

## 황 함유 화합물이 동물의 조직과 세포에 미치는 영향

이기섭 · 이정재 · 나상록 · 정희영 · 임계택\*  
전남대학교 생물공학연구소 생활성물질부

### Effects on Mammalian Tissues and Cells by Sulfur Containing Compounds

Ki-Seoup Lee, Jeong-Chae Lee, Sang-Lok Na, Hee-Young Jung and Kye-Taek Lim\*

#411, Department of Bioactive Substances, Institute of Biotechnology, Chonnam National  
University, Kwangju, 300 Youngbong-Dong, 500-757, Korea

(Received October 20, 1998)

(Accepted December 21, 1998)

**ABSTRACT :** To know the stress response and antioxidative effect of sulfur containing compounds, we observed the expression of the stress protein (heat shock protein; inducible protein) from mouse tissues and evaluated the protective effects to hydroxyl radical in mouse brain cell culture. Cysteine, methionine or sodium sulfide was fed by oral administration of 1 ml/per 6hr/three times with 1 mM, 2 mM or 3 mM to mouse, respectively. After that, the stress proteins were extracted from mouse tissues and analyzed the features of expression. The stress proteins by sulfur containing compounds were showed different aspects in the kinds and concentrations of their compounds, and in the tissues of mouse. In the liver, the stress proteins were appeared at different time on the concentration of sulfur containing compounds and had less than 20 KDa as small molecules. In general, the molecular weights of stress protein in the spleen were evaluated from 32 KDa to 50 KDa, and the induced times were relatively late at high concentration of cysteine, early at low concentration of methionine or sodium sulfide. The stress proteins in mouse muscle were detected mostly between 24 hr and 48 hr after treatment of sulfur containing compounds. Their molecular weights were 15~24 KDa. In the antioxidative effects of sulfur containing compounds to hydroxyl radical, cell viabilities were measured by 63.2% at 10  $\mu$ M, 65.5% at 50  $\mu$ M, 68.6% at 100  $\mu$ M, 78.3% at 150  $\mu$ M, or 83.0% at 200  $\mu$ M of cysteine, respectively. At addition of methionine, the cell viabilities were assessed as 58.1% at 10  $\mu$ M, 62.8% at 50  $\mu$ M, 75.7% at 100  $\mu$ M, 78.6% at 150  $\mu$ M, and 79.2% at 200  $\mu$ M after 4 hrs exposure with 20 mU/ml glucose oxidase (GO) system, while the numbers of live cells to hydroxyl radicals in treatment of sodium sulfide were showed 48.6% at 10  $\mu$ M, 54.8% at 100  $\mu$ M, 51.8% at 150  $\mu$ M, and 51.6% at 200  $\mu$ M in the neuronal cells. In the inhibitory effects on the proliferation of tumor cells, percentages of dead cells of the CT-26 or HeLa cell were generally less than 30% even 48 hr after addition of sulfur containing compounds. Conclusively, the results of these experiments indicate that stress protein by sulfur containing compounds can be used as physiological indicator for animal nutrition and for environment, and also that cysteine and methionine can play critical roles as an antioxidant.

**Key Words :** Sulfur containing compounds, Stress protein, Antioxidant

## I. 서 론

현대인의 질병을 일으키는 요인은 환경오염에 의한 내분비 장애물질(환경호르몬), 스트레스, radical 등 여러가지가 있지만, 그 중에서도 산소가 결합된 대사산

물중 active oxygen radical은 노인성 뇌질환과 노화, 암 등을 유발하는 것으로 많은 학자들은 말하고 있다.

특히 인체에 대한 산소자유기(oxygen free radical)는 정상적인 생체내에서 신호전달 및 면역체계 등의 여러 가지 생리작용에서 생명 현상을 유지하도록 작용하지만(Burdon, 1995; Yuichiro 등, 1997), 다른 한편 과도한 radicals 생성은 생체내 여러 조직에서 세포막, 단백질,

\*To whom correspondence should be addressed

혹은 DNA의 산화 그리고 돌연변이를 초래함으로써 세포 기능에 장애를 일으켜(Adelman 등, 1988) 비정상적인 대사뿐만 아니라 세포의 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Ames 등, 1993; Packer, 1995). 또한 *in vitro* fertilization(IVF)에서는 생식세포의 분화 과정중에 radical이 자연적으로 생성되어 수정률은 물론 수정 되더라도 배반포가 되기 전에 많은 수정란이 죽어 생존률이 낮아지는 원인이 되기도 한다(Yang 등, 1998). 뿐만 아니라, Mann 등 (1997)은  $H_2O_2$ 가 Endonuclease 효소의 활성을 높여 DNA를 oligosome 형태로 파괴하여 radical이 apoptosis에도 관여한다는 것을 보고하였다(Thomas 등, 1994). 이러한 많은 문제들 중에서도 최근에는 radical과 암의 연관성에 대한 연구가 활발히 진행 되고 있는데, Kuratko(1988)에 따르면 radical에 의한 손상을 막는 항산화 효소(manganese superoxide dismutase)는 암증식 억제성이 있으며, 활동적인 암세포에서는 이 항산화 효소가 부재, 결핍되어 있다고 보고함으로써 radical이 암의 발생과 증식에도 관여한다는 사실을 입증하고 있다.

