

배뇨조절 골반 자율신경에서  
**GABA**에 의한 흥분성 작용의  
분자적 특성

연세대학교 대학원

의 학 과

김 성 훈

배뇨조절 골반 자율신경에서  
**GABA**에 의한 흥분성 작용의  
분자적 특성

지도 이영희 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 성 훈

# 김성훈의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

## 감사의 글

이 연구를 시작하고 논문을 완성하기까지 도움을 주신 많은 분들께 마음깊이 감사를 드립니다.

항상 끊임없는 지도와 자상한 배려로 이끌어주신 이영희 교수님, 정성우 교수님께 깊이 감사드립니다. 각별한 조언으로 도와주신 정순희 교수님, 공인덕 교수님, 이성수 교수님께 감사를 드리며 아울러 저의 의사생활의 스승이신 박정미 교수님, 김헌주 교수님께 항상 감사드립니다.

저를 낳아 주시고 새벽마다 눈물로 기도해 주시는 아버지, 어머니 그리고 누님들께 진심으로 감사를 드리며 항상 저희 가족을 위해 기도해 주시는 장모님, 장인어른께 깊은 감사를 드립니다.

제 인생의 새로운 의미가 되고 언제나 변함없이 힘이 되어준 사랑하는 아내와 이 세상의 새로운 생을 시작하는 소중한 현이, 서현이와 함께 이 작은 결실을 나누고자 합니다.

저 자 올림

# 차 례

표 차례 .....	iii
그림 차례 .....	iv
국문요약 .....	vi
제1장. 서론 .....	1
1.1. 배뇨 조절에 관련된 신경 회로 .....	1
1.2. 지역 통합 센터로서의 자율 신경절 .....	3
1.3. 골반 신경절의 특성 .....	7
1.4. GABA 수용체 및 GABA 작용의 특성 .....	9
1.5. 연구목적 .....	11
제2장. 재료 및 방법 .....	13
2.1. MPG 신경세포의 분리 및 유지 .....	13
2.2. 실험용액 및 약물 .....	16
2.2.1. 실험용액 .....	16
2.2.2. 약물 .....	16
2.3. 전기 생리학적 실험 .....	17
2.4. MPG 표본 제작 및 면역조직화학 염색 .....	18
2.5. 역전사 중합 연쇄 반응 (RT-PCR) .....	19
2.6. 외래 유전자의 이중 발현 .....	22
2.7. 데이터 분석 및 통계 처리 .....	24
제 3장 결 과 .....	25
3.1. MPG 신경세포의 특징 .....	25

3.2 MPG 교감 신경세포에서 GABA에 의한 반응 .....	26
3.2.1. MPG 교감 신경세포에서 GABA 농도-전류 관계 .....	26
3.2.2. MPG 교감 신경세포에 발현되는 GABA 수용체의 종류 .....	26
3.2.3. MPG 교감 신경세포에서 GABA에 의한 막전압의 변화 .....	33
3.2.4. 세포 내 Cl <sup>-</sup> 농도와 GABA 전류의 역전 전압 (E <sub>GABA</sub> )의 상관성 .....	33
3.3. MPG 교감 신경세포 내 Cl <sup>-</sup> 이온의 농도 .....	37
3.4. 역전사 연쇄중합 반응 분석에 의한 MPG에 발현된 양이온-Cl <sup>-</sup> 공수송체의 동정 .....	39
3.5. MPG 교감 신경세포에서 KCC2의 과발현에 의한 GABA 반응의 변화 .....	41
3.6. MPG 교감 신경세포에서 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /Cl <sup>-</sup> exchanger가 E <sub>GABA</sub> 에 미치는 영향 .....	47
3.7. MPG 교감 신경세포에서 bumetanide의 E <sub>Cl<sup>-</sup></sub> 에 대한 효과 .....	47
 제 4장 고 찰 .....	 51
제 5장 결 론 .....	57
 참고문헌 .....	 58
영문초록 .....	70

## 표 차 례

표1. 역전사 연쇄중합 반응에 사용한 primer들 .....	21
------------------------------------	----

## 그림 차례

그림 1. 요 저장 및 배뇨 조절에 관련된 신경 회로의 모식도 .....	5
그림 2. 지역 통합 센터로서의 MPG의 기능적 역할에 대한 예시 .....	6
그림 3. 수컷 쥐에서 MPG의 해부학적 위치 .....	14
그림 4. MPG로부터 분리된 단일 신경세포들의 광학 현미경적 소견 .....	15
그림 5. 막전압 고정법에 의한 이온 채널 전류 측정 장치의 구성 모식도 .....	20
그림 6. 세포 핵 내 cDNA 주입 방법 .....	23
그림 7. MPG에 존재하는 두 종류의 신경 세포 .....	28
그림 8. MPG 신경세포 종류에 따른 GABA 및 5-HT 전류 .....	29
그림 9. MPG 교감 신경세포에서 GABA 농도와 전류 크기의 상관 관계 .....	30
그림 10. MPG 교감 신경세포에서 GABA 전류에 대한 GABA 수용체 차단제의 효과 .....	31
그림 11. MPG에서 GABA 및 GABA <sub>A</sub> 수용체의 면역 형광 염색 .....	32
그림 12. MPG 교감 신경세포에서 GABA에 의한 막전압의 변화 .....	35
그림 13. MPG 교감 신경세포에서 세포내 Cl <sup>-</sup> 농도에 따른 GABA 전류의 역전 전압 변화 .....	36
그림 14. MPG 교감 신경세포내의 생리적 Cl <sup>-</sup> 농도의 간접적 측정 .....	38
그림 15. MPG에서 역전사 연쇄 중합 반응 분석에 의한 양이온-Cl <sup>-</sup> 공수송체의 mRNA 발현 조사 .....	40
그림 16. MPG 신경세포에서 세포핵 내 미세 주입법에 의한 GFP 단백질의 발현 .....	43
그림 17. MPG 교감 신경세포에서 KCC2 유전자 과다 발현시 E <sub>GABA</sub> 의 변화 .....	44
그림 18. MPG 교감 신경세포에서 KCC2 유전자 과다 발현시 Cl <sup>-</sup> 의 역전 전압 (E <sub>Cl</sub> ) 및 세포내 Cl <sup>-</sup> 농도의 변화 요약 .....	45



그림 19. MPG 신경세포에서 KCC2 유전자 과다 발현시 GABA에 의한 탈분극 반응의 변화 .....	46
그림 20. MPG 교감 신경세포의 $E_{GABA}$ 에 $HCO_3^-$ 가 미치는 영향 .....	48
그림 21. MPG 교감 신경세포에서 $HCO_3^-$ 에 의한 $Cl^-$ 의 역전 전압 ( $E_{Cl}$ 또는 $E_{GABA}$ ) 및 세포내 $Cl^-$ 농도의 변화 .....	49
그림 22. MPG 교감 신경세포에서 $E_{GABA}$ 에 미치는 bumetanide의 효과 .....	50

## 배노조절 골반 자율신경에서 GABA에 의한 흥분성 작용의 분자적 특성

배노반사를 조절하는 주골반 신경절은 중추신경계의 명령을 효과기에 전달하는 릴레이 스테이션 역할도 하지만 국부적으로 발생하는 다양한 정보를 가지고 통합하는 지역통합센터의 역할을 담당하고 있다. 주골반신경절은 같은 신경절 캡슐 내에 교감 및 부교감 신경세포를 가지고 있는 다른 자율신경절과는 구별되는 특징을 가지고 있다. 이러한 주골반 신경절은 그 해부학적 구조가 단순하여 분리 및 정량화가 용이하기 때문에 골반장기의 신경조절의 생리 및 병태생리학적 메커니즘을 규명하는 연구의 모델 시스템으로 많이 사용되고 있다.

성숙된 신경에서 GABA는 억제성 신경전달물질로 알려져 있지만 주골반 신경절에서 가바는 세포막의 탈분극을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구의 목적은 지금까지 규명되지 않은 주골반신경절에서 흥분성 가바작용이 나타나는 메커니즘을 분자 수준에서 최초로 규명하고자 하였다. 이를 위하여 그라미시딘 천공 패치클램프 방법, 역전사 연쇄 중합반응, 세포핵 내 미세 주입에 의한 유전자 도입, 면역조직화학 등의 연구방법을 사용하였다.

가바 전류는 세포의 전기용량이 크며 티-형 칼슘채널을 발현하는 주골반 교감 신경세포에서 주로 기록되었는데 비큐클린과 피크로톡신에 의해 억제되었기 때문에 가바 에이 수용체 활성을 통해 나타났음을 알 수 있었다. 또한 세포의 액의 염소이온 농도를 변화시켰을 때 가바전류의 역전전압이 이에 비례하여 변하는 것을 관찰하여 가바전류가 염소이온의 이동에 의한 것임을 확인하였다. 면역조직화학 염색으로 주골반신경절 내에 가바가 생리적으로 존재하는 것과 가바 에이 수용체가 타이로신 수산화효소에 양성인 교감신경세포에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 주골반 교감 신경세포에서 가바에 의한 탈분극이 일어났으며 그 크기는 시

간 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 그러나 주골반 부교감 신경세포에서는 가바에 의한 막전압의 변동이 나타나지 않았다. 분리한 후 3~4시간 경과 후 주골반 교감 신경세포에서 기록된 가바전류의 역전전압은 약 -43 밀리볼트로 안정막 전압보다 낮다는 것을 확인하였고, 넌스트 공식을 사용하여 세포 내 생리적인 염소이온의 농도는 약 30 밀리몰인 것으로 추정하였다. 가바의 역전전압과 세포 내 염소이온의 농도는 세포를 24시간 배양 한 후 감소하는 경향을 보였다. 역전사 연쇄중합반응 분석 결과 주골반 신경절은 소듐-포타슘-염소이온 공수송체 1과 포타슘-염소이온 공수송체 1을 발현하나 신경특이적으로 분포하여 세포 내 염소이온의 농도를 낮게 세팅하는 역할을 하는 포타슘-염소이온 공수송체 2는 발현하지 않는 것을 확인하였다. 포타슘-염소이온 공수송체 2를 주골반 교감 신경세포에 과발현시켰을 때 녹색형광 단백질만 과발현하는 대조군에 비해 가바의 역전전압이 음성으로 약 30 밀리볼트 정도 이동하였으며 세포 내 생리적인 염소이온의 농도가 22 밀리몰에서 6.5 밀리몰로 감소하였음을 알 수 있었다. 포타슘-염소이온 공수송체 2가 과발현된 주골반 교감 신경세포에 가바를 가하였을 때 탈분극이 아닌 과분극이 유발되었으며 이러한 가바의 억제성 작용은 포타슘-염소이온 공수송체 2 차단제인 푸로세마이드의 전 처치에 의해 소실되었다. 주골반 교감 신경세포에서 기록된 가바 전류의 역전전압은 소듐-포타슘-염소이온 공수송체 1을 차단하는 부메타나이드에 의해 크게 영향을 받지 않았으며, 세포외액에 중탄산염을 포함시켰을 때 도 변동되지 않았다.

이상의 결과들을 토대로 성숙 쥐의 주골반 신경세포에서 가바의 흥분성 작용이 세포 내 염소이온의 농도를 낮추는 포타슘-염소이온 공수송체 2의 발현 부재에 의해서 기인한다는 결론을 얻었다.

---

핵심되는 말: 자율신경, 배뇨, 주골반 신경절, 교감 신경세포, 가바, 흥분성 가바 작용, 가바에이 수용체, 소듐-포타슘-염소이온 공수송체 1, 포타슘-염소이온 공수송체 2

# 배뇨조절 골반자율신경에서 GABA에 의한 흥분성 작용의 분자적 특성

< 지도 이영희 교수 >

연세대학교 대학원 의학과

김 성 훈

## 제1장 서론

### 1.1. 배뇨 조절에 관련된 신경 회로

인간에 있어서의 배뇨(micturition)는 임상적으로 요로 역동 검사(urodynamic study) 등을 통해 검사할 수 있다. 정상인에서 방광(urinary bladder) 내로 요가 저장되는 동안에는 방광을 이루는 배뇨근(detrusor muscle)이 이완하고 내외 요도 괄약근(internal and external urethral sphincter)은 수축하게 된다. 한편 수의적인 배뇨(voluntary micturition)시에는 내외 요도 괄약근(internal and external urethral sphincters)의 이완에 이어서 배뇨근의 수축에 의해 방광의 내압이 증가하여 배뇨가 이루어지게 된다(Chancellor 및 Yoshimura, 2002). 척수 손상(spinal cord injury, SCI) 환자에서는 이러한 방광-요도 괄약근의 조화 운동에 이상이 나타나 신경인성 방광의 소견을 보이며 만성적으로 배뇨장애가 초래된다(McGuire 및 Brady, 1979; de

Groat 등, 1993).

요를 방광에 저장하고 주기적으로 배뇨하는 과정은 뇌, 척수, 그리고 말초 자율 신경절에 위치한 신경회로에 의해 지배된다(de Groat 등, 1993; Morrison 등, 2002; de Groat 및 Yoshimura, 2006) (그림1). 심장이나 소화장기는 전적으로 불수의적 운동을 하며 중추 신경으로부터 오는 입력이 없을 때도 어느 수준에서 자율적인 기능을 수행하지만 방광의 경우는 그 기능이 배뇨 중추를 통해 전달되는 수의 명령(예, 외부 요도 괄약근의 체성 운동 신경 지배)과 불수의적 교감(sympathetic) 및 부교감(parasympathetic) 자율 신경계(autonomic nervous system)의 조정(coordination)에 의해 지배를 받는다. 방광의 저장기(storage or filling phase) 동안 척수에서 기시하는 교감 신경계는 골반 신경절(pelvic ganglia)를 경유하여 방광의 배뇨근에 긴장성 억제 입력(tonic inhibitory input)을, 내요도 괄약근에는 흥분성 입력을 보내어 방광이 이완되고 요도가 수축하는 척수 반사(spinal reflex)를 지배하는데 이때, 골반 신경절을 경유하여 배뇨근을 지배하는 부교감 신경계의 활성화는 매우 저하되게 된다. 실제로 외과적 수술이나 약리적 차단제에 의해 교감신경이 차단되면 요도의 저항과 방광 용적이 감소하며 방광 수축의 빈도와 크기가 증가하는 것이 확인되었다(deGroat 및 Yosimura, 2006). 교감 신경의 기능과 더불어 요수(lumbar spinal cord) 및 천수(sacral spinal cord)의 복측 ventral side)에 위치한 체성 운동 신경 세포(somatic motor neuron)가 pudental 신경을 통해 외요도 괄약근을 수의적으로 수축 시킴으로써 urinary continence를 유지하게 된다. 교감 신경에 의한 반사나 외요도 괄약근의 수축은 교(pons) (구체적으로 inferior colliculus 위치)에 있는 배뇨 센터(micturition center)에서 기시하는 것으로 추측되고 있다. 한편, 방광의 내압이 증가하여 배뇨를 위한 역치(threshold) (인간에서의 역치는 5-15 mmHg)에 이르게 되면 그 정보가 주로 골반 신경 및 후근 신경절(dorsal root ganglion)을 통해 척수로 들어가고 중뇌수도주위 회백질(periaqueductal gray)에 있는 릴레이스테이션을 거쳐 교에 전달된다(Blok, 2002). 그 후 교에서 기시하는 척수-연수-척수(spino-bulbo-spinal) 반사 경로(유아에서는 척수 반사를 볼 수 있음)를 통해 부교감신경이 활성화되고 교감 신경 및 체성 운동 신경이 억제되면 방광의 수축과 요도 괄약근의 이완이 각각 일어나 배뇨가 시작된다(Torrens 및 Morrison, 1986; Mallory 등, 1991; deGroat

등, 1993). 따라서 교의 배뇨 센터는 방광으로부터 오는 구심성 감각 정보에 의해 작동되는 “on-off” 스위치라 할 수 있으며 이 스위치는 시상이나 대뇌에 의해 억제성 또는 흥분성 조절을 받는 것으로 알려져 있다( de Groat 등, 1993) (그림 1). 교의 배뇨 센터가 배뇨의 조절을 지시한다고 한다면 방광이나 요도와 같은 효과기에 최종적인 교감 및 부교감 입력을 전달하는 역할을 하는 중요한 위치에 골반 신경절이 있다. 과거에 배뇨 센터나 척수에 위치한 절전 신경 세포, 그리고 방광의 감각을 전달하는 후근 신경절(dorsal root ganglion)에 관한 연구는 비교적 많이 이루어졌지만 배뇨 조절을 위한 골반 신경절의 역할에 관한 연구는 미미한 실정이다. 그 이유는 골반 신경절이 복잡한 구조를 가지고 있어 연구하기가 쉽지 않다는 점과 그 기능이 단순한 릴레이 스테이션(relay station)의 역할을 할 것이라는 고전적인 개념 때문이다. 그러나 최근에 골반 신경절이 지역 통합 센터(local integration center)로서의 기능을 할 수 있다는 연구 결과들이 알려지고 있어 새로운 주목을 받고 있다 (Keast, 2006). 특히 척수 손상, 파킨슨, 암 등의 상위 배뇨 조절 신경이 제 기능을 하지 못하는 병태 생리적 상황에서 골반 신경절의 가소성(plasticity)을 규명하는 것은 임상적으로 매우 흥미로운 것이다(Sakakibara 및 Fowler, 1999; Chancellor 및 Yosimura; Wein, 2002).

## 1.2. 지역 통합 센터로서의 자율 신경절

자율 신경계를 이루는 교감 및 부교감(parasympathetic) 신경계는 우리 몸의 내장 운동을 길항적으로 조절함으로써 우리 몸의 항상성(homeostasis)을 유지시켜주는 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 자율 신경계의 일차 신경 세포는 중추 신경계(뇌간 및 척수)에 있으나 이차 신경 세포는 말초 신경계의 자율 신경절(autonomic ganglia)에 위치해 있으며 자율 신경절 내 절후 신경 세포(postganglionic neuron)로부터 나오는 절후 신경 섬유(postganglionic fiber)가 내장 조직의 효과기(visceral effector)에 분포하여 지배하게 된다. 과거에는 자율 신경절이 단순히 중추에서 오는 정보를 효과기에 그대로 전달만 해주는 릴레이 스테이션의

역할만 한다고 하여 중추 신경계에 비해 상대적으로 연구자들의 관심을 많이 끌지 못했다. 그러나 최근에는 자율 신경절이 단순한 릴레이의 역할 외에도 복잡한 정보를 통합하고 새로운 정보를 효과기로 프로세싱(processing)하기 위한 지역 통합 센터(local integration center)로서 중요한 역할을 한다는 것이 알려졌다(그림 2). 이를 뒷받침하는 몇 가지 연구 결과들을 살펴보면 첫째, 자율 신경절 내에도 중추 신경계에서 볼 수 있는 개재 신경 세포(interneuron)가 존재하며(Seabrook 등, 1990), 둘째, 자율 신경절 신경 세포의 세포체(soma)와 시냅스 말단에서 콜린성 또는 아드레날린성 시냅스 전달을 조절할 수 있는 다양한 신경 전달 물질과 이를 합성할 수 있는 효소들이 발견되었으며(Keast, 1995) (그림 1), 셋째, 자율 신경절 신경 세포의 세포체에 니코틴성 수용체 외에도 시냅스 이후 전류를 발생시킬 수 있는 ligand-gated channel(P2X, 5-HT, GABA 수용체 등)들이 발견되며(de Groat 및 Booth, 1993; Keast, 1995; Keast 2006), 넷째, 중추 신경계에서 복잡한 시냅스 입력(input)을 받는 해마(hippocampus) 등에서 볼 수 있는 LTP(long-term potentiation)가 상경 신경절 (superior cervical ganglion)과 같은 교감 신경절에서도 관찰된다고 하였다 (Briggs 1992; Alkadhi 등, 2001). 특히, 자율 신경절에서도 LTP가 존재한다는 사실은 시냅스 전달의 메커니즘이 생각보다 훨씬 복잡함을 시사해주며, 생리 및 병리적인 여러 요인들에 의해 시냅스 가소성(synaptic plasticity)이 나타날 때 신경 기능이 변화될 수 있다는 점에서 매우 흥미로운 결과라 할 수 있다.

