

## 산화성 손상을 받은 N18D3 세포에서 Epigallocatechin gallate가 Phosphoinositide 3-kinase/Akt 및 Glycogen synthase kinase-3경로에 미치는 효과

고성호<sup>a,c</sup> · 권혁성<sup>a</sup> · 오화순<sup>a</sup> · 오재호<sup>a</sup> · 박윤주<sup>a</sup> · 김준규<sup>a</sup> ·  
김기석<sup>\*</sup> · 김용순<sup>a</sup> · 양기화<sup>a</sup> · 김승업<sup>b</sup> · 김승현<sup>c</sup> · 정해관<sup>a</sup>

<sup>a</sup>식품의약품안전청 국립독성연구원 신경독성과  
<sup>b</sup>아주대학교 의과대학 신경과학교실, <sup>c</sup>한양대학교 의과대학 신경과학교실

## Effect of Epigallocatechin Gallate on Phosphoinositide 3-kinase/Akt and Glycogen Synthase Kinase-3 Pathway in Oxidative-stressed N18D3 Cells Following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposure

Seong Ho Koh<sup>a,c</sup>, Hyug Sung Kwon<sup>a</sup>, Hwa Soon Oh<sup>a</sup>, Jae Ho Oh<sup>a</sup>, Youn Joo Park<sup>a</sup>, Jun Gyou Kim<sup>a</sup>,  
Ki Sok Kim<sup>a</sup>, Yong Soon Kim<sup>a</sup>, Ki Hwa Yang<sup>a</sup>, Seung U. Kim<sup>b</sup>, Seung H. Kim<sup>c</sup>, and Hai Kwan Jung<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Division of Neurotoxicology, Department of General Toxicology,  
National Institute of Toxicological Research, KFDA

<sup>b</sup>Department of Neurology, Ajou University School of Medicine

<sup>c</sup>Department of Neurology, College of Medicine, Hanyang University

Neurodegenerative disorders are associated with apoptosis as a causing factor or an inducer. On the other hand, it has been reported that epigallocatechin gallate (EGCG), one of antioxidants and flavonoids, and z-VAD-fmk, a nonselective caspase inhibitor, suppress oxidative-radical-stress-induced apoptosis. However, it is not yet known what is the effects of EGCG and z-VAD-fmk on the apoptotic pathway is through phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Akt and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) as well as mitochondria, caspase-3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). We investigated the effects of EGCG by using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated N18D3 cells, mouse DRG hybrid neurons. Methods: Following 30 min 100 μm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure, the viability of N18D3 cells (not pretreated vs. EGCG or z-VAD-fmk pretreated) was evaluated by using MTT assay. The effect of EGCG on immunoreactivity (IR) of cytochrome c, caspase-3, PARP, PI3K/Akt and GSK-3 was examined by using Western blot, and was compared with that of z-VAD-fmk.

Results: EGCG or z-VAD-fmk pretreated N18D3 cells showed increased viability. Dose-dependent inhibition of caspase-3 activation accompanied by PARP cleavage were demonstrated by pretreatment of both agents. However, inhibition of cytochrome c release was only detected in EGCG pretreated N18D3 cells. On the pathway through PI3K/Akt and GSK-3, however, the result of Western blot in EGCG pretreated N18D3 cells showed decreased IR of Akt and GSK-3 and increased IR of p85a PI3K, phosphorylated Akt and GSK-3, and contrasted with that in z-VAD-fmk pretreated N18D3 cells showing no changes on each molecule. Conclusion: These data show that EGCG affects apoptotic pathway through upstream signal including PI3K/Akt and GSK-3 pathway as well as downstream signal including cytochrome c and caspase-3 pathway. Therefore, these results suggest that EGCG mediated activation of PI3K/Akt and inhibition GSK-3 could be new potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases associated with oxidative injury.

□ Key words – Apoptosis, Neurodegenerative disease, Antioxidants, GSK-3, PI3K, Akt

교신저자: 김승현

한양대학교 의과대학 신경과학교실

133-792 서울시 성동구 행당동 17

Tel: +82-2-2290-8371, Fax: +82-2-2296-8370

E-mail: Kimsh1@hanyang.ac.kr

산화성 스트레스(oxidative stress)는 신경계 퇴행성질환의 발병기전에 중요한 인자 중 하나로서, 특히 알츠하이머병, 파킨슨병 및 근위축성측삭경화증 등의 병리기전에 관여한다는 증거들이 제시되어 왔다<sup>1,4)</sup>. 산화자극이 어떤 경로를 통해 퇴행성질환에서 세포사멸을 유발하는 지에 대해서는 정확히 규명되지 않았지만, 산화자극에 의해 직간접적으로 유발되는 신경세포의 손상을 억제하기 위해 항산화제 투여가 실험적 모델에서 뿐아니라 임상에서도 시도되고 있다.

Epigallocatechin gallate(EGCG)는 녹차의 주성분인 polyphenol, 특히 flavonoid 중 대표적인 물질로서 항산화효과<sup>5,7)</sup>, 항아팍프로토시스<sup>8,9)</sup>, 항암<sup>10)</sup> 및 항돌연변이<sup>11,12)</sup> 효과가 있어 신경계 퇴행성질환의 실험모델 및 암, 심혈관계질환<sup>13,14)</sup>에도 효과가 있다고 알려져 왔다. EGCG의 생체 내 작용기전에 대해서는 아직도 자세히 알려지지 않았지만, 세포 실험을 통해 EGCG가 mitogen-activated protein kinase(MEK) signaling cascades, c-Jun N-terminal kinase(JNK), c-Jun과 caspase-3 등에 작용한다는 것이 확인되었다<sup>15-17)</sup>. 그러나 최근 세포사멸에 중요한 역할을 한다고 알려져 주의를 끌고있는 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt와 glycogen synthase kinase-3(GSK-3) 경로에 대한 EGCG의 영향은 밝혀져 있지 않고 특히 신경계 세포를 이용한 연구는 없었다.

Glycogen 대사에 관련된다고만 알려졌던 GSK-3가 activator protein-1<sup>18)</sup>, cyclic AMP response element binding protein<sup>19)</sup>, nuclear factor of activated T cells<sup>20)</sup>, heat shock factor-1<sup>21)</sup> 및  $\beta$ -catenin<sup>22)</sup> 등의 신호전달 단백질의 기능 조절에도 관여하며, 신경계에서는 neurofibrillary tangle<sup>23)</sup>이나 presenilin<sup>24)</sup> 등의 형성에 관여하여 알츠하이머병의 발병에 중요한 역할을 할 것이라는 보고가 있다<sup>25)</sup>. GSK-3 활성도는 PI3K 및 Akt에 의해 조절을 받게 되며<sup>26-31)</sup> GSK-3 활성도의 억제는 cytochrome c 분비 및 caspase-3 활성을 억제하게 되는 효과가 있어<sup>32,33)</sup> GSK-3 억제제가 신경퇴행성질환 및 염증 매개성 질환에 효과가 있을 것이라는 증거가 제시되고 있다<sup>26-33)</sup>.

