

수컷 흰쥐 주 골반 신경절에
존재하는 니코틴성 아세틸콜린
수용체의 특성 규명

연세대학교 대학원
의 학 과
박 중 현

수컷 흰쥐 주 골반 신경절에
존재하는 니코틴성 아세틸콜린
수용체의 특성 규명

지도 이 중 우 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

박 중 현

박중현의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 항상 바쁘신 와중에도 아낌없는 지도와 배려를 베풀어 주신 이중우 지도교수님과 연구 시작부터 끝까지 온갖 도움과 격려를 아끼지 않으신 김성진 교수님, 송재만 교수님, 고창만 교수님, 공인덕 교수님께 깊은 곳으로부터 감사를 드립니다..

또한 연구 기간 중 물심양면으로 도움을 주신 정성우 교수님과 차승규 선생님 등 생리학 교실원 여러분께도 깊이 감사드리며, 영원한 친구이자 인생 동반자인 박규상 교수님께 특별한 감사를 드립니다.

작고하신 아버님, 늘 저를 위해서 무한한 사랑을 아끼지 않으시는 어머니님, 그리고 사랑하는 나의 아내와 두 아이들, 수민과 기준에게 이 논문을 바칩니다.

2003년 6월

저자 씀

차 례

표 차례	iii
그림 차례	iv
국문요약	1
제1장 서론	3
제2장 재료 및 방법	8
2.1. 실험 동물	8
2.2. 실험용액 및 약물	8
2.2.1. 실험 용액	8
2.2.2. 약물	8
2.3. 단일 신경세포 분리 및 유지	9
2.4. 전기생리학적 실험	10
2.5. 세포 내 칼슘이온 농도 측정	10
2.6. 역전사 연쇄 중합반응(RT-PCR)	11
2.7. 자료 분석	12
제3장 결 과	18
3.1. 교감 및 부교감 신경세포의 전기 생리적 특성	18
3.2. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류의 특성	20
3.3. 니코틴성 수용체 차단제들의 효과	23
3.4. 니코틴성 수용체의 분자생물학적 규명	30
3.5. 아세틸콜린에 의한 막전압 변화	32
3.6. 아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화	37
제4장 고찰	40
제5장 결론	47

참고문헌	48
영문요약	58

표 차 례

표 1. 역전사 연쇄 중합반응에 사용된 primer들	17
표 2. 니코틴성 수용체 효현제 및 차단제의 효력 비교	29

그 립 차 례

그림 1. 수컷 흰쥐 주 골반 신경절(major pelvic ganglion)의 해부 및 구조 ..	13
그림 2. 주 골반 신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견	14
그림 3. 막전압 고정법에 의한 전류측정 장치의 회로 모식도	15
그림 4. 세포 내 칼슘이온농도 측정을 위한 형광측정장치 모식도	16
그림 5. 주 골반 신경절의 교감 및 부교감 신경군 세포들의 전기 생리적 특성 비교	19
그림 6. 아세틸콜린 투여에 의해 유도된 전류-전압 관계	21
그림 7. 아세틸콜린 투여에 의해 유도된 전류의 농도-반응 관계	22
그림 8. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류에 대한 α -bungarotoxin의 효과	25
그림 9. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류에 대한 mecamylamine의 효과	26
그림 10. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류에 대한 dihydro- β -erythroidine의 효 과	27
그림 11. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류에 대한 α -methyllycaconitine의 효과	28
그림 12. 주 골반 신경절 세포에서 발현되는 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 아 형들	31
그림 13. 교감신경군과 부교감신경군 세포간의 아세틸콜린에 의한 막전압 변화 비교	33
그림 14. Atropine 전처치가 아세틸콜린에 의한 막전압 변화에 미치는 영향	34
그림 15. 세포 내액의 칼슘이온 제거가 아세틸콜린에 의한 막전압 변화에 미치 는 영향	35
그림 16. Apamin 투여가 아세틸콜린에 의한 막전압변화에 미치는 영향	36
그림 17. 막전류 및 전압 고정 상태에서 아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘이온	

농도 변화	38
그림 18. 니코틴성 아세틸콜린 수용체 차단제가 아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화에 미치는 영향	39

국문요약

수컷 흰쥐 주 골반 신경절에 존재하는 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 특성 규명

수컷 흰쥐의 주 골반 신경절(major pelvic ganglia, MPG)은 교감신경과 부교감신경으로부터 입력을 받고, 방광, 전립선 및 음경 등을 지배하여 배뇨나 발기 현상을 조절하는 자율 신경절이다. 일반적으로 교감 및 부교감 신경 모두 절전·절후 신경간 시냅스 전달은 주로 니코틴성 아세틸콜린 수용체에 의해 매개된다고 알려져 있다. 그러나 아직까지 골반 신경절에서의 니코틴성 수용체에 관한 연구는 거의 이루어진 바 없다. 따라서 본 실험에서는 주 골반 신경절 세포에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 전기생리학적 및 분자생물학적 특성을 관찰하고, 이에 따른 자율 신경절의 흥분성 변화를 관찰하고자 하였다.

실험 방법은 효소처리로 분리된 단일 골반 신경절 세포에서 dialyzed 혹은 gramicidin-perforated patch clamp 방법으로 이온전류 및 막전압을 측정하였으며, 형광측정장치를 이용하여 세포 내 칼슘이온농도를 측정하였다. 또 역전사 연쇄중합반응(RT-PCR)을 시행하여 수용체 서브유닛들의 발현 정도를 확인하였다.

막전압 고정상태에서 아세틸콜린은 농도 의존적으로 내측 편향성 전류를 초래하였으며, 역전 전압은 대략 0mV이었다. 최대전류 크기에 대한 효력은 교감 신경군 세포(EC₅₀; 41.4μM)가 부교감신경군 세포(64.0μM)에 비해 크게 나타났다. 아세틸콜린에 의해 유발된 전류는 α3β4 수용체의 선택적 차단제인 mecamylamine에 의해 민감하게 억제되었으며, 교감 및 부교감 신경군 세포들을 비교한 결과 최대 전류치(IC₅₀; 515nM vs. 288nM)와 이동 전하량(252nM vs. 41nM) 모두 부교감신경군 세포에서 효력이 크게 나타났다. RT-PCR을 통해 골반 신경절에 발현된 니코틴성 수용체의 서브유닛들을 확인한 결과, α3의 발현량이 현저히 컸으며 α2, α5, α7, β2, β4등도 발현되어 있었다. 막

전류 고정상태에서 두 세포군 모두 활동전압 형성과 함께 빠른 탈분극 효과를 나타내었으나, 부교감 신경군과 달리 교감 신경군 세포에서는 탈분극 이후 지속되는 과분극이 관찰되었다. 교감신경군 세포에서 나타나는 아세틸콜린의 과분극 효과는 세포 내 칼슘이온을 chelation 하거나, Ca^{2+} -activated K^+ 통로 차단제중의 하나인 apamin에 의해 선택적으로 소실되었다. 아세틸콜린은 막전류 고정상태에서 탈분극과 함께 세포 내 칼슘이온농도를 증가시켰으며, -80mV로 막전압을 고정한 상태에서도 내향성 전류와 함께 칼슘이온농도 증가가 관찰되었다. 막전압 고정상태에서의 아세틸콜린에 의한 칼슘이온 증가는 니코틴성 수용체 차단제인 hexamethonium에 의해 완전히 차단되었다.

이상의 실험 결과들로 미루어 보아 주 골반 신경절 세포들에는 $\alpha 3$ 서브유닛이 포함된 니코틴성 아세틸콜린 수용체가 존재하고 있으며, 절전 신경 말단에서 분비된 아세틸콜린의 결합 시 막전압을 탈분극 시켜 활동전압을 형성하고 세포 내 칼슘이온농도를 증가시킴으로써 시냅스간 흥분의 전달 및 조절 역할을 담당하고 있을 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 주 골반 신경절, 니코틴성 아세틸콜린 수용체, 세포 내 칼슘이온 농도

수컷 흰쥐 주 골반 신경절에 존재하는 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 특성 규명

<지도 이 중 우 교수>

연세대학교 대학원 의학과

박 중 현

제1장 서론

비뇨 및 생식기관(urinary and reproductive organ)은 척수로부터 내려온 교감 및 부교감 신경에 의해 복잡하게 조절되고 있으며, 이러한 자율신경 지배는 비뇨 생식 기능유지에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 특히 남성의 경우에는 자율신경조절에 대한 의존도가 높다고 알려져 있는데, 질환이나 외상으로 인해 비슷한 정도의 자율신경 손상이 있다 하더라도 남성에서는 생식기능 저하가 쉽게 초래되는 반면 여성에서는 임신 및 출산에 지장을 주지 않을 가능성이 높다 하였다(Dail, 1992). 비뇨 및 생식기관을 지배하는 교감 및 부교감 자율신경들은 이들 장기 주변에서 골반총(pelvic plexus)을 형성하고 있다. 골반총의 해부 및 조직학적 특징은 종(species)에 따라 많은 차이가 있으나, 대부분의 종에서는 작게 서로 연결되어진 신경절들이 복잡한 망 구조를 띄고 있다(Bradley 등, 1975; Jänig 및 McLachlan, 1987). 하지만 흰쥐(rat)에서는 그 구조가 비교적 단순하여 여러 자율신경세포들이 하나의 큰 신경절을 이루고 있는데, 수컷 쥐의 경우 이를 주 골반 신경절(major pelvic ganglion, 이하 MPG)이라 하고 암컷의 경우에는 자궁경관 주위 신경절(paracervical ganglion)이라 한다.

수컷과 암컷의 골반 신경절은 구조 및 기능적인 면에서 여러 차이점이 있다. 먼저 신경절 내 세포 수인데, 수컷의 MPG에 존재하는 세포의 수(약 30,000개)가

암컷의 그것(약 10,000개)에 비해 월등히 많다. 또 다른 차이점은 구심성 입력의 종류 및 신경전달물질이 다르다는 점이다. 암컷의 paracervical ganglion은 교감신경 분포가 매우 적고, 대부분 골반신경으로부터 입력을 받는 부교감신경으로 이루어져 있다(Hancock 및 Peveto, 1979; Nadelhaft 및 Booth, 1984; Jänig 및 McLachlan, 1987). 반면 수컷의 MPG는 하복신경(hypogastric nerve)으로부터 내려온 교감신경과 골반신경(pelvic nerve)으로부터 온 부교감신경(일부 교감신경이 포함되어 있음)이 모두 존재한다. 이와 같이 교감신경과 부교감신경이 같은 신경절 내에 존재하는 형태는 다른 자율신경절에서는 찾아볼 수 없는 매우 독특한 형태이다(Dail, 1992; Keast, 1995; Keast, 1999). 수컷의 MPG는 방광, 전립선 및 음경 등과 같은 비뇨 생식계 기관과 일부의 장(bowel)을 지배하며(Langworthy 1965; Dail 등, 1975; Keast, 1991; De Groat 및 Booth, 1993), 배뇨(micturition)나 발기(erection)와 같은 자율신경 반사를 조절한다(Zoubek 등, 1993). 특히 방광출구 폐쇄(bladder outlet obstruction)나 발기 부전(erection dysfunction)과 같은 병적 상태에서 MPG의 형태적 및 기능적인 변화가 보고된 바 있다(Mills 등, 1992). 따라서 골반 장기의 자율신경계 조절에 관한 생리적 혹은 병태 생리적 연구에 있어서 MPG는 유용한 모델이라 할 수 있다(Keast, 1999).

근자에 이르러 MPG에 존재하는 절후(postganglionic) 교감 및 부교감 신경세포를 전기생리학적(electrophysiological) 및 신경화학적(neurochemical) 특성을 기준으로 구분하려는 연구가 일부 시도되어져 오고 있다(Zhu 등, 1995). 이러한 분류에서 가장 중요한 기준 중 하나는 낮은 막전압에서 활성화되는 T-형 칼슘이온통로의 존재 유·무이다. 즉 T-형 칼슘통로가 존재하는 세포군에서는 세포의 크기가 비교적 크고 교감신경의 특징중 하나인 tyrosine hydroxylase와 α_2 교감신경 수용체가 잘 발현되어 있는 반면, 그렇지 않은 세포군에서는 세포의 크기가 작고 acetylcholinesterase, VIP 및 NADPH diaphorase 등의 발현이 많다는 것이다(Zhu 등, 1995; Zhu 및 Yakel, 1997; Park 등, 2001; Lee 등, 2002). 또 GABA나 neuropeptide Y와 같은 일부 신경전달 물질들의 작용이 교감신경세포에서 선택적으로 나타나는 반면(Kong 등, 2001; Cha 등, 2001), ATP 민감성 K^+ 전류의 경우에는 부교감신경세포에서만 나타난다고 보고된 바 있다(Park 등, 2002). 하지만 아직

까지 두 세포군간의 흥분성 및 여러 신경전달물질들의 작용 상 차이점에 관해서는 폭 넓게 연구되지 못한 상태이다.

대부분의 자율 신경절에서 절전(pre-synaptic)과 절후(post-synaptic) 신경간 시냅스 전달은 교감 및 부교감신경 모두 니코틴성 아세틸콜린 수용체에 의해 매개된다고 알려져 있다(Skok, 1987; Rust 등, 1994). 니코틴성 아세틸콜린 수용체는 GABA_A, glycine 및 5-HT₃ 수용체들과 마찬가지로 5개의 서브유닛(subunit)으로 이루어진 오합체(pentamer) 구조의 이온통로이다(Betz 등, 1990; Barnard, 1992; Lindstrom, 1996). 척추동물에서 지금까지 모두 16개의 서브유닛 유전자(α 1-9, β 1-4, ν , δ , ϵ)가 클로닝 되어 있으며(Lukas 등, 1999; Dani, 2001), 각 서브유닛들의 조합에 따라 조직 분포 양상 및 여러 특성상의 차이점을 나타낸다. 특히 효현제 및 길항제의 선택성, 이온전류의 활성화 및 비활성화 역학(kinetics)등이 서브유닛의 구성에 따라 현저히 달라진다고 보고되었다(Genzen 등, 2001). 자율신경절에 주로 존재하는 서브유닛 조합들에 관해서도 일부 보고된 바 있는데, 이들은 주로 두개의 α 서브유닛과 세 개의 β 서브유닛으로 구성되어 있는 hetero-multimeric 구조가 일반적이다(De Biasi, 2002). 하지만 자율신경절에 존재하는 α 7, α 8, α 9 등의 경우에는 다섯 개의 동일 서브유닛들로 구성된 homo-oligomeric 구조를 가진다 하였다(Le Novère 등, 2002).

