

구척(狗脊) 메탄올추출액이 신경세포의 재생 및 회복효과에 미치는 영향

김상태 · 김정도 · 김영균*
주암생명공학연구소, 국민대학교 삼립과학대학

Effect of MeOH Extract of *Cibotium barometz* for Repair and Regeneration of Nogo A-injured Neuroblastoma Cells

Sang Tae Kim, Jeong-Do Kim, and Young-Kyoon Kim*

Juam of Research Institute Bioscience & Biotechnology
College of Forest Science, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

Abstract – The effect of MeOH extract of *Cibotium barometz* (or Cibaro) on nogo-A expression was studied by neurite cone collapse and neurite outgrowth assay. The degrees of mRNA expression of BDNF, GDNF, and Caspase-3 in nogo-A were also examined with SK-N-SH cell lines using RT-PCR and confocal microscopy methods. We have shown that Cibaro treatment inhibits nogo-A activation in SK-N-SH cell lines. It has been shown that Cibaro increases the expression rates of neurofilament and enhances neurite outgrowth in neuroblastoma cells as increasing the amount of Cibaro. It has been also shown that Cibaro increases the expression rates of BDNF, GDNF mRNA in neuroblastoma cells as increasing the amount of Cibaro. These results suggest that Cibaro induces neurite outgrowth by nogo-A inactivation and is, therefore, crucial for the treatments against anaplastic disc and spinal neuronal anesthesia.

Key words – neurotrophic factors, nogo-A, apoptosis, neurite outgrowth

운동신경 마비 그리고 치매 및 중풍에서 오는 하반신 마비같은 중추신경 장애에 의한 신경전달 마비등의 병적증상은 아직 현대의학에서도 골질환 및 중추신경계의 상해요인으로로부터 어떻게 신경마비가 유발되는지 정확한 의학적 기전에 대한 연구가 미미한 수준이다. 최근 신경전달 마비의 원인이 nogo-A에 의해 야기되며 주로 중추신경과 척추신경의 oligodendrocyte에 존재하고 어떤 상해로부터 nogo-A가 발견되어 myelin을 분해하거나 신경전달을 방해하여 신경재생을 차단한다고 밝혀짐으로서¹⁾ 신경마비의 원인이 파악되기 시작하였다. 그러나 아직 뇌세포의 손상으로 오는 척추신경의 상해, 중풍, 치매, 뇌성마비같은 것에 의한 상,하반신의 운동장애 후유증에 유효한 치료제는 전무한 실정이다.^{2,8)} 따라서 척추 골질환에 우수한 약효를 지니며 신경마비를 억제하는 생약을 검색하기 위해 분자생물학적 연구 시스템을 구축하여 척추신경에 미치는 영향을 관찰한 바 구척(狗脊)의 MeOH 추출물 (이하 Cibaro)이 척추질환의 주 증상인 신경마비를 회복내지 억제시키는 약리작용이 있음을 확인하였다.

구척(狗脊)은 일명 고비라고도하며, Osmundaceae(고비과)의 고비(*Osmunda japonica* Thunb.)의 지상부(地上部)를 건조한 것을 전통의학과 민간에서는 임질, 각기, 수종, 풍한, 마비증, 허리와 등의 동통에 사용되어지고 있는데, 특히 고비의 줄기뿌리를 한방에서는 풍한(風寒), 마비증, 허리등의 동통에 사용되고 민간에서는 고비뿌리를 허리와 무릎이 저리고 아프며, 다리에 힘이 없고 오줌을 참지 못하는데 달여서 마신다고 전해지고 있다. 한편 구척의 지상부에는 triterpene 성분인 woodwardinic acid, 아스파라긴산, 글루타민산, 탄닌,⁹⁾ onitin, onitin-4-O-β-d-glucopyranoside, pterosin R (4-deoxy, 4-chloroonitin), 특히 onitin은 평활근 이완작용이 있다고 밝혀져 있으며,¹⁰⁾ astragalin, isoginkgetin, kaempferol, diterpene, 특히 근경에는 근충변태홀몬인 ponasterone A, ecdysterone, custecdysone, ecdysone 등이 있으며 무수를 100 g중 벤토산 4.132%, 단백질 20.3%, 탄수화물 75.5%, 섬유질 90.8%로 구성되어 있다.

