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

해마신경세포의 성장에 미치는 GABA의 흥분성 영향

계명대학교 의과대학 생리학교실 및 계명대학교 뇌연구소

이상훈 · 송대규 · 배재훈 · 박원균

Excitatory Effect of GABA on Development of Cultured Rat Hippocampal Neurons

Sang-Hoon Lee, 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 designed to evaluate whether the activation of the GABA receptor had an excitatory effect on the early developing hippocampal neurons. Thus, primary culture of hippocampal neurons was prepared from rat embryos at embryonic day 17 18, In the groups treated with glutamate (25 μM), NMDA (25 μM) or kainate (25 μM), the neuronal development did not change, compared to the control group, however, the development was prominently inhibited by AMPA (25 μM). APV (10 μM), an NMDA receptor angagonist did not affect the development of the neurons, but non-NMDA receptor angagonist, CNQX (10 μM), suppressed the neuronal development. Kainate receptor selective blocker, NS-102 (10 μM), inhibited the neuronal growth, but AMPA receptor selective blocker, 6-chlorkynurenic acid (10 μM), had no effect. GABA (25 μM) stimulated the neuronal development, while GABA antagonist, bicuculline (10 μM), had an opposite effect. Nifedipine, voltage-dependent Ca^{2+} channel blocker, inhibited the neuronal development in almost all the groups treated with glutamate or GABA receptor agonists. These results indicate that GABA has an excitatory effect on early developing hippocampal neurons and that the role of kainate receptor in the effect of glutamate is greater than that of NMDA receptor in early development of cultured hippocampal neurons.

Key Words : GABA receptor, Glutamate receptors, Kainate receptor, NMDA receptor, Rat hippocampal neurons

서 론

포유동물의 중추신경계에서 신경전달물질 중 glutamate 및 γ-aminobutyric acid(GABA)는 각각 중요한 흥분성 및 억제성 신경전달물질이다[1,2]. 신경세포의 glutamate 수용체는 크게 향이온성(ionotropic) 및 향대사성(metabotropic) 수용체로 구분된다. 향이온성 수용체는 다시 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체와 non-MNDA 수용체로 구분되며, non-NMDA 수용체는 α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate(AMPA) 및 kainate 수용체로 나눈다[3]. Glutamate는 신경세포의 배양 초기과정에 신경세포의 성장을 촉진하기 위하여 사용되며, Glutamate가 신경세포의 성장에 작용하는 데는 NMDA 수용체 및 AMPA 수용체가 관여한다. AMPA 수용체는 glutamate 작용의 rapid component를 이루며, 시냅스후(postsynaptic) 세포막을 탈분극시켜 안정막전압에서는 Mg^{2+}에 의해 억제되어 있던 NMDA 수용체를 활성화시킨다[4]. NMDA 수용체는 glutamate 작용의 slow component를 형성하며 Na^{+} 뿐만 아니라 Ca^{2+}이 유입되는 통로로 작용한다.

중추신경계에서 GABA의 수용체는 $GABA_A$, $GABA_B$ 및 $GABA_C$ 아형이 있지만[5,6], 크게 $GABA_A$ 및 $GABA_B$ 수용체로 나누어진다. 염소이온(Cl^-)에 특이한 이온통로를 형성하는 $GABA_A$ 수용체는 중추신경계 전반에 걸쳐 고루 분포하고 있다. GABA에 의해 $GABA_A$ 수용체가 활성화되면 Cl^-의 전도성이 증가하는데 성숙된 신경세포에서는 Cl^-의 세포 내 유입으로 과분극이 유발되므로 신경의 흥분이 억제되는 것으로 알려져 있다. 그러나 경우에 따라서는 GABA에 의해 수용체는 흥분작용을 나타낼 수도 있으며, 한편으로는 다른 시냅스에 의한 흥분의 조절에 관여하기도 한다[7]. GABA가 흥분성을 나타낼 수 있는 가능성의 하나는 $GABA_B$ 수용체를 통해 나타날 수 있다[8]. $GABA_B$ 수용체는 G-단백과 연결된 K^+ 통로를 활성화하거나 Ca^{2+} 통로를 억제한다[9,10].

중추신경계에서의 GABA작용은 뇌절편을 이용하거나 일차 배양 신경세포를 이용한 실험에서 신경세포의 성숙 정도에 따라 다양하게 나타난다. 실험실에서 통상 이용하는 일차 배양 신경세포는 태생기 15일 이후 혹은 출생 후 2일 이내의 뇌세포를 사용하는데, 배양하는 기간에 따라 세포의 특성에 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 배양 신경세포는 배양시작 후 2주일까지 'developing model'로 이용하고, 3주 이후는 'adult neuronal model'로 사용한다[11]. 배양기간에 따른 신경세포의 특성 차이는 Cl^- 전도성의 차이로 설명한다. 즉, developing neuron에 GABA를 투여하면 Cl^-이 세포 바깥으로 이동하여 세포는 저분극 되면서 세포질내의 Ca^{2+}의 증가와 세포의 흥분성이 관찰되며, mature neuron에서는 Cl^-이 세포 내로 이동하여 억제성 효과가 나타나는 것을 일차 배양 시상하부 신경세포에서 관찰한 보고가 있다[11].

이 연구에서는 초기 배양 해마신경세포에서 GABA가 세포막을 탈분극시키는 흥분성으로 작용한다면 glutamate의 어느 수용체를 활성화시키는 기전으로 작용함으로써 신경세포의 성장을 촉진할 수 있을 것이라는 가설을 실험으로 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 해마신경세포의 배양

Sprague-Dawley종 임신 17 18일 된 쥐를 에테르로 흡입 마취하여 빠른 시간 내 태아를 분리해 냉각된 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 담아 대사를 억제시킨 후 해마신경세포를 분리하였다.

해마신경세포 분리는 태아의 뇌에서 해마를 분리해 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 37℃ 수조에서 25분간 정치시켰다. 이 과정은 결합조

직이나 교원섬유 등을 분해해 신경세포 분리를 돕기 위한 것으로 25분 후 trypsin-EDTA를 제거하고 더 이상의 trypsin-EDTA 작용을 막기위해 HBSS는 Ca^{2+}, Mg^{2+}이 포함되지 않고 1 mM pyruvate와 10 mM HEPES(N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethane sulfoniate)를 첨가하여 pH를 7.4로 세척하였다. 세척이 끝난 해마조직에 HBSS를 첨가하여 파스퇴르 피펫으로 덩어리를 부순 후 원침(1000 rpm, 2 min)시켜 상층액은 제거하였다. 이 과정을 2 3회 반복하여 순수한 해마신경세포를 모은 후 배양액에 부유시키고, 세포부유액 10 μL를 trypan blue 25 μL와 HBSS 15 μL 혼합액에 첨가하여 5배 희석하였다. 이 희석액으로 세포 수를 산정하여 미리 poly-D-lysine을 1시간 처리하여 건조시킨 24 well plate에 well 당 1 x 10^6 개의 세포를 뿌려서 각 조건을 처리한 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 세포를 뿌린 후 3일째 배양액의 1/2을 교체하였다. 이 실험에 사용한 배양액은 Neurobasal Medium^{R}에 20 μL/mL B-27, 500 μM glutamine, 25 μM β-mercaptoethanol, 10 μg/mL 항생물질을 첨가하여사용하였다. 위에서 사용한 시약 중 Neurobasal Medium^R, B-27은 Gibco-BRL사(미국)의 제품을, 나머지 시약들은 Sigma사(미국) 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

