동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 18. No. 1, 2007

인간 신경모세포종 SH-SY5Y에서 人蔘 total ginsenosides의 신경보호 기능에 관련된 유전자 발현 양상에 대한 연구

허용석, 이승기, 채영규*, 정경화*, 김지혁**
상지대학교 한의과대학 신경정신과, 한양대학교 분자생명과학부*, 라파경희한의원**

Gene expression profiling of SH-SY5Y cells in neuroprotective effect of total ginsenosides on H2O2 induced neurotoxicity

Yongsuk Hu, Seunggi Lee, Younggyu Chai*, Kyounghwa Jung*, Jihyouck Kim**
Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Sang Ji university
Division of Molecular & Life science, Han Yang university*
Rapha Kyunghee Clinic of Oriental Medicine**

Abstract

Objective : The purpose of this study was to investigate molecular basis of neuroprotective effect in total ginsenosides. After H2O2 induced neurotoxicity, gene expression profiling of SH-SY5Y neuroblastoma cells treated by total ginsenosides is analyzed.

Method : After SH-SY5Y cells were cultured, they were damaged by H2O2 induced oxidative stress. After twenty four hours, experimental group is treated by total ginsenosides and control group is treated by 0.9% saline. A high density cDNA microarray chip is used to analyze the gene expression profiling of SH-SY5Y cells. The Significance Analysis of Microarray method is used for identifying genes on a microarray.

Results:

1. According to the results of microarray experiment, 17 genes were up-regulated, 38 genes were down-regulated.
2. Expression of OPHN1, KTAN1, ATM, PRKCE, MAPKs genes associated with cell proliferation, neural growth, and the prevention of apoptosis were increased.
3. Change of EPX gene was the greatest among all genes. EPX gene associated with oxidative stress, and tumor suppressor gene ADAM11 were decreased.

Conclusion : According to this study, molecular basis of neuroprotective effect of total ginsenosides is as followings: the increase of gene expression associated with cell proliferation, neuron growth, the prevention of apoptotsis and decrease of gene expression associated with oxidative stress and tumor suppressor.

Key words : ginsenoside, gene expression, microarray, EPX, neuroprotective effect, oxidative stress

투고일 : 2/15 수정일 : 3/14 채택일 : 3/15
교신저자 : 허용석, 강원 원주시 우산동 상지대학교 한방신경정신과
Tel : 033-741-9268, Fax : 033-732-2124, E-mail : caravan73@empal.com

Ⅰ. 서 론

한의학에서는 "正氣存內 邪不可干"[1] 이라고 하여, 邪氣의 침입과 이로 인한 疾病의 발생이 正氣의 强弱에 의해 좌우된다고 보았고, 치료에 있어서도 正氣를 도와 邪氣를 제거하는 '扶正祛邪'의 治法을 중시하였다[2]. 正氣가 오랫동안 부족하면 虛勞가 발생되는데, 이는 만성질환의 총칭으로 臟腑氣血과 精血의 부족으로 나타난다[3]. 人蔘은 五加皮科 Panax屬에 속한 多年生 草本으로 그 뿌리를 건조한 것으로[4], 元氣를 보양하고 津液을 생겨나게 하며 安神시켜서 주로 虛勞, 少食, 倦怠 등의 氣血津液이 不足할 때 처방된다[5].

활성산소는 정상적인 대사과정에서 생산되고 유용한 기능을 수행하지만, 허혈이나 외상에 의한 조직손상 등으로 인해 과다하게 생긴 활성산소는[6] 불안정하여 세포내 핵산의 DNA 염기서열에 문제를 일으킨다[7]. 활성산소로는 superoxide radical(O_2), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical(OH), single oxygen이 대표적이다[8]. 활성산소는 100개가 넘는 질병과 연관이 있는데[9], 특히 금속 이온이 풍부한 뇌와 같은 신경조직에서의 신경퇴행질환[6], 심장혈관질환, 만성감염질환, 암 발생의 중요한 요인이다[9].

人蔘의 항산화 작용에 대해서 많은 연구가 있었는데, 人蔘 saponin 중 하나인 Rb1은 지질합성을 억제하고 생체내의 대사과정에서 생성된 유독한 H_2O_2를 제거하는 효소인 catalase를 증가시켜 활성산소를 제거한다[10]. Chen 등[11]은 SH-SY5Y cell을 MPP(1-methyl-4-phenyl-pyridinium)라는 산화제로 세포사(apoptosis)를 유도한 실험을 통해 Rg1과 같은 ginsenoside가 신경세포 보호 효과가 있다고 보고하였다. 한편 ginsenoside는 지질의 과산화에 대해 calf aortic endothelial cell 손상을 방어했는데, 人蔘이 내피세포에 대한 보호작용을 통해 죽상경화 방어에 중요한 역할을 한 것으로 추정된다[12].

五臟의 기능을 補해서 邪氣를 제거하고 正氣가 虛脫해서 생긴 虛勞를 치료하는 人蔘의 한의학적 효능[5]과 활성산소로 인한 산화작용을 막아 신경세포를 보호하고 줄어든 세포의 증식과 성장을 돕는다는 실험보고[10-12]는 외부자극으로부터 생체를 보호하고 손상된 조직을 회복시킨다는 면에서 유사하다고 할 수 있다. 하지만, 이런 효능이 분자생물학적으로 어떤 유전자 발현을 통해 나타나는지에 대한 연구는 아직 없었다. 이에 저자는 산화제인 H2O2로 신경세포 손상을 유도한 후 total ginsenosides로 처치했을 때의 유전자 발현양상을 분석하여 人蔘의 신경보호기능이 어떤 유전자와 관련되는지를 추정하고자 한다.

Ⅱ. 실험재료 및 실험방법

(1) 세포배양

Human neuroblastoma SH-SY5Y cell을 2 mM l-glutamate와 Earle's balanced salt가 포함된 50% minimal essential medium(MEM) 배지와 50% F-12 nutrient mixtures에 10% fetal bovine serum과 100 U/㎖ penicillin, 10 ㎍/㎖ streptomycin를 첨가하여 배양하였다. 세포의 배양은 95% air/5% CO_2에서 배양하였다. 세포는 1×10^6 cells/10-mm plate가 되도록 polystyrene tissue culture dish에 분주하였으며 12시간 동안 세포를 부착시킨 후, 새로운 배지로 갈아주면서 30 uM H2O2로 처리하였다.

