

## 해마 theta 리듬과 pyramidal neuron의 세포내 특성과의 상관관계

경북대학교 치과대학 소아치과학교실, 치과약리학교실\*\* 및 의과대학 약리학교실\*

권오흥 · 김영진 · 남순현 · 김현정 · 이만기\* · 조진화\*\* · 최병주\*\*

Abstract

### CORRELATIONS BETWEEN HIPPOCAMPAL THETA RHYTHM AND INTRACELLULAR CHARACTERISTICS OF PYRAMIDAL NEURONS

Oh-Heung Kwon, Young-Jin Kim, Soon-Hyeun Nam, Hyeun-Jung Kim  
Man-gee Lee\*, Jin-Hwa Cho\*\*, Byung-Ju Choi\*\*

*Department of Pediatric Dentistry, Department of Dental Pharmacology\*\*,  
School of Dentistry Department of Pharmacology\*, School of Medicine, Kyungpook National University*

Electrophysiological phenomena of pyramidal cells in the CA1 area of the dorsal hippocampus were recorded from and filled with neurobiotin in anesthetized rats. The electropharmacological properties of membrane as well as the cellular-synaptic generation of rhythmic slow activity (theta) were examined.

The intracellular response characteristics of these pyramidal cells were distinctly different from responses of interneurons. Pyramidal cells had a high resting membrane potential, a low input resistance, and a large amplitude action potential. A afterhyperpolarization was followed a single action potential.

Most of pyramidal cells did not display a spontaneous firing. Pyramidal cells displayed weak inward rectification and anodal break excitation. The slope of the frequency-current relation was 53.4 Hz/nA for the first interspike interval and 15.9 Hz/nA for the last intervals, suggesting the presence of spike frequency adaptation. Neurobiotin-filled neurons showed pyramidal morphology. Cells were generally bipolar dendritic processes ramifying in stratum lacunosum-moleculare, radiatum, and oriens. Commissural stimulation discharged pyramidal cells, followed by excitatory and inhibitory postsynaptic potentials (EPSPs and IPSPs). The frequency of theta-related membrane potential oscillation was voltage-independent in pyramidal neurons. At strong depolarization levels (less than 30 mV) pyramidal cells emitted

sodium spike oscillation, phase-locked to theta. The observations provide direct evidence that theta-related rhythmic hyperpolarization of principal cells is brought by the rhythmically discharging interneurons. Furthermore, the findings in which interneurons were also paced by rhythmic inhibitory postsynaptic potentials during theta suggest that they were periodically hyperpolarized by their GABAergic septal afferents.

**Key words** : intracellular recording, pyramidal cell, theta rhythm, neurobiotin

## I. 서 론

해마의 일정 영역에서 전위의 변화로 기록될 수 있는 해마의 전기생리적 현상은 각 해마세포의 흥분 또는 억제성 반응들이 단세포 단위에서 그룹 세포 단위의 합으로 나타나는 population pattern으로 외부 자극 없이도 자발적으로 전위가 발생하고 일정한 주기를 가지는 리드믹한 양태를 보여주는 특징을 가진다<sup>1,2</sup>. 연구자들은 해마에서 나타나는 population pattern을 theta activity 및 관련된 gamma pattern(4V - 100Hz), hippocampal sharp wave(SPW) 및 관련된 SPW-associated high frequency(200Hz) oscillation("ripple"), 2종류의 dentate spike, sleep spindle 그리고 delta wave of sleep<sup>3-6</sup> 등으로 구분한다.

Ylinen 등<sup>7</sup>에 의하면 이 중에서 리드믹한 서파(RSA 또는 theta)는 해마에서 가장 많이 연구된 뇌파(EEG)의 한 형태로서 감각의 전달 및 기억, 동작의 수의적 조절 등과 관계가 있다고 알려져 있다<sup>8</sup>. 세포외부 전기적 현상을 측정할 실험에 의하면 각성 동물에서 주세포 세포체는 개재신경에 의하여 리드믹한 과분극을 발생하는데 이 과분극은 perforant path 자극으로 pyramidal cell 및 granule cell을 자극하여 나타나는 dendrite의 리드믹한 흥분보다 미리 발생할 것이라고 하였다<sup>6</sup>. 그러나 이러한 가정을 뒤받침 하기 위해서는 세포내 측정을 동시에 행하여야만 가능할 것이다. 현재까지 자유로이 움직이는 실험동물에서 세포내 기록은 이루어지고 있지 않지만 마취 하에서 pyramidal cell, mossy hilar, 그리고 granule cell을 대상으로 theta파와 관련된 intrasomatic current를 측정

한 실험이 보고되었다<sup>9</sup>. 이러한 세포내 측정 실험 결과에서 somatic currents의 주된 동력으로서 interneuron-mediated inhibitory postsynaptic potential(IPSP)을 지지하고 있지만<sup>9</sup> 다른 실험에서는 theta-concurrent somatic membrane fluctuation이 dendritic EPSP를 반영한다고 하였다<sup>10</sup>.

Gulyas 등<sup>11</sup>이 인접한 두 신경세포의 전기적 반응을 쌍으로 기록하고 그 시냅스 접촉점을 광학 및 전자 현미경적으로 관찰하여 이들 양쪽 소견을 합치시킨 실험을 행한 이후 이와 유사한 방법으로 시냅스 기능을 연구한 새로운 논문이 발표되고 있다<sup>12,13</sup>. 지금까지 알려진 바에 따르면 전기생리학적으로 동일한 억제성 작용이 그 형태학적 시냅스 형태에 따라 신경망 활성도에서는 전혀 다른 효과를 나타낼 수도 있다고 한다. 이러한 독특한 억제성 과정은 해마에서도 일부 알려져 있는데 해마의 population pattern의 동시성 정도를 결정하거나 해마로부터 출력되는 신호를 조절하는데 이 과정이 관여하며, 또한 해마 주세포에서 NMDA(N-methyl-D-aspartate) 수용체 매개성 반응 강도 및 전달 효율을 조절하는 데에도 관여한다<sup>14</sup>. 실제로 서로 다른 억제성 세포들이 모두 pyramidal cell의 세포막에 시냅스를 형성하고 있으나 각각 미세하게 정해진 서로 다른 부위(somata, axon initial segments, 그리고 distal 및 proximal dendrite부위 등)에 접합하고 있다고 한다<sup>12,15</sup>.

