

흰쥐의 소뇌에서 글루탐산수송체의 노화에 따른 변화

이 은 영¹, 최 용²

충북대학교 의과대학 및 의학전문대학원 ¹해부학교실,
²약리학교실, ^{1,2}의학연구소

간추림 : 본 연구에서는 흰쥐의 소뇌에서 글루탐산수송체인 GLT-1과 GLAST의 노화에 따른 분포 양상 및 그 양적 변화를 비교하였다. 이를 위하여 Sprague-Dawley계 흰쥐를 성숙군으로 3개월령, 노화군으로 24개월령을 이용하였다. 4% 파라포름알데히드 용액으로 관류고정 한 다음, 소뇌를 적출하고 뇌절편을 제작하여 GLT-1, GLAST에 대한 면역조직화학염색을 시행하였고, 면역조직염색 후 일부는 전자현미경 관찰을 위한 표본을 제작하였다. 관찰 결과, 소뇌에서 GLT-1과 GLAST에 대한 면역염색성은 소뇌 회색질의 전체 층에서 광범위하게 흩어져 관찰되었다. 노화군에서 GLT-1에 대한 면역염색성은 성숙 대조군보다 증가한 반면, GLAST는 노화군에서 감소한 양상을 보였고 Western blot 결과는 면역조직화학염색의 결과와 일치하였다. 면역조직화학염색된 소뇌를 전자현미경으로 관찰한 결과, GLT-1과 GLAST 각각은 별아교세포의 특징을 나타내는 아교세포에 국한되어 존재하였으며, 신경세포에서는 관찰되지 않았다. 본 연구결과는 소뇌에서 글루탐산수송체인 GLT-1과 GLAST의 발현은 노화에 따른 변화를 보였는데, GLT-1은 노화에 따른 증가를, GLAST는 노화에 따른 감소를 보임으로, 이 두 수송체는 서로 다른 조절 기전에 의한 노화에 따른 변화를 나타낼 가능성이 있음을 시사하였다.

(2008년 11월 24일 접수, 2008년 12월 19일 게재승인)

찾아보기 낱말 : 글루탐산수송체, GLT-1, GLAST, 소뇌, 노화

서 론

글루탐산 (glutamate)은 포유류의 뇌에서 주된 흥분성 신경전달물질이다(Curtis와 Johnston 1974, Fonnum, 1984). 글루탐산은 뇌에서의 신경연접전달에 핵심적인 물질이지만, 이것이 과도할 경우 신경세포의 손상과 세포사멸을 유발할 수 있음이 널리 알려져 있다(Maragakis와 Rothstein 2001). 글루탐산에 의한 신경독성은 뇌졸중 (stroke), 근위축성측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis), 알츠하이머씨병 (Alzheimer's disease), 간질 (epilepsy)의 한 기전으로

보고되고 있다(Maslah 등 1996, Maragakis와 Rothstein 2001). 따라서, 글루탐산의 연접부위로부터 과잉의 글루탐산의 흡수는 세포가 생존하는데 있어서 필수적이다. 세포밖공간으로부터 세포의 안쪽으로 글루탐산을 흡수하는데 일차적으로 중요한 역할을 하는 것은 주로 별아교세포 (astrocyte)의 세포막에 존재하는 글루탐산수송체 (glutamate transporter)에 의한 수송체의존적흡수 (transporter-mediated uptake)이다(Rothstein 등 1996). 별아교세포에 의한 글루탐산의 수송은 Na^+ 에 의존적인 방식과 비의존적 방식 두 가지가 존재한다. 이 둘 중 Na^+ 에 의존적인 시스템이 글루탐산에 대해 친화도가 더 높으며, 중추신경계에서 글루탐산수송에 있어서 더 우세한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Anderson과 Swanson 2000). 별아교세포에 존재하는 Na^+ 에 의존적 글루탐산 수

*이 논문은 2005년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

교신저자: 이은영 (충북대학교 의과대학 및 의학전문대학원 해부학교실)

전자우편: eylee@chungbuk.ac.kr

송체는 흰쥐의 뇌에서 가장 먼저 클로닝되었으며, 그 이름을 GLAST (glutamate/aspartate transporter) 와 GLT-1 (glutamate transporter-1)으로 명명하였다 (Pines 등 1992; Storck 등 1992). 사람에서는 이를 EAAT1 (excitatory amino acid transporter 1)과 EAAT2 (excitatory amino acid transporter 2)로 각각 명명하였다 (Shashidharan과 Plaitakis 1993, Shashidharan 등 1994).

