

별아교세포에서 NMDA 수용체 길항제의 칼슘흥분성 조절 기능

Dash Oyunbileg¹, Joo-Min Park², Su-Yong Eun¹, Sung-Cherl Jung¹

¹제주대학교 의학전문대학원 생리학교실

²대전 기초연구원 인지 및 사회성 연구단

(Received December 2, 2016; Revised December 9, 2016; Accepted December 16, 2016)

Abstract

Modulatory function of calcium excitability in astrocytes by NMDA receptor antagonists

Dash Oyunbileg¹, Joo-Min Park², Su-Yong Eun¹, Sung-Cherl Jung¹

¹Department of Physiology, School of Medicine, Jaju National University, Jeju,

²Center for Cognition and Sociality, Institute for Basic Science, Daejeon, Republic of Korea

Astrocytes, the predominant cell type in central nervous system, are electrically non-excitabile cells. However, astrocytes display their excitability by increasing intracellular calcium concentration. Several lines of evidence have highlighted the importance of astrocytic calcium excitability in both physiological and pathological conditions. Here, we investigated the effects of dissociated anesthetics: ketamine and MK-801 (dizocilpine) known as NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor antagonists, on calcium excitability in mouse cortical astrocytes. We further compared the effects of Ketamine and MK-801 on astrocytic serotonin (5-HT) receptors. In cultured cortical astrocytes, MK-801 increased intracellular calcium concentration and led to further increases in calcium in the presence of 5-HT. However ketamine had no effect on the calcium response in astrocytes. These results suggest that the calcium concentration in astrocytes is reinforced by MK-801 under the modulation of serotonin receptors. (*J Med Life Sci* 2016;12(2):93-97)

Key Words : NMDA receptor, Astrocyte, Calcium, Serotonin receptor, Cerebral cortex

서론

성상교세포는 전기적으로는 비흥분성 세포이지만 신경전달물질에 의해서 유도되는 세포 내 칼슘의 변화에 따라 흥분성을 나타내며, 성상교세포에서의 칼슘 증가에 따른 흥분성은 신경세포 시냅스에서의 신경전달물질을 조절하는데 매우 중요한 요소가 된다. 특히 성상교세포로부터 글루탐산 (glutamate), adenosine, taurine, D-serine, GABA (gamma-aminobutyric acid), GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) 등의 신경아교전달물질(gliotransmitter) 분비는 일시적 혹은 반복적인 성상교세포 내의 칼슘 증가에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다. 이는 포스포리파아제 C

(phospholipase C)가 활성화되어 생성되는 이노시톨-1,4,5-트리스인산 (inositol 1,4,5-trisphosphate)가 IP3수용체를 활성화 시킴에 따라서 세포내의 칼슘 저장소인 소포체 (endoplasmic reticulum)로부터 칼슘 분비를 촉진시키기 때문인 것으로 알려져 있다 (Pozzan et al, 1994). 성상교세포로부터 신경아교세포로 분비되는 기전과 관련해서는 다양한 형태의 수용체들 기능이 보고되고 있다 (Narges, 2016). 세로토닌 (serotonin, 5-HT) 수용체는 성상교세포에 분포하는 대표적인 수용체로서 5-HT 수용체 아형 중에 5-HT1A (azmitia et al 1996), 5-HT2A (Gull-Britt et al 1998), 5-HT5A, 5-HT7 (Hirst et al 1997) 등이 성상교세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 특히 5-HT2A는 다른 수용체 아형들에 비해 성상교세포의 분화 및 기능 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 5-HT2A 수용체가 활성화 되면 세포 내 이노시톨-1,4,5-트리스인산 (IP3)레벨이 상승되어 세포 내 소포체의 칼슘 채널을 통한 세포내 칼슘농도 증가가 보고된 바 있다 (Nilsson et al 1991). 그러나, 성상교세포의 칼슘 흥분성이 실제 신경세포간 신호전달 및 시냅스 가소성 등에 미치는 영향에 대한

Correspondence to : Sung-Cherl Jung

Department of Physiology, Jeju National University Hospital, Jeju National University School of Medicine, 15, Aran 13gil, Jeju-si, Jeju Special self-governing province, 63241, Republic of Korea
E-mail : jungsc@jejunu.ac.kr

