

생쥐 대뇌겉질의 발생단계별 Synaptophysin 발현량 차이에 관한 연구

편희장, 이영일¹

단국대학교 나노바이오의과학과, ¹단국대학교 의과대학 해부학교실
(2011년 12월 20일 접수, 2012년 2월 13일 수정접수, 2012년 3월 6일 게재승인)

간추림 : 신경연접 (neural synapse)의 형성은 신경세포 사이의 전기적 신호전달 시작을 의미하므로 신경세포의 분화와 더불어 중추신경계의 발생 및 성장에 매우 중요한 단계라 할 수 있다. 본 연구는 생쥐 (mouse)의 대뇌겉질 (cerebral cortex)에서 신경연접표지인자 (synaptogenic marker) 중의 하나인 synaptophysin의 발현양상 및 그 양적 차이를 대뇌겉질의 발달단계에 따라 층별로 비교분석하여 각각의 특징을 밝혀내는 것을 목적으로 진행되었다.

이를 위해 본 연구에서는 synaptophysin에 대한 면역형광염색을 하였으며, 최종적으로 소프트웨어를 활용한 형태학적 정량을 시행하였다.

배아 (embryo)와 신생 (neonate) 생쥐의 synaptophysin 발현은 대뇌겉질의 얇은층 (superficial layer)보다 깊은층 (deep layer)에서 더 높게 나타났으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 또한 분자층 (molecular layer)에 해당하는 부위에서도 상대적으로 많이 발현되는 것이 확인되었다. 대뇌겉질의 깊은층에서 synaptophysin 발현의 유의한 증가는 주로 배아기에 국한되어 나타났으며, 이후 층 사이의 synaptophysin 발현 차이는 점차 감소하여 성숙한 생쥐에서는 차이가 없었다.

연구결과, 대뇌겉질에서 신경연접의 형성은 중추신경계의 성장단계에 따라 층별로 다르게 나타남을 알 수 있다. 이는 신경연접형성과 관련된 중추신경계의 부위별 특징을 파악하고 나아가 중추신경계의 발달과정에서 나타나는 다양한 병태생리를 이해하는 데 도움을 줄 것으로 기대한다.

찾아보기 낱말 : 신경연접형성, 시냅토피신, 대뇌겉질, 신경발달, 생쥐

서 론

설치류 (rodents)의 경우 대뇌겉질은 배아 초기 단계에서 발생이 진행되나 일반적으로 중추신경계의 성숙은 다른 계통에 비해 늦게 완성되고, 감각겉질 층판구조는 출생 후 16일이 지나야 비로소 6개 층으로 뚜렷하게 구분된다 (Osterheld-Hass과 Hornun 1996). 포유류의 대뇌겉질은 대뇌반구의 회색질 (gray matter) 부위로서, 조직학적으로 일정하게 여섯 개의 층 (layers) 구조로 되어 있어 동형겉질 (isocortex)이라고도 불린다. 겉질의 동일

층에 존재하는 신경세포들은 형태학적, 기능적 특성, 그리고 신경연접 접촉 (synapse connection)에서 비슷한 성향을 나타낸다. 층 특이적인 신경세포들의 표현형 (phenotype)은 발생중인 대뇌의 뇌실영역 (ventricular zone)에 존재하는 신경전구세포 (neural progenitor cell) (Stephen 등 2001)로부터 연속적으로 발생되어 나타나게 되는데, 신경세포들은 뇌실영역으로부터 방사형 (radial)으로 뻗은 신경아교섬유 (glial fiber)를 따라 점차 바깥쪽 (outward)으로 이동하여 마지막 목적인 대뇌겉질의 특정 층에 위치한다.

중추신경계에서 신경연접형성 (synaptogenesis, synaptic formation)에 대한 연구는 신경근접합 (neuro-muscular junction)에 관한 연구보다 더 최근에 이루어졌다. 신경연접형성의 폭발적인 증가는 중추신경계의 발생 초기 단계에 이루어지며, 이 기간 동안 신경세포와 신경연접에 의해 유래된 신경 성장 인자들의 경쟁에 의해 어느

*이 논문은 2009년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음
저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자 : 이영일 (단국대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : anat104@dku.edu

정도 신경세포들에 대한 가지치기가 나타난다(Comery 등 1997). 기존 신경연접에 새로운 축삭(axon)을 분포시키려는 경향 때문에 출생 직후 기간의 미성숙(immature) 신경연접은 신경세포를 다양하게 분포시킨다. 신경연접이 완전하게 형성되면 신경연접이 분리되어 결과적으로 하나의 축삭을 제외한 모든 축삭의 신호전달은 철회되는데 이는 연접도태(synapse elimination)라는 현상에 해당한다(Sanes와 Lichtman 1999).

