KISEP Esperimental Researchs J Korean Neurosurg Soc 29 : 1429-1436, 2000

일차 배양 해마신경세포에서 NMDA- 및 Glutamate- 유도전류의 특성

계명대학교 의과대학 신경외과학교실, 생리학교실,*
전북대학교 의과대학 신경외과학교실**
김일만 · 손은익 · 김동원 · 김인홍 · 임만빈
송대규* · 박원균* · 배재훈* · 최하영**

= Abstract =

Characteristics of NMDA- and Glutamate-Induced Currents in Primary Cultured Rat Hippocampal Neurons

Il-Man Kim, M.D., Eun-Ik Son, M.D., Dong-Won Kim, M.D., In-Hong Kim, M.D., Man-Bin Yim, M.D., Dae-Kyu Song, M.D.,* Won-Kyun Park, M.D.,* Jae-Hun Bae, M.D.,* Ha-Young Choi, M.D.**

Departments of Neurosurgery and Physiology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea*
Department of Neurosurgery, Chunbuk National University Medical School, Chunju, Korea

Objectives : This study was performed in cultured rat hippocampal neurons to investigate the acute electrophysiological features of ionotropic glutamate receptors which act as a major excitatory neurotransmitter in mammalian brain.

Method : Glutamate receptor agonists were applied into the bath solution embedding in whole-cell patch-clamp recording of single hippocampal neuron.

Results : In voltage-clamped at -60mV and the presence of 1mmol Mg^{2+}, extracellulary applied NMDA did not induce any inward current. Both the elimination of Mg^{2+} and addition of glycine in bath, however, elicited a NMDA-induced inward current. Mg^{2+} block current was increased gradually in more negative potentials from -30mV, showing a negative slope in I-V plot with Mg^{2+}. Glutamate-induced current represented an outward rectification. A non-NMDA receptor component occupied about 40% of glutamate-induced current in the voltage range of -80mV to +60mV.

Conclusion : Present study suggests that glutamate activates acutely the non-NMDA receptors which induces an inward current in the level of resting membrane potential. This makes the membrane potential increase and can activate the NMDA receptors that permit calcium influx against Mg^{2+} block. At the depolarized state of neuron, there may be recovery mechanisms of membrane potential to repolarize irrespective of voltage-dependent potassium channels in the hippocampal neurons.

KEY WORDS : Hippocampal neuron · Patch clamp · Electrophysiology · Glutamate NMDA receptor · Non-NMDA receptor.

서 론

해마(hippocampus)는 대뇌피질 고유기능의 하나인 기억에 관여하며 세포수준에서 기억의 기전은 장기강화(long-term potentiation)이다[3)9)]. 기억의 과정에서 일차적으로 관여하는 신경전달물질은 glutamate로 알려져 있으며 이는 포유류의 대표적인 흥분성 신경전달물질이다[8)25)]. Glutamate

수용체들은 친이온성수용체와 친대사성수용체로 구분되며 친이온성수용체는 양이온들이 통과하여 세포막전압에 영향을 주는 일종의 리간드 - 개폐성 이온통로(ligand - gated ion channels)를 구성하며 그 특성상 NMDA(N - methyl - D - aspartate) 수용체와 non - NMDA 수용체로 나눈다[20]. NMDA 수용체는 glutamate 또는 NMDA에 의해 자극되어 신경세포내로 Ca^{2+}을 유입시켜 세포내 신호전달계의 매개체 역할을 하도록 한다[5]. 정상적인 glutamate 수용체들의 발현은 기억과 신경계 발달에는 필수적이나 치매, 뇌허혈 및 간질 등의 뇌질환에서는 수용체 과다항진에의한 흥분성신경독작용으로 신경세포의 괴사(necrosis)나 세포고사(apoptosis)를 초래한다[1)22)24)]. NMDA 수용체는 입체구조상 세포외면에 glutamate 부착부위와 독립적인 glycine 부착부위를 가지며 수용체내부에는 Mg^{2+} 부착부위가 있어[17] 이온통로의 개폐에는 Mg^{2+}이 관여하고 보조활성인자로 glycine이 필요하다고 알려져 있다[4)16)]. Non - NMDA 수용체는 AMPA(α - amino - 3 - hydroxy - 5 - methyl - 4 - isox - azole propio - nate) 수용체와 kainate 수용체로 분류되며 친대사성 수용체는 G - 단백질(G - protein)과 연관되어 세포내 저장형 Ca^{2+}을 유리시켜 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시킨다고 밝혀져 있다[10].

뇌해마는 간질 및 허혈성 뇌질환에서 빈번히 침범되므로 해마 신경세포에서 흥분성 신경전달물질 수용체의 전기생리적 특성을 밝히는 것은 의의있는 일이며 현재까지의 많은 연구는 생리적 상태가 아닌 특정 수용체만 활성화할 수 있는 개개의 세포상태에서 시행되어 수용체의 많은 특성을 얻을 수 있었다. 그러나 많은 이온통로들이 공존하는 상황에서 한 수용체의 기능을 파악하기란 어렵고 실제 병리적 상태에서와 같이 모든 glutamate 수용체가 흥분했을 때의 반응은 매우 다양하고 복잡하여 아직도 연구중이다.

