

## 산화적 스트레스 및 항산화제가 항산화효소 활성에 미치는 영향

김안근\* · 김지현  
숙명여자대학교 약학대학

### Alterations of Antioxidant Enzymes in Response to Oxidative Stress and Antioxidants

An Keun KIM\* and Ji Hyun KIM

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

(Received August 20, 2001; accepted December 10, 2001)

**Abstract** – The effect of oxidative stress on the alterations of different antioxidant enzyme activities was investigated in human skin melanoma cell line (SK-MEL-2). Oxidative stress was induced by the exposure to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). SK-MEL-2 cells were treated with antioxidants such as vitamin E and selenomethionine in combination with  $H_2O_2$ . SK-MEL-2 cells were exposed to various concentrations of  $H_2O_2$  and measured the time course of changes in cell viability and antioxidant enzyme activities for 24 hr. Oxidative stress was induced by the exposure to 2.5mM hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) resulted in declining significantly for 24 hr. GPX and CAT activities peaked at 3 hr and returned to control levels by 24 hr. On the contrary, SOD activity was inactive before 6 hr but recovered at 24 hr. In case vitamin E (Vit E) and selenomethionine (Se-Met) were used at nontoxic concentrations (25  $\mu$ M Vit E/500  $\mu$ M Se-Met) to oxidative stress was induced by the exposure to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) led to a 3- and 5-fold increase on the viability comparing to control and caused an increase in GPX activity respectively.

**Key words** □ Hydroperoxide, Antioxidants, SOD, GPX, Catalase

산소를 이용하는 생물체는 정상적인 대사과정에서도 지속적으로 superoxide radical anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $OH\cdot$ ) 등과 같은 반응성이 큰 reactive oxygen species (ROS)를 생성하고(Oberley 등, 1995), 이들은 UV, ozone, 공기오염 등과 같은 외부 자극에 의해서도 생성된다(Shindo 등, 1997). 이런 ROS는 다양한 기전을 통하여 base lesions, sugar lesions, single-strand breaks, abasic sites, DNA-protein cross-links와 같은 DNA damage나 lipid peroxidation, protein denaturation 등을 일으키며(Brennan 등, 2000), 암, 노화, 심장질환(Gavat V 등, 1999), 염증, radiation injury등의 여러 가지 질병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Rohrdanz 등, 1998).

항산화와 관련된 Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX)와 같은 항산화 효소들은 membrane의 lipid peroxidative damage, sulfhydryl-containing enzymes의 inactivation, integral protein의 cross-linking 등을 일으키는 oxygen species를 불활성화 시키거나 제거함으로써 항산화 작용을 하게 된다(Gregus 등, 1996;

Ranos 등, 1996). Cytosol(Cu, Zn-SOD)과 mitochondria (Mn-SOD)에 존재하고 있는 SOD는 superoxide radical anion을 hydrogen peroxide로 전환시킨다. SOD의 반응에 의해 만들어진 hydrogen peroxide는 Fenton reaction을 통해 더욱 반응성이 큰 hydroxyl radical로 전환될 수 있다. 이때 생성된 hydrogen peroxide는 peroxisome에 존재하는 CAT가 산소와 물로 전환시키고, 세포질과 미토콘드리아에 존재하는 GPX에 의해 물로 무독화된다(Shull 등, 1991).

또한, glutathione, ascorbate, tocopherol 등과 같이 분자량이 작은 항산화제들은 free oxygen radicals과 직접 결합하여 무독화 시키게 되며 특히 지용성이면서 plasma membrane에 존재하는 vitamin E는 대부분의 vitamin들이 효소 반응에서 cofactor로 작용하는 것과는 달리 chain-breaking antioxidant로 작용하여 *in vivo*와 *in vitro*에서 free radical lipid peroxidation으로부터 lipid membrane과 lipoprotein 구조를 보호한다(Ottino 등, 1997; T raber, 1997). 또한 vitamin E는 immune response를 자극시키고 면역성을 높여 cancer initiation을 억제시키기도 한다(Kelly, 1997).  $\alpha$ -Tocopherol은 효과적인 radical-trapping scavenger (chain-breaking agent)로 알려져 있다. Free

\*To whom correspondence should be addressed.

radicals은 DNA를 손상시키거나 polyunsaturated fatty acids (PUFAs)와 반응하여 chain reactions을 통해 또 다른 free radicals을 생성하게 된다. 이때,  $\alpha$ -tocopherol의 aromatic ring (chroman head)이 free radicals과 반응하여 이를 파괴시키고 oxidation으로부터 PUFAs를 보호하고 membrane lipids의 oxidative damage를 막게 된다. (Burton 등, 1996). Vitamin E는 용량에 따라서 그 활성이 달라지는데 저농도에서는 antioxidant activity를 나타내며 일정농도 이상일 경우에는 cancer cell에 대해 antiproliferative activity와 prooxidant activity를 나타나는 것으로 보고되어 있다 (Mauro Picardo 등, 1996).

Selenomethionine은 포유류에서 미량으로 존재하는 필수적인 mineral이며(Goyer, 1996) Vitamin E와 같이 항암 작용과 항산화 작용을 동시에 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 과거에는 alkali disease, neurological symptoms, loss of fertility, congenital defects, embryotoxicity 등과 같은 독성만이 알려졌으나, selenium이 결핍되면 muscular dystrophy, cellular necrosis, Keshan disease 등이 야기된다는 것이 밝혀졌다.

