啓明醫大學術誌 第21券 1號
Keimyung Med J
Vol. 21, No. 1, June, 2002

Nerve Growth Factor로 분화된 PC12 세포에서 GABA 및 NMDA 수용체의 전기생리학적 특성

계명대학교 의과대학 생리학교실 및 뇌연구소

김종욱 · 송대규 · 배재훈 · 박원균

Electrophysiological Properties of NMDA and GABA Receptors in Nerve Growth Factor Differentiated PC12 Cells

Jong Ook Kim, M.D., Dae Kyu Song, M.D.,
Jae Hoon Bae, M.D., Won Kyun Park, M.D.

Department of Physiology, Keimyung University School of Medicine & Brain Research Institute, Taegu, Korea

Abstract : Nerve growth factor (NGF), which has been used for the differentiation of PC12 cells in culture, not only promotes the survival and differentiation of neurons but also affects the suructural and functional properties. The aim of this study was to investigate the current properties of NMDA and GABA receptors by using whole-cell patch clamp technique in NGF differentiated PC12 cells cultured for 7~14 days. Membrane potential did not change from the resting potential of -48 mV by the infusion of a NMDA receptor blocker, APV, (50 μM) in the perfusion solution. NMDA components of the evoked currents at the membrane potential, changing from -80 mV to -10 mV, showed a voltage dependency in the current-potential relationship. When action potential and glutamate receptors were blocked, membrane potential was hyperpolarized by the infusion of GABA (20 μM) in some PC12 cells, but not in other cells. In the hyperpolarized cells, GABA components of the evoked currents at the membrane potential, changing from -80 mV to -10 mV, showed a linear correlation between the currents and the membrnae potential. In conclusion, the electrophysiological properties of NMDA and GABA receptors in NGF differentiated PC12 cells may be similar to those in the biological neurons. Therefore, it seems that PC12 cells appear to be suited for the studies on function and signal transmission of these receptors.

Key Words : GABA receptor, Nerve growth factor, NMDA receptor, PC12 cells

서 론

Gamma-aminobutyric acid (GABA)는 포유동물의 신경계에서 중요한 억제성 신경전달물질이며, 중추신경계에 존재하는 시냅스의 약 20%는 GABA를 신경전달물질로 사용한다[1]. 신경세포에 존재하는 GABA 수용체는 크게 $GABA_A$ 및 $GABA_B$ 수용체로 나누어진다[2,3]. $GABA_A$ 수용체는 Cl^-에 특이한 이온통로를 형성하며, 중추신경계 전반에 걸쳐 고루 분포한다[1]. 특히 성숙된 신경세포에서 GABA 수용체가 활성화되면 Cl^-이 세포 내로 유입되어 과분극이 유발되므로 신경세포 활성은 억제되는 것으로 알려져 있다[4]. 그러나 미성숙 신경세포와 같은 경우에는 GABA에 의해 수용체는 흥분작용을 나타낼 수 있으며, 다른 시냅스에 의한 흥분의 조절에 관여하기도 한다[5].

Glutamate는 신경계에서 시냅스 흥분을 유도하는 신경전달물질로 그 수용체는 크게 metabotropic 및 ionotropic 수용체로 구분되어진다. Ionotropic 수용체는 다시 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체와 non-NMDA 수용체인 α-amino-3-hydroxyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 및 kainate 수용체로 나눠진다[6]. Glutamate 수용체들은 비선택적 양이온 통로로, glutamate가 non-NMDA 수용체에 결합하면 이온통로가 열리고, Na^+, K^+이 유입되면서 세포막이 탈분극되면 안정막전압에서는 Mg^{2+}에 의해 억제되어 있던 NMDA 수용체가 활성화된다[7]. NMDA 수용체의 활성은 Na^+, K^+ 뿐만 아니라 Ca^{2+}의 유입을 유발한다. 이때 과다한 Ca^{2+}이 유입되면 세포독작용을 일으키는 물질의 합성경로를 자극하여 세포에 치명적인 손상을 야기할 수도 있다[8]. 따라서 glutamate는 신경세포에 대해 흥분작용과 함께 신경독작용을 유발하는 물질로 중추신경계의 만성 퇴행성 질환과도 관련이 있는 것으로 알려져 있다[9-11]. 따라서 AMPA/kainate 수용체나 NMDA 수용체의 기능에 대한 연구가 관심의 대상이 되고 있다[12].

PC12 세포는 갈색세포종(pheochromocytoma)의 불멸 세포주로 시냅스에서 분비되는 신경전달물질은 glutamate, GABA 뿐만 아니라 dopamine, norepinephrine, acetylcholine 등 다양하다[13-20]. PC12 세포를 분화하기 위하여 이용하는 nerve growth factor (NGF)는 이러한 신경전달물질의 분비 및 수용체의 활성에 영향을 미친다. NGF는 brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3와 함께 신경계에 소량으로 존재하면서 신경세포의 생존과 분화에 영향을 미치며, 신경세포의 구조 및 기능적 변화에 관여한다[21,22]. NGF는 trkA 및 $p75^{Lntr}$ 등 세포내의 수용체를 통하여 그 효과를 나타내며[21], 세포막에 존재하는 여러 가지 이온통로에도 영향을 주어 그 발현 및 기능에 작용하리라 생각된다. PC12 세포는 NGF를 포함한 다양한 약제의 작용을 관찰하는데 이용되고 있다[23,24]. 그러나 지금까지 PC12 세포를 이용하여 이루어지는 많은 연구가 각 수용체의 mRNA의 발현이나 세포 내 신호전달의 기전에 관한 분자생물학적인 연구에 치중되어 있으며, 전기생리학적인 특성에 관한 연구는 의외로 많지 않다.

