

생체내 흰쥐 해마 CA1 세포에서 가바성 억제에 대한 전기생리학 특성

최병주 · 조진화 · 김영진*

경북대학교 치과대학 치과약리학교실, 소아치과학교실*

국문초록

가바성 억제 신경세포는 해마의 정상적인 기능을 조절하는데 중요한 역할을 하며 해마 병변을 유발하는 중요한 요소이다. 본 연구는 in vivo 실험법을 사용하여 해마 CA1 영역에서의 전기 생리학적 반응을 측정함으로써 가바성 신경세포의 기능을 분석하고 이를 슬라이스 실험법과 비교하고자 하였다.

Fimbria-fonix 전기자극시 전형적인 population spike가 나타났고 10 μ M bicuculline 존재하에서는 전기자극에 의해 burst 형태의 population spike가 나타났다. Population spike의 크기는 자극 강도에 비례하였으며 그 숫자도 bicuculline 전극사용시와 같이 동일한 양상을 보였다. CA1 영역의 흥분성 수준을 측정하기 위해 paired-pulse 자극을 하였는데 짧은 자극 간격에서 억제성 반응을 보였고 burst 형태의 afterdischarge를 나타내었다.

CA1 영역에서 in vivo 실험법을 사용한 가바성 신경세포반응의 결과는 추체세포의 흥분성 조절을 효과적으로 분석할 수 있으며 in vitro 실험법에 비해 기능적 평가가 더욱 이상적임을 알 수 있다.

주요어 : bicuculline, 가바성 억제 세포, in vivo, paired-pulse inhibition, 해마

I. 서 론

해마의 가바성 신경세포는 CA1 영역의 추체세포의 활성을 억제함으로써 해마의 정상기능을 유지하는데 중요한 역할을 하며 또한 해마의 병리적 상태에도 관여한다¹⁾. 이러한 점을 고려할 때 억제성 신경세포의 신경망 특성을 이해하는 것은 매우 중요하다. 신경망 연결 구조를 연구한 보편적인 방법으로서 axon의 투사 영역을 확인하고 이러한 분지가 신경성 흥분을 미칠 수 있는 범위를 확인하는 방법이 많이 사용되고 있다. Struble 등²⁾은 Golgi 법을 사용하여 basket cell의 axonal arbor를 서술하였는데 axon은 450 μ m의 넓이로 퍼져 있으며 septotemporal 축을 따라 1100 μ m까지 뻗어져 있다고 하였다. 이러한 Golgi 실험법을 사용한 실험에서는 억제성 신경세포의 세포체 및 수지의 형태에 대한 구체적 분석은 가능하지만 신뢰성이 높도록 axon을 염색하지 못하는 단점이 있다. 또 다른 접근 방법으로서 최근 slice 법을 이용한 intracellular labelling 연구방법이 제시되어 여러 종류의 억제성 신경세포가 존재한다³⁾고 하였지

만 슬라이스를 만드는 과정에서 axon의 collateral이 절단되기 때문에 axon의 전체 범위를 측정할 수 없는 한계가 있다.

본 실험에서는 Golgi 법 및 slice 법의 이러한 한계를 피하기 위해 intact 흰쥐 뇌를 사용하여 전기생리학적 반응을 분석함으로써 해마내에서의 억제성 신경세포들의 기능적 역할을 규명하고자 하였다. 또한 억제성 신경세포가 해마의 상당한 영역에 영향을 미칠 수 있다는 가설을 검증하기 위해 완전한 (intact) 뇌에서 fimbria-fornix 영역을 자극하여 CA1 영역에서의 시냅스 반응을 관찰하였고 슬라이스 실험법에서의 보고들과 비교 고찰하였다. 만일 완전한 뇌 억제 신경세포가 원거리의 해마 영역에 영향을 미친다면 slice 법으로 일부 억제성 시냅스가 절단된 상태에서는 억제성 시냅스 입력을 보다 미약하게 받게 될 것이다.

II. 실험 재료 및 방법

자극용 전극 및 기록용 미세전극 설치, 세포막 특성 측정은 권 등⁴⁾의 보고와 동일하게 행하였는데 두개골 상방에 자극용 및

* 이 논문은 1998년도 경북대학교 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

기록용 전극을 위치시키고 맞교차입력을 자극하면서 기록용 전극을 통하여 반응을 확인하였다.

전기생리반응을 관찰한 후 2.5% neurobiotin을 세포내 주입하고 일정시간 경과후 4% paraformaldehyde를 사용하여 심장을 통해 관류 고정하였다. 그후 뇌를 적출하여 동일 고정액에 24시간 후 고정하였다. Vibratome을 이용해서 관상면 (coronal plane)에 평행하게 100 μ m 두께로 자른 후 0.1 M PB (phosphate-buffer solution, pH=7.4)에 담아두었다. 0.1 M PB로 3회 washing하고 Triton-X100 (0.5% in PB)으로 30분간 처리하고, TBS (0.05 M, pH=7.4)에 3회 washing 한 후 VECTASTAIN ABC kit (희석 1 : 100 in TBS)로 2

시간동안 반응시켰다. TBS로 3회 washing한 다음 DAB (3'-3-diaminobenzidine, 0.05%)를 이용해 발색반응을 시킨 후 광학현미경을 이용하여 관찰하였고 camera lucida를 이용하여 신경세포의 모양을 재구성하였다.

