

신경교 세포에서 resveratrol이 amyloid- β 에 의해 유도되는 Cdk inhibitor p21 및 Bax 발현의 감소 효과

김영애¹ · 임선영² · 고우신 · 최병태 · 이용태 · 이숙희³ · 박건영³ · 이원호⁴ · 최영현*

동의대학교 한의과대학 한의학과 및 한방바이오연구센터, ¹日本 富山医科薬科大学 和漢薬研究所,

²한국해양대학교 해양과학기술대학 해양과학부, ³부산대학교 생활환경대학 식품영양학과, ⁴부산대학교 자연과학대학 생물학과

Received December 6, 2004 / Accepted January 10, 2005

Effect of Resveratrol on the Induction of Cdk Inhibitor p21 and Pro-apoptotic Bax Expression by Amyloid- β in Astrogloma C6 Cells. Young Ae Kim¹, Sun-Young Lim², Woo Shin Ko, Byung Tae Choi, Yong Tae, Sook-Hee Rhee³, Kun-Young Park³, Won-Ho Lee⁴ and Yung Hyun Choi*. *Department of Oriental Medicine, Dongguk University College of Oriental Medicine and Biomedical Research Center of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea, ¹Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan, ²Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea, ³Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, ⁴Department of Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea - Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene), a phytoalexin found in grape skins, peanuts, and red wine, has been reported to have a wide range of biological and pharmacological properties. Amyloid- β deposition and senile plaque-associated astrocytes are common neuropathological features of Alzheimer's disease. In this study, we have explored the effects of resveratrol on amyloid- β -peptide-mediated cytotoxicity *in vitro* and modulation of cell growth-regulatory gene products in astrogloma C6 cells to elucidate its possible mechanism for anti-cytotoxicity. Exposure of C6 cells to amyloid- β resulted in dose-dependent growth inhibition and morphological changes of C6 cells, which were recovered by pre-treatment with resveratrol. The anti-proliferative effect of amyloid- β was associated with the induction of tumor suppressor p53 and cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21 (WAF1/CIP1) expression assessed by RT-PCR and Western blot analysis in time-dependent manner in C6 cells. In addition, the pro-apoptotic Bax expression was also up-regulated in amyloid- β -treated C6 cells without alteration of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-X_L expression. However, pre-treatment of resveratrol significantly inhibited amyloid- β -induced p53, p21 and Bax levels, suggesting that the modulation of p53, p21 and Bax levels could be one of the possible pathways by which resveratrol functions as anti-cytotoxic agent. Our results demonstrate that resveratrol may enhance the protection against amyloid- β -induced cytotoxicity by promoting the survival of glial cells.*

Key words – resveratrol, amyloid- β , p53, Bax, astrogloma C6 cells

고령화 사회가 도래하면서 노인성 치매 환자가 매년 급격히 늘고 있는데, 현재 세계적으로 1,200만 명에 달하며, 2050년에는 4,500만 명에 달할 것으로 추정된다. 지난 2000년 Washington DC에서 열린 “국제 Alzheimer 회의”에서는 노인성 치매를 “인류가 가장 시급히 해결해야 할 범지구적 질병”으로 규정된 바 있는데, Alzheimer 병은 Alzheimer 형 노인성 치매증을 포함하는 신경변성 질환이다[27]. 우리나라도 급속히 고령화가 진행되어, 노령 인구가 2020년 및 2030년에는 전체 인구의 13.2 및 19.3%에 달할 것으로 보인다. 이러한 고령화 사회에서 치매는 심각한 사회 문제가 되고 있다. 현재 우리나라의 치매 환자 수는 65세 이상 노인 인구 가운데 4~5%인 10만~12만 명에 이른다고 추정하고 있다. Alzheimer에 동반되는 amyloid 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)이 뇌에서 단백질의 이동을 담당하는 운송 시스템을 저

해할 것이라는 초기 가설[20,22]이 최근 과학적으로 증명되어 있으므로 Alzheimer의 발병원인 및 치료 기술개발에 큰 도움을 주고 있다. 즉 Alzheimer 환자의 뇌에 축적되어 뇌 신경세포를 죽이는 amyloid plaque의 주성분은 amyloid- β 의 축적에 의한 것인데, amyloid- β 는 정상적인 단백질 신진대사 과정의 결과로 체내 모든 세포들로부터 생성되는 물질이다. 그런데 신경세포에서만 amyloid- β 에 의해 유해한 영향을 받는 것은 신경세포가 APP에 의한 손상에 대해 감수성이 큼을 의미한다. 이때 presenilin와 β -secretase 등도 관여하는데, 특히 presenilin 유전자의 돌연변이는 가족성 Alzheimer의 원인이 된다[21]. 또한 뇌 속의 apolipoprotein-E (Apo-E) 단백질 중, E4를 발현하는 유전자를 가진 사람에서는 amyloid plaque의 형성이 잘되지만, E3 형태를 가진 사람에겐 치매가 잘 생기지 않는다[26,30]. 만일 Apo-E4 단백질을 Apo-E3 단백질 등 다른 형태로 바꾸어주면 치매의 발생위험을 크게 낮출 수 있다. 그리고 비정상적인 Tau 단백질 역시 Alzheimer 유발과 관계가 있으므로, 최근 Alzheimer 연구는 amyloid- β