이 연구는 NGF로 분화시킨 PC12 세포에서 NMDA 수용체 및 GABA 수용체의 전기생리학적 특성을 관찰하고자 배양 7~14일 사이의 PC12 세포를 이용하여 whole-cell patch clamp 방법으로 안정막전압 및 막전압의 변동에 따른 각 수용체를 통한 전류의 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

갈색세포종 세포인 PC12 세포주를 7~14일

배양하여 실험에 사용하였다. PC12 세포의 배양은 지름 60 mm 배양접시에 세포를 뿌려 37℃, 5% CO_2 배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였다. 3일 간격으로 배양액의 1/2을 교체하였다. 사용한 배양액은 10% fetal bovine serum을 포함한 RPMI 1640 배양액(Sigma사, 미국)에 100 ㎍/ml penicillin/streptomycin을 첨가한 용액을 사용하였다. 전기생리학적 실험을 위하여 미리 poly-D-lysine을 1시간 처리한 후 말려 놓은 2 x 5 mm의 cover glass 10개를 배양접시(지름 35 mm)에 깔고 그 위에 PC12 세포를 안치시킨 후 배양초기부터 NGF (50 ng/ml)를 첨가하였으며, PC12 세포의 돌기가 자라는 것을 확인하면서 7~14일 동안 배양한 후 신경세포와 유사한 형태의 세포를 선택하여 사용하였다.

2. 전기생리학적 측정

분화된 PC12 세포는 whole-cell patch clamp 방법을 이용하여 측정하였다. 먼저 조제된 관류액을 분당 2ml의 속도로 관류하면서 30℃를 유지하는 측정용 bath에 배양된 PC12 세포가 부착된 cover glass를 안치시켜 20분 동안 세포가 안정되기를 기다린 후 실험하였다. 관류액의 조성은 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM $NaHCO_3$, 1.4 mM NaH_2PO_4, 1.3 mM $CaCl_2$, 1.3 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose를 함유한 액을 NaOH로 pH 7.3~7.4가 되게 맞추어 이용하였다. 미세전극은 외경 1.5 mm의 borosilicate glass capillary를 사용하였으며, vertical micropipette puller (Narishige사, 일본)를 이용하여 5~10 MΩ의 저항이 되도록 미세전극을 제작하였다. 미세전극 내 충진액은 130 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM Mg-ATP를 함유한 액을 KOH로 pH 7.1~7.2로 맞추어 사용하였다.

미세전극은 세포막에 접근하여 giga ohm seal을 확인한 후 약간의 음압을 가하여 세포막을 파괴하면서 whole-cell을 만들었다. Voltage clamp mode에서 막전압을 고정하면서 미세전극을 통한 전류의 변동은 Axopatch 200A amplifier (Axon사, 미국)를 통하여 증폭하였다. 이 전류는 physiograph (Harvard사, 미국)에 기록함과 동시에 Digidata 1200 A/D converter (Axon사, 미국)를 통하여 pClamp 6.04 (Aoxn사, 미국) 프로그램을 이용한 컴퓨터와 비디오테이프에 저장하였다.

적절한 수용체전류를 측정하기 위하여 여러 가지 시약을 관류액에 첨가하여 실험하였다. 시냅스에서 막전압 의존성 Na^+ 통로의 활동을 억제하기 위하여 관류액에 0.5 μM tetrodotoxin (TTX)을 첨가하였고, glutamate 수용체 중 NMDA수용체에 의한 전기생리학적 특성을 관찰하기 위하여 관류액에 NMDA 수용체 차단제인 50 μM 2-amino-5-phosphoquinopentanoic acid (APV)를 첨가하였다. 또한 분화된 PC12 세포에 대한 GABA 수용체의 영향을 보기 위하여 관류액에 20 μM GABA를 첨가하였고, 일부 세포에서는 GABA성 전류를 glutamate성 전류와 분리하기 위하여 관류액에 0.5 μM TTX, 50 μM APV, 20 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)을 첨가하여 glutamate성 전류를 차단한 후 20 μM GABA를 관류시켰다.

성 적

NGF로 분화시킨 PC12 세포는 배양 7~14일 사이에 돌기가 나와 시냅스를 형성한 세포를 골라 전기생리학적 측정을 시도하였다. Whole-cell patch clamp mode에서 안정막전압을 측정하여 -30 mV 이상의 안정막전압을 보이는 세포만을 골라 자료로 사용하였다. 선택된 총 33개의 배양 PC12 세포의 안정막전압의 평균 및 표준오차는 -48.9 ± 2.15 mV였으며, 자발성 시냅스 전류는 모든 세포에서 관찰되지 않았다.

