

SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell에서 에스트로겐의 신경세포 보호효과에 대한 기전

염지현 · 김희 · 홍현석 · 방오영*
허균* · 묵인희

아주대학교 의과대학 뇌질환연구센터,
신경과학교실*

Neuroprotective Effects of Estrogen in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells

Ji Hyun Yeom, M.D., Hee Kim, M.D., Hyun-Seok Hong, M.D.,
Oh-Young Band, M.D.*, Kyoong Huh, M.D.*, Inhee Mook-Jung, M.D.

Brain Disease Research Center, Department of Neurology*, Ajou University School of Medicine,
Suwon, Korea

Address for correspondence

Inhee Mook-Jung, M.D.
Associate Professor Brain Disease Research
Center Ajou University School of Medicine,
Suwon 442-721, Korea
Tel: +82-31-219-4554
Fax: +82-31-219-4540
E-mail: inhee@ajou.ac.kr

*This work was supported by a grant (HMP-01-PJ8-PG6-01NE01-0003) from Ministry of Health and Welfare, R.O. Korea.

Apoptosis is one major mechanism underlying neuronal cell death in degenerative diseases in the central nervous system. Previous studies have shown that estrogen has neuroprotective effects in several neuronal cell death model systems. In the present study, we established a staurosporine-induced apoptotic neuronal cell death system with human SH-SY5Y cell line. 17 β -estradiol (E2) blocked staurosporine-induced apoptosis of SH-SY5Y cells, as revealed by MTT as well as LDH assay. The cells showed typical DNA fragmentation at 4 h and 8 h following staurosporine treatment, which was attenuated by E2 pretreatment. Staurosporine-induced chromatin condensation was also reduced by E2 treatment. Because apoptotic stimuli are known to induce caspase-3 activation and PARP cleavage, we examined whether E2 blocks these processes. E2 markedly attenuated staurosporine-induced caspase-3 activation and PARP cleavage. This study shows that E2 blocks staurosporine-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, suggesting that E2 is a neuroprotective agent that may be used for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease.

Key Words : *Alzheimer's disease, Estrogen, Beta amyloid, Caspase-3, Cell death*

서 론

1980년대 이후 세포생물학적 관점에서 세포의 사멸기전에 대한 다양한 연구가 진행되어 왔고 그 중에서도 특히 apoptosis라고 알려진 세포의 능동적 사멸기전에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 이러한 apoptosis는 세포가 사멸되는 또 다른 방법인 necrosis와 대별되어 그 특징들을 나타낸다. Necrosis는 세포의 괴사로서 세포의 죽음을 나타내는 형태학적 변화의 총체적인 말로 효소의 진행성 퇴행성 작용에 의해서 일어난다. 한편 apoptosis는 세포의 고사, 세포 소멸, 혹은 세포 예정사라고 불리는 세포사로서 세포가 막 결함형의 입자로 단편화되고 그것이 식세포 작용에 의하여 다른 세포에 포식되어 소멸되는 것을 말한다. Apoptosis의 형태학적 변화는 세포의 크기가 축소되는 특징적인 변화와 세포막으로부터 세포막으로 쏠려져 있는 용기가 돌출하는 현상(membrane blebbing)이 나타나고, apoptosis 소포체(apoptotic body)라는 특수한 구조를 가지며, 미토콘드리아와 같은 세포내 소기관들은 그 구조를 유지하는데 비해 핵에서는 염색소 응

축(chromatin condensation), 핵 분열(nuclear fragmentation) 등과 같은 변화와 세포 사멸시에 에너지를 필요로 하는 생화학적 변화도 동반되는 특징을 갖고 있다.

Apoptosis는 세포사멸에 필요한 단백질 분해효소와 같은 단백질들을 합성하고 이렇게 새롭게 합성된 단백질들은 적극적으로 세포사멸을 일으킨다. 그 중 caspases (Cysteiny Aspartate-Specific Proteinases; 시스테인계열 단백질 분해 효소로 aspartate 등의 특정 잔기 절단), calpain (칼슘 활성 시스테인계열 단백질 분해 효소) 등이 그 좋은 예이다. Caspases는 단백질분해기능을 가지면서 apoptosis를 일으키는데 중요한 역할을 한다[1].

Caspases는 interleukin-1- β -converting enzyme (ICE) 계열의 단백질분해효소로 현재까지 12종이 알려져 있고, 그 중 caspase-1은 전뇌 부위에서 apoptosis를 유도하며, caspase-3는 apoptosis동안 non-erythroid α -spectrin, PARP [Poly (ADP-ribose)-polymerase], DNA-PKcs, PKC δ (protein kinase C δ) 등과 같은 단백질들을 절단한다. 그리고 그 밖의 다른 caspase-3 like라 불리는 caspases (2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12)들은

caspase-3와 같은 기능을 하나 결과적으로는 caspase-3를 따라 기능을 수행하게 된다. 따라서 최근에는 caspase-3가 apoptosis의 중요한 표적으로 알려지고 있다[1-3]. 그러나 신경 세포 중에서 에스트로겐에 의한 신경세포 보호효과가 apoptosis의 중요한 표적인 caspase-3를 조절함으로써 일어나는가는 보고되어 있지 않다. 이러한 apoptosis는 특히 중추신경계에서 발생할 때 퇴행성 질환이라고 일컬어지는 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease 등과 같은 많은 질병들의 발병기전이 됨으로써 이들 질환의 치료와 연관되어 계속해서 연구되고 있으나 아직까지 정확한 기전과 효과적인 치료제는 밝혀지지 않고 있다.

에스트로겐은 스테로이드계열의 호르몬으로서 분화 단계에 있는 뇌세포에서 급격히 증가하고, 신경세포성장인자(nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor 등)와 같이 있을 때에는 신경돌기 형성에 관여한다[4]. 최근 에스트로겐이 신경계에 미치는 영향들이 보고되기 시작하였는데 에스트로겐은 acetylcholine의 생성을 촉진시키고[5], 뇌의 혈류를 향상시키며[6] 해마의 완전성을 유지시키고 퇴행성 신경세포에 대해 보호효과를 나타낸다는 것 등이 그 예이다[7, 8]. 또한 에스트로겐이 사람의 알츠하이머병, 파킨슨병, 간질 등과 같은 뇌질환의 발병에 영향을 주며, 이러한 질병들과 관련하여 에스트로겐이 신경세포 보호효과를 나타낸다는 연구 결과들이 나오고 있다[8, 9]. 에스트로겐은 생체 내에서 17- β -estradiol, estrone, estriol 형태로 존재하게 되는데 이 중 17- β -estradiol이 세포 내에 있는 에스트로겐 수용체와 강하게 결합하여 다양한 효과를 나타낸다고 보고되었다[10]. 에스트로겐의 세포 내 전달 방법은 다른 스테로이드성 호르몬과 마찬가지로 확산작용에 의해 세포막 안으로 들어가고 이것은 세포 내에 존재하는 특이적인 결합단백질인 에스트로겐 수용체와 결합하여 작용한다고 알려져 있다[11, 12]. 에스트로겐도 일반적인 핵 수용체(nuclear receptor)와 같이 리간드와 결합하여 핵 안으로 들어가 DNA에 존재하는 estrogen response element (ERE)에 결합함으로써 표적 유전자의 발현을 조절하게 된다[13]. 그러나 세포에서의 이런 일반적인 에스트로겐의 작용 이외에도 유전자의 조절에 영향을 주지 않고 빠르게 세포막에서 일어나는 작용에 대한 보고도 있으며[14, 15] 에스트로겐 작용이 에스트로겐과 그 수용체의 결합에 의해서가 아니라 항산화제(antioxidant)로서 작용하여 세포 보호효과를 나타낸다는 보고도 있다[16]. 이러한 에스트로겐 수용체는 뇌의 모든 부위에 분포하나 주로 해마의 CA1-CA3 부분, 전전두엽 기저핵의 IV-VI층에 분포한다고 알려져 있다[17].

