

흰쥐 주골반 신경절에서 GABA
활동성의 조절

연세대학교 대학원
의 학 과
한 준 규

흰쥐 주골반 신경절에서 GABA
활동성의 조절

지도 이 중 우 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

한 준 규

한준규의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

기초 의학이라는 학문의 길을 경험하게 해주시고 본 연구의 처음부터 끝까지 자상한 배려와 격려를 아끼지 않으신 이중우 교수님께 존경과 감사의 마음을 전합니다. 정신과 의사로서의 첫 발을 내딛을 때부터 학문적 스승이자 인생의 스승이신 신정호 교수님의 격려는 큰 힘이 되었습니다. 서툴고 게을러질 때마다 날카로운 가르침과 세심한 학문적 충고를 아끼지 않으신 공인덕 교수님의 마음도 제 가슴 한켠에 아로새겨져 있을 것입니다. 그리고 바쁘신 가운데에서도 많은 조언과 수고를 해주신 박경선 교수님, 변진수 교수님께 또한 감사드립니다. 철모르던 생리학 조교 시절 즐거움을 함께 했던 박규상 교수님과 정해숙 선생님이 떠오르며 특히 실험과정에 많은 도움을 주신 차승규 선생님께 진심으로 감사를 드립니다. 일생을 당신들의 삶보다는 자녀들을 위해 헌신적인 사랑을 베풀어 주신 아버님과 어머님, 묵묵히 곁에서 큰 힘이 되어준 아내에게 이 작은 결실을 바치며 소중한 민아와 종욱이에게도 나의 따뜻한 마음을 전하고 싶습니다.

2003년 2월

저자 씀

차 례

그림 차례	iii
국문 요약	iv
제1장 서론	1
제2장 재료 및 방법	5
2.1. 실험 동물	5
2.2. 실험용액 및 약물	5
2.2.1. 실험 용액	5
2.2.2. 약물	6
2.3. 단일 신경세포 분리 및 유지	6
2.4. 전기생리학적 실험	7
2.5. 표본제작 및 면역조직화학 염색	8
2.6. 세포내 Ca^{2+} 측정	8
2.7. 자료분석	9
제3장 결과	13
3.1. MPG 신경 세포 종류에 따른 GABA 전류	13
3.2. MPG에서 GABA 수용체 $\beta 2/\beta 3$ subunit의 면역조직화학 염색	13
3.3. GABA 전류의 농도-반응 관계	14
3.4. GABA 전류에 대한 barbiturate의 효과	17
3.5. GABA 전류에 대한 zolpidem 및 DMCM의 효과	17
3.6. GABA 전류에 대한 loreclezole의 효과	21
3.7. GABA 전류에 대한 2가 및 3가 양이온들의 효과	21
3.8. GABA 전류에 대한 GABA 수용체 차단제의 효과	22
3.9. GABA가 세포막 전압 및 세포내 Ca^{2+} 변화에 미치는 영향	22

제4장 고찰	27
제5장 결론	33
참고 문헌	34
영문 요약	41

그림 차례

그림 1. 수컷 흰쥐의 주 골반 신경절(major pelvic ganglion)의 해부 및 구조 ...	10
그림 2. 주 골반 신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견	11
그림 3. 막전압 고정법에 의한 전류측정 장치의 회로 모식도	12
그림 4. MPG 신경세포 종류에 따른 GABA 전류	15
그림 5. GABA 수용체 $\beta 2/3$ subunit(GABA _A R $\beta 2/3$)의 면역조직화학 염색	16
그림 6. GABA 전류의 농도-반응 관계(dose-response relationship)	18
그림 7. GABA 전류에 대한 barbiturate의 효과	19
그림 8. GABA 전류에 대한 zolpidem 및 DMCM의 효과	20
그림 9. GABA 전류에 대한 loreclezole의 효과	23
그림 10. GABA 전류에 대한 2가 및 3가 양이온들의 효과	24
그림 11. GABA 전류에 대한 GABA 수용체 차단제의 효과	25
그림 12. GABA가 세포막 전압 및 세포내 Ca^{2+} 변화에 미치는 영향	26

국 문 요 약

흰쥐 주 골반 신경절에서 GABA 활동성의 조절

중추신경계에서 γ -aminobutyric acid(GABA)는 억제성 신경전달물질로 잘 알려져왔다. 하지만 자율신경계에서 GABA의 기능적인 역할은 충분히 규명되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐 주 골반 신경절(major pelvic ganglion; MPG) 세포에서 GABA 활성화 전류의 특성과 조절을 whole-cell 및 gramicidin perforated patch 방법을 통하여 알아보고자 하였다. MPG 신경세포는 T-형 칼슘 전류 존재 유무에 따라 두가지 군으로 나뉘어 진다. T-형 칼슘 전류가 존재하는 교감 신경세포에서 GABA는 내향성 전류를 유발하였으며, T-형 칼슘 전류가 존재하지 않는 부교감 신경세포에서는 동일한 조건하에서 GABA에 의한 내향성 전류가 유발되지 않았다. 또한 교감 신경세포에서 GABA_A 수용체 면역반응이 나타났으며, 이는 tyrosine hydroxylase와 같이 염색이 되었다. GABA 활성화 전류는 농도의존적 반응을 보였으며 EC₅₀는 7.3 μ M 이었다. GABA_A 수용체 차단제인 bicuculline이나 picrotoxin(100 μ M)을 전처리 하였을 경우 GABA에 의한 내향성 전류는 현저히 억제되었으나, GABA_C 수용체 차단제인 TPMPA(10 μ M)에 의해서는 아무런 영향을 받지 않았다. Zolpidem은 GABA 전류를 증가시켰으며, 반면에 inverse benzodiazepine 효현제인 DMCM은 GABA 전류를 억제시켰다. GABA 활성화 전류는 pentobarbital과 loreclezole에 의해 증가되었으며, furosemide에 의해서는 영향을 받지 않았다. Zinc와 cadmium은 GABA 전류를 현저히 억제하였으나, lanthanum은 유의한 효과를 나타내지 않았다. 막전류 고정법 하에서 GABA는 막전압을 탈분극시켰으며, 동시에 세포내 칼슘 농도를 증가시켰다. 이상의 실험 결과로 미루어 볼 때, GABA는 MPG의 교감 신경세포에 발현된 GABA_A 수용체를 활성화 시켜 세포의 생리적 조절에 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 주골반 신경절, GABA, GABA_A 수용체

흰쥐 주골반 신경절에서 GABA 활동성의 조절

<지도 이 중 우 교수>

연세대학교 대학원 의학과

한 준 규

제1장 서론

γ -aminobutyric acid(GABA)는 중추 신경계에서 주된 억제성 신경전달물질의 하나로, 일련의 GABA 수용체(receptor)에 결합하여 세포내로의 Cl^- 이동을 활성화 시킴으로 막전압을 과분극시켜 억제성 신경 전도를 일으키는 것으로 잘 알려져 있다(Barnard 등, 1998; Lu 등, 1999). GABA 수용체는 오합체(pentamer) 구조로 몇 가지 효현제나 길항제들의 효과와 작용기전에 따라 3가지 아형(subtype)이 보고되고 있다(Barnard 등, 1998). 즉 GABA 수용체는 ionotropic 수용체인 $GABA_A$ 및 $GABA_C$ 수용체와 GTP-binding protein과 연결된 metabotropic 수용체인 $GABA_B$ 수용체로 크게 나뉘어진다. 그 중에서 $GABA_A$ 수용체는 5개의 subunit으로 이뤄진 Cl^- 통로로서 4 종류의 서로 다른 subunit family($\alpha\beta\alpha$, β , γ 및 δ)가 많이 알려져 있지만(Macdonald 및 Olsen, 1994), 최근에는 두 개의 새로운 subunit(ϵ 및 π)이 보고되기도 하였다(Davies 등, 1997; Hedblom 및 Kirkness, 1997). GABA 수용체를 구성하고 있는 subunit family도 benzodiazepine이나 zinc와 같은 modulator들에 대한 민감도나 반응 정도에 따라 더 세분화 되는데 α subunit은 6종류($\alpha 1$ - $\alpha 6$), β subunit은 4종류($\beta 1$ - $\beta 4$), 그리고 γ subunit의 경우 역시 4종류($\gamma 1$ - $\gamma 4$)의 아형이 알려져있다. 또한 GABA 수용체 전류는 임상적으로 사용되는 약물에 따라 차이가 있는데, barbiturates, benzodiazepine, neurosteroid 그리고 imidazopyridines과 같은 약물들에 의해 증가되며, 반대로 β

-carboline과 zinc와 같은 modulator에 의해서는 억제되는 상반된 반응을 보인다 (Smart 등, 1991; Macdonald 및 Olsen 1994). GABA_B 수용체는 GABA_A와 GABA_C 수용체와는 달리 G-protein과 연결된 metabotropic 수용체이다. GABA_B 수용체는 baclofen에 의해 활성화되며, G-protein을 경유하여 Ca²⁺ 통로나 K⁺ 통로의 활성을 조절한다. 다른 ionotropic GABA 수용체인 GABA_C 수용체는 ρ subunit($\rho 1$ - $\rho 3$)이 포함된 pentameric Cl⁻ 통로이다(Ogurusu 및 Shingai, 1996; Barnard 등, 1998). GABA_C 수용체는 single channel conductance가 GABA_A 수용체보다 작으며, bicuculline에 의해 억제되지 않고, barbiturates, benzodiazepines, 혹은 neuroactive steroid에 의해 조절되지 않는 특성을 지닌다(Dong 등, 1994; Bormann 및 Feigenspan, 1995; Akasu 등, 1999).

골반총(pelvic plexus)은 비뇨 생식기계를 비롯한 여러 골반장기의 신경성 조절에 있어 중요한 역할을 담당하고 있다. 골반총의 해부 및 조직학적 특징은 종(species)에 따라 큰 차이를 보이고 있는데, 폭넓게 산재해 존재하며 여러 다발성 연결들로 이루어진 대부분의 포유류에서와 달리 쥐에서는 골반 신경절(pelvic ganglion) 세포들이 하나의 큰 신경절을 이루고 있다. 수컷 쥐의 경우 이를 주골반 신경절(major pelvic ganglion, MPG)이라 하며, 암컷의 경우에는 자궁경관주위 신경절(paracervical ganglion)이라 부르고 있다. 또한 수컷 쥐는 일부 accessory ganglia를 가지고 있으며, MPG는 암컷의 그것에 비해 세배 이상의 신경절 세포를 가지고 있어 구조 및 기능 면에서 성(sex)에 따른 차이가 있다(de Groat 및 Booth, 1993a,b).

