

A Study on the Effects of Sirtuin 1 on Dendritic Outgrowth and Spine Formation and Mechanism in Neuronal Cells

Mi Kyoung Seo¹, Hye Kyeong Kim¹, Song Young Baek¹, Jung Goo Lee^{1,2}, Sang-Hwa Urm³,
Sung Woo Park^{1,4*} and Dae-Hyun Seog^{5,6*}

¹Paik Institute for Clinical Research, Inje University, Busan 47392, Korea

²Department of Psychiatry, College of Medicine, Haeundae Paik Hospital, Inje University, Busan 48108, Korea

³Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Inje University, Busan 47392, Korea

⁴Department of Convergence Biomedical Science, College of Medicine, Inje University, Busan 47392, Korea

⁵Department of Biochemistry, College of Medicine, Inje University, Busan 47392, Korea

⁶Dementia and Neurodegenerative Disease Research Center, College of Medicine, Inje University, Busan 47392, Korea

Receivedv January 11, 2021 /Revised January 15, 2021 /Accepted January 18, 2021

Increasing evidence suggests that depression is associated with impairments in neural plasticity. Sirtuin 1 plays an important role in neural plasticity, and the activation of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling is known to improve neural plasticity. In this study, we aimed to determine whether sirtuin 1 affects dendrite outgrowth and spine formation through mTORC1 signaling. Resveratrol (sirtuin 1 activator; 1 and 10 μ M) and sirtinol (sirtuin 1 inhibitor; 1 and 10 μ M) were treated in primary cortical culture with and without dexamethasone (500 μ M). Levels of sirtuin 1, phospho-extracellular signal regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2), phospho-mTORC1, and phospho-p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) were evaluated using Western blot analysis. Dendritic outgrowth and spine density were assessed using immunostaining. Resveratrol significantly increased levels of sirtuin 1 expression and phosphorylation of ERK1/2 (a downstream target of sirtuin 1), mTORC1, and p70S6K (a downstream target of mTORC1) in a concentration-dependent manner under dexamethasone conditions. Resveratrol also significantly increased dendritic outgrowth and spine density. Conversely, sirtinol significantly decreased levels of sirtuin 1 expression and phosphorylation of ERK1/2, mTORC1, and p70S6K in a concentration-dependent manner under normal conditions. Moreover, sirtinol significantly decreased dendritic outgrowth and spine density. Consistent with the results of sirtinol, sirtuin 1 knockdown using sirtuin 1 siRNA transfection significantly decreased dendritic outgrowth and spine density as well as phosphorylation levels of ERK1/2 and mTORC1. These data suggest that sirtuin 1 enhances dendritic outgrowth and spine density by activating mTORC1 signaling.

Key words : Depression, mTORC1 signaling, neural plasticity, sirtuin 1

서 론

우울증은 현대 사회에 만연해 있으며, 그 증상이 우울한 기분, 의욕 저하, 흥미 저하, 절망감, 자살충동까지 포함하는 심각한 질병이다. 1950년대 이후 항우울제는 지속적으로 처방됐지만, 현재까지 개발된 항우울제는 대부분 세로토닌과 노르에피네프린 같은 신경전달물질을 높이는 방식이다. 이러한 약물

들이 효과는 있지만, 상당수의 환자가 기존의 항우울제에 저항을 가지고 있으며, 또한 약효가 나타날 때까지 수주에서 수개월이 걸린다는 한계가 있다[2]. 현재까지 우울증 발병에 관한 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만, 신경가소성의 손상이 주요 기전이라는 여러 가지 증거들이 제시되고 있다[5, 18, 20].

Sirtuin 1은 히스톤 탈아세틸화 효소(histone deacetylase)이다. 따라서, 세포 분화(cell differentiation), 세포자살(apoptosis), 자가포식작용(autophagy), 대사(metabolism) 및 생체 리듬(circadian rhythm)과 같은 다양한 세포 기능에 관여하는 전사 인자, 히스톤 단백질 및 효소들을 탈아세틸화 시키는 작용을 하고 있다[22]. 특히, 뇌에서 sirtuin 1은 학습과 기억 그리고 신경가소성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[9, 21]. 또한 Sirtuin 1은 해마에 발생한 허혈성 손상을 예방하는 보호 작용을 한다[28]. 생쥐 동물모델을 이용한 연구에 의하면, sirtuin 1은 알츠하이머 치매와 헌팅틴병과 같은 퇴행성 뇌질환에 신경 보호 작용이 있음이 확인되었다[24, 27].

*Corresponding authors

Tel : +82-51-890-6071, Fax : +82-51-894-6709

E-mail : swpark@inje.ac.kr (Sung Woo Park)

Tel : +82-51-890-6974, Fax : +82-51-894-5801

E-mail : daehyun@inje.ac.kr (Dae-Hyun Seog)

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.

최근 연구들은 우울증의 병리와 치료에 sirtuin 1이 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 11,670명의 우울증 환자를 대상으로 한 전장 유전체 연관분석 결과, 우울증의 위험요소를 증가시키는 영역에 sirtuin 1 유전자가 위치함이 확인되었다[3]. 우울증 환자의 혈액에서 sirtuin 1의 발현이 감소하였으며[17], sirtuin 1 유전자 다형성이 우울증 및 자살행동과도 연관되어 있다고 설명하였다[23]. 동물실험 연구에 의하면, 스트레스는 해마에서 sirtuin 1의 활성을 감소시켰으며, 우울 유사 행동을 보여주었다. 또한 sirtuin 1을 유전적으로 knockout 하였을 경우, 우울 행동을 관찰할 수 있었다[1]. 반면, sirtuin 1의 활성은 하위 조절 단백질인 extracellular signal regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2)의 활성화를 통해 우울행동 및 신경세포의 위축을 예방하였다[1]. 이러한 작용에 sirtuin 1의 활성 증가로 인한 신경가소성 증가가 관여한다고 추정하고 있다[1]. 그러나 다른 동물연구에서는 sirtuin 1의 항우울효과에 대한 상반되는 연구 결과들을 보여주기도 하였다. 뇌에 특이적인 sirtuin 1 knockout 생쥐의 경우 불안울 줄이고 스트레스에 회복력이 있는 형질을 보였다면, sirtuin 1 과발현 생쥐의 경우 불안이 늘어나고 스트레스에 취약하였다[14]. 이러한 연구 결과들을 종합하면, 신경세포에서 sirtuin 1이 신경가소성에 미치는 영향에 대한 체계적인 기전 연구가 필요하다.

임상 연구에서 마취를 유발하지 않는 농도의 케타민을 우울증 환자들에게 투여한 결과, 투여 후 몇 시간 만에 급속하게 우울 증상들이 감소하는 것을 관찰하였는데, 이러한 항우울효과는 적어도 1주일 동안 지속되었다[31]. 동물실험에서는 이러한 급속한 항우울효과에 mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1)의 활성화로 인한 신경가소성 증가가 관여한다[13]. 쥐 전전두엽(prefrontal cortex)에서 케타민은 투여 후 30분부터 2시간까지 단백질 합성을 조절하는 mTORC1을 비롯한 mTORC1 신호전달계의 하위 단백질들인 eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP-1)과 p70S6Kinase (p70S6K)를 인산화시켰다[13]. 이렇게 활성화된 mTORC1 신호전달계는 새로운 시냅스 형성 및 성숙에 필요한 synapsin 1, postsynaptic density protein-95 (PSD-95), glutamate receptor 1 (GluA1) 등 같은 시냅스 단백질들의 발현을 촉진하는 것으로 확인되었다[6]. 즉 케타민으로 인한 mTORC1 활성화는 신경가소성을 증가시킴으로써 항우울효과를 나타낸다는 것이다[6].

우리는 sirtuin 1이 ERK1/2를 활성화시켜 mTORC1 신호전달계를 통하여 신경가소성에 영향을 줄 수 있다고 가정하였다. 이러한 기전을 조사하기 위하여, 1차 신경세포 배양에서 sirtuin 1의 활성제인 resveratrol과 sirtuin 1의 억제제인 sirtinol을 처리하여 이들 약물이 mTORC1 신호전달을 어떻게 조절하는지 조사하였으며, 이들 약물이 수상돌기 성장(dendritic outgrowth)과 가지형성(spine formation)에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다. 또한 신경세포에서 sirtuin 1 발현을

knockdown 시켰을 경우 mTORC1 활성 및 수상돌기 성장, 가지형성이 어떻게 변화되는지도 확인하였다.

