

## 랫드 흑질 신경세포의 전기적 특성과 ATP-sensitive K<sup>+</sup> 채널의 전류밀도

한성규 · 박진봉\* · 류판동

서울대학교 수의과대학 약리학교실

충남대학교 의과대학 생리학교실\*

(2000년 4월 21일 게재승인)

### Electrical properties and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel density of the rat substantia nigra pars compacta neurons

Seong-kyu Han, Jin-bong Park\*, Pan-dong Ryu

*Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

*Department of Physiology, College of Medicine, Chungnam National University\**

(Accepted by Apr 21, 2000)

**Abstract** : Substantia nigra is known to highly express glibenclamide binding site, a protein associated to ATP-sensitive K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channel in the brain. However, the functional expression of K<sub>ATP</sub> channels in the area is not yet known. In this work, we attempted to estimate the functional expression of K<sub>ATP</sub> channels in neurons of the substantia nigra pars compacta (SNC) in young rats using slice patch clamp technique. Membrane properties and whole cell currents attributable to K<sub>ATP</sub> channel were examined by the current and voltage clamp method, respectively.

In SNC, two sub-populations of neurons were identified. Type I (rhythmic) neurons had low frequency rebound action potentials ( $4.5 \pm 0.25$  Hz,  $n = 75$ ) with rhythmic pattern. Type II (phasic) neurons were characterized by faster firing ( $22.7 \pm 3.16$  Hz,  $n = 12$ ). Both time constants and membrane capacitance in rhythmic neurons ( $34.0 \pm 1.27$  ms,  $270.0 \pm 11.83$  pF) and phasic neurons ( $23.7 \pm 4.16$  ms,  $184 \pm 35.2$  pF) were also significantly different. The current density of K<sub>ATP</sub> channels was  $6.1 \pm 1.47$  pA/pF ( $2.44 \sim 15.43$  pA/pF,  $n = 8$ ) at rhythmic neurons of young rats.

Our data show that in SNC there are two types of neurons with different electrical properties and the density of K<sub>ATP</sub> channel of rhythmic neuron is about 600 channels per neuron.

**Key words** : substantia nigra pars compacta, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel, slice patch.

## 서 론

흑질(substantia nigra)은 색소를 가진 대형의 신경세포가 밀집해 있는 substantia nigra pars compacta (SNC)와 상대적으로 세포가 드물게 존재하는 substantia nigra pars reticulata (SNR)의 두 부분으로 구분되며 주로 GABA성 신경이 이 부분으로 유입된다<sup>1</sup>. SNC는 dopamine성 신경을 고밀도로 함유하고 있는데 이들 dopamine성 신경은 선조체(corpus striatum)로 축삭(axon)을 뻗어 'nigrostriatal pathway'를 형성하는데<sup>2</sup>, 이런 'nigrostriatal pathway'가 퇴행될 경우 '파킨슨병'을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>3</sup>. SNC는 전기적으로 다양한 특성을 보이는 세포집단으로 구성되어 있으며, 이중 dopamine성 신경은 흑질내에서 관찰되는 다른 세포에 비하여 rebound action potential의 firing rate가 적은 것으로 알려져 있다<sup>4-6</sup>. 이러한 특성을 갖는 신경은 여러 연구자들에 의하여 'dopamine'<sup>6</sup>, 'type I'<sup>7</sup>, 'principal'<sup>5</sup>, 'non-bursting'<sup>4</sup> 신경 등으로 명명되었다.

[<sup>3</sup>H]glibenclamide를 이용한 결합실험(binding experiment)에서 흑질은 다른 부위에 비해 ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel이 높게 발현되어 있음이 밝혀졌다<sup>8,9</sup>. 이러한 결과는 파킨슨병의 병인에 K<sub>ATP</sub> 통로가 관련이 있을 수 있음을 시사하고 또한 K<sub>ATP</sub> 통로의 선택적 억제제인 tolbutamide가 파킨슨병의 치료제로 이용될 수 있다는 보고도 있다<sup>10,11</sup>. K<sub>ATP</sub> 통로는 원래 심근세포에서 발견되었으며<sup>12,13</sup>, 췌장 세포<sup>14,15</sup>, 골격근<sup>16</sup>, 평활근<sup>17</sup>을 포함한 여러가지 종류의 세포에 존재함이 보고되었고, 랫드 뇌에서도 흑질, 담창구(globus pallidus), 신피질(neocortex), 대뇌피질(cerebral cortex) 그리고 해마(hippocampus)의 CA3 부분 등에 존재함이 보고되었다<sup>18</sup>. K<sub>ATP</sub> 통로가 흑질세포의 기능 및 기능장애에 기여하는 정도는 길항제 결합실험<sup>18,19</sup>이나 신경화학물질 분비<sup>1</sup> 등과 같은 간접적인 방법과 전기생리학적 방법에 의하여 K<sub>ATP</sub> 통로의 활성을 직접적으로 기록하고자 하는 노력이 있었다<sup>20-22</sup>.

