

Effect of Cymbidium Root Extracts on Oxidative Stress-induced Myoblasts Damage

Wan Joong Kim¹, Han-Sung Kim², Joerg Opitz³, Kazuya Kabayama⁴ and Tack-Joong Kim^{1*}

¹Division of Biological Science and Technology, Yonsei-Fraunhofer Medical Device Lab, College of Science and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

²Department of Biomedical Engineering, Yonsei-Fraunhofer Medical Device Lab, College of Health Science, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

³Fraunhofer Institute for Ceramic Technologies and Systems-Material Diagnostics, Dresden, Germany

⁴Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Osaka, Japan

Received July 21, 2014 / Revised August 9, 2014 / Accepted August 12, 2014

Skeletal muscle atrophy can be defined as a decrease in or a disease of the muscle tissue, or as a disorder of the nerves that control the muscle, through injury or lack of use. This condition is associated with reactive oxygen species (ROS), resulting in various muscular disorders. Exposure to ROS induces muscle atrophy through several biological factors, such as SOD1 and HSP70. We found that cymbidium root extract reduced the H₂O₂-induced viability loss in C2C12 myoblasts and inhibited apoptosis. In addition, we showed that the cymbidium root extract increased the expression of HSP70 and decreased the expression of SOD1 in the H₂O₂-induced C2C12 myoblasts. These results suggest that cymbidium root extract might have therapeutic value in reducing ROS-induced muscle atrophy.

Key words : Cymbidium, heat shock protein 70, reactive oxygen species

서 론

근위축(atrophy)은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실 또는 근육을 지배하는 신경의 손상으로 정의할 수 있으나, 정확한 진단이 어려워 한국 및 서양에서도 정확한 통계를 산출하기 어렵다[1].

근위축은 움직이지 못하는 상태에서의 근육사용 감소, 장기적인 요양, 신경계거, 우주탐사 등의 결과로 나타날 수 있으며[20], 근위축이 발병하면 완전한 치료가 이루어지지 않아 진행을 늦추어 주는 약물효과만의 연구가 진행되고 있다. 근위축은 산화적인 환경의 근육에서 전자이동과 산소흐름이 갑자기 많아질 때 활성산소에 의하여 발생하기도 하며 심한 운동을 하면 활성산소 생산의 증가로 인해 근육손상이 유도된다[6, 11, 20]. 이러한 기전은 활성산소와 관련된 물질대사와 매개되어 세포 내 높은 라디칼 농도를 유지시켜 단백질 또는 DNA에 의해 세포사를 유도한다[5, 21]. 즉, 과도한 활성산소에 의해 높은 라디칼이 형성되고 이는 세포막, DNA, 그 외의 모든 세포 구조를 손상시키며 손상의 범위에 따라 세포가 기능을 잃거나 변질된다. 이와 같이 과산화수소가 세포 내에서

높은 수준의 농도를 유지할 수 있는 이유는 막 투과성을 이용한 확산 등으로 OH· 또는 자유라디칼을 세포 내로 유입시키기 때문으로 보고되고 있다[14].

세포 내 세포사의 관련된 신호전달 경로 단백질 중 하나인 열충격단백질(heat shock protein: HSP)은 샤페론과 같이 세포간에 다른 단백질의 제대로 된 구조형성을 도와주며, 기능적인 부류에 관련되는 단백질이다. 이 단백질은 열손상, 감염, 염증, 격렬한 운동을 포함한 다양한 스트레스와 세포의 독성, 기아, 저산소증, 알코올, 아미노산 유사체 등의 스트레스 유발 인자에 노출 시 발현된다[9]. 특히, HSP70의 발현은 tumor necrosis factor (TNF)-α로 유도된 세포독성물질과 화학적 손상물질의 공격으로부터 방어하기 위해 유도되며 산화스트레스, 세라마이드, 방사선과 같은 세포 내 세포사 자극신호들로부터 세포를 보호하는 역할을 한다[9, 10, 24].