NMDA수용체에 의한 영향을 관찰하기 위하여 관류액에 20 μM APV를 투여한 후 5분에 안정막전압은 -47.4 ± 6.62 mV에서 -46.2 ± 5.76

mV로 유의한 변동이 없었다(Fig. 1). 막전압을 -80 mV에서 -10 mV까지 단계적으로 고정하였을 때 발생하는 유발전류를 측정하였다(Fig. 2). 이중 NMDA수용체에 의한 전류를 분리하기 위하여 관류액에 50 μM의 APV를 투여하기 전에 측정된 유발전류에 투여 후에 측정된 동일시간대의 유발전류를 감하여 시간에 따른 유발전류의 NMDA 수용체 전류를 얻었다(Fig. 3). NMDA 수용체 전류는 초기에 급격한 변화를 보인 후 서

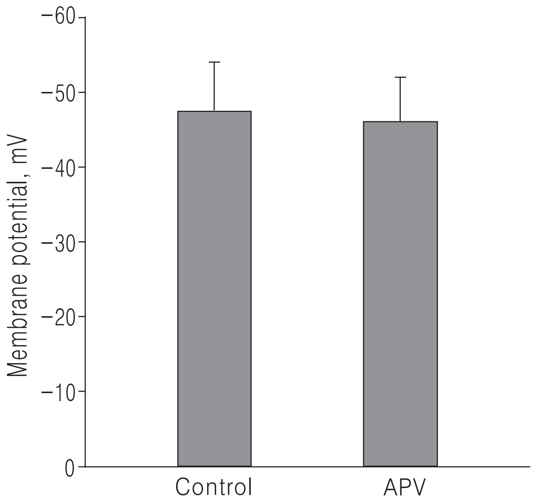

Fig. 1. Change in membrane potential after infusion of 50 mM APV into the bath solution containing 0.5m M TTX (control) in PC12 cells

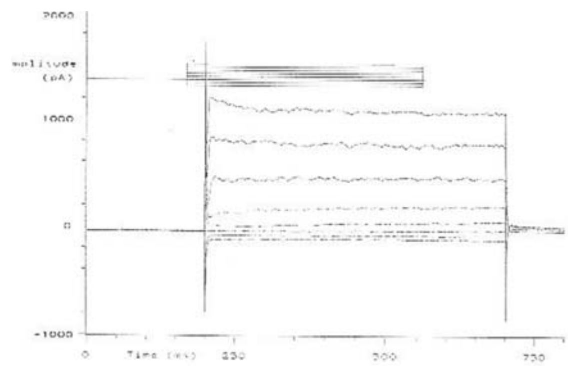

Fig. 2. Evoked currents at the membrane potentials changing from -80 mV to -10 mV by 10 mV, respectively, from the holding potential -60 mV.

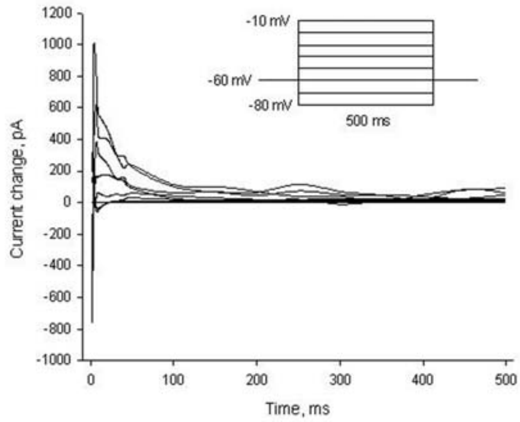

Fig. 3. NMDA components of the evoked currents at the membrane potential changing from -80 mV to -10 mV by 10 mV, respectively, from the holding potential -60 mV. Each NMDA current was obtained by substracting the evoked current in 50 mM APV solution from that in the control solution at each potential.

서히 안정되었고, 크기는 고정 막전압에 의존적으로 변하는 양상이었다. NMDA 수용체 전류의 최고치는 6~10 ms에서 관찰되었고 탈분극의 정도가 클수록 유발전류의 최고치에 달하는 시간이 감소되었다. NMDA 수용체 전류의 최고치를 고정 막전압의 변동에 따른 상관그래프로 표시하였다(Fig. 4). NMDA 수용체 전류는 막전압이 -60 mV 보다 과분극될 때는 내향성, 탈분극될 때는 외향성의 전류가 측정되며 그 크기는 과분극에 비하여 탈분극시 유발전류의 증가폭이 점점 더 크게 나타나는 막전압 의존적인 특성을 나타내었다.

GABA 수용체에 의한 전류를 관찰하기 위하여 관류액에 20 μM GABA를 투여한 후 5분에 안정 막전압은 -51.8 ± 6.58 mV에서 -50.4 ± 9.20 mV로 유의한 변동이 없었다. 막전압을 -60 mV에 고정하였다가 500 ms 동안 -80 mV에서부터 -10 mV까지 10 mV씩 단계적으로 변화시켰을 때 발생하는 유발전류 중 GABA 수용체에 의한 전류를 분리하기 위하여 GABA를 투여한 후에 측정된 유발전류로부터 투여 전에 측정된 동일

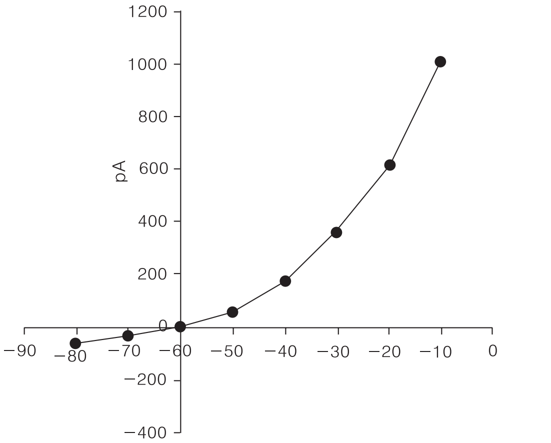

Fig. 4. Current-voltage relationship of NMDA components in the evoked currents. Each NMDA current was obtained from the peak current at 6 to 10 ms in Figure 3.