일차 분리한 해마신경세포를 대상으로 Neurobasal medium 외에 다른 첨가물이 함유되지 않은 배양액으로 배양한 대조군과 배양액에 25 μM glutamate 및 glutamate 수용체의 작용물질인 25 μM NMDA, 25 μM AMPA, 25 μM kainate를 첨가한 배양액으로 배양한 각 군에서 배양 4일 및 9일째 세포의 성장 정도를 측정하였다. 또한 해마신경세포의 성장에 미치는 각 glutamate 수용체들의 역할을 비교해 보고자 배양액에 NMDA 수용체 길항제인 D-2-amino-5-phosphoquinopentanoic acid(APV)와 non-NMDA 수용체 길항제인 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione(CNQX)을 처리한 군을 비교하여 관찰하였다. Non-NMDA 수용체중 AMPA 수용체와 kainate 수용체의 역할을 구분하고자 AMPA 수용체 길항제인 6-chlorokynurenic acid(6-CK), kainate 수용체 길항제인 6,7,8,9-tetrahydro-5-nitro-1H-benz[g]indole-2,3-dione-3-xime(NS-102)을 첨가하여 세포 성장을 관찰하였다.

일차 배양 해마신경세포의 성장에 GABA가 흥분성 영향을 미치는 지를 관찰하기 위하여 배양액에 첨가물이 함유되지 않은 대조군과 배양액에 $GABA_A$ 수용체 길항제인 10 μM bicuculline을 첨가한 군, 배양액에 25 μM GABA를 첨가한 군에서 배양 4일과 9일에 각각 신경세포의 성장을 비교하였다. 동시에 세포성장에 미치는 GABA 수용체, NMDA 수용체, kainate 수용체간의 연계성을 알아보고자 각 수용체의 효현제를 첨가한 배양액에 다른 수용체의 길항제인 bicuculline, APV, NS-102를 각각 처리하여 세포의 성장을 관찰하였다.

해마신경세포가 성장에 각 수용체들이 미치는 영향에 있어서 외부로부터 유입되는 Ca^{2+}의 영향을 알아보기 위해 각 배양군에 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 길항제인 10 μM nifedifine을 처리한 후 세포의 성장을 관찰하였다.

배양액에 glutamate 수용체 및 GABA 수용체의 효현제 및 각종 길항제를 처리한 후 배양한 해마신경세포의 성장을 비교하기 위하여 배양 4일 및 9일째에 신경세포를 도립현미경상에서 100배 및 200배의 비율로 세포의 수, 접합의 수 등을 형태학적으로 평가하였고, 동시에 세포를 채집하여 현미경하에서 세포의 수를 산정하였다. 또한 각 군에서 신경세포의 생존능력을 평가하기 위하여 배양액으로 유리된 lactate dehydrogenase (LDH) 활성을 Sigma사(미국)의 LDH 측정 kit를 사용하여 측정하였다.

실험결과는 통계처리하여 평균과 표준편차로 표시하였으며, 각 군에서 세포 수 산정이나 LDH 활성 변동의 비교는 Student's t-test와 일원분산분석(ANOVA)으로 통계학적 유의성을 검증하

였다.

결　　과

해마신경세포의 성장에 미치는 여러 배양조건을 비교하였던 바 배양 4일과 9일째의 신경세포를 상호 비교하였을 때 세포의 수나 형태적인 면에서 두 시기 사이에는 별 차이가 없어서 성적은 배양 9일째의 신경세포를 위주로 제시하였다.

배양 9일째 대조군과 glutamate, kainate, AMPA를 각각 25 μM의 농도로 첨가한 군에서 해마신경세포의 형태학적 관찰 결과는 다음과 같다(Fig. 1A & 1B). 대조군에의 신경세포와 비교할 때 glutamate 첨가군과 kainate 첨가군에서 세포의 크기나 신경돌기 및 시냅스 형성 등의 형태학적인 차이는 관찰하기 어려웠다(Fig.1A). 또한 세포수의 산정에서도 대조군의 well당 4.9 ± 0.64×10^{5}에 비하여 glutamate 첨가군과 kainate 첨가군에서 각각 5.8 ± 0.70 ×10^5 및 5.3 ± 0.59×10^{5}로 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 1B). 그러나 AMPA 첨가군은 대조군과 비교할 때 다수의 세포가 탈락하여 소수의 세포만이 남아 있었으며, 세포의 돌기는 현저하게 위축되어 세포의 성장이 매우 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 1A).

신경세포 성장에 대한 glutamate 수용체들의 영향을 평가하고자 glutamate(25 μM) 첨가군에 대하여 glutamate(25 μM) 첨가와 함께 APV(10 μM) 및 CNQX(10 μM)를 처치한 군에

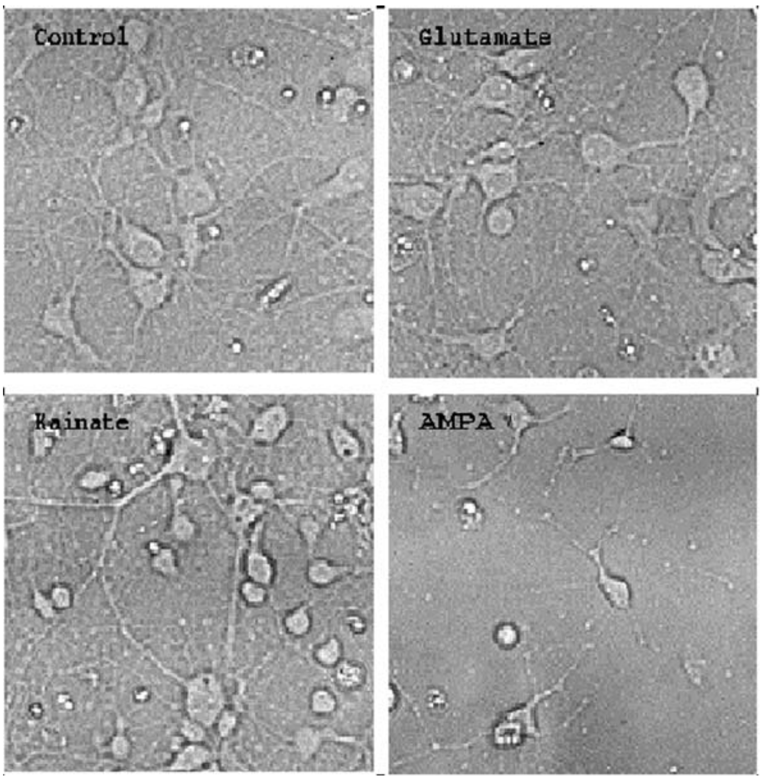

Fig. 1A. Phase-contrast photomicrographs of 9 days in vitro in the culture conditions including glutamate (25 μM), AMPA (25 μM) or kainate (25 μM) in the neurobasal medium (control) in the developing rat hippocampal neurons (x 200).

