

## 랫드 척수후각 단일세포 분리 및 특성에 관한 연구

서울대학교 수의과대학 약리학교실

한 성 규 · 류 판 동

= Abstract =

### Isolation and Electrical Characterization of the Rat Spinal Dorsal Horn Neurons

Seong Kyu Han and Pan Dong Ryu

*Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine,  
Seoul National University*

The spinal dorsal horn is the area where primary afferent fibers terminate and cutaneous sensory information is processed. A number of putative neurotransmitter substances, including excitatory and inhibitory amino acids and peptides, are present in this region. In this study, single neurons of the spinal dorsal horn were acutely isolated and the properties of whole cell current and responses to excitatory and inhibitory neurotransmitters were studied by patch clamp technique.

Transverse slice(300  $\mu\text{m}$ ) of lumbar spinal cords from young rats(7~14 days) were sequentially treated with two proteases(pronase 0.75 mg/ml and thermolysin 0.75 mg/ml), then single neurons were mechanically dissociated. These neurons showed near-intact morphology such as multipolar, ellipsoidal and bipolar, and pyramidal cells and we recorded the typical whole cell currents of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and ligand-operated channels from these neurons. Glutamate(30  $\mu\text{M}$ ) and N-methyl-D-aspartate(NMDA, 30  $\mu\text{M}$ ) induced inward currents of  $117 \pm 12.4$  pA(n=5) and  $49 \pm 6.9$  pA(n=3), respectively. Glycine(1  $\mu\text{M}$ ) potentiated glutamate-induced currents 4~5 times and NMDA-induced currents 8~10 times. In addition, glycine(30  $\mu\text{M}$ ) induced inward current ( $31 \pm 6.1$  nA, n=2), which was rapidly desensitized after the peak to a new steady-state level. However, the inward currents induced by  $\gamma$ -amino butyric acid(GABA, 1  $\mu\text{M}$ ) decreased continuously after the peak( $226 \pm 41.6$  pA, n=3) under the similar experimental condition.

The ionic currents and pharmacological responses of isolated neurons in this work were similar to those observed *in vivo* or *in vitro* spinal cord slice, indicating that acutely isolated neurons could be effectively used for further pharmacological studies.

---

**Key Words:** Spinal dorsal horn, Excitatory and inhibitory amino acids acutely-isolated neurons

## 서 론

척수후각(spinal dorsal horn)은 피부, 내부 장기, 근육 등으로부터 정보를 받아 그 감각 정보를 뇌에 전달하는 기능을 하며 다양한 형태의 개재 신경(interneuron)과 상행 투사 신경(ascending projection neuron)으로 구성되어 있고 지금까지 보고된 거의 모든 신경 전달 물질과 신경 펩타이드가 존재하는 것으로 알려져 있다(Willis 등, 1991). Patch clamp(Hamil 등, 1981)기법은 이런 세포의 전기적 활성을 기록하는데 유용하게 이용되는데, 일반적으로 patch clamp 방법에는 주로 배양된 세포를 사용하거나 단백분해효소처리 및 기계적인 방법으로 조직에서 급속 분리한 단일 세포, 또는 조직 절편이 사용된다. 배양된 세포를 이용하는 방법은 단일 세포 분리에 필요한 노력을 절감할 수 있는 장점이 있으나 배양 조건이나 배양 시간에 따라 생체와 다른 성질을 가질 수 있고, 또한 미분화된 세포 등 제한된 종류의 세포만이 배양될 수 있는 단점이 있다. 이러한 배양된 세포의 단점을 보완하기 위하여 Kay와 Wong 등(1986)은 성숙한 포유동물의 중추신경 조직에서 단백분해효소 처리와 기계적인 방법으로 단일 세포를 분리하여 전기적인 활성을 기록하였으며, 최근 해마 등 여러 부위의 뇌신경 조직에서 단일 세포를 분리하여 전기적 활성을 기록하는데 널리 쓰이고 있다(Rusin 등, 1991; Kolaj 등, 1995; Wang 등, 1995). 한편, 분리된 세포를 이용하는 방법은 단일 세포의 활성을 쉽게 기록할 수 있지만 신경전도 및 다른 신경세포와의 상호작용 등을 조사하는데는 한계가 있다. 반면에 조직 절편에 직접 적용하는 blind patch법(Blanton, 1989)은 배양 세포나 급속 분리된 세포에는 보존되지 않는 신경회로가 그대로 존재하므로 신경 전달 및 신경세포 간의 상호작용 등을 조사하는데 유리한 면이 있다. 그러나 이 방법도 긴 신경돌기 때문에 막전압 고정(voltage clamping)이 불완전한 단점이 있다(Yoshimura 등, 1993).