24시간 후 80 ㎕의 20 ㎍/㎖ 인삼추출물을 처리하였고. 대조군은 80 ㎕의 0.9% saline을 처리하였다. 인삼추출물은 인삼연초연구소에서 확보한 Ginseng Total Saponin(GTS; 98% 이상의 순도)를 2 ㎎/㎖로 0.9% saline에 녹여서 사용하였다. 각각의 시료 처리 후, 12시간마다 현미경을 이용하여 관찰한 후 사진 촬영하였다.(Fig. 1) DNA chip 실험을 위한 샘플은 12시간 후에 채취하였고, real-time RT PCR 실험을 위한 샘플은 12시간, 24시간 및 48시간 이후에 채취하여 사용하였다.

⑵ Total RNA 분리

Total RNA분리는 single-step RNA 분리 방법을 개선한 TRIZOL(InvitrogenTM, CA)방법으로 수행하였다[13]. 실험군과 대조군의 대식세포주는 각 시간별로 배지를 제거하고, 세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 2번 세척하였다. 세척된 세포에 TRIZOL을 넣어 세포를 파쇄하였다. 파쇄한 세포를 튜브에 옮긴 후 200 ㎕의 클로로포름 (Sigma, USA)을 첨가하여 단백질을 변성시켰다. 실온에서 15분간 방치해 두었다가 12,000 x *g* 15분, 4℃에서 원심분리하여 상층액을 회수하여 새로운 튜브에 옮긴 후 동량의 이소프로필알콜 (Sigma, USA)을 넣어주고 얼음에서 1시간 동안 방치하였다. 방치한 후 12,000 x *g* 15분, 4℃에서 원심분리하여 RNA를 침전 시켜 응집체로 모으고 상층액을 제거하고, 1 ㎖의 75% 알코올을 첨가하여 교반한 후 12,000 x *g* 15분, 4℃에서 원심분리하여 상층액을 모두 제거하였다. 튜브 아래의 응집체를 15분 동안 상온에서 건조하고, diethyl pyrocarbonate (DEPC, Amresco, Inc. USA)를 처리한 3차 증류수 30 ㎕를 가하여 녹였다. 확보된 샘플은 분광광도계 (spectrophotometer VU 1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 파장 260 ㎚와 280 ㎚에서 흡광도를 측정한 후 A260/A280의 값이 1.7 이상인지를 확인하였다. 12시간 후에 sample을 채취하여 TRIZOL 방법으로 total RNA를 분리하였다.

⑶ cDNA microarray

신경 손상에 관련된 유전자 발현 양상을 조사하기 위해 약 8,000 개의 유전자를 보유한 TwinChipTM Human-8K (Digital genomics Inc., Korea)을 사용하였다. 대조군 total RNA와 실험군 total RNA에 각각 annealing 반응 혼합물 (total RNA 100 ㎍, control mRNA 1 ng, oligo dT 시발체 2 pmol)을 첨가한 후 70℃ 5분간 방치하고 즉시 튜브를 얼음으로 옮겼다. 새 튜브에 실험군과 대조군 각각의 반응액 [5X AMV RT buffer, low dT dNTP, 1 mM Cy3 (대조군), Cy5 (실험군)-dUTP, Rnase inhibitor (40U/㎕) AMV reverse transcriptase (100units)]을 준비한 후, annealing 반응 혼합물을 각각 첨가하고 42℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 각각의 튜브에 0.5M EDTA 5 ㎕를 첨가하였다. DNA를 클리닝하기 위하여 각 튜브에 1 N NaOH 10 ㎕를 첨가하여 37℃에서 10분간 방치한 후 1M Tris HCl (pH 7.5) 완충액을 25 ㎕를 첨가하였다. Chromaspin column에 준비된 대조군과 실험군의 반응액을 컬럼에 로딩한 후 1,300 x *g*, 5분 동안 원심분리하였다. 각각의 원심분리 후 얻어진 시료에 100% ethanol 300 ㎕와 3M sodium acetate 10 ㎕를 첨가하고, 영하 70℃에 30분 동안 방치해 두었다가 12,000 x *g*로 15분, 4℃에서 원심분리하여 ethanol을 제거하고, 70% ethanol 1 ㎖ 첨가한 후, 다시 원심분리하여 ethanol을 제거하였다. 얻어진 응집체(pellet)를 건조한 후 15 ㎕의 hybridization 완충액 (25 % formamide, 5 X SSC, 0.1 % SDS)에 녹였다. 용해된 시료를 9

5℃에서 5분 동안 끓인 후, pre-hybridization된 cDNA microarry의 표면에 부은 후 커버글라스를 덮고, hybridization chamber에 옮겨 58℃에서 16시간 동안 반응시켰다.

DNA microarray는 반응 12시간 후 42℃로 가열한 세척 완충액 Ⅰ(2 X SSC, 0.1 % SDS)에서 커버글라스를 제거한 후, 세척 완충액 Ⅰ에 넣고 42℃에서 5분간 반응시켰다. 세척완충액 Ⅱ(0.1 X SSC, 0.1 % SDS)에 microarray를 넣고 실온에서 1분간 방치한 후, 이 과정을 4회 반복하였다. 이 후 60 x *g*로 15분 동안 실온에서 원심분리하여 건조시켰다.

Microarray scanning은 Scanarry (DSS Imagetech, New Delhi, India)를 이용한 confocal laser scanning을 사용하여 이미지를 얻었다.(Fig. 2) 얻어진 데이터를 GenePix software(Axon Instrument, Union City, CA)의 scatter plot smoother 'lowess' 방법을 이용하여 intensity-dependent manner로 normalization하였다[14].(Fig. 3) 얻어진 유전자들의 발현 양상은 Significance Analysis of Microarray (SAM) software program을 사용하여 통계 분석하였다[15]. 발현양상이 다른 유전자는 logarithmic gene expression ration (1 이상)을 선택하였으며, q value 5% 이내의 유전자를 선택하였다.

⑷ Real-time RT PCR용 시발체 (Primers) 고안 및 제작

시발체의 고안은 Genamic expression 프로그램을 사용하였으며, 각 유전자의 시발체의 염기서열은 다음과 같다.

Gene		Sequence
EPX	Forward	5'-CCACCAGGACAGTTGTTCGG-3'
	Reverse	5'-AGTGACAATGAAGGGTCCGG-3'
OPHN 1	Forward	5'-TTCGCCAAGGTTGTAGCATG-3'
	Reverse	5'-GCAGAGGCACCAAGACCTTTT-3'

⑸ Real-time RT PCR

Real-time RT PCR은 7500 fast real-time PCR System (Applied Biosystems, CA)를 이용하여 수행하였다. SYBR® Green을 이용한 PCR 반응액은 TaKaRa사 (Japan)의 2× SYBR Green PCR Master Mix를 이용하였다. 각각의 시발체를 최종 농도 2 pmol과 최종 농도 0.01 ㎍의 cDNA를 첨가하였다. DNA의 변성은 95℃에서 30초, annealing은 60℃에서 30초, 합성은 72℃에서 30초간의 사이클로 40회를 반복하였다. 모든 증폭과 detection은 optical caps (Applied Biosystems, CA)로 덮은 96-웰 반응 플레이트에서 수행하였다. 각 사이클의 PCR 생성물은 두 가닥 DNA에 결합하는 SYBR Green의 특성을 이용하여 증가되는 DNA 양을 측정하였다. PCR 반응 후 95℃ 에서 1분간 변성을 시키고, 60℃에서 모두 annealing 시킨 후 60℃에서 95℃로 1분에 2℃ 씩 증가시킨 후 dissociation curve (melting curve)를 분석하여 얻어진 PCR products가 단일 PCR 생산물임을 확인하였다.