신경돌기(neurite)의 발아(sprouting)와 성장에 따른 신경연접형성을 연구하기 위해 다양한 표지단백(marker proteins)들이 이용되고 있다. 이에 속하는 것들은 growth associated protein-43 (GAP-43), synaptophysin, synapsin 등을 포함하는 여러 가지가 있으며 연구목적과 범위에 따라 다양하게 활용되고 있다. 이 중 synaptophysin은 신경세포나 신경내분비세포(neuroendocrine cell)의 소포막(vesicular membrane)에 존재하는 당단백(glycoprotein)으로서, 신경연접단백(synaptic vesicular protein)의 일종이다. 신경연접에 관여하는 물질들 중 처음으로 규명된(Jahn 등 1985, Navone 등 1986) 이 단백질은 synaptogyrin과 synaptoporin을 포함하는 네 개의 막관통도메인(transmembrane domain)을 포함한다(Sudhof 등 1987). 생체 내 모델에서 synaptophysin에 대한 다양한 유전자 조작은 비록 신경조직망(neuronal network)의 기본적인 발생과 기능에 필수적이지는 않지만, 이 단백질은 신경가소성(neural plasticity)의 미세조정에 매우 중요하게 여겨진다(McMahon 등 1996). 또한 최근의 연구결과에 따르면 synaptophysin은 중추신경계의 신경세포에서 연접소포(synaptic vesicle)의 세포내이입(endocytosis) 기전에 일정부분 관여하는 것으로 보고되었다(Kwon과 Chapman 2011).

신경연접의 형성은 신경세포 사이의 전기적 신호전달 시작을 의미하므로 신경세포의 분화와 더불어 중추신경계의 발생 및 성장에 매우 중요한 단계라 할 수 있다. 그러나 아직까지 신경연접 표지 인자를 이용한 중추신경계에서 신경연접형성에 관한 연구 성과는 부족한 실정이며, 특히 중추신경계 부위별에 따라 표지인자들이 어떠한 양상으로 발현되는가에 대한 연구 또한 미약한 상태이다. 따라서 본 연구는 신경연접 표지인자인 synaptophysin의 발현양상 및 양적인 차이를 대뇌결질의 발달단계에 따라 얇은층과 깊은층 및 분자층으로 나누어 비교분석하고, 서로 다른 양상을 띠게 됨을 밝혀내는 것을 목적으로 진행되었다. 이를 위하여 synaptophysin에 대한 면역형광염색(immunofluorescence staining)을 시행한 후에 공초점현미경(confocal microscope)으로 synap-

tophysin의 발현을 관찰하였으며, 최종적으로 소프트웨어를 활용한 형태학적 정량을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

본 연구에 사용된 실험동물은 C57BL/6 계통의 생쥐(mouse)이며 각각 임신 16~18일 사이의 배아생쥐, 출생 1~3일 사이의 신생생쥐, 그리고 출생 10~12주 사이의 성숙한(adult) 생쥐로 구분하여 실험에 사용했다.

2. 연구 방법

임신한 생쥐의 배를 절개하여 얻은 배아생쥐와 출생 1~3일 사이의 신생생쥐의 경우 각각 수술 현미경을 이용한 외과적 수술을 통해 뇌를 적출한 뒤 4% paraformaldehyde (PFA) 속에서 24시간 이상 고정하였다. 성숙한 생쥐는 먼저 Ether로 마취시킨 다음 peristaltic pump를 이용하여 0.12 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 용액을 1분간, 그리고 4% PFA (para-formaldehyde)가 들어있는 PBS (0.12 M)를 10분간 주입하여 관류고정(perfusion fixation)하였다. 적출한 뇌 조직은 관류고정액과 동일한 고정액에 16~18시간 동안 후고정(postfixation) 하였다. 후고정이 끝난 조직은 12%의 sucrose가 첨가된 0.12 M PBS 용액에 1시간 동안 담가두고 같은 용액을 1시간마다 두 번 더 교환하였으며, 16%의 sucrose와 18%의 sucrose가 첨가된 0.12 M PBS 용액들도 같은 방법으로 3번씩 교환하였다. Sucrose 처리를 한 조직은 냉각조매제(embedding medium)인 OCT Compound (Tissue-Tek, Torrance, USA)에 포매하여 액체질소에 의해 온도가 낮아진 알코올 속에 넣어 30초 동안 얼렸다. 12 μ m 두께로 냉동절단(cryosection; LEICA CM1850, Wetzlar, Germany)을 시행하여 젤라틴(gelatin)으로 코팅된 현미경슬라이드에 부착시켰으며, 면역형광염색(immunofluorescence staining)과 닛슬(Nissl)염색에 사용될 때까지 -70°C 의 초저온냉동고(deep freezer)에 보관하였다.