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

및 Tau 단백질의 핵심역할 규명에 집중화되어 있고, 각국은 현재 알츠하이머병의 진행을 늦추는 항체, 백신개발을 포함한 신약 개발 경쟁을 펼치고 있다.

한편 resveratrol은 포도의 씨, 껍질 등에 주로 분포하고 있으며 당도가 높은 포도에서 곱팡이와 같은 감염균으로 부터 자신의 몸을 보호하기 위해 생산하는 방어물질인 phytoalexin의 일종이다[2,33]. Resveratrol은 trans-resveratrol, cis-resveratrol 및 resveratrol piceid의 3가지 형태로 존재하는데 이중 trans-resveratrol이 모든 효능 면에서 가장 뛰어난 것으로 알려져 있다. Resveratrol은 여러 가지 과일과 견과류 등에도 함유되어 있으며 특히 붉은 포도와 오디, 나무딸기, 땅콩 등에 많이 들어있다. 포도 과피 100 g 중에 약 5~10 mg 정도 들어있고, 포도주 1 l에는 1.5~3 mg 정도 함유되어 있다. 따라서 이런 식품을 많이 섭취할 것을 권장하고 있으며, 최근 각종 기능성 식품에 resveratrol의 함량을 높이려는 연구가 시도 중이며 특히 항산화제 및 항균제 등으로서 이미 상품화되어 있다. 본 연구에서는 신경교세포에서 amyloid-β의 처리에 의한 신경교세포의 증식억제 및 apoptosis 유발관련 주요 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였으며, 이러한 신경교세포의 세포독성에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 amyloid-β의 처리

본 연구에 사용된 C6 신경교세포(astrogloma cells)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS 및 1% penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. Resveratrol 및 amyloid-β (amyloid-β-protein fragment 31~35)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Resveratrol은 ethanol에 희석하여 200 mM의 stock solution을 만들어 사용하였으며, amyloid-β는 3차 증류수에 2.5 mM의 농도로 희석하여 사용하였다. Amyloid-β 및 resveratrol의 혼합 처리를 위한 실험에서는 resveratrol을 amyloid-β 처리 40분전에 적적농도로 배지에 희석하여 먼저 처리하였다.

Hematocytometer를 이용한 생존율의 측정

세포배양용 60-mm dish 당 1×10⁵ cells개의 C6 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, amyloid-β 단독 또는 resveratrol과 혼합처리 후 적정시간 동안 배양하였다. 준비된 세포들은 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세하고 trypan blue (Gibco BRL)로 염색하였으며, 이를 hema-

tocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경(×200) 하에서 살아있는 세포의 수를 측정하여 대조군과 비교 분석하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

동일한 조건에서 준비된 세포들을 대상으로 TRIzol B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, ONE-STEP RT-PCR PreMix (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Korea)를 이용하여 2 μg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 선행연구 조건에 준하여 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자 (Table 1)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다[6]. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

선행 방법에 준하여 amyloid-β 단독 또는 resveratrol과 혼합 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다[7]. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4°C에서 1시간 이상 배양하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 ECL (Enhanced Chemi Luminoesence) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name	Sequence
p53	Sence 5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence 5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence 5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence 5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
Bax	Sence 5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	Antisence 5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-2	Sence 5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence 5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bcl-X _L	Sence 5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence 5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
GAPDH	Sence 5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence 5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

결 과

Amyloid-β에 의한 C6 신경교세포의 형태변화 및 증식억제에 resveratrol의 영향

Resveratrol이 amyloid-β에 의한 세포독성 보호 효과 여부를 조사하기 위하여 amyloid-β에 의한 C6 신경교세포의 형태변화 및 증식억제에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였다. Fig. 1A 및 2A에 나타난 바와 같이 amyloid-β가 처리된 C6 신경교세포의 경우 amyloid-β의 처리 시간이 증가될수록 신경교세포의 부착력이 상실됨과 동시에 생존율이 다소 감소됨을 알 수 있었다. 그러나 resveratrol이 전처리된 경우 resveratrol의 처리 농도가 증가될수록 세포의 형태 및 생존율이 정상 배지에서 배양된 세포의 수준으로 회복됨을 알 수 있었다(Fig. 1B 및 2B).