Real time RT PCR은 전기영동을 하여 PCR products의 크기를 확인하지 않기 때문에 melting curve를 분석하여 생성된 products를 확인한다[16]. PCR products를 60℃로 낮추어 두 가닥이 되게 한 후 95℃까지 올리면 두 가닥의 DNA는 점점 서로 떨어지게 되어 형광값이 감소하다가 특정온도가 되면 완전히 단일가닥이 되어 형광값이 사라지게 된다. 형광값이 사라지는 특정온도(Tm)는 PCR prodcuts의 염기서열에 따라 달라지는데, 이 값은 미리 알 수 있으므로 PCR products의 Tm을 예상할 수 있다.

모든 데이터는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 사용하여 분석하였다[17]. Threshold cycle (CT) values는 exponential phase 동안 증폭율이 가장 좋은 level에 도달하는 cycle로 정의할 수 있다. 각 실험군과 대조군의 유전자와 GAPDH의 CT값

을 얻었고 유전자의 ΔCT 값은 다음의 수식으로 계산하였다. [ΔCT (total ginsenoside or saline treated) = CT (각 유전자) - CT (GAPDH)] 유전자의 ΔCT (total ginsenoside treated)와 ΔCT(saline treated) 값의 차이로 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 유전자 발현의 변화를 계산하였다. $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값이 1 이라면 변화가 없는 것으로, 1 이상이면 유전자 발현이 증가된 것이고, 1 이하이면 감소된 것으로 해석할 수 있다.

Ⅲ. 실험결과

1. Human neuroblastoma SH-SY5Y cell에 30uM의 H2O2를 처리하고 실험군은 24시간 이후에 80㎕의 20㎍/㎖ GTS, 대조군은 같은 부피의 0.9% saline을 처리하여, 12, 24, 48시간 후 세포증식을 현미경으로 관찰하였다. 초기에는 세포독성으로 인하여 세포의 수가 감소하였으나 시간이 지날수록 세포 수가 증가되었다.(Fig. 1)

2. 데이터를 분석한 결과, $\log_2$ 값 0.7을 기준으로 대조군에 비해 실험군은 17개의 유전자 발현이 증가하였고(Table 2), 38개의 유전자 발현이 감소하였다.(Table 1)

3. 산화스트레스(oxidative stress) 유발과 관련되는 EPX 유전자 발현은 1/4 이하로 크게 감소하였고, tumor suppressor gene인 ADAM11 유전자 발현도 감소하였다.

4. 신경세포의 성장, 증식과 관련되는 OPHN1, KTAN1, ATM과 세포사 방지와 관련되는 PRKCE, MAPKs 유전자의 발현이 증가하였다.

5. EPX 유전자에 대한 real time RT PCR 결과, 대조군에 비해 12시간 후에 4배 이상 발현이 증가하였고, 24시간 후에는 별다른 차이가 없었다.(Fig. 4)

6. OPHN1 유전자에 대한 real time RT PCR 결과, 대조군에 비해 12시간, 24시간 모두 별다른 차이가 없었다.(Fig. 5)

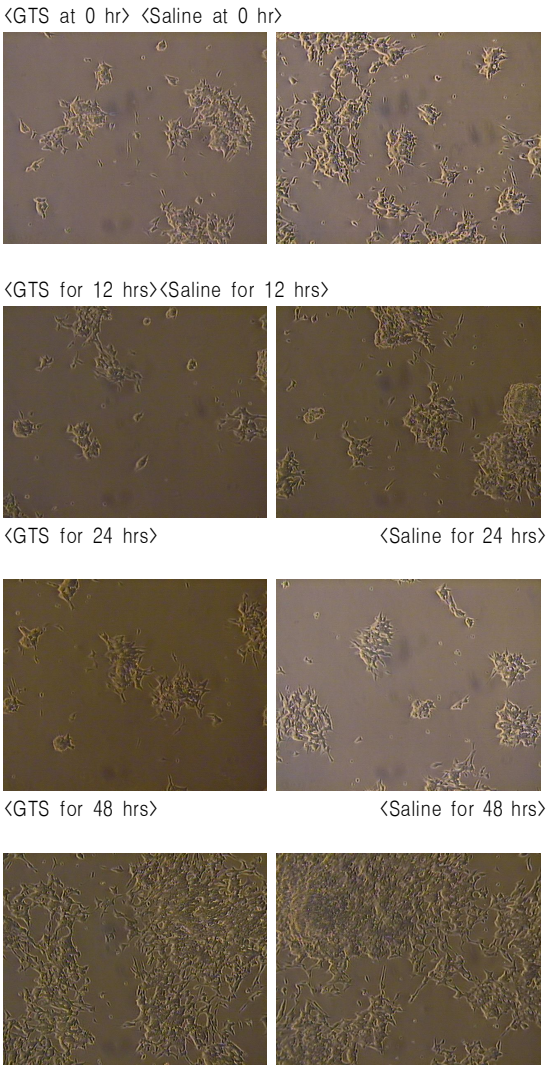


Fig. 1. Total ginsenosides protect SH-SY5Y cells from H2O2 toxicity. Cultured SH-SY5Y cells were treated with 30 mM H2O2 for 24hrs and then cultured in the absence (0.9 % saline) or in the presence of 20 ㎍/㎖ of GTS. After 12, 24 and 48 hrs of culture, the cells were observed by microscope (x200).

