



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

현쥐 성상세포에서 오탄당 인산회로
저해제인 DHEA가 LPS/IFN- γ 에 의해
유도된 NO와 PGE₂생성에 미치는 영향

아주대학교 대학원

의학과

신진애

흰쥐 성상세포에서 오탄당 인산회로
저해제인 DHEA가 LPS/IFN- γ 에 의해
유도된 NO와 PGE₂생성에 미치는 영향

지도교수 이 수 환

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2004년 2월

아주대학교 대학원

의학과

신진애

신진애의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 백 은 주 인

심사위원 이 영 돈 인

심사위원 이 수 환 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2003년 12월 20일

감사의 글

언제나 그렇듯 시간이 지난 후에 되돌아보면 시간의 참 소중한함을 깨달게 되는 것 같습니다. 소중한 시간들 속에 언제나 함께 했던 고마운 분들께 작지만 가슴깊이 감사드리려 합니다. 벅찬 기대와 설레임 그리고 약간의 긴장으로 시작했던 2년 동안의 대학원 생활을 어느덧 마치게 되었습니다. 아직은 많이 부족하지만 저를 아껴주시고 사랑해주시는 많은 분들의 관심 속에 논문을 완성하게 되었습니다.

교실이라는 작은 울타리 속에서 하루 중 대부분의 시간을 함께 했던 실험실 가족 한분 한분께 고마움을 전하고 싶습니다.

인자하심과 깊이 있는 카리스마를 지니신 우리 실험실의 최고 어른이신 문창현 선생님, 부드러운 미소로 항상 학생들을 챙겨주시는 백은주 선생님, 밝은 미소로 즐거움을 주시는 정이숙 선생님, 바쁘신 가운데 논문을 심사해주신 이영돈 선생님께 깊이 감사드리며 너무나도 부족한 저를 언제나 관심과 사랑으로 믿고 지도해 주신 이수환 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 아낌없는 격려와 관심으로 지켜봐주시고, 특히 건강을 걱정해 주셨던 이광호 교수님, 어려울 때면 든든한 상담자가 되어주시고 용기를 듬뿍 주시는 양시용 교수님께 감사드립니다.

언제나 함께 하기에 익숙함에 소중한함을 잠시나마 알지 못했던 실험실 분들께 감사드리며, 짧다면 짧을 수도 길 다면 길수도 있을 2년이라는 시간을 함께 하며 미운정 고운정~으로 소중한 추억을 함께 만들어 주신 분들께 고마움을 전합니다. 만능 맥가이버 김한수 선생님, 박혜성, 정의명 연구강사 선생님, 실험실 왕 언니 권경자 선생님, 꼼꼼히 실험 가르쳐 주셨던 김영채 선생님, 많이 힘들 때 큰 의지가 되어주었던 (쨍언니) 박지영 선생님, (뽕깡언니) 이보경 선생님, 이해심 많은 이시은 선생님, 재치만점 박석 선생님, 매일매일 웃음 가득 심재경 선생님, 1년 동안 한 지붕 아래서 함께했던 미영언니, 기도 많이 해주셨던 최정이 선생님, 그리고 처음부터 지금까지 동기라는 이름으로 함께 했

던 박동현 선생님, 김찬식 선생님, 미정이에게 고마움을 전합니다. 그리고 세상에서 가장 소중한 우리 가족들 언제나 말없이 큰딸을 믿고 지켜봐주신 우리 엄마 아빠, 얼마 전 대한의 남아로 군대에 입대한 우리 동생 영학이, 어리지만 가끔은 놀라울 정도로 의젓한 사랑스런 막내 동생 영규 그리고 언제나 진애의 엄청난 심통을 넓은 가슴으로 이해해주고 한결같이 나만 바라봐주는 사랑하는 성식이에게 가슴깊이 고마움을 전합니다. (우리 멍멍이 새싹, 새봄)

언제나 시작과 끝은 함께 하듯 2년 동안의 대학원 생활을 마치며, 다시 시작할 새로운 출발점에서 언제나 처음과 같은 마음으로 성실히 노력하는 자세로 최선을 다 할 것을 다짐하며, 감사의 글을 마치겠습니다.

- 국문요약 -

혈류 정상세포에서 오탄당 인산회로 저해제인 DHEA가 LPS/IFN- γ 에 의해 유도된 NO와 PGE₂ 생성에 미치는 영향

목 적 : 오탄당 인산회로는 세포내 산화/환원준위를 조절하는 중요한 경로이나 오탄당 인산회로가 뇌세포에서의 염증매개인자 생성에 미치는 영향은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 오탄당 인산회로 저해제인 neurosteroid DHEA에 의한 뇌 정상세포에서의 NO 및 PGE₂ 생성조절과 세포기전을 규명함으로써 오탄당 인산회로에 의한 염증 매개인자 생성 조절 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법 : American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입한 rat 정상세포주(astrocyte)인 C6 glioma cell을 대상으로 DHEA 및 DHEAS가 lipopolysaccharide(LPS)/interferon- γ (IFN- γ) 처리 후 세포 생존율, NO 및 PGE₂ 생성, inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현, MAP kinase 작용경로에 미치는 영향을 검토하였다.

결 과 : LPS/IFN- γ 유도 세포사멸에 DHEA와 DHEAS가 미치는 영향을 확인한 결과 24시간까지 세포보호 효과를 나타내었다. LPS/IFN- γ 로 유도된 NO와 PGE₂ 생성은 DHEA에 의해 유의적으로 증가되었으며 iNOS와 COX-2의 발현 또한 단백질과 mRNA 수준에서 증가되었다. DHEAS는

LPS/IFN- γ 로 유도된 NO 와 PGE₂ 생성을 유의적으로 억제하였으며 iNOS 와 COX-2의 발현 또한 단백질과 mRNA 수준에서 감소되었다.

DHEA는 MAP kinase family중 p38 과 ERK의 인산화를 증가시켰으며 MAP kinase 저해제 처리 시 DHEA에 의해 유도되는 NO 생성 증폭이 유의성 있게 억제 되었다. 그러나 DHEAS는 MAP kinase 활성화에 유의한 영향을 주지 않았다.

결론 : 본 연구결과는 오탄당 인산회로가 glucose 대사뿐만 아니라 염증매개 인자조절을 통해 염증반응에 영향을 미칠 가능성을 시사하고 있다.

핵심되는말: C6 glioma cell, iNOS(inducible Nitric Oxide Synthase), Nitric Oxide(NO), Cyclooxygenase-2(COX-2), Prostaglandin E₂(PGE₂), Dehydroepiandrostrone(DHEA), Dehydroiso-androsterone-3-sulfate(DHEAS)

차 례

국문요약.....	1
차 례.....	3
그림차례.....	5
사용약어.....	6
I . 서 론.....	7
II . 연구목적.....	10
III . 실험재료 및 방법.....	11
A. 실험 기기 및 시약.....	11
1. 시약 및 재료.....	11
2. 실험 기기 및 기구.....	11
B. 연구 방법.....	12
1. 세포배양.....	12
2. 세포의 처리.....	12
3. NO assay	12
4. MTT assay.....	13
5. Western blotting(iNOS, COX-2).....	13
6. Western blotting(MAP Kinase).....	14
7. RT-PCR.....	14
8. PGE ₂ assay.....	16
9. 통계처리.....	16
IV . 결 과.....	17
1. DHEA 와 DHEAS가 LPS/IPN- 유도	

세포사멸 (death)에 미치는 영향.....	17
2 DHEA 와 DHEAS가 iNOS 발현과 NO 생성에 미치는 영향.....	17
3 DHEA 와 DHEAS가 COX-2 발현과 PGE ₂ 생성에 미치는 영향.....	18
4 DHEA의 NO 생성 증폭작용에 미치는 MAP kinase 저해제의 영향.....	18
V . 고 찰.....	30
VI . 결 론.....	34
참고문헌.....	36
ABSTRACT.....	49

그림 차례

Fig. 1. Effects of DHEA and DHEAS on LPS and IFN- γ induced cell death in C6 glioma cell.....	20
Fig. 2. Effects of DHEA and DHEAS on NO production.....	21
Fig. 3. Effects of DHEA and DHEAS on iNOS expression.....	22
Fig. 4. Effects of DHEA and DHEAS on PGE ₂ production.....	23
Fig. 5. Effects of DHEA and DHEAS on COX-2 expression.....	24
Fig. 6. Effects of DHEA and DHEAS on MAPK pathway.....	25
Fig. 7. Effects of MAPK inhibitors on NO production (DHEA treatment).....	26
Fig. 8. Effects of MAPK inhibitors on NO production (DHEAS treatment).....	27
Fig. 9. Effects of p38-inhibitor on LPS/IFN- γ induced NO production.....	28
Fig. 10. Effects of MAPK inhibitors on enhancement of LPS/IFN- γ induced iNOS and COX-2 expression by DHEA.....	29

사 용 약 어

- COX-2** : Cyclooxygenase-2
DHEA : Dehydroepiandrosterone
DHEAS : Dehydroepiandrosterone sulfate
DEPC : Diethylpyrocarbonate
DMEM : Dubecco's modified Eagle's medium
EIA : Enzyme immunoassay
FBS : Fetal bovine serum
GSH : glutathione
G6PD : Glucose 6-phosphate dehydrogenase
GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IFN- γ : Interferon gamma
iNOS : Inducible nitric oxide synthase
LPS : Lipopolysaccharide
LAS : Luminescent image analyzer
MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-20yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium
NO : Nitric oxide
PGE₂ : Prostaglandin E₂
PPP : Pentose phosphate pathway
PVDF : Polyvinylidene difluoride
ROS : reactive oxygen species
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

I. 서 론

각종 원인에 따른 뇌 손상 진행과정에서의 염증매개인자의 역할에 대해서는 이미 잘 알려져 있으며 따라서 염증매개인자의 생성조절 또는 작용억제는 뇌질환의 예방 및 치료를 위한 중요한 표적이 되고 있다.