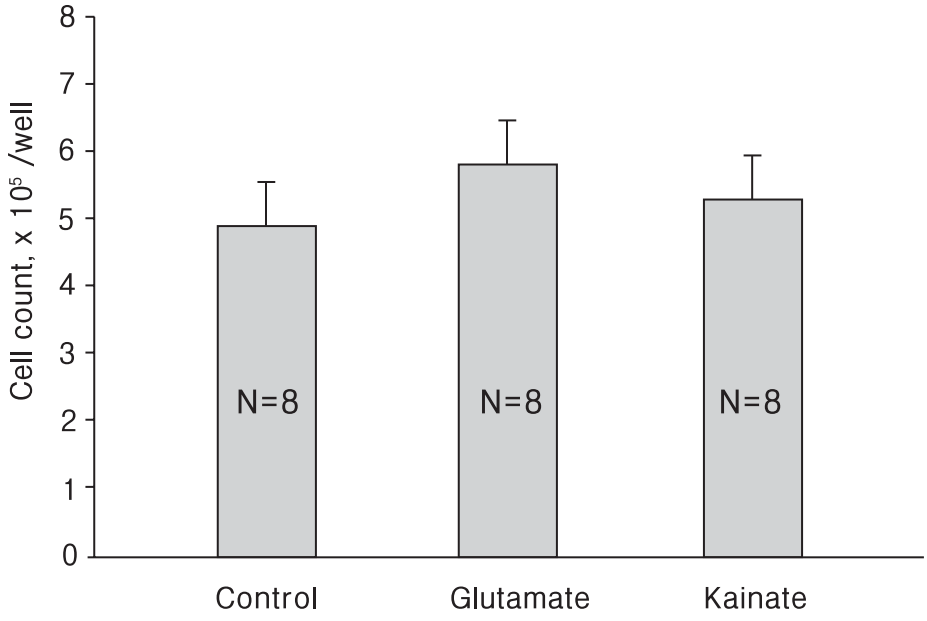

Fig. 1B. Cell viability in the culture conditions including glutamate (25 μM) or kainate (25 μM) in neurobasal medium (control) in the developing rat hippocampal neurons.

서 결과를 비교하면, APV 처치군은 glutamate 첨가군에 비하여 형태학적으로 현저한 변화가 없으나 CNQX 처치군은 많은 세포의 감소와 함께 돌기가 위축되는 양상을 보였다(Fig. 2A). 세포수의 산정시 glutamate 첨가군의 5.8 ± 0.70 $\times 10^5$에 비하여 APV 처치군은 4.1 ± 0.64$\times 10^5$으로 약간 감소하였으나 유의한 수준은 아닌 반면에 CNQX 처치군은 2.6 ± 0.28$\times 10^5$으로 세포수가 50% 이상 유의하게 감소($p<0.01$)하여 신경세포의 성장에 non-NMDA 수용체가 밀접하게 관계됨을 보였다(Fig. 2B).

Non-NMDA 수용체에 의하여 신경세포에 미치는 영향을 분석하기 위하여 대조군에 대하여 6-CK(10 μM) 처치군 및 NS-102(10 μM) 처치군을 비교하였을 때의 결과를 비교하면 6-CK 처치군은 대조군에 비하여 형태학적으로 현저한 변화가 없으나 NS-102 처치군은 어느 정도 세포의 감소와 함께 돌기가 위축되는 양상을 보였다(Fig. 3A). 세포수의 산정 시 대조군의 4.9 ± 0.64 x 10^5에 비하여 6-CK 처치군은 4.8 ± 0.51 x 10^5으로 차이가 없었으나 NS-102 처치군은 3.3 ± 0.54 x 10^5으로 세포수가 유의하게 감소($p<0.05$)하여 신경세포의 성장에 kainate 수용체가 밀접하게 관계됨을 보였다(Fig. 3B).

신경세포의 성장에 미치는 GABA 수용체의 영향을 보기 위하여 대조군에 대하여 bicuculline(10 μM) 처치군과 배양액에 GABA(25 μM) 첨가군을 비교하였을 때의 결과를 보면 bicuculline 처치군은 대조군에 비하여 세포수가 감소하는 양상을 보인 반면에 GABA 첨가군은 큰 변화를 나타내지 않았다(Fig. 4A). 세포수의 산정 시 대조군의 4.9 ± 0.64$\times 10^5$에 비하여 bicuculline 처치군은 2.9 ± 0.49$\times 10^5$로 유의한 감소($p<0.05$)를 보였고, GABA 첨가군은 6.7 ± 0.43$\times 10^5$으로 세포수가 유의하게 많았으며($p<0.05$) 신경세포의 성장에 GABA 수용체가

