



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

NMDA 수용체 길항제를 통한
성상교세포 칼슘
흥분성 조절기전에 대한 연구

제주대학교 대학원

의생명 신약개발 학과

Oyunbileg Dash

2016년 8월

NMDA 수용체 길항제를 통한
성상교세포 칼슘
흥분성 조절기전에 대한 연구

지도교수 정 성 철

Oyunbileg Dash

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2016년 8월

대어윤블렉의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 -----

위 원 -----

위 원 -----

제주대학교 대학원

2016년 8월

Study on the modulatory function of calcium excitability in astrocytes by NMDA receptor antagonists

Oyunbileg Dash

(Supervised by professor Sung-Cherl Jung)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Science

2016. 8.

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....

Date.....

Department of Biomedicine & Drug Development
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

Abstract

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), 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.

Key words: Astrocyte, NMDA antagonist, calcium excitability, serotonin

목 차

ABSTRACT	I
목 차	II
I. 서론	1
II. 연구방법	4
1. 세포배양	
2. 칼슘 이온농도 측정 (calcium imaging)	
3. 자료분석	
III. 결과	6
1. NMDA 수용체 길항제인 디조실핀 (MK-801)의 의한 칼슘이온농도 변화	
2. 디조실핀 (MK-801)에 의해서 유도된 칼슘 반응에 대한 NMDA 수용체 길항제 D-AP5의 억제	
3. 5-HT 존재 하에 NMDA 수용체 길항제인 디조실핀 (MK-801)의 의한 칼슘이온농도 변화	
4. NMDA 수용체 길항제인 Ketamine에 의한 칼슘이온농도 변화	
IV. 고찰	15
V. 참고문헌	20

I. 서론

성상교세포 (astrocyte)는 신경아교세포 (glial cell) 중 하나로서 중추신경계에 가장 많이 분포되어 있으며 뇌의 발생과정뿐만 아니라 결합조직 구조를 유지하는데 중요한 역할을 한다 (김규원 외 2004). 성상교세포는 전기적으로는 비흥분성 세포이지만 신경전달물질에 의해서 유도되는 세포내 칼슘의 변화에 따라 흥분성을 나타내며, 성상교세포에서의 칼슘 증가에 따른 흥분성은 신경세포 시냅스에서의 신경전달과정을 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 성상교세포내의 칼슘 증가에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다. 이는 포스포리파아제 C (phospholipase C)가 활성화되어 생성되는 이노시톨-1,4,5-트리스인산 (inositol 1,4,5-tirsposphate)가 IP₃ 수용체를 활성화 시킴에 따라 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 분포하

는 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 세포내 이노시톨-1,4,5-트리스인산 (IP_3) 레벨이 상승되어 세포내 소포체의 칼슘 채널을 통한 세포내 칼슘농도 증가가 보고된 바 있다 (Nilsson et al 1991).

실제 성상교세포의 칼슘 흥분성 (astrocytic calcium excitability) 조절은 신경세포와 성상교세포 간 시냅스 (tripartite synapse) 형성을 포함한 구조적 특성뿐 아니라 신경망 항상성유지, 뇌 혈류의 조절, 에너지 공급, 신경세포 분화 등 뇌 환경 유지에 중요한 기능을 담당하고 있음이 보고 되고 있다. 그러나 이러한 성상교세포의 칼슘 흥분성이 실제 신경세포간 신호전달 및 시냅스 가소성 등에 미치는 영향에 대한 연구는 이루어져 있지 않다. 이는 신경세포간 신호 전달이 milliseconds내에 일어나는 것에 비해서 성상교세포를 통한 신호는 수 초에서 심지어 분 단위로 발생하기 때문이며, 대부분의 신경계 신호전달 기전과 관련해서 신경세포에 존재하는 수용체에 대한 영향 및 관련 기전에 대해서만 연구가 이루어지고 있을 뿐, 뇌 전체 부피의 50% 이상을 차지하고 있는 성상교세포에 대한 연구는 미미한 실정이다. 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-HT₂ 수용체 및 도파민 D₂ 수용체에 대한 작용기전이다(Kazumi yoshizawa et al 2013). 본 실험에서는 성상교세포에서의 칼슘 흥분성 측정을 통해 케타민과 디조실핀 (MK-801)에 대한 반응성과 더불어 성상교세포 5-HT₂ 수용체 (astrocytic 5-HT₂ receptor) 에 대한 NMDA 수용체 길항제의 효과를 확인해 보고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 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% CO₂ 항온기에서 14일 동안 배양하였다. 14일 후에 배지를 버리고 1X PBS로 세 번 세척해준 후 물리적 힘을 가하여 microglia 및 oligodendrocyte를 제거하여 주었다. 실험을 위하여 성장교세포는 0.25% trypsin으로 바닥에서 떼어내고 poly-D-lysine으로 코팅된 6 well plate에 2.5 X 10⁵ cells/plate로 분주하여 실험에 사용하였다.

