KISEP Original Article 생물정신의학 Vol. 12, No. 2, November 2005

흰쥐 C6 신경교종 세포에서 Venlafaxine 그리고 Dexamethasone 처리가 열충격 단백질 70의 발현에 미치는 영향

유재학[1)] · 이준석[2)†] · 양병환[3)] · 최미란[3)] · 채영규[4)]
김석현[3)] · 노성원[3)] · 오동열[2)] · 최인근[5)]

Effects of Venlafaxine and Dexamethasone Treatment on HSP70 Expression in Rat C6 Glioma Cells

Jae-Hak Yu, M.D., Ph.D.,[1)] Jun-Seok Lee, M.D., Ph.D.,[2)†] Byung-Hwan Yang, M.D., Ph.D.,[3)] Mi-Ran Choi, Ph.D.,[3)] Young-Gyu Chai, Ph.D.,[4)] Seok-Hyeon Kim, M.D., Ph.D.,[3)] Sung-Won Roh, M.D., Ph.D.,[3)] Dong-Yul Oh, M.D., Ph.D.,[2)] Ihn-Geun Choi, M.D., Ph.D.[5)]

ABSTRACT

Object : The intracellular action of the antidepressant, venlafaxine, was studied in C6-gliomas using heat shock protein 70(HSP70) immunocytochemistry and HSP70 Western blots because HSP70 is associated with stress and depression.

Methods : To examine how the glucocorticoid affects the expression of HSP70 in nerve cells, the rat C6 glioma cell was treated with dexamethasone for 6 hours. In addition, venlafaxine was administered to the experimental groups of C6 glioma cells for 1, 6, 24, and 72 hours each, after which the expression of HSP70 was investigated. Finally, venlafaxine and dexamethasone were simultaneously administered to the experimental groups for 1, 6, 24, and 72 hours, followed by an investigation of the expression of HSP70.

Results : The short term(1 hour) venlafaxine treatment significantly increased the level of HSP70 expression. The short term treatment of venlafaxine with dexamethasone also increased the level of HSP70 expression but this reduction was not statistically significant. The long term(72 hours) venlafaxine with dexamethasone treatment significantly reduced the level of HSP70 expression. The long term treatment of venlafaxine also reduced

[1)]건국대학교 의과대학 건국대학교병원 신경정신과학교실
Department of Neuropsychiatry, School of Medicine Konkuk University Hospital, Seoul, Korea
[2)]관동대학교 의과대학 명지병원 정신과학교실
Department of Psychiatry, College of Medicine Kwandong University, Myongji Hospital, Goyang, Korea
[3)]한양대학교 의과대학 신경정신과학교실 및 정신건강연구소
Department of Neuropsychiatry & The Mental Health Research Institute, Hanyang University, Seoul, Korea
[4)]한양대학교 과학기술대학 생화학분자생물학교실
Department of Biochemistry & Molecular Biology, Hanyang University, Ansan, Korea
[5)]한림대학교 의과대학 신경정신과학교실
Department of Neuropsychiatry, Hyllym University College of Medicine, Seoul, Korea
[†]교신저자 : 이준석, 412-270 경기도 고양시 덕양구 화정동 697-24
전화) (031) 810-6230, 전송) (031) 810-5109 E-mail) mdjslee@kwandong.ac.kr

the level of HSP70 expression but this reduction was not statistically significant. Dexamethasone(10uM, 6hours) did not affect the level of HSP70 expression compared with controls.

Conclusion : Venlafaxine increases the expression of HSP70 at short term treatment, but prolonged treatment with dexamethasone suppresses the expression of HSP70.

KEY WORDS : Venlafaxine · Dexamethasone · Heat shock protein 70(HSP70).

