

# Cu/Zn Superoxide Dismutase 유전자 발현 운동신경세포 주에서 NO 독성에 대한 Testosterone의 보호효과

동국대학교 의과대학 일산병원 신경과학교실, 서울대학교 의과대학 신경과학교실\*

김남희\* · 김현정\* · 김만호\* · 박경석\* · 이광우\*

## Testosterone-mediated Neuroprotection in NO Induced Cell Death of Motor Neuron Cells Expressing Wild Type or Mutant Cu/Zn Superoxide Dismutase

Nam Hee Kim, M.D., Hyun Jung Kim, B.S.\*, Manho Kim, M.D.\*,  
Kyung Seok Park, M.D.\*, Kwang-Woo Lee, M.D.\*

*Department of Neurology, Dongguk University International Hospital  
Department of Neurology, College of Medicine, Seoul National University\**

**Background:** Testosterone is reported to have neuroprotective effect in various neurological diseases. Recently, the mechanism involved in nitric oxide (NO)-mediated motor neuron death is under extensive investigation. The Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) mutations has been implicated in selective motor neuron death of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and it is said to play an important role in NO-mediated motor neuron death. However, neuroprotective effect of testosterone on motor neuron exposed to NO has rarely been studied. **Methods:** Motor neuron-neuroblastoma hybrid cells expressing wild-type or mutant (G93A or A4V) SOD gene were treated with 200  $\mu$ M S-nitrosoglutathione. After 24 hr, cell viability was measured by MTT assay. To see the neuroprotective effect of testosterone, pretreatment with 1 nM testosterone was done 1 hr before S-nitrosoglutathione treatment. To study the mechanism of protective effect, 20  $\mu$ M flutamide (androgen receptor antagonist) was also pretreated with testosterone 1 hr before S-nitrosoglutathione treatment. **Results:** S-nitrosoglutathione showed significant neurotoxic effect in all three cell lines. Percentage of cell death was somewhat different in each cell line. 1 nM testosterone showed neuroprotective effect in G93A and wild-type cell line. In A4V cell line, testosterone did not showed neuroprotective effect. The neuroprotective effect of testosterone was reversed by 20  $\mu$ M flutamide. **Conclusions:** These results indicate that testosterone induces neuroprotection in NO-mediated motor neuron death directly through the androgen receptor. This neuroprotective effect of testosterone varies according to the types of SOD1 gene mutation. These data suggest that testosterone may be of therapeutic value against ALS.

**Key words:** Amyotrophic lateral sclerosis, Testosterone, Nitric Oxide, Neuroprotection, Cu/Zn superoxide dismutase, Cell viability

Address for correspondence

**Kwang-Woo Lee, MD, PhD.**

Department of Neurology, Seoul National University Hospital,

28, Yongon-Dong Chongno-gu, Seoul, 110-774, Korea.

Tel: +82-2-760-3215 Fax: +82-2-3672-7553

E-mail: kwoo@plaza.snu.ac.kr

\* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업(과제고유번호 A050443)과 서울대학교병원 일반연구비(21-20030130)의 지원에 의하여 이루어진 것임

## 서 론

대표적인 신경계 퇴행성 질환인 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)은 대뇌피질의 상부운동신경원과 뇌간 및 척수 하부운동신경원의 선택적인 퇴행을 특징으로 하는 질환이다.<sup>1</sup> 서서히 진행되는 사지의 위약 및 위축으로 시작하여 결국 호흡근 마비로 수

년 내에 사망하게 되는 치명적인 질환으로 그 병태생리학적 기전에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으나 아직 그 원인은 밝혀져 있지 않다.

ALS 환자의 10%는 가족성 근위축성측삭경화증(Familial ALS, FALS)이고, 이 중 20%에서 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) 유전자의 돌연변이가 원인이 밝혀졌다.<sup>2</sup> 이러한 FALS와 산발적 ALS는 병인 기전이 공통될 것으로 추측되고 있어, SOD1 돌연변이는 ALS의 병태생리기전의 대표적인 연구 모델로 생각되고 있다.<sup>1</sup> 현재까지 ALS와 연관된 100여종이 넘는 Cu/Zn SOD1 유전자의 돌연변이가 발견되었으며,<sup>3</sup> 변형된 Cu/Zn SOD1 단백질의 비정상적인 기능 획득에 의한 산화성 손상,<sup>4</sup> 또는 세포내 응집체 형성,<sup>5</sup> glutamate로 인한 흥분독성,<sup>6</sup> neurofilament의 이상,<sup>7</sup> 미토콘드리아의 장애<sup>8</sup> 등이 ALS의 발병 기전으로 제시되고 있다. 근래에 nitric oxide (NO)와 ALS의 관계에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. NO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 형성되며 superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 반응하여 독성 중간 물질인 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)를 형성한다. 변이 SOD1은 세포 내 단백질의 tyrosine기와 peroxynitrite의 반응을 매개하여 단백질의 질소화를 일으킨다.<sup>9</sup> 이러한 질소화는 세포 내 단백질의 변성 및 이에 따른 세포 내 신호 전달의 장애를 초래함으로써 세포사를 일으킨다.<sup>10</sup>

최근 들어 신경퇴행성질환에서 생식샘스테로이드의 작용이 점차 밝혀지고 있다.<sup>11,12</sup> Estrogen은 알츠하이머병, 파킨슨병 등의 신경퇴행성질환에서 신경보호효과가 있음이 이미 알려져 있으며, 돌연변이 Cu/Zn SOD 유전자를 발현하는 운동신경세포에서 NO에 의한 세포사에 대해서도 보호효과가 있음이 보고된 바가 있다.<sup>13</sup> 반면 testosterone은 척수근 근위축증(spino-bulbar muscular atrophy, SBMA; Kennedy's disease) 외의 신경퇴행성 질환에 대해서는 그 관련성이 연구된 바가 거의 없으며, 특히 ALS와 관련해서는 연구가 매우 미흡한 실정이다.

