大韓藥理學雜誌 : 第 32 卷 第 2 號
Korean J. of Pharmacology
Vol. 32, No. 2, pp. 127~138, 1996

허혈이 유발된 흰쥐 해마에서 Acetylcholine 유리에 미치는 Adenosine 수용체의 역할

원광대학교 의과대학 약리학교실 및 원광대학교 의약자원연구센터

최봉규[1] · 김도경 · 강 헌 · 전재민 · 강연욱

=Abstract=

The Role of Adenosine Receptor on Acetylcholine Release from Ischemic-Induced Rat Hippocampus

Bong Kyu Choi[1], Do Kyung Kim, Hun Kang
Jae Min Jeon and Yeon Wook Kang

Department of Pharmacology, Wonkwang University School of Medicine and Medicinal Resources Research Center of Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

The effects of adenosine analogues on the electrically-evoked acetylcholine(ACh) release and the influence of ischemia on the effects were studied in the rat hippocampus. Slices from the rat hippocampus were equilibrated with 0.1 μM [^{3}H]-choline and the release of the labelled product, [^{3}H]-ACh, was evoked by electrical stimulation(3 Hz, 2 ms, 5 VCm^{-1} and rectangular pulses for 2 min), and the influence of various agents on the evoked tritium-outflow was investigated.

Ischemia(10 min with 95% N_2 + 5% CO_2) increased both the basal and evoked ACh release. These increases were abolished by glucose addition into the superfused medium, and they significantly inhibited either by 0.1 & 0.3 μM TTX pretreatment or by removing Ca^{++} in the medium. MK-801(1~10 μM), a specific NMDA receptor antagonist, and glibenclamide (1 μM), a K^+-channel inhibitor, did not alter the evoked ACh release and nor did they affect the ischemia-induced increases in ACh release. However, polymyxin B(0.03 mg), a specific protein kinase C inhibitor, significantly inhibited the effects of ischemia on the evoked ACh release. Adenosine and N^6-cyclopentyladenosine decreased the ACh release in a dose-dependent manner in ischemic condition, though the magnitude of inhibition was far less than those in normal(normoxic) condition. However, the treatment with 5 μM DPCPX, a potent A_1-adenosine receptor antagonist, potentiated the ischemia-effect.

These results indicate that the evoked-ACh release is potentiated by ischemia, and this process being most probably mediated by protein kinase C, and that the decreased effect of ACh release mediated by A_1-adenosine receptor is significantly inhibited in ischemic state.

Key Words: Ischemia, Acetylcholine, Hippocampus, Adenosine

[1]To whom correspondence should be addressed.

*본 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(기초의학)에 의하여 이루어졌음.

서 론

뇌 조직은 혈류량 감소에 따른 산소 및 에너지 원 물질의 공급 감소시 심각한 손상을 입게 되며 비록 혈류가 정상으로 되돌아 온다 해도 신경조직의 손상은 회복되지 않는다 한다. 특히 이러한 손상은 신경 연접부(synapse)에서 심하게 나타나 결과적으로 신경전달물질의 유리 및 작용에 장애를 초래함이 알려진 이래(Grossman and Williams, 1971; Tower, 1979) 허혈(ischemia) 및 산소 공급 장애시(anoxia or hypoxia)의 신경 전달물질의 유리에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다. 즉 glutamate(Hauptman등, 1984; Rothman, 1984), dopamine(DA)(Globus등, 1988; Vulto등, 1988) 및 γ-aminobutyric acid(GABA)(Hillered등, 1989; Yao등, 1990) 등의 유리는 증가, norepinephrine(NE) 유리의 증가(Saito등, 1985) 또는 감소(Miwa등, 1986; Yoshinobu등, 1993)가 나타나며, acetylcholine(ACh)의 유리는 감소(Gibson and Peterson, 1982; Hirsch and Gibson, 1984; Freeman등, 1987) 또는 별다른 변화가 없다(Milusheva등, 1992)는 보고 등 신경전달물질의 종류 및 실험 상태에 따라 많은 차이를 나타내고 있다.

한편 저산소증(Zetterstrom등, 1982), 허혈(Hagberg등, 1987) 또는 경련시(Winn등, 1980) 뇌내의 adenosine 농도가 급격히 증가하게 되며, 유리된 adenosine은 뇌세포의 에너지 공급을 증가시키거나 에너지 소모를 감소시키는 방향으로 작용을 할 수 있음이 보고(Fredholm등, 1985)된 바 있으며, 아울러 Evans등(1987)은 adenosine이 쥐 해마에서 허혈시 세포손상을 막을 수 있다고 보고하였으며, Rudolphi등(1987)과 Gribkoff와 Bauman(1992)은 adenosine 길항제가 허혈시 뇌 손상을 악화시킬 수 있음을 보고한 바 있다. 중추에서 adenosine의 여러가지 중요한 기능중 하나는 신경전달물질 유리의 억제제로 작용한다(Fredholm and Hedqvist, 1980)는 것이다. 즉 ACh, NE, 5-hydroxytryptamine 및 glutamate 등의 유리를 억제함이 보고된 바 있으며 여기에는 A_1-adenosine 수용체가 관여함이 밝혀진 바 있다(Jakisch등, 1985; Fredholm등, 1986; Fredholm and Lindgren, 1987). 특히 해마(hippocampus)에서 ACh 유리는 전연접부 무스카린성 수용체의 활성(Hertting등, 1987; Choi등, 1991)에 의해서만이 아니라 A_1-adenosine 수용체의 활성에 의해 감소됨이 밝혀져 있으며(Jakisch등, 1984; Choi 등, 1992), 아울러 해마 조직은 뇌 조직 중에서도 허혈시 가장 손상을 잘 입는 조직의 하나임이 알려져 있다(Siesjö, 1988).