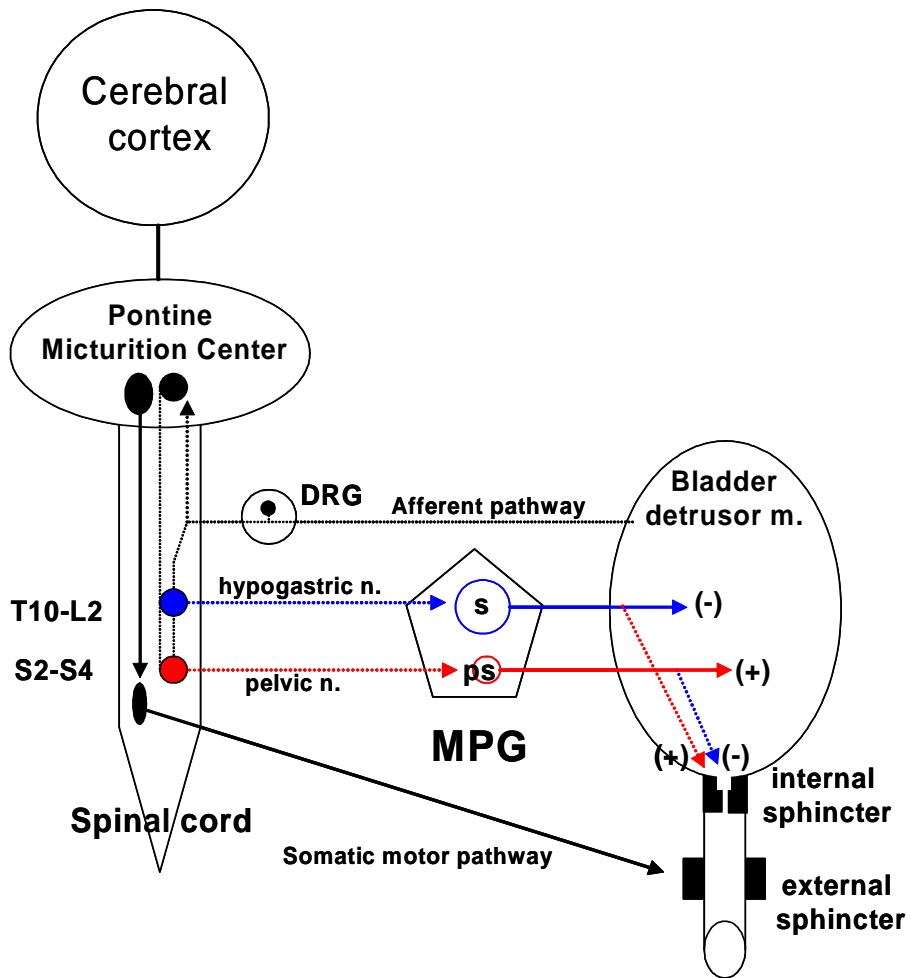


그림 1. 요 저장 및 배뇨조절에 관련된 신경회로의 모식도.

(+)와 (-)는 각각 흥분성 또는 억제성 조절을 나타낸다.



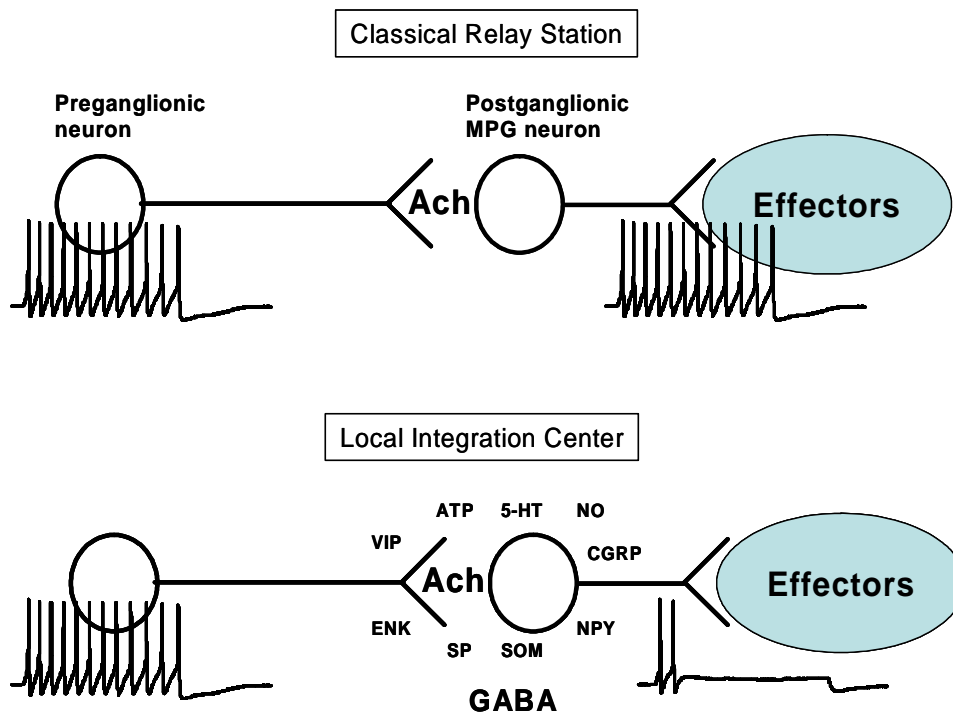


그림2. 지역 통합센터로서의 MPG의 기능적 역할에 대한 예시.  
 골반 신경절 내에 다양한 흥분성 또는 억제성 신경 전달 물질이 존재하며 이들에 의해 시냅스 전달 및 골반 신경 세포의 흥분성 조절이 활발히 일어날 수 있음을 나타내었음.

### 1.3. 골반 신경절의 특성

골반 신경절(pelvic ganglion)은 방광(urinary bladder), 전립선(prostate gland), 음경(penis) 등과 같은 비뇨 생식 기관과 하부 직장(distal colon)을 지배하여 자율신경절을 배뇨(micturition) 및 발기 반사(erecile reflex)를 조절한다(Langworthy, 1965; Dail 등 1986). 이러한 골반 신경절은 그 기능의 중요성 때문에 골반 장기의 기능 장애인 요실금(urinary incontinence), 신경성 발기 부전(neurogenic impotence), 변비(constipation), 척수손상 및 염증(inflammation)에 의한 신경성 방광(neurogenic bladder) 등의 발병 원인을 규명하고 치료법을 개발하기 위한 연구 대상으로 많은 관심을 받고 있다. 골반 장기 주변에 분포하는 골반 신경절은 경우에 따라 골반총(pelvic plexus) 또는 하복총(hypogastric plexus)으로 불리기도 하며 여성(female)의 경우 paracervical ganglia 또는 프란켄하우저절(Frankenhauser's ganglia)로 알려져 있다(Langworthy, 1965; Partanen 등, 1979; Baljet 및 Drucker, 1980). 한편 골반 신경절의 해부 조직학적 구조는 종(species)에 따라 다양하게 나타난다(De Groat 및 Booth, 1993; Keast 1993). 예를 들면 수컷 쥐의 경우 전립선 주변에 주골반 신경절(major pelvic ganglia, MPG)이라 불리는 좌우 한 쌍의 큰 신경절로 존재하는데 그 형태가 뚜렷하고 분리(isolation)가 용이하기 때문에 골반 신경절의 형태 및 기능 연구에 많이 쓰이고 있다(Keast 1993). 그러나 쥐와는 달리 인간을 포함한 대부분의 종들에서의 골반 신경절은 뚜렷한 형태를 가지지 않고 작은 신경절들이 복잡하게 연결된 망상 구조를 하고 있다(Bradley 등 1974; Janig 등, 1987).

MPG에는 15-60  $\mu\text{m}$ 의 크기를 가지는 주신경세포(principal neuron, 이후로 “골반 신경세포”로 칭함), 개재신경세포, paracrine 기능을 가지는 10-20  $\mu\text{m}$ 의 크기의 SIF 세포 (small intensely fluorescent cell), 위성세포(satellite cell), 그리고 비만 세포(mast cell)가 존재한다(de Groat 및 Booth, 1993). 수컷 쥐의 경우 골반 신경세포의 수는 약 30,000 개 정도인데 (암컷의 경우 약 10,000 개) (Greenwood 등, 1985) 기능적으로 교감 및 부교감 신경 세포로 나눌 수 있다. 이러한 한 신경절 내에 교감 및 부교감 신경이 함께 분포하는 경우는 많은 자율 신경절 중 골반 자율 신경절에서

유일하게 관찰된다. 교감 골반 신경 세포는 하복 신경(hypogastric nerve, HGN)을 통하여 척수의 T10-L2에서 기시하는 절전 신경(preganglionic neuron)의 지배를 받는다(de Groat 및 Booth, 1980; Janig 및 McLachlan, 1987; Delancey, 2002). 한편, 부교감 골반 신경 세포는 골반 신경(pelvic nerve, PVN)을 통하여 인간의 경우 S2-S4, 고양이나 원숭이의 경우 S1-S3, 그리고 쥐에서는 L1-S3에서 기시하는 절전 신경의 지배를 받는다(Sfletcher 및 Bradley, 1978; Thomas 등 1982; Maggi 및 Meli, 1986; Brindley, 1988). 이들 골반 신경 세포는 절후 신경(postganglionic nerve)을 통해 축삭(axon)을 보내 해당 비뇨 생식 기관을 지배한다. 쥐의 주골반 신경절에서 연구된 바에 의하면 골반 신경 세포는 지배하는 기관(즉, 음경, 전립선, 직장 및 vas deference)에 따라 제한된 지역에 viscerotropic한 분포를 보이는 데 방광을 지배하는 골반신경의 경우 신경절 내에 광범위하게 분포한다고 하였다(Dail 등, 1993; Keast 등, 1989).

일반적으로 중추의 신호가 HGN과 PVN을 통해 골반 신경절로 전달되는 과정은 아세틸콜린(Ach)에 의해 매개되는 니코틴성 시냅스 전달(nicotinic transmission)이며, 절후 골반 신경에서 각 비뇨 생식 장기로 신호가 전달 될 때에는 기본적으로 교감 골반 신경 세포로부터 노에피네프린(NE)에 의해, 부교감 골반 신경 세포로부터 Ach에 의해 매개된다. 그러나 면역화학염색 방법으로 확인된 결과 이러한 주 신경 전달 물질 외에도 비아드레날린성-비콜린성(non-adrenergic, non-cholinergic, NANC) 신경 전달 물질들이 종에 따라 또는 특정 골반 장기를 지배하는 골반 신경 그룹(예, 방광 지배 골반 신경, 전립선 지배 골반 신경, 음경 지배 골반 신경 등)에 따라 다양한 조합(combination)으로 절전 골반 신경 섬유(mal단(nerve terminal), 골반 신경의 세포체, 그리고 골반 신경에 연결되어 지역 반사(local reflex)를 매개하는 원심성 감각 섬유(afferent sensory nerve fiber)의 측지(collateral) 말단에 소위 "chemical coding"되어 있음이 밝혀졌다 (Keast, 1995). 쥐의 경우를 현재까지 enkephalin, somatostatin, cholecystokinin(CCK), galanin, calcitonin gene-related peptide(CGRP), vasoactive inhibitory peptide(VIP), substance P(SP), neuro-peptide Y (NPY) 등의 펩티드성(peptidergic), ATP와 같은 퓨린성(purinergic), 5-hydroxytryptamine (5-HT,serotonin)과 같은 아민성(aminergic),  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA), NO(nitric

oxide)와 같은 신경전달물질들이 존재하는 것이 확인되었다(de Groat 1970; Kusunoki 등 1984). 이러한 사실은 니코틴성 시냅스 전달이 다양한 신경 전달 물질들의 작용에 의해 조절을 받을 수 있음을 시사하고 있다. 실제로 이들 NANC 신경전달물질들이 결합하는 metabotropic 수용체 및 ligand-gated 이온 채널들이 골반 신경세포에 존재하는 것이 확인되었으며(de Groat 및 Booth, 1995) 기능적으로 니코틴성 시냅스 전달과 골반 신경의 흥분성을 조절한다는 것이 확인되었다. 예를 들면 SP(Kawatani 등 1989), VIP(Kawatani 등, 1985; Akasu 등, 1986), CCK(Keast 등, 1989), 5-HT(Nishimura 및 Akasu, 1989)는 골반 신경을 탈분극(depolarization)시켜 흥분성을 높이는 작용을 한다고 보고되었다. 한편 SP는 니코틴성 시냅스 전달을 항진시키는 반면(Kawatani 등 1989) enkephalin(de Groat 및 Kawatani, 1989), CGRP, NPY(de Groat 등 1985), 5-HT(Nishimura 및 Akasu, 1989)는 시냅스전 말단에 존재하는 G 단백질에 연결된 metabotropic 수용체를 활성화시켜 Ach 방출을 감소시킴으로써 니코틴성 시냅스 전달을 오히려 억제시킨다고 하였다(de Groat 등 1985).

#### 1.4. GABA 수용체 및 GABA 작용의 특성

GABA가 작용하는 수용체는 크게 ionotropic GABA 수용체와 G 단백질에 연결되어있는 metabotropic GABA 수용체로 나눌 수 있다. 이 중 inotropic GABA 수용체는 Cl<sup>-</sup>에 특이적인 이온 채널로 5개의 아단위 (subunit)로 이루어지는 pentameric 구조를 가지며, bicuculin이나 picrotoxin에 민감한 GABA<sub>A</sub> 수용체와 TPMPA에 민감한 GABA<sub>C</sub> 수용체 2종류의 아형(isoform)을 가진다 (MacDonald 및 Olsen, 1994; Barnard 등, 1998). 현재까지 GABA<sub>A</sub> 수용체는 6 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 3 $\gamma$ , 1 $\delta$ , 1 $\epsilon$ , 1 $\theta$ , 그리고 1 $\pi$  아단위의 조합으로, GABA<sub>C</sub> 수용체는  $\rho$ 1-3 아단위로만 이루어져 있음이 보고되었다 (Akabas, 2004; Chebib, 2004).

GABA는 glycine과 함께 성체 중추 신경계의 대표적인 억제성 신경 전달 물질이다. 활성화된 GABA 수용체를 통하여 시냅스 후 신경 세포 (postsynaptic neuron) 내로 Cl<sup>-</sup>가 유입되면 막전압의 과분극 (hyperpolarization)이 일어나 세포의 활동 전

압 방사(action potential firing)를 억제시킨다. 그러나 태어나 출생 후 발달 (postnatal development)과정 동안에는 GABA에 의한 효과가 억제성이 아닌 흥분성으로 나타나는데(Alvarez-Leefmans 등, 1988; Cherubini 등 1991; Stein 등, 2003) 이러한 흥분성 GABA 작용은 신경의 분화 및 성숙을 위해서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(Yuste 및 Katz, 1991; Ben Ari 등, 1997; Baker 등, 1998; Maric 등, 2001; Owens 및 Kriegstein, 2002; ). 이러한 GABA의 영양 작용 (trophic action)의 메커니즘은 막전압의 탈분극에 이은 전압 의존적 칼슘 채널이나 glutamate ionotropic N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 통한 세포 내 칼슘의 증가인 것으로 보고되었고(Ben Ari 등, 1997; Fukuda 등, 1998), 이는 시냅스 형성에 중요한 것으로 나타났다(Ben-ari, 2002; Owens 및 Kriegstein, 2002).

GABA의 작용에는 세포내외의 Cl<sup>-</sup> 농도 경사의 크기에 의해 결정되는 E<sub>Cl</sub>(즉, E<sub>GABA</sub>의 값이 중요한데 만약 E<sub>GABA</sub>가 안정막 전압(resting membrane potential, RMP)보다 낮으면(즉, 더 음성이면) 억제성으로, 반대로 E<sub>GABA</sub>가 RMP보다 높으면(즉, 더 양성이면) 흥분성으로 나타난다. 세포 외 Cl<sup>-</sup>의 농도([Cl<sup>-</sup>]<sub>out</sub>)가 일정하다고 가정할 때 Nernst equation (식 1)에 의거하여 세포 내 Cl<sup>-</sup>의 농도([Cl<sup>-</sup>]<sub>in</sub>)를 계산해보면 억제성 GABA 작용을 위해서는 [Cl<sup>-</sup>]<sub>in</sub>가 낮게, 흥분성 GABA 작용을 위해서는 [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>가 높게 세팅되어져 있음을 쉽게 예측 수 있다.

$$E_{Cl} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[Cl]_{in}}{[Cl]_{out}} \quad (\text{식 1}) \quad \left( \begin{array}{l} R: \text{가스상수, T: 절대온도(K)} \\ Z: \text{전하, F: Faraday 상수} \end{array} \right)$$

신경의 발달과정에서 GABA 작용이 흥분성에서 억제성으로 전환되는 것은 결국 [Cl<sup>-</sup>]<sub>in</sub>에 의존적이라 할 수 있다. 과거의 일련의 연구를 통해서 [Cl<sup>-</sup>]<sub>in</sub>를 조절하는 양이온-Cl<sup>-</sup> 공수송체(cation-chloride cotransporter, CCC) 과(family)가 발견되었다(Ben-Ari, 2002; Delpire, 2000; Owens 및 Kriegstein, 2002). 이 CCC 중 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 공수송체(NKCC)는 소듐과 포타슘의 농도경사를 이용하여 [Cl<sup>-</sup>]<sub>in</sub>를 높여주는 기능을 한다. 반면에 K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 공수송체(KCC)는 포타슘의 농도 경사를 이용하여 [Cl<sup>-</sup>]<sub>in</sub>

를 낮춰주는 상반된 기능을 한다. 현재까지 2개의 NKCC 아형(NKCC1-2) 과 4 개의 KCC 아형(KCC1-4)과 2개의 NKCC(NKCC1-4) 아형이 클로닝되었다(Russell, 2000; Payne 등, 2003). NKCC1은 신경 세포를 비롯한 교세포(glia cell), choroid plexus, 혈관 내피 세포에서 주로 발현되며, NKCC2는 신장(kidney)에만 분포하는 아형이다. KCC2는 성숙한 신경에만 발현되어  $[Cl^-]_{in}$ 을 실질적으로 낮추는 아형이며, KCC1, KCC3, 그리고 KCC4는 제한된 신경 세포에 분포하나  $[Cl^-]_{in}$ 에는 크게 영향을 주지 않는다고 보고되었다(Payne 등, 2003). 따라서 신경에서  $[Cl^-]_{in}$ 은 NKCC1과 KCC2의 균형에 의해 결정되어진다. 실제로 해마에서 KCC2를 antisense knock-down 시켰을 때  $E_{GABA}$ 의 탈분극 이동(depolarizing shift)이 나타났으며(Rivera 등, 1999), KCC2가 knock-out된 생쥐에서 GABA에 의한 흥분성 작용이 나타난다고 하여 KCC2의 발현이 억제성 GABA 작용에 중요한 요인임이 증명되었다(Hubner 등, 2001). 따라서 출생 후 신경의 발달 과정에서 GABA 작용이 흥분성으로부터 억제성으로 전환되기 위해서는 NKCC1 발현의 감소와 함께 KCC2 발현의 유도(induction)이 중요하다고 하였다(Rivera 등, 1999; Stein 및 Nicoll, 2003).

