

Biophoton에 의한 생체 세포수준에서의 항산화 작용에 대한 척도

¹백 구 연 · † 천 병 수 · ¹임 재 관 · ¹이 승 호 · ¹소 광 섭
† 경희 의대 · ¹서울대 물리학과
(접수 : 2003. 3. 6., 게재승인 : 2003.6. 25.)

Biophoton Emission of MDCK Kidney Cell with ROS(reactive oxygen species)

Goo-Hyun Baek¹, Byeung-Soo Cheun,† Jae-kwan Lim¹, Seung-Ho Yi¹, and Kwang-Sup Soh¹
† Department of KyungHee University Medical College, Seoul 130-701, Korea
¹School of Physics Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received : 2003. 3. 6., Accepted : 2003. 6. 25.)

This study was studied biophoton characteristics of Madin-Darby canine kidney cells under the influence of CsA and each cell type (mock, wt, R55A) by employing a Photomultipliertube. H₂O₂ was used for producing reactive oxygen species (ROS) in this measurement. ROS is also generated during oxidative metabolism in living organism. Images from a fluorescence show an increase of photon intensity emitted from the sample on the influence of CsA and each cell type (mock, wt, R55A). It is believed chemiluminescence (CL) occurred by ROS is responsible for the biophoton emission. hence PMT measurement might be considered as a useful tool for studying biochemical characteristics in relation to ROS.

Key Words : Biophoton, MDCK cell, ROS, PMT

서 론

저명 학술지 'Nature'는 21세기 과학발전의 주요 방향은 생물학과 물리학의 학제적 연구라고 강조한 바 있다(1). 세포의 통신과 암의 기전 이해에 있어서도 생물학과 물리학의 학제적 연구의 중요성은 이미 오래전부터 주장되었었다(2).

물리학적 관점에서 세포의 통신 및 조절기능과 암세포의 성장 요인을 이해하려는 최근의 노력 중에 생체광자(biophoton)는 특별한 관심을 끌고 있다. 세포수준에서 나오는 아주 미약한 빛으로 넓은 스펙트럼 분포 (250 nm ~ 800 nm)를 갖는 biophoton은 1970년대부터 광증배관 (Photo multiplier tube: PMT)의 기술발전으로 측정이 가능하게 되었으며, 독일의 Popp(3, 4) 일본의 Inaba(5, 6) 등이 중심이 되어 활발하게 연구가 진행되고 있다. Biophoton의 원천은 활성화 산소에 의한 대사과정과 DNA의 형태 (conformation) 변화에 기인한다고 알려져있다(7). Biophoton은 물리학적으로는 양자적 결맞음 (quantum coherence) 특성이 있으므로 기본적인 중요성을 가지며, 생물학적으로는 세포의 분열과 분화, 성장과정, 상처와 치유 과정에서 많이 방출되어 발달과정의 이해에 새

로운 기여를 할 것으로 기대된다(8). 특히 암세포 및 조직에서 나오는 biophoton의 양과 특성이 정상세포 및 조직과 다름이 여러 연구에서 밝혀지고 있으므로(9) 이 방면의 연구는 앞으로 크게 활발해질 것으로 기대된다.

본 연구에서는 항산화물질과 세포사 등에 관심을 가지고 biophoton을 측정함으로써 항산화 현상의 생물광학적 이해에 기여하고자 한다.

세포수준에서 일반적으로 신장이식 수술에 많이 쓰이고 있는 cyclosporin A (CsA)라는 약물의 면역 억제 기능과 심각한 신장독성으로 인한 CsA의 부작용 등에 대해 알아보고자 연구를 하게 되었다(10). CsA의 독성은 활성화 산소(ROS) 생성에 기인한다는 보고에 의해 세포레벨에서의 CsA의 독성 관계를 biophoton 양을 측정함으로써 그 척도를 알아내기 위해서 시도된 중요한 결과를 얻었기에 이것들을 보고한다. 즉 CsA는 인체에 존재하는 cyclophilin A (CypA)와 결합하여 그 양의 변화에 의해 항산화 작용이 일어나는데 신장 이식 결과 이러한 약제 사용에 의한 부작용을 최소화 하기 위해 CsA를 신장독성 없이 추가 주입하여 면역성을 유도하기 위한 방법으로 cyclophilin A의 증가를 일으킬 수만 있다면 신장 독성을 감소시킬 수 있을 것으로 추측된다.