본 연구에서는 현재까지의 *in vitro*에서의 수용체 연구가 생리적 상태와 비슷하게 시냅스전뉴론에서 glutamate가 분비되었다고 가정하고 시냅스후뉴론의 신경세포체에서 일어나는 모든 전기생리적반응 즉 해마 단일 신경세포의 총전류를 살펴보고자 하였다. 위 반응가운데 NMDA 및 non - NMDA 수용체의 전기적 특성이 어느 정도인지 관찰하고 각 수용체의 차단제, 친화제 및 길항제를 투여하면서 각각의 막전압에 따른 세포막전류를 구하고 각 수용체의 기여도, 활성 및 억제의 기전을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 해마신경세포의 분리와 배양

임신 17 18일된 Sprague - Dawley종 흰쥐를 에테르 흡입마취하에서 무균적으로 복강을 절개한 후 태자를 취하고 단두하여, 4 10℃로 냉각시켜 놓은 Hank′s balanced salt solution〔Ca^{2+}, Mg^{2+}이 들어 있지 않으며 1mmol pyru - vate와 10mmol HEPES(N - 2 - hydroxyehtylpiperazine - N^1 - 2 - ethane sulfonate)를 첨가해 pH 7.4로 맞춤〕(이하 HBSS라 함)에 담구어 대사를 억제시킨 상태에서 뇌해마를 적출하여 별도의 HBSS 용액으로 세척하였다.

절제된 해마조직에 0.25% trypsin - EDTA(ethylenedia - mine tetraacetic acid)를 처리한 후 37℃ 수조에서 25분간 정치하여 결체조직과 세포간응집을 제거시켜 신경세포 분리가 쉽도록 하였다. 이후 깨끗한 HBSS 용액속에서 해마조직을 파스퇴르 피펫으로 반복흡인하여 기계적분쇄를 한 다음 1000rpm 속도로 2분간 원침하여 상층액은 제거하였다. 이 과정을 2 3회 반복하여 순도가 높아진 해마신경세포 침전물을 glutamate(25 μmol)를 첨가한 신경세포 특이적인 배양매질(Neurobasal medium®)[7]에 부유시켰다. 이 세포부유액 10 μL에 trypan blue(25 μL)와 HBSS(15 μL) 혼합액을 첨가하여 5배 희석한 후 현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 세포수를 산정하였다.

Poly - D - lysine을 1시간 처리한 후 건조시킨 15×2mm 크기의 덮개유리 10개를 직경 35mm 배양접시에 깔고, 배양접시당 2×10^6개의 세포를 뿌려 안치시킨 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 해마신경세포의 수상돌기가 자라는 것을 확인하면서 배양 4일째 glutamate가 들어 있지 않는 배양매질 10mL에 B - 27(200 μL), 200mmol L - gl - utamine(25 μL), 14.3mmol mercaptoethanol(17.5 μL) 및 100mg/mL penicillin과 streptomycin 혼합항생물질(1 μL)을 첨가한 용액으로 처음 배양액의 반을 교체하였다.

전기생리학적 측정은 10일 이상 배양하여 신경돌기가 2 3개 발생한 추체신경세포가 놓여 있는 하나의 덮개유리를 도립현미경이 장치된 실험조에 옮겨 실험하였다.

Neurobasal medium®과 B - 27은 Gibco - BRL Lab사(미국)의 제품이고 그외의 시약들은 Sigma사(미국)의 것이다.

2. 전기생리학적 측정

일차 배양된 해마신경세포의 세포막이온통로의 전류는 표준적인 whole - cell patch - clamp 방법[11]으로 측정하였고, 실험조의 세포외액성 관류액은 2mmol $CaCl_2$, 1mmol $MgSO_4$, 5mmol KCl, 135mmol NaCl, 17mmol glucose, 10mmol HEPES 및 50mmol sucrose로 조성되었고 NaOH로 pH 7.4가 되게 적정하였다. 실험조는 30℃를 유지하고 관류액을 분당 2mL의 속도로 관류되도록 한 상태에서 배양세포가 부착된 덮개유리를 안치하고 20분 정도 안정시킨 후 측정하

였다. Mg^{2+}이 필요없는 경우에는 관류액에서 $MgSO_4$를 제거하였다.

미세유리전극은 borosilicate 미세피펫(Narishige사, 일본)을 사용하였고, micropipette puller(Narishige사, 일본)을 이용하여 미세유리전극을 만든 후 피펫의 끝은 열코일로 연마(fabrication)하여 신경세포와의 접촉이 쉽도록 하고 피펫끝은 sylgard로 처리하여 정전용량을 최대한 줄였다. 제작된 미세유리전극의 평균저항은 3 5Mω으로 측정되었고 내부는 112mmol KCl, 2mmol $MgCl_2$, 0.1mmol $CaCl_2$, 11 mmol EGTA, 10mmol HEPES 및 2mmol ATP_{Na}로 조성된 세포내액성 용액으로 충진하였다.

미세조작기로 미세전극을 신경세포막에 부착하고 음압을 가하여 파열시키면, 해마 신경세포내부는 피펫내의 충진용액과 섞여 평형상태에 도달하여 총 전류가 형성되는 상태가 되면 자발성 시냅스전류가 발생한다. 필요에 따라 ramp pulse를 사용하여 세포막전압을 변화시켰으며 미세유리전극을 통한 세포막 시냅스전류는 Axopatch 200A(Axon사, 미국)로 모아 증폭하고, 변환기 Digidata 1200A(Axon사, 미국)와 VR - 10B pulse modulator(Instrutech사, 미국)를 경유하여 개인용컴퓨터와 비디오테이프에 저장하였다가 pClamp 6.04(Axon사, 미국) 프로그램으로 분석하였다. 전류신호는 sampling rate 2KHz, filter 5KHz 상태에서 얻었다.