따라서 본 연구에서는 흰쥐 해마 조직을 사용하여 허혈 및 저혈당이 ACh 유리에 미치는 영향과 이에 미치는 여러가지 약물의 영향을 관찰하여 허혈시 ACh 유리 양상 및 그 기전을 구명하고자 하였으며 아울러 이러한 효과에 미치는 adenosine 및 그 유사약물들의 영향을 관찰하여, 허혈이 유발된 해마 조직에서 ACh 유리를 조절하는 adenosine 수용체의 역할을 구명하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

흰쥐(Sprague-Dawley, 250~300 gm)를 암수 구별없이 단두기를 사용하여 두부를 떼어낸 즉시 절개하여 얼음위에서 해마를 손상이 가지 않도록 적출한 다음 조직절단기(tissue chopper, Balzers®)를 이용 0.4 mm의 두께로 절단하여 중간부위만을 실험에 사용하였다. 절단한 조직들을 0.1 μmol/L의 ^{3}H-choline이 함유된 영양액(modified Krebs-Henseleit solution)에 37℃로 30분간 평형시킨 다음 영양액으로 잘 씻어 관류장치(superfusion chamber)에 옮긴 후 95% O_2 및 5% CO_2로 포화시켜 pH를 7.4로 맞추고, 10 μM의 hemicholinium-3와 30 nM의 atropine을 함유시킨 영양액을 분당 1 ml의 속도로 관류시켰다. 관류시작후 50분부터 5분 간격으로 관류액을 채집하였으며, 60분(S_1) 및 120분(S_2) 두 차례에 걸쳐 전기자극(구형파, 3 Hz, 2 ms, 24 mA, 5 Vcm^{-1}, 2 min)

을 하였다. 허혈의 유발은 95% O_2를 95% N_2로 치환시키고 영양액 내에서 glucose를 제거하여 일으켰으며, 영양액 내의 녹아있는 O_2를 완전히 제거하기 위해 3시간 이상 포화시킨 영양액으로 관류시켰다. 약물 투여는 S_1과 S_2 사이에 실시하였으며, 실험종료후 조직을 조직용해액(0.5 N quaternary ammonium hydroxide in toluene)에 녹혔다. 채집관류액 및 조직용해액 내의 3중 수소의 측정은 liquid scintillation counter(Beckman® LS5000 TD)로 하였으며, 단위 분당 유리되는 3중 수소 양은 Hertting등(1980)의 방법에 의하여 계산하고, 이때 유리되는 acetylcholine(ACh)의 양은 조직내 함유된 양에 대한 백분율(%)로 나타내었다. ACh 유리에 미치는 약물들의 효과는 S_2/S_1으로 추정하였으며 기저유리는 S_1과 S_2 직전의 유리량인 b_2/b_1으로 계산하였다.

실험에 사용한 영양액의 조성(mM)은 NaCl 118, KCl 4.8, $CaCl_2$ 1.3, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2, glucose 11, ascorbic acid 1.57, Na_2EDTA 0.03이었으며, 약물들은 [methyl-^{3}H]-choline chloride(72~78 Ci mmol^{-1}, Amersham), hemicholinium-3(Sigma), atropine sulfate(Sigma), adenosine(RBI), N^6-cyclopentyladenosine(RBI), 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine(RBI), tetrodotoxin(RBI), polymyxin B sulfate(Sigma), 4β-phorbol 12,13-dibutyrate(Sigma), MK-801(RBI) 및 glibenclamide(RBI) 등 이었으며, 이들중 hemicholinium-3, atropine sulfate, adenosine, N^6-cyclopentyladenosine 및 tetrodotoxin은 증류수에 나머지 약물들은 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 투여직전 증류수로 희석하여 사용하였다.

모든 실험성적은 mean±SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA test 후에 Student's t-test로 하였다.

실 험 결 과

1) 저산소증 및 허혈이 [^{3}H]-Acetylcholine 유리에 미치는 영향

[^{3}H]-Acetylcholine(ACh)의 전구물질인 [^{3}H]-choline에 30분간 평형시킨 흰쥐 해마조직을 choline 재흡수 차단제인 hemicholinium-3(10 μM) 및 유리된 ACh에 의한 전연접부 무스카린성 수용체의 자극을 방지하기 위해서 30 nM의 atropine을 함유시킨 영양액을 관류시키면서 두번의 전기자극을 실시하였다. 허혈의 유발은 두번째 자극 15, 10, 5분전에 95 % N_2 및 5% CO_2로 포화시키고 glucose를 제거한 영양액을 관류시켜 일으켰다. 이러한 실험결과를 Fig. 1 및 Table 1에 종합하였다. 5분간의 허혈은 자극에 의한 ACh 유리에 별다른 영향을 미치지 못하였으나 10분간의 허혈은 자극에 의한 ACh 유리를 약 2배까지 증가시켰으며 이때 기저유리도 증가함을 볼 수 있었다. 15분간의 허혈시는 자극에 의한 ACh 유리는 나타나지 않았으며 기저유리는 대조치의 약 7배에 달하는 증가를 보였으며 이는 조직의 파괴에 의한것으로 생각되어 이후 허혈실험은 10분간 허혈의 유발로 실시하였다.

다음에는 저산소증이 ACh 유리에 미치는 영향

Table 1. Effect of ischemia on the electrically-evoked and basal outflows of tritium from the rat hippocampal slices preincubated with ^{3}H-choline

Ischemia beforee S_2(min)	n	S_2/S_1	b_2/b_1
Control	3	1.075±0.009	0.644±0.010
5	3	1.030±0.092	0.650±0.047
10	7	1.974±0.260*	0.765±0.019*
15	3	−0.129±1.025	4.367±0.964*

After preincubation, the slices were superfused with medium containing hemicholinium-3(10 μM) & atropine(30 nM) and stimulated twice(S_1, S_2). Ischemia was induce before S_2 onwards at the minutes (min) indicated. Effect of ischemia on basal outflow are expressed as the ratio b_2/b_1 between fractional rates of outflow immediately before S_2(115~120 min) and before S_1(55~60 min). Mean±SEM from number(n) of observation are given. Significant differences from the control are marked with asterisks (*=$p<0.001$).

