

## 포타슘 통로 억제가 저산소 초기의 신경세포에 미치는 영향

고려대학교 의과대학 구로병원 신경외과학교실

김종현 · 문홍주 · 김주한 · 권택현 · 정흥섭 · 박윤관

### Influence of Potassium Channel Blockage on Early Hypoxic Neuronal Excitability

Jong Hyun Kim, MD, Hong-Joo Moon, MD, Joo-Han Kim, MD,  
Taek-Hyun Kwon, MD, Hung-Seob Chung, MD and Youn-Kwan Park, MD

Department of Neurosurgery, Guro Hospital, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

**Objective:** Potassium channels are ubiquitously expressed in all organisms and constitute the most diverse class of ion channels. Their action is regulated by various factors and is involved in neuronal excitability. 4-aminopyridine (4-AP) is a voltage-sensitive K<sup>+</sup> channel inhibitor used in studies of experimental neuronal excitation and in the treatment of demyelinating diseases. It is also known as having a strong convulsant activity on hippocampal slices. We investigated the effect of several K<sup>+</sup> channel antagonists on evoked potentials during normoxia and hypoxia. **Methods:** Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs), orthodromic (oPSs) and antidromic population spikes (aPSs) were recorded simultaneously in the cornu ammoni (CA1) area of rat hippocampal slices. fEPSP/Spike (E-S) ratio was calculated during the experiments to observe sequential changes of pre- and postsynaptic neuronal excitability, especially epileptiform activities. 4-AP, tetraethylammonium (TEA), dequalinium dichloride, paxilline, tertiapin-Q, glibenclamide and barium chloride were tested. **Results:** Most of the tested K<sup>+</sup> channel blockers showed increase of mean amplitudes in oPS, fEPSP and aPS compared to control slices. 4-AP showed most strong increase in oPS (188.5–2.1%). During the early period of hypoxia, epileptiform activities were observed more prominently in 4-AP treated slices, which were not produced in other K<sup>+</sup> channel blockers. Those epileptiform activities were accompanied by E-S potentiation (mean 426.6%). Common antiepileptic drugs- valproic acid, phenytoin and carbamazepine- effectively controlled epileptiform activities induced by 4-AP during hypoxia ( $p=0.0035$ ). **Conclusion:** Our experimental results thus show that 1) potassium channels significantly increase evoked field potentials, 2) epileptiform activities are increased in 4-AP treated slices during hypoxia and they are attributed to E-S potentiation and 3) 4-AP induced epileptiform activities during hypoxia are effectively controlled by antiepileptic drugs. (J Kor Neurotraumatol Soc 2010;6:97-105)

**KEY WORDS:** Hypoxia · E-S potentiation · Epileptiform discharge · Potassium channel blockers · 4-aminopyridine.

## 서 론

신경세포에 존재하는 다양한 포타슘 통로(potassium channel)들은 흥분성의 조절, 안정막전위(resting membrane potential)의 유지, 활동전위(action potential)의

재분극(repolarization) 등에 중요한 역할을 담당한다.<sup>8)</sup> 이 중 전압의존성 포타슘 통로(voltage dependent potassium channel: Kv)는 시냅스 전후에 분포되는 빈도가 다르며 이러한 차이가 활동전위의 발생 정도에 영향을 미치게 된다.<sup>22)</sup> Kv의 선택적 억제제인 4-aminopyridine (4-AP)는 활동전위의 재분극억제와 시냅스 전달효력(synaptic efficacy)의 증가로 인하여 신경세포의 과흥분(overexcitability)을 유발시키는 것으로 알려져 있으며 척수손상이나 다발성 경화증 같은 질병의 치료제로 임상시험 중에 있다.<sup>16)</sup> 4-AP의 이러한 작용은 세포밖으로의 포타슘 이온 이동억제 및 글루탐산(glutamate)과 같은 신경전도물질 분비의 증

Received: April 23, 2010 / Revised: April 27, 2010

Accepted: November 30, 2010

Address for correspondence: Youn-Kwan Park, MD, PhD  
Department of Neurosurgery, Guro Hospital, Korea University  
College of Medicine, 97 Gurodong-gil, Guro-gu, Seoul 152-703,  
Korea

Tel: +82-2-2626-3095, Fax: +82-2-863-1684

E-mail: ykapa76@yahoo.co.kr

가와 관계되며 고농도로 투여 시 경련성 전위(epileptiform discharge)의 발생에도 기인하는 것으로 보고되었다.<sup>28)</sup>

저산소 조건에서는 시냅스전도 저하 현상이 발생하는데 이는 대부분 아데노신의 작용에 의하여 발생하며 주로 A1 수용체에 작용하여 시냅스 말단에서 글루탐산의 분비 억제, 세포 내로의 칼슘 이동 억제, 신경세포막의 과다분극 및 시냅스 후 영역에서의 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체 작용 억제 등에 의한다.<sup>7,9,33)</sup> 그러나 저산소 후 상태나 반복적인 저산소 조건의 해마조직편에서는 경련 양상이 관찰되는데 이는 long-term potentiation (LTP)과 관계되고 EPSP-Spike (E-S) potentiation과는 관계없다고 보고된 바 있다.<sup>14)</sup> 반면 반복적인 고농도의 포타슘에 노출시킨 조직에서 나타나는 경련은 E-S potentiation을 동반한다고 보고되었으며<sup>34)</sup> 포타슘 통로 차단을 통한 탈분극에서도 과흥분 양상이 관찰되었다. 그러나 이러한 저산소 상태의 전도 변화와 포타슘 농도에 관계된 경련 양상이 중복되는 경우의 전도변화에 관해서는 아직 규명된 바 없다.

이에 본 저자는 다양한 포타슘 통로들을 선택적 길항제를 통하여 각각 차단한 뒤 신경세포의 유발전위의 변화 정도를 세포외측정법(extracellular recording)을 이용하여 비교하였고, 또한 저산소 조건 시에 각각의 흥분성 변화를 시냅스 후 흥분성의 척도인 E-S ratio의 변화와 함께 관찰하였다.

## 대상 및 방법

### 해마 조직편의 제작

모든 실험은 백서 (4~6주, 100~120 g 중량, Sprague-Dawley rat)를 이용하였다. 실험동물은 에테르를 이용하여 전신 마취한 뒤 7 단두하고 신속히 뇌를 적출한 후 4℃ 표준 인공 척수액 하에 해마를 분리하였다. 해마를 septo-temporal axis에 직각이 되도록 MacIlwaine chopper를 이용하여 450  $\mu$ m의 두께로 절편을 만들었다. 사용전의 절편은 30±1℃의 표준 인공 뇌척수액에서 배양하였다. 표준 인공 뇌척수액의 구성은 다음과 같으며 (NaCl 130 mM, KCl 3.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, D-glucose 10 mM) 여기에 O<sub>2</sub> 95%/CO<sub>2</sub> 5%를 환기하여 pH 7.4±0.05를 유지시켰다.