대표적 염증 매개인자인 nitric oxide(NO)는 포유류의 병태 생리적 과정에서 중심적인 역할을 할 뿐만 아니라 신경세포와 면역체계의 기능조절을 담당하고 있는 확산 가능한 신호전달 물질로 알려져 있다. NO는 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine이 L-citrulline로 변환되는 oxygen-dependent reaction 동안 형성된다. NO를 합성하는 NOS는 세 가지 isotype, 즉 칼슘의존성인 neuronal type(nNOS)와 혈관내피세포(endothelial cell)에 존재하는 endothelial NOS(eNOS), 그리고 칼슘 비의존성이면서 cytokine이나 조직손상, 감염 등에 의한 염증반응시 유도되는 inducible NOS(iNOS)등이 알려져 있다. nNOS와 eNOS는 constitutive하게 발현되는 반면 iNOS는 각종 자극에 의해 유도되는 특성을 가지고 있다. NO는 혈관 확장 등의 혈관계에 대한 작용이외에 대뇌에서 paracrine 방식의 신호전달 기능을 하는 매개물으로써 long-term potentiation 이나 long-term depression에서 glutamate에 의한 세포독성과 신경전달 뿐만 아니라 nonadrenergic-noncholinergic 신경 매개성 반응에 기여한다. NO는 주위세포에 작용하여 특정 유전자의 발현을 촉진하거나 억제함은 물론 단백질의 post-translational modification을 초래하여 효소의 활성을 억제 또는 촉진하기도 한다. 이렇게 NO가 세포에 미치는 영향이 다양한 이유는 NO가 효소의 iron과 sulfur complex에 강한 결합을 보이거나 ribosylation을 통해 단백질의 구조를 변화시키는 것 외에도 NO가 주위에 존재하는 reactive oxygen intermediate(ROI)들

과 작용하여 또 다른 반응성을 갖는 물질로 전환되기 때문이다. NO의 불균형적인 생성은 세포 내 에너지 대사의 파괴, DNA손상, Poly(ADP-ribose) polymerase의 활성화 그리고 세포질 내 칼슘의 비정상적 역할을 야기하며⁷ 세포사멸을 유도한다. 뇌에서의 iNOS 발현은 성상세포(astrocyte)나 미세아교세포(microglia)에서 관찰되며 특히 미세아교세포에서의 iNOS 발현은 뇌신경세포의 손상 및 사멸과 밀접한 관련이 있다.

NO 뿐만 아니라 염증반응에서 중요시 되고 있는 prostaglandins(PGs)은 정상적인 뇌의 기능 및 허혈성 뇌질환이나 뇌졸중과 뇌질환에 중요하게 관여하며, 내·외부적 요인에 의한 뇌신경세포의 손상에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다. PGs는 phospholipase A₂(PLA₂)에 의해 세포막의 인지질로부터 유리된 arachidonic acid(AA)가 cyclooxygenase(COX)의 작용에 의해 대사된다. 뇌 신경세포가 손상되면 AA유리가 증가하고 COX가 활성화되어 여러 종류의 prostanoid를 유리시키게 된다⁶¹. 이러한 PGs의 합성에 중요한 역할을 하는 COX는 일반적으로 COX-1 과 COX-2, 두 종류의 isotype이 존재하는 것으로 알려져 있으며 최근에 COX-3의 존재가 보고 된 바 있으나 그 생리적 의미는 아직 규명되지 않고 있다. COX-1은 거의 모든 생체 내 조직에서 항상 일정한 수준으로 발현되고 있으며 반면에 COX-2의 경우 염증을 유발하는 IL-1 β 나 TNF- α 와 같은 cytokine류, 박테리아 내독소나 기계적 및 온도에 의한 조직손상 시에 발현이 유도된다⁶⁰.

본 실험에서 사용된 오탄당 인산회로(PPP) 저해제로 알려진 DHEA는 신경전달의 조절, 신경세포 보호, 세포 성장억제 및 면역조절에도 관여하는 것으로 알려져 있으며^{27,29} 노화와 관련하여 신경퇴화 질병과 기억 그리고 학습과도 관련되어 많은 보고가 있다. DHEA는 또한 오탄당 인산회로를 차단함으로써

NADPH의 고갈, GSH level의 감소를 유발하며, 이에 따라 세포내 환원력이 감소되어 세포내 산화/환원 준위의 불균형이 초래된다. 세포내 산화 준위의 증가는 다양한 세포기능 변화와 밀접한 관련이 있는 것으로 잘 알려져 있어 DHEA에 의한 생리활성과의 관련성이 주목되고 있다.

II. 연구 목적

오탄당 인산회로 저해제인 DHEA와 DHEA의 생체내 전환가능 물질인 DHEAS는 neurosteroid로 알려져 있다. 이 두 물질은 상호전환이 가능한 물질임에도 불구하고 동일한 손상에 대해 세포 종류, 종간 차이, 실험방법 등에 따라 그 영향의 상이함이 보고되어 있다. 이러한 결과는 염증매개인자인 NO와 PGE₂생성의 경우에도 동일하게 보고되어 있으나, 이와 관련하여 자세한 세포기전 및 신호전달 과정에 대해 아직까지 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 DHEA 및 DHEAS의 NO 및 PGE₂ 생성 조절과 세포기전을 규명하고, 오탄당 인산회로에 의한 염증매개인자 생성조절 가능성을 확인하고자 흰쥐 상세포주인 C6 glioma cell을 사용하여 실험하였다.

III. 실험재료 및 방법

A. 실험기기 및 시약

1. 시약 및 재료

Dubecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 (JBI, Seoul, Korea), Penicillin-streptomycin, 0.25% Trypsin-EDTA는 (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA), Fetal bovine serum(FBS)은 (Hyclon, Logan, UT, USA)에서 Lipo polysaccharide (*Escherichia coli*, O111:B4), MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-dephenyl-tetrazoliumbromide), Dehydroepiandrosterone (5-Androsten-3 α -ol-17-one, DHEA), Dehydroiso-androsterone 3-sulfate(5-Androsten-3 β -ol-17-one sulfate, DHEAS), (Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. iNOS polyclonal antibody는 (UBI, Lake Placid, NY, USA)에서, COX-2 polyclonal antibody는 (Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. ERK, p-ERK, p38, p-p38, JNK, p-JNK, HRP anti rabbit anti body는(Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, ARGG goat anti-rabbit IgG(Caltag, Burlingame, CA, USA), PD96059, SB202190 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), SP600125(Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였다. mRNA를 추출하기 위한 easy-BLUE, western blot detection을 위한 West-zol은 (iNtRON, Seoul, Korea) 에서 구입하였다.

2. 실험기기 및 기구

RNA 및 단백질 정량은 분광광도계 Ultrospec 3000(Amersham, Piscataway,

NJ, USA)를 이용하였으며 RT-PCR은 PCR machine 640(Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)을, MTT, NO 그리고 PGE₂ 측정은 microplate reader Emax(Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하였다. 그리고, MAP kinase Western blot은 LAS-1000 CH(Fuji, Japan)를 사용하여 이미지를 관찰 하였다.

B. 실험 방법

1. 세포배양

Rat 성장세포주인 C6 glioma cell은 American Type Culture Collection에서 구입하여 20mM glucose가 포함된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)에 5% FBS, 1% penicilline-streptomycin이 첨가된 배지로 세포배양기 (37℃, 5% CO₂, 95% air)에서 배양하였다.

2. 세포의 처리

배양한 C6 glioma cell을 24 well plate에 각 well당 3 X 10⁶ 개의 세포를 가하고 confluent하게 되면 24시간 동안 serum 제거 조건에서 배양한 후 LPS(10μg/ml)와 IFN- (200U/ml) 그리고 PPP 저해제인 DHEA(100μM)와 DHEAS (100μM)를 실험 조건에 따라 처리하여 실험에 이용하였다.

3. Nitric Oxide(NO) assay

배양액에 축적된 nitrite는 Griess의 방법을 사용하여 측정하였다²⁴. Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100μl를 동량의 배양액에 첨가한 뒤 15분 후 540nm의 파장에서 microplate

reader로 측정하였다. Nitrite 농도는 sodium nitrite를 표준액으로 비교하여 정량하였다.

4. MTT assay

5mg/ml MTT를 최종농도 0.5mg/ml가 되도록 96well에 첨가하고 세포를 2시간 동안 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 배양한 후, 100µl의 extraction buffer(5% acetic acid, 5% 1N-HCL DMF를 1:1로 혼합하고 20% SDS를 첨가한 buffer)를 가하였다. 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 10시간 동안 배양 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference 파장은 630nm를 사용하였다.

5. Western blotting

iNOS, COX-2 효소 단백질의 발현량을 측정하기 위해 western blotting을 실시하였다. 준비한 세포를 PBS(phosphate buffered saline)으로 2회 세척하고 10mg/ml PMSF, 10µM leupeptin을 첨가한 lysis buffer(50mM Tris-HCL, pH 7.4, 10mM EDTA, 1% Tween 20)를 각각 200µl씩 넣고 취한 후 30분 동안 얼음위에 방치한 뒤 초음파 분쇄기(Sonics & Materials Inc, CU26, Danbury, CT, USA)를 이용하여 5초 간격으로 5회 분쇄하여 세포를 용해시키고 15,000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리를 하여 상층을 시료로 취하였다. 분리한 cell lysate를 얻어 BCA protein assay kit을 사용하여 단백질량을 정량 하였다. 단백질량에 따라 시료를 준비하고 Laemmli sample buffer를 넣어준 후 10분간 끓인 뒤 10% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동 후 PVDF에 electrotransfer 한 뒤 5% non-fat dry milk로 blocking 하였다. 90분 후 iNOS(1:5,000), COX-2 (1:600) 항체를 상온에서 2시간 동안 처리하였다. TBS-T(0.05% Tween 20, 10mM Tris

base, 150mM NaCl, pH 8.0)로 3회 세척하고 ARGG(anti rabbit Ig G, 1:600)를 3시간 상온에서 처리한 후 AP(Alkaline phosphatase) conjugate substrate kit를 사용하여 발색하였다.