Amyloid-β 처리에 의한 p53 및 p21의 발현 증가에 미치는 resveratrol의 영향

다음은 C6 세포에서 amyloid-β에 의한 세포독성의 부분

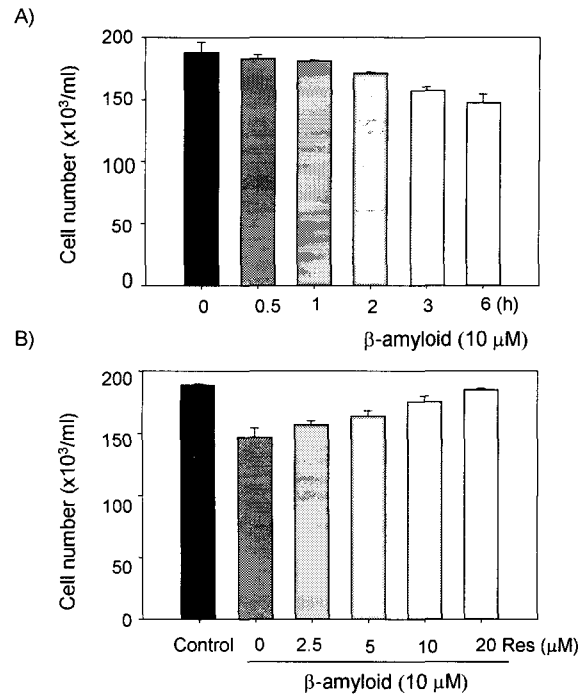


Fig. 2. Effects of resveratrol on astroglioma C6 cell viability in the presence of amyloid-β. Cells were plated at 1×10⁵ cells/60-mm plate, and pre-incubated for 24 h. Cells were treated with amyloid-β for indicated times (A) or pre-treated with variable concentrations of resveratrol for 40 min (B) before treatment with amyloid-β for 6 h. The cells were trypsinized, washed with PBS and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. Each point represents the mean ± S.E. of three independent experiments.

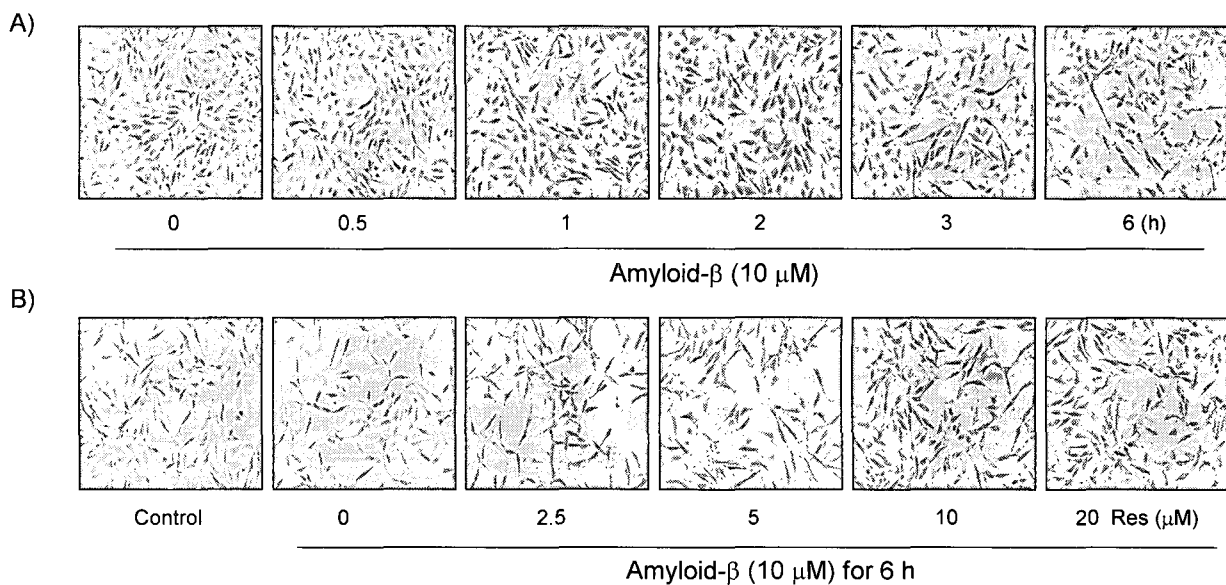


Fig. 1. Effects of resveratrol on amyloid-β-induced morphological changes in astroglioma C6 cells. (A) Cells were treated with 10 μM amyloid-β for indicated times. (B) Cells were pre-treated with resveratrol (Res) for 40 min, before treatment with amyloid-β. After incubation for 6 h cells were sampled and examined under light microscopy. Magnification, ×200