따라서 본 연구는 신경세포의 상해시 Cibaro가 신경세포의 증식과 신경돌기의 신장에 어떠한 영향을 미치는지에 관하여 분자생물학적인 방법을 통해서 그 효과를 보고자 하였다.

*교신저자(E-mail) : ykkim@kookmin.ac.kr
(FAX) : 02-910-4808

실험재료 및 방법

시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin는 Gibco에서, Ethanol는 Merck사에서 구입하였고, 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (VS-9108 MS, vision scientific Co.), light microscope (Olympus), fluorescence microscope (Nikon, Champigny, France), confocal laser-scanning microscope 등을 사용하였다.

생약의 추출 및 시료검액 조제

Cibaro 조제 : 본 실험에 사용한 구척 (2 kg)은 경동시장에서 엄선하여 세말한 다음 적당량의 MeOH 8L에 넣고 일주일간 상온에서 침출시킨 후 마포로 추출액을 여과하고 즉시 rotary evaporator에서 감압농축하였다. 농축액은 냉동 보관하고 실험 직전에 0.1 M phosphate buffer (0.1 N NaCl 함유)로 0.5 mg/ml의 농도로 녹여 stock sol.의 시료검액으로 사용하였다.

Tunel assay

TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyltransferase-Mediated UTP End Labeling) assay는 세포를 4% paraformaldehyde으로 30분간 고정 후 permeabilization용액인 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate에 2분간 둔 다음 PBS로 세척하고 TUNEL반응 혼합액인 terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme과 fluorescein-dUTP을 Boehringer Mannheim에서 구입하여 3'-DNA단편 말단에 표지하여 세포사가 유도된 경우 형광현미경하에서 관찰하기 전까지 4°C 냉장고 암소에 30분간 보관하여 형광신호를 관찰하였다.

Nogo-A의 neurite outgrowth에 미치는 영향

Nogo-A 과발현 neuroblastoma세포주를 poly-L-lysine coated glass된 6-well에 10³ 세포수를 분주하고 24시간동안 배양하고 NGF가 50 ng/ml이 되게 2시간동안 자극을 가한 후 무혈청 내지 상기 약물 농도가 20 µg/ml이 되도록 가한 후 neurite outgrowth length를 현미경 하에서 사진을 촬영하면서 조사하였다. 무혈청배지에 NGF 및 Cibaro을 1시간 동안 처리한 부착된 총 세포수에서 관찰한 다음 사진 촬영하여 통계처리 하여 조사하였다.

Nogo-A에 의해 신경돌기 신장에 미치는 영향

Nogo-A 과발현 SK-H-SH 세포주를 2주간 G-418로 선택

적으로 분리하여 10% DMEM배지가 함유한 poly-L-lysine coated glass된 6-well에 10³ 세포수를 분주하고 24시간동안 배양하고 NGF가 50 ng/ml이 되게 2시간동안 자극을 가한 후 무혈청 내지 Cibaro 20 µg/ml이 되도록 가한 후 신경 돌기의 신장유무를 현미경하에서 사진 촬영하였으며, nogo-A 유도한 growth-cone-collapse assays는 Jin방법¹¹⁾에 준하여 실시하였다. 무혈청배지에 NGF 내지 약물을 1시간동안 처리한 후 부착된 세포집단에서 관찰한 다음 조사하였다.

