

세포 밖 2가 양이온이 과분극에 의해 활성화되는 전류(I_h)에 미치는 영향

곽 지 연[#]

인하대학교 의과대학 생리학 교실

(Received April 9, 2012; Revised April 16, 2012; Accepted April 23, 2012)

Effects of Extracellular Divalent Cations on the Hyperpolarization-activated Currents in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons

Jiyeon Kwak[#]

Department of Physiology and Biophysics, Inha University College of Medicine, Incheon 402-751, Korea

Abstract — The hyperpolarization-activated current (I_h) is an inward cation current activated by hyperpolarization of the membrane potential and plays a role as an important modulator of action potential firing frequency in many excitable cells. In the present study we investigated the effects of extracellular divalent cations on I_h in dorsal root ganglion (DRG) neurons using whole-cell voltage clamp technique. I_h was slightly increased in Ca^{2+} -free bath solution. BAPTA-AM did not change the amplitudes of I_h . Amplitudes of I_h were decreased by Ca^{2+} , Mg^{2+} and Ba^{2+} dose-dependently and voltage-independently. Inhibition magnitudes of I_h by external divalent cations were partly reversed by the concomitant increase of extracellular K^+ concentration. Reversal potential of I_h was significantly shifted by Ba^{2+} and $V_{1/2}$ was significantly affected by the changes of extracellular Ca^{2+} concentrations. These results suggest that I_h is inhibited by extracellular divalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} and Ba^{2+}) by interfering ion influxes in cultured rat DRG neurons.

Keywords □ divalent cations, DRG, hyperpolarization-activated currents, rat

막전압의 과분극에 의해 활성화되는 양이온 전류(I_h)는 Na^+ 과 K^+ 의 이동에 의해 형성되는 내향 전류로서 심장의 동방결절(sinoatrial node) 세포에서 처음으로 확인되었다.^{1,2)} I_h 를 매개하는 채널 단백질은 hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated(HCN) channel로 밝혀졌으며 현재까지 포유류에서 모두 4가지 아형이 발견되었다(HCN 1-4).³⁾ I_h 채널은 전압 의존성 K^+ channel과 유사한 구조를 가지며 C 말단에는 cyclic nucleotide binding domain(CNDB)이 존재하여 cAMP 또는 cGMP의 직접적인 결합에 의해 조절되는 것이 채널의 대표적인 특징으로 알려져 있다.⁴⁻⁸⁾ I_h 가 발생하면 막전압이 탈분극(depolarization)되어 세포의 흥분성, 특히 활동전압 발사 빈도를 조절하는 생리적 역할이 있기 때문에 'pacemaker current'라고도 알려진 바 있다. 포유류의 신경세포에서 확인된 과분극에 의해 활성화되는 전류는 I_h 또는 I_Q (queer current)로 명명되었으나⁹⁾ 분포하는 세포의 종류가 워낙 다양하기 때문에 아직까지도 명확한 생리적 기능은

논란의 여지가 있는 실정이다. 현재까지 I_h 는 흥분성 세포의 자발적인 활동 전압 발생에 중요한 역할을 하므로^{5,6,10)} I_h 의 활성이 변하면 세포의 흥분 발사의 빈도가 달라진다고 알려져 있다.^{5,10-12)} 이러한 이유로 I_h 를 발생시키는 HCN 채널의 활성 변화는 세포의 흥분성에 영향을 미칠 수 있다고 볼 수 있다.

심장 세포나 피질 뉴런 이외에 감각 신경의 세포체인 후근절 세포에도 HCN 채널에 의한 I_h 가 존재한다.^{7,13-16)} 후근절 세포는 말초 감각 신경 세포에서 감지된 감각 정보를 척수로 전달하는 신경 세포로서 감각과 관련된 연구에 많이 사용된다. 후근절을 지속적으로 압박하는 chronic compression of dorsal root ganglia(CCD) model에서 발생하는 통각과민과 접촉성 이질통은 HCN 채널의 활성과 연관되어 있을 것으로 추정되고 있다.¹⁷⁾ Momin 등¹⁸⁾은 $HCN1^{-/-}$ 생쥐에서 차가운 온도에 대한 이질통이 덜 나타나는 것으로 볼 때 체성 감각 신경 세포에서 I_h 의 발생이 말초 신경 세포에서 활동 전압을 생성하는데, 특히 통각의 조절에서 중요한 역할을 할 것이라 보고한 바 있다.

I_h 는 세포 밖의 Cs^+ 에 의해 억제될 뿐만 아니라 양이온에 의해서도 그 크기가 감소된다는 결과가 여러 세포들에서 얻어졌다.^{11,12,19-23)} 또한 후근절 세포에 존재하는 I_h 가 2가 금속 이온인

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 032-890-0923 (팩스) 032-884-5997
(E-mail) kwak1014@inha.ac.kr

납(Pb^{2+})에 의해서 억제된다는 보고²⁴⁾와 더불어 후각 신경 세포에 존재하는 cyclic nucleotide-gated channel이 세포 밖 2가 양이온에 의하여 억제된다는 결과가 보고된 바 있다.²⁵⁾ 또한 캡사이신 수용체인 TRPV1(transient receptor potential vanilloid subtype 1)의 활성이 세포 밖에 존재하는 Mg^{2+} 와 Ca^{2+} 에 의해 증가된다는 보고도 있었다.²⁶⁾ 이밖에 Na^+ 채널,²⁷⁾ 랫트의 *eag* K^+ 채널²⁸⁾과 심근 세포의 비선택적 양이온성 전류²⁹⁾ 및 근육 세포의 Ca^{2+} 채널과 전압의존성 K^+ 채널³⁰⁾ 등이 세포 밖 양이온에 의해 조절된다는 보고들이 있다. 이처럼 세포 밖 2가 양이온의 농도 변화는 다양한 이온 채널의 활성에 변화를 일으킬 수 있으므로, 본 연구에서는 랫트의 후근절 세포에 발현된 I_h 에 대한 세포 밖 2가 양이온이 미치는 영향을 패치 클램프(patch clamp) 방법을 사용하여 알아보고자 하였다.