## 1.5. 연구목적

성숙한 포유동물의 중추 신경계에서는 억제성 신경 전달 물질로 알려져 있는 GABA가 성숙 쥐 MPG에서는  $GABA_A$  수용체를 활성화시켜 탈분극을 유발함으로써 오히려 흥분성 신경 전달 물질로 작용한다고 예외적으로 보고되었다(Akasu 등, 1999). 이러한 GABA의 작용에 본 연구자가 관심을 가지게 된 것은 metabotropic 수용체를 활성화시켜 간접적으로 작용하는 대부분의 신경 전달 물질과는 달리 ligand-gated 채널을 활성화시켜 직접적으로 니코틴성 시냅스 전달을 조절하는 점이 독특하였고 MPG에서 흥분성 GABA작용의 분자적 메커니즘이 아직 밝혀지지 않았기 때문이었다. 따라서 본 연구에서는 성숙 쥐의 MPG에서 이러한 GABA의 흥분성 작용이  $[Cl^-]_{in}$ 를 낮추는 KCC2의 발현 결여에 의해서 유발된다는 가설을 세우고 GABA의 흥분성 작용에 대한 메커니즘을 분자 수준에서 규명하고자 하였다.

## 제 2장 재료 및 방법

### 2.1. MPG 신경세포의 분리 및 유지

실험 동물로 200-250 gm 내외의 수컷 쥐(Sprague-Dawley rat)를 사용하였다. 쥐를 ketamine(50 mg/kg) 및 xylazine (10mg/kg)의 복강 주사로 마취시킨 뒤 개복하고 전립선의 외측에 위치한 MPG를 적출하여(그림 3) 차가운 (4°C) Hanks' balanced salt 용액으로 옮겼다. MPG를 둘러싸고 있는 결체 조직과 지방을 벗기고 조심스럽게 작은 틈새를 낸 후, 이를 0.7 mg/ml collagenase (type D), 0.1 mg/ml trypsin과 0.1 mg/ml의 DNase type I이 함유된 6 ml의 Earle's balanced salt 용액(EBSS, pH 7.4)이 들어있는 25 cm<sup>2</sup> 배양 플라스크에 옮긴 후 55분간 35.5°C에서 빠른 속도(90 strokes/min)로 흔들면서 배양하였다(Zhu 등, 1995; Lee 등, 2002; Won 등, 2006). 이때, EBSS는 기본 조성에 3.6 g/L의 glucose와 10 mM의 HEPES를 추가하여 만들었다. 배양 직전 배양 플라스크 내로 95% O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>를 약 3분간 공급하였다. 배양 후 배양 플라스크를 10회 정도 세게 흔들어 단일 신경 세포들로 분리한 후, 1% penicillin- streptomycin과 10% FBS(fetal bovine serum)가 포함되어 있는 Minimal Essential Media(MEM) (GiocoBRL)를 8 ml 정도 넣어 trypsin을 비활성화 시켰다. 분리된 신경 세포들을 임상용 원심분리기(Hanil, Korea) 이용하여 1,500 rpm의 속도로 원심 분리하였다. 같은 방법으로 세포를 두 번 씻어내고 분리된 단일 신경세포들을 MEM에 재부유 (resuspend)시킨 뒤, poly-L-lysine으로 코팅되어 있는 35 mm 폴리스티렌 배양 접시(Corning, NY, USA)에 plating 하였다. 분리 한 골반 신경세포는 37°C 세포 배양기(humidified CO<sub>2</sub> incubator; 95% air-5% CO<sub>2</sub>)에서 사용 때까지 배양하였다. 분리된 MPG 신경세포의 광학 현미경적 소견은 그림 4에 나타내었다.

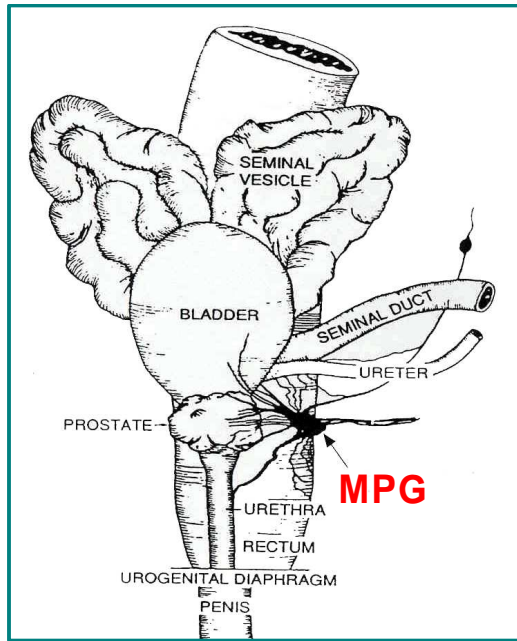


그림 3. 수컷 쥐에서 MPG의 해부학적 위치





그림 4. MPG로부터 분리된 단일 신경세포들의 광학 현미경적 소견

## 2.2. 실험용액 및 약물

### 2.2.1. 실험 용액

칼슘 전류 측정을 위해 사용된 전극 내 용액의 기본 조성(mM)은 120 N-methyl- D-glucamine(NMG)-methanesulfonate(MS), 20 tetraethylammonium(TEA)-MS, 20 HCl, 11 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 0.3 Na<sub>2</sub>-GTP, 14 creatine phosphate (pH 7.2, 290 mOsm/kg)로 이루어졌다. 세포외 관류액의 조성(mM)은 145 TEA-MS, 10 HEPES, 10 CaCl<sub>2</sub>, 15 glucose, 0.0003 tetrodotoxin(TTX) (pH 7.4, 325 mOsm/kg)으로 하였다. 막전압(membrane potential)을 기록하기 위한 막전류 고정 패치법 (Current-clamp patch-clamp method)와 GABA 및 5-HT에 의한 반응을 조사하기 위한 그라미시딘 천공 패치법 (gramicidin-perforated patch-clamp method)의 전극 내 용액의 기본 조성 (mM)은 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA (pH 7.2, 295 mosm/KgH<sub>2</sub>O)이며, 세포외 관류액의 조성(mM)은 150 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 2 glucose (pH 7.4, 325 mosm/KgH<sub>2</sub>O)으로 이루어졌다. 그라미시딘 천공 패치 전극 내 용액에는 dimethyl sulfoxide (DMSO)을 용매로 사용하여 만든 높은 농도의 그라미시딘 stock을 최종 농도가 50 µg/ml가 되도록 첨가하여 사용하였다. Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger의 역할을 조사하기 위한 세포 관류액의 조성(mM)은 126 NaCl, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 2 glucose (pH 7.4, 325 mosm/KgH<sub>2</sub>O)이었으며 5% CO<sub>2</sub>로 기포를 내어 pH를 조절하였다.

### 2.2.2. 약물

Collagenase type D와 Trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN, USA)로부터 구입하였으며, 5-HT, GABA, Bicuculin, TPMPA, Picrotoxin은 Tocris (Tocris Cookson Inc., Bristol, UK)로부터 구입하였다. 형광 염색에 사용한 각종 항체를 비롯하여 DNase type I, furosemide, bumetanide 등과 세포 배양과 관계된 모든

배지 및 약물은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 약물은 7-array-polyethylene 튜브에 연결된 가스크로마토 그라피용 모세관 끝을 신경세포의 100  $\mu\text{m}$  이내에 위치하도록 한 후 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

### 2.3. 전기 생리학적 실험

T-형을 비롯한 전압 의존적 칼슘 전류는 전형적인 전세포 패치클램프(whole-cell patch-clamp) 방법으로 기록하였다(Hamill 등, 1981; Jeong 및 Ikeda, 1998; Lee 등, 2002; Won 등 2006). 전극은 Corning 7052 borosilicate 유리 모세관(외경-1.65 mm; 내경-1.2 mm, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)으로부터 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co.)를 사용하여 만들었다. 유리 전극의 끝은 Sylgard 184로 코팅하고 microforge로 열처리하여 전극 내부에 용액을 채웠을 때 저항이 2~3 M $\Omega$ 이 되도록 만들었다. 세포가 들어 있는 배양 접시를 도립 현미경(Nikon, Japan)위에 올려놓고, 세포 외액을 중력에 의해 약 1~2 ml/min 속도로 관류되도록 하였다. 세포막 전압의 변화는 막전류 고정법(current-clamp method)으로, 세포의 막전류는 막전압 고정법(voltage-clamp method)으로 각각 기록하였다. 막전압 고정전 세포막의 직렬 저항(series resistance)은 패치 클램프 증폭기(patch-clamp amplifier) (Axopatch 1D, Axon Instruments, Foster city, CA, USA)에 내장된 보정 기능을 이용하여 80% 이상 감소시켰다. 전압 자극 프로토콜 생성 및 칼슘 전류의 기록은 ITC-18 아날로그/디지털 전환기 (Instrutech, Port Washington, NY, USA)가 연결된 맥킨토시 컴퓨터에 장착되어 있는 S5(미국 NIH의 Stephen R. Ikeda 박사제작) 프로그램을 사용하여 이루어졌다. 전류는 2~5 kHz로 저대역 필터링(low pass filtering) (-3dB: four-pole Bessel)을 한 뒤, 컴퓨터의 하드 디스크에 저장하였고, IGOR PRO (Wave-Metrics, Lake Oswego, OR, USA)로 분석하였다. 막전류 고정법에 의한 실험 데이터는 EPC 10 패치 클램프 증폭기(Heka Elektronik, Lambrecht, Germany)를 사용하여 획득하였고, Pulse/Pulsefit (v8.50) (Heka Elektronik, Lambrecht, Germany) 소프트웨어를 사용하여 IBM 컴퓨터에 저장하여 분석하였다.

모든 실험은 실온(20~22℃)에서 시행하였다. 본 실험에 사용된 전류 측정 장치는 그림 5에 도식적으로 나타내었다.

## 2.4. MPG 표본 제작 및 면역 조직화학 염색

MPG 표본 제작을 위해, 쥐를 에테르로 마취 후, 깊은 마취 상태에서 왼쪽 심실을 통해 0.9% NaCl을 포함하는 0.1 M 인산염완충액(PBS; pH 7.4, 37℃)을 관류하여 혈액을 제거하였고, 이어서 4% paraformaldehyde로 관류, 고정하였다. 관류 고정을 마친 다음 면역조직화학 염색을 위해 MPG 표본을 적출하여 동일한 고정액으로 4℃에서 16-20시간 동안 후고정하였다. 이후 표본을 25% sucrose 용액(in 0.1 M PBS)에 16시간 동안 침투시키고 -70℃ isopentane으로 동결시켜, 동결 절편기(Reichert-Jung, Germany)를 이용하여 25  $\mu$ m 두께의 절편을 제작하였다. 면역 염색의 모든 과정은 자유 부유법으로 시행하였다. 우선 동결 절편을 3% 과산화수소에 20분간 처리한 후 0.1 M PBS로 세 번 수세하였고, 이차 항체에 대한 비특이적 반응을 제거하기 위하여 5% normal horse serum으로 두 시간 동안 처리하였다. 이어서 항 GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>A</sub> 수용체 및 tyrosine hydroxylase(1:250; sigma chemical Co. St. Louis, MO, USA)를 각각 실온에서 overnight 처리하였고 0.1% Triton X-100을 포함하는 0.1 M PBS (PBST)로 네 차례 수세한 후 biotinylated mouse IgG (Vectastain Elite Kit, Vector Labs, USA)로 한 시간 동안 반응시켰다. 항체 흡착을 마친 표본은 PBST로 수세한 후 avidin-biotin peroxidase complex(Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, USA)에 한 시간 동안 반응시켰다. 면역 반응을 마친 조직을 PBS로 수세한 후 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 포함하는 0.05% Ni-DAB(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 발색시켰으며 cresyl violet으로 대조 염색을 시행한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

## 2.5. 역전사 중합 연쇄 반응 (RT-PCR)

TRIzol® LS 반응액 (reagent) (Invitrogen Corp.)을 이용하여 주골반 신경 세포들로부터 전체 RNA를 분리하였다. 수초를 벗긴 MPG를 Trizol에 녹인 다음 클로로포름 (chloroform)을 가하여 보텍스 교반기를 사용하여 잘 섞어 준 뒤 이를 4°C에서 13,000 x g로 20분간 원심 분리하여 상층액만을 조심스럽게 취하였다. 이 상층액은 동량의 isopropanol과 섞은 다음 -70°C에서 1시간 이상 세워 두어 RNA를 침전시켰다. 다시 4°C에서 13,000 x g로 20분간 원심 분리하여 RNA 침전물(pellet)을 얻었으며, 이를 다시 75% ethanol로 씻어낸 후 원심 분리하여 최종 RNA 샘플을 얻어 분광 광도기의 (Effendorf) 260 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. cDNA의 합성을 위해 1  $\mu$ g RNA와 1  $\mu$ g OligodT를 먼저 70°C에서 5분간 반응시키고, 200 units의 murine leukemia virus reverse transcriptase(Promega Corporation, Madison, WI, USA), 25 nmoles의 dNTP, 20 units의 RNase inhibitor(Promega) 등을 혼합하여 37°C에서 1 시간 반응시켰다. PCR은 여러 양이온-Cl<sup>-</sup> 공수용체와 GapDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)에 특이적인 primer들을 이용하여 수행하였는데, 이들 primer의 염기서열은 표 1에 요약하였다. PCR 반응액 (20  $\mu$ l)에는 합성된 cDNA, 각각의 primer(10 pmoles), 1.0 units의 AmpliTaq polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nmoles의 dNTP 등을 혼합하여, 95°C 15분 선가열한 후, 95°C 60초, 55°C 45초, 72°C 60초로 35 cycle 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide(Et-Br)가 포함된 1.5% agarose gel에 전기 영동하여 U.V 하에서 관찰하였다.

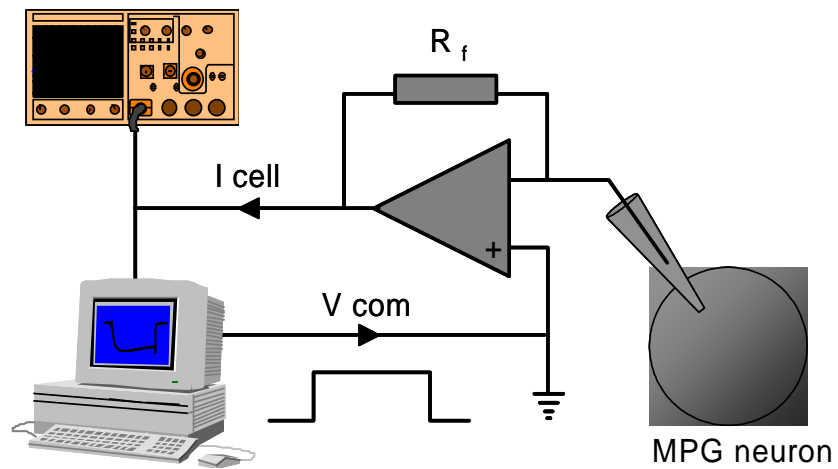


그림 5. 막전압 고정법에 의한 이온 채널 전류 측정 장치의 구성 모식도.

패치클램프 전용 software(S5) 또는 IGOR 프로그램을 이용하여 만든 펄스 프로토콜로 고정하고자 하는 전압 ( $V_{com}$ )을 A/D converter(ITC-18)를 사용하여 아날로그 신호로 변환한 후 패치 전극을 통하여 세포에 전달하고 세포막에 존재하는 이온 채널의 활성 정도에 따라 변화하는 전압을 영점(null-out)하기 위해 증폭기(Axo-1D 또는 EPC10)를 통하여 흘려주는 전류( $I_{cell}$ )를 다시 디지털 신호로 전환하여 컴퓨터의 하드 디스크에 저장함.

표1. 역전사 연쇄중합 반응에 사용한 primer들

Primer	Accession #		Sequence	Predicted size
<b>NKCC1</b>	AF051561	F	GATGGTTTTGCGAATGGAGATAGAT	790 bp
		R	GGGTATGGCTGACTGAGGA	
<b>NKCC2</b>	U10096	F	GAGATGAGCAAGCAGAAAAC	925 bp
		R	GAGAAGTCGTAGCCCAGTCC	
<b>KCC1</b>	U55815	F	CCTGGAGTTGGGTTGTCTAAGA	233 bp
		R	CATCAGCCCTCACCAGTCATCTC	
<b>KCC2</b>	U55816	F	CTCAACAACCTGACGGACTG	399 bp
		R	GCAGAAGGACTCCATGATCCTGCG	
<b>KCC3</b>	AF108831	F	GTG TGG CGA AAG TGC AGC ATA C	641 bp
		R	ATG GTG ATC ACT TCA CTG TCC AC	
<b>KCC4</b>	AW530615	F	CTG GAA GAT GGC TGC ACT TG	480 bp
		R	GAC AGC AAC CCC ATG GTA TC	
<b>NCC</b>	NM-019345	F	GGC ACC ATC TTC CAG TCG GAG	607 bp
		R	TGG CAG TAA AAG GTG AGC AC	
<b>GapDH</b>	AB017801	F	TCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG	377 bp
		R	GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC	

## 2.6. 외래 유전자의 이중 발현

MPG 신경세포에 KCC2와 GFP를 발현시키기 위해 세포 핵 내 미세 주입 방법 (intranuclear microinjection method)을 사용하였다(Ikeda, 1996; Jeong 및 Ikeda, 1999; Ikeda 및 Jeong, 2004) (그림 6). pCDNA3.1에 클로닝 된 KCC2를 코딩하는 cDNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  stock)와 세포 내 발현 표식자로 EGFP-N1 (0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  stock)를 각각 1  $\mu\text{l}$ 씩 넣고, TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) 8  $\mu\text{l}$ 를 잘 혼합한 후 GELoader (Eppendorf, Madison, WI, USA)를 이용하여 한쪽 끝이 막힌 모세관에 옮긴다. 모세관을 eppendorf tube로 옮긴 후 원심분리기 5415R(Eppendorf)을 이용하여 상온에서 30분간 10,000 rpm으로 원심 분리하여 이물질을 침전시키고 순도 높은 cDNA 혼합물을 얻는다. Microinjection pipet은 얇은 벽을 가진 유리 튜빙(외경: 1.2 mm, w/filament, WPI)을 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA)를 사용하여 만들었다. cDNA 혼합물을 GELoader를 이용하여 미세 주입관(microinjection tube)에 넣고, Eppendorf 5246 microinjector(Eppendorf)에 연결된 홀더에 삽입하였다. 위상차 도립 현미경 (TE 2000, Nikon)하에서 Eppendorf 5171 micromanipulator(Eppendorf)를 이용하여 세포의 핵 중앙에 관 끝이 위치하도록 한 다음 주입하였고, 주입되는 cDNA의 양은 압력 (100~200 hPa)과 주입 시간 (0.2~0.4 초)에 의해 조절되었다. 특정 단백질을 성공적으로 발현하는 세포는 cDNA 주입 후 14-24 시간에 epifluorescence 유닛(B-2A filter cube, Nikon)이 장착된 도립 현미경 (Nikon)하에서 GFP가 내는 녹색 형광을 관찰하여 알 수 있었다.



