

태반 추출물의 자가포식 활성을 통해 산화스트레스에 대한 슈반세포 보호 효과

임경민¹ · 조광원² · 장철호^{3*}

¹조선대학교 글로벌바이오융합학과,

²조선대학교 생명과학과,

³전남대학교 의과대학 이비인후과

Protective Effect of Placental Extract against Oxidative Stress through Autophagy Activity in Schwann Cells

GyeongMin Lim¹, Gwang-Won Cho², and Chul Ho Jang^{3*}

¹Department of Integrative Biological Science, Chosun University, Gwangju

²Department of Biology, Chosun University, Gwangju

³Department of Otolaryngology, Chonnam National University Medical School, Gwangju

Abstract

Schwann cells play a critical role for myelination in peripheral nerve system. It also plays an important role in nerve protection and regeneration. In peripheral nerve damage, regeneration is induced by the migration and proliferation of Schwann cells which were promoted by suppressing the oxidative stress. In this study, Human placental extract was prepared by homogenization and estimated its efficacy in RSC96 cells. Placental extract exhibited a protective effect against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in RSC96 cells, confirmed by MTT assay. Furthermore, placental extract decreased intracellular ROS against oxidative stress, confirmed by DCFH-DA assay. Autophagy was visualized with Cyto-ID staining to confirm the autophagy activity of placental extracts. The activity of autophagy was confirmed by immunoblot analysis of autophagy flux-associated proteins such as LC3 conversion and SQSTM1 degradation. Thus, we confirmed the antioxidant effect of placental extract to protect RSC96 cells from oxidative stress, and observed that it activated autophagy and restored autophagy flux.

Keyword: Schwann cell, Oxidative stress, Autophagy, Autophagic flux

(Received September 13, 2022; Revised September 27, 2022; Accepted September 27, 2022)

* Corresponding author: jchsavio@gmail.com

1. Introduction

말초 신경 손상은 외상으로 인해 발생하는 심각한 임상 문제이다^[1]. 중추신경계와 달리 말초신경계의 신경 섬유에는 수초가 있어 손상 및 기능이 재생이 될 수 있다^[2]. 말초 신경 손상 후 말단부에 Wallerian Degeneration이 발생하는데, 이는 손상된 신경의 재생에 중요한 단계로 여겨진다^[3]. Wallerian Degeneration은 신경 재생보다 우선시된다^[4]. 이 과정에서 슈반세포는 대식세포가 자가포식(Autophagy)을 통해 미엘린 조각을 삼키도록 도와서 신경 회복 과정을 가속화 할 수 있다. 이것은 손상 후 슈반세포의 생존이 간접적으로 신경 복구 및 재생에 영향을 미치는 것을 보여준다^[5]. 그러나 재생된 축삭이 표적 기관에 도달하는 데 시간이 걸리고 신경 기능이 손상 전 수준으로 돌아가는 경우는 거의 없다^[6]. 따라서 손상 후 기능적 결과를 개선하고 신경 재생을 향상시키기 위해서는 효과적인 약물 및 치료가 필요하다.

산화 스트레스는 부상 후 신경 손상의 주요 원인 중 하나로 여겨지며 말초 신경 손상 후 신경 기능 회복에 부정적인 역할을 한다^[7, 8]. 여러 연구에 따르면 말초 신경 손상 후 산화 스트레스를 억제하면 신경 회복을 가속화하고 신경 손상 후 기능회복을 향상시킬 수 있다^[9, 10]. 따라서 산화스트레스 억제는 신경 손상을 예방하고 말초 신경 손상 후 신경 재생 및 기능 재건에 중요하다.

