

주골반 자율신경절에서 세로토닌
수용체의 특성

연세대학교 대학원
의 학 과
차 승 규

주골반 자율신경절에서 세로토닌
수용체의 특성

지도 공 인 덕 교수

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

차 승 규

차승규의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

감사의 글

나의 나 된 것은 오로지 하나님의 은혜입니다. 부족한 사람이 작은 결실을 맺었습니다. 내 능력으로 맺은 것이 아님을 알기에 모든 영광을 하나님께 드립니다.

인내와 사랑으로 늘 이끌어 주신 공인덕 교수님과 삶과 배움에 대한 겸손의 모범을 보여주신 존경하는 이중우 교수님께 깊이 감사를 드립니다. 배움의 길에서 학자의 바른 길을 보여주신 정성우 교수님과 본 연구를 위해 관심어린 지도와 조언을 해주신 고창만 교수님과 예병일 교수님께 깊이 감사드립니다. 생리학 교실 처음부터 지금까지 늘 힘이 되어주신 박규상 선생님과 함께 동고동락 했던 박병곤 선생님 그리고 생리학 교실 선생님들께도 감사한 마음을 전합니다.

어린 시절부터 절 아껴 주셨던 삼촌 내외분, 고모 내외분께 감사드립니다. 항상 힘이 되는 사랑하는 동생들과 부족한 이를 위해 일생을 말로 할 수 없는 희생과 사랑으로 일관하신 사랑하는 할머니와 어머니께 머리 숙여 감사드립니다. 늘 기도와 사랑으로 분에 넘치게 아껴주시는 아버님, 어머님과 묵묵히 곁에서 큰 힘이 되어 준 사랑하는 아내 하영에게도 감사의 마음을 전합니다.

2004년 12월

저자

차 례

표 차례	iii
그림 차례	iv
국문요약	vi
제1장. 서론	1
제2장. 재료 및 방법	13
2.1. 실험동물	13
2.2. 실험 용액 및 약물	13
2.2.1. 실험 용액	13
2.2.2. 약물	14
2.3. 단일 신경세포 분리 및 유지	14
2.4. 전기생리학적 실험	15
2.5. 세포내 칼슘 이온 농도 측정	15
2.6. 역전사 중합 연쇄반응(RT-PCR)	16
2.7. 자료분석	17
제3장. 결과	24
3.1. 주골반절 신경세포의 전기 생리적 특성	24
3.2. 주골반절 신경세포 종류에 따른 5-HT ₃ 수용체의 특성	30
3.3. 5-HT ₃ 전류의 농도-반응관계 및 5-HT ₃ 수용체 차단제의 효과들	35
3.4. 5-HT ₃ 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘 이온 농도 변화	35
3.5. GABA _B 수용체 활성화가 5-HT ₃ 수용체에 미치는 영향	39
3.6. Adenylyl cyclase와 protein kinase A 억제가 5-HT ₃ 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향	40

3.7. Forskolin이 5-HT ₃ 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향	40
3.8. 5-HT ₃ 및 GABA _B 수용체의 분자생물학적 동정	48
3.9. G-단백질과 관련된 5-HT 수용체들의 분자생물학적 동정	48
3.10. 주골반절 신경세포에서 5-HT ₂ 수용체 활성화가 세포내 칼슘에 미치는 영향	51
3.11. 세포외 칼슘이 5-HT ₂ 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가에 미치는 영향	54
3.12. 비선택적 양이온 통로 차단제가 5-HT _{2B} 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가에 미치는 영향	54
3.13. 5-HT _{2B} 수용체 효현제에 의해 유발된 내향성 전류의 특성	58
3.14. PLC가 5-HT _{2B} 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향	58
3.15. OAG가 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향	61
3.16. 주골반절 신경세포에 발현된 TRPC 통로의 분자생물학적 규명	61
제4장. 고찰	64
4.1. 주골반절 신경세포의 전기생리적 특성	64
4.2. 주골반절 신경세포에서 5-HT ₃ 수용체의 특성 및 조절	65
4.3. 주골반절 신경세포에서 5-HT _{2B} 수용체 활성화에 의한 칼슘 조절	69
제5장. 결론	73
참고문헌	75
영문초록	93

표 차 례

표 1. 골반장기에 분포하는 자율신경의 생리적 기능	3
표 2. Metabotropic 5-HT 수용체의 신호전달 요약	6
표 3. 5-HT 수용체의 역전사 중합 연쇄반응에 사용된 primer들	22
표 4. GABA _B 수용체 및 TRPC 통로 역전사 중합 연쇄반응에 사용된 primer들 ...	23
표 5. 주골반절 신경세포들의 전기생리적 특성 요약	27

그림 차례

그림 1. 수컷 흰쥐 주 골반 신경절(major pelvic ganglion)의 해부 및 구조	18
그림 2. 주골반 신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견	19
그림 3. 막전압 고정법에 의한 전류측정 장치의 모식도	20
그림 4. 세포 내 칼슘이온농도 측정을 위한 형광측정장치 모식도	21
그림 5. 주골반절 신경세포의 활동전압 및 방전 패턴(firing pattern)	28
그림 6. 주골반절 신경세포의 입력저항 및 세포막 용량과의 관계	29
그림 7. 주골반절 세포에서 GABA와 5-HT에 의한 세포내 칼슘 변화	32
그림 8. 주골반절 신경세포 종류에 따른 GABA _A 및 5-HT ₃ 수용체 전류	33
그림 9. 5-HT가 주골반절 신경세포의 막 전압 및 전류에 미치는 효과	34
그림 10. 5-HT에 의해 활성화된 전류의 농도-반응 관계	36
그림 11. 5-HT에 의해 활성화된 전류에 대한 5-HT ₃ 수용체 차단제 효과	37
그림 12. 막전류 및 전압고정 상태에서 5-HT에 의한 세포내 칼슘 이온 농도 변화	38
그림 13. GABA _B 수용체 활성이 5-HT에 의한 전류 및 탈분극에 미치는 영향	42
그림 14. GABA _B 수용체 활성이 5-HT ₃ 전류에 미치는 영향	43
그림 15. GABA _B 수용체 차단제가 balcofen의 억제효과에 미치는 영향	44
그림 16. GABA _B 수용체 활성이 5-HT에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향	45
그림 17. Adenylyl cyclase와 PKA가 5-HT에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향	46
그림 18. Forskolin이 5-HT에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향	47
그림 19. 주골반절에 발현된 5-HT ₃ 및 GABA _B 수용체의 분자생물학적 동정	49
그림 20. 주골반절에 발현된 metabotropic 5-HT 수용체의 분자생물학적 동정	50
그림 21. 5-HT _{2B} 수용체 활성이 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향	52
그림 22. 5-HT _{2B} 수용체 차단제가 5-HT _{2B} 에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향	53

그림 23. 세포의 칼슘이 5-HT _{2B} 에 의한 세포내 칼슘 이온 농도 변화에 미치는 효과	56
그림 24. 비선택적 양이온통로 차단제가 5-HT _{2B} 에 의한 세포내 칼슘 이온 농도 변화에 미치는 효과	57
그림 25. 5-HT _{2B} 수용체 활성화에 의해 유발된 내향성 전류의 특성	59
그림 26. PLC가 5-HT _{2B} 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가에 미치는 영향	60
그림 27. OAG가 세포내 칼슘에 미치는 효과	62
그림 28. 주골반절에 발현된 TRPC 통로의 분자 생물학적 동정	62

국문요약

주골반 자율신경절에서 세로토닌 수용체의 특성

세로토닌(serotonin, 5-hydroxytryptamin, 5-HT)과 그 수용체는 중추 및 말초신경계 모두에 존재하며, 신경 활성화 및 신경전달물질 유리 등의 조절에 중요한 역할을 담당한다. 또한 리간드(ligand)에 의해 활성화 되는 통로와 G-단백질과 연결된 수용체들 간의 상호 작용이 신경의 기능의 조절에 매우 중요하다. 골반 신경절은 방광, 음경 등 다양한 비노생식 기관의 신경 지배를 담당하며 생리적으로 배뇨나 발기 반사와 같은 중요한 기능을 조절한다. 5-HT는 골반 신경절의 일부 신경세포에 존재하며, 신경세포를 탈분극시키거나 신경절 내의 시냅스 전달을 억제한다고 알려져 있다. 하지만 현재 골반 신경절에서 5-HT의 작용기전에 관해서는 세포 및 분자 수준에서 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 첫째, 이온통로 기능을 하는 5HT₃ 수용체의 특성을 확인하고, 둘째, GABA_B 수용체에 의한 5HT₃ 수용체 조절의 신호전달 과정을 확인하고, 셋째, G-단백질과 연결된 5HT₂ 수용체를 통한 세포내 칼슘 조절 기전 중 일부를 규명하고자 하였다. 이를 위하여 수컷 쥐 주골반 신경절(major pelvic ganglia, MPG) 세포에서 패치 클램프(patch clamp)와 형광 칼슘 측정 기술을 사용하여 5-HT 수용체 활성화가 막전압과 및 막전류 및 세포내 칼슘([Ca²⁺])에 미치는 효과를 관찰하였다.

역전사 중합 연쇄반응 분석으로 주골반 신경에는 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{3A}, 5HT_{3B} 및 5HT₄₇ 등 다양한 5HT 수용체가 발현되어 있음을 확인하였다. 5-HT(10 μM)는 내향성 전류를 유발하는 동시에 [Ca²⁺]을 증가시켰으며, 이러한 작용들은 5-HT₃ 수용체 차단제인 MDL7222(1 μM)와 Y25130(10 μM)에 의해 완전히 차단되었다. GABA_B 수용체의 효현제인 baclofen(10 μM)은 5-HT₃에 의한 여러 반응들을 억제하였으며, GABA_B 수용체 차단제인 CGP35348(10 μM)을 전처치 하였을 경우 baclofen에 의한 효과가 소실되었다. 5-HT₃ 수용체 활성화에 의한 [Ca²⁺] 증가가 adenylyl cyclase(AC) 억제제인 SQ 22536(200 μM)과 PKA 억제제(100 nM)에 의해 감소되었으며, 이러한

AC/PKA 경로 차단 효과는 badofen의 효과와 일치하였다. 한편, AC/PKA 경로 활성화제인 forskolin(1 μ M)은 5-HT에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화를 증가시켰다. 이상의 결과로부터 주골반절 신경세포에서 GABA_B 수용체는 AC/PKA 의존적 경로를 통하여 5-HT₃ 수용체를 조절함을 알 수 있었다.

교감 및 부교감 신경세포에서 5-HT와 5-HT_B 수용체 효현제인 BW723C8610 (μ M)은 $[Ca^{2+}]_i$ 을 증가시켰으며, 이러한 증가는 5-HT_B 수용체 차단제인 SB204741(10 μ M)에 의해 소실되었다. 세포외액 내에 칼슘 이온을 제거하였을 경우에는 5-HT_B 활성화에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 나타나지 않았다. 5-HT_B에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 비선택적 양이온통로 차단제, Gd³⁺(10 μ M) 및 La³⁺(100 μ M), PLC 억제제(U73122, 1 μ M)에 의해 현저히 억제되었으나, U73122의 유사체로 PLC를 억제하지 않는 U733431 (μ M) 전처치에 의해서는 영향을 받지 않았다. 막전압고정법 하에서 BW723C8610 (μ M)는 내향성 전류를 유발하였으며, 유발된 전류는 La³⁺에 의해 완전히 차단되었다. 흥미롭게도 세포막 투과가 가능한 DAG 유사체인 OAG(100 μ M)는 세포 외부로부터 칼슘 유입을 증가시켰다. 역전사 증합 연쇄반응 분석시 주골반절 신경세포에 TRPC1과 TRPC6 통로가 발현되어 있음이 확인되었다. 이상의 결과들은 5-HT_B 수용체에 연결된 G_{q11}-PLC-DAG 신호전달에 의해 TRPC 통로가 활성화 되어 세포내로 칼슘이 유입됨을 시사한다.

결론적으로 주골반 신경절 세포들에는 여러 종류의 5-HT 수용체들이 기능적으로 발현되어 있으며, 이들 수용체들 중 5-HT₃ 수용체는 주로 부교감 신경세포에서 세포내 칼슘을 증가시켜 세포막의 흥분성을 높였으며, 이러한 기능은 AC/PKA 경로를 통해 조절될 수 있음을 확인하였다. 또한 5-HT_{2B} 수용체 활성화는 교감 및 부교감 신경 세포에서 세포내 칼슘 저장고와는 무관하게 TRPC6를 통해 세포내 칼슘을 증가시켰다. 앞으로 주골반 신경절세포는 5-HT 수용체와 다른 신경전달물질의 수용체 간의 상호작용 연구나 5-HT 수용체 활성화에 의해 TRPC 통로가 조절되는 메커니즘 연구에 좋은 모델이 될 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 주골반 신경절, 5-HT₃ 수용체, 5-HT_{2B} 수용체, TRPC 통로

주골반 자율신경절에서 세로토닌 수용체의 특성

<지도 공 인 덕 교수>

연세대학교 대학원 의학과

차 승 규

제1장 서론

골반총(pelvic plexus)에는 비뇨생식계(urogenital system)를 비롯한 여러 골반 장기를 지배하는 자율신경이 분포한다. 골반 자율신경절(pelvic autonomic ganglia)은 척수와 말초 기관들 간의 구심성(efferent) 및 원심성(afferent) 신호들을 전달함으로써 비뇨생식계의 기능유지에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 특히 남성의 경우에는 자율신경조절에 대한 의존도가 높다고 알려져 있는데, 질환이나 외상으로 인해 비슷한 정도의 자율신경 손상이 있다 하더라도 남성에서는 생식기능 저하가 쉽게 초래되는 반면 여성에서는 임신 및 출산에 지장을 주지 않을 가능성이 높다고 알려져 있다(Dail, 1992). 골반 자율신경절 해부 및 조직학적 특징은 종(species)에 따라 많은 차이가 있으나, 대부분의 종에서는 작게 서로 연결되어진 신경절들이 복잡한 망 구조를 띠고 있다(Bradley 등, 1975; Jänig 및 McLachlan, 1987). 하지만 쥐에서는 그 구조가 비교적 단순하여 여러 자율신경세포들이 하나의 큰 신경절을 이루고 있는데, 수컷 쥐의 경우 이를 주골반 신경절(major pelvic ganglion, 이하 MPG)이라 하고 암컷의 경우에는 자궁경관 신경절(paracervical ganglion) 혹은 Frankenhauser 신경절이라 한다(Langworthy, 1965).

수컷과 암컷의 골반 신경절은 구조 및 기능적인 면에서 여러 차이점들이 있다. 수컷 쥐의 경우 일부 부신경절(accessory ganglia)을 가지고 있으며, 신경절 내 세포 수는 수컷의 골반 신경절에 존재하는 세포의 수(약 30,000개)가 암컷(약 10,000

개)에 비해 월등히 많다. 또한 구심성 입력의 종류 및 신경전달물질의 분포에 있어 차이가 있다고 알려져 있다. 암컷의 자궁경관 신경절은 교감신경 분포가 매우 적고, 대부분 골반신경(pelvic nerve)으로부터 입력을 받는 부교감신경으로 이루어져 있다(Hancock 및 Peveto, 1979; Nadelhaft 및 Booth, 1984; Jänig 및 McLachlan, 1987). 반면 MPG는 하복신경(hypogastric nerve)으로부터 내려온 교감신경과 골반신경으로부터 온 부교감신경이 모두 존재한다. 하복신경은 척수의 상측 요수(rostral lumbar)에서 기시한 구심성 성분의 교감신경 섬유와 하장간막 신경절(inferior mesenteric ganglia) 및 교감 신경절(sympathetic chain)으로부터 오는 원심성 섬유가 함께 포함되어있다(de Groat 및 Booth, 1993). 이와 같이 교감신경과 부교감신경이 같은 신경절 캡슐내에 존재하는 형태는 다른 자율 신경절에서는 찾아볼 수 없는 매우 독특한 형태이다(Dail, 1992; Keast, 1995a; Keast, 1999).

MPG는 방광, 전립선 및 음경등과 같은 비뇨 생식계 기관과 일부의 장(bowel)을 지배하며(Langworthy 1965; Dail 등, 1975; Keast, 1991; De Groat 및 Booth, 1993), 배뇨(micturition)나 발기(erection)와 같은 자율신경 반사를 조절한다(Zoubek 등, 1993). 자율신경계의 활성화는 골반장기에서 매우 다양한 생리적 기능을 담당한다(표 1 참조). 나아가 방광출구 폐쇄(bladder outlet obstruction)나 발기 부전(erection dysfunction)과 같은 병적 상태에서 MPG의 형태적 및 기능적인 변화가 보고 된바 있다(Mills 등, 1992). 따라서 골반 장기의 자율신경계 조절에 관한 생리적 혹은 병태 생리적 연구에 있어서 MPG는 유용한 모델이라 할 수 있다(Keast, 1999).

최근에 MPG에 존재하는 절후(postganglionic) 교감 및 부교감 신경세포를 전기생리학적(electrophysiological) 및 신경화학적(neurochemical) 특성을 기준으로 구분하려는 연구가 일부 시도되고 있다(Zhu 등, 1995). 이러한 분류에서 가장 중요한 기준 중 하나는 낮은 막전압에서 활성화되는 T-형 칼슘이온통로의 존재 유·무이다. 즉 T-형 칼슘통로가 존재하는 세포군에서는 세포의 크기가 비교적 크고 교감신경의 특징 중 하나인 tyrosine hydroxylase와 α_2 아드레날린성 수용체가 잘 발현되어 있는 반면, T-형 칼슘통로가 존재하지 않는 세포군에서는 세포의 크기가

표1. 골반장기에 분포하는 자율신경의 생리적 기능

<i>Tissue</i>	<i>Nerve supply</i>	<i>Effect</i>
<i>Lower Urinary Tract</i>		
- Bladder detrusor (body)	Parasympathetic	Contraction
- Bladder trigone (base)	Parasympathetic	Relaxation
	Sympathetic	Contraction
- Urethra/sphincter	Parasympathetic	Relaxation
	Sympathetic	Contraction
<i>Large Intestine</i>		
- Muscle (non-sphincter)	Parasympathetic	Contraction
- Muscle (sphincter)	Parasympathetic	Relaxation
	Sympathetic	Contraction
- Enteric ganglia	Parasympathetic	Excitation
	Sympathetic	Inhibition
- Blood vessels	Parasympathetic	Dilation
	Sympathetic	Constriction
<i>Reproductive System</i>		
- Smooth muscle ^a	Sympathetic	Contraction
- Smooth muscle ^b	Parasympathetic	Relaxation (non-pregnant)
	Sympathetic	Contraction (non-pregnant) or Relaxation (pregnant)
- Glands	Parasympathetic	Secretion
- Erectile tissue	Parasympathetic	Relaxation/vasodilation/erection
	Sympathetic	Contraction (prevents erection)

^a Vas deference, prostate gland, seminal vesicle

^b uterus, oviducts, vagina

adopted from McLachlan (1995)

작고 VIP(vasointestinal inhibitory peptide), acetylcholinesterase, 및 NADPH diaphorase 등의 발현이 많다는 것이다(Zhu 등, 1995; Zhu 및 Yakel, 1997). 또한 GABA나 neuropeptide Y와 같은 일부 신경전달 물질들의 작용이 교감신경세포에서 선택적으로 나타나는 반면(Kong 등, 2001; Cha 등, 2001), ATP 민감성 K⁺ 전류의 경우에는 부교감신경세포에서만 나타난다고 보고된 바 있다(Park 등, 2002). 하지만 아직까지 두 세포군간의 흥분성 및 여러 신경전달물질들의 작용 상 차이점에 관해서는 폭넓게 연구되지 못한 상태이다.

세로토닌(5-hydroxytryptamin, 이하 5-HT)은 세포막에 있는 수용체를 통해서 다양한 효과들을 나타낸다. 5-HT와 그 수용체는 중추 및 말초신경계와 위장관, 심혈관계 그리고 혈액과 같은 비신경성 조직에 존재한다(Hoyer 등, 2002). 5-HT는 고전적인 신경전달물질 중 하나로 우울증, 공포증, 정신분열증, 두통, 구토, 그리고

과민성 장증후군(irritable bowel syndrome; IBS)과 같은 많은 질환들과 관련이 있다. 5-HT 수용체에는 모두 7개(5-HT₁₋₇)의 과(family)가 존재하며, 이온통로 기능을 하는 수용체인 5-HT₃ 수용체를 제외한 나머지 수용체들은 G-단백질과 관련된 metabotropic 수용체이다(Barns 및 Sharp, 1999; Hoyer 등, 2002; Raymond 등, 2001). 5-HT₁ 수용체는 모두 5 종류(5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F})의 아형(subtype)이 알려져 있으며, 5-HT_{1C} 수용체는 5-HT₂ 수용체들과 구조 및 세포내 신호전달 경로가 유사하여 5-HT₁ 아형에서 5-HT_{2C} 수용체로 재분류 되어졌다(Hoyer 등, 1994). 5-HT₁ 수용체는 공통적으로 G_{i/o}-단백질을 활성화시키고, 활성화된 G_{i/o}-단백질은 adenylyl cyclase(AC)를 억제한다. AC는 ATP에서 cyclic AMP(cAMP)의 생성을 촉진시키고, cAMP는 cAMP-dependent protein kinase(PKA)를 활성화시킴으로써 생리적 기능을 수행하게 된다.

5-HT_{1A} 수용체는 5-HT₁ 수용체 중 그 특성이 가장 잘 알려져 있다(Raymond 등, 2001). 5-HT_{1A} 수용체는 신경-내분비(neuro-endocrine) 기능, 체온조절(Goodwin 등, 1985, 1987; Seletti 등, 1995), 두통(Leone 등, 1998), 면역기능(Iken 등, 1995), 우울증(Blier 등, 1997; Shiah 등, 1998), 기억(Edagawa 등, 1998) 등에 중요한 역할을 한다. 5-HT_{1A} 수용체는 매우 다양한 세포내 신호전달 체계와 연결이 되어있으며(표 2 참조), 또한 여러 이온통로, 효소 및 kinase를 활성화하거나 억제한다. 5-HT_{1A} 수용체는 다른 5-HT₁ 수용체와 마찬가지로 AC를 억제하는 것으로 알려져 있다(Barns 및 Sharp, 1999; De Vivo 및 Maayani, 1986; Hoyer 등, 2002; Weiss 등, 1986). 하지만 5-HT_{1A} 수용체가 모든 세포에서 AC를 억제하는 것은 아니며, 종(species)에 따라 다른 양상을 나타내기도 한다. 예를 들면, 쥐 dorsal raphe 신경의 경우에 5-HT_{1A} 수용체가 많이 발현되어 있음에도 AC를 억제하지 않았지만(Clark 등, 1996), 사람 dorsal raphe 신경에서 forskolin에 의한 AC 활성화를 억제함을 보였다(Palego 등, 1999, 2000). 이와 반대로 5-HT_{1A} 수용체는 해마(Cadogan 등, 1994; Shenker 등, 1987) 및 전립선(Carmena 등, 1998) 등에서 AC를 활성화시켰다. 5-HT_{1A} 수용체는 AC 뿐만 아니라 phospholipase C(PLC) 역시 세포에 따라 활성화 혹은 억제시키며, protein kinase C(PKC), Src kinase 및 mitogen-activated protein(MAP) kinase 등을 활성화시킨다(Raymond 등, 2001;

Wu 등, 2002). 5-HT_{1A} 수용체는 여러 이온통로들에 영향을 미치는데 G-단백질에 의해 활성화되는 K⁺ 통로(GIRK) 및 Ca²⁺-activated Cl⁻ 통로를 활성화시키며 (Andrade 및 Nicoll, 1987; Foehring 등, 2002; Hoyer 등, 2002; Ni 등, 1997), N- 및 P/Q-형의 칼슘 통로와 칼슘-의존적 K⁺(K_{Ca})통로를 억제하였다(Bayliss 등, 1995; Hill 등, 2003; Lin 등, 2001; Wu 등, 2002). 이러한 5-HT_{1A} 수용체에 의한 전압-의존적 칼슘 통로 억제는 세포내 칼슘 신호전달에 중요한 역할을 한다(Ladewig 등, 2004).

5-HT_{1B} 수용체는 5-HT_{1D} 수용체와 상당히 유사하다. 5-HT_{1B} 수용체는 설치류(마우스, 흰쥐, 햄스터)에서 많이 발현되어있으며, 5-HT_{1D} 수용체는 설치류가 아닌 다른 종(사람, 기니피그, 개 등)에 많이 발현되어있다(Barnes 및 Sharp, 1999; Raymond 등, 2001). 5-HT_{1B} 수용체는 pertussis toxin(PTX)에 민감한 G_{i/o}-단백질과 연결이 되어있으며, AC를 억제한다(Barnes 및 Sharp, 1999; Hoyer 등, 2002; Raymond, 2001). 5-HT_{1A} 수용체와 마찬가지로 5-HT_{1B} 수용체 역시 일부의 경우에 cAMP의 증가와 관련이 있다(Albert 등, 1999). 또한 5-HT_{1B} 수용체는 일부 세포에서 PLC와 관련이 있는데, 사람 5-HT_{1B} 수용체를 chinese hamster ovary(CHO) 세포에 이종 발현 시킨 후 활성화하였을 때 G-단백질과 PLC를 통하여 IP₃ 및 세포내 칼슘을 증가시켰다(Dickenson 및 Hill, 1998). 5-HT_{1B} 수용체는 사람 관상동맥 환에서 nitric oxide(NO) 생성을 증가시켰으며(Auch-Schwelk 등, 2000), McDuffie 등 (1999)은 5-HT_{1B} 수용체가 내피세포에서 nitric oxide synthase(NOS)를 활성화시킴을 보고하였다. 또한 5-HT_{1B} 수용체는 신경종말에서 5-HT나 ACh과 같은 신경전달물질의 유리를 억제한다(Barnes 및 Sharp, 1999).

5-HT_{1D} 수용체 역시 PTX에 민감한 G-단백질과 연결이 되어있으며, AC를 억제한다(Barnes 및 Sharp, 1999). 5-HT₁ 수용체 처럼 5-HT_{1D} 수용체도 K⁺ 통로 및 칼슘 통로를 조절한다. C6 glioma 세포에 5-HT_{1D} 수용체를 transfection하였을 때, 5-HT_{1D} 수용체는 K_{Ca} 통로를 활성화하였으며(Le Grand 등, 1998), *Xenopus*의 척수 운동신경에서는 N-형 칼슘통로를 억제하였다(Sun 및 Dale, 1998).

