

# C6 신경교세포에서 lipopolysaccharide에 의한 p21 (WAF1/CIP1) 및 Bax의 발현증가에 미치는 resveratrol의 영향

김영애<sup>1</sup> · 임선영<sup>2</sup> · 이숙희<sup>3</sup> · 최영현\*

동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 한방바이오연구소, 1: 日本 富山医科薬科大学 和漢薬研究所,  
2: 한국해양대학교 해양과학기술대학 해양과학부, 3: 부산대학교 생활환경대학 식품영양학과

## Inhibitory Effect of Resveratrol on Lipopolysaccharide-induced p21 (WAF1/CIP1) and Bax Expression in Astroglioma C6 Cells

Young Ae Kim<sup>1</sup>, Sun Young Lim<sup>2</sup>, Sook Hee Rhee<sup>3</sup>, Yung Hyun Choi\*

Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine and Biomedical Research Center of Oriental Medicine.

1: Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan.

2: Division of Ocean Science, Korea Maritime University.

3: Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University

Resveratrol, a phytoalexin found at high levels in grapes and in grape products such as red wine, has been reported to possess a wide range of biological and pharmacological activities including anti-oxident, anti-inflammatory, anti-mutagenic, and anti-carcinogenic effects, but its molecular mechanism is poorly understood. In this study, we examined the effects of resveratrol on lipopolysaccharide (LPS)-induced growth inhibitory activity and cell growth-regulatory gene products in astroglioma C6 cells to elucidate its possible mechanism for anti-cytotoxicity. It is shown that LPS induced time-dependent growth inhibition and morphological changes of C6 cells, which were recovered by pre-treatment with resveratrol. The anti-proliferative effect of LPS 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 LPS-treated C6 cells without alteration of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-XL expression. However, resveratrol significantly inhibited LPS-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.

Key words : resveratrol, LPS, p53, p21, bax, C6 cells

### 서 론

뇌는 신경세포와 비신경성 세포인 신경교로 구성되어 있다. 신경교세포는 뇌 전체의 90%를 차지하고 부피로는 50%에 해당되며, 중추신경계의 신경교는 astrocyte, oligodendrocyte 및 microglia로 구분되며, 말초신경계의 신경교로는 Schwann 세포가 해당된다<sup>1)</sup>. 최근의 연구들에서, astrocyte는 거의 모든 종류의

신경전달물질에 대한 수용체를 발현하며 뇌 내의 대표적인 신호 전달물질의 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<sup>2,3)</sup>. 그리고 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

\* 교신저자 : 최영현, 부산시 부산진구 양정동 산45-1 동의대학교 한의과대학

· E-mail : choiyh@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7413

· 접수 : 2004/11/01 · 수정 : 2004/12/06 · 채택 : 2005/01/13

블리기도 한다<sup>4)</sup>. 중추신경계의 활성화된 microglia는 세포증식과 phagocytosis 작용이 활발해지고 염증반응의 매개체인 nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF), prostaglandin (PG) 등을 분비한다. 이러한 염증매개체들은 이차 감염으로부터 뇌를 보호하는 긍정적인 측면도 있으나 주변 신경세포의 손상을 가중시킨다는 부정적인 측면이 문제가 되고 있다<sup>5,6)</sup>. 최근 들어 Alzheimer의 발병과 비신경세포의 연관성에 대한 많은 연구결과가 발표되었다. 특히 뇌의 염증작용이 Alzheimer의 발병을 증가시키며<sup>7)</sup>, 면역억제제가 병의 진전을 완화시킬 수 있다는 결과들이 발표되면서<sup>8)</sup> 뇌의 면역세포 또는 염증세포로 알려진 microglia에 대한 연구가 급속도로 진행되고 있다. 또한 microglia가 노인성치매의 원인 물질로 생각되는  $\beta$ -amyloid에 의해 활성화되어  $\beta$ -amyloid의 독성을 매개 또는 증폭시키며, 면역억제제가 치매의 발병을 낮추어준다는 연구결과들이 발표되면서 microglia가 뇌 손상을 악화시킬 뿐 아니라 노인성치매와 같은 퇴행성뇌질환의 발병 또는 진전에도 관여할 가능성이 부각되고 있다<sup>9,10)</sup>. 즉 신경교는 정상적인 신경계의 신경활동에 필수적이며 뇌 손상이나 뇌 질환의 발병과 진전, 재생과도 크게 관련되어 있다. 이러한 사실들은 신경교가 양적인 면에서의 신경계의 주요 부분일 뿐 아니라 기능적인 면에서도 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사하는 것이라 하겠다.

