

牡丹皮의 PC12 cell 항산화 효과와 관련 HO, MIF, COMT 유전자 발현에 미치는 영향

손무성¹ · 노삼웅¹ · 고은정¹ · 나영인² · 조종운² · 배현수^{1,2} · 홍무창¹ · 신민규^{1*}

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

Effect of *Moutan Cortex Radicis* on Gene Expression Profile of Differentiated PC12 Rat Cells Oxidative-stressed with Hydrogen Peroxide

Mu Song Son¹, Sam Woong Rho¹, Eun Jung Ko¹, Youn Gin Na²,
Chong Woon Cho², Hyun Su Bae^{1,2}, Moo Chang Hong¹, Min Kyu Shin^{1*}

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, 2: Purimed R&D Institute

Oriental medicine explains aging as the weakening of Kidney-Qi, and Kidney-strengthening herbal medicines such as Yukmijihwang-tang have been studied for anti-aging effects. In Western Medicine, the hypothesis that reactive oxidant species(ROS) contribute to the aging process is generally accepted. It has been reported that Moutan Cortex Radicis extract (MCR) was the most effective constituent of Yukmijihwang-tang in decreasing ROS production in oxidative-stressed cells. The purpose of this study is to confirm the anti-oxidant effect of MCR on PC12 cells, the expression of Heme oxygenase (HO), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), Catechol-O-methyltransferase (COMT) using real time RT PCR. PC12 cells were treated without or with hydrogen peroxide in the presence or absence of MCR using MTS assay. Hydrogen peroxide decreased the viability of PC12 cells by 53% and MCR did not influence that of stressed PC 12 cells irrespective of dose or incubation period. However, MCR showed an inhibitory effect on production of ROS in stressed cells, both dose and incubation time dependently. In particular, 1 mg/ml of MCR for 24 h culture almost returned to normal level. In the quantitation of anti-aging related gene expression, MCR at 1 mg/ml increased the expression of HO by 370%, MIF by 180% and COMT by 280% through real time RT PCR. In conclusion, MCR treatment protected PC12 cells from hydrogen peroxide and decreased ROS production and enhanced anti-oxidative gene expression such as HO, COMT and MIF, which suggests that MCR is involved in controlling anti-aging of nerve cells through elimination of cytotoxic stimuli..

Key words : Anti-Oxidative effect, MCR, Differentiated PC12 cell, Yukmijihwang-tang, HO, MIF, COMT, mRNA expression

서론

현대사회는 의학과 경제적 여건의 발전으로 인간의 수명은 점차 연장되어 가고 있다. 그에 따라 노인의 수는 점차 늘어가고, 노인성 질환 또한 증가하고 있는 추세이다. 인구사회학 분야에서는 65세 이상을 노인이라고 정의하고 있는데¹⁾, 한의학에서는 五臟의 기가 쇠하기 시작하는 시기²⁾, 특히 생식능력이 단절되는 시

기³⁾를 기준으로 하여 노화가 시작된다고 보고 있다. 노화는 시간의 흐름에 따른 생리 변화의 일부분으로 그 자체를 질병으로 볼 수는 없다. 단지 先天의 精氣와 後天에서의 養生에 따라서³⁾ 노화의 시기와 진행 양상은 다양하게 나타나고, 병리적인 상태로 이어지기도 한다. 한의학에서 인간의 노화를 바라보고 치료하는 관점은, 평소의 養生을 통해 인체의 精氣를 보존하는데 있다. 黃帝 內經³⁾에서는 인간의 나이에 따른 성장 및 노화의 과정을 腎氣의 盛衰로 설명하고, 長壽의 비결을 腎氣有餘라 강조하였다. 즉 노인의 질병에 대한 예방과 치료의 대원칙은 腎精의 보존에 있음을 알 수 있다. 그래서 후대의 노화에 대한 연구는 주로 腎虛의 회복

* 교신저자 : 신민규, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 의과대학
· E-mail : shinmk@khu.ac.kr · Tel : 02-961-0323
· 접수 : 2003/03/27 · 수정 : 2003/04/30 · 채택 : 2003/07/15

에 그 목적을 두어왔다. 서의학에서는 노화에 대하여 여러 가지 이론이 존재한다. 그 중에서 특히 자유유리기설 (free-radical aging)이 보편화되면서, 노화의 원인인 ROS의 감소를 유도하는 방향으로 항산화물질에 대한 연구가 광범위하게 진행되고 있다⁴⁾. 한의학의 노화에 대한 연구는 주로 腎虛를 치료하여 노화를 억제하는 방향으로 진행되어 왔으며, 그 중 안 등⁵⁾은 腎虛證에 사용하는 代表處方인 六味地黃湯과 熟地黃이 노화과정 환경에서 산화를 억제시킨다고 보고한 바 있고, 최⁶⁾는 六味地黃湯加味方이 환경의 기억능력을 향상시킬 뿐 아니라 미분화 PC12 cell의 산화억제 효과를 나타내었다고 보고했다. 또한徐⁷⁾는 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. 특히 김⁸⁾은 분화된 PC12 cell의 산화억제 효과 및 기전에 대해서 oligonucleotide chip microarray를 통해 유전자 발현 양상을 분석해서, 牡丹皮를 투여한 군에서 독성물질 제거를 통한 세포 방어기전을 일으키는 HO (Heme oxygenase), COMT (Catechol-O-methyltransferase), MIF (Macrophage migration inhibitory factor) 등의 유전자 발현이 증가되었음을 보고한 바 있다. 牡丹皮는 腎虛 치료의 대표 처방인 육미지황탕의 구성약물로 心肝腎經에 歸經하여 淸熱涼血하고 活血祛瘀하는 효능이 있다고 하여, 대사과정에서 발생하는 노폐물질 혹은 독소를 제거함으로써 이러한 효과를 나타내는 것으로 추정할 수 있다.

