암페타민에 의해 유도된 조건화 반응의 발현에서 중격측좌핵 내의 Akt-GSK3β 신호전달의 역할

연세대학교 대학원

의과학과

신 중 근

암페타민에 의해 유도된 조건화 반응의 발현에서 중격측좌핵 내의 Akt-GSK3β 신호전달의 역할

연세대학교 대학원

의과학과

신 중 근

암페타민에 의해 유도된 조건화 반응의 발현에서 중격측좌핵 내의 Akt-GSK3β 신호전달의 역할

지도교수 김 정 훈

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2011년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

신 중 근

신중근의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김 정 훈 인

심사위원 이 배 환 인

심사위원 김 철 훈 인

연세대학교 대학원

2011년 12월

감사의 글

그 동안의 학위과정을 돌아보면 감사드려야 할 분들이 매우 많다. 가장 먼저 떠오르는 분으로는 지도교수이신 김정훈 교수님이시다. 내게는 학문적 부모님 같은 분으로 학위과정 동안 즐겁게 실험할 수 있도록 이끌어주셨으며 학문적인 가르침 외에도 인생을 살아감에 있어서 꼭 필요한 지식을 습득할 수 있도록 관심으로 이끌어 주심에 감사드린다. 또한 학위논문의 심사위원이신 이배환 교수님, 김철훈 교수님께서도 보다 심도 있는 학위논문을 작성 할 수 있도록 지도편달 해주심에 감사를 드린다.

본 연구자에게는 정말 소중한 연구실의 동료들이 있다. 김승우박사님, 김화영박사님, 윤형신박사님, 장주경, 박혜경, 송민지, 조보람, 이정원 모두 나의 학위과정 동안 즐거움과 용기를 북돋아주었던 소중한 제2의 가족과 같은 분들이다. 그 외에도 많은 관심으로 지도해주신 연세대학교 의과대학 생리학교실 박사님들과 동료들, 그리고 친구들에게도 감사드린다.

마지막으로 항상 좋은 말씀으로 사랑을 베풀어주시는 조부모님, 그리고 아낌없는 사랑으로 성장할 수 있도록 지원해주신 부모님과 끊임없이 절차탁마 하도록 자극을 심어주는 누나에게도 감사드린다.

또한 지금의 나를 존재할 수 있도록 창조하여주시고 등불처럼 나의 걸음을 인도하여주시는 하나님께 감사드린다.

차 례

국문요약·····1
Ⅰ. 서론·····3
II. 재료 및 방법·····5
1. 실험동물·····5
2. 약물·····5
3. 행동실험·····5
4. Western blotting·····6
5. 실험절차 및 방법·····8
6. 통계분석·····10

III. 결과 ·····11
1. 실험1. 암페타민에 의해 유도된 조건화 반응이 중격측좌핵 각층과 중심층 내의 Akt-GSK3β 신호전달에 미치는 영향·····11
2. 실험2. 암페타민에 의해 유도된 조건화 반응에서 GSK3-β의 억제제인 리튬을 주었을 때의 변화·····20
IV. 고찰·····25
V. 결론·····27

참고문헌·····28
영문요약·····33

그림 차례

그림 1. 집단간의 조건화 반응 보행성 활동량 측정결과(10분)····
····13

그림 2. 집단간의 조건화 반응 보행성 활동량 측정결과(60분)····
····14

그림 3. 조건화 보행성 활동량 측정 10분 후 각 집단간의
Akt, GSK3β의 인산화 정도····16

그림 4. 조건화 보행성 활동량 측정 60분 후 각 집단간의
Akt, GSK3β의 인산화 정도····18

그림 5. GSK3β의 억제제인 리튬을 주사하고 60분 후 집단
간의 조건화 반응 보행성 활동량 측정결과····21

그림 6. GSK3β의 억제제인 리튬을 주사하고 60분 후 Akt,
GSK3β의 인산화 정도····23

국문요약

암페타민에 의해 유도된 조건화 반응의 발현에서 중격측좌핵 내의 Akt-GSK3β 신호전달의 역할

실험용 쥐에서 암페타민(AMPH)과 코카인같은 정신자극제와 특정한 환경이 짝지어졌을 때 보행성 활동량(locomotor activity)의 조건화 반응이 일어난다. 본 연구에서는 암페타민을 이용하여 이와 같은 조건화 반응을 유도하고, 이때 중격측좌핵(nucleus accumbens) 내의 Akt-GSK3β의 인산화 수준의 차이를 서로 다른 시간대 별로 나누어 조사하였다. 실험용 쥐를 3개의 집단으로 나누고 2일에 한번씩 총 5회 다음과 같이 복강 주사하였다: 보행성 활동량 측정상자(locomotor activity box)와 짝지어진(paired) 집단은 첫째 날에 암페타민(1 mg/kg, IP)을 보행성 활동량 측정상자에서 주사하여주고 둘째 날은 동물이 사육되는 상자(home cage)에서 생리식염수(saline, 1 mg/kg, IP)를 주사하였다; 보행성 활동량 측정상자와 짝지어지지 않은(unpaired) 집단은 첫째 날에 생리식염수를 보행성 활동량 측정상자에서 주사하고 둘째 날은 동물이 사육되는 상자에서 암페타민(1 mg/kg, IP)를 주사하였다; 대조(control) 집단은 보행성 활동량 측정상자와 동물사육상자에서 모두 생리식염수를 주사하였다. 5회의 주사가 끝난 후 1주일 동안 휴식기간을 거친 뒤 모든 그룹의 쥐를 보행성 활동량 측정상자에 넣어두고 보행성 활동량의 조건화 반응을 측정하였다. 이때 모든 집단에 생리식염수만을 주사하였으며 서로 다른 시간대별로(10분, 60분) 나누어 보행성 활동량 측정을

하였다. 예상대로 짝지어진 집단에서의 보행성 활동량이 짝지어지지 않은 집단 및 대조 집단과 비교하였을 경우 현저한 증가가 일어났다. 10분 또는 60분의 보행성 활동량 측정이 끝난 직후 바로 실험용 쥐 뇌의 중격측좌핵 각층(shell)과 중심층(core)조직을 취하여 Western blot 실험방법으로 Akt, GSK3β의 인산화 정도를 확인하였다. 그 결과 60분 후 짝지어진 집단의 중격측좌핵 각층조직에서 Akt는 변화가 없었지만 반면 GSK3β의 인산화 수준이 현저하게 감소됨을 확인하였다. 또한 GSK3β의 억제제인 리튬(lithium chloride, 50 mg/kg, IP)이 조건화 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 앞에서 실시한 방법과 같은 방법으로 조건화 모델을 만든 후 조건화 반응을 측정하는 날 짝지어진 집단과 짝지어지지 않은 집단, 대조 집단을 생리식염수만 주사 맞는 집단과 리튬을 주사 맞는 집단으로 각각 나누어 총 6집단으로 나누어 주었다. 그 결과 짝지어진 집단 중 리튬을 주사한 집단에서 보행성 활동량이 대조집단과 같은 크기로 감소함을 확인하였으며 중격측좌핵 각층 내의 GSK3β 인산화 수준 또한 대조집단의 크기로 현저하게 회복됨을 관찰하였다. 이 결과를 종합하면, GSK3β 단백질은 중격측좌핵 각층 내에서 약물과 짝지어진 환경에 대한 조건화 반응을 나타낼 때 중요한 조절작용을 하고 있는 것으로 생각되며, GSK3β의 기전연구는 약물중독을 이해하는데 중요한 열쇠가 될 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 리튬, 암페타민, 조건화 반응, 중격측좌핵, GSK3β

