 농도와 황체형성 호르몬 자극에 대한 고환내 테스토스테론 생성

혈청내 테스토스테론 농도는 대조군에서 165.8 ng/dL이었으며, 심근경색 실험군에서 158.7~183 ng/dL으로 관찰되었고 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 10). 황체형성호르몬 자극에 대한 고환조직 당 테스토스테론 생성은 대조군에서 18,898



**Fig. 11.** Testosterone secretory capacity per testis (ng) at 30 day after sham ligation and at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery (mean±SEM).



**Fig. 12.** Daily sperm production per testis ( $\times 10^6$ ) at 30 day after sham ligation and at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery (mean±SEM).

ng/testis이었으며, 심근경색 모든 실험군에서 대조군 보다는 조금씩 수치가 높게 관찰 되었으나 유의성 있는 차이는 없었다(Fig. 11).

### 6. 고환조직 당 1일 정자생성

대조군에서 고환조직 당 1일 정자생성은  $31.2 \times 10^6$ 이었고 왼쪽관상동맥을 결찰하여 심근경색을 유

발시킨 후 일정한 기간 경과 후에 각각의 실험군에서 고환조직 당 1일 정자생성은  $30.6 \sim 31.8 \times 10^6$ 으로 대조군과 모든 실험군에서 결과를 비교하여 볼 때 유의성 있는 결과는 보이지 않았다(Fig. 12)

## 고찰

흰쥐 심근경색 모델은 품종에 따라서 심근경색 유발 확률, 사망률 및 심근경색의 크기가 다양한 것으로 보고되어 있고 (Hearse와 Sutherland 2000, Mudras와 Elsner 2000), 심근경색을 유도한 후 왼쪽 심실의 경색이 30%보다 작은 경우를 작은 심근경색, 30~40%를 중등도 및 40% 이상인 경우를 큰 심근경색으로 분류하였고, 주로 중간 크기의 심근경색이 실험에 사용되고 20% 이하인 경우에는 혈동력 학적인 변화와 펌프기능에 변화가 있더라도 심근비 대는 없다(Pfeffer 등 1991). 본 연구에서도 심근경색을 유도하고자 수술을 시행할 때 동일한 부위의 왼쪽관상동맥을 결찰하여 희생시켜 심근경색의 크기를 측정된 결과 여러 가지 다양한 크기의 변화를 보여주었다. 따라서 심근경색의 크기를 측정하고 30~35% 정도 크기만을 실험군으로 택하여 실험군 당 숫자가 12마리가 되도록 배정하여 실험을 진행 하였다.

테스토스테론은 고환의 간질세포에서 주로 생성 되어 정자발생의 조절, 부속생식기관 (accessory sex organs)의 유지 및 발기 기능 등을 포함한 수컷생식 계통에서 중요한 역할을 담당하고 있으며 (Chen 등 1994, Zirkin과 Chen 2000), 수컷에서 테스토스테론은 다른 계통 즉, 뇌 (성욕과 감정), 피부 (털 성장과 피지 샘의 활성화), 근육 (근력과 근부피증가), 간 (혈청 단백질 합성), 관절 (면역반응 조절), 뼈 (강도와 부피 유지), 골수 (stem cell 자극) 및 신장 (erythropoietin 분비 자극)에서 적절한 기능을 유지함에 있어서 필요 하기 때문에 수컷에서 정상적인 테스토스테론 농도의 유지는 대단히 중요하다 (Johnson 1986, Gooren 1996, Chen과 Zirkin 1999, Kim 등 2002). 사람에서 관상동맥 질환으로부터 유인된 심근경색시 혈청 테스토스테론 농도는 큰 폭으로 감소하였다는 보고가

