

장기간 플루세틴 처리에 의한 흰쥐 해마에서의 NCAM140 유전자 발현의 증가

최미란¹⁾ · 채영규¹⁾ · 정경화¹⁾ · 백승연¹⁾ · 김석현²⁾
노성원²⁾ · 최준호²⁾ · 이준석³⁾ · 최인근⁴⁾ · 양병환²⁾†

Chronic Treatment of Fluoxetine Increases Expression of NCAM140 in the Rat Hippocampus

Mi Ran Choi, Ph.D.,¹⁾ Young Gyu Chai, Ph.D.,¹⁾ Kyoung Hwa Jung, Ph.D.,¹⁾ Seung Youn Baik, Ph.D.,¹⁾
Seok Hyeon Kim, M.D., Ph.D.,²⁾ Sungwon Roh, M.D., Ph.D.,²⁾ Joonho Choi, M.D., Ph.D.,²⁾
Jun-Seok Lee, M.D., Ph.D.,³⁾ Ihn Geun Choi, M.D., Ph.D.,⁴⁾ Byung-Hwan Yang, M.D., Ph.D.²⁾†

ABSTRACT

Objectives : Most of the mechanisms reported for antidepressant drugs are the enhancement of neurite outgrowth and neuronal survival in the rat hippocampus. Neural cell adhesion molecule 140(NCAM140) has been implicated as having a role in cell-cell adhesion, neurite outgrowth, and synaptic plasticity. In this report, we have performed to elucidate a correlation among chronic antidepressant treatments, NCAM140 expression, and activation of phosphorylated cyclicAMP responsive element binding protein(pCREB) which is a downstream molecule of NCAM140-mediated intracellular signaling pathway in the rat hippocampus.

Methods : Fluoxetine(10mg/kg) was injected acutely(daily injection for 5days) or chronically(daily injection for 14days) in adult rats. RNA and protein were extracted from the rat hippocampus, respectively. Real-time RT-PCR was performed to analyze the expression pattern of NCAM140 gene and western blot analyses for the activation of the phosphorylation ratio of CREB.

Results : Chronic fluoxetine treatments increased NCAM140 expression 1.3 times higher than control in rat hippocampus. pCREB immunoreactivity in the rat hippocampus with chronic fluoxetine treatment was increased 4.0 times higher than that of control.

Conclusion : Chronic fluoxetine treatment increased NCAM140 expression and pCREB activity in the rat hippo-

¹⁾한양대학교 분자생명과학부 *Division of Molecular & Life Sciences, Hanyang University, Ansan, Korea*

²⁾한양대학교 의과대학 신경정신과학교실 및 정신건강연구소

Department of Neuropsychiatry, College of Medicine & Institute of Mental Health, Hanyang University, Seoul, Korea

³⁾관동대학교 의과대학 신경정신과학교실

Department of Neuropsychiatry, College of Medicine, Kwandong University, Goyang, Korea

⁴⁾한림대학교 의과대학 신경정신과학교실

Department of Neuropsychiatry, College of Medicine, Hallym University, Seoul, Korea

†교신저자 : 양병환, 133-792 서울 상동구 행당동 17

전화) (02) 2290-8422, 전송) (02) 2298-2055, E-mail) bhyang@hanyang.ac.kr

campus. Our data suggest that NCAM140 and pCREB may play a role in the clinical efficacy of antidepressants promoting the neurite outgrowth and neuronal survival.

KEY WORDS : Fluoxetine · Hippocampus · NCAM140 · CREB · pCREB.

서 론

이미 성장이 멈춘 성인의 해마(hippocampus)와 후신경구(olfactory bulb)에서 일생을 통해 지속적으로 신경세포가 만들어지며, 신경세포의 지속적인 생성은 학습과 기억 등의 해마 기능에 영향을 준다.¹⁻³⁾ 새로 만들어지는 신경세포의 수(쥐의 경우 1,000~3,000개/일)는 해마의 과립세포층(granule cell layer)에 이미 존재하는 신경세포의 수(쥐의 경우 100~200만 개)에 비하면 적지만, 평생을 놓고 보자면 전체의 10~20%에 이르는 수이다.⁴⁾ 이렇게 새로 생성되는 미성숙한 신경세포가 지속적으로 추가되는 해마부위, 특히 치상회(dentate gyrus)는 갑작스런 스트레스에 노출되면 세포증식이 감소한다.⁵⁾ 또한 해마의 CA3 추체 신경세포(pyramidal neuron)는 반복된 스트레스를 받으면 위축을 유발하며 첨단축삭돌기(apical dendrites)의 길이와 수도 감소한다.⁶⁾ 해마는 이같이 스트레스처럼 환경적인 영향으로 구조변화가 일어날 수 있으며, 이러한 구조변화로 인하여 우울증을 포함한 다양한 정신질환이 유발될 수 있다.⁷⁾

최근에는 항우울제와 관련하여 해마에서의 신경세포 성장과 신경돌기 성장 및 세포 생존에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Nibuya 등⁸⁾은 삼환계 항우울제인 imipramine을 흰쥐 해마에 장기간 투여 후 cyclic AMP (cAMP) 경로가 활성화되고, cAMP responsive element binding protein(CREB)의 발현이 증가하였다고 보고하였다. 또한 항우울제 투여에 의한 CREB의 증가는 brain-derived neurotrophic factor(BDNF)와 BDNF의 수용체인 tyrosine kinase B(trkB) 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ Palmer 등¹⁰⁾은 항우울제 투여 후 CREB와 BDNF의 발현 증가가 신경세포의 생존과 분화는 증가시켰지만 세포 증식에는 영향을 미치지 않는다고 보고하여 세포 증식은 cAMP와 CREB 관여 경로 외에도 다양한 다른 경로가 있음을 보이고 있다.

