

## 노화촉진 생쥐에서 노화에 따른 활성산소 생성 및 항산화능의 변화

정해영\* · 김윤경  
부산대학교 약학대학 약학과  
(Received August 26, 1992)

### Age-associated Alteration in the Hepatic Superoxide Generation and Antioxidant Activities in the Senescence-accelerated Mice

Hae Young Chung\* and Yun Kyung Kim  
College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**Abstract**—Several biochemical parameters related to free radicals were estimated in senile-prone (P) and resistant(R) strains of male senescence-accelerated mice(SAM) at 2, 5 and 11 months of age.

The superoxide generation was increased with age in SAM-R/1 and SAM-P/2. Compared to SAM-R/1, more generation of superoxide was significantly noted in the SAM-P/2 liver. The activities of Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase were decreased during aging and these activities in SAM-P/2 were significantly lower than in SAM-R/1 liver. The activities of glutathione S-transferase were varied with aging, whereas SAM-P/2 showed lower levels compared to SAM-R/1. The gradual decreases of glutathione, protein bound-SH and nonprotein bound-SH contents were noted with increasing age. SAM-P/2 liver contained lesser amounts of glutathione and nonprotein bound-SH compared to SAM-R.

In conclusion, superoxide generation was increased whereas the antioxidant enzyme activities were decreased during aging in SAM-R/1. In addition, SAM-P/2 strain showed more superoxide generation and less antioxidant enzyme activities than SAM-R/1 in the liver, thus we assume that these factors might accelerate the senescence of SAM-P/2 strain.

**Keywords** □ Superoxide, Cu/Zn-superoxide dismutase, glutathione S-transferase, catalase, glutathione, nonprotein bound-SH, protein bound-SH.

노화란 시간경과에 따른 연속적인 현상으로, 일정한 외부환경에 대한 적응력의 점진적 소실로 인해 생명력이 감퇴되어가는 자연적인 과정이다. 노화를 설명하기 위해 많은 가설들이 제안되어 있는데 크게 free radical theory,<sup>1)</sup> cross linking theory,<sup>2)</sup> accumulation of waste product theory<sup>3)</sup> 등을 포함하는 비유전자설(소모설)과 somatic mutation theory, programmed aging theory<sup>4)</sup>의 유전자설로 대별된다. 이 중 활성산소와 관련된 학설이 최근 주목을 받고 있는데, Buffon

(1749)과 Pearl(1928)의 노화의 대사속도설에 의하면 단위 체중당 대사속도, 즉 산소 소비속도가 큰 동물일수록 수명이 짧다고 하였으며, Harman(1956)<sup>5)</sup>에 의하면 free radical(활성산소)에 의한 연속적인 유해 반응의 결과로 노화과정이 진행된다고 하였다.

Free radical이란 분자 혹은 원자 최외각 전자패도에 부대전자를 가진 불안정한 화합물을 말하는데, 생체내 문제가 되는 것은 대사과정에서 부수적으로 생기는 산소원자나 분자에 부대전자가 있는 활성산소로서  $\cdot O_2^-$  (superoxide),  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide),  $\cdot OH$  (hydroxyl radical)이 있으며, 이들은 세포내 과립

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

(mitochondria, microsome, peroxisome) 및 cytosol에서 생성된다.<sup>6)</sup> 이러한 활성산소는 macrophage의 살균작용, 오래된 단백질의 제거 등에 이용되는 필수불가결한 물질이나, 반응성이 커서 생체내 유해한 작용을 나타낼 수 있으며, 생체는 이에 대해 항산화제인 glutathione, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, nonprotein bound-SH, protein bound-SH 등을 이용하여 활성산소를 제거함으로써 생체 homeostasis를 유지하고 있다.

본 연구에 사용된 노화촉진 생쥐(Senescence-Accelerated Mouse)는 경도대학 Takeda 교수 연구실에서 AKR계 생쥐를 형대교배를 계속한 결과 급속한 노화 징조-활동성 저하, 탈모, 피모 팽택 감퇴, 피모 조잡, 안주위 병변, 백내장, 척추 전곡 증가, 수명단축을 나타내는 배를 택하여 이를 "Senescence-prone" = P라 칭하고, 대조 strain으로서 같은 AKR계와 비교해서 정상적인 노화를 나타내는 배를 "Senescence-resistant" = R계라 한 것으로서, SAM-R/1은 평균수명이 18.9개월이며, SAM-P/2는 10.1개월로 노화가 급속히 진행되는 strain이다.

저자들은 노화에 따른 활성산소 생성능의 변화와 이에 대한 생체내 방어기전의 변화를 검토하고자 2, 5, 11개월령의 웅성 SAM-R/1과 SAM-P/2를 이용하여 가령에 따른 superoxide 생성능과 항산화제인 superoxide dismutase, catalase, glutathione, glutathione S-transferase, nonprotein bound-SH 및 protein bound-SH의 변화를 검토하였다.

### 실험방법

**실험동물**—본 실험에 사용된 노화촉진 생쥐(Senescence-Accelerated Mouse, SAM)는 1990년 5월 일본의 Takeda 교수로부터 분양받아 사육하여 온 것으로, 사육실의 온도는  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도는  $50 \pm 5\%$ , 명암은 12시간 주기로 조절하였다.

실험에는 2, 5, 11개월령의 웅성 SAM-R/1, SAM-P/2를 사용하였다.

