

고양이 삼차신경꼬리핵에서 저역치기계자극수용기 유래 들신경종말의 연접이전종말이 함유하는 신경전달물질에 대한 정량적 분석

김운숙, 문철주, 조진현¹, 배진영, 나연경², 복혜정³, 배용철, 백상규*
경북대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실, ¹경북대학교 치의학전문대학원 치과보철학교실,
²경북대학교 간호대학 기초간호과학교실, ³부산여자대학교 치위생과

Quantitative Analysis of Neurotransmitters in the Endings Presynaptic to Vibrissa Afferent Terminals in the Cat Trigeminal Caudal Nucleus

Yun Sook Kim, Cheol Ju Mun, Jin Hyun Cho¹, Jin Young Bae, Yeon Kyung Na²,
Hye Jeong Bok³, Yong Chul Bae, Sang Kyoo Paik*

Department of Oralanatomy and Neurobiology, ¹Department of Prosthetics, School of Dentistry, Daegu 700-412, Korea
²Division of Basic Nursing Science, College of Nursing, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea
³Department of Dental Hyegine, Busan Women's College, Busan 614-050, Korea
(Received January 19, 2012; Revised March 26, 2012; Accepted March 26, 2012)

ABSTRACT

The goal of this study was to identify neurotransmitters in endings (p-endings) presynaptic to low-threshold mechanoreceptive vibrissa afferents in the laminae III/IV of cat trigeminal caudal nucleus (Vc). Rapidly-adapting vibrissa afferents were intra-axonally labeled after electrophysiological identification, and postembedding immunogold staining with antisera against γ -aminobutyric acid (GABA) and glycine was performed, followed by quantitative ultrastructural analysis of p-endings presynaptic to the labeled vibrissa afferent terminals.

Sixteen p-endings, which are presynaptic to the HRP-labeled vibrissa afferent terminals, were analyzed in this study: Eight p-endings (50%, 8/16) were immunopositive to GABA but immunonegative to glycine (GABA+ p-ending), and remaining 8 p-endings (50%, 8/16) exhibited immunoreactivity to both GABA and glycine. Bouton volume of the p-endings was not significantly different between the two groups. However, the p-endings differed from each other in relative content of GABA and glycine.

These findings suggest that low-threshold mechanoreceptive information conveyed through vibrissa afferent at Vc is presynaptically modulated by GABA and/or glycine, and that degree of presynaptic modulation may differ among each vibrissa afferent terminal.

Keywords : Presynaptic endings, Vibrissa afferent, Immunogold, GABA, Glycine

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (to S. K. Paik, No. 2010-0008469) and the Korea Research Foundation Grant (to Y. S. Kim, KRF-2008-E00006) funded by the Korean Government (MOEHRD)

* Correspondence should be addressed to Dr. Sang Kyoo Paik, Department of Oral Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 700-412, Korea. Ph.: (053) 660-6865, Fax: (053) 426-7731, E-mail: skpaik@knu.ac.kr

서 론

구강악안면 영역의 감각정보는 일차들신경섬유(primary afferent)을 통해 삼차신경감각핵군(trigeminal sensory nuclei) 내에 위치하는 2차신경세포로 전달된다. 삼차신경감각핵군은 뇌다리(brainstem) 가쪽에 뻗어있는 세포군집으로서 세포구축학적 및 기능적으로 4개 아핵(subnucleus)으로 구성된다. 이는 삼차신경주감각핵(trigeminal principal sensory nucleus)과 삼차신경척수핵(spinal trigeminal nucleus)으로 크게 분류되며, 삼차신경척수핵은 다시 입쪽핵(nucleus oralis), 중간핵(nucleus interpolaris) 및 꼬리핵(nucleus caudalis)으로 세분된다(Olszewski, 1950). 이들 삼차신경감각핵군으로 일차들신경섬유가 투사하는 양식은 서로 다른 감각정보를 전달하는 특정 신경집단마다 다르게 나타나며, 또한 일차들신경과 2차신경사이에 이루어지는 연결양식도 각 아핵마다 그리고 서로 다른 감각정보를 전달하는 특정 신경집단마다 다양한 차이를 나타낸다(Bae & Yoshida, 2011). 이러한 형태학적 정보들은 구강악안면 영역의 감각정보들이 각 아핵별로 또한 특정 감각정보와 관련한 신경회로에 따라 감각정보의 처리기전이 서로 다를 것이라는 것을 제시한다.

말초감각의 전달은 대부분 일차들신경의 축삭종말에서 흥분성 신경전달물질인 glutamate를 분비함으로써 이루어지는데(Maxwell et al., 1990a, b, 1993; Valtchanoff et al., 1992; Broman et al., 1993; De Biasi et al., 1994), 이 때 연결이전종말(presynaptic endings; p-ending)은 일차들신경종말과 축삭사이연접(axoaxonic synapse)을 형성하고, 대표적인 억제성 신경전달물질인 γ -aminobutyric acid(GABA) 및 glycine을 분비함으로써 연결이전억제(presynaptic inhibition)가 발생하며, 결과적으로 일차들신경의 신경전달물질 분비량이 조절됨으로써 감각정보의 전달이 제어된다고 알려져 있다(Aronin et al., 1981; Lovik, 1981, 1983; Peng & Frank, 1989a, b; Ribeiro-Da-Silva & Cuello, 1990; Todd, 1990; Ribeiro-Da-Silva et al., 1991; Todd et al., 1991; Doyle & Maxwell, 1994). 또한 삼차신경감각핵군의 각 아핵별로 그리고 특정 감각신경마다 서로 다른 p-ending의 수와 빈도, GABA 및 glycine의 함유 비율, 그리고 체적의 차이가 존재한다는 것이 다수 보고된 바 있다(Bae et al., 2005; Moon et al., 2008; Bae & Yoshida, 2011). 이러한 다양한 차이들은 일차들신경종말의 연결분비량을 보다 세밀하고 복잡한 양상으로 조절한다는 것을 나타내는 것으로서, 감각정보의 전달과 처리에 있어 p-ending에 의한 연결이전억제는 매우 중요한 요소임을 분명히 제시하고 있다.