Testosterone은 운동신경세포에 대하여 영양효과를 나타내며,<sup>14</sup> 척수와 뇌간의 운동신경세포의 형태, 기능, 그리고 생존에 관여한다.<sup>15</sup> 운동신경세포에서 유전자 발현을 조절하여,<sup>16</sup> 척수전각세포의 성장과 유지, 단백질 합성에 중요한 작용을 한다.<sup>17</sup> 또한 손상된 운동신경세포의 생존을 증가시키며, 운동신경축삭의 재생을 촉진한다.<sup>18,19</sup> Testosterone은 인간의 신경원세포에서 androgen 수용체를 통한 신경보호작용을 나타내며,<sup>20</sup> 척수근 근위축증의 androgen 수용체를 발현시킨 운동신경세포주 NSC34에서는 testosterone이 세포 생존을 유의하게 증가시킨다.<sup>21</sup>

이와 같이 testosterone이 운동신경세포에 대하여 신경보호효과를 나타내며, 생식샘스테로이드의 신경퇴행성

질환들에서의 보호작용에 대한 최근 결과들을 감안할 때 ALS에서도 testosterone이 보호효과를 나타낼 가능성이 있다. 이에 저자들은 본 실험에서 정상 또는 변이 인간 SOD1 유전자를 발현하는 운동신경세포를 이용하여 사람의 혈중 농도에 가까운 testosterone이 NO를 생성하는 S-nitrosoglutathion (GSNO)에 의해 가해진 세포 손상에 대하여 보호효과가 있는지를 관찰하였으며 이러한 보호작용이 SOD1 유전자의 돌연변이에 따라 어떠한 양상으로 나타나는지를 함께 관찰하였다.

## 대상과 방법

### 1. 세포배양과 SOD1 유전자 조작 세포주 확립

운동신경세포-신경모세포종 잡종 세포(VSC 4.1)를 poly-(L-ornithine)로 처리한 배양접시에서 Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) /F-12 growth medium (Gibco, Grand Island, NY, USA)에 Sato's components (Sigma, St. Louis, MD, USA)와 2% 우혈청 (HyClone)을 첨가한 배양액으로 37°C에서 배양하였다. VSC 4.1 세포주는 Appel 박사의 연구소(Baylor university, USA)에서 제공한 것으로, 운동신경세포의 특성을 보유하도록 15일된 쥐의 배아의 운동신경세포와 마우스 N18TG2의 신경모세포종 세포를 융합하여 만든 세포주이다. 사람의 정상(wild-type, WT)과 돌연변이 SOD1 유전자는 Hayward 박사 (University of Massachusetts, Boston, USA)가 기증한 것으로, 정상 또는 돌연변이(G93A or A4V) 인간 Cu/Zn SOD를 발현하는 운동신경세포를 만들기 위해 정상 또는 변이 Cu/Zn SOD cDNA를 pcDNA 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 BamHI과 EchoRI의 제한효소를 이용하여 첨가하여 cloning을 하였다. WT SOD1의 4번째 아미노산이 alanine이 valine으로 바뀐 유전자(A4V), 그리고 93번째 glycine이 alanine으로 바뀐 SOD1 유전자(G93A)를 전입시킨 세포를 각각 WT, A4V, G93A로 칭하였다. 유전자전입(Superfect, Qiagen, Valencia, CA)을 시켜서 G418 (Gibco, Grand Island, NY)이 400 µg/ml의 농도로 있는 배양액에서 키운 집락의 세포를 사용하였으며 실험하기 전에 유전자전달할 SOD1이 발현되고 있는지를 항인간 SOD1 다클론 항체(1: 500; Binding Site, England)를 사용한 Western blot으로 확인하였다.<sup>22</sup>

### 2. 세포 배양 및 생존율 분석

#### 1) Testosterone의 적정 농도 결정

WT 세포와 G93A 세포, A4V 세포를 사용하여 각각 2회의 실험을 하였으며 각각의 실험은 3배수로 시행하였다 (n=6). 먼저 각각의 세포주를 96-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 갈아 주었

다. Testosterone의 적정 농도를 확인하기 위하여 각각 여러 농도(0.25~128 nM)의 testosterone을 포함하는 배양액을 첨가하였다. 다시 24시간이 지난 후에 각 well에서의 세포생존율을 측정하였다. 이를 통해 적절한 testosterone의 농도 범위를 구하였다.

