

석사학위논문

신경세포, 성상교세포, 미세신경교세포에서의
glucocorticoid에 의한 세포특이적 유전자
발현과 신호전달계에 관한 연구



제주대학교 대학원

의학과

Yan-Ji Cui

2008년 8월

신경세포, 성상교세포, 미세신경교세포
에서의 glucocorticoid에 의한 세포특
이적 유전자 발현과 신호전달계에
관한 연구

지도교수 은 수 용

최 연 희

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2008년 08월

최연희의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2008년 08월

Glucocorticoid-induced cell type-specific
alterations of gene expression and function in
neurons, astrocytes and microglia

Yan-Ji Cui

(Supervised by professor Su-Yong Eun)

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

2008. 08.

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....
Date

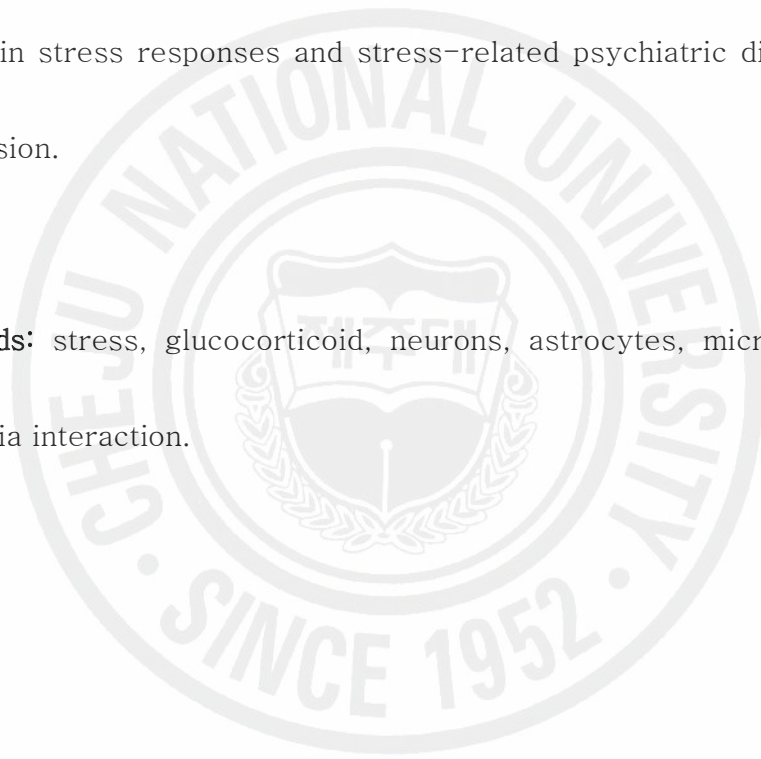
DEPARTMENT of MEDICINE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

In the brain, there are several different types of cells, such as neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia. We are interested in the roles and mechanisms of neuron-to-glia interaction in stress responses and stress-related psychiatric disorders such as depression. In the present study, we investigated cell type-specific effects of glucocorticoid on cellular function and gene expression in different brain cells. Dexamethasone (DEX, 1 μ M), a synthetic glucocorticoid, was treated for 24 hours in HT-22, C6 and BV-2 cells. DEX treatment significantly reduced both cellular mRNA expression and extracellular protein release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in HT-22 neurons. However, the mRNA expressions of BDNF and crystallin alpha B were markedly increased in C6 astrocytes. Lipopolysaccharide (LPS, 200 ng/ml)-induced NO release, nuclei translocation of NF- κ B, degradation of I κ B, and mRNA expression of TNF alpha in microglia, a well-known phenomenon presenting proinflammatory capacity of microglia, was suppressed by DEX treatment. These effects were reversed by glucocorticoid receptor antagonist RU486 (Mifepristone). Our

results suggest that glucocorticoid might deteriorate neuronal survival and maintenance of function. Astrocytes and microglia might protect damaged neurons vulnerable to stress hormone, by providing BDNF to neurons and anti-neuroinflammatory effect, respectively. Taken together, we postulate the specific roles and the neuron-glia interaction of neurons, astrocytes and microglia in stress responses and stress-related psychiatric disorders such as depression.

Keywords: stress, glucocorticoid, neurons, astrocytes, microglia, BDNF, neuron-glia interaction.



목 차

ABSTRACT	I
목 차	III
LIST OF FIGURES	V
I. 서론	1
II. 연구방법	4
1. 세포배양	
2. 스트레스 유발 동물실험 (Chronic Mild Stress Model, CMS)	
3. Nitric Oxide 측정법	
4. Total RNA 분리와 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	
5. 효소면역측정 (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay, ELISA)	
6. Western Blot Analysis	
7. 통계처리	
III. 결과	9
1. HT-22 neurons에서의 dexamethasone에 의한 BDNF의 발현 감소작용	
2. C6 astrocytes에서의 dexamethasone에 의한 BDNF의 발현 증가작용	

3. 스트레스 유발 동물실험모델 (CMS) 해마조직에서 스트레스에 의한 BDNF mRNA 발현 감소
4. HT-22 neurons과 C6 astrocytes에서의 dexamethasone에 의한 crystalline alpha B의 유전자 발현상의 변화
5. C6 astrocyte의 dexamethasone에 의한 crystalline alpha B 발현 증가에 대한 PKC, PI3 kinase의 영향 조사
6. 스트레스 유발 동물실험모델 (CMS) 해마조직에서 스트레스에 의한 crystalline alpha B mRNA 발현 증가
7. BV2 microglia에서의 LPS에 의한 NO 방출에 대한 dexamethasone의 억제작용
8. BV2 microglia에서의 dexamethasone에 의한 TNF-alpha mRNA 발현상의 변화
9. BV2 microglia에서의 LPS에 의한 NF- κ B와 I κ B의 발현에 대한 dexamethasone의 작용

IV. 고찰	27
V. 참고문헌	30
VI. 감사의 글	32

LIST OF FIGURES

Figure 1. GR-mediated suppression of BDNF mRNA expression (A) and extracellular BDNF release (B) in HT-22 neurons	18
Figure 2. GR-mediated increase of BDNF mRNA expression (A) and extracellular BDNF release (B) in C6 astrocytes	19
Figure 3. CMS stress-induced decrease of BDNF mRNA expression in SD rat hippocampus	20
Figure 4. GR-mediated effects of dexamethasone on crystallin alpha B mRNA expression in HT-22 neurons (A) and C6 astrocytes (B)	21
Figure 5. Inhibitor studies of PKC (A) and PI3 Kinase (B) on dexamethasone-induced crystalline alpha B mRNA expression in C6 astrocytes.....	22
Figure 6. CMS stress-induced increase of crystalline alpha B mRNA expression in SD rat hippocampus	23
Figure 7. GR-mediated inhibition of dexamethasone on LPS-induced NO release in BV2 microglia	24
Figure 8. Effects of dexamethasone on LPS-induced TNF-alpha mRNA expression in BV2 microglia	25
Figure 9. Effects of dexamethasone on LPS-induced NF- κ B expression in BV2 microglia	26
Figure 10. Effects of dexamethasone on LPS-induced I κ B expression in BV2	



I. 서론

Stress란 stressful event 나 stressor 에 대한 유기체의 반응으로 특이적인 생화학적, 생리학적 및 행동면의 변화가 관찰되는 것으로 정의되고 있다 (Selye, 1936). 따라서 stress 를 보다 근원적인 측면에서 이해하기 위해서는 사회, 문화적 요소를 포함한 심리적 변인에 대한 이해와 더불어 생물학적 연구가 보다 광범위하게 요구된다 하겠다 (양병환 외, 1999). 생물학적인 측면에서 스트레스 기전을 살펴보면, 인체가 스트레스에 직면하면 즉각적인 반응으로 교감신경계 (sympathetic nervous system)가 작동되며 이후 부신수질에서 epinephrine 을 분비하고, 이어서 시상하부 (hypothalamus)-뇌하수체 (pituitary gland)-부신피질 (adrenal gland)의 HPA 내분비축을 통하여 부신피질에서 glucocorticoid hormone 분비가 촉진되어 epinephrine 과 glucocorticoid hormone 에 의한 전신적 스트레스 반응이 나타난다 (Plotsky et al., 1998).