동물의 콧수염은 물체의 위치, 거리, 방향성, 질감 및 공기의 흐름 등을 인지하는 기관이다. 그동안 보고된 바에 의하면, 이러한 저역치기계자극정보를 전달하는 고양이콧수염유

래 일차들신경은 삼차신경감각핵군의 주감각핵, 중간핵 및 꼬리핵의 제 3~4층(laminae III/IV)으로 투사되며, 각 아핵별로 일차들신경종말과 p-ending 및 2차신경 사이에 이루어지는 연결양상이 서로 다를 뿐만 아니라, 각 아핵별로 일차들신경의 연결분비 혹은 연결강도와 관련한 미세구조적 차이가 있다는 것이 알려져 왔다(Bae et al., 2000, 2005; Moon et al., 2008; Paik et al., 2010). 또한 최근에는 삼차신경중간핵에서 저역치기계자극정보를 전달하는 일차들신경종말에 대한 연결이전억제에는 GABA 혹은 glycine이 관여할 것이라는 보고가 있었다(Moon et al., 2008). 그러나 삼차신경꼬리핵에서 정보를 처리하는 연결이전억제에는 어떠한 신경전달물질이 관여하는 지에 대해서는 알려진 바 없다.

이 연구에서는 면역조직화학적 염색을 통해 연결이전종말 내의 GABA와 glycine에 대한 정량적 분석을 시행함으로써, 삼차신경꼬리핵에서 저역치기계자극정보를 전달하는 일차들신경과 축삭사이연접을 이루는 연결이전종말에는 어떠한 신경전달물질이 함유되어 있는 지, 그리고 이들 연결이전종말의 연결강도와 밀접한 연관이 있는 미세구조적 특징에 대하여 연구함으로써 연결이전억제 기전에 대해 좀 더 깊이있게 이해하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 처리

본 연구와 관련한 모든 실험동물의 보호 및 처치는 경북대학교 동물실험윤리위원회(Intramural Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아서 진행하였다. 체중 약 3.5 kg의 성숙한 고양이를 sodium pentobarbital (40 mg/kg, I.V.)로 전신마취하고 pancuronium bromide (0.07 mg/kg)를 정맥주사하여 근육이완을 시킨 후, 인공호흡기를 이용하여 호기 이산화탄소 농도를 3.5~5.0%로 유지하는 인공호흡을 실시하였다. 전기열판을 이용하여 체온을 37~38°C로 유지하며, 호흡운동에 따른 뇌의 움직임(brainstem pulsation)을 방지하기 위해서 양측성 기흉(bilateral pneumothorax)을 형성하고 뇌척수액을 유출(cisternal drainage)시켰다. 동물을 뇌정위 고정장치(stereotaxic apparatus)로 고정하여 뒤통수뼈(occipital bone), 마루뼈(parietal bone), 관자뼈(temporal bone)의 일부를 제거한 후, 뒤통수엽 겹질(occipital cortex), 소뇌 천막(tentorium of cerebellum), 소뇌의 가쪽 일부(lateral part of cerebellum)를 흡입펌프의 끝으로 흡입하여 중간뇌 아래둔덕(inferior colliculus of mesencephalon)의 꼬리 끝으로부터 상하 길이가 10 mm 정도 되도록 아래쪽 뇌줄기를 노출시켰다.

2. 단일 축삭 내 HRP 주입 (intra-axonal HRP injection)

0.3 M KCl 및 0.05 M Tris buffer에 용해한 3.0% horseradish peroxidase (HRP) 용액 (pH 7.6; Toyobo, Japan)을 직경 0.7~1.0 μm 의 끝이 경사진 마이크로피펫 (beveled micropipette)에 모세혈관 작용 (capillary action)을 이용하여 채운 후, 축삭 내 기록 및 HRP 염색을 시행하였다. 2 M potassium citrate 용액을 채운 끝이 경사진 마이크로피펫을 사용하여 삼차신경척수로 (spinal trigeminal tract)를 찾았으며, high amplification에서 전위를 나타내기 위해 축전기 (condenser)를 접속시킨 것과 low amplification에서 전위를 나타내기 위해 직접 접속시킨 2개의 oscilloscope (Nihonkoden, Vc-10, Japan)를 사용하여 활동전위를 관찰 및 기록하였다. Stepping microdrive (Narishige, Japan)를 사용하여 삼차신경주감각핵 부위의 높이에서 삼차신경 척수로를 관통시켜 피펫을 하방으로 이동하면서 갑작스러운 음전하로의 DC potential shift와 수용영역 (receptive field)에 자극이 가해지면서 나타나는 활동전위 (action potential)의 출현에 의해 축삭 내에 삽입된 것을 확인하였다 (Nakagawa et al., 1997). 고양이 콧수염 유래 신경섬유 내에 삽입한 후, 단일 고양이 콧수염에 가해지는 기계적 자극에 대한 신경섬유의 반응 특성을 통하여 고양이 콧수염 유래 신경섬유를 전기생리학적으로 확인하고, 안정적으로 축삭 내 삽입이 이루어졌을 때 10~15 nA의 전류를 가하여 3~6분간 HRP 용액을 이온삼투 (iontophoresis)하였다.

