creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학석사 학위논문

시린가레지놀이 해마 CA1의 흥분성 시냅스 전도와 피크로톡신으로 유도된 간질 유사 전기적 활성을 억제하는 기전에 관한 연구

2019년 2월

서울대학교 대학원
의과학과 의과학전공
조 영 선

시린가레지놀이 해마 CA1의 흥분성 시냅스 전도와 피크로톡신으로 유도된 간질 유사 전기적 활성을 억제하는 기전에 관한 연구

지도교수 김 명 환

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

서울대학교 대학원

의과학과 의과학전공

조 영 선

조영선의 석사 학위논문을 인준함

2019년 2월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국 문 초 록

신경세포 사이의 시냅스 전도는 신경세포에서 분비되는 신경전달물질에 의해 일어난다. 이 때, 신경전달물질이 분비되는 과정은 신경조절물질에 의해 촉진되거나 억제될 수 있다. 생리학적으로는 체내에서 분비되는 신경조절물질에 의해 시냅스 전도가 조절되지만, 그와 유사한 작용의 약물을 합성하거나 자연에서 추출, 정제하여 신경세포의 활성을 조절하는 데 사용되고 있다. 그 중, 식물에서 유래한 물질은 신경세포의 막수용체, 운반체 또는 이온 채널을 조절할 수 있으며, 이러한 특성에 관한 연구는 의과학 연구에 중요하다. 이에 본 연구에서는 식물에서 유래한 물질인 시린가레지놀(Syringaresinol, SYR)이 마우스 해마의 CA1 신경세포의 시냅스 전도에 미치는 영향을 확인하였다. 전기생리학 실험을 통해, 마우스의 해마 Schaffer collateral 경로를 자극하였을 때 측정되는 세포 외 흥분성 시냅스 전위(fEPSP)가 SYR에 의해 감소함을 확인하였으며, 억제성 시냅스에는 영향을 미치지 않음을 관찰할 수 있었다. SYR을 마우스 해마 CA1 슬라이스에 처리하였을 때, 쌍-펄스 비율(paired pulse ratio, PPR)이 증가하였다. 그러나 HEK293T 세포에 AMPA 수용체 발현을 유도하여 SYR을 처리하기 전, 후의 전류를 비교하였을 때 아무 변화가 관찰되지 않았다. 이를 통해 SYR이 시냅스 전 조절을 통해 흥분성 시냅스 전위를 감소시켰음을 확인하였다. 한편, N-ethylmaleimide (NEM)으로 전처리하면 SYR의 효과가 사라지는 것을 관찰하였다. 또한 SYR이 해마 CA1 신경세포의 칼슘이온 전류를 감소시키며 안정막 전위를 과분극시키는 것을 확인하였다. SYR의 이러한 흥분성 시냅스 전도 억제 작용은 해마 슬라이스에서 피크로톡신으로 유도된 간질 활성을 억제할 수 있었다. 이에 본 연구는 SYR이 시냅스 전 뉴런 말단에

작용하여 흥분성 시냅스 전도를 억제하는 새로운 신경조절물질임을 제시한다.

* 본 내용은 Y.S. Cho et al., 2018, Neuropharmacology 학술지에 출판된 내용임

주요어 : 시린가레지놀, 흥분성 시냅스, 시냅스전 억제,
준비된 즉각 분비 시냅스 소낭, 간질억제 활성
학 번 : 2016-22009

목 차

국문 초록 ····· 1
목차 ····· 3
도표 및 그림 목록 ····· 4
약어 ····· 6
I. 서론 ····· 7
II. 재료 및 방법 ····· 9
III. 결과 ····· 16
IV. 고찰 ····· 52
V. 참고문헌 ····· 56
Abstract in English ····· 66

도표 및 그림 목록

1. 표

표 1. 인공 뇌척수액 용액 조성
표 2. Dissection buffer 조성

2. 그림

Figure 1. SYR에 의한 흥분성 시냅스 전도 억제
Figure 2. SYR 처리 시 일정한 억제성 시냅스 전도
Figure 3. SYR 처리 시 일정한 시냅스 장기 강화
Figure 4. NMDAR, mAchR, mGluR1/5에 비의존적인 SYR의 작용
Figure 5. SYR에 의한 ERK pathway 활성화 여부 확인
Figure 6. SYR 처리 시 변하지 않은 AMPA 수용체를 통한 전류
Figure 7. AMPA 수용체의 탈감작과 관계없는 SYR의 작용
Figure 8. SC-CA1 시냅스에서 SYR에 의한 paired-pulse ratio 변화
Figure 9. 쌍-펄스 간격에 따른, SYR의 효과
Figure 10. SYR에 의한 RRP size 감소
Figure 11. SYR 처리 시 일정한 mEPSCs
Figure 12. NEM, LY341495, CGP55845 처리 시 SYR의 작용 여부 확인
Figure 13. SYR에 의한 칼슘이온 전도 감소
Figure 14. SYR에 의한 막전위의 과분극
Figure 15. SYR에 의한 picrotoxin 유도 간질성 전기적 활성의 감소
Figure 16. 막전위의 과분극과 관계없는 picrotoxin 유도 간질성 전기적

활성

Figure 17. SYR에 의해 영향받지 않은 Locomotor activity와 간질 동물 모델

Figure 18. SYR에 의해 영향받지 않은 공포 조건화 기억

약어

AP5, 2-amino-5-phosphonopentanoic acid
CTZ, cyclothiazide
DHPG, dihydroxyphenylglycine
ECL, enhanced chemiluminescence
ERK, extracellular signal-regulated kinases
GABA, gamma-Aminobutyric acid
GIRK, G protein-activated inwardly rectifying K+ channel
HEK293T, human embryonic kidney 293T
HFS, high frequency stimulation
HRP, horse radish peroxidase
LEV, Levetiracetam
LTP/LTD, long term potentiation/depression
mGluR, metabotropic glutamate receptor
NBQX,
6-Nitro-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide
NEM, N-Ethylmaleimide
PPR, paired pulse ratio
SC, Schaffer collateral
SYR, (+)-syringaresinol
SV2A, synaptic vesicle protein 2A
TTX, tetrodotoxin
VGCC, voltage-gated calcium channel

I. 서론

중추신경계에서 흥분성 시냅스 전도는 신경세포 사이의 정보 전달에 매우 중요하다. 포유류에서 흥분성 시냅스 전도의 대부분은 시냅스 후 신경세포의 AMPA 수용체와 NMDA 수용체가 시냅스 전 신경세포 말단에서 분비되는 글루타메이트에 의해 열리면서 일어난다. 이러한 과정을 통해 일어나는 흥분성 시냅스 전도는 일정하지 않고 신경조절물질에 의해 변할 수 있으며, 활성 의존적인 시냅스 가소성에 영향을 받을 수 있다. 특히 해마의 CA3-CA1 시냅스는 흥분성 시냅스 전도의 조절에 대해 많이 연구되었으며, 흥분성 시냅스 전도는 신경전달물질 분비의 변화, 시냅스 수용체의 기능 변화, 그리고 교세포에서 분비되는 신경아교전달물질에 의해 조절됨이 보고되었다. 시냅스 전 신경세포에 존재하는 GABA 수용체, 아데노신 A1 수용체는 글루타메이트의 방출을 억제한다. 시냅스 후 반응 또한 시냅스 가소성의 형태로 조절될 수 있는데 장기 강화와 장기 저하가 이에 해당된다. 또한 신경아교세포는 글루타메이트, D-세린, ATP, 아데노신, GABA를 포함하는 신경아교전달물질을 통하여 시냅스 전, 시냅스 후 신경세포에 모두 작용한다. 이러한 신경세포 사이의 정보 전달 조절은 뇌에서 일어나고 있는 정보 처리에 매우 중요한 역할을 하며, 조절 작용이 정상적이지 않을 때는 뇌기능장애가 유발하기도 한다.

신경 전달 경로를 조절하는 약물은 시냅스의 기능이 정상적이지 않아 발생하는 신경·정신과 질환을 치료하는 데에 사용되고 있다. 중추신경계에 작용하는 약물은 수용체, 이온 채널, 운반체 등에 작용하여 신경계의 활성을 조절할 수 있으며, 치료를 목적으로 처방되고 있다. 그 중 상당수의 약물은 식물에서 유래한 것들이며, 그 예로 아트로핀, 모르핀 등이 있다(Gomes et al., 2009; Gurib-Fakim., 2006; Roth et al., 2004; Wiart., 2006). 또한 피크로톡신(GABA 수용체 억제제), 스트리키닌(글리신 수용체 억제제), 캡사이신(vanilloid 수용체 작용제) 등도 식물에서 추출한 성분이며, 의과학, 신경과학 분야 연구에 널리 사용되고 있는 약물이다. 이

런 약물들을 발견하는 것은 치료뿐 아니라 뇌에서 일어나는 현상들을 연구하는 데 유용하게 사용될 수 있다.

(+)-Syringaresinol (SYR; 4,4′-(1S,3aR,4S,6aR)-tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1,4-diylbis(2,6-dimethoxyphenol))은 인삼열매, 매화나무, 목련속 식물에서 발견되는 리그난으로, 그 생리활성에 관하여 명확하게 알려지지 않았다. 지금까지 연구된 바에 의하면, SYR은 박테리아 세포와 포유류 세포에 모두 활성을 나타낸다. SYR은 헬리코박토 파일로리균의 운동성을 저해하며, 마우스에 구강투여 하였을 때 장내미생물 환경을 변화시킨다(Cho et al., 2016; Miyazawa et al., 2006). SYR을 포유류 상피세포에 처리하였을 때 산화질소의 생성과 SIRT1 유전자의 발현이 촉진되었다(Cho et al., 2013; Chung et al., 2012; Park et al., 2015). 또한 마우스 세포에 SYR을 처리하였을 때, NF-κB의 활성을 저해하여 염증반응을 감소시키는 것이 확인되었다(Bajpai eal., 2018). 한편, SYR이 신경아세포종 세포의 신경돌기 생성을 촉진하는 것이 관찰되었는데, PC12h와 Neuro2a 세포에 SYR을 처리하였을 때 신경돌기의 숫자와 길이가 증가 되었다(Chiba et al., 2002). 그러나 현재까지 SYR이 신경세포와 시냅스 작용에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 수행되지 못했다.

이에 본 연구에서는 전기생리학적 실험방법을 사용하여, 해마의 신경회로에 SYR이 어떠한 작용을 하는지 알아보고자 하였다. 그 결과 SYR이 세포 밖에서 측정되는 흥분성 시냅스 후 전위를 감소시키나 억제성 시냅스 전도에는 아무 영향을 주지 않는 것을 관찰하였다. 이는 SYR이 시냅스 전 신경세포 말단의 준비되어있는 시냅스 소낭의 개수를 줄임으로써 나타나는 현상임을 알 수 있었다. SYR의 이러한 작용은 피크로톡신으로 유도된 간질파 활성을 감소시켰다. 이와 같은 결과를 통해 SYR이 시냅스 전 뉴런 말단에 작용하여 흥분성 시냅스 전도를 억제하는 새로운 신경조절물질이 될 수 있음을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 동물

4주에서 6주 사이의 암·수 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 12시간 간격으로 교대되는 환경에서 동물을 사육하였으며, 주간은 오전 7시에 시작되었다. SPF (specific pathogen free) 환경에서 하나의 케이지에 3-5마리의 마우스를 사육하였다. 먹이와 물은 제한 없이 공급하였다. 동물실험은 서울대학교 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)의 승인을 받아 진행되었다.

2. 슬라이스 절편 제작

혼합가스(산소 95%, 이산화탄소 5%)를 통해 pH를 7.4로 유지한 절삭용액(dissection buffer)에서 마우스의 뇌를 최대한 빠르게 분리한다. 분리해낸 뇌를 vibratome (Leica, Germany)을 사용하여 400 μm 두께로 자른 뒤, 각각의 슬라이스에서 CA3 부분을 제거하였다. 슬라이스는 바로 인공뇌척수액 용액(artificial cerebrospinal fluid, aCSF)에서 36°C로 약 한 시간 회복시켰다. 인공 뇌척수액 또한 95%의 산소, 5% 이산화탄소로 구성된 혼합가스로 pH를 7.4로 조절하였다. 회복과정을 끝낸 후, 전기생리학 실험을 진행하는 동안 상온에서 유지하였다.

	Conc(mM)
NaCl	125
$NaHCO_3$	25
KCl	2.5
NaH_2PO_4	1.25
$CaCl_2$	2.5
$MgCl_2$	1.3
Glucose	10

표 1. 인공 뇌척수액 용액 조성

	Conc(mM)
Sucrose	230
$NaHCO_3$	25
KCl	2.5
NaH_2PO_4	1.25
$CaCl_2$	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	3
Glucose	10
Na-VitC	1.3

표 2. Dissection buffer 조성

3. 세포 배양과 AMPA 수용체 발현

인간배아신장(HEK293T) 세포주를 10% FBS (Fetal bovine serum, FBS), 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배양액으로 37°C, 5% CO2가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포는 12-well plate에서 배양되었다. AMPA 수용체를 발현시키기 위해 GluA1과 GluA2를 함께 발현시키거나, GluA2와 GluA3를 함께 발현시켰으며, 전기생리학 실험 시 수용체 발현 세포를 확인하기 위해 EGFP를 함께 발현시켰다. 주입(transfection) 비율은 EGFP:GluA1 또는 A3:GluA2을 2:3:3 (total 2 μg/well)으로 하였다. 전기생리학실험은 DNA 주입 후 48 - 72 시간 뒤에 시행하였다.

4. 전기생리학

슬라이스를 챔버안에서 보관하면서 시행하는 전기생리학 방법은 기존에 보고된 방법을 따랐다(Song et al., 2017). 회복과정을 끝낸 슬라이스는 95%의 산소, 5% 이산화탄소가 주입되는 상태로 상온에서 유지하였다. 슬라이스를 올려 두는 측정용 챔버는 온도유지장치(SH-27B, Warner Instruments, CT, USA)를 통해 29-30℃로 유지하였다. 측정되는 신호는 MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices, CA, USA)로 증폭하였고, 전류는 Digidata 1440A interface (Molecular Devices)를 사용하여 2.8 kHz로 거르고 10 kHz로 기록하였다. 전류, 전압은 pClamp10.2 (Molecular Devices) software로 측정하였으며 측정값은 Igor Pro (WaveMetrics, OR, USA)로 분석하였다.

해마의 Schaffer collateral (SC)-CA1 시냅스에서 세포 외 흥분성 시냅스 후 전위(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)는 0.05 Hz 의 시냅스 자극을 통해 기록된다. aCSF로 채워진 유리전극(0.3-0.5 MΩ)을 해마의 stratum radiatum (SR)에 두어 자극하고, aCSF를 채운 다른 유리전극(3-4 MΩ)을 사용하여 기록하였다. 자극 강도는 실험으로 얻을 수 있는 최대 시냅스 반응의 1/3 정도의 반응을 얻을 수 있는 강도로 조정하였다. 시냅스 반응이 불안정한 경우에 측정을 중단하였다.

시냅스 장기 강화(long term potentiation, LTP)를 유도하기 위해서 고빈도 자극(high frequency stimulations, HFS)를 주었다. 100 Hz로 2번의 자극을 준 후, 이어서 바로 fEPSP를 앞의 방법과 동일하게 측정하였다.

유발 흥분성 시냅스 후 전류(evoked excitatory postsynaptic currents, eEPSCs) 측정은 whole cell 전압고정법으로 측정하였으며, 전류기록에 사용된 유리전극의 저항은 3-4 MΩ 이다. 이때 세포 내 용액은 (in mM) 100 $CsMeSO_4$, 10 TEA-Cl, 20 CsCl, 8 NaCl, 10 HEPES, 0.5 QX-314-Cl, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, 10 EGTA로 구성되었으며, pH와 삼투압은 각각 7.25와 290 mOsm/kg로 조정하였다. aCSF로 채워진 유리전극(0.3-0.5 MΩ)을 사용하여 0.05 Hz로 해마의 stratum radiatum (SR)

을 자극하여 측정하였다. GABA A 수용체 억제제인 picrotoxin (50 μM)이 있는 상태에서 측정되었으며, 자극 강도는 -70 mV에서 EPSC 정점의 진폭이 100-250 pA 되도록 하였다.