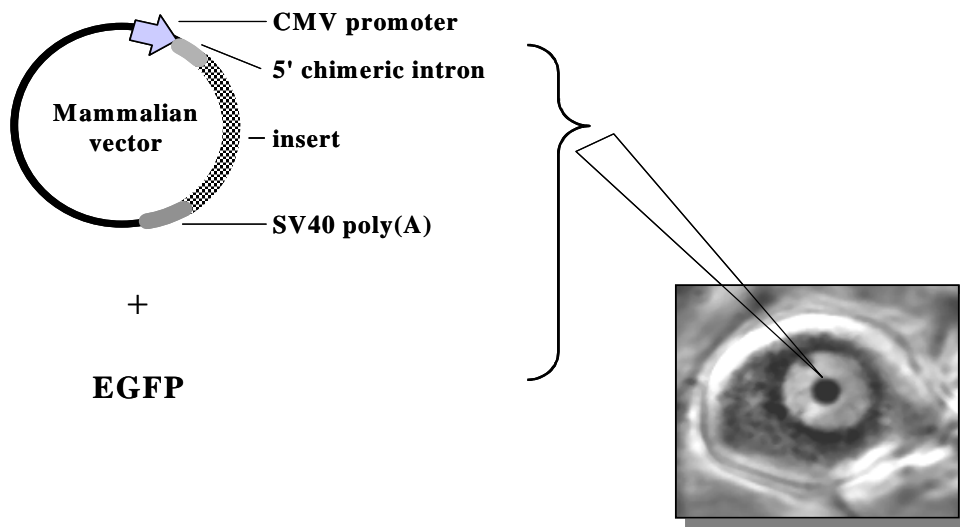


그림 6. 세포 핵 내 cDNA 주입방법.

Eppendorf 미세주입 시스템 (Eppendorf 5246 transjector /5171 micromanipulator)을 이용하여 효소 처리에 의해 분리된 주골반 신경세포의 핵 내에 KCC2 cDNA를 약 100-200 hPa 정도의 압력으로 주입(pressure injection) 하였다. 이때 발현 marker로 GFP를 코딩하는 cDNA (pEGFP-N1)를 같이 주입시켜 발현시킨다. 모든 cDNA 들은 CMV 프로모터가 있는 포유 동물 발현 벡터에 subcloning 된 것을 사용하였다.

## 2.7. 데이터 분석 및 통계처리

모든 데이터 분석과 그래프 구성을 위해 IGOR 프로그램을 사용하였다. 전류 및 전압의 크기는 각 최대치에서 측정하였다. 세포막 전기 용량 ( $C_m$ )은 20 ms, 10 mV 과분극 자극을 가한 뒤 얻은 용량 전류(capacitive current)의 면적을 측정하는 IGOR 매크로를 사용하여 구하였다. 모든 결과는 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였고 통계적인 의미는 Student t-검정(unpaired)이나 필요한 경우 one-way ANOVA로 확인하였고  $p < 0.05$  인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 농도-반응 곡선(concentration-response curve)의  $EC_{50}$ 는 Prism 3.0 software(GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA)에 있는 Hill 공식, 즉  $I = \text{MaxI} / (1 + EC_{50}/[I])^{-1}$  (I: 전류크기, MaxI: 최대 전류크기,  $EC_{50}$ : 최대전류의 절반이 활성화될 때의 효현재 농도)을 적용하여 구하였다.

## 제 3장 결과

### 3.1. 주골반 신경 세포의 특징

MPG는 한 신경절 캡슐 내에 교감 및 부교감 신경이 공존하고 있기 때문에 신경세포를 분리한 후 전기 생리학적 실험을 수행할 때 두 종류의 세포를 구별해야 한다. 선행 연구에 의하면 MPG 세포 중 tyrosine hydroxylase(TH)에 대한 면역-조직학적 염색에서 양성을 보이는 교감 신경세포는 세포의 크기에 비례하는 전기용량(capacitance, Cm)이 크며 T-형 칼슘채널을 발현하는 반면 TH에 음성인 부교감 신경 세포는 전기 용량이 작으며 T-형 칼슘 채널을 발현하지 않는다고 하였다(Zhu 등, 1995). 본 연구에서는 이러한 전기적인 특성에 따라 교감과 부교감 신경 세포로 구별하였다. 즉, MPG 세포막의 평균 전기 용량은 교감 신경세포( $65.0 \pm 3.4$  pF)가 부교감 신경세포( $37.5 \pm 2.7$  pF)보다 현저하게 큰 것을 알 수 있었다( $p < 0.001$ ). 또한 MPG 교감 신경세포에서는 램프 펄스를 가하였을 때 고전압에 의해 활성화되는 칼슘 채널에 의한 전류 이외에  $-30 \sim -40$  mV의 낮은 전압에서 활성화되는 hump 형태의 내향성 T-형 칼슘 전류가 두드러지게 기록되었다(그림 7.A) 신경세포에 일정 기간 동안 과분극 전류를 가하다가 멈추게 되면 막전압이 과분극되었다가 안정막 전위로 돌아오면서 활동 전압을 형성하게 되는데, 이를 'anode break excitation' 이라 한다. 이는 안정막 전압에서 비활성화 되어 있던 T-형 칼슘채널이 과분극에 의해 활성화될 수 있는 채널로 전환되는 데 이렇게 전환된 T-형 칼슘채널을 통해 들어오는 칼슘 이온에 의한 탈분극 때문에 나타나는 현상이다(Lee 등, 2002). 그림 7B에 나타낸 바와 같이 과분극 전류를 세포에 주입한 다음 형성되는 post-anodal spike는 T-형 칼슘 채널이 발현되는 교감 신경세포에서만 관찰되었다.

막전압을  $-80$  mV로 고정하고 GABA( $100 \mu\text{M}$ )를 가하면 MPG 교감 신경세포에서는 내향성 전류가 기록되지만 부교감 신경 세포에서는 GABA에 의한 반응은 매우 미미하게 나타났다. 반면 5-HT( $10 \mu\text{M}$ )에 의한 내향성 전류가 대부분의 부교감 신경 세포에서는 기록되나, 교감 신경세포에서는 거의 관찰되지 않았다(그림 8). 이렇게 MPG에 존재하는 신경세포의 종류에 따라 GABA와 5-HT에 대한 반응이 다르기 때문에 앞에서 기술한 기본적인 전기 생리학적 특성과 함께 GABA 및 5-HT 효과를 기준으로 하여 단일 MPG 신경세포들을 교감 및 부교감 신경세포로

구별하여 실험하였다.

## 3.2 MPG 교감 신경 세포에서 GABA에 의한 반응

### 3.2.1. MPG 교감신경세포에서 GABA 농도-전류 관계

MPG 교감 신경세포에서 GABA에 의한 반응을 연구하기 위하여 먼저 몇 가지 기본적인 실험들을 수행하였다. 전형적인 전세포 패치 클램프법을 이용하여 -80 mV로 막전압을 고정된 상태에서 GABA의 농도와 전류의 상관관계를 확인하였다. GABA의 농도가 10  $\mu$ M에서 3 mM로 증가함에 따라 내향성 GABA 전류의 크기가 비례적으로 증가하였다. GABA에 의해 유도된 전류의 크기를 포화 농도에서 기록한 수치에 대해 표준화된 값으로 전환한 후, GABA 농도-전류의 상관 그래프를 그렸고 Hill 공식으로 curve fitting한 결과  $EC_{50}$  값은 약 298.5  $\mu$ M임을 확인할 수 있었다 (그림 9).

### 3.2.2. MPG 교감 신경세포에 발현되는 GABA 수용체의 종류

일반적으로 GABA에 의해 활성화되는 ionotropic 채널은  $GABA_A$ 와  $GABA_C$ 의 두 종류가 알려져 있다(MacDonald 및 Olsen, 1994; Barnard 등, 1998). MPG 교감 신경 세포에서 GABA에 의한 효과를 매개하는 수용체의 종류를 확인하기 위하여  $GABA_A$ 와  $GABA_C$  수용체의 특이적 차단제로 알려진 bicuculin(10  $\mu$ M)과 TPMPA (10  $\mu$ M)를 각각 처리하였다. 그림 10 A에 나타낸 바와 같이 MPG 교감 신경세포에서 bicuculin에 의해 GABA 전류가  $16.2 \pm 0.5$  pA/pF에서  $1.3 \pm 0.2$  pA/pF로 억제되었으나 TPMPA에 의해서는 억제 효과가 일어나지 않음을 확인하였다( $14.8 \pm 1.8$  pA/pF). 이러한 실험 데이터는 MPG 교감 신경세포에서 GABA 전류는  $GABA_A$  수용체의 활성화에 의해 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 다른 종류의  $GABA_A$  수용체의 특이적 차단제인 picrotoxin에 의해서도 GABA 전류가 억제되는 것으로 재차 확인하였고 그림과 같이 결과를 요약하였다(그림 10). 한편, GABA와  $GABA_A$  수용체 특이적 항체를 사용하여 MPG 절편에서 면역 조직 화학 염색을 수행하였다. 대조군으로 염색한 소뇌에서와 마찬가지로 MPG의 신경세포에서 GABA가 녹색으로 면역 염색되어 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한  $GABA_A$  수용

체 특이적인 항체에 의해 MPG 신경세포가 적색으로 면역 염색되었다. 교감 신경의 보편적 마커로 알려진 TH와 GABA<sub>A</sub> 수용체에 특이적 항체를 사용하여 이중염색(double labelling)을 하였을 때 동일 세포의 세포막에 겹쳐져 염색되어 있음을 확인할 수 있었다(그림 11). 이러한 결과는 TH 양성의 MPG 교감 신경세포에서 GABA<sub>A</sub> 수용체를 매개한 전류가 기록된다는 전기 생리학적인 실험 결과와 일치하였다.

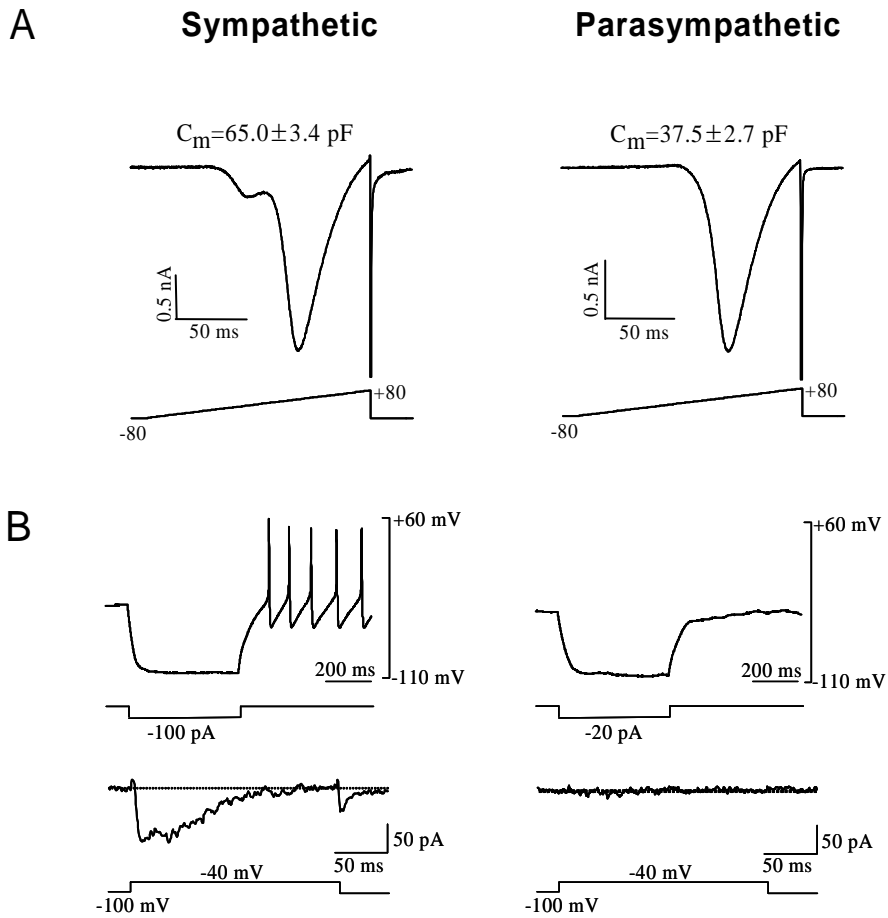


그림 7. MPG에 존재하는 두 종류의 신경 세포.

A. MPG의 교감 신경(좌측)과 부교감 신경(우측)에서 20 ms, 10 mV 과분극 자극을 가한 뒤 얻은 평균 세포 전기 용량 값과 막전압 고정 상태로 -80 mV에서 +80 mV 까지 램프 펄스를 주입하여 기록된 전류의 형태이다. B. 교감 및 부교감 신경에 과분극 전류를 400 ms동안 가하였다가 멈추었을 때 발생하는 활동 전압의 형태(B의 위)와, T형 칼슘 전류를 확인하기 위하여 -100 mV로 막전압을 고정하고 -40 mV로 탈분극 하였을 때 기록된 전류(B의 아래)이다.

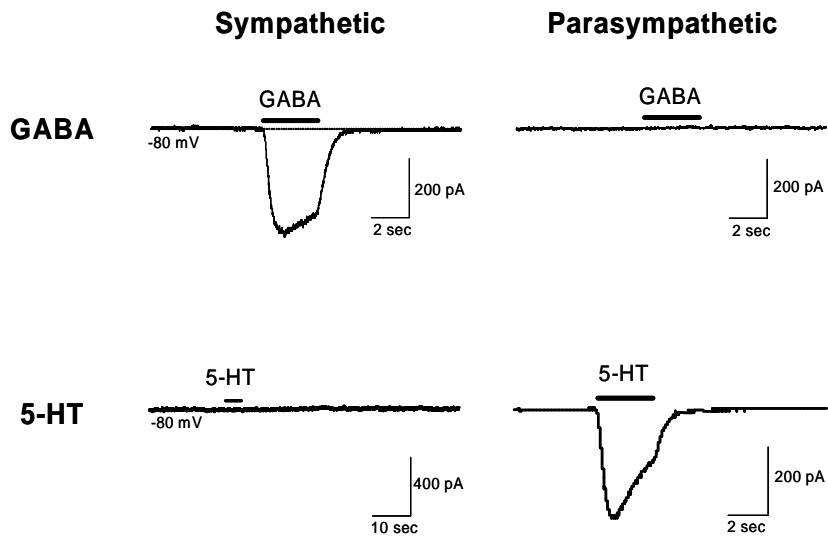


그림 8. MPG 신경세포 종류에 따른 GABA 및 5-HT 전류.

막전압을 -80 mV에 고정하여 GABA(100  $\mu$ M)와 5-HT(10  $\mu$ M)를 MPG 교감 및 부교감 신경 세포에 처리하여 반응 전류를 기록하였다. 검정색 막대는 약물을 처리한 시간을 나타낸다.

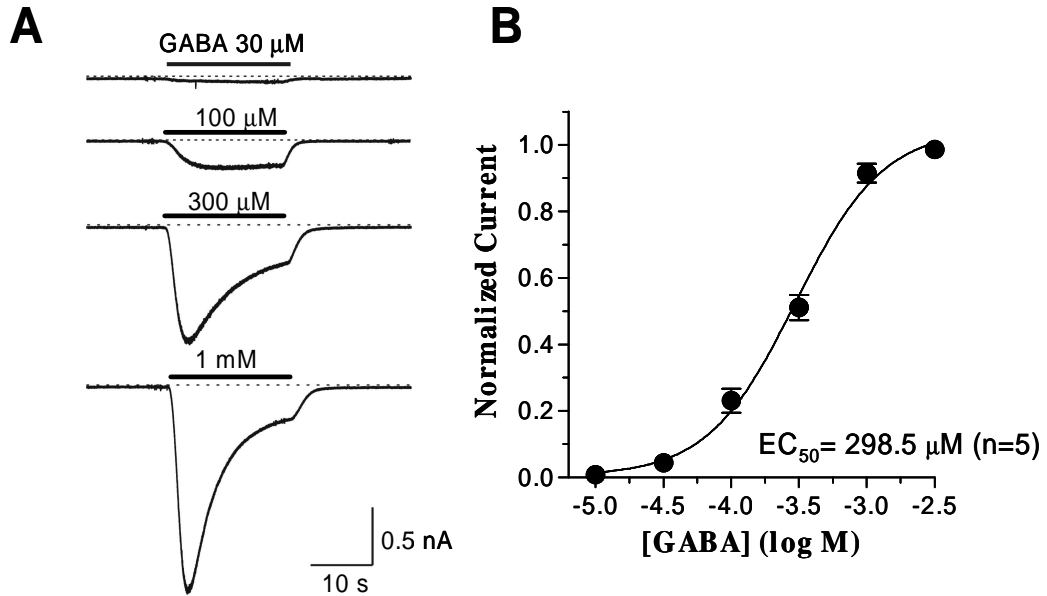


그림 9. MPG 교감 신경세포에서 GABA 농도와 전류 크기의 상관 관계.

A. 막 전압을 -80 mV로 고정된 상태에서 여러 농도(10 μM ~ 3 mM)의 GABA에 의해 유도된 전류를 기록하였다. 가한 GABA의 농도와 관류시킨 시간을 각각 기록된 전류의 상단에 나타내었다. B. GABA 농도-전류크기 곡선. GABA에 의해 유도된 전류는 포화 농도에서 기록한 수치에 대해 표준화된 값을 취하였다. 모든 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며 괄호안의 값은 실험 예수를 나타낸다. EC<sub>50</sub> 값은 Hill 공식 즉,  $I_{GABA} = \text{Max}I / (1 + EC_{50}/[GABA])^{-1}$ 으로 curve fitting하여 구하였다.



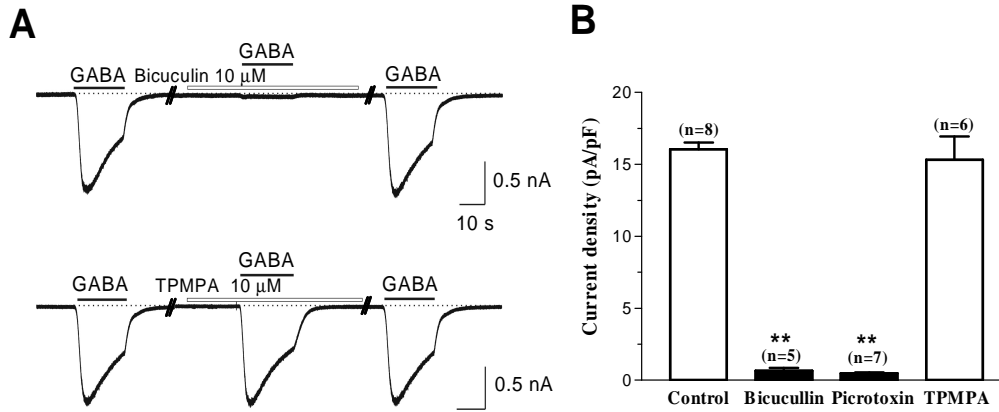


그림 10. MPG 교감 신경 세포에서 GABA 전류에 대한 GABA 수용체 차단제의 효과.

