

牡丹皮의 PC12 cell 酸化抑制 효과 및 neuronal 유전자 발현 profile 분석에 대한 연구

김현희¹ · 노삼웅¹ · 나영인² · 배현수^{1,2} · 신민규¹ · 김정숙³ · 홍무창^{1*}

1: 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 퓨리메드(주) 기업부설연구소, 3: 국립한의학연구소

Effect of Moutan Cortex Radicis on gene expression profile of differentiated PC12 rat cells oxidative-stressed with hydrogen peroxide

Hyun Hee Kim¹, Sam Woong Rho¹, Youn Gin Na², Hyun Su Bae^{1,2},
Min Kyu Shin¹, Chung Suk Kim³, Moo Chang Hong^{1*}

1: Department of Oriental Medicine, Graduate School of Kyunghee University,

2: Purimed R&D Institute, 3: Korea Institute of Oriental Medicine

Yukmijihwang-tang has been widely used as an anti-aging herbal medicine for hundred years in Asian countries. Numerous studies show that Yukmijihwangtang has anti-oxidative effect both in vivo and in vitro. It has been reported that Moutan Cortex Radicis extract (MCR) was the most effective herb in Yukmijihwang-tang on undifferentiated PC12 cells upon oxidative-stressed with hydrogen peroxide. The purpose of this study is to; 1) evaluate the recovery of neuronal damage by assessing the anti-oxidant effect of MCR on PC12 cells differentiated with nerve growth factor (NGF), 2) identify candidate genes responsible for anti-oxidative effect on differentiated PC12 cells by oligonucleotide chip microarray. PC12 cells, which were differentiated by treating with NGF, were treated without or with hydrogen peroxide in the presence or absence of various concentration of MCR. Cell survival was determined by using MTS assay. Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS) generation was determined using the H2DCFDA assay. The viability of cells treated with MCR was significantly recovered from stressed PC12 cell. In addition, wide range of concentrations of MCR shows dose-dependent inhibitory effect on ROS production in oxidative-stressed cells. Total RNAs of cells without treatment(Control group), only treated with H₂O₂ (stressed group) and treated with both H₂O₂ and of MCR (MCR group) were isolated, and cDNAs was synthesized using oligoT7(dT) primer. The fragmented cRNAs, synthesized from cDNAs, were applied to Affymetrix GeneChip Rat Neurobiology U34 Array. mRNA of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta subunit(CaMKII), neuron glucose transporter (GLUT3) and myelin/oligodendrocyte glycoprotein(MOG) were downregulated in Stressed group comparing to Control group. P2X2-5 receptor (P2X2R-5), P2X2-4 receptor (P2X2R-4), c-fos, 25 kDa synaptosomal attachment protein(SNAP-25a) and GLUT3 were downregulated, whereas A2 adenosine receptor (A2AR), catechol-O-methyltransferase(COMT), glucose transporter 1 (GLUT1), EST223333, heme oxygenase (HO), VGF, UI-R-C0-ja-a-07-0-UI.s1 and macrophage migration inhibitory factor (MIF) were upregulated in MCR group comparing to Control group. Expression of Putative potassium channel subunit protein (RCK4), P2X2R-5, P2X2R-4, Interferon-gamma inducing factor isoform alpha precursor (IL-18 α), EST199031, P2XR, P2X2 purinoceptor isoform e (P2X2R-e), Precursor interleukin 18 (IL-18) were downregulated, whereas MOG, EST223333, GLUT-1, MIF, Neuronatin alpha, UI-R-C0-ja-a-07-0-UI.s1, A2 adenosine receptor, COMT, neuron-specific enolase (NSE), HO, VGF, A rat novel protein which is expressed with nerve injury (E12625) were upregulated in MCR group comparing to Stressed group. The results suggest that decreased viability and ROS production of PC12 cell by H₂O₂ may be, at least, mediated by impaired glucose transporter expression. It is implicated that the MCR treatment protect PC12 cell from oxidative stress via following mechanisms; improving glucose transport into the cell, enhancing expression of anti-oxidative genes and protecting from dopamine cytotoxicity by increment of COMT and MIF expression. The list of differentially expressed genes may implicate further insight on the action and mechanism behind the anti-oxidative effects of herbal extract Moutan Cortex Radicis.

Key words : Moutan Cortex Radicis, Yukmijihwangtang, anti-oxidative effect, PC12 cell, oligonucleotide chip microarray, anti-aging

서 론

한의학은 질병의 예방과 건강한 삶의 유지를 강조하며 발전하여 왔고 이것은 韓醫學의 큰 장점 중 하나이다. 이러한 질병이 되기 전에 예방한다는 治未病의 개념은 正氣가 지키고 있어 방어 능력이 있으면 질병이 발생할 수 없다는 “正氣存內 邪不可干”¹⁾에 근본을 두고 있는 것으로, 正氣를 보존하는 방법에 있어서는 마음 가짐이나 四時의 행동양식, 음식 등을 망라하는 養生法과 方藥이 사용되어 왔다. 그러나 인간은 유한한 수명을 지닌 생물체이므로 노화를 피할 길이 없고 결국은 이를 최대한 지연시켜서 건강한 삶을 영위하고 수명을 연장하는 것이 養生法의 중요한 과제가 되었다. 이에 대해 『素問·上古天真論』¹⁾에서는 인간의 나이에 따른 성장 및 노화의 과정을 腎氣의 盛衰로 설명하고 長壽의 비결을 腎氣有餘라 하여 노화를 지연시키기 위해서는 腎氣를 보존해야 함을 강조하였다. 이러한 이론은 후대에도 중대한 영향을 미쳐서 延年益壽를 목적으로 하는 대부분의 方藥은 腎虛證을 해소하기 위한 것이었다²⁾. 서양의학적 연구방법에 있어서는 ROS (Reactive Oxygen Species)가 노화의 원인이라는 假說이 보편화되면서 산화가 유도된 세포에서 ROS 발생량 감소를 확인하는 방법으로 抗酸化物質에 대한 연구가 이루어지고 있다³⁾. 한의학에서는 주로 腎虛證을 치료함으로써 노화를 억제하는 방법에 대한 연구가 활발하게 이루어져 왔는데, 안 등은⁴⁾ 腎虛證에 사용하는 대표처방인 六味地黃湯과 熟地黃이 노화과정 흰쥐에서 산화를 억제시킨다고 보고한 바 있고, 최는⁵⁾ 六味地黃湯加味方이 흰쥐의 기억능력을 향상시킬 뿐 아니라 미분화 PC12 cell의 산화억제 효과를 나타내었다고 보고한 바 있다. 특히 徐는⁶⁾ 六味地黃湯 各各의 구성약물이 미분화 PC12 cell의 酸化抑制 효과를 확인한 결과 牡丹皮 추출물이 가장 우수한 결과를 나타내었음을 보고한 바 있다. 그러나 분화된 PC12 cell을 사용한 산화억제의 효과 및 기전에 대한 연구는 없었다. 六味地黃湯 각각의 구성약물 중 미분화 PC12 cell의 酸化抑制 효과가 가장 우수했던 牡丹皮는 心肝腎經에 歸經하여 清熱涼血하고 活血祛瘀하는 효능이 있어서 대사과정에서 발생하는 노폐물질 혹은 독소를 제거하는 것과 관련되어 이러한 효과를 나타내는 것으로 추정할 수 있다. 牡丹皮 혹은 그의 유효물질인 paeonol을 이용한 많은 연구에서 심근허혈 방어효과⁷⁾, 혈전생성 억제효과^{8,9)}, 소염효과^{10,11)}, 세포면역 강화효과¹²⁾ 등이 보고된 바 있다.

이에 저자는 노화에 따른 질환 중 가장 대표적인 퇴행성 뇌 신경질환에 대한 목단피의 신경계 노화 지연 효과를 확인하여 보고자, 신경독성 물질이나 산화스트레스 등으로 유발되는 neuron 손상과 관련된 연구를 목적으로 NGF (nerve growth factor)에 의해 분화된 PC12 cell에 대한 牡丹皮의 항산화효과를 관찰하였다¹³⁾. 동시에 牡丹皮가 어떠한 기전에 의하여 분화된 PC12 cell의 산화를 억제하는지 알아보려고 oligonucleotide chip을 이용하여 유전자 발현 양상을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

牡丹皮 (Moutan Cortex Radicis, 산동, 중국, 2001)는 경희대학교 한의과대학 본초학교실 최호영 교수의 검수를 받아 사용하였으며 표품 및 건조 추출물은 경희대학교 한의과대학 생리학교실에 보관중이다. 牡丹皮 추출물의 제조는 compound의 손상을 줄이고 고유의 유기화합물들까지 최대한 추출하고자 에탄올 추출법을 사용하였다. 건조된 牡丹皮 300 g을 분쇄기로 분말화하여 70% ethyl alcohol (덕산화학, Korea) 1 l가 담긴 플라스크에 넣고 실온에서 sonicator (Branson, USA)로 30분간 추출하여 상청액을 포집하였다. 상청액을 제거한 남은 牡丹皮 분말은 85%, 100% ethyl alcohol을 이용하여 같은 방법으로 추출한 후 상청액을 모두 혼합하였다. 거즈로 여과한 여액을 evaporator (EYELA, Japan)로 농축한 후, lyophilizer (EYELA, Japan)로 동결건조하여 건조추출물 牡丹皮 62.8 g (수율 26%)을 회수하였다. 건조추출물은 100 mg/ml 농도로 증류수에 녹이고 10,000 × g에서 15분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거한 후, 0.22 μm filter를 통과시켜 실험에 사용하였다.

2. 시료의 지표물질 분석

牡丹皮 추출물은 牡丹皮의 지표물질인 paeonol (2-Hydroxy-4-methoxyacetophenone, Wako Pure Chemical Industries Co. LTD. Japan)를 이용하여¹⁴⁾ Waters Breeze System (717+ Autosampler, 2487 dual λ absorbance detector, 1525 binary HPLC Pump, Waters co, Milford, USA)에서 HPLC 분석을 통해 확인하였으며 data의 처리는 Waters Breeze System (Ver. 3.20, Waters co, Milford, USA)을 사용하였다. Paeonol 10 mg을 methanol (JT Baker, Mallinckrodt Baker Inc., USA) 5 ml에 녹인 후 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 mg/ml로 희석한 표준액을 이용하여 검량선을 작성하였다. 牡丹皮 추출물 10 mg을 methanol 5 ml로 녹인 후 0.45 μm syringe filter (PVDF, Waters co, Milford, USA)를 통과시켜서 검액으로 사용하였다. HPLC 분석조건은 아래와 같았다.

