

## Roles of Metabotropic Glutamate Receptors 1 and 5 in Rat Medial Vestibular Nucleus Neurons

Hae In Lee, Sung Hyo Lee, and Sang Woo Chun\*

Dept. of Oral Physiology, College of Dentistry, Institute of Wonkwang Biomaterial and Implant, Wonkwang University, Iksan 570-749

(received March 18, 2011 ; revised April 19, 2011 ; accepted April 22, 2011)

Using whole cell current- and voltage-clamp recording we investigated the characteristics and pharmacology of group I metabotropic glutamate receptor (mGluR)-mediated responses in rat medial vestibular nucleus (MVN) neurons. In current clamp conditions, activation of mGluR I by application of the group I mGluR agonist (R,S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) induced a direct excitation of MVN neurons that is characterized by depolarization and increased spontaneous firing frequency. To identify which of mGluR subtypes are responsible for the various actions of DHPG in MVN, we used two subtype-selective antagonists. (S)-(+)-alpha-amino-a-methylbenzeneacetic acid (LY367385) is a potent competitive antagonist that is selective for mGluR1, whereas 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) is a potent noncompetitive antagonist that is selective for mGluR5. In voltage clamp conditions, DHPG application increased the frequency of spontaneous and miniature inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) but had no effect on amplitude distributions. Antagonism of the DHPG-induced increase of miniature IPSCs required the blockade of both mGluR1 and mGluR5. DHPG application induced an inward current, which can be enhanced under depolarized conditions. DHPG-induced current was blocked by LY367385, but not by MPEP. Both LY367385 and MPEP antagonized the DHPG-induced suppression of the calcium activated potassium current ( $I_{AHP}$ ). These data suggest that mGluR1 and mGluR5 have similar roles in the regulation of the excitability of MVN neurons, and show a little distinct. Furthermore, mGluR I, via pre- and postsynaptic actions, have the potential to modulate the functions of the MVN.

**Key words:** medial vestibular nucleus neurons, metabotropic glutamate receptor, LY367385, MPEP, patch clamp

### 서 론

중추신경계에서 대사성 glutamate 수용체 (metabotropic glutamate receptor; mGluR)의 활성화는 신경 흥분의 조절, 시냅스에서 전달물질의 분비, 시냅스 가소성(plasticity)등에서 다양한 조절작용을 가지고 있다(Conn & Pin, 1997; Anwyl, 1999). 대사성 glutamate 수용체는 G-단백질과 연결된 수용체로 아미노산 배열순서나 이차전달자 작용방식에 따라 세 군으로 분류한다. 즉, I군 수용체는 phospholipase C(PLC)를 이용하며 inositoltriphosphate(IP<sub>3</sub>) 합성을 조절하는데 mGluR1, 5가 해당되고, II군과 III군은 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate 전달계와 관련되는데 II군은 mGluR2, 3, III군은 mGluR4, 6, 7, 8이 속한다(Conn & Pin, 1997; Pin & Duvoisin, 1997).

I군 수용체의 활성화는 해마의 CA1 추체세포에서 탈분극과 활동전압의 빈도 증가 등 직접적인 흥분 효과를 일으키며(Mannaioni *et al.*, 1999), 이러한 효과는 칼슘활성화 양이온 전류의 활성화(Crepel *et al.*, 1994), 칼슘활성화 포타슘 전류 ( $I_{AHP}$ )의 억제(Charpak *et al.*, 1990), 유출전류의 억제(Guerineau *et al.*, 1994), 불활성화가 느린 전압 의존성 포타슘 전류의 억제(Luthi *et al.*, 1996) 등에 의한다. 또한 시냅스 전달에 대한 작용으로는 중간뉴론에 작용하여 세포체의 수용체를 활성화시켜 세포흥분성을 증가시키거나(Poncer *et al.*, 1995; Zhou & Hablitz, 1997) 축삭말단의 수용체에 작용하여 시냅스전 촉진작용이 있음이 보고되어 있다(Mannaioni *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2003).

전정신경핵에는 I군 수용체 중 mGluR1과 5, II군 수용

\*Corresponding author: Sang-Woo Chun, Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang University, 344-2, Shinyong-Dong, Iksan 570-749, Korea  
Tel.: 82-63-850-6932, E-mail: [physiol@wonkwang.ac.kr](mailto:physiol@wonkwang.ac.kr)

체인 mGluR2와 3, III군 수용체인 mGluR7의 존재가 확인되었다(Shigemoto *et al.*, 1992; Darlington & Smith, 1995; Horii *et al.*, 2001). mGluR1, 2 효현제인 ACPD 적용시 내측 전정핵 뉴런의 흥분발사율이 증가하였으며(Darlington & Smith, 1995), Grassi 등(2002)은 II군과 III군 수용체에 의해 long term potentiation(LTP)의 유발이 억제되는 반면 mGluR1에 의해서는 촉진됨을 보고하였고 Park 등(2003)은 1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid(ACPD)와 mGluR2, 3 효현제인 (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl)glycine(DCG-IV)가 억제성 시냅스의 축색말단에서 신경전달물질 분비를 시냅스전 억제 작용으로 감소시킴을 보고하였다.

최근 I군 수용체인 mGluR1과 mGluR5가 서로 다른 세포반응을 매개함이 알려졌다. 척수뉴런에서 mGluR5는 세포내 칼슘 농도를 변화시켰으나 mGluR1에 의해서는 변화가 없었으며(Kettunen *et al.*, 2002), 유출전류 차단에 의한 탈분극에는 mGluR1만이 관여하였다(Kettunen *et al.*, 2003). 또한 해마의 CA1 세포에서는 mGluR1에 의해서는 세포내 칼슘 농도의 변화를 유발하였고 mGluR5에 의해서는 칼슘활성화 포타슘 전류( $I_{AHP}$ )의 억제, NMDA 수용체 전류의 증가를 일으켰으며(Mannaioni *et al.*, 2001), 이러한 서로 다른 효과는 동물의 종에 따라 또는 세포의 종류에 따라 차이를 보이고 있다.