III. 결 과

1. 필드 전위 반응

Fimbria-fornix의 정방향 자극시 필드 PSP (postsynaptic potential)와 population spike가 나타났다. 대부분의 popu-

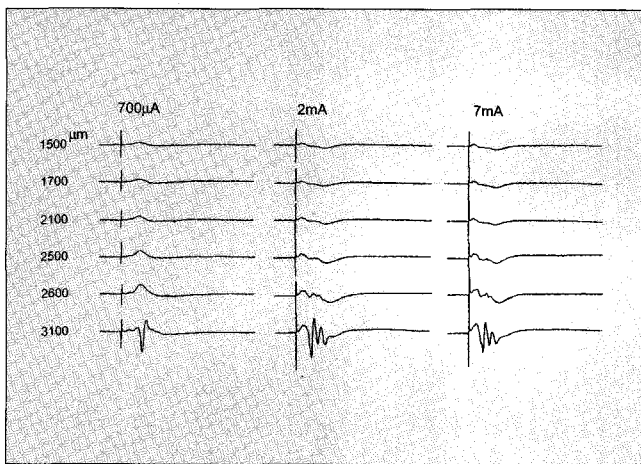


Fig. 1. An example of depth profile of the evoked potentials in the hippocampus. CA1 field potential response to fimbria-fornix stimulation (stimulus frequency 0.1Hz) with varying stimulus intensity were obtained. At least 10 responses were evoked and averaged at each sweep.

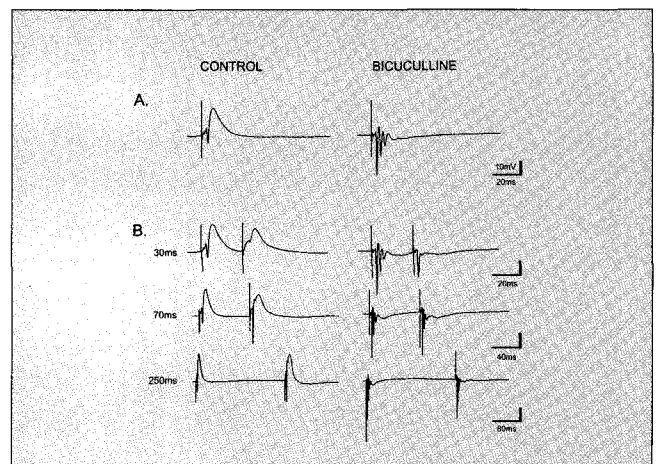


Fig. 2. Paired-pulse responses in the CA1 pyramidal layer. A: CA1 field potential responses to single stimulation obtained with saline-filled recording electrodes and with a bicuculline filled electrode. B: Paired-pulse stimulation (interstimulate interval 30, 70, 250ms, stimulus frequency 0.1Hz, stimulation intensity 5 X stimulus threshold for population spike) evoked population spike with a saline or bicuculline filled electrode.

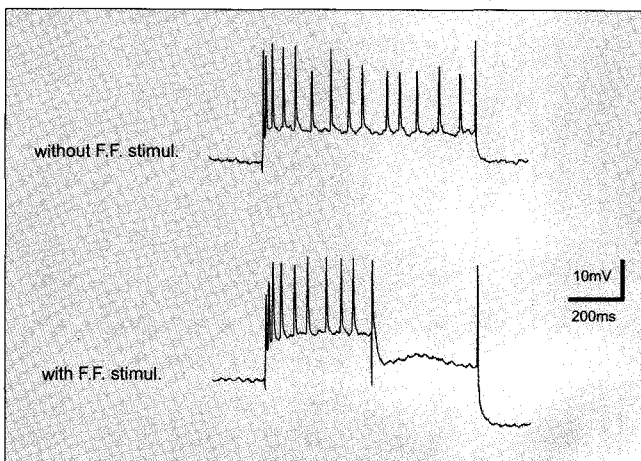


Fig. 3. Intracellular responses of CA1 pyramidal cell with and without fimbria-fornix stimulation. Intracellular current (+0.1nA) injection without fimbria-fornix stimulation evoked train of action potential. When simultaneous fimbria-fornix stimulate, current inject made action potential train in early phase, but this response was inhibited by stimulation in late phase.

