ORIGINAL ARTICLE
ISSN 1225-8709 / eISSN 2005-7571
Korean J Biol Psychiatry 2013;20:159-165

리튬 및 발프로에이트 병용 처치가 PC12 세포에서 ERK1/2 인산화와 *ELK1* 및 *C-FOS* 전사활성에 미치는 영향

서울대학교병원 정신건강의학과,[1] 서울대학교 의학연구원 인간행동의학연구소,[2] 분당서울대학교병원 정신건강의학과,[3] 서울대학교 의과대학 정신과학교실,[4] 건국대학교 생명과학과[5]
차승근[1] · 김세현[2] · 하규섭[2,3,4] · 신순영[5*] · 강웅구[1,2,4*]

Effects of Combined Treatments of Lithium and Valproate on the Phosphorylation of ERK1/2 and Transcriptional Activity of *ELK1* and *C-FOS* in PC12 Cells

Seung Keun Cha, MD,[1] Se Hyun Kim, MD,[2] Kyooseob Ha, MD,[2,3,4] Soon Young Shin,[5*] Ung Gu Kang, MD[1,2,4*]

[1]Department of Neuropsychiatry, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea
[2]Institute of Human Behavioral Medicine, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea
[3]Department of Neuropsychiatry, Bundang Seoul National University Hospital, Seongnam, Korea
[4]Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea
[5]Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul, Korea

Objectives Mechanisms of clinical synergistic effects, induced by co-treatments of lithium and valproate, are unclear. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) has been suggested to play important roles in mechanisms of the action of mood stabilizers. In this study, effects of co-treatments of lithium and valproate on the ERK1/2 signal pathway and its down-stream transcription factors, *ELK1* and *C-FOS*, were investigated *in vitro*.

Methods PC12 cells, human pheochromocytoma cells, were treated with lithium chloride (30 mM), valproate (1 mM) or lithium chloride + valproate. The phosphorylation of ERK1/2 was analyzed with immunoblot analysis. Transcriptional activities of *ELK1* and *C-FOS* were analyzed with reporter gene assay.

Results Single treatment of lithium and valproate increased the phosphorylation of ERK and transcriptional activities of *ELK1* and *C-FOS*, respectively. Combined treatments of lithium and valproate induced more robust increase in the phosphorylation of ERK1/2 and transcriptional activities of *ELK1* and *C-FOS*, compared to those in response to single treatment of lithium or valproate.

Conclusions Co-treatments of lithium and valproate induced synergistic increase in the phosphorylation of ERK1/2 and transcriptional activities of its down-stream transcription factors, *ELK1* and *C-FOS*, compared to effects of single treatment. The findings might suggest potentiating effects of lithium and valproate augmentation treatment strategy.

Key Words Mood stabilizers · Mitogen-activated protein kinase · Augmentation · Transcription factors.

Received: September 5, 2013 / **Revised:** September 17, 2013 / **Accepted:** September 17, 2013
Address for correspondence: Ung Gu Kang, MD
Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Seoul National University College of Medicine, 101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel: +82-2-2072-2296, **Fax:** +82-2-744-7241, **E-mail:** kangug@snu.ac.kr
Address for correspondence: Soon Young Shin, MD
Department of Biological Sciences, Konkuk University, 20-1 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 143-729, Korea
Tel: +82-2-2030-7946, **Fax:** +82-2-3437-9781, **E-mail:** shinsy@konkuk.ac.kr
*Soon Young Shin and Ung Gu Kang equally contributed to this study as corresponding authors.

서 론

리튬(lithium)과 발프로에이트(valproate)는 대표적인 기분 조절제로서, 양극성장애의 급성기 및 유지기에 쓰이며, 삽화에 관계없이 일차, 이차 치료제로 쓰인다.[1)2)] 뿐만 아니라, 여러 가지 약제와 병용 투여되기도 한다. 주로, 비정형 항정신병약

Copyright © 2013 Korean Society of Biological Psychiatry

물제, 다른 종류의 기분조절제, 그리고 항우울제와 병용되고 있다.[3] 실제 임상에서, 한 가지 약물만을 단독 투여해서는 충분한 효과를 얻지 못하기 때문에 병용 투여를 하는 경우가 있다.[4)5)] 그 중에서 리튬과 발프로에이트의 병용 투여를 하는 경우는 대개 일차 치료에 실패하였을 때 많이 시도되고 있다.[3] 리튬과 발프로에이트의 병용 투여가 양극성장애 1형 환자군에서 발프로에이트 단독 투여에 비해 기분삽화 재발의 위험률이 감소한다고 알려지기도 했다.[6]

리튬 및 발프로에이트의 치료 기전과 관련된 세포내 신호전달 기전들이 알려져 왔다. 리튬은 glycogen synthase kinase 3(이하 GSK-3)을 억제한다.[7] GSK-3의 억제는 세포예정사(apoptosis)를 방지하여 신경세포에 안정성을 부여한다.[8] 리튬은 phosphoinositol(이하 PI)/Akt 경로를 활성화시켜 신경세포보호작용을 하며,[8)9)] N-methyl-D-aspartate(이하 NMDA) 수용체의 작용을 억제하여 흥분독성(excitotoxicity)을 막고 신경세포를 보호한다.[10)11)] 그리고 리튬은 extracellular signal-regulated kinase 1/2(이하 ERK1/2)를 비롯한 mitogen activated protein kinase(이하 MAPK) 신호전달경로에 작용하여 신경세포보호작용을 일으키는 전사인자의 활성을 증가시킨다.[8)12)13)]

발프로에이트도 PI/Akt 경로 활성화, GSK-3 억제 작용을 하는 것으로 알려져 있고,[9)14)] histone deacetylase(이하 HDAC)를 억제하여 염색질 리모델링(chromatin remodelilng)을 일으킨다.[15)] 또한 ERK1/2, p38과 같은 MAPK의 인산화를 촉진시켜 신경세포보호작용을 유도한다.[16)] 요약하면, 리튬과 발프로에이트는 다양한 신호전달경로에 작용하여 신경세포보호작용을 통해 치료효과에 기여할 것으로 보인다.