암페타민에 의해 유도된 조건화 반응의 발현에서 중격측좌핵 내의 Akt-GSK3β 신호전달의 역할

<지도교수 김정훈>

연세대학교 대학원 의과학과

신 중 근

Ⅰ. 서론

파블로프의 조건화는 가장 많이 연구되는 학습의 예로 여러 종에서 약물의 갈망과 밀접하게 관련되어 있음이 밝혀졌다[1]. 이러한 조건화 현상은 다양한 약물의 갈망이나 재발과 같은 약물중독의 결과를 잘 설명해준다[2,3]. 가령 실험용 쥐에게 아편제 약물이나 정신운동 자극제인 코카인, 암페타민을 특정환경과 짝지어주게 되면 약물이 없는 조건에서도 단지 짝지어진 특정 환경만으로도 보행성 활동량(locomotor activity)의 증가를 불러일으킨다[4-12]. 따라서 약물과 짝지어진 환경요소의 자극만으로 어떻게 약물의 갈망이 유발되는지 알아보는 연구는 약물중독의 기전을 이해하는데 있어서 매우 중요하다.

여러 연구를 통해 조건화 반응의 발현과 관련된 가장 주요부위 중의 한 곳으로 중격측좌핵(nucleus accumbens)이 알려져있다[13-15]. 가령

정신자극제와 짝지어진 환경신호는 약물이 없이도 중격측좌핵 내의 도파민 과다유출과 Fos와 관련된 단백질을 활성화시킨다[16-20]. 한편 더 나아가 중격측좌핵은 해부학적으로나 기능적으로 다른 체제를 이루고 있는데[21,22], 최근의 연구 결과에 의하면, 정신운동 자극제와 짝지어진 자극을 제시해 주었을 때 동물에서 나타나는 조건화 반응의 결과는 중격측좌핵의 각층(shell)과 중심층(core)에서 서로 다른 분자기전을 통하여 매개한다고 알려져 있다[23-26].

한편 중격측좌핵 내의 도파민은 G-단백질(G-protein)과 결합하는 도파민 수용체에 의해 세포 내 신호를 전달한다. 도파민 수용체는 크게 cAMP에 의존하여 빠르게 활성화되는 D1-수용체와 cAMP에 의존하지 않고 느리게 지속적으로 활성화되는 D2-수용체로 나누어진다[25]. Akt-GSK3β신호전달은 D2-수용체로 매개되는 도파민과 관련된 행동발현에 밀접한 관련이 있다[27]. 가령 선조체(striatum)의 경우 증가된 도파민에 의해 시간차를 두고 D2-수용체가 느리게 활성화되면서 결국 Akt-GSK3 신호전달계를 활성화시킨다는 보고가 있다. 특히 암페타민을 실험 쥐에게 주입하였을 경우 쥐의 선조체에서 GSK3β의 인산화 정도가 감소한다고 보고되었다[28].

이러한 선행연구결과들을 바탕으로 본 연구에서는 암페타민으로 조건화 반응을 유도하였을 때 약물중독에서 매우 중요한 역할을 하는 중격측좌핵 각층과 중심층에서 각각 Akt-GSK3β 신호전달이 어떤 관련이 있는지 알아보고자 하였다. 한편, GSK3β의 억제제로 널리 알려진 리튬을 주고[29,30], 이때 나타나는 보행성 활동량의 변화와 Akt-GSK3β의 인산화 수준을 비교하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물

오리엔트 바이오(성남시, 대한민국)에서 받은 220-260g의 수컷 Sprague-Dawley rats. 실험용 쥐는 한 상자에 3마리씩 사육되며 사육실은 오후 7시에 소등하여 12시간 주기로 빛이 들어온다. 모든 실험은 낮 시간에 행하였다. 실험 동물은 물과 음식을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 동물의 사육 및 실험은 연세의료원 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 진행하였다.

2. 약물

D-amphetamine sulfate(United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, USA)와 lithium chloride(Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) 는 모두 멸균된 0.9%의 생리식염수에 녹여서 사용하였다.

3. 행동실험 (보행성 활동량 측정)

6개의 activity boxes(이우과학, 서울, 대한민국)가 보행성 활동량 측정에 사용되어졌다. 각 박스의 크기는 25 × 35 × 40 ㎝이며 불투명한 플라스틱과 Plexiglas front-hinged door, 그리고 관모양의 21개의 스테인리스 바닥(tubular stainless steel floor, 5 mm diameter)으로 구성되어 있으며 각각 관 모양의 스테인리스 중심에서

다른 스테인리스 중심까지 사이의 간격은 1.2 cm이다. 두 개의 광전지(photocell, Med Associates, St. Albans, VT, USA)는 바닥에서 4.5 cm 위에 위치하여 쥐의 수평적 움직임(movement)을 측정한다. 추가 두 개의 광전지는 양쪽 벽에 위치하여 바닥에서부터 14.5 cm 높이에 있으며 앞과 뒤 벽의 7.5 cm 거리에 설치되어 쥐의 수직적 움직임(rearing)을 측정한다. 쥐의 움직임은 electrical interface를 통해 컴퓨터에 자동으로 기록되어진다.

4. Western blotting

쥐에게 생리식염수 또는 리튬을 주사하고 10분 또는 60분의 보행성 활동량 검사를 마친 후에 마취 없이 decapitation을 하여 뇌를 꺼내고, 빠른 속도로 4℃ 얼음 위에서 coronal section(1.0 mm thick)으로 뇌를 얇게 자른다. 그 중에서 중격측좌핵의 각층과 중심층을 잘라낸 후 -80℃로 급랭하여 보관한다. 뇌에서 꺼낸 중격측좌핵조직에 homogenization medium(0.32 M sucrose, 2 mM EDTA, 1% SDS, 10 ug/ml aprotinin, 10 ug/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 넣고 homogenization한다. 그 후 원심분리(2,000g)하여 단백질만 추출한다. 단백질 농도의 정량은 pierce BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용한다. 정량 후 단백질이 들어있는 튜브를 10분간 100℃에서 가열하여준다. 10-20 ㎍의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 transfer한다. Transfer한 nitrocellulose membrane은 PBS-T 완충액(10 mM phosphate-buffered saline plus 0.05% Tween-20)에 5%

