대한산업의학회지 제 17 권 제 4 호 (2005년 12월)
Korean J Occup Environ Med, 2005;17(4):352-364

cDNA array 방법을 이용한 망간에 노출된 흰쥐 뇌기저핵의 유전자발현 분석

인제대학교 산업의학연구소, 부산백병원 산업의학과

이채관 · 노성민 · 문덕환 · 김정호 · 손병철 · 김대환
이창희 · 김휘동 · 김정원 · 김종은 · 안진홍 · 이채언

— **Abstract** —

Gene Expression Analysis in Basal Ganglia of Manganese-Exposed Rat Based on cDNA Array

Chae Kwan Lee, Noh Sung Min, Deog-Hwan Moon, Jeong Ho Kim, Byung-Chul Son, Dae-Hwan Kim, Chang-Hee Lee, Hwi-Dong Kim, Jung-Won Kim, Jong-Eun Kim, Jin Hong Ahn, Chae-Un Lee

Institute of Industrial Medicine & Department of Occupational and Environmental Medicine, Busan Paik Hospital, Inje University

Objectives: This study investigated the gene expression profile in basal ganglia of manganese-exposed rats based on cDNA array analysis.

Methods: For cDNA array, 25 male Sprague-Dawley rats (250±25 g) were intraperitoneally injected with 25 mg/kg B.W./day of $MnCl_2$ (0.3 ml) for 10 days. For dose-related gene expression analysis, rats were intraperitoneally injected with 0.2, 1.0, and 5.0 mg/kg B.W/day of $MnCl_2$ for 10 days. Control rats were injected with an equal volume of saline. RNA samples were extracted from brain tissue and reverse-transcribed in the presence of [α^{32}P]-dATP. Membrane sets of the Atlas Rat 1.2 array II and Toxicology array 1.2 kit (Clontech, Palo Alto, CA) were hybridized with cDNA probe sets. Northern blot hybridization method was employed to assess the dose-related gene expression.

Results: Fifty-two genes showed significant changes in expression of more than two-fold. Twenty-eight were up-regulated and 24 were down-regulated in the manganese-exposed group compared to the control. Among the 52 genes, 28 genes including nuclear factor I-X1 (NF1-X1), neuroligin 2 and 3, mitochondrial stress-70 protein (MTHSP70), neurodegeneration-associated protein 1 (Neurodap1), multidrug resistance protein (MDR), and endoplasmic reticulum stress protein 72 (ERP72), were reported for the first time related to the manganese-induced neurotoxic-metabolism in the rat basal ganglia. According to the dose-related gene expression analyses, MTHSP70, Neurodap1 and ERP72 genes were up-regulated compared to the control even in the group exposed to low manganese dose (0.2 mg/kg B.W./day).

Conclusions: Twenty-eight genes detected for the first time in this study were closely related to the manganese-induced neurotoxic-metabolism in the rat basal ganglia and further study of these genes can give some more useful information about the manganese metabolism.

Key Words: Basal ganglia, cDNA array, Dose-related gene expression, Manganese.

<접수일: 2005년 9월 8일, 채택일: 2005년 12월 7일>
교신저자: 문 덕 환 (Tel: 051-890-6741) E-mail: iimmdh@inje.ac.kr

* 이 연구는 2004년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의한 것임.

서 론

망간은 비철 합금의 제조와 건전지 제조, 과망간산칼륨 등 망간 화합물의 제조, 용접봉의 피막, 유리와 섬유의 표백제, 염색제, 가죽의 유피(tanning), 비료제조 등에 사용되며 망간의 유기탄산염은 중유의 첨가제, 매연제거제, 안티노킹(antiknoking)제로 이용된다(Kim et al, 1994; Park et al, 1991). 우리나라에는 산업화에 따른 각종 제조업의 발달로 망간을 재료로 사용하는 합금이나 용광로 작업, 배터리 등 화학제품 제조 및 용접 등에서 망간 흄에 대한 노출이 보고되었다(Kim et al, 1994; Park et al., 1991; Lim et al, 1995). 1991년 망간광석을 분쇄하여 용접봉 제조 원료를 생산하는 업체에서 4명의 환자 발생이 보고되었고(Park et al, 1991) 아크(CO_2 Arc)용접공의 자기공명 영상에서 망간 과노출이 의심되는 소견이 보고되었다(Hong et al, 1998). 1997년 2월 12일 노동부 직업병 심의위원회에서 용접에 의한 망간 중독이 업무상 질병으로 인정됨으로서 특히 용접공들의 망간 중독은 산업의학 분야의 중요한 연구 과제이다.

망간 중독 대부분이 신경학적 증상에 근거하므로 망간 중독의 진단 및 확진 그리고 증상의 단계를 판단하기에 어려움이 많으며, 증상을 진단하기 위한 객관적인 자료 확보를 위한 연구가 필요하다. 최근 망간의 신경독성에 관한 분자생물학적 접근이 시도 되었는데 미토콘드리아의 manganese superoxide dismutase의 작용에 의한 신경세포사멸 억제기전(Keller et al, 1998), peroxynite 생성억제 및 지질산화 억제기전 등 중금속에 의한 유도되는 세포사멸(apoptosis) 억제기전, 그리고 신경전달 물질인 gamma-aminobutyric-acid (GABA)과 도파민 분비기전에 관한 연구 등이 진행되었다(Gwiazda et al., 2002; Heron et al, 2001; Hirata, 2002; Stredrick et al, 2004). 그러나 망간의 독성기전을 전반적으로 설명하기에는 아직 연구가 부족한 실정이다.

특정유전자들을 대상으로 한 연구는 그 유전자를 포함한 부분적인 독성기전은 심도 있게 연구할 수 있으나 독성기전에 관련되어 아직 알려지지 않은 유전자를 발굴하여 새로운 연구 분야를 제시하는 등 연구영역을 확대하기는 어렵다. 반면 cDNA array 방법은 다량의 유전자를 동시에 검색하여 독성기전에 관련된 다수의 유전자들을 확인할 수 있으며 아울러 지금까지 망간의 독성기전에 관하여 연구되지 않은 새로운 유전자들도 발굴함으로서 연구영역을 확대할 수 있는 장점이 있다.

이 연구와 유사한 연구로 망간에 노출된 마우스 뇌기저핵의 흑색질(substantia nigra)과 선조체(striatum)에서 cDNA array 방법으로 유전자발현에 관한 연구를 수행하여 흑색질에서는 neural cell adhesion protein BIG2, heavy neurofilament subunit 등 5개, 선조체에서는 light neurofilament subunit, brain acyl-CoA synthetase II, heavy neurofilament subunit 등 9개의 망간에 의한 신경세포에서의 독성기전에 관련된 유전자들을 보고한 바 있었다(Beak et al, 2004). 그러나 포유류의 내분비 중추와 밀접한 관련이 있는 뇌기저핵 전반에 관한 연구는 아직 없었다. 망간에 의한 도파민 분비교란은 혈중 프로락틴의 농도를 변화시킨다(Mutti et al, 1996; Smargiassi와 Mutti, 1999). 또한 망간은 시상하부에 축적되어 luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)의 분비를 자극하는 등 뇌기저핵 전반의 기능에 영향을 미치며(Pine et al, 2005), 특히 뇌기저핵의 과도한 망간 축적은 파킨슨병과 유사한 신경학적 증상을 일으킨다고 알려져 있다(Takeda, 2003). 따라서 망간에 노출된 흰쥐의 뇌기저핵에서의 유전자발현에 관한 연구는 망간에 의한 프로락틴, LHRH 등 호르몬분비 교란기전 및 신경학적 증상을 연구하는 데에도 도움이 될 것이다.