한편 resveratrol은 포도의 씨, 껍질 등에 주로 분포하고 있으며 당도가 높은 포도에서 곰팡이와 같은 감염균으로부터 자신의 몸을 보호하기 위해 생산하는 방어물질인 phytoalexin의 일종이다<sup>11)</sup>. 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. 최근 연구 결과들에 의하면 resveratrol은 인체유방암, 전립선암, 대장암, 폐암 등을 포함한 많은 암세포주에서 apoptosis를 유발함이 보고된 바 있으며<sup>12-16)</sup>, 생쥐 JB6 상피세포에서 종양 촉진자나 상피세포 성장인자에 의한 세포의 형질전환을 억제하였고, 동일 농도에서 apoptosis를 유도하였다<sup>13)</sup>. 그리고 쥐의 pheochromocytoma (PC12) 세포에서 oxidative stress나 치매유발 인자로 알려진  $\beta$ -amyloid에 의한 세포독성을 완벽하게 보호해 주는 효과 등도 보고된 바 있다<sup>17,18)</sup>. 본 연구에서는 대표적인 염증유발물질로 알려진 lipopolysaccharide (LPS) 처리에 의한 신경교세포의 세포증식 억제 및 apoptosis 유발 관련 유전자들의 발현에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였으며 몇 가지 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양 및 LPS와 resveratrol의 처리

본 연구에 사용된 C6 신경교세포 (astrogloma cells)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (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% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. Resveratrol 및 LPS는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Resveratrol은 ethanol에 희석하여 200 mM의 stock solution을 만들어 사용하였으며, LPS는 3 차 증류수에 10 mg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다. LPS 및 resveratrol의 혼합 처리를 위한 실험에서는 resveratrol을 LPS 처리 40분전에 적적농도로 배지에 희석하여 먼저 처리하였다.

### 2. Hematocytometer를 이용한 생존율의 측정

세포배양용 6 well plate를 이용하여 plate당 1x10<sup>5</sup>개의 C6 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, LPS 단독 또는 resveratrol과 혼합처리 후 적정시간 동안 배양하였다. 준비된 세포들은 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세하고 trypan blue (Gibco BRL)로 염색하였으며, 이를 hematocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경(x 200) 하에서 살아있는 세포의 수를 측정하여 대조군과 비교 분석하였다.

### 3. 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  $\mu$ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 선행연구 조건에 준하여 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자(Table 1)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다<sup>19)</sup>. 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.

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-XL	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'

### 4. 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

선행 방법에 준하여 LPS 단독 또는 resveratrol과 혼합처리 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을

SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다<sup>20)</sup>. 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 Luminescence) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington 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 Corp에서 구입하였다.

결 과

1. LPS에 의한 C6 신경교세포의 형태변화 및 증식억제에 resveratrol의 영향

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

2. LPS 처리에 의한 p53 및 p21의 발현 증가에 미치는 resveratrol의 영향

다음은 신경교세포에서 LPS에 의한 세포독성의 부분적인 이해를 조사하기 위하여 세포증식 조절에 매우 중요한 조절인자에 해당하는 종양억제 유전자인 p53 및 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor인 p21 (WAF1/CIP1)의 발현에 미치는 LPS의 영향을 조사하였다. Fig. 3A 및 4A에 나타난 바와 같이 LPS의 처리 농도가 증가될수록 조사된 두 유전자의 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 LPS 처리 농도 의존적으로 증가되었다. 즉 LPS 처리에 의한 신경교세포의 증식 억제에는 p53 및 p21의 유전자가 관여하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 LPS 처리에 의한 신경교세포의 증식억제 및 resveratrol에 의한 신경교세포의 증식억제 회복효과가 조사된 두 유전자의 발현 조절과 상관성이 있는지의 여부를 조사하였다. Fig. 3B 및 4B에 나타난 바와 같이 resveratrol의 전 처리에 의하여 LPS에 의하여 유도될 수 있는 p53 및 p21 유전자의 발현 증가가 resveratrol 처리 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과는 LPS에 의한 신경교세포의 증식억제는 p53 및 p21의 발현 증가와 연관성이 있으며, resveratrol은

두 유전자들의 발현 증가 억제를 통하여 LPS에 의한 신경교세포의 세포 증식 억제에 대한 보호 효과가 있음을 의미하여 준다.