6. MAP kinase 단백질 분리

MAP kinase family인 p38 MAP kinase, JNK, ERK의 활성을 보기 위해 62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 50mM DTT, 0.1% bromophenol blue 10mM PMSF, 1mM sodium vanadate, leupeptin을 첨가하고 10분간 100℃에서 끓인 후 전기영동 하였다. 10% SDS-PAGE에 의해 단백질을 분리하고 PVDF membrane으로 옮겼다. Membrane은 TBS-0.05% tween(T-TBS)로 씻어낸 후 60분간 5% non-fat dry milk로 blocking 하였다. 이를 다시 T-TBS로 5분씩 3회 씻어내고 PBS에 primary antibody(1:1000)를 희석하여 하룻밤 동안 반응시킨 후 2차 antibody인 HRP antibody(1:1000)을 1시간 동안 반응시킨 뒤 enhancer chemiluminescent reagent(ECL)로 발색하고 LAS-1000CH (Fuji, Japan)를 이용하여 이미지를 관찰하였다.

7. RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

세포를 PBS로 두 번 세척 후, easy-BLUE를 이용하여 세포 균질액을 분리 후 chloroform을 첨가하였다. 4℃ 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 걷어내어 RNA를 분리하였다. 10X reaction buffer 2μl/sample, 25mM MgCl₂ 4μl/sample, random primer p(dN)₆ 2μl/sample, deoxynucleotide Mix 2μl/sample, RNase inhibitor 1μl/sample, AMV reverse transcriptase 0.4μl/sample, RNA sample 1μg을 넣은 후 DEPC water로 total volume 이 20μl가

되도록 맞춘 뒤 PCR machine 640(Perkin Elmer, Wlleslay, MA, USA)으로 25℃에서 10분, 42℃에서 1시간, 97℃에서 5분을 1 cycle로 돌린 후 cDNA를 얻었다. 위에서 얻은 cDNA 2μl에 PCR 10X buffer 5μl/sample, dNTP mix 2μl/sample, sense primer 1μl/sample, antisense primer 1μl/sample, taq polymerase 0.5μl/sample을 넣고 DEPC water로 total volume이 30μl가 되도록 맞춰 주었다. 각 시료에 대해 다음의 조건하에서 PCR을 행하여 iNOS 및 COX-2 mRNA의 발현 정도를 비교하였다. 총 RNA양은 260nm에서 측정하며, 280nm에서 측정한 값을 비교하여 추출된 mRNA의 순도를 측정하였다. RNA 농도를 보정하고 RT-PCR을 이용 cDNA를 합성 후 합성된 cDNA는 EtBr (ethidium bromide)로 염색된 2% agarose gel에서 전기영동하고 UV를 이용하여 발광되는 빛의 양을 사진으로 현상하였다.

<PCR 조건>

iNOS primer

sense : 5'-GTGTTCCACCAGGAGATGTTG-3'

antisense : 5'-CTCCTGCCCACTGAGTTCGTC-3'

COX-2 primer

sense : 5'-ACTCACTCAGTTTGTGAGTCATTC-3'

antisense : 5'-TTTGATTAGTACTGTAGGGTTAATG-3'

GAPDH

sense : 5'-GTGAAGGTCGGTGTGAACGGATTT-3'

antisense : 5'-CACAGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3'

reaction cycle

iNOS : 94℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 1분 28 cycle

COX-2 : 94℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 1분 28 cycle

GAPDH : 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분 30 cycle

8. Prostaglandin(PG) 정량

EIA(enzyme linked immunoassay)방법을 사용해서 PGE₂를 정량하였다. PGE₂항체는 PBS(0.01M, pH 7.4)로 1:5000으로 희석해서 Maxisorp immunomodule(Nunc, Denmark)에 각각 150μl씩 가하여 4℃에서 24시간 동안 처리한 후, 0.3% BSA-PBS로 4℃에서 24시간 이상 blocking하였다. 0.1% BSA가 포함된 PBS buffer로 세척한 후 PGE₂ acetylcholinesterase EIA tracer (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA)를 사용해 시료와 tracer를 경쟁적으로 결합하도록 하였다. 상온에서 2시간 반응시킨 후 생성된 PGE₂와 tracer를 제거하기 위해 0.05% Tween 20-PBS용액으로 씻고, Ellman's reagent를 가하여 발색시킨 다음 405nm에서 파장을 측정하여 최소자승 회귀 분석법을 통해 작성된 표준곡선으로부터 산출 하였다.

9. 통계처리

모든 자료는 평균 ± S.E.M. 으로 나타내었고, T-Test로 통계처리하여 p<0.05 및 p<0.01 수준에서 유의성을 검증하였다.

IV. 결 과

1. DHEA 와 DHEAS가 LPS/IPN- 유도 세포사멸(death)에 미치는 영향

배양한 C6 glioma cell을 LPS/IPN- 그리고 DHEA 와 DHEAS를 각각 10 μ M-100 μ M까지 농도별 처리하여 24시간 배양하였다. MTT assay를 통하여 세포 생존율을 측정된 결과 DHEA와 DHEAS는 세포사멸을 유의적으로 억제 하였다(Fig. 1).

2. DHEA와 DHEAS가 iNOS 발현과 NO 생성에 미치는 영향

LPS/IPN- 그리고 DHEA와 DHEAS를 각각 10 μ M-100 μ M까지 농도별 처리하여 24시간 배양한 후 nitrite(NO)양을 Griess 반응에 의해 측정된 결과 LPS 단독처리에 비해 LPS/IPN- 로 유도된 NO 생성은 증가되었고, DHEA 처리에 의해 유의적으로 더욱 증가하였으며, DHEAS 처리 시에는 유의적으로 감소됨을 관찰하였다(Fig. 2).

NO 생성 효소인 iNOS의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 C6 glioma cell을 6 well plate에 배양하여 LPS/IPN- 그리고 DHEA 또는 DHEAS를 각각 처리하고 24시간 후 western blotting로 확인한 결과 NO 생성과 비슷한 경향으로 DHEA처리에 의해 iNOS 발현이 증가됨을 관찰하였으며, DHEAS 처리 시 감소됨을 관찰하였다. 또한 iNOS 효소 단백질 발현에 미치는 영향이 유전자 수준에서 일어나는지를 확인해 보고자 RT-PCR을 시행하였다. LPS/ IPN-

그리고 DHEA와 또는 DHEAS를 가하고 각각 6시간 동안 배양한 뒤 RT-PCR로 iNOS의 mRNA의 발현량을 확인한 결과 역시 DHEA처리에 의해 iNOS mRNA양이 증가되었으며, DHEAS의 경우에는 감소되었다. 따라서

DHEA와 DHEAS에 의한 LPS유도 NO생성 증가와 감소는 iNOS발현 조절에 기인하고 있음을 확인하였다(Fig. 3).

3. DHEA 와 DHEAS가 COX-2 발현과 PGE₂생성에 미치는 영향

DHEA와 DHEAS가 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 LPS/IFN- γ 그리고 DHEA 또는 DHEAS를 각각 10 μ M-100 μ M까지 농도별 처리하여 24시간 동안 배양하였다. EIA에 의해 PGE₂ 생성량을 측정한 결과 LPS 단독처리와 비교시 LPS/IFN- γ 로 유도된 PGE₂량은 큰 변화는 없었으나 DHEA 처리에 의해 유의적으로 증가하였으며, DHEAS 처리시 DHEA와는 반대로 유의적으로 감소하였다(Fig. 4).

PGs 생성 효소인 COX-2의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 LPS/IFN- γ 그리고 DHEA 또는 DHEAS를 각각 처리 하여 24시간 동안 배양한 뒤 western blotting으로 LPS 유도 COX-2 효소단백 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 DHEA에 의해 COX-2 발현이 증가되었으며, DHEAS의 경우 감소 양상을 보였다. 또한 COX-2 효소 단백질 발현에 미치는 영향이 유전자 수준에서 일어나는 지를 확인해 보고자 western blotting과 동일한 실험조건에서 약물 처리 6시간 후에 RT-PCR로 COX-2의 mRNA의 발현량을 확인한 결과 DHEA처리에 의해 COX-2 mRNA 가 증가되었으며, DHEAS처리에 의해 감소되었다. 따라서 DHEA 와 DHEAS에 의한 LPS유도 PGs생성 증가와 감소는 COX-2발현 조절에 기인하고 있음을 확인하였다(Fig. 5).

