

일차 배양한 백서 피부섬유아세포에서 Paraquat 독성에 미치는 SOD와 Catalase의 영향

車鍾希 · 俞養卿[†]

조선대학교 의과대학 생화학교실

[†] 세종대학교 자연과학대학 화학과

(1993. 9. 7 접수)

Effects of Copper/Zinc-Containing Superoxide Dismutase(Cu, Zn-SOD) and Catalase on Paraquat-Induced Injury in Primary Cultured Rat Skin Fibroblast

Jong Hee Cha and Euy Kyung Yu[†]

Department of Biochemistry, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

[†]Department of Chemistry, Se-jong University, Seoul 133-150, Korea

(Received September 7, 1993)

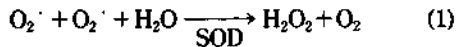
요 약. Cu, Zn-SOD 억제제인 diethyldithiocarbamate(DDC)가 paraquat(PQ)에 의한 세포독성에 미치는 영향을 배양한 백서 섬유아세포에 DDC(30 mM)를 전처리하여 PQ를 100 μ M이 되게 첨가해 배양하여 생존한 세포를 Carmichael 등의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)법에 의해 측정된 결과 DDC 전처리 대조군과 DDC 전처리 PQ 첨가군 사이에 유의한 세포생존율의 차이는 없었다. Catalase 억제제인 3-amino-1,2,4-triazol(AT)를 전처리하여 PQ를 100 μ M을 첨가하고 배양한 섬유아세포의 생존율을 MTT법에 의해 측정된 결과 AT 전처리 PQ 첨가군에서 유의한 세포생존율의 감소를 나타냈다. 섬유아세포를 PQ(200 μ M)로 처리한 후 Cu, Zn-SOD를 첨가하여 생존한 세포수를 각각 MTT법에 의해 측정된 결과 Cu, Zn-SOD 첨가로 인한 세포생존율의 유의한 변화는 없었다. PQ 처리군에 catalase 첨가로 PQ 처리 대조군에 비하여 생존한 세포수가 유의하게 증가되었다. 이상의 실험결과 일차배양한 백서 섬유아세포를 AT로 전처리하면 PQ 독성이 증가되고, catalase 첨가로 독성이 감소되며, DDC 전처리나 Cu, Zn-SOD 첨가로 PQ에 의한 세포생존에 미치는 영향이 적은 점으로 미루어, PQ 독성은 superoxide보다 과산화수소농도와 더 밀접한 관련성이 있는 것으로 추정된다.

ABSTRACT. The participation of superoxide in initiating tissue damage derived from xenobiotics is best illustrated by paraquat intoxication. In the present study, the roles of superoxide dismutase and catalase on paraquat-induced cell injury were investigated using primary cultured rat skin fibroblast. The degree of cell injury was assessed by the conversion of reduced MTT to a blue formazan. Paraquat produced concentration- and time-related cell injury in cultured rat skin fibroblast. Paraquat induced-cell injury was aggravated by pretreatment of aminotriazol (AT : 10 mM), an catalase inhibitor, and attenuated by addition of catalase (100~500 unit/ml). However, the effects of diethyldithiocarbamate (DDC : 10 mM), copper-and zinc-containing superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) inhibitor, and Cu, Zn-SOD on paraquat-induced injury were not significant. These results suggest that hydrogen peroxide might be more responsible factor than superoxide in the pathogenesis of paraquat-induced cell injury.

서 론

광범위 제초제로 이용되는 paraquat(*N,N'*-dimethyl-4,4'-bipyridilium; methyl viologen 이하 PQ로 약함)에 중독되면 치명적 손상이 초래되는데, 독성에 대한 생화학적 기전은 명확하지 않으나, superoxide radicals 생성이 PQ 독성의 주요인으로 생각되고 있다¹⁻³.