(Li 등 1998, English 등 2002, ) 있는가 하면, 이와는 달리 심근경색과 테스토스테론 농도의 변화는 중요한 연관성이 없다는 보고가(Luria 등 1982, Cauley 등 1987, Hautanen 등 1994, Alexandersen 등 1996 ) 있어 이에 관한 정확한 이해가 필요하다. 본 실험에서 심근경색 유발 후 일정한 시간 경과 후에 대조군과 실험군의 테스토스테론 농도를 측정하여 본 결과, 모든 실험군에서 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 따라서 심근경색 실험동물 모델에서 혈청 내 테스토스테론 농도는 변화가 없음을 확인하였고, 이러한 결과는 사람에서는 심근경색을 갖고 있는 환자를 대상으로 1회에 한하여 채혈하여 결과를 도출 하였으나 본 연구에서는 심근경색을 유발시키고 1, 3, 5, 7, 14 및 30일 후에 폭 넓게 결과를 산출하여 본 연구의 보고가 심근경색과 테스토스테론 농도의 상호연관성에 관한 정보를 이해하는데 있어서 좀 더 많은 도움을 줄 것으로 사료된다.

고환내 1일 정자생성 및 각종 형태계측은 심근경색 유발 후 30일령에 희생시켜 측정하였다. 고환내 정자생성 측정과 관련하여, 흰쥐에서 곱슬정세관의 주기는 13단계로 나누어져 있고 정자형성 기간은 50일 정도로 알려져 있다(Clermont 1972). 본 논문에서 고환내 1일 정자생성을 측정하기 위하여, 고환을 균질화 할때 생존하는 step 17~19 정자세포(stage IV~VIII)의 수를 측정하여 고환 당 총 정자수를 측정한 다음, 흰쥐에서 발생중인 정자세포는 정자형성기간동안 step 17~19에서 6.3일이 소요되기 때문에 총 정자수를 6.3으로 나누어 고환내 1일 정자생성을 측정하였다. 정자형성 과정에서 모든 정자발생 세포가 동시에 정자형성이 이루어지지 않기 때문에 정자생성을 측정하는 데에 있어서 그 시기는 별로 중요한 요소가 아닌 것으로 사료되며, 정자생성을 측정하는 대부분의 다른 보고에서도 처리 후 짧게는 30일부터 길게는 90일 정도까지 측정하였다(Cooke 등 1994, Ashby 등 2003).

고환은 주로 정자형성이 이루어지는 곱슬정세관과 내분비기능을 담당하는 간질세포를 포함하고 있는 간질조직으로 이루어져 있다(Christensen 1975, Russel 등 1995, Ariyaratne와 Mendis-Handagama

2000, Kim 등 2002). 심근경색 실험동물 모델에서 고환의 형태학적인 변화에 관한 연구 보고를 접할 수 없어서 본 연구결과와 비교할 수는 없으나 본 실험에서 심근경색 유발 후 고환 용적, 곱슬정세관과 간질조직의 절대용적, 간질세포의 절대용적 및 1일 정자생성을 살펴본 결과 모든 실험군에서 대조군과 차이를 보이지 않았다. 그러므로 이러한 결과는 심근경색이 고환의 일반적인 형태변화에 미치는 영향이 없음을 알 수 있었다.

황체형성호르몬(luteinizing hormone)이 간질세포의 구조와 기능을 조절하여 일반적으로 간질세포의 크기와 형태는 황체형성호르몬에 의존적으로 변화하고 황체형성호르몬 자극에 대하여 각기 다른 반응정도를 나타내는 것은 테스토스테론 분비 양상에 중요한 역할을 담당하고 있다(Mendis-Handagama 등 1998). 이 연구에서 심근경색 흰쥐에서 황체형성호르몬 자극에 대한 고환 내 테스토스테론 분비 양상이 변화가 있는 지를 알아보기 위하여 시험관 내에서 황체형성호르몬 100 ng/mL을 첨가하고 고환조직을 배양한 결과 실험군과 대조군에서 고환내 테스토스테론 생성은 차이를 보이지 않았다. 따라서 이러한 결과는 심근경색 실험동물 모델에서 황체형성호르몬 자극에 대한 고환의 반응정도의 차이에 영향이 없음을 알 수 있었고 이와 관련하여 혈청내 테스토스테론 농도 변화가 없는 것은 이 연구에서 얻어진 매우 가치 있는 결과로 생각 된다.