리튬과 발프로에이트, 각각의 분자생물학적 기전은 여러 가지 밝혀져 있지만 함께 투여되었을 때의 작용에 대해서는 알려져 있는 바가 적다. 공통적으로 작용하는 경로는, PI/Akt/GSK-3B 경로, Wnt/β-catenin 경로 및 MAPK/ERK kinase(이하 MEK)/ERK 경로가 있다.[17-20)]

이 중에서도 ERK1/2는 MAPK의 일종으로 세포 증식, 분열, 발달 및 암의 발생에 중요한 역할을 하며, 세포주기 조절에 관여한다.[21)] 중추신경계의 분화를 마친 신경세포에 작용하여, 외부 자극에 대한 반응을 조절한다.[22)] ERK1/2는 장기강화(long-term potentiation) 유발을 통해 기억 및 학습에 작용하며,[22-24)] 신경돌기(dendritic spines)에서 국소적으로 단백질의 합성을 증진시켜서 신경돌기의 형성 및 유지한다. 이는 시냅스 연접을 생성하고 강화하는 데 있어서 중요한 역할을 하며, 이를 통해 학습과 기억에 작용한다.[25)26)] 리튬, 발프로에이트와 같은 기분조절제뿐 아니라, 클로자핀(clozapine), 할로페리돌(haloperidol)과 같은 항정신병제가 ERK1/2의 작용에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며,[27-30)] 기분상태와 연관된 행동에 관여하는 것으로 생각된다.[12)] 실제로 기분조절장애가 있던 환자의 사후 뇌조직을 조사해본 결과, ERK1/2 신호전달경로의 활성화 정도가 달라져 있었다는 보고가 있다.[31)32)]

종합하면, 기분조절제의 작용 기전으로서 ERK1/2의 역할이 시사되며, 양극성장애 환자의 뇌 및 동물모델에서의 ERK1/2 신호전달계의 이상이 시사되고 있다. 이는 세포 수준에서 신경세포의 사멸, 분화, 생존과 같은 운명 결정, 신경돌기 형성, 장기강화 과정 및 세포주기 조절 등의 ERK1/2 신호전달계 기능의 관련성을 시사하는 바이다.

본 연구에서는 리튬과 발프로에이트의 단독 또는 병용 처치가 ERK1/2의 인산화와 하위 전사인자인 *ELK1*과 *C-FOS*의 전사능에 미치는 영향을 분석하였다. 이를 통해 리튬 및 발프로에이트 단독 및 병용 처치가 미치는 영향을 비교 분석하고자 하였다.

방 법

세포주 배양

PC12 세포주는 RPMI 1640(Life Technologies, Inc.) 배지에 10%의 열-비활성화된(heat-inactivated) 신생우아혈청(fetal calf serum)(HyClone, Logan, UT, USA), 2 mg/mL glucose, 292 mg/mL L-glutamine, penicillin(100 units/mL), streptomycin (0.1 mg/mL)을 첨가하여 5%의 CO_2와 95%의 air 조건에서 37℃에서 배양하였다. 세포는 48시간 간격으로 배지를 교체해 주었으며, 3~5일에 한 번 1 : 4로 계대 배양하였다.

전기영동 및 면역블롯

8~10% polyacrylamide(acrylamide : bisacrylamide = 2 : 1) 젤을 사용하였으며, Laemmli의 방법에 따라 전기영동하였다. 각 lane당 총 단백질 양으로서 50 μg의 시료를 사용하였다. 전기영동 후 메탄올을 20% 포함하는 Tris-Glycin 완충액 속에서 nitrocellulose 막에 단백질을 옮겼다. 그 후 Ponceau-S 염색하여 막에 단백질이 균질하게 옮겨졌는지를 확인하고, Tween-20을 0.1% 포함하는 Tris 완충 식염수(TBS-T)에 녹인 5% 탈지분유 액에서 1시간 차단(blocking)하였다. 이후 1 : 1000으로 희석한 anti-p-ERK1/2(Thr202/Tyr204)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), ERK(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)으로 4℃에서 16시간 동안 1차항체 반응을 시켰다. 이후 막을 TBS-T로 3회 씻고 1 : 1000으로 희석한 horseradish peroxidase결합 2차항체로 1시간 반응시켰다. 2차항체 반응 뒤 역시 막을 씻고, ECL-

detection reagent(Amersham, Piscataway, NJ, USA)로 발광하게 한 후 X-ray 필름에 감광시켜 현상하였다. 면역블롯 신호는 TINA program version 2.10G(Raytest, Straubenhardt, Germany)을 이용하여 정량화하였으며, ERK1/2 인산화 값은 ERK 전체 단백질 값에 대한 비율을 구하여 통계 분석에 사용하였다.