이에 본 실험에서는 산화적 스트레스상태에서의 항산화 효소의활성변화를 살펴보고자 human skin melanoma cell line (SK-MEL-2)에 hydrogen peroxide를 시간별, 농도별로 처리하여 생존율에 대한 영향을 확인하였고 이에 대한 시간별, 농도별 항산화 효소 활성을 측정하여 산화적 스트레스에서의 항산화 효소의 변화를 알아보았다. 또한 vitamin E 나 selenomethionine 등을 처리하여 산화적 스트레스에 대한 항산화제의 방어 작용이 생존율과 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

## 실험방법 및 재료

### 재료 및 시약

RPMI 1640 powder medium, fetal bovine serum (FBS), antibiotics (penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000  $\mu$ g/ml), trypsin-EDTA (0.25% trypsin, 1mM EDTA  $\cdot$  4Na), sodium pyruvate, trypan blue는 Gibco BRL Life Technologies Inc. 제품을 사용하였고, sodium bicarbonate, N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid(HEPES), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), d- $\alpha$ -tocopherol acid succinate (1210 I.U. per mg, vitamin E), seleno-dl-methionine,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form ( $\beta$ -NADPH), glutathione reductase, glutathione reduced form, sodium azide, cacodylic acid, tris[hydroxy-methyl]aminomethane (Tris), pyrogallol은 Sigma chemical Co. 제품을 사용하였다. Hy-

drogen peroxide는 Fluka 제품을 사용하였고, Protein assay kit, bovine serum albumin (BSA)은 Bio-Rad Laboratories 제품, ethanol (absolute)은 J.J. Baker 제품을 사용하였으며, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)는 Junsei chemical Co. Ltd.를 사용하였다. Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)은 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 를 1L로 조제하여 멸균 여과한 다음 사용하였고, 이들 시약들은 모두 특급 및 일급 시약을 사용하였다. 모든 실험에서 deionized water를 사용하였다.

### 기구 및 기기

0.2  $\mu$ m pore membrane filter (Gelman science), 0.2  $\mu$ m syringe filter (Gelman science), 5 ml disposable plastic syringe (동신 의료기 산업 주식회사), 96 well plate (Nunc<sup>®</sup>, Iwaki), 60 mm tissue culture disc (Iwaki), 25 cm<sup>2</sup>/75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Nunc<sup>®</sup>), conical tube (Nunc<sup>®</sup>, coming), cuvette (Bio-Rad), filter unit (Nalgene<sup>®</sup>), hemocytometer (Superior, Germany), electronic top loading balance (AC 211S, Sartorius), digital pH meter (Mettler Delta 340), labo autoclave (Sanyo), ELISA reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (New brunswick science), clean bench (한국삼공), table top centrifuge (Hanil science industrial Co. Ltd.), microcentrifuge (micro17TR, Hanil science industrial Co. Ltd.), vacuum pump (DOA-V152-AA, Gast), inverted microscope (Olympus CK2), pipet-aid (Barnstead), vortex mixer (Broomall, PA, USA), magnetic stirrer (Coming), sonicator (2210, Branson<sup>®</sup>), deep freezer (OPR-DFU-128C, Operon), UV/visible spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech)

### 세포 배양

Human malignant melanoma로부터 유래된 SK-MEL-2 cells는 한국 세포주 은행 (Korean cell lines bank)으로부터 분양받았다. SK-MEL-2 cells는 10% FBS와 항생제 (penicillin G 100 sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000  $\mu$ g/ml), 1mM sodium pyruvate를 포함하는 RPMI 1640 배지를 배양액으로 하여 37°C, humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양되었다. 배양액의 pH는 10 mM HEPES와 2 mg/ml sodium bicarbonate를 사용하여 7.2-7.4로 조정하였다. 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask나 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask에서 계대 배양하고 confluent되었을 때 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 실험에 사용하였다.

### 시료의 조제

30% hydrogen peroxide는 PBS에, vitamin E는 abso-

lute ethanol에, methionine은 증류수에 녹여 원액을 조제하였으며, DMSO와 ethanol의 최종 농도는 0.1%가 되도록 PBS로 희석하였다. 시료 원액은 0.2 µm pore size syringe filter로 여과하였다. vitamin E 시료는 사용 직전에 조제하였으며 4°C를 유지한 상태로 실험에 사용하였다.

### 세포 생존율 측정

#### Hydrogen peroxide 단독 처리

SK-MEL-2 cells suspension을 trypan blue dye exclusion method(Benford 등, 1987)로 예비 실험에서 결정된 적정수의 세포 농도 ( $4 \times 10^5$  cells/ml)로 보정하였다. Cell suspension을 96-well plate의 well에 100 µl씩 가한 후, 배양기 (37°C, humidified 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 안정화시켰다. hydrogen peroxide는 stock solution을 연속 희석하여 농도별로 시료용액을 각 well에 100 µl씩 넣어 실험군으로 하고, 각 시료를 녹인 용매 100 µl씩 가한 것을 대조군으로 하였다. 각각 시간별(3, 6, 12, 24시간)로 배양하여 MTT 용액을 well 당 50 µl씩 넣어 4시간 동안 배양기에 방치한 후 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 여기에 DMSO 원액을 well 당 50 µl씩을 가하여 1분간 shaking하면서 formazan을 완전히 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 흡광도(570 nm)를 측정하였다. 이 때, 실험군과 대조군은 3개의 well에 동일하게 시행하였으며, 동일 실험을 3회 이상 실시하여 다음과 같은 식에 의해 세포 생존율을 산출하였다.

$$\text{Cell viability(\%)} = \frac{b}{a} \times 100$$

a : control group의 흡광도

b : experimental group의 흡광도

### 시료의 단독 처리

Hydrogen peroxide 단독처리에서와 같은 방법으로 seeding한 cells에 Vitamin E와 selenomethionine을 각각 농도별로 투여한 후 12시간 동안 배양하여 MTT assay를 실시하여 세포 생존율을 측정하였으며, 각 실험군과 대조군은 3개의 well에 동일하게 시행하였으며, 동일 실험을 3회 이상 실시하였다.