닛슬염색은 0.1% cresyl violet (Sigma, St Louis, MO, USA)으로 5분간 시행하였다. 염색 후 alcohol과 xylene을 이용한 탈수 및 투명 과정을 마친 조직 슬라이드는 poly-mount xylene (Polyscience, Niles, Illinois, USA)으로 봉입 후 광학현미경으로 관찰하였다.

뇌 조직의 면역형광염색은 각 단계에 따라 먼저 0.05

M PBS에서 5분씩 3회 세척한 후 rabbit anti-synaptophysin polyclonal antibody (1 : 500; AB14692 Abcam, Cambridge, UK)와 albumin (Sigma, St Louis, MO, USA), 그리고 1.5% goat serum (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)이 들어있는 일차항체 희석용액에서 48시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 0.05 M PBS에서 15분씩 3회 세척한 다음 Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, CA, USA)를 1 : 200으로 희석하여 90분 동안 25°C에서 반응시켰다. 그 후 다시 0.05 M PBS에서 5분씩 3회 세척과정을 거쳤으며 마지막으로 신경세포의 핵을 DAPI (ABBOT Molecular, Des Plaines, IL, USA)를

이용해 대조염색하였다.

면역형광염색을 마친 조직들은 레이저공초점현미경 (laser confocal microscope)을 이용해 관찰 및 분석하였다. 제작된 조직 슬라이드를 공초점현미경 (LSM-700 Carl Zeiss, Jena, Germany)에 장착하고, ZEN2009 microscope software (version 5,5,0,375 Carl Zeiss, Jena, Germany)를 이용해 조직을 스캔하여 대뇌겉질 이미지를 확보하였다. Alexa 555의 master gain은 600~650으로 일정하게 유지하였으며, laser force는 5, pin-hole은 1 AU로 지정하였다. 각 조직표본들에 대해 정확하고 신뢰할 만한 결과를 얻기 위하여 공초점 현미경의 condition을