신경세포 분화와 관련하여 중요하게 다루지고 있는 물

질 중에 하나인 neural cell adhesion molecule(NCAM)은 세포내 신호전달경로를 활성화 시켜 신경돌기 성장과 세포 생존 등을 촉진시키는 면역글로블린이다.¹¹⁾ NCAM은 mRNA에서 유전암호해독(translation) 후에 polysialic acid(PSA)를 NCAM의 다섯 번째 면역글로블린 도메인에 부착하여 형성성(plasticity)을 촉진시킨다. 따라서 PSA-NCAM이 발생하는 동안 감수분열 후의 신경세포에 많이 분포하고, 성인 뇌에서는 계속적으로 감소하여 낮은 수준으로 존재하며 미성숙 신경세포들에 대한 표지자로서 연구되기도 한다.²⁾ 성인의 뇌에서 PSA-NCAM이 낮게 존재한다는 것은 신경세포 분화가 활발히 진행되고 있지 않다는 것을 의미하며, 외부 스트레스나 바이러스와 세균 감염 같은 환경적인 요인들에 의해 신경세포가 쉽게 손상될 수 있으며, 회복 역시 느리다는 것을 시사한다. NCAM의 세 가지 이성질체 중 하나인 NCAM140은 Ras-Raf-MEK-ERK 경로와 FGFR-PLC γ -DAG-AA 경로를 조절하여 CREB를 활성화 시켜 CREB에 의한 신경돌기 성장과 세포생존에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 이와 같은 신호전달과정을 통한 NCAM140의 신경돌기 성장에 관해 시험관내(*in vitro*)¹²⁾¹³⁾와 생체내(*in vivo*)¹⁴⁾에서 꾸준히 연구되고 있지만, 최근까지도 시험관내와 생체내에서 항우울제에 의한 NCAM140 발현 조절과 NCAM140이 관여하는 신경세포 성장과 신경돌기 형성에 관한 관련 연구는 미비하다.

플루세틴은 최초의 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitor, 이하 SSRI)로써 강력한 항우울 효과를 나타내며, 세로토닌 수송체(transporter)에 선택적으로 작용하기 때문에 세로토닌의 신경전달을 증가시키는 약물로 널리 이용된다.¹⁵⁾¹⁶⁾ 그러나, 플루세틴을 포함한 SSRI 계열 항우울제들은 투여 후 세로토닌 재흡수 작용은 단기간에 일어나지만, 우울증 치료의 임상 효과는 2 내지 3주의 일정한 기간이 경과해야 발현되고,¹⁷⁾ 단기간 투여한 경우에는 항우울제 치료 효과가 나타나지 않아서 세로토닌 재흡수 억제 작용이외의 다른 기전이 존재할 것으로 추측된다.¹⁸⁾ 추정되는 여러 가

능성들 중 하나는 신경세포 생성과 생존에 관련된 세포 내 신호전달경로와 그에 관련된 유전자들이 연관된 좀 더 복잡한 과정에 의해 항우울제 치료 효과가 있을 것이라는 가능성이다.¹⁹⁾

본 연구는 흰쥐 해마에서 SSRI계인 플루세틴의 투여 기간에 따라 NCAM140 유전자 발현과 NCAM140의 세포내 신호전달과정의 하부에 위치한 CREB의 활성화를 측정하여, 이들이 관여하는 신경 성장과 플루세틴과의 연관성을 연구하고자 하였다.

방 법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 7주령(200~250g)의 specific pathogen free (SPF) Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하여 플루세틴 투여군과 대조군으로 나누었다(Charls River). 플루세틴 투여군을 5일(F5군), 14일(F14군) 경과군으로 나누었고 대조군도 5일(C5군), 14일(C14군) 경과군으로 나누었으며, 각 군당 5마리의 실험동물을 사용하였다.

실험기간 중 사료와 식수는 임의로 주었고, 22℃에서 12시간 간격으로 빛이 조절되는 곳에서 한 cage당 3마리씩 사육하였다.

2. 플루세틴 투여

Marcussen 등²⁰⁾의 연구에서 흰쥐에 체중 1kg당 10mg의 플루세틴을 장기간 투여하여 신경재생(neurogenesis)을 유도하였다는 근거를 바탕으로, 본 연구에서도 동량의 플루세틴을 투여하였다. 투여군(F5와 F14군)의 흰쥐에는 체중 1kg당 10mg의 플루세틴을 주사용 증류수에 용해시켜(40mg/10mL) 경구로 투여하였다. 대조군(C5와 C14군)의 실험동물에는 주사용 증류수만을 동량 투여하였다. 이들 투여군과 대조군은 매일 같은 시각에 처치하였고, 각각 5일, 14일에 걸쳐 투여하였다.

3. RNA 분리

RNA 분리는 Invitrogen사가 제공하는 방법으로 수행하였다. 해마 조직 100mg을 trizol 1mL를 넣고 조직을 으갠 후, 1.5mL 튜브에 옮기고 200 μ L의 chloroform을 첨가하였다. 튜브 뚜껑을 15초간 와류(vortexing)하고 상온에서 2 내지 3분간 방치하였다. 후에 12,000rpm,

15분, 4℃에서 원심분리하였다. 이후 tip 끝으로 조심스럽게 상층액을 수거한 후 새로운 튜브에 옮기고 동량의 isopropyl alcohol을 넣고 상온에서 10분간 방치하였다. 후에 12,000rpm, 15분, 4℃에서 원심분리하였다. 겔 같은 응집체 형성을 확인하고 상층액을 제거하였다. 75% 에탄올(diethyl pyrocarbonate(DEPC) 투여 증류수)을 1mL 첨가한 후 교반하고 7,500rpm, 5분, 4℃에서 원심분리하여 남아있는 상층액을 모두 제거하였다. RNA 응집체를 5분에서 10분 동안 상온에서 건조시킨 후 DEPC 투여된 3차 증류수 30 μ L를 가하여 녹인 다음 56℃에서 10분간 방치하였다. 분광편광계(spectrophotometer)에서 파장 260nm와 280nm로 시료를 측정하여 A_{260}/A_{280} 의 값이 1.7 이상인지 확인하였다. 전기영동으로 RNA가 잘 분리되었는지도 확인하였다.