따라서 최근 많은 학자들은 이러한 과도한 radical을 제어하여 radical로 인해 발생하는 여러 가지 인체에 미치는 손상을 예방하기 위하여 항산화에 대한 많은 연구를 진행하고 있다. 최근 알려진 항산화제중 많은 효소가 황과 같은 6족의 원소를 가지고 있는 것으로 밝혀져, 많은 연구소에서 sulfur(S)가 포함하는 화합물의 항산화적 성격을 이용한 radical 손상 방어에 대한 연구가 계속 진행되고 있다. 그 이유는 황함유 화합물은 그 원소의 화학적 특성상 원자가가 -2가임으로 주로 화합물 내에서 SH(thiol) 형태로, 때로는 S 형태(oxidation form)로 생체분자내에서 존재하여 생체의 대사 과정에서 산화, 환원에 깊숙히 관여하여(한 등, 1996) radical에 의한 세포손상을 막을 수 있기 때문이다. 실제로 Gillissen과 Nowak(1998)의 연구에 따르면 N-acetyl-L-cysteine(NAC)은 cysteine으로 쉽게 탈아세틸화 되어 glutathione의 전구체로 쓰이며, glutathione은 SH 그룹이 존재하여 활성 산소인  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ , HOCl 등을 환원 시키므로 radical에 의한 손상을 억제한다. 뿐만 아니라 황함유 화합물은 오래 전부터 생체활력 향상과 살균작용 물질로써 한방에서 사용되어져 왔으며(방약합편, 1991; 현대인의 건강비법, 1988), -2가 화학적 특이성 때문에 중금속 독성을 해독시키는데도 이용되어져 왔다(한 등, 1996). 또한 황함유 화합물인 sulfoxide, disulfides, trisulfides 및 thiophenes는 지질의 양적인 저하(Sainani 등, 1979), 항응혈작용 유발(Bordia, 1978), 미생물활동 억제(Subrahmanyam 등, 1958) 및 fibri-

nolity에서의 향상(Bordia 등, 1977) 등의 많은 대사 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 암에 있어서도 sulindac sulfide(SS)는 대장암세포 증식억제에도 효과를 나타내고(Qiao 등, 1997), 마늘, 양파에서의 지용성 유기황 화합물과 수용성 유기황 화합물이 역시 화학적 발암 현상에 대한 억제력을 가지고 있다고 보고되었다(Fukushima 등, 1997).

이와 같이 생체활성 물질인 황함유 화합물은 생체 내 여러 대사작용에 깊이 관여를 하고 있지만, 동물에 대한 황함유 화합물의 급여 수준과 급여량의 과잉, 결핍에 대한 생화학적 증후는 알려져 있지 않고 역시 황의 급여에 대한 적당한 기준도 설정 되어 있지 않다(Pillay, 1980; Shunrou, 1996). 그 이유중 하나는 동물체에 황의 결핍이나 과다 영향으로 나타나는 외관상 증상은 인지할 수 없지만 미시적으로는 생명체내의 생리적인 변화가 많이 일어나므로 동물체내에서 stress protein(heat shock protein; inducible protein)의 발현에 대한 경시적인 변화를 동물의 환경요인에 의한 stress inducer의 지표로써 이용하였다(이와 임, 1997). Stress protein은 생체에 비생리적인 생활 환경(stress)이 주어졌을 때, 생명체의 환경에 대해 적응하기 위한 반응의 표현으로써, stress inducer의 종류나 양에 따라 각각 특이하게 생성되거나 표현되며(Lindquist, 1986; Pelham, 1985), 이 때 유도생성되는 단백질의 발현시간, 크기와 양도 특이적으로 표현되기 때문에 생명체의 환경적인 변화 및 생리적 상태를 검진 하는데 지표로 사용할 수가 있는 것이다(Stringham과 Candido, 1993).

따라서 본 연구에서는 황함유 화합물이 생체에 미치는 영향과 특성을 이해하기 위해 S를 함유하고 있는 유기 화합물으로써 cysteine과 methionine, 무기 화합물으로써 sodium sulfide를 선택하여 mouse에 급여한 후 황함유 화합물에 의해 유도되는 stress protein의 발현과, 다른 한편으로는 황함유 화합물의 radical에 대한 항산화력을 mouse embryo brain cell culture system에서 측정하였고 아울러 황함유 화합물의 세포에 미치는 생물학적 기능을 알아보기 위하여 CT-26 cell과 HeLa cell의 성장에 미치는 영향을 연구 검토했다.

## III. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 공시재료

Mouse(ICR)는 대한실험동물센터에서 구입하였고 사

육환경은 이와 임(1996)의 방법에 따라 사육했으며, CT-26 cell과 HeLa cell은 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였다.

## 2) 시약

Cysteine(C 7755), methionine(M 6039), sodium sulfide ( $\text{Na}_2\text{S}$ ; S 4766), D(+)-glucose(G 7528), glucose oxidase(G 8135), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheyltetrazolium bromide(MTT; M 5655) 그리고 모든 세포 배양액은 Sigma사에서 구입하였고 그 외의 실험에 사용한 시약도 순수도(99% 이상)가 높은 것을 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 황함유 화합물의 급여

이와 임(1997)의 방법에 따라 8주령된( $22 \text{ g} \pm 5$ ) mouse를 각 처리군에 5마리씩 나누어 황함유 화합물인 cysteine, methionine 및 sodium sulfide를 각각 1 mM, 2 mM, 3 mM로 증류수에 용해시킨 후 6시간 간격으로 카테터를 이용해 1 ml씩 3회 급여하고 급여 후 3, 6, 12, 24, 48시간에 쥐를 경추분리하여 도살하고 근육, 비장, 간을 절취하여 PBS(Phosphate buffered saline, pH 7.4)에 세척한 후  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하여 이 실험의 sample로 사용하였다.

### 2) 유도단백질 측정

동결된 각 조직 1 g을 취하여 이와 임(1997)의 방법에 따라 7 ml의 lysis buffer [150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.05% SDS, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), 0.1 ml(v/v) Nonidet P-40, 10 mg/ml soybean trypsin inhibitor]를 각 조직에 섞어 균질시키고 3시간 동안 얼음위에서 정치시킨 후 13,000 rpm(VS-15000 CFN)에서 20분간 원심 분리하였다. 그 후 상등액에 1% trichloroacetic acid (TCA)로 단백질을 추출한 후 desiccator안에서 건조한 다음 Lowry(1951)의 방법에 따라 단백질을 정량하고,  $-20^\circ\text{C}$ 에 저장하여 시료로 사용하였다. 전기영동은 Mini protein II Cell(Bio Rad)에 0.1% SDS 및 15% acrylamide gel을 사용하여 실시하였고, 이 때 각 lane에 loading된 단백질량은 80  $\mu\text{g}$ 이었으며, gel의 염색은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 하였다.

