C2C12 골격근세포에서 황기의 미토콘드리아 조절 작용

송미영

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

The Effects of Astragali Radix Extracts on Mitochondrial Function in C2C12 Myotubes

Miyoung Song

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Received: November 17, 2014

Revised: December 5, 2014

Accepted: December 5, 2014

Correspondence to: Miyoung Song
Department of Oriental Rehabilitation
Medicine, College of Oriental
Medicine, Dongguk University, 123
Dongdae-ro, Gyeongju 780-714,
Korea
Tel: +82-54-770-1264
Fax: +82-54-770-1200
E-mail: miyoungsong@dongguk.ac.kr

Copyright © 2014 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objective: The prevalence of metabolic syndrome and type 2 diabetes is increasing worldwide. Mitochondrial dysfunction is known to be involved in insulin resistance and obesity, researches have been increasing highly. Astragali Radix extract (ARE) or its main components have been shown to perform comparably to insulin by significantly reducing blood glucose levels in animal models however, the influence on mitochondrial dysfunction are not well understood.

Methods: ARE (0.2, 0.5 and 1.0 mg/ml) or metformin (2.5 mM) were treated in C2C12 after 6 day-differentiation. The expressions of adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) and phosphorylation AMPK, peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC1 α), nuclear respiratory factors 1 (NRF1), mitochondrial transcription factor (Tfam) and myosin heavy chain were detected with western blotting or polymerase chain reaction analysis. The morphological changes were also investigated.

Results: ARE dose dependently increased phosphorylation of AMPK and respectively activated mRNA expressions of PGC1 α , NRF1 and Tfam which are mitochondrial biogenesis regulators. Furthermore, there were some morphologic differences of differentiated cells between ARE treatment and control.

Conclusions: This study suggests that ARE has the potential to increase muscle mitochondrial function by activating AMPK and PGC1 α .

Key Words: Astragali radix extract, Mitochondria, Myotube, AMP-activated protein kinases, Proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α

서 론

최근 만성질환에 대한 미토콘드리아 패러다임이 확산되고 있는데, 이는 에너지 대사과정에서 미토콘드리아라는 세포 내 소기관의 역할에 주목하고, 그 기능부전의 결과로서 만성질환들을 설명하는 이론이다^{1,2)}. 미토콘드리아 기능장애와 관련된 여러 만성 질환 중 특히 비만 및 인슐린저항성에 대한 개념이 2000년대에 들어서 보다 구체적으로 밝혀지면서 관련 연구들이 활발하게 진행되고 있다³⁻⁵⁾. 제2형 당뇨병 치료제인 metformin의 미토콘드리아 생합성 증가

효과⁶⁾ 및 SIRT1 활성제인 레스베라트롤의 미토콘드리아 생합성 증가 효과 등⁷⁾이 밝혀져 있지만, 부분적인 효과만이 밝혀져 있을 뿐, 현재 임상에서 비만 및 인슐린저항성 치료에 있어 미토콘드리아 기능 조절을 타겟으로 보편적으로 처방할 수 있는 약물은 개발되지 않은 상황이다. 한편, 골격근은 인슐린 감수성 조직 중 가장 큰 비중을 차지하며 미토콘드리아가 가장 풍부한 조직이므로 인슐린 저항성 개선을 위한 미토콘드리아 기능 조절 효과를 연구하기 위해서는 골격근을 일차 타겟으로 하는 것이 중요하다^{5,8)}.

황기(Astragali Radix)는 대표적인 보기제로 발한 억제,

체력증강, 피로회복 등의 목적으로 한의학에서 다용되는 약물이다⁹⁾. 최근 실험적 연구들을 통해 황기의 주성분인 Astragalus polysaccharide의 항당뇨^{10,11)}, 면역작용¹²⁾, 항산화 효과¹³⁾ 및 미토콘드리아 보호 효과¹⁴⁾ 등이 밝혀져 있다. 특히 Astragalus polysaccharide는 비만형 당뇨병 동물모델에서 인슐린저항성 개선, 혈당강화 효과 및 adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) 증가 효과가 있음이 밝혀져 있으며^{10,11)}, 또한 심장, 대뇌 조직 세포의 미토콘드리아 보호효과를 통해 활성산소를 감소시키고 항노화 작용을 하는 것으로 나타났다¹⁴⁾. 그러나 골격근에서 미토콘드리아 조절과 관련한 황기의 작용에 대해서는 관련 연구를 찾을 수가 없었다. 이에 본 연구에서는 C2C12 골격근세포를 이용한 세포 배양모델에서 황기의 미토콘드리아 조절 효과를 연구하고자 하였다. 이를 위해 미토콘드리아 생합성 관련 전사인자 및 에너지 대사와 미토콘드리아 생합성을 활성화시키는 AMPK의 활성도를 실험하였으며, 또한 미토콘드리아가 근육 분화를 조절함에 착안하여 근육 분화도를 동시에 측정하였다.