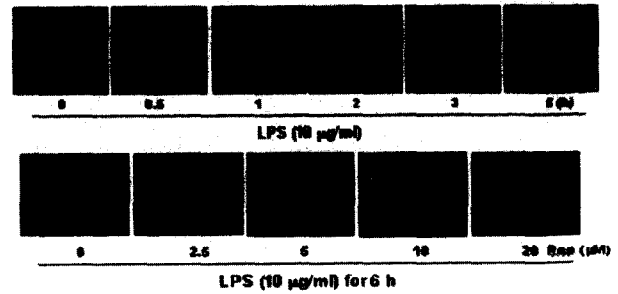


Fig. 1. Effects of resveratrol on LPS-induced morphological changes in astrogloma C6 cells. (A) Cells were treated with 10 µg LPS for indicated times. (B) Cells were pre-treated with resveratrol (Res) for 40 min, before treatment with LPS. After incubation for 6 h cells were sampled and examined under light microscopy. Magnification, X200

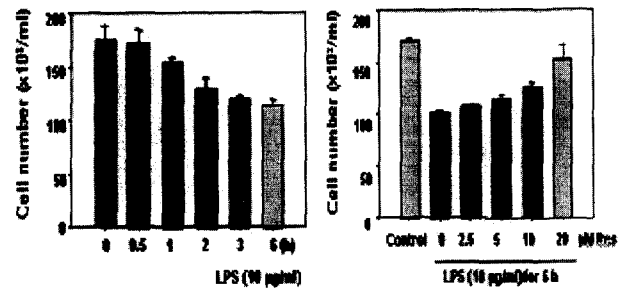


Fig. 2. Effects of resveratrol on astrogloma C6 cell viability in the presence of LPS. Cells were plated at 1x10<sup>5</sup> cells/60-mm plate, and pre-incubated for 24 h. Cells were treated with LPS for indicated times (A) or pre-treated with variable concentrations of resveratrol for 40 min (B) before treatment with LPS. 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.

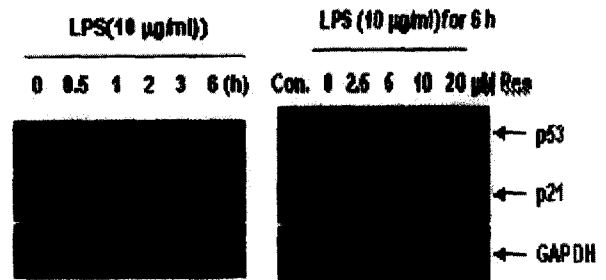


Fig. 3. Inhibitory effects of resveratrol on the transcriptional levels of p53 and p21 induced by LPS in astrogloma C6 cells. C6 cells were incubated with LPS for 6 h (A) or treated variable concentrations of resveratrol for 40 min, before treatment with LPS (B), and total RNAs were isolated and RT-PCR 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.

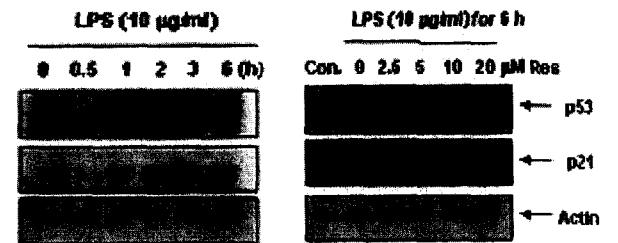


Fig. 4. Inhibitory effects of resveratrol on the translational levels of p53 and p21 induced by LPS in astrogloma C6 cells. C6 cells were incubated with LPS for 6 h (A) or treated variable concentrations of resveratrol for 40 min, before treatment with LPS (B). Cell extracts were prepared, and the expression levels were examined by Western blotting with anti-p53 and anti-p21 antibodies, and ECL detection system. Actin was used an internal control.