표 2. Metabotropic 5-HT 수용체의 신호전달 요약

Receptor	Common Signaling Linkage	Other signaling linkage	G-protein
5-HT _{1A}	Inhibits AC Activates K ⁺ channels Inhibits Ca ²⁺ conductances Stimulates ERK	Activates PLC Activates NOS Activates NAD(P)H oxidase Activates NHE-1	G _{1α3} > G _{1α2} ≥ G _{0α} ≥ G _{zα}
5-HT _{1B}	Inhibits AC Stimulates ERK	Activates PLC Activates NOS Activates AC2 Activates K ⁺ channels	G _{1α3} > G _{1α1} ≥ G _{1α2} ≥ G _{0α}
5-HT _{1D}	Inhibits AC	Inhibits Ca ²⁺ conductances Activates K ⁺ channels	G _{1α3} & G _{0α}
5-HT _{1E}	Inhibits AC		G _{1α3} & G _{0α}
5-HT _{1F}	Inhibits AC	Activates PLC	G _{1α3} & G _{0α}
5-HT _{2A}	Activates PLC Activates PKC Stimulates ERK Activates PLA ₂	Activates NHE-1 Activates AC2 Inhibits AC Activates Ca ²⁺ channels Activates Jak2/STAT3	G _{qα} & G _{11α} ≥ G _{1α}
5-HT _{2B}	Activates PLC Activates ERK Activates PLA ₂	Activates cell cycle Activates iNOS Activates cNOS	G _{qα} & G _{11α}
5-HT _{2C}	Activates PLC Activates PKC Activates PLA ₂	Activates Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger PDZ motif signals?	G _{qα} & G _{11α}
5-HT ₄	Activates AC Activates PKA	Regulates various channels	G _{sα}
5-ht _{5a}	Inhibits AC		G _{1/o}
5-ht _{5B}	Unknown	Unknown	Unidentified
5-HT ₆	Activates AC Activates PKA		G _{sα}
5-HT ₇	Activates AC Activates PKA	Activates ERK	G _{sα}

Abbreviations; AC, adenylyl cyclase; PLC, phospholipase C; ERK, extracellular signal-regulated kinase; Jak, Janus kinsase; STAT, signal transducers and activators of transcription; NOS, nitric oxide synthase; PDZ, *PS-95 dsccs-large ZO-1*; PKC, protein kinase C; PKA, protein kinsase A.

5-HT_{1D} 수용체는 기니픽의 해마, 전두엽 등에서 자가수용체(autoreceptor)로 작용하여 5-HT 유리를 억제한다(Barns 및 Sharp, 1999; Raymond, 2001). 5-HT_{1E} 및 5-HT_{1F} 수용체 역시 PTX 민감성 G-단백질과 연결되어 AC를 억제하지만 자세한 신호전달 과정은 잘 알려져 있지 않다(Barns 및 Sharp, 1999; Hoyer 등, 2002).

5-HT₂ 수용체는 모두 세종류(5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C})의 아형이 알려져 있으며, 5-HT₂ 수용체는 공통적으로 G-단백질 중 G_{q/11}을 활성화시킨다. 활성화된 G_{q/11}은 PLC를 활성화시키고, PLC는 PIP₂로부터 IP₃와 diacylglycerol(DAG) 생성을 촉진시킨다. IP₃는 세포내 칼슘 저장고인 근형질내망(sarcoplasmic reticulum, SR) 혹은 원형질내망(endoplasmic reticulum, ER)으로부터 칼슘 유리를 촉진시키고, DAG은 PKC를 활성화 시킴으로서 다양한 생리적 기능을 나타낸다. 5-HT₂ 수용체의 세포내 신호전달 경로 역시 G_{q/11}-PLC 경로 뿐만 아니라 5-HT₁ 수용체처럼 다양하다(Raymond 등, 2001; 표 2 참조).

5-HT_{2A} 수용체는 뇌, 골격근, 평활근, 신장 및 혈소판 등에 널리 분포되어 있다(Barns 및 Sharp, 1999). 5-HT_{2A} 수용체는 대부분의 조직 및 세포에서 PLC- β 를 활성화시키고 inositol phosphate(IP)와 세포내 칼슘을 증가시킨다(Raymond 등, 2001). 5-HT_{2A} 수용체는 PLC 뿐만 아니라 다른 phospholipase(PL) 즉 PLA₂ 및 PLD 등을 활성화시킨다. 5-HT_{2A} 수용체는 CHO 세포에서 PLA₂에 의한 arachidonic acid(AA)의 유리를 촉진시켰으며(Berg 등, 1996, 1998), 배양된 쥐 신장의 간질(mesangial) 세포에서는 5-HT_{2A} 수용체가 PLD를 활성화시켰다(Kurscheid-Reich 등, 1995). 일부의 세포에서 5-HT_{2A} 수용체는 cAMP 생성을 조절한다. Garnovskaya 등(1995)은 쥐 신장의 사구체 간질 세포에서 forskolin에 의한 cAMP 증가를 억제하였다. 이러한 cAMP 증가 억제는 PLC, 칼슘 및 PKC와는 무관하였으며, PTX에 민감하였다. 이는 5-HT_{2A} 수용체에 의한 cAMP 감소가 G_{i/o}-단백질 활성화에 의한 것임을 알 수 있다. 5-HT_{2A} 수용체는 ER로부터 칼슘을 유리시킬 뿐만 아니라 세포막의 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입을 통해 세포내 칼슘을 증가시킨다. 5-HT_{2A} 수용체는 일부의 세포에서 L-형 칼슘 통로를 활성화시킨다(Eberle-Wang 등, 1994; Hagberg 등, 1998). 5-HT_{2A} 수용체에

의한 칼슘 증가는 K_{Ca} 통로를 활성화한다(Bartrup 및 Newberry, 1994). 쥐 대뇌피질의 별아교세포(astrocyte)에서 5-HT_{2A} 수용체는 L-형 칼슘 통로와 아파민(apamin) 민감성- K_{Ca} 통로를 동시에 활성화하였다(Jalonen 등, 1997). 한편 5-HT_{2A} 수용체는 뇌 발달단계에서 중요하게 작용하는데, 발달 초기 쥐의 전두엽 피질세포에서 강한 흥분성으로 작용하여 세포의 분화 및 연접생성(synptogenesis)을 촉진시켰다(Zhang, 2003).

5-HT_{2B} 수용체는 위 유문(gastric fundus)에서 처음 알려졌으며, 초기에 5-HT_{2F} 혹은 SRL(serotonin receptor-like)로 불려졌다(Barns 및 Sharp, 1999). 5-HT_{2B} 수용체는 사람의 간 및 신장에 많이 발현되어있으며, 소뇌, 시상하부 및 편도핵(amygdala) 등과 같은 신경에 많이 분포한다(Raymond 등, 2001). 5-HT_{2B} 수용체는 다른 5-HT₂ 수용체처럼 PLC와 연결이 되어있으며, inositol phosphate와 세포내 칼슘을 증가시킨다(Barns 및 Sharp, 1999). 이 수용체는 대뇌피질, 해마 및 뇌줄기의 별아교세포에서 칼슘 동원(mobilization)을 촉진시키는 것이 보고 되었으며(Sanden 등, 2000), IC11 세포에서 PLA₂를 활성화시켰다(Tournois 등, 1998). 5-HT_{2B} 수용체 신호전달의 좋은 모델인 쥐 위 유문에서 5-HT는 세포내 칼슘 유리와 PKC 활성화를 통해 유문을 수축시키며, 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의한 수축은 bardiakin과는 달리 phospholipase D(PLD)와는 연결이 되어있지 않았다(Cox 등, 1999). 또한 5-HT_{2B} 수용체는 사람 관상동맥의 내피세포에서 NO 생성을 증가시켰다(Ishida 등, 1998).

5-HT_{2C} 수용체는 초기 5-HT_{1C} 수용체로 분류되었으나, 5-HT₁ 수용체 보다는 5-HT₂ 수용체의 특성을 지녀 재분류된 것이다. 5-HT_{2C} 수용체는 뇌실의 맥락열기, 뇌 피질, 해마, 미상핵, 및 흑색질 등 뇌에 전반적으로 분포한다(Barns 및 Sharp, 1999; Raymond 등, 2001). 5-HT_{2C} 수용체의 주된 기능은 다른 5-HT₂ 수용체와 마찬가지로 PLC를 활성화시켜 inositol phosphate를 증가시키는 것이다(Hoyer 등, 2002). 한편 5-HT_{2C} 수용체는 PLA₂를 활성화하여 AA를 생성을 촉진시키기도 한다(Berg 등, 1996). 5-HT_{2C} 수용체는 Ba²⁺-민감성 내향정류 K⁺ 통로 (Ba²⁺-sensitive inwardly rectifying K⁺ channel, IRK) 및 Shaker 형의 막전압 의존적 K⁺ 통로 등의 활성을 억제하였다(Raymond, 2001). 5-HT_{2C} 수용체는

GABA_A 통로의 억제시키기도하며, ER의 IP₃ 수용체로부터 칼슘을 유리시켜 결과적으로 칼슘-민감성 Cl⁻ 통로를 열기도 하였다(Raymond 등, 2001). 5-HT_{2C} 수용체는 기능적으로 보행저하(hypolocomotion), 연하저하(hypophagia) 및 발기(penile erection) 등에 중요한 역할을 하며, 절전 신경에 작용하여 dopamin 이나 norepinephrine(NE)의 유리를 억제하기도 한다(Barns 및 Sharp, 1999).

5-HT₄, 5-HT₆, 및 5-HT₇ 수용체는 5-HT₁ 수용체와는 달리 G-단백질 중 G_s를 통해 AC를 활성화시켜 cAMP 농도를 증가시킴으로써 다양한 반응들을 매개한다. 5-HT₄ 수용체의 주된 기능으로 위장관에서의 prokinetic 효과와 심방의 수축력 및 빈도를 증가시키는 것이 잘 알려져 있으며(Kim 및 Camilleri, 2000), 5-HT₄ 수용체와 관련된 약물들은 심부정맥(Kaumann 및 Sanders, 1994), 신경 퇴행성 질환(Raynolds 등, 1995), 그리고 요실금(Hegde 및 Eglen, 1996)과 같은 질환에 효과적인 치료제로 사용되어왔다. 5-HT₄ 수용체의 주된 기능은 AC의 활성화이며, adrenocortical 세포(Contesse 등, 1996)와 심방근(Ouadid 등, 1992) 등에서 세포내 칼슘 유입(influx)을 증가시켰다. 이러한 칼슘의 유입은 5-HT₄ 수용체 활성화로 인한 cAMP 증가가 L-형 칼슘 통로의 활성을 증가시켜서 일어난 결과이다. 5-HT₄ 수용체는 스플리싱 변이(splice variant)들에 따라 서로 다르게 조절되기도 한다. 예를 들면, Pindon 등(2002)은 사람의 h5-HT_{4b}는 G_{α₁₀} 및 G_{α_s} 연결 되어있으며, 또 다른 스플리싱 변이인 5-HT_{4a}는 G_{α_s}와만 연결이 되어 G_{α_s}를 활성화를 통한 세포내 칼슘 농도를 증가를 유발시킴을 보고하였다. 5-HT₄ 수용체는 심방근에서 I_f pacemaker 전류 증가, Cl⁻ 전류 및 tetrodotoxin(TTX)-비민감성 Na⁺ 전류를 활성화와 같이 다른 종류의 이온통로 역시 조절한다(Raymond 등, 2001). 또한 5-HT₄ 수용체는 절전신경에 작용하여 5-HT, ACh 및 dopamin과 같은 신경전달물질 유리를 촉진시킨다(Barns 및 Sharp, 1999).

5-HT₅ 수용체는 5-HT_{5A}와 5-HT_{5B} 두개의 아형이 알려져 있으며, 마우스에서 처음으로 알려졌으며, 이후에 쥐에서 아형들이 보고 되었다(Barns 및 Sharp, 1999). 사람의 경우에는 5-HT_{5B} 수용체의 발현이 보고되지 않았다(Grailhe 등, 2001). 약리학적으로 5-HT₅ 수용체는 5-HT₁ 수용체와 유사하며, 특히

5-carbamidotryptamine(5-CT)과 맥각 유도체(ergot derivatives)인 lyergic acid(LSD)나 ergotamin 등에 민감하다. 5-HT_{5A} 수용체는 PTX-민감성 G-단백질인 G_{i/o}와 연결 되어 AC를 억제하며(Noda 등, 2003; Thamas 등, 2000), 5-HT_{5A} 수용체는 G-단백질에 의해 열리는 K⁺ 통로(GIRK)의 활성을 조절한다(Grailhe 등, 2001). Noda 등(2003)은 5-HT_{5A}가 cAMP 농도 감소와 ADP-ribosyl cyclase 활성억제를 통해 세포내 칼슘을 조절함을 보고하였다. ADP-ribosyl cyclase는 세포내 2차 전령인 cyclic ADP ribose(cADPR)를 증가시키고, 증가된 cADPR은 ryanodine-민감성 칼슘 통로를 개방하는 것으로 알려져 있다. Noda 등의 연구에서는 5-HT_{5A}가 AC, cAMP 농도 및 cADPR을 억제시켜, IP₃-민감성 칼슘 통로를 조절함을 보고하였다.

5-HT₃ 수용체는 GABA_A, glycine, 니코틴성 acetylcholine(ACh) 수용체들과 마찬가지로 5개의 소단위로 이루어진 오합체(pentamer) 구조의 이온통로이다. 절전신경에 존재하는 5-HT₃ 수용체는 신경전달 물질 유리를 조절하며, 절후신경절의 5-HT₃ 수용체는 신경의 흥분성에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 5-HT₃ 수용체의 활성화는 세포내로 Na⁺과 Ca²⁺의 유입과 K⁺의 유출을 증가시키며, 막전압을 탈분극시킨다(Barns 및 Sharp, 1999). 이 수용체를 통해 유입된 칼슘과 막전압 의존적 칼슘 통로를 통해 증가된 칼슘은 다양한 기능을 수행한다. 연결전 세포막에서 5-HT₃ 수용체는 dopamine 이나 GABA와 같은 다양한 신경전달 물질들의 유리를 조절하며(Raymond 등, 2001; van Hooft 및 Vijerberg, 2000), 연결후 신경에서는 흥분성 신호전달을 매개한다(Raymond 등, 2001). 5-HT₃ 수용체는 5-HT_{3A}와 5-HT_{3B} 두개의 아형이 존재하며, 이들 수용체의 구성에 따라 약리적인, 생물리학적(biophysical properties) 특성들이 차이를 보인다(Hapfelmeier 등, 2003). 이와 같이 5-HT 수용체의 분포와 그 기능 및 역할이 매우 다양함을 알 수가 있다.

골반 장기에 관한 5-HT에 대한 역할은 오래전부터 알려져 왔다. 5-HT를 정맥 혹은 척추강 내에 주입을 하게 되면 개 혹은 고양이의 방광을 biphasic하게 수축시키는데, 첫번째 일시적인(transient) 수축은 방광 부교감 신경절(vesical (or bladder) parasympathetic ganglia)의 흥분에 의한 것이며, 두 번째 타나나

는 지속적인 수축은 방광 평활근의 직접적인 자극에 의한 것이다(Gyermek, 1962, Saum 및 de Groat, 1973). 토끼 방광의 골반신경절(Nishimura 등, 1989) 및 도롱뇽 심장 신경절(cardiac ganglia; Neel 등, 1986)을 지배하는 신경말단의 varicose에서 5-HT의 면역반응성(immunoreactivity)이 존재하였으며, MPG와 상 장간막 신경절(superior mesenteric ganglion)에서 5-HT는 histamine 및 그 합성 효소인 histidine decarboxylase/histidine decarboxylase와 함께 있음이 보고 되었다(Karhula 등, 1990). 5-HT는 토끼 방광 골반 신경절에서 탈분극을 유발하였으며, 이러한 탈분극은 5-HT₃ 수용체 차단제에 의해 소실되었다(Akasu 등, 1987). 5-HT는 고양이의 골반장기에 신경지배하는 교감 및 부교감 신경에서 서로 상반되게 작용함이 보고 되었는데, 즉, 방광의 부교감신경에는 억제성 효과, 하 장간막 신경절(inferior mesenteric ganglion)에는 흥분성 효과를 나타내었다(Samu 및 de Groat, 1973). 또한 5-HT는 방광 골반신경절과 모양체 신경절(ciliary ganglia)에서 연접전 세포막(presynaptic membrane)에 작용하여 콜린성 신경전달을 조절하였다(Nishimura 및 Akasu, 1989; Nishimura 등, 1989; Tatsumi 및 Katayama, 1987). 방광 골반 신경절에서 5-HT는 초기에는 흥분성 연접후 전위(excitatory post-synaptic potential; EPSP)를 억제, 이 후에 EPSP를 향진시키는 반응을 보였으며, 방광신경절의 연접전 세포막에서 ACh의 유리를 촉진시켰다(Nishimura 및 Akasu, 1989). 초기 EPSP의 억제는 5-HT_{1A} 수용체의 활성화에 의한 것이고, 이후의 EPSP의 향진은 5-HT_B 혹은 5-HT_C 수용체 활성화에 의해 일어났다. 또한 5-HT는 고양이 모양체 신경절에서는 EPSP를 억제하였다(Tatsumi 및 Katayama, 1987). 이상에서 5-HT는 *in vitro* 혹은 *in vivo* 실험에서 흥분성 혹은 억제성으로 작용하여 골반장기의 생리적 기능에 기여를 함을 알 수 있다(Keast, 1995b).

본 연구에서 MPG에는 여러 아형의 5-HT 수용체가 발견되어 있었다(결과 참조). 선행 연구들에서 MPG 내에 5-HT를 함유한 세포들이 존재하며(Karhula 등, 1990), *in vitro* 혹은 *in vivo* 실험에서 5-HT의 역할이 보고 되었지만 MPG의 연접전 신경(presynaptic nerve)을 자극하거나 반사 활동(reflex activity)이 증가되었을 때 내인성(endogenous)으로 5-HT가 유리되는가에 대한 실험적 증거는 부족하며(Keast, 1995b), 또한 골반 신경절 내에 단일 교감 및 부교감신경

에서 5-HT의 생리적 역할에 대해서는 아직까지 보고가 부족하다. 본 연구에서는 5-HT가 단일 교감 및 부교감 신경에 작용하는지를 확인하고자 하였다. 5-HT 수용체들은 어느 수용체가 활성화 되느냐에 따라 절전신경에서 신경전달물질 유리 정도와 절후 신경절의 흥분성이 결정된다. 세포막의 흥분성 변화와 신경전달물질 자체는 세포내 칼슘 변화를 초래하며, 세포내 칼슘은 신경전달물질 유리, 호르몬 분비, 신경의 흥분성, 근육의 수축, 유전자 발현, 세포의 성장과 분화 및 세포자멸사(apoptosis) 등의 다양한 과정의 조절에 중요한 역할을 한다(Hill, 2001). 따라서 MPG에 발현된 여러 5-HT 수용체 중 이온통로 역할을 하는 5-HT₃ 수용체와 PLC 연결 수용체인 5-HT_{2B} 수용체를 중심으로 5-HT 수용체의 전기생리학적 특성과 이들 수용체 활성화에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화 및 조절 기전의 일부를 규명하고자 하였다.

제2장 재료 및 방법

2.1. 실험 동물

실험동물로는 200-250 gm 내외의 수컷 쥐(Sprague-Dawley rat)를 사용하였다.

2.2. 실험용액 및 약물

2.2.1. 실험 용액

전기생리 실험 및 칼슘 측정에 사용된 세포 외 관류액의 조성(mM)은 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES 그리고 10 glucose이며, Tris를 첨가한 후 pH가 7.4가 되도록 적정하였다. 전기생리 실험에 사용된 전극 내 용액(internal solution)의 조성(mM)은 20 KCl, 120 K⁺-aspartate, 10 HEPES, 10 EGTA, 0.1 Tris-phosphocreatine, 5 MgATP, 0.3 Na₂GTP이며, Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 적정하였다. 단, 그라미시딘 천공 패치(gramicidin-perforated patch)를 위한 전극 내 용액의 조성(mM)은 140 KCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 0.5 CaCl₂, 5 NaCl (pH 7.2)으로 하였으며, 전극 내 용액에는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 높은 농도로 녹인 gramicidin을 최종 농도가 50 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 첨가하여 사용하였다. 약물의 투여는 perfusion valve control system(VC-6M, Warner Instruments, CT, USA)을 이용하였으며, 약물이 나오는 관 끝을 신경세포의 100 μm 이내에 위치하도록 하여 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

2.2.2. 약물

Collagenase type D와 trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN, USA)로부터 구입하였으며, fura-2/AM 및 fluo-3/AM은 Molecular Probe(Eugene, OR, USA)로부터, *m*-chlorophenylbiguanide(mCPBG), 5-HT, mucimol, Y25130, 및 MDL7222는 Tocris(Tocris Cookson Inc., Bristol, UK)로부터 구입하였다. Calbiochem Co.(San Diego, CA, USA)으로부터 SQ22536, mirystoylated PKA 억제제를 구입하였고 forskolin, gramicidin, DAG kinase 억제제, DNase type I 등과 세포 배양과 관계된 모든 배지 및 약물은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2.3. 단일 신경세포 분리 및 유지

수컷 쥐(180 ~ 200 gm)를 pentobarbital sodium (50 mg/kg, *i.p.*)으로 마취시킨 뒤, 즉시 개복 하여 전립선의 외측에 위치한 MPG를 적출하고(그림 1 참조), 이를 차가운(4°C) Hanks' balanced salt 용액으로 옮겼다. 수초를 벗기고 작은 틈새를 낸 후, 이를 0.7 mg/ml collagenase(type D), 0.1 mg/ml trypsin과 0.1 mg/ml의 DNase type I이 들어있는 10 ml의 modified Earle's balanced salt 용액(EBSS, pH 7.4)에서 1시간 동안 배양(35°C)하였다(Zhu 등, 1995). 이때 EBSS에는 3.6 g/L의 glucose와 10 mM의 HEPES를 포함시켰다. 배양 후 신경세포들을 배양용기에 넣어 흔들어 분리한 후, clinical centrifuge(International Equipment Company, MA, USA)를 이용하여 1000 rpm의 속도로 원심 분리하였다. 분리된 신경세포들을 10% fetal bovine serum, 1% glutamine, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 MEM에 재부유(resuspend) 시킨 뒤, poly-L-lysine으로 코팅되어 있는 cover glass (직경 12 mm)에 plating 하였다. 이를 37°C 세포 배양기(humidified incubator; 95% air-5% CO₂)에서 배양하였으며, 분리한 후 24시간 이내에 실험에 사용하였다. 분리된 세포들의 광학현미경적 소견은 그림 2에 나타내었다.

2.4. 전기생리학적 실험

전기생리학적 실험은 EPC9 혹은 EPC7 (Instrutech Corp., NY, USA) 패치 클램프 증폭기(patch clamp amplifier)를 사용하여 전형적인 전세포 패치 클램프(whole-cell patch clamp) 방법으로 측정하였다(Hamill 등, 1981). 측정 전극은 borosilicate glass capillary(외경: 1.65 mm, 내경: 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co.)로 제작하여 사용하였다. 전극은 Sylgard 184(Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅하였으며, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5~2.5 M Ω 이 되는 것을 사용하였다. 세포가 붙어 있는 cover glass를 도립현미경(inverted microscope) 위에 올려놓고, 세포 외액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 세포막 전압의 변화는 막전류 고정법(current-clamp method)을 사용하였으며, 막전류 측정시에는 막전압 고정법(voltage-clamp method)을 사용하여 측정하였다. 막전압 고정법 기록을 위해서 세포막의 용량(capacitance)과 직렬저항(series resistance)은 80% 이상 보정하였으며, 실험시 sampling rate은 1 kHz, low-pass 필터는 2 kHz(-3dB; 8-pole Bessel filter)로 하여 기록하였다. 실험결과는 Pulse/Pulsefit(v8.50) (Heka Elektronik, Lambrecht, Germany) 혹은 pClamp6(Axon Instrument, USA) 소프트웨어를 통해 IBM 컴퓨터에 저장하여 분석하였다. 모든 실험은 실온(21~24 $^{\circ}$ C)에서 시행하였으며, 본 실험에 사용된 전류 측정 장치는 그림 3에 도식적으로 나타내었다.

2.5. 세포 내 칼슘이온 농도 측정

세포 내 칼슘 농도 측정은 형광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)과 이에 연결된 형광측정장치(Ratio Fluorescence system; Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하였다. 이 시스템에는 크게 형광염료가 부하된 세포를 여기(excitation) 시키기 위한 arc lamp housing과 작은 크기의 형광 신

호를 증폭시킬 수 있는 photomultiplier 튜브(PMT tube), 그리고 특정 파장의 빛을 통과시킬 수 있는 필터로 구성되어있다(그림 4참조). 형광의 신호들의 측정 및 분석은 FeliX 소프트웨어(Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 통해서 실시하였다.

이온 농도 측정하기 위해서는 이온들과 결합하여 형광 특성을 보이는 형광염료(fluorescence dye)를 세포내에 부하시킨 뒤 형광 현미경을 통해 방출되는 형광의 세기를 분석하여야 한다. 칼슘 이온 농도를 측정하기 위해서 사용한 형광염료는 칼슘의 농도를 반영하는 fura2/AM을 사용하였다. 실험 방법은 단일 MPG 세포가 있는 배양접시에 fura2/AM를 5 μ M 농도로 처치하여 실온에서 빛이 차단된 상태로 30-60분간 두어 세포 내로 부하시켰다. 부하가 끝나면 세포 외 관류액으로 2회 세척한 다음 현미경위에 올려놓고, 약물이 포함된 관류액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 이때 나타나는 형광세기의 변화를 기록 및 분석하였는데, fura-2의 형광특성상 340 nm와 380 nm의 빛으로 번갈아 가며 여기(excitation)시켰을 때 510 nm으로 방출(emmission)되는 형광강도의 비율(F_{340}/F_{380})이 세포 내 이온농도를 반영하게 된다. 특히 그라미시딘 천공 폐지 방법을 사용하여 세포 내 칼슘이온 농도 측정과 함께 세포막 전압이나 전류의 변화를 동시에 측정하였다.

2.6. 역전사 중합 연쇄반응(RT-PCR)

Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 이용하여 MPG 신경세포들로부터 total RNA를 분리하였다(Chomczynski 및 Sacchi, 1987). 먼저 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 용해시킨 다음 페놀(phenol) 및 클로로포름(chloroform)을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 세워두었다. 이를 4°C에서 10,000xg로 20분간 원심분리하여 상층액만을 조심스럽게 취하였다. 이 상층액은 동량의 isopropanol과 섞은 다음 -70°C에서 1시간 이상 세워 두어 RNA를 침전시켰다. 다시 4°C에서 10,000xg로 20분간 원심분리하여 RNA pellet을 얻었으며, 이를 다시

75% ethanol로 씻어낸 후 원심분리하여 RNA sample을 얻었다.

cDNA의 합성을 위해 2 μg RNA와 0.5 μg random hexamer를 먼저 70°C에서 5분간 반응시키고, 200 units의 murine leukemia virus reverse transcriptase(Promega Corporation, Madison, WI, USA), 25 nmoles의 dNTP, 20 units의 RNase inhibitor(Promega) 등을 혼합하여(25 μl) 37°C에서 1 시간 반응시켰다. PCR은 여러 5-HT 수용체, GABA_B 수용체 및 TRPC 통로들에 대한 primer들을 이용하여 이루어졌으며, 이들의 염기서열은 표 1에 요약하였다. PCR 반응액(50 μl)에는 합성된 cDNA, 각각의 primer(10 pmoles), 1.25 units의 AmpliTaq polymerase(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nmoles의 dNTP등을 혼합하여, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 35 cycle 동안 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.1% agarose gel에 전기영동하여 관찰하였다.