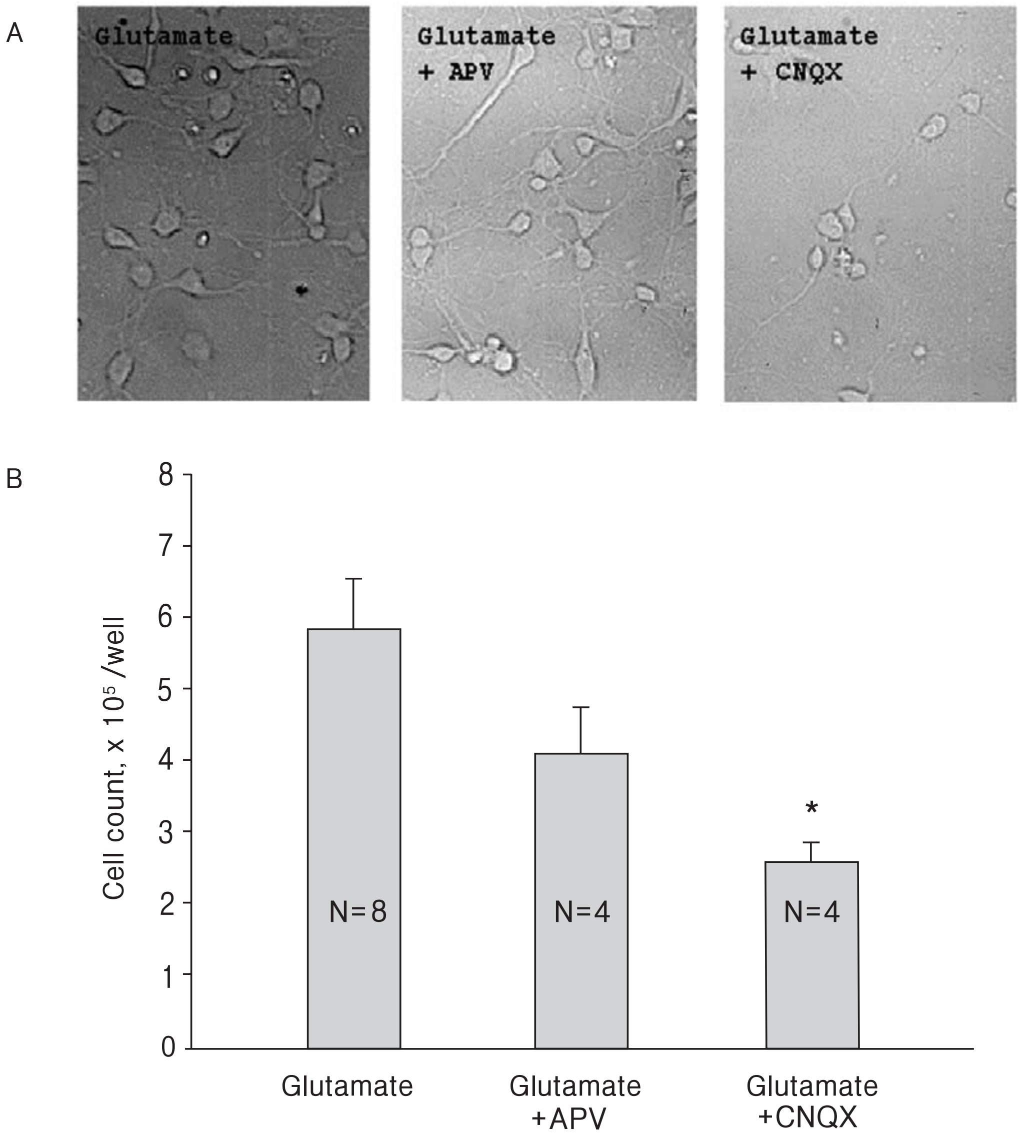

Fig. 2. Phase-contrast photomicrographs (A, x 200) and cell viability (B) of 9 days in vitro in the culture conditions including NMDA receptor antagonist, APV (10 μM) or non-NMDA receptor antagonist, CNQX (10 μM) in glutamate (10 μM) containing neurobasal medium (glutamate) in the developing rat hippocampal neurons. * $p < 0.05$ compared to glutamate group.

밀접하게 관계됨을 보였다(Fig. 4B).

신경세포 성장에 대한 NMDA 수용체, kainate 수용체 및 GABA 수용체의 상호작용을 평가하고자 kainate(25 μM) 첨가군에 대하여 kainate 첨가와 함께 APV(10 μM) 및 bicuculline(10 μM)를 처치한 군에서의 결과를 비교하면, APV 처치군 및 bicuculline 처치군에서 kainate 첨가군에 비하여 형태학적으로 유의한 변화를 관찰할 수 없었고, 세포수의 산정 시 kainate 첨가군의 5.3 ± 0.59×10^5에 비하여 APV 처치군은 5.2 ± 1.51×10^5으로 변화가 없었으며 bicuculline 처치군은 4.3 ± 0.45×10^5으로 세

포수가 약간 감소하는 양상이나 유의한 변화는 아니었다(Fig. 5). 한편, GABA(25 μM)를 첨가한 군과 비교하여 APV(10 μM) 및 NS -102(10 μM)를 처치한 군에서의 결과를 보면, APV 처치군 및 NS-102 처치군 모두에서 GABA 첨가군의 6.7 ± 0.43×10^5에 비하여 APV 처치군은 5.1 ± 0.63 x 10^5, NS-102 처치군은 5.7 ± 0.34×10^5으로 세포수가 유의하게 감소($p<0.05$)하는 결과를 보였으나 GABA를 첨가하지 않은 대조군에 비하여는 여전히 세포의 수가 많은 양상이었다(Fig. 6).

해마신경세포가 성장에 각 수용체들이 미치는 영향에 있어서 외부로부터 유입되는 Ca^{2+}의 필요성을 알아보기 위해 대조군, glutamate 첨가군, kainate 첨가군 및 GABA 첨가군에 대하여 각각 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 길항제인 nifedifine을 처리하였을 때 모든 군에서 세포의 수는 매우 감소된 양상을 보여 해마신경세포의 성장에 외부로부터 유입되는 Ca^{2+}은 필수적이었다(Fig.7).

위에서 언급된 각종 배양 조건에서 LDH 활성도를 측정한 결과는 Table 1에서 나타내었다. 대조군에 대하여 AMPA 수용체, kainate 수용체 및 GABA 수용체 각각의 길항제을 처치시 6-CK 처치군에서만 LDH 활성도가 유의하게 낮았고($p<0.05$), GABA 첨가군에 대하여 APV 처치군에서 LDH 활성도가 낮게 나타났다($p<0.05$).

고 찰

배양 초기의 해마신경세포에서 기능을 나타내는 glutamate 수용체는 kainate에 친화력이 높은 subunit들로 구성된다[12]. 이 실험에서 glutamate에 반응하는 각 수용체에 대한 효현제

Table 1. Lactate dehydrogenase activity in several adjuvants in cultured rat hippocampal neurons

Conditions	No.	Mean	S.D.
Control	10	982	184.6
+ 6-CK (10 μM)	4	685[a]	121.0
+ BI (10 μM)	7	893	197.7
+ NS-102 (10 μM)	6	880	241.2
+ BI (10 μM), NS-102 (10 μM)	6	998	189.3
Glutamate (25 μM)	10	908	119.0
+ APV (10 μM)	7	809	276.9
Kainate (25 μM)	10	868	151.2
+ APV (10 μM)	6	722	280.2
+ BI (10 μM)	7	852	233.1
GABA (25 μM)	9	970	164.0
+ APV (10 μM)	10	751[b]	305.5
+ NS-102 (10 μM)	7	1,015	134.5

Abbreviations: 6-CK, 6-chlorokynurate; BI, bicuculline; APV: D-2-amino-5-phosphoquino-pentanoic acid; NS-102, 6,7,8,9-tetrahydro-5-nitro-1H-benz[g]indole-2,3-dione-3-xime. a: $p< 0.05$ vs. control; b: $p< 0.05$ vs. GABA.