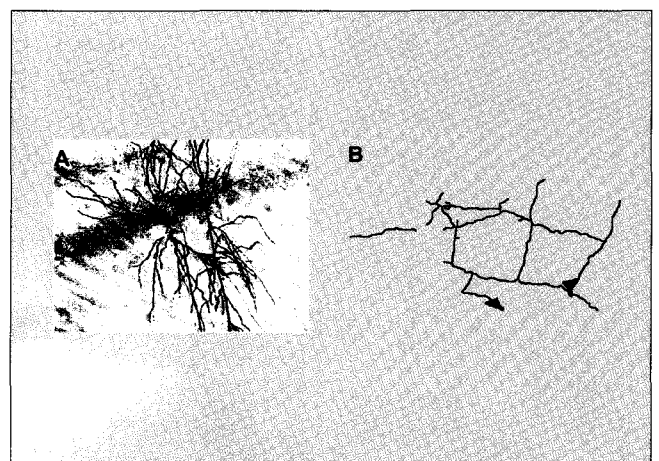


Fig. 4. Neurobiotin filling of CA1 pyramidal neuron and camera lucida of cell body and axons. A: A neurobiotin-labelled pyramidal cells recorded from CA1 hippocampus. B: Camera lucida reconstruction of soma and dendrite of pyramidal cell. Reconstruction was made from A.

lation spike는 기준값 하방으로 나타났는데 이것은 기록전극이 dendrite의 sink 영역 즉 내향성 전류 (negative current, 시냅스 부위) 흐름에 위치해 있기 때문이고 이와 반면에 PSP는 기준선 상방에 존재하였는데 이것은 dendrite의 positive charge 영역인 source 영역에 있기 때문이다. 10 μ M이 포함된 bicuculline 전극을 사용하였을 때 수 개의 population spike가 나타났고 필드 PSP 및 population spike의 역치는 낮아졌으며 amplitude는 높아졌다(Fig. 1).

2. Paired-pulse 반응

Fimbria-fonix의 paired-pulse 자극에 대한 CA1 필드 반응은 Fig. 2에서와 같다. 30ms 자극 간격시 대조군 및 bicuculline 투여군에서 population spike 크기가 감소했으나 70 및 200ms 자극간격에서는 그 크기가 증가되었다.

3. 세포내 기록 및 세포 형태

본 실험에서 측정된 해마 신경세포는 CA1 세포를 잡아 기록하고 neurobiotin 염색법으로 확인하였다. CA1 위치 선정은 세포내 유리 전극을 뇌내로 전진시킬 때의 깊이로써 구분하였으며 세포를 고정(holding)한 후 세포의 안정막 전위상태와 활동전위의 형태로써 피라미트세포임을 확인하고 반응들을 기록하였다. 우선 CA1에 위치한 이 세포의 세포체와 가지돌기의 해부학적 위치관계를 해마의 각 층과 연관시켜 확인한 결과 세포체는 피라미트층에서 분명한 피라미드 형태를 띄고 있었고 기저 및 선단 가지돌기가 각각 방향층 및 섬유방-분자층까지 뻗어 있었으며 축삭은 겉질을 향해 기저 가지돌기면에서 수직으로 뻗어

있었다(Fig. 4). 평균 RMP (\pm SEM)는 $-74.2 (\pm 5.9)$ mV 이고 amplitude는 $52 (\pm 3.5)$ mV였다. 해마내의 다른 개체 신경들과는 달리 대부분의 피라미트세포에서 자발적인 활동전위는 미약하였다. 세포내 자극에만 의해서 발생하는 sustained AP의 수는 세포의 자극이 존재할 때 발생하는 AP 수보다 현저하게 많았다. interneuron의 AHP는 RMP이하로 떨어져서 다시 RMP로 회복되는 반면 피라미트세포의 AHP는 RMP 상방으로 상승한 후 RMP이하로 하강하였다(Fig. 3).

4. 전류-전압관계 (Current-voltage relationship)

탈분극 전류를 주입하면 지속적인 형태의 AP가 발생되며 전류를 증가시킬수록 AP개수가 증가하며 AP간격에서 spike frequency adaptation이 나타났다(Fig. 3).

5. 시냅스 자극에 대한 afterdischarge

실험군에서 CA1 population의 시냅스 활성이 epileptic-form afterdischarge를 나타내는지 여부를 확인하기 위해 최대 자극 강도 (5T)에서 쌍자극에 대한 반응을 관찰하였다. 대조군에서 쌍자극에 의한 discharge를 나타내었다. Bicuculline을 기록용 전극에 포함시켰을 때 전형적인 short-latency 반응이 억제기능을 차단하지 않은 경우에 비해 더욱 일정하게 나타났지만 long-latency afterdischarge는 더욱 많이 유발되었고 CA1 회로의 억제에 의한 다양한 long-latency afterdischarge를 나타내었다(Fig. 5).

IV. 총괄 및 고찰

Fimbria-fornix 자극시 나타나는 필드 PSP는 CA1 추체세포의 dendrite에서 생기는 내인성 탈분극 전류의 합으로서 세포체가 충분히 탈분극되면 population spike 형태로 기록되는데 이것은 자극부위 인접한 추체세포들의 모든 활동성 전위를 의미한다. 이러한 필드 PSP와 population spike의 threshold를 측정함으로써 퇴행성 질환과 같이 어떤 신경세포 집단의 활성이 감소되어 있을 경우 그 병적 상태를 조사하는데 유용하게 사용되고 또한 각 동물에 주어지는 자극 강도를 표준화할 수 있게 된다⁵⁾. 본 실험에서는 정상 동물을 사용하였으므로 필드 PSP의 크기가 예측한 것 보다 크게 나타난 결과는 자극 전극 인접의 세포들의 수가 많았음을 의미한다.