서 론

열충격 단백질(heat shock protein ; 이하 HSP)이라고 알려진 일군의 단백질이 스트레스에 반응하여 극적으로 증가하는 세포 현상이 거의 모든 생물체에서 보편적으로 관찰된다.[1] HSP는 분자적 샤프롱(molecular chaperone)의 기능을 하는데, 즉 외부 스트레스에 의해 세포내 단백질이 변성되었을 때, 리보솜(ribosome)에서 새로운 단백질이 합성될 때, 그리고 세포내에서 단백질이 이동하면서 막을 통과하려고 펼쳐질 때 노출되는 소수성(hydrophobic) 부위에 HSP가 결합하여 단백질의 응집(aggregation)을 막고 본래의 입체형태(conformation)를 유지시키는 작용을 한다.[2-4] 또한 최근에는 HSP가 분자적 샤프롱 이외에도 glucocorticid 수용체(glucocorticoid receptor : 이하 GR)와 상호작용,[5] 아포프토시스의 조절,[6] 그리고 immunophilin과 결합[7]과 같은 다양한 기능을 가진 것으로 알려졌다.

HSP의 일종인 70kDa HSP(HSP70)는 정상적인 세포에서 가장 풍부하게 발견되는 HSP로서 다른 HSP와 마찬가지로 스트레스를 받지 않은 상태에서는 분자적 샤프롱의 기능을 하다가 스트레스에 노출되면 다량의 HSP70이 새로 합성되어 세포의 항상성(homeostasis)을 유지시킨다.[8][9] 특히 HSP70은 GR에 결합하는 최초의 HSP로서 구조적으로 불안정한 상태의 GR을 활성화시키는데 필수적인 역할을 하며,[5][10] 더 나아가 주요 우울증[11][12]이나 항우울제[13][14]와 관련성도 보고되었다.

한편 우울증 환자에서는 혈장, 소변, 뇌척수액에서 cortisol 농도가 증가되어 있으며,[15] adrenocorticotrophic hormone(ACTH)에 대한 cortisol 반응이 과대하게 나타나고, 뇌하수체(pituitary)와 부신샘(adrenal gland)이 비대해져 있다.[15-17] 이와 같은 시상하부-뇌하수체-부신(hypothalamic-pituitary-adrenal ; 이하 HPA) 축의 과활동성(hyperactivity)은 우울증 환자에서 관찰되는 가장 일관된 특성들 가운데 하나이다. 또한 고농도의 glucocorticoid에 장기간 노출되면 해마(hippocampus)의 추체 신경세포(pyramidal neuron)가 소실되며, 수상돌기(dendrite)가 위축되는 등 신경독성이 나타난다.[18-20]

현재 우울증의 치료에서는 monoamine의 재흡수를 억제하는 약물이 주로 사용되고 있다. 특히 venlafaxine은 serotonin과 norepinephrine의 재흡수를 함께 억제하는 새로운 계열(SNRI)의 항우울제로서 널리 사용되고 있다. 생체에서 venlafaxine의 일차적 작용은 두 가지 monoamine의 수송체(transporter)를 막음으로써 시냅스에서 serotonin과 norepinephrine의 농도를 높이는 것이다. Venlafaxine을 투여한 후 시냅스에서 monoamine의 농도가 높아지는 효과는 즉각적으로 나타나는 반면 항우울 효과는 2주 내지 6주가 지연되어 나타난다.[21] 이런 지연 효과는 monoamine의 재흡수를 억제하는 다른 항우울제에서도 마찬가지로 관찰되며, 이런 현상을 설명하기 위하여 최근에는 monoamine결핍 가설 이외에도 수용체-후 신호전달(post-receptor signaling)의 변화[22-24]나 HSP70과 관련성[13][14] 등 항우울제의 다양한 기전들이 제시되고 있다.