유발 억제성 시냅스 후 전류(evoked inhibitory postsynaptic currents, eIPSCs)는 -70 mV에서 eEPSCs와 동일한 세포 내 용액을 사용하여 NBQX (10 μM)와 AP5 (50 μM, NMDA 수용체 저해제)가 있는 상태에서 측정하였다. eIPSCs 측정 시 100 ms 간격으로 쌍-펄스 자극을 주었다. 자극 강도는 -70 mV에서 IPSC 정점의 진폭이 100-250 pA가 되도록 하였다. eEPSC나 eIPSC가 기록되는 동안 series resistance와 seal resistance는 짧게 과분극시키는 펄스(-5 mV, 50 ms)를 주어 지속적으로 관찰하였다. 기록된 값 중 저항이 20% 이상 변한 값은 배제하였다.

미니어쳐 EPSCs (miniature EPSCs, mEPSCs)는 -70 mV에서 측정되었으며, 세포 내 용액 조성은(in mM) 110 K-gluconate, 20 KCl, 8 NaCl, 10 HEPES, 0.5 QX-314-Cl, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, 0.5 EGTA로 하였고, pH 7.25, 삼투압 290 mOsm/kg으로 맞추었다. 자발적 활동전위와 IPSCs 는 TTX (1 μM)과 피크로톡신(50 μM)으로 막고 측정하였다. 미니어쳐 IPSC (mIPSC)는 TTX (1 μM), NBQX (10 μM), AP5 (50 μM)가 있는 상태로, 위 세포 내 용액 조성에서 K-gluconate를 같은 농도의 KCl로 대체하여 -70 mV 에서 기록하였다.

세포막전위 측정은 mEPSC 측정 시 사용했던 세포 내 용액 조성을 사용하였고 whole-cell 전류고정법을 사용하였다. 측정 시 안정적인 막전위를 나타내지 않는 세포는 제거하였다.

칼슘채널 전류 측정 시 사용된 세포 내 용액 조성은 (in mM) 100 Cs-gluconate, 10 CsCl, 10 TEA-Cl, 8 NaCl, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 0.5 Na-GTP, 10 EGTA이며, pH 7.25, 삼투압 290 mOsm/kg으로 맞추었다. 칼슘이온 전류 측정 시 aCSF에서 염화칼슘을 같은 농도의 염화바륨으로 대체하였고, TTX, NBQX, AP5, 피크로톡신이 있는 상태에서 기록하였다.

HEK293T 세포에 AMPA 수용체를 발현시킨 후, 글루타메이트 유도 전

류 측정은 mEPSC 측정 시 사용했던 세포 내 용액에서 EGTA 10 mM을 제외한 나머지 조성을 같게 한 세포 내 용액을 사용하였다. -30 mV에서 측정하였으며, glutamate (10 μM)로 전류를 유도하였다. 세포 외 용액 조성은(in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 D-glucose, 10 HEPES로 하였으며, pH는 수산화나트륨을 사용하여 7.4로 맞추었다. 해마 슬라이스 전기생리학 실험과 마찬가지로 측정 챔버는 29-30℃로 유지하였다. Cyclothiazide (100 μM, CTZ)은 AMPA 수용체의 탈감작을 막는 데 사용하였다.

5. Western blotting

해마 슬라이스는 전기생리학 실험에서 시행한 슬라이스 제작방법과 동일한 방법으로 얻었다. 그 후 western blotting 샘플을 만드는 과정은 기존에 보고된 방법에 따랐다(Song et al., 2017). CA3 부위를 자른 뒤 슬라이스를 aCSF에서 36°C 유지하여 4시간 동안 회복시킨 후, 약물을 10분 처리하고 바로 액화질소로 동결시켰다. ERK 활성에 대한 분석은 아래와 같은 방법으로 시행하였다. 슬라이스를 차갑게 유지한 lysis buffer 안에 넣고 초음파분쇄기로 균질화시킨다. Lysis buffer 조성은 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 탈인산화효소 억제제(phosphatase inhibitor cocktail, GenDEPOT, TX, USA), 단백질 분해효소 억제제(proteinase inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich, MO, USA)이며 pH는 7.3으로 맞추었다. 균질화된 단백질의 전체 농도는 브래드포드 단백질 정량 분석방법(Bradford protein assay, Bio-Rad, CA, USA)으로 측정하였다. Polyacrylamide gel electrophorsis (PAGE) 겔에 10-12 μg의 단백질이 포함되어있는 샘플을 넣어 단백질을 크기별로 분리한 후, 이를 나이트로섬유소 막에 옮겼다. 이 막을 1차 항체(phospho-ERK 또는 ERK; Cell Signaling Technologies, MA, USA)로 처리한 후, HRP가 결합된 2차 항체(Jackson ImmunoResearch, USA)로 처리하였다. HRP 신호는 ECL (GE Healthcare, UK)기질을 사용하여 검출하였고, MetaMorph software

(Molecular Devices, CA, USA)로 정량하였다.

6. 행동실험

1) Open field test

40cm X 40cm 크기의 4개의 흰 상자 안에 동물을 넣고, 30분 동안 동물의 움직임을 촬영하였다. 촬영 후, 동물이 움직인 거리는 Video Tracking system (Ethovision XT, Noldus)로 분석하였다.

2) Fear conditioning test

소리와 전기자극을 주기 전에 동물을 챔버 안에 미리 넣어 적응하도록 한다. 챔버의 크기는 20cm X 20cm이며, 전기가 통하는 격자판과 소리 장치가 설치되어 있다. 동물을 챔버 안에 넣은 후 5분 뒤에 프로토콜에 따라 소리와 전기자극을 준다. 다음날 같은 챔버 안에 동물을 넣고 5분 동안 촬영한 후, 수동으로 freezing time을 측정한다.

3) Pentylenetetrazole (Sigma-Aldrich, MO, USA) 투여 및 간질 단계분석

Pentylenetetrazole (PTZ)를 마우스에 50 mg/kg의 농도로 Phosphate-buffered saline에 희석하여 복강내로 주입하였다. 간질 단계 분석은 Racine scale (Racine et al,. 1972)과 기존 논문에 사용된 방법(Y.S Bae et al,. 2013)을 참고하였다.

7. 약물

추출 및 정제한 (+)-Syringaresinol은 Chemfaces (Wuhan, China)에서 구입하였으며, 합성한 (+)-Syringaresinol은 Hanchem (Deajeon, Korea)에서 구입하였다. NBQX, 피크로톡신, TTX, AP5, DHPG, cyclothiazide, LY341495, CGP55845는 Tocris Cookson (Bristol, UK)에서 구매하였다. 그 외 다른 시약과 화학물질은 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구매하

였다.

8. 자료처리 및 분석

모든 실험 결과는 Igor Pro (WaveMetrics, OR, USA) 와 SPSS (IBM, NY, USA)로 분석하였고, 평균(mean) ± 표준오차(standard error of mean, SEM)로 표기하였다. 통계학적 유의성은 Student's t-test 또는 Paired t-test를 사용하여 판단하였다. 비교 그룹이 여러 개인 경우 일원 분산분석(one-way ANOVA)을 통하여 통계학적 유의성을 판단하였다. 사후검정은 Tukey's HSD test 또는 Bonferroni test를 사용하였다. 통계학적 유의성은 p-값이 0.05 미만인 경우 유의성이 있다고 판단하였다.

III. 결과

1. SYR이 흥분성 및 억제성 시냅스에 미치는 영향

1) 시린가레지놀에 의한 흥분성 시냅스 전도의 감소

시린가레지놀(syringaresinol, SYR)이 시냅스 전도에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해, 4-6주령의 마우스 해마의 SC-CA1 시냅스에서 세포 외 흥분성 시냅스 후 전위(fEPSPs)를 측정하였다. 안정적인 초기 반응을 확인한 후, SYR의 농도를 달리하여 처리하였다. 그 결과 낮은 농도의 SYR (1-5 μM)은 fEPSP에 영향을 주지 않았으나, 높은 농도의 SYR (> 10 μM)은 빠르게 시냅스 후 전위를 감소시켰다(Fig. 1A). SYR의 농도가 높아짐에 따라 fEPSP의 기울기와 진폭의 감소하는 정도가 더 커졌으며(IC_{50} = 90 μM), 500 μM의 SYR을 처리하였을 때 감소 효과가 최대(75.9 ± 1.6 %)로 나타났다(Fig. 1B). 이 때, 시냅스 전 fiber volley가 영향받지 않았고(Fig. 1C,D) 이는 자극되는 축삭의 수에 변화가 없음을 의미한다. SYR에 의해 감소한 fEPSP는 AMPA 수용체 저해제인 NBQX (10 μM)에 의해 완전히 억제되었다(Fig. 1C,D). 이를 통해 SYR이 SC-C1 시냅스의 흥분성 시냅스 전도를 저해함을 확인하였다.

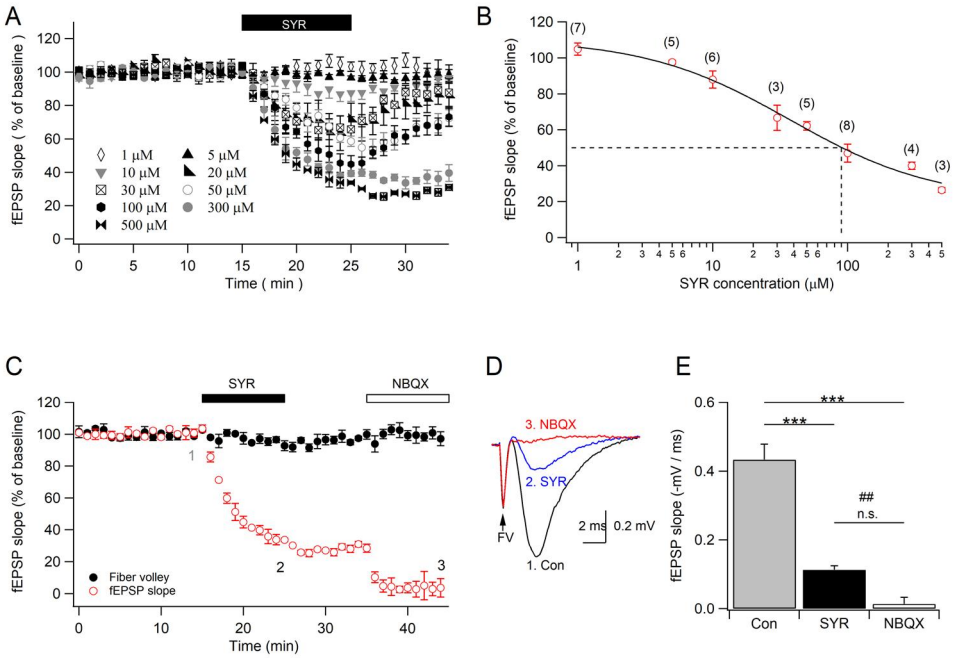

Fig 1. SYR에 의한 흥분성 시냅스 전도 억제

(A) SC-CA1 시냅스에서 SYR이 농도 변화에 의존적으로 fEPSP가 감소하였다. fEPSP를 안정적으로 15분 기록 후, SYR을 농도별로 달리하여 10분 처리하였다. (B) SYR 농도별로 처리한 후, 마지막 2분의 평균을 계산하여 기준값 대비하여 줄어든 정도를 표시하였다. (C) SYR 500 μM에 의하여 줄어든 시냅스 전도는 NBQX에 의해 완전히 없어졌다. 이에 대한 대표 trace는 (D)에 나타내었다.(FV, Fiber volley) (E) 약물이 처리되는 마지막 2분 동안 fEPSP slope의 값이다. n=3 slices; ***$p < 0.001$; n.s., not significant ($p > 0.05$); $F_{(2, 6)} = 2.93$; one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test; ##$p < 0.01$; $t = 4.64$; Student's t-test.

2) 억제성 시냅스 전도에 대한 SYR의 영향

SYR이 CA1 신경세포의 흥분성 시냅스 전도를 저해하는 것을 확인 후, 억제성 시냅스 전도에는 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다. AMPA 수용체 저해제(NBQX 10 μM)와 NMDA 수용체 저해제(AP5 50 μM)가 있는 상태에서 억제성 시냅스 후 전류(IPSCs)에 미치는 SYR의 영향을 알아보았다(Fig. 2A). 간격이 100 ms 간격인 쌍-펄스로 시냅스를 자극했을 때, SYR은 eIPSCs에 영향을 주지 않았다 (Fig. 2A-E). SYR을 처리하기 전과 후를 비교하였을 때, 첫 번째 ($t = -0.47$, $p > 0.05$), 두 번째($t = -0.33$, $p > 0.05$) eIPSCs 모두 변하지 않았으며, 쌍-펄스 비율($t = 0.23$, $p > 0.05$) 또한 일정하였다(Fig. 2D,E). 이것으로 SYR은 GABA A 수용체나 시냅스 전 세포에서 분비되는 GABA에 영향을 주지 않는다고 볼 수 있었다. 뿐만 아니라 미니어처 IPSCs (mIPSCs) 에도 SYR의 효과가 없음을 확인하였다. mIPSC의 진폭($t = 1.0$, $p > 0.05$)과 빈도($t = 1.04$, $p > 0.05$) 모두 SYR을 처리하기 전과 후에 차이가 없었다 (Fig. 2F-H). 이로써 SYR이 억제성 시냅스 전도에 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

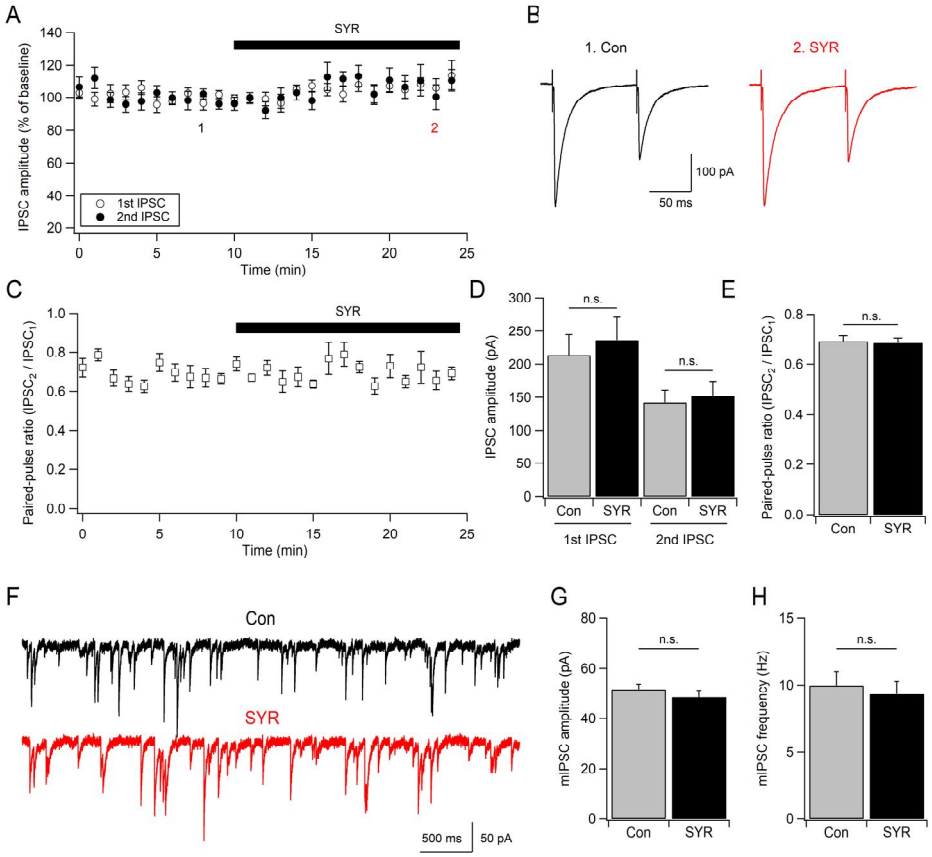

Fig 2. SYR 처리 시 일정한 억제성 시냅스 전도

(A) 쌍-펄스 자극으로(100 ms 간격) 유도한 IPSCs의 진폭을 시간에 따라 나타내었다. 대표 trace는 (B)에 표시하였다. (C) 쌍-펄스 비율이 SYR에 의해 변하지 않았다. (D) 첫 번째와 두 번째 IPSCs 모두 SYR에 의해 변화하지 않았다. (E) 쌍-펄스 비율 또한 SYR에 의해 영향 받지 않았다. n=8 cells. n.s., not significant. (F) CA1 신경세포에서 SYR을 처리하기 전(con)과 후의(SYR) mIPSCs trace이다. mIPSCs의 (G)진폭과 (H)빈도 모두 SYR에 의해 변하지 않았다. n=9 cells. n.s., not significant.