인체의 스트레스 반응은 위급한 상황에 대하여 인체의 항상성 (homeostasis)을 유지하기 위하여 발생하나 지속적이고 정도가 과도한 경우 위궤양, 빈맥, 면역저하 등 전신적인 장기에 심각한 장애와 질병을 초래한다. 본 논문에서는 과도하고 지속적인 스트레스로 인하여 유발되는 우울증 등

정신질환에서 스트레스 호르몬이 뇌세포에 어떠한 영향을 끼칠 수 있는지를 분자 수준 (molecular level)과 세포 수준 (cellular level)에서 뇌세포의 스트레스 반응에 관심을 두고 있다. 스트레스 상황에서 뇌조직에 스트레스 호르몬이 증가하면 신경세포 (neuron) 뿐만 아니라 주요한 뇌세포인 성상교세포 (astrocyte), 미세신경교세포 (microglia) 등도 스트레스 호르몬의 영향을 받게 될 것이다. 각각의 세포가 독립적으로 반응하기도 하겠지만 신경세포-신경교세포 상호작용 (neuron-to-glia interaction)을 통하여 통합적인 스트레스 호르몬반응을 조절한다고 본다.

본 실험에서는 스트레스 상황에서의 뇌세포의 반응을 조사하기 위한 *in vitro* 세포배양 실험모델을 구축하기 위하여 Glucocorticoid Receptor (GR)에 특이적인 합성 스트레스 호르몬인 dexamethasone (DEX, Sigma)을 1-2 일 투여 및 반복 투여 등의 약물처리 방법을 시도하였다. Dose study 와 time course 실험 결과는 조사한 유전자에 따라 조금씩 달랐으나 일관된 경향성이 나타나서, 약물농도는 1 μ M 로 결정하였고 약물처리 기간은 1 일로 결정하였다. 뇌에는 neuron 뿐만 아니라 astrocyte, microglia 가 존재하며 각각의 고유한 기능을 수행하고 또한 상호 작용 (neuron-glia interaction)을 하고 있기 때문에 뇌조직 내에서 스트레스 호르몬에 대한 반응도 각각의 기능과 관련되어 나타날 것이고 서로 유기적으로 연결되어 있을 것으로 생각되기 때문에 각각의 cell line 인

HT-22, C6, BV-2 cell 에서의 DEX 처리를 통한 스트레스 호르몬 반응의 비교
분석을 시도하였다.



II. 연구 방법

1. 세포배양

신경세포 (neuron), 성상교세포 (astrocyte), 미세신경교세포 (microglia)는 10%(v/v) fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, 16000-044)과 1% penicillin streptomycin이 함유된 Dulecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, BV2 microglia는 매일 계대 하였고 HT22 neurons과 C6 astrocytes는 2일에 한번씩 계대 하였다.

2. Nitric Oxide 측정법

Nitric Oxide 의 생체 내 전변물질인 nitrite (NO₂⁻)를 간접적으로 측정함으로써 Nitric Oxide 양을 측정하였다. 즉, sulfanilamide 가 nitrite 와 반응을 하게 되고, 여기에 다시 N-[1-naphthyl]-ethylenediamine dihydrochloride 이 결합되게 되면서 colorimetric change 가 일어나게 되는 원리로 되어 있다. 각 시료의 세포 상층액 100 µl 에 동량의 Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% N-[1-naphthyl]-ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid)를 첨가 후 암실조건에서 10 분간 반응시켰다. 다음 540nm 에서 흡광도를 측정하였다. NO₂ 의 농도는 NaNO₂ standard curve 로 계산하였다.

3. Total RNA 분리와 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Dexamethasone 의 chronic treatment 에 의한 유전자 발현을 조사하기 위하여 RT/PCR 기계를 사용하였다. 세포배양 plate 에서 media 를 제거한 후 1 ml TRIZOL Reagent (Invitrogen, Molecular Research Center)로 세포에서 DNA 와 RNA 를 유리하였다. 얼음 위에서 15 분 방치 후 200 μ l chloroform 으로 처리하였다. Chloroform 에 의해 RNA 을 제외한 DNA 와 protein 이 응집되면 4°C에서 15 분간 원심분리 하여 상대적으로 무거운 TRIZOL 과 DNA, protein 등을 아래로 침전 시켰다. RNA 가 있는 상층을 pipet 를 이용하여 다른 튜브로 옮겼다. RNA 가 있는 aqueous phase 에 500 μ l isopropanol 처리해 RNA 만 뭉치게 하였다. 4°C에서 15 분간 원심부리 후 상층액을 제거하였다. 75% ethanol 1 ml 처리 후 다시 한번 원심분리, 상층액 (ethanol)을 제거해주었다. Ethanol 을 모두 휘발 시켜 RNA 만 남겨두고 0.1% DEPC D.W.로 RNase 를 제거하였다. RNA 를 0.1% DEPC D.W.로 100 배 희석한 다음 260nm 와 280nm 에서 optical density (OD)를 측정하였다. 정량 한 RNA 와 0.1% DEPC D.W.에 1 μ l 의 oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer 를 넣고 70°C에서 15 분간 1 차 반응 시켰다. 5 \times buffer 4 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l, RNase inhibitor (Invitrogen) 0.5 μ l, SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) 0.5 μ l 를 넣고 42°C에서 45 분간, 70°C에서 15 분간 반응하여 효소들을 불활성화

시켜주고 4°C에 보관하였다. Primer 신장반응으로 얻은 cDNA 용액의 일부 (3 μ l)를 PCR 주형으로 직접 이용하였다. Primer 신장반응의 일부 3 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, dNTP Mixture 2 μ l, sense primer 3 μ l, antisense primer 3 μ l, D.W. 11 μ l, Taq polymerase 0.5 μ l 로 총 25 μ l 용액을 만들었다. 이 mixture 로 증폭반응을 시켰다. 초기 열변성은 94°C에서 10 분이고 cycle 수는 30 cycle 로 하였고 최종신장반응은 72°C에서 7 분 하였다. 각 primer 에 해당하는 cycle 반응은 다음과 같다: BDNF (94°C, 40s ; 49°C, 40s ; 72°C, 60s), TNF- α (94°C, 60s ; 50°C, 60s ; 72°C, 60s), crystalline α B (94°C, 40s ; 55°C, 40s ; 72°C, 40s), GAPDH (94°C, 40s ; 55°C, 40s ; 72°C, 60s). Primer 의 염기서열은 아래와 같다:

BDNF: (F) ATG GTT ATT TCA TAC TTC GGT TGC; (R) TTG TAT TCC TCC AGC AGA AAG AC, **TNF- α :** (F) ATG AGC ACA GAA GCA TGA T; (R) TGA CTT TCT CCT GGT TGA, **Crystalline α B:** (F) TTC CAC TCC CCA AGC CGC CTC TTT; (R) CTG ATG GGA AAC TTC CTT GT, **GAPDH:** (F) GTC CAC ATT GTT GCC ATC AAC GAC; (R) TTT CTC GTG GTT CAC ACC CAT CAC. 각 Primer 의 사이즈는 아래와 같다: 326bp for BDNF, 508bp for TNF- α , 528bp for crystalline α B, 336bp for GAPDH. PCR product 10 μ l 를 Ethidium Bromide (BIO-RAD)로 염색한 1% agarose gel/1 \times TAE buffer (BIONEER)에 로딩하였다. 밴드의 optical densities 는 image J 로 분석하였고 해당하는

GAPDH 로 보정하였다. 본 RT-PCR 실험을 통하여 조사한 많은 유전자들 중에서 신경성장인자 brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 성상교세포의 구조 단백질인 crystalline α B, TNF- α 등 cytokines 의 유전자 발현 변화가 의미가 있는 결과를 도출했다.