Mossy fiber를 역방향 자극하였을 때 granule cell에서 기록을 할 경우 필드 PSP가 사라지고 population spike에 대한 threshold가 낮아지면서 그 크기는 증가한다고 알려져 있다⁴⁾. 역방향 자극으로 필드 PSP가 사라지는 이유는 기록하는 세포의 axon을 자극하기 때문에 세포체 방향으로 역행성 전류가 흐르고 결과적으로 이온 채널이 개구되지 않아서 시냅스후 전위가 생길 수 없기 때문이고 다만 전압 의존성 이온 채널만 개구

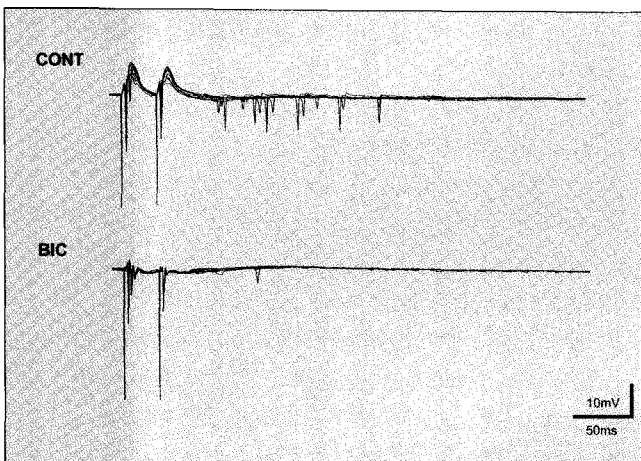


Fig. 5. Afterdischarges induced by paired-pulse stimulus (frequency 1Hz, intensity 5T, pulse interval 30ms) in the CA1 near the saline(CONT) or bicuculline-containing(BIC) electrode. Paired-pulse stimulation usually resulted in a single population spike after each pulse, but usually a brief afterdischarge could be evoked when saline-electrode was used to record responses(CONT) multiple population spikes with a brief after discharge were evoked by afferent stimulation when bicuculline was leaked from the electrode.

되므로 population spike만 발생된다. Mossy fiber는 granule cell의 axon bundle이므로 여기에서 나타나는 population spike는 compound action potential과 유사하다. 따라서 본 실험에서는 순방향자극을 사용하였으므로 perforant path의 시냅스전 신경섬유의 전기 자극으로 인해 CA1 세포에서 시냅스 반응의 합으로서 전형적인 필드 PSP가 나타났고 이와 더불어 CA1 추체세포들이 다발적으로 발화하여 population spike가 동시에 나타난 결과일 것이다.

CA3 영역에서는 회귀성 흥분성 회로가 많이 형성되어 있기 때문에 GABAa 길항제인 bicuculline을 사용하여 가바성 억제를 차단하면 이 회로를 노출시키는 결과를 초래하므로 mossy fiber 자극시 자발적 interictal spike와 수개의 population spike 반응이 나타난다⁶⁾. 그러나 dentate gyrus 영역에서는 이러한 recurrent 흥분성 회로가 많지 않으므로 슬라이스상에서 bicuculline 전극을 사용시 자발적 interictal spike가 나타나지 않고 단일의 population spike만 나타나게 되지만 slice 제작과정에서 entorhinal cortex가 많이 남아 있는 경우 perforant path 자극시 dentate gyrus에서도 한 개 이상의 population spike가 나타날 수 있다. 본 실험에서 나타난 결과와 같이 CA1 영역에서도 bicuculline 전극 사용시 다수의 population spike가 나타난 것은 이와 같은 회귀성 흥분회로가 존재함을 의미한다. 이러한 반응의 재현성 및 분석 용이도를 증가시키기 위해 세포외부 potassium 농도를 6mM로 증가시킨 조건에서 실험을 행하기도 하는데 이러한 조건하에서는 필드 PSP 및 population spike의 역치가 감소하고 크기는 증가되며 spike의 개수가 많아진다. 왜냐하면 세포외부 potassium 농도가 증가되면 세포를 효과적으로 더욱 탈분극시키므로 역치에 근접하게 되어 적은 전류로서도 반응을 볼수가 있기 때문이다.

일반적으로 시냅스 회로의 흥분성 수준을 측정하기 위한 실험적 프로토콜로서 paired-pulse stimulation paradigm을 많이 사용하는데 short interstimulus interval (20ms 이하)에서는 paired-pulse inhibition이 나타나고 intermediate interstimulus interval (50~60ms)에서는 paired-pulse facilitation이 나타난다고 알려져 있다⁷⁾. 이러한 paradigm을 사용하면 뇌 각 영역에서의 필드 전위값의 변동기전을 신경세포간의 억제성 및 흥분성 증감으로 설명할 수 있는데 해마 영역에서는 paired-pulse facilitation에 대한 기전으로서 흥분성의 증가 혹은 feedback inhibition의 감소를 제시하였다⁸⁾. 먼저 feedback inhibition에 의한 기전을 고려할 경우 이러한 유추 방법을 시행하기 전에 실험 기법의 분석에 영향을 줄 수 있는 요소를 배제하는 것이 필수적이다. 이에 따라 본 실험에서의 실험값은 각 동물에 대하여 동일한 반응 criterion (역치값의 5 배)를 적용한 상대적인 값을 사용하여 동물간 및 전극간에 생기는 변수를 배제하였으며 또한 paired-pulse 반응 특성이 기술적 요소에 의존적인 점, 즉 자극 강도가 그 반응에 영향을 미칠 수 있다는 점을 고려해서 역치값을 기준치로 정하였다. 그 이외에 또 다른 영향 요소로서는 자극 속도를 들 수 있다. 일반적으로