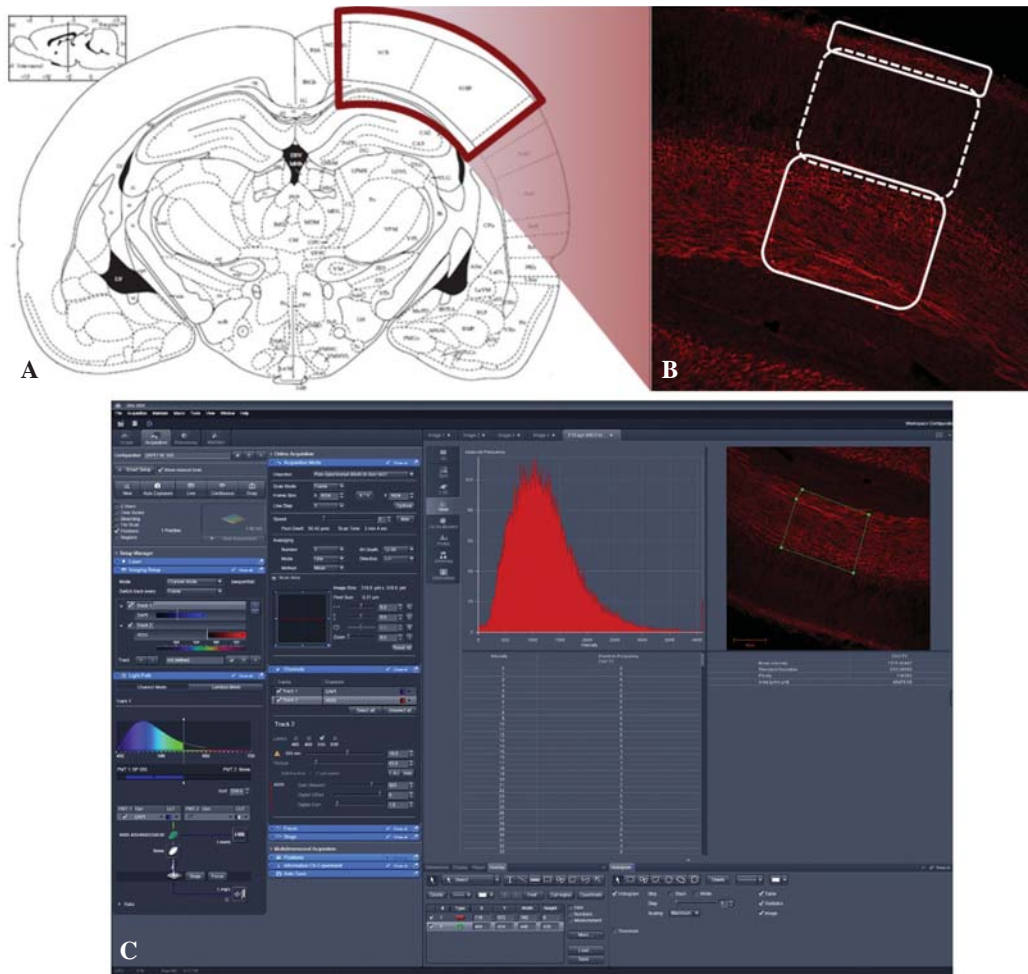


Fig. 1. Confocal densitometric analysis methods for the morphological quantification of synaptophysin in the mice cerebral cortices. (A) Diagram of coronal thin section (about 10 μ m) of the mice brain. Among the cortical areas, red sectored regions (primary somatosensory & motor cortex) were used for confocal microscopic analysis. (B) Confocal image of coronal sectioned cerebral cortical region. Synaptophysin volume data were obtained by analyzing this image using the system calculating penetration ratio of light intensity into optical density values. Optical density measurement was obtained by manually positioning the area (white straight small square: molecular layer, dashed square: superficial layer, white straight large square: deep layer) of immunofluorescence-stained section. (C) ZEN 2009 (version 5,5, 0,375 Carl Zeiss, Germany) software used for image acquisition and analysis. The synaptophysin densities were assayed in relation to the total area, and results were appeared on analysis software (C).

위의 조건으로 일정하게 유지하였다. 위의 과정을 거쳐 얻은 공초점 이미지를 바탕으로 이미지 분석 과정을 시행하였다. Synaptophysin의 면역염색성 (immunoreactivities)에 대한 발현정도 분석에는 ZEN2009 program (Fig. 1C)이 사용되었으며, 이미지에 기록된 염색 농도를 규격에 따라 정해진 방법으로 측정하였다. 먼저 대뇌겉질의 분자층 및 얇은층과 깊은층을 각각 일정한 넓이로 선택한 후, 이미지에 나타난 겉질의 바깥층과 속층 각각

을 좌·우 세 영역으로 나누어 synaptophysin의 면역염색성을 측정하였다(Fig. 1B). 이 때, 선택한 부분의 좌우가 약간씩 겹치도록 측정하였으며, 세 번에 걸쳐 측정된 각각의 수치들을 평균화하여 얇은층과 깊은층의 수치 차이를 비교하였다. 발달단계에 따라 분자층 및 얇은층과 깊은층의 synaptophysin 면역염색성을 15개 조직 개체수를 이용하여 분석하였으며, 각 조직 당 세 부분에 걸쳐 측정하였다. 위와 같은 방법으로 대뇌겉질