4. 효소면역측정법 (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay, ELISA)

BDNF는 말초신경 및 중추신경계의 발생 및 유지 재생하기 위해서 꼭 필요한 물질로서, 이러한 성장인자를 즉각적이고 지속적으로 방출되도록 하기 위해 BDNF가 순차 방출되는 지연적 과정을 ELISA를 통해 관찰하였다. BDNF 양은 현재 시판되고 있는 BDNF Sandwich ELISA Kit (ChemiKine, CHEMICON™)를 사용하여 항체반응과 발색반응을 시행하였다. 먼저 sample을 96-well plate에 100 μ L/well을 분배하여 4°C에서 overnight하였다. Washing buffer로 4번 세척한 다음 biotinylated antibody를 100 μ l씩 첨가 후 실온에서 흔들어주면서 3시간 배양하였다. 다시 washing 후 streptavidin-HRP conjugate solution 100 μ l씩 분배하여 실온에서 1시간 배양하였다. TMB로 발색반응을 시행한 후 곧바로 450nm에서 흡광도 (optical density, OD) 수치를 얻었으며, 이 수치를 BDNF standard를 통해 얻은 standard curve를 통해 pg/ml 단위로 변환시켰다.

5. 세포핵, 세포질의 단백질 분리 및 Western Blot Analysis

세포배양 plate에서 media를 제거한 다음 NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE)를 이용하여 각각의 핵과 세포질을 분리, 단백질을 얻었다. 25 µg 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 size 별로 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 젤 상의 단백질을 nitrocellulose 막에 이동시켰다. 여기에 5% skim milk로 2 h 처리하여 비 특이적인 반응을 줄인 다음 IκB (Santa Cruz, 1:500), NF-κB (Santa Cruz, 1: 500), GAPDH (cell signaling, 1:1000) 항체를 결합시키고 다시 그 항체에 특이적인 HRP-conjugated anti rabbit 2차 항체를 결합시켰다. ECL로 발색 반응이 나타나는 형광반응을 X-ray film으로 이미지화 하였다.

6. 통계처리

실험결과는 Image J 와 Origin50 프로그램으로 분석했다. 통계 처리한 후 평균 ±표준오차 (standard error)로 나타내었다. 두 집단 사이의 평균을 비교할 때는 Student's-test를 실시하여 p값을 비교했다. P<0.05인 경우를 통계적으로 유의 하다고 평가하였다.

III. 결 과

1. HT-22 neurons 에서의 dexamethasone 에 의한 BDNF 의 발현 감소작용

BDNF 는 신경세포 (neurons)의 생존, 성장, 또는 분화에 관여하는 신경성장인자로서 신경세포에서 아주 중요한 작용을 하고 있다고 알려져 있다 (Gomez-Pinilla, 2008; Nakajima et al., 2008). HT-22 neurons 에 합성 glucocorticoid 인 DEX (1 μ M, 24 h) 와 glucocorticoid receptor (GR) antagonist 인 RU486 (10 μ M, 27 h)을 처리하여 BDNF mRNA 발현상의 변화를 RT-PCR 를 통하여 확인하였고, BDNF 의 세포 외 방출량 변화에 대해서는 BDNF ELISA 를 통하여 조사하였다. HT-22 neurons 에서 스트레스 호르몬 DEX 에 의해 BDNF 가 세포 내 mRNA 발현상에서나, 세포배양액에서의 방출량에 있어서 감소하는 것으로 나타났으며 GR antagonist 인 RU486 에 의해서 효과가 차단됨을 보여 GR-특이적 반응이라고 본다 (Figure 1). 신경세포는 스트레스 호르몬에 취약하여 신경세포의 기능 유지와 생존에 필수적인 신경성장인자 BDNF 발현이 줄어든다고 본다.

2. C6 astrocytes 에서의 dexamethasone 에 의한 BDNF 의 발현 증가작용

신경세포에서 감소하는 BDNF 가 성장교세포에서 어떻게 변하는지 조사하였다. C6 astrocytes 에 DEX (1 μ M, 24 h) 과 GR antagonist 인 RU486 (10 μ M, 27 h)을 처리하여 BDNF mRNA 의 발현상의 변화를 RT-PCR 를 통하여 확인하였다. 그리고 BDNF 의 세포 외 방출량 변화에 대해서는 BDNF ELISA 를 통하여 시간대 별로 조사하였다 (2 h 과 24 h). HT-22 neurons 은 합성 스트레스 호르몬인 DEX 에 의하여 BDNF mRNA 발현이 유의하게 감소하였으나, C6 astrocytes 에서는 반대로 BDNF mRNA 발현이 증가하였으며 GR antagonist 인 RU486 에 의해서 효과가 차단됨을 보여 GR-매개 반응이라고 추정한다 (Figure 2). 세포배양액에 방출된 BDNF 는 ELISA 로 확인하였으며 24 시간에서 가장 많이 증가하였다. 이는 Figure 3 에서 astrocytes 의 구조단백질인 crystallin α B mRNA 의 발현이 DEX 처리에 증가하는 것 과도 관련이 있을 수 있다고 본다. Neurons 는 스트레스 호르몬에 취약하여 신경세포의 기능 유지와 생존에 필수적인 신경성장인자 발현이 줄어드나 astrocytes 는 반대로 활성화되어 neurons 에 BDNF 를 공급하여 스트레스에 의한 신경세포의 손상을 최대한 경감시키려는 반응을 보이는 것으로 추측된다. 이는 노령 쥐나 우울증 쥐에서 보인 astrocytes 의 증가 및 활성화와도 일관성이 있는 결과이다. BDNF 는 과거에 neurons 에만 발현되는 것으로

알려졌으나, 본 실험에서 astrocytes 에서도 발현되었으며 스트레스에 의해 발현이 증가되었다.

3. 스트레스 유발 동물실험모델 (CMS) 해마조직에서의 BDNF mRNA 발현 감소

위의 세포배양실험 결과에서 DEX 에 의해 신경세포에서의 BDNF mRNA 발현은 현저한 감소를 보여주었다. 이와 관련하여 만성적 스트레스를 준 실험동물의 해마조직에서 BDNF mRNA 발현량을 RT/PCR 로 조사한 결과 세포배양 실험결과와 동일하게 BDNF mRNA 감소가 확인 되었다 (Figure 3). 해마조직에서는 신경세포와 성장교세포가 공존하고 두 세포에서 스트레스에 대한 BDNF 발현 증감의 방향이 반대이나 본 실험에서의 해마조직 전체의 BDNF mRNA 감소가 우세한 것을 보면 신경세포의 스트레스에 의한 BDNF mRNA 감소의 정도가 훨씬 우세할 것으로 사료된다.

4. HT-22 neurons 과 C6 astrocytes 에서의 dexamethasone 에 의한 crystalline alpha B 의 유전자 발현상의 변화

Crystallin α B 는 Alzheimer's disease, cerebral abscess 등 여러 가지 병리적 상태에서 발현되는 것으로 알려져 있다 (Renkawek et al., 1994; Stege et al., 1999; Ha et al., 2002). 또 세포골격의 형성과 분자적 샤프론 (molecular

chaperone)에서 중요한 작용을 할뿐만 아니라 세포 사멸로부터 보호해준다고 알려져 있다 (Iwaki et al., 1994; Huot et al., 1996; Kamradt et al., 2002). 이번 연구에서 저는 스트레스 호르몬의 자극을 주었을 때 crystalline α B 가 어떻게 변하는지 연구하여 보았다. HT-22 neurons (Figure 4A) 과 C6 astrocytes (Figure 4B) 에 1 μ M DEX 을 24 h 처리 혹은 DEX 와 RU486 (10 μ M, 27 h)을 함께 처리 하였을 때, 뉴런에서는 DEX 에 의해 crystallin α B mRNA 가 변화가 없게 나왔지만 astrocytes 에서는 유의성 있게 증가하였고 GR antagonist 인 RU486 에 의해 감소됨을 확인함으로써 스트레스에 의해 정상교세포가 활성화됨을 보여준다. 이렇게 활성화된 astrocytes 가 Figure 2 에서 보여주는 것처럼 자체의 BDNF 를 증가시켜 뉴런에 BDNF 를 공급함으로써 스트레스에 취약한 뉴런을 보호해 주는 것으로 추측된다.