재료 및 방법

신경세포 배양

본 동물실험을 수행하기 위해 인제대학교 의과대학 동물실험 윤리 위원회(IACUC)의 심의 및 승인(승인번호 2018-016)을 받았다. 1차 순수 신경세포 배양을 위해 임신 19일 된 Sprague-Dawley (SD rat) 흰쥐(Hana Biotech, Korea)의 태아를 이용하였으며, Kaech와 Banker [11]의 방법에 따라 유사한 방식으로 시행하였다. 해부현미경하에서 쥐 태아로부터 뇌를 적출한 후, 뇌막을 제거하고 대뇌피질을 해부하여 Neurobasal™ (NB) 배양액(Gibco BRL, USA)에 0.03% Trypsin-EDTA (0.05%, phenol red, Gibco BRL)을 함께 처리하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 10% B27™ supplement (B27, serum free, Gibco BRL), 1% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 1% horse serum (HS, Gibco BRL), 0.25% L-glutamine (Gibco BRL) 및 1% Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep, Gibco BRL)을 함유한 growth 배양액을 준비하여 세포 현탁액을 배양 plate에 분주하였다. 배양 plate는 plating 전에 미리 100 ng/ml의 poly-D-lysine (PDL, Sigma, USA)을 이용하여 coating하였다. 세포는 37°C와 5% CO₂를 유지하는 incubator에서 배양하였으며, 7~10일간 배양하여 안정화한 후 약물들을 처리하여 실험에 사용하였다. 2~3일 한 번씩 새로운 배양액을 교체하였다.

약물 처리

세포독성 모델을 유도하는 텍사메타손(Sigma), sirtuin 1 활성제인 resveratrol (Sigma)과 sirtuin 1/2 억제제인 sirtinol (Tocris Bioscience, UK)을 4일(세포독성 측정 및 단백질 발현 분석) 또는 5일(수상돌기 성장 및 가지형성 분석) 처리하였으며, 약물들은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Amresco, USA)에 녹여 100 mM의 stock으로 만들어 0.45 µm pore size의 syringe filter를 이용하여 filtration한 후 최종농도에 맞게 사용하였다. 본 연구에 사용된 resveratrol과 sirtinol의 농도는 다양한 세포 배양에서 신경 보호 및 신경 가소성에 영향을 미치는 여러 연구를 기반으로 1-500 µM으로 선정하여 적용하였다[1, 7, 8]. 세포배양에 사용된 DMSO의 최종농도는 0.5% 이하가 되도록 하였다.

Resveratrol의 효과를 확인하기 위하여 텍사메타손에 의한 세포독성 모델을 적용하였으며, 세포독성을 유도하는 텍사메타손은 세포 생존율이 75-80%되는 500 µM을 선택하여 사용하였다[26]. Resveratrol의 mTORC1 신호전달 및 수상돌기 성장과 가지형성에 미치는 영향을 확인하기 위해 정상 배양액 및 텍사메타손 배양액에 resveratrol을 동시에 처리하였다. 반면에, sirtinol의 동일한 효과를 확인하기 위해서는 정상배양액에

sirtinol을 동시 처리하여 실험에 사용하였다. 약물 처리 후 2~3일 한 번씩 새로운 배양액과 약물을 교체하였다.

세포독성 측정

Resveratrol, sirtinol의 세포독성을 조사하기 위하여 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide (MTT, Amresco) assay를 실시하였다. 이를 위하여 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 density로 세포를 seeding 하였다. 0.5 mg/ml MTT 용액을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, MTT가 포함된 배지를 제거하고 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan을 모두 녹이고 96-well plate를 SpectraMax M2e microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용해 570 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

Small interference RNA (siRNA)를 이용한 sirtuin 1의 knockdown

형광이 추가되어 화학적으로 합성된 이중가닥(double-stranded) AccuTarget™ Fluorescein-labeled siRNA는 Bioneer (Korea)에 의해 제작되었으며, siRNA를 이용한 sirtuin 1 knockdown은 배양된 세포의 confluency가 60-80%가 되었을 때, Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen, USA)를 사용하여 manufacturer's protocol에 따라 transfection하였다. Lipofectamine™ RNAiMAX와 Opti-MEM (Gibco BRL) (RNAiMAX mixture)을 실온에서 5분간 반응을 시키고, control (SN-1022)과 sirtuin 1 (93759-3) siRNA 100 nM/well과 opti-MEM (siRNA mixture)을 준비하였다. 5분 후 siRNA mixture와 RNAiMAX mixture를 같이 섞어(reagent mixture) 10-20분간 실온에 다시 반응하였다. Reagent mixture를 well에 분주하고 6시간 후에 growth 배양액으로 교체한 후 2일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

단백질 발현 분석

PDL로 coating된 6-well plate에 2×10^5 cells/well의 density로 세포를 seeding 하였다. 배양된 세포는 RIPA cell lysis buffer (GenDEPOT, USA)에 protease inhibitor cocktail solution (GenDEPOT)과 phosphatase inhibitor cocktail solution (GenDEPOT)을 이용하여 단백질을 추출하였으며, Bradford protein assay plus kit (GenDEPOT)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 세포에서 분리된 단백질 30 µg을 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 전기영동 하였다. SDS-PAGE에서 분리한 단백질은 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Germany)에 transfer하였다. Gel transfer된 membrane을 5% skim milk blocking solution [0.15% Tween-20, tris-buffered saline (TBS-T, GenDEPOT)]에 1시간 동안 blocking한 후 적정 1차 항체로는 anti-sirtuin1 (07-131) (Millipore, USA), anti-

phospho-Ser²⁴⁴⁸-mTORC1 (#2971), anti-total-mTORC1 (#2972), anti-phospho-Thr³⁸⁹-p70S6K (#9205), and anti-total-p70S6K (#9202), anti-phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-p44/42 MAPK (ERK1/2, #9101), anti-total-p44/42 MAPK (#4695) (Cell signaling, USA) [1:1,000]; anti- α -tubulin (T9026, Sigma) [1:2,000]를 처리하여 4°C에서 over night 시켰다. 그 후 Horseradish Peroxidase (HRP)와 결합된 2차 항체 mouse-anti-rabbit IgG (sc-2357) [1:2,000] anti-mouse IgG (A4416) [1:10,000]를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백질 밴드는 Clarity Western enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Bio-rad)을 1분간 반응시켜 Amersham™ Imager 600 (AI600) (GE healthcare, USA)로 관찰하였다. 단백질 발현 변화에 대한 정량화는 Multi-Gauge Software (Fuji photo film Co, Ltd., Japan)를 이용하여 분석하였으며, 3번의 독립적인 실험이 수행되었다. 단백질의 양을 표준화하기 위해, sirtuin 1은 α -tubulin, phospho형은 total형으로 총 단백질 양에 대한 대조군으로 사용하였다.

수상돌기 성장 분석

수상돌기 성장 면역 염색(immunostaining)을 위해 PDL로 coating된 12-well plate의 18 mm의 cover glass에 2×10^4 cells/well의 density로 세포를 seeding 하였다. 배양된 세포를 4% paraformaldehyde (Biosesang, Korea)를 사용하여 실온에서 20분 동안 고정한 후, 0.1% tritonX-100이 함유된 phosphate-buffered saline (PBS, GenDEPOT)을 사용하여 3분 동안 permeabilization시켰다. 4% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 PBS를 사용하여 2시간 동안 blocking하였다. 1차 항체로 anti-Microtubule-associated protein 2 (MAP2) 항체 (1:1,000, MAB341, Millipore)를 처리하여 2시간 동안 반응시킨 후, Alexa 568이 결합된 anti-mouse IgG 2차 항체(1:1,000, A-11031, Invitrogen, USA)를 1시간 처리하였으며, 핵 염색으로는 Hoechst33258 (1:10,000, H21491, Invitrogen)를 5분 반응한 뒤, 세포를 mounting solution (Biomeda, USA)으로 mounting하였다. 염색된 세포는 fluorescence in situ hybridization (FISH) 형광현미경(fluorescence microscope) (BX51, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고 이미지화하였다. Metamorph Image Program (Molecular Devices, USA)으로 정량 분석하였으며[12, 26], 재연성을 확인하기 위해 2번의 독립적인 실험을 수행하였다.

가시형성 분석

가시형성 면역 염색(immunostaining)을 위해 PDL로 coating된 12-well plate의 18 mm의 cover glass에 5×10^3 cells/well의 density로 세포를 seeding하였다. 배양된 세포의 fix, permeabilization, blocking은 수상돌기 성장 분석과 동일하게 적용한 후, anti-Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (1:40, A12379, Invitrogen) 또는 anti-Alexa Fluor™ 594 phalloidin (1:40,

A12381, Invitrogen)를 4시간 반응시켰다. 항체 반응이 끝난 후 mounting하였다. 염색한 세포는 공초점 현미경(confocal laser microscope) (A1⁺, Nikon, Japan)으로 관찰하여 이미지화하였다. 신경세포의 가지밀도를 분석하기 위해 3 μm 미만인 것을 count하였으며[26], 2번의 독립적인 실험을 수행하였다.