실험방법

후근절 신경 세포의 일차 배양

후근절 세포의 일차 배양은 생후 1~3일 경과한 Sprague-Dawley 신생 랫트를 사용하였다. 신생 랫트를 단두치사한 후 70% 알코올로 소독하고 현미경하에서 등쪽의 피부와 척추를 절개하여 척수를 노출시켰다. 경추로부터 요추에 이르는 모든 부위의 후근절을 모아서 Dulbecco's modified Eagle medium/F-12 mixture(DMEM/F-12; Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 용액으로 세척하였다. Collagenase(Type II; Worthington, Freehold, NJ, USA) 용액(1 mg/ml)에 후근절을 옮기고 30분 동안 37°C에서 진탕하며 방치하였다. HBSS(Gibco, Invitrogen)로 세척하고 trypsin(Gibco, Invitrogen) 용액(0.5%)을 가하여 역시 30분간 37°C에서 반응시켰다. 효소 처리가 모두 끝난 후근절은 1,000×g로 원심 분리하여 침전시키고 배양 용액(1% fetal bovine serum, streptomycin/penicillin, sodium pyruvate를 포함하는 DMEM/F-12)으로 세척하여 trypsin의 작용을 억제시킨 후 끝을 알코올 램프로 가열한 Pasteur pipet을 사용하여 20~30회 trituration하였다. 마지막으로 2.5s nerve growth factor(NGF, Alomone Labs, Jerusalem, Israel)를 첨가한 후 poly-L-lysine(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 코팅된 glass plates를 넣어 둔 culture dish(35 mm, Falcon)에 옮겨 5% CO_2 가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 배양 후 2일부터 실험에 사용하였다.

전기생리학적 기록 방법

세포가 배양된 glass plate를 역상현미경에 설치된 recording bath에 옮긴 후 막전압과 막전류의 신호를 기록하였다. 패치 클램프 실험에 사용하는 미세유리전극(pipette)은 borosilicate 유리 capillary(Harvard, Kent, UK)로 만들며 전극의 저항은 3 MΩ 이하가 되도록 하였다. 후근절 세포에 유리 전극을 접근시킨 후 살짝

감압하여 giga-seal을 만들고 whole-cell 상태를 만들기 위해서 seal이 안정된 후 다시 강하게 감압하여 세포막을 터뜨렸다. 막전압의 고정 및 발생하는 전류의 기록은 Axopatch 200B 막전압 고정증폭기(Molecular Devices, Union City, CA, USA)를 사용하였다. 전류는 2.5 kHz의 샘플링 빈도로 Digidata 1322A(Molecular Devices)를 이용하여 컴퓨터에 저장하였다. pClamp 8.0 software(Molecular Device) 중 Clampex를 사용하여 일련의 실험 수행 명령을 발생시켰으며 Clampfit과 Origin Pro 8.0(Origin Lab, Northampton, MA, USA)을 사용하여 데이터 분석을 하였다. 모든 실험은 실온에서 수행하였다.

시약 및 용액

유리 전극 내 용액은 140 mM K-gluconate, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM ATP-Mg, 0.1 mM GTP-Na를 포함하도록 하였으며 pH는 KOH를 사용하여 7.4로 맞추었다. 실험 용액은 Tyrode's 용액($NaCl$ 140 mM; KCl 3 mM; $CaCl_2$ 1.8 mM; $MgCl_2$ 1 mM, HEPES 10 mM; glucose 5 mM, pH 7.4)을 중력에 의해 bath에 계속 흘러주며 실험하였다. I_h 를 다른 전압의존성 전류와 분리하여 기록하기 위하여 실험 용액에 0.5 mM $BaCl_2$, 0.1 μM tetrodotoxin, 10 mM tetraethylammonium chloride, 1 mM 4-aminopyridine and 0.1 mM $NiCl_2$ 를 첨가하여 사용하였다. Tetrodotoxin(Tocris Bioscience, Bristol, UK)을 제외한 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

데이터 분석

모든 결과는 평균±S.E.M으로 나타내었으며 평균값의 비교는 Student's *t*-test와 ANOVA를 사용하여 검증하였으며 *p* 값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의한 차이를 보이는 것으로 간주하였다.

결 과

후근절 세포의 안정 막전압과 I_h

I_h 의 생리적 기능으로 가장 중요한 것은 세포의 안정 막전압 유지로 알려져 있다. Fig. 1A는 전류 고정(current clamp) 조건에서 막전압을 연속적으로 기록한 결과를 보여주는데 후근절 세포의 안정시 막전압은 -56.6 ± 1.26 mV($n=14$)였으며 I_h blocker인 Cs^+ 과 ZD7288을 처리했을 때 막전압이 과분극 되는 것을 알 수 있다. Cs^+ (3 mM)의 경우 수초 이내에 막전압을 과분극시켰으며 이 효과는 가역적인 반면 ZD7288은 2분 이상 처리했을 때 서서히 막전압이 과분극되었으며 Tyrode 용액으로 계속 washout해도 막전압이 안정시 값으로 회복되지 않았다. Cs^+ 에 의해 막전압이 과분극되는 정도는 세포에 따라 2 mV에서 20 mV까지 다양했으며 세포 크기 또는 세포의 안정 막전압과의 상관 관계는

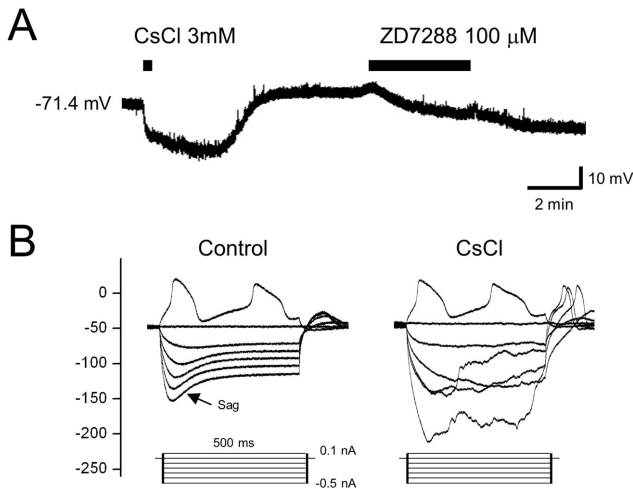


Fig. 1 – Inhibition of I_h induced hyperpolarization of the membrane potential in DRG neurons. (A) In current clamp mode, membrane potential of DRG neuron was hyperpolarized by Cs^+ and ZD 7288, I_h blockers. (B) Representative voltage responses of DRG neurons to 500-ms current pulses injected in 100 pA increment under control condition and in the presence of 3 mM CsCl .