2. 세포내 칼슘 이온농도 측정

세포내 칼슘 이온농도 변화를 측정하기 위해 공초점 현미경 시스템(confocal microscopy system)을 이용하였다. 세포 배양액 2 ml에 Fluo-4/AM 3 μM 농

도를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 20 분간 부하시킨다. 세포 외액으로 한 번 세척하여 fluo-4/AM을 완벽하게 제거한 후 도립현미경(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. 세포내 칼슘 이온농도는 자극을 주기 전 fluo-4/AM 부하로 인한 기본 형광값 (F₀)에서 약물을 투여했을 때 변화되는 형광값 (F₁)의 비율로 측정하였으며 F_1/F_0 (또는 $\Delta F/F = [(F_1 - F_B) - (F_0 - F_B)] / (F_0 - F_B)$, F_B는 background value) 값을 이용하여 세포내 칼슘 이온농도의 변화를 측정하도록 적용하였다.

3. 자료분석

모든 결과는 통계 처리한 후 평균 ± 표준오차 (mean ± standard error mean)로 나타내었다. 두 집단 사이의 평균을 비교 할 때는 *student's-test* 를 실행하여 *p* 값을 비교하였으며, *p*<0.05인 경우를 통계적으로 유의하다고 평가하였다.

Ⅲ. 결 과

1. NMDA 수용체 길항제인 MK-801에 의한 칼슘 이온농도 변화

Fluo-4/AM으로 부하된 정상교세포내 10 μM 과 300 μM MK-801을 30 초간 투여 시 대부분의 세포내에서 칼슘 이온농도의 증가가 뚜렷이 관찰 되지 않았다. 또한, 300 μM MK-801을 반복적으로 투여했을 때에도 칼슘 반응이 보였다.

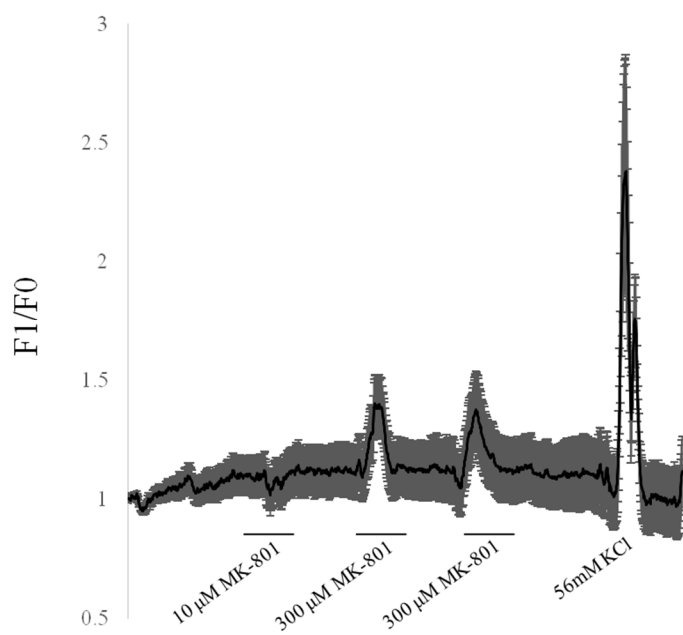


Figure 1. MK-801-induced calcium response in astrocytes loaded with $3\ \mu\text{M}$ fluo-4/AM for 15 min was monitored. Either $10\ \mu\text{M}$ or $300\ \mu\text{M}$ of MK-801 increased intracellular calcium level.