로 저속도의 자극은 feedback inhibition을 평가하는데 유용한 반면 고속도의 자극은 feedforward inhibition 분석에 이용된다⁷⁾. 본 실험에서는 회귀성 억제에 초점을 맞추었기 때문에 저속도 (0.1 Hz)의 자극을 사용하였다. 따라서 intermediate interstimulus에서 paired-pulse facilitation이 증가된다면 그 이유는 feedback inhibition의 감소에 기인할 것이다. 한편 paired-pulse facilitation의 또 다른 기전으로서 흥분성의 증가 즉 회귀성 흥분성을 고려할 수 있고 또한 long-term potentiation에 의해서 나타날 가능성도 있다¹¹⁾. 그러나 억제성 interneuron들 사이에서의 상호작용에 근거한 disinhibition 가설과는 달리 presynaptic disinhibition도 고려할 수 있다. 즉 GABA가 가바성 axon 말단의 GABAB 수용체에 결합하여 GABA의 유리를 억제할 수 있다. 이것은 GABAB agonist인 baclofen이 feedback inhibition을 감소하고 GABAB antagonist인 phaclofen이 이러한 감소를 차단할수 있다는 실험보고로 뒷받침 된다⁹⁾. 따라서 본 실험 결과로 볼 때 억제성 신경세포는 매우 광범위하게 신경세포의 흥분성에 영향을 줄수 있음을 알 수 있다. 이러한 가설은 intact 해마에서는 slice법을 사용한 해마와 비교할 때 보다 정형적인 시냅스 억제를 나타낸다는 것¹¹⁾으로도 뒷받침 될 수 있다. Slice 법에서 억제성이 감소되는 것은 이들 신경세포의 내인성 전기 생리적 특성의 변화로 설명될 수 없을 것이다. 그러므로 slice 내에서의 억제성 신경세포의 소실 혹은 절단등의 영향임을 반영하는 것으로 믿어진다.

신경세포는 넓은 의미에서 투사 신경과 interneuron 두가지 종류로 구분할 수 있다¹⁰⁾. 이러한 interneuron은 smooth, aspiny dendrite와 국소적으로 한정된 axon과 대칭적인 시냅스를 형성하며 GABA를 신경전달체로 가지고 있다고 알려져 있다¹¹⁾. 해마의 interneuron에 대한 주된 특징으로서 principal 세포에 비하여 이질적이며 다양한 특징으로 interneuron을 분류할 수가 있으며 다양한 기능을 가진다는 것이다. 먼저 내인성 전기생리학적 특성면에서는 전통적으로 fast-spiking, 즉 짧은 폭(<1.0ms)의 활동성 전위를 가진다고 알려져 있다^{12,13)}. dV/dt ratio가 유용한 변수로 사용될 수 있는데 이것은 활동성 전위의 최대 상승 속도와 최대 하강 속도의 비율과 관련된다. 또 다른 변수로서는 spike afterhyperpolarization인데 interneuron의 경우 더욱 저명한 afterhyperpolarization을 가지고 탈분극 phase를 나타내지 않는다. 비교적 덜 유용한 변수로서 spike-frequency adaptation, membrane time constant, input resistance, 휴지기 막전위, 활동성 전위 크기등이 있다¹⁴⁾. 내인성 전기생리학적 특성이 interneuron을 구분지을 수 있는 척도로서 사용될수 있지만 세포의 형태학적 서술이 동반될 경우에 더욱 확정적으로 구분할 수 있다고 한다. 더욱이 sharp electrode법 보다는 whole-cell patch mode인 경우 전기 생리학적 특성으로서 interneuron과 principal cell을 구분하는 것이 힘들다고 하였다. 또 다른 특성으로서 형태학적 측면을 들 수 있는데¹⁵⁾ interneuron은 매우 다양한 dendrite 및 axon 형태를 보인다. 추체세포와 같이 dendrite가 여러층에

걸쳐서 퍼져 있는 세포들도 있고 매우 한정된 영역에 분포하는 경우도 있다. 전통적으로 interneuron의 axon은 주 세포의 세포체부분에 국소적으로 투사된다. 그러나 원거리의 axon collateral을 투사하여 시냅스를 형성하는 경우도 있다. CA1에 존재하는 interneuron의 경우 두가지 다른 형태가 존재한다고 하는데 한정된 axon collateral을 지니고 있는 경우 (basket cell, axo-axonic cell, CA1 stratum lacunosum-moleculare)와 보다 넓은 영역을 지배하는 세포 (bistratified, trilaminar interneuron, 그리고 CA1에서 CA3로 역행 투사하는 세포 등)가 있다. 후자의 경우 다른 interneuron에 영향을 주어서 궁극적으로 해마의 넓은 영역에 걸쳐서 interneuron과 principal cell의 활성을 조절한다.