4. DHEA의 NO 생성증폭작용에 미치는 MAP kinase 저해제의 영향

DHEA 및 DHEAS의 NO 생성 조절작용에 있어서 MAP kinase 의 관여

가능성을 확인하기 위해 DHEA 와 DHEAS가 MAP kinase활성에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 우선 LPS/IPN- 그리고 DHEA 또는 DHEAS를 처리한 뒤 각각 30분 또는 1시간 동안 배양 하고 western blotting로 LPS 유도 DHEA와 DHEAS의 영향을 살펴본 결과 DHEA처리에 의해 p44/42 및 p38의 인산화가 시간별로 증가되는 양상을 보였으며, DHEAS의 경우 감소 양상을 보였다(Fig. 6). DHEA는 LPS/IPN- 유도 NO생성을 유의적으로 증가시켰으며, 증가된 NO는 Erk 및 JNK저해제에 의해 감소되었다. 그러나 p38 저해제인 SB202190(10 μ M)은 DHEA가 존재하지 않는 경우 오히려 NO 생성을 증폭시켰다(Fig. 7, 8). p38저해제의 농도를 1 μ M로 처리한 경우에는 LPS/IPN- 유도 NO 생성을 증폭시키지 못하였으나 DHEA에 의한 NO 생성증가는 억제하였으며(Fig. 9). 각 MAP kinase 저해제들은 DHEA에 의한 iNOS 및 COX-2 발현 증가를 저해하였다.(Fig 10). 이 결과들은 DHEA에 의한 NO 및 PGE₂ 생성 증폭이 MAP kinase 활성화 특히 p38과 Erk 활성화 증가와 관련이 있음을 추론케 하고 있다.

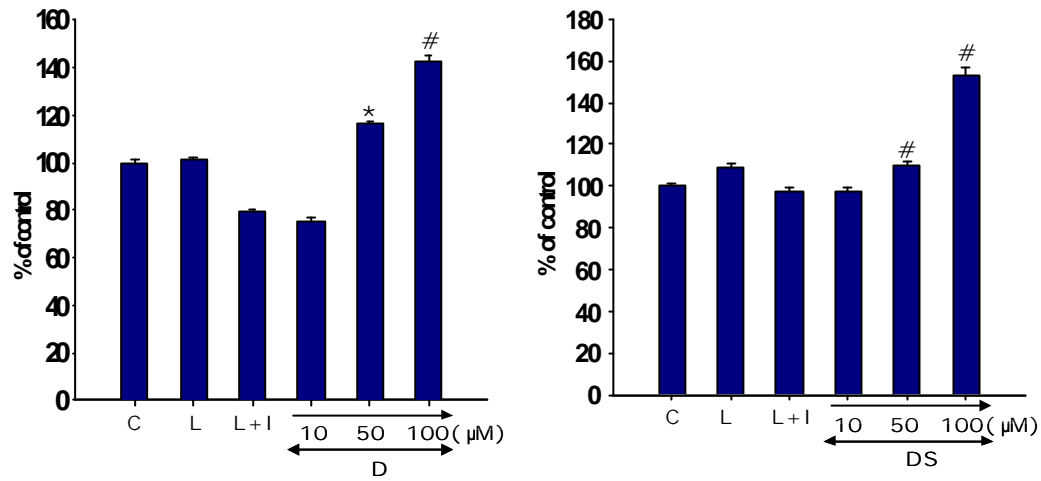


Fig. 1. Effects of DHEA and DHEAS on LPS and IFN- γ induced cell death in C6 glioma cells. Cells were incubated with DHEA or DHEAS in the presence of LPS(10 μ g/ml) and IFN- γ (200U/ml) for 24h, Cell viability was determined by MTT assay, Data are expressed as mean \pm S.E.M(n=3 well per each group). # P<0,01 vs. LPS/IFN- γ treated; *P<0,05 vs LPS/IFN- γ treated
C: control; L: LPS; L+I: LPS+IFN- γ ; D: DHEA; DS: DHEAS

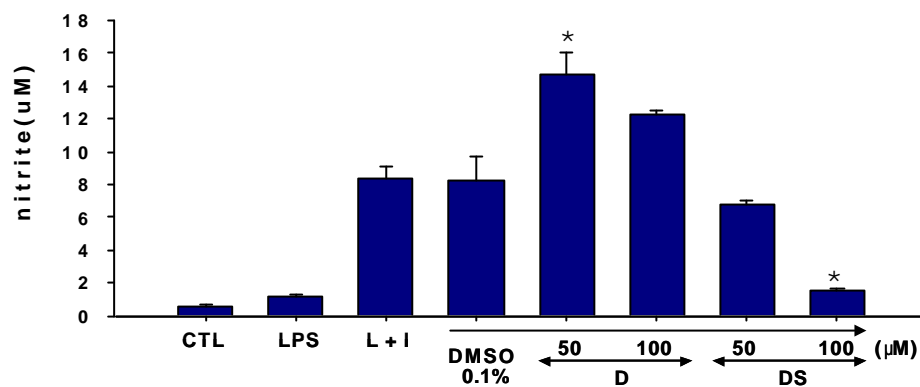


Fig. 2. Effects of DHEA and DHEAS on NO production. Cells were incubated with DHEA or DHEAS in the presence of LPS(10 μ g/ml) and IFN- (200U/ml) for 24h, and the amount of NO was measured by Griess reaction, Data are expressed as mean \pm S.E.M(n=3 well per each group), *P<0,05 vs LPS/IFN- treated
 CTL: control; L: LPS; L+I: LPS+IFN- ; D: DHEA; DS: DHEAS

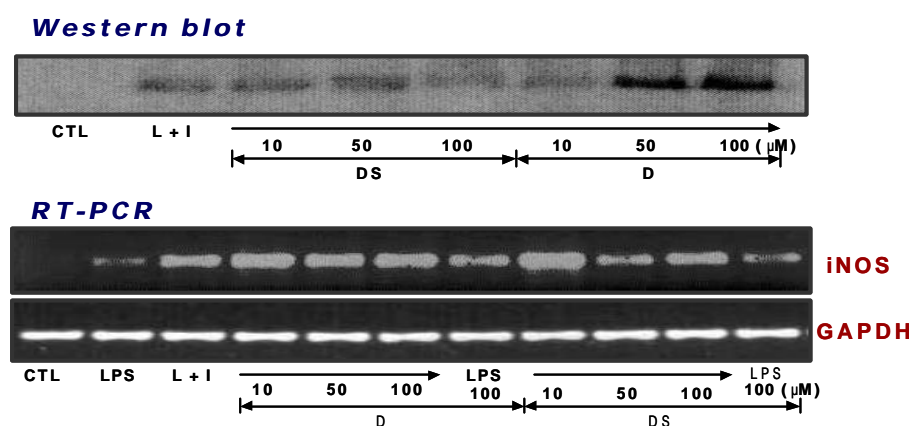


Fig. 3. Effects of DHEA and DHEAS on iNOS expression. Cells were incubated with DHEA or DHEAS in the presence of LPS(10μg/ml) and IFN- (200U/ml) indicated time. Western blot analysis for iNOS was performed at 24hr and the levels of mRNA at 6hr were determined by RT-PCR as described in materials and methods.

CTL: control; L: LPS; L+I: LPS+IFN- ; D: DHEA; DS: DHEAS

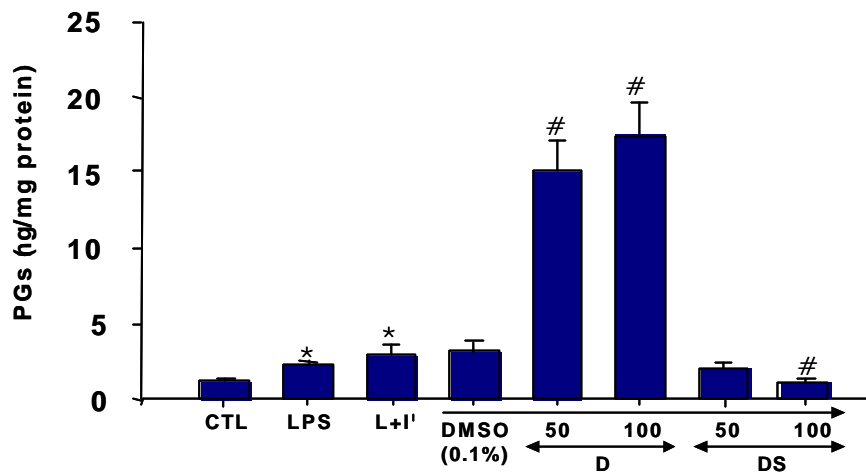


Fig. 4. Effects of DHEA and DHEAS on PGE₂ production. Cells were incubated with DHEA or DHEAS in the presence of LPS(10 μ g/ml) and IFN- (200U/ml) for 24hr, and the amount of PGE₂ was measured by enzyme immunoassay(EIA) as described in materials and methods. Data are expressed as mean \pm S.E.M(n=3 well per each group).

P<0.01 vs LPS/IFN- treated; *P<0.05 vs CTL

CTL: control, L: LPS, L+I: LPS+IFN- , D: DHEA, DS: DHEAS

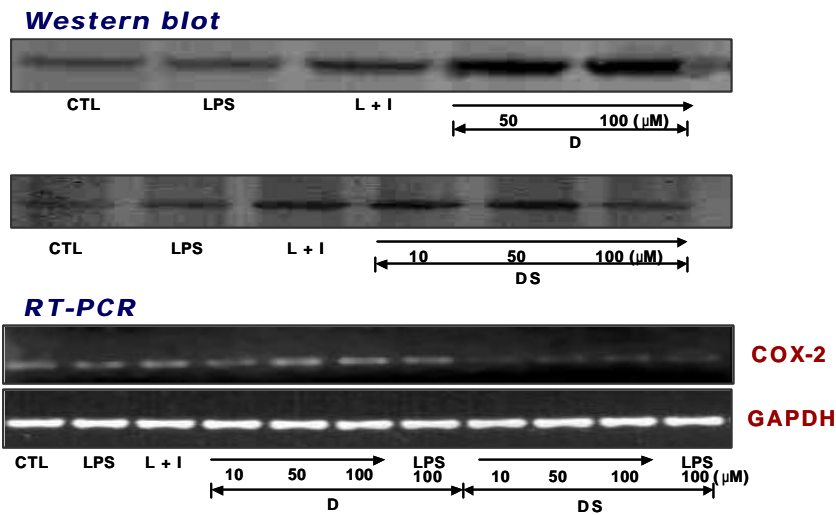


Fig. 5. Effects of DHEA and DHEAS on COX-2 expression. Cells were incubated with DHEA or DHEAS in the presence of LPS(10μg/ml) and IFN- (200U/ml) for indicated time. Western blot analysis for COX-2 protein was performed at 24hr and the levels of COX-2 mRNA were determined by RT-PCR at 6hr as described in materials and methods.