없는 것으로 관찰되었다. Fig. 1B는 전류 고정 상태에서 막전압을 과분극시키도록 전류를 주입하는 명령을 500 ms 동안 반복적으로 세포에 가하였을 때 나타나는 막전압 변동을 나타내고 있다. I_h 의 발생에 의해 나타나는 sag의 속도는 막전압을 과분극시키는 전류를 많이 주입할수록 증가하였으며 전류 주입이 끝날 때 rebound depolarization을 동반하였다. 3 mM Cs^+ 존재 하에서는 I_h 가 억제되므로 sag가 거의 나타나지 않았으며 막전압의 탈분극시 나타나는 반응은 거의 변화가 없는 반면 rebound depolarization이 영향 받음을 알 수 있다.

후근절 세포에서 I_h 에 대한 Ca^{2+} 의 영향

세포 밖 또는 세포 안쪽의 Ca^{2+} 의 농도는 세포의 기능에 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 따라서 감각신경세포인 후근절 세포에서 Ca^{2+} 에 의한 I_h 의 조절 여부 및 그 관련 기전을 알아보려고 하였다. 우선 Ca^{2+} 을 제거하고 EGTA를 첨가한 Tyrode 용액을 사용했을 때 기록되는 I_h 를 normal Tyrode 용액에서 발생하는 전류와 비교하였다(Fig. 2). Ca^{2+} 이 없는 용액에서 I_h 의 크기는 약하기는 하지만 유의성 있게 증가하였으나 activation curve의 이동은 나타나지 않아 $V_{1/2}$ 는 유사하였으며 activation time constant(τ)의 경우에도 세포 밖 Ca^{2+} 제거에 의해 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 결국 후근절 세포의 I_h 는 세포 밖으로부터 Ca^{2+} 의 이동이 기여하지 않는 것으로 보이며 세포 밖 Ca^{2+} 존재 여부가 I_h 의 activation kinetics에는 큰 영향이 없는 것으로 생각되었다. 세포 내 존재하는 Ca^{2+} 이 I_h 에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포 안으로 들어갈 수 있는 Ca^{2+}

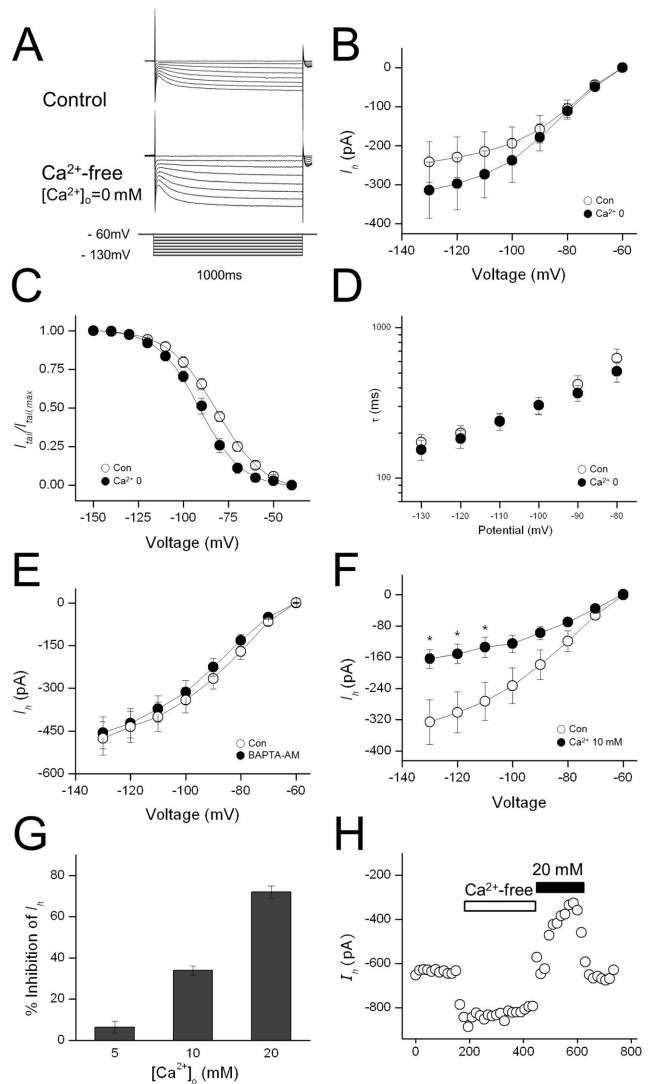


Fig. 2 – Effects of Ca^{2+} on I_h . (A) Representative current responses of DRG neurons to 1-s voltage pulses injected in 10-mV increment under control condition, during application of Ca^{2+} -free Tyrode's solution. (B) Current-voltage relationship of I_h . Amplitudes of I_h in the absence of external Ca^{2+} were compared with those of control I_h at the same test voltage. (C) Current-voltage relationship of I_h . Amplitudes of I_h in the presence of BAPTA-AM were compared with those of control I_h at the same test voltage. (D) Current-voltage relationship of I_h . Amplitudes of I_h in the presence of 10 mM external Ca^{2+} were compared with those of control I_h at the same test voltage. (E) Concentration dependence of I_h inhibition by external Ca^{2+} . Bar graph summarized the % inhibition of I_h induced by extracellular Ca^{2+} . (F) Concentration dependence of extracellular Ca^{2+} -induced inhibition of I_h . (G) A hyperpolarizing voltage steps from -60 mV to -130 mV lasting 1s was applied every 15s. The amplitudes of inward currents measured at the end of the voltage step were plotted against time.

chelator인 BAPTA-AM에 의한 I_h 의 변화를 기록하였다. 그러나, 심장 세포에서 얻어진 Rigg 등³¹⁾의 결과와는 달리 후근절 세포

의 I_h 에 대해서는 모든 실험 전압에서 BAPTA-AM에 의해 유의성 있는 변화를 관찰하지 못하였다(Fig. 2E). 이상의 결과로부터 Ca^{2+} -free 용액을 사용했을 때 관찰된 I_h 의 증가는 세포 내 Ca^{2+} 에 의한 영향이 제거되었기 때문이 아니라 실험 용액에 포함되어 있는 Ca^{2+} 에 의한 채널의 억제 작용이 소실되어 나타났을 가능성이 있다고 사료되었다.