5. C6 astrocytes 의 dexamethasone 에 의한 crystalline alpha B 발현 증가에

대한 PKC, PI3 kinase 의 영향 조사

C6 astrocytes에서 DEX에 의한 crystalline α B의 발현증가에 PKC, PI3 kinase가 관여하는지 알아보기 위하여 PKC inhibitor인 Bisindolylmaleimide I (1 μ M, 24 h), PI3 kinase inhibitor 인 Wortmannin (100 nM, 24 h) 과 LY294002 (50 μ M, 24 h)를 처리하였다 (Figure 5). GR를 활성화 시키는 DEX의

작용에는 PKC, PI3 kinase가 관여한다는 보고가 있어 본 주제를 실험하기 위하여 우선적으로 PKC, PI3 kinase의 저해제를 사용해 보았다. 본 실험 결과에 의하면 astrocytes의 crystallin α B 유전자 발현에는 이 두 가지 pathway가 관여하지 않음을 알 수 있다.

6. 스트레스 유발 동물실험모델 (CMS) 해마조직에서의 crystalline alpha B mRNA 발현 변화

위의 세포배양 실험 결과에서 보면 성상교세포의 활성화에 의한 crystalline α B 발현의 현저한 증가가 확인되었다. CMS 실험동물의 해마조직 전체의 tissue RNA를 추출하여 RT/PCR를 한 결과 crystalline α B의 발현 증가의 경향성은 확인할 수는 있었으나 통계적 유의성을 확보하지 못했다 (Figure 6). 이는 해마조직에서는 세포배양실험에서처럼 성상교세포만 존재하는 것이 아니라 신경세포, 미세신경교세포, 희소돌기아교세포들이 공존하는 것이기 때문에 성상교세포의 작용이 희석이 되어 통계적 유의성 확보에 실패한 것으로 추측된다. 만약 조직절편을 취하여 *in situ* hybridization 이나 immunohistochemistry를 시행한다면 성상교세포 세포 특이적 반응을 확인할 수 있을 것으로 본다.

7. BV2-microglia 에서의 LPS 에 의한 NO 방출에 대한 dexamethasone 의 억제작용

뇌의 염증유발물질인 lipopolysaccharide (LPS) 약물처리에 의하여 분비된 NO 는 신경세포의 손상과 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다 (McCoy et al., 2006). 본 실험은 LPS 가 유도하는 BV-2 cell 의 NO 분비 기능에 대한 DEX 의 영향을 조사하기 위하여 BV-2 cell 에서 분비하는 nitric oxide 를 NO assay 를 통하여 측정하였다. BV2-microglia 에 200 ng/ml LPS 처리 동시에 1 μ M DEX (24 h) 약물처리 하였을 때 DEX 에 의해 LPS 에 의한 NO 방출이 현저히 감소되었음을 알 수 있다 (Figure 7). 이 효과는 DEX 의 antagonist 인 RU486 (10 μ M, 27 h) 에 의하여 사라진다. 이는 DEX 에의 장시간 노출이 microglia 의 손상을 초래했거나 세포내 신호 전달계를 변경시켜 염증유발물질 LPS 에 대한 NO 방출을 억제하는 것으로 생각되고 이는 스트레스 호르몬이 신경염증에 대한 항염 효과가 있어 신경세포 보호작용이 있을 수 있음을 시사한다.

8. BV2 microglia 에서의 dexamethasone 에 의한 TNF- α mRNA 발현상의 변화

LPS 에 의하여 분비되는 중요한 염증유발조절인자 (pro-inflammatory agent)인 TNF- α 도 신경세포의 손상과 사멸을 유도한다 (Yang et al., 2006;

Yan et al., 2008). DEX 가 TNF- α 의 증가에 어떤 영향을 미치는가를 RT-PCR 기계를 사용하여 유전자발현에서의 변화를 조사하였다. 200 ng/ml LPS 처리 동시에 1 μ M DEX (24 h)를 주었을 때 LPS 에 의한 TNF- α mRNA 발현상 증가는 DEX 에 의해 되돌아옴을 확인하였다 (Figure 8). DEX 의 이러한 작용은 DEX 의 antagonist 인 RU486 (10 μ M, 27 h) 에 의하여 억제된다. DEX 의 미세신경교세포의 기능 억제 반응은 위 Figure 7 의 경우처럼 LPS 에 의해 유도되는 NO 방출의 저해뿐만이 아니라 LPS 에 의해 유도되는 TNF- α 발현의 감소와도 관련이 있음을 시사한다.

9. BV2 microglia 에서의 LPS 에 의한 NF- κ B 와 I κ B 의 발현에 대한 dexamethasone 의 작용

NF- κ B 는 염증반응, 스트레스 등 상황에 반응하여 TNF- α 를 포함한 많은 유전자들을 활성화 시키는 중요 전사인자이다 (Paul et al., 1997; Liu et al., 2000; Kim et al., 2003). 비활성 시에는 세포질에 NF- κ B/I κ B 결합체로 존재하다 각종 자극에 노출된 뒤 복합체에서 I κ B 는 분리되고 활성화 된 NF- κ B 는 핵 내로 들어가 각종 염증매개물질 등의 합성에 전사물질로 핵심적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Hayden and Ghosh, 2004). NF- κ B 의 활성을 억제한다면 TNF- α 의 활성을 억제할 가능성이 매우 크다는 관점에서 Western

Blot 방법으로 세포핵에서의 NF- κ B 의 발현상 변화를 조사하였다. LPS (200 ng/ml, 30 min) 처리 전에 DEX (1 μ M, 24 h)를 전처리 하였을 때 그림에서 보여주는 것처럼 DEX 는 LPS 에 의한 세포핵 NF- κ B 의 발현을 유의성 있게 억제하며 이는 GR antagonist 인 RU486 에 의해 억제된다 (Figure 9).

I κ B 가 인산화 되어 degrade 되면 I κ B 와 결합하여 있던 NF- κ B 가 분리 되어 핵 내로 이동함으로써 TNF- α 등 유전자들의 전사를 유도한다 (Swantek et al., 1997; Hayden and Ghosh, 2004). LPS 에 의하여 현저하게 감소되었던 I κ B 가 DEX 에 의하여 되돌아옴을 알 수 있다 (Figure 10). 이는 NO 분비 및 TNF- α 발현과 같은 microglia 기능에 대한 DEX 의 억제효과가 NF- κ B 신호전달 경로를 통하여 이루어 짐을 설명해준다.

