

## 해마절편의 허혈성 $K^+$ 축적에 대한 $K^+$ 채널 조절 약물의 작용

최진규<sup>1</sup>·전보권<sup>2</sup>·류판동<sup>1</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 수의과대학 약리학교실 및 <sup>2</sup>고려대학교 의과대학 약리학교실

**Effects of  $K^+$  Channel Modulators on Extracellular  $K^+$  Accumulation during Ischemia in the Rat Hippocampal Slice.** Jin Kyu Choi<sup>1</sup>, Boe-Gwun Chun<sup>2</sup> and Pan Dong Ryu<sup>1</sup> Department of Pharmacology, <sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744; and <sup>2</sup>College of Medicine, Korea University, Seoul 136-705, Korea

Loss of synaptic transmission and accumulation of extracellular  $K^+$  ( $[K^+]_o$ ) are the key features in ischemic brain damage. Here, we examined the effects of several  $K^+$  channel modulators on the early ischemic changes in population spike (PS) and  $[K^+]_o$  in the CA1 pyramidal layer of the rat hippocampal slice using electrophysiological techniques. After onset of anoxic aglycemia (AA), orthodromic field potentials decreased and disappeared in  $3.3 \pm 0.22$  min (mean  $\pm$  SEM,  $n=40$ ). The hypoxic injury potential (HIP), a transient recovery of PS appeared at  $6.0 \pm 0.25$  min ( $n=40$ ) in most slices during AA and lasted for  $3.3 \pm 0.43$  min.  $[K^+]_o$  increased initially at a rate of 0.43 mM/min (Phase 1) and later at a much faster rate (12.45 mM/min, Phase 2). The beginning of Phase 2 was invariably coincided with the disappearance of HIP. Among  $K^+$  channel modulators tested such as 4-aminopyridine (0.03, 0.3 mM), tetraethylammonium (0.1 mM), NS1619 (0.3~10  $\mu$ M), niflumic acid (0.1 mM), glibenclamide (40  $\mu$ M), tolbutamide (300  $\mu$ M) and pinacidil (100  $\mu$ M), only 4-aminopyridine (0.3 mM) induced slight increase of  $[K^+]_o$  during Phase 1. However, none of the above agents modulated the pattern of Phase 2 in  $[K^+]_o$  in response to AA. Taken together, the experimental data suggest that 4-aminopyridine-sensitive  $K^+$  channels, large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels and ATP-sensitive  $K^+$  channels may not be the major contributors to the sudden increase of  $[K^+]_o$  during the early stage of brain ischemia, suggesting the presence of other routes of  $K^+$  efflux during brain ischemia.

**Key Words:** Ischemia, Extracellular  $K^+$ , Population spike, Hippocampal slice,  $K^+$  channel, 4-aminopyridine, NS-1619, Tetraethylammonium, Glibenclamide

### 서론

허혈성 뇌손상의 과정을 살펴보면 혈액 공급이 중단된 허혈상태의 뇌조직에서는 초기에 영양분과 산소부족으로 인하여 ATP의 감소, pH의 감소, 세포막의 탈분극, 세포바깥  $K^+$ 의 축적,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ 의 세포 안으로의 유입, adenosine 유리 및 신경 전달 소실 그리고 거의 0 mV에 가까운 세포막의 급격한 탈분극과 많은 양의 glutamate의 분비가 일어난다(Martin et al, 1994). 초기허

혈 반응에 뒤이어 허혈 2~7일 이후에 형태학적인 세포 변성과 활성이 있는 신경세포 수가 감소(cell death)되는 지연성 신경손상(Kirino et al, 1982)이 뒤따른다. 이러한 허혈성 뇌손상의 원인으로는 허혈시에 과도하게 분비되는 glutamate에 의한 NMDA 수용체의 활성화로 인한  $Ca^{2+}$ 의 과도한 세포 유입과 관련이 있음이 가장 잘 알려져 있다(Papas et al, 1993).

세포밖의  $K^+$ 의 축적은 뇌가 산소부족(anoxia) 상태에 처하게 될 때 초기에 가장 두드러지게 나타나는 현상으로 ATP 부족으로 인한  $Na^+/K^+$  ATPase의 활성의 억제보다도 세포밖의  $K^+$ 전도도의 증가에 더 기인한다(Jiang & Haddad, 1991, 1992). 그러나 산소와 포도당의 공급이 동

시에 차단되는 경우(anoxic aglycemia), 세포내 ATP의 농도가 3분내에 정상 10%로 감소되기 때문에(Kraig et al, 1985), 세포밖의  $K^+$  축적의 상당부분이  $Na^+/K^+$  ATPase의 기능손상에서 기인할 것으로 여겨지고 있다. 한편, 허혈시 세포외  $K^+$ 의 축적은 부분적으로 세포밖의  $K^+$  채널을 통한 세포내  $K^+$ 의 유출의 결과라 할 수 있다. 즉, 세포밖의 탈분극에 의한 voltage-dependent  $K^+$  채널의 개방, 허혈시 세포안의 ATP가 감소될 때 ATP에 의하여 억제되어 있던 ATP-sensitive  $K^+$  채널의 개방(Noma, 1981), 탈분극과 glutamate의 작용으로 인하여 세포안의  $Ca^{2+}$ 의 증가 및  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  채널의 개방(Moczydlowski & Latorre, 1983) 등이 그것이다.

신경세포막에 있는 다양한  $K^+$  채널 가운데 어느 것이 허혈시 세포밖에서 축적되는  $K^+$ 의 주 유출 경로가 될 것인지에 대하여 일찍부터 관심의 대상이 되어 왔으나 아직도 이에 대한 명확한 결론이 나지 않고 있다. 특히, ATP-sensitive  $K^+$  채널의 경우, 허혈시의 세포내 ATP농도가 감소되고 이 채널이 ATP에 의하여 억제된다는 사실 때문에 많은 연구가 되었으며, anoxia 상태에서 세포막이 과분극되거나 또는 외향성  $K^+$  전류가 활성화되거나 허혈손상에 저항력이 있는 생후 수일령의 쥐의 뇌에서는 이 채널을 통한 전류가 작다는 사실 등이 보고되었다(Krnjevic & Leblond, 1989; Jiang et al, 1994; Murphy & Greenfield, 1992; Jiang et al, 1992; Murphy & Greenfield, 1991; Godfraind & Krnjevic, 1993). 반면에, 허혈시 활성화되는 주 채널은 ATP-sensitive  $K^+$  채널이 아닌 다른  $K^+$  채널이라는 보고도 있다(Leblond & Krnjevic, 1989; Zetterstrom et al, 1995). 아울러, 지금까지 언급한  $K^+$  채널 외에 glutamate에 의해 열리는 ligand-gated cation channel을 통한  $K^+$ 의 유출 가능성도 배제할 수 없다.