SOD는 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키는 효소로서(반응식 1),

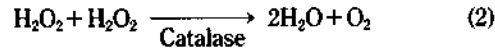


1969년 McCord 등⁴이 소의 혈액에서 SOD를 처음 분리하였는데, 그 이후로 진핵세포에서는 세포질의 Cu, Zn-SOD와 사립체의 Mn-SOD, 원핵세포에서는 세포질의 Cu, Zn-SOD와 사립체의 Mn-SOD, 원핵세포에서는 세포질의 Mn-SOD와 원형질막 외강(periplasmic space)의 Fe-SOD 등 여러가지 동위효소들이 알려져 있다⁵. 1978년 Hassan 등⁶은 PQ가 *E. coli*에서 manganese superoxide dismutase(Mn-SOD) 합성을 유도하고 효소합성이 유도된 세균에 PQ를 부여하면 독성이 감소되므로 PQ 독성은 세포내 SOD 농도와 직접 관련이 있고, 1989년 Phillips 등⁷은 Cu, Zn-SOD가 돌연변이된 초파리에서 PQ에 대한 감수성이 증가되었으며, 1991년 St Clair 등⁸은 사람 Mn-SOD cDNA로 형질전환시킨 생쥐 C3H10T 1/2 세포에서 Mn-SOD 생성을 증가시키면 PQ에 대한 감수성이 감소된다고 보고하였다.

그러나 1990년 Kaelner 등⁹은 Cu, Zn-SOD 활성과 PQ의 세포독성 사이에 연관성이 없으며, 1990년 Seto 등¹⁰은 초파리에서 SOD 활성증가와 PQ 독성이 연관이 없는 것으로 보고하여 PQ 독성에 미치는 SOD의 영향에 대해서는 이견이 있다.

Superoxide anion(O_2^-)은 Haber Weiss 반응에 의해 과산화수소와 반응하여 OH·가 형성되어 핵산, 지질 및 단백질 등을 직접 손상시킬 수 있다¹¹. 따라서 과산화수소는 hydroxyl radicals 형성에 필요하며, hydroxyl radicals는 superoxide보다 반응성이 훨씬 강하다¹².

과산화수소는 catalase(반응식 2)와 peroxidase(반응식 3)에 의해 소거된다.



PQ 독성이 superoxide 생성과 연관이 있는 것으로 알려져 있으므로, superoxide 소거에 관여하는 효소인 SOD와 catalase가 PQ 독성에 미치는 영향을 일차 배양한 백서 섬유아세포에서 Cu, Zn-SOD 활성억제제인 diethyldithiocarbamate(DDC)와 catalase 활성억제제인 aminotriazol(AT)을 이용하여, Cu, Zn-SOD와 catalase를 억제시킨 후 PQ에 의한 세포독성을 측정하고, PQ를 처리한 세포에 SOD와 catalase를 투여하여 세포생존율을 측정하여 PQ 독성에 미치는 SOD와 catalase의 영향을 비교 관찰하였다.

연구방법

시 약. Paraquat(PQ), catalase, superoxide dismutase(Cu, Zn-SOD), 3-amino-1,2,4-triazol(AT), dimethyldithiocarbamate(DDC), fetal bovine serum, sodium bicarbonate, essential minimum medium(MEM), antibiotics-antimycotics liophilized power, Hank's balanced salt solution(Ca^{2+} - Mg^{2+} free) (CMF-HBSS), dimethyl sulfoxide(DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), xanthine, xanthine oxidase, cytochrome c, bovine serum albumin, ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), phenol reagent 등은 Sigma사, hydrogen peroxide(H_2O_2)는 E. Merk사 제품을 사용하였고, 기타시약은 특급 및 1급을 사용하였다.

백서 피부섬유아세포의 배양. 백서 피부섬유아세포는 Freshney의 방법¹³으로 일차 배양하여 실험에 이용하였다. 즉, 백서를 ether 흡입으로 마취시켜 70% ethanol로 전신을 소독한 후 DMF-HBSS로 3회 세척하고 피부조직을 절제하였다. 절제된 조직은 수술용 칼로 잘게 잘라서 CMF-HBSS로 3회 세척하여 10% fetal bovine serum, penicilline(100 U/ml), streptomycin(100 U/ml) 및 nystatin 등을 함유한 MEM에 부유시켜 Falcon culture flask(T-25)에 넣고 CO_2 배양기로 37°C, 5% CO_2 하에서 배양하였고,

3일마다 배양액을 교환해 주었다. 일차 배양된 세포는 0.25% trypsin을 처리하여 계대배양하였으며 12회 계대배양한 후 실험에 사용하였다.