### 세포의 전기생리학적 측정

해마 조직편을 약 90분간 배양 후 용적이 1 mL 이하인 기록조(submerging chamber)로 옮겼다. 기록조 안에서

는 산소가 환기되고 30±1℃가 유지되는 표준 인공뇌척수액이 분당 3 mL의 속도로 관류되게 유지시켰다. 경련양상에 관한 실험에서는 CA1 영역에서의 경련양상을 관찰하기 위하여 CA3영역과의 연결을 미세 칼날로 절단시켰다. 세포의 기록용 미세유리관은 150 mM NaCl로 채운 후 1~10 M $\Omega$ 의 저항을 유지시켰다. 흥분성 시냅스 후전위(field excitatory postsynaptic potentials: fEPSP)와 정방향 군집전위(orthodromic: oPS)는 Schaffer collaterals/commissural pathway를 전기적으로 자극하여 CA1 영역의 stratum radiatum과 stratum pyramidale 각각에 같은 저항을 가진 미세유리관을 위치하여 기록하였다. 이때 얻어진 유발전위는 증폭 및 여과 (P511, Grass) 후에 Digidata 1,200을 이용하여 개인 컴퓨터와 연결하여 저장하였다. 양극성 플라티늄-이리듐 전기침 (직경 25  $\mu$ m)을 이용하여 50  $\mu$ s 동안 0.05 Hz의 빈도로 가하고 oPS는 stratum radiatum에 위치시킨 전극을 최대 유발전위의 절반이 나오도록 강도를 조정하여 전 실험 기간 동안 일정하게 유지시켰다. 정방향의 fEPSP가 상대적으로 큰 PS에 의해 일정정도 영향을 받을 수 있으므로 자극용 전극 한 개를 반대편의 stratum radiatum에 위치시켜 PS를 발생시키지 않을 정도 (subpopulation level)로 자극을 주었다. 이때 자극용 전극과 기록용 미세유리관의 거리는 약 500  $\mu$ m 정도 유지시켰다. Antidromic population spike (aPS)는 자극용 전극을 CA1 방향의 stratum alveus에 위치시켜서 신경의 축삭을 자극한 후 측정하고 최대 유발전위의 절반이 나오도록 강도를 조정하였다 (Figure 1). 안정된 상태에서 PS가 3 mV 이상인 경우만 실험에 이용하고, 조직편은 30분간 안정전위(baseline recording)를 측정하였다.

### 저산소 상태의 유발

30분간의 안정전위 측정 후에 95% 질소/5% 이산화탄소를 환기한 표준 인공뇌척수액을 10분간 관류하여 저산소 상태를 유발하며 이후 다시 표준 인공뇌척수액을 10분간 관류하여 회복시켰다.

### 사용된 약제

전위의존성 포타슘 통로 길항제로 4-aminopyridine (4-AP)과 tetraethylammonium (TEA), G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel (GIRK) 길항제로 tertiapin-Q, 칼슘 의존성 포타슘 통로 길항제로 paxilline과 dequalinium dichloride, inwardly-rectifying potassium channel (IRK) 길항제로 barium chloride, ATP의존성 포타슘 통로 길항제로 gliben-

clamide를 이용하였고 A1아테노신 수용체 차단을 위하여 DPCPX (8-cyclopentyl-1, 3-dipropylxanthine)을 이용하였다. 4-AP, Tertiapin-Q, Paxilline, Barium chloride는 Sigma Aldrich Co.에서 구입하였고, DPCPX, glibenclamide, dequalinium dichloride 및 TEA는 Torcris Cookson에서 구입하였다. 각각의 약제들을 표준인공 뇌척수액에 희석 전에 증류수, ethanol 혹은 DMSO에 녹인 후에 사용하였고 사용된 ethanol 혹은 dimethyl sulfide (DMSO)의 최종농도는 0.05% 미만으로 조절하였다.

### 자료 분석 및 통계

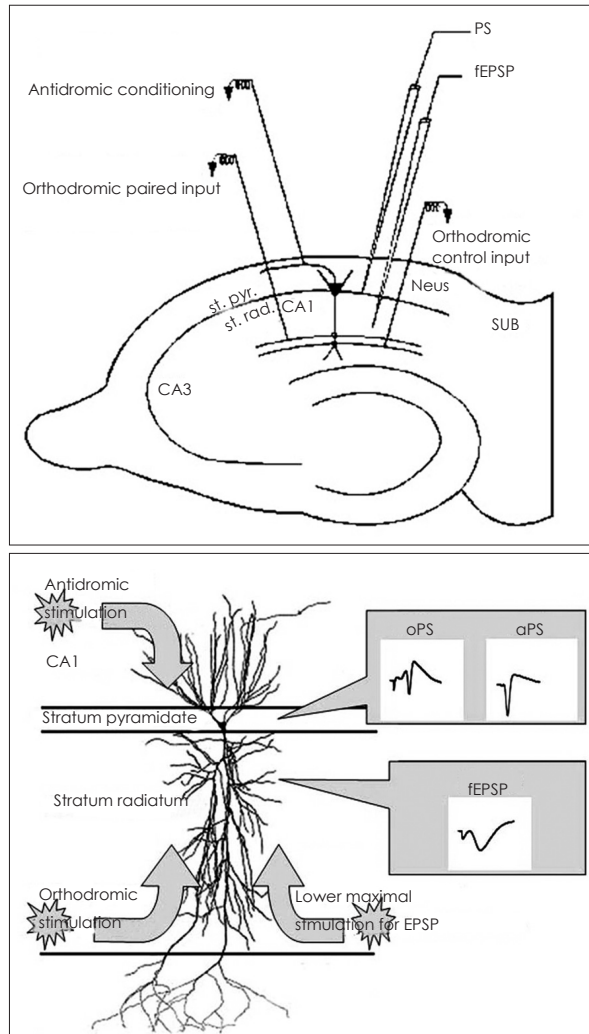
얻어진 모든 데이터는 평균±표준오차로 표시하였다. 조직 절편들로부터 얻어진 자료는 unpaired Student's t-

test를 이용하여 통계학적 유의성을 검사하였고 유의수준 0.05 미만을 의미 있는 것으로 보았다.