다양한  $K^+$  채널 가운데 허혈시의  $[K^+]_o$ 의 증가와 직접적인 관련이 있는 것이 어느 것인지에 대하여는 아직도 의견이 일치 되지 않고 있다. 특히, 단일세포에서 얻은 결과는 주위에 신경회로와 교세포가 없기 때문에 조직이나 생체에서 얻은 실험자료와 다를 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 기능적으로 생체의 조건에 가깝고 실험적 처치가 용이할 뿐만 아니라 많은 연구가 되어 있는 해마 뇌절편을 이용하여, 허혈 시의  $[K^+]_o$ 의 유출 경로로 이용되는  $K^+$  채널의 종류를 조사하고자, 해마절편에서 허혈의 유발 및 집단전위와  $[K^+]_o$  농도를 재현성있게 측정할 수 있는 방법을 확립하고 수종의  $K^+$  채널 개방제와 차단제의 작용을 비교 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 해마 절편

성숙한(300~400 g) Sprague-Dawley계 수컷 쥐를 ether로 마취한 후 단두하여 신속하게 뇌를 적출하고 얼음 속에 보관된 차가운(4°C) 인공뇌척수액에서 해마가 포함된 부분의 조직을 분리하였다. 직육면체의 agar block(1.5×1.5×1.5 cm<sup>3</sup>)에 순간 접착제를 이용하여 붙인 다음 agar block과 뇌조직을 Vibroslicer(World Precision Instrument Co, USA)의 챔버바닥에 해마의 장축에 수직되게 붙이고 400 μm 두께의 해마 절편을 만들었다. 만들어진 해마 절편은 32°C의 항온수조 안의 Gibb 챔버(보관용 챔버)에서 1시간 이상 안정화시켰다. 이 절편은 대략 6~8시간까지 전기적 활성이 유지되었다. 해마 절편이 안정화하기를 기다린 다음 공기 중에 노출이 되지 않도록 조심하면서 기록용 챔버(1 ml)에 옮겨 해마 절편이 1 mm의 깊이로 잠기도록 하고 산소로 포화된 34°C의 인공뇌척수액을 분당 2~3 ml의 속도로 관류시켰다. 인공뇌척수액의 조성은 NaCl 126, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 3.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.0, MgCl<sub>2</sub> 1.3, glucose 5 mM이며 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>로 충분히(30분 이상) 포화시켰다. 본 실험에서는 인위적으로 허혈을 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(95/5%) 혼합 가스 대신 N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(95/5%) 혼합 가스로, glucose대신 sucrose로 대체하였다. 허혈반응이 나타난 후 산소와 glucose 재공급은 hypoxic injury potential이 소실된 직후에 시작되었다. 약물 적용은 허혈 10분전부터 적용되었으며 이후 허혈기간과 정상용액 재관류기간을 포함하여 실험이 끝날 때까지 적용되었다.

### $K^+$ selective electrode

$K^+$ -selective electrode는 Ammann등(1987)의 방법에 따라 만들었으며 구체적인 과정은 아래와 같다. 외경 0.58 mm의 유리관을 미세전극제작기(Microelectrode puller, PD-5, Narishige Scientific Instrument Lab, Tokyo, Japan)를 이용하여 유리 미세 전극을 만들었다 (2~5 MΩ). 이 미세 전극 내면을 소수성(hydrophobic)으로 만들기 위하여, 먼저 100°C오븐에서 1시간 건조시킨 후 silanizing 용액(Fluka 52619, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)을 전극 내부에 적용시키고 100°C에서 다시 1시간 건조시켰다. 이렇게 처리된 전극의 끝을  $K^+$ -ionophore용액(Fluka 91761/1, Fluka chemie AG, Buchs, Switzerland)에 담그어 끝에서 1 mm 내외까지  $K^+$ -ionophore 용액으로 채우고 그 나머지 부분은 0.1 M KCl용액으로 채웠다. 이렇게 만들어진  $K^+$ -selective electrode는 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mM KCl표준 용액을 34°C에서 pen recorder와 Axoscope에서 각 농도에 대한 활성도(activity)를 측정하여 표준 직선을

그렸다. K<sup>+</sup> 농도가 10배 증가할 때 전압이 50 mV 이상 증가하는 K<sup>+</sup>-selective electrode만을 실험에 사용하였다.

집단활동전위의 기록 및 세포밖 K<sup>+</sup> 농도의 측정

집단활동전위(population spike)는 인공뇌척수액을 채운 유리 미세 전극(2~5 MΩ)을 CA1 pyramidal layer에 위치하고 자극용 전극(bipolar tungsten electrode, WPI, USA. 125 μm간극)은 CA3에 위치시키고 Schaffer collateral pathway를 따라 자극하여 기록하였다. 기록용 유리 미세 전극은 K<sup>+</sup>-selective electrode와 유사하게 만들고 인공뇌척수액으로 유리 전극을 채웠다. 전기 자극은 역치의 두 배되는 전압 펄스(40 μs기간)를 매 30초에 한 번씩 가하였다. 집단활동전위(population spike)는 AC 증폭기(DAM 80, WPI, Sarasota, USA)로 100배 증폭시키고, 데이터 변환 장치(VR-10B)를 통하여 VTR tape에 저장하고 동시에 AD converter(Digidata, Axon Instrument, Foster City, USA)를 이용하여 pClamp(Ver 6.0 Axon Instrument) 또는 Axoscope(Ver 1.0 Axon Instrument) 프로그램으로 입력하였다. K<sup>+</sup>-selective electrode는 해마의 CA1 부위에 위치시키고 반응이 안정화되면 허혈을 유발시켰다. 나타나는 전기적 반응은 DC증폭기(IE-251, Warner instrument, USA)로 10배 증폭하여 측정하며, 결과는 pen recorder와 데이터 변환 장치(VR-10B)를 통하여 VTR tape에 저장하고 동시에 AD converter를 이용하여 Axoscope 프로그램으로 컴퓨터에 입력하였다. 집단 활동 전위의 크기는 분석프로그램을 이용하여 Shurr등(1984)의 방법에 따라 측정하였다(Fig. 1). Fiber volley와 first EPSP는 거의 모든 경우에 약물의 투여 여부와 상관없이 PS와 평행하게 변화하였기 때문에 여기서는 PS만을 주 분석 대상으로 삼았다. 세포밖의 K<sup>+</sup> 농도는 얻어진 전압 자료를 표준직선과 비교하여 환산하였다.