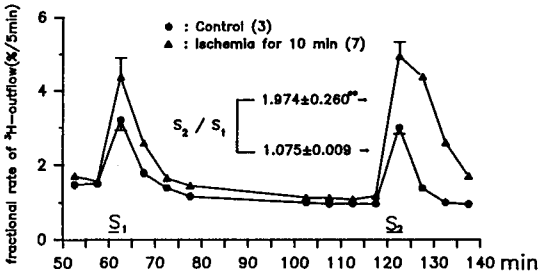

Fig. 1. Effect of ischemia on the outflow of tritium from rat hippocampal slices preincubated with ^{3}H-choline. The slices were electrically stimulated twice for 2 min each after 60 and 120 min of superfusion(S_1, S_2). Ischemia is induced by replacing the glucose free medium saturated with 95% N_2 + 5% CO_2 10 min before S_2 onwards. The effect of ischemia on the stimulation -evoked outflow of tritium are expressed by the ratio S_2/S_1. The radioactivity of the tissue at the start of experiments was 0.978±0.271(control) and 0.956±0.142(ischemia) pmol. Asterisks indicate the significant difference between the groups(** =$p<0.01$).

Table 2. Effects of different glucose concentrations on the electrically- evoked and basal outflows of tritium from the rat hippocampus in hypoxic states

Glucose conc.(mM)	n	S_2/S_1	b_2/b_1
11.0 (normoxic)	6	1.018±0.028	0.677±0.016
0	11	2.107±0.294*	0.756±0.017*
2.75	4	0.745±0.057*	0.696±0.026
5.5	7	0.759±0.053*	0.682±0.022
11.0	9	0.977±0.135	0.710±0.027

Glucose concentration were changed from 10 min before S_2 onwards. Other legends are the same as in Table 1.

을 확인하고자 하여 영양액 내의 glucose 농도를 변화시키면서 O_2를 N_2로 대치하였다(Table 2). Glucose가 정상 영양액의 농도인 11 mM 이었을

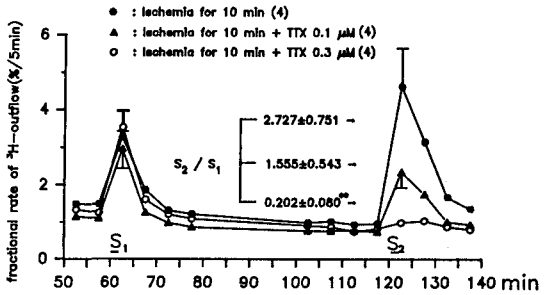

Fig. 2. Effect of tetrodotoxin(TTX) on the potentiated electrically-evoked tritium outflow from the ischemic-induced rat hippocampal slices by ischemia. TTX was added to the medium 15 min before S_2 onwards. The radioactivity of the tissues at the start of experiments were 0.602±0.026(●), 0.759±0.115(▲) and 0.892±0.059(○) pmol. Significant difference from the ischemic group is marked with asterisks(**=$p<0.05$).

때에 ACh 유리는 대조치와 별다른 차이를 보이지 않았으며, 기저유리 또한 약간 증가를 보였을 뿐이었다. Glucose 농도를 1/2 및 1/4로 낮추었을 때에는 ACh 유리가 오히려 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었으며 glucose를 완전히 제거하였을 때에만 ACh 유리증가가 일어남을 볼 수 있었다.

다음에는 허혈에 의해 유발된 ACh 유리증가를 tetrodotoxin(TTX) 하에서 관찰하였다(Fig. 2). 허혈시 자극에 의해 증가된 ACh 유리가 TTX 0.1, 0.3 μM 전처치 하에서 약물농도 의존적으로 감소함을 볼 수 있었다. 또한 이러한 ACh 유리 증가는 관류 영양액 내의 Ca^{++}을 제거하였을 때에도 유의한 억제를 나타냄을 볼 수 있었다(Fig. 3).

2) Polymyxin B가 허혈 작용에 미치는 영향

Protein kinase C의 억제제로 알려진 polymyxin B(PMB)의 효과를 허혈시 관찰하였다(Fig. 4). 10분간 허혈시 ACh 유리는 약 38% 증가를, PMB 전처리 하에서는 PMB 단독에 의해서 보다 ACh 유리는 약 68%로 더욱 크게 증가함을 보였으나, 허혈시 유리된 ACh는 0.03 mg PMB 존재

하에서 통계적으로 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있었다.

3) MK-801이 허혈 작용에 미치는 영향

NMDA 수용체 차단제인 MK-801 존재하에서 허혈시 ACh 유리를 관찰하였다. MK-801 1, 5 및 10 μM 자체로는 ACh 유리에 별다른 영향을 미치지 못하였으나, 5 μM MK-801 존재하에서 허혈

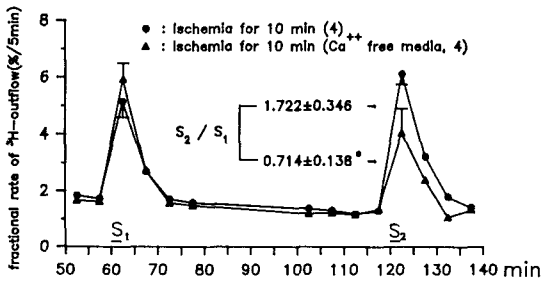

Fig. 3. Effect of Ca^{++}-free medium on the electrically-evoked tritium outflow from the ischemia-induced rat hippocampus. Legends are the same as in Fig. 2.