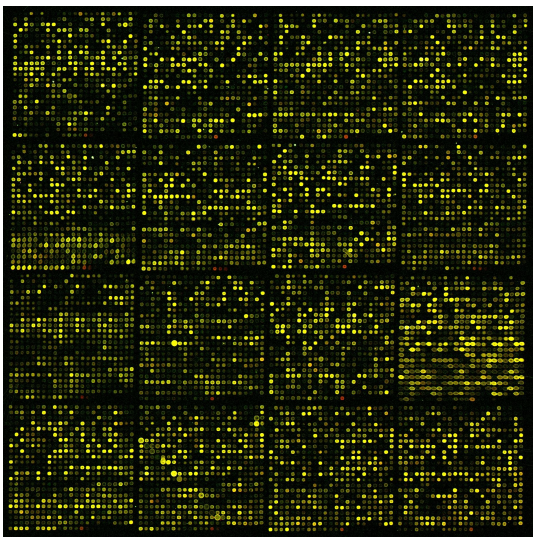


Fig. 2. cDNA microarray image of SH-SY5Y cells treated with total ginsenosides for 12 hrs after incubation with H2O2 for 24 hrs ealier. Analysis of gene expression profiling using microarray contains

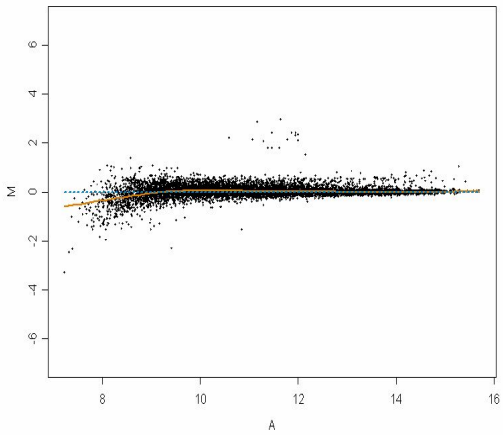


Fig. 3. The MA plot of cDNA miroarray of SH-SY5Y cells treated with total ginsenosides for 12 hrs after incubation with H2O2 for 24 hrs ealier. 17 genes were up-regulated and 38 genes were down-regulated.
M (relative expression ratio) = log2(Cy5/Cy3)
A (signal intensity) = [log2(Cy5*Cy3)]/2.

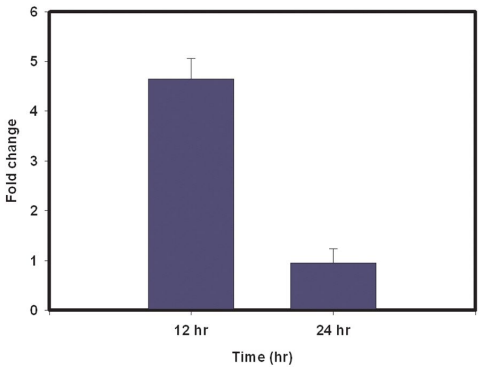


Fig. 4. The result of real-time RT-PCR of EPX gene from the total ginsenosides treated SH-SY5Y cells at 12 hr and at 24 hr, respectively.

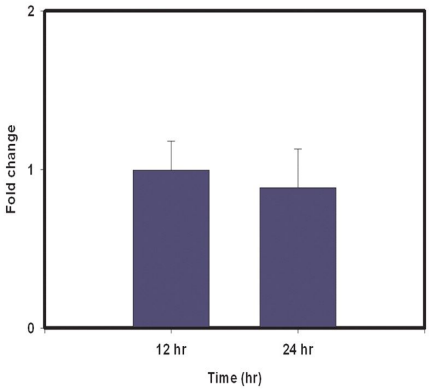


Fig. 5. The result of real-time RT-PCR of OPHL1 gene from the total ginsenosides treated SH-SY5Y cells at 12 hr and at 24 hr, respectively.

Table 1. Down-regulated genes

Ratio	GenBank_ ACC	Title	Biological Process
−2.2	X14346	Eosinophil peroxidase [EPX]	response to oxidative stress
−1.5	AI421852	LanC lantibiotic synthetase component C−like 2 (bacterial)	−−
−1.4	K02581	Thymidine kinase 1, soluble	DNA metabolism
−1.3	AI436356	Transcribed locus	−−
−1.2	M16965	Cerebellar degeneration−related protein 1, 34kDa	cell growth and/or maintenance
−1.2	U87558	Bridging integrator 1	cell differentiation
−1.1	X16323	−−	−−
−1.0	AF086713	RAS protein activator like 1 (GAP1 like)	intracellular signaling cascade
−1.0	AB009675	A disintegrin and metalloproteinase domain 11 [ADAM11]	integrin−mediated signaling pathway
−1.0	L36531	Integrin, alpha 8	cell−cell adhesion
−0.9	AA476826	Regulating synaptic membrane exocytosis 2	−−
−0.9	BQ028878	−−	−−
−0.9	AA854852	Exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)	tRNA−nucleus export
−0.9	NM_006509	V−rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B−cells 3 (avian) [RELB]	regulation of transcription, DNA−dependent
−0.9	AB015046	−−	−−
−0.9	M30646	Erythrocyte membrane protein band 4.2	cellular morphogenesis
−0.9	U01147	Active BCR−related gene	small GTPase mediated signal transduction
−0.8	AB011141	Zinc finger homeobox 1b	negative regulation of transcription
−0.8	AI889200	Cell division cycle 2−like 1 (PITSLRE proteins)	−−
−0.7	AI972505	TDP−glucose 4,6−dehydratase	nucleotide−sugar metabolism
−0.7	AI928081	CAMP responsive element binding protein 3−like 4	regulation of transcription, DNA−dependent
−0.7	AB018299	Neurofascin	cell adhesion
−0.7	AF000545	−−	−−
−0.7	M28880	Ankyrin 1, erythrocytic	cytoskeleton organization and biogenesis
−0.7	X51602	−−	−−
−0.7	AF012281	PDZ domain containing 1	cell proliferation
−0.7	AF052120	Hypothetical protein FLJ43806	−−
−0.7	AA732702	2',5'−oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	immune response
−0.7	M96739	Nescient helix loop helix 1[NHLH1]	cell differentiation
−0.7	U17989	Striatin, calmodulin binding protein 3	cell cycle
−0.8	AI913329	Chromosome 19 open reading frame 29	−−
−0.8	NM_003085	Synuclein, beta	−−
−0.8	H87563	Cholecystokinin	signal transduction
−0.7	L40371	Thyroid hormone receptor interactor 4 [TRIP4]	regulation of transcription, DNA−dependent
−0.7	M28210	RAB3A, member RAS oncogene family [RAB3A]	exocytosis
−0.7	NM_002314	LIM domain kinase 1	Rho protein signal transduction
−0.7	U57721	Kynureninase (L−kynurenine hydrolase)	tryptophan catabolism
−0.7	AI590320	Sin3−associated polypeptide, 18kDa [SAP18]	regulation of transcription from Pol II promoter