이전의 전정신경핵 뉴런을 이용한 연구에서 DHPG 처리에 의한 I군 대사성 glutamate 수용체의 활성이 내향성 전류를 발생시키고 억제성 시냅스후 전류를 증가시킴을 보고하였는데(Lee & Chun, 2009), 이러한 반응이 어느 subtype에 작용하여 발생하였는지는 아직 보고되지 않았다. 따라서 이 연구에서는 내측 전정핵에서 I군 대사성 글루탐산염 수용체의 역할을 구체적으로 확인하기 위하여 억제성 시냅스 전도, 유출전류, 칼슘활성화 포타슘 전류에 미치는 mGluR1과 mGluR5 길항제의 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 뇌절편 제작

생후 10-17일의 Sprague-Dawley 흰쥐를 암수 구별 없이 사용하였으며 이 연구는 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 얻었다. 흰쥐를 ether로 깊게 마취한 후 단두하여 소뇌와 뇌간부위를 적출하고 0-4°C의 저  $Na^+$  농도의 절단용액에 넣어 보관한 후 꺼내어 순간접착제(cyanoacrylate adhesive)를 이용하여 뇌조직을 고정시켰다. 95%  $O_2$ -5%  $CO_2$ 를 공급하면서 조직절편기(vibroslicer, Campden, 영국)를 이용하여 내측 전정신경핵 부위를 200  $\mu m$  두께로 관상면 절단하여 뇌절편을 만들었다. 뇌절편은 37°C의 인공 뇌척수액 용액에 1시간 정도 보관하였으며, 이후에는 실온에서 실험을 시행하였다. 기록은 뇌절편을 현미경

(BX50WI, Olympus, 일본) 위의 기록용기(1 ml)에 옮겨 시행하였고, 실험기간동안 계속해서 95%  $O_2$ -5%  $CO_2$ 가 포함된 용액을 관류펌프(Minipuls 3, Gilson, 프랑스)를 이용하여 관류시켰다(1-2 ml/min). 세포의 정확한 구분을 위하여 현미경에 differential interference contrast (DIC) 장치를 부착하였으며, 40배의 water immersion 대물렌즈로 세포를 확인하였다.

### 실험용액

뇌절편 제작에 사용했던 절단용액의 조성(mM)은 252 Sucrose, 2.5 KCl, 0.1  $CaCl_2$ , 2  $MgCl_2$ , 10 glucose, 26  $NaHCO_3$ , 1.25  $NaH_2PO_4$  등으로 구성되었으며, 시냅스 전류 기록을 위한 인공 뇌척수액은 124 NaCl, 5 KCl, 1.2  $KH_2PO_4$ , 1.3  $MgSO_4$ , 2.4  $CaCl_2$ , 10 glucose, 24  $NaHCO_3$  이었고, 95%  $O_2$ -5%  $CO_2$ 를 공급하여 pH를 7.4로 유지하였다. 자발적 억제성 시냅스후 전류 기록시 세포외용액에는 흥분성 시냅스 전류를 억제시키기 위하여 AMPA 수용체 차단제인 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) 20  $\mu M$ 과 ( $\pm$ )-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) 20  $\mu M$ 을 포함시켰으며, 미세 시냅스후 전류 기록시에는 TTX 0.5  $\mu M$ 을 추가 하였다. 세포내 용액은 140 KCl, 1  $MgCl_2$ , 0.1  $CaCl_2$ , 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2  $MgATP$ , 0.3  $NaGTP$ 를 사용하고, pH는 7.3으로 하였다. 비선택성 양이온 전류를 확인하기 위한 세포외용액은 100 NaCl, 3 KCl, 1.2  $KH_2PO_4$ , 1.3  $MgCl_2$ , 1  $CaCl_2$ , 10 glucose, 24  $NaHCO_3$ , 24 TEA-Cl 이었고, 세포내 용액은 140 CsCl, 5 EGTA, 5 HEPES, 1  $CaCl_2$ , 3  $MgATP$ 를 사용하였다. 실험에 사용한 AP5, DNQX, L-glutamic acid 등은 Sigma사(미국)에서 구입하였고, (2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxycyclopropyl) glycine (DCG-IV), (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG), (S)-(+)- $\alpha$ -amino-a-methylbenzeneacetic acid (LY367385), 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), tetrodotoxin(TTX)은 Tocris사(영국)에서 구입하여 사용하였다. 세포에 대한 실험용액의 적용은 중력을 이용한 관류장치를 이용하여 기록용기내 용액을 교환하였다.

### 전기생리학적 기록방법

미세 유리전극 제조기(PP-830, Narishige, 일본)와 microforge (MF-830, Narishige, 일본)를 이용하여 외경 1.5 mm의 연질 유리미세관(WPI, 미국)을 저항이 3-5  $M\Omega$ 이 되도록 기록전극을 제작하였다. 전극에 양압을 주면서 세포에 접근하여 내측 전정핵뉴런 세포막이 약간의 변형을 보일 때 음압을 가하여 giga ohm seal을 이루었다. 전류고정에 의한 자발성 활동전압과 막전압 측정, 막전압 고정에 의한 전류측정에는 Axopatch 200B 증폭기(Axon, 미국)를 사용하였고, 이 증폭기는 Digidata 1200B(Axon, 미국) AD변환기를 통하여 컴퓨터에 연결하였으며, pCLAMP software (version 9.0, Axon, 미국)를 사용하여 실험수행의 명령