2) GSNO가 운동신경세포의 생존율에 미치는 영향

WT 세포와 G93A 세포, A4V 세포를 사용하여 각각 2회의 실험을 하였으며 각각의 실험은 3배수로 시행하였다 (n=6). 먼저 각각의 세포주를 96-well 배지에  $1 \times 10^4$  cells/well 농도로 각 well당 200  $\mu$ L가 되도록 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 갈아 주었다. GSNO의 용량에 따른 독성 작용은 200  $\mu$ M 과 2 mM의 GSNO를 사용하여 이전에 시행된 실험의<sup>13</sup> 결과를 참고로 하였다. 이를 토대로 이번 실험에서는 각 well당 200  $\mu$ M 의 GSNO가 포함된 배양액을 첨가하였다. 다시 24시간이 지난 후에 각 well에서 세포생존율을 측정하였으며, 이후 실험에서도 GSNO의 농도를 각 well당 200  $\mu$ M로 하였다.

3) Testosterone이 GSNO독성에 미치는 영향

WT 세포와 G93A 세포, A4V 세포를 사용하여 각각 2회의 실험을 하였으며 각각의 실험은 3배수로 시행하였다 (n=6). 먼저 각각의 세포주를 96-well 배지에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 갈아 주었다. Testosterone의 효과를 보기 위한 경우 예비 실험의 결과를 토대로 1 nM 의 testosterone을 포함하는 배양액으로 갈아 주었다. 배양액을 갈아준 뒤 1시간이 지난 후에 각각의 well에 새로운 배양액을 첨가하였다. GSNO의 세포독성을 보기 위한 경우에는 200  $\mu$ M GSNO를 포함한 배양액을 첨가하여 well당 GSNO농도가 200  $\mu$ M이 되도록 하였다. 다시 24시간이 지난 후에 각 well에서의 세포생존율을 측정하였다.

4) Testosterone의 GSNO독성에 대한 작용의 androgen 수용체 매개성의 여부

WT 세포와 G93A 세포, A4V 세포를 사용하여 각각 3회의 실험을 하였으며 각각의 실험은 2배수로 시행하였다 (n=6). 먼저 각각의 세포주를 96-well 배지에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 갈아 주었다. Androgen 수용체 차단제인 20  $\mu$ M flutamide를 testosterone과 동시에 포함하는 배양액으로 갈아 주었다. 배양액을 갈아준 뒤 1시간이 지난 후에 각각의 well에 새로운 배양액을 첨가하였다. GSNO의 세포독성을 보기 위한 경우에는 200  $\mu$ M GSNO를 포함한 배양액을 첨가하였다. 다시 24시간이 지난 후에 각 well에서의 세포생존율을 측정하였다.

5) 세포생존율 측정

세포생존율은 3-[4,5-dimethylthazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)가 생존해 있는 세포의 미토콘드리아 산화-환원 효소계와 반응하여 환원될 때 청보라색 색소가 침착되는 원리를 이용한 생존세포 검사법으로 측정하였다. MTT 용액(5 mg/ml in PBS, Amresco, Solon, OH)을 세포에 처리하여 3시간 동안 작용시킨 후 MTT 용액을 제거하고, formazan 침전색소를 200  $\mu$ l 의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany) 에 용해시켜, DMSO를 대조로 삼아 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 자료 처리 및 분석

SPSS 프로그램 (Release 11.5)를 이용하여 Wilcoxon Signed Ranks Test로 평가하였으며 p < 0.05인 경우를 통계적으로 의미 있는 것으로 보았다.

결 과

1. Testosterone의 농도에 따른 세포생존율의 변화 (Fig. 1)

세 가지 세포주에 testosterone을 다양한 농도로 처치하고 24시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 보기 위해 시행한 MTT assay에서 testosterone의 농도 변화에 따라 모든 세포주의 생존율이 비슷한 경향으로 변화됨을 알 수 있었다. 사람의 혈중에 정상적으로 존재할 수 있는 농도

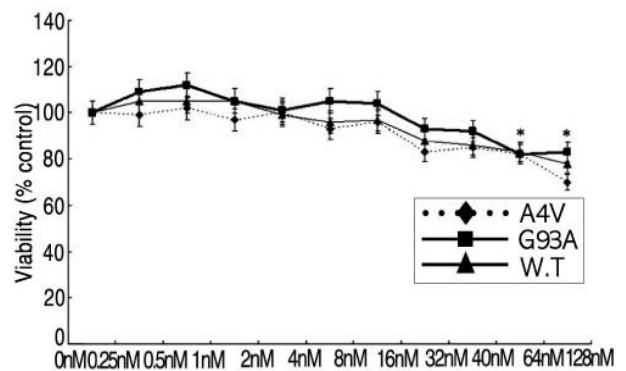


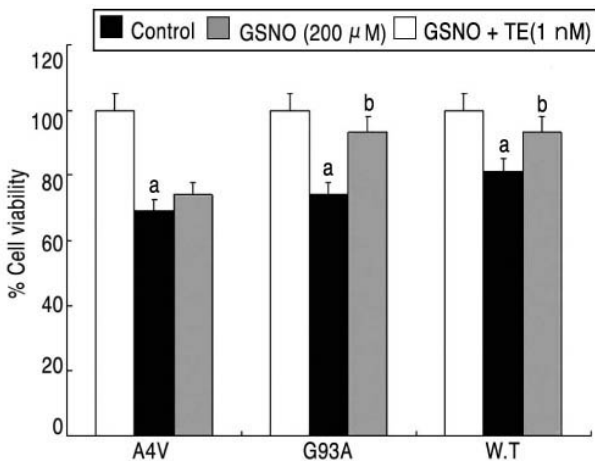
Figure 1. Cell viability changes in WT, A4V and G93A cells by different testosterone doses. At the dose between 0.25 and 8 nM of testosterone (testosterone propionate), cells presented no significant change in cell viability. Increased testosterone treatment reduced the viabilities of all three cell groups in a dose dependent manner from the 16 nM of testosterone. Filled triangle, filled diamond, and filled box indicate wild type, A4V, and G93A, respectively. Each point represents the mean viability ratio to the control value of each cell group with SEM (error bar), and was calculated from the results of 6 sets of experiments.