연구는 이루어져 있지 않다. 본 연구에서는 중추 신경계 대표적 흥분성 신호전달 수용체인 채널형 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 수용체의 길항제로 알려진 케타민 (ketamine)과 디조실핀 (dizocilpine, MK-801)에 대한 성상교세포의 칼슘 흥분성 조절 특성에 대하여 연구를 진행하였다. NMDA 수용체 길항체인 케타민과 디조실핀 (MK-801)은 다양한 형태의 동물 모델 및 신경병증성 질환 모델에서 항염증 작용 (anti-inflammatory effect) 및 항우울 효과 (anti-depressive effect)를 나타냄이 보고되고 있다 (McGirr A, 2015; Zarate CA Jr, 2006). 최근 들어 케타민과 디조실핀 (MK-801)의 작용기전과 관련해서 NMDA 수용체 길항제로의 역할이 아닌 다양한 약리적 효과가 보고되고 있으며, 그 대표적인 예가 5-HT₂수용체 및 도파민 D₂수용체에 대한 작용기전이다(Kazumi yoshizawa et al 2013). 본 실험에서는 성상교세포에서의 칼슘 흥분성 측정을 통해 케타민과 디조실핀 (MK-801)에 대한 반응성과 더불어 성상교세포 5-HT₂수용체 (astrocytic 5-HT₂ receptor) 에 대한 NMDA 수용체 길항제의 효과를 확인해 보고자 하였다.

대상 및 실험 방법

세포 배양

생후 1일 된 쥐의 뇌를 적출하여 10 % fetal bovine serum 과 1 % penicillin streptomycin이 함유된 Dulecco's modified Eagle medium에 넣는다. 입체현미경에서 뇌막 (cerebral meninges)과 해마 (hippocampus), 선조체 (striatum)를 제거하고 대뇌피질 (cerebrum cortex)만을 분리하여 배양액에 넣고, 글라스 파이펫으로 분쇄하여 세포를 분리하고 37°C, 5% CO₂향온기에서 14일 동안 배양하였다. 14일 후에 배지를 버리고 1X PBS로 세 번 세척해준 후 물리적 힘을 가하여 microglia 및 oligodendrocyte를 제거하여 주었다. 실험을 위하여 성상교세포는 0.25% trypsin으로 바닥에서 떼어내고 poly-D-lysine으로 코팅된 6 well plate에 2.5 X 10⁶cells/plate로 분주하여 실험에 사용하였다.

세포 내 칼슘 이온농도 측정

세포 내 칼슘 이온농도 변화를 측정하기 위해 공초점 현미경 시스템(confocal microscopy system)을 이용하였다. 세포 배양액 2 ml에 Fluo-4/AM 농도를 첨가한 후 37°C, 5% 향온기에서 20 분간 부하시킨다. 세포 외액으로 한 번 세척하여 fluo-4/AM을 완벽하게 제거한 후 독립현미경(Eclipse Ti-E, Nikon) 위의 관류 챔버 (chamber)에 올려 놓고 관류액을 중력에 의해 3 ml/min 속도로 흘려주었다. Fluo-4/AM에 맞는 485 nm 파장으로 활성화 (excitation) 시켰을 때 520 nm의 파장에서 방출 (emission)되는 형광 세기를 CCD 카메라 (cooled charge-coupled device camera)가 증폭시켜 1 Hz의 빈도로 30 초간 측정하였다. 세포 내 칼슘 이온농도는 자극을 주기 전 fluo-4/AM 부하로 인한 기본 형광값 (F₀)에서 약물을 투여했을 때 변화되는 형광값 (F₁)의 비율로 측정하였으며 F₁/F₀ 값을 이용하여 세포 내 칼슘 이온농

도의 변화를 측정하도록 적용하였다.

자료분석

모든 결과는 통계 처리한 후 평균표준오차 (mean standard error mean)로 나타내었다. 두 집단 사이의 평균을 비교 할 때는 student' s-test를 실행하여 p 값을 비교하였으며, p < 0.05 인 경우를 통계적으로 유의 하다고 평가하였다.

결 과

1. NMDA 수용체 길항제인 케타민에 의한 칼슘 이온농도 변화

Fluo-4/AM으로 부하된 성상교세포내 케타민을 30 초간 투여 시 대부분의 세포 내에서 칼슘 이온농도의 증가가 뚜렷이 관찰 되지 않았다. 또한, 케타민을 반복적으로 투여했을 때에도 칼슘 반응이 나타나지 않았다. 세로토닌 (serotonin)을 처리 했을 때에는 세포 내 칼슘이온농도가 증가 하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의 할 만한 수준 (ketamine, p>0.186 ketamine p>0.305)은 아니었다. 세포에 세로토닌을 전처리 한 후 케타민을 투여 시, 그림 1에서 나타난 바와 같이 세포 내 칼슘 이온 농도는 변화하지 않는 것으로 관찰 되었다.