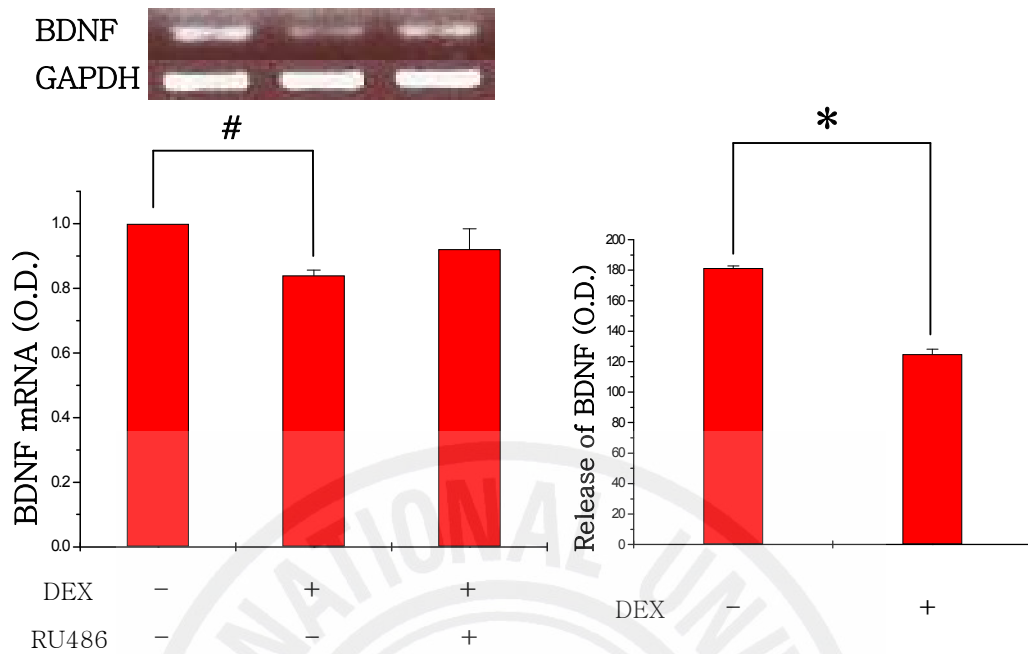


Figure 1. GR-mediated suppression of BDNF mRNA expression (A) and extracellular BDNF release (B) in HT-22 neurons. (A). HT-22 neurons were treated with 1 μ M DEX for 24 h or cotreated with GR antagonist RU486 (10 μ M, 27 h). BDNF mRNA expression was measured using RT-PCR. (B) HT-22 neurons were treated with 1 μ M DEX for 24 h. The amount of BDNF released into the media was measured using BDNF ELISA kit. Data were representative of three independent experiments and values are expressed as means \pm SE. (*: $p < 0.05$, #: $p < 0.001$).

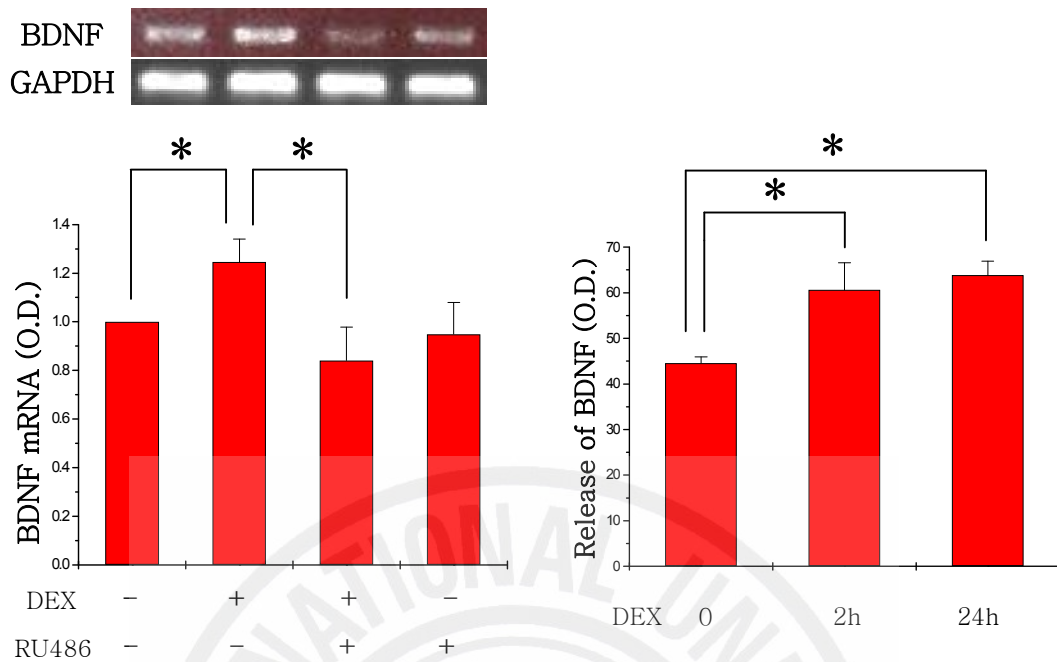


Figure 2. GR-mediated increase of BDNF mRNA expression (A) and extracellular BDNF release (B) in C6 astrocytes. (A) C6 astrocytes were treated with 1 μ M DEX for 24 h or cotreated with GR antagonist RU486 (10 μ M, 27 h). BDNF mRNA expression was measured using RT-PCR. (B) C6 astrocytes were treated with 1 μ M DEX for 2 h and 24 h. The amount of BDNF released into the media was measured using BDNF ELISA kit. Data were representative of three independent experiments and values are expressed as means \pm SE. (*: $p < 0.05$).

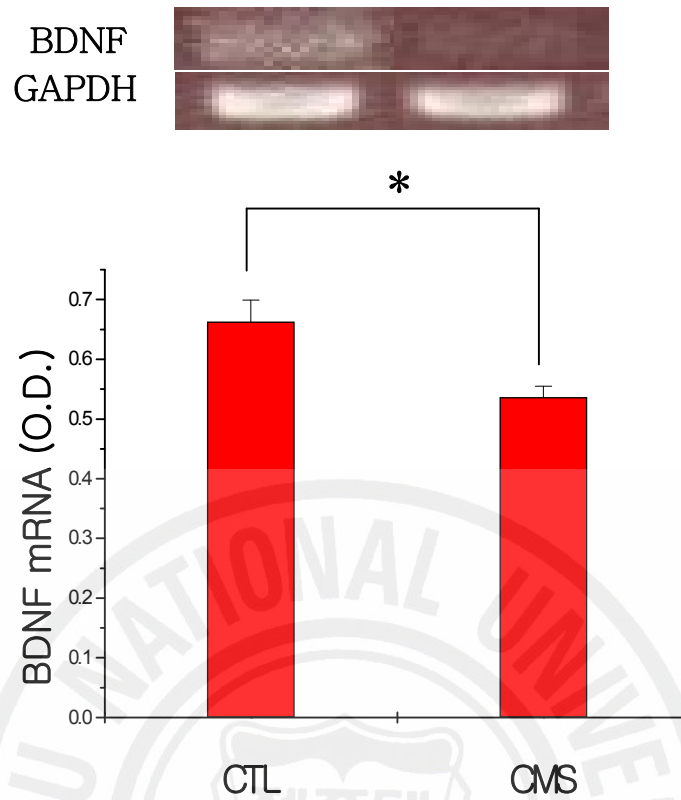


Figure 3. CMS stress-induced decrease of BDNF mRNA expression in SD rat hippocampus. Tissue BDNF mRNA expression was determined using RT-PCR. (*: $p < 0.05$).

