

## TREK2 채널에 대한 항정신성약물 및 항우울제의 효과

곽지연<sup>1</sup>, 김양미<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>인하대학교 의과대학 생리학교실, <sup>2</sup>충북대학교 의과대학 생리학교실

## The effect of antipsychotics and antidepressants on the TREK2 channel

Jiyeon Kwak<sup>1</sup> and Yangmi Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Physiology, College of Medicine, Inha University

<sup>2</sup>Dept. of Physiology, College of Medicine, Chungbuk National University

**요 약** Fluoxetine과 tianeptine은 보편적으로 사용되는 항우울제 (AD)이며, haloperidol과 risperidone도 많이 사용되는 항정신성 (APD) 약물로 다양한 이온채널을 조절한다. TREK2 채널은 우울증과 정신분열증 같은 정신질환에 대한 병태생리학적으로 중요한 역할을 하는 TREK1 채널과 생리학적 성질이 매우 비슷하여, 정신성 및 우울증 약물의 TREK2 채널에 대한 효과가 TREK1과 유사하게 나타날 가능성이 있다. Excised inside-out 패치 방법을 사용하여, 클론된 TREK2 채널이 발현된 CHO 세포에서 항정신성 약물과 항우울제의 효과를 조사했다. Fluoxetine (선택적 세로토닌 방출 억제제, SSRI)은 TREK2 채널을 농도 의존적으로 억제하였으나 ( $IC_{50} = 13 \mu M$ ), tianeptine (선택적 세로토닌 재흡수 증가제, SSRE)은 TREK2 채널 활성을 감소시키지 않고 증가시켰다. Haloperidol은 TREK2 채널을 농도 의존적으로 억제하였으나 ( $IC_{50} = 44 \mu M$ ), risperidone은 고농도 (100  $\mu M$ )에서도 TREK2 채널 활성을 완전히 억제 시키지 못했다. 본 연구는 tianeptine 보다 fluoxetine이 TREK2 채널을 더 잘 억제하고 risperidone 보다 haloperidol에 더 잘 억제됨을 보여 주었고, TREK2 채널에 대한 항정신성 약물과 항우울제의 차별적 작용이 약물 부작용의 어떤 기전에 기여 할 수 있음을 제시한다.

**Abstract** Fluoxetine and tianeptine are commonly used as antidepressants (AD), and haloperidol and risperidone are widely used as antipsychotic drugs (APD), and it modulates various ion channels. TREK2 channel subfamily is very similar to physiological properties of TREK1 channel which can play important roles in the pathophysiology of mental disorders such as depression and schizophrenia, therefore, the pharmacological effect of psychiatric and depression drug on TREK2 channel may be similar to those of TREK1. Using the excised inside-out patch-clamp technique, we have examined the effects of APD and AD on cloned TREK2 channel expressed CHO cells. Fluoxetine (selective serotonin release inhibitor, SSRI) inhibited the TREK2 channel in a concentration-dependent manner ( $IC_{50} 13 \mu M$ ), whereas selective serotonin reuptake enhancer (SSRE) tianeptine increased without reducing the TREK2 channel activity. Haloperidol also inhibited the TREK2 channel in a concentration-dependent manner ( $IC_{50} 44 \mu M$ ), whereas even higher concentration (100  $\mu M$ ) of risperidone did not completely inhibit on the activity. This study showed that TREK2 channel was preferentially blocked by fluoxetine rather than tianeptine, and inhibited by haloperidol rather than risperidone, suggesting differential effect of TREK2 channels by APD and AD may contribute to some mechanism of adverse side effects.

**Key Words** : TREK2, Antipsychotic drug, Antidepressant, Tianeptine, Excised inside-out patch

본 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비에 의하여 수행되었음.

\*Corresponding Author : Yangmi Kim

Tel: +82-10-4213-9376 email: yangmik@chungbuk.ac.kr

접수일 12년 04월 10일

수정일 (1차 12년 04월 30일, 2차 12년 05월 04일)

게재확정일 12년 05월 10일

## 1. 서론

시냅스 공간에 세로토닌이나 도파민, 노르에피네프린 같은 신경전달 물질이 결여되면 정신질환이 유발되기 때문에 대부분의 항정신성약물(antipsychotic drug, APD)이나 항우울제(antidepressant drug, AD)는 시냅스에 있는 신경전달물질의 농도를 높이는 약리 작용을 한다[1]. 이러한 신경전달물질을 일정하게 유지하기 위해 신경말단의 전시냅스(presynapse)에서 신경전달 물질의 재흡수를 막거나 후시냅스(postsynapse)에서 신경전달 물질이 수용체에 붙지 못하게 하여 항우울이나 항정신성효과를 나타낸다[1]. 하지만 APD 및 AD의 작용기전은 매우 다양하기 때문에 장기간 복용할 경우 또는 과량을 복용할 경우 많은 부작용을 유발한다[2]. 신경전달 물질의 작용은 이온채널 개폐에 의한 세포막 전압의 변화에 의해 시작되므로 이온채널에 의한 신경세포의 흥분성 조절이 이러한 약물작용 기전에 중요하다[3].

이온채널에 대한 약리학적 효과에 대한 조사는 약물개발에 있어서 아주 중요한 부분 중의 하나로 이온채널이 어떤 농도에서 어떤 이온채널을 억제 또는 활성화하는지에 대한 연구는 약물의 부작용을 줄일 수 있는 필수불가결한 절차 중의 하나이다. 약물개발에 있어서 독성 테스트를 포함한 모든 테스트가 완료되었다고 하더라도 이온채널에 대한 테스트가 완료되지 않았다면 임상에 사용할 수가 없다. 왜냐하면 만약 개발된 약물이 생명을 위협하는 채널, 예를 들어 심장에 존재하는 채널( $Ca^{2+}$  채널,  $K^+$  채널,  $Na^+$  채널, K2P 채널 등)을 나노몰(nM) 수준에서 억제하거나 증가시킨다면 부정맥을 일으켜 생명에 위협을 가할 수 있기 때문이다. 그러므로 약물개발에 있어서 이온채널을 조절하는지 조사하는 것은 필수 불가결하다[4]. 이것은 기존의 임상응용 약물에도 적용된다. 특히 포타슘 채널은 세포의 안정막전압 유지와 밀접한 관련이 있으므로 포타슘 채널을 억제 또는 활성화시킬 수 있는 저농도의 약물이라면 더욱 위험하다.