고환에서 테스토스테론을 합성하여 분비하는 능력은 간질세포의 숫자보다는 크기와 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Mendis-Handagama와 Sharma 1994). 이러한 사실은 생쥐에서 실험적으로 잠복고환을 일으킨 후 고환 간질세포의 변화에 관한 연구(Mendis-Handagama 등 1990) 및 흰쥐에서 만성 황체형성호르몬 자극에 대한 간질세포의 반응정도에 관한 연구(Riegler과 Meites 1976, Mendis-Handagama 등 1988)에서 입증되었다. 수컷 생식기계통에서 테스토스테론의 농도가 감소하게 되면 이로 인해 골다공증, 근력의 감소, 체지방의 증가, 그리고 성기능의 감퇴를 초래하는 것으로 알려져 있다(Grooren 1996). 이 연구에서 형태계측학적인 방법을 적용하여 고환 조직 당 간질세포의 총 숫자와

간질세포의 크기를 관찰한 결과 대조군과 비교하여 모든 실험군에서 차이가 없었다. 이는 간질세포의 크기뿐만 아니라 숫자 또한 변화가 없기 때문에 본 실험에서 혈청내 테스토스테론 농도 변화가 관찰되지 않은 것은 특이한 결과가 아닌 것으로 확인할 수 있다. 이러한 관점에서 살펴 볼 때 사람의 심근경색에서 혈청내 테스토스테론 농도가 크게 감소된 연구보고는 실험방법의 한계가 있어서 고환의 간질세포의 크기 및 숫자에 관한 연구를 진행하지는 못하였지만 본 실험결과와 연계하여 유추하여 보면 사람에서 간질세포의 크기와 숫자는 변화가 없을 것으로 생각된다.

관상동맥 질환에서 테스토스테론을 처치하면 증상이 완화되는 경향이(Alexandersen 등 1996, Rosano 등 1999, Webb 등 1999, Palusinski 등 2002) 있는 반면에, 다른 연구에서는 테스토스테론을 처치한 원숭이에서 대조군에 비하여 관상동맥경화증이 광범위하게 관찰되었고 기니픽에서는 테스토스테론을 처치한 군에서 관상동맥수축력이 큰 폭으로 증가되어 테스토스테론이 관상동맥에 해로운 영향이 있음을 보고하였다(Schorr 등 1994). 이러한 상이한 결과로 인하여 관상동맥 질환이 있는 사람에서 여전히 치료의 목적으로 테스토스테론을 사용하지 못하고 있는 실정이다. 이와 관련하여 추후에 실험동물을 사용하여 관상동맥 질환을 인위적으로 유발한 다음 테스토스테론을 처리하고 본 연구에서 적용한 실험방법에 따라서 실험을 진행하여 결과를 얻게 되면 테스토스테론이 관상동맥질환에 미치는 영향에 관하여 더욱 더 정확하게 이해 할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구를 요약하여 보면, 흰쥐 심근경색 모델에서 고환의 일반적인 형태학적인 변화 및 1일 정자생성의 변화가 없었고, 테스토스테론을 분비하는 간질세포의 숫자, 크기와 황체형성호르몬에 대한 반응 정도에 차이가 없으므로 인하여 혈청내 테스토스테론 농도의 변화가 없었다. 이러한 결과는 수컷 흰쥐에서 심근경색이 번식기능에 해로운 영향이 없음을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Adams MR, Williams JK, Kaplan JR : Effect of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis related impairment of vascular responsiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 562-570, 1995.
- Ahn DC, Cheng L, Moon C, Spurgeon H, Lakatta EG, Talan MI : Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice. *Am J Physiol* 286: 1201-1207, 2003.
- Alexandersen P, Haarbo J, Christiansen C : The relationship of natural androgens to coronary artery disease in male: A review. *Atherosclerosis* 125: 1-13, 1996.
- Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC : Changes in the testis interstitium Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod* 62: 680-690, 2000.
- Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Joiner R, Haseman J : The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed bisphenol. *Toxicol Sci* 74: 129-138, 2003.
- Cauley JA, Cutai JP, Kuller LH : Usefulness of sex steroid hormone levels in predicting coronary artery disease in men. *Am J Cardiol* 60: 771-777, 1989.
- Chen HL, Hardy MP, Huhtaniemi I, Zirkin BR : Age-related decreased Leydig cell testosterone production in the brown norway rat. *J Androl* 15: 551-557, 1994.
- Chen HL, Zirkin BR : Long-term suppression of Leydig cell steroidogenesis prevents Leydig cell aging. *Proc Natl Acad Sci* 96: 14877-14881, 1999.
- Clermont Y : Kinetics of spermatogenesis in mammals : Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52: 198-236, 1972
- Cooke PS, Hess RA, Porcelli J, Weisami E : Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology* 129: 244-248, 1991.
- Cooke, PS, Porcelli J, Hess RA : Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogm treatment. *Biol Reprod* 51: 1000-1005, 1994.
- Eldrup E, Lindholm J, Winkel P : Plasma sex hormones and ischemic heart disease. *Clin Biochem* 20: 105-112, 1987.

