

사춘기전 마우스에서 소마토스타틴에 의한 GnRH 신경세포의 전기활성 억제 효과

박선아 · 바타라이저나던 · 한성규

전북대학교 치의학전문대학원 구강생리학교실 및 구강생체과학연구소

Somatostatin Inhibits Gonadotropin Releasing Hormone Neuronal Activities in Juvenile Mice

Seon Ah Park, Janardhan P. Bhattarai, Seong Kyu Han

Department of Oral Physiology, School of Dentistry & Institute of Oral Bioscience, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

Background: The gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons perform a pivotal function in the central regulation of fertility. Somatostatin (SST) is an important neuromodulatory peptide in the central nervous system and alters neuronal activities via G protein-coupled SST receptors. A number of studies have shown that SST modulates the reproductive axis at the hypothalamic level. However, the precise action mechanisms of SST and related receptor subtypes have yet to be fully understood. In this study, we evaluated the direct effects of SST on GnRH neurons in juvenile mice.

Methods: Juvenile (postnatal days, < PND 30) GnRH-GFP transgenic mice expressing green fluorescent protein were used in this study. Acute coronal brain slices containing the preoptic area were prepared and all identified GnRH neurons were recorded using the gramicidin perforated-patch clamp technique; type II SST receptor (SSTR2) mRNA expression was evaluated via single cell reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: SST caused membrane hyperpolarization, depolarization, no response, or membrane hyperpolarization with a reduction of action potential. Most (57.7%, 30/52) of the GnRH neurons tested were hyperpolarized by SST and this SST-induced hyperpolarization was found to be concentration-dependent. The percentage of responses, membrane potential changes (MPC), and resting membrane potential (RMP) by SST were not significantly different in juvenile male and female GnRH neurons. The SST-induced hyperpolarization was maintained in the presence of tetrodotoxin (TTX), a sodium channel blocker, and an amino acid blocking cocktail (AABC) containing AP-5 (NMDA receptor antagonist), CNQX (non-NMDA glutamate receptor antagonist), picrotoxin (GABAA receptor antagonist), and strychnine (glycine receptor antagonist). SSTR2 mRNA was expressed on 10 (38%) among 26 GnRH neurons. Seglitide, an SSTR2 agonist, mimicked this SST-induced hyperpolarization (11/23 47.8%) and this response was maintained in the presence of TTX and AABC.

Conclusion: Our data show that SST can exert potent inhibitory action against GnRH neuronal excitability via SSTR2 activation in juvenile mice. (*Endocrinol Metab* 26:210-217, 2011)

Key Words: GnRH neuron, Somatostatin, Perforated-patch clamp

서론

성선자극호르몬유리호르몬(gonadotropin releasing hormone,

GnRH) 신경세포는 시상하부에 산발적으로 위치하며, 정중돌기(median eminence)에 분지를 내어 GnRH를 분비한다. GnRH는 뇌하수체 전엽에서 성선자극호르몬분비세포(gonadotrope)를 자극함으로

Received: 29 December 2010, Accepted: 19 April 2011

Corresponding author: Seong Kyu Han

Department of Oral Physiology & Institute of Oral Bioscience, School of Dentistry, Chonbuk National University, Deokjindong 1-ga, Deokjin-gu, Jeonju 561-756, Korea
Tel: +82-63-270-4030, Fax: +82-63-270-4028, E-mail: skhan@jbnu.ac.kr

※ 본 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2009-0067150).

Copyright © 2011 Korean Endocrine Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

써 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH), 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone, FSH)과 같은 성선자극호르몬(gonadotropin)의 분비를 조절한다[1].

소마토스타틴(somatostatin, SST)은 중추신경계 내에서 중요한 신경조절 펩티드로, 성장호르몬, 인슐린, 글루카곤, 프로락틴 및 성선자극호르몬 등의 분비를 조절한다. 특히 SST는 뇌하수체 수준에서 reproductive axis를 조절하는데, 예를 들어 랫드에서 GnRH로 유도되는 LH의 분비를 억제하며[2] 혈중 LH의 혈중농도를 감소시킨다[3]. 중추 내로 SST 또는 그 유사체를 투여시 성선자극호르몬분비세포의 크기 및 수를 감소시킨다[3,4]. 또한 양에서 LH pulsatility를 억제하며[5] 랫드에서 LH level의 감소를 초래한다[6]. 시상하부 수준에서도 SST 유사체인 octreotide를 주입 시 시상하부 GnRH 신경세포의 활성을 억제할 뿐만 아니라 LH의 분비도 억제한다[6].

이러한 결과들로 미루어볼 때 SST가 GnRH 신경세포의 활성 조절에 관여함을 추정할 수 있지만 GnRH 신경세포 활성의 직접적인 조절에 대한 보고는 미약하다. GnRH 신경세포는 발생과정 중 시상하부로 이주하는 특성 때문에 다른 신경세포들과는 다른 특성을 지니고 있고 성장과정에 따른 호르몬 분비 변화와 성별에 따른 차이에 대한 연구가 보고되었다[7-9]. 최근 Bhattarai 등[10]은 마우스 성체(PND45-60) GnRH 신경세포에서 기능적인 SSTR2가 발현되어 있고, SSTR2를 매개로 한 억제성 반응을 보고한 바 있다. 그러나 미성숙 마우스에서의 SST에 대한 GnRH 신경세포 활성에 대한 연구는 밝혀져 있지 않기 때문에 마우스의 GnRH 신경세포가 발생과정 동안에 SST에 대한 반응성이 달라질 수 있는지 조사하고자 하였다. 따라서, 본 연구에서는 미성숙 마우스(PND7-29)로부터 얻은 GnRH 신경세포에서 gramicidin perforated-patch clamp 기법을 이용하여 SST의 반응성을 조사하였고, single cell RT-PCR을 이용하여 SSTR2 mRNA의 발현 확인 및 효능제를 이용한 기능적 발현을 조사하고, 성별 차이점을 비교하였다.

대상 및 방법

1. 대상

실험동물로는 GnRH 신경세포만 녹색의 형광을 발하도록 형질을 개량한 형질전환 마우스(GnRH-EGFP-Mut5)를 뉴질랜드 오타고 대학으로부터 분양 받아 실험에 이용하였다. 실험동물 사육실은 12시간 빛 12시간 어둠 상태를 유지하였고, 사료와 물은 무제한 공급하였다. 모든 실험은 전북대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻어 실시하였다.

