

랫트의 청 소 년 기
dextromethorphan 투 여 에 의 한
뇌 기 능 변 동 에 관 한 연 구

연 세 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

조 희 정

랫트의 청 소 년 기
dextromethorphan 투 여 에 의 한
뇌 기 능 변 동 에 관 한 연 구

연 세 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

조 희 정

랫트의 청소년기
dextromethorphan 투여에 의한
뇌기능 변동에 관한 연구

지도교수 장 정 원

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함
2004 년 6 월 일

연세대학교 대학원
의과학과
조 희 정

조희정의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2004 년 6 월 일

감사의 글

문득 어릴 적 생각이 납니다. 시간이 흘러 빨리 어른이 됐으면 좋겠다는 생각을 했었습니다. 그렇게 빨리 흘러가기만을 바랬던 세월인데, 이제는 흘러가는 시간을 되레 붙잡고 싶은 마음이 드는 건 왜인지...?

대학원에서 보낸 2년이라는 시간도 어느새 지나가고, 아쉬움을 뒤로하며 실험실 생활을 마치게 되었습니다. 진정으로 과학을 사랑하는 방법을 가르쳐 주신 지도 교수님이신 장 정 원 교수님께 먼저 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 약리학교실을 이끌어 가시며, 항상 밝은 미소로 대해 주시고 보살피 주신 김 동 구 교수님, 진심으로 감사드립니다. 또한 김경환 교수님, 안영수 교수님, 김혜영 교수님, 이민구 교수님, 박경수 교수님께 그동안의 염려와 노고에 머리 숙여 감사드립니다. 그리고 이주영 선생님을 비롯해 같은 실험실에서 동고동락을 함께 했던 소중한 실험실 식구들... 곧 미국으로 유학을 떠나게 될 그래서 많이 그리워 질 시호오빠, 랩 쓰리를 항상 챙기고 이끈 형진언니, 지금은 아기엄마가 된 윤미언니, 꽃미남 민수오빠, 마음이 너무 따뜻한 재구오빠, 너무나 자유분방한 삶을 살아가는 재우오빠, 한결같이 든직한 남열오빠, 이쁜막내 미주, 그리고 짧은 만남이었지만 인상이 좋았던 유상배 선생님에게도 고마운 마음을 전합니다. 그리고 지금은 원광의대 약리학교실에 계시는 대학원 생활 초기에 연구자로서의 마음가짐을 심어주신 이서울 선생님, 또 동물실험을 하는데 있어 많은 도움을 주신 김건태 선생님, 진심으로 감사합니다. 마지막으로 연세의대 약리학교실에 계시는 여러 선·후배 선생님들께도 같은 마음을 전합니다.

늘 정신적인 동반자가 되어주시고, 세상에서 가장 존경하고 사랑하는 아버지, 어머니께 그동안의 노고와 사랑에 가슴깊이 감사드립니다. 또 멀리서 나의 고민을 함께 해 준, 하나밖에 없는 재성오빠에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

사회로의 첫발을 내딛게 될 2004년은 인생에 있어 영원히 잊혀지지 않을 한 해로 기억될 것이고, 언제 어디서라도 연세의대 약리학교실에서 보낸 지난 2년의 시간들은 나의 인생에 있어 가장 소중한 기억으로 남아 있을 것입니다.

이천사년 유월... 여름의 중턱에서, hee貞 씀.

차 례

국문 요약	1
I. 서 론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 실험동물	7
2. 약물처리	8
3. 행동검색	9
가. 수중미로 학습검사 (Morris water maze test)	9
나. 방사상미로 학습검사 (Radial arm maze test)	11
4. 조직검색	13
가. NMDAR1 면역조직화학법	13
나. Cresyl violet 염색법	14
다. Western Blot	14
5. 통계학적 분석	16
III. 결 과	17
1. 수컷 랫트의 청소년기 dextromethorphan에 의한 기억력 손상에 대한 glucocorticoid의 효과	17
가. 수중미로 학습	17

나. 방사상미로학습	19
다. NMDAR1 면역조직 활성화도	21
라. Cresyl violet 염색	22
마. NMDAR1 western blot	23
2. 암컷 랫트의 청소년기 dextromethorphan에 의한 기억력 손상에 대한 난소의 역할	25
가. 수중미로학습	25
나. NMDAR1 면역조직 활성화도	27
다. NMDAR1 western blot	29
IV. 고 찰	31
V. 결 론	37
참고문헌	38
영문요약	48

그림 차례

그림 1. 공간지각 학습검사 (Morris water maze test) 실험모식도	10
그림 2. 방사상미로 학습검사 (Radial arm maze test) 진행순서 ...	12
그림 3. 수컷 랫트의 수중미로 학습에서 DM과 GC의 효과	18
그림 4. 수컷 랫트의 방사상미로 학습검사	20
그림 5. 수컷 랫트 해마의 NMDAR1 면역조직 화학상	21
그림 6. 수컷 랫트 해마의 Cresyl violet 염색상	22
그림 7. 수컷 랫트 전전두엽피질과 해마에서의 NMDAR1 western blot	23,24
그림 8. 암컷 랫트의 공간지각 학습검사	26
그림 9. 암컷 랫트 해마의 NMDAR1 면역조직 화학상	28
그림 10. 암컷 랫트 전전두엽피질과 해마의 NMDAR1 western blot	29,30

랫트의 청소년기 dextromethorphan 투여에 의한 뇌기능 변동에 관한 연구

Dextromethorphan (DM) 은 1950년부터 비의존성 진해제로 널리 사용되면서 안정성이 입증된 약물이다. 그러나 청소년층 사이에서 DM의 대량투여로 인한 환각작용이 인지되었고, 최근에는 한국 청소년층에서도 남용사례의 심각성이 보고되었다. DM은 흥분성 아미노산 수용체중 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 수용체의 비경쟁적 억제제이다. NMDA 수용체 억제제는 뇌의 해마부위에서 주도되는 학습기능에 저해 효과를 초래하며, 어린시기의 반복적 투여는 학습과 기억능력에 있어서 영구적 장애를 초래한다는 보고들이 있다. 따라서, 청소년기 DM의 남용(과량의 반복적 투여)에 의한 학습과 기억능력의 장애효과를 예측할 수 있으나, 지금까지 이에 대해 보고된 바는 없다. Glucocorticoid와 estrogen은 해마 신경세포의 기능에 대해 보호 또는 유해 효과를 나타내는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 DM 남용이 청소년기 뇌신경계에 미치는 유해효과와 이에 대한 glucocorticoid 및 난소호르몬의 역할을 조사하였다.

DM의 유해효과에 대한 glucocorticoid의 영향을 알아보기 위해 생후 4주의 수컷 랫트에게 10일간 DM을 투여한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 투여하였다. 또한 난소가 적출된 암컷 랫트에서 DM의 학습장애효과를 검색함으로써 해마기능에 대한 estrogen의 영향을 살펴 보았다.

학습장애 효과는 수중미로학습과 방사상미로학습 행동으로 조사하였고, 각 실험군의 해마부위에서 NMDA 수용체의 필수적 소단위인

NMDAR1 발현변화를 면역조직화학법과 western blot 방법으로 분석하였다.

본 연구의 결과는 다음과 같다.

- 수컷 랫트의 청소년기 dextromethorphan에 의한 기억력 손상에 대한 glucocorticoid의 효과
 1. 생후 90일에 수중미로학습을 실시한 결과, DM 투여군에서 기억력 손상효과 관찰되었으며, corticosterone 투여에 의해 이러한 기억력 손상효과가 회복된 것으로 나타났다.
 2. 해마의 NMDAR1 western blot 결과, DM군에서 NMDAR1 발현이 증가되었으며, 이러한 증가는 corticosterone 투여에 의해 억제되었다.
 3. 방사상미로학습 행동검색에서는 실험군과 대조군간의 유의한 차이가 관찰되지 않았다.
 4. 해마의 조직검사 소견에서 신경세포의 형태 및 분포양상은 각 군간의 차이는 관찰되지 않았다.
- 암컷 랫트의 청소년기 dextromethorphan에 의한 기억력 손상에 대한 난소의 역할
 1. 생후 38일에 수중미로학습을 실시한 결과, DM 투여군에서 기억력 손상효과가 관찰되었으며, 난소 적출군에서는 DM에 의한 기억력 손상효과가 나타나지 않았다.
 2. Estradiol이 공급된 난소 적출군에서는 DM에 의한 기억력 손상효과가 관찰되었다.

3. 해마의 NMDAR1 western blot 결과, DM 투여군에서 NMDAR1 단백질 발현이 대조군에 비해 증가하였다.
4. 난소적출군의 NMDAR1 발현양상에는 DM의 효과가 나타나지 않았다.
5. Estradiol이 공급된 난소 적출군의 NMDAR1 발현양상에서도 DM의 효과는 관찰되지 않았다.

본 연구결과를 종합해 보면, 청소년 시기의 DM 경험은 기억능력의 장기적 손상을 초래할 수 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 기억능력의 장애효과는 해마부위에서 NMDA 수용체 발현의 변화와 관련이 있을 것으로 사료되었다. 또한 암컷 랫트의 연구결과로부터, DM의 약물작용에 대한 estrogen 효과는 NMDA 수용체 발현변화와 무관한 것으로 보이며, 그 상세작용기전은 추가연구를 통해 규명되어야 할 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : dextromethorphan, 약물남용, 학습과 기억, 해마, NMDA 수용체, Morris water maze, corticosterone, estrogen

랫트의 청소년기 dextromethorphan 투여에 의한 뇌기능 변동에 관한 연구

< 지도교수 장 정 원 >

연세대학교 대학원 의과학과

조 희 정

I. 서 론

덱스트로메토르펜 (DM) 은 일반감기약 (진해제) 성분으로서,¹ 뇌의 중추에 직접 작용하여 코데인과 같은 진해효과가 있으며, glutamate 수용체의 이성체인 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 에 대한 낮은 친화성을 갖는 저해제로,² 흥분성 아미노산 수용체인 NMDA 수용체의 비경쟁적 억제제이다. 근래에는 신정보호 및 항 간질효과를 나타내어 퇴행성 신경질환, 만성통증, 간질 등의 잠정적 치료제로서 임상적으로 연구되고 있다.^{1,3} 한편, 우리나라를 포함한 몇몇 나라들에서 DM의 남용사례와 그 부작용의 심각성이 보고되었으며, 이러한 남용사례는 청소년층에서 심각한 것으로 보고되었다.⁴ 랫트에서 DM이 뇌신경계의 도파민 보상회로를 활성화시키며, behavioral sensitization을 유도한다고 보고됨으로써 남용약물로서의 작용기전이 검증되었다.⁵⁻⁷

뇌의 해마영역에 의한 학습행동에 있어서 NMDA 수용체는 중요한 역할을 한다.⁸ 전형적인 해마매개 학습행동인 수중미로학습검색에서 NMDA 수

용체 억제제의 저해효과가 보고되었다.^{9,10} 또한 해마는 glucocorticoid 수용체가 밀집하게 분포하고 있는 뇌의 영역이기도 하다.^{11,12} 학습행동과 스트레스와 관련해 스트레스 호르몬인 glucocorticoid는 뇌 기능 조절에 양면성을 나타내는데, 특히 해마 부위에서 이와 같은 양극현상이 뚜렷하게 나타남이 보고되었다.^{13,14} Corticosterone은 해마 뉴론을 통한 뇌기능 조절에 관여하며,¹⁵⁻¹⁷ 공간학습에 있어 뇌의 전전두엽피질에서 수상돌기의 밀도를 증가시키는 것으로 보고되었다.¹⁸ 또한 스트레스는 시냅스 가소성 (synaptic plasticity) 에 영향을 미치며,^{19,20} 해마를 통한 기억형성에 있어 중요한 요소로 작용함이 보고되었다.^{21,22}