과 얻어진 전기신호의 저장 및 분석에 이용하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

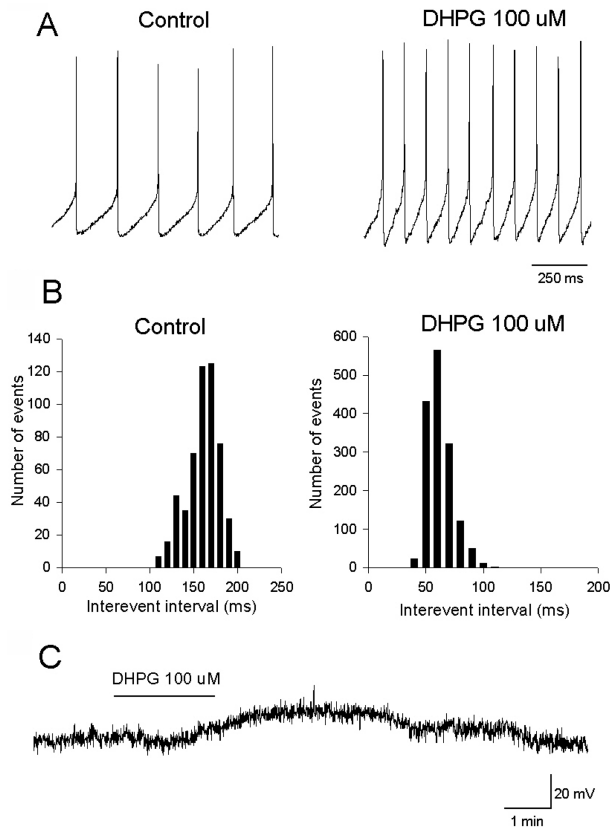
**실험자료의 분석**

자발적 활성화와 억제성 시냅스후 전류의 분석은 Mini Analysis program (version 6.0, Synaptosoft, 미국)을 이용하였고 막전류의 분석은 Clampfit(version 9.0, Axon, 미국)을 이용하였다. 시냅스 전류를 기저선과 분리하는데는 8-15 pA 이상의 크기를 기준으로 97% 이상의 전류가 포함되게 하였다. 모든 결과는 평균 ± 표준오차의 형식으로 표현하였으며, 대조군에 대한 약물효과의 비교는 Student t-test를 이용하였고,  $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

**결 과**

**I군 대사성 글루탐산염 수용체 효현제가 내측전정핵 뉴런의 자발활성에 미치는 영향**

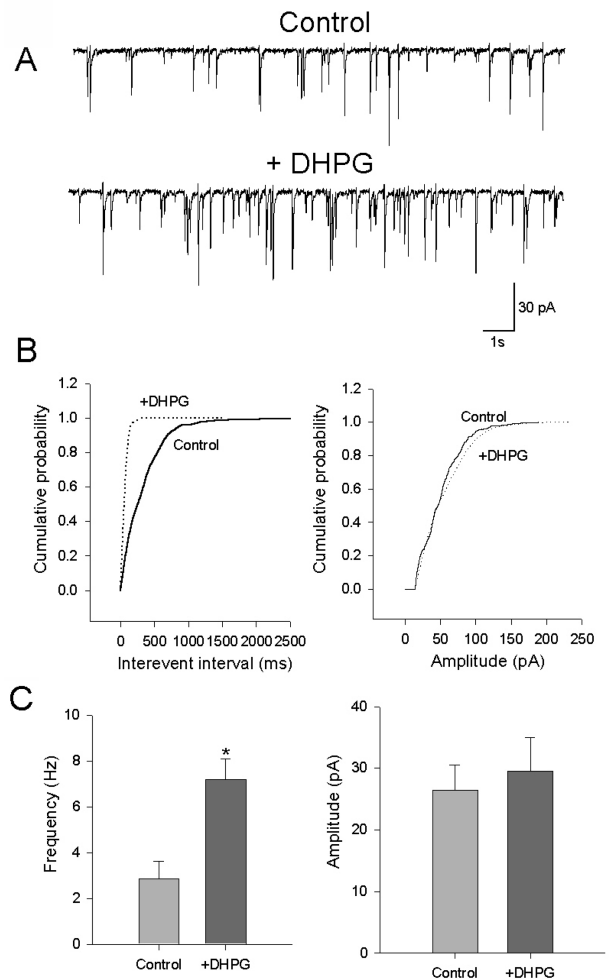
내측전정핵 뉴런의 자발활성을 기록하기 위하여 26개의



**Fig. 1.** Effects of Group I mGluR agonist DHPG on the spontaneous discharge and membrane potential of MVN neurons. (A) DHPG increased the spontaneous discharge of a MVN neuron. (B) Firing frequency histograms show that DHPG increased the spontaneous discharge rate. (C) In a TTX containing solution, DHPG depolarized membrane potential.

세포에서 전류 고정법(current clamp)으로 막전압을 기록하였다. 기록한 세포 중 4개의 세포에서는 안정막 전압이 일정하게 유지되며 자발적인 전기활성을 보이지 않았다. 나머지 22개의 세포에서는 자발적인 전기활성을 보였는데, 막전압은  $-47 \text{ mV} \sim -65 \text{ mV}$ 까지 다양하였고 자발적인 흥분성의 빈도는 초당  $6.4 \pm 0.7$ 회였다.

I군 대사성 글루탐산염 수용체 효현제인 DHPG( $100 \mu\text{M}$ )를 관류용액에 첨가시켰을 때 22개의 세포 중 19개의 세포에서(86%) 자발적 활성화의 빈도가 초당  $6.3 \pm 0.6$  회에서  $8.2 \pm 0.7$  회로 증가하였으며( $p < 0.05$ ) (Fig. 1), 나머지 3개의 세포에서는 유의성은 없었으나 약간 감소하였다. 빈도의 변화는 약물 주입 후 20초 - 1분 후부터 보이기 시작했으며 DHPG가 포함되지 않은 세포의 용액으로 재관류시켰을 때 자발활성의 빈도가 10분 - 30분 후 회복되었다. 세포의 용액에 TTX  $1 \mu\text{M}$ 을 추가하여 자발적인 활성을



**Fig. 2.** Effects of DHPG on spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs). (A) Current traces of sIPSCs show the effects of DHPG on the synaptic activity of a MVN neuron. (B) Cumulative fraction plot of sIPSCs interevent interval and amplitude. (C) DHPG significantly increased the average sIPSCs frequency. No significant effect on sIPSCs amplitude was observed.

억제시킨 후 DHPG를 처리 하였을 때 약물 주입 후 30 초 - 1분 후 막전압의 탈분극이 관찰되었고, 이는 약물이 포함되지 않은 용액으로 재관류시 원상태로 회복되었다 (n = 5, Fig. 1C).

