啓明醫大學術誌 第21券 2號
Keimyung Med J
Vol. 21, No. 2, December, 2002

일차 배양 해마신경세포에서 BDNF가 GABA성 전류에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 생리학교실 및 계명대학교 뇌연구소

황진수 · 송대규 · 배재훈 · 박원균

Effect of BDNF on GABAergic Currents in Primary Cultured Rat Hippocampal Neurons

Jin Soo Whang, 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 &
Keimyung University Brain Research Institute, Taegu, Korea

Abstract : This study was performed to observe the effect of briefly (30-50 ms) sprizing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on synaptic currents and to evaluate the role of GABA receptor in this synaptic transmission. Thus rat hippocampal neurons were prepared from 17 18 day embryonic rats and cultured for 7 10 days to study the electrophysiological properties. BDNF inhibited the frequency of spontaneous current and action potential within it's 2 3 min, but did not affect it's amplitudes. Membrane potential was slowly hyperpolarized. The evoked current by a brief application of GABA (30 50 ms) showed the maximum peak at 100 μM and GABA. The feature and amplitude of evoked current were not different before and after BDNF administration. This GABAergic evoked current was completely inhibited by a GABAA receptor blocker, 100 μM bicuculline. When the current-voltage curve of GABAergic current was plotted, short-term administration of BDNF did not alter the property of GABA receptor. In conclusion, it is suggested that BDNF may hyperpolarize the membrane potential by activation of GABAergic synaptic terminal of early developing hippocampal neurons and inhibit the frequency of synaptic currents and action potential.

Key words : Brain-derived neurotrophic factor, GABA, Synaptic current

서 론

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)는 말초신경계 및 중추신경계에서 nerve growth factor(NGF), neurotrophin-3(NT-3)와 함께 신경계에 소량으로 존재하면서 신경세포의 생존과 분화에 영향을 미치며, 중추신경계에서 BDNF는 활동이 활발한 신경세포의 구조적 및 기능적 변화에 관여한다는 증거가 증가하고 있다[1,2]. 말초신경계와 달리 중추신경계에서는 neurotrophin들이 합성될 수 있어 신경의 활동 정도에 의해 neurotrophin의 유전자의 발현 및 분비는 조절된다[3].

지금까지 BDNF에 의한 신경세포의 성장 및 분화 촉진효과는 주로 장시간의 투여에 의해 관찰되어 왔다. 2주간의 BDNF 투여에 의해서 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 신경전달물질의 증가, 재흡수의 증가, 접합 밀도의 증가 등을 초래하므로 신경세포의 양적 변화를 초래한다[4,5]. 최근에는 단시간의 BDNF 투여에 의한 효과는 신경접합부에 작용하여 신경전달물질의 분비나 수용체 반응에 영향을 미친다[6,7]. BDNF는 해마신경세포에서 glutamate성 전류를 증가시킨다[8]. 그러나 그 기전이 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체나 α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 수용체, kainate 수용체 중 어느 수용체를 통하는지 혹은 다른 경로를 통하여 나타나는 지는 아직까지 명확히 알려지지 않고 있다. 배양된 해마세포에서 BDNF 투여 시 NMDA를 통한 전류는 증가하지만 AMPA 수용체를 통한 전류는 억제된다는 보고[9]가 있으나 시각중추에서는 NMDA 및 AMPA 수용체를 통한 전류를 다 같이 증가시킨다는 보고[8]도 있다. 이처럼 BDNF는 장시간에 걸친 시냅스의 형태 및 기능에 대한 영향뿐만 아니라 단시간의 시냅스 기능에도 조절역할을 하는 것으로 여겨진다[6,7]. 그러나 이러한 BDNF의 조절에 대한 자세한 기전의 연구는 아직 미흡하다.

GABA(γ-aminobutyric acid)는 포유동물의 중추신경계에서 중요한 신경전달물질이다. 실지 중추신경계에 존재하는 시냅스의 약 20%는 GABA성이다[10]. GABA의 다양한 작용은 세포 내 Cl^- 농도 및 GABA 수용체를 구성하는 subunit의 조성에 의해 나타나기도 한다[11,12]. $GABA_A$ 수용체를 구성하는 subunit로 13종류가 알려져 있으며[13], subunit의 구성에 의해 $GABA_A$ 수용체의 기능적 특성이 달라진다[14]. Cl^-는 세포막의 흥분성에 관여하는 것 외에도 세포의 부피, 염분의 분비와 재흡수, G-단백의존성 세포 내 신호전달 등에 관여한다[15].

이러한 점에서 BDNF에 의해 유도되는 세포보호작용에는 Cl^-의 이동과 세포 내 Cl^- 농도의 변화에 영향을 미쳐 흥분독성을 방지하는 효과가 있을지 모른다. 신경세포에서 세포가 흥분성 혹은 억제성 신호특성이 변화하는 것을 전기생리학적으로 관찰하는 방법은 두 가지이다. 첫째는 신경세포 자체의 intrinsic property가 변화함으로써 세포의 특성이 변하는 경우이다. 이를 증명하기 위해서는 신경세포의 안정막전압, 활동전압 등을 관찰하여 비교할 수 있다. 둘째, 시냅스 활성도의 변동에 의한 흥분성 혹은 억제성 특성의 변화를 생각할 수 있다. 예를 들어 신경세포의 흥분성 증가에 대한 시냅스 활성도의 변동을 관찰하기 위해서, 정상적인 억제성 기능의 저하로 인한 흥분성 증가가 있는지 혹은 흥분성 시냅스 활성도의 증가에 의한 결과인지를 알아볼 수 있을 것이다. 이러한 경로 중 BDNF는 어느 한가지 혹은 두 기전 모두를 통하여 GABA성 전류에 영향을 미쳐 보호작용을 유도할 것이라는 가설이 성립된다.

