



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

성장기 흰쥐에서 높은 농도의 혈중  
코티졸이 해마 신경의 연접가소성 및  
인지행동기능에 미치는 영향

김 혜 지

**Department of Medicine**

**Graduate School**

**Jeju National University**

2019년 2월

성장기 흰쥐에서 높은 농도의 혈중  
코티졸이 해마 신경의 연접가소성 및  
인지행동기능에 미치는 영향

지도교수 정 성 철

김 혜 지

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2019 년 2 월

김혜지의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_

위 원 \_\_\_\_\_

위 원 \_\_\_\_\_

제주대학교 대학원

2019 년 2 월

**The effects of high blood cortisol on synaptic  
plasticity of hippocampal neurons  
and cognitive behaviors**

**Hye-Ji Kim**

(Supervised by Professor Sung-Cherl Jung)

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

**2019.02**

**This thesis has been examined and approved.**

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

Date .....

**Department of Medicine**

**Graduate School**

**Jeju National University**

## ABSTRACT

The high level of blood cortisol is the key factor to identify major depressive disorder (MDD) which is mediated with the abnormal modulation of brain-derived neurotrophic factor (BNDF) in mammalian brains. However, it is not well known if and how the elevation of cortisol level during prenatal period affects brain functions and induces psychiatric disorders such as MDD after birth. For this issue, we constantly elevated the cortisol level of prenatal rats by injecting corticosterone (20 mg/kg) to maternal rats every day for 21 consecutive pregnant days until delivery. This procedure critically elevated cortisol level in both maternal and postnatal pups. After delivery, pups were bred with their mother rat and isolated from their mother in postnatal 21<sup>st</sup> day for behavioral tests. Behavioral tests to observe cortisol effects in brain functions were performed by hiring a forced swim test (FST), Morris water maze test (MWT) and open field moving test (OFT). Pups delivered from corticosterone-injected maternal rats (Corti.Pup) showed significantly different behavioral patterns, compared with normal pups (Normal, saline-injected). In FST performed for 5 min, immobility time of Corti.Pup was critically shorter than that of Normal, showing anxiety-mediated hyperactivity. In addition, Corti.Pup were confirmed to have the critical impairment of learning and memory functions in MWT as they needed longer time to figure out where a hidden platform located. These behavioral patterns of Corti.Pup seemed to be correlated with those showing in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) patients. To clarify the impairment of memory function, I also tried electrophysiological experiments to observe neuronal characteristics and memory functions in a cellular level. Using hippocampal slices (p14~18), patch-clamp recordings for observing the long-term potentiation (LTP) patterns and membrane excitability in CA1 neurons were performed. In

results, Corti.pup showed higher excitable properties of CA1 membranes and incomplete potentiation in LTP pattern. Therefore, it is possible that cortisol may affect learning and memory functions in developmental brains and consequently behaviors are revealed as the abnormal patterns similar with ADHD.

Key words : Major depressive disorder, ADHD, Cortisol, Long-term potentiation,  
Learning and Memory, Cognitive behavior

# 목차

ABSTRACT .....	I
목차 .....	III
LIST OF FIGURES .....	IV
서론 .....	1
연구 방법 .....	6
결과 .....	12
1) 동물모델 사이의 행동학적 특징 비교 .....	12
2) 성장기 흰쥐 hippocampal CA1 neuron 의 전기생리학적 특성 비교 .....	22
3) LTP 차이에 따른 세포 단위의 기억 기능의 이해 .....	30
고찰 .....	35
참고문헌 .....	39

## LIST OF FIGURES

<b>Figure 1.</b>	<b>The Experimental Scheme .....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 2.</b>	<b>Different behavioral patterns in Forced Swimming Test .....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 3.</b>	<b>Different behavioral patterns in Open Field Test between Normal and Corti.Pups .....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 4.</b>	<b>Different behavioral patterns of Open Field Center Index between Normal and Corti.Pups .....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 5.</b>	<b>Comparison of RMP of CA1 neurons between Normal and Corti.Pups .....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 6.</b>	<b>Comparison of AP threshold of CA1 neurons between Normal and Corti.Pups .....</b>	<b>25</b>
<b>Supplemental Figure.</b>	<b>Sample waves observed in current-clamping .....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 7.</b>	<b>Suprathreshold properties of CA1 neurons compared between Normal and Corti.Pups .....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 8.</b>	<b>Subthreshold properties of CA1 neurons compared between Normal and Corti.Pups .....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 9.</b>	<b>Different LTP responses observed in two groups .....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 10.</b>	<b>Comparison of potentiation in early and late phases between two groups .....</b>	<b>34</b>



## I. 서론

주요우울장애(Major Depressive Disorder, MDD)를 겪는 사람들의 큰 특징은 스트레스로 인한 우울감, 공포, 불안감 등을 겪고 있다는 것이다. MDD는 일생 동안 17% 이상의 높은 발병률을 보이며 회복 후 2-3년 이내에 50% 이상의 재발률을 보인다. MDD로 인한 자살률은 15% 이상으로 일상생활에서 크고 작은 형태로 나타나는 흔한 질병이라는 사실을 알 수 있다. 흥미로운 사실은 미국의 연간 MDD 발병률이 여성이 남성의 두 배로 보고 되었다는 점이다(Angelino, Johns Hopkins Medicine Health Library, 2014). 성비에서의 차이는 산모에게 발생하는 MDD 또한 적지 않음을 내포한다. 이는 임신기간 동안 산모의 MDD가 태아에게 미치는 영향이 있을 수 있다는 것을 의미한다.

최근 행동연구에서, 산모가 어린 시절이나 임신기간 중 낮은 사회경제적 수준(socioeconomic status, SES)을 갖는 경우 코티졸 수치가 높은 것으로 확인되었다(Bosquet Enlow et. al., 2019). SES는 교육성취도, 연간 가구 소득 및 현재 주택을 소유하는지 등의 여부를 물어 스트레스의 정도를 조사한다. 이 연구는 임신 중 사회적으로 겪게 되는 스트레스로 인해서 산모의 코티졸 수치가 증가할 수 있다는 사실을 보여준다. 이와 더불어 임신 중 스트레스 또는 충격으로

인해 조산아를 출산한 산모와 자녀 사이의 코티졸 연관성이 연구된 바 있다. 연구에 따르면 임신 중 큰 충격 또는 스트레스를 받게 된 산모의 모발 코티졸이 출산 후 자녀에게도 나타났다(Slopena et. al., 2018). 이는 코티졸이 산모에서부터 태아로 전달된다는 사실을 보여준다. 따라서 임신 중 우울증이 태아의 뇌 발달 및 기능에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다.

이전의 연구들에서 모체의 코티졸이 태아에게 전달되었을 때 뇌의 기능과 발달을 저해하는 문제들이 나타나는 것으로 확인되었다. 그 예로, Glucocorticoids(GCs)의 과다 노출은 태반의 지질 수송 및 대사, 포도당 흡수에 기능장애를 일으킨다(Mateos et. al., 2018). 산모의 혈중 코티졸 수준이 높아질 경우 태아의 성장 발달에 부정적 영향을 미쳤는데, 이는 모체에서 태아로 전달되는 코티졸 유입 경로가 있다는 것을 제시하는 증거이다. 코티졸 유입은 인간뿐만 아니라 포유류에게서도 나타났다. 설치류를 이용한 실험에서 baseline plasma cortisol(BL-cortisol)과 stress-induced plasma cortisol(SI-cortisol)을 측정해본 결과 부분적으로 모계로부터 코티졸이 태아체에 전달됨을 확인했다(BAIROS-NOVAK et. al., 2018). 이것은 야생 포유 동물에서 스트레스 반응의 유전성을 연구한 것으로 모계로부터 코티졸이 유전학적 경로를 통해 부분적으로 전달됨이 확인되었다. 이러한 보고들은 임신 중 우울증이 단순히 산모의 우울감을 형성하는 것뿐만

아니라 자녀에게도 부정적 영향이 줄 수 있다는 것을 증명한다.

뇌에는 신경 보호 기능들이 존재해 기능 및 발달을 저해하는 부정적 영향들에 대해 보호 기전을 작용한다. 그 예로, 높은 농도의 포도당은 세포 자살을 일으키고 시냅스 가소성을 낮추지만 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)에 의한 신경 보호 효과를 나타냈다(ZHONG et. al., 2018). 여기서 BDNF는 신경 보호뿐만 아니라 시냅스 연결 강화 및 신경전달물질 분비 촉진, 신경세포의 성장 등 다양한 방면에서 뇌에 도움을 준다. 이와 더불어 BDNF 활동 조절이 시냅스 가소성의 조절에서 핵심이며 퇴행성 질환의 발병 과정에서도 중추적인 역할을 한다는 것이 연구되었다(Markham et. al., 2013). 또한 Hypoxia-ischemia (H/I) 뇌 손상 예방에 BDNF가 관여하는지 연구한 논문에서 BDNF가 신경보호제의 역할로 작용했으며 임상적용에 가능할 것이라는 결과가 나왔다(CHEN et. al., 2012). 이를 통해 BDNF가 뇌 신경보호에 중요한 역할을 하며 임상 적용 시 H/I 치료에 기반이 될 것을 보여준다.