2. 뇌절편 제조

형질전환 마우스(Mut5)를 경추탈골로 희생시키고 절두 후 신속하게 뇌를 적출하여 4°C 인공뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid,

ACSF)에 담가 차가워질 때까지 3-4분간 기다렸다. 인공뇌척수액은 NaCl 118 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 0.5 mM, MgCl₂ 6 mM, D-glucose 11 mM, HEPES 10 mM, NaHCO₃ 25 mM로 조성하였고, 95% O₂, 5% CO₂로 포화시 pH는 7.4로 유지되도록 하였다. 적출된 뇌는 순간접착제로 뇌절편제조기(Microm, Walldorf, Germany)에 고정시키고 내측중격(medial septum)과 시각교차앞구역(preoptic area)을 포함하는 150-200 μm 두께의 뇌절편을 만들었다. 제조된 뇌절편은 32°C 인공뇌척수액에서 1시간 이상 배양시켜 뇌절편 제조시의 손상에서 충분히 회복되도록 기다렸다.

3. 전기생리학 기록

1시간 이상 배양한 뇌절편을 기록용 챔버에 옮기고 인공뇌척수액을 분당 4-5 mL의 속도로 계속하여 관류시켰으며 뇌절편은 업라이트 형광 현미경(BX50WI, Olympus, Tokyo, Japan)하에서 관찰하였다. DIC optic으로 전환하기 전 고배율에서 GnRH 신경세포의 형광을 확인하였으며 모든 기록은 실온에서 수행되었다.

미세유리전극(thin-wall borosilicate glass capillary tubing, PG52151-4, 외경 1.5 mm, 내경 1 mm, WPI)은 미세유리전극 제조기(P-97, Sutter Instruments Co. Novato, CA, USA)를 이용하여 제조하였다. 유리전극용액은 KCl 130 mM, NaCl 5 mM, CaCl₂ 0.4 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1.1 mM로 조성하였고, KOH를 이용하여 pH를 7.3으로 보정한 후 0.22 μm filter를 통해 여과시켰다. Gramicidin (Sigma, St. Louis, MO, USA)은 DMSO에 녹여 2.5 mg/mL 농도로 만들고 5분간 고주파음을 이용해 분쇄하고 유리전극 용액에 1000배 희석(최종 농도 2.5 μg/mL)한 후 다시 15분간 고주파음을 이용해 분쇄하였다. 유리전극의 끝을 gramicidin-free 용액으로 채우고, 이어서 gramicidin이 첨가된 유리전극 용액으로 뒷부분을 채웠다. Gramicidin perforated-patch clamp recording은 Axopatch 200B amplifier (Axon instrument, Foster City, CA, USA)를 이용하여 수행하였고, 유리전극 용액을 채운 후 저항은 4-6 MΩ이었다. Gigaseal 형성 후 gramicidin에 의하여 pore가 형성되고 막전압이 -45 mV 이하로 떨어져 안정되었을 때 SST를 비롯한 약물들을 처치하였다. GnRH 신경세포의 전기적 활성은 Digidata 1322A interface (Axon Instruments)를 이용하여 컴퓨터의 하드디스크에 직접 저장하였고, 신호는 3 kHz로 여과하였으며 후에 pClamp9 software (Axon Instruments)를 이용하여 분석하였다.

4. Single Cell RT-PCR (단일세포 역전사-중합효소연쇄반응)

미세유리전극은 RNase의 활성을 차단하기 위하여 250°C에서 6시간 동안 멸균하였다. 이후 미세유리전극은 미세유리전극 제조기를 이용하여 4-6 MΩ정도의 저항을 보이는 미세유리전극에 멸균된 미세전극용액 8 μL를 채운 후 미성숙 마우스로부터 뇌절편을 제조한 후 GnRH 신경세포의 형광을 확인하고, 미세유리전극을 이용하여

whole cell mode에서 음압을 가하여 세포 내용물 획득한 후, 각 신경세포의 내용물을 0.2 mL PCR tube에 수집하였다. 뇌절편으로부터 획득한 세포 내용물을 pre-RT 혼합 용액(DNase free distilled water [DW] 0.3 μ L, 3 μ g/ μ L random primers 0.7 μ L, 40 U/mL RNase OUT™ 0.7 μ L, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 혼합하여 원심분리한 후 65°C에서 5분, 얼음 위에서 최소한 1분 동안 반응시켰다. 두 번째 RT 혼합 용액(5X RT buffer 4 μ L, 0.1 M DTT 2 μ L, 10 mM dNTP 1 μ L, 200 U/ μ L Superscriptase III 0.5 μ L, DW 0.5 μ L)을 첨가하고, 25°C에서 5분간, 50°C에서 1시간, 마지막으로 70°C에서 15분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다(MJ Research, Waltham, MA, USA). SSTR2 (NM_009217, sense; 5'-GCAGCTGT ACCATCAACTGG-3', antisense; 5'-CACGGAAGAGACGTTGAAGA-3')와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, M32599, sense; 5'-TTGGCA-TTGTGGAAGGGCTC-3', antisense; 5'-TGCTGTTGAAGTCGCAG-GAGAC-3')의 primer는 Primer 3 program[11]을 이용하여 제작하였

다. 합성된 cDNA는 2X PCR master mix 용액 (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응은 94°C에서 2분 동안 변성단계 이후 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 45초 동안 50회 증폭을 시켰다. 이후 72°C에서 10분 동안 연장단계를 수행 후 PCR 반응물들은 1.5% agarose gel (Promega)에서 전기영동을 시행하였다. PCR 반응물들의 분석은 Lab systems analyzer (Bio-Rad, Milano, Italy)를 사용하여 분석하였다.

5. 통계

농도의존성 반응 및 성별에 따른 SST의 반응성은 χ^2 -test, 막전압의 변화 정도는 one-way ANOVA test 또는 student *t*-test (non-paired), 상대적인 반응성은 one sample *t*-test 로 유의성을 검정하였으며, $P < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 간주하였다. 실험결과는 control에 대한 상대적인 값 및 mean \pm SEM으로 표시하였으며, n은 분석된 신경세포의 수를 나타내었다.