그러므로 본 연구에서 다양한 채널 중 two-pore 도메인 포타슘(K2P) 채널 중의 하나인 TREK2 채널에 대한 AD와 APD의 효과를 관찰하였다. K2P 채널들이 세포 내외의 pH의 변화나 저산소증, 휘발성마취제, 항경련제, 세포막전전, 불포화 지방산 등 다양한 자극에 의해 반응하기 때문에 K2P 채널에 대한 약리학적 반응 조사는 마취제 뿐 아니라 항우울제, 항정신성 약물에까지 확대되었다[5]. K2P 채널은 TWIK, TASK, TREK, THIK, TRESK, TALK 등 18종이 보고되었고[5], 특히 이들 중 TREK1 채널은 항우울 효과와 연관성이 있고[5], fluoxetine과 같은 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)에 의해 직접적으로 조절됨이 확인되었다[6].

수십 년 동안 APD 및 AD는 다양한 이온채널 즉, hERG

(human ether-a-go-go Related Gene) 채널[7, 8],  $K_v$  (막전압 의존성  $K^+$  channel) 채널[9], GIRK (G-protein activated  $K^+$  channel) 채널[10],  $K_{ir}$  (Inward rectifying  $K^+$  channel) 채널[11],  $K_{Ca}$  ( $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel) 채널[12],  $Na^+$  채널[13], 음이온채널[14],  $Ca^{2+}$  채널[15] 등을 조절하는 것으로 보고되었다. 하지만 TREK2 채널에 대한 AD 및 APD의 효과 연구보고는 거의 없다.

APD 중 risperidone은 benzisoxazole 유도체로서 도파민  $D_2$  수용체와 세로토닌 5HT 수용체(receptor)의 길항제로 작용한다고 알려져 있고 [16], 비전형적인(atypical) APD로서 haloperidol과 같은 전형적인(typical) APD에 잘 반응하지 않는 정신분열증 환자에게 효과를 보이는 것으로 알려져 있다[16]. AD 중 tianeptine은 비전형적인 삼환계(tricyclic) AD이지만 삼환계 약물과는 그 효과 면에서 차이가 있으며 [17], SSRI 약물과는 다르게 SSRI로서 시냅스의 세로토닌 농도의 감소를 초래하여 세로토닌의 신경전달을 감소시키는 약물로 알려져 있으며 정확한 기전은 아직까지 불분명하다 [17, 18]. TREK1 채널은 신경말단의 전시냅스(presynapse)에 많이 존재한다고 알려져 있고, 이 채널이 억제 또는 활성화 되면 세포막 전압을 조절하여 시냅스 소포에서의 세로토닌과 같은 신경전달물질의 방출을 조절할 것으로 생각된다 [19]. 만약 AD나 APD가 TREK 채널에 영향을 주지 않은 약물이라면 세포막의 탈분극에 기여하지 못하게 되고 다른 경로를 통해 신경가소성의 증가를 유발하여 신경전달물질의 불균형을 교정하는데 중요한 역할을 할 것이다[20].

다양한 이온채널을 표적으로 하는 AD 및 APD가 많이 보고되었고 이온채널을 표적으로 하는 약물은 수많은 세포내 신호 전달 물질에 작용하는 약물보다 좀 더 특이적으로 작용할 수 있으므로 약물개발 및 약물의 부작용 연구에 있어서 아주 유용하다. 그럼에도 불구하고 K2P중 TREK1과 기능적으로나 유전자적으로 유사성을 가진 TREK2에 대한 APD와 AD의 효과에 대한 연구는 시도되지 않았다. 본 연구에서 TREK2 채널 단백질을 CHO 세포에 과발현하여 AD 중 tianeptine과 fluoxetine, 그리고 APD 중 haloperidol 과 risperidone의 TREK2 채널에 대한 효과를 비교 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 TREK-2의 발현

CHO (Chinese Hamster Ovary) 세포는 35 mm 배양접시에 세포가 50-80% 정도까지 자랄 때까지 10% fetal calf serum (Life technology, Calsbad, CA, USA)이 포함된 RPMI 1640 (Life technology)에서 배양하여 트랜스펙션(transfection)에 사용하였다. TREK2 (Genbank accession No: NM\_023096)을

pcDNA3.1 vector (Life technology)에 클로닝하고 lipofectamin (Life technology)을 이용하여 트랜스펙션 하여 전기생리학적 실험에 사용하였다. 그 방법을 간단하게 요약하면, 녹색 형광단백질(green fluorescence protein, GFP)과, TREK2를 lipofectamin과 Opti-MEM (Life technology)을 함께 넣어 5 시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, 20% fetal calf serum이 들어있는 RPMI 1640 배양액 1 ml을 넣어주고 하룻밤 동안 배양하였다. TREK2 채널 단백질이 발현된 세포는 0.25% 트립신(trypsin)으로 처리하여 Poly-D-lysine (Sigma, St Louis, MO, USA)이 처리된 12 mm 커버글라스 (cover glass)로 옮겨 글래스에 붙으면 1 시간 후부터 2 일 ~ 3 일 동안 전기생리학적 실험에 사용하였고, 트립신 처리 전후의 단일채널역학 (single channel kinetics)은 변하지 않았다. 또한 녹색형광이 보이지 않은 세포에서는 TREK2 채널이 기록되지 않았다 (n=10).