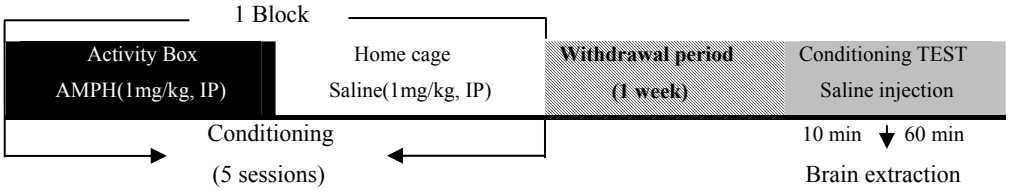
탈지유를 혼합하여 nitrocellulose membrane과 붙어있는 단백질의 사이를 매워 준다. 각각의 항체 즉, total Akt(1:1,000 dilution in PBS-T with 5% skim milk; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), phospho-Akt thr 308(1:500 dilution in PBS-T with 5% bovine serum albumin; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), total GSK(1:10,000 dilution in PBS-T with 5% skim milk; Cell Signaling, Beverly, MA, USA) 그리고 phospho-GSK3β(1:1,000 dilution in PBS-T with 5% bovine serum albumin; Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 nitrocellulose membrane에 떨어뜨려 탐침한다. 1차 항체에 부착하는 2차 항체는 peroxidase-conjugated되어있는 anti-rabbit IgG(1:2,000 dilution in PBS-T with 5% skim milk; 고마바이오텍, 서울, 대한민국)와 anti-mouse IgG(1:5,000 dilution in PBS-T with 5% skim milk; Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 사용한다. 화학 발광 증가제(ECL, Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 X-ray film에 감광시켜 단백질을 확인한다. 현상한 밴드의 강도는 Fujifilm Science Lab 97 Image Gauge software(version 2.54)를 이용하여 수치화한다. nitrocellulose membrane에 부착된 항체들은 Restore™ Western Blot Stripping Buffer(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 제거해주고 anti-β-actin antibody(1:10,000 dilution in PBS-T with 5% skim milk; Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 정량한 단백질들을 보정하였다.

5. 실험절차 및 방법

실험1. 암페타민에 의해 유도된 조건화 반응이 중격측좌핵 각층과 중심층 내의 Akt-GSK3β 신호전달에 미치는 영향

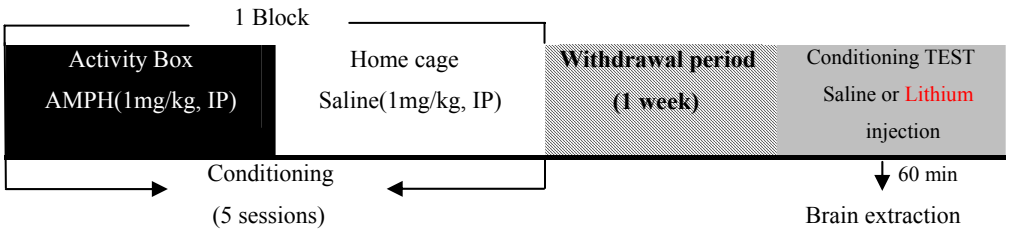
실험용 쥐를 무작위로 3개의 집단으로 나누어준다: 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단, 보행성 활동량 측정 상자와 짝지어지지않은 집단, 대조집단. 실험용 쥐를 3개의 집단으로 나누고 2일에 한번씩 총 5회 복강 주사하였다. 짝지어진(paired) 집단은 첫째 날에 암페타민(1 mg/kg, IP)을 보행성 활동량 측정상자(locomotor activity box)에서 주사하여주고 둘째 날은 동물이 사육되는 상자(home cage)에서 생리식염수(1 mg/kg, IP)를 주사하였다; 짝지어지지 않은(unpaired)집단은 첫째 날에 생리식염수를 보행성 활동량 측정상자에서 주사하고 둘째 날은 동물이 사육되는 상자에서 암페타민(1 mg/kg, IP)을 주사하였다; 대조(control)집단은 보행성 활동량 측정상자와 동물사육상자에서 모두 생리식염수를 주사하였다. 이렇게 5회의 주사가 끝난 다음에 1주일 간의 휴식기간을 거친 후 모든 그룹의 쥐를 보행성 활동량 측정상자에서 조건화 반응에 대한 보행성 활동량 측정을 시행하였다. 보행성 활동량 측정을 하는 날은 모든 집단에 생리식염수만을 주사하였으며 각각 10분과 60분으로 나누어 보행성 활동량 측정을 하였다. 보행성 활동량 측정이 끝남과 동시에 마취 없이 decapitation을 하여 뇌를 꺼내고, 빠른 속도로 얼음 위에서 coronal section(1.0 mm thick)으로 뇌를 얇게 잘랐다. 그 중에서 중격측좌핵의 각층과 중심층을 잘라낸 후 -80℃로 급랭하여 보관하였다. 그 후 조직을 꺼내어 단백질을 분리하고,

Akt-GSK3β의 인산화 수준을 western blot 실험방법으로 분석하였다.



실험 2. 암페타민에 의해 유도된 조건화 반응에서 GSK3β의 억제제인 리튬을 주었을 때의 변화

실험1과 같은 방법으로 3개의 집단을 만들어 조건화 반응을 유도하였다. 조건화 반응을 측정하는 날에 리튬의 영향을 보기위해 각각의 그룹 내에 생리식염수 또는 리튬을 주사 받는 세부집단으로 각각 나눔으로, 결국 총 6개의 집단으로 나누어 보행성 활동량을 측정하였다. 보행성 활동량 측정이 끝남과 동시에 마취 없이 decapitation을 하여 뇌를 꺼내고, 빠른 속도로 얼음 위에서 coronal section(1.0 mm thick)으로 뇌를 얇게 잘라주었다. 그 중에서 중격측좌핵의 각층과 중심층을 잘라낸 후 -80℃로 급랭하여 보관한 다음, 그 후에 단백질을 분리하여, Akt-GSK3β의 인산화 수준을 western blot으로 분석하였다.



6. 통계분석

모든 자료는 평균±표준오차로 표시하고, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의미한 것으로 간주한다. 여러 그룹간의 비교는 t-test, one-way와 two-way ANOVA(analysis of variance)로 분석한 뒤 post hoc Bonferroni방법으로 비교하였다.