결 과

해마 절편에서의 집단활동전위의 기록

해마 절편의 집단활동전위(population spike, PS)는 기록용 electrode와 K<sup>+</sup>-selective electrode를 CA1 부위에 위치시키고 해마절편의 Schaffer collateral 신경전도도를 따라 자극하며 기록하였다. 이 자극에 의해 자극후 1~3 ms 이내에 나타나는 fiber volley와 3~6 ms에는 집단활동전위를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 한편, population EPSP는 위쪽 방향으로 기록이 되었다. PS의 크기는 기록하는 위치에 따라 다르게 나타났으며 pyramidal cell 층에 가까울수록 크게 나타났다. 본 연구에서는 PS가 가장 크게 기록

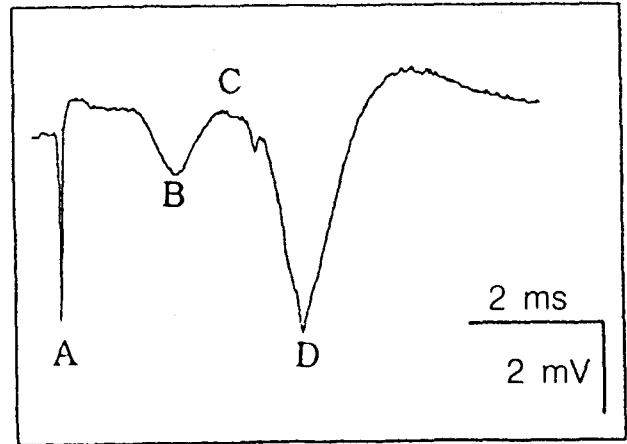
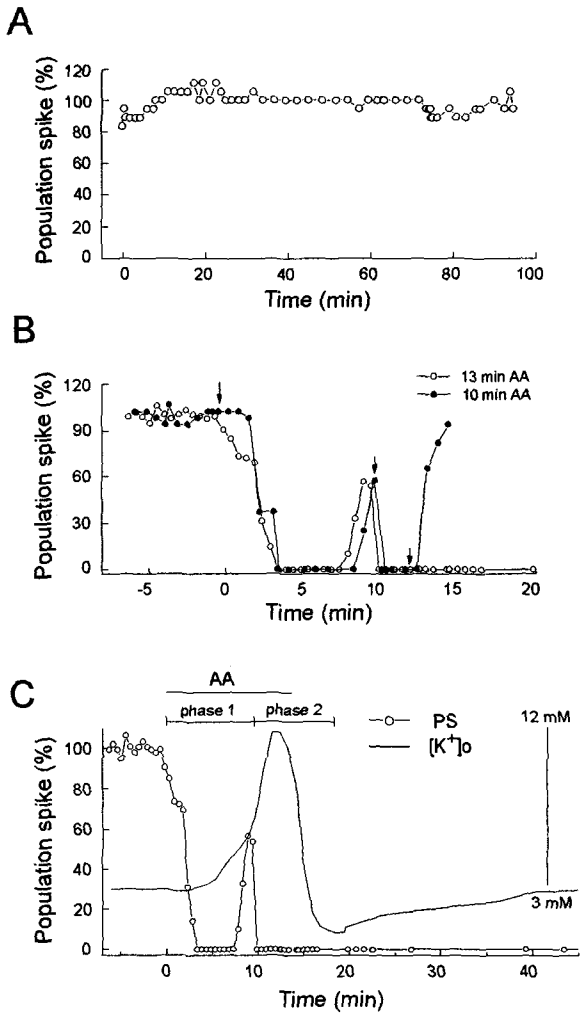


Fig. 1. CA1 population response to a single 40 μs stimulus to Schaffer collaterals at twice of threshold. A, Stimulus artifact; B, Fiber volley; C, First excitatory postsynaptic potential; D, Peak of population spike (PS). The amplitude of population spike was determined by measuring the voltage difference between C and D.

되는 위치 즉 pyramidal layer에 recording electrode를 위치시키고 PS를 기록하였다. 한편 PS의 크기는 자극하는 전압이 커질수록 그 크기가 증가하였고 역치는 대략 2~4 V이었으며 실제의 실험에서는 역치의 2배 되는 5~7 V에서 자극하였다. 이때 PS의 크기는 3~6 mV이었다.

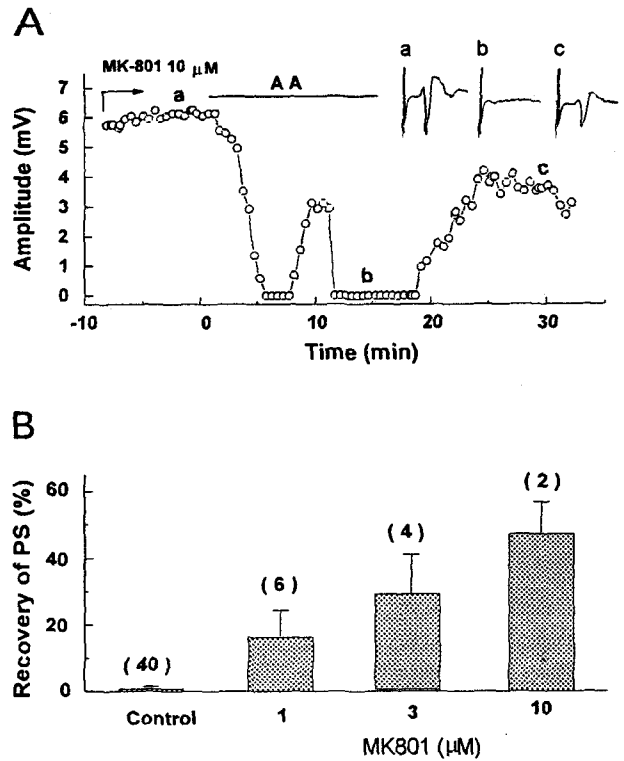
해마 절편에서 허혈시 집단활동전위와 세포밖 K<sup>+</sup> 농도의 변화

Fig. 2A는 Schaffer collateral pathway를 반복 자극하여 1시간 동안 기록된 PS의 크기를 그래프로 표시한 것이다. 이 기간은 허혈반응에 대한 약물의 작용을 조사하는 실험의 전기간과 일치하는 것으로 이 기간 동안 PS의 크기가 거의 일정하게 유지됨을 보여주고 있다. 이렇게 PS와 세포밖 K<sup>+</sup> 농도를 기록하며 산소와 glucose를 질소와 sucrose로 대체한 허혈 용액으로 바꾸어 주면(anoxic aglycemia, AA) PS의 크기가 곧 작아지는데 평균 감소속도는  $-32 \pm 2.88$  mV/min이었다(mean  $\pm$  sem, n=40). 허혈 후 PS가 완전히 소실된 시간은  $3.3 \pm 0.22$ 분이었다(Fig. 2B). 그러나 완전히 소실되었던 PS는 허혈중임에도 다시 증가하기 시작하여 허혈전 PS 크기의  $57 \pm 4.62\%$ 에 도달하였다가 9.6  $\pm$  0.47분 후에 다시 소실되었다 (Table 1 참조). 이 때 증가되는 PS는 흔히 hypoxic injury potential (HIP)이라 하며 허혈반응의 진행을 알 수 있는 하나의 지표로 이용되고 있다(Fairchild et al, 1988). AA후 PS의 회



**Fig. 2.** Ischemic changes in the population spike (PS) and extracellular  $K^+$  concentration ( $[K^+]_o$ ) at CA1 area of the rat hippocampus. **A.** A plot of population spike amplitude against time. The graph illustrates that PS amplitude in the hippocampal slice preparation is stable for 100 min. **B.** Changes in PS amplitude induced by aglycemic anoxia (AA) that started at  $t=0$ . Hypoxic injury potentials (HIP) appeared during AA. Note that recovery of PS is dependent on the duration of AA period. PS was recovered when reperfused during HIP, but failed to recover when reperfused after disappearance of HIP. **C.** Records showing that correlation of changes in PS amplitude and  $[K^+]_o$ .