3) SYR이 시냅스 장기 강화에 미치는 영향

앞서 SYR이 흥분성 시냅스 전도를 방해함을 확인하였기 때문에, 시냅스 장기 강화(LTP, long term potentiation)에도 영향을 줄 수 있다고 생각해볼 수 있다. 이를 확인하기 위하여 두 번의 100 Hz 자극(HFS, High frequency stimulation)을 주어 LTP를 유도(Bliss et al,. 1993)하여 SYR의 효과를 실험하였다. 두 가지 실험을 진행하였는데, 첫 번째는 LTP 유도 후에 SYR (50 μM) 처리하여 fEPSP 가 얼마나 줄어드는지 관찰하였고, 두 번째는 SYR (50 μM)을 처리하고 씻어낸 뒤 LTP 유도를 하였다. LTP 유도를 먼저 시행한 후 SYR을 처리하였을 경우, SYR을 처리하는 동안에는 예상했던 대로 fEPSP 기울기가 감소하였다. 그러나 앞선 실험과 마찬가지로 SYR을 씻어내었을 때, fEPSP 기울기 값은 control과 비슷한 수준으로 회복되었다(Fig. 3A). 이를 통해 SYR을 단기적으로 처리한 후 씻어내었을 때, fEPSP가 회복되는 것 뿐 아니라 유도된 시냅스 장기 강화에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Con-LTP; 139.36±7.9 %, SYR-LTP; 131.47±7.5 %). SYR을 먼저 처리하여 시냅스 전도를 감소시킨 후에 LTP를 유도하였을 때, 대조군과 유사한 정도로 장기 강화가 일어나는 것을 관찰하였다(Fig. 3D-F, Con-LTP; 147.74±7 %, SYR-LTP; 165.5±10 %). 이것으로 SYR에 일시적으로 노출되었을 때, 기본적인 시냅스 전도가 회복될 뿐만 아니라 이후 유도되는 시냅스 장기 강화도 정상임을 알 수 있었다.

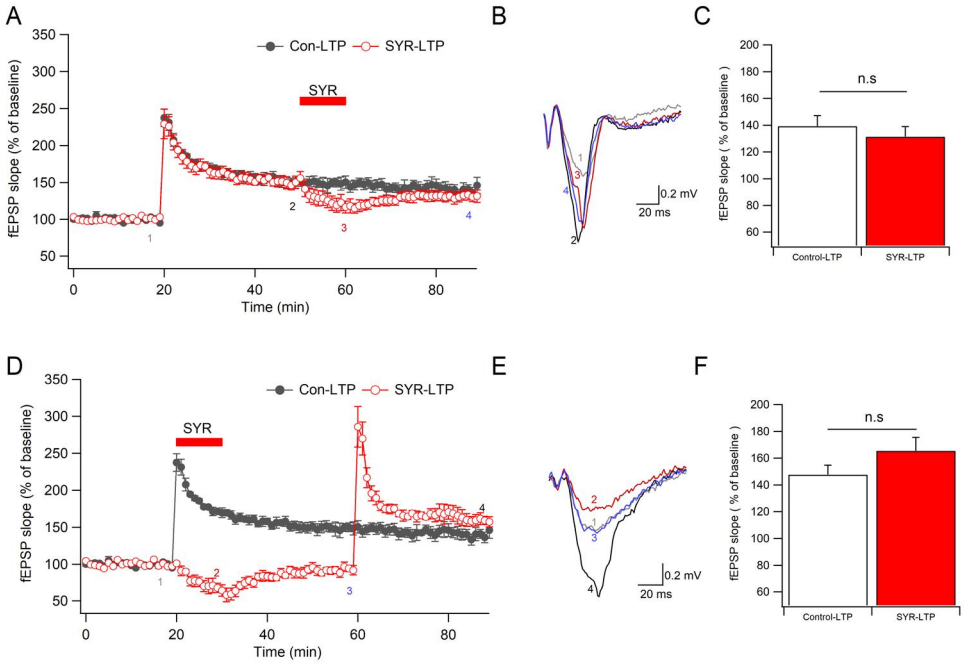

Fig 3. SYR 처리 시 일정한 시냅스 장기 강화

(A) LTP 유도 후, SYR을 처리하였을 때(SYR-LTP, n=6 slices)와 처리하지 않았을 때(Con-LTP, n=5 slices), fEPSP의 변화이다. (B)는 SYR을 처리하였을 때 변한 fEPSP의 대표 trace이며, 마지막 5분을 정량하여 (C)에 나타냈다. (D) SYR을 먼저 처리한 후, 씻어내고 LTP를 유도하였을 때, fEPSP의 변화이다(SYR-LTP, n=5 slices). (E) (D)에 대한 대표 trace이고, 마지막 5분을 정량하여 (F)에 나타냈다.

4) NMDAR, mAChR, mGluR1/5 수용체에 비의존적인 SYR의 작용

기존의 연구 결과에 의하면 NMDA 수용체, Group I 대사성 글루타메이트 수용체(mGluRs), 대사성 아세틸콜린 수용체(mAChRs)들의 활성화는 SC-CA1 시냅스에서 AMPA 수용체를 통한 시냅스 전도의 장기 저하(long-term depression, LTD)를 유발한다고 보고되어 있다(Fitzjohn et al., 1999; Lee et al., 1998; McCutchen et al., 2006). 따라서 SYR에 의한 시냅스 억제가 위의 수용체를 통한 것인지 확인하였다. NMDA 수용체 저해제 AP5, mAChR 수용체 저해제 atropine, mGluR5 저해제 MPEP, mGluR1 저해제 CPCCOEt가 aCSF에 들어있는 상태에서 안정적인 fEPSP를 측정한 후 SYR (100 μM)을 처리하였다. 그 결과 SYR에 의해서 fEPSP의 기울기가 줄어들었으나(75.47 ± 1.25 %), 수용체를 막지 않았을 때보다 덜 줄어드는 것을 관찰하였다(Fig. 4A-C). MPEP은 mGluR5를 막는다고 알려져 있으나 시냅스 전 말단에 있는 mGluR4를 활성화시킨다는 보고가 있다(Mathiesen JM et al,. 2003). 시냅스 전 말단의 mGluR4 활성화는 신경전달물질의 분비를 감소시키며, 이러한 작용에 의해 SYR의 효과가 적게 측정되었을 가능성이 있다. 그러나 NMDAR, mGluRs, mAChR이 억제된 상태에서도 SYR이 흥분성 시냅스 전도를 억제함을 확인하였다.

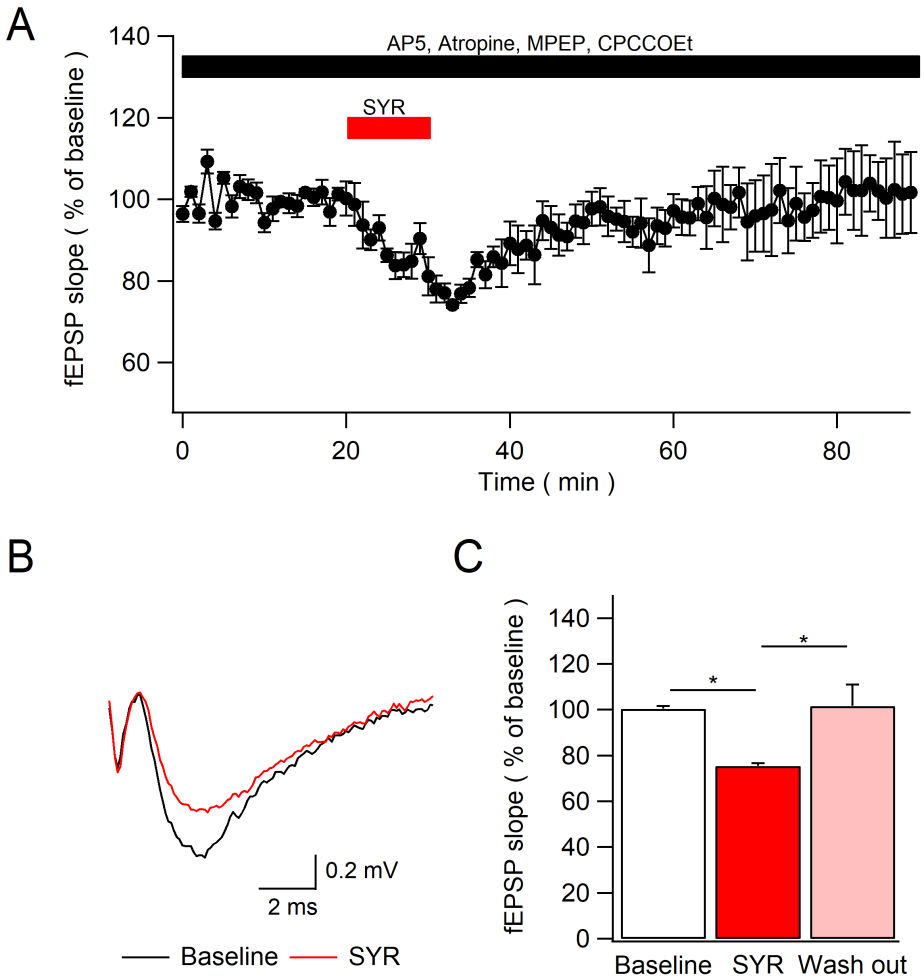

Fig 4. NMDAR, mAchR, mGluR1/5에 비의존적인 SYR의 작용

(A) 기록하는 전 구간 동안 AP5, atropine, MPEP, CPCCOEt가 aCSF에 포함되어 있으며, 이 조건하에서 SYR 100 μM을 처리하였다. Trace는 (B)에 나타내었다. (C) fEPSP의 변화를 기준값에 대비하여 정량한 결과이다. n=5 slices; *$p < 0.05$; $F_{(2,\ 12)} = 7.251$; one-way ANOVA with a post hoc Tukey's HSD test.

5) SYR의 시냅스 전도 억제와 ERK pathway의 관계

SYR에 의한 시냅스 기능 변형이 NMDAR, mAChR, mGluR1/5 활성화에 공통으로 동반되는 ERK 신호전달경로 활성화를 동반하는지를 확인하기 위해 ERK 단백질의 인산화를 측정하였다(Song et al., 2017; Volk et al., 2007). 이를 위해 해마 슬라이스에 SYR을 고농도(100, 300, 500 μM)로 처리한 후, 전체 ERK 단백질과 인산화된 ERK 단백질의 양을 비교하였다(Fig. 5A, B). 그 결과 mAChR 작용제 carbachol (CCH), Group Ⅰ mGluRs 작용제 DHPG, NMDA 수용체 작용제 NMDA를 처리하였을 때와는 다르게, SYR이 ERK 활성화에 아무 영향을 주지 않음을 확인하였다. ($F_{(6,\ 42)} = 1.29$, $p > 0.05$, one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test; Fig. 5B). 이를 통해 SYR이 시냅스 전도를 저해하는 현상이 ERK 활성화와는 다른 경로로 일어나는 것을 알 수 있었다.

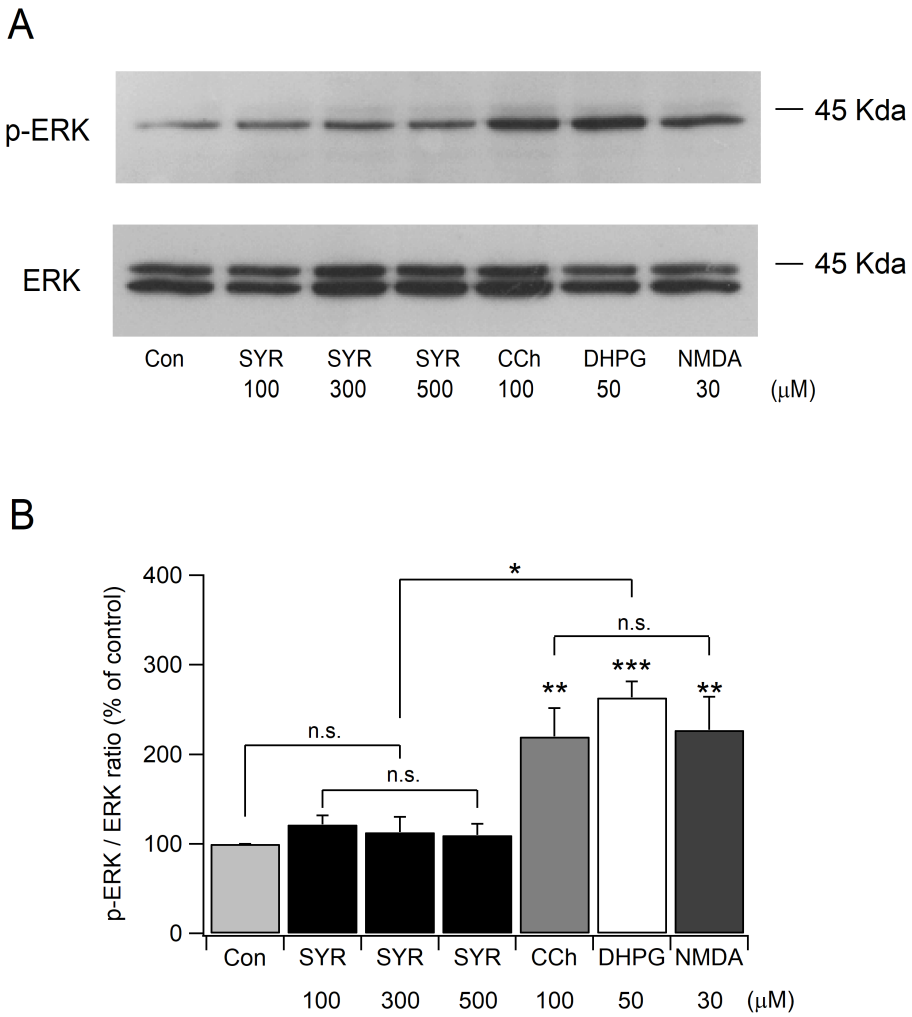

Fig 5. SYR에 의한 ERK pathway 활성화 여부 확인

(A) p-ERK (phospho ERK)와 ERK (total ERK)의 Western blots 결과이다. 이를 정량한 값은 (B)에 나타내었다. n=7; n.s., not significant ($p > 0.05$); *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; $F_{(6, 42)} = 1.29$; one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test

6) AMPA 수용체에 대한 SYR의 영향

SYR이 NMDA 수용체, 대사성 글루타메이트 수용체, 대사성 아세틸콜린 수용체에 비의존적인 경로로 흥분성 시냅스 전도를 방해하는 것을 확인하였다. 다른 가능성은 SYR이 AMPA 수용체에 직접 작용하는 것이다. 이를 확인하기 위해 HEK293T 세포에 AMPA 수용체를 발현시킨 후 글루타메이트로 전류를 유도하여 SYR의 영향이 있는지 실험해보았다. 해마 CA1 신경세포에는 GluA1/2 나 GluA2/3가 주로 발현되기 때문에 (Wenthold et al., 1996), HEK293T 세포에 GluA1과 GluA2를 함께 발현시키거나 GluA2와 GluA3을 함께 발현시켰다. AMPA 수용체의 탈감작(desensitization)을 막기 위하여 cyclothiazide (CTZ, 100 μM)가 있는 상태에서 실험하였으며, 전류 유도를 위해 글루타메이트(10 μM)을 처리하였다(Fig. 6A,C). 이때 유도된 전류는 SYR에 의해 영향을 받지 않았으며 AMPA 수용체 억제제인 NBQX에 의해 완전히 없어졌다(Fig. 6A-D). 이로써 SYR이 AMPA 수용체에 직접 작용하지 않음을 알 수 있었다.