### 3) Newborn mouse brain tissue culture

임과 심(1997)의 방법에 따라 임신 13일령인 mouse의 태아에서 뇌를 절취하여 PBS로 씻고 확대현미경하

에서 물리적으로 잘게 세절하여 0.25% trypsin, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase을 처리한 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 15분간 배양시키고  $1,000 \times g$ 으로 원심분리한 다음 상층액을 제거하였다. 그 후 PBS로 재부유 시킨 후 원심분리( $800 \times g$ )하여 단일 세포로 만든 후 5% serum(fetal bovine serum)을 포함한 minimum essential medium(MEM)과 항생제를 첨가하여  $1 \times 10^5$  cells/ml 정도로 96 multiwell에 균일하게 분주하여 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ 에서 2일간 배양한 후 3일째 되는 날 serum을 포함하지 않은 MEM으로 배지를 교환하여 10일간 더 배양하였다. 이때 96 multiwell plate의 well당 최종 배지 부피는 100  $\mu\text{l}$ 로 하였다.

### 4) 항산화력 측정

생쥐 뇌세포를 10일간 배양한 후 세포 배양액에 0.5% D(+)-glucose와 20 mU/ml glucose oxidase(GO)(임과 심, 1997)를 넣은 다음 cysteine, methionine, sodium sulfide를 각 well당 각각 10, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{M}$ 이 되도록 culture media와 함께 첨가하고, 이 때 각 well의 총 배지량은 100  $\mu\text{l}$ 로 하였다. 그 후 mouse brain cell을  $37^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 배양한 후 각 well에 50  $\mu\text{l}$  MTT(5 mg/ml)를 첨가한 다음 다시 4시간 배양한 후 70  $\mu\text{l}$ 의 isopropanol을 첨가하여 Microelisa Leader (Molecular Vices Corp Tmax)로 570 nm에서 측정하여 살아 있는 뇌 세포수를 대조군에 대한 percentage(%)로 환산하였다.

### 5) 암세포 증식 억제 효과

CT-26의 배양은 DMEM 배지에 10% serum을 첨가하고, HeLa 세포의 배양은 MEM 배지에 3% serum을 넣은 다음 각각의 배지에 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 streptomycin 및 penicillin과 50 mg/100 ml의 fungizone을 0.5% 첨가하고 세포수를 약  $1 \times 10^5$  cells/ml으로 96 multiwell의 각 well에 분주한 다음, 5%  $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}$ 에서 monolayer가 될 때까지 약 2~3일간 배양시켰다. 그 후 기존의 배지를 버리고 새로운 배지로 교환한 다음 뇌세포에 대한 처리와 동일한 농도로써 각 well에 cysteine, methionine, sodium sulfide를 각각 10, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{M}$ 씩 첨가하여 well당 배지의 총량이 100  $\mu\text{l}$ 가 되게 한 후 5%  $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}$ 에서 각각 6, 12, 24, 48시간 동안 배양시켜 MTT를 처리하였다. 이 때 살아 있는 세포수를 대조군에 대한 percentage(%)로 환산한 후 대조군의 살아있는 세포수를 100%로 규정하여 황함유 화합물 처리군의 살아있는 세포수(%)를 빼서 죽어있는 세포로 환산하여 암세포 증식억제에 미치는 영향을 알아 보았다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 황함유 화합물에 의한 stress protein 발현

생쥐에 황함유 화합물인 cysteine, methionine 및 sodium sulfide를 각각 1 mM, 2 mM, 3 mM로 용해시켜 1 ml씩 6시간 간격으로 3회 급여한 후 3, 6, 12, 24, 48시간에 경추분리로 도살하여 간, 비장, 근육에서 유도되는 단백질 발현에 대해 얻은 결과는 다음과 같다.

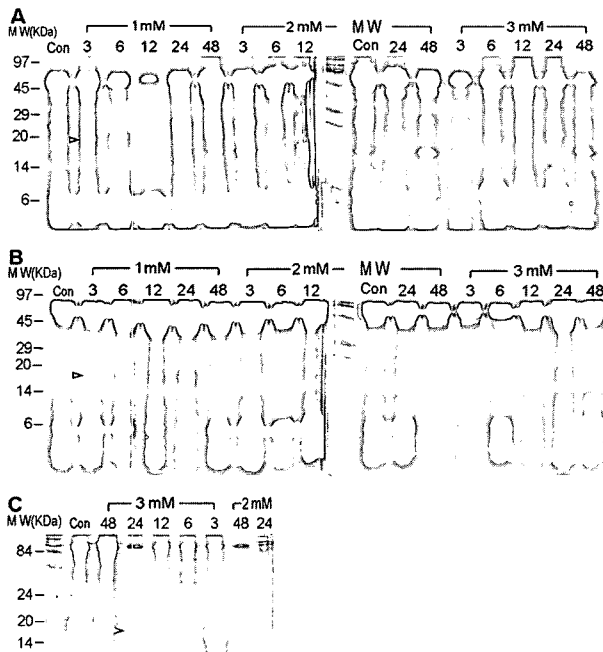
먼저 쥐 간조직에 있어서 cysteine을 급여한 후 stress protein의 발현은 1 mM 급여 후 3시간부터 12시간 사이에 찾아 볼 수 있었으나, 2 mM과 3 mM 급여 후에는 stress protein은 검출되지 않았다. 이 때 cysteine에 의해 생성되는 stress protein의 크기는 약 20 KDa으로써 그 양은 많지 않았다(Fig. 1A). Methionine을 급여한 경우, stress protein은 1 mM 급여 후 6시간에 발현되어 24시간에 가장 많이 생성되었으나 48시간에는 stress protein을 찾아 볼 수 없었다. 이러한 경향은 2 mM과 3 mM 급여후에도 유사하였으나 생성 정도는 경미했으며, 이 때 methionine에 의해 생성된 stress protein의 크기는 약 17 KDa 정도였다(Fig. 1B). 한편 sodium sulfide 급여에 있어서 간조직내 stress protein의

발현은 3 mM을 급여한 후 6시간부터 24시간 사이에 약 18 KDa의 새로운 stress protein이 생성되었다(Fig. 1C).

