ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2018 Vol. 28. No. 5. 597~604 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.5.597

Analysis of Gliotransmitters in ADHD Mice

Ga-Yeon Kim, Jaewon Park and Bo-Eun Yoon*

Department of Molecular Biology, Dankook University, Cheonan 31116, Korea

Received December 28, 2017 / Revised February 13, 2018 / Accepted February 21, 2018

Although the core mechanisms of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) are unknown, several ADHD-associated proteins have been studied. G-protein - coupled receptor kinase interacting protein-1 (GIT1) is a multifunctional adapter protein that affects neuron growth and dendrite formation. GIT1-deficient mice have shown ADHD-like behavior and also recovered through amphetamine treatment. In this study, gliotransmitters were investigated in both intracellular and extracellular space from GIT1-deficient mice. To measure the amount of gliotransmitters, primary astrocyte cultures were taken from the cerebral and cerebellar cortices of wild (WT), hetero (HE), and knock-out (KO) mice. Major gliotransmitters were analyzed using high-performance liquid chromatography. It was observed that the amount of excitatory and inhibitory gliotransmitters were dependent on genotype and showed a change in excitation/inhibition ratios. Interestingly, the major excitatory gliotransmitter, glutamate, existed at the lowest level in WT mice, but the amount of inhibitory gliotransmitters, gamma-aminobutyric acid (GABA) and glycine, varied depending on brain region. Remarkably, an increased amount of GABA was measured at the intracellular cerebrum in WT mice compared with KO mice. It was presumed that KO mice would secrete more inhibitory gliotransmitters to compensate for GIT1 depletion or else acquire a defect to reuptake-secreted GABA. This may be a possible mechanism for ADHD pathology.

Key words : ADHD, astrocyte, GIT1, glia, gliotransmitter

서 론

ADHD는 아동 및 청소년에서 10% 정도의 높은 유병률을 보이는 정신의학적 신경발달 장애로서 주의가 산만하고 충동성과 과잉행동을 보이는 것이 특징이다[1, 2, 4]. 주로 소아기에 발병해 청소년기까지 지속되는 것으로 알려져 있지만 성인기까지 지속되는 경우도 있다[12]. 또한 흥미롭게도, 남아보다 여아의 발병률이 더 낮았지만 지적인 손상도와 내면적 문제는 여아에게서 더 큰 것으로 나타났다[5]. ADHD 관련 다양한 역학 및 임상연구가 수행되고 있으나 아직까지 ADHD의 핵심적인 기전은 밝혀져 있지 않다.

최근 인간에서의 ADHD가 GIT1 (G-protein coupled-receptor kinase interacting protein-1)과 연관 되어 있다고 보고되었는데[10], GIT1이 결손된 마우스는 ADHD의 대표적인 증상인 과잉행동과 학습 및 기억장애를 보였으며 임상에서 사용중인 amphetamine 등 ADHD 치료제를 처리하면 ADHD의 양상이 회복되는 것을 관찰하였다[13].

***Corresponding author**
Tel : +82-41-550-3694, Fax : +82-41-559-7941
E-mail : boeunyoon@dankook.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

GIT1 KO 생쥐의 뇌에서 나타나는 특징은 WT과 비교했을 때 뇌의 전체 크기 감소 및 해마의 CA1 부위에서 수상돌기의 길이와 가시 밀도의 감소를 들 수 있다[8].

또한 GIT1 KO 4주령과 2~3개월령 모두에서 별아교세포의 증식(astrocytosis)이 나타나며[11], astrocytosis는 세포 수가 증가하기도 하고 형태가 변하기도 하는 것으로 신경세포 및 시냅스 회로 발달에 중요한 역할을 한다[3]. 한편 astrocyte는 GABA 성, 아드레날린 성, 퓨린 성, 세로토닌 성, 무스카린 성 및 펩티드 성 수용체들을 다양하게 발현하여 신경활성 조절에 기여할 수도 있다[10].

GIT1 KO 생쥐는 행동에 있어서도 WT과 차이를 보였는데 감소된 운동협응력(motor coordination)과 짧아진 작동주기(duty cycle)의 변화된 걸음걸이를 보였다[6].

ADHD 환자는 행동에 있어서 과잉행동, 충동성 등 전반적으로 통제력이 감소되어 있기 때문에, 특히 억제성 신경전달물질인 GABA (gamma-aminobutyric acid)와 연관된 시스템의 변화와 관련이 있을 것이라 추측된다. 이전의 연구에서 GIT1 생쥐의 IHC (immunohistochemistry) 분석 결과, GIT1 KO의 소뇌의 별아교세포의 GABA의 발현량 및 별아교세포가 매개하는 지속적 억제(tonic inhibition) 정도가 현저히 감소된 것을 확인하였다[7].

따라서 본 논문에서는 GIT1 생쥐의 유전형(genotype)별 별아교세포가 생성 및 분비하는 GABA를 비롯한 여러 종류의 신경아교전달물질(gliotransmitter)에 차이가 있을 것이라 예

상하고 GIT1 (ADHD 모델) 생쥐의 유전형별로 별아교세포 배양(astrocyte primary culture)을 한 후 세포 내/외의 신경아교전달물질을 비교하였다. 또한 대뇌와 소뇌에서 발현되는 신경아교전달물질에도 차이가 있을 수 있으므로 각각을 분리하여 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

실험동물(animal)

GIT 생쥐 모델은 *Git1* 유전자와 ADHD의 연관성을 보고한 KAIST 김은준 교수 연구팀(현 IBS 시냅스 뇌질환 연구단)[13]에서 각 유전자형을 분양 받아 mating cage를 만들어 개체수를 늘린 후 실험에 사용 되었다. 실험에 사용된 GIT1 생쥐모델로는 야생형(WT, wild Type(+/+))과 이종형(HE, hetero Type(+/-)), 넉아웃형(KO, knock Out(-/-))의 세 종류가 있다. 모든 동물실험은 단국대학교 동물실험윤리위원회의 기준을 따랐다(동물 실험 승인 번호: DKU-17-022).