한편, 심비디움은 난초과에 속하는 식물로 동남아시아, 중국, 일본, 오스트레일리아 북부 등에 분포한다. 다수의 연구결과에 따르면 심비디움의 뿌리에서 추출된 phenanthrene과 phenylpropanoid는 항균력 실험에서 고초균, 폐렴간균, 적색 백선균에 대해 항균기능을 가지고[22], carrageenin으로 유도된 쥐의 부종에 대한 항염증 실험에서 효과를 나타내었으며[7], 착향 및 화장품 성분으로 이용된다고 알려진 linalool과 4-methyl-phenol은 심비디움 뿌리에서 색층분석법을 통해 분석되었다[4]. 특히, 심비디움에서 추출된 유효성분인 aromatic glucosides는 과산화물제거 실험에서 항산화능 효과를 확인하였다[23]. 하지만, 근육세포에서의 심비디움 추출물에 대한 효과 및 기전은 현재까지 보고되지 않았다. 따라서,

*Corresponding author

Tel : +82-33-760-2242, Fax : +82-33-760-2183

E-mail : ktj@yonsei.ac.kr

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.

본 연구에서는 근육세포의 산화적 손상에 대한 심비디움 뿌리 추출물의 효과와 분자기전을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 세포배양 재료는 Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하였으며, HSP70 antibody는 Enzo Life Science (Switzerland)로부터 Beta-actin (β -actin)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였다. 비교군으로 사용되는 N-acetyl-L-cysteine (NAC)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, 세포 염색시 사용하는 4',6'-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI)는 Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)에서 구입하였다. 심비디움 뿌리추출물은 농촌진흥청에서 제공받아 고체추출물 100 mg을 물 1 ml에 녹인 sample을 희석하여 사용하였다.

자유라디칼 소거율 측정

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 용액은 항산화 기작 중 Pronton-radical scavenger에 의해 전자를 내어주면서 라디칼이 소거되며 가시적으로는 보라색으로부터 노란색으로 색의 변화가 관찰되는데 본 연구에서는 심비디움 뿌리추출물과 DPPH의 두 물질을 암상태에서 30분간 반응시켜 추출물의 각 농도에서 자유라디칼 소거율을 517 nm 파장영역에서 packard EL800 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)로 측정하였다[2].

세포배양

본 실험에 사용된 C2C12 근육세포는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin과 L-glutamine을 첨가한 dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지를 이용하여 37°C 습윤한 CO₂ 배양기(5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포는 실험을 위해 80% 채워서 사용하였고 계대 배양을 하기 전에 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)로 세척한 후에 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양을 하였다.

세포생존율 측정

24 well plate에 C2C12 근육세포를 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고, 24시간 37°C 습윤한 CO₂ 배양기(5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 이 후, 배지를 serum free DMEM으로 바꾸어주고 각각의 농도로 심비디움 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후에 각각 0, 1 mM의 H₂O₂가 포함된 serum free DMEM으로 배지를 교체하였다. Control 세포들은 DMEM에 H₂O₂를 넣지 않은 것으로 정하고 MTT assay를 이용하여 550 nm의 흡광도에서 packard EL800 microplate

reader로 측정하였다. 시험물질을 첨가하지 않은 대조군 세포수를 100%로 하여 각 시험물질의 상대적인 생존율을 구하였다.

세포사 확인

C2C12 근육세포는 2.5×10^5 cell/cm² 로 커버글라스 위에 23시간 배양한 후, 배지를 serum free DMEM으로 바꾸어주고 각각의 농도로 심비디움 추출물을 첨가하여 24시간 배양하였다. 이후 각각 0, 1 mM의 H₂O₂가 포함된 serum free DMEM으로 배지를 교체하였다. 1시간 후 C2C12 근육세포는 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 상온에서 PBS에 0.1% Triton X-100을 넣어준 것에 30분 동안 노출시켜서 DAPI 용액이 세포막에 잘 투과될 수 있도록 하였다. 죽은 세포는 형광 현미경으로 염색된 세포에서 형태적인 변화로 확인하였다. 각각 3번의 독립된 100개 세포를 세어 확인하였고, 핵의 형태가 깨어진 세포로 진행된 것을 눈으로 확인하여 세포사가 진행되었다고 예상되는 세포를 전체 세포수의 퍼센트로 표시하였다. 핵의 형태가 응축되거나 단편화 된 것은 세포사가 진행된 것으로 간주하여 측정된 세포는 전체 세포수의 퍼센트로 표시하였다.