이런 맥락에서 본 연구는 흰쥐 C6 glioma 세포를 이용하여 venlafaxine 처리 후 HSP70의 발현을 조사하였다. C6 glioma 세포는 adenylyl cyclase activity의 상승처럼 항우울제 투여 후 쥐의 뇌에서 일어나는 생체 변화와 유사한 방식으로 항우울제에 대한 반응을 나타내며 높은 수준의 GR을 가지고 있는 반면, serotonin과 norepinephrine 수송체(transporter)는 갖고 있지 않다.[25-27] 따라서 본 연구의 결과는 serotonin이나 norepinephrine 수용체(receptor) 혹은 각각의 수송체(transporter)와 같은 monoamine의 작용을 넘어서는 기전에 의한 것이라고 할 수 있다. 먼저 venlafaxine을 단독으로 1, 6, 24, 72시간 동안 처리했을 때 HSP70의 발현 정도를 면역탁본법(immunoblot)을 이용해 조사하였다. 다음으로 생

체에서 우울증 상태와 유사하게 venlafaxine과 dexamethasone을 1, 6, 24, 72시간 동안 동시에 처리했을 때 HSP70의 발현 양상을 비교 조사하였다.

연구방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 흰쥐 C6 glioma 세포는 ATCC사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. Dexamethasone은 Sigma사(St. Louis, MO)에서 구입하였고, HSP70에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology사(USA)에서 구입하였다. Venlafaxine은 한국와이어스사로부터 제공받아 사용하였다. 그 외 일반적인 화학약품은 대부분 Sigma사(USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 세포 배양 및 시약 처리

흰쥐 C6 glioma 세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 10% fetal bovine serum(FBS: Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD)이 포함된 DMEM(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에 배양하였다. 48시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하며, 성장 안정기까지 배양하였다. Dexamethasone은 95% ethanol을 사용하여 2.55mM 농도로 녹인 후 -20℃에 저장하였다. 실험 직전 본 저장 용액 0.25 ml를 배양 접시(Nunc, Vangard, Neptune, NJ)에 넣어 ethanol을 증발시킨 뒤, 10ml DMEM 배지(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD)로 다시 녹여 실험에 이용하였다. Venlafaxine은 멸균된 물로 녹여 여과한 후 희석하여 사용하였다. 본 연구에서는 dexamethasone과 venlafaxine의 농도는 세포 배양 조건에서 HSP의 발현[28]이나 세포 내 신호[29)30)]을 조사하였던 선행 연구를 참고하여 예비 실험을 시행한 결과 아포프토시스를 일으키지 않는 농도(dexamethasone 10uM과 venlafaxine 10uM)를 각각 선정하였다.

3. 단백질 분리

100mm 접시에 준과밀도로 자란 세포들을 phosphate buffered saline(PBS)으로 씻은 후 2,000-3,000rpm으로 5분간 원심분리하여 세포들을 수확하였다. Pro-Prep™(iNtRON biotechnology, USA)을 약 5×10^6 세포에 400ul씩을 넣고 잘 섞은 후 얼음 속에서 20분간 세포들을 용해시켰다. 다시 4℃에서 13,000rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 새로운 1.5ml 튜브에 옮겼다. 단백질 정량과 면역탁본(immunoblotting)을 하기 전까지 얻어진 단백질을 -20℃에 보관하였다.

4. 단백질 정량

세포로부터 얻은 단백질을 Bradford 방법으로 정량하였다. Bradford reagent(Bio-Rad)를 1 : 5의 비율로 증류수에 희석하여 준비하였다(working solution). Bovine serum albumin(BSA) standard를 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0mg/ml로 준비하였다. 96 well plate에 standard를 10ul씩 넣은 후 working solution을 200ul씩 첨가했다. 분리한 단백질을 10배 희석하여 10ul씩 96 well plate에 넣은 후 working solution을 200ul씩 첨가하였다. 준비된 standard와 정량하고자 하는 단백질을 5분간 상온에 방치하였다. ELISA reader를 이용하여 wave length 595nm에서 흡광도를 측정하였고, standard curve를 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다.

