

Effects of Nitric Oxide on the Neuronal Activity of Rat Cerebellar Purkinje Neurons

Sujeong Jang, Han-Seong Jeong and Jong-Seong Park[†]

Department of Physiology, Chonnam National University Medical School, Gwangju 501-746, Korea

This study was designed to investigate the effects of nitric oxide on the neuronal activity of rat cerebellar Purkinje cells. Sprague-Dawley rats aged 14 to 16 days were decapitated under ether anesthesia. After treatment with pronase and thermolysin, the dissociated Purkinje cells were transferred into a chamber on an inverted microscope. Spontaneous action potentials and potassium currents were recorded by standard patch-clamp techniques under current and voltage-clamp modes respectively. 15 Purkinje cells revealed excitatory responses to 20 μ M of sodium nitroprusside (SNP) and 4 neurons (20%) did not respond to SNP. Whole potassium currents of Purkinje cells were decreased by SNP (n=10). Whole potassium currents of Purkinje cells were also decreased by L-arginine, substrate of nitric oxide (n=10). These experimental results suggest that nitric oxide increases the neuronal activity of Purkinje cells by altering the resting membrane potential and afterhyperpolarization.

Key Words: Nitric oxide, Purkinje cell, L-arginine, Neuronal activity

서 론

산화질소는 L-arginine을 기질로 하여 산화질소 생성효소 (nitric oxide synthase, NOS)의 매개를 받아 생성이 되는 것으로 알려져 있다. 이들 NOS는 기능적으로 constitutive형과 inducible형으로 나뉘어지는데, 이중 전자는 calcium과 calmodulin 의존형으로서 세포질 내에 calcium을 증가시키는 일차 전령에 의하여 활성화된다 (Bredt and Snyder, 1990; Garthwaite, 1991; Bredt and Snyder 1992). 또한 constitutive형에는 신경세포에 고르게 분포하는 nNOS와 혈관의 내피층에 분포하여 혈관이완을 통하여 혈류를 조절하는 eNOS 등이 포함된다. 이에 비하여 inducible형은 calcium과 calmodulin 비의존성이며 endotoxin이나 cytokine 등에 의하여 대식세포나 혈관 평활근에서 유도된다 (Bredt et al., 1990).

nNOS는 중추신경계의 다양한 부위에서 발견됨이 이미 많은 연구자들에 의하여 보고 되었다. 중추신경계에

서 산화질소는 뇌혈관의 내피세포와 면역적인 자극을 받은 교세포 (glial cell)와 nonadrenergic and noncholinergic 뉴론 그리고 특히 glutamate성 뉴론에 많이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다 (Bult et al., 1990). 이들은 시냅스 가소성, 신경세포의 발육, 세포고사 등에 관여하는 것으로 알려져 있는데 정상적으로는 기억과 학습, 뇌혈류의 조절, 통각, 후각과 음식의 섭취 등에 있어서 일정한 기능을 하는 것으로 밝혀져 있다 (Holscher and Rose, 1993; Matsumoto et al., 1994; Schilling et al., 1994; Bon et al., 1994).

소뇌에서 산화질소는 전정안구반사의 가소성에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Nagao 등 (1997)은 정상적인 토끼와 소뇌의 편엽을 절제한 토끼에서 tetrahydrobiopterin의 투여가 전정안구반사의 적응현상에 미치는 효과가 상이함을 관찰하였으며 이들은 또한 산화질소를 억제시키는 hemoglobin의 소뇌 투여가 전정안구반사의 적응현상을 저하시키는 것을 관찰한 바 있다.

이와 같이 전정성반사에 중요한 역할을 하는 소뇌의 Purkinje cell에 대한 산화질소의 영향을 규명한 연구는 아직까지 그렇게 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐의 소뇌 Purkinje cell을 대상으로 전류고정법과 전압고정법 하에서 whole-cell configuration patch clamp 기법을 이용하여 산화질소의 효과를 검증하고자 하였다.