이 연구에서는 망간에 노출된 흰쥐의 뇌기저핵에서 cDNA array분석을 시행하여 흰쥐의 내분비 중추와 밀접한 관련이 있는 뇌기저핵에서 망간의 독성기전에 관련된 유전자들을 조사하고자 한다. 이 연구의 결과는 흰쥐의 뇌기저핵에서 망간의 독성기전과 관련되어 지금까지 알려지지 않은 새로운 유전자들을 제시하는 등 이 분야의 연구에 유익한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

대상 및 방법

1. 연구 재료

1) 실험동물 관리

실험동물은 망간 노출력이 없는 출생 후 15주된 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐(250±25 g) 25마리를 사용하였으며 사료와 물은 자유롭게 공급되었다. 사육된 온도조건은 24℃~26℃, 습도는 65%, 광조건은 명기 14시간, 암기 10시간이었다. 실험동물은 인제대학교 동물사육실 규정에 따라 관리하였다.

2) 망간 투여 및 조직 적출

망간($MnCl_2$, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA)은 생리식염수에 녹인 후 복강 주사(0.3 ml)하였으며 대조군은 동량의 생리식염수를 주사하였다. 망간 투여량은 기존문헌(Pecze et al, 2004; Takeda et al, 2003; Weber et al, 2002; Zheng et al, 1999)과 no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) 및 lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL)을

참고하여(Greger, 1998) cDNA array를 위하여 25 mg/kg B.W./day로 10일간, 그리고 망간 투여 농도별 유전자 발현분석을 위하여 대조군, 0.2, 1.0, 5.0 mg/kg B.W./day로 각 군별 5마리씩 10일간 투여하였다. 흰쥐의 경우 만성중독 증상은 20~50 mg/kg B.W./day 로 30일 이상 투여 시(Shukakidze et al, 2003), 그리고 아급성 중독은 50 mg/kg B.W./day 농도로 4일간 투여시 나타난다(Zwingmann et al, 2004). 이 연구에서는 아급성이하 - LOAEL 범위의 망간독성에 관련된 유전자들을 조사하고자 하였다. 실험동물은 망간투여 10일째에 모두 도살하였다. 도살 직후 후두개골을 개방하여 전뇌(whole brain)를 분리한 후 두정부에서부터 피질과 해마를 차례로 제거하고 나머지 기저핵 부위를 적출하여 실험에 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 체중 및 뇌의 무게 측정

체중은 매일 오전(AM 10:00)에, 전뇌의 무게는 도살 후 시료적출 시 측정하였다.

2) 뇌기저핵의 망간 농도분석

실험동물은 망간투여 10일째에 모두 도살하였으며, 뇌기저핵은 도살 직후 적출하여 생리식염수로 씻고 3M 종이로 수분을 제거한 뒤 정량하였다. 시료의 전처리 및 분석은 Montes 등의 방법에 따랐다(Montes et al., 2002). 정량된 조직을 1 ml의 HNO_3 용액과 60℃에서 30분간 반응시켜 분해한 후 원심분리하였다. 상층액을 적정량의 0.1 N HNO_3 용액으로 희석한 후 비불꽃법 원자흡광광도계(Flameless Atomic absorption spectrometry; Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)로 정량하였다.

3) RNA 추출

적출된 뇌 조직에 Tri-reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.1 g/ml를 가한 후 homogenizer (Ingenieurburo Co., Etzenbach, Germany)를 사용하여 얼음에 시험관을 담은 상태로 약 30초간 마쇄하였다. Tri-Reagent 1/5 분량의 chloroform을 가하고 실온에서 15분간 방치한 후 4℃, 13,500 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 새 시험관에 옮기고 동량의 isopropanol을 가한 뒤 실온에서 15분간 방치 후, 다시 4℃, 13,500 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 침전물을 75% 에탄올로 2회 세척하였다. 침전물을 실온에서 10분 동안 건조한 후 적당량의 formamide (Sigma-Aldrich) 또는 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma-Aldrich)로 처리된 멸균수에 녹였다. mRNA는 mRNA Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하였다. 추출된 total RNA와 mRNA는 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, 280 nm에 대한 260 nm 흡광도의 비율이 1.6~2.0인 것들을 cDNA array, RT-PCR 및 Northern blot hybridization에 사용하였다.

4) cDNA array 분석

cDNA array는 Rat Toxicology array 1.2 kit (Clontech, East Meadow Circle, Palo Alto, CA, USA)와 Atlas Rat 1.2 array II kit (Clontech)를 사용하였다. 추출한 total RNA는 DNase I (Roche Molecular Biochemicals)를 처리하여 genomic DNA를 제거한 다음 β-actin primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 genomic DNA 잔존 유무를 확인하였다. 준비된 total RNA 20 μg를 0.5 ml micro-centrifuge tube에서 70℃로 2분, 50℃로 2분간 incubation 한 후 [α^{32}P]-dATP (Amersharm Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), MMLV reverse transcriptase (Roche Molecular Biochemicals)와 CDS (cDNA synthesis) primer mix를 사용하여 50℃에서 25분간 반응시켜 동위원소가 표지된 cDNA probe를 합성하였다. 합성된 probe는 Nucleospin Extraction Spin Column (Amersharm Pharmacia Biotech)을 이용하여 정제한 후 scintillation counter로 cpm값을 측정하였으며 각 실험군 별로 5×10^6 cpm 이상 사용하였다. Atlas array membrane (Clontech Co.)을 0.5 mg denaturated salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich Co.)가 첨가된 ExpressHyb로 68℃에서 30분간 pre-hybridization하였다. Probe를 10X denaturing solution (1 M NaOH, 10 mM EDTA)과 2X neutralizing solution (1 M NaH_2PO_4, pH 7.0)로 68℃에서 각각 20분과 10분씩 incubation 한 뒤 ExpressHyb에 첨가하여 68℃에서 18시간 hybridization시켰다. Hybridization 후 세척액 1(2X SSC, 1% SDS)로 68℃에서 30분간 3회, 세척액 2(0.1X SSC, 0.5% SDS)로 68℃에서 30분간 1회 세척하였다.

5) Northern blot hybridization

mRNA (1~4 μg)를 1% agarose/2.2 M formaldehyde gel에서 50 V로 3시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후 RNA를 transfer kit (Trans Vac, Hoefer Co., San Francisco, CA, USA)를 이용하여 나일론종이(Schleicher & Schuell Inc., Keene, NH, USA)

로 옮긴 후, vacuum oven에서 80℃로 2시간 동안 건조하였다. RNA가 부착된 나일론종이를 hybridization buffer로 60℃에서 2시간 동안 prehybridization한 후 합성된 cDNA probe (1×10^9 cpm/ml)를 첨가하여 60℃에서 18시간 동안 hybridization하였다. Hybridization buffer의 조성은 50% deionized formamide, 5X SSC (1XSSC: 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate), 5X Denhardt's solution (1X Denhardt's solution: 0.01% polyvinyl pyrrolidone, 0.01% Ficoll and 0.01% BSA), 0.1% SDS, 2 mg/ml salmon sperm DNA이다. Hybridization 후 비특이적인 결합을 제거하기 위하여 나일론종이를 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 55℃에서 3회 세척한 뒤 X선필름(X-OMAT, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA)으로 1~4일간 감광시켰다. 사용된 probe는 RT-PCR로 합성된 cDNA 절편을 주형으로 Oligolabelling Kit (Amersham Pharmacia Biotech.)와 [α^{32}P]-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech.)를 사용하여 합성하였다. 합성된 cDNA probe를 Nick column (Amersham Pharmacia Co.)으로 정제하였다. 사용된 cDNA probe의 활성은 1×10^9 cpm/μg 이상이었다.

