C2C12 근아세포에서 산자나무 유래 Isorhamnetin의 산화적 스트레스에 의한 Apoptosis 유발 억제 효과

최영현

동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 항노화연구소

Protective Effects of Isorhamnetin against Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in C2C12 Murine Myoblasts

Yung Hyun Choi

Department of Biochemistry, College of Korean Medicine and Anti-Aging Research Center, Dong-Eui University

Received: September 19, 2015
Revised: November 13, 2015
Accepted: November 23, 2015

Correspondence to: Yung Hyun Choi
Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57 Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan 47227, Korea
Tel: +82-51-850-7413
Fax: +82-51-853-4036
E-mail: choiyh@deu.ac.kr

Copyright © 2015 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: It was investigated the cytoprotective efficacies of isorhamnetin, a flavonoid originally derived from *Hippophae rhamnoides* L., against oxidative stress-induced apoptosis in C2C12 myoblasts.

Methods: The effects of isorhamnetin on cell growth, apoptosis and reactive oxygen species (ROS) generation were evaluated by trypan blue dye exclusion assay, 4',6-diamidino-2-phenylindole staining and flow cytometry. The levels of apoptosis-regulatory and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway-related proteins, and caspase activities (caspase-3 and -9) were determined by Western blot analysis and colorimetric assay, respectively.

Results: Our results revealed that treatment with isorhamnetin prior to hydrogen peroxide (H₂O₂) exposure significantly increased the C2C12 cell viability and, indicating that the exposure of C2C12 cells to isorhamnetin conferred a protective effect against oxidative stress. Isorhamnetin also effectively attenuated H₂O₂-induced apoptosis and ROS generation, which was associated with the restoration of the upregulation of Bax and downregulation of Bcl-2 induced by H₂O₂. In addition, H₂O₂ enhanced the activation of caspase-9 and -3, and degradation of poly (ADP-ribose)-polymerase, a typical substrate protein of activated caspase-3; however, these events were almost totally reversed by pretreatment with isorhamnetin. Moreover, isorhamnetin increased the levels of heme oxygenase-1, a potent antioxidant enzyme, associated with the induction of Nrf2.

Conclusions: Our data indicated that isorhamnetin may potentially serve as an agent for the treatment and prevention of muscle disorders caused by oxidative stress.

Key Words: 3-methylquercetin, Oxidative stress, Reactive oxygen species, Apoptosis, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1

서론

비록 다양한 근 기능 장애 질환의 원인이 점차 규명되고 있지만, 최근 많은 연구들에서 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성 증가로 대별되는 산화적 스트레스(oxidative stress)는 근 기능 장애 질환을 야기하는 가장

중요한 요인 중의 하나로 인식되고 있다. ROS는 정상 세포의 호흡과정에서 발생하는 mitochondria 부산물로서 하나 또는 그 이상의 배우자가 없는 산소 원자를 함유하는 고반응 분자들의 집단이며, 산화적 스트레스는 ROS의 생성과 항산화적 방어(antioxidant defenses) 능력 사이의 불균형에서 비롯된다^{1,2)}. 비록 ROS가 정상 세포의 기능 수행을 위

한 중요한 신호 분자로서 작용을 하지만, 비정상적으로 증가된 ROS는 근육세포의 기능 장애를 유발하며, 근세포의 단백질, 지질 및 핵산 등과 같은 세포 내 거대분자들의 손상을 일으킴으로써 세포 죽음을 야기하는 원인 인자로 작용한다. 따라서 산화방지 전략(antioxidant strategy)은 근육성 이영양증(muscular dystrophy)과 근육 감소증(sarcopenia)을 포함한 근 기능 장애 질환의 예방과 치료에 매우 중요한 접근 방법으로 대두되고 있다^{3,4)}. 아울러 기존 화학 합성물에 비해 부작용이 적으며 복합적인 기능을 가지고 있는 천연물을 이용한 근 기능 강화에 대한 관심이 높아지고 있다.

Isorhamnetin (3-O-β-D-glucopyranoside, C₁₆H₁₂O₇)은 산자나무(*Hippophae rhamnoides* L., Sea Buckthorn)를 포함한 다양한 식물에 함유되어 있는 페놀 화합물(poly-phenolic compound)의 일종으로 quercetin 대사산물의 하나이다⁵⁾. 최근 연구에 의하면 isorhamnetin은 항산화 효과 뿐만 아니라 항염증 및 항암 효과 등 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다⁶⁻⁹⁾. 특히 isorhamnetin은 저밀도 리포 단백질 콜레스테롤의 산화(oxidized low-density lipoprotein)를 방지하고¹⁰⁾, 산화적 스트레스로부터 신경세포의 보호 작용이 있으며^{11,12)}, 이러한 항산화력은 ROS 생성 억제 및 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) 신호계의 활성화와 직접적인 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다^{6,8,13)}. 특히 최근 Pichiah 등¹⁴⁾의 연구에 의하면 산자나무 잎의 에탄올 추출물은 고지방 식이에 의하여 유도된 비만을 adipogenic 및 lipogenic 관련 유전자들의 발현 억제를 통하여 억제시켰다고 보고한 바 있다. 그러나 현재까지 산자나무 추출물의 유효 생리활성 성분 중의 하나인 isorhamnetin에 대한 항비만 관련 연구는 구체적으로 이루어진 바 없다. 본 연구에서는 isorhamnetin의 항비만 효능과 산화적 스트레스 억제와의 연관성에 대한 근거 자료를 도출하기 위하여 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)에 의해 자극된 C2C12 근아세포 모델을 이용하여 isorhamnetin의 항산화 효능을 조사하여 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 isorhamnetin의 처리

