

DNA Microarray Analysis of Methylprednisolone Inducible Genes in the PC12 Cells

Woo Jin Choi, Seung-Won Choi, Seon-Hwan Kim, Youn Kim and O-Yu Kwon^{1,†}

Department of Neurosurgery, Chungnam National University Hospital, Daejeon 301-721, Korea

¹*Department of Anatomy, Chungnam National University Medical School, Daejeon 301-747, Korea*

Methylprednisolone is a synthetic glucocorticoid which is usually taken intravenously for many neurosurgical diseases which cause edema including brain tumor, and trauma including spinal cord injury. Methylprednisolone reduces swelling and decreases the body's immune response. It is also used to treat many immune and allergic disorders, such as arthritis, lupus, psoriasis, asthma, ulcerative colitis, and Crohn's disease. To identify genes expressed during methylprednisolone treatment against neurons of rats (PC12 cells), DNA microarray method was used. We have isolated 2 gene groups (up- or down-regulated genes) which are methylprednisolone differentially expressed in neurons. Lipocalin 3 is the gene most significantly increased among 772 up-regulated genes (more than 2 fold over-expression) and Aristaless 3 is the gene most dramatically decreased among 959 down-regulated genes (more than 2 fold down-expression). The gene increased expression of Fgb, Thbd, Cfi, F3, Kng1, Serpine1, C3, Tnfrsf4 and Il8rb are involved stress-response gene, and Nfkbia, Casp7, Pik3r1, Il1b, Unc5a, Tgfb2, Kitl and Fgf15 are strongly associated with development. Cell cycle associated genes (Mcm6, Ccnb2, Plk1, Ccnd1, E2f1, Cdc2a, Tgfa, Dusp6, Id3) and cell proliferation associated genes (Ccl2, Tnfsf13, Csf2, Kit, Pim1, Nr3c1, Chrm4, Fos1, Spp1) are down-regulated more than 2 times by methylprednisolone treatment. Among the genes described above, 4 up-regulated genes are confirmed those expression by RT-PCR. We found that methylprednisolone is related to expression of many genes associated with stress response, development, cell cycle, and cell proliferation by DNA microarray analysis. However, We think further experimental molecular studies will be needed to figure out the exact biological function of various genes described above and the physiological change of neuronal cells by methylprednisolone. The resulting data will give the one of the good clues for understanding of methylprednisolone under molecular level in the neurons.

Key Words: Methylprednisolone, PC12 cells, DNA microarray

각종 생명체의 genome 프로젝트 연구가 끝나면서, 생명체의 DNA 염기서열 자체의 정보는 급속한 증가를 보이고 있다. DNA의 염기서열만으로는 유전자의 생체 내 기능을 알 수 없기에 최근에 post-genome 연구로 유전자의 생체 내 기능을 효율적으로 해석하기 위한 새로운 방법이 필요하게 되었다. 그 중에서 가장 대표적인 것이 DNA microchip이다 (Price et al., 2009). 본 실험에 사용되는 methylprednisolone (Solu-Medrol[®], Pharmacia 코리아)는 항염 스테로이드 (steroid) 제제로서 prednisolone 보다 항염

작용이 더 좋으며 나트륨 및 수분의 지류도 적은 것으로 알려져 있다. 이 약제는 뇌종양이나 기타 원인으로 인한 뇌부종의 치료 및 척수 손상 등의 치료에 널리 사용되고 있다 (Akhtar et al., 2009). 그러나 methylprednisolone에 의한 세포 내 생리 변화에 관한 정보는 거의 전무한 상태로, 여기에서는 DNA chip 기술을 이용하여 백서의 PC12 세포에 methylprednisolone을 처리하여 변화하는 유전자 발현의 변화를 연구하였다. 즉, PC12 세포에 methylprednisolone 처리에 따라서 특이적으로 up/down-regulation 되는 유전자를 DNA microchip을 사용하여 탐색하였다.