설치류의 뇌에서 산화적 손상이 가해질 경우 BDNF와 별아교세포-신경세포의 상호작용으로 뉴런의 보호가 확인되었다(Ishii et. al., 2018). 그러나 BDNF가 억제될 경우, BDNF의 감소로 인한 Entorhinal Cortex (EC)에서의 흥분성 및 흥분 / 억제 불균형의 상태 변화가 나타났다(Abidina et. al., 2019). 밝혀진 바에 따르면 MDD

를 가진 피험자의 여러 뇌 영역에서 피라미드세포 가지돌기를 표적으로 하는 BDNF와 somatostatin(SST)의 하향 조절이 보고되었다. 이를 바탕으로 BDNF를 억제시킨 쥐에서 겉질 신경세포의 수상돌기가 줄어들고, 세포 특이적으로 MDD와 유사한 유전자 변화가 일어났으며 우울증과 불안증 같은 행동이 유도되었다(Oh et. al., 2018). 또한 BDNF의 불균형을 초래하는 copine 6를 처리했을 때 역시 스트레스로 인한 우울증과 같은 행동 및 시냅스 가소성 변화에 부정적 영향을 미쳤다(Han et. al., 2018). 뿐만 아니라 스트레스로 인한 BDNF의 억제는 미세아교세포의 소실도 초래했다(Zhu et. al., 2018). 따라서 모체에 의해 코티졸 수치가 증가하게 되면 태아에서 BDNF가 감소해 뇌 발달 및 기능에 부정적 영향을 미칠 가능성이 있다.

신생아 시기 코티졸 수치의 상승이 뇌 기능에 영향을 미치는지, 출생 후 MDD와 같은 정신장애를 유도하는지는 잘 알려져 있지 않다. 출생 전 혈중 코티졸의 증가는 뇌의 정상적 발달 및 기능에 부정적 영향을 줄 수 있는 가능성이 있기 때문에, 본 연구에서는 임신기간 동안 혈중 코티졸 수치를 높은 흰쥐 pup model (Corti.Pup)을 개발하여 정상쥐 pup model (Normal)과 비교해 보고자 하였다. 실험에서는, 어미의 코티졸 수준 차이에 의한 두 그룹의 행동학적 특성 및 신경세포의 전기적 특성을 비교 관찰하였으며, 또한 이를 통해 신경체계의

조절능력 및 신경정신과적 질환과의 연관성을 확인하고자 하였다. 이후 행동학적 실험에서 나타나는 특성과 뇌신경의 특이적 반응 연관성을 전기생리학적 실험을 통해 증명했다. 결과적으로 행동실험에서는 Corti.Pup그룹이 새로운 환경에 대한 부적응이 나타났으며 과잉행동양상과 유사한 행동을 보였다. 또한 신경세포의 전기적 특성을 비교해본 결과 학습 및 기억 기능이 정상 쥐 그룹 보다 떨어져 있음을 확인했다.

## II. 연구 방법

### 2.1. Experimental animals

제주대학교 의학전문대학원 동물 시설에서 사육한 Sprague-Dawley (SD) rats를 가지고 실험을 진행했다. 사육장의 환경은  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 의 온도와  $50 \pm 10\%$ 의 습도가 조절되었다. 밝기 조절 시스템은 12시간 간격으로 켜다 켜지도록 설정되었고, 먹이와 물은 자율식으로 주어졌다. 사육장 안에서의 짝 짓기는 수컷 한 마리와 암컷 한 마리씩 한 케이지 안에 들어가 이루어졌으며, 기간은 1주일 이내로 진행되었다. 모든 동물 실험 방법은 제주대학교 실험동물윤리위원회에 의해 승인되었다.

### 2.2. Drug treatment

사용한 Corticosterone은 SIGMA(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 약물은 교미한 날로부터 임신기간 21일동안 피하로 주사되었다. 동물 모델에 따라 Corticosterone 또는 Normal saline이 20 mg/kg의 양으로 주사되었다. 주사된

용액은 Normal saline(0.9 % NaCl)에 Corticosterone(10 mg/ml)과 0.1 % tween 80을 부유시켜 만들어졌다(Figure 1).

### 2.3. Forced Swim Test(FST)

FST는 설치류의 동물모델에서 우울 행동 양상을 확인하기 위해 가장 널리 쓰이는 방법이다. 실험 동물이 빠져나올 수 없는 크기(높이 60cm, 지름 40 cm)의 투명한 원형 수조를 사용했다. 수조에 채워진 물 온도는 24~25°C로 맞춰주었고, 수조 중앙부에 rat를 넣어 강제 수영 시켰다. 실험은 총 5일동안 5분씩 진행되었으며, 실험과정은 모두 촬영해 기록되었다.

실험 동물의 행동양상은 총 세가지 Immobility, Climbing, Swimming 상태로 분석된다(Figure 2A 참조). Immobility는 동물이 가만히 있는 상태로 물 위에서 몸체가 일직선인 형태로 앞발과 뒷발을 움직이지 않는 상태를 말한다. Immobility는 Immobility time을 측정해 분석하게 된다. Climbing은 수조를 양 앞발로 긁는 상태를 말하며 양 앞발이 수조 물 밖으로 나왔을 때 1회로 counting한다. Swimming은 동물이 자유롭게 수영하는 상태이다.

#### 2.4. Open Field Test (OFT)

OFT는 설치류의 동물모델에서 운동능력을 평가하는 실험 기법 중 하나이다. 주로 운동 능력과 불안, 탐험의지를 평가하는데 사용된다. 실험은 윗면이 뚫린 정사각형의 arena(가로 80 cm, 세로 80 cm, 높이 50 cm)에서 진행되었다. 바닥 면은 가로×세로 총 4×4, 16개의 정사각형으로 나누어져 있으며 중앙의 4칸을 center zone으로 지정했다. 실험은 정사각형의 4개 구역 모서리 부근이 그늘이 지지 않는 밝기에서 진행되었다. 카메라는 arena 중앙부 높이 1m 이상 떨어진 지점에 설치해 촬영했다. 실험은 총 5일동안 5분씩 진행되며 실험과정은 모두 촬영해 기록되었다.

#### 2.5. Tissue preparation for patch-clamping

Acute hippocampal slice는 발달 초기의(postnatal 14-18 days) SD rat을 이용하여 제작하였다. 조직은 0~4 °C의 acute cutting solution이 채워진 상태에서 350 μm의 두께로 준비되었다. Cutting solution의 조성은 다음과 같다(in mM) : 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 glucose, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 5 MgCl<sub>2</sub> (pH 7.25). 뇌 조직을 자르기 전 acute cutting solution은 20분 동안 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub> gas로 bubbling



시킨다. Bubbling은 recording을 포함한 모든 실험시간 동안 유지되었다. 조직이 준비되면 artificial cerebrospinal fluid(ACSF) solution으로 옮기고 37°C에서 20분동안 incubation시킨다. ACSF solution은 아래의 성분이 포함되어있다(in mM) : 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 glucose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4). Electrophysiological recording을 위한 조직 준비는 실온에서 진행되었다.

## 2.6. Electrophysiology

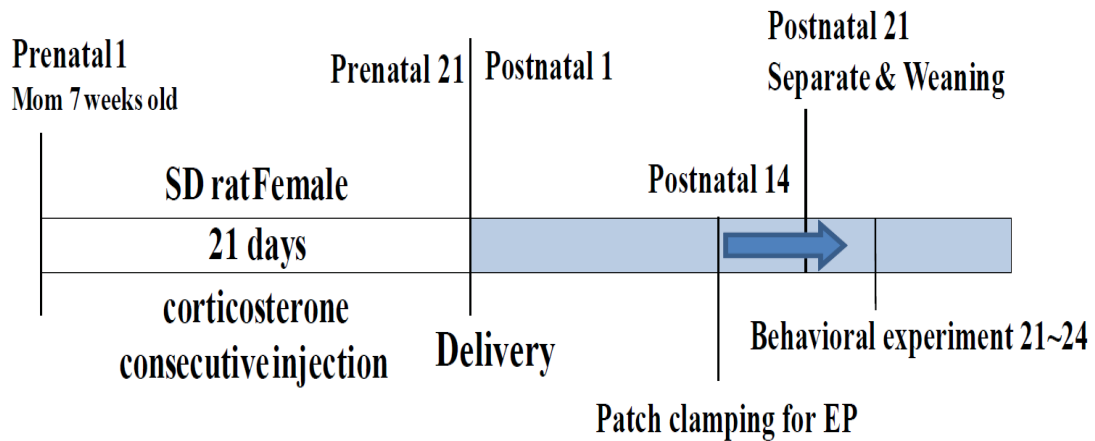
Whole cell patch clamp recording에서 acute hippocampal slice는 ACSF solution(bubbled with 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>)이 흐르도록 유지되는 recording chamber로 옮겨서 실험을 진행했다. 조직은 BX50 microscopy(Olympus, Japan)의 40 X water-immersed 대물렌즈를 통해 확인했다.