3. 약물처리에 따른 시냅스전류의 기록

자발성 시냅스전류가 발생하는 해마신경세포를 선택하여 원하는 시약을 관류액에 첨가하면서 변화되는 특정이온통로의 유도전류와 차단전류를 기록하였다. Glutamate를 투여하여 모든 glutamate 수용체가 흥분되어 나타나는 총전류를 확인하고, 안정막 전압 상태에서와 세포막전압 변동에 따른 각 수용체의 전류를 규명하였다. NMDA 수용체의 선택적 자극이 필요한 경우에는 NMDA 단독투여 후 glycine과 Mg^{2+} 유무에 따른 전류 변화 및 길항제에 의한 차단전류를 기록하였고, non - NMDA 수용체 전류특성은 길항제를 써서 관찰하였다.

수용체 유도전류의 크기는 수평기저선의 아래로 표시하였고 수직막대의 높낮이는 전압변동시 가해진 전압의 범위를 의미하며, 전류 - 전압 곡선(I - V plot)에서 전류가 전압변화에 따라 크게 변하거나 곡선꺾임이 있는 경우에는 전압의존적이라고 한다.

NMDA 수용체 길항제인 2 - amino - 5 - phosphonopentanoic acid(AP5)와 non - NMDA 수용체의 길항제인 6 - cyano - 7 - nitroquinoxaline - 2,3 - dione(CNQX)은 미국 RBI사의 제품이며, L - 형 Ca^{2+} 통로 차단제인 Nifedipine과 기타 언급하지 않은 시약들은 미국 Sigma사의 것이다.

결　　과

1. 세포외액에 Mg^{2+} 존재시 Glutamate 및 NMDA 유도전류

세포막전압을 - 60mV로 고정하고 해당세포의 총전류가 형성되는 상태가 되면 자발적인 시냅스전류가 나타나는데, 이는 양이온들의 세포내유입에 따른 세포내로의 내향성 전류로서 기저선의 아래쪽으로 표시되며 신경세포체에서 기록되는 흥분성 시냅스후전류(excitatory postsynaptic current)가 될 것이다.

NMDA 수용체 차단제인 Mg^{2+}이 생리적농도(1mmol)로 있는 상태에서 10μmol NMDA를 세포외액성 관류액에 투여한 경우에는 전류가 발생되지 않았으나 10μmol glutamate를 투여하면 즉시 내향성 전류가 야기되었고 이 전류는 관류액에서 glutamate를 제거하면 서서히 소실되었다(Fig. 1).

2. Mg^{2+}의 NMDA 수용체 전류에 대한 영향

관류액에 Mg^{2+}(1mmol)이 존재하는 상태에서 세포막전압을 - 60mV로 고정한 후 NMDA 수용체의 활성보조인자인 5μmol glycine을 10μmol NMDA와 동시투여(NMDA+glycine)하여 얻은 내향성 전류는 Fig. 1에서의 glutamate 유도전류의 양상과는 다르게 깜박거리는 양상을 보였고 NMDA+glycine 투여를 계속 유지하여도 전류는 사라졌다(Fig. 2A). 그러나 NMDA+glycine을 제거하였을 때 실험시 투여한 NMDA+glycine 농도가 생리적 농도보다 커서 어떤 세포에서는 완전히 회복되지는 못하였다.

Mg^{2+}을 제거한 세포외액으로 관류한 상태에서 NMDA+glycine을 투여한 경우에는 Fig. 1에서 관찰되었던 glutamate

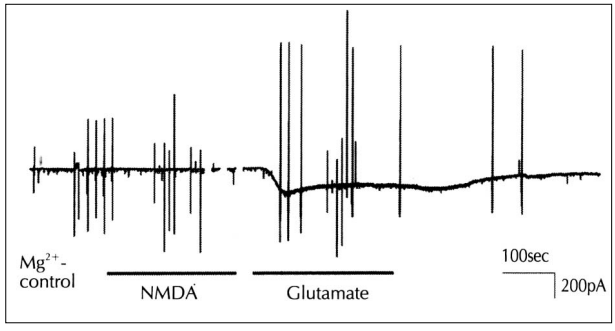

Fig. 1. Inward currents activated by glutamate receptor agonists in a cultured rat hippocampal neuron. NMDA (10μmol) did not elicit a noticable current but glutamate(10μmol) induced an inward current in the presence of 1mmol Mg^{2+}. Whole-cell configuration was clamped at - 60mV. Vertical bars are on time when ramp pulse from - 80mV to +60mV was injected.

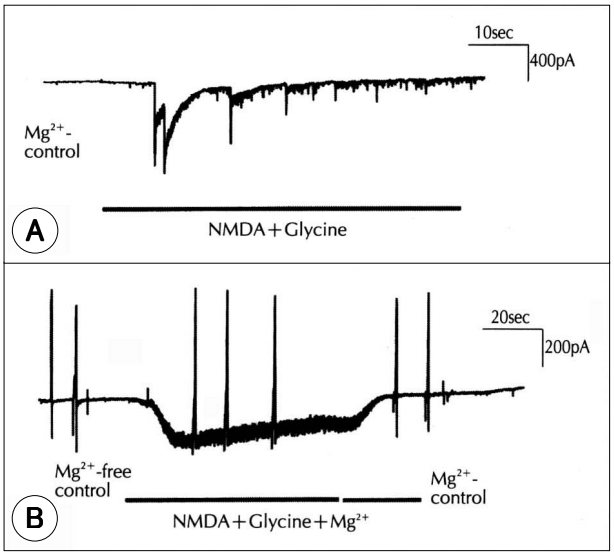

Fig. 2. Both NMDA(10 μmol) and glycine(5 μmol)-induced current with(A) or without(B) 1mmol Mg^{2+} in a cultured rat hippocampal neuron. Whole-cell configuration was clamped at -60mV. Vertical bars in B are on time when ramp pulse was injected.