## 2.2 실험용액

본 실험에 사용된 fluoxetine, tianeptine, haloperidol, risperidone은 Sigma (St.Louis, MO, USA)에서 구입하여 dimethyl sulfoxide (DMSO), 물, 에탄올에 녹여 사용하였고, 모든 용액은 실험 직전 만들어 사용하였다. 용매로 사용된 용매의 최종 농도는 0.1%를 넘지 않았고, 용매는 단일채널 역학에 영향을 주지 않았다. 불포화 지방산인 arachidonic acid (Sigma St.Louis, MO, USA)는 수용액에 잘 녹지 않으므로 유기용매인 클로로포름 (chloroform)에 녹여 -70°C에 보관하였다가 실험 직전 꺼내 클로로포름을 증발시킨 후 초음파세척기 (sonicator)로 10분 이상 분쇄하여 실험에 사용하였다. 전기생리학적 실험에 사용할 용액은 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA 로 구성하였고, pH는 HCl로 7.2 또는 pH 6.0으로 적정하였다.

## 2.3 전기생리학적 방법

단일채널전류 (single channel current)는 막전압 고정법 (voltage clamp technique) 중의 하나인 패치고정기법 (patch clamp technique)을 이용하여 기록하였다[21, 22]. 패치고정기법은 세포내 성분의 변화 없이 유리전극이 붙어있는 부분에 있는 단일채널을 기록할 수 있는 cell-attached 패치기법, 세포 전체의 세포막에 존재하는 채널을 기록할 수 있는 whole-cell 패치기법, 세포 내 용액을 자유롭게 변경하면서 단일채널을 기록할 수 있는 excised inside-out 패치기법, 세포 밖 용액을 바꾸며 단일채널을 기록할 수 있는 excised outside-out 패치기법이 있다[21, 22]. 본 연구에서는 excised inside-out 기법을 사용하였다[21, 22]. 채널전류를 기록할 때에는 사용되는 미세유리전극은 미세유리전극제조기

(PP-830, Narishige, Japan)를 사용하여 2 MΩ~ 3 MΩ 저항의 전극을 만들어 사용하였다. 전류기록 시에는 패치고정 증폭기 (patch clamp amplifier, Axopatch 200B, Axon Instruments, Union City, CA, USA)로 GΩ seal 이상의 패치만 기록하였고 (n = 257), GΩ seal 이하의 패치는 데이터 분석에서 배제하였다. 패치를 형성한 모습은 그림 1에 삽입되어 있다. 매크로 램프 전류는 excised inside-out 패치 상태에서 유지전압 (holding potential)을 0 mV로 하고 -100 mV에서 100 mV 까지 300 ms 동안 램프 자극 (ramp pulse)을 주어 전류를 기록하였고, 단일채널 전류 (single channel current)는 유지전압을 -60 mV 또는 -40 mV에서 excised inside-out 패치 상태로 gap-free 모드에서 기록하였다. 세포막에 주어지는 음압은 주사기를 이용하여 유리전극을 통해 직접 세포막에 입력되었다. 기록되는 전류는 10 kHz의 샘플링 비율로 digidata interface (Digidata 1322A, Axon instrument, Union City, CA, USA)를 이용하여 컴퓨터에 저장하였다. 전류는 형광 현미경 (TE 2000, Nikon, Japan)을 이용하여 488 nm의 파장에서 녹색 형광이 확인된 세포에서만 기록하였고, 기록되는 신호는 8-pole Bessel filter (-3dB, Frequency Device)를 사용하여 2 kHz에서 필터 하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다 (22-25 °C).

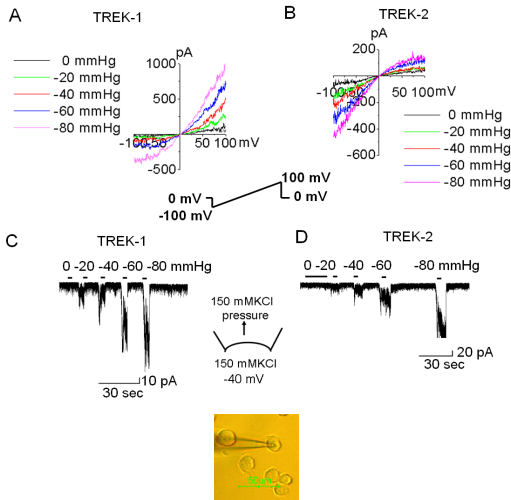
## 2.4 데이터 분석

모든 데이터는 pCLAMP 프로그램 (version 9.02, Axon instrument, Union City, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 모든 데이터는 전류의 크기 (amplitude, pA), 이온채널 활성화도 (NP<sub>o</sub>, N은 이온통로의 수, P<sub>o</sub>는 활성을 가진 채널의 열릴 확률)를 분석하였다[21, 22]. TREK2 전류에 대한 APD와 AD의 농도-반응 그래프를 그리기 위해 Origin software (OriginLab, Corp, Northampton, MA, USA)에서 Hill 공식  $y = 1/(1+(IC_{50}/[D])^n)$  식을 사용하였다. y는 채널 활성화도 (또는 전류의 크기)를 나타낸다. IC<sub>50</sub>는 AD또는 APD에 의해 TREK2 채널이 50% 억제되는 값이며 n은 Hill 상관계수, D는 APD 또는 AD의 농도이다. 상대적 채널활성도 (relative channel activity)는 NP<sub>o</sub>/NP<sub>oControl</sub>, 상대적 전류 (relative current)는 I/I<sub>Control</sub>로 계산하였다. 모든 수치는 평균 ± S.E.로 나타내었다. APD 및 AD 처리 전의 평균값과 APD 및 AD 처리 후 평균값의 차이는 unpaired (independent) Student's t를 사용하였고, 모든 통계량의 유의수준은 P<0.05로 하였다.