유전형 분석(genotyping)

유전형별 신경아교전달물질의 차이를 보기 위해서 cell culture를 진행하기 전 꼬리 끝부분을 잘라 DNA를 추출하여 PCR을 통해 증폭시킨 뒤 전기영동으로 확인하였다. 야생형(WT)과 넉아웃형(KO)에 대한 각각의 primer (10 pmole/μl)를 사용한다.

유전형 분석 과정은 첫째, 꼬리를 녹이는 과정, 둘째, DNA 추출 과정 그리고 마지막으로 PCR을 통해 band size를 확인하는 과정으로 나뉘어진다. 먼저 분리한 꼬리를 녹이기 위해 tail lysis buffer (5 Mm EDTA + 20 Mm NaCl + 0.2% SDS + 100 Mm Tris (PH 8.0)) 400 μl와 proteinase K 8 μl를 각 튜브에 넣은 뒤 오븐(55℃)에 3시간 이상 넣어둔다.

꼬리가 녹은 다음 EDTA를 조절하기 위해 potassium acetate 120 μl를 넣고 10분간 방치 후 chloroform 400 μl를 넣어 단백질을 변성시켜주고 상온에서 10분간 shaking 후 원심분리(4℃, 13,000 rpm, 15분)하여 변성된 단백질 찌꺼기들을 침전시킨다. 그 후 상층액 400 μl를 새 tube로 옮긴 뒤 100% ethanol 500 μl를 넣은 후 10분간 상온에서 shaking을 한다. 이 과정에서 흰색이 보이면 DNA가 충분히 응축되었음을 의미한다. Shaking (상온, 10분)후 원심분리(4℃, 13,000 rpm, 10분)를 진행하여 응축된 DNA를 침전 시킨다. 원심분리를 한 후 상층액은 모두 버린다.

응축이 완료되면 그 다음 단계는 washing으로 DNA를 제외한 각종 찌꺼기들을 제거한다. Washing은 70% ethanol 800 μl를 넣어 원심분리(4℃, 13,000 rpm, 5분)하여 진행한다. 마지막으로 상층액을 버린 뒤 20분간 말린 후 3차 D.W 20 μl에 녹인다.

PCR은 보통 혼합물(mixture)을 만들어서 진행하는데 이때 GIT1의 경우 WT과 KO를 각각의 primer로 나눠서 진행 했다. WT의 primer는 GIT1 WT forward primer, reverse primer 두 가지가 있으며 KO primer 또한 β-Gal (β-galactosidase) forward primer, reverse primer 두 가지가 있다. Primer 서열은 결과에 기재하였다(Fig. 1B).

각 PCR 조성은 총 부피가 50 μl로 i-starTaq^{TM} PCR core kit (Intronbio, Cat# 25161)를 사용하여 추출하였다. 각 튜브당 D.W 38.7 μl, 10X hot taq buffer 5 μl, dNTP 4 μl, forward primer 0.4 μl, reverse primer 0.4 μl, taq polymerase 0.5 μl, DNA 1 μl를 넣어 만든다.

Negative control 또한 WT, KO 각각 1개씩 만들어주는데 이때 DNA 대신 D.W를 1μl 넣어준다. GIT1의 경우 PCR 조건은 DNA 변성(95℃, 30초), primer 결합(60℃, 30초), primer 신장(72℃, 100초)으로 총 39 cycle을 반복한다.

이렇게 증폭된 DNA로 전기영동을 진행하는데 6X loading star (Dynebio, Cat# A750) 0.4 μl와 PCR이 완료된 DNA 2 μl씩 넣고 섞어서 젤에 내려준다. DNA ladder (Elpis biotech, Cat# EBM-1003)와 negative control 또한 2 μl씩 넣어 젤에 내려준다.

별아교세포 배양(Astrocyte primary culture)

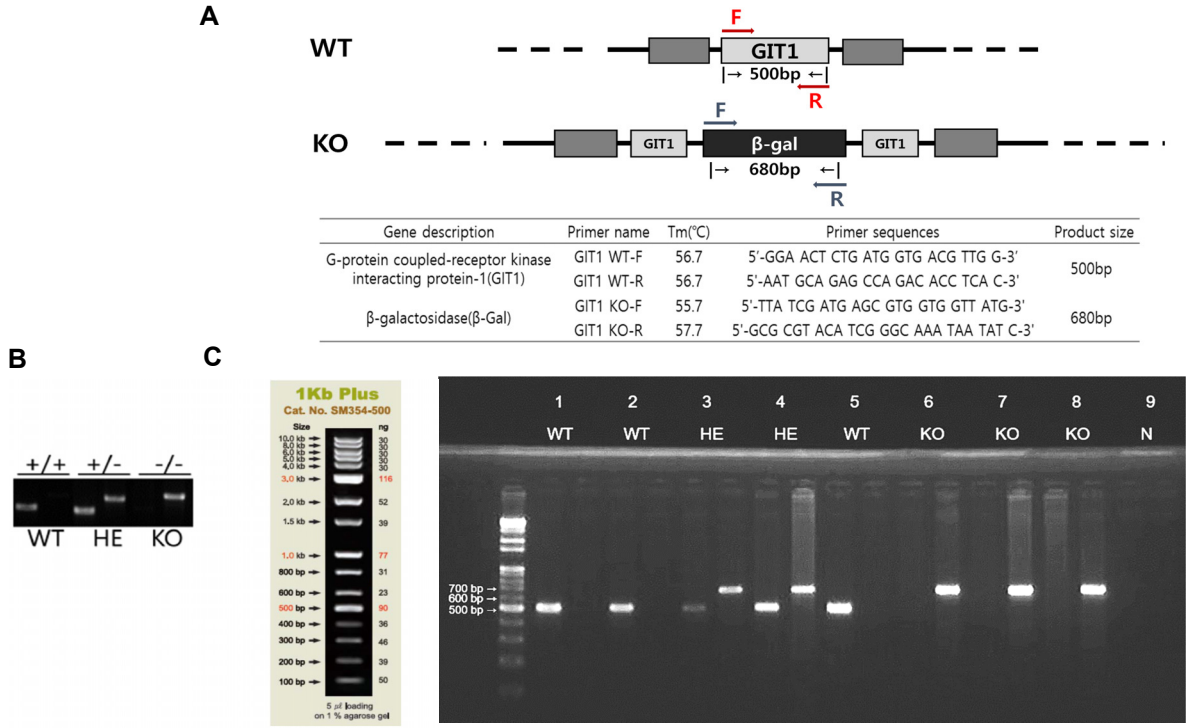
배양을 진행하기 전, 별아교세포가 배양 접시(culture dish)에 잘 달라붙게 하기 위해 dish (60x10 nm)에 PDL (poly-D-lysine, Corning biocoat, Cat# 54210) 코팅을 진행 했다. PDL 코팅은 별아교세포의 세포 결합을 강화하여 세포의 부착, 성장을 돕는다. PDL 코팅은 D.W 1,980 μl과 PDL 20 μl를 넣어 접시에 고루 펴지게 한 뒤 상온에서 약1시간 정도 둔 후 배양 시작 전 PBS 1 ml로 씻어낸 후 사용했다.