이 연구에서는 일차 배양 해마신경세포에서 BDNF가 단시간에 작용할 때 세포에 대한 효과가 나타나는 지의 여부와 그 과정에서 BDNF가 세포막 및 신경접합수준에서 GABA 수용체에는 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보고자 태아쥐 대뇌에서 해마신경세포를 분리하여 일차 배양하였고, 배양 7 10일 사이의 해마신경세포를 이용하여 자발성 시냅스전류 및 GABA성 전류의 역할

에 대한 BDNF의 작용을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 해마신경세포의 분리 및 배양

일차 배양 해마신경세포를 얻기 위하여 Sprague-Dawley종 임신쥐를 사용하였다. 임신 17 18일 된 임신 쥐를 에테르 흡입마취 하에서 복강을 열어 감염이 되지 않게 태아 쥐를 분리하였고, 이하의 단계는 clean bench로 옮겨 무균적으로 실시하였다. 임신 쥐 1마리에서 보통 10 13마리의 태아 쥐를 얻을 수 있었다. 빠른 시간 내에 태아 쥐를 단두하여 머리를 4 10℃ 냉각된 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 담아 대사를 억제하였고, 대뇌를 분리한 후 다시 대뇌피질로 부터 해마를 분리하여 별도의 HBSS로 옮겼다. HBSS는 Ca^{2+}과 Mg^{2+}을 포함하지 않고 1 mM pyruvate와 10 mM HEPES로 pH를 7.4로 맞추어 사용하였다.

분리된 해마에 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 37℃ 수조에서 25분간 정치시켰다. 이 과정은 결합조직이나 교원섬유 등을 분해해 신경세포 분리를 돕기 위한 것이다. 25분 후 trypsin-EDTA를 제거하고 더 이상의 trypsin-EDTA 작용을 막기 위해 HBSS로 세척하였다. 세척이 끝난 해마조직에 HBSS를 첨가한 후 Pasteur 피펫으로 해마 덩어리를 부순 후 원침(1000 rpm, 2분)시켜 상층액은 제거하였다. 이 과정을 2 3회 반복하여 순수한 해마신경세포를 모은 후 glutamate(25 μM)를 첨가한 배양액에 부유시켰다. 세포 부유액 10 μL을 trypan blue(25 μL)와 HBSS(15 μL) 혼합액에 첨가하여 5배 희석한 후 현미경하에서 세포 수를 산정하였다.

미리 poly-D-lysine을 1시간 처리한 후 건조시킨 지름 10 mm의 둥근 cover glass 5개를 배양접시(지름 35 mm)에 깔고 배양접시 당 2 x 10^5 개의 세포를 뿌려 안치시킨 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 해마신경세포의 돌기가 자라는 것을 확인하면서 배양 4일 및 10일에는 각각 배양액의 1/2을 교체하였다. 이때 교체한 배양액은 glutamate가 들어있지 않은 것으로 Neurobasal medium®(10 mL)에 B-27 (200 μL), 200 mM L-glutamine(25 μL), 14.3 mM β-mercaptoethanol(17.5 μL), 100 mg/mL 항생물질(1 μL)을 첨가하여 사용하였다. 이러한 과정을 거쳐 준비한 해마신경세포는 10 14일 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

위에서 사용한 시약 중 Neurobasal medium®과 B-27은 Gibco-BRL사(미국)의 제품을 사용하였으며, 그 외의 시약들은 Sigma사(미국) 제품이었다.

2. 전기생리학적 측정

일차 배양된 해마신경세포는 배양 7 10일 사이에 측정하였고, 해마신경세포 중 체부에서 신경돌기가 2 3개정도 나온 세포를 골라 전기생리학적 측정을 시도하였다. 생리적인 상태의 배양 해마신경세포에서 자발성 시냅스전류가 발생하는 세포를 선택하여 whole-cell current clamp mode에서 실험을 실시하였다.

먼저 조제된 세포외액성 관류액을 분당 2 mL의 속도로 관류하면서 30℃를 유지하도록 고안된 측정용 수조에 배양된 해마신경세포가 부착된 커버글라스를 안치시켜 20분 동안 세포가 안정되기를 기다린 후 실험하였다. 사용된 세포외액성 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 미세유리관을 사용하였으며, vertical micropipette puller(Narishige사, 일본)를 이용하여 5 10 MΩ의 저항이 되도록 미세전극을 제조하였다. 미세전극 내 충진액은 130 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM Mg-ATP 함유액을 KOH로 pH 7.1 7.2로 맞추어 사용하였다.

미세전극은 세포막에 접근하여 giga ohm seal을 확인 한 후 약간의 음압을 가하여 세포막을 파괴하면서 whole-cell을 만들었다. 막전압고정법에서 막전압을 고정하면서 미세전극을 통한 시냅스전류를 Axopatch 200A amplifier (Axon사, 미국)로 증폭하였고, physiograph (Harvard사, 미국)에 기록함과 동시에 Digidata 1200 A/D converter(Axon사, 미국)를 통하여 테잎에 저장하였다.

3. 실험방법

적절한 시냅스전류를 측정하기 위하여 여러 가지 시약을 관류액에 첨가하여 실험하였다. 일차배양 해마신경세포에 대한 BDNF의 영향을 보기 위하여 관류액에 BDNF가 20 ng/mL 되게 첨가하였다. GABA 수용체의 반응 특성을 관찰하기 위하여 100 μM 및 1 mM의 GABA를 미세전극 내에 채운 뒤 미세주입기(IM300, Narishige사, 일본)를 이용하여 1 1.5 psi 압력에서 30 50 ms 동안 세포주변에 뿌렸다. 활동전압에 의한 자극이 없어도 시냅스 자체에서 자연적으로 발생하는 억제성 시냅스전류의 발생 유무를 관찰하기 위하여 관류액에 0.5 μM tetrodotoxin(TTX), 50 μM 2-amino-5-phospho-quinopentanoic acid(APV), 10 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione(CNQX)을 첨가하였다.

비디오 테잎에 저장된 전기생리학적 측정 자료는 컴퓨터와 pClamp 6.04(Axon사, 미국)를 사용하여 막전압, 시냅스전류, 유발전류를 분석하였다. 시냅스전류의 분석은 각 신경세포 당 50 200개의 시냅스전류의 크기를 측정하여 통계처리하였다. 통계처리된 자료는 평균과 표준오차를 사용하여 나타내었고, Student's t-test를 이용하여 95%이상의 유의성으로 표시하였다.