플라스미드

전사촉진(*Trans*-activator) 플라스미드로써 GAL4 DNA binding domain(이하, DBD)-cFOS 단백질을 인코딩(encoding)하는 pFA2-cFOS와 GAL4 DBD-ELK1 단백질을 인코딩하는 pFA2-Elk1를 사용하였다. 그리고 리포터(reporter) 플라스미드로써 5번 반복되는 GAL4 binding element와 luciferase 유전자를 가지고 있는 pFR-Luc를 사용하였다. 이 두 가지 플라스미드는 Stratagene사(La Jolla, CA, USA) 제품을 사용하였다. pRL-null 플라스미드와 firefly, Renilla Dual-Glo™ Luciferase Assay System은 Promega사(Madison, WI, USA)의 제품을 사용하였다.

일시적 형질감염(transient transfection), 리포터 유전자 분석(reporter gene assay)

ERK1/2 하위 전사인자 활성도의 분석을 위해서 Stratagene사의 PathDetect® *in vivo* signal transduction pathway reporting system을 사용하였다. pFA2-Elk1(50 ng)과 pFA2-cFOS(50 ng)은 각각 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada)을 이용하여 pFR-Luc(0.5 g)와 같이 PC12 세포주에 형질감염시켰다. 형질감염의 효율성을 보기 위해, Renilla luciferase를 인코딩하는 pRL-null 플라스미드 50 ng을 모든 표본에 넣었다. 세포주를 24시간 동안 형질감염시킨 후에, 12시간 동안 각각 리튬(30 mM), 발프로에이트(1 mM)로 처리한 두 그룹과 리튬과 발프로에이트를 병용 처치한 한 그룹을 만들었다. 이후, 각 그룹을 냉동-해동 3사이클을 시행하여 단백질 추출물을 얻었다. Firefly와 Renilla luciferase 활성도는 제조사의 설명에 따라 luminometer(Centro LB960 ; Berthold Tech, Bad Wildbad, Germany)를 이용한 Dual-Glo™ Luciferase Assay System(Promega, Madison, WI, USA)을 써서, 단일 표본씩 순차적으로 측정하였다. Firefly luciferase 활성도는 Renilla luciferase 활성도로 정규화(normalize)하였고 아무런 처리를 하지 않은 세포의 luciferase 활성도를 1로 설정하였다.

통계분석

정량화된 면역 블롯 신호값 및 luciferase 전사 활성도 값을 이용하여 통계 분석을 수행하였다. 리튬, 발프로에이트 단독 처치 및 병용 처치의 효과에 대한 분석을 위해서 이원분산분석(two-way analysis of variance)을 수행하고, Tukey 사후분석을 통해 각 군 간의 차이를 분석하였다. 통계분석은 SPSS for Windows version 19.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였으며, 유의수준을 $p < 0.05$로 하였다.

결 과

리튬과 발프로에이트 처치에 따른 ERK1/2의 인산화 변화

리튬 및 발프로에이트에 의한 ERK1/2 T202/Y204 활성화 잔기의 급성 인산화 변화를 면역블롯을 통해 분석하였다. 약물 처치 15분 후 리튬 및 발프로에이트는 각각 ERK1/2 인산화 수준의 증가를 유발하였다. 리튬과 발프로에이트의 병용 처치는 ERK1/2 인산화 수준의 더 큰 증가를 유발하였다. 발프로에이트, 리튬은 각각 ERK1/2 인산화 수준에 유의한 영향을 주었으며($F = 18.372$, $p = 0.015$; $F = 30.324$, $p = 0.008$), 리튬 및 발프로에이트의 유의한 상호작용 영향 역시 확인되었다($F = 26.872$, $p = 0.022$). 평균 분석 결과, 리튬 및 발프로에이트 단독 처치, 그리고 리튬과 발프로에이트의 병용 처치는 각각 대조군에 비해 ERK1/2 인산화 수준을 유의하게 증가시켰으며(각 $p = 0.026$, $p = 0.012$, $p < 0.001$), 리튬과 발프로에이트의 병용 처치는 발프로에이트 및 리튬의 단독 처치군에 비하여 ERK1/2 인산화 수준의 유의한 증가를 유발하였다(각 $p = 0.023$, $p = 0.010$)(Fig. 1).

즉, 리튬 및 발프로에이트는 PC12 세포주에서 각각 ERK1/2 인산화의 증가를 유발하였으며, 두 약물의 병용 처치는 ERK1/2 인산화 증가에 있어서 상호적인 상승작용을 유발하였다.

리튬과 발프로에이트 처치에 따른 ERK1/2 경로의 전사인자 활성 변화

리튬 및 발프로에이트 단독 및 병용 처치에 의한 *ELK1* 및 *C-FOS*의 전사활성 변화를 분석하였다. 이원분산분석 결과, 리튬 및 발프로에이트는 각각 *ELK1* 전사 활성에 유의한 영향을 주었으며($F = 167.270$, $p < 0.001$; $F = 33.697$, $p < 0.001$), 리튬 및 발프로에이트의 상호작용 역시 유의하였다($F = 32.641$, $p < 0.01$). *ELK1* 전사활성 평균 비교 분석 결과, 리튬은 대조군에 비해 *ELK1* 전사활성을 유의하게 증가시켰으며($p = 0.001$), 리튬과 발프로에이트 병용 처치는 대조군에 비해 *ELK1*의 전사 활성을 유의하게 증가시켰다($p < 0.001$). 발프로에이트 및 리튬 단독 처치에 비해서도 유의한 *ELK1* 활성 증가를 유발하였다(모두 $p < 0.001$)(Fig. 2).