단백질 분리 및 Western blot 분석

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출을 위해 H₂O₂와 각 농도별로 심비디움 추출물을 처리한 세포를 PBS로 1회 세척한 후, PRO-PREP 단백질 추출 키트 (iNtRON, Korea)를 사용하여 각 well에 처리하고 얼음 위에서 20분 반응시켰다. 13,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 시킨 후, 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 농도 비율을 균일하게 맞춰준 뒤 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리시킨 후, PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 전이시켰다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% skim milk와 0.1% Tween 20을 함유한 Tris-buffered saline)에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 각 검증 단백질에 대한 항체를 BSA/Tris-buffered saline에 희석하여 가한 후 4°C에서 overnight 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 Tris-buffered saline (TBS-T)로 membrane을 5분간 3회 세척하고, 이차 항체를 상온에서 1시간 반응시킨 후, 다시 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) detect kit (GE healthcare, Buckinghamshire, UK)를 처리하여 ImageQuant LAS4000 (GE healthcare, Buckinghamshire, UK)를 통해 단백질 발현을 확인하였다.

통계처리

본 실험적 결과는 mean \pm standard error로 표시하였고,

통계처리는 student's *t*-test에 의해 $p < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

심비디움 추출물의 자유라디칼 소거 효과와 H₂O₂로 유도된 C2C12 근육세포 손상에서 심비디움 추출물의 영향

산화스트레스에 의한 C2C12 근육세포 손상에서 심비디움 추출물의 예방효과를 확인하기 전에 심비디움 추출물의 양에 따른 항산화 효과를 확인하였다. 산화제인 DPPH로 산화를 개시시킨 후 0-200 µg/ml 심비디움 추출물에 의한 라디칼 소거 능력을 측정하였다. 심비디움 추출물을 농도별(0-200 µg/ml)로 처리한 결과, 자유라디칼이 농도 의존적으로 소거되었다. 특히, 200 µg/ml의 심비디움 추출물은 Control군에 비해 약 23%정도 감소한 것을 확인하였다(Fig. 1A).

또한, C2C12 근육세포에서 심비디움 추출물의 농도에 따른 세포 내 미치는 영향과 그 유효농도를 설정하기 위하여 세포독성을 확인하였다. 심비디움 추출물을 농도별(0-200 µg/ml)로 24시간 동안 처리한 결과 Fig. 1B와 같이 200 µg/ml의 농도범위 내에서 C2C12 근육세포에 대한 심비디움 추출물의 세포독성은 확인되지 않았다.

C2C12 근육세포를 H₂O₂에 노출시켜 산화스트레스에 대한 반응에서 심비디움 추출물의 예방효과를 측정하였다. Control군은 심비디움 추출물을 처리하지 않았고, 1 mM의 H₂O₂ 처