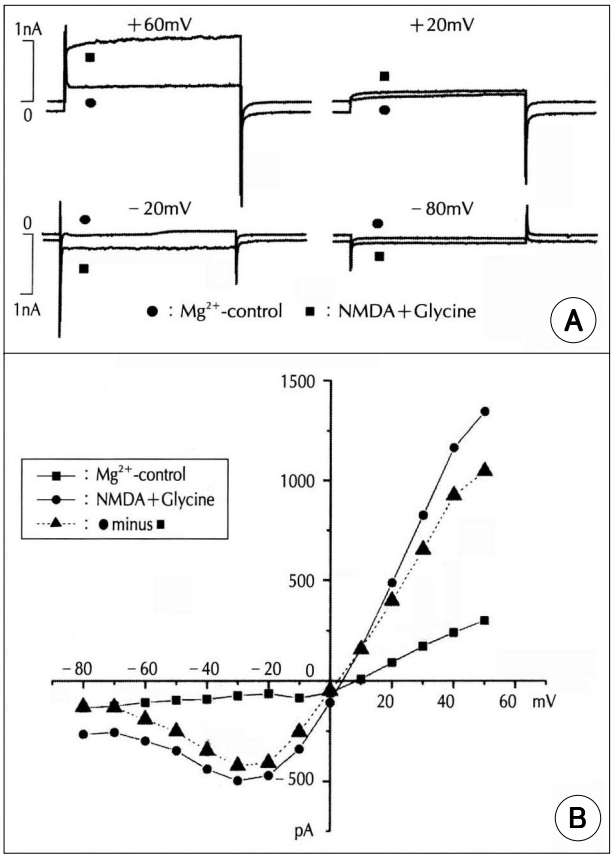

Fig. 3. Both NMDA(10 μmol) and glycine(5 μmol)-induced current in the presence of 50 μmol Mg in a cultured rat hippocampal neuron. A : Inward or outward currents according to the change of membrane potentials elicited by NMDA and glycine application. B : I-V plot for NMDA and glycine-induced current with Mg^{2+}.

유도전류와 비슷한 양상의 내향성 전류가 형성되었으며, 이 전류는 Mg^{2+}의 단독투여로 차단되어 NMDA 유도전류로 확인되었다(Fig. 2B).

3. 세포막전압 변화에 의한 Mg^{2+}의 NMDA 수용체 전류의 차단

세포막전압을 -60mV로 고정하고 관류액에 50 μmol Mg^{2+}이 존재하는 상태에서 10 μmol NMDA와 5 μmol glycine의 동시투여시 약간의 내향성전류가 유지되었다. 막전압을 -100mV에서 +60mV까지 10mV씩 변화시킨 경우에는 세포막이 탈분극쪽으로 갈수록 내향성 전류는 증가하고, -30 mV를 기점으로 과분극시에는 같은 크기의 탈분극에 비해 내향성 전류는 현저히 감소하였으며 평형전압은 약 0mV였다.

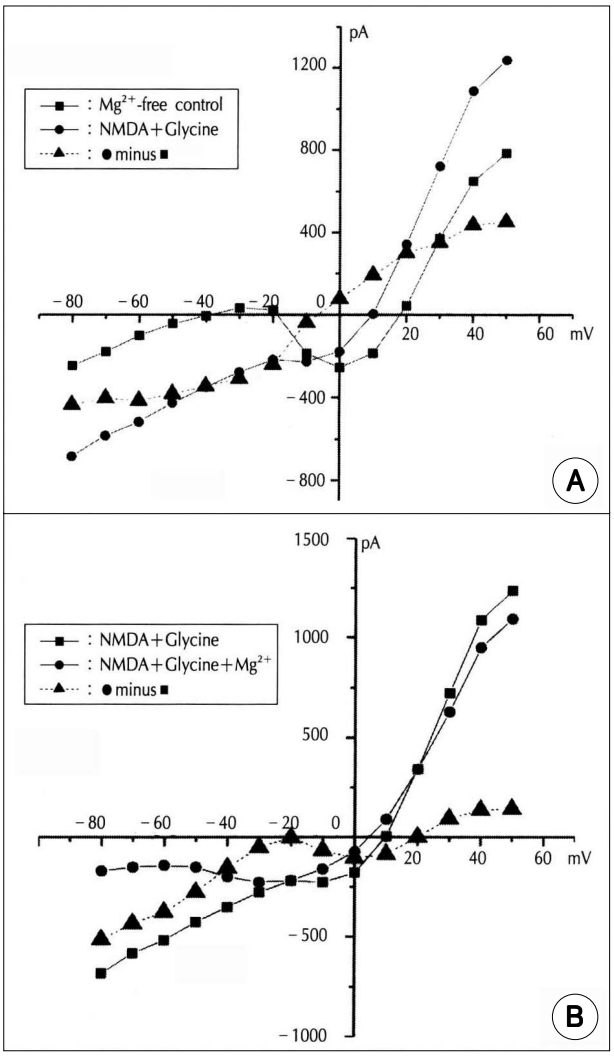

Fig. 4. Effect of 50 μmol Mg^{2+} on both NMDA)10 μmol) and glycine(5 μmol)-induced current. A : I-V plot for NMDA and glycine-current(▲) without Mg^{2+}. B : I-V plot for the amount of Mg^{2+}-sensitive NMDA current.