통계처리

각 실험결과값으로부터 계산한 평균값±S.E.M.으로 나타냈다. 통계분석은 Prism 9 (Graph Pad Software, USA)를 이용하였고 그룹 간 비교는 Student's t-test 또는 One-way analysis of variance (One-way ANOVA)의 Tukey's multiple-comparisons test를 이용하여 분석하였다. 통계학적인 유의성 분석은 p-value가 0.05 이하인 경우를 유의미하다고 판정하였다.

결 과

텍사메타손을 처치한 세포배양에서 sirtuin 1 활성제인 resveratrol이 mTORC1 신호전달 및 신경세포의 수상돌기 성장과 가지형성에 미치는 영향

세포독성 효과 분석

신경세포에 독성을 주지 않는 resveratrol의 농도를 설정하기 위하여, MTT 분석법으로 세포 생존율을 조사하였다(Fig. 1). 정상 배양액과 텍사메타손 배양액에 resveratrol을 각각 1-500 μM까지 처리하였다. Resveratrol 500 μM은 세포 생존율을 정상 배양액에서 37% (p<0.001), 텍사메타손 배양액에서 27% (p<0.001) 감소시켰으나, 그 이하의 농도들은 세포 생존율에는 영향이 없었다.

Sirtuin 1 발현 및 ERK1/2 인산화 분석

세포독성이 관찰되지 않는 1-50 μM의 resveratrol이 sirtuin 1 발현에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 2A). 정상 배양액에

텍사메타손 500 μM을 처치하였을 때, sirtuin 1 발현이 37% (p<0.001) 감소하였다. 반면, 텍사메타손 배양액에서 resveratrol은 1-10 μM까지 sirtuin 1 발현을 유의하게 증가시켰다(0 μM=63%; 1 μM=88%, p=0.022; 10 μM=96%, p=0.002). 연구 결과를 바탕으로 향후 실험에는 resveratrol 1 μM과 10 μM을 사용하였다. Resveratrol이 sirtuin 1의 하위 조절 단백질인 ERK1/2의 활성화에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 2B). 정상대조군과 비교하였을 때, 텍사메타손은 ERK1/2 인산화를 52% (p<0.001) 감소시켰으나, resveratrol 1 μM과 10 μM에서 ERK1/2 인산화는 농도 의존적으로 증가하였다(0 μM=48%; 1 μM=63%; 10 μM=80%, p=0.027).

mTORC1 및 p70S6K 인산화 분석

Resveratrol이 mTORC1 신호전달 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, mTORC1 (Fig. 3A) 및 하위 조절 단백질인 p70S6K (Fig. 3B)의 인산화를 분석하였다. 정상 대조군과 비교하였을 때, 텍사메타손은 mTORC1 인산화 및 p70S6K 인산화를 각각 34% (p=0.040)와 58% (p=0.003) 감소시켰으나, resveratrol 1 μM과 10 μM은 mTORC1 및 p70S6K 인산화를 유의하게 증가시켰다(mTORC1: 0 μM=66%; 1 μM=86%; 10 μM=103%, p=0.033; p70S6K: 0 μM=42%; 1 μM=84%, p=0.038; 10 μM=92%, p=0.010).

수상돌기의 성장 및 가지밀도 분석

Resveratrol이 신경세포의 수상돌기 성장(Fig. 4A)과 가지형성(Fig. 4B)에 미치는 영향을 알아보았다. 정상 대조군과 비교하였을 때, 텍사메타손에 의한 수상돌기와 가지형성은 각각 유의하게 감소하였다(수상돌기: 270 μm vs. 177 μm, p<0.001; 가지밀도: 8.2 vs. 6.6, p<0.001). 반면, resveratrol 1 μM과 10 μM에서 이러한 감소는 유의하게 증가하였다(수상돌기: 0 μM=177 μm; 1 μM=318 μm, p<0.001; 10 μM=349 μm, p<0.001;

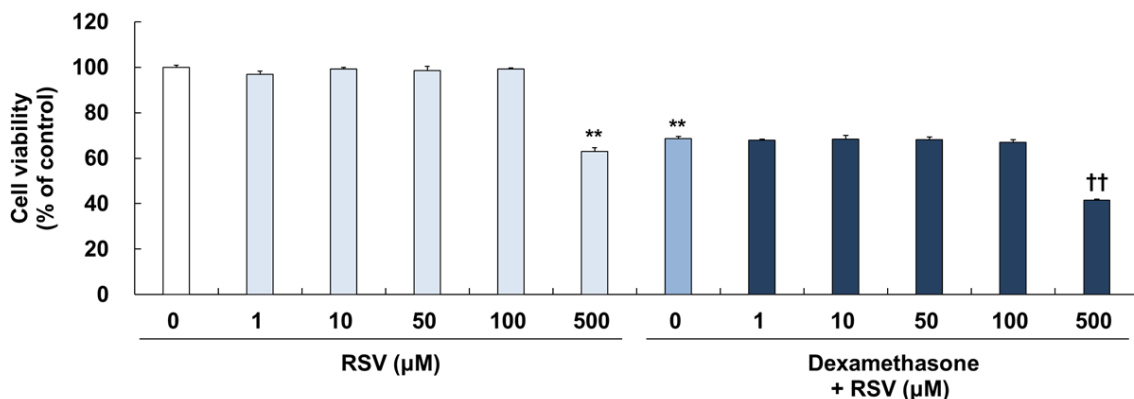


Fig. 1. Effects of resveratrol on cell viability in primary neuronal cultures. Resveratrol (RSV 1, 10, 50, 100 and 500 μM) or DMSO (non-drug treatment control, final concentration 0.5%) was treated in neuronal cells with or without dexamethasone (500 μM) for 4 days. An MTT assay was performed (n=8). Values represent the mean ± SEM expressed as a percentage of control cells (DMSO-treated, non-dexamethasone-treated cells). ** p<0.01 vs. control cells; †† p<0.01 vs. DMSO-treated, dexamethasone-treated cells.

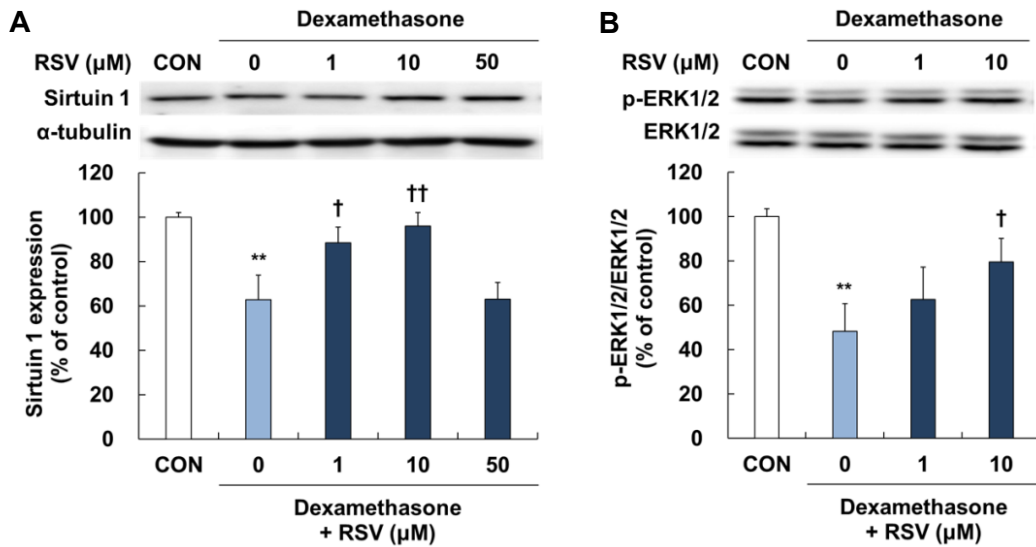


Fig. 2. Effects of resveratrol on the levels of sirtuin 1 expression and ERK1/2 phosphorylation in dexamethasone-treated neuronal cells. Resveratrol (RSV 1, 10 and 50 μM) was treated in neuronal cells with dexamethasone (500 μM) for 4 days. The levels of sirtuin 1 (A) and phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2 (B) were determined by Western blotting (n=6). Values represent the mean ± SEM expressed as a percentage of control cells (DMSO-treated, non-dexamethasone-treated cells). ***p*<0.01 vs. control cells; †*p*<0.05 vs. DMSO-treated, dexamethasone-treated cells; ††*p*<0.01 vs. DMSO-treated, dexamethasone-treated cells.