5. Western blot analysis

HSP70의 발현 양상을 살펴보기 위해 세포추출물에 대해 항HSP 단일클론항체(Anti-HSP70mAb)를 사용하여 면역탁본(immunoblotting)을 실시하였다. 동량의 단백질을 Laemmli sample 용액(62.5mM Tris-Cl, pH 6.8 ; 2% SDS ; 10% glycerol ; 0.5% β-mercaptoethanol ; 10μg/ml bromophenol blue)에 넣고 5분간 끓인 후 10% polyacrylamide-gel에 얹고 SDS-PAGE를 시행한 다음 20% 메탄올 용액에서 gel내의 단백질을 100V로 4℃에서 nitrocellulose membrane으로 90분간 이송시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% nonfat-dry milk가 포함된 TBS-T 완충액(20mM Tris-HCl, pH 7.6 ; 500mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 넣고 교반기에서 상온으로 1시간 방치하였다. Anti-HSP70mAb(200μg/ml)를 1 : 2,000배 희석하여 첨가한 TBS 완충액 속에서 1시간 반응시켰다. 교반기 위에서 TBS-T 완충액으로 nitrocellulose membrane을 다시 15분간 2회 씻은 후 HRP-conjugated anti-mouse IgG(1 : 1000 dilution)를 넣고 1시간 반응시켰다. 다시 nitrocellulose membrane을 TBS-T 완충액으로 15분간 2회 씻은 후, 1 : 40으로 섞은 ECL+ reagents에 반응시키고 필름으로 감광하였다. QuantityOne software(Bio-Rad)를 이용하여 HSP70의 농도를 정량하였다.

6. 통계학적 분석

모든 실험값은 평균값±표준오차(mean±standard error)로 하였고, 통계학적 분석은 SPSS program을 이용하였다. 약물 처리에 따른 HSP70 발현 양상의 차이를 보기 위하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고, 각 집단간의 통계학적 유의성은 paired samples t-test를 이용하여 검정하였다.

결 과

1. Dexamethasone이 HSP70의 발현에 미치는 영향

먼저 dexamethasone이 단독으로 HSP70 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양용기에 흰쥐 C6 glioma 세포들이 85% 정도의 성장을 보일 때 dexamethasone (10uM)이 포함된 새로운 배양액으로 교체하고 6시간 처리한 다음, 얻어진 단백질을 이용하여 western blotting을 5번 반복 실시하여 발현정도를 조사하였다. 대조군과 비교할 때 dexamethasone을 처리한 경우 HSP70의 발현은 차이가 없었다(표 1).

2. Venlafaxine 단독 처리가 HSP70의 발현에 미치는 영향

Venlafaxine을 C6 glioma cell에 단독으로 처리했을 때 HSP70 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포들이 85% 정도의 성장을 보였을 때 venlafaxine(10uM)이 포함된 새로운 배양액으로 교체하여 각각 1시간, 6시간, 24시간, 72시간 동안 처리한 다음 HSP70 발현을 조사하였다(그림 1). 항-HSP70 단일클론항체를 이용하여 HSP70의 발현 정도를 조사한 결과, 대조군과 비교하여 venlafaxine으로 처리한 이후 1시간(P=0.027)에 HSP70의 발현이 의미 있게 증가하였으며, 이후 시간의 경과에 따라 감소하여 24시간 이후에는 대조군 수준 이하로 감소되는 경향을 나타냈다(표 2).

