

흰쥐 부신수질 세포에서 voltage-dependent Ca⁺⁺ 채널의 전기적 특성에 관한 연구

구 용숙[○], 이 태수^{*}, 차 은중^{*}

충북대학교 의과대학 생리학교실[○], 의공학교실^{*}

Electrical characteristics of voltage-dependent Ca⁺⁺ channel in rat chromaffin cell.

Yong Sook Goo[○], Tae Soo Lee^{*}, and Eun Jong Cha^{*}

Departments of Physiology[○] and Biomedical Engineering^{*}, College of Medicine, Chungbuk National University

Abstract

Calcium(Ca) ion plays an important role to trigger the secretion of important neurotransmitters. Since Ca ion flows into the cell thru the ion selective channel, the conductance of which depends on the transmembrane potential, the voltage-dependent characteristic of Ca ion channel is crucial to elucidate the stimulus-secretion coupling of exocytosis. The present study measured the Ca ion currents thru a whole-cell configuration patch at the transmembrane potential clamped at various desired levels in the rat chromaffin cell. The resultant current-voltage relationship was differentiated to obtain dynamic conductance at each clamped voltage. Based on these measured data, five numerical parameters were extracted to reveal electrical properties of Ca ion inflow process thru the voltage-gated channel. The present study can be applied to comparing the electrical characteristics of Ca channel under different experimental conditions. Also, further study is warranted to model the conformational changes of the channel molecules.

서 론

세포의 분비활동을 조절하는 기능에 있어서 많은 경우 Ca-ion이 핵심적인 trigger 신호로 작용한다[1,2]. 세포의 Ca-ion이 세포 내로 유입되어 세포내 Ca-ion의 농도가 증가하면 세포외 분비작용(exocytosis)이 증진되어 신경 전달물질이 세포 밖으로 분비된다. Ca-ion은 Ca-ion에 선택적인 통로인 Ca-channel을 통하여 세포막을 통과하는데 이 채널은 세포의 막전압(transmembrane potential)의 크기에 따라 그 개폐여부가 결정된다(voltage

dependency). 그림 1에 Ca-ion의 유입에 따른 세포의 분비작용의 모식도를 보였다. 채널을 통한 Ca-ion의 이동은 Ca-전류를 형성하며 다른 ion들의 이동이 없는 경우에는 막전류(transmembrane current)가 Ca-전류를 반영하게 된다. 즉 막전압과 막전류의 측정을 통하여 Ca-채널의 특성을 추측할 수 있으며 이는 다른 이온 채널(Na⁺, K⁺-channel)의 연구에 사용되는 막전압 고정법(voltage clamp technique)을 그대로 사용하여 측정할 수 있다[3]. Ca-ion이 생체정보전달을 일으키는 신경전달물질의 분비를 조절하므로 Ca-ion의 유입을 결정하는 채널의 특성을 밝히는 것은 대단히 중요하지만 아직 많이 연구되지 못하고 있다. 따라서 본 연구에서는 막전압 고정법을 분리된 흰쥐 부신수질 세포에 적용하여 Ca-전류를 측정하고 막전압의 변화에 따른 Ca-전류의 변화를 관찰하여 채널의 전류-전압 특성을 산출한 후 이를 정량적으로 취급하는 방법을 제안하고자 한다.