별아교세포 배양은 P0~P2인 생쥐로 진행하는데 먼저 P0~P2의 생쥐 뇌로부터 해부현미경을 사용해 각각 대뇌와 소뇌를 분리한 뒤 뇌막을 제거한 후 배양한다. 배양은 clean bench안에서 진행했으며 모든 실험기구들은 autoclave로 멸균되었으며 사용 전 70% ethanol로 소독 후 사용하였다.

먼저 분리한 뇌를 10%의 FBS (fetal bovine serum), 10%의 horse serum과 penicillin/streptomycin가 1% 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified eagle's media, Welgene, Cat# LM 001-05) 4 ml에 넣고 pipetting으로 잘게 부수어 PDL이 코팅된 접시에 넣어준 후 24℃, 5%, CO_2 incubator에 넣어 약 1주일간 기른다. 배지는 배양한 날을 기준으로 4일차 때 갈아준다. 새 배지로 교체할 때 PBS 1 ml으로 별아교세포 외에 미세아교세포(microglia)같은 다른 종류의 세포와 찌꺼기(cell debris)를 씻어내는 과정도 함께 진행되었다.

샘플 추출(Sampling)

샘플 추출은 배양한 날을 기준으로 8일차인 그 다음 주에 진행되었다. 소뇌와 대뇌 모두 세포 안팎의 아교세포전달물질



Gene description	Primer name	Tm(℃)	Primer sequences	Product size
G-protein coupled-receptor kinase interacting protein-1(GIT1)	GIT1 WT-F	56.7	5'-GGA ACT CTG ATG GTG ACG TTG G-3'	500bp
	GIT1 WT-R	56.7	5'-AAT GCA GAG CCA GAC ACC TCA C-3'	
β-galactosidase(β-Gal)	GIT1 KO-F	55.7	5'-TTA TCG ATG AGC GTG GTG GTT ATG-3'	680bp
	GIT1 KO-R	57.7	5'-GCG CGT ACA TCG GGC AAA TAA TAT C-3'	

Fig. 1. Genotyping and astrocyte primary culture. A: Schematic representation of the genetic strategy for GIT1 KO and WT (upper panel). A table of primer information (lower panel). B: PCR results of genotyping for GIT1 WT, HE and KO. HE has both band of WT and KO. C: Representative PCR results with primers for GIT1 WT and KO. 500 bp fragment was generated from the WT allele, and a 680 bp fragment from the KO allele.

의 차이를 보기 위해 새 배지로 교체한 후 4일 뒤에 추출했다. 별아교세포가 가득 차면 RIPA (radio immunoprecipitation assay) buffer를 사용하여 접시 안의 별아교세포를 떼어낸 후 샘플 추출을 진행한다.

RIPA buffer는 세포나 조직을 용해시키는 용해 완충제로서 RIPA buffer를 사용하면 접시와 세포 사이의 결합을 끊어 세포가 더 잘 떨어지도록 한다. RIPA buffer (10 ml기준)는 Tris-HCl (50 mM, PH 7.5), NaCl (150 mM), Triton X-100 (0.1%), EDTA (5 mM), PMSF (1 mM)를 넣고 섞어준 후 protease inhibitor cocktail EDTA-free (Roche, Cat# 04 693 159 001) 1 table/10 ml와 D.W로 총 부피를 맞춰준다. 이때 PMSF (phenylmethane sulfonyl fluoride)는 사용하기 직전에 첨가해서 사용해야 한다. 이렇게 만들어진 RIPA buffer는 250 µl/(60×10 nm)를 접시에 넣어 사용했다.

세포 외의 신경아교전달물질을 얻기 위해서 4일 전에 넣어준 배지를 따서 tube에 담은 후 ice box에 10분간 보관 후 원심분리(4℃, 10분)하여 상층액 50 µl를 따서 -80℃에 보관하였다. 세포 내의 신경아교전달물질을 얻기 전 PBS로 1회 씻어낸 뒤 RIPA buffer 250 µl를 넣고 1분간 방치 후 scrapper를 이용해서 세포를 얻었다. Tube에 담긴 세포를 pipetting으로 충분히 풀어준 뒤 세포 외의 신경아교전달물질 추출과 같은 방법으로 ice상에서 원심 분리하여 상층액 50 µl를 따서 -80℃에 보관하였다.