4. 실시간 RT-PCR

NCAM140 유전자를 실시간 RT-PCR로 3회 이상 반복 실험하여 유전자 발현 정도를 측정하였다.

역전사(reverse transcription) 과정은 Promega사가 제공하는 방법으로 수행하였다. 대조군과 플루세틴 투여군 흰쥐 해마에서 분리한 전체 RNA 2 μ g, oligo(dT) 15 primer 1 μ L와 DEPC 투여 3차 증류수를 첨가하여 총 15 μ L가 되도록 하였다. 이 혼합액을 70℃, 5분간 반응시킨 후 즉시 얼음에서 식혔다. 이 혼합액에 RNasin ribonuclease inhibitor 30units, 5X reaction buffer 6 μ L, 2.5mM dNTP mixture 6 μ L, M-MLV reverse transcriptase 200units을 첨가하여 최종적으로 30 μ L가 되도록 DEPC를 투여한 3차 증류수를 첨가하고, 42℃에서 1시간 방치하여 cDNA를 합성하였다.

대조군과 투여군 전체 RNA에서 합성한 cDNA를 주형으로 실시간 PCR(iCycler iQ system, Bio-Rad)을 수행하였다. PCR 반응 동안 증폭된 두 가닥 DNA의 소 홈(minor groove)에 SYBR green이 끼어들어 나타나는 형광을 측정하는 검출방법을 사용하였다. 반응은 Bio-Rad사로부터 제공된 설명서에 따라 수행하였다. 12.5 μ L의 iQ SYBR green supermix(Bio-Rad)와 sense primer 10pmol(1 μ L), antisense primer 10pmol(1 μ L), cDNA 0.5 μ L, 3차 증류수 10 μ L를 혼합하여 총 25 μ L가 되도록 첨가한 후, β -actin으로 표준화하였다. 반응 조건은 95℃에서 주형 cDNA 가닥의 열변성 과정(denaturation step) 30초, 56℃에서 시발체 어닐링 과정

정(annealing step) 30초, 72°C에서 DNA 합성 과정(extension step) 30초를 40회 반복하였다. 후에 95°C에서 1분간 DNA 가닥의 열변성 과정을 실시한 후, 55°C에서 1분간 어닐링 과정을 수행하고, 0.5°C씩 10초 간격으로 온도를 올려주면서 증폭된 DNA의 melting 온도를 결정하여 합성된 DNA를 확인하였다. 결과 분석은 Bio-Rad 사로부터 제공된 iCycler 프로그램을 이용하였다. 실험으로부터 얻어진 cycle threshold(C_T) 값은 2^{-ΔΔC_T}법(comparative C_T method)을 사용하였다.²¹⁾ 2^{-ΔΔC_T}법을 간략히 설명하면 다음과 같다. 플루세틴을 투여한 흰쥐 해마와 대조군 흰쥐 해마에서 NCAM140과 β-actin의 C_T값을 얻은 후, NCAM140의 C_T값에서 β-actin의 C_T값을 빼서 ΔC_T값을 얻는다. 얻어진 ΔC_T값에서 ΔΔC_T값을 얻기 위해 플루세틴 투여한 흰쥐 해마에서 얻은 NCAM140의 ΔC_T값을 대조군 흰쥐 해마에서 얻은 NCAM140의 ΔC_T값으로 빼준다. 얻어진 ΔΔC_T값을 2^{-ΔΔC_T}에 넣어 계산하여 나온 값으로 대조군에 비해 플루세틴을 투여한 흰쥐 해마에서 NCAM140의 mRNA 발현이 증가했는지 감소했는지 알 수 있다. 최종 계산한 값이 '1'보다 높으면 발현이 증가한 것이고, '1'보다 낮으면 발현이 감소되었다고 해석할 수 있다.

실시간 PCR에 사용된 primer는 Genamics expression program을 사용하여 제작하였고, primer 서열은 다음과 같다.

NCAM140 : 5'-AGA TCC GAG GCA TCA AGA AA-3', 5'-ATC CTT TGT CCA GCT CAT GGT-3'. β-actin : 5'-ACC GGA GAG CAT TCA GTG AT-3', 5'-TGC AAT CCG ACT CAC CAA TA-3'.

5. 단백질 분리

흰쥐 해마 조직 1mg에 1mL의 lysis buffer(5mM potassium phosphate, pH 6.5, containing 0.2% Triton X-100)를 넣고 조직분쇄기(homogenizer)로 으갠다. 으갠 조직을 -70°C에서 얼린 후, 다시 녹여 4°C 회전 진탕기(orbital shaker)에서 15분 동안 회전시키고, 4°C, 13,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 새로운 1.5mL 튜브에 옮겼다. 단백질 정량과 western blot을 하기 전까지 얻어진 단백질을 -70°C에 보관하였다.

6. 단백질 정량

흰쥐 해마로부터 얻은 단백질을 정량하였다. Protein

assay kit(Bio-Rad)를 1 : 5의 비율로 증류수에 희석하여 준비하였다(working solution). BSA standard를 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0mg/mL로 준비하였다. 96well plate에 standard를 10 μL씩 넣은 후 working solution을 200 μL씩 첨가했다. 분리한 단백질을 10배 희석하여 10 μL씩 96well plate에 넣은 후 working solution을 200 μL씩 첨가하였다. 준비된 standard와 정량하고자 하는 단백질을 5분간 상온에 방치하였다. ELISA reader를 이용하여 파장 595nm에서 흡광도를 측정하였고, standard curve를 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다.