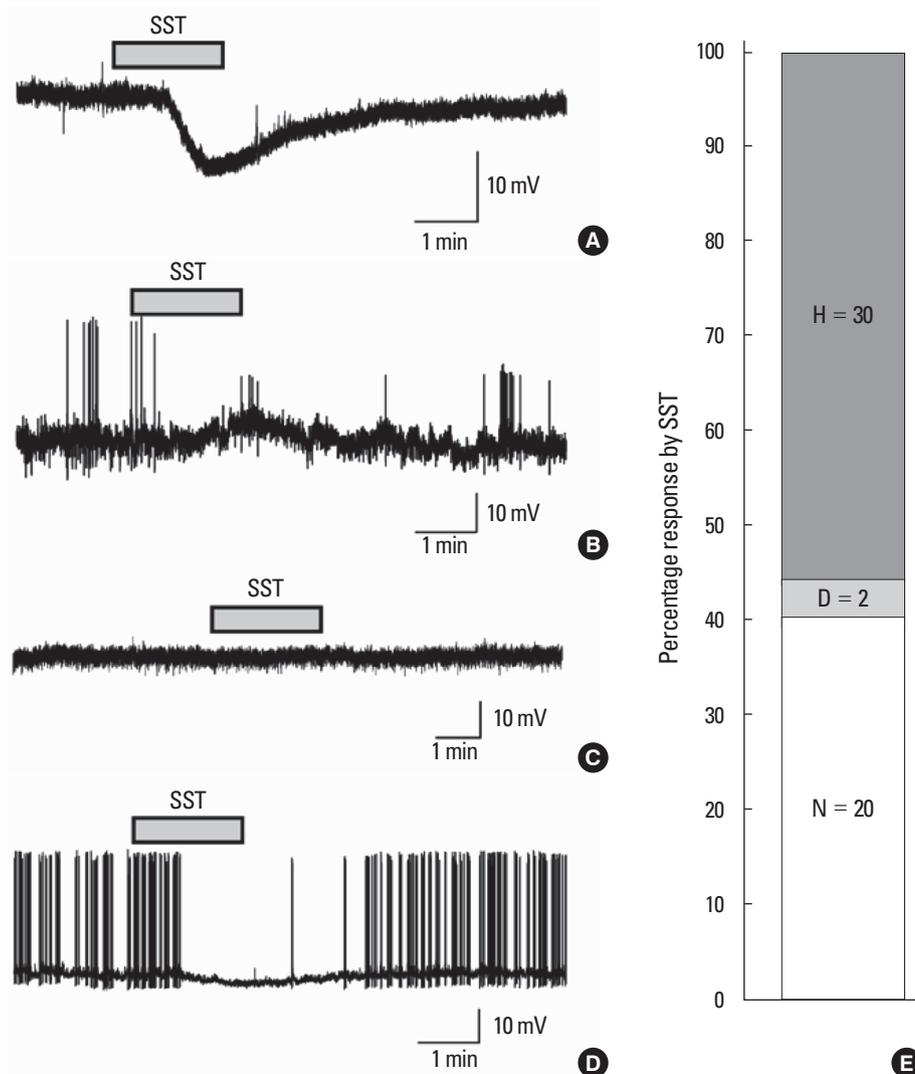


Fig. 1. Effects of somatostatin (SST) on juvenile gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons in mice at gramicidin perforated current clamp mode. Representative traces showing membrane hyperpolarization (A. PND18, RMP = -72 mV), membrane depolarization (B. PND28, RMP = -63 mV), no response (C. PND28, RMP = -55 mV) and surcease of action potential followed by membrane hyperpolarization (D. PND14, RMP = -62 mV) by bath application of 300 nM SST. E. Stag column showing percentage response by SST (H, hyperpolarization; N, no response; D, depolarization).

연구 결과

Gramicidin perforated-patch recording 방법으로 내측중격(medial septum) 또는 원주시각교차암구역(rostral preoptic area)에서 총 72개의 GnRH 신경세포에서 막전압의 변화를 기록하였다. 안정막전위(resting membrane potential, RMP)는 수컷의 경우 -59.1 ± 1.20 mV ($n = 32$), 암컷의 경우 -59.9 ± 1.16 mV ($n = 40$)로 암, 수 간 안정막전위는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(PND7-29).

1. GnRH 신경세포에서 SST에 의한 반응성

Current clamp mode에서 300 nM SST 적용 시 세포막 과분극(Fig. 1A), 세포막 탈분극(Fig. 1B), 무반응(Fig. 1C) 및 자발적인 활동전위 감소를 동반한 과분극(Fig. 1D) 등이 관찰되었다. 반응 비율을 볼 때, SST 적용에 의해 다수(57.7%, 30/52)의 기록된 GnRH 신경세포에서 -5.37 ± 0.49 mV ($n = 30$)의 과분극이 유발되었다(Fig. 1A, D). 기록

된 52개의 세포 중 2개(4%)의 GnRH 신경세포에서 세포막 탈분극(2.53 ± 0.30 mV, $n = 2$)이 유발되었으며, 나머지 20개(38.5%)의 세포에서는 SST에 의해 유의한 반응성이 관찰되지 않았다. 자발적인 활동전위를 보이는 신경세포에서 SST에 의해 유도되는 과분극은 자발적인 활동전위의 현저한 감소를 동반하였다(Fig. 1D). Figure 1E는 SST에 의한 과분극(H), 탈분극(D) 및 무반응(N)의 비율을 보여주고 있다. SST에 의한 과분극 반응이 농도의존성을 보이는지 확인하기 위해 10-300 nM SST를 단계적으로 적용하였다. Figure 2A는 각 농도에서 보이는 막전압 과분극의 대표적인 예를 보여주고 있다. 농도가 증가될수록 과분극 정도가 증가되는 양상을 보여주고 있으며, Figure 2B는 각 농도에서 보이는 과분극의 평균값을 보여주고 있다($n = 10$).