아세틸콜린이 니코틴성 수용체의 서브유닛들 사이에 위치한 리간드-결합영역(ligand-binding domain)에 부착하게 될 경우, 이는 수용체 안쪽의 이온통로를 개방(open) 상태로 고정시키게끔 만든다. 그 통로를 통해 양이온들이 이동하게 되며, 따라서 막전압이 탈분극 되면서 흥분전달이 가능케 된다. 여기서 나타나는 양이온의 이동은 주로 Na⁺의 유입과 K⁺의 유출이지만, 이와 함께 칼슘이온의 유입도 적지 않다고 보고되고 있다(Castro 및 Albuquerque, 1995; Dani 및 Meyer, 1995). 니코틴성 수용체를 통한 칼슘이온 유입은 막전압 의존성 칼슘 통로나 NMDA 수용체를 통한 것과는 달리 막전압에 의해 개폐 역학(opening kinetics)이 달라지지 않는다. 따라서 과분극시 더 많은 칼슘이온이 유입되는 등, 다른 통로들과는 막전압 의존성에 차이가 있다(Dani, 2001). 여러 서브유닛들 중에서 특히 α 7 homo-oligomeric 수용체의 칼슘이온 투과도가 크다는 보고가 있으나(Cuevas 등,

2000), 각 서브유닛 조성들 간에 구체적으로 비교된 바는 없다(Bertrand 등, 1993; Seguela 등, 1993). 만일 이처럼 칼슘이온이 유입될 경우 증가된 세포 내 칼슘이온 농도가 다른 이차적인 신호전달(예를 들어 여러 Ca^{2+} -activated channel들의 활성화)을 초래할 수 있으며, 세포 내 여러 신경전달물질들의 유리(exocytosis) 과정에도 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 골반 신경절의 니코틴성 수용체에 관한 이온 이동 특성 및 그로 인해 나타나는 세포 내 변화는 보다 심도 있게 연구되어야 할 필요가 있다.

니코틴성 아세틸콜린 수용체의 유전적 이상이 원인이 되는 대표적인 질환으로는 선천성 근무력증(congenital myasthenia)과 대뇌전엽 발작성 간질(frontal lobe epilepsy)을 들 수 있다(Léna 및 Changeux, 1997; Lindstorm, 1997). 뿐만아니라 니코틴성 수용체는 파킨슨씨 병, 알츠하이머 병 및 Gilles de la Tourette 증후군 등의 발병기전과도 관련이 있으며(Picciotto 및 Zoli, 2002), 흡연과 관계된 니코틴중독의 직접적인 대상이기도 하다(Dani, 2001; Le Novère 등, 2002). 근자에는 원인이 명확치 않은 자율 신경병증(autonomic neuropathy) 환자 중 상당수에서 니코틴성 수용체의 자가항체가 형성되어 있으며, 이로 인해 소변 배설장애(urinary retention)나 발기부전이 흔하게 초래된다고 보고된 바 있다(Vernino 등, 1998; Vernino 등, 2000). 또 이 환자들의 비뇨 생식기능 이상의 정도는 혈중 자가항체의 양과 직접적인 관계가 있다고 하였다(Vernino 등, 2000).

앞에서 언급한 바와 같이 골반 장기의 기능들은 교감 및 부교감 자율신경에 의해 복잡하고 예민한 지배를 받고 있으며, 이들의 절전·절후간 시냅스를 매개하는 가장 중요한 수용체는 니코틴성 아세틸콜린 수용체이다. 하지만 아직까지 골반 신경절에서의 시냅스 전달에 관해서는 잘 알려져 있지 않아, 골반 장기의 신경조절 기전 및 그와 관계된 병적 상태들을 이해하는데 어려움이 있다. 특히 골반신경절에 분포된 니코틴성 수용체의 서브유닛 조성에 관해서는 전혀 보고된 바 없다(De Biasi, 2002). 따라서 본 실험에서는 교감 및 부교감 신경이 모두 존재하고 있는 수컷 흰쥐의 주 골반 신경절 세포를 효소 분리(enzymatic dissociation)하여, 여기에 존재하는 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 전기생리학적 특성을 관찰하고, 이를 두 세포군간에 비교하고자 하였다. 그리고 골반신경절 세포에 발현된 수용체의

서브유닛을 약리학적 및 분자생물학적으로 확인하고, 이와 함께 수용체 활성화에 의한 세포막전압 변화 및 세포 내 칼슘이온농도 변화를 관찰하여 골반 자율신경 절의 흥분전달 기전의 일부를 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

전기생리 실험에 사용된 전극 내 용액(internal solution)의 조성(mM)은 30 KCl, 100 K^+ -gluconate, 10 HEPES, 10 glucose, 10 EGTA, 10 Tris-phosphocreatine, 1.2 $MgCl_2$, 5 MgATP, 0.3 Na_2GTP (pH 7.2)이며, 세포 외 관류액의 조성(mM)은 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 HEPES, 10 glucose (pH 7.4)이었다. 단 gramicidin-perforated patch를 위한 전극 내 용액의 조성(mM)은 140 KCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 0.5 $CaCl_2$, 5 NaCl (pH 7.2)으로 하였으며, 전극 내 용액에는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 높은 농도로 녹인 gramicidin을 최종 농도가 $50 \mu g/ml$ 가 되도록 첨가하여 사용하였다. 약물의 투여는 perfusion valve control system(VC-6M, Warner Instruments, CT, USA)을 이용하였으며, 그 끝을 신경세포의 $100 \mu m$ 이내에 위치하도록 하여 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

2.2.2. 약물

Collagenase type D와 trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals

(Indianapolis, IN, USA)로부터 구입하였으며, fura-2/AM은 Molecular Probe(Eugene, OR, USA)로부터, α -methyllycaconitine는 Tocris(Tocris Cookson Inc., Bristol, UK)로부터 구입하였다. Calbiochem(Calbiochem Co., San Diego, CA, USA)으로부터 α -bungarotoxin을 구입하였고, 아세틸콜린, atropine, apamin, mecamlamine, dihydro- β -erythroidine, hexamethonium, gramicidin, DNase type I, pentobarbital등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 세포 배양과 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 MPG를 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 bovine serum, 1% glutamine, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 MEM에 재부유(resuspend)시킨 뒤, poly-L-lysine으로 코팅되어 있는 cover glass(직경 12 mm)에 plating 하였다. 이를 37°C 세포 배양기(humidified incubator; 95% air-5% CO₂)에서 배양하였으며, 분리한 후 36시간 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 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 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co.)로 제작하여 사용하였다. 전극은 Sylgard 184(Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅하였으며, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5~2.5 M Ω 이 되는 것을 사용하였다. 세포가 붙어 있는 cover glass를 도립현미경(inverted microscope) 위에 올려놓고, 세포 외액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 세포막 전압의 변화는 막전류 고정법(current-clamp method)을 사용하였으며, 막 전류 측정시에는 막전압 고정법(voltage-clamp method)을 사용하여 측정하였다. 막전압 고정법 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. 실험결과는 Pulse/Pulsefit(v8.50) software(Heka Elektronik, Lambrecht, Germany)를 통해 IBM 컴퓨터에 저장하여 분석하였다. 모든 실험은 실온(21~24 $^{\circ}$ C)에서 시행하였으며, 본 실험에 사용된 전류 측정장치는 그림 3에 도식적으로 나타내었다.

2.5. 세포 내 칼슘이온 농도 측정

세포 내 Ca²⁺ 농도 측정은 형광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)과 연결된 형광측정장치(Ratio Fluorescence system; Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하였다(그림 4 참조). 먼저 단일 MPG 세포가 있는 배양접시에 fura2/AM를 5 μ M 농도로 처치하여 실온에서 빛이 차단된 상태로 60분간 두어 세포 내로 부하시켰다. 부하가 끝나면 세포 외 관류액으로 2회 세척

한 다음 현미경위의 올려놓고, 약물이 포함된 관류액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 이때 나타나는 형광세기의 변화를 기록 및 분석하였는데, fura-2의 형광특성상 340nm와 380nm의 빛으로 번갈아 가며 여기(excitation)시켰을 때 510nm으로 방출(emmission)되는 형광강도의 비율(F_{340}/F_{380})이 세포 내 이온 농도를 반영하게 된다. 특히 세포 내 칼슘이온 농도 측정과 함께 세포막 전압이나 전류의 변화를 gramicidin-perforated patch 방법을 사용하여 동시에 측정하였다.

2.6. 역전사 연쇄 중합반응(RT-PCR)

Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 이용하여 MPG 신경 세포들로부터 RNA를 분리하였다(Chomczynski 및 Sacchi, 1987). 먼저 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 lysis시킨 다음 phenol 및 chloroform을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 세워두었다. 이를 4°C에서 10,000xg로 20분간 원심분리하여 상층액만을 조심스럽게 취하였다. 이 상층액은 동량의 isopropanol과 섞은 다음 -70°C에서 1시간 이상 세워 두어 RNA를 침전시켰다. 다시 4°C에서 10,000xg로 20분간 원심분리하여 RNA pellet을 얻었으며, 이를 다시 75% ethanol로 씻어낸 후 원심분리하여 RNA sample을 얻었다.

RNA에 대한 cDNA의 합성은 2 μ g RNA와 0.5 μ g random hexamer를 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) 등이 포함되게 하여(25 μ l) 37°C에서 1시간 반응시킴으로써 이루어 졌다. 이어 PCR은 여러 니코틴성 아세틸콜린 수용체 서브유닛들에 대한 primer들을 이용하여 이루어졌으며(Liu 등, 1998), 이들의 염기서열은 표 1에 요약되어 있다. PCR 반응액(50 μ l)에는 합성된 cDNA, 각각의 primer(10 pmoles), 1.25 units의 AmpliTaq polymerase(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nmoles의 dNTP등이 포함되게 하여, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 35

cycle동안 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.1% agarose gel에 전기영동하여 관찰하였다.

2.7. 자료 분석

모든 결과는 평균±표준오차로 나타내었고, 통계적인 의의는 unpaired t-검정과 경우에 따라서 비모수 검정인 Mann-Whitney 검정으로 확인하였다. 이때 p값은 0.05이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 측정된 전류의 이동 전하량(charge movement)은 Pulse/Pulsefit software(Heka Elektronik)를 이용하여 계산하였으며, 농도-반응 곡선(concentration-response curve)의 EC₅₀ 혹은 IC₅₀, 그리고 Hill slope는 Prism 3.0 software(GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 구하였다.

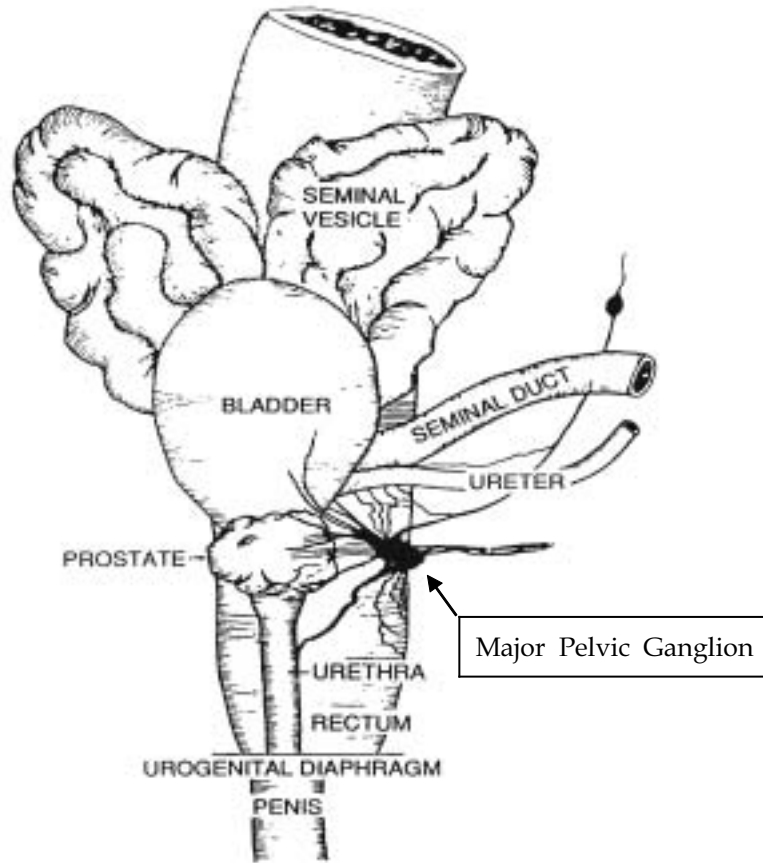


그림 1. 수컷 흰쥐 주 골반 신경절(major pelvic ganglion)의 해부 및 구조

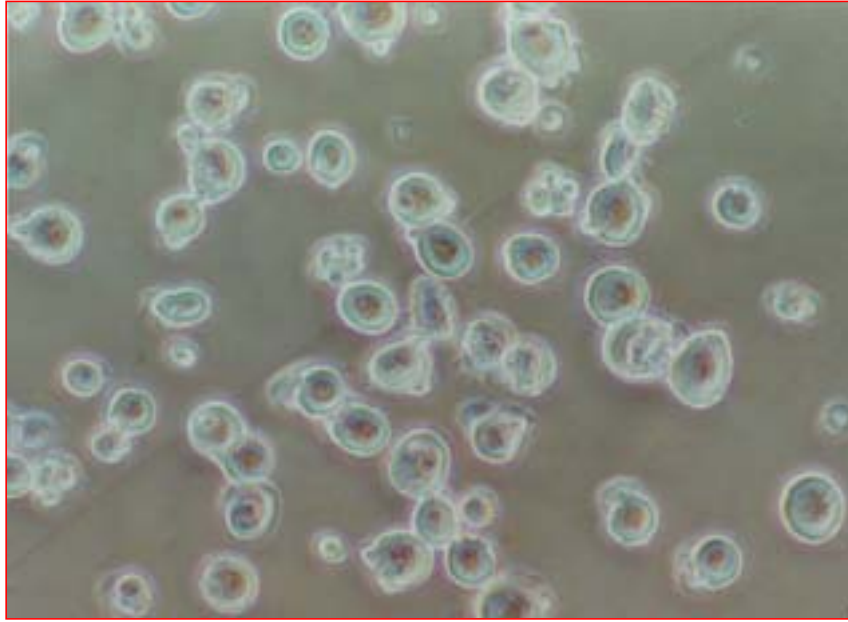


그림 2. 주 골반 신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견 (x200)