Ⅲ. 결과

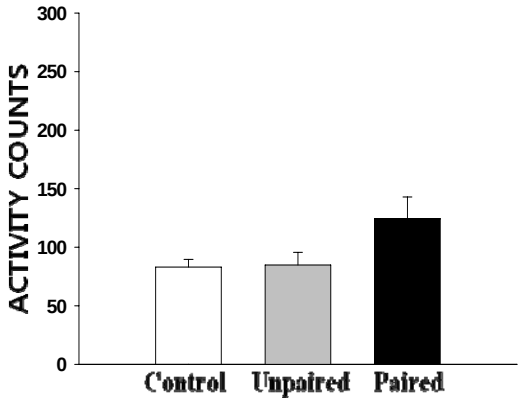
실험 1. 암페타민에 의해 유도된 조건화 반응이 중격측좌핵 각층과 중심층 내의 Akt-GSK3β 신호전달에 미치는 영향

그림1과 2는 암페타민을 이용한 조건화 반응 모델을 만든 뒤 1주일간의 약물을 주입하지 않는 휴식기간을 거치고 모든 집단에게 보행성 활동량 측정상자에서 생리식염수(1 mg/kg, IP)를 복강주사 한 다음 각각 10분과 60분으로 나누어 보행성 활동량 측정을 한 결과를 보여준다. 그 결과 10분에서는 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 그룹에서 보행성 활동량의 증가가 유의미하게 나타나지 않았지만, 60분을 측정한 집단 중 짝지어진 집단에서만 짝지어지지 않은 집단과 대조집단보다 수평운동 및 수직운동이 유의미하게 증가한 것을 확인할 수 있었다($p<0.05$; one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni t-test에 의한 비교).

그림3과 4는 10분과 60분 보행성 활동량 측정을 마친 후에 마취 없이 decapitation을 하여 뇌를 꺼내고 중격측좌핵 각층과 중심층의 조직을 취하여 western blot의 실험방법으로 Akt, GSK3β의 인산화 정도를 10분과 60분으로 나누어 나타내었다. 그 결과 10분에서는 Akt, GSK3β 둘 다 집단간의 차이가 없지만, 60분에서는 각층의 경우 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단을 보행성 활동량 측정상자와 짝지어지지 않은 집단과 대조 집단 각각을 비교하였을 경우 Akt에서 집단간의 차이가 없지만, GSK3β는 유의미하게 감소되었음을 확인할 수 있었다($p<0.01$; one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni t-test에 의한 비교). 중격측좌핵 중심층에서는 GSK3β가

감소하는 경향을 보이기는 하였으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다.

가. 수평행동



나. 수직행동

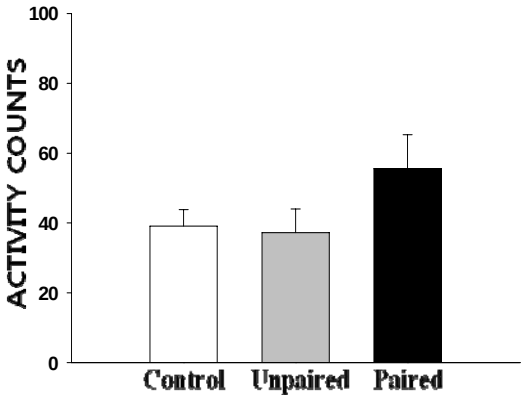
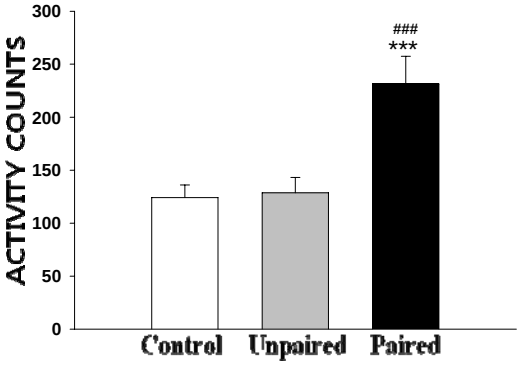


그림 1. 집단간의 조건화 반응 보행성 활동량 측정결과(10분). 각 그룹간에 유의미한 차이는 나타나지 않았다.

가. 수평행동


ACTIVITY COUNTS
300
250
200
150
100
50
0
###
***
Control
Unpaired
Paired

나. 수직행동

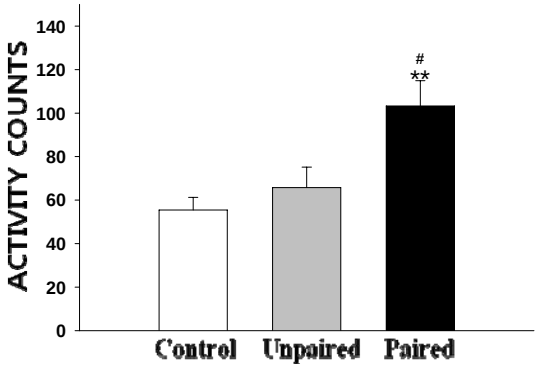
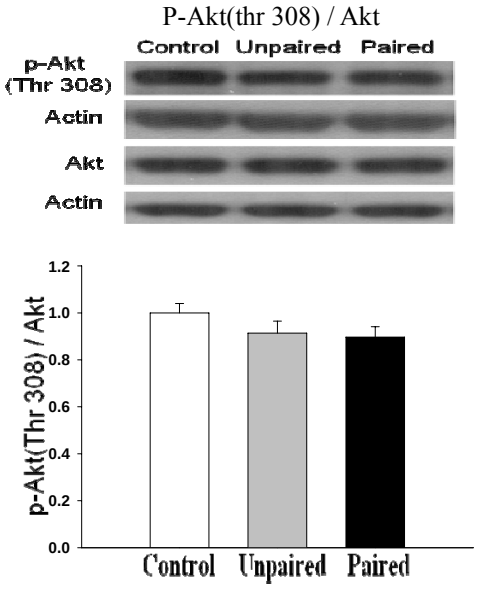
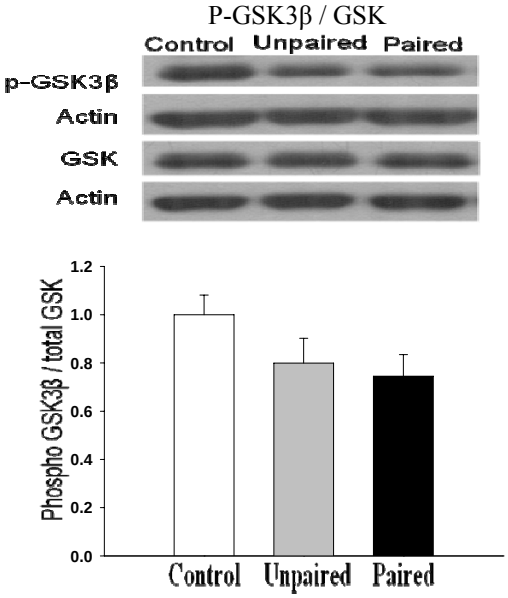