### 시료의 병용 처리

Hydrogen peroxide 단독처리에서와 같은 방법으로 seeding한 cells에 vitamin E와 selenomethionine을 투여하고 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 처리하여 시간별로 배양한 후 MTT assay를 위와 동일하게 실시하여 세포 생존율을 측정하였다. 각 실험군과 대조군은 3개의 well에 동일하게 시행하였으며, 동일 실험을 3회 이상 실시하였다.

### 항산화 효소 활성 측정

#### 시료의 처리

$4 \times 10^5$  cells/ml의 SK-MEL-2 cells suspension을 60 mm tissue culture dish에 가한 후, 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨다. (3)에서와 같은 방법으로 각각의 시료를 cell suspension과 동량으로 가한 후 시간별로 배양한다. dish에서 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하여 농도별 sample ( $1.0 \times 10^6$  cells)을 얻고 상등액을 제거한 pellet을 -20°C에 저장한다. cell pellet에 cold PBS 1 ml을 가하고 얼음 위에서 한 sample 당 15초 간격으로 10초 동안 3회 sonication시킨 후, 12000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하고 상등액만을 취하여 enzyme assay sample로 사용하였다. Sample의 protein양은 bovine serum albumin (BSA)을 standard로 사용하여 Bradford protein assay에 의해 정량하였다(Bradford, 1976).

#### Glutathione peroxidase activity 측정

Glutathione peroxidase (GPX)의 활성은 Flohé와 Günzler의 방법에 의해 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다(Folhe Leopold 등, 1984), (Donald E Paglia 등, 1967). GPX의 반응동안 glutathione (GSSG)은 reduced glutathione (GSH)의 일정 농도에 대해서 제공되는 과잉의 glutathione reductase (GR)에 의해 계속 환원된다. 이때 환원형의 NADPH의 산화를 관찰하였다.

0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.0, 1 mM EDTA) 500 µl에 각 sample, GR, 10 mM GSH, 1 mM sodium azide를 각각 100 µl씩 넣은 후 37°C에서 10분간 예비양시킨다. 여기에 1.5 mM NADPH 100 µl를 가한 다음 3분 동안 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 없는 상태에서의 NADPH 소비를 관찰하였다. 예온시킨(rewarmed) 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣고 NADPH의 감소한 흡광도가 직선이 나타나도록 340 nm에서 5분간 흡광도를 측정하고 다음 식에 의해 효소 활성을 계산하였다.

$$A = 0.868 \frac{\Delta NADPH}{[GSH]_0 t} \times \frac{V_i}{V_s}$$

$\Delta NADPH/t$  = 분당 NADPH의 흡광도 변화  
 $[GSH]_0$  = GSH의 초기 농도  
 $V_i$  = incubation mixture의 volume  
 $V_s$  = enzyme sample의 volume

#### Superoxide dismutase activity 측정

Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정은 pyrogallol autoxidation의 저해를 관찰하는 Marklund의 방법을 사용하였다(Marklund 등, 1974; Roth 등, 1983).

50 mM tris-cacodylic acid buffer (pH 8.20, 1 mM EDTA) 1 ml에 pyrogallol stock solution (0.2 mM/10 mM HCl) 약 500 µl를 가하여 1분당 0.015 정도의 흡광도 증가를 나타내도록 조절하여 standard absorbance로 사용하였다.

이 substrate 용액 1 ml에 각 sample 100  $\mu$ l를 가하고 UV/visible spectrophotometer를 사용해 420 nm에서 tris-cacodylic acid buffer를 blank로 하고 1분마다 10분까지 absorbance를 측정하고, lag phase에서 직선이 성립하는 5분에서 10분까지 1분당 흡광도 변화를 평균내어 다음 식에 의해 효소 활성을 계산하였다. SOD 1 Unit는 pyrogallol autoxidation rate를 50%까지 억제하는 SOD의 양으로 정의한다.

$$\text{SOD activity} = \frac{(a-b)}{0.5 \times a}$$

a = standard의 흡광도 변화  
b = sample의 흡광도 변화

**Catalase activity 측정**

Catalase (CAT)의 활성 측정은 hydrogen peroxide의 분해에 따라 감소하는 흡광도를 측정하는 Aebi의 방법을 이용하였다(Aebi 등, 1984).