본 연구는 위 방법들 중 척수후각 조직의 신경세포를 급속분리하고, 막전압 고정기법을 이용하여 척수후각 신경에서의 ①  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  및  $\text{Ca}^{2+}$  전류의 분리, ② 흥분성(glutamate) 및 억제성(glycine, GABA) 신경전달물질들의 약리적 작용, ③ glycine에 의한 glutamate와 NMDA 반응에 대한 상승작용을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 랫드 척수후각 신경세포 분리

단일 척수후각 신경세포는 암수 구분 없이 7~14일령 Sprague Dawley종의 랫드 척수절편으로부터 단백분해효소 처리와 기계적인 방법을 이용하여 분리하였다. 척수 절편은 실험 동물을 diethyl-ether로 마취한 후 척수의 요추부분을 적출하여  $\text{O}_2/\text{CO}_2(95\%/5\%)$ 로 포화된  $4^\circ\text{C}$ 의 인공뇌척수액에 넣고 척수의 배근(dorsal root)과 복근(ventral root) 및 피막을 제거한 다음 agar block에 순간 접착제(cyanoacrylate adhesive)를 이용하여 척수 조직을 고정시키고 Vibroslicer(World Precision Instrument Co, USA)를 이용하여  $300\ \mu\text{M}$  두께로 만들었다(Murase 등, 1983). 척수 절편은 평형에 도달할 때까지  $36^\circ\text{C}$  인공뇌척수액에 1시간 이상 보관한 후 단백분해효소인 pronase(Calbiochem,  $0.75\ \text{mg/ml}$ )와 thermolysin(Sigma,  $0.75\ \text{mg/ml}$ )으로 각각 10분간 처리하고 ethylene glycol-bis-tetraacetic acid(EGTA,  $2\ \text{mM}$ )를 함유한  $50\ \text{ml}$  인공뇌척수액에 10분간 보관하였다. Pronase와 thermolysin으로 처리된 척수 절편을 hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid(HEPES) 완충액이 담겨있는 배양용기(Tissue culture dish/ $35\ \text{mm}$ , Corning, N.Y. 14831)에 옮기고 현미경(Stereo Zoom)하에서  $1\ \text{ml}$  주사기 바늘을 이용하여 척수후각 부분만을 분리하였다. 분리된 각각의 척수후각 조직을  $1.5\ \text{ml}$ 의 HEPES 완충액이 담겨있는 다른  $35\ \text{mm}$  배양용기에 옮겨 작은 피펫속으로 조직을 흡입-분출하는 과정을 반복하여 단일세포를 분리하였다. 분리 후 배양용기

바닥에 붙도록 약 30분 동안 방치한 후 실험에 사용될 때까지 상온에서 humidified O<sub>2</sub>가 분사되는 용기에 보관하였다. 인공뇌척수액은 NaCl 124, KCl 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.3, CaCl<sub>2</sub> 2.4, NaHCO<sub>3</sub> 26, Glucose 10 mM로 조성하였으며 HEPES 완충용액은 NaCl 150, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10, Glucose 10 mM로 조성하고 pH는 tris-base를 첨가하여 7.4로 조정하였다. EGTA를 함유한 인공뇌척수액의 조성은 NaCl 124, KCl 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.3, EGTA 2, NaHCO<sub>3</sub> 26, Glucose 10 mM로 조정하였다 (Murase 등, 1989a). 특히 세포 분리시 효소처리 이후 척수후각부분을 떼어내어 작은 피펫으로 조직을 흡입-분출하는 과정에서 조직이 가급적 피펫에서 멀리 벗어나지 않도록 하여 조직에 가하는 충격을 되도록 줄이도록 주의하였다.

## 2) 전류의 기록 및 분석

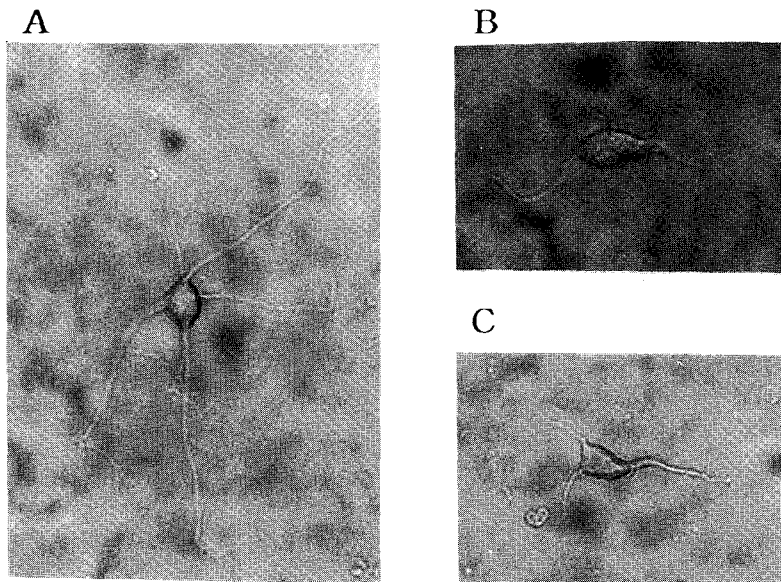
분리된 척수후각 신경세포가 담겨 있는 35 mm

배양용기를 도립현미경(Inverted microscope, Olympus CK2, Japan) 위의 plate에 옮기고 patch clamp용 신호증폭기(Nihonkoden, CEZ2300, Japan)로 전류를 기록하였다. 유리미세전극은 내경 1 mm 외경 1.5 mm의 가는 유리관(World Precision Instruments)을 미세전극제조기(Microelectrode puller PP83, Narishige, Japan)로 만들어 사용하였다. 전류는 5 kHz로 여과한 후 A/D converter(TL-1 Labmaster)와 pClamp6 소프트웨어를 이용하여 컴퓨터에 직접 기록하고 분석하였다. 약물의 적용은 1초 이내에 교체가 가능한 Y자 관을 사용하여(Murase 등, 1989a) 세포로부터 100~200 μm 정도의 거리에서 0.3 ml/min의 속도로 적용하였으며, 용액은 peristaltic pump를 이용하여 배출시켰다.