Figure 3은 SST에 의한 반응성에 있어서 성별의 차이가 나타나는지 비교한 그래프이다. 미성숙 수컷의 경우, 24개의 신경세포 중 2개(50%)의 신경세포에서 -4.53 ± 0.59 mV ($n = 12$)의 과분극이 유발

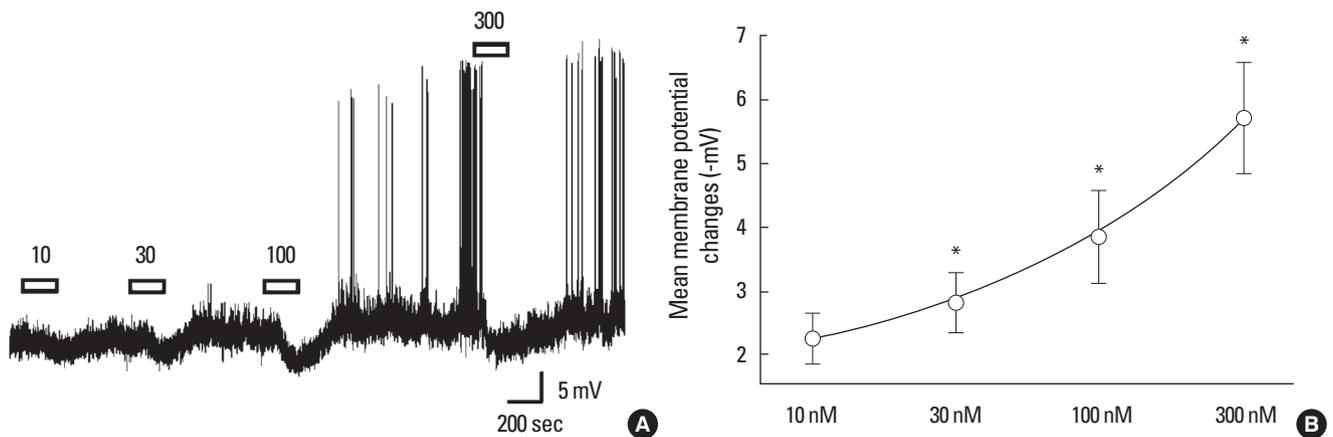


Fig. 2. Concentration-dependent hyperpolarizing effect of SST on juvenile GnRH neurons. A. Representative trace showing concentration dependent membrane hyperpolarization by application of 10, 30, 100, and 300 nM SST (PND28, RMP = -62.0 mV). B. Concentration-response relationship. *represents $P < 0.05$.

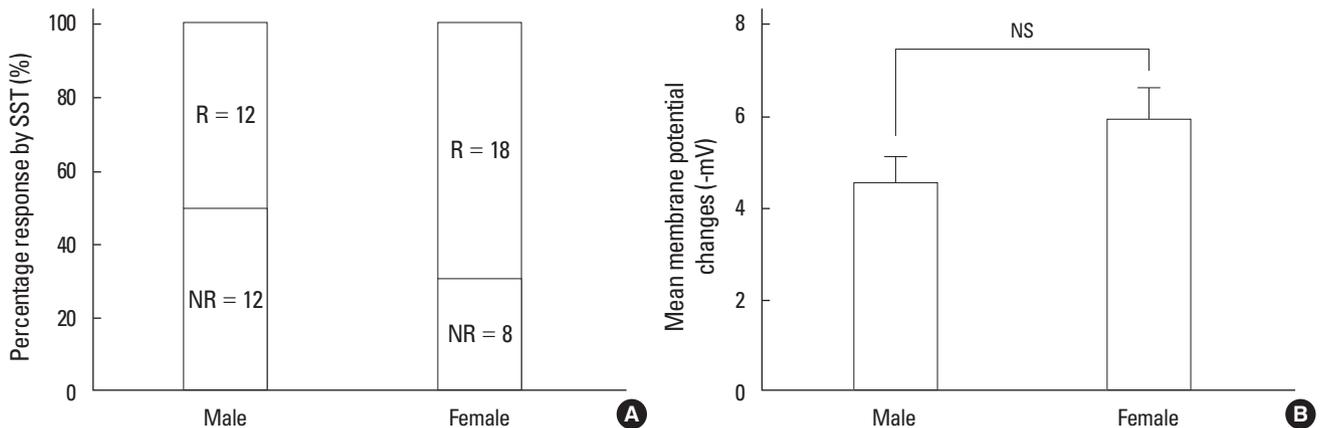


Fig. 3. A. Percentage response by 300 nM SST in juvenile males and females. R, responded; NR, not responded. B. Comparison of the mean membrane potential changes between males and females by 300 nM SST. Found no significant difference ($P > 0.05$; one way ANOVA).

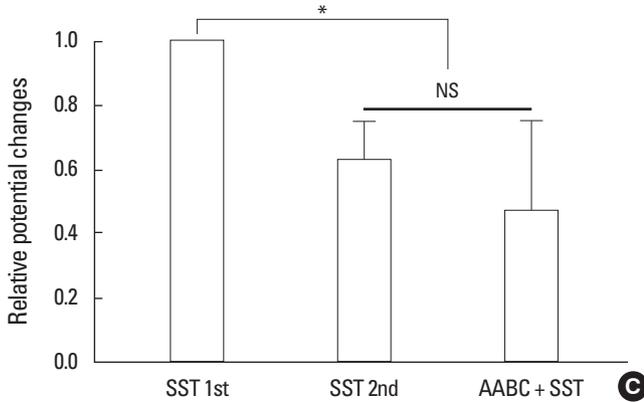
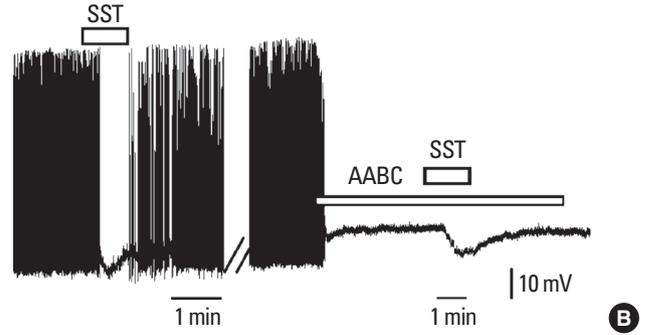
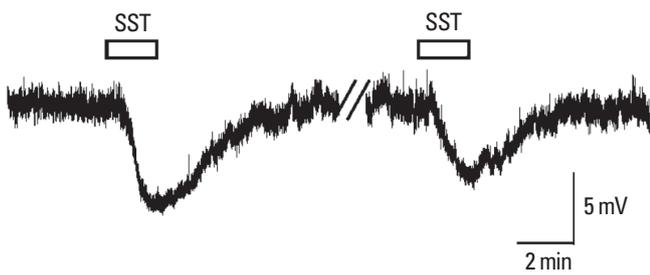