최근에 에스트로겐이 신경세포를 보호하는 효과가 있다는 결과들이 보고되어 있으나 그것이 어떠한 기전을 통해 일어나는지는 명확히 규명되어있지 않다. 그러나 몇몇 보고들에 의하면 에스트로겐의 신경세포 보호효과가 에스트로겐 수용체를 매개로 이루어진다는 것과[17], 수용체를 필요로 하지 않는다는[14] 상반된 결과들이 보고되고 있다.

본 연구는 이러한 에스트로겐의 신경세포 보호효과의 기전을 연구하고자 에스트로겐 수용체를 발현하고 있는 사람의 신경세포주 SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line)를 사용하였으며, apoptosis를 유도하는 물질로 잘 알려진 staurosporine을 SH-SY5Y 세포에 처리하여 신경세포사를 일으키는 세포배양 시스템을 정립하였고 이때 에스트로겐을 투여하여 apoptosis가 저지되는가를 관찰하였다.

이를 위하여 세포형태관찰, MTT assay, LDH assay를 통해 세포의 생존율 및 치사율을 측정하고 DNA fragmentation과 Hoechst staining을 통해 apoptosis의 확인 및 에스트로겐의 신경세포 보호효과를 확인하였으며 caspase-3의 활성을 측정함으로써 staurosporine에 의한 apoptosis를 확인하고 에스트로겐이 이를 억제하는지를 알아보았다. 또한 caspase-3와 더불어 나타나는 apoptosis의 특징의 하나인 PARP의 절편을 확인함으로써 SH-SY5Y 세포에서 staurosporine에 의하여 apoptosis가 일어날 때 에스트로겐이 caspase-3의 활성을 줄임으로써 세포사멸을 억제할 수 있음을 확인하였다.

실험재료 및 방법

1. 세포배양

본 연구에 사용된 세포는 사람의 신경세포주인 SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line)이다. 이 세포는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco-BRL) (1,000 mg/L glutamine, pyridoxine hydrochloride, 110 mg/L sodium pyruvate)배지에 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Hyclone)와 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma)이 첨가된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Forma)의 조건에서 배양하였다. Serum이 제거된 DMEM과 1% Penicillin/Streptomycin이 첨가된 배지에서 1시간 동안 배양한 후 Staurosporine (Calbiochem)과 17 β -estradiol (Sigma)을 처리하였다.

2. 세포관찰

본 연구에 사용된 SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line)세포에 staurosporine과 17 β -estradiol 처리 전 후의 형태변화를 microscopy (Olympus)를 이용하여 관찰한 뒤 CCD camera (Samsung)를 이용하여 사진촬영 하였다.

3. 에스트로겐 수용체 확인

1) RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

① RNA분리

SH-SY5Y 세포를 100 mm 접시에 1.5×10^6 cells/well의 밀도로 평판 배양하여 하룻밤동안 배양한 후 배지는 제거하고 de-naturing solution (4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7.0, 0.1 M β -mercaptoethanol, 0.5% N-lauroylsarkosyl) 500 μ L 넣고 pipetting하였다. 2 M NaOAc를 lysate의 1/10 부피, water-saturated phenol을 동일부피의 chloroform:isoamylalcohol (49:1) (Sigma)의 혼합용액을 1/5 부피로 첨가 한 후 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액만 따서 새로운 용기에 옮긴다. 상층액과 100% isopropanol (Sigma)을 1부피 넣고 -80°C 에서 1시간 동안 정치시켰다. 14,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 생긴 침전물을 70% EtOH로 세척하여 건조시킨 후 20 μ L DEPC (diethyl pyrocarbonate)가 처리된 증류수에 녹여 사용하였다.

② cDNA 합성

분리한 RNA는 UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec, Pharmacia Biotech)를 사용하여 농도를 260 nm에서 OD값을 측정하여 계산한 후 1 μ g/mL이 되도록 만들어 사용하였다. 먼저 1 μ g/mL RNA와 20 μ g/mL Oligo dT primer (Promega)를 혼합한 후 65°C 에서 15분간 반응시키고, 5 \times M-MLV RT buffer (Promega)를 4 μ L, 10 mM dNTP (Takara)를 1 μ L, M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)를 1 μ L씩 첨가한 후 DEPC 증류수를 넣어 전체 반응액이 20 μ L가 되게 하여 42°C 에서 1시간 동안 반응하여 cDNA를 합성하였다.

③ Primer 제작

두 가지 에스트로겐 수용체의 유전자를 증폭하기 위해서 다음의 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이 primer는 human ER α 와 ER β 에 특이적인 sequence를 선택한 것으로 이 primer로부터 증폭되어 나오는 산물이 사람 특이적 에스트로겐 수용체인 것이다.

ER α forward: 5'-GTGCCCTACTACCTGGAGAACG-3'
reverse: 5'-GGTTGGCAGCTCTCATGTCTCC-3'

ER β forward: 5'-CCTTACCTGTAAACAGAGAGAC-3'
reverse: 5'-CCAGGAGCATGTCAAAGATTTC-3'

④ PCR 증폭조건

PCR에 의한 ER α 와 ER β 유전자의 증폭조건은 10 \times reaction buffer (Takara), 2.5 mM dNTPs mixture (Takara), 25 pmole primer (GenoTech), SH-SY5Y 세포에서 분리한 ER α 와 ER β cDNA, 그리고 5 U/ μ L EX Taq DNA polymerase (Takara)를 첨가하여 전체 20 μ L의 반응액을 만들어 PCR cycler (MJ Research)로 수행하였다. ER α 와 ER β 유전자의 PCR 증폭조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. PCR cycling condition for ER α and ER β cDNA

	ER α		ER β	
	Temperature ($^\circ\text{C}$)	Time (sec)	Temperature ($^\circ\text{C}$)	Time (sec)
Denaturation	94	30	94	30
Annealing	62	60	60	60
Extension	72	90	72	90
Number of cycle		35		35

⑤ 증폭된 cDNA 확인

증폭된 PCR product는 1% agarose gel 전기영동을 하여 확인하였다. Gel Doc 2000 (Bio-Rad)을 사용하여 agarose gel을 사진으로 나타내었다.