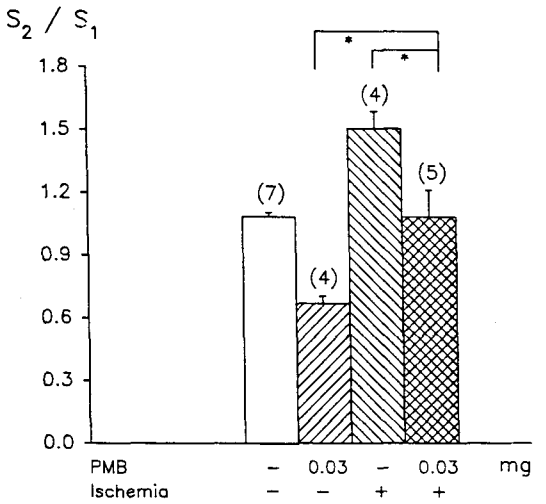

Fig. 4. Influence of polymyxin B(PMB) on the electrically-evoked tritium outflow from the ischemic hippocampus. PMB was added to the medium 30 min before S_2 onwards. Other legends are the same as in previous figures.

유발시 MK-801 단독 투여시 보다 통계적으로 유의한 ACh 유리 증가가 일어났으며 허혈만에 의한 ACh 유리 증가보다도 상당한 양의 ACh 유리 증가가 일어났음을 볼 수 있었다(Fig. 5). 한편 K^+-통로 차단제인 glibenclamide(1 μM)의, 허혈시 ACh 유리에 미치는 영향을 관찰하였으나 별다른 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다.

4) Adenosine계 약물들이 허혈에 의한 ACh 유리증가에 미치는 영향

허혈시 ACh 유리에 미치는 adenosine 수용체의 역할을 확인하기 위하여 adenosine, N^6-cyclopentyladenosine(CPA) 및 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine(DPCPX)의 영향을 관찰하였다. Adenosine 3 μM은 대조치에 비해 약 39%, 30 μM은 62% 정도의 ACh 유리 감소를 나타내었으나 허혈시에는 3 μM에서는 5%, 30 μM에서는 30%로서 그 효과가 크게 약화됨을 볼 수 있었다(Fig. 6).

다음에는 A_1-adenosine 수용체의 선택적 흥분약으로 알려진 CPA의 영향을 관찰하였다. CPA 0.1, 1 및 10 μM에 의해 약 37, 54 및 66%의 ACh

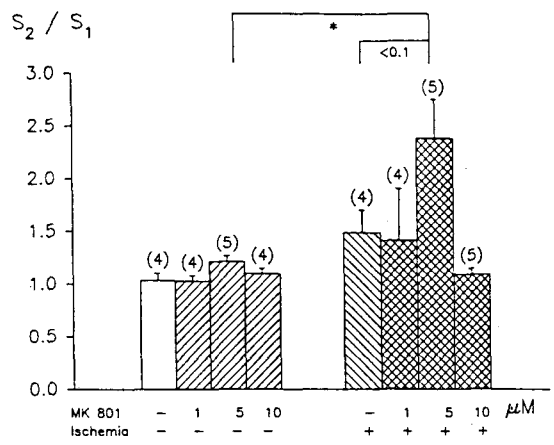

Fig. 5. Effect of MK-801 on electrically-evoked tritium-outflow from ischemic rat hippocampus. MK-801 was added to the medium 15 min before S_2. Other legend are the same as in previous figures.

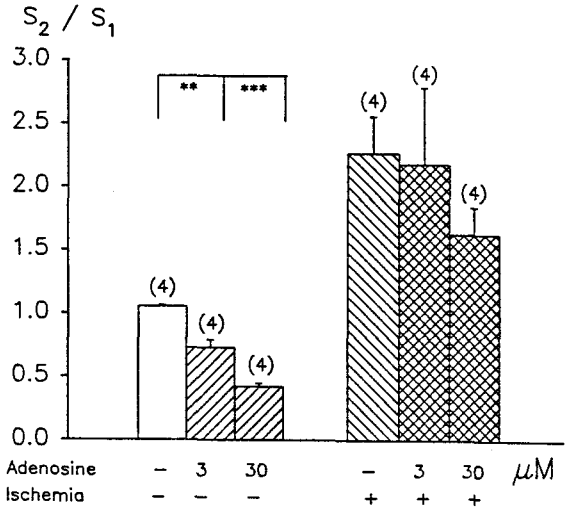

Fig. 6. Effect of adenosine on electrically-evoked tritium outflow from ischemic rat hippocampus. Adenosine was added to the medium 15 min before S_2 onwards. Asterisks(***=$p<0.001$) indicate the significant difference between groups. Other legends are the same as in previous figures.

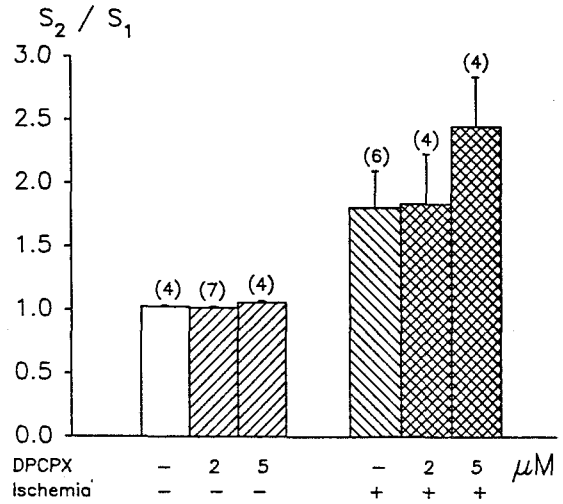

Fig. 8. Effect of 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) on the electrically-evoked tritium outflow from ischemic rat hippocampus. Other legends are the same as in previous figures.