DM 투여는 생리적으로 스트레스 효과를 유발하며 반복 투여시 해마세포의 손상으로 인한 학습장애 효과를 나타낼 수 있으며, 해마는 스트레스 대응축인 HPA axis (hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis) 에 대해 조절기능을 갖는 것으로 알려진 바,^{23,24} 청소년기의 약물남용으로 인한 해마손상은 HPA axis의 영구적 변동을 초래할 수 있다. 스트레스에 의한 해마손상은 NMDA 수용체가 매개되는 과정으로 보이며,²⁵ 청소년기 DM의 장기투여 후 중·장년기에 이르러 수중미로 학습을 검색한 결과, 수컷 랫트에서는 reversal trail에서, 암컷 랫트에서는 probe test에서 기억력 손상이 나타남이 발견되었다.²⁶ 위와 같이 생물학적 측면에서 약물남용에 대한 성별간의 차이에 관한 보고들이 있다.^{27,28} 또한 본 실험의 예비실험에서 DM 반복투여에 의한 NMDA 수용체 면역조직 활성화도 증가는 암컷의 경우, 더욱 현저한 것을 관찰할 수 있었다. 수중미로 학습검색 결과, probe test와 reversal trail에서 기억력 손상이 수컷 랫트에 비해 암컷 랫트에서 현저한 것을 관찰하였다. 즉 암컷 랫트는 수컷에 비해 DM에 대해 높은 민감도(behavioral sensitization)를 보였으며, DM 반복투여에 의한 신경화학적 변동도 암컷에서 더욱 뚜렷하게 관찰되었다.

장기간의 corticosterone의 투여가 내측 전전두엽피질 (medial prefrontal cortex ; mPFC) 에서 피라미드 뉴론의 수상돌기 재생에 관여함이 보고되

어 있다.¹⁸ 부신 스테로이드 호르몬은 또한 해마의 치아이랑 (dentate gyrus) 발달에 있어 NMDA 수용체와 함께 세포복제를 조절한다.^{29,30} 이러한 스트레스의 경험은 HPA axis에 의해 대부분 조절되는데, HPA axis는 성별에 따라 달리 작용한다고 알려져 있다.^{28,31} 암컷 랫트의 경우, 휴지기에 더 높은 corticosterone level을 나타내며 주행성의 변화 및 adrenocorticotropin과 corticosterone level이 수컷 랫트보다 더 높게 나타난다. NMDA, AMPA 수용체 억제제에 대한 corticosterone의 효과는 또한 장기증강 (Long-term potentiation, LTP) 을 증진시킨다.³² 학습과 기억 형성에 관여하는 해마기능에 있어서 corticosteroid의 영향에 대한 보고는 논쟁의 여지가 있다.¹³ 시냅스 가소성 (synaptic plasticity) 은 기억과 학습에 대한 세포차원에서 그 기전을 밝히는데 등장되어진 개념으로서,^{19,20,33} 외부로부터 들어온 신호가 시냅스 하나의 점유를 강하게 자극하여, 장기증강 (LTP) 을 구축하게 된다.³⁴ 이러한 장기증강 (LTP) 은 활성화된 시냅스 가소성 (synaptic plasticity) 의 한가지 형태이며,³⁵ 이것은 주로 해마에서 일어나게 된다. 해마의 CA1 영역에서 생성되어진 장기증강 (LTP) 은 동시에, 전 시냅스 (pre-synapse) 와 후 시냅스 (post-synapse) 에서는 탈분극 (depolarization) 이 일어나며, 여기에서 NMDA 수용체 채널을 통한 Ca^{2+} 의 유입이 있게 된다.^{15,21} 이러한 자극은 시냅스의 활동을 흥분시켜 생화학적 변화를 가져오게 되는 것이다.³⁶ Estrogen은 해마의 CA1 뉴론에 보호기능을 갖으며,³⁷ 이러한 해마 뉴론 보호기능에는 NMDA 수용체가 관여된다.³⁸⁻⁴⁰

본 연구에서는 DM 남용이 뇌 신경계에 미치는 유해효과 특히, 뇌 신경계 손상으로 인한 학습능력 감퇴와 DM 작용의 성별간 기전을 알아보고자 한다. 청소년기 DM 남용으로 인한 뇌 기능손상의 기전을 규명하기 위해 어린 시기의 랫트에 DM을 반복 투여한 후, 학습행동과 뇌 조직 검사 등을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

연세의대 실험 동물부에서 랫트 (Sprague - Dawley) 를 구입 및 사육하면서 실험에 사용하며, 실험기간 동안 SPF (specific pathogen free) 환경에서 동물을 유지하며, 임신경험이 없는 female rat 3마리(220~240 g)와 임신경험이 있는 male rat 1마리(breeder ; 450~500 g)를 한 개의 cage에 사육하여 교미를 유도한다. Rat는 야행성 동물이므로, 교미는 밤 시간에 이루어지도록 하였다. 동물 사육실의 Light/Dark cycle은 07:00~19:00, 12시간이므로 breeder는 보통 17:00경에 female rat가 있는 cage에 넣어주고 다음날 아침, 자신의 cage로 돌려놓아 휴식을 취하도록 한다. 교미유도가 시행된 후, 다음날 오전 8시경 cage에 breeder를 house cage에 돌려보내고, female rat의 질도말 (vaginal smearing) 검사를 실시하여 광학현미경 아래서 sperm을 관찰하여 sperm이 발견되면 임신으로 판단하고, 임신된 female rat끼리 격리된 사육실에서 사육을 시켰다. 임신 15일째부터는 출산에 대비하여 임신된 female rat를 각각 독립된 cage에 분리시켜 유지하였다. 출산은 임신 21일경에 하였으며, 정확한 출산일을 확인한 후 출산이 확인된 날을 0일로 정하고, 생후 2일째에 성별을 구분하여 각기 6마리씩 한 어미에게 사육시켰다.

2. 약물처리

사람의 청소년기에 해당하는 시기에 실험을 수행하기 위해, 수컷 랫트를 생후 4주(PND 28)에 약물처리를 시작하였다. Dextromethorphan (DM ; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 을 생리식염수에 녹여 40 mg/kg의 용량으로 복강 주사하였다. Corticosterone은 vehicle (polyethylene glycol : saline=7 : 3) 에 부유하여 40 mg/kg의 용량으로 피하 주사하였다. 암컷 랫트의 경우, 수컷과 동일한 방법으로 생후 4주에 약물처리를 시작하였으며, 생후 21일에 난소적출 시술을 실시하였다. 7일간 회복기간을 둔 뒤, 생후 28일부터 10일 동안 약물을 투여하였다. Estradiol 대체실험에서는 난소적출을 하고 3일 후인, 생후 24일부터 vehicle과 estradiol을 투여하였다. 사용한 호르몬은 β -Estradiol 3-benzonate (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 이며, 이것을 sesame oil에 녹여 1 μ g의 농도로 DM과 함께 생후 37일까지 매일 피하 주사하였다.

3. 행동검색

가. 수중미로 학습검사 (Morris water maze test : 그림 1)

수컷 랫트를 생후 60일에 직경 2 m의 원형 수조에 물을 30 cm 깊이로 채우고, 4분면의 중앙에 수심 2 cm 깊이로 실험동물에게 무해한 검은색 염료를 뿌려서 platform이 보이지 않도록 한 뒤, 직경 20 cm의 platform을 찾아가도록 9일 동안의 훈련과정을 실시하였다. 실험동물들을 동, 서, 남, 북 4방향에서 출발시켜 1분 동안 platform을 찾아가도록 훈련시켰다. 훈련은 하루에 4차례 시행되었으며, 매회 출발지점은 임의로 선택되었다. 매 시도마다 수조 속의 숨겨진 platform 위에서 실험동물을 15초 동안 주변 지형과 사물을 숙지하도록 배려하였다. 한 번의 시도가 끝나면 물기를 제거하고 온열 전구 아래에서 젖은 몸을 말릴 수 있도록 하였으며, 다음 시도는 최소 5분이 경과된 이후에 시행하였다. 9일 동안의 훈련과정이 끝나고, 10일째 되는 날 probe test를 시행하였다. Platform을 수조에서 제거한 후, 훈련받았던 실험동물을 platform이 있던 자리의 정반대 위치에서 출발시켜 platform이 있었던 1분면과 그 외 3분면에서 보내는 시간을 측정하여 이를 공간지각 학습의 측정변수로 기록하였다. 같은 방법으로 암컷 랫트의 경우, 생후 38일에 훈련을 시작하여 6일 동안 실시하였고, 훈련과정이 끝난 다음날 7일째에 probe test를 시행하였다. 모든 과정은 영상추적장치 (video tracking system ; SMART ver. 2.0, Ugo Basile Co., Spain) 를 이용하여 기록한 후, IBM 호환 컴퓨터를 이용하여 분석하였다.

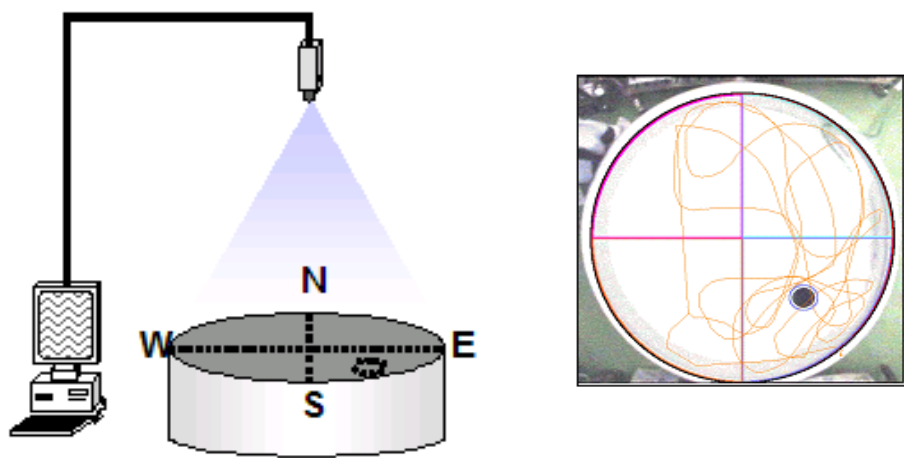


그림 1. 공간지각 학습검사 (Morris water maze test) 실험모식도

나. 방사상미로 학습검사 (Radial arm maze : 그림 2)

방사상 미로는 8개의 arm (Nos. 1-8 ; 60 × 14 cm) 으로 이루어져 있으며, 중심부분 직경은 40 cm 이며, 중심부분에 포함된 가장자리 길이는 5 cm 이다. 방사상 미로 중앙 부분에 실험 시작을 알리는 opaque ring (높이 ; 25 cm) 을 마분지를 이용해 8각형으로 제작하였으며, 실험동물이 접하는 부분인 안쪽을 검게 하였다. Opaque ring을 포함한 방사상 미로는 모두 검정색으로 도색되어 있다. 각 arm의 가장자리에 놓여지는 food cup의 직경은 3 cm이며, 깊이는 1 cm이다. 방사상 미로는 바닥에 놓인 상태로 진행하였으며, 행동실험실에 위치한 의자와 시계 등의 실험조건은 실험시작시부터 종료시까지 변동을 주지 않았다. 실험에 들어가기 2주전부터 개체별로 체중대비 85%의 먹이를 공급하였으며, 물은 자유로이 공급되었다. 여기서 사용한 먹이는 food pellet 45 mg (P.J. NOYES company Inc., St Lancaster, USA) 과 sucrose pellet 45 mg (Research diets Inc, New Brunswick, USA) 을 사용하였다. 체중이 기준에 도달하면 먹이와 방사상 미로에 적응할 수 있도록 3일간 적응기간을 두었다. 적응기간 첫째날은 pellet을 중앙부분에 흩어 뿌려 주고, 둘째날은 중앙부분과 중앙부로부터 각 arm쪽으로 3분의 1가량까지 공급하였으며, 마지막 날에는 arm의 가장자리에 위치한 food cup에만 sucrose pellet을 2~3개 공급하여, 적응기간을 종료하고 실험에 들어갔다. 실험은 실험동물을 방사상 미로 중앙부에 5초간 머물게 한 뒤, opaque ring을 제거함과 동시에 pellet을 찾아 먹이까지 최대시간을 8분으로 잡았으며, 한번 진입하여 먹이를 먹은 arm으로 재진입할 경우, error 1회로 계산하여 자료화 하였으며, 각 arm으로의 진입이 완전히 종료되는 시간을 기록하여 그래프화 하였다.