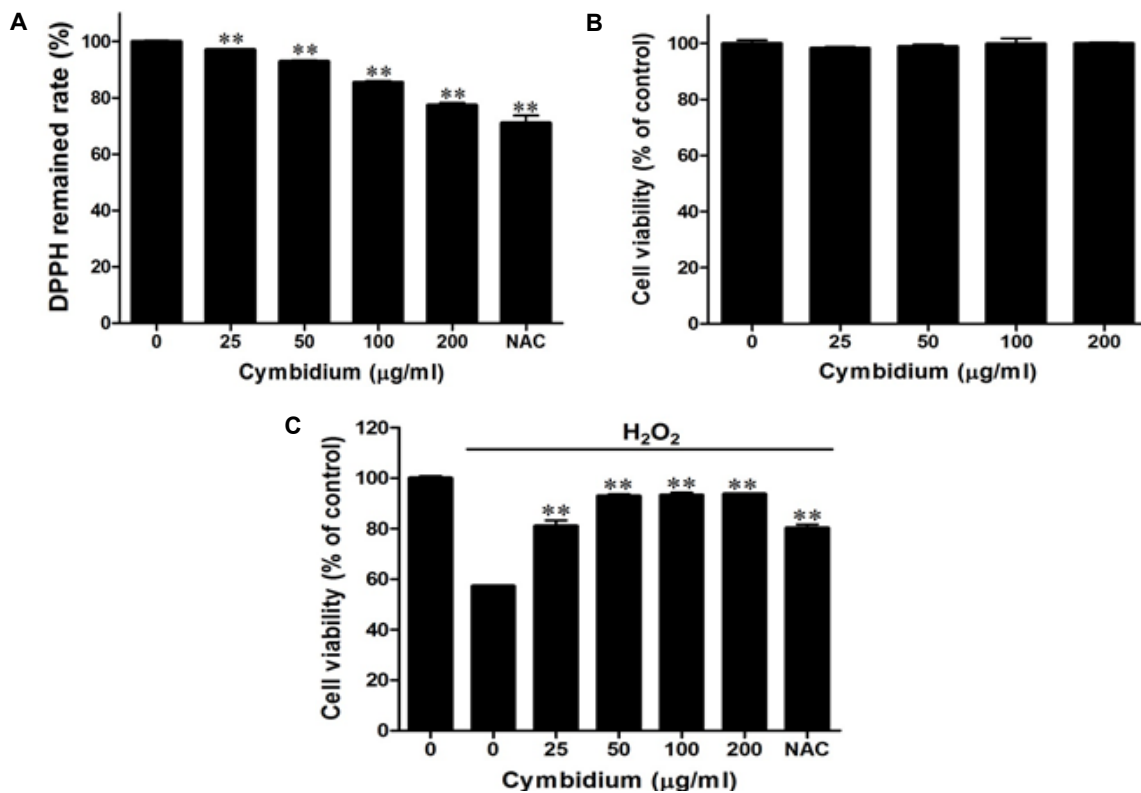


Fig. 1. Effect of cymbidium extract on H₂O₂-induced oxidative stress in C2C12 myoblasts (A) Scavenging of cymbidium extract by DPPH assay. Extract was treated in 96 well plate with ethanol and DPPH solution. Then sample was incubated for 30 min without light. Optical density was determined at 517 nm. DPPH remained rate was calculated by the following equation. DPPH remained rate (%) = [(absorbance of sample / absorbance of control) × 100]. (B) Cytotoxicity of cymbidium extract. C2C12 myoblasts were cultured in 96-well plates until confluent, and the medium was replaced with serum-free medium with or without cymbidium extract (0-200 µg/ml) for 24 hr. The EZ-Cytox reagent was added to the medium, and C2C12 myoblasts were incubated for 1 hr. Optical density was determined at 450 nm using a microplate reader. (C) Effect of cymbidium extract on H₂O₂-induced oxidative stress in C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were cultured in 96-well plates until confluent and the medium was then replaced with a serum-free medium with cymbidium extract (0-200 µg/ml). After pre-incubating for 23 hr, 1 mM H₂O₂ was added for 1 hr. The EZ-Cytox reagent was added to the medium, and C2C12 myoblasts were incubated for an additional 1 hr. The optical density was set at 450 nm by using a microplate reader. The cell viability was calculated using the following equation: Cell viability (%) = [(absorbance of the H₂O₂-treated sample/absorbance of the H₂O₂-untreated control) × 100]. Each value represents the mean (± SD) from three experiments in which each experiment was performed in triplicate. NAC: N-acetyl cysteine. ** $p < 0.01$ versus H₂O₂ alone.