결 과

일차 배양된 해마신경세포의 시냅스 부위에 GABA성 수용체가 존재하는 지를 확인하기 위하여 관류액에 0.5 μM TTX , 50 μM APV , 10 μM CNQX를 섞어 활동전압 및 glutamate성 시냅스전류를 차단한 후 GABA성 시냅스전류의 존재 여부를 관찰하였다. 일부 세포에서는 활동전압 및 glutamate 수용체를 차단하였을 때 시냅스전류가 상당 부분 감소하지만 일부 시냅스전류는 소실되지 않고 남아있는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1A). 이 시냅스전류가 GABA성 전류인지를 확인하기 위하여 $GABA_A$ 수용체 차단제인 bicuculline 100 μM를 투여하였을 때 남아있던 시냅스전류는 완전 억제되었다. 그러나 일부 신경세포에서는 활동전압 및 glutamate성 시냅스의 차단만으로도 시냅스전류가 거의 소실되었고 (Fig. 1B), 이 세포는 glutamate성 시냅스만을 형성하는 것을 알 수 있다. 그러나 위의 두가지 신경세포 모두 관류액으로 흘려준 20 μM GABA에 의해 자발성 시냅스전류의 크기 및 빈도는 감소하는 반응을 보여 GABA성 시냅스를 형성하지 않는 신경세포에서도 GABA 수용체는 존재함을 알 수 있었고, 따라서 생리적인 상태에서의 실험을 위하여 아래의 실험에서는 glutamate 수용체의 차단제를 사용하지 않은 상태에서 BDNF의 영향에 관한 실험을 실시하였다.

관류액에 20 ng/mL의 BDNF를 투여하였을 때 해마신경세포의 자발성 시냅스전류의 변화를 관찰하였다(Fig. 2). 자발성 시냅스전류와 함께 활동전압을 발생하는 것으로 추정되는 신경세포에서 BDNF 투여는 신경세포의 흥분성을 감소시켰다(Fig. 2A). BDNF의 효과는 투여후 2분 경부터 나타나기 시작하여 3분에는 그 효과가 현저하였다. 큰 시냅스전류의 빈도는 BDNF 투여 후 3분에 현저하게 감소되었으나 각 시냅스전류의 크기에 대한 BDNF의 영향은 잘 알 수 없었다. 활동전압의 발생이 없이 자발성 시냅스전류를 발생하는 신경세포에서도 BDNF는 시냅스전류의 발생빈도를 억제하였으나 개개의 시냅스전류의 크기에 대한 영향은 현저하지 않았다(Fig. 2B).

BDNF가 해마신경세포의 막전압에 미치는 영

향을 보기 위하여 current clamp mode에서 막전압을 관찰하면서 BDNF를 관류시켰다. 활동전압을 보이는 신경세포에서 BDNF는 3분 후 활동전압의 빈도를 유의하게 감소시킴을 알 수 있었다(Fig. 3A). 관류액에 BDNF를 투여하기 전과 후에서 신경세포의 막전압을 측정하였을 때 막전

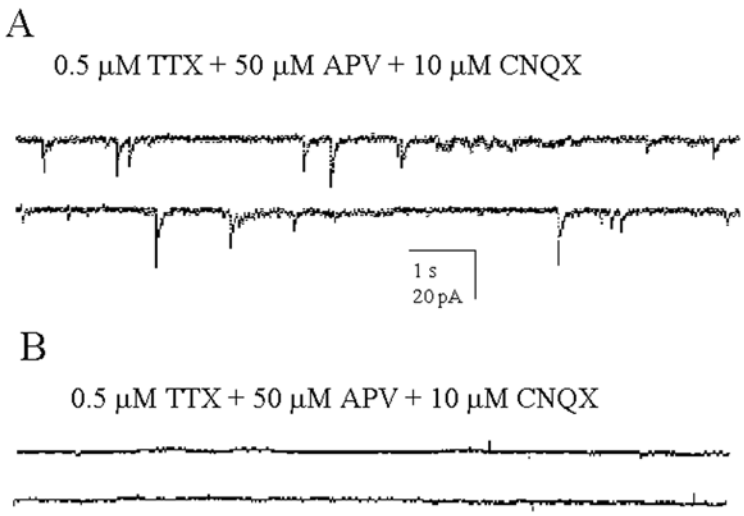

Fig. 1. GABAergic synaptic currents in the cultured hippocampal neurons. Membrane was held at -60 mV during the infusion of extracellular solution containing 0.5 mM TTX, 50 mM APV and 10 mM CNQX. A: Spontaneous synaptic currents were noticed in a cell which was GABAergic because these currents were disappeared in the solution containing 100 mM bicuculline (not shown). B: No spontaneous currents showed that this cell had no GABAergic synapse.

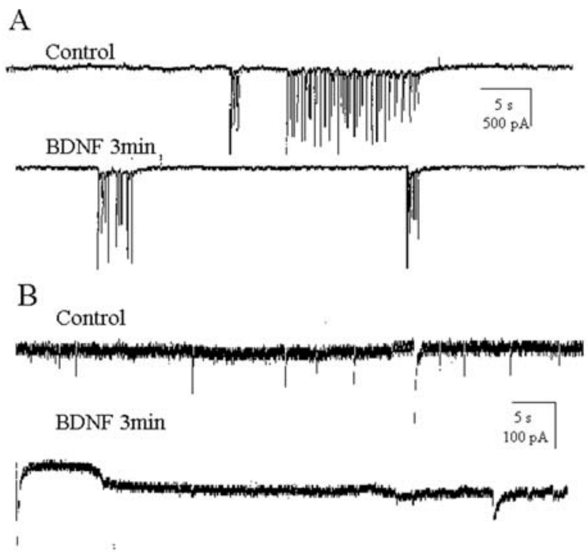

Fig. 2. Effect of BDNF (20 ng/ml) on the spontaneous currents in a cultured hippocampal neuron. Membrane was held at -60 mV. A: The frequency of large currents corresponding to action potentials was decreased during the infusion of bath solution containing BDNF (lower trace) comparing to the control. B: Spontaneous small synaptic currents were inhibited by the infusion of BDNF in another neuron.

압은 서서히 과분극되는 양상을 나타내어 신경세포의 흥분성은 안정되는 것으로 나타났다(Fig. 3B).

