

Reactive Oxygen Species are Involved in Y-27632-induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells

So Yeong Park[†], Seong Ah Moon[†], Jeong Mi An, Du sik Kim and Jeong Taeg Seo^{*}

Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 120-752, Korea

(received November 21, 2016; revised December 12, 2016; accepted December 13, 2016)

Inhibition of Rho-associated coiled coil-containing kinase (ROCK) has been reported to promote differentiation of neuronal cells. Here, we examined the effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on the outgrowth of neurites in PC12 cells. Y-27632 caused a rapid induction of neurite outgrowth in PC12 cells in a time-dependent manner. The neurite outgrowth, triggered by Y-27632, was accompanied by Rac1 activation, and was attenuated by Rac1 inhibitor NSC23766, in a concentration-dependent manner. Y-27632 also induced an increase in the production of reactive oxygen species (ROS). Pretreatment with N-acetylcysteine, an ROS scavenger, inhibited the ROS generation and neurite outgrowth in response to Y-27632. These results indicate that the activation of Rac1 and the generation of ROS contribute to the neurite outgrowth triggered by Y-27632 in PC12 cells.

Key words: Y-27632, ROCK, PC12 cells, neurite outgrowth

[†] These authors contributed equally to this work.

^{*}Correspondence to: Jeong Taeg Seo, Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-3054,
E-mail: jeong@yuhs.ac
ORCID : 0000-0003-2697-0251

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

1998년 serine/threonine kinases인 Rho-associated coiled coil-containing kinase(ROCK)가 신경돌기 퇴축을 매개하며, ROCK 억제제인 Y-27632가 미세소관(microtubule)의 중합을 촉진하여 신경돌기의 빠른 성장을 유도함이 밝혀졌다[1]. 이후 신경손상과 관련된 다양한 질환 모델에서 수행된 많은 연구를 통해, ROCK을 억제하는 경우 신경세포의 세포사가 억제되고 신경 분화가 촉진되는 효과가 관찰되었으며, 이를 근거로 ROCK 억제제가 신경병성 통증, 척수손상, stroke, 알츠하이머병 등 신경세포 손상과 관련된 질환의 치료제로서 연구되고 있다 [2-4]. 그러나 이와 같은 노력에도 불구하고 아직까지 ROCK 억제가 신경돌기를 성장시키는 기전은 정확하게 밝혀져 있지 않다. 다만 현재까지 수행된 많은 연구를 통해 신경돌기의 퇴축을 유도하는 RhoA-ROCK 신호가 억제되면 신경돌기의 성장을 유도하는 Rac1이 활성화되어 미세소관의 중합반응이 촉진되는 것이 신경돌기 성장의 주요 기전으로 생각하고 있으나[1], 신경세포의 분화 과정에는 다양한 신호계가 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에 ROCK 억제에 의한 신경돌기 성장 촉진 과정에도 Rac1 활성화에 의한 미세소관의 중합반응 촉진 이외에 다른 기전이 관여할 것으로 보고 이를 밝히기 위한 많은 연구가 수행되고 있다[5-7].

한편, Rac1의 활성화는 미세소관의 중합반응을 촉진함으로써 신경돌기의 성장을 촉진시키지만 그 외에도 다양한 신호계에 영향을 미친다. Rac1은 GTP가 결합함

으로써 활성화되는데, GTP-결합 Rac1은 NADPH oxidase 복합체의 구성요소로서 NADPH oxidase를 활성화시키고 활성산소종을 생성한다[8]. 활성산소종은 세포내 수많은 효소 및 단백을 산화시킴으로써 다양한 작용을 조절하는데, 신경세포의 분화 및 성장에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있으므로[9] Rac1 활성화에 이은 NADPH oxidase의 활성화, 활성산소종의 생성이 ROCK 억제에 따른 신경돌기 성장에 관여할 가능성이 있다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐의 부신 수질 세포로부터 유래한 세포주로서 신경성장인자 자극에 의해 신경세포로 분화하기 때문에 신경세포의 분화 과정을 연구하는데 적절한 실험 모델로 이용되고 있는 PC12 세포를 이용하여 ROCK 억제제인 Y-27632가 신경돌기를 형성할 때 Rac1과 활성산소종(reactive oxygen species)이 관여하는지 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 재료