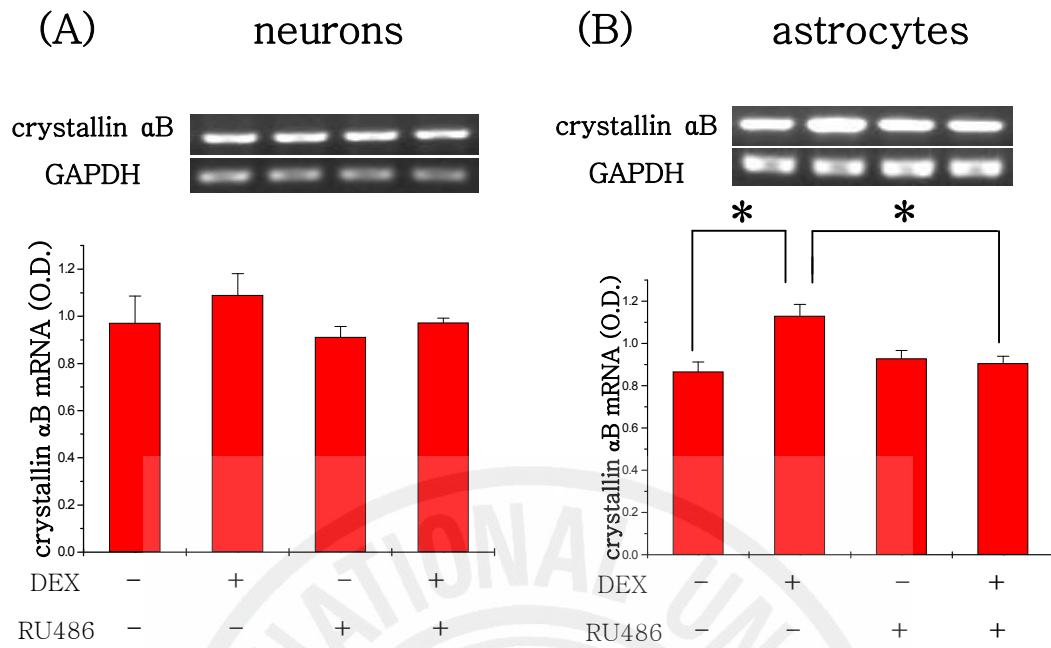


Figure 4. GR-mediated effects of dexamethasone on crystallin alpha B mRNA expression in HT-22 neurons (A) and C6 astrocytes (B). (A) HT-22 neurons were treated with 1 μ M DEX for 24 h or cotreated with GR antagonist RU486 (10 μ M, 27 h). The crystalline α B mRNA expression was measured using RT-PCR. (B) C6 astrocytes were treated with 1 μ M DEX for 24 h or cotreated with GR antagonist RU486 (10 μ M, 27 h). The crystalline α B mRNA expression was measured using RT-PCR. Data were representative of three independent experiments and values are expressed as means \pm SE. (*: $p < 0.05$).

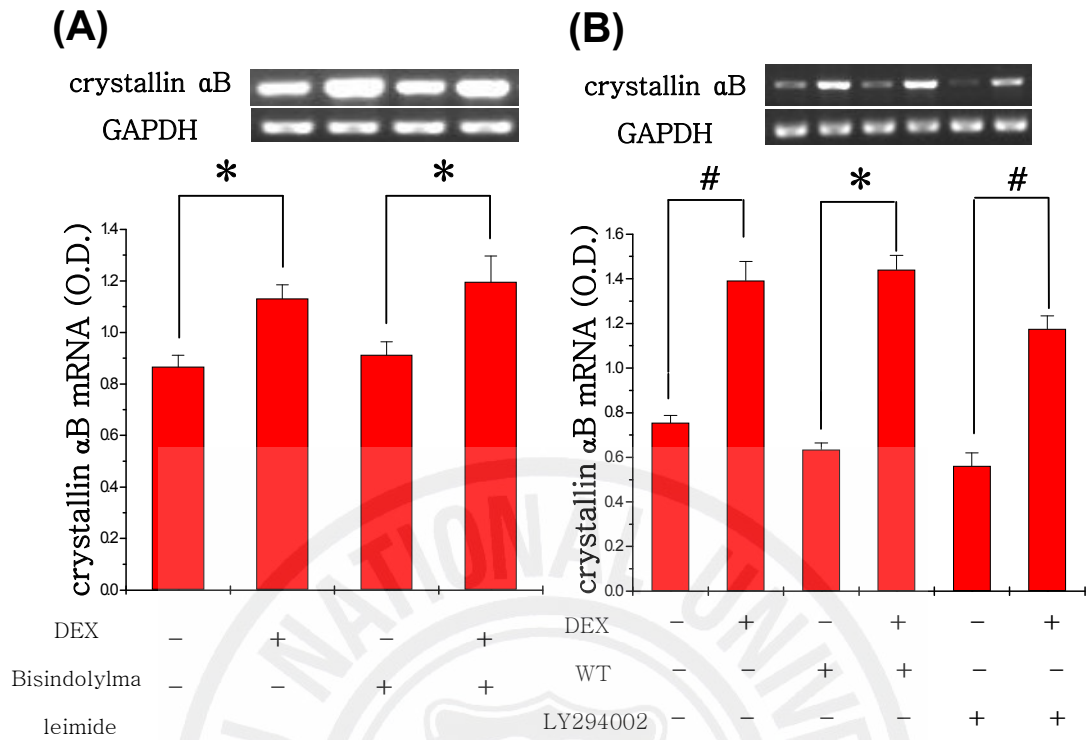


Figure 5. Inhibitor studies of PKC (A) and PI3 Kinase (B) on dexamethasone-induced crystallin alpha B mRNA expression in C6 astrocytes. Both PKC inhibitor (Bisindolylmaleimide) and PI3 kinase inhibitor (Wortmannin and LY294002) did not suppress DEX effect on crystallin αB mRNA expression in C6 astrocytes. (*: $p < 0.05$, #: $p < 0.001$).

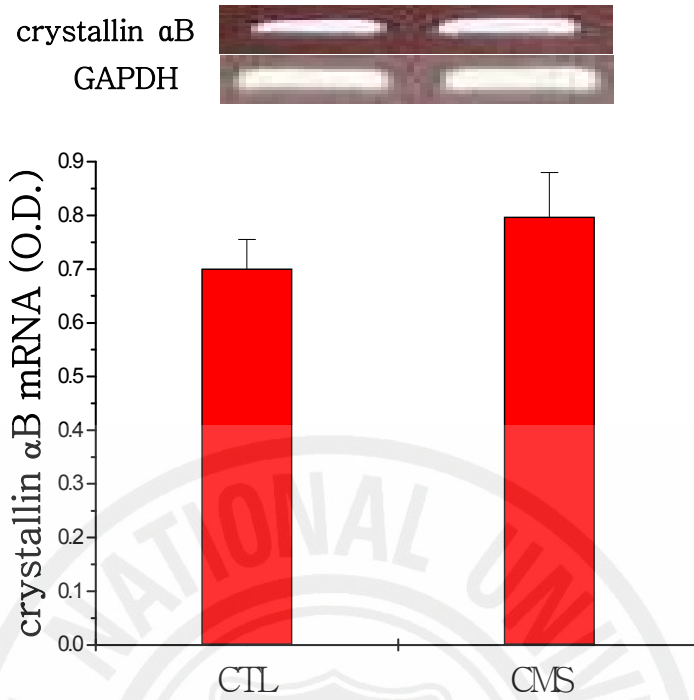


Figure 6. CMS stress-induced increase of crystalline alpha B mRNA expression in SD rat hippocampus. Tissue crystalline α B mRNA expression was determined using RT-PCR.

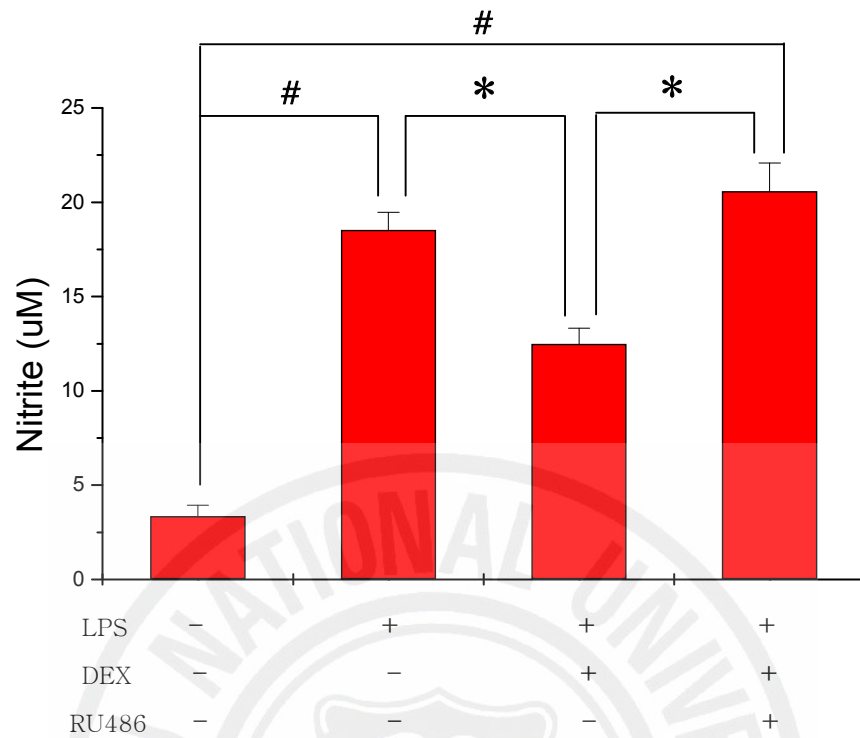


Figure 7. GR-mediated inhibition of dexamethasone on LPS-induced NO release in BV2 microglia. Microglia were treated with 200 ng/ml LPS for 24 h in the absence or presence of 1 μ M DEX (24 h) or 10 μ M RU486 (27 h). Data were representative of three independent experiments and values are expressed as means \pm SE. (*: $p < 0.05$; #: $p < .0001$),