*접수일: 2010년 10월 21일 / 수정일: 2010년 12월 20일
채택일: 2010년 12월 29일

[†]교신저자: 박종성, (우) 501-746 광주광역시 동구 학동,
전남대학교 의과대학 생리학교실
Tel: 062-220-4264, Fax: 062-232-1242
e-mail: Parkjs@chonnam.ac.kr

재료 및 방법

소뇌 Purkinje 세포의 분리

생후 14~16일 사이의 Sprague-Dawley 흰쥐에서 Kay와 Wong의 방법에 의하여 소뇌 Purkinje 세포를 분리하였다 (Kay and Wong, 1986). 흰쥐를 ether로 마취한 후, 두피 및 두개골을 제거하고 소뇌 부위를 적출하였다. 적출한 조직은 95% O₂, 5% CO₂로 포화된 인공 뇌척수액 (4°C)에 보관하고, 뇌조직 절편기 (Vibroslice, WPI, USA)를 사용하여 400 μm의 두께로 관상면으로 절단하여 전정소뇌가 포함된 뇌절편을 만들었다. 뇌절편은 실온의 배양 용액에서 1시간 이상 배양한 다음 단백 분해효소인 pronase (Sigma, USA)와 thermolysin (Sigma)을 이용하여 각각 0.2 mg/ml 농도에서 효소처리 과정을 거쳤다. 효소처리가 끝난 절편은 다시 실온의 배양액 속에서 배양하면서 흑질 부위는 흰쥐 뇌지도를 참조하여 21G 주사침으로 천공하여 얻었고 이를 도립현미경 위의 실험용기에 옮긴 후 작은 피펫을 이용하여 단일 세포로 분리하였다. 분리된 세포는 용기의 바닥에 가라앉아 안정화된 다음에 세포 전류를 기록하였다.

용액의 조성 및 시약

배양액의 조성 (mM)은 124 NaCl, 5 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.4 CaCl₂, 10 Glucose, 24 NaHCO₃ 등으로 구성되었으며, 세포의 용액 (mM)은 3 KCl, 140 Choline-Cl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), 30 Glucose, pH 7.4로 하였고, 세포내 용액 (단위; mM)은 140 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 10 HEPES, 0.1 EGTA (ethylene glycol-bis (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid), 2 Mg-ATP이며 pH는 7.3으로 하였다. 세포에 대한 약물 투여는 중력을 이용한 관류장치를 이용하여 용기내 용액을 순환시켰다. 본 실험에서 사용한 약물은 Sigma사 (St. Louis, USA)제품을 사용하였다.

이온 전류의 기록

소뇌 Purkinje 세포에서 Hamill 등의 whole-cell patch clamp 방법을 이용하여 자발적 활동전위를 기록하였다. 기록용 전극은 미세 유리 전극 제조기 (Narishige, Japan)와 microforge (Narishige, Japan)를 이용하여 저항이 3~5 MΩ이 되도록 제작하였다. 막전압 고정과 전류의 측정은 Axopatch 200B patch clamp 증폭기 (Axon, USA)를 이용하

여 Digidata 1200B (Axon, USA) interface를 통하여 컴퓨터와 연결하였다. 막전압 조절과 실험결과 얻어진 포타슘 전류의 기록 및 자료 분석은 pCLAMP 7.0 software (Axon, USA)를 사용하였으며, oscilloscope를 사용하여 전류의 변화를 동시에 관찰하였다.

실험결과 분석

기록된 자료는 pCLAMP 7.0 및 Microcal Origin 4.1 (Microcal software Inc., USA) 프로그램으로 분석하였다. 실험측정치는 변량분석 (ANOVA)과 Bonferroni 사후검정을 시행하여 $P < 0.05$ 를 유의성의 기준으로 삼았으며 평균 ± 표준오차로 표시하였다.