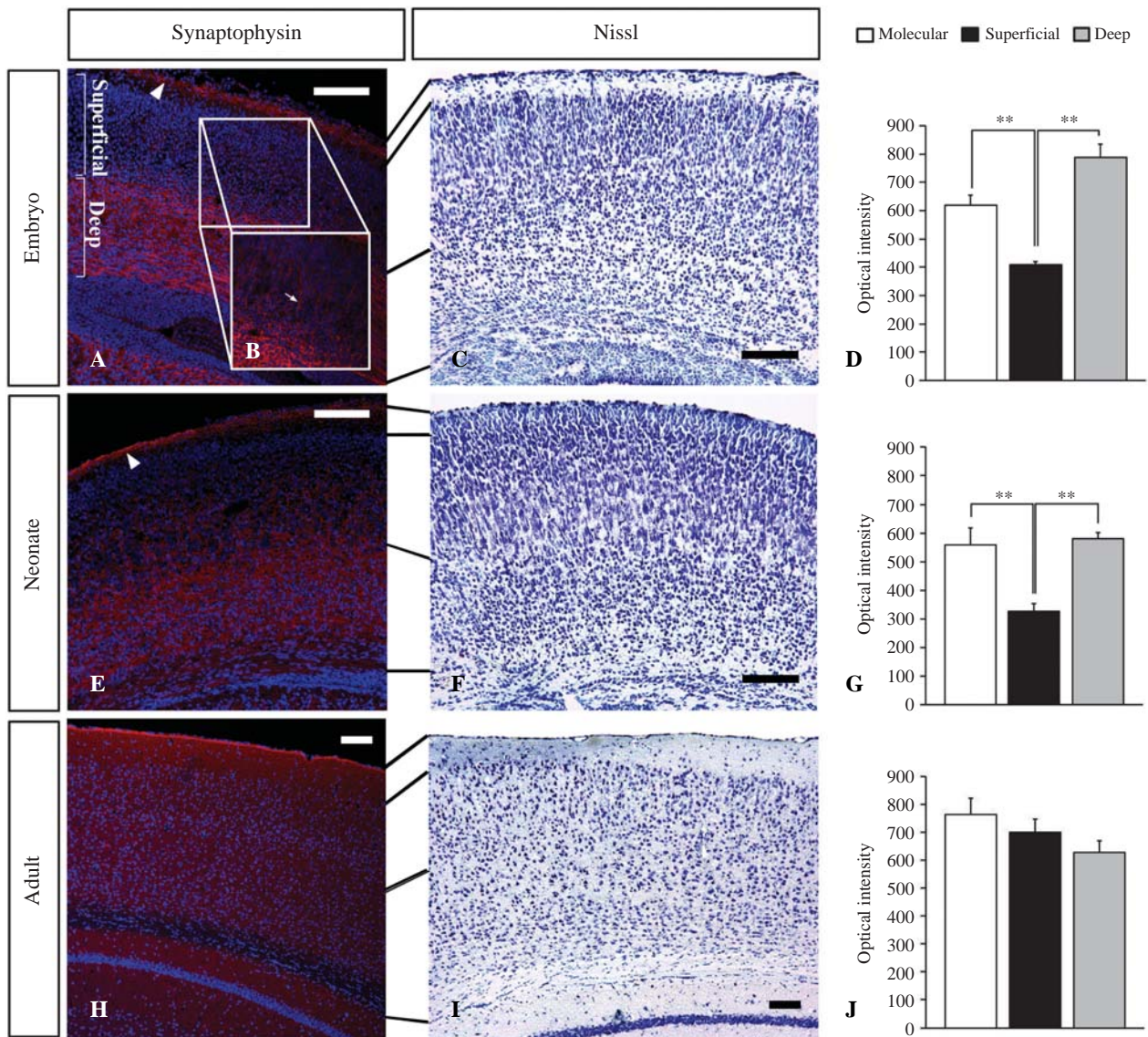


Fig. 2. Immunofluorescence of synaptophysin in the cerebral cortices of mouse brain through the developmental stages of embryonic (A), neonatal (E), and adult (H). Nissl stained pictures (C, F, and I) are also shown to indicate molecular, superficial and deep layers respectively. Synaptophysin immunoreactivities are mainly focused on molecular (arrow heads) and deep layer. (B) Magnified pictures of square area delineated in (A). Note synaptophysin immunoreactivities extending toward superficial layer (arrow). Graphs show differences of synaptophysin immunoreactivities among the molecular, superficial and deep layers of cerebral cortices in each developmental stages of embryonic (D), neonatal (G), and adult (J). **P < 0.001. n=13~15. Nuclei are counterstained with DAPI. Scale bars=100 μm.

의 층별 synaptophysin 농도를 형태학적 정량을 통해 측정 한 후, 통계분석소프트웨어(R-program)를 이용한 independent samples T-test를 통해 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 대뇌겉질에서 synaptophysin의 층별 발현양상

synaptophysin의 분포상은 대뇌겉질의 각 층별 구조에 따라 다른 양상을 띠었으며, 발달 초기일수록 그 특징이 명확하게 나타났다(Fig. 2). 배아생쥐의 경우 대뇌겉질에서 synaptophysin의 발현은 얇은층보다 깊은층에서 높게 나타났으며, 맨 바깥 층인 분자층에 해당하는 부위에서도 상대적으로 많이 발현되는 것이 확인되었다(Fig. 2A). 이러한 synaptophysin의 발현 양상은 신생생쥐(neonate)에서도 유사하게 관찰되었다. 다만 신생생쥐의 경우 synaptophysin 면역염색에 의한 대뇌겉질 얇은층과 깊은층 사이의 경계는 배아기의 경우처럼 뚜렷하지 않았다(Fig. 2E). 그리고 배아와 신생생쥐에서는 synaptophysin의 면역염색성이 깊은층에서 얇은층으로 점차 뺏어나가는 특징을 보였다(Fig. 2B, E). 반면 성숙한 생쥐에서는 synaptophysin의 면역염색성이 대뇌겉질의 얇은층과 깊은층에서 차이가 나지 않았으며(Fig. 2H) 특히 깊은층의 발현정도는 배아생쥐의 겉질과 비교하였을 때 의미 있게 감소하였다(Table 1). 이러한 결과는 대뇌겉질의 모든 영역에서 거의 동일한 양상으로 나타났기에, 본 연구에서 분석을 위해 선택한 대뇌겉질부위는 주로 일차몸감각영역(primary somatosensory area)과 일차운동영역(primary motor area)에만 국한시켰다. 형태학적 정량에 의한 결과치를 바탕으로 통계분석을 시행한 결과, 배아와 신생생쥐에서 대뇌겉질 얇은층과 깊은층 사이의 synaptophysin 면역염색성은 통계적으로 유의한 차이를 보였으며, 분자층과 얇은층 사이에서도 유의한 차이를 보였다(Fig. 2D, G). 그러나 성숙한 생쥐에서 분자층 및 얇은층과 깊은층 사이의 통계적 유의성은 찾아볼 수 없었다(Fig. 2J).