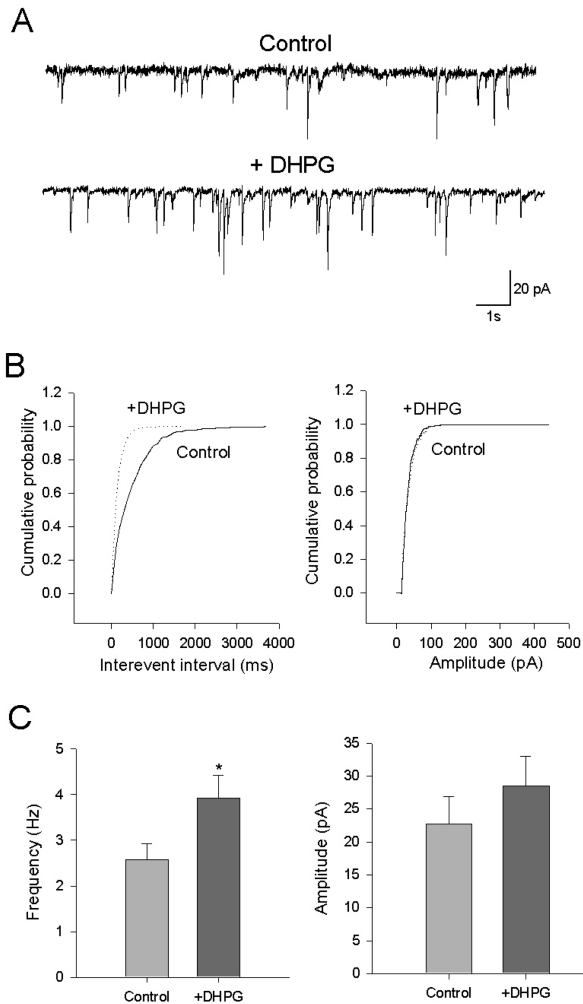
**억제성 미세시냅스후 전류(miniature postsynaptic current)에 대한 효과**

자발적 활성화에 증가효과를 보인 DHPG의 작용기전을 규명하고자 먼저 시냅스 전달에 대한 DHPG의 효과를 알아보았다. 내측전정핵의 시냅스 전달에는 non-NMDA, NMDA 수용체를 통한 흥분성 시냅스 전류보다는 GABA 수용체를 통한 억제성 시냅스 전류가 신경흥분성 조절에 더 우세하게 작용하고 있다고 보고 된 바 있어(Chun *et al.*, 2003a) 이 연구에서는 억제성 미세시냅스후 전류에 대한 DHPG의

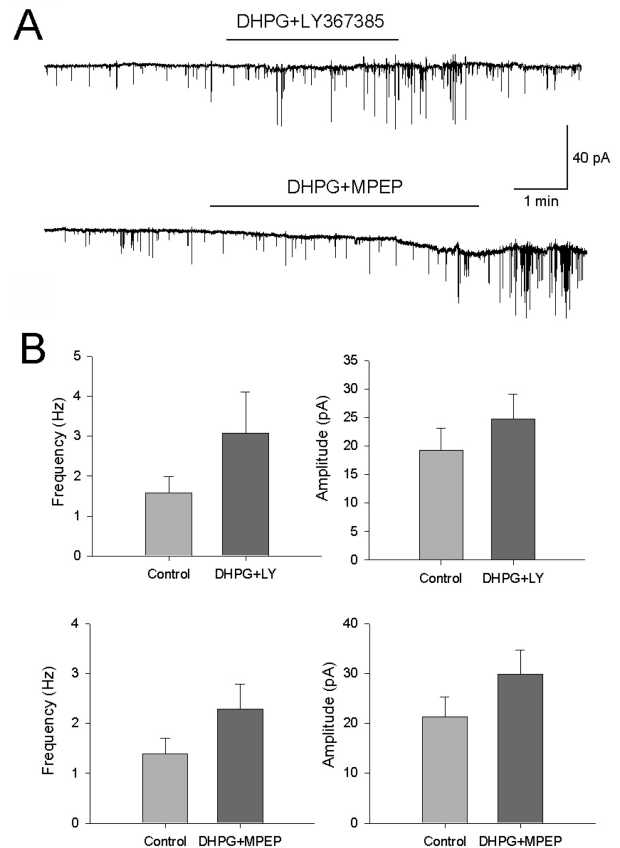
효과를 확인하였다. 억제성 시냅스후 전류를 기록하기 위하여 세포의 용액에 AMPA 수용체 길항제인 DNQX 20  $\mu$ M 과 NMDA 수용체 길항제인 AP5 20  $\mu$ M을 추가하여 흥분성 시냅스후 전류를 차단하였으며 유지전압을 -70 mV 로 고정하여 시냅스후 전류를 기록하였다.

10개의 세포에서 자발적인 시냅스후 전류에 DHPG 100  $\mu$ M을 투여한 결과 빈도가  $2.9 \pm 0.8$  회에서  $7.2 \pm 1.9$  회로 유의하게 증가하였으나(P < 0.05), 크기는  $26.4 \pm 4.0$  pA에서  $29.5 \pm 5.5$  pA로 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 2). TTX 0.5  $\mu$ M을 처리하여 신경흥분 전달을 차단한 후 미세시냅스후 전류에 대한 DHPG의 효과를 확인하였다. DHPG 처리 후 빈도는  $2.5 \pm 0.4$  회에서  $3.9 \pm 0.5$  회로 유의하게 증가하였으며(P < 0.05), 크기는  $22.7 \pm 4.2$  pA에서  $28.5 \pm 4.6$  pA로 증가하였으나 유의하지 않았다(n = 7) (Fig. 3).

DHPG의 작용이 mGluR1 혹은 mGluR5에 선택적으로 일어나는지 확인하고자 mGluR1과 mGluR5에 길항작용을 가지는 LY367385와 MPEP를 각각 DHPG와 함께 투여하였다. Fig. 4에서 보여주는 바와 같이 각각의 길항제가 포함된 용액에서도 빈도의 증가가 관찰되어 시냅스후 전



**Fig. 3.** Effects of DHPG on miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs). (A) Current traces of mIPSCs show the effects of DHPG on the synaptic activity of a MVN neuron. (B) Cumulative fraction plot of mIPSCs interevent interval and amplitude. Application of DHPG increased the frequency of mIPSCs but the amplitude was not changed. (C) DHPG significantly increased the average mIPSCs frequency.



**Fig. 4.** Both mGluR1 and mGluR5 mediates the DHPG induced increase in the frequency of sIPSCs. (A) DHPG-induced increase in the frequency of sIPSCs was remained by coapplication with MPEP or LY367385. (B) Bar graph showing the increase in the frequency of sIPSCs induced by DHPG in the presence of MPEP or LY367385.