7. 웨스턴 블롯(Western blot) 분석

CREB 발현과 pCREB의 활성 양상을 살펴보기 위해 흰쥐 해마에서 추출한 전체 단백질에 대해 polyclonal rabbit anti-CREB 항체(Cell signaling)와 polyclonal rabbit anti-pCREB 항체(ser133)(Cell signaling)를 사용하여 각각 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 동량의 단백질을 Laemmli sample 용액(62.5mM Tris-Cl, pH 6.8 ; 2% SDS ; 10% glycerol ; 0.5% β-mercaptoethanol ; 10 μg/mL bromophenol blue)에 넣고 5분간 끓인 후 12% 폴리아크릴아마이드 젤(polyacrylamide-gel)에 넣고 80V에서 전기영동한 다음, 20% 메탄올 용액에서 젤내의 단백질을 30V로 4°C에서 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 overnight 이송시켰다. 나이트로셀룰로스 막을 5% 탈지분유(nonfat-dry milk)가 포함된 TBS-T 완충액{20mM Tris-HCl (pH 7.6), 500mM NaCl, 0.1% Tween 20}에 넣고 교반기에서 상온으로 1시간 방치하였다. Polyclonal rabbit anti-CREB 항체{polyclonal rabbit anti-pCREB 항체(ser 133)}를 1 : 1,000배 희석하여 첨가한 TBS-T 완충액 속에서 4°C에서 overnight 교반시켰다. 교반기 위에서 TBS-T 완충액으로 나이트로셀룰로스 막을 10분씩 3회 씻은 후, HRP-conjugated anti-rabbit IgG를 1 : 2,000배 희석하여 첨가한 TBS-T 완충액으로 10분씩 3회 씻은 후, 1 : 40으로 섞은 ECL+ 시약에 반응시키고 필름으로 감광하였다.

8. 통계 분석

모든 실험값은 평균값±표준오차(mean±standard error)로 하였고, 통계 분석은 SPSS(Statistical Package for Social Science) 11.0 version(SPSS, USA)을 이용

하였다. 약물 투여에 따른 NCAM140과 CREB의 발현 및 pCREB의 활성 양상의 차이를 보기 위하여 two-way ANOVA를 사용하였고, 각 집단 사이의 통계학적 유의성은 post hoc test (Tukey test)를 이용하여 검정하였다.

결 과

1. 플루세틴에 의한 NCAM140 mRNA 발현 증가

F5군 흰쥐 해마의 경우 얻어진 C_T 값을 actin으로 보정한 후 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 공식으로 환산하여 C5군과 비교했을 때 NCAM140 mRNA의 발현에 변화가 없었다.

F14군 흰쥐 해마의 경우 actin으로 보정하여 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 공식으로 환산했을 때 C14군에 비해 1.3배 정도 증가를 보였으며, 통계적으로 유의성이 있었다($p < 0.05$; $n = 3$) (그림 1). 따라서, 장기간 플루세틴을 투여하면 NCAM140 mRNA의 발현이 증가함을 확인하였다.

2. 대조군과 플루세틴 투여군과의 시간별 CREB 변화

단기간(F5와 C5)군과 장기간(F14와 C14)군 흰쥐 해마로부터 얻은 전체 단백질을 이용하여 단기간과 장기간 CREB의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 본 연구에 사용된 CREB 항체는 비인산화된 CREB와 인산화된 CREB 모두에 결합할 수 있는 항체이다. F5군의 경우 C5군과의 CREB 발현의 차이가 없었으나, F14군과 C14군 사이의 CREB 발현은 현저히 차이가 났다. C14군에서는 CREB의 발현이 관찰되지 않았다.

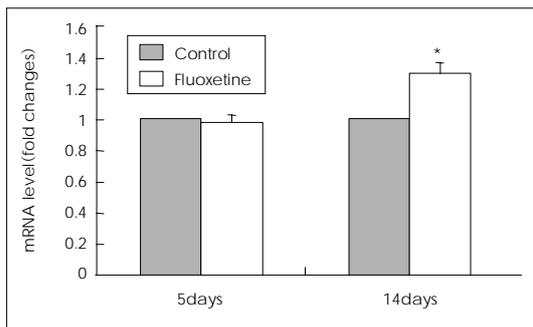


Fig. 1. Real-time RT-PCR of mRNA expression of NCAM140 by fluoxetine in rat hippocampus. Y axes represent the values of $2^{-\Delta\Delta CT}$, and on the basis of control value 1, calculated values of mRNA level changed by fluoxetine treatment were plotted. Values represent mean \pm SEM ($n = 3$). *: significantly different from the control ($p < 0.05$). ANOVA followed by Tukey HSD.

농도를 측정하여 actin으로 보정했을 때, 플루세틴 투여군은 육안으로 보는 것과는 달리 단기간인 F5군에 비해 장기간인 F14군 흰쥐의 해마내의 CREB가 약간 감소한 것으로 나타났으나 유의한 수치는 아니었다. C14군과 F14군을 비교했을 때 F14군의 CREB 증가가 눈에 두드러지게 나타났으며($p = 0.005$, $n = 4$), 통계적으로 유의성 있게 나타났다(그림 2B). 플루세틴의 장기간 투여는 CREB의 발현 증가를 유도할 가능성을 확인하였다.