## 결 과

### 1) 단일세포의 분리

Fig. 1 A, B, C는 pronase와 thermolysin을 처



**Fig. 1.** Single spinal dorsal horn neurons isolated from superficial laminae of 7-day-old (A and C), and 8-day-old (B) rats by the method described in Materials and Methods. Multipolar (A), ellipse and bipolar (B), and pyramidal cells (C) are shown ( $\times 300$ ).

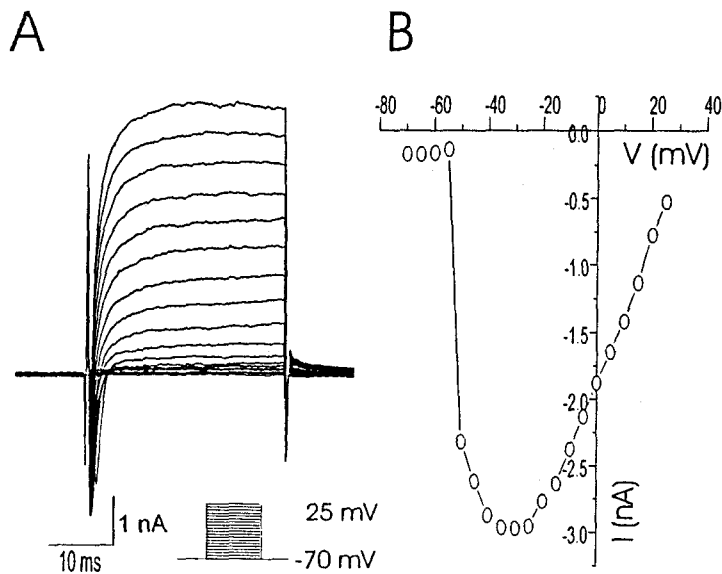
리하고 Murase등(1989a)의 방법을 병용하여 분리한 단일 척수후각 신경세포의 모양이다. 돌기가 사방으로 나 있는 것(Fig. 1A), 돌기가 한쪽 방향으로만 있는 것(사진 제시하지 않음), 타원형이며 양쪽에 돌기를 가진 것(Fig. 1B), 피라미드 모양의 것(Fig. 1C)등 다양한 종류의 세포들을 얻을 수 있었다. 일부 돌기들이 절단된 경우에도 세포체가 밝게 빛나고 윤곽이 뚜렷한 세포의 경우 전기적 활성은 그대로 유지되었다. 이중 본 실험에서는 dendrite가 대부분 절단된 원형이나 타원형의 세포에서 전류를 기록하였다.

## 2) 척수후각신경의 단일세포 전류

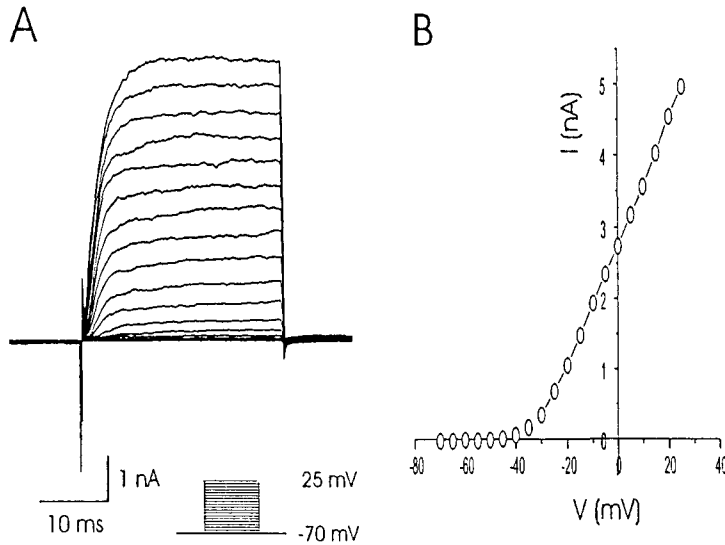
Fig. 2A는 분리된 척수후각 신경세포에서 유지 전압을  $-70$  mV로 하고 30 ms 동안  $-70$  mV부터  $+20$  mV까지 5 mV 간격으로 막전압을 증가시켰을 때 나타나는 전류의 모양이다. 처음 1~1.5

ms에 최고 크기에 도달하고 빠르게 불활성화 되는 내향성 전류가 기록되었는데 정점에서의 전류의 크기는  $3.3 \pm 0.65$  nA( $n=8$ )이었다. 초기 내향성 전류가 작아지고 이어서 외향성 전류가 활성화되었는데 이 외향성 전류의 크기는 30 ms 자극을 적용하는 동안 끝까지 유지되었다. Fig. 2A에서 보이는 내향성 전류는 초기에 빠르게 활성화되고 다시 불활성화되는 성질, 그리고 Fig. 3A에서 처럼  $\text{Na}^+$  채널 차단제인 tetrodotoxin(TTX,  $0.5 \mu\text{M}$ )에 의하여 차단되는 것으로 보아 잘 알려진  $\text{Na}^{2+}$  전류임을 알 수 있었다(Hille, 1992). Fig. 2B는 이 내향성 전류의 전압과의 관계 그래프를 나타낸 것으로  $-50$  mV에서 이 전류가 갑자기 활성화됨을 보여주고 있다.