Mg^{2+}이 NMDA 수용체전류 차단하는 효과는 -30mV부터 관찰되었으며 과분극이 커질수록 차단효과는 커져 -70 mV정도에서 최대효과를 나타내었다(Fig. 3). -30mV에서부터 양전압 범위에서는 전류차단이 거의 없는 것으로 나타났다. Mg^{2+}을 제거한 경우에 NMDA 수용체전류의 전류-전압 곡선은 Mg^{2+}이 존재할 경우와는 달리 -30mV 이하에서의 내향성전류의 차단현상이 없어 막전압 비의존적인 형태를 보였다(Fig. 4).

4. Non-NMDA 수용체 전류의 특성

세포막전압을 -60mV로 고정하고 10 μmol glutamate을 투여하여 내향성전류를 유도한 후 NMDA 수용체 길항제인 APV(50 μmol)를 투여하여서는 glutamate 유도전류의 반응은 거의 없어 glycine 없이는 glutamate에 의해 NMDA 수용체는 활성화되지 않음을 확인하였다. 그러나 non-NMDA 수용체 길항제인 CNQX(10 μmol)을 투여하면 glutamate 유도전류는 약 40%정도가 감소하였다. 칼슘통로 차단제인 nifedipine(10 μmol) 투여시에는 매우 적으나 더욱 감소하였다(Fig. 5).

기저상태의 전류를 감한 glutamate 투여에 의한 순전류(I *glutamate* - I *control*)는 평형전압이 약 +20mV이고 세

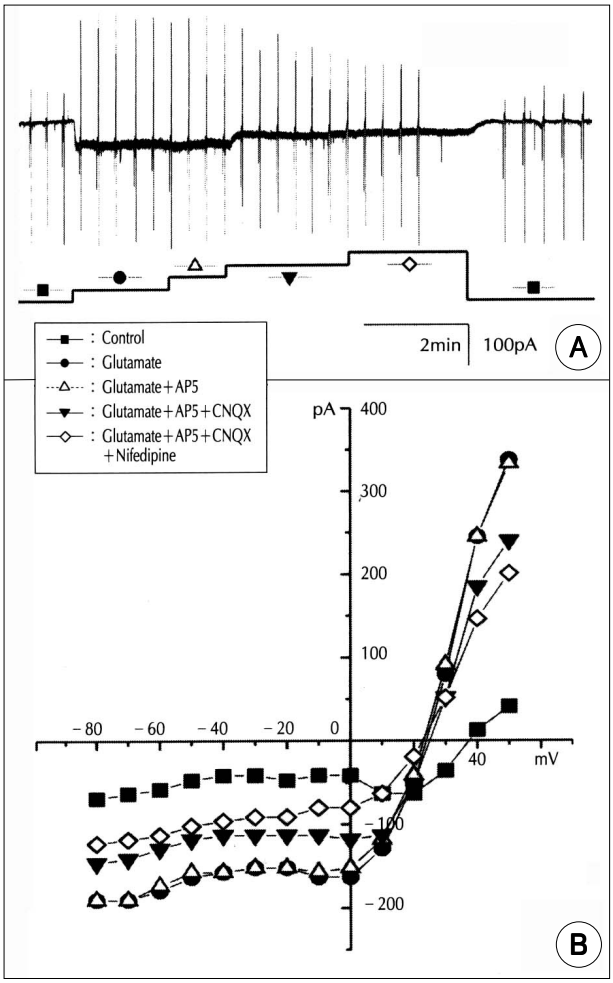

Fig. 5. Effect of glutamate receptor antagonists and nifedipine on glutamate-induced current. A : Glutamate-induced inward current was partially eliminated by its antagonists ; AP5(50 μmol), CNQX(10 μmol) and nifedipine(10 μmol) were applied subsequently. Vertical bars are on time when ramp pulse was injected. Whole-cell configuration was clamped at -60mV. B : I-V plots recorded from ramp pulse during the ramp pulses in serial drug application.