CTL: control; L: LPS; L+I: LPS+IFN- ; D: DHEA; DS: DHEAS

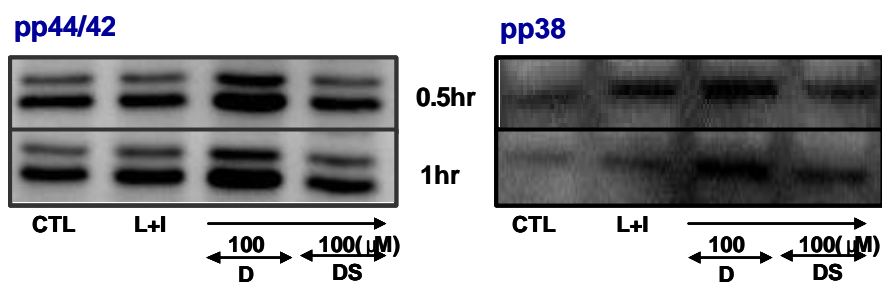


Fig. 6. Effect of DHEA and DHEAS on MAPK pathway

Cells were incubated with DHEA/DHEAS in the presence of LPS(10μg/ml) and IFN- (200U/ml) and, phosphorylation of MAP kinases were determined by western blot at 30min and 1h, respectively.

CTL: control; L+I: LPS+IFN- ; D: DHEA; DS: DHEAS

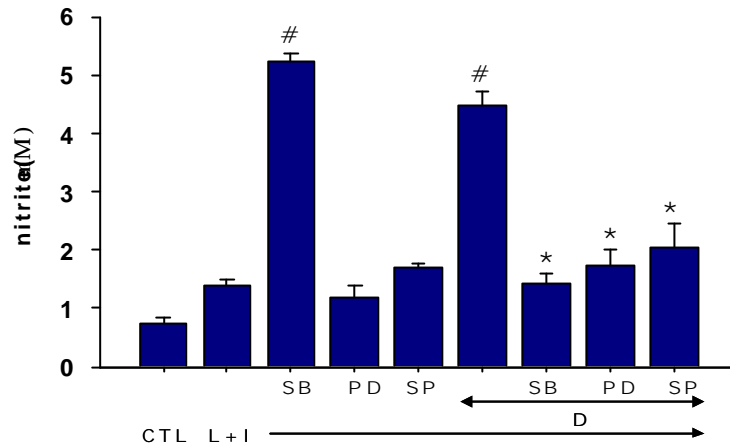


Fig. 7. Effects of MAPK inhibitors on NO production (DHEA treatment)

Cells were incubated with MAP Kinase inhibitors in the presence of DHEA(100 μ M), LPS(10 μ g/ml) and IFN- γ (200U/ml) for 24hr and the amount of NO was determined by Griess reaction.

P<0,01 vs, LPS/IFN- γ treated; *P<0,05 vs, LPS/IFN- γ +DHEA treated

CTL: control; L+I: LPS+IFN- γ ; D: DHEA

SB: SB202190 10 μ M; PD: PD98059 10 μ M; SP: SP600125 2 μ M

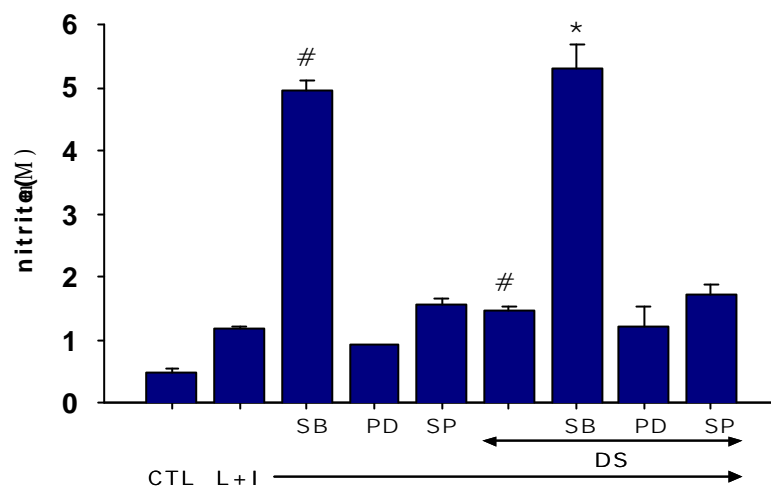


Fig. 8. Effect of MAPK inhibitors on NO production (DHEAS treatment)

Cells were incubated with MAP Kinase inhibitors in the presence of DHEAS(100μM), LPS(10μg/ml) and IFN- (200U/ml) for 24hr and the amount of NO was determined by Griess reaction.

P<0,01 vs LPS/IFN- treated; *P<0,05 vs LPS/IFN- +DHEAS treated

CTL: control; L+I: LPS+IFN- ; DS: DHEAS

SB: SB202190 10μM; PD: PD98059 10μM; SP: SP600125 2μM

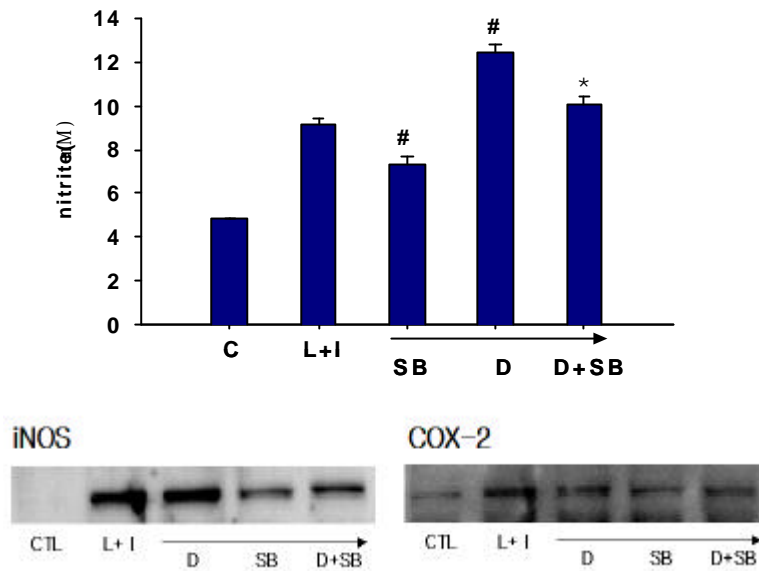


Fig. 9. Effects of p38-inhibitor on LPS/IFN- γ induced NO production

Cells were incubated with SB202190, a p38 inhibitor in the presence of DHEA(100 μ M), LPS(10 μ g/ml) and IFN- γ (200U/ml) for 24hr. The amount of NO was determined by Griess reaction, and the levels of iNOS and COX-2 protein were analysed by western blot.

P<0,01 vs, LPS/IFN- γ treated; *P<0,05 vs, LPS/IFN- γ +DHEA treated

CTL: control; L+I: LPS+IFN- γ ; D: DHEA; SB: SB202190 1 μ M

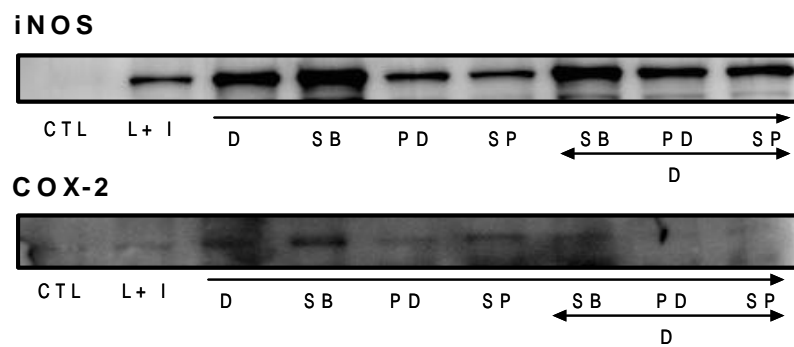


Fig. 10. Effects of MAPK inhibitors on enhancement of LPS/IFN- γ induced iNOS and COX-2 expression by DHEA

Cells were incubated with DHEA(100 μ M) plus LPS(10 μ g/ml) and IFN- γ (200U/ml) for 24hr, and the expression levels of iNOS and COX-2 were determined by western blot.