Table 2. Up-regulated genes

Ratio	GenBank_ ACC	Title	Biological Process
0.9	AI016298	X 006 protein	--
0.9	AA620508	ATPase, Class II, type 9A	cation transport
0.9	D87466	KIAA0276 protein	--
0.8	AA683420	Protein kinase C, epsilon [PRKCE]	induction of apoptosis
0.8	AI082260	Regulator of G-protein signalling 5 [RGS]	regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway
0.8	AF217508	Carboxypeptidase, vitellogenic-like	proteolysis and peptidolysis
0.8	AA219672	CDC5 cell division cycle 5-like [CDC5]	regulation of transcription, DNA-dependent
0.8	X80692	Mitogen-activated protein kinase 6 [MAPKs]	cell cycle
0.8	AA931319	Cardiomyopathy associated 5	--
0.8	AF052432	Katanin p80 (WD repeat containing) subunit B 1 [KTAN1]	--
0.8	AW006234	Ring finger protein 144	--
0.7	AJ001189	Oligophrenin 1[OPHN1]	axon guidance
0.7	U67093	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D) [ATM]	DNA repair
0.7	AL036280	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	--
0.7	U40992	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	protein folding
0.7	AA707391	Aminolevulinate, delta-, synthase 1	--
0.7	BC010054	--	--

Ⅳ. 고 찰

한의학의 질병발생과정은 邪와 正의 대립으로 귀결되는데[2], <素問 評熱病論>에서는 "邪之所湊, 其氣必虛"[1]라고 하여, 正氣는 發病에 있어서 중요한 관건이 되며, 病邪의 소멸도 正氣의 작용에 의하여 일어나므로 치료에 있어서도 '扶正' 을 중시하였다[2]. 虛勞는 臟腑氣血, 元氣, 精血의 不足으로 인해 나타나는 만성질환에 대한 총칭으로[3], H_2O_2로 세포가 손상되면 신경세포 수가 급격히 감소되는데, 이는 正氣가 부족하여 발병하는 虛勞와 관련지어 볼 수 있다.

산화스트레스는 모든 감염과정에 동반되는데 활성화된 phagocyte는 외부유기체를 죽이기 위해 많은 양의 활성산소를 생산한다[9]. 이런 과정에서 생성된 활성산소는 먼저 superoxide dismutase, catalase, 항산화효소에 의해 방어되며 base excision repair, transcription-coupled repair, mismatch repair 등의 DNA repair mechanism에 의해 DNA의 산화 손상이 회복된다[18]. 하지만, 체내에서 제거되지 못한 활성산소는 생체분자에 손상을 줘서 세포의 붕괴와 죽음에 이르게 하며[9], 암, 자가면역성 질환, 빈혈, 요독증, 당뇨병, 노화 등의 만성퇴행성 질환의 병리적 과정에서 영향을 준다[18]. 특히 중추신경계는 낮은 항산화능을 가지고 있어서, 활성산소가 Alzheimer's 치매, Parkinson's disease, Huntington disease, 죽상경화증같은 신경퇴행질환의 발생에 중요한 요인이 된다고 보고되었다[19].

人蔘의 산화스트레스에 대한 신경세포보호 작용과 관련된 많은 연구가 있었다. 환경호르몬 PCB52는 neural SK-N-MC cell에서 산화물을 증가시키고 세포독성을 유발하는데, 人蔘

은 활성산소의 발생을 감소시켜 환경호르몬 P52에 의한 세포사를 방지시켰다[20]. Liao 등[21]에 의하면 외상에 의한 spinal cord 손상으로 인한 신경세포손실과 axon의 퇴화에 대해 人蔘은 glutatmate, kainic acid로 인한 세포독성과 H2O2에 의한 oxidative stress를 방어하여 신경세포를 보호한다. 人蔘은 손상된 신경세포의 증식속도를 증가시키는데, Rb1과 Rg1은 신경세포 독성이 있는 glutamate에 의해 DA(dopamine) 신경세포 및 신경세포 돌기의 수가 현저히 감소되었을 때 세포사는 막지 못했지만 이후 신경세포의 수와 돌기의 길이를 증가시켰다[22].

이와 같은 인삼의 신경세포 보호 작용[20-22]은 虛勞를 치료하는 주요약재인 人蔘의 한의학적 효능[5] 과 외부자극으로부터 생체를 보호하고 손상된 조직의 회복을 촉진시킨다는 면에서 유사하다고 할 수 있다.

人蔘의 항산화와 신경세포 보호에 관한 실험보고는 人蔘이 활성산소로부터 신경세포를 보호하고 그 성장과 증식속도를 증가시키는 효능이 있음을 보여준다. 하지만, 산화제로 인한 신경세포 손상시 人蔘의 신경세포 보호 작용이 어떤 유전자 발현을 통해 나타나는지에 대해서는 아직 보고되지 않았다. 이번 연구에서는 먼저 H_2O_2로 신경세포 손상을 유도한 후 실험군으로 人蔘의 total ginsenosides, 대조군으로 saline을 처리한 후 microarray 방법을 사용하여 total ginsenosides의 유전자 발현을 분석하였다.

세포배양 system은 세포독성과 세포의 적응반응과 관련하여 oxidative stress를 연구하는데 있어서 유용하다. H_2O_2는 대부분의 배양액에서 안정되지만 세포가 있을 때는 세포수와 catalase 함량에 따라 빠르게 감소한다. H_2O_2는 세포내의 catalase에 의해 무독화되는데, 짧은 시간동안 반응한 후 회복 단계로 들어간다. 예를 들어 hyperoxic 처치가 세포 생존률을 10% 까지 줄이는데 48-72시간 걸리는 반면에, H_2O_2 처치는 비슷한 수준의 독성이 나타나는데 수분에서 60분을 넘기지 않는다[23]. H_2O_2 처치는 세포의 적응성 변화와 세포 독성 과정이 겹치지 않으므로 total ginsenosides에 의한 세포변화를 분석하는데 유용해서 본실험에서는 H_2O_2를 산화제로 사용하였다.

Microarray는 염기서열이 알려진 DNA를 spots이라고 불리는 정해진 위치에 붙여 미세집적(micro-array)시킨 것을 통칭하는데 이 방법을 통해 수천 또는 수만의 유전자 발현을 동시에 정량적으로 관찰할 수 있다. 두 개의 sample에서 추출한 mRNA로부터 만들어진 cDNA에 red, green의 형광색소로 표지한 후 지지체 위에 고정된 표지 DNA와 혼성화 과정(hybridization)을 행한다. 그리고, 표지 DNA가 내뿜는 형광의 발현량을 비교하여 유전자 발현을 분석한다[24].

Microarray 결과 $\log_2$ 값 0.7 이상으로 발현이 증가한 유전자는 OPHN1, KTAN1, ATM, PRKCE, MAPKs, CDC5, RGS 등 모두 17개이다.(Table 2)

이[25]는 人蔘 사포닌의 주요성분중 하나인 Rb1과 Rg1을 처리한 신경세포 유전자에 대한 microarray 분석 결과 신호변환, 세포증식, 성장, 보호, 세포주기조절 등에 관련된 유전자의 발현이 증가된다고 보고하였는데, 본실험에서도 세포의 증식과 성장에 관련된 유전자 발현이 증가하였다.