*Rattus norvegicus*의 pheochromocytoma에서 유래한 PC12 신경세포를 10% 마혈청과 5% 우혈청이 함유된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 배양기는 37°C, 5% 이산화탄소, 90% 이상의 습도가 유지되는 환경으로 조건을 맞

*접수일: 2009년 8월 21일 / 수정일: 2009년 9월 11일

채택일: 2009년 9월 15일

†교신저자: 권오유, (우) 301-747 대전광역시 중구 문화동 6, 충남대학교 의학전문대학원 해부학교실

Tel: 042-580-8006, Fax: 042-586-4800

e-mail: oykwon@cnu.ac.kr

추고, 배지를 2~3일마다 교환하고, 7~10일 마다 passage 하였다. PC12 세포를 6-well plate에 splitting하여 하루 동안 배양한 후 80% 이상의 세포 증식도를 보일 때 methylprednisolone를 최종농도 4 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 16시간 동안 정상적인 배양 조건에서 처리하였다. 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)로 3회 세척 후 세포의 형태학적인 변화를 관찰하였고, 위의 농도에서는 어떤 세포의 형태학적 변화도 없었다. Total RNA의 분리에는 RNAzol-B Kit (TEL-TEST, Inc. TX, USA)를 사용하였다 (Yang et al., 2009). 본 실험에서 사용된 Operon Rat Whole 27 K Oligo chip은 Operon사에서 보유하고 있는 Rat Whole Genome Oligo subsets V3.0 중 Exon sequence oligo (22,167개), transcript sequence oligo (4,795개)와 chip의 quality 확인과 normalization을 위하여 control sample (1,070개)이 점적되어 있다. PC12 세포에서 methylprednisolone 처리에 의해서 특이적으로 발현하는 유전자를 DNA microarray로 탐색하였다. 이 결과를 재확인하기 위하여 up-regulation 되는 4종류의 유전자를 선택하여 RT-PCR로 발현을 재확인 하였다.

총 1,731개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상의 over-/down-expression 발현 변화를 나타냈다. Fgb, Thbd, Cfi, F3, Kng1, Serpine1, C3, Tnfrsf4, Il8rb gene 등의 stress response (GO : 6950, P-value: 1.39e-6)에 관여하는 유전자들 및 Fyn, Nfkbia, Casp7, Pik3r1, I11b, Unc5a, Tgfb2, Kitl, Fgf15 gene 등의 development (GO : 7275, p-value: 4.4e-5)에 관여하는 유전자들을 포함하여 772개의 유전자들이 2 fold 이상 over-expression을 나타냈다. 그리고 가장 강하게 발현하는 Lipocalin 3을 포함하여 Fatty acid-binding protein 4, Orosomucoid 1, Sodium Channel, Voltage-gated, Type III, Beta Subunit, Prostaglandin D2 synthase는 20 fold를 넘을 정도로 강한 over-expression을 보였다. Mcm6, Ccnb2, Plk1, Cend1, E2f1, Cdc2a, Tgfa, Dusp6, Id3 gene 등의 cell cycle (GO : 7049, p-value: 5.02e-10)에 관여하는 유전자들 및 Ccl2, Tnfsf13, Csf2, Kit, Pim1, Nr3c1, Chm4, Fosl1, Spp1 gene 등의 cell proliferation (GO : 8283, p-value: 3.04e-9)에 관여하는 유전자들을 포함하여 959개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상의 down-expression을 나타냈다. 그리고 Hypothetical gene supported by NM-138881을 포함하여 aristaless 3, Lysyl oxidase-like 1, matrix metalloproteinase는 20 fold를 넘을 정도로 강한 down-expression을 보였다. Methylprednisolone에 의해 up-regulation되는 대표적인 4종류의 유전자