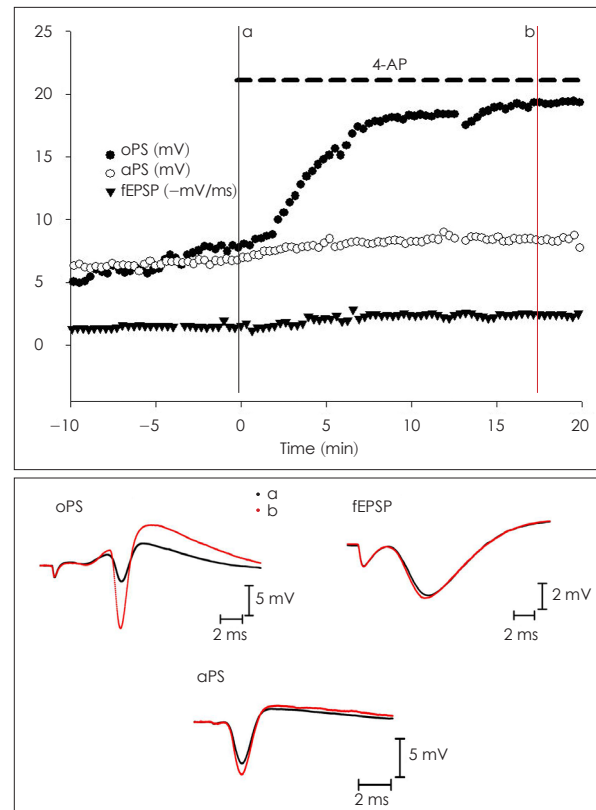
## 결 과

### 포타슘 통로 길항제 투여 후 신경세포의 흥분성의 변화

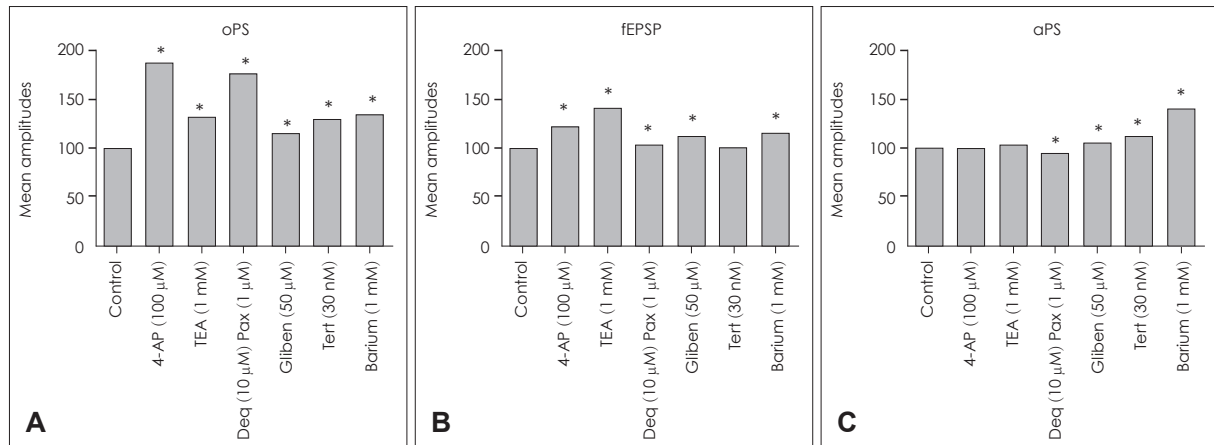
조직 절편에서 baseline recording을 측정한 뒤 각각의 포타슘 통로 길항제를 20분간 사용했을 때 fEPSP, oPS 및 aPS의 변화를 관찰하였다 (Figure 2). 투여된 포타슘 통로 길항제의 농도는 다음과 같다: 4-AP 100  $\mu$ M, TEA 1 mM, Dequalinium 10  $\mu$ M, Paxilline 1 nM, Glibenclamide 50  $\mu$ M, Tertiapin 30 nM, Barium chloride 1 mM. 투여 기간의 각각의 유발전위들의 평균을 투여전의 평균 (대조군)과 비교하였을 때 fEPSP와 oPS는 대부분의 포타슘 통로 길항제 투여 후 통계학적으로 의미 있는 증가 소견을 보였다 (Figure 3A, B)( $p < 0.001$ ). oPS의 경우 4-AP를 투여하였을 때 가장 증가하였고 ( $188.5 \pm 2.1\%$ ) fEPSP는 TEA를 투여하였을 때 가장 큰 증가 소견을 나타냈다 ( $141.8 \pm 1.5\%$ ). aPS의 경우 다른 군들에 비해 bar-



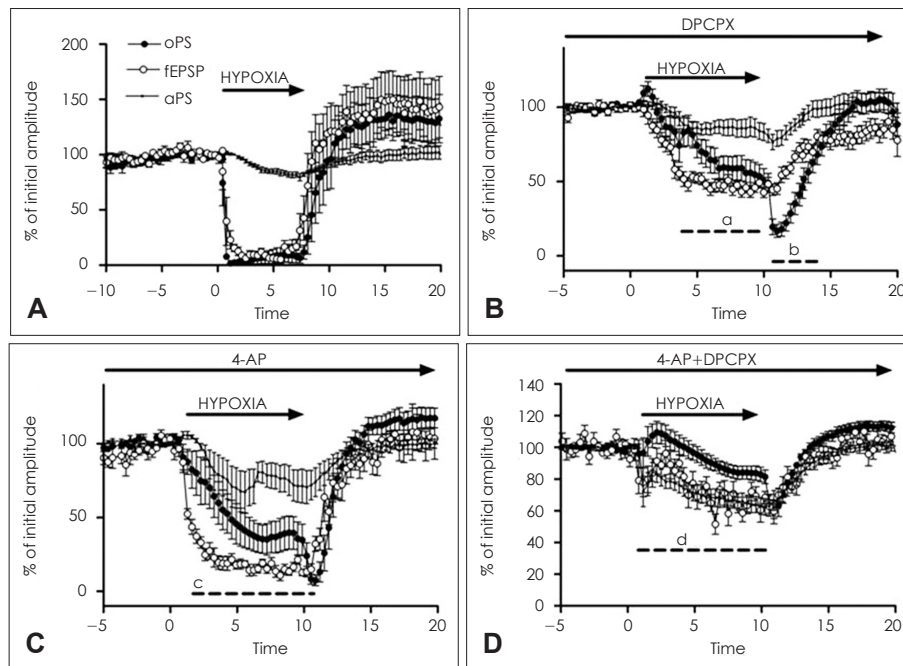
**FIGURE 1.** Upper: Schematic diagrams representing locations of stimulating and recording sites in CA1 hippocampal region. Lower: Three stimulating sites (orthodromic control input, paired input and antidromic conditioning) and two recording sites (PS, fEPSP). CA: cornu ammoni, PS: population spike, fEPSP: field excitatory postsynaptic potentials.