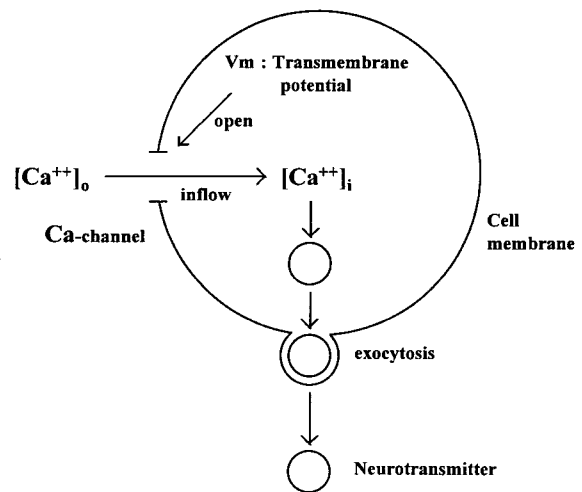


그림 1. Ca-ion의 유입에 따른 세포의 분비작용의 모식도

흰쥐 부신수질 세포에서 Voltage-dependent Ca²⁺ 채널의 전기적 특성에 관한 연구

재료 및 방법

1. 세포 분리

체중 150~250 gm 되는 성숙한 흰 쥐(Sprague-Dawley rat)를 실험동물로 사용하였다. 실험동물을 목의 탈구(cervical dislocation)로 희생시킨 즉시 가능한 한 무균 상태로 부신을 적출하였다. 적출한 부신을 pH 7.4로 맞춘 Ca²⁺ free phosphate buffer 용액(이후 PBS로 표기)에 옮겨 미세 현미경 시야에서 수질만을 분리한 후 5 mm³ 조각으로 절단하였다. 부신 조각을 조심스럽게 PBS로 3번 씻은 다음 collagenase 용액(2 mg/ml, Sigma type IA)을 넣고 37°C에서 30분간 진탕 처리하였다. PBS로 3번 씻어서 collagenase 용액을 제거하고 끝을 불로 처리한 Pasteur pipette으로 약 10분간 조심스럽게 용액을 상하운동하여 세포 분산(cell trituration)을 시행하였다. 100 G-force에서 약 10 분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 배양액(Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) with 10% fetal bovine serum)에 부유시킨 후 다시 한 번 원심분리하였다(100 G-force, 10 min). 0.5 ml의 배양액에 세포를 최종 부유시킨 후 현미경 시야에서 세포수를 확인하여 세포수가 1.5×10⁵/ml이 되도록 세포 농도를 조정하였다.

Polyethylene imine을 처리한 cover slip위에 세포를 분주한 후 CO₂ 항온기에 보관하여 세포배양 2시간 후부터 3일 후까지 사용하였다. 분리된 세포가 붙어있는 cover slip을 세포외용액(N-methyl D-glucamine, 140 ; KCl, 5.4 ; CaCl₂, 10 ; MgCl₂, 0.5 ; HEPES, 5 ; glucose, 5.5 (단위 mM) ; pH 7.2)을 채운 기록 chamber에 옮겨서 사용하였다. 세포외용액의 Na⁺을 N-methyl D-glucamine으로 대체하여 Na⁺ 전류를 제거함으로써 Ca²⁺ 이온 전류만을 기록하였다. 한편 pipette 내에는 K⁺ 이온 전류를 억제하는 동시에 Ca²⁺ 에 대한 완충용량이 적절히 조정되어 있는 세포내용액(CsCl, 120 ; MgCl₂ 2 ; TEA-Cl, 20 ; EGTA, 0.5 ; HEPES, 10 (단위 mM) ; pH 7.2)으로 채웠다.

2. 실험장치

분리한 세포군을 Bath solution에 담근 후 Inverted microscope(Diaphot, Nikon)로 관찰하여 대상세포를 선택하였다. 실험실에서 제작한 Glass microelectrode(2~5 MOhm)를 3D Micro-manipulator(MX-1, Narishige)로 조작하여 대상세포의 세포막에 접근시켜 부착하여 Giga-seal을 형성한 후 흡압을 가하여 puncture 시켰다(whole-cell mode patch 형성). 이와같이 세포내 공간과

Glass electrode를 전기적으로 증가하게 만드는 것은 최근 개발된 whole-cell mode patch clamp technique[4]과 같은 방법을 사용하였다. Patch를 통하여 막전압을 인가하였고 세포막을 통하여 흐르는 전류는 역시 patch를 통과하므로 patch를 형성하기 위하여 부착한 Glass microelectrode에서의 전압인가와 전류 측정을 Patch-clamp amplifier(EPC-7, List-electronic)를 사용하여 수행하였다. 측정된 막전압과 전류는 chart recorder(RS 3400, Gould)로 기록하였다. 그림 2에 실험 장치의 모식도를 보였다.