## 3. 결과

### 3.1 TREK1 채널과 TREK2 채널의 전류 전압 곡선 비교

TREK1 채널과 TREK2 채널의 생리학적 성질은 비슷하지만 단일 통로의 전도도와 전류-전압 (I-V) 곡선의 모양은 다르다. 이를 확인하기 위해 excised inside-out 패치를 형성하여 유지전압을 0 mV로 고정하고 -100 mV에서 100 mV 까지 300 ms 동안 램프 자극(그림 1의 inset)을 주어 전류-전압 (I-V) 곡선을 기록하였다(그림 1A 와 1B). 그림 1에서 TREK1 채널의 I-V 곡선은 outward rectifying 성질을 보였고, TREK2 채널의 I-V 곡선은 inward rectifying 전류를 보였다.



[그림 1] TREK1 채널과 TREK2 채널의 전류-전압곡선 비교  
[Fig. 1] Comparison of current - voltage relationships on TREK1 and TREK2 channel

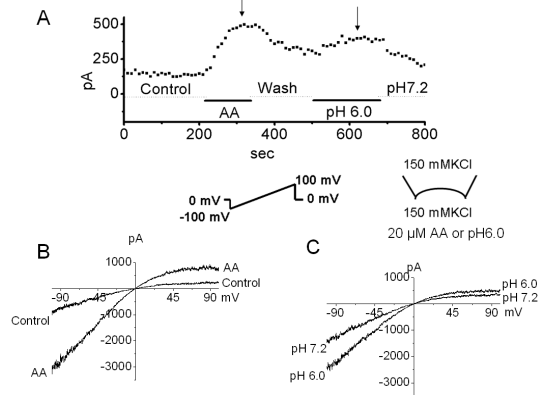
\*\* ↑: 음압을 주는 방향

이 전류는 세포내 (bath) 용액과 세포막 (pipette) 용액은 동일하게 150 mM KCl 용액을 사용하여 기록하였다. 이 두 전류는 세포막 신전에 의해 활성화되는 성질을 가지고 있으므로 유리전극을 통해 세포막에 기계적으로 음압을 가하여 채널의 세포막 신전에 대한 효과를 관찰하였다. 세포막에 음압을 가하면 음압이 증가함에 따라 전류의 크기는 증가하였고, I-V 곡선 모양은 TREK1 채널은 outward rectifying을 TREK2 채널은 inward rectifying 을 보였다. 즉 이 두 채널은 매우 유사한 생리학적인 성질을 가지고 있지만 I-V 곡선으로 TREK1인지 TREK2 인지 구분 할 수 있었다(그림 1A와 1B).

세포막신전의 효과는 단일채널 수준 (single channel level)에서도 관찰되었다(그림 1C 와 1D). 단일채널기록은 유지 전압 -40 mV에서 기록되었으며 유리전극을 통해 음압을 -20 mmHg 부터 -80 mmHg까지 적용하여 세포막을 신전시켜 주면 채널 활성이 증가되었다가 음압을 제거하면 다

시 채널 활성이 원래대로 회복되는 효과를 보였다(그림 1C 와 1D). 이 효과는 K2P 채널 중 TREK2, TREK1, TRAAK 채널에서만 나타나는 효과이며 연구자들에 의해 보고된 바 있다[23, 24].

TREK2 채널이 잘 발현되었는지 확인하기 위하여 TREK2 채널의 활성제인 세포내 산성 pH와 불포화 지방산 중의 하나인 arachidonic acid (AA)의 효과를 확인하였다(그림 2). TREK2는 불포화 지방산과 세포내 산성 pH의 적용에 의해 잘 활성화되는 것으로 보고된 바 있다[23, 24]. 그림 2는 AA (20 μM)에 의해 상대적 전류가 약 2 배 활성화된 후 ( $I/I_{Control} = 1.99 \pm 0.20, n=7$ ) AA를 씻어내면 천천히 회복되었다. 세포내 산성 pH에 의해 1.5 배 활성화 ( $I/I_{Control} = 1.47 \pm 0.12, n=5$ ) 되었다가 회복됨을 확인하였다(그림 2, 표 1).



[그림 2] TREK2 채널에 대한 불포화 지방산과 세포내 산성 pH의 효과

[Fig. 2] The effect of arachidonic acid and intracellular acidic pH on TREK2 channel

\*\* ↑; 그림 2B와 2C의 I-V 곡선이 기록된 지점

[표 1] TREK2 채널에 대한 불포화 지방산과 세포내 산성 pH의 효과

[Table 1] The effect of arachidonic acid and intracellular acidic pH on TREK2 channel

용액	측정전압 (mV)	상대적 전류 (평균 ± S.E.)	n
AA (20 μM)	-60	1.99 ± 0.20*	7
	60	2.43 ± 0.31*	7
pH (6.0)	-60	1.47 ± 0.12*	5
	60	1.67 ± 0.12*	5

\*\*상대적 전류는 ± 60 mV에서  $I/I_{Control}$ 로 표시.