Fig. 4. SST acts on the postsynaptic GnRH neurons directly. A. A representative trace showing hyperpolarization by successive application of 300 nM SST (PND27, RMP = -57.3 mV). Break bar depicts a time interval of 15-20 minutes. B. A representative trace showing hyperpolarization by SST and remains persisted in the presence of amino acid blocking cocktail (AABC) including AP-5 (20 μM, an NMDA receptor antagonist), CNQX (10 μM, a non-NMDA glutamate receptor antagonist), picrotoxin (50 μM, a GABA_A receptor antagonist), and strychnine (2 μM, a glycine receptor antagonist) with TTX (0.5 μM, a voltage-gated Na⁺ channel blocker) in a juvenile GnRH neuron resting at -59.6 mV. PND29. C. Relative potential changes of the 2nd response and response in the presence of AABC. * and NS represent *P* < 0.05 and not significant, respectively (one sample *t*-test).

되었으며, 암컷의 경우 26개의 세포 중 18개(69%)의 세포에서 -5.93 ± 0.69 mV ($n = 18$)의 과분극이 유발되었다(Fig. 3). 그러나 암컷과 수컷에서 SST에 의한 반응성의 비율, 막전압의 변화 및 안정막전위는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

2. GnRH 신경세포에 SST의 작용부위 조사

미성숙 마우스 GnRH 신경세포에서 SST 반복 적용 시 탈감작 유무를 평가하고자, 반복적 300 nM의 SST를 적용하여 그 반응 정도를 비교하였다. Figure 4A는 SST 반복적용에 의한 과분극을 보이는 세포들의 대표적인 막전압의 변화를 보여주고 있다. Figure 4C에서 보이는 바와 같이 SST 연속 적용 시 첫 번째 적용에 의해 나타나는 반응에 대한 두 번째 적용시의 상대적인 반응은 0.63 ± 0.12 ($n = 13$)로 첫 번째 반응에 비하여 통계적으로 유의한 감소를 보였다. SST가 GnRH 신경세포에 직접적으로 작용하는지를 조사하고자, 막전압 의존성 나트륨 통로 차단제인 tetrodotoxin (TTX)과 시냅스전 신경말단에서 분비된 glutamate, GABA, glycine에 의해 매개되는 가능성을 배제하기 위해, AP-5 (NMDA glutamate 수용체 길항제), CNQX (non-NMDA glutamate 수용체 길항제), picrotoxin (GABA_A 수용체 길항제), strychnine (glycine 수용체 길항제)를 포함하는 amino acid blocker cocktail (AABC)을 전처치한 상태에서 SST의 반응성을 조사하였다. SST 단독 적용시 과분극을 나타낸 모든 신경세포들은 AABC 존재 하에서도 세포막 과분극을 유발하였다(Fig. 4B). 본 결과는 SST가 시냅스 후 GnRH 신경세포에 직접적으로 작용한다는 간접적

인 증거를 제시하고 있다. Figure 4C에서 보이는 바와 같이 SST 단독 적용 시 나타난 과분극 반응에 대한 AABC 존재 하에서 SST 적용에 의해 나타나는 과분극 반응의 상대적인 값은 0.47 ± 0.27 ($n = 4$)로 통계적으로 유의한 감소를 보였다.

3. SSTR2를 매개로 한 억제성 반응

Figure 5A는 GnRH 신경세포에서 3회에 걸쳐 총 26개의 세포내용물을 추출하여 single cell RT-PCR을 수행하여 얻은 SSTR2 mRNA 발현 양상으로 1차 시도의 예를 보여주고 있다(1차 시도, 5/8; 2차 시도, 1/6; 3차 시도, 4/12). 총 26개의 형광을 발하는 세포 중 10개(38.5%)에서 SSTR2 mRNA가 발현되었다. SSTR2 mRNA 발현 비율은 SSTR3 ($n = 5$, 19.2%)과 SSTR4 ($n = 3$, 11.5%) mRNA 발현 정도는 보다 높았으며, 따라서 SSTR2가 미성숙 GnRH 신경세포에서 주로 발현하고 있으며, SST-매개 신호전달에 기여할 수 있음을 시사한다. Figure 5B는 SSTR2 효능제인 seglitide (SEG, 1 μM)를 적용하였을 때 나타나는 과분극 반응의 대표적인 예를 보여주고 있다. SEG 적용 시 23개의 세포 중 11개(47.8%)의 미성숙 GnRH 신경세포에서 -7.67 ± 1.39 mV ($n = 11$, RMP = -63.5 ± 2.47 mV)의 과분극이 유발되었고, 나머지 12개의 세포 중 11개(47.8%)의 세포는 SST에 의해 유의한 반응성이 관찰되지 않았으며, 1개의 세포에서 3.7 mV의 탈분극이 유발되었다. 이러한 SEG-매개 과분극 반응이 시냅스 후 신경세포에 직접적으로 작용하여 나타나는 반응인지를 조사하기 위하여 AABC가 존재하는 상태에서 SEG를 적용하였다. Figure 5C에서 보이는 것처럼