3. 조직 처리

18시간 정도 생존시킨 후, 동물을 희생하여 약 4 liter의 Palay's 고정액 (1.0% paraformaldehyde, 1.0% glutaraldehyde and 0.2 M CaCl_2 in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2~7.4)을 좌심실을 통해 관류 고정시키고, 뇌줄기를 제거한 후 4°C의 동일 고정액에 2시간 동안 후고정 (post-fixation)을 시행하였다. 진동절편기 (TPI 1000; The Vibratome Co., St. Louis, MO)로 80 μm 두께의 횡단 연속절편을 형성한 후, CoCl_2 -intensified 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 반응을 시행하였다 (Adams, 1977). 삼차신경꼬리핵 제 3~4층에서 HRP에 의해 표식된 축삭이 다수 보이는 절편들을 골라 0.1 M phosphate buffer로 충분히 세척한 다음, 2% OsO_4 용액에 실온에서 30분간 후고정한 후, 계열 에탄올로 탈수과정, epon 포매과정을 거쳐 실리콘을 입힌 슬라이드글라스 위에서 58°C에서 48시간 동안 경화시켰다.

4. 포매후금입자면역염색 (Postembedding immunogold labeling) 및 정량 분석

포매한 절편으로부터 HRP에 의해 표식된 축삭이 다수 함유하는 부분을 미세절취하여 순간접착제를 이용하여 공

block 위에 붙인 후, 연속초박절편을 형성하였다. Formvar 지지막을 형성한 단공 nickel grid 위에 모은 연속절편상에서 포매후금입자면역염색법을 시행하였다. 요약하면, 먼저 레진을 녹여내기 위하여 그리드를 1% periodic acid에 10분간 반응시켰다. 또한 osmium tetroxide를 제거하기 위하여 9% sodium periodate에 15분간 반응시켰다. 절편은 각 반응 사이마다 증류수로 세척한 뒤, TBST (tris-buffered saline containing 0.1% triton X-100; pH 7.4) 방울 위에 10분간 두었다. 이후 TBST에 용해된 2% human serum albumin (HSA; pH 7.4)에 10분간 반응시킨 뒤 TBST(containing 2% HSA, pH 7.4)로 희석한 항혈청 rabbit anti-GABA (1 : 800) 및 rabbit anti-glycine (1 : 280)에 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이후 TBST로 세척한 그리드를 15 nm 직경의 금입자가 결합된 goat anti-rabbit IgG (BioCell Co., Cardiff, UK)를 TBST (containing 0.05% polyethylene glycol; pH 7.4)에 1 : 25배율로 희석한 용액에 3시간 동안 반응시켰다. 증류수로 세척 후 그리드를 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하였다.

항 GABA (rabbit anti-GABA) 및 항 glycine (rabbit anti-glycine) 혈청은 노르웨이 오슬로 대학의 오테르슨 박사 (Dr. O. P. Ottersen, Oslo Univ., Norway)로부터 기증받아 사용하였다. 일차 항혈청을 처리하기 전, 교차반응을 방지하기 위하여 희석된 각 혈청을 아미노산과 glutaraldehyde (G)의 결합물과 반응시켰다. 즉, 항 GABA 혈청은 glutamate-G (500 μM)와 항 glycine 혈청은 GABA-G (200 μM) 및 β -alanine-G (300 μM)와 16 시간 동안 반응시킨 후 사용하였다 (Ottersen et al., 1986). 항체 특이성을 검증한 결과, 일차 항혈청을 제외한 면역반응, 비면역혈청 (normal rabbit serum)으로 대체한 면역반응, 그리고 희석한 항 GABA 혈청을 GABA-G (200 μM)와 항 glycine 혈청을 glycine-G (300 μM)와 미리 반응시킨 preadsorption test를 시행한 경우에는 특이적 면역반응이 나타나지 않음을 확인하였다.

전자현미경 검경은 가속전압 80 kv에서 투과전자현미경 (Hitachi H-7500, Japan)으로 관찰하였다. 투과전자현미경으로 HRP에 표식된 종말 및 이와 인접한 가지돌기와 비표식 축삭 종말을 포함하는 부위를 모든 연속절편에서, 인접 연속절편 두 장 당 한 장씩 사진을 촬영 후 인화하여 (배율: 15,000 \times , 인화배율: 25,000 \times) 재구성한 후, 각 사진의 표식종말과 연결하는 p-ending의 단면적에 절편을 두께 (75 nm)를 곱함으로써 체적을 구하였다. 또한 P-ending내 금입자 밀도 (금입자 수/ μm^2)는 Image J software를 사용하여 표식종말과 연결하는 p-ending의 면적을 측정 한 후 p-endings내 사립체 (mitochondria)를 제외한 연결소포위에 분포하는 금입자의 수를 헤아림으로써 산출하였다. P-ending내 금입자 밀도를 측정 한 초박절편 전체의 조직평균금입자밀도 (mean tissue density)는 해당 절편내에서 약 2 μm^2 면적에 해당하는 영역 10군데를 무작위로 선택한 후 단위면적 (μm^2) 당 금입자 수로서 산출