Patch electrode는 PP-830(Narishige, Tokyo, Japan)을 사용해 만들었다. Electrode는 4-6 MΩ의 팁 저항을 갖고 있으며 내부에 internal solution을 채운다. Internal solution의 조성은 다음과 같다(in mM) : 20 KCl, 125 K-gluconate, 10 HEPES, 4 NaCl, 0.5 EGTA, 4 ATP, 0.3 TrisGTP, 10 Phosphocreatin(pH 7.2). 흰쥐의 hippocampal CA1 neuron 흥분성 측정은 HEKA patch system(EPC9)에서 current 인가에 따른 membrane potential의 변화로 기록되었다(current-clamping mode). Ramp current(250 pA/sec)는 action

potentials(APs)의 threshold를 측정하기 위해 인가하였다. 세포 흥분성의 특성은 순차적으로 current pulse를 인가하는 세기에 따라 나타난다(-200 pA ~ 250 pA with 50 pA step, width 800 ms, **Supplemental figure 참조**). Long-term potentiation(LTP)는 두 그룹 동일하게 세포막 전압을 -65 mV로 고정한 뒤 excitatory postsynaptic current(EPSC)를 측정해 기록했다. EPSC는 자극 전 10분간 control EPSC와 LTP 유도를 위한 low frequency(0 mV holding, 4 Hz, 1 min) 자극을 준 후 30분간 기록되었다.

## 2.7. Analysis

Open Field Test의 분석은 idTracker(ver.4.97)로 경로를 추적해 분석되었다. 거리는 arena를 4분면으로 나눠 좌표를 구해 합산된 값을 말한다. 전기생리학 실험은 Pulse(HEKA, German)과 IGOR Pro(Wavemetrics, Lake Oswego, USA)를 사용해 분석되었다. 통계적 유의성은 Excel software(Microsoft, USA) 사용했다. 유의성 분석은 Student's t-test를 사용했으며 p-value < 0.05 or 0.01보다 작을 때 유의성이 있다고 판단했다.



**Figure 1. The Experimental Scheme**

짝 짚기에는 7~8 주령의 female과 8~9주령의 male이 사용되었다. 짝 짚기 기간은 1주일 이내로 지정했다. Female은 임신기간 21일동안 피하로 corticosterone (20 mg/kg)이 주사되었다. 정상쥐 그룹에는 주사하지 않은 그룹과 Corti.Pup 그룹과 마찬가지로 normal saline (20 mg/kg)이 주사된 그룹을 포함시켰다. 새끼들은 출산 후 3주간 어미의 보살핌을 받았으며 P-14부터 patch clamp 실험에 사용되었다. p-21 부터는 어미와 분리시키고, p-21~24에는 코티졸 영향에 따른 행동학적 실험을 진행했다.

### Ⅲ. 결과

#### 3.1. 동물모델 사이의 행동학적 특징 비교

실험실의 선행연구에서 corticosterone 주사를 맞은 어미쥐의 혈중 코티졸 수치가 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 통해 상승하는 것을 확인하였으며, 동시에 새끼 쥐에서도 코티졸 수치가 상승하였다(data not shown). 이를 바탕으로, **Figure2**와 **3**에서는 어미에 의해 혈중 코티졸 수치가 높아진 새끼들에게서 나타나는 행동학적 특징을 비교해 보았다. 이전에 밝혀진 바에 따르면 corticosterone의 반복적인 주사는 실험동물에게 depressive-like behavior를 나타나게 한다. 이러한 사실은 FST를 통해 Immobility time의 증가로 확인되었다(Johnson et al., 2006). 이번 실험에서는 동물모델 어미가 depressive-like behavior를 보인다는 가정하에 진행되었으며 어미에게 약물을 주사하는 것 이외에 모든 조건은 동일했다. 따라서 임신 중 엄마의 스트레스로 인한 코티졸 수치의 증가는 태아에게 전달되어 뇌의 정상적 발달 및 기능에 영향을 미치며, 이에 따라 행동학적 패턴도 다르게 나타날 것으로 예측하였다.

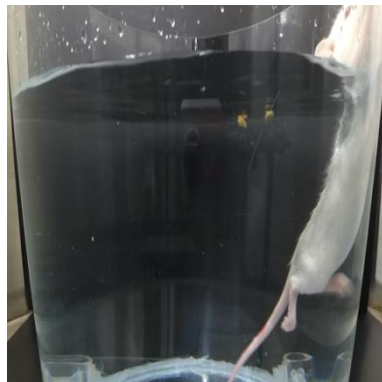
실험은 성장기(p-21~24)에 흰쥐가 새로운 환경의 적응에 따른 행동 패턴의

차이를 비교하기 위해 5일간 지속되었다. **Figure 2A**는 FST에서 나타나는 흰쥐의 세 가지 행동 양상을 보여주는 사진이다. 이를 통해 세가지 행동학적 특징이 뚜렷하게 나타나는 것을 볼 수 있다. 실험한 결과 첫째 날과 둘째 날에는 Immobility time의 차이가 거의 없었다(**Figure 2B**). 그러나 셋째 날부터 차이가 나기 시작해 넷째, 다섯째 날에는 유의하게 차이가 나타났다. 두 그룹을 비교해보면, 정상쥐 그룹에서는 실험이 진행될수록 물 속에서 수영하는 시간이 짧아지고 Immobility가 증가하는데 비해 Corti.Pup의 경우 수조의 중앙부를 가로지르며 이리저리 떠도는 모습이 지속적으로 관찰되었다. 물속에서 쉬지 않고 주위를 돌아다니는 모습이 과잉행동양상과 유사하게 나타났다(**Figure 2B**).

**A. Immobility**

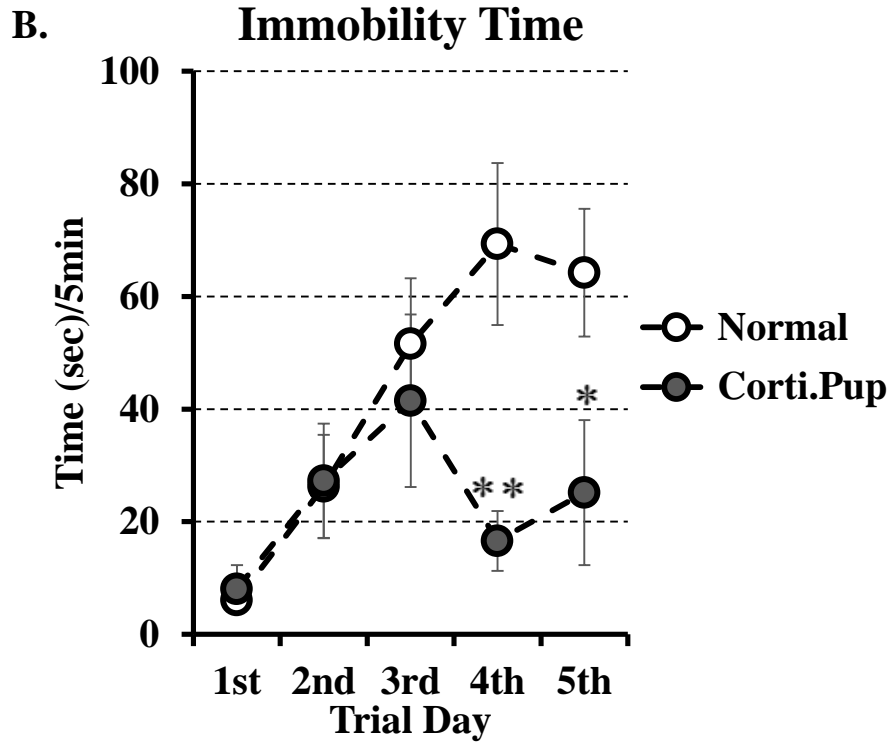


**Climbing**



**Swimming**





**Figure 2. Different behavioral patterns in Forced Swimming Test**

FST 실험결과 정상쥐(Normal)에 비해 Corti.Pup의 부적응 행동양상이 눈에 띄게

나타났다. **A.** FST의 대표적인 행동양상을 보여주는 사진. **B.** Normal

pup(n=10)에서는 반복적인 강제 수영 실험이 진행되는 동안 Immobility time이

증가했지만 Corti.Pup(n=8)은 실험이 진행될수록 Immobility가 줄어들었다.

데이터는 ‘평균 ± S.E.’로 표시되었다. \* : P < 0.05, \*\* : P < 0.01

두 번째 행동실험은 OFT를 통해 새로운 공간에 대한 적응력과 불안의 정도를 평가했다. 실험을 하기 앞서 arena의 위치를 정할 때 모서리 부분에 그들이 지지 않도록 했다. 그들이 생기게 될 경우 조명을 조절해 모든 모서리 부근의 밝기가 비슷해지도록 만들었다.

실험 첫째 날에 두 그룹 모두 낯선 환경에 대한 불안감으로 주변을 돌아다니는 것을 확인했다(**Figure 3A**). 정상쥐 그룹의 경우 마지막 날에 공간에 대한 적응력을 보이며 쥐의 습성상 상대적으로 안정감을 주는 구석에서 웅크리고 있는 모습이 관찰되었다. Corti.Pup 그룹은 정상쥐 그룹과는 다르게 실험이 진행될수록 오히려 더 많이 움직였다. 또한 center zone을 지나치는 횟수가 많았고 안정되지 못한 행동양상을 보였다(**Figure 3A**). **Figure 3B**는 실험이 진행되는 5분동안 두 그룹의 전체 이동거리를 보여준다. 영상에서 기록된 이동거리는 idTracker(ver.4.97)로 경로를 추적해 구했다. Corti.Pup에서 과잉행동 양상이 보이며 유의하게 많이 움직이는 것을 확인했다. **Figure 3C**의 데이터는 center zone에서 움직인 거리를 구한 값이다. 이것은 불안과 부적응의 척도로 판단했다. 정상쥐 그룹에 비해 Corti.Pup에서 center에 머무르는 빈도가 유의하게 높았다.