Fig. 3A는  $\text{Na}^+$  전류를 선택적으로 차단하는 TTX( $0.5 \mu\text{M}$ ) 존재 하에 Fig. 2에서와 같은 방법으로 기록한 전류로 Fig. 2A에서 초기에 나타나



**Fig. 2.** A, Whole cell current records of an acutely-isolated dorsal horn neuron isolated from 14-day-old rat under voltage-clamp at  $V_H = -70$  mV and step pulse from  $-70$  to 25 mV. Microelectrode solution contained K-Asp 120, KCl 20, NaCl 10,  $\text{MgCl}_2$  1,  $\text{CaCl}_2$  0.5,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10, MgATP 3, leupeptin 0.1 mM and titrated with tris base to pH 7.2. External solution contained NaCl 150, KCl 5,  $\text{CaCl}_2$  2, HEPES 10, Glucose 10,  $\text{MgCl}_2$  1 mM. Note that depolarizing steps evoked fast inward currents followed outward currents. B, Current-voltage relation at the peak of inward currents.



**Fig. 3.** A, Current features under voltage clamp at  $V_H = -70$  mV and step pulse from  $-70$  to  $25$  mV. External solution contained NaCl 150, KCl 5,  $\text{CaCl}_2$  2, HEPES 10, Glucose 10,  $\text{MgCl}_2$  1 mM and TTX  $0.5$   $\mu\text{M}$ . Note that fast inward currents were blocked. Other conditions are the same as in Fig. 2. B, Current-voltage relation at steady-state.

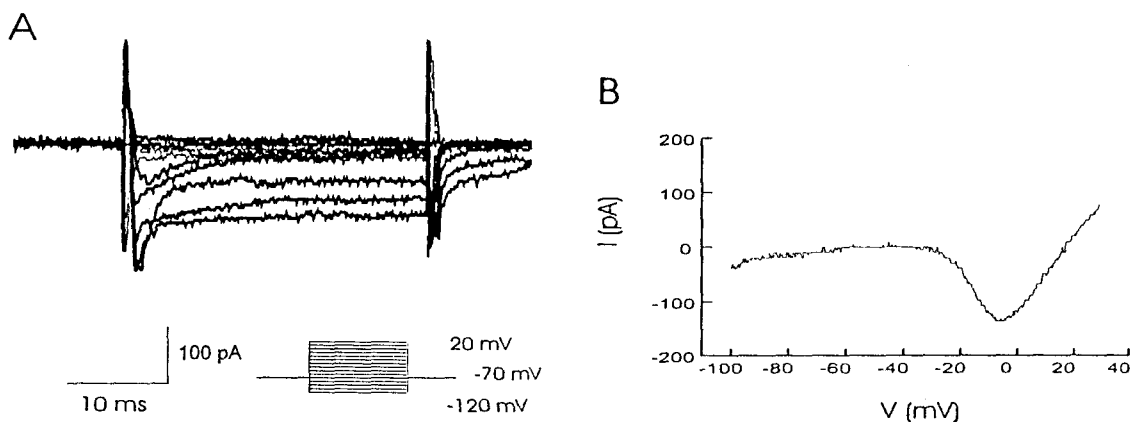
는 내향성 전류가 나타나지 않았으며 Fig. 2A와 Fig 3A의 외향성 전류는 비슷한 양상을 보였다.  $30$  ms의 시점에서 측정된 이 전류의 크기는 최고  $4.2 \pm 0.26$  nA( $n=8$ )를 나타내었다. Fig. 3B에서 보인 전류와 전압과의 관계 그래프에서 볼 때 이 전류가  $-40$  mV에서 활성화되기 시작하여  $0$  mV를 지나면서 급격하게 활성화됨을 알 수 있다. 또한 이 그래프는 Murase(1989b)등에 의해 기록된  $\text{K}^+$ -전류 관계 그래프와 아주 유사하였다.

Fig. 4A는 피펫용액의 K-aspartate를 CsCl로 대체하고 외부 관류용액에  $20$  mM  $\text{K}^+$  채널 차단제인 tetraethylammonium(TEA,  $20$  mM)과  $0.5$   $\mu\text{M}$  TTX를 추가하여  $\text{K}^+$  전류와  $\text{Na}^+$  전류가 대부분 차단된 상태에서 유지전압을  $-70$  mV로 하고  $-120$  mV부터  $+20$  mV까지  $10$  mV간격으로 막전압을 변화시켜 주었을 때 나타나는 전류의 모양이다. Fig. 2A와 5A에서와는 다르게 상대적으로 작고(최고  $0.2$  nA), 불활성화되지 않는 내향성 전류가 관찰되었다. Fig. 4B는 램프 프로토콜