그리고 해마의 각 신경세포들은 이와 같이 형태학적으로 다양하게 시냅스를 형성하고 있을 뿐 아니라 신경 화학적인 이질성도 유지하고 있는 것으로 알려져 있다. 최근에 와서야 비로소 형태적

/신경 화학적 특성과 입/출력 특성 사이의 관계에 관한 논문이 발표되기 시작하였는데<sup>15,16</sup> 아직까지도 이러한 양상의 세포생리학적 일치성에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 해부학적 및 생리학적 분류 방식 사이의 관계를 확립하는 것은 더욱 중요하다고 여겨진다. 이러한 전기 생리적 특성과 형태/면역화학사이의 상관 관계를 확립하는데 있어서 지금까지 사용된 분석 방법과는 달리 더욱 진보된 접근 방법이 필요하다. 지금까지의 연구보고에 의하면 신경세포의 기능적 특성을 연구하는데 있어서 신경세포의 세포내 전위 변화 측정과 함께 시각적 분석을 동시에 수행하는 것이 가장 직접적인 접근 방법이며<sup>12,15,17</sup>, 생리적 및 해부적 분류 범주를 연결하는데 중요한 역할을 할 것이라고 한다.

본 연구에서 시도한 in vivo 연구방법은 신경세포의 population pattern을 고려할 때 기존의 in vitro 방법보다 이상적이고 신경 전체의 axon collateral system에 관한 정보를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 따라서 본 실험으로 얻은 결과는 생체에서와 유사한 신경 시스템을 반영하게 될 것이므로 해마에서 일어나는 전기 생리적 현상의 기전을 이해하는데 큰 도움이 되리라고 생각된다. 본 연구 목적은 신경망이 보존된 in vivo 연구모형을 사용하여 경련발작의 가장 취약한 부분인 해마의 주세포층 세포들의 세포내 전기 생리적 변동 여부를 확인하여 신경망 기능에 기여하는 역할을 파악하고자하였다. 또한 해마 주세포의 발화형태와 세포외부로 측정된 network pattern과의 관계를 연관지어서 신경세포의 기능을 설명하였으며 이러한 실험을 통하여 경련발작 및 이에 수반되는 뇌손상에 대한 기초적 기전을 제시하였고 그 실험 모델을 확립하였다.

## II. 실험재료 및 방법

자극용 전극설치 및 기록용 미세전극설치 : 체중 300g 내외의 흰쥐(Sprague-Dawley)를 urethane(1.5 g/kg)으로 마취한 후 정위고정장치에 위치시켜 수술을 시행하였다. 두개골 상방의 피부와 골막을 제거한후 bregma와 lambda를 포함하는 suture를 노출시켰다. 자극용 전극 1쌍 (각 100 $\mu$ m, 0.5

mm간격)을 좌측 fimbria-fornix (AP=1.3, bat=1.0, ver=3.9) 및 우측 (AP=1.3, bat=-1.0, ver=4.3, 체중 200g 기준)에 위치시켜 CA1 영역으로가는 맞교차입력(commisural input)을 자극할 수 있도록 하였다. Reference 및 ground용 나사를 lambda의 caudal 쪽에 고정하였다. 세포외 기록용 전극(20 $\mu$ m insulated tungsten wire)을 해마 상방에 형성한 bone window의 medial edge 부위에 근접시켜 뇌내로 삽입하여 CA1 pyramidal cell 층까지 위치시켰는데 위쪽 wire는 CA1 층에, 그리고 아래쪽 wire는 hippocampal fissure와 hilus에 각각 위치하도록 하였다. 이러한 위치 선정을 위해서 맞교차입력을 자극하면서 세포외전극을 통하여 pyramidal cell 층의 유발전위인 population spike (폭:10ms)의 존재를 확인하였다. 세포외 전위는 HS-2A HEADSTAGE(gain:×1LU) preamplifier (axon사)를 이용하여 증폭 한후 cyberamp 320 (axon사)에서 후증폭을 하고 이 신호를 각각 oscilloscope 및 AD 변환기 (digidata 1200, axon사)로 보내었다. digital화 된 신호는 컴퓨터로 보내어 프로그램 (AxoScope, Axon사)을 운용하여 on-line 및 off-line으로 data를 분석하였다. 세포내 기록을 위해 전해질이 채워진 glass capillary 전극을 뇌실질내로 삽입하였다.

미세전극준비 및 반응 monitoring : 세포내 전극으로서 capillary glass(직경:2mm, 길이:6in, WPI회사제품)를 pulling한 후 1M potassium acetate 및 2.5% Neurobiotin으로 채웠다. in vivo electrode impedance는 60 - 100 M $\Omega$ 이 되게 하였고 일단 안정된 세포내 기록이 얻어지면 세포의 전기 생리적 반응(evoked-, passive)을 관찰하였다. 세포외 전극을 통하여 field activity를 기록하고 1Hz 및 5kHz로 filter하며, Axoscope(software)를 이용하여 monitoring하면서, 자발적으로 나타나거나 혹은 꼬리를 자극함으로써 나타나는 theta wave는 epoch (5초-1분)로서 capture하였다. Amplifier (Axoclamp-2B, Axon사)를 통하여 들어온 세포내 신호는 DC signal로 digitize한후 증폭 (5X) 및 filtering (0.1 Hz - 5kHz) 과정을 거친다. 증폭된 세포내 활성도 및 세포외 field/unit는 10 Hz로 숫자화 한후 Syquest disk에 저장하였다.

세포내 neurobiotin 주입 : bridge circuit를 사용

하여(Axoclamp 2B) 1-4nA의 depolarizing pulse를 500ms duration, 1Hz로 30-60분간 가하여 1M potassium acetate에 용해되어있는 2.5% neurobiotin (Neurobiotin™ Tracer, N-(2-aminoethyl) biotinamide hydrochloride, Vector사)을 세포내로 주입하였다.