다음으로는 세포 밖 Ca^{2+} 농도를 증가시켰을 때 이러한 변화가 I_h 에 미치는 영향을 살펴보았다. 세포 밖 Ca^{2+} 농도를 5, 10, 그리고 20 mM로 증가시켰을 때, -130 mV에서 기록된 I_h 의 크기는 해당 Ca^{2+} 농도에서 control I_h 크기의 $6.2 \pm 2.9\%$ ($n=7$), $48.7 \pm 3.4\%$ ($n=5$), $62.2 \pm 4.6\%$ ($n=14$)로, 세포 밖 Ca^{2+} 농도가 증가할수록 I_h 크기의 억제 정도가 증가하는, 즉 농도 의존적으로 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2F, G). 또한 막전압을 -60 mV에서 -130 mV로 과분극시키는 명령을 15초마다 반복적으로 후근절 세포에 가하면서 세포 밖 용액의 Ca^{2+} 농도를 0에서 2 mM(control), 다시 20 mM로 변화시켰을 때 Fig. 2H에서 보이듯이 Ca^{2+} -free 용액에서는 I_h 크기가 증가하였으며 반대로 20 mM로 증가시켰을 때는 감소되는 것을 재확인할 수 있었으며

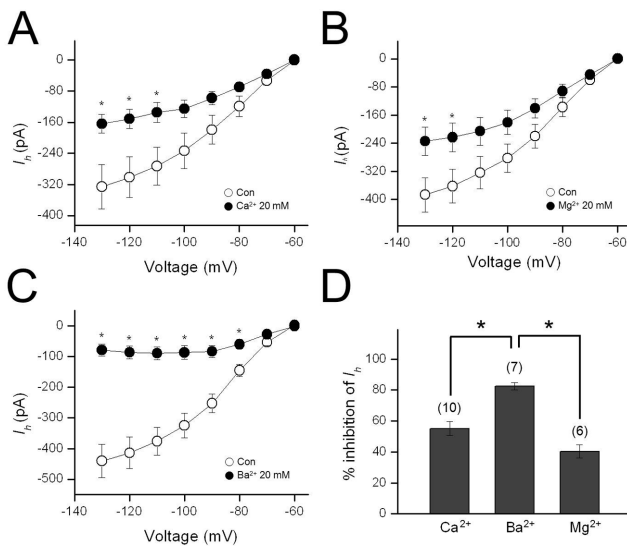


Fig. 3 – Effects of extracellular Mg^{2+} and Ba^{2+} on I_h . (A) Current-voltage relationship of I_h . Amplitudes of I_h in the 20 mM external Ca^{2+} were compared with those of control I_h at the same test voltage. (B) Current-voltage relationship of I_h . Amplitudes of I_h in the presence of external Mg^{2+} (20 mM) were compared with those of control I_h at the same test voltage. (C) Current-voltage relationship of I_h . Amplitudes of I_h in the presence of external Ba^{2+} (20 mM) were compared with those of control I_h at the same test voltage. (D) Bar graph summarized the % inhibition of I_h induced by extracellular divalent cations, Ca^{2+} , Mg^{2+} and Ba^{2+} at 20 mM. Values at the top of each bar represent the number of experiments. Bars represent the mean \pm S.E.M. Asterisks indicate a significant difference from the first bar (** $p < 0.01$).

이러한 반응은 모두 가역적으로 나타났다.

세포 밖 2가 양이온이 I_h 에 미치는 영향

Ca^{2+} 농도 증가에 의한 I_h 크기 억제 효과가 Ca^{2+} 에 국한되어 나타나는 것인지 아니면 세포 밖 2가 양이온에 의해 공통적으로 일어나는 현상인지 알아보기 위해 실험 용액 중 존재하는 또 다른 2가 양이온인 Mg^{2+} 의 농도를 증가시키고 그 영향을 살펴보았다(Fig. 3). Mg^{2+} 의 경우 Ca^{2+} 보다는 효과가 낮았으나 20 mM 농도에서는 유의성 있게 I_h 의 크기를 감소시킬 수 있었다. 다음으로는 세포 밖 용액에 Ba^{2+} 이 존재할 때 I_h 의 크기가 어떻게 달라지는 지 확인하여 보았다. 이때도 역시 Ca^{2+} 농도를 변

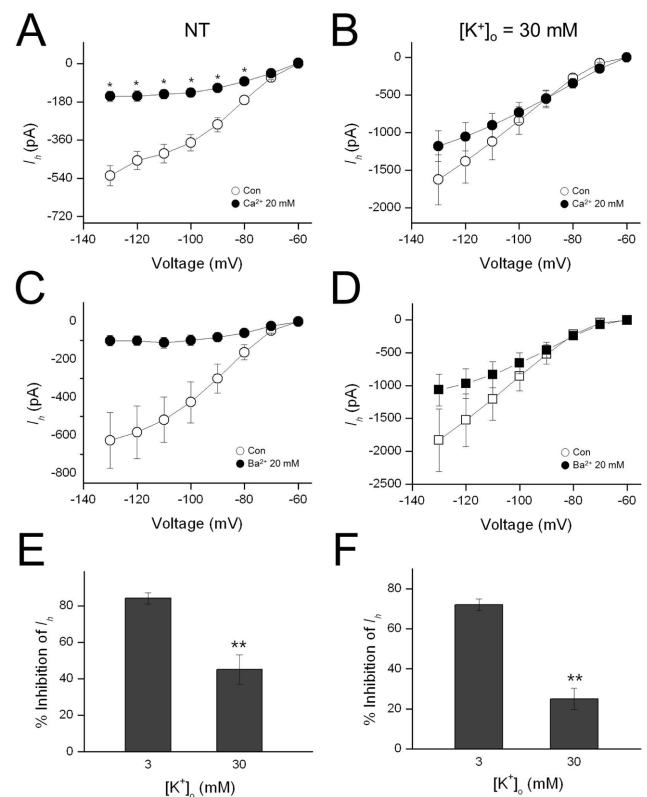


Fig. 4 – Effects of increased extracellular K^+ concentration on the I_h inhibition by external Ca^{2+} and Ba^{2+} . (A, B) Current-voltage relationships of I_h in normal Tyrode's solution (NT) and in Tyrode's solution with 30 mM K^+ . Amplitudes of I_h in the presence of external Ca^{2+} (20 mM) were compared with those of control I_h at the same test voltage. (C, D) Current-voltage relationships of I_h in normal Tyrode's solution (NT) and in Tyrode's solution with 30 mM K^+ . Amplitudes of I_h in the presence of external Ba^{2+} (20 mM) were compared with those of control I_h at the same test voltage. (E, F) Bar graphs summarized the % inhibition of I_h induced by extracellular divalent cations, Ca^{2+} , Ba^{2+} at 20 mM in the NT and Tyrode's solution with K^+ 30 mM, respectively. Bars represent the mean \pm S.E.M. Asterisks indicate a significant difference from the first bar (** $p < 0.01$).