A. 막전압을 -80 mV로 고정시킨 상태에서 10  $\mu$ M GABA에 의해 유발된 내향성 전류에 각각 GABA<sub>A</sub> 및 GABA<sub>C</sub> 수용체 특이적 차단제인 Bicuculin(10  $\mu$ M)과 TPMPA(10  $\mu$ M)가 미치는 영향을 확인하였다. B. GABA에 의해 활성화된 전류에 대해 Bicucullin, Picrotoxin, TPMPA 같은 특정 GABA 수용체에 특이적 차단제들의 억제 효과를 요약하였다. 모든 데이터는 평균 표준 오차로 나타내었으며 괄호안의 값은 실험 예수를 나타낸다. \*\* p<0.01

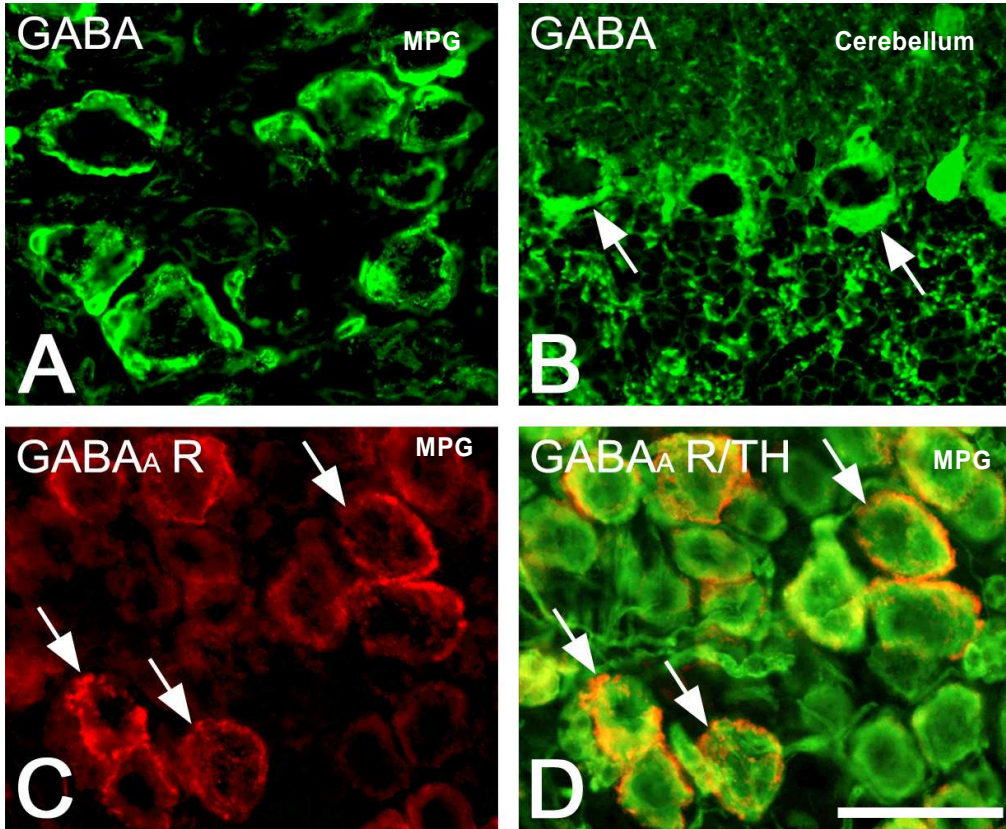


그림 11. MPG에서 GABA 및 GABA<sub>A</sub> 수용체의 면역 형광 염색.

A, B. MPG와 소뇌 조직 각각에서 GABA에 대한 특이적 항체에 의해 형광 염색된 결과(녹색)를 확인하였다. C. MPG에서 GABA<sub>A</sub> 수용체 특이적 항체에 의한 형광 염색된 결과(적색)를 확인하였다. D. Tyrosine hydroxylase(TH)와 GABA<sub>A</sub> 수용체 특이적 항체로 double-labelling 하였을 때 동일 세포의 세포막에 염색됨을 보여준다(화살표).

### 3.2.3. MPG 교감 신경 세포에서 GABA에 의한 막전압의 변화

일반적으로 중추 신경계(CNS)에서는 안정막 전압을 과분극 시킴으로 억제성 신경전달물질(Inhibitory neurotransmitter)로 작용하는 GABA가 MPG 신경세포에서는 어떠한 작용을 하는지, 그 기능적인 부분에 대하여 연구하였다. 기본적으로 MPG 교감 신경세포에 대한 GABA의 작용을 막전압의 탈분극 혹은 과분극 반응을 통하여 확인하기 위하여 그라미시딘 천공 패치 방법을 이용한 전류 고정 상태(current clamp,  $I=0$ )에서 GABA를 처리한 후 세포막 전압의 변화를 관찰하였다. MPG를 단일 신경세포로 분리하여 3시간 정도 배양하여 안정화 시킨 후 교감 신경세포에 GABA를 처리하였을 때 막전압의 탈분극 현상이 관찰되었으나( $20.4 \pm 0.4$  mV), 부교감 신경세포에서는 GABA에 의한 막전압 변화가 거의 나타나지 않았다( $1.5 \pm 0.1$ mV). MPG 신경세포를 24시간 배양한 후 GABA에 의한 막전압 변화를 측정하였을 때 교감 신경세포의 탈분극 r크기는 분리하여 3시간 후 측정된 값보다 감소하였으며( $7.5 \pm 0.9$  mV) 부교감 신경세포에서는 GABA에 의한 막전위의 변화가 거의 관찰되지 않았다( $1.1 \pm 0.2$  mV) (그림 12).

### 3.2.4. 세포내 $Cl^-$ 농도와 GABA 전류의 역전전압( $E_{GABA}$ )의 상관성

일반적으로  $GABA_A$  수용체는 다섯 개의 서브유닛 ( $6\alpha$ ,  $3\beta$ ,  $3\gamma$ ,  $1\delta$ ,  $1\epsilon$ ,  $1\theta$ ,  $1\pi$ )이 결합되어 있는 구조를 가진  $Cl^-$  channel로 알려져 있다(Akabas, 2004; Chebib, 2004). 따라서 MPG 신경세포에서 관찰되는 막전압의 탈분극이 GABA 수용체를 통한  $Cl^-$ 의 이동에 의한 것인지를 확인하였다. 이를 위해 전세포 파열(whole-cell ruptured) 패치 클램프 방법을 사용하여 세포내  $Cl^-$  농도를 변화시켰을 때 GABA 전류의 역전 전압값( $E_{GABA}$  또는  $E_{Cl}$ )의 변화를 조사하였다. 그림 13A에 나타난 바와 같이 패치 전극 내 용액의  $Cl^-$ 의 농도를 12 mM에서 22 mM로 변화시켰을 때  $E_{GABA}$  값이 약 -20 mV에서 0 mV로 증가되었음을 확인 할 수 있었다. 그림 13B는

패치 전극 내 용액의 농도가 각각 12 mM과 22 mM일 때 막고정 값의 변화에 따른 GABA 전류의 크기를 나타낸 것이다. 그래프의 x절편의 값을 취하여 각  $\text{Cl}^-$  농도에서의  $E_{\text{GABA}}$  값을 측정할 수 있었으며 이때 세포 내  $\text{Cl}^-$  농도가 증가할수록  $E_{\text{GABA}}$  값은 비례하여 감소함을 알 수 있었다(그림 13C). 이러한 결과로부터 GABA 전류는  $\text{Cl}^-$  전류이고 GABA에 의한 막전압의 탈분극은  $\text{Cl}^-$ 가 세포 밖으로 이동하여 일어났음을 추측할 수 있다. 한편,  $\text{Cl}^-$  이온의 역전 전압값을 실험을 통해 측정한다면 Nernst 식(서론 참조: 식1)을 이용하여 세포 내의  $\text{Cl}^-$  농도를 역으로 계산할 수 있다(그림 13C).

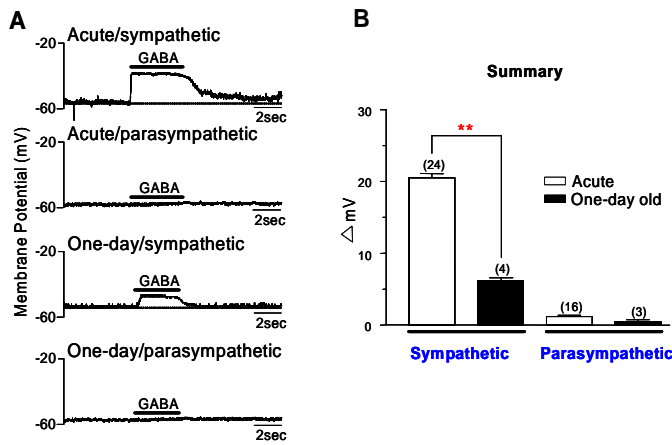


그림 12. MPG 교감 신경세포에서 GABA에 의한 막전압의 변화.

A. 막전류 고정 상태(current-clamp,  $I=0$ )에서 GABA 투여에 의한 막전압의 변화를 조사하였다. 단일 신경 세포로 분리한 후 3시간과 24시간 배양하여 교감 및 부교감 신경 세포에서 각각 GABA에 의한 막전압의 변화를 관찰하였다. B. 두 종류의 주골반 신경 세포에서 시간에 따른 탈분극 반응 크기의 변화를 요약하였다. 모든 데이터는 평균 표준 오차로 나타내었으며 괄호안의 값은 실험 예수를 나타낸다.

\*\*  $p < 0.01$

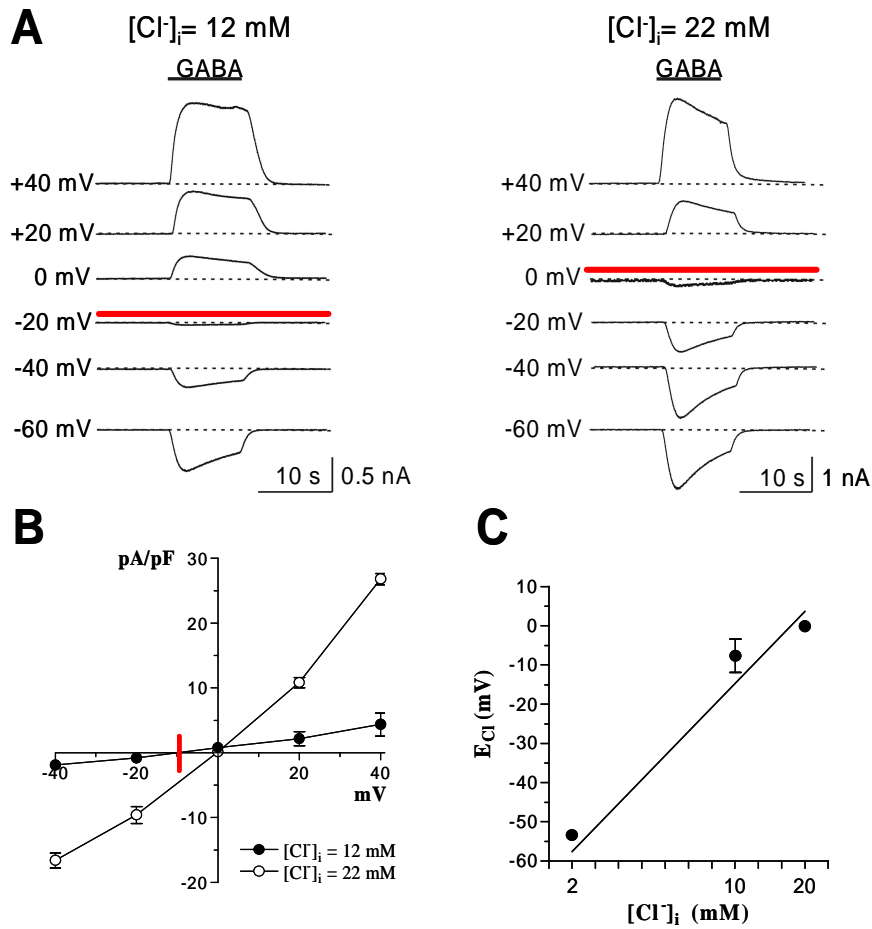


그림 13. MPG 교감 신경세포에서 세포내  $Cl^-$  농도에 따른 GABA 전류의 역전 전압 변화.

A. 전극 내의  $Cl^-$  농도를 12 mM에서 22 mM로 변화시켰을 때, GABA에 의해 유발되는 전류의 역전 전압 ( $E_{GABA}$ )이 역전되는 현상을 막전압의 고정값을 변화시키면서 기록하였다. B. 전극 내의  $Cl^-$  농도를 변화시켰을 때 막전압의 크기와 GABA에 의해 유발되는 전류의 밀도 관계를 나타내었다. 전류-전압 곡선으로부터 전류가 0이 되는 x 좌표상의 점이  $E_{GABA}$ 이다. C. 세포내의  $Cl^-$  농도와  $E_{GABA}$ 의 변화의 관계를 나타내었다. 세포내의  $Cl^-$  농도는 Nernst equation 즉,  $E = (RT/nF) \ln [Cl^-]_i/[Cl^-]_o$ 으로 계산하였다. 모든 데이터는 평균 표준 오차로 나타내었다.

### 3.3. MPG 교감 신경세포 내 $\text{Cl}^-$ 이온의 농도

GABA에 의한 막전압의 탈분극 반응은 MPG 신경세포 내의  $\text{Cl}^-$  농도가 비교적 높다는 사실을 시사한다 하겠다(Alvarez-Leefmans 등, 1988; Rohrbough 및 Spitzer, 1966; Sung 등, 2000). 따라서 양이온만 통과할 수 있는 공 (pore)을 만들어 전류 측정 동안 세포내의 생리적  $\text{Cl}^-$ 의 농도를 그대로 유지시킬 수 있는 방법인 그라미 시딘 천공 패치 클램프 방법(Abe 등, 1994; Akaike, 1996)을 사용하여 MPG 교감 신경 세포에서 막전압 고정값의 변화에 따른 GABA 전류를 측정하였다. 그 결과 MPG 교감 신경세포에서  $E_{\text{GABA}}$  (즉,  $E_{\text{Cl}}$ )는 약  $-42.6 \pm 1.0$  mV ( $n=4$ )이었으며, 이를 Nernst 식에 대입한 결과 세포내  $\text{Cl}^-$ 의 생리적 농도는 약  $29.8 \pm 1.4$  mM ( $n=4$ )로 계산되었다(그림 14)

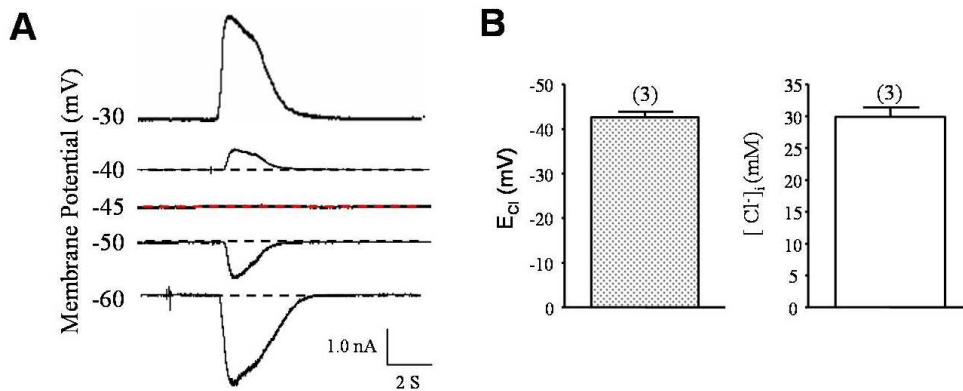


그림 14. MPG 교감 신경세포내의 생리적  $Cl^-$  농도의 간접적 측정

A. 그라미시딘 천공 패치 클램프법을 이용하여 MPG 교감 신경세포에서 막전압 고정값에 따른 GABA 전류를 기록하였다. B. A에서 얻어진 막전압 고정값과 GABA에 의한 전류의 크기의 상관관계로부터 MPG 교감 신경세포에서  $E_{GABA}$  값을 얻었다(좌).  $E_{GABA}$  값을 Nernst equation 즉,  $E_{GABA} = RT/nF \log [Cl^-]_i/[Cl^-]_o$ 에 대입하여 MPG 교감 신경세포내의 생리적  $Cl^-$  농도를 구하였다(우). 모든 데이터는 평균 표준오차로 나타내었다.



### 3.4. 역전사 연쇄중합 반응 분석에 의한 MPG에 발현된 양이온 -Cl<sup>-</sup> 공수송체의 동정

세포내의 Cl<sup>-</sup> 이온의 농도를 조절하는 메커니즘으로는 대표적으로 양이온의 농도 경사에 따른 확산력을 이용하여 Cl<sup>-</sup>의 배출과 유입을 담당하는 양이온-Cl<sup>-</sup> 공수송체들이 알려져 있다(Ben-Ari, 2002; Delpire, 2000; Owens 및 Kriegstein, 2002). 이러한 Cl<sup>-</sup> 공수송체들은 크게 NCC, NKCC1, NKCC2 등과 같은 Na<sup>+</sup> 매개 공수송체들과 KCC1, KCC2, KCC3, KCC4같은 K<sup>+</sup> 매개 공수송체들로 나눌 수 있다. 전자들은 내향성 Na<sup>+</sup> 농도 경사를 이용하여 세포 내 Cl<sup>-</sup>의 축적을 돕는 반면, 후자들은 외향성 K<sup>+</sup> 농도 경사에 의해 Cl<sup>-</sup>를 외부로 배출하여 세포내 Cl<sup>-</sup>를 낮추는 역할을 한다(Payne 등, 2003). 따라서 MPG 신경세포 내 Cl<sup>-</sup> 이온의 높은 농도가 유지되는 메커니즘을 규명하기 위한 방법으로 역전사 연쇄 중합 반응 분석을 통해 MPG 신경세포에 발현되는 양이온-Cl<sup>-</sup> 공수송체의 종류를 조사하였다. 표1에 양이온-Cl<sup>-</sup> 공수송체 특이적인 primer들을 나타내었다. 각 primer의 특이성은 동일 쥐의 뇌와 신장 조직을 이용하여 검증하였고, 대조군으로 GapDH에 특이적인 primer를 사용하여 나타내었다. 그림 15에서 나타낸 바와 같이 MPG에는 Na<sup>+</sup>매개 공수송체의 신경 타입 아형인 NKCC1의 mRNA가 희미하게 발현되어 있었으며, KCC1을 제외한 K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 공수송체들의 mRNA는 발현되어 있지 않았는데 특히, 신경에서 세포 내 Cl<sup>-</sup> 농도를 낮게 유지하는 기능을 가진다고 알려진 KCC 아형인 KCC2의 transcript가 발현되지 않았다.

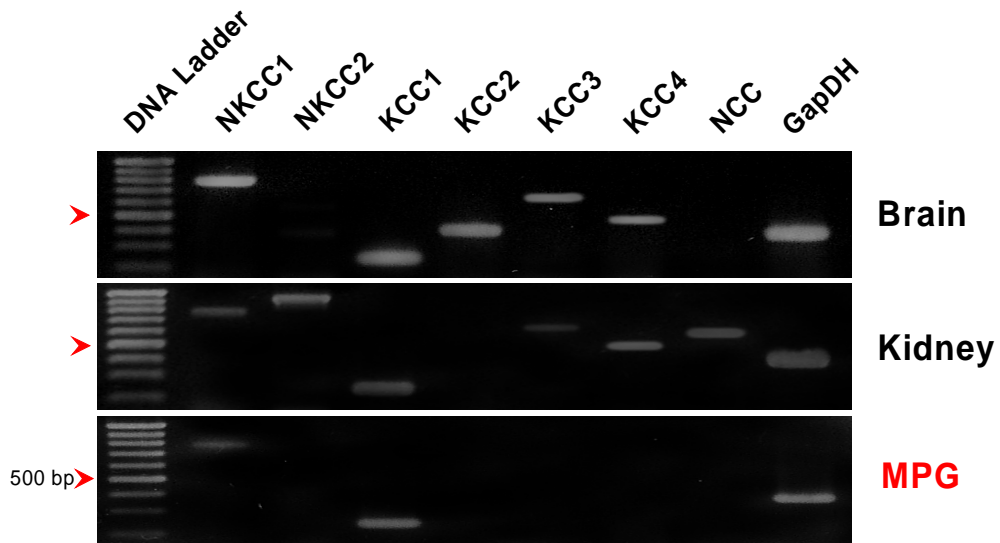


그림 15. MPG에서 역전사 연쇄 중합 반응 분석에 의한 양이온-Cl<sup>-</sup> 공수송체의 mRNA 발현 조사.