PC12 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), horse serum, penicillin, streptomycin은 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였으며 Y-27632와 Rac1 억제제인 NSC23766는 Tocris Bioscience(Ellisville, MO, USA)에서 구입하였다. 항 Rac1 항체는 BD Transduction Laboratories(San Jose, CA, USA)에서, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 그 외 활성산소종의 제거제인 N-acetylcysteine (NAC) 및 trolox 등은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

PC12 세포 배양

PC12 세포는 10% horse serum, 5% FBS, 50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin을 포함한 DMEM을 이용하여 37°C에서 배양하였다. 신경돌기를 성장시키기 위해 Y-27632 등을 투여하기 전 배양액을 2% horse serum, 1% FBS, 50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin을 포함한 DMEM으로 교체하고 약물을 투여하였다.

신경돌기 생성 확인

Y-27632에 의해 신경돌기가 자라나온 경우 그 길이가 PC12 세포의 세포체 크기보다 긴 경우를 유효한 신경돌기로 간주하였다. 유효한 신경돌기를 생성한 세포의 숫

자를 전체 세포 숫자에 대한 비율로 표시하였다. 신경돌기의 길이는 Imagepro 프로그램을 사용하여 측정하였다.

Rac1 활성화 확인(GST-pull down assay)

세포를 완충용액 (Tris (pH 7.4) 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2mM, Glycerol 10%, NP-40 1%, DTT 1 mM, BM cocktail 20x)에서 반응시킨 다음 4°C에서 5분간 13,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 분리한다. 분리한 세포추출액을 10 µg GST-CRIB과 overnight 동안 4°C에 반응시킨 후, Glutathione-Sepharose bead와 함께 2시간 동안 4°C에 둔다. Bead를 Tris (pH 7.4) 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2mM, Glycerol 10%, NP-40 1%, DTT 1 mM을 함유한 용액으로 씻고 bead와 결합된 단백을 Laemmli 용액으로 추출한 후 12.5% SDS-PAGE로 전기영동한다. 전기영동 후 nitrocellulose membranes으로 이동시킨 전체 단백질을 5% 탈지분유(nonfat dried milk)에서 1시간 동안 유지시킨 다음 항 Rac1 항체를 이용하여 반응시키고 ECL detection system으로 GTP-Rac1과 Rac1반응 정도를 확인한다.

활성산소종 생성 확인

배양한 PC12 세포에 활성산소종과 반응하여 형광을 내는 물질인 DCF-DA 5 µg/ml를 30분 동안 처리하여 세포 내 축적시킨 후 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 excitation wavelength 488 nm와 emission wavelength 525 nm에서 세포 내 형광 강도를 측정하였다.

결 과

Y-27632에 의한 PC12 세포 분화

ROCK 억제제인 Y-27632가 PC12 세포의 분화에 미치는 영향을 확인하였다. 그림 1A와 B에서 보는 바와 같이 Y-27632를 투여하기 전 PC12 세포는 둥근 형태이며 신경돌기를 형성한 세포는 전체 세포 수의 $3.4 \pm 1.9 \%$ (n=4)였다. 그러나 PC12 세포에 50 µM Y-27632를 처리하면 빠르게 신경세포로 분화하여 1 시간 후에는 신경돌기를 형성한 세포가 전체 세포 수의 $42.1 \pm 8.5 \%$ (n=4)였다. Y-27632에 의해 신경세포로 분화한 PC12 세포 수는 시간이 지남에 따라 증가하여 2 시간 후에는 $76.3 \pm 5.5 \%$ (n=4), 3 시간 후에는 $89.7 \pm 4.1 \%$ (n=4)였다.