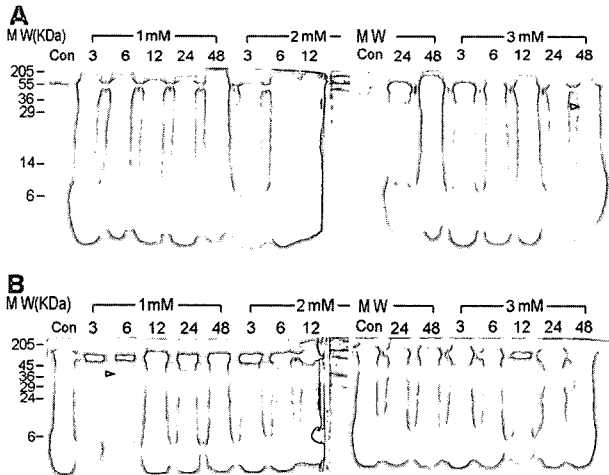
일반적인 황함유 화합물에 의한 쥐 간조직에서 발현되는 stress protein은 유기황함유 화합물인 cysteine과 methionine은 적은 농도인 1 mM에서 stress protein의 발현이 있었으나, 무기황함유 화합물인 sodium sulfide는 3 mM 급여후에 발현되는 것을 알 수 있었다. 또한 stress protein의 생성시간은 황함유 화합물의 종류에 관계없이 급여 후 6시간부터 12시간에 가장 발현 정도가 강한 것을 볼 수 있었다. 따라서 간 조직에서의 stress protein의 발현은 황함유 화합물의 급여후에 황함유 화합물의 종류와 급여농도에 따라 각각 다르게 유도되고, 그 크기는 약 17~20 KDa 이었는데 이와 같은 현상은 일반적으로 광물질에 의한 stress protein의 발현양상 및 크기와 일치하는 경향을 보여준다. 또한 이것은 이와 임(1996)의 6족 원소인 셀렌을 0.25 mM부터 1 mM 수준으로 쥐에 급여 하였을 경우 간 조직에서 나타났던 stress protein 생성과 유사한 결과를 보여준다. 이것은 아마도 S는 화학적 특이성이 Se과 유사하기 때문으로 추정된다. 또한 황함유 화합물의 종류에 따른 stress protein 발현의 차이는 유기황함유 화합물은 낮은 농도에서 stress protein이 발현되는데 비하여 무기황함유 화합물인 sodium sulfide는 비교적 높은 농도에서 발현되는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 간에 있어서 황함유 화합물에 의한 stress protein의 다른 조직에 비해 경미한 생성은 Toyoda 등(1990)의 연구에서와 같이 간조직에는 glutathione peroxidase와 같은 다양한 종류의 해독에 관여하는 효소에 의해 황함유 화합물을 어느정도 해독할 수 있기 때문일 것으로 여겨진다.

각 황함유 화합물의 급여에 따른 쥐 비장에서의 stress protein의 발현은, cysteine을 1 mM과 2 mM 급여 후에는 stress protein의 발현을 볼 수 없었으나, 가장 높은 농도인 3 mM 급여 후 48시간에 약 32 KDa의 stress protein이 발현되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2A). 한편 methionine 2 mM과 3 mM 급여후에는 stress protein의 생성은 보이지 않았고 가장 적은 농도인 1 mM 급여 후 6시간과 12시간에서 약 32 KDa의 stress protein이 생성되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2B). 이러한 경향은 sodium sulfide의 급여에 있어서도 1 mM 급여 후 6시간에 약 50 KDa의 stress protein이 생성되는 유사한 결과를 보였다(결과생략).

일반적으로 비장에서의 황함유 화합물에 의한 stress protein은 methionine과 sodium sulfide 1 mM 급여 후 6~12시간에 발현되며, stress protein의 크기는



**Fig. 1.** The stress proteins by cysteine (A), methionine (B) or sodium sulfide (C) in mouse liver. Electrophoresis was carried out in a 15% polyacrylamide gel.  $\triangleright$ ; indicates 20 KDa stress protein (A), 17 KDa stress protein (B), and 18 KDa stress protein (C). MW; marker, Con; control.

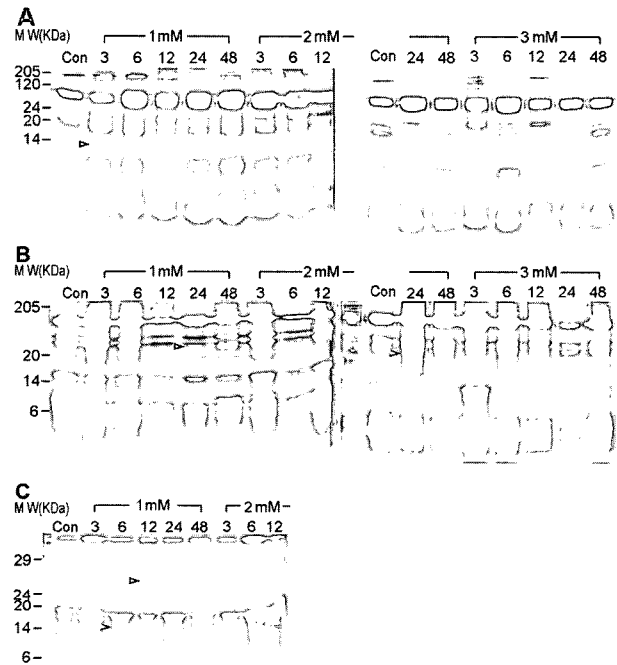


**Fig. 2.** The stress proteins by cysteine (A) or methionine (B) in mouse spleen. Electrophoresis was performed in a 15% polyacrylamide gel.  $\triangleright$ ; pinpoints 32 KDa stress proteins (A), (B). MW; marker, Con; control.