배양 해마신경세포에 분포하는 GABA 수용체의 반응도를 보기 위하여 세포 주변에 100 μM 및 1 mM의 GABA를 뿌렸을 때 모든 세포에서 내향성의 GABA 유발전류(GABA-induced current)가 나타났으며, GABA의 농도에 영향을 받았다(Fig. 4). GABA 1 mM에 의한 유발전류는 1038 ± 121.0 pA였으며, 이는 100 μM GABA의 371 ± 73.7 pA에 비하여 약 3배의 크기로써 증가($p<0.01$)되었다.

GABA 수용체에 대한 BDNF의 영향을 보기 위하여 20 ng/mL의 BDNF를 관류하기 전과 후에 100 μM의 GABA에 의한 유발전류를 비교하였다(Fig. 5). GABA 유발전류는 BDNF를 관류한 후 3분에 374 ±101.9 pA로 BDNF를 관류하기 전 수치에 비하여 유발전류의 크기 및 형태에 차이가 없었다.

BDNF를 관류 시 GABA 유발전류에 GABA$_A$ 수용체외 다른 이온통로의 활성화에 의한 전류가 포함되는 지를 보기 위하여 BDNF와 함께 GABA$_A$ 수용체 차단제인 100 μM의 bicuculline을 동시에 관류하면서 100 μM GABA에 의한 유발전류를 관찰하였다(Fig.6). GABA 유발전류는 BDNF의 존재 하에서 서서히 감소하다가 투여 후 3분 경에 완전히 차단됨으로써 배양 해마신경세포에 분포하는 GABA 수용체는 GABA$_A$형으로 확인되었다.

GABA 수용체의 특성에 대하여 BDNF가 영

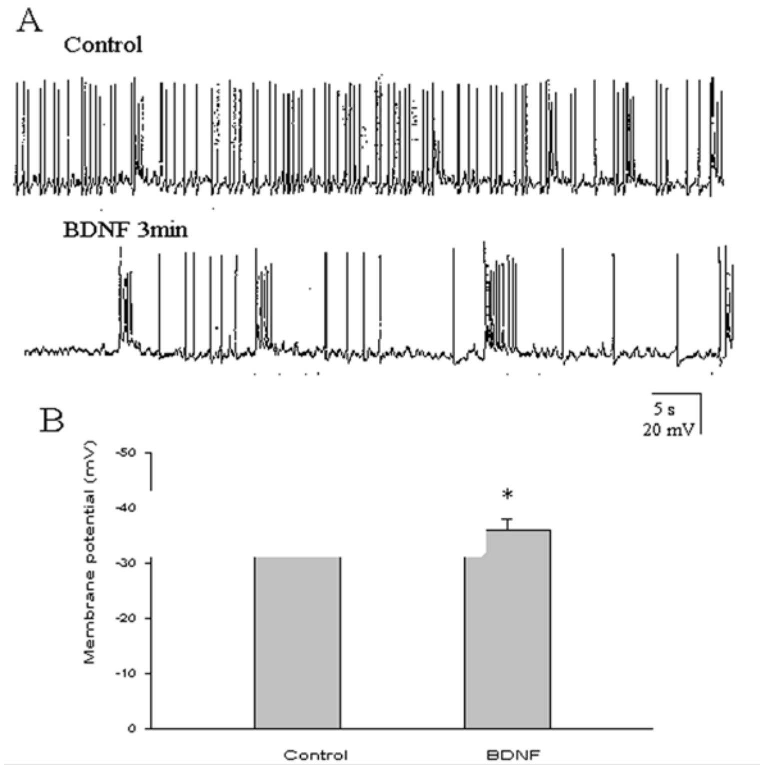

Fig. 3. Effect of BDNF (20 ng/ml) on the membrane potential in the cultured hippocampal neurons. A: The frequency of depolarization and action potential was decreased during the infusion of bath solution containing BDNF comparing to the control. B: Membrane potential was hyperpolarized in small amount by the infusion of BDNF (n=12). This stabilizing effect of BDNF on the membrane potential was significant ($p<0.05$).

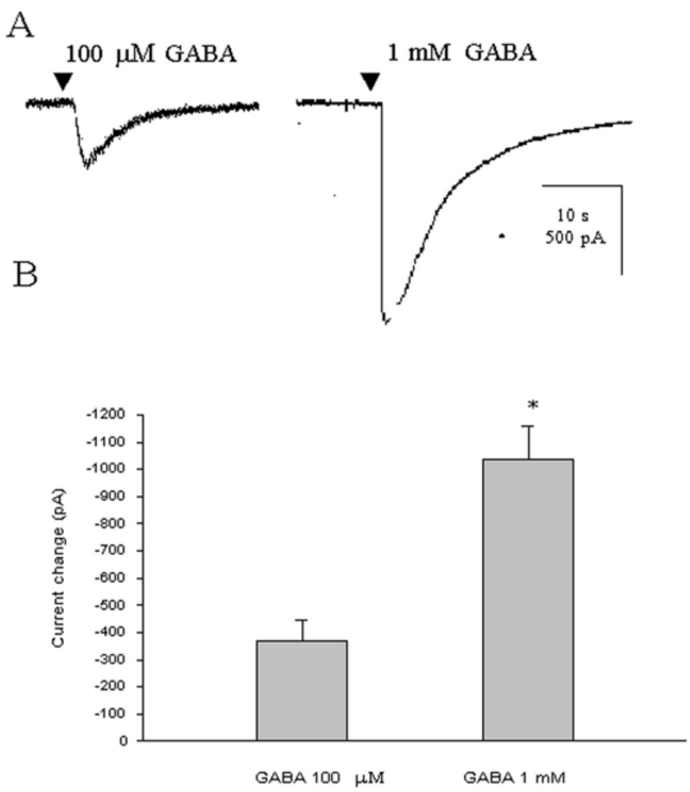

Fig. 4. Dose dependency of GABA-induced current in the hippocampal neurons. Membrane was held at -60 mV. A: GABA of 100 mM (left) and 1mM (right) was applied arround the recording cell for 30 to 50 ms by a microinjector. B: Comparison of GABA-induced inward current amplitude between 100 mM (n=12) and 1 mM (n=7) GABA infusion: * p<0.01.