복여부는 산소와 glucose의 공급시기와 관련이 있었다. 즉, HIP가 완전히 소실되기 전에 산소와 glucose를 공급하면 PS가 일부 회복되었으나 HIP가 소실된 이후에는 PS가 회복되지 않았다(Fig. 2B).



**Fig. 3.** Effects of MK-801 on the ischemic responses in hippocampal slice. **A.** Plots of the PS amplitude and  $[K^+]_o$  vs time. Typical examples of PS recorded before (a), during (b) AA and following recovery period (c). **B.** These bar graphs illustrate the percent recovery of PS amplitude in MK-801-treated slices. Increasing the concentration of MK-801 resulted in a greater recovery of PS. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM as percent of PS amplitude before introducing AA.

한편 세포밖  $K^+$ 의 농도는 허혈 초기에는 천천히 증가하기 시작하여(0.43 mM/min, Phase 1) HIP가 소실되는 시점에서 급격히 증가되어(12.5 mM/min, Phase 2) 수분내에 최고 농도( $18.1 \pm 1.97$  mM,  $n=6$ )에 도달하였다(Fig. 2C). 특히, HIP의 소실 시점과 Phase 2가 시작되는 시점의 일치 현상은 거의 모든 해마절편에서 일관되게 관찰되었다. 최고농도에 도달한 이후, 세포밖  $K^+$ 의 농도는 서서히 감소하다가 산소와 glucose가 함유된 영양액을 재공급하면 급격히 정상 수준 이하로 떨어졌다가( $1.3 \pm 0.13$  mM,  $n=6$ ) 서서히 정상 수준으로 회복되었다. 세포밖으로의  $K^+$ 의 급격한 유출과 더불어  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ 의 세포 안으로의 급격한 유입이 일어나는 Phase 2에서 HIP가 소실된 후  $[K^+]_o$ 가 최고를 이루는 시기는 HIP 소실 시간과 1분 이내의 간격으로 일어났다.

MK-801의 허혈성 뇌손상 보호 효과

허혈시 과도하게 분비되는 glutamate에 의한 excitotoxicity가 허혈후 신경의 손상 및 괴사와 관련이 있음은 잘 알려져있다. MK-801은 excitotoxicity를 매개하는 NMDA 수용체의 open channel blocker로서 뇌절편을 이용한 허혈 모델에서도 허혈후의 PS의 회복을 돕는다(Papas et al, 1993). MK-801을 적용하였을 경우 해마 절편의 CA1 pyramidal 세포에서의 PS의 크기에 영향을 미치지 않았으나, 재관류후 최고 한시간 기간 동안에 측정된 PS의 회복여부에는 두드러지게 영향을 미쳤다. Fig. 3A는 MK-801의 효과를 보여주는 대표적인 그림으로 산소와 포도당을 재공급하였을 때 PS가 허혈전 크기의 56% 만큼 회복되고 있다. 또한 MK-801을 적용하였을 때 허혈 초기 PS가 소실되는 속도가 농도의존적으로 지연되었고 HIP도 늦

게 나타났다(자료 제시하지 않음). 그러나 HIP 지속 시간에는 유의성있는 차이를 관찰할 수 없었다. Fig. 3B는 이러한 일련의 실험 결과를 요약한 것으로 HIP소실 3분 후부터 정상용액으로 재관류시킨 것으로 대조군에서는 PS가 거의 회복되지 않았으나 MK-801(1~10 μM)을 처치한 경우 PS의 크기가 농도 의존적으로 회복되었음을 보여주고 있다.

K<sup>+</sup> 채널 조절 약물이 허혈반응에 미치는 영향

4-aminopyridine(4-AP)은 A type K<sup>+</sup> 채널을 효과적으로 차단하나 고농도에서는 다른 종류의 채널도 차단하는 것으로 알려져 있다(Rudy et al, 1988). 4-AP의 영향하에서는 허혈전 PS의 크기가 증가되었고 [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>도 다소 불규칙 하였지만 3 mM 내외로 증가되는 경향을 보였다(Fig. 4A). 허혈전 PS크기의 증가는 농도의존적으로 나타나 30 μM에서 14%, 300 μM에서 30% 만큼 증가되었다. 특히 4-AP는 허혈시 대조군에서는 대개 허혈 유발후 3~4분에 일어나는 Phase 1 과정의 PS 소실을 지연시키거나 혹은 불완전하게 하였다. 초기 PS의 감소 속도는 -20±4.48 mV/min(n=6)이었고 Phase 2에서의 [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>의 급격한 증가

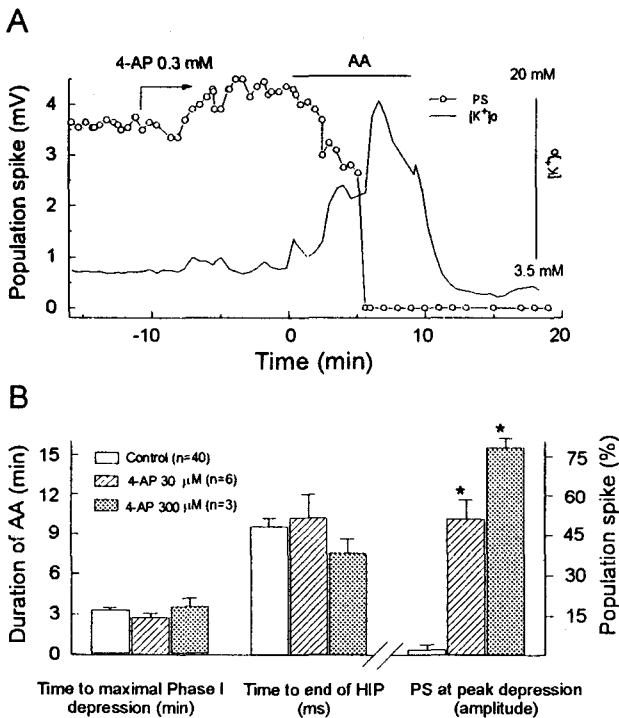


Fig. 4. Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on the ischemic responses of the hippocampal slice. A. Typical plots of the amplitude of PS and [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> against time. B. Effects of 4-AP on the ischemic responses of the hippocampal slice. 'Time to maximal Phase 1 depression' indicates the duration of AA when the maximal depression of PS was seen during Phase 1. Similarly, 'time to end of HIP' is the AA duration to the end of hypoxic injury potential (HIP). 'PS at peak depression' is the amplitude of PS as percent of the control at the maximal depression during Phase 1. \*P<0.001.