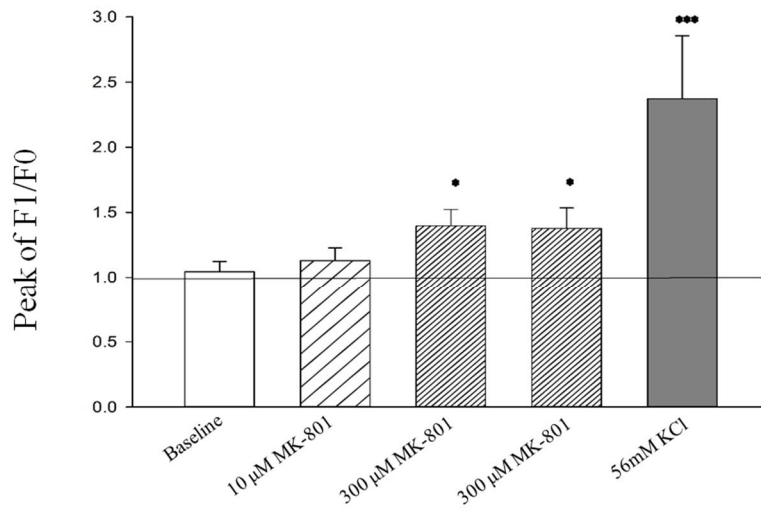


Figure 2. MK-801-induced calcium response in astrocytes loaded with 3 μ M fluo-4/AM for 15 min was monitored. Population responses show that either 10 μ M or 300 μ M of MK-801 increase intracellular calcium level.

2. 디조실핀 (MK-801)에 의해서 유도된 칼슘 반응에 대한 NMDA 수용체 길

항제 D-AP5의 억제

MK-801에 의해서 유도된 세포내 칼슘 반응이 어떤 수용체를 통해서 나타나는지를 보기 위해서 경쟁적 NMDA 수용체 길항제 (competitive antagonist)인 D-AP5 50 μ M을 5 분간 전 처리한 후 MK-801을 처리 하였다. 이때, 앞 실험에서 관찰되었던 칼슘 반응이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(MK-801 300 μ M $p > 0.08$) (그림 3,4).