최근까지 glibenclamide는 K<sub>ATP</sub> 통로의 특이적인 억제제로 알려져 왔기 때문에 이 glibenclamide 결합부위가 곧 K<sub>ATP</sub> 통로와 일치할 것으로 가정되어져 왔다. 그러나 최근에 sulfonylurea receptor (SUR) 단백질이 별도로 존재한다는 사실이 밝혀졌고 또한 SUR에 대한 cDNA가 클로닝되었다<sup>23</sup>. SUR cDNA가 클로닝 됨으로서 기존에 [<sup>3</sup>H]glibenclamide 결합실험에 의해 K<sub>ATP</sub> 통로로 간주되어졌

던 것이 사실상 K<sub>ATP</sub> 통로가 아닌 SUR이었다는 사실이 밝혀졌다<sup>23</sup>. 그러므로 SUR이 높게 발현되었다 해서 K<sub>ATP</sub> 통로의 발현이 높다고 단정지을 수는 없다. 또한 흑질이 glibenclamide 수용체의 밀도가 높다고 잘 알려져 있으나<sup>8,9</sup>, K<sub>ATP</sub> 통로의 발현 정도와 glibenclamide 수용체 발현과의 상관관계는 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 K<sub>ATP</sub> 채널의 기능적 발현 정도를 조사하기 위하여 glibenclamide 수용체의 발현이 높은 것으로 알려진 흑질에서 전기적 특성으로 흑질세포의 종류를 구분하고 단일세포에서의 K<sub>ATP</sub> 통로의 전류밀도를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

뇌절편 제조 : 생후 1-2주령 Sprague-Dawley rat를 절두하여 뇌를 적출한 후 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(95%/5%)로 포화된 4℃의 인공뇌척수액에 담가 뇌의 내부가 차가워질 때까지 약 2분간 정지하였다. 3% agaros를 함유한 'agar block'에 뇌의 복측면을 순간접착제(Cyanoacrylate adhesive)를 이용하여 고정시키고 vibroslicer (World Precision Instrument)을 이용해 400 μm의 두께로 절편을 만들었다. 제조된 절편은 32℃로 유지되는 인공뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)에서 1시간 이상 보관하고 실험에 이용하였다. 인공뇌척수액은 NaCl 126, KCl 5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.4, MgCl<sub>2</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, Glucose 11 mM로 조성하였고 pipette 용액은 K-gluconate 135, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 0.5, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 5, HEPES 5 mM로 조성하고 KOH를 이용하여 pH 7.2로 적정하였다.

전류의 기록 및 분석 : 제조된 조직절편을 1시간 이상 배양후 기록용 챔버로 옮기고 blind patch clamp 방법<sup>24</sup>을 이용하여 전기적 활성을 기록하였다. 신호증폭기(Axoclamp 2B, WPI)에 3~4 MΩ의 저항을 갖는 유리전극을 연결하고 voltage clamp 상태에서 양압을 가하면서 절편에 접근시켜 attached patch 상태를 만들고 capacitance를 보정하였다. Current clamp 상태로 바꾸고 0.1 nA의 전류를 주입하면서 음압을 가하여 whole cell patch clamp 상태를 만들었다. Series resistance는 bridge mode에서 -0.1 nA의 전류를 가하면서 보정하였다. Current clamp 상태에서 -0.3 nA부터 -0.6 nA까지 0.1 nA 간격으로 전류를 주입하고 나타나는 막전압의 변화를 기록하고, 이 자료로부터 time constant, input resistance, membrane capacitance,

활동전위의 크기, rebound action potential의 firing rate, 안정막전위 등을 얻었다. 세포종류의 구분은 rebound action potential의 firing rate를 일차적인 기준으로 구분하였다.