화시켰을 때와 마찬가지로 I_h 의 크기가 감소하였으며 그 감소되는 정도는 Ca^{2+} 이나 Mg^{2+} 에 비해 유의성 있게 큰 것으로 확인되었다.

세포 밖 2가 양이온에 의한 I_h 억제 작용이 세포 밖 K^+ 농도 증가에 의해서는 어떠한 영향을 받는지 알아보기 위해 K^+ 농도를 30 mM로 증가시키고 실험하였다(Fig. 4). 세포 밖 K^+ 농도를 증가시키면 HCN 채널을 통해 K^+ 이 이동하는 중요한 driving force인 농도 경사가 증가하게 되어 I_h 의 크기가 약 3배 정도 증가하게 된다. 이러한 조건에서 Ca^{2+} 농도 변화에 의한 I_h 억제 효과는 세포 밖 K^+ 농도를 증가시켜 채널을 통해 이온이 이동

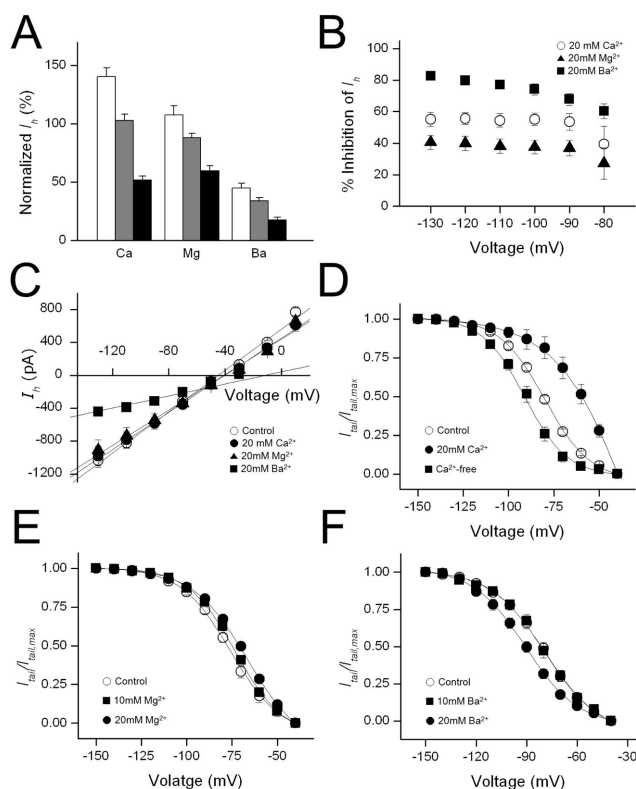


Fig. 5 – Effects of extracellular Ca^{2+} , Mg^{2+} and Ba^{2+} on the activation kinetics of I_h . (A) Bar graphs summarized the normalized % of I_{inst} (open), I_{ss} (grey) and I_h (filled bar) by extracellular cations. (B) Voltage-dependence of I_h inhibition by extracellular divalent cations. (C) Current-Voltage relationship of I_h . Data were fit with linear regression and the reversal potentials were estimated. (D) Effects of removal of external Ca^{2+} and 20 mM Ca^{2+} on the voltage dependence of I_h activation. Normalized tail current was plotted versus various potentials (-60 to -130 mV) and fitted with Boltzmann equation. (E) Effects of extracellular Mg^{2+} concentrations on the voltage dependence of activation of I_h . Normalized tail current was plotted versus various potentials (-60 to -130 mV) and fitted with Boltzmann equation. (F) Effects of extracellular Ba^{2+} concentrations on the voltage dependence of activation of I_h . Normalized tail current was plotted versus various potentials (-60 to -130 mV) and fitted with Boltzmann equation.

하는 driving force를 증가시켰을 때 유의성 있게 억제되었다. 10 mM Ca^{2+} 에서는 -130 mV에서 기록된 I_h 의 크기는 control의 $33.9 \pm 2.2\%$ 로 감소하였으나 30 mM K^+ 용액 중에서는 그 억제되는 정도가 $8.9 \pm 1.8\%$ 로 유의성 있게 감소하였으며($n=5$) 20 mM Ca^{2+} 에서는 마찬가지로 30 mM K^+ 용액 중에서도 $71.9 \pm 2.9\%$ control 에서 $25.0 \pm 5.3\%$ 로 억제 효과가 감소하였다($n=7$). 또한 Ba^{2+} 의 경우에도 용액 중 K^+ 농도를 30 mM로 증가시켰을 때 억제 효과가 감소하였으나 그 정도는 Ca^{2+} 보다 약하게 나타났다. 10 mM Ba^{2+} 에서는 -130 mV에서 억제 정도는 control I_h 의 $63.0 \pm 3.9\%$ 였으나, 30 mM K^+ 용액 중에서는 그 억제되는 정도가 $25.9 \pm 4.9\%$ 로 유의성 있게 감소하였으며($n=6$) 20 mM Ba^{2+} 에서는 마찬가지로 30 mM K^+ 용액 중에서도 $84.1 \pm 3.1\%$ 에서 $45.1 \pm 8.1\%$ 로 억제 효과가 감소하였다($n=5$).