본 실험에 사용된 C2C12 근아세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 10% fetal bovine serum (WelGENE Inc., Daegu, Korea)과 100 unit/ml penicillin/streptomycin (WelGENE Inc.)이 함유된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, WelGENE Inc.)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 매 48시간마다 0.05% trypsin-0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 세포를 부유시킨 후 적정 수의 세포(70% 정도의 포화도)를 유지하였다. Isorhamnetin (Fig. 1A)은 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하였으

Fig. 1. Effects of isorhamnetin on H₂O₂-induced growth inhibition in C2C12 myoblasts. (A) Chemical structure of isorhamnetin. (B) Cells were treated with 30 μM isorhamnetin for 1 hour and then incubated with or without 1 mM H₂O₂ for 24 hours. The cells were trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. The results are the mean ± standard deviation values obtained in three independent experiments (*P < 0.05 compared with control group; #P < 0.05 compared with H₂O₂-treated group).

며 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Chemical Co.)에 녹인 후 실험 직전에 DMEM에 적정 농도로 희석하여 처리하였다.

2. C2C12 세포의 생존에 미치는 isorhamnetin의 영향

Isorhamnetin 처리에 따른 C2C12 세포의 생존율을 측정하기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 C2C12 세포를 1×10^5 cells/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 적정 농도의 isorhamnetin을 1시간 동안 처리 후 1 mM의 H_2O_2 (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 처리하고 다시 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 phosphate-buffered saline (PBS)을 각 well당 적정량을 첨가하여 세포를 모았다. 이렇게 모인 세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 세포만 남긴 다음 각각 1 ml의 PBS와 0.5% trypan blue solution (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 2분간 처리하였다. 그 다음 hemocytometer에 세포를 분주한 후 도립현미경 (inverted microscope; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였다.

3. DAPI staining에 의한 apoptosis 유발의 확인

H_2O_2 처리에 따른 C2C12 세포의 apoptosis 유발 여부의 확인 및 isorhamnetin의 보호 효과 확인을 위하여 apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하였다. 이를 위하여 24시간 30 μ M의 isorhamnetin과 1 mM의 H_2O_2 가 단독 또는 혼합 처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포를 모아 fixing solution (3.7% formaldehyde in PBS)을 상온에서 10분 동안 처리하였다. 고정된 세포에 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 2.5 μ g/ml 농도의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 형광현미경(fluorescence microscope; Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 핵 내 염색질의 응축(chromatin condensation) 및 apoptotic body의 형성여부를 관찰하였다.

4. Apoptosis 유발의 정량적 분석

C2C12 세포에서 H_2O_2 처리에 의한 apoptosis 유발 및 isorhamnetin에 의한 apoptosis의 차단 효과를 정량적으로 분석하기 위하여 준비된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 다시 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하고 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl 및 2.5 mM $CaCl_2$ 가 포함된 annexin V binding buffer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 부유시킨 다음 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) 및 propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 처리하여 암실에서 15분 동안 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리하고 flow cytometer (FACS Calibur; Becton Dickinson)를 적용시켜 apoptosis가 유발된 세포(V^+/PI^-)를 형광반응에 따라 정량적으로 분석하였다.

5. ROS 생성 변화 측정

세포 내 ROS 생성 변화를 확인하기 위하여 C2C12 세포에 1 mM의 H_2O_2 를 단독으로 처리하거나 30 μ M의 isorhamnetin을 1시간 전처리 후 H_2O_2 를 재처리하였다. 30분 후, 이들 세포를 모아 fluorescent probe인 10 μ M의 2',7'-di-chlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA; Molecular Probes, Leiden, Netherlands) 용액으로 20분간 염색하였다. 반응이 끝난 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS를 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 단일세포로 분리하였다. 이렇게 준비된 세포를 flow cytometer에 적용시켜 ROS 값의 변화를 분석하였다.

6. Western blot analysis

적정 조건에서 배양이 끝난 세포에 적당량의 lysis buffer (25 mM Tris-Cl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet-P40 [NP-40], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol [DTT])를 첨가하여 4°C에서 1시간 이상 반응시켰다. 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하고 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량하였다. 추출된 단백질을 동량의 Laemli sample buffer (Bio-Rad)와 혼합하

여 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 이를 다시 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시키고 분리된 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 1시간 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 분석하고자 하는 단백질에 해당되는 1차 항체(Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-9, poly [ADP-ribose]-polymerase [PARP], Nrf2, p-Nrf2, HO-1, NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 [NQO-1], thioredoxin reductase 1 [TrxR1] 및 actin)를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 overnight 반응시킨 다음 PBS-T (PBS with Tween 20)로 세척하고 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 변화를 분석하였다. 본 실험에서 단백질 분석을 위하여 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. 및 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse 및 anti-rabbit 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구입하였다.