C-FOS 전사 활성의 경우, 리튬 및 발프로에이트는 각각 유

의한 영향을 주었으며 *C-FOS* 전사 활성 변화에 유의한 영향을 주었으며(F = 560.450, p < 0.001 ; F = 402.995, p < 0.001), 리튬 및 발프로에이트의 유의한 상호작용 영향이 있었다(F = 317.029, p < 0.01). *C-FOS* 전사활성 평균 비교 분석 결과, 발프로에이트 및 리튬은 대조군에 비해 *C-FOS* 전사활성을 유의하게 증가시켰으며(각, p = 0.032, p < 0.001), 리튬과 발프로에이트 병용 처치는 대조군에 비해 *C-FOS* 전사 활성을 유의하게 증가시켰다(p < 0.001). 발프로에이트 및 리튬 단독 처

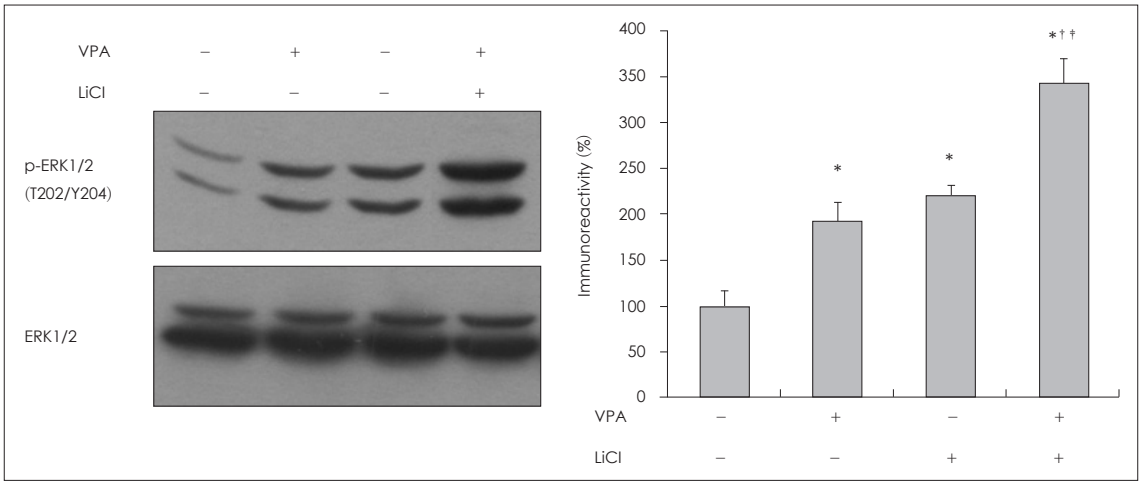

Fig. 1. The immunoreactivity of p-ERK1/2 (T202/Y204) in response to treatments of lithium and/or valproate in PC12 cells. Immunoblot analysis was performed to examine the changes in the immunoreactivity of p-ERK1/2 (T202/Y204) in response to treatments of LiCl (30 mM) and/or VPA (1 mM) in PC12 cells. LiCl and VPA increased the immunoreactivity of p-ERK1/2 (T202/Y204) in PC12 cells, respectively. The co-treatment of LiCl and VPA induced more robust increase in the immunoreactivity of p-ERK1/2 (T202/Y204) in PC12 cells. Total level of ERK was not affected by the treatments of LiCl and/or VPA. Demonstrated immunoblot figures are representative ones of three independent experiments. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were indicated as ∗ : compared to control group, † : compared to VPA-treated group, and ‡ : compared to LiCl-treated group, respectively. VPA : valproate, LiCl : lithium chloride.

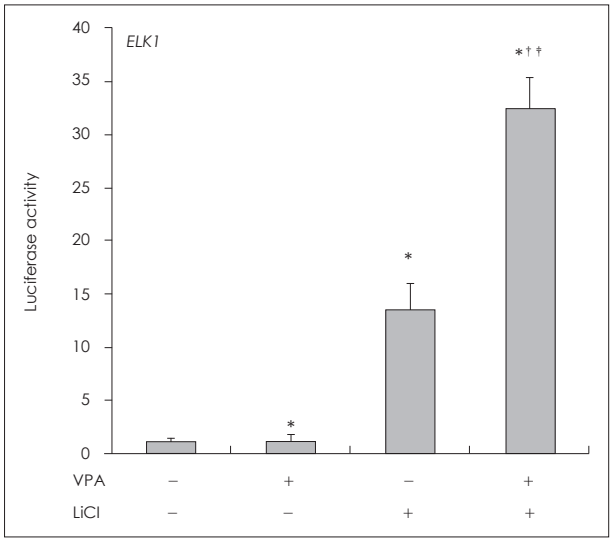

Fig. 2. The transcriptional activity of *ELK1* in response to treatments of lithium and/or valproate in PC12 cells. Reporter gene assay was performed to examine the changes in the transcriptional activity of *ELK1* in response to treatments of LiCl (30 mM) and/or VPA (1 mM) in PC12 cells. Compared to the control group, the VPA-treated group didn't increase the transcriptional activity of *ELK1*, but the LiCl-treated group increased the transcriptional activity of *ELK1*. The co-treatment of LiCl and VPA induced more robust increase in the transcriptional activity of *ELK1*. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were indicated as ∗ : compared to control group, † : compared to VPA-treated group, and ‡ : compared to LiCl-treated group, respectively. VPA : valproate, LiCl : lithium chloride.