- Column : Symmetry®C18 5 μm (ODS, 4.6 × 150 mm) (Waters co, Milford, USA)
- Mobile phase : acetonitrile : 2% acetic acid aqueous solution = 35 : 65 (v/v)
- Detection : UV 274 nm
- Flow rate : 1 ml/min
- Sample injection : 10 μl
- Temperature : 22°C

牡丹皮 추출물의 paeonol 정량은 표준액 paeonol의 양에 牡丹皮 추출물의 paeonol peak 면적을 곱하고 표준액 paeonol peak 면적으로 나누어서 구하였으며 3회 측정하여 평균값을 취하였다.

3. 牡丹皮의 분화된 PC12 cell에 대한 항산화 효과 측정

1) PC12 cell

PC12 cell line (Rat, pheochromocytoma)은 한국 세포주 은

* 교신저자 : 홍무창, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : homgmc@khu.ac.kr, Tel : 02-961-0334

· 접수 : 2003/02/02 · 수정 : 2003/02/28 · 채택 : 2003/04/01

행에서 구입하여 사용하였다 (KCLB #21721).

2) PC12 cell의 배양

분화전후의 PC12 cell은 먼저 배양 flask를 collagen (#C-9791, Sigma, St. Louis, USA)으로 코팅한 후 10% horse serum (#16050-122, Invitrogen Life Technologies, Rockville, USA)과 5% fetal bovine serum (#B-2518, Sigma, St. Louis, USA) 및 1% penicillin-streptomycin (#15140-122, Invitrogen Life Technologies, Rockville, USA)이 함유된 RPMI 1640 배지 (#31800-022, Invitrogen Life Technologies, Rockville, USA)를 사용하여, 습도가 유지되는 37°C, 5% CO₂ incubator(Nuaire, USA)에서 배양하였으며, 계대배양 횟수는 10회를 넘기지 않도록 하였다.

3) PC12 cell의 분화

PC12 cell의 분화는 Holtsberg 등의¹³⁾ 방법에 따라 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지 에 nerve growth factor (#G5141, Promega co. Madison, USA)를 100 ng/ml가 되도록 혼합하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 6일간 배양함으로써 유도하였다.

4) 시료와 hydrogen peroxide의 처리

6일간 분화 유도 후 5×10⁵ cells/ml의 분화된 PC12 cell을 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 상기 방법으로 추출한 牡丹皮 추출물을 최종농도가 0, 0.01, 0.1, 1 mg/ml 농도가 되도록 배지에 희석하여 cell에 처리하고 37°C에서 24시간 동안 전처리 하였다. 24시간 후 cell을 같은 배지로 1회 수세하고 100 μM hydrogen peroxide가 포함된 배지를 30분간 처리하였다.

5) MTS assay

세포증식 및 세포독성을 측정하기 위해 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (#G3581, Promega co. Madison, USA)를 사용하여 제조사 protocol 대로 수행하였다. 4)에서 100 μM hydrogen peroxide로 처리한 cell 각각의 well에 세포액 100 μl당 20 μl의 MTS 용액을 넣고 37°C 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 반응 후 microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 490 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

6) ROS (Reactive Oxygen Species) 측정

ROS 측정은 Hai Yan Zhang 등의¹⁵⁾ 방법을 응용하여 실시 하였다. 5×10⁵ cells/ml의 분화된 PC12 cell을 96 well plate에 분 주하고 24시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포에 牡丹皮 추출물 0, 0.01, 0.1, 1 mg/ml을 포함하는 배지를 넣고 동일한 조건에서 24시간 배양하였다. 세포를 FBS-free 배지로 1회 수세한 다음 100 μM hydrogen peroxide를 30분간 처리하고, 1 ml N,N-dimethyl formamide (#C-4254, Sigma, St. Louis, USA)에 100 mg H2DCFDA (#D399, Molecular Probes Inc. Eugene, USA)를 녹인 후 최종농도가 50 μM이 되도록 배지에 희석하여 처리 후 37°C water bath에서 1시간 반응하였다. 발생 된 형광은 Fluoroscan Ascent FL (Type 374, Labsystems, Finland)을 이용하여 excitation 485 nm/emission 538 nm에서 측정하였다.

4. Oligonucleotide Chip Microarray

1) PC12 cell harvest

3×10⁵ cells/ml의 PC12 cell을 분화유도 후 각 flask의 cell 을 PBS로 1회 세척한 다음 대조군 (Control group)과 억제군 (Stressed Group)에는 10% FBS를 함유한 배지를 처리하고 실험 군 (MCR Group)에서는 10% FBS와 1 mg/ml 牡丹皮 추출물을 함유한 배지를 처리하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간 배양후 각 flask의 cell을 PBS로 1회 세척 한 다음 대조군을 제외한 억제군과 실험군에 100 μM hydrogen peroxide를 30분간 처리하여 산화를 유발하고 대조 군, 억제군, 실험군의 cell을 각 군별로 10분동안 300×g에서 원 심분리하여 모았다.

2) Total RNA 분리

각 군별로 모아진 PC12 cell은 RNaeasy mini kit (#74104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 을 사용하여 Total RNA를 분 리하였다. 1/100 부피의 β-mercaptoethanol (#M-7522, Sigma, St. Louis, USA)가 첨가된 600 μl buffer RTL을 cell pellet에 첨가 하고 pipet으로 cell clump가 없어질 때 까지 잘 섞어준 후 pellet pestle (#Z35,996-3, Sigma, St. Louis, USA)로 homogenize하였다. Sample에 600 μl 70% ethanol을 넣고 잘 섞은 후 600 μl씩 2회, Rneasy mini spin column에 넣고 8,000 ×g에서 15초간 원심분리 하였다. Column에 700 μl buffer RW1을 넣고 위와 같은 방법으 로 원심분리하여 세척한 후 500 μl buffer RPE를 넣고 같은 방법 으로 세척하기를 2회 반복하되 2번째는 14,000 ×g에서 2분간 원 심분리하였다. Column을 새로운 1.5 ml RNase free tube 에 옮 기고 30 μl DEPC처리 증류수를 넣고 1분 후 8,000 ×g에서 1분간 원심분리하여 Total RNA를 elution하였다. 분리된 total RNA는 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc. Fullerton, USA)로 定量한 후 농도가 2 μg/μl가 되도록 하였다.

3) cDNA 합성

18 μg의 total RNA가 ds cDNA 합성에 사용되었다. cDNA 합성은 Superscript Choice System for cDNA Synthesis (#18090-019, Invitrogen Life Technologies, Rockville, USA)를 사 용하였다. Total RNA에 1 μl의 100 μM T7-(dT)24 primer (Genotech co. Daejun, Korea)를 넣고 70 °C에서 10분간 배양하 여 annealing하였다. 여기에 4 μl 5 × first strand Buffer, 2 μl 0.1 M dithiothreitol (DTT), 1 μl 10 mM dNTP mix, 2 μl 200 U/μl Superscript II reverse transcriptase를 넣고 잘 섞은 후 4 2°C에서 1시간 동안 배양하여 first strand cDNA를 합성하였다. First strand cDNA에 91 μl DEPC처리 증류수, 30 μl second strand buffer, 3 μl 10 mM dNTP mix, 1 μl 10 U/μl E. coli DNA Ligase, 4 μl 10 U/μl E. coli DNA Polymerase, 1 μl 2 U/μl E. coli RNase H 등을 넣고 잘 섞어서 16°C에서 2시간동안 배 양하고 다시 2 μl 5 U/μl T4 DNA polymerase를 넣은 후 16°C 에서 5분간 추가로 배양하여 second strand cDNA를 합성하였 다. cDNA 정제를 위하여 합성된 cDNA에 162 μl phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (#15593-049, Invitrogen Life Technologies, Rockville, USA)를 섞어서 2 ml

PLG(phase lock gel) heavy tube (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)에 넣고 12,000 ×g에서 5분간 원심분리한 후 상청액에 1/2배 부피의 7.5 M ammonium acetate, 2.5배 부피의 -20℃ 100% ethanol을 넣고 14,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 침전시켰다. 상청액을 제거하고 남은 cDNA pellet에 400 μl -20℃ 80% ethanol을 넣고 14,000 ×g에서 5분간 원심분리하여 2번 세척한 후 다시 상청액을 제거하고 공기중에서 완전히 말렸다. 건조된 cDNA에 12 μl DEPC처리 증류수를 넣어 녹였다.

4) Biotin-labeled cRNA 합성

12 μl의 ds cDNA 중 3.3 μl가 biotin-labeled cRNA 합성에 사용되었다. Biotin-labeled cRNA 합성은 ENZO BioArray Highyield RNA transcript Labeling Kit (#900182, Affymetrix co. Santa Clara, USA)를 사용하였다. cDNA에 4 μl 10 × Hy reaction buffer, 4 μl 10 × Biotin labeled ribonucleotides, 4 μl 10 × DTT, 4 μl 10 × Rnase inhibitor Mix, 2 μl 20 × T7 RNA polymerase를 넣고 DEPC 처리 증류수로 40 μl가 되도록 한 후 37℃에서 4시간 배양하여 biotin-labeled cRNA 합성하였다. 합성된 biotin-labeled cRNA는 RNaeasy mini kit을 사용하여 cleanup한 후 spectrophotometer로 定量하여 1 μg/μl의 농도가 되도록 하였다.

5) Fragmentation of cRNA

합성된 cRNA 20 μg에 2 μl의 5×Fragmentation buffer (200 mM Tris acetate pH 8.1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc)를 첨가한 후 DEPC로 처리된 증류수로 40 μl가 되게 하였다. 40 μl의 반응액은 94℃에서 35분간 배양하여 30-200 bases의 fragment로 만들었다.