4. Western blot analysis

1) 에스트로겐 수용체 확인

SH-SY5Y 세포를 100 mm 접시에 1.5×10^6 cells/well의 밀도로 평판 배양하여 하룻밤 동안 배양한 후 배지는 모두 버리고 칼슘과 마그네슘이 제거된 PBS (Phosphate buffered saline)로 세척한 다음 Protease inhibitor (aprotinin, leupeptin 각각 2 μ g/mL, 100 μ g/mL PMSF)과, phosphatase inhibitor인 200 μ M Na₃VO₄가 첨가된 1 \times RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 mM Tris (pH 8.0))를 300 μ L씩을 접시에 떨어뜨려 세포를 용해하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액만을 취해 Bicinchoninic acid solution (BCA) (Sigma) 방법에 따라 단백질 정량을 하였다. 모든 시료는 50 μ g/mL이 되게 만들어 5 \times sample buffer (60 mM Tris, 2% SDS, 25% Glycerol, 14.4 mM BMF, pH 6.8)와 혼합하여 100°C 에서 5분간 끓인 후 사용하였다.

2) Caspase-3와 PARP 활성화 측정

SH-SY5Y 세포를 100 mm 접시에 1.5×10^6 cells/well의 밀도로 평판 배양하여 하룻밤 동안 배양한 후 DMEM과 1% Penicillin/Streptomycin이 첨가된 배지에서 1시간 동안 배양하였다. 10 nM 17- β -estradiol을 1시간 전처리 한 후 500 nM staurosporine을 처리하여 2-4시간 동안 배양하였다. 칼슘과 마그네슘이 제거된 PBS(Phosphate buffer saline)로 세척한 다음 1 \times RIPA buffer로 lysate를 만든 후 단백질 정량을 하였다. 각각의 시료는 50 μ g/mL이 되게 만들어 5 \times sample buffer와 혼합하여 100°C 에서 5분간 끓인 후 사용하였다.

3) 단백질 정량

각각의 시료를 5 μ L씩 따서 96 well plate에 놓고 BCA와 copper (II) sulfate (Sigma)를 49:1로 혼합한 용액을 200 μ L씩 첨가하여 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 Microplate reader로 570 nm에서 OD 값을 측정하였다.

Table 2. SDS-PAGE condition

	Polyacrylamide (%)	Primary Ab	Secondary Ab	Primary Ab dilution
ER α	8	Anti-Estrogen Recetor(UBI)	Anti-mouse IgG	1:1,000
ER β	8	ER (Y19) (Santa Cruz)	Anti-goat IgG	1:500
Caspase-3	15	Anti-Caspase-3 (PharMingen)	Anti-rabbit IgG	1:1,000
PARP	8	Anti-PARP (PharMingen)	Anti-mouse IgG	1:1,000

4) 전기영동

8-15% SDS-PAGE에서 전기영동을 한 후 Wet transfer method (transfer buffer-0.25 M Tris, 1.92 M Glycine, pH 8.3-8.4)로 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (millipore)에 transfer하였다. TBST (200 mM Tris, 1.37 M NaCl, 0.05% Tween-20)용액에 5% non fat dried milk를 녹여 30분간 blocking 한 후 각각의 조건에 맞는 일차항체를 4°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. TBST로 10분씩 2번 세척한 후 이차항체(HRP)를 1시간 동안 실온에서 반응시키고 다시 TBST로 10분씩 3번 세척한 후 ECL (Enhanced Chemiluminescence) (Amersham)과 반응시켜 형광발색 하였다. 각각의 SDS-PAGE 조건은 Table 2에 나타내었다.

5. 세포사 측정

1) MTT assay

실험에 들어가기 전 SH-SY5Y 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 밀도로 평판 배양하여 시간대 별로 staurosporine과 17 β -estradiol을 처리하였다.

인자들 처리 전에 Serum이 제거된 DMEM과 1% Penicillin/Streptomycin이 첨가된 배지에서 1시간 동안 배양한 후 10 nM 17 β -estradiol, 500 nM Staurosporine 순으로 1시간씩 전 처리하여 18시간 동안의 변화를 측정하였다. 24시간 동안 처리 후 5 mg/mL MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma) 용액을 well당 15 μ L씩 넣고, 4시간 incubator에서 배양 후 Solubilization buffer (10% SDS, 50% Dimethylformamide, pH 4.7)를 100 μ L씩 첨가하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 18시간 후 Microplate reader (Benchmark, Bio-Rad)를 사용하여 OD_{570/630nm}에서 읽었다.

2) LDH assay

SH-SY5Y 세포를 96 well plate에 3×10^4 cells/well의 밀도로 평판 배양하여 위와 같은 방법으로 staurosporine과 17 β -estradiol을 처리 한 후 24시간 동안 incubator에서 배양하였다. 시간대 별로 media를 걷어 원심분리 한 후 상층액만 취해 96 well plate에 50 μ L씩 넣고 Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Ro-

che)의 solution A와 B의 45:1 혼합액을 시료와 동일하게 첨가한 뒤 30분간 실온에서 반응시킨 후 Microplate reader (Bio-Tek)를 사용하여 OD_{490/630nm}에서 읽었다.

3) DNA fragmentation

SH-SY5Y 세포를 100 mm 접시에 1.5×10^6 cells/well의 밀도로 평판 배양하여 하룻밤 동안 배양한 뒤 위와 같은 방법으로 10 nM 17 β -estradiol, 500 nM Staurosporine을 처리 한 후 β -mercaptoethanol이 제외된 Denaturing solution 500 μ L를 처리하여 10분간 실온에서 배양한 후 Phenol:Chloroform: Isoamylalcohol (25:24:1) 혼합용액을 동일 부피 넣고 12,000 rpm, 16°C에서 10분간 원심분리를 하였다. 상층액을 다른 용기로 옮기고 다시 한 번 Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol 혼합용액을 동일 부피 넣고 12,000 rpm, 16°C에서 10분간 원심분리를 하였다. 다시 상층액을 새로운 용기에 옮긴 후 2배 부피의 100% EtOH와 1/10배 부피의 3 M Sodium Acetate (pH 5.2)를 넣고 -20°C에서 1시간 반응시킨 다음 12,000 rpm, 16°C에서 10분간 원심분리를 하였다. 용액을 제거하고 건조시킨 후 20 μ L TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA)에 1 mg/mL RNase를 함께 처리하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec, Pharmacia Biotech)를 사용하여 260 nm에서 농도를 측정한 뒤 1.5% Agarose gel에 5 μ g/mL ethidium bromide를 첨가하여 3 μ g의 DNA를 loading하여 50 mA로 전기영동 하였다.

4) Hoechst staining

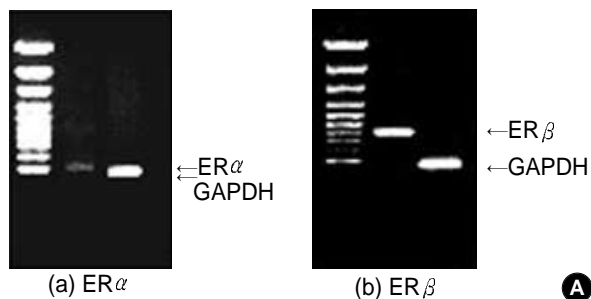
위와 같은 조건으로 SH-SY5Y 세포를 10 mm Cover slip (Nunc) 위에 2×10^4 cells/well의 밀도로 평판 배양하여 하룻밤동안 배양시킨 후 위 실험과 같이 10 nM 17 β -estradiol, 500 nM Staurosporine을 처리하였다. PBS로 세 번 세척한 후 2.5% Glutaraldehyde (Sigma)로 5분간 세포를 고정시킨 뒤 1 μ g/mL adenine-thymine-base-pair-specific DNA dye Hoechst 33285 (bis-benzimide) (Sigma) 용액을 넣고 -20°C에서 10분간 염색하였다. 형광현미경(Zeiss)에서 4,6-Diamino-2-phenylindole (DAPI) filter로 관찰한 후 CCD camera (Apogee)로 사진촬영 하였다.