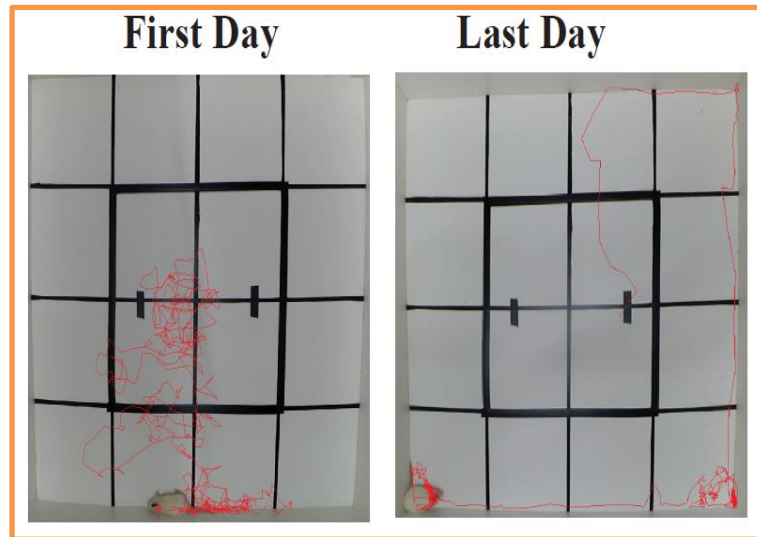
**Figure 4**는 center field index로 center zone에 머무른 거리(**Figure 3C**)를 전체



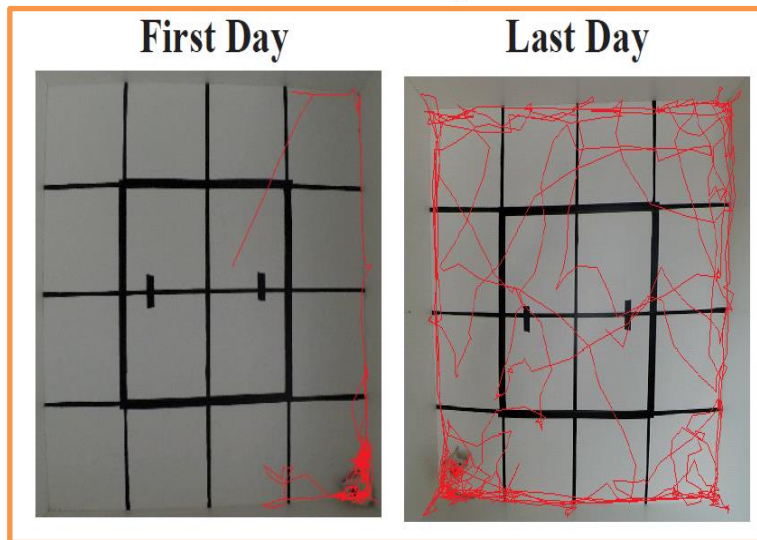
이동거리(**Figure 3B**)로 나뉜 전체거리 대비 center zone에 있는 정도를 %로 계산한 그래프이다. 분석결과 Corti.Pup의 center field index가 정상 쥐 그룹에 비해 유의하게 차이가 나는 것을 확인했다. 실험이 5일 동안 지속됨에 따라 정상 쥐 그룹의 경우 막혀있는 공간을 찾아 무의미한 움직임을 하지 않았다. 그에 비해 Corti.Pup 그룹은 실험이 진행됨에 따라 center를 돌아다니는 빈도가 늘어나고 계속해서 탐색하려는 경향을 보였다. 이것은 Corti.Pup 그룹이 새로운 환경에 대한 불안함과 부적응성을 보인다고 판단된다. 또한 전체 이동거리와(**Figure 3B**) 유사하게 나타나는 center field index로(**Figure 4**) 보아 Corti.Pup 그룹에서 과잉행동양상이 나타남을 확인했다.

**A.**

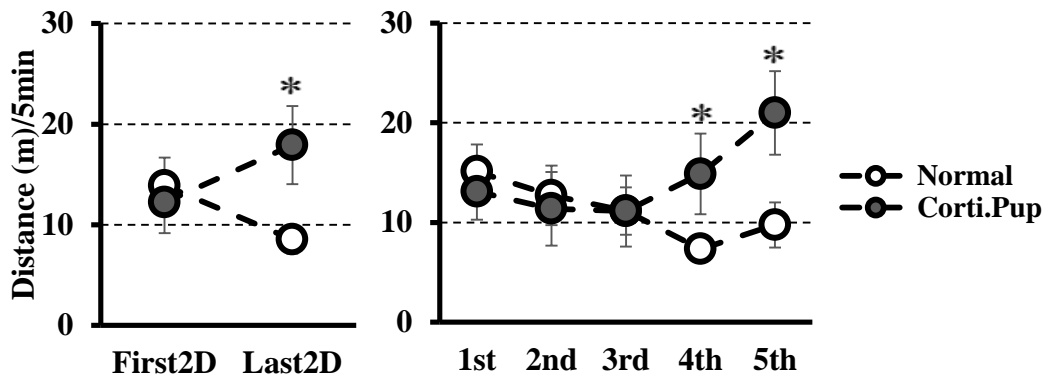
**Normal Pup**



**Corti. Pup**



## B. Open Field Total Distance



## C. Open Field Center Distance

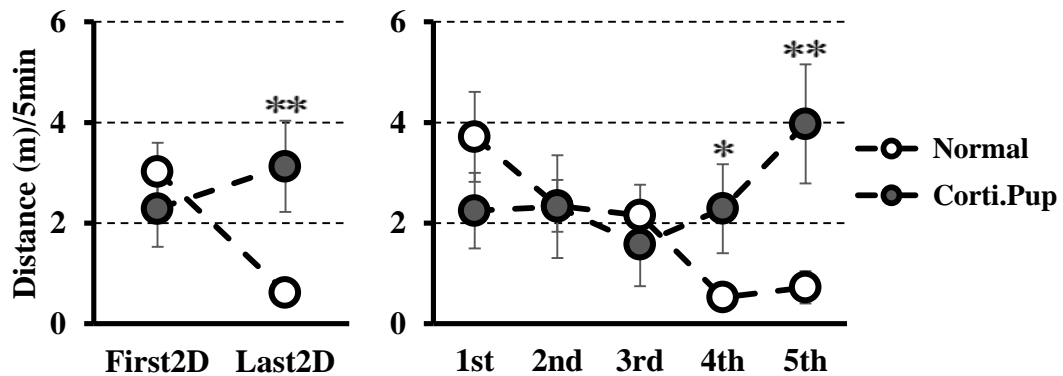
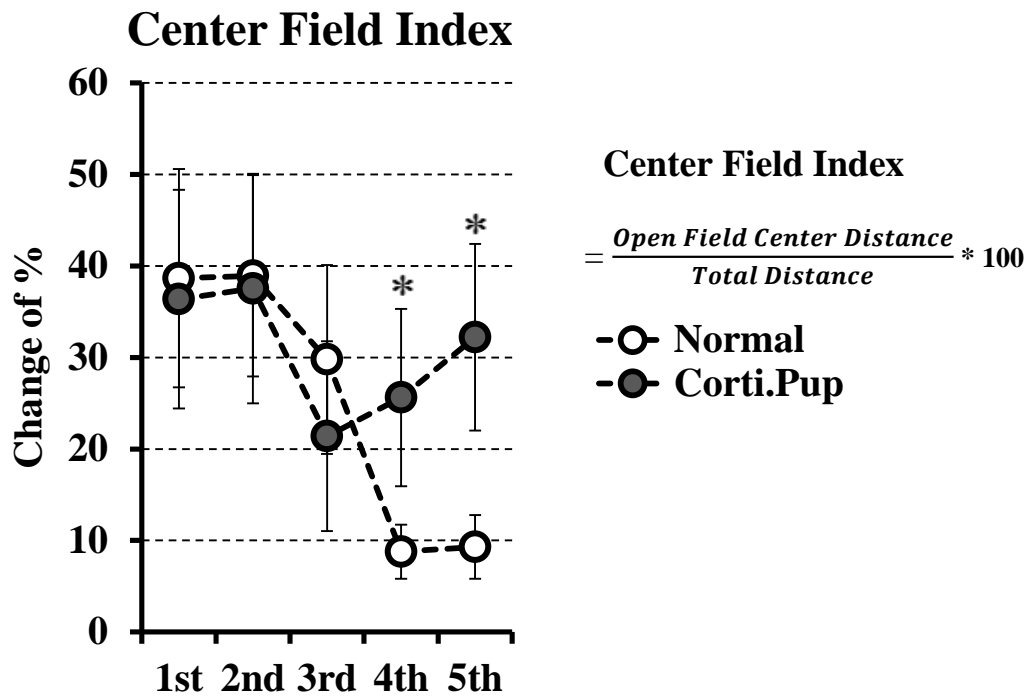


Figure 3. Different behavioral patterns in OFT between Normal and Corti. Pups

OFT는 새로운 공간인 arena에서의 불안 정도를 나타낸다. A. 실험결과 두 그룹의 첫날 이동거리는 비슷한데 비해 마지막 날에는 유의하게 차이를 보였다.