3. 대조군과 플루세틴 투여군과의 시간별 pCREB 변화

CREB가 세포내 신호전달경로를 통해 serine 133번째 잔기에서 인산화(pCREB)가 되면 활성화되어 세포 생존이나 신경돌기 성장 관련 유전자의 전사촉진 인자로 작용한다. 위와 같은 역할을 하는 pCREB의 활성이 플루세틴에 의해 변화하는지를 확인하기 위하여, 대조군(C5와 C14군)과 플루세틴 투여군(F5와 F14군) 흰쥐 해마로부터 전체 단백질을 얻어 pCREB의 활성 변화를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 대조군의 경우 C5와 C14군 모두 pCREB의 활성이 적었으며, 시간별 활성량에도 차이

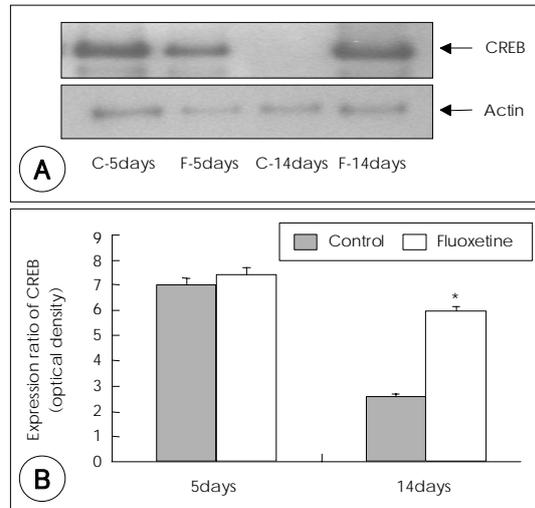


Fig. 2. The effect of fluoxetine on CREB expression in rat hippocampus. A : For detection of CREB, total proteins from hippocampus of control and fluoxetine-treated rat were separated on 12% SDS-PAGE and probed with polyclonal rabbit anti-CREB antibody. Actin was used as an internal control. B : Expression ratio of CREB was represented as optical density from band of x-ray film. Values represent mean \pm SEM ($n = 4$). For statistical analysis, we conducted two-way ANOVA followed by Tukey's HSD. *: significantly different from control ($p < 0.05$). C : control, F : fluoxetine.

가 없었다(그림 3A). 플루세틴 투여군은 단기간인 F5군에서는 pCREB의 활성이 사진상에서 C5군과 거의 차이가 없었으나, F14군 흰쥐의 해마에서의 활성은 C14군

에 비해 현저히 증가함을 관찰할 수 있었다(그림 3A). 또한 농도를 측정하여 actin으로 보정했을 때 F5군은 C5군과 유의한 차이가 보이지 않았으나(n=4), F14군 흰쥐 해마의 경우에 C14군에 비해 3배 이상 활성 증가를 보였고($p < 0.001$; n=4), 통계적으로 유의하게 나타났다(그림 3B). 따라서 플루세틴을 장기간 투여할 경우 흰쥐 해마에서 pCREB의 활성이 증가함을 확인할 수 있었다.

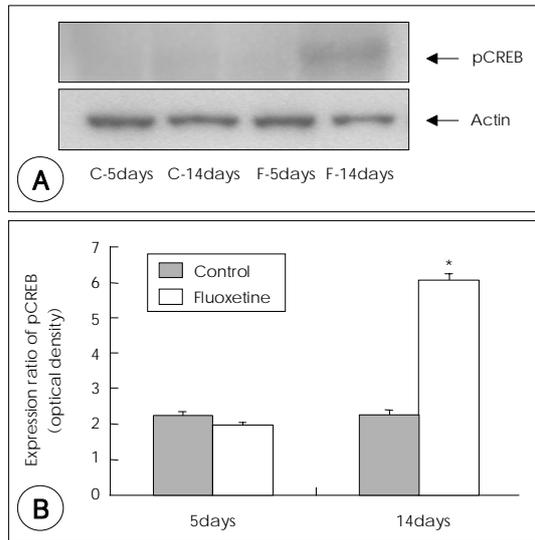


Fig. 3. The effect of fluoxetine on pCREB expression in rat hippocampus. A : For detection of pCREB, total proteins from hippocampus of control and fluoxetine-treated rat were separated on 12% SDS-PAGE and probed with polyclonal rabbit anti-pCREB antibody. Actin was used as an internal control. B : Expression ratio of pCREB was represented as optical density from band of x-ray film. Values represent mean \pm SEM (n=4). For statistical analysis, we conducted two-way ANOVA followed by Tukey's HSD. * : significantly different from control ($p < 0.05$). C : control, F : fluoxetine.

4. 시간별 CREB 발현과 pCREB의 활성 변화

대조군의 시간별 CREB과 pCREB를 관찰한 결과, 단기간인 C5군의 CREB보다 장기간인 C14군의 CREB 발현이 현저히 감소했으며($p = 0.001$; n=4), pCREB은 C5군과 C14군 사이의 활성 차이를 확인할 수 없었다(그림 4A). 따라서, 대조군은 시간이 지날수록 전체 CREB의 발현이 줄어들고, CREB의 활성화가 활발하지 못하다는 것을 추측할 수 있다.

CREB은 F5군에 비해 F14군의 발현이 약간 감소를 보였으나 유의하지는 않았으며, 인산화된 CREB인 pCREB은 14일간 투여한 경우 F5군에 비해 F14군의 활성이 4배 증가하였으며, 통계적으로 유의하였다($p < 0.005$; n=4)(그림 4B). 플루세틴에 의해 CREB의 발현은 초기에 증가를 보이다가 장기간으로 갈수록 다소 감소하지만, pCREB의 활성은 장기간 투여해야 증가함을 알 수 있었다. 시간별로 관찰했을 때 CREB의 발현과 pCREB의 활성이 대조군에 비해 플루세틴 투여군에서 증가를 보였다.