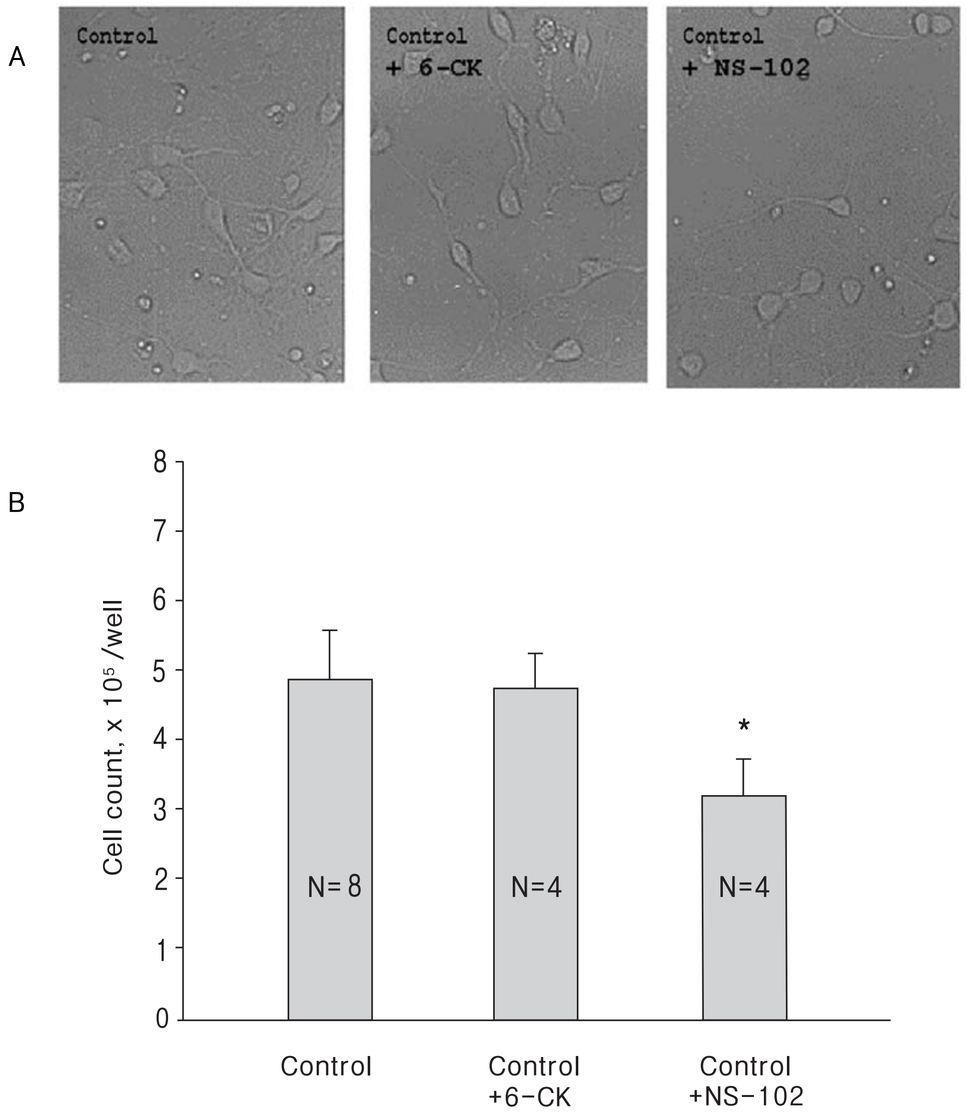

Fig. 3. Phase-contrast photomicrographs (A, x 200) and cell viability (B) of 9 days in vitro in the culture conditions including AMPA receptor antagonist, 6-cyclokynurenic acid (6-CK, 10 μM) or kainate receptor antagonist, NS-102 (10 μM) in neurobasal medium (control) in the developing rat hippocampal neurons. * $p < 0.05$ compared to control group.

및 길항제를 처리한 후 신경세포의 성장을 관찰한 결과 kainate 수용체를 통한 신경세포의 성장유지 효과가 높게 나타났으며, NMDA 수용체를 통한 성장유지효과는 상대적으로 미약하여 Lerma 등[12]의 보고와 간접적으로 일치하는 양상이었다. 이는 배양 초기 해마신경세포에서 NMDA 수용체의 발현은 비교적 약하여 세포의 흥분에 주된 인자로 관여하지는 않으며, 배양 초기에는 해마신경세포에서 kainate 수용체에 의해 흥분 및 성장이 유도됨을 보여주는 소견이다. 배양 초기 해마