6) Autoradiograph 및 유전자 발현비율 분석

유전자 발현은 Image-Analyzer 감광방식과 X선 필름 감광방식을 병행하였다. Image-Analyzer 감광방식은 Phosphor스크린을 방사성 동위원소로 표지된 나일론종이에 부착하여 감광시킨 후 Typhoon9400 (Amersharm Biosciences, Piscatway, NJ, USA)으로 영상화 하였다. 사용된 프로그램은 Image Quant (version 5.0)이었다. X선 필름 감광방식은 hybridization과 세척이 끝난 나일론종이를 X-OMAT AR 필름 (Eastman Kodak Co.)으로 -70℃에서 1~3일 감광 시킨 후 X선 필름 현상기(RGII, Fuji Co., Tokyo, Japan)로 현상하였다. cDNA array의 대조군과 실험군(25 mg군) 간의 유전자 발현 배율 분석은 cDNA array 제작사에서 제공하는 array 분석용 Atlaseimage™ Software (Clontech)를 사용하였다. 제시된 발현비율은 Atlaseimage™ Software를 이용한 array 결과의 평균치를 비교하였다. Northern blot hybridization 분석의 대조군과 각 농도군 간의 유전자 발현 배율 분석은 Adobe Photoshop (version 6.0)을 이용하였다. 사용된 total RNA 양의 오차는 βactin 간의 오차에 따라 보정 하였으며, 각 시료의 감광정도를 측정한 뒤 대조군의 값을 1로 설정하여 각 농도군의 상대치를 계산하였다.

3. 자료 분석

자료 분석은 SPSS 프로그램(version 12.0)을 이용하여 실험군간 평균의 전체비교에는 Kruskal-Wallis one-way ANOVA를 사용하였다. 군 간의 비교에는 Mann-Whitney U test를 사용하였고 p 값은 Bonferroni correction을 적용하여 5개 군 간의 상호비교일 경우 0.005 미만을, 4개 군 간의 상호비교일 경우 0.0083 미만인 경우를 유의수준으로 설정하였다.

결 과

1. 체중과 뇌의 무게

체중과 뇌의 무게를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 체중은 대조군에 비하여 망간 투여군에서 투여농도에 따라 감소하였으며 5 mg과 25 mg 투여군은 통계적으로 유의하였다. 뇌의 무게는 유의한 변화가 없었다. 기타 소견으로 망간 25 mg 투여군에서 간과 횡경막 간의 유착 소견이 있었다.

2. 뇌기저핵의 망간 농도

뇌기저핵의 망간 농도를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 혈액과 뇌기저핵의 망간 농도는 대조군에 비하여 망간 투여군에서 투여 농도에 따라 유의하게 증가되었다.

3. cDNA array 분석

흰쥐의 뇌기저핵에 대하여 조사된 두 array kit에서 671개 유전자의 발현이 확인 되었으며(Fig. 1) 그 중 대조군과 비교하여 망간 투여군에서 2배 이상의 유의한 차이를 보인 유전자는 26개 분류군의 52개 유전자였다 (Table 3). 이들 중 망간투여군에서 발현이 증가된 유전자는 28개였고 감소된 유전자는 24개였다. 대조군 또는 망간투여군에서만 발현되는 유전자는 없었다. 그리고 이 유전자들에 대하여 Pubmed 등을 통한 문헌검색 결과 지금까지 망간의 신경독성기전과의 관련성이 보고된 바 없는 유전자는 19개 분류군의 28개였다(Table 4).

4. 망간 투여 농도별 유전자 발현 (Dose-related gene expression)

Table 4 에 제시된 28개의 유전자들 중 두 실험군간에 발현비율차가 큰 mitochondrial stress-70 protein, multidrug resistance protein, neurodegeneration-

Table 1. Mean weight of body and brain according to the manganese exposure level mean±S.D.

Parameters	Control	0.2 mg	1.0 mg	5.0 mg	25.0 mg
Body (g)	367.50±37.20	358.47±42.86	342.63±38.27	295.55±32.94[abc]	273.82±34.78[abc]
Brain (g)	1.85±0.13	1.83±0.14	1.85±0.12	1.84±0.13	1.78±0.12

[a]compared to control group, [b]compared to 0.2 mg exposed group, [c]compared to 1.0 mg exposed group.
p(<0.005) values were calculated by Bonferroni correction.

Table 2. Mean manganese concentration of blood and basal ganglia according to the manganese exposure level mean±S.D.

Parameters	Control	0.2 mg	1.0 mg	5.0 mg	25.0 mg
Blood (μg/㎖)	0.015±0.001	0.031±0.003[a]	0.135±0.011[ab]	0.842±0.076[abc]	1.047±0.112[abc]
Basal ganglia (μg/g)	0.121±0.012	0.352±0.032[a]	0.757±0.073[ab]	2.953±0.261[abc]	14.586±1.183[abcd]

[a]compared to control group, [b]compared to 0.2 mg, [c]compared to 1.0 mg,dcompared to 5.0 mg exposed group.
p(<0.005) value was calculated by Bonferroni correction.

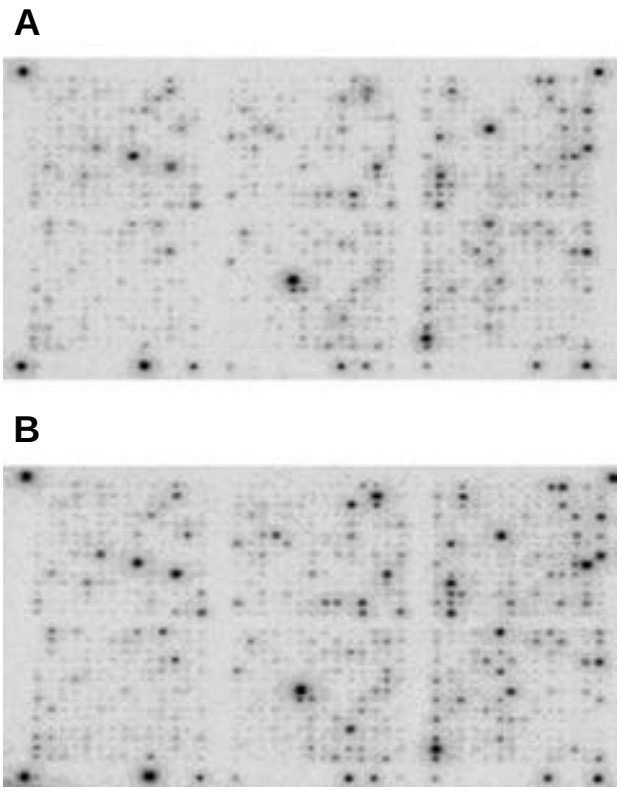

Fig. 1. Representative autoradiogram of cDNA expression array. The Rat Toxicology array 1.2 membrane sets were hybridized with cDNA probe sets reverse-transcribed from the basal ganglia of manganese exposed rat (**B**) and control (**A**).

associated protein 1, endoplasmic reticulum stress protein 72, neuroligin 2, dopa/tyrosine sulfotransferase, dopamine receptor 1a, dopamine receptor 2 등 8개 유전자들에 대하여 망간투여 농도별 유전자 발현을 조사하였다.

1) Mitochondrial stress-70 protein (MTHSP70)

Mitochondrial stress-70 protein (Table 1, No 11)은 스트레스 반응 단백군에 속하며, 유전자발현은 대조군과 비교하여 망간 0.2, 1.0, 5.0 mg 투여군에서 각각 4.12, 4.29, 5.56배 증가되었으며, 낮은 농도의 망간 투여군에서도 대조군과 비교하여 현저히 증가되었다 (Fig. 2).

2) Multidrug resistance protein (MDRP)

Multidrug resistance protein (Table 1, No. 13)은 약제내성 단백군에 속하며, 유전자발현은 대조군과 비교하여 망간 0.2, 1.0, 5.0 mg 투여군에서 각각 2.57, 5.12, 5.21배 증가되었다(Fig. 2).

3) Neurodegeneration-associated protein 1 (Neurodap 1)

Neurodegeneration-associated protein 1 (Table 1, No.25)은 trafficking and targetting protein군에 속하며, 유전자발현은 대조군과 비교하여 망간 0.2, 1.0, 5.0 mg 투여군에서 각각 2.95, 4.67, 6.25배 증가되었으며, 낮은 농도의 망간 투여군에서도 대조군과 비교하여 현저히 증가되었다(Fig. 2).

4) Endoplasmic recticulm stress protein 72 (ERP72)

Endoplasmic recticulm stress protein 72 (Table 1, No. 31)는 전사 후 조절 및 스트레스 반응 단백군에 속하며, 유전자발현은 대조군과 비교하여 망간 0.2, 1.0, 5.0 mg 투여군에서 각각 3.92, 6.41, 10.18배 증가되었으며, 낮은 농도의 망간 투여군에서 대조군과 비교하여 현저히 증가되었다(Fig. 2).