CTL: control; L+I: LPS+IFN- γ ; D: DHEA

SB: SB202190 10 μ M; PD: PD98059 10 μ M; SP: SP600125 2 μ M

V. 고 찰

본 연구는 중추신경 내 신경전달(neurotransmission)의 조절뿐만 아니라 신경보호(neuroprotection), 성장억제(anti-proliferation) 및 면역기능조절에도 관여하는 것으로 알려져 있는 다기능성 스테로이드(multifunctional steroid)인 DHEA와 DHEA의 황산화 유도체인 DHEAS의 염증반응에 미치는 영향과 그 세포내 작용기전을 규명하기 위한 연구의 일환으로 수행되었다^{33,42,47}. DHEA와 DHEAS는 모두 neurosteroid이며 상호 전환이 가능한 물질임에도 불구하고 이 두 물질의 effect는 동일한 injury에 대해 세포종류, 종간 차이 및 실험 방법에 따라 다르게 나타나고 있음이 보고되어 있다. DHEA는 오탄당 인산 회로(pentose phosphate pathway, PPP)의 저해제로써 알려져 있으며, 오탄당 인산회로 저해작용과 이 물질의 생리작용과의 관련성에 관한 연구 결과가 다수 보고된 바 있다. 즉, 오탄당 인산회로는 세포내 산화/환원 준위 조절, 신경 세포 보호 및 세포성장 조절 등 다양한 생리활성을 조절하는 기능을 갖는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 뇌세포 대부분을 차지하고 있는 흰쥐 성상 세포에서 LPS/IPN- 유도 iNOS 및 COX-2 발현과 세포사멸에 미치는 DHEA와 DHEAS의 영향을 검토 하였다. DHEA와 DHEAS는 처리 후 24시간까지는 세포보호 작용을 나타내고 있으나 48시간 후에는 오히려 세포사멸을 유도하는 것으로 관찰 되었다. 마우스 미세아교세포주인 BV-2 cell의 경우 DHEA처리 시 세포성장의 저해, 세포사멸유도, ribose 5-phosphate 공급 감소를 일으키는 것으로 알려져 있다³⁹. 또한 DHEA는 glutamate의 유출에 의해 유도된 신경세포 사멸을 억제하며, 마우스 배아 신경세포의 경우에서도 생존율을 증가시킨 것으로 보고된 바 있다. 이러한 보고들은 DHEA의 세포 보호

작용이 세포의 종류, 손상모델 등에 따라 상이하게 나타날 수 있음을 시사하고 있다. 일반적으로 미세아교세포 및 macrophage 세포주의 경우 LPS단독 처리만으로도 NO 생성을 유도 하지만, 본 실험 조건에 사용되어진 흰쥐 성상 세포주인 C6 glioma cell은 LPS 단독으로는 NO 생성을 나타내지 못했다. 다른 연구자들의 연구결과에 의하면, C6 glioma cell은 LPS단독으로는 NO생성을 유도 할 수 없으며, IFN- γ , TNF- α , 등과 같은 여러 가지 사이토카인과 혼합하여 사용할 때 NO 생성을 유도하는 것으로 보고된 바 있다.^{13,16,17,19} 본 실험 조건에서 LPS/IFN- γ 와 DHEA처리 시 LPS/IFN- γ 처리 군에 비해 유의적인 NO 및 PGE₂ 생성증가를 확인하였으며, 단백질과 mRNA수준에서의 iNOS 와 COX-2 발현도 증가됨을 확인하였다. 이와 같은 결과는 오탄당 인산 회로의 속도결정 효소인 G6PDH(glucose-6-phosphate dehydrogenase)를 억제함으로써 유발되는 세포내 산화/환원 중화반응의 이상에 기인하는 것으로 생각될 수 있으며, 특히 이때 증가되는 ROS가 NO생성증가에 영향을 미칠 수 있음을 가정 할 수 있다. 이와 관련하여 Garcia-Nogales등은 LPS처리에 의해 감소된 GSH level이 LPS와 DHEA 처리 시 더욱 감소되었으며 이러한 GSH level 감소를 NO 억제제인 AMT를 동시 처리함으로써 GSH level 개선 효과를 확인한 것을 보고 하여, DHEA에 의한 NO생성 증폭작용을 시사한 바 있다.²¹ 즉, GSH level의 감소는 ROS(reactive oxygen species) 생성 증가를 의미하며, 따라서 LPS에 의해 감소된 GSH level이 DHEA처리 시 더욱 감소되었다는 것은 DHEA가 ROS생성에 기여했음을 시사하고 있다. 또한 NO 억제제인 AMT를 처리함으로써 감소된 GSH level이 어느 정도 회복되었다는 결과는 DHEA에 의한 NO생성 증가와도 상호관련성이 있는 것으로 추정할 수 있다. 본 연구 결과에서 관찰된 DHEA에 의한 NO 생성증폭, 단백질 및 mRNA수준

에서의 iNOS 발현 등은 이와 같은 추론을 뒷받침하고 있다. DHEA는 처리 농도나 직접 세포에 작용하는 농도에 따라 산화제 및 항산화제의 두 가지 효과를 나타낼 수 있다³⁵. ROS 생성과 관련하여 DHEA가 해마세포에서는 활성 산소로 유도된 세포 손상을 보호한다고 보고 되어 있다³⁴. 또한 본 연구실의 선행연구결과 일차배양 마우스 정상세포에서 DHEA는 오탄당 인산화 경로를 억제함으로써 ROS 생성은 물론 NO와 PGE₂의 생성을 감소 시켰다. 그러나 본 실험 조건에서 사용된 흰쥐 정상세포주인 C6 glioma cell에서는 선행된 일차배양 마우스 정상세포에서와는 달리 오히려 DHEA 처리 시 NO 및 PGE₂의 생성을 증가시켰다. 반면에 일차배양 흰쥐 정상세포의 경우 DHEA에 의한 NO나 PGE₂의 생성변화는 없었다고 기술하고 있다³². 뿐만 아니라 glucose deprivation 조건하에서 DHEA 처리 시 C6 glioma cell의 세포사멸은 억제되었으며 이때 NO 생성에는 영향이 없는 것으로 보아 이 경우 세포보호 작용은 세포내 산화적 스트레스 감소에 의한 것을 추론된 바 있다. 이와 같은 상이한 결과는 앞서 언급한 DHEA의 두 가지(antioxidant, pro-oxidant)^{27,36} 작용에 기인한 것이라 할 수 있으며, 아직까지 정확한 작용기전에 대한 보고는 없으나 아마도 세포종류 및 종간차이에 의한 특이적 효과라고 할 수 있다. DHEA가 염증반응의 주요 매개인자인 NO나 PGE₂의 생성에 미치는 영향과 세포내 산화적 스트레스에 의해 조절되는 MAP kinase 경로와의 상호 관련성을 확인한 결과 염증매개인자 생성 증가를 보였던 DHEA는 MAP kinase의 family인 p-p38와 p-pErk의 활성을 증가 시켰으며, DHEA에 의해 증가된 NO 생성이 각저해제에 의해 감소됨을 확인하였다. 그러나 p38 MAPK 저해제인 SB202190(10 μ M)처리 시 오히려 NO생성 및 iNOS 발현이 증가 되었다. SB(202190, 203580)의 경우 농도에 따라 NO 생성 및 iNOS 발현에 상반되는

두 가지 효과를 나타낸다고 보고되어 있으며,⁵⁹ SB202190의 경우 J774.1 cell에서 cell death를 유발한다고 알려져 있기 때문에⁶⁰, 본 실험에서 SB농도를 낮추어(1 μ M)처리 시 NO생성 및 iNOS 감소 효과를 확인 하였다. DHEAS 처리 시 western blot 결과 약간의 감소 경향은 확인 하였으나 각 저해제실험에서는 유의적인 결과를 얻지 못하였다.

본 실험의 결과를 요약하면, 오탄당 인산화로(PPP) 저해제로 알려진 DHEA는 MAP Kinase 활성을 변화시킴으로써 LPS/IFN- γ 유도 iNOS, COX-2 발현 및 NO, PGs등의 염증매개인자 생성을 조절하는 것으로 확인되었다. 이 결과로부터 오탄당 인산화 과정을 차단함으로써 유발되는 NADPH의 고갈 및 GSH level의 감소로 인해 세포내 산화/환원증화반응의 이상이 발생되며 세포내 다양한 ROS의 증가로 인해 MAP kinase가 활성화되어 또 다른 세포 작용기전이 일어나는 것으로 추론 할 수 있다. 따라서 본 연구 결과들은 오탄당 인산 회로가 포도당대사 과정 뿐만 아니라 염증반응과 관련하여 염증매개인자생성조절에 영향을 미치고 있음을 시사하고 있다.

VI. 결 론

본 연구는 오탄당 인산회로의 저해제인 Dehydroepiandrosterone(DHEA) 와 sulfated form인 DHEAS 가 rat 성상세포주인 C6 glioma cell에서 LPS 와 IFN- 로 유도된 세포손상의 중요한 요소로 알려져 있는 iNOS 및 COX-2의 발현 에 따른 NO 및 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 밝힘으로써 DHEA와 DHEAS 의 염증반응 시 세포내 작용기전을 규명하고자 시도되었으며, 그 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. LPS(10 μ g/ml) 와 IFN- (200U/ml)로 처리된 C6 glioma cell에서 DHEA (50, 100 μ M) 와 DHEAS(50, 100 μ M)는 24시간 까지는 세포생존율에 영향을 주지 않았다.

2. DHEA(100 μ M)은 C6 glioma cell에서 LPS/IFN- 에 의해 유도된 iNOS 발현을 단백질 및 mRNA 수준에서 증가시켰다. 또한 DHEA는 C6 glioma cell에서 LPS/IFN- 유도 NO 생성을 유의적으로 증가시켰다. 반면, DHEAS(100 μ M)는 C6 glioma cell에서 LPS/IFN- 에 의해 유도된 iNOS 발현을 단백질 및 mRNA수준에서 감소시켰다. 또한 C6 glioma cell에서 LPS/IFN- 유도 NO 생성을 유의적으로 감소시켰다.

3. DHEA(100 μ M)는 C6 glioma cell에서 농도 의존적으로 LPS/IFN- 에 의해 유도된 PGE₂ 생성을 유의적으로 증가시켰으며, 단백질 및 mRNA 수준에서의 COX-2 발현 또한 증가시켰다. 반면, DHEAS(100 μ M)는 농도 의존적으로 LPS/

IFN- γ 에 의해 유도된 PGE₂ 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 단백질 및 mRNA 수준에서의 COX-2 발현 또한 감소시켰다.