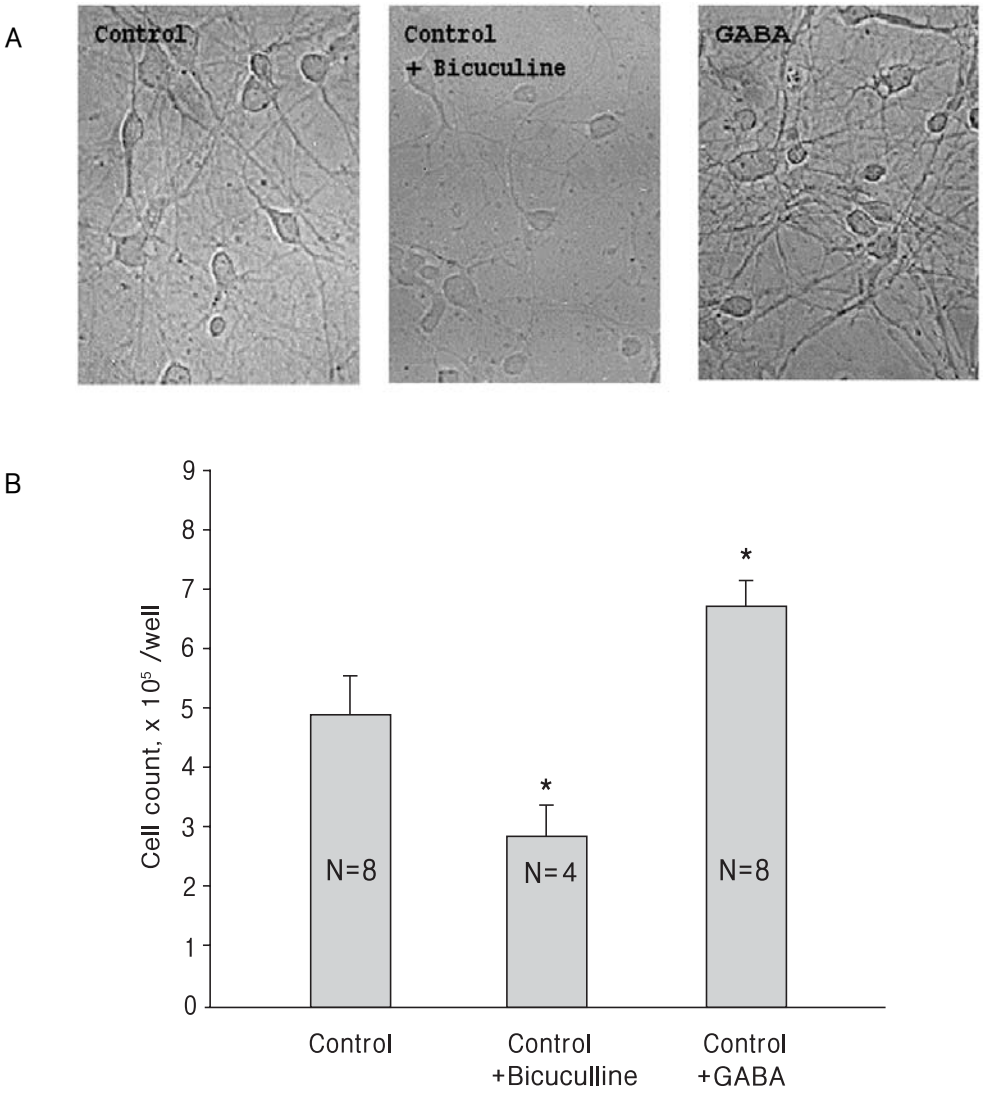

Fig. 4. Phase-contrast photomicrographs (A, x 200) and cell viability (B) of 9 days in vitro in the culture conditions including GABA receptor antagonist, bicuculline (10 μM) or GABA receptor agonist, GABA (25 μM) in neurobasal medium (control) in the developing rat hippocampal neurons. * $p < 0.05$ compared to control group.

신경세포의 BDNF mRNA 발현에 미치는 glutamate 수용체들의 역할을 보고한 다른 보고자들도 여러가지 glutamate 수용체 작용물질을 처리하였을 때 kainate에 의한 BDNF mRNA 발현이 가장 뚜렷하게 나타난다고 하였다[1,13,14]. 동시에 non-NMDA 수용체 길항제는 kainate에 의한 BDNF mRNA 발현을 억제하는 보고[1,13]와 비교하였을 때 이 실험에서 glutamate와 함께 CNQX를 첨가한 군에서 세포수가 50% 이상 감소하였으며, NS-102로 처치시 세포수가 감소한 결과와 일치하는 소견이었다.

다른 의미에서 kainate와 함께 glutamate나

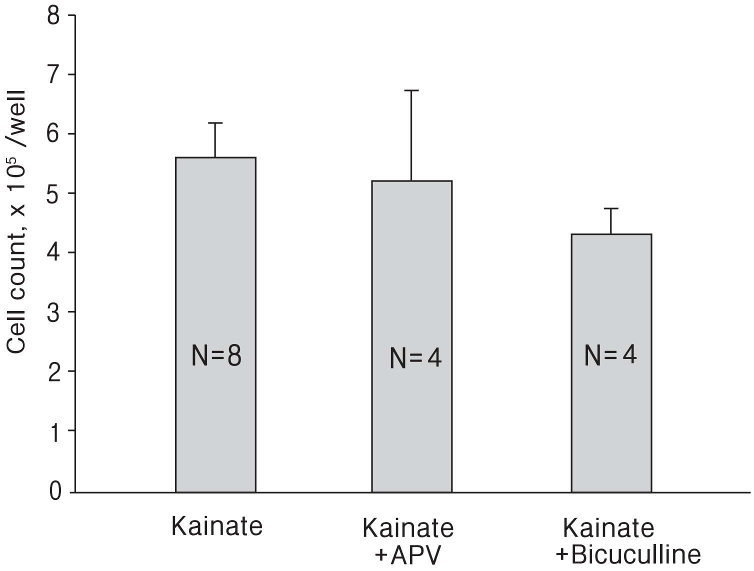

Fig. 5. Cell viability in the culture conditions including NMDA receptor antagonist, APV (10 μM) or GABA receptor antagonist, bicuculline (10 μM) in kainate (25 μM) containing neurobasal medium (kainate) in the developing rat hippocampal neurons.

AMPA를 동시에 처리했을 때 BDNF mRNA 발현이 오히려 kainate 단독 처리시 보다 감소된 양상을 보인다는 문헌[14]과도 연관된다고 보여진다. 홍영수 등[14]은 이러한 결과를 배양 해마 신경세포에서 glutamate 수용체들간 상호작용에 의해 kainate 단독 처리시 보다 kainate 수용체에 미치는 효과가 억제된 것으로 설명하였다. 그 기전으로 glutamate나 AMPA는 AMPA 수용체에 작용하여 이를 활성화시키고 활성화된 AMPA 수용체는 kainate 수용체의 탈감화(desensitization)를 유발함으로써 kainate 수용체의 활성을 억제시킨 결과로 설명하였다[15-19]. 이 실험에서도 배양액에 AMPA를 첨가시 세포수의 현저하게 감소하고, 배양액에 AMPA 길항제를 처치시 세포의 수는 변동이 없으면서 LDH 활성도가 유의하게 증가한 양상은 이러한 보고와 동일한 기전의 결과로 생각되나 이 실험으로는 AMPA 수용체에 의한 세포독작용의 결과를 배제할 수는 없어 추후 추가적인 실험이 필요하리라 생각된다.

일반적으로 신경세포에서 GABA는 억제성 신경전달물질로 작용하는 것으로 알려져 있으나 특수한 경우에 GABA가 흥분성으로 작용할 수 있다는 보고들이 있다[20-22]. 태아쥐 및 신생쥐에서 GABA는 흥분성으로 작용하며[23-25], 성숙을 촉진하는 인자로 작용한다[25,26]. 이는 이 시기에 glutamate 수용체는 발현이 미성숙된 상태이므로 GABA수용체가 흥분성 역할을 대신할 것이라는 주장을 뒷받침한다[27]. 그러나 미성숙된 신경세포에서도 GABA에 의한 탈분극은 직접 활동전압을 유발하거나 흥분성 시냅스 전류를 유발하므로서 흥분성으로 작용할 수도 있지만 경우에 따라 다른 흥분성 시냅스 전류와 동시에 $GABA_A$ 수용체가 흥분되면 chloride에 대한 막전도가 증가되어 흥분성 신호를 단락(shunt)시키므로서 오히려 억제성으로 작용할 수 있다[11].