50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 100 ml당 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣어 10 mM substrate solution(A<sub>240</sub>=0.5)을 만든다. 이 substrate solution 3 ml에 각 sample 100  $\mu$ l를 가한 후, 43.6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>의 extinction coefficient를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 240 nm에서 phosphate buffer를 blank로 하고 1분마다 2분동안 absorbance를 측정하고, 1분당 흡광도 변화를 평균내어 다음 식에 의해 효소 활성을 계산하였다.

$$\text{Specific activity} = \frac{\Delta A/\text{min} \times 1000}{43.6}$$

$\Delta A/\text{min}$  = sample의 1분당 흡광도 변화  
43.6 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 molar extinction coefficient (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)  
1000 = dilution factor

**통계 처리**

Graphs와 tables의 모든 수치는 각 실험횟수에 대한 평균과 표준오차 [mean  $\pm$  S.E.M.(standard error of the means)]로 나타낸 것이며, 생존율과 효소 활성의 대조군에 대한 유의성은 t-student test를 이용하여 계산하였다.

**결 과**

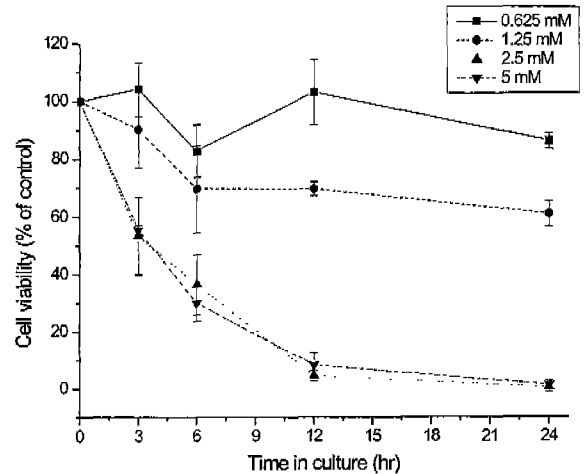
**Hydrogen peroxide에 의한 산화적 스트레스**

**세포 생존율**

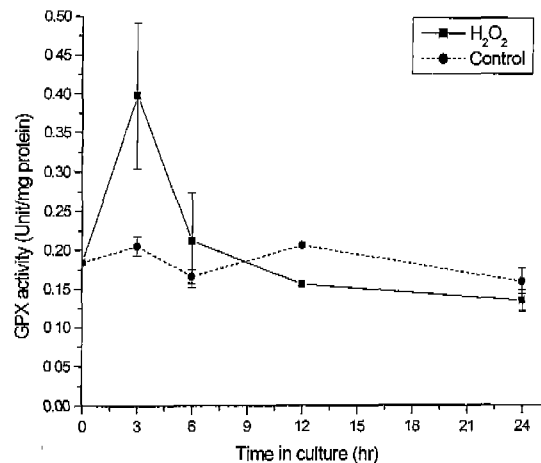
MTT assay에 의해 시간별, 농도별로 세포 생존율을 측정 한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 저농도(0.625 mM, 1.25 mM)일 때는 24 시간동안 60% 이상의 생존율을 유지한 반면에 2.5 mM 이상의 고농도에서는 3시간 정도가 지났을 때 53%를 나타내면서 생존율이 거의 절반정도로 감소하여 6시간에는 36.5%, 12시간에는 4.5%, 24시간에는 거의 0%에 가까웠다(Fig. 1).

**항산화 효소 활성**

24시간 동안 세포 생존율을 점차 감소시킨 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 농도 2.5 mM에서 항산화 효소의 활성을 시간에 따라 측정해 본 결과, GPX와 CAT는 3시간일 때 control에 비해 2배 정도 증가하다가 시간이 지날수록 서서히 감소하여 control 수준으로 회복되었다(Fig. 2, 3). SOD는 처리한 후부터 6시간까지 활성을 없다가 이후부터 서서히 증가하여 24시간에는 control 수준에 도달하였다(Fig. 4).



**Fig. 1.** Time course of cell viability after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The cells were exposed to various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ■, exposed to 0.625 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ●, exposed to 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ▲, exposed to 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ▼, exposed to 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. †p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 compared with control.



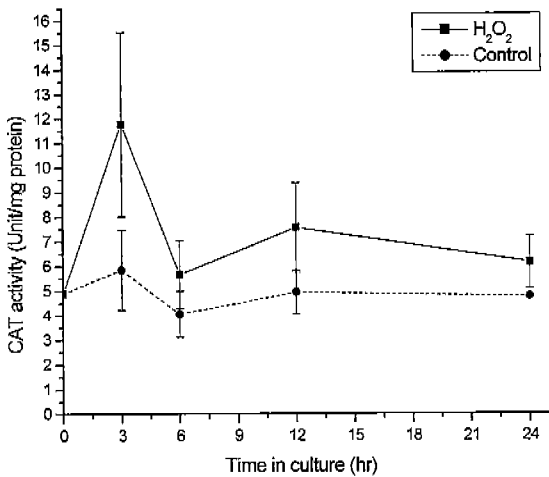
**Fig. 2.** Time course of GPX activity after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-exposed cells and control cells were harvested at the indicated times and GPX activity of the extracts was measured. The results were expressed as the average of duplicate samples with S.D. ●, control; ■, exposed to 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Vitamin E의 영향**