(10 nM 이하)에서는 생존율의 감소가 없었으며 그 이상의 농도에서 생존율이 점차 감소함을 알 수 있었다.

WT 세포주의 경우 0.125 nM과 8 nM 사이의 농도에서는 생존율의 큰 변화가 없었으며 16 nM 이상의 농도에서 생존율이 감소되는 경향(16 nM에서 12% 감소, 64 nM에서 17% 감소, 128 nM에서 22% 감소)이 있음을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ). A4V 세포주의 경우도 0.125 nM과 8 nM 사이의 농도에서는 생존율의 변화가 없었으며 16 nM 이상의 농도에서 생존율이 감소되는 경향(16 nM에서 17% 감소, 64 nM에서 18% 감소, 128 nM에서 30% 감소)이 있음을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ). G93A 세포주의 경우도 대체로 16 nM 이상의 농도에서 생존율이 감소되는 경향(64 nM에서 18% 감소, 128 nM에서 17% 감소)이 있었다( $p < 0.05$ ). Testosterone이 고농도(16 nM 이상)로 처리되면 세 가지 세포주 모두에서 세포의 생존도가 저하되며, testosterone의 농도 증가에 따라 세포생존율이 점차 감소되는 경향을 보였다

## 2. GSNO가 운동신경세포의 생존율에 미치는 영향 (Fig. 2)

GSNO를 처리한 경우 WT 세포주는 세포 생존율이  $80.77 \pm 1.77\%$ 로 각각 감소되었고, A4V 세포주는  $69.21 \pm 4.14\%$ , G93A 세포주는  $73.90 \pm 4.83\%$ 로 세포생존율이 감소됨을 관찰할 수 있다. 각각의 경우에서의 세포생존율은 대조군과 비교하여 통계적으로 의미 있는 차이를 보였다. 대개 변이세포주에서 더 많은 세포수의 감소 추세를 보였고, 이는 이전의 실험과도 비슷한 양상이었다.<sup>13</sup>



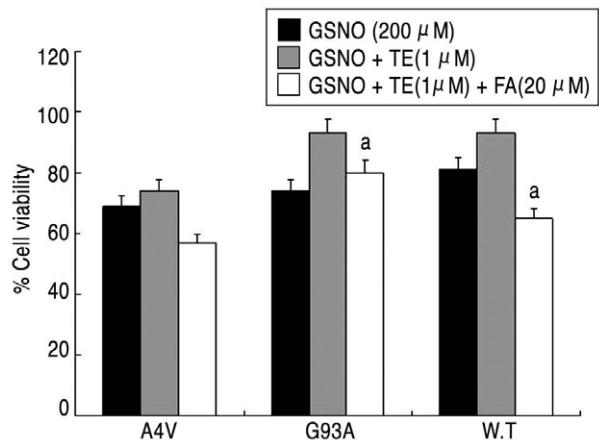
**Figure 2.** Protective effect of testosterone on wild-type or mutant SOD1-transfected VSC 4.1 cells treated with GSNO. GSNO induced significant cytotoxicity in all cells. Testosterone inhibit nitric oxide induced cytotoxicity in wild-type and G93A.  $n=6$ ,  $P < 0.05$  (when viability is compared with that of control group);  $bn=6$ ,  $P < 0.05$  (when viability is compared with that of SOD1 cells treated with 200 μM GSNO).

## 3. Testosterone이 GSNO에 의한 세포독성에 미치는 영향 (Fig. 2)

WT 세포의 배양 결과 GSNO로 처리한 군은 대조군에 비해  $80.77 \pm 1.77\%$ 의 세포생존율을 보인데 비해 GSNO로 처리 1시간 전에 1 nM testosterone을 전처리한 군은  $92.50 \pm 2.07\%$ 로서 testosterone에 의해 세포생존율이 증가됨을 관찰하였다. G93A 세포의 배양 결과에서도 GSNO로 처리한 군은 대조군에 비해  $73.90 \pm 4.83\%$ 의 세포생존율을 보인데 비해 1 nM testosterone을 전처리한 군은  $93.26 \pm 7.64\%$  서 testosterone에 의해 세포생존율이 증가됨을 관찰하였다. A4V 세포의 배양 결과 GSNO로 처리한 군은 대조군에 비해  $69.21 \pm 4.14\%$ 의 세포생존율을 보였으며 1 nM testosterone을 전처리한 군은  $74.27 \pm 3.62\%$ 로서 통계적으로 유의한 세포생존율의 차이를 보이지 않았다.