현재까지의 EGCG에 대한 연구들은 cytochrome c 분비 및 caspase-3 활성에 관련된 하위전달체계에 국한되었다<sup>15-17)</sup>. 본 연구에서는 EGCG가 다양한 경로에 작용하여 세포보호효과를 나타낼 것이라는 가정하에 산화성 자극이 가해진 신경계 세포 즉 N18D3 세포<sup>34,35)</sup>에서 EGCG가 PI3k/Akt 및 GSK-3를 거치는 상위전달체계에도 영향을 미치는지 여부를 알아보고자 한다.

## 연구방법

### 세포배양과 처치

4주령된 Balb/C 생쥐(mouse)로부터 분리한 후근신

경절 신경세포(DRG neuron)를 생쥐의 신경모세포종(neuroblastoma) N18TG2 세포와 교잡시켜 얻은 N18D3 세포<sup>34,35)</sup>를 이용하여 실험을 진행하였는데 배양은 poly-L-lysine(Sigma)로 코팅된 100-mm 배양접시를 이용하였으며, 각 배양접시 당  $1 \times 10^6$ 개의 세포를 넣은 후 37°C 온도에서 5% CO<sub>2</sub>/95% Air 상태에서 10% heat-inactivated horse serum, 5% fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml 페니실린, 100 U/ml 스트렙토마이신, 4 g/l 포도당, 2.2 g/l NaHCO<sub>3</sub>와 10 ml/l L-glutamine 등을 첨가한 Minium Essential Medium 배지(GIBCO BRL)를 이용하여 logarithmic-phase 상태로 유지하였다. 배양된 세포들이 배양접시의 50% 정도를 차지하면 1 mm EDTA를 포함하는 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free Hank's balanced salt solution을 이용하여 세포들을 배양접시로부터 수거하였다.

과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 농도변화에 따른 세포생존도 평가 및 적정농도를 결정하기 위해 세포들을 4군으로 나누어 50, 100, 150, 200  $\mu$ M의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 각각 30분간 처리한 후, 세정과정을 거쳐 배양액에 24시간동안 방치한 후 MTT 분석<sup>36)</sup>을 시행하였으며 대조군으로는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 세포를 이용하였다.

EGCG 및 z-VAD-fmk의 세포보호효과를 확인하기 위해 0, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M의 EGCG를 N18D3 세포에 2시간동안 각각 전처리한 후 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30분간 투여한 후 세정과정을 거쳐 24시간 후 세포생존도를 측정하였다. PI3K/Akt와 GSK-3 등의 Western blot을 위해서는 30분간의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 세정하고 30분이 지난 다음 배양접시로부터 세포를 수거하였고 cytochrome c, caspase-3 및 PARP 등의 Western blot을 위해서는 30분간의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리하고 세정한 후 6시간이 지나서 수거하였다<sup>31), 37-41)</sup>. EGCG의 세포보호효과에 대한 평가는 비특이적인 caspase 억제제인 z-VAD-fmk를 투여한 후 관찰된 효과와 각각 비교하였다.

### DAPI 염색

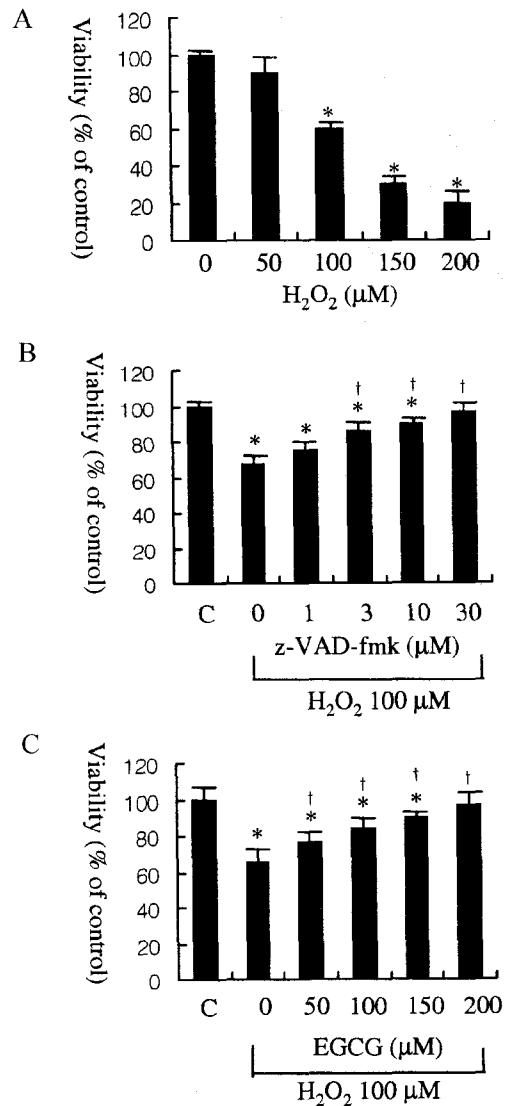
100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 N18D3세포의 사멸과정을 확인하기 위해 DAPI 염색을 시행하였다. 대조군과 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 N18D3 세포들을 각각 2분간 원심분리(1200 rpm)한 후 세포 pellet을 분리하여 받침유리위에 세포들을 얹고 2-3회 phosphate-buffered saline (PBS)로 세정한 후 4% neutral buffered formalin 100  $\mu$ l로 10분간 고정시켜 PBS로 세정하였다. 이후 20분간 0.26% NH<sub>4</sub>Cl로 block하고 PBS 세정과정을 거친 후 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI, Sigma)으로 20분간 염색과정을 가졌다. 그 후 90% glycerol로 mounting한 후 fluorescence microscopy (Olympus)를 이용하여 확인하였다<sup>42)</sup>.