각각 32 KDa과 50 KDa임을 알 수 있었다. 그러나 cysteine 처리의 경우는 3 mM 급여 후 48시간에서 발견되는 것으로 보아 황함유 화합물의 특이성 때문에 반응하는 것으로 이해된다. 한편 6족 원소로써 Se의 경우 비장에 있어서 스트레스 반응은 아주 민감하여 경우에 따라서는 stress protein의 발현의 양상이 불규칙하고 stress protein이 분해되는 것을 볼 수 있었다 (이와 임, 1996). 또한 특이하게도 stress protein은 같은 조직에 있어서도 stress inducer에 따라 발현되는 stress protein의 발현시간, 크기가 다르다는 것을 알 수 있다 (Ananthan 등, 1986).

근육의 경우에 있어서 cysteine 1 mM 급여후 3시간부터 12시간에 약 15 KDa의 stress protein이 생성 하였다가 24시간부터는 점차 사라짐을 알 수 있었으며, 이와같은 경향은 2 mM과 3 mM 급여후에도 유사하였으나, 유도되는 단백질의 양은 많지 않았다(Fig. 3A). 그러나 methionine 1 mM 급여후 24시간과 48시간에서, 2 mM 급여후에는 3시간부터 24시간에서, 그리고 3 mM 급여후에는 3시간과 12시간사이에 stress protein의 생성을 볼 수 있었으며, 그 stress protein의 크기는 약 24 KDa 이였다(Fig. 3B). Methionine 급여에 대한 이러한 경향은 sodium sulfide의 급여시에도 유사하였지만, 생성되는 stress protein의 크기는 약 15 KDa과 27 KDa로써 약간 차이가 있었다(Fig. 3C).

일반적으로 근육에서는 다른조직에 비해 황함유 화합물에 의해 stress protein이 아주 민감하게 생성될 수 있는 것을 알 수 있었으며, 그 크기는 대략 15 KDa에서 27 KDa인 것으로 나타났다. Pelham(1984)이 지적



**Fig. 3.** The stress proteins by cysteine (A), methionine (B), or sodium sulfide (C) in mouse muscle. Electrophoresis was accomplished in a 15% polyacrylamide gel.  $\triangleright$ ; denotes 15 kDa stress protein (A), 24 KDa stress protein (B), and 15 KDa and 27 KDa stress protein (C). MW; marker, Con; control.

한바와 같이 stress protein은 stress inducer에 따라 적게는 10 KDa부터 크게는 110 KDa까지의 다양한 크기로 발현되는 것으로 알려져 있으며, 이와 같이 황함유 화합물에 의하여 발현되는 적은 크기의 단백질은 독성 광물질에 의해 발현되는 stress protein의 크기는 적은 분자량(15~35 KDa)으로 되어 있다고 한 것과 일치함을 보여준다(Caltadiano, 1986; 이와 임, 1996). 따라서 지금까지의 결과를 종합해볼 때, 황함유 화합물에 의해서 척추동물의 조직에서도 stress protein은 생성발현되며, stress protein의 크기는 대략 17 KDa에서 35 KDa 정도의 적은 분자량을 알 수 있었고 또한 황함유 화합물의 급여에 의해 mouse 조직내에서 생성되는 stress protein의 수명은 약 12시간 정도였는데, 이는 Kelley와 Schlesinger(1978)의 모든 stress protein은 유도체의 종류에 따라 특이적으로 생명현상의 보호 측면에서 발현되어 영원이 생존하는 것이 아니라 일정시간을 두고 생명체가 환경에 적응하면서 사라지는데, 대부분의 stress protein은 발현 후 12시간정도이면 소멸된다는 보고와 이 실험결과가 유사함을 알 수 있다.

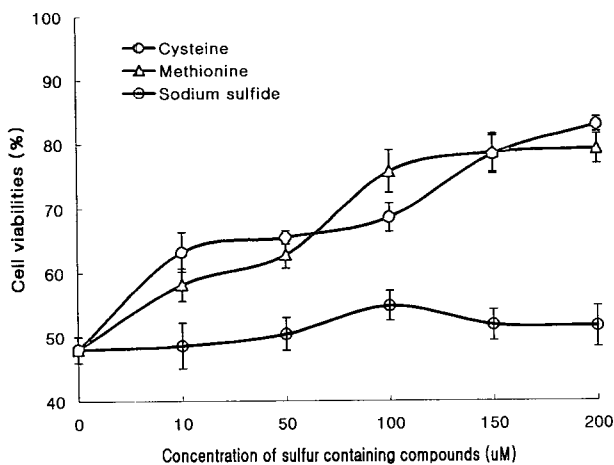
따라서 황함유 화합물인 cysteine, methionine 및 sodium sulfide에 의한 stress protein의 생성유무나 생성량의 변화를 시간별, 농도별 및 조직별로 알아본 결과

황 함유 화합물의 과다 또는 과소에 따라 생체 내에서 민감하게 스트레스 반응으로 표현된다는 것을 알 수 있었다. 그러나 보다 정확한 stress protein의 발현기작을 이해하기 위해서는 특이적인 단일항체의 이용과 유전자의 클로닝 등의 실험결과가 더해져야 할 것으로 사료된다.

## 2. 황 함유 화합물의 항산화 효과

황 함유 화합물의 hydroxyl radical에 대한 항산화 효과를 알아보기 위해 임신 13일령 생쥐 embryo 뇌세포를 약 10일간 배양시킨 후 hydroxyl radical이 생성되기 위하여 20 mU/ml glucose oxidase(GO)를 처리하고, 여기에 각각의 황 함유 화합물을 각 well에 각각 10  $\mu$ M에서 200  $\mu$ M까지 되도록 첨가하여 4시간 배양하여 MTT assay를 통하여 얻은 결과는 다음과 같다.