결 과

1. 에스트로겐 수용체 확인

본 연구에서 사용하고 있는 사람의 신경세포주인 SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line) 세포 내에 에스트로겐 수용체의 유무를 RT-PCR 방법과 Western blot 방법을 사용하여 확인하였다. mRNA 수준에서의 에스트로겐 수용체의 유무를 확인

RT-PCR



Western blot analysis



Fig. 1. Identification of ER α or ER β in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. A: RT-PCR results with ER α or ER β in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Single bands were found for both mRNAs after electrophoretic separation in the ethidium-bromide stained 1% agarose gel with approximate sizes of 480 bp and 780 bp for ER α and ER β respectively. (a) lanes: Marker, ER α in SH-SY5Y, GAPDH. (b) lanes: Marker, ER β in SH-SY5Y, GAPDH. B: Western analysis of ER α or ER β in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. hER α and hER β were transfected with human ER α and ER β cDNA in HT22 cells. hER α and hER β were positive control. Western analysis using an antibody for ER α (UBI 1:1,000) and ER β (Santa Cruz 1:500).

하기 위해 RT-PCR (Fig. 1A)을 수행하였고, 단백질 수준에서의 에스트로겐 수용체 유무를 확인하기 위해 Western blotting (Fig. 1B)을 수행하여 SH-SY5Y 세포 내에 에스트로겐 수용체의 존재를 확인하였다.

세포에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 에스트로겐 수용체 α 와 β 유전자의 특이적인 primer를 제작하여 PCR을 수행한 결과 SH-SY5Y 세포 내에 α 와 β 수용체 모두가 존재함을 알 수 있었다. 이때 실험의 조건 등을 확인하기 위한 control 실험군으로 세포내 과발현되는 GAPDH (glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase)에 특이적인 primer를 사용하며 그 결과를 확인하였다(Fig. 1A). 또한 에스트로겐 수용체 α 와 β 의 특이적인 항체들을 이용하여 Western blotting을 수행한 결과 역시 세포 내에 α 와 β 수용체 모두 존재함을 알 수 있었으며 항체의 특이성을 확인하기 위하여 ER α , ER β 를 과발현하는 세포주와 비교하였다(Fig. 1B). 이러한 실험 결과들로부터 SH-SY5Y 세포 내에는 에스트로겐 수용체 α 와 β 가 모두 존재한다는 것을 확인하였다(Fig. 1).

2. Staurosporine에 의한 세포사 측정

Staurosporine은 일반적으로 알려진 protein kinase inhibitor로

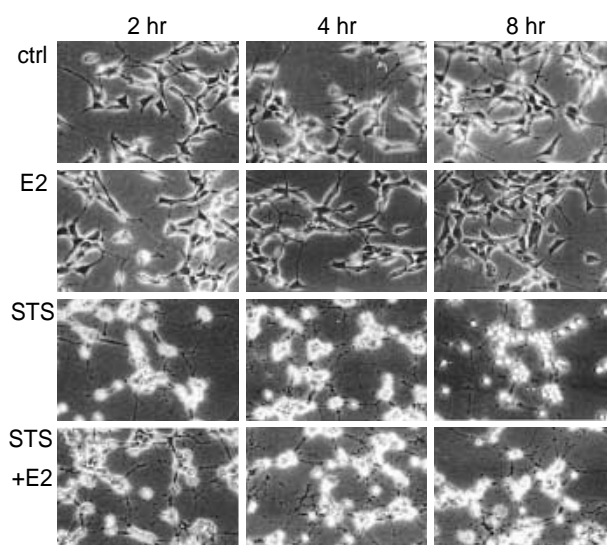


Fig. 2. The morphology of SH-SY5Y neuroblastoma cells with staurosporine and 17 β -estradiol treatment. Cells were treated with medium alone (control), 10 nM 17 β -estradiol (E2), 500 nM staurosporine (STS), or staurosporine plus 17 β -estradiol (STS+E2). Images were analyzed by microscopy (Olympus) ($\times 200$).

서 apoptotic 세포사를 유도하는 약물로 알려져 있으며 또한 SH-SY5Y 세포에서 apoptosis를 유도하는 staurosporine의 최적의 농도는 500 nM이라고 알려져 있다[18]. 따라서 본 연구 과정 동안 모든 실험에는 staurosporine의 농도를 500 nM로 사용하고 에스트로겐은 생체 내 농도로 알려진 2-10 nM을 사용하였다.

1) Microscopy 관찰

Staurosporine에 의하여 유도되어진 신경세포사에 대한 에스트로겐의 보호효과를 알아보기 위해 먼저 대조군의 세포모양을 staurosporine을 처리한 군과 세포모양을 비교하여 관찰하였다. Staurosporine을 처리하여 세포모양을 관찰한 결과 staurosporine만을 처리한 세포들은 세포의 응축과 신경돌기의 소멸이 일어나며 세포사가 진행되고 있었으나 에스트로겐을 함께 처리한 군이 staurosporine만 처리한 군에 비해 세포의 응축이 적게 나타나고 신경돌기가 많이 남아있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 즉, 에스트로겐이 staurosporine에 의한 세포사를 억제하고 있음을 현미경을 통해 육안으로 관찰할 수 있었다.

2) MTT assay

SH-SY5Y 세포에서 에스트로겐이 staurosporine에 의한 신경세포사를 억제할 수 있는지 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 시간대 별로 SH-SY5Y 세포에 500 nM staurosporine을 처리한 후 18시간 후에 MTT assay를 수행하여 분석한 결과 세포의 생존율은 아무 것도 처리하지 않은 대조군의 생존율을 100%로 고정하였을 때 4시간에서는 79.03 ± 1.30 (n=8), 8시간에서는 66.45 ± 3.02 (n=8), 18시간에서는 56.39 ± 3.98

Table 3. Estrogen protective effects of staurosporine by MTT assay

	4 hr					8 hr					18 hr				
	Ctrl	E2	STS	STS +E2	[STS+E2] -[STS]	Ctrl	E2	STS	STS +E2	[STS+E2] -[STS]	Ctrl	E2	STS	STS +E2	[STS+E2] -[STS]
%	100.04	102.86	79.03	84.75	5.6	99.99	101.89	66.45	73.80	7.35	99.97	99.17	56.39	58.33	1.93
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	8.26	4.48	1.30	6.72	5.42	5.93	3.97	3.02	4.02	1.0	3.79	6.13	3.98	1.78	2.2