Tissue preparation 및 histochemistry : 400ml의 4% paraformaldehyde, 0.2% glutaldehyde가 용해된 PBS(pH=7.3)를 심장을 통하여 관류시킨 후, 뇌를 떼어내어 같은 성분의 고정액(4°C)에 24시간 이상 담구어 2차 고정하였다. 100µm 두께로 coronal section한 후 Triton-X100(0.5% in NaPB) 처리와 VECTASTAIN® ABC kit(희석 1:100 in TBS)에 2시간 이상 incubation 과정을 거쳐 diaminobenzidine(DAB, 0.05%)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1% in TBS)에 반응시켰다. 염색된 세포의 dendrite는 camera lucida를 이용하여 reconstruction하였다.

cell hunting 및 holding : 세포 hunting시 neurobiotin이 채워진 glass capillary전극을 통해 bridge circuit(Axoclamp 2B)의 step command -0.3nA hyperpolarizing pulse(100ms)를 1Hz로 가하면서 microcontroller(Burleigh사)로 2µm씩 전진시키면서 전류의 흐름을 관찰하였다. 세포막 전위는 항상 기준선(0.0mV)에 맞춘 뒤 세포 hunting을 시작하였다. 세포를 holding하기 위해서는 computer와 oscilloscope의 monitor에 나타나는 signal을 보며 세포막에 전극이 접촉된 순간에 Axoclamp 2B 부속품인 Remote Buzz를 사용하여 세포막을 뚫어 그 상태로 유지하였다. 세포를 잡은 상태에서는 bridge circuit를 off한 상태에서 DC current를 (-)로 흘려보내 세포 흥분을 안정시켜 휴지막 전위

(Resting Membrane Potential, RMP)상태로 되게 하였다.

### III. 결 과

세포내 전기 신호 전체의 background에서 자발적 활동전위(action potential, AP)가 발생하여 리드믹한 파형을 형성하는 경우에는 CA1 pyramidal 층에서 기록한 세포의 theta리듬과 그 파형을 동시에 비교하였는데 세포의 theta 파의 negative peak에 세포내 AP발화가 위상 일치되는 경향이 있었다. 그러나 세포의 theta파가 발생되지 않은 조건에서는 세포내 AP 발화와 위상일치가 나타나지 않았다. 이러한 세포내 AP 발화가 theta 파형을 형성하는 여부는 세포막 전위로서 조절할 수 없었고 신경세포의 조건과도 관계가 없었다. 다만 이들 파의 크기와 위상 변이는 신경세포의 분극 수준에 상당히 의존적이었다. 전형적인 pyramidal neuron에서 기록된 반응은 그림 1과 같다. 세포막 전위가 일정한 폭으로 진동을 나타내었는데 항상 세포외부 theta 파형의 rhythmicity에 비하여 규칙성이 저하된 상태를 보여 주었다. Tail pinching등과 같은 인위적인 외부 자극으로 theta 파를 유발시키면 신경세포는 과분극이 되고 이에 따라 세포내 oscillation은 AP를 생성시키는 탈분극 수준에 거의 도달하지 않는다. 세포 외부 theta 파형이 나타나지 않은 조건에서 pyramidal cell을 지속적인 탈분극 또는 과분극을 시켰으나 세포막전위가 theta frequency의 rhythmic oscillation 형태로 변화되지 않았다. 그러나 alpha 및 beta 파와 같은 12-30 Hz의 rhythmic oscillation이 종종 관

Table 1. Membrane properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons.

Characteristics	Mean	S.E.	Range	n
Resting membrane potential(mV)	66.63	2.88	61.0, 81.0	8
Action potential amplitude(mV)	67.50	1.82	55.0, 70.0	8
Input resistance(MΩ)	26.70	8.30	14.3, 42.5	3
Time Constant(msec)	32.00	16.09	13.0, 64.0	3
Number of action potentials per current pulse	17.00	1.00	15.0, 18.0	6
Afterhyperpolarization amplitude burst(mV, positive cell only)	5.17	1.03	3.1, 6.2	3
Afterhyperpolarization duration burst(msec, positive cell only)	125.70	25.00	77.0, 160.0	3

찰되었다.

IPSP 반응은 시간적으로 더욱 세분화할 수 있어서 외부 전기 자극 강도를 200-400 $\mu$ A 크기로 가하면 IPSP 반응을 초기 및 후기 반응으로 구분할 수 있었고 또한 이러한 IPSP가 나타나는 기간과 크기는 자극의 강도와 연관이 있음을 확인하였는데 초기 IPSP는 비교적 적은 자극 강도에서도 최대치를 보였으나 후기 IPSP는 높은 자극 강도에서만 확연히 보였다 (Fig. 2, A). 한편 단세포에서 일어나는 현상과 다세포 집단에서 일어나는 현상을 언제나 외삽으로 상관 관계를 추정 가능한 것은 아니다. 즉 단일 pyramidal cell에서 일어나는 세포 전위 변화가 stratum pyramidale 층에서 측정된 세포외부 전위 변화를 정확히 유추하거나 또는 그 역순으로 유추하는 것이 실험적으로 증명되어야 한다고 본다. 이러한 가정하에서 본 실험에서는 일정한 자극에 의하여 CA1영역에서 발생하는 evoked 필드 반응과 세포내 반응을 동시에 기록하였다. CA1 pyramidal cell의 IPSP의 onset는 dentate gyrus에서 volume-conduction되어 나타나는 population spike와 시간적으로 거의 일치하여 나타났고 population spike (Fig. 2, B)를 야기시키는 크기의 자극을 가하면 EPSP에 연이어 과분극 전

위가 나타나고 그 출현 시기에 따라 초기 및 후기 과분극으로 구분할 수 있었다.