MPG는 중추신경으로부터 흥분성 신호들을 비뇨생식 기관들에 전달하는 연결 중추로서의 기능을 담당할 뿐만 아니라 이러한 신경 정보들의 조절자로서 기능을 수행한다(Akasu 및 Nishimura, 1995; de Groat 및 Booth, 1980). MPG의 신경들은 골반신경으로부터 콜린성 입력을 받고, inferior mesenteric ganglia로부터 하복신경(hypogastric nerve)을 통해 교감성 입력을 받아 방광, 전립선 및 음경 등과 같은 비뇨 생식계 기관과 일부의 장(bowel)에 신경지배를 한다(Dail 등, 1975; Keast, 1991; de Groat 및 Booth, 1993a,b). MPG는 교감 신경, 부교감 신경 및 일부의 비아드레날린성, 비콜린성(nonadrenergic, noncholinergic, NANC) 신경들을

포함하고 있는데(de Groat 및 Booth, 1993), 여기에 포함된 신경들은 전기생리학적 및 신경화학적 특성을 기준으로 할 때 적어도 두 가지 이상의 아군(two subpopulation)의 절후신경이 존재하는 것으로 확인되고 있다(Zhu 등, 1995).~

세포내 막전압 기록법(intracellular recording technique)의 결과에 의하면 골반 절(pelvic ganglia) 신경들은 대략 -45 mV ~에서 -75 mV 정도의 안정막 전압을 가지고 있으며, 일부에서는 극파(spike) 혹은 낮은 진폭의 자발적인 활성도가 기록되는 것으로 알려지고 있다. 또한 아세틸콜린, 노아드레날린, VIP(vasoactive intestinal peptide) 및 dopamine과 같은 신경전달물질들을 투여하였을 때 자발적인 전기현상이 영향을 받는 것으로 보고되었으나, 자세한 기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 1990년대에 들어서면서 MPG에서도 단일 신경을 분리하여 단일 세포수준에서 이온전류를 측정하는 패치클램프 기법(patch clamp technique)이 도입되었으나, 칼슘 통로 및 일부 K^+ 통로에 관한 보고만 일부 있을 뿐 기타 이온 전류의 특성에 관해서는 뚜렷이 밝혀진 바 없다.

포유류의 중추 신경계에서 주된 억제성 신경전달물질의 하나인 GABA는 lower urinary tract에서도 작용을 한다(Maggi 등, 1983). GABA는 MPG로 가는 절전신경을 자극하였을 때 나타나는 방광수축을 억제하였다. 흰쥐 MPG에는 GABA를 포함한 신경세포들이 존재하며, 골반신경을 자극하였을 경우 GABA가 유리된다(de Groat, 1970; Kusunoki 등, 1984). 또한 MPG 신경세포에 GABA 합성 효소와 binding site가 존재함이 보고되었다(de Groat, 1970; Kusunoki 등, 1984). 고양이 방광의 골반신경절에서 GABA는 막전압의 탈분극과, 탈분극 이후에 과분극이 따라 일어나는 biphasic한 반응을 보이며, 이러한 반응은 Cl^- 이온의 conductance가 변하여 일어난다(Mayer 등, 1983). MPG에서 GABA 수용체의 역할이 기술되어 왔으나(Akasu 등, 1999), 세포 수준에서 수용체의 아형과 subunit의 조합 및 조절에 대해서는 연구된 바가 없다.

기능적으로 수컷 흰쥐의 MPG 신경들은 배뇨(micturation)와 발기(penile erection)등에 관련되고(de Groat 및 Booth, 1993), 이들 신경 세포의 이상은 방광 폐쇄나 발기부전과 같은 병적 과정(pathological process)과 관련될 수 있다(de Groat 및 Booth, 1993). MPG 신경은 비뇨생식기를 비롯한 골반 장기(pelvic

organ)에 대한 자율신경계 조절을 연구하는 유용한 모델로 사용될 수 있으나 아직은 여러 전기생리학적 특성들이 규명되어 있지 않아 다양한 역할 규명이 필요하다.

따라서 본 연구는 효소처리를 통해 수컷 흰쥐의 MPG 신경들을 단일 신경세포로 분리, 배양한 후 전기생리학적(electrophysiological) 기법을 이용하여 이들에 발현되어 있을 것으로 예상되는 GABA-활성화 전류의 특성들을 확인하고, 그 기전을 규명하고자 하였다.

제2장 재료 및 방법

2.1. 실험 동물

실험동물로는 200-250 gm 내외의 흰쥐(Sprague-Dawley rat) 수컷을 사용하였다.

2.2. 실험용액 및 약물

2.2.1. 실험 용액

GABA 활성화 전류 측정시 사용된 전극내 용액의 조성(mM)은 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 11 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 그리고 2 MgCl₂ (pH 7.2)으로 하였다. 세포외 관류액의 조성(mM)은 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES 그리고 10 glucose (pH 7.4)으로 하여 실험하였다.

Gramicidin-perforated patch를 위한 전극내 용액(internal solution)의 조성(mM)은 140 KCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 0.5 CaCl₂, 5 NaCl(pH 7.2)으로 하였으며 세포외 관류액은 GABA 전류 측정시 사용한 용액과 동일하게 사용하였다. 전극내 용액에는 최종 농도가 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 gramicidin을 포함시켜 perforated whole-cell mode를 만들었다. Gramicidin은 DMSO에 녹여 사용하였다. 모든 약물은 polyethylene관과 연결된 gas chromatography용 모세관(capillary tube) 끝을 신경 세포의 100 μm 이내에 위치하도록 하여 이를 통해 약물이 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

2.2.2. 약물

Collagenase type D와 trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN, USA)로 부터 구입하였으며, GABA, bicuculline, picrotoxin, (1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl)methylphosphinic acid(TPMPA), 등은 Tocris (Tocris Cookson Inc., Ballwin, MO, USA)로부터, 6,7-dimethoxy-4-ethyl- β -carboline-3-carboxylate(DMCM), loreclezole, zolpidem, gramicidin, pentobarbital, furosemide, DNase type I 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 세포배양과 관계된 모든 배지 및 약물은 GibcoBRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

2.3. 단일 신경세포 분리 및 유지

성숙된 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷(200 ~ 250 gm)을 pentobarbital sodium (50 mg/kg, *i.p.*)으로 마취시킨 뒤, 즉시 개복 하여 전립선의 외측에 위치한 주 골반 신경절(major pelvic ganglia; MPG)을 적출하고(그림 1 참조), 이를 차가운(4°C) Hanks' balanced salt 용액(GibcoBRL)으로 옮겼다. 수초를 벗기고 작은 틈새를 낸 후, 이를 0.7 mg/ml collagenase(type D), 0.1 mg/ml trypsin과 0.1 mg/ml의 DNase type I이 들어있는 10 ml의 modified Earle's balanced salt 용액(EBSS, pH 7.4)에서 1시간 동안 배양(35°C)하였다(Zhu 등, 1995). 이때 EBSS에는 3.6 g/L의 glucose와 10 mM의 HEPES를 포함시켰다. 배양 후 신경세포들을 배양용기에 넣어 흔들어 분리한 후, clinical centrifuge(International Equipment Company, MA, USA)를 이용하여 1000 rpm의 속도로 원심 분리하였다. 분리된 신경세포들을 10% fetal calf serum, 1% glutamine, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 MEM에 재부유시킨 뒤, poly-L-lysine으로 코팅되어 있는 cover glass(Φ =12 mm)에 plating 하였다. 이를 37°C 세포 배양기(humidified incubator; 95% air-5%

CO₂)에서 배양하였으며, 분리한 후 12시간 이내에 실험에 사용하였다. 분리된 세포들의 광학현미경적 소견은 그림 2에 나타내었다.

2.4. 전기생리학적 실험

이온 전류는 patch clamp amplifier(EPC9, Instrutech Corp., NY, USA)를 사용하여 전형적인 whole-cell 및 gramicidin-perforated patch clamp 방법으로 측정하였다(Hamill 등, 1981). 측정 전극은 borosilicate glass capillary(외경; 1.65 mm, 내경; 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 사용하였다. 모든 전극은 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co.)로 뽑아 제작하였다. 전극은 Sylgard 184(Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅하였으며, whole-cell 전류 측정에는 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5~2.5 MΩ이 되는 것을 사용하였다. 세포가 붙어 있는 cover glass를 도립현미경(inverted microscope) 위에 올려놓고, 세포외액은 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 막전압 고정법(voltage clamp) 기록을 위해서 세포막의 capacitance와 series resistance는 80% 이상 보정하였으며, 실험시 sampling rate은 1 kHz, low-pass filter는 2 kHz(-3dB; 8-pole Bessel filter)로 하여 기록하였다. 막전류 고정법을 사용한 막전압 측정시에는 sampling rate을 2 kHz, low-pass filter는 2 kHz(-3dB)로 하였다. 모든 실험결과는 Pulse/Pulsefit(v8.50) software(Heka Elektronik, Lambrecht, Germany)를 통해 IBM 컴퓨터에 저장하여 분석하였다. 모든 실험은 실온(21 ~ 24°C)에서 시행하였으며, 본 실험에 사용된 전류 측정장치는 그림 3에 도식적으로 나타내었다.

2.5. 표본제작 및 면역조직화학 염색

MPG 표본 제작을 위해, 흰쥐를 ether로 마취 후, 깊은 마취 상태에서 왼쪽 심실을 통해 0.9% NaCl을 포함하는 0.1 M 인산염완충액(PBS; pH 7.4, 37°C)을 관류하여 혈액을 제거하였고, 이어서 4% paraformaldehyde로 관류, 고정하였다. 관류고정을 마친 다음 면역조직화학 염색을 위해 MPG 표본을 적출하여 동일한 고정액으로 4°C에서 16-20 시간 동안 후고정하였다. 이후 표본을 25% sucrose 용액(in 0.1 M PBS)에 16시간 동안 침투시키고 -70°C isopentan으로 동결시켜, 동결절편기(Reichert-Jung, Germany)를 이용하여 25 μ m 두께의 절편을 제작하였다. 면역염색의 모든 과정은 자유부유법으로 시행하였다. 우선 동결 절편을 3% 과산화수소에 20분간 처리한 후 0.1 M PBS로 세 번 수세하였고, 이차항체에 대한 비특이적 반응을 제거하기 위하여 5% normal horse serum으로 두 시간 동안 처리하였다. 이어서 항 GABA_A β 2/3(1 : 250; Upstate, USA)을 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. 면역반응을 마친 조직을 PBS로 수세한 후 0.01% H₂O₂를 포함하는 0.05% Ni-DAB(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 발색시켰으며 cresyl violet으로 대조염색을 시행한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

2.6. 세포내 Ca²⁺ 측정

세포내 Ca²⁺ 측정은 ratio fluorescence system(Ratiometer, PTI, USA)을 이용하여 측정하였다. 먼저 단일 MPG 세포가 있는 배양접시에 Fura2/AM를 5 μ M 농도로 처리하여 상온에서 60분간 loading 시켰다. Fura2가 loading 된 것을 형광현미경으로 확인한 후, gramicidin-perforated patch 방법을 사용하여 세포막 전압

과 전류를 Ca^{2+} 변화와 동시에 측정하였다. GABA에 의한 세포막 전압의 변화는 전류고정법(current-clamp method)을 사용하였으며, GABA 전류 측정시에는 전압 고정법(voltage-clamp method)을 사용하여 측정하였다.