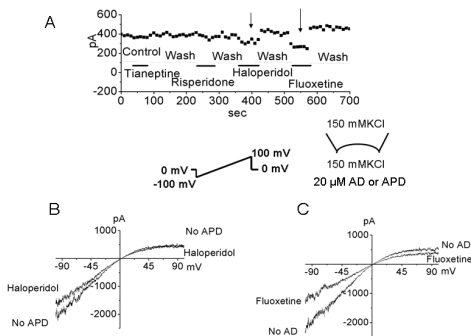
\*:  $p < 0.05$ 에서 유의성 있음

그림 2A는 활성제 투여 후 시간에 따른 전류의 변화를 유지전압을 0 mV로 하고 -100 mV에서 100 mV 까지 램프 자극

극을 주면서 기록한 전류로 막전압 50 mV에서 측정된 전류의 크기를 시간에 따라 나타낸 것이다. 그림 2B와 2C는 TREK2 채널에 AA와 산성 pH 용액을 처리하였을 경우 기록되는 I-V 곡선이다. TREK2 채널 I-V 곡선 모양인 inward rectifying을 잘 보여 주고 있다 (그림 2)

### 3.2 TREK2 채널에 대한 APD 및 AD의 효과

TREK1은 AD에 의해 억제되고 TREK1 결여쥐 (TREK1 knockout mice)는 항우울 효과를 나타낸다[25]. TREK1과 기능적으로나 유전자적으로 유사성을 가진 TREK2 채널도 APD 및 AD에 반응할 가능성이 있다. 그러므로 TREK2 채널을 조절하는 APD 및 AD를 조사하기 위해 유지전압을 0 mV로 하고 -100 mV에서 100 mV까지 램프 자극을 주어 약물의 효과를 관찰하였다 (그림 3). AD 중 SSRI로 알려진 fluoxetine (20 μM)의 TREK2 채널에 대한 효과는 유지전압 -60 mV에서 약물 처리 후 35% 감소하였다 ( $I/I_{Control} = 0.65 \pm 0.08, n=8$ ).



[그림 3] TREK2 채널에 대한 항정신성 약물 및 항우울제의 효과  
 [Fig. 3] The effect of antipsychotics and antidepressants on TREK2 channel  
 \*\* ↓; 그림 3B와 3C의 I-V 곡선이 기록된 지점

하지만 SSRI로 알려진 tianeptine (20 μM)은 -60 mV에서 34% ( $I/I_{Control} = 1.34 \pm 0.12, n=4$ ), 60 mV에서 16% ( $I/I_{Control} = 1.16 \pm 0.05, n=4$ ) TREK2 전류를 증가시키는 양상을 보였다. 전형적인 APD (typical antipsychotic drug)인 haloperidol (20 μM)은 -60 mV에서 약물 처리 후 25% 감소하였으며 ( $I/I_{Control} = 0.75 \pm 0.10, n=5$ ), 비전형적 APD (atypical antipsychotic drug)인 risperidone (20 μM)은 TREK2 전류를 18% 감소시켰다 ( $I/I_{Control} = 0.82 \pm 0.04, n=5$ ) (그림 3, 표 2).

매크로 TREK2 전류에 대한 AD와 APD의 효과가 단일채널 수준에서도 나타나는지 조사하였다.

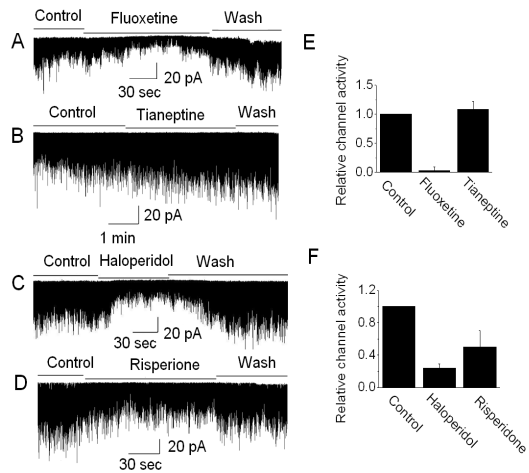
[표 2] TREK2 채널에 대한 항우울제 및 항정신성 약물 효과  
 [Table 2] The effect of antidepressants and antipsychotics on TREK2 channel

약물		전압 (mV)	상대적 전류 (평균 ± S.E.)	n
A D	Fluoxetine (20 μM)	-60	0.65 ± 0.08*	8
		60	0.66 ± 0.07*	9
	Tianeptine (20 μM)	-60	1.34 ± 0.12*	4
		60	1.16 ± 0.05*	4
A P D	Haloperidol (20 μM)	-60	0.75 ± 0.10*	5
		60	0.75 ± 0.11*	6
	Risperidone (20 μM)	-60	0.82 ± 0.04*	5
		60	0.84 ± 0.05*	5

\*\* 상대적 전류는 ± 60 mV에서  $I/I_{Control}$ 로 표시.

\*:  $p < 0.05$ 에서 유의성 있음

단일채널 기록에서는 그 효과를 극대화 하기 위해 100 μM 농도를 사용하였다.



[그림 4] 단일채널 기록에서 TREK2 채널에 대한 항정신성 약물 및 항우울제 약물 효과  
 [Fig. 4] The effect of antipsychotics and antidepressants on TREK2 channel using single channel recording

그림 4에서 SSRI로 알려진 fluoxetine 에서 상대적 채널 활성도 (relative channel activity,  $NP_o/NP_{oControl}$ )가 93% 까지 현저히 감소함을 알 수 있었으나 ( $NP_o/NP_{oControl} = 0.08 \pm 0.02, n=5$ ), SSRI로 알려진 tianeptine (100 μM)의 효과는 1% 내외로 채널활성이 거의 변화가 없거나 오히려 증가하였다 ( $NP_o/NP_{oControl} = 1.01 \pm 0.07, n=4$ ) (그림 4 와 표 3) 이러한 결과는 TREK2 매크로 전류에서의 tianeptine의 결과와 유사하다 (표 2)

전형적인 APD인 haloperidol에 의해 TREK2 채널 활성화는 76% 까지 감소됨이 확인 되었으나 ( $NP_o/NP_oControl = 0.24 \pm 0.05, n=3$ ) 비전형적인 APD 인 risperidone은 그 효과는 50% 감소로 그 효과가 haloperidol 보다는 작았다 ( $NP_o/NP_oControl = 0.50 \pm 0.18, n=4$ ) (그림 4, 표3). 이러한 결과를 종합해 볼 때 TREK2 채널에 대한 AD 또는 APD의 유형에 따라 효과는 차별적으로 나타남을 알 수 있었다.