Y-27632에 의한 Rac1 활성화

세포골격을 이루는 미세소관 및 액틴의 합성에 관여

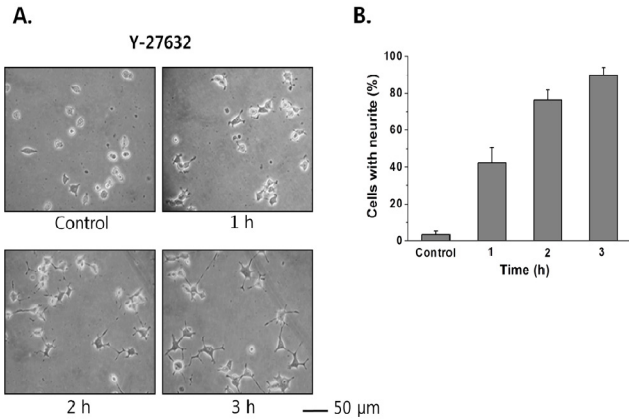


Fig. 1. Y-27632 caused neuronal differentiation of PC12 cells in a time-dependent manner. (A) Photomicrographs of PC12 cells incubated with 50 μ M Y-27632 for the indicated times. The image in each panel is representative of 4 independent experiments. (B) Cells with neurites longer than the cell body diameter were counted and the percentage of neurite-bearing cells was determined. Results are presented as mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments; at least 50 cells/condition were analyzed in each experiment.

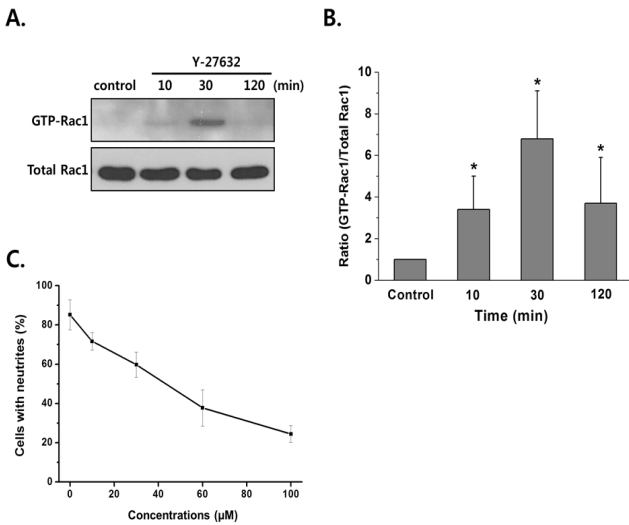


Fig. 2. Y-27632 induced Rac1 activation in PC12 cells. (A) PC12 cells were stimulated with 50 μ M Y-27632 and Rac1 activation was determined by measuring the amount of GTP-bound Rac1. (B) Data from 4 experiments were quantified. Results are presented as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Bonferroni's test. *(Asterisk) indicates difference from the value at time 0 ($p < 0.05$). (C) The percentage of neurite-bearing cells was determined in Y-27632-stimulated PC12 cells in the presence of various concentrations of NSC23766. Results are presented as mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments; at least 50 cells/condition were analyzed in each experiment.

하는 Rac1이 Y-27632에 의해 활성화되는지 확인하기 위해 GST-pull down assay 방법을 이용하여 총 Rac1 양에

대한 GTP 결합 Rac1 양의 비율을 측정하였다(n=4). 그림 2A와 B에서 보는 바와 같이 배양한 PC12 세포에 50 μ M Y-27632를 처리한 결과 총 Rac1 양에 대한 GTP 결합 Rac1 양의 비율이 증가하였으며, 특히 Y-27632 처리 30분 후에 최대치를 보였다.

Rac1의 활성화가 Y-27632에 의한 PC12 세포의 분화에 직접적으로 관련이 있는지 확인하기 위해 Rac1 억제제인 NSC23766을 다양한 농도로 전처리한 후 Y-27632를 투여하였다. 그림 2C와 같이 PC12 세포에서 50 μ M Y-27632에 의한 신경 돌기 형성이 NSC23766 전처리에 의해 농도의존적으로 억제되었다(n=4).