2.7. 자료분석

GABA 전류의 크기는 peak 값을 취하였다. 전류의 크기(amplitude)는 세포의 크기에 따른 차이를 보정하기 위해 세포막의 capacitance로 나누어 전류 밀도(current density)로 표시하였으며, 세포막의 capacitance는 Pulse/Pulsefit 프로그램에서 구하였다. 모든 결과는 평균±표준오차로 나타내었고, 통계적인 의의는 t-검정(paired 혹은 unpaired)으로 확인하였으며, 경우에 따라 분산분석(ANOVA)과 비모수 검정인 Mann-Whitney 검정을 실시하였다. 이 모든 경우에 p값이 0.05이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

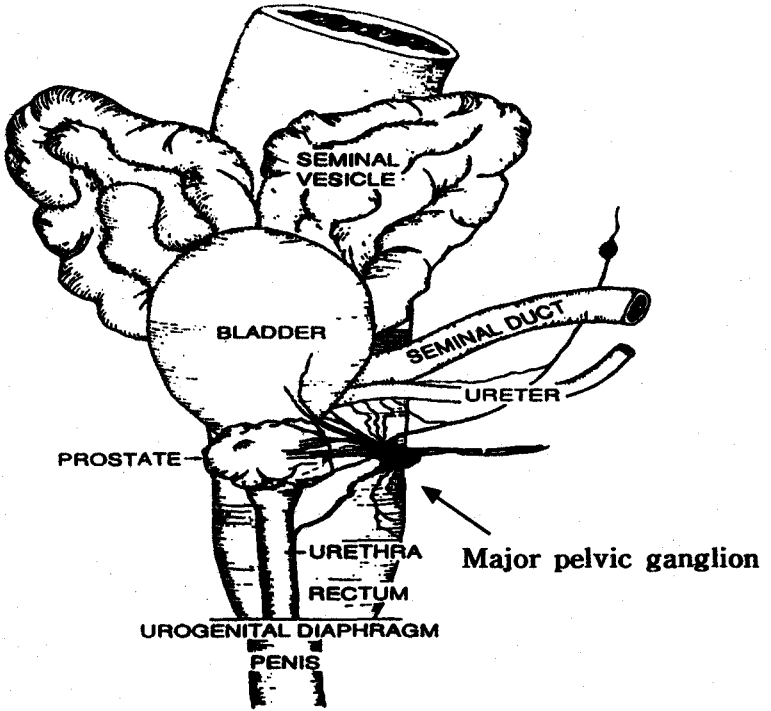


그림 1. 수컷 흰쥐의 주골반 신경절(major pelvic ganglion)의 해부 및 구조



그림 2. 주골반 신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견 (x200)

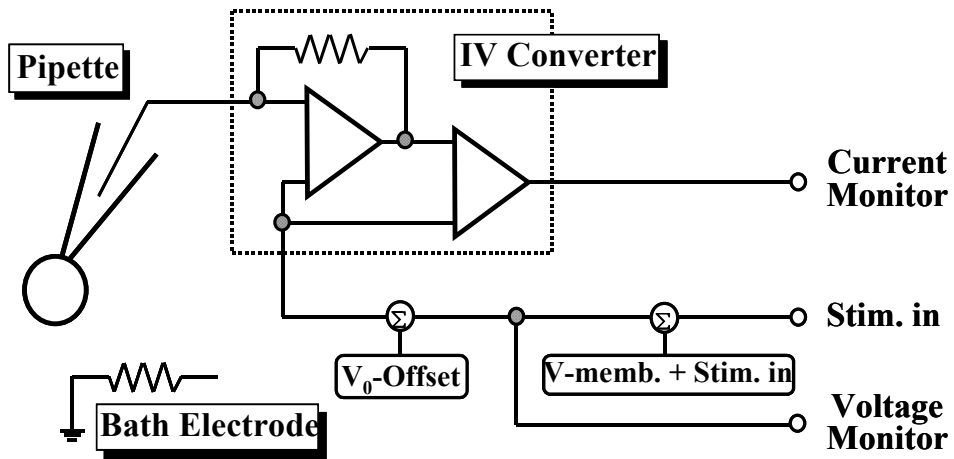


그림 3. 막전압 고정법에 의한 전류 측정 장치의 회로 모식도

제3장 결과

3.1. MPG 신경 세포 종류에 따른 GABA 전류

분리된 MPG 신경의 종류에 따른 GABA 전류의 활성을 비교하기 위해 먼저 칼슘 전류를 측정하였다. MPG 신경절에서 T-형 전류를 나타내는 세포는 대부분 tyrosine hydroxylase에 대한 면역-조직학적 염색에서 양성을 보이는 교감신경세포인 반면, T-형 전류가 없는 세포는 부교감신경을 포함한 기타 다른 신경세포들이다(Zhu, 1995). 먼저 막전압을 -100 mV에 고정된 후 -30 mV까지 탈분극시켜 T-형 칼슘 전류를 기록하여 MPG 신경세포에서 교감 및 부교감 신경을 구분하였다(그림 4). T-형 칼슘 전류가 존재하는 교감 신경세포에서 막전압을 -80 mV에 고정된 후 100 μ M의 GABA를 가하였을 경우 아주 큰 내향성 전류가 관찰되었다($n=62$; 그림 4A). 그러나 T-형 칼슘 전류가 존재하지 않는 신경세포의 경우에는 동일한 조건에서 내향성 전류가 관찰되지 않았다($n=20$; 그림 4B). 세포의 크기 즉 세포의 용적에 비례하는 평균 세포막 전기용량(capacitance)은 T-형 전류를 가진 교감신경 세포군(82 ± 3 pF, $n=50$)이 그렇지 않은 기타 신경세포군(47 ± 3 pF, $n=54$)에 비해 크게 나타났다.

3.2. MPG에서 GABA 수용체 $\beta 2/\beta 3$ subunit의 면역조직화학 염색

GABA_A 수용체가 MPG 신경세포에 존재하는 것을 면역조직화학 염색을 통해 확인하였다. MPG 신경 세포 중 GABA_A 수용체 $\beta 2/\beta 3$ subunit(GABA_AR $\beta 2/3$)은 주로 큰 세포에 염색이 되었으며, 작은세포에는 염색이 되지 않았다(그림 5A). 세포 종류에 따른 GABA 수용체 발현을 알아보기 위하여 tyrosine hydroxylase

(TH)와 GABA_AR β 2/3를 동시에 염색하였다. TH와 GABA_AR β 2/3는 동일한 세포에 같이 존재하였으며 따라서 GABA_AR β 2/3는 TH에 염색되는 교감 신경세포에 존재함을 알 수 있었다(그림 5B).

3.3. GABA 전류의 농도-반응 관계

GABA 전류는 세포 내외의 140 mM/140 mM 대칭적 Cl⁻ 농도경사에서 기록하였다. 이러한 조건하에서 세포외액에 1 μ M의 GABA에 의해 내향성 전류가 관찰되기 시작했으며, GABA 농도가 증가할수록 내향성 전류가 더욱 커지는 농도의 존적 반응을 나타내었다(그림 6A). 가한 GABA의 농도 범위는 0.1 μ M에서 100 μ M였다. GABA 전류는 낮은 농도에서는 내향성 전류의 활성화가 느리고, 탈감작(desensitization)이 잘 일어나지 않았으나, 높은 농도로 갈수록 빠른 활성화와 탈감작을 보였다(그림 6A). GABA에 의한 내향성 전류는 100 μ M 이상에서 포화(saturation)되었으며, EC₅₀는 7.3 μ M, Hill's slope은 1.35 \pm 0.12였다(그림 6B). GABA 전류의 농도 반응 곡선은 6개의 세포에서 기록된 값을 사용하였다.

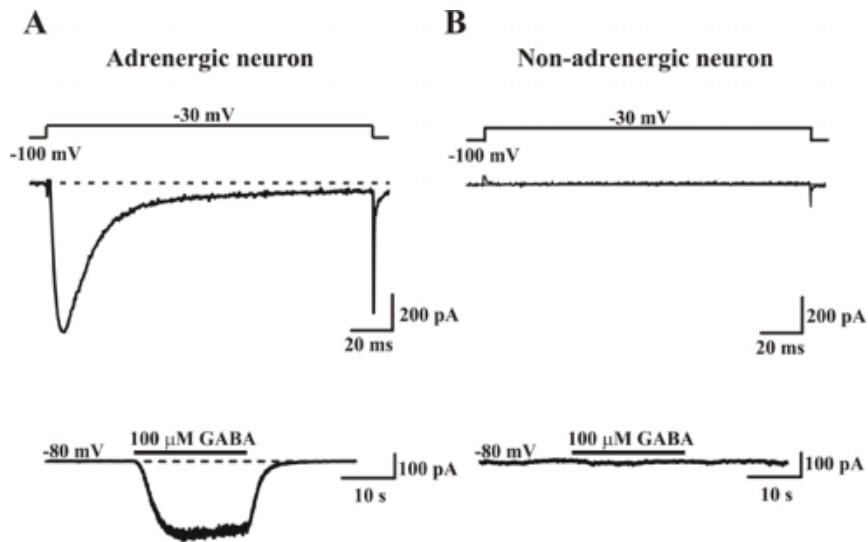


그림 4. MPG 신경세포 종류에 따른 GABA 전류. T-형 칼슘 통로는 막전압을 -100 mV에 고정한 상태에서 -30 mV까지 탈분극 시켜 기록하였고, GABA 전류는 막전압을 -80 mV에 고정한 상태에서 기록하였다. A: 막전압을 -100 mV에 고정한 상태에서 -30 mV까지 탈분극 시켰을 때 나타나는 T-형 칼슘 전류를 보여주며, 이 세포에 100 μM의 GABA를 가하였을 경우 내향성 전류가 유발됨을 보여준다. B: T-형 칼슘 전류가 존재하지 않는 세포이며 100 μM의 GABA를 가하였을 경우이다.