2.7. 자료 분석

모든 결과는 평균±표준오차로 나타내었고, 통계적인 의의는 분산분석(ANOVA)을 사용하였으며, 각 군간의 차이를 위해서 Tukey 방법을 사용하여 사후검정하였다. 두 군간의 차이 혹은 약물 처치 전후의 차이에 대한 검정은 각각 독립적 t-검정(unpaired t-test)과 짝비교 t-검정(paired t-test)으로 확인하였다. 이때 p값은 0.05 이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 측정된 전류 및 전압의 크기 및 이동 전하량(charge movement)은 Pulse/Pulsefit 소프트웨어(Heka Elektronik)를 이용하여 계산하였으며, 선형회귀 방정식, 농도-반응 곡선(concentration-response curve)의 EC₅₀ 혹은 IC₅₀, 그리고 Hill slope는 Prism 3.0 software(GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 구하였다.

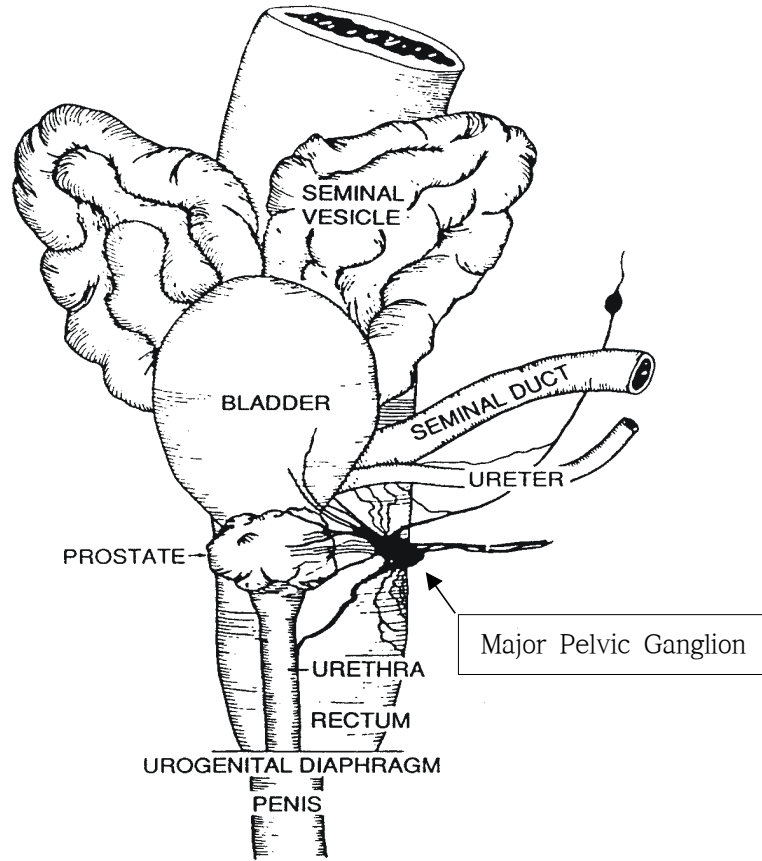


그림 1. 수컷 흰쥐 주골반 신경절(major pelvic ganglion)의 해부학적 위치



그림 2. 주골반 신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견 (x200)

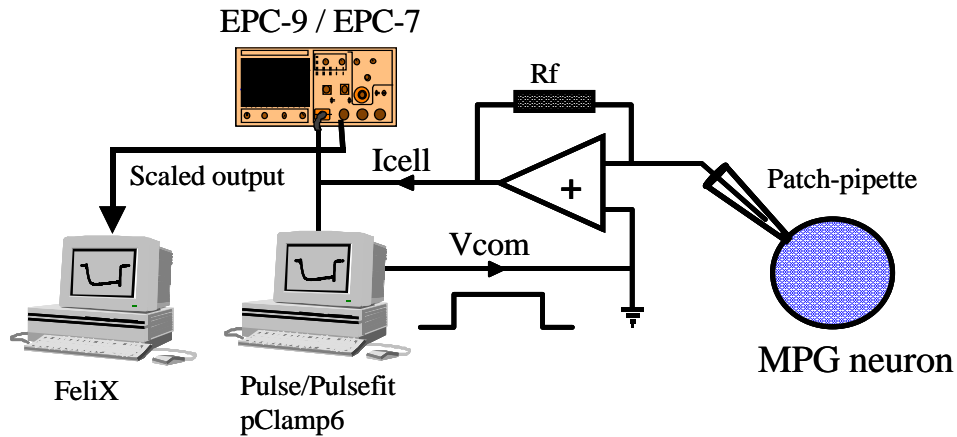


그림 3. 막전압 고정법에 의한 이온 전류 측정 장치의 모식도. 패치 클램프 전용소프트웨어(Pulse/Pulsefit 혹은 pClamp6)를 이용하여 만든 전압 프로토콜로 고정하고자 하는 전압(V_{com})을 A/D converter(EPC-9 혹은 digidata 1200)를 거쳐 아날로그 신호로 바꾸어 패치 전극(patch pipette)을 통하여 전달하고 세포막에 존재하는 이온통로의 활성정도에 따라 변화하는 전압을 고정하기 위해 증폭기(EPC-9 혹은 EPC-7)를 통하여 흘려주는 전류(I_{cell})을 다시 디지털로 전환하여 컴퓨터에 저장한다. 이때 세포내 칼슘과 동시 측정하거나 혹은 단독으로 전류를 지속적으로 기록하기 위해서 증폭기에서 전류를 다른 컴퓨터로 연결하여(scaled output), FeliX 소프트웨어 상에서 구현하였다.

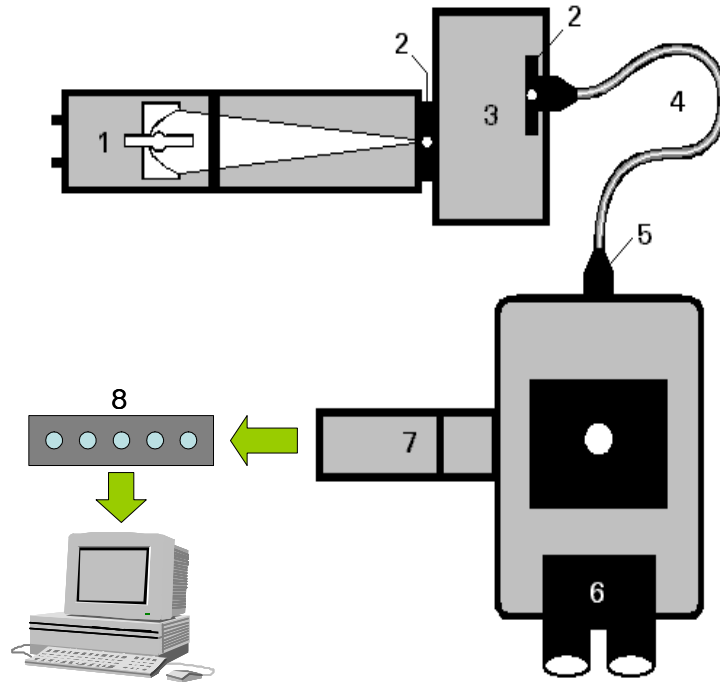


그림 4. 세포 내 칼슘이온농도 측정을 위한 형광 측정장치 모식도. 1. Arc lamp housing, 2. Adjustable slits, 3. Excitation monochromator, 4. Liquid light guide, 5. Liquid light guide adapter, 6. Microscope, 7. Photomultiplier tube, 8. AD converter (connected to IBM computer).

표 3. 5-HT 수용체의 역전사 중합 연쇄반응에 사용된 primer들

Primer		Sequence (5' to 3')	Position	Size (bp)	GeneBank Accession #
5-HT 1A	Sense	TCA GCT ACC AAG TGA TCA CC	590-609	211	NM_0083080
	Antisense	GTC CAC TTG TTG AGC ACC TG	800-781		
5-HT 1B	Sense	TAC ACG GTC TAC TCC ACG GT	610-629	258	NM_010482
	Antisense	TCG CAC TTT GAC TTG GTT CAC	867-847		
5-HT 1D	Sense	TCC TGC ATC TCT GTG TCA TC	368-387	279	NM_012852
	Antisense	GGC CAT ACA GGA TAA TGA GC	646-627		
5-HT 1F	Sense	CAC AAG AGA CAA GCA AGT CG	637-656	261	NM_021857
	Antisense	CAA GAT CAA TCC CAG GGT AG	897-878		
5-HT 2A	Sense	GTG TCC ATG TTA ACC ATC CT	1480-1499	375	NM_172812
	Antisense	GTA GGT GAT CAC CAT GAT GG	1855-1836		
5-HT 2B	Sense	CAT GCA TCT CTG TGC CAT TTC	461-481	357	NM_008311
	Antisense	TGT TAG GCG TTG AGG TGG C	812-794		
5-HT 2C	Sense	CGA GGA GGA ACT GGC TAA TA	741-762	324	NM_012765
	Antisense	CAC ACA TAG CCA ATC CAC AC	1085-1066		
5-HT 3A	Sense	TCC TCA ACG TGG ATG AGA AG	281-300	352	NM-013561
	Antisense	ATG TTG ATG TCC TGG ATG GT	632-613		
5-HT 3B	Sense	AAG CCC ATC CAG GTG GTC TC	633-652	428	NM_020274
	Antisense	GAC ATG TTG ACC CTG AAG AC	1060-1041		
5-HT 4	Sense	TCA TGG TGC TGG CCT ATT AC	622-641	378	NM_008313
	Antisense	CTC ATC ATC ACA GCA GAG GA	998-979		
5-HT 5A	Sense	GAA CAG GAG GAA GGA AGA GA	1535-1554	109	NM_01314
	Antisense	TAA GTC TCC TTG GTG TGA GG	1643-1624		
5-HT 5B	Sense	TTC ACC GTA CTC GTG GTA AC	453-472	132	L10073
	Antisense	GGT CGA GGC TAC CAA GTT AT	584-565		
5-HT 6	Sense	CCT GAG AGT GTG CTG AAT TG	1716-1735	129	NM_02436
	Antisense	AGC CAC ACT ACA CAA GCA AC	1844-1825		
5-HT 7	Sense	GTG TGT CCA CTG TCA AAT CC	2072-2091	148	NM_02293
	Antisense	TCA CTC ATC TCC AGT TAC CG	2219-2200		

표 4. GABA_B 수용체 및 TRPC 통로 역전사 증합 연쇄반응에 사용된 primer들

Primer	Sequence (5' to 3')	Position	Size (bp)	GeneBank Accession #
GABA B1	Sense GTG GAG AAA CTA ACC AAG CG	1088-1107	341	NM_031028
	Antisense AGA TCA TCC TTG GTG CTG TC	1428-1409		
GABA B2	Sense ATC CAG GAC TTC AAC TAC AC	1433-1452	206	AJ011318
	Antisense TTG ATG ATC TCC AGT GTG TC	1638-1619		
TRPC1	Sense GGC CAG TCC AGC TCT AAT AA	579-598	316	NM_053558
	Antisense TGA CTG GGA GAC AAA CTC CT	894-875		
TRPC2	Sense GCT ACT CAA CAT GCT CAT CG	1933-1952	333	NM_02263
	Antisense AGA GCC TTG ATG ACT CGA AG	2265-2246		
TRPC3	Sense CTG CCT CCT TCA TCA TCT TC	911-930	309	NM_02177
	Antisense GCA GAA ATG CTA GGA ACC TG	1219-1200		
TRPC4	Sense AGG ACT GCT CTT CTC ATT GC	214-233	327	NM_08039
	Antisense AAC ACA GTT ACA GCG GAC CT	540-521		
TRPC5	Sense CAA GTG GAAG AGA AGC AGG TT	693-712	335	AY064411
	Antisense CTT GCT CAG CTC CTT GAG TT	1027-1008		
TRPC6	Sense GTG GAG GCT ATT CTC AAC CA	526-545	333	NM_05355
	Antisense TGA CAG GTA TGC TGG ACT TG	858-839		
TRPC7	Sense CGG GAT GTT CAA CCT GTA CT	2328-2347	335	XM_225159
	Antisense CAG GGA GAG TTC TTC CTT CA	2662-2643		

제3장 결 과

3.1. 주골반 신경세포의 전기 생리적 특성

일반적으로 자율신경절 세포는 매우 다양한 전기적인 특성들을 보인다. 즉, 세포에 따라 활동 전압(action potential)과 afterhyperpolarization(AHP) 그리고 활동 전압의 방전 패턴(firing pattern) 등이 다르다. 따라서 자율신경절 세포인 MPG 신경세포에서 전기생리학적 특성을 살펴보았다. 자율신경절 세포는 탈분극 전류 주입(depolarizing current injection)에 대한 반응 특성에 따라 크게 두 가지 세포군(toinic vs. phasic)으로 분류된다(Adams 및 Harper, 1995). 옴(Ohm)의 법칙에 따라 세포에 전류를 주입하면 세포막 전압이 변화되는데 이러한 특성은 수동적(passive)인 특성과 능동적(active)인 특성 두 가지로 구분할 수 있다.

MPG 신경세포의 전기생리적 특성은 모두 그라미시딘 천공 패치 방법으로 측정하였으며, 수동적 특성들을 표 5에 요약하였다. 세포의 크기를 반영하는 세포막의 전기용량(capacitance)은 교감신경세포(68.6 ± 3.4 pF, $n=51$)가 부교감신경세포(30.3 ± 2.7 pF)에 비해 현저히 크게 나타났다($p < 0.0001$). 교감신경과 부교감신경의 안정막 전위(resting membrane potential, RMP)는 각각 -50.6 ± 1.1 mV($n=54$)와 -50.7 ± 1.0 mV($n=52$)로 두 군 사이에 통계학적인 유의한 차이는 없었다. 신경세포에 전극을 통해 음전류(negative current)를 주입하면 세포막은 좀더 음극화 즉, 과분극되며, 주입하는 음전류가 커질수록 더 큰 과분극이 발생한다. 대부분의 신경세포는 주입하는 음전류와 과분극크기 사이에 선형적 관계가 형성하며, 이때 전류에 대한 전압비를 신경세포의 입력저항(input resistance, R_{in})이라한다(Adams 및 Harper, 1995; Koester 및 Siegelbaum, 2000). 그림 6에서 음전류를 단계적으로 증가시키면 세포막전압의 과분극이 증가되는 것을 관찰할 수 있다. 이때 옴의 법칙에 따라 주입한 음전류의 크기와 변화된 막전압의 크기로 R_{in} 의 크기를 구하였다(그림 6C). 세포막 용량(C_m)이 클수록 R_{in} 값은 작은 반비례관계를 보였는데(그림 6C 및 D), 이는 R_{in} 값이 세포 부피에 반비례하기 때문이다. 세포간의 차이에서는

tonic 신경세포($245.9 \pm 3.4 \text{ M}\Omega$, $n=18$)가 phasic 신경세포($542 \pm 56.3 \text{ M}\Omega$, $n=11$)에 비해 R_{in} 값이 작았다(표 5; $p < 0.0001$).

MPG 신경세포의 능동적 특징들을 표 5에 요약하였다. 그림 5A는 MPG 신경세포의 전형적인 활동전압의 모양을 보여준다. 역치 이상의 강도로 자극하였을 때, MPG 신경세포의 활동전압 크기(amplitude)는 tonic 신경세포가 $98.8 \pm 2.9 \text{ mV}$ ($n=36$), phasic 신경세포가 $88.1 \pm 56.3 \text{ mV}$ ($n=21$)로 두 군 간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.06$). 자극 후 활동전압의 peak에 도달하는 시간 역시 차이가 없었으며($p=0.14$), 활동전압 기간은 tonic 신경세포($18.1 \pm 0.8 \text{ ms}$, $n=23$)가 phasic 신경세포($15.5 \pm 1.0 \text{ ms}$, $n=14$)에 비해 좀더 긴 값을 보였다(표 5, $p=0.05$). 두 신경의 AHP의 크기는 각각 $16.4 \pm 0.8 \text{ mV}$ ($n=31$)와 $15.9 \pm 1.1 \text{ mV}$ ($n=17$)로 두 군간에 통계적 유의한 차이는 없었다(표 5, $p=0.72$). AHP의 기간 역시 $191.5 \pm 19.8 \text{ ms}$ ($n=24$)와 $159 \pm 25.7 \text{ ms}$ ($n=23$)로 두군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(표 5, $p=0.35$).

탈분극 전류를 신경세포에 가하였을 때 신경세포는 주로 burst한 활동전압을 형성한다. 그림 5B와 5C는 MPG 신경세포에서 탈분극 전류를 주입하였을 때 형성되는 활동전압의 양상을 보여준다. 막전류 고정상태에서 600 ms 동안 역치이상의 탈분극 전류를 주입하였을 때, MPG 신경세포는 활동전압의 크기가 자극기간동안 지속되는 tonic 반응을 보이는 신경(그림 5B)과 자극기간 동안 소실되는 phasic 반응을 신경으로 구분되었다(그림 5C). Tonic 신경의 활동전압 형성 빈도는 $16.9 \pm 0.7 \text{ 회}/600\text{ms}$ ($n=35$)였으며, phasic 신경세포는 $2.9 \pm 0.3 \text{ 회}/600\text{ms}$ ($n=19$)로 두 값은 통계적으로 유의한 차이를 보였다(표 4, $p < 0.0001$). Tonic 신경세포는 600 ms 동안 활동전압은 최소 9회에서 최대 26회 유발되었으며, 가운데(median) 값은 17회였다. Phasic 신경세포는 동일한 기간동안 최소 1회에서 최대 6회까지 활동전압이 형성되었으며, 이들 값의 가운데 값은 3회였다. Tonic 및 phasic 신경의 구분은 탈분극 전류 주입 기간 동안 활동전압의 소실 유무로 판단하였다. 한편 신경세포에 일정 기간 과분극 전류를 가한 다음 멈추었을 때 활동전압이 과분극되었다가 안정막 전위로 돌아오면서 활동전압을 형성하게 되는데 이를 'anode break excitation 현상'이라 한다. 그림 5D와 E는 과분극 전류를 세포에 주입한 다음 형

성되는 post-anodal spike이며, tonic 신경세포는 spike 형성이 일어나지만, phasic 신경에서는 일어나지 않음을 보여준다. Tonic 신경세포의 spike 형성 빈도는 3.4 ± 0.5 회(n=34)였으며, phasic 신경세포는 0.7 ± 0.2 회(n=32)로 두 값은 통계적으로 유의한 차이를 보였다(표 5, $p < 0.0001$). Tonic 신경세포의 post-spike 횟수는 0회에서 최대 11회까지 다양하였으며, 한번도 spiking을 하지 않은 경우는 11.7 %, 1-2회는 32.3 % 그리고 3회 이상이 66.0 %의 비율을 보였다. Phasic 신경세포의 spiking 횟수 역시 0회에서 최대 4까지 다양하였으며, 한번도 spiking을 하지 않은 경우는 59.4 %, 1-2회는 31.2 % 그리고 3-4회가 9.4 %의 비율을 보였다(그림 5F).

표 5. MPG 신경세포들의 전기 생리적 특성 요약

Electrophysiological Properties	Tonic	Phasic	p-value
Membrane properties			
<i>C_m</i> , pF	68.6±3.4 (n=51)	30.3±2.7 (n=50)	**p<0.001
RMP, mV	-50.6±1.1 (n=54)	-50.7±1.0 (n=52)	p=0.910
<i>R_{in}</i> , MΩ	245.9±24.2 (n=18)	542.9±56.3 (n=12)	**p<0.001
Action potential			
Amplitude, mV	98.8±2.9 (n=36)	88.1±5.5 (n=21)	p=0.062
Duration, ms	18.1±0.8 (n=23)	15.5±1.0 (n=14)	*p=0.05
Time to peak, ms	8.8±0.6 (n=30)	7.3±0.7 (n=14)	p=0.14
AHP			
Amplitude, mV	16.4±0.8 (n=31)	15.9±1.1 (n=17)	p=0.717
Duration, ms	191.5±19.8 (n=24)	159.8±25.7 (n=12)	p=0.350
Firing pattern			
Evoked discharge, beats/0.6s	16.9±0.7 (n=35)	2.9±0.3 (n=25)	**p<0.0001
Post-anodal AP spiking, beats	3.4±0.5 (n=34)	0.7±0.2 (n=32)	**p=0.002

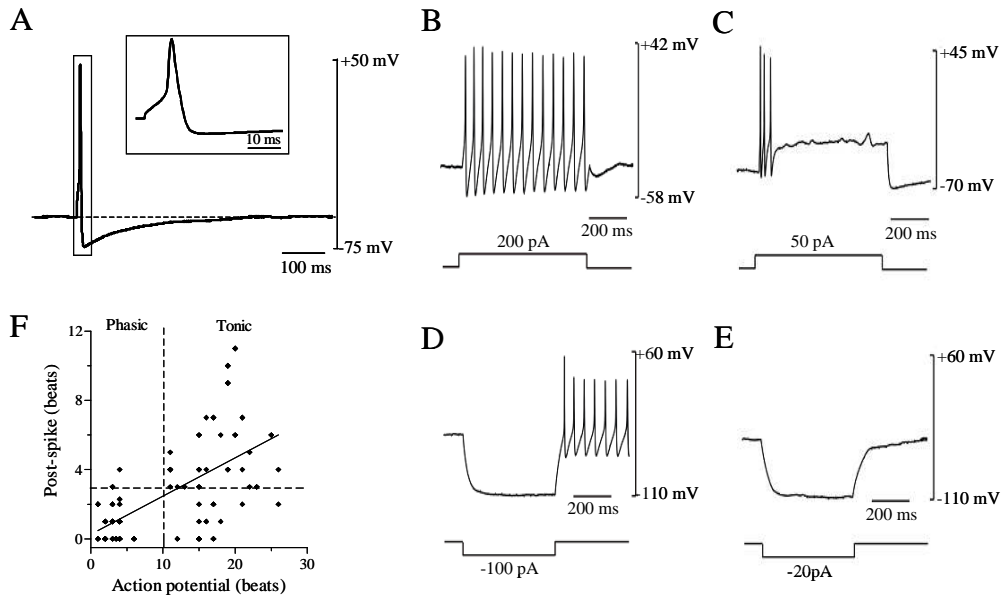


그림 5. 주골반절 신경세포의 활동전압 및 방전(firing) 패턴. A. 전류고정 ($I=0$) 상태에서 단계적으로 탈분극 전류를 10 ms 동안 주입하여 활동전압을 유발시켰으며, 위의 그림은 역치 이상의 자극에 의해 tonic 신경세포에서 기록된 전형적인 활동전압이다. Inset은 박스 부분을 확대한 것이다. B와 C는 탈분극 전류를 600 ms 동안 가하였을 때 발생하는 활동전압의 모습이다. D와 E는 과분극 전류를 600 ms 동안 가한 후 안정막 전압으로 막전압을 돌이켰을 때 발생하는 post-anodal excitation을 보여준다. 각 그림 아래 bar는 전류 주입 시간 및 크기를 보여주며, B와 D, 그리고 C와 E는 동일한 세포이다. F. 탈분극 전류(x 축) 및 과분극 전류(y 축)를 가하였을 때 기록되는 활동전압의 수의 분포 그림. 모든 기록은 그라미시딘 천공 패치 방법을 사용한 전류고정법 (current-clamp, $I=0$)하에서 측정하였다.

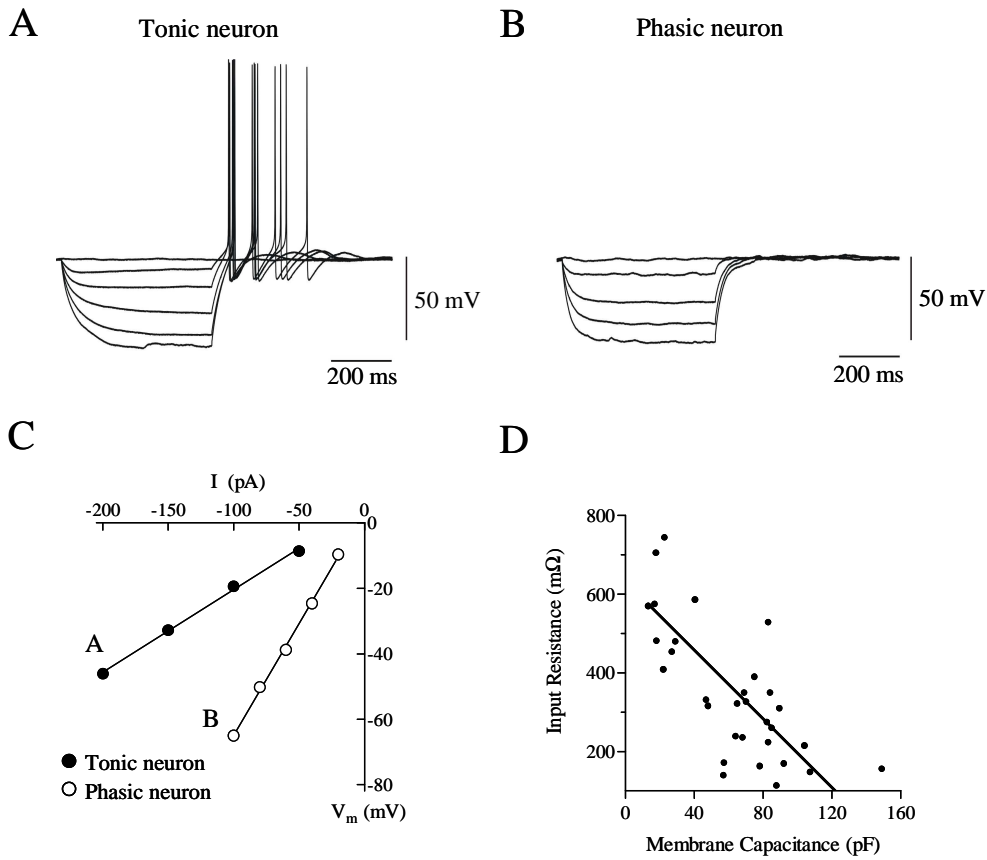


그림 6. 주골반절 신경세포의 입력저항(R_{in}) 및 세포막 용량과의 관계. A와 B는 각각 tonic 신경과 phasic 신경에서 기록한 post-anodal excitation이다. A는 과분극 전류를 -50 pA씩 600 ms 동안 단계적으로 가하여 기록하였으며, B는 -20 pA의 과분극 전류를 단계적으로 주입하여 기록하였다. C. A와 B에서 주입한 전류의 크기와 기록된 과분극 크기와의 전류-전압 관계 (current-voltage relationship)이다. A(●)와 B(○)에서 기록한 값은 모두 선형적인 관계를 보이며 이 값들을 선형회귀 방정식으로 plotting 하였다. 이때 선형회귀 방정식의 기울기 값이 R_{in} 이며 교감 신경이 부교감 신경보다 작은 기울기를 보였다. D는 C의 방법으로 구한 R_{in} 값들과 세포의 크기를 반영하는 세포막 용량(C_m , pF)간의 상관관계를 보여준다.