6) Array chip hybridization

cRNA fragment 5 μg을 1,300 이상의 Rat 중추신경계 유전자가 탑재되어 있는 GeneChip® Rat Neurobiology U34 Array (P/N900283, Affymetrix co. Santa Clara, USA)에 적용하여 hybridization 하였다. 50 μl 2×hybridization buffer (200 mM MES, 2 M [Na+], 40 mM EDTA, 0.02% Tween 20), 1.7 μl 3 nM control oligonucleotide B2 (P/N900299, Affymetrix co. Santa Clara, USA), 5 μl 20 × eukaryotic hybridization controls (bioB, bioC, bioD, cre 30 pM each) (P/N900362, Affymetrix co. Santa Clara, USA), 1 μl 10 mg/ml herring sperm DNA (#D1811, Promega co. Madison, USA), 1 μl 50 mg/ml acetylated BSA (#15561-020, Invitrogen Life Technologies, Rockville, USA), 10 μl 0.5 μg/μl fragmented cRNA 혼합액에 DEPC 처리 증류수를 첨가하여 100 μl의 반응액을 만들었다. 반응액은 99℃ 5분, 45℃ 5분간 반응 후 15,000 ×g에서 5분간 원심분리하여 불용성물질을 제거하였다. Array chip은 septa를 통하여 80 μl의 1 × hybridization buffer를 채운 후 rotisserie hybridization oven (Affymetrix co. Santa Clara, USA)에서 60 rpm, 45℃, 10분간 incubation하였다. Array chip에서 hybridization buffer를 제거한 후 80 μl의 반응액을 채우고 Rotisserie hybridization oven에서 60 rpm, 45℃, 16시간 동안 반응시켰다.

7) Array chip의 staining과 scanning

반응이 종료된 array chip은 GeneChip Fluidics Station

(Affymetrix co. Santa Clara, USA)의 Mini_euk1 protocol에 따라 washing 및 staining한 후 GeneChip System confocal scanner (Hewlett-Packard, Santa Clara, USA)를 이용하여 3 μm resolution으로 두번 scan하였다.

8) Sample의 Quality 평가

각군의 total RNA와 cDNA 및 fragment cRNA는 1 μg을 1% agarose gel에 전기영동하여 size를 평가하였다. β-actin 및 GAPDH의 3' oligonucleotide와 5' oligonucleotide의 average Differential expression ratio는 제조사의 권장대로 3 미만인가를 확인하였다.

5. Data 처리

MTS assay 결과는 각각 대조군에 대한 세포 생존율 %로 표시하였다. data는 mean ± SEM(standard error mean)로 표시하였고 결과의 유의성 평가는 SPSS 8.0 for windows(SPSS, Inc.)를 이용하여 Student T-test를 실시하였다. Array chip의 scan data는 GeneChip 3.1 software(Affymetrix co. Santa Clara, USA)를 이용하여 분석하였다. Hybridization의 완전성은 control oligonucleotide B2, bioB, bioC, bioD, cre의 signal을 비교함으로써 평가하였다. 사용된 array chip에는 모든 probe oligonucleotide에 대하여 mismatch probe가 인접해서 탑재되어 있어 positive match에 대하여 상대적으로 mismatch가 큰 경우는 data에서 제거하였다. 각 유전자의 발현량은 signal intensity의 평균값으로 normalization하여 average differential expression(AD)를 구한 후 GAPDH, β-actin 등 housekeep gene로 구성된 internal control과 spike control들의 AD value에 대한 상대치를 이용하여 비교함으로써 발현량의 차이가 있는 유전자를 구분하였다. 발현량의 비교는 대조군을 기준으로 억제군에서의 발현량을 비교하거나, 대조군을 기준으로 실험군에서의 발현량을 비교하거나 억제군을 기준으로 실험군에서의 발현량을 비교하는 등 3가지의 비교를 실시하였다. 하나의 유전자당 여러개의 oligonucleotide가 적용되어 있으므로 각 oligonucleotide의 hybridization intensity의 평균값으로 비교를 하였으며 발현량의 차이를 확인하는 기준은 기본적으로 제조사의 추천대로 ±2 이상으로 하였다.

결 과

1. 시료의 지표물질 분석

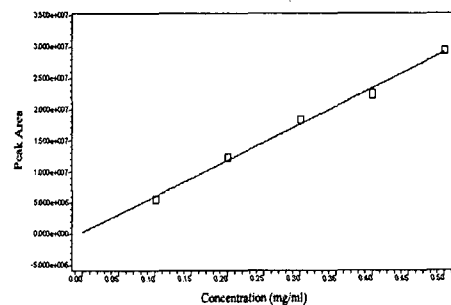


Fig. 1. The standard calibration curve of paeonol

牡丹皮의 지표물질인 paeonol을 HPLC 분석하여 작성한 표준검량선은 Fig. 1과 같고, 선형회귀분석을 이용하여 얻은 R2 값은 0.9941로 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

0.1 mg/ml Paeonol 및 2 mg/ml 牡丹皮 추출물의 HPLC chromatogram은 Fig. 2, 3과 같으며 牡丹皮 추출물 1 g당 paeonol 함량은 12.57 ± 0.00 mg이었다.

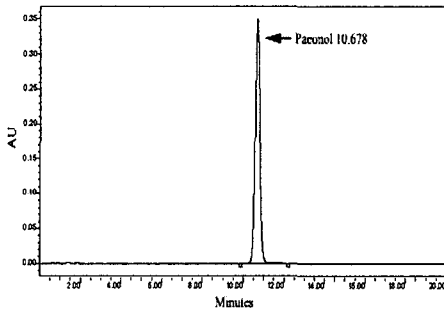


Fig. 2. The HPLC chromatogram of paeonol (0.1 mg/ml)

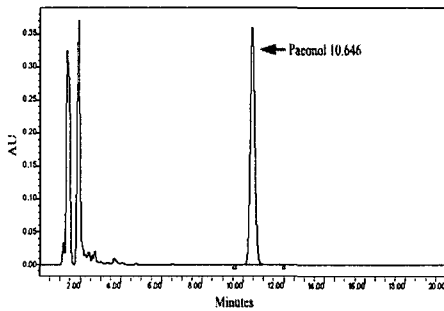


Fig. 3. The HPLC chromatogram of Moutan Cortex Radicis extract (2 mg/ml)

2. PC12 cell의 분화

PC12 cell을 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지에 NGF를 100 ng/ml이 되도록 혼합하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 6일간 배양하여 현미경으로 촬영하였다.(Fig. 4) NGF를 처리하지 않은 PC12 cell과 달리 NGF로 6일간 처리한 PC12 cell에서는 neurite가 형성됨으로써 분화가 되었음을 확인할 수 있었다.

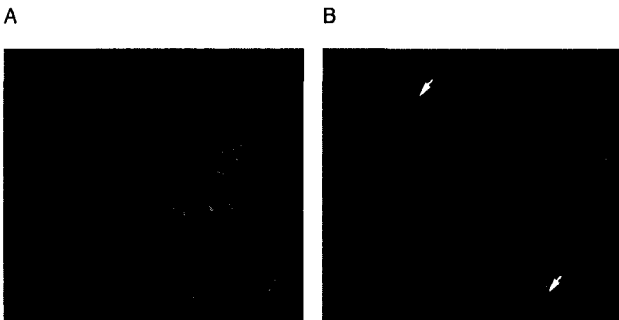


Fig. 4. Differentiation of PC12 cell A: Undifferentiated PC12 cell; B: To differentiate PC12 cell was cultured in medium supplemented with 100 ng/ml NGF for 6 days. PC12 cell extended neurites(white arrows) and differentiated to sympathetic neuron-like cells.

3. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포손상에 대한 牡丹皮 추출물의 방어 효과

牡丹皮 추출물이 분화된 PC12 cell에서 산화스트레스에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 세포를 96 well plate에 5×10^4 cell/well로 분주하고 37°C에서 배양하여 cell이 잘 부착된 것만 실험에 사용하였다. 분주 배양 24시간 후에 牡丹皮 추출물을 0, 0.01, 0.1, 1.0 mg/ml이 되도록 처리하여 24시간 배양한 후 100 μM hydrogen peroxide를 30분간 처리하였다. 그 후 각각의 well에 세포액 100 μl당 20 μl의 MTS 용액을 넣고 37°C 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 반응 후 microplate reader를 이용하여 490nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. 결과 data는 cell viability 즉 牡丹皮와 hydrogen peroxide 없이 배양한 군에 대한 비율로 표시되었다 (Fig. 5).

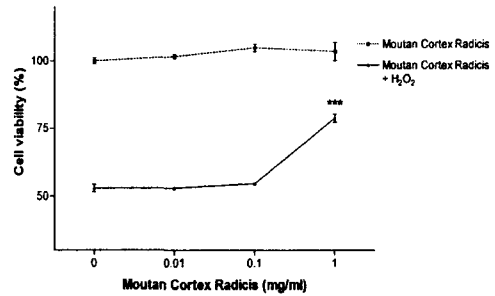


Fig. 5. Cell viability of PC12 cells in medium containing various concentration of each Moutan Cortex Radicis extract after 24hr. Cell proliferation were quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. *** p<0.001 vs. respective control.

그 결과 100 μM hydrogen peroxide 처리시 세포 생존율이 53%까지 감소하였으며, hydrogen peroxide로 세포 손상시 牡丹皮를 1 mg/ml로 처리한 군의 세포생존율이 79%로 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다 (p<0.001).

4. Hydrogen peroxide에 의해 세포내 ROS 생성에 대한 牡丹皮 추출물의 억제 효과

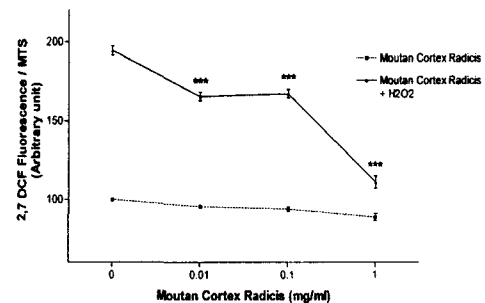


Fig. 6. ROS measurement of PC12 cells in medium containing various concentration of Moutan Cortex Radicis after 24hr. ROS of each samples were quantified by DCF fluorescence intensity (excitation 485 nm / emission 538 nm). Error bars indicate S.E.M. *** p<0.001 vs. respective control.