대상 및 방법

1. 약재

황기는 (주)광명당제약(Kwangmyungdang Medicinal Herb, Ulsan, Korea)으로부터 표준약재를 구입하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 감별한 후 정선하여 시료로 사용하였다. 황기 200 g 정제수 2 L를 가하여 열탕추출기에서 3시간씩 2회 가열하여 얻은 추출물을 여과지(Whatman NO. 1)로 여과한 후 회전식 감압농축기로 감압농축하고 동결 건조하여 황기 물 추출물(Astragali Radix extract)을 제조하였다.

2. 세포배양

C2C12 근육세포 분화과정 중, 시료에 의한 세포의 손상 정도를 관찰하였다. 마우스 유래 C2C12 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC) (CRL-1772; Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. C2C12 근육세포는 60 mm petridish에 각각 1×10^6 의 seeding한 후, fetal bovine serum (10%) 및 penicillin-streptomycin (1%)을

함유한 고농도 포도당 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (89%)에서 100% confluence될 때까지 배양하였다. 그 후 horse serum 2%로 근육세포의 분화를 유도하였다. 24시간마다 배지를 교환하면서 6일간 분화시킨 후, 약물을 처리하였다.

3. 세포독성평가

C2C12에 대한 시료의 세포 생존능 평가는 thiazoly blue tetrazolium bromid (MTT)를 이용하여 측정하였다. C2C12 세포를 실험 전날 1×10^6 cells/ml 농도로 96-well plate에 seeding하고, 황기 추출물을 0.2, 0.5 및 1.0 mg/ml를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 모두 버리고 DMEM에 녹인 5 mg/ml MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 100 μ l씩 각 well에 처리하여 알루미늄 호일로 차광시킨 후 2시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 dimethyl sulfoxide 100 μ l를 처리하고 2시간 방치 후 Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Western blot

AMPK, pAMPK의 단백질 발현량을 Western blot을 수행하여 측정하였다. 골격근 세포를 6일간 분화시킨 후, 여러 농도의 황기 물 추출물(0.2, 0.5, 1.0 mg/ml)을 처리하여 45분간 배양하였다. 세포를 수거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 phosphate buffer saline 용액으로 2회 세척하고 lysis 용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride [PMSF], 1 μ g/ml aprotinin)을 이용하여 부유시킨 후 얼음에 30분간 반응시켰다. 20 μ g의 단백질을 2 $\times$ sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithithreitol, 4% sodium dodecyl sulphate [SDS], 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 100°C에서 3분 끓인 다음 8~15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 이용하여 분리하였다. 전기영동을 통해 분리된 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V로 16시간 동안 transfer시켰다. Membrane은 10% skim milk로 실온에

서 1시간 동안 blocking한 다음, 각 단백질의 항체와 상온에서 2시간 반응시켰다. 이를 Tris-buffered Saline and Tween 20 (TBS-T)로 3회 세척한 후 anti-pAMPK, AMPK (cell signaling)로 각각 처리한 후, 상온에서 1시간 반응시키고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액으로 기질반응시켜 x-ray film에 감광하였다. X-ray film상의 밴드는 이미지(Image-J; National Institutes of Health, public domain) 프로그램을 이용하여 AMPK에 대한 pAMPK의 발현 비율로 표시하였다.

5. Real time PCR analysis

골격근 세포에서 peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC1 α), nuclear respiratory factors 1 (NRF1)과 mitochondrial transcription factor (Tfam) 및 myosin heavy chain (MHC)의 mRNA 발현량을 측정하기 위해 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 골격근 세포를 6일간 분화시킨 후, 각 농도별 ARE 및 metformin을 24시간 동안 처리하였다. 각 세포를 수거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 TRIzol 시약을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA에 oligo-(dT) primer와 Improm-IITM reverse transcriptase를 넣어 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분 조건으로 mRNA로부터 cDNA를 합성하였다.