Cl<sup>-</sup> 이온의 공수송체의 mRNA 발현 여부를 확인하기 위해 MPG 조직으로부터 총 RNA를 분리한 후 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄 중합 반응을 실시하였다. Primer의 특이성은 동일한 쥐의 뇌와 신장을 사용하여 검증하였으며, 내부 대조군으로는 GapDH를 사용하였다.

### 3.5. MPG 교감 신경세포에서 KCC2의 과발현에 의한 GABA 반응의 변화

세포외로  $\text{Cl}^-$ 를 배출함으로써 세포 내  $\text{Cl}^-$ 의 농도를 낮게 유지해주는(즉,  $\text{Cl}^-$ 의 농도 경사를 크게 해주는) 역할을 하는  $\text{K}^+-\text{Cl}^-$  공수송체인 KCC2의 부재로 인해 MPG 교감 신경세포 내의  $\text{Cl}^-$  농도가 높게 유지된다는 본 연구의 가설을 증명하기 위하여 세포 핵 내 미세 주입법에 의하여 KCC2를 코딩하는 유전자를 과다 발현 시킨 후  $E_{\text{GABA}}$ 의 변화가 일어나는지를 조사하였다. 외부 유전자가 핵 내에 제대로 들어가 발현되는지를 확인하기 위하여 실험군으로 GFP를 코딩하는 벡터를 KCC2 벡터와의 비를 0.05:1로 섞은 벡터 혼합물을 주입하였으며, 대조군으로는 GFP 벡터만 주입하였다. 외부 유전자의 핵 내 미세 주입 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 15~17시간 정도 배양한 뒤 형광 현미경에 의하여 GFP가 발현된 신경세포를 확인하였고(그림 16) 그라미시딘 천공 패치 클램프 방법을 사용하여 막전압 고정값에 따른 GABA 전류를 기록하고  $E_{\text{GABA}}$ 를 구하였다. 그 결과 GFP만 발현된 대조군에 비하여 KCC2를 과다 발현 시켰을 경우 GABA에 의해 내향에서 외향으로의 전류 방향이 변화되는 시점의  $E_{\text{GABA}}$ 값이 대조군에 비해 더 음성 쪽으로 이동(negative shift)된 것을 관찰할 수 있었다(그림 17). 즉, GFP이 발현된 대조군의 경우  $E_{\text{GABA}}$ 값은 약  $-51 \pm 3$  mV(n=3)로 분리 후 바로 측정된 대조군보다 약 9 mV 정도 음성 이동을 하였는데 이러한 현상은 24 시간 배양 후 GABA 전류가 감소한 사실로 설명할 수 있다(그림 12). KCC2를 같이 발현한 실험군에서  $E_{\text{GABA}}$ 값이  $-80 \pm 1$  mV(n=3)로 현저하게 증가(음성으로 또는 절대값의) 된 것을 확인할 수 있었다. 이  $E_{\text{GABA}}$ 를 사용하여 MPG 교감 신경세포내의  $\text{Cl}^-$  농도를 계산하였을 때 GFP만 발현된 경우는  $21.6 \pm 1.5$  mM인 반면, KCC2를 같이 발현 시킨 신경세포의 경우  $6.5 \pm 0.1$  mM로 낮아진 것을 확인할 수 있었다(그림 18).

다음은 KCC2의 과다 발현에 의해 낮아진 MPG 교감 신경세포 내  $\text{Cl}^-$  농도에

기인하여 흥분성 GABA 반응이 억제성으로 전환되는지를 관찰하였다. GFP만 발현시킨 MPG 신경세포에서는 GABA에 의한 막전압의 탈분극이 유도되었으나, KCC2를 같이 발현했을 경우 GABA에 의한 과분극 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 막전압의 변화 현상이 과다 발현된 KCC2 때문인지 확인하기 위해  $K^+-Cl^-$  공수송체 차단제로 알려진 furosemide를 전 처치한 결과 GABA에 의한 세포막의 과분극 현상이 소실되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 19).

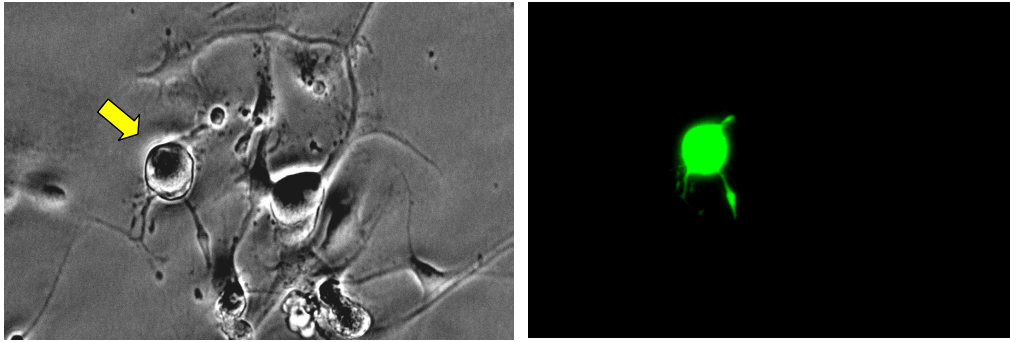


그림 16. MPG 신경세포에서 세포핵 내 미세 주입법에 의한 GFP 단백질의 발현.

형광 단백질을 코딩하는 pEGFP-N1(0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 MPG 교감 신경 세포내로 미세 주입하여 15~17 시간 배양한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

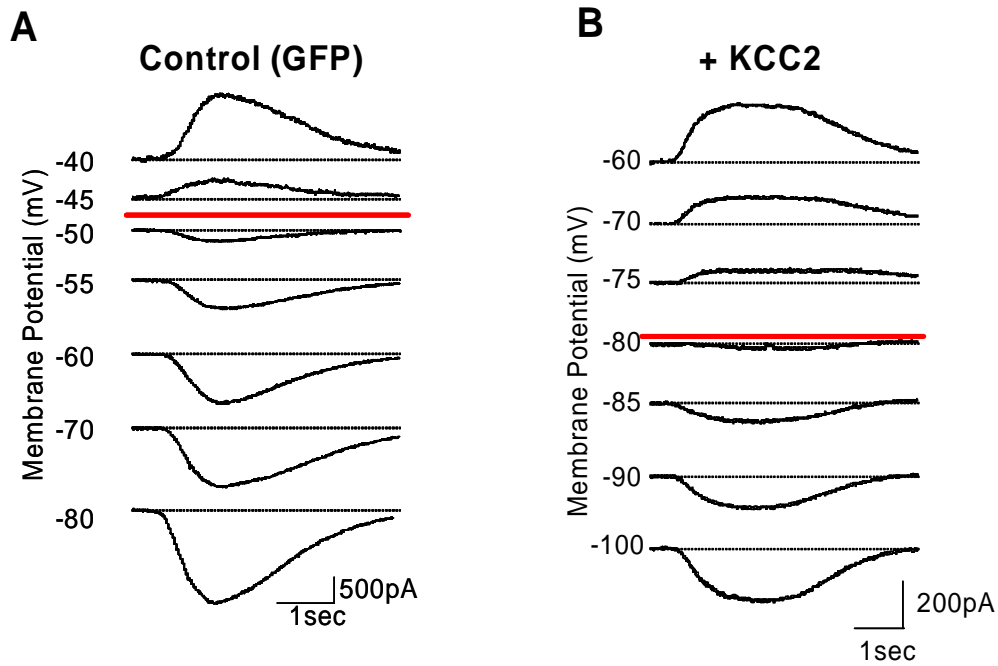


그림 17. MPG 교감 신경세포에서 KCC2 유전자 과다 발현 시  $E_{GABA}$ 의 변화.

MPG 교감 신경세포에 핵 내 미세 주입법을 통하여 대조군(A)으로는 pEGFP-N1 (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 단독으로 실험군(B)으로는 pEGFP-N1(0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 KCC(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 공동 발현 시켰을 때 막전압 고정값에 따른 GABA(100  $\mu\text{M}$ ) 의한 내향 및 외향 전류의 변화를 기록하였다.

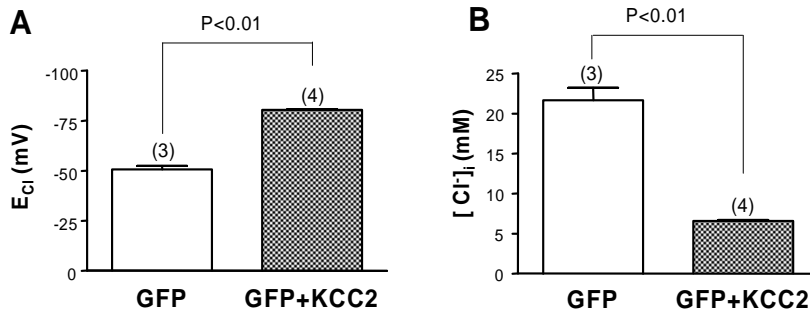


그림 18. MPG 교감 신경세포에서 KCC2 유전자 과다 발현 시 Cl<sup>-</sup>의 역전 전압 ( $E_{Cl}$ ) 및 세포내 Cl<sup>-</sup> 농도의 변화 요약

A. MPG 교감 신경세포에서 GFP만 발현한 대조군과 KCC2를 함께 발현시킨 실험군에서  $E_{Cl}$  ( $=E_{GABA}$ ) 변화를 나타내었다. B. A에서 계산한 각각의  $E_{GABA}$  값을 Nernst Equation ( $E=RT/nF \log [Cl]_{in}/[Cl]_{out}$ )에 대입하여 세포내 Cl<sup>-</sup>의 농도를 계산하여 나타내었다. 모든 데이터는 평균 표준 오차로 나타내었다.

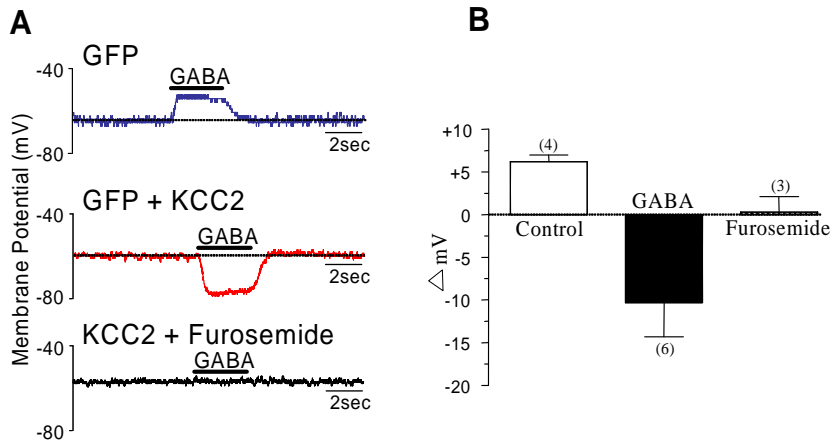


그림 19. MPG 신경 세포에서 KCC2 유전자 과다 발현에 의한 GABA에 의한 탈분극 반응의 변화

A. MPG 교감 신경세포에 GFP와 GFP + KCC2를 과다 발현시켰을 때 막전류 고정 상태(current-clamp,  $I=0$ )에서 GABA( $100 \mu\text{M}$ )를 처리하여 각각의 경우 막전압의 변화를 나타내었다. GFP + KCC2를 과다 발현시킨 경우 KCC2 차단제인 furosemide ( $100 \mu\text{M}$ )을 처리하여 막전압의 과분극 현상의 변화를 나타내었다. B. 좌측의 결과를 막전압값의 변화 그래프로 요약하였다. 모든 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었으며 괄호안의 값은 실험 레수를 나타낸다.

### 3.6. MPG 교감 신경세포에서 $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger가 $E_{\text{GABA}}$ 에



## 미치는 영향

$\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  exchanger는 전기적 중성 음이온 교환기로서 심장이나 평활근에 발견되어 세포내  $\text{Cl}^-$  농도를 증가시키는 이온 메커니즘에 관여한다고 보고되었다 (Vaughan-Jones, 1986; Aickin 1990). 따라서 MPG 교감 신경세포 내 높은  $\text{Cl}^-$  이온의 농도가  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  exchanger의 작용과 관련되어 있는지 조사하기 위하여 이를 위해 그라미시딘 천공 패치법을 사용하였고 세포의 외액을 정상 PSS에서  $\text{HCO}_3^-$ 가 24 mM 포함된 PSS로 교체하였다. 세포 외액이  $\text{HCO}_3^-$  PSS일 때  $E_{\text{GABA}}$  값은 약  $-45.5 \pm 0.8$  mV로 계산되었으며(그림 20), 이는 세포 외액을 normal PSS로 하였을 경우의  $E_{\text{GABA}}$  값  $-42.6 \pm 1.0$  mV와 통계적으로 차이가 없었다. 앞서와 마찬가지로  $E_{\text{GABA}}$  값으로 세포내  $\text{Cl}^-$  이온의 농도를 계산해 본 결과 normal PSS와  $\text{HCO}_3^-$  PSS buffer일 경우 각각  $29.8 \pm 1.4$  mM과  $26.7 \pm 0.5$  mM로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 21). 이러한 실험 데이터는 MPG 교감 신경 세포 내  $\text{Cl}^-$  이온의 조절에  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  exchanger의 역할은 없다는 것을 시사하였다.

### 3.7. MPG 교감 신경세포에서 bumetanide의 $E_{\text{Cl}^-}$ 에 대한 효과

앞에서 역전사 연쇄 중합 반응 분석을 통해 성체 쥐의 MPG에 NKCC1이 역전히 발현되는 것을 확인하였다. 따라서 세포 내  $\text{Cl}^-$ 의 농도의 조절을 위해 NKCC1의 기능을 하는 지 확인하였다. 이를 위해 MPG 교감 신경세포에서 NKCC1을 100  $\mu\text{M}$  bumetanide로 차단하였을 경우 세포내  $\text{Cl}^-$  농도에 변화가 있는지 조사하였다. 그 결과 막전압값 고정에 따른 GABA의 반응과 역전전압이 약물을 처리하지 않은 경우와 비교할 때 큰 변화가 없는 것을 확인 할 수 있었다(그림 22).

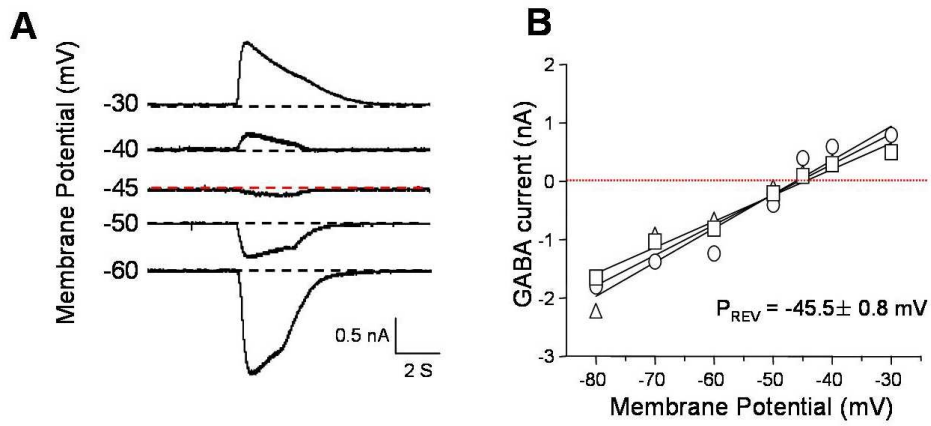


그림 20. MPG 교감 신경세포의  $E_{GABA}$ 에  $HCO_3^-$ 가 미치는 영향.

A. 세포 외액을 Normal PSS에서  $HCO_3^-$  PSS buffer로 변화시킨 후 막전압에 따른 GABA 전류의 변화를 기록하였다. B. 세포 외액을  $HCO_3^-$  PSS buffer로 변화 시켰을 경우 막전압에 따른 GABA 전류의 크기를 나타내었다. GABA에 의해 유도되는 전류값이 0인 지점에서  $Cl^-$ 의 역전 전압값 즉,  $E_{GABA}$ 를 얻을 수 있었다. 모든 데이터는 평균 표준오차로 나타내었다.

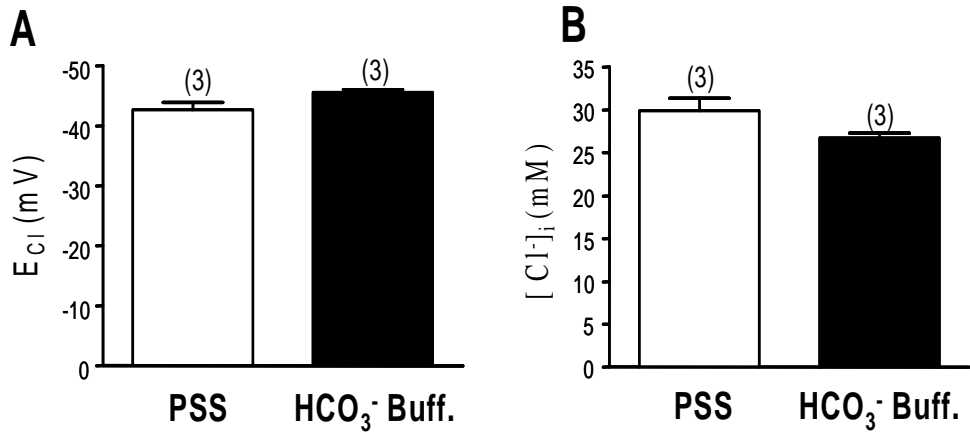


그림 21. MPG 교감 신경세포에서  $HCO_3^-$ 에 의한  $Cl^-$ 의 역전 전압 ( $E_{Cl^-}$  또는  $E_{GABA}$ ) 및 세포내  $Cl^-$  농도의 변화.

A. MPG 교감 신경세포에서 세포 외액을 Normal PSS에서  $HCO_3^-$  PSS buffer로 변화시켰을 경우  $Cl^-$ 의 역전 전압 변화의 요약을 나타내었다. B.  $E_{GABA}$  값을 Nernst Equation( $E=RT/nF \ln [Cl^-]_{in}/[Cl^-]_{out}$ )에 대입하여 세포내  $Cl^-$ 의 농도를 계산하여 나타내었다.

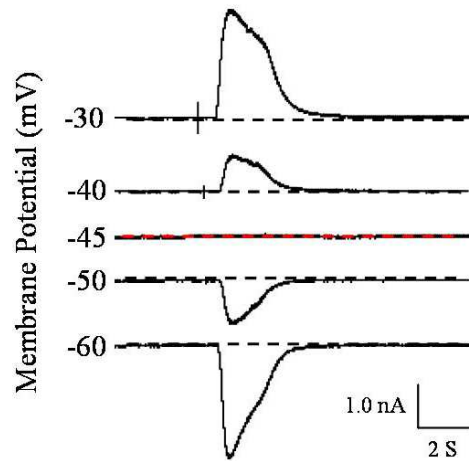


그림 22. MPG 교감 신경세포에서  $E_{GABA}$ 에 미치는 bumetanide의 효과  
NKCC1의 효과적 차단제인 bumetanide( $100 \mu\text{M}$ )를 MPG 교감 신경 세포에 약 20  
분간 처리하였을 경우 막고정 값에 따른 GABA( $100 \mu\text{M}$ )에 의한 반응을 나타내었  
다.