향을 미치는 지 보기 위하여 20 ng/mL의 BDNF를 관류하기 전과 후에 voltage-clamp mode에서 막전압을 -80 mV에서 +20 mV까지 20 mV씩 변화시키면서 100 μM GABA에 의한 유발전류의 방향 및 크기를 관찰하였다(Fig. 7). 막전압을 -80 mV로 고정하였을 때 가장 큰 내향성 전류가 유발되었고, 막전압이 증가함에 따라 GABA 유발전류의 크기는 점차 감소하여 0 mV에서는 미미한 유발전류가 형성되었다. 또한 막전압을 20 mV로 고정하였을 때는 외향성 전류를 유발하였다(Fig. 7A). BDNF의 관류 전과 후에 있어 막전압의 변동에 따른 GABA 유발전류의 크기를 전류-전압 곡선(current-voltage curve)으로 나타내었을 때 GABA 유발전류의 전류-전압 곡선은 직선적인 형태를 보였다. BDNF의 관류 후에도 전류-전압 곡선의 형태에는 유의한 변화가 없었으며 역전전압도 BDNF의 관류전과 비슷한 양상이어서 단시간의 투여 시 BDNF가 GABA 수용체의 특성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 7B).

고 찰

이 실험에서 배양 7 10일된 해마신경세포의 안정막전압은 평균 -33 mV로 배양 10 14일의 해마신경세포에서 측정된 -48 mV의 안정막전압[16]이나 생후 13 16일의 해마 뇌절편에서 측정한 -67 mV의 안정막전압[17]보다 다소 높은 경향이 있다.

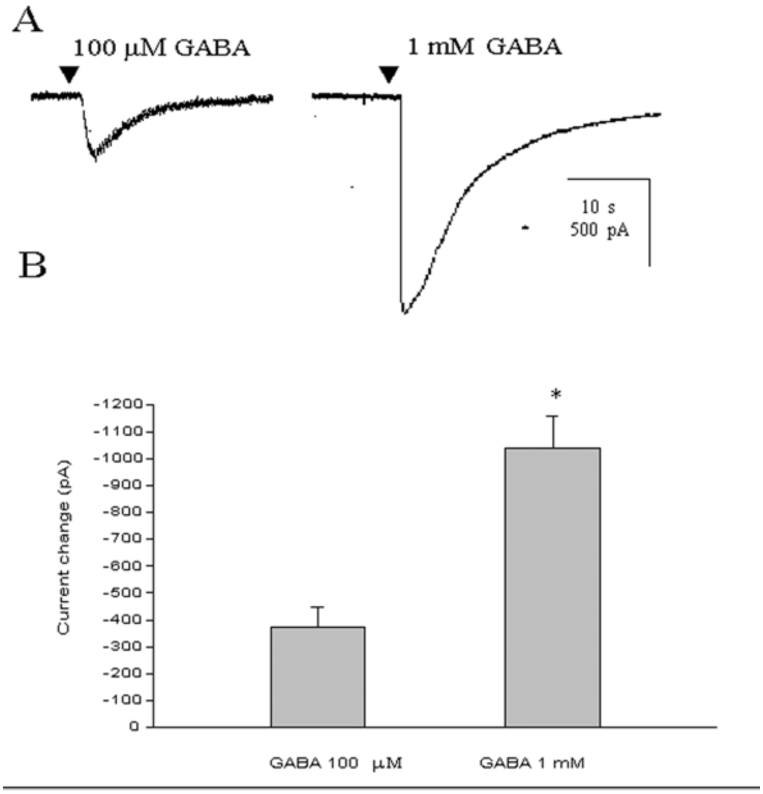

Fig. 5. Effect of BDNF (20 ng/ml) on the GABA-induced current in the cultured hippocampal neurons. Membrane was held at -60 mV. A: GABA of 100 mM was applied arround the recording cell in control solution (left) or in BDNF solution (right) for 30 to 50 ms by a microinjector. B: GABA-induced current amplitude was not different between control (n=12) and BDNF (n=11) solution.

중추신경계에서 GABA성 시냅스의 분포는 다양하다. 대뇌피질에서는 전체 시냅스의 17%[18], 시상하부에서는 50%[19], 배양 해마신경세포에서는 25%[16]에서 GABA성이다. 그러나 활동전압과 glutamate성 시냅스를 차단하였을 때 GABA성 시냅스전류가 관찰되지 않는 세포에서도 외부에서 GABA를 관류 시 자발성 시냅스전류는 억제되므로 모든 해마신경세포막에는 GABA 수용체가 존재함으로써 신경전달을 효율적으로 조절함을 알 수 있다[16].

BDNF는 중추신경계에서 NGF, NT-3와 함께 신경세포의 생존과 분화에 영향을 미치며[1,2,20]. BDNF는 중추신경계 신경세포에서 합성되며 BDNF 유전자의 발현 및 분비는 신경의 활동정도에 의해 조절된다[3]. 지금까지 BDNF에 의한 신경세포의 성장 및 분화 촉진효과는 주로 장시간의 투여에 의해 관찰되어 왔으며[4,5,21], 여러 가지 흥분성 신경전달물질 뿐만 아니라 억제성인 GABA 수용체의 형성 및 성숙에도 관여한다[22-24]. 그러나 최근에는 단시간의 투여에 의해서도 BDNF는 신경세포의 시냅스에 작용하여 신경세포에 영향을 미치며 배양 해마신경세포에서 BDNF가 시냅스전류에 대한 작용은 BDNF의 투여 2 3분의 짧은 시간 내에도 관찰되었다[25]. 단시간 내에 나타나는 BDNF의 효과는 신경세포에서 시냅스전 신경전달물질의 분비[26]나 시냅스후 수용체 반응[6,7]에 영향을 미치며, 이 때에도 BDNF의 작용기전은 trkB

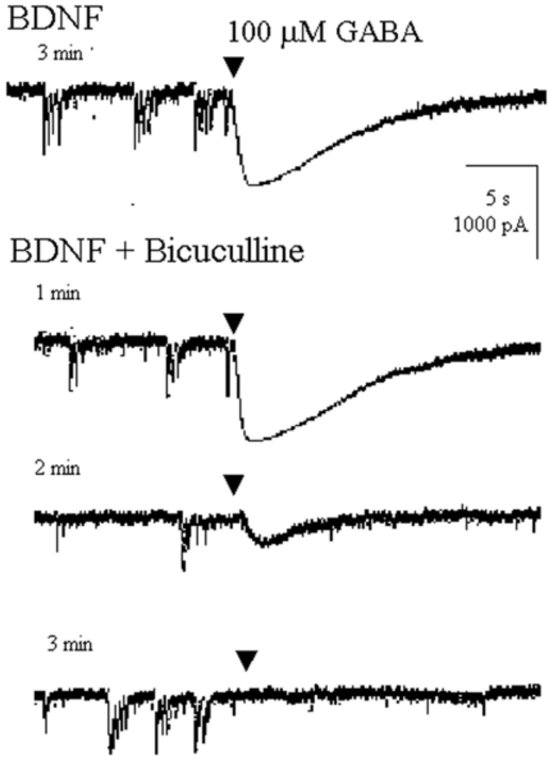

Fig. 6. Complete inhibition of GABA (100 mM) -induced current by application of 100 mM bicuculline in a hippocampal neuron. Membrane was held at -60 mV. The amplitude of GABA-induced current was disappeared at 3 min following the bicuculline infusion and there was no mechanically induced current change by a microinjector.