Table 1. Effects of dexamethasone on the expression of HSP70 in C6 glioma cells

Experimental group†	HSP70 value‡
Control group	100.0± 0.5
Dexamethasone group	92.4±10.1

†: The C6 glioma cells belong to control group were incubated with DMEM culture solution and the cells belong to dexamethasone group were incubated with dexamethasone for 6 hours, ‡: HSP70 values are the mean±SEM(n=5) of the percent change from 100% control group

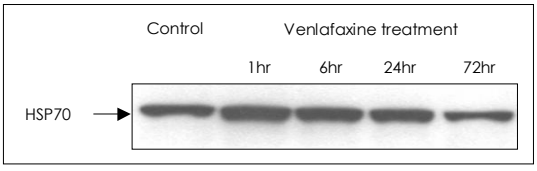

Fig. 1. HSP70 expression of C6 glioma cells treatment with venlafaxine for 1, 6, 24 and 72 hours. Crude extracts from control and venlafaxine-treated C6 glioma cells were separated on a 10% SDS-PAGE and probed with anti-HSP70mAb.

3. Venlafaxine과 dexamethasone의 동시 처리가 HSP70의 발현에 미치는 영향

Venlafaxine과 dexamethasone을 C6 glioma cell에 함께 처리하였을 때 HSP70 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포들이 85% 정도의 성장을 보였을 때 venlafaxine(10uM)과 dexamethasone(10uM)이 포함된 새로운 배양액으로 교체하여 1시간, 6시간, 24시간, 72시간 동안 배양하여 HSP70 발현을 조사하였다(그림 2).

Table 2. Effects of venlafaxine on the expression of HSP70 in C6 glioma cells

Experimental group†		HSP70 values‡
Venlafaxine group	1hr	122.6± 7.3*
	6hr	127.7±33.4
	24hr	88.8±14.4
	72hr	82.3± 9.7
Venlafaxine with dexamethasone group	1hr	161.6±31.1
	6hr	91.3±21.5
	24hr	96.2±10.8
	72hr	70.2± 2.7*

†: The C6 glioma cells belong to venlafaxine group were incubated with venlafaxine for 1, 6, 24, and 72 hours, and the cells belong to venlafaxine with dexamethasone group were incubated with venlafaxine and dexamethasone simultaneously for 1, 6, 24, and 72hours, ‡: HSP70 values are the mean±SEM(n=5) of the percent change from 100% control group, *: Significant difference from control group(p<0.05, paired samples t-test)

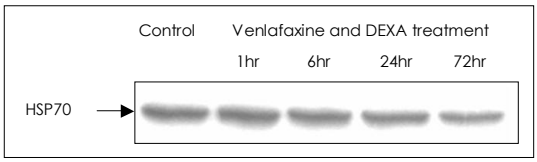

Fig. 2. HSP70 expression of C6 glioma cells treatment with venlafaxine and dexamethasone for 1, 6, 24 and 72hours. Crude extracts from control and venlafaxine on a 10% SDS-PAGE and probed with anti-HSP70mAb. DEXA: dexamethasone.

표 2에 나타낸 것처럼 대조군에 비하여 venlafaxine과 dexamethasone을 동시 처리한 이후 1시간에서는 HSP70의 발현이 증가되는 경향을 보였지만, 이후 급격히 감소하여 72시간(p=0.001)에서는 대조군에 비하여 의미 있게 감소되었다.

고 찰

세포에서 HSP는 분자적 샤프롱(molecular chaperone)의 기능을 하는데, 스트레스를 받지 않은 상태에서 HSP는 세포질과 핵내에 존재하는 heat shock transcription factor(HSF)라고 알려진 전사 인자(transcription factor)의 단량체(monomer)와 일대일 결합을 하여 HSP-HSF 복합체(complex)를 형성하고 있다. 세포에 스트레스가 가해져서 오중첩 단백질(misfolding protein)의 양이 증가하면 HSP는 이런 오중첩 단백질(misfolding protein)과 결합하면서 HSF로부터 떨어진다. HSP로부터 분리된 HSF는 삼합체(trimer)로 뭉쳐서 핵내로 이동하여 heat shock gene promotor에 위치한 heat shock element (HSE)와 결합하여 heat shock gene의 전사(transcription)를 활성화시킨다. 결과적으로 free HSP의 발현이 증가되면 HSF가 DNA로부터 떨어져서 단량체(monomer)로서 다시 HSP-HSF 복합체의 형성을 증가시키는 과정을 통하여 HSP 발현이 조절된다.[31] 특히 HSP70은 우울증의 병태생리와 밀접하게 연관되는데, HSP70 mRNA의 결손이 일부 우울증 환자에서 발견되지만 정상군이나 여타 질환을 가진 경우에서는 발견되지 않았으며,[11] 또한 HSP70은 우울증과 밀접한 관련을 가진 GR의 기능을 조절한다.[5)10)]