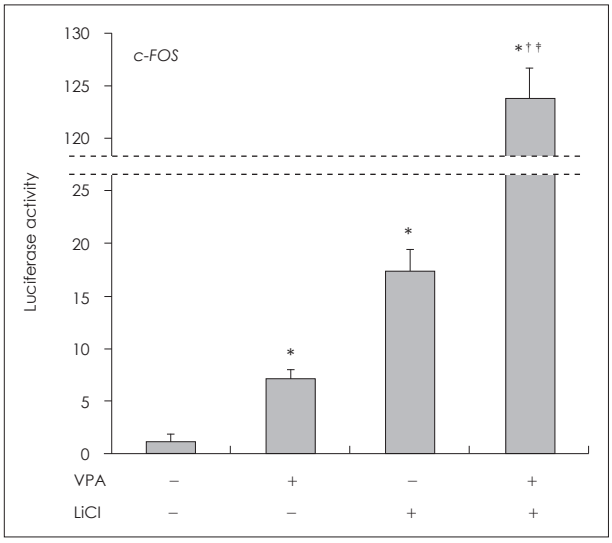

Fig. 3. The transcriptional activity of *C-FOS* in response to treatments of lithium and/or valproate in PC12 cells. Reporter gene assay was performed to examine the changes in the transcriptional activity of *ELK1* in response to treatments of LiCl (30 mM) and/or VPA (1 mM) in PC12 cells. Compared to the control group, the VPA-treated group increased the transcriptional activity of *C-FOS* and the LiCl-treated group increased the transcriptional activity of *C-FOS* more than the VPA-treated group. The co-treatment of LiCl and VPA induced more robust increase in the transcriptional activity of *C-FOS*. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were indicated as ∗ : compared to control group, † : compared to VPA-treated group, and ‡ : compared to LiCl-treated group, respectively. VPA : valproate, LiCl : lithium chloride.

치에 비해서도 유의한 *C-FOS* 전사 활성 증가를 유발하였다 (모두 $p < 0.001$)(Fig. 3).

즉, 리튬 및 발프로에이트는 PC12 세포주에서 각각 *ELK1*과 *C-FOS* 전사 활성을 증가시켰으며, 두 약물의 병용 처치는 *ELK1*과 *C-FOS* 전사 활성 증가에 있어서 상호적인 상승작용을 유발하였다.

고 찰

리튬과 발프로에이트 병용 투여는 세포주에서 ERK1/2 인산화 및 *C-FOS*와 *ELK1* 전사 활성 증가에 있어서 단독 투여에 비해서 유의하게 높은 수준의 증가를 유발하였다. 양극성장애 치료 임상 현장에서 리튬과 발프로에이트 병용 투여가 실제로 이루어지고 있지만, 관련 분자 기전에 대한 연구는 제한적이다. 본 연구에서는 리튬과 발프로에이트 병용 투여가 ERK1/2 신호전달계 활성화에 있어서 상호적인 상승작용을 유발함을 시사한다.

리튬과 발프로에이트의 작용 기전에 있어서 ERK1/2 신호전달계의 중요 역할이 시사되어 왔다. 리튬과 발프로에이트가 ERK1/2의 인산화를 증가시킨다는 기존 연구결과가 보고되어 왔다. 리튬과 발프로에이트는 각각 SH-SY5Y 세포주, 동물의 대뇌 겉질 신경세포/해마 전구세포(progenitor cell) 및 사람의 내피세포(endothelial cell)에서 ERK1/2의 인산화를 증가시켰다.[27)33-36)] 본 연구에서도 리튬과 발프로에이트의 단독 처치에 의한 ERK1/2의 인산화 증가를 확인하였다. ERK1/2의 인산화 증가는 ERK1/2 신호전달계의 활성화를 의미한다. 이와 동반하여, ERK1/2에 의해 활성이 조절되는 하위 전사인자 *ELK1*과 *C-FOS*의 전사활성 증가를 확인하였다.

리튬과 발프로에이트를 병용 처치하였을 때, ERK1/2 신호전달계에 미치는 영향을 분석한 기존의 연구 결과는 없으나, 본 연구에서는 ERK1/2의 인산화 증가가 단독 처치에 비해서 더 높은 수준의 증가를 유발함을 확인하였고 하위 전사인자인 *ELK1*과 *C-FOS*의 전사활성도 단독 처치에 비해서 더 높은 수준의 증가가 유발함을 확인하였다. 즉, 리튬 및 발프로에이트의 병용 처치가 ERK1/2 신호전달계의 활성화 작용에 있어서 상호적인 상승작용을 유발함을 확인하였다.

인산화된 ERK1/2는 하위전사인자의 전사 활성을 통해 세포의 기능에 작용한다.[37)] 활성화된 *ELK1*과 *C-FOS*는 다른 유전자의 전사를 활성화하여 세포의 성장, 분화, 생존, 혈구세포생성, 혈관생성 및 상처치유에 관여한다.[38)39)] 본 연구 결과는, 리튬과 발프로에이트의 병용 투여가 이러한 세포의 기능을 더 크게 증가시킬 가능성을 제시한다.