Holding한 세포에 일정한 시간 간격 (2-3Hz)으로 다양한 크기 및 duration (+0.4 - +1.4nA, 400ms)의 탈분극 전류를 미세 전극을 통하여 흘려 보내면 전류가 가해지는 동안 고빈도의 반복적 발화 양상을 보여 주었다. 그 발화 양태는 탈분극 전류가 가해지는 기간의 후반부로 갈수록 AP들 사이의 시간 간격이 커지는 현상인 발화 빈도 적응 (AP accommodation, spike frequency adaptation)이 나타났다(Fig. 3, A). 이러한 spike frequency의 percentage 변화를 다음과 같이 측정하였다. 즉 % of control = (ffinal/finitial) x 100, 여기서 ffinal과 finitial은 각각 마지막 및 처음의 interspike interval (ISI)이다. 이러한 spike frequency는 본 실험에서 가해진 전류의 크기에 따라 9.6 - 20.4 % 범위에서 나타났고 처음의 ISI에 대한 f-I curve의 기울기는 53.4 Hz/nA였다 (Fig. 3, B).

본 실험에서 측정된 신경세포는 CA1 영역의 stratum pyramidale 층에 한정하여 hunting된 것으로서 피질 표면으로부터의 깊이 (1800 - 2000 $\mu$ m)와 neurobiotin 염색법으로 확인하였다. 그리고 해마내에서 다른 종류의 신경세포와의 위치 상관

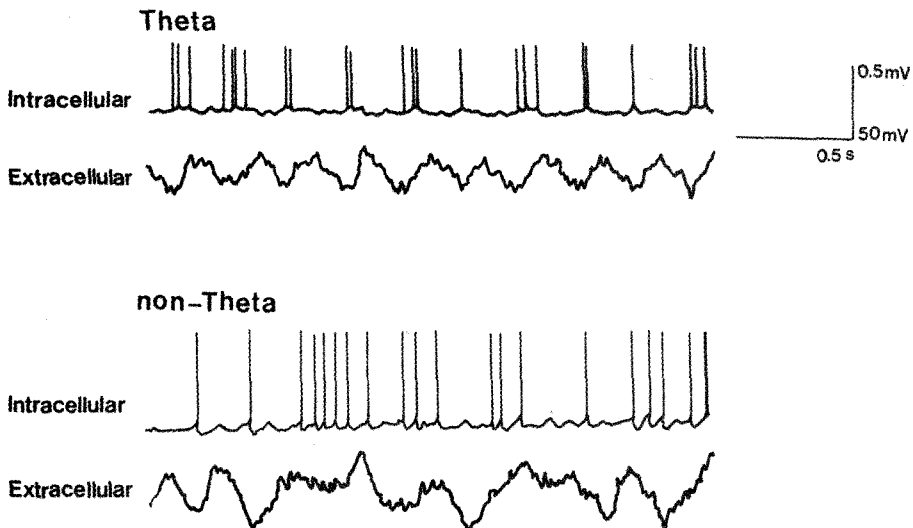


Fig. 1. Simultaneous recording of intracellular activity of pyramidal cell and extracellular activity in the CA1 pyramidal layer during theta activity (theta, above) and its absence (non-theta, below).

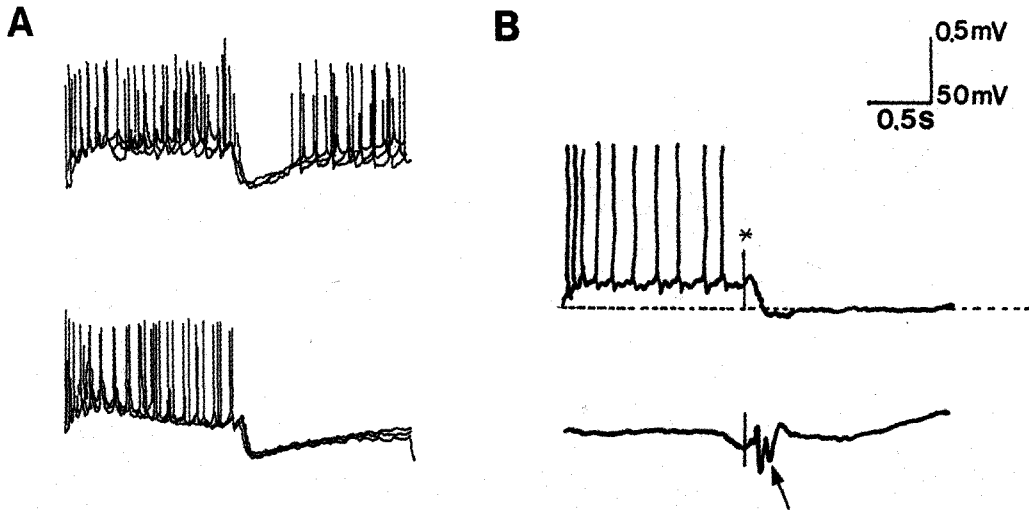


Fig. 2. Evoked response properties of identified pyramidal cells. (A) Three superimposed responses to increasing stimulation intensities of the commissural input (200 and 300  $\mu$ A) in CA1 cell. (B) Evoked field response recorded by an extracellular electrode in the CA1 pyramidal layer (below) and an intracellular response (above).

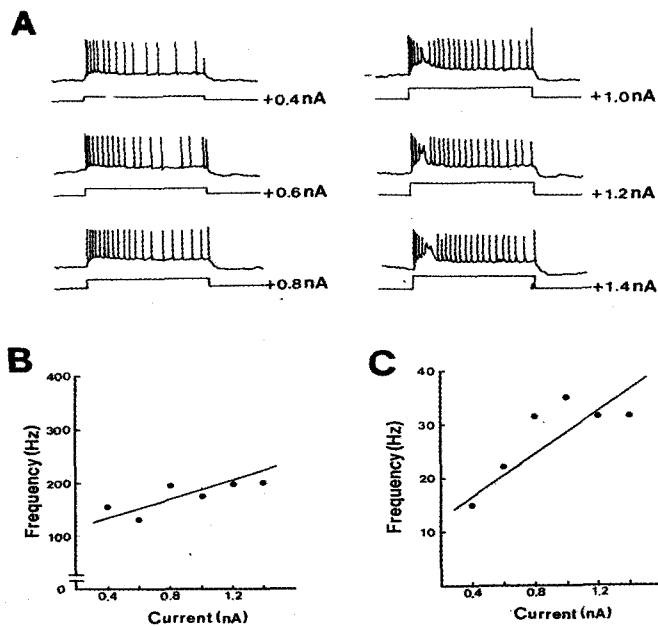


Fig. 3. Repetitive firing of pyramidal cells in CA1. (A) Pyramidal cell responses to depolarizing current pulses of increasing intensity (0.4-1.4 nA ; membrane potential -66mV). Note the progressive lengthening of the ISI during these responses. Graph of frequency of firing as a function of injected current ( $f-1$ ) for the first ISI (B) and for the last ISI (C) during the pulse (ISI last) with their respective linear equations.