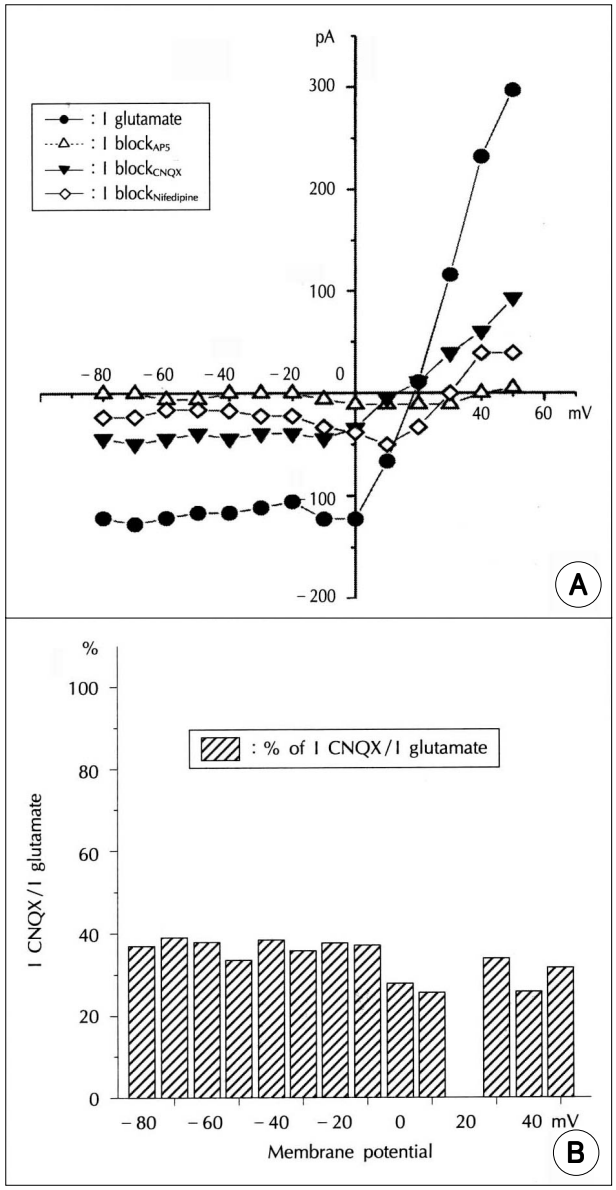

Fig. 6. Effect of glutamate receptor antagonists and nifedipine on glutamate-induced current. A : Current-voltage relationships representing the block currents by each drug. B : Percentage values of CNQX-dependent current in overall glutamate current.

포안으로 보다 세포 밖으로 잘 흐르는 외향성정류현상(outward rectification)을 보였고 음전압 쪽에서는 일정크기의 전류만이 나타났다. CNQX에 의해 차단되는 non-NMDA 전류도 평형전압이 +10mV로 glutamate와 큰 차이가 없었으며 비슷한 외향성정류현상을 보였다. Nifedipine 투여로 감소한 전류로부터 얻은 칼슘통로 전류는 평형전압이 약 +30 mV로 특징적인 종모양의 전류-전압 곡선을 보여 전형적인 막전압의존성전류로 나타났다(Fig. 6A). 세포막 전압의 변화에 따른 glutamate 유도 총전류에 대한 CNQX 차단전류의 비율은 막전압의 변동에 무관하게 약 40%정도로 일정하게 나타나 막전압 비의존성임을 확인하였으며 양전압 범위에서는 차단정도가 약간 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6B).

고 찰

중추신경계의 손상에서 흥분성 신경전달물질인 glutamate의 과다분비와 glutamate 수용체의 과잉발현은 흥분성 신경독작용의 중요한 기전이 된다. 본 연구는 포유류의 중추신경계에서 중요한 신경전달물질의 하나인 glutamate 자극에 의해 흰쥐의 단일 해마신경세포에서 초기에 나타나는 세포막 수용체 전류를 분석하고자 하였다. Glutamate 수용체 중 NMDA 수용체는 막전압의존성이며[2)15)21)] 수용체의 개폐와 활성화를 위해서는 보조인자인 glycine이 필수적인 것으로 알려져 있다[13)]. 본 실험에서도 세포막의 안정막전압 수준에서 NMDA의 단독투여는 해마신경세포에서 어떠한 유발전류를 일으키지 않았으나 glycine과 함께 투여한 경우에는 glutamate 경우와 유사한 내향성 전류를 관찰하였다. Glutamate에 의한 유도전류는 즉각적이고 쉽게 회복되는 특성을 보였으며 NMDA 단독 투여시의 결과로 보아 non-NMDA 수용체를 통한 전류임을 알 수 있었다. Glycine은 기능상 억제성신경전달물질로 작용하며[19)] 외부에서 인위적인 glycine 투여없이는 NMDA 수용체가 탈분극상태에서도 활성화되지 않는 것으로 보아 해마의 일차 배양신경세포에서는 인접 흥분성 시냅스의 NMDA 수용체에 영향을 줄 만한 많은 양의 glycine이 분비되지 않거나 분비되더라도 세포외액으로 희석된 것으로 생각된다.

NMDA와 glycine의 동시투여에 의한 전류는 대상 신경세포의 전체 NMDA 수용체의 전류의 합으로 판단되며 이 전류는 NMDA 수용체 차단제인 Mg^{2+}의 유무에 따라 발생하였다. NMDA 수용체의 전류는 glutamate 유도전류와는 다르게 깜박거림 양상를 보였고 수용체의 친화제가 계속 존재하는 상태에서도 결국 소실되었다. 이는 안정막 전압이 유지되는 상태에서 친화제의 투여로 열린 NMDA 통로가 Mg^{2+}에 의해 차단되고 다시 열리는 과정이 반복되다가 시간이 지남에 따라 모든 통로가 닫혀 이온의 이동이 불가능한 것을 의미한다. 세포막전위 변화에 의한 활동전압의 발생은 흥분성 신경세포가 신호전달 및 세포기능을 수행하는 수단이 되는데 이 실험에서는 세포막전압을 +80mV에서 -60mV로 변동하였으며 NMDA 수용체 전류는 생리적 농도의 Mg^{2+}에 의해 막전압이 -30mV 이상의 음전압일 경우에는 과분극쪽으로 갈수록 막전압의존적으로 차단되고 -30mV 미만의 음전압과 양전압 범위에서는 큰 영향이 없음을 확인하였다.