ACTIVITY COUNTS
140
120
100
80
60
40
20
0
#
**
Control
Unpaired
Paired

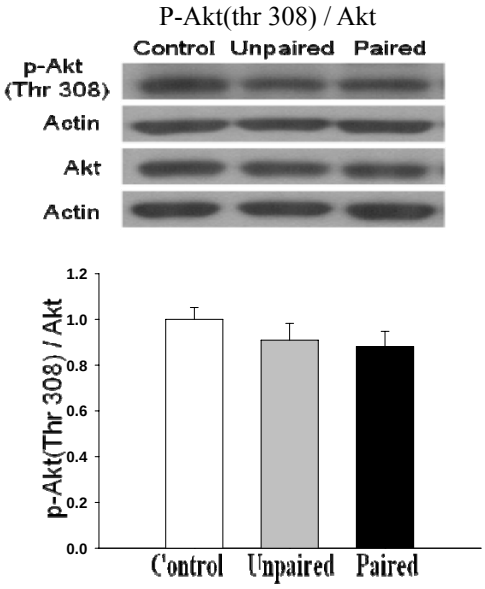
그림 2. 집단간의 조건화 반응 보행성 활동량 측정결과(60분). 모두 보행성 활동량 측정 전에 생리식염수(1 mg/kg, IP)를 주사하였다. **p<0.01, ***p<0.001(대조군과 짝지은 군 비교, n=15 per group), #p<0.05, ###, p<0.001(짝짓지 않은 군과 짝지은 군 비교, n=15 per group) 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단을 보행성 활동량 측정상자와 짝지어지지 않은 집단과 대조집단을 놓고 비교하였을 경우 60분 측정한 집단에서 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단의 수평행동 및, 수직행동이 유의미하게 증가하였음을 확인할 수 있었다.

가. 중심층(core)





나. 각층(shell)



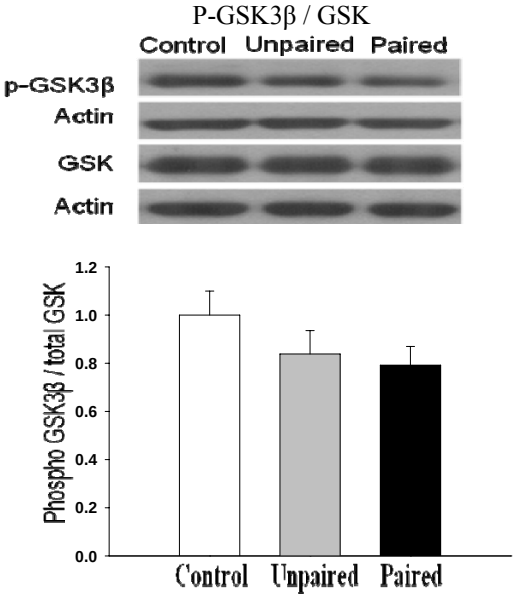
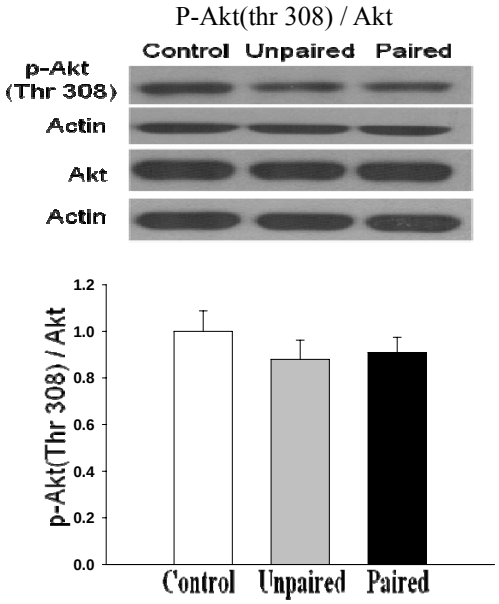
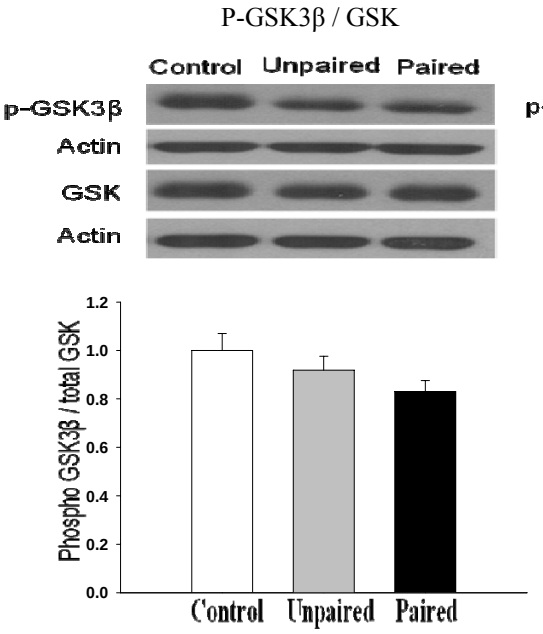


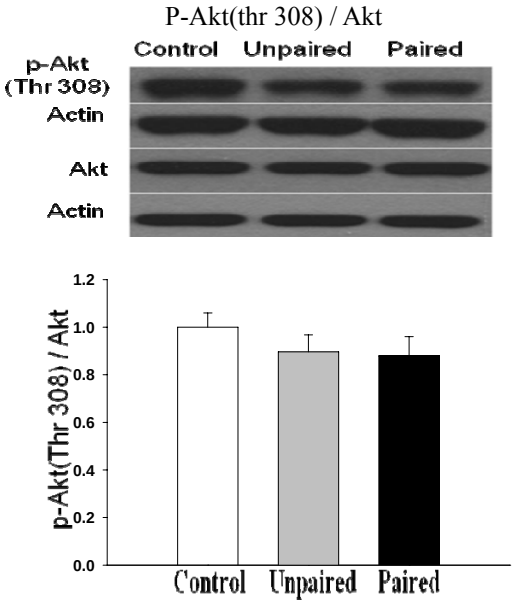
그림 3. 조건화 보행성 활동량 측정 10분 후 각 집단간의 Akt, GSK3β의 인산화 정도. 각 그룹간에 유의미한 차이는 발견되지 않았다.