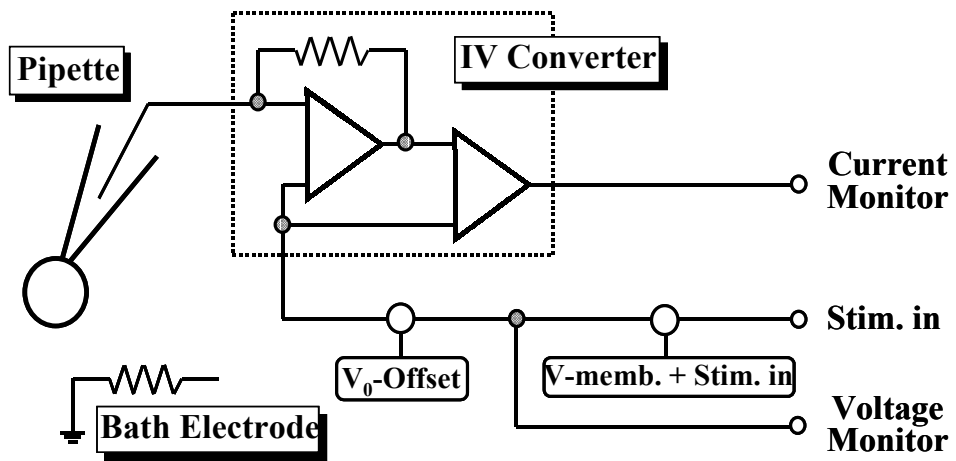


그림 3. 막전압 고정법에 의한 전류 측정 장치의 회로 모식도

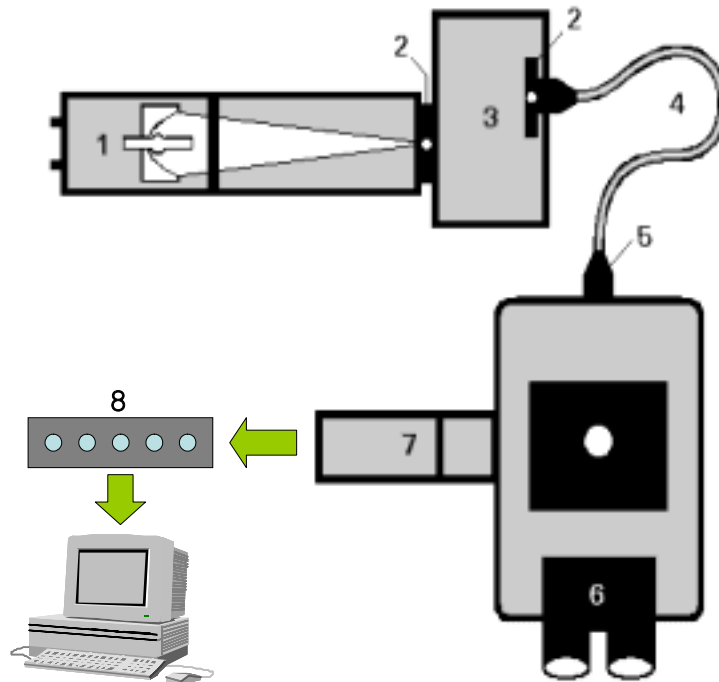


그림 4. 세포 내 칼슘이온농도 측정을 위한 형광측정장치 모식도.

1. Arc lamp housing, 2. Adjustable slits, 3. Excitation monochromator, 4. Liquid light guide, 5. Liquid light guide adapter, 6. Microscope, 7. Photomultiplier tube, 8. AD converter (connected to IBM computer)

표 1. 역전사 연쇄 중합반응(RT-PCR)에 사용된 primer들

Primer		Sequence (5' to 3')	Position	Size (bp)	GeneBank Accession #
ACh α 2	Sense	TGC CCA GGT GGC TGA TGA TGA ACC	1356-1379	301	NM_133420
	Antisense	GCT TTC TGT ATT TGA GGT GAC AGC	1656-1633		
ACh α 3	Sense	AAC CTG CTC CCC AGG GTC ATG TTT	1174-1197	301	NM_052805
	Antisense	CAC TTT GGA TGG CTT CTT TGA TTT	1474-1451		
ACh α 4	Sense	GTC AAA GAC AAC TGC CCG AGA CTT	1105-1128	301	NM_024354
	Antisense	TGA TGA GCA TTG GAG CCC CAC TGC	1405-1382		
ACh α 5	Sense	GTG GAT TTA GTG AGC AGT CAT GCA	1478-1501	299	NM_017078
	Antisense	TTT GGG GGG AGT TTT AAA TAG TCT	1776-1753		
ACh α 7	Sense	AAC TGG TGT GCA TGG TTT CTG CGC	1031-1054	300	NM_012832
	Antisense	AGA TCT TGG CCA GGT CGG GGT CCC	1330-1308		
ACh β 2	Sense	ACG GTG TTC CTG CTG CTC ATC	1014-1034	507	NM_019297
	Antisense	CAC ACT CTG GTC ATC ATC CTC	1523-1503		
ACh β 3	Sense	GAA GAT GTG GAT ACA TCG TTT CCA	1545-1568	299	NM_133597
	Antisense	GAG CAG AGG GAG TAG TTC AGG AAC	1843-1820		
ACh β 4	Sense	ATG AAG CGT CCC GGT CTT GAA GTC	1096-1119	301	NM_052806
	Antisense	GGT CAT CGC TCT CCA GAT GCT GGG	1396-1373		

제3장 결 과

3.1. 교감 및 부교감 신경세포의 전기 생리적 특성

기존 연구에 의하면 MPG 신경세포 중 T-형 전류를 나타내는 대부분은 tyrosine hydroxylase에 대한 면역-조직학적 염색에서 양성을 보이는 교감신경세포 인 반면, T-형 전류가 없는 세포는 부교감신경을 포함한 기타 다른 신경세포들이 라 하였다(Zhu 등, 1995). 또 교감신경세포에 존재하는 T-형 칼슘통로는 세 가지 아형($\alpha 1G$, $\alpha 1H$, $\alpha 1I$)중 $\alpha 1H$ 임이 이미 보고된 바 있다(Lee 등, 2002). 본 실험 에서도 막전압을 -100mV 에서 -40mV 까지 탈분극시켜 T-형 칼슘 전류를 기록함으로써 교감 및 부교감 신경을 구분하였다(그림 5A, 5B). 이어 같은 세포를 막전류 고정(current-clamp) 상태로 전환하여 막전압의 변화를 측정하였는데, 일정기간 과분 극 전류를 가한 다음 멈추었을 때 활동전압이 나타나는 ‘anode break excitation 현상’이 교감신경세포에서만 선택적으로 나타났다(그림 5C). 그 기전은 안정막전압 에서 많은 부분이 비활성 상태로 존재하고 있는 T-형 칼슘통로가 과분극 전류에 의해 회복되어 나타나는 현상으로 추측되어진다. 이에 관해서는 이미 보고된 바 있으며(Lee 등, 2002), T-형 칼슘통로가 없는 부교감신경세포에서는 나타나지 않는 점이 이것을 간접적으로 증명한다고 할 수 있다(그림 5D).

한편 장기간 탈분극 전류를 가할 경우 신경세포는 활동전압 발생빈도가 점차 감소하게 되는데, 이러한 특성이 빠르게 나타나는 경우를 ‘phasic’이라 하는 반면 잘 나타나지 않는 경우를 ‘tonic’이라고 한다(Adams 및 Harper, 1995). 그림 5E 및 5F에서 나타난 바와 같이 교감신경세포는 주로 활동전압 형성양상이 ‘tonic’한 반면(22례 중 20례), 부교감 신경은 주로 ‘phasic’한 양상을 나타내었다(19례 중 14례). 세포의 크기는 세포막의 전기용량(capacitance)과 비례하므로 세포막 용량을 두 세포군 간에 비교한 결과, 교감신경세포($73.3 \pm 4.9\text{pF}$)가 부교감신경세포 ($24.9 \pm 5.0\text{pF}$)에 비해 월등히 크게 나타났다($p < 0.001$).

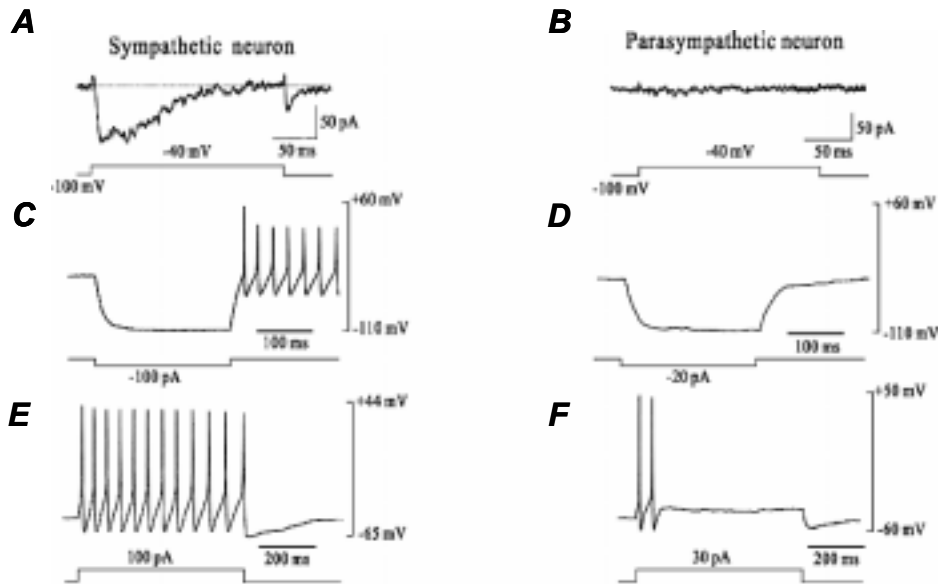


그림 5. 주 골반 신경절의 교감 및 부교감 신경군 세포들의 전기 생리적 특성 비교. 교감 신경군(A, C, E) 및 부교감 신경군(B, D, F) 세포에서 T-형 칼슘전류(A, B)와 anode break excitation(C, D)의 유무, 그리고 장시간 탈분극화 전류자극에 대한 활동전압 형성 방식의 변화(E, F)를 비교하였다.

3.2. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류의 특성

아세틸콜린으로 유도된 전류-전압 관계(current-voltage relationship)를 확인하기 위해 막전압을 달리 고정된 상태(-80~+40mV)에서 아세틸콜린(10 μ M)을 투여하여 나타나는 전류를 기록하였다. 그림 6에 나타난 바와 같이 아세틸콜린에 의해 유도된 전류의 역전 전압(reversal potential)은 대략 0mV부근이었으며, 이를 기준으로 내향성 전류는 가한 막전압의 절대값에 비례하여 증가하였으나 외향성 전류는 잘 나타나지 않는 강한 내측 편향성(inwardly rectification)을 나타내었다. 이러한 특성들은 신경계에 존재하는 니코틴성 아세틸콜린 수용체에 관한 기존 보고들과 일치하는 결과였다(Mathie 등, 1990; Aibara 및 Akaike, 1991; Fieber 및 Adams, 1991; Zhang 등, 1999; Nelson 등, 2001). 아세틸콜린에 의해 유도된 전류의 크기는 1 μ M~1mM의 범위에서 가한 농도에 비례하여 증가하는 농도 의존적 반응을 나타내었다(그림 7A). 하지만 1mM에서부터는 현저히 비활성화(inactivation)가 빨라지면서 전체적인 이동 전하량이 줄어들었으며(그림 7C), 특히 10mM에서는 최대 전류 크기의 증가 없이 이동전하량만이 크게 감소하였다. 농도-반응 곡선을 통해 최대 전류 크기에 대한 세포군 간의 효력을 비교하였는데, 부교감신경군 세포(EC₅₀; 64.0 μ M)에 비해 교감신경군 세포(EC₅₀; 41.4 μ M)에서 효력이 크게 나타났(p<0.05).

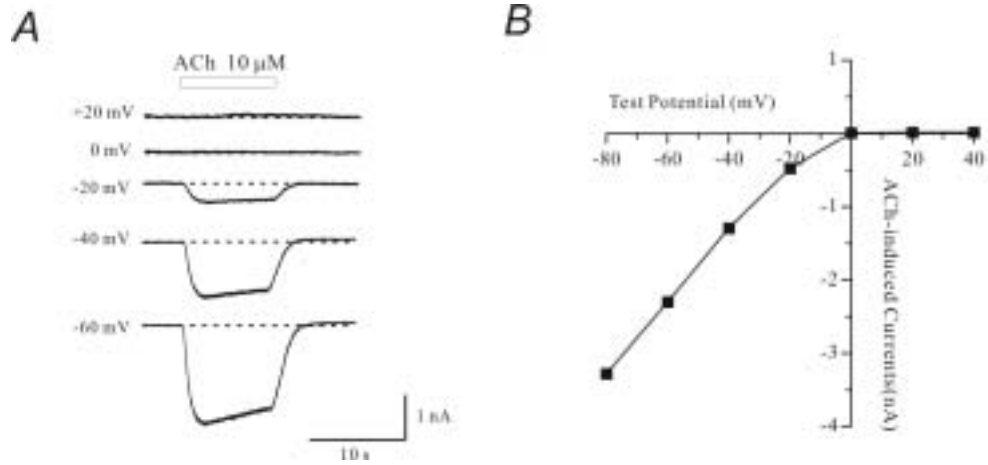


그림 6. 아세틸콜린 투여에 의해 유도된 전류-전압 관계. A: 막전압을 -60, -40, -20, 0 및 +20mV로 각각 달리 고정시킨 상태에서 10 μ M 아세틸콜린에 의해 유도되어진 전류를 나타내었다. B: 아세틸콜린(10 μ M)에 의해 유도된 전류의 크기와 고정된 막전압간의 관계(current-voltage relationship)를 나타내었다.