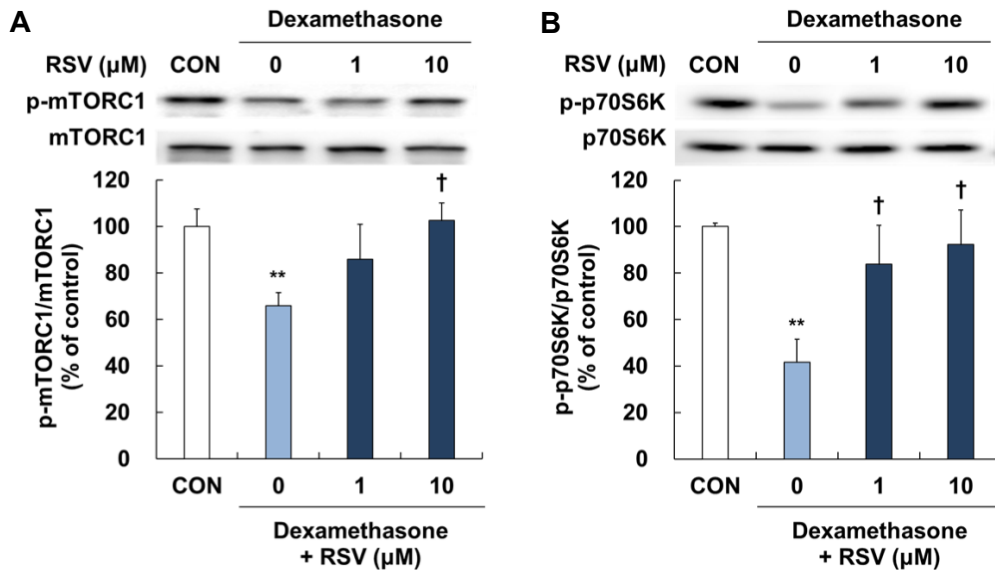


Fig. 3. Effects of resveratrol on the levels of mTORC1 and p70S6K phosphorylation in dexamethasone-treated neuronal cells. Resveratrol (RSV 1 and 10 μM) was treated in neuronal cells with dexamethasone (500 μM) for 4 days. The levels of phospho-Ser²⁴⁸-mTORC1 (A) and phospho-Thr³⁸⁹-p70S6K (B) were determined by Western blotting (n=6). Values represent the mean ± SEM expressed as a percentage of control cells (DMSO-treated, non-dexamethasone-treated cells). ***p*<0.01 vs. control cells; †*p*<0.05 vs. DMSO-treated, dexamethasone-treated cells.

가시밀도: 0 μM=6.6; 1 μM=8.6, *p*<0.001; 10 μM=9.7, *p*<0.001).

정상 세포배양에서 sirtuin 1/2 억제제인 sirtinol이 mTORC1 신호전달 및 신경세포의 수상돌기 성장과 가시형성에 미치는 영향 세포독성 효과 분석 신경세포에 독성을 주지 않는 sirtinol의 농도를 설정하기

위하여, MTT 분석법으로 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 5). 정상 배양액에 sirtinol을 1-500 μM까지 처리하였다. Sirtinol 100 μM과 500 μM은 세포 생존율을 각각 63% (*p*<0.001)와 76% (*p*<0.001) 감소시켰으나, 그 이하의 농도에서 세포 생존율은 영향이 없었다.

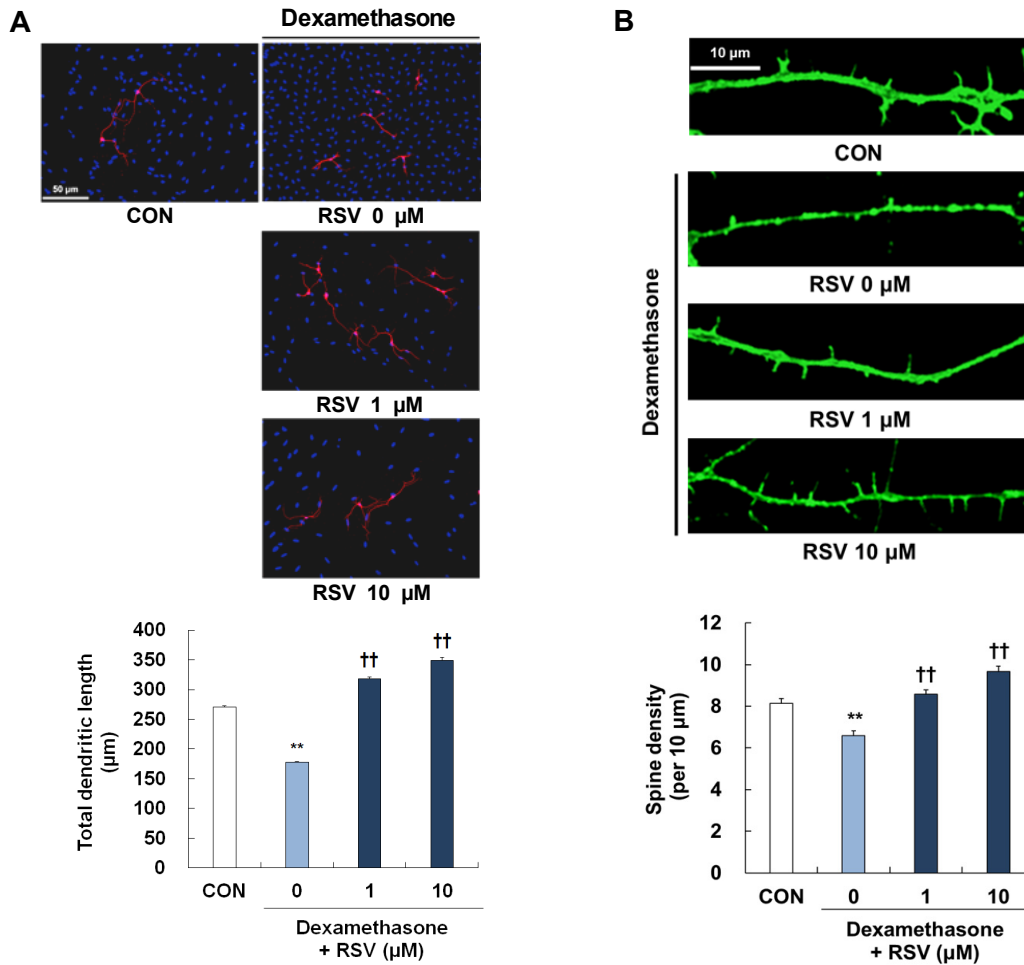


Fig. 4. Effects of resveratrol on total dendritic length and spine density in dexamethasone-treated neuronal cells. Resveratrol (RSV 1 and 10 μM) was treated in neuronal cells with dexamethasone (500 μM) for 5 days. In total, 400 cells from each group were analyzed using anti-MAP2 to assess dendritic outgrowth (A). In total, 40 dendritic segments from each group were analyzed using phalloidin dye to assess spine formation (B). All data are expressed as the mean ± SEM. ***p*<0.01 vs. control cells (DMSO-treated, non-dexamethasone-treated cells); ††*p*<0.01 vs. DMSO-treated, dexamethasone-treated cells.

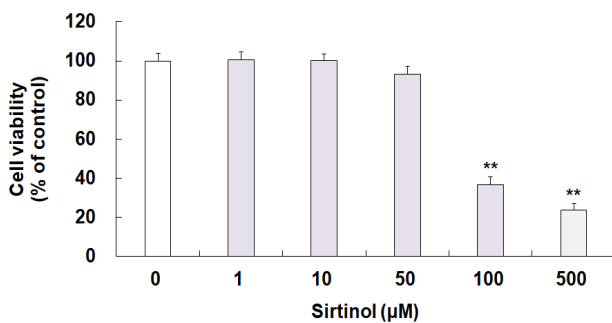


Fig. 5. Effects of sirtinol on cell viability in primary neuronal cultures. Sirtinol (1, 10, 50, 100 and 500 μM) or DMSO (non-drug treatment control, final concentration 0.5%) was treated in neuronal cells for 4 days. An MTT assay was performed (n=8). Values represent the mean ± SEM expressed as a percentage of control cells (DMSO-treated cells). ***p*<0.01 vs. control cells.