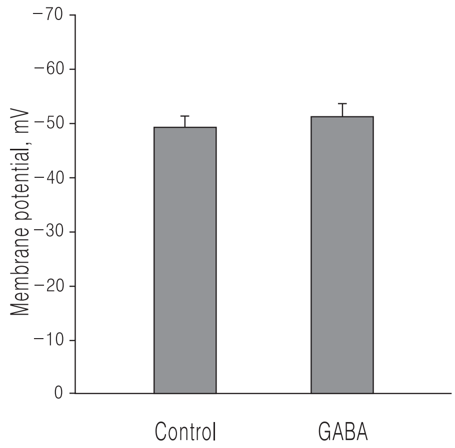

Fig. 5. Change in membrane potential after infusion of 20 mM GABA into the bath solution containing 0.5 mM TTX, 50 mM APV and 20 mM CNQX (control) in PC12 cells.

시간대의 유발전류를 감하여 시간에 따른 GABA 수용체 전류를 얻었다. GABA성 유발전류는 2~3 ms에서 최고치를 보였으나 그 후 유발전류는 다양한 변동을 보여 일관된 경향을 보이지 않았다. 이중 2~3 ms에서 관찰되는 GABA 수용체 전류의 크기를 고정 막전압의 변동에 따른 상관그래프로 나타내었을 때 유발전류는 막전압이 과분극될 때는 외향성, 탈분극될 때는 내향성의 전류가 측정되며 -30 mV까지는 막전압의 변동과 GABA 수용체 전류사이에 직선적인 관계가 관찰되었다.

위의 실험에서 GABA 수용체 이외에 다른 전류가 함께 나타나는 것을 배제하기 위하여 GABA를 투여하기 전 관류액에 0.5 μM TTX, 50 μM APV, 20 μM CNQX를 섞어 관류하였을 때 안정막전압은 -49.4 ± 2.63 mV였으며, 20 μM GABA를 투여한 후 5분에는 -51.3 ± 2.84 mV로 약간 증가하나 유의한 변동은 아니었다(Fig. 5). 그러나 개개의 안정막전압의 변동을 보면 두 종류 즉, 안정막전압이 약간 과분극되는 세포와 안정막전압의 변동이 없는 세포로 나눌 수 있어 이 두 종류의 세포에서 측정된 전류를 분리하여 분석해 보았다.

먼저 20 μM GABA를 투여한 후 안정막전압이 -49.0 ± 8.54 mV에서 -53.0 ± 8.00 mV까지 과분극되는 세포군에서 막전압을 -80 mV에서 -10 mV까지 단계적으로 고정하였을 때 발생하는 GABA 수용체 전류를 얻었다(Fig. 6). GABA 수용체 전류는 2~3 ms에서 최고치를 보였으며, 그 후 Figure 7에서와는 달리 어느 정도 일정한 변동양상을 보였다. 이중 2~3 ms에서 관찰되는 GABA성 전류의 크기를 고정 막전압의 변동에 따른 상관그래프로 나타내었을 때 GABA 수용체 전류는 막전압이 과분극될 때는 외향성, 탈분극될 때는 내향성의 전류가 측정되며 30 mV까지는 막전압의 변동과 GABA 수용체 전류사이에 직선적인 관계가 관찰되었으나 40 및 50 mV의 탈분극 시 전류는 오히려 감소하는 양상이었다(Fig. 7).

다른 세포에서는 20 μM GABA를 투여한 후 -49.8 ± 2.5 mV에서 -50.0 ± 4.8 mV로 안정막전압의 변동이 없는 세포군에서 막전압을 -80 mV에서 -10 mV까지 단계적으로 고정하였을 때 발생하는 GABA 수용체 전류는 Fig. 6에서와는 달리 전반적으로 감소되는 변동양상을 보였다(Fig. 8). 이중 2~3 ms에서 관찰되는 GABA

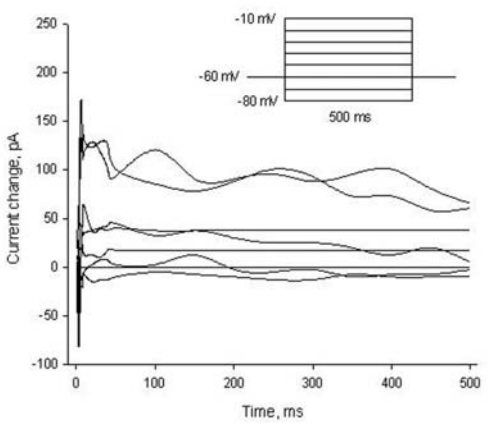

Fig. 6. GABA components of the evoked currents in hyperpolarized PC12 cells after infusion of 20 mM GABA into the bath solution containing 0.5 mM TTX, 50 mM APV and 20 mM CNQX (control). The membrane potential was changed from -80 mV to -10 mV by 10 mV, respectively, from the holding potential -60 mV. Each GABA current was obtained by substracting the evoked current in the control solution from that in 20 mM GABA at each potential.