## 제 4장 고찰

본 연구에서는 역전사 연쇄 증합반응 분석과 기능 유전자를 핵 내 주입에 의해 발현시키는 첨단 연구기법을 활용하여 성숙 쥐의 MPG 교감 신경세포에서 흥분성 GABA 반응이 나타나는 분자적 메커니즘을 최초로 규명하였다.

중추신경계에 널리 존재하는 GABA는 말초신경계, 특히 자율신경절에서도 신경전달물질 내지는 신경조절물질(neuromodulator)로서 작용할 수 있다고 알려져 있다(Ong 및 Kerr, 1990; Gladkevich 등, 2006). 예를 들면 최근에 GABA가 생리학적으로 신생 쥐(neonatal rat)의 심장을 지배하는 부교감신경인 내심신경절(intracardiac ganglia)에 존재한다고 하였다 (Fischer 등, 2005). 그러나 대부분의 자율신경절에서는 GABA를 합성하는 효소인 glutamic acid decarboxylase(GAD)의 존재를 확인하거나(Karhula 등, 1988) 면역조직화학 방법이나 약리학적 방법으로 GABA가 작용하는 수용체의 하나인 GABA<sub>A</sub> 수용체를 동정함으로써 GABA의 존재 가능성을 간접적으로 시사하였다(Brown 등, 1979; Zhou 및 Galligan, 2000; Sha 등, 2001). 본 연구에서는 MPG 신경세포 내에 GABA가 존재한다는 사실을 단클론성 항체를 사용한 면역형광염색 방법으로 확인하였다. 이러한 결과는 MPG에 GAD가 발현된다는 과거의 보고와 일치하는 것이며(Karhula 등, 1988) GABA가 생리적으로 MPG 신경기능에 영향을 줄 수 있는 신경전달물질임을 시사한다 하겠다. MPG 내 GABA 수용체의 존재가 TH 양성인 교감신경에서 주로 관찰되었는데 GABA<sub>A</sub> 수용체 아단위인  $\beta 2/3$ 가 일부 VIP나 NO synthetase(NOS)를 발현하는 비아드레날린성 신경세포에서도 발현된다고 하였다(Park 등, 2006). 그러나 전기생리학적 실험에서는 GABA 전류가 교감신경에서 큰 밀도로 기록되지만 부교감 신경세포에서는 GABA에 대한 반응이 특히 24시간 배양 후 매우 미미하였다. MPG에서의 GABA의 작용은 이전에 intracellular recording 방법으로 기록되어진 바가 있었으나(Akasu 등, 1999) 이 경우 세포 종류를 구별하지 않았기 때문에 MPG 교감 및 부교감 신경세포로 구분하여 GABA 작용을 확인한 것은 큰 의의가

있다고 할 것이다. 이러한 세포종류에 특이적(cell type-specific)으로 나타나는 **GABA** 반응은 기존에 알려진 기준(즉, 세포의 크기, T-형 칼슘채널의 유무, 그리고 5-HT 반응의 유무) (Zhu 등, 1995; Lee 등, 2002; Won 등 2006)과 더불어 MPG 교감 및 부교감 신경세포를 구별하는 데 도움이 될 것이다.

MPG 교감신경세포를 -80 mV로 세포막 전압보다 낮게 고정하였을 때 **GABA**는 bicuculin이나 picrotoxin에 민감한 **GABA<sub>A</sub>** 수용체를 활성화 시켜 내향성 전류를 유발하였다. 이러한 **GABA** 전류는 CI의 농도경사를 변화시켜주었을 때  $E_{GABA}$ 의 값이 변화하는 것으로부터 CI의 이동에 의한 것임을 알 수 있었다. 과거 *in situ* 실험을 통해 MPG 조직절편에서 측정된 결과에 의하면 **GABA**가 **GABA<sub>A</sub>** 수용체 뿐만 아니라 **GABA<sub>C</sub>** 수용체도 활성화 시킨다고 보고되었으나(Akasu 등, 1999) 본 연구에서는 **GABA** 전류가 **GABA<sub>C</sub>** 수용체 차단제인 TPMPA에 의해 억제되지 않았다. 이러한 두 연구결과의 차이는 근본적으로 실험조건의 차이로부터 기인할 가능성을 배제할 수 없다. 예를 들면 *in situ* 실험은 32 °C에서 이루어진 반면 본 연구는 실온(20~22 °C)에서 이루어졌다. 만약 **GABA<sub>C</sub>** 수용체가 세포체(soma)보다는 축삭돌기(axon)나 수상돌기(dendrite)에 분포한다면 효소처리에 의해 이들이 제거될 경우 **GABA<sub>C</sub>** 수용체를 통한 **GABA** 전류를 볼 수 없을 것이다. 따라서 역전사 연쇄중합반응이나 Western blotting을 통하여 MPG에 **GABA<sub>C</sub>** 수용체가 발현되는 지를 확인하는 것이 앞으로 필요할 것이다.

성숙 쥐로부터 분리한 MPG 교감 신경세포에서의 **GABA** 작용은 막전압을 탈분극시키는 흥분성으로 나타났다. 이러한 결과는 신경세포 내로 CI를 유입하여 막전압을 과분극시킴으로써 세포의 활동전압 방사(action potential firing)를 억제하는 전형적인 억제성 **GABA**의 작용과는 반대되는 것이었다. 이러한 성숙한 신경세포에서의 흥분성 **GABA** 작용은 후근신경절 세포(Sung 등, 2000), 내심신경절 세포(Fischer 등, 2005), 척장 신경세포(Sha 등, 2001)등에서 관찰되어졌으나 그 원인은 아직 밝혀지지 않고 있다. 또한 MPG 신경세포에서 볼 수 있는 흥분성 **GABA** 작용은 태어나 출생 후 발달(postnatal development)과정의 초기에 볼 수 있다(Alvarez-Leefmans 등, 1988; Cherubini 등 1991; Stein 등, 2003). 신경세포에서 **GABA**의 흥분성 작용이 나타나기 위해서는  $E_{GABA}$ 가 안정막 전압보다 더 양성인

어야 하는데 세포 내외의  $Cl^-$ 의 농도경사가 작아져야한다. 세포 외  $Cl^-$ 의 농도가 일정하다고 가정할 때 흥분성 **GABA** 작용을 위해서는 세포 내  $Cl^-$ 의 농도가 높게 세팅되어져야한다. MPG 교감신경세포의 경우  $E_{GABA}$  값이 약  $-43$  mV 정도로 안정막 전압( $-51\sim-55$  mV)보다 양성이었다고 이를 Nernst 식에 대입해서 계산한 이론적인 세포 내  $Cl^-$ 의 농도는 약  $30$  mM이었다. 이 값은 양이온만 통과할 수 있는 pore를 형성하여 세포 내 음이온인  $Cl^-$  농도를 변함없이 유지시켜주는 그라미시딘 천공 패치클램프 방법(Abe 등, 1994; Akaike, 1996)을 사용하였기 때문에 *in vivo*의 생리적  $Cl^-$  농도와 같거나 거의 유사하다고 볼 수 있다. MPG 교감 신경세포 내  $Cl^-$ 의 농도는 **GABA**에 의해 탈분극이 일어나는 내심신경절 세포에서의  $21.5$  mM 보다는 높은 값을 가지는데 (Fischer 등, 2005) 이것은 다음과 같은 이유에서 큰 의미를 가진다. 내심신경절 세포의 경우  $E_{GABA}$  값이 약  $-50$  mV로 안정막 전압과 거의 같기 때문에 막전압을 탈분극 혹은 과분극 시킬 수 있는 **GABA**의 작용은 매우 미미하거나 일어나지 않아 생리학적인 의의가 없을 것이다. 반면에 MPG 신경세포의 경우 성숙한 후에도  $E_{GABA}$  값이 안정막 전압보다 양성이기 때문에 흥분성 **GABA**의 작용이 *in vivo*에서도 일어날 수 있을 것이다.

태어나 출생 직 후 중추신경계에서 볼 수 있는 흥분성 **GABA** 작용도 출생 후 2주 정도 내에 억제성 **GABA** 작용으로 전환되며 이것은 전술한 바와 같이 세포내  $Cl^-$ 의 농도가 낮아지고 이에 따라  $E_{GABA}$ 가 안정막 전압보다 더 양성으로 되기 때문이다(Miles, 1999; Rivera 등, 1999; Stein 및 Nicoll, 2003). 신경세포막에는 다양한 수송체 단백질이 존재하는 데 이들 중 NKCC1이 세포 내로  $Cl^-$ 를 유입시키고, KCC2가 세포 밖으로  $Cl^-$ 를 유출시켜 세포 내  $Cl^-$ 의 농도를 일정하게 조절한다고 하였다. 이를 뒷받침하는 실험적 증거들 중 직접적인 증거들을 예를 들면 NKCC1이 knock-out된 생쥐의 후근신경절 세포(Sung 등, 2000)나 후각수용체(olfactory receptor) 신경세포(Reisert 등, 2005)에서  $E_{GABA}$ 가 더 음성으로 이동한다는 사실로부터 NKCC1이 세포 내  $Cl^-$ 를 축적하여 높게 유지하는 기능을 한다는 것을 알 수 있다. 이러한 기능과 반대로 해마에서는 KCC2를 antisense knock-down 시켰을 때  $E_{GABA}$ 의 탈분극 이동(depolarizing shift)이 나타났으며(Rivera 등, 1999), KCC2가 knock-out된 생쥐에서 **GABA**에 의한 흥분성 작용이 나타난다고 하여

KCC2의 발현이 세포 내 Cl<sup>-</sup>의 농도를 낮게 유지시킴으로써 억제성 GABA 작용에 중요한 요인이 증명되었다 (Hubner 등, 2001). 따라서 출생 후 신경의 발달과정에서 GABA 작용이 흥분성으로부터 억제성으로 전환되기 위해서는 NKCC1 발현의 감소와 함께 KCC2 발현의 유도(induction)가 중요하다고 하였다(Plotkin 등, 1997; Clayton 등, 1998; Lu 등, 1999; Rivera 등, 1999; Stein 및 Nicoll, 2003). 역전사 연쇄증합반응 분석으로 성숙 쥐의 MPG 신경세포에는 NKCC1과 KCC 아과(family)의 멤버 중 KCC1은 발현 되지만 KCC2는 발현되지 않는 것이 확인되었다. 한편 NKCC1을 코딩하는 transcript가 확인되었지만 NKCC1을 억제하는 것으로 알려진 bumetanide(100 μM)를 20분간 전 처치한 실험에서 E<sub>GABA</sub>의 음성이동이 나타나지 않았기 때문에 성숙 MPG 신경세포에는 성숙 후근신경절 세포에서와는 달리(Sung 등, 2000) NKCC1 단백질이 존재하지 않거나 있다하더라도 그 활성이 높지 않을 가능성이 있다. 그러나 bumetanide가 다른 수송체(예를 들면 KCC1/2)에 비특이적으로 작용할 수 있기 때문에(Korpi 및 Luddens, 1997; Sung 등, 2000) 다른 방법으로 성숙 MPG 교감 신경세포에 발현된 NKCC1이 세포 내 Cl<sup>-</sup> 농도의 조절에 실제로 기여를 하는 지 여부를 심층적으로 검증하는 것이 필요할 것이다. 이를 위해 세포의 액의 Na<sup>+</sup>을 NMDG로 치환하여 NKCC1을 기능적으로 억제하거나 SiRNA silencing 방법을 사용하여 기능적 NKCC1을 knock-down 시키는 것을 고려할 수 있을 것이다. 아울러 중추신경계처럼 MPG의 발달과정에서 NKCC1의 발현이 점점 줄어드는 지를 신생 및 성숙 쥐의 MPG에서 Western blotting을 통하여 확인하는 것도 흥미로울 것이다.

NKCC1에 비의존적인 세포 내 Cl<sup>-</sup>의 축적은 NKCC1이 knock-out 된 생쥐의 후각 수용체 신경세포(olfactory receptor neuron)에서도 볼 수 있으나 그 메커니즘은 잘 알려져 있지 않다(Nickell 등, 2006). 전술한바와 같이 성숙 MPG 신경세포 내 Cl<sup>-</sup>를 높은 농도로 세팅하기 위해서는 NKCC1 외에 다른 시스템이 기여해야 할 것 같다. 그 후보단백질로 음이온 교환기(anion exchanger, AE)와 Na<sup>+</sup> 의존적 AE(NDAE)를 들 수 있는데, AE는 Cl<sup>-</sup> 수송체 중에 한 개의 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>이온과 Cl<sup>-</sup>이온을 교환함으로써, NDAE는 Na<sup>+</sup>과 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 세포 내로 들여보내고 H<sup>+</sup>과 Cl<sup>-</sup>을 바깥으로 내보냄으로써 세포 내 Cl<sup>-</sup> 농도를 조절할 수 있다고 알려져 있다(Payne 등,



2003). 그러나 본 연구에서 세포외액에 24 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 포함시켜 AE를 차단하는 동시에 NDAE를 활성화시켰을 때 MPG 교감 신경세포에서 E<sub>GABA</sub>의 음성 이동이 일어나지 않았다. 이러한 결과는 중추신경계의 세포에서 E<sub>GABA</sub>나 E<sub>Glycine</sub>이 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 또는 CO<sub>2</sub>에 의해 영향을 받지 않았다는 보고들과 일치하는 것이었다(Owens 등, 1996; Ehrlich 등, 1999). MPG 교감 신경세포에서 세포 내 Cl<sup>-</sup> 농도를 높일 수 있는 다른 유력한 경로는 교감 신경세포에만 발현되어 있는 T-형 Ca<sup>2+</sup> 채널(T-채널)을 통해서이다. MPG 교감 신경세포에는 세 가지 아형( $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ ,  $\alpha 1I$ ) 중  $\alpha 1H$ 가 발현되는데 기능적으로 안정막전압 근처의 낮은 전압에서 활성화되어 'rebound spike firing'을 유발함으로써 세포의 흥분성을 높여준다(Lee 등, 2002). T-채널이 가지고 있는 생물학적 특성 중의 하나가 'window current'가 크다는 것인데 이 때문에 안정막 상태(즉, 자극을 받지 않은 상태)에서도 채널의 약 10~20%가 열려 있어 세포 내로 칼슘이 유입되게 된다. 이렇게 유입된 Ca<sup>2+</sup>은 Ca<sup>2+</sup> 의존적 Cl<sup>-</sup> 채널을 열어서 세포 내 Cl<sup>-</sup>의 농도를 증가시킬 수 있게 된다. 앞으로 MPG 교감신경에 특이적으로 공존하는 T-형 채널과 GABA<sub>A</sub> 수용체의 기능적 연결(functional coupling)을 연구하는 것은 매우 흥미로울 것이다.

NKCC1과 더불어 KCC1이 MPG에 발현되지만 세포 내 Cl<sup>-</sup> 농도를 낮게 세팅하는 데에 역할을 하지 않는 것으로 보인다. KCC1은 일종의 'house keeping' 유전자로 모든 종류의 세포에서 발현되며 세포용적을 유지하거나 상피세포에서 염(salt)의 운반 기능을 가지지만 KCC2에 비해 K<sup>+</sup>과 Cl<sup>-</sup>에 대한 친화력(affinity)이 떨어져서 신경세포 내 Cl<sup>-</sup>의 농도 조절에 크게 기여하지 않는다고 보고되었다(Gillen 등, 1996; Payne, 1997). 결국 MPG 신경세포에서 발달과정에서 GABA의 작용이 흥분성에서 억제성으로 전환되지 않는 근본적인 이유는 신경 특이적 공수송체 아형인 KCC2 발현이 MPG 신경이 성숙한 이후에도 결여되었기 때문일 것이다. 이를 뒷받침하는 강력한 실험적 증거는 세포 핵 내 미세주입법으로 KCC2 유전자를 MPG 교감신경세포에 도입하였을 때 furosemide에 민감하게 막전압이 과분극된 것이다. 이를 요약하면 KCC2가 세포외로 Cl<sup>-</sup>를 K<sup>+</sup>과 함께 배출함에 따라 E<sub>GABA</sub>가 -51 mV에서 -80 mV로 음성 이동을 하여 안정막 전압보다 낮아지게 된다. 이때 GABA를 가하면 막전압이 E<sub>GABA</sub>에 가까워질 때까지 과분극이 일어나는

것이다. Nernst 공식으로  $E_{GABA}$  값을 가지고 계산한 결과 MPG 교감 신경세포에 발현된 KCC2가 세포 내  $Cl^-$  농도를 약 6.5 mM 정도로 낮게 세팅하였음을 알 수 있었다. 이러한  $Cl^-$  농도는 KCC2를 생리적으로 발현하고 있는 다른 신경세포, 예를 들면 해마의 피라미드 세포의 그것과 거의 일치하고 있다(Inoue 등, 1991; Payne, 1996). 한 보고에 의하면 전압의존적  $Cl^-$  채널(CIC2)이 세포 내  $Cl^-$ 를 밖으로 내보내는 역할을 함으로써 세포 내  $Cl^-$  농도를 낮출 수 있다고 하였고 CIC2의 발현도 KCC2같이 출생 직후 발현정도가 낮으나 나이에 따라 점차 증가한다고 하였다. 그러나 MPG 신경세포에는 CIC2가 발현되지 않는 것으로 확인되어 KCC2의 부재와 더불어 GABA의 흥분성작용을 설명하는 부가적인 이유가 될 수 있을 것이다(Won 및 Jeong, 미발표 관찰).

현재까지 성숙한 실험동물에서 억제성 GABA 반응을 보이는 대부분 신경세포는 KCC2를 발현한다고 하였다(Payne 등 2003). 흥분성 GABA 작용이 나타나는 경우(예를 들면 후근신경절 세포)에서도 NKCC1보다도 그 정도가 약하지만 발현된다고 하였다(Lu 등, 1999; Sung 등, 2000; 그러나 Kanaka 등, 2001을 참조). 따라서 KCC2가 전혀 발현되지 않는 MPG는 매우 독특한 경우라 할 수 있다. 현재까지 성숙 MPG에 KCC2가 발현되지 않는 이유는 명확하지 않다. 최근에 출생 후 발달 초기의 미성숙 신경세포에 이미 비활성적인 KCC2가 인산화된 형태로 존재하며 발달과정에서 탈인산화되면 기능적인 KCC2로 전환된다고 하였고 (Khirug 등, 2005; Vale 등, 2005) 이와는 반대로 뇌에 발현되는 종류인 크레아틴 카이네즈(creatine kinase)의 인산화가 KCC2의 기능에 중요하다고 주장하는 보고도 있었다(Inoue 등, 2006). 그러나 MPG에서는 KCC2 유전자의 전사(transcription) 자체가 유도되지 않는 것으로 보인다. 한 보고에 의하면 유전자 수준에서 KCC2 mRNA의 발현이 early growth response 4(EGR4)라는 전사인자(transcription factor)에 의해 항진 조절된다고 하였다. 또한 GABA 자체가 발달과정에서 KCC2의 발현을 촉진하는 영양인자(trophic factor)로 작용한다고 하였는데(Ganguly 등, 2001) MPG 내의 GABA 농도가 이러한 영양인자로서 작용할 만큼 충분히 높은 농도가 유지되는지는 명확하지 않다. 앞으로 KCC2가 왜 MPG에서만 존재하지 않는지를 규명하는 것이 필요할 것이다.