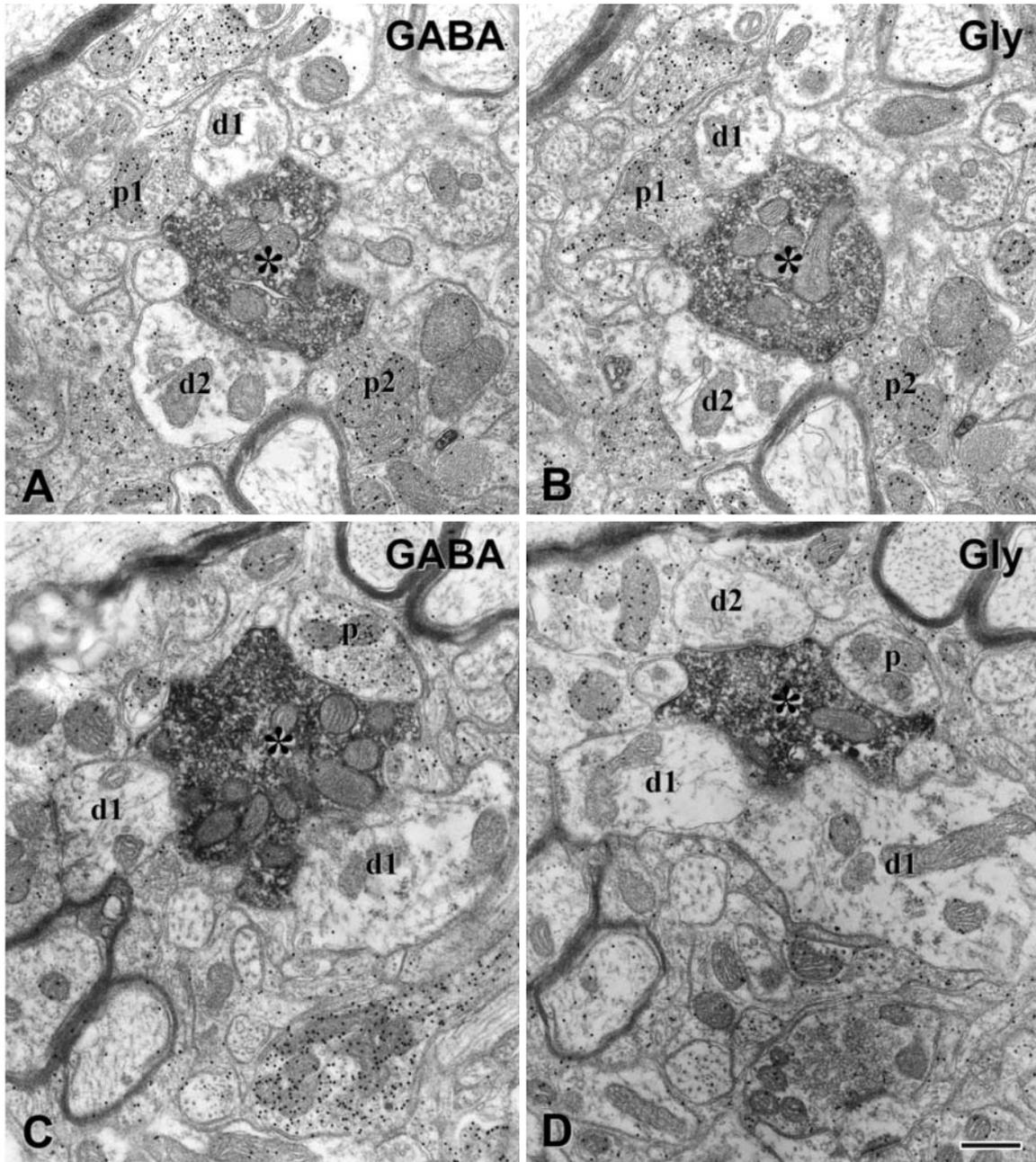


Fig. 1. Electron micrographs of HRP-labeled vibrissa afferent terminals that made contacts with presynaptic endings (p-endings) and postsynaptic dendrites (d) in laminae III/IV of cat trigeminal caudal nucleus. Postembedding immunogold staining against GABA or glycine (Gly) on adjacent ultrathin sections specifically labeled the p-endings (p) that made contacts with the HRP-labeled vibrissa afferent terminals (asterisks). A, B: Two p-endings (p1, p2) were immunopositive for both GABA and glycine. C, D: A p-ending (p) showed immunoreactivity only for GABA. Scale bar in D, 500 nm (also applies to A-C).

하였다. GABA 혹은 glycine에 대한 p-endings내 금입자 밀도가 평균금입자밀도보다 높은 금입자 밀도를 보이는 경우, 면역양성 반응을 보인 p-ending으로 정의하였다. P-ending내의 GABA 혹은 glycine에 대한 표준금입자밀도(normalized gold particle density)는 p-endings내 금입자 밀도를 조직평균금입자밀도로 나눔으로써 산출하였다. 통계는 unpaired stu-

dent's t-test ($P < 0.05$)를 사용하였다.

결 과

광학현미경을 통한 관찰에서, 콧수염유래 일차들신경섬유

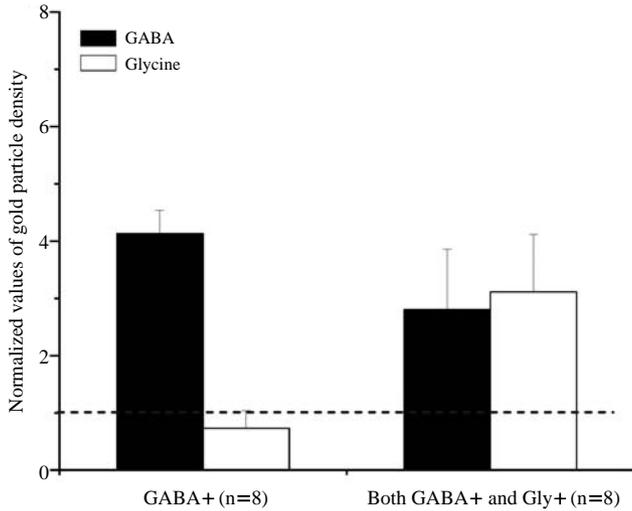


Fig. 2. Histogram showing normalized values (mean \pm SD) of gold particle density relative to mean tissue density for GABA and glycine (Gly) in endings (p-endings) presynaptic to the vibrissa afferent terminals in laminae III/IV of cat trigeminal caudal nucleus. A dotted line indicates a cutoff value for immunopositivity. The normalized values for GABA and glycine in GABA-immunopositive (+) p-endings were 4.1 ± 0.4 for GABA and 0.7 ± 0.3 for glycine. In both GABA+ and Gly+ p-endings, the values were 2.8 ± 1.1 for GABA and 3.1 ± 1.0 for glycine.

Table 1. Frequency (%) of occurrence and volume (μm^3) of GABA- and/or glycine (Gly)-immunopositive (+) endings (p-endings) presynaptic to the vibrissa afferent terminals in cat trigeminal caudal nucleus

Immunoreactivity of p-endings	Proportion (%)	Volume (μm^3)
Both GABA+ and Gly+	50.0 (8/16)	0.38 ± 0.18
GABA+	50.0 (8/16)	0.32 ± 0.19
Gly+	0.0 (0/16)	—
Immunonegative	0.0 (0/16)	—

Values in parentheses denote the number of immunopositive p-endings per total p-endings examined.