본 연구결과 venlafaxine을 C6 glioma 세포에 처리한 초기에는 HSP70의 발현이 증가하였다. 다만 venlafaxine을 단독으로 처리한 경우에는 1시간에서 HSP70의 발현이 의미 있게 증가하였던 반면, dexamethasone과 함께 처리한 경우에는 발현이 급격히 증가하는 경향을 보였으나 통계적 의미를 갖지는 못했다. 최근에 imipramine, amitriptyline, clomipramine, citalopram과 같은 삼환계 항우울제들이 여러 세포주에서 아포프토시스를 일으킨다고 보고되었고,[32-34] 선택적 serotonin 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitor ; 이하 SSRI)의 하나인 fluoxetine이 C6 glioma 세포에서 아포프토시스를 일으킨다고 보고 되었다.[32] 본 연구에서는 아포프토시스를 일으키지 않는 venlafaxine의 농도(10uM)를 선택하였으므로 세포의 아포프토시스까지는 일으키지 않았지만 1시간에서 HSP70의 발현이 증가된 것은 venlafaxine이 투여 초기에는 오히려 신경세포에 스트레스 인자로 작용할 가능성을 시사한다.

Venlafaxine을 장기간 처리한 경우에는 HSP70의 발현이 감소되었는데, dexamethasone과 함께 처리한 경우에는 72시간에서 의미 있게 감소되었으며, venalafaxine 단독으로 처리한 경우에는 감소되는 경향만을 나타냈다. 이처럼 venlafaxine의 장기적 처리에 의하여 HSP70의 발현을 감소시킬 수 있는 몇 가지 기전이 있다. 첫 번째는 venlafaxine이 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 유도를 통하여 HSF의 활동도를 감소시키는 기전이다. MAPK는 HSF의 부적 조절인자라는 연구결과가 있었으며,[35)36)] MAPK에 속하는 Extracellular signal-regulated kinases(ERKs)가 HSF를 비활성화시킨다고 보고 되었다.[37] 또한 최근에 Khawaja 등[30]은 C6 glioma 세포에서 venlafaxine을 3일간 처리한 이후 MAPK 경로의 p90Rsk, pCREB, pELK-1 등을 증가시킨다고 보고하였다. 즉, venlafaxine에 의해 상승된 MAPK 경로를 통하여 HSF가 억제되어 HSP70의 발현이 감소될 수 있다. 두 번째로 venlafaxine에 의한 GR의 전위 기전이다. Fluoxetine, milnacipran, clogyline 등 다양한 종류의 항우울제가 GR의 전위를 일으키는 것으로 알려져 있다.[38] 핵으로 전위된 GR은 HSF의 활동도를 억제시키며, 이와 함께 GR이 전위되는 과정에서 free HSP70이 상승되어 HSF의 삼합체화(trimerization) 과정을 억제시키는 부적 되먹임 과정을 통하여 HSP70의 수준이 감소될 수 있다. 따라서 venlafaxine이 GR을 핵내로 전위시키는 기전은 HSP70의 발현을 감소시킬 수 있다. 본 연구에서 Dexamethasone과 venlafaxine을 함께 처리한 경우에는 HSP70의 발현이 의미 있게 감소된 반면, dexamethasone이나 venlafaxine을 단독으로 처리했을 때는 HSP70의 발현에 의미 있는 변화가 없었다. 이런 결과는 venlafaxine이 GR을 전위시키는 기전을 통하여 HSP70의 발현을 감소시켰을 가능성을 시사한다.