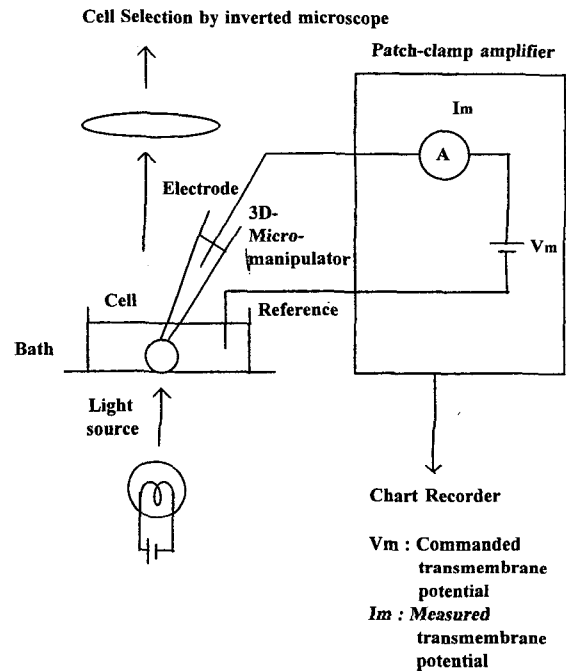


그림 2. 실험 장치의 모식도

3. 실험 순서

Patch-clamp amplifier를 사용하여 막전압(V_m)을 -80 mV(V_r, resting potential)로 고정된 후 막전류(I_m)가 거의 흐르지 않는 것을 확인하였다. 이는 형성된 patch의 특성을 반영하며 patch의 특성이 확인되면 10 mV, 100 Hz의 test pulse-sequence를 resting potential과 중첩시켜 인가하였다. Test pulse의 rising and falling edge에서 시스템의 capacitance 성분에 의한 전류를 관찰할 수 있으며 Patch-clamp amplifier의 보상회로를 사용하여 이를 제거하였다. Capacitance를 보상한 후 V_m을 V_r로부터 원하는 수준까지 증가시킨 후 250 msec동안 일정하게 유지시키며 I_m을 측정하였다. I_m은 과도기적 변화가 사라지는 200~250 msec 구간의 수치를 측정치로 선택하였다. 이를 -70~+60 mV까지 10 mV 간격으로 반복하였다.

4. 자료분석

위의 방법에 의해 얻은 막전류-막전압 자료를 사용하여 Ca-channel의 전류-전압 특성곡선을 구성하였다. 이를 보다 자세하게 관찰하기 위하여 전류-전압 특성 곡선의 기울기(G_D , Dynamic conductance)를 산출하였다. G_D 는 Ca-channel의 voltage dependency를 반영하므로 G_D 의 변화양상을 나타내는 매개변수(onset potential, negative and positive G_D , transition potential, reversal potential)를 산출하여 Ca-channel의 전기적 특성을 표현하고자 하였다.

결과 및 고찰

18 개의 세포로부터 앞서 설명한대로 Ca-channel의 막전류-막전압 특성 곡선과 Dynamic conductance(G_D) 변화를 측정하였다. 막전압(V_m)이 Resting potential(V_r)로부터 증가함에 따라 세포내로 유입되는 막전류(I_m)가 증가하였다($I_m < 0$). 이에 따라 G_D 는 음의 값(Negative conductance)을 가지며 I_m 의 크기가 최대가 되는 V_m 을 기점으로 양의 값(Positive conductance)으로 반전하였다. V_m 이 더욱 증가하면 I_m 은 세포밖으로 유출되었다($I_m > 0$). 그 대표적인 측정 예를 그림 3에 보였다. 그림 3에서 $V_m < -30$ mV 영역에서는 $I_m \approx 0$ 으로써 Ca-ion의 유입은 거의 없었다. $V_m = -30 \sim -20$ mV에서 Ca-ion의 유입이 시작되어 그 정도는 $V_m = 10 \sim 20$ mV일 때 최대치를 가지며 V_m 이 60 mV 이상이 되면 Ca-ion은 반대로 세포밖으로 유출되었다($I_m > 0$). 이와같은 I_m - V_m 관계에 따라 G_D 는 Negative 및 Positive conductance 영역으로 구분되며 그 변화는 그리 크지 않았다. 이는 I_m - V_m 관계가 거의 선형적인 관계를 가지는 것을 의미한다. 그러나 이는 V_m 의 크기에 따라 열리게 되는 채널의 수가 변화할 것이므로 일반적인 현상이라고는 볼 수 없을 것이다.

위에 설명한 I_m - V_m 및 G_D - V_m 의 변화 양상에 따라 Ca-channel의 전기적 특성을 나타내는 매개변수들을 다음과 같이 설정하였다.

- Onset potential (V_{ON}) : Ca-ion이 유입되기 시작하는 막전압.
- Transition potential (V_{tr}) : G_D 가 반전되는 막전압 (I_m 의 크기가 최대가 되는 막전압).
- Reversal potential (V_{OFF}) : Ca-ion이 유출되기 시작하는 막전압.
- Negative conductance (G_N) : Ca-ion의 유입 정도

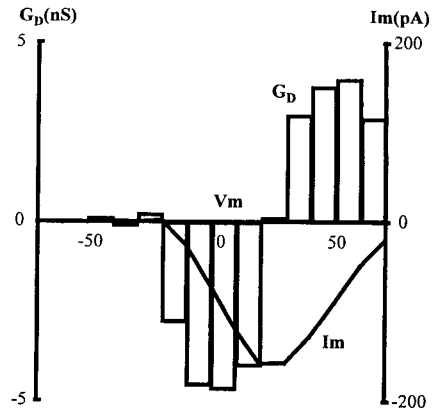


그림3. 흰쥐의 부신수질 세포의 Ca-ion channel의 전기적 특성곡선: V_m =transmembrane potential, I_m =Ca-ion current, G_D =Dynamic conductance.

가 가장 크게 증가하는 막전압에서의 G_D .

- Positive conductance (G_P) : Ca-ion의 유입 정도가 가장 크게 감소하는 막전압에서의 G_D .