자가포식은 다양한 세포 유형에서 광범위하게 발생하여 세포 내 단백질 및 손상된 세포 소기관의 축적을 저하시켜 항상성을 유지한다^[11]. 자식작용은 리소좀 분해에 의해 손상된 세포 내 소기관 구성 요소를 제거하는 이화 과정이다. 자식작용은 활성산소종(ROS)과 같은 세포 스트레스에 반응하여 활성화되는 것으로 보고되었다^[12, 13]. 자가포식의 전체 과정은 자가포식 플럭스(Autophagic flux)라고 한다. 미세소관 연관 단백질 경연쇄3(LC3)은 자가포식의 표지자로 자가포식의 전 과정에 관여하는 것으로 확인되었다^[14]. SQSTM1 단백질은 유비퀴틴-LC3 결합 단백질이다^[15]. 자가포식 플럭스 발달의 후기 단계에

서 SQSTM1은 유비퀴틴 기질과 LC3-II사이의 복합체 형성을 매개하고 최종적으로 분해를 위해 Autolysosome으로 들어갈 수 있다. 자가포식 플럭스의 감소는 ROS의 축적 및 미토콘드리아 손상과 밀접한 관련이 있다^[16]. 따라서 자가포식 플럭스의 개선과 ROS의 감소는 산화스트레스를 줄이는 중요한 이유로 작용할 수 있다.

태반은 자궁벽을 성장하는 태아와 연결하는 독특한 기관이다. 태반은 태아의 성장과 발달에 필수적이며 아미노산, 호르몬, 사이토카인, 성장인자, 비타민, 생리활성 펩타이드를 함유하고 있다^[17]. 인간 태반 추출물(Human Placental extract)은 임상 용도로 승인되었으며 건강 개선, 피부 미백, 피로 및 노화 방지에 사용된다^[18-21]. 태반 추출물은 면역 반응을 조절하고 항산화, 항알레르기 및 호르몬 활동, 증식 및 이동 과정을 촉진한다^[22-25]. 또한 강력한 항산화 및 항염 작용을 하는 우라실, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 태반 추출물과 자가포식에 관련된 연구는 많은 조사가 되어있지 않다^[26].

본 연구에서는 슈반세포에서 태반추출물의 산화스트레스에 대한 실험을 수행하였다. 우리는 균질화 방법으로 태반추출물을 준비하고 쥐 슈반세포주인 RSC96 세포에서 실험 하였다.

2. Materials and Methods

2.1 세포 배양

쥐 슈반세포주 RSC96 세포는 10% Fetal bovine serum (FBS) 및 1% penicillin and Streptomycin이 포함된 high-glucose DMEM배지를 이용하여 37°C 와 5% CO₂ 에서 배양하였다.

2.2 세포 생존률 분석

세포 생존률은 MTT 분석으로 평가하였다. RSC96 세포를 96-well plate에 1 x 10⁴ cell/well의 밀도로 접종하였다. 24시간 이후 세포를 2 mg/ml 의 태반 추출물과 24시간 동안 배양한 다음 0.6 mM H₂O₂로 1시간 동안 처리한 다음 MTT 분

석하였다.

2.3 세포내 ROS 검출

세포내 ROS 수준을 평가하기 위하여 DCFH-DA를 이용하여 검출하였다. RSC96세포를 12-well plate에 1×10^5 cell/well로 접종하였다. 24시간 이후 태반 추출물과 24시간 동안 배양한 다음 0.6mM H_2O_2 로 1시간 동안 처리하였다. 1XPBS로 세척한 후 30분동안 37°C에서 20 μ M DCFH-DA를 처리하였다. PBS로 세척 후 Hoechst 33342(1:1000)를 20분 동안 처리하였다. PBS로 세척한 후 Nikon Eclipse Ti2 형광현미경으로 세포를 관찰하고 DS-Ri2 디지털카메라로 촬영하였다. 형광은 Image J 프로그램을 이용하여 정량화 되었다.

2.4 자가포식 검출 분석

Autophagosomes는 CYTO-ID® 자가포식 검출 키트로 측정되었다. RSC96 세포를 24-well plate에 4×10^4 cell/well로 접종한 다음 24시간 이후 2 mg/ml 태반 추출물 또는 500 nM Rapamycin을 30 μ M Chloroquine과 함께 12시간동안 처리하였다. 처리 후 배지를 제거하고 제조사의 지시에 따라 Cyto-ID assay를 진행하였다. 세포는 Nikon Eclipse Ti2 형광현미경으로 세포를 관찰하고 DS-Ri2 디지털카메라로 촬영하였다.