섬유아세포에 대한 PQ 독성측정. 일차 배양한 백서 피부섬유아세포는 10% fetal bovine serum, penicilline(100 U/ml), streptomycin(100 U/ml) 및 nystatin 등을 함유한 MWM에 부유시켜 2×10^5 세포를 6 well culture plate(Falcon)에 3일간 배양한 후 실험에 사용하였다. 실험군은 PQ 첨가군, PQ+catalase 첨가군 및 PQ+SOD 첨가군에서 나누어 PQ는 배양액에 최종 농도가 200 μM 이 되게 첨가하여 4시간 동안 전처리한 후 catalase와 Cu, Zn-SOD(50~400 unit/ml)를 12시간 간격으로 2회 첨가하여 배양시켜 Carmichael 등¹⁴의 방법에 의해서 생존한 세포수를 측정하여 독성을 판정하였다. 이 방법은 생존한 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해서 MTT가 formazan으로 전환된 양을 측정하는 원리로서, 0.5 mg MTT를 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 방치한 후 상층액을 제거하고 HBSS로 1회 세척하여 1 ml DMSO를 가해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DDC와 AT가 PQ의 섬유아세포 독성에 미치는 영향은 DDC와 AT를 배양액에 첨가하여 1시간 동안 전처리하고 PQ(100 $\mu\text{M}/\text{ml}$)를 첨가해 4시간 동안 처리하여 3일간 배양한 후 생존한 세포수를 MTT법에 의해서 측정하였다.

섬유아세포의 SOD 및 catalase 활성도 측정. 섬유아세포는 10% fetal bovine serum, penicilline (100 U/ml), streptomycin(100 U/ml) 및 nystatin 등을 함유한 MEM에 2×10^5 세포를 6 well culture plate(Falcon)를 이용하여 3일간 배양한 후 실험에 사용하였다. SOD는 Crapo 등¹⁵의 방법, catalase는 Aebi¹⁶의 방법에 따라 각각 효소활성을 측정하였고, DDC와 AT를 배양액에 첨가하여 1시간 동안 처리한 후 효소활성을 측정하여 DDC와 AT가 효소활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

단백질 정량. 단백질의 정량은 Lowry 등¹⁷의 방법에 의해서 측정했으며, 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

실험결과의 유의성 판정. 이상의 실험결과는 Student t-test에 의해서 검정하였다.

결과 및 고찰

일차 배양한 백서 피부섬유아세포에 PQ(200 μM)를 1시간, 2시간 및 4시간 동안 처리한 후 생존한 세포수를 MTT법으로 측정한 결과 PQ 처리 시간이 증가할수록 생존 세포수는 감소되었으며, PQ 처리 후 시간경과에 따라 생존한 세포수가 감소되어 3일째에 가장 적었다(Fig. 1).

AT와 DDC를 각각 10 mM, 20 mM 및 30 mM이 되게 세포 배양액에 첨가하고 1시간 경과 후 SOD 활성을 측정한 결과 AT 첨가로 섬유아세포 SOD 활성은 변화가 없었으며, DDC 첨가로 20 mM 및 30 mM 첨가군에서 각각 정상대조군에 비해서 효소 활성이 14.6%, 31.8%씩 감소되었다(Fig. 2). AT와 DDC를 세포배양액에 각각 10 mM, 20 mM 및 30 mM이 되게 첨가하고 1시간 경과 후 섬유아세포 catalase 활성을 측정한 결과 AT 10 mM 및 30 mM 첨가군에서 정상대조군에 비해서 각각 61%, 73% 및 85%가 감소되었고, DDC 첨가로 섬유아세포 catalase 활성은 변화가 없었다(Fig. 3).