PCR을 수행하기 위해서 mRNA로부터 합성된 cDNA 1

Fig. 1. Effect of Astragali Radix extract (ARE) on cell viability in C2C12 cells. Cells were incubated for 24 hours. Results are represented as mean $\pm$ standard deviation. Con: control.

μ g에 mouse PGC1 α primers [sense; 5'-CAC CAA ACC CAC AGA AAA CAG-3', antisense; 5'-GGG TCA GAG GAA GAG ATA AAG TTG], mouse NRF1 primers [sense; 5'-AAT GTC CGC AGT GAT GTC C-3', antisense; 5'-GCC TGA GTT TGT GTT TGC TG-3'], mouse Tfam primers [sense; 5'-CAC CCA GAT GCA AAA CTT TCA G-3', antisense; 5'-CTG CTC TTT ATA CTT GCT CAC AG-3'], mouse MHC primers [sense; 5'-TGA ACT GGA GGG TGA GGT AG-3', antisense; 5'-TTC GGT CTT CTT CTG TCT GG-3'], 표준 대조구인 mouse GDPAH primers [sense; 5'-ATT CAA CGG CAC ACT CAA GG-3', antisense; 5'-CAG TGT AGC CCA AGA TGC CCT-3'] 및 10 $\times$ PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP, 1U *Tag* polymerase 등을 혼합한 후 denaturation을 위해 94°C에서 30초, annealing을 위해 55~60°C에서 30초 및 extension을 위해 70°C에서 60초 조건에서 30 cycles을 수행하였다. PCR 반응물은 EtBr이 포함된 1% agarose gel을 이용하여 전기 영동한 후 UV lamp를 이용하여 확인하였으며, 이미지 (Image-J) 프로그램을 이용하여 도표화하였다. PCR 반응물

Fig. 2. Effect of Astragali Radix extract (ARE) on adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation in C2C12 cells. The expressions of protein level were determined by western blotting, cells were treated with ARE 0.2, 0.5, 1.0 mg/ml and metformin 2.5 mM for 45 minutes.

은 이미지(Image-J) 프로그램을 이용하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase에 대한 발현 비율(ratio)로 표시하였다.

결 과

1. 세포 생존율

항기 물추출물이 C2C12의 골격근 세포의 생존율에 미치는 영향을 비교하였다. 24시간 동안 처리한 결과 모든 농도에서 유의한 변화는 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. AMPK에 대한 작용

AMPK는 골격근에서 지방산대사에 중요한 역할을 하며,

근육 내 AMPK의 활성화는 PGC-1 α 발현을 통해 미토콘드리아 관련 유전자들의 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다¹⁵⁾. 이에 본 연구에서는 대표적인 AMPK activator로서 미토콘드리아 생합성 작용이 알려진 metformin⁵⁾을 양성 대조군으로 설정하여 AMPK, pAMPK의 단백질 발현량을 측정하여 실험하였다. 그 결과 농도 의존적으로 pAMPK가 증가하는 것으로 나타났으며, 1.0 mg/ml의 농도에서는 양성 대조군인 metformin에 비해서도 더욱 증가한 것으로 나타났다(Fig. 2).

3. PGC1 α , NRF1, Tfam에 대한 작용

미토콘드리아 생합성 관련 전사인자인 PGC1 α , NRF1, Tfam의 mRNA 발현량을 측정하였을 때, PGC1 α , NRF1

Fig. 3. Effect of Astragali Radix extract (ARE) on mRNA expressions of peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC1 α) (A), nuclear respiratory factors 1 (NRF1) (B), and mitochondrial transcription factor (Tfam) (C) in C2C12 cells. The expressions were determined by polymerase chain reaction analysis, cells were treated with ARE 0.2, 0.5, 1.0 mg/ml and metformin 2.5 mM for 24 hours, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Fig. 4. Morphologic changes of C2C12 cells by differentiation. The images were captured using microscope ($\times 100$). (A) Undifferentiated C2C12 cells. (B~F) Differentiated C2C12 cells (B: 0 day, C: 2 days, D: 4 days, and E: 6 days).