2. NMDA 수용체 길항제인 디조실핀 (MK-801)의 의한 칼슘 이온농도 변화

NMDA 수용체 길항제인 디조실핀 (MK-801)의 의한 칼슘이온 농도 변화율 30 초간 성상교세포에 투여한 실험에서 MK-801에서는 칼슘 농도의 변화를 보이지 않았으나 고농도의 MK-801 에서는 세포 내 칼슘 이온 농도가 증가하는 것을 보였고 반복적으로 투여했을 때에도 통계적으로 유의하게 증가된 칼슘 반응을 볼 수 있었다 (MK-801 p<0.0008). 이 실험에서도 마찬가지로 세로토닌을 전처리 한 후 MK-801을 투여하였을 경우, 농도에서 칼슘 반응이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 세포 밖의 높은 KCl의 농도는 세포막의 탈분극을 유도하여 세포 내의 칼슘 농도가 증가하게 된다. 이런 특성을 적용하여 모든 칼슘 반응 실험에서는 마지막으로 56 mM KCl을 처리 하여 실험에 사용된 세포가 안정된 반응을 보이는 지에 대한 대조군으로 확인한 결과, 모든 기록된 세포에서 적절한 칼슘 반응이 나타남을 확인할 수 있었다. (그림 2)

3. 디조실핀 (MK-801)에 의해서 유도된 칼슘 반응에 대한 NMDA 수용체 길항제 D-AP5의 억제

MK-801에 의해서 유도된 세포 내 칼슘 반응이 어떤 수용체를 통해서 나타나는지를 보기 위해서 경쟁적 NMDA 수용체 길항제 (competitive antagonist)인 D-AP5 을 5 분간 전 처리한 후 MK-801을 처리 하였다. 이때, 앞 실험에서 관찰되었던 칼슘 반응이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.(MK-801 p>0.08). (그림 3).

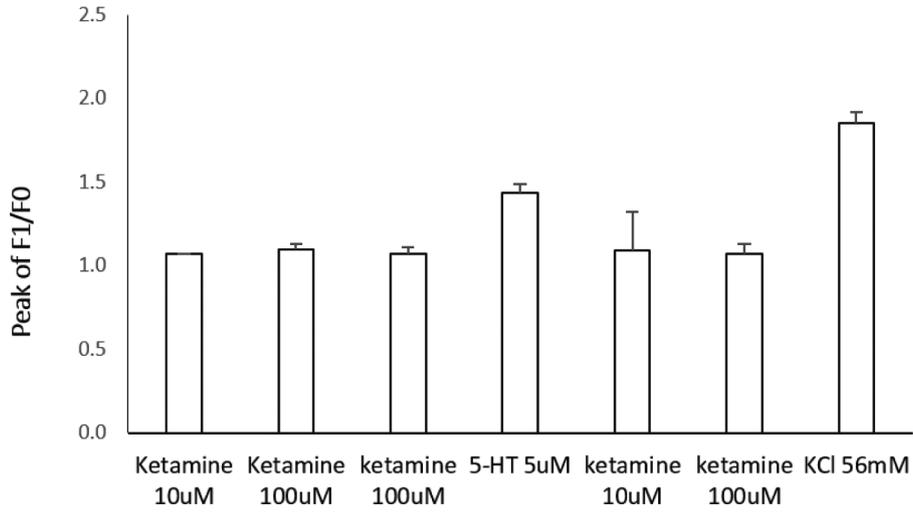


Figure 1. Ketamine-induced calcium response in astrocytes. Astrocytes, which were loaded with 3 fluo-4/AM for 15 min, were mounted in a chamber. Either 10 of Ketamine did not increase intracellular calcium level. There were not significant differences between the 10 Ketamine-induced calcium transient after the pretreatment of 5serotonin. Data show the averaged peak of F1/F0 (ketamine 10=1.070.029; ketamine 100=1.100.045; second ketamine 100=1.070.057; 5-HT=1.430.232; ketamine 10=1.090.063; ketamine 100=1.070.065; KCl=1.860.238).