Fig. 4는 GO 시스템에 대해 각각의 황 함유 화합물의 첨가에 대한 생쥐 뇌세포의 생존률을 나타낸 것이다. 먼저 배양된 뇌세포에 GO 20 mU/ml로 처리한 후 cysteine을 각각 10, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M이 되도록 첨가한 후 뇌세포의 생존률을 알아본 결과, 대조군에 비해 cysteine 처리군이 첨가 농도에 따라 각각 63.2%, 65.5%, 68.6%, 78.3% 및 83.0%로써 나타났다. 이 때 GO 단독 처리구의 생존률은 48.0%인 반면 200  $\mu$ M의 cysteine만을 처리한 경우의 생존률은 98.5%로 나타났다. 또한, methionine을 10  $\mu$ M부터 200  $\mu$ M까지 처리했을 경우에 뇌세포의 생존률은 각각 58.1%, 62.8%, 75.7%,



**Fig. 4.** Antioxidative effects of cysteine, methionine, and sodium sulfide to hydroxyl radical in mouse neuron cells. After 10 day culture, cysteine, methionine or sodium sulfide added to neuron cells in 10  $\mu$ M to 200  $\mu$ M respectively. Then, the neuron cells were exposed to hydroxyl radicals generated by 20 mU/ml glucose oxidase (GO) for 4 hr. Cell viabilities were determined by MTT assay. "0"; 20 mU/ml glucose oxidase alone. Values represent the means and SD (n=4).

78.6%, 79.2%로써 cysteine의 뇌세포에 대한 항산화 효과와 유사함을 알 수 있었으며, methionine(200  $\mu$ M)만을 처리한 경우의 생존률은 98.8%로써 대조군에 비해 차이가 없었다. 그러나 sodium sulfide를 처리했을 경우 첨가된 농도에 상관없이 뇌세포의 생존률은 낮게 나타났는데, 10  $\mu$ M부터 100  $\mu$ M까지 첨가했을 때 생존률은 48.6%부터 54.8% 정도였으며, 150  $\mu$ M과 200  $\mu$ M 첨가시는 뇌세포의 생존률이 51.8%와 51.6%로써 오히려 저하되는 경향을 보였으며, GO 처리없이 200  $\mu$ M의 sodium sulfide만을 처리했을 경우에도 생존률은 84.1%로써 대조군과 상당한 차이를 보였다(Fig. 4).

이와 같은 결과는 cysteine과 methionine은 GO 시스템의 hydroxyl radical에 대해 항산화 효과를 가지고 있는 것을 보여주며, 일반적인 경향으로써 cysteine 또는 methionine 첨가량의 증가에 따라 점차적으로 hydroxyl radical에 의한 쥐 뇌세포의 손상이 보호되어 살아있는 세포수가 증가하는 것을 알 수 있었다. 아울러 methionine과 cysteine은 쥐의 뇌세포 배양에 총 배지의 10%까지 첨가하여도 그 자체는 아무런 세포에 해를 주지 않음을 알 수 있었다. 그러나 sodium sulfide는 hydroxyl radical에 대한 항산화효과가 거의 없는 것으로 나타났으며, 200  $\mu$ M의 sodium sulfide만을 처리했을 경우의 생존률도 대조군에 비해 84.1%로써 그 자체만으로도 쥐 뇌세포에 대해서 독성작용을 가지는 것을 알 수 있었다. 이와같이 유기황화합물과 무기황화합물의 hydroxyl radical에 대한 항산화효과가 다른 것은 유기황화합물은 거대한 생체고분자를 만들 수 있는 잘 알려진 아미노산으로써 그 분자의 특성 때문이며, 반면 무기황화합물은 수용액 상태에서 이온화하여 존재하기 때문으로 생각된다. 한편, 항산화력가의 비교에 있어서 뇌세포의 생존률은 200  $\mu$ M 처리시 cysteine은 83.0%이고, methionine은 79.2%로써 유사한 항산화력을 가지는 것을 알 수 있었다. 따라서 이 실험결과는 황 함유 화합물로서 cysteine과 methionine은 생체내 여러 생리적 대사작용에도 관여하지만 hydroxyl radical에 대한 scavenger로서도 잠재력을 가졌다는 것을 말해주고 또한 모든 유기황 함유 화합물은 세포내에서 주요한 생리적인 기능을 가진다는 것을 뒷받침 해준다.

## 3. 암세포 증식 억제 효과

황 함유 화합물이 세포에 미치는 생리적인 기능을 더 이해하기 위하여 암세포주로서 CT-26 및 HeLa cell을 배양시켜 methionine, cysteine, 및 sodium sulfide를 well당 각각 10, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M씩 첨가 후 6, 12,

24, 48시간에 따른 암세포 증식에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 얻은 결과는 Fig. 5(A, B)와 같다. 암세포증식억제에 대한 방법에서 이미 언급했듯이 살아있는 세포수를 계산하여 백분율을 낸 후 대조구에서 처리구의 살아있는 세포수를 빼서 죽은 세포의 백분율을 구하였다.

먼저 cysteine을 배양된 CT-26에 10  $\mu\text{M}$ 부터 100  $\mu\text{M}$  첨가 후 각 배양시간에 따른 사멸률은 cysteine을 처리하지 않은 대조군에 비해 각각 1.1%에서 11.1% 정도로써 대조군에 비해 큰 차이는 없었으며, 200  $\mu\text{M}$  처리 후 배양 6, 12, 24, 48시간에는 대조군에 대해 4.9%, 12.8%, 14.4%, 15.8%의 사멸률을 나타냈다. 한편, CT-26에 대한 sodium sulfide의 효과에 있어서는 첨가하는 농도와 배양시간이 증가 할수록 사멸률이 증가하는 경향을 보였는데, 특히 CT-26에 200  $\mu\text{M}$  첨가 후 배양시간에 따른 사멸률은 각각 14.8%, 15.9%, 18.4%, 26.7%로써 나타났다. 그러나 CT-26에 methionine을 첨가한 후 사멸률을 보았을 때 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  처리구에서는 대조군과 거의 차이가 없었으며, 200  $\mu\text{M}$  첨가 후 각

배양시간에 대해서도 2%, 6.2%, 12.5%, 16.2% 정도로써 cysteine이나 sodium sulfide의 첨가에 따른 CT-26의 사멸률에 비해 다소 낮은 것을 알 수 있었다(Fig. 5A).