Time constant는 current clamp 상태에서 -0.3, -0.4, -0.5 nA의 전류를 주입후 나타나는 막전압의 변화를

$$V = V_0 \cdot \exp(-(t-K)/\tau) + C$$

V and  $V_0$ : memb. potential at  $t=0$  and  $t=t$ ,  $t$ : time, K: fit starting point, C: correction factor,  $\tau$ : time constant의 식에 fitting 하여 얻었으며(Fig 1A), Fig 1B에서 보이는 것과 같이 -0.3, -0.4, -0.5 nA를 주입하였을 때 나타나는 time constant의 변화가 1% 미만으로 능동 막특성(active membrane properties)이 없는 것으로 간주하고 -0.3 nA를 주입한 막전압의 변화를 기준으로 하여 구하였다. Input resistance는 전류-전압관계 그래프의 기울기를 이용하여 구하였고 cell capacitance는

$$\tau = RC$$

$\tau$ : time constant, R: input resistance, C: membrane capacitance로부터 얻었다<sup>25</sup>. Firing rate는 -0.5 nA의 전류를

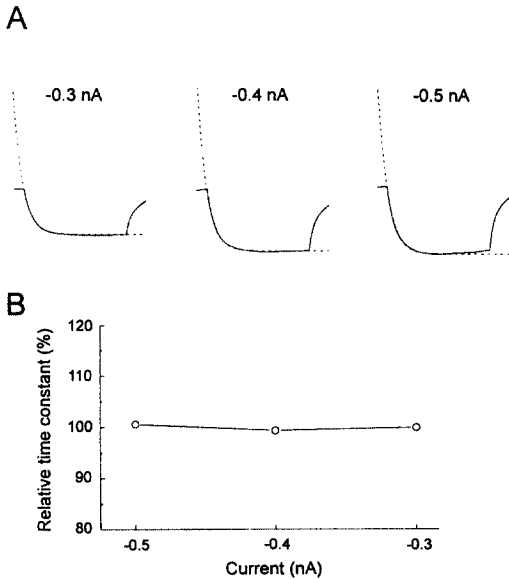


Fig 1. A, Voltage responses of SNC neurons to hyperpolarizing currents. Solid lines show membrane voltage responses to injections of hyperpolarizing currents(0.3, 0.4, 0.5 nA) and dashed lines are drawn fitted with following equation ' $V = V_0 \cdot \exp(-(t-K)/\tau) + c$ ' V,  $V_0$ : membrane potential,  $t$ : time, K: fit starting point, C: offset,  $\tau$ : time constant. B, Independence of relative time constant on injected currents.

가해진 이후의 단위시간당 'rebound action potential'의 수를 기준으로 하여 얻었다.

$K_{ATP}$  통로의 전류밀도를 조사하기 위하여 voltage clamp 상태에서 막전압을 -60 mV로 고정시키고 200 ms 동안 +20 mV까지 80 mV 크기의 펄스를 30초 간격으로 가하면서 시간경과에 따른 외향성 전류의 크기를 구하였다. Whole cell 상태를 만들고 5~15분 후 전류의 크기가 평형상태에 도달하였을 때  $K_{ATP}$  통로의 선택적인 억제제인 tolbutamide 0.5 mM<sup>26</sup>를 적용하여 감소되는 전류의 크기를 기록된 세포의  $K_{ATP}$  전류로 간주하였다.  $K_{ATP}$  전류밀도는 capacitance를 기준으로 하여 단위세포당  $K_{ATP}$  통로의 수로 나타내었다.

전류 및 막전압의 변화는 pClamp software (Version 6.03)와 AD converter (TL-1, Axon Instrument Co. Foster city, CA)를 이용하여 PC에 저장하고 분석하였다.

단위세포당  $K_{ATP}$  통로의 수 측정: 단위세포당  $K_{ATP}$  통로의 수는 -60 mV로 막전압을 유지하며 200 ms 동안 +20 mV까지 80 mV의 펄스를 가한 후 얻어지는  $K_{ATP}$  통로 전류크기를 단일  $K_{ATP}$  통로에 동일한 크기의 전압을 가해주었을 때 나타나는 전류의 크기로 나누어 얻었는데 전류밀도를 표준화 하기 위하여 단위 capacitance당 전류의 크기를 구하고 전체 세포에서 구한 capacitance의 평균을 세포 하나의 capacitance로 간주하였다. Ohno *et al*<sup>27</sup>은 흰쥐의 배양된 cortical neuron에서 생리적 상태인 5/145 mM  $K^+$ 에서의 단일  $K_{ATP}$  통로의 전도도는 25 pS이고 역전전압은 -86 mV임을 보고하였다. 본 실험에서는 Ohno *et al*<sup>27</sup>에 의하여 배양된 cortical neuron에서 얻은 단일통로 전도도와 본 실험에 이용된 흑질세포의 단일통로 전도도가 같다는 가정하에 25 pS의 전도도와 -86 mV의 역전전압을 기준으로 단위세포당 이온통로의 수를 추정하였다.