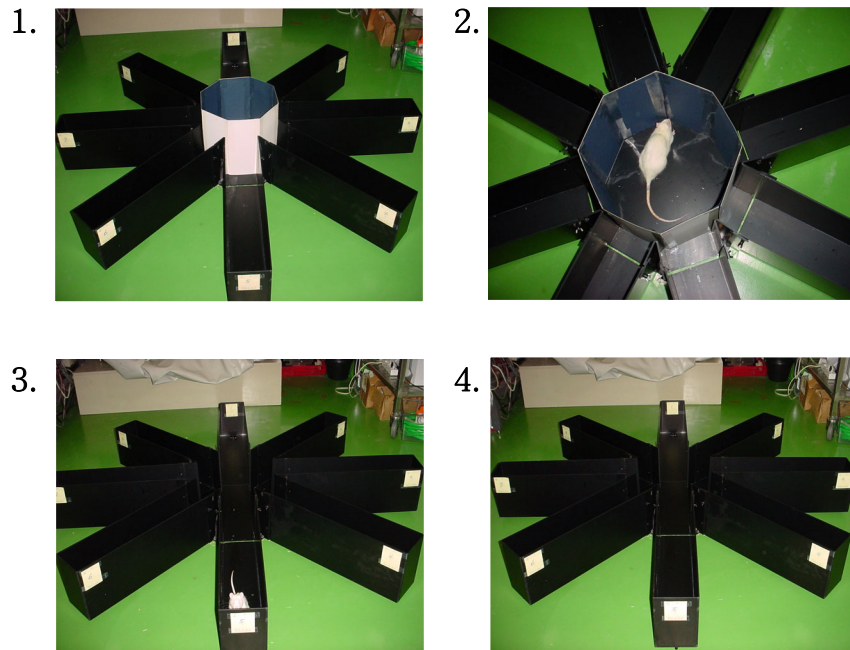


그림 2. 방사상미로 학습검사 (Radial arm maze test) 진행순서

실험의 진행순서는 위의 그림과 같다. (1) Radial arm maze의 중심부에 opaque ring을 놓아둔다. (2) 실험동물을 중심부에 5초간 머물게 한 뒤, opaque ring을 제거한다. (3) 각 arm으로의 진입을 관찰하면서 error 횟수와 시간을 기록한다. (4) 실험이 종료되면, 알코올로 깨끗이 닦고 다음실험동물을 준비한다.

4. 조직검색

가. NMDAR1 면역조직화학법

수컷 랫트의 경우 생후 90일, 암컷 랫트의 경우 생후 45일, 행동실험이 끝난 다음 날 랫트의 뇌를 적출하여 NMDAR1 면역조직화학법을 실시하였다. 이를 위해 랫트의 복강에 pentobarbital chloral hydrate 혼합액을 과용량 주사하여 신속히 마취시킨 후, 심장관류법(transcardiac perfusion)을 이용하여 헤파린이 첨가된 0.9% saline 용액으로 혈액을 제거하고, 냉각시킨 고정액 (4% paraformaldehyde, 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.2) 을 주입하여 조직을 고정시킨 후, 뇌를 적출하여 동일한 고정액으로 2~3시간 동안 4°C에서 후 고정을 하였다. 냉동절편 제작 시 조직의 손상을 방지할 목적으로 30% sucrose 용액에 24시간 동안 처리한 다음, 적출된 뇌조직을 후고정하고 30% sucrose 용액에 24시간동안 처리한 다음, sliding microtome (Microm, Zeiss, Germany) 을 이용하여 조직을 40 μ m로 냉동 박절한 후 0.1M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2) 에 모았다. Triton 용액 (0.2% Triton X-100, 1% bovine serum albumin(BSA), 0.1M PBS) 에 30분간 처리 후, monoclonal anti-NMDAR1 antibody (1:2,000, Zymed, CA, USA) 로 상온에서 16시간 동안 반응 시킨 후, PBS-BSA (0.5% BSA, 0.1M PBS) 로 조직을 세척하고 biotinylated anti-mouse IgG (1:200, Vector Laboratories, CA, USA) 로 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS-BSA로 조직을 세척한 다음, avidin-biotin complex (1:50, ABC Elite kit, Vector Laboratories, CA, USA) 에 1시간 반응시키고, 0.1M PB (0.1M sodium phosphate dibasic, 0.1M sodium phosphate monobasic, pH 7.4) 로 반응의 종결과 조직 세척을 한 후, DAB (0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.003% hydrogen peroxide, 0.1M phosphate buffer, pH 7.2) 을 이용하여 5분 동안 발색시켰다. 0.1M PB로 조직을 세척한 후,

0.05M PB에서 젤라틴으로 입힌 슬라이드(gelatin-subbed slide glass)에 얹어 공기 중에서 건조시켰다. 슬라이드에 부착된 염색된 뇌 조직은 일반적인 탈수(dehydration)와 청명(cleaning)과정을 거친 후, Permount (Fisher, CA, USA) 를 이용하여 덮개유리를 씌웠다.

나. Cresyl violet 염색법

면역조직화학법에서와 동일하게 고정된 뇌 조직을 sliding microtome으로 40 μm 의 두께로 절편하여, 0.05M PB에서 유리 슬라이드에 얹는다. 조직이 공기 중에서 건조되면, 알코올 탈수과정을 거쳐 ethanol : chloroform (1:1) 용액에 20분간 두어 조직으로부터 지질을 제거한다. 알코올 탈수과정을 반대로 반복하여 조직을 수화시킨 후, cresyl violet 염색액에서 30초간 염색한다. 다시 알코올 탈수과정을 거쳐 permount를 이용하여 덮개유리를 씌운다.

다. Western Blot

수컷 랫트의 경우 생후 90일, 암컷 랫트의 경우 생후 45일, 랫트를 절두하여 신속하게 뇌를 적출, 얼음 위에서 전전두엽피질과 해마부위를 적출하여 sucrose, NaHCO_3 , MgCl_2 , CaCl_2 등이 들어있는 buffer에서 분쇄하여 4°C에서 1,400 $\times$ g로 10분간 원심분리 후 상등액을 취하고, 침전물을 같은 buffer에 용해하여 다시 10분간 710 g에서 원심 분리한 후, 다시 상등액을 취해 이전의 상등액과 혼합한다. 710 g으로 10분간 다시 원심 분리하여 침전물을 제거한 뒤, 13,800 g으로 원심분리하여 침전물을 Tris buffer (10mM Tris, 0.1M NaCl, 5% Triton X-100, 100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 mM EDTA) 에 녹여 정량한다. SDS polyacrylamide (8%) 겔에서 전기영동 후, transfer system

을 이용하여 membrane에 옮겨 PBS-T blocking buffer로 membrane을 씻은 후, NMDAR1 primary antibody를 넣어 4°C에서 밤 동안 반응시킨다. PBS-T buffer로 4차례 씻은 후, secondary antibody로 1시간 동안 반응시키고, 다시 씻은 후 WEST-ZOL의 A, B용액 혼합액에 실온에서 5분간 반응시킨다. Membrane을 3M paper에 얹어 말린 후, 암실에서 X-ray film에 노출한다.

5. 통계학적 분석

실험결과는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며, 통계분석을 위하여 StatView (version 5.01, The SAS Institute, CA, USA) 프로그램을 사용하였다. 공간학습검사에서 학습 습득과정은 학습곡선을 이용하여 repeated measures ANOVA로 수행하였으며, probe test와 방사상미로 학습검사는 일분산분석 (one-way ANOVA) 을 사용하였다. 전체적인 실험군간 분산분석 결과에서 유의한 차이는 집단내 표본 수에 의거하여 Scheffe's F test 와 Fisher's protected least significance difference (PLSD) test 방법으로 *post hoc* test를 수행하여 차이를 규명하였다. Western blot의 정량화는 TINA software (TINA 2.01) 를 사용하였으며, 두 군간의 통계처리는 ANOVA (Unpaired *t*-test) 로 군간의 통계적 유의성을 검색하였다.

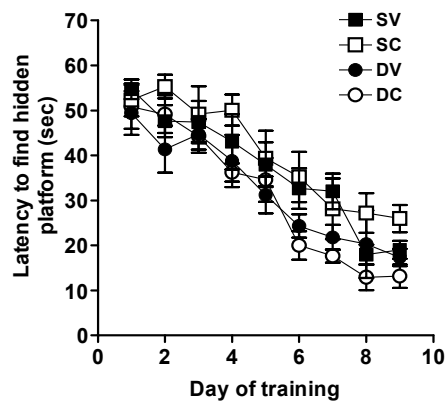
Ⅲ. 결 과

1. 수컷 랫트의 청소년기 dextromethorphan에 의한 기억력 손상에 대한 glucocorticoid의 효과

가. 수중미로 학습

생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40 mg/kg 용량으로 매일 피하주사 하였다. Corticosterone 주사가 끝난 다음날 수중미로 학습을 실시하였다. 훈련 기간(그림 3-A)동안 수중미로에 대한 학습이 모두 이루어졌다. Probe test에서 DM 투여군에 있어 기억력 손상이 나타났다 (** $p < 0.01$, 그림 3-B).

A.



B.