의 종말은 삼차신경꼬리핵의 제 3~4층에서 밀집되어 있는 것이 관찰되었다. 전자현미경 검경에서, HRP에 의해 표식된 이들 일차측신경섬유의 종말에는 전자밀도가 높은 염색산물이 존재하였으며, 이를 통해서 표식종말을 구분할 수 있었다 (Fig. 1). 본 연구에서는 총 19개의 표식종말을 확인하였으며, 이들과 연결하는 16개의 연결이전종말에 함유된 신경전달물질을 금입자면역염색법을 통하여 분석하였다.

면역양성 연결이전종말에서 금입자들은 세포질, 연결소포, 사립체 위에서 밀집되어 관찰되었다. 표식종말의 연결이전종말(p-ending)들은 GABA 혹은 glycine에 대하여 면역양성 반응을 보였는데, 특히 glycine에 면역양성 반응을 보이는 것은 모두 GABA에 대해서도 면역양성 반응을 보였다 (Fig. 1). 분석한 총 16개 p-ending 중 8개 p-ending (50%, 8/16)은 GABA에만 면역양성 반응을 보였다 (GABA+): 이들 GABA+

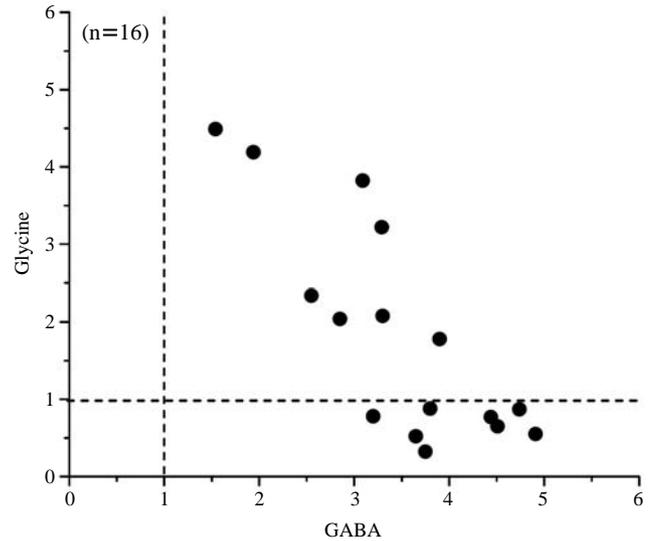


Fig. 3. Scatterplot showing normalized values of gold particle density relative to mean tissue density for GABA and glycine in individual endings (p-endings) presynaptic to the vibrissa afferent terminals in the cat trigeminal caudal nucleus. Normalized values denote relative GABA and glycine content in p-endings. Dotted lines indicate cutoff values for immunopositivity.

p-ending에서 GABA에 대한 금입자밀도 (gold particle density)는 조직평균금입자밀도 (mean tissue density)에 비해 약 3.2~4.9배 높은 반면, glycine에 대한 금입자밀도는 조직평균금입자밀도의 0.3~0.9배로서 glycine에 대해서는 면역양성 반응을 보였다 (Fig. 2, Table 1). 나머지 8개 p-ending (50%, 8/16)들은 GABA 및 glycine에 대하여 함께 면역양성 반응을 보였다 (both GABA+ and Gly+): 이들은 GABA에 대한 금입자밀도는 조직평균금입자밀도에 비해 약 1.5~3.8배 높았으며, 또한 glycine에 대한 금입자밀도는 조직평균금입자밀도의 1.7~4.5배로서 glycine에도 면역양성 반응을 보였다 (Fig. 2, Table 1).

이들 p-ending들의 체적은 $0.17 \sim 0.63 \mu\text{m}^3$ 범위였고, 평균 및 표준편차가 $0.35 \pm 0.18 \mu\text{m}^3$ 이었다. GABA만을 함유하는 p-ending과 GABA와 glycine 모두를 함유하는 p-ending간에 유의한 평균체적의 차이는 없는 것으로 나타났다 (unpaired *t*-test, $P < 0.05$; Table 1).

각 p-ending들의 GABA 및 glycine에 대한 표준금입자밀도 (normalized gold particle density)를 확인한 결과, 각 p-endings내 GABA와 glycine의 상대적 함량은 각기 서로 다른 것으로 나타났다 (Fig. 3).

고 찰

이 연구에서 삼차신경꼬리핵 제 3~4층으로 투사하는 고

양이콧수염유래 일차들신경과 연결하는 p-ending들은 GABA 및 glycine을 함유하고 있었다. 그 p-ending들은 GABA만을 함유하거나 GABA와 glycine 모두를 함유하는 2개 집단으로 구분되었으며, 두 집단간 비율은 서로 유사하였다. 또한 이 두 집단의 p-endings 사이에는 유의한 체적의 차이가 보이지 않았으나, 각 p-ending 별로 GABA와 glycine에 대한 상대적 함량이 서로 다르다는 것을 밝혔다. 이러한 결과들은 고양이콧수염유래 일차들신경이 삼차신경꼬리핵의 2차신경으로 저역치기계자극정보를 전달하는 과정에서 일차들신경종말마다 각기 서로 다른 양상으로 제어되고 있음을 시사한다.