이와 같은 결과는 PC12 세포에서 Y-27632에 의한 신경세포 분화에 Rac1의 활성화가 직접적으로 관여함을 보여 준다.

Y-27632에 의한 활성산소종 생성

PC12 세포에서 Y-27632에 의해 신경돌기가 생성될 때 활성산소종의 생성이 관여하는지 확인하기 위하여, 우선 활성산소종에 의해 형광을 내는 물질인 DCF를 축적시킨 PC12 세포를 Y-27632로 처리하거나 활성산소종의 제거제인 NAC을 전처리하고 Y-27632를 투여한 후 FACS를 이용하여 활성산소종 생성량을 측정하였다. 그림 3A와 B에서 보는 바와 같이 50 μ M Y-27632를 30분 동안 처리한 세포에서 세포 내 활성산소종이 증가하였으며, 10 mM NAC을 전처리하고 Y-27632를 투여한 세포에서는 Y-27632만 처리한 세포에 비해 세포내 활성산소종의 양이 크게 감소하였음을 확인하였다(n=3).

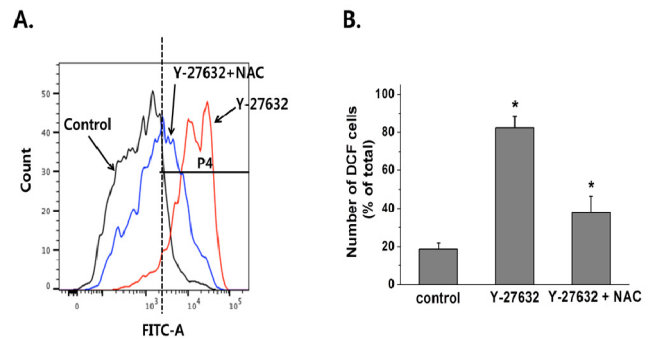


Fig. 3. Y-27632 induced ROS generation in PC12 cells. (A) PC12 cells were treated with 50 μ M Y-27632 and 5 μ M DCF-DA in the presence or absence of 10 mM NAC for 30 min and flow cytometric analysis was performed (n=3). The x-axis shows log fluorescence intensity and the y-axis indicates the cell number. (B) Quantification of P4 area is expressed as a percentage relative to the total number of cells. Results are presented as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Bonferroni's test. *(Asterisk) indicates difference from the control value ($P < 0.05$).

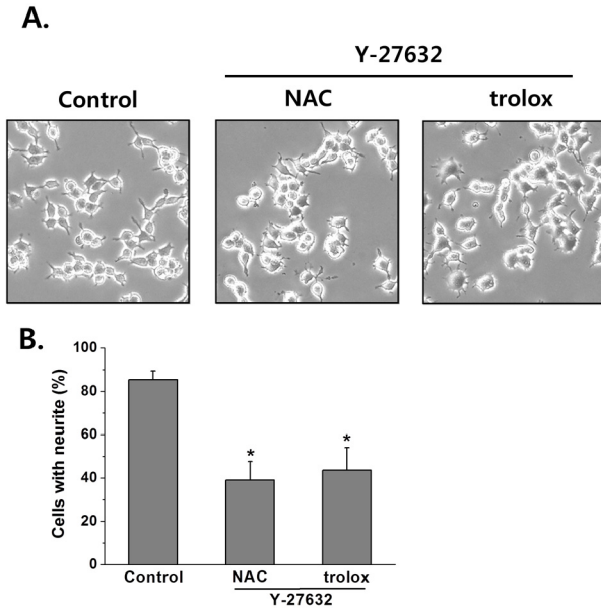


Fig. 4. ROS were involved in Y27632-caused neuronal differentiation in PC12 cells. (A) Photomicrographs of PC12 cells incubated with 50 μ M Y-27632 for 3 h in the presence or absence of 10 mM NAC or 1 mM trolox. The image in each panel is representative of 3-7 independent experiments. (B) PC12 Cells with neurites longer than the cell body diameter were counted and the percentage of neurite-bearing cells was determined. Results are presented as mean \pm S.E.M. of 3-7 independent experiments; at least 50 cells/condition were analyzed in each experiment. Statistical analysis was performed using an unpaired Student's *t*-test. *(Asterisk) indicates difference from the control value ($P < 0.05$). NAC: N-acetylcysteine