이에 저자는 牡丹皮의 신경계 노화 지연 효과를 확인하여 보고자, 신경독성 물질이나 산화스트레스 등으로 유발되는 신경 손상과 관련된 연구를 목적으로 nerve growth factor (NGF)에 의해 분화된 PC12 cell에 대한 牡丹皮의 항산화 효과를 관찰하였다⁹⁾. 특히 선행 연구에서 노화와 관련 있다고 판단되는 HO, MIF, COMT 등의 유전자 발현 양상을 real-time RT-PCR의 방법을 통해서 검증한 바, 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

본 실험에 牡丹皮 시료 (Moutan Cortex Radicis, 산동, 중국, 2001)는 알코올 추출물을 사용하였다. 牡丹皮 건조추출물의 수율은 26%이었으며 100 mg/ml 농도로 증류수에 녹이고 10,000 × g 에서 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 이용하여¹⁰⁾ Waters Breeze System (717+ Autosampler, 2487 dual λ absorbance detector, 1525 binary HPLC Pump, Waters co, U.S.A)에서 HPLC 분석을 통해 확인하였으며 data의 처리는 Waters Breeze System (Ver. 3.20, Waters co, U.S.A)을 사용하였다. Paeonol 10 mg을 methanol (JT

Baker, Mallinckrodt Baker Inc., U.S.A) 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, U.S.A)를 통과시켜서 검액으로 사용하였다. HPLC 분석조건은 아래와 같았다.

- Column : Symmetry®C18 5 μm (ODS, 4.6×150 mm) (Waters co, U.S.A)
- 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 은행에서 구입하여 사용하였다 (KCLB #21721).

2) PC12 cell의 배양

분화 전후의 PC12 cell은 먼저 배양 flask를 collagen (Sigma, U.S.A)으로 코팅한 후 10% horse serum (Invitrogen Life Technologies, U.S.A)과 5% fetal bovine serum (Sigma, U.S.A) 및 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen Life Technologies, U.S.A)이 함유된 RPMI 1640 배지 (Invitrogen Life Technologies, U.S.A)를 사용하여, 습도가 유지되는 37°C, 5% CO₂ incubator (Nuair, U.S.A)에서 배양하였으며, 계대배양 횟수는 10회를 넘기지 않도록 하였다.

3) PC12 cell의 분화

PC12 cell의 분화는 Holtsberg 등⁹⁾의 방법에 따라 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지에 nerve growth factor (Promega co. U.S.A)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, 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/ml 농도가 되도록 배지에 희석하여 세포에 처치하고 37°C에서 6, 12, 24시간 동안 전처리 하였다. 24시간 후 세포를 같은 배지로 1회 수세하고 100 μM hydrogen peroxide가 포함된 배지를 30분간 처치하였다.

5) MTS assay

세포증식 및 세포독성을 측정하기 위해 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega

co. U.S.A)를 사용하여 제조사 protocol 대로 수행하였다. 4)에서 牡丹皮 추출물 및 100 μ M hydrogen peroxide로 처리한 cell 각각의 well에 세포액 100 μ l당 20 μ l의 MTS 용액을 넣고 37°C 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 반응 후 microplate reader (Molecular Device, U.S.A)를 이용하여 490 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

6) Reactive Oxygen Species (ROS) 측정

ROS 측정은 Hai Yan Zhang 등¹¹⁾의 방법을 응용하여 실시하였다. 4)에서와 같이 牡丹皮 추출물 및 100 μ M hydrogen peroxide로 처리한 후 1 ml N,N-dimethyl formamide (Sigma, U.S.A)에 100 mg H₂DCFDA (Molecular Probes Inc. U.S.A)를 녹여서 최종농도가 50 μ M이 되도록 배지에 희석하여 처리 후 37°C water bath에서 1시간 반응하였다. 발생된 형광은 Fluorocan Ascent FL (Type 374, LabSystems, Finland)을 이용하여 excitation 485 nm / emission 538 nm에서 측정하였다.

4. Real-time RT-PCR

1) PC12 cell harvest

위의 MTS 및 ROS 측정실험에서와 같은 조건으로 牡丹皮 추출물과 100 μ M hydrogen peroxide으로 처리한 cell을 각 군별로 10분 동안 300 ×g에서 원심분리하여 모았다.

2) Total RNA 분리

각 군별로 모아진 PC12 cell은 RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 1/100 부피의 β -mercaptoethanol (Sigma, U.S.A)가 첨가된 600 μ l buffer RTL을 cell pellet에 첨가하고 pipet으로 cell clump가 없어질 때까지 잘 섞어준 후 pellet pestle (Sigma, U.S.A)로 homogenize하였다. Sample에 600 μ l 70% ethanol을 넣고 잘 섞은 후 600 μ l씩 2회, RNeasy mini spin column에 넣고 8,000 ×g에서 15초간 원심분리하였다. Column에 700 μ l buffer RW1을 넣고 위와 같은 방법으로 원심분리하여 세척한 후 500 μ l buffer RPE를 넣고 같은 방법으로 세척하기를 2회 반복하되 2번째는 14,000 ×g에서 2분간 원심분리하였다. Column을 새로운 1.5 ml RNase free tube 에 옮기고 30 μ l DEPC처리 증류수를 넣고 1분후 8,000 ×g에서 1분간 원심분리하여 Total RNA를 elution하였다. 분리된 total RNA는 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc. U.S.A)로 정량한 후 농도가 0.5 μ g/ μ l 가 되도록 하였다.

3) Single Strand cDNA의 합성 (Reverse Transcription)

Single strand cDNA의 합성은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Rockville, U.S.A)을 이용하여 제조사의 protocol에 준하여 실시하였다. 2 μ g의 total RNA에 1.1 μ l의 10× DNase I Reaction buffer, 1 μ l의 1 U/ μ l DNase I (Invitrogen Life Technologies, Rockville, U.S.A)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11 μ l이 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었는지 모를 DNA를 제거하였다. 반응후 1 μ l의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 PCR 반응을 하였다. 10 μ l의 반응액에 1

μ l의 0.5 μ g/ μ l Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen Life Technologies, Rockville, U.S.A)를 첨가한 후 70°C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 μ l의 5× first strand buffer, 1 μ l의 10mM each dNTPs, 2 μ l의 0.1M Dithiothreitol, 1 μ l의 200U/ μ l M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 μ l의 40 U/ μ l RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies, Rockville, U.S.A), 5.5 μ l DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 μ l로 만들고 37°C에서 60 분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72°C에서 15분간 배양하여 Reverse transcriptase를 불활성화 시켰다.

4) Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction)

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 Real-time PCR을 실시하였다. 1 μ l의 cDNA에 12.5 μ l의 2× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 각각 1.5 μ l의 5 μ M sense, antisense primer (Genotech co. Daejun, Korea), 8.5 μ l의 증류수를 넣어 25 μ l가 되게 한 후 Gene Amp 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Warrington, UK)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 최초 denaturation한 후 95°C 15초, 62°C 45초를 40 cycle 반복하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), HO, MIF, COMT 유전자의 primer sequence는 Table 1과 같다. cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도당 3개씩 PCR 하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 amplification이 threshold에 도달한 Cycle number (Ct)를 기준으로 standard curve을 그려서 정량하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다. PCR 반응의 종료 후 60-95°C 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하고 peak가 하나인지를 확인하는 한편 2% agarose gel에서 band의 size를 확인함으로써 non-specific PCR product나 primer dimer 등이 없는지를 확인하였다.

Table 1. Sequences of primer Used for real-time PCR

Gene	Primer sequence	Amplicon Size (bp)
GAPDH	sense: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'	236
	antisense: 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'	
HO	sense: 5'-GCC CAG CTG GAA TTT CTT TAC TCT-3'	163
	antisense: 5'-AGC CCC CAA CCT CCT GAT TT-3'	
MIF	sense: 5'-CGC CCA GAA CCG CAA CTA CA-3'	232
	antisense: 5'-CCG GAA GGT GGC CAT CAT TAC-3'	
COMT	sense: 5'-AAT GTG GGT GAC GCG AAA-3'	178
	antisense: 5'-GGG TGA TGG CAG CGT AGT-3'	

5) Data의 처리

PCR data는 GeneAmp 5700 software (PE Biosystems, Warrington, U.K)을 이용하여 얻었고 mean±S.E.M (standard error mean)으로 표시하였다. 통계처리는 SPSS 11.0 for windows (SPSS, Inc. U.S.A)를 이용하여 Independent sample T-test로 처리하였으며, 선형회귀분석 및 plotting은 GraphicPad Prizm 3.02 (GraphicPad software, Inc. U.S.A)를 이용하였다.

결 과

1. 시료의 지표물질 분석

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.

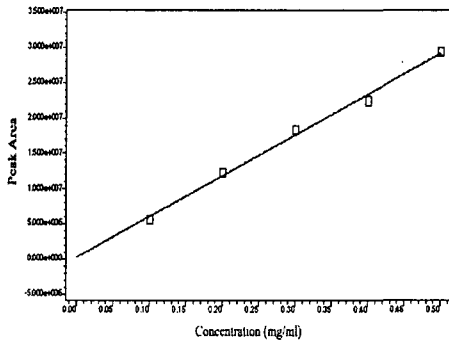


Fig. 1. The standard calibration curve of paeonol

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.

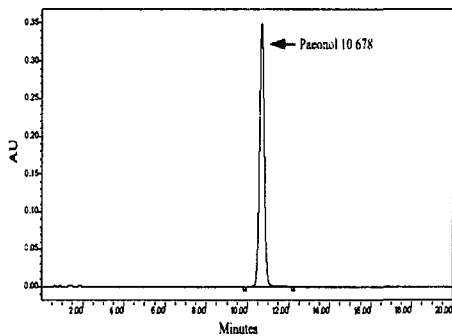


Fig. 2. The HPLC chromatogram of paeonol (0.1 mg/ml)

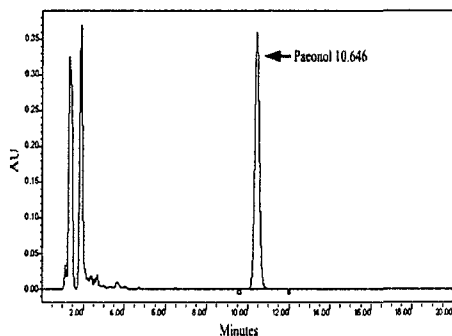


Fig. 3. The HPLC chromatogram of Moutan Cortex Radicis extract (2 mg/ml)

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

분화된 PC12 cell에 牡丹皮 추출물을 농도별로 투여하고 배양시간을 다르게 하여 세포생존율을 확인한 결과는 Fig. 4. 5와

같다. 결과 data는 cell viability, 즉 牡丹皮 추출물 투여나 산화 stress 없이 배양한 control에 대한 비율 (%)로 표시되었다. 그 결과 100 μ M hydrogen peroxide 처리시 세포생존율이 51%까지 감소하였으며, 牡丹皮 추출물 투여시에는 농도나 배양시간 그리고 산화자극 여부와 상관없이 세포생존율이 변화를 보이지 않았다.

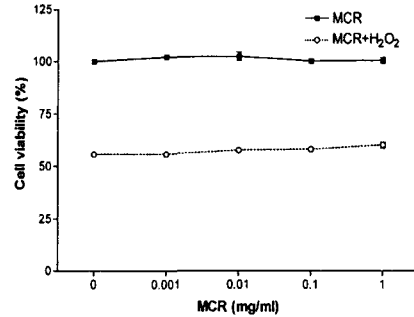


Fig. 4. Cell viability of PC12 cells cultured in medium containing various concentration of MCR for 24 hr. Cell proliferation were quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. All data was normalized with that of control cultured in only medium, which was assumed to 100

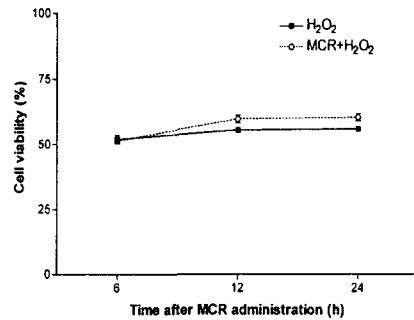


Fig. 5. Cell viability of PC12 cells cultured in medium containing 1 mg/ml MCR for 6, 12, 24 hr. Cell proliferation were quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. All data was normalized with that of control cultured in only medium, which was assumed to 100

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

牡丹皮 추출물의 농도별, 배양시간별 분화된 PC12 cell 산화 억제효과를 측정된 결과는 Fig. 6, 7과 같다.