가. 중심층(core)





나. 각층(shell)



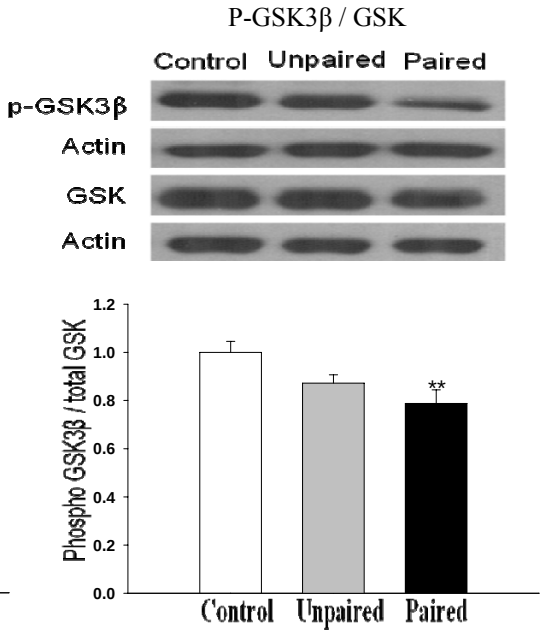


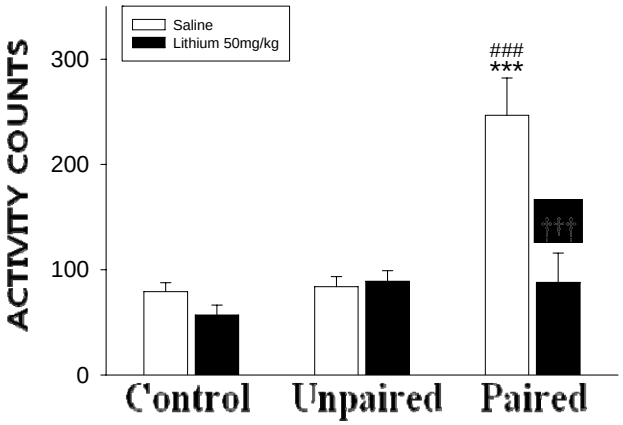
그림 4. 조건화 보행성 활동량 측정 60분 후 각 집단간의 Akt, GSK3β의 인산화 정도. 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단을 보행성 활동량 측정상자와 짝지어지지 않은 집단과 대조집단 각각을 비교하였을 경우 Akt에서 집단간의 차이가 없었지만, GSK3β는 각층에서 유의미하게 감소되었음을 확인할 수 있었다 (**$p<0.01$, n=15 per group). 정량 단백질 보정은 β-actin으로 보정하였다.

실험 2. 암페타민에 의해 유도된 조건화 반응에서 GSK3β의 억제제인 리튬을 주었을 때의 변화

그림5는 앞에서 기술한 실험1과 마찬가지로 암페타민을 이용한 조건화 반응 모델을 만든 뒤 1주일간의 약물을 주입하지 않는 휴식기간을 거치고, 각 집단을 다시 둘로 나누어 보행성 활동량 측정상자에서 생리식염수(1 mg/kg, IP) 또는 리튬(1 mg/kg, IP)을 복강주사 한 다음 60분 동안 보행성 활동량 측정을 하였다. 그 결과 생리식염수만 주입한 쥐 중 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단은 보행성 활동량 측정상자와 짝지어지지 않은 집단과 대조집단을 각각 비교하였을 경우 수평행동 및 수직행동이 모두 유의미하게 증가하였음을 확인할 수 있었다($p<0.001$; two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni t-test에 의한 비교). 그러나 리튬을 투여한 집단의 조건화된 보행성 활동량은 생리식염수를 맞은 집단에 비하여 유의미하게 감소하였음을 확인할 수 있었다. 즉 보행성 활동량 상자와 짝지어진 집단의 조건화 반응이 리튬에 의해서 억제되어 짐을 확인할 수 있었다($p<0.001$; two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni t-test에 의한 비교).

한편, 그림6은 같은 조건으로 각 집단으로부터 중격측좌핵 각층과 중심층을 분리한 다음 Akt-GSK3β의 인산화 수준을 비교한 결과를 보여준다. 앞서 기술한 실험1의 결과와 마찬가지로 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단의 경우 중격측좌핵 각층에서 GSK3β의 인산화 수준이 감소하는 경향이 나타남을 알 수 있었다. 하지만, 리튬을 투여했을 때는 이러한 GSK3β의 인산화 수준의 감소가 더 이상 관찰되지 않고 대조군 수준으로 회복되어지는 경향을 관찰할 수 있었다.

가. 수평행동


Saline
Lithium 50mg/kg
ACTIVITY COUNTS
300
200
100
0
###
***
Control
Unpaired
Paired

나. 수직행동

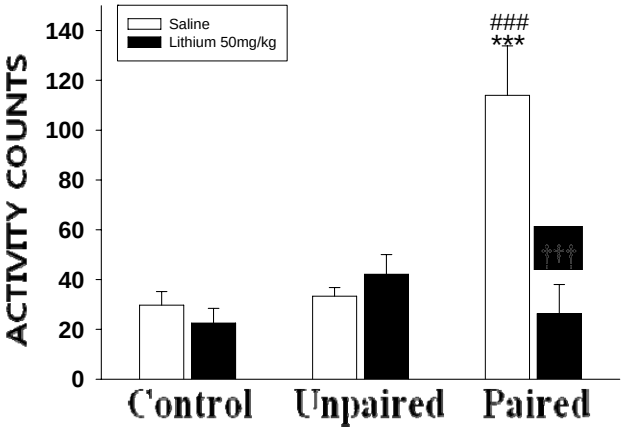
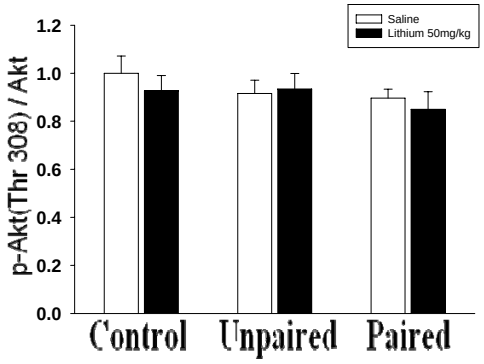

Saline
Lithium 50mg/kg
ACTIVITY COUNTS
140
120
100
80
60
40
20
0
###
***
Control
Unpaired
Paired

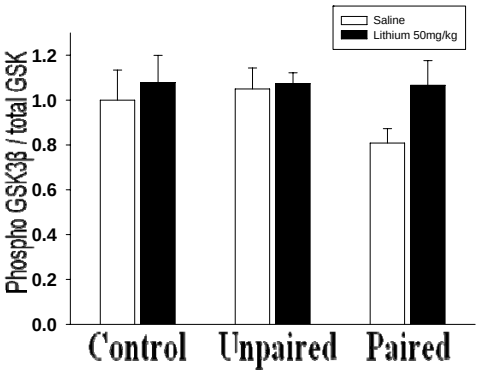
그림 5. GSK3β의 억제제인 리튬을 주사하고 60분 후 집단간의 조건화 반응 보행성 활동량 측정결과. 각각의 집단에게 보행성 활동량 측정 전에 생리식염수 또는 리튬 (50 mg/kg, IP)를 주사하였다. 생리식염수만 주입한 쥐 중 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단을 보행성 활동량 측정상자와 짝지어지지 않은 집단과 대조집단을 놓고 비교하였을 경우 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단의 수평행동 및 수직행동이 유의미하게 증가하였음을 확인할 수 있었다 (*** $p<0.001$, 대조군과 짝지은 군 비교, ### $p<0.001$, 짝짓지 않은 군과 짝지은 군 비교). 또한 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단 만 비교할 경우 리튬을 맞은 집단의 보행성 활동량이 생리식염수를 맞은 집단의 보행성 활동량에 비하여 유의미하게 감소하였음을 확인할 수 있었다(††† $p<0.001$, 짝지은 군-생리식염수와 짝지은 군-리튬 비교)(그룹별 마리수: 대조군-생리식염수(8), 대조군-리튬(8), 짝짓지 않은 군-생리식염수(7), 짝짓지 않은 군-리튬(8), 짝지은 군-생리식염수(7), 짝지은 군-리튬(8)).