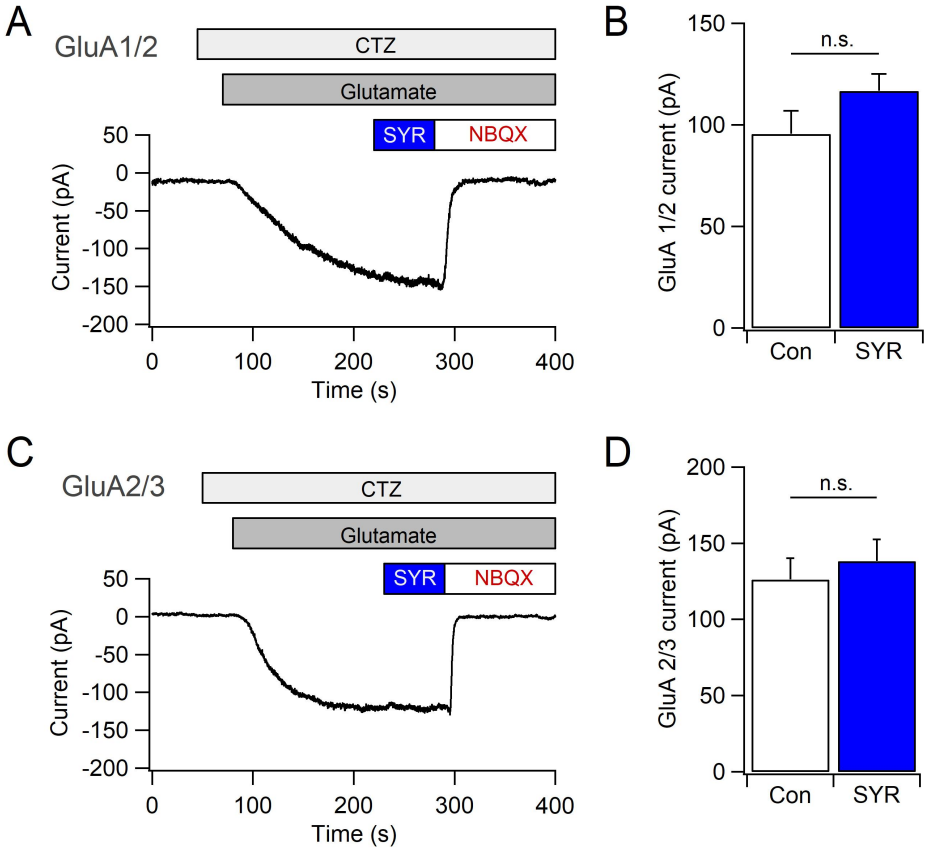

Fig 6. SYR처리 시 변하지 않은 AMPA 수용체를 통한 전류

(A) CTZ (100 μM)는 글루타메이트 (10 μM)을 처리하기 1분 전에 먼저 흘려주었고, 그 뒤 SYR (60 초)을 처리하였다. 글루타메이트에 의해 유발된 전류는 NBQX로 차단되었다. (B) GluA1/2를 통한 전류의 평균을 나타내었다. n=4 cells. t = 2.12, p > 0.05 by Student's t-test. (C) HEK293T 세포에 GluA2/3를 발현시킨 후, 글루타메이트로 유도한 전류를 나타낸 trace로 CTZ와 glutamate, SYR은 (A)와 동일한 방식으로 처리되었다. (D) GluA2/3를 통한 전류의 평균을 나타내었다. n=5 cells. t = 0.61, p > 0.05 by Student's t-test.

7) AMPA 수용체의 탈감작에 SYR이 미치는 영향

SYR이 AMPA 수용체의 탈감작을 일으킨다면, CTZ가 있는 실험환경에서는 SYR의 영향을 알 수 없다. SYR이 AMPA 수용체의 탈감작에 작용하는지 확인하기 위해 AP5와 피크로톡신이 있는 상태에서 whole-cell 패치클램프 방법을 사용하였다. SYR이 fEPSP를 감소시킨 것과 같이, -70 mV에서 측정된 흥분성 시냅스 후 전류(excitatory postsynaptic currents, EPSCs)도 SYR에 의해 감소하였다(Fig. 7A). 그러나 AMPA 수용체를 통한 EPSCs (AMPAR-EPSCs)의 감쇠(decay)시간은 SYR에 영향을 받지 않았다 (Fig. 7D). 이로써 SYR이 AMPA 수용체의 탈감작에 작용하지 않음을 확인하였다.

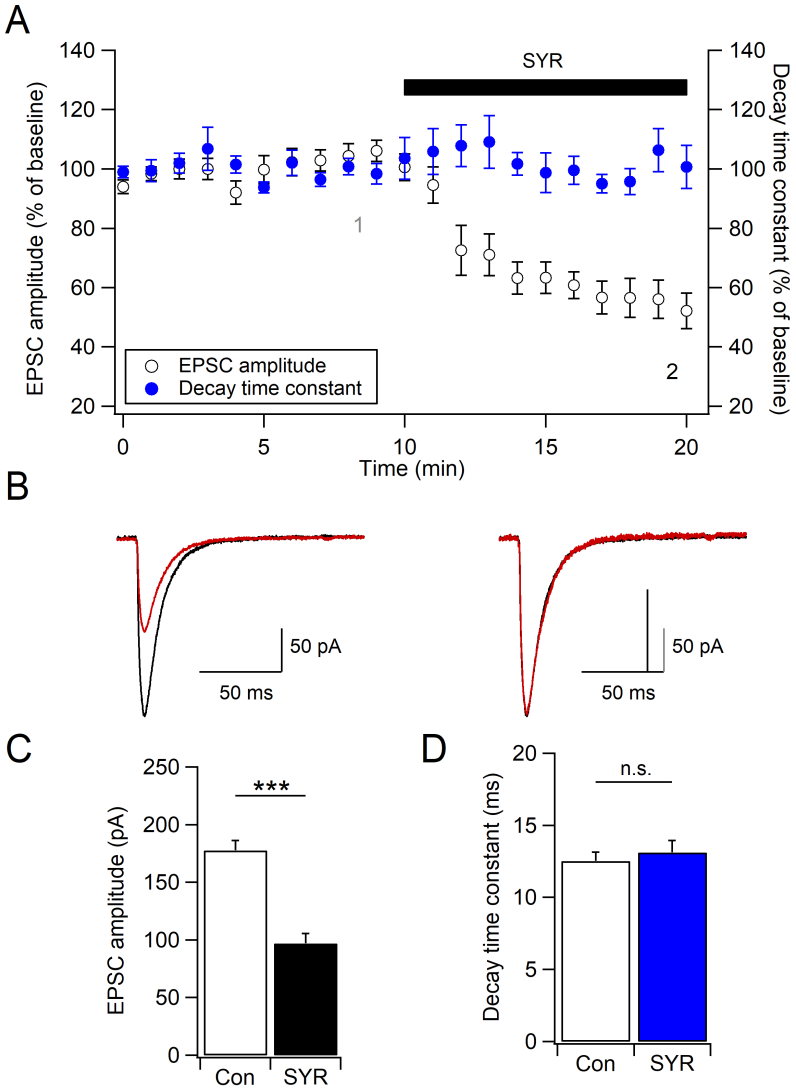

Fig 7. AMPA 수용체의 탈감작과 관계없는 SYR의 작용

(A) -70 mV에서 SYR이 EPSCs의 진폭(open circle)을 줄이는 반면 EPSCs의 감쇠시간(closed circle)에는 영향을 주지 않았다. (B) SYR 처리 전후에 측정된 EPSC(좌)와 최대 진폭으로 정규화 하여 나타낸 EPSC(우)의 trace이다. (C) SYR은 EPSC의 진폭을 줄이며, ($t = 6.62$, $p < 0.001$) EPSC 감쇠시간에는 효과가 없음($t = 0.56$, $p > 0.05$).에 대한 정량 그래프이다. n=9 cells, Student's t-test.

2. SYR의 시냅스 전 억제 효과

1) SYR에 의한 SC-CA1 시냅스의 시냅스 전 기능 변화

SYR이 흥분성 시냅스 전 기능에 영향을 주는지 알아보기 위해 쌍-펄스(paired-pulse) 자극을 주면서 fEPSP를 측정하였다(Fig. 8A-D). 펄스 사이 간격은 100 ms로 하였다. SYR을 30 μM 과 100 μM 로 처리하였을 때, 첫 번째와 두 번째 fEPSPs의 기울기가 줄었고, 쌍-펄스 비율(paired-pusle ratio, PPR)은 증가하는 것이 확인되었다. 또한 SYR을 씻어내었을 때 점차 처음의 값으로 돌아왔다(Fig. 8A, B). 이 결과를 통해 SYR이 시냅스 전에 작용하여 신경전달물질의 분비를 저해하는 것으로 유추할 수 있었다.

펄스 사이 간격이 100 ms 일 때, SYR으로 인해 PPR이 증가하는 것을 확인한 후, 펄스 자극의 간격을 다양하게 하여 실험해보았다. 먼저, SYR 100 μM 을 1시간 동안 처리하였을 때 fEPSP가 감소한 상태로 일정하게 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 9A). 이를 바탕으로 SYR 처리 시간을 1시간으로 하여 충분히 SYR이 작용할 수 있도록 하였다. SYR을 처리하기 전과 SYR을 1시간 처리한 후의 쌍-펄스 비율을 비교한 결과 펄스 사이 간격이 200 ms 이하였을 때 SYR에 의해 쌍-펄스 비율이 유의미하게 증가하였고, 500 ms 이상으로 펄스 사이 간격이 길었을 때는 그 차이가 유의미하지 않았다(Fig. 9B, C). 이를 통해 SYR이 시냅스 전 조절에 관여함을 명확히 확인할 수 있었다.

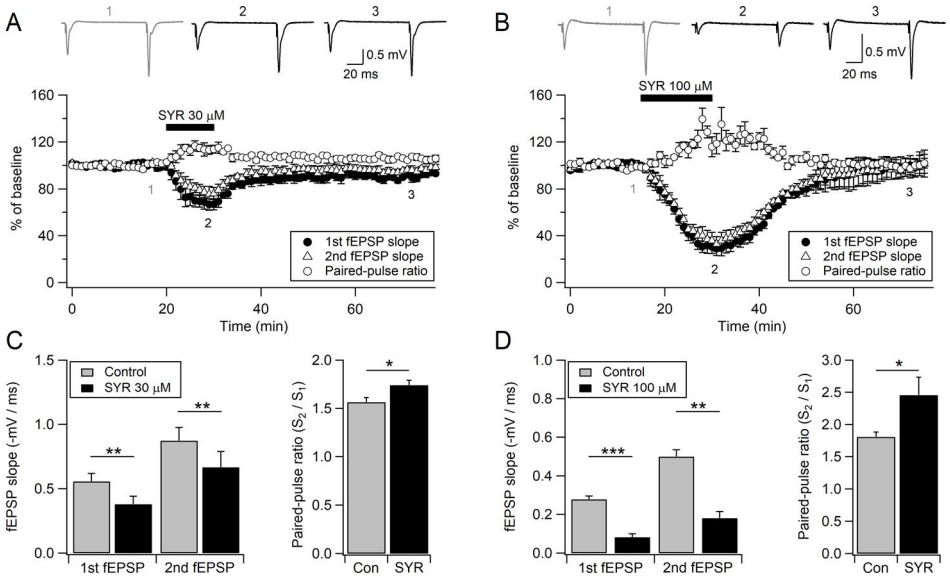

Fig 8. SC-CA1 시냅스에서 SYR에 의한 paired-pulse ratio 변화

(A, B) SYR을 30 μM (A), 100 μM (B) 처리하였을 때 fEPSP와 쌍-펄스 비율(open circle)의 변화이다. 이를 각각 정량하여 비교하여 보면 30 μM (C), 100 μM (D) 모두 첫 번째, 두 번째 fEPSP를 감소시켰으며, 쌍-펄스 비율이 증가하였음을 알 수 있다. (C) SYR 30 μM 은 첫 번째 fEPSP slope와 ($t = 11.0$, $p < 0.01$) 두 번째 fEPSP slope ($t = 10.6$, $p < 0.01$)를 감소시켰으며 PPRs는 증가시켰다.($t = 2.58$, $p < 0.05$). n=4 slices, Student's t-test. (D) SYR 100 μM은 첫 번째 fEPSP slope와 ($t = 12.1$, $p < 0.001$) 두 번째 fEPSP slope ($t = 7.5$, $p < 0.01$)를 감소시켰으며 PPRs는 증가시켰다.($t = 3.03$, $p < 0.05$). n=5 slices, Student's t-test.

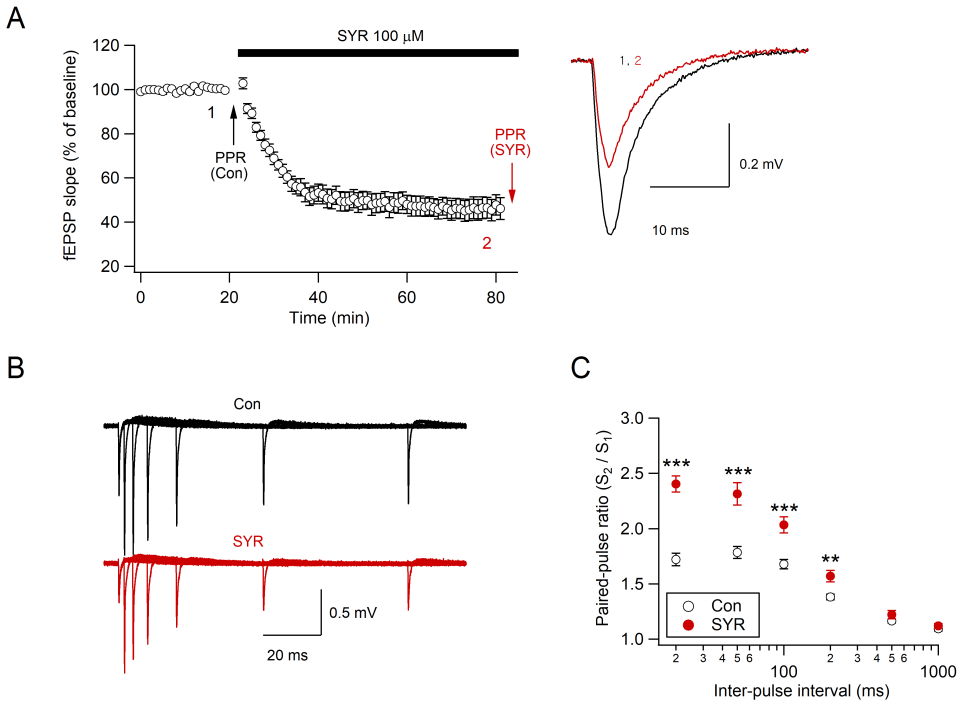

Fig 9. 쌍-펄스 간격에 따른, SYR의 효과

(A) SYR을 1시간 동안 처리하기 전과 후의 fEPSP의 변화이다. 대표 trace는 오른쪽에 나타내었다. (B) 1번과 2번 시점에서 펄스 사이 간격을 20 ms, 50 ms, 100 ms, 200 ms, 500 ms, 1000 ms 로 하여 측정한 fEPSP의 대표 trace이다. (C)에서 그 값을 비교하였다. t = 12.5 (20 ms), t = 5.67 (50 ms), t = 5.11 (100 ms), t = 3.63 (200 ms), ***p < 0.001, **p < 0.01, n=14 slices, Student's t-test.