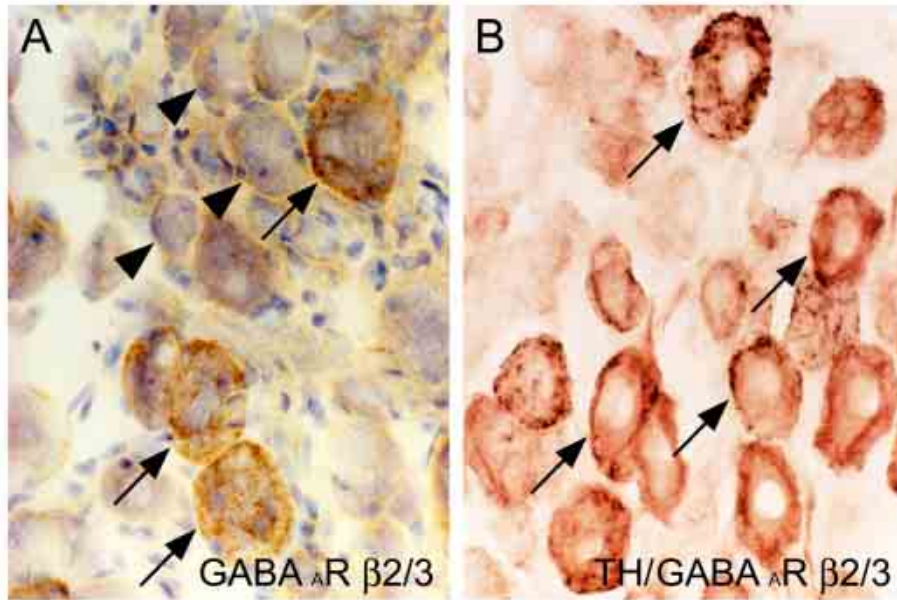


그림 5. GABA 수용체 β 2/3 subunit(GABA_AR β 2/3)의 면역조직화학 염색. A: Cresyl violet으로 배경 염색을 하고 GABA_AR β 2/3을 labelling 시켰다(brown). GABA_AR β 2/3 염색은 대부분 큰 세포들에서 이루어졌으며(화살표), 작은 세포들은 염색이 이루어지지 않았다(화살표 머리). B: Tyrosine hydroxylase(TH)와 GABA_AR β 2/3의 double-labelling. TH(red)와 GABA_AR β 2/3(black)은 동일 세포에서 염색됨을 보여준다(화살표).

3.4. GABA 전류에 대한 barbiturate의 효과

막전압을 -80 mV에 고정된 후 3 μ M의 GABA를 가하여 GABA 전류를 유발한 후, pentobarbital의 효과를 확인하였다. Pentobarbital은 GABA 전류를 농도의존적으로 증가시켰으며, 300 μ M pentobarbital 농도에서 GABA 전류를 최대 $1527 \pm 81.99\%$ ($n=7$) 증가시켰다(그림 7A). Pentobarbital에 의한 GABA 전류의 증가는 100 μ M 이상에서 포화(saturation)되었으며, EC_{50} 는 3.90 μ M, Hill's slope은 3.39 ± 1.40 였다(그림 7B).

3.5. GABA 전류에 대한 zolpidem 및 DMCM의 효과

Zolpidem은 GABA 수용체의 α subunit에 민감한 benzodiazepine 효현제이다. Zolpidem은 GABA에 의해 유발된 전류를 농도의존적으로 증가시켰다(그림 8A). Zolpidem에 의한 GABA 전류 증가는 10 μ M 농도에서 최대 $293.20 \pm 17.95\%$ 였으며, EC_{50} 는 0.68 μ M, Hill's slope은 2.10 ± 0.77 였다($n=5$; 그림 8C). DMCM은 GABA 수용체 benzodiazepine site에 inverse agonist로 작용하는 β -carboline이다. DMCM은 GABA 전류를 농도의존적으로 억제하였다(그림 8B). DMCM은 GABA 전류를 최대 $71.39 \pm 5.40\%$ 억제하였으며, IC_{50} 는 0.56 μ M, Hill's slope은 1.97 ± 0.79 였다($n=5$; 그림 8C).

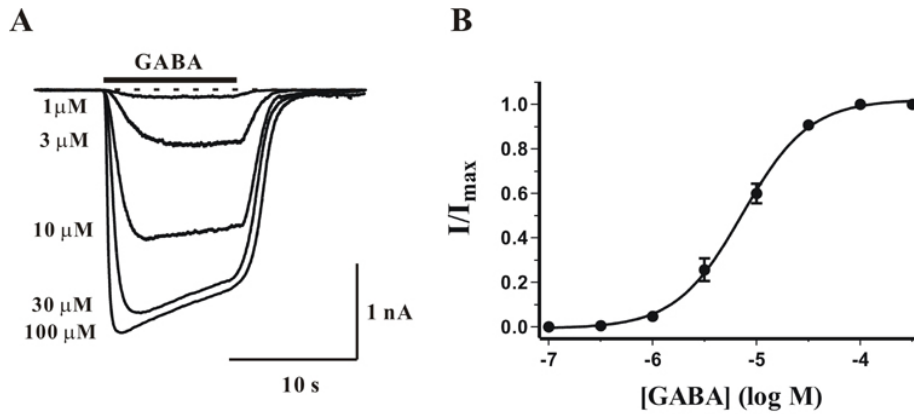


그림 6. GABA 전류의 농도-반응 관계(dose-response relationship). A: 막전압을 -80 mV에 고정된 상태에서 기록한 GABA 전류. 가한 GABA의 농도는 왼쪽에 제시되었으며 GABA를 관류시킨 시간은 검은 막대로 표시하였다. B: GABA 농도-반응 곡선. 모든 data는 포화농도(saturating concentration)에서 기록한 전류에 대한 표준화된 값을 취하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 6.

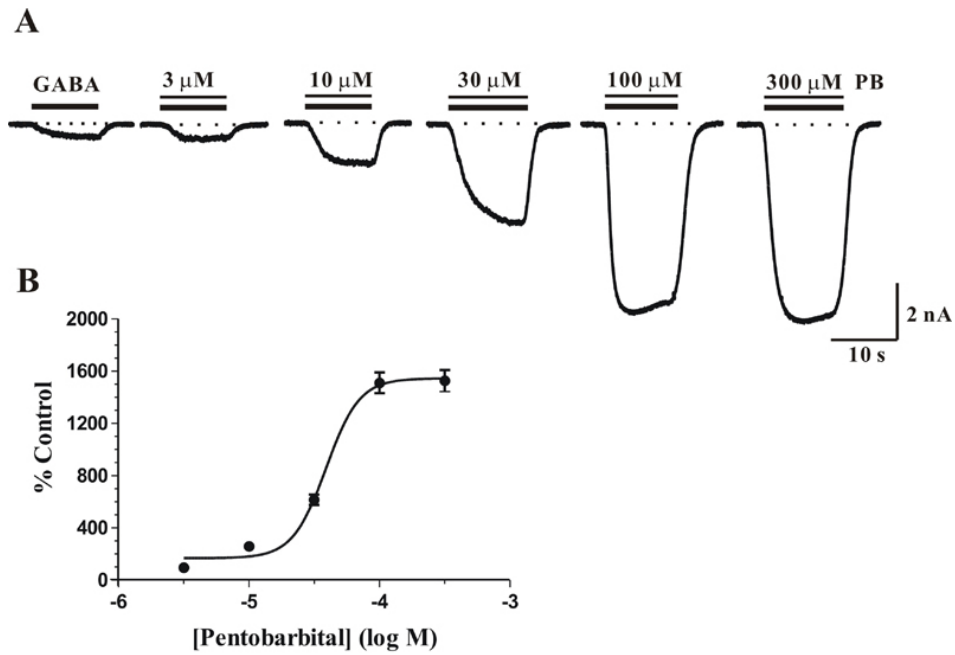


그림 7. GABA 전류에 대한 barbiturate의 효과. A: GABA 전류는 막 전압을 -80 mV에 고정된 상태에서 기록하였으며 가한 GABA의 농도는 3μ M이었다. Pentobarbital(PB)은 3μ M에서 300μ M까지 각 농도에서 GABA와 함께 동시에 가하였다. B: GABA 전류에 대한 PB의 농도-반응 곡선. Y축은 GABA 전류의 크기를 100%로 하였을 경우 PB에 의해 증가율을 나타내었으며, X축은 PB의 농도를 log 값으로 나타내었다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 7.

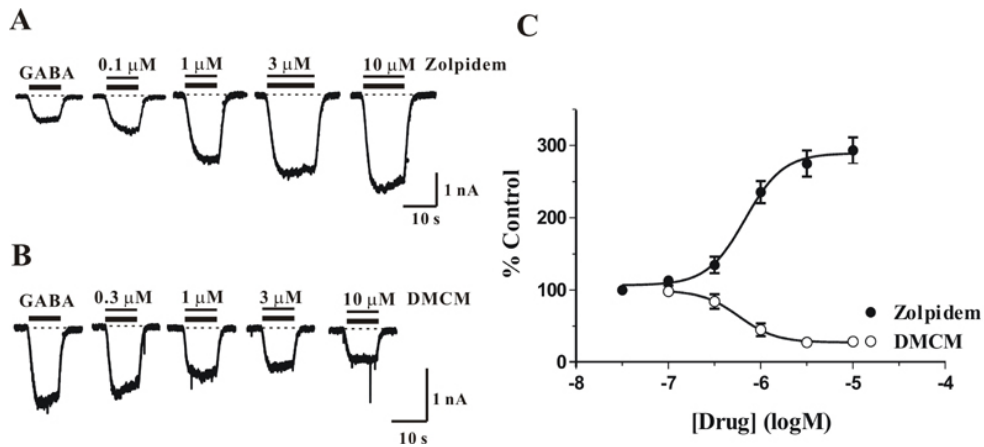


그림 8. GABA 전류에 대한 zolpidem 및 DMCM의 효과. 모든 GABA 활성화 전류는 3 μM GABA에 의해 유발 시켰다. A: GABA 전류는 막 전압을 -80 mV 에 고정된 상태에서 기록하였다. Benzodiazepine 효현제인 zolpidem의 농도는 0.1 μM 에서 10 μM 까지 다양하게 가하였으며, 가한 기간은 점선으로 표시하였다. B: Benzodiazepine의 inverse agonist인 DMCM의 효과. DMCM의 농도는 0.1 μM 에서 10 μM 까지 다양하게 가하였으며, 가한 기간은 점선으로 표시하였다. C: GABA 전류에 대한 benzodiazepine 약물의 농도-반응곡선. Y축은 GABA 전류의 크기를 100%로 하였을 경우 약물들에 의한 % 증가 및 감소를 나타내었으며, X축은 약물의 농도를 log 값으로 나타내었다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 zolpidem 및 DMCM 모두 5.