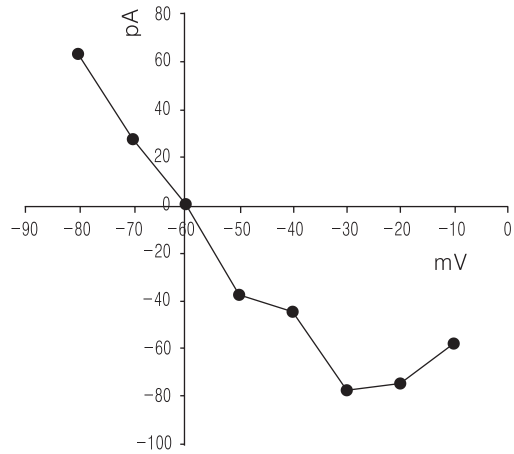

Fig. 7. Current-voltage relationship of GABA components in the evoked currents in hyperpolarized PC12 cells after infusion of 20 mM GABA into the bath solution containing 0.5 mM TTX, 50 mM APV and 20 mM CNQX. Each GABA current was obtained from the peak current at 2 to 3 ms in Figure 6.

수용체의 크기를 고정 막전압의 변동에 따른 상관관계 그래프로 나타내었을 때 GABA성 유발전류는 Fig. 7에서와 비슷한 양상이었으나 막전압의 변동에 따른 전류의 크기는 크게 감소되는 양상이었다(Fig. 9).

고 찰

배양 7~14일 된 PC12 세포의 안정막전압은 평균 -49 mV로 일차 배양 해마신경세포[25] 및 대뇌 피질세포[26]에서 측정된 안정막전압과 비슷하였다.

PC12 세포는 갈색세포종 세포의 일종이지만 신경세포와 유사한 다양한 이온통로가 존재하고, 다양한 신경전달물질을 분비한다. PC12 세포에 존재하는 이온 통로는 막전압의존성 Na^+, K^+, Ca^{2+}가 발현[27-29]될 뿐만 아니라 막전압에 의존적이면서 양이온에 비특이성을 가진 이온통로도 8~27% 에서 관찰된 바 있다[30]. 동시에 glutamate 및 GABA 이외에도 acetylcholine과 monoamine들을 분비한다[13-20]. NGF가 PC12 세포의 분화에 미치는 영향은 신경돌기(neurite)의 형성을 촉진하면서[31] Na^+, Ca^{2+} 이온통로 및 NMDA 수용체의 숫적 증가를 유발하여 이를 활성화시킨다[28,32].

NMDA수용체는 신경계에서 시냅스의 가소성(plasticity)에 중요한 역할을 하며 장기강화(long-term potentiation)의 기전에 관여할 뿐만 아니라 과도할 때는 흥분독성(excytotoxicity)을 유발하기도 한다[23]. PC12 세포에 존재하는 NMDA 수용체는 NMDAR1 및 NMDAR2가 모두 존재하는 것으로 알려져 있으며, 수용체의 발현은 NGF 투여와 관계없지만 NGF는 NMDA수용체의 양적인 증가를 통하여 이를 활성화시킨다

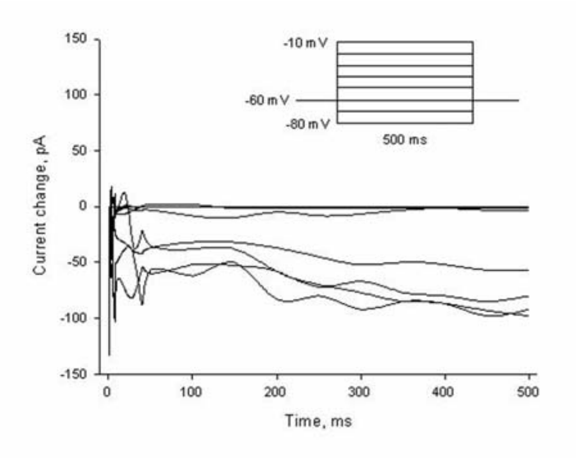

Fig. 8. GABA components of the evoked currents in PC12 cells not showing membrane potential change after infusion of 20 mM GABA into the bath solution containing 0.5 mM TTX, 50 mM APV and 20 mM CNQX (control). The membrane potential was changed from -80 mV to -10 mV by 10 mV, respectively, from the holding potential -60 mV. Each GABA current was obtained by substracting the evoked current in the control solution from that in 20 mM GABA at each potential.

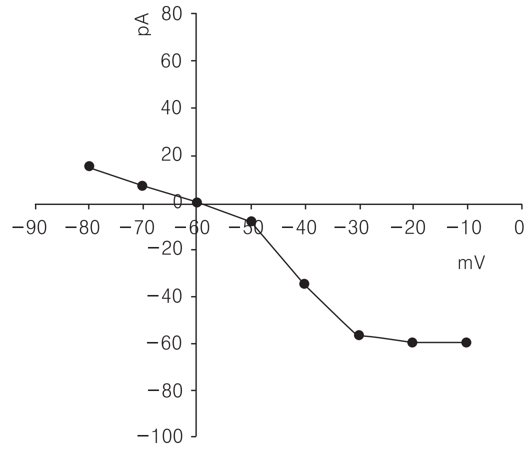

Fig. 9. Current-voltage relationship of GABA components in the evoked currents in PC12 cells not showing membrane potential change after infusion of 20 mM GABA into the bath solution containing 0.5 mM TTX, 50 mM APV and 20 mM CNQX. Each GABA current was obtained from the peak current at 2 to 3 ms in Fig. 8.