7. In vitro caspase activity 측정

다양한 조건에서 배양된 C2C12 세포의 caspase-9 및 -3의 활성 정도를 정량적으로 확인하기 위하여 Colorimetric assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다 이를 위하여 상기와 동일한 방법으로 단백질을 추출하고 정량한 다음 150 µg의 단백질이 함유된 50 µl의 sample에 기질 100 µM이 함유된 reaction buffer (40 mM HEPES [pH 7.4], 20% glycerol [v/v], 1 mM EDTA, 0.2% NP-40, 10 mM DTT) 50 µl를 혼합하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 여기에 caspases 종류에 따른 기질 (caspase-3: Asp-Glu-Val-Asp [DEVD]-p-nitroaniline [pNA], caspase-9: Leu-Glu-His-Asp [LEHD]-pNA)을 각각 5 µl 씩 첨가하여 37°C, 암실에서 3시간 동안 반응시킨 후 enzyme-linked immunosorbent assay reader (Mole-

cular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

8. 통계 분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistic Analysis System ver. 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 분석하였다.

결 과

1. C2C12 세포에서 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스에 대한 isorhamnetin의 세포보호 효과

C2C12 세포에서 isorhamnetin의 산화적 스트레스 보호 효과를 조사하기 위한 처리 농도 범위를 설정하기 위해 24 시간 동안 다양한 농도의 H₂O₂와 isorhamnetin을 처리한 후 살아있는 세포의 빈도를 조사하였다. 이를 위하여 C2C12 세포에 H₂O₂를 각각 0.25, 0.5 및 1 mM 농도로 24시간 동안 처리하여 확인한 결과, 1 mM 처리군에서 약 50% 이하의 생존율을 보였으며, isorhamnetin의 경우 50 µM 이상 처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포에서 다소 생존율이 감소하였다(95% ± 0.5%). 따라서 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스에 대한 isorhamnetin의 세포보호 효과 확인을 위한 H₂O₂의 처리 농도는 1 mM로, isorhamnetin의 경우는 30 µM로 설정하였다. 즉 isorhamnetin이 산화적 스트레스에 의해 억제된 C2C12 세포 생존을 회복 능력을 가지는지의 여부를 조사하기 위하여 1 mM의 H₂O₂를 처리하기 1시간 전에 세포독성을 보이지 않았던 30 µM의 isorhamnetin을 처리한 후 24시간 추가 배양한 후 살아있는 세포의 빈도를 비교하였다. Fig. 1B에 나타난 바와 같이, isorhamnetin을 전처리하였을 경우, H₂O₂ 처리에 의한 세포 생존 억제 현상이 유의적으로 차단되었음을 확인하였다. 이는 isorhamnetin이 산화적 스트레스에 대한 C2C12 세포의 세포 보호 효과를 가지고 있음을 의미하는 것이다.

2. 산화적 스트레스에 의한 C2C12 세포 apoptosis 유발에 미치는 isorhamnetin의 영향

산화적 스트레스는 DNA 손상을 야기함으로써 세포의 죽음을 유발하는 것으로 잘 알려져 있으며, 이러한 H_2O_2 와 같은 산화적 스트레스에 의한 세포의 죽음은 프로그램화된 세포 사멸의 일종인 apoptosis 과정을 통하여 일어난다¹⁵⁾. Apoptosis가 일어난 세포에서 관찰되는 다양한 biomarker 중의 하나가 핵 내 염색질의 응축(chromatin condensation)에 따른 apoptotic body의 형성이다. 따라서 산화적 스트레스에 의한 apoptosis 유발에 미치는 isorhamnetin의 영향을 DAPI 염색에 따른 염색질 응축의 생성 억제 정도로 확인하였다. Fig. 2A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, 정상 배지 또는 isorhamnetin이 단독 처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포의 염색질은 핵 내에 광범위하게 골고루 산재해 있었으나 H_2O_2 가 처리된 세포에서는 apoptosis 유발을 의미하는 염색질 응축에 따른 apoptotic body가 형성된 세포의 빈도가 다소 높게 나타났다. 그러나 isorhamnetin (30 μ M)의 전처리군에서는 H_2O_2 에 의한 이러한 핵의 형태적 변형이 상대적으로 억제되었다.