적인 이해를 조사하기 위하여 세포증식 조절에 매우 중요한 조절인자에 해당하는 종양억제 유전자인 p53 및 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor인 p21의 발현에 미치는 amyloid-β의 영향을 조사하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 amyloid-β의 처리 농도가 증가될수록 조사된 두 유전자의 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 amyloid-β 처리 농도 의존적으로 증가되었다. 즉 amyloid-β 처리에 의한 정상 신경교세포의 증식 억제에는 p53 및 p21의 유전자가 관여하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 amyloid-β 처리에 의한 C6 세포의 증식억제 및 resveratrol에 의한 C6 세포의 증식억제 회복효과가 조사된 두 유전자의 발현 조절과 상관성이 있는지의 여부를 조사하였다. Fig. 4A 및 B에 나타난 바와 같이 resveratrol의 전처리에 의하여 amyloid-β에 의하여 유도된 p53 및 p21 유전

자의 발현 증가가 resveratrol 처리 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과는 amyloid-β에 의한 C6 교세포의 증식억제는 p53 및 p21의 발현 증가와 연관성이 있으며, resveratrol은 두 유전자들의 발현 증가 억제를 통하여 amyloid-β에 의한 C6 세포의 세포 증식 억제에 대한 보호 효과가 있음을 의미하여 준다.

Amyloid-β 처리에 의한 apoptosis 유발관련 유전자의 발현 변화에 미치는 resveratrol의 영향

이상에서 조사된 amyloid-β에 의한 C6 세포의 증식억제가 apoptosis 유발과의 상관성 여부를 조사하기 위하여 apoptosis 조절과 관련이 있는 주요 유전자들의 발현에 미치는 amyloid-β의 영향을 조사하였다. Fig. 5A 및 B에 나타난 바와 같이 apoptosis 유발에 직접적인 영향을 주는 것으로 알려진 Bax 유전자의 발현이 amyloid-β의 처리에 의하여 전사 및 번역 수준에서 처리시간 의존적으로 매우 증가하였음을 알 수 있었다. 그러나 apoptosis 유발 억제와 직접연관성이 있는 Bcl-2 및 Bcl-X_L의 유전자의 발현은 amyloid-β 처리에 의하여 큰 변화가 없었다. 즉 amyloid-β가 처리된 C6 세포에서는 Bax의 발현을 통한 세포사멸의 과정을 밟을 것으로 추정이 되어진다. 그러나 Fig. 6에 나타난 바와 같이 resveratrol의 전처리에 의하여 amyloid-β에 의한 Bax 발현의 증가 전사 및 번역 수준에서 모두 감소되었다. 그러나 Bcl-2 및 Bcl-X_L의 유전자의 발현변화에는 큰 영향을 미치지 않았다. 즉 amyloid-β에 의한 Bax의 발현 증가를 감소시킴으로서 resveratrol은 C6 세포의 사멸을 억제할 수 있음을 시사하여 주었다.

논 의

중추신경계의 비신경성 세포에 해당되는 신경교세포는 astrocyte, oligodendrocyte 및 microglia로 구분되어지는데

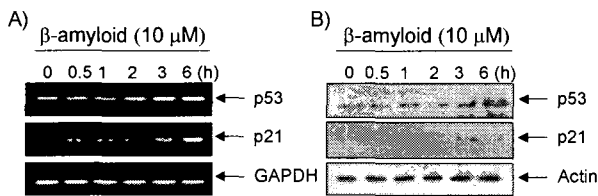


Fig. 3. Induction of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 levels by amyloid-β treatment in astrogloma C6 cells. (A) C6 cells were incubated with amyloid-β for 6 h, total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and p21 primers. The amplified PCR products were run in a garose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cell extracts were prepared, and the expression levels were examined by Western blotting with anti-p53 and anti-p21 antibodies, and ECL detection system. Actin was used an internal control.

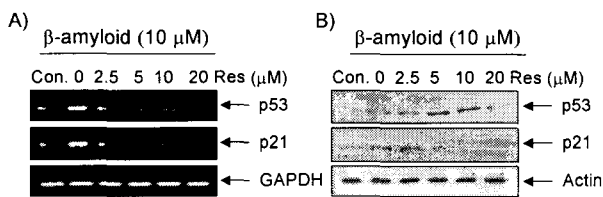


Fig. 4. Inhibitory effects of resveratrol on the induction of p53 and p21 expression by amyloid-β treatment in astrogloma C6 cells. (A) C6 cells were treated variable concentrations of resveratrol for 40 min, before treatment with amyloid-β, and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and p21 primers. The amplified PCR products were run in agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After amyloid-β treatment for 6 h in the presence or absence of resveratrol, cells extracts were prepared, and the expression levels were examined by Western blotting with anti-p53 and p21 antibodies, and ECL detection system. Actin was used an internal control.