수용체를 통하여 이온 통로나 효소계를 인산화 함으로서 그 효과를 나타낸다고 생각하는 것이 일반적이다[26-30]. 그러나 BDNF가 이온 통로에 미치는 효과는 trkB를 통하지 않고 직접 glycine 유사작용을 나타낸다는 보고[31]도 있다.

Whole-cell patch clamp법을 사용한 다른 보고에서 BDNF는 배양 해마신경세포에서 시냅스 전류를 증가시키며[9,32], GABA 수용체를 차단한 상태에서도 흥분성 시냅스 전류의 빈도 및 크기를 증가시키므로 일차적으로 BDNF는 glutamate성 시냅스에 미치는 영향으로 생각되고 있다[29]. Glutamate성 시냅스에 대한 BDNF의 영향은 시냅스전 수준에서 glutamate 분비의 증가[29,33] 및 NMDA 수용체중 NR2B를 통하여 나타나는 양상이다 [25,32]. 그러나 배양된 해마세포에서 BDNF 투여 시 AMPA수용체를 통한 전류는 억제된다는 보고[9]가 있으나 시각중추에서 BDNF는 NMDA수용체와 함께 AMPA수용체도 관여한다는 보고[8]도 있다. 또한 BDNF는 시냅스전 수준에서 GABA의 분비[27,34] 및 GABA 수용체를 통한 전도[35]를 증가시킨다. 뿐만 아니라 중추신경계의 피라밋 세포와 GABA성 중간뉴론 사이에서 반대적인 작용을 함으로써 흥분과 억제의 적절한 조절을 이룬다는 보고[36-38]도 있어 BDNF가 신경세포의 시냅스전류에 미치는 영향은 다양한 것으로 생각된다.

이 실험에서 BDNF의 효과는 투여 후 2분 경

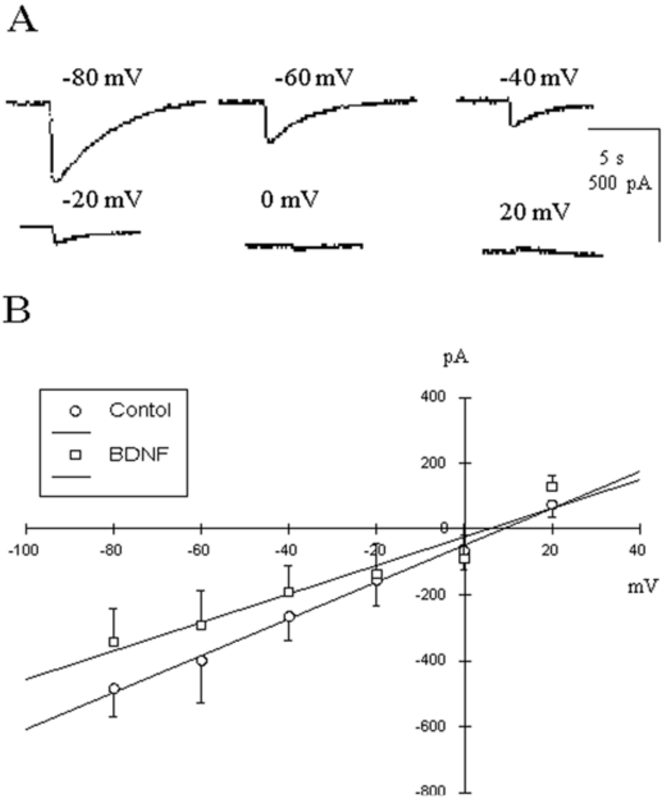

Fig. 7. Current-voltage relationship (I-V curve) of GABA-induced current in the hippocampal neurons. A: GABA (100 mM) -induced current was changed in amplitude and direction according to clamped membrane potential from -80 to 20 mV. Large inward current at -80 mV decreased when membrane potential was depolarized and small outward current was shown at 20 mV. B: I-V curve of GABA-induced current in control and BDNF solution (n=3).

부터 나타나기 시작하여 다른 보고[25]와 같이 BDNF가 세포막에 작용하여 인산화를 유도하는 데는 많은 시간이 걸리지 않았지만, BDNF는 해마신경세포의 자발성 시냅스전류의 빈도 및 활동전압의 발생을 억제하여 시냅스전류에 대한 BDNF의 촉진적 영향을 보고한 다른 보고자들[9,32]과 일치하지 않는다. 그러나 BDNF는 모든 경우에 있어 일괄적으로 시냅스전류를 증가하지는 않는다는 증거들이 제시되고 있다. 과도한 세포의 흥분을 유발하는 조건에서 BDNF는 오히려 glutamate에 의한 전류를 억제한다는 경우도 있으며[9], 중추신경계의 피라밋 세포와 GABA성 중간뉴런 사이에서 상호 반대적인 작용을 함으로써 흥분과 억제적 조절을 이루기도 한다[36-38]. 따라서 이 실험에서 나타난 결과를 바탕으로 몇 가지 기전을 가정할 수 있을 것이다.