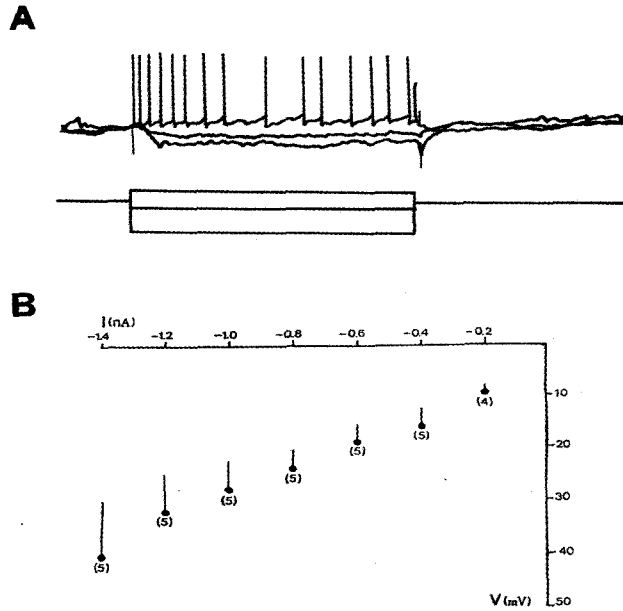


Fig. 4. V-I relation in pyramidal neuron. (A) Response of the neuron to depolarizing (0.4 nA) and hyperpolarizing (-0.2 and -1.4 nA) current steps. (B) Current-voltage curve from the responses of neuronal cells in (A).

관계를 고려해 볼 때 본 실험에서 주로 hunting된 세포는 pyramidal cell이었다. Pyramidal cell임을 확인한 또다른 근거는 다음과 같은 전기 생리적 특성을 나타내는 것이었다. 자발적인 발화 활성도는 미약했으며 AP 크기는  $67.5 \pm 1.8$  mV이었고 자발적 활동전위후 연속되어 나타나는 afterhyperpolarization (AHP)의 duration 및 크기는 각각  $125.7 \pm 25.0$  msec 및  $5.2 \pm 1.0$  mV 이었고 spike의 형태적 특성으로 pronounced spike를 보였으며 세포내로 탈분극을 야기하는 전류를 보내면 지속적이며 높은 빈도의 발화 반응을 나타내었다. Input resistance ( $R_{in}$ )는 26.7 megaohm 범위였다. 본 실험에서 기록된 또다른 세포막 특성은 표 1과 같다. 평균 RMP ( $\pm$ SEM)는  $66.6 (\pm 2.9)$  mV이었다. 과분극을 유발하는 전류 pulse를 가하였을 때 time constant 값은  $32.0 \pm 16.1$  msec이었고  $R_{in}$ 은 비교적 높은 값을 나타내었는데 이는 holding한 세포가 건강한 상태임을 의미한다. 이 세포에서 일정한 기간 탈분극 전류를 세포내로 가하면 연속적인 spike가 발생한 직후 짧은 duration을 가지는 afterhyperpolarization (AHP)이 나타나는데 그 am-

plitude는  $5.2 \pm 1.0$  mV 였다.

Fig. 4는 일련의 과분극 전류를 세포내로 주입하였을 때 나타나는 전위의 변화를 비교한 것으로서 다양한 크기 (+0.4에서 -1.4 nA까지)의 전류를 가하였던 바 전 범위에 걸쳐서 세포막 전위는 완만하고 지수적 (exponential)으로 변화되어 최고 값에 도달하였다. RMP 상태에서  $R_{in}$  값은 큰 변화가 없었으며 I-V curve에서 표시한 바와 같다.

Fig. 5는 휴지전위에서 commissural stimulation에 의해서 유발되는 시냅스 전위로서 다단계의 위상을 보여 주었는데 처음에는 EPSP를 나타내었고 연이어 IPSP가 나타났으나 자발적인 시냅스 활성화는 유의하게 관찰되지 않았다. EPSP의 voltage-sensitive component가 NMDA 수용체를 매개로 하여 pyramidal cell의 bursting activity에 기여하고 있다고 알려져 있는 바(Lacaille등, 1993) 이를 확인하기 위하여 EPSP의 전위 민감성 (voltage sensitivity)에 대해 실험을 행하였다. 세포막 전위를 -53에서 -81mV까지 다단계로 과분극시키면 자극에 의한 EPSP의 크기가 증가되었다. 탈분극 전위에서 commissural stimulation에 의하여 나타나는

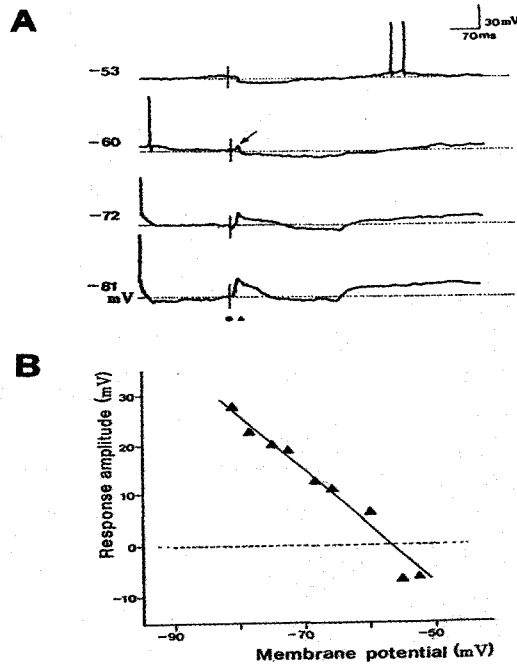


Fig. 5. Intracellular responses of CA1 pyramidal neuron to stimulation of the commissural path *in vivo*. (A) Both an early IPSP and EPSP (arrow) were evoked by single pulses (dot). (B) Current versus voltage plot of the evoked response amplitude at a latency indicated by the triangle in (A).