3.2. 주골반절 신경세포 종류에 따른 5-HT₃ 수용체의 특성

기존 연구에 의하면 MPG 신경세포 중 T-형 칼슘전류를 나타내는 대부분은 tyrosine hydroxylase에 대한 면역-조직학적 염색에서 양성을 보이는 교감신경세포인 반면, T-형 전류가 없는 세포는 부교감신경을 포함한 기타 다른 신경세포들이라 하였다(Zhu 등, 1995). 또 교감신경세포에 존재하는 T-형 칼슘통로는 세 가지 아형($\alpha 1G$, $\alpha 1H$, $\alpha 1I$)중 $\alpha 1H$ 임이 이미 보고된 바 있다(Lee 등, 2002). 또한 T-형 칼슘 전류 있는 교감신경에는 GABA_A 수용체가 발현되어 있으며, 부교감 신경에는 GABA_A 수용체 발현이 미미함이 보고되었다(Kong 등, 2002). 이러한 교감 및 부교감 신경을 구분하는 기준을 바탕으로 본 실험에서는 5-HT 수용체 중 이온통로로써 역할을 하는 수용체인 5-HT₃ 수용체가 세포군에 따라 발현의 차이가 있는지를 칼슘 이미징 및 전기생리적 방법을 통하여 확인하였다.

그림 7A에 나타난 바와 같이 T-형 칼슘 전류가 있는 교감신경세포에서 GABA_A 수용체 전류가 발생하며, T-형 전류가 없는 부교감 신경에서는 GABA_A 전류가 유발되지 않았다. 선행연구(Kong 등, 2001)에서 GABA_A 수용체의 활성화는 교감 신경을 탈분극시켜 세포내 칼슘을 증가시키는 것이 관찰되었다. 따라서 세포내 칼슘 이온농도 측정을 통해 여러 세포들 간에 GABA 및 5-HT에 의한 반응의 차이가 있는지를 확인하였다. 여러 개의 MPG 신경세포를 관찰하면서 GABA(10 μ M)와 5-HT(10 μ M)를 번갈아 가하여 GABA 및 5-HT에 의한 반응을 확인하였다. GABA에 의해 칼슘이 증가하는 세포의 경우에는 5-HT에 반응하지 않았으며, GABA에 반응하지 않은 세포의 경우에는 5-HT에 의한 칼슘의 증가가 관찰되었다(그림 7B). 칼슘 이미징을 통해서 MPG 신경세포들 간에는 GABA와 5-HT에 대한 반응의 차이가 있음을 알 수 있었다.

다음은 세포들 간에 반응성의 차이를 패치 클램프 방법을 통하여 살펴보았다. 교감 신경세포에서는 선택적 GABA_A 수용체 효현제인 mucimol(10 μ M)에 의해 내향성 전류가 유발되었으며, 5-HT(10 μ M)에 의해서는 전류가 유발되지 않았다(그림 8A). 반면 mucimol에 반응하지 않은 부교감 신경세포는 5-HT에 의해 내향성 전

류가 유발되었다(그림 8B). MPG 신경세포는 mucimol에 반응하는 세포(57.3 %)와 5-HT에만 반응하는 세포(30.9 %), 그리고 두 가지 모두에 반응하는 세포(11.8 %)로 구분되었다(그림 8C-F). Mucimol에만 반응하는 세포에서 기록된 mucimol과 5-HT에 의한 내향성 전류의 크기는 각각 $5.5 \pm 0.7 \text{ nA}$ 와 $0.04 \pm 0.01 \text{ nA}$ (n=39, $p < 0.001$, 그림 8D, F)였으며, 이동 전하량은 각각 $40.2 \pm 4.2 \text{ nC}$ 과 $0.1 \pm 0.03 \text{ nC}$ (n=39, $p < 0.001$, 그림 8D, F)다. 5-HT에 반응하는 세포에서 기록된 mucimol과 5-HT에 의한 내향성 전류의 크기는 각각 $0.14 \pm 0.03 \text{ nA}$ 와 $3.3 \pm 0.3 \text{ nA}$ (n=21, $p < 0.001$, 그림 8D, F)였으며, 이동 전하량은 각각 $0.9 \pm 0.2 \text{ nC}$ 과 $8.8 \pm 1.4 \text{ nC}$ (n=21, $p < 0.001$, 그림 8D, F)였다. 두 가지 모두에 반응하는 세포의 mucimol과 5-HT에 의한 내향성 전류 크기는 각각 $3.3 \pm 0.8 \text{ nA}$ 와 $3.9 \pm 0.9 \text{ nA}$ (n=8, $p > 0.05$, 그림 8D, F)였으며, 이동 전하량은 각각 $24.1 \pm 6.8 \text{ nC}$ 과 $8.1 \pm 2.4 \text{ nC}$ (n=8, $p < 0.001$, 그림 8D, F)였다.

세포에 따라 5-HT가 막전압에 미치는 영향을 확인하였다. GABA_A 수용체 전류 유무와 세포막 특성을 이용하여 세포를 구분하였다. 부교감 신경세포에서 5-HT는 탈분극을 유발하였으며, 교감신경세포에서는 탈분극이 일어나지 않았다. 동일 세포에서 막전압 고정(voltage-clamp) 상태로 전환하여 막전류를 측정하면 부교감 신경에서는 내향성 전류가 유발되고 교감 신경세포는 그렇지 않음을 관찰할 수 있다(그림 9A, B). 이상의 결과들을 볼 때 5-HT₃ 수용체는 GABA_A 수용체가 발현되지 않은 부교감 신경세포에 주로 존재하며, 세포막을 탈분극 시킴을 알 수 있었다.

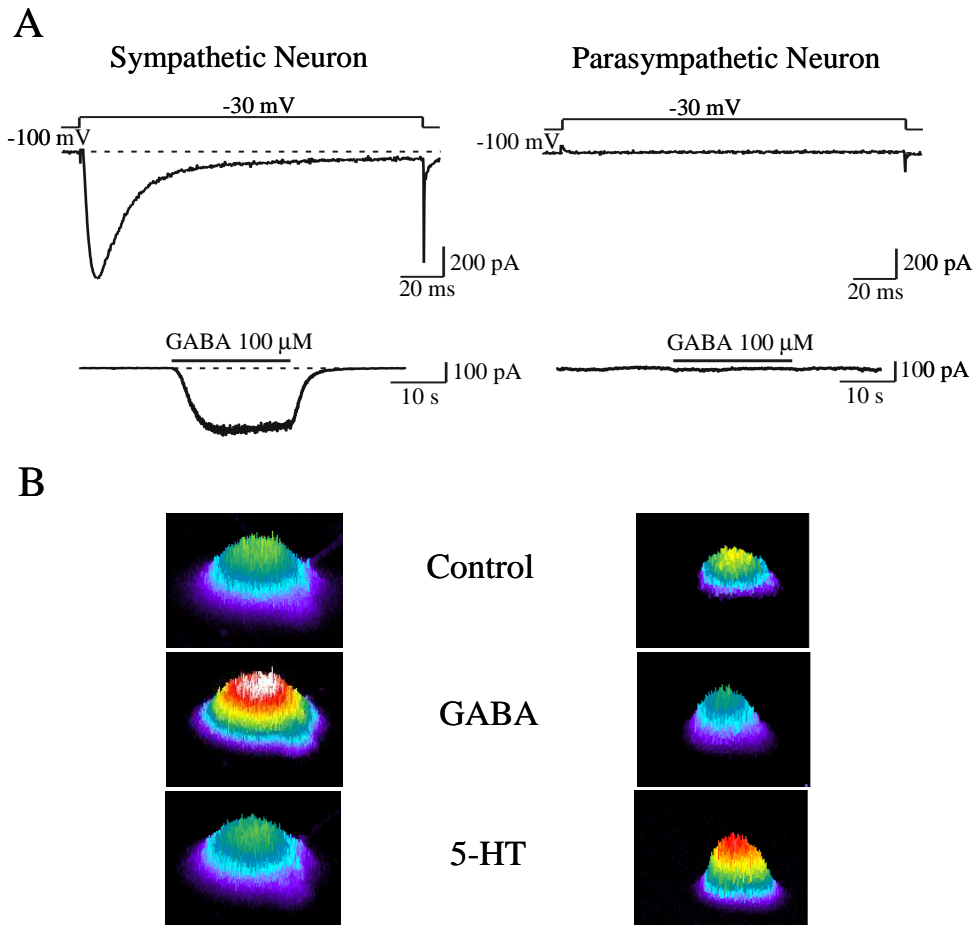


그림 7. 주골반절 세포에서 GABA와 5-HT에 의한 세포내 칼슘 변화. 그림 A는 T-형 칼슘 전류와 GABA 전류를 기록한 것이다. T-형 전류는 막전압을 -100 mV에 고정된 상태에서 -30 mV까지 탈분극 자극을 가하여 기록하였으며, GABA 전류는 막전압을 -80 mV에 고정하여 기록하였다. B. GABA(10 μM) 및 5-HT(10 μM)에 의한 세포내 칼슘 변화를 형광 칼슘 이미징 방법으로 측정하였다. 두개의 세포를 동시에 측정하였으며 GABA와 5-HT를 번갈아 관류하였다. 붉은 색으로 갈수록, 크기가 커질수록 세포내 칼슘 증가가 큰 것을 의미하며, 세포내 칼슘은 Fluo-3/AM(5 μM)을 부하하여 냉각 CCD를 이용한 형광 이미징 장치를 통해 측정하였다. GABA 및 5-HT를 가한 순서에 따른 차이는 없었다.

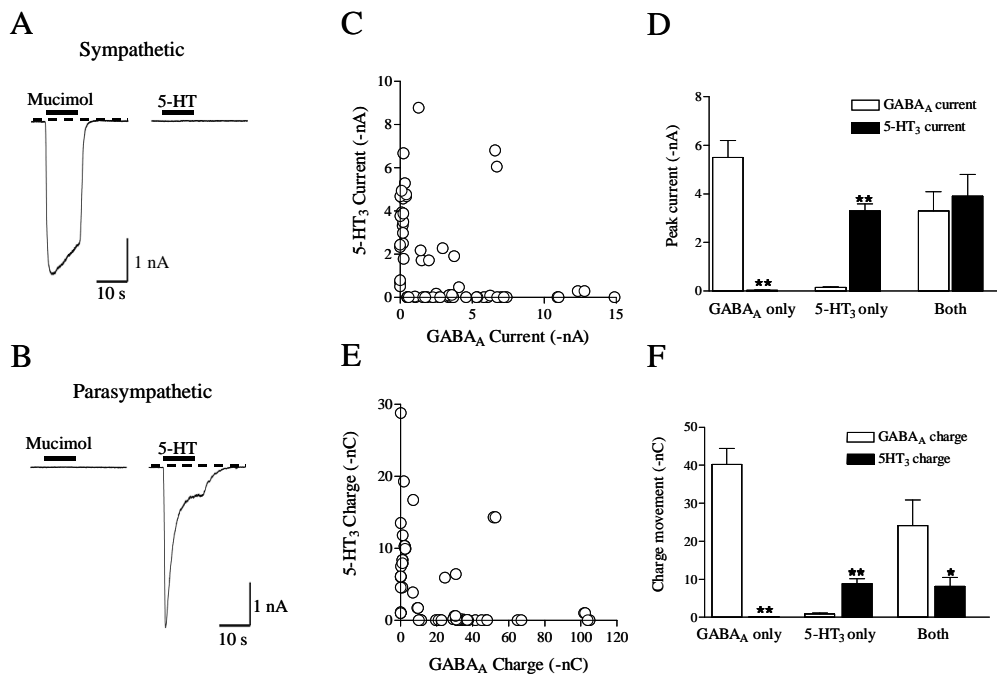


그림 8. 주골반절 신경세포 종류에 따른 GABA_A 및 5-HT₃ 수용체 전류. A. 교감 신경세포에서 GABA_A 수용체 효현제인 mucimol(10 μ M) 및 5-HT(10 μ M)에 의해 유발된 전류. B. 부교감 신경세포에서 관찰되는 mucimol 및 5-HT에 의해 유발된 전류. A 및 B는 모두 막전압을 -80 mV에 고정된 상태에서 약물을 10초간 가하여 기록하였다. C. mucimol 및 5-HT에 의한 peak 전류의 크기를 (x,y) 좌표로 나타내었다. Mucimol 및 5-HT 활성화 전류는 절대값(-nA)으로 표시하였다. D. Mucimol에만 반응하는 세포(n=39), 5-HT에만 반응하는 세포(n=21) 및 모두에 반응하는 세포군(n=8)의 peak 전류값의 요약. E. mucimol 및 5-HT에 의해 이동한 전하량(C) 값을 (x,y) 좌표로 나타내었다. 전하량은 절대값(-nC)으로 표시하였다. F. Mucimol에만 반응하는 세포, 5-HT에만 반응하는 세포 및 모두에 반응하는 세포군의 전하량 값의 요약. 전류 기록 모두는 gramicidin-perforated patch 방법을 사용하여, 전압 고정법(HP=-80 mV)하에서 측정하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며, **p<0.001, *p<0.05

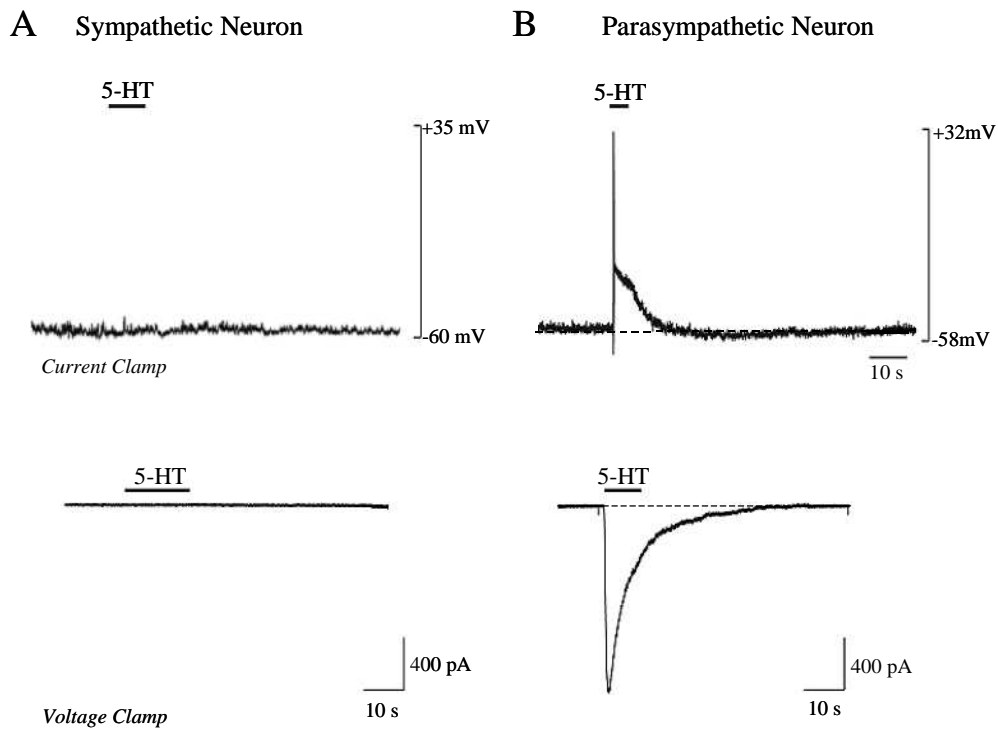


그림 9. 5-HT가 주골반절 신경세포의 막 전압 및 전류에 미치는 효과. A. 교감 신경세포에서 5-HT에 의한 막전압의 변화 및 전류의 변화. B. 부교감 신경세포에서 5-HT에 의한 막전압 및 막전류의 변화. GABA_A 전류 유무 및 세포막 특성으로 세포를 구분하였다. 막전압은 전류 고정법 하에서, 전류는 전압 고정법으로 측정하였다.

3.3. 5-HT₃ 전류의 농도-반응 관계 및 5-HT₃ 수용체 차단제의 효과들

5-HT에 의해 활성화되는 전류의 크기는 0.3 μM ~100 μM 의 범위에서 가한 농도에 비례하여 증가하는 농도 의존적 반응을 나타내었다(그림 10A). 30 μM 이상의 농도에서 포화(saturation)되는 경향을 보였으며, 5-HT의 EC₅₀는 3.4 μM (n=6)이었다. 5-HT에 의해 활성화 되는 전류가 5-HT₃ 수용체를 통한 것인지 확인하기 위하여 5-HT₃ 수용체 차단제를 사용하여 확인하였다. 그림 11A는 10 μM 5-HT에 의해 활성화 되는 전류가 5-HT₃ 수용체 차단제인 MDL7222(1 μM)에 의해 완전히 차단되는 것을 보여준다. 5-HT에 의해 활성화 되는 전류는 MDL7222 뿐만 아니라 또 다른 5-HT₃ 수용체 차단제인 Y25130(10 μM)에 의해서도 완전 차단되었다(그림 11B). 이상의 결과로 MPG 신경세포에서 활성화되는 전류는 5-HT₃ 수용체 전류임을 알 수 있었다.

3.4. 5-HT₃ 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘 이온 농도 변화

칼슘 이온 농도 측정에 사용되는 형광 염료(fura-2/AM)를 이용하여 5-HT에 의하여 칼슘이 증가하는 기전을 확인하고자 하였다. 전기생리 실험장치와 형광 측정장치를 결합하여, 막전압 혹은 전류 변화와 세포내 칼슘 농도 변화를 동시에 측정하였다. 그림 12A에 나타난 바와 같이 막전류 고정 상태에서 5-HT(10 μM)는 막전압의 탈분극과 함께 세포내 칼슘 농도를 급격히 증가시켰다. 한편 막전압을 -80 mV에 고정하여 막전압 의존성(voltage-dependent) 칼슘 통로의 활성화를 배제한 상태에서도 5-HT는 내향성 전류와 함께 세포내 칼슘 농도를 증가시켰다(그림 12B). 막전압 고정법으로 측정한 칼슘 유입 양이 전류 고정법으로 측정한 양보다 다소 적음을 알 수 있었다. 이는 전류를 고정한 경우 세포내 칼슘 이온의 유입이 5-HT₃ 수용체 통해 직접 유입되는 부분과 5-HT에 의한 탈분극으로 막전압 의존적 칼슘통로가 활성화되어 들어오는 부분이 같이 있음을 의미한다.

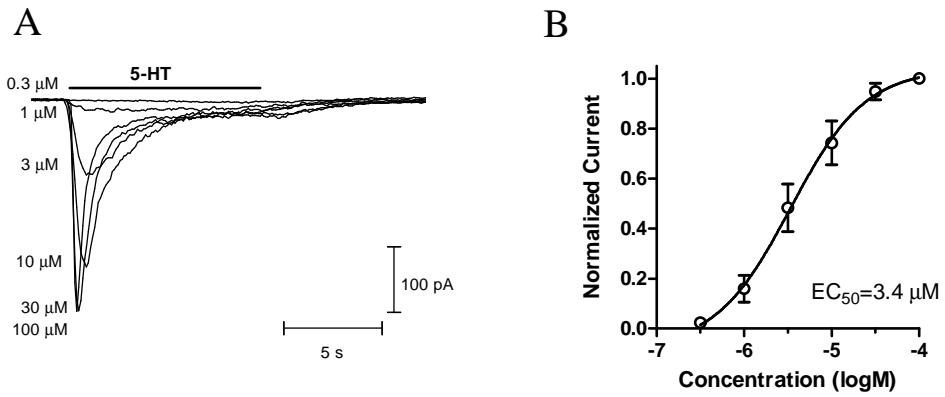


그림 10. 5-HT에 의해 활성화 된 전류의 농도-반응 관계. A. 막전압을 -80 mV로 고정시킨 상태로 여러 농도의 5-HT 투여에 의해 유도되어진 전류를 관찰하였다. 0.3 μM에서 100 μM까지 5-HT의 농도를 증가시켰을 때 전류의 크기가 증가하는 것을 보여준다. B. 농도를 증가시켰을 때 유도된 전류 최대 값의 농도-반응 관계 (concentration-response relationship)를 나타낸다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다.

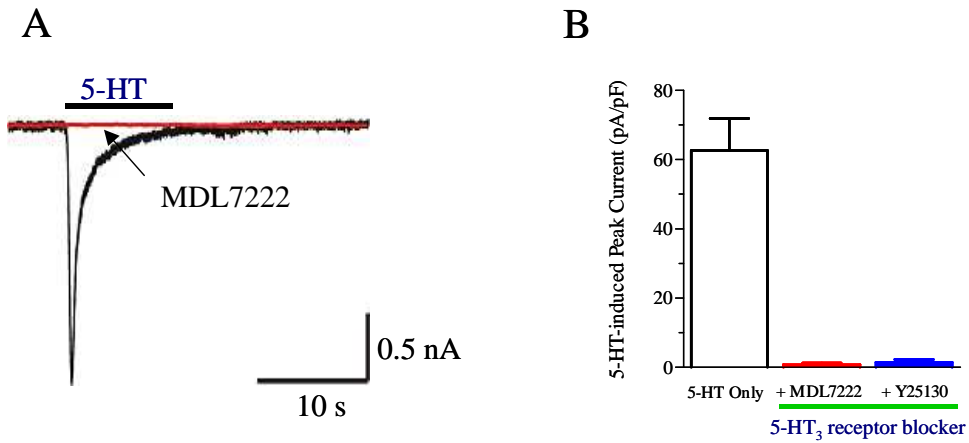


그림 11. 5-HT에 의해 활성화 된 전류에 대한 5-HT₃ 수용체 차단제의 효과. A. 막전압을 -80 mV로 고정시킨 상태에서 10 μ M 5-HT에 의해 유발된 내향성 전류에 5-HT₃ 수용체 차단제가 미치는 영향을 확인하였다. 5-HT에 의해 유발된 내향성 전류는 5-HT₃ 수용체 차단제 중 하나인 MDL7222(1 μ M) 전처치에 의해 완전 차단되는 것을 보여준다. B. 5-HT에 의해 활성화된 전류에 대한 5-HT₃ 수용체 차단제들의 억제효과를 요약하였다. MDL7222와 Y25130의 농도는 각각 1 μ M과 10 μ M이었으며, 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 4-5례.

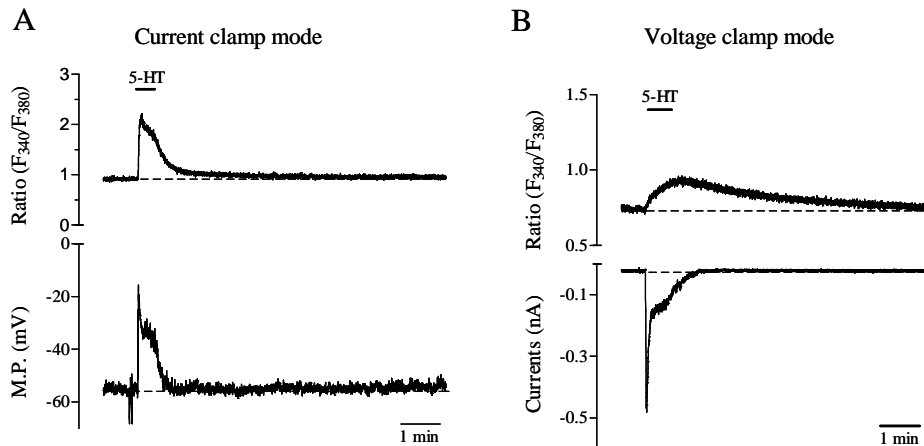


그림 12. 막전류 및 전압 고정 상태에서 5-HT에 의한 세포내 칼슘이온 농도 변화. A. 막전류 고정 상태(current-clamp, $I=0$)에서 $10 \mu\text{M}$ 5-HT 투여에 의한 막전압의 변화와 세포내 칼슘이온농도 변화를 동시에 기록하였다. B. 막전압 고정 상태(voltage-clamp, $HP=-80 \text{ mV}$)에서 5-HT에 의한 막전류의 변화와 세포내 칼슘이온 농도 변화를 동시에 기록한 결과이다. 이때 막전류 및 전압 고정은 그라미시딘 천공 패치 클램프 방법을 사용하였으며, 세포내 칼슘이온농도 측정은 칼슘 측정 염료인 fura-2를 부하시켜 형광 측정 장치로 기록하였다. 칼슘 농도는 340 nm와 380 nm로 여기(excitation) 시켰을 때 방출되는 빛의 세기의 비(Ratio F_{340}/F_{380})로 나타내었다. MP는 막전압(membrane potential)을 나타냄.

3.5. GABA_B 수용체 활성이 5-HT₃ 수용체에 미치는 영향

5-HT₃ 수용체는 다양한 신경전달물질로부터 영향을 받을 수 있다. 본 실험에서는 5-HT₃ 수용체가 GABA 수용체 중 하나인 GABA_B 수용체에 의해 조절되는 것을 확인하였다. GABA_B 수용체는 G-단백질과 연결된 수용체로서 baclofen에 의해 활성화된다. 그림 13A는 5-HT에 의해 유발되는 내향성 전류가 GABA_B 수용체 효현제인 baclofen(10 μ M)에 의해 가역적으로 억제되는 것을 보여준다. 이러한 결과와 일치하게 baclofen은 효과는 5-HT에 의한 탈분극을 억제하였다(그림 13B). Baclofen은 5-HT₃ 수용체 효현제인 mCPBG에 의해 활성화되는 전류 역시 억제하였다(그림 14A). 5-HT 및 mCPBG(10 μ M)에 의해 유발된 전류의 크기는 각각 -1108 ± 259.5 pA와 -443.3 ± 88.3 pA였으며, baclofen을 전처리 하였을 경우 전류의 크기는 각각 -129.5 ± 43.0 pA, -69.2 ± 14.45 pA로 감소하였다(그림 13AB).

Baclofen에 의한 5-HT₃ 수용체 전류 억제효과가 GABA_B 수용체를 매개하여 이루어지는지를 확인하기 위하여 GABA_B 수용체 차단제인 CGP35348을 사용하여 확인하였다. 그림 15A는 5-HT에 의해 활성화된 내향성 전류가 baclofen에 의해 억제되며, CGP35348을 전처리 하였을 때 회복되는 것을 보여준다. 5-HT에 의해 활성화되는 전류의 크기는 -528 ± 68.8 pA(n=4)였으며, baclofen에 의해 -60.3 ± 20.3 pA로 감소하였으며, CGP35348을 baclofen과 함께 전처리 하였을 경우에는 -356 ± 29.8 pA로 회복되었다. 따라서 baclofen에 의한 5-HT₃ 수용체 전류 억제는 GABA_B 수용체 활성화에 의해서 일어남을 알 수 있었다.