Table 4. Estrogen protective effects of staurosporine by LDH assay

	15 hr					18 hr					21 hr				
	Ctrl	E2	STS	STS +E2	[STS+E2] -[STS]	Ctrl	E2	STS	STS +E2	[STS+E2] -[STS]	Ctrl	E2	STS	STS +E2	[STS+E2] -[STS]
OD	4.387	3.714	22.08	17.19	4.882	5.059	3.837	23.93	18.82	5.104	6.082	5.250	26.5	18.28	8.22
490/	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
630 nm	0.24	0.13	1.27	0.59	0.68	0.17	0.17	1.51	1.05	0.46	1.18	1.50	7.34	5.35	1.98

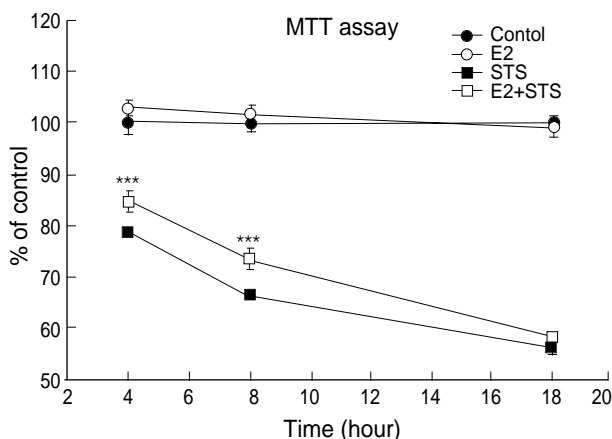


Fig. 3. Effect of 17β -estradiol on the viability of SH-SY5Y neuroblastoma cells. Cells were grown in DMEM with concentration of 17β -estradiol (10 nM), staurosporine (500 nM). After 18 h the cellular viability was assessed by MTT assay. Samples were control (●), 17β -estradiol (E2) (○), staurosporine (■), or staurosporine plus 17β -estradiol (STS+E2) (□). Two-sides ANOVA with Student's test pairs with comparisons was used for statistical analysis, with *** p <0.001 in comparisons to the staurosporine treated group. Data are mean \pm SEM values (n =11).

(n =8)을 나타내었다(Table 3). 여기에 10 nM 에스트로겐을 함께 처리했을 때에는 4시간에서는 84.75 ± 6.72 (n =8), 8시간에서는 73.80 ± 4.02 (n =8), 18시간에서는 58.33 ± 1.78 (n =8)의 생존율이 증가하는 양상을 보였다(Table 3). 따라서 에스트로겐이 staurosporine에 의한 신경 세포사에 4시간에서는 약 5.67%, 8시간에서는 약 7.35%, 18시간에서는 약 1.93%의 보호 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

3) LDH assay

세포가 죽거나 용해될 때 세포의 원형질막으로부터 분비되는

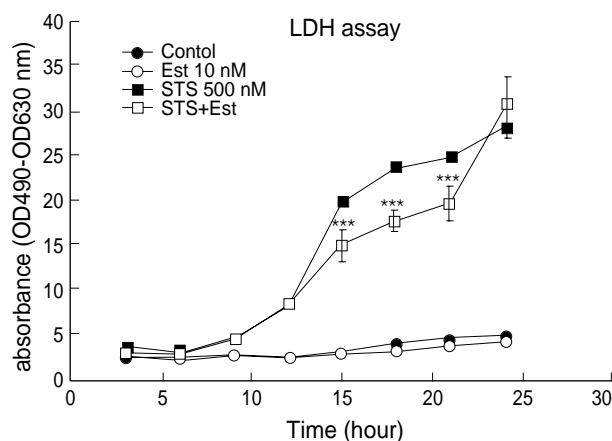


Fig. 4. LDH assay of SH-SY5Y human neuroblastoma apoptotic cells. The cells seeded at a density of 3×10^4 cells/well onto 96-well plates. LDH release sample from control (●), either 17β -estradiol (E2) (○), staurosporine (■), or staurosporine plus 17β -estradiol (STS+E2) (□). Two-sides ANOVA with Student's test pairs with comparisons was used for statistical analysis, with *** p <0.001 in comparisons to the staurosporine treated group. Data are mean \pm SEM values (n =11).

물질인 lactate dehydrogenase를 측정할 수 있는 LDH assay kit를 이용하여 staurosporine을 처리한 후 24시간 동안의 변화를 OD_{490/630nm}에서 흡광도를 측정해 세포의 치사율을 알아보았다. 그 결과 아무 것도 처리하지 않은 대조군은 15시간에 4.387 ± 0.24 (n =11), 18시간에 5.059 ± 0.17 (n =11), 21시간에는 6.082 ± 1.71 (n =11)로 나타난 것에 비하여 500 nM staurosporine을 처리한 군은 15시간에 22.08 ± 1.27 (n =11), 18시간에 23.93 ± 1.51 (n =11), 21시간에 26.5 ± 7.34 (n =11)로 대조군에 비해 치사율이 증가하였다(Table 4). 또한 500 nM staurosporine과 10 nM 에스트로겐을 함께 처리한 군은 15시간에 17.19 ± 0.59 (n =11), 18시간에 18.82 ± 1.05 (n =11), 21시간에 18.28 ± 5.35 (n =11)

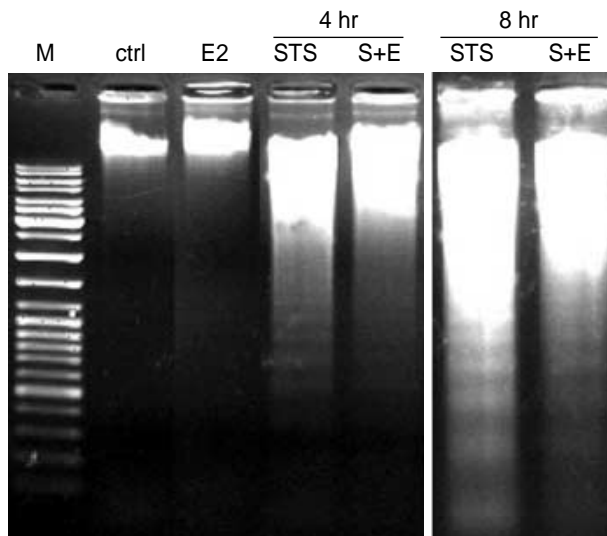


Fig. 5. Electrophoretal analysis of chromosomal DNA fragmentation in staurosporine or 17 β -estradiol treated SH-SY5Y neuroblastoma cells. Cells were treated staurosporine (STS), 17 β -estradiol (E2) or both (S+E) for 4 h, 8 h. Chromosomal DNA was isolated from the cells. DNA (3 μ g/lane) was loaded onto 1.5% agarose gels containing ethidium bromide. After electrophoresis, DNA bands were visualized under ultraviolet light.

로 에스트로겐을 함께 처리했을 때 각 각 5.06 \pm 0.68, 5.1 \pm 0.46, 8.22 \pm 1.98로 세포 치사율이 감소하였다(Fig. 4).