Table 3. List of genes showing changed expression in the manganese exposed group compared with the control

GenBank	No.	Gene/Protein Name	Gene/Protein Classification	[a]Fold change
D26307	1	JunD proto-oncogen	Oncogenes & tumor suppressors	+2.13
M65008	2	Zinc finger transcriptional activator (NGFI-C)		+2.22
AB012234	3	Nuclear factor I-X1 (NF1-X1)	DNA polymerases, replication factors & topoisomerases	+5.46
M14656	4	Osteopontin (ON)	Matrix adhesion receptors	-2.64
M20035	5	Prothymosine-alpha (PTMA)	Other immune system protein	-2.94
X14878	6	Thioredoxin		-2.87
U41662	7	Neuroligin 2	Cell surface antigens; cell adhesion protein	-7.65
U41663	8	Neuroligin 3		-3.41
M96375	9	Neurexin I beta (NRXN1-beta)		-2.84
Z27118	10	Heat shock 70-kDa protein (HSP70)	Heat shock proteins	+3.06
S78556	11	Mitochondrial stress-70 protein (MTHSP70); 75-kDa	Stress response proteins	+10.03
M18330	12	Protein kinase C delta (PKC-delta; PRKCD; PKCD)		-2.26
X96394	13	Multidrug resistance protein (MDRP)	Drug-resistance protein	+11.25
Y00404	14	Soluble superoxide dismutase 1 (SOD1)	Other metabolism enzymes	+4.21
X56600	15	Superoxide dismutase 2, mitochondria		+4.26
X94371	16	Superoxide dismutase 3		+2.41
M60753	17	Membrane-bound soluble catechol-O-methyltransferase		-2.23
AF05528	18	Potential-sensitive polyspecific organic cation transporter 3	Intracellular transducers, effectors & modulators	-2.21
X59949	19	Nitric oxide synthase 1		+5.85
D17521	20	Chloride channel protein 3 (CLCN3; CLC3)	Voltage-gated ion channels	-2.07
Z67744	21	Chloride channel protein 7 (CLCN7; CLC7)		-2.26
M91808	22	Sodium channel beta 1 subunit		+2.10
J03753	23	Brain calcium-transporting plasma membrane type ATPase	ATPase transporters	-2.82
X05834	24	Fibronectin	Extracellular matrix proteins	-3.46
D32249	25	Neurodegeneration-associated protein 1 (Neurodap 1)	Other trafficking & targeting proteins	+8.25
M18668	26	Creatine kinase b	Energy metabolism	+2.13
X14209	27	Cytochrome c oxidase subunit IV (COX4)		-2.85
D10952	28	Cytochrome c oxidase polypeptide Vb (COX5B)		-3.68
M17086	29	cAMP-dependent protein kinase type I alpha regulatory subunit (PRKAR1A)	Nucleotide metabolism	+2.64
U38419	30	Dopa/tyrosine sulfotransferase (DTST)	Metabolism of cofactors, vitamins & related substances	-6.84
M86870	31	Endoplasmic reticulum stress protein 72 (ERP72)	Post-translational modification protein; other stress response proteins	+12.24
X78167	32	Ribosomal protein L15	Ribosomal proteins	+4.24
X51707	33	Ribosomal protein S19 (RPS19)		+6.25
X51536	34	Ribosomal protein S3 (RPS3)		+3.35
AF003523	35	BCL2-associated death promoter (BAD)	Bcl family proteins	-3.59
U72350	36	BCL2-like protein 1 (BCL2L1); BCLX		-3.24
M35077	37	Dopamine receptor 1A (D1A)	Hormone receptor nuclear receptors	-9.56
M36831	38	Dopamine receptor 2 (D2)		-11.76

[a] The fold change was obtained by comparing signal intensities between control and manganese exposed in the cDNA expression array. +: increased in manganese exposed group ; - decreased in manganese exposed group.

Table 3. continued.

GenBank	No.	Gene/Protein Name	Gene/Protein Classification	[a]Fold change
L08490	39	Gamma-aminobutyric-acid receptor alpha 1 subunit (GABA(A) receptor alpha 1; GABRA1)	Neurotransmitter receptors	-2.16
X15468	40	Gamma-aminobutyric-acid receptor beta 3 subunit receptor (GABRB3)		-2.06
AJ000556	41	Janus tyrosine-protein kinase 1 (JAK1)	Intracellular kinase network members	+2.36
U13396	42	Janus tyrosine-protein kinase 2 (JAK2)		+2.23
M18331	43	Protein kinase C epsilon type (PKC-epsilon)		-2.24
L01624	44	Serum/glucocorticoid-regulated serine / threonine protein kinase (SGK)		+2.20
D85509	45	Matrix metalloproteinase 3 (MT-MMP3)	Metalloproteinase	+2.81
M60616	46	Matrix metalloproteinase 11 (MMP11)		+3.14
AJ012603	47	A disintegrin and metalloproteinase domain 17	+2.10	
J00750	48	Metallothionein 1 (MT1)	Functionally unclassified proteins	+3.20
S65838	49	Metallothionein 3 (MT3)		+2.46
M17698	50	Thymosin beta 10 (TMSB10; THYB10); PTMB10		-4.99
D38380	51	Siderophilin; beta-1-metal-bindin	Extracellular transport/carrier proteins	+4.04
M58040	52	Transferrin receptor		+4.10

[a] Fold change was obtained by comparing signal intensities between control and manganese exposed in the cDNA expression array. +: increased in manganese exposed group ; - decreased in manganese exposed group.

5) Neuroligin 2

Neuroligin 2 (Table 1, No. 7)는 adhesion receptor군에 속하는 유전자로써 발현은 대조군과 비교하여 망간 0.2, 1.0, 5.0 mg 투여군에서 각각 1.40, 2.85, 7.14배 감소되었다(Fig. 3).

6) Dopa/tyrosine sulfotransferase (DTST)

Dopa/tyrosine sulfotransferase(Table 1, No. 30)은 cofactor와 비타민 관련 기질의 신진대사에 관여하는 효소이며, 유전자발현은 대조군과 비교하여 망간 0.2 mg 투여군에서는 변화가 없었으나 1.0 mg 투여군에서는 3.35배 감소되었다(Fig. 3).

7) Dopamine receptor 1A (D1A)와 Dopamine receptor 2(D2)

Dopamine receptor 1A (Table 1, No. 37)와 Dopamine receptor 2 (No. 38)는 호르몬 및 핵 수용체군에 속하며, 유전자발현은 Dopamine receptor D1A의 경우 대조군과 비교하여 망간 0.2 mg 투여군에서는 변화가 없었으나 1.0, 5.0 mg 투여군에는 각각 4.76, 6.67배 감소되었다(Fig. 3). Dopamine receptor 2 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 망간 0.2, 1.0, 5.0 mg 투여군에서 각각 1.20, 2.32, 6.25배 감소되었다(Fig. 3).

고 찰

이 연구에서 cDNA array방법을 이용하여 확인한 망간의 뇌신경계 독성기전에 관여하는 새로운 유전자는 19개 분류군의 28개였으며, 그 중 이미 망간 대사와의 연관성이 알려진 유전자로는 gamma-aminobutyric-acid (GABA), superoxide dismutase (SOD), metalloproteinase, metallothionein, transferrin 등이 있었으며 지금까지 망간의 독성기전과 관련되어 보고된바 없는 유전자도 neurodegeneration associated protein, endoplasmic reticulum stress protein, neuroligin 등 21개가 확인되었다.