B. 반복된 실험으로 정상 쥐그룹(n=11)은 새로운 공간에 적응했지만 Corti.Pup 그룹(n=9)은 center zone에서 머무르는 시간이 길어졌다. C. 두 그룹이 Center zone에 머무르는 빈도를 계산했을 때 Corti.Pup이 유의하게 증가했다. Corti.Pup 그룹에서 불안과 부적응의 양상을 보이며 이러한 패턴은 코티졸과 상관관계가

있음을 나타낸다. 데이터는 ‘평균 ± S.E.’로 표시되었다. \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$



**Figure 4. Different behavioral patterns of Open Field Center Index between Normal and Corti. Pups**

OFT에서 정상쥐 그룹과(n=11) Corti.Pup 그룹(n=9)이 center zone에 머무른 거리를 총 이동거리로 나눠 center zone에 머무른 정도를 %로 나타내었다.

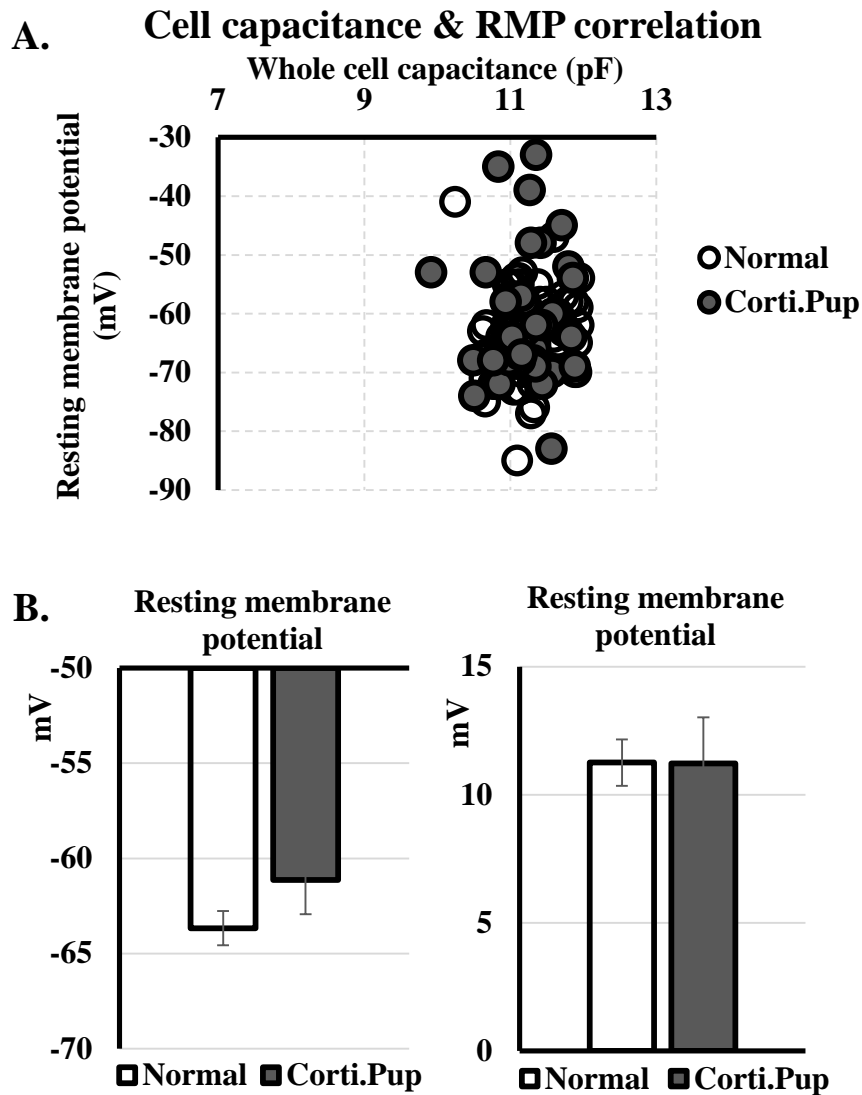
데이터는 ‘평균 ± S.E.’로 표시되었다. \* : P < 0.05

### 3.2. 성장기 흰쥐 hippocampal CA1 neuron의 전기생리학적 특성 비교

전기생리학 실험기법 중 Whole cell patch clamp 기법을 사용해 전기생리학적 특성을 기록했다. 세포의 특성을 찾아 내기 위해 실험 데이터 수집에 기준을 정했다. 기록한 세포들의 크기는 모두 whole cell capacitance가 9~12 pF 이며 기준에 포함되지 않은 것들은 데이터에 포함시키지 않았다(Figure 5A). Figure 5A는 cell capacitance(pF)와 RMP의 상관관계를 보여주는 그래프이다. 두 그룹 모두 비슷한 범주 내에 있다. Figure 5B는 Figure 5A의 RMP를 정량화한 그래프이다. Corti.Prp 그룹의 RMP가 약간 높지만 유의하지는 않다.

Igor pro의 Threshold ramp test로 기록한 데이터이다(Figure 6). 막 전압을 서서히 증가시켜 AP의 threshold를 알아낸다(Figure 6A). 그림에서 보이는 wave 시작점은 RMP이며 두 그룹간 차이는 없다(Figure 6A). Figure 7과 8은 Igor pro의 current-clamping으로 기록한 데이터이다. Sample waves는 각각의 세포단위에서 50 pA/sec 간격으로 -250~250 pA 까지 current를 차례대로 인가했을 때 두 그룹간 세포의 흥분성 정도를 보여주는 그림이다. Figure 7A는 0 pA가 인가되었을 때인 RMP 상태를 기준으로 위 쪽 Suprathreshold를 보여주는 그림이다. Suprathreshold에서 AP의 firing rate를 비교해 보았다. 두 그룹의 Firing rate 값은 거의 비슷하게 나타났다(Figure 7B). Figure 8A는 0 pA가 인가되었을 때인 RMP 상태를 기준으로

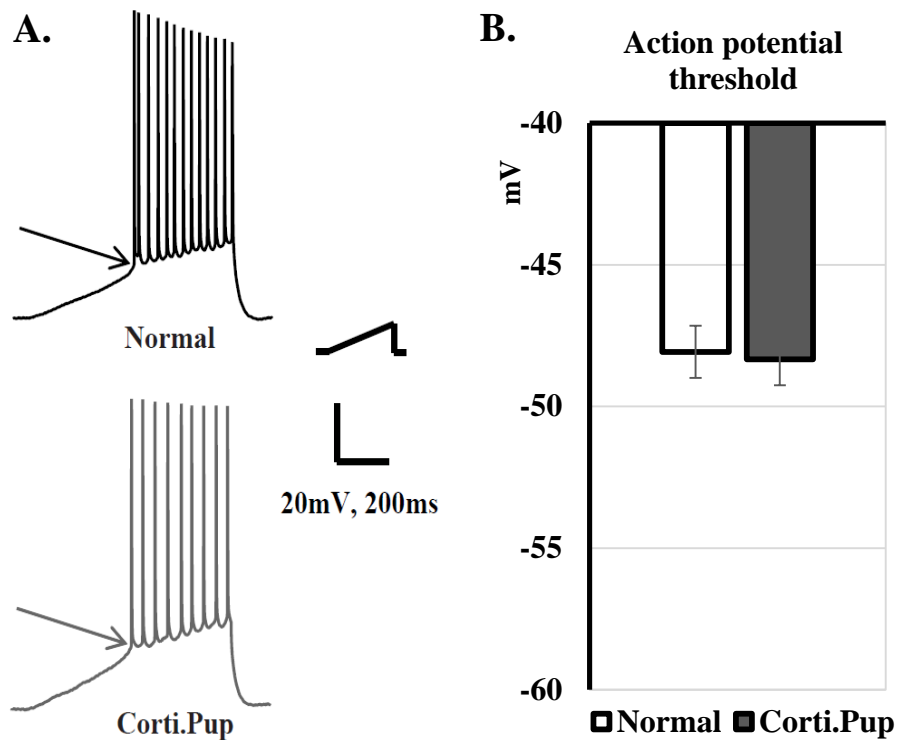
아래 쪽인 Subthreshold를 보여주는 그림이다. Subthreshold에서는 input resistance와 voltage sag의 값을 구했으며 두 그룹에 유의성은 없었다(**Figure 8B**). Input resistance는 세포막에 있는 단백질의 양에 대해 알 수 있는 값으로 R(저항) 값이 클수록 막 단백질의 양이 적다. Voltage sag은 주입되는 current 자극에 따른 세포의 흥분 정도를 보여준다. V(전압) 차의 크기가 클수록 hyperpolarizing-activated cation( $I_h$ ) channel의 양이 많다는 것을 의미한다.  $I_h$  channel이 열리면 과분극을 막아줘 세포가 자극에 대해 버티는 정도가 증가한다.