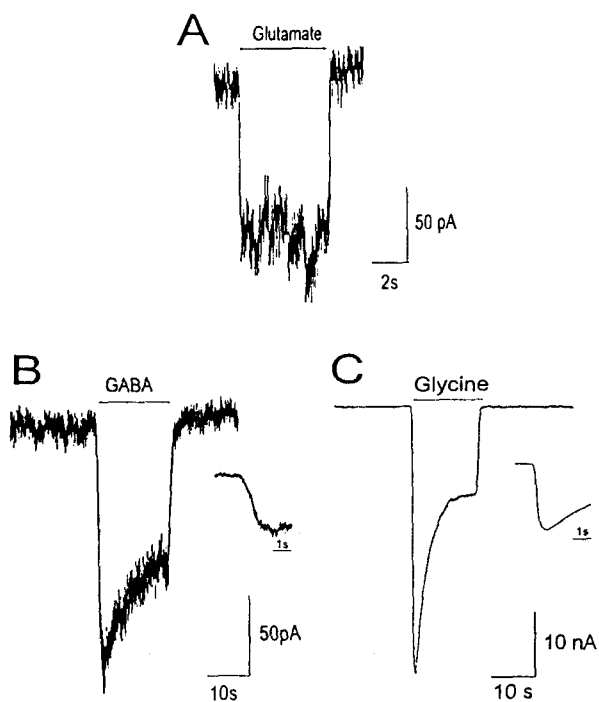
(ramp protocol)을 이용하여 기록된 이 전류의 전류-전압관계 그래프로 전형적인  $\text{Ca}^{2+}$  전류의 모양을 나타내었다. 즉  $-30$  mV에서 활성화되기 시작하여  $-5$  mV에서 최고도에 달하고  $+20$  mV 정도에서 역전되었으며 이는 Murase등(1989b)의 자료와도 일치하였다. 따라서 Fig. 2A에서의 전류는 대부분  $\text{K}^+$  전류라 할 수 있지만  $\text{Ca}^{2+}$  전류가 함께 섞여 있다고 할 수 있다.

### 3) 흥분성, 억제성 신경전달물질에 의한 전류

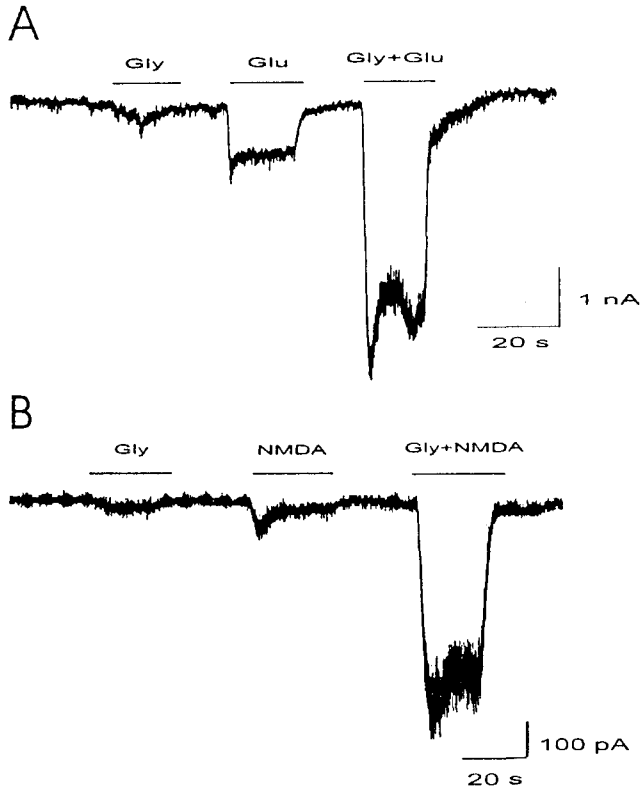
Fig. 5는 흥분성 신경전달물질인 glutamate와 억제성 신경전달물질인  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), glycine에 의한 내향성 전류를 보여주고 있다. 피펫내 용액은 KCl  $140$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5$ ,  $\text{MgCl}_2$   $1$ , EGTA  $5$ , HEPES  $10$ , MgATP  $3$ , leupeptin  $0.1$  mM로 조성하고 tris base를 이용해 pH  $7.2$ 로 맞추었으며 bath 용액은 NaCl  $150$ , KCl  $5$ ,  $\text{CaCl}_2$   $2$ , HEPES  $10$ , Glucose  $10$  mM로 조성하고 tris base를 이용해 pH  $7.4$ 로 적정하였



**Fig. 4.** A, Current features under voltage clamp at  $V_H = -70$  mV and step pulse from  $-120$  to  $20$  mV. K-Asp was replaced with CsCl in pipette solution and TEA ( $20$  mM) and TTX ( $0.5$   $\mu$ M) were added to external solution to block  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents, respectively. Other conditions are the same as in Fig. 2. B, Slow inward current evoked by a ramp command of  $1$  s from  $-120$  to  $+30$  mV.



**Fig. 5.** Current responses elicited by excitatory and inhibitory amino acids in isolated dorsal horn neurons at  $V_H = -70$  mV. A, Glutamate ( $30$   $\mu$ M); B, GABA ( $1$   $\mu$ M); C, Glycine ( $30$   $\mu$ M). Initial current responses of GABA and Glycine are shown in insets in B and C at a faster time scale. Horizontal bars indicate duration of drug application. Pipette solution contained CsCl  $140$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0.5$ ,  $\text{MgCl}_2$   $1$ , EGTA  $5$ , HEPES  $10$ , MgATP  $3$ , leupeptin  $0.1$  mM and titrated with tris base to pH  $7.2$ . External solution contained NaCl  $150$ , KCl  $5$ ,  $\text{CaCl}_2$   $2$ , HEPES  $10$ , Glucose  $10$  mM and titrated with tris base to pH  $7.4$ .