GLT-1과 GLAST는 포유류의 뇌에서 각기 서로 다른 분포를 지닌다고 보고되었다. 즉, 출생 시에 GLAST는 흰쥐의 앞뇌 (forebrain)와 소뇌에 많이 분포해 있는 반면, GLT-1은 생후 3주까지도 흰쥐의 뇌에서 거의 발현되지 않다가 생후 5주 경에 성체의 수준에 도달한다는 보고가 있다 (Ullensvang 등 1997). 성체의 뇌에서 GLT-1은 앞뇌에서 가장 많이 발현하며, 꼬리핵 (caudate nucleus), 대뇌겉질 (cerebral cortex), 해마 (hippocampus)에서 많이 발현된다는 보고가 있었다 (Rothstein 등 1994). 소뇌에서는 GLAST의 발현이 GLT-1보다 높은 것으로 알려져 있다 (Milton 등 1997, Lehre와 Danbolt 1998). 즉, 소뇌에서는 평행섬유 (parallel fiber)와 조롱박세포 (Purkinje cell) 사이의 연결에서 글루탐산이 신경전달물질로 사용되는데, 이를 감싸고 있는 신경아교세포가 주로 GLAST를 함유하고 있고, 소량의 GLT-1을 함유하고 있음이 보고된바 있다 (Lehre와 Danbolt 1998, Xu-Friedman 등 2001). 이 두개의 글루탐산수송체는 평행섬유와 조롱박세포 사이의 연결부위에서 글루탐산의 확산에 의한 조롱박세포의 AMPA 수용체를 통한 조롱박세포의 활성화를 제한시킨다는 보고가 있었다 (Marcaggi 등 2003). 소뇌에서 GLAST의 기능은 명확히 밝혀지지는 않았지만, GLAST 유전자 변이 생쥐에서 운동의 조화불능과 소뇌 손상시 부종의 양이 증가한다는 결과가 보고된 바 있다 (Watase 등 1998).

중추신경계에 분포하는 글루탐산수송체의 노화에 따른 변화는 아직 잘 알려져 있지 않지만, 간접적으로 퇴행성신경질환자에서의 변화나, 노화에 따른 글루탐산대사의 변화에 대한 이전의 보고들은 다음과 같다. 근위축성측삭경화증과 같은 퇴행성신경질환자

의 뇌에서 글루탐산수송체의 감소가 보고된 바 있는데 (Rothstein 등 1992), 이중 GLT-1의 감소가 보고되었다 (Rothstein 등 1995). Liang 등 (2002)은 알츠하이머씨병 환자 뇌의 별아교세포에서 글루탐산의 흡수가 감소되었다고 보고한 바 있다. 노화에 따른 글루탐산대사의 변화에 대하여는 연구 결과들이 일치하지 않고 있다. 예를 들어, 뇌에서 글루탐산의 농도가 노화된 흰쥐에서는 감소하였다는 보고 (Wallace와 Dawson 1990)가 있는 반면, 노화된 생쥐를 이용한 다른 연구에서는 변화가 없다고 보고 하였다 (Kirzinger와 Fonda 1978). 또한, 노화된 흰쥐의 대뇌겉질과 줄무늬체 (striatum)에서 글루탐산의 흡수가 감소하였다고 보고된 바 있으나 (Matsumoto 등 1982, Najlerahim 등 1990, Vatasery 등 1998, Liang 등 2002), 별 변화가 없다는 보고 (Dawson 등 1989)도 있었다.

이와 같이 노화와 연관된 글루탐산수송체의 변화에 대한 연구는 아직 미흡하기에, 본 연구에서는 흰쥐의 소뇌에서 노화에 따른 글루탐산수송체의 발현의 변화를 면역조직화학염색과 western blot을 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

Sprague-Dawley계의 흰쥐를 사용하였다. 성숙대 조군은 3개월령, 3마리를 사용하였으며, 노화군은 24개월령, 4마리를 사용하였다. 실험동물은 암수의 구별없이 사용하였다.

2. 면역조직화학염색 및 전자현미경

실험동물을 ether로 흡입 마취시킨 다음 심장으로 생리식염수를 먼저 관류하고 곧이어 4% paraformaldehyde (0.1 M PB, pH 7.4)를 관류하여 고정시켰다. 뇌를 곧바로 적출하고 동일한 고정액으로 4°C에서 4시간 동안 후고정하였다.

뇌를 세척한 다음 진동절편기 (vibrating micro-

tome)를 이용하여 40 µm 두께의 관상절편 (coronal section)을 제작하였다. 제작한 뇌 절편을 phosphate buffered saline (PBS)에 세척한 다음 내재성 peroxidase 활성을 억제하기 위하여 1% H₂O₂ 용액에 15분간 반응시켰다. 세척한 다음 일차항체용액에서 반응시켰다. 일차항체로는 guinea pig anti-glial glutamate transporter GLAST (EAAT1) (Cat No.#AB1782, Chemicon International Inc., Temecula, CA) 또는 guinea pig anti-glial glutamate transporter GLT-1 (EAAT2) (Cat No. #AB1783, Chemicon International Inc.)를 각각 사용하였으며, 이들은 0.01 M PBS에 1 : 1,000이 되도록 희석한 용액에서 조직과 12시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 이후, 세척한 조직은 biotinylated goat anti-guinea pig IgG (Vector Lab., Burlingame, CA), avidin-biotin peroxidase complex (Vector Lab.) 용액에서 순차적으로 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 발색반응 0.003% hydrogen peroxide를 함유한 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, St.Louis, MO) 용액을 사용하였다.