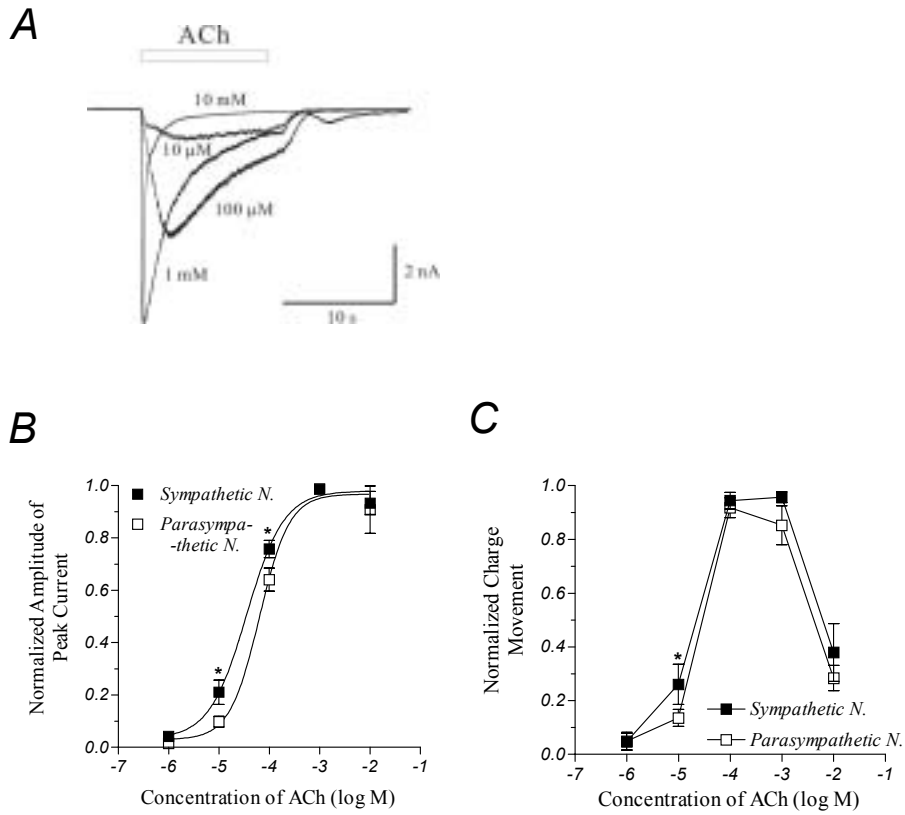


그림 7. 아세틸콜린 투여에 의해 유도된 전류의 농도-반응 관계. A: 교감신경군 세포에서 막전압을 -80mV로 고정시킨 상태로 여러 농도의 아세틸콜린 투여에 의해 유도되어진 전류를 관찰하였다. 1 μ M에서 10mM까지 아세틸콜린의 농도를 증가시켰을 때 유도된 전류 최대 값(B)과 이동 전하량(C)의 농도-반응 관계(concentration-response relationship)를 교감신경군과 부교감신경군 세포간에 비교하였다. 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 실험례수는 7, *는 $p < 0.05$ 임.

3.3. 니코틴성 수용체 차단제들의 효과

기존에 알려진 여러 니코틴성 수용체 차단제들이 아세틸콜린에 의해 유도된 전류에 미치는 영향을 관찰하였다. 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 여러 아형들을 구분하는데 사용되는 차단제로서 α -bungarotoxin이 잘 알려져 있으며, 일반적으로 α -bungarotoxin에 의한 억제효과가 nanomolar 농도 범위에서 이루어진다고 알려져 있다(Lukas 등, 1999; Narahashi 등, 1999). 하지만 골반 신경절에서는 $1\mu\text{M}$ 까지도 억제효과가 미미하였으므로(그림 8), 존재하는 니코틴성 수용체의 많은 부분이 α -bungarotoxin에 의해 억제되지 않는 군이라 말할 수 있다.

다른 서브유닛들에 비해 $\alpha 3$ 와 $\beta 4$ 로 구성된 수용체에 선택적 억제효과를 가진다고 알려진 mecamlamine은 골반 신경절의 아세틸콜린 전류를 비교적 낮은 농도에서부터 농도 의존적으로 억제하였다(Chavez-Noriega 등, 1997; Zhou 등, 2002). 특히 그림 9A에 나타난 바와 같이 mecamlamine 처치가 아세틸콜린($100\mu\text{M}$)으로 유도된 전류의 비활성화를 촉진시켰으며, 이로 인해 이동 전하량(charge movement)의 감소 효과가 최대 전류(peak current) 크기에 대한 효과보다 상대적으로 낮은 농도에서부터 두드러지게 나타났다. 교감신경군과 부교감신경군 세포간의 억제효과를 비교한 결과(그림 9B, 9C), 최대 전류치(IC_{50} ; 515nM vs. 288nM) 및 이동전하량(IC_{50} ; 252nM vs. 41nM) 모두 부교감신경세포에서 효력이 크게 나타났다($p < 0.05$).

한편 $\alpha 4$ 와 $\beta 2$ 로 구성된 수용체에 선택적 억제효과를 가진다고 알려진 dihydro- β -erythroidine의 경우에도 역시 농도 의존적 억제가 이루어지긴 하였으나, mecamlamine과 달리 비활성화 역학(inactivation kinetics)에는 큰 영향 없이 전류의 크기만을 감소시켰다(그림 10). 최대 전류치(IC_{50} ; $26.3\mu\text{M}$ vs. $35.0\mu\text{M}$)와 이동전하량(IC_{50} ; $26.3\mu\text{M}$ vs. $22.5\mu\text{M}$)에 대한 억제효력은 교감 및 부교감 신경군간에 큰 차이가 없었다. 이러한 효력은 기존에 보고된 $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ 수용체에 대한 차단 효과보다 100배 이상 높은 농도에서 이루어 졌으므로 선택적 차단 효과라고 말할 수 없다(Chavez-Noriega 등, 1997). 또 homomeric 구조를 가지는 $\alpha 7$ 수용체는

α -methyllycaconitine에 의해 10nM 이하 농도에서 억제효과가 나타난다고 보고된 바 있으나(Cuevas 등, 2000; Genzen 등, 2001), 본 실험에서는 1 μ M 이하에서는 억제현상을 관찰할 수 없었다(그림 11A). 높은 농도에서 나타난 α -methyllycaconitine의 억제효과는 다른 니코틴성 수용체들을 비선택적으로 차단한 결과로 해석할 수 있다(Skok, 2002).

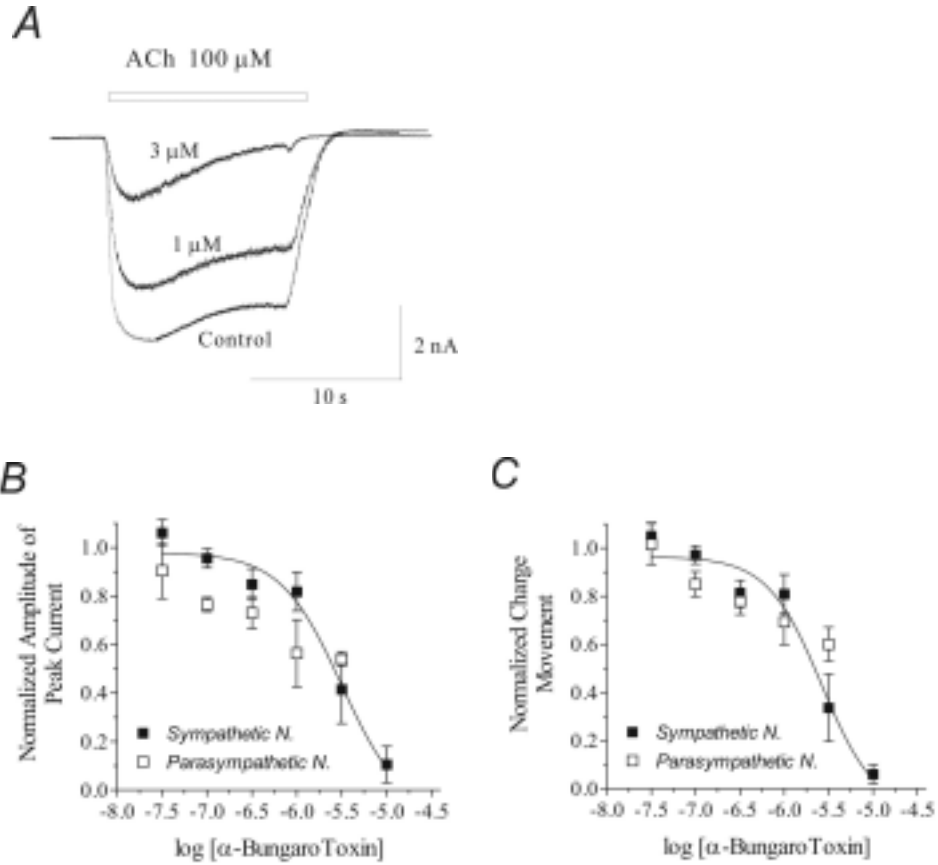


그림 8. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류에 대한 α -bungarotoxin의 효과.
A: 교감신경군 세포에서 아세틸콜린(100 μ M)에 의해 유도되어진 전류를 α -bungarotoxin이 억제하는 정도를 나타내었다. 아세틸콜린(100 μ M)으로 유도되어진 전류의 최대 값(B)과 이동 전하량(C)에 대한 α -bungarotoxin의 억제효과를 교감신경군과 부교감신경군 세포간에 비교하였다. 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 실험례수는 4-7임.

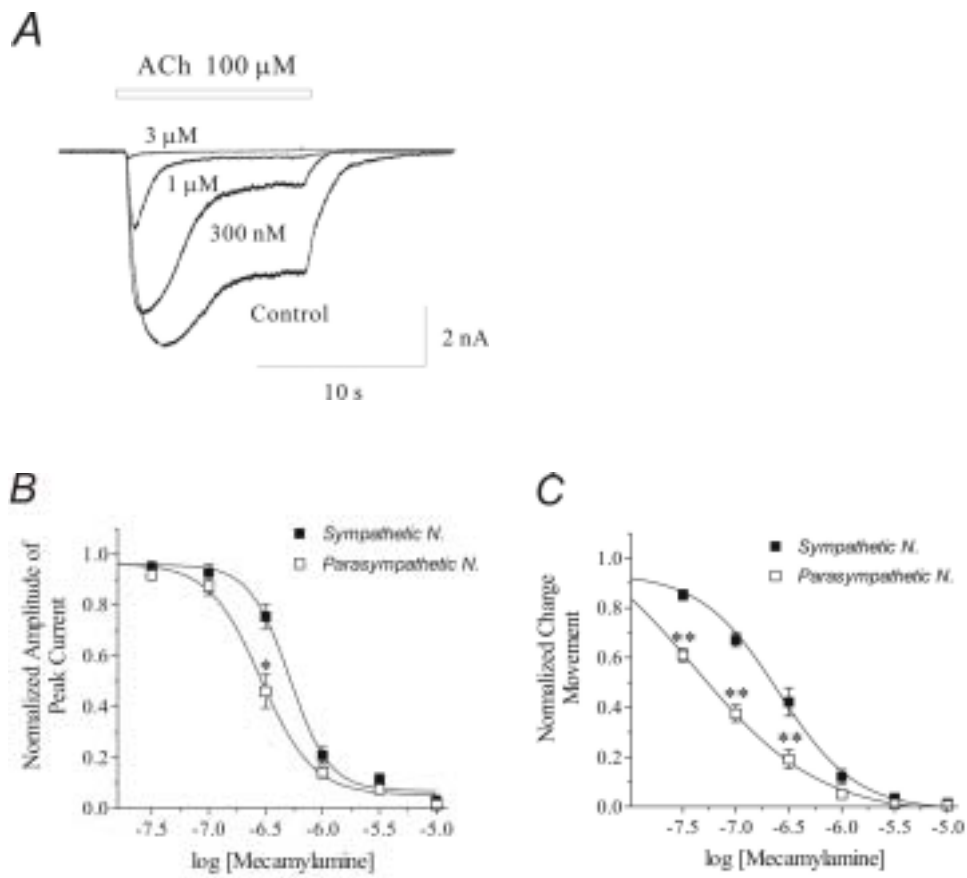


그림 9. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류에 대한 mecamylamine의 효과. A: 교감신경군 세포에서 아세틸콜린(100 μ M)에 의해 유도되어진 전류를 mecamylamine이 억제하는 정도를 나타내었다. 아세틸콜린(100 μ M)으로 유도되어진 전류의 최대 값(B)과 이동 전하량(C)에 대한 mecamylamine의 억제효과를 교감신경군과 부교감신경군 세포간에 비교하였다. 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 실험례수는 5-9, *는 $p < 0.05$ 임.

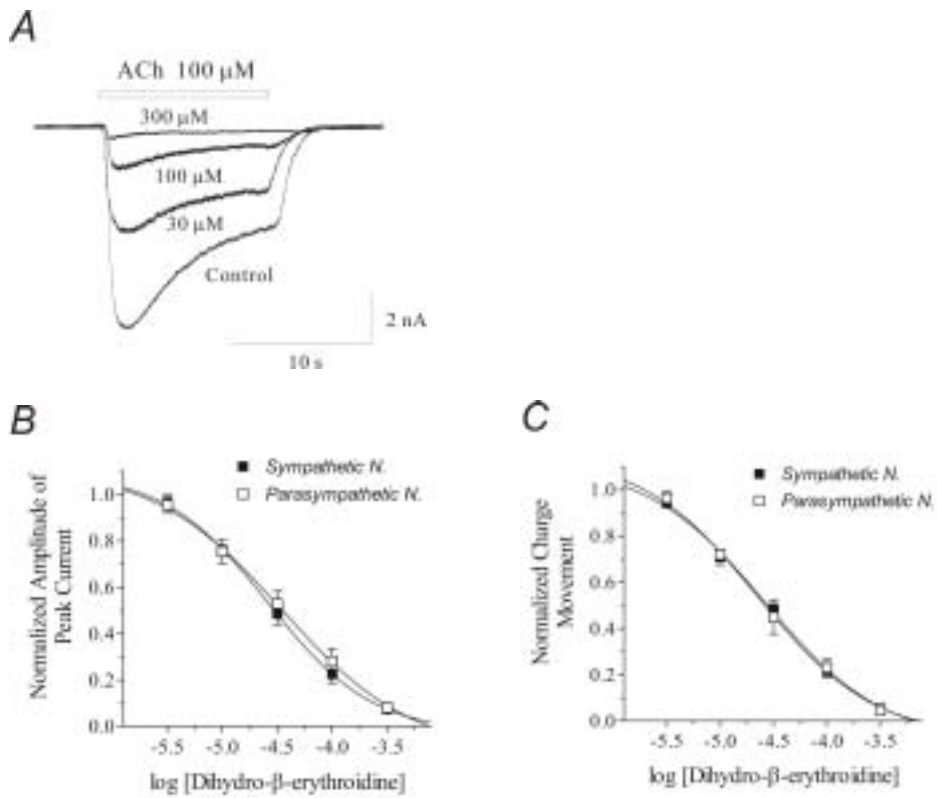


그림 10. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류에 대한 dihydro- β -erythroidine의 효과. A: 교감신경군 세포에서 아세틸콜린(100 μ M)에 의해 유도되어진 전류를 dihydro- β -erythroidine이 억제하는 정도를 나타내었다. 아세틸콜린(100 μ M)으로 유도되어진 전류의 최대 값(B)과 이동 전하량(C)에 대한 dihydro- β -erythroidine의 억제효과를 교감신경군과 부교감신경군 세포간에 비교하였다. 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 실험례수는 6임.