4 DHEA(100 μ M)는 C6 glioma cell에서 LPS/IFN- γ 에 의해 유도된 MAP kinase (p38, pErk) 활성을 유의적으로 증가 시켰다. 반면, DHEAS(100 μ M) LPS/IFN- γ 에 의해 유도된 MAP kinase(p38, pErk) 활성을 감소시켰다.

5 DHEA(100 μ M)에 의한 LPS/IFN- γ 유도 NO 생성증폭 현상은 MAP kinase 저해제인 SB202190(p38), PD98059(Erk), SP600125(JNK)에 의해 억제되었으며, 이때 iNOS, COX-2의 발현도 감소되었다.

이상의 결과는 DHEA에 의한 오탄당 인산회로의 저해는 MAP kinase 활성 변화와 이에 따른 iNOS, COX-2 발현 증가를 유도하며 따라서 포도당 인산회로는 염증매개 인자생성에 영향을 줌으로써 염증반응 조절에 관여하고 있음을 시사하고 있다.

참 고 문 헌

1. Ferenc Puskas, Peter Gergely, JR, Katalin Banki, Andras Perl : Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C, FASEB J 14: 1352-61, 2000
2. Gary W. Goodwin, David M. Cohen, Heinrich Taegtmeyer : [5-³H]glucose overestimates glycolytic flux in isolated working rat heart: role of the pentose phosphate pathway, Am. J. Physiol. Endocrinol Metab 280: E502-E508, 2001
3. Jason A. Koutcher, Alan A. Alfieri, Cornelia Matei, Kristen L. Meyer, James C. Street, Daniel S. Martin : Effect of 6-aminonicotinamide on the pentose phosphate pathway: ³¹P NMR and tumor growth delay Studies, J. Natl. Cancer Inst 36:887-92, 1996
4. Kashiwagi A, Nishio Y, Asahina T, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y, Takahara N, Taki H, Obata T, Hidaka H, Saeki Y, Kikawa R : Pyruvate improves deleterious effects of high glucose on activation of pentose phosphate pathway and glutathione redox cycle in endothelial cells, Diabetes 46(12):2068-95, 1997

5. Sachin A. Gupte, Kai-Xun Li, Takao Okada, Koichi Sato, Masahiko Oka : Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilation involvement of voltage-gated potassium channels, *J. Pharmacol. Experiment Ther* 301:299-305, 2002
6. Karin M. Overkamp, Barbara M. Bakker, H. Y. Steensma, Johannes P. van Dijken, Jack T. Pronk : Two mechanisms for oxidation of cytosolic NADPH by *Kluyveromyces lactis* mitochondria, *Yeast* 19:813-824, 2002
7. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ : Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death, *J. Biochem & Mol. Biol* 35:67-86, 2002
8. Benveniste EN : Inflammatory cytokines within the central nervous system : sources, function and mechanism of action, *Am. J. Physiol* 263:C1-C16, 1992
9. Francisco MH, Eduardo MH, Carmen G, Rothwell NJ : Role CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocytes, *J. Neurosci. Res* 69:29-36, 2002
10. Chan Young Shin, Ji Woong Choi, Jae Ryun Ryu, Kwang Ho Ko, Jung-Jin Choi, Hyun-Soo Kim, Hee-Sun Kim, Jae-Chul Lee, Sun Jung

- Lee, Hyoung Chun Kim, Won-Ki Kim : Glucose deprivation decreases nitric oxide production via NADPH depletion in immunostimulated rat primary astrocytes, *Glia* 37:268-274, 2002
11. Paula Garcia-Nogales, Angeles Almeida, Emilio Fernandez, Jose M. Medina, Juan P. Bolanos : Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocyte, *J. Neurochem* 72: 1750-1758, 1999
12. Ben-Yoseph O, Boxer PA, Ross BD : Oxidative stress in the central nervous system : monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway, *Devel Neurosci* 16(5-6):328-36, 1994
13. Boada J, Roig T, Perez X, Gamez A, Bartrons R, Cascante M, Bermudez J : Cells overexpressing fructose-2,6-bisphosphatase showed enhanced pentose phosphate pathway flux and resistance to oxidative stress, *FEBS Lett* 480(2-3):261-4, 2000
14. Riganti C, Aldieri E, Bergandi L, Fenoglio I, Costamagna C, Fubini B, Bosia Ghigo D : Crocidolite asbestos inhibits pentose phosphate oxidative pathway and glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in human lung epithelial cells, *Free Radic. Biol. Med* 32(9):938-49, 2002

15. Wen Yi Zhang, Masaki Takiguchi, Yasuo Koshiyama, Tomomi Gotoh, Akitoshi Nagasaki, Katsuro Iwase, Keizo Yamamoto, Hideo Takeshima, Akira Negi, Masataka Mori : Expression of citrulline-nitric oxide cycle in lipopolysaccharide and cytokine-stimulated rat astrogloma C6 cells, *Brain Research* 84:78-84, 1999
16. Chien-Huang Lin, Yuan-Fong Lin, Meng-Chu Chang, Chih-Hsiung Wu, Yuan-Soon Ho, Horng-Mo Lee : Advanced glycosylation end products induce nitric oxide synthase expression in C6 glioma cells Involvement of p38 MAP kinase-dependent mechanism, *Life Sciences* 69:2503-2515, 2001
17. Je-Seong Won, Jin-Koo Lee, Hong-Won Suh : Forskolin inhibits expression of inducible nitric oxide synthase mRNA via inhibiting the mitogen activated protein kinase in C6 cells, *Molecular Brain Research* 89:1-10, 2001
18. Douglas L., Feinstein, Elena Galea, Steeven Roberts, Henrik Berquist, Hong Wang, Donald J. Reis : Induction of nitric oxide synthase in Rat C6 glioma Cells, *J. Neurochem* 62(1):315-20, 1994
19. Tadashi Nishiya, Takashi Uehara, Masayuki Kaneko, and Yasuyuki Nomura : Involvement of nuclear factor- κ B(NF- κ B) signaling in the

- expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS) gene in rat C6 glioma cells, *Biochem, Biophys, Res, Commun* 275:268-273, 2000
20. Tadashi Nishiya, Takashi Uehara, Hiroki Edamatsu, Yoshito Kaziro, Hiroshi Itoh, Yasuyuki Nomura : Activation of Stat1 and subsequent transcription of inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon- γ -induced MAPK activation that is mediated by p21^{TAS}, *FEBS Letters* 408:33-38, 1997
21. Jianjun Gao, David C., Morrison, Tari J., Parmely, Stephen W., Russell, William J., Murphy : An interferon- γ activated Site(GAS) Is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon- γ and lipopolysaccharide, *J. Biol. Chem* 272:1226-1230, 1997
22. Douglas L., Feinstein, Elena Galea, Jennifer Cermak, Punita Chugh, Lyandvert, Donald J. Reis : Nitric oxide synthase expression in glial cells:suppression by tyrosine kinase inhibitors, *J. Neurochem* 62(2), 1994
23. Tadashi Nishiya, Takashi Uehara, Yasuyuki Nomura : Herbimycin A suppresses NF- κ B activation and tyrosine phosphorylation of JAK2 and the subsequent induction of nitric oxide synthase in C6 glioma cells, *FEBS Lett* 371:333-336, 1995

24. Paula Garcia-Nogales, Angeles Almeida, Emilio Fernandez, Jose M. Medina, Juan P. Bolanos : Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediate glutathione depletion in cultured rat astrocytes, *J. Neurochem* 72:1750-1758, 1999
25. Philip Manning, Mark R. Cookson, Calum J. McNeil, Denise Figlewicz, Pamela J. Shaw : Superoxide-induced nitric oxide release from cultured glial cells, *Brain Research* 911:203-210, 2001
26. Jun Shinoda, Katherine E. McLaughlin, Helen S. Bell, Gopal R. Swaroop, Shin-Ichi Yamaguchi, Megan C. Holmes, Lan R. Whittle : Molecular mechanisms underlying dexamethasone inhibition of iNOS expression and activity in C6 glioma Cells, *Glia* 42:68-76, 2003
27. Keigo Nakatani, Norimichi Nakahata, Tsutomu Arakawa, Hideyuki Yasuda, Yasushi Ohizumi : Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E₂ synthesis by α -mangostin, a xanthone derivate in mangosteen in C6 rat glioma cells, *Biochem. Pharmacol* 63:73-79, 2002
28. Xinyun Xu, Andres Malave : p38 MAPK, but not p42/p44 MAPK mediated inducible nitric oxide synthase expression in C6 glioma cells, *Life Sciences* 67:3221-3230, 2000

29. Lei Zhang, Bing shen Li, Wu Ma, Jeffery L. Barker, Yoong H. Chang, Weiqin Zhao, David R. Rubinow : Dehydroepiandrosterone(DHEA) and its sulfated derivate(DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathwqy in opposing ways, *Molecular Brain Research* 98:58-66, 2002
30. Ismail H. zwain and Samuel S. C. Yen : Dehydroepiandrosterone: Biosynthesis and Metabolism in the Brain, *Endocrinology* 140:880-887, 1999
31. J. Belaisch : DHEA: desire and resistance, *Gynecologie Obstetrique & Ferilite* 30:961-969, 2002
32. Marianne Kipper-Galperin, Ruth Galilly, Haim D. Danenberg, Talma Brenner : Dehydroepiandrosteron selectively inhibits production of tumor necrosis factor and Interlukin-6 Astrocytes, *Int. J. Devl Neuroscience* 17(8):765-775, 1999
33. Mei-Jen Wang, Hsueh-Meei Huang, Huan-Lian Chen, Jon-Son Kuo Kee-Ching G. Jeng : Dehydroepiandrosterone inhibits lipopolysaccharide -induced nitric oxide production in BV-2 microglia, *J. Neurochem* 77:830-838, 2001