면역조직화학염색을 마친 뇌 조직 절편의 일부는 광학현미경관찰을 위한 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 슬라이드를 제작하였고, 일부의 조직절편은 전자현미경관찰을 위해 다음의 과정을 거쳤다. 즉, 염색한 조직은 다시 1% glutaraldehyde (0.1 M PB) 용액, 1% osmium tetroxide 용액에서 각각 순차적으로 1시간 동안 후고정하였다. 이후, 에탄올을 이용하여 탈수하고, 탈수과정 중 70% 에탄올로 제작한 1% uranyl acetate 용액에서 1시간 동안 처리하였다. 탈수가 끝난 조직절편은 프로필렌옥사이드 용액을 거쳐 에폰(Epon 812)을 이용하여 포매하고 중합시켰다. 중합이 끝난 조직절편은 광학현미경 상에서 염색이 잘 된 부분을 잘라 비어있는 에폰 레진에 부착시킨 다음 이를 굳혀 초박절편을 제작하고, 대조 염색 없이 전자현미경 상에서 관찰하였다 (Hitachi, Japan).

3. Western blot

흰쥐를 ether로 마취시킨 다음 소뇌를 적출하였다.

각 동물로부터의 조직을 따로 분리하여 Tris 완충액 (20% glycerol, 10 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)에 넣고 polytron을 이용하여 분쇄하였다. 12,000 g, 4°C에서 분쇄한 조직액을 원심분리하여 상층액을 모았다. 단백질의 농도는 Bradford 방법으로 측정하였고 모든 단백질 샘플은 전기영동 전에 95°C에서 5분간 처리하였다. GASLT, GLT-1을 위해 각 well 당 각각 1 µg의 단백질을 넣어준 다음 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% polyacrylamide gel)를 시행하고 니트로셀룰로스막 (nitrocellulose membrane)에 이를 옮겼다.

니트로셀룰로스막은 비특이적 반응을 차단하기 위하여 0.1% Tween, 2% skim milk를 함유한 Tris buffered saline (TBS)으로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 일차항체용액으로 TBS에 1 : 60,000으로 희석한 guinea pig anti-GLAST (EAAT1, Chemicon International Inc.), guinea pig anti-GLT-1 (EAAT2, Chemicon International Inc.) 각각에 실온에서 1시간 반응시켰다. TBS에 세척 후, 이차항체용액으로 horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-guinea pig IgG (1 : 8,000, Zymed, San Francisco, CA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 면역반응물은 최종적으로 enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection kit (Amersham International plc, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 확인하였다.

결 과

1. 면역조직화학염색 결과와 전자현미경 관찰 결과

GLT-1과 GLAST에 대한 면역반응력 (immunoreactivity)은 소뇌의 백색질을 제외하고 소뇌의 회색질의 모든 층, 즉, 분자층 (molecular layer), 조롱박층 (Purkinje cell layer), 과립층 (granule cell layer)에서 관찰되었다 (Fig. 1). 면역염색성은 특정신경세포나 아교세포의 세포체를 나타내지 않고, 조롱박층에서는 신경세포체의 사이에서 관찰되었으며, 다른 층에