3. LPS 처리에 의한 apoptosis 유발관련 유전자의 발현 변화에 미치는 resveratrol의 영향

LPS에 의한 신경교세포의 증식억제가 apoptosis 유발과의 상관성 여부를 조사하기 위하여 apoptosis 조절과 관련이 있는 주요 유전자들의 발현에 미치는 LPS의 영향을 조사하였다. Fig. 5A 및 6A에 나타낸 바와 같이 apoptosis 유발에 직접적인 영향을 주는 것으로 알려진 Bax 유전자의 발현이 LPS의 처리에 의하여 전사 및 번역 수준에서 처리시간 의존적으로 매우 증가하였음을 알 수 있었다. 그러나 apoptosis 유발 억제와 직접연관성이 있는 Bcl-2 및 Bcl-XL 유전자의 발현은 LPS 처리에 의하여 큰 변화가 없었다. 즉 LPS가 처리된 신경교세포에서는 Bax의 발현을 통한 세포사멸의 과정을 밟을 것으로 추정되어진다. 그러나 Fig. 5B 및 6B에 나타낸 바와 같이 resveratrol의 전 처리에 의하여 LPS에 의한 Bax 발현의 증가 전사 및 번역 수준에서 모두 감소되었다. 이는 LPS에 의한 Bax의 발현 증가를 감소시킴으로서 resveratrol은 신경교세포의 사멸을 억제할 수 있음을 시사하여 주었다.

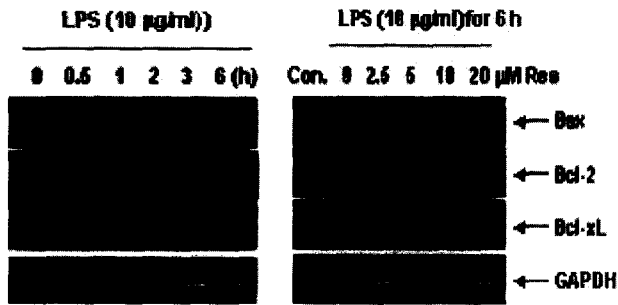


Fig. 5. Effect of resveratrol on the induction of Bax mRNA by LPS in astrogloma C6 cells. C6 cells were incubated with LPS for 6 h (A) or treated variable concentrations of resveratrol for 40 min, before treatment with LPS (B), and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. The amplified PCR products were run in agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

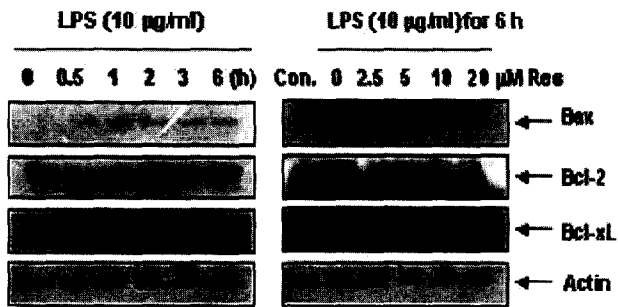


Fig. 6. Effect of resveratrol on the induction of Bax protein by LPS in astrogloma C6 cells. C6 cells were incubated with LPS for 6 h (A) or treated variable concentrations of resveratrol for 40 min, before treatment with LPS (B). Cell extracts were prepared, and the expression levels were examined by Western blotting with indicated antibodies, and ECL detection system. Actin was used an internal control.

고찰

Resveratrol은 많은 식물체에서 박테리아를 포함한 다양한 외부 환경의 변화에 식물체 스스로가 자신을 보호하기 위한 수단으로 만들어내는 phytoalexin의 일종이다. 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 좁으므로 협심증과 뇌졸중을 포함한 심장병/동맥경화의 예방효과를 지니며 또한 혈소판 응집 억제 효과를 가진다<sup>11,21,22</sup>. 그리고 resveratrol은 정상세포가 암으로 전환되는 것을 막고 악성종양의 증식 및 전이를 차단하며, radiosensitizer로서의 기능, antiestrogenic 효과 및 angiogenesis 억제 등<sup>11,23,24</sup>의 항암효과 역시 잘 알려져 있다. 또한 resveratrol은 cyclooxygenase (COX) 활성 및 nuclear factor kappa B (NF-κB)와 연관되어 연구가 많이 된 부분으로 다양한 질병과 관련이 있는 세포 염증을 차단하는 역할을 가지고 있으며<sup>25,26</sup>, DNA breakage를 통한 박테리아의 성장억제, 특히 Helicobacter pylori 및 herpes simplex virus에서의 DNA 합성 억제를 통한 성장 억제하며 내성이 생김 변종 바이러스의 성장도 차단할 수 있는 탁월한 항생물질 효과를 가진다<sup>27,28</sup>. 한편 활성 산소는 생체에 다양한 장애를 주면서 각종 질병, 암, 노화의 발생에 직접적인 원인으로 작용하는데 resveratrol은 활성산소의 제거 능력이 탁월하며, oxidative DNA damage의 방어 작용 등의 강력한 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 있다<sup>12,29</sup>.