결 과

소뇌 Purkinje 세포 자발적 흥분 발현에 미치는 산화질소의 효과

산화질소가 소뇌 Purkinje 세포의 흥분성에 미치는 직접적인 효과를 whole-cell patch clamp recording의 전류 고정법으로 관찰하였다. 전류를 0 nA로 고정하였을 때 흑질 소뇌 Purkinje 세포는 자발적 활동전위를 나타내었다. SNP에 의하여 총 19개의 신경세포 중 15개의 세포에서 반응을 보였으며 4개의 신경세포는 반응을 보이지 않았다. 반응을 보이는 15개의 신경세포는 모두 동일한 반응을 나타내었으며 이들은 20 μM의 SNP에 의하여 흥분성이 증가되는 반응을 나타내었다 (Fig. 1).

SNP가 소뇌 Purkinje 세포 포타슘 전류에 미치는 효과

산화질소를 방출하는 SNP가 소뇌 Purkinje 세포의 포타슘 전류에 미치는 영향을 확인하고자 voltage-clamp mode 하에서 포타슘 전류를 기록한 후 SNP의 효과를 관찰하였다. 유지전압을 -70 mV로 하고 10 mV 간격으로 -60 mV에서 +40 mV까지 단계적으로 탈분극 펄스를 매 10초 마다 400 ms 동안 자극하였다.

총 10에서 소뇌 Purkinje 세포의 포타슘 전류는 1 μM SNP에 의하여 7,902±121 pA에서 7,011±342 pA로 감소하였으며 ($P < 0.05$), 10 μM SNP에 의하여서는 6,320±232 pA로 ($P < 0.05$) 감소하는 반응을 나타내었다 (Fig. 2).

L-arginine이 소뇌 Purkinje 세포 포타슘 전류에 미치는 효과

생체 내에서 산화질소가 생성될 때 기질로서 작용하는

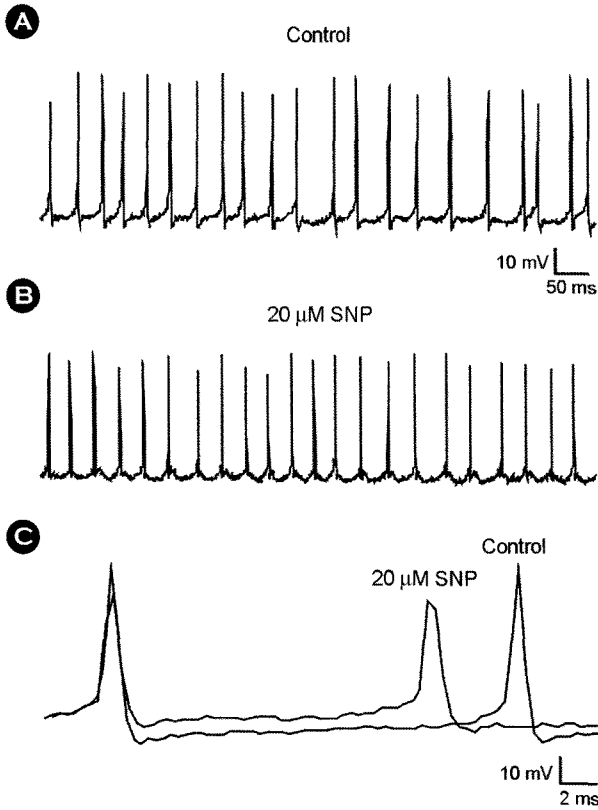


Fig. 1. Excitatory effects of SNP on spontaneous activity of rat cerebellar Purkinje cells. (A) control, (B) effects of 20 μM SNP, (C) comparison of SNP effects on the shape of action potentials.

L-arginine이 소뇌 Purkinje 세포 포타슘 전류에 미치는 영향을 확인하고자 voltage-clamp mode 하에서 포타슘 전류를 기록한 후 EGCG의 효과를 관찰하였다. 유지전압을 -70 mV 로 하고 10 mV 간격으로 -60 mV 에서 $+40\text{ mV}$ 까지 단계적으로 탈분극 펄스를 매 10초 마다 400 ms 동안 자극하였다.

총 10예에서 소뇌 Purkinje 세포의 포타슘 전류는 $10\text{ }\mu\text{M}$ SNP에 의하여 $8,112\pm 121\text{ pA}$ 에서 $7,302\pm 342\text{ pA}$ 로 감소하였으며 ($P<0.05$), $20\text{ }\mu\text{M}$ SNP에 의하여서는 $5,242\pm 232\text{ pA}$ 로 ($P<0.05$) 감소하는 반응을 나타내었다 (Fig. 3).