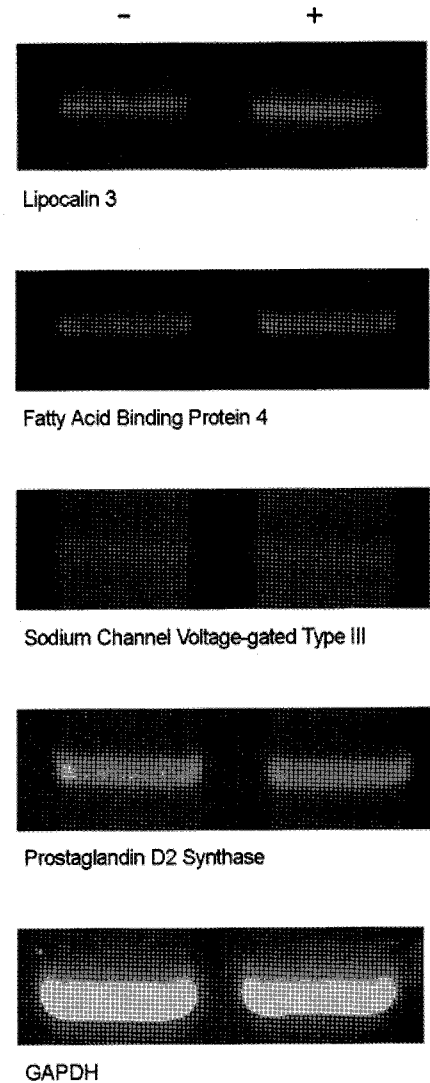


Fig. 1. The result of RT-PCR. Without treatment (+) and treatment (-) of methylprednisolone, RT-PCR primers used in this experiment are; Lipocalin 3 (F-ggacaatggtaccctgaacg, R-ttaagctgcccactttgctt), Fatty acid binding protein 4 (F-agcccaactgatcatcage, R-tcgactttccatcccacttc), Sodium channel voltage-gated type III (F-agatgtggcatggatgaat, R-gaatcgagggtcacaggagt), Prostaglandin D2 synthase (F-ggttcgggagaagaagag, R-cactgagagggtggaagc), GAPDH (F-gatggcacttctgatggt, R-cccagttcattcacattca). The conditions of RT-PCR is described above.

(Lipocalin 3, Fatty acid binding protein 4, Sodium channel voltage-gated type III, Prostaglandin D2 synthase)를 선택하여 RT-PCR로 발현을 확인한 결과, methylprednisolone 처리 후 이들 유전자들의 발현이 control에 비하여 증가되는 것이 재확인되었다 (Han et al., 2009; Malo et al., 1991; Miyawaki et al., 1994; Vural et al., 2008).

PC12 신경세포에 methylprednisolone을 처리하여 DNA microarray 방법으로 control sample에 대비한 유전자 발현

변이를 확인한 바, 총 1,731개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상 발현 변이를 나타내었으며, 그 중 stress response 및 development에 관여하는 유전자들을 포함하여 772개의 유전자들이 2 fold 이상 over-expression을 나타냈고, cell cycle에 관여하는 유전자들 및 cell proliferation에 관여하는 유전자들을 포함하여 959개의 유전자들이 2 fold 이상 down-expression을 나타냈다. 이와 같이 methylprednisolone은 신경세포의 apoptosis pathway 유도 및 감염 저항성의 유도를 위하여 stress response 및 development에 관여하는 유전자 발현을 증강시켜 신경세포의 급격한 환경변화에 적응하고, cell proliferation, cell cycle 과정에서 elastic fiber와 extracellular matrix의 생합성을 조절함으로써 세포의 항상성을 유지한다는 사실을 DNA microarray 실험으로 알아냈다. 이와 같은 결과는 신경세포에서는 처음으로 보고되는 것이며, 이는 향후 methylprednisolone이 여러 종류의 유전자 발현을 통하여 신경세포 생리를 유지하는 분자 기전을 연구할 수 있는 새로운 기회를 제공할 수 있을 것이다. 추후 연구에서는 이들 개별 유전자들 혹은 복합적인 유전자들의 발현 기전을 통하여, 신경세포에서 methylprednisolone에 의해서 유도되는 특이적인 기능을 이해할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 20070401034024)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

Akhtar AZ, Pippin JJ, Sandusky CB. Animal studies in spinal cord

- injury: a systematic review of methylprednisolone. *Altern Lab Anim*. 2009. 37: 43-62.
- Han F, Takeda K, Ishikawa K, Ono M, Date F, Yokoyama S, Furuyama K, Shinozawa Y, Urade Y, Shibahara S. Induction of lipocalin-type prostaglandin D synthase in mouse heart under hypoxemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. 385: 449-453.
- Malo D, Schurr E, Dorfman J, Canfield V, Levenson R, Gros P. Three brain sodium channel alpha-subunit genes are clustered on the proximal segment of mouse chromosome 2. *Genomics* 1991. 10: 666-672.
- Miyawaki A, Matsushita F, Ryo Y, Mikoshiba K. Possible pheromone-carrier function of two lipocalin proteins in the vomeronasal organ. *EMBO J*. 1994. 13: 5835-5842.
- Price CW, Leslie DC, Landers JP. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab Chip* 2009. 9: 2484-2494.
- Vural B, Atalar F, Ciftci C, Demirkan A, Susleyici-Duman B, Gunay D, Akpınar B, Sagbas E, Ozbek U, Buyukdevrim AS. Presence of fatty-acid-binding protein 4 expression in human epicardial adipose tissue in metabolic syndrome. *Cardiovasc Pathol*. 2008. 17: 392-398.
- Yang YM, Kim SW, Kwon OY. Analysis of Genes Regulated by HSP90 Inhibitor Geldanamycin in Neurons. *J Exp Biomed Sci*. 2009. 15: 97-99.