2.5 면역블롯 분석

PMSF와 inhibitor cocktail을 포함하는 50 μ l의 RIPA buffer을 사용하여 RSC96세포에서 총 단백질을 추출하였다. 그 다음 원심분리기를 이용하여 16,000rpm에서 20분 동안 원심 분리하였다. 단백질 농도는 BSA assay kit로 측정하였다. 그런 다음 단백질 샘플을 4°C에서 16시간 동안 SQSTM1(1:500), LC3(1:500), GAPDH(1:1000)에 대한 특이적 항체를 사용한 면역블롯 분석을 실시하였다. 이후 HRP가 결합된 2차 항체를 사용하였다. 단백질 밴드는 ECL 검출 시스템을 이용하여 X-ray film에 노출되었다.

2.6 통계 분석

모든 데이터는 표시된 실험 횟수의 평균 \pm 표준편차로 표시되며 유의성은 Student's t-test를 사용하여 분석하였다. 그룹간의 통계적 비교는 independent t-test를 사용하여 분석되었다.

3. Results and Discussion

3.1 태반 추출물의 산화스트레스에 대한 보호효과

태반 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 태반추출물을 24시간 동안 배양한 다음 0.6 mM H_2O_2 를 1시간동안 처리 하였다. 세포 생존률은 처리되지 않은 RSC96세포에 비해 2 mg/ml 태반 추출물이 전 처리된 RSC96세포에서 유의하게 증가하였으며 태반 추출물만 처리된 군에서는 유의한 세포 증식력의 증가를 확인 할 수 있었다. 따라서 산화스트레스로 유도된 세포 손상이 태반추출물 처리에 의해 감소되었음을 나타낸다.

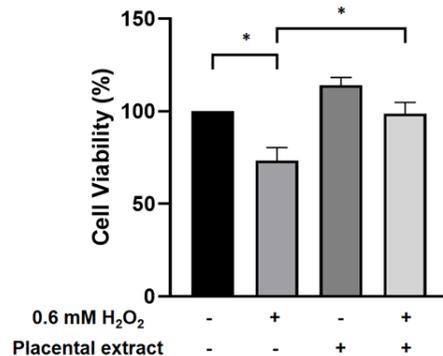


Fig. 1. 태반 추출물의 산화스트레스 보호효과

3.2 태반 추출물의 세포내 ROS의 제거

과도한 수준의 ROS는 산화 스트레스와 세포 손상을 유발한다. 태반 추출물이 처리된 RSC96세포에서 H_2O_2 에 대한 보호효과를 확인하였기 때문에 세포내 ROS수준을 평가하였다. 세포내 ROS수준을 측정하기 위해 0.6 mM H_2O_2 를 1시간동안 처리하였다. 세포내 ROS수준은 태반 추출물이 전 처리된 RSC96세포에서 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 태반추

출물이 산화스트레스 상태에서 ROS를 제거하여 세포를 보호하는 것을 시사한다.

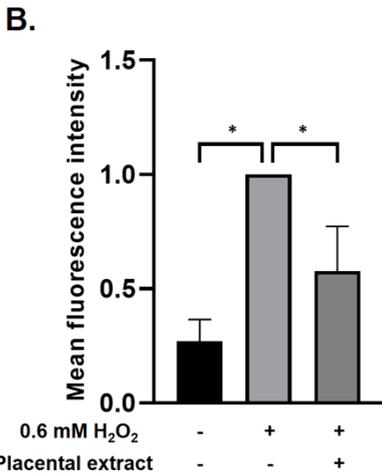
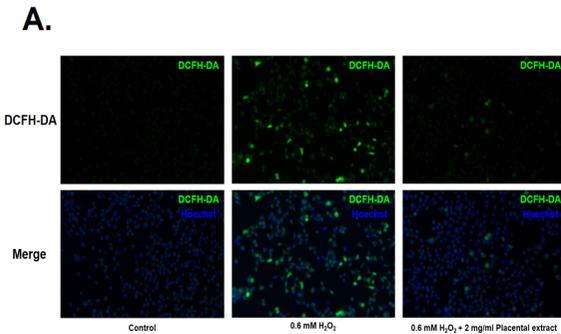