GABA_B 수용체가 5-HT₃ 수용체에 의한 칼슘 증가에 영향을 미치는지를 확인하였다. 세포내 칼슘 농도는 Fura-2/AM를 MPG 세포에 부하한 뒤 기록하였다. 부교감 신경에서 5-HT (10 μ M)는 세포내 칼슘농도를 증가시켰으며, 5-HT에 의한 칼슘 증가는 5-HT₃ 수용체 차단제인 MDL7222(1 μ M)에 의해 완전히 차단되었다(그림 16A). 5-HT에 의해 증가된 칼슘은 baclofen 전처리에 의해 현저히 감소하였으며, baclofen을 제거한 후에는 5-HT에 의한 반응이 회복되는 양상을 보였다(그림 16B). 칼슘 농도는 340 nm와 380 nm로 여기하였을 때 방출되는 빛의 세기의 비

(Ratio F_{340}/F_{380})로 나타내었으며, 칼슘 농도 변화된 양은 Δ ratio (F_{340}/F_{380})로 나타내었는데, $10 \mu\text{M}$ 5-HT에 의해 증가된 ratio는 0.8 ± 0.2 였으며, baclofen을 전처리 한 경우에는 0.09 ± 0.07 , baclofen을 제거한 다음 다시 5-HT를 가하였을 경우에는 0.7 ± 0.2 였다(그림 16C, $p < 0.01$).

3.6. Adenylyl cyclase와 protein kinase A 억제가 5-HT₃ 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘증가에 미치는 영향

부교감 MPG 세포에서 5-HT₃ 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가가 adenylyl cyclase (AC)-PKA 경로를 통해 일어나는지를 확인하였다. 5-HT를 가하였을 경우 칼슘이 증가하였으며(Δ ratio= 0.72 ± 0.2 , n=4) AC 억제제인 SQ22536($200 \mu\text{M}$)을 전처리 한 후엔 5-HT에 의한 칼슘 증가가 현저히 감소하였다(Δ ratio= 0.06 ± 0.02 , n=4, $p < 0.01$, 그림 17A, B). SQ22536을 제거한 후에는 5-HT에 의한 효과가 회복되었다. 5-HT₃ 수용체에 PKA가 미치는 효과를 알아보기 위해서는 세포막 투과가 가능한 myristoylated PKA inhibitor (PKAI)를 이용하여 확인하였다. 5-HT에 의한 칼슘 증가(Δ ratio= 0.83 ± 0.2 , n=4)는 PKAI(100 nM)을 전처리 한 후엔 증가가 현저히 감소하였다(Δ ratio= 0.09 ± 0.07 , n=4, $p < 0.01$, 그림 17C, D). GABA_B 수용체는 G-단백질과 연결되어 있으며, G_{i/o} 단백질을 활성화하여 AC를 억제하는 것으로 알려져있다. AC와 PKA 억제는 5-HT₃ 수용체에 의한 칼슘 증가를 감소시켰으며, 이는 GABA_B 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가 억제와 유사하였다. 따라서 MPG 세포에서 GABA_B 수용체는 AC-PKA 의존적 경로를 통해 5-HT₃ 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가를 조절할 것으로 사료된다.

3.7. Forskolin이 5-HT₃ 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘증가에 미치는 영향

5-HT₃ 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가가 AC 활성화제인 forskolin(FSK)에 의해

영향을 받는지를 확인하였다. FSK는 AC를 활성화하여 세포내 cAMP의 농도를 증가시키며, 증가된 cAMP는 PKA 활성화하여 다양한 생리적 기능을 수행한다. 5-HT($10 \mu\text{M}$)에 의한 칼슘 증가($\Delta\text{ratio}=0.4\pm 0.05$, $n=5$)는 FSK($1 \mu\text{M}$) 전처리 한 후에 현저히 증가하였다($\Delta\text{ratio}=1.04\pm 0.27$, $n=5$, $p<0.01$, 그림 18A,B). 이는 5-HT₃ 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가가 세포내 cAMP에 의해 조절됨을 의미한다.

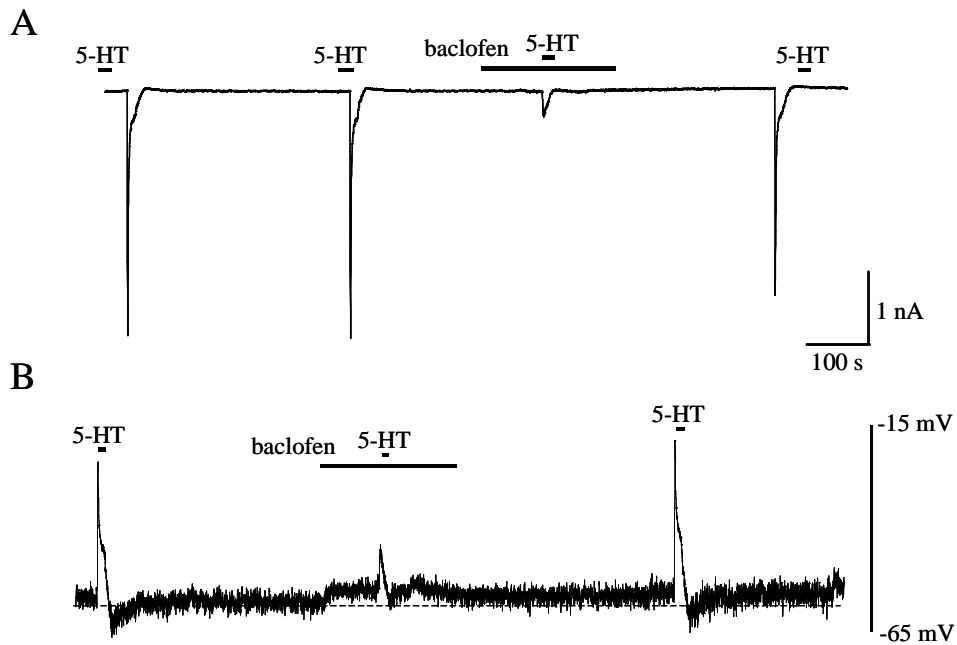


그림 13. GABA_B 수용체 활성이 5-HT에 의한 전류 및 탈분극에 미치는 영향. A. 막전압을 -80 mV에 고정한 후 10 μM 5-HT를 가하여 내향성 전류를 유발시켰다. 반복투여시 크기가 일정함을 확인한 후에 GABA_B 수용체 효현제인 baclofen(10 μM)을 전처치하여 5-HT 전류에 미치는 영향을 확인하였으며, 약물을 제거한 다음 다시 회복되는 것을 확인하였다. B. 막전류 고정 상태(current-clamp, I=0)에서 10 μM 5-HT 투여에 의한 탈분극에 baclofen이 미치는 효과.

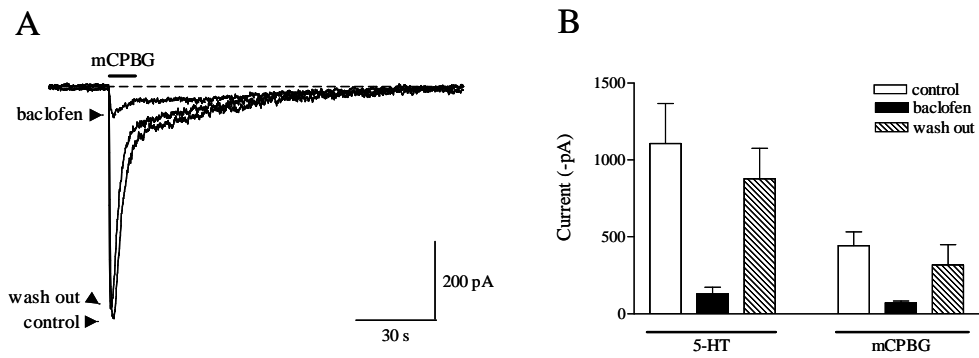


그림 14. GABA_B 수용체 활성이 5-HT₃ 전류에 미치는 영향. A. 부교감 신경세포에서 5-HT₃ 수용체 효현제인 mCPBG(10 μ M)에 의해 유도되어진 전류를 baclofen이 억제하는 것을 보여주며, baclofen을 제거하면 원래의 크기로 되돌아오는 것을 볼 수 있다. B. 5-HT 및 mCPBG에 의해 유발된 내향성 전류에 baclofen의 억제 효과를 요약하였다. 모든 기록은 gramicidin-perforated patch 하에서 막전압을 -80 mV에 고정하여 실험하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 5-6례.

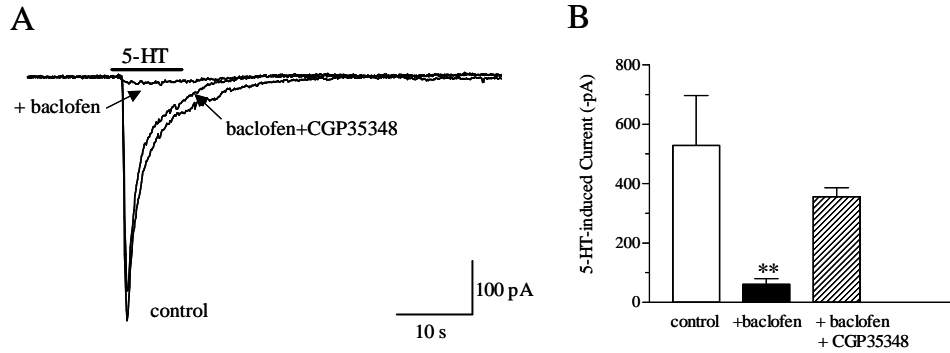


그림 15. GABA_B 수용체 차단제가 baclofen의 억제효과에 미치는 영향. A. 부교감 신경세포에서 5-HT(10 μ M)에 의해 유도되어진 전류를 baclofen(10 μ M)이 억제하는 것과 baclofen 억제효과가 GABA_B 수용체 차단제인 CGP35348(10 μ M)에 의해 감소되는 것을 보여준다. B. 5-HT에 의해 유발된 내향성 전류에 baclofen의 억제 효과와 GABA_B 수용체 차단제 효과를 요약하였다. 모든 기록은 gramicidin-perforated patch 하에서 막전압을 -80 mV에 고정된 상태에서 하였으며, 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다.

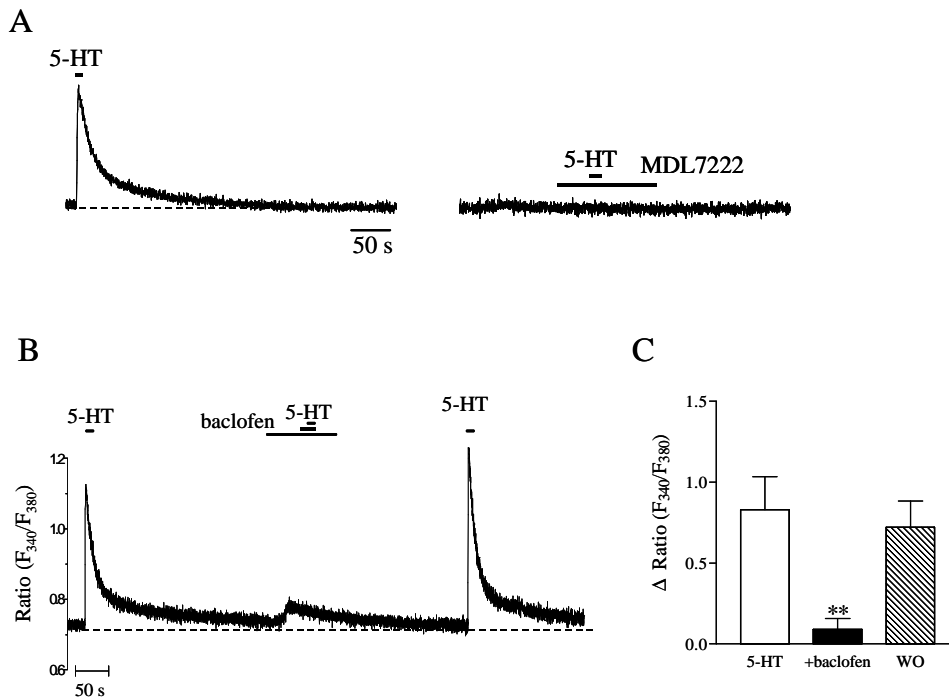


그림 16. GABA_B 수용체 활성이 5-HT에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향. A. 부교감 신경세포에서 5-HT(10 μM)에 의한 세포내 칼슘 증가가 5-HT₃ 차단제(MDL7222, 1 μM)에 의해 차단되어, 5-HT에 의한 칼슘 증가가 5-HT₃ 수용체를 통해 일어남을 알 수 있다. B. 5-HT에 의한 칼슘 증가는 baclofen(10 μM) 전처치에 의해 현저히 억제되었으며, baclofen을 제거한 후에는 회복되었다. C. 5-HT에 의한 칼슘증가에 미치는 baclofen의 효과 요약. 세포내 칼슘이온도농도 측정은 칼슘 측정 염료인 fura-2를 부하시켜 형광 측정장치로 기록하였다. 막대 그래프의 y축은 Δratio 로 표시하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 5례. **p<0.01

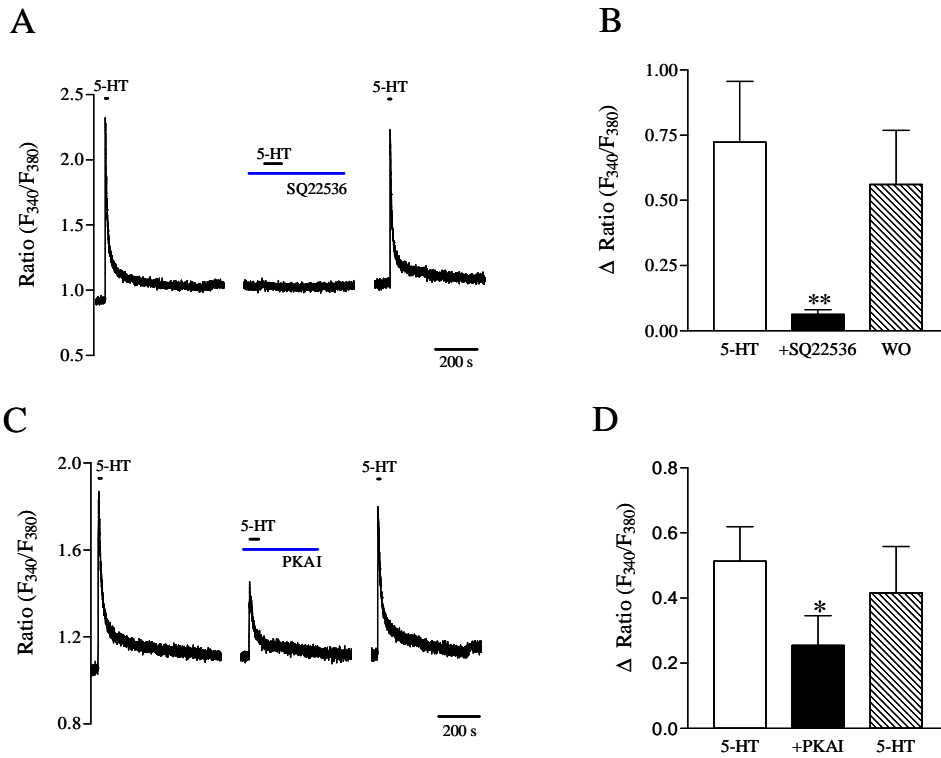


그림 17. Adenylyl cyclase와 PKA가 5-HT에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향. A. 5-HT($10 \mu\text{M}$)에 의한 세포내 칼슘 증가에 대한 AC 억제제인 SQ22536($200 \mu\text{M}$) 전처리 효과. B. SQ22536 전처리 전후의 5-HT에 의한 칼슘 증가 요약. WO는 SQ22536을 충분히 제거한 다음 다시 5-HT를 가하였을 경우임. C. 5-HT($10 \mu\text{M}$)에 의한 세포내 칼슘 증가에 대한 PKA 억제제인 myristoylated PKA inhibitor(PKAI, 100 nM) 전처리 효과. D. PKAI 전처리 전후의 5-HT에 의한 칼슘 증가 요약. 두 번째 5-HT는 PKAI을 충분히 제거한 다음 다시 가하였을 경우임. 세포내 칼슘이온도농도 측정은 칼슘 측정 염료인 fura-2를 부하시켜 형광 측정장치로 기록하였으며, 그래프의 y축은 Δ ratio로 표시하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 4-5례, ** $p < 0.01$

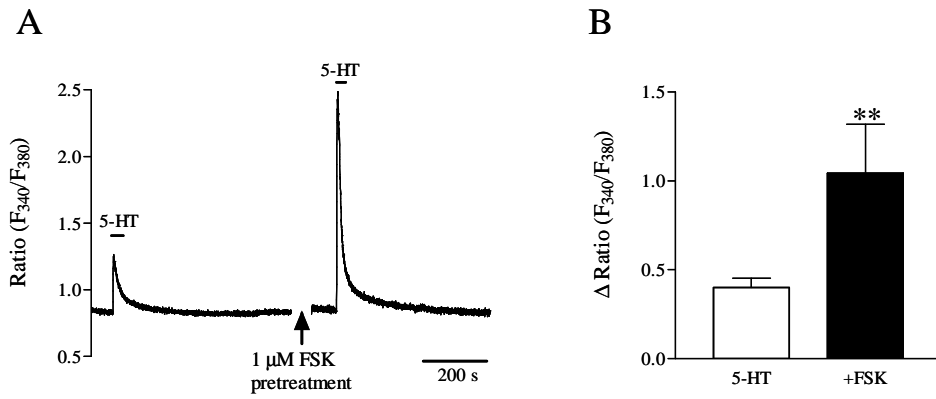


그림 18. Forskolin이 5-HT에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향. A. 5-HT(10 μM)를 가하여 세포내 칼슘을 증가시켰으며, AC 활성제인 forskolin(FSK, 1 μM)을 전처리한 후 5-HT에 의한 칼슘 증가를 확인하였다. B. FSK 전처리 전후의 5-HT에 의한 칼슘 증가 요약. 세포내 칼슘이온농도 측정은 칼슘 측정 염료인 fura-2를 부하시켜 형광 측정장치로 기록하였으며, 그래프의 y축은 ratio의 증가분(Δ ratio)으로 표시하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 실험 배수는 5례. **p<0.01

3.8. 5-HT₃ 및 GABA_B 수용체의 분자생물학적 동정

MPG 신경세포에서 발현되는 5-HT₃ 및 GABA_B 수용체를 확인하기 위해, MPG를 비롯한 또 다른 자율신경절세포인 상경신경절(superior cervical ganglia, SCG)과 뇌의 조직으로부터 mRNA를 분리한 다음, 특정 수용체에 선택적인 primer를 이용하여 역전사 중합 연쇄반응을 실시하였다. 5-HT₃ 수용체는 두 가지 아형 즉 5-HT_{3A}와 5-HT_{3B}가 알려져 있다. MPG와 SCG에는 5-HT_{3A} 및 5-HT_{3B} 모두가 발현되어있으며, 뇌에는 5-HT_{3A}만 확인할 수 있었다. GABA_B 수용체는 GABA_{B1}과 GABA_{B2} 두 종류의 소단위가 이합체(heterodimer)를 구성하는데, GABA_B 수용체의 GABA_{B1}과 GABA_{B2}은 MPG, SCG 및 뇌에서 모두 발현되어있음을 확인할 수 있다(그림 19A, B).

3.9. G-단백질과 관련된 5-HT 수용체들의 분자생물학적 동정

MPG 신경세포에서 발현되는 metabotropic 5-HT 수용체를 확인하기 위해, MPG로부터 mRNA를 분리한 다음 특정 수용체에 선택적인 primer(표 2)를 이용하여 역전사 중합 연쇄반응을 실시하였다. 5-HT₃를 제외한 12 종류의 5-HT 수용체의 발현유무를 확인하였다. 그 결과 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ 및 5-HT₇ 수용체의 발현이 확인되었다(그림 20).

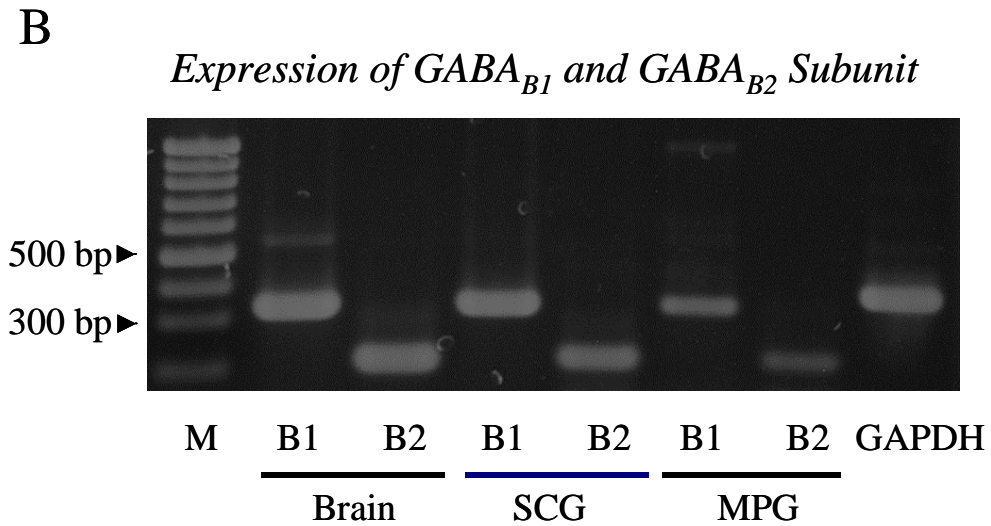
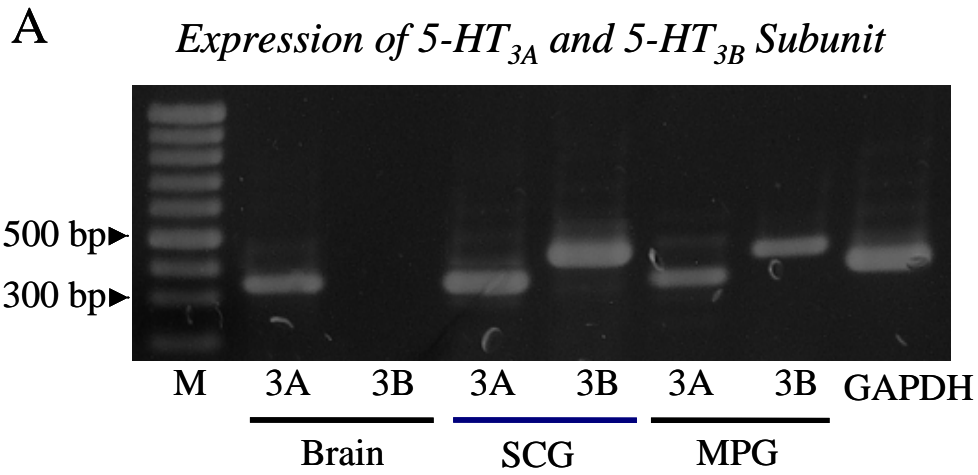


그림 19. MPG에 발현된 5-HT₃ 및 GABA_B 수용체의 분자생물학적 동정. 자율신경절인 MPG와 SCG 그리고 뇌에서 발현되는 5-HT₃ 수용체 아형(A) 및 GABA_B 수용체 소단위(B)들을 확인하기 위해, 이들 조직으로부터 mRNA를 분리한 다음, 특정 아형 또는 소단위에 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄중합반응을 실시하였다. 대조군으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였으며, M은 DNA size marker임.

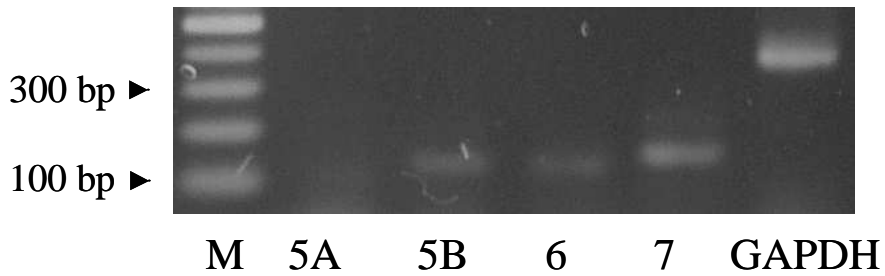
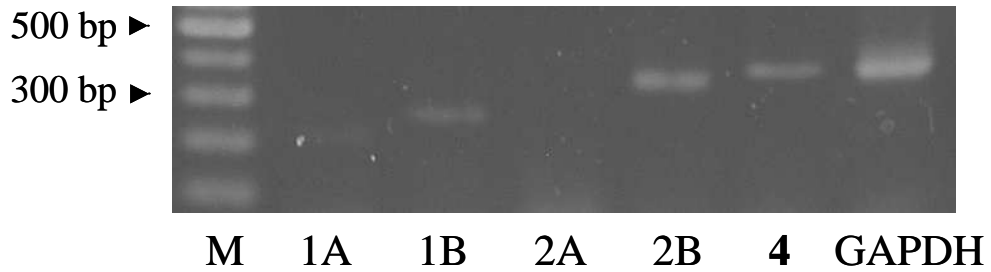


그림 20. 주골반절에 발현된 metabotropic 5-HT 수용체의 분자생물학적 동정. MPG 존재하는 metabotropic 5-HT 수용체 아형을 확인하기 위해, 조직으로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 수용체에 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄중합반응을 실시하였다. 대조군으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였으며, M은 DNA size marker임.

3.10. 주골반 신경세포에서 5-HT₂ 수용체 활성이 세포내칼슘에 미치는 영향

5-HT₂ 수용체는 G-단백질과 연결된 수용체로서 주로 PLC- β 를 매개로 신호전달을 한다(Peroutka, 1995; Barns 및 Sharp, 1999). 다른 metabotropic 5-HT 수용체들과 마찬가지로 5-HT₂ 수용체는 세포에 따라 다른 신호전달 경로를 가지기도 한다(Raymond 등, 2001). 5-HT₂ 수용체는 세포에 따라 여러 신호전달체계를 가지며, 세포내 칼슘 변화 및 이온통로 활성화에 중요한 역할을 담당한다. RT-PCR 분석을 통해 5-HT_{2B} 수용체가 MPG에 발현되어 있음을 확인하였다(결과 3.9. 참조). 따라서 본 실험에서는 5-HT 및 5-HT₂ 수용체 효현제를 사용하여, 이들에 의해 세포내 칼슘 변화를 측정하고자 하였다. 교감 신경세포에서 5-HT(10 μ M) 및 5-HT_{2B} 수용체의 선택적 효현제인 BW723C86(10 μ M)은 세포내 칼슘을 증가시켰다(그림 21A). 부교감 신경세포에서 5-HT는 5-HT₃ 수용체를 활성화하여 일시적인(transient) 칼슘 반응을 보였으며, BW723C86에 의해서는 상대적으로 느린 증가를 보였다(그림 21B). BW723C86에 의해 증가되는 칼슘의 양은 교감 및 부교감 신경세포에서 차이를 보이지 않았다(그림 21C, $p > 0.05$).