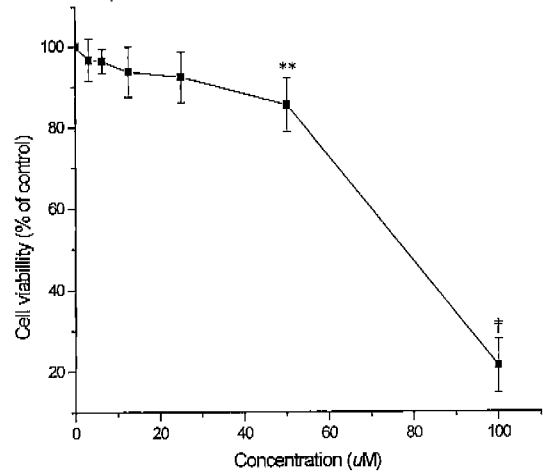
세포 생존율 : Vitamin E(Vit E)를 3.125  $\mu\text{M}$ 에서 100  $\mu\text{M}$ 의 범위로 농도별로 처리하면 25  $\mu\text{M}$  이전 농도에서는 12시간 동안 90% 이상의 생존율을 유지하고 50  $\mu\text{M}$ 에서는 85%, 100  $\mu\text{M}$ 에서는 21%를 나타내면서 농도 의존적으로 생존율이 감소하였다(Fig. 5). Vit E를 생존율에 크게 영향을 미치지 않는 농도인 25  $\mu\text{M}$ 과 50  $\mu\text{M}$ 로 처리하고  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 투여하여 시간별로 배양하면 6시간 이후부터  $\text{H}_2\text{O}_2$  단독 처리한 실험군보다 생존율이 더 높아졌으며 12시간에는 3

배, 24시간에는 10배 이상 높아졌다(Fig. 6).

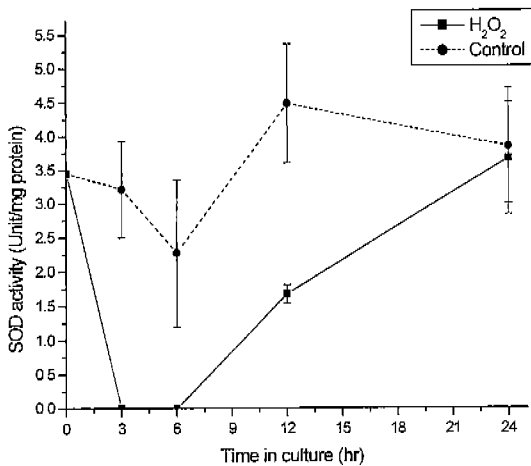
항산화 효소 활성 :  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 없는 상태에서 Vit E만 처리한 실험군의 경우 SOD는 활성을 나타내지 않았으며 GPX는 control에 비해 증가하였고  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 병용 투여한 실험군은  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 단독으로 처리한 실험군보다 GPX와 SOD가 각각 1.6배, 1.7배 정도 증가하였다. CAT는 모든 실험군에서 control보다 약간 높았지만 차이는 서로 거의 없었다(Table I).



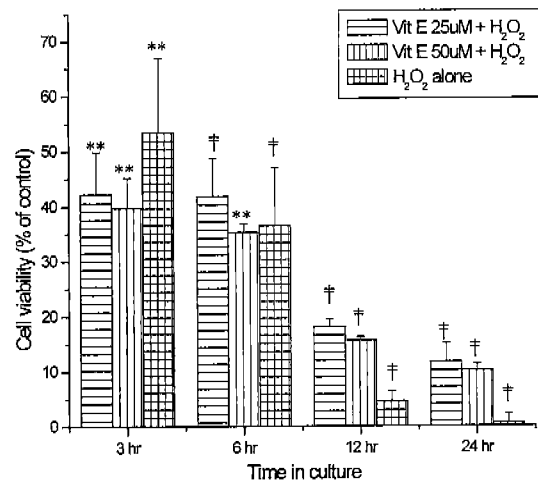
**Fig. 3.** Time course of CAT activity after exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The  $\text{H}_2\text{O}_2$ -exposed cells and control cells were harvested at the indicated times and CAT activity of the extracts was measured. The results were expressed as the average of duplicate samples with S.D. ●, control; ■, exposed to 2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Fig. 5.** Dose-dependent effect of vitamin E on cell viability. The cells were treated with various concentrations of vitamin E for 12hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. † $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control.



**Fig. 4.** Time course of SOD activity after exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The  $\text{H}_2\text{O}_2$ -exposed cells and control cells were harvested at the indicated times and SOD activity of the extracts was measured. The results were expressed as the average of duplicate samples with S.D. ●, control; ■, exposed to 2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Fig. 6.** Effects of vitamin E,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and vitamin E in combination with  $\text{H}_2\text{O}_2$  on cell viability. The cells were cultured with both 25  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$  vitamin E in combination with 2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  for the indicated times. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. † $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control.