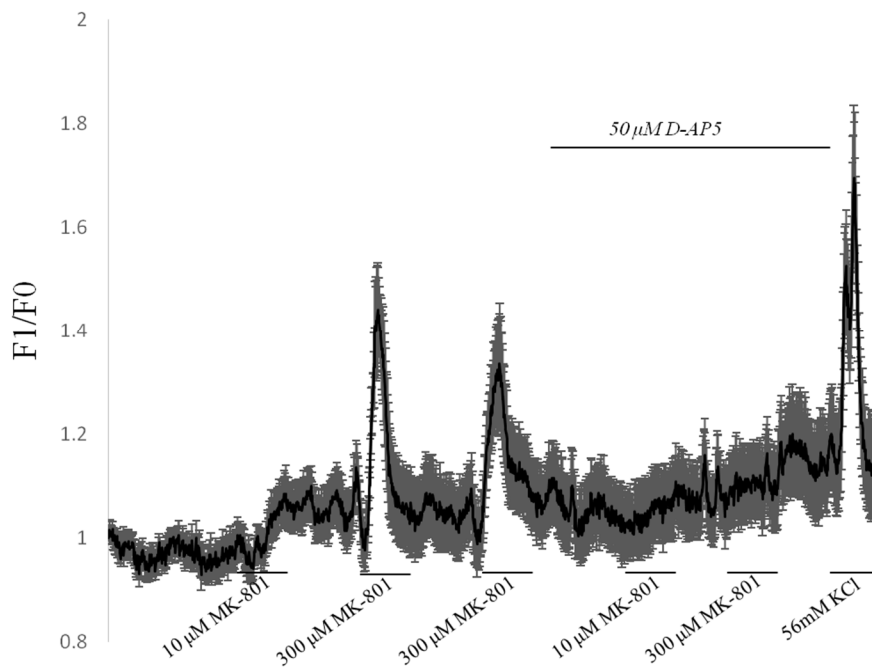


Figure 3. Effect of D-AP5 on the MK-801-induced calcium response in astrocytes, which were loaded with $3\ \mu\text{M}$ fluo-4/AM for 15 min, was mounted in a chamber. $300\ \mu\text{M}$ MK-801 but not $10\ \mu\text{M}$ increased intracellular calcium level. $50\ \mu\text{M}$ D-AP5 blocked $10\ \mu\text{M}$, $300\ \mu\text{M}$ MK-801-induced calcium transient. Data show the averaged F1/F0 of intensity.

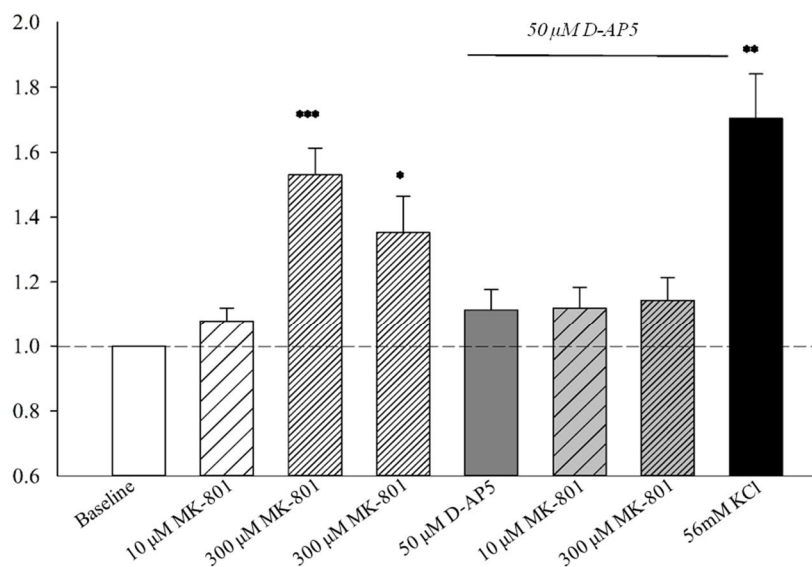


Figure 4. Effect of D-AP5 on the MK-801-induced calcium response in astrocytes loaded with 3 μM fluo-4/AM for 15 min and was mounted. 300 μM MK-801 but not 10 μM increased intracellular calcium level. D-AP5 (50 μM) blocked MK-801-induced calcium transient. Data show the averaged peak of F1/F0 (MK-801 10 μM = 1.079 \pm 0.040; MK-801 300 μM = 1.531 \pm 0.082; second MK-801 300 μM = 1.353 \pm 0.112; D-AP5 = 1.114 \pm 0.063; MK-801 10 μM = 1.119 \pm 0.064; MK-801 300 μM = 1.143 \pm 0.07; KCl = 1.704 \pm 0.137).

3. 5-HT 존재 하에 NMDA 수용체 길항제인 디조실핀 (MK-801)의 의한 칼슘이온농도 변화

10 μM 과 300 μM 디조실핀 (MK-801)을 30 초간 정상교세포에 투여한 실험에서 10 μM MK-801에서는 칼슘 농도의 변화를 보이지 않았으나 고농도의 300 μM MK-801 에서는 세포내 칼슘 이온 농도가 증가하는 것을 보였고 반복적으로 투여했을 때에도 통계적으로 유의하게 증가된 칼슘 반응을 볼 수 있었다 (MK-801 300 μM $p < 0.0008$). 이 실험에서도 마찬가지로 세로토닌을 전처리 한 후 MK-801을 투여하였을 경우, 300 μM 농도에서 칼슘 반응이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 세포 밖의 높은 KCl의 농도는 세포막의 탈분극을 유도하여 세포내의 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 5,6).