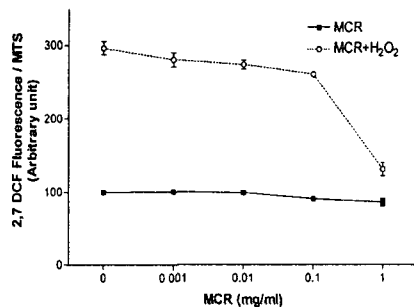


Fig. 6. ROS measurement of PC12 cells cultured in medium containing various concentration of MCR for 24 hr. ROS of each samples were quantified by DCF fluorescence intensity (exclaton 485 nm / emsson 538 nm) Error bars indicate S.E.M. All data was normalized with control cultured in only medium

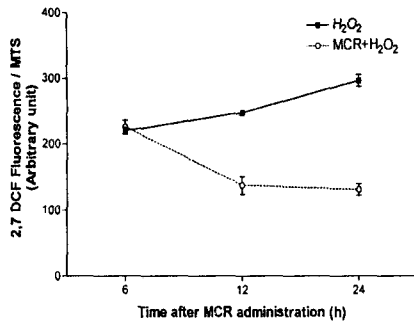


Fig. 7. ROS measurement of PC12 cells cultured in medium containing 1 mg/ml MCR for 6, 12, 24 hr. ROS of each samples were quantified by DCF fluorescence intensity (excitation 485 nm / emission 538 nm). Error bars indicate S.E.M. All data was normalized with control cultured in only medium

결과는 ROS 측정량을 MTS 측정량으로 나눔으로써 세포당 ROS 발생량을 표시하였으며 牡丹皮 추출물 투여나 산화 stress 없이 배양한 control에 대한 비율 (%)로 표시되었다. 그 결과 분화된 PC12 cell에 hydrogen peroxide 처리시 ROS 형성이 배양 시간에 따라 증가되는 경향을 보였으며 24시간에서는 296%로 증가되었다. 牡丹皮 추출물을 처리하였을 때는 ROS 형성이 대조군에 배양시간 및 농도 의존적으로 감소하였으며 1 mg/ml 투여 후 24시간 배양시 130%로 저하되어 거의 control 수준을 회복한 것을 볼 수 있다.

4. Real-time PCR

대조군, 억제군, 실험군 각각에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR함으로써 특정 유전자의 발현량을 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 Internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 작성된 standard curve는 Fig. 8과 같다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R2는 0.9880로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

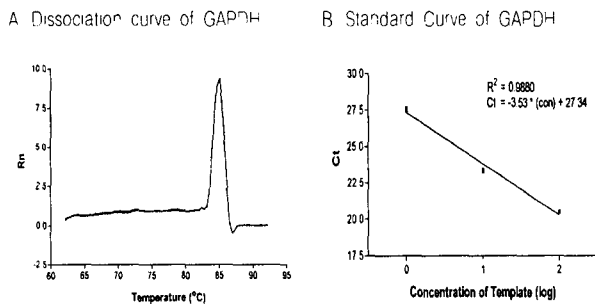


Fig. 8. Dissociation and Standard curve of GAPDH as internal control. A. After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 60 to 93°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer. B. Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

2) HO

HO 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 9와 같다. Dissociation curve는 nonspecific

PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9950으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

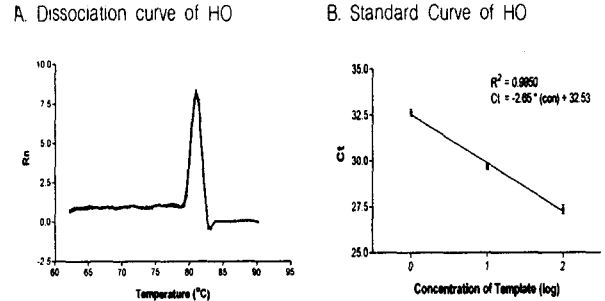


Fig. 9. Dissociation and Standard curve of HO

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 HO 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 10). 牡丹皮 추출물 투여시 PC12 cell의 HO mRNA의 발현량은 control에 비하여 배양 시간 및 농도 의존적으로 발현이 증가한 것으로 나타났다. 특히 1 mg/ml 牡丹皮를 투여하고 24시간 배양한 경우 control에 비하여 3.7배 가량 발현이 증가한 것으로 나타났다.

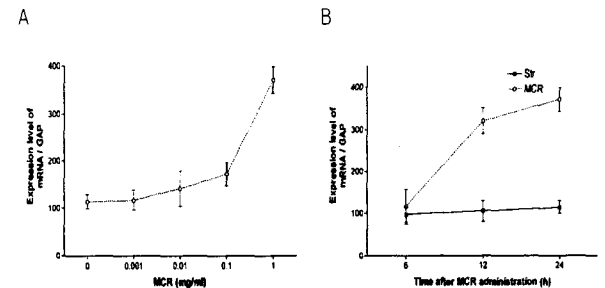


Fig. 10. Expression level of HO PCR was performed with cDNA from PC12 cell cultured in medium containing various concentration of MCR for 24 hr. (A); or 1 mg/ml MCR for 6, 12, 24 hr. (B) Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

2) MIF

MIF 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 11과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9702로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

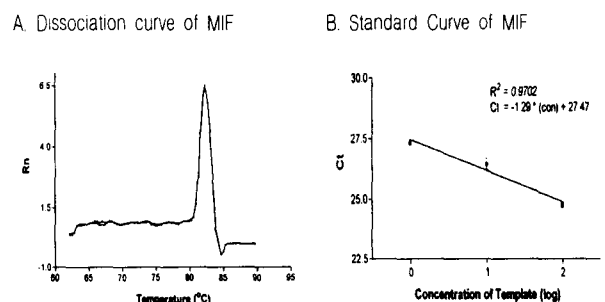


Fig. 11. Dissociation and Standard curve of MIF

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 MIF 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 12). 牡丹皮 추출물 투여시 PC12 cell의 MIF mRNA의 발현량은 control에 비하여 배양 시간에 따라 발현이 증가하고 24시간 배양시 저농도에서는 별다른 변화가 없다가 1 mg/ml에서 1.8배 가량 발현이 증가한 것으로 나타났다.