5×10^4 cells/well의 분화된 PC12 cell을 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 37°C에서 배양한 후, 세포에 牡丹皮 추출물을 포함하는 배지를 넣고 동일한 조건에서 24시간 배양하였다.

세포를 FBS-free 배지로 1회 수세한 다음 100 μ M hydrogen peroxide를 30분간 처리하고, N,N-dimethyl formamide에 용해된 H₂DCFDA를 최종농도가 50 μ M이 되도록 처리하여 37°C water bath에서 1시간 반응한 후 ROS 발생을 측정하였다. 결과는 ROS 측정량을 MTS 측정량으로 나눔으로써 세포당 ROS 발생량을 표시하였다(Fig. 6). 그 결과 분화된 PC12 cell에 hydrogen peroxide 처리시 ROS 형성이 195%로 증가되었으며, 牡丹皮 추출물 처리 후 hydrogen peroxide로 세소 손상시 ROS 형성이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다 (p<0.001).

5. Sample quality의 평가

Array chip에 적용된 cRNA가 full-length인가를 확인하기 위하여 internal control인 β -actin 및 GAPDH의 3' oligo와 5' oligo의 average Differential expression ratio를 평가한 결과는 Table 1과 같다. Cut-off range는 제조사의 권장대로 3 미만으로 하였는데 대조군, 억제군, 실험군 모두에서 3'/5' ratio는 2미만으로 조건을 만족시켰다.

Table 1. The average differential expression of internal controls

Probe Set	AD* (5')	AD (M')	AD (3')	AD (all)	Ratio of AD (3'/5')	
Con	GAPDH	88512.7	86473.1	89936.3	88307.35	1.02
	β -actin	51263.9	107339.6	98931.2	85844.88	1.93
Str	GAPDH	95405.5	96700.6	106888.2	99664.77	1.12
	β -actin	69036.8	107370	100114.9	92173.89	1.45
MCR	GAPDH	111801.7	118265.7	120960.9	117009.45	1.08
	β -actin	78995.1	116835.5	100009.9	98613.51	1.27

* AD : average differential expression, which was normalized with average signal value. To evaluate which synthesized cRNA was full-length, ratio of 3'oligonucleotide and 5' oligonucleotide AD of internal controls was checked. The cut-off range was less than 3 according to manufacturer's recommendation. Ratio of all sample was less than 2 so that be available to be used.

6. Microarray

1) hybridization efficiency

대조군, 억제군, 실험군의 sample을 Array chip에 hybridization 시킨 후 scan한 이미지에서 positive control 및 negative control에 의한 이미지를 선명하게 확인할 수 있다.

Table 2. The average differential expression of spike controls

Probe Set	AD	Ratio*	
Con	BioB	3521.91	
	BioC	8165.65	
	BioD	20419.48	
	CreX	117837.6	
Str	BioB	3261.28	0.925998
	BioC	7653.27	0.937252
	BioD	19836.77	0.971463
	CreX	114985.5	0.975796
MCR	BioB	2234.52	0.634463
	BioC	6355.12	0.778275
	BioD	16060.24	0.786516
	CreX	102612.4	0.870795

* Each spike control's AD of Stressed and MCR group was compared to that of Control group. To evaluate the efficiency of hybridization, the ratio of each spike control's AD between samples was checked. The ratio was moderately regular in sample.

Hybridization efficiency의 평가를 위하여 첨가된 spike control의 AD 비율을 확인한 결과는 Table 2와 같다. 억제군과 실험군의 spike control은 대조군의 spike control과 비교하였을 때 일정한 비율을 나타냄으로써 hybridization efficiency는 적절하여 결과의 신뢰도는 충분한 것으로 나타났다.

2) 각 군별 Hybridization Intensity의 비교

PC12 cell의 분화를 유도한 후 대조군과 hydrogen peroxide로 산화를 유발한 억제군 및 산화 유발 후 牡丹皮 추출물 1 mg/ml를 처리한 실험군의 microarray scan 결과를 log-log scale의 scatter plot으로 표시하면 Fig. 7과 같다. 각 군의 signal value는 biotin-labeling된 cRNA가 oligonucleotide chip에 hybridization 된 정도를 의미하며 각각 internal control을 이용하여 normalization 하였다.

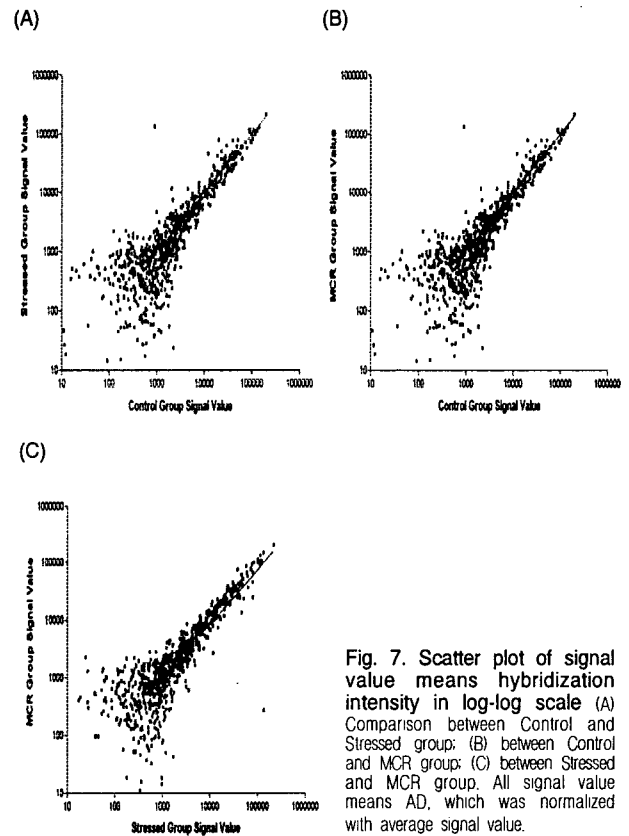


Fig. 7. Scatter plot of signal value means hybridization intensity in log-log scale (A) Comparison between Control and Stressed group; (B) between Control and MCR group; (C) between Stressed and MCR group. All signal value means AD, which was normalized with average signal value.

3) 발현량의 차이를 보인 유전자

각 유전자의 발현량을 signal intensity의 평균값으로 normalization하여 average differential expression (AD)를 구한 후 GAPDH, β -actin 등 housekeeping gene로 구성된 internal control과 spike control들의 AD value에 대한 상대치를 이용하여 비교하였다. 유전자의 oligonucleotide들의 hybridization intensity가 큰 편차를 가진 경우는 분석 프로그램의 algorithm이 제공하는 유의수준을 따름에 따라 |2| 이하의 경우에도 유의성을 지니는 것이 있거나 |2| 이상의 경우에도 유의성이 인정되지 않는 것이 있었다. 억제군에서 대조군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 3종으로 모두 발현이 감소하였다 (Table 3).

Table 3. The genes expressed significantly different between Control and Stressed Group.

Gene Name	Fold*	ID#
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta subunit (CaMKII-delta)	-1.7	L13406
Neuron glucose transporter (GLUT3)	-2.2	D13962
Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG)	-3.7	M99485

* Fold means ratio of hybridization intensity. The genes with negative value are abundant in Control group, while positive value are abundant in Stressed group. # ID indicates the accession number of GenBank (NCBI).

실험군에서 대조군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 14종으로 Table 4와 같다. 이 중에서 5종의 유전자는 발현이 감소하였고, 9종의 유전자는 발현이 증가하였다.

Table 4. The genes expressed significantly different between Control and MCR Group.

Gene Name	Fold*	ID
P2X2-5 receptor (P2X2-5)	-3.1	AF020758
P2X2-4 receptor (P2X2-4)	-2.6	AF020757
c-fos	-2.3	X06769
25 kDa synaptosomal attachment protein (SNAP-25a)	-1.8	U56261
Neuron glucose transporter (GLUT3)	-1.8	D13962
A2 adenosine receptor (A2AR)	2.2	S47609
Catechol-O-methyltransferase (COMT)	3.9	M93257
Glucose transporter 1 (GLUT1)	5.7	S68135
EST223333	4.0	A1179610
Heme oxygenase (HO)	3.8	J02722
VEGF	2.2	M74223
UI-R-C0-ja-a-07-0-UI.s1	2.3	A1029917
Neuronatin alpha	2.6	U08290
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	2.0	S73424

* The genes with negative value are abundant in Control group, while positive value are abundant in Stressed group.

Table 5. The genes expressed significantly different between Stressed and MCR Group.

Gene Name	Fold*	ID
Putative potassium channel subunit protein (RCK4)	-2.1	X16002
P2X2-5 receptor (P2X2R-5)	-2.8	AF020758
P2X2-4 receptor (P2X2R-4)	-2.4	AF020757
Interferon-gamma inducing factor isoform alpha precursor (IL-18 α)	-2.7	U77777
EST199031	-1.8	AA943532
P2x receptor (P2XR)	-2.5	U14414
AP2X2 purinoceptor isoform e (P2X2R-e)	-2.6	AF028603
Precursor interleukin 18 (IL-18)	-2.2	AJ222813
Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG)	3.9	M99485
EST223333	3.2	A1179610
Glucose transporter 1 (GLUT1)	4.4	S68135
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	1.7	S73424
Neuronatin alpha	1.8	U08290
UI-R-C0-ja-a-07-0-UI.s1	2.0	A1029917
A2 adenosine receptor (A2AR)	2.2	S47609
Catechol-O-methyltransferase (COMT)	2.7	M93257
Neuron-specific enolase (NSE)	2.0	X07729
Heme oxygenase (HO)	3.4	J02722
VEGF	2.0	M74223
A rat novel protein which is expressed with nerve injury (E12625)	2.7	E12625

* The genes with negative value are abundant in Stressed group, while positive value are abundant in MCR group.