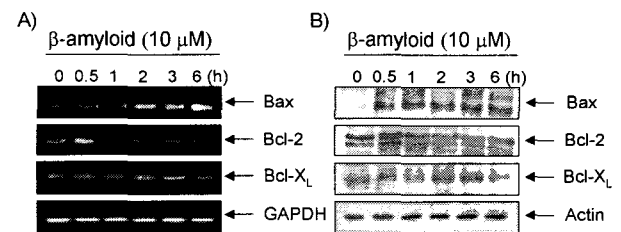


Fig. 5. Induction of pro-apoptotic Bax by amyloid-β treatment in astrogloma C6 cells. (A) C6 cells were incubated with amyloid-β for 6 h, total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. The amplified PCR products were run in a garose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cell extracts were prepared, and the expression levels were examined by Western blotting with indicated antibodies, and ECL detection system. Actin was used an internal control.

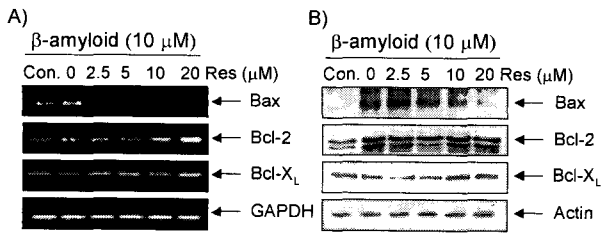


Fig. 6. Inhibitory effect of resveratrol on the induction of Bax expression by amyloid- β treatment in astrogloma C6 cells. (A) C6 cells were treated variable concentrations of resveratrol for 40 min, before treatment with amyloid- β , and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. The amplified PCR products were run in agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After amyloid- β treatment for 6 h in the presence or absence of resveratrol, cells extracts were prepared, and the expression levels were examined by Western blotting with indicated antibodies, and ECL detection system. Actin was used an internal control.

[14], 최근의 연구들에서, astrocyte가 거의 모든 종류의 신경 전달물질에 대한 수용체를 발현하며, astrocyte가 뇌 내의 대표적인 신호전달물질의 하나인 glutamate를 분비한다는 것이 확인되었다. 이는 astrocyte가 신경세포의 작용을 원활하게 유지시켜주는 수동적인 기능 뿐 아니라 신경세포의 고유한 기능으로 알려져 왔던 신호전달에도 관여할 수 있음을 의미하며 신경계의 손상 및 재생과도 관련이 있음을 의미한다 [15,23]. 한편 oligodendrocyte는 신경전달의 속도를 빠르게 유지시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있는 반면에, microglia는 전체 뇌 세포의 5~10%를 차지하고 있는 세포로 정상상태의 기능에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않으나 여러 가지 원인에 의한 뇌 손상 시에 활성화되어 체내의 macrophage와 유사한 작용을 하기 때문에 brain macrophage로 불리기도 한다[25]. 그리고 활성화된 microglia로부터 분비되는 염증매개물질들은 뇌 손상에 직접 또는 간접적으로 영향을 준다고 알려져 있으며, 최근에는 microglia가 노인성치매의 원인 물질로 생각되는 amyloid- β 에 의해 활성화되어 amyloid- β 의 독성을 매개 또는 증폭시키며, 면역억제제가 치매의 발병을 낮추어준다는 연구결과들이 발표되면서 microglia가 뇌 손상을 악화시킬 뿐 아니라 노인성치매와 같은 퇴행성뇌질환의 발병 또는 진단에도 관여할 가능성이 부각되고 있다[9,11]. 즉 신경교세포는 정상적인 신경계의 신경활동에 필수적이며 뇌 손상이나 뇌 질환의 발병과 진단, 재생과도 크게 관련되어 있으며, 신경교세포가 양적인 면에서의 신경계의 주요 부분일 뿐 아니라 기능적인 면에서도 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사하는 것이라 하겠다. 또한 microglia는 Alzheimer의 특징이며 진단의 기준이 되는 amyloid plaque에서 발견될 뿐 아니라 plaque의 주 구성분인 amyloid- β 에 의해 활성화