배양한 백서 섬유아세포에 DDC를 최종농도가 30 mM이 되게 첨가하고 1시간이 경과된 후 PQ(100 μM)를 4시간 동안 처리하여 3일간 배양한 후, 생존한 세포를 MTT법에 의해 측정된 결과 DDC 첨가로

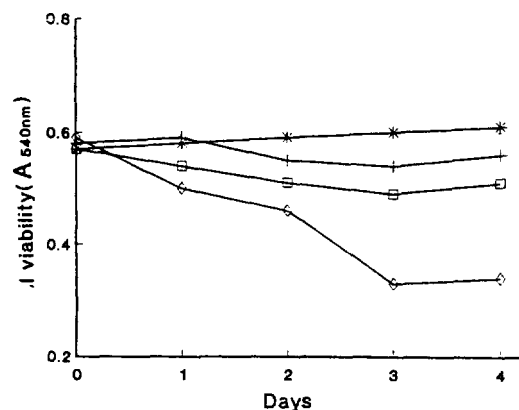


Fig. 1. Effects of paraquat on the viability of rat skin fibroblast. Primary cultured rat skin fibroblast were treated with PQ (200 μM) for 1~4 hours after designated time, viable cells were determined by MTT method. Values are means of duplicated determinations of 4 independent cell preparations. *: Control, +: 1 hr, □: 2 hrs, ◇: 4 hrs.

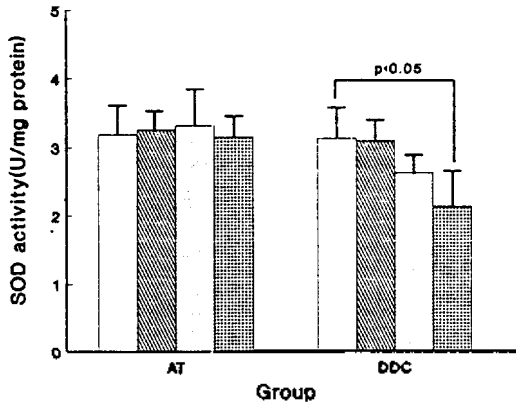


Fig. 2. Effects of aminotriazol (AT) and diethyldithiocarbamate (DDC) on the activity of superoxide dismutase (SOD). Primary cultured rat skin fibroblast were treated with AT (10~30 mM) or DDC (10~30 mM) for 1 hour and SOD activity was determined by Crapo method. Values are mean \pm S.D. of duplicated determinations of 4 independent cell preparations. \square : Control, ▨ : 10 mM, ▩ : 20 mM, ▧ : 30 mM.

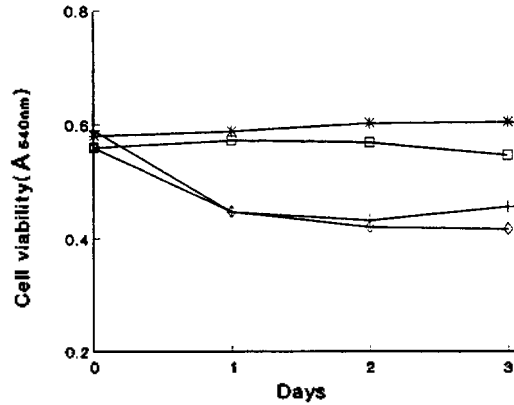


Fig. 4. Effects of diethyldithiocarbamate (DDC) on paraquat-induced cell toxicity. Primary cultured rat skin fibroblast were treated with DDC for 1 hour and then treated with PQ for 4 hours. After designated time, viable cells were determined by MTT method. Values are means of duplicated determinations of 4 independent cell preparations. *: Control, +: DDC (30 mM), ▨ : PQ (100 μM), ⊕ : DDC (30 mM) + PQ (100 μM).