활성산소종 제거에 의한 PC12 세포 분화 억제

Y-27632에 의한 PC12 세포의 분화에 활성산소종의 생성이 관여하는지 확인하기 위해 활성산소종의 제거제인 NAC을 전처리하고 Y-27632을 투여하여 신경돌기의 생성 정도를 Y-27632 만을 투여한 세포의 신경돌기 생성과 비교하였다. 그림 4A와 B에서 보는 바와 같이 50 μ M Y-27632 만을 3 시간 투여한 경우 신경돌기를 형성한 세포가 총 세포 수에 비해 $85.4 \pm 4.1\%$ ($n=7$)이었으나 10 mM NAC 및 1 mM trolox를 전처리한 후 50 μ M Y-27632을 투여한 경우 신경돌기를 형성한 세포가 각각 $39.1 \pm 8.5\%$ ($n=5$) 및 $43.7 \pm 10.3\%$ ($n=3$)로서 NAC과 trolox 전처리가 Y-27632에 의한 신경돌기 형성을 통계적으로 유의하게 억제하였음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 Y-27632에 의한 PC12 세포의 분화에 활성산소종의 생성 증가가 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

고 찰

신경세포가 손상을 받게 되면 신경돌기 성장 및 세포

생존을 억제하는 신호들이 활성화되어 신경세포의 재생이 일어나지 못하고 세포사가 유발된다[10]. 이와 같이 신경세포가 손상을 받았을 때 신경돌기 성장이 억제되고 세포사가 유발되는 일련의 과정에 관여하는 세포내 신호전달인자로서 ROCK이 중요한 역할을 한다[11]. 신경손상과 관련된 다양한 질환 모델에서 수행된 많은 연구를 통해, ROCK을 억제하는 경우 신경세포의 세포사를 억제하고 신경 분화를 촉진하는 효과를 관찰하였으며 이를 근거로 ROCK 억제제가 신경병성 통증(neuropathic pain), 척수손상, 뇌졸중(stroke), 알츠하이머병 등 신경세포 손상과 관련된 질환의 치료제로서 연구되고 있다[2-4].

실험적으로 ROCK을 억제하면 신경세포의 퇴축 및 세포사를 억제할 뿐 아니라 신경돌기의 빠른 성장을 유도하여 신경세포의 분화 및 재생을 유도한다[12]. ROCK의 활성화에 의해 신경돌기가 퇴축되는 과정에는 myosin light chain(MLC)의 인산화에 의한 actomyosin의 수축 과정이 관여하는 것으로 알려져 있지만[13], ROCK 억제가 신경돌기를 성장시키는 기전은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다. 다만, 단량체 G-단백(small G-protein)인 Rho와 Rac이 신경돌기의 성장에 서로 반대되는 역할을 함으로써 신경세포 성장을 조절하므로, 신경돌기의 퇴축을 유도하는 Rho-ROCK 신호가 억제되면 상대적으로 Rac이 활성화되고, 이에 의해 미세소관의 중합 반응이 촉진되어 신경돌기의 성장을 유도하는 것이 가장 중요한 기전으로 생각되고 있다[1].