교감 및 부교감 신경세포에서 BW723C86에 의해 유발되는 세포내 칼슘 증가가 5-HT_{2B} 수용체를 활성화하여 일어난 것임을 확인하기 위하여 선택적 5-HT_{2B} 수용체 차단제인 SB204741(10 μ M)를 전처리 하였다. SB204741를 전처리 한 후에는 교감 및 부교감 신경세포 모두에서 BW723C86에 의한 칼슘 증가가 소실되었다(그림 22A-C, $p < 0.01$). BW723C86의 농도가 10 μ M, 30 μ M 그리고 100 μ M로 증가할수록 BW723C86에 의한 칼슘 증가가 커지는 농도-의존적 반응을 나타냈다(그림 22D). 이상의 결과를 볼 때 5-HT_{2B} 수용체는 MPG 신경세포에서 세포의 종류와는 상관없이 세포내 칼슘 증가를 유발함을 알 수 있었다.

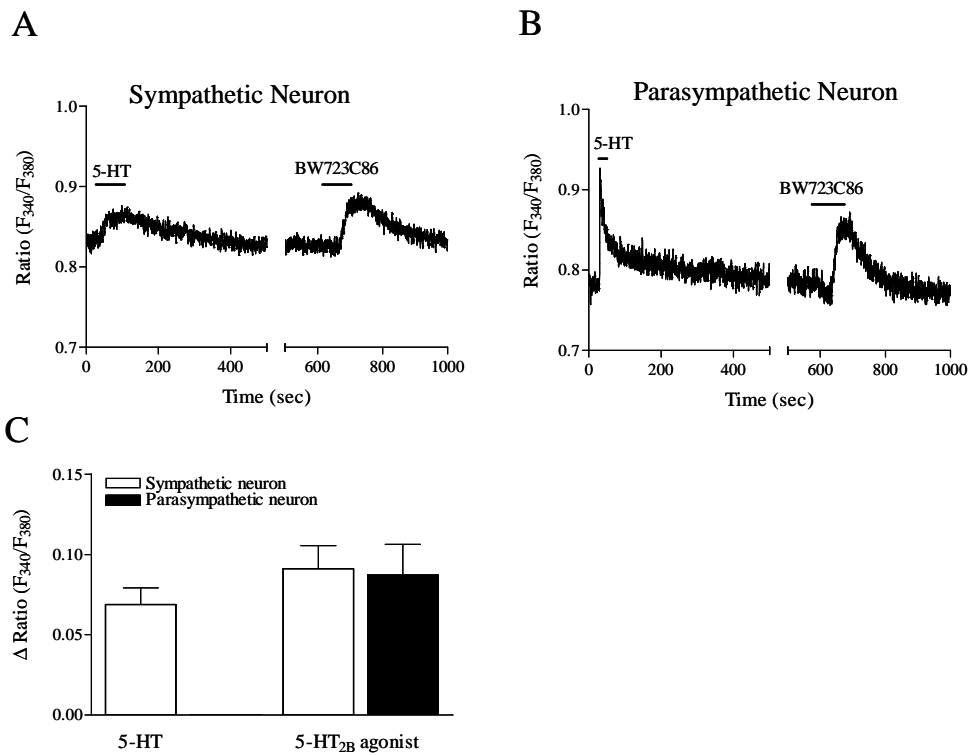


그림 21. 5-HT_{2B} 수용체 활성이 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향. A, B. 교감(A) 및 부교감 신경세포(B)에서 5-HT(10 μ M)와 BW723C86(10 μ M)를 가하여 세포내 칼슘 변화를 관찰하였다. C. 5-HT 및 BW723C86에 의한 세포내 칼슘 증가 값의 요약. 흰색 그래프는 교감신경세포, 검은색 그래프는 부교감 신경세포의 값을 나타낸다. 막대 그래프의 y축은 칼슘 증가를 반영하는 ratio(F₃₄₀/F₃₈₀)의 증가분(Δ Ratio)으로 나타내었다. 세포내 칼슘이온도농도 측정은 칼슘 측정 염료인 fura-2/AM을 부하시켜 형광 측정장치로 기록하였으며, 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 5-6례.

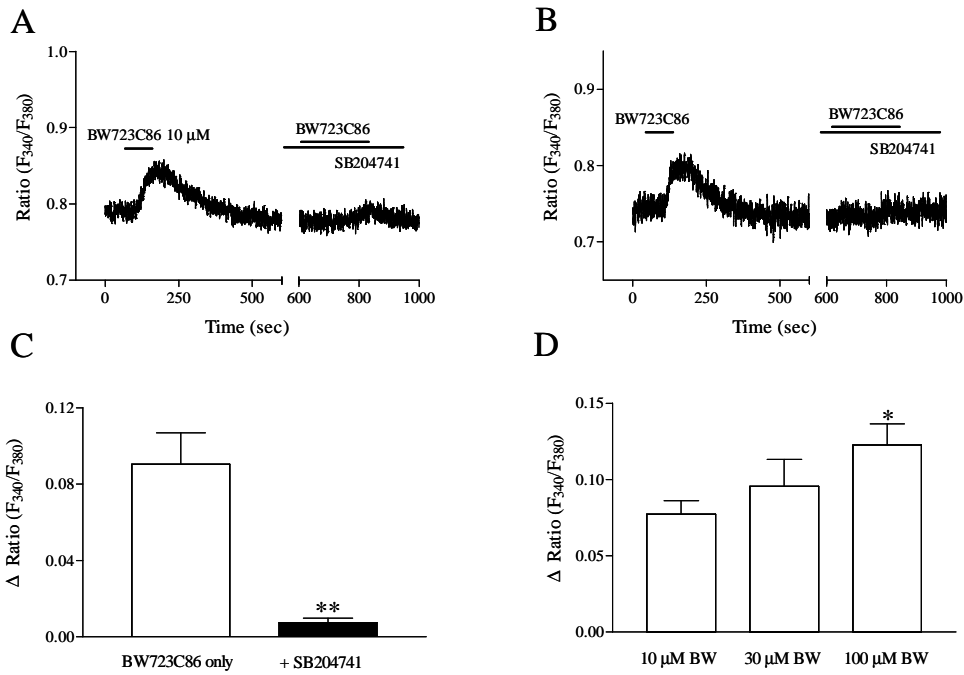


그림 22. 5-HT_{2B} 수용체 차단제가 5-HT_{2B}에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향. A 및 B. 교감(A) 및 부교감 신경세포(B)에서 5-HT_{2B} 수용체 차단제인 SB204741 전처리 전후의 BW723C86(10 μM)에 의한 칼슘 변화를 기록하였다. C. 5-HT_{2B} 차단제인 SB204741 전처리 전(BW723C86 only)과 후(+SB204741)의 BW723C86에 의한 칼슘 증가 요약. D. BW723C86 농도에 따른 세포내 칼슘 증가 값의 요약. 막대 그래프의 y축은 칼슘 농도를 반영하는 ratio(F₃₄₀/F₃₈₀)의 증가분(Δ Ratio)으로 나타내었다. 세포내 칼슘이온도농도 측정은 칼슘 측정 염료인 fura-2/AM를 부하시켜 형광 측정장치로 기록하였으며, 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 4-6.

3.11. 세포외 칼슘이 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가에 미치는 영향

세포 종류에 따른 5-HT_{2B} 수용체에 의한 칼슘 증가의 차이가 없었으므로(결과 3.10 참조), 이후의 실험에서는 5-HT₃ 수용체가 없는 교감 신경세포에서 세포내 칼슘 농도를 측정하였다. 5-HT_{2B} 수용체는 세포내 칼슘 저장소로부터 칼슘을 동원하는 것으로 알려져 있다(Ullmer 등, 1996, Foguet 등, 1992). 따라서 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘이온 농도 증가가 세포외 칼슘유입 때문인지, 세포내 칼슘 저장소로부터의 유리인지를 확인하였다. 먼저 정상 2 mM Ca²⁺이 포함된 정상 관류액하에서 BW723C86(10 μM) 가하여 칼슘 증가가 일어나는지를 확인한 후, 세포외액에서 칼슘을 제거한 Ca²⁺-free 용액으로 5분이상 관류시킨 후 BW723C86을 세포에 가하여 칼슘 변화를 확인하였다. Ca²⁺-free 용액을 관류시키면 기저(basal) 칼슘 농도가 감소하는 경향을 보이며, 이 상태에서 BW723C86를 가하면 정상 칼슘일 때와는 달리 칼슘 증가가 관찰되지 않았다(그림 23A). 관류액의 순서를 바꾸어 실험하여도 동일한 결과를 얻을 수 있었는데 이는 BW723C86에 의해 증가하는 세포내 칼슘은 세포내 칼슘 저장소로부터 유리되는 것이 아니라 세포외로부터 유입되는 것임을 알 수 있었다.

3.12. 비선택적 양이온 통로 차단제가 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가에 미치는 영향

5-HT_{2B} 수용체에 의해 매개되는 칼슘 유입이 비선택적 양이온통로(non-selective cation channel, NSCC)를 통해 일어나는지를 확인하기 위해 NSCC 차단제인 La³⁺과 Gd³⁺ 사용하였다. 그림 24A는 BW723C86(100 μM)에 의한 칼슘 증가가 NSCC 차단제인 La³⁺(100 μM)에 의해 완전 소실되는 것을 보여준다. La³⁺을 제거한 후 다시 BW723C86를 가하면 세포내 칼슘 증가가 다시 관찰되었다. BW723C86에 의한 칼슘 증가는 La³⁺뿐만 아니라 또 다른 NSCC 차단제인 Gd³⁺(10

μM 에 의해서도 완전 소실되었다(그림 24B). 이러한 결과는 BW723C86에 의한 칼슘 유입이 NSCC를 통한 것임을 시사한다.

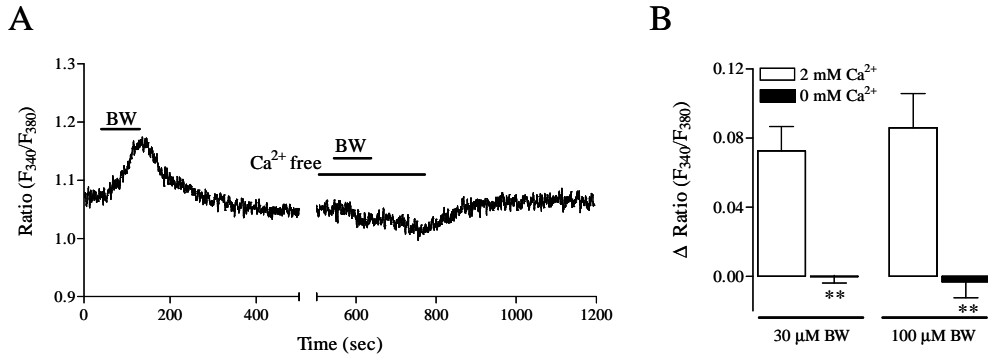


그림 23. 세포의 칼슘이 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. A. 정상 관류액(2 mM Ca²⁺)에서 100 μM BW723C86(BW)을 가하여 칼슘 증가를 확인한 후, 세포의 칼슘을 제거한 Ca²⁺-free 관류액(0 mM Ca²⁺)을 5분간 관류한 후 100 μM BW723C86에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다. Ca²⁺-free 조건에서는 세포내 기저(basal) 칼슘 농도가 조금 감소하였으며, BW723C86에 의해 칼슘 변화는 관찰되지 않았다. B. 정상 관류액과 Ca²⁺-free 관류액 조건에서 30 μM 과 100 μM의 BW723C86에 의해 증가되는 칼슘의 양을 비교하였다. 막대 그래프의 y축은 칼슘 농도를 반영하는 fura-2의 ratio(F₃₄₀/F₃₈₀)의 증가분(ΔRatio)으로 나타내었으며, 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 4-5례. ** p<.001

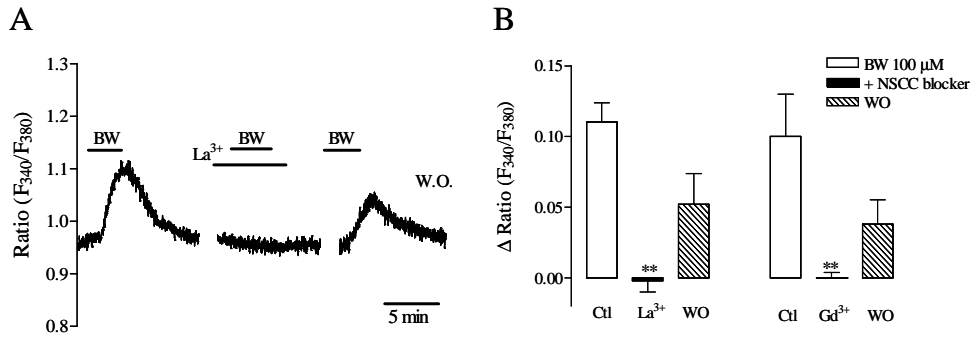


그림 24. 비선택적 양이온 통로 차단제가 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. A. 100 μM BW723C86(BW)을 가하여 세포내 칼슘이온 농도의 변화를 확인한 다음 NSCC 차단제인 La³⁺(100 μM)을 전처리하여 BW에 의한 칼슘 변화를 확인하였다. 충분히 정상 관류액으로 관류시킨 다음 BW를 다시 가하면 칼슘 증가가 회복되는 것을 관찰할 수 있다. B. BW723C86에 의한 칼슘 증가가 NSCC 차단제인 La³⁺(100 μM)과 Gd³⁺(10 μM)이 미치는 효과를 요약하였다. 막대 그래프의 y축은 fura-2의 ratio(F₃₄₀/F₃₈₀)의 증가분(Δ Ratio)으로 나타내었으며, Ctl은 BW723C86에 의한 칼슘 증가 크기를 나타내며, WO은 NSCC 차단제를 제거한 후의 BW723C86에 의한 칼슘 증가 크기이다. 실험 레수는 5례. ** p<.001

3.13. 5-HT_{2B} 수용체 효현제에 의해 유발된 내향성 전류의 특성

5-HT_{2B} 수용체에 의해 매개되는 칼슘 증가가 NSCC 차단제인 La³⁺과 Gd³⁺ 등에 의해 차단되었는데, 실제로 세포막을 통한 내향성 전류가 유발되는지를 확인하였다. Gramicidin-perforated patch 상태에서 막전압을 -80 mV에 고정된 후 100 μM의 BW723C86를 가하였다. BW723C86는 내향성 전류를 유발하였으며(-145±11.0 pA, 그림 25A), 유발된 전류는 NSCC 차단제인 La³⁺(100 μM)에 의해 억제되었다(-48±5.0 pA, 그림 25C). 내향성 전류가 유발되었을 때 -100 mV부터 +50 mV까지 ramp 자극을 주어 전류-전압 관계를 살펴보았다. BW723C86에 의해 유발된 전류는 내향 전류보다는 외향성 전류의 크기가 더 크며, outward-going rectification 되는 특징을 보였다(그림 25C). 이상의 결과는 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의해 내향성 전류가 유발됨을 알 수 있다.

3.14. PLC가 5-HT_{2B} 수용체에 의한 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향

5-HT_{2B} 수용체는 G_q 단백질과 연결되어있으며, G-단백질은 phospholipase C(PLC)를 활성화시킴으로 다양한 생리적 기능을 수행한다. MPG에서 5-HT_{2B} 수용체에 의한 칼슘 증가가 PLC를 매개하는지를 확인하였다. BW723C86에 의해 세포내 칼슘 농도 증가하였으며, PLC 억제제인 1 μM U73122를 10분간 전처리 한 후에는 BW723C86에 의한 칼슘 증가가 현저히 억제되었다(그림 26A, p<0.01). 한편 PLC 억제제의 비활성 형태인 U73343 전처리에 의해서는 여전히 칼슘 증가가 유발되었다(그림 26B, p>0.05). 이상의 결과에서 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가는 PLC에 의해 매개됨을 알 수 있었다.

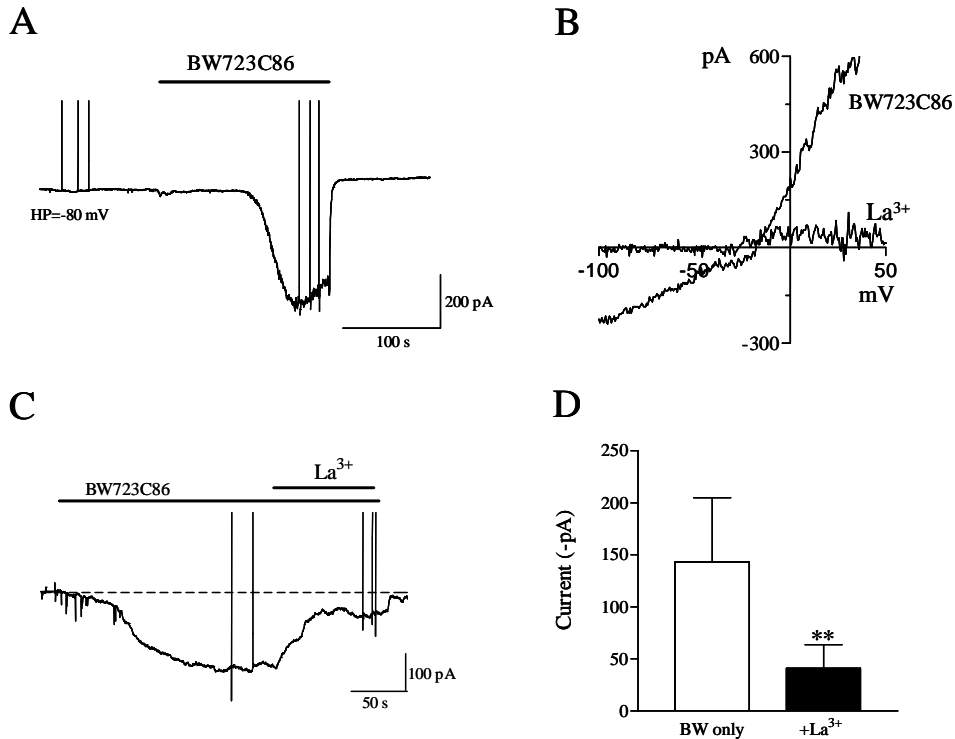


그림 25. 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의해 유발된 내향성 전류의 특성. A. 막전압을 -80 mV에 고정한 상태에서 100 μ M BW723C86을 가하여 전류가 유발되는지를 확인하였다. B. BW723C86에 의해 내향성 전류가 유발될 때 -100 mV부터 +50 mV까지 ramp 전압을 가하여 전류를 측정하였으며, 이것을 토대로 전류-전압 곡선을 그렸다. C. BW723C86에 의해 유발된 내향성 전류에 NSCC 차단제인 La³⁺(100 μ M)이 미치는 영향을 살펴보았다. D. BW723C86(100 μ M)에 의해 유발된 전류의 크기(BW only)와 La³⁺과 함께 가하였을 때 전류의 크기 값을 나타내었다(n=4). 전류값은 내향성 전류의 최대값을 취하였다. 모든 측정은 그라미시딘 천공 패치 방법으로 측정하였으며, steady-state 전류는 그림 3에서 설명한 것처럼 FeliX 프로그램으로 연결하여 기록하였고, pClamp6를 통해 ramp 전압을 가하였다. Y축은 유발된 전류의 절대값(-nA)으로 나타내었다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. ** p<.001

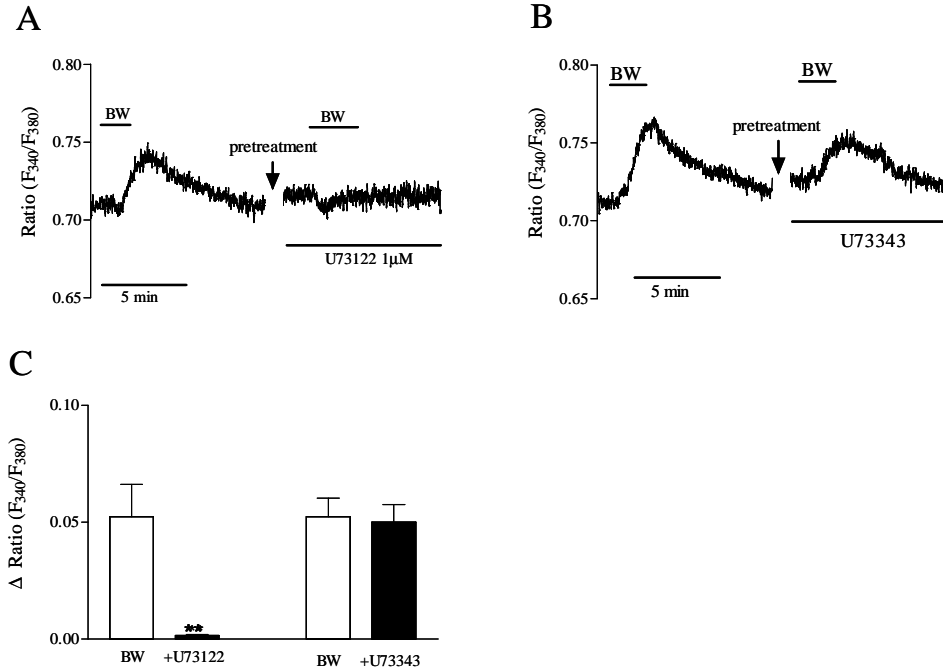


그림 26. PLC가 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가에 미치는 영향. A. 먼저 100 μM BW723C86(BW)을 가하여 칼슘 증가를 확인 한 다음 10분간 PLC 억제제인 U73122를 전처치(preTx)하였다. 전처치 후 다시 BW를 가하였을 때 칼슘 증가를 확인 하였다. B. 동일한 조건에서 U73122의 유사체로 PLC를 억제하지 않는 약물인 U73343을 전처치하여 BW에 의한 칼슘 변화를 측정하였다. C. BW에 의해 증가되는 칼슘에 대한 U73122 및 U73343의 효과 요약. 막대 그래프의 y축은 fura-2의 ratio(F₃₄₀/F₃₈₀)의 증가분(Δ Ratio)으로 나타내었으며, 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 5-6례. ** p<.001

3.15. OAG가 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향

NSCC의 후보인 transient receptor potential(TRP) 통로들은 DAG 자체나 DAG metabolite들, 그리고 DAG에 의해 활성화되는 PKC 등 여러 세포내 조절자에 의해 조절된다. 따라서 세포막 투과가 가능한 DAG 활성화제인 oleyl-acetyl-glycerol (OAG)에 의해 세포내 칼슘이 조절되는지를 살펴보았다. 정상 상태에서 $100 \mu\text{M}$ OAG를 가하게 되면 세포내 칼슘이 크게 증가하며 불규칙적인 칼슘 oscillation을 보였다(그림 27). 그림 27B에서 나타난 바와 같이 $100 \mu\text{M}$ OAG는 세포외액에 칼슘을 제거한 경우에 칼슘을 증가시키지 않았으며, 세포 외부에 칼슘이 있는 상태에서만 칼슘 증가를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들로부터 DAG 활성화가 세포 외부로부터 세포내로 칼슘 유입을 증가시킨다는 것을 알 수 있다. DAG kinase는 ATP를 사용하여 DAG를 인산화시켜 phosphatidic acid(PA)로 만드는 기능을 한다. DAG kinase 억제제인 R59949(DAG kinase inhibitor II)는 DAG가 인산화되어 PA로 생성되는 것을 차단하여 DAG 농도가 높아지는 효과를 나타낸다(Topham 및 Prescott, 1999). R59949($10 \mu\text{M}$) 역시 세포내 칼슘을 증가시켰다. 이상의 결과들은 DAG 활성화가 세포내 칼슘을 증가시킴을 시사한다.

3.16. 주골반절 신경세포에 발현된 TRPC 통로의 분자생물학적 동정

MPG 신경세포에서 발현되는 TRPC 통로의 종류를 확인하기 위해, MPG로부터 mRNA를 분리한 다음 특정 수용체에 선택적인 primer(표 4)를 이용하여 역전사 연쇄중합반응을 실시하였다. TRPC1-7 중 TRPC1과 TRPC6통로의 발현이 확인되었으며, 나머지 TRPC 통로의 발현은 확인되지 않았다(그림 28B). 대조군으로는 뇌의 mRNA를 사용하였으며, TRPC2를 제외한 나머지 TRPC 통로들이 발현되어 있음을 알 수 있었다.

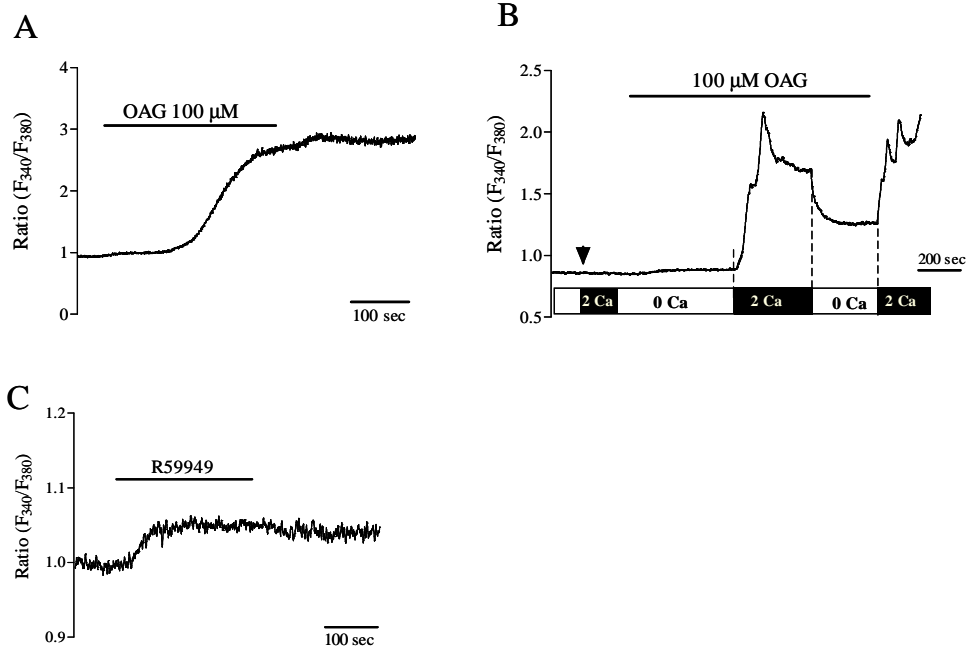


그림 27. OAG가 세포내 칼슘에 미치는 효과. A. 100 μ M OAG를 가하였을 때 칼슘의 증가를 보여준다. B. 그래프 아래 빈 부분은 칼슘이 없는(0 mM) 용액, 채워진 부분은 2 mM 칼슘이 포함된 정상 용액을 관류시킨 것이다. 칼슘이 제거된 용액에서 OAG에 의한 칼슘 증가는 관찰할 수 없었으며, 정상 용액하에서만 칼슘 증가를 관찰할 수 있었다. 칼슘이 증가된 상태에서 칼슘을 제거하면 칼슘의 양은 다시 감소함을 관찰할 수 있었다. C. DAG kinase 억제제(DAG kinase inhibitor II, R59949, 10 μ M)가 세포내 칼슘에 미치는 영향.