2) SYR에 의한 readily releasable pool 조절

신경전달물질이 방출되는 것은 readily releasable pool (RRP)의 변화로 인해 조절될 수 있다(Debanne et al., 1996; Zucker and Regehr, 2002). 기존에 보고된 바에 의하면 소낭이 분비되는 확률은 RRP 크기에 의해 조절될 수 있다(Dobrunz, 2002; Dobrunz and Stevens, 1997; Murthy et al., 2001). 이에 SYR이 RRP 크기에 영향을 주는지 확인하고자 하였다. 기존의 연구에 의하면 SC-CA1 시냅스에서 20 Hz의 자극을 60번 이상 주었을 때 RRP는 고갈된다. 이를 참고하여 20 Hz 의 자극을 4초 동안 주어서 RRP 고갈을 유도하였다. 이를 활용하여 RRP의 크기를 분석하였다(Stevens and Williams, 2007; Wesseling and Lo, 2002). 그 결과, AP5와 피크로톡신이 있는 환경에서 SYR은 AMPAR-EPSCs를 감소시켰다(Fig. 10A, B). EPSC 진폭을 축적한 그래프의 마지막 20개 데이터 구간을 이용하여 y축과의 교점을 비교하였을 때, SYR에 의해 RRP의 크기가 작아졌음을 확인하였다(Fig. 10E-F). 이를 통하여 SYR이 시냅스 전도를 방해하는 것이 RRP의 크기와 분비 확률의 감소와 연관 있는 것을 알 수 있었다.

한편, CA1 신경세포의 mEPSCs를 측정하였을 때, SYR은 mEPSC의 진폭과 빈도에 영향을 주지 않음이 확인되었다(Fig. 11A-C). 이를 통해 SYR은 주로 시냅스 활성에 영향을 받는 소낭에 영향을 주는 것이라고 생각할 수 있다(Sara et al., 2005).

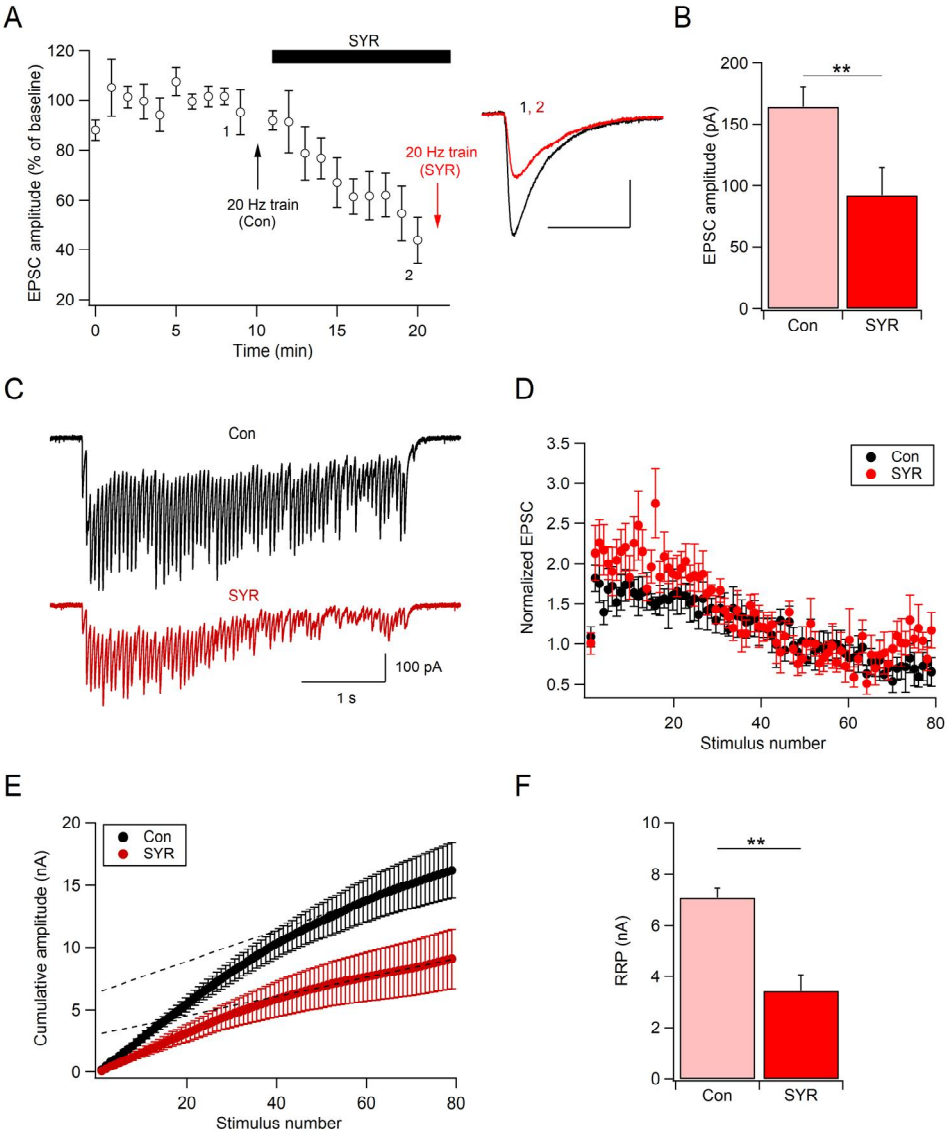

Fig 10. SYR에 의한 RRP size 감소

(A) SYR 처리하기 전과 후의 EPSCs 진폭의 변화이다. 화살표로 20 Hz 자극을 준 시점을 표시하였다. 또한 해당 시점의 EPSCs의 진폭의 변화는 오른쪽에 나타내었다.(눈금 50 ms, 50 pA) (B) SYR을 처리한 후에 EPSCs가 유의미하게 감소하였다. $t = 4.84$, $p < 0.01$, n=6 cells, Student's t-test. (C) 고빈도의 자극(20 Hz train; 20 Hz for 4 s)을 주

었을 때 측정된 EPSCs의 대표 trace이다. (D) 20 Hz로 80번 자극하였을 때, SYR을 처리하기 전과 후의 EPSCs를 각각 첫 번째 EPSC 의 진폭으로 표준화한 그래프이다. (E) 측정되는 진폭을 축적시켜서 그래프에 표시한 후, 마지막 20개 점의 연장선과 y축이 만나는 점을 표시하였다. (F) RRP 크기가 SYR 처리 시 줄어들었음을 확인하였다. $t = 4.84$, $p < 0.01$, n=6 cells, Student's t-test.

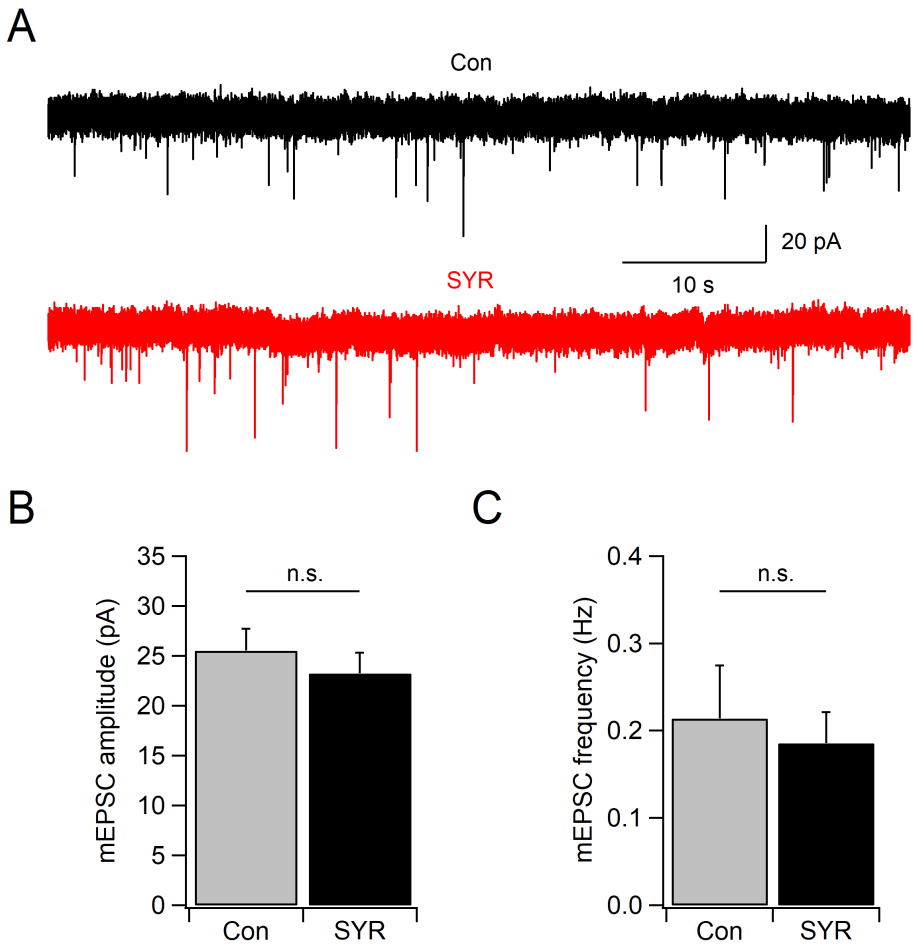

Fig 11. SYR 처리 시 일정한 mEPSCs

(A) SYR 처리하기 전과 후에 측정된 mEPSCs의 trace이다.

(B,C) mEPSC의 진폭($t = 0.87$, $p > 0.05$; B)과 빈도($t = 0.80$, $p > 0.05$; C) 모두 변하지 않았다. n=13 cells, Student's t-test.

3. Gi/o 단백질 결합 수용체를 통한 SYR의 효과

이제까지의 실험결과로 SYR이 흥분성 시냅스 전도를 줄이는 것은 시냅스 전 기능의 변화를 일으켰기 때문이라고 생각할 수 있다. 연구된 바에 의하면 시냅스 전에 존재하면서, 시냅스 전도를 억제하는 수용체로는 Group Ⅱ mGluR, GABA B receptor, Adenosine receptor 등이 있다. 이들 수용체의 상당수는 G protein coupled receptor이며, 그 중 G i/o protein과 매개 되어 있는 수용체들이 많다. 이에 SYR이 G i/o protein을 매개하여 시냅스 전도를 줄이는지 확인해보고자 하였다.

1) Gi/o 단백질과 결합하는 수용체의 활성 저해 시 SYR의 효과

SYR을 통한 시냅스 억제가 Gi/o 단백질과 연결된 수용체의 활성화를 통해 일어나는지 확인하기 위하여, 전기생리학 실험 전 수용체가 Gi/o 단백질과 결합하는 것을 방해하는 약물인 N-ethylmaleimide (NEM, 200 μM)을 해마 슬라이스에 미리 처리하여 Gi/o 단백질로 인한 수용체의 작용을 막았다(McCool et al., 1998). 그 결과 SYR의 시냅스 전도를 방해하는 현상이 사라지는 것을 발견하였다(Fig. 12A). 한편, GABA B 수용체와 mGluR 2,3는 Gi/o 단백질과 동반되어 활성화 시 시냅스 전 말단에서 신경전달물질의 분비를 억제하는 것으로 알려져 있다(Atwood et al., 2014; Betke et al., 2012). 이에 SYR이 이들 수용체를 통하여 시냅스 전도를 방해하는지 알아보고자 하였다. mGluR 2,3 저해제인 LY341495 (100 μM)와 GABA B 수용체 저해제인 CGP55845 (2 μM)가 있는 상태에서 fEPSP를 측정하였고, SYR의 저해효과가 여전히 관찰되었다(Fig 12B,C). 이로써 SYR은 NEM에 영향을 받는 Gi/o 단백질과 결합하는 수용체를 통해 시냅스 전도를 저해하지만 GABA B 수용체나 mGluR 2,3

가 아닌 다른 수용체를 통해 작용함을 확인하였다(Fig. 12D).

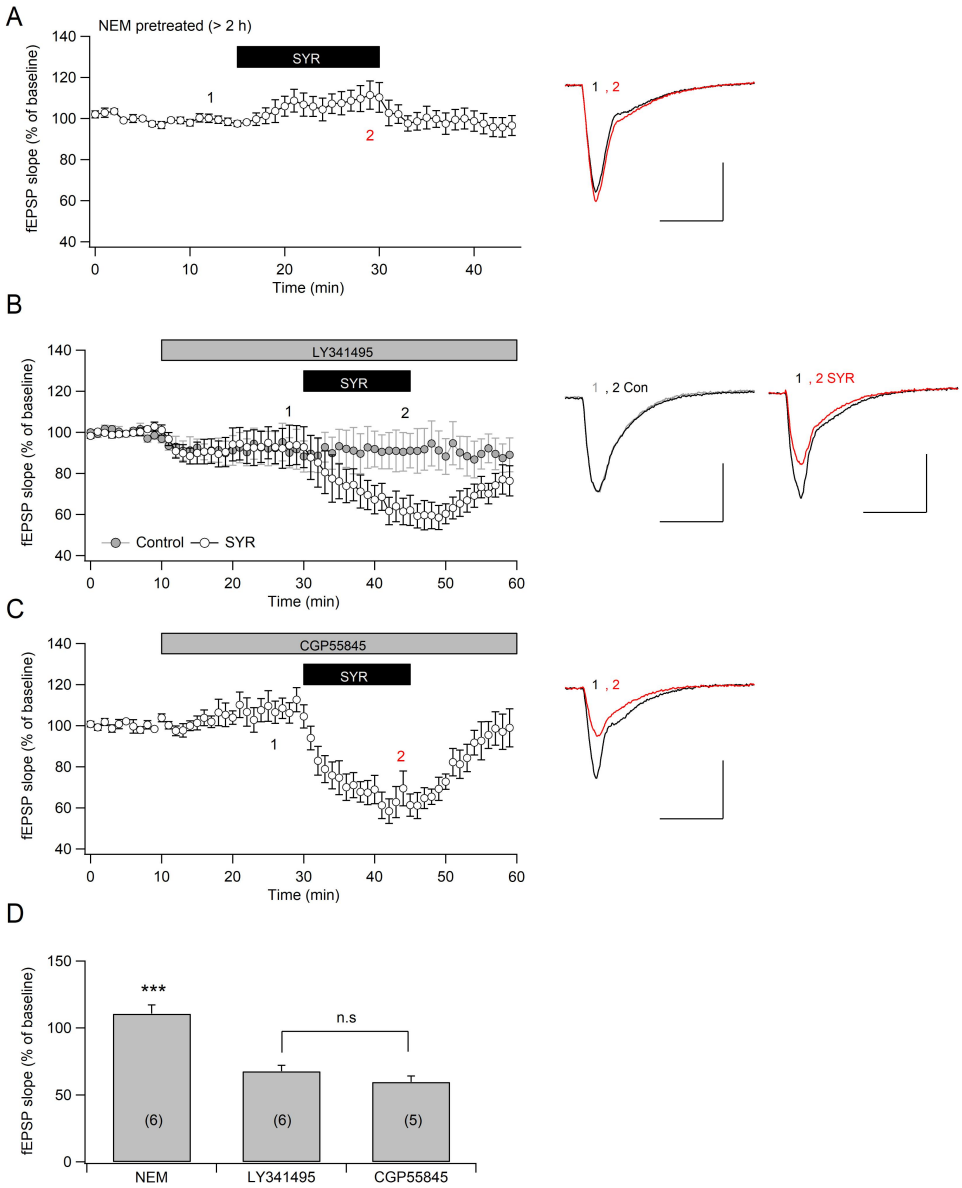

Fig 12. NEM, LY341495, CGP55845 처리 시 SYR의 작용 여부 확인

(A-C) 각각의 약물 및 SYR 처리에 의한 fEPSP의 변화를 나타내었다. 각 실험의 traces는 그래프 오른쪽에 표시하였다. (눈금, 50 ms, 50 pA). (A) NEM을 전 처리하였을 때 SYR에 의한 시냅스 억제 효과가 사라졌

다. 반면 LY341495 (B) 과 CGP55845 (C) 사용 시 SYR에 의한 효과가 여전히 나타났다. (D) 각 약물 사용 시 SYR에 의한 fEPSP 기울기 감소의 정도를 나타낸 그래프이다. 각 실험에서 사용된 슬라이스의 개수는 괄호 안에 표시하였다. $F_{(2,\ 14)} = 25.572$, ***$p < 0.001$, by one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test.