**Selenomethionine의 영향**

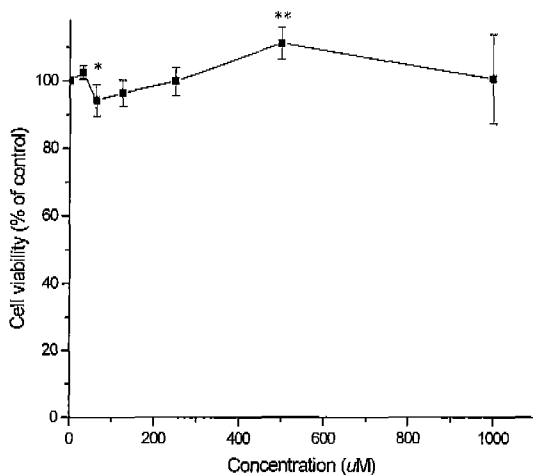
**세포 생존율** : Selenomethionine(Se-Met)을 31.25 μM에서 1 mM의 범위로 농도별로 처리하여 12시간동안 배양하였더니 모두 90 % 이상의 생존율을 보였다. 특히 500 μM 농도에서는 control보다 더 높은 수치를 나타내었다(Fig. 7). Se-Met을 농도별로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같이 투여하면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리한 것보다 4배 내지 5배 정도로 생존율이 증가하는 것을 보였지만 농도에 따라 크게 다르지는 않았다(Fig. 8-1). 500 μM Se-Met과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 병용 투여하여 시간별로 생존율을 측정해 보니 12시간에는 5배 정도 높아졌으며 24시간에는 12시간동안 배양한 것보다 생존율이 1.5배 정도 더 증가하였다(Fig. 8-2).

**항산화 효소 활성** : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 없는 상태에서 Se-Met만 처리한 실험군은 control보다 GPX가 1.5배 정도 증가한 것을

**Table I.** Effects of vitamin E, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vitamin E in combination with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on antioxidant enzyme activities

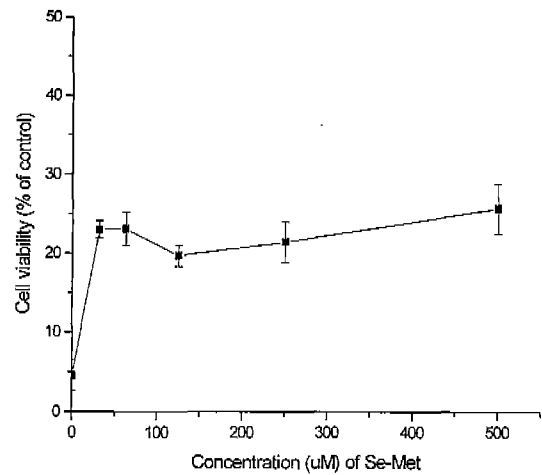
	GPX Unit/mg protein	SOD Unit/mg protein	CAT Unit/mg protein
Control	0.206	4.48	4.94
Vit E	0.235	0	7.28
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.157	1.68	7.55
Vit E+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.255	2.91	7.02

The treated cells and control cells were harvested at 12hr and antioxidant enzyme activities of the extracts were measured. The results were expressed as the average of duplicate samples with S.D. Control, untreated; Vit E, treated with 25 μM vitamin E; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, exposed to 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Vit E+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, treated with 25 μM vitamin E in combination with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

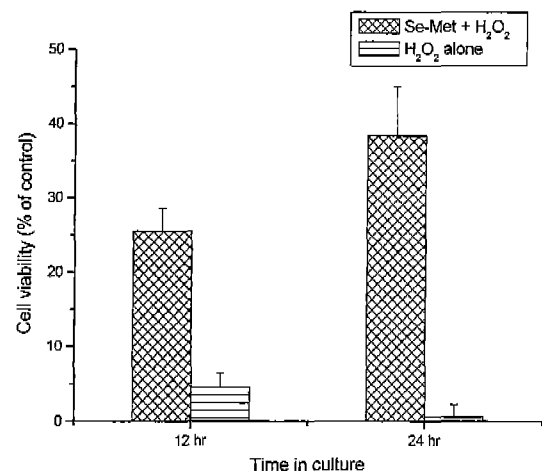


**Fig. 7.** Dose-dependent effect of selenomethionine on cell viability. The cells were treated with various concentrations of selenomethionine for 12hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*\*p<0.01, \*p<0.05 compared with control.

볼 수 있었고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 병용 투여한 실험군은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독으로 투여한 실험군보다 1.6배 증가하였다. SOD는 Se-Met을 단독 처리한 실험군, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독 처리한 실험군, Se-Met과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 병용 투여한 실험군 등 이 세가지 실험군에서 모두 control보다 낮았고 서로 비슷한 수준이었다. CAT는 Se-Met을 처리했을 때 가장 높았고, 다른 두 실험군에서도 control보다는 높게 나타났다(Table II).



**Fig. 8-1.** Effects of dose-treatment with selenomethionine in combination with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell viability. The cells were treated with various concentrations of selenomethionine in combination with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. All data in p<0.001 compared with control.



**Fig. 8-2.** Effects of selenomethionine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and selenomethionine in combination with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell viability. The cells were cultured with 500 μM selenomethionine in combination with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 hr and 24 hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. All data in p<0.001 compared with control.

**Table II.** Effects of selenomethionine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and selenomethionine in combination with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on antioxidant enzyme activities

Control	0.206	4.48	4.94
Se-Met	0.322	2.37	8.98
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.157	1.68	7.55
Se-Met+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.243	2.47	8.00

The treated cells and control cells were harvested at 12hr and antioxidant enzyme activities of the extracts were measured.