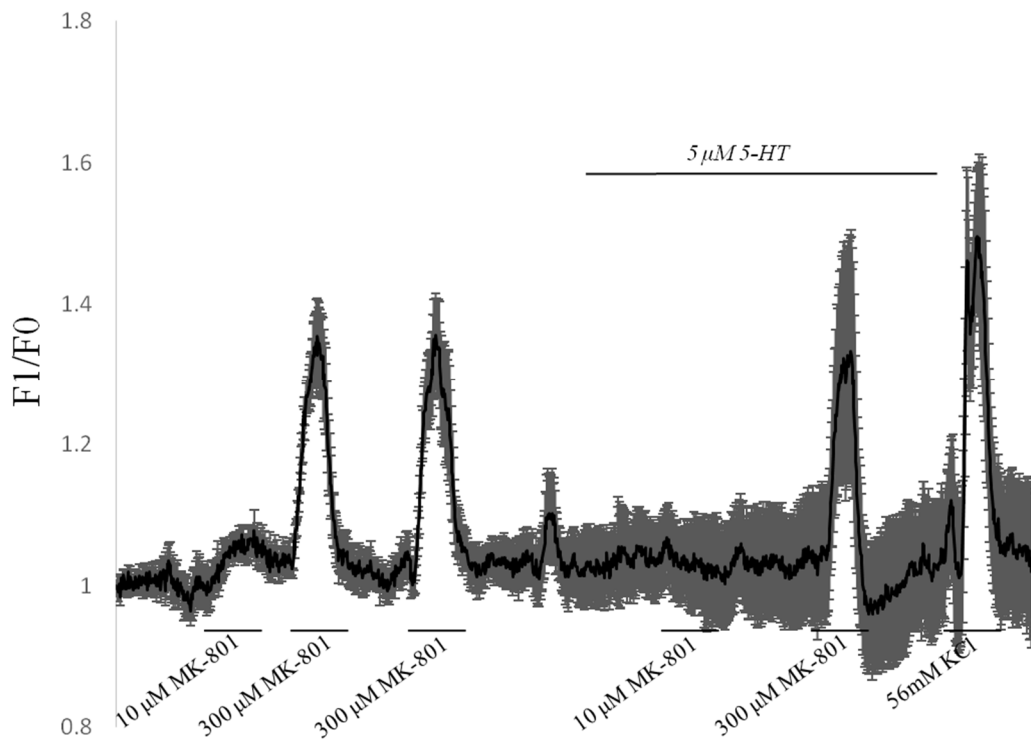


Figure 5. MK-801-induced calcium response in astrocytes loaded with 3 μM fluo-4/AM for 15 min was monitored. 300 μM of MK-801 but not 10 μM increased intracellular calcium level. There were not significant differences between low (10 μM) and high (300 μM) MK-801 induced calcium transient after the pretreatment of 5 μM serotonin. Data show the averaged F1/F0 of intensity.