2. 대뇌겉질 분자층 및 깊은층에서 발달단계에 따른 synaptophysin의 발현변화

대뇌겉질의 발달 초기부터 synaptophysin의 발현이 비교적 현저한 층들에 대해서는 발달과정에 따른 발현변화를 시기별로 정량·분석하였다. 그 결과 배아생쥐의 대뇌겉질 깊은층에서 synaptophysin의 발현이 유의하게

Table 1. Densitometric analysis for the morphological quantification of synaptophysin immunoreactivities in molecular and deep cortical layers through the developmental stages

Cortical layers	Developmental stages	Mean intensity	SEM		
Molecular	Embryo	619.24	36.49		
	Neonate	558.08	60.35		
	Adult	765.61	57.75		
Deep	Embryo	787.90	45.73	*	**
	Neonate	580.39	21.34		
	Adult	628.28	41.15		

SEM (Standard Error of the Mean). *P<0.01, **P<0.001. n=13~15.

높은 것을 신생 및 성숙한 생쥐와의 비교를 통해 확인하였다(Table 1). 반면, 대뇌겉질 분자층에서 synaptophysin의 발현은 발달단계에 따라 다소 차이가 있었으나 모든 개체에서 대체로 유사한 발현 특성을 나타내었고 통계적으로도 유의한 차이는 없었다(Table 1).

고 찰

본 연구에서는 신경연접표지인자들 중 하나인 synaptophysin의 발현특성을 바탕으로 하여, 대뇌겉질에서 신경연접형성의 양적 차이를 발달단계별로 두 개의 층(layer)으로 구분하여 분석하였다. 배아와 신생생쥐의 경우 닛슬염색 결과에서 세포의 크기 및 밀도가 확연히 차이가 나는 두 층을 기준으로 구분하였으며, 성숙생쥐의 경우에는 이에 상응하는 부위에서 임의로 구분하였다. 연구 결과에 따르면 synaptophysin의 발현은 대뇌겉질의 발달 초기에 유의하게 증가하였고 이러한 현상은 대뇌겉질의 깊은층과 분자층에서만 국한되어 나타났다. 이는 대뇌겉질의 발달과정에서 신경연접형성이 특정 시기와 층에 국한되어 활성화됨을 보여주는 결과라 할 수 있다. 대뇌겉질의 깊은층에서 synaptophysin 발현의 증가는 신경세포들이 발생 및 분화하는 과정과 관련이 있는 것으로 사료된다. 대뇌겉질은 각 층마다 존재하는 신경세포의 종류와 특성이 다르므로 대뇌겉질의 발달에 따른 신경연접의 형성과정 또한 다양한 양상으로 나타난다. 이와 더불어 대뇌겉질의 분자층에서도 synaptophysin의 발현이 상대적으로 강하게 나타나는 것이 배아 및 신생생쥐에서 관찰되었다. 이곳은 깊은층에 위치하는 피라밋세포의 첨단가지돌기(apical dendrites)가 끝나는 부분으로, 대부분 수평(horizontal)방향으로 갈라져 축삭종말(axon terminal)과 함께 주행한다. 시상(thalamus)의 비특이핵(non-specific nuclei)에서 들어오는 비

특이시상겉질섬유(nonspecific thalamocortical fiber)와 대뇌겉질의 다른 부위에서 들어오는 연합섬유(association fiber) 및 교통섬유(commisural fiber)의 종말도 이 부분에서 둘로 갈라져 수평방향으로 주행하며 가지돌기 가지(dendritic spines)에 수많은 신경연접을 형성한다. 겉질 속에서는 오름축삭(ascending axon)이 있는 마르티노티세포(cell of Martinotti)의 축삭종말도 이곳에서 신경연접을 형성한다. 따라서 분자층에서 관찰된 synaptophysin의 발현양상으로 볼 때, 이곳은 깊은층으로부터 올라오는 신경섬유와의 연접형성이 대뇌겉질의 발달 초기부터 활발함을 보여주는 소견으로 해석될 수도 있으나, 본 연구결과만으로는 이를 검증하기에 충분치 않다.