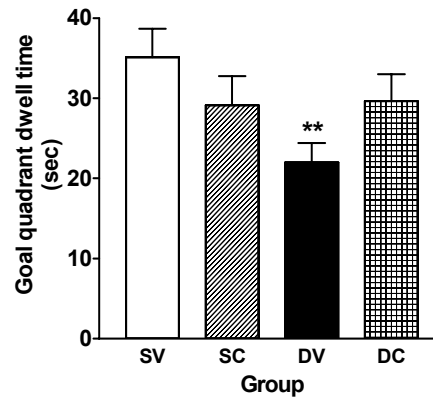
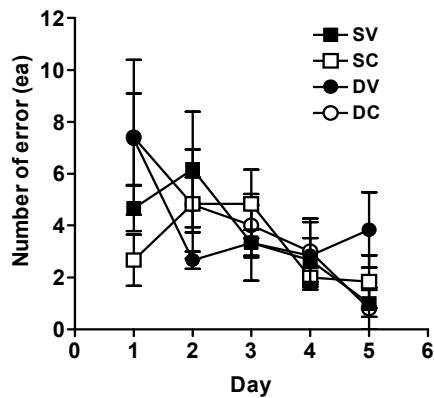


그림 3. 수컷 랫트의 수중미로 학습에서 DM과 GC의 효과. (A) 수중미로 학습 훈련양상 ; 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40 mg/kg 용량으로 매일 피하주사 하였다. Corticosterone을 3주간 투여한 생후 60일에, 9일 동안 수조의 숨겨진 platform을 찾아가도록 수중미로 학습훈련을 1일 4회씩 매일 실시하였다 (n=6). (B) **Probe test** ; 9일간의 훈련기간이 끝난 다음날인 생후 70일에 probe test를 수행하였다 (** p < 0.01 vs. SV, n=12). SV: saline+vehicle군, SC: saline+corticosterone군, DV: dextromethorphan+vehicle군, DC: dextromethorphan+corticosterone군.

나. 방사상미로 학습

생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40 mg/kg 용량으로 매일 피하주사한 뒤, 수중미로 학습검사 후 생후 85일에 방사상미로 학습을 실시하였다. 각 arm으로의 재진입에 대한 error 횟수의 유의한 차이는 나타나지 않았다. 학습 횟수가 거듭됨에 따라 학습완료에 소요되는 시간이 점차 단축되었다 (그림 4).

A.



B.

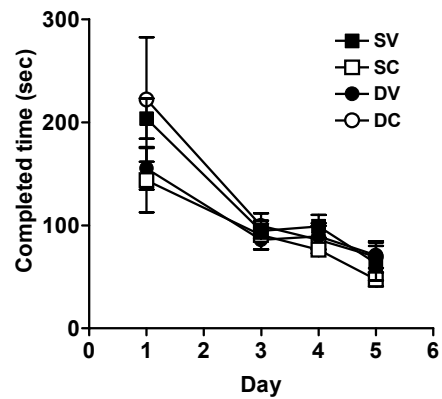


그림 4. 수컷 랫트의 방사상미로 학습검사. 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40 mg/kg 용량으로 매일 피하주사한 뒤, 수중미로 학습검사 후 생후 85일에 방사상미로 학습을 실시하였다. 각 arm으로의 재진입의 error 횟수와 8개의 arm으로 최소 한번 이상 진입하여 8개의 arm으로의 진입을 완료하는 시간을 측정하였다. (A) 각 arm으로의 재진입 error 횟수 ; (n=6). (B) 모든 arm으로의 진입을 완료한 시간 ; (n=6). SV: saline+vehicle군, SC: saline+corticosterone군, DV: dextromethorphan+vehicle군, DC: dextromethorphan+corticosterone군.

다. NMDAR1 면역조직 활성화도

생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40 mg/kg 용량으로 매일 피하주사한 뒤, 생후 60일 수중미로 학습검색과 생후 85일 방사상미로 학습을 실시한 후, 생후 90일 랫트를 신속히 마취시킨 후, 각 실험군의 뇌 조직 절편을 준비하여 해마에서 NMDAR1 면역조직화화법을 수행하였다. 수중미로 학습에서 기억력 손상을 보인 DV군의 해마부위(CA1과 CA3)에서 NMDAR1 면역조직화화 염색 양성세포가 대조군에 비해 증가되었다 (그림 5).

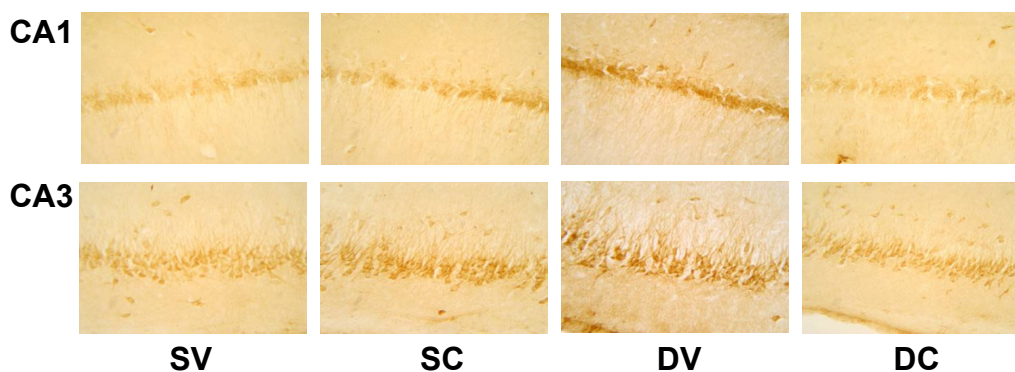


그림 5. 수컷 랫트 해마의 NMDAR1 면역조직 화학상. 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40 mg/kg 용량으로 매일 피하주사한 뒤, 생후 60일 수중미로 학습검사 후 생후 85일에 방사상미로 학습을 실시하였다. 모든 행동검색을 종료하고 난 후인 생후 90일에 랫트를 신속히 마취시킨 후, 각 실험군의 뇌 조직 절편을 준비하여 해마에서 NMDAR1 면역조직화화법을 수행하였다. 면역 염색된 세포는 광학현미경하에서 관찰하였다 (×200). SV: saline+vehicle군, SC: saline+corticosterone군, DV: dextromethorphan+vehicle군, DC: dextromethorphan+corticosterone군.

라. Cresyl violet 염색

생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40 mg/kg 용량으로 매일 피하주사한 뒤, 생후 60일 수중미로 학습검사 후 생후 85일 방사상미로 학습을 실시하였다. 모든 행동검색을 종료하고 난 후 생후 90일에 랫트를 신속히 마취시킨 후, 각 군의 뇌 조직 절편을 준비하여 해마에서 cresyl violet 염색을 수행하였다. Cresyl violet 염색상에서, 해마신경세포의 형태와 세포 밀집도의 변화는 나타나지 않았다 (그림 6).

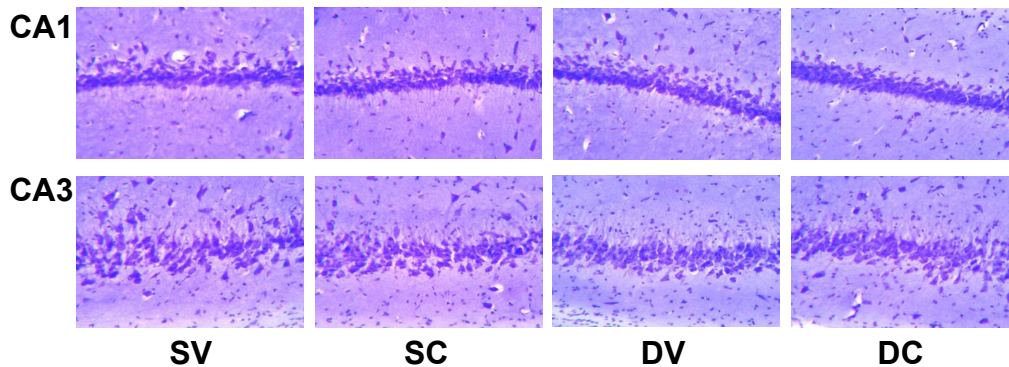
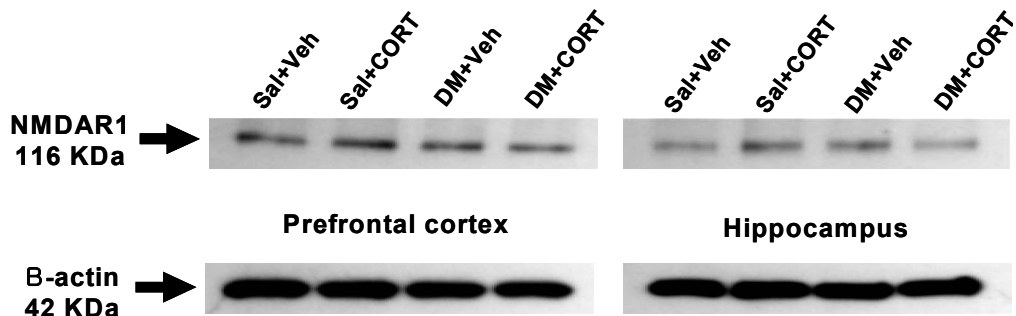


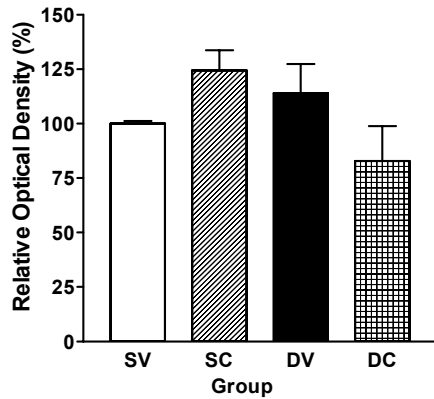
그림 6. 해마의 Cresyl violet 염색상. 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40 mg/kg 용량으로 매일 피하주사한 뒤, 생후 60일 수중미로 학습검사 후 생후 85일에 방사상미로 학습을 실시하였다. 모든 행동검색을 종료하고 난 후인 생후 90일에 랫트를 신속히 마취시킨 후, 각 군의 뇌 조직 절편을 준비하여 해마에서 cresyl violet 염색을 수행하였다. 염색된 세포는 광학현미경하에서 관찰하였다 ($\times 200$). SV: saline+vehicle군, SC: saline+corticosterone군, DV: dextromethorphan+vehicle군, DC: dextromethorphan+corticosterone군.

마. NMDAR1 western blot

생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40 mg/kg 용량으로 매일 피하주사한 뒤, 생후 60일 수중미로 학습검사 후 생후 85일에 방사상미로 학습을 실시하였다. 모든 행동검사를 종료하고 난 후인 생후 90일에 랫트를 흡입마취 시킨 뒤, 전전두엽피질과 해마조직을 dissection하여 NMDAR1의 양적변화를 western blot으로 수행하였다. 전전두엽피질에서는 각 군간의 유의한 차이가 관찰되지 않았고(그림 7-A), 해마에서는 NMDAR1의 단백발현이 대조군에 비해 DM 처리군에서 증가하였다 (* $p < 0.05$, 그림 7-B).



A.



B.