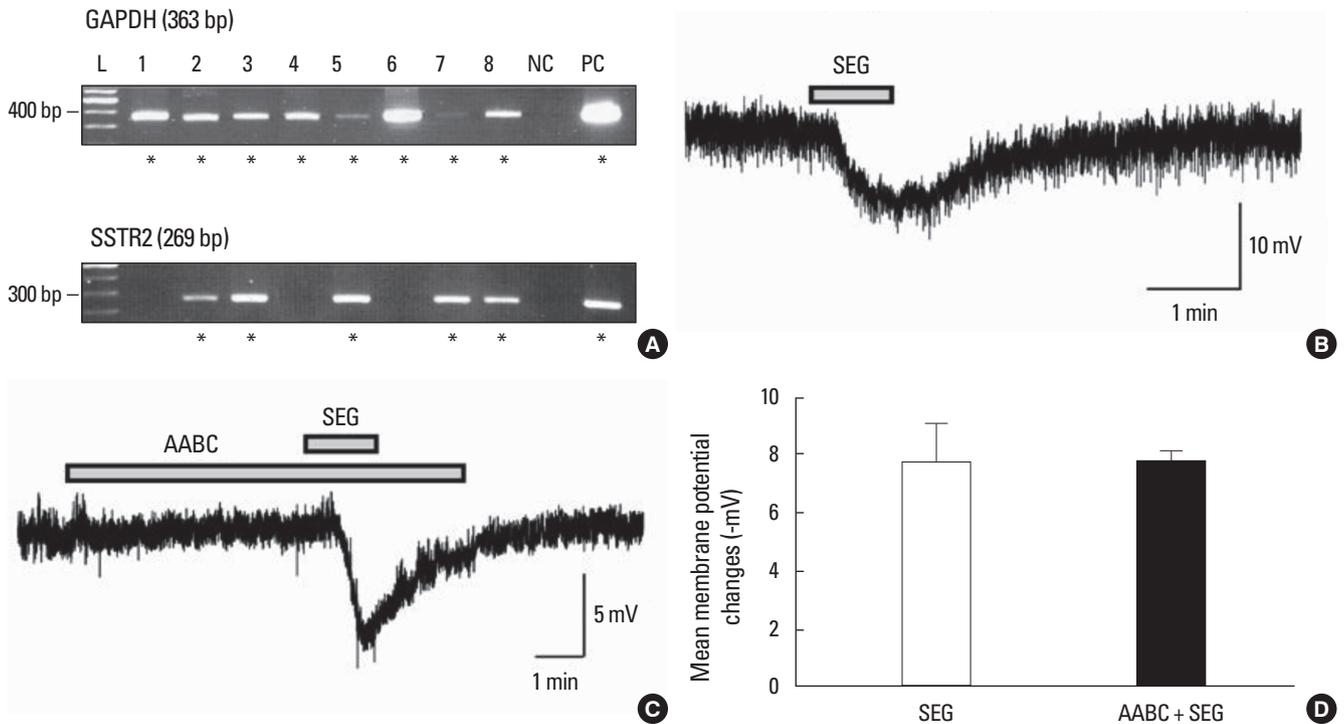


Fig. 5. A. An example of SSTR2 mRNA expression on GnRH neurons. GAPDH, a housekeeping gene was used to conform the harvested GnRH neurons ($n = 8$). L (100 bp ladder), 1-8 (harvested GnRH neurons), NC (negative control, harvested GnRH neurons reacted without reverse transcriptase), PC (positive control, cDNA of total brain extract). B. A representative trace showing hyperpolarization by seglitide (SEG) ($1 \mu\text{M}$), a SSTR2 agonist from a GnRH neuron resting at -70 mV depicting mimicry of SST-induced membrane hyperpolarization (PND28). C. A representative traces showing hyperpolarization by SEG in the presence of AABC. PND13, RMP = -72 mV . D. Bar graph showing the mean membrane hyperpolarization to SEG ($1 \mu\text{M}$) and with AABC ($P > 0.05$).

SEG에 의한 과분극 반응은 AABC가 존재하는 상태에서도 $-7.76 \pm 0.37 \text{ mV}$ ($n = 3$, RMP = $-67.33 \pm 2.90 \text{ mV}$)의 과분극이 관찰되었다. SEG-매개 과분극 반응과 AABC가 존재하는 상태에서 SEG 적용 시 관찰되는 과분극 반응은 유의한 차이가 보이지 않았으며(Fig. 5D), 이는 시냅스 후 신경세포에 존재하는 SSTR2가 기능적으로 발현함을 시사하고 있다.

고찰

Gramicidin은 1가 양이온 만을 투과할 수 있는 pore를 형성함으로써, 세포내 Cl^- , Ca^{2+} 및 2차 전달자 시스템을 그대로 유지한 상태에서 이온통로의 기능적인 역할을 규명할 수 있는 whole cell mode에서 기록하는 방법과 같이 세포막 전체 이온통로의 활성을 기록할 수 있는 장점이 있다[12]. SST는 G-단백과 연계된 수용체에 결합하여 세포내 2차 전달계를 매개로 하여 특정효과를 나타내기 때문에 G-단백매개수용체에 작용하는 경우, 일반적인 whole cell mode보다는 gramicidin 등을 이용한 perforated-patch clamp 방법이 아주 유용한 것으로 보고되었다[13]. 따라서, 본 연구에서도 gramicidin perforated-patch clamp 기법을 이용하여 미성숙 마우스 시상하부 GnRH 신경세포에서 SST를 적용한 결과 58% (30/52)의 GnRH 신경

세포가 과분극되어 활성이 억제됨을 관찰하였다.

SST에 의한 세포활성 억제효과는 랫드의 척수후각[14,15], 삼차신경절[16], 해마신경[17,18], 연수후각[19] 등 다양한 신경세포에서 보고된 바 있다. 최근, Bhattarai 등[10]은 SST (300 nM)가 성체 마우스에서 기록된 GnRH 신경세포 중 68% (47/69)에서 과분극을 유발하였고, 본 연구에서 얻어진 미성숙 GnRH 세포에서는 58% (30/52)에서 과분극을 유발하였다. 미성숙 GnRH 신경세포에서 과분극을 유발하는 정도가 약간 낮았으나 통계적으로는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 몇몇 보고에 의하면 성장과정에 따른 호르몬 분비의 변화와 성별에 따른 차이에 대한 연구가 보고되었다[7-9]. 그러나 Bhattarai 등[10]은 외인성 SST에 의한 성체 GnRH 신경세포에서 수컷($n = 27$, 68%)과 암컷($n = 20$, 69%)에서 각각 $-5.9 \pm 0.6 \text{ mV}$ 와 $-6.1 \pm 0.9 \text{ mV}$ 의 과분극이 유도되었고 성별에 따른 외인성 SST 적용에 의한 과분극 유발비율의 차이는 없다고 보고하였다. 본 연구에서는 외인성 SST 적용에 의한 미성숙 GnRH 신경세포에서 과분극 유발비율이 수컷에서는 50% 그리고 암컷에서는 69%로 암컷에서 더 높은 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지는 않아 SST에 의한 반응성이 성별에 따른 차이가 없음을 시사하고 있다. 성체 GnRH 신경세포에서 관찰되지 않았지만 미성숙 GnRH 신경세포에서 관찰된 탈분극 현상에 대한 별도의 해석이 요구되거나 반응비율이 너무

낮아 추가적인 실험은 진행되지 못하였다.