### Western blot analysis

Western blot을 통해 p85a PI3K, 인산화 형태와 비인산화 형태의 GSK-3 $\beta$  및 Akt, caspase-3와 PARP 등의 면역활성도를 측정하였다. Western blot 과정 중 먼저 단백질을 추출을 위해 각각의 조건에 맞추어 처리가 끝난 세포들로부터 배지를 제거하고 두 차례 차가운 PBS로 세정한 후, scraper로 대략  $5 \times 10^6$ 개의 세포를 모으고 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.2% SDS, PMSF(Phenyl methyl sulfonyl fluoride) 100 ug/ml, Aprotinin 50 ul/ml, Igepal 630 1%, NaF 100 mM, Sodium Deoxy choate 0.5%, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.1 mM로 조성된 lysis buffer를 넣어 접시로부터 세포를 분리하여 튜브에 담고, 4°C에서 10분간 lysis 시킨 후 4°C에서 15000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 추출하였다. 추출된 lysate의 단백질 농도는 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 측정하였다. 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용하여 20  $\mu$ g의 단백을 전기영동 시킨 후, nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)에 단백을 이동시켰다. 5% skimmed milk를 이용하여 비특이 부분을 차단한 후 1차 항체로서 caspase-3(1:1000, Santa Cruz Biotech, Delaware, CA, USA), cleaved caspase-3 (Asp 175) (1:1000, Cell signaling, Beverly, MA, USA), GSK-3 $\beta$ (1:1000, Santa Cruz Biotech, Delaware, CA, USA), phospho-GSK-3 $\beta$ (Ser 9) (1:1000, Santa Cruz Biotech, Delaware, CA, USA), Akt(1:1000, Cell signaling, Beverly, MA, USA), phospho-Akt(1:1000, Cell signaling, Beverly, MA, USA), p85a PI3K(1:1000, Sigma, Saint Louis, MO, USA), PARP(1:500, Pharmingen, San Diego, CA, USA)나 cytochrome c(1:500, Santa Cruz Biotech, Delaware, CA, USA)등을 이용하여 냉암실에서 12시간정도 부착시킨 후 HRP-conjugated anti-rabbit antibodies 혹은 anti-mouse antibodies(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)등의 2차 항체를 2시간에 걸쳐 부착시킨 후 ECL detection(Amersham Pharmacia Biotech)용액을 이용하여 면역활성도를 확인하였다<sup>43)</sup>. 재현성이 있었던 Western blot의 결과들을 이용하여 image analyzer (Bio-Rad, Quantity One-4.2.0)을 통해 정량화 하였다.

### 자료분석

이상의 모든 실험들은 5회 이상 반복하였으며, 각각의 결과는 One-Way ANOVA test와 Duncan's Multiple Range Test를 이용하여 통계분석 하였다. *p*-value가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 의미 있다고 하였다.



**Fig 1. Viability of N18D3 cells.** A. Viability of N18D3 cells decreases with increasing hydrogen peroxide concentration. B. Viability of N18D3 cells increases depending on concentration of z-VAD-fmk compared with the viability of N18D3 cells cultured with only 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In cells pretreated with 200  $\mu$ M z-VAD-fmk, viability is similar to that of the control group. C. Viability of N18D3 cells increases depending on concentration of EGCG. This result is similar to that of z-VAD-fmk. The data are represented as means (% of control)  $\pm$ SEM. Each data is compared with other data using Duncan's Multiple Range Test. \**p*<0.05 (when viability is compared with that of control group), †*p*<0.05 (when viability is compared with that of N18D3 cells treated with only 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

## 결 과

### MTT 분석을 통한 EGCG의 세포보호효과 분석

산화자극에 노출된 N18D3 세포들의 세포생존도 변화를 확인하기 위해 50, 100, 150, 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 N18D3 세포들에 30분간 노출시킨 후 세정하고 24시간이 경과한 후 사립체의 기능을 반영하는 MTT 분석을 이용하여 세포생존도를 측정하였다. 같은 조건으로 배양되었지만 아무 처리도 하지않은 세포들을 대조군으로 하였다. MTT 분석 결과  $\text{H}_2\text{O}_2$  농도 증가에 따라 유의한 MTT 환원감소를 보였다. 즉,  $\text{H}_2\text{O}_2$  농도 변화에 대해 농도 의존적인 세포생존도의 감소를 보였다. 여러 농도 중 60-70%의 세포생존도를 보인 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 추후 실험을 위한 농도로 선택하였다(Fig 1A). 또한, 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  처리 후 DAPI 염색소견상 사멸세포들의 대부분은 아포프토시스 과정을 거치는 것을 알 수 있었다(Fig 2).

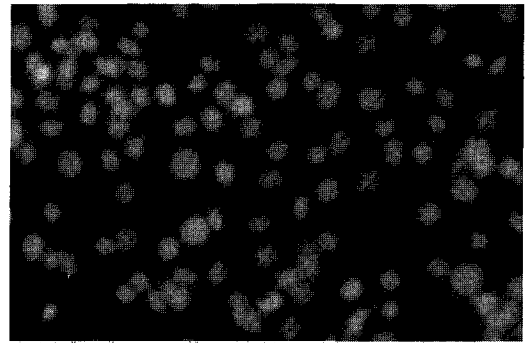
EGCG 및 z-VAD-fmk의 세포보호효과를 확인하기 위해  $\text{H}_2\text{O}_2$  투여 전에 EGCG와 z-VAD-fmk를 전처리한 후 MTT 분석을 통한 세포생존도를 비교하였을 때, EGCG 농도 증가에 따라 세포생존도의 증가를 확인할 수 있었고 200  $\mu\text{M}$  EGCG 전처리 경우에는 아무런 처리도 하지않은 대조군과 유사한 정도의 세포생존도를 나타냈다. z-VAD-fmk의 경우에도 EGCG와 유사한 결과를 보였으며 30  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 대조군과 유사한 정도의 세포생존도를 보였다(Fig. 1B and 1C).

### Cytochrome c와 caspase-3를 포함하는 하위 경로에 대한 EGCG의 효과

EGCG 및 z-VAD-fmk가 cytochrome c, caspase-3 활성 및 이에 따른 일련의 변화에 미치는 영향을 확인하기 위해 시행한 western blot 결과상 EGCG 및 z-VAD-fmk로 전처리한 세포군에서는 pro-caspase-3에 대한 활성화된 caspase-3의 비(activated caspase-3/procaspase-3)와 정상 PARP에 대한 분절형 PARP의 비(cleaved PARP/non-cleaved PARP)가 모두 감소하여 EGCG 및 z-VAD-fmk 두 물질 모두 caspase-3의 활성을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(Fig 3). 그러나, cytochrome c에 대해서는 차이가 있어 EGCG는 cytochrome c의 분비를 억제하였지만, z-VAD-fmk의 경우에는 이미 알려진 바와 같이 cytochrome c의 분비에는<sup>45)</sup> 아무런 영향도 미치지 못했다(Fig 4).