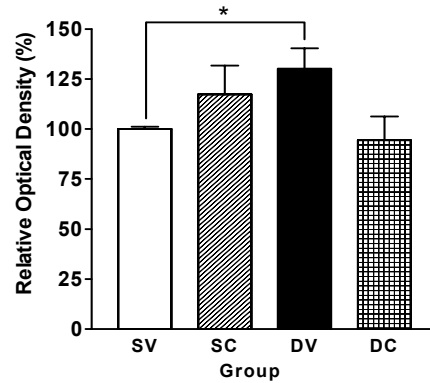


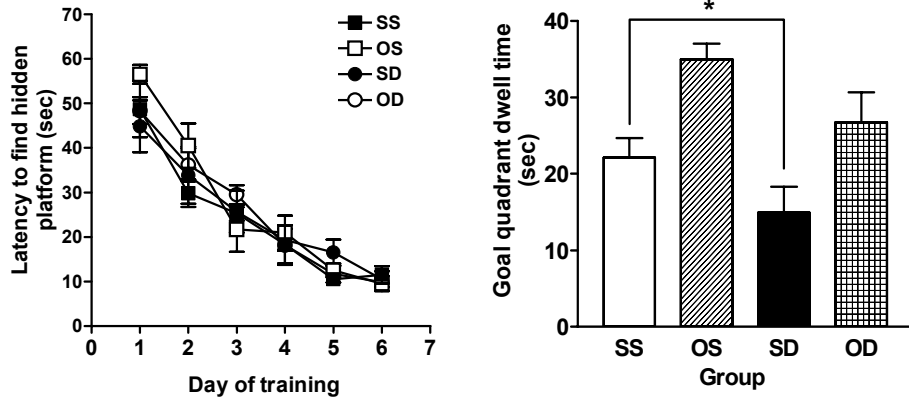
그림 7. 수컷 랫트 전전두엽 피질과 해마의 NMDAR1 western blot. 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후, 이어서 3주간 corticosterone을 40mg/kg 용량으로 매일 피하주사한 뒤, 생후 60일 수중미로 학습검사 후 생후 85일에 방사상미로 학습을 실시하였다. 모든 행동검색을 종료하고 난 후인 생후 90일에 랫트를 흡입마취 시킨 뒤, 전전두엽피질과 해마조직을 dissection하여 NMDAR1의 양적변화를 western blot으로 수행하였다. (A) 전전두엽피질 ; (n=6), (B) 해마 ; (* $p < 0.05$ vs. SV, n=6). SV: saline+vehicle군, SC: saline+corticosterone군, DV: dextromethorphan+vehicle군, DC: dextromethorphan+corticosterone군.

2. 암컷 랫트의 청소년기 dextromethorphan에 의한 기억력 손상에 대한 난소의 역할

가. 수중미로 학습

생후 21일 난소적출 시술 후 7일간의 회복기간을 거치고, 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사 한 후, 생후 38일에 수중미로 학습검사를 실시하였다. 난소 비적출 DM 투여군(SS군)에서 대조군(SS군)대비 기억력 손상이 나타났다 (* $p < 0.05$, **그림 8-A**). 난소 적출군에서는 DM에 의한 기억력 손상이 나타나지 않았다. 난소적출 DM 투여군의 estradiol 대체군에서는 vehicle군 대비 기억력 손상이 나타났다 (* $p < 0.05$, **그림 8-B**).

A.



B.

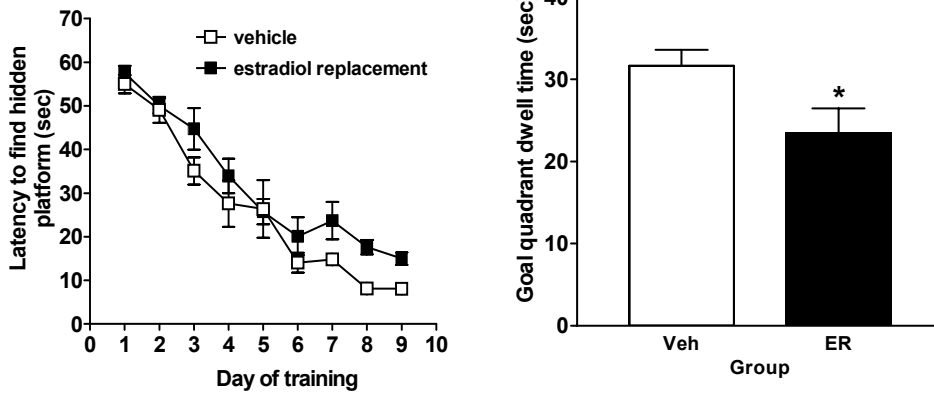


그림 8. 암컷 랫트의 공간지각 학습검사. 생후 21일 난소적출 시술 후 7 일간의 회복기간을 거치고, 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사 한 후, 생후 38일에 수중미로 학습 검사를 실시하였다. (A) DM에 의한 기억력 손상 ; (* p < 0.05 vs. SS, n=6). (B) Estradiol 대체결과 ; (* p < 0.05 vs. Veh, n=6). SS: sham+saline군, SD: sham+dextromethorphan군, OS: ovx+saline군, OD: ovx+dextromethorphan군, Veh: ovx+vehicle+dextromethorphan군, ER: ovx+estradiol+dextromethorphan군.

나. NMDAR1 면역조직 활성화도

생후 21일 난소적출 시술 후 7일간의 회복기간을 거치고, 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사 한 후, 생후 38일 수중미로 학습 검사를 종료한 뒤 생후 45일에 랫트를 신속히 마취시킨 후, 각 실험군의 뇌 조직 절편을 준비하여 해마에서 NMDAR1 면역조직화학법을 수행하였다. 난소 비적출 DM 투여군(SD군)의 NMDAR1 면역조직화학염색 양성세포가 대조군(SS군)에 비해 증가되었다. 난소 적출군(OS군과 OD군)과 estradiol 대체군(Veh군과 ER군)에서는 각각 군간의 뚜렷한 차이가 없었다.

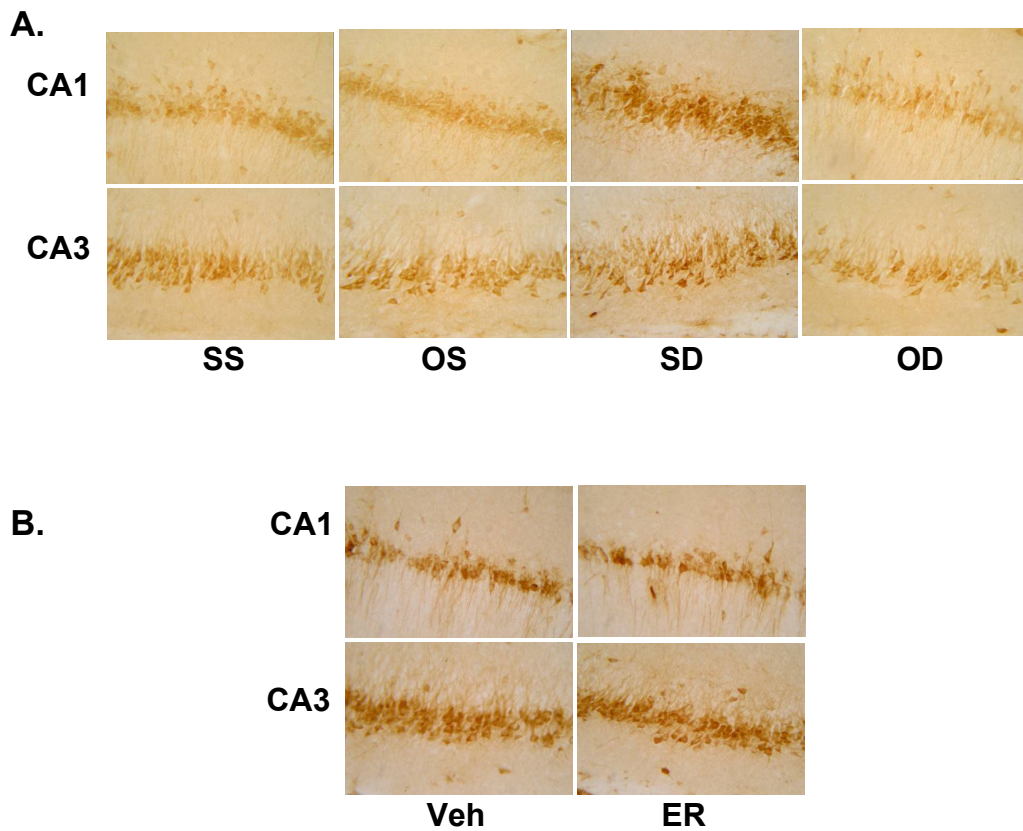
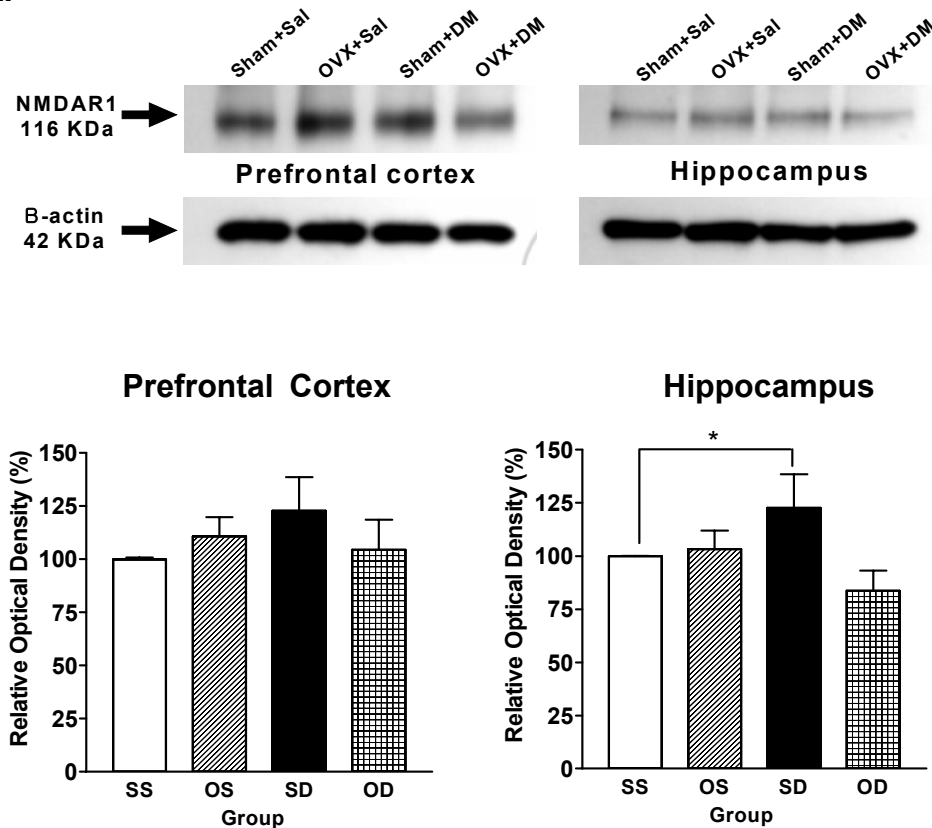


그림 9. 암컷 랫트 해마의 NMDAR1 면역조직 화학상. 생후 21일 난소 적출 시술 후 7일간의 회복기간을 거치고, 생후 28일부터 10일간 매일 DM 을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사 한 후, 생후 38일 수중미로 학습검사를 종료하고 난 뒤 생후 45일에 랫트를 신속히 마취시킨 후, 각 실험군의 뇌 조직 절편을 준비하여 해마에서 NMDAR1 면역조직화학법을 수행하였다. (A) DM에 의한 면역조직화학 염색 양성세포 증가 (B) Estradiol 대체 결과 SS: sham+saline군, SD: sham+dextromethorphan군, OS: ovx+saline 군, OD: ovx+dextromethorphan군, Veh: ovx+vehicle+dextromethorphan군 ER: ovx+estradiol+dextromethorphan군.