[23,33]. 이 실험에서 50 μM의 APV 투여 시 세포막전압의 변동은 없어 생리적인 상태에서 NMDA 수용체를 통한 막전압의 조절작용은 미약한 것으로 생각된다. 막전압의 변동을 통한 유발전류에서 NMDA 수용체 전류가 초기에 증가하고 시간이 지남에 따라 안정되는 양상은 NMDA 수용체는 자극이 있을 때 일시적으로 활성화되는 것으로 보인다. 그러나 시간이 지남에 따른 NMDA성 전류의 소실이 시냅스에서 glutamate 농도의 감소 때문인지 NMDA 수용체의 탈감작(desensitization) 때문인지는 알 수 없다. 관류액에 glycine이 풍부한 상태에서 NMDA 수용체는 탈감작이 잘 되지 않지만 이 실험에서와 같이 glycine이 없거나 농도가 감소할수록 탈감작은 빨리 나타난다고 한다[33].

NMDA 수용체 전류의 특성이 막전압이 과분극 및 탈분극됨에 따라 내향성 및 외향성의 전류가 발생함으로써 통과하는 양이온에 비특이적인 성향을 보였다[7]. 동시에 -60 mV에서 과분극될 때 전류가 탈분극 시의 전류보다 상당히 감소하는 현상은 NMDA 수용체의 특이적 반응으로 과분극 시 Mg^{2+}에 의한 수용체의 억제현상으로 보이며 탈분극에 의해 Mg^{2+}이 떨어짐으로써 수용체는 활성화되는 현상으로 포유동물의 신경계에서의 NMDA 수용체 특성[33]과 유사한 것으로 생각된다.

신경계에 존재하는 GABA 수용체는 $GABA_A$, $GABA_B$ 및 $GABA_C$ 형이 있지만[2,3], 크게 $GABA_A$ 및 $GABA_B$ 수용체로 나누어진다. $GABA_A$ 수용체는 Cl^-에 특이성 이온통로를 형성하며, $GABA_A$ 수용체가 활성화되면 Cl^-의 전도성이 증가한다[1]. 성숙된 신경세포에서는 이 Cl^-의 세포 내 유입으로 과분극이 유발되므로 신경세포의 활성은 억제되는 것으로 알려져 있지만 경우에 따라서는 GABA에 의해 수용체는 흥분작용을 나

타낼 수도 있으며, 한편으로는 다른 시냅스에 의한 흥분의 조절에 관여하기도 한다[5]. $GABA_B$ 수용체는 G단백과 연결된 K^+통로를 활성화하거나 Ca^{2+} 통로를 억제한다[34,35]. 시냅스전(presynaptic) 신경말단에서 $GABA_B$ 수용체는 Ca^{2+}통로를 억제함으로써 GAB_A의 분비를 억제하여 흥분성을 높일 수 있으며, 시냅스후(postsynaptic) 수준에서는 K^+의 전도성 증가에 의한 장시간 지속되는 억제성 시냅스전압(inhibitory postsynaptic potential)을 유도하여 신경세포의 흥분성을 억제한다[36]. 이 실험에서 20 μM의 GABA 투여 시 안정막전압의 변동은 없었지만 일부 세포에서 활동전압 및 glutamate 수용체를 차단한 후 20 μM GABA를 투여하였을 때 안정막전압은 -4 mV정도 과분극 되는 양상을 보였다. PC12 세포에서 GABA의 농도는 중추신경계에 비하여 낮으므로[15] PC12 세포막에 분포하는 GABA 수용체의 수는 중추신경계와 비교할 때 많지 않을 것으로 생각된다. 막전압의 변동을 통한 유발전류에서 GABA 수용체 전류는 초기 2~3 ms에 작용하였고, 시간이 지남에 따라 활성화된 GABA 수용체는 탈감작화 된다[37]고 하므로 유지되는 전류는 주로 K^+ 전류를 포함한 다른 통로인 것으로 생각된다. 따라서 GABA 수용체는 막전압의 변동이 있을 때 일시적으로 활성화되는 것으로 보인다.

$GABA_A$ 수용체의 기능적 변화는 $GABA_A$ 수용체가 다른 subunit로 구성됨을 의미한다. $GABA_A$ 수용체의 subunit의 구성은 $GABA_A$ 수용체의 기능적 특성인 전도도, kinetics 및 효현제에 대한 민감성(sensitivity)에 영향을 미친다[38,39]. 포유동물에서 $GABA_A$ 수용체의 subunit에는 13개(α1-6, β1-3, γ1-3, δ)가 알려져 있으며, 기능적으로는 $\alpha/\beta/\gamma$나 $\alpha/\beta/\delta$의 pentameric complex를 형성한다[40,41]. 여기에는 많은 수의 GABA 수용체의 조합이 가능할 것이며 쥐의 대뇌에 가장 널리 분포하는 $GABA_A$ 수용체 구조는 $\alpha\beta_2\gamma_2$로 전체 $GABA_A$ 수용체의 43%를 차지한다[42]. 실제 많은 다양한 종류의 $GABA_A$ 수용체가 중추신경계의 다양한 영역에 걸쳐 분포하고 있으며, 이것은 다양한 기능을 유발하는데 이용되고 있다[39]. 이 실험에서 GABA 수용체 전류의 특성은 막전압이 과분극 및 탈분극됨에 따라 각각 외향성 및 내향성의 전류가 발생함으로써 막전압과 GABA 수용체 전류는 직선적인 상관관계를 보여 PC12 세포막에 분포하는 GABA 수용체는 Cl^-에 특이적인 $GABA_A$ 수용체로 생각되며, 수용체가 활성화된 상태에서 Cl^-는 막전압에 따라 수동적으로 이동하는 현상으로 생각된다. 그러나 -60 mV의 막전압에서 -10 mV까지 막전압이 탈분극될 경우 GABA 수용체 전류가 오히려 감소되는 것은 탈분극에 따른 GABA 수용체 이외의 다른 이온통로의 내향성 전류가 초기에 활성화되는 것으로 생각된다.