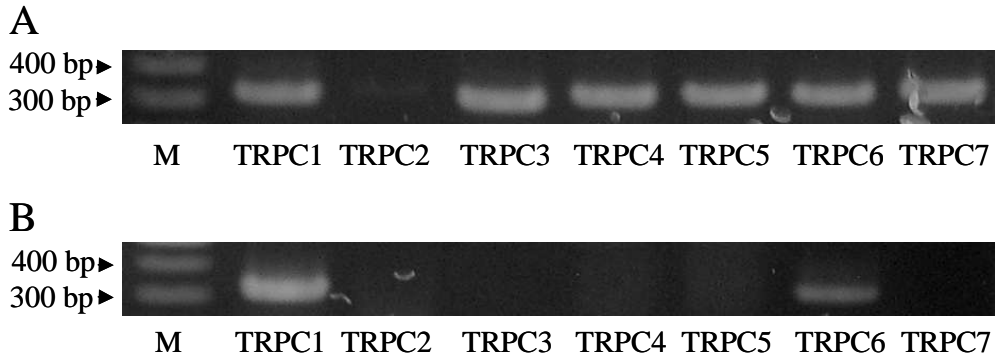


그림 28. 주골반절에 발현된 TRPC 통로의 분자생물학적 동정. MPG 존재하는 TRPC 통로를 확인하기 위해, MPG로부터 mRNA를 분리한 다음, 특정 TRPC 통로에 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄중합반응을 실시하였다(B). 대조군은 뇌로부터 mRNA를 분리하여 확인하였다(A). M은 DNA size marker임.

제4장 고찰

4.1. 주골반절 신경세포의 전기 생리적 특성

자율신경절 세포는 그 종류에 따라 활동 전압과 AHP(afterhyperpolarization) 그리고 활동전압의 방전패턴(firing pattern) 등과 같은 전기적인 특성들이 매우 다양하다(Adams 및 Harper, 1995). MPG 신경세포에서 전기생리적 특성들 중 교감 및 부교감 신경세포간에 유의한 차이가 있는 것은 세포막 용량(C_m), R_{in} , 활동전압 기간, 그리고 방전 패턴이었다. 나머지 전기적 특성들은 두군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 세포막 용량은 Zhu 등(1995)이 보고 하였듯이 교감신경세포가 부교감 신경세포보다 큰 값을 가졌다. R_{in} 의 크기는 부교감 신경세포가 교감 신경세포보다 크게 나타났는데 이는 R_{in} 와 세포막 용량간의 관계에서 보듯이 부교감 신경세포의 부피가 작기 때문이다. 또한 본 실험에서 얻은 R_{in} 값은 기존의 다른 자율신경절 세포에서 얻은 값보다 상대적으로 크게 나타났다. 예를 들면, 기니픽의 골반신경이나 하 장간막신경의 경우에는 각각 124 M Ω , 40-150 M Ω 정도였는데(Adams 및 Harper, 1995) 본 실험에서는 교감신경이 245 M Ω , 부교감신경이 542 M Ω 으로 크게 기록되었다. Intracellular recording의 경우에는 R_{in} 값이 상대적으로 낮게 나오며, whole-cell patch의 경우에는 크게 나오는 경향이 있다(Adams 및 Harper, 1995). 예를 들면 SCG 신경세포에서 R_{in} 값은 4 M K-aspartate를 전극용액으로 사용한 intracellular recording의 경우에는 약 40-50 M Ω , whole-cell patch인 경우에는 350 M Ω 로 높게 기록되었다(Adams 및 Harper, 1995). 본 실험에서 MPG 신경세포의 R_{in} 값이 크게 기록된 것은 perforated whole-cell patch를 사용하여 R_{in} 값을 구하였기 때문으로 사료된다.

자율신경절 세포에 탈분극 전류 주입(depolarizing current injection)에 대한 반응 특성에 따라 크게 두 가지 세포군 즉, tonic 혹은 phasic으로 분류된다(Adams 및 Harper, 1995). MPG 신경세포는 활동전압의 크기가 자극기간동안 지속되는 tonic 반응을 보이는 신경과 자극기간 동안 소실되는 phasic 반응을 신경

으로 구분되었다. MPG에서 교감신경세포는 활동전압 형성 양상이 tonic한 반면, 부교감 신경은 주로 phasic한 양상을 나타내는 것으로 알려졌다(Lee 등, 2002; Park 등, 2002). 한편 anode break excitation 현상은 주로 교감신경세포에서 spike 형성이 일어나며, 부교감 신경에서는 일어나지 않는 경향을 보였다. 교감신경포에서 post-spiking의 수가 많은 것은 post-spiking에 T-형 칼슘 전류가 관여하며(Lee 등, 2002), T-형 전류는 교감신경에 발현되어있기 때문이다. 이상의 결과들에서 세포 종류에 따른 전기생리적 특성들의 차이는 세포의 흥분성과 이와 관련된 이온 통로의 종류, 특성 및 조절에 관한 기초적 정보들을 제공할 수 있을 것이라 생각된다.

4.2. 주골반절 신경세포에서 5-HT₃ 수용체의 특성 및 조절

5-HT₃ 수용체는 GABA_A, glycine, 니코틴성 acetylcholine(ACh) 수용체들과 마찬가지로 5개의 소단위로 이루어진 오합체(pentamer) 구조의 이온통로이다. 5-HT₃ 수용체의 아형은 5-HT_{3A}와 5-HT_{3B} 두 가지가 알려져있다. MPG 신경세포와 또 다른 자율신경절 세포인 SCG에는 5-HT_{3A}와 5-HT_{3B} 두 가지 아형 모두 발현(5-HT_{3A/B}) 되어있었으며, 뇌에서는 5-HT_{3A}만 확인할 수 있었다. Morales 및 Wang은(2002) *in situ* hybridization과 RT-PCR 방법을 통해 5-HT_{3A}는 중추 및 말초신경계 모두에 발현되어 있는데 반해 5-HT_{3B}의 발현은 주로 말초신경계에 국한되어 있음을 보고하였다. Morales 및 Wang은(2002) 자율신경절인 SCG와 nodose 신경절(nodose ganglia, NG), 그리고 감각 신경절인 후근신경절(dorsal root ganglion, DRG)과 삼차신경절(trigeminal ganglion, TG)에서 5-HT_{3A}와 5-HT_{3B} 두 가지 모두다 발현 되어있음을 보고하였다. 쥐 뇌에서 5-HT_{3B}의 mRNA가 적은 것은 이 아형의 발현 패턴이 종(species)에 따라 다를 가능성과, 5-HT_{3B} 아형이 뇌의 특정 부위에 분포하여 그 전체적인 발현양이 적을 가능성이 있다. 사람의 뇌에서는 이 아형의 mRNA가 Northern blot(Davis 등, 1999)이나 RT-PCR 분석(Dubin 등, 1999)에 의해 확인되었다. 5-HT₃ 수용체

아형의 조합에 따라 그 생리적 기능이 다양하다. 예를 들면, 감각 신경 말단에 존재하는 5-HT₃ 수용체는 5-HT에 의한 통증과 밀접한 관련이 있다(Glaum 등, 1990). 감각신경절인 DRG 세포에서 5-HT_{3A}는 매우 다양한 크기의 세포에 발현되어 있음에 반해 5-HT_{3A/B}는 중간 및 큰 크기의 세포에 발현되어있었다(Morales 등, 2001). 이는 5-HT₃ 수용체 종류에 따라 유해감각과 같은 감각정보를 다르게 전달할 수 있음을 의미한다(Morales 등, 2001). 이와 같이, 5-HT₃ 수용체의 아형 구성에 대한 분포 및 전기생리적, 약리적 특성들에 대한 정보들은 말초 및 중추신경계 기능 특히 신경회로를 이해하는데 유용한 모델로 제시되었다(Morales 등, 2001). MPG에서도 서로 다른 5-HT₃ 수용체의 아형이 발현되어 있으며, 이러한 결과들은 MPG를 통한 비뇨생식 기관의 세로토닌성 조절 연구에 기초가 될 것으로 생각되며, 추후 이들 아형의 조합과 MPG의 구심성 및 원심성 신경회로와의 관계를 규명하는 연구가 필요하다고 사료된다.

최근에 MPG에 존재하는 교감 및 부교감 신경세포를 전기생리학적 및 신경화학적(neurochemical) 특성을 기준으로 구분하려는 시도가 되어져 왔다(Zhu 등, 1995). MPG 신경세포 종류에 따른 가장 큰 전기생리적 특징은 T-형 칼슘 전류의 존재 유무이다(Zhu 등, 1995; Zhu 및 Yakel, 1997). 또 GABA_A 수용체는 전기생리적으로는 T-형 칼슘 전류가 있는 세포에서 주로 존재하며(Kong 등, 2001), 교감 신경 marker인 TH에 염색이 되는 92 % 세포에 GABA_A 수용체 면역반응성(immunoreactivity)이 같이 염색되었다(Park JC 등). 이상의 결과들은 MPG 신경세포에서 GABA_A 수용체는 주로 교감 신경절 세포에 발현되어있음을 제시한다. 일부의 세포(11.8 %)에서는 GABA_A, 5-HT₃ 수용체 모두에 반응을 하였지만 본 연구에서 대부분의 GABA_A 수용체는 5-HT₃ 수용체는 서로 다른 세포에 존재함을 알 수 있었다. 이는 Akasu 등(1987)의 연구에서 보듯이 5-HT₃ 수용체가 방광 등을 지배하는 부교감 신경에 작용 할 수 있음을 제시한다. MPG에서 GABA_A, 5-HT₃ 수용체 뿐만 아니라 니코틴성 ACh 수용체도 교감 및 부교감 신경에 따라 그 특징이 다름이 알려졌다(Park 등, 2004). MPG는 다른 자율신경절과는 달리 교감 및 부교감 신경이 같은 신경절 내에 존재하는 독특한 자율신경절이다(Dail, 1992; Keast, 1999). 따라서 MPG에서 세포 종류에 따

른 GABA_A 수용체와 5-HT₃ 수용체의 존재는 MPG를 통해 자율신경절의 GABA_A 및 5-HT₃ 수용체 조절을 연구하는데 좋은 모델이 될 것으로 사료된다.

5-HT₃ 수용체는 다른 GABA나 dopamine과 같은 신경전달물질 유리를 조절하거나(van Hooft 및 Vijverberg, 2000), substance P나 내재성 cannabinoid 수용체 효현제인 anandamide와 같은 신경전달물질에 의해 조절된다(Hu 등, 2004; Oz 등, 2002). 또한 PKC(Sun 등, 2003; Zhang 등, 1995)와 PKA(Hubbard, 2000; Koyama, 2000)와 같은 protein kinase들에 의해 조절된다. PKC는 *Xenopus* oocyte에 이중 발현시킨 5-HT_{3A} 수용체 전류를 향진시키거나(Zhang 등, 1995), 5-HT₃ 수용체를 세포막에 많이 trafficking 시킴으로서 5-HT₃ 수용체 기능을 조절한다(Sun 등, 2003). PKA 혹은 cAMP는 마우스 해마 및 NG108-15 세포 등에서 탈감작(desensitization)을 증가시킨다(Koyama 등, 2000; Yakel 및 Jackson, 1988). 이상의 선행 연구들은 5-HT₃ 수용체가 다른 신경전달물질에 의해 조절될 수 있음을 보여주는데, 본 실험에서는 5-HT₃ 수용체가 G-단백질과 연결된 GABA_B 수용체에 의해 조절되는지를 살펴보았다. 5-HT₃ 수용체 전류와 5-HT₃에 의해 증가되는 세포내 칼슘은 선택적 GABA_B 수용체 효현제인 baclofen에 의해서 현저히 억제되었다. GABA_B 수용체는 G-단백질과 연결되었고, K⁺ 통로를 활성화시키거나, 막전압 의존적 칼슘 통로를 억제한다(Bowery 등, 2002; Harayama 등, 1998). GABA_B 수용체는 AC의 활성을 조절하는 것이 잘 알려져 있으며(Knight 및 Bowery, 1996; Kubota 등, 2003), 일부 세포에서는 PKC 활성을 조절하기도 한다(Taniyama 등, 1992). GABA_B 수용체는 G-단백질을 통해 forskolin에 의한 AC의 활성화를 억제하여 세포내 cAMP 농도를 떨어뜨리는 것이 잘 알려져있다(Bowery 등, 2002; Knight 및 Bowery, 1996). 이와 반대로 GABA_B 수용체 활성화는 뇌 slice에서 Gs 단백질과 연결된 β-아드레날린성 수용체 활성화에 의해 cAMP 생성을 촉진시키기도 하였다(Enna, 2000). 또한 쥐의 후각 팽대부(olfactory bulb)에서 GABA_B 수용체는 AC의 활성을 증가시켰는데, 흥미롭게도 이러한 효과는 PTX에 의해 차단되어, Gs 단백질이 아닌 G_{i/o} 단백질에 의해 일어남을 보여주었다(Olianas 및 Onali, 1999). 이들 선행연구들은 GABA_B 수용체가 forskolin에 의한 AC 활성화와 cAMP 생성

증가를 억제하거나 증가시키는 두가지 모드로 다 작용할 수 있음을 의미한다 (Bowery 등, 2002). 본 연구에서 GABA_B 수용체는 5-HT₃ 수용체 활성화에 의한 전류 및 칼슘 증가를 억제하였다. 또한 5-HT₃ 수용체에 의한 효과는 AC 및 PKA 억제에 의해 감소하였으며, forskolin을 통해 AC 활성화시켰을 때는 증가하였다. 이러한 결과들은 GABA_B 수용체 활성화가 cAMP/PKA 경로를 통해 5-HT₃ 수용체를 조절할 수 있음을 시사한다.

Forskolin에 의한 cAMP의 증가는 마우스 해마 및 NG108-15 세포 혹은 HEK239 세포에 이중발현된 5-HT_{3A} 수용체 등에서 탈감작(desensitization)을 증가시켰다(Yakel 및 Jackson, 1988; Hubbard 등, 2000). 또한 편도(amygdala) 신경의 연접전 세포막의 5-HT₃ 수용체는 PKA 의존적으로 GABA 유리를 조절하였다. 한편 NCB-20 세포에서 클로닝된 5-HT₃ 수용체를 *Xenopus* oocyte에 이중 발현시킨 시스템에서 forskolin(30 μ M)은 cAMP와는 상관없이 비경쟁적(non-competitive) 모드로 5-HT₃ 수용체를 억제하였다(Oz 등, 2002). 이와 같이 cAMP나 PKA에 의한 5-HT₃ 수용체 조절이 현재까지 명확하지 않으며, 다른 ionotropic 수용체의 조절에 비해 알려진 바가 적다. MPG에서 GABA_A 수용체와 5-HT₃ 수용체는 세포에 따라 다르게 분포하며, GABA_B 수용체는 AC/PKA 경로를 통해 5-HT₃ 수용체를 조절할 수 있음을 보여주었다. 따라서 본 연구의 결과들과 함께 다른 metabotropic 5-HT 수용체들에 의한 GABA_A 수용체 조절에 관한 연구가 병행된다면, 자율신경절에서 5-HT 및 GABA성 조절의 상호작용(cross-talk)을 규명하는 연구에 MPG가 좋은 도구가 되며, 비노 생식기 및 장운동 조절의 생리 및 병태생리적 기전을 이해하는데 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

4.3. 주골반절 신경세포에서 5-HT₂ 수용체의 활성화에 의한 칼슘 조절

5-HT₂ 수용체는 G_q-단백질을 매개로하여 PLC를 활성화시킨다(Raymond 등, 2001). MPG에서 확인된 5-HT_{2B} 수용체는 잘 알려진 대로 PLC를 활성화시키고, 일반적인 것 같지만 일부의 세포에서는 cAMP 농도를 증가시킨다(Lucaites 등, 1996). 뿐만 아니라 세포 분화 및 성장에도 관여하며 NO 생성을 증가시키기도 한다(Ishida 등, 1998). 또한 5-HT_{2B} 수용체는 세포내 칼슘 동원에 관여한다. 사람 폐동맥 내피 세포에서 IP₃ 생성과는 무관하게 ryanodine-민감성 칼슘 통로를 개방시켜 세포내 칼슘을 증가시킨다(Ullmer 등, 1996). 이와 반대로 *Xenopus* oocyte에 이중발현 시킨 5-HT_{2B} 수용체는 IP₃ 의존적으로 작용하며, IP₃ 수용체를 활성화하여 세포내 칼슘 oscillation을 유발시킨다. 이렇게 증가된 칼슘은 Ca²⁺-의존적 Cl⁻ 통로를 개방한다는 것이 알려졌다(Parekh 등, 1993). 따라서 MPG 세포에서 5-HT_{2B} 수용체 활성화가 세포내 칼슘을 증가시키는지 확인하였다. 5-HT_{2B} 수용체 활성화는 세포내 칼슘을 증가시켰으며, 세포군에 따라서는 차이가 없었다. 5-HT_{2B} 수용체 활성화에 의한 칼슘 증가는 세포외액에 칼슘을 제거한 상태에서는 일어나지 않고, NSCC 차단제에 의해 완전히 소실되는 것으로 보아, 5-HT_{2B}에 의한 칼슘 증가는 NSCC를 통해 세포외부로부터 유입되는 것임을 알 수 있었다. 실제로 내향성 전류가 유발되는지 확인하기 위해 막전압 고정법으로 확인하였을 때 내향성 전류가 유발되었다. 세포외부에서 내부로 칼슘이 유입되는 경로는 막전압-의존적 칼슘 통로, ACh나 NMDA 통로와 같은 리간드에 의해 개방되는 이온 통로(ligand-gated ion channels), G-단백질 활성화에 의해 개방되는 통로(receptor-operated channel, IROC), 세포내 칼슘 저장고에 민감한 통로(store-operated channel, SOC), vanilloid 수용체 그리고 transient receptor potential(TRP) 통로와 Na⁺-Ca²⁺ exchanger(NCX)와 같은 transporter 등이 알려져 있다(Hill, 2001). 이중 막전압-의존적 칼슘 통로는 세포막 전압을 -80 mV에 고정한 다음 탈분극 자극없이 steady-state 전류를 기록

하였기 때문에 막전압-의존적 칼슘 통로는 아님을 알수 있으며, 5-HT_{2B} 효현제에 의해 유발된 전류가 NSCC 억제제에 의해 차단되었으므로, 이 중 강력한 후보는 G-단백질에 의해 활성화될 수 있는 NSCC임을 알 수 있다. TRPC 통로는 NSCC로서 칼슘 투과도가 크며(Clapham, 2003; Huang, 2004), 이들은 모두 G-단백질에 의해 활성화 될 수 있다. TRPC 통로는 G-단백질을 활성화키는 효현제에 따라 무스카린형(muscarinic type, TRPC1, TRPC4, TRPC5), 히스타민성(histaminergic, TRPC3, TRPC6) 그리고 퓨린성(purinergic, TRPC7)으로 구분할 수 있다(Clapham, 2003). RT-PCR 분석을 하였을 때 뇌에는 TRPC2를 제외하고 나머지 TRPC 통로들이 많이 발현되어 있었다. 뇌에서 TRPC2 통로가 아주 약하게 발현되어 있었는데 이는 TRPC2 통로가 마우스 정자 혹은 쥐 서비골 기관(vomer nasal organ)과 같은 제한된 조직에서만 발현되어 있기 때문인 것으로 생각된다(Facemire 등, 2004; Minke 및 Cook, 2002). MPG에는 TRPC1과 TRPC6가 발현되는 것이 확인되었다. 5-HT_{2B} 수용체에 의한 칼슘 증가나 내향성 전류는 NSCC 차단제에 의해 차단되었는데, TRPC 통로들이 이들 차단제에 의해 차단된다. 그리고 5-HT_{2B} 수용체에 의해 활성화된 전류의 I-V 곡선의 모양은 TRPC6의 특성과 유사하였다(Clapham, 2004; Hoffmann, 1999). 5-HT_{2B}에 의한 칼슘 증가는 PLC 억제제에 의해 억제되며, PLC 억제제의 비활성형태인 U73343에 의해서는 억제되지 않아 5-HT_{2B}에 의한 칼슘 증가는 PLC를 매개로 함을 알수 있었다. PLC가 활성화되면 PLC는 세포막에 있는 PIP₂로부터 IP₃와 DAG를 생산한다. IP₃는 세포내 ER에 있는 IP₃ 수용체를 활성화시켜 ER로부터 칼슘을 유리시킨다. 한편 DAG는 protein kinase C를 활성화 시켜 여러 target를 인산화시킴으로 다양한 생리적 기능을 수행한다. TRP 통로는 세포내 지방성분의 전령(messenger)인 PIP₂, DAG, 혹은 DAG 대사물질들인 PUFAs(polyunsaturated fatty acids)들에 의해 조절될 수 있다(Clapham, 2003; Hardie, 2003; Huang, 2004). 세포에서 DAG를 활성화하기 위해서는 DAG 유사체(analogue)인 OAG를 가하거나 DAG kinase 억제제를 사용한다. DAG kinase는 ATP를 사용하여 DAG를 인산화시켜 phosphatidic acid(PA)를 생성하여 DAG 농도를 낮추는 역할을 한다. 이때 DAG kinase 억제제를 사용하면

DAG가 인산화되어 PA로 생성되는 것을 차단하여 DAG 농도가 높아지게 된다 (Topham 및 Prescott, 1999). MPG 신경세포에서 DAG 유사체 OAG나 DAG kinase 억제제를 가하여 DAG를 활성화하게 되면 세포내 칼슘이 크게 증가하였으며, 이러한 증가는 외부 칼슘이 없는 상태에서는 일어나지 않았다. 이는 세포외부로부터 칼슘 유입에 DAG 활성화가 관여함을 의미한다. TRPC3/6/7는 DAG에 의해 직접 활성화된다(Clapham, 2003; Hardie, 2003; Huang, 2004). TRPC6는 DAG에 의해 활성화되는데 대부분의 경우에 PKC와는 무관하게 일어나는 것으로 알려져있다(Hofmann, 1999; Clapham, 2003; Hardie, 2003; Shi 등, 2004). 일부에서는 PKC에 의해서 억제되거나(Estacion 등, 2004; Trebak 등, 2003), PKC와는 무관하게 Ca²⁺-calmodulin(CaM) kinase II에 의해 활성화된다(Shi 등, 2004). 추후 연구에서는 5-HT_{2B}에 의한 TRPC 통로 조절이 PKC를 매개하는지를 확인하여야 할 것이다. 쥐 시상(thalamus)의 사이신경세포(interneuron)에서 5-HT₂ 수용체는 세포내 칼슘 저장고로부터 칼슘 유리 및 막 전압 의존적 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입과는 무관하게 TRPC4 통로를 활성화하여 세포외부로부터 칼슘을 유입시켰다. 5-HT₂ 수용체 활성화에 의한 TRPC4를 통한 칼슘유입은 이들 신경세포의 가지돌기(dendrite)에서 GABA 유리를 조절하였다(Munsch 등, 2003). 또한 마우스 대장의 감각신경원에서 5-HT₂ 수용체와 5-HT₄ 수용체 효현제들에 의해 TRPV1 통로의 활성화가 증가되어 장 통증 증후군(visceral pain syndrome)에 5-HT₂ 및 5-HT₄ 수용체가 관련되어있음이 보고되었다(Sugiura 등, 2004). 이들 결과들은 5-HT₂ 수용체가 TRP 통로를 조절할 수 있음을 시사한다. 하지만 5-HT₂ 수용체와 TRPC6 수용체, 특히 5-HT_{2B} 수용체에 의한 TRPC6 통로 조절은 보고된 바가 없다. 이상의 결과들에서 MPG 신경세포의 5-HT_{2B} 수용체는 기존의 연구결과들과는 달리 세포내 칼슘 저장소로부터 칼슘을 동원하는 것이 아니라 TRPC 통로 등을 통해서 세포외부로부터 칼슘 유입을 증가시킴을 확인하였으며, 5-HT_{2B} 수용체의 작용은 PLC-DAG 의존적 경로를 매개로 함을 알 수 있었다. 따라서 MPG 신경은 ER과는 무관하게 PLC-DAG 경로를 통한 TRPC 통로 조절 연구에 좋은 모델이 될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 쥐 위문(gastric fundus)이 5-HT_{2B} 수용체에

의한 신호전달 및 이온통로 조절을 연구하는데 좋은 모델로 사용되는 것 처럼, MPG는 신경에서 5-HT_{2B} 수용체에 의한 신호전달 및 이온 통로 활성 조절 연구에 좋은 재료(material)가 될 것으로 사료된다.

제5장 결 론

수컷 쥐 자율 신경절인 주골반절 신경 세포들에 존재하는 5-HT 수용체의 특성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 주골반절 신경세포의 교감 및 부교감 신경세포들간에 C_m , R_{in} , 활동전압 기간, evoked discharge 그리고 post-anodal spiking과 같은 전기생리적 특성들에 차이를 보였다.
2. GABA_A 수용체와 5-HT₃ 수용체는 89 % 이상의 세포에서 같이 발현되지 않았으며, 5-HT₃ 수용체는 주로 부교감세포에서 발현됨이 확인되었다.
3. 주골반절 신경세포에서 5-HT₃ 수용체 및 GABA_B 수용체가 발현되어 있으며, 5-HT₃ 수용체는 AC/PKA 신호전달을 통해 GABA_B 수용체 활성화에 의해 조절되었다.
4. 주골반절 신경세포에 발현된 metabotropic 5-HT 수용체는 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ 및 5-HT₇ 수용체였다.
5. 5-HT_{2B} 수용체는 세포내로 칼슘 유입을 증가시켰으며, 칼슘 유입은 NSCC 차단제에 의해 차단되었다.
6. 5-HT_{2B} 수용체에 의한 칼슘 증가는 PLC 의존적이었으며, DAG 유사체인 OAG는 세포내 칼슘을 증가시켰다.