## 4. Testosterone 의 GSNO-induced cytotoxicity에 대한 작용의 androgen 수용체 매개성의 여부 (Fig. 3)

WT 세포의 배양 결과 GSNO와 1 nM testosterone을 처리한 군은  $92.50 \pm 2.07\%$ 의 생존율을 보이거나 flutamide를 함께 처리하면  $64.78 \pm 3.18\%$ 로서 flutamide에 의해 testosterone의 세포생존율 증가 효과가 없어짐을 관찰하였다. G93A 세포의 배양 결과 GSNO와 1 nM testosterone을 처리한 군은  $93.26 \pm 7.64\%$ 의 생존율을 보이고 flutamide를 함께 처리 시에는  $80.43 \pm 6.75\%$ 로서 flutamide에 의해 testosterone의 세포생존율 증가



**Figure 3.** Protective effect of testosterone against GSNO-induced cytotoxicity in G93A and wild-type cells was reversed by flutamide (androgen receptor blocker).  $n=6$ ,  $P < 0.05$  (when viability is compared with that of SOD1 cells treated with 200 μM GSNO and 1nM testosterone enanthate).

효과가 없어짐을 관찰하였다.

## 고 찰

본 연구에서 testosterone은 생리적 농도의 범위 내에서 SOD1 운동신경세포주에 대하여 세포생존율의 변화를 일으키지 않으나 고농도로 처리하면 생존율이 감소되는 현상을 나타내었다. 고농도에서의 생존율의 감소 현상은 세포자멸사가 testosterone에 의해 유도되어 생존율이 감소되었다고 추측될 수도 있으나, 고농도의 testosterone이 세포사에 직접적인 영향을 주는지, 세포의 분화 유도에 의한 이차적인 효과인지는 감별되어야 할 필요성이 있다. 향후 고농도에서 세포생존율 감소의 원인 감별을 위해서는 형태 관찰 등의 추가적인 연구가 필요하겠다. 고농도로 처리시의 세포생존율의 감소는 치료 목적으로 고용량의 testosterone 사용시 세포 재생을 억제하고 생존을 감소시킬 수 있는 부작용에 대한 가능성을 시사한다. 따라서 임상 적용 시 적절한 testosterone의 사용농도에 대한 기초적인 자료로 이용될 수 있겠다. 이러한 현상에 대해서는 앞으로 추가적인 연구가 필요한 부분이다.

저자들은 본 실험에서 NO를 발생시키는 GSNO가 정상 또는 변이 인간 Cu/Zn SOD를 발현하는 운동신경세포의 생존율을 저하시키며 이러한 생존율의 저하는 Cu/Zn SOD의 변이 여부 또는 변이의 종류에 따라 다르게 나타난다는 것을 확인하였으며 WT과 G93A 세포에서 testosterone 전처치를 통해 이러한 세포사를 부분적으로 억제할 수 있다는 것을 확인하였다. GSNO는 용액 내에서 NO 공여체로 작용하여 세포의 세포자멸사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 GSNO에 의한 세포자멸사는 Bcl-2, p53, p21 modulation과 cytochrome c 유리, caspase 3 활성화의 과정을 포함하며,<sup>23</sup> Cu/Zn SOD 유전자가 GSNO에 의한 세포자멸사에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다.<sup>24</sup> Ciriolo 등<sup>25</sup> 은 인간의 신경모세포종 세포주에 WT 또는 G93A 변이 Cu/Zn SOD 유전자를 유전자전달한 뒤 GSNO를 처리하였을 때 G93A 변이 Cu/Zn SOD 유전자를 가진 세포가 WT Cu/Zn SOD 유전자를 가진 세포보다 세포자멸사에 더 민감하다는 것을 발견하였으며 이러한 결과를 통해 NO에 의한 세포자멸사에 Cu/Zn SOD가 관여하며 세포의 NO에 대한 반응에 Cu/Zn SOD의 변이가 영향을 미침을 발견하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 NO에 의한 세포사 기전에 Cu/Zn SOD가 중요한 역할을 함을 다시 한 번 확인할 수 있었으며 변이의 여부 또는 변이의 위치에 따라 NO-매개 독성에 민감도가 다르다는 사실은 각각의 변이 Cu/Zn SOD가 세포 내에서 NO에 의해 초래되는 반응을 각각 다르게 조절하고 있음을 시사하는 소견이라고 할 수 있겠다.