GABA는 glutamate와 함께 중추신경계의 주요한 신경전달 물질로서 GABA는 억제기전에, 그리고 glutamate는 흥분기전에 관여한다(Calaza et al, 2003). 망간노출은 선조체에서 GABA 농도를 증가시킨다고 알려져 있다(Gwiazda et al, 2002). GABA 수용체들 중 GABA(A)는 신경 신호전달과정에서 postsyneptic clustering에 관여하며 신경망 형성에도 관여한다. 따라서 GABA(A) 수용체의 기능저하는 신경망형성 및 신경계 교란의 원인이 된다(Erikson과 Aschner, 2003; Schweizer et al, 2003). 망간과 이 유전자와의 관련성에 관한 연구보고는 아직 없었다. 이 연구의 결과에 의하면 망간은 흰쥐 뇌의 GABA(A) α, βsubunit 유전자의

발현을 억제하였는데, 참고문헌과 이 연구의 결과로 보아 망간에 의한 GABA(A) α, βsubunit 유전자의 발현 억제는 뇌신경계의 신경망 형성과 신호전달체계를 교란시킬 것으로 추정된다.

과산화물질은 미토콘드리아에 의해 생성되며 peroxynitrite와 같은 유독성 과산화물을 생성한다. 그리고 이러한 과산화물들은 적절히 분해되지 못하면 세포의 항상성(homeostasis)이 유지되지 못하며 궁극적으로는 신경손상을 일으킨다(Chen et al, 2002; Colombrita et al., 2003; Viggiano et al, 2003). Superoxide dismutase (SOD)는 과산화물질의 분해작용을 가진 효소로서 과산화물들을 과산화수소(H_2O_2)로 전환시킨다(Kao et al, 2003; Viggiano et al, 2003). 이 연구에서는 SOD (manganese superoxide dismutase) 1, 2, 3 등의 유전자가 확인 되었으며 모두 발현이 증가되었는데 이는 망간투여에 의해 생성된 과산화물 분해과정으로 추

Table 4. List of new genes involved in the manganese-induced metabolism in the rat basal ganglia

GenBank	No.	Gene/Protein Name	Gene/Protein Classification
D26307	1	JunD proto-oncogen	Oncogenes & tumor suppressors
AB012234	3	Nuclear factor I-X1 (NF1-X1)	DNA polymerases, replication factors & topoisomerases
M14656	4	Osteopontin(ON)	Matrix adhesion receptors
M20035	5	Prothymosine-alpha (PTMA)	Other immune system protein
X14878	6	Thioredoxin	
U41662	7	Neuroligin 2	Cell surface antigens; cell adhesion protein
U41663	8	Neuroligin 3	
M96375	9	Neurexin I beta (NRXN1-beta)	
Z27118	10	Heat shock 70-kDa protein (HSP70)	Heat shock proteins
S78556	11	Mitochondrial stress-70 protein (MTHSP70); 75-kDa	Stress response proteins
X96394	13	Multidrug resistance protein (MDRP)	Drug-resistance protein
M60753	17	Membrane-bound soluble catechol-O-methyltransferase	
AF05528	18	Potential-sensitive polyspecific organic cation transporter 3	Intracellular transducers, effectors & modulators
D17521	20	Chloride channel protein 3 (CLCN3; CLC3)	Voltage-gated ion channels
Z67744	21	Chloride channel protein 7 (CLCN7; CLC7)	
M91808	22	Sodium channel beta 1 subunit	
J03753	23	Brain calcium-transporting plasma membrane type ATPase	ATPase transporters
X05834	24	Fibronectin	Extracellular matrix proteins
D32249	25	Neurodegeneration-associated protein 1 (Neurodap 1)	Trafficking & targeting proteins
M17086	29	cAMP-dependent protein kinase type I alpha regulatory subunit (PRKAR1A)	Nucleotide metabolis
M86870	31	Endoplasmic reticulum stress protein 72 (ERP72)	Post-translational modification protein; stress response proteins
M35077	37	Dopamine receptor 1A (D1A)	Hormone & nuclear receptors
M36831	38	Dopamine receptor 2 (D2)	
AJ000556	41	Janus tyrosine-protein kinase 1 (JAK1)	Intracellular kinase network members
U13396	42	Janus tyrosine-protein kinase 2 (JAK2)	
M18331	43	Protein kinase C epsilon type (PKC-epsilon)	
L01624	44	Serum/glucocorticoid-regulated serine /threonine protein kinase (SGK)	
M17698	50	Thymosin beta 10 (TMSB10; THYB10) ; PTMB10	Functionally unclassified proteins

정된다. 그 외 세포내 과산화물 생성억제 효소인 nitric oxide synthease (NOS) 유전자의 발현이 확인 되었는데 이 효소 또한 망간 투여군에서 유전자 발현이 현격히 증가되었다. SOD와 NOs 등의 활성이 저하되어 세포내 과산화물 분해가 원활치 못하면 세포는 superoxide 이온과 hydroxyl radical 등의 증가와 이로 인한 지질의 과산화, 세포내 환경의 과산화 및 DNA와 세포막 파괴 유전자 발현의 교란을 일으키게 되고 궁극적으로는 세포사멸(apoptosis) 또는 괴사한다(Stohs et al, 2001). 이 연구에서 확인된 세포사멸 관련 유전자는 BCL-associated death promoter (BAD)와 BCL2-like protein 1 (BCLX) 등이 있었다. BAD는 세포사멸 유도인자로, BCLX는 세포사멸 억제인자로 알려져 있다(Datta et

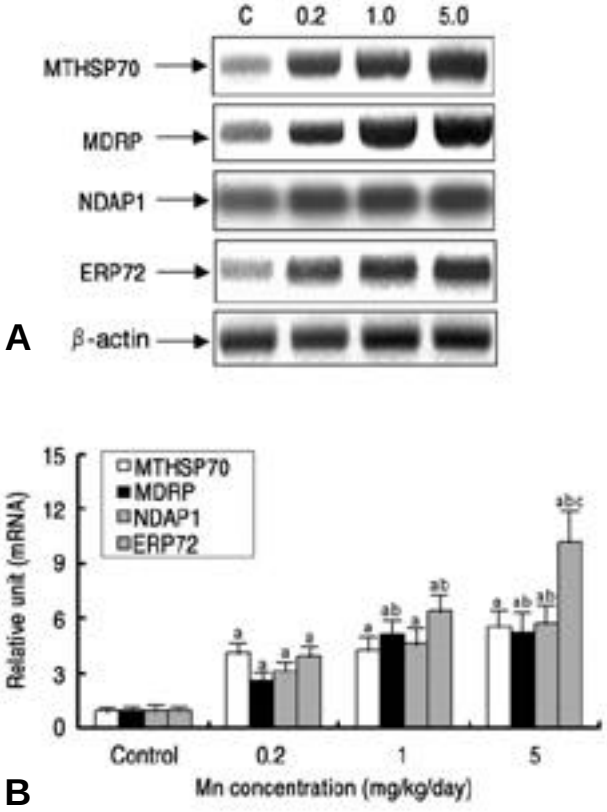

Fig. 2. Dose-related expression of mitochondrial stress protein 70 (MTHSP70), multidrug resistance protein (MDRP), neurodegeneration associated protein 1 (NDAP1) and endoplasmic recticulm stress protein 72 (ERP72) genes in the rat basal ganglia. (**A**) Northern blot analysis mRNAs. mRNAs (1 μg) were fractionated on a 1% formaldehyde agarose gel, transferred to a nylon paper, and hybridized with the [α^{32}P]dCTP-labeled cDNA probes. The βactin probe was hybridized to confirm equal loading of the mRNA samples. Arabic numbers on the lane indicate the manganese exposed level/kg B.W/day. C: control. (**B**) The Northern signals were normalized relative to the βactin mRNA levels, and expressed as relative units over the C value of 1.0. The experiments were repeated three times, and individual values are expressed as the mean±S.D. a, b and c on the bar indicate the significantly difference ($p<0.0083$) compared with control, 0.2 and 1.0 mg/kg B.W./day exposed groups, respectively.