**세포 분획**—생쥐를 단두하여 간장을 취해 10배의 냉 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 냉각하에서 glass teflon homogenizer로 균질화한 후  $600 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 postnuclear fraction을 얻고, 이를  $12,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 post-

mitochondrial fraction을 얻었다.

### 측정방법

**1) Superoxide 생성능 측정<sup>7-8)</sup>**—Superoxide 유리의 생성은 superoxide dismutase를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원되는 속도를 측정하였다. 즉, 0.1 mM EDTA를 함유한 phosphate buffer (pH 7.8) 420  $\mu\text{l}$ 에 cyanide의 농도가 50  $\mu\text{M}$ 이 되도록 20 mM cyanide 용액을 가한 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 10분간 보온하였다. 이 용액에 postnuclear fraction 300  $\mu\text{l}$ 와 0.1 mM cytochrome C 50  $\mu\text{l}$ 를 넣어 spectrophotometer로 cuvette를  $37^\circ\text{C}$ 로 유지시키면서 550 nm에서 측정하였다. 이때 cytochrome C의 양은 분자흡광계수  $19,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 계산하였다.

**2) Total-SH의 측정<sup>9)</sup>**—0.2 M tris buffer(pH 8.2) 1 ml, 0.01 M DTNB(5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) 0.1 ml, methanol 4 ml를 취한 후 여기에 homogenate 0.1 ml를 취하여  $24^\circ\text{C}$ , 15분간 방치하였다. 이것을 4000 rpm, 30분간, 원심분리한 후 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**3) Nonprotein bound-SH의 측정<sup>10)</sup>**—Saville법에 의해서 측정했으며 homogenate에 동량의 10% trichloroacetic acid 용액을 가하여 원심분리한 상등액을 sample로 하였다. Sample 0.1 ml에 0.01 M  $\text{NaNO}_2$  1 vol.과 0.2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 vol.을 혼합조제하여 0.5 ml를 가한 다음에 5분간 방치시켰다. 0.5% sulfamic acid ammonium 수용액 0.2 ml를 가하여 강하게 혼화한 후 1%  $\text{HgCl}_2$  1 vol과 3.4% sulfanilamide/0.4 N HCl 9 vol 혼합을 1 ml 가하였다. 그리고 0.1% N-1-naphthylethylenediamine/0.4 N HCl 용액 1 ml 가하고 5분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로서 125 nM glutathione 용액을 사용하였다.

**4) Glutathione의 측정<sup>11)</sup>**—Gaitonde법에 의해 cystein의 양을 측정하여, nonprotein bound-SH의 양에서 cystein-SH의 양을 빼어 산출하였다. Homogenate에 10% trichloroacetic acid 동량을 가한 후 원심분리하여 상등액 0.5 ml를 취하고 여기에 빙초산 0.5 ml, ninhydrin시약 (250 mg ninhydrin/빙초산 6 ml + conc. HCl 4 ml)을 조제하여 0.5 ml 가하였다. 이를 10분간 끓인 다음 즉시 냉수중에서 냉각하여 ethanol 3 ml를 가한 즉시 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**5) Glutathione S-transferase 활성 측정<sup>12)</sup>**—Habig

등의 법에 준하여 2.5 mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene 1 ml, 5 mM glutathione 0.5 ml, 0.25 mM phosphate buffer(pH 6.5)를 각각 취한 반응액을 25°C 에서 5분간 preincubation 시킨 후 효소원을 가하여 340 nm에서 3분간 흡광도의 변화를 관찰하여 측정하였다.

6) Catalase 활성 측정<sup>13)</sup>—50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 1.5 ml에 효소원 100 µl를 가하고 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액의 3배 희석액을 1 ml 가하여서 240 nm에서 흡광도 변화를 2분간 관찰하여 측정하였다.

7) Superoxide dismutase 활성의 측정<sup>14)</sup>—7.5 mM xanthine 50 µl와 10 mM hydroxylamine hydrochloride 50 µl에 농도별 희석 시료 0.5 ml, blank 로써 65 mM P.B. (pH 7.8) 0.5 ml를 취해 37에서 10분간 preincubation시켰다. 0.42 unit/ml의 xanthine oxidase를 0.2 ml가한 후 20분간 incubation 시키고 sulfanilamide 용액 1 ml와 naphthylethylenediamine 1 ml를 가하여 실온에서 20분간 방치 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 총 SOD활성을 구한 뒤 4 mM KCN을 0.2 ml 넣고 측정한 Mn-SOD 값을 제하여 Cu, Zn-SOD 값을 구하였다.

### 실험결과

**노화에 따른 SAM-R/1과 SAM-P/2의 간장중 superoxide generation의 변화**—Superoxide generation은 SAM-R/1의 경우 2개월령의 2.13±0.66 nM/mg protein, 11개월령이 6.67±1.20 nM/mg protein을 나타내어 SAM-R/1 11개월령에서 2개월령에 비해 68% 유의성있게 증가하였다(p<0.05). SAM-P/2의 경우도 2개월령이 5.09±0.32 nM/mg protein, 5개월령이 8.33±0.41 nM/mg protein을 나타내어 SAM-P/2 5개월령에서 2개월령에 비해 약 38% 유의성있는 증가를 나타내었다(p<0.05).