RT-PCR을 통해 전사수준에서 미치는 영향

Cibaro가 신경세포의 BDNF, GDNF, caspase-3 그리고 nogo-A mRNA발현을 유도하는지조사하기 위해 세포주를 PBS로 2회 세척한 다음 policeman으로 모아서 1.5 ml eppendorf tube에 넣고 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 RNazol 용액을 200 µl를 첨가한 다음 chloroform 50 µl를 가하고 조심스럽게 pipetting하여 세포를 lysis하고 이를 15,000 rpm에서 4°C하에 15분간 원심분리하여 total RNA를 회수한 다음 isopropanol 동량을 넣고 4°C에서 15분간 침전시켜 75% EtOH로 한번 세척하여 건조시킨 다음 RNase free dH₂O를 20 µl을 넣고 60°C에서 30분간 가하여 녹인 다음 total RNA (1 µg) 2 µl에 10 mM dNTP 5 µl, 25 mM MgCl₂ 6 µl, 10×RNA PCR buffer µl, RNase inhibitor 1 µl, AMV-Optimized Taq 1 µl, AMV reverse Transcriptase XL 1 µl, 대조군으로 표준 발현량을 위해 β-actin primer로 AF sense: 5'-CCAAGGCCAACCGCG AGAAGATGAC-3'/ antisense: 5'-AGGGTACATGGTGGTG CCGCCAGAC-3')을 10 pM이 되게 각각 1 µl, RNase free dH₂O 31 µl을 첨가하여 42°C에서 30분간 역전사 반응을 실시하고, 94°C에서 2분간 반응을 정지시켜서 PCR를 실시하였는데 반응조건은 94°C 1 min, 55°C 45 sec, 70°C 60 sec에서 30 cycles를 진행시켜 70°C에서 최종적으로 5분간 elongation 반응을 실시하여 종결한 후 이 PCR 산물을 1% agarose gel에 clute시켜 사이즈 마커를 기준으로 band유무를 확인하였다.

통계처리

모든 실험은 최소한 3회 수행하였으며 세포의 대조군은 백분율로 (% Control)로 표시하였으며 통계학적 유의성은 one-way ANOVA와 post hoc Dunnett test $p < 0.05$ 으로 나타내었다.

실험결과

신경세포의 생존율에 미치는 영향 - 형광은 nogo-A에 의하여 유도된 세포사를 보인 세포핵내에서 형광현미경으로

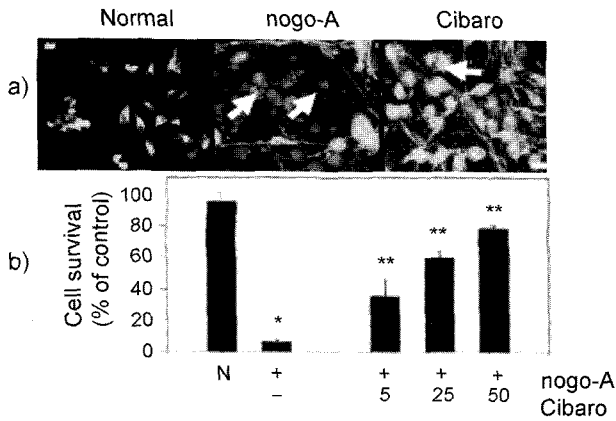


Fig. 1. TUNEL assay of nogo-overexpressing SK-N-SH cells *in vitro*. a) Nogo-induced SK-N-SH cells were either untreated with Cibaro or pre-treated with Cibaro. Twenty four hrs after nogo-transfected, the cells were fixed and processed for TUNEL assay. The cells were then visualized by fluorescence microscopy. The arrows indicated some of the apoptotic cells with red signal and green signal indicated survival cells. (Magnification: $\times 100$. b) nogo-overexpressed neuroblastoma cells were treated with 5, 25, and 50 $\mu\text{g/ml}$ of Cibaro, normal and control cells treated with PBS buffer for 12 h, then the TUNEL assay was performed. All results are mean \pm SEM of three independent experiments, each of which was done in triplicate. Asterisk indicates significantly different from other samples ($p < 0.05$). Means for Cibaro treatment in the presence or absence of nogo-A expression were compared using a one-way ANOVA with a post hoc Dunnett test of significance, where $p < 0.05$ was taken as significant.

Tunel assay를 실시하여 세포생존율을 조사한 결과 Fig. 1a) 에서처럼 대조군은 적색형광의 수가 크게 증가된 상태인 반면 Cibaro를 처리시 감소하는 경향을 보였으며 적색형광의 수를 통계처리하여 본 결과 Fig. 1b)에서 Cibaro의 농도가 5, 25 그리고 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시 세포생존율에서 정상군은 $92 \pm 2.5\%$ 이고 대조군은 $6.5 \pm 2.1\%$ 인 반면 각각 $34 \pm 6.4\%$, $57 \pm 2.4\%$ 그리고 $87 \pm 1.3\%$ 였다. 따라서 Cibaro가 nogo-A 과발현 신경세포주에서 세포생존율을 증가시킨다는 유의성을 보이며, 이 결과는 Cibaro가 세포사멸을 억제하거나 혹은 세포의 생존율을 촉진시킨다는 것으로 사료된다.