동시에 GABA의 투여 시 안정막전압이 변화되지 않는 세포에서의 GABA성 전류는 막전압 고정 시 시간에 따른 GABA 수용체 전류의 회복현상이 나타나지 않는다. 따라서 이 세포에서 막전압에 따른 GABA 수용체 전류의 상관그래프의 기울기가 낮은 현상은 PC12 세포에서 Cl^-에 대한 전도도가 다른 두 종류의 GABA 수용체가 존재한다고 생각하기는 힘들며, 장시간의 whole-cell patch clamp에 의한 세포의 활성이 감소한 것으로 여겨진다. PC12 세포에서 GABA 수용체의 기능을 평가하기 위한 전기생리학적 실험에서 GABA 및 수용체 효현제의 투여 시 비록 몇 mV의 미미한 변화라 할 지라도 안정막전압의 과분극 여부를 관찰하는 것은 실험결과의 신뢰성을 높이는 중요한 기준이 되리라 생각한다.

이상과 같이 NGF로 분화시킨 PC12 세포주에서 NMDA 수용체 및 GABA 수용체의 전기생리학적 특성은 생체의 신경계에서의 발견되는 수용체 특성과 유사한 것으로 생각되며, PC12 세포는 이들 수용체에 대한 다양한 전기생리학적 실험의 연구재료로 충분히 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

NGF로 분화시킨 PC12 세포에서 NMDA 수용체 및 GABA 수용체의 전기생리학적 특성을 관

찰하고자 배양 7~14일 사이의 PC12 세포를 이용하여 whole-cell patch clamp 방법으로 안정 막전압 및 막전압의 변동에 따른 이들 수용체 전류의 특성을 기록하였다. 관류액에 20 μM APV를 투여한 후 안정막전압은 유의한 변동이 없었다. 막전압을 -80 mV에서 -10 mV까지 단계적으로 고정하였을 때 발생하는 NMDA 수용체 전류는 막전압이 과분극될 때는 내향성, 탈분극될 때는 외향성의 전류가 측정되며 그 크기는 과분극에 비하여 탈분극 시 유발전류의 증가폭이 점점 더 크게 나타나는 막전압에 의존적이었다. 활동전압 및 glutamate 수용체를 차단한 후 20 μM GABA를 투여한 후 안정막전압이 약간 과분극되는 세포에서 막전압을 -80 mV에서 -10 mV까지 단계적으로 고정하였을 때 발생하는 GABA 수용체 유발전류는 막전압이 과분극될 때는 외향성, 탈분극될 때는 내향성의 전류가 측정되며 30 mV까지는 막전압의 변동과 유발전류사이에 직선적인 관계가 관찰되었다. 이상으로 NGF로 분화시킨 PC12 세포주에서 NMDA 수용체 및 GABA 수용체의 전기생리학적 특성은 생체의 신경계에서 발견되는 수용체 특성과 유사한 것으로 생각되며, PC12세포는 이들 수용체에 대한 다양한 전기생리학적 실험의 연구재료로 충분히 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Sieghart W. Structure and pharmacology of γ-aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 1995; **47**(2): 181-234.
2. Shimura M, Harata N, Tamai M, Akaike N. Allosteric modulation of $GABA_A$ receptors in acutely dissociated neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol* 1996; **270**(6): C1726-34.
3. Qian H, Li L, Chappell RL, Ripps H. GABA receptors of bipolar cells from the skate retina: actions of zinc on GABA-mediated membrane currents. *J Neurophysiol* 1997; **78**(5): 2402-12.
4. Decavel C, van den Pol AN. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 1990; **302**(4): 1019-37.
5. Mody I, De Koninck Y, Otis TS, Soltesz I. Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci* 1994; **17**(12): 517-25.
6. Metsis M, Timmusk T, Arenas E, Persson H. Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**(19): 8802-6.
7. Asztely F, Gustafsson B. Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 1996; **12**(1): 1-11.
8. Froissard P, Duval D. Cytotoxic effects of glutamic acid on PC12 cells. *Neurochem Int* 1994; **24**(5): 485-93.
9. Akaike A, Tamura Y, Terada K, Nakata N. Regulation by neuroprotective factors of NMDA receptor mediated nitric oxide synthesis in the brain and retina. *Prog Brain Res* 1994; **103**: 391-403.
10. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; **36**: 83-106.
11. Ying W. A new hypothesis of neurodegenerative diseases: the deleterious network hypothesis. *Med Hypotheses* 1996; **47**(4): 307-13.
12. Camins A, Gabriel C, Aguirre L, Sureda FX, Pubill D, Pallas M, *et al.* U-83836E prevents kainic acid -induced neuronal damage. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; **357**(4): 413-8.
13. Ohara-Imaizumi M, Nakazawa K, Obama T, Fujimori K, Takanaka A, Inoue K. Inhibitory action of peripheral-type benzodiazepines on dopamine release from PC12 pheochromocytoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **259**(2): 484-9.
14. Tyndale RF, Hales TG, Olsen RW, Tobin AJ. Distinctive patterns of $GABA_A$ receptor subunit mRNAs in 13 cell lines. *J Neurosci* 1994; **14**(9):

5417-28.