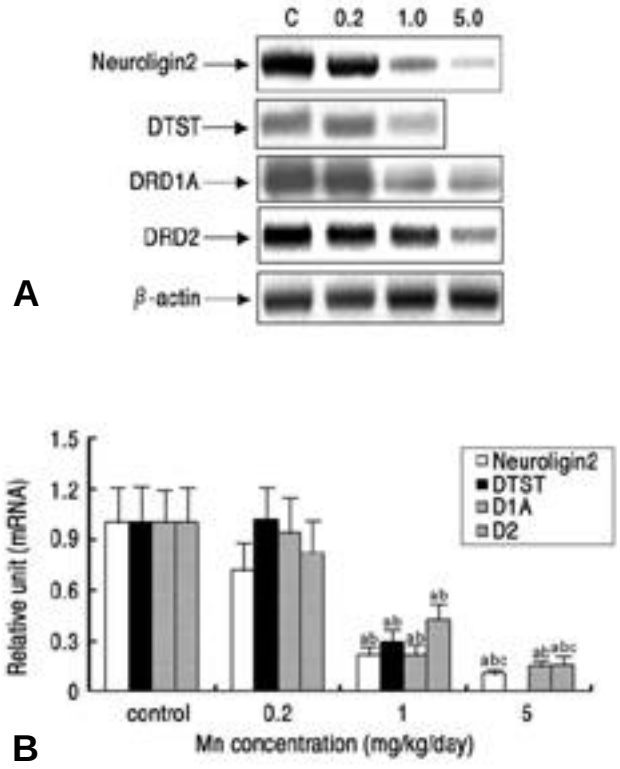

Fig. 3. Dose-related expression of neuroligin 2, dopa/tyrosin sulfotransferase (DTST), dopamine receptor 1A (D1A) and dopamine receptor 2 (D2) genes in the rat basal ganalia. (**A**) Northern blot analysis mRNAs. mRNAs (1 μg) were fractionated on a 1% formaldehyde agarose gel, transferred to a nylon membrane, and hybridized with the [α^{32}P]dCTP-labeled cDNA probes. The βactin probe was hybridized to confirm equal loading of the mRNA samples. Arabic numbers on the lane indicate the manganese exposed level/kg B.W/day. C: control. (**B**) The Northern signals were normalized relative to the βactin mRNA levels, and expressed as relative units over the C value of 1.0. The experiments were repeated three times, and individual values are expressed as the mean±S.D. a, b and c on the bar indicate the significantly difference ($p<0.0083$) compared with control, 0.2 and 1.0 mg/kg B.W./day exposed groups, respectively.

al, 2002; Ma et al, 1995). 망간에 의한 세포사멸 유도는 앞서 언급된 SOD2도 작용한다(Schrantz et al, 1999). 그러나 세포사멸 유도 및 억제 기전은 매우 복잡하고 관련된 유전자 또한 위의 유전자들 이외에 Bak, Bax 등(Huh et al, 2001; Matuszyk et al, 2001; Schimmer et al, 2001; Sundararajin et al, 2001) 다양하기 때문에 이전의 연구에서 알려진 유전자들과 이 연구에서 확인된 유전자들에 대한 추가적인 연구가 필요하며, 이러한 연구는 망간에 의한 과산화물 형성과 분해 및 세포사멸기전 연구에 많은 도움이 될 것이다.

Metalloproteinase (MMP)는 세포의 이동과 remodeling에 관여하는 효소로써 활성산소 및 활성 암모니아에 의해 활성이 조절되며 따라서 활성산소 및 활성 암모니아의 대사와 관련된 SOD2에 의하여 유전자 발현 및 효소활성이 조절된다고 알려져 있다(Zhang et al, 2002). 이 연구에서는 MMP3와 MMP11 유전자의 발현이 확인 되었으며 이 두 유전자 모두 망간 투여에 의해 발현이 증가 되었다. 이것을 망간 투여에 의하여 SOD2의 유전자의 발현이 증가 된 사실과 연계하면 MMP 유전자 발현의 증가는 망간에 의한 oxidative stress에 의해 유도된 것으로 해석된다.

Metallothionein (MT)은 중금속 결합 단백질로써 망간을 비롯한 중금속의 생체내 대사에 관여한다. 이 단백질들은 중금속과 결합하여 간, 신장 및 체내 여러 기관간의 이동에 관여한다(Coyle et al, 2001). 이 연구에서는 MT 1과 3 유전자의 발현이 확인 되었는데, 이들은 중금속에 의하여 유전자 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. MT 유전자의 발현 증가도 MMP 및 SOD2와 마찬가지로 oxidative stress를 억제하기 위한 과정으로 해석 된다(Sato et al, 1995).

혈장에서의 망간의 대사과정은 Mn^{2+}가 Mn^{3+}로 산화되어 transferrin과 결합하며(Archilbald와 Tyree, 1987; Aschner와 Aschner, 1991) 일부는 α_2-macroglobulin과 결합한다(Morrow et al, 1967). Mn^{2+} 및 Mn^{3+} 형태로서 α_2-macroglobulin과 결합하고 있는 것은 간정맥에서 빠르게 감소하지만 transferrin과 결합하고 있는 것은 그 감소가 더디며 특히 이런 형태의 Mn이 다른 조직으로 지속적으로 공급되어 진다(Morrow et al, 1967). Transferrin 수용체는 뇌의 모세혈관 내피세포에 존재하며(Jefferies et al, 1984), transferrin과 결합된 망간의 뇌혈류장벽 통과기전에 관여한다(Aschner와 Aschner, 1990; Aschner와 Gannon, 1994). 이 연구에서 망간에 노출된 흰쥐의 뇌기저핵에서 transferine 유전자의 발현이 현저히 증가되었다. Transferine 수용체 유전자에 관한 연구는 망간의 생체 대사 중 특히 뇌에서의 망간 축적 및 독성기전을 연구하는데 중요한 자료를 제공할 수 있을 것이다.

Dopamine 또한 망간대사와 관련된 중요한 인자이다. Dopamine은 시상하부의 tubero-infundibular neurone에서 주로 합성되며 프로락틴유전자 발현을 억제한다(Elsholtz et al, 1991). 이 연구에서는 흰쥐의 뇌기저핵에서 dopa/tyrosine sulfotransferase, dopamine receptor 1a, dopamine receptor 2 유전자의 발현이 확인 되었으며, 망간 투여군에서 세 유전자의 발현이 모두 감소하였다. 장기적인 망간노출은 뇌의 dopamine 분비를 억제하고 norepinephrine 분비를 증가시키는 등 신경전달물질의 분비를 교란시킨다고 알려져있다(Autissier et al, 1982). 이와 연관하여 이 연구에서 조사된 망간에 의한 dopa/tyrosin sulfotransferase 유전자의 발현 감소는 망간에 의한 dopamine 분비 감소의 원인으로 추정된다. 그러나 이와는 달리 망간 노출이 dopamine의 분비를 증가 시킨다는 연구보고도 있으며(Tran et al, 2002) 망간과 dopamine 분비에 관해서는 추가적인 연구가 필요한 분야이다. 그리고 dopamine 대사의 주요 매개체인 dopamine receptor 1a와 dopamine receptor 2 유전자와 망간의 독성기전에 관한 연구는 아직 보고 된 바 없으며, 이 유전자들의 역할에 관한 연구는 망간의 독성기전을 설명하는데 중요한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

이 연구에서 확인된 망간대사와 관련된 28개의 새로운 유전자들 중 뇌신경계의 신호전달기전에 중요한 역할을 하는 것들로는 neuroligin 2, 3, neurexin 1-beta등이 있다. Neuroligin은 다수의 subtype을 가진 유전자군으로써 이 연구에서 확인된 subtype 2, 3는 뇌세포 특이적으로 발현되는 막단백질이다(Bolliger et al, 2001; Ichtichenko et al, 1996). Neuroligin은 neurexin-beta, postsynaptic scaffolding protein (PSD-95) 등 다양한 종류의 단백질들과 반응한다(Ichtichenko et al, 1996; Ullrich et al, 1995; Ushkaryov et al, 1992). Neurexin 단백질들은 다양한 형태의 뇌세포 특이적인 막표면 단백질로서(Ullrich et al, 1995; Ushkaryov et al, 1992) neuroligin과 함께 뉴런간의 교량을 형성한다(Missler와 Sudhof. 1998). 그 외에도 neuroligin의 c-말단 부위는 PSD-95/D1g/ZO-1 (PDZ-95) 단백질과도 결합하여 뇌세포간의 신호 형성 및 전달에 관여한다(Kornau et al., 1997). 그리고 세포질에서의 PSD-95와 neuroligin 간의 상호작용은 그 차제가 시냅스로 작용한다(Hunt et al, 1996). 따라서 neuroligin은 신호전달시 형성되는 단백질 결합체의 구성을 결정하는 접합인자로 작용한다. 이 연구에서 사용된 두 개의 cDNA array kit에는 neuroligin 2, 3와 PSD-95, neurexin 유전자 들이 포함되어 있으며,

neuroligin 2, 3와 neuroxin-beta유전자의 경우 망간 투여군에서 유전자 발현이 현격히 감소되었다. 이러한 사실로 보아 망간 투여에 의한 neuroligin과 neurexin 유전자의 발현 억제는 망간에 의한 흰쥐의 뇌신경계 신호전달체계 교란의 직접적인 원인으로 생각된다.