[표 3] 단일채널 기록에서 TREK2 채널에 대한 항정신성 약물 및 항우울제에 대한 상대적 채널 활성화도  
 [Table 3] The relative channel activity of antipsychotics and antidepressants on TREK2 channel using single channel recording

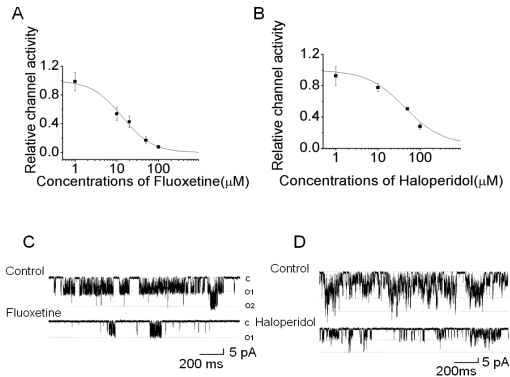
약물		전압 (mV)	상대적 채널 활성화도 (평균 ± S.E.)	n
A D	Fluoxetine (100 μM)	-60	0.08 ± 0.02*	5
	Tianeptine (100 μM)	-60	1.01 ± 0.07	4
A P D	Haloperidol (100 μM)	-60	0.24 ± 0.05*	3
	Risperidone (100 μM)	-60	0.50 ± 0.18*	4

\*\* 상대적 채널 활성화도는  $NP_o/NP_oControl$ 로 표시.

\*:  $p < 0.05$ 에서 유의성 있음

### 3.3 TREK2 채널에 대한 항정신성 약물 및 항우울제의 농도 의존성

이러한 결과를 바탕으로 haloperidol과 fluoxetine이 TREK2 채널을 최대로 억제하는지 농도를 알아보기 위해 채널이 50% 억제되는 농도 즉  $IC_{50}$ 를 측정하였다 (그림 5). Haloperidol의  $IC_{50}$ 는 44 μM ( $43.5 \mu M \pm 6.8 \mu M, n=5$ ) 이었고 Hill 상관계수는 0.97 이었다 (그림 5A). Fluoxetine의  $IC_{50}$ 는 13 μM ( $13.4 \mu M \pm 2.8 \mu M, n=5$ ) Hill 상관계수는 1.19 이었다 (그림 5B). 그림 5C와 5D는 대표적인 단일채널 trace로 시간을 확장한 것이다. 그림 5C에서 약물 처리 전 (control)일 경우 하나 또는 두 개의 열린 채널이 관찰되고 있으며, fluoxetine (100 μM)의 처리 하였을 경우 채널 활성화 가능성이 감소되고 있어 채널 하나만 무작위로 열리고 닫힘을 보여 주고 있다 (그림 5C). Haloperidol의 경우도 control에서 세 개의 열린 채널의 활성이 관찰되고 있고, haloperidol을 (100 μM)을 처리할 경우 두 개의 채널의 활성이 관찰되고 있음이 관찰되었다 (그림 5D). 이러한 결과는 fluoxetine과 haloperidol이 TREK2 채널의 열리고 닫힘 즉 채널역학에 기여하여 채널 활성도를 조절함을 보여주었다.



[그림 5] TREK-2에 대한 항정신성 약물 및 항우울제의 농도 의존성

[Fig. 5] Dose dependency of antipsychotics and antidepressants on TREK-2

\*\* c; 채널 닫힘, o1; 채널 1개 열림, o2; 채널 2개 열림, o3; 채널 3개 열림

## 4. 고찰 및 결론

우리는 전기생리학적 방법을 이용하여 TREK2 채널에 대한 비전형적 AD (tianeptine) 및 APD (risperidone) 그리고 전형적 AD (fluoxetine) 및 APD (haloperidol)의 약리학적 효과를 처음으로 확인하였다.

SSRE인 tianeptine은 SSRI인 fluoxetine과 달리 100 μM의 고농도에서도 TREK2 채널을 억제시키지 못했고 오히려 증가시키는 양상을 보였다 (표 2 와 그림 4). 이러한 결과는 쥐 해마의 CA3 뉴런에서 글루타메이트 수용체 전류 ( $I_{glutamate}$ )를 증가시킨다는 결과와 유사하였다[26]. 하지만 쥐의 등쪽 솔기핵 신경 (dorsal raphe neuron)에서 억제성 신경전달물질인 GABA (gamma-aminobutyric acid) 또는 글라이신 (glycine)에 의해 유발되는 전류 ( $I_{GABA}$  또는  $I_{glycine}$ )에 의해 억제된다는 결과와는 상반된다[27]. 이러한 연구 보고 및 결과는 tianeptine의 불확실한 항우울 기전에 대한 단서를 제공할 수 있을지도 모른다. 더구나 tianeptine은 fluoxetine 만큼 유용한 AD로 사용되고 있기 때문에[18], fluoxetine과 같은 전형적인 AD에 대한 TREK2 채널의 과도한 억제가 오히려 AD에 의한 부작용을 일으키는 원인을 유추해 낼 수 있는 열쇠가 될 수도 있다.

현재 연구에서 fluoxetine이 TREK2 채널을 50% 억제하는 농도인  $IC_{50}$ 는 13 μM로 TREK1에 대한 fluoxetine의  $IC_{50}$  9 μM과 거의 유사하였다[6]. 고농도 fluoxetine (100 μM)에서 TREK1과 TREK2의 억제 효과는 각각 84%와 93%로 유사하게 관찰되었다[6]. 다양한 채널, 즉 HERG 채널[7],  $K_{v1.3}$ [28], T형 칼슘 채널(T-type  $Ca^{2+}$  channel)[15]에 대한

fluoxetine의 IC<sub>50</sub>가 3.1 μM, 6 μM, 1 μM로 TREK2 채널에 대한 fluoxetine의 IC<sub>50</sub> 13 μM 보다는 작지만 (그림 5) CNG 뉴런에서 K<sub>v</sub>의 IC<sub>50</sub> 11 μM[9], GIRK (G-protein activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel)의 IC<sub>50</sub> 17 μM[10], 정상교세포의 K<sub>ir4.1</sub> IC<sub>50</sub> 15.2 μM[11] 과는 유사하거나 약간 낮았다.