된다[11]. Amyloid- β 는 세포막에 있는 scavenger 수용체[9]나 RAGE (receptor for advanced glycation end product)를 통해 microglia를 활성화시키는 것으로 알려져 있다[38]. Microglia와 Alzheimer의 관련성은 Alzheimer의 위험인자인 Apo-E4가 amyloid- β 에 의한 microglia의 활성화를 촉진시킨다는 연구 결과로도 뒷받침된다[1]. 이러한 연구 결과들은 microglia가 amyloid- β 의 독성을 직접적으로 매개 또는 증폭 시킴으로써, 그리고 뇌 내의 환경적인 변화가 간접적으로 microglia의 변형을 초래함으로써 Alzheimer의 유발 빈도를 높일 수 있다는 것을 의미한다. 그러므로 microglia의 활성화 시에 나타나는 변화들을 규명하고 활성화에 관여하는 신호전달체계를 이해하며 microglia와 신경세포와의 상호작용을 조사하는 것은 Alzheimer의 예방이나 치료를 위한 한 가지 접근 방법이 될 수 있다.

한편 최근까지 알려진 resveratrol의 생리활성 효과를 요약하면, 먼저 가장 많은 연구가 이루어진 심혈관질환 예방효과로서 low density lipids (LDL)의 양을 저하시키고 high density lipids (HDL)를 증가시켜 HDL에 의한 혈 중 불필요한 cholesterol을 운반하여 제거하여 줌으로서 협심증과 뇌졸중을 포함한 심장병/동맥경화의 예방효과를 지니며 또한 혈소판 응집 억제 효과를 가진다[3,12,36,37,39]. 그리고 resveratrol은 정상세포가 암으로 전환되는 것을 막고 악성종양의 증식 및 전이를 차단하며, radiosensitizer로서의 기능, antiestrogenic 효과 및 angiogenesis 억제 등[2,15,17]을 통한 항암 효과 역시 잘 알려져 있다. 또한 resveratrol은 cyclooxygenase (COX) 활성 및 nuclear factor kappa B (NF- κ B)와 연관되어 연구가 많이 된 부분으로 다양한 질병과 관련이 있는 세포염증을 차단하는 역할을 가지고 있으며[8,31], DNA breakage를 통한 박테리아의 성장억제, 특히 Helicobacter pylori 및 herpes simplex virus에서의 DNA합성 억제를 통한 성장억제하며 내성이 생긴 변종 바이러스의 성장도 차단할 수 있는 탁월한 항생물질 효과를 가진다[2,4,34]. 한편 활성 산소는 생체에 다양한 장애를 주면서 각종 질병, 암, 노화의 발생에 직접적인 원인으로 작용하는데 resveratrol은 활성산소의 제거 능력이 탁월하며, oxidative DNA damage의 방어작용 등의 강력한 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 있다[2,39].

또한 최근 연구결과에 의하면 쥐의 pheochromocytoma (PC12) 세포에서 resveratrol은 oxidative stress나 치매유발인자로 알려진 amyloid- β 에 의한 세포독성을 완벽하게 보호해 주는 효과 등도 보고된 바 있으므로[18,19], resveratrol은 amyloid- β 로 유도된 세포독성의 차단 또는 보호 효과가 매우 탁월할 것으로 기대되어 신경교세포를 대상으로 조사한 결과, Fig. 1 및 2에 나타낸 바와 같이 amyloid- β 에 의한 신경교세포의 형태변형과 연관된 성장 억제를 매우 효과적으로 차단할 수 있었다. 따라서 amyloid- β 에 의한 신경교세포의 성장억제와 연관된 몇 가지 중요 유전자의 발현 변화 여부를

조사하였으며, amyloid- β 에 의한 특정 유전자의 발현에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 p53 및 p21의 발현에 미치는 amyloid- β 의 영향을 조사한 결과, amyloid- β 의 처리로 인하여 처리 시간 의존적으로 전사 및 번역 수준에서 두 유전자의 발현이 모두 매우 증가되었다. 특히 Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며[10,28], 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점[29,32]에서 amyloid- β 의 처리에 의한 신경교세포에서의 발현 증가는 amyloid- β 에 의한 신경교세포의 증식억제에 이들 두 유전자가 핵심적으로 관여할 것으로 추정되어지지만, 이러한 현상들이 resveratrol의 전 처리에 의하여 매우 유의적으로 차단됨을 알 수 있었다(Fig. 3 및 4).