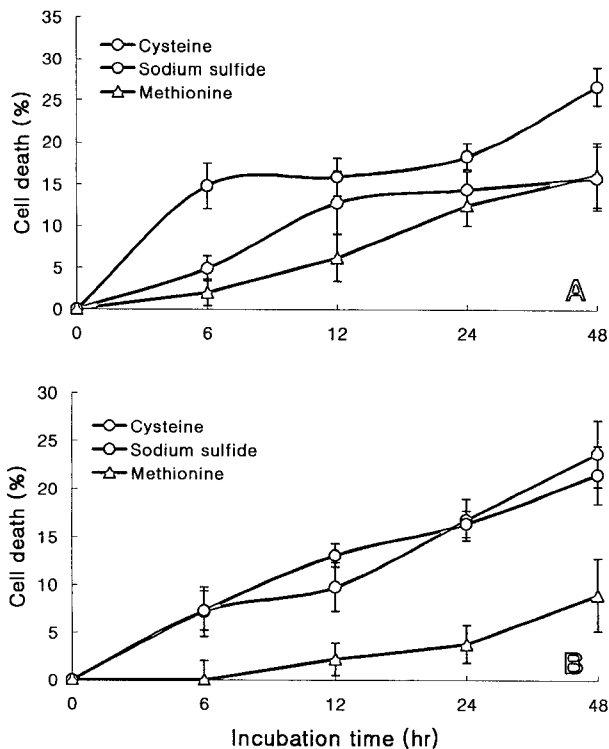
한편, HeLa cell에 cysteine을 첨가한 경우는 전반적인 경향으로써 CT-26의 결과와 유사함을 알 수 있었으며, 200  $\mu\text{M}$ 을 첨가 후 배양 6, 12, 24, 48시간에 대한 사멸률은 대조군에 비해 각각 7.2%, 9.8%, 16.8% 23.7%로 나타났다. 또한 HeLa cell에 sodium sulfide를 처리했을 경우의 사멸률도 200  $\mu\text{M}$  첨가 후 각 배양시간에 대해 7.3%, 13.1%, 16.4% 및 21.5%로 나타났다. 그러나 HeLa cell에 대한 methionine의 첨가에 있어서 대조군에 대한 사멸률은 CT-26의 경우와 같이 매우 낮게 나타났으며, 최고 농도인 200  $\mu\text{M}$ 을 처리한 후 각 시간에 따른 사멸률도 대조군에 비해 0%, 2.2%, 3.8%, 9%로써 낮게 나타났다(Fig. 5B).

앞에서 언급한 것과 같이 황함유 화합물의 암세포에 대한 성장억제효과는 어느 황함유 화합물이거나 30% 이하로 처리구간에 유의성이 없어 암세포의 생리적 성장 억제 기능은 황함유 화합물 종류간에 특이성이 없었다. 이것은 황함유 화합물의 암세포 증식억제에 대한 그 효과는 강력하지 않았다는 의미이거나, 혹은 암세포의 자연사함으로써 나타나는 경향으로 추측된다. 황함유 화합물의 암세포 증식억제에 미치는 효과는 아주 경미했지만 황함유 화합물을 종류별로 그 결과를 비교했을 때 sodium sulfide와 cysteine이 methionine 보다는 암세포 증식억제 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 본 실험에서 얻은 현상은 일반적으로 황함유 화합물의 낮은 농도에서는 CT-26이나 HeLa cell의 증식이나 억제에 충분한 영향을 미치지 못하였지만, 하나의 영양물질로써 작용하여 암세포의 증식을 촉진시킬 수도 있는 경향을 알 수 있었다. 한편 황함유 화합물의 높은 농도에서는 즉 황함유 화합물의 200  $\mu\text{M}$ 의 경우는 CT-26이나 HeLa cell에 대해 다소 세포독성작용을 하는 것으로 나타났다.

#### IV. 요약

황함유 화합물인 cysteine, methionine 및 sodium sulfide에 대한 생체내의 생리적인 변화와 동물의 조직과 세포에 미치는 영향을 이해하기 위하여 stress protein, 항산화효과, 암세포의 성장억제에 대해 실험한 결과는 다음과 같다.

황함유 화합물의 급여에 의한 생쥐 조직내 stress protein의 발현에 있어서 간조직의 경우, cysteine 1 mM 급여 후 3~12시간, methionine 1 mM 급여 후 6~



**Fig. 5.** Comparison to the inhibitory effects on proliferation of CT-26 (A) or of HeLa cell (B) by cysteine, methionine or sodium sulfide. 200  $\mu\text{M}$  of cysteine, methionine or sodium sulfide added to culture media and coincubated for 6, 12, 24, or 48 hrs individually. After incubation, the cell deaths (%) were evaluated by difference of living cell ratio between treatment and control. "0" indicates control, non-treated with the compounds. Values represent the means and SD (n=4).

24시간에 약 20 KDa과 17 KDa 크기의 stress protein이 발현되었다. 무기황 함유 화합물인 sodium sulfide의 경우 3 mM을 급여한 후 6시간부터 24시간 사이에 stress protein의 발현을 검증할 수 있었으며 그 크기는 약 18 KDa 이었다.

비장에서는, cysteine을 처리했을 경우 3 mM 급여 후 48시간에 stress protein이 발현되는 것을 볼 수 있었으나, methionine을 급여한 경우는 1 mM 급여 후 6시간과 12시간에서 생성되었으며, 그 크기는 약 32 KDa 이었다. 다른 한편, sodium sulfide의 경우는 1 mM 급여 후 6시간에 약 50 KDa의 stress protein이 생성되었다.

근육의 경우에 있어서는 cysteine 1 mM 급여 후 3~12시간, methionine 1 mM 급여 후 24~48 시간, 2 mM 급여 후 3~24시간, 그리고 3 mM 급여 후 3~12시간에 각각 15~24 KDa의 stress protein 생성을 볼 수 있었다.