**Figure 5. Comparison of RMP of CA1 neurons between Normal and Corti.Pups**

성장기의 정상쥐 그룹(n=66)과 Corti.Pup 그룹(n=37)의 hippocampal slice에서 세포단위 신경 흥분의 특성을 비교했다. **A.** 세포 크기에 따른 RMP를 보여준다. Whole cell capacitance는 9~12 pF으로 제한했다. **B. Figure 5A**를 정량화한 그래프이다. 두 그룹간 약간의 차이는 있으나 유의적 차이는 없었다. 데이터는 ‘평균 ± S.E.’로 표시되었다.



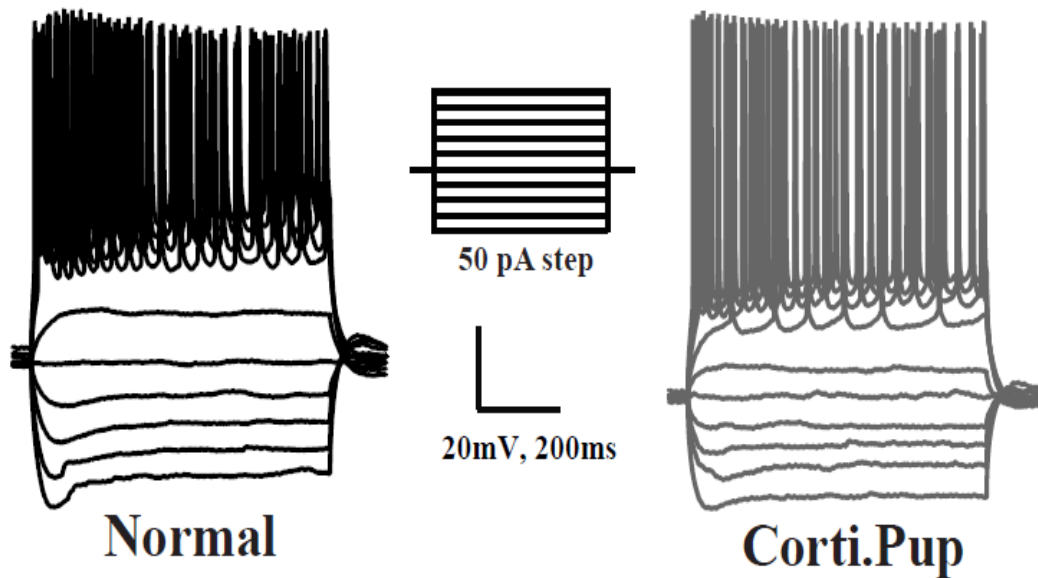


**Figure 6. Comparison of AP threshold of CA1 neurons between Normal and Corti.Pups**

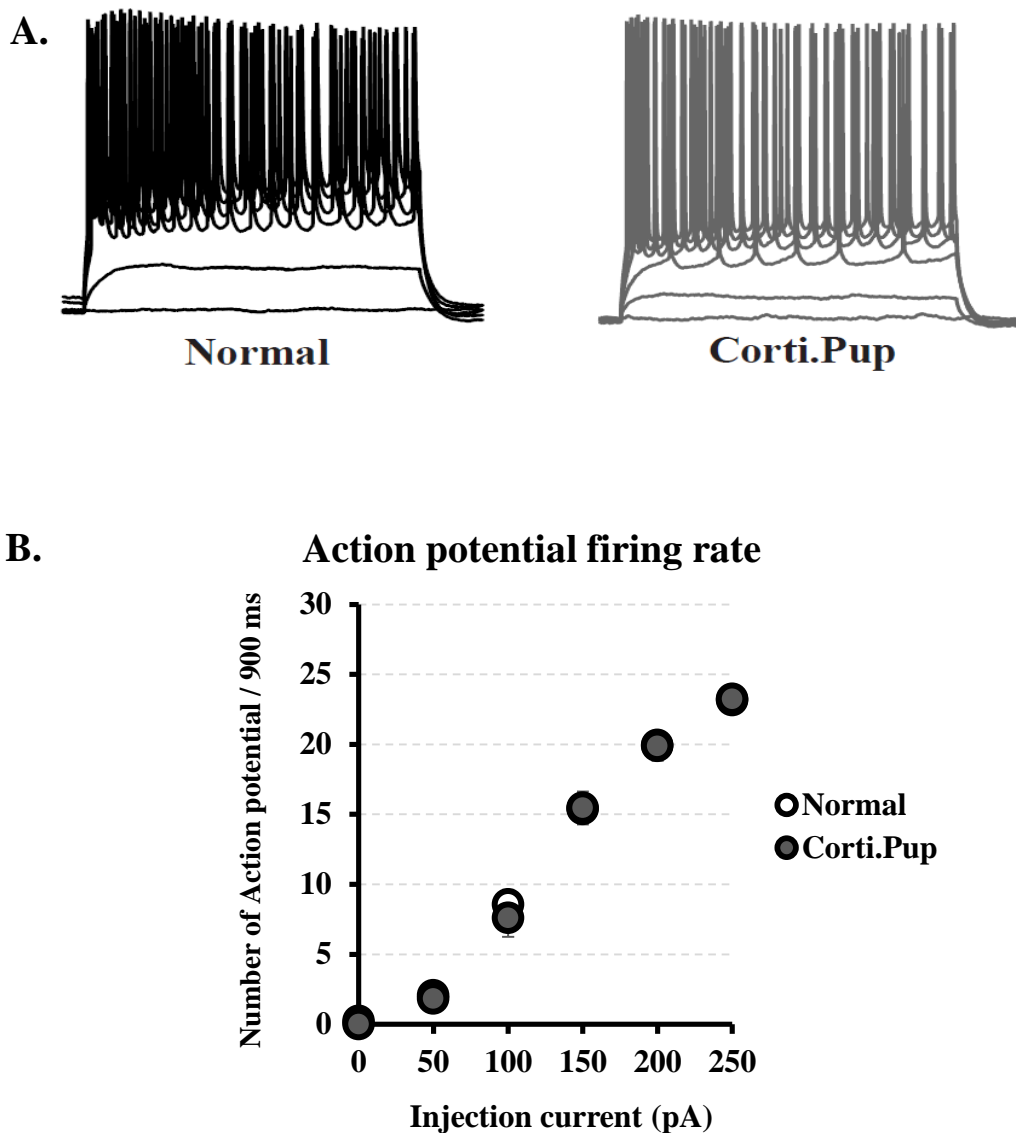
정상쥐 그룹(n=40)과 Corti.Pup 그룹(n=24)의 AP Threshold를 비교했다. **A.** 두 그룹의 막 전압을 서서히 증가시켰을 때 threshold가 나타난 지점을 표시한 그림이다.

**B.** 두 그룹의 AP threshold를 정량화해 나타낸 그래프로 두 그룹간 유의적 차이는 없었다. 데이터는 '평균 ± S.E.'로 표시되었다.

## Sample waves observed in current-clamping



**Supplemental Figure.** 성장기 정상쥐 그룹(n=35)과 Corti.Pup 그룹(n=22)의 hippocampal slice에서 세포에 50 pA/sec 간격으로 -250~250 pA까지 current pulse (가운데 도식화된 step pulse)를 인가했을 때 두 그룹간 세포의 흥분성 정도를 보여주는 예제 그림이다.



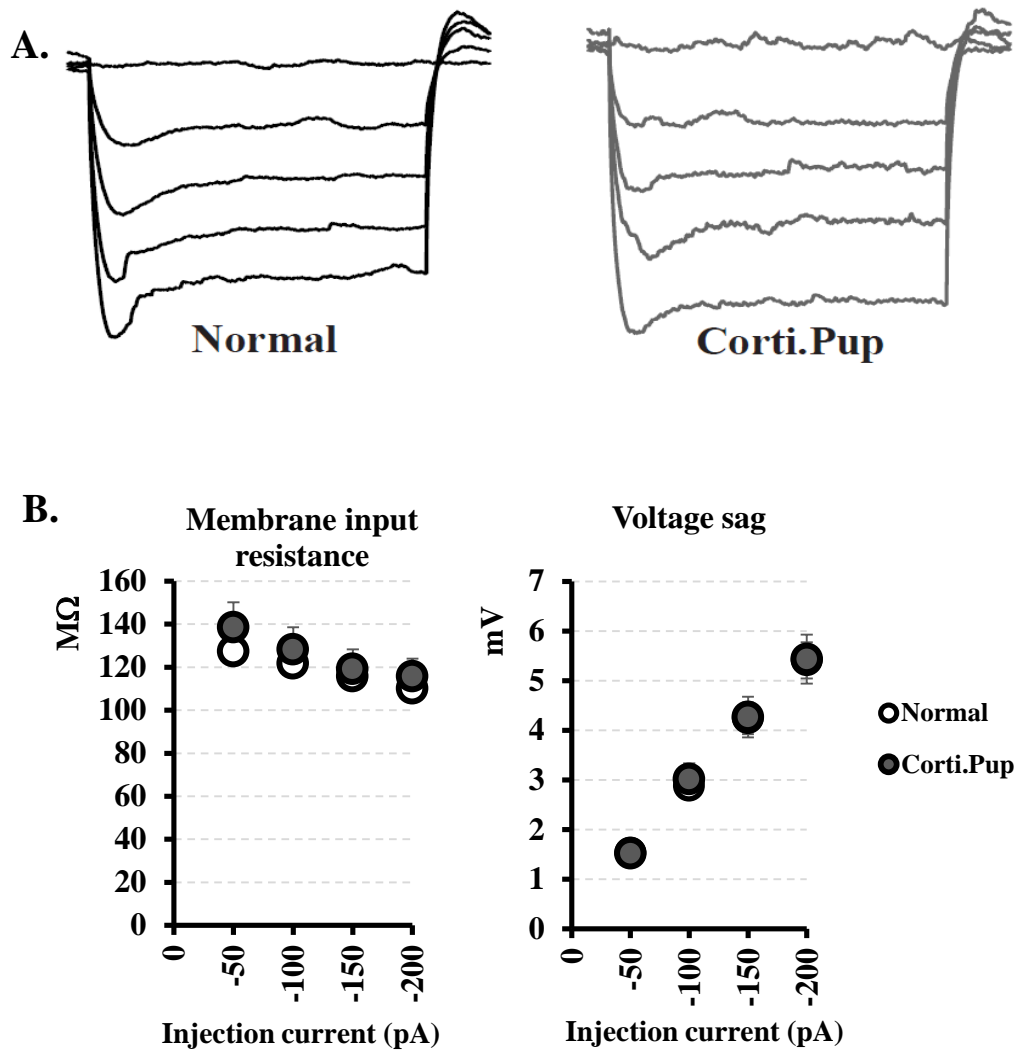
**Figure 7. Suprathreshold properties of CA1 neurons compared between Normal and Corti.Pups**