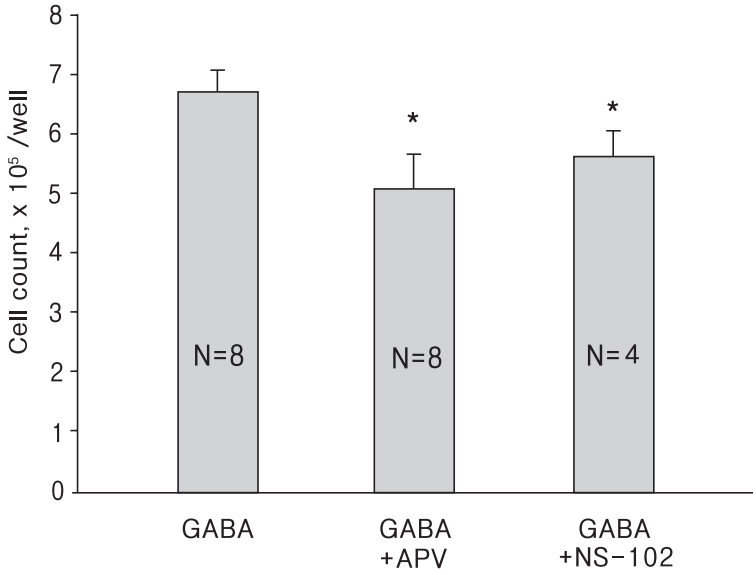

Fig. 6. Cell viability in the culture conditions including NMDA receptor antagonist, APV (10 μM) or kainate receptor antagonist, NS-102 (10 μM) in GABA (25 μM) containing neurobasal medium (GABA) in the developing rat hippocampal neurons. * $p < 0.05$ compared to GABA group.

이 실험에서 해마신경세포의 배양 초기에 GABA 수용체의 작용은 신경세포를 흥분시켜 성장을 촉진하는 결과를 보여 태아쥐 및 신생쥐에서 GABA는 흥분성으로 작용하며 성숙을 촉진하는 인자로 작용한다는 보고들과 일치 한다[23-26]. 그러나 신생쥐에서 glutamate 수용체는 발현이 미성숙된 상태이므로 GABA수용체가 흥분성 역할을 대신할 것이라는 설명[27]과는 완전히 일치하지는 않는다. 저자의 실험결과는 배양 초기에 glutamate 수용체중 NMDA 수용체의 역할이 상대적으로 미약함을 나타내지만 kainate 수용체가 그 역할을 담당하는 것으로 판단되며, 배양 초기의 해마신경세포에서 기능을 나타내는 glutamate 수용체는 kainate에 친화력이 높은 subunit들로 구성된다고 한 Lerma 등[12]의 보고와 부합한다. 따라서 배양 초기 해마신경세포의 성장에 GABA 수용체 및 kainate 수용체 모두 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

LDH 활성도는 세포사의 정도를 나타내는 지표로 사용된다[28]. 그러나 이 실험에서 각 조건에서의 신경세포수와 LDH의 결과는 완전히 일치하지 않았다. 이는 신경세포수가 일정하지 않은 조건에서 LDH 활성도의 비교는 상대적인 의미가 감소하는 것으로 판단되며, 이 실험에서는 AMPA 수용체 길항제를 처치한 군에서 대조군과 비교하여 신경세포의 수는 비슷하지만 LDH 활성도가 증가한 결과가 유의할 것으로 생각된다.

신경세포에 대한 흥분적 작용 뿐만 아니라 신경독작용에서 세포내 Ca^{2+} 농도는 직접적인 연관성이 있다[29]. 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가할 수 있는 경로는 세포막에 존재하는 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로, Na^{+}/Ca^{2+} exchanger, NMDA 수용체 뿐만 아니라 세포내 미토콘드리아 등에 저장되어 있는 Ca^{2+}을 분비하는 ryanodine 수용체 등으로 다양하다[30]. 그러나 실험적으로 세포외액의 Ca^{2+}을 제거했을 때[29,31,32]나 막전압 의

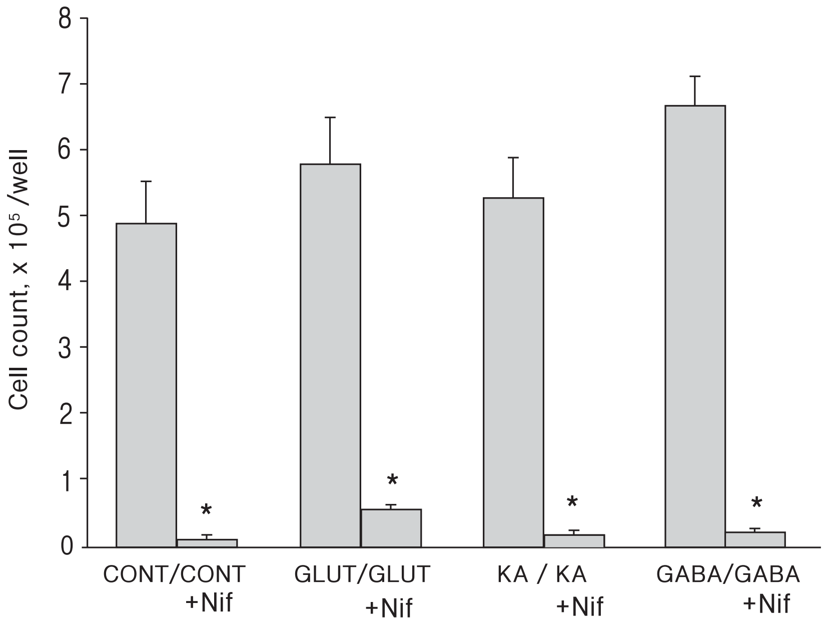

Fig. 7. Cell viability in the culture conditions including voltage dependent Ca^{2+} channel blocker, nifedipine (Nif, 25 μM) in neurobasal medium (control, CONT), glutamate (GLUT, 25 μM), kainate (25 μM) and GABA (25 μM) -containing medium, respectively, in the developing rat hippocampal neurons. * $p < 0.01$ paired comparison in each group.

존성 Ca^{2+} 통로를 차단했을 때[14]에는 kainate 등을 처리하여도 신경독작용에 따른 반응이 유발되지 않거나 억제됨으로써 신경전달물질에 의한 세포의 흥분에는 세포외에서 유입되는 경로가 상대적으로 중요하다고 생각된다. 저자의 실험에서도 glutamate와 kainate, GABA를 첨가한 세포에서나 첨가하지 않은 세포 모두에서 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 차단제를 처치한 경우 신경세포의 성장은 거의 억제되어 배양 초기 신경세포의 성장에는 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입이 중요한 인자이며, NMDA 수용체 길항제를 투여시 세포의 성장에는 영향을 미치지 않으므로 NMDA 수용체의 역할은 상대적으로 낮을 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 해마신경세포의 배양시 glutamate 투여가 초기 신경세포의 성장에 미치는 영향에서 NMDA수용체의 역할은 상대적으로 크지 않으며, 주로 kainate 수용체를 통하여 이루어 지는 것으로 보인다. 동시에 GABA는 해마신경세포의 성장에 중요한 흥분성 영향을 미치는 것으로 생각된다. 따라서 태아쥐를 이용한 해마신경세포의 분리시 기본적인 배양액에 glutamate와 함께 GABA의 첨가는 세포의 성장을 촉진시킬 수 있으리라 생각된다.