황 함유 화합물이 hydroxyl radical에 대한 scavenger로서의 항산화효과 기능에 있어서, GO만을 단독으로 처리한 구의 생존률은 GO 처리 4시간 후 대조군에 비해 48.0% 였으나, cysteine을 10~200  $\mu$ M까지 첨가했을 경우의 뇌세포 생존률은 63.2~83.0%로써 나타났다. 또한 methionine의 경우 생존률은 각 처리농도에 대해 각각 58.1%부터 79.2% 정도로써 cysteine의 항산화효과와 비슷하였다. 하지만 sodium sulfide 첨가시의 뇌세포 생존률은 무기황 함유 화합물에 비해 낮게 나타났다.

황 함유 화합물의 CT-26과 HeLa cell의 증식억제에 미치는 영향에 대한 일반적인 경향은 황 함유 화합물의 낮은 농도에서는 영양물질로써 오히려 세포의 증식을 촉진시키는 경향을 보여준 반면, 황 함유 화합물의 농도가 높을수록, 배양시간이 경과할수록 독성으로 작용해 대조군에 비해 사멸률이 증가했다. 일반적으로 황 함유 화합물의 암세포성장억제에 대한 효과는 경미했지만 methionine 보다는 cysteine과 sodium sulfide의 첨가시에 암세포의 증식억제 효과가 약간 높은 경향을 보여 주었다.

## 참고문헌

- Adelman, R., Saul, P.L. and Ames, B.N. (1988): Oxidative stress to DNA: Relation to species metabolic rate and life span, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2706-2708.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915-7922.
- Ananthan, T., Goldberg, A.L. and Voellmy, R. (1986): Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes, *Science*, **232**, 522-524.
- Bordia, A. (1978): Effect of garlic on human platelet aggregation *in vitro*, *Atherosclerosis*, **30**, 355-360.
- Bordia, A., Joshi, H., Sanadhya, Y. and Bhu, N. (1977): Effect of essential oil of garlic on serum fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease, *Atherosclerosis*, **28**, 155-159.
- Burdon, R.H. (1995): Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation, *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 775-794.
- Caltabiono, M.M., Koestler, T.P., Poste, G. and Greig, R.G. (1986): Induction of 32- and 34 KDa stress proteins by sodium arsenite, heavy metals, and thiol-reactive agents, *J. Biol. Chem.*, **261**, 13381-13386.
- Fukushima, S., Takada, N., Hori, T. and Wanibuchi, H. (1997): Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion, *J. Cell Biochem. Suppl.*, **27**, 100-106.
- Gillissen, A. and Nowak, D. (1998): Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol anti-oxidant therapy, *Respir. Med.*, **92**, 609-614.
- Kuratko, C.N. (1988): Decrease of manganese superoxide dismutase activity in rats fed high levels of iron during colon carcinogenesis, *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 819-823.
- Lindquist, S. (1986): The heat shock response, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 1155-1191.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Mann, H., McCoy, M.T., Subramaniam, J., Van Remmen, H. and Cadet, J.L. (1997): Overexpression of superoxide dismutase and catalase in immortalized neural cells: toxic effects of hydrogen peroxide, *Brain Res.*, **770**, 168-171.
- Packer, L. (1995): Oxidative stress, antioxidants, aging and disease. Oxidants and Antioxidants, 1.
- Pelham, H. (1985): Activation of heat-shock genes in eukaryotes, *TIG*, 31-35.
- Pillay, T.V.R. (1980): Development and coordination programme, *Fish Food Technology*, **80**, 108-114.
- Qiao, L., Shiff, S.J. and Rigas, B. (1997): Sulindac sulfide inhibits the proliferation of colon cancer cell: Diminished expression of the proliferation markers PCNA and KI-67, *Cancer Lett.*, **115**, 229-234.
- Sainani, G., Desai, D., Katrodia, K., Valame, V. and Sainani, P. (1979): Onion, garlic, and experimental atherosclerosis, *Japanese Heart Journal*,



- 20, 351-357.
- Shunrou, K. (1996): Bioregular substances in foods on trial methode. Japan Scientific Societies Press, 4.
- Stringham, E. and Candido, E.P.M. (1993): Targeted single-cell induction of gene products in *Caenorhabditis elegans*: A new tool for developmental studies, *J. Experimental Zoology*, **266**, 227-233.
- Subrahmanyam, V., Sreenivasamurthy, V., Krishnamurthy, K. and Swaminathan, M. (1958): The effect of garlic on certain intestinal bacteria, *Food Science*, **7**, 223-230.
- Buttke, T.M. and Sandstrom, P.A. (1994): Oxidative stress as a mediator of apoptosis, *Immunology Today*, **15**, 7-10.
- Toyoda, H., Himeno, S.I. and Imura, N. (1990): Regulation of glutathione peroxidase mRNA level by dietary selenium manipulation, *Biochimica Biophysica. Acta.*, **1049**, 213-215.
- Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S., Choi, K.W. and Oh, K.S. (1998): Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos, *Human Reproduction*, **13**, 998-1002.
- Yuichiro, S., Henry, J.F. and Sevanian, A. (1997): Oxidants as stimulators of signal transduction, *Free Radical Biology & Medicine*, **22**, 269-285.
- 방약합편 (1991): 과학백과 출판사편. 일월서각 16권, 504-505.
- 이기섭, 임계택 (1997): S 화합물에 의한 쥐 조직내의 유도단백질. 전남대학교 농업과학기술연구학회지, **32**, 67-73.
- 이정채, 임계택 (1996): 환경오염원인 구리, 셀렌에 의한 Mouse 조직내 스트레스 반응. 한국환경생물학회지, **14**, 177-187.
- 임계택, 심재한 (1997): 옻나무 에탄올 추출물의 쥐 뇌세포에 대한 항산화효과. 한국식품과학회지, **29**, 1248-1254.
- 한인규, 이영철, 정근기, 박홍석, 최진호 (1996): 가축영양학. 선진문화사, 227-229.
- 현대인의 건강비법 (1988): 금성출판 주식회사 12권. 469-470.