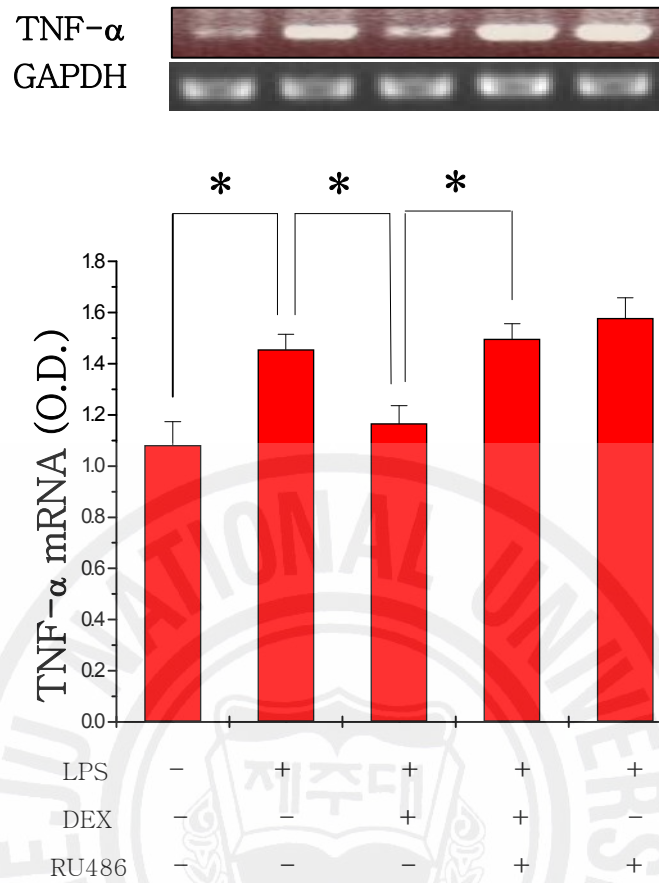


Figure 8. Effects of dexamethasone on LPS-induced TNF- α mRNA expression in BV2 microglia. BV2 microglia were treated with 200 ng/ml LPS for 24 h in the absence or presence of 1 μ M DEX (24 h) or 10 μ M RU486 (27 h). Data were representative of three independent experiments and values are expressed as means \pm SE. (*: $p < 0.05$).

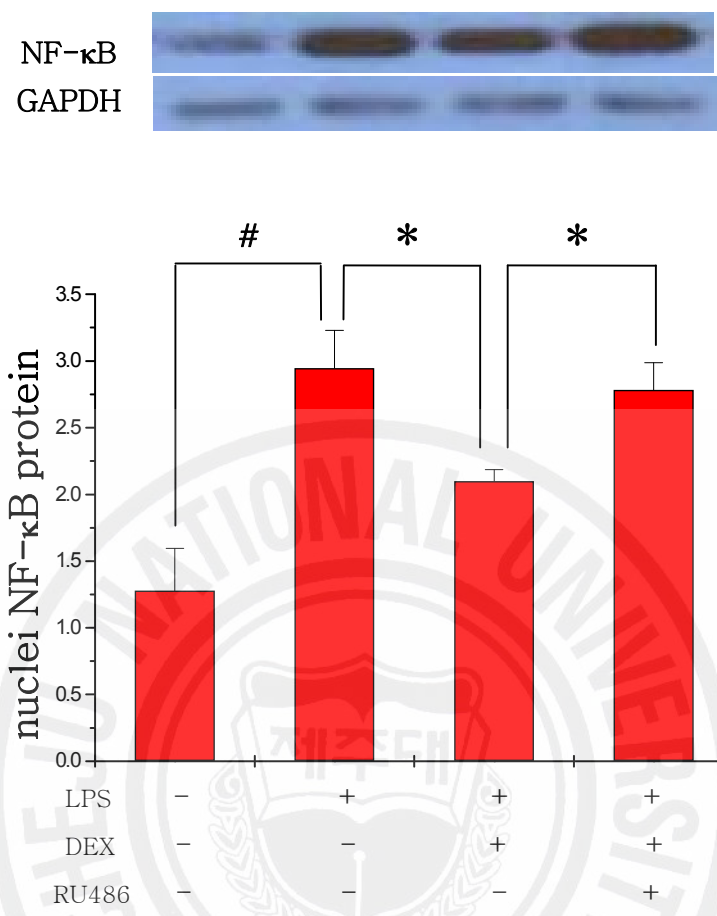


Figure 9. Effects of dexamethasone on LPS-induced NF-κB expression in BV2 microglia. BV2 microglia were treated with 200 ng/ml LPS for 30 min in the absence or presence of 1 μM DEX (24 h) or 10 μM RU486 (27 h). The levels of NF-κB was determined using Western Blot Analysis. (*: p<0.05; #: p<.0005).

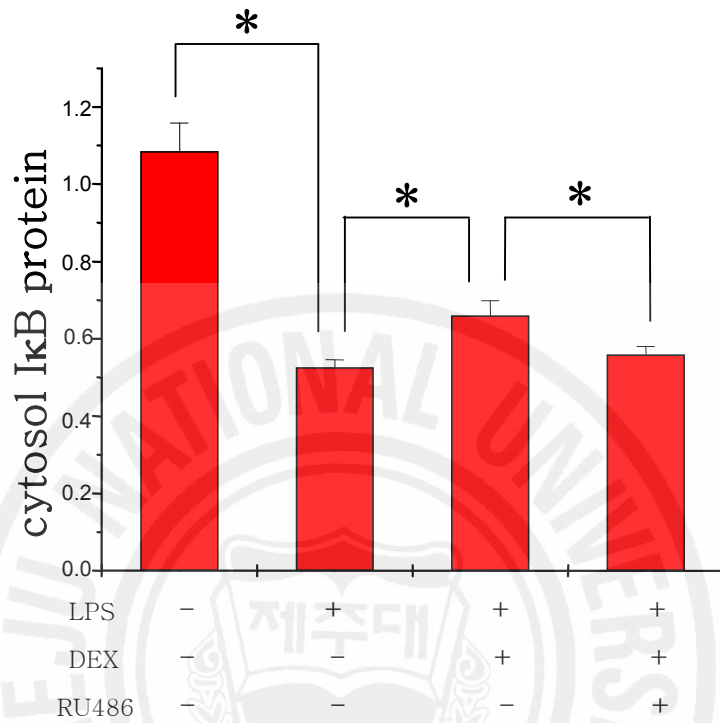
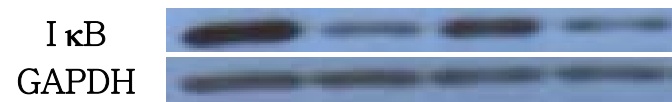


Figure 10. Effects of dexamethasone on LPS-induced IκB expression in BV2 microglia. BV2 microglia were treated with 200 ng/ml LPS for 30 min in the absence or presence of 1 μM DEX (24 h) or 10 μM RU486 (27 h). The levels of IκB was determined using Western Blot Analysis. (*: p<0.05; #: p<0.0005).