고찰

소뇌는 크게 신소뇌 (neocerebellum)와 고소뇌 (paleocerebellum), 그리고 원시소뇌 (archicerebellum)로 분류된다. 원시소뇌는 편엽소절엽 (flocculonodular lobe)으로 이루어져 있으며 전정계와 밀접하게 관계하여 몸의 균형유지와 안구운동의 조절에 관여하므로 전정성 소뇌 (vestibulocerebellum)라 부른다 (Ito, 1985).

소뇌의 소절엽에는 말초전정계에서 기시한 일차 전정 신경이나 뇌간의 전정핵을 거친 이차 전정신경이 하강 램핵 (inferior olive)을 거친 등반섬유 (climbing fiber)나 태

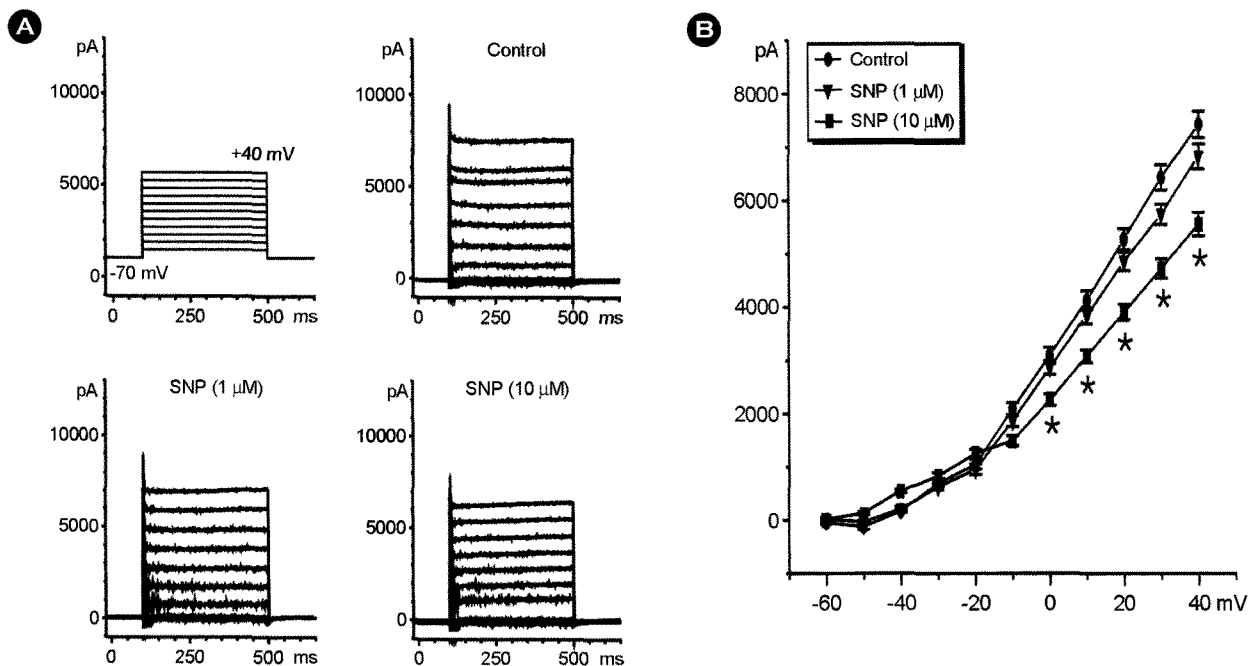


Fig. 2. Effects of SNP on the outward potassium currents in rat cerebellar Purkinje cells. In each panel, the cell was held at -70 mV and test depolarization with duration of 400 ms were applied from -60 mV to $+40\text{ mV}$ in 10 mV increments. (A) effects of $1\text{ }\mu\text{M}$ and $10\text{ }\mu\text{M}$ SNP, (B) current-voltage relationships for the potassium currents. *Significantly different from control ($P<0.05$).