**FIGURE 2.** Sample tracing of evoked potentials treated by 4-aminopyridine (4-AP). orthodromic (oPS) are significantly increased after superfusing 4-AP (compare a and b), while fEPSP and antidromic population spike (aPS) does not change during the time course. fEPSP: field excitatory postsynaptic potentials.



**FIGURE 3.** Mean amplitudes of each evoked potentials after superfusion of various potassium channel blockers. A: oPS: All potassium channel blockers shows significantly increased amplitudes of oPS compared to control slices. 4-AP shows largest increase ( $188.5 \pm 2.1\%$ ) in oPS. B: fEPSP: Kv blockers show more increase fEPSP than other antagonists and TEA shows most prominent effect ( $141.8 \pm 1.5\%$ ). C: aPS: Compared to oPS and fEPSP, aPS shows rather small changes. Barium chloride has most prominent effect ( $140 \pm 3.7\%$ ). Asterisk(\*) indicates  $p < 0.05$  of mean amplitudes between control and test slices (Student's t test for unpaired observations). oPS: orthodromic, fEPSP: field excitatory postsynaptic potentials, aPS: antidromic population spike, Kv: voltage dependent potassium channel, 4-AP: 4-aminopyridine, TEA: tetraethylammonium.



**FIGURE 4.** Sequential changes of evoked potentials during hypoxia with A1 adenosine antagonist. A: During hypoxia, both oPS and fEPSP rapidly depresses and recover after reoxygenation and show posthypoxic excitation. B: After A1 receptor blocking, depressed fEPSP and oPS are largely attenuated. Note the differences of recovered amplitudes of fEPSP and oPS. (a): E-S potentiation and (b): E-S depression. C: In slices superfused with 4-AP, E-S potentiation (c) is appeared during hypoxia. D: Similar result with more attenuated fEPSP and oPS [with E-S potentiation(d)] during hypoxia in slices with DPCPX. oPS: orthodromic, fEPSP: field excitatory postsynaptic potentials, E-S: EPSP-Spike, 4-AP: 4-aminopyridine.

ium 투여 시 좀 더 증가하는 양상을 나타냈다 (Figure 3C) ( $140 \pm 3.7\%$ ).

#### 포타슘 통로 길항제 투여 후 저산소 조건에서의 유발전위 변화

##### E-S ratio

먼저 저산소 조건에서의 각각의 유발전위의 변화를 관찰했을 때 저산소 조건 후 aPS와 fEPSP는 급격히 감소하였고 재관류 후 후저산소성 흥분상태(posthypoxic excita-

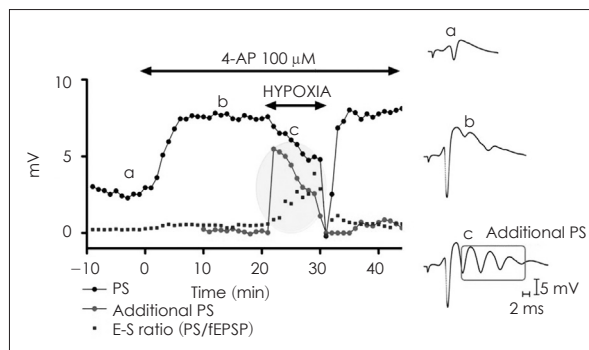
tion)를 나타냈다 (Figure 4A). 반면 aPS는 큰 변화를 나타내지 않았다. 저산소 상태에서 시냅스 전도 억제요인을 감소시키기 위하여 DPCPX를 투여하였을 때 시냅스 전도저하는 약 50% 회복되었고 저산소 조건하에서는 E-S potentiation이, 재관류 시에는 E-S depression의 양상이 관찰되었다 (Figure 4B). 4-AP를 투여하였을 때 일반 저산소 조건에서보다 시냅스 전도저하의 감소 및 E-S potentiation이 더욱 뚜렷하게 관찰되었다 (Figure 4C, D). 이는 저산소 조건 하에서도 4-AP에 의하여 신경 흥분상태가 증가한다는 것을 의미하며, 다른 포타슘 채널 억제제에



서는 이런 현상이 관찰되지 않았다.

#### 저산소 조건 시 4-AP에 의한 경련 양상의 증가

저산소 조건하에서 4-AP에 의하여 흥분상태가 증가하는 양상이 경련양상의 변화에는 어떤 관계가 있는지에 대하여 관찰 하였다. 경련양 반응은 같은 강도로 유발된 oPS에서 부가적인 PS (Figure 5)가 일어났을 때 그 진폭을 측정하여 비교하였다. 전체 28개의 조직절편에서 4-AP를 20분간 투여한 뒤 이어 10분간의 저산소 조건 시 oPS의 변화 및 경련양상의 증가 여부를 관찰하였다. 저산소 조건 전 2 mV 이상의 경련양상은 6개의 절편 (21.4%)에서 나타났



**FIGURE 5.** Increase of epileptiform activities (additional PS) during hypoxia in slices with 4-AP. Normal tracing (a) and typical samples showing epileptiform activities appearing after superfusing 4-AP (b) and exaggerated by additional hypoxia (c). Sequential changes of E-S ratio shows prominent E-S potentiation during hypoxia (filled squares). PS: population spike, 4-AP: 4-aminopyridine, E-S: EPSP-Spike.

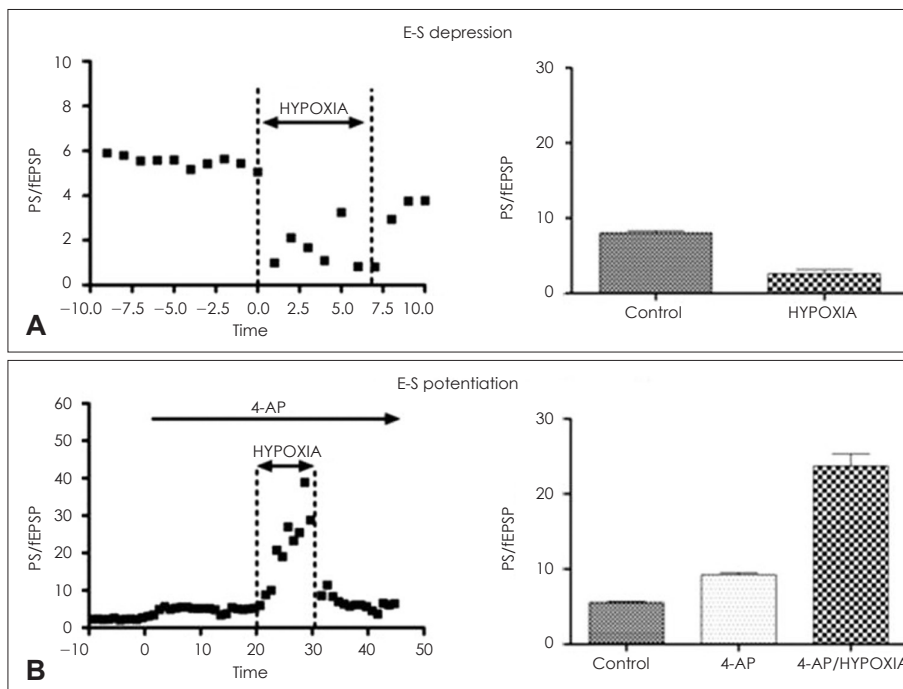
고 저산소 조건에서는 21개의 절편 (75%)에서 나타나서, 저산소 조건 시 경련 양상이 증가한 절편은 모두 17개 (60.7%)였다 (Figure 5). 나머지 2개의 절편에서는 경련양상이 감소했고 4개에서는 변화가 없었으며 5개에서는 뚜렷한 경련 양상이 관찰되지 않았다. 이런 현상은 기존 연구에서 관찰된 4-AP 투여 후 저산소 시 일시적 세포흥분성의 향상과 유사한 결과이다.<sup>24)</sup> 이러한 경련 양상은 다른 포타슘 통로 길항제 투여 시에는 관찰되지 않았다.