3. DNA fragmentation

Apoptosis가 일어나게 되면 DNA가 endogeneous한 Ca²⁺과 Mg²⁺과는 독립적으로 endonuclease (예를 들어, caspase-activated DNase)의 활성화에 의하여 180-200 bp로 잘려지게 되며 전기영동으로 agarose gel 상에서 분리해 볼 경우 사다리꼴과 같은 DNA 절편 모양이 나타나게 된다[19]. 이에 DNA fragmentation assay를 수행하여 staurosporine에 의해 유도된 apoptosis가 에스트로겐에 의해 억제되는지를 알아보았다. SH-SY5Y 세포에 앞의 실험들과 같이 staurosporine과 17 β -estradiol을 처리하고 4시간, 8시간 뒤에 1.5% agarose gel을 통한 전기영동으로 확인하여 본 결과 4시간, 8시간 모두 staurosporine과 에스트로겐을 함께 처리한 군에서 staurosporine만을 처리한 군에 비해 DNA 분절이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

4. Hoechst staining

Apoptosis를 확인하기 위한 또 다른 방법으로 Hoechst staining을 수행하여 핵내의 변화인 chromatin 응축이나 DNA 분절 현상을 세포의 수준에서 관찰하여 staurosporine에 의한 apoptosis가 에스트로겐에 의해 억제되는지를 알아보았다. staurosporine을 처리한 군에서는 많은 수의 세포에서 핵 내 chromatin의 응

Hoechst staining

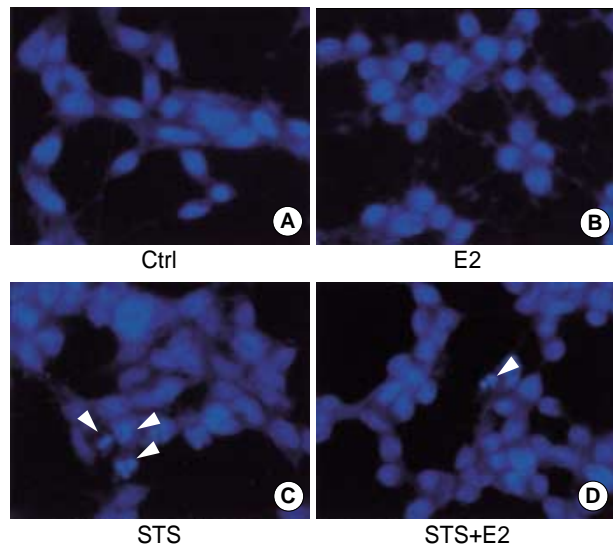


Fig. 6. 17 β -estradiol prevents nuclear fragmentation and apoptotic bodies in staurosporine treated SH-SY5Y neuroblastoma cells. The morphology of SH-SY5Y neuroblastoma cells treated with media alone (control), 10 nM 17 β -estradiol (E2), 500 nM staurosporine (STS), or staurosporine plus 17 β -estradiol (STS+E2) were analyzed by fluorescent microscopy (ZEISS) (\times 400). Nuclear fragmentation and condensation, as assessed by Hoechst dye 33285 staining was prevented in staurosporine treated SH-SY5Y neuroblastoma cells by adding 17 β -estradiol. Arrow head indicates apoptotic cell.

축과 분절을 관찰하여 apoptosis가 일어나고 있음을 확인했으며 (Fig. 6C), 에스트로겐을 함께 처리한 군에서는 핵 내 chromatin의 응축과 분절이 일어나는 세포의 수가 staurosporine을 처리한 군에 비해 현저히 줄어드는 것으로 보아 staurosporine에 의한 apoptosis가 에스트로겐에 의해 억제되고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 6D).

5. Caspase-3 활성화 측정

최근의 연구들에 따르면 apoptosis 과정에서 interleukin 1 β 변환효소(interleukin-1- β -converting enzyme: ICE) 계열의 약 12종의 시스틴 계열의 단백질 분해 효소인 caspases들이 staurosporine에 의한 apoptosis로 활성화된다는 보고들이 있다[3]. 이러한 caspases들은 단백질 분해 기능을 가지면서 세포사멸의 신호를 수행하는 유전자로서 역할을 하는데, 세포 사멸의 신호를 받게 되면 caspases 계열이 활성화되는 cascade를 거치게 되고 최종적으로 활성화된 caspase-1, 3 및 4 등이 세포내의 중요한 단백질을 분해함으로써 세포사멸을 실행하는 것으로 알려져 있다[3, 20]. 이러한 caspases들의 활성화는 단계적으로 일어나는데 그 중 caspase-6, -8, -10들은 caspase-3이 없을 경우에 활성화되지 않으며[20], 대부분의 caspases들의 활성화 정도는 caspase-3의 활성도를 측정함으로써 활성정도를 알 수 있다는 연구 결과

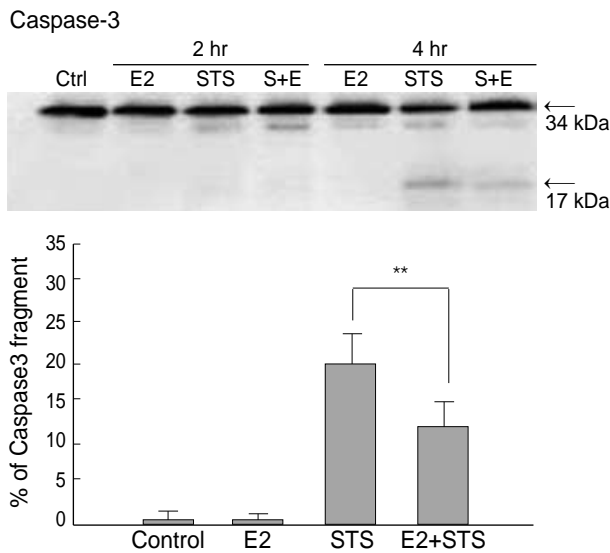


Fig. 7. Caspase-3 activation in SH-SY5Y cells is inhibited by 17 β -estradiol. Caspase-3 activity was measured in lysates prepared from SH-SY5Y human neuroblastom cells treated with medium alone (control), 10 nM 17 β -estradiol (E2), 500 nM staurosporine (STS), or 500 nM staurosporine plus 10 nM 17 β -estradiol (STS+E2) for 2 h, 4 h. Western blotting was performed with anti-caspase 3 antibody. Two-sides ANOVA with Student's test pairs with $**p < 0.01$ in comparisons to the staurosporine treated group. Data are mean \pm SEM (n=4). Caspase-3 activity (%) = [fragment/(full length-fragment)] \times 100.