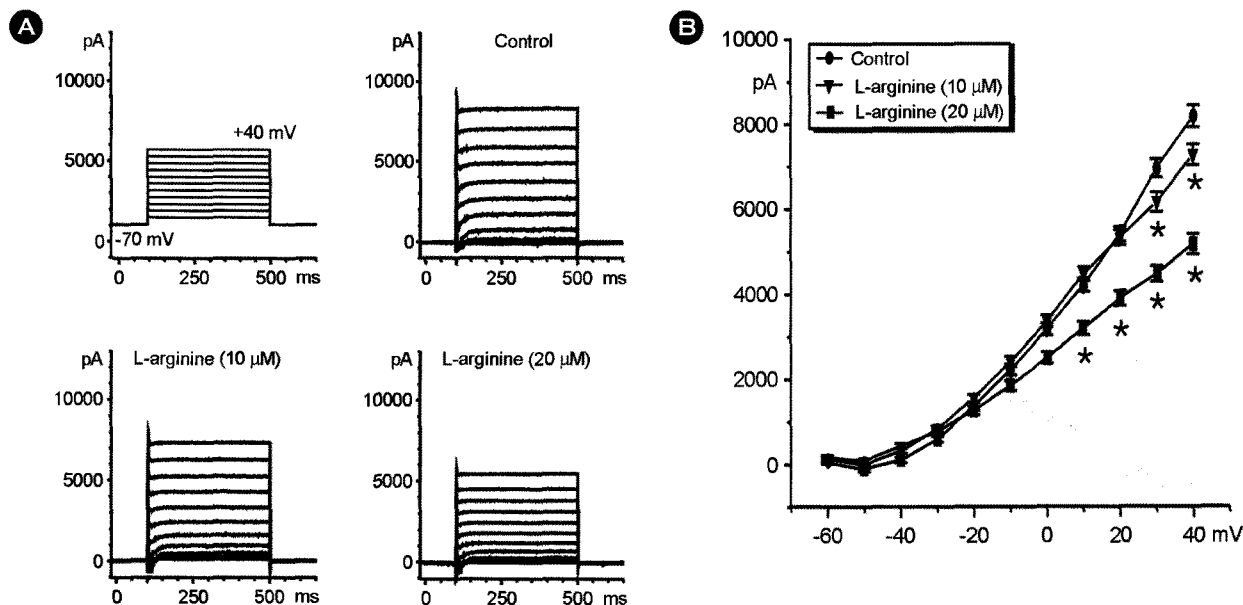


Fig. 3. Effects of L-arginine on the outward potassium currents in rat cerebellar Purkinje cells. In each panel, the cell was held at -70 mV and test depolarization with duration of 400 ms were applied from -60 mV to +40 mV in 10 mV increments. (A) effects of 10 μ M and 20 μ M L-arginine, (B) current-voltage relationships for the potassium currents. *Significantly different from control ($P < 0.05$).

상섬유 (mossy fiber)를 통하여 투사된다. 이들 감각정보들은 소뇌피질을 거쳐 다시 전정핵으로 feedback되어 전정안구반사나 전정척수반사의 조절에 관여하는데 이때 피질의 Purkinje 섬유가 전정핵에 대하여 억제적 조절을 하는 것으로 알려져 있다 (Ito, 1985).

전정기능이 정상인 경우 뿐만 아니라 일측 전정기능이 소실된 후 나타나는 전정보상 작용에 있어서도 소뇌는 중요한 역할을 하고 있다 (McCabe and Ryu, 1969; Kitahara et al., 1995; Kitahara et al., 1995). 소뇌제거술을 시행한 동물에서 일측 전정미로제거술을 시행한 동물에서 전정계 파괴에 따라 출현하는 증상의 회복이 느리거나 전혀 회복이 되지 않는 전정보상의 실패가 일어남이 보고되어 있고, 사람에서도 소뇌 경색 (cerebellar infarction)이 있는 환자에서 전정계의 손상에 따른 보상이 일어나지 않는다는 보고가 있다 (Furman et al., 1997). 특히 전정소뇌는 전정보상의 초기 단계에서 전정보상의 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 여기에 전정과 소뇌를 연결하는 전정-소뇌 뉴런의 주요한 신경전달물질인 glutamate가 관여하는 것으로 알려져 있다 (Smith and Darlington, 1988; Sansom et al., 1990; Darlington et al., 1991; Aoki et al., 1996).