The results were expressed as the average of duplicate samples with S.D. Control, untreated; Vit E, treated with 25 μM vitamin E; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, exposed to 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Vit E+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, treated with 25 μM vitamin E in combination with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 고 찰

고등생물의 생명 유지에 필수적인 성분 중의 하나인 산소는 전자전달계의 최종 전자 수용체가 되고, 체내의 각종 대사과정에도 관여하며 이 과정에서 reactive oxygen species (ROS)를 생성한다. ROS는 저농도일 때는 세포분화의 자극 등과 같은 생리학적 역할도 가지고는 있지만 과도한 생성으로 인해 많은 양의 축적되면 DNA, protein, 세포막 등과 같은 거대분자에 가역적 또는 비가역적 손상을 입히게 된다. 이러한 산화적 스트레스에 대해 vitamin E나 selenomethionine과 같은 항산화제의 방어 작용을 세포내에서의 항산화 효소의 활성 변화로 관찰하였다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 농도에 따라 세포에 주는 영향이 달라지는데 증식하고 있는 포유류의 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 매우 낮은 농도인 3-15 μM일 때는 25%-45%로 성장을 자극시키는 mitogen으로서 작용하며, 120-150 μM에서는 일시적인 성장 억제를 일으켜서 에너지의 과잉 사용과 DNA 손상으로부터 세포를 보호해 준다. 산화적 손상은 0.5-1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 나타나며 결과적으로 apoptosis를 일으키게 된다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 매우 높은 농도인 5.0-10.0 mM에서는 세포막이 분해되고 단백질과 핵산이 변성되어 곧바로 necrosis가 일어난다고 보고되어 있다(Davies, 1999; Saladino 등, 1985). 실험에 사용된 melanoma cells에서는 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 이하까지는 세포의 생존율에 크게 영향을 미치지 않았으나 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 시간에 따라 서서히 생존율이 감소되는 것을 볼 수 있었는데 이는 보고된 농도보다는 높은 농도지만 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 세포에 산화적 스트레스를 주어 결국 apoptosis를 일으킨 것임을 확인할 수 있었으며 농도가 좀더 높아진 것은 정상 세포가 아닌 암세포이기 때문일 것으로 생각된다. 산화적 스트레스를 일으키는 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서의 항산화 효소 활성을 살펴보면 시간에 따라 다르다는 것을 확인할 수 있었다. GPX와 CAT는 3시간대에 최고치를 나타내었고 이후부터 24시간동안 정상치로 회복되는 반면에 SOD는 6시간까지 활성을 나타내지 않다가 점차 회복되었다. SOD는 O<sub>2</sub>·을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로

전환시키는 효소인데 과잉의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 세포내로 유입되면서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 degradation (Iizawa 등, 1994)되어 그 활성을 잃었다가 시간이 지나면서 GPX나 CAT에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 제거되면서 SOD의 활성도 점차 회복된 것으로 생각된다.

항산화제들의 방어 작용을 알아보기 위해 vitamin E와 selenomethionine을 처리해 주고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 투여한 후 항산화 효소들이 정상치로 돌아오는 12시간 동안 배양해 주었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독으로 투여한 경우보다 Vitamin E를 병용 투여해 주면 생존율이 3배로 증가하였다. 항산화 효소의 변화를 살펴보면 vitamin E만 처리한 실험군에서 SOD는 감소되었으나 GPX나 CAT는 증가한 것을 볼 수 있었다. CAT는 vitamin E만 처리한 실험군, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리한 실험군, vitamin E와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 병용 투여한 실험군 등 모든 실험군에서 control보다는 약간 높게 나타났지만 유의성은 없었다. 항산화 효소 중에서 가장 뚜렷하게 증가된 GPX는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 없는 상황에서 vitamin E를 처리했을 때 control에 비해 13% 증가했으며, vitamin E를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 병용 투여하면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리한 실험군보다 활성이 63% 정도 높은 것으로 나타났는데 이는 생존율의 증가를 보여준 것과 관련하여 산화적 스트레스 상황에서 vitamin E가 chain-breaking agent로서 free radicals를 제거해 줄 뿐 아니라 항산화 효소의 유도 작용에 의해 세포 손상을 막는 작용을 할 수도 있는 것으로 생각해 볼 수 있다. Selenomethionine을 처리했을 때에도 역시 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 인한 산화적 스트레스 상황에서 생존율이 5배로 증가하였다(p<0.001). 항산화 효소의 변화를 살펴보면 selenomethionine만 처리한 실험군에서 SOD나 CAT는 control과 비교해 보았을 때 큰 변화를 찾아보기 어려웠다. 그러나 selenomethionine이 GPX에 미치는 영향을 살펴보면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 존재하는 상태에서 selenomethionine을 병용 투여한 실험군에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리한 실험군보다 55%까지 활성이 증가하였다. 산화적 스트레스 상황에서 selenomethionine을 처리하고 24시간 배양하면 12시간 동안 배양하는 것보다 생존율이 50% 정도 증가하는데 이는 항산화 효소 중에서 GPX가 크게 증가하여 세포의 생존에 영향을 미친 것으로 생각된다. 이러한 실험결과는 selenomethionine을 배지에 공급하면 GPX의 mRNA 수준이나 gene transcription에는 별다른 변화를 주지는 못하지만 배양시간에 따라 GPX 활성이 증가된다는 보고에서도 확인할 수 있다(Jomot 등, 1995). 산화적 스트레스 상황에서 selenomethionine이 GPX 활성 증가에 영향을 주어 세포를 보호하는 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었는데 이러한 세포 보호 작용은 lipid peroxidation에 의한 세포 손상을 보호하는 GPX의 작용이 증가되었기 때문이라고 볼 수 있다. 항산화제들은 대체로 GPX는 높여주는 반면에 단독으로 처리했을 때는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독으로 처리해 주었을 때와 마찬가지로 SOD를 감소시켰다. 비정상적으로 높은 SOD는 세포에 산

화적 손상을 입혀 유해하다는 보고가 있는데 (Amstad 등, 1994; Yohn 등, 1991), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리로 SOD가 감소되었던 것은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 SOD를 inactivation시켰기 때문이며 항산화제들에 의한 SOD의 감소는 산화적 손상을 줄이는 방향으로 작용했기 때문인 것으로 생각된다.