하나의 가능성은 GABA성 시냅스에 대한 BDNF의 작용으로 생각할 수 있다. 만약 BDNF가 GABA 수용체에 흥분적으로 작용한다면[35] 시냅스전류 및 활동전압의 발생을 감소시킬 수 있을 것이다. 그러나 whole-cell patch clamp mode에서 GABA성 전류는 glutamate성 전류와 같이 내향성으로 나타나므로 흥분성으로 작용한다. 동시에 이 실험에서 외부에서 투여한 GABA 유발전류 및 GABA 수용체의 전기생리학적 특성에는 BDNF가 영향을 미치지 못하는 것

으로 나타남으로써 시냅스 후 수준에서 GABA 수용체에 대한 BDNF의 작용은 아닌 것으로 판단된다. 한편 중간뉴론의 시냅스전 수준에서 GABA의 분비를 증가시킨다면[27,34] 시냅스전류의 억제가 가능할 것으로 생각된다.

다른 가능성은 BDNF의 효과가 농도에 의존적인 경우를 생각할 수 있다. 이 실험에 사용된 BDNF의 농도는 20 ng/mL로 BDNF가 시냅스전류를 증가시킨다는 다른 보고[9,25]에서의 2 10 ng/ml 보다 높은 농도이다. BDNF를 20 100 ng/mL까지 투여한 보고[28]는 BDNF가 유발된 glutamate성 시냅스전류에는 영향이 없고, GABA성 시냅스 전류는 감소시키며, GABA의 투여시 유발전류도 감소된다고 하였다. 그러나 비슷한 농도의 BDNF를 사용한 다른 보고[2,29]에서는 동일한 결과를 나타내지 않으므로 저자의 실험 결과를 BDNF의 농도에 따른 현상으로 보기는 어렵다.

또 다른 가능성은 과도한 흥분세포에 대한 BDNF의 안정화 효과로 해석할 수 있다. 그 기전은 알 수 없지만 과도한 세포 흥분을 유발하는 조건에서 BDNF는 오히려 glutamate에 의한 전류를 억제한다는 보고[9]도 있으며, BDNF는 해마에서 흥분성인 피라밋 세포와 억제성인 중간신경 사이에 반대적인 작용을 하므로써 흥분과 억제의 적절한 조절을 한다는 보고[36-38]도 있다. BDNF가 시냅스전류를 증가하는 조건에서도 활동전압의 크기 및 빈도, 그리고 안정막전압에는 별 영향을 미치지 못한다는 보고들[29, 35]과는 달리 이 실험에서 세포막전압은 BDNF의 투여시 투여전에 비하여 크지는 않지만 과분극되는 양상을 보이면서 활동전압의 발생빈도는 억제되는 양상을 보였다. 이는 과도한 흥분을 보이는 신경세포에서 BDNF에 의한 신경세포의 안정화 경향으로 생각할 수 있으며, 이 실험에서 안정막전압이 다른 보고들[16,17] 보다 높은 경향은 전반적인 신경세포들이 저분극된 쪽으로 유지된 결과로 과도한 흥분의 조건이 선행 될 수 있을 것이다. 이 경우 시냅스전류 및 활동전압의 크기에 대한 BDNF의 영향은 다른 보고들[29,35]과 같이 크지 않았던 것으로 생각된다.

이 실험에 사용된 해마신경세포는 배양 7 10일로 비교적 배양 초기의 세포이다. 이 경우 성숙된 신경세포에 비하여 세포막전압은 저분극을 보인다[39,40]. 동시에 glutamate 수용체중 NMDA 수용체의 발현은 상대적으로 약하므로[41] 단시간의 BDNF 투여가 NMDA 수용체를 자극하는 효과는 미약할 것이다. 따라서 배양초기의 해마 신경세포를 이용한 이 실험에서 BDNF는 억제성인 GABA성 신경말단에서 GABA성 활성을 촉진시켜 막전압을 과분극시키고 시냅스전류 및 활동전압의 발생은 억제되는 것으로 생각된다.

요 약

BDNF는 신경세포의 생존과 분화에 영향을 미치며, 중추신경계에서 BDNF는 활동이 활발한 신경세포의 구조적 및 기능적 변화 관여한다. 지금까지 BDNF에 의한 신경세포의 성장 및 분화 촉진효과는 주로 장시간의 투여에 의해 관찰되어 왔지만 단시간의 BDNF 투여에 의한 효과는 신경접합부에 작용하여 신경전달물질의 분비나 수용체 반응에 영향을 미친다. 그러나 이러한 BDNF의 조절에 대한 자세한 기전의 연구는 아직 미흡하다.

이 연구에서는 일차 배양한 해마신경세포에서 BDNF가 단시간에 작용할 때 시냅스전류에 미치는 효과를 알아보고, 그 기전에서 시냅스 수준에서 GABA성 수용체의 역할을 알아보고자 임신 17 18일 사이의 태아쥐로부터 해마 신경세포를 분리하여 일차 배양하였고, 배양 7 10일 사이의 해마신경세포를 이용하여 전기생리학적인 특성을 whole-cell patch clamp 방법으로 기록하였다.

관류액에 20 ng/mL의 BDNF를 투여하였을 때 자발성 시냅스전류 및 활동전압의 발생빈도를 감소시켰으나 그 크기에 대한 영향은 현저하지 않았다. 동시에 세포막전압은 서서히 과분극되는 양