이러한 H_2O_2 에 의한 isorhamnetin의 apoptosis 억제 효능을 정량적으로 분석하기 위하여 annexin V-FITC/PI 염색을 이용한 flow cytometer 분석을 실시한 결과, H_2O_2 만이 처리된 배지에서 24시간 동안 배양된 C2C12 세포에서는 약 38.06%에 해당되는 세포에서 apoptosis (V^+ /PI⁺ 세포의 빈도)가 유발되었다. 아울러 isorhamnetin 단독 처리군에서는 대조군의 수준(3.38%)과 유사하였고(3.54%), isorhamnetin이 전처리된 세포에서 apoptosis 유발 빈도는 19.16% 정도로 나타났다(Fig. 2B). 이상의 결과는 isorhamnetin이 산화적 스트레스에 의한 C2C12 세포의 apoptosis를 효율적으로 억제하였음을 의미하는 것이다.

3. 산화적 스트레스에 의한 C2C12 세포의 ROS 생성에 미치는 isorhamnetin의 영향

세포 내 소기관 중, mitochondria는 산화적 손상에 노출될 경우 손상된 세포의 제거 목적으로 apoptosis 유발 신호를 개시하며, H_2O_2 에 의한 apoptosis 유발은 mitochondria에서의 비정상적인 ROS 생성에 의한 mitochondria 기능 손상과 연계되어 있다^{15,16)}. 따라서 isorhamnetin에 의한

C2C12 세포의 apoptosis 유발 억제 효과가 ROS 생성의 차단에 의한 것인지의 여부를 조사하기 위하여 H_2O_2 처리에 의한 ROS의 생성 차단 여부를 DCF-DA 염색을 통한 flow cytometry 분석을 통하여 조사하였다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이, 1 mM의 H_2O_2 가 30분 동안 처리된 C2C12 세포에서 ROS의 생성이 정상배지(5.41%)에서 배양된 세포에 비하여 약 6.5배(34.94%) 증가되었다. 그러나 isorhamnetin이 전처리된 조건에서 H_2O_2 가 처리된 세포에서는 H_2O_2 단독 처리군에 비하여 약 64% 정도(12.47%)의 ROS 생성 억제 효능을 보였다. 따라서 isorhamnetin은 C2C12 세포에서 산화적 스트레스를 유발하는 H_2O_2 에 대한 강력

Fig. 2. Attenuation of H_2O_2 -induced apoptosis by isorhamnetin in C2C12 myoblasts. Cells were pretreated with 30 μ M isorhamnetin for 1 hour and then stimulated with or without 1 mM H_2O_2 for 24 hours. (A) The cells were fixed and stained with DAPI solution. After 15 minutes incubation at room temperature, stained nuclei were observed using a fluorescence microscope ($\times 400$). (B) The cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Annexin-V and propidium iodide (PI) for flow cytometry analysis. The percentages of apoptotic cells were determined by counting the percentage of Annexin V-positive cells. Each point represents the mean of two independent experiments.

Fig. 3. Effects of isorhamnetin on reactive oxygen species (ROS) generation, and the levels of Bax and Bcl-2 in H_2O_2 -treated C2C12 myoblasts. Cells were pretreated with 30 μM isorhamnetin for 1 hour and then stimulated with or without 1 mM H_2O_2 for 24 hours, (A) The cells were incubated at 37°C in the dark for 20 minutes with culture medium containing 10 μM 5,6'-di-chlorodihydrofluorescein diacetate to monitor ROS production. ROS generation was measured by flow cytometry. The data represent the average of two independent experiments, (B) The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with specific antibodies against Bax and Bcl-2, and the proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence detection system. Actin was used as an internal control.

한 ROS 소거능이 있음을 알 수 있었고, 이는 H_2O_2 처리에 의한 isorhamnetin의 apoptosis 유발 억제에 ROS 생성의 차단과 연관성이 있음을 의미하는 것이다.

4. 산화적 스트레스에 의한 C2C12 세포의 Bcl-2 family 단백질 변화에 미치는 isorhamnetin의 영향

Apoptosis 조절에 핵심적인 역할을 담당하는 Bcl-2 family는 mitochondria의 기능 보존과 mitochondria에 의해 유도되는 apoptosis를 조절하는 intrinsic pathway의 중요한 조절자이다. Bcl-2 family는 Bcl-2와 같은 apoptosis를 억제하는 인자들과 Bax와 같이 apoptosis를 유발하는 인자들로 구성되어 있으며, 이들은 서로 dimer를 형성하고 있다. 하지

만 이들 사이의 균형이 깨어지게 되면 mitochondria의 기능 이상을 유발하게 되고 mitochondria 내막에 존재하고 있는 cytochrome *c*가 세포질로 방출됨으로써 하위단계에 있는 여러 가지 유전자들을 조절하여 apoptosis가 유발된다^{17,18}. 따라서 isorhamnetin의 H_2O_2 에 의한 apoptosis 유발 억제 과정에 Bcl-2 family 단백질의 변화 연관성 여부를 조사한 결과, H_2O_2 의 처리에 의하여 Bax의 발현이 증가된 반면 Bcl-2의 발현은 억제되었다(Fig. 3B). 그러나 이러한 변화가 isorhamnetin이 전처리된 세포에서는 대조군의 수준과 비슷한 발현 양상을 보여 isorhamnetin에 의한 C2C12 세포의 apoptosis 보호 효과는 Bcl-2 family 단백질 발현 변화 차단과 연관성이 있음을 알 수 있었다.