#### E-S ratio의 변화

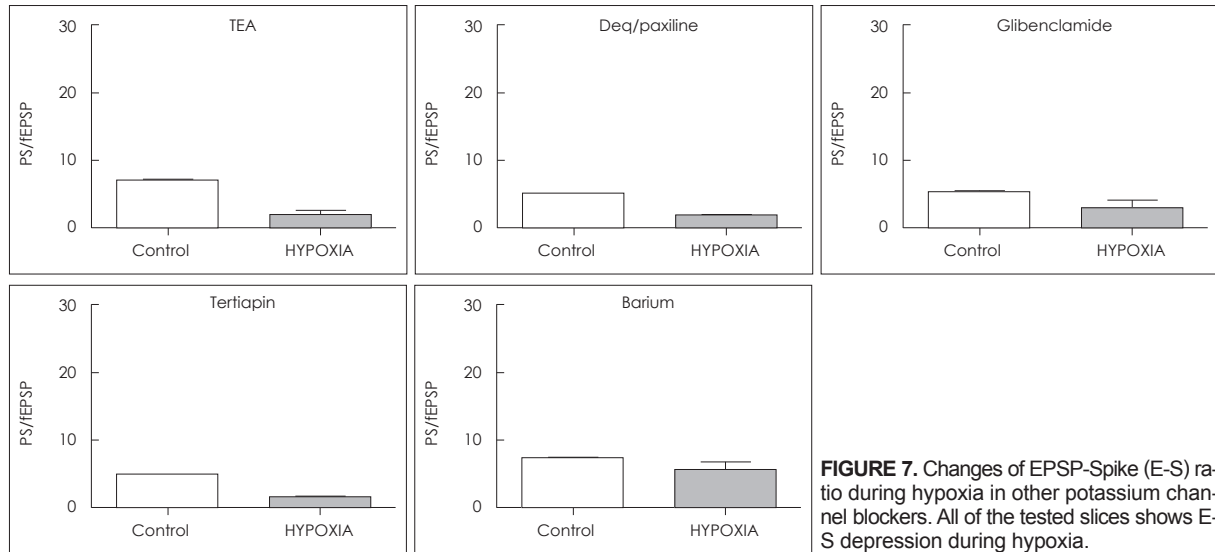
4-AP를 투여한 조직절편에서 저산소 조건 시 E-S ratio의 변화를 일반 저산소 조건과 비교하여 관찰했을 때 일반 저산소 조건 시에는 31.7%의 E-S depression 소견이 (Figure 6A), 4-AP 투여 시에는 426.6%의 E-S potentiation 소견을 보였다 (Figure 6B). 다른 포타슘 통로 길항제의 저산소 조건 시 E-S ratio에서는 모두 E-S depression 소견을 나타냈다 (Figure 7). 이는 저산소 상태에서 경련양상의 증가 현상에 E-S potentiation이 연관되어 있음을 시사한다.

#### 항경련제 투여 후 4-AP에서의 경련 양상 억제 효과

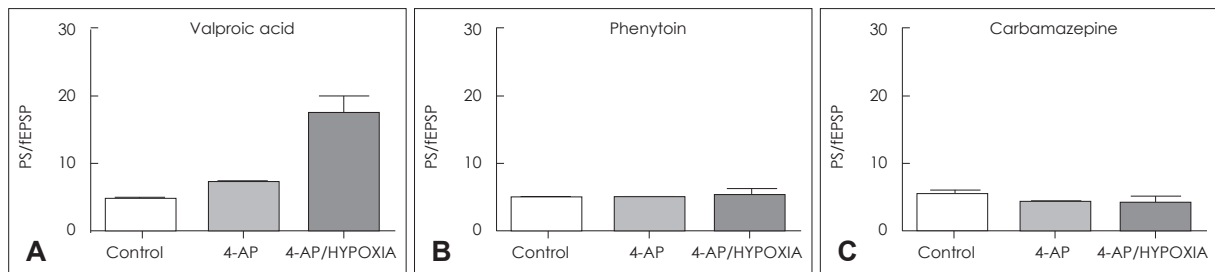
같은 정도의 효력을 가진 농도의 3가지 항경련제 (valproic acid 2 mM, phenytoin 100 μM, carbamazepine 50 μM)를 투여하여 각각 5개의 절편에서 경련양상의 유발전위 발생을 관찰했을 때 모두 15개의 조직 절편 중 4



**FIGURE 6.** Comparing E-S ratio between hypoxia (A) and 4-AP with hypoxia (B). Sample tracing and mean shows that E-S depression during hypoxia (A) while E-S potentiation in slices with 4-AP and 4-AP with hypoxia (B). E-S: EPSP-Spike, 4-AP: 4-aminopyridine.



**FIGURE 7.** Changes of EPSP-Spike (E-S) ratio during hypoxia in other potassium channel blockers. All of the tested slices shows E-S depression during hypoxia.



**FIGURE 8.** Changes of EPSP-Spike (E-S) ratio of in slices with each antiepileptic drugs. E-S potentiation is most prominent with valproic acid 2 mM in slices with 4-aminopyridine (4-AP) during hypoxia. A: valproic acid. B: phenytoin. C: carbamazepine.