한편 apoptosis는 다양한 유전자의 발현에 의하여 조절되는데 그중 가장 중요한 유전자로 알려진 Bcl-2 family에 속하는 유전자 산물들은 apoptosis를 직접적으로 유발하거나 억제하는데 관여하며, 그들 사이의 상대적인 유전자 발현의 양적 차이에 의해 apoptosis 유발 여부가 결정 되어진다[16,31]. Bcl-2 family의 대표적 유전자인 Bcl-2 member에 속하는 유전자 산물들은 anti-apoptotic 인자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax member에 속하는 유전자들은 pro-apoptotic 인자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다[5]. 이들은 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다[5,24]. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다. 따라서 amyloid- β 처리에 의한 신경교세포의 증식억제와 연관된 apoptotic 유발에 Bcl-2 family의 가능성 여부를 조사하였으며, 그 결과 Bax의 발현이 선택적으로 amyloid- β 의 처리에 의하여 증가됨을 관찰할 수 있었으며, resveratrol의 전 처리는 amyloid- β 에 의한 Bax 발현을 유의적으로 차단시켜 주었다(Fig. 5 및 6). 이상의 결과는 대표적인 치매유발 물질로 알려진 amyloid- β 에 의한 신경교세포의 세포독성 유발에 resveratrol이 매우 효과적인 보호 작용을 가짐으로서 신경교세포의 정상적인 생존을 유지시켜줄 것으로 기대되는 결과로 추정되어지며, 추후 보다 정확한 기전해석을 위한 보충실험이 요구될 것으로 생각된다.

요 약

Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene)은 포도와 같은 식물에서 각종 감염균으로부터 자신의 몸을 보호하기 위하여 생성되는 물질인 phytoalexin의 일종으로 강력한 항산화작용, 암예방 효과 및 항암 작용을 포함한 각종 약리작용을 가진 것으로 보고 되어져 오고 있다. Alzheimer 환자의

뇌에 축적되어 뇌 신경세포를 죽이는 amyloid plaque의 주 성분은 amyloid- β 의 축적에 의한 것인데, amyloid- β 는 정상적인 단백질 신진대사 과정의 결과로 체내 모든 세포들로부터 생성되는 물질이다. 본 연구에서는 resveratrol의 세포독성 보호효과에 관한 효능을 검증하기 위하여 C6 신경교세포에서 amyloid- β -peptide (fragment 31-35)에 의한 세포독성 및 세포성장 조절관련 주요 유전자들의 발현에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였다. Amyloid- β 가 처리된 C6 세포는 처리 농도의존적으로 증식이 억제되었으며, 형태적 변형도 유발되었으나 resveratrol의 전처리에 의하여 효과적으로 차단되었다. RT-PCR 및 Western blot analysis에 의한 결과에서 amyloid- β 처리에 의한 세포증식 억제는 종양억제유전자 p53 및 Cdk 억제제인 p21 (WAF1/CIP1) 발현이 증가되었다. 또한 apoptosis 유발에 매우 중요한 역할을 수행하는 Bax의 발현도 amyloid- β 가 처리된 C6 세포에서 발현이 증가되었으나 apoptosis 유발억제에 관여하는 Bcl-2 및 Bcl-X_L 발현에는 큰 영향을 미치지 못하였다. 그러나 resveratrol이 전처리된 세포에서는 처리 농도 의존적으로 amyloid- β 에 의해 유도되는 p53, p21 및 Bax의 발현이 정상수준으로 회복되었다

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원(02-PJ1-PG3-20905-0009)에 의하여 이루어진 결과의 일부분입니다.

참고 문헌

1. Barger, S.W. and A.D. Harmon. 1997. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* **388**, 878-881.
2. Bhat, K.P.L., J.W. Kosmeder 2nd and J.M. Pezzuto. 2001. Biological effects of resveratrol. *Antioxid. Redox Signal* **3**, 1041-1064.
3. Bhavnani, B.R., A. Cecutti, A. Gerulath, A.C. Woolever and M. Berco. 2001. Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E, and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. *Menopause* **8**, 408-419.
4. Chan, M.M. 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 99-104.
5. Chiarugi, V., L. Magnelli and G. Basi. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 603-612.
6. Choi, Y.H., K.R. Kong, Y.A. Kim, K.O. Jung, J.H. Kil, S.H. Rhee and K.Y. Park. 2003. Induction of Bax and activation of caspases during β -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* **23**, 1657-1661.
7. Choi, Y.H., S.J. Lee, P. Nguyen, J.S. Jang, J. Lee, M.L. Wu, E. Takano, M. Maki, P.A. Henkart and J.B. Trepel. 1997. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.*