5. 산화적 스트레스에 의한 C2C12 세포의 caspase 활성화에 미치는 isorhamnetin의 영향

Caspase protease는 apoptosis 유발에 중심적인 조절인자로서 작용하는데, 이 효소들은 핵과 mitochondria의 외막에 불활성화 상태인 pro-enzyme 형태로 존재하며 mitochondria 기능 손상과 동반된 intrinsic apoptosis 경로의 활성화를 위해서는 initiator caspase에 해당되는 caspase-9의 활성화에 의한 effector caspase인 caspase-3 또는 -7의 활성이 증가되어야 한다^{19,20}. 따라서 isorhamnetin의 C2C12 세포 보호 효과가 이러한 caspase cascade의 경로 차단에 의한 것인지를 여부를 조사하기 위하여 이들 두 caspase의 발현과 활성화에 미치는 isorhamnetin의 영향을 조사하였다. Fig. 4A에 나타낸 바와 같이 H_2O_2 가 단독 처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포의 경우 비활성인 pro-caspase-9 및 -3의 발현이 매우 감소되었으며, 그들의 효소적 활성이 유의적으로 증가되었다(Fig. 4B). 그러나 isorhamnetin이 전처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포의 경우의 H_2O_2 에 의하여 감소된 pro-caspase-9 및 -3의 발현과 증가된 그들의 활성이 정상 배지에서 배양된 세포수준으로 회복되었다. 한편 PARP는 활성화된 effector caspase에 의하여 분해되는 대표적인 기질 단백질로서 caspase 활성화 의존적 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 되고 있다^{21,22}. Fig. 4A의 결과에서 알 수 있듯이 H_2O_2 가 단독 처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포에 PARP의 단편화 현상이 뚜렷하게 관찰되었으나 isorhamnetin의 전처리에 의하여 PARP의 단

Fig. 4. Prevention of H₂O₂-induced activation of caspase-9 and -3, and degradation of poly (ADP-ribose)-polymerase (PARP) by isorhamnetin in C2C12 myoblasts. Cells were pretreated with or without 30 μM isorhamnetin for 1 hour, then induced with 1 mM H₂O₂ for 24 hours. (A) The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with specific antibodies against caspase-9, -3 and PARP, and the proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence detection system. Actin was used as an internal control. (B) The cells were lysed, and aliquots were assayed for in vitro caspase-9 and -3 activity using DEVD-pNA and LEHD-pNA as substrates, respectively, at 37°C for 1 hour. The released fluorescent products were measured. The data are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments (*P < 0.05 compared with control group; #P < 0.05 compared with H₂O₂-treated group).

편화가 완벽하게 차단되었으며, 이는 caspase의 활성 억제에 따른 결과임을 알 수 있었다.

6. C2C12 세포에서 Nrf2 및 HO-1의 발현에 미치는 isorhamnetin의 영향

한편 Nrf2/HO-1 신호 경로의 활성화는 세포 내 산화적 스트레스 제거와 세포 방어 기작으로 중요한 역할을 하고 있음이 알려져 왔으며, 이 신호계의 활성화 유도를 위한 신규 물질의 발굴은 산화적 퇴행성 질환뿐만 아니라 다양한 대사성 질환의 예방과 치료에 유용하게 적용될 수 있다^{23,24}. 따라서 C2C12 세포에서 isorhamnetin의 산화적 스트레스 억제 효능과 Nrf2/HO-1 신호계의 연관성을 조사하기 위하여 isorhamnetin이 첨가된 배지에서 배양된 세포의 단백질을 분리하여 Nrf2 및 HO-1의 발현 증가 여부를 조사하였다. Fig. 5에 제시된 Western blot analysis의 결과에서 알

수 있듯이 isorhamnetin 처리에 따라 Nrf2의 발현이 증가하였으며, 그에 따른 HO-1의 발현도 증가되었다. 그러나 NQO-1 및 TrxR1과 같은 항산화 관련 유전자들의 발현에는 큰 변화를 관찰할 수 없었다.

고 찰

정상적인 생리학적 조건에서 근육세포를 포함한 대부분의 세포는 superoxide dismutase, catalase, thioredoxin reductase 및 glutathione reductase 등과 같은 내생적 산화방지제 시스템(endogenous antioxidant system)에 포함되어 있는 다양한 항산화 효소들의 기본적 활성화에 의하여 산화적 스트레스로부터 차단할 수 있다^{25,26}. 그러나 이 시스템의 항산화적 용량이 초과할 경우나 이 시스템이 손상을 받았을 경우에는 ROS에 의한 산화적 스트레스가 유발될

Fig. 5. Induction of nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase 1 (HO-1) expression by isorhamnetin in C2C12 myoblasts. Cells were incubated with various concentrations of isorhamnetin for 24 hours. Total cellular proteins were separated on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels and then transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence detection system. Actin was used as an internal control.

것이다.