실험군에서 억제군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 20종으로 Table 5와 같다. 이 중에서 8종의 유전자는 발현이 감소하였고, 12종의 유전자는 발현이 증가하였다.

대조군에 비하여 억제군에서 증가하는 경향을 보이고 실험군에서 더욱 증가하는 경향을 보인 유전자는 MIF, COMT, VGF, GLUT1, EST223333, HO, Neuronatin-alpha, UI-R-C0-ja-a-07-0-UI.s1 등 8종, 억제군에서는 변화없다가 실험군에서는 증가하는 경향을 보인 유전자는 NSE, A2AR 등 2종, 억제군에서는 감소하였다가 실험군에서 증가하는 경향을 보인 유전자는 E12625, GLUT3, CaMKII-delta, MOG 등 4종, 억제군에서 증가하다가 실험군에서 감소하는 경향을 보인 유전자는 EST199031, P2X2R-e, P2XR, RCK4, IL-18, IL-18 α 등 6종, 억제군에서 감소하다가 실험군에서 더욱 감소하는 경향을 보인 유전자는 c-fos, SNAP-25a, P2X2R-4, P2X2R-5 등 4종 이었다.

고찰

노화는 시간에 따른 생리적 변화의 일부분이며 노화 시작의 시기에 대하여서는 학자들에 따라 생명발생 순간부터 혹은 성장기 이후 등으로 차이가 있다. 노화가 비록 질병으로 인한 변화는 아니라 하더라도 인체는 노화로 인하여 건강에 손상을 받기도 하며 노화를 중년이후에 나타나는 비가역적 변화로 보는 것이 일반적이다¹⁶⁾.

『素問·陰陽應象大論』¹⁾에서는 40세 이후의 생리적 특성 및 변화에 따른 노화의 진행과정에 대하여 늙는다는 것은 陰精의 소모가 신체의 기능을 저하시키면서 생명활동의 쇠약함을 부추기고, 陰精에 의해 안정을 취하면서 활동하던 陽氣가 虛火로 변하여 위로 상승하여 신체 氣의 분포가 위는 盛해지고 아래가 衰해지는 상태로 바뀌어 가는 것임을 나타내고 있으며, 『靈樞·千年』¹⁷⁾에서는 노화의 진행을 五臟之氣의 쇠약으로 설명하면서 40세 이후 노화가 시작되어 50세부터 肝心脾肺腎의 순서로 五臟之氣가 쇠하기 시작하여 마지막으로 腎氣가 쇠하고 나면 오장이 모두 허해져서 죽음에 이르게 된다고 하였다. 또 『素問·上古天真論』¹⁾에서는 인간의 나이에 따른 성장 및 노화의 과정을 표현하면서 五臟六腑의 精을 저장하는 腎氣의 盛衰로 설명하고 또 “天壽過度, 氣脈常通, 而腎氣有餘也”라 하여 老化를 지연시키기 위해서는 腎氣를 보존해야 함을 강조하였다. 이에 따라 延年益壽를 위해서는 腎精을 보존하는 養精法 및 方藥이 후대에도 많이 사용되고 있다. 특히 六味地黃湯, 補腎丸, 左歸飲, 右歸飲, 五子地黃飲子 등 補腎之劑의 노화지연효과에 대하여 실험적으로 규명하여 보려는 시도가 이어지고 있다^{4,18-21)}.

한편 서양의학적 노화의 원인은 여러 가지 학설이 많으나 유전학적, 세포/분자 level, 개체 level로 표현하고 있고²²⁾ 특히 세포/분자 level 중 자유유리기설(free radical theory)은 Harman에 의해 1956년에 제기된 'ROS가 노화의 원인이다'라는 이론을 근거로 하고 있다. ROS는 외각에 쌍을 이루지 못한 전자를 가진 모든 물질을 지칭하는 말로서 세포내 산화효소에 의하여 촉매되는 O₂ 분자의 환원반응에서 발생하며 단백질, RNA, DNA

등 세포성분과 임의로 반응하여 그 산화체 혹은 과산화체를 만들며 이로 인하여 세포성분이 본래의 기능을 상실하고 심한 경우 세포의 apoptosis를 유발하기도 하며 연령에 따라서 증대하여 노화의 원인이 된다고 하였다. ROS의 예로는 superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (OH \cdot), proxyl radical (RO_2^{\cdot}) 등과 radical이 아니지만 생체에 有害한 hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), singlet oxygen, peroxyntirine (ONOO \cdot) 등이 있으며 이들은 정상적 대사과정 중에도 생성되므로 생체내에는 항산화 기제가 동시에 존재하게 된다. 이러한 항산화기제로 대표적인 것이 ascorbate, α -tocopherol 등의 細胞內에 미량으로 存在하는 抗酸化物質들과 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px)와 같은 抗酸化酵素들이다^{3,16,22}.

본 실험에 사용된 PC12 cell은 rat adrenal gland의 pheochromocytoma line으로 신경에서 유래한 세포가 아님에도 불구하고 NGF가 함유된 배지에서 sympathetic neuron-like cell로 분화되어 neurite를 형성한다. 이렇게 NGF에 의해 분화된 PC12 cell은 신경세포와 유사한 성질을 가지고 있어 다루기 어려운 신경세포를 대신하여 neurotoxic 물질과 산화스트레스 등으로 유발되는 neuronal 손상에 관련된 실험에 많이 이용된다¹³. 徐는⁶ 腎虛證에 사용하는 代表處方인 六味地黃湯 각각의 구성약물을 이용하여 분화되지 않은 PC12 cell의 抗酸化作用을 확인한 결과 熟地黃, 山茱萸, 牡丹皮가 유의하게 PC12 cell의 산화를 억제하고 牡丹皮가 가장 우수한 결과를 나타내었음을 보고한 바 있다.

牡丹皮는 氣味가 辛苦涼하며 心, 肝, 腎經으로 入하여 清熱涼血, 活血祛瘀, 退虛熱하는 效能을 지닌다. 주성분은 paeonol, paeonoside, paeonolide, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoyl-oxy-paeoniflorin, apiopaeonoside 등이다. 牡丹皮의 약리작용을 보면 소염작용, 항혈전, 죽상동맥경화 억제작용, 항심근허혈작용, 항부정맥작용, 혈압강화작용, 진정, 최면, 항경련작용, 진통, 항균, 이뇨작용 등이 밝혀진 바 있다²³. 徐의 연구에서 補腎精하는 기능보다는 清熱涼血하고 活血祛瘀하는 효능을 지닌 牡丹皮 추출물이 가장 우수한 효과를 지닌 것은 다소 의외로 생각된다. 그러나 腎主水하는 것이 인체의 대사 후 노폐물을 제거하는 기능을 포괄하는 것으로 볼 때 牡丹皮는 세포에서 대사후 노폐물 및 유해물질을 제거함으로써 腎기능을 돕는 것으로 추측된다. 본 실험에서는 牡丹皮를 ethanol로 추출, 동결건조하고 PC12 cell은 NGF로 6일간 자극하여 분화시킨 후 현미경으로 neurite를 형성하였는지 확인하여 사용하였다. 분화된 PC12 cell에 hydrogen peroxide로 자극하여 산화를 유발시킨 후 牡丹皮 추출물을 농도별로 투여하면서 억제된 PC12 cell의 생존능을 회복시키는 정도를 MTS assay로 확인하여 본 결과 hydrogen peroxide 자극으로 대조군에 비해 53% 정도로 떨어진 PC12 cell의 생존능이 牡丹皮 추출물 1 mg/ml 투여군에서 75%로 유의성 있게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이보다 작은 농도에서도 증가하는 경향을 확인하여 볼 수는 있었으나 미미하였으며 유의성도 입증되지 않았다. Hydrogen peroxide 자극없이 牡丹皮 추출물만을 투여하면서 세포 생존능을 측정한 결과 1 mg/ml 농

도에서 세포독성을 나타내지 않음으로써 적절한 실험조건으로 사료된다. 牡丹皮가 분화된 PC12 cell의 항산화에 미치는 영향을 확인하여 보기 위해 세포당 산화물질 발생량으로 비교하여 본 결과 모든 농도 (0.01, 0.1, 1 mg/ml)의 牡丹皮에서 우수한 산화물질 발생 억제 효과가 인정되었으며 1 mg/ml에서 가장 우수한 효과를 나타냄으로써 미분화 PC12 cell을 이용한 실험에서의⁶ 같은 양상의 결과를 나타내었다. 대조군, 억제군, 실험군 등 세군의 cRNA를 oligonucleotide chip microarray에 hybridization한 결과 억제군에서 대조군에 비하여 3종의 유전자가 발현이 감소하였고 실험군에서는 대조군에 비하여 5종의 유전자가 발현이 감소하고 9종의 유전자가 발현이 증가하였으며, 실험군에서 억제군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 20종으로 8종의 유전자가 발현이 감소하고, 12종의 유전자가 발현이 증가하였다. 억제군에서 대조군에 비하여 발현량의 변화를 보인 유전자들을 살펴보면, MOG 유전자는 억제군에서 대조군에 비하여 3.7배가 감소한 것으로 나타났고 실험군에서는 다시 억제군에 비하여 3.9배가 증가하여 원래 상태를 회복한 것으로 나타남으로써 牡丹皮 추출물 투여가 hydrogen peroxide의 자극에 의하여 유발된 산화를 억제하는데 있어서 중요한 기전을 담당할 것으로 추측하여 볼 수 있다. 이 MOG 유전자는 immunoglobulin 유전자의 superfamily에 속하는 minor myelin protein으로서 중추신경계의 myelin membrane 표면에서 발현되는 transmembrane glycoprotein이다^{24,25}. MOG는 자가면역에 관련되어 있지만, 특히 발생단계에서 neurite의 outgrowth를 증강시키는 것으로 알려져 있다²⁶. CaMKII의 delta subunit은 억제군에서 1.7배가 감소되었고 유의한 변화는 아니었으나 실험군에서 억제군에 비하여 1.5배 증가된 것으로 나타났다. CaMKII는 Signal pathway에서 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있는데 그 자체의 mRNA나 다른 subunit의 mRNA 발현량은 세군 모두에서 차이가 없는 것으로 나타났다. GLUT3 유전자는 억제군에서 대조군에 비하여 2.2배가 감소한 것으로 나타났고 실험군에서는 대조군에 비하여 1.8배가 감소한 것으로 나타나서 다소 회복되는 경향을 나타내기는 했으나 유의하게 회복시키지는 못했다. GLUT3 유전자는 metabolism에 관여하는 protein으로서 neuron에서만 제한적으로 생산되는 glucose transporter이다²⁷.