Nogo-A에 의해 neurite outgrowth 伸張에 미치는 영향
 - Nogo-A 과발현(neuroblastoma cells의 neurite outgrowth length를 현미경 하에서 사진을 촬영하면서 조사하였으며 Fig. 2(a)에서처럼 무혈청배지에 정상군, nogo-A 과발현 (neuroblastoma cells세포에 Cibaro를 무처리한 대조군 및 5, 25 그리고 50 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 1시간동안 처리하여 부착된 총 세포수에서 관찰한 다음 사진 촬영하여 통계처리 하였는데 정상군에서는 신경돌기의 신장이 왕성하게 뻗어가는 양상을 보인 반면 nogo-A과발현 세포군에서는 신경돌기가 감소

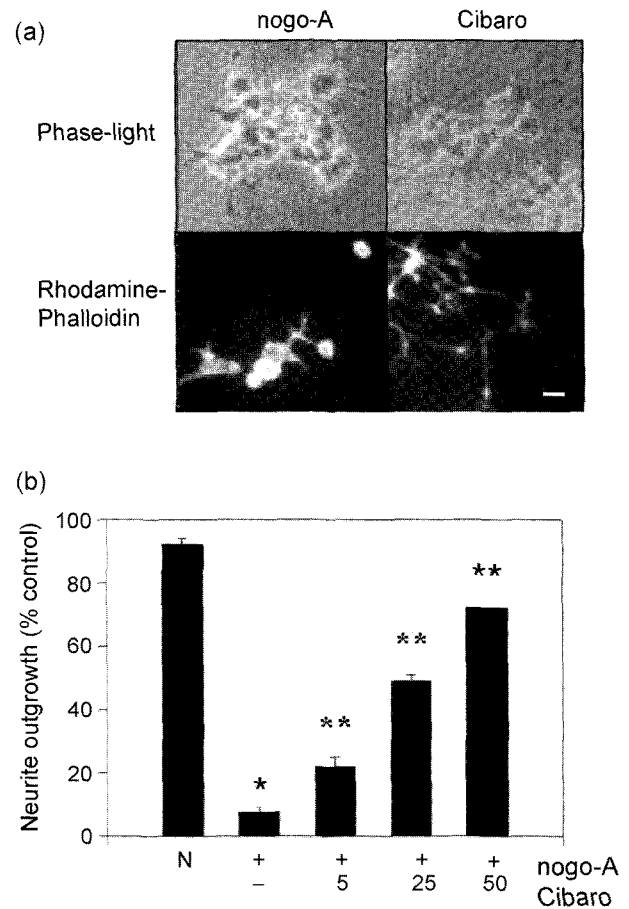


Fig. 2. Cibaro blocked with inhibitor of neurite outgrowth by nogo-A. 1) Themorphological pattern, Treatment with Cibaro (50 $\mu\text{g/ml}$) for 12 hrs caused cells to be round (right) and was associated with a decrease in proliferation (left), as measured by phase-light microscopy (a). Neurite outgrowth was visualized by staining with rhodamine-phalloidin (b). Scale bar, 50 m. 2) length of neurite outgrowth on nogo-overexpressed SK-N-SH cells were cultured for 12 hrs in the absence/presence of the indicated Cibaro: Nogo-induced cells (nogo-A); and 5, 25, and 50 $\mu\text{g/ml}$ Cibaro. All results are mean \pm SEM of three independent experiments, each of which was done in triplicate. Means for Cibaro treatment in the presence or absence of nogo-A expression were compared using a one-way ANOVA with a post hoc Dunnett test of significance, where $p < 0.05$ was taken as significant.