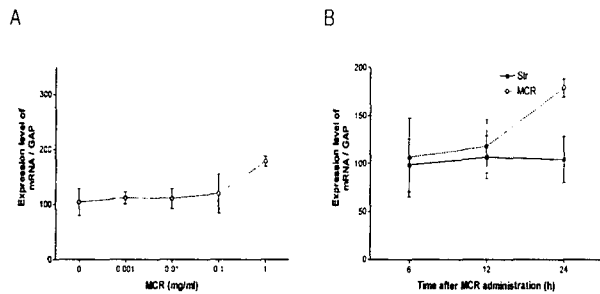


Fig 12. Expression level of MIF PCR was performed with cDNA from PC12 cell cultured in medium containing various concentration of MCR for 24 hr. (A); or 1 mg/ml MCR for 6, 12, 24 hr. (B) Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

3) COMT

COMT 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 13과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9981로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

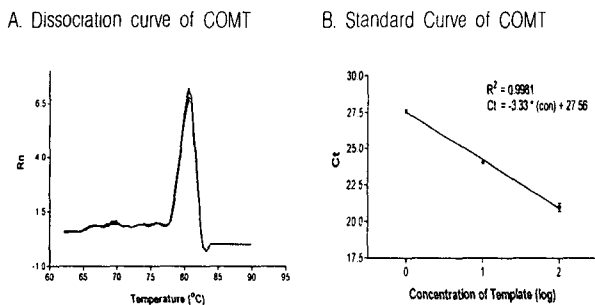


Fig 13. Dissociation and Standard curve of COMT

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 COMT 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 14).

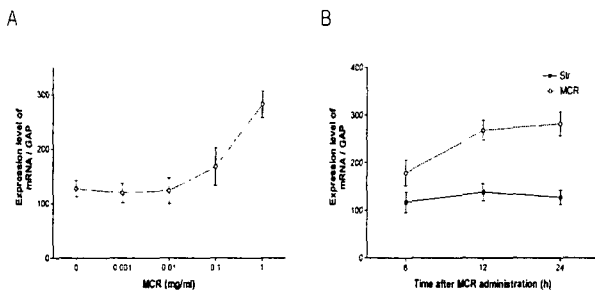


Fig 14. Expression level of COMT PCR was performed with cDNA from PC12 cell cultured in medium containing various concentration of MCR for 24 hr. (A); or 1 mg/ml MCR for 6, 12, 24 hr. (B) Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

고찰

牡丹皮 추출물 투여시 PC12 cell의 COMT mRNA의 발현량은 배양 시간에 따라 증가하는 것으로 나타났으며 牡丹皮 추출물 저농도에서는 별다른 변화가 없다가 0.01 mg/ml의 농도에서부터 농도의존적으로 발현이 증가한 것으로 나타났다. 특히 1 mg/ml 牡丹皮를 투여하고 24시간 배양한 경우 control에 비하여 2.8배 가량 발현이 증가한 것으로 나타났다.

노화를 한마디로 정의하기는 쉽지 않고 조금씩 다른 견해들이 있지만, 대체로 나이가 들어가면서 나타나는 신체의 형태적, 기능적인 비가역적인 변화를 노화라고 정리할 수 있을 것이다^{12,13}. 서의학에서는 노화의 원인에 따라서 여러가지 이론이 존재해 왔다. 이는 크게 두 가지로 분류할 수 있는데, 노화는 무작위적으로 일어난 유해한 기작들에 의한 퇴행적 변화라는 degenerative aging과 노화란 계획된 바대로 발생성장 단계의 마지막 종착지로서 일어난다는 programmed aging이 그것이다. 최근에는 다시 노화의 활성산소설에 따라서 광범위한 연구가 진행되고 있다¹⁴. 활성산소설은 흔히 자유유리기설이라고 불리며 1956년에 Harman에 의해서 제창된 것으로 'ROS가 노화의 원인이다.'라는 이론에 근거하고 있다. Reactive oxygen species는 화학적으로 최외각 전자껍데에 쌍을 이루지 못한 전자를 지닌 원자나 분자를 의미한다. 이들은 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 잃거나 혹은 주위로부터 전자 하나를 더 얻어 보다 안정된 상태로 가려는 성질을 가지고 있기 때문에 불안정하다. 따라서 주위의 화합물과 쉽게 반응하여 높은 반응성을 갖는다. 이들은 세포내 산화효소에 의하여 촉매되는 O₂ 분자의 환원반응에서 발생하며 단백질, RNA, DNA 등 세포성분과 임의로 반응하여 산화체 혹은 과산화체를 만들며 이로 인하여 세포성분이 본래의 기능을 상실하고 심한 경우 apoptosis를 유발하기도 하며, 또한 ROS가 연령에 따라서 증대하여 노화의 원인이 된다는 것이다. ROS의 예로는 O₂⁻, OH⁻, RO₂⁻ 등의 radecal과 radical이 아니지만 생체에 유해한 H₂O₂, HOCl, O, ONOO⁻ 등이 있으며 이들은 정상적 대사과정 중에도 생성되므로, 생체 내에는 항산화 기제가 동시에 존재하게 된다. 이러한 항산화 기제로 대표적인 것이 ascorbate, a-tocopherol등의 세포내에 미량으로 존재하는 항산화 물질들과 SOD, CAT, GSH-Px 등과 같은 항산화 효소들이다^{4,12,15}. 이러한 항산화제를 연구하는 것이 노화 억제에 한 흐름이 되고 있다.