실험군에서 대조군에 비하여 발현량의 변화를 보인 유전자를 살펴보면, Extracellular ATP에 의하여 activation됨으로써 Ca^{2+} influx를 증가시키는 ATP-gated cation channels인 P2X receptor는 통증이나 음성과 같은 감각신호의 전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{28,30}. P2X2R은 P2X receptor의 subtype 중의 하나로 splicing 과정에서의 변화에 따라 6개의 isotype이 발견되었다³¹. 이 P2X2R의 6개 isotype 중 3, 4, 5번 등 3개의 isotype이 본 실험에 사용된 array chip에 탑재되어 있었다. 결과는 모두 실험군에서 대조군에 비하여 각각 1.9, 2.6, 3.1배가 감소한 것으로 나타났을 뿐 아니라 억제군에 대하여서도 각각 1.7, 2.4, 2.8배가 감소한 것으로 나타났다. 다만 P2X2-3 receptor의 경우 유의성은 지니지 못하였다. P2XR도 실험군에서 대조군에 비하여 1.8배, 억제군에 비하여 2.5배 감소한 것으로 나

타남으로써 P2XR 군들이 모두 牡丹皮 추출물 투여로 인하여 오히려 감소된 것으로 나타났다. P2XR 및 P2X2R은 ATP가 starvation으로 유도된 PC12 cell의 apoptotic cell death를 억제하는 데 있어서 발현량이 증가하여 Ca^{2+} influx를 증가시키고 MAP kinase cascade를 활성화함으로써 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있음^{32,33}) 감안할 때 牡丹皮 추출물의 투여는 이와는 다른 기전을 통하여 PC12 cell의 손상을 억제함을 추측하여 볼 수 있다. c-fos 유전자는 실험군에서 대조군에 비하여 2.3배 감소한 것으로 나타났다. c-fos 유전자는 protooncogene group에 속하는 immediate early response gene (IER)에 해당하는 것으로서 IER gene은 세포 증식과 분화의 조절에 개입하는 것으로 알려져 있다. C-fos가 coding하는 FOS protein은 DNA-binding protein으로서 Jun family protein과 결합하여 activating protein 1 (AP-1)을 형성하는데 AP-1은 target gene의 AP-1 sequence에 binding하여 전사를 조절하는 중요한 transcription factor이며 excitotoxicity를 지니는 것으로 알려져 있다^{34,35}). 특히 NGF를 이용한 PC12 cell의 분화에서는 c-fos gene의 발현은 NGF 투여 후 30분 이내의 초기에는 증가하였다가 감소하며 neurite outgrowth에 관여하는 것으로 밝혀졌다³⁶). SNAP-25a는 실험군에서 대조군에 비하여 1.8배 감소하였다. SNAP-25a는 SNAP receptor (SNARE) protein 중의 하나로 Neuron과 내분비 세포에서 발현되며, axon과 신경말단 및 cytoplasmic vesicular membrane에 존재하면서 neurotransmitter의 exocytosis에 결정적 역할을 하는 SNAP-25 protein의 isotype이다^{37,39}). SNAP-25 gene은 intracellular Ca^{2+} 와 NGF에 의하여 발현이 증가하고 PC12 cell에서 neurite의 outgrowth에 개입한다^{40,42}). 앞에서 언급한 바 있는 GLUR3는 실험군에서 대조군에 비하여 1.8배 감소하였다. 실험군의 A2AR은 대조군, 억제군 모두에 비하여 2.2배 증가한 것으로 나타났다. A2AR은 stimulatory GTP-binding protein (Gs)과 coupling 하여 Gs의 작용을 돕고 adenylate cyclase를 stimulation시키는 것으로 알려져 있다^{43,44}). 실험군에서 COMT는 대조군에 비하여 3.9배, 억제군에 비하여 2.7배 증가하였다. COMT는 neurotransmitter나 hormone들 중 catechol 구조를 가지는 화합물 (특히 dopamine)의 O-methylation을 유발하여 그 대사기능을 억제할 뿐 아니라 degradation시킨다⁴⁵). GLUT-3 gene이 억제군과 실험군 모두에서 대조군에 비하여 감소한 것과는 대조적으로 GLUT-1 gene은 실험군에서 대조군에 비하여는 5.7배, 억제군에 비하여서는 4.4배 증가한 것으로 나타났다. 이들은 Neuron에서 특이적으로 분비되는 glucose transporter이다. HO는 실험군에서 대조군에 비해 3.8배, 억제군에 비해서 3.4배 증가한 것으로 나타났다. HO는 산화자극에 대하여 방어작용을 나타내는 것으로 알려져 있다⁴⁶). 신경세포의 손상이나 산화자극, 염증에 대한 세포 방어 기전에 작용하는 HO는 산화자극이 있을 때 heme protein으로부터 유리되는 heme이 많아지면 발현이 증가한다. Heme의 과다한 축적은 ROS의 발생을 촉진하고 세포의 손상을 유발하게 되는데 HO는 heme을 biliverdin, iron, carbon monoxide로 분해하여 세포의 손상을 방어하게 된다^{47,48}). 이러한 작용을 하는 HO가 牡丹皮 추출물 투여에 의하여 증가하는 것

로 나타난 것은 牡丹皮 추출물의 산화 억제 효과의 중요한 기전을 의미하는 것으로 볼 수 있겠다. 산화자극에 대하여 세포의 방어작용을 나타내는 enzyme으로 알려진 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, heme oxygenase 중에서 발현되는 heme oxygenase가 본 연구에 사용된 array chip에 포함되어 있었다⁴⁶). EST223333은 실험군에서 대조군에 비하여 4.0배 증가한 것으로 나타났는데 아직 기능이 밝혀지지 않은 EST로서 consensus sequence이며 HO gene의 cluster를 지니고 있어서 HO gene이 중복되어 평가된 것으로 볼 수 있을 것이다. VGF gene은 실험군에서 대조군에 비해 2.2배, 억제군에 비하여 2.0배 증가한 것으로 나타났다. NGF에 의해 신속하게 생성이 유발되는 VGF의 작용은 주로 NGF와 같은 neurotrophin이 MAP kinase pathway 혹은 다른 기전을 통하여 신경세포의 neuronal differentiation을 유발하는데 중요한 역할을 할 뿐 아니라 대사를 조절하여 에너지 balance 조절의 기능을 지닌 것으로 알려져 있다⁴⁹). UI-R-C0-ja-a-07-0-UI.s1 유전자는 실험군에서 대조군에 비해 2.3배, 억제군에 비하여 2.0배 증가한 것으로 나타났다. 이 유전자의 작용에 대하여는 아직 밝혀진 바 없고 다만 본 array에 사용된 이 유전자의 cluster는 실험군에서 대조군에 비해 1.9배, 억제군에 비해 2.0배 많이 발현된 것으로 나타난 NSE 유전자의 일부와 같은 sequence를 포함하고 있어서 이를 반영하고 있는 것으로도 볼 수 있겠다. Neuronatin alpha는 실험군에서 대조군에 비해 2.6배, 억제군에 비하여 1.8배 증가한 것으로 나타났다. ligand, cofactors, small cell adhesion molecule 등으로 작용하는 transmembrane protein을 encode하는 것으로 알려진 neuronatin의 splice 변이에 따른 두개의 isoform 중에 하나이다⁵⁰). Neuronatin은 특히 발생단계에서 신경계의 성숙과 유지에 영향을 미치며 NGF로 PC12 cell을 분화시키면 분화전에 비하여 발현이 감소하였다가 NGF를 제거하면 다시 발현이 증가한다는 연구결과가 있었다⁵¹). MIF는 선천 면역체계에서 중요한 매개체로서 만성염증과 자가면역질환에서 숙주 방어에 있어서 중요한 작용을 하며 glucocorticoid의 항염증과 면역억제 작용의 평형을 유지하는 기능을 지닌 것으로 알려져 왔다^{52,53}). 최근 연구결과에 따르면 MIF는 PC12 cell에서 세포 증식 작용을 지니며⁵⁴) 세포내 dopamine cytotoxicity에 대한 강력한 방어기제를 보이는 것으로 밝혀졌다⁵⁵). 이런 작용을 지닌 MIF 유전자의 발현이 실험군에서 대조군에 비해 2.0배, 억제군에 비하여 1.7배 증가한 것은 본 실험에서 MTS assay 결과와 상통하는 바가 있으며 COMT의 발현이 증가한 것과 더불어 牡丹皮 추출물 투여가 dopamine의 cytotoxicity를 억제하는 것은 물론 degradation시키는 작용을 하는 것으로 추측하여 볼 수 있겠다. 실험군에서 억제군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자를 보면, P2X2R-5, P2X2R-4, P2XR P2X2R-e 등의 유전자는 대조군에 비하여 감소된 것으로 나타난 유전자들로서 위에서 언급한 바가 있다. RCK4 유전자는 실험군에서 억제군에 비하여 2.1배 감소한 것으로 나타났으며 유의한 data로서의 범위에서는 벗어났으나 억제군에서 실험군에 비하여 2.1배 증가한 것으로 나타남으로써 억제군에서 대조군에 비하여 증가한 RCK4 유전자의 발