Sirtuin 1 발현 및 ERK1/2 인산화 분석

세포독성이 관찰되지 않는 1-50 μM의 sirtinol이 sirtuin 1 발현에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 6A). Sirtinol은 1 μM과 10 μM에서 sirtuin 1 발현을 감소시켰으며, 10 μM에서 유의하게 감소시켰다(1 μM=78%; 10 μM=67%, *p*=0.039). 이러한 연구 결과를 바탕으로 향후 실험에는 sirtinol 1 μM과 10 μM을 사용하였다. Sirtinol이 sirtuin 1의 하위 조절 단백질인 ERK1/2의 억제에 영향을 미치는지를 확인하였다(Fig. 6B). Sirtinol 1 μM과 10 μM은 ERK1/2 인산화를 농도 의존적으로 감소시켰다(1 μM=82%, *p*=0.031; 10 μM=70%, *p*<0.001).

mTORC1 및 p70S6K 인산화 분석

Sirtinol이 mTORC1 신호전달 억제에 영향을 미치는지 알아보기 위하여, mTORC1 (Fig. 7A) 및 p70S6K (Fig. 7B)의 인산화를 분석하였다. Sirtinol 10 μM에서 mTORC1 및 p70S6K 인

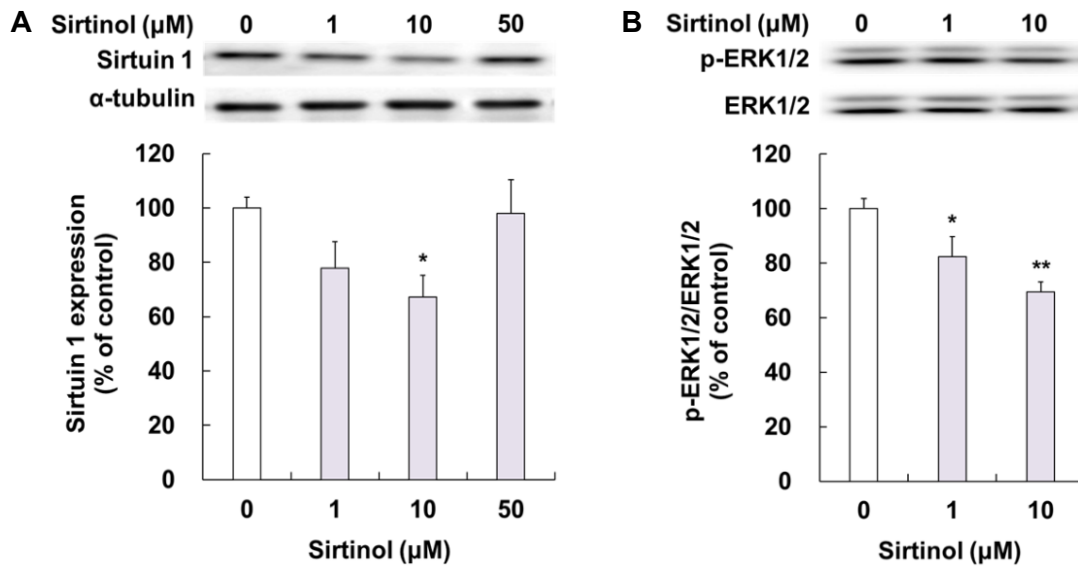


Fig. 6. Effects of sirtinol on the levels of sirtuin 1 expression and ERK1/2 phosphorylation in neuronal cells. Sirtinol (1, 10 and 50 μ M) was treated in neuronal cells for 4 days. The levels of sirtuin 1 (A) and phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2 (B) were determined by Western blotting (n=6). Values represent the mean \pm SEM expressed as a percentage of control cells (DMSO-treated cells). * $p < 0.05$ vs. control cells; ** $p < 0.01$ vs. control cells.

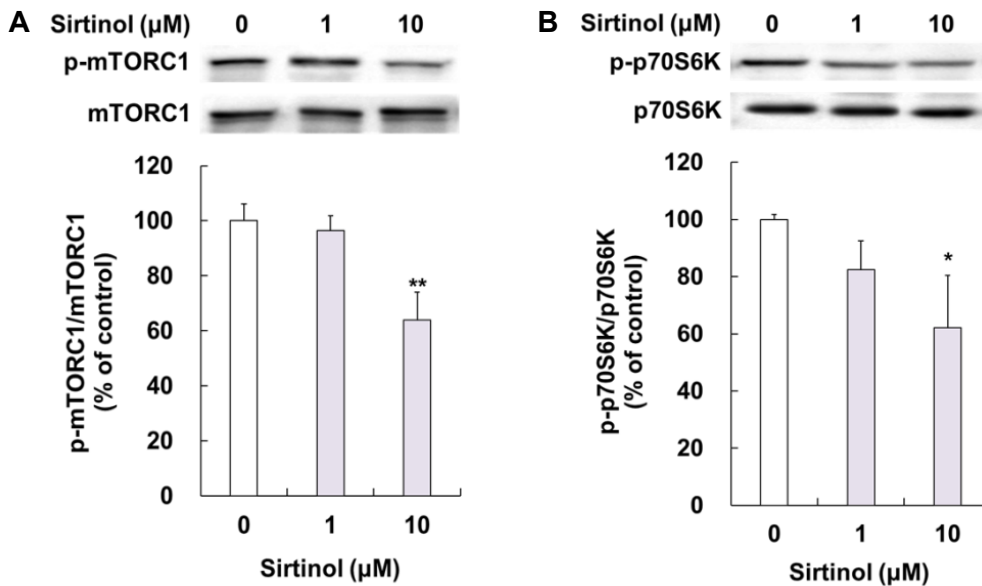


Fig. 7. Effects of sirtinol on the levels of mTORC1 and p70S6K phosphorylation in neuronal cells. Sirtinol (1 and 10 μ M) was treated in neuronal cells for 4 days. The levels of phospho-Ser²⁴⁴⁸-mTORC1 (A) and phospho-Thr³⁸⁹-p70S6K (B) were determined by Western blotting (n=6). Values represent the mean \pm SEM expressed as a percentage of control cells (DMSO-treated cells). * $p < 0.05$ vs. control cells; ** $p < 0.01$ vs. control cells.

산화는 유의하게 감소하였다(mTORC1: 10 μ M=63%, $p=0.002$; p70S6K: 10 μ M=62%, $p=0.014$).

수상돌기의 성장 및 가지밀도 분석

Sirtinol이 신경세포의 수상돌기 성장(Fig. 8A)과 가지형성(Fig. 8B)에 미치는 영향을 확인하였다. Sirtinol 10 μ M에서 수상돌기 성장(250 μ m vs. 208 μ m, $p < 0.001$) 및 가지밀도(7.9 vs

5.4, $p < 0.001$)은 유의하게 감소하였다.

Sirtuin 1 knockdown 이 mTORC1 신호전달 및 신경세포의 수상돌기 성장과 가지형성에 미치는 영향

Sirtuin 1 knockdown 확인

Sirtinol은 sirtuin 1뿐만 아니라 sirtuin 2도 억제시킨다. 따라서 sirtuin 1의 특이적인 억제 작용기전을 알아보기 위해,

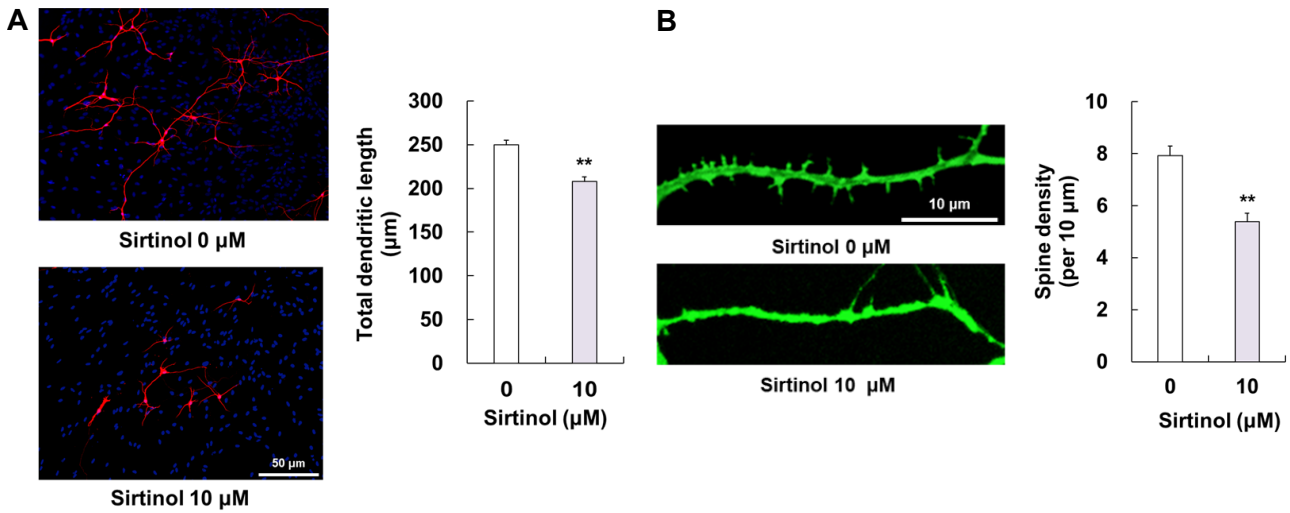


Fig. 8. Effects of sirtinol on total dendritic length and spine density in neuronal cells. Sirtinol (10 μ M) was treated in neuronal cells for 5 days. In total, 400 cells from each group were analyzed using anti-MAP2 to assess dendritic outgrowth (A). In total, 39-40 dendritic segments from each group were analyzed using phalloidin dye for spine formation (B). All data are expressed as the mean \pm SEM. All data are expressed as the mean \pm SEM. ** p <0.01 vs. control cells (DMSO-treated cells).