이러한 선행연구들의 결과들에서 resveratrol은 LPS로 유도된 세포독성의 차단 또는 보호 효과가 매우 탁월할 것으로 기대되어 신경교세포를 대상으로 조사한 결과, Fig. 1 및 2에 나타낸 바와 같이 LPS에 의한 신경교세포의 형태변형과 연관된 성장억제를 매우 효과적으로 차단할 수 있었다. 따라서 LPS에 의한 신경교세포의 성장억제와 연관된 몇 가지 중요 유전자의 발현 변화 여부를 조사하였으며, LPS에 의한 특정 유전자의 발현에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 p53 및 p21의 발현에 미치는 LPS의 영향을 조사한 결과, LPS의 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<sup>30,31</sup>, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자인 p53에서 LPS의 처리에 의한 신경교세포에서의 발현 증가는 LPS에 의한 신경교세포의 증식억제에 이들 두 유전자가 핵심적으로 관여할 것으로 추정되어진다. 그러나 resveratrol의 전 처리에 의하여 LPS의 효과가 매우 유의적으로 차단됨을 알 수 있었다(Fig. 4 및 5).

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<sup>34,35</sup>. 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 인자로서 apoptosis의 유발과 관계가 있다<sup>36</sup>. 이들은 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와

연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다<sup>36,37</sup>. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다. 따라서 LPS 처리에 의한 신경교세포의 증식억제와 연관된 apoptotic 유발에 Bcl-2 family의 가능성 여부를 조사하였다. 그 결과 Bax의 발현이 선택적으로 LPS의 처리에 의하여 증가됨을 관찰할 수 있었으며, resveratrol의 전 처리는 LPS에 의한 Bax 발현을 유의적으로 차단시켜주었다(Fig. 5, 6). 이상의 결과는 대표적인 염증유발 물질로 알려진 LPS에 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.

## 결 론

Resveratrol은 포도를 비롯한 고등식물에 다량 함유되어 있는 phytoalexin의 일종으로 항산화, 항염증, 항돌연변이 및 항암 작용을 포함한 다양한 생리약학적 특징을 지닌 천연물이다. 본 연구에서는 대표적인 염증유발 물질인 LPS 처리에 의한 신경교세포의 세포독성보호 효과에 대한 resveratrol의 영향을 조사하였다. Resveratrol은 LPS에 의한 세포증식 및 세포의 형태변형을 매우 억제하는 효과를 나타내었으며, LPS에 의한 세포증식 주요 조절인자인 종양억제유전자 p53 및 Cdk inhibitor인 p21(EAF1/CIP1)의 발현을 차단시키는 효과를 보였다. 또한 apoptosis 유도에 중심적인 역할을 하는 Bax의 발현이 LPS 처리에 의하여 유의적으로 증가되었으나 resveratrol에 의하여 정상 수준으로 감소되었다.

## 참고문헌

1. Hansson, E., Astroglia from defined brain regions as studied with primary cultures. *Prog Neurobiol.* 30, 369-397, 1988.
2. Harder, D.R., Zhang, C., Gebremedhin, D., Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol Sci.* 17, 27-31, 2002.
3. Mazzanti, M., Sul, J.Y., Haydon, P.G., Glutamate on demand: astrocytes as a ready source. *Neuroscientist.* 7, 396-405, 2001.
4. Lue, L.F., Walker, D.G., Rogers, J., Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiol Aging.* 22, 945-956, 2001.
5. Streit, W.J., Graeber, M.B., Kreutzberg, G.W., Functional plasticity of microglia: a review. *Glia.* 1, 301-307, 1988.
6. Chao, C.C., Hu, S., Molitor, T.W., Shaskan, E.G., Peterson, P.K., Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol.* 149, 2736-2741, 1992.