Testosterone은 세포내 또는 세포막에 존재하는 수용

체와 결합하여 작용한다. Testosterone이 세포내의 수용체와 결합하면 그 결합체 자체가 전사인자로 작용하여 표적유전자의 발현을 증가시키는 양상의 유전자 활성기능을 한다.<sup>25</sup> Testosterone에 의해 전사가 증가되는 표적 유전자는 운동신경세포의 영양 효과에 관련된 작용을 한다. 그러나 그 구체적인 표적 유전자는 RNA processing에 관련된 두 종류의 유전자 외에는 아직 밝혀져 있지 않다.<sup>26</sup> 이러한 유전자 활성기능 외에 testosterone은 MAPK family 인 ERK1/2를 활성화시키는 비유전자 활성기능도 나타낸다.<sup>27</sup> 그리고 testosterone은 세포막에 존재하는 testosterone의 수용체에 작용하여 세포내 칼슘을 증가시키고 이에 따라 lipopolysaccharide (LPS) 대사계의 활성화가 감소되며 결국 mitogen-activated protein kinase (MAPK) family 중 p38을 활성화시킨다.<sup>28</sup> 또한 testosterone이 세포내의 수용체와 결합 시에, 일부 (<5%)의 testosterone은 국소 조직에서 5-alpha-reductase에 의해 그 작용이 더욱 강화된 dihydrotestosterone (DHT)으로 변하여 수용체에 더욱 강하게 작용하기도 하며, 극히 일부(0.1%)의 testosterone은 aromatase에 의해 estradiol로 변형되어 estrogen 수용체에 작용하여 estrogen의 유전자 활성기능을 나타내기도 한다.<sup>25</sup> 본 연구에서 testosterone은 운동신경세포의 세포사에 대하여 G93A와 WT 세포주에서 보호효과를 나타내었다. 이러한 세포보호작용은 androgen 수용체 차단제인 flutamide에 의하여 이러한 작용이 억제되는 양상을 보이는 바, androgen 수용체 매개 작용임을 확인할 수 있었다. 본 실험에서 testosterone을 단지 독성 손상 1시간 전에 전처리하였을 때(단기간에) 보호효과가 나타난 점을 감안하면 testosterone이 전사를 조절하는 유전자 활성화보다는 비유전자 활성에 의한 작용을 통하여 NO에 대한 보호작용을 나타내었을 가능성이 더 높겠다. 따라서 앞에서 설명한 testosterone의 작용 기전 가운데 비유전자 활성의 부분과의 관련성이 있겠고 이 부분에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요하다.

본 실험에서 세포주에 따른 testosterone의 세포보호 작용이 다르게 나타난 기전은 확실하지 않다. 한 가지 가능성은, GSNO에 대한 세포사가 각각의 세포주에서 다른 정도로 나타난 점을 고려한다면 세포 손상의 단계에서 각각의 세포주의 Cu/Zn SOD 유전자의 차이로 인해 서로 다른 대사과정을 통해 세포사를 일으키고 testosterone은 이러한 세포사의 기전 중 일부에만 선택적으로 작용하였을 가능성을 생각할 수 있겠다. 즉, 현재까지 알려진 NO에 의한 세포사의 기전은 다양한 경로를 포함하고 있는 바, 특정한 Cu/Zn SOD 변이는 이러한 경로 중 특정 부분을 선택적으로 강화시키고 다른 경로는 상대적으로 기여하게 하여 결과적으로 Cu/Zn SOD의 변이 여부 또는 변이의 종류에 따라 NO에 의해 세포사가 일어나

는 기전이 각 세포주마다 차이가 있을 가능성이 있다. 이러한 상태에서 testosterone의 세포보호효과는 testosterone이 작용할 수 있는 경로를 통해 세포사가 일어나는 세포주에만 국한되어 나타날 것이다. 다른 가능성은, 각각의 세포주에서 같은 과정을 통해 세포사가 일어나지만 Cu/Zn SOD 유전자의 차이로 인해 세포사와 관련된 세포내 대사의 속도나 양의 차이가 발생하여 어떤 세포주에서는 testosterone의 신경세포보호작용이 충분히 일어나더라도 궁극적인 세포사에는 영향을 미치지 못하는 경우이다. 이에 대한 정확한 기전은 본 연구만으로는 알 수 없다. 임상적으로도 A4V 변이세포주를 가진 환자는 병의 진행 경과가 빠르며, G93A 변이세포주를 가진 환자와는 임상양상이 다르다. 따라서 같은 testosterone을 적용하게 되더라도 A4V와 G93A 변이세포주를 가진 환자에선 각각 반응의 정도가 다를 수 있음을 예측할 수 있으며, 향후 다양한 변이 위치에 대한 효과여부를 확인하는 것이 필요하다.

본 실험의 결과 외에도 ALS의 발병기전과 역학적인 측면에서 ALS와 testosterone과의 관련성을 강력히 시사하는 몇 가지의 증거들이 있다.<sup>29</sup> 첫째, 역학적인 측면에서의 관련성으로 고령, 남성은 ALS의 위험인자이다.<sup>30</sup> ALS는 발병률에 있어서 남녀의 뚜렷한 차이가 있으며 남성에서 1.5~2.5배 더 많이 발생한다.<sup>31</sup> 현재 ALS의 알려진 기전 가운데 이러한 차이를 설명할 만한 이론은 없다. 그리고 최근 주목되고 있는 남성갱년기와 호발 시기가 일치한다. 정상 남성은 40대 이후에 testosterone이 점차 감소하고, sex-hormone binding globulin (SHBG)은 60대 이후에 증가하며 이에 따라 free testosterone은 감소한다.<sup>32</sup> 최근 ALS transgenic mice model (mutant hSOD1)을 이용한 연구에서도 수컷에서 암컷보다 더 일찍 발병하는 성별에 따른 차이가 있었다.<sup>33</sup> 둘째, 해부학적인 측면에서의 관련성으로 testosterone이 고농도로 분포하는 부위와 ALS의 주요 침범부위가 잘 일치한다. 운동신경원세포는 testosterone의 표적세포이며 또한 ALS에서 주로 파괴되는 부분이다.<sup>34</sup> 해부학적으로 testosterone은 뇌신경 중 특히 운동기능에 관련된 5, 7, 11번 뇌신경, 그리고 10번 뇌신경의 nucleus ambiguus 부위에 고농도로 분포하며, 척수 중 요수와 흉수 하부의 전각의 lamina IX에 있는  $\alpha$ -motor neuron에 가장 높은 농도로 분포하나, 눈의 움직임 등과 관련된 3, 4, 6번 뇌신경, 청각, 전정, 삼차신경 등 감각에 관련된 뇌신경에는 저농도로 분포한다.<sup>34</sup> 이를 통해 testosterone의 분포 부위가 ALS에서 주로 침범되는 척수, 특히 요수, 흉수의 운동신경세포와 연수 기능에 관련된 뇌신경의 운동신경세포와 그 분포가 매우 잘 일치함을 알 수 있다. 셋째, ALS와 유사한 양상의 질환에서 밝혀진 testosterone의 발병 관련성이다. ALS와 유사하나 하부운동신경원세포만 주로