이상의 실험 결과들로 미루어 보아 주 골반 신경절 세포들에는 여러 종류의 5-HT 수용체가 존재하고 있음을 확인하였다. 5-HT₃ 수용체는 세포 종류에 따라 다르게 기능을 하였으며, AC/PKA 경로를 통해 조절됨을 확인하였으며, 5-HT_{2B} 수용체는 세포내 칼슘 저장고와는 무관하게 TRPC6를 개방하여 세포외로부터 칼슘을 유입시켰다. 이와 같은 5-HT₃ 및 5-HT_{2B} 수용체의 활성화는 자율신경 세포간의 상호작용 연구나 세포외로 칼슘 유입 조절 연구에 좋은 모델이 되며, 추후 기능적

인 연구가 진행될 때 자율신경절에서 세로토닌성 조절에 중요한 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

참고문헌

- Adams DJ, Harper AA. Electrophysiological properties of autonomic ganglion neurons. In: Autonomic ganglia, edited by McLachlan EM, Harwood Academic Publishers, Luxembourg, 1995, 153-212
- Akasu T, Hasuo H, Tokimasa T. Activation of 5-HT₃ receptor subtypes causes rapid excitation of rabbit parasympathetic neurons. *Br J Pharmacol* 1987;91:453-455.
- Albert PR, Sajedi N, Lemonde S, Ghahremani MH. Constitutive G₁₂-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT_{1A} receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists. *J Biol Chem* 1999;274:35469-35474.
- Andrade R, Nicoll RA. Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol* 1987;394:99-124.
- Auch-Schwelk W, Paetsch I, Krackhardt F, Grafe M, Hetzer R, Fleck E. Modulation of contractions to ergonovine and methylergonovine by nitric oxide and thromboxane A₂ in the human coronary artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:631-639.
- Baltup JT, Newberry NR. 5-HT_{2A} receptor-mediated outward current in C6 glioma cells is mimicked by intracellular IP₃ release. *Neuroreport* 1994;5:1245-1248.

- Barns NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999;38:1083-1152.
- Bayliss DA, Umemiya M, Berger AJ. Inhibition of N- and P-type calcium currents and the after-hyperpolarization in rat motor neurones by serotonin. *J Physiol* 1995;635-647.
- Berg KA, Maayani S, Clark WP. 5-Hydroxytryptamine_{2C} receptor activation inhibits 5-hydroxytryptamine_{1B}-like receptor function via arachidonic acid metabolism. *Mol Pharmacol* 1996;50:1017-1023.
- Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Clark WP. Pleiotropic behavior of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor agonists. *Ann N Y Acad Sci* 1998;861:104-110.
- Blier P, Bergeron R, de Montigny C. Selective activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors induces rapid antidepressant response. *Neuropsychopharmacology* 1997;16:333-337.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, et al. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid_B receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 2002;54(2):247-264.
- Bradely WE, Timm GW, Scott FB. Cystometry IV. Neuromuscular transmission in urinary bladder. *Urology* 1975;6:520-524
- Cadogan AK, Kendall DA, Marsden CA. Serotonin 5-HT_{1A} receptor activation increases cyclic AMP formation in the rat hippocampus in vivo. *J Neurochem* 1994;62:1816-1821.

- Carmena MJ, Camacho A, Solano RM, Montalvo L, Garcia Lopez E, Arias A et al. 5-Hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated effects on adenylate cyclase and nitric oxide synthase activities in rat ventral prostate. *Cell Signal* 1998;10:583-587.
- Cha SK, Park KS, Chung HS, Kong ID, Lee JW, Jeong SW. Modulation of N-type Ca²⁺ currents by activation of neuropeptide Y₁ receptors in rat major pelvic ganglion neurons. *Society for Neuroscience* 2001;27(2):2235.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426:517-524.
- Clarke WP, Yocca FD, Maayani S. Lack of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J pharmacol Exp Ther* 1996;227:1259-1266.
- Contesse V, Hamel C, Lefebvre H, Dumuis A, Vaudry H, Delarue C. Activation of 5-hydroxytryptamine₄ receptors causes calcium influx in adrenocortical cells: involvement of calcium in 5-hydroxytryptamine-induced steroid secretion. *Mol Pharmacol* 1996;49:481-493.
- Cox DA, Blase DK, Cohen ML. Bradykinin and phorbol ester but not 5-HT_{2B} receptor activation stimulate phospholipase D activity in the rat stomach fundus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1999;23:697-704.

- Dail WG, Evan AP, Eason HR. The major ganglion in the pelvic plexus of the male rat: a histochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1975;159:49-62.
- Dail WG. Autonomic innervation of male reproductive genitalia. In: The autonomic nervous system, vol. 2, Nervous control of the urogenital system, edited by Maggi CA, Harwood Academic Publishers, London, 1992, 69-101.
- Davis PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, et al. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 1989;339:706-709.
- De Groat WC, Booth AM. Neural control of penile erection. In: Nervous control of the urogenital system, edited by Maggi CA, Harwood Academic Publishers, London, 1993, 467-524.
- De Groat WC, Saum WR. Synaptic transmission in parasympathetic ganglia in the urinary bladder of the cat. *J Physiol* 1976;256:137-158.
- De Vivo M, Maayani S. Characterization of the 5-hydroxytryptamine 1a receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;238:248-253.
- Dikenson JM, Hill SJ. Human 5-HT_{1B} receptor stimulated inositol phospholipid hydrolysis in CHO cells: synergy with G_q-coupled receptors. *Eur J Pharmacol* 1998;348:279-285.

- Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, et al. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J Biol Chem* 1999;274:30799-30810.
- Eberle-Wang K, Braun BT, Simansky KJ. Serotonin contracts the isolated rat pylorus via a 5-HT₂-like receptor. *Am J Physiol* 1994;266:R284-R291.
- Edagawa Y, Saito H, Abe K. 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of long-term potentiation in rat visual cortex. *Eur J Pharmacol* 1998;349:221-224.
- Enna SJ. GABA_B receptor signaling pathways. In: Mohler H ed. *Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission*, Berlin, Springer-Verlag, pp 329-342.
- Estacion M, Li S, Sinkins WG, Gosling M, Bahra P, Poll C, et al. Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *J Biol Chem* 2004;279:22047-22056.
- Facemire CS, Mohler PJ, Arendshorst WJ. Expression and relative abundance of short transient receptor potential channels in the rat renal microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F546-F551.
- Foehring RC, van Brederode JFM, Kinney GA, Spain WJ. Serotonergic modulation of Supragranular neurons in rat sensory motor cortex. *J Neuroscience* 2002;22(18):8238-8250.
- Garnovskaya MN, Nebigil CG, Arthur JM, Spurney RF, Raymond JR.

- 5-Hydroxytryptamin_{2A} receptors expressed in rat renal mesangial cells inhibits cyclic AMP accumulation. *Mol Pharmacol* 1995;48:230-237.
- Glaum SR, Proudfit HK, Anderson EG. 5-HT₃ receptors modulate spinal nociceptive reflexes. *Brain Res* 1990;510:12-16.
- Grailhe R, Grabtree GW, Hen R. Human 5-HT_{5A} receptor is functional receptor; the 5-HT_{5A} receptor is functional but the 5-HT_{5B} receptor was lost during mammalian evolution. *Eur J Pharmacol* 2001;418:157-167.
- Goodwin GM, De Souza RJ, Green AR. The pharmacology of the hypothermic response in mice to 8-hydroxy-2(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). A model of presynaptic 5-HT₁ function. *Neuropharmacology* 1985;24:1187-1194.
- Goodwin GM, De Souza RJ, Green AR, Heal DJ. The pharmacology of the behavioral and hypothermic responses of rat to 8-hydroxy-2(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT). *Psychopharmacology* 1987;91:506-511.
- Gyermek L. Action of 5-hydroxytryptamine on the urinary bladder of the dog. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1962;1:137-144.
- Hagberg GB, Blomstrand F, Nilsson M, Tamir H, Hansson E. Stimulation of 5-HT_{2A} receptors on astrocytes in primary culture opens voltage-independent Ca²⁺ channels. *Neurochem Int* 1998;32:153-162.
- Hamil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;391:85-100.

- Hancock MB, Peveto CA. Preganglionic neurons in the sacral spinal cord of the rat: An HRP study. *Neurosci Lett* 1979;11:1-5.
- Hapfelmeier G, Tredt C, Haseneder R, Zieglansberger W, Eisensamer B. Co-expression of the 5-HT_{3B} serotonin receptor subunit alters the biophysics of the 5-HT₃ receptor. *Biophys J* 2003;84:1720-1733.
- Harayama N, Shibuya I, Tanaka K, Kabashima N, Ueta Y, Yamoshita H. Inhibition of N- and P/Q-type calcium channels by postsynaptic GABA_B receptor activation in rat supraoptic neurons. *J Physiol* 1998;509:371-383.
- Hardie RC. Regulation of TRP channels via lipid second messengers. *Annu Rev Physiol* 2003;65:735-759.
- Hegde SS, Eglen RM. Peripheral 5-HT₄ receptors. *FASEB J* 1996;10:1398-1408.
- Hill B. Calcium dynamics, epithelial transport, and intercellular coupling. In: Hill B, editor. *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. Sunderland; Sinauer Associates, Inc.; 2001. p.269-306.
- Hill RH, Svensson E, Dewael Y, Grillner S. 5-HT inhibits N-type but not L-type Ca²⁺ channels via 5-HT_{1A} receptors in lamprey spinal neurons. *Eur J Neurosci* 2003;18:2919-2924.
- Hoffmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999;397:259-263.

- Hoyer D, Clark DE, Fozard JR, Hatig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 1994;46:157-203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71:533-554.
- Hu WP, You XH, Guan BC, Ru LQ, Chen JG, Li ZW. Substance P potentiates 5-HT₃ receptor mediated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Neurosci Lett* 2004;365:147-152.
- Huang CL. The transient receptor potential subfamily of ion channels. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1690-1699.
- Hubbard PC, Thompson AJ, Lummis SCR. Functional differences between splice variants of the murine 5-HT_{3A} receptor: possible role for phosphorylation. *Mol Brain Res* 2000;81:101-108.
- Iken K, Chheng S, Fargin A, Goulet AC, Kouassi E. Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors. *Cell Immunol* 1995;163:1-9.
- Ishida T, Tawashima S, Hirata K, Yokoyama M. Nitric oxide is produced via 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptor activation in human coronary artery endothelial cells. *Kobe J Med Sci* 1998;44:51-63.
- Jalonen TO, Margraf RR, Wielt DB, Charniga CJ, Linne ML, Kimelberg HK. Serotonin induces inward potassium and calcium currents in rat cortical

- astrocytes. *Brain Res* 1997;758:69-82.
- Jänig W, McLachlan EM. Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev* 1987;67:1332-1404.
- Kaumann AJ, Sanders L. 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium: facilitation by chronic beta-adrenoceptor blockade. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994;349(4):331-337.
- Karhula T, Panula P, Steinbusch H, Happola O. Immunohistochemical localization of 5-hydroxytryptamine, histamine and histidine decarboxylase in the rat major pelvic and coeliac-superior mesenteric ganglion. *J Auton Nerv Syst* 1990;31(2):91-99.
- Keast JR. Patterns of co-existence of peptides and differences of nerve fibre types associated with noradrenergic and non-noradrenergic (putative cholinergic) neurons in the major pelvic ganglion of the male rat. *Cell Tissue Res* 1991;266:405-415.
- Keast JR. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience* 1995a;66:655-662.
- Keast JR. Pelvic ganglia. In: *Autonomic Ganglia*, edited by McLachlan EM, Harwood Academic Publishers, London, 1995b, 445-479.
- Keast JR. Unusual autonomic ganglia: connections, chemistry, and plasticity of

- pelvic ganglia. *Int Rev Cytol* 1999;193:1-69.
- Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterology* 2000;95:2698-2709.
- Knight AR, Bowery NG. The pharmacology of adenylyl cyclase modulation by GABA_B receptors in rat brain slices. *Neuropharmacology* 1996;35:703-712.
- Koester J, Siegelbaum SA. Local signaling: passive electrical properties of the neuron. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. Principles of neural science. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p.140-149.
- Kong ID, Cha SK, Park KS, Lee JH, Lee JW, Jeong SW. Phenotype-specific expression of ionotropic GABA receptors in male rat major pelvic ganglion neurons. *Society for Neuroscience* 2001;27(1):685.
- Koyama S, Matsumoto N, Kubo C, Akaike N. Presynaptic 5-HT₃-receptor mediated modulation of synaptic GABA release in the mechanically dissociated rat amygdala neurons. *J Physiol* 2000;592.2:373-383.
- Kubota H, Katsurabayashi S, Moorhouse AJ, Murakami N, Koga H, Akaike N. GABA_B receptor transduction mechanisms, and cross-talk between protein kinases A and C, in GABAergic terminals synapsing onto neurons of the rat nucleus basalis of Meynert. *J Physiol* 2003;551(Pt 1):263-276.
- Kurscheid-Reich D, Trockmorton DC, Rasmussen H. Serotonin activates phospholipase D in rat mesangial cells. *Am J Physiol* 1995;268:F997-F1003.

- Ladewig T, Lalley PM, Keller BU. Serotonergic modulation of intracellular calcium dynamics in neonatal hypoglossal motoneurons from mouse. *Brain Res* 2004;1001:1-12.
- Langworthy OR. Innervation of the pelvic organs of the rat. *Investig Urology* 1965;2:491-511
- Lee JH, Kim EG, Park BG, Kim KH, Cha SK, Kong ID, Lee JW, Jeong SW. Identification of T-type $\alpha 1H$ Ca^{2+} channels ($Ca_v3.2$) in major pelvic ganglion neurons. *J Neurophysiol* 2002;87(6):2844-2850
- Le Grand B, Panissie A, Pauwels PJ, John GW. Activation of recombinant $h5-HT_{1B}$ and $5-HT_{1D}$ receptors stably expressed in C6 glioma cells produces increases in Ca^{2+} -dependent K^+ current. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998;358:608-615.
- Leone M, Attanasio A, Croci D, Ferraris A, D'Amico D, Grazzi L, et al. 5-HT_{1A} receptor hypersensitivity in migraine is suggested by the m-chlorophenylpiperazine test. *Neuroreport* 1998;9:2605-2608.
- Lin CH, Huang YC, Tsai JJ, Gean PW. Modulation of voltage-dependent calcium currents by serotonin in acutely isolated rat amygdala neurons. *Synapse* 2001;41:351-359.
- Lucaites VL, Nelson DL, Wainscott DB, Baez M. Receptor subtype and density determine the coupling repertoire of the 5-HT₂ receptor subfamily. *Life Sci* 1996;59:1081-1095.

- McDuffie JE, Coaxum SD, Maleque MA. 5-Hydroxytryptamine evokes endothelial nitric oxide synthase activation in bovine aortic endothelial cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;221:386-390.
- Mills TM, Wiedmeier VT, Stopper VS. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod* 1992;46:342-348
- Minke B, Cook B. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 2002;82:429-471.
- Morales M, McCollum N, Kirkness EF. 5-HT₃-receptor subunits A and B are coexpressed in neurons of the dorsal root ganglion. *J Comp Neurol* 2001;438:163-172.
- Morales M, Wang SD. Differential composition of 5-hydroxytryptamine₃ receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. *J Neurosci* 2002;22(15):6732-6741.
- Munsch T, Freichel M, Flockerzi V, Pape HC. Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(26):16065-16070.
- Nadelhaft I, Booth AM. The location and morphology of preganglionic neurons and the distribution of visceral afferents from the rat pelvic nerve: A horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol* 1984;226:238-245
- Neel DS, Parsons RL. Catecholamine, serotonin, and substance P-like peptide containing intrinsic neurons in the mudpuppy parasympathetic cardiac

- ganglion. *J Neurosci* 1986;6:1970-1975.
- Ni YG, Panicker MM, Miledi R. Efficiency coupling of 5-HT_{1a} receptors to the phospholipase C pathway in *Xenopus* oocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;51:115-122.
- Nishimura T, Akasu T. 5-Hydroxytryptamine produces presynaptic facilitation of cholinergic transmission in rabbit parasympathetic ganglia. *J Auto Nerv Syst* 1989;26:251-260.
- Nishimura T, Yoshida M, Nagatsu I, Akasu T. Frequency dependent inhibition of the nicotinic transmission by serotonin in vesical pelvic ganglia of the rabbit. *Neurosci Lett* 1989;103:179-184.
- Noda M, Yasuda S, Okada M, Higashida H, Shimada A, Iwata N, et al. Recombinant human serotonin 5A receptors stably expression in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathway. *J Neurochem* 2003;84:222-232.
- Olianas MC, Onali P. GABA_B receptor-mediated stimulation of adenylyl cyclase activity in membranes of rat olfactory bulb. *Br J Pharmacol* 1999;126:657-664.
- Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J, Nargeot J. Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Mol Pharmacol* 1992;41:346-351.
- Oz M, Zhang L, Morales M. Endogeneous cannabinoid, anandamide, act as a noncompetitive inhibitor on 5-HT₃ receptor-mediated responses in *Xenopus*

oocytes. *Synapse* 2002;46:150-156.

Palego L, Giromella A, Marazziti D, Borsini F, Naccarato AG, Giannaccini G, et al. Effects of postmortem delay on serotonin and (+)8-OH-DPAT-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in rat and human brain tissues. *Brain Res* 1999;816:165-174.

Palego L, Giromella A, Marazziti D, Giannaccini G, Borsini F, Bigazzi F, et al. Lack of stereoselectivity of 8-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetralin-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity in human pre- and post-synaptic brain regions. *Neurochem Int* 2000;36:225-232.

Parekh AB, Foguet M, Lubbert H, Stuhmer W. Ca^{2+} oscillations and Ca^{2+} influx in *Xenopus* oocytes expressing a novel 5-hydroxytryptamine receptor. *J Physiol* 1993;469:653-671.

Park KS, Jeong SW, Cha SK, Lee BS, Kong ID, Ikeda SR, Lee JW. Modulation of N-type Ca^{2+} currents by A_1 -adenosine receptor activation in male rat pelvic ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(2):501-508.

Park KS, Cha SK, Lee KI, Jun JY, Jeong SW, Kong ID, Lee JW. Identification of ATP-sensitive K^+ conductances in male rat major pelvic ganglion neurons. *Korean J Physiol Pharmacol* 2002;6:247-253.

Park JH, Park KS, Cha SK, Lee KI, Kim MJ, Park JY, et al. Characterization of acetylcholine-induced currents in male rat pelvic ganglion neuron. *Kor J Physiol Pharmacol* 2004;8:219-225.

- Peroutka SJ. 5-HT receptors: past, present and future. *Trends Neurosci* 1995;18:68-69.
- Pindon A, van Hecke G, van Gompel P, Lesage AS, Leysen JE, Jurzak M. Differences in signal transduction of two 5-HT₄ receptor splice variants: compound specificity and dual coupling with G_{α-} and G_{α_{i/o}} proteins. *Mol Pharmacol*. 2002;61(1):85-96.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Colinsworth G, Gettys TW, et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 2001;92:179-212.
- Reynolds GP, Mason SL, Meldrum A, De Keczer S, Parnes H, Eglen RM, Wong EH. 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₄ receptors in post mortem human brain tissue: distribution, pharmacology and effects of neurodegenerative diseases. *Br J Pharmacol* 1995;114(5):993-998.
- Samu WR, de Groat WC. The actions of 5-hydroxytryptamine on the urinary bladder and on vesical autonomic ganglia in the cat. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;185:70-83.
- Sanden N, Thorlin T, Blomstrand F, Persson PAI, Hansson E. 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptors stimulates Ca²⁺ increases in cultured astrocytes from three different brain regions. *Neurochem Int* 2000;36:427-434.
- Seletti B, Benkelfat C, Blier P, Annable L, Gillbert F, Montigny C. Serotonin_{1A} receptor activation by flesinoxan in humans. Body temperature and neuroendocrine responses. *Neuropsychopharmacology* 1995;13:93-104.

- Shenker A, Maayani S, Weinstein H, Green JP. Pharmacological characterization of two 5-hydroxytryptamin receptors coupled to adenylyl cyclase in guinea pig hippocampal membranes. *Mol Pharmacol* 1987;31:357-367.
- Shi J, Mori E, Mori Y, Mori M, Li J, Ito Y, Inoue R. Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol* 2004;561:415-432.
- Shiah IS, Yatham LN, Lam RW, Tam EM, Zis AP. Cortisol, hypothermic, and behavioral responses to ipsapirone in patients with bipolar depression and normal controls. *Neuropsychobiology* 1998;38:6-12.
- Sugiura T, Bielefeldt K, Gebhart GF. TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. *J Neurosci* 2004;24(43):9252-9530.
- Sun H, Hu XQ, Moradel EM, Weight FF, Zhang L. Modulation of 5-HT₃ receptor mediated response and trafficking by activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 2003;278(36):34150-34157.
- Sun QQ, Dale N. Differential inhibition of N and P/Q Ca²⁺ currents by 5-HT_{1A} and 5-HT_{1D} receptors in spinal neurons of *Xenopus* larvae. *J Physiol (Lond)* 1998;510:103-120.
- Taniyama K, Niwa M, Kataoka Y, Yamashita K. Activation of protein kinase C suppresses the gamma-aminobutyric acid_B receptor-mediated inhibition of the vesicular release of noradrenaline and acetylcholine. *J Neurochem* 1992 ;58(4):1239-1245.

- Tatsumi H, Katayama Y. The actions of 5-hydroxytryptamine in the rabbit ciliary ganglion. *J Auton Nerv Syst* 1987;20:137-145.
- Thamas EA, Matli JR, Hu JL, Carson MJ, Sutcliffe JG. Pertussis toxin treatment prevents 5-HT_{5A} receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in rat C6 glioma cells. *J Neurosci Res* 2000;61:75-81.
- Topham MK, Prescott SM. Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signalling functions. *J Biol Chem* 1999;274:11447-11450.
- Trebak M, Vazquez G, St Bird G, J & Putney JW Jr. The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium* 2003;33:451-461.
- Ullmer C, Boddeke HG, Schmuck K, Lubbert H. 5-HT_{2B} receptor-mediated calcium release from ryanodine-sensitive intracellular stores in human pulmonary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol* 199;117(6):1081-1088.
- Van Hoof JA, Vijverberg HPM. 5-HT₃ receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story? *Trends Neurosci* 2000;23:605-610.
- Weiss S, Sebben M, Kemp DE, Bockaert J. Serotonin 5-HT₁ receptors mediated inhibition of cyclic AMP production in nerons. *Eur J Pharmacol* 1986;120:227-230.
- Wu X, Kushwaha N, Albert PR, Penington NJ. A critical protein kinase C phosphorylation site on the 5-HT_{1A} receptor controlling coupling to N-type calcium channels. *J Physiol* 2002;538.1:41-51.

- Yakel JL, Jackson MB. 5-HT₃ receptors mediate rapid responses in cultured hippocampus and a clonal cell line. *Neuron* 1988;1:615-621.
- Zhang L, Oz M, Weight FF. Potentiation of 5-HT₃ receptor-mediated responses by protein kinase C activation. *Neuroreport* 1995;6(10):1464-1468.
- Zhang ZW. Serotonin induces tonic firing in layer V pyramidal neurons of rat prefrontal cortex during postnatal development. *J Neurosci* 2003;23(8):3373-3384.
- Zhu Y, Zboran EL, Ikeda SR. Phenotype-specific expression of T-type calcium channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *J Physiol* 1995;489:363-375.
- Zhu Y, Yakel JL. Modulation of Ca²⁺ currents by various G protein-coupled receptors in sympathetic neurons of male rat pelvic ganglia. *J Neurophysiol* 1997;78:780-789.
- Zoubek J, Somogyi GT, De Groat WC. A comparison of inhibitory effects of neuropeptide Y on rat urinary bladder, urethra and vas deferens. *Am J Physiol* 1993;265:R537-543.

ABSTRACT

Characteristics of Serotonergic Receptors in Autonomic Major Pelvic Ganglia

Cha, Seung Kyu

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor In Deok Kong)

Serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) and its receptors are found in the central and peripheral nervous systems, and play important roles in regulation of neuronal activity and transmitter release. In addition, communication between the ligand-gated channels and G protein-coupled receptors appears to provide crucial mechanisms for tuning of neuronal functions. Pelvic ganglia provides autonomic innervations to the various urogenital organs including the bladder and the penis, and thereby plays physiologically important roles in the micturition and erectile reflexes. Several studies have shown that 5-HT is present in some neurons of the pelvic ganglia, depolarizes neurons and inhibits ganglionic transmission. In pelvic ganglia, however, mechanisms underlying actions of 5-HT remain unknown. Therefore, this study was performed to examine i) characteristics of 5-HT₃ receptors, ii) signalling pathways involved in GABA_B-receptor mediated modulation of the 5-HT₃ receptors, and iii) mechanisms underlying regulation of intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) by G_q-coupled 5-HT₂ receptor. In this regard, effects of 5-HT receptors on membrane potential, ionic currents, and [Ca²⁺]_i were investigated using

patch-clamp and fluorescence Ca^{2+} measurement techniques.

RT-PCR analysis revealed that MPG neurons express different subtypes of 5-HT receptors including 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT₄, 5-HT_{5B}, and 5-HT_{6/7}. 5-HT (10 μM) elicited a fast inward current and simultaneous augmentation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which were completely abolished by MDL7222 (1 μM) and Y25130 (10 μM), selective 5-HT₃ receptor antagonists. Baclofen (10 μM), a selective GABA_B agonist, also completely suppressed the 5-HT-induced response. As expected, this baclofen effect was prevented by CGP35348 (10 μM), a selective GABA_B antagonist. Action of 5-HT₃ receptor was blocked by SQ22536 (200 μM), an adenylyl cyclase inhibitor, and myristoylated PKA inhibitor (100 nM), which was mimicked baclofen. Furthermore, forskolin (1 μM) augmented the 5-HT-induced changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. Taken together, these data suggest that 5-HT₃ receptor negatively couples GABA_B receptor via an AC/PKA-dependent pathway in rat MPG neurons.

In both sympathetic and parasympathetic neurons, 5-HT (10 μM) itself and BW723C86 (10 μM), a 5-HT_{2B} agonist, increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which were prevented by SB204741 (10 μM), a 5-HT_{2B} antagonist. This 5-HT_{2B}-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase was blocked by removal of extracellular Ca^{2+} , by nonselective cation channel blockers, Gd^{3+} (10 μM) or La^{3+} (100 μM), and by U73122 (1 μM), a PLC inhibitor with no effect of U73343 (1 μM), an inactive analogue of PLC. Under a voltage-clamp condition, BW723C86 (100 μM) also caused an inward current in a La^{3+} -sensitive manner. Interestingly, OAG (100 μM), a membrane permeable DAG analogue, induced Ca^{2+} influx. RT-PCR analysis confirmed TRPC1 and TRPC6 expressed in MPG neurons. Taken together, these data suggest that Ca^{2+} influx occurs through TRP6 channels when activation of 5-HT_{2B} receptors stimulates the G_q-PLC-DAG pathway.

In conclusion, various 5-HT receptors are functionally expressed in rat MPG neurons. Activation of 5-HT₃ receptors increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and consequently enhances excitability primarily in parasympathetic neurons, which can be modulated via an AC/PKA-pathway. Activation of 5-HT_{2B} receptors increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ through TRPC6

channels independent of intracellular Ca^{2+} storage. Hence MPG neurons may provide a good model system for studies of communication between 5-HT_3 receptors and other G-protein coupled receptors, and mechanisms of TRPC6 channel modulation by 5-HT receptors.

Key words : Major pelvic ganglia, 5-HT_3 receptor, 5-HT_{2B} receptor, TRPC channel