7. Mrak, R.E., Sheng, J.G., Griffin, W.S., Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum Pathol.* 26, 816-823, 1995.
8. Stewart, R.R., Membrane properties of microglial cells isolated from the leech central nervous system. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 255, 201-208, 1994.
9. Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L. Jr, Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., Rossi, F., Activation of microglial cells by  $\beta$ -amyloid protein and interferon- $\gamma$ . *Nature.* 374, 647-650, 1995.
10. El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C., Loike, J.D., Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature.* 382, 716-719, 1996.
11. Bhat, K.P.L., Kosmeder, J.W. 2nd, Pezzuto, J.M., Biological effects of resveratrol. *Antioxid Redox Signal.* 3, 1041-1064, 2001.
12. Ahmad, N., Adhami, V.M., Afaq, F., Feyes, D.K., Mukhtar, H., Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res.* 7, 1466-1473, 2001.
13. Huang, C., Ma, W.Y., Goranson, A., Dong, Z., Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis.* 20, 237-242, 1999.
14. Kim, Y.A., Lee, W.H., Choi, T.H., Rhee, S.H., Park, K.Y., Choi, Y.H., Involvement of p21, pRB, Bax and NF- $\kappa$ B in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Int J Oncol.* 23, 1143-1149, 2003.
15. She, Q.B., Bode, A.M., Ma, W.Y., Chen, N.Y., Dong, Z., Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.* 61, 1604-1610, 2001.
16. Surh, Y.J., Hurh, Y.J., Kang, J.Y., Lee, E., Kong, G., Lee, S.J., Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett.* 140, 1-10, 1999.
17. Jang, J.H., Surh, Y.J., Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat Res.* 496, 181-190, 2001.
18. Jang, J.H., Surh, Y.J., Protective effect of resveratrol on  $\beta$ -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med.* 34, 1100-1110, 2003.
19. Choi, Y.H., Kong, K.R., Kim, Y.A., Jung, K.O., Kil, J.H., Rhee, R.H., Park, K.Y., Induction of Bax and activation of caspases during  $\beta$ -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 23, 1657-1661, 2003.
20. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu,

- M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A., Trepel, J.B., Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J Biol Chem.* 272, 28479-28484, 1997.
21. Bhavnani, B.R., Cecutti, A., Gerulath, A., Woolever, A.C., Berco, M., 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, 2001.
  22. Wang, Z., Huang, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y., Wu, J.M., Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med.* 9, 77-79, 2002.
  23. Zoberi, I., Bradbury, C.M., Curry, H.A., Bisht, K.S., Goswami, P.C., Roti, J.L., Gius, D., Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines. *Cancer Lett.* 175, 165-173, 2002.
  24. Lin, J.K., Tsai, S.H., Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* 23, 99-106, 1999.
  25. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S., Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat Res.* 480-481, 243-268, 2001.
  26. Draczynska-Lusiak, B., Chen, Y.M., Sun, A.Y., Oxidized lipoproteins activate NF- $\kappa$ B binding activity and apoptosis in PC12 cells. *Neuroreport.* 9, 527-532, 1998.
  27. Chan, M.M., Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol.* 63, 99-104, 2002.
  28. Docherty, J.J., Fu, M.M., Stiffler, B.S., Limperos, R.J., Pokabla, C.M., DeLucia, A.L., Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res.* 43, 145-155, 1999.
  29. Zou, J., Huang, Y., Chen, Q., Wei, E., Cao, K., Wu, J.M., Effects of resveratrol on oxidative modification of human low density lipoprotein. *Chin Med J(Engl).* 113, 99-102, 2000.
  30. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculesco, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, E.W., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75, 817-825, 1993.
  31. Miyashita, T., Reed, J.C., Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 80, 293-299, 1995.
  32. Morgan, D.O., Principles of CDK regulation. *Nature.* 374, 131-134, 1995.
  33. Sherr, C.J., The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60, 3689-3695, 2000.
  34. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.M., Yin, X.M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 75, 241-251, 1993.
  35. Reddy, B.S., Wang, C.X., Samaha, H., Lubet, R., Steele, V.E., Kelloff, G.J., Rao, C.V., Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res.* 57, 420-425, 1997.
  36. Chiarugi, V., Magnelli, L., Basi, G., Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res.* 40, 603-612, 1994.
  37. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E., p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 74, 957-967, 1993.