세포 밖 2가 양이온이 I_h kinetics에 미치는 영향

세포 밖 2가 양이온들이 I_h 의 activation kinetics에 미치는 영향을 살펴본 결과들을 Fig. 5에 나타냈다. 세포 밖 Ca^{2+} , Mg^{2+} 과 Ba^{2+} 의 I_h 에 대한 억제 효과가 세포의 막전압과 상관관계가 있는지 확인한 결과, I_h 의 억제 정도는 실험 시 세포에 걸여준 전압에 비의존적인 것으로 나타났다(Fig. 5B). Ca^{2+} , Mg^{2+} 20 mM 존재 하에 얻어진 전류-전압 곡선에서 I_h 의 역전 전압(reversal potential)은 각각 -41.3 ± 1.5 mV($n=8$), -40.6 ± 1.8 mV($n=9$)로서 control 상태에서 얻어진 reversal potential -44.5 ± 1.1 mV($n=23$)와 크게 다르지 않았다. 그러나, 20 mM Ba^{2+} 의 경우에는 그 값이 -29.7 ± 2.2 mV($n=7$)로 오른쪽으로 유의성 있게 shift되는 것을 알 수 있었다(Fig. 5C). 또한 각 양이온이 I_h 의 activation curve에 미치는 영향을 알아본 결과 Ca^{2+} 20 mM에서는 $V_{1/2}$ 값이 -44.6 ± 4.9 mV($n=5$)로 측정되어 control 값인 -80.3 ± 1.1 mV($n=10$)에 비해 크게 오른쪽으로 shift되어 채널이 열리기 시작하는 전압이 상당히 증가함을 알 수 있었다. 그러나, 이와 달리 Mg^{2+} 과 Ba^{2+} 은 10, 20 mM에서 모두 $V_{1/2}$ 값을 유의성 있게 변화시키지 않았다.

고찰 및 결론

신생 흰쥐의 후근절 세포에서 과분극에 의해 활성화되는 양이온 전류는 실험 용액 중에 존재하는 2가 양이온에 의해 억제되었다. 이러한 억제 효과는 Ca^{2+} , Mg^{2+} 및 Ba^{2+} 에 의해 유사한 결과를 보였으며 동일 농도(20 mM)에서 이들 3가지 2가 양이온이 -130 mV에서 기록된 I_h 크기를 억제하는 정도(% inhibition)는 $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ 의 순으로 감소하였다.

I_h 는 흥분성 세포에서 막전압의 과분극에 의해 발생하는 내향 전류로서 주로 Na^+ 와 K^+ 의 세포 내 이동으로 형성되는 전류로 알려져 있다.^{1,2)} 세포 밖 K^+ 농도를 증가(30 mM)시키면 전류의

크기가 크게 증가하는 특성을 가지고 있으며 I_h 에 대한 세포 밖 Na^+ 농도 증가의 영향은 미약하였다. 본 연구 결과, 세포 밖 실험 용액 중 Ca^{2+} 이 없으면 I_h 의 크기는 약간 증가하였으며 이를 볼 때 후근절 세포에서 Ca^{2+} 은 HCN 채널을 통과하여 내향 전류에 기여하는 바는 크지 않은 것으로 생각되었다. 기니피그의 SA node에서 세포막을 통과하는 BAPTA-AM을 처리하여 세포 내 Ca^{2+} 을 chelation했을 때 I_h 의 크기가 감소하였다는 Rigg 등의³¹⁾ 보고와 달리 후근절 세포에서는 BAPTA-AM에 의해 세포 내 Ca^{2+} 을 감소시켰을 때 I_h 크기가 달라지지 않은 결과를 볼 때 세포 내 Ca^{2+} 농도 감소 역시 I_h 에 유의성 있는 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다. 이와 반대로 세포 밖 Ca^{2+} 농도를 증가시키면 I_h 가 억제되었으며 그 억제 정도는 Ca^{2+} 농도에 비례하여 증가하였다. 세포 밖 Ca^{2+} 농도 증가에 의한 I_h 감소는 세포 밖 K^+ 농도를 30 mM로 증가시켰을 때 I_h 크기가 증가되는 전류의 특성과 상반된 결과를 나타내는 것으로 볼 때 Ca^{2+} 농도 증가에 의한 I_h 감소는 실험 용액의 삼투질 농도 증가에 의한 비특이적 효과는 아닌 것으로 생각된다. 이러한 세포 밖 Ca^{2+} 농도 증가에 의한 I_h 의 억제 기전은 아마도 세포 밖 Ca^{2+} 이 HCN 채널의 이온이 통과하는 구멍 바깥쪽 부위에 위치하여 세포 안으로 들어오는 Na^+ 과 K^+ 의 흐름을 방해하는 것으로 생각해 볼 수 있다. 이러한 가설은 세포 밖의 K^+ 농도를 증가(30 mM)시켜 I_h 전류를 형성하는 K^+ 의 농도 경사를 증가시켜 세포막을 통과하는 K^+ 의 흐름을 증가시켰을 때 20 mM Ca^{2+} 또는 Ba^{2+} 의 억제 효과가 유의적으로 감소되는 결과로 뒷받침된다 할 수 있겠다.

I_h 는 일반적으로 500 ms 이상 지속되는 과분극 전압 명령에 의해 발생하는 전류인데 전압이 변동되는 초기에 나타나는 I_{inst} 와 과분극 명령이 끝날 때까지 감소되지 않고 유지되는 I_{ss} , 두가지 성분으로 나누어 표현하며 I_h 의 크기는 이 둘의 차이로 정의된다 ($I_h = I_{ss} - I_{inst}$). 정확히 표현하자면, I_h 의 I_{inst} 는 막전압의 과분극에 의해 열리는 또 다른 채널인 inward rectifying K^+ channel(K_{ir})에 의해 발생하는 전류이고 I_{ss} 는 HCN 채널을 통한 양이온의 세포 내 유입에 의해 생성되는 전류이다. Ba^{2+} 은 1 mM 내외의 농도에서 K_{ir} 의 억제제로 알려져 있다. 그러나, 본 연구의 분석 결과를 보면 세포 밖 Ba^{2+} 은 I_{inst} 뿐만 아니라 I_{ss} 의 크기도 감소시켜 결과적으로 I_h 의 크기를 크게 감소시키는 것으로 보인다. 따라서 세포 밖 Ba^{2+} 은 이미 알려진 대로 K_{ir} 을 억제할 뿐만 아니라 고농도에서는 I_h 도 억제하여 HCN을 통해 세포 안으로 들어오는 Na^+ 또는 K^+ 의 양을 감소시키는 것으로 생각된다. 이와 달리 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 는 I_{inst} 와 I_{ss} 의 크기를 모두 증가시키지만 I_{ss} 에 대한 영향이 상대적으로 적어 I_h 의 크기를 감소시키는 것을 알 수 있었다. 결국 Ca^{2+} , Mg^{2+} 와 Ba^{2+} 이 I_h 를 억제하는 기전에는 다소 차이가 있을 것으로 사료된다.