## 결 과

Blind patch 법에서는 이름 그대로 세포의 형태를 확인하지 않는 상태에서 기록하기 때문에 다양한 종류의 세포가 기록이 된다<sup>24</sup>. 따라서 본 연구에서는 current clamp 상태에서 전류 펄스를 가한 후에 나타나는 막전압의 변화로부터 rebound action potential의 수, membrane time constant, membrane capacitance 등을 측정하여 기록된 세포의 종류를 구분하는 기준으로 삼았다. Fig 2는 어린 쥐의 흑질세포에서 나타나는 막전위의 변화를 보여주고

있다. 흑질세포는 크게 rebound action potential의 빈도가 높은 것과 낮은 것으로 나눌 수 있었는데 자발적인 활동 전위가 보이고 rebound action potential의 firing rate가  $22.7 \pm 3.16$  Hz인 세포군(Fig 2A; phasic neuron)과, 상대적으로

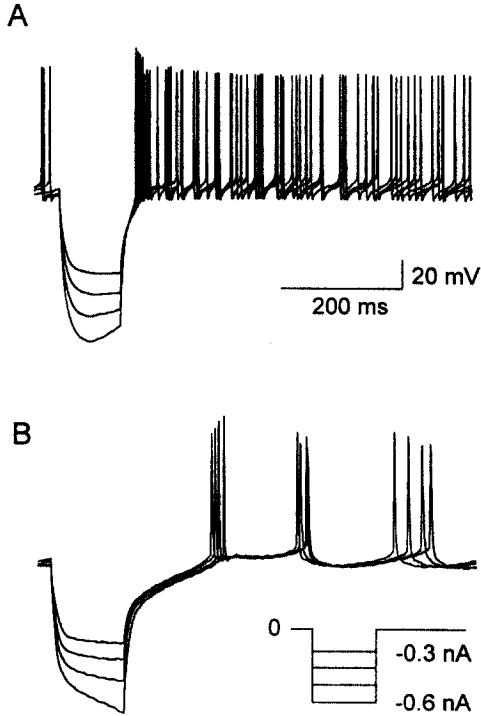


Fig 2. The two characteristic cell types recorded in this study. Superimposition of membrane voltage responses to injections of hyperpolarizing currents(-0.3, -0.4, -0.5, -0.6 nA) in phasic (A) and rhythmic neurons (B) showing two characteristic cell types.

로 규칙적인 rebound action potential 형태를 보이고  $4.5 \pm 0.25$  Hz의 낮은 firing rate를 갖는 세포군(Fig 2B; rhythmic neuron)이 관찰되었다. 조사된 87개의 신경세포중 75개는 rhythmic neuron(77%)이었고 12개는 phasic neuron(23%)이었다. 이들 두 종류 세포막 특성은 다음 Table 1에 나타나 있다.

Time constant 및 membrane capacitance는 phasic neuron에 비하여 rhythmic neuron에서 더 크게 관찰되었다( $p < 0.01$ ). 따라서 세포막 표면적이 capacitance와 비례한다고 가정할 때 phasic neuron에 비하여 rhythmic neuron의 표면적이 더 크다고 예상할 수 있다. 나머지 변수들인 활동전위의 크기, 안정막전위, input resistance 등은 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

Fig 3은 capacitance와 firing rate와의 관계를 보여주는 그래프이다. Rhythmic neuron에서는 capacitance의 분포가 100 pF부터 500 pF의 범위에서 고르게 분포되어 있고 phasic neuron의 경우는 50 pF부터 200 pF까지 분포되어 있음을 볼 수 있다. Phasic neuron에 비해 rhythmic neuron에서 일반적으로 더 큰 capacitance를 가지고 있음을 볼 수 있으나 firing rate와 capacitance와는 일정한 상관관계를 보이지 않았다. 또한 firing rate와 어떤 다른 parameters와도 일정한 상관관계를 갖고 있지 않아서 firing rate는 다른 변수들에 의해 영향을 받지 않는 고유한 특성을 알 수 있었다.