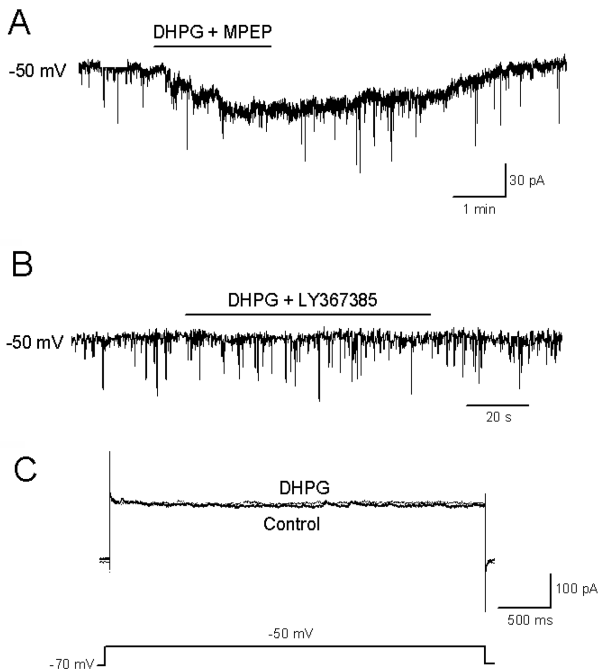
류의 증가에는 mGluR1과 mGluR5가 모두 관여함을 확인하였다.

**DHPG의 시냅스후 조절**

DHPG의 시냅스후 뉴론에 대한 효과를 알아보기 위하여 DHPG에 의한 전류의 변화를 기록하였다. 유지전압을 -60 mV로 고정하여 DHPG를 처리하였을 때 내향성 전류가 발생하였다. 전류의 크기는  $35.7 \pm 5.7$  pA이었으며(n=7), 약물이 포함되지 않은 용액으로 관류시 서서히 원상태로 회복되었다(n=10). 유지전압을 -50 mV로 고정하고 DHPG에 의해 발생한 내향성전류는  $67.1 \pm 5.2$  pA의(n=7) 크기를 보여 막전압이 탈분극됨에 따라 전류의 크기도 증가함을 확인하였다. DHPG와 mGluR5의 억제제인 MPEP가 포함된 용액으로 관류시  $62.8 \pm 7.3$  pA의 내향성전류를 기록하였다(n=6). 그러나 DHPG와 mGluR1의 억제제인 LY367385가 포함된 용액으로 관류시에는 변화를 보이지 않아(n=6), DHPG에 의한 내향성전류는 mGluR1을 통하여 발생함을 확인하였다(Fig. 5A, B).

유지전압을 -70 mV로 고정하고 -50 mV로 3초 동안 step 자극을 가하여 유발된 전류에 DHPG를 처리하여 본 결과 변화를 보이지 않았다(n=3) (Fig. 5C). 이는 DHPG에 의해 발생된 전류는 전압의존성 전류에 의하지 않고 유출전류(leak current)의 차단에 의해 발생되었음을 시사한다.

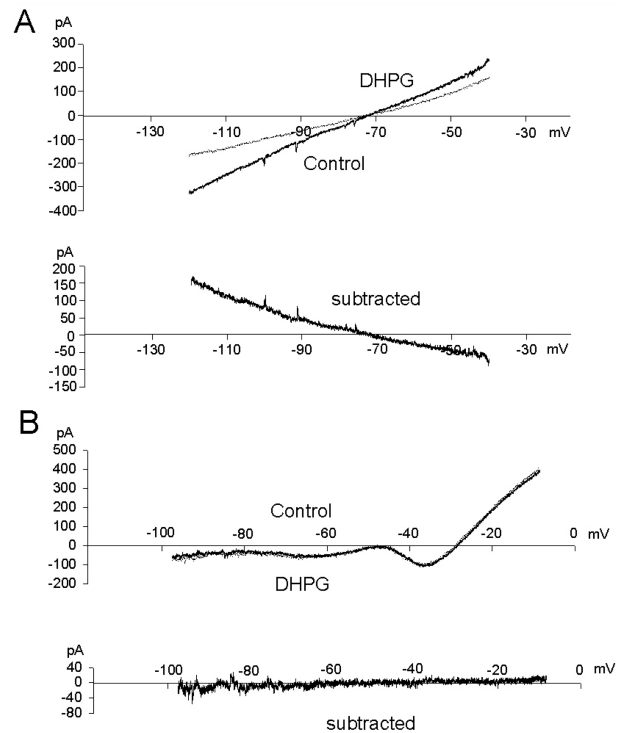
DHPG에 의해 유발된 전류가 어느 이온의 이동에 의



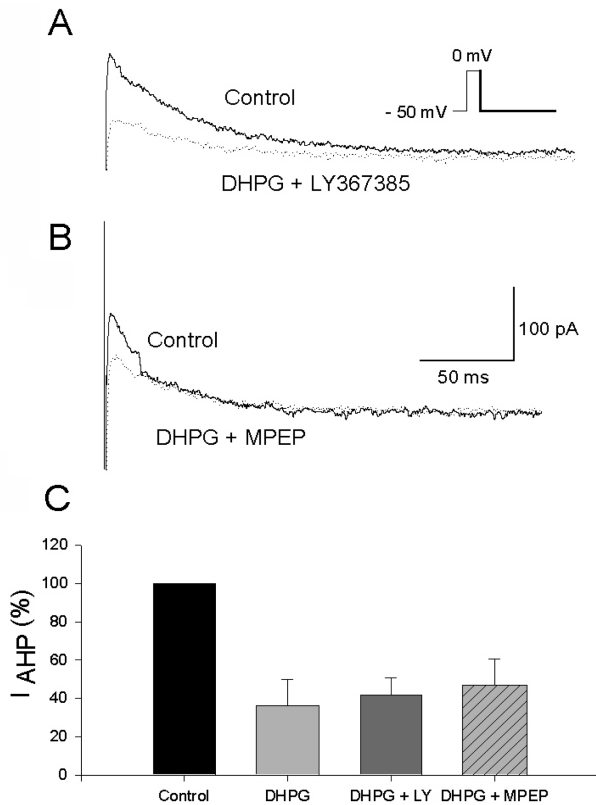
**Fig. 5.** Inward current is mediated by mGluR1. (A) Inward current induced by DHPG was remained by the mGluR5 antagonist MPEP. (B) DHPG induced current was not appeared in the presence of mGluR1 antagonist LY367385. (C) A voltage step from -70 mV to -50 mV induced an outward voltage dependent current. In these conditions, DHPG did not induce any significant inward current.