다. NMDAR1 western blot

생후 21일 난소적출 수술 후 7일간의 회복기간을 거치고, 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사 한 후, 생후 38일 수중미로 학습 검사를 종료하고 난 뒤 생후 45일에 랫트를 흡입마취 시킨 뒤, 전전두엽 피질과 해마조직을 dissection하여 NMDAR1의 양적변화를 western blot으로 수행하였다. 전전두엽피질에서는 각 군간의 유의한 차이가 관찰되지 않았고, 해마에서는 NMDAR1의 단백발현이 대조군에 비해 DM 처리군에서 증가하였다 (* $p < 0.05$, 그림 7-A). Estradiol 대체군과 vehicle 투여군에서는 전전두엽피질과 해마에서 NMDAR1 단백발현 차이가 나타나지 않았다 (그림 10-B).

A.



B.

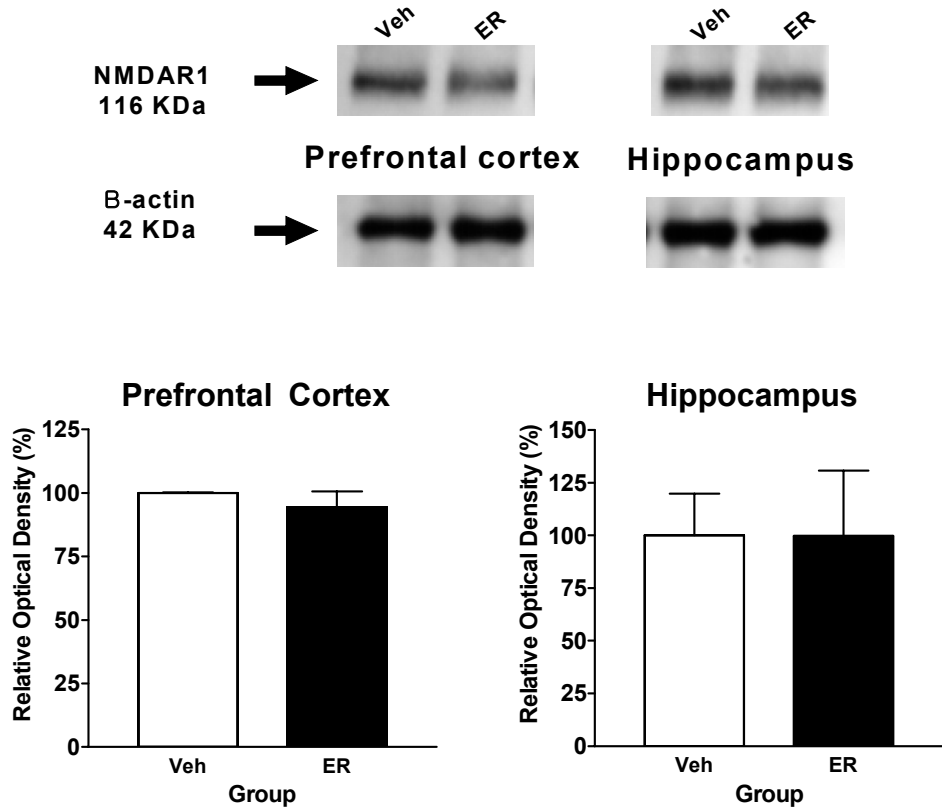


그림 10. 암컷 랫트 전전두엽피질과 해마의 NMDAR1 western blot. 생후 21일 난소적출 수술 후 7일간의 회복기간을 거치고, 생후 28일부터 10일간 매일 DM을 40 mg/kg의 용량으로 복강주사 한 후, 생후 38일 수중 미로 학습검사를 종료하고 난 뒤 생후 45일에 랫트를 흡입마취 시킨 뒤, 전전두엽피질과 해마조직을 dissection하여 NMDAR1의 양적변화를 western blot으로 수행하였다. (A) DM에 의한 NMDAR1 단백질발현 증가 ; (* $p < 0.05$ vs. SS, $n=6$). (B) Estradiol 대체결과 ; ($n=6$). SS: sham+saline군, SD: sham+dextromethorphan군, OS: ovx+saline군, OD: ovx+dextromethorphan군, Veh: ovx+vehicle+dextromethorphan군 ER: ovx+estradiol+dextromethorphan군.

IV. 고 찰

본 연구에서는 청소년기의 DM 남용에 의해 초래되는 장기적인 유해효과 검증의 일환으로서, 랫트의 청소년기 동안 다량의 DM을 반복적으로 투여한 후 공간지각 학습능력을 조사하였다. 수중미로 학습법으로 장기 학습능력을 방사상미로 학습법으로 단기 기억능력을 검색하였다. 수컷 랫트의 청소년기에 고용량의 DM을 10일간 반복 투여하고 성장 후 수중미로 학습과 방사상미로 학습을 실시한 결과, 방사상미로 학습에서는 DM에 의한 유해 효과가 관찰되지 않았으나, 수중미로 학습에서는 DM 투여군에서 기억력의 장애효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 반복적 DM 투여가 단기 기억능에는 유해효과를 나타내지 않으나 장기 기억능력에 유해효과를 나타낸다는 사실을 시사한다. 수중미로 학습 과제의 초기 훈련과정 동안에는 랫트가 수조내의 일정한 지점에 설치된 platform을 찾아가면 더 이상 헤엄치지 않고 쉴 수 있다는 사실을 학습하게 되는데, 목표지점에 이르는 시간은 반복 훈련을 통하여 점차 짧아지게 된다. 반복 훈련을 통해 단시간 내에 platform에 이르는 학습이 완성되면, platform이 제거된 수조 내에서 랫트가 원래 platform이 자리 되어있던 지점의 위치를 기억하고 있는지를 시험하는 probe test를 실시한다. DM 투여군의 수중미로 학습결과에서 초기 훈련과정 동안에는 약물의 효과가 관찰되지 않았으나, probe test에서 DM 투여군은 platform이 있었던 위치를 기억하는 능력이 대조군에 비해 현저히 떨어진 것으로 나타났다. 이러한 결과는, 공간 학습의 형성과정보다는 학습된 위치를 기억하는 과정에서 DM의 유해효과가 뚜렷하게 나타났음을 시사한다. 설치류의 경우, 미로학습과 같은 공간 지각능력에는 뇌의 해마부위 기능이 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.²² 따라서 본 연구에서 관찰된 DM의 수중미로 학습장애 효과는 DM에 의한 해마부위의 기능적 손상효과를 짐작하게 한다.

해마의 기능에 있어서 NMDA 수용체가 중요한 역할을 하는 것으로 보

고되고 있는데,⁸ 본 연구에서 사용된 DM은 NMDA 수용체의 비경쟁적 저해제이다.¹⁴ 이러한 사실은 DM의 수중미로 학습장애 효과가 해마부위에서 DM에 의한 NMDA 수용체 저해효과와 관련 있을 것임을 시사한다. 실제로 NMDA 수용체의 저해제인 MK-801 및 phencyclidine 등이 랫트의 수중미로 학습에 장애효과를 나타낸다는 사실이 보고 된 바 있다.⁷² 특히, Bane 등(1996)은 수중미로 학습 실시 15분전에 DM을 투여할 경우 초기 학습과정 및 probe test에서 모두 장애효과가 유발된다고 보고한 바 있다.⁷¹ 이 경우 DM의 학습장애 효과는 학습 진행과정동안 NMDA 수용체의 기능이 억제된 결과로 해석되나, 본 연구에서는 DM 투여 후 3주 이상 경과된 시점에서 수중미로 학습이 진행되었으므로 학습실시 기간동안 DM의 직접적인 약물효과를 기대하기는 어렵다. 즉, NMDA 수용체 억제 약물 처리 후 오랜 기간이 경과 되었을 때 관찰되는 수중미로 학습 장애 효과에는 단기적인 NMDA 수용체 작용의 억제 이외의 다른 기전이 개입될 것임을 짐작할 수 있다. 이와 관련하여, Sicar(2003)는 랫트에서 생애초기의 phencyclidine 반복투여가 성장 후 수중미로 학습에 장애효과를 유발하며, 이러한 효과는 뇌 부위에서 NMDA 수용체 발현이 증가된 것과 연관성을 보인다고 보고하였다.⁷² 본 연구에서도, DM 투여군의 해마부위에서 NMDA 수용체의 필수단위인 NMDAR1 (NR1)의 발현이 장기적으로 증가된 것으로 관찰되었다. NMDA 수용체는 특히 중추신경계에 많이 존재하며,⁴¹ glutamate에 반응하는데 그것은 Ca^{2+} influx를 조절하는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 본 실험에서 해마에 분포하고 있는 NMDA 수용체의 변동을 관찰한 결과, DM 노출군이 비노출군에 비해 NR1의 단백발현이 증가해 있음을 확인하였다. 이러한 결과로부터, NMDA 수용체 저해제인 DM의 반복투여로 인한 NMDA 수용체 증가는 기억과 관련된 뇌기능의 변동(neuro-cytotoxicity)을 초래함을 시사한다. 특히 해마의 CA1 영역의 NMDA 수용체는 공간기억에 있어서 시냅스 가소성 (synaptic plasticity)에 중요한 역할을 함이 보고되어 있으며,²¹ 기억능력에 있어 해마의 CA3

영역 또한 밀접한 연관성이 있다.^{25,43} 또한 뇌의 전전두엽피질은 공간인지에 있어서 단기 기억과 관련되어 있음이 보고되었으며,^{42,44} 본 실험의 western blot 결과, 전전두엽피질에서는 DM에 의한 수용체의 유의한 증감은 관찰되지 않았으나, 해마에서는 NR1의 증가를 DM 투여군에서 관찰하였다.

흥미롭게도 본 연구의 수중미로 학습 결과, DM과 corticosterone을 투여한 군에서는 이러한 DM으로 인한 기억력 손상을 보이지 않았으며, 오히려 대조군 수준으로 손상된 기억력을 회복시키는 결과를 나타냈다. 스트레스는 학습과 기억에 직·간접적으로 영향을 미치는 매우 중요한 요소 중의 하나이다.^{11,12,23} 해마매개 학습검색인 수중미로 학습검색은 가해지는 스트레스 정도에 따라 학습에 대한 기억강화 (memory consolidation) 및 장기증강 (Long-term potentiation, LTP) 을 촉진시키기도 하고, 억제시키기도 한다.^{45,46} 스트레스 대응축인 HPA axis (hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis) 활성화의 최종산물인 glucocorticoid (랫트의 경우, corticosterone) 는 부신피질에서 합성되어 혈중으로 분비되는 스테로이드계 호르몬으로,¹⁷ 혈중 corticosterone 수준은 스트레스 반응의 지표가 되기도 한다.⁴⁷ Corticosterone은 중추신경계와 말초신경계에 모두 영향을 미치며, 신체의 에너지 균형 및 항상성 유지에 기여한다. 본 연구의 수중미로 학습검색과 western blot 결과, 반복된 DM에 의한 기억력 손상을 스트레스 호르몬인 corticosterone의 장기간(3주)의 투여로 인해 손상된 기억을 대조군의 수준으로 회복을 시킨 결과로 비추어 볼 때, DM 투여로 초래된 NR1의 증가를 corticosterone이 억제하였다.^{48-50,55} 결과적으로 해마의 기능에서 glucocorticoid는 DM에 의한 수중미로 학습 장애효과와 해마에서의 NMDA 수용체 발현 증가 효과를 모두 상쇄시켰다. 본 실험에서는 뇌 전전두엽피질에서는 각 군의 NR1 단백질 발현 차이를 관찰하지 못했지만, 장기간의 corticosterone의 투여가 내측 전전두엽피질 피라미드 세포의 수상돌기 재생에 관여됨이 보고된 바 있다.¹⁸ 또한 해마의 치아이랑 (dentate gyrus)