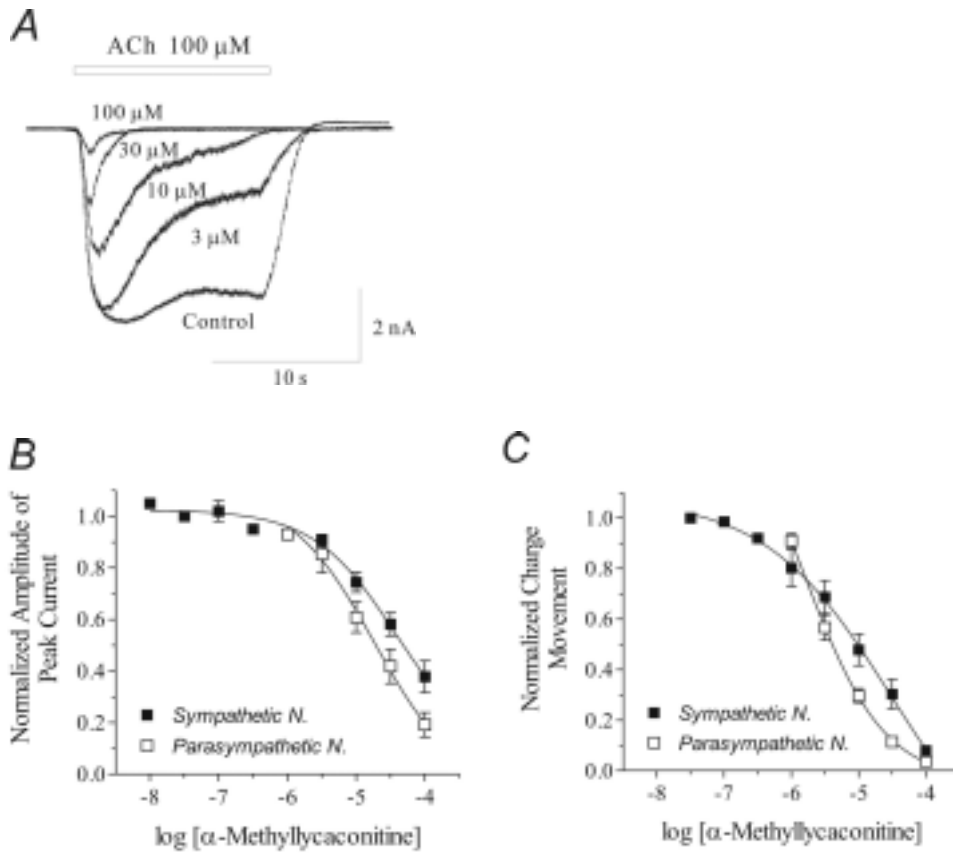


그림 11. 아세틸콜린에 의해 유도된 전류에 대한 α -methyllycaconitine의 효과. A: 교감신경군 세포에서 아세틸콜린(100 μ M)에 의해 유도되어진 전류를 α -methyllycaconitine이 억제하는 정도를 나타내었다. 아세틸콜린(100 μ M)으로 유도되어진 전류의 최대 값(B)과 이동 전하량(C)에 대한 α -methyllycaconitine의 억제효과를 교감신경군과 부교감신경군 세포간에 비교하였다. 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 실험례수는 3-9임.

표 2. 니코틴성 수용체 효현제 및 차단제의 효력 비교

Agonist		Sympathetic Neuron		Parasympathetic Neuron	
		EC ₅₀ (μ M)	Hill Slope	EC ₅₀ (μ M)	Hill Slope
acetylcholine	(Peak)	41.4	1.33	64.0	1.47
Antagonist		IC ₅₀ (μ M)	Hill Slope	IC ₅₀ (μ M)	Hill Slope
α -bungarotoxin	Peak ¹⁾	3.14	1.28	-	-
	Charge ²⁾	2.64	1.42	-	-
mecamylamine	Peak	0.53	1.44	0.22	1.72
	Charge	0.25	0.98	0.08	0.91
dihydro- β -erythroidine	Peak	26.2	0.92	35.0	0.73
	Charge	26.3	0.78	22.5	0.80
α -methyllycaconitine	Peak	37.8	0.72	18.6	0.71
	Charge	31.2	0.46	15.0	0.73

1) 최대 전류치에 대한 억제효과를 나타내었음

2) 이동 전하량에 대한 억제효과를 나타내었음

* 각각의 실험례수는 3-9회임

3.4. 니코틴성 수용체의 분자생물학적 규명

골반 신경절에서 발현되는 니코틴성 수용체의 서브유닛들을 확인하기 위해, 신경절 조직으로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 서브유닛에 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄중합반응을 실시하였다. 그림 12에서 나타난 바와 같이 니코틴성 수용체의 대표적인 서브유닛들 중 $\alpha 4$ 와 $\beta 3$ 를 제외한 대부분이 발현되고 있음을 알 수 있었다. 특히 다른 서브유닛에 비해 $\alpha 3$ 의 발현 양이 현저히 많이 나타난 반면, β 서브유닛들의 발현양은 상대적으로 다소 적게 나타났다.

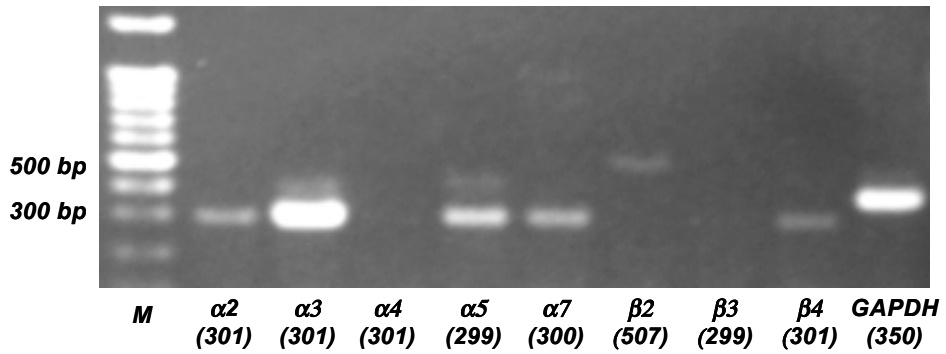


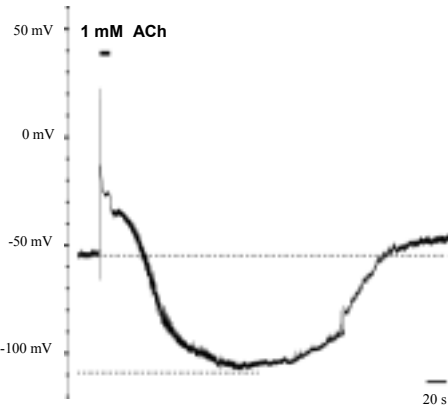
그림 12. 주 골반 신경절 세포에서 발현되는 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 아형들. 골반 신경절에서 발현되는 니코틴성 수용체의 서브유닛들을 확인하기 위해, 신경절 조직으로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 서브유닛에 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄증합반응을 실시하였다. 대조군으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였으며, 괄호 안은 예상되는 증폭산물의 크기(bp)를 나타내었다. M은 DNA size marker임.

3.5. 아세틸콜린에 의한 막전압 변화

막전류 고정(current-clamp) 상태에서 아세틸콜린 투여에 의한 막전압 변화를 교감신경군과 부교감신경군 세포간에 비교하였다. 두 세포군 모두에서 아세틸콜린 투여 즉시 활동전압 형성과 함께 빠른 탈분극현상을 나타내었다(그림 13). 하지만 교감신경군 세포(세포막용량: 87.9 pF, Tonic firing, (+) GABA current)에서는 탈분극 후 오랜 시간 지속되는 과분극이 관찰된 반면(그림 13A), 부교감신경군 세포(세포막용량: 21.9 pF, Phasic firing, (-) GABA current)에서는 과분극 현상 없이 바로 안정막 전압으로 회복되었다(그림 13B). 아세틸콜린에 의한 막전압 변화에 무스카린성 수용체의 활성화가 관여하는지 확인하기 위해 무스카린성 수용체 차단제인 atropine(5 μ M)을 전처리하여 그에 따른 변화를 관찰하였다. 그림 14에 보여진 바와 같이 atropine은 교감신경세포에서 나타나는 아세틸콜린의 탈분극 및 과분극 현상 모두에 큰 영향을 미치지 못하였다.

아세틸콜린 투여에 따른 막전압의 과분극 현상이 세포 내 칼슘이온농도 증가의 이차적 변화인지를 확인하기 위해, 전극 내 용액에 EGTA를 포함시켜 세포 내 칼슘이온 증가를 chelation시킨 상태에서 아세틸콜린에 의한 막전압 변화를 기록하였다. 그림 15에서 나타난 바와 같이 0.1mM 혹은 10mM의 EGTA가 포함되어 있는 전극 내 용액으로 교감신경군 세포에서 측정된 결과, 아세틸콜린에 의한 탈분극 반응에는 큰 영향 없이 과분극 현상이 소실됨을 관찰할 수 있었다. 한편 세포 내 칼슘이온 증가에 의해 활성화되는 small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} 통로의 차단제인 apamin(500nM)을 전처리 한 경우에도 역시 아세틸콜린에 의한 과분극 현상만 선택적으로 차단되어짐이 관찰되었다(그림 16)

A. Sympathetic Neuron



B. Parasympathetic Neuron

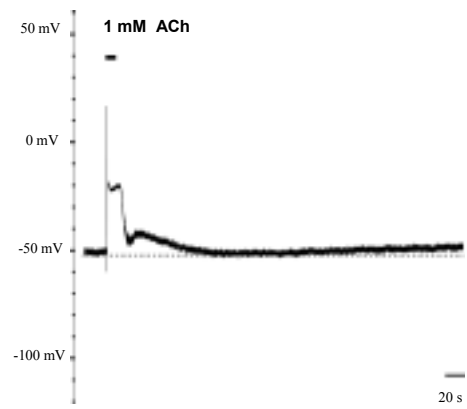


그림 13. 교감신경군과 부교감신경군 세포간의 아세틸콜린에 의한 막전압 변화 비교. 막전류 고정상태에서 아세틸콜린(1mM) 투여에 의한 막전압 변화를 교감신경군(A)과 부교감신경군 세포(B)간에 비교하였다. 부교감신경군 세포와 달리 교감신경군 세포에서는 탈분극 후 오랜 시간 지속되는 과분극이 관찰되었다.

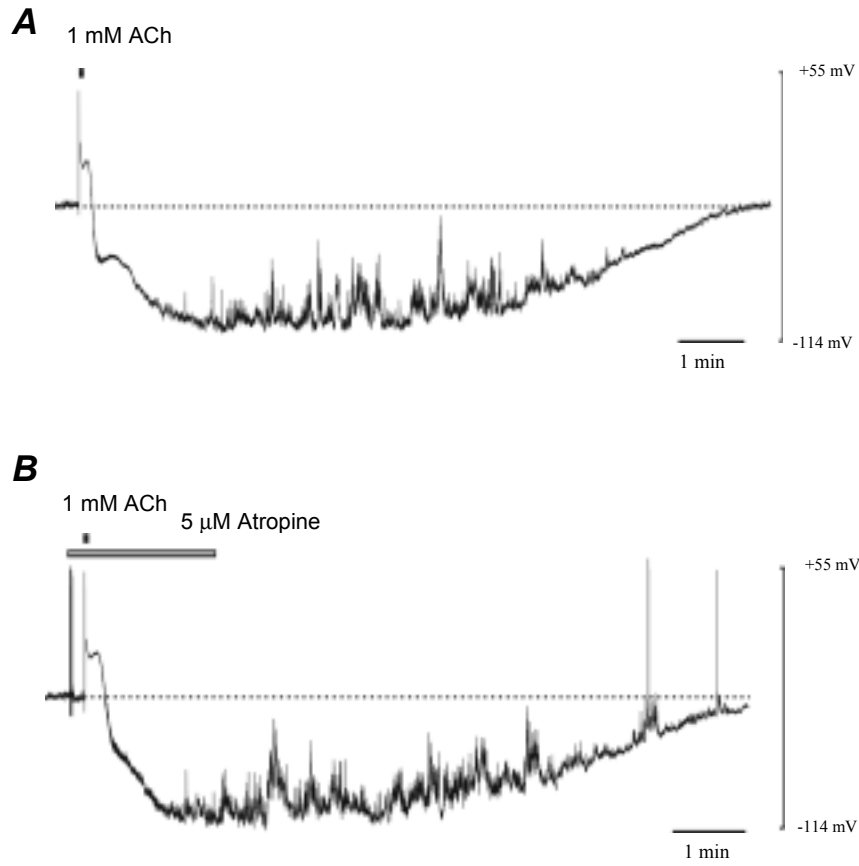
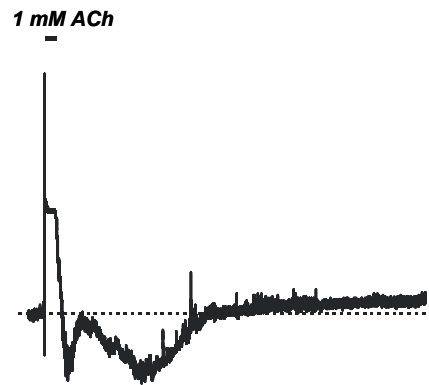


그림 14. Atropine 전처치가 아세틸콜린에 의한 막전압 변화에 미치는 영향. 대조군(A) 혹은 무스카린성 수용체 차단제인 atropine(5 μ M)을 전처치한(B) 교감신경 세포에서 아세틸콜린(1mM)에 의한 막전압 변화를 관찰하여 이를 비교하였다.

A. 0.1 mM EGTA in pipette



B. 10 mM EGTA in pipette

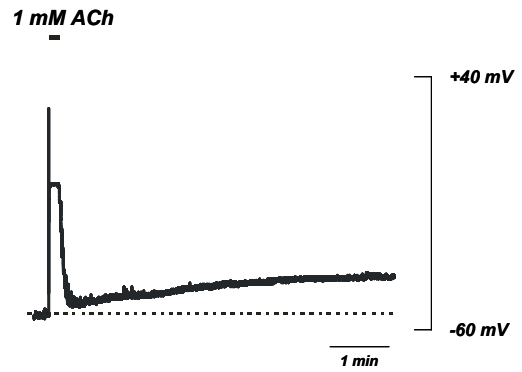


그림 15. 세포내액의 칼슘이온 제거가 아세틸콜린에 의한 막전압 변화에 미치는 영향. 세포내 칼슘이온을 제거하기 위해 전극 내 용액에 0.1 mM(A)과 10 mM(B)의 EGTA를 포함시킨 상태에서 아세틸콜린(1mM)에 의한 교감신경 세포의 막전압 변화를 관찰하여 이를 비교하였다.