EPSP는 short duration을 가지며 과분극 전위에서는 동일한 자극에 의하여 더 큰 amplitude 및 더 긴 duration을 가지는 EPSP가 기록되었다. 여기서 탈분극 전위에서 나타난 EPSP와 과분극상태에서 나타난 EPSP의 차이는 negative voltage-sensitive component를 보여 주었다. IPSP를 유발하는데 관여하는 이온을 추정하기 위해서 일정한 자극에 의하여 발생하는 유발 반응의 크기를 전류 대 전위 관계로 측정 계산하였다. IPSP 반응은 짧은 latency를 가지며 극성의 반전이 -57 mV에서 이루어지고 있으므로 염소 이온의 평형전위 수준에 근사한 것으로 추정되었다 (Fig. 5, B).

#### IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 theta파가 발생하는 데에는 세포막 전위의 변화가 선행되거나 일치되어야 할 것으로 생각되어 세포의 전위 및 세포내 전위 변화를 동시 비교하였다. 실험 결과 theta activity 동

안에 pyramidal cell의 AP이 세포의 theta 리듬과 일치하여 발생하였는데 다른 실험보고에 의하면 세포막 전위 자체도 rhythmic oscillation 현상을 보이며 이 현상을 유발하는데 somatic 및 perisomatic inhibition이 관여하고 있다고 한다<sup>7,18)</sup>. 그러나 세포막 전위의 oscillation은 항상 세포의 theta의 rhythmicity에 비하여 규칙성이 저하되어 있었다. 본 실험에서 세포내 theta oscillation의 여러 가지 변수중 frequency가 amplitude 및 phase와는 대조적으로 전위 의존적이지 않은 결과가 나타났는데 이로 미루어 network로부터 rhythmic synaptic input가 theta oscillation의 주된 driving force임을 알 수 있으나 역으로 생각하면 theta wave는 세포가 본래 가지고 있는 전위 의존성 전류가 상호 작용하여 리드믹하게 생성되는 것이 아님을 알 수 있다. 그러나 본 실험의 다른 결과에서는 해마의 주 세포 자체가 지속적으로 oscillation하는 내인성 전류를 가지고 있기 때문에 이 세포가 적절한 막전위범위를 유지할 수 있고 그 전류로서 high-



threshold calcium current를 고려할 수 있었으나 이를 확인하는 데에는 theta rhythm 및 본 실험에서 추정된 high-threshold spike가 서로 상호 작용한다는 실험적 증거가 향후 필요할 것이다. Buzsaki 및 Chrobak<sup>19)</sup>에 의하면 신경 정보의 표현은 신경 시스템의 구성요소들간의 상호 협동적인 관계로 이루어지며 특히 감각 정보의 처리와 관련하여 인지의 결합(binding) 및 분할(segmentation)은 상관된 신경세포들 간의 시간적 관련성에 암호화되어 있다고 한다. 이러한 상호 작동성은 리드막하면서 단속적인 진동(oscillation)으로 이루어진다. 본 연구에서는 이러한 신경망 진동을 야기하는 해마의 주신경 및 억제성 신경망의 기능 및 그 의의를 밝히고자 하였다. Buzsaki 및 Chrobak<sup>19)</sup>은 GABA성 신경세포의 초신경망설을 제안하였다. 이들의 가설에 의하면 초신경망은 전두골 전 영역에 걸쳐서 pyramidal cell의 다수 집단을 동시에 작동시킨다고 하며 기본 개념은 개재성 신경세포망이 주세포에 진동성 시냅스 입력을 제공하여 주세포의 세포막 전위를 threshold에 가까이 주기적으로 변동시킨다는 것이다. 또한 주세포의 세포막 전위가 주기적으로 변화하게 되면 일련의 전위 전도도 발생을 유도한다는 것이다. 이와 같은 개재성 신경세포 및 주신경세포의 조합시스템에서는 개재신경세포가 주신경세포의 시간적으로 정확한 활동성 전위 생성을 가능하도록 해주며 이들 서로 다른 신경세포의 활동성 전위의 시간적 연속성에 정보가 포함되어 있음을 알 수 있다. 두개 이상의 서로 다른 주기를 가진 진동(예: theta 및 gamma)이 동시에 발생할 수 있고 서로 다른 정보의 표현은 서로 다른 주기를 의미할 수도 있다. 이러한 활동성 전위의 상대적인 시간성 뿐 아니라 주세포의 발화 속도에도 부가적인 정보가 포함되어 있을 수가 있다.

해마에서는 CA1영역의 stratum lacunosum-moleculare에 있는 개재뉴런이 low-threshold calcium spike를 가지고 있어서 이들 세포가 theta 범위의 진동을 할 수 있다고 하였다<sup>20)</sup>. 또한 population synchrony를 유지하는데 관계하는 개재성 뉴런의 신경망이 약리학적으로 분리되었는데 GABAa 시냅스 혹은 gap junction을 통하여 이루어 질 수 있다고 하였다<sup>21)</sup>. 동기화된 진동은 pyramidal cell의

국소 신경망에서 시간적 구조를 제공할 뿐 아니라 해부학적으로 분산되어 있는 신경 세포 집단이 상호 작용할 수 있도록 해준다. 즉 gamma 진동이 해마의 각 영역, dentate gyrus, CA3, 및 CA1 영역에서 독립적으로 발생할 수 있다.