OPHN1(oligophreini1)은 mouse에서 신경관의 신경상피를 발달시키며, 주로 분화의 나중 단계나 성숙한 뇌에서 의미 있는 수준의 발현이 나타난다. OPHN1은 rhoGAP 단백질로 GTP 가수분해를 자극하여 Rho-GTPase 활동을 부정적으로 조절한다. RhoGAP 단백질의 불활성화는 계속적인 GTPase target의 활성화

를 야기하는데, 그것은 axon과 dendrite의 성장과 이동에 영향을 준다[26]. CA1 neuron에서 OPHN1의 발현 감소는 dentrite의 길이의 감소로 이어진다[27].

KTAN-1(katanin p80 subunit B1)은 세포내의 microtuble 배열의 급속한 재조직과 분비를 자극한다[28]. 방추체에서 microtubule은 세포가 분열할 때 중심적인 역할을 하는데 중심체 속에는 보통 1개 또는 2개의 중심립이 있고, 그 주변은 중심구라고 한다. 핵분열이 시작되면 1개의 중심체가 분열하여 2개로 되어 각각 핵의 양극으로 이동하고, 그 주위에 성상체(星狀體)가 발달하게 되며, 2개의 중심체 사이에는 방추체가 발달하여 핵분열이 이루어지게 되고 microtubule은 해중합 (depolymerization) 할 수 있게 한다[29]. 신경세포에서 microtubule의 분비는 신경전달에 필요한 수송을 하게하며 이것은 axon의 성장을 위해 꼭 필요하다. microtubule은 P60과 P80의 subunit으로 구성되어 있으며, 이들은 신경세포내에서 부분적으로 다른 양상으로 변화하는데, 이런 microtubule의 부분적인 민감성 차이는 신경극성의 유지와 성장에 있어서 중요한 요소이다[28].

ATM(ataxia telangiectasia mutated)은 DNA의 상해를 인식하면 활성화되며 DNA 손상 회복에 중심적 역할을 하고[30], 신호전도, 세포순환조절과 관련된다. 다양한 형태의 DNA의 손상에 대해 선택적인 target 특이성을 나타내는데, 산화스트레스 폭로 이후에도 손상회복을 위해 활성화된다[31]. 예를 들어 전리방사선에 노출된 세포는 이중나선구조의 DNA의 손상이 일어나는데, 이에 대한 자연적인 인산화 과정이 ATM의 이합체 분해와 ATM kinase의 활동에 의해 일어난다[32].

PRKCE(protein kinase C, epsilon)는 약물을 비롯한 다양한 자극으로 인한 세포사멸을 막고 세포생존을 유도한다. 화학치료에 저항하는 세포에서 역배열 cDNA에 의한 PRKCE의 발현이 감소하면 민감성이 증가하게 된다[33,34]. Okhrimenko H 등[35]은 종양 괴사와 관련된 세포사를 이용하여 glioma cell의 생존과 세포사(apoptosis)에 있어서의 PRKCE의 역할에 대해 연구하였다. PRKCE는 glioma cell의 생존에 필수적인 AKT 발현을 조절하며, 이 유전자의 감소는 다양한 glioma cell의 세포사(apoptosis)를 증가시켰다.

MAPKs(mitogen-activated protein kinase6) 군은 대표적인 인산화효소로 세포주기와 분화에 중요한 단백질의 발현을 조절하는 transcription factor를 인산화한다[36]. MAPKs는 또한 신경상피를 발달시킬 때 많이 발현되는데, MAPKs의 손실은 세포사멸과 신경관 결손을 초래한다[37]. 도파민으로 일어나는 산화 스트레스시 SH-SY5Y cell의 세포사가 일어나게 되는데, MAPKs는 도파민 처치 후 10분 이내에 활성화되어 세포사를 방지한다[38].

CDC5(CDC5 cell division cycle 5-like)는 mRNA의 전사에 필수적으로 pre-mRNA의 splicing과 세포 cycle의 조절에 관련된 중요한 역할을 한다[39]. RGS(regulator of G-protein signalling 5)는 G-protein과 관련한 신호전달 입자로 GTPase의 활성화로서 작용하여 heterotrimeric G-protein 신호를 막는다. 많은 포유동물의 RGS 단백질은 뇌에서 발현되는데 이 조절자의 생리적인 기전은 아직 명확하지 않다[40].

신경세포보호와 관련하여 발현이 증가한 유전자는 주로 신경세포의 성장과 증식, 세포사 방지와 관련이 있다. OPHN1의 발현 증가는 axon과 dendrite의 성장을 증가시키며 KTAN1도 microtubule을 증가시켜 axon의 성장을 돕는다. 그리고, ATM은 산화스트레스 이후의 손상 이후의 DNA 손상 회복을 활성화시

킨다.

세포사(apoptosis)는 세포가 수복능력의 한도를 넘은 내외인성의 상해를 받은 병적인 세포사인 괴사(necrosis)와는 달리 세포가 어떤 정해진 시기에 계획적으로 일어나는 생리적인 세포사이다. 세포사를 유발하는 신호의 전달은 세포증식, 분화, 주기, DNA 손상, 스트레스 등과 밀접한 관련을 가진다[30]. PRKCE, MAPKs는 세포사를 방지하여 세포생존에 영향을 미쳤다.

$\log_2$ 값 -0.7이하로 발현이 감소한 유전자는 EPX, ADAM11, TRIP4, RELB, SAP18, RAB3A 등 모두 38개이다.(Table 1)

EPX(eosinophil peroxidase)는 microarray상 가장 큰 변화가 나타난 유전자로 1/4 이하로 발현이 감소하였다. EPX는 H2O2를 이용하여 hypobromous acid 와 hypochlorous acid를 생산하는데, 이들은 강력한 산화제로서 염증 반응을 일으킨다[41]. Wu 등[42]에 의하면 EPX는 hypohalous acid, nitrotyrosine formation, NO(nitric oxide)를 사용하여 감염세포에 작용한다.

ADAM11(a disintegrin and metalloproteinase domain 11)은 주로 유방과 난소의 tumor를 억제하는 유전자로 세포와 세포 사이, 세포와 기질간에 상호작용에 영향을 준다[43].