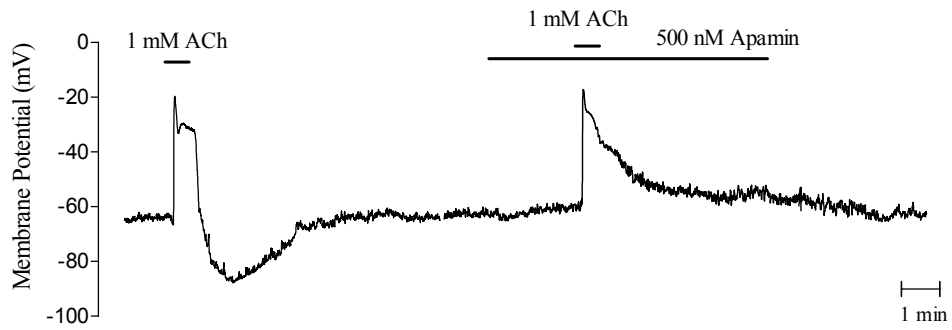


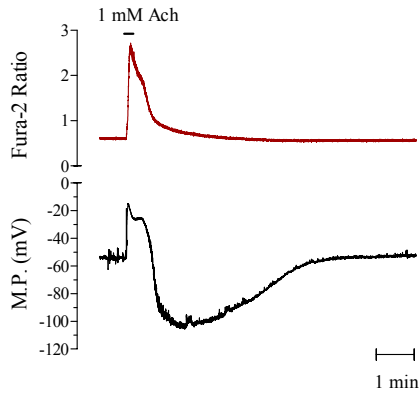
그림 16. Apamin 투여가 아세틸콜린에 의한 막전압 변화에 미치는 영향. 교감신경군 세포에서 아세틸콜린(1mM) 투여에 의해 나타나는 과분극 현상이 Ca^{2+} -activated K^+ 통로 차단제인 apamin(500nM)에 의해 선택적으로 차단되어 짐을 나타내었다.

3.6. 아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화

아세틸콜린에 의한 막전압 과분극 현상에 세포 내 칼슘이온농도 증가가 관여할 것이라는 간접적 증거를 바탕으로, 칼슘이온 농도 측정에 사용되는 형광염료 (fura-2)를 이용하여 칼슘이온 증가 기전을 확인하고자 하였다. 전기생리 실험장치와 형광측정장치를 결합하여, 막전압 혹은 전류의 변화와 세포 내 칼슘이온 농도 변화를 동시에 측정하였다. 그림 17A에 나타난 바와 같이 막전류 고정상태에서 아세틸콜린은 막전압의 탈분극과 함께 세포 내 칼슘이온농도를 급격히 증가시켰다. 한편 막전압을 -80mV로 고정하여 막전압-민감성(voltage-sensitive) 칼슘 통로의 활성화가 불가능한 상태에서도 아세틸콜린은 내향성 전류와 함께 세포 내 칼슘이온농도를 크게 증가시켰다(그림 17B). 이는 아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘이온 유입의 많은 부분이 막전압 민감성 칼슘이온 유입과는 무관하게 니코틴성 수용체를 통해 직접 유입된 것임을 시사해 준다.

막전압 고정상태에서의 칼슘이온농도 증가에 무스카린성 수용체 활성화가 관여하고 있을 가능성을 배제하기 위해 대표적인 니코틴성 수용체 차단제 hexamethonium(100 μ M)을 전처리한 다음 아세틸콜린을 투여하여 그 효과를 대조군과 비교하였다. 그림 18에서와 같이 hexamethonium은 아세틸콜린에 의한 내향성전류와 함께 세포 내 칼슘이온농도 증가를 거의 대부분 차단함을 관찰할 수 있었다.

A. Current Clamp



B. Voltage Clamp

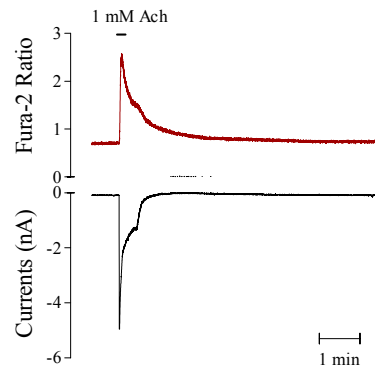


그림 17. 막전류 및 전압 고정 상태에서 아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘 이온농도 변화. A: 막전류 고정 상태(current-clamp)에서 아세틸콜린(1mM) 투여에 의한 막전압 변화와 함께 세포 내 칼슘이온농도의 변화를 동시에 기록하였다. B: 막전압 고정 상태(voltage-clamp)에서 아세틸콜린에 의한 막전류의 변화와 세포 내 칼슘이온농도의 변화를 동시에 기록한 결과이다. 이때 막전류 및 전압 고정은 gramicidin-perforated patch clamp 방법을 이용하였으며, 세포 내 칼슘이온농도 측정은 fura-2를 부하시켜 형광측정장치로 기록하였다.

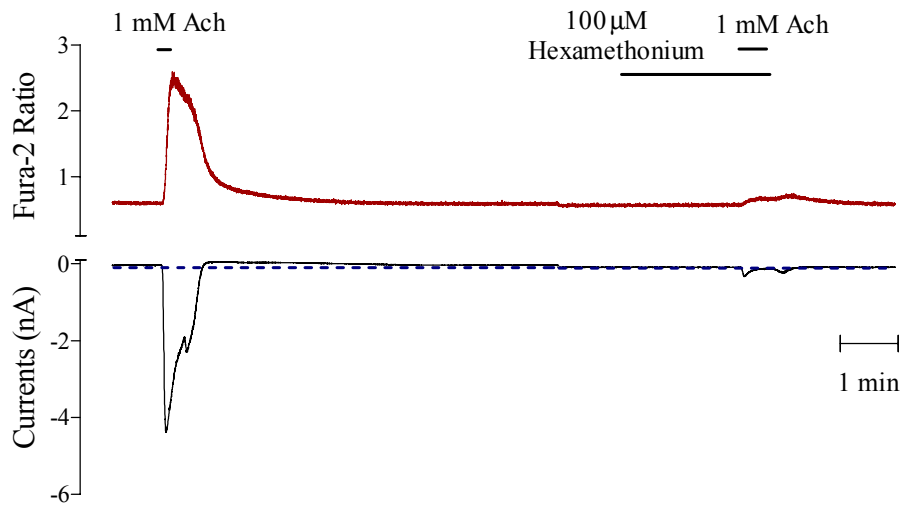


그림 18. 니코틴성 아세틸콜린 수용체 차단제가 아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화에 미치는 영향. 막전압 고정 상태(voltage-clamp)에서 아세틸콜린(1mM)에 의한 전류 및 세포 내 칼슘이온농도 변화가 니코틴성 아세틸콜린 수용체 차단제인 hexamethonium(100μM) 전처치에 의해 모두 차단되어짐을 나타내고 있다.

제4장 고찰

니코틴성 아세틸콜린 수용체는 신경-근 접합부에서 흥분 전달을 매개하여 수 의적인 근 수축을 가능케 하며, 중추 및 말초 신경계에서도 시냅스 간 신호 전달 및 흥분성 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. 근육에 존재하는 니코틴성 수용 체는 $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ 혹은 $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ 들이 오합체(pentameric structure)를 구성하 고 있으며(Lukas 등, 1999), 칼슘이온의 투과도가 매우 낮고(Costa 등, 1994; Zhang 등, 1999), γ 나 δ 서브유닛으로 인해 전류-전압 관계가 비교적 편향성이 없는 선형 관계를 나타낸다(Francis 및 Papke, 1996). 반면 신경계에 존재하는 수 용체들은 다양한 조성의 α 와 β 서브유닛이 이종 혹은 동종으로 구성되어 있으 며, 본 연구에서도 잘 나타난 바와 같이(그림 6) 전압-전류 관계상 현저한 내측 편 향성(inwardly rectification)을 보인다고 알려져 있다(Nelson 등, 2001). 신경계에 존재하는 니코틴성 수용체들 중에서도 구성하고 있는 서브유닛 조성에 따라 기능 적 특성에 많은 차이가 있으므로, 이를 규명하는 일은 그 조직에서의 수용체 작용 이해에 중요하다 할 수 있다. 수용체 규명을 위해서는 분자생물학적, 약리학적, 그 리고 면역학적 방법들을 사용할 수 있으며(Skok, 2002), 본 연구에서는 이 중 분자 생물학적 및 약리학적 방법을 사용하였다.

골반 신경절에 발현되어진 니코틴성 수용체 서브유닛들을 확인한 결과(그림 12) 가장 발현양이 많은 서브유닛은 $\alpha 3$ 였으며, 그 외에도 $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, 그리고 $\beta 2$ 및 $\beta 4$ 가 발현되어 있었다. 발현된 서브유닛의 종류는 기존에 다른 자율 신경 절에서 보고된 결과와 크게 다르지 않았으나(Nelson 등, 2001; Tachikawa 등, 2001; Zhou 등, 2002), 각각의 발현 양은 실험동물의 종 및 조직에 따라 다소 차이 가 있었다. 예를 들어 chick ciliary ganglion에서는 $\alpha 3:\alpha 5:\beta 2:\beta 4:\alpha 7$ 이 3:1:1:1:7 정도로 $\alpha 7$ 발현양이 상대적으로 많은 반면(Corriveau 및 Berg, 1993; Lukas 등, 1993), 흰쥐의 superior cervical ganglion이나 intracardiac neuron에서는 $\alpha 3:\alpha 4:\alpha 5:\alpha 7$ 의 발현된 세포 비율이 각각 100:58:100:100과 32:47:14:22 정도로 나타났다

(Skok 등, 1999).

지금까지의 발표 결과에 따르면 신경 세포에 분포하는 대표적인 서브유닛 조성으로 $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$, $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ 및 $(\alpha 7)_5$ 등이 알려져 있으므로, 이들에 대한 선택적 차단제들을 이용하여 약리학적 방법으로 그 조성을 확인하고자 하였다. 니코틴성 수용체들을 크게 분류하는 방법 중 하나는 α -bungarotoxin(α -BgTx)에 의해 억제되는 정도에 따라 낮은 농도에서 억제되는 군(α -BgTx sensitive)과 그렇지 않은 군(α -BgTx insensitive)으로 나누는 것이며, 이 때 전자에 해당되는 대표적인 예로 $(\alpha 7)_5$ 을 들 수 있다. $(\alpha 7)_5$ 수용체는 여러 자율 신경절에서 발견되어 시냅스 전달에 관여하고 있으며(Cuevas 등, 2000), 특히 칼슘이온 투과도가 커서 현저한 세포 내 칼슘이온농도 증가 및 이로 인한 다양한 칼슘 의존적 반응을 초래함이 잘 알려져 있다(Bertrand 등, 1993; Seguela 등, 1993; Roth 등, 2000). 앞에서 언급한 바와 같이 골반 신경절에서도 $\alpha 7$ 서브유닛이 발견되어 있음을 직접 확인하였다. 그럼에도 불구하고 아래의 몇 가지 증거들을 미루어 볼 때 $(\alpha 7)_5$ 수용체가 골반 신경절에서 아세틸콜린에 대한 반응을 매개하는 기능적 수용체로 작용하지 못하고 있다고 추측된다. 그 첫 번째 증거는 바로 골반신경절에서의 아세틸콜린에 대한 반응이 낮은 농도의 α -BgTx에 의해 차단되지 않은 점이다. 일반적으로 $(\alpha 7)_5$ 수용체에 대한 α -BgTx의 IC_{50} 은 1~10nM이라 알려져 있으나(Roth 등, 2000), 골반 신경절에서는 nanomolar 농도 범위에서는 억제효과를 관찰할 수 없었다. 두 번째 증거로 낮은 농도의 α -methyllycaconitine(MLA)에 의해 차단되지 않은 점을 들 수 있는데, 일반적으로 MLA는 $(\alpha 7)_5$ 수용체의 선택적 차단제로 IC_{50} 가 25nM(Palma 등, 1996) 혹은 0.64nM(Briggs 및 McKenna, 1996)이라고 알려져 있다. 하지만 본 실험에서와 같이 micromolar 농도 범위에서 억제되는 경우는 비선택적으로 니코틴성 수용체들을 억제한 결과로 해석된다는 기존의 보고가 있다(Skok, 2002). 세 번째로 아세틸콜린 투여에 의해 유도된 전류의 비활성화 속도가 전형적인 $(\alpha 7)_5$ 수용체에서의 그것에 비해 매우 느리다는 점이다. 일반적으로 $(\alpha 7)_5$ 수용체는 다른 수용체와 달리 100msec 이내에 비활성화가 나타나는 특성이 있다(Zhang 등, 1994; Chavez-Noriega 등, 1997).

또 다른 수용체인 $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ 의 경우에는 중추신경계에 주로 분포하며,

dihydro- β -erythroidine(DH β E)에 의해 선택적으로 억제됨이 알려져 있다 (Albuquerque 등, 1997; Zhou 등, 2002). DH β E가 나타내는 억제효과의 IC₅₀를 비교한 결과에 따르면, (α 4)₂(β 2)₃ 수용체의 경우 110nM에 불과한데 비해 (α 3)₂(β 4)₃ 수용체는 14 μ M으로 100배 가량의 차이가 있다(Chavez-Noriega 등, 1997). 본 연구의 골반 신경절에서 측정된 DH β E의 IC₅₀(약 25 μ M)가 (α 3)₂(β 4)₃ 수용체에 대한 그것과 유사하였으므로, 이 수용체의 선택적 차단제로 알려진 mecamylamine의 효과를 관찰하여 이를 확인하고자 하였다. 예측대로 mecamylamine은 낮은 농도(IC₅₀: 약 200nM)에서 아세틸콜린의 작용을 차단하였고, 이러한 결과는 (α 3)₂(β 4)₃ 수용체에서 관찰된 기존의 보고와도 큰 차이가 없었다. Harvey 등(1996)은 (α 3)₂(β 4)₃ 수용체에 대한 DH β E 및 mecamylamine의 IC₅₀가 각각 23 μ M과 200nM라고 보고하였는데 이는 본 연구 결과와 매우 유사하며, 또 (α 3)₂(β 4)₃ 수용체가 분포한다고 추정되는 조직에서 역시 본 연구와 유사한 결과를 보고한 점으로 미루어 볼 때(Nelson 등, 2001; Zhou 등, 2002), 골반 신경절의 아세틸콜린 작용이 주로 (α 3)₂(β 4)₃ 수용체에 의해 매개되어 질 것이라 생각되어 진다. Bryant 등(2002)은 MLA가 높은 농도(IC₅₀: 3.8 μ M)에서 (α 3)₂(β 4)₃ 수용체도 억제한다고 보고하였는데, 이 역시 골반 신경절에 이 수용체가 존재한다는 간접적 증거라 할 수 있겠다. 하지만 α 3와 β 4 외에 α 5가 같이 조합되어 있을 가능성이 있으며, 이 경우 약리학적인 특성이 다소 달라질 수 있으나(Gerzanich 등, 1998) 아직 이에 관해서는 잘 알려져 있지 않다. 또 (α 3)₂(β 2)₃ 수용체의 존재도 배제할 수 없으나, 이 경우 DH β E에 대한 IC₅₀가 낮아진다고(1.6 μ M) 알려져 있어 골반 신경절에서의 결과와는 다소 차이가 있다(Chavez-Noriega 등, 1997).