Kim 등 (1997)은 NMDA 수용체의 길항제인 MK801에 의하여 유도된 전정보상의 실패가 전정-소뇌의 NMDA 수용체의 매개에 의한 것임을 확인한 바 있다. 이에 따

르면 일측 미로제거술만 시행한 동물에서 MK801을 투여하면 자발적 안진의 발생빈도수가 증가되는 등 일측 미로제거술의 정적증상이 악화되는 이른바 탈보상작용이 일어나는 반면, 일측 미로제거술과 소뇌의 편엽소절엽을 제거한 실험동물에서는 자발적 안진의 발생이 감소하는 등 전정보상기전이 촉진됨을 관찰한 바 있다.

산화질소는 세포내에 여러 가지 작용점을 가지고 있으나 중추신경계에서는 주로 cGMP를 통하여 그 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉 glutamate성 뉴런에서 NMDA 수용체가 활성화되면 세포내의 calcium 농도가 상승하게 되고 증가된 calcium과 세포내 calcium 결합 단백질인 calmodulin에 의하여 NOS의 활성이 증가된다 (Lee et al., 1993). 이에 따라 많은 양의 산화질소가 생성되는데 이들은 확산에 의하여 주위의 표적세포로 들어가는 데, 이곳에서 soluble guanylyl cyclase의 활성을 증가시켜 세포내 cGMP 농도를 올림으로써 다양한 기능을 나타내게 된다 (Brune and Lapetina, 1989; Meller et al., 1992; Dawson et al., 1992; Lee et al., 1993).

신경세포의 활동성에 영향을 미치는 것은 이온 채널의 전기적 활성이다. 특히 흥분성 세포에서 포타슘 전류는 세포의 막전압이나 활동전위 모양변화, 그리고 흥분 발사의 조정 등을 통하여 세포의 흥분성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 포타슘 채널이 열리게 되면 세포는 과분극되어 흥분성이 억제되고, 닫히게 되면 탈

분극되어 흥분성이 증가하게 된다 (Johnston et al., 1994; Kaplan and Miller, 2000). 본 실험에서 voltage-clamp 방법에 의하여 SNP는 전체 포타슘 전류를 감소시켰음을 관찰하였으며, current-clamp 방법에 의하면 SNP가 후과분극의 크기를 감소시키는 것을 관찰하였다. 신경세포 활동전위에서 재분극 후에 나타나는 후과분극은 주로 칼슘 의존성 포타슘 전류 (calcium-dependent potassium current)에 의하여 형성되는 것으로 알려져 있다 (Sah and Faber, 2002).

본 연구에서 소뇌의 Purkinje 세포는 산화질소에 의하여 흥분성이 증가되었으며, 포타슘 전류는 감소하였고 산화질소의 기질인 L-arginine에 의하여서도 동일한 반응을 나타내었다. 위에서 기술한 바와 같이 산화질소는 신경세포의 포타슘 전류를 조절함으로써 이 세포의 흥분성을 조절하는 것으로 사료된다. 이와 같은 실험결과는 산화질소가 전정핵에 작용할 뿐 아니라 소뇌의 신경세포에서도 의의 있는 기능을 하는 것으로서, 전정기능 조절이나 전정보상작용에 대한 연구 혹은 임상적 적용에 있어서 산화질소가 주요한 고려인자가 될 것임을 시사한다 하겠다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 전남대학교병원 임상의학연구소 연구비 지원에 의하여 이루어졌습니다.