일반적으로 H_2O_2 에 노출된 세포는 미토콘드리아 손상을 동반한 apoptosis 과정을 경유하는 경우가 대부분이며^{14,27)}, apoptosis에 의한 세포의 죽음은 세포의 위축과 DNA 응축 (DNA condensation)과 같은 형태적 변화의 동반을 특징적으로 가지고 있다. 본 연구에서는 산화적 스트레스에 대한 isorhamnetin의 C2C12 근아세포 보호 효과가 apoptosis 유발 억제와 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, H_2O_2 가 단독으로 처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포에서는 apoptosis 유발을 의미하는 DNA 응축에 따른 apoptotic body의 형성이 매우 증가하였으나 isorhamnetin이 동시에 처리된 조건에서 배양된 세포에서는 정상 및 isorhamnetin 단독 처리된 배지에서 배양된 세포에서와 같이 이러한 형태적 변형이 관찰되지 않았다. 또한 flow cytometry 분석 결과에서도 H_2O_2 가 단독으로 처리된 C2C12 세포에서의 apoptosis가 유발 빈도는 정상 배지에서 배양된 세포의 비하여 6.5배 정도 증가되었으나 isorhamnetin의 복합 처리군에서는 apoptosis가 유발된 세포의 빈도가 현저하게 감소되어 isorhamnetin의 산화적 스트레스 보호 효과는 apoptosis

유도 차단에 의하여 나타난 현상임을 알 수 있었다.

일반적으로 apoptosis 유도 과정은 세포막에 존재하는 death receptor (DR)와 해당 DR 특이적 death legend와의 결합으로 개시되는 DR-mediated extrinsic apoptosis 경로와 mitochondria를 중심으로 apoptosis가 활성화되는 mitochondria-mediated intrinsic apoptosis 경로로 대별된다^{28,29)}. 선행 보고들에 의하면 산화적 스트레스에 동반된 ROS의 증가는 extrinsic apoptosis 경로 활성화에 따른 intrinsic apoptosis 경로의 활성화 증폭과 연계되어 있으나 궁극적으로 mitochondria의 기능 손상에 따른 intrinsic apoptosis 경로 활성화 결정적인 역할을 한다^{30,31)}. 따라서 isorhamnetin에 의한, H_2O_2 처리에 따른 C2C12 세포의 apoptosis 유발 억제가 ROS 생성 억제와 연관되어 있는지를 조사한 결과 H_2O_2 처리에 의하여 증가된 ROS의 생성이 isorhamnetin에 의하여 매우 감소되었다. 이러한 결과는 H_2O_2 가 처리된 C2C12 세포에서 ROS의 생성에 의한 mitochondria 기능 소실을 isorhamnetin이 차단함으로써 intrinsic apoptosis 경로 활성을 억제하여 세포의 생존을 증대시켰음을 의미하는 것이다. 아울러 Bcl-2 family에 속하는 인자들은 mitochondria 막 투과성을 조절하는 단백질로 알려져 있으며, Bax와 같은 pro-apoptotic 단백질은 mitochondria 막으로 이동하여 막 투과성을 증가시킴으로써 mitochondria의 내막과 외막 사이에 존재하는 cytochrome c의 방출을 촉진하여 apoptosis를 유도한다. 반면 Bcl-2와 같은 anti-apoptotic Bcl-2 family 단백질은 mitochondria 막의 탈분극을 억제하여 막 투과성을 감소시켜 apoptosis를 억제한다^{17,18)}. 본 연구의 결과에 의하면, isorhamnetin이 전처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포에서는 H_2O_2 에 의한 Bax의 발현 증가와 Bcl-2의 발현 감소가 관찰되지 않았으며, 이러한 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화 억제가 mitochondria 기능 소실을 차단함으로써 apoptosis 유도를 억제하였을 것으로 생각된다.

또한 apoptosis 유발에 핵심적으로 관여하는 caspase protease 중에서 intrinsic apoptosis 경로의 활성화 개시에 관여하는 것이 caspase-9이며 활성화된 caspase-9는 caspase-3 및 -7과 같은 effector caspase의 활성을 유도하여 PARP와 같은 표적 기질 단백질의 분해와 DNA의 분절을 유도하고 apoptosis를 완결시키는 caspase cascade를 형성한다²¹⁾. 특히 PARP는 정상세포의 DNA 수복이나 유전자 안

정성 유지에 중요한 역할을 하며, apoptosis 유발 시 caspase-3에 의해 분해가 일어나면 이러한 회복 기능이 상실되며 DNA 분절화와 함께 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰이 된다²¹⁾. 본 연구의 결과에 의하면 isorhamnetin은 C2C12 세포에서 H₂O₂ 처리에 의하여 유도된 caspase-9 및 -3의 활성을 억제하였을 뿐만 아니라 PARP의 단편화를 효과적으로 차단하였다. 이는 산화적 스트레스에 의한 C2C12 세포의 intrinsic apoptosis 유도 활성 경로를 isorhamnetin이 억제함으로써 apoptosis로부터 보호 효과가 있음을 보여주는 결과이다.