내지 소실되는 양상을 보였고 Cibaro를 처리시 신경돌기의 신장이 회복되는 결과를 관찰할 수 있었는데 신경신장의 길이를 통계처리시 Fig. 2(b)에서처럼 대조군경우 정상군이 약 $92 \pm 2\%$ 정도 증가된데 반해 약 $6 \pm 3\%$ 정도로 크게 감소하였고 Cibaro의 농도가 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 $22 \pm 3\%$, $47 \pm 4\%$, $72 \pm 8\%$ 정도가 회복됨을 나타내고 있는데 이는 Cibaro처리군은 nogo-A의 과발현에 의한 신경돌기 신장저해를 유의적으로 개선하는 효과가 있다고 사료된다($p < 0.05$).

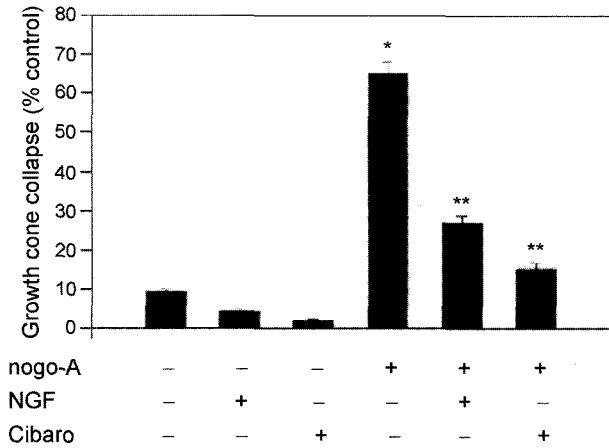


Fig. 3. Cibaro inhibits growth cone collapse. Nogo-A has inhibitory effect on the neurite outgrowth. The growth cone collapse significantly overexpressed compared with before exposure. The morphology of nogo-A expressed SK-N-SH cells after exposure to Cibaro (50 µg/ml) was changed compared with normal and NGF. Treatment with Cibaro (50 µg/ml) for 12 hrs caused cells to be round (right). All results are mean ± SEM of three independent experiments, each of which was done in triplicate. Means for Cibaro treatment in the presence or absence of nogo-A expression were compared using a one-way ANOVA with a post hoc Dunnett test of significance, where $p < 0.05$ was taken as significant.

Nogo-A에 의해 神經突起 함몰에 미치는 영향 - pTAR-nogo-A를 과발현 시킨 SK-N-SH세포주를 10³ 세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 현미경하에서 관찰한 결과 정상세포 경우에는 세포증식과 신경돌기의 신장이 활발히 진행되고 있으나 nogo-A가 발현된 신경세포에서는 세포사가 유도되는 양상과 growth-cone collapse가 발생하는 것으로 관찰되는데 Fig. 3에서처럼 정상군에서는 신경돌기의 말단의 collapse가 약 10 ± 2%이하, NGF 경우는 4 ± 1%정도였고, Cibaro 경우는 2 ± 1%정도였는데 반해 nogo-A 발현세포주에서는 약 65 ± 4%정도 유도되었고 여기에 NGF 처리시 약 25 ± 3%로 감소하고 Cibaro 처리시 약 15 ± 2% 정도로 감소함을 관찰하였다. 따라서 본 Cibaro 처리를 통해서 척추 상해시 야기되는 신경돌기의 함몰이 개선되므로 신경마비를 개선하는 것에 대해 유의적으로 개선하는 효과가 있다고 사료된다($p < 0.05$). 따라서 본 nogo-A에 의해 유발된 신경돌기 상해가 회복이 되고 결과적으로 Cibaro가 신경마비를 회복내지 재생을 초래하게 될 가능성이 있는 것으로 사료된다.