서론에서도 언급되었듯이 뇌실 주변의 뇌실영역(ventricular zone) 속에서 생겨난 신경전구세포(neural progenitor cell)는 뇌실영역으로부터 방사형으로 뻗은 신경아교섬유(glial fiber)를 따라 점차 바깥쪽(outward)으로 이동한다. 그리고 대뇌겉질 속의 신경연접형성이 성숙화 되면 일반적으로 하나의 축삭을 제외한 나머지 축삭의 신경연접이 분리되는 연접도태 현상이 나타나게 된다. 생쥐에서 이러한 연접도태는 발생중의 대뇌겉질에서 감각 및 학습경험에 의해 가속되는 것으로 보고되었다(Bhatt 등 2009). 또한 몸감각겉질(somatosensory cortex)에서 신경연접은 출생 직후에 활발히 형성되며 출생 3주에서 8주에 걸쳐 점차 감소하는 것으로 보고되었다(Zuo 등 2005, Yang 등 2009). 배아와 신생생쥐의 대뇌겉질에서 synaptophysin의 발현이 깊은층에서 점차 얇은층으로 확대되는 양상은 신경세포들이 부챗살이주(radial migration)하는 모습과 유사하였다. 그러나 부챗살이주하는 신경세포들은 연접을 하지 않은 신경모세포이며 신경모세포의 이동이 완료된 후 신경연접 형성이 이루어짐을 고려해볼 때 본 연구결과에서 나타난 특징은 부챗살이주와는 연관성이 없는 것으로 판단된다. 한편 배아생쥐에서 synaptophysin의 발현은 대뇌겉질의 얇은층과 깊은층에서 뚜렷한 경계를 지으며 양적인 차이를 보였는데, 이는 대뇌겉질의 발생과 성숙과정에서 synaptophysin의 발현특징이 단순히 발생중인 신경세포의 이동 및 분화에 의해서만 결정되는 것이 아님을 보여주는 것으로 판단된다. 물론 대뇌겉질의 결과만으로 발생중인 중추신경계에서 신경연접형성의 양상을 보편적으로 설명하는 것은 중추신경계 구성의 특성상 불가능하다. 실제로 중추신경계의 발달과정에서 부위별 신경연접의 형성과 이에 관여하는 인자들의 연구는 최근에도 활발히 진행되고 있다. 흰쥐를 이용한 Cheng 등(2011)의 연구에 의하면 출생전후의 시기에 겉질시상섬

유(corticothalamic fibers)에서 흥분성 신경연접의 비율이 상당히 증가하는 반면, 억제성 신경연접의 비율은 변하지 않는 것으로 확인되었다. 신경연접에 대한 개별적인 표지(labeling)를 통해 얻은 결과에서는 소뇌(cerebellum)에 존재하는 신경세포의 종류별로 다양한 형태의 연접을 형성함이 형태학적으로 입증되었다(Li 등 2010). 중추신경계의 손상에 대한 보호효과가 있는 것으로 알려진 프로제스테론(progesterone)은 소뇌 조롱박신경1원(Purkinje cell)의 신경연접형성에 기여(Sakamoto 등 2001, 2002)함은 물론 해마(hippocampus)의 CA1 부위에서 synaptophysin 발현을 증가시키는 효과를 보였다(Choi 등 2003). 또한 출생 후의 시기별 해마에서 연접단백 발현양은 성별에 따라 일부 차이가 나는 것으로 보고되었다(Bian 등 2011). 따라서 본 연구결과에 대한 보다 정확한 해석을 위해서는 대뇌겉질과 연결된 중추신경계 여러 부위에서 발생단계별 신경연접형성과 이에 관여하는 인자들을 함께 이해할 필요가 있는 것으로 사료된다.