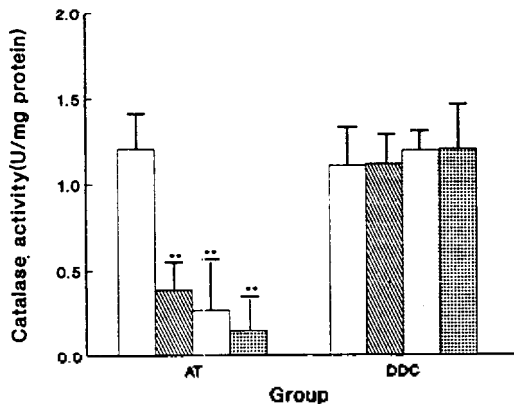


Fig. 3. Effects of aminotriazol (AT) and diethyldithiocarbamate (DDC) on catalase activity. Primary cultured rat skin fibroblast were treated with AT (10~30 mM) or DDC (10~30 mM) for 1 hour and catalase activity was determined by Aebi method. Values are mean \pm S.D. of duplicated determinations of 4 independent cell preparations. \square : Control, ▨ : 10 mM, ▩ : 20 mM, ▧ : 30 mM. ** $p < 0.01$ vs. control group.

세포생존율은 감소되었으나, DDC 전처리 대조군과 DDC 전처리 PQ 첨가군 사이에 유의한 세포 생존율의 차이는 없었다(Fig. 4).

DDC는 Cu, Zn-SOD와 Mn-SOD 중에서 선택적

으로 Cu, Zn-SOD 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으므로 Cu, Zn-SOD 활성을 억제할 목적으로 실험에 이용되고 있다¹⁸. 따라서 DDC를 전처리한 세포에서 PQ에 의한 세포독성의 증가가 나타나지 않아서 Cu, Zn-SOD는 PQ에 의한 세포독성에 미치는 영향이 비교적 적을 것으로 생각된다. AT는 선택적으로 catalase 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데^{19,20}, 본 실험에서 AT가 PQ에 의한 세포독성에 미치는 영향을 배양한 백서 섬유아세포에 AT(10 mM)로 1시간 동안 전처리하고 PQ(100 μM)를 4시간 동안 처리하여 3일간 배양하여 생존한 세포를 MTT법에 의해 측정된 결과, AT 전처리로 인한 세포생존율의 변화는 없었으나, AT 전처리 PQ 첨가군에서 유의한 세포생존율의 감소를 나타냈다. AT 전처리에 의한 PQ 독성증가는 AT가 특이성이 높게 catalase를 억제하므로 catalase 활성감소에 의한 결과로 생각되므로 PQ 독성은 catalase 활성과 밀접한 연관이 있는 것으로 생각된다(Fig. 5).

Superoxide나 과산화수소는 생체막은 쉽게 통과하는 것으로 알려져 있으므로²¹, SOD와 catalase를 세포배양액에 첨가하여 PQ 독성에 미치는 영향을 생존한 세포수로서 관찰하였다.

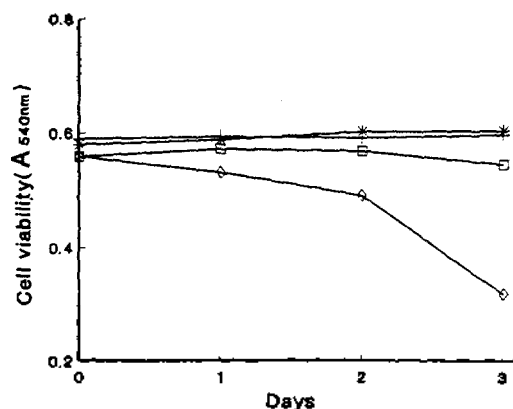


Fig. 5. Effects of aminotriazol (AT) on paraquat-induced cell toxicity. Primary cultured rat skin fibroblast were pretreated with AT for 1 hour and then treated with PQ for 4 hours. After designated time, viable cells were determined by MTT method. Values are means of duplicated determinations of 4 independent cell preparations. *: Control, +: AT (10 mM), □: PQ (100 μ M), ◇: AT (10 mM)+PQ (100 μ M).

PQ(200 μ M)를 4시간 동안 전처리한 섬유아세포에 Cu, Zn-SOD를 50, 100, 200 및 400 units/ml가 되게 첨가한 후 1일, 2일 및 3일째에 각각 MTT법에 의해 생존한 세포수를 측정할 결과 PQ 전처리군에서 Cu, Zn-SOD 첨가로 인한 세포생존율의 유의한 변화는 없었다(Fig. 6).