이온 채널을 통한 전류의 역전 전압(reversal potential, V_r)은 전류-전압 곡선이 전압 축(X축)과 만나는 점으로 이 전압이 어

는 이온의 평형 전압(Equilibrium potential, E_{ion})에 근사한 값을 갖는가에 의해 해당 전류가 주로 어떤 이온에 의해 형성되는 것인지를 예측할 수 있는 파라미터이다. I_h 의 V_r 에 미치는 이들 2가 양이온의 효과를 보면 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 은 모두 V_r 을 유의성 있게 변화시키지 않았으나 Ba^{2+} 에 의해서는 V_r 이 우측으로 이동하는 결과를 얻었다. 즉 V_r 이 Na^+ 의 평형 전압인 약 +61 mV ($E_{Na} = 58 \log[\text{Na}]_o/[\text{Na}]_i$) 쪽으로 이동한 결과는 Ba^{2+} 이 높은 농도로 세포 밖에 존재할 때 HCN 채널을 통한 K^+ 의 이동이 제한되고 Na^+ 의 세포 내 이동이 보다 많이 I_h 에 기여했다는 것을 의미한다. K^+ 가 Na^+ 보다 크기 때문에 이온 채널의 구멍에 대해 이온이 통과하기 어려운 공간적 방해가 있다면 Na^+ 보다 더 영향을 받기 쉬울 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Ba^{2+} 과 Ca^{2+} / Mg^{2+} 의 작용 기전이 상이할 수도 있으나 Ba^{2+} 의 크기가 다른 두 양이온보다 크기 때문에 통로의 입구에 위치했을 때 이온의 흐름에 대한 저해 효과가 더 크게 나타날 수도 있을 것으로 생각된다. 또한 Ba^{2+} 농도만 증가시켰을 때 보여준 I_h 억제 효과와 Ca^{2+} 과 Ba^{2+} 의 농도를 모두 높였을 때 나타나는 억제 효과가 유의성 있는 차이를 보이지 않았는데, 이 결과를 볼 때 I_h 억제와 관련하여 Ca^{2+} 과 Ba^{2+} 의 작용 부위는 서로 다르지 않을 것으로 추정된다. 그러나, 명확한 기전을 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Mg^{2+} , Ca^{2+} 및 Ba^{2+} 은 모두 원소 주기율표에서 2족에 속하는 금속 이온들이다. 원소주기율표에서 같은 족에 속하는 원소들은 비슷한 화학적 성질을 보이며 아래로 내려갈수록 원소의 크기는 증가하게 된다. 즉 이온의 크기가 $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ 의 순이며 이는 본 연구에서 얻어진 I_h 의 크기를 감소시키는 효과의 순서와 같다. 이는 이들 이온의 크기와 채널을 통한 이온의 흐름을 억제하는 효과가 관계가 있음을 의미하며 아마도 HCN 채널의 구멍을 막는 직접적인 기전에 의해 I_h 크기를 감소시키는 것으로 생각된다. 그러나, 이들 2가 양이온들에 의한 I_h 억제 효과가 전압에 의존적이지 않은 것을 볼 때 채널 구멍 안쪽에 결합하여 open-channel blocker로 작용한다기 보다는 구멍 바깥쪽 특정 위치에 결합하여 채널을 통한 이온의 흐름을 저해할 가능성이 있다고 생각된다.²⁷⁾ 세포 밖 Mg^{2+} , Ca^{2+} 에 의해서 TRPV1의 활성이 감작되는데 이는 2개의 glutamates(E600 and E648)와 2가 양이온간의 electrostatic interactions에 의하여 이루어진다고 보고된 바 있다.²⁶⁾ 따라서 HCN 채널에 대하여 이온이 이동하는 통로에 위치하는 아미노산의 종류, 잔기의 극성 등과 이러한 세포 밖 양이온의 작용이 어떻게 연관되는지 연구할 필요가 있다.

본 연구 결과 세포 밖에 존재하는 2가 양이온인 Ba^{2+} 은 HCN 채널의 바깥쪽에서 채널을 통한 이온 특히 K^+ 의 흐름을 방해함으로써 I_h 크기를 감소시키는 것으로 보이며 Ca^{2+} 과는 작용 부위를 공유할 것으로 예상할 수 있다. 또한 최근 들어 I_h 억제가 국소마취제^{32,33)}와 이편성 진통제의 작용 기전^{13,34)}으로 제안되고

있으며 신경병증성 통증의 기전³⁵⁻³⁷⁾으로도 가능성이 제시되고 있다. 따라서 말초 감각 신경 세포에서 I_h 의 전기 생리학적, 생물리학적 특성에 대한 자세한 정보는 새로운 국소 마취제 또는 진통제의 개발에 도움을 줄 수 있다고 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2004년도 정부의 재원으로 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2004-202-E00033).

