

# 성장단계의 흰쥐 해마 CA1 신경세포에서 안정막 전압과 세포용량 변화의 상관관계

양윤실, 강문석, 김선희, 은수용, 정성철\*

제주대학교 의학전문대학원 생리학교실

## Abstract

### The changes of neuronal capacitance related resting membrane potential of CA1 hippocampal neurons of rats in developmental stages

Yoon-Sil Yang, Moon-Suk Kang, Sun-Hee Kim, Su-Yong Eun, Sung-Cherl Jung\*

Department of Physiology, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

In an early developmental stage within postnatal 3 weeks, neurons in mammalian brains shows dynamic and rapid changes of protein expression on cellular membrane, related with ion channels and receptors. Using acute slices of rat hippocampi (postnatal 7-21), change change of cell capacitance measured electrophysiologically during developmental stages have been studied to find the correlation with resting membrane potentials(RMP), which are decided by ion channel expression on neuronal membrane. The change of RMP showed significant changes to be hyperpolarized during developmental periods. However, the size of neurons was not significantly increased. This result indicates that, in an early developmental stage, developmental processings of neurons may be concentrated for modulating protein/lipid ratio of cellular membranes, rather than physical developments. (J Med Life Sci 2011;8:42-45)

Key Words : Resting membrane potential, Whole-cell Capacitance, CA1, Hippocampus, K<sup>+</sup> channel, Na<sup>+</sup> channel

## 서론

해마는 포유류의 뇌에서 학습과 기억에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 CA1, CA2, CA3 신경세포와 치아이랑(dentate gyrus)로 구성되어있다<sup>1)</sup>. 이 중 CA1 신경세포는 CA3 신경세포와 내후각뇌피질 Ⅲ층 신경세포(entorhinal cortex layer Ⅲ)로부터 각기 다른 신호를 받는다고 알려져 있다<sup>2)</sup>. 이러한 신경연접의 신호 유입이 해마의 학습과 기억에 영향을 준다는 것 또한 이미 잘 알려져 있다<sup>3)</sup>.

해마에서 학습과 기억의 메커니즘은 신경세포의 내재적 흥분성(intrinsic excitability)의 변화를 포함한다<sup>4)</sup>. 내재적 흥분성은 세포가 신호를 받았을 때 활동전위(action potential, AP)를 발화하는 경향으로 정의할 수 있다<sup>5)</sup>. 따라서 신경세포가 활동전위를 발화할 수 있는 능력이 학습과 기억의 형성에 영향을 미친다. 활동전위는 주로 전압의존성 나트륨 통로(voltage-dependent Na<sup>+</sup> 이온통로, Nav 이온통로)와 칼륨 통로(voltage-dependent K<sup>+</sup> 이온통로, Kv 이온통로)의 개폐에 의해서 조절된다. 활동전위는 역치 이상의 자극이 세포에 주어지게 되면 세포막의 Nav 이온통로가 열리면서 나트륨이 세포 내로 유입되어 생기기 시작

한다. 그 후, K<sup>+</sup> 이온통로가 열리게 되고, Na<sup>+</sup> 이온통로가 닫히면서 탈분극되었던 막전압이 다시 재분극을 거치게 된다. 열린 K<sup>+</sup> 이온통로에 의해 칼륨이 세포 밖으로 빠져나가 막전압이 안정막 전(resting membrane potential, RMP)에 도달하고도 Kv 이온통로가 닫히지 않아 과분극이 생기고, 그 후 다시 막전압이 안정막 전압으로 돌아오게 된 이때, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 통로들의 특성과 분포는 활동전위의 빈도와 진폭, 그리고 기간을 결정짓는다.

현재 포유류의 뇌에서 활동전위를 생성하는 신경세포막의 특성이 각각의 발달단계에 따라 다르게 나타난다는 많은 연구결과가 보고되어 있다. 예를 들면, hipoglossal motoneurons에서 생후 2일과 20일 사이에서는 hyperpolarization-activated inward currents의 차이가 관찰되었으며<sup>6)</sup>, 청각 뇌간(auditory brainstem)에서는 12~14일 전후의 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup> 등의 이온 통로의 차이가 관찰되었다<sup>7-12)</sup>. 초기 생후 3주 이내의 발달단계에서 보여지는 세포막 이온통로들의 발현 정도는 기존 연구에서도 보여지듯이 급격하게 변하는 경향이 있으며, 이것은 바로 안정막 전압으로 반영된다. 그러나 현재 이온통로들의 발현 증가로 인한 세포의 크기 변화는 실질적으로 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서 생후 3주 이내의 해마 CA1 신경세포를 이용하여 세포막 전압의 변화와 세포의 크기 변화가 상관관계가 있는가를 전기생리학적 실험기법을 이용하여 관찰하고자 하였다.