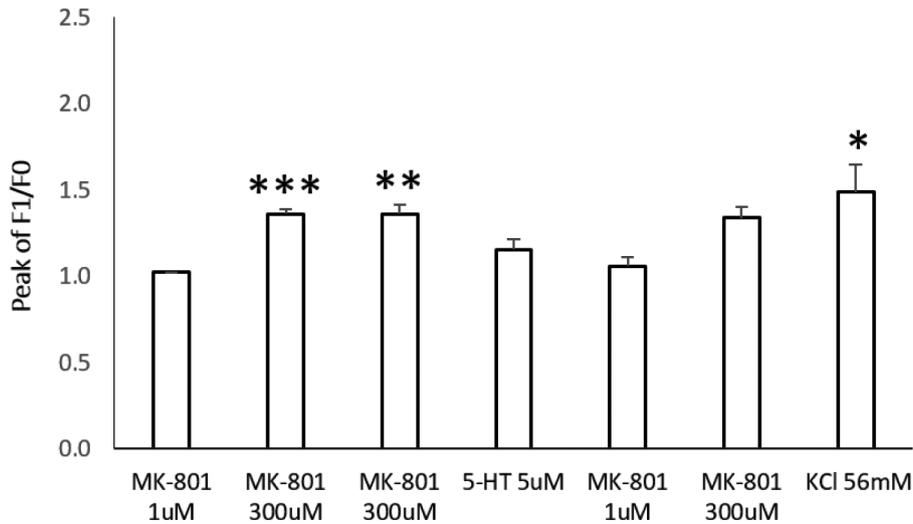


Figure 2. MK-801-induced calcium response in astrocytes. Astrocytes, which were loaded with 3 fluo-4/AM for 15 min, were mounted in a chamber. of MK-801 but not 10 increased intracellular calcium level. There were not significant differences in the 10 of MK-801 induced calcium transient after the pretreatment of 5serotonin. Data show the averaged F1/F0 of intensity.

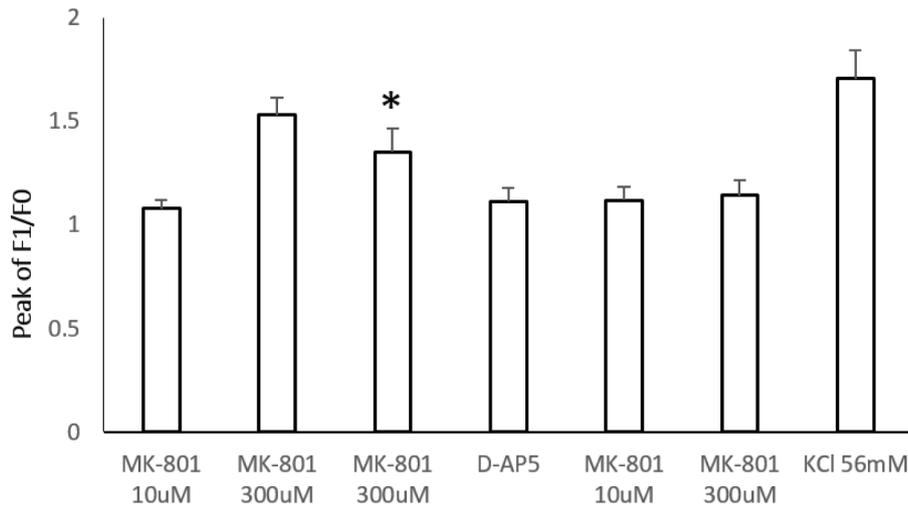


Figure 3. Effect of D-AP5 on the MK-801-induced calcium response in astrocytes. Astrocytes which were loaded with 3 fluo-4/AM for 15 min, was mounted in a chamber. MK-801 increased intracellular calcium level. D-AP5 blocked 10 MK-801-induced calcium transient. Data show the averaged peak of F1/F0 (MK-801 10=1,0790,040; MK-801 300=1,5310,082; second MK-801 300 =1,3530,112; D-AP5=1,1140,063; MK-801 10=1,1190,064; MK-801 300=1,1430,07; KCl=1,7040,137).