SAM-R/1과 SAM-P/2를 각 연령별로 비교해 보면 SAM-R/1 2개월령(2.13±0.66 nM/mg protein)에 비해 SAM-P/2 2개월령(5.09±0.32 nM/mg protein)에서 58% 유의성있게 증가하였으며(p<0.01), SAM-R/1 5개월령 (3.63±0.42 nM/mg protein)에 대해 SAM-P/2 5개월령(8.33±1.41 nM/mg protein)도 56% 유의성있는 증가를 나타내었다.(p<0.05, Fig. 1).

**노화에 따른 SAM-R/1과 SAM-P/2의 간장 중 superoxide dismutase활성의 변화**—Cu, Zn-superoxide

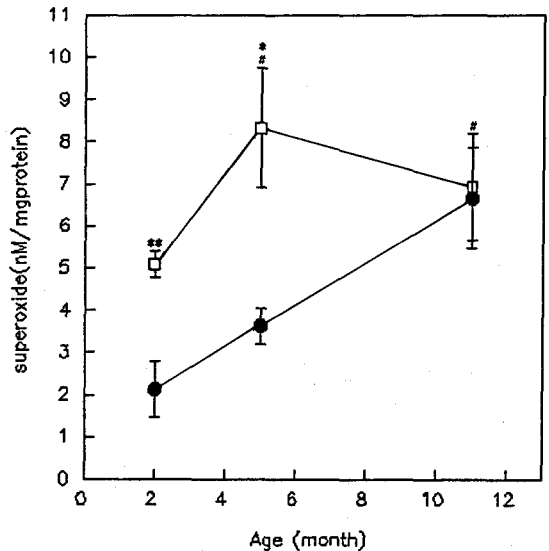


Fig. 1—Changes in superoxide generation (postnuclear fraction) in male SAM-R/1(●) and SAM-P/2(□) at 2,5 and 11 months of age. Data are means±SEM from 5 animals. Statistical significance; \*p<0.05 vs. 2 month of SAM-R/1 or SAM-P/2; \*p<0.05 and \*\*p<0.01 vs. SAM-R/1.

dismutase는 SAM-R/1의 경우 11개월령이 45.60±4.72 NU/mg protein, 5개월령이 56.13±2.76 NU/mg protein, 2개월령이 62.31±5.04 NU/mg protein을 나타내어, SAM-R/1 11개월령은 2개월령에 비해 27% 유의성있는 감소를 나타내었다(p<0.01). SAM-R/1과 SAM-P/2를 각 연령별로 비교해 보았을 때, 5개월령에서 SAM-R/1(56.13±2.76 NU/mg protein)에 대해 SAM-P/2(43.73±2.56 NU/mg protein)는 23% 유의성있게 감소하였으며(p<0.05), 2개월령에서도 SAM-R/1 (62.31±5.04 NU/mg protein)에 대해 SAM-P/2(36.31±7.76 NU/mg protein)는 42% 유의성있는 감소를 나타내었다(p<0.01, Fig. 2).

Mn-superoxide dismutase는 SAM-R/1의 경우 11개월령이 18.58±1.04 NU/mg protein 5개월령이 16.87±0.13 NU/mg protein, 2개월령이 17.38±0.38 NU/mg protein을 나타내었으며, SAM-P/2의 경우 11개월령이 17.38±0.83 NU/mg protein, 5개월령이 18.33±0.90 NU/mg protein, 2개월령이 16.87±0.63 NU/mg protein을 나타내었으나 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다.

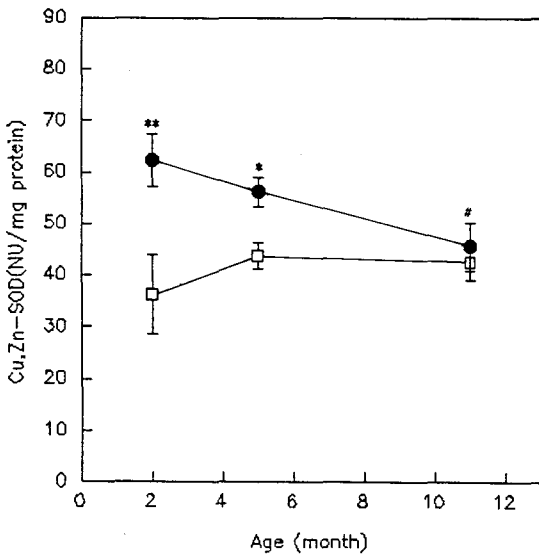


Fig. 2—Cu/Zn-superoxide dismutase(SOD) activities male SAM-R/1(●) and SAM-P/2(□) at 2,5 and 11 months of age. Data are means±SEM from 5 animals. Statistical significance; \* $p<0.01$  vs. 2 month of SAM-R/1; \* $p<0.05$  and \* $p<0.01$  vs. SAM-R/1.

**노화에 따른 SAM-R/1과 SAM-P/2의 간장 중 protein bound-SH, nonprotein bound-SH, glutathione의 변화**—Protein bound-SH는 SAM-R/1 5개월령이  $19.05 \pm 0.20 \mu\text{M/g tissue}$ , SAM-P/2 5개월령이  $14.12 \pm 0.78 \mu\text{M/g tissue}$ 를 나타내어, 5개월령에서 SAM-R/1에 비해 SAM-P/2는 protein bound-SH의 26% 유의성있는 감소를 나타내었으며( $p<0.01$ ), 11개월령에서도 SAM-R/1은  $18.49 \pm 0.78 \mu\text{M/g tissue}$ , SAM-P/2는  $15.79 \pm 1.24 \mu\text{M/g tissue}$ 로서 SAM-R/1에 대해 SAM-P/2에서 15% 유의성있는 감소를 나타내었다( $p<0.05$ , Table I).