- 272, 28479-28484.
8. Draczynska-Lusiak, B., Y.M. Chen and A.Y. Sun. 1998. Oxidized lipoproteins activate NF- κ B binding activity and apoptosis in PC12 cells. *Neuroreport* **9**, 527-532.
 9. El Khoury, J., S.E. Hickman, C.A. Thomas, L. Cao, S.C. Silverstein and J.D. Loike. 1996. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* **382**, 716-719.
 10. El-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculesco, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, E.W. Mercer, K.W. Kinzler and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.
 11. Giulian, D., L.J. Haverkamp, J.H. Yu, W. Karshin, D. Tom, J. Li, J. Kirkpatrick, L.M. Kuo and A.E. Roher. 1996. Specific domains of β -amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J. Neurosci.* **16**, 6021-6037.
 12. Goldberg, D.M., S.E. Hahn and J.G. Parkes. 1995. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin. Chim. Acta.* **237**, 155-187.
 13. Hadi, S.M., S.F. Asad, S. Singh and A. Ahmad. 2000. Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life* **50**, 167-171.
 14. Hansson, E. 1998. Astroglia from defined brain regions as studied with primary cultures. *Prog. Neurobiol.* **30**, 369-397.
 15. Harder, D.R., C. Zhang and D. Gebremedhin. 2002. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol. Sci.* **17**, 27-31.
 16. Hockenbery, D.M., Z.M. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Millman and S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**, 241-251.
 17. Igura, K., T. Ohta, Y. Kuroda and K. Kajii. 2001. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis *in vitro*. *Cancer Lett.* **171**, 11-16.
 18. Jang, D.S., B.S. Kang, S.Y. Ryu, J.M. Chang, K.R. Min and Y. Kim. 1999. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 705-712.
 19. Jang, J.H. and Y.J. Surh. 2001. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat. Res.* **496**, 181-190.
 20. Johnson, S.A., G.M. Pasinetti, P.C. May, P.A. Ponte, B. Cordell and C.E. Finch. 1998. Selective reduction of mRNA for the β -amyloid precursor protein that lacks a Kunitz-type protease inhibitor motif in cortex from Alzheimer brains. *Exp. Neurol.* **102**, 264-826.
 21. Kopan, R. and A. Goate. 2002. Aph-2/Nicastrin: an essential component of gamma-secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization. *Neuron* **33**, 321-324.
 22. Kosik, K.S. 1992. Alzheimer's disease: a cell biological perspective. *Science* **256**, 780-783.
 23. Kvamme, E., I.A. Torgner and B. Roberg. 2001. Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *J. Neurosci. Res.* **66**, 951-958.
 24. Lowe, S.W., H.E. Ruley, T. Jacks and D.E. Housman. 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anti-cancer agents. *Cell* **74**, 957-967.
 25. Lue, L.F., D.G. Walker and J. Rogers. 2001. Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiol. Aging* **22**, 945-956.
 26. Mahley, R.W. and S.C. Rall Jr. 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **1**, 507-537.
 27. Marin, D.B., M.C. Sewell and A. Schlechter. 2002. Alzheimer's disease. Accurate and early diagnosis in the primary care setting. *Geriatrics* **57**, 36-40.
 28. Miyashita, T. and J.C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
 29. Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
 30. Potter, H., I.M. Wefes and L.N. Nilsson. 2001. The inflammation-induced pathological chaperones ACT and apo-E are necessary catalysts of Alzheimer amyloid formation. *Neurobiol. Aging* **22**, 923-930.
 31. Reddy, B.S., C.X. Wang, H. Samaha, R. Lubet, V.E. Steele, G.J. Kelloff and C.V. Rao. 1997. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res.* **57**, 420-425.
 32. Sherr, C.J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* **60**, 3689-3695.
 33. Soleas, G.J., E.P. Diamandis and D.M. Goldberg. 1997. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal.* **11**, 287-313.
 34. Sun, N.J., S.H. Woo, J.M. Cassidy and R.M. Snapka. 1998. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. *J. Nat. Prod.* **61**, 362-366.
 35. Surh, Y.J., K.S. Chun, H.H. Cha, S.S. Han, Y.S. Keum, K.K. Park and S.S. Lee. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268.
 36. Wang, Z., Y. Huang, J. Zou, K. Cao, Y. Xu and J.M. Wu. 2002. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Mol. Med.* **9**, 77-79.
 37. Wu, J.M., Z.R. Wang, T.C. Hsieh, J.L. Bruder, J.G. Zou and Y.Z. Huang. 2001. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *Int. J. Mol. Med.* **8**, 3-17.
 38. Yan, S.D., X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Migheli, P. Nawroth, D. Stern and A.M. Schmidt. 1996. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **382**, 685-691.
 39. Zou, J., Y. Huang, Q. Chen, E. Wei, K. Cao and J.M. Wu. 2000. Effects of resveratrol on oxidative modification of human low density lipoprotein. *Chin. Med. J. (Engl)* **113**, 99-102.