PQ 전처리군에 catalase 100, 250, 500 및 1000 units/ml 첨가군에서는 catalase 100, 250 및 500 units/ml 첨가군에서 catalase 농도가 증가함에 따라서 PQ 전처리 대조군에 비하여 생존한 세포수가 유의하게 증가하고, 1000 units/ml 첨가군에서는 세포수가 PQ 전처리 대조군에 비하여 세포수가 더 감소되었다(Fig. 7). 이상의 실험결과 일차 배양한 백서 섬유아세포에 대한 PQ 독성은 세포내 catalase 활성과 밀접한 연관성이 있으며, Cu, Zn-SOD는 PQ 독성에 미치는 영향이 적은 것으로 나타나, Phillips 등⁷의 Cu, Zn-SOD 저하가 PQ에 대한 감수성을 증가시킨다는 실험결과와는 상반되며, Kelner 등⁸이나 Seto 등¹⁰의 실험결과와 유사한 소견이다.

Cu, Zn-SOD는 주로 세포질에서 superoxide를 과산화수소로 전환시키는데, 본 실험 결과 PQ의 독성에 미치는 DDC나 Cu, Zn-SOD 영향은 적고,

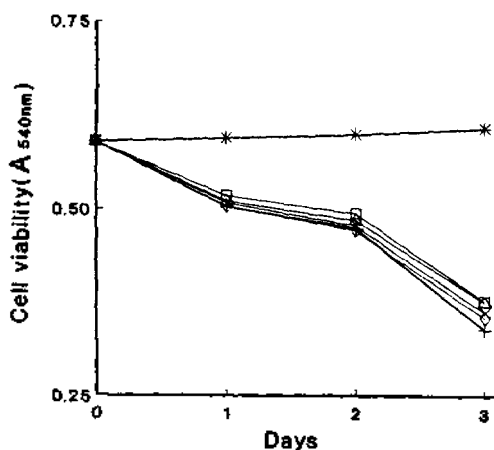


Fig. 6. Effects of superoxide dismutase (SOD) on paraquat-induced cell toxicity. Primary cultured rat skin fibroblast were pretreated with PQ (400 μ M) for 4 hour and then treated with SOD (50~400 units/ml) for 1 day. After designated time, viable cells were determined by MTT method. Values are means of duplicated determinations of 4 independent cell preparations. *: Control, +: PQ, □: PQ+SOD (50 μ /ml), △: PQ+SOD (100 μ /ml), ×: PQ+SOD (200 μ /ml), ◇: PQ+SOD (400 μ /ml).

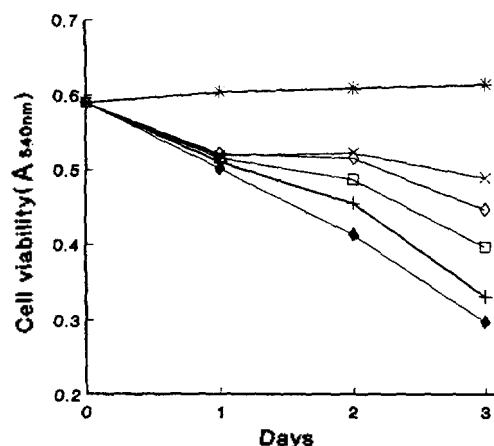
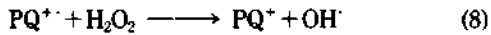
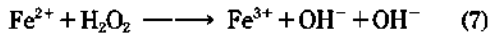
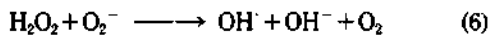
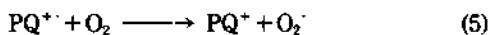
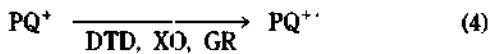


Fig. 7. Effects of catalase (CAT) on paraquat-induced cell toxicity. Primary cultured rat skin fibroblast pretreated with PQ (400 μ M) for 4 hour and then treated with CAT (100~1000 units/ml) for 1 day. After designated time, viable cells were determined by MTT method. Values are means of duplicated determinations of 4 independent cell preparations. *: Control, +: PQ, □: PQ+CAT (100 μ /ml), ◇: PQ+CAT (250 μ /ml), △: PQ+CAT (500 μ /ml), ◆: PQ+CAT (1000 μ /ml).