참고문헌

- 1) Yanagihara, K. and Irisawa, H. : Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Archv Eur. J. Physiol.* **380**, 11 (1980).
- 2) DiFrancesco, D. and Ojeda, C. : Properties of the current i_f in the sino-atrial node of the rabbit compared with those of the current i_K , in Purkinje fibres. *J. Physiol.* **308**, 353 (1980).
- 3) Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S. and Zong, X. : Hyperpolarization-activated cation channels: From genes to function. *Physiol. Rev.* **89**, 847 (2009).
- 4) Chen, S., Wang, J. and Siegelbaum, S. A. : Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.* **117**, 491 (2001).
- 5) McCormick, D. A. and Pape, H. C. : Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol. (Lond)* **431**, 291 (1990).
- 6) DiFrancesco, D. and Tortora, P. : Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* **351**, 145 (1991).
- 7) Mayer, M. L. and Westbrook, G. L. : A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J. Physiol.* **340**, 9 (1983).
- 8) Pape, H. C. and McCormick, D. A. : Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature.* **340**, 715 (1989).
- 9) Pape, H. C. : Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 299 (1996).
- 10) Noble, D., Denyer, J. C., Brown, H. F. and DiFrancesco, D. : Reciprocal role of the inward currents i_b , i_{Na} and i_f in controlling and stabilizing pacemaker frequency of rabbit sino-atrial node cells. *Proceedings: Biological Sciences* **250**, 199 (1992).
- 11) DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M. and Trobba, C. : Properties of the hyperpolarizing-activated current (i_p) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node *J. Physiol. (Lond.)* **377**, 61 (1986).
- 12) Denyer, J. C. and Brown, H. F. : Pacemaking in rabbit isolated sino-atrial node cells during Cs^+ block of the hyperpolarization-activated current i_f . *J. Physiol. (Lond.)* **429**, 401 (1990).
- 13) Vasilyev, D. V., Shan, Q., Lee, Y., Mayer, S. C., Bowlby, M. R., Strassle, B. W., Kaftan, E. J., Rogers, K. E. and Dunlop, J. : Direct inhibition of I_h by analgesic loperamide in rat DRG neurons. *J. Neurophysiol.* **97**, 3713 (2007).
- 14) Scroggs, R. S., Todorovic, S. M., Anderson, E. F. and Fox, A. P. : Variation in I_H , I_{IR} , and I_{LEAK} between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J. Neurophysiol.* **71**, 271 (1994).
- 15) Villiere, V. and McLachlan, E. M. : Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration. *J. Neurophysiol.* **76**, 1924 (1996).
- 16) Cardenas, C. G., Del Mar, L. P., Vysokanov, A. V., Arnold, P. B., Cardenas, L. M., Surmeier, D. J. and Scroggs, R. S. : Serotonergic modulation of hyperpolarization-activated current in acutely isolated rat dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol. (Lond.)* **518**, 507 (1999).
- 17) Yao, H., Donnelly, D. F., Chao, M. and LaMotte, R. H. : Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current after chronic compression of the dorsal root ganglion. *J. Neurosci.* **23**, 2069 (2003).
- 18) Momin, A., Cadiou, H., Mason, A. and McNaughton, P. A. : Role of the hyperpolarization-activated current I_h in somatosensory neurons *J. Physiol.* **586**, 5911 (2008).
- 19) Gauss, R., Seifert, R. and Kaupp, U. B. : Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature.* **393**, 583 (1998).
- 20) Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. and Biel, M. : A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature.* **393**, 587 (1998).
- 21) Maruoka, M., Nakashima, Y., Takano, M., Ono, K. and Noma, A. : Cation-dependent gating of the hyperpolarization-activated cation current in the rabbit sino-atrial node cell. *J. Physiol. (Lond.)* **477**, 423 (1994).
- 22) Ono, K., Maruoka, F. and Noma, A. : Voltage- and time-dependent block of I_f by Sr^{2+} in rabbit sino-atrial node cells *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **427**, 437 (1994).
- 23) van Welie, I., Wytse J. Wadman, W. J. and van Hooff, J. A. : Low affinity block of native and cloned hyperpolarization-activated channels by Ba^{2+} ions. *Eur. J. Pharmacol.* **507**, 15 (2005).
- 24) Daia, X.-Q., Karpinskia, E. and Chen, X.-Z. : Pb^{2+} inhibits the hyperpolarization-activated current in acutely isolated dorsal

- root ganglion neurons. *Neuroscience*. **120**, 57 (2003).
- 25) Zufall, F. and Firestein, S. : Divalent cations block the cyclic nucleotide-gated channel of olfactory receptor neurons. *J. Neurophysiol.* **69**, 1758 (1993).
- 26) Ahern, G. P., Brooks, I. M., Miyares, R. L. and Wang, X. : Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J. Neurosci.* **25**, 5109 (2005).
- 27) Sheets, M. and Hanck, D. : Mechanisms of extracellular divalent and trivalent cation block of the sodium current in canine cardiac Purkinje cells. *J. Physiol.* **454**, 299 (1992).
- 28) Terlau, H., Ludwig, J., Steffan, R., Pongs, O., Stühmer, W. and Heinemann, S. H. : Extracellular Mg^{2+} regulates activation of rat eag potassium channel. *Pfluegers Archiv Eur. J. Physiol.* **432**, 301 (1996).
- 29) Mubagwa, K., Stengl, M. and Flameng, W. : Extracellular divalent cations block a cation non-selective conductance unrelated to calcium channels in rat cardiac muscle. *J. Physiol.* **502**, 235 (1997).
- 30) Morera, F. J., Woff, D. and Vegara, C. : External copper inhibits the activity of the large-conductance calcium- and voltage-sensitive potassium channel from skeletal muscle. *J. Membrane. Biol.* **192**, 65 (2003).
- 31) Rigg, L., Mattick, P. A. D., Heath, B. M. and Terrar, D. A. : Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_f) by calcium and calmodulin in the guinea-pig sino-atrial node. *Cardiovasc. Res.* **57**, 497 (2003).
- 32) Putrenkco, I., Stephen, K. W. and Schwarz, M. D. : Lidocaine blocks the hyperpolarization-activated mixed cation current, I_h , in rat thalamocortical neurons. *Anesthesiology* **115**, 822 (2011).
- 33) Perkins, K. L. and Wong, R. : Intracellular QX-314 blocks the hyperpolarization-activated inward current I_q in hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* **73**, 911 (1995).
- 34) Ingram, S. L. and Williams, J. T. : Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. *Neuron*. **13**, 179 (1994).
- 35) Dalle, C. and Eisenach, J. C. : Peripheral block of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) reduces mechanical allodynia in animal models of postoperative and neuropathic pain. *Region. Anesth. Pain M.* **30**, 243 (2005).
- 36) Chaplan, S. R., Guo, H. Q., Lee, D. H., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., Velumian, A. A., Butler, M. P., Brown, S. M. and Dubin, A. E. : Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J. Neurosci.* **23**, 1169 (2003).
- 37) Sun, Q., Xing, G. G., Tu, H. Y., Han, J. S. and Wan, Y. : Inhibition of hyperpolarization-activated current by ZD7288 suppresses ectopic discharges of injured dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain. *Brain Res.* **1032**, 63 (2005).