### PI3K/Akt 및 GSK-3 등의 상위전달경로에 대한 EGCG의 효과

PI3K/Akt 및 GSK-3 경로에 대한 EGCG의 영향을 평가하기 위해 p85a PI3K, Akt, GSK-3 $\beta$  및 phosphor-



A



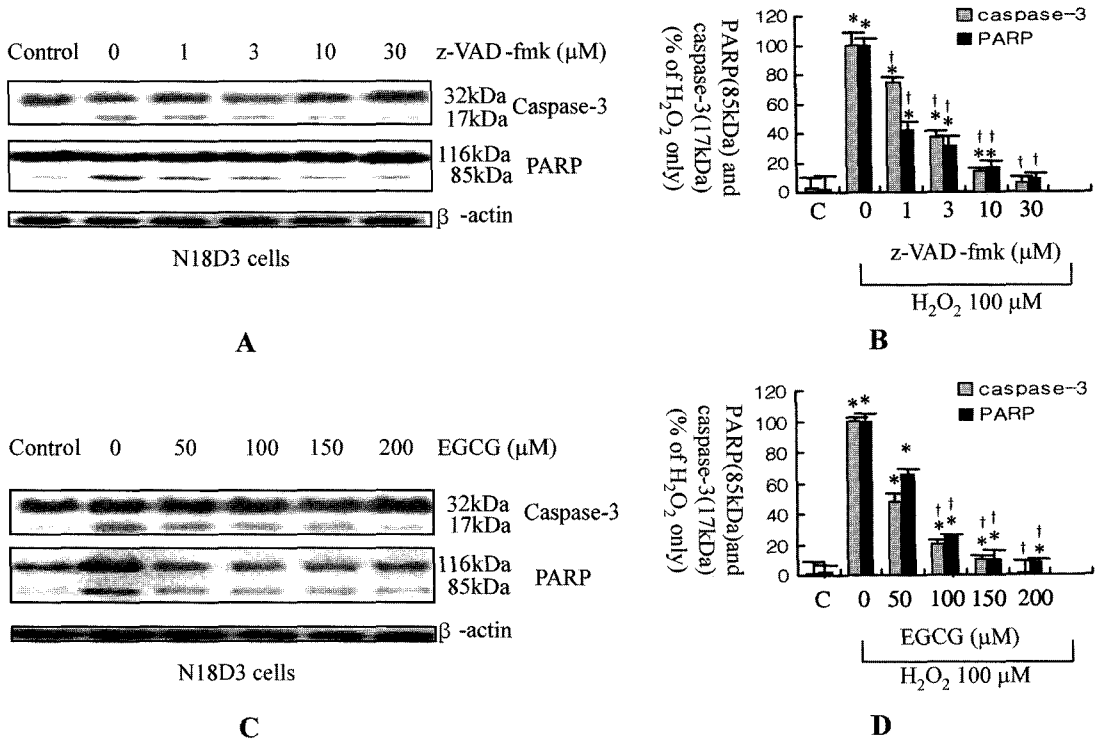
B

**Fig 2. Detection of apoptosis in N18D3 cells by DAPI Staining. A. Normal cells have a round or an ovoid shape. B. Cells treated with only 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  are undergoing apoptosis showing condensation and fragmentation of the nuclei**

Akt(p-Akt), phospho-GSK-3 $\beta$ (p-GSK3 $\beta$ ) 등의 항체를 이용한 western blot 결과상 EGCG 전처리 세포군에서는 Akt 와 GSK-3 면역활성도의 현저한 감소를 보이며 pAkt, pGSK-3 및 PI3K는 증가된 면역활성도를 나타냈다. 그러나, z-VAD-fmk로 전처리한 세포군에서는  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리한 세포군과 뚜렷한 차이를 보이지 않아 EGCG의 결과와는 대조적이었다(Fig 5, 6 and 7). 이상의 결과를 통해 EGCG는 cytochrome c 분비 및 caspase-3 활성억제 뿐아니라 PI3K/Akt의 활성을 증진하고 GSK-3의 활성을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

신경퇴행성질환의 발병기전으로는 산화자극, 글루탐산에 의한 흥분성 독성, 비정상 단백질들의 축적, 칼슘에 의해 매개되는 독성, 유전적 결함, 자가면역이상 등의 여러 가지 기전들이 제시되고 있으며 이러한 기전들은 단독으로보다는 상호 긴밀한 복합적 과정을 통



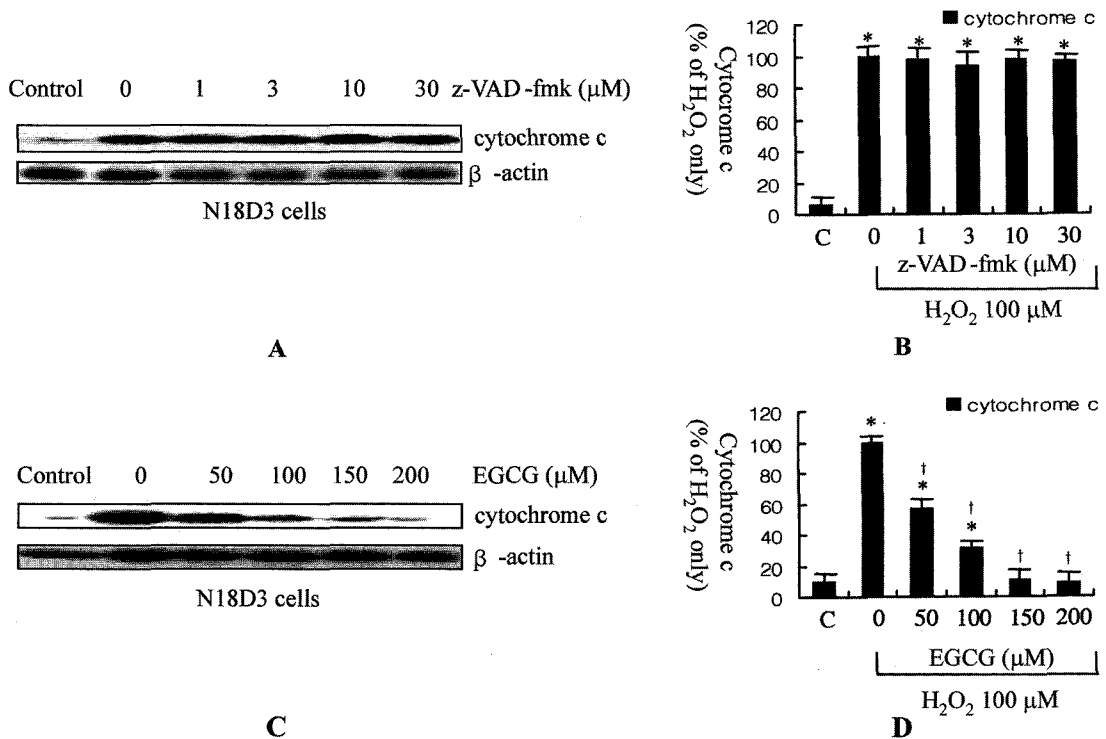
**Fig 3. Caspase-3 and PARP immunoreactivity (IR) in N18D3 cells.** A. Representative ECL photograph of immunoblot demonstrating decreased IR of cleaved PARP (85 kDa) and activated caspase-3 (17 kDa) with increasing z-VAD-fmk concentration. Data of N18D3 cells pretreated with several concentration of z-VAD-fmk are expressed as percentage of simultaneously assayed control group's value. IR of cleaved PARP and activated caspase-3 in N18D3 cells pretreated with z-VAD-fmk is significantly lower than in control. B. Quantitative data expressing IR of cleaved PARP and activated caspase-3, normalized to actin immunostaining, in N18D3 cells pretreated with several concentration of z-VAD-fmk and control group. C. Representative ECL photograph of immunoblot demonstrating decreased IR of cleaved PARP and activated caspase-3 with increasing EGCG concentration. D. Quantitative data expressing IR of cleaved PARP and activated caspase-3, normalized to actin immunostaining, in N18D3 cells pretreated with several concentrations of EGCG and in the control group. \* $p < 0.05$  (when IR is compared with that of control group), † $p < 0.05$  (when IR is compared with that of N18D3 cells treated with only 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ )

해 신경계를 손상시킨다고 알려져 있다<sup>46)</sup>. 그밖에도 산화자극은 뇌허혈 및 간질과 같은 여러 가지 신경계 질환의 발병에 있어서도 중요한 역할을 한다<sup>47)</sup>. 따라서, Egb761, clotrimazole, dehydroepiandrosteron, melatonin 및 indole propionic acid 등과 같은 항산화제들을 처리함으로써 산화자극에 의해 유발된 세포사를 억제하는 실험들이 진행되었다<sup>48-55)</sup>.