그리고 신경화학적 표식 및 분자적 특성으로서 해마의 interneuron의 분류는 calcium-binding proteins, neuropeptides, neurotransmitter-synthesizing enzymes, 신경전달체 수용체등을 기준으로 한다. 아직 이러한 신경화학적 표식들의 기능에 대해서는 알려진 바 없지만 interneuron 종류를 분별하는데 큰 도움이 된다. Seress¹⁶⁾에 의하면 해마의 interneuron들중 절반은 NADPH-diaphorase에 반응을 나타내므로 nitric oxide를 합성할 것으로 생각하였다. 그러나 신경화학적 표식은 처치과정에서, 발달중 변화단계에서 표식발현이 변화될 수 있고 동물종에 따라 다를 수 있으므로 이를 기준으로 분류하는 것은 힘들다고 하였다. Leranath¹⁷⁾는 interneuron에서는 AMPA glutamate 수용체가 추체세포에 비하여 다르다고 하였다. 즉 해마의 interneuron은 주로 GluR-2/3이 없는 반면 GluR-4를 나타낸다고 하였다. 이러한 보고는 interneuron이 가지고 있는 AMPA 수용체는 추체세포보다 칼슘이 더욱 쉽게 통과함을 의미한다. 왜냐하면 GluR-2의 부재는 칼슘의 투과성이 증가됨을 내포하고 있기 때문이다.

약리학적 민감성에 대한 특성으로서 해마의 interneuron은 피질하부 구조로부터의 입력에 의해 분비되는 신경전달체에 다양한 반응을 보이는데 이것은 피질 하부 핵에 의해 다양하게 해마의 기능을 조절할 수 있음을 의미한다. Doze¹⁸⁾는 CA1 interneuron의 경우 alpha1-아드레날린성 수용체를 통해 nor-epinephrin의 영향을 받는데 potassium conductance가 감소되고 막 전위를 탈분극시킨다고 하였다. 이러한 탈분극 효과는 너무나 강력해서 sodium channel이 비활성화되기 때문에 interneuron의 억제성 기능을 상실하여 CA1 추체세포의 과흥분 결과를 초래한다. 반면에 Bergles¹⁹⁾는 stratum radiatum/lacunosum-moleculare에 존재하는 다른 CA1 interneuron은 흥분되지 않고 오히려 억제된다고 하였다. 이러한 억제는 potassium conductance를 증가시킴으로써 나타나는데 일시적인 세포막전위의 과분극을 유도하거나 input resistance를 감소시키고 활동전위의 빈도를 감소시킨다고 하였다. Deasi²⁰⁾는 serotonin에 의해서 stratum radiatum/lacunosum-moleculare 경계에 있는 CA1 interneuron 일부가 흥분성을 나타낸다고 하였다. serotonin은 5-HT3 수용체 매개성, 리간드 개

폐성 채널을 통해서 fast cation이 통과하여 작용을 나타낸다.

해마 interneuron의 기능을 이해하기 위해서는 신경세포 집단의 분류와 관련이 있어야 한다. 전통적으로 해마의 interneuron은 억제성 기능을 보유하고 있는 바 GABA가 주세포에 대하여 shunting 혹은 과 분극 작용을 나타낸다. 이러한 관념에서는 interneuron이 feedback 혹은 feedforward 억제를 통해서 주세포의 안정성을 유지한다고 볼 수 있다.

Interneuron들과 synchrony의 관계는 전기 리듬을 발생하는 interneuron의 역할에 대한 많은 보고²¹⁾로서 설명될 수 있는데 해마에서의 전기적 파동은 theta rhythm 및 gamma 파동으로 잘 알려져 있다. 이러한 전기적 파동현상은 동물의 행동양태와 관련이 있는데 동물이 주위 환경을 탐색할 때 theta 및 gamma 파장의 필드 전위를 나타낸다. 현재 interneuron이 이러한 리듬을 생성한다는 가설을 지지하는 많은 보고²²⁾가 있는데 GABAA IPSP에 의해 주세포가 리듬막하게 발화하는 것이 EEG 상에서 파동성 전기 신호로 측정된다는 것과 GABAA 상호작용이 없으면 신경망은 desynchronize된다는 보고가 있는데 Cobb²³⁾은 단일 basket cell이 1,000개의 추체세포를 synchronizing 할 수 있다고 하였다. 현재 basket cell의 활동전위의 rhythmic burst (40 Hz)가 theta 파동을 생성하는데 주 역할을 할 것이라고 하였다. 이러한 interneuron의 burst는 septum으로부터의 tonic excitatory input (아마 muscarinic 혹은 metabotropic glutamate 수용체 매개성) 및 phasic 억제성 입력의 상호작용에 의해 형성될 것이다. Buzsaki²¹⁾는 이러한 interneuron망을 통해서 추체세포들은 발화 역치 직하의 막 전위를 유지하고 있다가 entorhinal cortex로부터의 흥분성 입력을 받으면 발화하게 되므로 interneuron의 주 기능이 원거리의 주세포를 synchronizing하는 것임을 고려해 볼 때 신경 집단이 동시에 활성화되는 것이 정보의 출력의 기초가 된다고 하였다.