sirtuin 1 siRNA를 transfection 한 후 sirtuin 1 knockdown을 유도하였다(Fig. 9A). 정상 대조군 siRNA를 transfection한 신경세포와 비교하였을 때, sirtuin 1 siRNA를 transfection한 세포에서 sirtuin 1 발현은 유의하게 60% (p <0.001) 감소하였다.

ERK1/2 및 mTORC1 인산화 분석

Sirtuin 1 knockdown 신경세포에서 ERK1/2 (Fig. 9B) 및 mTORC1 (Fig. 9C)의 활성이 감소하는지를 확인하였다. 정상 대조군 siRNA를 transfection한 신경세포와 비교했을 때, sir-

tuin 1 siRNA를 transfection한 세포에서 ERK1/2 및 mTORC1 인산화는 유의하게 감소하였다(ERK1/2: 70%, p =0.004; mTORC1: 64%, p =0.002).

수상돌기의 성장 및 가지밀도 분석

Sirtuin 1 knockdown 신경세포에서 수상돌기의 성장(Fig. 10A) 및 가지밀도(Fig. 10B)가 감소하는지를 확인하였다. Control siRNA를 transfection한 신경세포와 비교하였을 때, sirtuin 1 siRNA를 transfection한 세포에서 수상돌기 성장 및

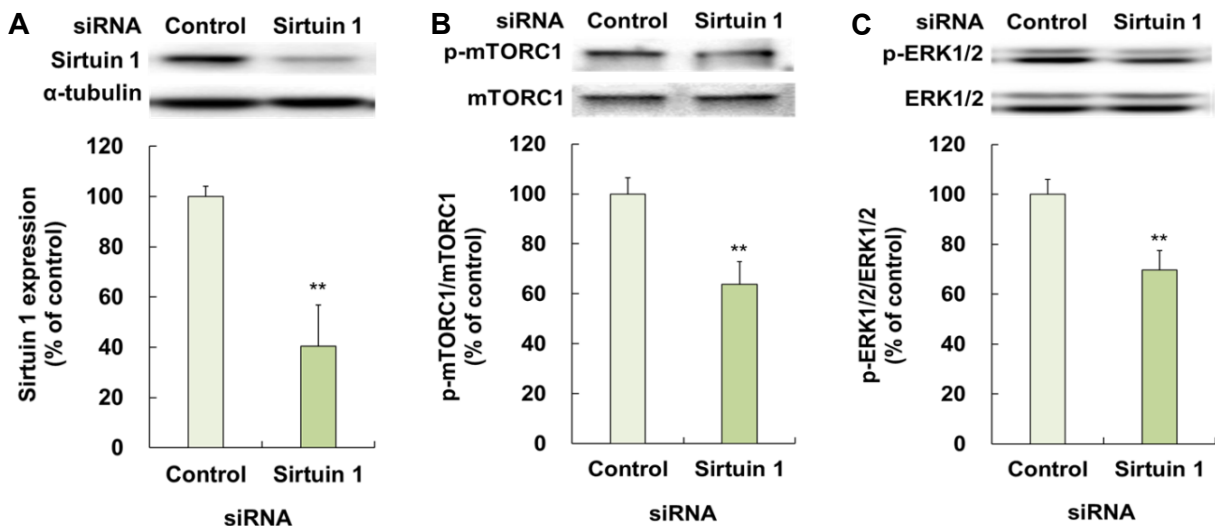


Fig. 9. Effects of sirtuin 1 knockdown on the levels of sirtuin expression and ERK1/2 and mTORC1 phosphorylation in neuronal cells. Neuronal cells were transfected with fluorescein-labeled control or sirtuin 1 siRNA (100 nM) for 24 hr. The levels of sirtuin 1 (A), phospho-Ser²⁴⁴⁸-mTORC1 (B) and phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2 (C) were determined by Western blotting (n=6). Values represent the mean \pm SEM expressed as a percentage of control cells (control siRNA-transfected cells). ** p <0.01 vs. control cells.

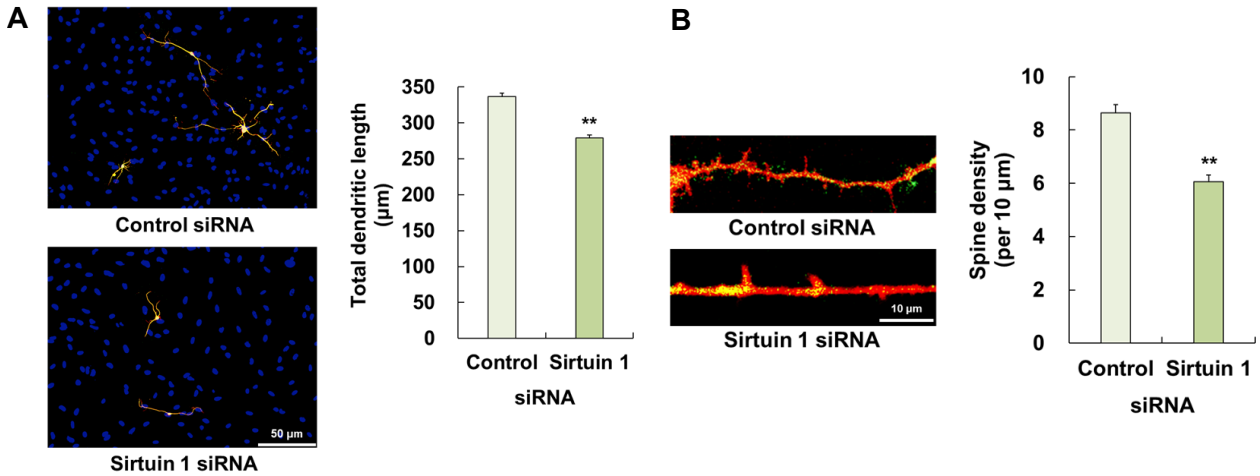


Fig. 10. Effects of sirtuin 1 knockdown on total dendritic length and spine density in neuronal cells. Neuronal cells were transfected with fluorescein-labeled control or sirtuin 1 siRNA (100 nM) for 24 hr. In total, 400 cells from each group were analyzed using anti-MAP2 to assess dendritic outgrowth (A). In total, 40 dendritic segments from each group were analyzed using phalloidin dye for spine formation (B). All data are expressed as the mean ± SEM. All data are expressed as the mean ± SEM. ***p*<0.01 vs. control cells (control siRNA-transfected cells).

가시밀도는 유의하게 감소하였다(수상돌기: 337 μm vs. 279 μm, *p*<0.001; 가시밀도: 8.7 vs. 6.1, *p*<0.001).

고찰

본 연구는 신경세포에서 sirtuin 1이 신경가소성에 관여하며, 이러한 sirtuin 1의 기능에 ERK1/2-mTORC1 신호전달 기전이 관여함을 확인하였다. 신경세포에서 sirtuin 1의 활성 효과를 알아보기 위해 처리한 resveratrol은 ERK1/2-mTORC1 신호전달을 활성화하였으며, 수상돌기의 성장과 가시밀도는 증가하였다. 반면, sirtuin 1의 억제 효과를 알아보기 위해 처리한 sirtinol과 sirtuin 1 발현을 감소시킨 sirtuin 1 knockdown 세포는 모두 ERK1/2-mTORC1 신호전달을 억제하였으며, 수상돌기의 성장과 가시밀도는 감소하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로, sirtuin 1-ERK1/2-mTORC1 신호전달 기전이 뇌의 신경 가소성 조절에 관여하여 우울증 발병 및 항우울효과에 영향을 미치리라 추정하였다.