15. Gallyas F Jr, Satoh J, Takeuchi AM, Konishi Y, Kunishita T, Tabira T. Identifying monoaminergic, GABAergic, and cholinergic characteristics in immortalized neuronal cell lines. *Neurochem Res* 1997; **22**(5): 569-75.
16. McIntire Sl, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 1997; **389**(6653): 870-6.
17. Zhu WH, Conforti L, Millhorn DE. Expression of dopamine D2 receptor in PC12 cells and regulation of membrane conductances by dopamine. *Am J Physiol* 1997; **273**(4): C1143-50.
18. Andoh T, Furuya R, Oka K, Hattori S, Watanabe I, Kamiya Y, *et al.* Differential effects of thiopental on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and P2X purinergic receptors in PC12 cells. *Anesthesiology* 1997; **87**(5): 1199-209.
19. Khvotchev M, Sudhof TC. Newly synthesized phosphatidylinositol phosphates are required for synaptic norepinephrine but not glutamate or gamma - minobutyric acid (GABA) release. *J Biol Chem* 1998; **273**(34): 21451-4.
20. Shi L, Wang CA. Inhibitory effect of the kinase inhibitor chelerythrine on acetylcholine-induced current in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* 1999; **368**(1): 40-4.
21. Blochl A, Sirrenberg C. Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75Lntr receptors. *J Biol Chem* 1996; **271**(35): 21100-7.
22. Bartrup JT, Moorman JM, Newberry NR. BDNF enhances neuronal growth and synaptic activity in hippocampal cell cultures. *Neuroreport* 1997; **8**(7): 3791-4.
23. Bai G, Kusiak JW. Nerve growth factor up-regulates the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter in PC12 cells. *J Biol Chem* 1997; **272**(9): 5936-42.
24. Said SI, Dickman K, Dey RD, Bandyopadhyay A, De Stefanis P, Raza S, *et al.* Glutamate toxicity in the lung and neuronal cells: prevention or attenuation by VIP and PACAP. *Ann NY Acad Sci* 1998; **865**: 226-37.
25. 김용대, 홍영수, 송대규, 배재훈, 박원균. 흰쥐의 일차 배양 해마신경세포에서 시냅스전류에 대한 GABA의 영향. *항공우주의학* 1999; **9**(3): 302-12.
26. Vicini S, Mienville JM, Costa E. Actions of benzodiazepine and β-carboline derivatives on γ-aminobutyric acid-activated Cl^- channels recorded from membrane patches of neonatal rat cortical neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; **243**(3): 1195-201.
27. Fanger GR, Brennan C, Henderson LP, Gardner PD, Maue RA. Differential expression of sodium channels and nicotinic acetylcholine receptor channels in nnr variants of the PC12 pheochromocytoma cell line. *J Membr Biol* 1995; **144**(1): 71-80.
28. Bouron A, Becker C, Porzig H. Functional expression of voltage-gated Na^+ and Ca^{2+} channels during neuronal differentiation of PC12 cells with nerve growth factor of forskolin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; **359**(5): 370-7.
29. Hahn SJ, Choi JS, Rhie DJ, Oh CS, Jo YH, Kim MS. Inhibition by fluoxetine of voltage-activated ion channels in rat PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 1999; **367**(1): 113-8.
30. Dopico AM, Treistman SN. A novel large conductance, nonselective cation channel in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Membr Biol* 1997; **160**(2): 151-60.
31. Sherwood NT, Lesser SS, Lo DC. Neurotrophin regulation of ionic currents and cell size depends on cell context. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**(11): 5917-22.
32. Pereira C, Santos MS, Oliveira C. Metabolic inhibition increases glutamate susceptibility on a PC12 cell line. *J Neurosci Res* 1998; **51**(3): 360-70.

33. Casado M, Lopez-Guajardo A, Mellstrom B, Naranjo JR, Lerma J. Functional N-methyl-D-aspartate receptors in clonal rat phaeochromocytoma cells. *J Physiol* 1996; **490**(2): 391-404.
34. Bormann J. Electrophysiology of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor subtypes. *Trends Neurosci* 1988; **11**(3): 112-6.
35. Sivilotti L, Nistri A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 1991; **36**(1): 35-92.
36. Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, *et al.* Expression cloning of $GABA_B$ receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1997; **386**(6622): 239-46.
37. Jones MV, Westbrook GL. Desensitized states prolong $GABA_A$ responses to brief agonist pulses. *Neuron* 1995; **15**(1): 181-91.
38. Verdoorn TA, Draguhn A, Ymer S, Seeburg PH, Sakmann B. Functional properties of recombinant rat $GABA_A$ receptors depend upon subunit composition. *Neuron* 1990; **4**(6): 919-28.
39. Inglefield JR, Sieghart W, Kellogg CK. Immunohistochemical and neurochemical evidence for $GABA_A$ receptor heterogeneity between the hypothalamus and cortex. *J Chem Neuroanat* 1994; **7**(4): 243-52.
40. Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH. The distribution of thirteen $GABA_A$ receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* 1992; **12**(11): 4151-72.
41. Davies PA, Hanna MC, Hales TG, Kirkness EF. Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of $GABA_A$ receptor subunit. *Nature* 1997; **385**(6619): 820-3.
42. McKernan RM, Whiting PJ. Which $GABA_A$-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 1996; **19**(4): 139-43.