3) 해마 신경세포에서 SYR로 인한 칼슘이온 전도의 감소와 안정막 전위의 과분극

신경세포에서 Gi/o 단백질의 활성화는 칼슘 전류는 억제하는 반면 칼륨 전류를 활성화하여 세포막을 과분극 시킨다. SYR로 인한 시냅스 저해가 Gi/o 단백질 억제제인 NEM에 의해 사라졌기 때문에, SYR에 의해 칼슘 전류와 막전위의 변화가 관찰되는지 실험하였다. 먼저 해마 CA1 신경세포의 칼슘이온 전류에 대한 SYR의 영향을 분석하였다. 실험이 진행되는 동안 칼슘채널이 불활성화되는 것을 최소로 하기 위해 aCSF의 염화칼슘을 동일한 농도의 염화바륨으로 대체하였다(Budde et al., 2002). TTX가 있는 상태에서 -90 mV 에서 10 mV 로 50 ms 동안 짧게 탈분극시켜 신경세포의 내향 바륨 전류를 유도하였다(Fig. 13A-C). 관찰되는 바륨 전류는 칼슘채널을 통한 것으로 2분 간격으로 탈분극시키는 펄스를 주었을 때 초기에는 안정적인 전류가 관찰되다가 점차 그 값이 줄어드는 양상을 보였다(Fig 13A). 동일한 환경에서 SYR은 칼슘채널을 통한 전류를 더 큰 폭으로 줄였고 그 정도가 통계학적으로 유의미하였다.

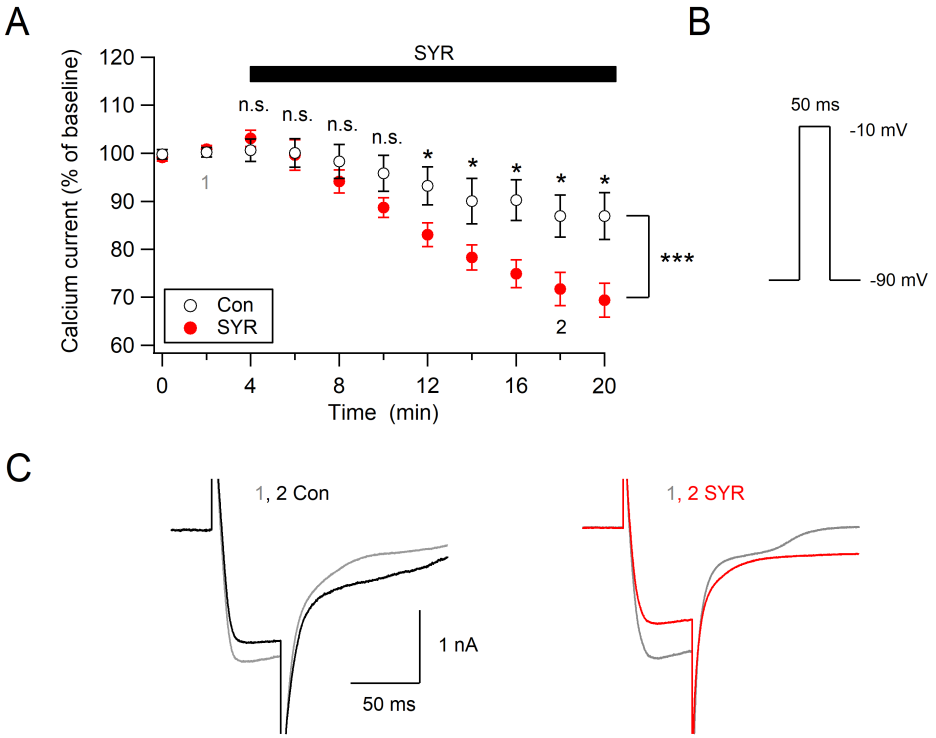

Fig 13. SYR에 의한 칼슘이온 전도 감소

(A) Control(oepn circle)과 SYR(closed circle)을 처리 시 Ca2+ 채널을 통한 전류의 변화를 시간대별로 나타내었다. n=6 (Con) and 7 (SYR) cells. *p < 0.05; ***p < 0.001, $F_{(1,\ 16)}$ = 28.84 by two-way ANOVA with a post hoc Tukey's HSD test. (B,C) 칼슘이온 채널을 통한 전류 측정을 위해 사용한 펄스의 모식도(B)와 대표 trace(C)이다.

SYR의 작용으로 인한 GIRK(G protein coupled inward rectifying potassium channel)의 활성화를 알아보기 위해서 -60 mV 에서 -100 mV 로 100 ms 동안 과분극시켰을 때 유발되는 전류를 측정하였다. 이때, aCSF 의 칼륨농도를 5 mM로 높이고 고농도의 칼륨을 포함하는 피펫용액을 사용하여 전류를 측정하였다. 위와 같은 방법으로 과분극시켰을 때, -100 mV에서 내향 전류가 SYR에 의해 증가하는 것이 확인되었다. 또한 -60 mV 에서 SYR이 외향 전류를 유발하였다(Fig 14D, E). 이를 통해 SYR가 칼륨이온의 전도를 높임을 확인하였다.

또한 whole-cell 전류고정법을 이용하여 SYR이 CA1 신경세포 막전위에 어떤 영향을 미치는지 실험해보았다. 앞선 실험들의 결과와 일치하여 SYR을 처리하였을 때, 막전위가 과분극 되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 14F). 이러한 현상은 SYR 100 μM 을 세포 내 용액에 첨가한 상태에서 세포 외부에 SYR을 처리하였을 때도 동일하게 나타났다(Fig. 14G). 이를 통해 SYR이 세포 바깥에 작용하여 칼슘 이온의 유입을 감소시키며 신경세포의 막전위를 과분극시키는 것을 알 수 있었다.

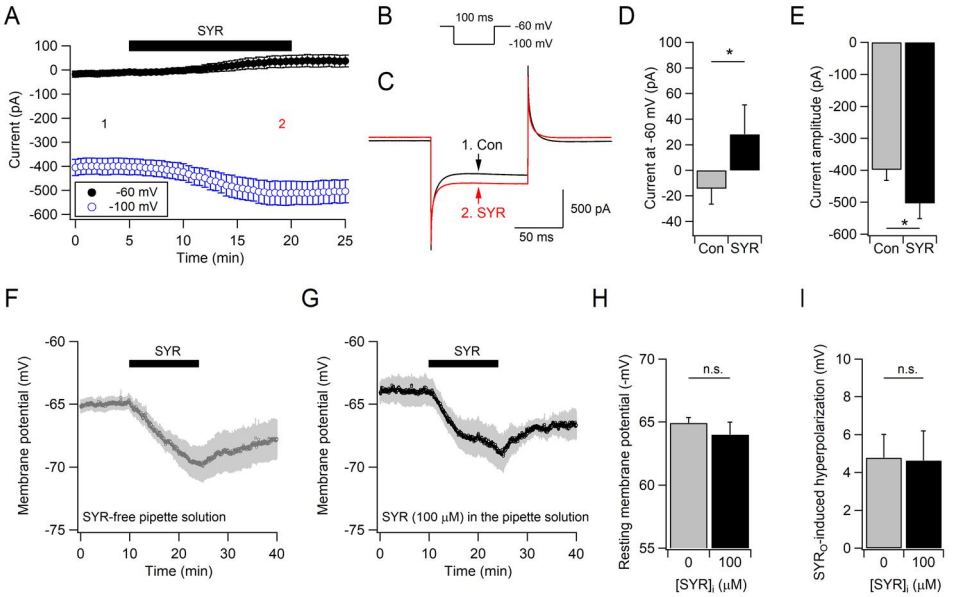

Fig 14. SYR에 의한 막전위의 과분극

(A) -60 mV (closed circle)와 -100 mV (open circle)에서 측정한 전류이다. 사용한 펄스의 모식도는 (B)에 나타내었으며 (C)는 대표 trace이다. (D,E) SYR처리 전과 후를 비교하였을 때 -60 mV에서 외향 전류가 기록되었고 (D, n=9 cells, t = 3.01, *p < 0.05), -100 mV에서는 내향 전류가 기록되었다(E, t(8) = 3.02, *p < 0.05). (F,G) SYR (100 μM)을 처리하였을 때, CA1 신경세포의 안정막 전위 변화를 기록한 것으로, 세포 내 용액에 SYR이 없는 경우(F)와 SYR이 있는 경우(G)를 측정하였다. (H,I) 안정막 전위와(H) SYR로 인해 과분극된 정도(I) 모두에서 SYR의 유무에 따른 차이는 발견되지 않았다. n=9 (SYR이 없는 세포 내 용액), 4 (100 μM SYR이 포함된 세포 내 용액)cells.

4. SYR이 간질 네트워크와 동물행동에 미치는 영향

1) SYR의 해마 CA1 부위의 간질 활성 감소 효과

SYR이 억제성 시냅스 전도에는 효과가 없지만, 흥분성 시냅스 전도만 방해하는 것은 신경세포의 시냅스 활성의 균형에 영향을 주게 된다. 간질은 시냅스 불균형이 동반되는 대표적인 신경질환으로 억제성 시냅스 전도에 비해 흥분성 시냅스 전도가 우세하다(L.R. González-Ramírez et al., 2015). 따라서 SYR에 의한 선택적 흥분성 시냅스 전도 억제는 간질 신경 네트워크의 과도한 전기적 활성을 회복할 수 있을 것이라는 예측이 가능하다. 이를 확인하기 위해 먼저 해마 슬라이스에서 CA3를 남기고 피크로톡신(50 μM)을 처리하여서 간질 유사한 전기적 활성을 유도하였다(Hablitz, 1984). 이 때, SYR 50 μM 을 처리하면 피크로톡신으로 유도되었던 전기적 활성이 저해되는 것을 확인하였다(Fig. 15A,C). 반면 SYR이 없는 경우에는 30분이상 파형이 유지되었다(Fig. 15A,B). Epileptic field response를 측정하기 위해 파형의 면적을 계산하여 비교하였을 때, SYR이 간질 활성을 감소시키는 것을 알 수 있다(Fig. 15E,F) SYR에 의한 간질파 억제 효과가 안정막전위의 과분극에 의한 것인지 확인하였다. 먼저 세포 외 용액의 칼륨 이온 농도를 2.5 mM에서 1 mM로 낮추어, SYR 100 μM을 처리했을 때와 유사한 과분극을 유도하였다(Fig. 16A,B). 이와 같은 방법으로 실험을 진행하였을 때, 피크로톡신으로 유도된 간질 형태의 전기 활성은 낮은 칼륨농도에는 영향을 받지 않았다(Fig. 16C-F). 이를 통해 해마 슬라이스에서 피크로톡신으로 유도된 간질 양상의 전기 활성을 SYR이 줄이는 것은, 과분극에 의한 효과보다는 vesicle의 release probability 감소에 의한 효과가 더 주요함을 알 수 있었다.

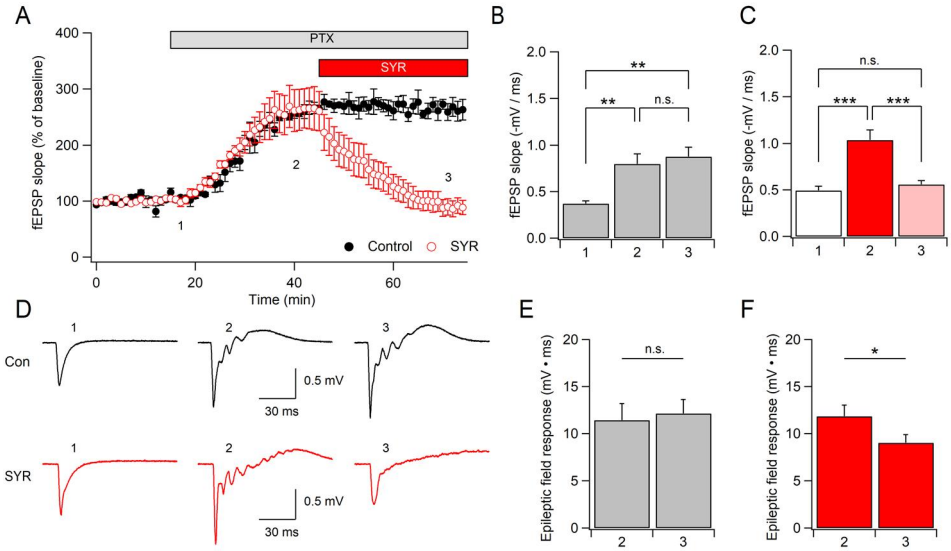

Fig 15. SYR에 의한 picrotoxin 유도 간질성 전기적 활성의 감소

(A) 피크로톡신으로 간질을 유도한 경우와(closed circle) SYR을 중간에 처리하였을 경우(open circle)에 대하여 stratum radiatum에서 측정한 fEPSP 변화를 나타내었다. 피크로톡신 처리 30 분 후에, SYR (50 μM)을 30분 처리하였다. (B) SYR을 처리하지 않았을 때, (A)의 각 지점(1-3)에서의 fEPSP 기울기 값이다. **$p < 0.01$; n.s., not significant ($p > 0.05$); $F_{(2, 24)} = 9.69$, n=9 slices by one-way ANOVA with a post hoc Tukey's HSD test. (C) SYR을 처리하였을 때 (A)의 각 지점(1-3)에서의 fEPSP 기울기 값이다. ***$p < 0.001$, $F_{(2, 24)} = 4.57$, n=9 slices by one-way ANOVA with a post hoc Tukey's HSD test. (D) (A)의 각 지점의 대표 trace이다. (E,F) fEPSP에서 간질파의 면적을 계산한 값으로, SYR을 처리하지 않은 경우(E)와 SYR을 처리한 경우(F)에 대한 그래프이다.