HPLC 분석을 위한 최소 용매의 부피를 200 µl으로 맞추기 위해 세포 외 신경아교전달물질 샘플에는 배지 200 µl를 추가하여 충분히 섞어주고 세포 내의 신경아교전달물질 샘플에는 RIPA buffer 200 µl를 추가하여 각각의 농도를 1/5로 희석하여 분석을 의뢰하였다. 후에 실험데이터를 분석할 때는 농도를 1로 맞추어 분석하였다.

HPLC

HPLC (High performance liquid chromatography)는 서울대학교 내부에 있는 연구기관인 서울대학교 농생명과학 공동기기원(NICEM)에 의뢰하여 분석하였다. HPLC는 Ultimate 3000 (pump, auto sampler, oven and UV / Thermo dionex, USA)를 사용하여 진행했고, fluorescence detector로는 emission 450 nm, excitation 340 nm (OPA)과 emission 305 nm, excitation 266 nm (FMOC)를 사용했으며 UV detector를 이용했다. 과정은 다음과 같다.

먼저 샘플은 VDSpher 100 C18-E (4.6 mm × 150 mm, 3.5 µm/VDS optilab, Germany)를 통해 injection되고 UV detector를 통해 detection된다.

Mobile phase A로는 40 mM sodium phosphate dibasic, pH 7.8가 사용되었고 mobile phase B로는 3 D.W / acetoni-

trile / methanol (10: 45: 45 v/v %)가 사용 되었다. 그리고 flow rate은 1.5 ml/min이며 총 retention time은 30분이다.

HPLC injection volume은 0.5 μl이고 Column 온도는 40℃, 샘플 온도는 20℃에서 진행 되었다.

결과 분석(analysis)

HPLC 결과 분석은 T-test를 이용하여 유전형 간의 차이를 보았다. 또한 유전형별로 흥분성/억제성(excitatory/inhibitory) 비율 분석을 위해서는 ANOVA (analysis of variance) test를 진행하였다($p<0.05$ (*), $p<0.01$(**), $p<0.001$(***)).

결과 및 고찰

GIT1 생쥐 모델 유전형 분석

GIT1 KO은 *Git1* 유전자 사이에 β-galactosidase (β-gal)가 끼어들어가 *Git1* 유전자를 넉아웃(knock-out) 시킨다. 유전형 분석에 사용된 KO primer는 β-gal에 대한 서열을 가지고 있다. Primer가 결합하는 *Git1* 유전자의 길이는 500 bp 정도이고 β-gal은 680 bp이다(Fig. 1A). 유전형별 신경아교전달물질의 차이를 보기 위해 배양 전 생쥐의 꼬리에서 추출한 DNA에 WT과 KO에 대한 primer를 이용하여 DNA를 증폭 시킨 후 2% agarose gel에 전기영동하여 유전자형을 확인했다(Fig. 1B). 예를 들어, 그림의 별아교세포 배양을 진행한 8마리의 유전형 분석 결과에서 1번, 2번과 5번 생쥐는 WT primer를 사용한 lane에서만 밴드가 나타났고 band size가 500 bp이므로 WT의 유전형을 갖고 있다. 6번, 7번과 8번 생쥐는 KO primer를 사용한 lane에서만 600~700 bp 사이의 밴드가 나타났으므로 KO의 유전형을 갖고 있으며, 3번과 4번 생쥐는 WT과 KO 둘 모두에서 밴드가 나타났으므로 HE의 유전형을 갖고 있다고 판별 할 수 있었다(Fig. 1C).

HPLC를 통한 흥분성 신경아교전달물질(excitatory gliotransmitter) 분석

배양한 별아교세포의 배지와 세포에서 얻은 lysate을 샘플로 하여 NICEM (서울대학교 농생명과학 공동기기원)에 아미노산 분석을 의뢰했다. 아미노산 분석은 aspartic acid, glutamic acid, asparagine, serine, glutamine, histidine, glycine, threonine, arginine, alanine, taurine, GABA, tyrosine, valine, methionine, tryptophan, phenylalanine, isoleucine, leucine, lysine, proline 물질들을 조사하였다. 그 중 glutamate, glutamine, glycine, taurine 위주로 분석하였으며, 유전자형별 세포 내부(cell lysate)와 외부(media)로 나누어 진행하였다.

먼저 중추신경계 대표적 흥분성 신경전달물질인 glutamate와 원료가 되는 glutamine을 소뇌에서 세포내외, 대뇌에서 세포내외 별로 분석하였다. Glutamate는 소뇌에서 세포내외 모두 HE에서 가장 많이 존재하였으며 대뇌에서도 HE에서 가장 많이 존재하였다(Fig. 2A~Fig. 2D). 또한 대뇌와 소뇌 모두 세포 내에서 WT보다 KO에서 더 많은 glutamate를 함유하고 있었다(Fig. 2A, Fig. 2B). Glutamine의 경우, 대체로 HE에서 가장 많은 양의 glutamine이 검출되었지만 소뇌의 세포내 에서는 KO이 가장 많은 보였다(Fig. 2E~Fig. 2H). 또한 대뇌와 소뇌 모두 세포내 에서 WT보다 KO에서 더 많은 glutamine을 함유하고 있었으며(Fig. 2E, Fig. 2F) 이러한 특성은 glutamate와 공통적이었다.

따라서 소뇌의 세포 내에서 KO이 WT보다 더 많은 흥분성 전달물질을 가지며(Fig. 2A, Fig. 2E) 세포 외에서는 KO보다는 WT에 더 많은 양을 가지는 경향을 보였다(Fig. 2C, Fig. 2G). 대뇌 또한 세포내에서 KO이 WT보다 더 많은 흥분성을 가지고 있는 경향을 보였다(Fig. 2B, Fig. 2G). 이 결과를 종합하였을 때, KO이 WT보다 세포 내에서 더 많은 흥분성 전달물질을 지니며 이는 ADHD 모델의 세포 내에서 합성되는 흥분성전달물질의 양이 WT보다 증가되어 축적되는 거라 여겨진다.