현을 牡丹皮 추출물 투여에 의하여 회복한 것으로 볼 수 있겠다. RCK4는 membrane protein인 voltage-dependent K⁺ channel (RCK) family의 5개 subfamily 중의 하나이며 다른 subfamily 중 RCK1, RCK2와 기본 구조는 아주 흡사하나 channel의 개폐에 관련된 기능면에서는 확실히 다른 것으로 보고된 바 있다. RCK1이나 RCK2가 내부 Mg²⁺의 농도나 전압에 따라 닫히는 반면 RCK4는 아주 높은 전위에서만 약하게 닫히는 것으로 알려져 있다⁵⁶). Precursor IL-18 isotype alpha는 실험군에서 대조군에 비해 2.5배, 억제군에 비하여 2.7배 감소한 것으로 나타났으나 대조군의 data가 유의성 범위에서 벗어나 있어 대조군과의 비교는 결과에서 생략되었다. Precursor IL-18은 대조군을 1로 보았을 때 억제군에서 1.4배 증가하였다가 실험군에서는 1.8배 감소함으로써 실험군에서 억제군에 비하여 2.2배 감소한 것으로 나타났다. 여기에서도 실험군과 억제군의 비교만 유의성 범위 안에 있었다. 결과적으로 牡丹皮 추출물 투여가 hydrogen peroxide에 의하여 발현량이 다소 증가한 Precursor IL-18의 발현을 대조군 수준 이하로 감소시킨 결과를 나타내었다. IL-18은 원래 Interferon-gamma inducing factor로 불리어 지던 물질로 inactive form인 precursor molecule로 합성이 된 후 caspase-1 등의 enzyme에 의하여 cleavage된 후 activation된다⁵⁷). IL-18은 preinflammatory cytokine으로 T cell, B cell, macrophage, microglia 등 광범위한 cell에서 만들어지며 기본적으로 T cell에서 IFN- γ 합성을 유도하는 기능을 지닌다^{58,59}). 또한 IL-18은 신경계의 자가면역에 복잡한 기전으로 개입되어 있는 것으로 드러나 있으며 신경손상의 초기에 생성이 증가하는 것으로 알려진 바 있다⁶⁰⁻⁶³). EST199031는 실험군에서 억제군에 비하여 1.8배 감소된 것으로 나타났는데 기능은 아직 밝혀지지 않았다. MOG gene은 억제군에서 대조군에 비하여 3.7배 감소하였다가 실험군에서 억제군에 비하여 3.9배 증가함으로써 원래 상태를 회복한 것으로 위에서 언급한 바 있다. EST223333, GLUT1, MIF, neuronatin alpha, UI-R-C0-ja-a-07-0-UI.s1, A2 adenosine receptor, COMT, HO, VGF 등의 유전자는 실험군에서 대조군과 억제군 모두에 비하여 증가한 것으로 나타났으며 위에서 언급하였다. NSE는 실험군에서 대조군에 비하여 1.9배, 억제군에 비하여 2.0배 증가하는 것으로 나타났으며 대조군에 비한 증가량은 유의성 범위에 들지 못하였다. NSE는 성숙한 neuron의 marker protein으로 사용되며⁶⁴) NGF 처리에 의하여 PC12 cell이 differentiation 될 때 발현이 증가하는 것이 관찰되었다⁶⁵). A rat novel protein which is expressed with nerve injury (E12625) 유전자는 대조군을 1로 보았을 때 억제군에서 1.6배 감소하고 실험군에서 2.0배 증가하여 실험군에서 억제군에 비해 2.7배 증가한 것으로 나타났으나 실험군과 억제군 간의 비교만 유의성이 인정되었다 이 유전자는 신경계의 손상과 관련되어 발현되는 유전자로서 어떠한 기능을 하는지는 아직 밝혀지지 않았다. 발현량에 유의한 변화를 보인 유전자들 중 기능이 확인된 유전자들의 계통을 살펴보면 channel protein을 포함한 membrane protein이 MOG, neuronatin alpha, SNAP-25a, P2XR, RCK4 등 5종, immune response factor가 IL-18, MIF 등 2종, transporter protein이 GLUT1, GLUT3 등 2종, enzyme이

COMT, HO, NSE 등 3종, signal pathway 관련 protein이 CaMKII, A2AR 등 2종, growth factor가 VGF로 1종, transcription factor가 c-fos로 1종으로 나타났다. Hydrogen peroxide 자극에 의한 PC12 cell의 생존을 저하나 산화 기전을 설명할 만한 이렇다 할 유전자 변화는 없었으나 GLUT3의 생성 억제에 따른 neuron에서의 glucose transport 장애가 하나의 원인일 것으로 추측할 수 있다. 牡丹皮 추출물의 투여가 PC12 cell에서 P2XR 계열의 Ca²⁺ channel receptor와 K⁺ channel (RCK4) 유전자의 발현을 억제한 것은 세포의 흥분을 억제하는 것으로 생각해 볼 수 있겠으나 산화억제에 무슨 영향을 미치는지는 추측이 어렵다. 牡丹皮 추출물의 투여는 NGF에 의한 neuronal differentiation에서 발현이 증가하는 SNAP-25a, c-fos 유전자의 발현을 감소시키고 MOG, NSE, VGF 유전자의 발현을 증가시켰으며 형태학적으로 neurite의 변화는 없었다. 신경손상시 IL-18과 E12625의 발현이 증가함으로써 어떤 영향을 미치는지 아직 밝혀진 바 없다. 다만 본 실험을 통해 IL-18과 E12625는 신경손상시 발현이 증가하여 신경손상을 회복시키는 방향으로 작용하지 않을까 추측하여 볼 수 있을 것이며 이에 대하여 확인하는 연구가 필요할 것으로 보인다. 牡丹皮 추출물 투여가 hydrogen peroxide에 의한 산화자극을 억제하는데 있어서는 세포 방어기전으로 작용하는 HO 유전자의 발현량이 4배 가까이 증가한 것이 결정적인 영향을 미친 것으로 보여진다. 염증이나 신경 손상으로 인하여 과다하게 축적된 heme을 일종의 瘀血로 볼 수 있다면 牡丹皮가 滿熱涼血, 活血祛瘀함으로써 消炎作用을 지니는 것과 일맥상통한다고 볼 수 있겠다. 그밖에 신경계의 성숙과 유지에 영향을 미치는 neuronatin의 발현이 증가한 것, neuron-specific한 GLUT3가 감소한데 반하여 GLUT1의 발현이 증가하여 glucose transport를 보완하여 준 것, COMT와 MIF의 발현이 증가하여 dopamine cytotoxicity를 제거하고 세포증식을 촉진한 것 등이 牡丹皮 추출물 투여에 의한 산화억제작용의 기전이 된 것으로 생각된다. 여기서 COMT와 MIF의 작용은 牡丹皮의 退熱하는 작용으로 볼 수 있을 것 같다.

결론

분화된 PC12 cell에 대한 牡丹皮의 항산화작용을 확인하고 그 기전에 대하여 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

牡丹皮 추출물 투여는 분화된 PC12 cell에서 hydrogen peroxide에 의하여 억제된 증식능을 농도의존적으로 증강시켰다. 牡丹皮 추출물 투여는 분화된 PC12 cell에서 hydrogen peroxide에 의하여 유발된 산화를 농도의존적으로 억제하였다. Hydrogen peroxide의 산화자극에 의하여, 분화된 PC12 cell에서는 3종의 유전자가 유의성있게 감소하였다. 牡丹皮 추출물 투여는 hydrogen peroxide로 산화자극이 유발된, 분화된 PC12 cell에서 대조군에 비하여 5종의 유전자가 유의성있게 감소하였고 9종의 유전자가 유의성있게 증가하였다. 牡丹皮 추출물 투여는 hydrogen peroxide로 산화자극이 유발된, 분화된 PC12 cell에서 억제군에 비하여 8종의 유전자가 유의성있게 감소하였고 12종의

유전자가 유의성있게 증가하였다. 牡丹皮 추출물 투여는 독성물질 제거를 통한 세포 방어기전을 일으키는 HO, COMT, MIF 등의 유전자 발현을 증가시켰다.

이상으로 볼 때 牡丹皮 추출물의 투여는 HO, COMT, MIF 유전자의 발현을 증가시킴으로써 清熱涼血, 活血祛瘀, 退虛熱과 관련된 기능을 발휘하여 신경세포의 노화를 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 벤처 및 중소기업기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (01-PJ4-PG4-01VN01-0372).