삼차신경감각핵군으로 투사되는 일차들신경종말들은 흔히 p-endings과의 축삭사이연접(axoaxonic synapse)을 통해 2차신경으로의 감각정보전달이 연접이전제어(presynaptic modulation)를 받는다(Lovick, 1981, 1983; Bae et al., 2000, 2005; Moon et al., 2008). 이 p-endings들은 대개 억제성신경전달물질인 GABA 혹은 glycine을 함유하는 것으로 알려져 있으며, 대다수의 p-ending들은 GABA와 glycine 모두를 동시에 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Bae & Yoshida, 2011). 예를 들어, 척수등쪽뿔(spinal dorsal horn) 혹은 삼차신경꼬리핵의 제 3~4층으로 투사하는 감각신경들이 GABA와 glycine 모두를 함유한 p-endings과 연결하는 비율을 살펴보면, 모낭유래들신경(hair follicle afferent)은 약 67~80%(Sutherland et al., 2002; Watson et al., 2002), 빠른적응형 피부유래들신경(rapidly-adapting cutaneous afferents)은 73~95%(Sutherland et al., 2002; Watson, 2003)이다. 또한 삼차신경중간핵으로 투사하는 고양이콧수염유래 들신경종말과 연결하는 p-endings 또한 대다수(83%)가 GABA와 glycine 모두를 함유하는 것으로 보고되고 있다(Moon et al., 2008). 반면, 이들 기존 보고에서는 GABA만을 함유하는 p-endings들은 4~17%에 불과하다는 결과를 제시하고 있다. 이 연구에서 제시한 삼차신경꼬리핵 제 3~4층으로 투사하는 빠른적응형 고양이콧수염유래 들신경과 연결하는 p-endings들은 기존 보고들의 결과에 비해 GABA만을 함유하는 p-ending의 비율이 상대적으로 높고, GABA와 glycine 모두를 함유하는 p-ending의 비율은 상대적으로 낮은 경향을 보인다. 이와 같은 비율의 차이점은 아마도 콧수염유래 일차들신경이 동일한 투사영역을 가지는 다른 감각신경과는 다른 양상으로 p-endings에 의해 제어될 수 있으며, 또한 동일한 콧수염유래 일차들신경섬유라고 할지라도 투사하는 아핵별로 그 제어양상이 다를 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

또한 이 연구에서는 GABA만을 함유한 p-ending과 GABA와 glycine 모두를 함유한 p-ending 사이에 유의한 평균체적의 차이가 없었다. '크기의 원칙(size principle)'에 따르면, 축삭종말의 체적은 그 종말이 함유한 신경전달물질의 분비량과 밀접한 상관관계가 있다(Pierce & Mendell, 1993; Pierce &

Lewin, 1994). 즉, 체적이 클수록 함유하는 연접소포(synaptic vesicle)가 많으며, 연접이후신경과 이루는 활성연접면적(active zone area)이 크다는 등의 여러 미세구조적 지표들에 근거하여 축삭종말의 체적은 신경전달물질의 분비량 혹은 연접강도(synaptic strength)를 상대적으로 나타낼 수 있는 지표라고 할 수 있다. 이전의 연구에 따르면, 고양이콧수염유래 일차들신경종말과 연결하는 p-ending의 체적은 삼차신경중간핵이나 주감각핵에 비해 꼬리핵에서 매우 작고 일정한 체적을 지닌 것으로 나타났다(Nakagawa et al., 1997; Moon et al., 2008; Paik et al., 2010). 이는 다른 아핵의 p-ending의 분비량과 비교해서 삼차신경꼬리핵의 p-ending이 분비할 수 있는 억제성 신경전달물질의 총량이 상대적으로 적은 수준임을 나타낸다. 이와 더불어, GABA만을 함유한 그리고 GABA와 glycine 모두를 함유한 p-ending 집단 사이의 평균 체적에 유의한 차이가 없다는 것은 두 p-ending 집단의 신경전달물질의 분비량이 서로 비슷한 수준임을 나타낸다.

그러나 이 연구에서 각 p-ending이 함유하는 GABA와 glycine의 상대적 함량이 서로 달랐다. 이는 p-ending에서 분비할 수 있는 신경전달물질의 총량은 유사하더라도 분비되는 신경전달물질내에 포함된 GABA와 glycine 함량은 서로 다른 비율일 것이라는 점을 시사한다. GABA와 glycine에 의한 연접이전억제는 연접이후신경의 연접분비를 억제하는 가장 기초적인 억제성 신경전달물질이다. P-endings에서 일차들신경으로 분비되는 GABA의 경우, GABA_A 혹은 GABA_B 수용체를 통한 억제기전이 널리 받아들여지고 있다. 예를 들어 GABA_A 수용체가 활성화되면 일차들신경종말내의 염소이온(Cl⁻) 농도를 증가시키고, primary afferent depolarization(PAD)을 단계적으로 유발함으로써 일차들신경내로 칼슘이온(Ca²⁺)의 유입량을 감소시키고, 결과적으로 일차들신경종말의 연접분비량을 감소시키는 연접이전억제를 유발한다고 알려져 있다(Curtis et al., 1981; Edwards et al., 1989; Maxwell et al., 1990b; Cattaert & El Manira, 1999; Watson et al., 2005). 또한 GABA_B 수용체가 활성화된다면, inwardly rectifying potassium channel(GIRK 혹은 Kir3)의 활성화를 야기시켜 억제성연접이후전위(inhibitory postsynaptic potential)를 생성하고(Dutar & Nicoll, 1988; Lüscher et al., 1997), voltage-activated Ca²⁺ channel을 억제함으로써 신경전달물질의 분비가 감소한다고 알려져 있다(Scholz & Miller, 1991; Mintz & Bean, 1993; Amico et al., 1995; Poncer et al., 1997). 한편, gephyrin이라는 glycine 수용체 지지단백질은 일차들신경종말에서는 발현되지 않는다는 보고가 있으며(Todd et al., 1995), 이에 p-ending과 일차들신경종말 및 연접이후신경사이의 삼각연접(synaptic triad)을 통해 p-endings이 분비한 glycine이 일차들신경종말을 통하지 않고 직접 연접이후신경에 작용할 것이라는 가정이 제기되기도 한다(Bae & Yoshida, 2011). 그러나 현재까지 p-endings이 분비하는