그런데 중요한점중 한가지는 비집중상태인 수면동안 신경집합의 시간적-공간적 일치성이 각성상태의 뇌 보다 더욱 높다는 것이다. 이러한 조화된 집단 발화가 hippocampal formation에서는 5-15개의 sinusoid 파가 합쳐진 ripple (200Hz)이 거시적인 sharp wave와 함께 나타나며 이러한 pyramidal cell의 200 Hz의 일시적인 신경망 진동은 sharp wave에 포개져 나타나는데 basket cell 및 chandelier 세포의 전위 의존적인 속성 진동 때문이라는 가설<sup>22)</sup>이 있다. 이는 개재뉴런이 200 Hz 리듬을 유지 할 수 있는 반면에 pyramidal cell은 이와 같은 능력을 보유하고 있지 않다는 점 때문인 것으로 생각된다. 이러한 고속 진동성 억제는 pyramidal cell 집단 양태에 두 가지 결과를 나타낸다고 한다. 우선 세포체 및 axon initial segment 세포막의 억제는 CA1 pyramidal cell의 발화 강화를 연장시키는 효과를 가지고 있으며 또한 pyramidal cell이 연속적으로 발화할수 있는 time-window를 제공해준다. 그리고 regenerative burst동안 sodium spike의 발생시간을 효율적으로 맞추어 줄 수 있으므로 결과적으로 공간적으로 격리되어 있는 pyramidal cell 사이에서 3ms 미만의 간격으로 세포들이 활동 전위를 발생할 수 있게 해준다는 것이다<sup>7)</sup>.

Sharp wave에 포개져 있는 200Hz 진동의 매 5ms 파에는 수천 개의 pyramidal cell이 위상 일치되어 발화된 결과가 담겨져 있다. 그런데 이 현상은 해마 정보처리를 신경질로 출력하는 중계지역인 subicular cortex 및 entorhinal cortex의 심부에서도 동시에 일어난다는 보고<sup>23)</sup>와 관련 지워 생각해 야 한다. 지금까지 제시된 가설중 가장 최근의 것으로 population burst내의 spike의 시간적 순서는 신경망의 최근 경험에 의해 결정된다는 가설이 보고되어 있다<sup>18)</sup>.

본 실험에서는 해마의 CA 영역에 존재하는 pyramidal cell에 대하여 세포내 전위변화를 기록하여 안정된 세포내 기록 결과를 얻었다. 그리고

형태적으로 해마의 주세포로 판명된 세포는 모두 유사한 전기 생리적 특징을 나타내고 있었으며 형태적 및 생리적 기준에서 고려할 때 모든 세포가 동질의 세포상을 보였다. 이들 세포가 가진 생리적 특성은 동일 영역의 interneuron 또는 O/A interneuron의 특성과는 차이가 있었다. 세포막 특성 면에서 L/M interneuron과 다른 점은 본 실험에서 holding된 pyramidal cell의 경우 낮은 input resistance (26 Mohm)를 가졌고 활동전위 발생 직후 depolarizing afterpotential이 나타났으며 (L/M interneuron의 경우는 저명한 afterhyperpolarization이 나타남), 휴지전위에서 탈분극 전류를 가하여 AP를 유발시켰을 경우 frequency accommodation이 나타났다는 것이다. holding한 세포내로 음극 전류를 가하여 세포막 전위를 과분극 전위로 형성한 후 다시 휴지 전위 수준으로 세포막 전위가 회복될 때 활동전위 혹은 sub-threshold depolarization 형태의 anodal break excitation이 나타나며 그 기전은 low-threshold calcium spike로서 설명하고 있으나<sup>24)</sup> 본 실험에서는 이러한 anodal break excitation이 나타나지 않았다. 세포에 탈분극 전류를 흘려 보내면 세포가 발화하게 되고 그 양태는 세포의 막전위 수준에 따라서 달라진다고 알려져 있다. Lacaille등<sup>25)</sup>은 일정한 크기의 탈분극 전류에 대하여 sustained 및 burst의 두 가지 종류의 AP 생성 형태가 있고 sustained형보다는 burst형에서 더 많은 AP가 유발한다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 sustained형의 발화 양태만 관찰되었다.

흥분성 경로를 자극함에 따라 유발되는 pyramidal cell의 세포막 전위 변화는 다른 세포의 그것과 차이가 있었다. 흥분성 경로중 본 실험에서는 commissural afferent를 택하여 전기 자극하였던 바 pyramidal cell에서 짧은 지연후 세포막 전위 변화가 기시되었으므로 이는 흥분성 경로 자극으로 인해 pyramidal cell 전위 변화가 나타나는 데 관여하는 세포들 사이에서 그 시냅스 양태가 polysynaptic이 아닌 monosynaptic임을 의미한다고 여겨진다. 또다른 synaptic response의 차이는 IPSP의 양상에서 찾아 볼 수 있다. 해마의 granular cell 층에 인접한 interneuron을 대상으로 한 실험보고<sup>9)</sup>에 의하면 perforant path 자극시 IPSP에 연이어 EPSP가 나타난다고 하였다. 그러나 본 실험의 pyramidal cell에서는 이들 interneuron과는 역순의 양상인 EPSP에 연이어 IPSP가 나타났다. 그러나 이들의 실험은 본 실험과는 달리 해마 slice를 사용하였으므로 인접 흥분성 혹은 억제성 입력이 절단되어 본 실험과는 상반된 결과를 나타낼 가능성도 배제할 수 없다.

본 실험의 결과, pyramidal cell의 긴 time constant값과 Rin 값으로 미루어 볼 때 이러한 특성들은 이들 세포의 다양한 정보처리 능력을 설명해 줄 수 있는 요인이 될 수 있을 것이다.

탈분극 반응을 유발하는 근원에 대한 의문점을 설명하기 위해 본 실험에서 IPSP에 대한 reversal potential이 되도록 세포막을 과분극하였을 때 연이어 유발되었던 EPSP가 소실되었다는 실험 결과로서 이 탈분극이 synaptic origin이 아닌 것으로 인정되었다. 따라서 이러한 탈분극을 유발하는 기전으로서 synaptic origin을 제외하고 추정할 수 있는 것은 membrane conductance의 변화이다. 즉 IP-SP 동안 intrinsic membrane conductance가 활성화되어 탈분극 oscillation이 유발될 것으로 생각되며 아마도 이러한 membrane conductance는 anodal break excitation을 형성하는 그것과 동일하고 과분극 전류를 가할 때 발생하는 membrane rectification과도 유사할 것으로 믿어진다.