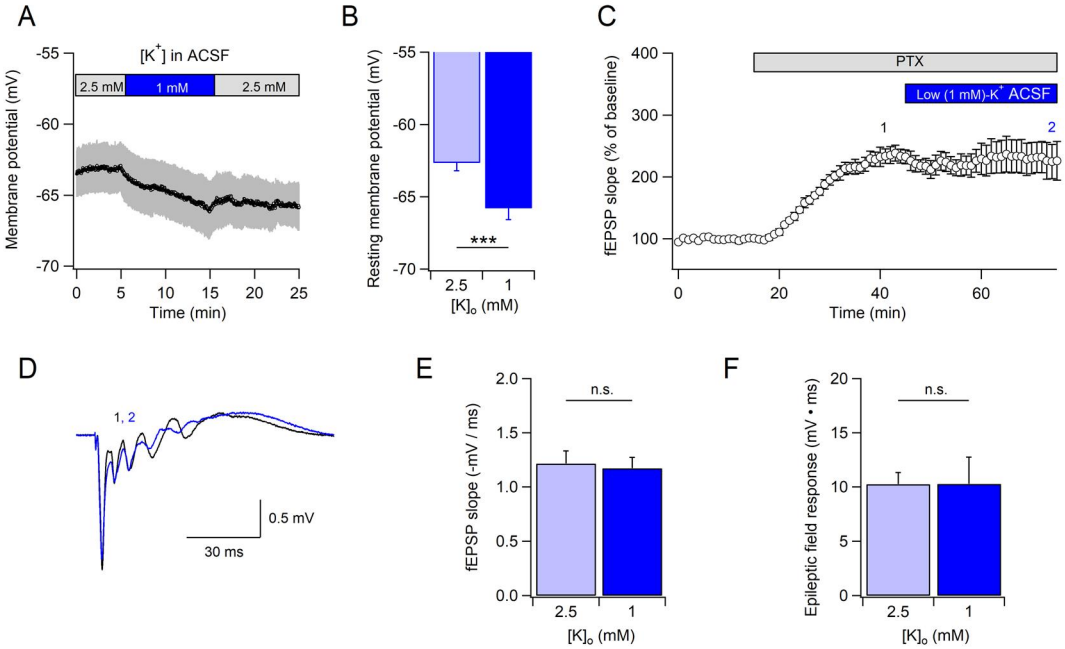

Fig 16. 막전위의 과분극과 관계없는 picrotoxin 유도 간질성 전기적 활성

(A,B) 칼륨이온 농도를 낮추었을 때 CA1에서 막전위의 과분극이 유도되며 이는 정상 aCSF($[K]_o$ = 2.5 mM)와 비교하였을 때 유의미한 차이가 있다. t = 7.43, n=6 cells, ***$p < 0.001$ by paired Student's t-test. (C) 칼륨이온 농도를 낮추어서 막전위을 과분극 시키는 것은 피크로톡신으로 유도한 간질성 전기적 활성 상태에서 측정되는 fEPSP slope에 영향을 주지 않았다. 각 지점의 대표 trace는 (D)에 표기하였다. (E,F) 세포 외 칼륨이온 농도를 낮추었을 때의 fEPSP slope(E)와 간질파의 면적(F)을 측정한 값이다.

2) 마우스의 Open field 활동도와 PTZ에 의한 간질 행동에 SYR이 미치는 효과

SYR에 의한 흥분성 시냅스 억제 효과가 동물의 행동에는 어떠한 영향을 주는지 확인하고자 하였다. Vehicle (DMSO)과 SYR을 마우스 복강에 주입(Intraperitoneal injection)한 후 30분 뒤 open field test를 시행하였다(Fig. 17A). 전체 움직인 거리와 시간대별로 움직인 거리 측정을 통해 마우스의 활동도를 분석하였을 때 실험군 (SYR)과 대조군 (DMSO) 간에 차이가 없었다(Fig. 17C,D). Open field test 시행 후, 간질 유발 약물인 Pentylenetetrazole (PTZ, 50 mg/kg)를 복강 내 주입 후, 실험군과 대조군의 간질 단계를 비교하였다. 분석 결과, SYR는 PTZ로 유발한 간질을 억제하지는 못하였다(Fig. 17B).

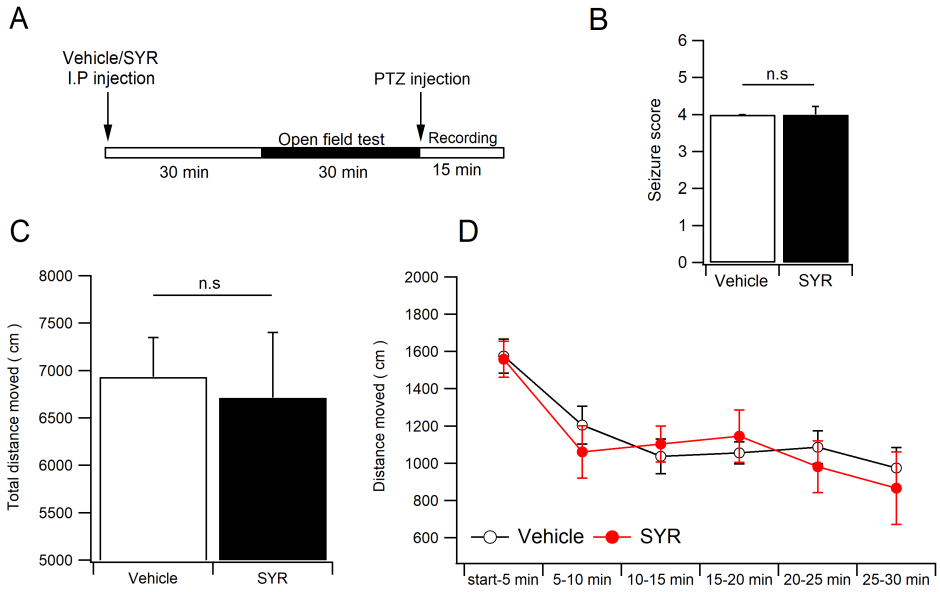

Fig 17. SYR에 의해 영향받지 않은 Locomotor activity와 간질 동물모델

(A) Open field test와 PTZ 주입 후 간질 양상을 파악하기 위한 실험 방법에 대한 모식도이다. Vehicle과 SYR을 I.P 주입 후 30분 뒤에 open field test를 시행하였으며, PTZ 주입 후 바로 15분 동안 동물의 행동 변화를 관찰하였다. (B) PTZ 주입 후 동물의 행동을 관찰하여 seizure 단계(Racine scale)를 나누었다. (C,D) open field test시 측정된 전체 이동거리(C)와 시간대별로 움직인 거리를(D) 비교하였을 때, Vehicle (open circle)과 SYR (closed circle)의 차이는 발견되지 않았다. Vehicle n=7; SYR n=7 mouse.

3) 공포 조건화 실험 시 나타나는 행동에 SYR이 미치는 효과

공포 조건화 실험은 동물모델에서 학습과 기억을 측정할 때 사용되는 실험 방법이다(J.W. Rudy et al., 2004). 조건화된 자극(CS, Conditioned stimulus)과 조건화되지 않은 자극(US, Unconditioned stimulus)을 같이 주게 되는데 본 실험에서는 CS로 소리 자극을 사용하였고, US는 강한 전기적 자극을 사용하였다. 다음날 동일한 장소에서 공포 반응을 측정하여 전날 겪었던 공포 경험을 기억하고 있는지 확인하였다(Fig. 18A). 실험 결과, 대조군과 실험군(SYR 10 mg/kg)의 전체 freezing time에 차이가 없었고, 이를 시간대별로 비교하였을 때도 마찬가지였다(Fig. 18B,C).

이를 통해, 본 연구에서 수행한 행동실험(open field test, 공포 조건화 실험, PTZ 투여) 세 가지에서 SYR이 행동의 변화를 유발하지 못함을 확인하였다.

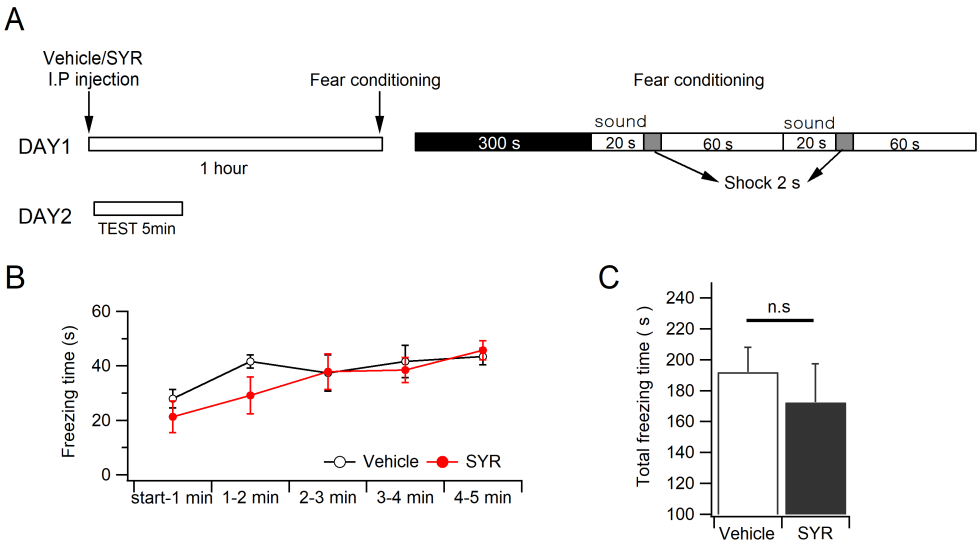

Fig 18. SYR에 의해 영향받지 않은 공포 조건화 기억

(A) 공포 조건화 실험 방법을 나타낸 모식도이다. Vehicle과 SYR을 I.P 주입한 후 1시간 뒤에 공포 조건화를 시켰다. 동물을 챔버에 넣은 후 300초 뒤에 소리 자극을 20초 동안 주고 전기자극을 2초 동안 주었다. 60초 간격을 두고 소리 자극과 전기자극을 같은 방법으로 한번 더 주었다. 다음날, 동물을 동일한 챔버에 넣어, 자극을 주지 않은 상태로 freezing time을 기록하였다. (B,C) 시간대별로 기록한 freezing time (B)과 전체 freezing time (C) 모두 SYR의 영향은 발견되지 않았다. Vehicle n=5, SYR n=6 mouse.

Ⅳ. 고찰

본 연구를 통해 식물 리그난인 SYR이 억제성 시냅스에는 영향을 주지 않고, 시냅스 후 AMPA 수용체에 작용하지 않으면서 흥분성 시냅스 전도를 감소시킴을 알 수 있었다. SYR의 효과는 시냅스 전 말단에서 글루타메이트 분비를 저해하고, 이것이 RRP 크기를 줄이는 과정을 통해 나타나는 것임을 확인하였다. 이러한 시냅스 전 억제는 피크로톡신으로 유도된 간질성 전기적 활성을 저해하였다. 이러한 결과들을 바탕으로 SYR이 글루타메이트성 시냅스 전 억제과정을 통하여 흥분성과 억제성 시냅스 정도의 균형을 조절할 수 있음을 확인하였다.

1) SYR에 의한 흥분성 시냅스 억제 기전

해마 SC-CA1 시냅스에서 신경전달물질의 분비는 다양한 신경조절물질에 의해 조절될 수 있는데, 그 예로 GABA, adenosine, ATP, glutamte, 아세틸콜린 등이 있다(Ayala et al., 2008; Fernandez de Sevilla et al., 2002; Gereau and Conn, 1995; Lupica et al., 1992; Mendoza-Fernandez et al., 2000; Vigot et al., 2006; Wu and Saggau, 1994a, 1995; Zhang et al., 2003). 그 중 시냅스 전 GABA B 수용체($GABA_B$ Rs), 아데노신 A1 수용체 (A1Rs), P2Y 수용체, Group II와 III 대사성 글루타메이트 수용체 (mGluR2,3 와 mGluR4,6,7,8), 무스카린성 아세틸콜린 수용체 (M2, M4)는 모두 Gi/o 단백질과 결합한다. 이 수용체들이 활성화되면 신경전달물질의 분비가 억제되는데, 이 과정에 칼슘이온이 관여하는 경로가 있고, 칼슘이온과 관계없는 경로가 있다(Betke et al., 2012). Gi/o 단백질에서 떨어져 나온 βγ 소단위체(subunits)는 직접적으로 N타입과 P/Q 타입 칼슘채널에 작용하고 전압 개폐성 칼슘채널(Voltage-gated calcium channel, VGCC)을 억제한다. 한편, SC-CA1 시냅스에서 시냅스 전 글루

타메이트 분비는 주로 N, P/Q 타입 칼슘채널에 의해서 매개된다(Wu and Saggau, 1994b). 분리된 G 단백질-βγ 소단위체는 NEM (N-ethylmaleimide)에 영향을 받는 부착 단백질 수용체와 상호작용 하며 축삭 말단에서 신경전달물질의 분비를 억제하는 작용을 한다. 또한 G 단백질-βγ 소단위체는 G 단백질에 의해서 활성화되는 내향 칼륨 채널(G protein-activated inwardly rectifying K+ channel, GIRK)을 활성화시키고, 신경세포의 과분극을 유도한다. 그러나 SC-CA1 시냅스의 Gi/o 단백질이 매개하는 시냅스 전 신경전달물질 분비의 억제는 GIRK 채널의 활성화와는 관련이 없다(Luscher et al., 1997). SYR이 시냅스 전 이온 채널에 미치는 영향에 대해서 알 수 없지만, SYR을 처리하였을 때 해마 신경세포에서 Gi/o 단백질과 결합하는 수용체의 활성에 의한 효과 즉, 칼슘 전류가 감소하고 안정막 전위가 과분극 되는 효과와 비슷한 양상을 보인다. 또한 NEM을 전처리하였을 때, SYR로 인한 시냅스 전 억제효과가 사라졌다. 이것은 SYR이 VGCCs를 직접적으로 억제하기 보다는 Gi/o 단백질을 통한 시냅스 전 억제를 유도한다고 볼 수 있다. Group Ⅰ mGluRs와 mAChRs(M1, M3)과 같이 Gq 단백질과 결합해 있는 수용체들도 SC-CA1 시냅스에서 시냅스 전 억제를 유발한다. 그러나 해마 슬라이스에 SYR을 처리하였을 때 ERK가 활성화되지 않았기 때문에, 이러한 수용체들은 SYR로 인한 시냅스 전 억제와 관련이 없는 것을 확인하였다.

2) Gi/o 단백질 결합 수용체를 통한 신경전달물질 분비 조절

기존 연구 결과에 의하면 중추신경계에서 신경전달물질의 분비를 억제하는 Gi/o 단백질 결합 수용체가 매우 많다(Atwood et al., 2014). 이들 중 일부의 활성화는 해마의 억제성 시냅스에는 영향을 주지 않으면서 흥분성 시냅스에 영향을 주는 것으로 보고되었다. somatostatin (Tallent and Siggins, 1997), α2-아드레날린 작용제(Shirey et al., 2008), M4 mAchRs의 알로스테릭 작용제(Shirey et al., 2008), group Ⅲ mGluRs

작용제 L-AP4 (Gereau and Conn, 1995), 아데노신(Thompson et al., 1992)은 흥분성 시냅스 전도만을 줄인다. 이번 연구에서는 앞에 제시한 물질들과 SYR이 같은 기전으로 작용하는지에 대해 알 수 없었다. 단지 Gi/o protein coupled receptor를 통하며, Group Ⅱ mGluR과 GABA B 수용체와 관련이 없음을 확인하였다. 따라서 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

3) 간질 유사 전기적 활성과 행동에 미치는 SYR의 영향

본 연구에서 SYR이 피크로톡신으로 유도된 간질성 전기 활성을 억제함을 알 수 있었다. 간질성 전기적 활성은 흥분성 시냅스 전도와 억제성 시냅스 전도가 균형을 이루지 못할 때 나타나는 것으로 알려져 있고 이러한 불균형은 신경회로가 과도하게 흥분되도록 한다(L.R. González-Ramírez et al., 2015). 이에 사용되고 있는 간질 억제 약물은 GABA 성 시냅스 전도를 촉진하거나 간접적으로 전압 개폐성 나트륨 채널이나 칼슘채널을 억제하여 글루타메이트성 시냅스 전도를 방해하는 역할을 한다(Landmark, 2007). 이와 함께 흥분성 시냅스 전도를 직접적으로 억제하는 작용은 간질 발작이나 약물 저항성 간질을 치료할 수 있다고 알려져 있다. 대표적으로 간질억제 약물로 널리 쓰이는 Levetiracetam (LEV)은 시냅스 소낭 단백질 2A (SV2A, synaptic vesicle protein 2A)에 직접적으로 작용하여 시냅스 전 말단의 글루타메이트 분비를 막는다(Lynch et al., 2004). 하지만 SV2A는 GABA 뉴런에도 발현되며, 해마 CA1에서 LEV는 글루타메이트와 GABA 분비 모두에 영향을 준다는 것이 보고되었다(Meehan et al., 2012). 그리고 LEV는 소낭의 내포작용을 통해 신경말단에 작용하기 때문에, LEV의 작용이 나타나기까지 IPSCs는 30분, EPSCs는 3시간의 시간이 필요하다. 반면, SYR은 5분 안에 흥분성 시냅스 전도를 억제한다.