Nonprotein bound-SH는 SAM-R/1의 경우 11개월령이  $3.90 \pm 0.60 \mu\text{M/g tissue}$ , 5개월령이  $4.06 \pm 0.14 \mu\text{M/g tissue}$ , 2개월령이  $3.94 \pm 0.06 \mu\text{M/g tissue}$ 를 나타내어 2, 5개월령에 비해 11개월령에서 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다. SAM-P/2의 경우 11개월령이  $2.78 \pm 0.08 \mu\text{M/g tissue}$ , 5개월령이  $3.41 \pm 0.20 \mu\text{M/g tissue}$ , 2개월령이  $3.71 \pm 0.14 \mu\text{M/g tissue}$ 를 나타내어 SAM-P/2 11개월령에서 2개월령에 대해 25% 유의성있는 감소를 나타내었으며( $p<0.01$ ), 5개월령에 대해서도 18% 유의성있는 감소를 관찰할 수 있었다( $p<0.05$ ). SAM-R/1과 SAM-P/2를 각 연령별로 비교해 보았을때, 5개월령에서 SAM-R/1( $4.06 \pm 0.14 \mu\text{M/g tissue}$ )에 대해 SAM-P/2( $3.41 \pm 0.20 \mu\text{M/g tissue}$ )는 16% 유의성있게 감소하였으며( $p<0.05$ ), 11개월령에서도 SAM-R/1( $3.94 \pm 0.06 \mu\text{M/g tissue}$ )에 대해 SAM-P/2( $2.78 \pm 0.08 \mu\text{M/g tissue}$ )는 29% 유의성있는 감소를 나타내었다( $p<0.01$ , Table I).

Glutathione의 양은 SAM-P/2의 경우 11개월령이  $2.75 \pm 0.09 \mu\text{M/g tissue}$ , 5개월령이  $3.36 \pm 0.20 \mu\text{M/g tissue}$ , 2개월령이  $3.60 \pm 0.16 \mu\text{M/g tissue}$ 를 나타내어 SAM-P/2 11개월령에서 2개월령에 대해 24% 유의성있는 감소를 나타내었으며( $p<0.05$ ), 5개월령에 대해서도 18% 유의성있는 감소를 관찰할 수 있었다( $p<0.01$ ). SAM-R/1과 SAM-P/2를 각 연령별로 비교해 보았을때, 5개월령에서 SAM-R/1( $4.01 \pm 0.13 \mu\text{M/g tissue}$ )에 대해 SAM-P/2( $3.36 \pm 0.20 \mu\text{M/g tissue}$ )는 16% 유의성있게 감소하였으며, 11개월령에서도 SAM-R/1( $3.85 \pm 0.06 \mu\text{M/g tissue}$ )에 대해 SAM-P/2( $2.75 \pm 0.09 \mu\text{M/g tissue}$ )는 29% 유의성있는 감소를 나타내었다( $p<0.01$ , Fig. 3).

**노화에 따른 SAM-R/1과 SAM-P/2의 간장 중 ca-**

Table I—Hepatic protein-bound and nonprotein-bound sulfhydryl concentration as a function of age in male SAM-R/1 and SAM-P/2

Age (months)	Protein bound-SH ( $\mu\text{M/g tissue}$ )		Nonprotein bound-SH ( $\mu\text{M/g tissue}$ )	
	SAM-R/1	SAM-P/2	SAM-R/1	SAM-P/2
2	$17.52(\pm 0.36)$	$17.97(\pm 0.35)$	$3.94(\pm 0.06)$	$3.71(\pm 0.14)$
5	$19.05(\pm 0.20)$	$14.12(\pm 0.89)^{**}$	$4.06(\pm 0.14)$	$3.41(\pm 0.20)^*$
11	$18.49(\pm 0.78)$	$15.79(\pm 1.24)^*$	$3.94(\pm 0.06)$	$2.78(\pm 0.08)^{**}$

Data are means±SEM from 6 animals.

Statistical significance; \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$  vs. 2 month of SAM-P/2; \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$  vs. SAM-R/1

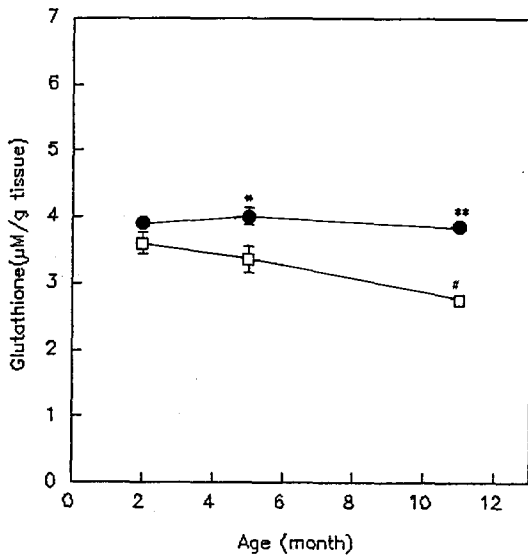


Fig. 3—Glutathione in male SAM-R/1(●) and SAM-P/2 (□) at 2,5 and 11 months of age. Data are means±SEM from 5 animals. Statistical significance; \* $p < 0.01$  vs. 2 month of SAM-P/2: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. SAM-R/1.