신경세포보호능은 ERK1/2 신호전달계의 영향을 받는 기능 중 하나이다. ERK1/2에 활성화에 의한 하위 전사인자의 전사활성 증가가 유도하는 변화는 몇 차례 기존 연구에서 거론되었다. 해마에서 *ELK1*의 활성화는 장기기억 형성에 중요하다는 연구결과가 있으며, 우울증과 자살환자에서는 전두엽과 해마에서 *ELK1*의 활성도가 저하되어 있다는 사후 뇌조직 연구결과가 있다.[38)] *C-FOS*는 JUN, ATF와 함께 이종이합체화(heterodimerization)를 이루어, activator protein-1(이하, AP-1)라는 또 다른 전사인자를 형성한다.[40)] AP-1은 DNA의 특정부위(AP-1 binding site)에 작용하여 다양한 신경전달물질의 생성과 관련이 있는 신경펩티드(neuropeptides)와 수용체, 전사인자, 효소의 발현을 유도하고 신경세포를 보호한다.[41-43)] 즉, ERK1/2의 인산화 증가에 의한 ERK1/2 신호전달계의 활성화는 하위 전사인자의 활성을 통해 신경세포보호능을 증가 시킬 수 있으며, 이는 리튬과 발프로에이트에 의해서 더 증가될 가능성이 있다.

리튬과 발프로에이트가 신경세포보호능을 증가시킨다는 증거는 기존 연구에서 몇 차례 언급되었다. 여러 뇌영상 연구에서 양극성장애 환자의 배외측 전전두엽(dorsolateral prefrontal cortex), 해마, 대상회(cingulate gyrus)와 같은 뇌의 여러 부위에서 부피 감소가 관찰되었고 리튬과 발프로에이트는 이를 막는다는 연구결과가 있다.[44-46)] 리튬과 발프로에이트 모두 동물을 이용한 *in vivo* 연구에서 해마의 치상회(dentate gyrus)에서 신경세포발생을 증가시키고, 전구세포를 이용한 *in vitro* 연구에서도 신경세포발생을 증가시켰다는 보고가 있다.[16)47)48)] 리튬과 발프로에이트는 배양된 여러 세포주와 동물모델에서 신경돌기의 증식을 촉진시켰으며, ERK1/2 신경전달계의 활성화가 동반되었다.[16)30)49)] 최근의 뇌영상 연구에서는, 양극성장애 환자의 뇌 부위 중 일부의 형태변화가 보고되었으며,[50-52)] 사후 뇌조직 연구결과에서 형태변화가 신경세포의 감소에 의한 것이라는 견해가 있다.[53-55)] 리튬과 발프로에이트를 통한 치료가 뇌의 형태변화를 막고 일부에서는 발병전의 형태로 복구시킨다는 추적연구 결과는 리튬과 발프로에이트의 신경세포보호능과 신경영양적 작용(neurotrophic effect)에 대한 가능성을 제시한다.[56)] 한편, 현재 리튬과 발프로에이트의 신경세포보호능은 알츠하이머병, 뇌졸중, 헌팅턴병, 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis)과 같은 신경세포손상, 신경세포퇴행성 질환에서의 치료 방법으로도 연구되고 있다.[46)]

즉, 리튬과 발프로에이트의 병용 처치는 ERK1/2 신호전달계의 활성화에 상승작용을 일으키고 ERK1/2 신호전달계가 관여하는 신경세포보호능에도 증가 효과를 일으킬 것으로 보인다. 기존 연구에서는 리튬과 발프로에이트의 단독 처치와 이에 대한 신경세포보호능에 대한 영향에 대해서만 보고되었

으므로 병용 처치의 영향에 대해서는 향후 연구가 요구되는 바이다.

본 연구에서, 리튬과 발프로에이트를 병용 처치하였을 때 보이는 *ELK1*과 *C-FOS* 전사활성 증가는 ERK1/2의 인산화 정도의 증가에서 기대되는 수준에 비해 더 높은 상승효과를 보였다. 이는 다음과 같은 가설을 고려해볼 수 있다. 발프로에이트는 HDAC의 억제를 통해서 이질염색질(heterochromatin)에서 진정염색질(euchromatin) 상태를 유도하여 다른 전사인자가 DNA에 작용하기 쉽게 할 수 있다. 즉, 발프로에이트의 염색질 리모델링(chromatin remodeling) 작용은 리튬이 ERK1/2 신호전달계에 미치는 영향을 증가시켜서 상승작용을 일으킬 수도 있다. 발프로에이트는 다른 약제들과의 상승효과를 일으킬 수 있으며 조현병에서도 항정신병제에 발프로에이트를 병용함으로써 정신병적 증상의 호전에 상승작용을 하는 경우가 보고되었다.[57)58)] 이는 발프로에이트의 염색질 리모델링이 리튬의 효과에도 작용할 수 있다는 가설을 뒷받침한다.