한편 HO는 heme의 분해에 관여하는 효소로서 현재까지 서로 다른 유전자에 의하여 발현이 조절되는 세 가지의 이형체(HO-1, HO-2 및 HO-3)가 알려져 있는데, HO-2와 HO-3과는 달리 HO-1은 유도성 이형체로서 근육 조직 및 다양한 세포에서 강력한 항산화 효능을 보임으로써 다양한 산화적 스트레스에서 세포를 보호하는 생체방어기능 핵심 효소로 작용을 한다^{32,33)}. HO-1의 발현은 다양한 전사인자들에 의해 조절되고 있으나 그 중에 가장 대표적 전사인자가 Nrf2이며, Nrf2는 산화-환원 감수성 전사인자(redox-sensitive transcription factor)로서 다양한 항산화 효소 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다^{34,35)}. 산화적 방어 신호가 존재하지 않을 경우, Nrf2는 보통 세포질에서 Nrf2의 억제제인 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)과 복합체를 이루고 있지만, Nrf2의 활성 신호에 의하여 Keap1과 분리되면 핵 속으로 이동하여 해당 유전자 promoter의 antioxidant response element 자리에 결합하여 HO-1을 포함한 다양한 항산화 효소들의 전사 활성을 증가시킨다. 따라서 Nrf2의 활성화를 통한 HO-1 발현 증대는 세포내 항산화방어를 위한 중요한 신호 기전으로 인식되고 있다^{36,37)}. 본 연구에서 관찰된 isorhamnetin의 산화적 스트레스에 대한 강력한 방어 작용이 이러한 Nrf2/ HO-1 신호 전달계의 활성화와 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 isorhamnetin이 처리된 C2C12 세포를 대상으로 Nrf2 및 HO-1의 발현 정도를 조사한 결과, isorhamnetin은 HO-1의 발현뿐만 아니라 Nrf2의 발현을 매우 증가시켰다. 그러나 NQO-1 및 TrxR1과 같은 다른 항산화 유전자들의 발현 증가는 관찰되지 않아 isorhamnetin의 항산화 효능은 아마도 Nrf2/HO-1 신호 경로의 선택적 활성화가 관여할 것으로 생각되며 이에 관한 후

속 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서 사용된 isorhamnetin이 처음 분리 동정된 식물은 산자나무이지만, isorhamnetin은 다양한 한약재에 광범위하게 널리 함유되어 있다. 산자나무는 아시아와 유럽이 원산지로서 티벳과 몽고 등지에서뿐만 아니라 중국에서 오랫동안 다양한 질환의 치료 목적으로 사용되어져 왔다³⁸⁾. 산자나무는 항비만 효과뿐만 아니라¹⁴⁾ 항산화¹⁴⁾, 혈행개선³⁹⁾과 항당뇨 효능⁴⁰⁾ 등과 같은 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 비록 한의학에서는 산자나무에 대한 구체적인 적용의 예가 미비하지만 본 연구 결과는 isorhamnetin이 주요 생리활성 물질로서 작용할 수 있는 한약재의 발굴과 이를 이용한 약재의 발굴을 위한 자료로서 사용하고자 한다.

결론

본 연구의 결과를 요약해 보면 isorhamnetin은 산화적 스트레스에 의한 C2C12 세포에서의 ROS 생성을 차단함으로써 이와 연계된 mitochondria의 기능 손상을 억제하였음을 알 수 있었으며, 이러한 항산화 효능이 mitochondria가 매개된 intrinsic apoptosis를 효과적으로 차단하였음을 의미한다. 아울러 isorhamnetin에 의한 Nrf2/HO-1 신호계의 활성화는 isorhamnetin이 C2C12 세포의 내재적 항산화 시스템을 강화시킴으로써 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 것으로 추정된다. 따라서 isorhamnetin의 근아세포에 대한 항산화 효능은 퇴행성 근 골격계 질환의 중요한 원인이 되는 만성적인 산화적 스트레스를 억제함으로써 근 퇴행성 장애 질환을 포함한 다양한 질환의 예방 또는 개선 효과가 있을 것으로 기대된다. 아울러 본 연구 결과는 향후 산자나무 추출물 및 isorhamnetin을 기반으로 하는 항비만 효능 연구를 위한 기초자료로서 활용될 것이다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2015-R1A2A2A01004633).