리에 따라 세포생존율을 약 43% 감소시켰다. 이와 대조적으로 심비디움 추출물의 전처리인 H₂O₂ 처리에 의한 C2C12 근육세포 생존의 손실을 농도 의존적으로 감소시켰다. 특히, 심비디움 추출물의 농도 200 µg/ml에서는 세포손상을 93%까지 보호하였다(Fig. 1C). 이 결과들은 산화 스트레스에 의해 유도된 근육세포의 손상을 심비디움 추출물이 보호하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 근위축은 근육세포의 전자전달과 일반적인 산소접합에 민감한 산화적 손상을 유발하는데 산화적 스트레스는 격렬한 운동으로도 증가될 수도 있다[3, 11, 15]. 근위축을 포함한 근육질환의 환원상태는 다른 기관의 환원상태보다 더 산화적이며, 세포수준의 항산화 방어기전의 활성 및 본 실험에서의 심비디움 추출물은 기본적으로 근육의 산화적 손상과 관계된 질병 조건의 조절과정 효율성을 높일 것으로 사료된다.

H₂O₂로 유도된 C2C12 근육세포에서 심비디움 추출물이 세포사에 미치는 영향

H₂O₂로 유도되는 세포사에서 심비디움 추출물의 효과를 확인하고자 DAPI 고정염색을 통해 염색질 응축 및 단편화

형태 변화를 통해 확인하였다. H₂O₂를 처리한 표본에서는 처리하지 않은 Control에 비해 염색질 응축 및 단편화 형태의 세포수가 높게 관찰되었고, 심비디움 추출물의 0-200 µg/ml 농도별로 측정된 염색질 응축 및 단편화 형태의 세포수는 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2). H₂O₂로 유도된 근육세포의 경우 세포 내 높은 라디칼 농도를 유지하여 단백질 또는 DNA에 손상을 주게 되며 이는 세포 외막, 세포 내 구조 단백질, 핵안 DNA 등에서 산화를 시켜 구조적 변화로 인한 손상을 유발함으로써 세포사를 유도한다[16]. 본 연구에서는 심비디움 추출물을 이용하여 근육세포의 산화적 스트레스로 유도된 세포사 및 증가된 라디칼을 잠정적으로 소거함으로써 산화적 손상인 세포사 및 세포의 구조적 변화에 대항할 것이라 사료된다.

H₂O₂로 유도된 C2C12 근육세포에서 HSP70, SOD1 발현에 대한 심비디움 추출물의 영향

근육 손상에서 HSPs의 종류 중 하나인 HSP70은 근육을 보호할 수 있는 활성을 나타낸다는 이미 알려진 사실을 토대로 심비디움 추출물이 근육세포의 산화적 스트레스에 대한