한의학에서는 인체의 기본적인 물질이라 일컬어지는 腎精이 시간의 흐름에 따라 쇠퇴함으로 인해서 노화가 진행된다고 보고 있다. 즉 인간의 나이에 따른 성장 및 노화의 과정을論하면서, 生長壯老의 과정에서 腎氣의 盛衰가 결정적인 영향을 미친다는 것을 제시했다. 그리하여 腎藏精氣를 保養하는 것이 질병을 예방하고 老衰를 방지하는데 중요한 의의가 있다고 하였다³. 또한 40세 이후의 신체의 변화에 따른 노화의 진행과정에 대하여, 노화는 陰精의 소모가 신체의 기능을 저하시키면서 생명활동의 衰弱함을 부추키고, 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 下虛上實의 상태로 바뀌어 가는 것임을 나타내

었다³⁾. 사람의 나이에 따른 생리, 병리 등의 변화를論하면서는, 40세 이후에 五臟六腑와 十二經脈의 衰退가 시작되어, 50세부터는 10년을 주기로 五臟의 기운이 肝心脾肺腎의 순서로 衰하기 시작하여 마지막으로 腎氣가 衰하고 나면 五臟이 모두 虛해져서 죽음에 이르게 된다고 하였다²⁾. 이와 같이, 한의학에서는 古來로 腎氣를 保養하는 것이 養生에서 중요한 의의를 가진다고 하여, 후대에도 養生을 하는 데나, 노화를 억제하는 데에는 腎精을 보존하는 방법이 사용되어 왔다. 특히 補腎之劑라 할 수 있는, 六味地黃湯⁵⁾, 補腎丸¹⁶⁾, 左歸飲, 右歸飲¹⁷⁾, 五子地黃飲子¹⁸⁾ 등의 노화 지연효과에 대하여 실험적인 규명들이 이루어져 오고 있다.

실험에 사용된 PC12 cell은 rat adrenal gland의 pheochromocytoma line으로 신경에서 유래한 세포가 아님에도 불구하고 nerve growth factor가 함유된 배지에서 sympathetic neuron-like cell로 분화되어 neurite를 형성한다. 이렇게 NGF에 의해 분화된 PC12 cell은 신경세포와 유사한 성질을 가지고 있어서 다루기 어려운 신경세포를 대신하여 neurotoxic 물질과 산화 스트레스 등으로 유발되는 neuronal 손상에 관련된 실험에 많이 이용되고 있다⁹⁾. 徐⁷⁾는 腎虛證에 사용하는 대표처방인 六味地黃湯 각각의 구성약물을 이용하여 분화되지 않은 PC12 cell의 항산화작용을 확인한 결과 熟地黃, 山茱萸, 牡丹皮가 유의하게 PC12 cell의 산화를 억제하고, 그 중 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. 주성분중 paeonol이 대표적인 지표물질로서 사용되고 있다¹⁹⁾. 牡丹皮의 약리작용을 보면 소염작용, 항혈전, 죽상동맥경화억제작용, 항심근허혈작용, 항부정맥작용, 혈압감하작용, 진정, 최면, 항경련작용, 진통, 항균, 이뇨작용 등이 알려져 있다²⁰⁾. 또한 최근 牡丹皮 혹은 그의 유효물질인 paeonol을 이용한 많은 연구에서 심근허혈 방어효과²¹⁾, 혈전생성 억제효과^{22,23)}, 소염효과^{24,25)}, 세포면역 강화효과²⁶⁾ 등이 보고된 바 있다. 김⁸⁾은 분화된 PC12 cell의 산화억제 효과 및 기전에 대해서 oligonucleotide chip microarray를 이용하여 유전자 발현 양상을 분석하여 보고했다. 여기에서는 독성물질 제거를 통한 세포 방어기전을 일으키는 HO, COMT, MIF 등의 유전자의 발현이 증가했고, 세포독성기전을 유발시키는 것으로 알려진 P2X receptor family 등의 유전자의 발현이 감소했음을 보여주었다. 본 실험에서는 이 중 노화억제와 관련된 항산화 효과로 유의성 있다고 판단되는 HO, COMT, MIF 등의 유전자 발현양상을 real-time RT-PCR를 통해서 검증하고자 하였다. Real-time RT-PCR은 실시간으로 정량분석이 가능한 실험방법으로, oligonucleotide chip microarray를 통한 실험의 다음 단계로 사용되고 있다²⁷⁾.