가. 중심층(core)

P-Akt(thr 308) / Akt

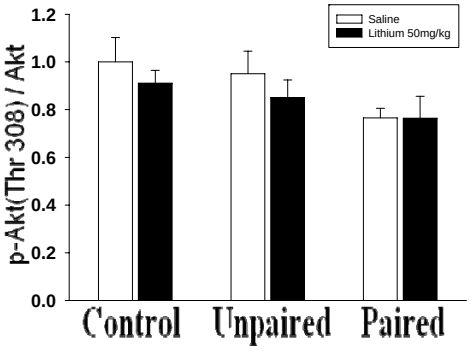


P-GSK3β / GSK



나. 각층(shell)

P-Akt(thr 308) / Akt



P-GSK3β / GSK

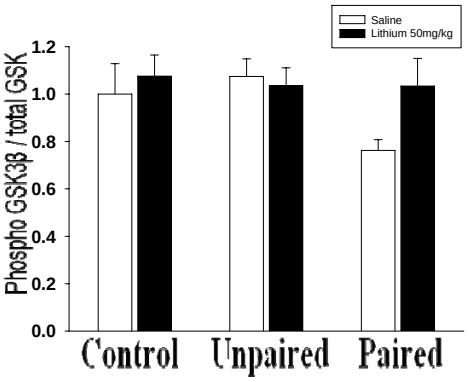


그림 6. GSK3β의 억제제인 리튬을 주사하고 60분 후 Akt, GSK3β의 인산화 정도. 보행성 활동량 측정상자와 짝지어진 집단의 경우 중격 측좌핵 각층에서 GSK3β의 인산화 수준이 감소하는 경향이 나타났다. 한편, 리튬을 주었을 때는 이러한 효과가 사라지고, 대조군과 같은 수준으로 회복되어지는 경향이 나타났다(그룹별 마리수: 대조군-생리식염수(8), 대조군-리튬(8), 짝짓지 않은 군-생리식염수(7), 짝짓지 않은 군-리튬(8), 짝지은 군-생리식염수(7), 짝지은 군-리튬(8)).

Ⅳ. 고찰

본 연구결과를 통해 암페타민을 이용하여 특정환경과 짝지어진 동물모델에서 조건화 반응이 나타날 때 중격측좌핵 각층 내에 있는 GSK3β 단백질이 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. GSK3β는 세포의 성장과 생존, 그리고 구조의 변화에 관련이 되어있으며 신경세포에 많은 양이 존재하는 단백질로 보고되어 있다[31,32]. 또한 GSK3β는 도파민분비성 약물이나 도파민과 짝지어진 행동발현에 관여하는 Akt-GSK3β의 신호전달과도 관련되어있음이 보고 되었다[27]. 최근 들어 보고된 연구 결과로 cAMP에 의존하지 않고 느리게 지속적으로 활성화되는 D2-수용체가 주목되어지고 있다[25]. 한 예로 선조체(striatum)에서의 경우 증가된 도파민에 의해 시간차를 두고 D2-수용체까지 느리게 활성화 되면서 결국 Akt-GSK3β 신호전달계를 활성화시킨다는 보고가 있다[27,28]. 이번 연구에서도 GSK3β의 활성은 10분 에서는 나타나지 않고, 60분 후에 관찰되어 이러한 가능성을 뒷받침한다.

중격측좌핵은 각층과 중심층이 해부학적으로나 기능적으로 각기 다른 체제를 이루고 있다[21,22]. 이번 연구결과에서도 암페타민으로 조건화 반응을 유도하였을 때 각각의 부위에서 GSK3β의 인산화 수준이 차등적으로 나타남을 관찰하였는데, 이러한 결과가 실제적으로 조건화된 보행성 활동량의 발현에 직접적으로 어떤 관련이 있는지는 앞으로 더 많은 연구를 필요로 한다. 일반적으로 조건화된 보행성 활동량의 발현 그 자체는 중격측좌핵 중심층을 통해서 매개되는 것으로 알려져 있으며, 각층은 약물의 보상기전을 강화시켜 행동과민반응을 유도한다고 알려져 있다. 한 연구에서는 14일간 코카인을 지속적으로

주었을 경우 중격측좌핵 중심층에서 GSK3β의 인산화 수준이 감소되었다는 보고가 있었다[33]. 본 연구결과에서는 암페타민으로 조건화 반응을 유도하고 약물 없이 조건화 반응을 측정한 뒤 60분 후에 GSK3β의 인산화 수준을 측정한 것이기 때문에, 그 결과는 다를 수 있다. 아마도 본 연구에서 관찰된 결과는 조건화 반응의 발현에 직접적으로 관여한다기 보다는 그 결과로서 나타나는 현상일 가능성이 있으며, 중심층이 아닌 각층에서만 유의미한 결과가 나온 것으로 보아 아마도 암페타민으로 유도한 조건화 반응의 보상작용과 관련한 어떤 기전에 작용할 수도 있다고 생각된다.

한편, 본 연구에서 조건화 반응으로 증가된 보행성 활동량은 리튬을 투여하게 되면 억제가 될 뿐만 아니라 그때 각층에서 감소되었던 GSK3β의 인산화 수준 또한 대조군 수준으로 회복됨을 관찰하였다. 리튬은 문헌에 나타난 대로 GSK3β의 억제제 역할을 하기 때문에 조건화된 보행성 활동량을 억제시킬 수 있다고 생각되며, 정확히 어떤 분자기전을 통해 GSK3β의 인산화 수준을 회복시키는지 알기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다.

Ⅴ. 결론

본 연구결과를 통하여 암페타민을 이용하여 특정환경과 짝지어진 동물모델에서의 조건화 반응으로 인한 보행성 활동량 발현에 중격측좌핵 각층 내에 있는 GSK3β 단백질이 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한 GSK3β 단백질은 중격측좌핵 각층부위에서 빠른 활성(10분)이 아닌 느리고 지속적인 활성(60분)으로 암페타민과 짝지어진 환경에 대한 조건화 반응을 나타낸다고 생각된다. 현재까지 중격측좌핵 내에서 암페타민에 의한 조건화 반응의 분자적 기전은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 그러므로 조건화 반응에서 GSK3β의 분자적인 기전연구는 약물중독을 이해하는데 중요한 열쇠가 될 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Domjan M. Pavlovian conditioning: a functional perspective. Annu Rev Psychol 2005;56:179-206.