Lipopolysaccharide (LPS) 유도 우울증 동물모델에서 resveratrol이 해마 치상회에서 소교세포의 활성을 약화시켜 항우울효과를 보여주었으며, neurogenesis를 증가시킴으로써 우울행동을 개선시켰다[24]. 이러한 resveratrol의 항우울효과는 항우울작용 기전과 관련된 신호전달 단백질들인 ERK1/2 및 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)의 발현 및 활성을 증가시키는 것과 관련되는 것으로 보인다[1]. Abe-Higuchi 등[1]의 연구는 resveratrol의 투여가 sirtuin 1의 발현을 증가시켰으며, sirtuin 1의 잠재적인 하위 조절 단백질로 알려져 있는 ERK1/2를 활성화했다는 것을 발견함으로써 ERK 1/2가 sirtuin1의 하위 조절 단백질이라고 추정하였다. 또한 resvera-

tol이 Neuro2a 세포에서 신경돌기 성장을 촉진시켰으며, sirtinol은 신경돌기 성장을 농도의존적으로 감소시키는 것으로 확인되었다[1].

본 연구는 resveratrol이 sirtuin 1의 발현 및 신경세포의 신경가소성을 증가시키는 것을 확인하기 위하여, 신경세포에 텍사메타손을 처리하여 세포독성 환경을 유도하였다. 스트레스는 hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis를 과활성화시켜 혈중 glucocorticoid (cortisol) 농도를 증가시킨다[15]. 이로 인하여 BDNF 발현이 억제되고, 해마에서의 신경가소성이 저하되어, 해마의 위축과 우울증이 유발된다고 알려져 있다[19, 29]. 본 연구는 합성 glucocorticoid 인 텍사메타손을 신경세포에 처리하여 신경가소성이 저하되는 환경을 만들었다. 이러한 환경은 sirtuin 1 발현을 현저히 감소시켰으며, resveratrol은 감소된 sirtuin 1의 발현을 유의하게 증가시켰다. 또한 Abe-Higuchi 등[1]의 연구와 일치하게 ERK1/2의 인산화가 증가하는 것으로 확인하였다. 더 나아가 resveratrol은 신경세포의 수상돌기 성장 및 가시밀도를 증가시켜 신경가소성을 향상시켰다. 반면, sirtinol은 resveratrol의 효과와 반대의 결과를 보였다. Resveratrol은 텍사메타손 배양액에서 활성효과를 보았고, sirtinol은 정상 배양액에서 억제효과를 보았다는 차이점이 있다. 텍사메타손 환경은 sirtuin 1의 발현 및 신경가소성을 감소시키는 환경이다. Sirtinol을 처리하면 이 약물 자체만으로도 sirtuin 1의 발현이 감소하고, 신경가소성이 감소하기 때문에, 정상 배양액에서 sirtinol의 억제효과를 조사하였다. 또한 본 연구를 수행하기 전의 선행연구에 의하면, 정상 배양액에서 resveratrol 효과는 텍사메타손 배양액에서의 효과에는 못 미치지만 mTORC1 신호전달을 활성화시켰으며, 수상돌기 성장과 가시밀도를 증가시켰다. 본 연구결과들은, sirtuin 1의 활성

화는 ERK1/2의 활성화로 이어지며 이러한 기전이 신경가소성을 향상시켜 항우울효과를 나타낸다고 추정한다.

항우울작용에 관한 sirtuin 1의 긍정적인 효과에 대한 다수의 연구결과들이 발표되었으나, 부정적인 효과의 연구 결과들도 또한 발표되었다. 뇌의 sirtuin 1 유전자를 knockout 시킨 쥐에서 불안이 줄어들었고, 우울증에 대한 회복이 증가하였다[22]. 또한 sirtuin 1을 과발현한 쥐의 경우, 불안도가 늘었으며 우울증에 대해 취약한 것으로 나타났다[14]. 반면, 뇌와 척수에 특이적인 Sirtuin 1을 과발현시킨 쥐(C57BL/6J background)의 경우 우울증이나 불안과 같은 행동에 대해 확실한 행동 장애를 보이지 않았다[30]. Sirtuin 1의 효과에 관한 상반된 연구 결과들은 각 연구에서 사용된 쥐들이 서로 다른 유전적 배경을 가지기 때문일 것으로 추정한다. Libert 등[14]의 연구에서 사용한 쥐는 다양한 유전적 배경을 가진 backcrossing sirtuin 1 floxed 쥐와 C57BL/6쥐에서 sirtuin 1 knockin한 쥐를 사용하였다. 12세대에 걸쳐 backcrossing을 시켰더라도 처음 배아 줄기세포를 기증한 종의 유전자를 포함한 염색체 부분이 1%라도 원래 genome을 가지고 있을 수 있고, 그 유전자는 쥐의 행동 결과에 영향을 미칠 수 있으므로 이에 대한 논의가 필요하다[4, 10].

본 연구에서 sirtuin 1은 ERK1/2를 통해 mTORC1 신호전달을 활성화시켰다. 케타민은 mTORC1 신호전달을 활성화해 신경가소성의 향상으로 인해 빠른 항우울효과를 나타낸다고 알려져 있다[13]. 본 연구에서 resveratrol이 mTORC1 신호전달을 활성화했으나, sirtinol과 신경세포에서 sirtuin 1을 knockdown 시킨 세포는 ERK1/2-mTORC1 신호전달을 억제시켰다. 따라서 sirtuin 1의 발현 증가가 mTORC1 신호전달을 활성화시켜 신경가소성을 향상하는 것으로 보인다. 반면, Gue 등[10]의 연구는 신경세포에서 sirtuin 1의 과발현이 mTOR 신호전달을 억제해 신경가소성을 향상시킨다고 보고하였다. 이 연구결과와 본 연구결과와의 차이점을 확인하기 위해서는 추가 연구가 필요하다. mTORC1 억제제인 라파마이신을 신경세포 배양액에 전 처치한 후에 resveratrol을 처치하여 수상돌기와 가지형성을 관찰한다면, sirtuin 1과 mTORC1 신호전달과의 연관성을 더 명확히 알 수 있을 것이다. Park 등[25]의 연구에 의하면, 항우울제 escitalopram이 mTORC1 신호전달을 통해서 해마의 수상돌기 성장을 증가시켰다. 따라서 향후 실험에서 escitalopram이 sirtuin 1의 발현을 증가시키는지 조사해 본다면, sirtuin 1과 mTORC1과의 관계를 더 명확히 밝힐 수 있을 것이다.

본 연구는 sirtuin 1이 ERK1/2-mTORC1 신호전달을 통해서 신경가소성을 조절한다는 것을 보여주었다. Sirtuin 1의 활성 감소가 우울증 발병에 영향을 주며, sirtuin 1의 활성 증가가 항우울작용을 나타낸다는 전임상 연구들의 주장을 뒷받침한다. 향후 추가 실험을 통해 sirtuin 1의 항우울효과가 검증된다면, sirtuin 1의 신호전달 활성화가 우울증 치료제 개발의 새로

운 타겟이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 성과는 정부(과학기술정보통신부 및 교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2019R1F1A1040903, 2020R1A2C1010148 및 2020R1I1A3060731).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Abe-Higuchi, N., Uchida, S., Yamagata, H., Higuchi, F., Hobara, T., Hara, K., Kobayashi, A. and Watanabe, Y. 2016. Hippocampal sirtuin 1 signaling mediates depression-like behavior. *Biol. Psychiatry* **80**, 815-826.
2. Artigas, F. 2001. Limitations to enhancing the speed of onset of antidepressants - are rapid action antidepressants possible? *Hum. Psychopharmacol.* **16**, 29-36.
3. CONVERGE consortium. 2015. Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder. *Nature* **523**, 588-591.
4. Crusio, W. E. 2004. Flanking gene and genetic background problems in genetically manipulated mice. *Biol. Psychiatry* **56**, 381-385.
5. Duman, R. S. and Aghajanian, G. K. 2012. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* **338**, 68-72.
6. Duman, R. S. and Voleti, B. 2012. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci.* **35**, 47-56.
7. El Hayek, L., Khalifeh, M., Zibara, V., Abi Assaad, R., Emmanuel, N., Karnib, N., El-Ghandour, R., Nasrallah, P., Bilen, M., Ibrahim, P., Younes, J., Abou Haidar, E., Barmo, N., Jabre, V., Stephan, J. S. and Sleiman, S. F. 2019. Lactate mediates the effects of exercise on learning and memory through SIRT1-dependent activation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J. Neurosci.* **39**, 2369-2382.
8. Gao, D., Huang, T., Jiang, X., Hu, S., Zhang, L. and Fei, Z. 2014. Resveratrol protects primary cortical neuron cultures from transient oxygen-glucose deprivation by inhibiting MMP-9. *Mol. Med. Rep.* **9**, 2197-2204.
9. Gao, J., Wang, W. Y., Mao, Y. W., Gräff, J., Guan, J. S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S. C. and Tsai, L. H. 2010. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* **466**, 1105-1109.
10. Guo, W., Qian, L., Zhang, J., Zhang, W., Morrison, A., Hayes, P., Wilson, S., Chen, T. and Zhao, J. 2011. Sirt1 overex-