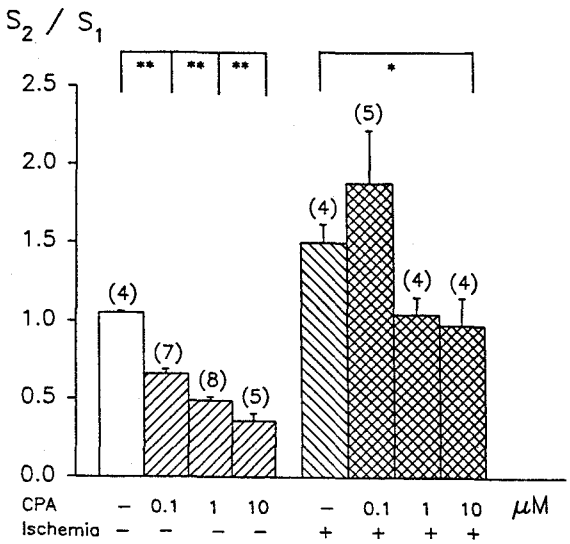

Fig. 7. Effect of N^6-cyclopentyladenosine(CPA) on the electrically-evoked tritium outflow from ischemic rat hippocampus. Legends are the same as in previous figures.

유리 감소가, 허혈시 0.1 μM에서는 약 25% 증가를, 1 및 10 μM에서는 각각 30 및 35%의 감소를 나타내 이 역시 허혈시에는 ACh 유리억제 효과가 크게 감약됨을 볼 수 있었다(Fig. 7). 이러한 허혈시 ACh 유리 변화를 A_1-수용체의 선택적 차단제인 DPCPX 하에서 실험하였던 바 DPCPX 자체로는 별다른 변화가 없었으며, 허혈시 통계적인 유의성은 없었으나 5 μM DPCPX 투여시 ACh 유리의 증가가 일어남을 관찰할 수 있었다(Fig. 8).

고 찰

본 연구에서 영양액 내에 glucose를 제거하고 95% N_2 및 5% CO_2로 포화시킨 영양액으로 10분간 허혈을 유발시켰을때 전기자극에 의한 ACh 유리가 증가함을 볼 수 있었다. 이러한 허혈에 의한 ACh 유리증가가 axonal firing에 의하는지를 확인하고자 전압의존성 Na^+ 통로를 억제함으로써 axonal firing을 억제하는 tetrodotoxin(TTX)

(Singer, 1974)의 영향을 관찰하였던 바 0.1 및 0.3 μM TTX 처리로 ACh 유리는 용량의존적으로 감소함을 볼 수 있었다. 또한 허혈유발이 자극에 의한 ACh 유리증가 뿐만아니라 기저유리 또한 증가시킴을 볼 수 있어, 이러한 효과가 세포외액의 Ca^{++} 농도에 의존적인가를 확인하기 위하여 Ca^{++}을 제거한 영양액 하에서 허혈을 일으켰던 바 자극에 의한 ACh 유리증가가 억제됨을 볼 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 해마의 콜린성 신경말단에서 활동전위(action potential)에 의해 유발되는 ACh 유리증가가 허혈에 의해 강화됨은 조직의 파괴에 의한 것이 아니라 생리적인 결과로 생각된다.

그러나 이러한 사실은 저산소증(Gibson and Peterson, 1982; Hirsch and Gibson, 1984) 및 무산소증(Freeman등, 1987)시 ACh 유리가 억제된다는 보고와 차이를 보이는 것으로서 본 연구에서도 이를 확인하고자 하여 영양액내에 glucose를 첨가하여 보았다. 정상농도인 11 mM의 glucose 첨가시 자극에 의한 ACh 유리는 정상산소 및 glucose 농도시와 차이가 없으나 glucose 농도를 점차로 낮추면 ACh 유리는 오히려 감소됨을 볼 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 허혈(ischemia)시와 무산소(anoxia) 또는 저산소증(hypoxia)시에는 ACh 유리는 차이가 있다는 것을 보여주고 있다. 최근 Milusheva 등(1992)은 쥐 선조체(striatum)에서 저산소증시 자극유발성 DA, GABA 및 glutamate의 유리가 증가되고 이때 저혈당(hypoglycemia) 상태가 동반되면 그 유리효과가 더욱 강화되나 이러한 허혈상태에서 ACh 유리는 기저유리만 약간 증가되고 자극에 의한 유리는 변화가 없다고 보고한 바 있다. 이러한 결과는 본 연구 결과와 매우 상치되는 것으로서 그 차이는 조직의 차이일 수도 있겠으며, 또한 그들은 ACh 유리를 potassium으로 일으켰으나 본 연구에서는 전기자극으로 일으키는 등 실험 방법상의 차이에 기인한 것으로 보이지만 이러한 사실만으로는 그 차이를 설명하기는 쉽지 않다.

다음에는 본 연구에서의 ACh 유리증가가 허혈시 유리되는 glutamate에 의한 NMDA 수용체 자극에 기인한(Szerb, 1988; Choi, 1988) 것인지 확인하고자 하여 NMDA 수용체 차단제인 MK-801(Wong등, 1986) 하에서 실험을 하였던 바 5 μM 하에서 ACh 유리가 오히려 증가됨을 볼 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 본 연구에서의 ACh 유리증가는 glutamate에 의한 NMDA 수용체의 활성화에 의함은 아닌 것을 알 수 있다.