3.6. GABA 전류에 대한 loreclezole의 효과

Loreclezole은 항경련성(anticonvulsant) 약물로서 GABA 수용체의 $\beta 2$ 와 $\beta 3$ subunit에 작용하여 GABA 전류를 활성화시키는 것으로 알려져있다(Wafford 등, 1994). MPG 신경세포에서 loreclezole은 GABA 전류를 증가시켰다(그림 9A). GABA 전류의 증가는 10 μM 일 때 최대였으며 그 이상의 농도에서는 포화 현상을 나타내었다. Loreclezole은 GABA 전류를 최대 471.90 \pm 45.31% 증가시켰으며, 이러한 loreclezole의 효과의 EC_{50} 는 2.91 μM , Hill's slope은 1.72 \pm 0.19였다(n=7; 그림 9B).

3.7. GABA 전류에 대한 2가 및 3가 양이온들의 효과

그림 9는 여러 가지 2가 및 3가 양이온들이 GABA 전류에 미치는 영향을 보여준다. Zn^{2+} 는 GABA 전류의 noncompetitive antagonist로 알려져있다. Zn^{2+} 는 10 μM GABA에 의해 활성화된 전류를 농도 의존적으로 억제하였으며, 100 μM Zn^{2+} 를 가하였을 경우 GABA 전류는 97.31 \pm 1.07% 차단되었다(n=5; 그림 10A,C). Zn^{2+} 의 IC_{50} 는 29.5 μM , Hill's slope은 -1.85 \pm 1.47이었다(그림 10C). 다른 2가 양이온인 Cd^{2+} 역시 GABA 전류를 억제하였으며, 최대 억제는 80.01 \pm 1.29%이었다. Cd^{2+} 의 GABA 전류 억제에 대한 IC_{50} 는 42.7 μM , Hill's slope은 -1.02 \pm 0.43이었다(그림 10C). 3가 양이온인 La^{3+} 은 $\alpha 6$ subunit이 포함되어 있는 GABA 수용체 전류의 경우 억제하며, $\alpha 1$ subunit이 포함된 GABA 수용체의 경우 GABA 전류를 증가시키는 것으로 보고되었다(Saxena 등, 1997). MPG 신경세포에서 300 μM 의 La^{3+} 은 GABA 전류를 37.53 \pm 7.21% 억제하였으며, 일부의 세포에서는 증가를 나타내었다(그림 10B,C).

3.8. GABA 전류에 대한 GABA 수용체 차단제의 효과

Bicuculline은 competitive GABA 수용체 차단제로서 GABA_B 수용체나 GABA_C 수용체에는 효과가 없는 것으로 알려져 있다. MPG 신경세포에서 bicuculline은 GABA 전류를 농도 의존적으로 억제하였으며, 10 μ M bicuculline은 GABA 전류를 거의 차단하였다(그림 11A,D). GABA 전류에 대한 bicuculline의 IC₅₀는 0.26 μ M, Hill's slope은 -0.97 ± 2.24 이었다(n=6; 그림 11C). Picrotoxin은 noncompetitive GABA 수용체 차단제로서, bicuculline과 동일하게 GABA 전류를 억제하였다. Picrotoxin (100 μ M)은 10 μ M GABA에 의해 활성화된 전류를 93.49 \pm 1.07% 억제하였다(n=5; 그림 11D). 이러한 bicuculline과 picrotoxin의 효과는 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(p<0.01). Furosemide는 anthranilic acid derivative로서 micromolar 범위의 IC₅₀ 값을 가지며 α 4 혹은 α 6 subunit이 포함된 GABA 수용체인 경우 GABA 전류를 억제하는 것으로 알려져 있다(Wafford 등, 1996). MPG 신경세포에서 furosemide(1 mM)는 GABA 전류에 큰 영향을 미치지 못하였다(p>0.05; 그림 11B,D). GABA_C 수용체 차단제인 TPMPA(100 μ M) 역시 GABA 전류에 효과가 없었다(p>0.05; 그림 11D).

3.9. GABA가 세포막 전압 및 세포내 Ca²⁺ 변화에 미치는 영향

먼저 Fura2가 loading 된 세포에서 gramicidin-perforated patch를 시행하였다(Ebihara 등, 1995). Gramicidin-perforated patch를 시행한 후 전류고정법(current-clamp method) 하에서 GABA에 의한 세포막 전압의 변화와 Ca²⁺ 변화를 관찰하였다. GABA(100 μ M)는 세포막 막전압을 탈분극 시켰으며, 그와 동시에 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가시켰다(그림 12A). 한편 전압고정법(voltage-clamp method) 하에서 GABA는 내향성 전류를 유발 시켰지만 세포내 Ca²⁺ 농도 변화에는 영향을 미치지 못하였다(그림 12B).

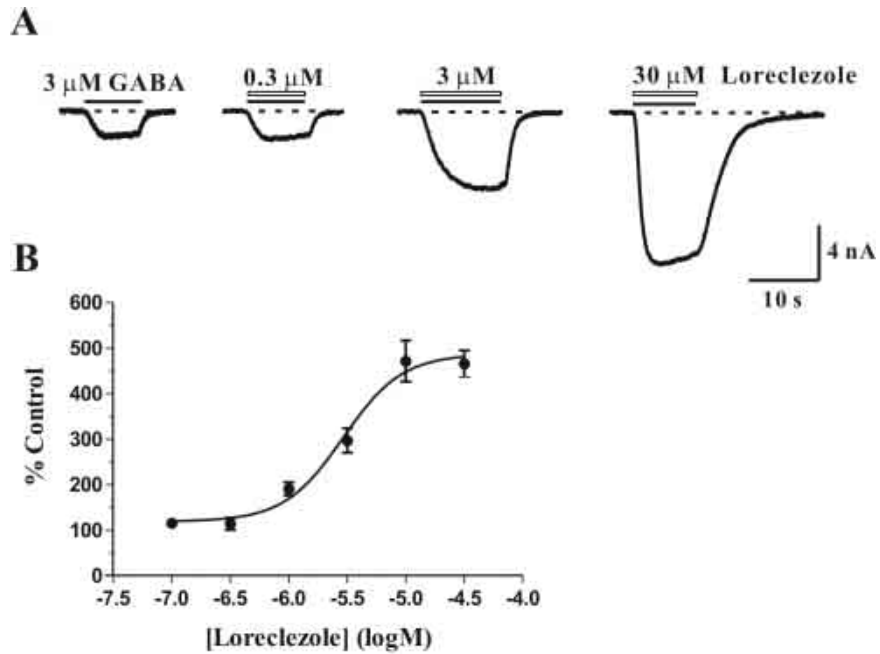


그림 9. GABA 전류에 대한 loreclezole의 효과. A: GABA 전류는 막 전압을 -80 mV에 고정된 상태에서 기록하였으며 GABA 전류를 유발한 농도는 $3 \mu\text{M}$ 이었다. Loreclezole은 $0.3 \mu\text{M}$ 에서 $30 \mu\text{M}$ 까지 각 농도에서 GABA와 함께 동시에 가하였다. B: GABA 전류에 대한 loreclezole의 농도-반응곡선. Y축은 GABA 전류의 크기를 100%로 하였을 경우 loreclezole에 의한 %를 나타내었으며, X축은 loreclezole의 농도를 log 값으로 나타내었다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 7.

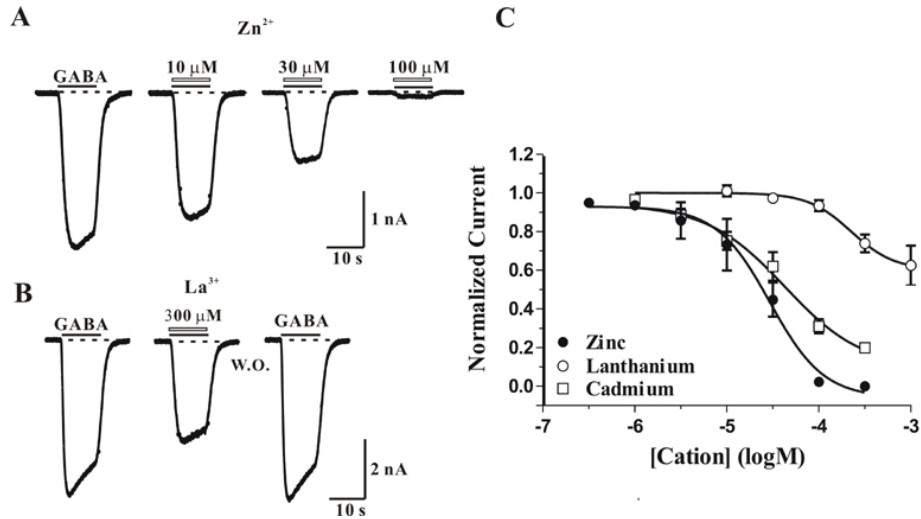


그림 10. GABA 전류에 대한 2가 및 3가 양이온들의 효과. 모든 전류는 막전압을 -80 mV에 고정된 상태에서 기록하였으며 약물효과 확인 후에는 다시 정상 관류액으로 교환하여 회복되는지를 확인하였다. GABA 전류는 $10 \mu\text{M}$ GABA를 가하여 유발시켰다. A: Zn^{2+} 가 GABA 전류에 미치는 영향. Zn^{2+} 를 $10 \mu\text{M}$ 에서 $100 \mu\text{M}$ 까지 GABA와 동시에 가하였다. B: La^{3+} ($300 \mu\text{M}$)을 가하였을 경우 보이는 GABA 전류억제를 나타내었으며, 정상 관류액으로 교환하였을 경우 회복되는 것을 보여준다. C: 여러 2가 및 3가 양이온들이 GABA 전류에 미치는 영향을 요약하였다. 모든 data는 포화농도(saturating concentration)에서 기록한 전류에 대한 표준화된 값이다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 4-5.