EGCG는 항산화제들 중 하나로서 자유기 청소(free radical scavenging)<sup>56)</sup>, 항산화 작용<sup>11-12)</sup>, 항암작용<sup>13)</sup> 및 항돌연변이<sup>14)</sup> 효과 등 다양한 효과가 알려져 있지만 EGCG가 어떻게 다양한 효과들을 갖는지, 신경보호작용을 나타내는지 등은 자세히 알려져 있지 않다. EGCG의 다양한 효과는 실험 세포의 종류나 EGCG의 농도 차이에 의한 것일 수도 있기에 이에 대한 고찰도 이루어져야 한다.

본 연구에서는 녹차의 주성분인 EGCG가 cytochrome c 분비 및 caspase-3 활성화와 연관된 하위전달체계 외에도 다양한 경로에 작용함으로써 세포보호효과가 있을 것이라는 가정하에 최근 주의를 끄는 PI3K/Akt와 GSK-3 경로에 미치는 영향을 평가하였다. EGCG가 PI3K를 증가시킴으로써 insulin과 유사한 작용을 한다는 보고<sup>57)</sup>가 있기는 하였으나 PI3K/Akt와 GSK-3 경로 전반에 미치는 EGCG의 효과에 대해서는 아직 보고된 바 없고 본 연구를 통해 처음 시도된 것이다.

PI3K/Akt와 GSK-3 경로는 여러 가지 중요한 세포 반응의 조절에 관여한다. PI3K/Akt 경로는 항아포프토시스 단백질의 발현을 촉진시키고 아포프토시스를 촉진하는 단백질의 활성을 억제함으로써 세포 생존을 증진한다. 구체적으로 말하자면, PI3K는 여러 생리적 효과들을 증대하기 위해 하위 표적인 Akt와 protein

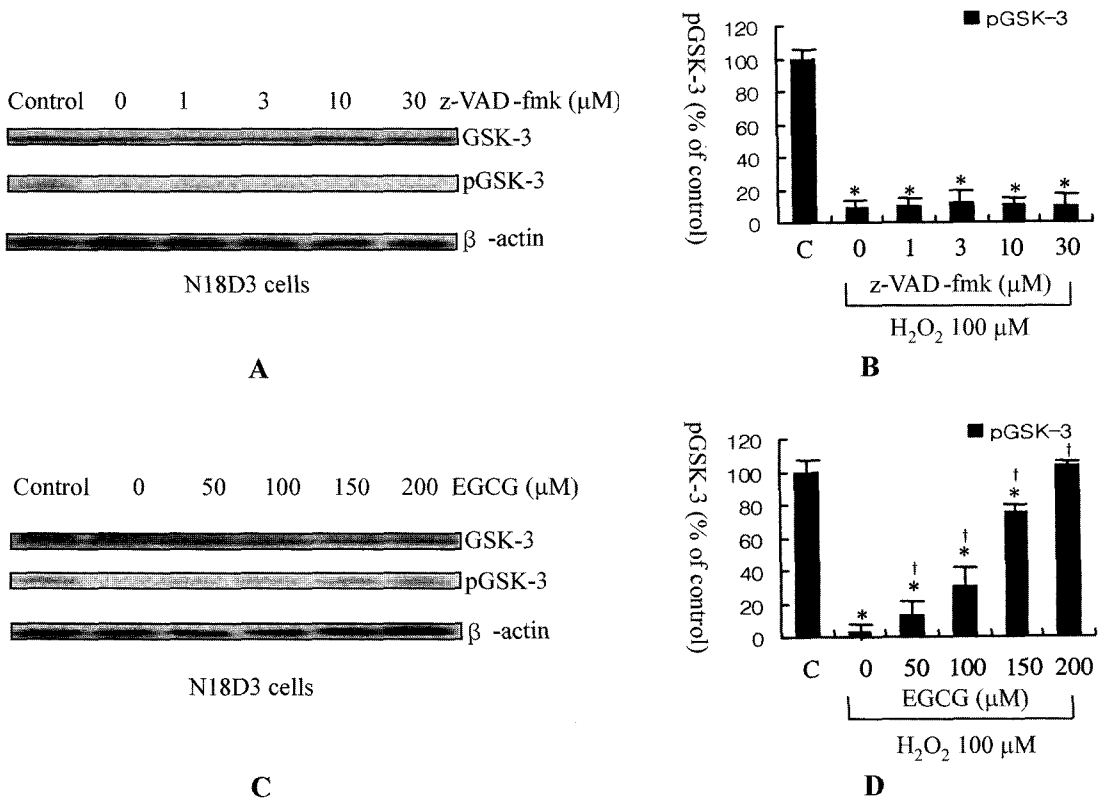


**Fig 4. Cytochrome c immunoreactivity (IR) in N18D3 cells.** A. Representative ECL photograph of immunoblot demonstrating no significant change in IR of cytochrome c regardless of concentration of z-VAD-fmk. B. Quantitative data expressing IR of cytochrome c, normalized to actin immunostaining, in cells pretreated with several concentrations of z-VAD-fmk and control group. C. Representative ECL photograph demonstrating decreased IR of cytochrome c with increasing EGCG concentration. D. Quantitative data expressing IR of cytochrome c, normalized to actin immunostaining, in cells pretreated with several concentrations of EGCG and in the control group. \* $p < 0.05$  (when IR is compared with that of control group), † $p < 0.05$  (when IR is compared with that of N18D3 cell treated with only 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ )

kinase B를 활성화시킨다. 만약 어떤 유해한 자극이 세포에 가해지면 3'-phosphatase이며 phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate [ $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ ]를  $\text{PI}(4)\text{P}$ 로,  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ 를  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ 로 바꾸는 PTEN(phosphatase and tensin homolog)이 활성화된다. 그 결과  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ 의 양이 적어지고  $\text{PI}3\text{K}$ 가 불활성화되며 Akt의 인산화가 장애를 받게 된다. 정상상태에서는 인산화된 Akt(pAkt)가 GSK-3, BAD/Bcl-2, caspase-9, I $\kappa$ B kinase 및 forkhead-related transcription factor 1등에 영향을 미친다. GSK-3 측면에서 보면, pAkt의 감소는 GSK-3를 pGSK-3로 인산화시키는 것이 감소하여 활성형태인 GSK-3의 상대적 증가를 유발한다. 이렇게 증가된 GSK-3(active form)는 사립체 손상에 의한 cytochrome c 분비를 증가시키고 caspase-9 활성화를 거쳐 PARP의 분절을 동반하는 caspase-3를 활성화시켜 세포사를 유발하게 된다.<sup>26-32), 56-58)</sup>