References

1. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr Med Chem*. 2010 ; 17 : 3262-88.
2. Guerra-Araiza C, Álvarez-Mejía AL, Sánchez-Torres S, Farfan-García E, Mondragón-Lozano R, Pinto-Almazán R, et al. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radic Res*. 2013 ; 47 : 451-62.
3. Mason S, Wadley GD. Skeletal muscle reactive oxygen species: a target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox Rep*. 2014 ; 19 : 97-106.
4. Zhang M, Shah AM. ROS signalling between endothelial cells and cardiac cells. *Cardiovasc Res*. 2014 ; 102 : 249-57.
5. Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Demigné C, Rémésy C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol*. 1998 ; 275 : R212-9.
6. Kong CS, Kim JA, Qian ZJ, Kim YA, Lee JI, Kim SK, et al. Protective effect of isorhamnetin 3-O-beta-D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea* against oxidation-induced cell damage. *Food Chem Toxicol*. 2009 ; 47 : 1914-20.
7. Saud SM, Young MR, Jones-Hall YL, Ileva L, Evbuomwan MO, Wise J, et al. Chemopreventive activity of plant flavonoid isorhamnetin in colorectal cancer is mediated by oncogenic Src and β -catenin. *Cancer Res*. 2013 ; 73 : 5473-84.
8. Seo K, Yang JH, Kim SC, Ku SK, Ki SH, Shin SM. The antioxidant effects of isorhamnetin contribute to inhibit COX-2 expression in response to inflammation: a potential role of HO-1. *Inflammation*. 2014 ; 37 : 712-22.
9. Manu KA, Shanmugam MK, Ramachandran L, Li F, Siveen KS, Chinnathambi A, et al. Isorhamnetin augments the anti-tumor effect of capecitabine through the negative regulation of NF- κ B signaling cascade in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2015 ; 363 : 28-36.
10. Bao M, Lou Y. Isorhamnetin prevent endothelial cell injuries from oxidized LDL via activation of p38MAPK. *Eur J Pharmacol*. 2006 ; 547 : 22-30.
11. Hwang SL, Yen GC. Modulation of Akt, JNK, and p38 activation is involved in citrus flavonoid-mediated cytoprotection of PC12 cells challenged by hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem*. 2009 ; 57 : 2576-82.
12. Qu L, Chen H, Liu X, Bi L, Xiong J, Mao Z, et al. Protective effects of flavonoids against oxidative stress induced by simulated microgravity in SH-SY5Y cells. *Neurochem Res*. 2010 ; 35 : 1445-54.
13. Yang JH, Shin BY, Han JY, Kim MG, Wi JE, Kim YW, et al. Isorhamnetin protects against oxidative stress by activating Nrf2 and inducing the expression of its target genes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 ; 274 : 293-301.
14. Pichiah PB, Moon HJ, Park JE, Moon YJ, Cha YS. Ethanolic extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L) prevents high-fat diet-induced obesity in mice through down-regulation of adipogenic and lipogenic gene expression. *Nutr Res*. 2012 ; 32 : 856-64.
15. Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000 ; 32 : 157-70.
16. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 2006 ; 5 : 145-52.
17. Tomek M, Akiyama T, Dass CR. Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy. *J Pharm Pharmacol*. 2012 ; 64 : 1695-702.
18. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome *c* release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 ; 304 : 437-44.
19. Asakura T, Ohkawa K. Chemotherapeutic agents that induce mitochondrial apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004 ; 4 : 577-90.
20. Jourdain A, Martinou JC. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 ; 41 : 1884-9.
21. Duriez PJ, Shah GM. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol*. 1997 ; 75 : 337-49.
22. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 ; 7 : 517-28.
23. Saso L, Firuzi O. Pharmacological applications of antioxidants: lights and shadows. *Curr Drug Targets*. 2014 ; 15 : 1177-99.
24. Jazwa A, Cuadrado A. Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets*. 2010 ; 11 : 1517-31.
25. McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL Jr. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr*. 2005 ; 25 : 261-95.
26. Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008 ; 5 : 338-49.
27. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 ; 8 : 722-8.
28. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006 ; 25 : 4798-811.
29. Lavrik IN. Systems biology of apoptosis signaling networks. *Curr Opin Biotechnol*. 2010 ; 21 : 551-5.
30. Rashid K, Das J, Sil PC. Taurine ameliorate alloxan induced

- oxidative stress and intrinsic apoptotic pathway in the hepatic tissue of diabetic rats. *Food Chem Toxicol.* 2013 ; 51 : 317-29.
31. Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *J Biol Chem.* 2003 ; 278 : 28443-54.
32. Chen J. Heme oxygenase in neuroprotection: from mechanisms to therapeutic implications. *Rev Neurosci.* 2014 ; 25 : 269-80.
33. Elbirt KK, Bonkovsky HL. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999 ; 111 : 438-47.
34. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009 ; 47 : 1304-9.
35. Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2: an update. *Free Radic Biol Med.* 2014 ; 66 : 36-44.
36. Zhang Y, Gordon GB. A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther.* 2004 ; 3 : 885-93.
37. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* 2008 ; 74 : 1526-39.
38. Suryakumar G, Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Ethnopharmacol.* 2011 ; 138 : 268-78.
39. Basu M, Prasad R, Jayamurthy P, Pal K, Arumugham C, Sawhney RC. Anti-atherogenic effects of seabuckthorn (*Hippophaea rhamnoides*) seed oil. *Phytomedicine.* 2007 ; 14 : 770-47.
40. Wang J, Zhang W, Zhu D, Zhu X, Pang X, Qu W. Hypolipidaemic and hypoglycaemic effects of total flavonoids from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in mice fed a high-fat diet. *J Sci Food Agric.* 2011 ; 91 : 1446-51.