RT-PCR를 통해 mRNA 발현수준에 미치는 영향 - pTAR-nogo-A를 과발현시킨 신경세포에서 신경상해시 세포생존에 영향을 미치는 nogo-A, BDNF, Caspase-3, GDNF, β-actin의 발현을 조사하기 위해 세포로부터 mRNA를 분리하여 RT-PCR를 실시하여 band유무를 확인하였는데 Fig. 4에서처럼

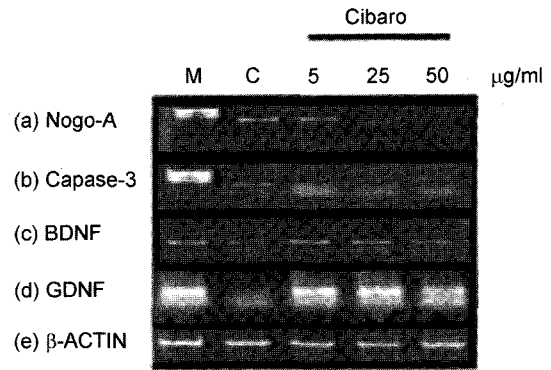


Fig. 4. RT-PCR analysis of RNA amplified from nogo-induced neuroblastoma cells. Total RNA was isolated from SK-N-SH cells using the RNeasy kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol. One µg of RNA was amplified as described in Method and "Materials and Methods." The amplified nogo-A, caspase-3, BDNF, GDNF, β-actin cDNA products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

럼 신경세포의 증식과 신경 돌기의 신장에 필수적인 인자들에 의해 하위 분자들의 활성화를 촉진하는 BDNF, GDNF의 발현은 대조군에서는 약하지만 Cibaro군에서 농도가 증가할수록 발현이 증가됨을 알 수 있었고, nogo-A와 Caspase-3 경우 nogo-A과발현 세포주의 대조군에서는 발현이 강한 반면 Cibaro군의 농도가 증가할수록 감소되는 경향을 보이는 것을 보아 Cibaro 처리시 신경돌기의 신장에 관여한다고 사료된다. 아마도 이들 발현량이 증가되므로 해서 신경세포의 신장이 microtubules으로 Kinesin의 전방 이동에 중요한 ATP소비와 MAPK, tyrosine kinase의 활성화에 관여할 것으로 사료되며 결론적으로 neurite 신장을 촉진하는 것으로 생각된다. 한편 β-actin mRNA의 경우 모든 lane에서 365 bp의 위치에서 standard로써 발현되는 것으로 보아 세포의 전사수준에서 공통적으로 여타의 mRNA 발현이 유도되는 것으로 이해할 수 있다.

신경재생에 미치는 단백질 발현정도 - nogo-A 과발현에 의해 신경돌기 신장에 관여하는 neurofilament 단백질 발현에 미치는 영향을 조사한 결과를 나타내는 Fig. 5에 의하면 신경세포의 신장을 특이적으로 나타내는 neurofilament 단백질 경우에서 정상군은 강하게 녹색형광을 나타내면서 길게 뻗어 있는 반면, 대조군 경우에는 nogo-A에 의해 발현이 억제되는 양상을 보여 짧은 신경돌기 형태를 보였으며, Cibaro군에서 강하게 발현을 유도하여 대조군보다 길게 neurofilament가 뻗어 가고 있음을 알 수 있었다. 이는 nogo-A 단백질의 발현은 정상군에서 발현이 전혀 없지만, 대조군에서는 발현이 유도되면서 신경돌기의 신장을 억제하는데 기인한다고 사료된다. 한편 Cibaro에서는 nogo-A의 발현을 감소

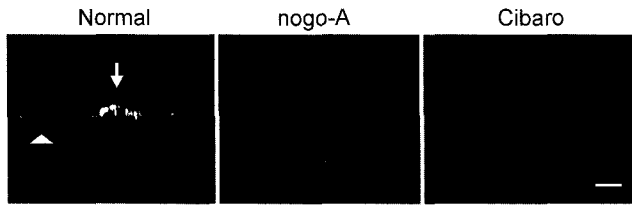


Fig. 5. Intracellular localization of neurofilament analyzed by laser scanning confocal microscopy. SK-N-SH cells were transfected with nogo-A expression plasmids: pTRA-nogo. Cells were stained for neurofilament with fluorescein isothiocyanate-labeled human anti-rabbit IgG (left) and for nuclei with propidium iodide in cells. The morphology of nogo-A expressed SK-N-SH cells after exposure to Cibrao (50 µg/ml) was changed compared with normal. Bars=10 µm. Cells were left untreated (Normal) or treated with Cibrao (50 µg/ml) for 12 hrs, then fixed and labeled for confocal laser-scanning microscopy. Original magnification: ×100. The cells were left untreated (normal) or treated with Cibrao (50 µg/ml) for 12 hrs (right), then treated as above for examining of neurofilament (green) and nuclei (red).