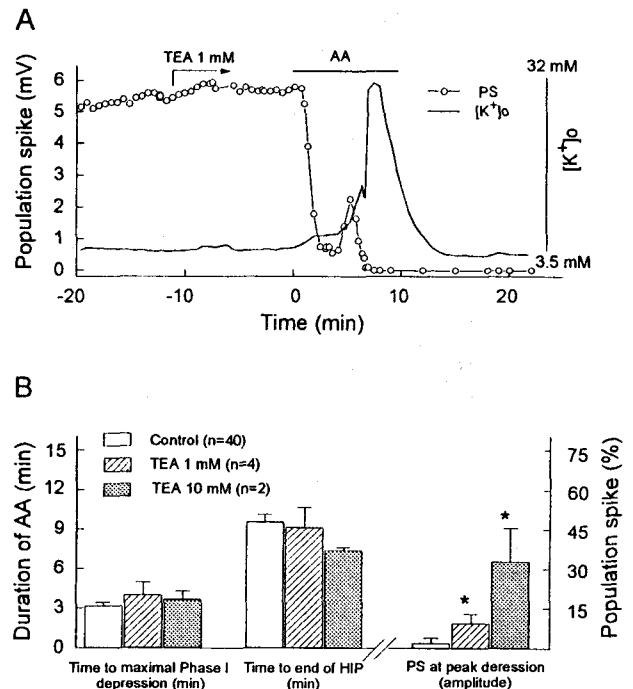


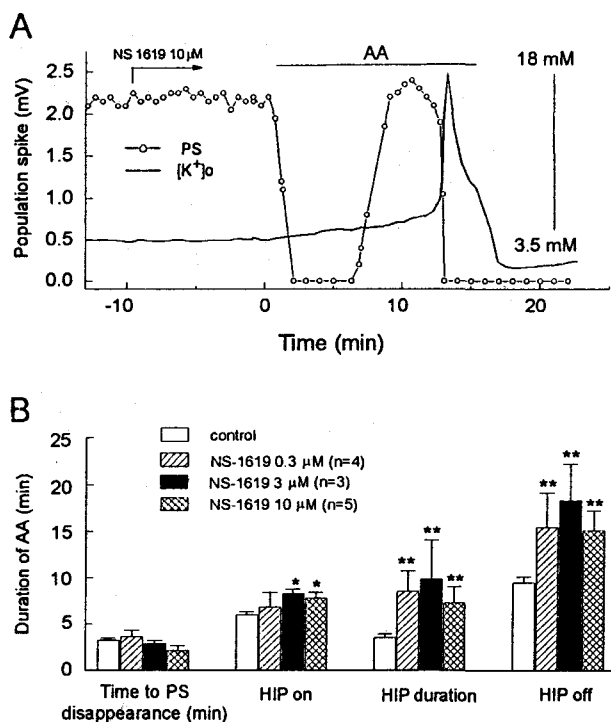
Fig. 5. Effects of tetraethylammonium chloride (TEA) on the ischemic responses of the hippocampal slice. A. Typical plots of the amplitude of PS and [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> against time. B. Effects of TEA on the ischemic responses in the hippocampal slice. Other descriptions are the same as in Fig 4B. \*P<0.05.

와 더불어 일어나는 PS 소실, 즉 HIP의 소실시점은 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 4B). 세포 밖의  $K^+$ 의 경우 Phase 2에서  $[K^+]_o$ 가 최고에 도달하였을 때의 농도는  $19.0 \pm 2.75$  mM (n=3)으로 대조군( $18.0 \pm 1.97$  mM, n=6)과 별로 차이를 보이지 않았으나, 정상용액으로 재관류시 포타슘 농도가 약간 감소하는 대조군( $1.28 \pm 0.13$  mM, n=6)과는 유의성있게 높게 나타났다( $3.0 \pm 0.31$  mM, n=3,  $p < 0.01$ ).

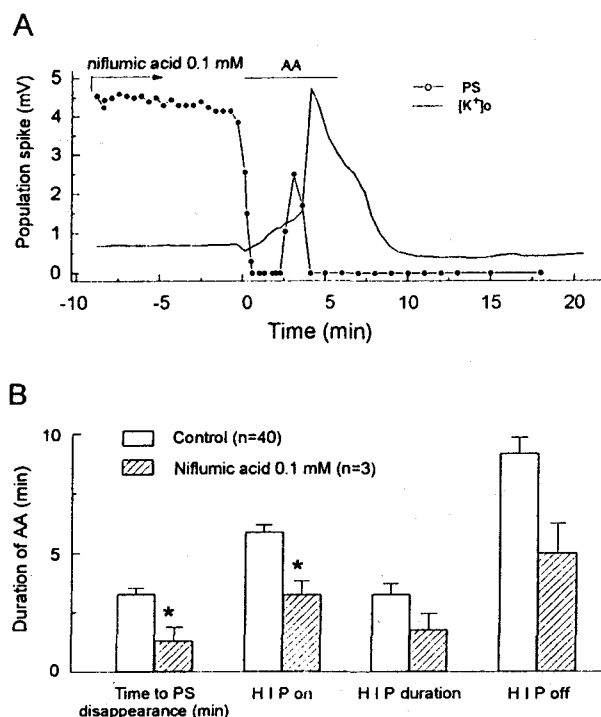
Tetraethylammonium chloride(TEA)은 비특이적인  $K^+$  채널 차단제이나 저농도(1 mM)에서는 BK 채널을 선택적으로 차단하는 것으로 알려져 있다(Rudy et al, 1988). Fig. 5는 TEA를 적용하며 허혈을 유발하였을 때 반응을 보여주는 것으로 4개중 3개의 해마 절편에서 phase 1의 PS는 감소되는 경향을 보였으나( $-29 \pm 7.56$  mV/min, n=3), 4-AP를 적용한 경우처럼 소실이 불완전하였으며, 이어 phase 2로 이행되어 HIP로 보이는 PS의 증가현상이 보이고 수분 후에 소실되었다(Fig. 5A). 그러나, HIP 크기(57

$\pm 10.5\%$ , n=3), HIP 소실 시간( $10.2 \pm 1.59$ 분, n=3), 그리고 세포밖  $K^+$  농도 변화에는 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 또 4-AP와 TEA는 HIP소실 후 3분에 정상용액으로 관류하였을 때, PS의 회복양상에 이렇다할 영향을 주지 않았다(Fig. 5B).