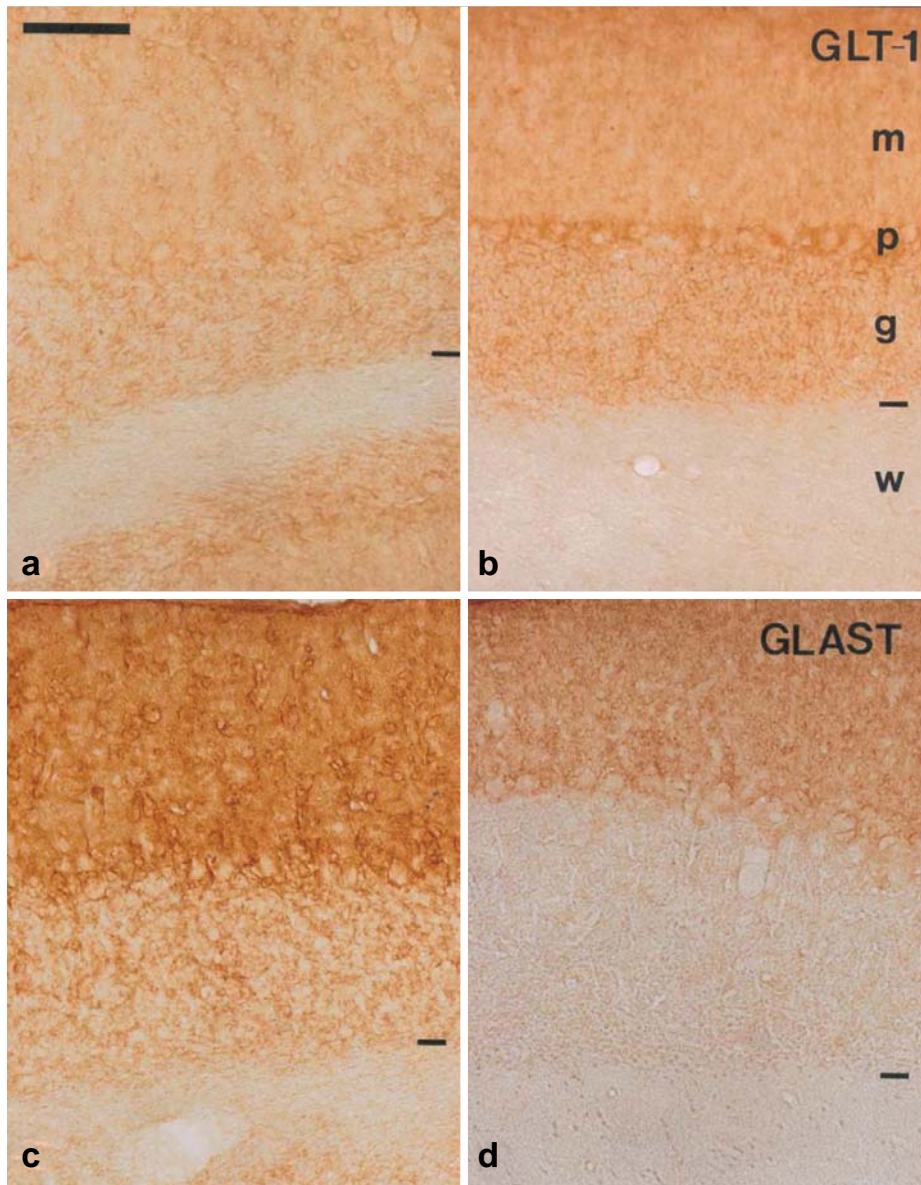


Fig. 1. GLT-1- and GLAST-immunoreactivity (IR) in the cerebellum of young and aged rats. Immunoreactive materials were distributed throughout the gray matter of the cerebellum but not in the white matter (a~d). Immunoreactivities were found in the molecular, Purkinje cell, and granule cell layers (a~d). Staining intensity of GLT-1 in aged cerebellum (b) appeared to be higher than in young control (a). In the aged cerebellum, GLT-1-immunoreactive materials were densely packed around the Purkinje cells (b). In contrast to GLT-1-IR, the immunostaining intensity of GLAST was higher in young control (c) than in aged cerebellum (d). In the cerebellum of young rat, dense immunostaining intensity of GLAST was observed in the molecular layer (c). m, molecular layer; p, Purkinje cell layer; g, granule cell layer; w, white matter. Short bars located in middle part of Fig. 1a-d represent the boundary between the gray and the white matter of the cerebellum. Scale bar in left upper part of Fig. 1a=50 μ m. (a) GLT-1-IR in the cerebellum of young rat, (b) GLT-1-IR in the cerebellum of aged rat, (c) GLAST-IR in the cerebellum of young rat, (d) GLAST-IR in the cerebellum of aged rat.

서는 점상으로 넓게 퍼져 흩어져 존재하는 양상이었다. 성숙대조군 내에서 GLT-1과 GLAST의 면역염색을 비교하였을 때, GLAST의 면역염색성이 GLT-1보다 전반적으로 높았다(Fig. 1a, c).

광학현미경 상에서는 이들 글루탐산수송체가 세포의 세포질 안에 묻혀있지 않아 분포양상의 미세구조를 확인할 수 없었다. 그러나, 면역전자현미경을 시행한 결과, 이 두 개의 글루탐산수송체는 신경세포의 세포질에서는 관찰되지 않고, 신경세포 사이에 존재하는 아교세포 또는 뇌의 미세혈관 주위를 둘러싼 아교세포의 혈관주위돌기(perivascular end feet) 내에서 관찰되었다(Fig. 2a~c). 글루탐산수송체에 대한 면역염색성을 나타내는 세포의 세포질은 별모양의 돌기를 지닌다는 점과 균일하게 퍼진 핵질을 지닌다는 점, 그리고, 혈관주위돌기를 낸다는 점에서 GLT-1 또는 GLAST에 양성인 세포들은 별아교세포(astrocyte)로 확인되었다(Fig. 2a~c).

노화군에서의 GLT-1의 면역염색성은 분자층, 조롱박층, 과립층 모두에서 성숙대조군에서 보다 증가한 면역염색성을 보였으며(Fig. 1a, b), 이는 western blot 결과(Fig. 3)에서도 같은 양상을 보였다. 성숙대조군에서의 GLAST의 면역염색성은 GLT-1과 마찬가지로 소뇌의 백색질을 제외한 회색질의 모든 층에서 관찰되었으며, 분자층에서 가장 강하게 발현되는 양상을 나타내었다(Fig. 1c). 노화군에서는 GLAST의 면역염색성이 전반적으로 감소하여 주로 분자층에서 GLAST에 대한 면역염색성이 관찰되었다(Fig. 1d). 노화군에서 GLAST에 대한 면역염색성의 감소는 western blot 결과에서도 같은 양상을 보였다(Fig. 3).