2. Childress AR, McLellan AT, O'Brien CP. Abstinent opiate abusers exhibit conditioned craving, conditioned withdrawal and reductions in both through extinction. Br J Addict 1986;81:655-60.

3. O'Brien CP, Childress AR, McLellan AT, Ehrman R. Classical conditioning in drug dependent humans. Ann N Y Acad Sci 1992;654:400-15.

4. Anagnostaras SG, Schallert T, Robinson TE. Memory processes governing amphetamine-induced psychomotor sensitization. Neuropsychopharmacology 2002;26:703-15.

5. DiCiano P, Blaha CD, Phillips AG. The relation between dopamine oxidation currents in the nucleus accumbens and conditioned increases in motor activity in rats following repeated administration of D-amphetamine or cocaine. Eur J Neurosci 1988;10:1113-20.

6. Franklin TR, Druhan JP. Involvement of the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex in the expression of conditioned hyperactivity to a cocaine-associated environment in rats. Neuropsychopharmacology 2000;23:633-44.

7. Sellings LH, Clarke PB. 6-Hydroxydopamine lesions of nucleus accumbens core abolish amphetamine-induced conditioned activity. Synapse 2006;59:374-7.

8. Stewart J, de Wit H, Eikelboom R. Role of unconditioned and conditioned drug effects in the self-administration of opiates and stimulants. Psychol Rev 1984;91:251-68.

9. Stewart J, Vezina P. Conditioning and behavioral sensitization. In: Kalivas PW, Barnes CD, editors. Sensitization in the nervous system. Caldwell, NJ: Telford press;1988.p.207-24.

10. Kim WY, Vezina P, Kim JH. Blockade of group II, but not group I, mGluRs in the rat nucleus accumbens inhibits the expression of conditioned hyperactivity in an amphetamine-associated environment. Behav Brain Res 2008;191:62-6.

11. Franklin TR, Druhan JP. Involvement of the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex in the expression of conditioned hyperactivity to a cocaine-associated environment in rats. Neuropsychopharmacology 2000;23:633-44.

12. Yoon HS, Jang JK, Kim JH. Blockade of group II metabotropic glutamate receptors produces hyper-locomotion in cocaine pre-exposed rats by interactions with dopamine receptors. Neuropharmacology 2008;55:555-9.

13. Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. Brain Res Brain Res Rev 1993;18:247-91.

14. Perugini M, Vezina P. Amphetamine administered to the ventral tegmental area sensitizes rats to the locomotor effects of nucleus accumbens amphetamine.

J Pharmacol Exp Ther 1994;270:690-6.

15. Cador M, Bjijou Y, Stinus L. Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine. Neuroscience 1995;65:385-95.

16. Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:5274-8.

17. Robledo P, Maldonado-Lopez R, Koob GF. Role of dopamine receptors in the nucleus accumbens in the rewarding properties of cocaine. Ann N Y Acad Sci 1992;654:509-12.

18. Fontana DJ, Post RM, Pert A. Conditioned increases in mesolimbic dopamine overflow by stimuli associated with cocaine. Brain Res 1993;629:31-9.

19. Franklin TR, Druhan JP. Expression of Fos-related antigens in the nucleus accumbens and associated regions following exposure to a cocaine-paired environment. Eur J Neurosci 2000;12:2097-106.

20. Field M, Schoenmakers T, Wiers RW. Cognitive processes in alcohol binges: a review and research agenda. Curr Drug Abuse Rev 2008;1:263-79.

21. Jongen-Relo AL, Groenewegen HJ, Voorn P. Evidence for a multi-compartmental histochemical organization of the nucleus accumbens in the rat. J Comp Neurol 1993;337:267-76.

22. Zahm DS. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. Neurosci Biobehav Rev 2000;24:85-105.

23. Fuchs RA, Evans KA, Parker MP, See RE. Differential involvement of Orbitofrontal cortex subregions in conditioned cue-induced and cocaine-primed reinstatement of cocaine seeking in rats. J Neurosci 2004;24:6600-10.

24. Parkinson JA, Olmstead MC, Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ. Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. J Neurosci 1999;19:2401-11.

25. Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. Dopamine receptor signaling. J Recept Signal Transduct Res 2004;24:165-205.

26. Chen JC, Chen PC, Chiang YC. Molecular mechanisms of psychostimulant addiction. Chang Gung Med J 2009;32:148-54.

27. Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG. The Akt-GSK-3 signaling Cascade in the actions of dopamine. Trends Pharmacol Sci 2007;28:166-72.

28. Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:5099-104.

29. Beaulieu JM, Caron MG. Looking at lithium: molecular moods and complex behaviour. Mol Interv 2008;8:230-41.

30. Phiel CJ, Klein PS. Molecular targets of lithium action. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001;41:789-813.

31. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. J Cell Sci 2003;116:1175-86.

32. Alonso M, Martinez A. GSK-3 inhibitors: discoveries and developments. Curr Med Chem 2004;11:755-63.

33. Cadoni C, Solinas M, Di Chiara G. Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. Eur J Pharmacol 2000;388:69-76.

ABSTRACT

The role of Akt-GSK3β signaling in the nucleus accumbens in the expression of amphetamine-induced conditioned hyperactivity.

Joong Keun Shin

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeong-Hoon Kim)

A distinct environment associated with psychomotor stimulants like amphetamine (AMPH) and cocaine can elicit conditioned locomotion in rats. It has been shown in the striatum that dopamine (DA) influences Akt-GSK3β signaling in a delayed and long-lasting fashion. In this study, I examined the effects of the expression of conditioned locomotion in an AMPH-associated environment on the phosphorylation levels for GSK3β in the nucleus accumbens (NAcc) core and shell at different time points. Rats in different groups were administered injections in five 2-days blocks: Paired, AMPH (1 mg/kg, IP) in locomotor activity boxes on day 1 and saline in their home cages on day 2; Unpaired, saline in the activity boxes on day 1 and AMPH in their home cages on day 2; or Control, saline in both environments. One week after the last conditioning block, all rats were tested for their conditioned locomotor response in the activity boxes for either 10 or 60 min following an IP saline. As expected, Paired rats showed increased locomotor activity compared to rats in either Unpaired or Control groups. Rats were then decapitated after 10 and 60 min, respectively. When proteins from the NAcc core and shell tissues

were analyzed by Westernblot, it was found that the ratio of the phosphorylation levels to the total amount of GSK3β was significantly decreased in the NAcc shell in only Paired group after 60 min. Further, when lithium chloride (50mg/kg), a GSK3β inhibitor, was given before conditioned locomotor activity test, the expression of these conditioned hyper-locomotion and the decrease of p-GSK3β were both inhibited by lithium chloride. These results suggest that GSK3β in the NAcc shell contributes to the expression of conditioned locomotion in an environment associated with amphetamine.

Key words : Amphetamine, Conditioned locomotion, GSK3β, Lithium, Nucleus accumbens