도 있다[3]. 또한 caspase-2, -8, -9, -10과 -12에 의해 다양한 caspase를 활성화시키는 caspase cascade가 시작되고 이 것이 caspase-3, -6, -7에 전달되어 다른 caspase들을 절단하게 된다는 보고도 있다[3]. 이에 본 실험에서는 caspase-3의 특이적인 항체를 이용하여 Western blotting을 수행하여 caspase-3의 활성도를 측정함으로써 staurosporine에 의하여 유도되어지는 신경 세포사와 에스트로겐의 신경세포 보호효과의 기전에 caspase-3가 연관되어져 있는가를 살펴보았다. Apoptosis로 인해 caspase-3의 활성이 일어나게 되면 zymogen 상태로 있던 caspase-3는 34 kDa와 17 kDa 두 개의 절편으로 나뉘면서 활성화되게 되는데 본 실험의 결과를 살펴보면 2시간에서는 모든 실험군에서 caspase-3 절편을 확인할 수 없었으나 apoptosis가 일어난 4시간에서는 staurosporine을 처리한 군에서 caspase-3 절편을 확인할 수 있었고, 에스트로겐을 함께 처리한 군에서는 staurosporine을 처리한 군보다 절편이 감소하는 것을 볼 수 있었다(n=4). 따라서 staurosporine으로 인해 유도된 apoptosis와 에스트로겐에 의한 caspase-3가 연관되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

6. PARP [Poly (ADP-Ribose) Polymerase] fragmentation 측정

Caspases의 기질로 알려진 단백질들은 세포의 기능을 조절하

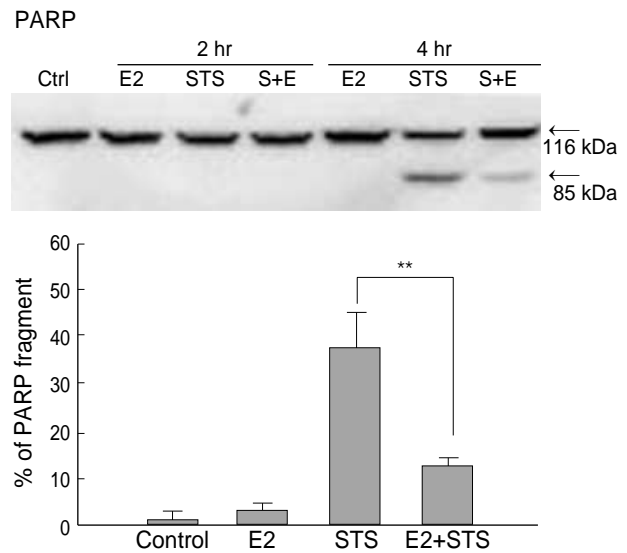


Fig. 8. Staurosporine-induced apoptosis showed PARP cleavage in SH-SY5Y cells. Cells were treated with medium alone (control), 10 nM 17 β -estradiol (E2), 500 nM staurosporine (STS), or 500 nM staurosporine plus 10 nM 17 β -estradiol (STS+E2) for 2 h, 4 h. Western blotting was performed with anti-PARP antibody. Two-sides ANOVA with Student's test pairs was used for statistical analysis, with $**p < 0.01$ in comparisons to the staurosporine treated group. Data are mean \pm SEM (n=5).

는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있으며, 이들이 활성화된 caspases에 의해 절단되면 그 기능을 수행할 수 없으므로 세포사가 유도된다. 그러한 기질들에는 PARP [Poly (ADP-ribose) polymerase]와 같은 DNA repair관련 효소, actin, lamin, fordin과 같은 세포골격 관련 단백질, PKC, phospholipase C, PKA 등과 같은 신호전달관련 단백질 및 presenilin, huntingtin과 같은 질병관련 단백질에 이르기까지 매우 다양하다[21]. 따라서 본 실험에서는 다양한 기질 중에서 PARP의 절편을 확인하여 staurosporine에 의한 apoptosis에서 에스트로겐의 보호효과를 알아보았다. 본 실험 결과에서는 staurosporine에 의해 caspase-3가 가장 활성화되는 4시간째에 PARP 절편을 확인할 수 있었으며 에스트로겐을 함께 처리한 군에서는 staurosporine만을 처리한 군보다 PARP절편이 감소하는 것으로 보아 caspase-3의 활성이 떨어지는 것을 볼 수 있었다(Fig. 8).

고 찰

본 연구는 에스트로겐의 신경세포 보호효과의 기전에 대한 연구의 한 부분으로서 사람의 신경세포종인 SH-SY5Y 세포에서 apoptosis가 일어날 때 17 β -estradiol이 생체 내 농도 수준에서 보호효과를 나타내며 이 효과가 caspase-3를 매개로 한다는 사실을 처음으로 보여주고 있다. 17 β -estradiol은 여러 약물들로 인해 나타나는 apoptosis에 대해 신경세포 보호효과를 나타낸다고 알

려져 있다[8]. 또한 이와 같은 신경세포 보호효과에 에스트로겐 수용체가 관련된다는 증거들이 제시되고 있다[8, 22]. Behl 등의 연구에 의하면 에스트로겐 수용체가 결여된 HT22 세포에서도 apoptosis가 일어나는 동안에 에스트로겐의 보호효과를 확인할 수 있다고 한다[14, 23]. 그러나 다른 그룹들은 신경세포 보호효과에 에스트로겐 수용체가 관련된다는 증거들을 제시하고 있다[15, 24]. 즉, 신경세포 보호효과에 있어서 에스트로겐은 수용체를 매개로 한다는 사실을 알 수 있으며 신경세포 보호효과에 있어 에스트로겐의 수용체와 관련된 기전이 존재함을 알 수 있다. 이러한 기전에 에스트로겐 수용체의 유형에 따른 차이가 논의되기는 하나 실험에 사용한 17β -estradiol은 에스트로겐 수용체의 유형과 관계없이 친화력을 가지고 있는 것으로서[25], 본 실험에서는 특별히 에스트로겐 수용체의 유형을 구분하지 않고 신경세포 보호효과를 확인하였다.

Staurosporine은 일반적으로 사용하는 protein kinase inhibitor로서 serum이 배제된 media 상태에서 SH-SY5Y 세포의 apoptosis를 유도한다고 알려져 있다[26]. 따라서 본 연구에서는 SH-SY5Y 세포에서 staurosporine으로 인해 나타나는 apoptosis 과정동안의 세포형태, 생존율과 치사율, caspase-3와 PARP의 활성도를 측정하였으며 또한 이 모든 실험을 통해 에스트로겐이 apoptosis를 억제한다는 사실을 17β -estradiol을 처리하여 알아 보았다. 이에 모든 결과들을 요약해 보면 다음과 같다.

첫째, MTT assay 결과를 살펴보면 staurosporine과 에스트로겐을 함께 처리한 군에서 더 높은 흡광도를 보임으로서 더 높은 생존율을 나타냈다. 즉, 에스트로겐은 staurosporine에 의한 신경세포사를 억제한다는 것을 알 수 있었다. 둘째, 세포의 치사율을 측정한 LDH assay 결과를 보면 staurosporine을 처리한 24 시간 후 에스트로겐을 함께 처리한 군과 staurosporine만을 단독으로 처리한 군을 비교했을 때 후자가 더 높은 흡광도를 나타냈으며 이로써 에스트로겐이 staurosporine으로 인한 신경세포사를 억제한다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 에스트로겐이 신경세포사에 보호효과를 나타낸다는 것을 알 수 있는 증거이다. 셋째, DNA fragmentation의 결과는 staurosporine을 처리한 군에서 많은 절편을 확인할 수 있었으며 에스트로겐을 함께 처리한 군에서는 에스트로겐의 보호효과로 인해 staurosporine을 처리한 군에 비해 DNA fragmentation이 억제되는 현상을 볼 수 있었다. 넷째, Hoechst staining에서는 chromatin 응축이나 DNA 분절 현상을 DNA의 특이적인 dye로 염색하여 정상적인 핵과 비교하였다. DNA의 손상을 확인한 결과 staurosporine만 처리한 군에서는 정상적인 핵에 비해 여러 개의 작은 몇 개의 덩어리 조각으로 나누어져 있었으며 또한 chromatin 응축현상으로 인해 정상적인 핵에 비해 밝은 색을 나타내고 있었다. 이 실험에서 역시 에스트로겐이 apoptosis에 보호효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다. 다섯째, caspases가 활성화된 상태가 될 때는 34 kDa과 17 kDa로 절단됨으로서 세포의 사멸을 촉진하는 것으로 알려져 있는데 실험에서 나타난 결과로 볼 때 staurosporine으로 유도된

세포사에 의해 17 kDa의 절편들이 증가하는 caspase-3 활성화 상태를 나타냈으며 에스트로겐과 함께 처리한 군에서는 그 활성도가 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 여섯째, caspase-3의 활성화에 의한 PARP의 변화를 알아 본 결과 staurosporine을 처리한 군에서 PARP가 85 kDa의 절단된 형태로 나타났으며 에스트로겐을 함께 처리하였을 경우에는 절편이 감소하는 것을 확인하였다.