이 연구에서 망간투여 농도에 따른 유전자발현 분석을 통해 8개 유전자에 대하여 망간 농도별로 유전자 발현을 조사하였으며 이 가운데 mitichondrial stress-70 protein (MTHSP70), neurodegeneration associated protein (Neurodap 1), endoplasmic reticulum stress protein(ERP72) 유전자는 낮은 농도(0.2 mg 투여군)의 망간 투여군에서도 발현이 현저히 증가되었다. Mitochondrial stress-70 protein은 Heat shock protein군에 속하며, 미토콘드리아 TCA cycle에 작용하는 단백질로써, oxidative stress억제 및 관련 단백질합성에 관여한다(Mitsumoto et al, 2002). 또한 이 단백질은 종양억제 단백질의 일종인 p53 단백질의 C-말단과 결합하여 종양억제 기전에 관여한다(Wadhwa et al, 2002). Neurodegeneration associated protein은 신경세포의 활성 유지에 필요한 postsynaptic density (PSD) 형성에 관여하는 등 신경전달기전에 중요한 역할을 한다(Nakayama et al, 1995). 그리고 endoplasmic reticulum stress protein는 세포내 신호전달에 관련된 단백질이다(Srinivasan et al, 1993).

cDNA array를 이용한 연구는 다수의 유전자 발현을 동시에 비교분석함으로서 특정 독성물질에 작용기전에 관련된 유전자들의 변화를 폭넓게 비교분석해 봄으로서 거시적으로 안목을 가질 수 있다는 이점이 있고, 아울러 연구대상이 아니던 유전자들을 새로이 알게 됨으로서 지금까지의 연구에서의 미비점을 보완하고 아루러 연구의 미개척 분야를 찾을 수 있다는 이점을 가진다. 이 연구에서도 oxidative stress, 신경전달계 등 지금까지 알려진 망간의 독성기전과 관련된 유전자들이 다수 확인되었다. 이 유전자들에 관한 연구자료는 지금까지 진행된 연구의 부족한 부분을 보완할 수 있을 것이며 나아가 망간의 신경내분비 독성에 관한 생체지표 개발 등 이 분야의 연구에 유용한 정보를 제공 할 수 있을 것이다. 아울러 이 연구에서 제시된 흰쥐의 뇌기저핵에서 망간의 독성기전과 관련되어 지금까지 알려지지 않은 neuroligin, neurexin 1-beta 유전자 등에 관한 자료는 망간에 의한 뇌신경계 신호전달체계 교란의 원인을 설명할 수 있는 새로운 연구자료로 생각된다. 그리고 그 외 Neurodegeneration-associated protein 1, dopamine receptor 등 28개의 새로운 유전자들도 망간독성 기전에 관한 새로운 연구 분야를 제시할 수 있을 것이다.

요 약

목적: 흰쥐의 뇌기저핵에서 망간의 신경독성 기전과 관련된 유전자들을 조사하여 망간의 뇌신경독성 연구에 필요한 자료를 제공하고자 하였다.

방법: 실험동물은 망간에 노출력이 없는 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐(250±25 g) 25마리를 사용하였으며, 망간 투여량은 참고논문과 No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) 및 Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level (LOAEL)을 참고하여, cDNA array는 25 mg/kg B.W. 농도로 10일간, 망간 농도별 유전자발현 분석은 대조군(0.0), 0.2, 1.0, 5.0 mg/kg B.W으로 10일간 투여하였다. 혈액과 뇌조직의 망간 농도는 원자흡광강도계로 분석하였다. cDNA Array는 Atlas Rat 1.2 array II와 Toxicology array 1.2 cDNA expression array kit를 사용하였다. 망간 농도에 따른 유전자 발현은 Northern blot hybridization 방법으로 분석하였다.

결과: 흰쥐의 뇌기저핵에서는 Rat Toxicology array 1.2 kit에 포함된 유전자들 중 424개, 그리고 Atlas Rat 1.2 array II kit에 포함된 유전자들 중 247개를 합하여 671개의 유전자가 발현 되었으며, 대조군과 비교하여 망간 투여군에서 2배 이상의 유의한 차이를 보인 유전자는 Rat Toxicology array 1.2 kit에서 32개, Atlas Rat 1.2 array II kit에서 20개를 합하여 52개 유전자였다. 이들 중 망간투여군에서 발현이 증가된 유전자는 28개였고 감소된 유전자는 24개였다. 그리고 nuclear factor I-X1 (NF1-X1), neuroligin 2, 3, mitochondrial stress-70 protein (MTHSP70) 등 19개 분류군의 28개 유전자들은 지금까지 망간에 의한 흰쥐 뇌의 신경독성기전과의 관련성이 보고된 적이 없는 것들이었다. 28개 유전자에 대하여 망간농도별 발현을 분석한 결과 8개가 유의한 변화를 보였고 특히 mitochondrial stress-70 protein (MTHSP 70), neurodegeneration-associated protein 1 (Neurodap 1), endoplasmic reticulum stress protein 72 (ERP72)유전자는 0.2 mg/kg B.W./day 투여군에서도 발현이 현저히 증가되었다.

결론: 이 연구에서 처음 확인된 망간대사와 관련된 28개의 유전자들은 망간의 뇌 신경독성 기전을 연구하는데 새로운 정보를 제공 할 수 있을 것이다.

참고문헌

Archibald FS, Tyree C. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. Arch Biochem

Biophys 1987;256:638-50.

Aschner M, Aschner JL. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. Neurosci Biobehav 1991;15:333-40.

Aschner M, Aschner JL. Manganese transport across the blood barrier: relationship to iron homostasis. Brain Res 1990;24:857-60.

Aschner M, Gannon M. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. Brain Res Bull 1994;33:345-9.

Autissier N, Rochette L, Dumas P, Beley A, Loireau A, Bralet J. Dopamine and norepinephrine turnover in various regions of the rat brain after chronic manganese chloride administration. Toxicology 1982;24:175-82.

Baek SY, Cho JH, Kim ES, Kim HJ, Yoon S, Kim BS. cDNA array analysis of gene expression profiles in brain of mice exposed to manganese. Ind Health 2004;42:315-20.

Bolliger MF, Frei K, Winterhalter KH, Gloor SM. Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. Biochem J 2001;356:581-8.

Calaza Kda C, de Mello MC, de Mello FG, Gardino PF. Local differences in GABA release induced by excitatory amino acids during retina development: selective activation of NMDA receptors by aspartate in the inner retina. Neurochem Res 2003;28:1475-85.

Chan P, Cheng JT, Tsai JC, Lien GS, Chen FC, Kao PF. Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. Neurosci Lett 2002;328:281-4.

Colombrita C, Calabrese V, Stella AM, Mattei F, Alkon DL, Scapagnini G. Regional rat brain distribution of heme oxygenase-1 and manganese superoxide dismutase mRNA: relevance of redox homeostasis in the aging processes. Exp Biol Med 2003;228:517-24.