골반 신경절에 존재하는 교감 신경세포와 부교감 신경세포는 형태적 및 전기생리학적 특성에 차이가 있으며, 이를 기준으로 세포를 분류할 수 있다. 교감신경세포는 부교감 신경세포에 비해 세포의 크기가 비교적 크고, T-type 칼슘전류를 나타내며, GABA에 의한 Cl⁻ 전류가 현저히 크다. 또 그림 5에 나타난 바와 같이 지속적 탈분극 전류를 주었을 때 활동전압 형성이 tonic한 양상을 나타내며, 과분극 전류를 가하다가 멈추었을 때 활동전압이 형성되는 'anode break 현상'이 잘 나타난다. 이러한 특성들을 기준으로 세포들을 분류하여 아세틸콜린에 의한 전류

의 크기를 비교한 결과, 교감신경(EC_{50} : $41\mu M$)에서의 효력이 부교감 신경(EC_{50} : $64\mu M$)에 비해 크게 나타났다. 이러한 결과는 흰쥐의 $(\alpha_3)_2(\beta_4)_3$ 수용체에서 보고된 아세틸콜린의 $EC_{50}(77\mu M)$ 와 유사하였다(Cachelin 및 Rust, 1994). 여러 차단제들에 의한 억제효과를 두 세포군 간에 비교한 바에 따르면 mecamylamine의 경우 교감신경에 비해 부교감 신경세포에서 차단 효력이 크게 나타난 반면(그림 9 참조), DH β E의 경우는 두 군간에 유의 있는 효력 차이를 보이지 않았다(그림 10 참조). 이러한 결과를 바탕으로 부교감 신경세포에는 $(\alpha_3)_2(\beta_4)_3$ 수용체만이 주로 기능을 나타내는 반면 교감 신경세포에는 이보다 효력이 높은 다른 조성의 니코틴성 수용체가 일부 포함되어 작동되고 있다고 추정할 수 있으나, 이를 확인하기 위해서는 발현된 수용체들의 분포를 면역화학적 방법으로 관찰하여 두 세포군 간에 비교할 필요가 있다. 한편 일부 보고에 따르면 superior cervical ganglion등에 위치한 교감 신경세포들이 intracardiac ganglion에 위치한 부교감 신경세포들에 비해 상대적으로 약 3.1배 가량 많은 수의 니코틴성 수용체를 가지고 있다고 하였으나(Skok, 2002), 본 연구에서는 아세틸콜린($1mM$)에 의한 전류의 크기를 세포막용량으로 보정하여 비교한 결과 교감($0.31\pm 0.19nA/pF$, $n=8$) 및 부교감 신경세포군($0.41\pm 0.22nA/pF$, $n=7$)간에 큰 차이가 없었다.

아세틸콜린은 니코틴성 수용체에 결합 시 내측 이온 통로를 개방하여 Na^+ 의 유입을 증가시키고, 이로 인해 막전압을 빠르게 탈분극시켜 활동전압을 형성케 한다. 이는 세포 외액의 Na^+ 을 이온통로 투과가 불가능한 N-methyl-D-gluconate로 치환한 경우 탈분극이 나타나지 않는 점을 관찰함으로써 직접 확인할 수 있었다(결과에 나타내지 않았음). 흥미로운 점은 골반 신경절의 부교감 신경세포는 아세틸콜린 투여 후 바로 안정막 전압으로 회복되어지는데 반해, 교감 신경세포는 탈분극 후 장시간 지속되는 과분극이 현저하게 나타난다는 점이다. 일반적으로 여러 신경세포들에서 흥분시 유입된 칼슘이온에 의해 이차적인 과분극이 나타나는 예가 많이 있으므로, 교감신경세포에서의 과분극 역시 칼슘 의존적인 반응인지를 세포 내 칼슘이온을 제거함으로써 확인하였다. 또 apamin의 효과를 통해 Ca^{2+} activated K^+ 통로가 관여하고 있음을 입증하고자 하였다. 그림 13 및 14에 나타난 바와 같이 이러한 처치들은 교감 신경세포의 과분극 현상만을 선택적으로 소실시

켰고, 따라서 아세틸콜린에 의한 과분극 현상은 세포 내 칼슘이온농도 증가에 의해 K^+ 통로가 개방되면서 나타난 결과로 생각되어진다. 이러한 변화가 교감 신경 세포에서만 나타나는 이유는 아직까지 알 수 없으나, 크게 두 가지 가능성을 추측해 볼 수 있다. 첫 번째는 아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘이온농도 증가가 교감 신경세포에서 현저히 클 가능성이고, 두 번째는 교감신경세포에 Ca^{2+} activated K^+ 통로의 발현이 많거나 혹은 니코틴성 수용체 인근에 잘 분포되어 있을 가능성이며, 이에 관해서는 추후 연구가 필요한 실정이다.

아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘이온 증가 기전을 이해하기 위해 막전압 및 막전류 고정상태에서 칼슘이온농도를 측정된 결과, 칼슘이온 유입의 많은 부분이 막전압 민감성 칼슘 유입과 무관하게 나타남을 알 수 있었다(그림 17B 및 결과설명 참조). 한편 아세틸콜린이 무스카린성 수용체에 결합할 경우 G-단백을 매개로 하여 세포내 저장소로부터 칼슘이온을 유리시킬 수 있음이 잘 알려져 있으나, 아세틸콜린에 의한 칼슘이온 증가가 니코틴성 수용체 차단제에 의해 완전 봉쇄된 점으로 보아 골반 신경절 절후 신경세포에서는 무스카린성 수용체의 기능이 미미할 것이라 생각한다. 이러한 점은 무스카린성 수용체의 차단제인 atropine이 아세틸콜린에 의한 과분극 효과에 영향을 주지 못한 점으로도 증명되어진다(그림 14). Zhang 등(1999)은 니코틴성 수용체의 활성화시 세포 내로 유입된 Na^+ 에 의해 Na^+-Ca^{2+} exchanger가 작동하여 세포 내로 칼슘이온이 유입될 가능성을 언급한 바 있다. 하지만 세포 외액의 Na^+ 을 모두 K^+ 으로 치환한 경우에도 아세틸콜린에 의한 칼슘이온농도 증가에는 큰 영향을 미치지 못하였으므로, 이 운반체가 칼슘이온 유입에 기여할 가능성이 낮다고 보고하였다. 따라서 아세틸콜린은 골반 신경절의 $(\alpha_3)_2(\beta_4)_3$ 니코틴성 수용체를 통해 Na^+ 과 함께 직접 칼슘이온을 유입시키며, 이로 인해 증가된 세포 내 칼슘이온농도가 이차적 변화들을 초래한다고 말할 수 있겠다. 이미 α_3 가 포함된 니코틴성 수용체들이 적지 않은 칼슘이온 투과도를 가짐이 알려져 있으며(Fieber 및 Adams, 1991; Adams 및 Nutter, 1992; Vernino 등, 1992; Rogers 및 Dani, 1995), 여기에 α_5 가 포함될 경우 칼슘이온 투과도가 더욱 증가한다고 보고되었다(Gerzanich 등, 1998). 뿐만 아니라 $(\alpha_3)_2(\beta_4)_3$ 는 $(\alpha_7)_5$ 수용체에 비해 비활성화 속도가 느리기 때문에 아세틸콜린 자극에 대해 더 오랜 기

간동안 칼슘이온이 유입될 수 있을 것이므로, 그만큼 증가되는 칼슘이온의 양이 많아 생리적 의의가 클 것이라 생각된다.

자율 신경절에서의 시냅스는 단순히 흥분을 전달하는 기능 뿐 아니라 이를 통합하거나 수정하는 기능까지 담당하고 있다(De Groat 및 Saum, 1976; Burnstock 등, 1987; Gibbins 등, 2000). 니코틴성 아세틸콜린 수용체는 빠른 흥분성 시냅스후 전위를 초래하고 또 절후 자율신경세포의 흥분성을 조율함으로써, 골반신경절이 가지는 비뇨 생식기 및 하부 위장관 기능 조절에 핵심적인 역할을 수행함이 잘 알려져 있다(De Groat 및 Saum, 1976; Gallagher 등, 1982). 하지만 아직까지는 골반신경절에 분포하는 니코틴성 수용체의 서브유닛 조성 및 특성에 관한 보고가 없는 상태이다(De Biasi, 2002). 본 연구를 통해 흰쥐 골반신경절에는 $\alpha 3$, $\alpha 5$ 및 $\beta 4$ 등의 서브유닛으로 구성된 기능적 니코틴성 수용체가 존재하고 있으며, 아세틸콜린은 이 수용체에 작용하여 막전압을 탈분극시키고 세포내로의 칼슘이온 유입을 초래함을 알 수 있었다. 또 니코틴성 수용체를 통해 유입된 칼슘이온은 이차적으로 교감 신경세포의 K^+ 통로를 활성화시킴으로써 막전압을 과분극시켜, 활동전압의 과도한 형성을 억제하고 시냅스 흥분성을 조절하는데 관여할 것이라 생각된다. 골반신경절의 수용체 서브유닛 조성은 기니피그의 소장 자율신경절에서의 보고와도 유사하였다(Kirchgessner 및 Liu 등, 1998; Obaid 등, 1999; Zhou 등, 2002). 특히 니코틴성 수용체의 $\alpha 3$ 서브유닛을 knock-out시킨 마우스에서는 출생 후 2일 이내에 심한 방광 확장과 함께 요실금이 나타나며, 1주 이상 생존한 경우에도 방광 감염이 지속되거나 요석이 나타난다고 하였다(Xu 등, 1999; De Biasi, 2000). 또 nicotine을 주입하더라도 방광의 수축이 초래되지 못하는 반면, 전기장 자극을 가하거나 무스카린성 수용체 효현제를 투여할 경우에는 수축반응을 나타내었는데, 이러한 결과들은 골반 신경절에서 $\alpha 3$ 가 포함된 니코틴성 수용체의 중요성을 입증해주는 좋은 증거자료라 할 수 있을 것이다. 임상적으로도 자율 신경병증(autonomic neuropathy) 환자의 상당수가 니코틴성 수용체에 대한 자가항체를 가지고 있으며, 이로 인해 비뇨 생식기관 및 위장관 기능장애를 초래한다고 보고된 바 있다(Vernino 등, 1998; Vernino 등, 2000). 흥미로운 점은 megacystis microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome(MMHIS) 환자의 경우 심한 방광

확장과 기능성 장 폐색을 보이며 출생 후 수 개월내에 사망하게 되는데, 면역화학적 검사 결과 환자에게 니코틴성 수용체의 $\alpha 3$ 서브유닛 발현이 적거나 혹은 발현되지 않고 있음이 보고 되었다(Anneren 등, 1991; Richardson 등, 2001). 앞으로 본 연구와 관련하여 골반 신경절의 교감 및 부교감 신경세포에서 니코틴성 수용체의 분포를 명확히 구분하고, 아세틸콜린에 의한 흥분성 및 신경세포 기능 변화의 기전을 구체적으로 밝히며, 또 다른 신경전달 물질들이 니코틴성 수용체 활성화에 미치는 상호작용(cross-talk)을 규명하는 연구가 진행될 경우, 이는 여러 비노생식기 및 장 운동 조절의 생리 및 병태생리적 기전을 이해하거나 이와 관련된 질환들의 치료제를 개발하는데 효과적으로 이용되어질 수 있을 것이라 생각된다.

제5장 결 론

수컷 흰쥐 주 골반 자율 신경절 세포들에 존재하는 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 특성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 아세틸콜린은 농도 의존적으로 내측 편향성 전류를 초래하였으며, 역전전압은 대략 0mV 이었다.
2. 아세틸콜린에 의해 유발된 전류는 $\alpha 3\beta 4$ 수용체의 선택적 차단제인 mecamylamine에 의해 민감하게 억제되었다.
3. 니코틴성 수용체의 서브유닛 중 $\alpha 3$ 의 발현량이 현저히 컸으며, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ 등도 발현되어 있었다.
4. 아세틸콜린은 교감신경군 세포에서 강한 탈분극에 이은 지속적 과분극을 초래하였으며, 이러한 과분극 효과는 Ca^{2+} -activated K^+ 전류 차단제중의 하나인 apamin에 의해 소실되었다.
5. 아세틸콜린은 니코틴성 수용체를 통해 직접 칼슘이온을 유입시켰으며, 아세틸콜린에 의한 세포 내 칼슘이온 증가에 무스카린성 수용체는 관여하지 않았다.