In vivo 실험법에서 시냅스 흥분성 및 억제성에 대한 본 실험의 결과는 in vitro에서 보다는 in vivo에서 비추체세포의 spike firing을 야기시키기 힘들었다. 역치가 population spike에 대한 상대적 값으로 지정되어 있으므로 이러한 결과가 실험 기법면에서 즉 절대적인 자극 강도 및 자극 전극 위치등에서 단순히 설명하기 힘들다. 따라서 이러한 역치 결과는 in vivo에서 억제가 비교적 강하게 나타난 것으로 가정할 수 있다. 그리고 본 실험에서 EPSP는 고 자극 강도에서도 짧고 전형적으로 한 개 정도의 활동성 전위를 야기시킨 반면에 in vitro에서는 활동성 전위의 burst를 야기시킨다. 이러한 in vivo 및 in vitro에서의 차이에는 여러 가지 요인이 관여할 것으로 믿어지지만 주요인자로서 in vivo에서는 시냅스 억제가 잘 보존되어 있다는 점을 생각할 수 있다. 실제로 in vivo에서 측정은 IPSP는 슬라이스법으로 측정된 것에 비해 큰 값을 가지고 정형적인 biphasic IPSPs를 보여주었다. 여기서 slice 법에서의 억제성이 감소한 결과에는 어떤 요인이 있을지 고찰할 필요가 있다. 우선 마취제인 urethane이 IPSP의 크기와 conductance를 증

가시킬 가능성이 있을 것이다. Urethane의 작용기전에 대한 정보는 잘 알려져 있지 않지만 간질 관련 in vivo 실험에서 유용하게 사용되고 있는데 이 약물이 발작을 방해하지 않기 때문인 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 반대로 urethane 존재하에서는 억제성 신경세포의 활성이 50% 정도 감소되어 진다는 보고²⁵⁾도 있고 barbiturate는 오히려 IPSP를 증강시키고 연장시킨다고 한다. Urethane이 intact 뇌에서 IPSP를 증강시킬 수 있다는 점을 배제하지 못하지만 현재까지의 data로 볼 때 억제성 효과를 감소시킬 것으로 생각된다. 두 번째로 슬라이스를 제작하는 과정에서 억제성 신경세포가 선택적으로 손상을 입었기 때문에 실험에 사용된 슬라이스에는 상대적으로 적은 수의 억제성 신경세포가 포함되었을 것이라는 가설이다. 억제성 신경세포는 허혈 및 저산소등에 매우 민감하고 slice를 제작하는 과정중 이러한 환경이 어느 정도 형성된다²⁶⁾고 한다. 그러나 많은 실험실에서 in vitro 기법을 이용하여 세포내 기록을 수행하였고 이런 방법으로 얻은 내인성 전기생리학적 특성이 본 실험에서 얻은 in vivo 결과와 차이를 보이고 있지 않다. Slice법으로 얻은 절편에서 명확하게 억제성 신경세포 집단이 존재하고 있다는 것은 분명하지만 전체 숫자의 감소가 나타나는지는 추후 검토해야 할 것이다. 세 번째 슬라이스를 제작하는 과정에서 억제성 신경세포의 axon collateral이 절단되었을 가능성이 있다. 본 실험에서는 axon의 절단으로 인해 억제성 신경세포의 collateral의 dysfunction이 되기 때문에 슬라이스에서는 유발성 억제가 감소되었을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 실험의 목적은 in vivo 상태에서 세포외부 및 내부 전기생리학적 기록을 측정하여 해마의 가바성 억제신경세포의 기능을 분석하고 in vitro 실험법과 비교하고자 하였다.

1. 필드 전위 반응에서 orthodromic 자극으로 필드 PSP 및 population spike가 나타났다.
2. paired-pulse 자극에 대한 CA1 필드 반응은 짧은 자극간격에서 억제 반응이 나타났다.
3. 세포내 전류를 가함에 따라 활동성 전위의 burst가 나타났으며 세포외부 자극으로 그 반응이 사라졌다.
4. 최대 자극강도에서 쌍자극에 의한 afterdischarge가 나타났고 bicuculline 전극사용시 long-latency afterdischarge가 더욱 많이 유발되었다.

참고문헌

1. Paul SB, Philip AS : Interneurons and inhibition in the dentate gyrus of the rat in vivo. *J Neurosci* 15(1) : 774-789, 1994.
2. Struble RG, Desmond NL, Levy WB : Anatomical evidence for intralamellar inhibition in the fascia dentata. *Brain Res* 152 : 580-585, 1978.