HPLC를 통한 억제성 신경아교전달물질(inhibitory gliotransmitter) 분석

억제성 신경전달물질로는 GABA와 glycine 그리고 taurine을 위주로 분석하였다. 분석결과, 이 세가지 억제성 신경전달물질 모두 비슷한 경향을 보였는데, 소뇌의 세포외 taurine과 대뇌 세포 외 GABA를 제외한 모든 부위에서 억제성 신경전달물질이 HE에서 가장 높은 수치를 나타냈다(Fig. 3). 먼저, 소뇌를 살펴보면, 세포내에서는 억제성 신경전달물질이 HE에서 가장 많이 존재했으며 KO이 WT보다 많은 양을 가졌다(Fig. 3A, Fig. 3E, Fig. 3I). 반면 세포 외에서는 비록 통계적으로 유의미하지는 않지만 WT이 KO보다 많은 양을 가지고 있었다(Fig. 3C, Fig. 3G, Fig. 3K). 대뇌에서는 WT의 세포내에서 KO보다 더 많은 양의 억제성 신경전달물질이 존재했다(Fig. 3B, Fig. 3F, Fig. 3J). 대뇌의 세포외에서는 GABA를 제외하고 WT에서 KO보다 많은 양의 taurine과 glycine이 존재했다(Fig. 3D, Fig. 3H, Fig. 3L).

GABA의 경우 소뇌와 대뇌가 서로 다른 양상을 보였다. 즉, 대뇌의 세포 내에서는 WT에 더 많이 존재했지만, 소뇌의 세포 내에서는 KO에서 WT보다 더 많은 양의 GABA가 존재했다(Fig. 3A, Fig. 3B). 이는 GIT1 KO의 소뇌 피질에서 방출되는 GABA의 양이 감소되는 것을 확인한 선행 연구 결과와 차이가 있어 보이는데[7], KO의 소뇌에서 GABA 분비가 제대로 이루어지지 않거나 혹은 상호보완적으로 더 많은 양의 억제성 신경전달물질을 합성한다는 가능성을 제시할 수 있다. 또한 대뇌의 세포 내에서는 KO에서 가장 적은 양의 GABA가 존재했지만, 세포외에서는 다른 억제성 신경전달물질들과는 달리 HE가 아닌 KO에서 GABA가 가장 많이 존재했다(Fig. 3D). 이는 대뇌에서 분비하는 억제성 신경전달 물질이 흥분성을 억제하기위해 억제성 신경전달물질의 분비를 증가시키거나

또는 세포 외에 존재하는 억제성 신경전달물질의 재흡수가 제대로 이루어지지 않을 가능성을 제시할 수 있다(Fig. 3D).

Taurine의 경우, 다른 경향을 보였는데 소뇌의 세포 내에서는 다른 억제성 신경전달물질들과 같은 양상이지만 세포 외에서는 WT에서 가장 많은 양을 함유하며 KO에서 가장 적은 양의 taurine이 존재했다(Fig. 3K). 대뇌 세포 내에서는 HE가 가장 많고 KO이 WT보다 많았다(Fig. 3J). 반대로 대뇌의 세포 외에서는 WT이 KO보다 많았다(Fig. 3I).

흥분성/억제성 비율(E/I ratio)을 통한 유전형별 분석

억제성 신경전달물질과 흥분성 신경전달물질을 분석한 결과, 소뇌와 대뇌의 결과는 차이를 보였다. 흥분성과 억제성의 전체적 균형을 살펴 보기 위해 glutamate와 GABA를 기준으로 E/I (excitatory/inhibitory) ratio를 분석하였다(Fig. 4). 그 결과, 비록 통계적으로 유의하지는 않지만 소뇌에서는 KO이 가장 높은 E/I ratio를 가지고 있었다(Fig. 4A, Fig. 4C). 물질 분석에서 glutamate와 GABA은 세포내와 세포외 모두 HE가 가장 많은 양으로 존재했지만(Fig. 2A, Fig. 2C, Fig. 3A, Fig. 3C) E/I ratio는 KO이 가장 높은 것으로 나타나 GIT1이 제거된 생쥐는 흥분성이 증가해 있고 따라서 과잉행동을 보이는 ADHD의 특성을 뒷받침할 수 있을 것이다.

반면 대뇌에서는 HE가 가장 높은 E/I ratio를 보였으며 세포내에서는 KO이 WT보다 높아 더 흥분성이 증가된 것으로 보이나, 세포외에서는 WT이 KO보다 더 큰 흥분성을 가지고 있었다(Fig. 4B, Fig. 4D). 이에 따라, 앞서 제시한 GIT1 KO은 세포내에서 세포외로 흥분성 신경전달물질을 내보내는 과정이나 흥분성 신경전달물질 수용체에 WT과 차이가 있을 가능성을 제시한다.