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 떨어짐으로써 적

절한 산화자극임이 확인되었다. 또 牡丹皮 추출물 투여시 세포생존율은 농도나 배양시간 및 산화자극 여부에 상관없이 별다른 변화를 보이지 않음으로써 본 실험에 사용된 牡丹皮 추출물 농도가 세포독성을 띠지 않는 것을 확인되어 적절한 실험조건으로 사료된다. 牡丹皮가 분화된 PC12 cell의 항산화에 미치는 영향을 확인하여 보기 위해 세포당 산화물질 발생량으로 비교하여 본 결과 hydrogen peroxide 처리시 ROS 형성이 배양시간에 따라 증가되는 경향을 보였으며 24시간에서는 296%로 증가되었다. 牡丹皮 추출물을 처리하였을 때는 ROS 형성이 대조군에 배양시간 및 농도 의존적으로 감소하였으며 특히 1 mg/ml 투여후 24시간 배양시 130%로 저하되어 거의 대조군 수준을 회복한 것을 볼 수 있다. Real-time RT-PCR를 통해 유전자의 발현양상을 살펴보면, 먼저 PC12 cell의 HO mRNA의 발현량은 control에 비해 농도 의존적, 시간 의존적으로 증가했는데, 1 mg/ml 牡丹皮를 투여하고 24시간 배양한 경우 3.7배 증가한 것으로 나타났다. 이 결과는 김⁸⁾의 oligonucleotide chip microarray에서 나타난 HO의 3.8배 발현과 유사하다. HO는 heme을 제거하여, 세포의 스트레스 상황에서 세포를 보호하는 가장 효과적인 체계로 알려져 있다. HO는 4가지의 중요한 기능을 가지고 있다. 첫째, HO는 산화자극에 대하여 방어작용을 나타내는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 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^{29,30)}. 두 번째는 조직의 미세순환을 유지시켜 주는 것이고, 세 번째는 세포의 사이클을 조절하는 기능이다. 즉 혈관확장과 항혈전의 기능이 있는 carbon monoxide의 생산은 조직의 미세순환을 유지시켜주고, 세포사멸기전(apoptosis)이나 세포 정지 기전(cell arrest mechanisms)에 저항하게 해준다. 네 번째는 항염증 기능이다. Heme의 이화와 HO의 과다발현은 직간접적으로 중성구, 대식세포, 림프구 등에 의해 매개되는 숙주의 염증반응을 방해하는 효과를 나타낸다^{31,32)}. 그래서 최근에는 HO가 뇌, 간, 신장 등의 손상 시에 보호기전을 발휘하는 데 주목하고 있고, 항염증작용, 세포보호기능 등과 관련하여 죽상동맥경화증, 이식 거부, 내독성 속, 고혈압, 급성 폐 질환, 급성 신장 질환 등의 질환에 임상적으로 연구되고 있다^{33,34)}. 牡丹皮 추출물 투여로 인해 HO 유전자의 발현량이 가장 많이 증가했다. 이는 牡丹皮의 항산화 효과를 가장 강력하게 증명해 주는 것이다. 즉 HO 유전자가 heme을 제거하여 항산화 효과를 나타내고, 조직과 세포의 순환을 조절하고, 항염증 효과를 나타내는 것은 牡丹皮의 清熱涼血, 活血祛瘀, 退虛熱의 효능을 입증해주는 것이라 할 수 있다. MIF mRNA의 발현량은 control에 비해 시간에 따라 발현이 증가하였으며, 24시간 배양시 1 mg/ml에서 1.8배 가량 발현이 증가한 것으로 나타났다. 이는 선행연구⁸⁾와 흡사하다. MIF는 원래 선천면역계에서 중요한 매개 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. MIF는 infection과 stress에 반응하는 세포들인 단핵구, 대식세포, T-cell, B-cell, 내분비 세포, 상피 세포 등에서 광범위하게

발현되는 것으로 확인되고 있다. MIF는 만성 염증이나 자가면역 질환에서 숙주의 방어에 중요한 작용을 하며, 특히 glucocorticoid의 항염증과 면역억제 작용의 효과를 조절하는 기능을 가지고 있다^{35,36}. 최근에는 MIF가 조절하고 매개하는 역할에서 더 나아가, 감염질환인 패혈증, 류마티스 관절염, 사구체신염 등에서 직접적으로 pro-inflammatory의 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다³⁷. 또한 감염이나 염증질환에 덧붙여서 케양성 대장염, 염증성 신경 질환, 암 등의 질환에서도 MIF의 발현량이 증가한다고 보고되고 있다. MIF는 대식세포와 더불어 T cell, natural killer cell, fibroblast, endothelial cell 등의 활성화에 영향을 끼쳐서 각종 감염질환이나 암에 관여한다는 것이다³⁸. 그리고 MIF가 PC12 cell에서 세포 증식 작용을 하고³⁹, 세포내 dopamine cytotoxicity에 강력한 방어 기제⁴⁰를 보이는 것으로 보고되고 있다. MIF 유전자의 발현량이 증가한 것은 牡丹皮의 투여로 인해 항산화효과와 더불어 세포의 선천면역기능이 증가했음을 보여준다. COMT mRNA의 발현량은 control에 비해 배양 시간에 따라 증가하며, 0.01 mg/ml의 농도에서부터 농도 의존적으로 증가하여 1 mg/ml 牡丹皮를 투여하고 24시간 배양한 경우 2.8배 가량 발현이 증가한 것으로 나타났다. 김⁹의 oligonucleotide chip microarray에서는 3.9배 증가한 것으로 보고된 바 있다. COMT는 neurotransmitter나 hormone들 중 catechol 구조를 가지는 화합물 (특히 dopamine)의 O-methylation을 유발하여 그 대사기능을 억제할 뿐 아니라 degradation시킨다⁴¹. 특히 neuroactive drug (L-dopa, alpha-methyl dopa, isoproterenol 등)의 반감기를 짧게 하는 기능을 가지고 있다. dopamine은 ROS와 더불어서 해당 조직에 oxidative damage를 입힌다⁴². 그래서 최근에는 L-dopa가 치료제로 사용되고 있는 파킨슨병과 관련하여 많이 연구되고 있다. L-dopa는 파킨슨병의 치료제로 사용되고 있는데 PNS에서 COMT에 의해 감퇴되어 BBB를 통과하는 양이 적어지게 된다. 여기서 COMT의 발현량이 증가한 것은 牡丹皮 추출물 투여를 통해 산화 손상을 입히는dopamine류의 cytotoxicity를 억제하는 것은 물론 degradation 시키는 작용을 하여 항산화 효과를 낸 것으로 추측할 수 있을 것이다. 이것은 牡丹皮의 退虛熱 작용과 무관하지 않을 것이다.

결 론

분화된 PC12 cell에 대한 牡丹皮 추출물의 투여로 항산화작용을 확인하고, 그 기전에 대하여 real-time RT-PCR로 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

牡丹皮 추출물의 투여로 분화된 PC12 cell에서 hydrogen peroxide에 의해 유발된 산화를 배양시간 및 농도 의존적으로 억제하였다. Hydrogen peroxide의 산화자극으로 분화된 PC12 cell에서 牡丹皮 추출물 투여로 배양시간 및 농도 의존적으로 HO, COMT, MIF 등의 유전자 발현량이 증가된 것을 real-time RT-PCR을 통해 확인하였다.