결론

성상세포로부터의 신경아교물질 분비 기전과 관련해서는 기계적 자극(mechanical stimulation), 막전압 탈분극 (depolarization), 신경전달물질에 대한 반응의 결과로서 성상교세포 내 칼슘 흥분성이 중요할 것으로 알려져 있으나 신경세포의 흥분성 기전 연구에 비해 아직까지 연구가 활발히 이루어져 있지 않다 (Takahiro yaguchi and Tomoyuki Nishizaki, 2010). 성상교세포 칼슘은 또한 자폐증 (autism), 우울장애 (major depression disorder)을 포함한 다양한 형태의 신경병증성 질환 조절 약물에 의해서도 영향을 받는다 (Carola G etl al 2011). 예를 들어, 세포토닌 흡수 억제제인 citalopram과 fluoxetine은 대표적인 SSRI (selective serotonin reuptake inhibitors)로서 임상적으로 우울증 치료에 많이 사용 되는 약물이다. 이러한 SSRI는 신경세포뿐만 아니라 비신경세포인 일부 성상교세포 (전체 성상교세포 중 34~38%)에서도 세포내 칼슘 흥분성을 유발시키는 것으로 보고되고 있으나 (Carola G etl al 2011), 관련 기전에 대해서는 알려져 있지 않다. 성상교세포에는 중추 흥분성 신호전달 수용체인 채널형 NMDA (methylaspartatereceptor) 수용체 아형들 중 NR1, NR2A, NR2B- 발현이 되어 있다고 알려져 있다 (Ye Zhou, 2010). NMDA 수용체 길항제인 케타민과 디조실핀 (MK-801)은 해마의 신경세포에서 NMDA 수용체에 결합하여 신경세포내로의 칼슘이온의 유입을 억제함으로써 신경세포내 단백질의 합성 과정을 억제하는 칼슘의존적 CaMKII (eukaryotic elongation factor 2 kinase, eEF2K)를 억제시킨다. 이러한 신경세포내 단백질 탈억제 (disinhibition)을 통해 세포내 단백질 합성 과정을 촉진시키고, 이 과정에서 증가된 BDNF에 의해 항우울

효과를 보이는 것으로 보고된 바 있다 (Anita E et al 2011). 현재까지는 성상교세포에서 NMDA 수용체 길항제와 관련한 연구 결과는 보고된 바 없다. 비신경 세포인 성상교세포를 이용한 본 연구에서, 비록 NMDA 수용체 길항제인 케타민의 처리에 의한 세포 내 칼슘 반응은 보이지 않았지만 다른 길항제인 MK-801에 의한 칼슘 반응은 증가하였음이 관찰되었다. 이는 신경계에서는 케타민과 디조실핀 (MK-801)이 신경세포막상에 존재하는 흥분성 글루탐산 수용체인 NMDA 수용체에 작용하는 것과는 다른 방식으로 성상교세포에서 작용할 가능성이 있다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있다. 실제 신경세포에서 케타민과 디조실핀 (MK-801)은 NMDA 수용체에 대해 각각 IC 50이 각각 0.43친화도에 차이는 있으나 동일한 억제효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 관찰된 디조실핀 (MK-801)에 의한 성상교세포의 칼슘 흥분성 증가 기전은 선택적 NMDA 수용체 억제제인 D-AP5에 의해서 억제되었으며, 이를 통해 성상교세포에서의 NMDA 수용체 억제가 세포내 칼슘 증가에 관여하는 것으로 생각이 된다. 성상교세포에 대한 케타민의 무효과와 관련해서는 성상교세포에 존재하는 NMDA 수용체 아형 (subtypes)의 차이를 포함하여 실제 케타민과 디조실핀 (MK-801)이 NMDA 수용체가 아닌 다른 종류의 수용체 및 이온 통로에 대한 작용 가능성도 생각해 볼 수 있다. 실제 신경세포에 대해서도 케타민은 GABAA수용체 $\alpha 6\beta 2\delta$ 와 $\alpha 6\beta 3$ 수용체를 조절 할 수 있으나, 디조실핀 (MK-801)의 경우는 GABAA수용체 $\alpha 6\beta 2\delta$ 에 대한 조절 기전을 가지지 못하는 것으로 알려져 있다 (Hevers et al, 2008). 또한 케타민과 디조실핀 (MK-801)은 도파민 수용체 D(2) 및 세로토닌 5-HT₂ 수용체에 대한 부분적 agonist로 작용하는 것으로 알려져 있다 (kapur and Seeman, 2002).

세로토닌은 모노아민 계열의 신경전달 물질 중 하나로서 감정, 식욕, 수면 등을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Arango et al, 2002). 본 실험에서는 성상교세포에서 칼슘 흥분성을 일으킬 수 있는 고농도 (20 μ M) 대신 5 μ M의 낮은 세로토닌 농도 조건하에서의 MK-801에 의한 칼슘 반응을 측정함으로써, 디조실핀 (MK-801)에 대한 칼슘 흥분성에 미치는 세로토닌 수용체의 역할을 조사 하였으나 디조실핀 (MK-801)에 의한 칼슘 증가에 세로토닌 수용체 활성화가 영향을 미치지 못한다는 것을 확인하였다. 세로토닌 수용체에 대한 디조실핀 (MK-801)의 직접적인 작용 가능성과 관련해서는 세로토닌 수용체 억제제를 이용한 추가 연구가 진행 되어야 할 것으로 생각된다. 양성 대조군으로서 세로토닌 단일제제에 대해서는 칼슘 반응이 나타난 것은 관찰하였다.