2. Western blot 분석 결과

전기영동 상에서 GLT-1과 GLAST 단백질은 50 kDa에서 70 kDa의 분자량 사이에서 관찰되었다. 성숙대조군의 소뇌에서 GLAST의 발현이 GLT-1의 발현보다 높았다. 소뇌에서 각 글루탐산수송체의 노화에 따른 변화로서, GLT-1의 발현은 노화군의 경우가 성숙대조군의 경우보다 증가되었다. 그러나,

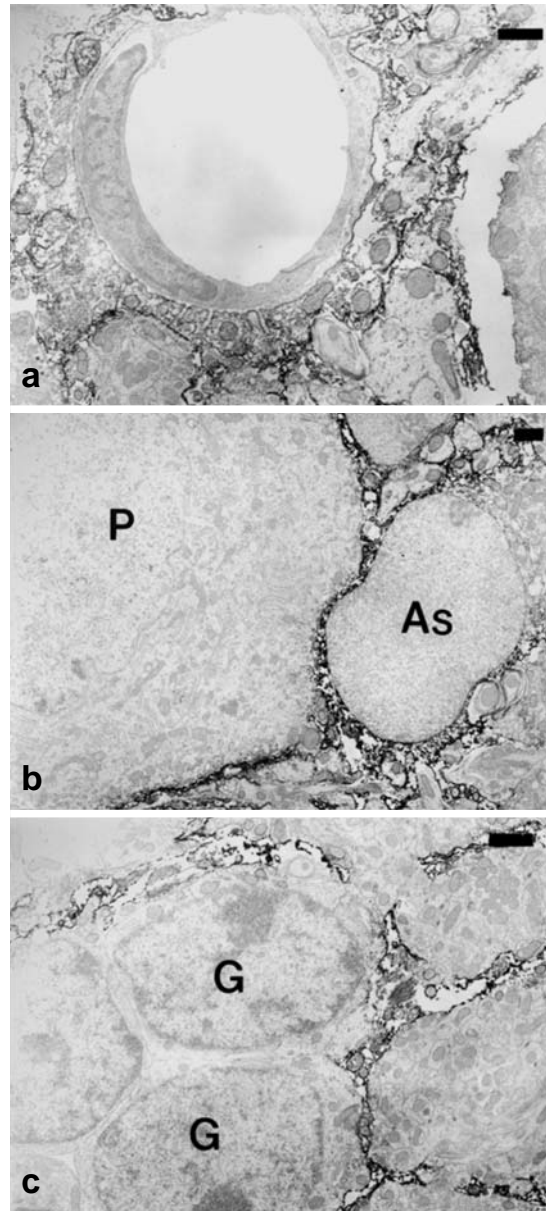


Fig. 2. Pre-embedding immunoelectron microscopy for GLT-1 (a) and GLAST (b, c) in the cerebellum of young rat. Dark granular reaction products indicate the localization of GLT-1 (a) or GLAST (b, c). They were present in astrocytic perivascular end feet (a) surrounding brain microvessel as well as in parenchymal astrocytes (b, c). P, Purkinje cell; As, astrocyte; G, granule cell. (a) GLT-1, (b) GLAST, (c) GLAST. All bars=1 μ m.

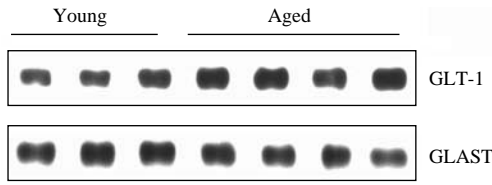


Fig. 3. Western blots of GLT-1 and GLAST with the cerebellum from young and aged rats. Each lane represents the result of different animal (n=3 for young; n=4 for aged). Each lane for the GLT-1 and GLAST was loaded with 1 µg of protein. GLT-1 bands migrated to approximately 60 kDa molecular marker, and GLAST bands were detected at approximately 50 kDa molecular mass.

GLAST의 발현은 노화 흰쥐의 소뇌에서 성숙 대조군보다 그 발현이 감소하였다(Fig. 3).

고 찰

본 연구는 글루탐산수송체인 GLT-1과 GLAST가 흰쥐의 소뇌에서 회색질 층에 분포하고 있음을 보여주었으며, 면역전자현미경적 관찰 결과 소뇌의 별아교세포에 분포하고 있음을 제시하였고, 이 두 수송체의 양은 흰쥐의 소뇌에서 노화에 따른 변화를 보였다.

다른 연구들에서도 GLT-1과 GLAST가 주로 별아교세포에 존재하고 있다고 보고하였다(Rothstein 등 1994, Torp 등 1994, Lehre 등 1995). Promotor를 이용한 최근의 연구에서도 GLT-1 promotor는 대부분 성숙 생쥐의 중추신경계에서 별아교세포에 국한하여 존재하였으며, GLAST promotor도 radial glia와 별아교세포에 국한되어 관찰되었으며, 척수와 뇌들보(corpus callosum)에서는 백색질의 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)에서도 관찰되었으나, 소뇌를 포함한 뇌의 다른 부위에서는 백색질에서 관찰되지 않았다고 하였다(Regan 등 2007). 본 연구에서의 결과도 위에서 언급한 이전의 다른 연구자들의 결과와 일치하였다.