glycine이 어떻게 일차들신경종말의 연결분비를 제어하는지에 대해서는 아직 명확히 알려진 바 없다. 다만, 이전 연구에 따르면 GABA의 작용에 의해 연결이후신경에서 발생하는 미세 억제성연접이후전류(GABA-mediated mIPSCs)는 느리게 소멸하는 특성이 있으며, 반면 glycine에 의해 발생하는 미세 억제성연접이후전류(glycine-mediated mIPSCs)는 GABA에 비해 상대적으로 빠르게 소멸하는 특징이 있는 것으로 알려져 있다(Jonas et al., 1998; Keller et al., 2001; Nabekura et al., 2004). 이러한 억제성연접이후전류에 관한 결과들은 GABA와 glycine이 연결이후신경을 억제하는 지속시간이 다르다는 것을 나타낸다. 또한 GABA와 glycine을 동시에 분비하는 경우에는 각각의 연결이후전류가 혼합된 형태로 나타나며, GABA나 glycine만을 분비하는 경우에 비해 연결이후신경에 대한 억제작용이 보다 강력하게 나타난다(Russier et al., 2002). 따라서 이 연구에서 고양이콧수염 유래 일차들신경종말과 연결하는 각 p-ending의 GABA와 glycine 함량이 각기 다르다는 점은 각 p-ending이 저역치기 계자극정보를 전달하는 일차들신경종말의 연결분비와 연결이후신경의 활성을 억제하는 시간 및 강도 측면에서 각기 서로 다르다는 것을 나타낸다.

참 고 문 헌

- Adams JC: Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker. *Neuroscience* 2 : 141-145, 1977.
- Amico C, Marchetti C, Nobile M, Usai C: Pharmacological types of calcium channels and their modulation by baclofen in cerebellar granules. *J Neurosci* 15 : 2839-2848, 1995.
- Aronin N, DiFiglia M, Liotta AS, Martin JB: Ultrastructural localization and biochemical features of immunoreactive LEU-enkephalin in monkey dorsal horn. *J Neurosci* 1 : 561-577, 1981.
- Bae YC, Ahn HJ, Park KP, Kim HN, Paik SK, Bae JY, Lee HW, Kim KH, Yoshida A, Moritani M, Shigenaga Y: The synaptic microcircuitry associated with primary afferent terminals in the interpolaris and caudalis of trigeminal sensory nuclear complex. *Brain Res* 1060 : 118-125, 2005.
- Bae YC, Ihn HJ, Park MJ, Ottersen OP, Moritani M, Yoshida A, Shigenaga Y: Identification of signal substances in synapses made between primary afferents and their associated axon terminals in the rat trigeminal sensory nuclei. *J Comp Neurol* 418 : 299-309, 2000.
- Bae YC, Yoshida A: Ultrastructural basis for craniofacial sensory processing in the brainstem. *Int Rev Neurobiol* 97 : 99-141, 2011.
- Broman J, Anderson S, Ottersen OP: Enrichment of glutamate-like immunoreactivity in primary afferent terminals throughout the spinal cord dorsal horn. *Eur J Neurosci* 5 : 1050-1061, 1993.
- Cattaert D, El Manira A: Shunting versus inactivation: analysis of presynaptic inhibitory mechanisms in primary afferents of the crayfish. *J Neurosci* 19 : 6079-6089, 1999.
- Curtis DR, Lodge D, Bornstein JC, Peet MJ: Selective effects of (-)-baclofen on spinal synaptic transmission in the cat. *Exp Brain Res* 42 : 158-170, 1981.
- De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Bernardi P, Valtchanoff JG, Weinberg RJ: Ultrastructural and immunocytochemical characterization of primary afferent terminals in the rat cuneate nucleus. *J Comp Neurol* 37 : 275-287, 1994.
- Doyle CA, Maxwell DJ: Light- and electron-microscopic analysis of neuropeptide Y-immunoreactive profiles in the cat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 61 : 107-121, 1994.
- Dutar P, Nicoll RA: A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. *Nature* 332 : 156-158, 1988.
- Edwards FR, Harrison PJ, Jack JJ, Kullmann DM: Reduction by baclofen of monosynaptic EPSPs in lumbosacral motoneurons of the anaesthetized cat. *J Physiol* 416 : 539-556, 1989.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkuhler J: Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281 : 419-424, 1998.
- Keller AF, Coull JA, Chery N, Poisbeau P, De Koninck Y: Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminae I-II of the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 21 : 7871-7880, 2001.
- Lovick TA: Primary afferent depolarization of tooth pulp afferents by simulation in nucleus raphe magnus and the adjacent reticular formation in the cat: effect of bicuculine. *Neurosci Lett* 25 : 173-178, 1981.
- Lovick TA: The role of 5-HT, GABA and opioid peptides in presynaptic inhibition of tooth pulp input from the medial brainstem. *Brain Res* 289 : 135-142, 1983.
- Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA: G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19 : 687-695, 1997.
- Maxwell DJ, Christie WM, Brown AG, Ottersen OP, Storm-Mathisen J: Identified hair follicle afferent boutons in the spinal cord of the cat are enriched with L-glutamate-like immunoreactivity. *Brain Res* 606 : 156-161, 1993.
- Maxwell DJ, Christie WM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J: Terminals of group Ia primary afferent fibers in Clarke's column are enriched with L-glutamate-like immunoreactivity. *Brain Res* 510 : 346-350, 1990a.
- Maxwell DJ, Christie WM, Short AD, Brown AG: Direct observation of synapses between GABA-immunoreactive boutons and muscle afferent terminals in lamina VI of the cat's spinal cord. *Brain Res* 530 : 215-222, 1990b.
- Mintz IM, Bean BP: GABA_B receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* 10 : 889-898, 1993.
- Moon YS, Paik SK, Seo JH, Yi HW, Cho YS, Moritani M, Yoshida A, Ahn CD, Kim YS, Bae YC: GABA- and glycine-like immunoreactivity in axonal endings presynaptic to the vibrissa afferents in the cat trigeminal interpolar nucleus. *Neuroscience* 152 : 138-145, 2008.