침범하는 질환인 SBMA는 androgen 수용체 (AR) 유전자의 돌연변이로 발생한다.<sup>35</sup> 이 질환은 AR의 기능 변화와 발병이 연관되며, AR의 발현이 감소되어 손상에 대한 재생능이 떨어져서 운동신경세포가 주로 손상되는 것으로 추측된다.<sup>21</sup> 또한 testosterone과 결합해서 유리 testosterone을 감소시키는 SHBG을 과발현시킨 형질전환 생쥐에서 주로 뒷다리의 이상을 보이는 진행성 운동 장애가 보고된 바 있으며 이 또한 testosterone과 운동신경원질환의 연관성을 시사한다.<sup>36</sup> 넷째, ALS환자에서 밝혀진 testosterone과의 관련성을 시사하는 소견이 있다. ALS환자(35명)에서 정상에 비하여 유리 testosterone이 유의하게 감소되어 있었고,<sup>37</sup> ALS가 나타나는 여성은 초경이 늦고 폐경이 빠른 양상을 보였다.<sup>38</sup> 임상실험으로는 4명의 ALS 남성 환자에게 testosterone을 근육주사하여 관찰한 결과 2명은 진행이 느려져서 4개월간 변화가 없었고,<sup>39</sup> 2명의 SBMA환자에 고용량 경구 testosterone 투여와 운동요법을 시행하여 1명에서 근력의 회복을 보인 바가 있다.<sup>40</sup> 이와 같은 증거들을 감안하면 testosterone이 ALS의 발병에 있어서도 관련성이 있을 것으로 생각되며 testosterone의 보호작용의 기전에 있어서도 발병기전과 관련하여 관련이 있을 것으로 추정된다.

본 실험의 결과는 testosterone이 ALS와 관련된 SOD1 돌연변이 운동신경세포주에서 ALS와 연관된 GSNO에 의한 세포사에 있어서 androgen 수용체를 통한 비유전자 활성으로 세포보호작용을 일부 나타낼 수 있음을 시사하고 있으나, 이는 예비적 성격의 실험으로서 이러한 결과만으로 testosterone의 신경세포보호효과를 설명하기에는 한계가 있다. GSNO에 의한 세포사와 testosterone에 의한 세포보호작용에 대한 더욱 깊이 있는 이해를 위해서는 WT과 G93A, A4V 세포 내에서의 GSNO 처리 이후 발생하는 세포사와 관련된 단백질들의 발현 양상의 확인이 필요하며, 돌연변이 SOD1을 지닌 미분화 상태의 운동신경세포주를 이용한 바 향후 분화된 운동신경세포에서의 작용도 확인할 필요가 있다. 또한 이러한 세포수준의 실험의 결과를 토대로 이를 확인하기 위한 동물모델에서 돌연변이 유무에 따른 testosterone 농도 분포의 차이, 수용체 분포의 차이나 기능의 이상 여부에 대한 확인과 testosterone의 처리 후 발병 지연이나 양상의 차이 등에 대한 추가적인 연구도 필요하다. 따라서 본 실험결과를 바탕으로 하여 SOD의 차이에 따른 세포사 기전의 차이 및 testosterone처리 이후 세포사와 관련된 단백질들의 발현 양상의 변화와 세포의 형태학적인 변화에 대한 연구, 그리고 이러한 단백질의 발현과 testosterone에 의한 변화가 각 세포주마다 어떻게 다르게 나타나는지에 대한 연구, 또한 동물실험을 통한 입증 등이 향후 이루어져야 할 것으로 생각한다. 본 실험의 결과는 ALS 환자에서 NO-매개 독성에 대한 반응은 Cu/Zn SOD 변이의

여부 또는 변이의 종류에 따라 다르게 나타날 가능성이 있으며 그 중 일부 환자에서는 이러한 NO의 작용을 testosterone을 통해 부분적으로 억제할 수도 있음을 시사한다. 다른 퇴행성 신경질환에 비해 ALS 환자군에서의 testosterone의 보호 효과에 대한 연구는 아직 없는 상태이다. 특히 WT 세포에서 testosterone이 보호효과를 보인 점은 ALS 환자의 대부분이 산발성이라는 점을 고려할 때 의미하는 바가 크다. 결론적으로 본 연구는 testosterone의 ALS에 대한 보호효과로 치료에 있어서의 가능성을 제시하였으며, 또한 발병기전과 관련해서도 앞서 기술한 바와 같이 어떤 연관성을 시사하는 증거들이 있는 바, 향후 이러한 작용들에 대한 보다 자세한 후속 연구가 필요하다고 생각된다.