본 연구에서 haloperidol의 경우 TREK2 채널에 대한 50% 억제되는 IC<sub>50</sub> (44 μM)는 해마에서 칼슘채널에 대한 haloperidol에 억제되는 IC<sub>50</sub>(15 μM) 보다는 세 배 정도 높고 [3], 특히 유전자 적으로 또는 병태생리학적 성질이 유사한 TREK1 채널에 대한 haloperidol의 IC<sub>50</sub>(6 μM)에 비하면 약 여덟 배나 높은 수치이다[6]. Haloperidol이 나노몰 농도 (170 nM)로도 HERG 채널을 억제하여 긴 QT 증후군 (Long QT syndrome)을 유발하여 부정맥을 유발 할 수 있다는 결과는 haloperidol의 IC<sub>50</sub>가 높으면 심장에 존재하는 TREK2 채널에는 영향을 주지 않을 가능성이 크므로 APD의 임상응용에 있어서 부작용을 줄일 수 있는 어떤 기전이 기여할 수 있음을 시사한다[29].

송과선 (pituitary gland)의 GH<sub>3</sub> 세포에서 risperidone은 빠르게 활성화되는 막전압 의존성 포타슘 채널 (I<sub>Kr</sub>)과 칼슘에 활성화 되는 포타슘 채널 (K<sub>Ca</sub>)을 10 μM 이하에서 억제하였으나, 막전압 의존성 포타슘 채널(K<sub>v</sub>)와 L형 칼슘채널 (L-type Ca<sup>2+</sup> channel)에는 효과가 없었다[30]. 또한 척수후근 신경절 (dorsal root ganglion) 세포의 I<sub>GABA</sub> 전류가 고농도의 risperidone (IC<sub>50</sub> = 106 μM)에 의해 억제되었다는 결과는 risperidone의 TREK2 채널에 대한 본 연구의 결과(그림 4)와 유사하였다[31]. 우리의 결과에서 risperidone이 고농도 (100 μM) 에서 50% 정도만 억제하므로 전형적 APD인 haloperidol에 의한 부작용시 비전형적 AD인 risperidone으로 대체하여 APD에 대한 부작용을 감소시킬 수도 있음을 시사한다. 이러한 결과는 심장세포에서 risperidone은 30 μM 농도로 포타슘 전류를 감소시켜 재분극을 느리게 하여 부정맥을 일으킬 수 있다는 결과가 이 가능성을 지지한다[32].

본 연구에서 나타난 SSRE AD인 tianeptine과 비전형적 risperidone의 TREK2 채널에 대한 효과는 이전의 연구에서 대부분의 AD나 APD가 TREK1 채널을 억제한다는 결과와 비교하면 무척 흥미롭다. 이러한 결과는 TREK2 채널이 AD 및 APD에 의해 차별적으로 조절될 수 있음을 시사한다. 그러므로 약물이 항우울 효과나 항정신성 효과를 동일하게 나타낸다고 하더라도 유사성을 가진 채널에 대한 그 약물의 효과는 생리학적으로 상반되게 나타날 수 있으므로 임상적으로 AD나 APD를 응용할 경우 약물의 다양성뿐 아니라 채널에 대한 약물효과의 다양성도 고려해야 할 것으로 생각된다.

요약하면, 비전형적 AD인 tianeptine은 TREK2 채널을 억제하지 않았고 비전형적 APD 인 risperidone 또한 haloperidol 보다 TREK2 채널에 대한 억제 효과가 작았다.

이러한 결과는 APD 및 AD 의한 부작용을 유발하는 기전 연구에 기여 할 수 있을 것으로 생각된다.

## References

- [1] H. Y. Meltzer, et al., "The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs". *Curr Opin Pharmacol*, Vol. 11, No. 1, pp.59-67, Feb. 2011.
- [2] J. Gerlach, "New antipsychotics: classification, efficacy, and adverse effects". *Schizophr Bull*, Vol. 17, No. 2, pp.289-309. 1991.
- [3] E. J. Fletcher, et al., "Haloperidol blocks voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal neurones". *Eur J Pharmacol*, Vol. 267, No. 2, pp.249-52, Apr. 1994.
- [4] T. Kazic, et al., "Potassium channels and the development of new drugs". *Med Pregl*, Vol. 51, No. 11-12, pp.481-8, Nov-Dec. 1998.
- [5] A. Mathie, et al., "Trafficking of neuronal two pore domain potassium channels". *Curr Neuropharmacol*, Vol. 8, No. 3, pp.276-86, Sep. 2010.
- [6] S. Thummler, et al., "Antipsychotics inhibit TREK but not TRAAK channels". *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 354, No. 1, pp.284-9, Mar. 2007.
- [7] D. Thomas, et al., "The antidepressant drug fluoxetine is an inhibitor of human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channels". *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 300, No. 2, pp.543-8, Feb. 2002.
- [8] D. Rampe, et al., "The antipsychotic agent sertindole is a high affinity antagonist of the human cardiac potassium channel HERG". *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 286, No. 2, pp.788-93, Aug. 1998.
- [9] S. Y. Yeung, et al., "Inhibition of neuronal K<sub>v</sub> potassium currents by the antidepressant drug, fluoxetine". *Br J Pharmacol*, Vol. 128, No. 7, pp.1609-15, Dec.1999.
- [10] T. Kobayashi, et al., "Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by fluoxetine (Prozac)". *Br J Pharmacol*, Vol. 138, No. 6, pp.1119-28, Mar.2003.
- [11] Y. Ohno, et al., "Inhibition of astroglial K<sub>ir4.1</sub> channels by selective serotonin reuptake inhibitors". *Brain Res*, Vol. 1178, No. pp.44-51, Oct 31.2007.
- [12] G. C. Terstappen, et al., "The antidepressant fluoxetine blocks the human small conductance calcium-activated potassium channels SK1, SK2 and SK3". *Neurosci Lett*, Vol. 346, No. 1-2, pp.85-8, Jul. 2003.
- [13] J. J. Pancrazio, et al., "Inhibition of neuronal Na<sup>+</sup> channels by antidepressant drugs". *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 284, No. 1, pp.208-14, Jan.1998.