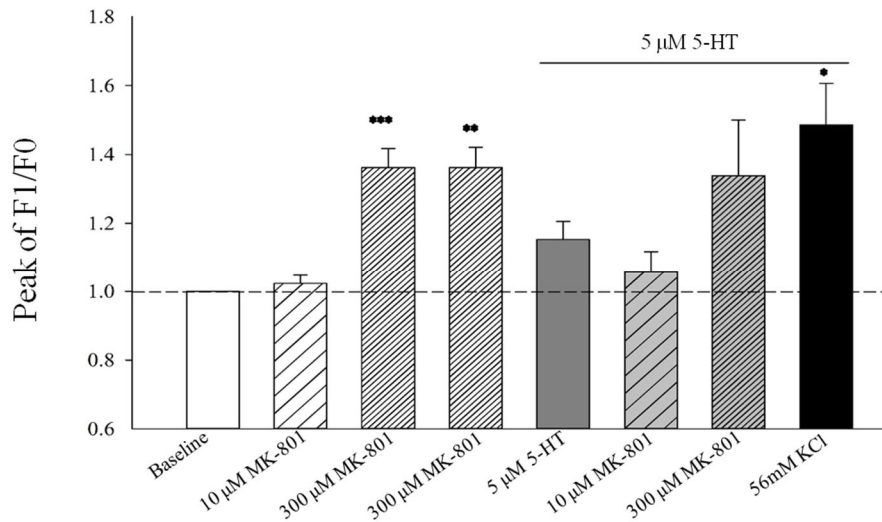


Figure 6. MK-801-induced calcium response in astrocytes loaded with 3 μ M fluo-4/AM for 15 min was monitored. High dose (300 μ M) of MK-801, but not low dose (10 μ M), increased intracellular calcium level. There were not significant differences between low (10 μ M) and high (300 μ M) MK-801-induced calcium transient after the pretreatment of 5 μ M serotonin. Data show the averaged F1/F0 of intensity.

4. NMDA 수용체 길항제인 케타민에 의한 칼슘 이온농도 변화

Fluo-4/AM으로 부하된 정상교세포내 10 μM 과 100 μM 케타민을 30 초간 투여 시 대부분의 세포내에서 칼슘 이온농도의 증가가 뚜렷이 관찰 되지 않았다. 또한, 100 μM 케타민을 반복적으로 투여했을 때에도 칼슘 반응이 나타나지 않았다. 세로토닌 (serotonin)을 처리 했을 때에는 세포내 칼슘이온농도가 증가 하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의 할 만한 수준 (ketamine 10 μM , $p>0.186$ ketamine 100 μM $p>0.305$)은 아니었다. 세포에 세로토닌을 전처리 한 후 케타민 투여 시, 그림 1과 2에서 나타낸 바와 같이 세포내 칼슘 이온 농도는 변화하지 않는 것으로 관찰 되었다.

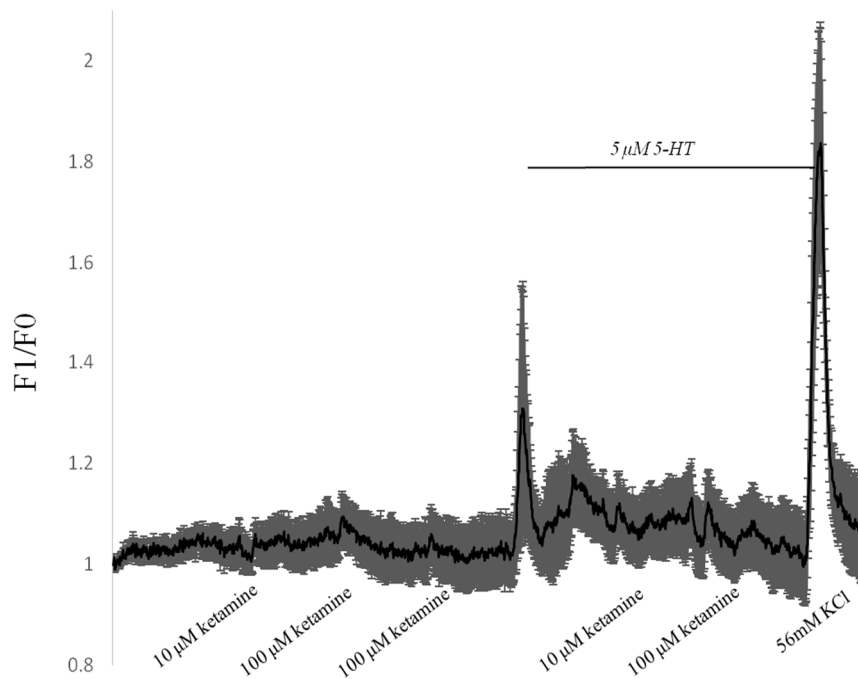


Figure 7. Ketamine-induced calcium response in astrocytes. Astrocytes loaded with $3\ \mu\text{M}$ fluo-4/AM for 15 min was monitored. Either $10\ \mu\text{M}$ or $100\ \mu\text{M}$ of Ketamine did not increase intracellular calcium level. There were not significant differences between $10\ \mu\text{M}$ and $100\ \mu\text{M}$ Ketamine . Ketamine induced calcium transient after the pretreatment of $5\ \mu\text{M}$ serotonin. Data show the averaged F1/F0 of intensity.