AT나 catalase에 의한 영향이 큰 점으로 미루어, PQ 독성은 세포질에서 superoxide보다 과산화수소의 농도 증가와 더 밀접한 연관이 있을 것으로 추측된다.

PQ는 세포내 DΓ-diaphorase(DTD), xanthine oxidase(XO) 및 glutathione reductase(GR) 등 여러 효소에 의해서 PQ radicals(PQ^{•+})로 환원되고(반응식 4), PQ radicals은 산소가 존재하며 superoxide를 생성한다(반응식 5)^{22,23}.

Superoxide anion(O₂⁻)은 Haber-Weiss 반응(반응식 6)이나¹¹ Fe²⁺나 Cu²⁺에 의해 촉매되는 Fenton 반응(반응식 7)에 의해^{12,24} 또는 PQ radicals이 직접 과산화수소와 반응하여 반응성이 훨씬 강력한 hydroxyl radical을 생성한다(반응식 8)²⁵.



DDC나 Cu, Zn-SOD 투여로 인해서 초래될 수 있는 superoxide anion량 변화가 PQ 독성은 연관성이 적은 것으로 생각된다.

그러나 AT에 의해서 catalase 활성이 억제되면 세포내 과산화수소 농도가 증가되어 paraquat radicals나 Haber-Weiss 반응 및 Fenton 반응에 의한 hydroxyl radical 생성량이 증가되고, catalase 첨가로 세포내 과산화수소 농도가 감소되면 hydroxyl radicals 생성량이 저하되므로, 세포내 과산화수소는 PQ 독성의 한 요인이 될 것으로 추측된다.

인 용 문 헌

1. Hassan, H. M.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 10846.
2. Bus, J. S.; Aust, S. D.; Gibson, J. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *58*, 749.
3. Sutton, H. C.; Winterbourn, C. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *235*, 116.
4. McCord, J. M.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049.

5. Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7761.
6. Hassan, H. M.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1987**, *253*, 8143.
7. Phillips, J. P.; Campbell, S. D.; Michaud, D.; Charbonneau, M.; Hilliker, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2761.
8. StClair, D. K.; Oberley, T. D.; Ho, Y. S. *FEBS-Lett.* **1991**, *293*, 199.
9. Kelner, M. J.; Bagnell, R. *Alterations of J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10872.
10. Seto, N. O. L.; Hayashi, S.; Tener, G. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4270.
11. Haber, F. and Weiss, J. *Proc. R. Soc. Lond.* **1934**, *147*, 332.
12. Fridovich, I. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *247*, 1.
13. Freshney, R. I. Alan. R. Liss. Inc. New York, **1983**, 104.
14. Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 936.
15. Crapo, C. H.; McCord, J. M.; Fridovich, I. *Methods Enzymol.* Ed. Fleischer, S.; Packer, L. Academic Press: New York, **1978**, *53*, 382.
16. Aebi, H. *Verlag Chemie.* **1983**, *3*, 273.
17. Lowry, O. H.; Rsenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 256.
18. Oberley, L. W. *Superoxide dismutase*; CRO. Press: Florid, **1982**, *2*, 157.
19. Guidet, B. R.; Shah, S. V. *Am. J. Physiol.* **1989**, *256*, 158.
20. Guidet, B. R.; Shah, S. V. *Am. J. Physiol.* **1989**, *257*, 440.
21. Boveris, A.; Cadenas, E. *Superoxide dismutase*; Oberley, L. W., Eds.; CRC Press, Inc.: Florida, **1982**, *2*, 15.
22. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Methods in enzymolgy*; Fleischer, S.; Packer, L., Eds.; Academic Press, Inc.: New York, **1990**, *186*, 1.
23. Sutton, H. C.; Winterbourn, C. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *235*, 116.
24. Fred, J.; Yost, J.; Fridovich, I. *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *175*, 514.
25. Winterbourn, C. C. *FEBS-Lett.* **1981**, *128*, 339.