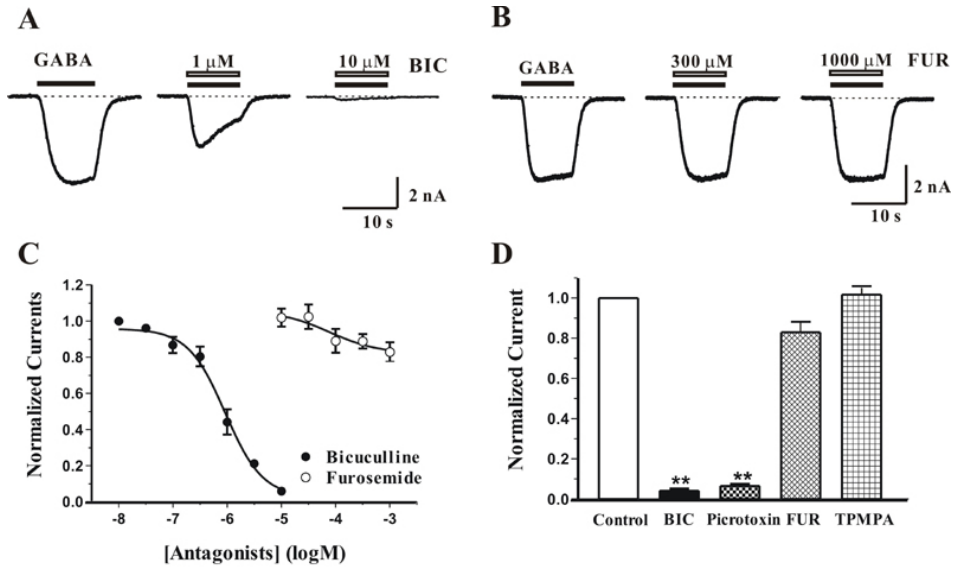


그림 11. GABA 전류에 대한 GABA 수용체 차단제의 효과. 모든 전류는 막전압을 -80 mV에 고정된 상태에서 기록하였으며 GABA 전류는 10 μ M GABA를 가하여 유발시켰다. A: GABA를 가하여 내향성 전류가 유발됨을 확인 한후, GABA_A 수용체 차단제인 bicuculline(BIC; 1 , 10 μ M)을 GABA와 동시에 가하여 효과를 비교하였다. B: Furosemide(FUR; 300 μ M, 1 mM)가 GABA 전류에 미치는 영향을 나타내었다. C: Bicuculline과 Furosemide의 농도-반응 곡선. 모든 data는 포화농도 (saturating concentration)에서 기록한 전류에 대한 표준화된 값이다. D: GABA_A 수용체 차단제인 BIC(10 μ M)과 picrotoxin(100 μ M) 그리고 FUR(1 mM), GABA_C 수용체 차단제인 TPMPA(100 μ M)가 GABA 전류에 미치는 효과를 요약하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 4-5. **: $p < 0.01$.

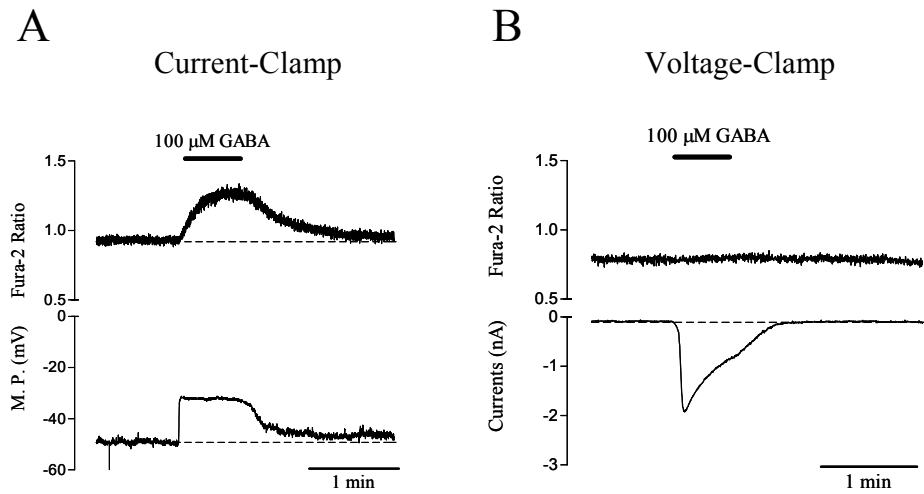


그림 12. GABA가 세포막 전압 및 세포내 Ca^{2+} 변화에 미치는 영향. 모든 실험은 fura2가 loading 된 세포에서 gramicidin-perforated patch를 시행하여 Ca^{2+} 변화 및 세포막전압/전류의 변화를 기록하였다. A: 막전압 고정법하에서 GABA(100 μM)에 의한 세포막전압의 변화와 Ca^{2+} 변화를 측정된 결과이다. B: 전류고정법 하에서 GABA(100 μM)에 의한 내향성 전류와 Ca^{2+} 변화를 동시에 측정된 결과이다.

제4장 고찰

중추신경계에서 GABA는 대표적인 억제성 신경전달물질로 알려져있다. 자율신경계에서는 자율신경절 세포를 탈분극시키며(Adams 및 Brown, 1975), 이러한 탈분극은 bicuculline이나 picrotoxin과 같은 GABA_A 수용체 차단제에 의해 소실됨이 보고되었다(de Groat 및 Booth, 1993). 한편 고양이 방광 신경절에서 GABA는 세포막 전압을 과분극 시킴으로 신경전달을 억제하는 상반된 반응을 보였다(Mayer 등, 1983; de Groat 및 Booth, 1993). 주골반 신경절(major pelvic ganglia; MPG)에서는 GABA를 함유한 신경세포와 GABA 합성 효소의 존재(de Groat, 1970; Kusunoki 등, 1984) 그리고 GABA 결합부위(binding sites)가 존재함이 보고되었다(Kusunoki 등, 1984). 하지만 MPG를 포함한 자율신경계에서 단일 세포수준에서의 GABA 작용과 GABA 수용체 아형에 대해서는 거의 보고된 바가 없었다. MPG는 교감신경과 부교감신경이 혼재해 있으며, 이들 신경세포들은 세포크기, 세포막용량, 그리고 전기생리적 특징에 따라 구분할 수 있다(Zhu 등, 1995). 교감신경세포는 부교감신경에 비해 크기가 크며, 세포막 용량이 크다. 또한 전기생리학적으로 낮은 역치(low threshold) 자극에 의해 활성화되는 T-형 칼슘(T-type calcium) 통로가 존재하며(Zhu 등, 1995), 탈분극 전류를 가하였을 때 tonic한 발화반응을 보인다(Lee 등, 2002). MPG 신경세포에서 GABA 전류는 T-형 칼슘 통로가 존재하는 신경세포에서만 기록되었다. 면역조직화학 염색에서 GABA 수용체는 주로 큰 세포들에 존재했으며, 교감신경 marker인 tyrosine hydroxylase(TH)와 함께 존재하였다. 이상의 전기생리학적 및 면역조직화학 염색 결과로 볼 때 MPG에서 GABA 수용체는 교감신경세포에만 존재하는 것으로 사료된다.

MPG 신경세포에서 GABA 전류는 GABA_A 수용체 봉쇄제인 bicuculline과 picrotoxin에 의해 그 효과가 완전히 억제되는 것으로 보아 기능적으로 GABA_A 수용체가 발현되어 있음을 알 수 있었다. 세포내 전극법(intracellular recording technique)을 이용하여 Akasu 등(1999)은 조직 수준에서 GABA가 GABA_A 및

GABA_C 수용체를 매개로 이중 반응(biphasic responses)을 유발하는 것으로 보고하였고, MPG에서 GABA_C 수용체의 존재를 GABA_C 효현제인 *cis*-4-Aminocrotonic acid/(*Z*)-4-Amino-2-butenic acid(CACA)가 세포막 전압을 탈분극 시키고, CACA에 의한 탈분극이 GABA_C 차단제인 Imidazole-4-acetic acid(I4AA)에 의해 소실됨으로 확인하였다. 쥐 소뇌의 granule cell에서 CACA는 GABA_C 수용체가 아닌 α GABA_A 수용체를 활성화시킴이 보고되었다(Wall, 2001). 이는 CACA가 GABA 수용체 아형에 따라 다르게 작용함을 시사한다. 한편 I4AA는 GABA_A 수용체에는 효현제로 작용하며, GABA_C 수용체에는 A-type 인 경우에는 차단제로 B-type인 경우에는 부분적인 효현제로 이중반응을 나타낸다(Zhang 등, 2001). 본 실험결과에 따르면 GABA의 효과는 GABA_C 수용체 차단제인 TPMPA를 전처리(pretreatment) 하더라도 거의 영향을 받지 못하였으며, 선택적 GABA_A 차단제인 bicuculline에 의해 완전 차단되었다. MPG에서 역시 CACA에 의해 내향성 전류가 관찰되었으며, 이러한 전류는 bicuculline에 의해 완전 차단되었다(data not shown). GABA_C 수용체는 bicuculline에 의해 영향을 받지 않으며, benzodiazepine, barbiturate 및 neurosteroid에 의해 조절되지 않는 것이 특징이다. 따라서 MPG의 교감신경세포에 발현된 ionotropic GABA 수용체는 GABA_C 수용체가 아닌 GABA_A 수용체임을 알 수 있다.

GABA_A 수용체는 뇌의 흥분성을 조절하는 역할을 담당하며, benzodiazepine, barbiturate, neurosteroid, 및 alcohol 등의 약물들이 약리학적 작용을 나타내는 수용체이다. GABA_A 수용체는 5가지 subunit의 조합으로 구성되어있으며, 지금까지 구조가 밝혀진 GABA_A 수용체의 subtype은 α 1-6, β 1-4, γ 1-4, δ , ϵ , 및 π 등 17 종류에 이른다. GABA 수용체에 관한 연구들은 주로 뇌를 중심으로 이루어졌다. GABA_A 수용체의 subtype들은 뇌의 부위에 따라 분포가 다르며, 실제로 조직의 종류, 연령에 따라 GABA_A 수용체 단백질 발현의 차이를 보인다(Mckernan 및 Whiting, 1996). 또한 다양한 subtype의 조합은 불안, 마취, 경련성 장애 및 불면증과 같은 다양한 임상적 질환들과 관련이 있다(Gottemann, 2002).

MPG 신경세포에서 GABA의 EC₅₀ 값은 7.3 μ M이었다. 유전자 재조합 실험에서 α , β , 및 γ subunit의 조합으로 된 GABA 수용체의 EC₅₀ 범위는 1-50 μ M

이였으며, $\alpha\beta\epsilon$, $\alpha\beta\delta$ 혹은 $\alpha\beta$ subunit의 경우에는 이보다 낮은 EC_{50} 범위를 가진다(Angelotti 등, 1993; Saxena 및 Macdonald, 1994). MPG 신경세포는 α , β , 및 γ subunit으로 이루어진 $GABA_A$ 수용체의 EC_{50} 값을 보였다.