Fig. 6은 최근에 개발된 BK 채널 개방제인 NS-1619 (Olesen et al, 1994)가 해마 절편 허혈반응에 미치는 영향을 보여주는 것이다. TEA와 같이 그 자체로는 PS의 크기나  $[K^+]_o$ 의 농도에는 이렇다할 영향을 미치지 않았다. 허혈초기의 PS 감소과정, 즉 phase 1에서는 두드러진 변화가 없었으나(Fig. 6B) 허혈후 HIP 기간의 증가는 4-AP나 TEA를 적용하였을 때는 관찰되지 않았던 현상이다. HIP는 대조군보다 늦게 나타났고 더 오래 지속되었음을 보여주고 있다. HIP의 소실과 더불어 세포밖  $K^+$ 의 급격한 증가 현상은 대조군과 유사하였다. 그러나 MK-801의 경우와는 달리 HIP 소실 3분후 정상용액으로 관류한 뒤 1시간 동안 관찰하여도 PS는 회복되지 않았다. 또한 NS 1619를 적용한 후 기록된 HIP의 크기는 대조군과 비교하



**Fig. 6.** Effects of NS-1619 on the ischemic responses of the hippocampal slice. **A.** Ischemic changes in PS and  $[K^+]_o$  recorded in the presence of NS-1619 (10  $\mu$ M). **B.** Effects of NS-1619 on the depression of population spike, onset and duration of HIP during ischemic responses of hippocampal slice. Note the early induction of HIP and prolongation of HIP duration. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



**Fig. 7.** Effects of niflumic acid on the ischemic response of the hippocampal slice. **A.** Ischemic changes in PS and  $[K^+]_o$  in the presence of niflumic acid (0.1 mM). **B.** Effect of niflumic acid on the ischemic changes in PS and HIP. Note the earlier loss of population spike in Phase 1 and the earlier induction of HIP. \* $P < 0.05$ .

**Table 1.** Effects of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel modulators on the population spikes (PS) recorded from CA1 of hippocampal slice during aglycemic anoxia

Drugs(mM, n)	Time to maximal depression of PS	Hypoxic injury potential		
		Onset(min*)	Amplitude(%**)	Duration(min)
Control (0, 40)	3.3±0.22	6.0±0.23	58±4.62	3.3±0.43
Pinacidil (0.1, 4)	2.2±0.10	7.3±1.20	73±8.50	5.2±2.06
Glibenclamide (0.4, 4)	4.5±0.90	7.4±0.96	66±12.9	3.7±1.33
Tolbutamide (0.3, 2)	3.5±0.21	7.8±1.78	64±10.0	3.0±0.35

Data are expressed as mean±SEM. \*Duration of aglycemic anoxia to the beginning of hypoxic injury potential. \*\*Percent of PS amplitude before inducing ischemic insult.

면 유의성있는 차이를 관찰할 수 없었다.

Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> 채널을 억제하는 것으로 알려진 niflumic acid는 최근 large conductance K<sup>+</sup> channel(BK)채널을 개방하는 것으로 알려졌다(Ottolia et al, 1994). Niflumic acid는 Fig. 7에 보인 것처럼 허혈 초기 phase 1단계에서는 대조군에 비해 빨리 PS를 소실시켰으나(P<0.05) NS 1619와는 달리 HIP는 일찍 생겼고 지속 시간도 대조군에 비해 짧았으며 더불어 [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>의 급격한 증가도 일찍 나타났다. Niflumic acid를 적용한 경우에도 정상용액으로 재관류한 후 PS가 회복현상을 관찰할 수 없었다(Fig. 7).

ATP-sensitive K<sup>+</sup> 채널 개방제인 pinacidil (0.1 mM)과 차단제인 glibenclamide (0.4 mM) 및 tolbutamide (0.3 mM)는 허혈시 PS의 크기와 세포밖 K<sup>+</sup>농도의 변화에 유의성있는 차이를 유발하지 않았다(P>0.05). ATP-sensitive K<sup>+</sup> 채널 개방제인 pinacidil을 적용하면 허혈 초기에 PS의 소실이 빨리 오고 ATP-sensitive K<sup>+</sup> 채널 차단제인 glibenclamide와 tolbutamide는 지연되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었고 ATP-sensitive K<sup>+</sup> 채널 조절 약물중 어느 것도 HIP소실 3분 후에 정상용액으로 관류하였을 때 PS를 회복시키지는 못하였다(Table 1).

## 고 찰

허혈상태의 뇌조직에서는 초기에 영양분과 산소의 부족으로 인한 ATP의 감소, pH의 감소, K<sup>+</sup>의 세포 밖으로의 유출과 Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>의 세포 안으로의 유입, adenosine 유리 및 신경 전달 소실, 과량의 glutamate가 분비됨이 알려져 있다(Martin et al, 1994). 허혈 초기(Phase 1)에 집단전위(population spike, PS)가 소실되는 이유는 adeno-

sine 등에 의한 절전 신경 말단의 Ca<sup>2+</sup> 채널의 차단, 절전 신경 섬유의 Na<sup>+</sup> 채널 차단 등으로 분비가 차단되기 때문이다(Martin et al, 1994). 특히 Krnjevic과 Leblond(1989)는 절전신경의 Ca<sup>2+</sup> 채널의 차단이 ATP의 감소에 기인한다고 하였다. 본 실험에서 세포 밖의 K<sup>+</sup>농도의 증가는 서서히 증가하는 Phase 1과 급격한 증가를 이루는 Phase 2의 두 가지 양상을 나타내었으며(Fig. 2C) 이는 허혈시 포타슘 농도를 측정했던 다른 보고와도 일치하였다(Zetterstrom et al, 1995). Phase 1에서의 세포밖 K<sup>+</sup>전도도의 증가나 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase의 활성의 감소로 인하여 K<sup>+</sup>의 세포 안으로 유입이 불충분하게 되어 일어나는 것으로 보고 있다(Martin et al, 1994; Anker et al, 1985). Phase 2에서는 [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>의 급격한 증가가 일어나며 phase 2는 HIP가 끝나는 시점에서 시작되었다. 이 시기에는 K<sup>+</sup>의 세포 밖으로의 유출과 더불어 Ca<sup>2+</sup>과 Na<sup>+</sup>의 급격한 세포내 유입이 있고 세포막의 탈분극(anoxic depolarization)이 일어남이 보고되었다(Balestrino et al, 1989).