REFERENCES

- Aoki M, Miyata H, Mizuta K, Ito Y. Evidence for the involvement of NMDA receptors in vestibular compensation. *J Vet Res.* 1996. 6: 315-317.
- Bon C, Bohm GA, Doble A, Stutzmann JM, Blanchard JC. A role for nitric oxide in long term potentiation. *Eur J Neurosci.* 1994. 4: 420-424.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase, indicating a neuronal role for nitric oxide. *Nature* 1990. 347: 768-770.
- Bredt DS, Snyder SS. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992. 8: 3-11.
- Brune B, Lapetina EG. Activation of a cytosolic ADP-ribosyl transferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem.* 1989. 264: 8455-8458.
- Bult H, Boeckstaens GE, Pelckmans PA, Hordaens, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990. 345: 346-347.
- Darlington CL, Flohr H, Smith PF. Molecular mechanisms of brainstem plasticity. The vestibular compensation model. *Mol-Neurobiol.* 1991. 5: 355-368.
- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in the brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol.* 1992. 32: 297-311.
- Furman JM, Balaban CD, Pollack IF. Vestibular compensation in a patient with a cerebellar infarction. *Neurology* 1997. 48: 916-920.
- Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *TINS.* 1991. 14: 60-67.
- Holscher C, Rose SP. Inhibiting synthesis of the putative retrograde messenger nitric oxide results in amnesia in a passive avoidance task in the chick. *Brain Res.* 1993. 619: 189-194.
- Ito M. *The cerebellum and neural control.* 1985. pp.13-20. Raven Press, NY, USA.
- Johnston AR, MacLeod NK, Dutia MS. Ion conductances contributing to spike repolarization and afterpotential in rat medial vestibular nucleus neurons. *J Physiol.* 1994. 481: 61-77.
- Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2000. 10: 381-391.
- Kay AR, Wong RK. Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *J Neurosci Methods.* 1986. 16: 227-238.
- Kim MS, Jin BK, Chun SW, Lee MY, Lee SH, Kim JH, Park BR. Role of vestibulocerebellar NMDA for behavioral recovery following unilateral labyrinthectomy in rats. *Neurosci Lett.* 1997. 222: 171-174.
- Kitahara T, Saika T, Takeda N, Kubo T, Kiyama H. Changes in Fos and jun expression after labyrinthectomy in the rat brainstem. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1995. 520: 401-404.
- Kitahara T, Takeda N, Saika T, Kubo T, Kiyama H. Effects of MK801 on Fos expression in the rat brainstem after unilateral labyrinthectomy. *Brain Res.* 1995. 700: 182-190.
- Lee JH, Price RH, Williams FG, Mayer B, Beitz AJ. Nitric oxide synthase is found in spinothalamic neurons and in neuronal processes that appose spinal neurons that express Fos induced by noxious stimulation. *Brain Res.* 1993. 608: 324-333.
- Matsumoto T, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U. Developmental changes of cytosolic and particulate nitric oxide synthase in rat brain. *Dev Brain Res.* 1994. 73: 199-203.
- McCabe BF, Ryu JH, Sekitani T. Further experiments on vestibular compensation. *Laryngoscope* 1972. 82: 381-396.
- Meller ST, Dykstra C, Gebhart GF. Production of endogenous

- nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. *Eur J Pharmacol.* 1992. 214: 93-96.
- Nagao S, Kitamura T, Nakamura N, Hiramatsu T, Yamada J. Differences of the primate flocculus and ventral paraflocculus in the mossy and climbing fiber input organization. *J Comp Neurol.* 1997. 382: 480-498.
- Sah P, Faber ES. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol.* 2002. 66: 345-353.
- Sansom AJ, Darlington CL, Smith PF. Intraventricular injection of an NMDA antagonists disrupts vestibular compensation. *Neuropharmacol.* 1990. 29: 83-84.
- Schilling K, Schmndt HHHW, Baader SL. Nitric oxide synthase expression reveals compartments of cerebellar granule cells and suggests a role of mossy fibers in their development. *Neuroscience* 1994. 59: 893-903.
- Smith PF, Darlington CL. The NMDA antagonist MK801 and CPP disrupt compensation for unilateral labyrinthectomy in the guinea pig. *Neurosci Lett.* 1988. 94: 309-313.
-