본 연구결과를 통해서 성상교세포에서 비경쟁적 NMDA 수용체 길항제인 케타민은 성상교세포 칼슘 흥분성에 어떠한 영향도 미치지 않는 반면, 디조실핀 (MK-801)은 성상교세포 칼슘 흥분성에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 이러한 결과들이 NMDA 수용체 기능 부진에 의해서 발생하는 질병치료를 위해 항정신성 자극제로 많이 사용되는 NMDA 수용체 억제제에 대하여 비신경 세포의 약물반응 양태를 확인할 수 있게 해주며, 해당 약물들에 대한 신경계의 전반적 작용에 대한 이해를 넓히는데 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74, 595-636.
- Narges Bazargani & David Attwell. 2016. Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nature neuroscience*.
- Azmitia, E.C, Gannon P.J, Kheck, N.M & Whitaker-Azmitia, P.M. 1996. Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology*, 14, 35-46.
- Gull-Britt Hagberg, Fredrik Blomstrand, Michael Nilsson, Hadassah Tamir, Elisabeth Hansson. 1998. Stimulation of 5-HT_{2A} receptors on astrocytes in primary culture opens voltage-independent calcium channels. *Neurochem. Int*, 32, 153-162.
- Hirst W.D, Price G.W, Rattray M & Wilkin G.P. 1997. Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br. J. Pharmacology*, 120, 509-515.
- Nilsson, M, Hansson, E Ronnback L. 1991. Heterogeneity among astroglial cells with respect to 5-HT-evoked cytosolic calcium responses. A microspectrofluorimetric study on single cells in primary cultures. *Life Sci*, 49, 1339-1350.
- McGirr a, Berlim MT, Bond DJ, Fleck MP, Yatham LN, Lam RW. 2015. A systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials of ketamine in the rapid treatment of major depressive episodes. *Psychol Med*, 45, 693-704.
- Zarate CA Jr, Mathews D, Ibrahim L, Chaves JF, Marquardt C, Ukoh I. 2013. A randomized trial of a low-trapping nonselective N-methyl-D-aspartate channel blocker in major depression. *Biol Psychiatry*, 74, 257-264.
- Kazumi Yoshizawa, Tomohisa Mori, Tamami Ueno, Mizuki Nishiwaki, Masahiro Shibasaki, Norifumi Shimizu, Minoru Narita, Tsutomu Suzuki. 2013. Involvement of Serotonin receptor mechanisms in the discriminative stimulus effects of ketamine in rats. *J Pharmacol Sci*, 121, 237-241.
- Takahiro Yaguchi, Tomoyuki Nishizaki. 2010. Extracellular high K⁺ stimulates vesicular glutamate release from astrocytes by activating voltage-dependent calcium channels. *J. Cell. Physiol*, 225, 512-518.
- Carola G. Schipke, Isabella heuser, Oliver Peters. 2011. Antidepressants act on glial cells: and serotonin elicit astrocyte calcium signaling in the mouse prefrontal cortex. *J. Psychia. Res*, 45, 242-248.
- Ye Zhou, Hui Li Li, Rui Zhao, Li Tao Yang. 2010. Astrocytes express N-methyl-D-aspartate receptor subunits in development, ischemia and post ischemia. *Neurochem Res*, 35, 2124-2134.
- Anita E. Autry, Megumi Adachi, Elena Nosyreva, Elisa S. Na, Maarten F. Los, Peng-Fei Cheng, Ege T. Kavalali, Lisa M. Monteggia. 2011. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, Vol 475, 91-95.
- Wulf Hevers, Stephen H. Hadley, Hartmut Luddens, Jahanshah Amin. 2008. Ketamine, but not Phencyclidine, selectively modulates cerebellar GABA_A receptors containing $\alpha 6$ and δ subunits. *J. Neuroscience*, 28, 5383-5393.
- S Kapur, P Seeman. 2002. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{2A} receptors implications for models of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 7, 837-844.
- Arango V, Underwood MD, Mann JJ. 2002. Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Progress in brain Res*, 136, 443-453.