흥분성 **GABA** 작용은 신경의 분화 및 성숙을 위해서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(Yuste 및 Katz, 1991; Ben Ari 등, 1997; Baker 등, 1998; Maric 등, 2001; Owens 및 Kriegstein, 2002; ). 이러한 **GABA**의 영양작용(trophic action)의 메커니즘은 막전압의 탈분극에 이은 전압의존적 칼슘채널(특히, L-형 칼슘채널)이나 glutamate ionotropic N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 통한 세포 내 칼슘의 증가인 것으로 보고되었고(Ben Ari 등, 1997; Fukuda 등, 1998), 이는 시냅스 형성에 중요한 것으로 나타났다(Ben-ari, 2002; Owens 및 Kriegstein, 2002). 그러나 성숙 쥐의 MPG의 교감 신경세포에서 이러한 **GABA**의 흥분성 작용이 유지되는 생리적 의미는 아직 명확하지 않다. 배뇨 기능에 관련하여 MPG 교감 신경세포의 역할은 지배하는 효과기인 배뇨근을 이완시키고 이와 동시에 내요도괄약근을 수축시켜 요의 저장을 조절하는 것이다. MPG 교감신경세포에서의 **GABA**의 흥분성 작용은 하복신경을 통한 니코틴성 시냅스 전달을 촉진시키고 절후 신경절 교감신경세포의 흥분성을 높여 궁극적으로 요의 저장 기능을 강화시키고 배뇨를 억제하는 방향으로 기능을 할 것으로 추측된다. 신경계에서 **GABA**의 작용은 그 크기와 방향이 변함없이 유지되는 것이 아니라 생리 및 병태생리학적 상황에 따라 역동적으로 달라지는데 (Payne, 2003). **GABA<sub>A</sub>** 수용체, 양이온-Cl<sup>-</sup> 수용체 등 세포 내 Cl<sup>-</sup>의 농도를 조절하는 단백질의 발현 및 세포막 수송(trafficking)의 변동에 의해 직접적인 영향을 받게 될 것이다. 앞으로 본 연구와 관련하여 MPG 교감 신경세포의 세포 내 Cl<sup>-</sup>의 생리적 조절 및 **GABA**의 흥분성 작용의 배뇨조절에서의 역할을 규명하는 것과 척수손상, 노화(aging), 염증(inflammation) 등에 의해 나타나는 배뇨조절의 이상과 관련하여 **GABA** 작용의 변화 및 이에 따른 신경가소성의 유무를 조사하는 방향으로 나아가야 할 것이다.

## 제 5장 결론

배뇨를 조절하는 말초자율신경인 MPG는 중추신경계의 명령을 전달하는 릴레이 역할도 하지만 국부적으로 발생하는 다양한 정보를 수집하고 통합하는 역할도 담당하고 있다. 본 연구에서는 이러한 MPG가 지역통합센터로서의 역할에 기여할 수 있는 신경전달물질들 중 **GABA**의 교감신경 특이적 기능을 확인함과 동시에 중추신경계에서와는 달리 성숙한 신경세포에서 흥분성 작용을 나타내는 원인을 분자 수준에서 규명하여 성숙 쥐의 MPG에서 **GABA**의 흥분성 작용이 세포 내 **Cl<sup>-</sup>**의 농도를 낮추는 **KCC2**의 발현 부재에 의해서 유발된다는 결론을 얻었다.

## 참고문헌

Aickin CC, Brading AF. The effect of loop diuretics on Cl<sup>-</sup> transport in smooth muscle of the guinea-pig vas deferens and taenia from the caecum. *J Physiol* 1990; 421:33-53.

Akabas MH. GABA<sub>A</sub> receptor structure-function studies: a reexamination in light of new acetylcholine receptor structures. *Int Rev Neurobiol* 2004;62:1-43.

Akasu T, Koketsu K. 5-Hydroxytryptamine decreases the sensitivity of nicotinic acetylcholine receptor in bull-frog sympathetic ganglion cells. *J Physiol* 1986;380:93-109.

Akasu T, Munakata Y, Tsurusaki M, Hasuo H. Role of GABAA and GABAC receptors in the biphasic GABA responses in neurons of the rat major pelvic ganglia. *J Neurophysiol* 1999;82:1489-1496.

Alkadhi KA, Al-Hijailan RS, Malik K, Hogan YH. Retrograde carbon monoxide is required for induction of long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *J Neurosci* 2001;21:3515-3520.

Alvarez-Leefmans FJ, Gamino SM, Giraldez F, Nogueron I. Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *J Physiol* 1988; 406:225-246.

Barker JL, Behar T, Li YX, Liu OY, Ma W, Maric D, Maric I, Schaffners AE,

Serafini R, Smith SV, Somogyi R, Vantrín JY, Wen XL, and Xian H. GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect Dev Neurobiol* 1998; 5:305-322.

Baljet B, Drukker J. The extrinsic innervation of the pelvic organs in the female rat. *Acta Anat (Basel)* 1980; 107:241-267.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 1998;50:209-313.

Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:728-739.

Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL. GABA<sub>A</sub>, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends Neurosci* 1997; 20:523-529.

Blok BF. Central pathways controlling micturition and urinary continence. *Urol* 2002;59(Suppl 1):13-17.

Bradley WE, Timm GW, Scott FB. Innervation of the detrusor muscle and urethra. *Urol Clin North Am* 1974;1:3-27.

Briggs CA, McAfee DA. Long-term potentiation at nicotinic synapses in the rat superior cervical ganglion. *J Physiol* 1988;404:129-144.

Brindley GS. The actions of parasympathetic and sympathetic nerves in human

micturition, erection and seminal emission, and their restoration in paraplegic patients by implanted electrical stimulators. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1988;235:111-120.

Brown DA, Adams PR, Higgins AJ, Marsh S. Distribution of GABA-receptors and GABA-carriers in the mammalian nervous system. *J Physiol (Paris)* 1979;75:667-671.

Chebib M. GABAC receptor ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31:800-804.

Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 1991;14:515-519.

Clayton GH, Owens GC, Wolf JS, Smith RL. Ontogeny of cation-Cl<sup>-</sup> cotransporter expression in rat neocortex. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;109:281-292.

Dail WG, Minorsky N. Composition of the pelvic nerve. *Exp Neurol* 1986;92(1):278-283.

de Groat WC. Anatomy and physiology of the lower urinary tract. *Urol Clin North Am.* 1993;20(3):383-401.

de Groat WC. Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. *Paraplegia* 1995;33:493-505.

de Groat WC. The actions of gamma-aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia. *J Pharmacol Exp Ther* 1970;172:384-396.

de Groat WC, Booth AM. Inhibition and facilitation in parasympathetic ganglia of the

urinary bladder. *Fed Proc.* 1980;39:2990-2996.

de Groat WC, Booth AM, Kawatani M, Lowe IP. A study of synaptic transmission and neuropeptide function in extramural colonic ganglia of the cat. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi.* 1985;21: Suppl:95.

de Groat WC, Kawatani M. Enkephalinergic inhibition in parasympathetic ganglia of the urinary bladder of the cat. *J Physiol* 1989;413:13-29.

de Groat WC, Yoshimura N. Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2006;152:59-84.

Delancey JO. Fascial and muscular abnormalities in women with urethral hypermobility and anterior vaginal wall prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:93-98.

Delpire E. Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* 2000;15:309-312.

Ehrlich I, Lohrke S, Friauf E. Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action in rat auditory neurones is due to age-dependent Cl<sup>-</sup> regulation. *J Physiol (London)* 1999;520:121-137.

Fischer H, Harper AA, Anderson CR, Adams DJ. Developmental discharges in expression of GABA<sub>A</sub> receptor-channels in rat intrinsic cardiac ganglion neurones. *J Physiol (London)* 2005;564:465-474.

Fletcher TF, Bradley WE. Neuroanatomy of the bladder-urethra. *J Urol* 1978;119:153-160.



Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, Nishino H. NMDA receptor-mediated differential laminar susceptibility to the intracellular  $Ca^{2+}$  accumulation induced by oxygen-glucose deprivation in rat neocortical slices. *J Neurophysiol.* 1998;79:430-438.

Ganguly K, Schneider AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 2001;105:521-532.

GillenCM, Brill S, Payne JA, Forbush III B. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransport from rabbit, rat, and human; a new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 1996;271:16237-16244.

Gladkevich A, Korf J, Hakobyan VP, Melkonyan KV. The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders. *Auton Neurosci: Basic and Clinical* 2006; 124:1-8.

Greenwood D, Coggeshall RE, Hulsebosch CE. Sexual dimorphism in the numbers of neurons in the pelvic ganglia of adult rats. *Brain Res* 1985;340:160-162.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membranes patches. *Pflug Arch Eur J Physiol* 1981;391:85-100.

Hubner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 2001;30:515-524.

Inouelkeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G protein gamma subunits. *Nature* 1996;380:255-258.

Ikeda SR, Jeong SW. Use of RGS-insensitive G $\alpha$  subunits to study endogenous RGS protein action on G-protein modulation of N-type calcium channels in sympathetic neurons. *Methods Enzymol* 2004;389:170-189.

Inoue K, Yamada J, Ueno S, Fukuda A. Brain-type creatine kinase activates neuron-specific K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2. *J Neurochem* 2006;96:598-608.

Janig W, McLachlan EM. Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev* 1987;67:1332-1404.

Jeong SW, Ikeda SR. G protein alpha subunit G alpha z couples neurotransmitter receptors to ion channels in sympathetic neurons. *Neuron* 1998;21:1201-1212.

Jeong SW, Ikeda SR. Sequestration of G-protein beta gamma subunits by different G-protein alpha subunits blocks voltage-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> channels in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 1999;19:4755-4761.

Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, and Sato K. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter(NKCC1) in the rat nervous system. *Neurosci* 2001, 104:933-946.

Karhula T, Häppölä O, Joh T, Wu JY. Localization of L-glutamate decarboxylase immunoreactivity in the major pelvic ganglion and in the coeliac-superior mesenteric ganglion complex of the rat. *Histochem* 1988;90:255-260.

Kawatani M, Erdman SL, de Groat WC. Vasoactive intestinal polypeptide and substance P in primary afferent pathways to the sacral spinal cord of the cat. *J Comp Neurol* 1985;241:327-347.

Kawatani M, Whitney T, Booth AM, de Groat WC. Excitatory effect of substance P in parasympathetic ganglia of cat urinary bladder. *Am J Physiol* 1989;257:R1450-1456.

Keast JR. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. *Neurosci* 1995;66:655-662.

Keast JR. Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. *Int Rev Cytol* 2006;248:141-187.

Keast JR, Booth AM, de Groat WC. Distribution of neurons in the major pelvic ganglion of the rat which supply the bladder, colon or penis. *Cell Tissue Res*. 1989;256:105-112.

Kriegstein AR, Owens DF. GABA may act as a self-limiting trophic factor at developing synapses. *Sci STKE* 2001;95:PE1.

Kusunoki M, Taniyama K, Tanaka C. Neuronal GABA release and GABA inhibition of ACh release in guinea pig urinary bladder. *Am J Physiol* 1984;246:R502-509.

Langworthy or. innervation of the pelvic organs of the rat. *Invest Urol* 1965;2:491-511.

Lee JH, Kim EG, Park BG, Kim KH, Cha SK, Kong ID, Lee JW, Jeong SW.

Identification of T-type  $\alpha_1H$   $Ca^{2+}$  channels (Ca(v)3.2) in major pelvic ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 2002;87(6):2844-2850.

Lu J, Karadshah M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol* 1999; 39:558-568.

Macdonald RL, Olsen RW. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:569-602.

Maggi CA, Meli A. The role of neuropeptides in the regulation of the micturition reflex. *J Auton Pharmacol* 1986;6:133-162.

Mallory BS, Roppolo JR, de Groat WC. Pharmacological modulation of the pontine micturition center. *Brain Res* 1991;546:310-320.

Maric D, Liu OY, Maric I, Chaudry S, Chang YH, Smith SV, Sieghart W, Fritschy JM, and Barker JL. GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA(A) autoreceptor/Cl<sup>-</sup> channels. *J Neurosci* 2001;21:2343-2360.

McGuire EJ, Brady S. Detrusor-sphincter dyssynergia. *J Urol* 1979;121:774-777.

Morrison, J. Steers, W.D., Brading A., Block, B., Fry, C., de Groat, W.C., Kakizaki, H. Levin, R. and Thor, K. (2002) Neurophysiology and neuropharmacology. In: Abrams P., Cardozo L., Khoury S. and Wein A. (Eds), Incontinence. Health Publication Ltd., Jersey, pp. 83-164

Nishimura T, Akasu T. 5-Hydroxytryptamine produces presynaptic facilitation of cholinergic transmission in rabbit parasympathetic ganglia. *J Auton Nerv Syst.* 1989 ;26(3):251-260.

Nickell WT, Kleene NK, Gesteland RC, and Kleene SJ. neuronal chloride accumulation in olfactory epithelium of mice lacking NKCC1. *J Neurophysiol* 2006; 95:2003-2006.

Ong J and Kerr DI. GABA-receptors in peripheral tissues. *Life Sci* 1990; 46:1489-1501.

Owens DF, Boyce LH, Davis MBE, and Kriegstein AR. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 1996;16:6414-6423.

Park JC, Song DY, Lee JS, Kong ID, Jeong SW, Lee BH, Kang HS, and Cho BP. Expression of GABAA receptor  $\beta 2/3$  subunits in the rat major pelvic ganglion. *Neurosci Letters* 2006;403:35-39.

Partanen M, Hervonen A, Vaalasti A, Kanerva L, Hervonen H. Vacuolated neurons in the hypogastric ganglion of the rat. *Cell Tissue Res.* 1979;17;199(3):373-386.

Payne JA. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for  $[K^+]_o$  regulation. *Am J Physiol* 1997;272:C1516-1525.

Payne JA, Rivera C, Voipio J, and Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 2003; 26:199-206.

Payne JA, Rivera C, Voipio J, and Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *TRENDS Neurosci* 2003;26:199-206.

Pearce RA. Physiological evidence for two distinct GABAA reponses in rat hippocampus. *Neuron* 1993;10:189-200.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999;397(6716):251-255.

Russell JM. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev.* 2000;80(1):211-276.

Sakakibara R, Fowler CJ, Hattori T. Voiding and MRI analysis of the brain. Pelvic Floor Dysfunct. *Int Urogynecol J* 1999;10(3):192-199.

Seabrook GR, Howson W, Lacey MG. Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and postsynaptic GABAB receptors on neurones in rat brain slices. *Br J Pharmacol.* 1990;101(4):949-957.

Sha L, Miller SM, and Szurszewski JH. Electrophysiological effects of GABA on cat pancreatic neurons. *Am J Physiol* 2001;280:G324-331.

Stein V, Nicoll RA. GABA generates excitement. *Neuron.* 2003;6;37(3):375-378.

Sung KW, Kirby M, McDonald MP, Lovinger DM, and Delpire E. Abnormal GABA<sub>A</sub> receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci* 2000;20:7531-7538.

Thomas R, Lewis RW, Sarma DP, Coker GB, Rao MK, Roberts JA. Aid to accurate clinical staging-histopathologic grading in prostatic cancer. *J Urol*. 1982;128(4):726-728.

Torrens, M. and Morrison, 1987 J. The physiology of the Lower Urinary Tract. Springer, New York, pp.1-355

Uvarov P, Ludwig A, markanen M, rivera C, and Airaksinen MS. Upregulation of the neuron-specific K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> transporter expression by transcription factor early growth response 4. *J Neurosci* 2006;26:13463-13473.

Vale C, Caminos E, Martinez-Galan JR, and Juiz JM. Expression and developmental regulation of the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 in the cochlear nucleus. *Hear Res* 2001;206:107-115.

Vaughan-Jones RD. An investigation of chloride-bicarbonate exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre. *J Physiol*. 1986;379:377-406.

Won YJ, Whang K, Kong ID, Park KS, Lee JW, Jeong SW. Expression profiles of high voltage-activated calcium channels in sympathetic and parasympathetic pelvic ganglion neurons innervating the urogenital system. *J Phar Exp Ther* 2006;317:1064-1071.

Yoshimura N, Chancellor MB. Current and future pharmacological treatment for overactive bladder. *J Urol*. 2002;168(5):1897-1913.

Yuste R and Katz LC. Control of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 1991;6:333-344.

Zhou X and Galligan JJ. GABA<sub>A</sub> receptors on calbindin-immunoreactive myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Auton Nerv Syst* 2000;78:122-135.

Zhu Y, Zboran EL, Ikeda SR. Phenotype-specific expression of T-type calcium channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *J Physiol* 1995;489:363-375.



## **ABSTRACT**

# **Molecular Characteristics Underlying Excitatory GABA Action in the Autonomic Pelvic Neurons Controlling Micturition**

*Kim, Sung-Hoon*

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Young-Hee Lee)

Major pelvic ganglia (MPG) controlling micturition play roles of not only a station relaying commands from the central nervous system (CNS) to effectors but also a center integrating various local information. A distinctive feature of the pelvic ganglia that differentiates them from other autonomic ganglia is the colocalization of both sympathetic and parasympathetic neurons within the same ganglion capsule. Because of their relative simple anatomy and thus, ease of isolation and quantification, MPG has been used as a model system for studying physiological and pathophysiological mechanisms underlying neural control of pelvic organs such as the urinary bladder.

In mature neurons of the CNS, **GABA** is an inhibitory neurotransmitter. However, **GABA** depolarized membranes of the MPG neurons from adult rat. Accordingly, the purpose of the present study was to examine for the first time molecular mechanism underlying excitatory **GABA** action in the MPG of adult rat. In this regard, various experimental techniques including gramicidin-

perforated patch-clamp, RT-PCR, intranuclear microinjection of genes, and immunohistochemistry were employed.

**GABA** currents were recorded mostly in the sympathetic MPG neurons with large capacitance and T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and were found to be conducted through bicuculin- and picrotoxin-sensitive **GABA<sub>A</sub>** receptors. In addition, reversal potentials of the **GABA** currents ( $E_{\text{GABA}}$ ) varied in proportion to external  $\text{Cl}^-$  concentration, indicating that  $\text{Cl}^-$  is primarily permeable to the **GABA<sub>A</sub>** receptors. Immunohistochemistry revealed presence of **GABA** and preferential expression of **GABA<sub>A</sub>** receptors in TH-positive sympathetic neurons. In the sympathetic MPG neurons, application of **GABA** produced depolarization of which amplitude was time-dependently decreased. Conversely, the **GABA** action was not observed in the parasympathetic MPG neurons. Three to four hours after dissociation,  $E_{\text{GABA}}$  was about -43 mV which was lower than resting membrane potentials. As estimated using the Nernst equation, the concentration of intracellular  $\text{Cl}^-$  ion ( $[\text{Cl}]_{\text{in}}$ ) was estimated at about 30 mM. The  $[\text{Cl}]_{\text{in}}$  tended to be decreased after 24 hour culture. RT-PCR analysis showed that MPG express **NKCC1** and **KCC1** but not **KCC2** which is critical for setting  $[\text{Cl}]_{\text{in}}$  low. When **KCC2** was overexpressed in the sympathetic MPG neurons,  $E_{\text{GABA}}$  was negatively shifted about 30 mV and physiological  $[\text{Cl}]_{\text{in}}$  was reduced from 22 mM to 6.5 mM. Furthermore, **GABA** produced hyperpolarization, which was prevented by furosemide, a **KCC2** blocker in the sympathetic MPG neurons overexpressing **KCC2**. In addition,  $E_{\text{GABA}}$  was not altered by external  $\text{HCO}_3^-$  and bumetanide, a **NKCC1** blocker.

Taken together, it was concluded that the excitatory **GABA** action arises from lack of **KCC2** expression which is capable of lowering  $[\text{Cl}]_{\text{in}}$  in the sympathetic MPG neurons of adult rats.

---

Key words: autonomic neuron, major pelvic ganglia, sympathetic, parasympathetic, excitatory **GABA** action, **GABA<sub>A</sub>** receptor, **NKCC1**, **KCC2**