한편 신경전달물질의 유리에는 세포내 Ca^{++} 증가가 중요한 역할을 하고 있음은 주지의 사실이며(Langer, 1981; Miller, 1987), Ca^{++} 의존성 효소인 protein kinase C(PKC)가 신경조직의 탈분극에 의해 활성화되며(Nishizuka, 1984) 이 PKC 활성이 신경전달물질의 유리에 중요한 역할을 할 수 있음이 알려져 있다(Nicholes등, 1987). Allgaier등(1988) 및 Dashmann등(1988)은 토끼해마에서 PKC의 활성화제인 4β-phorbol 12,13-dibutyrate는 ACh 유리증가를, 억제제인 polymyxin B(Kuo등, 1983)는 ACh 유리감소를 일으킴을 관찰하고 ACh 유리에 있어서도 PKC가 중요한 역할을 할 수 있음을 시사하였으며 본 교실에서도 이를 확인한 바 있다(Kim, 1994). 본 실험에서 허혈시 ACh의 기저유리가 증가하였으며 이는 Bernath와 Vizi(1987)의 저산소증 및 저혈당시 세포내 Ca^{++} 증가가 ACh의 기저유리를 증가시킨다는 보고와 일치하는 결과이며, 이러한 세포내 Ca^{++} 증가를 뒷받침할 수 있는 증거로 정상산소 상태에서(normoxic) 세포외액의 Ca^{++}을 제거하면 자극에 의한 ACh 유리가 완전히 소실되지만(대조: $S_2/S_1=1.088\pm0.039$, $n=6$; Ca^{++}-free: $S_2/S_1=0.137\pm0.144$, $n=4$), 허혈시 세포외액의 Ca^{++} 제거는 허혈에 의한 ACh 유리증가를 억제하기는 하나 상당한 양의 유리가 일어나는 점이다. 따라서 허혈시 ACh 유리증가는 세포내 Ca^{++} 증가에 따른 PKC의 활성화에 따른 것으로 가정할 수 있으며 본 실험에서도 PKC의 선택적 억제제인 PMB 투여가 허혈에 의한 ACh 유리를 유의하게 억제시켰으며 이는 Cardell과 Wieloch (1993)의 쥐의 신피질(neocortex)에서 허혈 유발

시 PKC가 증가한다는 보고에 비추어 위의 추정을 뒷받침한다 할 수 있다.

저산소증, 허혈 및 경련시 뇌내의 adenosine 농도가 급격히 증가 하게되고 adenosine은 허혈시 세포손상을 막을 수 있으며 adenosine 길항제는 뇌손상을 악화시킬 수 있다는 많은 보고 등이(서론 참조) 있으며 특히 해마조직에서는 A_1-adenosine 수용체가 많이 존재한다는 보고(Kirino, 1982) 등에 비추어 adenosine이 생체에서 생리적인 중요한 역할을 하고 있으리라 추측된다. 해마에서 ACh 유리는 전연접부의 무스카린성 수용체의 활성에 의해서(Hertting등, 1987; Choi등, 1991) 만이아니라 전연접부 A_1-adenosine 수용체의 활성에 의해서도(Jakisch등, 1984; Choi등, 1992) 억제됨이 알려져 있다. 따라서 본 연구에서도 허혈이 유발된 해마에서 A_1-adenosine 수용체의 역할을 구명하고자 하였다.

Adenosine 및 A_1-adenosine 수용체의 선택적 흥분약인 N^6-cyclopentyladenosine(CPA)은 정상상태에서 뚜렷한 ACh 유리감소를 일으켰으며 이러한 사실은 이전의 보고와 일치한다(Choi등, 1992, 1993). 그러나 허혈유발시 adenosine 및 CPA는 ACh 유리를 감소 시키기는 하나 그 효과는 정상상태에서 보다 훨씬 미약함을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 본 실험성적만으로는 어떠한 결론을 내리기에는 쉽지 않으나 Onodera와 Kogure(1988)의 쥐 해마에서 허혈이 adenosine 수용체 수를 감소시킨다는 보고 및 adenosine 수용체 수가 흥분약 투여에 의해 감소(Parsons and Stiles, 1987)되고, 반대로 차단약에 의해 증가(Fredholm; 1982)되며, 아울러 이러한 수용체 수의 증가 및 감소가 G-protein을 변화시킨다(Longabaugh등, 1989; Green등, 1990)는 연구결과와 해마에서 A_1-adenosine 수용체를 통한 신경전달물질 유리는 G-protein에 의존적(Choi등, 1992; Fredholm and Lindgren, 1987; Allgaier 등, 1987)이라는 사실로 미루어 본 연구에서 허혈시 A_1-adenosine 수용체 자극에 의한 ACh 유리억제 효과가 감소됨은 허혈에 의해 유리된 adenosine에 의해 adenosine 수용체가 계속 점유되고 있으므로 외부 투여 adenosine 유사약물들이 작용할 수 있는 수용체 수의 감소에 기인하리라 추정된다. 이러한 사실을 뒷받침할 수 있는 것으로 본 실험에서 A_1-adenosine 수용체의 선택적 차단제인 DPCPX 존재하에서 허혈시 정상상태보다 훨씬 더 ACh 유리증가를 일으킨다는 점이다.

따라서 허혈시 뇌손상 특히 해마에서 뇌손상이 ACh 유리증가와 관련이 있다면, adenosine 길항제가 뇌손상을 악화시킬 수 있다는 Rudolphi등(1987)과 Gribkoff와 Bauman(1992)의 의견은 수긍할 수 있으나 Evnas등(1987)의 adenosine이 쥐 해마에서 허혈시 세포 손상을 막을 수 있다는 의견은 본 연구의 결과 만으로는 수긍하기 어렵다고 생각되며 이는 앞으로 더욱 추구하여야할 과제라 생각된다.

결 론

흰쥐 해마에서 허혈이 ACh 유리에 미치는 영향과 그 기전 및 이때 A_1-adenosine 수용체의 역할을 구명하기 위하여, ^{3}H-choline으로 평형시킨 해마조직을 사용하여 ^{3}H-ACh 유리에 미치는 허혈 및 adenosine 및 유사약물들의 영향을 관찰하였다.