이상으로 볼 때 牡丹皮 추출물의 투여는 HO, MIF, COMT 등의 유전자 발현량을 증가시켜서 독성물질 제거를 통한 세포

방어기전을 통해 항산화 효과를 나타내며, 清熱涼血, 活血祛瘀, 退虛熱과 관련된 기능을 발휘하여 신경세포의 노화를 억제하는 것으로 생각된다.

감사의 글

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

참고문헌

1. 송미순, 하양, 노인간호학, p.3, 서울대학교출판부, 서울, 1995.
2. 허북의학원 校釋, 靈樞經校釋(下), p.126, 人民衛生出版社, 北京, 1982.
3. 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.
4. Harman, D. Free radical theory of aging. Mutat Res. 275(3-6):257-66, 1992.
5. 안상원, 이철완. 숙지황과 육미지황탕이 노화과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. 대전대논문집 8(1):593-623, 1999.
6. 최보업. 六味地黃湯加味方이 흰쥐의 기억능력과 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 16(5):1025-1034, 2002.
7. 서영은, 이은아, 배현수, 신민규, 홍무창. 六味地黃湯 構成藥物이 PC12 細胞의 酸化抑制에 미치는 影響. 동의생리병리학회지 17(1):203-208, 2002.
8. 김현희 외. 牡丹皮의 PC12 cell 酸化抑制 效果 및 neuronal 유전자 발현 profile 分析에 대한 연구. 동의생리병리학회지 17(2):529-541, 2002.
9. Holtsberg, F. W., Steiner, M. R., Bruce-Keller, A. J., Keller, J. N., Mattson, M. P., Moyers, J. C. and Steiner, S. M. Lysophosphatidic Acid and Apoptosis of nerve Growth Factor-differentiated PC-12 cells. J Neurosc Res. 53(6):685-96, 1998.
10. 한국의약품수출입협회 한국의약품시험연구소, 한약(생약)규격집, pp.155-6, 대명기획, 서울, 2000.
11. Hai Y.Z., Xi C.T., Huperzine B.A. novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. Neurosci Lett. 292(1):41-4, 2000.
12. 리정복, 장수화, pp.14-5, 41, 과학백과사전출판사, 평양, 1987.
13. 김종평, 유익동. 노화억제를 위한 항산화제 연구. 생명과학동향 62(989):25-36, 1998.
14. 한복기. 노화과정에서 활성산소의 역할. 생명과학동향, 62(989): 9-14, 1998.
15. 徐舜圭, 成人病·老人病學, pp.10-4, 고려의학, 서울, 1992.
16. 손민성, 오민석, 송태원. 노화과정의 흰쥐에서 보신환이 신장의 대사효소계에 미치는 영향. 대전대논문집 8(1):659-74, 1999.
17. 윤철호, 정지천, 박선동. 좌귀음(左歸飲)과 우귀음(右歸飲)이

- 노화 Rat의 뇌 과산화지질 생성 및 활성산소 생성계 효소 활성에 미치는 영향. 대한한의학회지 16(2):348-64, 1995.
18. 서경석, 이상룡. 五子地黃飲子가 노화백서의 혈청변화와 혈청·뇌조직의 항산화활성에 미치는 영향. 동의정신과학회지 10(1):79-93, 1999.
 19. 전국한의과대학 본초학교실 공저, 본초학, p193, 영림사, 서울, 1991.
 20. 김호철, 한약약리학, pp.147-50, 집문당, 서울, 2001.
 21. 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(2):145-8, 1994.
 22. 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(6):555-8, 1998.
 23. 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(1):29-40, 1983.
 24. Harada, M., Yamashita, A., 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(6):750-6, 1972.
 25. 김동혁, 송봉근, 김형균. 牡丹皮가 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향. 한국전통의학지 7(2):60-9, 1997.
 26. 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(1):37-8, 1994.
 27. Mills, J. C., Roth, K. A., Cagan, R. L. and Gordon, J. I. DNA microarrays and beyond: completing the journey from tissue to cell. Nat Cell Biol. 3(8):E175-8, 2001.
 28. 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(2):177-84, 2002.
 29. Maines, M. D., Panahian, N. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO¹ and HO² have different functions?. Adv Exp Med Biol. 502:249-72. 2001.
 30. Akagi R., Takahashi T., Sassa S. Fundamental role of heme oxygenase in the protection against ischemic acute renal failure. Jpn J Pharmacol 88(2):127-32, 2002.
 31. Katori, M., Busuttill, R. W. and Kupiec-Weglinski, J. W. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. Transplantation 74(7):905-12, 2002.
 32. Morse, D., Choi, A. M. Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. Am J Respir Cell Mol Biol. 27(1):8-16, 2002.
 33. Hill-Kapturczak, N., Chang, S. H. and Agarwal, A. Heme oxygenase and the kidney. DNA Cell Biol. 21(4):307-21, 2002.
 34. Guo, X., Shin, V. Y. and Cho, C. H. Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. Life Sci. 69(25-26):3113-9, 2001.
 35. Roger, T., Glauser, M. P. and Calandra, T.: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. Journal of endotoxin research 7(6):456-60, 2001.
 36. Lue H., Kleemann R., Calandra T., Roger T., Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. Microbes and infection 4(4):449-60, 2002.
 37. Baugh, J. A., Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor. Crit Care Med. 30(1 Suppl):S27-35, 2002.
 38. Lolis, E. Glucocorticoid counter regulation: macrophage migration inhibitory factor as a target for drug discovery. Curr Opin Pharmacol. 1(6):662-8, 2001.
 39. 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(4):409-30, 1997.
 40. Weingarten, P. and Zhou, Q. Y. Protection of intracellular dopamine cytotoxicity by dopamine disposition and metabolism factors. J Neurochem 77(3):776-85, 2001.
 41. Huotari, M., et. al., Brain catecholamine metabolism in catechol-O- methyltransferase (COMT)-deficient mice. Eur J Neurosci 15(2):246-56, 2002.
 42. Pattison, D. I., Dean, R. T. and Davies, M. J. Oxidation of DNA, proteins and lipids by DOPA, protein-bound DOPA, and related catechol(amines). Toxicology 177(1):23-37, 2002.