- pression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. *J. Neurosci. Res.* **89**, 1723-1736.
11. Kaech, S. and Banker, G. 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2406-2415.
 12. Klimaschewski, L., Nindl, W., Pimpl, M., Waltinger, P. and Pfaller, K. 2002. Biolistictransfection and morphological analysis of cultured sympathetic neurons. *J. Neurosci. Methods* **15**, 63-71.
 13. Li, N., Lee, B., Liu, R. J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., Li, X. Y., Aghajanian, G. and Duman, R. S. 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* **329**, 959-964.
 14. Libert, S., Pointer, K., Bell, E. L., Das, A., Cohen, D. E., Asara, J. M., Kapur, K., Bergmann, S., Preisig, M., Otowa, T., Kendler, K. S., Chen, X., Hettema, J. M., van den Oord, E. J., Rubio, J. P. and Guarente, L. 2011. SIRT1 activates MAO-A in the brain to mediate anxiety and exploratory drive. *Cell* **147**, 1459-1472.
 15. Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M. and Meaney, M. J. 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* **277**, 1659-1662.
 16. Liu, L., Zhang, Q., Cai, Y., Sun, D., He, X., Wang, L., Yu, D., Li, X., Xiong, X., Xu, H., Yang, Q. and Fan, X. 2016. Resveratrol counteracts lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors via enhanced hippocampal neurogenesis. *Oncotarget* **7**, 56045-56059.
 17. Luo, X. J. and Zhang, C. 2016. Down-regulation of SIRT1 gene expression in major depressive disorder. *Am. J. Psychiatry* **173**, 1046.
 18. Malykhin, N. V. and Coupland, N. J. 2015. Hippocampal neuroplasticity in major depressive disorder. *Neuroscience* **309**, 200-213.
 19. McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N. and Nasca, C. 2015. Mechanisms of stress in the brain. *Nat. Neurosci.* **18**, 1353-1363.
 20. McEwen, B. S., Eiland, L., Hunter, R. G. and Miller, M. M. 2012. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* **62**, 3-12.
 21. Michán, S., Li, Y., Chou, M. M., Parrella, E., Ge, H., Long, J. M., Allard, J. S., Lewis, K., Miller, M., Xu, W., Mervis, R. F., Chen, J., Guerin, K. I., Smith, L. E., McBurney, M. W., Sinclair, D. A., Baudry, M., de Cabo, R. and Longo, V. D. 2010. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **30**, 9695-9707.
 22. Michan, S. and Sinclair, D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* **404**, 1-13.
 23. Nivoli, A., Porcelli, S., Albani, D., Forloni, G., Fusco, F., Colom, A., Vieta, E. and Serretti, A. 2016. Association between sirtuin 1 gene rs10997870 polymorphism and suicide behaviors in bipolar disorder. *Neuropsychobiology* **74**, 1-7.
 24. Pallàs, M., Pizarro, J. G., Gutierrez-Cuesta, J., Crespo-Biel, N., Alvira, D., Tajés, M., Yeste-Velasco, M., Folch, J., Canudas, A. M., Sureda, F. X., Ferrer, I. and Camins, A. 2008. Modulation of SIRT1 expression in different neurodegenerative models and human pathologies. *Neuroscience* **154**, 1388-1397.
 25. Park, S. W., Lee, J. G., Seo, M. K., Lee, C. H., Cho, H. Y., Lee, B. J., Seol, W. and Kim, Y. H. 2014. Differential effects of antidepressant drugs on mTOR signalling in rat hippocampal neurons. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **17**, 1831-1846.
 26. Park, S. W., Mansur, R. B., Lee, Y., Lee, J. H., Seo, M. K., Choi, A. J., McIntyre, R. S. and Lee, J. G. 2018. Liraglutide activates mTORC1 signaling and AMPA receptors in rat hippocampal neurons under toxic conditions. *Front. Neurosci.* **12**, 756.
 27. Qin, W., Yang, T., Ho, L., Zhao, Z., Wang, J., Chen, L., Zhao, W., Thiyagarajan, M., MacGrogan, D., Rodgers, J. T., Puigserver, P., Sadoshima, J., Deng, H., Pedrini, S., Gandy, S., Sauve, A. A. and Pasinetti, G. M. 2006. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J. Biol. Chem.* **281**, 21745-21754.
 28. Raval, A. P., Lin, H. W., Dave, K. R., Defazio, R. A., Della Morte, D., Kim, E. J. and Perez-Pinzon, M. A. 2008. Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain. *Curr. Med. Chem.* **15**, 1545-1551.
 29. Watanabe, S., Ageta-Ishihara, N., Nagatsu, S., Takao, K., Komine, O., Endo, F., Miyakawa, T., Misawa, H., Takahashi, R., Kinoshita, M. and Yamanaka, K. 2014. SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. *Mol. Brain* **7**, 62.
 30. Wolfer, D. P., Crusio, W. E. and Lipp, H. P. 2002. Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends. Neurosci.* **25**, 336-340.
 31. Zarate, C. A. Jr., Singh, J. B., Carlson, P. J., Brutsche, N. E., Ameli, R., Luckenbaugh, D. A., Charney, D. S. and Manji, H. K. 2006. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **63**, 856-864.

초록 : 신경세포에서 sirtuin 10이 수상돌기 성장과 가지형성에 미치는 영향 및 기전에 관한 연구

서미경¹ · 김혜경¹ · 백송영¹ · 이정구^{1,2} · 엄상화³ · 박성우^{1,4*} · 석대현^{5,6*}

(¹인제대학교 백인제기념임상의학연구소, ²인제대학교 해운대백병원 의과대학 정신건강의학교실, ³인제대학교 의과대학 예방의학교실, ⁴인제대학교 의과대학 생의학융합교실, ⁵인제대학교 의과대학 생화학교실, ⁶인제대학교 의과대학 치매 및 퇴행성신경질환 연구센터)

우울증 발생 기전에 신경가소성의 손상이 관여한다. Sirtuin 1은 신경가소성의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 mTORC1 신호전달의 활성화가 신경가소성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 sirtuin 1이 mTORC1 신호전달을 통해 수상돌기 성장과 가지형성에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 텍사메타손이 처리된 신경세포와 정상 배양 신경세포에 resveratrol (sirtuin 1 활성화제)과 sirtinol (sirtuin 1 억제제)을 각각 처리하였다. Western blot 분석법을 사용하여, sirtuin 1 발현 및 ERK1/2, mTORC1, p70S6K의 인산화 양을 분석하였고, 면역형광측정법으로 수상돌기의 길이와 가지밀도를 분석하였다. Resveratrol은 텍사메타손 환경에서 농도 의존적으로 sirtuin 1의 발현을 증가시켰으며, ERK1/2 (sirtuin 1의 하위 타겟), mTORC1, 그리고 p70S6K (mTORC1의 하위 타겟)의 인산화를 유의하게 증가시켰다. 또한 resveratrol은 수상돌기 성장과 가지밀도를 증가시켰다. 반면, sirtinol은 정상 배양액에서 sirtuin 1의 발현을 유의하게 감소시켰으며, ERK1/2, mTORC1, p70S6K의 인산화 양을 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰다. 또한 sirtinol은 수상돌기 성장과 가지밀도를 유의하게 감소시켰다. 신경세포에 sirtuin 1의 siRNA를 transfection시켜 sirtuin 1을 knockdown 시켰을 때, ERK1/2 및 mTORC1의 인산화 양이 감소하였을 뿐만 아니라, 수상돌기 성장과 가지밀도도 감소하였다. 본 연구는 sirtuin 1이 ERK1/2-mTORC1 신호전달을 통해서 수상돌기 성장과 가지밀도를 변화시켜 신경가소성을 조절한다는 것을 보여주었다.