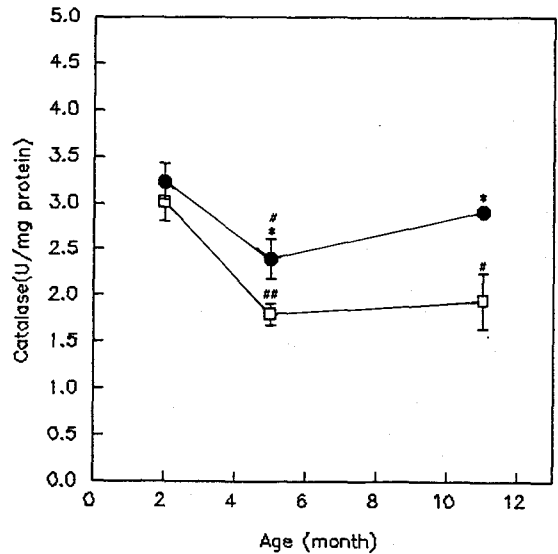


Fig. 4—Catalase activities in male SAM-R/1(●) and SAM-P/2(□) at 2,5 and 11 months of age. Data are means±SEM from 5 animals. Statistical significance; \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. 2 month of SAM-R/1 or SAM-P/2: \* $p < 0.05$  vs. SAM-R/1.

**talase활성의 변화**—Catalase는 SAM-R/1의 경우 11개월령이  $2.91 \pm 0.01$  U/mg protein, 5개월령이  $2.39 \pm 0.02$  U/mg protein, 2개월령이  $3.29 \pm 0.02$  U/mg protein을 나타내어, SAM-R/1 5개월령에서 2개월령에 비해 27% 유의성있는 감소를 나타내었다( $p < 0.05$ ). SAM-P/2의 경우 11개월령이  $1.94 \pm 0.30$  U/mg protein, 5개월령이  $1.79 \pm 0.12$  U/mg protein, 2개월령이  $3.01 \pm 0.02$  U/mg protein을 나타내어 SAM-P/2 11개월령에서 2개월령에 비해 36% 유의성있는 감소를 나타내었으며( $p < 0.05$ ), 5개월령의 경우에도 41% 유의성있게 감소하였다( $p < 0.01$ ). SAM-R/1과 SAM-P/2를 각 연령별로 비교해 보았을 때, 5개월령에서 SAM-R/1( $2.39 \pm 0.22$  U/mg protein)에 대해 SAM-P/2( $1.79 \pm 0.12$  U/mg protein)는 25% 유의성있게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 11개월령에서도 SAM-R/1( $2.91 \pm 0.07$  U/mg protein)에 대해 SAM-P/2( $1.94 \pm 0.30$  U/mg protein)는 33% 유의성있는 감소를 나타내었다( $p < 0.05$ , Fig. 4).

**노화에 따른 SAM-R/1과 SAM-P/2의 간장 중 glutathione S-transferase 활성의 변화**—Glutathione S-transferase는 SAM-R/1의 경우 11개월령이  $41.60 \pm$

$2.27$  U/mg protein, 5개월령이  $39.85 \pm 1.60$  U/mg protein, 2개월령이  $33.12 \pm 2.54$  U/mg protein을 나타내었으며, SAM-P/2의 경우 11개월령이  $24.98 \pm 1.15$  U/mg protein, 5개월령이  $38.62 \pm 4.78$  U/mg protein, 2개월령이  $22.93 \pm 1.22$  U/mg protein을 나타내었다.

SAM-R/1과 SAM-P/2를 각 연령별로 비교해 보았을 때 2개월령에서 SAM-R/1은  $33.12 \pm 2.54$  U/mg protein, SAM-P/2는  $22.93 \pm 1.22$  U/mg protein을 나타내어 SAM-R/1에 대해 SAM-P/2는 31% 유의성있게 감소하였으며( $p < 0.01$ ), 11개월령에서도 SAM-R/1은  $41.6 \pm 2.27$  U/mg protein, 이에 대해 SAM-P/2는  $24.98 \pm 1.55$  U/mg protein으로서 SAM-R/1에 비해 40% 유의성있는 감소를 나타내었다( $p < 0.01$ , Fig. 5).

## 고 찰

대사활성이 높을수록 수명이 짧다는 사실은 수종의 포유동물의 수명이 대사율과 반비례 관계가 성립한다는 사실로부터 알 수 있으며, 또한 산소 소비량이 증가할수록 노화가 촉진된다는 보고들<sup>15)</sup>로부터 활성

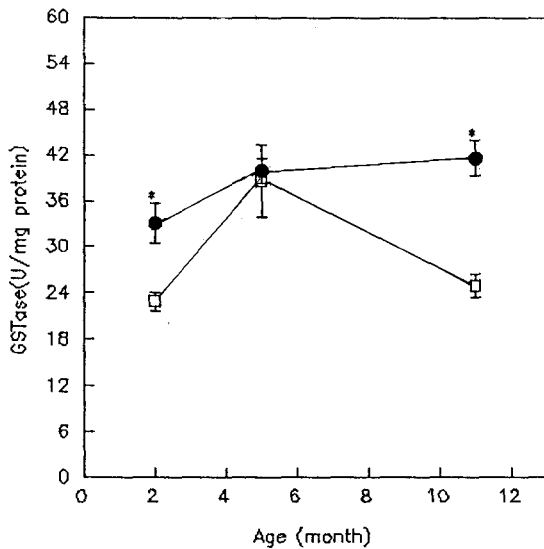


Fig. 5—Glutathione S-transferase activities in male SAM-R/1(●) and SAM-P/2(□) at 2,5 and 11 months of age. Data are means±SEM from 5 animals. Statistical significance; \* $p < 0.01$  vs. SAM-R/1.