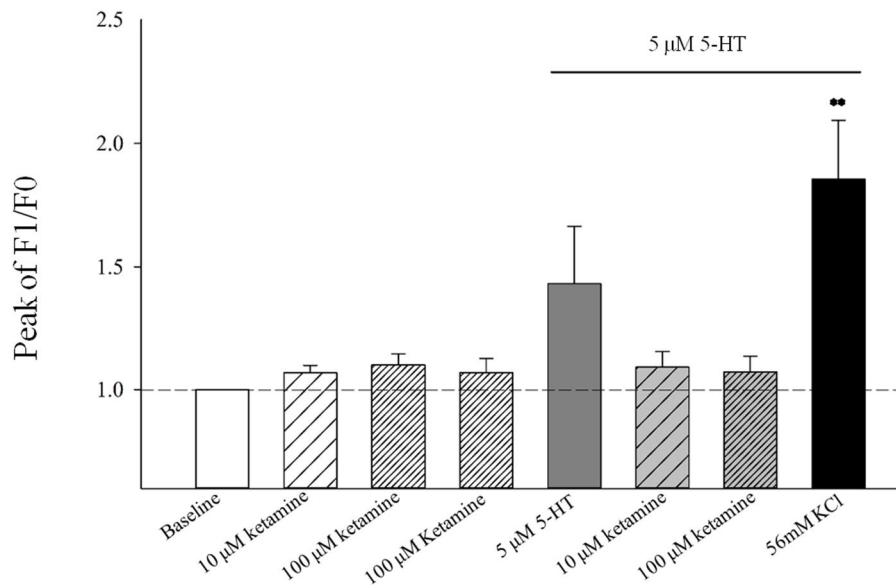


Figure 8. Ketamine-induced calcium response in astrocytes loaded with $3 \mu\text{M}$ fluo-4/AM for 15 min was monitored in a chamber. Either $10 \mu\text{M}$ or $100 \mu\text{M}$ Ketamine did not increase intracellular calcium level. There were not significant differences between the $10 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$ Ketamine-induced calcium transient after the pretreatment of $5 \mu\text{M}$ serotonin. Data show the averaged peak of F1/F0 (ketamine $10 \mu\text{M}$ = 1.07 ± 0.029 ; ketamine $100 \mu\text{M}$ = 1.10 ± 0.045 ; second ketamine $100 \mu\text{M}$ = 1.07 ± 0.057 ; 5-HT = 1.43 ± 0.232 ; ketamine $10 \mu\text{M}$ = 1.09 ± 0.063 ; ketamine $100 \mu\text{M}$ = 1.07 ± 0.065 ; KCl = 1.86 ± 0.238).

IV. 고 찰

뇌는 구조적/기능적 관점에서 신경세포와 아교세포로 이루어지며, 중추신경계의 아교세포는 성상교세포 (astrocyte), 희돌기아교세포 (oligodendrocytes)와 미세아교세포 (microglial cells)를 포함하여 뇌 전체 부피의 50% 이상을 차지할 만큼 그 수가 많은 것으로 알려져 있다. 신경세포간 연결 (synapse) 형성을 포함하여 신경계 구조 조절에 중요한 조절인자로서의 신경아교세포인 성상교세포는 cholesterol이나 thrombine 분비 등을 통해 신경세포간 연결에 관여하며, 신경세포 분화 및 연결 유지 보수, 방어기전과 같은 뇌 환경 유지에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 기능적으로는 뇌 혈류의 조절, 에너지 공급 등의 작용을 통해 신경세포간 신호전달을 포함한 시냅스 가소성 (synaptic plasticity), 신경망 항상성 (homeostasis) 유지 등 다양한 생리적 기능을 담당하고 있다. 최근 들어 신경계 생리적 기능 및 기능 이상과 관련하여 신경세포간 신호전달 및 시냅스 가소성 이상에 미치는 성상교세포 기능을 연구함으로써 신경계 기능 조절에 미치는 성상교세포 및 성상교세포로부터의 분비물질인 신경아교물질에 대한 연구가 활발히 진행이 되고 있다 (김규원 외 2004, 이정구 외 2015). 대표적 신경아교물질로는 글루탐산, 글루타민, ATP, GABA, D-serine, taurine, kiurenic acids, NGF, GDNF, BDNF 등이 있으며, 이러한 신경아교물질들은 신경세포간 신호전달 및 시냅스 가소성에 중