본 연구를 통해 ROCK의 선택적 억제제로 알려진 Y-27632가 PC12 세포의 신경분화를 빠르게 유도하며 Rac1을 활성화시키고, Y-27632에 의한 신경분화가 Rac 억제제에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다. 이러한 결과는 Y-27632에 의한 PC12 세포의 분화 과정에 Rac1의 활성화가 핵심적인 역할을 한다는 것을 의미한다. 그러나 본 연구에서 PC12 세포에 Y-27632을 처리하면 시간이 지남에 따라 30분 후까지는 Rac1의 활성화가 증가하였으나 120분 후에는 오히려 활성화 정도가 감소하여 Y-27632에 의한 신경돌기 생성 경향과는 일치하지 않음을 확인하였다. 이러한 차이는 이미 이전 연구에서도 확인되었는데, PC12 세포에서 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)에 의해 신경돌기가 생성되는 데에는 일반적으로 3일 이상이 걸리지만 Rac1의 활성화는 신경성장인자 투여 후 수 분 내에 일어나며 활성화 정도가 시간에 따라 감소함을 보였다[14, 15]. 이와 같이 세포 자극 초기에 활성화되었다가 감소하는 Rac1 활성화 경향과 지속적으로 일어나는 신경돌기 생성 양상이 일치하지 않는 이유는 아직까지 정확히 알려지지 않았으며 향후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Rac1의 활성화로 인해 신경돌기가 생성, 성장되는 과정에는 p21-activated kinases(PAKs)의 활성화가 관여하는 것으로 알려져 있다[16]. GTP-Rac이 PAK과 결합하면 PAK은 자가인산화에 의해 활성화되고 세포골격의 재편성을 유도한다[17]. 이와 같이 Rac1은 PAK과 결합하여 신경세포의 분화과정에 관여하지만, 한편으로는 NADPH oxidase의 구성요소로서 활성산소종의 생성에도 관여한다. 따라서 Y-27632에 의해 Rac1이 활성화되면 PAK을 통해 신경돌기 생성을 유도하는 동시에 NADPH oxidase를 활성화하여 활성산소종을 생성한다.

활성산소종은 생체내 대사과정에서 생산되어 주로 세포 독성을 야기하고 죽상경화증(atherosclerosis), 당뇨병, 퇴행성 뇌질환, 류마티스성 관절염 등 여러 가지 질환의 발병과 관련이 있으나[18-20] NADPH oxidase와 같은 효소작용에 의해 일시적으로 증가하는 활성산소종은 세포작용을 조절하는 중요한 이차전령체의 역할을 수행한다는 것이 잘 알려져 있다[21]. 특히 NADPH oxidase 활성화에 의해 생성되는 활성산소종이 신경세포의 신경돌기 성장점(growth cone) 형성에 관여한다는 보고가 있으므로[22], Y-27632에 의한 신경세포 분화과정에도 Rac1 및 NADPH oxidase 활성화에 의해 생성되는 활성산소종이 관여할 가능성이 있다.

본 실험을 통해 먼저 Y-27632가 PC12 세포에서 활성산소종 생성을 증가시키는 것을 확인하였으며, 활성산소종의 제거제가 Y-27632에 의해 증가된 활성산소종을 제거하며 Y-27632에 의한 신경돌기의 성장을 부분적으로 억제하는 것을 보였다. 따라서 Y-27632에 의해 Rac1이 활성화되어 신경돌기가 성장할 때 이미 잘 알려져 있는 PAK의 활성화가 핵심적인 역할을 하겠지만 NADPH oxidase 활성화로 인해 생성되는 활성산소종도 신경돌기 성장을 촉진시키는 역할을 하는 것으로 예상할 수 있다.

활성산소종이 어떻게 신경돌기 성장을 촉진하는지 아직까지 정확하게 알려져 있지는 않다. 활성산소종이 직접적으로 액틴의 중합을 촉진하거나[22] extracellular signal-regulated kinase(ERK)를 인산화하여[23] 신경세포의 분화를 촉진한다는 보고가 있으나 Y-27632에 의한 신경세포 분화에 활성산소종이 어떻게 작용하는지는 향후 연구를 통해 밝혀야 할 과제이다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2014R1A2A2A01007717).