본 연구에서 사용된 N18D3 세포는 후근신경절 신경

세포(DRG neuron)를 생쥐의 신경모세포종(neuroblastoma) N18TG2 세포와 교잡시켜 얻은 세포로 후근신경절 신경세포의 특성상 말초신경계질환의 모델로 이용되기도 하지만<sup>34-35)</sup> 신경세포라는 점에서 일반적인 신경계질환의 연구를 위한 in vitro 실험에 사용될 수 있다. EGCG로 전처리한 N18D3 세포는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 산화 자극에 노출되었을 때, EGCG 전처리가 없었던 세포와 비교해보면 현저한 세포생존도의 증가를 나타냈다. 200  $\mu\text{M}$  EGCG를 처리한 경우에는 대조군과 유사한 정도의 세포생존도를 나타냈다. 이런 소견은 EGCG가 특정 농도에서는 산화자극에 의한 세포사멸을 강력히 억제할 수 있음을 보여주며 산화자극이 발병기전과 연관되는 질환들의 치료에 유용하게 이용될 수 있음을 의미한다. Western blot의 결과에서 p85a  $\text{PI}3\text{K}$ 의 면역활성도가 EGCG를 전처리한 세포들은 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 만 처리한 세포들에 비해 의미 있게 증가되었는데 이런 소견은 EGCG가 N18D3 세포에서는 PTEN을 불활성



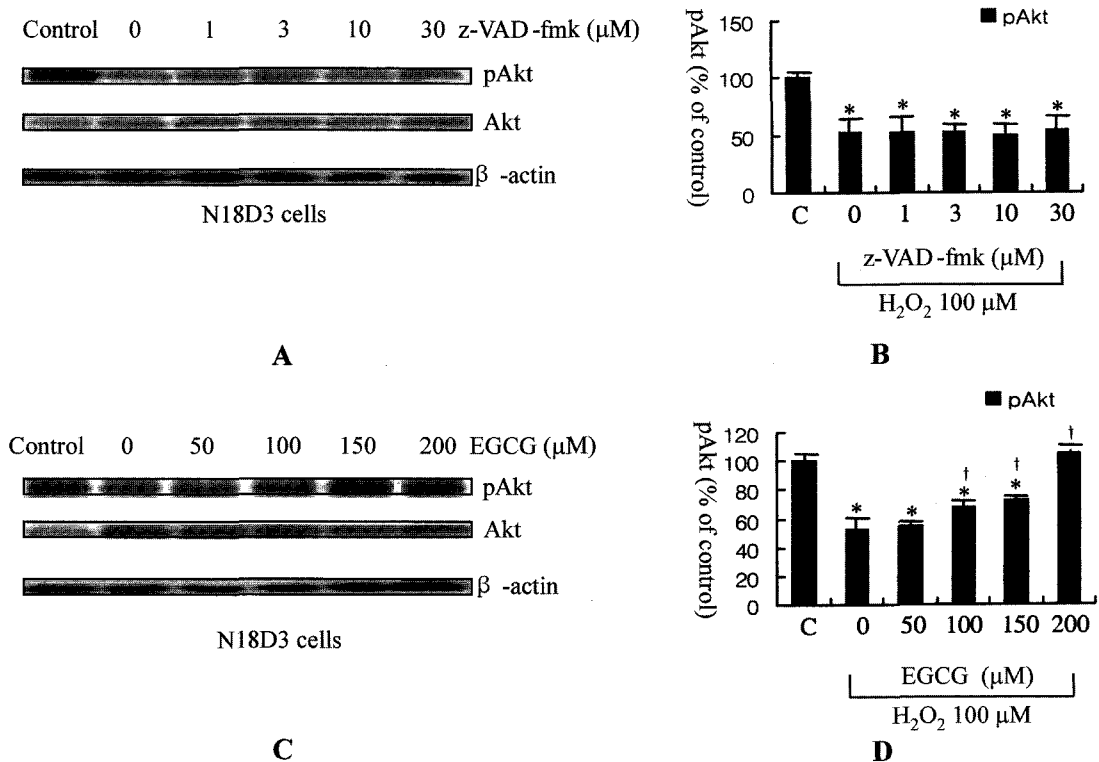
**Fig 5. GSK-3 and pGSK-3 immunoreactivity (IR) in N18D3 cells.** A. Representative ECL photograph of immunoblot demonstrating no significant change in IR of pGSK-3 regardless of concentration of z-VAD-fmk. B. Quantitative data expressing IR of pGSK-3, normalized to actin immunostaining, in N18D3 cells pretreated with several concentrations of z-VAD-fmk and control group. C. Representative ECL photograph of immunoblot demonstrating decreased IR of pGSK-3 with increasing EGCG concentration. D. Quantitative data expressing IR of pGSK-3, normalized to actin immunostaining, in N18D3 cells pretreated with several concentrations of EGCG and in the control group. \* $p < 0.05$  (when IR is compared with that of control group), † $p < 0.05$  (when IR is compared with that of N18D3 cells treated with only  $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ )

화 시키거나 혹은 PI3K를 활성화시킴으로써 작용할 것으로 추측할 수 있다. 인산화된 Akt의 면역활성도 역시 EGCG를 전처리한 경우 높았는데 EGCG가 직접적으로 Akt의 인산화를 증가 시킨 것인지 PI3K의 활성화 증가에 의한 이차적인 현상인지는 알 수 없지만 Akt 인산화 증가로 인한 인산화된 GSK-3(pGSK-3)의 면역활성도 증가를 확인함으로써 EGCG는 PI3K/Akt에 영향을 준 후, GSK-3의 인산화 형태를 증가시켜 사립체 손상을 줄여주고, 결국 cytochrome c 분비를 감소시켜 caspase-3 활성화에 의한 세포사를 막아주는 효과를 보이게 된다. 그러나, EGCG의 이런 작용이 각각의 인자들에 모두 영향을 미쳐 일어나는 것인지 아니면 PI3K에 대한 영향만을 통해 일어나는 것인지는 알 수 없다.