내지 억제되는 경향을 유도하므로 신경돌기의 재생을 유도 하리라 사료된다.

결 론

현재까지 신경 주변 근골격의 손상은 신경마비같은 후유 증을 초래하게 되는데 특히 근골격, 척추 질환의 대표적인 증세인 disc에 의한 운동신경 마비 그리고 치매 및 중풍에 서 오는 하반신 마비같은 중추신경 장애가 신경마비같은 신 경질환으로 발전하게 된다. 요추의 신경장애에 의한 통증을 디스크, 골막, 관절염, 골다공증등에 분포한 감각신경 및 운 동신경의 손상에 의해 유발된다. 또한, 신경장애에 의해 일 시적 혹은 장기간 운동 신경마비가 초래되면 추간판 자체 뿐만 아니라 추간판의 변성으로 인한 척추주변 근육, 척추 인대, 후방관절, 신경근에 영향을 미쳐 통증을 호소하는 경 향이 빈번하게 출현한다. 한편 서양의학에서도 골질환 및 중추신경계의 상해로부터 신경마비가 유발되는 정확한 의 학적 기전에 대해서 미미한 수준인데 신경마비가 주로 중 추신경과 척추신경의 oligodendrocyte에 존재하며 상해로부 터 nogo-A가 발현되어 myelin을 분해하거나 신경전달을 방 해하여 신경재생을 차단한다고 보고된 바 있다.¹⁾ 그러나 아 직도 신경마비의 치료제는 묘연한 상태이다. 그러므로 본 연구는 신경마비 억제를 포함한 유효성분을 검색하기 위해 분자생물학적 연구 시스템을 구축하여 Cibrao에 대해 척추 신경에 미치는 영향을 관찰하였고, 뇌신경 및 척추신경의 상해로부터 신경 마비를 의미하는 시험관내 검색 시스템을

구축하여 nogo-A 과발현 신경세포 SK-H-SH세포주에서 세 포사를 분석하고, 신경돌기의 신장 및 confocal방법으로 약 제의 유효성을 조사 연구하여 Cibrao가 척추질환의 신경마 비를 회복 내지 신경보호 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

결론적으로, 본 연구는 Cibrao와 같은 생약이 골질환과 신 경조직의 상해로 인한 신경세포의 회복과 보호효과를 가짐 을 확인하였으며 좀 더 과학적인 연구를 지속할 필요가 있 다고 사료된다.

감사의 글

이 연구는 농촌진흥청의 바이오그린21사업의 연구비지원 에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Schwab, M. E. and Thoenen, H. (1985) Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J. Neurosci.* **5**: 2415-2423.
2. Benfy, M. and Aguayo, A. G. (1982) Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature* **296**: 150-152.
3. Wang, L. H. *et al.* (1999) in *Neurobiology of Spinal Cord Injury* (eds Kalb, R. G. and Strittmatter, S. M.), 131-153.
4. GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., and Strittmatter, S. M. (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature* **403**: 439-444.
5. Chen, M. S. *et al.* (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* **403**: 434-439.
6. Prinjha, R. *et al.* (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* **403**: 383-384.
7. Schwab, M. and Caroni, P. (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are non-permissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading *in vitro*. *J. Neurosci.* **8**: 2381-2393.
8. Caroni, P. and Schwab, M. E. (1988) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell Biol.* **106**: 1281-1288.
9. Namba, T. (1983) *The Encyclopedia of Wakan-Yaku with Color Pictures(I)*, Hoikusha Pub. Co., Osaka, 86.
10. Murakami, T., Satake, T., Ninomiya, K., Iida, H., Yamauchi, K., Tanaka, N., Saiki, Y., and Chen, C. M. (1986) Pterosin-derivate aus der Familie Pteridaceae. *Phytochem.* **19**: 1743.
11. Jin, Z. and Strittmatter, S. M. (1997) Rac1 mediates collapsin-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* **17**: 6256-6263.

(2004년 1월 10일 접수)