Zolpidem은 $\alpha 1$ subunit이 포함된 $GABA_A$ 수용체에 선택적으로 작용을 하며, $\alpha 2$ 와 $\alpha 3$ 에는 중간정도의 affinity 그리고 $\alpha 5$ 에는 영향을 미치지 않는 것으로 알려져있다(Sigel 및 Buhr, 1997; Whiting 등, 1999). 그리고 $\gamma 2$ 에 비해 $\gamma 3$ 에는 아주 낮은 affinity를 보인다(Sigel 및 Buhr, 1997). Benzodiazepine site에 inverse agonist로 작용을 하는 DMCM은 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, 및 $\alpha 5$ subtype이 포함된 $GABA_A$ 수용체는 억제하며, $\alpha 4$ 와 $\alpha 6$ subtype은 항진시키는 것으로 알려져있다(Wafford 등, 1996). δ subunit은 benzodiazepine에 의해 조절되지 않는 것으로 보고되었다(Mckernan 및 Whiting, 1996). MPG 신경세포에서 GABA 전류는 zolpidem에 의해 증가되었으며, zolpidem은 GABA 전류에 대한 moderate affinity를 보였다. 반면 DMCM에 의해서는 억제되었다. 따라서 MPG 신경세포에는 α subunit 중에는 $\alpha 1-3$ subunit이 benzodiazepine 조절에 관련된 주된 subunit이며, $\alpha 4$, $\alpha 5$, 및 $\alpha 6$ subunit은 기능을 나타내지 않음을 알 수 있다. 또한 γ subunit은 $\gamma 2$ subunit이 기능을 나타냄을 알 수 있으며, δ subunit은 기능을 하지 않음을 알 수 있다. Barbiturate의 작용에는 α subunit이 필요하며, $\alpha 1$ subunit이 중요한 것으로 알려져있다. β subunit의 경우에는 subunit 종류에 따라 활성작용의 항진의 차이가 있다고 알려져있다(Zimmerman 등, 1994). Loreclezole은 $\beta 2$ 와 $\beta 3$ subunit에 작용을 하여 GABA 전류를 활성화시킨다(Wingrove 등, 1994). 덧붙여 $\beta 1$ 과 $\beta 3$ 를 함께 발현시켰을 경우에는 loreclezole의 효과가 $\beta 1$ 이 포함된 수용체와 같이 낮은 효과를 나타내는 것으로 알려져있다(Donnelly 및 Macdonald, 1996). MPG 신경세포에서 loreclezole은 GABA 전류를 항진 시켰으며, 이는 MPG 신경세포에 $\beta 2$ 와 $\beta 3$ subunit이 존재함을 의미한다. Furosemide는 $\alpha 4$ 와 $\alpha 6$ subunit이 γ 와 $\beta 2$ 혹은 $\beta 3$ subunit과 함께 조합되었을 경우 GABA 전류를 현저히 억제하는 것으로 보고되었다(Wafford 등, 1996). MPG 신경세포에서는 furosemide가 GABA 전류에 영향을 미치지 못하였으며, 이는 $\alpha 4$ 와 $\alpha 6$ subunit이 발현되어있지 않거나, 기능을 수행하지 않음을 의미한다.

GABA는 중추신경에서 막전압을 과분극시킴으로서 억제성 작용을 나타낸다. 세포내 Cl^- 의 농도를 변화시키지 않게 gramicidin-perforated patch 방법으로 실험한 결과, MPG 교감신경세포에서 GABA는 막전압의 과분극이 아닌 탈분극을 유발하였다. 성인 중추신경계에서 전형적인 억제성 신경전달물질로 작용하는 GABA는 신경의 발달단계나 신경의 종류에 따라 흥분성 혹은 억제성 효과를 나타낼 수 있는 것으로 알려지고 있는데(Ganguly 등, 2001), 이와 같은 차이의 원인에 대해서는 현재도 완전히 이해되고 있지 않다. 본 실험에서 성숙된 쥐로부터 MPG를 분리하였기 때문에 신경의 발달단계와는 무관하게 흥분성 $GABA_A$ 수용체의 특성을 보였는데, 이는 아주 예외적인 현상으로 생각된다. 이는 결국 분리된 MPG 신경내의 세포내 Cl^- 의 농도가 높게 유지되어 있다는 것으로 해석할 수 있는데, 세포내 Cl^- 의 농도를 조절해주는 생화학적 신호체계의 영향을 생각해 볼 수 있다.

Lu 등(1999)은 신경세포내 몇몇 cation-chloride cotransporter들의 발현정도와 세포내 Cl^- 의 농도와 상관관계를 설명하면서, 신경의 발달과정에서 Na-K-2Cl cotransporter는 발현 및 그 활성도가 점차 낮아지고 동시에 K-Cl cotransporter의 경우에는 점차 증가하여 세포내 Cl^- 의 농도를 점차 낮추어 줌으로서, GABA의 효과가 흥분성에서부터 억제성으로 이행된다고 하였다. 따라서 만약 MPG의 경우 이와 같은 신경발달단계 과정의 이상 등으로 즉, Na-K-2Cl cotransporter의 발현이 성인이 된 후에도 지속적으로 높게 유지되거나 혹은 K-Cl cotransporter의 발현이 증가되지 않는 경우를 예상해 볼 수 있다. 다음으로 생각해 볼 수 있는 것은 세포분리 과정이나 배양시의 조건에 따른 결과인데, 단일세포로 분리하는 과정이나 단기간의 배양이 생체내의 조건과 달라 이것이 세포내 Cl^- 의 농도에 영향을 줄 수 있겠다. 그러나 이미 조직 수준에서도 $GABA_A$ 수용체를 매개로한 탈분극 반응이 보고된바 있으며(Mayer 등, 1983), 장관신경(enteric neuron)에서도 GABA에 의한 흥분성 작용이 알려져 있기 때문에(Krantis, 2000) 이와 같은 효과는 크지 않을 것으로 생각된다. 이와 같은 사실을 종합해 볼 때, 어떠한 원인으로든지 MPG 신경세포 내부는 Cl^- 의 농도가 지속적으로 높게 유지되고 있으며, $GABA_A$ 수용체를 통한 Cl^- 의 유출(efflux)이 막전압의 탈분극을 유발하는 것으로 생각된다. MPG

신경세포에서 이러한 탈분극은 세포내 칼슘을 증가시켰는데, 세포내 칼슘 증가가 막전압 의존적 칼슘을 통한 유입인지 아니면 IP_3 경로를 통한 SR 내에서 유리된 것인지에 관한 실험은 추후에 진행되어야 할 것으로 사료된다.

GABA_A 수용체는 많은 조합의 이종(heterogeneity)이 존재하며 많은 subunit들은 뇌의 부위에 따라 다른 분포를 한다(McKernan 및 Whiting, 1996; Sigel 및 Buhr, 1997; Shiting 등, 1999). 흰쥐 뇌에 존재하는 native GABA_A 수용체의 43%는 $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ 조합으로 이루어져 있다(McKernan 및 Whiting, 1996; Sigel 및 Buhr, 1997; Shiting 등, 1999). $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ 조합은 뇌에 전반적으로 분포하며, 해마와 피질의 사이신경원(interneuron)과 Purkinje 세포에 많이 분포한다(McKernan 및 Whiting, 1996). 다른 두 가지 중요한 조합은 $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$ 조합과 $\alpha 3\beta n\gamma 2/\gamma 3$ (주로 $\alpha 3\beta \gamma 2$) 조합으로 각각 18%와 17%에 이른다. $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$ GABA_A 수용체는 주로 척수의 운동신경원과 해마의 pyramidal 세포에 많이 분포하며, $\alpha 3\beta n\gamma 2/\gamma 3$ 조합의 GABA_A 수용체는 콜린성 및 단가아민성 신경세포에 존재한다(McKernan 및 Whiting, 1996). 시상에는 $\alpha 4$ 가 많이 존재하며, $\alpha 5$ 는 해마에 주로 분포하는 것으로 알려져 있다. 또한 $\alpha 6$ 은 소뇌의 granular 세포에 존재하고 해마와 대뇌피질에는 분포하지 않은 것으로 알려져 있다. $\beta 1$ 과 $\beta 3$ subunit은 해마 > 대뇌피질 > 소뇌의 순으로 존재하나, $\beta 2$ 는 소뇌 > 대뇌피질 > 해마의 순으로 존재한다. $\gamma 2$ 는 뇌 전반에 걸쳐 고루 분포하는 것으로 알려져 있다. Native GABA_A 수용체에서 α 와 β subunit은 수용체 구조를 이루는데 필수적인 요소로 간주되며, 수용체의 특성은 각 subunit의 구성에 따라 다르게 나타난다. GABA_A 수용체는 benzodiazepine, barbiturate, neurosteroid, anticonvulsant, alcohol 등과 같은 여러 약물들의 target이 되며, 이러한 약물들의 효과는 GABA_A 수용체 subunit의 조합에 따라 다르게 나타난다. 이러한 GABA_A 수용체 subunit은 조직이나 부위에 따라 다르게 존재하며, 세포 종류에 따라 심지어 동일 종류의 세포에서도 다르게 나타날 수 있다. 비록 native GABA_A 수용체에서 $\alpha 1$, $\beta 2/3$, $\gamma 2$ subunit의 조합이 가장 많이 존재하는 것으로 알려져 있을 지라도 각각의 유전자들의 고유의 기능은 명확히 규명되지 않았다. 또한 GABA_A 수용체의 subunit의 종류와 여러 조절자에 의한 효과에 관련된 연구들이 대부분 뇌를 비롯한 중추신경계에서 진행되었

으며, 자율신경계를 비롯한 말초신경계에서는 연구들이 미흡하였다. 자율신경절인 MPG 신경세포에서는 교감신경에 GABA_A 수용체가 발현되어있으며, 발현된 α 1-3, β 2/3, ν 2 subunit의 약리학적 특성들을 보였다. 이상의 실험 결과들로부터 MPG에서 GABA 수용체는 교감신경세포에 발현되어 있으며, MPG 교감신경세포에서 GABA는 막전압을 탈분극 시키고, 이로 인해 세포내 칼슘을 증가시켜 신경의 흥분성을 조절을 통한 MPG 신경세포 영향하에 있는 여러 골반장기의 작용을 조절할 것으로 사료된다.