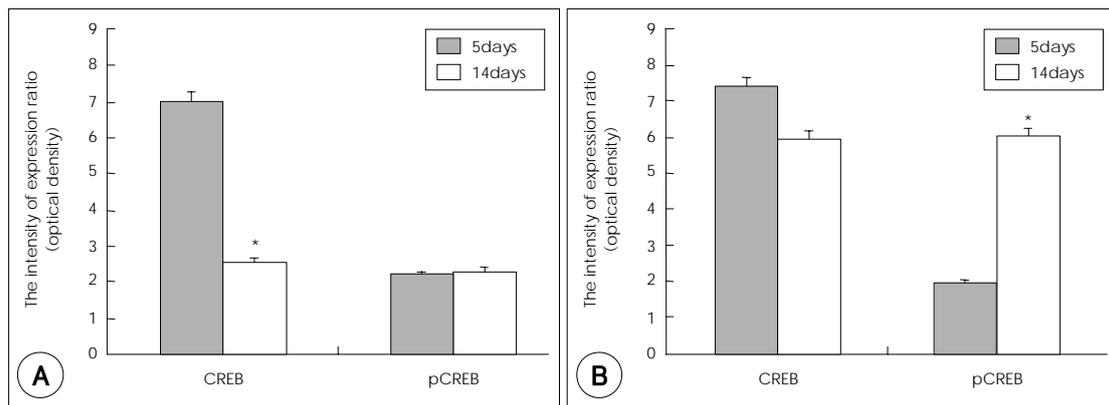


Fig. 4. Expression patterns of CREB and pCREB in rat hippocampus after fluoxetine treatments. A : Hippocampus of control rat. B : Hippocampus of fluoxetine-treated rat. Expression ratios of CREB and pCREB of hippocampus of control and fluoxetine-treated rats were represented as optical density from band of x-ray film. Values represent mean \pm SEM (n=4). For statistical analysis, we conducted two-way ANOVA followed by Tukey's HSD. * : significantly different from the 5 days group ($p < 0.05$).

고 찰

우울증 환자에서는 스트레스에 대한 반응으로 뇌에서 당질 코르티코이드(glucocorticoid)의 과분비를 보이거나 시상하부-뇌하수체-부신(hypothalamic-pituitary-adrenal, 이하 HPA)축의 활동항진이 있으며, 뇌의 해마에서는 부피의 감소를 보이거나 또는 해마의 CA3 추체 신경의 침단축삭돌기의 위축을 보인다.⁶⁾ 우울증 환자에서 항우울제를 장기간 투여한 경우 신경세포 손상이 감소한다.⁷⁾ 따라서 신경 손상의 억제 및 신경돌기 성장과 관련하여 항우울제의 작용기전을 알아보기 위해 신경돌기 성장에 관여하는 것으로 알려진 NCAM140과 SSRI계 항우울제인 플루세틴과의 연관성을 연구하였다.

신경돌기 성장과 시냅스 형성성에 관여하는 NCAM140이 시험관내에서 플루세틴을 장기간 투여시 mRNA 발현이 증가한다는 것이 보고되었다.²²⁾ NCAM은 활성을 띄는 단백질로 변환시 PSA가 결합하며 신경세포 발생 동안은 감수분열 후의 신경세포에 많이 분포하고, 성인 뇌에서는 계속적으로 감소하여 낮은 수준으로 존재한다.²⁾ NCAM이 낮은 수준으로 존재한다는 것은 이미 성장한 성인 뇌는 신경세포의 발생이 적으며, 신경돌기도 적게 만들어진다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 이미 성장한 흰쥐의 해마를 이용하여 항우울제에 의한 NCAM140 발현 변화를 연구하여 이미 연구 보고된 결과들과의 연관성 및 성인 뇌신경세포의 신경돌기 성장에 항우울제가 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 생체내에서 플루세틴에 의한 NCAM140의 mRNA 발현 양상을 관찰하기 위해 흰쥐에 단기과 장기 플루세틴을 투여한 후 흰쥐 해마내의 NCAM140의 mRNA 발현 변화를 관찰하였다. 플루세틴을 단기 투여한 예보다 장기 투여한 흰쥐 해마에서의 NCAM140의 mRNA 발현이 증가한 결과를 얻음으로써 플루세틴의 장기 투여는 NCAM140 mRNA의 발현을 증가시킴을 확인할 수 있었으며, 이미 성장이 멈춘 뇌에서도 신경돌기 생성에 관여하는 기전이 항우울제에 의해 촉진될 수 있는 가능성을 관찰하였다. 또한 Choi 등²²⁾의 연구에서 C6 세포에서의 장기 플루세틴 투여는 NCAM140 mRNA의 발현을 증가시킨다는 보고와 같은 양상을 보여주어 시험관내와 생체내에서의 플루세틴의 기능에 차이가 없음을 추측할 수 있다.

우울증 환자에 항우울제 투여시 해마의 CA3 추체 신

경의 신경돌기가 성장한다는 연구 결과⁷⁾는 종종 보고되는 반면 NCAM140 관련 신경돌기 성장에 관한 연구 보고는 미비한 편이다. 최근에 Wakabayashi 등²³⁾은 조울증(bipolar disorder) 환자의 말초혈액(peripheral blood) 세포에서 NCAM140 mRNA 발현을 정상인과 비교 분석한 결과 조울증 환자의 NCAM140 mRNA 발현이 2배 감소한 것으로 보고하여 조울증과 NCAM140의 연관성을 시사하였다. 또한 Seki와 Arai²⁴⁾가 성인 뇌에서 polysialic acid(PSA)-NCAM이 낮게 존재한다고 언급한 점을 고려했을 때, 본 연구에서 플루세틴의 장기 투여는 NCAM140의 발현을 증가시켰으며 플루세틴이 신경돌기 성장을 촉진시켜 신경세포 위축 등을 방지할 수 있음을 암시한다.