$K_{ATP}$  통로는 ATP에 의해 차단되는 성질이 있다. 또한 생리적 상태에서 세포내 ATP 농도는 2.5~3.5 mM로 유지되는데 세포내 ATP 농도가 0.9 mM 이하가 되면  $K_{ATP}$  통로는 활성화된다<sup>26</sup>. 본 실험조건에서는 유리전극내 ATP를 첨가하지 않았기 때문에 시간이 지남에 따라 세포내

Table 1. Comparison of phasic and rhythmic neurons in substantia nigra pars compacta

	Phasic (n = 12)	Rhythmic (n = 75)
Time constant (ms)	$23.7 \pm 4.16$	$34.0 \pm 1.27^{**}$
Input resistance ( $M\Omega$ )	$155 \pm 21.9$	$133 \pm 5.42$
Membrane capacitance (pF)	$184 \pm 35.2$	$270 \pm 11.8^{**}$
Action potential amplitude (mV)	$62.6 \pm 2.31$	$65.2 \pm 0.99$
Firing rate (Hz)	$22.7 \pm 3.16$	$4.50 \pm 0.25^{**}$
Resting membrane potential (mV)	$-40.1 \pm 1.67$	$-39.7 \pm 0.76$

\*\*p < 0.01

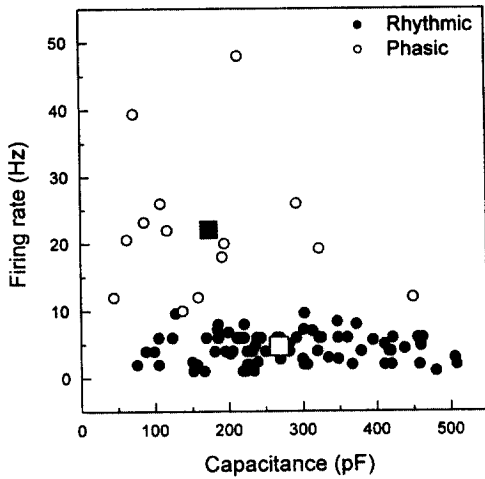


Fig 3. Scatter plot of cell capacitances against firing rates for SNC neurons. Closed circles stand for rhythmic neurons and open circles for phasic neurons. Open and solid squares stand for the centers of mass of the rhythmic and phasic neurons, respectively.

ATP 농도가 감소되고, 이로 인해  $K_{ATP}$  통로의 활성이 나타날 것으로 예상할 수 있다. Fig 4A에서처럼 막전압을 -60 mV로 고정된 상태에서 +20 mV까지 자극을 주었을 때 나타나는 전류의 크기는 시간이 지남에 따라 전류의 크기가 증가되었다. 또한 선택적인  $K_{ATP}$  통로 억제제로 알려진 tolbutamide (0.5 mM)에 의해 가역적으로 억제되었다. 이러한 사실을 미루어 볼 때 증가된 전류는  $K_{ATP}$  통로의 활성에 의해 이루어진 것임을 짐작할 수 있었다. Whole cell 상태를 형성한 후 전류의 크기가 최고에 달하는 시간은 5~15분 후였고, 이후 tolbutamide에 의해 초기 상태 이하로 감소되었다. 그래서 평형을 이룬 최고전류의 크기와 tolbutamide에 의해서 감소되었을 때의 전류의 크기의 차이를 단일세포의  $K_{ATP}$  전류의 크기로 간주하였다. 전류의 측정은 Fig 4B처럼 전류의 크기가 평형상태에 도달한 시점(화살표)을 기준으로 하였다. 이렇게 단일세포의 전류의 크기를 기록한 후 유사한 조건에서 기록된 단일  $K_{ATP}$  통로의 전류의 크기(전도도)로 나누어 단위세포당  $K_{ATP}$  통로의 개수를 측정하였다(방법란 참조).

본 실험결과로서 얻어진 채널 밀도는 Ohno *et al*<sup>27</sup>에 의한 결과를 토대로 하였다. 생리적인 5/145 mM  $K^+$  25 pS의 단일통로 전도도와 -86 mV의 역전전압(reversal potential)을 기준으로 하고 편류성(rectification) 전류가 없다