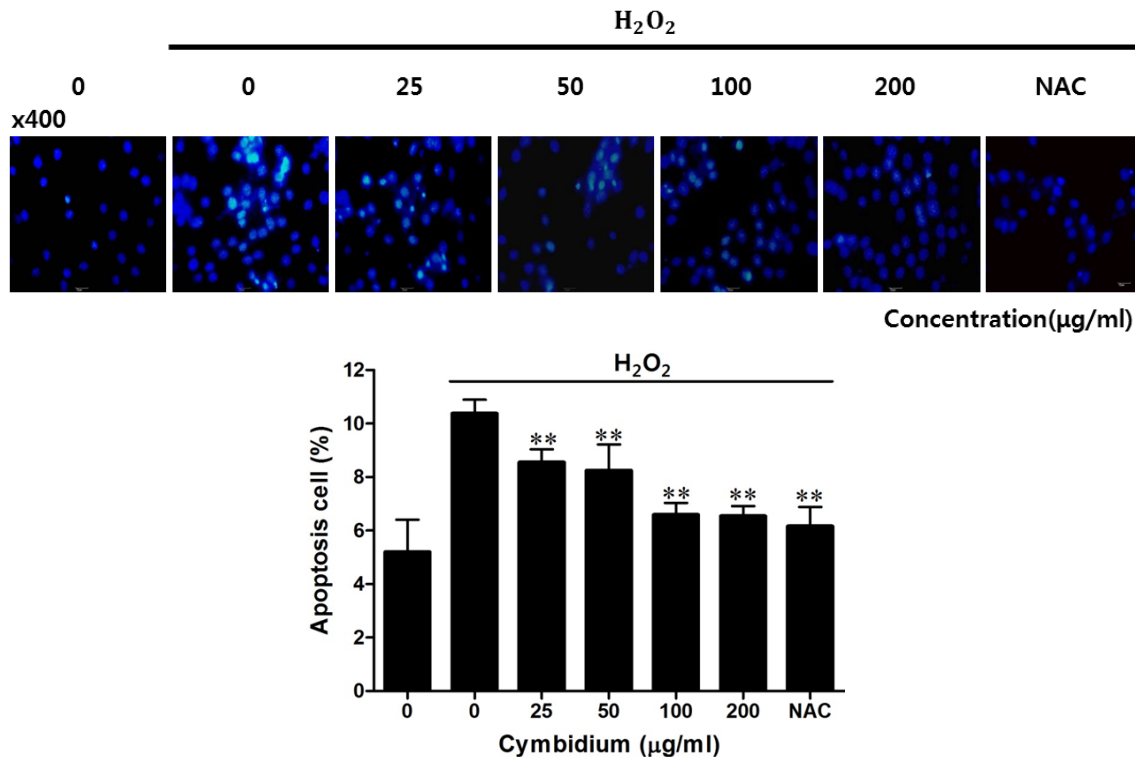


Fig. 2. Effect of cymbidium extract on cell death by H₂O₂-induced oxidative stress in C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were cultured on a cover glass until confluent, and then the medium was replaced with a serum-free medium with NAC (2 mM) and cymbidium extract (0-200 µg/ml). After pre-incubating for 23 hr, C2C12 myoblasts were treated with 1 mM H₂O₂ for 1 hr. C2C12 myoblasts on a cover glass were mounted with DAPI-mounting media, and then examined by fluorescence microscopy. The apoptotic cells were estimated by direct counting after staining. Each value represents the mean (± SD) from three experiments, each performed in triplicate. NAC: N-acetyl cysteine, DAPI: 4, 6-diamino-2-phenylindole. ***p*<0.01 versus H₂O₂ alone.