본 연구에서는 ERK1/2와 그 하위 전사인자인 *ELK1*과 *C-FOS*의 전사활성을 보았지만 세포의 신호전달 경로는 서로 복잡하게 연결되어 있고 한 가지의 인자가 다른 인자와 서로 조합되어 다양한 작용을 하게 된다. 그러므로 ERK 신호전달계가 아닌, 다른 경로의 인산화 효소, 전사인자의 활성도를 살펴볼 필요가 있다. 또한, 이러한 단백질의 활성화가 동물과 인간의 뇌에서 실제로 어떻게 작용하는지에 대한 연구가 향후 필요할 것으로 생각된다.

중심 단어: 기분조절제·MAP 인산화 효소·병용 투여·전사인자.

Acknowledgments

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업(A101915) 지원에 의하여 이루어진 것임.

Conflicts of interest

The authors have no financial conflicts of interest.

REFERENCES

1) **Cipriani A, Barbui C, Salanti G, Rendell J, Brown R, Stockton S, et al.** Comparative efficacy and acceptability of antimanic drugs in acute mania: a multiple-treatments meta-analysis. Lancet 2011;378:1306-1315.
2) **Cruz N, Sanchez-Moreno J, Torres F, Goikolea JM, Valentí M, Vieta E.** Efficacy of modern antipsychotics in placebo-controlled trials in bipolar depression: a meta-analysis. Int J Neuropsychopharmacol 2010;13:5-14.
3) **Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Beaulieu S, Alda M, et al.** Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. Bipolar Disord 2013;15:1-44.
4) **Goodwin GM; Consensus Group of the British Association for Psychopharmacology.** Evidence-based guidelines for treating bipolar disorder: revised second edition--recommendations from the British Association for Psychopharmacology. J Psychopharmacol 2009;23:346-348.
5) **Freeman MP, Stoll AL.** Mood stabilizer combinations: a review of safety and efficacy. Am J Psychiatry 1998;155:12-21.
6) **BALANCE investigators and collaborators, Geddes JR, Goodwin GM, Rendell J, Azorin JM, Cipriani A, et al.** Lithium plus valproate combination therapy versus monotherapy for relapse prevention in bipolar I disorder (BALANCE): a randomised open-label trial. Lancet 2010;375:385-395.
7) **Chin PC, Majdzadeh N, D'Mello SR.** Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors. Brain Res Mol Brain Res 2005;137:193-201.
8) **Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA Jr.** The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. Bipolar Disord 2009;11 Suppl 2:92-109.
9) **De Sarno P, Li X, Jope RS.** Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. Neuropharmacology 2002;43:1158-1164.
10) **Hashimoto R, Takei N, Shimazu K, Christ L, Lu B, Chuang DM.** Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. Neuropharmacology 2002;43:1173-1179.
11) **Nonaka S, Chuang DM.** Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats. Neuroreport 1998;9:2081-2084.
12) **Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, et al.** The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. J Neurosci 2003;23:7311-7316.
13) **Yan XB, Hou HL, Wu LM, Liu J, Zhou JN.** Lithium regulates hippocampal neurogenesis by ERK pathway and facilitates recovery of spatial learning and memory in rats after transient global cerebral ischemia. Neuropharmacology 2007;53:487-495.
14) **Kim AJ, Shi Y, Austin RC, Werstuck GH.** Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. J Cell Sci 2005;118(Pt 1):89-99.
15) **Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS.** Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. J Biol Chem 2001;276:36734-36741.
16) **Hao Y, Creson T, Zhang L, Li P, Du F, Yuan P, et al.** Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. J Neurosci 2004;24:6590-6599.
17) **Dou H, Ellison B, Bradley J, Kasiyanov A, Poluektova LY, Xiong H, et al.** Neuroprotective mechanisms of lithium in murine human immunodeficiency virus-1 encephalitis. J Neurosci 2005;25:8375-8385.
18) **Kostrouchová M, Kostrouch Z, Kostrouchová M.** Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. Folia Biol (Praha) 2007;53:37-49.
19) **Zhang Y, Sun Y, Wang F, Wang Z, Peng Y, Li R.** Downregulating the canonical Wnt/β-catenin signaling pathway attenuates the susceptibility to autism-like phenotypes by decreasing oxidative stress. Neurochem Res 2012;37:1409-1419.
20) **Pardo R, Andreolotti AG, Ramos B, Picatoste F, Claro E.** Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms. J Neurochem 2003;87:417-426.
21) **Johnson GL, Lapadat R.** Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 2002;298:1911-1912.