참고문헌

1. 王琦, 李炳文, 邱德文, 王慶其, 彭榮琛 編著. 黃帝內經素問今釋, pp 1-2, 28, 412, 成輔社, 서울, 1983.
2. 두호경 編著. 東醫腎系學, pp 1144-51, 東洋醫學研究院, 서울, 1991.
3. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 275, 257-66, 1992.
4. 안상원, 이철완. 숙지황과 육미지황탕이 노화과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. *대전대논문집* 8:593-623, 1999.
5. 최보엽, 배현수, 신민규, 홍무창. 六味地黃湯加味方이 흰쥐의 기억능력과 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 16, 1025-34, 2002.
6. 서영은. 六味地黃湯 構成藥物이 PC12 細胞의 酸化抑制에 미치는 影響. 석사학위논문, 경희대학교, 2002.
7. Zhang W. G. and Zhang Z. S. Anti-ischemia reperfusion damage and anti-lipid peroxidation effects of paeonol in rat heart. *Yao Xue Xue Bao* 29, 145-8, 1994.
8. Shi L., Fan P. S., Fang J. X. and Han Z. X. Inhibitory effects of paeonol on experimental atherosclerosis and platelet aggregation of rabbit. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 9:555-8, 1998.
9. Hirai A., Terano T., Hamazaki T., Sajiki J., Saito H., Tahara K., Tamura Y. and Kumagai A. Studies on the mechanism of antiaggregatory effect of Moutan Cortex. *Thromb Res Suppl* 31, 29-40, 1983.
10. Harada M., Yamashita A. and Aburada M. Pharmacological studies on the root bark of *Paeonia moutan*. II. Anti-inflammatory effect, preventive effect on stress-induced gastric erosion, inhibitory effect on gastric juice secretion and other effects of paeonol. *Yakugaku Zasshi* 92:750-6, 1972.
11. 김동혁, 송봉근, 김형균. 牡丹皮가 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향. *한국전통의학지* 7, 60-9, 1997.
12. Li F. C., Zhou X. L. and Mao H. L. A study of paeonol injection on immune functions in rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 14, 37-8, 1994.
13. Holtsberg F.W., Steiner M.R., Bruce-Keller A.J., Keller J.N., Mattson M.P., Moyers J.C., Steiner S.M. Lysophosphatidic Acid and Apoptosis of nerve Growth Factor-differentiated PC-12 cells. *J. Neurosc. Res* 53, 685-96, 1998.
14. 한국의약품수출입협회, 한국의약품시험연구소. 한약(생약) 규격집, pp 155-6, 대명기획, 서울, 2000.
15. Zhang H.Y., Tang X.C., Huperzine B. a novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. *Neurosci Lett* 292, 41-4, 2000.
16. 이정복, 장수화, pp 14-5,41, 과학백과사전출판사, 평양, 1987.
17. 하북의학원 校釋. 靈樞經校釋(下冊), p 126, 人民衛生出版社, 北京, 1982.
18. 손민성, 오민석, 송태원. 노화과정의 흰쥐에서 보신환이 신장의 대사효소계에 미치는 영향. *대전대논문집* 8, 659-74, 1999.
19. 서경석, 이상룡. 五子地黃飲子가 노화백서의 혈청변화와 혈청·뇌조직의 항산화활성에 미치는 영향. *동의정신과학회지* 10, 79-93, 1999.
20. 윤철호, 정지천, 박선동. 左歸飲과 右歸飲이 노화 Rat의 腦 과산화지질 생성 및 활성산소 생성계 효소 활성에 미치는 영향. *대한한의학회지* 16, 348-64, 1995.
21. 윤철호, 정지천. 左歸飲과 右歸飲이 노화 Rat의 肝 과산화 지질 생성 및 활성산소 생성계 효소 활성에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 16, 62-80, 1995.
22. 徐舜圭. 成人病·老人病學, pp 10-4, 고려의학, 서울, 1992.
23. 김호철. 한약약리학, pp 147-50, 집문당, 서울, 2001.
24. Sypecka J. pt point mutation in plp gene results in hyperexpression of MOG in hypomyelinated rabbit. *Acta Neurobiol Exp* 56, 9-14, 1996.
25. Devaux B., Enderlin F., Wallner B. and Smilek D. E. Induction of EAE in mice with recombinant human MOG, and treatment of EAE with a MOG peptide. *J Neuroimmunol* 75, 169-73, 1997.
26. Turnley AM, Bartlett PF. MAG and MOG enhance neurite outgrowth of embryonic mouse spinal cord neurons. *Neuroreport*, 9(9):1987-90, 1998.
27. Nagamatsu S., Sawa H., Kamada K., Nakamichi Y., Yoshimoto K. and Hoshino T. Neuron-specific glucose transporter(NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter(RGT3) in rat central neurons. *FEBS lett* 334, 289-95, 1993.
28. Stojilkovic S. S., Tomic M., Van Goor F. and Koshimizu T. Expression of purinergic P2X2 receptor-channels and their role in calcium signaling in pituitary cells. *Biochem Cell Biol* 78, 393-404, 2000.
29. Tsuda M., Koizumi S., Kita A., Shigemoto Y., Ueno S., Inoue K. Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: involvement of heteromeric P2X2/3 receptor signaling in capsaicin-insensitive primary

- afferent neurons. *J Neurosci* 20:RC90, 2000.
30. Bo X., Alavi A., Xiang Z., Oglesby I., Ford A. Burnstock G. Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport* 10, 1107-11, 1999.
 31. Koshimizu T., Tomic M., Van Goor F. and Stojilkovic S. S. Functional role of alternative splicing in pituitary P2X2 receptor-channel activation and desensitization. *Mol Endocrinol* 12, 901-13, 1998.
 32. Fujita N., Kakimi M., Ikeda Y., Hiramoto T. and Suzuki K. Extracellular ATP inhibits starvation-induced apoptosis via P2X2 receptors in differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells. *Life Science* 66, 1849-59, 2000.
 33. Swanson K. D., Reigh C., Landreth G. E. ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X2 purinoreceptors in PC12 cells; Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *J Biol Chem* 273, 19965-71, 1998.
 34. Braselmann S., Bergers G., Wrighton C., Graninger P., Superti-Furga G. and Busslinger M. Identification of Fos target genes by the use of selective induction systems. *J Cell Sci Suppl* 16, 97-109, 1992.
 35. Sagar S. M., Sharp F. R. Early response genes as markers of neuronal activity and growth factor action. *Adv Neurol* 59, 273-84, 1993.
 36. Zachor D. A., Moore J. F., Jin J., Theibert A. B., Percy A. K. C-fos mediates cocaine inhibition of NGF-induced PC12 cell differentiation. *Molecular Genetic Metabolism* 64:62-9, 1998.
 37. Oyler G. A., Higgins G. A., Hart R. A., Battenberg E., Billingsley M., Bloom F. E., Wilson M. C. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* 109(6Pt1), 3039-52, 1989.
 38. Walch-Solimena C., Blasi J., Edelmann L., Chapman E. R., von Mol-lard G. F. and Jahn R. The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol* 128, 637-45, 1995.
 39. Rothman J.E. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63, 1994.
 40. Sepulveda C.M., Troncoso C.C., Lara H., Cardenas A.M. Intracellular calcium and arachidonic acid increase SNAP-25 expression in cultured rat hippocampal explants, but not in cultured rat cerebellar explants. *Neurosci Lett* 252, 127-30, 1998.
 41. Hepp R, Dupont JL, Aunis D, Langley K, Grant NJ. NGF enhances depolarization effects on SNAP-25 expression: induction of SNAP-25b isoform. *Neuroreport* 12:673-7, 2001.
 42. Hirling H., Steiner P., Chaperon C., Marsault R., Regazzi R. and Catsicas S. Syntaxin 13 is a developmentally regulated SNARE involved in neurite outgrowth and endosomal trafficking. *Eur J Neurosci* 12, 1913-23, 2000.
 43. Marala R. B. and Mustafa S. J. Direct evidence for the coupling of A2-adenosine receptor to stimulatory guanine nucleotide-binding-protein in bovine brain striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 294-300, 1993.
 44. Ukena D., Olsson R. A. and Daly J. W. Definition of subclasses of adenosine receptors associated with adenylate cyclase: interaction of adenosine analogs with inhibitory A1 receptors and stimulatory A2 receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 65, 365-76, 1987.
 45. Huotari M., Gogos J. A., Karayiorgou M., Koponen O., Forsberg M., Raasmaja A., Hyttinen J. and Mannisto P. T. Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficient mice. *Eur J Neurosci* 15, 246-56, 2002.
 46. Christova T. Y., Duridanova D. B. and Setchenska M. S. Enhanced heme oxygenase activity increases the antioxidant defense capacity of guinea pig liver upon acute cobalt chloride loading: comparison with rat liver. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 131, 177-84, 2002.
 47. Maines M. D., Panahian N. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions?. *Adv Exp Med Biol* 502, 249-72, 2001.
 48. Akagi R., Takahashi T. and Sassa S. Fundamental role of heme oxygenase in the protection against ischemic acute renal failure. *JPN J Pharmacol* 88, 127-32, 2002.
 49. Salton S. R., Ferri G. L., Hahm S., Snyder S. E., Wilson A. J., Possenti R., Levi A. VGF: a novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 21, 199-219, 2000.
 50. Wijnholds J., Chowdhury K., Wehr R. and Gruss P. : Segment-specific expression of the neuronatin gene during early hindbrain development. *Dev Biol* 171, 73-84, 1995.
 51. Joseph R., Tsang W., Dou D., Nelson K. and Edvardsen K. Neuronatin mRNA in PC12 cells: downregulation by nerve growth factor. *Brain Res* 738, 32-8, 1996.
 52. Roger T., Glauser M. P. and Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *J Endotoxin Res* 7, 456-60, 2001.
 53. Lue H., Kleemann R., Calandra T., Roger T., Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* 4:449-60, 2002.
 54. Fujimoto S. Identification of macrophage migration inhibitory factor(MIF) in rat spinal cord and its kinetics on experimental spinal cord injury. *Hokkaido Igaku*

- Zasshi 72:409-30, 1997.
55. Weingarten P. and Zhou Q. Y. Protection of intracellular dopamine cytotoxicity by dopamine disposition and metabolism factors. *J Neurochem* 77, 776-85, 2001.
 56. Ludewig U., Lorra C., Pongs O. and Heinemann S. H. A site accessible to extracellular TEA⁺ and K⁺ influences intracellular Mg²⁺ block of cloned potassium channels. *Eur Biophys J* 22, 237-47, 1993.
 57. Ghayur T., Banerjee S., Hugunin M., Butler D., Herzog L., Carter A., Quintal L., Sekut L., Talanian R., Paskind M., Wong W., Kamen R., Tracey D. and Allen H. Caspase-1 processes IFN-gamma inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 386:619-23, 1997.
 58. Okamura H., Tsutsui H., Komatsu T., Yutsudo M., Hakura A., Tanimoto T., Torigoe K., Okura T., Nukada Y., Hattori K., Akita K., Namba M., Taanbe F., Konishi K., Fukuda S. and Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378, 88-91, 1995.
 59. Okamura H., Tsutsui H., Kashiwamura S., Yoshimoto T. and Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* 70, 281-312, 1998.
 60. Jander S. and Stoll G. Interleukin-18 is induced in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 114, 253-8, 2001.
 61. Jander S., Stoll G. Differential induction of interleukin-12, interleukin-18, and interleukin-1 beta converting enzyme mRNA in experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 91, 93-9, 1998.
 62. Wildbaum G., Youssef S., Grabie N., Karin N. Neutralizing antibodies to IFN-gamma-inducing factor prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 161, 6368-74, 1998.
 63. Menge T., Jander S., Stoll G. Induction of the proinflammatory cytokine interleukin-18 by axonal injury. *J Neurosci Res* 65, 332-9, 2001.
 64. Sakimura K., Kushiya E., Ogura A., Kudo Y., Katagiri T. and Takahashi Y. Upstream and intron regulatory regions for expression of the rat neuron-specific enolase gene. *Mol Brain Res* 28, 19-28, 1995.
 65. Vinore S. A., Marangos P. J., Parma A. M. and Guroff G. Increased levels of neuron-specific enolase in PC12 pheochromocytoma cells as a result of nerve growth factor treatment. *J Neurochem* 37, 597-600, 1981.