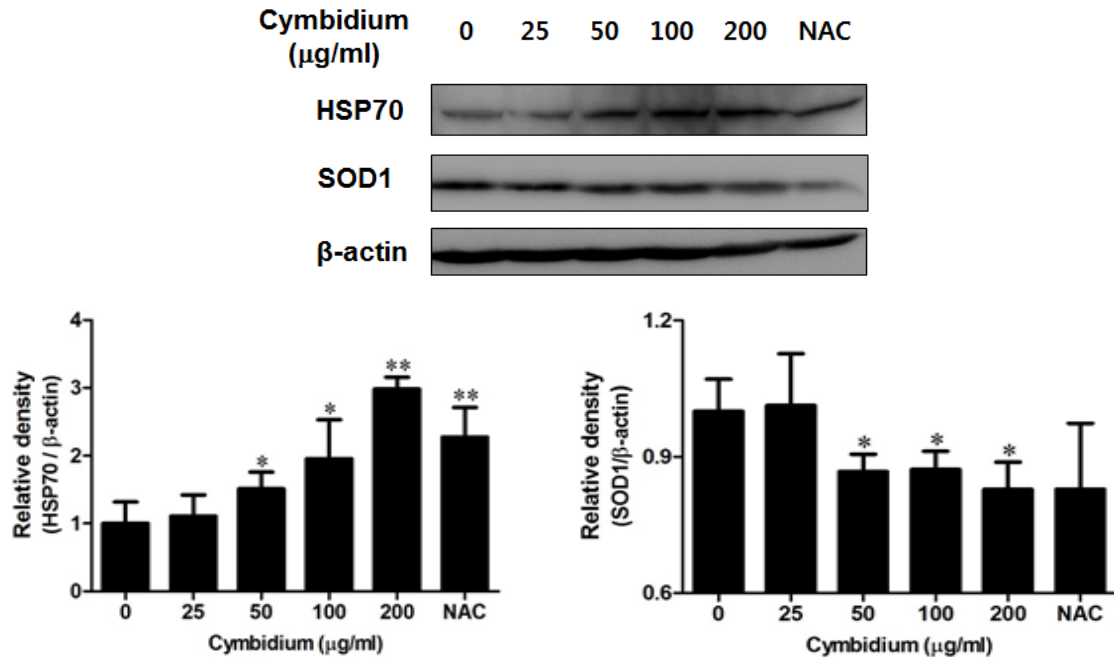


Fig. 3. Effect of cymbidium extract on HSP70 and SOD1 protein expression by H₂O₂-induced oxidative stress in C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were cultured in 6 well plates until confluent, and then the medium was replaced with a serum-free medium with cymbidium extract (0-200 µg/ml). After pre-incubating for 23 hr, C2C12 myoblasts were treated with 1 mM H₂O₂ for 1 hr and then C2C12 myoblasts were lysed using PRO-PREP. Whole lysates were analyzed using SDS-PAGE. Each protein was analyzed by Western blotting using specific antibodies. Expression of HSP70, SOD1 and β-actin are shown. Western blots were analyzed by densitometry and the values are given as the density of control. The results are an average of 3 similar experiments, expressed by mean ± SD. The inserts display representative blots of 3 similar independent experiments, respectively. **p*<0.05, ***p*<0.01 versus H₂O₂ alone.

반응에서 HSP70 신호의 세포보호 효과를 확인하였다[17]. H₂O₂를 처리한 근육세포가 단백질 수준인 HSP70의 발현에서 심비디움 추출물의 효과를 보면, C2C12 근육세포에 추출물의 농도 0-200 µg/ml로 24시간 동안 처리하여 배양하고, 그 후, 1시간 동안 1 mM의 H₂O₂로 처리하였다. 그 결과, HSP70 단백질은 심비디움 추출물을 처리한 세포에서 농도 의존적으로 증가하고 대조군인 NAC보다 더 증가함을 볼 수 있었다. 즉, HSP70의 발현을 통하여 근육세포의 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한, SOD1은 세포질에 존재하는 단백질로 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 변환시켜 줌으로써 활성산소로부터 세포를 보호하는 역할을 하는데, 이는 활성산소 존재 시 발현이 증가한다고 알려져 있다[18]. 동일한 조건에서 Western blot을 통해 확인한 결과, 심비디움 추출물을 처리한 세포에서 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 산화적 스트레스인 활성산소의 자유라디칼을 심비디움 추출물이 감소시켜 활성산소에 대해 나타나는 SOD1의 발현을 억제한 것으로 사료된다. 현재 산화적 근육 손상 연구와 관련된 다양한 신호전달체계 연구에서 단백질 및 메커니즘, 대사적 작용 등이 보고되고 있다[8, 9, 12, 13]. 본 연구는 HSP70, SOD1 두가지 단백질에 대한 항산화적 방어기능에 연관되어 집중했지

만, 자유라디칼을 만드는 세포의 기질들을 포함하는 다른 신호체계에 관계된 것을 토대로 연구의 범위를 확대할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 해외우수연구기관유치사업 연구(2010-00757)와 MOU근거 한일협력사업 연구(NRF-2012K2A2A4016850)임.

Reference

- Booth, F. W. 1982. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **52**, 1113-1118.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *J Food Sci Technol* **28**, 25-30.
- Chan, K. M. and Decker, E. A. 1994. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* **34**, 403-426.
- Gaytan, V. G., Mendoza, M. N. R., Hernandez, M. S., Trejo-Tellez, L. I., Santos, M. P. and Ponce, G. V. 2013.