**Fig. 6.** Potentiation of NMDA-induced current by glycine. Inward currents induced by bath-application of glutamate(30  $\mu$ M, A) or NMDA(0.1 mM, B) were potentiated by coadministration of glycine(1  $\mu$ M). Other recording conditions are the same as in Fig. 5.

다. Glutamate(30  $\mu$ M)는 약  $117 \pm 12.4$  pA(n=5)의 내향성 전류를 유발하였고 이 전류는 glutamate가 없는 대조 용액으로 대체되었을 때 곧 소실되었다. 또한, GABA(1  $\mu$ M)에 의해  $226 \pm 41.6$  pA(n=3), glycine(30  $\mu$ M)에 의해서도 적용기간 동안  $31 \pm 6.1$  nA(n=2)의 내향성 전류를 유발하였다. 이런 내향성 전류가 최대 크기의(1-1/e)배로 증가되는데 걸리는 시간은 GABA의 경우 894 ms이었고 glycine의 경우  $260 \pm 38$  ms이었다. Glutamate에 의한 내향성 전류는 약물적용기간동안 크기가 감소되지 않았으나 GABA에 의한 내향성 전류는 계속해서 빠르게 크기가 감소하는 경향을 보였으며(Fig. 5B) glycine에 의한 내향성 전류는 초기에만 빠르게 크기가 감소하고 이후 거

의 일정한 상태에 도달하는 두 가지 양상을 나타내었다(Fig. 5C). Glycine에 의한 내향성 전류의 경우 최고 크기의 1/e배로 감소되는 데까지 걸리는 시간은  $8.5 \pm 0.64$  sec이었으며 GABA의 경우 일정하게 전류의 크기가 감소되는 경향을 보였고 최고 크기의 1/e로 감소되는 시간은  $30 \pm 1.1$  sec로 glycine에 비해 훨씬 탈감작 속도가 낮았다. 특히 glycine에 의한 내향성 전류는 GABA의 경우와는 다르게 두 개의 time constant를 갖고 다음과 같은 식에 의하여 fitting이 되었다.

$$Y = Y_0 + Ae^{-x/a} + Be^{-x/B}$$

위 식에서 x는 glycine 적용시간(sec)이며 Y는 적용시간에서 기록된 전류의 크기의 절대값이다.

위 식에 해당하는 매개변수들로  $\alpha$ 는 초기 현저하게 감소되는 부분에서 전류의 크기가  $Y_0$ 의 1/e 배로 감소되는데 걸리는 시간으로 2.8 초이었으며,  $\beta$ 는 이후 서서히 감소하는 부분에서 전류의 크기가  $Y_0$ 의 1/e 배로 감소되는데 걸리는 시간으로 66.7 초이었다. 또한 A와 B는 두성분의 가상적인 초기( $t=0$ ) 값으로 각각 27.6, 5.8 nA이었으며  $Y_0$ 는  $x \rightarrow \infty$  일때 평형에 도달하는 가상전류의 크기로 8.1 nA이었다. 이런 fitting에 의한 결과로 보아 glycine의 탈감작 과정은 두 가지의 기전이 있음을 확인할 수 있었다.

Fig. 6은 glutamate와 NMDA에 의한 내향성 전류가 glycine을 추가해 주었을 때 상승 효과를 나타내고 있음을 보여주고 있다. 30  $\mu$ M의 glutamate와 1  $\mu$ M의 glycine을 단독으로 적용하였을 때보다 동시에 적용하였을 때 전류의 크기가 4~5배 정도 증가되었으며( $n=4$ ), 0.1 mM NMDA와 1  $\mu$ M의 glycine을 적용하였을 때에도 8~10배 정도의 상승 효과를 관찰할 수 있었다( $n=3$ ).

## 고 찰

감각정보 처리의 1차 세포인 척수후각신경의 성질을 연구하기 위하여 효소처리와 기계적인 방법을 이용하여 세포를 분리하고 분리된 세포로부터 patch clamp 기법을 이용하여 전류를 기록하였다. 본 연구에서 기록된 단일 신경세포의 전류들은 척수후각 절편에서 single-electrode voltage clamp 법에 의하여 선협자들이 얻은  $K^+$  전류, high-voltage activated  $Ca^{2+}$  전류(Murase 등, 1989b; Ryu 등, 1990)와 거의 유사하여 분리된 세포가 생체에서의 전기적인 활성을 잘 유지하고 있음을 알 수 있었다.