해 발생하는지 확인하고자 전류의 역전전압을 알아보았다. -120 mV에서 -40 mV까지의 ramp 자극을(20 mV/s) 가하여 전류전압곡선을 DHPG가 포함되기 전, 후의 용액에서 기록하였는데 두 곡선을 감산하여 얻은 곡선이 DHPG에 의해 유발된 전류전압곡선이다(Fig. 6A). DHPG에 의해 유발된 전류의 역전전압은 세포의 K<sup>+</sup>이 6 mM에서 기록했을 때  $-74.0 \pm 1.6$  mV(n=7)로 이는 Nernst 등식으로 계산된 K<sup>+</sup>의 평형전압(-79.8 mV)과 유사하여 DHPG에 의해 유발되는 전류는 K<sup>+</sup>의 이동에 의해 발생함을 확인하였다. DHPG는 K<sup>+</sup>의 유출전류에 영향을 미치거나 비선택적 양이온 전류에 영향 준다고 알려져 있어 세포의 용액에 TEA를 첨가하고 세포내 용액의 K<sup>+</sup>을 Cs<sup>+</sup>으로 교체하여 K<sup>+</sup>의 이동을 차단한 용액으로 DHPG의 효과를 확인하였다. -110 mV에서 -10 mV까지의 ramp 자극을 가한 후 DHPG 처리 전, 후의 전류를 감산에 의하여 확인하였는데 두 곡선사이에는 차이가 없었다(n=4) (Fig. 6B). 이는 DHPG에 의한 내향성 전류는 K<sup>+</sup>의 이동만이 관여하고 Na<sup>+</sup>은 관여하고 있지 않음을 나타낸다.

이군 대사성 글루탐산염 수용체가 칼슘활성화 포타슘 전류에 미치는 효과를 알아보하고자 유지전압을 -50 mV로 고



**Fig. 6.** DHPG-induced current is mediated by decreasing a leak potassium conductance. (A) DHPG-induced current was analyzed by linearly increasing the voltage from -120 to -40 mV in control and in the presence of DHPG. Subtracted current representing DHPG-induced current shows reversal potential of approximately -75 mV. (B) DHPG-induced current was analyzed by linearly increasing the voltage from -100 to -10 mV in a K<sup>+</sup> eliminating solution. Subtracted current shows that DHPG-induced current was not found.



**Fig. 7.** Effects of mGluR1 (A) or mGluR5 (B) antagonists on DHPG-induced inhibition of  $I_{AHP}$  in MVN neurons. These cells were clamped close to  $-50$  mV and the slow  $I_{AHP}$  was elicited with brief depolarizing voltage jumps to  $0$  mV ( $30$  ms) in the presence of tetrodotoxin (TTX). (C) The DHPG-induced suppression of  $I_{AHP}$  is mediated by mGluR1 and mGluR5.

정하고  $0$  mV로  $30$  ms동안 전자극을 가한 후 다시  $-50$  mV로  $500$  ms 동안 step 자극을 가하였다. 기록한 39개의 세포 중 30개의 세포에서  $-50$  mV로의 step 자극시 외향성 전류가 기록되었다. 발생된 전류에 DHPG를 처리하였을 때 크기가 64% 감소하였으며( $n=8$ ), DHPG와 LY367385를 같이 처리하였을 때 58% 감소하였고( $n=13$ ), MPEP와 같이 처리하였을 때 53% 감소하였다( $n=9$ ). 이는 DHPG에 의한 칼슘활성화 포타슘전류의 억제는 mGluR1과 mGluR5 수용체 모두에 의해서 발생됨을 의미한다(Fig. 7).

## 고 찰

I<sub>군</sub> 대사성 글루탐산염 수용체인 mGluR1과 5는 서로 다른 세포반응을 매개함이 알려졌는데 이는 동물의 종에 따라 또는 세포의 종류에 따라 차이를 보인다. 하시상핵(subthalamic nucleus)은 mGluR1과 5를 모두 가지고 있으나 DHPG에 의한 탈분극에는 mGluR5만이 작용한다고 하고(Awad *et al.*, 2000), 해마의 CA1 세포에서는 mGluR1에 의해서는 세포내 칼슘 농도의 변화를 유발하였고 mGluR5

에 의해서는 칼슘활성화 포타슘 전류( $I_{AHP}$ )의 억제를 일으켰다(Mannaioni *et al.*, 2001).

내측 전정핵에서도 mGluR1, 5 수용체가 모두 존재하나 그 작용은 서로 상이하다고 보고 된 바 있다(Grassi *et al.*, 2002). 즉, mGluR1 수용체를 통하여 고빈도 자극에 의해 유발되는 long term potentiation(LTP)를 증가시켰으나 mGluR5 수용체를 통하여는 억제된다고 하였다. 따라서 이 연구에서는 내측 전정핵에서 I<sub>군</sub> 대사성 글루탐산염 수용체의 역할을 더욱 구체적으로 확인하기 위하여 억제성 시냅스 전도, 유출전류, 칼슘활성화 포타슘 전류에 미치는 mGluR1과 mGluR5 길항제의 효과를 조사하였다.

이 연구에서 기록한 안정막 전압은 생후 3-4주의 흰쥐에서의 결과(Johnston *et al.*, 1994)와 유사하였다. 그러나 자발적 흥분성의 빈도(초당 6.3회)에 있어서는 *in vivo*에서 기록한 37회(Ris & Godaux, 1998)보다 크게 낮았다(Fig. 1). 이는 외부의 흥분성 입력신호가 고유의 막흥분성보다 2배정도 더 큰 영향을 주고 있다는 보고(Ris & Godaux, 1998)에 따라 부분적으로 시냅스연결이 차단된 뇌 절편에서 흥분성이 감소되었을 것으로 생각할 수 있으며, 이 연구가 체내온도가 아닌 실온에서 이루어진 점 등의 영향을 받았을 가능성이 있다. 자발적 활성화에 대하여 DHPG를 처리하였을 때 대부분의 세포에서 빈도가 증가하였다(Fig. 1). 이러한 DHPG의 흥분효과는 하시상핵세포(Awad *et al.*, 2000), 해마의 CA1세포(Mannaioni *et al.*, 2001), 척수뉴론(Kettunen *et al.*, 2003) 등에서도 보고되었다.