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, Uehata M, Kranenburg O, Moolenaar WH, et al. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol.* 1998;141(7):1625-1636.
- Kubo T, Yamaguchi A, Iwata N, Yamashita T. The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(3):605-615.
- Chen M, Liu A, Ouyang Y, Huang Y, Chao X, Pi R. Fasudil and its analogs: a new powerful weapon in the long war against central nervous system disorders? *Expert Opin Investig Drugs.* 2013;22(4):537-550. doi: 10.1517/13543784.2013.778242.
- Tonges L, Koch JC, Bahr M, Lingor P. ROCKing Regeneration: Rho Kinase Inhibition as Molecular Target for Neurorestoration. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:39. doi: 10.3389/fnmol.2011.00039.
- Kouchi Z, Igarashi T, Shibayama N, Inanobe S, Sakurai K, Yamaguchi H, et al. Phospholipase Cdelta3 regulates RhoA/Rho kinase signaling and neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 2011;286(10):8459-8471. doi: 10.1074/jbc.M110.171223.
- Chen S, Luo M, Zhao Y, Zhang Y, He M, Cai W, et al. Fasudil Stimulates Neurite Outgrowth and Promotes Differentiation in C17.2 Neural Stem Cells by Modulating Notch Signalling but not Autophagy. *Cell Physiol biochem.* 2015;36(2):531-541.
- Kamishibahara Y, Kawaguchi H, Shimizu N. Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes neuronal differentiation in mouse embryonic stem cells via phosphatidylinositol 3-kinase. *Neurosci Lett.* 2016;615:44-49. doi: 10.1016/j.neulet.2016.01.022.
- Pick E. Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task. *Small GTPases.* 2014;5:e27952. doi: 10.4161/sgtp.27952.
- Borquez DA, Urrutia PJ, Wilson C, van Zundert B, Nunez MT, Gonzalez-Billault C. Dissecting the role of redox signaling in neuronal development. *J Neurochem.* 2016;137(4):506-517. doi: 10.1111/jnc.13581.
- Tovar-y-Romo LB, Penagos-Puig A, Ramirez-Jarquín JO. Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *J Neurochem.* 2016;136(1):13-27. doi: 10.1111/jnc.13362.
- Forgione N, Fehlings MG. Rho-ROCK inhibition in the treatment of spinal cord injury. *World Neurosurg.* 2014;82(3-4):e535-539. doi: 10.1016/j.wneu.2013.01.009.
- Tan HB, Zhong YS, Cheng Y, Shen X. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for

- central nervous system and optic nerve damage. *Int J Ophthalmol.* 2011;4(6):652-657. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2011.06.16.
13. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 1996;273(5272):245-248.
 14. Yasui H, Katoh H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, Negishi M. Differential responses to nerve growth factor and epidermal growth factor in neurite outgrowth of PC12 cells are determined by Rac1 activation systems. *J Biol Chem.* 2001;276(18):15298-15305.
 15. Shirazi Fard S, Kele J, Vilar M, Paratcha G, Ledda F. Tiam1 as a signaling mediator of nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. *PLoS One.* 2010;5(3):e9647. doi: 10.1371/journal.pone.0009647.
 16. Rane CK, Minden A. P21 activated kinases: structure, regulation, and functions. *Small GTPases.* 2014;5. doi:10.4161/sgtp.28003.
 17. Szczepanowska J. Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56(2):225-234.
 18. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):247-258.
 19. Byon CH, Heath JM, Chen Y. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells. *Redox Biol.* 2016;9:244-253. doi: 10.1016/j.redox.2016.08.015.
 20. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone.* 2016;85:81-90. doi: 10.1016/j.bone.2016.01.019.
 21. Nayernia Z, Jaquet V, Krause KH. New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(17):2815-2837. doi: 10.1089/ars.2013.5703.
 22. Munnamalai V, Weaver CJ, Weisheit CE, Venkatraman P, Agim ZS, Quinn MT, et al. Bidirectional interactions between NOX2-type NADPH oxidase and the F-actin cytoskeleton in neuronal growth cones. *J Neurochem.* 2014;130(4):526-540. doi: 10.1111/jnc.12734.
 23. Wu H, Ichikawa S, Tani C, Zhu B, Tada M, Shimoishi Y, et al. Docosahexaenoic acid induces ERK1/2 activation and neuritogenesis via intracellular reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(1):8-16. doi: 10.1016/j.bbali.2008.10.004.