Address for correspondence : Sung-Cherl Jung  
Department of Internal Medicine, Jeju National University School of Medicine, 102 Jejudaeakno, 690-756, Jeju, Korea  
E-mail : jungsc@jeju.ac.kr

## 재료 및 방법

### 1. 흰쥐 해마의 뇌조직절편제작

본 연구에서는 성장단계에 따른 이온채널의 특성을 연구하기 위하여 초기발달단계(Early developmental stage, ED)와 후기발달단계(Late developmental stage, LD)의 Sprague-Dawley(SD) 계 흰쥐에서 뇌를 적출하여 실험을 진행하였다. 초기발달단계는 생후 7~13일의 어린 쥐를, 후기발달단계는 생후 19~21일의 쥐를 사용하였다. 조직절편은 0 °C 전후의 조직절편용액(125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM glucose, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) 하에서 뇌를 적출한 후, Sagittal section 방식을 이용하여 좌우반구를 분리하고, 350 μm 두께로 vibratome을 이용하여 제작하였다. 제작된 조직절편은 ACSF 용액(125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM glucose, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)으로 옮겨 37 °C에서 30 분간 배양한 후, 실험을 위하여 상온에서 보관하였다.

### 2. Patch-Clamping을 이용한 전기생리학적 기록

조직절편을 ACSF 용액이 연속적으로 흐르는 기록용 챔버로 옮긴 후, 현미경으로 CA1 신경세포들의 분포 위치를 확인하고, 수상돌기가 비교적 명확하고 세포체의 구조가 뚜렷한 세포 하나를 선정하여 실험에 사용하였다.

Patch-clamping 실험을 위해 glass-pipette를 heating-puller를 이용해 tip-diameter가 1-2 μm가 되는 기록용 전극을 제작하였으며, 이때의 전극 입력임피던스(input impedance)는 대략 4-6 MΩ이 되도록 유지하였다. 제작된 전극내에는 세포내액과 유사한 20 mM KCl, 125 mM K-gluconate, 10 mM HEPES, 4 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 4 mM ATP, 0.3 mM TrisGTP, 10 mM Phosphocreatin이 포함되어있는 용액(pH 7.2, Osm 290-320 mmHg)으로 채웠다. Whole cell patch를 시도하여 안정막전압을 관찰하였으며, 보상전류를 통한 세포의 whole-cell capacitance를 측정함으로써 세포의 크기를 간접적으로 확인하였다. 이러한 전기생리학적 실험은 EPC-9 patch system (HEKA, German)을 이용하였으며, 세포의 안정막전압과 세포용량의 관찰은 current clamp mode에서 아무런 자극도 주지 않는 상태에서 수행되었다.

### 3. 실험결과 분석 및 통계처리

본 연구에서는 안정막 전압과 세포의 용량이 초기 성장단계 및 후기 성장단계에서 어떤 변화를 보이는지를 분석하고, 초기 성장단계 수치를 이용하여 각각 안정막 전압과 세포의 용량이 얼마나 변화하였는가를 분석하여 비교하였다.

결과들의 추가적 분석들은 Igor Pro software(Wavemetrics, USA)와 Excel(Microsoft, U.S.A)을 이용하였으며, 통계처리에는 Student's t-test를 이용하여 유의성 0.05 수준에서 검증하였다.

## 결과

발달단계에 따른 이온 채널들의 차이를 확인하기 위해 current clamping mode에서 안정막전압을 확인하였다(Figure 1). 그림에서, 초기 발달단계의 안정막전압이 후기 발달단계의 안정막 전압보다 유의하게 높게 나타나고 있는 것을 알 수 있으며, 이러한 결과는 기존에 연구결과들과 일치하는 것으로 보인다(Figure 1A: ED :  $-61.33 \pm 1.95$  mV, n=15; LD :  $-66.96 \pm 2.20$  mV, n=14;  $p < 0.05$ ). RMP의 높고 낮음은 실질적으로 세포막의 이온통로 분포밀도(density)와 밀접한 관계가 있다. 그러나, 초기발달단계와 후기발달단계의 세포들 사이에서 세포용량의 차이는 유의하게 나타나지 않고, 일정하게 유지되는 것으로 파악되었다(Figure 1B). 이것은 설치류의 출생 후 초기 3주 동안 급격하게 세포막 이온통로의 발현이 증가하는 것과 동시에 세포용량도 증가할 것이라는 예상과는 다르게 나타나는 현상이다.