TRIP4(thyroid hormone recepotr interactor4)는 호르몬 의존적인 전사 요소로 다양한 target gene의 발현을 조절하는 비교적 강력한 전사 활성제이다[44]. RELB(V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3)는 전사와 관련된 유전자로 이의 발현은 면역과 관계되는 dendritic cell의 활성화와 관련된다[45]. SAP18(sin3-associated polypeptide, 18kDa)은 전사에 관여하는 RNA polymerase가 DNA에 붙어서 전사를 시작을 할 수 있게 해주는 부분인 promoter를 구속하여 전사를 억제한다[46]. NHLH1(nescient helix loop helix 1)을 helix-loop-helix protein이라고 하는데 전사요소로 특히 성장기에 중요한 역할을 한다[47]. RAB3A(RAB3A, member RAS oncogene)는 시냅스 전후의 유연성에 필수적인 유전자로[48] 신경 끝의 막 흐름을 조절하고 exocytosis에 관여한다[49].

신경세포 보호와 관련하여 EPX와 ADAM11 유전자 발현이 감소하였다. EPX의 발현감소는 total ginsenosides가 H2O2로 인한 산화반응을 방지하여 신경세포를 보호함을 시사한다. 암 관련 유전자에는 암을 유발하는 발암유전자(oncogene)와 암억제유전자(tumor suppressor gene)가 있다. 암억제유전자는 단적으로 말하면 그 기능이 저하되면 암이 되는데 결국 세포증식을 억제하는 역할을 한다[30]. Tumor suppressor gene ADAM11의 발현 감소는 total ginsenosides가 손상 이후의 신경세포 증식과 성장에 영향을 미침을 시사한다.

DNA 안에 저장되어있는 유전정보는 단백질 생성을 통해서 세포의 기능을 하게 되는데 DNA의 이중나선형은 고정되어 있어서 정보를 전달하기에 부적당하다. 그래서, DNA를 하나의 골격으로 해서 전사를 통해 mRNA를 만들고, splicing을 통해 intron을 제거한 후 핵에서 세포질로 나와 리보솜에서 효소, tRNA의 작용을 통해 단백질을 합성하게 된다[50]. 전사 과정은 직접적으로 신경세포 보호 기능과 관련이 없지만 다양한 단백질의 기능 발현을 위해서 필요한데, 이와 관련하여 CDC5, TRIP4, RELB, SAP18, NHLH1 유전자 발현의 변화가 나타났다. 그리고, RGS, RAB3A 유전자는 이온교환과 신경전도와 관련된다.

PCR(polymerase chain reaction)은 DNA의

특정 부분을 대량으로 증폭시키는 기술이다. RT(reverse transcriptase) PCR은 RNA를 추출하고 역전사효소를 이용하여 mRNA를 주형으로 cDNA를 제조하고 이를 이용하여 특정 부위를 증폭시키는 실험방법이다. 이는 간단하고 소량의 RNA에서도 각종 분석이 가능하기 때문에 미량으로 존재하는 여러 종류의 시료를 동시에 해석하는데 응용되며 유전자 하나하나의 발현량을 측정할 수 있다. Real-time PCR은 형광물질로 표시한 PCR 산물의 증폭량을 실시간으로 확인하면서 해석하는 방법으로 핵산의 초기량을 정확히 정량해낼 수 있다[24].

본실험에서는 microarray상 산화 반응과 관련된 유전자인 EPX와 신경세포의 성장과 관련된 유전자인 OPHN1에 대한 real time RT PCR을 시행하였다. PCR 실험 결과 EPX는 12시간 이후에는 대조군에 비해 4배 이상 발현이 증가하였고 24시간 이후에는 거의 차이가 없었다. OPHN1은 12시간, 24시간 모두 거의 차이가 나타나지 않았다. Schlingemann 등[51]은 microarray와 PCR 실험 결과가 질적으로 일치한다고 보고했는데, 본논문에서는 두 실험의 결과가 상이하였다. 앞으로 microarray와 PCR 실험 결과가 상이한 이유에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

人蔘이 산화스트레스로부터 신경세포를 보호하고, 세포의 성장과 증식속도를 증가시키는 효능은 다음과 같은 유전자 발현과 관련될 것으로 추정된다. H_2O_2로 인한 신경세포손상에 대한 total ginsenosides의 항산화 작용은 EPX 유전자 발현 감소와 관련되며, 신경세포의 성장과 증식속도를 증가시키는 효능은 OPHN1, KTAN1, ATM, PRKCE, MAPKs 유전자 발현 증가와 관련이 있다. 그리고, 이러한 유전자 발현은 虛勞를 치료하며 正氣를 補한다는 人蔘의 한의학적 효능과도 연관이 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

본연구는 H_2O_2로 인간 신경모세포종 SH-SY5Y에 산화스트레스를 주고 total ginsenosides를 처리했을 때의 유전자 발현 양상을 살펴보았다. 다음의 유전자 발현을 통해 人蔘의 total ginsenosides는 신경세포보호기능을 수행한다.

1. OPHN1, KTAN1, ATM 유전자 발현 증가는 신경세포의 증식과 성장과 관련이 있다.
2. PRKCE, MAPKs 유전자 발현 증가로 total ginsenosides는 세포사(apotosis)의 방지를 통해 신경세포를 보호한다.
3. EPX 유전자의 발현 감소로 total ginsenosides는 항산화 작용을 통하여 신경세포를 보호한다.
4. ADAM11 암억제유전자의 발현감소는 신경세포증식과 관련이 있다.
5. 다양한 단백질의 기능 발현을 위해 필요한 전사과정과 관련하여 CDC5, TRIP4, RELB, SAP18, NHLH1 유전자 발현의 변화가 나타났다.

상기한 유전자 발현 변화는 虛勞를 치료하며 正氣를 補하는 人蔘의 한의학적 효능과 연관이 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 배병철 역. 今釋黃帝內經素問. 서울;성보사. 1994:315, 729.
2. 최승훈. 내경병리학. 서울;통나무. 1995:222, 234-235, 239.