결 론

본 연구에서는 흰쥐 C6 glioma 세포를 이용하여 venlafaxine 처리 후 HSP70의 발현을 조사하였다. 먼저 ven-

lafaxine을 단독으로 1, 6, 24, 72시간 동안 처리했을 때 HSP70의 발현 정도를 면역탁본법(immunoblot)을 이용해 조사하였다. 다음으로 생체에서 우울증 상태와 유사하게 venlafaxine과 dexamethasone을 1, 6, 24, 72시간 동안 동시에 처리했을 때 HSP70의 발현 양상을 비교 조사하였다.

본 연구결과 첫째로venlafaxine을 C6 glioma 세포에 처리한 초기에는 HSP70의 발현이 증가하였다. 다만 venlafaxine을 단독으로 처리한 경우에는 1시간에서 HSP70의 발현이 의미 있게 증가하였던 반면, dexamethasone과 함께 처리한 경우에는 발현이 급격히 증가하는 경향을 보였으나 통계적 의미는 갖지 못했다. 둘째로 Venlafaxine을 장기간 처리한 경우에는 HSP70의 발현이 감소되었는데, dexamethasone과 함께 처리한 경우에는 72시간에서 의미 있게 감소되었으며, venalafaxine 단독으로 처리한 경우에는 감소되는 경향만을 나타냈다.

본 연구는 venlafaxine이 단기적으로는 신경세포에 스트레스 인자로 작용하여 HSP70의 발현을 증가시키는 반면, 장기적으로는 HSP70의 발현을 감소시킨다는 새로운 기전을 제시한다.

중심 단어 : Venlafaxine · Dexamethasone · 열충격 단백질 70.

참고문헌

1. **Welch WJ.** How cells respond to stress. Sci Am 1993; 268:56-64.
2. **Craig EA, Weissman JS, Horwich AL.** Heat shock proteins and molecular chaperones: Mediators of protein conformation and turnover in the cell. Cell 1994;78:365.
3. **Hartl FU, Holden R, Langer T.** Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. Trends in Biochem Sci 1994;19:20.
4. **Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C.** The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press;1994. p.1-30.
5. **Kimmins S, MacRae TH.** Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins. Cell Stress Chaperones 2000;5:76-86.
6. **Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G.** Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochem Biophys Res Commun 2001;286:433-442.
7. **Pratt WB, Toft DO.** Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilins chaperones. Endocr Rev 1997;18:306-360.
8. **Parsell DA, Lindquist S.** The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Ann Rev Genet 1993;27:437-496.
9. **Sharp FR, Massa SM, Swanson RA.** Heat-shock protein protection. Trends Neurosci 1999;22:97-99.
10. **Rajapandi T, Greene LE, Eisenberg E.** The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. J Biol Chem 2000;275:22597-22604.
11. **Shimizu S, Nomura K, Ujihara M, Sakamoto K, Shibata H, Suzuki T, et al.** An alle-specific abnormal transcript of the heat shock protein 70 gene in patients with major depression. Biochem Biophys Res Commun 1996; 219:745-752.
12. **Takimoto T, Nakamura K, Uneo H, Matsuda M, Fukunishi I, Ameno K, et al.** Major depression and heat shock protein 70-1 gene. Clinica Chimica Acta 2003; 332:133-137.
13. **Yamada M, Kiuchi Y, Nara K, Kanda Y, Morinobu S, Momose K, et al.** Identification of a novel splice variant of heat shock cognate protein 70 after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex. Biochem Biophys Res Commun 1999;261:541-545.
14. **Tomitaka M, Tomitaka S, Rajdev S, Sharp FR.** Fluoxetine prevents PCP- and MK801-induced HSP70 expression in injured limbic cortical neurons of rats. Biol Psychiatry 2000;47:836-841.
15. **Holsboer F, Barden N.** Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. Endocr Rev 1996; 17:187-205.
16. **Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP.** Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. N Engl J Med 1988;319:413-420.
17. **Nemeroff CB.** The corticotrophin-releasing factor(CRF) hypothesis of depression: New findings and new directions. Mol Psychiatry 1996;1:336-342.
18. **Sapolsky RM.** Why stress is bad for your brain. Science 1996a;273:749-750.
19. **Sapolsky RM.** Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: the current state of confusion. Stress 1996b;1:1-19.
20. **Magarinos AM, McEwen BS.** Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Comparison of stressors. Neuroscience 1995;69:83-88.
21. **Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ.** A molecular and cellular theory of depression. Arch Gen Psychiatry 1997; 54:597-606.
22. **Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS.** Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein(CREB) in rat hippocampus, J Neurosci 1996;16:2365-2372.
23. **Rasenick MM, Chaney KA, Chen J.** G protein-mediated signal transduction as a target of antidepressant and anti-