DHPG의 처리에 의하여 자발적 시냅스후 전류나 미세 시냅스후 전류가 증가하였다(Fig. 2, 3). 이는 DHPG가 시냅스전 세포체나 수상돌기에 존재하는 수용체에 결합하여 직접적인 탈분극을 일으켜 신경전달물질의 증가를 일으켰고(Zhou & Hablitz, 1997), 미세 시냅스후 전류의 증가는 축삭말단에 존재하는 수용체에 작용하여 GABA의 quantal release를 증가 시켰을 것으로 생각된다. DHPG가 미세 시냅스후 전류의 빈도를 증가시키는 효과는 축삭말단에 존재하는 mGluR1의 활성화에 의해서 phospholipase C를 활성화시키고 이는 inositol-(1, 4, 5)trisphosphate(IP3) 경로에 의해 세포내 칼슘량을 증가시켜 축삭말단에서 GABA 분비를 촉진한다고 알려져 있다(Kawabata *et al.*, 1996). DHPG에 의하여 미세 시냅스후 전위의 크기 증가는 유의하지 않았으나 일부의 세포에서 관찰되었다(Fig. 4). 미세 시냅스후 전위의 크기가 증가되는 이유로는 1) 하나의 quantum 분비에 의해 GABA 수용체가 포화되지 않았을 경우, GABA에 대한 수용체의 친화도 증가로 분비되는 GABA에 결합되는 수용체 수가 증가하였거나, 2) 시냅스후 수용체의 전도도가 증가하여 많은 이온을 이동시켜 전류의 크기가 증가하였거나, 3) 축삭이 분지될 때 일부에서만 신경전달 물질이 분비되다가 분비되는 축삭말단의 수가 증가하여 시냅스후 수용체의 open probability가 증가되었을 경우를 들 수 있다(Perrais & Ropert, 1999).

유지전압을  $-60$  mV로 고정하여 DHPG를 처리 하였을 때 내향성 전류가 발생하였다(Fig. 5). 이는 내측전정핵 뉴론에서는 안정막 전위상태에서도 I군 글루탐산염 수용체 활성이 내향성 전류를 발생시키고 이에 따라 막전위의 탈분극과 자발활성의 증가를 유발 할 수 있음을 의미한다. 막전압을  $-50$  mV로 탈분극 시켰을 때  $K^+$  이온의 기전력(driving force) 증가로 내향성 전류는 더 크게 발생되었다. 다른 세포에서도 탈분극에 따라 내향성 전류의 증가가 관찰되었는데(Chuang *et al.*, 2000; Kettunen *et al.*, 2003), 내향성 전류의 발생원인은 이 연구에서와 같이  $K^+$  유출 전류의 감소(Awad *et al.*, 2000; Mannaioni *et al.*, 2001) 외에도  $Na^+/Ca^{2+}$  교환기전의 활성화(Hirono *et al.*, 1998)이나 비선택성 양이온 전류의 활성화(Crepel *et al.*, 1994; Chuang *et al.*, 2000; Mannaioni *et al.*, 2001; Ireland & Abraham, 2002) 등이 알려져 있다.

내측전정핵 뉴론에서 DHPG에 의한 내향성 전류는 mGluR1을 통하여 발생하였는데 유사한 결과가 척수세포(Kettunen *et al.*, 2003)에서 보고되었으나 하시상핵 세포에서는 반대로 mGluR5에 의해서 내향성 전류가 발생됨이 보고되었으며(Awad *et al.*, 2000) 이러한 차이는 세포의 종류와 동물의 종 혹은 성장 정도에 따라 다르게 나타난다고 알려져 있다(Mannaioni *et al.*, 2001; Ireland & Abraham, 2002; Kettunen *et al.*, 2003).

내측 전정핵 뉴론은 활동전압에 이어지는 후과분극의 형태에 따라 A형과 B형으로 구분한다. 즉, A형은 초기의 빠른 후과분극만을 보이는 형이고, B형은 초기의 빠른 후과분극에 이어지는 느린 후과분극을 보이는 형으로, 이전의 실험에서 초기의 빠른 후과분극은 전도도가 큰 칼슘 활성화 포타슘 전류(large conductance  $Ca^{2+}$  activated  $K^+$  current)에 의하여 나타나고 느린 후과분극은 전도도가 낮은 칼슘 활성화 포타슘 전류(small conductance  $Ca^{2+}$  activated  $K^+$  current)에 기인함을 확인 하였다(Chun *et al.*, 2000). 특히, B형 뉴론에서의 자발활성의 발생기전이 지속성 소듐 전류에 의한 탈분극과 칼슘활성화 포타슘 전류에 의한 과분극의 상호작용에 의해 발생된다고 보고된 바 있고(Chun *et al.*, 2003b), 대사성 글루탐산염 수용체의 칼슘활성화 포타슘전류에 대한 효과가 알려진바 있어(Anwyl, 1999) 이 연구에서 DHPG에 의한 칼슘활성화 포타슘전류에 대한 효과를 관찰하였다.

$0$  mV의 자극을  $30$  ms 가하는 동안 칼슘이온의 세포내 이동을 유발하고 다시  $-50$  mV로 step 자극 하였을 때 포타슘의 외향성 전류가 발생하였다(Fig. 7). 기록한 76%(30/39)의 세포에서 DHPG에 의한 외향성 전류의 감소로 보아 DHPG의 칼슘활성화 포타슘전류에 대한 억제효과를 관찰하였다. 일부의 세포에서 외향성 전류가 기록되지 않은 것은 이 세포가 A형 세포로 전도도가 낮은 칼슘활성화 포타슘전류를 가지지 않음에 기인한다고 추측할 수 있고 이는 이전의 연구에서 A형과 B형의 비율이 3:7로 분포한다

는 보고(Chun *et al.*, 2000)와 일치한다.

이 연구에서는 칼슘 활성화 포타슘 전류의 억제가 mGluR1과 mGluR5 수용체 모두에 의해서 발생 되었으며, 이 결과는 CA1 해마세포에서 연구한 Ireland와 Abraham(2002)의 보고와 같다. 그러나 Mannaioni 등은(2001) 같은 세포에서  $I_{AHP}$ 의 억제에 mGluR5만이 관여한다고 하였으며 이러한 차이는 종과 성장 정도의 차이에 기인한다고 하였다.