22) **English JD, Sweatt JD.** Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. J Biol Chem 1996;271: 24329-24332.
23) **Sweatt JD.** Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. Curr Opin Neurobiol 2004;14:311-317.
24) **Wu SP, Lu KT, Chang WC, Gean PW.** Involvement of mitogen-activated protein kinase in hippocampal long-term potentiation. J Biomed Sci 1999;6:409-417.
25) **Goldin M, Segal M.** Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. Eur J Neurosci 2003;17:2529-2539.
26) **Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW.** Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. Nat Neurosci 2001;4:151-158.
27) **Di Daniel E, Mudge AW, Maycox PR.** Comparative analysis of the effects of four mood stabilizers in SH-SY5Y cells and in primary neurons. Bipolar Disord 2005;7:33-41.
28) **Kim SH, Seo MS, Jeon WJ, Yu HS, Park HG, Jung GA, et al.** Haloperidol regulates the phosphorylation level of the MEK-ERK-p90RSK signal pathway via protein phosphatase 2A in the rat frontal cortex. Int J Neuropsychopharmacol 2008;11:509-517.
29) **Pozzi L, Håkansson K, Usiello A, Borgkvist A, Lindskog M, Greengard P, et al.** Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum. J Neurochem 2003;86:451-459.
30) **Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK, Chen G.** The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. J Biol Chem 2001;276: 31674-31683.
31) **Dudbridge F.** Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. Hum Hered 2008;66:87-98.
32) **Yuan P, Zhou R, Wang Y, Li X, Li J, Chen G, et al.** Altered levels of extracellular signal-regulated kinase signaling proteins in postmortem frontal cortex of individuals with mood disorders and schizophrenia. J Affect Disord 2010;124:164-169.
33) **Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH.** Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:16659-16664.
34) **Michaelis M, Suhan T, Michaelis UR, Beek K, Rothweiler F, Tausch L, et al.** Valproic acid induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and inhibits apoptosis in endothelial cells. Cell Death Differ 2006;13:446-453.
35) **Kopnisky KL, Chalecka-Franaszek E, Gonzalez-Zulueta M, Chuang DM.** Chronic lithium treatment antagonizes glutamate-induced decrease of phosphorylated CREB in neurons via reducing protein phosphatase 1 and increasing MEK activities. Neuroscience 2003; 116:425-435.
36) **Son H, Yu IT, Hwang SJ, Kim JS, Lee SH, Lee YS, et al.** Lithium enhances long-term potentiation independently of hippocampal neurogenesis in the rat dentate gyrus. J Neurochem 2003;85:872-881.
37) **Chen G, Manji HK.** The extracellular signal-regulated kinase pathway: an emerging promising target for mood stabilizers. Curr Opin Psychiatry 2006;19:313-323.
38) **Besnard A, Galan-Rodriguez B, Vanhoutte P, Caboche J.** Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. Front Neurosci 2011;5:35.
39) **Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB.** A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. Biochimie 2003;85:747-752.
40) **Karin M, Liu Zg, Zandi E.** AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol 1997;9:240-246.
41) **Brunello N, Tascedda F.** Cellular mechanisms and second messengers: relevance to the psychopharmacology of bipolar disorders. Int J Neuropsychopharmacol 2003;6:181-189.
42) **Asghari V, Wang JF, Reiach JS, Young LT.** Differential effects of mood stabilizers on Fos/Jun proteins and AP-1 DNA binding activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Brain Res Mol Brain Res 1998; 58:95-102.
43) **Atmaca M.** Valproate and neuroprotective effects for bipolar disorder. Int Rev Psychiatry 2009;21:410-413.
44) **Atmaca M, Yildirim H, Ozdemir H, Ogur E, Tezcan E.** Hippocampal 1H MRS in patients with bipolar disorder taking valproate versus valproate plus quetiapine. Psychol Med 2007;37:121-129.
45) **Drevets WC.** Neuroimaging studies of mood disorders. Biol Psychiatry 2000;48:813-829.
46) **Chiu CT, Wang Z, Hunsberger JG, Chuang DM.** Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. Pharmacol Rev 2013;65:105-142.
47) **Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK.** Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. J Neurochem 2000;75:1729-1734.
48) **Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, Drabik CE, Weiner A, Tang H, et al.** The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells. J Neurochem 2004;91:238-251.
49) **Bachmann RF, Schloesser RJ, Gould TD, Manji HK.** Mood stabilizers target cellular plasticity and resilience cascades: implications for the development of novel therapeutics. Mol Neurobiol 2005;32: 173-202.
50) **McDonald C, Zanelli J, Rabe-Hesketh S, Ellison-Wright I, Sham P, Kalidindi S, et al.** Meta-analysis of magnetic resonance imaging brain morphometry studies in bipolar disorder. Biol Psychiatry 2004; 56:411-417.
51) **Caetano SC, Olvera RL, Glahn D, Fonseca M, Pliszka S, Soares JC.** Fronto-limbic brain abnormalities in juvenile onset bipolar disorder. Biol Psychiatry 2005;58:525-531.
52) **Dickstein DP, Milham MP, Nugent AC, Drevets WC, Charney DS, Pine DS, et al.** Frontotemporal alterations in pediatric bipolar disorder: results of a voxel-based morphometry study. Arch Gen Psychiatry 2005;62:734-741.
53) **Selemon LD, Rajkowska G.** Cellular pathology in the dorsolateral prefrontal cortex distinguishes schizophrenia from bipolar disorder. Curr Mol Med 2003;3:427-436.
54) **Drevets WC, Ongür D, Price JL.** Neuroimaging abnormalities in the subgenual prefrontal cortex: implications for the pathophysiology of familial mood disorders. Mol Psychiatry 1998;3:220-226, 190-191.
55) **Todtenkopf MS, Vincent SL, Benes FM.** A cross-study meta-analysis and three-dimensional comparison of cell counting in the anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar brain. Schizophr Res 2005;73:79-89.
56) **Moore GJ, Bebchuk JM, Wilds IB, Chen G, Manji HK.** Lithium-induced increase in human brain grey matter. Lancet 2000;356:1241-1242.
57) **Guidotti A, Dong E, Kundakovic M, Satta R, Grayson DR, Costa E.** Characterization of the action of antipsychotic subtypes on valproate-induced chromatin remodeling. Trends Pharmacol Sci 2009;30: 55-60.
58) **Machado-Vieira R, Ibrahim L, Zarate CA Jr.** Histone deacetylases and mood disorders: epigenetic programming in gene-environment interactions. CNS Neurosci Ther 2011;17:699-704.