반면 z-VAD-fmk를 전처리한 세포들에서는 비록 세

포생존도는 현저하게 증가하였지만 PI3K/Akt 및 GSK-3 등을 거치는 상위전달체계에는 영향을 미치지 못하였다. 그러므로, 이미 알려진 바와 같이<sup>43)</sup> z-VAD-fmk의 효과는 caspase계의 불활성화에 의존하는 것임이 확인되었다.

실험결과를 정리하면 EGCG는 산화자극에 의해 유발된 아파프토시스로부터 N18D3 세포들을 보호하는 효과를 가지고 있으며 이런 신경보호효과는 사립체 손상, caspase-3 활성화 및 PARP 분절 등을 거치는 하위전달체계의 억제뿐만 아니라 PI3K/Akt 및 GSK-3 등을 거치는 상위전달체계에도 영향을 미침으로써 나타나게 된다. 저자들은 이런 결과들을 토대로 EGCG가 산화자극에 의해 유발되는 신경퇴행성질환 및 기타 다른 신경계 질환들을 치료하거나 질병의 경과를 조절하는데 유용한 물질일 수 있을 것이라 생각한다.

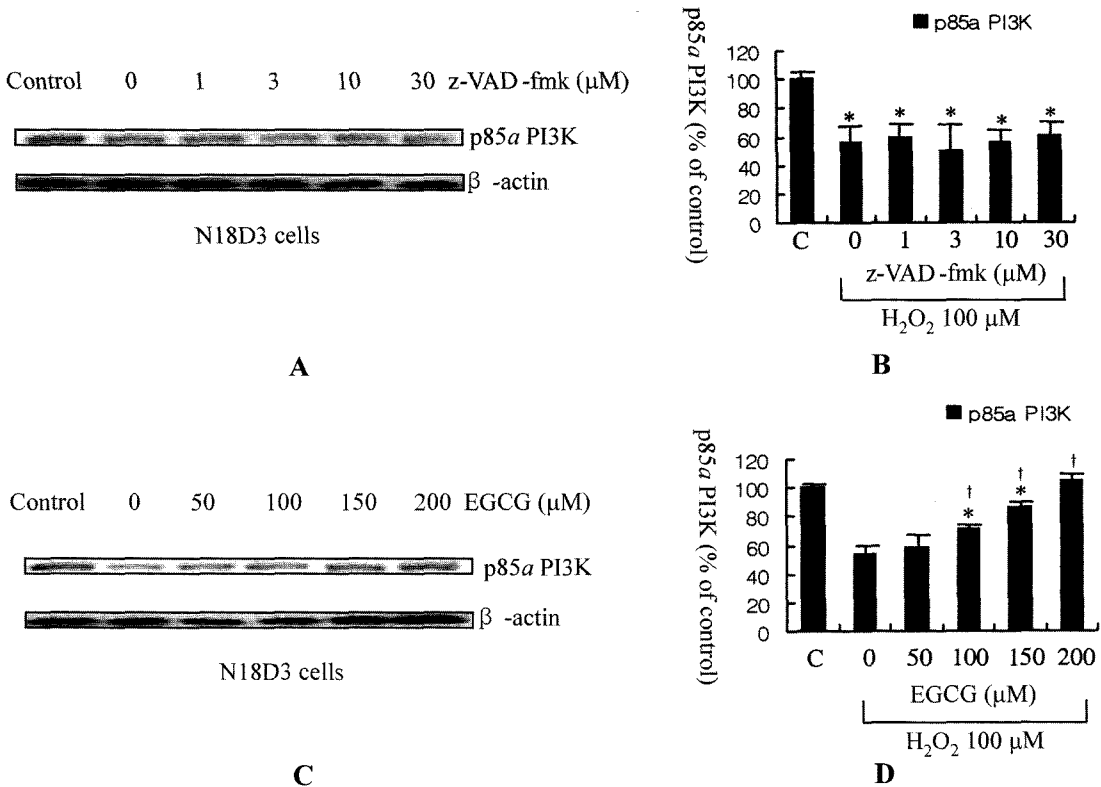


**Fig 6.** Akt and pAkt immunoreactivity (IR) in N18D3 cells. **A.** Representative ECL photograph of immunoblot demonstrating no significant change in IR of pAkt regardless of concentration of z-VAD-fmk. **B.** Quantitative data expressing IR of pAkt, normalized to actin immunostaining, in N18D3 cells pretreated with several concentrations of z-VAD-fmk and in the control group. **C.** Representative ECL photograph demonstrating increased IR of pAkt with increasing EGCG concentration. **D.** Quantitative data expressing IR of pAkt, normalized to actin immunostaining, in N18D3 cells pretreated with several concentrations of EGCG and in the control group. \* $p < 0.05$  (when IR is compared with that of control group), † $p < 0.05$  (when IR is compared with that of N18D3 cells treated with only 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

### 참고문헌

- Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1609-1623
- Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, et al. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 1996; 382(6587): 120-121
- Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 1992; 32(6): 804-812
- McCord JM. Mutant mice, Cu, Zn superoxide dismutase, and motor neuron degeneration. *Science* 1994; 266(5190): 1586-1587
- Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. The Ginkgo biloba extract (Egb761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: Involvement of its flavonoids constituents and protein kinase C. *J Neurochem* 2000; 74: 2268-2277
- Guo Q, Zhao BL, Li MF, Shen SR, Xin WJ. Studies on protective mechanism of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1304: 210-222
- Guo Q, Zhao BL, Shen SR, Hou JW, Hu JG, Xin WJ. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1427: 13-23
- Nie G, Jin C, Cao Y, Shen S, Zhao B. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 84-90
- Levites Y, Youdim MBH, Maor G, Mandel S. Attenuation of 6-hydroxydopamine-induced nuclear factor-kappa B (NF-kB) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 21-29
- Katiyar S, Mukhtar H. Tea consumption and cancer. *World Rev Nutr Diet* 1996; 79: 154-184
- Dong ZG, Ma WY, Huang CS, Yang CS. Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate and theaflavins. *Cancer Res* 1997; 57: 4414-4419





**Fig 7. p58a PI3K immunoreactivity (IR) in N18D3 cells. A. Representative ECL photograph of immunoblot demonstrating no significant change in IR of p58a PI3K regardless of concentration of z-VAD-fmk. B. Quantitative data expressing IR of p58a PI3K, normalized to actin immunostaining, in cells pretreated with several concentrations of z-VAD-fmk and in the control group. C. Representative ECL photograph of immunoblot demonstrating increased IR of p58a PI3K with increasing EGCG concentration. D. Quantitative data expressing IR of p58a PI3K, normalized to actin immunostaining, in cells pretreated with several concentrations of EGCG and control group. \*p<0.05 (when IR is compared with that of control group), †p<0.05 (when IR is compared with that of N18D3 cells treated with only 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