요 약

GABA(γ-aminobutyric acid)는 포유동물의 중추신경계에서 중요한 억제성 신경전달물질 중의 하나이지만 developing neuron에 GABA를 투여하면 세포질내의 calcium ion의 증가와 세포의 흥분성이 관찰된다. 일반적으로 glutamate가 신경세포에 미치는 효과는 NMDA 수용체 및

AMPA 수용체가 관여한다. 그러나 배양 초기단계의 신경세포에서는 NMDA 수용체의 발현이 미숙하므로 glutamate의 작용이 충분히 발휘되지 않을 수 있다. 이 연구에서는 초기 배양 해마 신경세포에서 GABA가 세포막을 탈분극시키는 흥분성으로 작용한다면 glutamate의 작용에 있어 NMDA 수용체를 활성화시키는 기전으로 작용하므로써 신경세포의 성장을 촉진할 수 있을 것이라는 가설을 실험으로 검증하고자 임신 17 18일째의 태아쥐에서 해마신경세포를 분리하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하면서 4일 및 9일째에 실험을 실시하였다.

실험의 조건은 세포 배양액에 첨가물이 함유되지 않은 대조군과 첨가물로 glutamate 및 glutamate 수용체들의 효현제와 길항제, GABA 및 $GABA_A$ 수용체 길항제를 첨가하여 배양한 세포군으로 하여 신경세포의 성장을 관찰하고, 세포의 활성도를 측정하였다.

배양액에 glutamate나 NMDA, kainate가 포함된 신경세포군은 대조군과 비교하여 세포의 성장에는 큰 차이가 없었으나 AMPA를 투여한 군은 세포성장이 매우 억제되었다. Glutamate 첨가군에서 NMDA 수용체 길항제는 세포의 성장에 별다른 영향을 주지 못하였으나 non-NMDA 수용체 길항제는 세포의 성장을 억제하였다. 배양액에 GABA를 투여한 경우 세포의 성장은 촉진되었으며, $GABA_A$ 수용체 길항제는 신경세포의 성장을 유의하게 억제하였다. 세포의 성장에 Ca^{2+}이 필요한 지를 보기위하여 Ca^{2+} 차단제인 nifedipine을 투여한 모든 군에서 세포의 성장은 거의 억제되었다.

이상으로 배양 해마신경세포에서 glutamate가 초기 신경세포의 성장에 미치는 영향에서 NMDA수용체의 역할은 상대적으로 크지 않으며, 주로 kainate 수용체를 통하여 이루어 지는 것으로 보인다. 동시에 GABA는 해마신경세포의 성장에 흥분적 영향을 미치는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 1990;**9**(1):3545-50.
2. Castillo PE, Malenka RC, Nicoli RA. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 1997; **388**(6638):182-6.
3. 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.
4. Asztely F, Gustafsson B. Ionotropic glutamate receptors. *Mol Neurobiol* 1996;**12**(1):1-11.
5. 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**:C1726-34.
6. 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.
7. 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.
8. Bowery NG, Brown DA. The cloning of GABA receptors. *Nature* 1997;**386**(20):223-4.
9. Bormann J. Electrophysiology of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor subtypes. *Trends Neurosci* 1988;**11**(3):112-6.
10. Sivilotti L Nistri A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 1991;**36**(1):35-92.
11. Chen G, Trombley PQ, van den Pol AN. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic

neurons. *J Physiol* 1996;**494**(2):451-64.

12. Lerma J, Paternain AV, Naranjo JR, Mellstr m B. Functional kainate-selective glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Pro Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:11688-92.
13. Wetmore C, Olson L, Bean A. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and release from hippocampal neurons is mediated by non-NMDA type glutamate receptors. *J Neurosci* 1994;**14**(3):1688-700.
14. 홍영수, 배재훈, 송대규, 임정근, 박원균. Kainate 수용체를 통한 신경독작용에서 BDNF mRNA 발현과 Ca^{2+} 유입경로. *항공우주의학* 1999;**9**(2):198-206.
15. Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML, Buonanno A. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* 1993;**11**(6):1069-82.
16. Patneau DK, Vyklicky L, Mayer ML. Hippocampal neurons exhibit cyclothiazide-sensitive rapidly desensitizing responses to kainate. *J Neurosci* 1993;**13**(8):3496-509.
17. Trussell LO, Zhang S, Raman IM. Desensitization of AMPA receptors upon multiquantal neurotransmitter release. *Neuron* 1993;**10**(6):1185-96.
18. Sharp RL, May PC, Mayne NG, Snyder YM, Burnett JP. Cyclothiazide potentiates agonist responses at human AMPA/kainate receptors expressed in oocytes. *Eur J Pharmacol* 1994;**266**(1):R1-2.
19. Fedele E, Raiteri M. Desensitization of AMPA receptors and AMPA-NMDA receptor interaction: an in vivo cyclic GMP microdialysis study in rat cerebellum. *Br J Pharmacol* 1996;**117**(6):1133-8.
20. Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 1991;**14**(12):515-9.
21. Gaiarsa JL, McLeans H, Congar P, Leinekugel X, Khazipov R, Tseeb V, *et al.* Postnatal maturation of gamma-aminobutyric acid A- and B-mediated inhibition in the CA3 hippocampal region of the rat. *J Neurobiol* 1995;**26**(3):339-49.
22. LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJS, Davis MBE, Kriegtein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 1995;**15**(6):1287-98.
23. Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons. *J Physiol* 1989;**416**:303-25.
24. Ben-Ari Y, Tseeb V, Raggozzino D, Khazipov R, Gaiarsa JL. Gamma-aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurons in early postnatal life. *Prog Brain Res* 1994;**102**:261-73.
25. Owens DF, Boyce LH, Davis MBE, 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.
26. Meier E, Drejer J, Schousboe A. GABA induces functionally active low-affinity GABA receptors on cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1984;**43**(6):1737-44.
27. 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.
28. May PC, Robison PM. Cyclothiazide treatment unmasks AMPA excitotoxicity in rat primary hippocampal cultures. *J Neurochem* 1993;**60**(3):1171-4.
29. Mattson M, Lovell M, Furukawa K, Markesbery W. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca^{2+} concentration, and neurotoxocity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal

neurons. *J Neurochem* 1995;**65**(4):1740-51.
30. Conley EC. *The Ion Channel Fast Book II*: intracellular ligan-gated channels. London: Academic Press 1996, p.21-277.
31. Hollmann M, Hartly M, Heinemann S. Ca^{2+} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 1991;**252**(5007):851-3.
32. Yu O, Chuang DM. Neurotrophin portection against toxicity induced by low potassium and nitroprusside in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 1997;**68**(1):68-77.

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-단백 의존성 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