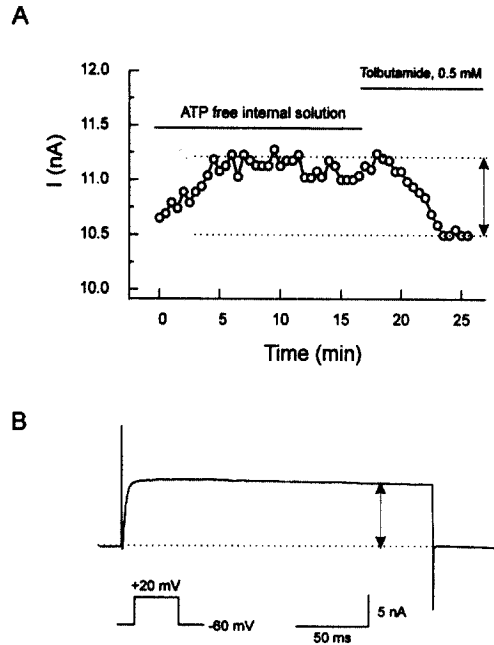


Fig 4. A. Representative time profile of the current amplitude from a SNC neuron. Each point represents current amplitude (marked by arrow) at steady-state induced by a voltage command at 30 second interval. The outward current started to increase gradually and reached a maximum. Application of tolbutamide (0.5 mM) to the perfusate outside the cell reversibly inhibited this current. B. Current response induced by a voltage command to +20 mV from holding potential of -60 mV.

는 가정 하에서 +20 mV로 가해진 자극은 역전전압으로부터 106 mV로 추정되었다. 25 pS의 전도도를 감안할 때 이론적으로 +20 mV로 펄스를 가할 때 얻어지는 단일통로 전류의 크기는 2.65 pA라 할 수 있다. 본 실험에서 얻은  $K_{ATP}$  전류의 크기를 세포의 capacitance로 나누어준 값으로 단위 capacitance당 전류의 크기를 비교하였다. 단위 capacitance당 전류의 크기는  $6.1 \pm 1.47$  pA/pF(2.44~15.43 pA/pF, n = 8)이었다. 재료 및 방법란에서 서술한 방법과 같이 단위세포당 전류의 크기에 capacitance를 곱하고 단일통로의 전류의 크기인 2.65 pA로 나누어 단위세포당  $K_{ATP}$  통로의 수를 계산하였을 때 얻어진 단일세포당  $K_{ATP}$  통로의 수는 610개로 계산되었다.

## 고 찰

뇌절편을 이용한 방법은 단일세포를 분리할 경우 효소처리에 의해 유발될 수 있는 세포막 특성의 변화를 줄일 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 뇌 조직절편으로부터 blind patch clamp 방법을 이용하여 흑질 신경세포막의 전기적 특성을 비교한 결과 두 종류의 세포로 구분할 수 있었다. Rhythmic neuron이 얻어지는 빈도를 살펴보면 본 실험에서는 전체실험중 약 77%를 차지하여 Yung과 Hausser<sup>4</sup>이 기니픽 흑질에서 얻은 빈도(85%)와 유사하였다. 또한 Hainsworth *et al*<sup>28</sup>은 기니픽 단일세포에서 perforated patch clamp 방법을 이용하여 type A와 type B로 구분하였는데 rebound action potential의 firing rate가 type A의 경우  $5.56 \pm 0.41$  Hz, type B의 경우  $26.05 \pm 1.91$  Hz로 본 실험에서 얻은 결과와 유사하였다.

최근 전기생리학적 특성과 조직화학적<sup>4,5</sup>, 약리학적<sup>26,29</sup> 특성 등을 비교해본 결과 dopamine성 흑질세포는 전기생리학적으로 rhythmic neuron의 특성과 매우 유사하다는 것이 제안되고 있고 phasic neuron은 tyrosine hydroxylase 활성이 관찰되지 않아서 비dopamine성 신경으로 간주되고 있다<sup>4,5</sup>. 이러한 결과를 미루어 볼 때 본 실험에서 얻은 rhythmic neuron은 다른 연구자들에 의하여 명명되어진 'dopamine', 'principal', 'type I', 'type A' neuron과 같은 것으로 간주할 수 있었다. Hainsworth *et al*<sup>28</sup>에 의한 형태학적 연구를 보면 rhythmic neuron으로 명명되어지는 type A는 2-6개의 두꺼운 돌기를 가지고 있고 세포체는 다각형이며 종종 삼각형의 형태를 가지고 있는데 직경은 20-40  $\mu\text{m}$  정도를 나타내었다. 반면 phasic neuron으로 명명되어지는 type B는 두 개의 가는 돌기를 내며 방추상의 세포체를 갖고 최고 직경은 10-20  $\mu\text{m}$ 이었다. 본 실험에서 얻은 capacitance와 Hainsworth *et al*<sup>28</sup>의 형태학적인 결과를 미루어 볼 때 rhythmic neuron과 type A 신경이 일치함을 알 수 있다.