- [14] C. Maertens, et al., "Block by fluoxetine of volume-regulated anion channels". *Br J Pharmacol*, Vol. 126, No. 2, pp.508-14, Jan.1999.
- [15] A. Trouboulis, et al., "T-type calcium channels are inhibited by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine". *Mol Pharmacol*, Vol. 69, No. 6, pp.1963-8, Jun.2006.
- [16] G. Chouinard, et al., "Clinical review of risperidone". *Can J Psychiatry*, Vol. 38 Suppl 3, No. pp.S89-95, Sep.1993.
- [17] T. Mennini, et al., "Tianeptine, a selective enhancer of serotonin uptake in rat brain". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, Vol. 336, No. 5, pp.478-82, Nov.1987.
- [18] S. Kasper, et al., "Neurobiological and clinical effects of the antidepressant tianeptine". *CNS Drugs*, Vol. 22, No. 1, pp.15-26, 2008.
- [19] E. Honore, "The neuronal background K<sub>2</sub>P channels: focus on TREK1". *Nat Rev Neurosci*, Vol. 8, No. 4, pp.251-61, Apr. 2007.
- [20] M. Spedding, et al., "Synaptic plasticity and neuropathology: new approaches in drug discovery". *Med Sci (Paris)*, Vol. 21, No. 1, pp.104-9, Jan. 2005.
- [21] O. P. Hamill, et al., "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". *Pflugers Arch*, Vol. 391, No. 2, pp.85-100, Aug. 1981.
- [22] F. Franciolini, "Patch clamp technique and biophysical study of membrane channels". *Experientia*, Vol. 42, No. 6, pp.589-94, Jun. 1986.
- [23] H. Bang, et al., "TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K<sup>+</sup> channel family". *J Biol Chem*, Vol. 275, No. 23, pp.17412-9, Jun. 2000.
- [24] Y. Kim, et al., "Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K<sup>+</sup> channels by pressure, free fatty acids and alkali". *Pflugers Arch*, Vol. 442, No. 1, pp.64-72, Apr. 2001.
- [25] C. Heurteaux, et al., "Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype". *Nat Neurosci*, Vol. 9, No. 9, pp.1134-41, Sep. 2006.
- [26] M. H. Kole, et al., "The antidepressant tianeptine persistently modulates glutamate receptor currents of the hippocampal CA3 commissural associational synapse in chronically stressed rats". *Eur J Neurosci*, Vol. 16, No. 5, pp.807-16, Sep. 2002.
- [27] Y. J. Kim, et al., "Modulation of tianeptine on ion currents induced by inhibitory neurotransmitters in acutely dissociated dorsal raphe neurons of Sprague-Dawley rats". *Eur Neuropsychopharmacol*, Vol. 12, No. 5, pp.417-25, Oct. 2002.
- [28] J. S. Choi, et al., "Mechanism of fluoxetine block of cloned voltage-activated potassium channel K<sub>v1.3</sub>". *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 291, No. 1, pp.1-6, Oct. 1999.
- [29] R. L. Martin, et al., "The utility of hERG and repolarization assays in evaluating delayed cardiac repolarization: influence of multi-channel block". *J Cardiovasc Pharmacol*, Vol. 43, No. 3, pp.369-79, Mar. 2004.
- [30] S. N. Wu, et al., "Characterization of inhibition by risperidone of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in pituitary GH<sub>3</sub> cells". *Neuropsychopharmacology*, Vol. 23, No. 6, pp.676-89, Dec. 2000.
- [31] K. Yokota, et al., "The effects of neuroleptics on the GABA-induced Cl<sup>-</sup> current in rat dorsal root ganglion neurons: differences between some neuroleptics". *Br J Pharmacol*, Vol. 135, No. 6, pp.1547-55, Mar. 2002.
- [32] P. Gluais, et al., "Risperidone reduces K<sup>+</sup> currents in human atrial myocytes and prolongs repolarization in human myocardium". *Eur J Pharmacol*, Vol. 497, No. 2, pp.215-22, Aug. 2004.

**곽지연(Jiyeon Kwak)**

[정회원]



- 1989년 2월 : 서울대학교 약학대학(약학사)
- 1991년 2월 : 서울대학교 약학대학(약학석사)
- 1998년 2월 : 서울대학교 약학대학(약학박사)
- 2000년 9월 ~ 2003년 8월 : 서울대학교 의과대학 기금조교수
- 2003년 9월 ~ 현재 : 인하대학교 의과대학 의학과 부교수

<관심분야>

신경생리학, 이온채널 생리학

**김양미(Yangmi Kim)**

[정회원]



- 1993년 2월 : 경상대학교 수의학과(수의학석사)
- 1997년 8월 : 경상대학교 수의학과(수의학박사)
- 1997년 12월 ~ 2000년 6월 : Chicago Medical School 박사후연수
- 2000년 9월 ~ 2003년 2월 : 서울대학교 의과대학 생리학교실 BK21 계약조교수
- 2003년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 의과대학 의학과 부교수

<관심분야>

전기 생리학, 막수송 생리학