Fig. 2. 태반 추출물의 세포내 ROS 제거

3.3 태반 추출물의 자가포식 활성화

태반 추출물이 자가포식의 활성화에 영향을 미칠 수 있는지 확인하기 위하여 자가포식 활성을 확인하였다. Cyto-ID 분석은 태반 추출물의 자가포식 활성을 측정하는데 사용 되었다. 태반 추출물과 양성 대조군인 라파마이신(Rapamycin)이 처리된 세포는 자가포식 활성을 나타내었다. 이 결과는 태반추출물이 자가포식을 활성화하여 세포내 ROS를 제거 할 수 있음을 시사한다.

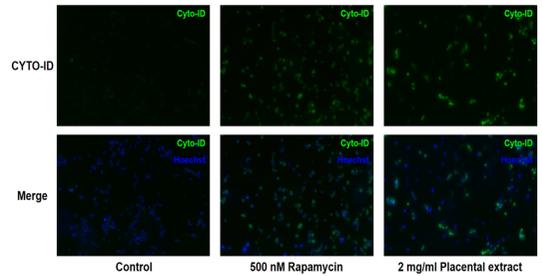


Fig. 3. 태반 추출물의 자가포식 활성화 능력

3.4 태반 추출물의 자가포식 플럭스의 회복 능력

LC3-II 의 형성 및 SQSTM1의 분해를 면역블롯 분석으로 확인하였다. LC3-II의 발현은 태반추출물이 전 처리된 군에서 확연하게 증가하였으며 SQSTM1은 H₂O₂만 처리된 군에서는 증가하는 것을 보여주지만 태반 추출물이 전 처리된 군에서는 확연한 감소를 확인 할 수 있었다. LC3-II의 증가는 Autophagosome의 증가로 볼 수 있으며 SQSTM1의 감소는 자가포식 플럭스로 인해 잘 분해하고 있다는 것을 나타낸다. 따라서 H₂O₂가 처리된 군에서 산화 스트레스로 인하여 고장난 자가포식 플럭스의 모습을 볼 수 있지만 태반 추출물이 전 처리된 군에서는 자가포식 플럭스가 작동하는 것을 볼 수 있다. 결과적으로 태반 추출물은 자가포식 플럭스의 활성을 통하여 세포내 ROS를 제거함을 나타낸다.

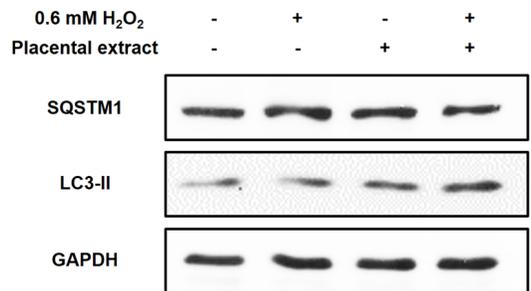


Fig. 4. 태반 추출물의 산화 스트레스에 대한 자가포식 플럭스 관련 단백질

4. Conclusion

슈만세포에서 산화스트레스를 억제하는 것은 말초신경 회복을 가속화 할 수 있으며 손상된 기능 회복

을 향상시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 태반 추출물의 효과를 확인하기 위하여 쥐 슈반세포주인 RSC96 세포에서 H₂O₂로 산화스트레스를 유도하여 실험을 진행하였다. 앞서 데이터에서 보여준 바와 같이 태반 추출물의 처리는 슈반세포에서 산화스트레스를 억제하였으며 ROS 또한 감소하였다. 또한 자가포식 플럭스의 회복으로 인하여 산화스트레스로부터 세포를 보호 할 수 있는 것을 확인하였다. 본 연구는 태반 추출물의 효능을 검증하는 연구자들에게 도움을 줄 것으로 사료된다.