및 Tfam은 대조군에 비해서 농도 의존적으로 발현량이 증가하였다. PGC1 α , NRF1의 mRNA 발현량은 1.0 mg/ml의 농도에서 양성 대조군인 metformin과 유사한 수준으로 증가했으며, Tfam의 경우 1.0 mg/ml의 농도에서 양성 대조군보다 발현량이 더욱 증가한 것으로 나타났다(Fig. 3).

4. 골격근 세포 분화에 대한 작용

분화배지로 C2C12세포를 6일간 배양했을 때, 개별적으로 존재하던 myoblast들이 시일이 경과함에 따라 세포들이 서로 융합되고 크기가 크고 길어지면서 점차 myotube의 형태를 형성함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 분화 시작 6일 뒤, 즉 분화 후기에 약물을 24시간 처리하고 군별로 세포의 형태 차이를 살펴본 결과, 황기군에서는 농도가 증가할수록 myoblast가 보다 치밀하게 형성된 것을 관찰할 수 있었고, 황기 1.0 mg/ml 농도의 경우 대조군에 비해서도 myoblast의 형성이 보다 밀도 있게 이뤄진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 한편, 근육 세포 분화의 후기 단계에서 관련된 전사인자인 MHC의 mRNA 발현량을 측정했을 때 대조군에

비해서 황기 처리 시 증가하는 양상이 보였지만, 발현량의 차이가 뚜렷하지는 않았다(Fig. 5B).

고찰 및 결론

미토콘드리아는 세포 내에서 대부분의 adenosine triphosphate (ATP)를 생산하는 소기관으로 미토콘드리아 기능장애로 인한 에너지 생산 저하는 대사를 저하로 이어져 비만을 가속화시킨다. 또한 미토콘드리아 기능 저하로 지방산 산화가 감소하게 되면, 인슐린 신호전달을 방해해서 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병을 일으키게 된다³⁻⁵. 미토콘드리아의 지방산 산화 및 에너지 대사를 조절하는 인자들로는 AMPK, PGC1 α 및 PPAR α 등이 있다. AMPK는 세포 내 에너지 상태를 감지하는 효소로서 지방산 산화를 증가시키고 미토콘드리아 생합성을 증가시킨다¹⁵. 또한 PGC1 α 는 미토콘드리아의 생합성과 호흡에 관여하는 전사조절인자들의 활동을 촉진시키는 전사보조활성인자이며, PGC1 α 가 NRF와 Tfam 등을 활성화시키고, 미토콘드리아 생합성이

Fig. 5. Effect of Astragali Radix extract (ARE) on myogenesis in C2C12 cells. The images were captured using biological microscope ($\times 100$) (A) and the expressions were determined by polymerase chain reaction analysis. Cells were treated with ARE 0.2, 0.5, 1.0 mg/ml and metformin 2.5 mM for 24 hours (B). MHC: myosin heavy chain, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

증가된다¹⁶⁾. 본 연구에서는 대표적인 AMPK activator로 골격근 조직에서 PGC1 α 증가 효과가 밝혀진 metformin⁶⁾을 양성 대조군으로 설정하고 골격근 세포에서의 황기 물 추출물의 효과를 비교하였다. 황기 물 추출물은 농도가 증가할수록 AMPK의 인산화를 증가시켜 AMPK를 활성화시켰으며, 미토콘드리아 생합성 조절인자인 PGC1 α , NRF 및 Tfam의 mRNA의 발현량이 농도 의존적으로 증가함을 확

인할 수 있었다.

한편, 골격근 세포는 myoblast에서 myotube로 분화되는데, 분화가 시작되면 미토콘드리아 활성이 증가되어 미토콘드리아가 근육 분화의 조절 작용을 하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 본 연구에서는 황기가 골격근 분화도에 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 6일간 분화 뒤 24시간 약물을 처리한 후, 분화 후기 상태에서 군별 분화도의 차이를 고배율 현