3. Han ZS, Buhl EH, Lorinczi Z : A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5 : 395-410, 1993.
4. 권오홍, 김영진, 남순현 등 : 해마 theta 리듬과 pyramidal neuron의 세포내 특성과의 상관관계. *대한소아치과학회지*, 25 : 671-682, 1998.
5. Paul SB, Dudek FE : Network properties of the dentate gyrus in epileptic rats with hilar neuron loss and granule cell axon reorganization. *J Neurophysiol* 77 : 2685-2696, 1997.
6. Patrylo PR, Dudek FE : Physiological unmasking of new glutamatergic pathway in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-induced epileptic rats. *J Neurophysiol* 79 : 418-429, 1998.
7. Paul SB, Philip AS : Hyperexcitability in the dentate gyrus of the epileptic Mongolian gerbil. *Epilepsy Research* 18 : 23-28, 1994.
8. Sloviter RS : Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation : GABA-mediated mechanism that regulate excitability in vivo. *Hippocampus* 1 : 31-40, 1991.
9. Mott DD, Bragdon AC, Lewis DV : Phaclofen antagonizes post-tetanic disinhibition in the rat dentate gyrus. *J Pharmacol Exp Ther* 249 : 721-725, 1989.
10. Paul SB, Ivan S : Neurobiology of hippocampal interneurons : A workshop review. *Hippocampus* 6 : 330-339, 1996.
11. Rakic P : Local circuit neurons. Cambridge, MIT Press, 161, 1976.
12. Shepherd GM : The synaptic organization of the brain. third edition. New York, Oxford University Press, 237-293, 1990.
13. Scharfman HE : Differentiation of rat dentate neurons by morphology and electrophysiology in hippocampal slices: granule cells, spiny hilar cells, and aspiny "fast-spiking" cells. In: The dentate gyrus and its role in seizures. Amsterdam, Elsevier, 93-109, 1992.
14. Scharfman HE : Electrophysiological diversity of pyramidal-shaped neurons at the granule cell layer/hilus border of the rat dentate gyrus recorded in vitro. *Hippocampus* 5 : 287-305, 1995.
15. Amaral DG : A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*

- 182 : 851-914, 1978.
16. Seress L, Nitsch R, Leranath C : Calretinin immunoreactivity in the monkey hippocampal formation. I. Light and electron microscopic characteristics and colocalization with other calcium binding proteins. *Neuroscience* 55 : 775-796, 1993.
 17. Leranath C, Nitsch R : Hypothalamic substance P-containing afferents can filter the signal flow in the monkey hippocampal formation: morphological evidence for stimulation and feed-forward inhibition of different populations of granule cells and indirect inhibition of CA3 pyramidal neuron. *J Neurosci* 14 : 4079-4094, 1994.
 18. Doze VA, Cohen GA, Madison DV : Calcium channel involvement in GABAB receptor-mediated inhibition of GABA release in area CA1 of the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 74 : 43-53, 1995.
 19. Bergles DE, Doze VA, Madison DA : Excitatory actions of norepinephrine on multiple classes of hippocampal CA1 interneurons. *J Neurosci* 16 : 572-585, 1996.
 20. Desai MA, McBain DJ, Kauer JA : Metabotropic glutamate receptor-induced disinhibition is mediated by reduced transmission at excitatory synapses onto interneurons and inhibitory synapses onto pyramidal cells. *Neurosci Lett* 181 : 78-82, 1994.
 21. Buzsaki G, Chrobak JJ : Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuron networks. *Curr Opin Neurobiol* 5 : 504-510, 1995.
 22. Bragin A, Jando G, Nadasdy Z : Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15 : 47-60, 1995.
 23. Cobb SR, Buhl EH, Halasy K : Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378 : 75-778, 1995.
 24. Nicoll RA, Eccles JC, Oshima T : Prolongation of hippocampal inhibitory postsynaptic potentials by barbiturates. *Nature* 258 : 625-627, 1975.
 25. Buzsaki G, Lenug LWS, Vanderwolf CH : Cellular basis of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res Rev* 6 : 139-171, 1983.
 26. Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH : Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnant study. *Neuroscience* 27 : 387-402, 1988.

Abstract

ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
GABAERGIC INHIBITION IN THE HIPPOCAMPAL CA1 OF THE RAT IN VIVO

Byung-Ju Choi, Jin-Hwa Cho, Young-Jin Kim*

Department of Dental Pharmacology, Department of Pedodontics,
College of Dentistry, Kyungpook National University*

Inhibitory cells are critically involved in shaping normal hippocampal function and are thought to be important elements in the development of hippocampal pathologies. The present study was carried out in hippocampal CA1 area in vivo to compare with hippocampal slice studies. Intracellular and extracellular recordings with or without bicuculline electrodes were obtained in the intact brain of anesthetized rats, and cells were intracellularly labelled with neurobiotin.

Electrical stimulation of fimbria-fornix resulted in an initial short-latency population spike. In the presence of 10 μ M bicuculline, orthodromic stimulation resulted in bursts of population spikes. The amplitude of population spikes in the CA1 region increased with stimulus intensity, as did the number of population spikes when the field recording electrode contained 10 μ M bicuculline.

We measured the level of excitability in the CA1 area, using a paired-pulse stimulus paradigm to evoke population spikes. Population spikes showed strong paired-pulse inhibition at short interstimulus intervals. Burst afterdischarges up to 400 ms were observed after paired-pulse stimulus.

These results suggest that hippocampal CA1 inhibitory interneurons can affect the excitability of pyramidal neurons that can not be appreciated in conventional in vitro preparation.

Key words : bicuculline, GABAergic interneuron, in vivo, paired-pulse