일반적으로 G-단백매개 수용체는 효능제에 지속적 노출 시 음성 피드백 조절기전에 의한 탈감작을 야기시키는 것으로 보고되고 있으며[20,21], 이러한 현상은 G-protein-coupled receptor (GPCR) kinase [22,23] 또는 protein kinase A 혹은 C와 같은 2차 전달자 의존적 kinase [24-26]를 통한 수용체의 인산화에 기인하는 것으로 알려져 있다. SST 수용체의 탈감작은 표피[27], 랫드의 해마 배양신경세포 [28], 랫드의 신피질 신경세포[29] 등 다양한 세포에서 보고되었다. 본 연구에서는 미성숙 마우스 GnRH 신경세포에서 SST의 연속적용이 탈감작 현상이 유발되는지를 관찰하였는데, 두 번째 SST를 적용한 결과 평균 과분극 막전압 변화의 비율이 첫 번째 반응의 63%로 감소하여 타 세포에서처럼 마우스 미성숙 GnRH 신경세포에서 SST에 의한 탈감작 현상이 있음을 시사하고 있다. Figure 5B처럼, TTX, AP-5, CNQX, picrotoxin, strychnine이 섞인 AABC용액을 적용하여 막전압 의존성 나트륨통로, ionotropic glutamate 수용체, GABA_A 수용체, 그리고 glycine 수용체를 억제한 상태에서의 SST 효과는 AABC 용액 처치가 없는 조건에 비해 47% 정도의 반응성을 보였는데, SST에 의해 유발된 세포막의 과분극이 흥분성 및 억제성 신경전달을 차단하고자 적용했던 AABC 용액에 의해서 억제되었다고 단정하기는 어려운데, 이는 Figure 4A와 C에서처럼 SST의 반복적용에 의한 SST 수용체의 탈감작 특성에 기인한 것으로 추정할 수 있다. 또한 Figure 3에서 보여주듯이, SST 수용체가 반복 적용으로 탈감작 될 수 있다 하더라도 SST에 의해 유발된 세포막 과분극은 농도 의존성을 보여 주었다. 이러한 결과들은 SST가 세포체나 수상돌기에 있는 SST 수용체에 직접적으로 작용하여 과분극을 유발하였음을 시사한다.

현재까지 SST 수용체는 5종류의 아형(SSTR1-5)이 알려져 있으며 [30-32], 성체 마우스 GnRH 신경세포에는 SSTR2 mRNA가 발현되어 있음을 보고하였다[7]. 따라서, 미성숙 마우스 GnRH 신경세포에서도 유사한 반응을 보이는지를 알아보고자 single cell RT-PCR을 통하여 SSTR2 mRNA의 발현양상을 조사하였고, SSTR2 효능제로 알려진 SEG에 대한 반응성을 조사하였다. SSTR2 mRNA는 수행된 세포의 약 38.5%의 세포에서 발현됨을 확인하였고, SSTR2 효능제인 SEG는 기록된 세포의 약 48%에서 SST에 의해 유발된 세포막 과분극과 유사한 반응을 유발하였다. 수용체 mRNA 발현비율이 전기생리학적 방법에 의해 나타나는 반응 비율보다 약간 낮게 관찰되었다. 이는 세포내용물 추출 과정에서 생길 수 있는 mRNA degradation 가능성으로 해석될 수 있다. 이는 미성숙 마우스 GnRH 신경세포에서도 SSTR2 mRNA 발현 및 수용체 효능제에 대한 반응으로서 SSTR2가 GnRH 신경세포에 기능적으로 발현하고 있음을 시사하고 있다.

GnRH 신경세포는 발생과정 중 시상하부로 이주하는 특성 때문에 다른 신경세포들과는 다른 특성을 지니고 있으며 번식기능을 조

절하는 시상하부-뇌하수체-성선축(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG axis) 조절에 중추적인 역할을 수행하며, 생리학적으로 발생, 성장 및 생식 등에 관여한다[33-35]. 따라서 본 연구의 결과들은 중추신경계 내에서 중요한 신경조절 패턴으로, 성장호르몬, 인슐린, 글루카곤, 프로락틴 및 성선자극호르몬 등의 분비를 조절하는 할 수 있는 SST가 뇌하수체 수준에서 reproductive axis를 조절하는데 중요한 역할을 수행할 수 있음을 시사한다. 결론적으로, 본 연구는 외인성 SST가 주로 미성숙 GnRH 신경세포의 활성을 억제하고, 이러한 반응은 미성숙 GnRH 신경세포에 기능적으로 존재하고 있는 SSTR2를 매개로 함을 보여주고 있으나 성별에 따른 반응성의 차이는 없음을 시사하고 있다.

요 약

배경: 성선자극호르몬 유리호르몬(GnRH) 신경세포는 생식기능 조절의 핵심 중추이며, 소마토스타틴(SST)은 뇌하수체 수준에서 reproductive axis를 조절하는 것으로 알려져 있다. 본 연구를 통해 미성숙 마우스 GnRH 신경세포에서 SST의 반응양상 및 성별에 따른 반응성의 차이를 비교하였다.

방법: 미성숙 GnRH 신경세포에서 gramicidin perforated-patch clamp 방법을 이용하여 SST의 반응성을 조사하고, single cell RT-PCR 방법을 통한 SSTR2 mRNA 발현 양상의 조사 및 효능제를 이용하여 그 기능적 발현을 조사하였다.

결과: 기록된 미성숙 GnRH 신경세포에서 SST는 주로 세포막 과분극을 유발하였고, 과분극 반응의 경우 농도 의존적인 반응을 보였다. SST에 의한 반응양상에서 성별에 대한 차이는 관찰되지 않았다. SST는 흥분성 미성숙 GnRH 신경세포에서 SSTR2 mRNA가 발현되었으며, 효능제인 seglitide에 의해 SST와 유사한 과분극이 관찰되었다.

결론: 본 연구결과는 외인성 SST가 SSTR2를 매개로 시상하부 미성숙 GnRH 신경세포활성을 억제하나 성별에 따른 차이는 없음을 시사하고 있다.