개에서 2 mV 이상의 경련양상이 발생했다. 이는 항경련제 투여 전과 비교하여 통계학적으로 의미 있는 차이를 보여 ( $p=0.0035$ , Fisher's exact test) 항경련제에 의하여 경련이 효과적으로 차단됨을 알 수 있었다. 각각의 항경련제에 의하여 발생된 경련양상은 valproic acid에서 3개, phenytoin에서 1개에서 관찰되었고 carbamazepine에서는 관찰되지 않았다. 각각의 항경련제 투여 후 E-S ratio의 변화를 관찰했을 때 phenytoin과 carbamazepine과 달리 valproic acid에서는 E-S potentiation이 관찰 되어 저산소 조건 시 경련양상의 발생과 E-S potentiation과의 연관을 다시 확인할 수 있었다 (Figure 8).

## 고 찰

### 포타슘 이온 통로

여러 이온 통로 중에서 포타슘 이온 통로는 가장 다양한 종류와 역할을 가지고 있다. 포타슘 이온 통로의 작용은 전압, 칼슘, G-protein 및 다양한 신경전달 물질에 의해 조절되며 부정맥, 난청, 경련, 당뇨 및 암 등과 관련된 다양한 유전적 질환들이 포타슘 이온 통로 유전자의 장애와 관련

되어 있다.<sup>25)</sup> 포타슘 이온 통로는 구조적으로 몇 가지 종류로 분류되며 전압의존성 포타슘 통로 ( $K_v$ )와 칼슘 의존성 (calcium activated) 포타슘 통로 ( $K_{Ca}$ )는 6TM (transmembrane) 단백질군, IRK와 GIRK는 2TM 단백질군에 속한다.<sup>17)</sup> 기본적으로 세포내의 포타슘 농도는 세포외보다 높게 유지되고 있고 포타슘 이온 통로가 작동하면 세포외로의 양전하 유출로 인한 세포막의 과다분극(hyperpolarization)이 일어난다. 이러한 작용으로 인해 포타슘 통로의 작동은 흥분된 신경, 근육, 체장의  $\beta$ 세포 등의 활동전위를 종결시키게 된다.<sup>25)</sup>

좀더 자세히 살펴 볼 때 각각의 포타슘 통로는 작용 기전과 역할에 차이가 있다.  $K_v$ 는 매우 많은 종류가 알려져 있으며 아직까지 신경 신호전달에 미치는 영향에 대하여 완전히 밝혀지지 않았다.  $K_v$ 는 활동전위 발생의 역치, 모양, 빈도, 지속기간 및 불응기의 기간을 조절하는데 관여하며, 각각의  $K_v$ 들의 서로 다른 전압 의존도, 관문여닫기 (gating) 성질들은 신경활동의 차이를 일으키는 데 영향을 준다.<sup>30)</sup>

활동전위 발생에 관여하는 많은 전위의존성 소듐 및 칼슘 이온 통로들은 가지돌기 내에서 균등한 분포를 나타

낸다.<sup>23)</sup> 대조적으로 Kv들은 신경세포내의 분포에서 차이를 보이는데 CA1 피라미트세포의 가지돌기에는 transient A-type 포타슘 통로들이 밀집되어 있고 이들은 세포체로부터 멀어질수록 밀집도가 증가한다.<sup>19)</sup> 반면 low-voltage-activated Kv는 축삭(axon) 부위에, high-voltage-activated Kv는 세포체(somata)와 시냅스 말단(synaptic terminal)에 주로 분포한다.<sup>20)</sup> 이러한 가지돌기 내의 이온 통로들의 분포 차이는 세포체로부터 멀어질수록 활동전위의 발생의 크기를 감소시키고, 가지돌기에서의 활동전위 발생을 억제하며 fEPSP의 모양을 변화시키는 원인으로 제시되었다.<sup>19)</sup>

$K_{ATP}$ 과 칼슘 의존성  $K_{Ca}$ 은 저산소 상태에서 세포내의 ATP 농도 저하와 칼슘 증가에 따라 각각 작동하여 세포막의 과분극에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>15,37,41)</sup> 또한, IRK의 일종인 GIRK는 아데노신(adenosine), 세로토닌(serotonin) 및 GABA의 영향을 받아 시냅스 후 수지상 돌기(postsynaptic dendrite) 내에서 흥분성 감소 및 시냅스의 통합(integration)에 영향을 준다.<sup>38)</sup>

#### 4-AP와 신경 흥분성

4-AP는 Kv의 길항제로서 많은 실험에서 경련 및 시냅스 가소성(synaptic plasticity)의 기전 연구에 이용되고 있고, 또한 Lambert-Eaton 증후군, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 중증근무력증(myasthenia gravis) 및 척수 손상의 회복에 효과를 보이는 것으로 보고되고 있다.<sup>16,18,35,36,40)</sup> 다발성 경화증과 척수 손상에 4-AP를 투여한 실험들에서 증상의 호전은 주로 탈수초화(demyelinated) 축삭의 전도(conduction) 회복에 기인하는 것으로 보고되었다.<sup>4,5)</sup> 임상적으로 아직 약리학적 용량반응곡선이 확립되지 않았고 고용량 투여 시 경련의 부작용 가능성으로 인해 임상적인 적용은 저용량 (1  $\mu$ M 이하)으로 권유되었다.<sup>4)</sup> 하지만 축삭전도 회복에 관한 동물실험에서는 500  $\mu$ M 이상의 고용량에서만 축삭의 전도 회복 효과가 있어서, 중추신경계와 신경-근육 이음부(neuromuscular junction)에서 증가되는 시냅스 전도의 향상이 임상적 저용량에서의 4-AP에 의한 다발성 경화증의 증상회복에 기인할 것으로 제시되었다.<sup>35)</sup> 이는 본 연구결과에서도 말집신경(myelinated nerve)의 전도를 나타내는 aPS의 반응은 4-AP의 투여 후에도 큰 증가를 보이지 않은 반면 시냅스 전도를 나타내는 oPS와 fEPSP의 뚜렷한 상승을 보임으로서 알 수 있다.