본 실험조건에서는 whole cell을 만든 후 시간이 지남에 따라 외향성 전류의 크기가 평형상태에 도달하였고 tolbutamide를 적용하였을 때 초기전류의 크기보다 더 작게 감소되었는데 이는 세포를 얻은 후 전류를 기록하는데 까지 세포의 종류를 구분하고 여러가지 매개변수를 보정하는 시간까지 활성화되는  $K_{ATP}$  통로가 있기 때문으로 여겨진다.

본 실험을 토대로 추정된 흑질신경세포의  $K_{ATP}$  통로의 수는 체장  $\beta$ 세포에서 500개<sup>30</sup>, cortical 또는 해마신경세포에서 얻어진 50개<sup>27</sup>와 비교하였을 때 비교적 많다.

그러나 이런 결과는 생리적 상태에서 흑질 신경세포가 아닌 cortical neuron의 단일통로 전도도를 적용하였고, 역전전압도 cortical neuron과 흑질세포가 같다는 조건에서 얻었기 때문에 절대적인 수치를 비교하는 데는 약간의 오차가 생길 수 있다. 또한 본 실험에서 얻은 capacitance가 뇌절편을 이용한 것이기 때문에 세포막 자체의 영향 뿐만 아니라 다른 capacitor로 작용하는 것이 있을 수 있다. 또한  $K_{ATP}$  통로가 100% 열렸다는 것과 tolbutamide에 의해서 완전히 닫혔다는 가정하에서 얻은 결과이기 때문에 실제 전류밀도 보다도 높게 나타났을 것으로 여겨진다.

$K_{ATP}$  통로는 일반적으로 세포내 ATP 농도에 민감하고 내향편류(inward rectification)의 특성을 보이는데, Ashford *et al*<sup>29,31</sup>에 의해 cortical neuron<sup>29</sup>, 해마신경세포<sup>31</sup>에서 보고된 일부  $K_{ATP}$  통로는 ATP에 덜 민감한 특성을 나타내었다. 이들  $K_{ATP}$  통로는 생리적인 5/145 mM K<sup>+</sup> 상태에서 53 pS의 전도도를 보이고 내향편류성을 보이는 대신 외향편류성을 보였다. 이런 특성들은 일반적인  $K_{ATP}$  통로의 특성 뿐만 아니라 Ohno와 Yamamoto<sup>27</sup>의 결과와는 아주 다른 면을 보여주고 있다. 본 실험결과로 얻은 세포당  $K_{ATP}$  통로의 개수를 Ohno와 Yamamoto<sup>27</sup>의 자료를 이용하였을 경우 610개이지만 Ashford *et al*<sup>31</sup>의 자료를 이용할 경우 288개로 계산되고 또 외향 편류성을 보이기 때문에 그보다 더 적은 수로 계산될 수도 있다.