산소가 관여할 것이라는 가능성이 시사되었는데, 노화에 의해 각조직에 활성산소 반응산물이 증가한다는 사실은 이미 잘 알려져 있으며 대표적으로 lipofuscin, 과산화 지질의 축적을 들 수 있다.<sup>16)</sup> Sawada 등은<sup>17)</sup> aging rotifer에서, Farmer 등은<sup>18)</sup> housefly, *Musca domestica*에서 노화에 따라 superoxide radical 형성이 증가함을 보고한 바 있으며, 본 실험에서도 가령에 따라 음성 SAM-R/1, SAM-P/2의 간장중 postnuclear fraction에서 superoxide 형성이 증가하였을 뿐 아니라 SAM-R/1에 비해 SAM-P/2에서 더 높은 형성능을 나타내어 노화에 따라 superoxide 형성이 증가함을 관찰할 수 있었다.

노화에 따른 활성산소 반응산물의 축적증가는 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제인 SOD, catalase, glutathione peroxidase, glutathione, protein bound-SH, nonprotein bound-SH 등의 변화와 연관되는데, superoxide는 생체내 SOD에 의해 hydrogen peroxide로 되고 이는 catalase나 glutathione peroxidase에 의해 제거된다고 알려져 있다.

SOD는 metalloproteins으로서 활성부위에 존재하는 금속의 종류에 따라 Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD로 분류되는데 그 기능은 동일하며, 동물조직에

서는 Cu, Zn-SOD와 Mn-SOD만이 발견된다고 한다. Cu, Zn-SOD는 cytoplasm에 Mn-SOD는 mitochondria에 주로 존재하는데, 설치류의 경우 Mn-SOD는 전체 SOD의 약 8% 정도를 차지한다고 알려져 있다.<sup>19)</sup> De Haan 등은<sup>20)</sup> 흰쥐 뇌에서, Ischiropoulos 등은<sup>21)</sup> 흰쥐의 폐에서, Gupta은<sup>22)</sup> 흰쥐의 뇌에서 노화에 따라 SOD 활성이 증가하였다고 보고하였고, Ansari 등은<sup>23)</sup> 변화가 없다고 보고하였으나, 본 실험에서 SOD 활성은 SAM-R/1과 SAM-P/2 모두 가령에 따라 감소하였으며 SAM-R/1보다 SAM-P/2에서 더 낮은 활성을 나타내었는데, 이는 Semsei등이<sup>24)</sup> 흰쥐 뇌에 대해, Cand등이<sup>25)</sup> 흰쥐 간장에 대해 보고한 결과와 일치하였다. Mn-SOD의 경우 Irene등은<sup>26)</sup> 노화에 따라 증가함을 보고하였으나 본 실험에서는 유의성있는 변화를 관찰할 수 없었다. Cu, Zn-SOD는 superoxide 제거과정에서 생기는 부산물인 hydrogen peroxide에 의해 비가역적으로 불활성화될 수 있으며, 노화 적혈구에서 보이는 Cu, Zn-SOD의 glycation증가에 의해서도 그 활성이 감소한다는 보고가 있다.<sup>27-29)</sup> 또한 활성부위에 존재하는 Cu와 Zn의 결핍시에도 활성의 현격한 감소가 보이는데, 소아 적혈구에서 Zn농도가 연령의존적으로 나타났다는 보고가 있다.<sup>30)</sup>

세포내 hydrogen peroxide를 제거하는 효소인 catalase는 생체내 모든 주요기관에 걸쳐 존재하나 특히 간장이나 적혈구에 많으며, 대개 peroxisome 내 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>31)</sup> Catalase 활성의 경우 Semsei등<sup>32)</sup>과 Sohal등이<sup>33)</sup> 노화에 따라 감소함을 보고하였으며, Perez등과<sup>34)</sup> Ansari등<sup>23)</sup> 변화가 없음을 보고하였으나 본 실험에서는 가령에 따라 감소하는 결과를 나타내었다.

Farooqui<sup>35)</sup>등은 흰쥐 간에서 노화에 따라 glutathione의 양이 감소하여 lipid peroxide가 증가한다고 보고한 바 있으며, Perez등은<sup>34)</sup> 흰쥐 폐에서 노화에 따라 glutathione의 양과 lipid peroxidation 정도가 변화가 없음을 보고하였는데, 본 실험에서는 가령에 따라 glutathione과 protein bound-SH, nonprotein bound-SH의 양은 감소하였으며, glutathione S-transferase의 활성도 감소하는 경향을 나타내었다.