결론적으로 I 군 대사성 글루탐산염 수용체는 내측전정핵 내에서 mGluR1 및 mGluR5 수용체를 통하여 시냅스 전 축색말단에서 억제성 신경전달물질 분비증가를 일으키고 시냅스후 수용체를 통하여 칼슘활성화 포타슘 전류의 억제를 유발하였으며 mGluR1 수용체를 통하여  $K^+$ 의 유출전류 차단을 일으켜 신경흥분성을 조절하고 있음을 나타낸다.

---

## 감사의 글

이 논문은 2009년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었음.

---

## 참고 문헌

- Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors : electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Rev* 1999;29:83-120.
- Awad H, Hubert GW, Smith Y, Levey AI, Conn PJ. Activation of metabotropic glutamate receptors 5 has direct excitatory effects and potentiates NMDA receptor current in neurons of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 2000;20:7871-9.
- Chapak S, Gahwiler BH, Do KQ, Knopfel T. Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino acid transmitters. *Nature* 1990;347:765-7.
- Chuang SC, Bianchi R, Wong RK. Group I mGluR activation turns on a voltage-gated inward current in hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol* 2000;83:2844-53.
- Chun SW, Jun JW, Park BR. Roles of  $Ca^{2+}$ -Activated  $K^+$  conductances on spontaneous firing patterns of isolated rat medial vestibular nucleus neurons. *Korean J Physiol Pharmacol* 2000;4:1-8.
- Chun SW, Choi JH, Kim MS, Park BR. Characterization of spontaneous synaptic transmission in rat medial vestibular nucleus. *Neuroreport* 2003a;14:1485-8.
- Chun SW, Choi JH, Kim KS, Lee HJ, Kim SR, Lee MY, Park BR. Ionic mechanisms underlying spontaneous firing in isolated type B medial vestibular nucleus neurons. *J Korean Balance Society* 2003b;2:78-85.
- Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:205-37.
- Crepel V, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Hammond C. Glutamate metabotropic receptors increase a  $Ca^{2+}$ -activated nonspecific

- cationic current in CA1 hippocampal neurones. *Br J Pharmacol* 1994;116:1859-69.
- Darlington CL, Smith PF. Metabotropic glutamate receptors in the guinea pig medial vestibular nucleus *in vitro*. *Neuroreport* 1995;6:1799-802.
- Grassi S, Petorossi VE. Synaptic plasticity in the medial vestibular nuclei : role of glutamate receptors and retrograde messengers in rat brainstem slices. *Prog Neurobiol* 2001;64:527-53.
- Grassi S, Frodaroli A, Pettorossi VE. Different metabotropic glutamate receptors play opposite roles in synaptic plasticity of the rat medial vestibular nuclei. *J Physiol (Lond)* 2002; 543:795-806.
- Guerineau NC, Gahwiler BH, Gerber U. Reduction of resting  $K^+$  current by metabotropic glutamate and muscarinic receptors in rat CA3 cells: mediation by G-proteins. *J Physiol* 1994;474:27-33.
- Hirono M, Konishi S, Yoshioka T. Phospholipase C-independent group I metabotropic glutamate receptor-mediated inward current in mouse purkinje cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:753-8.
- Horii A, Smith PF, Darlington CL. Quantitative changes in gene expression of glutamate receptor subunit/subtype in the vestibular nucleus, inferior olive and flocculus before and following unilateral labyrinthectomy in the rat: real-time quantitative PCR method. *Experimental Brain Res* 2001; 139:188-200.
- Ireland DR, Abraham WC. Group I mGluRs increase excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons by a PLC-independent mechanism. *J Neurophysiol* 2002;88:107-16.
- Johnston AR, MacLeod NK, Dutia MS. Ionic conductances contributing to spike repolarization and afterpotential in rat medial vestibular nucleus neurons. *J Physiol (Lond)* 1994; 481:61-77.
- Kawabata S, Tsutsumi R, Kohara A, Yamaguchi T, Nakanishi S, Okada M. Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1996;383:89-92.
- Kettunen P, Krieger P, Hess D, Marina A. Signaling mechanisms of metabotropic glutamate receptor 5 subtype and its endogenous role in a locomotor network. *J Neurosci* 2002;22:1868-73.
- Kettunen P, Hess D, EI Manira A. mGluR1, but not mGluR5, mediates depolarization of spinal cord neurons by blocking a leak current. *J Neurophysiol* 2003;90:2341-8.
- Lee HI, Chun SW. Actions of group I metabotropic glutamate receptor agonist on synaptic transmission and ionic currents in rat medial vestibular nucleus neurons. *Int J Oral Biol* 2009;34:215-22.
- Luthi A, Gahwiler BH, Gerber U. A slowly inactivating potassium current in CA3 pyramidal cells of rat hippocampus *in vitro*. *J Neurosci* 1996;16:586-94.
- Mannaioni G, Attucci S, Missanelli A, Pellicciari R, Corradetti R, Moroni F. Biochemical and electrophysiological studies on (S)-(+)-2-(3'- carboxybicyclo[1.1.1]pentyl)-glycine (CBPG), a novel mGlu5 receptor agonist endowed with mGlu1 receptor antagonist activity. *Neuropharmacol* 1999;38:917- 26.
- Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci* 2001;21: 5925-34.
- Park HY, Kim YS, Jo KH, Chun SW, Park BR. Roles of metabotropic glutamate receptors in inhibitory synaptic transmission in rat medial vestibular nucleus neurons. *J Korean Neurol Assoc* 2003;21:273-82.
- Perrais D, Ropert N. Effect of zolpidem on miniature IPSCs and occupancy of postsynaptic GABA<sub>A</sub> receptors in central synapses. *J Neurosci* 1999;19:578-88.
- Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol* 1997;34:1-26.
- Poncer JC, Shinozaki H, Miles R. Dual modulation of synaptic inhibition by distinct metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 1995;485:121-34.
- Ris L, Godaux E. Neuronal activity in the vestibular nuclei after contralateral or bilateral labyrinthectomy in the alert guinea pig. *J Neurophysiol* 1998;80:2352-67.
- Shigemoto R, Shigetada N, Mizuno M. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system : an *in situ* hybridization study in the adult and developing rat. *J Comp Neurol* 1992;322:121-35.
- Zhou FM, Hablitz JJ. Metabotropic glutamate receptor enhancement of spontaneous IPSCs in neocortical interneuron. *J Neurophysiol* 1997;78:2287-95.