10 분간의 허혈은 전기자극(3 Hz, 2 ms, 5 VCm^{-1}, 구형파, 2 min)에 의한 ACh 유리를 증가시켰으며 이때 기저유리 또한 증가됨을 볼 수 있었다. 이러한 유리증가는 TTX(0.1 & 0.3 μM) 전처리 및 Ca^{++}-free 영양액하에서 억제됨을 볼 수 있었으며, glucose 첨가에 의하여는 ACh 유리증가가 일어나지 않음을 알 수 있었다.

허혈에 의한 ACh 유리증가는 MK-801(1～10 μM) 및 glibenclamide(1 μM)에 의해 영향을 받지 않았으나 PKC 억제제인 polymyxin B(0.03 mg)에 의하여 크게 억제됨을 볼 수 있었다.

Adenosine 및 A_1-adenosine 수용체 선택적 흥분약인 N^6-cyclopentyladenosine(0.1～10 μM)은 ACh 유리를 감소시켰으나 그 효과는 정상상태에

서 보다 훨씬 약하였으며 5 μM의 DPCPX는 허혈에 의한 ACh 유리증가를 강화시킴을 볼 수 있었다.

이상의 실험결과로 흰쥐해마에서 허혈시 ACh의 유리는 매우 증가되고 이의 세포내 기전에는 PKC가 관여함을 알 수 있었으며, A_1-adenosine 수용체를 통한 ACh 유리억제 효과는 허혈시 크게 감약됨을 알 수 있었다.

감 사 말 씀

본 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(기초의학)에 의하여 이루어졌음.

참 고 문 헌

Allgaier C, Daschemann B, Huang HY and Hertting G: *Protein kinase C and presynaptic modulation of acetylcholine release in rabbit hippocampus. Br J Pharmacol 93: 525-534, 1988*

Bernath S and Vizi ES: *Inhibitory effect of ionized free intracellular calcium enhanced by ruthenium red and m-chlorocarbonylcyanide phenyl hydrazon on the evoked release of acetylcholine. Biochim Pharmacol 21: 3683-3687, 1987*

Cardell M and Wieloch T: *Time course of the translocation and inhibition of protein kinase C during complete cerebral ischemia in the rat. J Neurochem 61: 1308-1314, 1993*

Choi BK, Kim CS, Yoon YB and Kook YJ: *Interaction of forskolin with the effect of oxotremorine on [^{3}H]-acetylcholine release in rabbit hippocampus. Korean J Pharmacol 27: 89-97, 1991*

Choi BK and Yoon YB: *Influence of adenosine and magnesium on acetylcholine release in the rat hippocampus. Korean J of Pharmacology 29: 175-182, 1993*

Choi DW: *Glutamate neurotoxicity and diseases of the central nervous system. Neuron 1: 623-634, 1988*

Daschmann B, Allgaier C, Nakov R and Hertting G: *Staurosporine counteracts the phorbol ester-induced enhancement of neurotransmitter release in hippocampus. Arch int Pharmacodyn 296: 232-245, 1988*

Evans MC, Swan JH and Meldrum BS: *An adenosine analogue, 2-chloroadenosine, protects against long term development of ischemic cell loss in the rat hippocampus. Neurosci Lett 83: 287-292, 1987*

Fredholm BB and Hedqvist P: *Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. Biochem Pharmacol 29: 1635-1643, 1980*

Fredholm BB, Bergman B, Fastbom J and Jonzon B: *The role of adenosine in the actions of xanthines on the central nervous system. In: Anti-ashma xanhines and adenosine. Eds.: Persson, C.G.A. & Andersson, K.E. Excerpta. Medica, pp. 291-308, 1985*

Fredholm BB, Fastbom J and Lindgren E: *Effect of N-ethylmalemide and forskolin on glutamate release from rat hippocampal slices. Evidence that prejunctional adenosine receptors are linked to N-proteins, but not to adenylate cyclase. Acta Physiol Scand 127: 381-386, 1986*

Fredholm BB, Jonzon B and Lindström K: *Effect of adenosine receptor agonists and other compounds on cyclic AMP accumulation in forskolin-treated hippocampal slices. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 332: 173-178, 1986*

Fredholm BB and Lindgren E: *Effect of N-ethylmaleimide and forskolin on noradrenaline release from rat hippocampal slices. Evidence that prejunctional adenosine and α-receptors are linked to N-proteins but not to adenylate cyclase. Acta Physiol Scand 130: 95-100, 1987*

Freeman GB, Mykytyn V and Gibson GE: *Differential alteration of dopamine, acetylcholine and glutamate release during anoxia and/or 3,4-diaminopyridine treatment. Neurochem Res 12: 1019-1027, 1987*

Gibson GE and Peterson C: *Decreases in the re-*

lease of acetylcholine with low oxygen in vitro. Biochem Pharmacol 31: 111-115, 1982

Globus MYT, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I and Ginsberg MD: *Intra-ischemic extracellular release of dopamine and glutamate is associated with striatal vulnerability to ischimia. Neurosci Lett 91: 36-40, 1988*

Green A, Johnson JL and Milligan G: *Down-regulation of G(i) sub-types by prolonged incubation of adipocytes with an A_1 adenosine receptor agonist. J Biol Chem 265: 5206-5210, 1990*

Gribkoff VK and Bauman LA: *Endogenous adenosine contributes to hypoxic synaptic depression in hippocampus from young and aged rats. J Neurophysiol 68: 620-628, 1992*

Grossman RG and Williams VF: *Electrical activity and ultrastructure of cortical neurons and synapses in ischemia. p. 61. In Brierly, J. B., Meldrum, B. S.(eds): Brain hypoxia. Lippincott, Philadelphia, 1971*

Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S and Sandberg M: *Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. J Neurochem 49: 227-231, 1987*

Hauptman M, Nelson D, Wilson DF and Erccinska M: *Neurotransmitter amino acids in the CNS. II. Some changes in amino acids levels in rat brain synaptosomes during and after in vivo anoxia and stimulated ischimia. Brain Res 304: 23-35, 1984*