IV. 고찰

본 연구는 스트레스 호르몬인 glucocorticoid 에 대한 neuron, astrocyte, microglia 의 유전자 발현과 세포외로 방출된 단백질의 발현을 비교함으로써 microglia 의 NO 분비 기능, 스트레스 상황이 뇌에 있는 여러 세포들의 세포 특이적 유전자 발현과 세포기능을 조사하고자 하였으며 이를 통하여 neuron-glia 간의 스트레스 상황에서의 상호작용과 네트워크를 이해하고자 하였다. 스트레스 호르몬 DEX 처치 (1 μ M, 24 h)에 의하여 HT-22 neurons 은 BDNF mRNA 발현이 유의하게 감소되었으나 C6 astrocytes 에서는 오히려 증가하였고 그 구조단백질인 crystallin alpha B mRNA 발현도 증가하였음을 확인하였다. 또한 미세신경교세포 (microglia)는 염증유발물질인 LPS 에 의한 NO 분비, TNF-alpha 발현증가, 염증유발 전사인자인 NF- κ B 의 핵으로 이동, I κ B 의 발현량 감소 등의 parameter 가 DEX 처치에 의해 억제됨을 확인하였다. 이는 스트레스 호르몬은 뇌의 면역세포인 미세신경교세포의 활성을 억제하여 신경염증에 대한 항염 작용을 억제할 수 있음을 말하며, 실제로 Glucocorticoid Steroid 제제가 고용량의 처치에 의하여 항염제, 면역억제제로 임상에서 그 약리적 효과를 활용하고 있는 점과 연관이 있다. 본 실험을 통해서 뇌조직에 거주하는 미세신경교세포가 혈액과 뇌 이외의 인체 조직에 상주하는 monocytes,

macrophages 와 유사한 작용기전이 존재함을 확인한 점이 의미가 있다. 미세신경교세포에 관한 이상의 연구 결과를 통하여 스트레스 상황에서 뇌조직에서는 미세신경교세포가 신경염증에 의한 항염 작용을 통하여 신경세포를 보호하는 기작 (neurotrophic effect 혹은 neuron-protective effect)을 가질 수 있음을 추측해 볼 수 있다.

성상교세포에서의 BDNF 의 발현 증가는 스트레스 상황에서의 neurotrophic effect 로 보여진다. 이는 활성화한 성상교세포의 기능을 수행하기 위하여 autocrine 방식으로 BDNF 를 방출하여 성상교세포의 확대된 기능을 강화한다고 볼 수도 있고, paracrine 방식으로 스트레스 상황에서 신경세포의 BDNF 발현 감소를 보완한다고 볼 수 있다.

성상교세포의 neurotrophic effect 에 관한 연구결과는 아주 고도의 스트레스 상황에서 성상교세포가 손상 받아서 성상교세포의 neurotrophic 기능이 저하되면, 스트레스 상황에서 어느 정도 유지가 되고 있던 항상성 (homeostasis)이 깨져서 갑자기 신경세포의 기능이 소실되면 스트레스와 관련된 정신질환이 발생할 가능성이 있음을 추측해 볼 수 있게 한다. 또한 스트레스 상황에서의 신경세포의 BDNF 발현 감소, 성상교세포의 BDNF 발현 증가 및 활성화와 관련된 crystalline alpha B 발현 증가에 관한 결과는 성상교세포의

neurotrophic effect 가 스트레스 관련 질환의 치료제 개발의 표적이 될 수 있음을 시사한다.

본 연구결과를 종합하여 보면, 스트레스 상황에서 스트레스 호르몬이 증가하면 뇌에 존재하는 신경세포, 성상교세포, 미세신경교세포는 각각 GR 에 매개하는 신호전달계를 통하여 반응하는데, 신경세포는 스트레스 호르몬에 의해 신경세포의 생존과 성장, 기능유지에 필수적인 중요한 신경성장인자 BDNF 의 발현 감소가 나타나 스트레스 취약성을 드러내며 성상교세포와 미세신경교세포는 일차적으로 스트레스 호르몬에 대한 신경세포 보호기능을 나타내어 전반적으로 신경세포, 성상교세포, 미세신경교세포 간의 상호작용과 네트워크 체계를 구성하는 것으로 이해된다. 신경세포를 보호하기 위한 이러한 상호작용체계가 손상되면 스트레스 호르몬에 의한 신경세포의 손상이 가속화되고 스트레스 유발성 정신질환의 발병률이 높아질 것으로 사료된다.

V. 참고 문헌

- Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138:32.
- 양병환, 백기청, 김정희, 백인호, 강병조, 김광수, 한창환, 원호택, 임기영. 1999. 스트레스 연구. *하나의학사* 77-101.
- Gomez-Pinilla F. 2008. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci* 9:568-578.
- Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Cho YE, Kim TS. 2002. Nestin and small heat shock protein expression on reactive astrocytes and endothelial cells in cerebral abscess. *Neurosci Res* 44:207-212.
- Hayden MS, Ghosh S. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18:2195-2224.
- Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. 1996. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* 56:273-279.
- Iwaki T, Iwaki A, Tateishi J, Goldman JE. 1994. Sense and antisense modification of glial alpha B-crystallin production results in alterations of stress fiber formation and thermoresistance. *J Cell Biol* 125:1385-1393.
- Kamradt MC, Chen F, Sam S, Cryns VL. 2002. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J Biol Chem* 277:38731-38736.
- Kim HY, Park EJ, Joe EH, Jou I. 2003. Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia. *J Immunol* 171:6072-6079.
- Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J, Pope RM. 2000. TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J Immunol* 164:4277-4285.
- McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG. 2006. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of

- Parkinson's disease. *J Neurosci* 26:9365–9375.
- Nakajima T, Sato M, Akaza N, Umezawa Y. 2008. Cell-based fluorescent indicator to visualize brain-derived neurotrophic factor secreted from living neurons. *ACS Chem Biol* 3:352–358.
- Paul A, Wilson S, Belham CM, Robinson CJ, Scott PH, Gould GW, Plevin R. 1997. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal* 9:403–410.
- Plotsky PM, Owens MJ, Nemeroff CB. 1998. Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Psychiatr Clin North Am* 21:293–307.
- Renkawek K, Voorter CE, Bosman GJ, van Workum FP, de Jong WW. 1994. Expression of alpha B-crystallin in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 87:155–160.
- Stege GJ, Renkawek K, Overkamp PS, Verschuure P, van Rijk AF, Reijnen-Aalbers A, Boelens WC, Bosman GJ, de Jong WW. 1999. The molecular chaperone alphaB-crystallin enhances amyloid beta neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 262:152–156.
- Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. 1997. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* 17:6274–6282.
- Yan G, Huang J, Jarbadan NR, Jiang Y, Cheng H. 2008. Sequestration of NF-kappaB signaling complexes in lipid rafts contributes to repression of NF-kappaB in T lymphocytes under hyperthermia stress. *J Biol Chem* 283:12489–12500.
- Yang MS, Ji KA, Jeon SB, Jin BK, Kim SU, Jou I, Joe E. 2006. Interleukin-13 enhances cyclooxygenase-2 expression in activated rat brain microglia: implications for death of activated microglia. *J Immunol* 177:1323–1329.

VII. 감사의 글

한국이라는 이국 땅에서 결코 짧지 않은 2년간의 대학원 생활을 마치면서 정말 많은 것들을 배웠고 더 성숙해지고 발전한 나 자신을 발견 하였습니다.

우선 너무나도 많이 부족한 저를 받아주시고 인내하고 믿어주시는 은수용 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 공부, 실험뿐만 아니라 일상생활에서도 관심과 배려를 아끼지 않으시는 교수님 너무 고맙습니다. 그리고 저의 학위 논문 심사를 흔쾌히 맡아주시고 많은 조언을 해 주신 현진원 교수님과 강희경 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다. 시험실의 연구사업과 학부생 수업으로 항상 바쁘신 와중에도 대학원 강의에 심혈을 기울이시고 더 많은 지식을 전수해 주기 위해 노력하시는 여러 기초의학 실험실 교수님들께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 너무나도 생소하고 낯선 실험연구를 하면서 많이 힘들었는데 언제나 따뜻하게 대해주시고 도움을 주신 대학원 선생님들께 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 사랑하는 나의 가족들과 졸업의 기쁨을 함께 나누고 싶습니다. 언제 어디서나 늘 건강하세요..