상을 보였고, BDNF의 효과는 투여후 3분에 현저하였다. GABA에 의한 유발전류는 100 μM GABA에서 최고치에 달하지 않았고, BDNF 관류 전과 후 사이에 유발전류의 크기 및 형태에 차이가 없었다. 이 GABA 유발전류는 GABAA 수용체 차단제에 의해 억제되었다. BDNF의 관류 전과 후 GABA 수용체의 특성을 전류-전압 곡선으로 나타내었을 때 단시간의 투여시 BDNF는 GABA 수용체의 특성에는 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과에서 배양초기의 해마 신경세포에서 BDNF는 억제성인 GABA성 신경의 활성을 증가시켜 막전압을 과분극시키고 시냅스전류 및 활동전압의 발생은 억제되는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 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.
2. Bartrup JT, Moorman JM, Newberry NR. BDNF enhances neuronal growth and synaptic activity in hippocampal cell cultures. *Neuroreport* 1997;**8**(7):3791-4.
3. Blochl A, Thoenen H. Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur J Neurosci* 1995;**7**(6):1220-8.
4. Beck KD, Knusel B, Hefti F. The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des(1-3)-insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 1993;**52**(4):855-66.
5. Studer L, Spenger C, Seiler RW, Altar CA, Lindsay RM, Hyman C. Comparison of the effects of the neurotrophins on the morphological structure of dopaminergic neurons in cultures of rat substantia nigra. *Eur J Neurosci* 1995;**7**(2):223-33.
6. LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 1995;**15**(6):1287-98.
7. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 1995;**270**(5236):593-8.
8. Carmignoto G, Pizzorusso T, Tia S, Vicini S. Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex. *J Physiol* 1997;**498**(1):153-64.
9. Song DK, Choi BK, Bae JH, Park WK, Han IS, Ho WK, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor rapidly potentiates synaptic transmission through NMDA, but suppresses it through non-NMDA receptors in rat hippocampal neuron. *Brain Res* 1998;**799**(1):176-9.
10. Sieghart W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmcol Rev* 1995;**47**(2):181-234.
11. Puia G, Vicini S, Seeburg PH, Costa E. Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl^- currents. *Mol Pharmacol* 1991;**39**(6):691-6.
12. Macdonald RL, Kelly KM. Mechanisms of action of currently prescribed and newly developed antiepileptic drugs. *Epilepsia* 1994;**35**(suppl 4):S41-50.
13. McKernan RM, Whiting PJ. Which $GABA_A$-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 1996;**19**(4):139-43.
14. Davies PA, Hanna MC, Hales TG, Kirkness EF. Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABAA receptor subunit. *Nature* 1997;**385**(6619):820-3.
15. Akaike N. Gramicidin perforated patch recording and intracellular chloride activity in excitable cells. *Prog Biophys Mol Biol* 1996;**65**(3):251-64.

16. 김용대, 홍영수, 송대규, 배재훈, 박원균. 흰쥐의 일차 배양 해마신경세포에서 시냅스전류에 대한 GABA의 영향. *항공우주의학* 1999;**9**(3):302-12.
17. Rovira C, Ben-Ari Y. Benzodiazepines do not potentiate GABA responses in neonatal hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1991;**130**(2):157-61.
18. 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.
19. Decavel C, van den Pol AN. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 1990;**302**(4):1019-37.
20. Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip NY, Lindsay RM. Overlapping and distinct actions of the neurotorphins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J Neurosci* 1994;**14**(1):335-47.
21. Levine ES, Dreyfus CF, Black IB. Plummer MR. Differential effects of NGF and BDNF on voltage-gated calcium currents in embryonic basal forebrain neurons. *J Neurosci* 1995;**15**(4):3084-91.
22. Mizuno K, Carnahan J, Nawa H. Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of stiriatal GABAergic neurons. *Dev Biol* 1994;**165**(1):243-56.
23. Spenger C, Hyman C, Studer L, Egli M, Evtouchenko L, Jackson C, *et al.* Effects of BDNF on dopaminergic, serotonergic, and GABAergic neurons in cultures of human fetal ventral mesencephalon. *Exp Neurol* 1995;**133**(1):50-63.
24. Bao S, Chen L, Qiao X, Thompson RF. Transgenic brain-derived neurotrophic factor modulates a developing cerebellar inhibitory synapse. *Learn Mem* 1999;**6**(3):276-83.
25. Lin SY, Wu K, Levine ES, Mount HT, Suen PC, Black IB. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Mol Brain Res* 1998;**55**(1):20-7.
26. Sala R, Viegi A, Rossi FM, Pizzorusso T, Bonanno G, Raiteri M, *et al.* Nerve Gorwth factor and brain-derived neurotrophic factor increase neurontransmitter release in the rat visual cortex. *Eur J Neurosci* 1998;**10**(6):2185-91.
27. Zachrisson O, Falkenberg T, Lindefors N. Neuronal coexistence of trkB and glutamic acid decarboxyase 67 mRNAs in rat hippocampus. *Mol Brain Res* 1996;**36**(1):169-73.
28. Tanaka T, Saito H, Matsuki N. Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurontrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J Neurosci* 1997;**17**(9):2959-66.
29. Li YX, Zhang Y, Lester HA, Schuman EM, Davidson N. Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998;**18**(24):10231-40.
30. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Actions of brain-dervied neurotrophic factor in slices from rats with spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the dentate gyrus. *J Neurosci* 1999;**19**(3):5619-31.
31. Jarvis CR, Xiong ZG, Plant JR, Churchill D, Lu WY, MacVicar BA, *et al.* Neurotrophin modulaton of NMDA receptors in cultured murine and isolated rat neurons. *J Neurophysiol* 1997;**78**(5):2363-71.
32. Crozier RA, Black IB, Plummer MR. Blockade of NR2B-containing NMDA receptors prevents BDNF enhancement of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. *Learn Mem* 1999;**6**(3):257-66.
33. Takei N, Sasaoka K, Inpue K, Takahashi M, Endo Y, Hatanaka H. Brain-derived neurotrophic factor increases the stimulation-evoked release of glutamate and the levels of exocytosis-associated proteins in cultured cortical neurons from

embryonic rats. *J Neurochem* 1997;**68**(1):370-5.

34. Berninger B, Marty S, Zafra F, Da Penha Berzaghi M, Thoenen H, Lindholm D. GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation *in vitro*. *Development* 1995;**121**(8):2327-35.
35. Oyelese AA, Rizzo MA, Waxman SG, Kocsis JD. Differential effects of NGF and BDNF on axotomy-induced changes in GABA (A)-receptor-mediated conductance and sodium currents in cutaneous afferent neurons. *J Neurophysiol* 1997:**78**(1):31-42.
36. Marty S, Berzaghi Mda P, Berninger B. Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons. *Trends Neurosci* 1997;**20**(5):198-202.
37. Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM, Turrigiano GG. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci* 1997;**17**(12):4527-35.
38. Rutherford LC, Nelson Sb, Turrigiano GG. BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* 1998;**21**(3):521-30.
39. Chen G, Trombley PQ, van den Pol AN. GABA receptors precede glutamate receptors in hypothalamic development; differential regulation by astrocytes. *J Neurophysiol* 1995;**74**(4):1473-84.
40. Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 1996;**16**(20):6414-23.
41. 홍영수, 배재훈, 송대규, 배재훈, 박원균. Kainate 수용체를 통한 신경독작용에서 BDNF mRNA 발현과 Ca^{2+} 유입경로. *항공우주의학* 1999;**9**(2):198-206.