34. Takayuki Yoshimata, Akihiko Yoneyama, Yasunari Jin-no, Nozomu Tamai, Yoshinobu Kamiya, : Effects of dehydroepiandrosterone on mitogen-activated protein kinase in human aortic smooth muscle cells, *Life Sciences* 65(4):431-440, 1999
35. Steven W. Barger, Janet A. Chavis, Paul D. Drew : Dehydroepiandrosterone inhibits microglial nitric oxide production in a stimulus-specific manner, *J. Neurosci. Res* 62:503-509, 2000
36. Raffaella Mastrocola, Manuela Aragno, Silvia Betteto, Enrico Brignardello, Maria G. Catalano, Oliviero Danni, Giuseppe Boccuzzi : Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation, *Life Sciences* 732:289-299, 2003
37. Manuela Aragno, Raffaella Mastrocola, Enrico Brignardello, Maria Catalano, Gala Robino, Roberta Manti, Maurozio Parola, Oliviero Danni, and Giuseppe Boccuzzi : Dehydroepiandrosterone Modulated Nuclear Factor- κ B Activation in Hippocampus of Diabetic Rats, *Endocrinology* 143(9):3250-3258, 2000
38. Atsushi Fujita, Daisuke Furutama, Toshifumi Tanaka, Heiko, Akio Koyama, Toshiaki Hanafusa, Tomoaki Mitsuhashi, Nakaaki Ohsawa : In vivo activation of the constitutive androstane receptor β (CAR β)

treatment with dehydroepiandrosterone(DHEA) or DHEA sulfate(DHEA-S),
FEBS Lett 532:373-378, 2002

39. Philip Manning, Mark R. Cookson, Calum J. McNeil, Denise Figlewicz, Pamela J. Shaw : Superoxide-induced nitric oxide release from cultured glial cells, Brain Research 911:203-210, 2001
40. Jeffrey A. Klein, Susan L. Ackerman : Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration, J. Clin. Invest 111:785-793, 2003
41. Jinyoung Hur, Sun Yeou Kim, Hocheol Kim, Sang-hoon Cha, Myung-Shik Lee, Kyoungho Suk : Induction of caspase-11 by inflammatory stimuli in rat astrocytes: lipopolysaccharide induction through p38 mitogen-activated protein kinase pathway, FEBS Lett 507:157-162, 2001
42. Norimichi Nakahata, Chikako Tsuchiya, Keigo Nakatani, Yasushi Ohizumi, Satoko Ohkubo : Baicalein inhibits Raf-1-mediated phosphorylation of MEK-1 in C6 rat glioma cells, Eur. J. Pharmacol 461:1-7, 2003
43. A. Neil Verity, T.L. Wyatt, B. Hajos, R.M. Eglen, P.A. Baecker, R.M. Johnson : Regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor release from rat C6 glioblastoma cells, J. Neurochem 70:531-539, 1998

44. Joshua S. Marcus, Sharon L. Karackattu, Melissa A. Fleegal, Colin Sumners : Cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in astroglia: role of Erk mitogen-activated protein kinase and NF- κ B, *Glia* 41:152-160, 2003

45. Patricia D. Kroboth, Firoozeh S. Salek, Amy L. Pittenger, MS, Tanya J. Fabian, Reginald F. Frye : DHEA and DHEA-S: A Review, *J Clin Pharmacol* 39:327-348, 1999

46. Margaret M. McCarthy, Stuart K. Amateau, Jessica A. Mong : Steroid modulation of astrocytes in the neonatal brain: implication for adult reproductive function, *Biology of Reproduction* 6:691-698, 2002

47. Chan Young Shin, Ji-Woong Choi, Eun Sook Jang, Jong Hoon Ryu, Won-Ki Kim, Hyoung-Chun Kim, Kwang Ho Ko : Glucocorticoids exacerbate peroxynitrite mediated potentiation of glucose deprivation-induced death of rat primary astrocytes, *Brain Research* 923:163-171, 2001

48. Pratima Sur, Eric Anthony Sribnick, James Michael Wingrave, Mark Walter Nowak, Swapan Kumar Ray, Naren Lal Banik : Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells, *Brain Research* 971:178-188, 2003

49. Sarah J. Harper, Philip LoGrasso : Signalling for survival and death in neurones The role of stress-activated kinases, JNK and p38, *Cellular Signaling* 13:299-310, 2001
50. Caterina Cascio, Rachel C. Brown, Ying Liu, Zequi Han, Dale B. Hales, Vassilios Papadopoulos : Pathways of dehydroepiandrosterone formation in rat brain glia, *J. Steroid Biochem* 75:177-186, 2000
51. Chan Young Shin, Ji-Woong Choi, Eun Sook Jang, Chung Ju, Won-ki Kim, Hyoung-Chun Kim, Chang-Rak Choi, Kwang Ho Ko : Dehydroepiandrosterone inhibits the death of immunostimulated rat C6 glioma cells deprived of glucose, *Brain Research* 922:267-275, 2001
52. Elizabeth Mazzi, Alan Becker, Karam F.A. Soliman : Inflammation and inducible nitric oxide synthase have no effect on monoamine oxidase activity in glioma cells, *Biochem. Pharmacol* 65:1719-1727, 2003
53. Yongmei Chen, Raymond A. Swanson : Astrocytes and Brain Injury, *J. Cerebral Blood Flow & Metabol*, 23:137-149, 2003
54. Garcia-Nogales P, Almeida A, Fernandez E, Medina JM, Bolanos JP : Induction glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathion depletion in cultured rat

astrocytes, *J. Neurochem* 1750-8, 1999

55. Narayan R, Bhat, Douglas L, Feinstein, Qin Shen, Aruna N, Bhat : p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in Glial Cells, *J. Biol. Chem* 277(33):29584-29592, 2002
56. Hisae Karahashi, Kazuhiro, Nagata, Kumiko Ishii, Furnio Amano : A selective inhibitor of p38 MAP kinase, SB202190, induced apoptotic cell death of a lipopolysaccharide-treated macrophage-like cell line, J774.1, *Biochem. Biophys. Acta*, 1502:207-223, 2000
57. Edward D. Chan, David W. H. Riches : IFN- γ + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38^{mapk} in a mouse macrophage cell line, *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 280:C441-C450, 2001
58. Joshua S. Marcus, Sharon L. Karackattu, Melissa A. Fleegal, Colin Sumners : Cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in astroglia: role of Erk mitogen-activated protein kinase and NF- κ B, *Glia* 41:152-160, 2003
59. Alekski Lahti, Hannu Kankaanranta, Eeva Moilanen : P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production, *Eur J. Pharmacol*, 454:115-123,

2002

60. Fulvio D'Acquisto, Lidia Sautebin, Teresa Iuvone, Massimo Di Rosa, Rosa Carnuccio : Prostaglandins prevent inducible nitric oxide synthase protein expression by inhibiting nuclear factor- κ B activation in J774 macrophages, FEBS Letters 440:76-80, 1998

61. Kim YC : Effects of Fructose-1,6-diphosphate on iNOS and COX-2 Expression in rat cortical microglia, 아주대학교 대학원 이학석사 학위논문, 2001

62. Cho SY : Fructose-1,6-diphosphate modulates LPS-induced NO and PGs production in murine astrocytes and macrophages, 아주대학교 대학원 의학석사 학위논문, 2003

-ABSTRACT-

**Effect of DHEA on LPS and IFN- γ induced NO and PGE₂
production in C6 glioma cells**

Jin-Ae Shin

**Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University**

(Supervised by Associate Professor Soo Hwan Lee)

Purpose : The neurosteroid, dehydroepiandrosteron(DHEA) and its sulfated derivative DHEAS have various physiological activities such as neuroprotection, anti-proliferation, anti-inflammation although underlying mechanism is still unclear. DHEA is a well known inhibitor of pentose phosphate pathway (PPP). The purpose of this study is to determine whether DHEA and DHEAS could affect inflammatory mediators such as nitric oxide(NO) and prostaglandins(PGs) and thereby to explore the role of PPP in the regulation of inflammatory response.

Materials & Methods : Rat astrocyte like cell line C6 glioma cell was obtained from American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA). Cells were stimulated with LPS(10 μ g/ml) and IFN- γ (200U/ml) and the effects of DHEA / DHEAS(100 μ M) on viability, production of NO and PGE₂.

expression of iNOS and COX-2 and MAP kinase pathway were examined

Results : DHEA enhanced LPS and IFN- γ induced iNOS expression at the level of mRNA and protein and thereby increased NO production in C6 glioma cell. LPS and IFN- γ induced expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), a rate limiting enzyme for prostaglandin synthesis, was also significantly enhanced by DHEA. Increase in PGE₂ synthesis paralleled COX-2 expression in DHEA treated group. In contrast, its metabolite DHEAS mitigates inflammatory response through opposite effects on NO and PGE₂ production under the same experimental condition. DHEA increased the phosphorylation of Erk and p38 MAP kinase in cells stimulated with LPS/IFN- γ . MAP kinase inhibitors blocked the enhancement of LPS/IFN- γ induced NO production by DHEA, suggesting Erk and p38 MAP kinase are involved in DHEA effects.

Conclusion : These data showed that DHEA could affect to inflammatory response through enhancing LPS and IFN- γ induced NO and PGE₂ production, suggesting that PPP might be involved in the regulation of inflammatory response.

Keyword: C6 glioma cell, iNOS(inducible Nitric Oxide Synthase), Nitric Oxide (NO), Cyclooxygenase-2(COX-2), Prostaglandin E₂(PGE₂), Dehydro epiandrostrone (DHEA), Dehydroiso-androsterone-3-sulfate(DHEAS)