조직에서 세포를 직접 분리하여 기록하는 방법은 배양된 세포가 가지는 단점인 생체와 다를 수 있는 점을 보완하기 위하여 고안된 것으로 본 연구에 이용한 단일세포는 Gray와 Johnston(1985)의 방법을 변형하여(Murase, 1989a) Fig. 1 A, B, C에서와 같이 수상돌기와 축삭등이 비교적 온

전한 상태인 삼각형, 원형, 타원형 모양의 세포를 분리할 수 있었다. 척수는 해부학적 위치에 따라 배측으로부터 10개의 층(Lamina I-IX)으로 나누는데 이중 Lamina I-VI가 척수후각부분을 구성한다(Rexed, 1952). Lamina I에는 cell body의 크기가 다양한 세포들이 존재하는데 이중 상대적으로 드물고 크기가 큰 marginal cell이 존재한다. 이 세포는 1888년 Waldeyer의 척수 Golgi 염색에 의하여 확인되었는데 수상돌기가 대부분 척수후각 표면 사방으로 퍼져 있고 회질 부분으로의 침투는 아주 적다(Willis 등, 1991). Fig. 1A에서 보이는 세포는 회백질의 lamina I에 있는 marginal cell, Fig. 1B에서 보여주고 있는 세포는 타원형이며 돌기를 양쪽방향으로 내는 것으로써 laminar II의 islet cell과 stalked cell, 그리고 Fig. 1C에서 보여주고 있는 삼각형 모양의 세포는 laminar III의 pyramidal cell로 여겨진다(Willis 등, 1991). 이렇게 분리된 세포에서의 기록들은 척수후각에서 모양과 기능이 알려진 이들 세포의 전기적 활성과 약물에 대한 반응성의 차이를 조사하는데도 유용하게 이용될 것으로 보인다.

Glutamate 수용체는 선택적인 효현체에 따라 N-methyl-D-aspartate(NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid(AMPA), 그리고 kainate 수용체로 분류된다(Watson 등, 1996). 이 세가지 subtype은 주로  $Na^+$ 의 전도에 의해 효과를 내는데 이중 NMDA receptor는 다른 subtype과는 달리 channel kinetics가 느리고  $Mg^{2+}$  존재시 활성이 억제되며 막전압 의존성이 있고  $Ca^{2+}$  전도도가 크다(Ascher 등, 1988; Lester 등, 1990). Fig. 6에서 보는 바와 같이 glycine과 glutamate를 동시에 적용하였을 때, glutamate 단독으로 적용하였을 때보다 4~5배 정도 전류의 크기가 증가하였고 glycine과 NMDA를 동시에 적용하였을 때 NMDA 단독 적용 시보다 약 8~10배 정도 전류의 크기가 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이는 glycine을 NMDA나 glutamate와 같이 적용하였을 때 NMDA나 glutamate에 의한 전류의 불활화 정도를 농도 의존적으로 감소시킨다는 사실



과(Mayer 등, 1989), 수용체-약물 결합 실험에서 수용체에 대한 glutamate의 친화도가 glycine 결합 부위에 glycine이 결합되어 있을 때보다 partial agonist인(+)-HA-996이 결합되어 있을 때 감소된다는 사실(Priestley 등, 1994), NMDAR1 subunits의 mutagenesis에서 일부분이 glycine 결합에 결정적인 역할을 하며 이 부분의 mutation에 의하여 glutamate efficacy는 별 영향을 받지 않으나 glycine antagonist에 의한 channel gating의 억제는 유의성 있는 감소를 나타낸다(Kuryatov 등, 1994)는 보고에서처럼 glycine이 NMDA 수용체에 NMDA와 coagonist로 작용한다는 사실(Johnson과 Ascher, 1987)을 확인한 결과라 하겠다.

GABA( $\gamma$ -amino butyric acid)는 뇌, 척수 및 망막에 존재하고 기타 몇몇 자율신경절에서 발견되기도 하지만 그 외 말초신경에서는 찾아볼 수 없는 억제성 중추신경전달물질이다. 중추신경의 GABA 수용체는 GABA<sub>A</sub> 수용체와 GABA<sub>B</sub> 수용체의 두 가지 subtype으로 구분된다(Watson 등, 1996). 억제성 신경전달물질인 glycine과 GABA는 Cl<sup>-</sup> channel을 활성화시켜 생체에서는 외부로부터 Cl<sup>-</sup> 이온이 세포내로 유입되어 세포내 과분극을 일으킨다. 본 실험 조건에서는 세포내와 세포외의 Cl<sup>-</sup> 이온의 농도를 143/150 mM로 조성하였기 때문에 세포내가 세포외보다 적은 농도이지만 -70 mV의 유지전압에 의한 electrical driving force에 의하여 세포내 Cl<sup>-</sup>가 세포외로 유출될 것이다. 따라서 GABA와 glycine에 의해서 생기는 음이온의 유출은 Fig. 5B, C처럼 양이온의 유입과 같이 내향성 전류로 나타난다. Fig. 5B, C는 GABA와 glycine에 의한 반응의 탈감작 양상에 있어서 GABA의 반응은 느리고 반면에 glycine의 반응은 상대적으로 빠르며 두가지 성분으로 구성되어 있음을 알 수 있다. 뿐만 아니라 이 두 신경전달물질에 의한 전류의 활성화 과정에서도 glycine이 빠르게 나타났다. 이러한 사실은 활성화되었을 때 Cl<sup>-</sup> 전류를 증가시키는 면에서는 일치하나 이들 수용체의 분자수준에서의 작용기전(mo-

lecular mechanism)은 다름을 뚜렷이 암시하고 있다. 추후 이들 수용체의 구조에 대한 자료를 근거로 이러한 작용상의 차이점에 대한 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

## 결 론

1) 척수절편조직을 효소처리하여 척수후각신경에서 유래하는 다극 모양, 양극이며 타원형인 모양, 삼각형 모양의 단일세포를 분리하였다.