Figure 1에서 기록된 안정막전압과 세포용량을 이용하여 각각의 지표가 얼마나 변화하였는가를 초기발달단계 평균값을 이용하여 계산하였을 경우, 안정막전압은 9.17%의 변화가 후기발달과정에서 나타나는 데 비해, 세포용량의 변화는 6.6% 선에 머무르고 있다(Figure 2). 따라서 세포용량에 비해 더욱 과분극화된 후기발달단계 세포들의 이온통로의 발현변화가 초기발달단계 세포들보다 크게 나타남을 알 수 있으며, 이러한 변화의 차이를 이용하여 세포막의 단위면적당 이온통로의 발현량을 추측할 수 있을 것으로 판단한다.

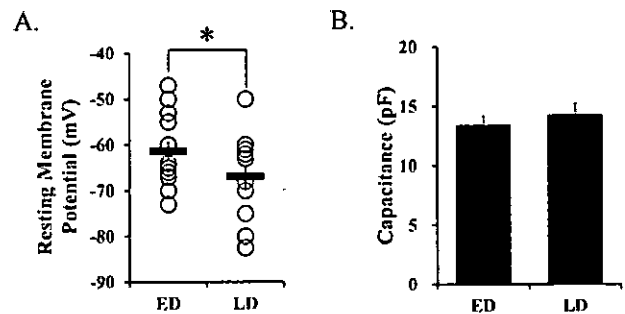
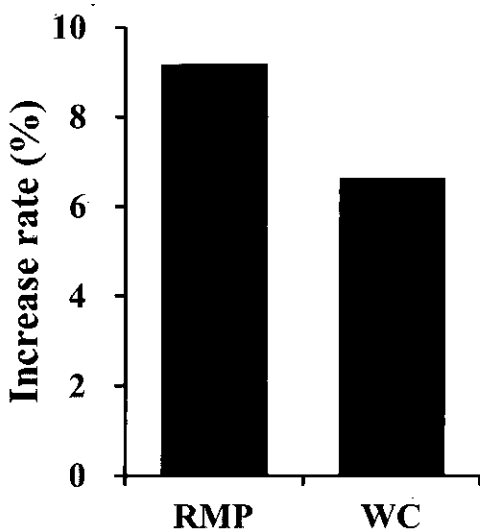


Figure 1. Comparison of RMP and whole-cell capacitance between ED and LD stage neurons. A. ED stage neurons were higher than ED stage neurons. RMPs were measured in current clamp mode from whole cell patched CA1 pyramidal neurons. Circles and squares indicate the individual and average value. B. Whole-cell capacitance shows no difference between ED and LD neurons, indicating no changes of cell size during these periods. Error bars represent SEM. \*:  $P < 0.05$

## 고찰

본 연구는 발달단계에 따른 세포막 이온통로의 분포에 차이가 있을 가능성을 확인하기 위하여 진행되었다. 실험 결과, Figure 1에서 보이듯이 초기발달단계와 후기발달단계에 따른 안정막전



**Figure 2.** Increase rates of resting membrane potential(RMP) and whole-cell capacitance(WC) calculated by the initial values of ED neurons. RMP shows a higher increase rate than cell capacitance during developmental stages.

압의 차이를 확인할 수 있었다. 안정막전압은 세포막 내외의 이온 농도 차에 따라 결정되는 것으로, 주로 inward rectifying potassium channel( $K_{ir}$ )에 의해 조절된다고 알려져 있다<sup>13)</sup>. 따라서 초기발달단계의 안정막전압이 높다는 것은 신경세포가 적은 양의  $K_{ir}$  이온통로를 갖고 있을 것이라는 것을 나타낸다. 또한, 이러한 결과로 볼 때  $Na_v$  또는  $K_v$  이온통로와 같은 다른 이온 통로들이 발달단계에 따라 세포막에 발현되는 양이 다를 수도 있다는 것을 시사한다. 안정막전압은 활동전위의 발화에도 영향을 미치게 되는데, 안정막전압이 높을수록 활동전압이 쉽게 생성될 수 있다. 따라서 초기발달단계의 신경세포가 후기발달단계의 신경세포에 비해 더 빨리 활동전위 역치(threshold)에 도달하게 되고, 쉽게 활동전위를 발생하게 된다. 이러한 활동전위의 발생에 영향을 미치는 인자로는 A-type  $K^+$  channel을 추가적으로 들 수 있는데, 세포막전압이 역치 값에 도달하는 시간을 지연시킴으로써 활동전위 발화를 늦출 수 있다<sup>14)</sup>. 이러한 이온통로들 또한 세포의 발달단계에서 서서히 그 발현양이 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 세포의 용량은 이 시기에는 크게 변하지 않는 것으로 관찰되었다(Figure 2). 세포막의 전기적 특성에서 이중지질층이 형성하는 축선 용량은 즉각적으로 세포막을 형성하는 지질의 양을 예측할 수 있는 척도로 활용될 수 있기 때문에, 본 연구에서 pF으로 표시되는 용량은 세포의 크기를 간접적으로 설명할 수 있다. 흰쥐의 중추신경계에서 신경세포의 세포막 지질 및 단백질 분포가 가장 급격하게 변하는 출생 후 3주 동안 주로 수용체나 이온통로들의 발현이 급격하게 증가한다. 따라서 이 시기에 세포의 크기 또한 단백질 분포의 증가에 의해 변할 것으로 판단하였으나, 본 연구에서 전기생리학적 방법으로 관찰한 결과에서는 크기 변화가 나타나지 않았다. 이상의 결과에서