Ca-ion을 통과시켜 세포의 분비작용을 조절하는데 중요한 역할을 하는 Ca-channel은 막전압에 관계되므로 위에 설정한 5개의 매개변수들은 Ca-channel의 voltage-dependency를 정량적으로 나타내는 한 방법이 될 것이다. 그림 3에 보인 세포의 예에서 측정된 매개변수들의 값을 아래표에 정리하였다.

| Parameter | Value |
|-----------|---------------------|
| V_{ON} | -30 ~ -20 mV |
| V_{tr} | 10 ~ 20 mV |
| V_{OFF} | > 60 mV |
| G_N | -5 nS(nano Siemens) |
| G_P | +4 nS |

본 연구에서 위의 5 가지 매개변수들을 설정한 것은 Ca-channel의 voltage-dependency를 정량적 수치로 제공하기 위함이다. V_{ON} 과 V_{OFF} 는 채널이 열려 Ca-ion이 유입되어세포의 분비작용을 유발시키는 막전압의 범위를 의미하고 V_{tr} 은 그 유입속도의 변화를 나타내는 Kinetic(Dynamic) parameter에 해당한다. 위의 5개 매개변수들의 수치로부터 Ca-channel의 개폐현상 혹은 Ca-ion의 유입이 막전압에 따라 일어나는 전기적 특성을 모두 정량적으로 추리할 수 있다.

Ca-ion이 신경세포로 유입되어 생체정보 전달기전에 관여하는 신경전달물질(Neurotransmitter)의 세포의 분비작용(exocytosis)을 trigger 시킨다는 사실이 밝혀지면서 Ca-ion의 생리적 중요성이 부각되었다. Ca-ion은 다른

흰쥐 부신수질 세포에서 Voltage-dependent Ca⁺⁺ 채널의 전기적 특성에 관한 연구

이온들과 마찬가지로 선택적인 이온채널을 통하여 세포내로 유입되며 이들 채널은 막전압의 변화에 따라 그 개폐여부가 결정된다. 이는 생체정보가 신경세포의 활동전압(action potential)을 통하여 전달되기 때문에 막전압을 통하여 세포의 분비작용을 조절하기 위함이다. 따라서 Ca-channel의 전기적 특성을 밝히는 것은 생체정보 전달기전을 규명하기 위한 선결 과제이다. 이온채널의 전기적 특성은 막전류-막전압 특성곡선으로 나타내는 것이 일반적이다. 그러나 이는 특성곡선의 전체적인 패턴에만 의존하는 것으로서 추상적인 개념만을 이해할 수 있다. 본 연구에서는 막전류-막전압 특성곡선과 Dynamic conductance-막전압의 변화양상을 정량적으로 나타낼 수 있는 5개의 매개변수를 설정하였다. 이들은 모두 Ca-ion의 세포내 유입현상의 조건과 크기를 정량적으로 나타내도록 고안하였다. Ca-ion의 생리적 중요성이 부각되면서 국내에서도 Ca-ion에 의한 막전류-막전압 특성 곡선이 측정된 바 있으나[5] 이로부터 Ca-channel의 전기적 특성을 정량적으로 분석한 경우는 없다. Ca-ion에 의한 신경전달물질의 조절현상기전과 약물효과등 이의 임상응용을 위하여는 Ca-channel의 전기적 특성을 정량적으로 나타내는 것이 필수적이다. 본 연구에서는 Ca-ion이 채널을 통해 유입됨에 따라 나타나는 막전류와, 막전류가 막전압에 따라 변화하는 voltage-dependency를 막전류-막전압 특성 곡선으로 관찰하고 이로부터 부수적으로 얻어지는 Dynamic conductance로부터 5개의 정량적 매개변수를 설정하여 Ca-channel의 전기적 특성을 나타내고자 제안하였다. 이는 여러 실험적 조건 간의 특성 비교에 요긴하게 사용될 수 있을 것이다. Ca-ion의 세포 내 유입을 위하여 Ca-channel이 개폐하는 것은 채널을 구성하는 단백질의 conformational change에 기인하며 이는 전기적 특성 변화를 유발하므로 Ca-channel의 전기적 특성의 측정 결과에 기초하여 채널의 구체적인 모델을 개발하는 것이 향후 과제일 것이다.

Acknowledgement

이 연구는 1992년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임. (과제번호 : 92-14-00-42)

참고문헌

1. Charlton MP, Smith SJ, and Zucker RS. Role of presynaptic calcium ions and channels in synaptic facilitation and depression at the squid giant synapse. *J. Physiol.* 323:173-193, 1982.
2. Douglas WW. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells.

Br. J. Pharmacol. 34:451-474, 1968.

3. Hodgkin AL, Huxley AF, and Katz B. Measurement of current voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116:424-448, 1952.

4. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Pflügers Archiv.* 391:85-100, 1981.

5. Kim J, Leem CH, and Kim SJ. Effect of various divalent ions on the calcium current of adrenal medullary chromaffin cells in the rat. *Kor. J. Physiol.* 26 :113-122, 1992.