Hertting G, Zumstein A, Jackisch R, Hoffmann I and Starke K: *Modulation of endogenous dopamine of the release of acetylcholine in the caudate nucleus of the rabbit. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 315: 111-117, 1980*

Hertting G, Wuster S, Gebicke-Harter P and Allgaier C: *Participation of regulatory G-proteins and protein kinase C in the modulation of transmitter release in hippocampus. Modulation of synaptic transmission and plasticity in nervous system. NATO ASI Series 19: 147-164, 1987*

Hillered L, Hallstrom A, Segersvard S, Persson L and Ungerstedt U: *Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. J Cereb Blood Flow Metab 9: 607-616, 1989*

Hirsch JA and Gibson GE: *Selective alteration of neurotransmitter release by low oxygen in vitro. Neurochem Res 9: 1039-1049, 1984*

Jackisch R, Strittmatter H, Kasakov L and Hertting G: *Endogenous adenosine as a modulator of hippocampal acetylcholine release. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 327: 319-325, 1984*

Jackisch R, Fehr R and Hertting G: *Adenosine: an endogenous modulator of hippocampal noradrenaline release. Neuropharmacology 24: 499-507, 1985*

Kim JS: *Effect of protein kinase C on acetylcholine release in the rat hippocampus. Inaugural thesis in Wonkwang University Graduate School, 1994*

Kirino T: *Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res 239: 257-269, 1982*

Kuo JF, Raynor RL, Mazzei GJ, Schatzmann RC, Turner RS and Kem WR: *Cobra polypeptide cytotoxin I and marine worm polypeptide cytotoxin A-IV are potent and selective inhibitors of phospholipid-sensitive Ca^{2+}-dependent protein kinase. FEBS Lett 153: 183-186, 1983*

Langer SZ: *Presynaptic regulation of the release of catecholamines. Pharm Rev 32: 337-362, 1981*

Longabaugh JP, Didsbury J, Spiegel A and Stiles GL: *Modification of the rat adipocytes A_1 adenosine receptor-adenylate cyclase system during chronic exposure to an A_1 adenosine receptor agonist: alterations in the quantity of G(salpha) and G(ialpha) are not associated with changes in their mRNAs. Mol Pharmacol 36: 681-688, 1989*

Miller RJ: *Multiple calcium channels and neuro-*

nal funtion. Science 235: 46-52, 1987

Milusheva E, Doda M, Pasztor E, Lajtha A, Sershen H and Vizi ES: *Regulatory interactions among axon terminals affecting the release of different transmitters from rat striatal slices under hypoxic and hypoglycemic conditions. J Neurochem 59: 946-952, 1992*

Miwa S, Fujiwara M, Inoue M and Fujiwara M: *Effects of hypoxia on the activities of noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat brain. J Neurochem 47: 63-69, 1986*

Nichols RA, Haycock JW, Wang JKT and Greengard P: *Phorbol ester enhancement of neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. J Neurochem 48: 615-621, 1987*

Nishizuka Y: *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Natrue 308: 693-698, 1984*

Onodera H and Kogure K: *Differential localization of adenosine A_1 receptors in the rat hippocampus: quantitative autoradiographic study. Brain Res 458: 212-217, 1988*

Parsons WJ and Stiles GL: *Heterologous desensitization of the inhibitory A_1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat adipocytes. Regulation of both N(s) and N(i). J Biol Chem 262: 841-847, 1987*

Rothman SM: *Synaptic release of excitatory amino acids mediates anoxic neuronal death. J Neurosci 4: 1884-1891, 1984*

Rudolphi KA, Keil M and Hinze HJ: *Effect of theophyline on ischemically induced hippocampal damage in monogolian gerbils: A behavioural and histopathological study. J Cereb Blood Flow Metab 7: 74-81, 1987*

Saito K, Honda S, Egawa M and Tobe A: *Effects of bifemelane hydrochloride(MCI-2016) on acetylcholine and norepinephrine release from cortical slices of bilaterally carotid-artery-ligated Mongolian gerbils. Japan J Pharmacol 39: 406-409, 1985*

Siesj BK: *Brain energy metabolism. John Wiley. New York 1978*

Singer SJ: *The molecular organization of membranes. Am Rev Biochem 43: 805-833, 1974*

Szerb JC: *Changes in the relative amounts of aspartate and glutamate released and retained in hippocampal slices during stimulation. J Neurochem 50: 219-224, 1988*

Tower DB: *Effects of ischemia or tissue hypoxia on the neuron. Adv neurol 25: 40-63, 1979*

Vulto AG, Sharp T, Ungerstedt U and Versteeg DHG: *Rapid postmortem increase in extracellular dopamine in the rat brain as assessed by brain microdialysis. J Neurochem 51: 746-749, 1988*

Winn RH, Welsh JE, Rubio R and Berne RM: *Changes in brain adenosine during bicuculline-induced seizures in rats. Effects hypoxia and altered systemic blood pressure. Circ Res 47: 568-577, 1980*

Wong EHF, Kemf JA, Priestly T, Knight AR and Woodruff GN: *The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. Proc Nat Acad Sci U.S.A. 83: 7104-7108, 1986*

Yao H, Matsumoto T, Hirano M, Uchimura H, Ooboshi H, Sadoshima S and Fujishima M: *Striatal glutamic acid and gamma-aminobutyric acid in transient cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. Jpn Heart J 31: 385-392, 1990*

Yoshinobu T, Fumiki S and Hitoshi K: *Possible involvement of ATP-sensitive K^+ channels in the inhibition of rat central adrenergic neurotransmission under hypoxia. Japan J Pharmacol 62: 279-287, 1993*

Zetterstrom T, Vernet L, Ungerstedt U, Tossman U, Jonzon B and Fredholm BB: *Purine levels the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. Nerurosci Lett 29: 111-115, 1982*