제5장 결론

분리된 단일 MPG 신경절 세포들에서 GABA 수용체 발현과 GABA 전류 조절자들이 GABA 활성화 전류에 대한 특성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. T-형 칼슘전류가 존재하는 교감신경세포에서 GABA는 내향성 전류를 유발시켰으며, T-형 칼슘 전류가 없는 부교감신경세포에서는 GABA에 의해 내향성 전류가 활성화되지 않았다. 교감 신경세포에서 GABA 활성화 전류는 농도 의존적이었다.
2. GABA_A 수용체 $\beta 2/3$ subunit는 큰 세포들에 존재하였으며, 교감신경 marker 인 TH와 함께 존재하였다. 이는 교감신경세포에 GABA_A 수용체가 발현되어 있음을 확인하였다.
3. GABA 활성화 전류는 barbiturate계 약물인 pentobarbital에 의해 더욱 증가하였다.
4. GABA 활성화 전류는 benzodiazepine 효현제인 zolpidem에 의해 더욱 증가하였으며, β -carboline DMCM에 의해서는 억제되었다
5. GABA 활성화 전류는 anticonvulsant 약물인 loreclezole에 의해 활성화되었다.
6. GABA 활성화 전류는 2가 양이온인 zinc와 cadmium에 의해 억제되었으며, 3가 양이온인 lanthanum에 의해 부분 억제되었다.
7. MPG 신경세포에서 GABA는 막전압을 탈분극 시켰으며, GABA에 의한 탈분극은 세포내 칼슘 농도를 증가시켰다.

이상의 실험 결과들로 미루어 보아 MPG 교감신경세포들에는 $\alpha 1-3$, $\beta 2/3$, γ subunit의 특성을 띠는 GABA_A 수용체가 있으며, GABA는 이 세포들을 탈분극시키고 세포내 칼슘농도를 증가시키므로써 MPG 신경세포 영향을 받는 여러 장기의 작용을 조절하는 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Adams PR, Brown DA. Actions of γ -aminobutyric acid on sympathetic ganglion cells. *J Physiol*. 1975;250:85-120.
- Akasu T, Munakata Y, Tsurusaki M, Hasuo H. Role of GABA_A and GABA_C receptors in the biphasic GABA responses in neurons of the rat major pelvic ganglia. *J Neurophysiol*. 1999;82(3):1489-1496.
- Akasu T, Nishimura T. Synaptic transmission and function of parasympathetic ganglia. *Prog Neurobiol*. 1995;45(5):459-522.
- Angelotti TP, Macdonald RL. Assembly of GABA_A receptor subunits: $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 1 \beta 1 \gamma 2S$ subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties. *J Neurosci*. 1993;13(4):1429-1440.
- 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_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 1998;50(2):291-313.
- Birnir B, Everitt AB, Lim MS, Gage PW. Spontaneously opening GABA_A channels in CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. *J Membr Biol*. 2000;174(1):21-29.
- Bormann J, Feigenspan A. GABA_C receptors. *Trends Neurosci*.

1995;18(12):515-519.

Dail WG, Evan AP, Eason HR: The major ganglion in the pelvic plexus of the male rat: a histochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 1975;159:49-62.

Davies PA, Hanna MC, Hales TG, Kirkness EF. Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA_A receptor subunit. *Nature* 1997;27:385(6619):820-823.

De Groat WC. The actions of gamma-aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia. *J Pharmacol Exp Ther.* 1970;172(2):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: *Neural control of penile erection*. In: Nervous control of the urogenital system, edited by Maggi CA, Harwood Academic Publishers, London, 1993a, 467-524.

De Groat WC, Booth AM: *Synaptic transmission in pelvic ganglia*. In : Nervous control of the urogenital system, edited by Maggi CA, Harwood Academic Publishers, London, 1993b, 291-348.

Dong CJ, Picaud SA, Werblin FS. GABA transporters and GABA_C-like receptors on catfish cone- but not rod-driven horizontal cells. *J Neurosci.* 1994;14(5 Pt 1):2648-2658.

- Donnelly JL, MacDonald RL. Loreclezole enhances apparent desensitization of recombinant GABA_A receptor currents. *Neuropharmacology*. 1996;35(9-10):1233-1241.
- Ebihara S, Shirato K, Harata N, Akaike N. Gramicidin-perforated patch recording: GABA response in mammalian neurones with intact intracellular chloride. *J Physiol*. 1995;484(Pt 1):77-86.
- Feigenspan A, Bormann J. Modulation of GABAC receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *J Physiol*. 1994;481:325-330.
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*. 2001;105(4):521-532.
- Gottesmann C. GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience*. 2002;111(2):231-239.
- Hamil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;391:85-100.
- Hedblom E, Kirkness EF. A novel class of GABA_A receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J Biol Chem*. 1997;272(24):15346-15350.
- Keast JR. Patterns of co-existence of peptides and differences of nerve fibre types associated with noradrenergic and non-noradrenergic (putative

- cholinergic) neurons in the major pelvic ganglion of the male rat. *Cell Tissue Res.* 1991;266:405-415.
- Krantis A. GABA in the Mammalian Enteric Nervous System. *News Physiol Sci.* 2000;15:284-290.
- Krishek BJ, Smart TG. Proton sensitivity of rat cerebellar granule cell GABA_A receptors: dependence on neuronal development. *J Physiol.* 2001;530:219-233.
- 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(4 Pt 2):R502-509.
- Lee JH, Kim EG, Park BG, Kim KH, Cha SK, Kong ID, Lee JW, Jeong SW. Identification of T-type α_1H Ca²⁺ channels (Ca_v3.2) in major pelvic ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 2002;87(6):2844-2850.
- Lu J, Karadsheh M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol.* 1999;39(4):558-568.
- Macdonald RL, Olsen RW. GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:569-602.
- Maggi CA, Santicoli P, Grimaldi G, Meli A. The effect of peripherally administered GABA on spontaneous contractions of rat urinary bladder in vivo. *Gen Pharmacol.* 1983;14(4):455-458.

- Mayer ML, Higashi H, Gallagher JP, Shinnick-Gallagher P. On the mechanism of action of GABA in pelvic vesical ganglia: biphasic responses evoked by two opposing actions on membrane conductance. *Brain Res.* 1983;260(2):233-248.
- McKernan RM, Whiting PJ. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain. *Trends Neurosci.* 1996;19:139-143.
- Nagaya N, Macdonald RL. Two $\alpha 2L$ subunit domains confer low Zn²⁺ sensitivity to ternary GABA_A receptors. *J Physiol.* 2001;532(1):17-30.
- Ogurusu T, Shingai R. Cloning of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho 3 cDNA. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1305(1-2):15-18.
- Rudolph U, Crestani F, Mohler H. GABA_A receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(4):188-194.
- Saxena NC, Macdonald RL. Assembly of GABA_A receptor subunits: role of the delta subunit. *J Neurosci.* 1994;14:7077-7086.
- Saxena NC, Neeland TR, Macdonald RL. Contrasting actions of lanthanum on different recombinant gamma-aminobutyric acid receptor isoforms expressed in L929 fibroblasts. *Mol Pharmacol* 1997;51:328-335.
- Sigel E, Buhr A. The benzodiazepine binding site of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(11):425-429.

- Smart TG, Moss SJ, Xie X, Huganir RL. GABA_A receptors are differentially sensitive to zinc: dependence on subunit composition. *Br J Pharmacol*. 1991;103(4):1837-1839.
- Wafford KA, Bain Cj, Quirk K, McKernan RM, Wingrove PB, Whiting PJ, Kemp JA. A novel allosteric modulatory site on the GABA_A receptor β subunit. *Neuron* 1994;12(4):775-782.
- Wafford KA, Thompson SA, Thomas D, Sikela J, Wilcox AS, Whiting PJ. Functional characterization of human gamma-aminobutyric acid_A receptors containing the alpha 4 subunit. *Mol Pharmacol*. 1996;50(3):670-678.
- Wall MJ. Cis-4-amino-crotonic acid activates alpha 6 subunit-containing GABA_A but not GABA_C receptors in granule cells of adult rat cerebellar slices. *Neurosci Lett*. 2001;316(1):37-40.
- Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Thompson SA, Wafford KA. Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868:645-653.
- Wingrove PB, Wafford KA, Bain C, Whiting PJ. The modulatory action of loreclezole at the gamma-aminobutyric acid type A receptor is determined by a single amino acid in the β 2 and β 3 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(10):4569-4573.
- Zhang D, Pan ZH, Awobuluyi M, Lipton SA. Structure and function of GABA_C receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. *Trends*

Pharmacol Sci. 2001;22(3):121-132.

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.

Zimmerman SA, Jones MV, Harrison NL. Potentiation of gamma-aminobutyric acidA receptor Cl^- current correlates with in vivo anesthetic potency. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;270(3):987-991.

ABSTRACT

Modulation of GABAergic Activity in Rat Major Pelvic Ganglia

Han, Joon Kyu
Dept. of Medicine
The Graduate School
Yonsei University

In central nervous system, γ -aminobutyric acid (GABA) has been well known to act as an inhibitory neurotransmitter. To date, however, the functional role of GABA remains unclear in autonomic nervous system. In present study, thus, we characterized the GABA-activated currents and their modulation in acutely dissociated rat major pelvic ganglion (MPG) neurons using whole-cell and gramicidin-perforated patch clamp techniques. MPG neurons are divided into two subpopulations based on the presence and absence of T-type Ca^{2+} channels. In sympathetic neurons expressing low-threshold T-type Ca^{2+} channels, application of GABA activated Cl^- currents, whereas it did not induce any responses in parasympathetic neurons lacking T-type Ca^{2+} channels. Furthermore, immunoreactivity to GABA_A receptor was identified in only sympathetic neurons, which were double-labeled with tyrosine hydroxylase (TH) antibody. The GABA-induced currents were concentration-dependent and their EC_{50} was $7.3 \mu\text{M}$. The pretreatment with

bicuculline or picrotoxin (100 μ M), GABA_A receptor antagonists, completely blocked the GABA-induced currents, while TPMPA (10 μ M), a GABA_C receptor antagonist, did not. Zolpidem enhanced GABA-induced currents, whereas methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl- β -carboline-3-carboxylate (DMCM), an inverse benzodiazepine agonist, inhibited those currents. GABA-activated currents were also enhanced by pentobarbital and loreclezole, but not by furosemide. Zinc and Cadmium blocked GABA-activated currents with high affinity, but lanthanum did not significantly alter those current. Under current-clamp mode, GABA produced significant membrane depolarization and increased intracellular Ca²⁺ concentration. Taken together, our data suggest that GABA may play physiological roles mainly through activating GABA_A receptors expressed in sympathetic neurons of rat MPG.

Key words : major pelvic ganglia, GABA, GABA_A receptor