뇌절편 허혈모델에서 허혈이 진행중임에도 불구하고 PS가 일시적으로 되살아났다 소멸되는 현상을 hypoxic injury potential(HIP)이라 하는데(Fairchild et al, 1988), 허혈기간(Phase 2) 중 HIP가 나타나는 것은 허혈로 인하여 흥분성 신경 전달 물질의 분비가 증가됨에 따라 초기 억제된 신경전도가 다시 나타나는 것으로 여겨지고 있다(Sick et al, 1987; Fowler et al, 1990). 본 실험에서 세포밖의 K<sup>+</sup>농도([K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>)가 급격히 증가되는 Phase 2 시기는 바로 HIP가 소실되는 시점과 일치하여 일어났고(Fig. 2), 이 현상은 또 거의 예외 없이 모든 절편에서 관찰이 되었다. 따라서, 이 두현상이 밀접한 관련 속에 일어날 것으로 짐작된다. 지금까지, HIP와 급격한 [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>의 증가와 어떤 관련이 있는지는 잘 알려지지 않았다. 다만 HIP의 생성이 허혈시에 과도하게 분비되는 glutamate 때문이라면

(Martin et al, 1994) glutamate에 의한 탈분극과 연관지어 먼저 다음과 같은 가능성을 생각할 수 있다. 즉, glutamate의 작용으로 활성화되는 막전압 의존성  $K^+$  채널이나, glutamate-gated 이온 채널을 통한  $K^+$ 의 유출이 일어난다는 것이다.

NMDA수용체 차단제로 알려진 MK-801은 주로 연결 후(postsynaptic) 부위에 주로 작용을 하여 허혈초기의 PS의 소실에는 영향을 끼치지 않고 주로 회복효과만을 갖는 것으로 보고되었으며(Papas et al, 1993) 본 실험에서 MK-801을 처치한 해마 절편에서 HIP소실 3분후 정상용액으로 관류하면 농도 의존적인 회복 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3B). MK-801의 농도 의존적인 회복 효과는 허혈시 분비되는 glutamate의 NMDA 수용체의 활성화에 의한 세포내  $Ca^{2+}$  유입을 감소시켜 나타난 것으로 본 실험에서 허혈 손상에 대한 MK-801의 이러한 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Roi et al, 1993; Papas et al, 1993). 본 연구의 해마절편 허혈 모델에서 4-AP는 허혈전의 PS의 크기를 증가시키고 phase 1에서의 PS의 소실이 지연되거나 불완전한 양상을 보였는데 이는 4-AP에 의하여 절전섬유 말단에서 신경전달물질의 분비의 증가 혹은 uptake의 감소와 관련이 있을 것으로 여겨진다(Hu et al, 1991; Patterson et al, 1997). 한편 adenosine 길항제인 8-phenyltheophylline를 처치하였을 경우 허혈 초기의 PS의 감소를 억제하는 것이 보고되었다(Fowler et al, 1990). 따라서 4-AP의 작용은 adenosine의 작용을 길항하여 나타났을 가능성도 있다(Gerber et al, 1989).

저농도에서 large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel을 주로 차단하는 TEA를 1 mM 적용한 경우에도 허혈초기 PS의 소실이 지연되거나 불완전한 면에서 비슷하였으며, 이는 phase 1과정에 large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel이 관련되어 있을 가능성을 제시하고 있다. 선택적인 large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel 차단제로 알려진 NS 1619의 작용의 특기할 만한 점은 AA상태에서 HIP가 나타나는 시간과 HIP 지속시간과 phase 2의  $[K^+]_o$ 의 증가시점이 유의성있게 지연되어 나타났다는 점이다. 여기서 흥미로운 점은 HIP소실과 Phase 2의 시작점이 동시에 지연되었다는 점으로, 앞에서 언급한 대로 두현상이 밀접한 관련하에 일어남을 보여주는 또 하나의 관찰이다. 어떠한 기전으로 NS-1619가 이런 결과를 가져오는 지는 확실하지 않지만, HIP의 출현이 지연된 점은 large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel의 개방으로 glutamate의 분비가 지연되었기 때문으로 유추해볼 수 있다. Adenosine A1 수용체와  $K^+$  채널이 활성화될 때 신경말단에서 과분극이 유발되어 glutamate의 분비가 감소되는 점(Zini et al, 1993)과, 앞에서 언급된 과다 분비

된 glutamate에 의하여 HIP가 유발된다는 가설(Sick et al, 1987; Fowler et al., 1990)에 근거해 볼 때, NS-1619에 의해 HIP의 생성이 지연된 이유는 NS 1619가 절전신경말단에 과분극을 유발하여 glutamate의 분비를 감소시켜 HIP의 생성과 지속 시간을 지연시키는 것으로 보인다. large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  채널 개방제이면서  $Ca^{2+}$ -dependent  $Cl^-$  채널을 억제하는 것으로 알려진(Seguella et al, 1993) niflumic acid를 처치시 HIP의 소실 시간과 Phase 2는 대조군에서 보다 빨리 나타났다. 이는 niflumic acid가 해마에 높게 발현되어 있는(Seguella et al, 1993)  $Ca^{2+}$ -dependent  $Cl^-$  채널을 억제함에 의해 탈분극을 촉진시켜 glutamate의 분비와 흥분성을 촉진하여 허혈손상을 빨리 유발하는 것으로 여겨진다(Fig. 7).

ATP-sensitive  $K^+$  채널은 대부분의 세포에 널리 분포하며 허혈시 ATP의 소모가 오고 이로 인하여 ATP-sensitive  $K^+$  채널에 의한  $K^+$ 의 세포 밖으로의 유출의 주경로로 예상되었다(Murphy et al, 1991). 또, [ $^3H$ ]glibenclamide의 결합단백질은 해마에도 존재하며, CA1(0.208 fM/mm<sup>2</sup>)에서 보다 CA2와 CA3에 두배정도 더 높은 것으로 알려졌다(Jerry et al, 1990). 본 실험에서는 ATP-sensitive  $K^+$  채널 조절 약물 존재 하에 허혈시 PS와  $[K^+]_o$ 의 변화에서 대조군과 유의성있는 차이를 관찰할 수 없었다(Table 1). 본 연구의 결과로 미루어 볼 때 해마절편의 CA1 부위에서는 허혈시  $[K^+]_o$  축적과정에서 ATP-sensitive  $K^+$  채널의 역할은 크지 않을 것으로 여겨진다.

결론적으로 본 연구의 결과는 허혈시 해마 CA1부위에서 허혈반응의 Phase 2 단계에서 세포외에 축적되는  $K^+$ 의 근원은 4-AP(300  $\mu$ M)에 의하여 차단되는 막전압 의존성  $K^+$  전류나, NS-1619(0.3~10  $\mu$ M)에 의하여 열리고, TEA(1 mM), niflumic acid(0.1 mM)에 의하여 차단되는 large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel, 그리고 glibenclamide에 의하여 차단되거나 pinacidil, diazoxide 등에 의하여 열리는 ATP-sensitive  $K^+$  채널 등이 아닌 다른 경로가 존재함을 제시하고 있다. 특히, 허혈시에 분비가 증가되는 것으로 잘 알려진 adenosine과 glutamate와 같은 신경전달물질의 관련성 등에 대한 직접적인 실험적 증거가 필요할 것으로 여겨진다(Hansen, 1990).