## 결 론

본 실험을 통해 뇌절편을 이용한 전기적 기록방법을 확립하고 흑질신경세포에서 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. SNC neuron은 전기적으로 특성에 따라 두가지 type의 세포(rhythmic, phasic neuron)로 구분할 수 있었고, 그 특성중 time constant 및 membrane capacitance에서 유의한 차이가 관찰되었다.
2. Rhythmic neuron에서  $K_{ATP}$  channel density는 세포당 약 600개 정도로 추정할 수 있었다.
3. 본 실험을 통해 얻어진 방법은 특정 채널의 전류밀도를 기능적으로 조사하고, 채널의 발현정도 또는 약물이나 질병 등에 의해 변화되는 채널의 발현양상을 신속하게 알아보는데 이용될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Amoroso S, Schmid AH, Fosset M, Lazdunski M. Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Science*, 247:852-854, 1990.
2. Dray A. The striatum and substantia nigra: a commentary on their relationships. *Neuroscience*, 4:1407-1439, 1977.
3. Jellinger K. Overview of the morphological changes in Parkinson's disease. In *advances in Neurology*, 45: Parkinson's Disease(eds Yahr MD and Bergmann KJ) 1-18 Raven Press, New York, 1986.
4. Yung WH, Hausser MA. Electrophysiology of dopaminergic and non-dopaminergic neurones of the guinea-pig substantia nigra pars compacta *in vitro*. *J Physiol*, 436:643~667, 1991.
5. Grace AA, Onn SP. Morphological and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded *in vitro*. *J Neurosci*, 9: 3463-3481, 1989.
6. Lacey MG, Mercuri NB, North RA. Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9:1233-1241, 1989.
7. Guyanet PG, Aghajanian GK. Antidromic identification of dopaminergic and other output neurones in rat substantia nigra. *Brain Res*, 150:69-84, 1978.
8. Treherne JM, Ashford MLJ. The regional distribution of sulfonylurea binding sites in rat brain. *Neuroscience*, 40:523-531, 1991.
9. Miller RJ. Glucose regulated potassium channels are sweet news for neurobiologists. *Trends in Neurosci*, 13:197-199, 1990.
10. Hansen JM, Kristensen M. Tolbutamide in the treatment of Parkinson's disease: a double blind trial. *Danish Medical Bulletin*, 12:181-184, 1965.
11. Gates EW, Hyman I. Use of tolbutamide in paralysis agitans. *J the American Medical Association*, 172:1351-1354, 1960.
12. Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature*, 305:147-148, 1983.
13. Trube G, Hescheler J. Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell attached patches. *Pflügers Arch*, 401:178-184, 1984.
14. Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta cells. *Nature*, 311:271-273, 1984.
15. Rorsman P, Trube G. Glucose dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta cells are regulated by intracellular ATP. *Pflügers Arch*, 405:305-309, 1985.
16. Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. Voltage-dependent ATP sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature*, 316:736-738, 1985.
17. Standen NB, Quayle JM, Davies NW. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science*, 245:177-180, 1989.
18. Mourre C, Ben Ari Y, Fosset M, Lazdunski M. Antidiabetic sulfonylureas: localization of binding sites in the brain and effects on the hyperpolarization induced by anoxia in hippocampal slices. *Brain Res*, 486:159-164, 1989.
19. Mourre C, Widmann C, Lazdunski M. Sulfonylurea binding sites associated with ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in the central nervous system: autoradiographic analysis of their distribution and ontogenesis, and of their localization in mutant mice cerebellum. *Brain Res*, 519:29-43, 1990.
20. Röper J, Hainsworth AH, Ashcroft FM. Tolbutamide reverses hypoglycemia-induced hyperpolarization in guinea-pig isolated substantia nigra neurones. *J Physiol*, 426: 68P, 1990a.
21. Röper J, Hainsworth AH, Ashcroft FM. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in guinea pig isolated substantia nigra neurones are modulated by cellular metabolism(abstract). *J Physiol (Lond)*, 430:130P, 1990b.
22. Hausser MA, Weille JR, Lazdunski M. Activation by cromakalim of pre- and post-synaptic ATP sensitive K<sup>+</sup> channel in substantia nigra. *BBRC*, 174:909-914, 1991.
23. Aguilar JS, Tan F, Durand I, Green RD. Isolation and

- characterization of an avian A1 adenosine receptor gene and a related cDNA clone. *Biochem J*, 307(Pt 3): 729-734, 1995.
24. Blanton MG, Turco J, Driegstein A. Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J Neurosci Method*, 30:203-210, 1989.
25. Villerie V, Elspeth MM. Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration. *The American Physiological Society*, 26:1924-1941, 1996.
26. Lacey MG, Mercuri NB, North RA. On the potassium conductance increase activated by GABA<sub>B</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors in rat substantia nigra neurons. *J Physiol*, 401:437-453, 1989b.
27. Ohno-Shosaku T, Yamamoto C. Identification of an ATP sensitive K<sup>+</sup> channel in rat cultured cortical neurons. *Pflügers Arch*, 422:260-266, 1992.
28. Hainsworth AH, Röper J, Kapoor R, Ashcroft FM. Identification and electrophysiology of isolated pars compacta neurons from guinea-pig substantia nigra. *Neuroscience*, 43:81-93, 1991.
29. Ashford MLJ, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ, Hales CN. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurons. *Pflügers Arch*, 412:297-304, 1988.
30. Röper J, Ashcroft FM. Metabolic inhibition and low internal ATP activate K<sub>ATP</sub> channels in rat dopaminergic substantia nigra neurones. *Pflügers Arch-Eur J Physiol*, 430:44-54, 1995.
31. Ashford MLJ, Boden PR, Treherne JM. Glucose-induced excitation of hypothalamic neurons is mediated by ATP sensitive K<sup>+</sup> channels. *Pflügers Arch*, 415:479-483, 1990.
-