본 연구의 결과 소뇌에서 GLT-1과 GLAST는 노화에 따라 서로 다른 양상의 변화를 보였다. GLT-1

은 노화에 따라 증가하는 양상을 보였으며, GLAST는 감소하였다. 이는 두 글루탐산수송체가 다른 기전의 조절을 받고 있음을 암시한다. 이전에 다른 연구자들의 결과에서도 또한 이러한 가능성이 제시된 바 있다. 즉, Haugeto 등(1996)은 이 두 개의 글루탐산수송체가 별아교세포의 막에 서로 나란히 옆에 존재하지만 서로 다르게 반응한다고 제시한 바 있다. 알츠하이머씨 질병의 환자에 에스트로젠을 투여했을 경우, GLT-1과 GLAST의 단백질 발현은 모두 증가하지만, 에스트로젠 수용체에 대한 길항제를 투여했을 경우는, 에스트로젠에 의해 유발되는 GLT-1의 증가 현상은 억제되지만, GLAST에 대하여는 그런 작용이 나타나지 않았다는 연구 결과가 있다(Liang 등 2002). 이는 GLT-1과 GLAST의 단백질 합성이 서로 기전으로 조절받고 있음을 시사하는 것이다(Liang 등 2002). 이런 가능성을 뒷받침하는 또 다른 보고로는, 헌팅톤질병의 유전자변이 실험동물모델에서 GLT-1 mRNA 및 단백질은 감소하였으나, GLAST는 변화가 없다는 보고가 있었다(Behrens 등 2002). 글루탐산수송체중에서 GLAST와 알츠하이머씨병과의 연관성이 많이 제시되고 있는데, 알츠하이머씨질병 환자의 사후 뇌에서 EAAT1 (GLAST)의 강한 발현이 관찰된 바 있다(Scott 등 2002). 한편, 알츠하이머씨 병 환자의 혈소판에서 EAAT1 (GLAST)이 감소하였다는 보고도 있으며(Zoia 등 2004), 또 다른 연구에서는 알츠하이머씨 질병 환자의 섬유모세포의 일차배양시 이들 세포에서의 글루탐산 흡수가 감소하였고, EAAT1 (GLAST)의 발현은 감소하였으나, EAAT2 (GLT-1) 단백질과 mRNA는 변화가 없었다고 보고하였다(Zoia 등 2005).

GLT-1의 증가는 별아교세포의 분화와 밀접한 연관이 있다는 보고가 있다(Zschocke 등 2005). 이들의 연구에서 흰쥐 걸질의 별아교세포는 일차배양에서 dexamethasone을 투여하였을 경우 코르티코스테로이드 수용체를 통한 GLT-1의 발현이 증가했지만, GLAST의 발현은 변화하지 않았다. 도파민계가 편측성으로 파괴된 실험동물 모델에서 levodopa를 투여하였을 경우, GLT-1 발현은 증가되었지만, GLAST mRNA는 의미있는 변화를 보이지 않았다는 보고도

있다(Lievens 등 2001).

더 나아가 이 두 개의 글루탐산수송체는 서로 다른 신호전달기전(signaling mechanism)에 의해 조절됨이 아래의 여러 연구들에서 제시되고 있다. 즉, 신경세포가 분비하는 신호전달물질은 신경아교세포에서의 GLT-1 발현을 증가시킨다는 보고가 있으며(Lievens 등 1997, Figiel과 Engele 2000, Zelenania 등 2000, Behrens 등 2002), Lievens 등(1997)의 연구에 따르면, 신경세포의 손상은 글루탐산수송체의 발현에 영향을 미칠 수 있음을 제시하였다. 손상에 의해 분비되는 epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGF α), platelet-derived growth factor (PDGF)는 GLT-1의 발현을 증가시키지만, GLAST의 발현에는 영향을 미치지 않는다고 보고된 바 있다(Figiel 등 2003). 한편, GLAST의 조절에 관련하여, oxidative stress가 증가하거나, 아밀로이드베타 펩티드가 축적되었을 경우, GLAST는 빠르게 파괴되거나 구조에 변성이 일어날 수 있다고 보고된 바 있다(Butterfield와 Lauderback 2002). GLAST는 세포 안에서 세포내이입체의 막(endoplasmic membrane)과 용해소체(lysosome) 또는 플라크(plaque)와 같은 장소에서 분해된다는 보고가 있었으며(Zoia 등 2005), 이들은 알츠하이머씨 병 환자에서 뿐 아니라, 노인에서도 젊은군에 비하여, 글루탐산 흡수와 EAAT1 (GLAST)의 발현이 감소하였음을 보여주었다(Zoia 등 2005). 이상의 다른 연구자들의 보고와 본 연구 결과를 종합해 볼 때, 본 연구에서 GLT-1의 노화에 따른 증가를 설명할 수 있는 가능한 하나의 기전으로 노화에 따른 소뇌의 세포손상이나 변성이 존재하며, 이로 인해 분비된 물질에 의해 GLT-1의 발현이 증가하였을 가능성이 있을 것으로 생각된다.