Glutathione S-transferase는 세포질 glutathione S-transferase과 mitochondria 및 소포체막 glutathione S-transferase으로 대별되는데 양 glutathione S-transferase는 생체 거의 전체조직에 함유되어 있지만,

간에서 최고의 함량을 나타내며 부신, 정도 등에도 양 glutathione S-transferase가 고농도로 분포한다.<sup>36)</sup> 세포질 glutathione S-transferase의 체내 중요한 역할의 하나는 친 전자성의 발암성 활성대사물의 해독 작용으로서,<sup>36)</sup> 발암물질은 생체내에서 cytochrome P-450<sup>36)</sup>이나 phosphotransferase<sup>37)</sup> 등의 각종 약물대사 효소에 의해서 활성화되어 DNA를 손상하지만, glutathione S-transferase은 이들 소수성잔기를 가지는 활성대사물(R-X)을 기질로 해서, 이것에 glutathione을 공유결합시켜 R-SG로서 안정화시켜서 최종적으로 N-acetyl conjugate로 뇨중 배설시키는 최초단계의 반응을 촉매한다는 사실이 일반적으로 널리 알려져 있다. 소수성 화합물 및 소수성이 높은 잔기를 가지는 화합물을 잔기로 하는 glutathione S-transferase는 다포화지방산의 peroxide(PUFA-OOH)를 기질로해서, GSSG의 생성과 동반하여 alcohol체(PUFA-OH)로 전환시키는 작용도 있다.<sup>38)</sup> Se 결핍증 흰쥐의 간에서 볼 수 있는 Se함유 glutathione peroxidase의 결손시에 세포질 glutathione S-transferase 활성이 증대하는 것은 glutathione S-transferase가 glutathione-peroxidase의 대체 역할을 하고 있다고 볼 수 있으며, 또한 모르모트의 간에서 PUFA-OOH의 소거는 glutathione S-transferase에 의해 행해지고 있다.<sup>38)</sup> 세포질 중에 있는 glutathione-peroxidase나 glutathione S-transferase에 의한 PUFA-OOH의 환원은 mitochondria나 소포체막을 구성하는 인지질의 PUFA잔기가 hydroperoxide가 된 경우에 지질과산화의 연쇄반응을 막기위해 phospholipase A<sub>2</sub>에 의해서 PUFA-OOH가 가수분해되어서 세포질 중에 들어가서 일어난다고 생각되고 있다.<sup>39)</sup>

본 연구에서 SAM-R/1에 비해 SAM-P/2에서 간장 중 superoxide생성능이 현저히 증가되어 있고, 이에 대해 SOD, catalase, glutathione S-transferase활성은 대체로 감소하여 있으며, protein bound-SH, nonprotein bound-SH, glutathione도 낮은 농도에 있으므로, SAM-R/1에 비해 SAM-P/2에서 활성산소에 의해 조직손상의 증가를 가져와서 이것이 노화과정을 더욱 촉진시키는 한 요인일 것으로 사료되었다.

간장중 superoxide생성능 증가 요인에 대해서는 더욱 연구가 필요할 것으로 생각되며, 본 연구실에서는 간장조직의 각 분획별 superoxide생성능 증가 유래에 대해 검토중에 있다.

## 결 론

가령에 따른 정산노화 생쥐 SAM-R/1과 촉진노화 생쥐 SAM-P/2의 간장 중 superoxide 생성능과 이에 대한 방어계로서 SOD, catalase, glutathione, glutathione S-transferase, protein bound-SH, nonprotein bound-SH의 변화를 검토하였다.

Superoxide 생성능은 SAM-R/1, SAM-P/2에서 가령에 따라 유의성있게 증가하였으며, SAM-R/1보다 SAM-P/2에서 더 높은 생성능을 나타내었다. SOD 활성은 SAM-R/1, SAM-P/2에서 가령에 따라 현저히 감소하였으며, SAM-R/1에 비해 SAM-P/2에서 더 낮은 활성을 나타내었다. Catalase 활성도 가령에 따라 감소하였으며, SAM-P/2에서 더욱 감소하였다. 또한, glutathione S-transferase활성은 가령에 따라서는 명확한 변화를 나타내지 않았으나, SAM-R/1에 대해 SAM-P/2는 유의성있는 감소를 나타내었다. Glutathione을 포함한 protein bound-SH, nonprotein bound-SH의 경우도 가령에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며 SAM-P/2에서 보다 명확히 감소하였다.

이상의 결과로부터 SAM-R/1에서 가령에 따른 간장 중 superoxide 생성능은 뚜렷하게 증가하였고 이를 제거하는 항산화능은 감소하였다. 또한, SAM-R/1의 경우보다 SAM-P/2에서 더욱 높은 superoxide 생성능과 낮은 항산화능을 나타내어, 이러한 요인이 SAM-P/2에서 노화과정을 더욱 촉진시킨 것으로 사료되었다.

## 감사의 말씀

노화촉진 생쥐 SAM-R/1 및 SAM-R/2를 분양하여 주신 京都大學 Takeda교수님께 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Balin, A. K.: Testing the free radical theory of aging. In: R. C. Adelman and G. S. Roth, eds., *Testing the Theories of Aging*. CRC Press, Boca Raton, Fla., pp. 37-56(1982).
- 2) Holliday, R.: Cross linking theory. *Science* **213**, 505 (1980).
- 3) Olsonm, C. B.: Accumulation of waste product