- Wang ZY, Cheng SJ, Zhou ZC, Athar M, Khan WA, Bicker DR, et al. Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutat Res* 1989; 223: 273-289
- Song DU, Jung YD, Chay KO, Chung MA, Lee KH, Yang SY, et al. Effect of drinking green tea on age-associated accumulation of maillard-type fluorescence carbonyl groups in rat aortic and skin collagen. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 424-429
- Bordin A, Hrelia S, Angeloni C, Giordano E, Guarneri C, Caldarera CM, et al. Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 103-111
- Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J* 2001; 358(Pt 3): 547-557
- Kobuchi H, Roy S, Sen CK, Nguyen HG, Packer L. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am J Physiol* 1999; 277: 403-411
- Kong ANT, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic responses and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res* 2000; 23: 1-16
- Mudher A, Chapman S, Richardson J, Asuni A, Gibb G, Pollard C, et al. Disheveled regulated the metabolism of amyloid precursor protein via protein kinase C/ mitogen-activated protein kinase and c-Jun terminal kinase. *J neurosci* 2001; 21: 4987-4995
- Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9356-9363
- Davies G, Jian WG, Mason MD. The interaction between beta-catenin, GSK3beta and APC after mitogen induced cell-cell dissociation, and their involvement in signal transduction pathways in prostate cancer. *Int J Oncol* 2001; 18: 843-847
- Xavier IJ, Mercier PA, McLoughlin CM, Ali A, Woodgett JR, Ovsenek N. Glycogen synthase kinase

- 3 $\beta$  negatively regulates both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *J Biol Chem* 2000; 275: 29147-29152
22. Sang H, Lu Z, Li Y, Ru B, Wang W, Chen J. Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in intact mammalian cells influence the stability of microtubules. *Neurosci Lett* 2001; 312: 141-144
  23. Brin JP, Anderton BH, Authelat M, Dayanandan R, Leroy K, Lovestone S, et al. Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation. *Siochem Soc Symp* 2001; 67: 81-88
  24. Kirschenbaum F, Hsu SC, Cordell B, McCarthy JV. Glycogen synthase kinase 3- $\beta$  regulates presenilin 1 C-terminal fragment levels. *J Biol Chem* 2001; 276: 30701-30707
  25. Yoganathan TN, Costello P, Chen X, Jabali M, Yan J, Leung D, et al. Intergrin-linked kinase (ILK): a "hot" therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1115-1119
  26. Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take center stage. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 219-225
  27. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999; 253: 239-254
  28. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *J Cell Sci.* 2001; 114: 1439-1445
  29. Cantley LC. The Phosphoinositide 3-kinase Pathway. *Science* 2002; 296: 1655-1657
  30. Roymans R, Slegers H. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem* 2001; 268: 487-498
  31. Pap M, Cooper GM. Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell survival Pathway. *J Biol Chem* 1998; 273: 19929-19932
  32. Pap M, Cooper GM. Role of Translation Initiation Factor 2B in Control of Cell Survival by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Signaling Pathway. *Mole Cell Biol* 2002; 22: 578-586
  33. Martinez A, Castro A, Dorronsoro I, Alonso M. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) Inhibitors as New Promising Drugs for Diabetes, Neurodegeneration, Cancer, and Inflammation. *Medic Res Rev* 2002; 22: 373-384
  34. Park SA, Choi KS, Bang JH, Huh K, Kim SU. Cisplatin-induced apoptotic cell death in mouse hybrid neurons is blocked by antioxidants through suppression of cisplatin-mediated accumulation of p53 but not of Fas/ Fas ligand. *J Neurochem* 2000 Sep; 75(3): 946-953
  35. Sanfeliu C, Wright JM, Kim SU. Neurotoxicity of isoniazid and its metabolites in cultures of mouse dorsal root ganglion neurons and hybrid neuronal cell line. *Neurotoxicology* 1999 Dec; 20(6): 935-944
  36. Garmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JB, Michell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomatic assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987; 47: 936-942
  37. Bijur GN, Samo PD, Jope RS. Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Facilitates Staurosporine- and Heat Shock-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 7583-7590
  38. Bijur GN, Jope RS. Proapoptotic Stimuli Induced Nuclear Accumulation of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ . *J Biol Chem* 2001; 276: 37436-37442
  39. Molina-Holgade E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almanzan G, Molina-Holgado F, Borrell J, et al. Cannabinoids Promote Oligodendrocyte Progenitor Survival: Involvement of Cannabinoid Receptors and Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Signaling. *J Neurosci* 2002; 22: 9742-9753
  40. Somerville TCP, Linch DC, Khwaja A. Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. *Blood* 2001; 98: 1374-1381
  41. Tsujio I, Tanaka T, Kudo T, Nishikawa T, Shinozaki K, Grundke-Iqbal I, et al. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C  $\delta$ : implications for regulation of  $\xi$  phosphorylation. *FEBS letters* 2000; 469: 111-117
  42. Jiang Q, Gu Z, Zhang G, Jin G. Diphosphorylation and involvement of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in glutamate-induced apoptotic-like death in cultured rat cortical neurons. *Brain Res* 857 (2000) 71-77
  43. Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein Methods*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1996; 195-230
  44. Richter-Landsberg C, Vollgraf U. Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp Cell Res* 1998; 244(1): 218-229
  45. Gordon J, Wu CH, Rastegar M, Safa AR. Beta2-microglobulin induces caspase-dependent apoptosis in the CCRF-HSB-2 human leukemia cell line independently of the caspase-3, -8 and -9 pathways but through increased reactive oxygen species. *Int J Cancer* 2003; 103(3): 316-327
  46. Victor M, Ropper AH. Adams and Victor's Principles of Neurology. Seventh edition. USA: McGraw Hill, 2001; 1106-1167
  47. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-695
  48. Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, et al. Inhibition of amyloid- $\beta$  aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract Egb761. *PNAS* 2002; 99(19): 12197-12202
  49. Isaev NK, Stelmashook EV, Dirnagl U, Andreeva NA, Manuhova L, Vorobjev VS, et al. Neuroprotective effects of the antifungal drug clotrimazole. *Neuroscience* 2002; 113(1); 47-53
  50. Zhang L, Li B, Ma W, Barker JL, Chang YH, Zhao W, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; 98(1-2): 58-66
  51. Cazevieuille C, Safa R, Osborne NN. Melatonin protects

- primary cultures of rat cortical neurons from NMDA excitotoxicity and hypoxia/reoxygenation. *Brain Res* 1997; 768(1-2): 120-124
52. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26(5): 497-502
53. Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res* 2000; 28(2): 89-96
54. Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, et al. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res* 2000; 28(4): 242-8
55. Chyan YJ, Poeggeler B, Omar RA, Chain DG, Frangione B, Ghiso J, et al. Potent neuroprotective properties against the Alzheimer beta-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 21937-42
56. Neri LM, Borgatti P, Capitni S, Martelli AM. The nuclear phosphoinositide 3-Kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1584: 73-80
57. Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granter DK. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem* 2002; 277: 34933-34940
58. Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* 2001; 114: 2375-2382