이와 같이 위의 모든 실험 결과들로부터 신경세포사가 일어나는 과정에 에스트로겐이 보호효과를 나타낸다는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다. 아직까지는 신경세포사 보호효과에 대한 에스트로겐의 정확한 대사과정이 규명되지 않았지만 다른 여러 연구 결과들과 마찬가지로 본 실험에서도 에스트로겐이 staurosporine에 의한 apoptosis에 대해 보호효과를 나타낸다는 사실을 여러 가지 실험방법을 통하여 증명할 수 있었으며 또한 caspase-3와 PARP를 매개로 하여 apoptosis를 억제한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험은 사람 신경세포종인 SH-SY5Y 세포에서 일어나는 apoptosis가 caspase-3를 매개로 하여 일어나며 이러한 현상은 에스트로겐에 의해 억제된다는 것을 확인한 것에 그 의의가 있다.

에스트로겐의 신경세포 보호효과와 관련된 최근 보고에 의해 estradiol의 하위 단계로는 Bcl-2가 apoptosis를 조절하고 있다는 것이 알려져 있다. 이 Bcl-2는 cytochrome c의 방출 증가와 caspase-3의 활성을 저해하는 antiapoptotic factor로 다양한 연구에서 그 사실이 증명되었으며[18, 27, 28] staurosporine 이외의 다른 여러 자극에 의해 유도되는 apoptosis를 억제한다고 보고되었다[29]. bcl-2 유전자의 promoter부분과 estradiol의 수용체가 직접적으로 혹은 간접적으로 결합함에 의해 상위 단계인 estradiol은 survival (생존) 요소로 작용할 것이라는 가설도 있다[30, 31].

위와 같이 아직까지 가설로만 나타나고 있는 에스트로겐의 신경세포 보호기전 규명에 대한 연구가 실행되어야만 신경세포사에 대한 효과적인 치료제로서 에스트로겐을 사용할 수 있을 것이라 사료된다.

참고문헌

1. Brian RP, Xiurong Z, Jennifer KN, Kevin KWW, Rand MP, Ronald LH. Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septo-hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 1998; 52: 505-20.
2. Tian LY, Chuanlin W, Anne MR, Kristine K, Paul K, Watler E, et al. Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: a potential role of caspase-3. *J. Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 495-507.
3. Paul AS, Jeffery AC, Michelle MR, Dorothy AS, Chad JB, Amy LI, et al. Quantification of active caspase 3 in apoptotic cells. *Analytical Biochem* 2000; 284: 114-24.

4. David C, Judy K, Paola ST. Estrogens influence growth, maturation, and amyloid β -peptide production in neuroblastoma cells and in a β -APP transfected kidney 293 cell line. *Bain Plasticity* 1997; 19: 261-71.
5. Gibbs RB, Hashash A, Johnson DA. Effects of estrogen on potassium-simulated acetylcholine release in the hippocampus and overlying cortex of adult rats. *Brain Res* 1997; 749: 143-6.
6. Hurn PD, Littleton-Kearne MT, Kirsch JR, Dharmarajan AM, Traystman RJ. Posriscemic cerebral blood flow recovery in the female: effect of 17 beta-estradiol. *J Cereb Blood Flow* 1995; 15: 666-72.
7. Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density the estrous cycle in the adult rat. *J. Neurosci* 1992; 12: 2549-54.
8. Hideyuki S, Masakazu I, Takeshi K, Makoto U, Kazuhiro H, Miki N, et al. Mechanism of antiapoptotic effect estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J* 2000; 14: 1202-14.
9. Marie O, George GJ, Jan-Ake G, Yasmin LH. Differential distribution and regulation of estrogen receptor- α and- β mRNA within female rat brain. *Mol Brain Res* 1998; 54: 175-80.
10. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; 211: 1294-302.
11. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 451-86.
12. Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptor: many actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83: 851-7.
13. Sabbah M, Gouilleux F, Sola B, Redeuilh G, Baulieu EE. Structural differences between the hormone and antihormone estrogen receptor complexes bound to the hormone response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 390-4.
14. Green PS, Gridley KE, Simpkins JW. Nuclear estrogen receptor-independent neuroprotection by estratrienes: a novel interaction with glutathione. *Neuroscience* 1998; 84: 7-10.
15. Lustig RH. Sex hormone modulation of neural development in vitro. *Horm Behav* 1994; 28: 383-95.
16. Bhel C, Widmann M, Trapp T, Holsboer. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 473-82.
17. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor and β . *Endocrinology* 1997; 138: 863-70.
18. Tieu K, Zuo DM, Yu PH. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of Bcl-2 and p53 protein. *J. Neurosci Res* 1999; 58: 426-35.
19. Wielckens K, Schmidt A, George E, Bredehorst R, Hilz H. DNA fragmentation and NAD depletion. Their relation to the turnover of endogenous mono (ADP-ribosyl) and poly (ADP-ribosyl) protein. *J Biol Chem* 1982; 257: 12872-7.
20. Damu T, Jill M, Vincent JK. Caspase-8 activation and Bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 9303-7.
21. Hamid BA, Alexander GY, Vessela I, Bogdan AS, Geping W, Sudha I, et al. Role of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 22932-40.
22. Theo P, Michael S, Manfred N, Tertia J, Michael S, Serfling E, et al. 17 β -Estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 192-200.
23. Behl C, Thomas S, Frank L, Ank P, Martina W, Christopher JN, et al. Neuroprotection against oxidative stress by estrogen: Structure-activity relationship. *Mol pharmacol* 1997; 51: 535-41.
24. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler L, Wise PM. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptor. *J Neurosci* 1999; 19: 6385-93.
25. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor β subtype: A novel mediator of estrogen action in neuroendocrine system. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1998; 19: 253-86.
26. Jonathan AP, Lars O. Staurosporine differential human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. *Brain Res Bull* 1997; 43: 515-23.
27. Garcia-Segura LM, Cardona GP, Naftolin F, Chowen JA. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *NeuroReport* 1998; 9: 593-7.
28. Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *NeuroReport* 1998; 9: 2565-8.
29. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
30. Teixeira C, Reed JC, Pratt MAC. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55: 3902-7.
31. Dena BD, Paul JS, Melinds EW, Istvan M, Phyllis MW. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: A potential role for estrogen receptor. *J Neurosci* 1999; 19: 6385-93.