참고문헌

1. Herbison AE: GnRH neuron. In: Henry H, Norman A eds. Encyclopedia of hormones. pp171-177, San Diego, Academic Press, 2003
2. Yu WH, Kimura M, McCann SM: Effect of somatostatin on the release of gonadotropins in male rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 214:83-86, 1997
3. Starcevic V, Milosevic V, Brkic B, Severs WB: Somatostatin affects morphology and secretion of pituitary luteinizing hormone (LH) cells in male rats. *Life Sci* 70:3019-3027, 2002
4. Prelevic GM, Wurzbarger MI, Balint-Peric L, Nescic JS: Inhibitory effect of sandostatin on secretion of luteinising hormone and ovarian steroids in polycystic ovary syndrome. *Lancet* 336:900-903, 1990

5. Pillon D, Caraty A, Fabre-Nys C, Lomet D, Cateau M, Bruneau G: Regulation by estradiol of hypothalamic somatostatin gene expression: possible involvement of somatostatin in the control of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod* 71:38-44, 2004
6. Van Vugt HH, Swarts HJ, Van de Heijning BJ, Van der Beek EM: Centrally applied somatostatin inhibits the estrogen-induced luteinizing hormone surge via hypothalamic gonadotropin-releasing hormone cell activation in female rats. *Biol Reprod* 71:813-819, 2004
7. Herbison AE: Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302-330, 1998
8. Flanagan-Cato LM: Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. *Front Neuroendocrinol* 21:309-329, 2000
9. Robinson JE, Birch RA, Grindrod JA, Taylor JA, Unsworth WP: Sexually differentiated regulation of GnRH release by gonadal steroid hormones in sheep. *Reprod Suppl* 61:299-310, 2003
10. Bhattarai JP, Kaszas A, Park SA, Yin H, Park SJ, Herbison AE, Han SK, Abraham IM: Somatostatin inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons in female and male mice. *Endocrinology* 151:3258-3266, 2010
11. Rozen S, Skaletsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz S eds. *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. pp365-386, Totowa, Humana Press, 2000
12. Rhee JS, Ebihara S, Akaike N: Gramicidin perforated patch-clamp technique reveals glycine-gated outward chloride current in dissociated nucleus solitarii neurons of the rat. *J Neurophysiol* 72:1103-1108, 1994
13. Han SK, Herbison AE: Norepinephrine suppresses gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in the adult mouse. *Endocrinology* 149:1129-1135, 2008
14. Mollenholt P, Rawal N, Gordh T Jr, Olsson Y: Intrathecal and epidural somatostatin for patients with cancer. Analgesic effects and postmortem neuropathologic investigations of spinal cord and nerve roots. *Anesthesiology* 81:534-542, 1994
15. Jiang N, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M: Somatostatin directly inhibits substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal dorsal horn in vitro. *Neurosci Res* 47:97-107, 2003
16. Takeda M, Kadoi J, Takahashi M, Nasu M, Matsumoto S: Somatostatin inhibits the excitability of rat small-diameter trigeminal ganglion neurons that innervate nasal mucosa and project to the upper cervical dorsal horn via activation of somatostatin 2a receptor. *Neuroscience* 148:744-756, 2007
17. Pittman QJ, Siggins GR: Somatostatin hyperpolarizes hippocampal pyramidal cells in vitro. *Brain Res* 221:402-408, 1981
18. Moore SD, Madamba SG, Joels M, Siggins GR: Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. *Science* 239:278-280, 1988
19. Yin H, Lee KE, Park SA, Bhattarai JP, Suh BJ, Jeon JG, Kim BG, Park SJ, Han SK: Inhibitory effects of somatostatin on the substantia gelatinosa neurons of trigeminal subnucleus caudalis via somatostatin type 2 receptors in juvenile mice. *Brain Res* 1304:49-56, 2009
20. Lefkowitz RJ: G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273:18677-18680, 1998
21. Bohm SK, Grady EF, Bunnnett NW: Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322 (Pt 1):1-18, 1997
22. Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ: Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J* 9:175-182, 1995
23. Horie K, Insel PA: Retrovirally mediated transfer of a G protein-coupled receptor kinase (GRK) dominant-negative mutant enhances endogenous calcitonin receptor signaling in Chinese hamster ovary cells. GRK inhibition enhances expression of receptors and receptor mRNA. *J Biol Chem* 275:29433-29440, 2000
24. Yoon SH, Jin W, Spencer RJ, Loh HH, Thayer SA: Desensitization of delta-opioid-induced mobilization of Ca²⁺ stores in NG108-15 cells. *Brain Res* 802:9-18, 1998
25. Kramer HK, Simon EJ: Role of protein kinase C (PKC) in agonist-induced mu-opioid receptor down-regulation: I. PKC translocation to the membrane of SH-SY5Y neuroblastoma cells is induced by mu-opioid agonists. *J Neurochem* 72:585-593, 1999
26. Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, Luttrell LM, Cong M, Lefkowitz RJ, Rockman HA: Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem* 278:35403-35411, 2003
27. Holliday ND, Tough IR, Cox HM: A functional comparison of recombinant and native somatostatin sst2 receptor variants in epithelia. *Br J Pharmacol* 152:132-140, 2007
28. Young Shim E, Jung Kim H, Kim MJ, Rhie DJ, Jo YH, Kim MS, June Hahn S, Lee MY, Yoon SH: Desensitization of somatostatin-induced inhibition of low extracellular magnesium concentration-induced calcium spikes in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1111:61-71, 2006
29. Wang HL, Dichter M, Reisine T: Lack of cross-desensitization of somatostatin-14 and somatostatin-28 receptors coupled to potassium channels in rat neocortical neurons. *Mol Pharmacol* 38:357-361, 1990
30. Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, Reisine T: Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16:86-88, 1995
31. Patel YC: Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157-198, 1999
32. Schonbrunn A, Gu YZ, Dournard P, Beaudet A, Tannenbaum GS, Brown PJ: Somatostatin receptor subtypes: specific expression and signaling properties. *Metabolism* 45:8-11, 1996
33. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW: The migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. *Experientia* 46:956-962, 1990
34. Han SK, Abraham IM, Herbison AE: Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Endocrinology* 143:1459-1466, 2002
35. Han SK, Todman MG, Herbison AE: Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 145:495-499, 2004