Sample waves 에서 중심 선인 RMP 를 기준으로 위 쪽 부분을 Suprathreshold 라

한다. **A.** 정상쥐 그룹(n=35)과 Corti.Pup(n=22)의 Suprathreshold 특성을 보여주는

그림이다. **B.** Figure 7A 에 나타난 AP firing rate 를 정량화해 나타낸 그래프이다. 두

그룹간 유의적 차이는 없었다. 데이터는 '평균 ± S.E.'로 표시되었다.



**Figure 8. Subthreshold properties of CA1 neurons compared between Normal and Corti.Pups**

Sample waves 에서 중심 선인 RMP 를 기준으로 아래 쪽 부분을 Subthreshold 라

한다. A. 정상쥐 그룹(n=35)과 Corti.Pup(n=22)의 Subthreshold 특성을 보여주는

그림이다. B. Figure 8A 에 나타난 input resistance 와 voltage sag 을 정량화해 나타낸

그래프이다. 두 그룹간 유의적 차이는 없었다. 데이터는 '평균  $\pm$  S.E.'로 표시되었다.

### 3.3. LTP 차이에 따른 세포단위 기억 기능의 이해

Whole cell path clamping을 통해 두 그룹의 LTP(Long-term potentiation)을 비교했다. Whole cell recording은 세포 막 위에서 한 번에 여러 채널을 통해 전류를 기록하는 것을 말한다. 이번 실험에서는 hippocampal CA1 조직에서 LTP 유도를 위한 low frequency(0 mV holding, 4 Hz, 1 min) 자극을 준 후 정상쥐 그룹과 Corti.Pup의 EPSC를 기록해 비교해 보았다.

**Figure 9A** 상단에 있는 wave는 각 그룹에서 측정된 EPSC 진폭을 나타내었다. 세 개의 wave는 차례대로 자극 전, 자극 직후, 자극 후반에 기록된 값들이다. wave에서 보이는 바와 같이 정상쥐의 경우에는 LTP 유도자극 직후 EPSC 진폭의 크기가 커졌고 30분동안 지속되었다(**Figure 9A**). 그러나 Corti.Pup의 경우에는 초기에 EPSC 진폭이 증폭되었으나 시간이 지남에 따라 증폭 정도가 유의하게 감소되었다(**Figure 9B**). **Figure 9B**에서 자극 후 30분 동안 두 그룹간의 격차가 점점 커지는 것을 확인할 수 있다.

**Figure 10A**는 **Figure 9B**를 정량화한 그래프이다. LTP low frequency 자극 후 두 그룹의 EPSC 진폭을 초반과 후반으로 나눠 나타냈다(**Figure 10A**). 초반은 0~5min 사이, 후반은 25~30min 사이에 기록된 EPSC 진폭의 평균 크기이다. 자극 후 Corti.Pup 그룹에서 후반부의 EPSC 진폭의 크기가 유의미하게 감소됨을

확인했다. 따라서 Corti.Pup의 성장기 뉴런들은 시냅스 가소성이 불완전하며 glutamatergic synapse 가소성에 문제가 있을 것으로 예상된다.





경우 후반부까지 long-lasting potentiation 이 유지되었지만 Corti.pup 은 후반부로 갈수록 감소되는 양상을 보였다.

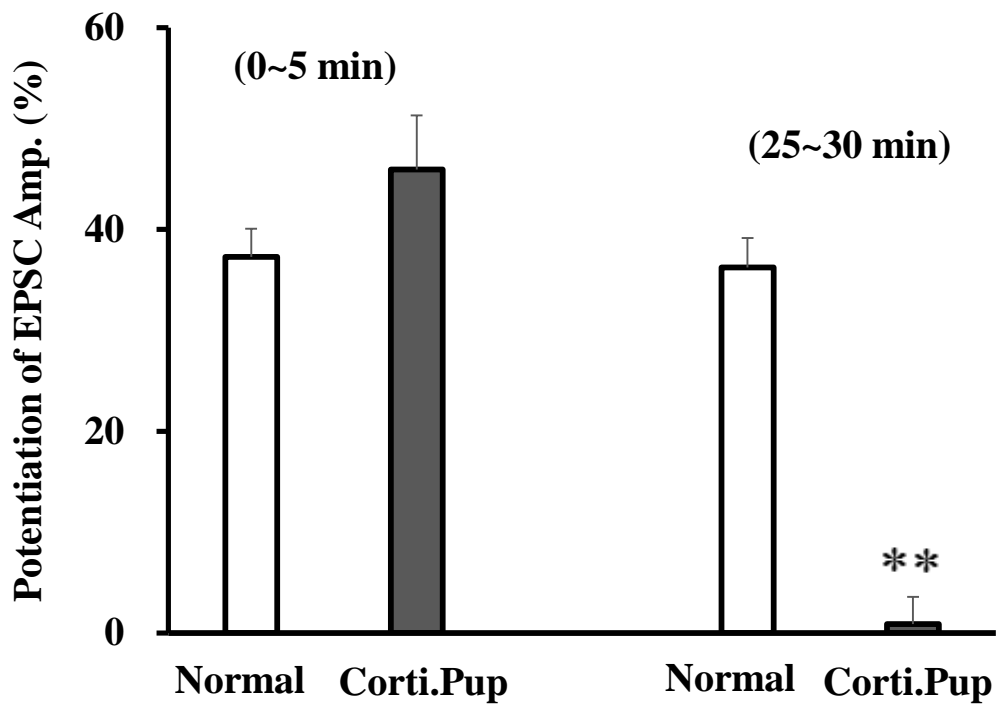


Figure 10. Comparison of potentiation in early and late phases between two groups

Figure 9B에서 정상쥐 그룹(n=7)과 Corti.Pup(n=10)그룹의 자극 후 초반과 후반의 EPSC 진폭 평균을 정량화한 그래프이다. 두 그룹간 후반부의 EPSC 진폭의 평균 크기에서 유의적 차이를 보인다. 데이터는 '평균 ± S.E.'로 표시되었다. \*\* : P < 0.01

## IV. 고찰

임신 중 산모의 스트레스 또는 트라우마는 모체에 코티졸을 증가시켜 태아의 성장 발달에 부정적 영향을 미친다(Mateos et. al., 2018). 산모의 코티졸이 태아에게 전달되는 것은 사람과 설치류의 포유 동물에게서도 확인되었다 (Slopena et. al., 2018; BAIROS-NOVAK et. al., 2018).

임신 중인 동물모델에서 모체의 코티졸 수치가 증가함에 따라 새끼에게 전달된다는 가정하에 실험을 진행했을 때, 행동학적 실험결과 코티졸이 유도된 pup모델에서 과잉행동양상이 두드러지게 나타났다. 이는 동물의 행동 실험에 대한 부적응의 영향으로 나타난 결과로 판단된다. 이러한 결과는 FST에서 낮은 Immobility time 과 OFT에서 center 머무름의 거리로 뒷받침 되었다. 주의력 결핍 과잉 행동장애(Attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)는 주로 아동기에 많이 나타나며 심리적으로 자존감이 떨어지고 우울과 불안감을 느끼는 특징을 가지고 있다(Schuck et. al., 2018). FST(**Figure 2B**)와 OFT 실험결과(**Figure 3과 4**), Corti.Pup 그룹이 정상쥐 그룹에 비해 과잉행동을 보이는 양상은 새로운 환경에 대한 불안과 부적응성이 관련되어 있을 것으로 생각된다. 최근 이와 비슷한 내용으로 출산 후 엄마의 정신건강 문제가 8-9 세 사이의 자녀들에게 ADHD를

야기한다는 내용이 밝혀졌다(Mulraney et. al., 2018). 따라서 ADHD의 문제는 부모와 자녀 사이에 직접적인 관련이 있음을 알 수 있다.