- Volatile Components in the Flower, Pedicellate Ovary and Aqueous Residue of *Cymbidium* sp. (ORCHIDACEAE). *J Anal Sci Meth Instrum* **3**, 212-218.
5. Giorgio, M., Trinei, M., Milgliccio, E. and Pelicci, P. G. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 722-728.
 6. Halter, B., Gonzales de Aquilar, J. L., Rene, F., Petri, S., Fricker, B., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Larmet, Y. and Loeffler, J. P. 2010. Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* **48**, 915-923.
 7. Howlader, M. A., Alam, M., Ahmed, Kh. T., Khatun, F. and Apu, A. S. 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the ethanolic extract of *Cymbidium aloifolium* (L.). *Pak J Biol Sci* **19**, 909-911.
 8. Kolesnick, R. N., Haimovitz-Friedman, A. and Fuks, Z. 1994. The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation. *Biochem Cell Biol* **72**, 471-474.
 9. Li, C. Y., Lee, J. S., Ko, Y. G., Kim, J. I. and Seo, J. S. 2000. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* **275**, 25665-25671.
 10. Mitsuhashi, M., Yamaguchi, M., Kojima, T., Nakajima, R. and Kasai, K. 2011. Effects of HSP70 on the compression force-induced TNF- α and RANKL expression in human periodontal ligament cells. *Inflamm Res* **60**, 187-194.
 11. Nishida, H., Ichikawa, H. and Konishi, T. 2007. Shengmaisan enhances antioxidant potential in C2C12 myoblasts through the induction of intracellular glutathione peroxidase. *J Pharmacol Sci* **105**, 342-352.
 12. Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A. and Hannun, Y. A. 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-1771.
 13. Powers, S. K., Kavazis, A. N. and McClung, J. M. 2007. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol* **102**, 2389-2397.
 14. Stone, J. R. and Yang, S. 2006. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* **8**, 243-270.
 15. Strobel, N. A., Peake, J. M., Matsumoto, A., Marsh, S. A., Coombes, J. S. and Wadley, G. D. 2011. Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sports Exerc* **43**, 1017-1024.
 16. Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I. and Milner, J. A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* **18**, 567-579.
 17. Senf, S. M., Dodd, S. L., McClung, J. M. and Judge, A. R. 2008. Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB J* **22**, 3836-3845.
 18. Smietana, M. J., Arruda, E. M., Faulkner, J. A., Brooks, S. V. and Larkin, L. M. 2010. Reactive oxygen species on bone mineral density and mechanics in Cu,Zn superoxide dismutase (Sod1) knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* **403**, 149-153.
 19. Thomason, D. B., Biggs, R. B. and Booth, F. W. 1989. Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am J Physiol* **257**, R300-305.
 20. Walker, P. M. 1991. Ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Ann Vasc Surg* **5**, 399-402.
 21. Yen, Y. P., Tsai, K. S., Chen, Y. W., Huang, C. F., Yang, R. S. and Liu, S. H. 2012. Arsenic induces apoptosis in myoblasts through a reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction pathway. *Arch Toxicol* **86**, 923-933.
 22. Yoshikawa, K., Baba, C., Iseki, K., Ito, T., Asakawa, Y., Kawano, S. and Hashimoto, T. 2014. Phenanthrene and phenylpropanoid constituents from the roots of *Cymbidium* Great Flower 'Marylaurencin' and their antimicrobial activity. *J Nat Med* **68**, 743-747.
 23. Yoshikawa, L., Otsu, M., Ito, T., Asakawa, Y., Kawano, S. and Hashimoto, T. 2013. Aromatic constituents of *Cymbidium* Great Flower Marie Laurencin and their antioxidative activity. *J Nat Med* **67**, 217-221.
 24. Zylicz, M. and Wawrzynow, A. 2001. Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life* **51**, 283-287.

초록 : 산화스트레스에 의해 유도된 근세포 손상에서 심비디움 뿌리추출물의 효과

김원중¹ · 김한성² · 오피츠 요크³ · 가바야마 카즈야⁴ · 김택중^{1*}

(¹연세대학교 과학기술대학 생명과학기술학부, ²연세대학교 보건과학대학 의공학부, ³독일 프라운호퍼연구소, ⁴일본 오사카대학교 과학대학원 화학과)

근위축은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실 또는 근육을 지배하는 신경의 손상으로 정의할 수 있다. 이 상태는 다양한 근육질환에 관여하는 활성산소종이 관여 한다. 우리는 심비디움 뿌리 추출물이 과산화수소에 의해 유도된 C2C12 근육세포 생존을 손실과 세포사를 억제한다는 것을 찾았다. 또한 심비디움 뿌리 추출물이 HSP70 단백질 발현증가와 SOD1 단백질 발현감소를 확인하였다. 이들의 결과는 심비디움 뿌리 추출물이 근위축에서 활성산소종을 환원하는 치료약물로서 작용이 가능할 것으로 사료된다.