- English KM, Mandour O, Steeds RP : Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms. *Eur Heart J* 21: 890-894, 2000.
- Ewing LL, Zirkin BR : Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog Horm Res* 39: 599-632, 1983.
- Glueck CJ, Glueck HI, Steeds RP : Endogenous testosterone, fibrinolysis, and coronary heart disease risk in hyperlipidemic men. *J Lab Clin Med* 122: 412-420, 1993.
- Gondos B, Morrison KP, Renston RH : Leydig cell differentiation in the prepubertal rabbit testis. *Biol Reprod* 17: 745-748, 1980.
- Gooren LJG : The age related decline of androgen levels in men: clinically significant *Br J Urol* 78: 763-768, 1996.
- Hautanen A, Manttari M, Manninen V : Adrenal androgen and testosterone as coronary artery risk factor in the Helsinki heart study. *Atherosclerosis* 105: 191-200, 1994.
- Hearse DJ, Sutherland FJ : Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol Res* 41: 597-603, 2000.
- Johnson L : Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl* 7: 331-354, 1986.
- Kerr JB : A light microscopic and morphometric analysis of the Sertoli cell during the spermatogenic cycle of the rat. *Anat Embryol* 177: 341-348, 1988.
- Kim IS, Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC : Changes in the testis interstitium of Brown Norway rats with aging and effects of luteinizing and thyroid hormones on the aged testes in enhancing the steroidogenic potential. *Biol Reprod* 66: 1359-1366, 2002.
- Kim IS, Yang HH : Morphometric study of the testicular interstitium of the rat during postnatal development. *Korean J Anat* 32: 849-858, 1999.
- Li X, Zhao S, Li Y : Changes of plasma testosterone level in male patients with coronary heart disease. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 105: 191-200, 1998.
- Luria MH, Johnson MW, Pego R : Relationship between sex hormones, myocardial infarction, and occlusive coronary disease. *Arch Intern Med* 142: 42-44, 1982.
- Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne HBS : Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65: 660-671, 2001.
- Mendis-Handagama SMLC, Ewing LL : Sources of error in the estimation of Leydig cell numbers in control and atrophied mammalian testes. *J Microsc* 59: 73-82, 1990.
- Mendis-Handagama SMLC, Kerr JB, de Krester DM : Experimental cryptorchidism in the adult mouse. *J Androl* 11: 539-547, 1990.
- Mendis-Handagama SMLC, Risbridger GP, de Krester DM : Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl* 10: 525-534, 1987.
- Mendis-Handagama SMLC, Sharma OP : Effects of neonatal administration of the reversible goitrogen propylthiouracil on the testis interstitium in adult rats. *J Reprod Fert* 100: 85-92, 1994.
- Mendis-Handagama SMLC, Watkins PA, Gelber SJ : Effects of chronic luteinizing hormone treatment on Leydig cell structure and function in adult rats. *Tissue Cell* 30: 64-73, 1998.
- Mendis-Handagama SMLC, Zirkin BR, Ewing LL : Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion hamster, rat, and guinea pig testes perfused in vitro. *Am J Anat* 188: 12-22, 1988.
- Mizushima H, Banks WA, Dohi K, Shioda S, Matsumoto H, Matsumoto K : The effect of cardiac arrest on the permeability of the mouse blood-testis barrier to adenylate cyclase activating polypeptide. *Peptide* 20: 1337-1340, 1999.
- Mori H, Christensen AK : Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol* 84: 340-354, 1980.
- Muders F, Elsner D : Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res* 41: 606-612, 2000.
- Palusinski R, Barud W, Bilan A : Effect of dihydrotestosterone treatment on exercise induced ischemia in men with stable ischemic heart disease. *Pol Merkuriusz Luk* 9: 533-534, 2002.
- Payne AH, Youngblood GL : Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod* 52: 217-225, 1995.
- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E : Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Heart Circ Physiol* 29: 1406-1414, 1991.
- Riegle GD, Meites J : Effects of aging on LH and prolactin after LHRH, L-DOPA, methyl dopa and stress in the male rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 151: 507-511, 1976.
- Robert A, Delost P : Peripheral metabolism of testosterone during puberty in the male guinea-pig. *Reprod Fert* 53: 273-276, 1978.

- Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P : Acute antiischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation* 99: 1666-1670, 1999.
- Russell LD, Franca LR : Building a testis. *Tissue & Cell* 27: 129-147, 1995.
- Saez JM : Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine Rev* 15: 576-626. 1994.
- Schorr K, Morinelli TA, Masuda A : Testosterone treatment enhances thromboxane A2 minetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. *Eur J Clin Invest* 24: 20-52, 1994.
- Webb CM, McNeill JG, Hayward CS : Effect of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation* 100: 1690-1696, 1999.
- Zirkin BR, Chen HL : Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod* 63: 977-981, 2000.

K C I

**Abstract**

## **The Effect of Myocardial Infarction on the Reproductive Function in Adult Male Rats**

Hyun-Jin Tae<sup>1</sup>, Jin-Hee Moon<sup>1</sup>, Il-Jeong Yu<sup>1</sup>, Jin-Ho Park<sup>1</sup>,  
Young-Hoon Lee<sup>2</sup>, Dong-Choon Ahn<sup>3</sup>, Hyung-Sub Kang,  
Young-Jae Park<sup>1</sup>, Hong-Hyun Yang<sup>1</sup>, In-Shik Kim

*Center for Healthcare Technology Development*

<sup>1</sup>*College of Veterinary Medicine, Bio-Safety Research Institute*

<sup>2</sup>*School of Dentistry, Chonbuk National University*

<sup>3</sup>*Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University*

The present study was to investigate in more detail the changes of reproductive function in the male rat following myocardial infarction (MI). Ligation of the left coronary artery was performed in male Sprague-Dawley male rats at 60 days of age. Control rats were obtained sham-operated animals. MI rats were sacrificed at 1, 3, 5, 7, 14, and 30 day after ligation of left anterior descending coronary artery. Control rats were sacrificed on 30 day after thoracotomy. Myocardial infarct size was assessed by planimetry and perimeter. Testes of rats were fixed by whole body perfusion using a fixative containing 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, processed and embedded in Epon-araldite. Using 1  $\mu$ m sections stained with methylene blue-azure II, qualitative and quantitative (stereological) morphological studies were performed. Testosterone levels in the incubation medium of luteinizing hormone-stimulated (100 ng/mL) testosterone secretion per testis *in vitro*, and in serum were determined by radioimmunoassay. Sperm production was measured by routine technique. Mean infarct size was 29.5~33.5% of the left ventricle after coronary occlusion in experimental groups. No changes were observed in testis volume, absolute volume of Leydig cell, Leydig cell size, and number of Leydig cell per testis in MI rats compared to sham-operated animals. Serum testosterone, LH-stimulated testicular testosterone production, and daily sperm production in MI rats were not significantly different ( $P > 0.05$ ) from sham-operated animals. These results demonstrate that under the experimental conditions employed here, experimental chronic myocardial infarction does not exert adverse effects on the reproductive function of male rats.

**Key words** : Male rat, Myocardial infarction, Reproductive function