CREB은 다양한 유전자의 조절부위에 있는 cis-acting enhancer인 cAMP response element에 결합하여 유전자 전사를 조절하며, CREB의 serine 133번째 잔기가 인산화되면서(pCREB) 활성화된다.²⁵⁾ pCREB의 활성화는 cAMP 경로와 protein kinase A(PKA)의 활성화뿐만 아니라 Ca²⁺-dependent protein kinase들의 활성화에 의해 일어나는 것으로 알려지고, 세로토닌이나 노르에피네프린에 영향을 미치는 다양한 항우울제들의 공통된 하부 타겟(target)으로 작용할 것이라는 가능성을 제시하면서,⁹⁾²⁶⁾ 항우울제와 관련하여 지속적으로 연구되고 있다. 현재까지의 연구에 의하면 장기 항우울제 투여 후 CREB의 발현 증가와 활성화가 보인다고 보고하고 있다.²⁷⁻²⁹⁾ Nibuya 등⁸⁾은 플루세틴과 다른 항우울제들을 흰쥐에 단기과 장기 투여 후 흰쥐 해마에서 CREB의 mRNA 수준을 확인하였다. 플루세틴 투여군의 경우 3일 투여 후에 약간의 증가를 보이고, 10일 투여한 경우는 대조군에 비해 CREB의 mRNA 발현이 50% 이상 증가했다고 보고하여 플루세틴의 장기 투여는 CREB mRNA의 발현 증가를 유도한다고 보고하였다. 본 연구에서도 플루세틴을 단기과 장기 흰쥐에 투여 후 해마에서의 CREB의 발현과 pCREB의 활성을 관찰한 결과, CREB은 단기 투여군의 경우 대조군과 플루세틴 투여군 사이에 발현 차이가 없었으나, 장기 투여군은 단기 투여군에 비해 감소하는 경향이 있었지만 대조군의 감소폭보다 현저히 작은 것으로 보아 플루세틴이 CREB의 발현 증가에 영향을 미칠 가능성을 확인했으며, 이전의 연구 결과들²⁷⁻²⁹⁾과 유사한 결과가 관찰되었다. pCREB은 장기 투여군이 대조군에 비해 4배의 증가를

보여 항우울제의 장기간 투여는 CREB의 활성화(pCREB)를 증가시킨다고 보고한 이전의 결과³⁰⁾와 같은 결과를 얻었다. 따라서 플루세틴의 장기간 투여는 CREB의 발현도 촉진시키는 동시에 활성화도 증가시킨다고 볼 수 있으며, 발현과 활성화 증가에 영향을 미치는 신호전달과정은 다소 차이가 있을 수 있음을 시사한다.

Nakagawa 등³¹⁾은 이미 성장한 흰쥐 해마의 미성숙 신경세포에서 CREB의 활성화와 PSA-NCAM의 발현증가가 동시에 일어난다고 보고하여 NCAM에 의한 신경돌기 성장에 CREB가 연관되어 있음을 보여줬다. Sairanen 등³²⁾은 삼환계 항우울제인 imipramine을 흰쥐에 단기(60분)와 장기(21일) 투여한 후 흰쥐 뇌에서 PSA-NCAM, pCREB, 그리고 성장연관 단백질 43(growth-associated protein 43, 이하 GAP-43)의 발현을 관찰하였다. 이들은 imipramine을 장기간 투여한 경우 해마와 내측 전전두엽(medial prefrontal cortex) 그리고 조롱박 피질(piriform cortex) 모두에서 PSA-NCAM의 발현이 증가되는 반면, pCREB는 내측 전전두엽과 조롱박 피질에서만 증가되고 성장연관 단백질 43은 해마에서만 증가되는 것을 확인하여 PSA-NCAM에 의해 pCREB와 성장연관 단백질 43의 발현이 흰쥐 뇌 부위별로 다르게 조절될 수 있음을 시사하였다. 본 연구에서도 흰쥐 해마에서 장기간 플루세틴 투여에 의한 NCAM140 mRNA가 증가하는 것을 확인하였으며, NCAM140에 의한 신경돌기 성장을 촉진하는 경로에 관여하는 여러 단백질 중 하나인 CREB의 발현 양상과 pCREB의 활성이 플루세틴에 의해 흰쥐 해마에서 증가되는지 관찰하고자 하였다. CREB는 장기간 투여군이 대조군에 비해 발현 증가를 보인 반면 단기 투여군에 비해서는 다소 감소하는 경향을 보였으나 pCREB의 활성화는 장기간 투여군의 경우 단기 투여군에 비해 현저히 증가함을 보여 NCAM140의 발현과 같은 양상을 보였다. 또한 본 연구에서 확인된 CREB가 전체 CREB이라는 것을 고려하여 pCREB의 활성화 양상과 비교하면, 단기 투여군의 CREB는 비인산화된 CREB가 대부분이고, 장기간 투여군의 CREB는 인산화된 CREB가 주류일 가능성이 높다. 따라서 CREB는 NCAM140에 의해 발현이 증가되기보다는 인산화로 인한 활성이 증가된다고 할 수 있다. 또한 이전의 연구³²⁾에서 imipramine의 장기간 투여가 흰쥐 해마에서 PSA-NCAM과 성장연관 단백질 43의 발현을 증가시키는 반면 pCREB의 활성화 증가는 유도하지 못하였으나, 본 연

구에서 플루세틴은 NCAM140과 pCREB의 활성을 증가시키는 것으로 관찰되어 같은 항우울제라도 NCAM의 조절 경로가 다를 수 있음을 보여주었다.

본 연구에서 저자들은 플루세틴의 효과는 신경세포 성장과 생존에 관련된 유전자나 단백질의 활성화에 있으며, 장기간의 시간이 필요함을 규명하였다. 이는 임상적으로 우울증 환자에서 항우울제가 치료 효과를 나타내는 데 일정 시간이 필요하다는 이전의 보고들과 일치한다. 또한 위의 연구 결과를 기초로 향후 플루세틴을 21일 이상의 장기간 투여 후 흰쥐 뇌에서 부위별 NCAM140 유전자 및 단백질 발현을 좀 더 분석해야 할 연구가 과제로 남아있다.