요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

성상세포로부터의 신경아교물질 분비 기전과 관련해서는 기계적 자극 (mechanical stimulation), 막전압 탈분극 (depolarization), 신경전달물질에 대한 반응의 결과로서 성상교세포내 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. 본 연구에서는 세포내 칼슘 이온 측정법을 이용하여 성상교세포에서 우울장애 및 자폐 등의 신경병증성 질환 치료제로 주목 받고 있는 약물인 글루탐산 수용체 길항제인 케타민과 디조실핀 (MK-801)이 어떤 작용을 하는지 조사 하고자 하였으며, 세포내 칼슘 기전에 대해 이해하고자 하였다. 성상교세포에는 중추 흥분성 신호전달 수용체인 채널형 NMDA (N-methyl-D-aspartate

receptor) 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 연구결과는 보고된 바 없다. 비신경 세포인 성상교세포를 이용한 본 연구에서, 비록 NMDA 수용체 길항제인 케타민의 처리에 의한 세포내 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 IC₅₀이 각각 $0.43 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 와 $0.12 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 으로 친화도에 차이는 있으나 동일한 억제효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 관찰된 디조실핀 (MK-801)에 의한 성상교세포의 칼슘 흥분성 증가 기전은 선택적 NMDA 수용체 억제

체인 D-AP5에 의해서 억제되었으며, 이를 통해 성상교세포에서의 NMDA 수용체 억제가 세포내 칼슘 증가에 관여하는 것으로 생각이 된다. 일반적으로 세포내 칼슘 유입에 중요한 NMDA 수용체의 억제가 세포내 칼슘 흥분성을 증가시킨다는 연구결과는 알려진 바 없으며, 향후 연구를 통해 관련 기전에 대한 연구를 진행해야 할 것으로 생각된다. 다만 NMDA 수용체 억제를 통한 성상교세포내로의 칼슘억제가 calcium-activated K^+ channel과 같은 칼슘 의존적 막전압 유지 기전에 관여하는 이온통로들을 억제함으로써, 결과적으로 세포막의 탈분극을 통해 세포내 칼슘 흥분성을 증가시킬 수 있는 가능성이 제시되는 바, 관련 기전에 대한 연구를 통해 성상교세포에서의 NMDA 수용체 및 칼슘 신호전달기전에 대한 연구를 진행할 필요가 있다고 생각된다. 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 $GABA_A$ 수용체 $\alpha 6\beta 2\delta$ 와 $\alpha 6\beta 3$ 수용체를 조절 할 수 있으나, 디조실핀 (MK-801)의 경우는 $GABA_A$ 수용체 $\alpha 6\beta 2\delta$ 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.

V. 참고 문헌

김규원, 김진형, 김정훈, 박정애. 2005. 정상세포의 칼슘변화에 따른 신경전달기전. *Bric* 1598-8767.

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-HT1A 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-HT2A 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.

김규원, 박정애, 전형호. 2004. 정상세포의 새로운 역할. *Biowave Vol. 6 No.12*

이정구, 서미경, 박성우, 감영훈. 2015. 신경아교세포와 기분장애. *Korean J Biol Psychiatry*, 22, 34-39.

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 GABAA 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-HT2A 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.