## REFERENCES

- Al-Chalabi A, Leigh PN. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2000;13:397-405.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.
- Shibata N, Hirano A, Yamamoto T, Kato Y, Kobayashi M. SOD-1 mutation-related neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:143-161.
- Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, et al. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 1996;271:515-518.
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, et al. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Scienc* 1998;281:1851-1854.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1995;38:73-84.
- Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:806-819.
- Kong J, Xu Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 1998;18:3241-3250.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 1993;364:584.
- Beckman JS and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-C1437.
- Green PS, Simpkins JW. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:347-358.
- Gouras GK, Xu H, Gross RS, et al. Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptides. *PNAS* 2000;97:1202-1205
- Kim HJ, Park SH, Kim M, Kim HJ, Lee KW. Neuroprotective Effect of Estrogen on Motor Neuron Cells Expressing Wild Type or Mutant Cu/Zn Superoxide Dismutase. *J Korean Neuro Asso* 2002;20:525-529.
- Matsumoto A. Hormonally induced neuronal plasticity in the adult motoneurons. *Brain Res Bull* 1997;44:539-547.
- Jones KJ. Androgenic enhancement of motor neuron regeneration. *Ann N Y Acad sci* 1994;743:141-161.
- Blanco CE, Popper P, Micevych P. Anabolic-androgenic steroid induced alterations in choline acetyltransferase messenger RNA levels of spinal cord motoneurons in the male rat. *Neuroscience* 1997;78:873-882.
- Matsubara S, Hirai S. Influence of anti-androgens on the anterior horn cells of rat spinal cord: Morphometric and in-situ hybridization studies. *J Neurol Sci* 1998;161:10-15.
- Yu WH. Administration of testosterone attenuates neuronal loss following axotomy in the brain-stem motornuclei of female rats. *J Neurosci* 1989;9:3908-3914.
- Kujawa KA, Emeric E, Jones KJ. Testosterone differentially regulates the regenerative properties of injured hamster facial motoneurons. *J Neurosci* 1991;11:3898-3906.
- Hammond J, Le Q, Goodyer C, Gelfand M, Trifiro M, LeBlanc A. Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *J Neurochem* 2001;77:1319-1326.
- Simeoni S, Mancini MA, Stenoien DL, et al. Motoneuronal cell death is not correlated with aggregate formation of androgen receptors containing an elongated polyglutamine tract. *Hum Mol Genet* 2000;9:133-144.
- Sung JJ, Kim HJ, Kwon SC, Lee JH, Kim M, Lee KW. Homocysteine induces oxidative cytotoxicity in Cu,Zn-superoxide dismutase mutant motor neuronal cell. *Neuroreport* 2002;13:377-381.
- Ciriolo MR, Aquilano K, De Martino A, Carri MT, Rotilio G. Differential role of superoxide and glutathione in S-nitrosoglutathione-mediated apoptosis: a rationale for mild forms of familial amyotrophic lateral sclerosis associated with less active Cu, Zn superoxide dismutase mutants. *J Neurochem* 2001;77:1433-1443.
- Ciriolo MR, De Martino A, Lafavia E, Rossi L, Carri MT, Rotilio G. Cu,Zn-superoxide dismutase-dependent apoptosis induced by nitric oxide in neuronal cells. *J Biol Chem* 2000;275:5065-5072.
- Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and Cardiovascular Disease. *Endocr Rev* 2003;24:313-340.
- Lieberman AP, Friedlich DL, Harmison G, et al.

- Androgens regulate the mammalian homologues of invertebrate sex determination genes *tra-2* and *fox-1*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:499-506.
27. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104:719-730.
  28. Guo Z, Benten WP, Krucken J, Wunderlich F. Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. *J Biol Chem* 2002;277:29600-29607.
  29. Weiner LP. Possible role of androgen receptors in amyotrophic lateral sclerosis: A hypothesis. *Arch Neurol* 1980;37:129-131.
  30. Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997; a population-based study. *Neurology* 1999; 52:504-509.
  31. Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 1995;118:707-719.
  32. Leifke E, Gorenou V, Wichers C, Von Zur Muhlen A, Von Buren E, Brabant G. Age-related changes of serum sex hormones, insulin-like growth factor-1 and sex-hormone binding globulin levels in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;53:689-695.
  33. Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH, van den Berg LH. Sexual difference in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* 2003;13:737-743.
  34. Sar M, Stumpf WE. Androgen concentration in motor neurons of cranial nerves and spinal cord. *Science* 1987;197:77-80.
  35. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991;352: 77-79.
  36. Joseph DR, O' Brien DA, Sullivan PM, Becchis M, Tsuruta JK, Petrusz P. Overexpression of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in male transgenic mice: tissue distribution and phenotypic disorders. *Biol Reprod* 1997;56:21-32.
  37. Militello A, Vitello G, Lunetta C, et al. The serum level of free testosterone is reduced in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2002;195:67-70.
  38. Chio A, Meineri P, Tribolo A, Schiffer D. Risk factors in motor neuron disease: a case control study. *Neuroepidemiology* 1991;10:174-184.
  39. Jones TM, Yu R, Antel JP. Response of patients with amyotrophic lateral sclerosis to testosterone therapy. *Arch Neurol* 1982;39:721-722.
  40. Goldenberg JN, Bradley WG. Testosterone therapy and the pathogenesis of Kennedy's disease. *J Neurol Sci* 1996;135:158-161.