- Nabekura J, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Shibata S, Matsubara A, Jinno S, Mizoguchi Y, Sasaki A, Ishibashi H: Developmental switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals. *Nat Neurosci* 7 : 17-23, 2004.
- Nakagawa S, Kurata S, Yoshida A, Nagase Y, Moritani M, Takemura M, Bae YC, Shigenaga Y: Ultrastructural observations of synaptic connections of vibrissa afferent terminals in cat principal sensory nucleus and morphometry of related synaptic elements. *J Comp Neurol* 389 : 12-33, 1997.
- Olszewski J: On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 92 : 401-413, 1950.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Madsen S, Skumlien S, Stromhaug J: Evaluation of the immunocytochemical method for amino acids. *Med Biol* 64 : 147-158, 1986.
- Paik SK, Choi SK, Lee JW, Kim TH, Ahn DK, Yoshida A, Kim YS, Bae YC: Ultrastructural analysis of low-threshold mechanoreceptive vibrissa afferent boutons in the cat trigeminal caudal nucleus. *Anat Cell Biol* 43 : 340-346, 2010.
- Peng YY, Frank E: Activation of GABA_B receptors causes presynaptic inhibition at synapses between muscle spindle afferents and motoneurons in the spinal cord of bullfrogs. *J Neurosci* 9 : 1502-1515, 1989a.
- Peng YY, Frank E: Activation of GABA_A receptors causes presynaptic and postsynaptic inhibition at synapses between muscle spindle afferents and motoneurons in the spinal cord of bullfrogs. *J Neurosci* 9 : 1516-1522, 1989b.
- Pierce JP, Lewin GR: An ultrastructural size principle. *Neuroscience* 58 : 441-446, 1994.
- Pierce JP, Mendell LM: Quantitative ultrastructure of Ia boutons in the ventral horn: scaling and positional relationships. *J Neurosci* 13 : 4748-4763, 1993.
- Poncer JC, McKinney RA, Gähwiler BH, Thompson SM: Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron* 18 : 463-472, 1997.
- Ribeiro-Da-Silva A, Cuello AC: Choline acetyltransferase-immunoreactive profiles are presynaptic to primary sensory fibers in the rat superficial dorsal horn. *J Comp Neurol* 295 : 370-384, 1990.
- Ribeiro-Da-Silva A, Pioro EP, Cuello AC: Substance P- and enkephalin-like immunoreactivities are colocalized in certain neurons of the substantia gelatinosa of the rat spinal cord: an ultrastructural double-labeling study. *J Neurosci* 11 : 1068-1080, 1991.
- Russier M, Kopysova IL, Ankri N, Ferrand N, Debanne D: GABA and glycine co-release optimizes functional inhibition in rat brainstem motoneurons in vitro. *J Physiol* 541 : 123-137, 2002.
- Scholz K, Miller RJ: GABA_B receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 444 : 669-686, 1991.
- Sutherland FI, Bannatyne BA, Kerr R, Riddell JS, Maxwell DJ: Inhibitory amino acid transmitters associated with axons in presynaptic apposition to cutaneous primary afferent axons in the cat spinal cord. *J Comp Neurol* 452 : 154-162, 2002.
- Todd AJ, Maxwell DJ, Brown AG: Relationships between hair-follicle afferent axons and glycine-immunoreactive profiles in cat spinal dorsal horn. *Brain Res* 564 : 132-137, 1991.
- Todd AJ, Spike RC, Chong D, Neilson M: The relationship between glycine and gephyrin in synapses of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 7 : 1-11, 1995.
- Todd AJ: An electron microscope study of glycine-like immunoreactivity in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat. *Neuroscience* 39 : 387-394, 1990.
- Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A: Peripheral injury and anterograde transport of WGA-HRP to the spinal cord. *Neuroscience* 50 : 685-696, 1992.
- Watson A, Le Bon-Jego M, Cattaert D: Central inhibitory microcircuits controlling spike propagation into sensory terminals. *J Comp Neurol* 484 : 234-248, 2005.
- Watson AH, Hughes DI, Bazzaz AA: Synaptic relationships between hair follicle afferents and neurones expressing GABA and glycine-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 452 : 367-380, 2002.
- Watson AH: GABA- and glycine-like immunoreactivity in axons and dendrites contacting the central terminals of rapidly adapting glabrous skin afferents in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 464 : 497-510, 2003.

< 국문 초록 >

이 연구에서는 삼차신경꼬리핵 제 3~4층에서 저역치기계자극정보를 전달하는 일차들신경섬유의 종말과 연결하는 연결이전 종말(presynaptic ending; p-ending)들이 어떤 억제성 신경전달물질들을 함유하는지를 분석하고자 하였다. 이를 위해 전기생리학적으로 동정된 고양이콧수염유래 일차들신경종말을 단일 축삭내 HRP주입법으로 표시하였고, GABA와 glycine에 대한 항혈청으로 포매 후금입자면역염색법을 시행한 후, 정량적 분석을 실시하였다.

표시종말과 연결하는 16개 p-ending들 중 8개(50%, 8/16) p-ending들은 GABA만을 함유하였으며, 나머지 8개(50%, 8/16) p-ending들은 GABA와 glycine 모두를 함유하는 집단으로 분류할 수 있었다. 또한, 이 두 집단의 p-ending 사이에는 유의한 평균체적 차이가 보이지 않았으며, 각 p-ending이 함유하는 GABA와 glycine의 상대적 함량은 서로 달랐다.

이러한 결과들은 삼차신경꼬리핵에서 콧수염유래 일차들신경섬유에 의해 전달되는 저역치기계자극정보는 GABA 및 glycine에 의해 연결이전제어(presynaptic modulation)를 받으며, 그 연결이전제어는 각 일차들신경섬유의 종말마다 다르게 나타날 것이라는 점을 제시한다.