- theory. *Mech. Ageing Dev.*, **41**, 17(1987).
- 4) 白倉卓夫, 『老化制御』 造血・免疫系, 朝創書店, pp. 145-162(1977).
  - 5) Harman, D.: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, **11**, 298(1956).
  - 6) Corfran, R. S., Kumar, V. and Robbins, S. L.: *Robbins Pathologic Basis of Disease*, W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 1-38(1989)
  - 7) McCord, J. M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythro cuprein (hemo cuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049(1969).
  - 8) Chan, P. C. and Bielski, B. H. J.: Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1317(1974).
  - 9) Sedlak, J. and Lindsay, R. H.: Estimation of total protein-bound and nonprotein-bound sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, **25**, 192(1968).
  - 10) Higash, T.: Critical review on the determination of glutathione in biological preparations. *Proteins, Nucleic Acid and Enzyme* **33**, 1370(1988).
  - 11) Gaitonide, M. K.: A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.*, **104**, 627(1967).
  - 12) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.: Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130(1974).
  - 13) Chance, B. and Maehly, A. C.: *Assay of Catalase and Peroxidase*. Vol. II, Academic Press, pp. 764-775(1955).
  - 14) Oyanagui, Y.: Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, **42**, 290(1948).
  - 15) Osamu, I.: Lipid Peroxidation and Nutrition, Japanese Society of Nutrition and Food Science, Tokyo, pp. 143-214(1986).
  - 16) Uysal, M., Seckin, S., Kocak-Toker, N. and Oz, H.: Increased hepatic lipid peroxidation in aged mice. *Mech. Ageing Dev.*, **85**, 48(1989).
  - 17) Sawada, M. and Carlson, J. C.: Biochemical changes associated with the mechanism controlling superoxide radical formation in the aging rotifer. *J. Cell Biochem.*, **153**, 44(1990).
  - 18) Farmer, K. J. and Sohal, R. S.: Relationship between superoxide anion radical generation and aging in the housefly, *Musca Domestica*. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 7(1989).
  - 19) Jakoby, W. B.: *Enzymatic Basis of Detoxication*, Academic Press, New York, pp. 318-320(1980).
  - 20) De Haan, J. B., Newman, J.D. and Kola, I.: Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity and susceptibility to lipid peroxidation increases with aging in murine brains. *Brain Res.*, **179**, 13(1992).
  - 21) Ischiropoulos, H., Nadziejko, C. E. and Kikkawa, Y.: Effect of aging on pulmonary superoxide dismutase. *Mech. Ageing Dev.*, **11**, 52(1990).
  - 22) Gupta, A., Hasan, M., Chander, R. and Kapoor, N. K.: Age-related elevation of lipid peroxidation products: diminution of superoxide dismutase activity in the central nervous system of rats. *Gerontology* **305**, 37(1991).
  - 23) Ansari, K. A., Kaplan, E. and Shoeman, D.: Age-related changes in lipid peroxidation and protective enzymes in the central nervous system. *Growth Dev. Aging* **117**, 53(1989).
  - 24) Semsei, I., Rao, G. and Richardson, A.: Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech. Ageing Dev.*, **13**, 58(1991).
  - 25) Cand, F. and Verdeti, J.: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic. Biol. Med.*, **59**, 7(1989).
  - 26) Irene, C. P., Trivier, J.M., Annie, N., Sinet P.M. and Marc, T.: Age-correlated modifications of Copper-Zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities erythrocytes. *Clin. Chem.*, **38**, 66(1992).
  - 27) Sinet, P. M. and Garber, P.: Inactivation of the human Cu, Zn superoxide dismutase during exposure to  $\cdot O_2^-$  and  $H_2O_2$ . *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 411(1981).
  - 28) Salo, D. C., Pacifini, R. E. and Davies, K. J. A.: Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood following oxidative modification by hydrogen peroxide. *Free*



- Rad. Biol. Med.*, **5**, 335(1988).
- 29) Arai, K., Magushi, S., Fujii, S. *et al.*: Glycation and inactivation of human Cu, Zn superoxide dismutase. Identification of the *in vitro* glycated sites. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16969(1987).
- 30) Bettger, W. J., Fesh, T. J. and O'Dell, B. L.: Effects of dietary copper and zinc on erythrocyte stability and superoxide dismutase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **158**, 279(1979).
- 31) Barry, H. and John, M. C. G.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, pp. 86-123(1989).
- 32) Semsei, I., Roc, G. and Richardson, A.: Changes in the expression of superoxide dismutase and catalase as a function of age and dietary restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **620**, 164(1989).
- 33) Sohal, R. S., Arnold, L. and Orr, W. C.: Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP<sup>+</sup> and NADH/NAD<sup>+</sup> in drosophila melangaster. *Mech. Ageing Dev.*, **223**, 56(1990).
- 34) Perez, R., Lopez, M. and Barja de Quiroga, G.: Aging and lung antioxidant enzyme, glutathione and lipid peroxidation in the rat. *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 10(1991).
- 35) Farooqui, M. Y., Day, W. W. and Zamorano, D. M.: Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Comp. Biochem. Physiol.*, [B], **177**, 88(1987).
- 36) 土田成記, 佐藤清美: Glutathione S-transferase isozyme, glutathione 研究のエポシク. 蛋白質, 核酸, 酵素, 臨時増刊, **33**, 1564(1988).
- 37) Watabe, T., Ishizuka, T., Isobe, M. and Ozawa, N.: 7-hydroxymethylsulfate ester as an active metabolite of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Science* **215**, 403(1982).
- 38) Sevanian, A., Muakkash-kelly, S. F. and Montestaque, S.: The influence of phospholipase A<sub>2</sub> and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 441(1983).
- 39) Sevanian, A. and Kim, E.: Phospholipase A<sub>2</sub> dependent release of fatty acids from peroxidized membranes. *J. Free Radical Biol. Med.*, **1**, 263(1985).