Fig. 2B, Fig. 3D와 Fig. 4D를 제외하고는 유의미한 차이가 WT과 HE에서 관찰되었다. 행동실험에서 HE가 WT과 같은

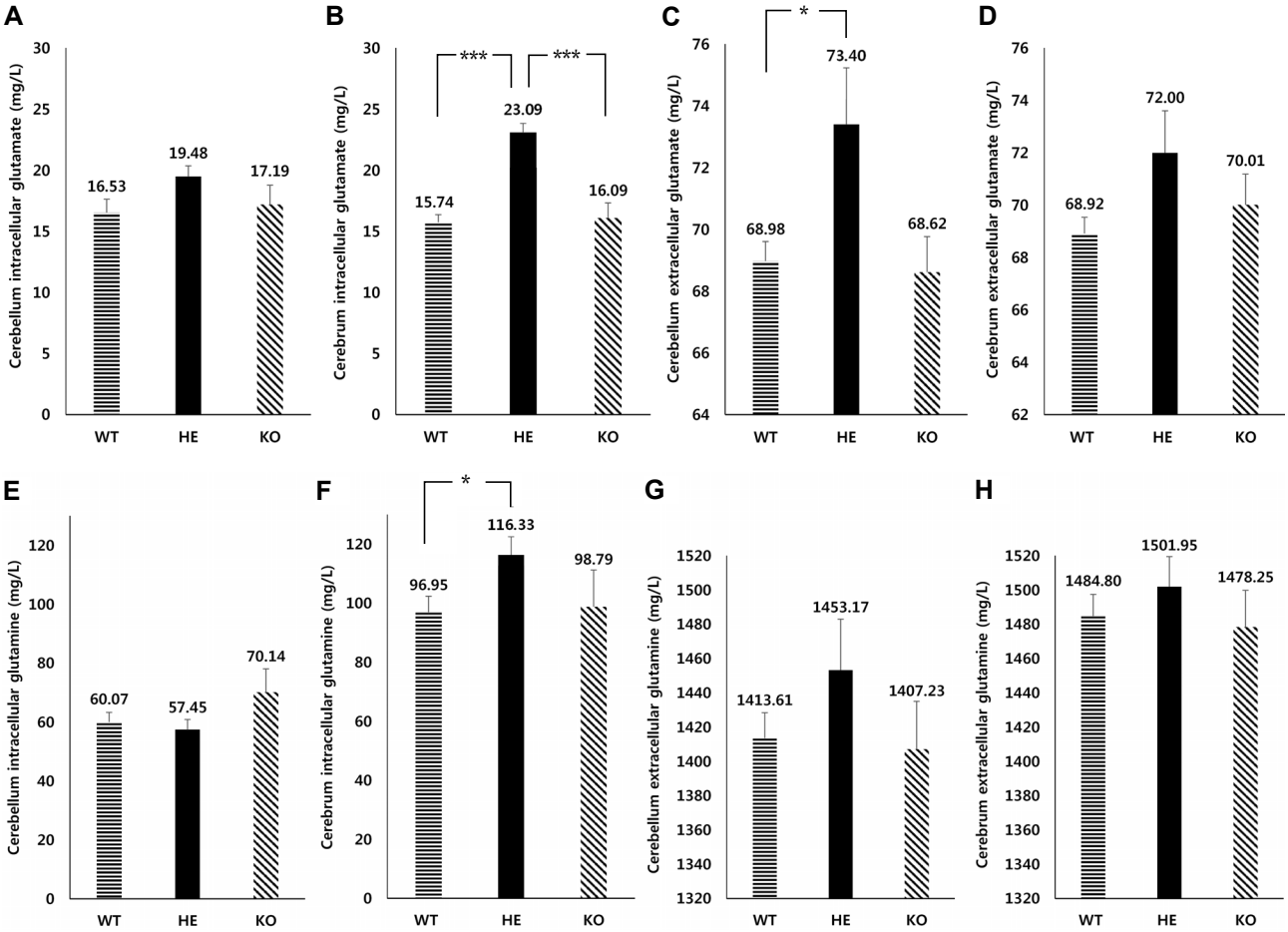


Fig. 2. The bar graph of HPLC analysis of excitatory gliotransmitters from cerebral cortex and cerebellar cortex astrocyte primary culture. A: Intracellular glutamate concentration in cerebellar astrocyte. B: Intracellular glutamate concentration in intracellular cerebral astrocyte (p value: $p<0.001$(***) (WT/HE), $p<0.001$(***) (KO/HE)). C: Extracellular glutamate concentration in cerebellar astrocyte (p value: 0.024). D: Extracellular glutamate concentration in cerebral astrocyte. E: Intracellular glutamine concentration in cerebellar astrocyte. F: Intracellular glutamine concentration in cerebral astrocyte (p value: 0.030). G: Extracellular glutamine concentration in cerebellar astrocyte. H: Extracellular glutamine concentration in cerebral astrocyte.