GLT-1은 설치류의 앞뇌, 뇌줄기, 척수에서 글루탐산수송체중 가장 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며, 전체 글루탐산수송의 90% 이상을 GLT-1이 담당한다고 보고된 바 있다(Tanaka 등 1997). 그러나, Takatsuru 등(2007)은 GLAST(-/-) 생쥐와 GLT-1(-/-) 생쥐를 이용한 전기생리학적 실험에서 오름섬유(climbing fiber)와 조롱박세포

사이에서 이용되는 글루탐산의 흡수에 GLT-1의 역할이 GLAST보다 더 작다고 보고하였다. 본 연구에서 노화 소뇌에서 GLT-1이 증가하였지만, GLT-1 mRNA는 multiple splice의 형태로 존재한다는 보고가 있기에(Lin 등 1998, Meyer 등 1998, Munch 등 1998, Figiel과 Engele 2000), 본 연구에서 노화 소뇌에서 증가한 GLT-1이 기능적으로 모두가 활성화 형태인지는 앞으로 더 연구의 여지가 있다고 생각된다. 또한, 본 연구에서 얻어진 노화된 소뇌에서의 GLT-1의 증가와 GLAST의 감소가 기능적으로 소뇌에서 전반적인 글루탐산흡수에 어떤 방향으로 작용하는 것인지는 앞으로 더 연구해야 될 부분이다.

결론적으로, 본 연구 결과, 흰쥐의 소뇌에서 GLT-1과 GLAST가 노화에 따른 변화를 보였으며 이는 중추신경계에서의 글루탐산시스템은 노화에 따른 변화를 보이리라는 것을 제시한다. 그러나, 노화에 따른 변화로 GLT-1은 증가한 반면, GLAST는 감소하는 방향의 변화를 보였기에 이 결과는 이 두 개의 글루탐산수송체는 노화시 서로 다른 조절 기전에 의해 조절 받음을 암시한다.

참 고 문 헌

- Anderson CM, Swanson RA : Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1-14, 2000.
- Behrens PF, Franz P, Woodman B, Lindenberg KS, Landwehrmeyer GB : Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain* 125: 1908-1922, 2002.
- Butterfield DA, Lauderback CM : Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 32: 1050-1060, 2002.
- Curtis DR, Johnston GA : Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergeb Physiol* 40: 97-188, 1974.
- Dawson R Jr, Wallace DR, Meldrum MJ : Endogenous glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. *Neu-*

- robiol Aging 10: 665-668, 1989.
- Figiel M, Engele J : Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J Neurosci* 20: 3596-3605, 2000.
- Figiel M, Maucher T, Rozyczka J, Bayatti N, Engele J : Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors. *Exp Neurol* 183: 124-135, 2003.
- Fonnum F : Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42: 1-11, 1984.
- Haugeto Φ , Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC : Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271: 27715-27722, 1996.
- Kirzinger SS, Fonda ML : Glutamine and ammonia metabolism in the brains of senescent mice. *Exp Gerontol* 13: 255-261, 1978.
- Lehre KP, Danbolt NC : The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamate transport subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18: 8751-8757, 1998.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC : Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15: 1835-1853, 1995.
- Liang Z, Valla J, Sefidvash-Hockley S, Rogers J, Li R : Effects of estrogen treatment on glutamate uptake in cultured human astrocytes derived from cortex of Alzheimer's disease patients. *J Neurochem* 80: 807-814, 2002.
- Lievens JC, Dutertre M, Forni C, Salin P, Kerkerian-Le Goff L : Continuous administration of the glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate produces striatal lesion. *Brain Res Mol Brain Res* 50: 181-189, 1997.
- Lievens JC, Salin P, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L : Nigrostriatal denervation does not affect glutamate transporter mRNA expression but subsequent levodopa treatment selectively increases GLT1 mRNA and protein expression in the rat striatum. *Neurochem* 79: 893-902, 2001.
- Lin CLG, Tzingounis AV, Jin L, Furuta A, Kavanaugh M, Rothstein JD : Molecular cloning and expression of the rat EAAT4 glutamate subtype. *Mol Brain Res* 63: 174-179, 1998.
- Maragakis NJ, Rothstein JD : Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58: 365-370, 2001.
- Marcaggi P, Billups D, Attwell D : The role of glutamate transporters in maintaining the independent operation of juvenile mouse cerebellar parallel fibre synapses. *J Physiol* 552: 89-107, 2003.
- Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L : Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 40: 759-766, 1996.
- Matsumoto H, Kikuchi S, Ito M : Age-related changes in the glutamate metabolism of cerebral cortical slices from rats. *Neurochem Res* 7: 679-685, 1982.
- Meyer T, Munch C, Knappenberger B, Liebau S, Volkel H, Ludolph AC : Alternative splicing of the glutamate transporter EAAT2 (GLT1). *Neurosci Lett* 241: 68-70, 1998.
- Milton ID, Banner SJ, Ince PG, Piggott NH, Fray AE, Thatcher N, Horne CH, Shaw PJ : Expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res* 52: 17-31, 1997.
- Munch C, Schwalenstocker B, Knappenberger B, Liebau S, Volkel H, Ludolph AC, Meyer T : 5'-heterogeneity of the human excitatory amino acid transporter cDNA EAAT2 (GLT1). *Neuroreport* 9: 1295-1297, 1998.
- Najlerahim A, Francis PT, Bowen DM : Age-related alterations in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. *Neurobiol Aging* 11: 155-158, 1990.
- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI : Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360: 464-467, 1992.
- Regan MR, Huang YH, Kim YS, Dykes-Hoberg MI, Jin L, Watkins AM, Bergles DE, Rothstein JD : Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J Neurosci* 27: 6607-6619, 2007.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF : Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 15: 675-686, 1996.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW : Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *New Engl J Med* 326: 1464-1468, 1992.

- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW : Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725, 1994.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW : Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38: 73-84, 1995.
- Scott HL, Pow DV, Tannenbergh AE : Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22: 1-5, 2002.
- Shashidharan P, Plaitakis A : Cloning and characterization of a glutamate transporter cDNA from human cerebellum. *Biochim Biophys Acta* 216: 161-164, 1993.
- Shashidharan P, Wittenberg I, Plaitakis A : Molecular cloning of human brain glutamate/aspartate transporter II. *Biochim Biophys Acta* 1191: 393-396, 1994.
- Storck T, Schulte S, Hoffmann K, Stoffel W : Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10955-10959, 1992.
- Takatsuru Y, Iino M, Tanaka K, Ozawa S : Contribution of glutamate transporter GLT-1 to removal of synaptically released glutamate at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neurosci Lett* 420: 85-89, 2007.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K : Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276: 1699-1702, 1997.
- Torp R, Danbolt NC, Babale E, Bjørås M, Seeberg E, Storm-Mathisen J, Ottersen OP : Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 6: 936-942, 1994.
- Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC : Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur J Neurosci* 9: 1646-1655, 1997.
- Vatassery GT, Lai JC, Smith WE : Aging is associated with a decrease in synaptosomal glutamate uptake and an increase in the susceptibility of synaptosomal Vitamin E to oxidative stress. *Neurochem Res* 23: 121-125, 1998.
- Wallace DR, Dawson R : Effect of age and monosodium-L-glutamate (MSG) treatment on neurotransmitter content in brain regions from male Fischer-344 rats. *Neurochem Res* 15: 889-898, 1990.
- Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K : Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10: 976-988, 1998.
- Xu-Friedman MA, Harris KM, Regehr WG : Three-dimensional transmission comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21: 6666-6672, 2001.
- Zelenian O, Schlag BD, Gochenauer GE, Ganel R, Song W, Beesley JS : Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF- κ B. *Mol Pharmacol* 57: 667-678, 2000.
- Zoia CP, Cogliati T, Tagliabue E : Glutamate transporters in platelets: EAAT1 decrease in aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25: 149-157, 2004.
- Zoia CP, Tagliabue E, Isella V, Bergni B, Fumagalli L, Brighina L, Appollonio I, Racchi M, Ferrarese C : Fibroblast glutamate transport in aging and AD: correlations with disease severity. *Neurobiol Aging* 26: 825-832, 2005.
- Zschocke J, Bayatti N, Clement AM, Witan H, Figiel M, Engle J, Behl C : Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions. *J Biol Chem* 280: 34924-34932, 2005.

Abstract

Age-Related Changes of Glutamate Transporters in the Rat Cerebellum

Eun Young Lee¹, Woong Choi²

*Department of ¹Anatomy and ²Pharmacology, School of Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju, Korea*

In the present study, we examined the distribution and amount of two important glutamate transporters, GLT-1 and GLAST in the cerebellum of young and aged rats. Sprague-Dawley rats were used at the age of three months for young control (n=3) and 24 months for aged group (n=4). After transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde, brain sections were immunostained for GLT-1, and GLAST. We found that GLT-1- and GLAST-immunoreactive materials were diffusely distributed throughout the gray matter of the cerebellum. Pre-embedding immunoelectron microscopic study demonstrated that the two glutamate transporters in the cerebellum were restricted to glial cells with astrocytic features. The intensity of GLT-1-immunostaining in the cerebellum appeared to be higher in aged rats than in young rats whereas GLAST-immunostaining decreased with aging. Western blot results were also consistent with the immunohistochemical observations. Conclusively, GLT-1 and GLAST expression in the rat cerebellum was changed with aging, i.e, increase of GLT-1 and decrease of GLAST expression with aging, which suggests that the two glutamate transporters might be regulated by different underlying mechanisms with aging.

Key words : Glutamate transporters, GLT-1, GLAST, Cerebellum, Aging