해마의 뇌 절편을 이용한 전기생리학 실험에서 동물모델 두 그룹간의 신경세포막 흥분성에는 특징적인 차이는 없었다. 같은 크기를 갖는 세포들에서 비교 했을 때, AP threshold는 전혀 차이가 없었다. RMP의 경우는 Corti.pup이 약간 높은 것으로 확인되었으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 따라서, 세포막 흥분성을 결정짓는  $\text{Na}^+$  channel이나  $\text{K}^+$  channel들의 구성 및 기질 특성은 크지 않을 것으로 예상된다. 이러한 특징은 subthreshold 막 흥분성에서도 나타났는데 voltage sag을 이용하여 간접적으로 확인한  $I_h$  크기가 두 그룹에서 차이가 나지 않았다. 특히 membrane resistance에 전혀 차이가 없다는 것은 세포막에 포함된 이온통로들의 분포 및 기질이 크게 차이가 없음을 의미한다.

세포막의 흥분성을 비교한 실험에서는 유의한 차이가 없었으나, 기억 및 학습기능을 전기생리학적으로 평가하는 LTP 실험에서는 두 그룹이 유의한 차이를 보였다. 해마에서의 LTP 장애는 학습과 기억기전의 영향이라고 할 수 있다. 최근 이를 기반으로 전기생리학적 기법을 이용해 Alzheimer's disease(AD)에서 copine 6이라는 약물을 통해 LTP증가를 확인했다(Hadipour et. al., 2018). 반대로 학습공간과 기억 장애를 갖는 쥐에게서 LTP를 측정할 결과 LTP가

감소하였다(Chen et. al., 2018).

실험결과 정상쥐 그룹의 경우 정상적인 LTP 양상을 보이는 반면, Corti.pup 그룹의 경우 LTP가 서서히 소멸되는 양상을 보였다. 이는 synaptic plasticity를 형성하는 기본적인 전연접·후연접 구성요소들에 문제가 있음을 의미한다(Figure 10). 본 실험에서는 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-dependent LTP induction 방식을 사용하였기 때문에, LTP에 문제가 생긴다는 것은 전형적인 glutamate system의 문제를 의미한다. 뇌 기능에서 LTP로 시냅스 가소성에 이르게 하는 핵심 역할인 NMDA receptor(NMDAR)는 중추 신경계의 기본적인 glutamate 수용체 중 하나로 간주 될 수 있다(Hui Wang et. al., 2016). NMDAR는 소뇌에서 장기 우울증과 운동 학습을 조절한다. LTP와 LTD는 다양한 뇌 영역의 NMDA 수용체에 의해 조절된다(Kono et. al., 2018). NMDAR-mediated LTP는 학습 및 기억에 관련된 주요 시냅스 가소성이다(Zhou et. al., 2018). 따라서 Corti.pup의 LTP 소멸은 기억형성에 문제가 있을 수 있음을 의미하고, 시냅스 형성과 가소성이 정상적이지 않을 수 있음을 시사한다. 본 연구실의 선행연구자에 의한 행동실험 Morris Water Maze Test에서 정상쥐 그룹과 Corti.Pup의 학습 능력에는 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 그 결과, 학습 전·후를 비교했을 때 hidden platform을 찾는 시간이 Corti.pup에서 더 많이 소요되었다. 이는 학습에 의한 공간기억이 저하되었음을

의미한다(Data not shown). 선행 연구와 더불어 Corti.pup의 LTP 소멸은 코티졸이 태아의 뇌 기억기능에 영향을 주고 있음을 증명하는 결과이다. 따라서, 본 연구에서 도출된 결과들은 태아의 혈중 코티졸 증가가 과잉행동을 유발하고 기억 및 학습에 영향을 미칠 수 있다는 것을 실험적으로 증명하였다고 할 수 있다. 특히, 이러한 신경정신과적 이상증상에 glutamate synapse가 관여하고 있을 것이라는 자료를 제공하며, 연구한 내용을 기반으로 보다 기전적 고찰을 시도한다면 ADHD나 MDD에서 glutamate system이 갖는 의미를 찾아 내는데 좋은 자료로 활용될 수 있을 것이다.

## 참고문헌

- Abidin İ, Aydin-Abidin S, Mittmann T. 2018. Neuronal excitability and spontaneous synaptic transmission in the entorhinal cortex of BDNF heterozygous mice. *Neurosci Lett.* 690:69-75.
- Angelino. 2014. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/articles-and-answers/wellbeing/seasonal-depression-infographic>.
- Bairos-Novak KR, Ryan CP, Freeman AR, Anderson WG, Hare JF; Handling editor: Sean Lema. 2018. Like mother, like daughter: heritability of female Richardson's ground squirrel *Urocyon richardsonii* cortisol stress responses. *Curr Zool* 64(2):153-163.
- Bosquet Enlow M, Sideridis G, Chiu YM, Nentin F, Howell EA, Le Grand BA, Wright RJ. 2019. Associations among maternal socioeconomic status in childhood and pregnancy and hair cortisol in pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 99:216-224.
- Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. 2013. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep.* 1(2):167-176.
- Chen Q, Ren L, Min S, Hao X, Chen H, Deng J. 2018. Changes in synaptic plasticity are associated with electroconvulsiveshock-induced learning and memory impairment in rats with depression-like behavior. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2;14:1737-1746.
- Hadipour M, Kaka G, Bahrami F, Meftahi GH, Pirzad Jahromi G, Mohammadi A, Sahraei H. 2018. Crocin improved amyloid beta induced long-term potentiation and memory deficits in the hippocampal CA1 neurons in freely moving rats. *Synapse* 72(5):e22026.
- Han YX, Tao C, Gao XR, Wang LL, Jiang FH, Wang C, Fang K, Chen XX, Chen Z, Ge JF. 2018. BDNF-Related Imbalance of Copine 6 and Synaptic Plasticity Markers Couples With Depression-Like Behavior and Immune Activation in CUMS Rats. *Front Neurosci.* 31;12:731.
- Ishii T, Warabi E, Mann GE. 2018. Circadian control of BDNF-mediated Nrf2 activation in astrocytes protects dopaminergic neurons from ferroptosis. *j.freeradbiomed.* [Epub ahead of print].
- Johnson SA, Fournier NM, Kalynchuk LE. 2006. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav Brain Res.* 3;168(2):280-8.
- Kono M, Kakegawa W, Yoshida K, Yuzaki M. 2018. Interneuronal NMDA receptors regulate long-term depression and motor learning in the cerebellum. *J Physiol.* [Epub ahead of print].

- Markham A, Bains R, Franklin P, Spedding M. 2014. Changes in mitochondrial function are pivotal in neurodegenerative and psychiatric disorders: how important is BDNF?. *Br J Pharmacol.* 171(8):2206-29.
- Mateos RM, Jiménez G, Álvarez-Gil C, Visiedo F, Rivera-Rodríguez F, Santos-Rosendo C, Rodríguez-Pareja A, Perdomo G, Lechuga-Sancho AM. 2018. Excess Hydrocortisone Hampers Placental Nutrient Uptake Disrupting Cellular Metabolism. *Biomed Res Int.* 5106174.
- Mulraney M, Giallo R, Efron D, Brown S, Nicholson JM, Sciberras E. 2018. Maternal postnatal mental health and offspring symptoms of ADHD at 8-9 years: pathways via parenting behavior. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* [Epub ahead of print].
- Oh H, Piantadosi SC, Rocco BR, Lewis DA, Watkins SC, Sibille E. 2018. The Role of Dendritic Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcripts on Altered Inhibitory Circuitry in Depression. *Biol Psychiatry.* S0006-3223(18)31897-3.
- Schuck SEB, Johnson HL, Abdullah MM, Stehli A, Fine AH, Lakes KD. 2018. The Role of Animal Assisted Intervention on Improving Self-Esteem in Children With Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Front Pediatr.* 2;6:300.
- Slopen N, Roberts AL, LeWinn KZ, Bush NR, Rovnaghi CR, Tylavsky F, Anand KJS. 2018. Maternal experiences of trauma and hair cortisol in early childhood in a prospective cohort. *Psychoneuroendocrinology* 98:168-176.
- Wang H, Peng RY. 2016. Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Mil Med Res.* 3(1):26.
- Zhu C, Xu J, Lin Y, Ju P, Duan D, Luo Y, Ding W, Huang S, Chen J, Cui D. 2018. Loss of Microglia and Impaired Brain-Neurotrophic Factor Signaling Pathway in a Comorbid Model of Chronic Pain and Depression. *Front Psychiatry* 4;9:442.
- Zhong Y, Zhu Y, He T, Li W, Li Q, Miao Y. 2019. Brain-derived neurotrophic factor inhibits hyperglycemia-induced apoptosis and downregulation of synaptic plasticity-related proteins in hippocampal neurons via the PI3K/Akt pathway. *Int J Mol Med.* 43(1):294-304.
- Zhou JJ, Li DP, Chen SR, Luo Y, Pan HL. 2018. The  $\alpha\delta$ -1-NMDA receptor coupling is essential for corticostriatal long-term potentiation and is involved in learning and memory. *J Biol Chem.* [Epub ahead of print].