Coyle P, Hubert CA, Philcox JC, Rofe AM. Importance of storage conditions for the stability of zinc- and cadmium-induced metallothionein. Biol Trace Elem Res 2001;81:269-78.

Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma YC, Cowan CW. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. Dev Cell 2002;3:631-43.

Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR, Sundmark VC. Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. J Biol Chem 1991;266:22919-25.

Erikson KM, Aschner M. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. Neurochem Int 2003;43:475-80.

Greger JL. Dietary standards for manganese overlap between nutritional and toxicological studies. J Nutr 1998;128:368-71.

Gwiazda RH, Lee D, Sheridan J, Smith DR. Low cumulative manganese exposure affects striatal GABA but not dopamine. Neurotoxicology 2002;23:69-76.

Heron P, Cousins C, Boyd C, Daya S. Paradoxical effects of copper and manganeses on brain mitochondrial function. Life Sci 2001;68:1575-83.

Hirata Y. Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. Neurotoxicol Teratol 2002;24:639-53.

Hong YS, Lim AY, Lee YH, Cheong HK, Kim JY, Lim HS, Lee JJ, Sa KJ, Kim JY. Three cases of high signal intensity by brain magnetic resonance image in arc weldwes. Korean J Occup Environ Med 1998;10;290-8.(Korean)

Huh WK, Gomez-Navarro J, Arafat WO, Xiang J, Mahasreshti PJ, Alvarez RD. Bax-induced apoptosis as a novel gene therapy approach for carcinoma of the cervix. Gynecol Oncol 2001;83:370-7.

Hunt CA, Schenker LJ, Kennedy MB. PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. J Neurosci 1996;16:1380-8.

Ichtchenko K, Naguyen T, Sudhof TC. Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. J Biol Chem 1996;271:2676-82.

Jefferies WA, Brandom MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, Mason DY. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. Nature 1984;312:162-3.

Kao PF, Lee WS, Liu JC, Chan P, Tsai JC, Hsu YH. Downregulation of superoxide dismutase activity and gene expression in cultured rat brain astrocytes after incubation with vitamin C. Pharmacology 2003;69:1-6.

Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, Clair DK, Yen HC, Germeyer A. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. J Neurosci 1998;18:687-97.

Kim JY, Lim HS, Cheong HK, Paik NW. A study on the manganese exposure and health hazards among manganese manufacturing workers. Korean J Occup Environ Med 1994;6:98-112.(Korean)

Kornau HC, Seeburg PH, Kennedy MB. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. Curr Opin Neurobiol 1997;7:368-73.

Lim HS, Kim JY, Cheong HK, Cheong HK. A Study on the Manganese Exposure and Health Hazard among Manganese Manufacturing Woman Workers. J Prev Med Public Health 1995;28:406-20.

Ma A, Pena JC, Chang B, Margosian E, Davidson L, Alt FW, et al. Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes. Proc Natl Acad Sci 1995;92:4763-7.

Matuszyk J, Kalas W, Cebrat M, Strzadala L. High expression of endogenous bcl-2 and bcl-xL in thymic lymphomas do not diminish their sensitivity to etoposide-induced apoptosis.

Anticancer Res 2001;21:2677-80.

Missler M, Sudhof TC. Neurexins: three genes and 1001 products. Trends Genet 1998;14:20-6.

Mitsumoto A, Takeuchi A, Okawa K, Nakagawa Y.A Subset of newly synthesized polypeptides in mitochondria from human endothelial cells exposed to hydroperoxide stress. Free Radic Biol Med 2002;32:22-37.

Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Rios C, Muriel P. A model to induce manganese accumulation in the brain of the cirrhotic rat and its evaluation. Brain Res Protoc 2002;9-15.

Morrow PE, Gibb FR, Gazioglu K. The clearence of dust from the lower respiratory tract of man. An experimental study, In Davies CN. Inhaled Particles and Vapours I. Pergmon Press 1967;455-61.

Mutti A, Bergamaschi E, Alinovi R, Lucchini R, Vettori MV, Franchini I. Serum prolactin in subjects occupationally exposed to manganese. Ann Clin Lab Sci 1996;26:10-7.

Nakayama M, Miyake T, Gahara Y, Ohara O, Kitamura T. A novel RING-H2 motif protein downregulated by axotomy: its characteristic localization at the postsynaptic density of axosomatic synapse. J Neurosci 1995;15:5238-48.

Park JI, Roh YM, Koo JW,Lee SH. Mangnaese exposure in ore crushing. Korean J Occup Environ Med 1991;3:111-8.(Korean)

Pecze L, Papp A, Nagymajtenyi L. Changes in the spontaneous and stimulus-evoked activity in the somatosensory cortex of rats on acute manganese administration. Toxicol Lett 2004;148:125-31.

Pine M, Lee B, Dearth R, Hiney JK, Dees WL. Manganese acts centrally to stimulate luteinizing hormone secretion: a potential influence on female pubertal development. Toxicol Sci 2005;85:880-5.

Sato M, Sasaki M, Hojo H. Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. Arch Biochem Biophys 1995;316:738-44.

Schimmer AD, Hedley DW, Pham NA, Chow S, Minden MD. BAD induces apoptosis in cells over-expressing Bcl-2 or Bcl-xL without loss of mitochondrial membrane potential. Leuk Lymphoma 2001;42:429-43.

Schrantz N, Blanchard DA, Mitenne F, Auffredou MT, Vazquez A, Leca G. Manganese induces apoptosis of human B cells: caspase-dependent cell death blocked by bcl-2. Cell Death Differ 1999;6:445-53.

Schweizer C, Balsiger S, Bluethmann H, Mansuy IM, Fritschy JM, Mohler H. The gamma2 subunit of GABA(A) receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. Mol Cell Neurosci 2003;24:442-50.

Shukakidze A, Lazriev I, Mitagvariya N. Behavioral impairments in acute and chronic manganese poisoning in white rats. Neurosci Behav Physiol 2003;33:263-7.

Smargiassi A, Mutti A. Peripheral biomarkers and exposure to manganese. Neurotoxicology 1999;20:401-6.

Srinivasan M, Lenny N, Green M. Identification of genomic sequences that mediate the induction of the endoplasmic reticulum stress protein, ERp72, by protein traffic. DNA Cell Biol 1993;12:807-22.

Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2001;20:77-88.

Stredrick DL, Stokes AH, Worst TJ, Freeman WM, Johnson EA, Lash LH. Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells. Neurotoxicology 2004;25:543-53.

Sundararajan R, Cuconati A, Nelson D, White E. Tumor necrosis factor-alpha induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K. J Biol Chem 2001;276:45120-7.

Takeda A. Manganese action in brain function. Brain Res Brain Res Rev 2003;41:79-87.

Tran TT, Chowanadisai W, Lonnerdal B, Le L, Parker M, Chicz-Demet A. Effects of neonatal dietary manganese exposure on brain dopamine levels and neurocognitive functions. Neurotoxicology 2002;23:645-51.

Ullrich B, Ushkaryov YA, Sudhof TC. Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. Neuron 1995;14:497-507.

Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, Sudhof TC. Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. Science 1992; 257:50-6.

Viggiano A, Viggiano D, Viggiano A, De Luca B. Quantitative histochemical assay for superoxide dismutase in rat brain. J Histochem Cytochem 2003;51:865-71.

Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan MK, Mitsui Y, Reddel RR, Kaul SC. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. Exp Cell Res 2002;274:246-53.

Weber S, Dorman DC, Lash LH, Erikson K, Vrana KE, Aschner M. Effects of manganese (Mn) on the developing rat brain: oxidative-stress related endpoints. Neurotoxicology 2002;23:169-75.

Zhang HJ, Zhao W, Venkataraman S, Robbins ME, Buettner GR, Kregel KC. Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. Biol Chem 2002;277:20919-26.

Zheng W, Zhao Q, Slavokovich V, Aschner M, Granziano JH. Alterration of iron homeostasis following chronic exposure to manganese in rat. Brain Res 1999;833:125-32.

Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell AS. Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: an ex vivo nuclear magnetic resonance study using [1-13C]glucose. Neurotoxicology 2004;25:573-87.