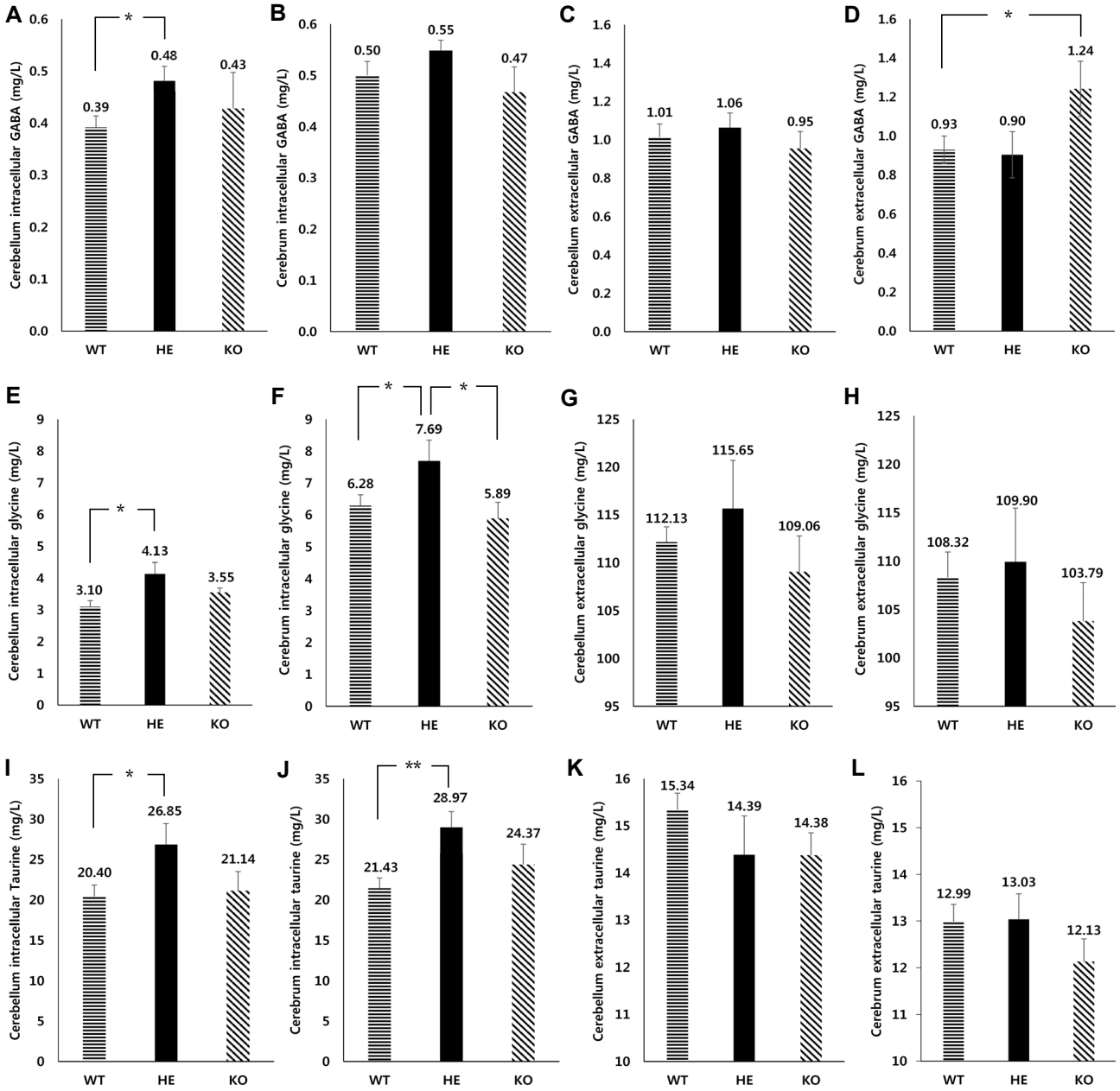


Fig. 3. The bar graph of HPLC analysis of inhibitory gliotransmitters from cerebral cortex and cerebellar cortex astrocyte. A: Intracellular GABA concentration in cerebellar astrocyte (*p* value: 0.028). B: Intracellular GABA concentration in cerebral astrocyte. C: Extracellular GABA concentration in cerebellar astrocyte D: Extracellular GABA concentration in cerebral astrocyte (*p* value: 0.039). E: Intracellular glycine concentration in cerebellar astrocyte (*p* value: 0.011). F: Intracellular glycine concentration in cerebral astrocyte (*p* value: 0.047). G: Extracellular glycine concentration in cerebellar astrocyte. H: Extracellular glycine concentration in cerebral astrocyte. I: Intracellular taurine concentration in cerebellar astrocyte (*p* value: 0.027). J: Intracellular taurine concentration in cerebral astrocyte (*p* value: 0.002). K: Extracellular taurine concentration in cerebellar astrocyte. L: Extracellular taurine concentration in cerebral astrocyte.

양상을 보인 기존의 보고와는 달리[13], HE가 WT과 신경전달물질에 있어서 차이가 존재함을 시사하며, 이는 HE의 모델로서의 연구가능성을 제시한다. 또한 KO의 신경전달물질의 합성 및 분비의 변화는 GIT1과 관련된 GPCR 외의 다른 경로를 상호보완적으로 이용할 수 있기 때문에 KO이 HE에 비해 유의성이 적게 관찰되었을 가능성이 있다.

본 연구는 별아교세포 특이적 배양을 진행했기 때문에 실제 뇌에 존재하는 다른 세포들과의 상호작용이 배제되었고 *in vivo* 환경과 차이가 있다는 한계가 있다. 따라서 다음 연구에서는 뉴런(neuron)과 교세포(glial cell)의 공동배양(co-culture)

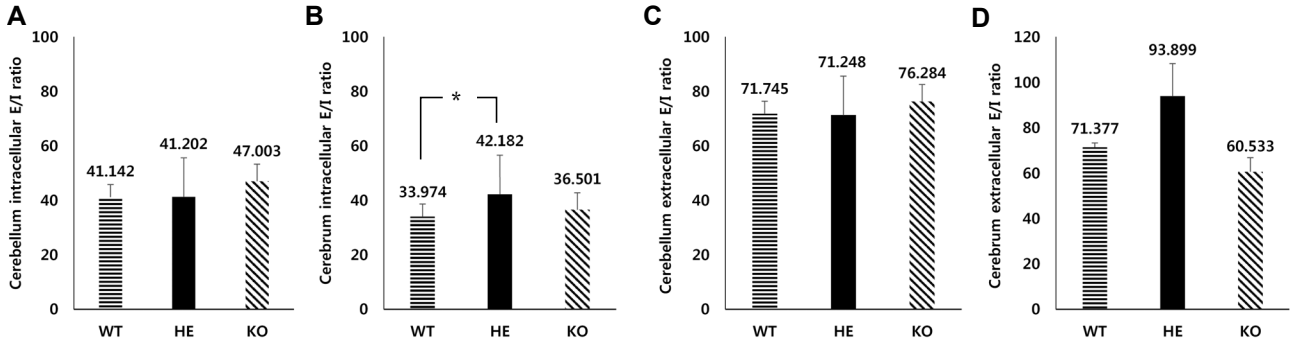


Fig. 4. E/I ratio of GABA and Glutamate from cerebellum or cerebrum. A: Intracellular E/I ratio in cerebellar astrocytes. B: Intracellular E/I ratio in cerebral astrocytes (*p* value: 0.013). C: Extracellular E/I ratio in cerebellar astrocytes. D: Extracellular E/I ratio in cerebral astrocyte.