해마조직편에 4-AP를 투여하면 글루탐산의 분비가 증가되고 경련과 신경변성(neurodegeneration)이 일어나

며,<sup>29)</sup> NMDA와 non-NMDA 종류의 흥분성 아미노산(excitatory amino acid) 수용체의 길항제를 사용했을 때 경련양상이 억제된다.<sup>1)</sup> 또한 소듐 통로의 기능을 억제하는 tetrodotoxin 및 항경련제인 carbamazepine과 valproic acid에 의하여 4-AP에 의한 효과적인 경련 억제 효과가 보고되었다.<sup>1,11,42)</sup>

본 연구에서는 1 mM의 TEA에 의한 경련 유발효과는 관찰되지 않았다. Kv 길항제인 TEA는 경련과 신경변성에 관하여 4-AP와 비교되어 실험되어 왔는데 4-AP에 비하여 신경전달 물질의 분비 촉진 정도 및 경련의 유발 정도가 약한 것으로 보고되었고, 포타슘 통로의 서로 다른 부위에 작용하여 상이한 세포내/외의 약리학적 성질을 가진다고 제시되었다.<sup>21,32)</sup> 본 연구에서 주목할 점은 4-AP를 투여한 해마 조직들에서 저산소 조건 전에는 약 20%, 저산소 시에는 약 75%의 조직에서 경련양상이 관찰되었는데 약 60%의 조직절편이 저산소 조건 전보다 저산소 시 경련양상이 증가한 점이다. 이는 4-AP를 투여한 해마조직에서 저산소 조건 초기에 일시적으로 세포의 흥분성이 증가하는 것을 의미하는데, 일반적으로 저산소 조건에서는 아데노신의 작용으로 시냅스 전도의 저하현상이 일어나며 세포 흥분성이 감소하게 된다.<sup>7,10)</sup> 기존 연구에서도 4-AP를 투여한 해마 조직에서 저산소 시 신경세포의 일시적 흥분에 관해서 보고된 바가 있으나<sup>24)</sup> CA3 영역에서 관찰된 것이었고 명확한 기전은 제시되지 못했다. 본 연구에서는 저산소조건의 CA1 해마조직에서 4-AP에 의한 경련양상의 증가와 더불어 E-S potentiation이 일어남을 알 수 있었다. E-S potentiation은 경련양상의 유발전위를 일으키는 강한 요소로 작용한다고 보고된 바 있다.<sup>34)</sup>

#### E-S potentiation

신경세포의 신호 전달의 측면에서 중요한 것은 신경세포들의 활동전위 발생의 총합이라 할 수 있다. 시냅스 신호가 가지돌기로 부터 세포체로 전달되는 과정은 수동적이지 않고 여러 이온 통로들과 리간드관문 통로들에 의하여 각각의 단일세포 수위에서 능동적으로 조절된다.<sup>2)</sup> fEPSP는 CA1 피라미드 세포에서 가지돌기의 흥분성 시냅스로부터 생성된 막전위들의 척도이고, PS는 그로 인한 활동전위 발생의 가중(summation)을 나타내며 또한 시냅스 후 영역의 흥분성을 나타낸다.<sup>27)</sup> 일반적으로 fEPSP와 PS는 비례하여 증가하거나 감소하는데 이것을 E-S coupling이라고 하며 동시에 측정된 fEPSP와 PS를 이용한 E-S 곡선은 주어진 시냅스의 탈분극에 대하여 시냅스 후 세포가 활동전위를 발생시키는 정도를 나타내는 표시이다. 즉 어떠한

원인에 의하여 시냅스 후 영역의 흥분성이 증가하는 경우 E-S potentiation이 나타나고 반대의 경우 E-S depression의 소견을 보이게 된다. E-S coupling의 기전에 대해서는 아직 완전히 밝혀지지 않았으나 억제성 구동(inhibitory drive)의 약화나 활동전위발생의 역치 감소, 전압의 존성 칼슘 이온통로분포의 밀집화 등이 E-S potentiation에 관여한다.<sup>2,3,39)</sup> E-S coupling은 학습과 기억에 관여하는 시냅스 가소성의 기전으로 연구되는 long-term potentiation (LTP)와 long-term depression (LTD) 현상과 함께 연구되어 왔다.<sup>3,6,12)</sup> LTP와 E-S potentiation은 공히 시냅스나 세포 반응을 강화시켜 신경세포들의 동조 방전(synchronous discharge)의 확률을 높이는 것으로 나타나며, LTP와는 달리 E-S potentiation은 NMDA 수용체의 활성화와 관계되지 않는다고 보고되었다.<sup>3)</sup> 다른 연구에서는 반복적인 고농도의 포타슘 용액의 투여로 인해 경련양상이 발생하며 이때 E-S potentiation이 발생하는데 이는 선택적 NMDA 수용체 길항제에 의하여 차단 된다고 보고하였다.<sup>34)</sup>

본 실험에서 4-AP를 투여한 조직에서 경련양상과 동반되어 E-S potentiation의 소견이 나타난 것은 시냅스 후 영역의 내인성 세포 흥분의 증가로 추측해 볼 수 있다. 일반적으로 해마조직편에서의 세포 내 막전위를 측정해 보면 저산소 조건 시 과분극이 나타나고 이후 회복을 시키면 일시적으로 심화된 후저산소성 과분극을 보인 후 회복된다.<sup>26)</sup> 이런 일련의 변화 중 일시적인 탈분극(depolarization) 현상이 과분극 현상 이전에 30% 가량의 조직에서 나타나고 이는 소듐 통로 길항제인 tetrodotoxin에 의하여 억제되었다고 보고되었다.<sup>13)</sup> 이와 같은 초기 탈분극은 칼슘의 농도와 관계없고 저산소 조건의 직간접적 영향에 의하여 발생된다고 추측되었다.<sup>31)</sup> 초기 탈분극의 기전으로는  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase의 작동억제와 그로 인한 세포외 포타슘 농도의 증가, TTX-sensitive sodium current 및 시냅스 말단에서의 글루탐산 증가 등이 제시되었다.<sup>26)</sup> 이런 초기 저산소 시에 발생할 수 있는 내인성 흥분성 증가가 4-AP로 인한 작용에 의해 가중되어 E-S potentiation 및 경련양상의 증가현상을 초래할 것으로 추측해 볼 수 있다.

## 결 론

본 실험에서는 크게 3가지 결론을 얻을 수 있었는데 1) 다양한 포타슘 통로 억제에 의하여 전반적인 유발 전위의 증가소견이 관찰되었고 oPS는 4-AP에서, fEPSP는 TEA에서, aPS는 barium chloride에서 가장 증가되었으며, 2)

4-AP 투여 조건에서 저산소 조건 시 경련 발생이 증가되었고 이는 E-S potentiation과 동반되었다. 또한 3) 4-AP를 투여한 저산소 조건 시 나타나는 경련은 항경련제에 의하여 효과적으로 억제됨을 알 수 있었다.