미경을 통해 형태적인 차이를 관찰하였으며, 분화 후기 myotube 상태에서 활성이 나타나는 MHC⁽¹⁸⁾의 mRNA 발현량을 평가하였다. 실험 결과, myotube의 형성 및 MHC의 mRNA 발현량 모두 황기균에서 농도가 높아짐에 따라 증가하는 양상이 보였고, 대조군과의 비교 시에도 약간의 차이가 있었다. 그러나 근육 분화 및 근육 비대에 대한 약물의 효과를 명확하게 연구하기 위해서는 증식기, 분화기 및 분화 종료기로 나누어서 각 단계별로 약물을 처리하여 분화의 전 과정에서 약물의 효과를 확인하는 것이 필요한데 본 연구에서는 분화 종료기에만 약물의 처리하여 분화 전 과정에 걸친 약물의 분화 촉진 효과를 확인하지 못한 한계가 있다. 미토콘드리아 근육 분화의 조절 작용을 하는 것으로 알려져 있기 때문에, 후속 연구를 통해 미토콘드리아 조절 작용을 통한 황기의 근육 세포 분화 촉진 효과를 보다 명확하게 규명할 필요가 있다.

본 연구는 여러 가지 제한점을 가지고 있다. 단회 실험만의 결과로서 반복 실험을 통해 재현성을 확보하지 못했으며, 또한 지방산 산화도, ATP 생산량, 미토콘드리아의 양 및 AMPK와 PGC1 α 와 연관된 효소인 SIRT1, ACC의 발현량 등 미토콘드리아 기능 조절과 관련한 여러 실험을 함께 수행하지 못했다. 본 연구는 황기의 항비만 및 인슐린 저항성 개선과 관련한 미토콘드리아 기능 조절 효과를 탐색하기 위한 기초 연구로서의 의미를 가지며 상기의 실험 내용을 보완한 후속 연구를 통해 황기의 효능을 보다 명확하게 밝혀내고자 한다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.2014R1A1A1003758).

References

- Wallace DC. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *J Clin Invest*. 2013 ; 123(4) : 1405-12.
- Lee HK, Cho YM, Kwak SH, Lim S, Park KS, Shim EB. Mitochondrial dysfunction and metabolic syndrome—looking for environmental factors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010 ; 1800(3) : 282-9.
- Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 2005 ; 307(5708) : 384-7.
- Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*. 2008 ; 102(4) : 401-14.
- Choo HS, Ko YK. Type 2 diabetes and mitochondria. *Endocrinol Metab*. 2006 ; 21(4) : 266-71.
- Suwa M, Egashira T, Nakano H, Sasaki H, Kumagai S. Metformin increases the PGC-1 α protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol* (1985). 2006 ; 101(6) : 1685-92.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussan F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*. 2006 ; 127(6) : 1109-22.
- Choi CS. Potential therapeutic strategies for fat induced insulin resistance. *Endocrinol Metab*. 2009 ; 24(2) : 65-74.
- Association of professors of herbology, Korean medicine. *Herbology*. Seoul : Yonglimsa. 2006 : 579-80.
- Liu M, Wu K, Mao X, Wu Y, Ouyang J. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KKAY mice: regulation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 127(1) : 32-7.
- Zou F, Mao XQ, Wang N, Liu J, Ou-Yang JP. Astragalus polysaccharides alleviates glucose toxicity and restores glucose homeostasis in diabetic states via activation of AMPK. *Acta Pharmacol Sin*. 2009 ; 30(12) : 1607-15.
- Shao BM, Xu W, Dai H, Tu P, Li Z, Gao XM. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 ; 320(4) : 1103-11.
- Chen R, Shao H, Lin S, Zhang JJ, Xu KQ. Treatment with *Astragalus membranaceus* produces antioxidative effects and attenuates intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Chin Med*. 2011 ; 39(5) : 879-87.
- Li XT, Zhang YK, Kuang HX, Jin FX, Liu DW, Gao MB, et al. Mitochondrial protection and anti-aging activity of Astragalus polysaccharides and their potential mechanism. *Int J Mol Sci*. 2012 ; 13(2) : 1747-61.
- Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009 ; 20(2) : 98-105.
- Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*. 2005 ; 25(4) :

- 1354-66.
17. Rochard P, Rodier A, Casas F, Cassar-Malek I, Marchal-Victorion S, Daury L, et al. Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors. *J Biol Chem.* 2000 ; 275(4) : 2733-44.
18. Dedieu S, Mazères G, Cottin P, Brustis JJ. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *Int J Dev Biol.* 2002 ; 46(2) : 235-41.