

Acetylcholine이 생쥐 초기 2-세포 배 세포질 내 Ca^{2+} 이온 농도 증가에 미치는 영향

윤숙영 · 배인하

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

서론

Acetylcholine(ACh)은 세포막 수용체를 통해 세포질내로 신호를 전달하는 물질로 주로 신경세포에서 분비되는 신경전달물질이다. 본 실험에서는 “in vitro 2-cell block” 현상이 나타나는 생쥐 초기 2-세포배를 체외에서 배양할 때 ACh이 배의 세포질 내 Ca^{2+} -농도($[Ca^{2+}]_i$)변화에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

ICR 계 생쥐를 과배란 유도 후 수정된 초기 2-세포 배를 체외에서 배양하면서 ACh를 농도별(1~100uM)로 처리하여 72시간 배양 후 발생율을 조사하였다. 또 이 시기의 배를 공초점 현미경과 세포질 내 Ca^{2+} -지시제인 fluo-3 AM을 이용하여 ACh에 의한 세포질내 Ca^{2+} -농도의 변화를 조사하였다. G-protein을 경유하는 신호 전달체계에 관련된 여러 가지 시약을 처리하면서 ACh에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화를 조사하였다.

결과 및 고찰

ACh를 농도별(1~100uM)로 처리하여 72시간 배양 후 발생율을 조사한 결과 100uM 처리군에서 대조군에 비해 유의하게 높은 발생율을 보였다($p < 0.01$). 1-1000uM ACh 처리 후 수초 내에 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하였으며, 이는 농도 의존적으로 나타났다. 배양액 내에 Ca^{2+} 을 제거한 후 ACh를 처리했을 때 Ca^{2+} 증가 현상이 나타나 세포질 내 Ca^{2+} -저장고로부터 유래함을 확인하였다. ACh의 저해제인 atropine을 전처리 후 ACh를 처리한 결과, $[Ca^{2+}]_i$ 변화가 일어나지 않았다. ACh로 인한 세포질 내 $[Ca^{2+}]_i$ 변화가 G-protein을 매개로 하는 신호 전달인가를 확인하기 위해 PLC 저해제로 알려진 5uM U73122를 전처리 후 같은 방법으로 $[Ca^{2+}]_i$ 변화를 측정하였다. 63개의 처리된 2-세포배 중에서 60개의 배에서 Ca^{2+} 농도의 변화가 보이지 않았다. 한편 IP3 수용체를 저해하여 세포질 내 Ca^{2+} 저장고로부터 Ca^{2+} 분비를 저해하는 heparine을 미세 주입 후 ACh를 처리하였다. 전체 27개의 배 중에서 26개의 배에서 $[Ca^{2+}]_i$ 증가가 나타났다. 이는 대조군으로 PBS만을 미세 주입한 배의 ACh 처리군과 차이가 없었다(42개/49개). 또 다른 IP3 수용체 저해제인 xestospongine C(XeC)를 전처리하여 동일한 방법으로 $[Ca^{2+}]_i$ 를 측정하였다. 40개의 배 중에서 14개가 ACh에 대해 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 나타냈다. 또 PKC 저해제인 sphingosine(10uM)을 전처리하여 ACh로 $[Ca^{2+}]_i$ 변화를 유도한 결과 $[Ca^{2+}]_i$ 변화가 일어나지 않았다. 또 BAPTA-AM 처리군에서는 전체 43개의 배에서 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하여 세포질 내 Ca^{2+} 에 의한 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release 기전은 아님을 알 수 있다. 끝으로 calmodulin dependent protein kinase II를 저해하는 KN-93을 30uM 전처리한 군은 ACh에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 변화가 일어나지 않았다. 본 실험 결과 ACh는 muscarinic ACh receptor에 결합하여 G-protein을 경유하는 신호 전달 과정에서 G-protein의 활성화에 따른 다른 변화로도 $[Ca^{2+}]_i$ 가 조절되는 것으로 보인다. 이때 G-protein의 활성화에 따라 일어나는 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가에 의해 세포 분열이 촉진되어 생쥐 초기 2-세포 배의 “in vitro 2-cell block”이 극복된 것으로 사료된다.