2) 척수후각신경에서 기록된 단일세포전류는 TTX(0.5  $\mu$ M)에 의해 억제되는 Na<sup>+</sup> 전류와 TEA(20 mM)에 의해 억제되는 K<sup>+</sup> 전류, 그리고 TEA와 TTX를 처리하였을 때 분리되는 Ca<sup>2+</sup> 전류 등이 있었다.

3) 흥분성 신경전달물질인 glutamate(30  $\mu$ M)에 의한 내향성 전류를 관찰할 수 있었고, 고농도의 세포내 Cl<sup>-</sup>에 의해 억제성 신경전달물질인 glycine(30  $\mu$ M)과 GABA(1  $\mu$ M)에 의해서도 탈감작되는 내향성 전류를 관찰할 수 있었으며 glutamate(30  $\mu$ M)와 NMDA(0.1 mM)에 의한 내향성 전류는 glycine(1  $\mu$ M)에 의하여 효과가 증강되었다.

## 참 고 문 헌

- Ascher P, Bregestovski P and Nowak L: *N-methyl-D-aspartate-activated channels in mouse central neurons in magnesium-free solutions*. *J Physiol Lond* 399: 207-226, 1988
- Blanton MG, Turco J and Driegstein A: *Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex*. *J Neurosci Meth* 30: 203-210, 1989
- Brown AG: *Organization in the spinal cord: The anatomy and physiology of identified neurons*. Springer-Verlag, Berlin 1981
- Gray R and Johnston D: *Noradrenaline and  $\beta$ -adrenoceptor antagonists increase activity of voltage-dependent calcium channels in hippocampal neurons*. *Nature(Lond)* 327: 620-

- 622, 1985
- Hamil OP, Marty A, Neher E, Sakman B and Sigworth F: *Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell free membrane patches. Pflug Arch* 391: 85-100, 1981
- Hille B: *Ionic channels of excitable membranes. 2nd. edition: 59-82, 1992 Sunderland, Massachusetts Sinauer Associates Inc*
- Iino M, Ozawa S and Tsusuki K: *Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. J Physiol* 424: 151-165, 1990
- Johnson JW and Ascher P: *Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons Nature(Lond)* 325: 529-531, 1987
- Jonas P and Sakmann B: *Glutamate receptor channels in isolated patches from CA1 and CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slices. J Physiol* 455: 143-171, 1992
- Kay and Wong: *Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. J Neurosci Meth* 16(3): 227-38, 1986
- Kolaj M, Cerne R and Randic M: *The opioid peptide dynorphin modulates AMPA and kainate responses in acutely isolated neurons from the dorsal horn. Brain Res* 671(2): 227-44, 1995
- Kuryatov A, Laube B, Betz H and Kuhse J: *Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. Neuron* 12(6): 1291-300, 1994
- Lester RA, Clements JD, Westbrook GL and Jahr CE: *Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. Nature* 346(6284): 565-7, 1990
- Mayer ML, Vyklícky LJ and Clements J: *Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. Nature* 338: 425-427, 1989
- Murase K, Randic M: *Electrophysiological properties of rat spinal dorsal horn neurons in vitro: calcium dependent action potentials. J Physiol Lond* 334: 141-153, 1983
- Murase K, Ryu PD and Randic M: *Excitatory and inhibitory amino acids and peptide-induced responses in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. Neurosci Lett* 103: 56-63, 1989a
- Murase K, Ryu PD and Randic M: *Tachykinins modulate multiple ionic conductances in voltage-clamped rat spinal dorsal horn neurons. J Neurophysiol* 61(4): 854-865, 1989b
- Priestley T and Kemp JA: *Kinetic study of the interactions between the glutamate and glycine recognition sites on the N-methyl-D-aspartic acid receptor complex. Mol Pharmacol* 46(6): 1191-6, 1994
- Rexed B: *The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. J Comp Neurol* 96: 415-466, 1952
- Rusin KI and Randic M: *Modulation of NMDA-induced currents by mu-opioid receptor agonist DAGO in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. Neurosci-Lett* 124(2): 208-12, 1991
- Ryu PD and Randic M: *Low-and high-voltage-activated calcium currents in rat spinal dorsal horn neurons. J Neurophysiol* 63: 273-285, 1990
- Wang RA, Cheng G, Kolaj M and Randic M: *Alpha-subunit of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II enhances gamma-amino butyric acid and inhibitory synaptic responses of rat neurons in vitro. J Neurophysiol* 73(5): 2099-106, 1995
- Watson S and Girdlestone D: *Receptor and ion channel nomenclature. Trends in Pharmacol Sci Suppl: 32-37, 1996 Elsevier Trend Journals*
- Willis WD and Coggeshall RE: *Sensory mechanism of spinal cord. 2nd ed. Plenum Press New York and London* 79-123, 1991
- Yoshimura M and Nishi S: *Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: Pharmacological properties of synaptic currents. Neuroscience* 53: 519-526, 1993