이는 이미 증명된 사실[12)]이나 전압 의존성 Na^{+} 통로 차단제를 사용하지 않은 보다 생리적인 조건으로 시냅스 전달이 이루어지는 상태에서도 관찰할 수 있었음이 의미있다고 판단되는데 NMDA 수용체에 대한 Mg^{2+} 차단은 다른 시냅스에 의해 간섭이나 조절을 받지 않는 고유한 특성임을 암시하기 때문이다. NMDA 통로는 막전압의존성으로 칼슘통로와 함께 세포내로의 칼슘이온 유입의 중요한 경로가 된다. 세포내 칼슘은 정상적인 신경세포간의 신호전달에서는 이차 전령으로 작용하나 과도한 유입 또는 지속적인 농도증가는 세포기능에 치명적인 악영향을 끼친다. 본 연구에서도 NMDA 수용체 전류의 평형전압은 거의 0mV에 가까워 작은 세포막전압의 변화에도 작동하여 모든 양이온을 통과시킬 수 있는 비선택적 양이온 통로임을 보여주었다. 그러나 non-NMDA 수용체와 다르게 안정막 전압수준에서 NMDA 수용체가 활성화되지 않음은 동일 신경전달물질로서 non-NMDA 수용체만을 통한 다른 종류의 신호전달을 할 수 있어 시냅스효율을 높일 수 있을 것이며[14)] 동시에 안정상태에서 세포내로 칼슘유입이 불필요하게 일어나는 것을 방지하는 효과도 있을 것이다.

Glycine이 공급되지 않아 NMDA 수용체가 활성화되지 않은 상태에서 glutamate 투여에 의해 표현된 non-NMDA 수용체전류는 세포막전압에 관계없이 일정하게 관여하는 것으로 관찰되었으며 non-NMDA 통로전류는 막전압 비의존성이라는 다른 보고[23)]와 일치한다. 그러나 기저상태의 전류를 감한 glutamate의 순전류는 외향성정류현상을 보였으며 non-NMDA 전류보다 양전압에서 전류-전압 곡선의 기울기가 크게 나타나며 NMDA 통로전류가 공헌하지 않은 상황에서 이러한 막전압의존적인 현상이 일어남은 NMDA 또는 non-NMDA 전류가 아닌 어떤 전류가 양전압 범위에서 활성화되었다고 할 수 있으나 이 실험으로서는 그 이유를 정확히 알 수 없다. 신경세포에서 자주 관찰되는 또 하나의 전류는 non-NMDA 수용체 활성후 관찰되는 막전압의존성 및 칼슘의존성 Cl^{-}에 의한 것인데 이는 glutamate 또는 non-NMDA 친화제들에 의해 활성화되어 양전압쪽에서 세포내

로 염소이온을 유입시켜 외향성 전류를 야기하고 전류 - 전압 곡선을 외향성 정류화할 수 있다고 한다[6]. 따라서 보통의 경우 세포막의 재분극은 K^+ 통로에 의하지만 해마신경세포의 경우 염소이온에 의해서도 재분극될 수 있을 것으로 보이며 Cl^- 통로는 세포내 칼슘이온의 증가 또는 탈분극에 의해서 열리는데 본 연구에서는 미세전극내 충진액으로 칼슘완충제인 EGTA가 사용됨으로써 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 Cl^- 통로에 작용하였다고 보기는 어렵다. 따라서 glutamate에 의한 전류가 정류현상을 일으키는 현상이 Cl^- 통로에 의한 것이라면 이는 탈분극에 의해 열린 것으로 생각된다. Glutamate 유도전류가 음전압범위에서 일정한 크기의 전류만을 보이는 것은 계속적인 glutamate의 투여로 수용체들이 탈감작화되어 평형상태를 유지하였다고 할 수 있다[18]. 본 실험용액의 이온조성으로 보아 NMDA 수용체가 Na^+, K^+, Ca^{2+} 모두에 투과도가 있고 이 이온들에 대해 비특이적이라고 가정할 때 계산된 평형전압은 5mV 정도인데 이 값은 본 실험의 실측치 0mV와 근접하였고 non - NMDA 수용체는 Na^+와 K^+에만 투과성이 있다고 보면 평형전압이 5.3mV로 계산되어 실측치 10mV로 나온 것은 큰 무리가 없는 것으로 보인다.

칼슘통로의 전류는 특징적인 모양의 전류 - 전압 곡선을 보였으며 - 40mV부터 내향성 전류가 생겨 +33mV를 향해서 다시 줄어들어 이후에는 외향성전류가 발생하는데 이는 막전압의존적인 통로로서 탈분극으로 갈수록 열리는 통로들은 많으나 통로개방의 원동력인 전위차가 작아지므로 +33mV에서 평형전압에 도달하고 그 이상에서는 전압차가 다시 커지면서 외향성 전류가 증가하기 때문일 것이다. 세포막은 탈분극상태에서 칼슘 통로의 개방으로 칼슘유입과 신호전달이 일어나고 과분극에서는 이와 반대의 현상이 일어나는 것으로 알려져 있는데 신경전달물질 glutamate의 분비에 의해 시냅스후뉴론이 흥분성을 띄는 것은 먼저 non - NMDA 수용체의 활성으로 세포막의 탈분극이 유발되고 이어 NMDA 통로가 자극되어 열림으로써 세포내로의 칼슘유입에 의한 것으로 사료되며 이러한 연속적인 non - NMDA 및 NMDA 수용체의 일련의 전기적반응은 세포막의 다른 이온통로에도 영향을 줄 수 있을 것이다.

본 실험에서는 생리적인 시냅스 전달이 있는 상황에서도 NMDA 수용체의 glycine 의존성이나 Mg^{2+}에 의한 막전압의존성 NMDA 수용체 차단현상은 독립적으로 표현되고 non - NMDA 수용체 특히 CNQX에 의해 차단되는 AMPA/kainate 수용체는 막전압비의존적으로 시냅스 전류를 발생시키는 것을 확인하였으며 glutamate에 의해 세포막이 탈분극된 상태에서는 여러 막전압의존성 이온전류들이 발생할 수 있으며 이들이 glutamate - 유도성 흥분성 시냅스 전달의 초기 전류의 구성요소들로 생각된다.