## 결 론

산화적 스트레스가 세포내 항산화 효소 활성에 미치는 영향과 항산화제에 의한 항산화 효소 활성의 변화를 SK-MEL-2 cells에서 살펴본 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. SK-MEL-2 cells에 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하면 산화적 스트레스를 일으켜 apoptosis가 유발됨을 확인하였다. 이때 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 항산화 효소에 미치는 영향을 살펴보면, GPX와 CAT의 활성은 3시간에서 증가한 반면에 SOD는 초기에는 활성을 나타내지 않았고 24시간 안에 모든 항산화 효소들이 정상치로 회복되었다.

2. Vitamin E는 산화적 스트레스 상황에서 세포의 생존율을 증가시켜 주었는데 이는 vitamin E가 radical-trapping scavenger일 뿐만 아니라 항산화 효소의 활성 증가를 유도시킬 수도 있는 것으로 보인다.

3. Selenomethionine도 산화적 스트레스 상황에서 세포의 생존율을 증가시켜 주었으며 이때 GPX 활성의 증가가 뚜렷하였다.

이상의 실험 결과, 산화적 스트레스는 항산화제들의 세포 방어 작용에 의해 완화될 수 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 KISTEP 2000년 숙명여자대학교 연구기반 확충사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Bradford M. M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.
- Davies K. J (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells : a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* **48**, 41-47.
- Donald E Paglia and William N Valentine (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med.* **70**, 158-169.
- Elke Röhrdanz and Regine Kahl (1998) Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radical Biol Med.* **24**, 27-38.
- Eugene F. Roth, Jr. and Harriet S. Gilbert (1983) The pyrogallol assay for superoxide dismutase : absence in glutathione artifact. *Anal Biochem.* **137**, 50-53.
- Flohè Leopold and Wolfgang A. Günzler (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology.* **105**, 93-127.
- Frank J. Kelly (1997) Vitamin E : its time has nearly come. *Nutrition & Food Science.* **6**, 239-241.
- Hugo Abei (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.* **105**, 93-127.
- Joseph J. Yohn, David A. Norris, David G. Yrastorza, Irene J. Buno, Jonathan A. Leff, Steven S. Hake, and John E. Repine (1991) Disparate antioxidant enzyme activities in cultured human cutaneous fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. *J Invest Dermatol.* **97**, 405-409.
- Kenneth S. Ranos, Enrique Chacon, and Jr. Daniel Acosta (1996) Toxic responses of the heart and vascular systems. In Casarett and Doull's toxicology. pp. 492-495. McGraw-Hill Com.
- MG Traber (1997) Vitamin E, oxidative stress and 'healthy ageing'. *Eur J Clin Invest.* **27**, 822-824.
- Mauro Picardo, Paola Grammatico, Francesca Roccella, Maria Roccella, and Mauro Grandinetti (1996) Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *J Invest Dermatol.* **107**, 322-326.
- Lisa A. Brennan, Gerard M. Morris, Gillian R. Wasson, Bernadette M Hannigan, and Yvonne A Barnett (2000) The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in human lymphocytes. *British Journal of Nutrition.* **84**, 195-202.
- O Iizawa, T. Kato, H. Tagami, H. Akamatsu, and Y. Niwa (1994) Long-term follow-up study of changes in lipid peroxide levels and the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase in mouse skin after acute and chronic UV irradiation. *Arch Dermatol Res.* **286**, 47-52.
- Paulo Ottino and John R. Duncan (1997) Effect of  $\alpha$ -tocopherol succinate on free radical and lipid peroxidation levels in BL6 melanoma cells. *Free Radical Bio Med.* **22**, 1145-1151.
- Paul Amstad, R. my Moret, and Peter Cerutti (1994) Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu, Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J Biol Chem.* **269**, 1606-1609.
- Robert A. Goyer (1996) Toxic effects of metals. In Casarett and Doull's toxicology. pp. 718-720. McGraw-Hill com.
- Saladino A. J, Willey J. C, Lechner J. F, Grafstrom RC, LaVeck M, and Harris C. C (1985) Effects of formaldehyde, acet-aldehyde, benzoyl peroxide, and hydrogen peroxide on cultured normal human bronchial epithelial cells. *Cancer Res.* **45**, 2522-2526.
- Stefan Marklund and Gudrun Marklund (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* **47**, 469-474.
- Susan Shull, Nicholas H. Heintz, Muthu Periasamy, Muniraj Manohar, Yvonne MW Janssen, Joanne P Marsh, and



- Brooke T Mossman (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem.* **266**, 24398-24403.
- Terry D. Oberley, Janice L. Schultz, Ning Li, and Larry W. Oberley (1995) Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radical Biol Med.* **19**, 53-65.
- Yasuko Shindo and Takashi Hashimoto (1997) Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UV irradiation. *J Dermatol Sci.* **14**, 225-232.
- Zolt n Gregus and Curtis D. Klaassen (1996) Mechanisms of toxicity. In Casarett and Doull's toxicology. pp. 39-43. McGraw-Hill Com.