결론적으로 신경연접단백이 초기에 발현되는 부위와 그 시간적 변화를 고려해볼 때, 신경연접단백의 발현은 대뇌겉질의 발달단계에 따라 독특한 양상으로 나타남을 알 수 있었다. 본 연구에서는 우선 대뇌겉질에서 발달단계별 신경연접단백의 발현양상을 분석하였으며 향후 해마, 바닥핵(basal ganglia), 사이뇌(diencephalon) 및 소뇌에서도 신경연접단백의 발현양상을 부위별로 분석할 계획이다. 아울러 synaptophysin 이외의 잘 알려진 신경연접 표지들에 대해서도 중추신경계의 발달에 따라 시기별로, 그리고 부위별로 어떠한 양상으로 활성화되는가를 규명하고자 한다. 하나의 신경연접 표지만으로 모든 특성을 설명할 수는 없으나 synaptophysin이 신경연접단백들 중 가장 풍부하고(Takamori 등 2006) 모든 신경연접에 일관되게 분포한다는 특성을 고려한다면 본 연구와 추가 연구를 통해 얻게 될 결과들은 중추신경계의 발달과정에서 신경연접형성과 관련된 각 부위별 특징을 이해하는 데 기여함은 물론, 중추신경계 발달과 연관된 병태생리를 신경연접형성의 시기와 부위별 차이라는 관점에서 분석하는 데 활용될 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Bhatt DH, Zhang S, Gan WB : Dendritic spine dynamics. *Annu Rev Physiol* 71: 261-282, 2009.
- Bian C, Zhu K, Guo Q, Xiong Y, Cai W, Zhang J : Sex differences and synchronous development of steroid recep-

- tor coactivator-1 and synaptic proteins in the hippocampus of postnatal female and male C57BL/6 mice. *Stroids Epub ahead of print* 77: 149, 156, 2012.
- Chen IH, Tammy SH, Yu RL, Yen CC : Morphological changes and synaptogenesis of corticothalamic neurons in the somatosensory cortex of rat during perinatal development. *Cerebral cortex* 21: 884-895, 2011.
- Choi JM, Romeo RD, Brake WG, Bethea CL, Rosenwaks Z, McEwen BS : Estradiol increases pre- and post-synaptic proteins in the CA1 region of the hippocampus in female rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 144: 4734-4738, 2003.
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT : Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94: 5401-5404, 1997.
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P : A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 82: 4137-4141, 1985.
- Kwon SE, Chapman ER : Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron* 70: 847-854, 2011.
- Li L, Tasic B, Micheva KD, Ivanov VM, Spletter ML, Smith SJ, Luo L : Visualizing the distribution of synapses from individual neurons in the mouse brain. *PLoS One* 5(7): e11503, 2010.
- McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Sudhof T : Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93: 4760-4764, 1996.
- Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P : Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol* 103: 2511-2527, 1986.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR : Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720, 2001.
- Osterheld-Hass MC, Hornung JP : Laminar development of the mouse barrel cortex: effects of neurotoxins against monoamines. *Exp Brain Res* 110: 183-195, 1996.
- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K : Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats. *Neurosci Lett* 322: 111-115, 2002.
- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K : Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J Neurosci* 21: 6221-6232, 2001.
- Sanes JR, Lichtman JW : Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22: 389-442, 1999.
- Sudhof TC, Lottspeich F, Greengard P, Mehl E, Jahn R : A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science* 238: 1142-1144, 1987.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräer F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R : Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127: 831-846, 2006.
- Yang G, Pan F, Parkhurst CN, Grutzendler J, Gan WB : Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc* 5: 201-208, 2010.
- Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB : Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46: 181-189, 2005.

Differential Expression Levels of Synaptophysin through Developmental Stages in Cerebral Cortices of Mouse Brain

Hee-Jang Pyeon, Young-Il Lee¹

Department of NanoBio Medical Science, Dankook University

¹*Department of Anatomy, College of Medicine, Dankook University*

Abstract : It is well known that differentiation and growth of central nervous system are accomplished through relatively early stages of development. The formation of neural synapse indicates beginning of electrical signaling between neurons, so that may be a critical step in the differentiation of neurons as well as the development and growth of central nervous system. The purpose of this study was to investigate the differential expression levels and patterns of synaptic marker (synaptophysin) between superficial and deep layers of cerebral cortex according to the developmental stages.

We introduced immunofluorescence staining of synaptophysin combined with densitometric analysis for the morphological quantification.

The intensities of synaptophysin immuno-reactivities in deep layers of cerebral cortices were significantly higher compared to superficial layers in cerebral cortices of embryonic and neonatal mice. The significant increase of synaptophysin expression in the deep layer of cerebral cortex was mainly confined to the embryonic stage. As the expression of synaptophysin gradually decrease thereafter, the difference of expression level between superficial and deep layers could not find in the adult mice.

From this study, we could confirm indirectly through synaptophysin that synaptogenic activities in the deep layer of cerebral cortex shows unique pattern especially during the early stages of brain development. Results from this study will be helpful for understanding different patterns of synaptogenesis among the various regions of developing brain.

Keywords : Synaptogenesis, Synaptophysin, Cerebral cortex, Neural development, Mouse