결 론

목 적

흰쥐 해마에서 보고된 항우울제의 기전 대부분은 신경돌기 성장 및 신경세포 생존의 증가에 있다. Neural cell adhesion molecule 140(NCAM 140)은 세포-세포 접착, 신경돌기 성장, 및 시냅스 가소성을 증가시키는 역할을 담당하고 있다. 본 연구는 흰쥐 해마에 장기간 플루세틴 처리가 NCAM140 발현과 NCAM140 매개로 인한 세포내 신호전달과정의 하부에 위치한 phosphorelated cyclicAMP responsive element binding protein (pCREB) 활성화와의 관련성을 규명하고자 하였다.

방 법

흰쥐에 플루세틴(10mg/kg)을 5일 동안(단기) 및 14일 동안(장기) 투여하였다. 흰쥐 해마로부터 RNA와 단백질을 각각 확보하였다. 실시간 RT-PCR을 수행하여 NCAM140 유전자의 발현을 분석하였고, 웨스턴 블롯 분석으로 CREB의 인산화 정도를 분석하였다.

결 과

플루세틴을 장기간 투여한 흰쥐 해마에서는 대조군에 비해 NCAM140 유전자의 발현이 1.3배 증가하였다. 또한, 플루세틴을 장기간 투여한 흰쥐 해마에서 pCREB 활성이 대조군에 비해 4배 증가하였다.

결 론

장기간 플루세틴을 투여할 경우 흰쥐 해마에서 NCAM140 유전자 발현과 pCREB 활성이 증가하였다. 본 연구결과는 NCAM140과 pCREB가 신경돌기 성장과 신경세포의 생존을 촉진시키는 기전이 항우울제의 임상적

효능에 참여하는 것으로 보인다.

중심 단어 : 플루세틴 · 해마 · NCAM140 · CREB · pCREB.

참고문헌

1. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965;124:319-335.
2. Fujioka T, Fujioka A, Duman RS. Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *J Neurosci* 2004;24:319-328.
3. Shors TJ, Miesegae G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 2001;410:372-376.
4. Jacobs BL, Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry* 2000;5:262-269.
5. Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry* 2000;48:715-720.
6. McEwen B. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* 2000;48:740-754.
7. Duman RS. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur Psychiatry* 2002;17 (suppl 3) : 306-310.
8. Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 1996;16:2365-2372.
9. Duman RS, Malberg J, Thome J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 1999; 46:1181-1191.
10. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 1997;8:389-404.
11. Povlsen GK, Ditlevsen DK, Berezin V, Bock E. Intracellular signaling by the neural cell adhesion molecule. *Neurochemical Res* 2003;28:127-141.
12. Jessen U, Novitskaya V, Pedersen N, Serup P, Berezin V, Bock E. The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neurogenesis in PC12-E2 cells. *J Neurochem* 2001;79:1149-1160.
13. Schmid RS, Graff RD, Schaller MD, Chen S, Schachner M, Hemperly JJ, et al. NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol* 1999;38:542-558.
14. Beggs HE, Soriano P, Maness PF. NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol* 1994;127:825-833.
15. Fuller RW, Wong DT, Robertson DW. Fluoxetine: A selective inhibitor of serotonin uptake. *Med Res Rev* 1991;11:17-34.
16. Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and antidepressant drug: Twenty years since its first publication. *Life Sci* 1995;57:411-441.
17. Montgomery SA. Understanding depression and its treatment: Restoration of chemical balance or creation of conditions promoting recovery? *J Clin Psychiatry* 2000; 61 (suppl 6) :3-6.
18. Vaswani M, Linda FK, Ramesh S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: A comprehensive review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:85-102.
19. Shopsin B, Gershon S, Goldstein M, Friedman E, Wilk S. Use of synthesis inhibitors in defining a role for biogenic amines during imipramine treatment in depressed patients. *Psychopharmacol Comm* 1975;1:239-249.
20. Marcussen AB, Flågstad P, Kristjansen PE, Johansen FF, Englund U. Increase in neurogenesis and behavioural benefit after chronic fluoxetine treatment in Wistar rats. *Acta Neurol Scand* 2008;117:94-100.
21. Giulietti A, Overbergh L, Valecx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25:386-401.
22. Choi M, Baik S, Jang K, Chai Y, Kim S, Roh S, et al. Characterization of Differentially Expressed Genes upon chronic Fluoxetine Treatment in Rat C6 Glial cells. *The Korean Journal of Psychopharmacology* 2004;15: 457-467.
23. Wakabayashi Y, Uchida S, Funato H, Matsubara T, Watanuki T, Otsuki K, et al. State-dependent changes in the expression levels of NCAM-140 and L1 in the peripheral blood cells of bipolar disorders, but not in the major depressive disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:1199-1205.
24. Seki T, Arai Y. The persistent expression of a highly polysialylated NCAM in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci Res* 1991;12:503-513.
25. Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* 1990;13:184-188.
26. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54:597-606.
27. Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet* 1998;352:1754-1755.
28. Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Reiaeh JS, Young LT. G protein-coupled cyclic AMP signaling in postmortem brain of subjects with mood disorders: effects of diagnosis, suicide, and treatment at the time of death. *J Neurochem* 1999;73:1121-1126.
29. Thome J, Sakai N, Shin K, Steffen C, Zhang YJ, Impey

- S, et al. cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J Neurosci* 2000;20:4030-4036.
30. Lai IC, Hong CJ, Tsai SJ. Expression of cAMP response element-binding protein in major depression before and after antidepressant treatment. *Neuropsychobiology* 2003;48:182-185.
31. Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Chen J, Fujioka T, Malberg J, et al. Localization of phosphorylated cAMP response element-binding protein in immature neurons of adult hippocampus. *J Neurosci* 2002;22:9868-9876.
32. Sairanen M, O'Leary OF, Knuutila JE, Castrén E. Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience* 2007;144:368-374.