bipolar drug action: evidence vfrom model systems. J Clin Psychiatry 1996;57:49-58.

24. **Thome J, Sakai N, Shin K, Steffen C, Zhang Y, Impey S, et al.** cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. J Neurosci 2000;20:4030-4036.
25. **Vielkind U, Walencewicz A, Levine JM, Bohn MC.** Type II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes. J Neurosci Res 1990;27:360-373.
26. **Chen J, Rasenick MM.** Chronic treatment of C6 glioma cells with antidepressant increases functional coupling between a G protein (Gs) and adenylyl cyclase. J Neurochem 64;1995:724-732.
27. **Fishman PH, Finberg JPM.** Effect of tricyclic antidepressant desipramine on beta-adrenergic receptors in cultured rat glioma C6 cells. J Neurochem 1987;49:282-289.
28. **Sathiyaa R, Campbell T, Vijayan MM.** Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2001;129:679-685.
29. **Pariante CM, Pearce BD, Pisell TL, Owens MJ, Miller AH.** Steroid-independent translocation of the glucocorticoid receptor by the antidepressant desipramine. Molecular Pharmacology 1997;52:571-581.
30. **Khawaja XZ, Storm S, Liang JJ.** Effects of venlafaxine on p90Rsk activity in rat C6-gliomas and brain. Neuroscience Letters 2004;372:99-103.
31. **Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K.** Transcriptional regulation of heat shock genes. J Biol Chem 1992;267: 21987-21990.
32. **Spanova A, Kovaru H, Lisa V, Lukasova E, Rittich B.** Estimation of apoptosis in C6 glioma cells treated with antidepressants. Physiol Res 1997;46:161-164.
33. **Xia Z, DePierre JW, Nassberger L.** The tricyclic antidepressants clomopramine and citalopram induce apoptosis in cultured human lymphocytes. J Pharm Pharmacol 1996;48:115-116.
34. **Xia Z, Karlsson H, DePierre JW, Nassberger L.** Tricyclic antidepressants induce apoptosis in human T lymphocytes. Int J Immunopharmacol 1997;19:645-654.
35. **Chu B, Soncin F, Price BD, Stevenson MA, Calderwood SK.** Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. J Biol Chem 1996;271:30847-30857.
36. **Mivechi NF, Giaccia AJ.** Mitogen activated protein kinase acts as a negative regulator of the heat shock response in NIH3T3 cells. Cancer Res 1995;55:5512-5519.
37. **Li DP, Periyasamy S, Jones TJ, Sanchez ER.** Heat and chemical shock potentiation of glucocorticoid receptor transactivation requires heat shock factor (HSF) activity: Modulation of HSF by vanadate and wortmannin. J Biol Chem 2000;275:26058-26065.
38. **Okuyama-Tamura M, Mikuni M, Kojima I.** Modulation of the human glucocorticoid receptor function by antidepressive compounds. Neuroscience Letters 2003;342: 206-210.