**중심 단어:** 저산소·포타슘 이온 차단·간질.

## REFERENCES

- 1) Avoli M, Barbarosie M, Lücke A, Nagao T, Lopantsev V, Köhling R. Synchronous GABA-mediated potentials and epileptiform discharges in the rat limbic system in vitro. *J Neurosci* **16**: 3912-3924, 1996
- 2) Bernard C, Pickering J, Wheal HV. Reversal of excitatory post-synaptic potential/spike potentiation in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neuroscience* **86**:431-436, 1998
- 3) Bernard C, Wheal HV. Expression of EPSP/spike potentiation following low frequency and tetanic stimulation in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Neurosci* **15**:6542-6551, 1995
- 4) Bever CT Jr, Young D, Anderson PA, Krumholz A, Conway K, Leslie J, et al. The effects of 4-aminopyridine in multiple sclerosis patients: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind, concentration-controlled, crossover trial. *Neurology* **44**: 1054-1059, 1994
- 5) Blight AR, Gruner JA. Augmentation by 4-aminopyridine of vestibulospinal free fall responses in chronic spinal-injured cats. *J Neurol Sci* **82**:145-159, 1987
- 6) Daoudal G, Hanada Y, Debanne D. Bidirectional plasticity of excitatory postsynaptic potential (EPSP)-spike coupling in CA1 hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14512-14517, 2002
- 7) de Mendonça A, Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev* **33**:258-274, 2000
- 8) Dodson PD, Forsythe ID. Presynaptic  $\text{K}^+$  channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends Neurosci* **27**: 210-217, 2004
- 9) Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**:31-55, 2001
- 10) Fowler JC. Adenosine antagonists delay hypoxia-induced depression of neuronal activity in hippocampal brain slice. *Brain Res* **490**:378-384, 1989
- 11) Fueta Y, Avoli M. Effects of antiepileptic drugs on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Epilepsy Res* **12**:207-215, 1992
- 12) Fujii S, Kuroda Y, Ito K, Kaneko K, Kato H. Effects of adenosine receptors on the synaptic and EPSP-spike components of long-term potentiation and depotentiation in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* **521 Pt 2**:451-466, 1999
- 13) Fujiwara N, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. Effects of hypoxia on rat hippocampal neurones in vitro. *J Physiol* **384**:131-151, 1987
- 14) Godukhin O, Savin A, Kalemenev S, Levin S. Neuronal hyperexcitability induced by repeated brief episodes of hypoxia in rat hippocampal slices: involvement of ionotropic glutamate receptors and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuropharmacology* **42**:459-466, 2002
- 15) Griesemer D, Zawar C, Neumcke B. Cell-type specific depression of neuronal excitability in rat hippocampus by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Eur Biophys J* **31**:467-477, 2002
- 16) Gu Y, Ge SY, Ruan DY. Effect of 4-aminopyridine on synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res* **1006**:225-232, 2004



- 17) Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, et al. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. **Pharmacol Rev** 55:583-586, 2003
- 18) Hayes KC, Potter PJ, Hsieh JT, Katz MA, Blight AR, Cohen R. Pharmacokinetics and safety of multiple oral doses of sustained-release 4-aminopyridine (Fampridine-SR) in subjects with chronic, incomplete spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil** 85:29-34, 2004
- 19) Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D. K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. **Nature** 387:869-875, 1997
- 20) Jan LY, Jan YN. Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. **J Physiol** 505:267-282, 1997
- 21) Kirsch GE, Shieh CC, Drewe JA, Vener DF, Brown AM. Segmental exchanges define 4-aminopyridine binding and the inner mouth of K<sup>+</sup> pores. **Neuron** 11:503-512, 1993
- 22) Magee JC. Dendritic integration of excitatory synaptic input. **Nat Rev Neurosci** 1:181-190, 2000
- 23) Magee JC, Johnston D. Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. **Science** 268:301-304, 1995
- 24) Mattia D, Nagao T, Rogawski MA, Avoli M. Potassium channel activators counteract anoxic hyperexcitability but not 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. **Neuropharmacology** 33:1515-1522, 1994
- 25) Miller C. An overview of the potassium channel family. **Genome Biol** 1:REVIEWS0004, 2000
- 26) Nieber K. Hypoxia and neuronal function under in vitro conditions. **Pharmacol Ther** 82:71-86, 1999
- 27) O'Kane EM, Stone TW. Barium, glibenclamide and CGS21680 prevent adenosine A1 receptor changes of ES coupling and spike threshold. **Neurosignals** 13:318-324, 2004
- 28) Peña F, Bargas J, Tapia R. Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. **Neuropharmacology** 42:807-812, 2002
- 29) Peña F, Tapia R. Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. **J Neurochem** 72:2006-2014, 1999
- 30) Pongs O. Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. **FEBS Lett** 452:31-35, 1999
- 31) Rader RK, Lanthorn TH. Experimental ischemia induces a persistent depolarization blocked by decreased calcium and NMDA antagonists. **Neurosci Lett** 99:125-130, 1989
- 32) Schechter LE. The potassium channel blockers 4-aminopyridine and tetraethylammonium increase the spontaneous basal release of [3H]5-hydroxytryptamine in rat hippocampal slices. **J Pharmacol Exp Ther** 282:262-270, 1997
- 33) Schubert P, Rudolph KA, Fredholm BB, Nakamura Y. Modulation of nerve and glial function by adenosine--role in the development of ischemic damage. **Int J Biochem** 26:1227-1236, 1994
- 34) Semyanov A, Godukhin O. Epileptiform activity and EPSP-spike potentiation induced in rat hippocampal CA1 slices by repeated high-K(+): involvement of ionotropic glutamate receptors and Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II. **Neuropharmacology** 40:203-211, 2001
- 35) Smith KJ, Felts PA, John GR. Effects of 4-aminopyridine on demyelinated axons, synapses and muscle tension. **Brain** 123:171-184, 2000
- 36) Solari A, Uitdehaag B, Giuliani G, Pucci E, Taus C. Aminopyridines for symptomatic treatment in multiple sclerosis. **Cochrane Database Syst Rev** CD001330, 2002
- 37) Sperlách B, Zsilla G, Vizi ES. K(ATP) channel blockers selectively interact with A(1)-adenosine receptor mediated modulation of acetylcholine release in the rat hippocampus. **Brain Res** 889:63-70, 2001
- 38) Takigawa T, Alzheimer C. G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) currents in dendrites of rat neocortical pyramidal cells. **J Physiol** 517:385-390, 1999
- 39) Taube JS, Schwartzkroin PA. Mechanisms of long-term potentiation: a current-source density analysis. **J Neurosci** 8:1645-1655, 1988
- 40) Wolfe DL, Hayes KC, Hsieh JT, Potter PJ. Effects of 4-aminopyridine on motor evoked potentials in patients with spinal cord injury: a double-blinded, placebo-controlled crossover trial. **J Neurotrauma** 18:757-771, 2001
- 41) Yamamoto S, Tanaka E, Higashi H. Mediation by intracellular calcium-dependent signals of hypoxic hyperpolarization in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. **J Neurophysiol** 77:386-392, 1997
- 42) Yonekawa WD, Kapetanovic IM, Kupferberg HJ. The effects of anticonvulsant agents on 4-aminopyridine induced epileptiform activity in rat hippocampus in vitro. **Epilepsy Res** 20:137-150, 1995