본 실험의 결과, pyramidal cell의 긴 time constant값과 Rin 값으로 미루어 볼 때 이러한 특성들은 이들 세포의 다양한 정보처리 능력을 설명해 줄 수 있는 요인이 될 수 있을 것이다.

## V. 결 론

세포내로 측정된 해마 주세포의 발화 pattern과 세포외부로 측정된 network pattern과의 관계를 밝히기 위해 주위 세포들과 완전한 상태로 신경망이 보존된 in vivo 연구모형을 사용하여 해마의 CA1영역에 존재하는 pyramidal cell을 holding하고 신경생리학적 변수를 측정된 후 neurobiotin을 채워서 형태학적 추적을 하였다.

1. 세포의 theta파의 negative peak에 세포내 AP발화가 위상 일치되는 경향이 있었으나 세포의 theta파가 발생되지 않은 조건에서는 세포내 AP발화가 theta 파형을 형성하는 여부는 세포막 전위로서 조절할 수 없었고 신경세포의 조건과도 관계가 없었다.
2. Frequency-current relation은 53.4 Hz/nA 및 15.9

Hz/nA (first ISI 및 last ISI)로서 spike frequency의 적응현상이 뚜렷이 나타났다.

3. 단일 action potential후 AHP가 나타났으며 대부분의 세포에서 자발적 발화 양태가 미약했다.
4. 세포내 반응의 특징으로 높은 휴지기 세포막 전위, 낮은 input resistance, 그리고 큰 action potential을 가졌다.
5. Commissural afferent 자극으로 pyramidal cell의 전위가 변화되었으며 전형적인 EPSP 및 IPSP 반응을 나타내었다.

이상의 본 연구 결과로서 해마의 기능적 특이성에 대한 형상화 기전을 미루어 보면 우선 Schaffer collateral-commissural pathway 자극에 의하여 시냅스 후 반응이 야기되어 pyramidal cell 및 interneuron이 활성화될 것으로 사료되며 이중 억제성 interneuron은 활성화된 pyramidal cell의 population size를 한정함으로써 hippocampal cell들의 공간적 발화양태가 다양하게 될 것으로 믿어진다.

### 참 고 문 헌

1. Buzsaki G : Hippocampal sharp waves : Their origin and significance, Brain Res 398:242-252, 1986.
2. O'Keefe J, Nadel L : The hippocampus as a cognitive map, Clarendon, Oxford, 1978.
3. Bland BH : Physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms, Prog Neurobiol 26:1-54, 1990.
4. Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, et al. : Dentate spikes: Interneuronal population bursts in the hippocampal hilar region of the awake rat, J Neurophysiol 73:4, 1995.
5. Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, et al. : Gamma (40-100Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat, J Neurosci 15:47-60, 1995.
6. Buzsaki G, Leung LS, Vanderwolf CH : Cellular basis of hippocampal EEG in the behaving rat, Brain Res Rev 6:139-171, 1983.
7. Ylinen A, Soltesz I, Bragin A, et al. :

Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells and basket cells, Hippocampus 5:78-90, 1995.

8. Grastyan E, Lissak K, Madarasz I, et al. : The hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes, Electroenceph clin Neurophysiol 11:409-430, 1959.
9. Soltesz I, Deschenes M : Low and high-frequency membrane potential oscillations during theta activity in CA1 and CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus under ketamine-xylazine anesthesia, J Neurophysiol 70:97-116, 1993.
10. Konopacki J, Bland BB, Colom LV, Oddie SD : In vivo intracellular correlates of hippocampal formation theta-on and theta-off cells, Brain Res 586:247-255, 1992.
11. Gulyas AI, Miles R, Sik A, et al. : Hippocampal inhibitory cells excite inhibitory neurons through a single release site, Nature 366:683-687, 1993b.
12. Buhl EH, Halasy K, Somogyi P : Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites, Nature 369:823-828, 1994.
13. Nicoll RA : Cajal's rational psychology, Nature 368:808-809, 1994.
14. Han Z-S, Buhl EH, Lorinczi Z, Somogyi P : A high degree of spacial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus, Eur J Neurosci 5:395-410, 1993.
15. Gulyas AI, Miles R, Hajos N, Freund TF : Precision and variability in postsynaptic target selection of hippocampal nonpyramidal cells, Eur J Neurosci 5:1729-1751, 1993a.
16. Miettinen R, Gulyas AI, Bairbridge KG, et al. : Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus: II. Coexistence with other calcium binding proteins and GABA, Neuroscience 48:29-43, 1992.

17. Miles R, Toth K, Gulyas AI, et al. : Distinct functional roles for somatic and dendritic inhibition in hippocampus. *Neuron* 16:4, 1996.
18. Wilson MA, McNaughton BL : Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265:676-679, 1994.
19. Buzsaki G, Chrobak J : Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles : a role for interneuronal networks. *Current Opinion in Neurobiology* 5:504-510, 1995.
20. Fraser DD, MacVicar BA : Low-threshold transient calcium current in rat hippocampal lacunosum-moleculare interneurons: kinetics and modulations by neurotransmitters. *J Neurosci* 11:2812-2820, 1991.
21. Michelson HB, Wong RKS : Synchronization of inhibitory neurons in the guinea-pig hippocampus in vitro. *J Physiol(Lond)* 477:35-45, 1994.
22. Buzsaki G, Horvath Z, Urioste R, et al. : High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* 256:1025-1027, 1992.
23. Chrobak JJ, Buzsaki G : Selective activation of deep layer(V-VI) retrohippocampal cortical neurons during hippocampal sharp waves in the behaving rat. *J Neurosci* 14:6160-6170, 1994.
24. Lacaille JC : Postsynaptic potentials mediated by excitatory and inhibitory amino acids in interneurons of stratum pyramidale of the CA1 region of rat hippocampal slices in vitro. *J Neurobiology* 66: 1441-1454, 1991.
25. Lacaille, JC, Schwartzkroin PA : Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. Intracellular response characteristics, synaptic responses, and morphology. *J Neuroscience* 8:1400-1410, 1988.