3. 상해중의학원. 중의내과학. 香港;商務印書館香港分館. 1975:126.
4. 생약학교재편찬위원회. 생약학. 서울;동명사. 1998:147-150.
5. 전국한의과대학교수(공편저). 본초학. 서울;영림사, 1992:531-3.
6. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem. 1992;59:1609-23.
7. 駒野徹(저), 최용락, 정수열(역). 유전자의 구조와 기능. 서울:세종출판사. 1999:125-6.
8. 손장락. 활성산소와 항산화제. 서울:바이오메디컬. 2004:18-19.
9. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease. Lancet. 1994;344:721-4.
10. Zhang JT, Qu ZW, Liu Y, Deng HL. Preliminary study on antiamnestic mechanism of ginsenoside Rg1 and Rb1. Chin Med J (Engl). 1990;103(11):932-8.
11. Chen XC, Fang F, Zhu YG, Chen LM, Zhou YC, Chen Y. Protective effect of ginsenoside Rg1 on MPP+-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. J Neural Transm. 2003;110(8):835-45.
12. Mei B, Wang YF, Wu JX, Chen WZ. Protective effects of ginsenosides on oxygen free radical induced damages of cultured vascular endothelial cells in vitro. Yao Xue Xue Bao. 1994;29(11):801-8.
13. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9.
14. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucleic Acids Res. 2002 Feb 15;30(4):e15.
15. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 2001 Apr 24;98(9):5116-21.
16. Lyondagger E, Millsondagger A, Phan T, Wittwer CT. Detection and Identification of Base Alterations Within the Region of Factor V. Leiden by Fluorescent Melting Curves. Mol. Diagn. 1998 Dec;3(4):203-9.
17. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acid Research. 2001 May 1;29(9):e45.
18. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutat. Res. 2003 Oct 29;531(1-2):231-51.
19. Rokyta R, Racek J, Holecek V. Free radicals in the central nervous system. Cesk Fysiol. 1996;45(1):4-12.
20. 김질수. 환경호르몬 PCB의 신경세포에 대한 세포독성기전 및 인삼의 방어효과. 원광대학교 박사학위논문. 2001.
21. Liao B, Newmark H, Zhou R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons in vitro. Exp. Neurol. 2002 Feb;173(2):224-34.
22. Radad K, Gille G, Moldzio R, Saito H, Rausch WD. Ginsenosides Rb1 and Rg1 effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate. Brain Res.

2004 Sep 17;1021(1):41-53.
23. Gille JJ, Joenje H. Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. Mutat Res. 1992 Sep;275(3-6):405-14.
24. 유대열, 송창우, 유영춘, 박승용. 게놈연구 프로토콜. 서울;월드사이언스. 2001:25-29, 110.
25. 이준노. 인삼 Ginsenoside Rb1 및 Rg1을 처리한 신경세포주의 유전자 발현양상에 대한 연구. 한양대학교박사학위논문. 2005.
26. Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, Portes V, Vinet MC, Zemni R, Crollius HR, Carrie A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine, C, Chelly, J. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. Nature. 1998;392(6679):923-6.
27. Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. Nature Neurosci. 2004;7:364-72.
28. Yu W, Solowska JM, Qiang L, Karabay A, Baird D, Baas PW. Regulation of microtubule severing by katanin subunits during neuronal development. J Neurosci. 2005 Jun 8;25(23):5573-83.
29. Snustad P, Simmons MJ(저), 김상구, 서동상, 서봉보, 이정주, 정기화(역). 최신유전학. 서울;범한서적주식회사. 2002:34-35.
30. 平賀紘一 등(저), 정혜영(역). 분자세포생물학. 서울;월드사이언스. 2001:228, 237, 255.
31. Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA, O'Reilly MA. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. J Biol Chem. 2005 Jan 14;280(2):1186-92.
32. Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J. Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. Oncogene. 2004 Apr 15;23(17):3122-7.
33. Knauf JA, Elisei R, Mochly-Rosen D, Liron T, Chen XN, Gonsky R, Korenberg JR, Fagin JA. Involvement of protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon) in thyroid cell death: a truncated chimeric PKC-epsilon cloned from a thyroid cancer cell line protects thyroid cells from apoptosis. J. Biol. Chem. 1999;274(33):23414-25.
34. Ding L, Wang H, Lang W, Xiao L. Protein kinase C-epsilon promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway. J. Biol. Chem. 2002;277(38):35305-13.
35. Okhrimenko H, Lu W, Xiang C, Hamburger N, Kazimirsky G, Brodie C. Protein kinase C-epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells. Cancer Res. 2005 Aug 15;65(16):7301-9.
36. 약품생화학분과위원회. 분자약품생화학. 서울;동명사. 2001;102-5.
37. Chi H, Sarkisian MR, Rakic P, Flavell RA. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MEKK4) results in enhanced apoptosis and defective neural

tube development. Proc. Nat. Acad. Sci. 2005;102:3846-51.
38. Junn E, Mouradian MM. Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. J Neurochem. 2001;78:374-83.
39. Liu L, Graub R, Hlaing M, Epting CL, Turck CW, Xu XQ, Zhang L, Bernstein HS. Distinct domains of human CDC5 direct its nuclear import and association with the spliceosome. Cell Biochem Biophys. 2003;39(2):119-32.
40. Seki N, Sugano S, Suzuki Y, Nakagawara A, Ohira M, Muramatsu M, Saito T, Hori T. Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of human RGS5, a novel G-protein signaling regulator gene. J Hum Genet. 1998;43(3):202-5.
41. Aldridge RE, Chan T, van Dalen CJ, Senthilmohan R, Winn M, Venge P, Town GI, Kettle AJ. Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics. Free Radic Biol Med. 2002 Sep 15;33(6):847-56.
42. Wu W, Chen Y, Hazen SL. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. J Biol Chem. 1999 Sep 3;274(36):25933-44.
43. Emi M, Katagiri T, Harada Y, Saito H, Inazawa J, Ito I, Kasumi F, Nakamura Y. A novel metalloprotease/disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers. Nat Genet. 1993 Oct;5(2):151-7.
44. Lee JW, Choi HS, Gyuris J, Brent R, Moore DD. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. Molec. Endocr. 1995;9(2):243-54.
45. Clark GJ, Gunningham S, Troy A, Vuckovic S, Hart DN. Expression of the RelB transcription factor correlates with the activation of human dendritic cells. Immunology. 1999;98:189-96.
46. Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. Cell. 1997;89:357-64.
47. Suzuki Y, Tsuruga E, Yajima T, Takeda M. Expression of bHLH transcription factors NSCL1 and NSCL2 in the mouse olfactory system. Chem Senses. 2003;28(7):603-8.
48. Huang YY, Zakharenko SS, Schoch S, Kaeser PS, Janz R, Sudhof TC, Siegelbaum SA, Kandel ER. Genetic evidence for a protein-kinase-A-mediated presynaptic component in NMDA-receptor-dependent forms of long-term synaptic potentiation. Proc. Nat. Acad. Sci. 2005;102:9365-70.
49. Elferink LA, Scheller RH. Synaptic vesicle proteins and regulated exocytosis. Prog Brain Res. 1995;105:79-85.
50. 이정균, 김용식. 정신의학. 서울;일조각. 2000:47-48.
51. Schlingemann J, Habtemichael N, Ittrich

C, Toedt G, Kramer H, Hambek M, Knecht R, Lichter P, Stauber R, Hahn M. Patient-based cross-platform comparison of oligonucleotide microarray expression profiles. Lab Invest. 2005 Aug;85(8):1024-39.