출생 후 3주 동안 흰쥐의 중추신경계 세포들은 세포의 용량적 크기보다는 세포막의 단백질 발현을 유도하여 단백질/지질의 비율을 높이는 쪽으로 세포의 발달을 조절할 것으로 예상되며, 이러한 현상에 의해 동일한 크기의 세포임에도 불구하고 세포의 전기적 특성은 다르게 나타남을 알 수 있다. 본 연구에서는 실제 세포 크기의 변화가 언제 급격하게 나타나는가에 대해서는 구체적으로 연구하지는 않았으나, 예상컨대, 3주를 중심으로 그전에는 단백질 발현정도를 집중적으로 조절하고, 그 후에는 세포의 크기를 조절하는 단계에 접어들 가능성이 있으며, 이는 추후에 더 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.(NRF 2010-0013821)

**참 고 문 헌**

- 1) Bruel-Jungerman E, Davis S and Laroch S (2007) Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *Neuroscientist* 13(5):492-505
- 2) Takahashi H and Magee JC (2009) Pathway interactions and synaptic plasticity in the dendritic tuft regions of CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 62(1):102-111
- 3) Speed HE and Dobrunz LE (2009) Developmental changes in short-term facilitation are opposite at temporoammonic synapses compared to schaffer collateral synapses onto CA1 pyramidal cells. *Hippocampus* 19(2):287-294
- 4) Sjostrom SJ, Rancz EA, Roth A and Hausser M (2008) Dendritic Excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 88:769-840
- 5) Daoudal G and Debanne G (2003) Long-term plasticity of intrinsic excitability: Learning rules and mechanisms. Cold spring Harbor Laboratory Press 10:456-465
- 6) Bayliss DA, Viana F, Bellingham MC and Berger AJ (1994) characteristics and postnatal development of hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol*. 71(1):119-128
- 7) Taschenberger H and Gersdorff HV (2000) Fine-Tuning an auditory synapse for speed and fidelity: Developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *J Neuroscience* 20(24):9162-9173
- 8) Joshi I and Wang LY (2002) Developmental profiles of glutamate receptors and synaptic transmission at a single synapse in the mouse auditory brainstem. *J Physiology* 540(3):861-873
- 9) Fedchyshyn MJ and Wang LY (2005) Developmental transformation of the release modality at the Calyx o Held synapse. *J neuroscience* 25(16):4131-4140
- 10) Futai K, Okada M, Matsuyama K and Takahashi T (2001) High-fidelity transmission acquired via a

- developmental decrease in NMDA receptor expression at an auditory synapse. *J Neuroscience* 21(10):3342-3349
- 11) Nakamura Y and Takahashi T (2007) Developmental changes in potassium currents at the rat calyx of held presynaptic terminal. *J Physiol* 581(3):1101-1112
- 12) Nakamura T, Yamashita T, Saitoh N, and Takahashi T (2008) Developmental changes in calcium/calmodulin-dependent inactivation of calcium currents at the rat calyx of held. *J Physiol* 586(9):2253-2261
- 13) Neusch C, Rozengurt N, Russell EJ, Lester HA, and Kofuji P (2001) Kir4.1 Potassium Channel Subunit Is Crucial for Oligodendrocyte Development and In Vivo Myelination. *J Neuroscience*, 21(15):5429-5438
- 14) Kim JH, Wei DS and Hoffman DA (2005) Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* 569(1):41-57