이상의 실험 결과들로 미루어 보아 주 골반 신경절 세포들에는 $\alpha 3$ 서브유닛이 포함된 니코틴성 아세틸콜린 수용체가 존재하고 있으며, 아세틸콜린은 이 수용체에 작용하여 막전압을 탈분극 시키고 세포 내 칼슘이온농도를 증가시킴으로써 시냅스간 흥분전달에 중요한 역할을 담당하고 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Adams DJ, Harper AA. Electrophysiological properties of autonomic ganglion neurons. In: Autonomic ganglia, edited by McLachlan EM, Harwood Academic Publishers, Luxembourg, 1995, 153-212
- Adams DJ, Nutter T. Calcium permeability and modulation of nicotinic acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons. *J Physiol* 1992;86:67-76
- Aibara K, Akaike N. Acetylcholine-activated ionic currents in isolated paratracheal ganglion cells of the rat. *Brain Res* 1991;558:20-26
- Albuquerque EX, Alkondon M, Pereira EFR, Castro NG, Schrattenholz A, Barbosa CTF, Bonfante-Cabarcas R, Aracava Y, Eisenberg HM, Maelicke A. Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:1117-1136
- Anneren G, Meurling S, Olsen L. Megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome (MMIHS), an autosomal recessive disorder: clinical reports and review of the literature. *Am J Med Genet* 1991;41:251-254
- Barnard E. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biol Sci* 1992;17:368-374
- Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Bertrand S, Changeux JP. Mutations at two distinct sites within the channel domain M₂ alter calcium permeability of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:6971-6975
- Betz H. Ligand-gated ion channels in the brain: The amino acid receptor superfamily. *Neuron* 1990;5:383-392

- Bradely WE, Timm GW, Scott FB. Cystometry IV. Neuromuscular transmission in urinary bladder. *Urology* 1975;6:520-524
- Briggs CA, McKenna OG. Effect of MK-801 at the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* 1996;35:407-414
- Bryant DL, Free RB, Thomasy SM, Lapinsky DJ, Ismail KA, Arason KM, Bergmeier SC, McKay DB. Effects of metyllycaconitine and related analogues on bovine adrenal $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *Ann NY Acad Sci* 2002;971:139-141
- Burnstock G, Allen TGJ, Hassall CJS, Pittam BS. Properties of intramural neurones cultured from the heart and bladder. In: Histochemistry and cell biology of autonomic neurones and paraganglia, edited by Heym C, Springer Verlag, Heidelberg, 1987,323-328
- Castro NG, Albuquerque EX. α -bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J* 1995;68:516-524
- Cachelin A, Rust G. Unusual pharmacology of (+)-tubocurarine with rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing $\beta 4$ subunits. *Mol Pharmacol* 1994;46:1168-1174
- Cha SK, Park KS, Chung HS, Kong ID, Lee JW, Jeong SW. Modulation of N-type Ca^{2+} currents by activation of neuropeptide Y_1 receptors in rat major pelvic ganglion neurons. *Society for Neuroscience* 2001;27(2):2235
- Chavez-Noriega LE, Crona JH, Washburn MS, Urrutia A, Elliott KJ, Johnson EC. Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $h\alpha 2\beta 2$, $h\alpha 2\beta 4$, $h\alpha 3\beta 2$, $h\alpha 3\beta 4$, $h\alpha 4\beta 2$, $h\alpha 4\beta 4$ and $h\alpha 7$ expressed in xenopus oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280(1):346-356
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid

- guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
- Corriveau R, Berg D. Coexpression of multiple acetylcholine receptor genes in neurons. Quantification of transcripts during development. *J Neurosci* 1993;13:2662-2671
- Costa CS, Patrick JW, Dani JA. Improved technique for studying ion channels expressed in *Xenopus* oocytes, including fast superfusion. *Biophys J* 1994;67:395-401
- Cuevas J, Roth AL, Berg DK. Two distinct classes of functional $\alpha 7$ -containing nicotinic receptor on rat superior cervical ganglion neuron. *J Physiol* 2000;525:735-746
- 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
- Dail WG. Autonomic innervation of male reproductive genitalia. In: The autonomic nervous system, vol. 2, Nervous control of the urogenital system, edited by Maggi CA, Harwood Academic Publishers, London, 1992, 69-101
- Dani JA. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 2001;49:166-174
- Dani JA, Mayer ML. Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol* 1995;5:310-317
- De Biasi MD. Nicotinic mechanisms in the autonomic control of organ systems. *J Neurobiol* 2002;53(4):568-579
- 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, 1993, 467-524

De Groat WC, Saum WR. Synaptic transmission in parasympathetic ganglia in the urinary bladder of the cat. *J Physiol* 1976;256:137-158

Fieber LA, Adams DJ. Acetylcholine-evoked currents in cultured neurones dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia. *J Physiol(Lond)* 1991;434:215-237

Francis MM, Papke RL. Muscle-type nicotinic acetylcholine receptor delta subunit determines sensitivity to noncompetitive inhibitors, while gamma subunit regulates divalent permeability. *Neuropharmacology* 1996;35(11):1547-1576

Gallagher JP, Griffith WH, Shinnick-Gallagher P. Cholinergic transmission in cat parasympathetic ganglia. *J Physiol* 1982;332:473-486

Genzen JR, van Cleve W, McGehee DS. Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurophysiol* 2001;86:1773-1782

Gerzanich V, Wang F, Kuryatov A, Lindstrom J. $\alpha 5$ subunit alters desensitization, pharmacology, Ca^{2+} permeability and Ca^{2+} modulation of human neuronal $\alpha 3$ nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:311-320

Gibbins IL, Jobling P, Messenger JP, Teo EH, Morris JL. Neuronal morphology and the synaptic organization of sympathetic ganglia. *J Auton Nerv Syst* 2000;81:104-109

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.

- Hancock MB, Peveto CA. Preganglionic neurons in the sacral spinal cord of the rat: An HRP study. *Neurosci Lett* 1979;11:1-5
- Harvey SC, Maddox FN, Luetje CW. Multiple determinants of dihydro- β -erythroidine sensitivity on rat neuronal nicotinic receptor alpha subunits. *J Neurochem* 1996;67:1953-1959
- Jänig W, McLachlan EM. Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev* 1987;67:1332-1404
- 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
- Keast JR. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience* 1995;66:655-662
- Keast JR. Unusual autonomic ganglia: connections, chemistry, and plasticity of pelvic ganglia. *Int Rev Cytol* 1999;193:1-69
- Kirchgessner AL, Liu MT. Immunohistochemical localization of nicotinic acetylcholine receptors in the guinea pig bowel and pancreas. *J Comp Neurol* 1998;390:197-514
- Kong ID, Cha SK, Park KS, Lee JH, Lee JW, Jeong SW. Phenotype-specific expression of ionotropic GABA receptors in male rat major pelvic ganglion neurons. *Society for Neuroscience* 2001;27(1):685
- Langworthy OR. Innervation of the pelvic organs of the rat. *Investig Urology* 1965;2:491-511
- Lee JH, Kim EG, Park BG, Kim KH, Cha SK, Kong ID, Lee JW, Jeong SW.

- Identification of T-type α_1H Ca^{2+} channels (Ca(v)3.2) in major pelvic ganglion neurons. *J Neurophysiol* 2002;87(6):2844-2850
- Léna C, Changeux JP. Pathological mutations of nicotinic receptors and nicotine-based therapies for brain disorders. *Curr Opin Neurobiol* 1997;7:674-682
- Le Novère N, Corringer P, Changeux J. The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 2002;53(4):447-456
- Lindstrom J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. In: Ion channels vol. 4., edited by Narahashi T, Plenum Press, New York, 1996, 377-450
- Lindstrom J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol* 1997;15:193-222
- Liu L, Chang GQ, Jiao YQ, Simon SA. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Brain Res* 1998;809:238-245
- Lukas RJ, Norman S, Lucero L. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the SH-SY5Y human neuroblastoma clonal line. *Mol Cell Neurosci* 1993;4:1-12
- Lukas RJ, Changeux J, Le Novère N, Albuquerque EX, Balfour DJK, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PBS, Collins AC, Dani JA, Grandy SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonnacott S. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 1999;51(2):397-401
- Mathie A, Colquhoun D, Cull-Candy SG. Rectification of currents activated by nicotinic acetylcholine receptors in rat sympathetic ganglion neurones. *J Physiol (Lond)* 1990;427:625-655

- McGehee DS. Molecular diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ann NY Acad Sci* 1999;868:565-577
- Mills TM, Wiedmeier VT, Stopper VS. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod* 1992;46:342-348
- Nadelhaft I, Booth AM. The location and morphology of preganglionic neurons and the distribution of visceral afferents from the rat pelvic nerve: A horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol* 1984;226:238-245
- Narahashi T, Aistrup GL, Marszalec W, Nagata K. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new target site of ethanol. *Neurochem Int* 1999;35:131-141
- Nelson ME, Wang F, Kuryatov A, Choi CH, Gerzanich V, Lindstrom J. Functional properties of human nicotinic AChRs expressed by IMR-32 neuroblastoma cells resemble those of $\alpha\beta 4$ AChRs expressed in permanently transfected HEK cells. *J Gen Physiol* 2001;118:563-582
- Obaid AL, Koyano T, Lindstrom J, Sakai T, Salzberg BM. Spatiotemporal pattern of activity in an intact mammalian network with single-cell resolution: Optical studies of nicotinic activity in an enteric plexus. *J Neurosci* 1999;19:3073-3093
- Palma E, Bertrand S, Binzoni T, Bertrand D. Neuronal nicotinic alpha-7 receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *J Physiol* 1996;491:151-161
- Park KS, Cha SK, Lee KI, Jun JY, Jeong SW, Kong ID, Lee JW. Identification of ATP-sensitive K^+ conductances in male rat major pelvic ganglion neurons. *Korean J Physiol Pharmacol* 2002;6:247-253
- Park KS, Jeong SW, Cha SK, Lee BS, Kong ID, Ikeda SR, Lee JW. Modulation of N-type Ca^{2+} currents by A_1 -adenosine receptor activation in male rat

- pelvic ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(2):501-508
- Picciotto MR, Zoli M. Nicotinic receptors in aging and dementia. *J Neurobiol* 2002;53(4):641-655
- Richardson CE, Morgan JM, Jasani B, Green JT, Rhodes J, Williams GT, Lindstrom J, Wonnacott S, Thomas GA, Smith V. Megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome and the absence of the alpha-3 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Gastroenterology* 2001;121:350-357
- Rogers M, Dani J. Comparison of quantitative calcium flux through NMDA, ATP, and ACh receptor channels. *Biophys J* 1995;68:501-506
- Roth A, Shoop RD, Berg DK. Targeting $\alpha 7$ containing nicotinic receptors on neurons to distal locations. *Eur J Pharmacol* 2000;393:105-112
- Rust G, Burgunder JM, Lauterburg TE, Cachelin AB. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in the rat autonomic nervous system. *Eur J Neurosci* 1994;6:478-485
- Seguela P, Wadiche J, Miller K, Dani JA, Patrick J. Molecular cloning, functional properties and distribution of rat brain $\alpha 7$: A nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 1993;13:596-604
- Skok VI. Nicotinic acetylcholine receptors in the neurons of autonomic ganglia. *J Auton Nerv Syst* 1987;21:91-99
- Skok MV, Voitenko LP, Voitenko SV, Lykhmus EY, Kalashnik EN, Litvin TI, Tzartos SJ, Skok VI. Alpha subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the rat autonomic ganglia neurons as determined with subunit-specific anti-alpha(181-192) peptide antibodies. *Neuroscience* 1999;93(4):1427-36.

- Skok VI. Nicotinic acetylcholine receptors in autonomic ganglia. *Auton Neurosci* 2002;97:1-11
- Tachikawa E, Mizuma K, Kudo K, Kashimoto T, Yamato S, Ohta S. Characterization of the functional subunit combination of nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett* 2001;312:161-164
- Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 1992;8:127-134
- Vernino S, Adamski J, Kryzer TJ, Fealey RD, Lennon VA. Neuronal nicotinic ACh receptor antibody in subacute autonomic neuropathy and cancer related syndromes. *Neurology* 1998;50:1806-1813
- Vernino S, Low PA, Fealey RD, Stewart JD, Farrugia G, Lennon VA. Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. *New Engl J Med* 2000;343:847-855
- Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, Patrick J, Role LW, De Biasi M, Beaudet AL. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the $\alpha 3$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5746-5751
- Zhang J, Xiao Y, Abdrakhmanova G, Wang W, Cleemann L, Keller KJ, Morad M. Activation and Ca^{2+} permeation of stably transfected $\alpha 3/\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 1999;55:970-981
- Zhang ZW, Vijayaraghavan S, Berg DK. Neuronal acetylcholine receptors that bind alpha-bungarotoxin with high affinity function as ligand gated ion channels. *Neuron* 1994;12:167-177
- Zhou X, Ren J, Brown E, Schneider D, Caraballo-Lopez Y, Galligan JJ.

Pharmacologic properties of nicotinic acetylcholine receptors expressed by guinea pig small intestine myenteric neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(3):889-897

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

Zhu Y, Yakel JL. Modulation of Ca²⁺ currents by various G protein-coupled receptors in sympathetic neurons of male rat pelvic ganglia. *J Neurophysiol* 1997;78:780-789

Zoubek J, Somogyi GT, De Groat WC. A comparison of inhibitory effects of neuropeptide Y on rat urinary bladder, urethra and vas deferens. *Am J Physiol* 1993;265:R537-543

ABSTRACT

Characterization of nicotinic acetylcholine receptors in male rat major pelvic ganglion neurons

Park, Joong-Hyun
Dept. of Medicine
The Graduate School
Yonsei University

The pelvic ganglia provide autonomic innervation to the various urogenital organs and physiologically play important roles in micturition and erectile reflexes. Within the same pelvic ganglion capsule, sympathetic and parasympathetic postganglionic neurons are co-localized, which is a distinctive feature of these ganglia. Both neurons receive presynaptic inputs mainly through nicotinic acetylcholine (nACh) receptor, however, the molecular nature and biophysical characteristics of nACh receptors in pelvic ganglia have not been elucidated clearly.

We investigated the effects of nACh receptor activation on membrane potential, ionic currents, and intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) using patch clamp technique combining with fluorescence measurement system and identified the expressed subtypes of nAChR using RT-PCR in male rat major pelvic ganglion (MPG) neurons.

ACh elicited fast inward currents dose-dependently, which was inwardly rectified and reversed at near 0 mV. ACh-induced currents were potently blocked by mecamylamine, a selective $\alpha 3\beta 4$ receptor blocker. RT-PCR

analysis revealed that subunit of $\alpha 3$ was most abundantly expressed in MPG neurons. In current clamp mode, ACh induced a fast depolarization and a following slow sustained hyperpolarization in sympathetic MPG neurons. ACh-induced hyperpolarization in sympathetic MPG neuron was selectively abolished by intracellular Ca^{2+} chelation or by pretreatment with apamin, a Ca^{2+} -activated K^+ channel blocker. ACh increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ under either the current clamp or the voltage clamp (at -80 mV) mode, which was completely blocked by hexamethonium.

Taken together, it is concluded that MPG neurons have functioning nAChRs containing $\alpha 3$ subunit, and their activation cause fast excitatory synaptic potential and Ca^{2+} influx into the cytosol. The elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induces a sustained hyperpolarization in sympathetic neurons, which may be involved in the regulation of the autonomic synaptic transmission.

Key words : major pelvic ganglia, nicotinic acetylcholine receptor, intracellular calcium concentration