## 결 론

뇌허혈시 세포간질  $K^+$ 이온의 증가는 잘알려진 현상이나, 어떤 경로를 통하여 세포안의  $K^+$ 이 세포밖으로 나오는지는 명확히 규명되어 있지 않다. 본 실험의 결과는 large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  채널, ATP-sensitive  $K^+$



<sup>+</sup>채널, 그리고 4-aminopyridine에 차단되는 K<sup>+</sup>채널이 산소와 포도당을 제거하여 유발된 해마절편 CA1 부위의 허혈반응의 초기에 급격하게 증가하는 세포간질의 K<sup>+</sup>이온의 축적현상에는 관련되지 않았음을 보여주고 있다.

### 감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 96 학술연구조성비(F-0079)와 96 보건 의료연구개발사업(HMP-96-M-4-0039)의 지원으로 가능하게 되었음에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Ammann D, Chao P, Simon W. Valinomycin-based K<sup>+</sup> selective microelectrodes with low electrical membrane resistance. *Neurosci Lett* 74: 221–226, 1987
- Anker JH. Effect of Anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65: 101–148, 1985
- Balestrino M, Aitken PG, Somjen GG. Spreading depression-like hypoxic depolarization in CA1 and fascia dentata of hippocampal slices: relationship to selective vulnerability. *Brain Res* 497: 102–107, 1989
- Choi JK, Ryu PD. Hippocampal slice preparation as an in vitro model of ischemia, *The 4th Meeting of Korean Society for Neuroscience Abstract* p32., 1995
- Fairchild MD, Parsons JE, Wasterlain CG, Rianaldi PC, Wallis RA. A hypoxic injury potential in the hippocampal slice. *Brain Res* 453: 357–361, 1988
- Fowler JC. Adenosine antagonists alter the synaptic response to in vitro ischemia in the rat hippocampus. *Brain Res* 509: 331–334, 1990
- Gerber U, Greene RW, Hass HL, Stevens DR. Characterization of inhibition mediated by adenosine in the hippocampus of the rat in vitro. *J Physiol* 417: 567–578, 1989
- Godfraind JM, Krnjevic K. Tolbutamide suppresses anoxic outward current of hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 162: 101–104, 1993
- Hansen AJ. Ion homeostasis in cerebral ischemia. In: Schurr A and Rigor BM ed, *Cerebral Ischemia and Resuscitation*. CRC Press, Boston, p78–87, 1990
- Hu PS, Fredholm BB. 4-Aminopyridine-induced increase in basal and stimulation-evoked [3H]-NA release in slices from rat hippocampus, *Br J Pharmacol* 102: 764–768, 1991
- Jerry AM, Nelson LV, Richard CD, David R. High Affinity [3H]Glibenclamide Binding Sites in Rat Neuronal and Cardiac Tissue: Localization and Developmental Characteristics. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 358–364, 1991
- Jiang C, Sigworth FJ, Haddad GG. Oxygen deprivation activates an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in substantia nigra. *J Neurophysiol* 14: 5590–5602, 1994
- Jiang C, Haddad GG. Effect of anoxia on intracellular and extracellular potassium activity in hypoglossal neurons in vitro. *J Neurophysiol* 66: 103–111, 1991
- Jiang C, Haddad GG. Differential responses of neocortical neurons to O<sub>2</sub> and/or glucose deprivation in human and rat. *J Neurophysiol* 68: 2165–2173, 1992
- Jiang C, Xia Y, Haddad GG. Role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels during anoxia: major differences between rat (newborn and adult) and turtle neurons. *J Physiol* 448: 599–612, 1992
- Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Brain Res* 239: 57–69, 1982
- Kraig RP, Pulsinelli WA, Plum F. Hydrogen ion buffering during complete brain ischemia. *Brain Res* 342: 281–290, 1985
- Krnjevic K, Leblond L. Changes in membrane currents of hippocampal neurons evoked by brief anoxia. *J Neurophysiol* 62: 15–30, 1989
- Leblond J, Krnjevic K. hypoxic changes in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 62:1–14, 1989
- Martin RJ, Lloyd HGE, Cowan AL. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trend Neurosci* 17: 251–257, 1994
- Moczydlowski E, Latorre R. Gating kinetics of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayers; Evidence for two voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> binding reactions. *J Gen Physiol* 82: 511–542, 1983
- Murphy KPSJ, Greenfield SA. ATP-sensitive potassium channels counteract anoxia in neurones of the substantia nigra. *Exp Brain Res* 84: 355–358, 1991
- Murphy KPSJ, Greenfield SA. Neuronal selectivity of ATP-sensitive potassium channels in Guinea pig substantia nigra revealed by responses to anoxia. *J Physiol* 453: 167–183, 1992
- Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147–148, 1983
- Olesen SP, Munch E, Moldt P, Drejer J. Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels by novel benzimidazolone. *European Journal of Pharmacology* 251: 53–59, 1994
- Ottolia M, Toro L. Potentiation of large conductance K<sub>Ca</sub> channels by Niflumic, Flufenamic and Mefenamic acids. *Biophysical Journal* 67: 2272–2279, 1994
- Papas S, Crepel V, Ben-Ari Y. The NMDA receptor contri-

- butes to anoxic aglycemic induced irreversible inhibition of synaptic transmission. *Brain Research* 607: 54–60, 1993
- Patterson TA, Kim EK, Meldrum MJ, Dawson RJ. Glutamate efflux from rat brain slices and cultures, *Neurochem-Res* 20: 225–232, 1995
- Roi AW, Kimberly LP. Protection from hypoxic and N-methyl-D-aspartate injury with azelastine, a leukotriene inhibitor. *European Journal of Pharmacology* 238: 165–171, 1993
- Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25: 729–749, 1988
- Ryu PD, Randic M. Low- and high-voltage-activated calcium currents in rat spinal dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 63: 273–285, 1990
- Seguela P, Wadiche J, Dineley MK, Dani JA, Patrick JW. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha. *J Neurosci* 13: 596–604, 1993
- Sick TJ, Emily LS, Eugene LR. Extracellular potassium ion activity and electrophysiology in the hippocampal slice: paradoxical recovery of synaptic transmission during anoxia. *Brain Research* 418: 227–234, 1987
- Schurr A, Reid KH, Tseng MT, Edmonds Jr HL. The stability of the hippocampal slice preparation: an electrophysiological and ultrastructural analysis. *Brain Research* 297: 357–362, 1984
- Zetterstrom TSC, Vaughan-Jones RD, Grahame-Smith DG. A short period of hypoxia produces a rapid and transient rise in  $[K^+]_e$  in rat hippocampus in vivo which is inhibited by certain  $K^+$ -channel blocking agents. *Neuroscience* 67: 815–821, 1995
- Zini S, Roisin M, Armengaud C, Ben-Ari Y. Effect of potassium channel modulators on the release of glutamate induced by ischemic-like conditions in rat hippocampal slice. *Neuroscience Letters* 153: 202–205, 1993
-