발달 중에 NMDA 수용체 기전을 통한 세포사(cell death)를 스테로이드가 억제함이 보고되었다..^{29,30} 또한 사람에 있어서 cortisol은 연령에 따라 인지 와 기억에 미치는 영향이 다르며,⁵¹ 단기 혹은 장기적인 스트레스 상황에 노출되면 HPA axis에 관여되는 호르몬들은 학습과 기억에 영향을 주게 된다.³⁶

본 실험에 사용된 스트레스 호르몬인 corticosterone의 농도는 스트레스 수준인 40 mg/kg를 사용하였는데, 이전에 많은 보고들에서 쟁점이 되는 스트레스 호르몬의 생리적인 효과는 호르몬의 농도와 투여되는 시간 등 전반적인 요소들이 모두 고려되어야 함을 강조하고 있다. 본 연구결과에서는 corticosterone이 기억의 장기증강 (LTP) 에 도움을 주었는데, 해마 뉴론에서의 NMDA 수용체를 통한 Ca^{2+} 조절에 스트레스 호르몬인 corticosterone이 관여했으리라 사료된다.^{29,30,45} 추측컨대, DM으로 인한 기억의 손상이 corticosterone과 같은 스테로이드에 반응함으로써 그 둘의 조절기전이 결과적으로 기억의 회복(보상효과, compensation)을 초래했으리라 추측되어진다.^{16,32,49,50} 그리고 장기간의 corticosterone의 투여가 학습과 기억을 관장하는 해마부위에서 시냅스 가소성 (synaptic plasticity) 을 형성했을 것으로 사료된다. 반대로 NMDA 수용체 억제제의 투여가 장기증강 (LTP) 형성을 방해하여 기억의 손상을 초래하였고,^{9,20} 상대적으로 corticosterone 투여군에서는 스테로이드에 민감하게 반응함으로써 방해되어진 시냅스 가소성 (synaptic plasticity) 이 재가동 되었을 것으로 사료된다.

암컷 랫트에 있어 청소년기 다량의 DM을 반복투여 후, 공간지각 능력에 있어서 나타나는 장기적 손상효과 및 이에 대한 estrogen의 영향을 조사하였다. Estrogen은 신경보호효과가 있음이 많이 보고되어 있다.^{39,52-54} 수컷의 결과에서처럼, DM 투여에 의한 수중미로 학습검색에서 DM 노출군의 기억력 손상이 관찰되었다. 또한 NMDA 수용체의 면역조직검색 결과, DM 투여군의 해마 CA1과 CA3 영역의 피라미드 세포들이 대조군에 비해 진하게 염색됨을 관찰할 수 있었고, NR1의 단백발현을 western blot으로 확인

해 본 결과, DM 노출군에서 증가해 있음을 확인하였다. 그러나 난소가 적출된 랫트에서는 DM에 의한 기억력 손상 효과가 나타나지 않았으며, 난소 적출 후 DM에 노출된 랫트에게 estradiol을 대체 투여한 결과, vehicle 투여군에 비해 estradiol 투여군에서 DM에 의한 기억력 손상을 보였다. 이러한 결과로 미루어 보아, estrogen이 공급되었을 때 DM에 의한 기억력 손상 작용기전에 estrogen이 관여될 것임을 짐작할 수 있다. 또한 DM 반복 투여 후 해마에서 NMDA 수용체 발현 증가 효과가 나타나지 않은 점으로 보아, 암컷 해마에서의 NMDA 수용체 발현정도는 DM에 의한 기억력 손상 작용기전에 직접적으로 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 난소는 estrogen과 progesterone 등 스테로이드 호르몬을 주기적으로 생합성한다.⁷⁰ 뿐만 아니라, 무기질, 탄수화물, 단백질, 지질 대사에 관여하며 여성 성징발현에도 중요한 역할을 한다. 사람에서는 estrone, 17 β -estradiol 및 estriol 등 3가지 estrogen이 만들어지며,⁷¹ 이중 17 β -estradiol이 대표적 난소 호르몬으로서, 생물학적 작용이 estrone보다 12배, estriol보다 80배 강하다. 폐경 증상은 자연적으로 오는 폐경보다 난소를 제거하여 갑자기 estrogen이 부족하게 되는 경우 더욱 심하다.⁷³ Estrogen 요법의 첫째 원인은 뼈 소실을 방지하고 혈관운동장애를 개선하기 위한 것이며, estrogen은 인지기능에 효과를 보이며,^{55,65,68} 알츠하이머병의 진행을 늦춘다고도 알려져 있다.⁷³ Estrogen의 신경보호효과는 MAP Kinase 경로를 활성화시키고, 세포고사(apoptosis)를 억제하고 amyloid β -peptide의 신경독성을 감소시킴으로 나타난다. Estrogen의 부작용은 용량 의존적으로 나타나는데, 생체내에서 정상적으로 분비되는 estrogen은 손상된 기억력의 회복에 기여했으리라 생각된다.^{62,67,69} 하지만 외부에서 투여되는 특히, 청소년 시기의 estrogen의 효과는 투여 농도수준과 생체 내 estrus cycle 시점과도 중요한 관계가 있을 것으로 사료되며,^{51,58} DM과 같은 약물에 의한 기억력 손상은 뇌 해마부위에서의 NMDA 수용체 활성변화를 일으킬 것으로 사료된다.^{56,57} 난소 호르몬은 발정주기 동안 뇌의 해마에서의 시냅스 변환을 조절한다.⁶⁰

Estrogen은 또한 일시적이고 서술적인 기억의 향상에 도움을 준다고 알려져 있으며,^{63,64} 이것은 해마가 기억과 감정정보를 가공함이 예상된다.⁶¹ 신경계에 관련해 많은 영향을 주는 난소 스테로이드 호르몬들은 여러 가지 질병을 치료하는데 있어 중요한 요소가 되고 있다.⁷¹ 또한 estradiol은 해마의 CA1 영역에서 전후 시냅스 단백을 증가시킨다는 보고와 시냅스 생성과 수상돌기의 수를 증가시킨다고 보고하였다.⁵² 난소적출 랫트의 경우, 해마의 CA1 영역의 피라미드 세포의 형상이 정상에 비해 많이 위축돼 있음이 또한 보고되었다.⁵³ 사람에 있어 성인여성의 폐경이후 호르몬 대체요법과는 달리,⁶⁶ 청소년기 DM에 의한 신경독작용에 있어 estrogen은 신경보호효과 기전은 아닐 것으로 추측되어지며,⁵⁹ estrogen 이외의 난소호르몬에 대한 상세기전이 더 규명되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 청소년 시기의 텍스트로메토르펜 (DM) 남용에 의한 뇌기능 손상 효과의 기전을 연구하였다. 랫트를 동물모델로 사용하여 청소년기 동안 다량의 DM을 반복투여 후 공간지각 능력에 있어서 나타나는 장기적 손상효과 및 이에 대한 glucocorticoid와 estrogen의 영향을 조사하였다. 연구의 결과에서, 랫트의 청소년기에 다량의 DM을 반복투여 한 후 수중미로 학습을 실시한 결과, 암컷과 수컷 모두에서 장기적인 기억력 손상효과가 관찰되었다. 수중미로 학습에서 DM의 유해효과는 뇌 해마부위에서 NMDA 수용체 발현의 증가와 관련이 있을 것으로 판단되었다. 장기적인 glucocorticoid 처치는 DM에 의한 수중미로 학습 장애효과와 해마에서의 NMDA 수용체 발현 증가 효과를 모두 상쇄시키는 것으로 나타났다. 난소가 적출된 암컷 랫트에서는 DM에 의한 기억력 손상 효과가 나타나지 않았으며, estrogen이 공급되었을 때 DM에 의한 기억손상 작용기전에는 estrogen이 관여될 것임을 짐작할 수 있었다. 아울러, 암컷의 경우 DM 반복투여 후 해마에서 NMDA 수용체 발현이 증가되었으며, 이러한 증가가 난소적출 시술 후 관찰되지 않았다. 그러나 estrogen이 공급된 난소적출군에서도 DM에 의한 해마의 NMDA 수용체 발현 증가 효과가 나타나지 않은 점으로 보아, 암컷의 경우 해마에서의 NMDA 수용체 발현정도는 DM에 의한 기억손상 기전에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Tortella FC, Pellicano M, Bowery NG. Dextromethorphan and neuromodulation: old drug coughs up new activities. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:501-507.
2. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* 1999;51:7-61.
3. Katz NP. MorphiDex [MS:DM] double-blind, multiple-dose studies in chronic pain patients. *J Pain Symptom Manage* 2000;19(1 Suppl):S37-41.
4. Wolfe TR, Caravati EM. Massive dextromethorphan ingestion and abuse. *Am J Emerg Med* 1995;13:174-176.
5. Zhang TY, Jahng JW, Kim DG. Dextromethorphan increases tyrosine hydroxylase mRNA in the mesencephalon of adolescent rats. *Neurosci Lett* 2001;309:85-88.
6. Zhang TY, Jahng JW, Kim EJ, Chung H, Kim DG. Chronic dextromethorphan increases NMDAR1 immunoreactivity in the brain and induces sensitization of stereotyped behavior in female rats. *Soc Neurosci Abs* 1999;25:2077.
7. Jahng JW, Zhang TY, Lee S, Kim DG. Effects of dextromethorphan on nocturnal behavior and brain c-Fos expression in adolescent rats. *Eur J Pharmacol* 2001;431:47-52.
8. Collingridge G. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 1987;330:604-605.

9. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP-5. *Nature* 1986;319:774-776.
10. Baker KB, Kim JJ. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem* 2002;9:58-65.
11. McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol* 2001;16:S7-S19.
12. Pavlides C, Nivon LG, McEwen BS. Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 2002;12:245-257.
13. Reagan LP, McEwen BS. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat* 1997;13:149-167.
14. Wolf OT, Convit A, McHugh PF, Kandil E, Thorn EL, De Santi S et al. Cortisol differentially affects memory in young and elderly men. *Behav Neurosci* 2001;115:1002-1011.
15. Takahashi T, Kimoto T, Tanabe N, Hattori T, Yasumatsu N, Kawato S. Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca^{2+} elevation in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2002;83:1441-1451.
16. Mondadori C, Weiskrantz L, Buerki H, Petschke F, Fagg GE. NMDA receptor antagonists can enhance or impair learning

- performance in animals. *Exp Brain Res* 1989;75:449–456.
17. Sousa N, Almeida OF. Corticosteroids: sculptors of the hippocampal formation. *Rev Neurosci* 2002;13:59–84.
 18. Wellman CL. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol* 2001;49:245–253.
 19. Kamphuis PJ, Gardoni F, Kamal A, Croiset G, Bakker JM, Cattabeni F et al. Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity: involvement of the NMDA receptor complex. *FASEB J* 2003;17:911–913.
 20. Morris RGM. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neuroscience* 1989;9:3040–3057.
 21. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996;87:1327–1338.
 22. Olton DS, Papas BC. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*. 1979;17:669–682.
 23. Wolf OT. HPA axis and memory. *Best pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17:287–299.
 24. Shakesby AC, Anwyl R, Rowan MJ. Overcoming the effects of stress on synaptic plasticity in the intact hippocampus: rapid actions

- of serotonergic and antidepressant agents. *J Neuroscience* 2002;22:3638-3644.
25. Adams MM, Smith TD, Moga D, Gallagher M, Wang Y, Wolfe BB et al. Hippocampal dependent learning ability correlates with N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor levels in CA3 neurons of young and aged rats. *J Comp Neurol* 2001;432:230-243.
 26. Zhang TY. Effects of dextromethorphan treated at adolescent on behavior and neurochemistry in rats[dissertation]. Seoul: Yonsei Univ.; 2001.
 27. Lynch WJ, Roth ME, Carroll ME. Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. *Psychopharmacology* 2002;164:121-137.
 28. Bowman RE, Beck KD, Luine VN. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm Behav* 2003;43:48-59.
 29. Gould E, Tanapat P, Cameron HA. Adrenal steroids suppress granule cell death in the developing dentate gyrus through an NMDA receptor-dependent mechanism. *Develop Brain Res* 1997;103:91-93.
 30. Cameron HA, Tanapat P, Gould E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* 1998;82:349-354.
 31. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid

- hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav* 1994;28:464-476.
32. Venero C, Sandi C. Effects of NMDA and AMPA receptor antagonists on corticosterone facilitation of long-term memory in the chick. *Eur J Neurosci* 1997;9:1923-1928.
 33. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-39.
 34. Donald PC. LTP, NMDA, genes and learning. *Current Opinion in Neurobiology* 1997;7:235-242.
 35. Escobar ML, Chao V, Bermudez-Rattoni F. In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain res* 1998;779:314-319.
 36. Izquierdo I, Medina JH. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology* 25:1-9.
 37. Choi JM, Romeo RD, Brake WG, Bethea CL, Rosenwaks Z, McEwen BS. Estradiol increases pre- and post-synaptic proteins in the CA1 region of the hippocampus in female Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 2003;144:4734-4738.
 38. Kalkbrenner KA, Standley CA. Estrogen modulation of NMDA-induced seizures in ovariectomized and non-ovariectomized rats. *Brain res* 2003;964:244-249.
 39. Weaver Jr CE, Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH. 17 β -Estradiol

- protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain res* 1997;761:338–341.
40. Gazzaley AH, Weiland NG, McEwen BS, Morrison JH. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. *J Neuroscience* 1996;16:6830–6838.
 41. Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ. Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci* 1994;14:667–696.
 42. Winocur G, Moscovitch M. Hippocampal and prefrontal cortex contributions to learning and memory: analysis of lesion and aging effects on maze learning in rats. *Behav Neurosci* 1990;104:544–551.
 43. Isgor C, Sengelaub DR. Effects of neonatal gonadal steroids on adult CA3 pyramidal neuron dendritic morphology and spatial memory in rats. *J Neurobiol* 2003;55:179–190.
 44. Kesner RP, Hunt ME, Willians JM, Long JM. Prefrontal cortex and working memory for spatial response, spatial location, and visual object information in the rat. *Cereb Cortex* 1996;6:311–318.
 45. Mondadori C, Borkowski J, Gentsch C. The memory-facilitating effects of the competitive NMDA-receptor antagonist CGP 37849 are steroid-sensitive, whereas its memory-impairing effects are not. *Psychopharmacology* 1996;124:380–383.
 46. Mondadori C, Gentsch C, Hengerer B, Ducret T, Borkowski J, Racine A et al. Pretreatment with aldosterone or corticosterone

- blocks the memory-enhancing effects of nimodipine, captopril, CGP 37,849, and strychnine in mice. *Psychopharmacology*. 1992;109:383–389.
47. Kim CK, Rivier CL. Nitric Oxide and Carbon Monoxide have a stimulatory role in the hypothalamic–pituitary–adrenal response to physico–emotional stressors in rats. *Endocrinology* 2000;141:2244–2253.
 48. Healy DG, Kelly JP, Leonard BE. Corticosterone influences the NMDA receptor antagonist MK–801 induced hyperactivity in the rat. *Biochem soc trans* 1998;26:S23.
 49. Stienstra CM, van Diepen MT, Joëls M. Field responses to perforant path stimulation in the rat dentate gyrus: role of corticosterone and NMDA–receptor activation. *Brain res* 2000;854:230–234.
 50. Duman RS, Malberg J, Nakagawa S. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:401–407.
 51. Wolf OT, Convit A, McHugh PF, Kandil E, Thorn EL, De Santi S et al. Cortisol differentially affects memory in young and elderly men. *Behav Neurosci* 2001;115:1002–1011.
 52. Reibel S, Andre V, Chassagnon S, Andre G, Marescaux C, Nehlig A et al. Neuroprotective effects of chronic estradiol benzoate treatment on hippocampal cell loss induced by status epilepticus in the female rat. *Neuroscience lett* 2000;281:79–82.
 53. Gureviciene I, Puolivali J, Pussinen R, Wang J, Tanila H, Ylinen A.

- Estrogen treatment alleviates NMDA-antagonist induced hippocampal LTP blockade and cognitive deficits in ovariectomized mice. *Neurobiol learn mem* 2003;79:72-80.
54. Behl C, Holsboer F. The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:441-443.
 55. Nihei MK, Desmond NL, McGlothlan JL, Kuhlmann AC, Guilarte TR. N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. *Neuroscience* 2000;99:233-242.
 56. Weiland NG, Orchinik M, Tanapat P. Chronic corticosterone treatment induces parallel changes in N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA levels and antagonist binding sites in the hippocampus. *Neuroscience* 1997;78:653-662.
 57. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: the good and bad sides of the response to stress. *Metabolism* 2002;51:2-4.
 58. McGaugh J. Memory: a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
 59. McEwen BS. Multiple ovarian hormone effects on brain structure and function. *J Gend Specif Med* 1998;1:33-41.
 60. Wilson IA, Puolivali J, Heikkinen T, Riekkinen Jr P. Estrogen and NMDA receptor antagonism: effects upon reference and working memory. *Eur J Pharmacol* 1999;381:93-99.

61. Picazo O, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Neuroprotective and neurotoxic effects of estrogens. *Brain res* 2003;990:20–27.
62. Keefe DL. Sex hormones and neural mechanisms. *Arch Sex behav* 2002;31:401–403.
63. Li C, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R et al. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:2185–2190.
64. Bimonte HA, Denenberg VH. Estradiol facilitates performance as working memory load increases. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:161–173.
65. Frick KM, Fernandez SM, Bulinski SC. Estrogen replacement improves spatial reference memory and increases hippocampal synaptophysin in aged female mice. *Neuroscience* 2002;115:547–558.
66. Markham JA, Pych JC, Juraska JM. Ovarian hormone replacement to aged ovariectomized female rats benefits acquisition of the Morris water maze. *Horm behav* 2002;42:284–293.
67. Chesler EJ, Juraska JM. Acute administration of estrogen and progesterone impairs the acquisition of the spatial Morris water maze in ovariectomized rats. *Horm behav* 2000;38:234–242.
68. Woolley CS. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm behav* 1998;34:140–148.

69. Adams MM, Shah RA, Janssen WG, Morrison JH. Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:8071-8076.
70. McEwen BS. Clinical review 108: The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1790-1797.
71. Bane A, Rojas D, Indermaur K, Bennett T, Avery D. Adverse effects of dextromethorphan on the spatial learning of rats in the Morris water maze. *Eur J Pharmacol* 1996;302:7-12.
72. Sicar R. Postnatal phencyclidine-induced deficit in adult water maze performance is associated with N-methyl-D-aspartate receptor upregulation. *Int J Devl Neuroscience* 2003;21:159-167.
73. 김경환, 고창만, 김기원, 김동구, 노재열, 백영홍 외. 이우주의 약리학 강의. 제5판. 서울: 의학문화사; 2003.

Abstract

Alterations in brain function induced by dextromethorphan at adolescence in rats

Hee Jeong Cho

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jeong Won Jahng)

Dextromethorphan (DM), a widely used antitussive agent and non-competitive antagonist of NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor, has been recently abused among adolescences. We previously observed that repeated administration of DM during adolescent period impairs water maze learning of rats in late age, parallel with a loss in the hippocampal neurons. NMDA receptor antagonism has been reported to impair the performance of spatial learning tasks. Corticosterone modulates the neurons in the hippocampus and the prefrontal cortex, which implicated in spatial learning. The hippocampal function is known to be sexually dimorphic, and we previously reported a sex difference in behavioral and neurochemical effects of DM given at adolescence. Both estrogen and NMDA receptor have been implicated in the neural plasticity of the hippocampus. In this study, we examined the effects of chronic corticosterone on spatial learning and the hippocampal NMDAR1

expression in male rats, and of estrogen in female rats.

Male rats received 10 daily injection of DM (40 mg/kg, i.p.) from PND 28 through 37, and three weeks of daily corticosterone (40 mg/kg, s.c.) was followed afterwards. Female rats received ovariectomy or sham operation on PND 21, and daily injection of DM (40 mg/kg, i.p.) was given from PND 28 through 37. A group of ovariectomized females received daily injection of 17 beta-estradiol (1 μ g in 200 μ l of sesame oil as a vehicle, s.c.) from PND 24 through 37 and of DM from PND 28 through 37. Control rats received vehicle injections at each drug injection. Rats were subjected to the Morris water maze and/or radial arm maze tasks 24 h after the last drug injection, and then sacrificed for immunohistochemical and western blot analyses of the brain tissues 24 h after the final session of behavioral tests.

Following results were obtained :

In the male study,

1. Repetitive high dose DM at adolescence impairment in probe trial of the Morris water maze task, up-regulated the hippocampal expression of NMDAR1 in male rats.
2. Chronic corticosterone followed after the repetitive DM ameliorated DM-induced impairment in the maze learning, reversed the DM-induced increase in the hippocampal NMDAR1 expression.
3. No significant difference was found among the experimental groups in the radial arm maze task.
4. Neither DM nor corticosterone appeared to alter the neuronal density

or morphology of pyramidal neurons in the hippocampal formation.

In the female study,

1. Repetitive high dose DM at adolescence produced impairment in probe trial of the Morris water maze task, up-regulated the hippocampal expression of NMDAR1 in female rats.
2. Either DM-induced impairment in the maze test or up-regulation of the hippocampal NMDAR1 expression was not found in the ovariectomized female rats.
3. The DM-induced impairment in water maze learning, but not NMDAR1 up-regulation, was revived with estrogen replacement in the ovariectomized female rats.

These results demonstrate that repetitive high dose DM at adolescence impairs spatial memory and up-regulates the hippocampal expression of NMDAR1 both in male and female rats. It is suggested that the DM-induced impairment in water maze learning may correlate with increased NMDAR1 expression in the hippocampus. Chronic glucocorticoids may ameliorate the DM-induced spatial memory impairment, at least partly, through its potential action in down-regulating NMDAR1 expression in the hippocampus. It appears that estrogen may take a role in the DM-induced memory impairment in female rats. Although the action of ovarian hormones appears to be required for DM-induced up-regulation of the hippocampal NMDAR1 expression, the NMDAR1 up-regulation may not be an essential factor for the DM-induced spatial memory impairment in female rats.

Key Words : dextromethorphan, drug abuse, learning and memory,
hippocampus, NMDA receptor, Morris water maze,
corticosterone, estrogen