현재까지 개발된 약물 중 글루타메이트의 분비를 선택적으로 억제하는

간질 치료제는 거의 없다. 본 연구에서 SYR이 흥분성 신경 말단에 작용하여 간질 유사 전기적 활성을 억제함을 전기생리학 분석을 통해 확인하였으나, 개체 수준에서 PTZ에 의해 유도된 간질 행동에는 SYR의 효과를 확인할 수 없었다. 또한 open field test와 fear conditioning test에서도 SYR에 의한 행동의 변화를 관찰할 수 없었다. 이에 대한 원인으로 낮은 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier) 투과도를 생각해 볼 수 있다. 일반적으로 400 Dalton 이하인 지용성(lipid soluble) 분자는 혈액-뇌 장벽을 잘 투과하며, 이외 분자는 수송체를 통한 이동(carrier-mediated transport) 또는 수용체를 통한 이동(receptor-mediated transport)이 불가능한 경우 혈액-뇌 장벽을 투과하지 못하는 것으로 알려져 있다(Hassan Pajouhesh and George R. Lenz., 2005). SYR의 분자량은 418 g/mol이며, 물에 대한 용해도는 낮은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 사용한 10 mg/Kg의 농도가 행동적 변화를 관찰하기에 충분한 농도였는지에 대해서는 추가적인 확인이 필요하다. SYR이 뇌-혈관 장벽을 통과하는지 알 수는 없으나 향후 다양한 수식(modification)을 통해 뇌침투도를 증가시킬 수 있으며, 이를 통해 SYR이 다양한 신경학적 질환의 치료제로 활용 가능할 것으로 생각된다.

Ⅴ. 참고문헌

Atwood, B.K., Lovinger, D.M., Mathur, B.N., 2014. Presynaptic long-term depression mediated by Gi/o-coupled receptors. Trends Neurosci. 37, 663-673.

Ayala, J.E., Niswender, C.M., Luo, Q., Banko, J.L., Conn, P.J., 2008. Group III mGluR regulation of synaptic transmission at the SC-CA1 synapse is developmentally regulated. Neuropharmacology 54, 804-814.

Bajpai VK, Alam MB, Quan KT, Ju MK, Majumder R, Shukla S, Huh YS, Na M, Lee SH, Han YK., 2018., Attenuation of inflammatory responses by (+)-syringaresinol via MAP-Kinase-mediated suppression of NF-κB signaling in vitro and in vivo., Sci Rep., 8., 9216.

Bae YS, Chung W, Han K, Park KY, Kim H, Kim E, Kim MH., 2013., Down-regulation of RalBP1 expression reduces seizure threshold and synaptic inhibition in mice., Biochem Biophys Res Commun., 433(2), 175-80.

Bliss TV, Collingridge GL., 1993., A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus., Nature., 361, 31 - 39.

Boehm, S., 1999. Presynaptic alpha2-adrenoceptors control excitatory, but not inhibitory, transmission at rat hippocampal synapses. J. Physiol. 519 (2), 439-449.

Boison, D., 2005. Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. Neuroscientist 11, 25-36.

Boulton, C.L., Irving, A.J., Southam, E., Potier, B., Garthwaite, J., Collingridge, G.L.,1994. The nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic depression in rat hippocampal slices. Eur. J. Neurosci. 6, 1528-1535.

Budde, T., Meuth, S., Pape, H.C., 2002. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. Nat. Rev. Neurosci. 3, 873-883.

Chang, P., Augustin, K., Boddum, K., Williams, S., Sun, M., Terschak, J.A., Hardege, J.D., Chen, P.E., Walker, M.C., Williams, R.S., 2016. Seizure control by decanoic acid through direct AMPA receptor inhibition. Brain 139, 431-443.

Chiba, K., Yamazaki, M., Umegaki, E., Li, M.R., Xu, Z.W., Terada, S., Taka, M., Naoi, N., Mohri, T., 2002. Neuritogenesis of herbal (+)- and (-)-syringaresinols separated by chiral HPLC in PC12h and Neuro2a cells. Biol. Pharm. Bull. 25, 791-793.

Cho, S.Y., Cho, M., Seo, D.B., Lee, S.J., Suh, Y., 2013. Identification of a small molecule activator of SIRT1 gene expression. Aging (Albany NY) 5, 174-182.

Cho, S.Y., Kim, J., Lee, J.H., Sim, J.H., Cho, D.H., Bae, I.H., Lee, H., Seol, M.A., Shin, H.M., Kim, T.J., Kim, D.Y., Lee, S.H., Shin, S.S., Lm, S.H., Kim, H.R., 2016. Modulation of gut microbiota and delayed

immunosenescence as a result of syringaresinol consumption in middle-aged mice. Sci. Rep. 6, 39026.

Chung, B.H., Kim, S., Kim, J.D., Lee, J.J., Baek, Y.Y., Jeoung, D., Lee, H., Choe, J., Ha, K.S., Won, M.H., Kwon, Y.G., Kim, Y.M., 2012. Syringaresinol causes vasorelaxation by elevating nitric oxide production through the phosphorylation and dimerization of endothelial nitric oxide synthase. Exp. Mol. Med. 44, 191-201.

de Vin, F., Choi, S.M., Bolognesi, M.L., Lefebvre, R.A., 2015. Presynaptic M3 muscarinic cholinoceptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampus. Brain Res. 1629, 260-269.

Debanne, D., Guerineau, N.C., Gahwiler, B.H., Thompson, S.M., 1996. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. J. Physiol. 491 (1), 163-176.

Dobrunz, L.E., 2002. Release probability is regulated by the size of the readily releasable vesicle pool at excitatory synapses in hippocampus. Int. J. Dev. Neurosci. 20, 225-236.

Dobrunz, L.E., Stevens, C.F., 1997. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. Neuron 18, 995-1008.

Fernandez de Sevilla, D., Cabezas, C., de Prada, A.N., Sanchez-Jimenez, A., Buno, W., 2002. Selective muscarinic regulation

of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. J. Physiol. 545, 51-63.

Fitzjohn, S.M., Kingston, A.E., Lodge, D., Collingridge, G.L., 1999. DHPG-induced LTD in area CA1 of juvenile rat hippocampus; characterisation and sensitivity to novel mGlu receptor antagonists. Neuropharmacology 38, 1577-1583.

Gereau, R. W. t., Conn, P.J., 1995. Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. J. Neurosci. 15, 6879-6889.

Gomes, N.G., Campos, M.G., Orfao, J.M., Ribeiro, C.A., 2009. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 33, 1372-1389.

González-Ramírez LR, Ahmed OJ, Cash SS, Wayne CE, Kramer MA., 2015. A biologically constrained, mathematical model of cortical wave propagation preceding seizure termination. PLoS Comput Biol, 17;11(2).

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol. Asp. Med. 27, 1-93.

Hablitz, J.J., 1984. Picrotoxin-induced epileptiform activity in hippocampus: role of endogenous versus synaptic factors. J. Neurophysiol. 51, 1011-1027.

Hassan Pajouhesh, George R. Lenz, 2005. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. NeuroRX. 2(4),

541-553.

Kim EC, Lee MJ, Shin SY, Seol GH, Han SH, Yee J, Kim C, Min SS., 2013., Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Enhances Long-Term Potentiation in the Hippocampus through Activation of Protein Kinase Cδ and ε., Korean J Physiol Pharmacol., 17(1), 51-6.

Landmark, C.J., 2007. Targets for antiepileptic drugs in the synapse. Med. Sci. Monit. 13, RA1-7.

Laxer, K.D., Trinka, E., Hirsch, L.J., Cendes, F., Langfitt, J., Delanty, N., Resnick, T., Benbadis, S.R., 2014. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. Epilepsy Behav. 37, 59-70.

Lee, H.K., Kameyama, K., Huganir, R.L., Bear, M.F., 1998. NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. Neuron 21, 1151-1162.

Lupica, C.R., Proctor,W.R., Dunwiddie, T.V., 1992. Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by adenosine in rat hippocampus: analysis of unitary EPSP variance measured by whole-cell recording. J. Neurosci. 12, 3753-3764.

Luscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1997. G protein-coupled inwardly rectifying K+ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. Neuron 19, 687-695.

Lynch, B.A., Lambeng, N., Nocka, K., Kensel-Hammes, P., Bajjalieh, S.M., Matagne, A., Fuks, B., 2004. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 9861-9866.

Mahfooz K, Singh M, Renden R, Wesseling JF., 2016., A Well-Defined Readily Releasable Pool with Fixed Capacity for Storing Vesicles at Calyx of Held., PLoS Comput Biol., 1, 2(4).

Maren S, Holt W., 2000., The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning., Behav Brain Res., 110(1-2), 97-108.

Mathiesen JM, Svendsen N, Bräuner-Osborne H, Thomsen C, Ramirez MT., 2003., Positive allosteric modulation of the human metabotropic glutamate receptor 4 (hmGluR4) by SIB-1893 and MPEP., Br J Pharmacol., 138(6), 1026-30.

McCool, B.A., Pin, J.P., Harpold, M.M., Brust, P.F., Stauderman, K.A., Lovinger, D.M., 1998. Rat group I metabotropic glutamate receptors inhibit neuronal Ca2+ channels via multiple signal transduction pathways in HEK 293 cells. J. Neurophysiol. 79, 379-391.

McCutchen, E., Scheiderer, C.L., Dobrunz, L.E., McMahon, L.L., 2006. Coexistence of muscarinic long-term depression with electrically induced long-term potentiation and depression at CA3-CA1 synapses. J. Neurophysiol. 96, 3114-3121.

Meehan, A.L., Yang, X., Yuan, L.L., Rothman, S.M., 2012.

Levetiracetam has an activity-dependent effect on inhibitory transmission. Epilepsia 53, 469-476.

Mendoza-Fernandez, V., Andrew, R.D., Barajas-Lopez, C., 2000. ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. J. Pharmacol. Exp. Ther. 293, 172-179.

Miyazawa, M., Utsunomiya, H., Inada, K., Yamada, T., Okuno, Y., Tanaka, H., Tatematsu, M., 2006. Inhibition of Helicobacter pylori motility by (+)-Syringaresinol from unripe Japanese apricot. Biol. Pharm. Bull. 29, 172-173.

Murthy, V.N., Schikorski, T., Stevens, C.F., Zhu, Y., 2001. Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. Neuron 32, 673-682.

Otmakhov N, Khibnik L, Otmakhova N, Carpenter S, Riahi S, Asrican B, Lisman J., 2004., orskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent., J Neurophysiol., 91(5), 1955-62.

Park, H.W., Cho, S.Y., Kim, H.H., Yun, B.S., Kim, J.U., Lee, S.J., Park, J., 2015. Enantioselective induction of SIRT1 gene by syringaresinol from Panax ginseng berry and Acanthopanax senticosus Harms stem. Bioorg Med. Chem. Lett. 25, 307-309.

Racine RJ., 1972., Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure., Electroencephalogr Clin Neurophysiol.,

32(3), 281-94.

Roth, B.L., Lopez, E., Beischel, S., Westkaemper, R.B., Evans, J.M., 2004. Screening the receptorome to discover the molecular targets for plant-derived psychoactive compounds: a novel approach for CNS drug discovery. Pharmacol. Ther. 102, 99-110.

Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P., 2004., Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model., Neurosci Biobehav Rev., 28(7), 675-85.

Sara, Y., Virmani, T., Deak, F., Liu, X., Kavalali, E.T., 2005. An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. Neuron 45, 563-573.

Sheridan, R.D., Sutor, B., 1990. Presynaptic M1 muscarinic cholinoceptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in the hippocampus in vitro. Neurosci. Lett. 108, 273-278.

Shirey, J.K., Xiang, Z., Orton, D., Brady, A.E., Johnson, K.A., Williams, R., Ayala, J.E., Rodriguez, A.L., Wess, J., Weaver, D., Niswender, C.M., Conn, P.J., 2008. An allosteric potentiator of M4 mAChR modulates hippocampal synaptic transmission. Nat. Chem. Biol. 4, 42-50.

Song, W.S., Cha, J.H., Yoon, S.H., Cho, Y.S., Park, K.Y., Kim, M.H., 2017. The atypical antipsychotic olanzapine disturbs depotentiation by modulating mAChRs and impairs reversal learning. Neuropharmacology 114, 1-11.

Stevens, C.F., Williams, J.H., 2007. Discharge of the readily releasable pool with action potentials at hippocampal synapses. J. Neurophysiol. 98, 3221-3229.

Tallent, M.K., Siggins, G.R., 1997. Somatostatin depresses excitatory but not inhibitory neurotransmission in rat CA1 hippocampus. J. Neurophysiol. 78, 3008-3018.

Thompson, S.M., Haas, H.L., Gahwiler, B.H., 1992. Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. J. Physiol. 451, 347-363.

Vigot, R., Barbieri, S., Brauner-Osborne, H., Turecek, R., Shigemoto, R., Zhang, Y.P., Lujan, R., Jacobson, L.H., Biermann, B., Fritschy, J.M., Vacher, C.M., Muller, M., Sansig, G., Guetg, N., Cryan, J.F., Kaupmann, K., Gassmann, M., Oertner, T.G., Bettler, B., 2006. Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. Neuron 50, 589-601.

Volk, L.J., Pfeiffer, B.E., Gibson, J.R., Huber, K.M., 2007. Multiple Gq-coupled receptors converge on a common protein synthesis-dependent long-term depression that is affected in fragile X syndrome mental retardation. J. Neurosci. 27, 11624-11634.

Wenthold, R.J., Petralia, R.S., Blahos II, J., Niedzielski, A.S., 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. J. Neurosci. 16, 1982-1989.

Wesseling, J.F., Lo, D.C., 2002. Limit on the role of activity in controlling the releaseready supply of synaptic vesicles. J. Neurosci. 22, 9708-9720.

Wiart, C., 2006. Ethnopharmacology of Medicinal Plants : Asia and the Pacific. Chapter 2. Plants Affecting the Central Nervous System. Humana Press.

Wu, L.G., Saggau, P., 1994a. Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. Neuron 12, 1139-1148.

Wu, L.G., Saggau, P., 1995. GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition in Guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca2+ influx. J. Physiol. 485 (3), 649-657.

Zhang, J.M., Wang, H.K., Ye, C.Q., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z.L., Wu, C.P., Poo, M.M., Duan, S., 2003. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activitydependent heterosynaptic suppression. Neuron 40, 971-982.

Zucker, R.S., Regehr, W.G., 2002. Short-term synaptic plasticity. Annu. Rev. Physiol. 64, 355-405.

ABSTRACT

Many neuromodulating drugs acting on the nervous system originate from botanical sources. These plant-derived substances modulate the activity of receptors, ion channels, or transporters in neurons. Their properties make the substances useful for medicine and research. In this study, I found that the plant lignan (+)-syringaresinol (SYR) suppresses excitatory synaptic transmission via presynaptic modulation. Bath application of SYR rapidly reduced the slopes of the field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) at the hippocampal Schaffer collateral (SC)-CA1 synapse in a dose-dependent manner. SYR preferentially affected excitatory synapses, while inhibitory synaptic transmission remained unchanged. SYR had no effect on the conductance or the desensitization of AMPARs but increased the paired-pulse ratios of synaptic responses at short (20-200 ms) inter-stimulus intervals. These presynaptic changes were accompanied by a reduction of the readily releasable pool size. Pretreatment of hippocampal slices with the Gi/o protein inhibitor N-ethylmaleimide (NEM) abolished the effect of SYR on excitatory synaptic transmission, while the application of SYR significantly decreased Ca2+ currents and hyperpolarized the resting membrane potentials of hippocampal neurons. In addition, SYR suppressed picrotoxin-induced epileptiform activity in hippocampal slices. Overall, this study identifies SYR as a new neuromodulating agent and suggests that SYR suppresses excitatory synaptic transmission by modulating presynaptic transmitter release.

These data were published in Neuropharmacology(Cho et al,. 2018)

Key words : syringaresinol, excitatory synapse, presynaptic depression, readily releasable pool, antiepileptic activity
Student number : 2016-22009