결 론

저자는 백서의 해마신경세포를 일차배양하여 얻어진 단일세포를 대상으로 whole - cell patch - clamp 기술을 이용하여 친이온적 glutamate 수용체의 전기생리적특성과 각 수용체의 작용기전을 밝히고자 하였다. Glutamate에 의해 유발된 NMDA 수용체 전류는 - 30mV 이상의 탈분극상태에서 열려 세포내로의 칼슘 유입에 관여하며 안정막전압을 비롯한 - 30mV 이하의 과분극시에는 Mg^{2+}에 의해 거의 닫혀있을 것으로 보이며 non - NMDA 전류는 Mg^{2+}의 유무나 세포막전압에 관계없이 glutamate에 의해 열려서 안정상태의 세포에 내향성 전류를 야기하여 막전압을 탈분극시키는데 관여하는 것으로 생각된다.

본 실험의 결과는 허혈, 외상 및 간질 등에서 초래되는 신경손상 및 신경방어기전에 대한 전기생리적변화에 기초가 되고 동시에 신경세포손상의 예방 및 치료법 연구에 있어서도 좋은 자료가 될 수 있을 것이다. 향후 glutamate 투여에 의한 NMDA 및 non - NMDA 수용체 이외의 이온통로에 대한 전기생리적 역할과 특성도 함께 연구되어야 할 것이다.

• 논문접수일 : 2000년 7월 12일
• 심사완료일 : 2000년 10월 2일
• 책임저자 : 김 일 만
700 - 712 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 의과대학 신경외과학교실
전화 : 053) 250 - 7823, 전송 : 053) 250 - 7356
E - mail : bach1158@dsmc.or.kr

References

1) Akaike A, Tamura Y, Terada K, Nakata N : *Regulation by neuroprotective factors of NMDA receptor mediated nitric oxide synthesis in the brain and retina. Brain Res 103 : 391-401, 1994*
2) Alford S, Frenguelli BG, Schofield JG, Collingridge GL : *Chracterization of Ca signals induced in hippocampal CA1 neurons by the synaptic activation of NMDA receptors. J Physiol 469 : 693-716, 1993*
3) Artola A, Singer W : *Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. Nature 330 : 649-652, 1987*
4) Aszteley F, Gustafsson B : *Ionotropic glutamate receptors. Mol Neurobiol 12 : 1-11, 1996*
5) Bading H, Gunty DD, Greenberg ME : *Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signalling pathways. Science 260 : 181-186, 1996*

6) Bowie D, Smart TG : *Interplay between expressed non-NMDA receptors and endogenous calcium-activated chloride currents in Xenopus laevis oocytes. Neurosci Lett 151 : 4-8, 1993*
7) Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ : *Optimized survival of hippocampal neurons in B27 supplemented neurobasal™ : a new serum-free medium combination. J Neurosci Res 35 : 567-576, 1995*
8) Castillo PE, Malenka RC, Nicoli RA : *Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. Nature 388 : 182-186, 1997*
9) Collingridge GL, Singer W : *Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. Trends Pharmacol Sci 11 : 290-296, 1990*
10) Golshani P, Warren RA, Jones EG : *Progression of change in NMDA, non-NMDA, and metabotropic glutamate receptor function at the developing corticothalamic synapse. J Neurophysiol 80 : 143-54, 1998*
11) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ : *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflgers Arch 391 : 85-100, 1981*
12) Jahr CE, Westbrook GL : *Physiological approaches to the study of glutamate receptors. In Chad J, Wheal H, Molecular Neurobiology : a practical approach. 1st ed. Oxford, Oxford University Press, 1991, pp49-73*
13) Johnson JW, Ascher P : *Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature 325 : 529-531, 1997*
14) Joels M, Yool AJ, Gruol DL : *Unique properties of non-NMDA excitatory responses in cultured purkinje neurons. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 3404-3408, 1989*
15) Karlsson U, Sundgren AK, Nasstrom J, Johansson S : *Glutamateevoked currents in acutely dissociated neurons from the rat medial preoptic nucleus. Brain Res 759 : 270-276, 1998*
16) Kleckner NW, Dingledine R : *Requirment for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in Xenopus Oocytes. Science 241 : 835-837, 1988*
17) MacDoanld JF, Bartlett MC, Mody I, Pahapill P, Reynolds JN, Salter MW, et al : *Actions of ketamine, phencyclidine and MK 801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. J Physiol 432 : 483-508, 1991*
18) Mayer ML, Vyklicky Jr L : *Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 1411-1415, 1989*
19) Mayer ML, Westbrook GL, Vyklicky Jr L : *Sites of antagonist action on N-methyl-D-aspartic acid receptors studied using fluctuation analysis and a rapid perfusion technique. J Neurophysiol 60 : 645-663, 1988*
20) Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW : *The excitatory amino acid receptors : their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. Annu Rev Pharmacol Toxicol 29 : 365-402, 1989*
21) Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A : *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse neurones. Nature 307 : 462-465, 1984*
22) Simonian NA, Coyle JT : *Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annu Rev Pharmacol 36 : 83-106, 1996*
23) Tang C-M, Dichter M, Morad M : *Quisqualate activates a rapidly inactivating high conductance ionic channel in hippocampal neurons. Science 243 : 1474-1477, 1989*
24) Ying W : *A new hypothesis of neurodegenerative disease : the deliterious network hypothesis. Med Hypothesis 47 : 307-313, 1996*
25) Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D : *Activity dependent regulation of BDNF and NGK mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. EMBO J 9 : 3545-3550, 1990*