References

- [1] J. Du, G. Zhen, H. Chen, S. Zhang, L. Qing, X. Yang, G. Lee, H. Q. Mao, and X. Jia. "Optimal Electrical Stimulation Boosts Stem Cell Therapy in Nerve Regeneration." [In eng]. *Biomaterials* 181 (Oct 2018): 347-59.
- [2] B. Liu, W. Xin, J. R. Tan, R. P. Zhu, T. Li, D. Wang, S. S. Kan, *et al.* "Myelin Sheath Structure and Regeneration in Peripheral Nerve Injury Repair." [In eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, no. 44 (Oct 29 2019): 22347-52.
- [3] H. S. Loring, and P. R. Thompson. "Emergence of Sarm1 as a Potential Therapeutic Target for Wallerian-Type Diseases." [In eng]. *Cell Chem Biol* 27, no. 1 (Jan 16 2020): 1-13.
- [4] Y. Shen, W. Jian, J. Li, T. Dai, B. Bao, and H. Nie. "Bilateral Wallerian Degeneration of the Middle Cerebellar Peduncles Secondary to Pontine Infarction: A Case Series." [In eng]. *J Neurol Sci* 388 (May 15 2018): 182-85.
- [5] Y. J. Chen, S. A. Nabavizadeh, A. Vossough, S. Kumar, L. A. Loevner, and S. Mohan. "Wallerian Degeneration Beyond the Corticospinal Tracts: Conventional and Advanced Mri Findings." [In eng]. *J Neuroimaging* 27, no. 3 (May 2017): 272-80.
- [6] H. M. Chang, C. H. Liu, W. M. Hsu, L. Y. Chen, H. P. Wang, T. H. Wu, K. Y. Chen, W. H. Ho, and W. C. Liao. "Proliferative Effects of Melatonin on Schwann Cells: Implication for Nerve Regeneration Following Peripheral Nerve Injury." [In eng]. *J Pineal Res* 56, no. 3 (Apr 2014): 322-32.
- [7] L. Zhang, D. Johnson, and J. A. Johnson. "Deletion of Nrf2 Impairs Functional Recovery, Reduces Clearance of Myelin Debris and Decreases Axonal Remyelination after Peripheral Nerve Injury." [In eng]. *Neurobiol Dis* 54 (Jun 2013): 329-38.
- [8] C. Lanza, S. Raimondo, L. Vergani, N. Catena, F. Sénès, P. Tos, and S. Geuna. "Expression of Antioxidant Molecules after Peripheral Nerve Injury and Regeneration." [In eng]. *J Neurosci Res* 90, no. 4 (Apr 2012): 842-8.
- [9] Y. Qian, Q. Han, X. Zhao, J. Song, Y. Cheng, Z. Fang, Y. Ouyang, W. E. Yuan, and C. Fan. "3d Melatonin Nerve Scaffold Reduces Oxidative Stress and Inflammation and Increases Autophagy in Peripheral Nerve Regeneration." [In eng]. *J Pineal Res* 65, no. 4 (Nov 2018): e12516.
- [10] W. M. Renno, L. Benov, and K. M. Khan. "Possible Role of Antioxidative Capacity of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Treatment in Morphological and Neurobehavioral Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury." [In eng]. *J Neurosurg Spine* 27, no. 5 (Nov 2017): 593-613.
- [11] T. Lamark, and T. Johansen. "Aggrephagy:

- Selective Disposal of Protein Aggregates by Macroautophagy." [In eng]. *Int J Cell Biol* 2012 (2012): 736905.
- [12] H. R. Yun, Y. H. Jo, J. Kim, Y. Shin, S. S. Kim, and T. G. Choi. "Roles of Autophagy in Oxidative Stress." [In eng]. *Int J Mol Sci* 21, no. 9 (May 6 2020).
- [13] H. Weidberg, E. Shvets, and Z. Elazar. "Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes." [In eng]. *Annu Rev Biochem* 80 (2011): 125-56.
- [14] S. C. Lai, and R. J. Devenish. "Lc3-Associated Phagocytosis (Lap): Connections with Host Autophagy." [In eng]. *Cells* 1, no. 3 (Jul 30 2012): 396-408.
- [15] W. J. Liu, L. Ye, W. F. Huang, L. J. Guo, Z. G. Xu, H. L. Wu, C. Yang, and H. F. Liu. "P62 Links the Autophagy Pathway and the Ubiquitin-Proteasome System Upon Ubiquitinated Protein Degradation." [In eng]. *Cell Mol Biol Lett* 21 (2016): 29.
- [16] G. Filomeni, D. De Zio, and F. Cecconi. "Oxidative Stress and Autophagy: The Clash between Damage and Metabolic Needs." [In eng]. *Cell Death Differ* 22, no. 3 (Mar 2015): 377-88.
- [17] Leo Donnelly, and Gillian Campling. "Functions of the Placenta." *Anaesthesia & intensive care medicine* 15, no. 3 (2014): 136-39.
- [18] Y. Karasawa, Y. Iwasaki, S. Kagawa, M. Saito, Y. Iwasaki, Y. Kimura, K. Kobayashi, and M. Tsuyuguchi. "Clinical Treatment Test of Melsmon on Menopausal Disorder." *Med. Treat. 1981: 9 (3): 1 10* (1981).
- [19] S. K. Tiwary, D. Shukla, A. K. Tripathi, S. Agrawal, M. K. Singh, and V. K. Shukla. "Effect of Placental-Extract Gel and Cream on Non-Healing Wounds." [In eng]. *J Wound Care* 15, no. 7 (Jul 2006): 325-8.
- [20] J. Y. Choi, K. Lee, S. M. Lee, S. H. Yoo, S. G. Hwang, J. Y. Choi, S. W. Lee, et al. "Efficacy and Safety of Human Placental Extract for Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis: An Open-Label, Randomized, Comparative Study." [In eng]. *Biol Pharm Bull* 37, no. 12 (2014): 1853-9.
- [21] M. H. Kong, E. J. Lee, S. Y. Lee, S. J. Cho, Y. S. Hong, and S. B. Park. "Effect of Human Placental Extract on Menopausal Symptoms, Fatigue, and Risk Factors for Cardiovascular Disease in Middle-Aged Korean Women." [In eng]. *Menopause* 15, no. 2 (Mar-Apr 2008): 296-303.
- [22] J. W. Hong, W. J. Lee, S. B. Hahn, B. J. Kim, and D. H. Lew. "The Effect of Human Placenta Extract in a Wound Healing Model." [In eng]. *Ann Plast Surg* 65, no. 1 (Jul 2010): 96-100.
- [23] S. Togashi, N. Takahashi, M. Iwama, S. Watanabe, K. Tamagawa, and T. Fukui. "Antioxidative Collagen-Derived Peptides in Human-Placenta Extract." [In eng]. *Placenta* 23, no. 6 (Jul 2002): 497-502.
- [24] Y. K. Lee, H. H. Chung, and S. B. Kang. "Efficacy and Safety of Human Placenta Extract in Alleviating Climacteric Symptoms: Prospective, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." [In eng]. *J Obstet Gynaecol Res* 35, no. 6 (Dec 2009): 1096-101.
- [25] L. A. Cole. "Biological Functions of Hcg and Hcg-Related Molecules." [In eng]. *Reprod Biol Endocrinol* 8 (Aug 24 2010): 102.
- [26] D. H. Bak, J. Na, S. I. Im, C. T. Oh, J. Y. Kim, S. K. Park, H. J. Han, et al. "Antioxidant Effect of Human Placenta

Hydrolysate against Oxidative Stress on Muscle Atrophy." [In eng]. *J Cell Physiol* 234, no. 2 (Feb 2019): 1643-58.