을 진행하여 신경세포와 교세포의 상호작용을 바탕으로 한 보다 거시적인 분석을 할 수 있을 것이다.

또한 이 실험에 사용한 생쥐들의 성별을 토대로 임상에서 남아가 여아보다 ADHD 발병률이 높은 문제에 대해서도 별아교세포 유래 신경전달물질의 차이를 분석해 볼 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 수도권 특성화 사업(CK-II), 단국대학교 켐바이오 글로벌 전문인력양성 사업의 일환으로 수행되었음.

References

1. Bloom, B., Jones, L. I. and Freeman, G. Vital Health Statistics, Series 10, No 258 [Internet] Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics; 2012. [cited 2017 Jul 20]. Summary health statistics for U.S. children: National Health Interview Survey.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Increasing prevalence of parent-reported attention-deficit/hyperactivity disorder among children --- United States, 2003 and 2007. MMWR Morb Mortal Wkly.
3. Eid, T., Thomas, M. J., Spencer, D. D., Runden-Pran, E., Lai, J. C., Malthankar, G. V., Kim, J. H., Danbolt, N. C., Ottersen, O. P. and de Lanerolle, N. C. 2004. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* **363**, 28-37.
4. Friedman, L. A. and Rapoport, J. L. 2015. Brain development in ADHD. *Curr. Opin. Neurobiol*. **30**, 106-111.
5. Gershon, J. 2002. A meta-analytic review of gender differences in ADHD. *J. Atten. Disord*. **5**, 143-154
6. Hong, S. T. and Mah, W. 2015. A critical role of GIT1 in vertebrate and invertebrate brain development. *Exp. Neurobiol*. **24**, 8-16.
7. Kim, Y. S., Woo, J., Lee, C. and Yoon, B. E. 2017. Decreased glial GABA and tonic inhibition in cerebellum of mouse model for attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Exp. Neurobiol*. **26**, 206-212.
8. Menon, P., Deane, R., Sagare, A., Lane, S. M., Zarcone, T. J., O'Dell, M. R., Yan, C., Zlokovic, B. V. and Berk, B. C. 2010. Impaired spine formation and learning in GPCR kinase 2 interacting protein-1 (GIT1) knockout mice. *Brain Res*. **1317**, 218-226.
9. Pastor, P., Reuben, C., Duran, C. and Hawkins, L. 2015. Association between diagnosed ADHD and selected charac teristics among children aged 4-17. *NCHS. Data Brief* **201**.
10. Porter, J. T. and McCarthy, K. D. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and *in vivo*. 1997. *Prog. Neurobiol*. **51**, 439-455.
11. Soo, Y. L. and Won, M. 2015. Abnormal astrocytosis in the basal ganglia pathway of Git1−/− mice. *Mol. Cells* **38**, 540-547.
12. Toone, B. K. and van der Linden, G. J. H. 1997. Attention deficit hyperactivity disorder or hyperkinetic disorder in adults. *Br. J. Psychiatry* **170**, 489-491.
13. Won, H., Mah, W., Kim, E., Kim, J. W., Hahm, E. K., Kim, M. H., Cho, S., Kim, J., Jang, H., Cho, S. C., Kim, B. N., Shin, M. S., Seo, J., Jeong, J., Choi, S. Y., Kim, D., Kang, C. and Kim, E. 2011. GIT1 is associated with ADHD in humans and ADHD-like behaviors in mice. *Nat. Med*. **17**, 566-572.

초록 : ADHD (주의력결핍 과잉행동장애) 생쥐 모델에서의 별아교세포 유래 신경전달물질 분석

김가연 · 박재원 · 윤보은*
(단국대학교 분자생물학과)

ADHD (Attention Deficit/Hyperactivity Disorder)은 4-17세의 아동 및 청소년의 약 10%가 겪는 흔한 신경 발달 장애이지만 그 핵심 기전이 알려져 있지 않은 가운데 관련한 여러 단백질들이 보고되어왔다. 이중 GIT1 (G-protein coupled-receptor kinase interacting protein-1)은 중추신경계에서 dendritic spine formation와 growth에 영향을 미치는 multifunctional adaptor protein으로, GIT1이 제거된 생쥐는 과잉행동, 주의력결핍 그리고 충동성을 보이는 ADHD 증상을 보이게 된다. 이 논문에서는 GIT1 유전자 변형 생쥐를 이용하여 genotype별로 신경교세포의 전달물질(gliotransmitter)을 비교 분석하는 실험을 진행하였다. 그 결과 주요 흥분성 전달물질인 glutamate는 HE (hetero)와 KO (knock-out)의 세포 내에서 WT (wildtype)보다 더 높은 농도로 존재했다. 한편, 억제성 신경전달물질인 GABA와 glycine의 경우 전반적으로 HE에서 가장 많은 함유량을 보였지만 소뇌 세포내의 경우, KO이 WT보다 많은 양을 함유한 것에 비해 대뇌 세포 내에서는 KO보다 WT의 억제성 전달물질 함유량이 높았다. 또한, glutamate와 GABA를 기준으로 흥분성/억제성 비율(excitation/inhibition ratio)을 보았을 때, 소뇌 세포 내/외 모두에서 KO이 가장 높은 수치를 보였고, 대뇌에서는 세포 내/외 모두 HE에서 가장 높은 수치를 보였다. 억제성 신경전달물질인 GABA가 KO의 대뇌 세포 외에서 가장 많은 것으로 보아 GIT1 결손을 보완하기 위해 억제성 물질을 더 많이 분비하거나 또는 과도하게 분비된 GABA를 재흡수하지 못하는 것이라 사료된다. 이는 ADHD 병리기전으로써 기능할 가능성을 제시하며 후속 연구를 통해 해당 기전에 대한 규명이 필요할 것으로 보인다.