이러한 약제의 결합에서 활성화 산소 (ROS)의 기전이 작동하게 되고 CypA가 항산화 작용에 관여하게 된다. 즉 CysA는 protein folding에 관여하여 peptidyl-proline-cis-trans isomerase (pplase) activity를 가지는데 pplase는 항산화 기능

† Corresponding Author : KyungHee University, Medical College, Seoul 130-701, Korea
Tel : +82-2-372-2627, Fax : +82-2-372-2627
E-mail : bscheun@empal.com

에 직접 관여하는 것으로 CypA의 과다발현만이 oxidative stress를 감소시켜 CsA 신장특성을 감소시킬 수 있을 것이다.

이러한 과정에서 세포의 종류에 의한 CypA/R55A mutant로 pphase activity mutant 즉 CsA R55A type, wild type CsA의 binding mutant type, kidney mock cell line의 3타입의 세포를 배양 구축하여 CsA가 포함된 것과 포함되지 않은 것들을 구분하여 PMT로 biophoton 양의 변화를 측정하였다. 본 연구 결과 CsA에 의한 활성화산소의 유도로 일어나는 신장 독성을 새로운 물리학적 방법으로 해결 가능함을 나타낸 중요한 자료가 되리라 사료된다.

재료 및 방법

세포재료

Mock CsA, Wt CsA, R55A CsA 타입의 세포는 경희대의 과대학에서 분주받아 실험에 사용하였다.

세포 배양

DMEM 배지에 kidney 인간 세포를 100 mm dish에 배양한 후 세포가 80% 정도 성장했을 때 PBS로 씻어내고 trypsin으로 세포를 부유시킨 후 3000 rpm, 5 min 원심분리하여 침전시킨 후 각 3 타입의 세포를 배양하였다.

세포처리

3 타입의 세포(mock, wt, R55A)를 각각 37°C, CO₂ 인큐베이터를 이용하여 세포를 배양시킨 후 CsA (1 µl/ml)를 첨가시킨 후 4일간 다시 배양시켰다. 세포를 부유시키고 H₂O₂ 1mM (시간대 별로, 각 타입의 세포 변화)를 처리하여 시간에 의한 변화와 ROS의 관계를 측정하였다.

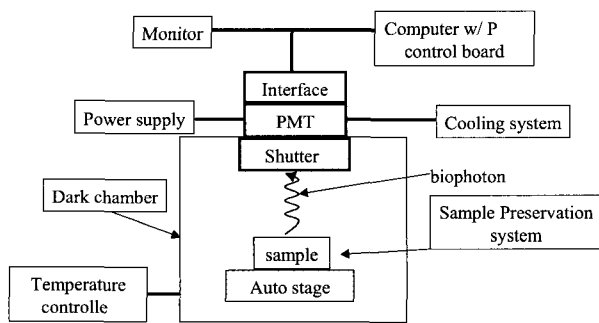


Figure 1. Schematics of experimental PMT setup.

PMT기기의 측정법

Fig. 1에서와 같이 PMT (Hamamatsu, R331-05S) 기기에 이미배양 처리된 세포들을 측정하였다.

생체광자 측정장치 개요도. 열감지기는 열전쌍을 사용하였으며 표본용기의 밑면에 부착하여 온도 조절기의 눈금이 37°C가 되도록 맞추었다. 암상자에 부착된 PMT를 중심으로 고전압 전원 1600V 장치와 데이터 처리 및 컴퓨터로 구성되

어 있으며 암상자 속에는 표본을 얹어 놓을 수 있는 용기와 열감지기 및 열선을 포함하고 있다. 열 감지기는 열전쌍을 사용하여 표본용기의 밑면에 부착하였으며 온도 조절기의 눈금이 37°C가 되도록 맞추었다. PMT와 표본간의 거리는 5cm로 PMT의 유효 직경 내에 들어오게 하였다. 사용된 PMT는 상온에서 작동되었으며 300 nm에서 650 nm의 영역에서 빛의 응답을 갖는다.

결과 및 고찰

Wild type CsA 농도별, 시간별 biophoton 양의 변화

세포에 CsA를 처리한 것과 처리하지 않은 것의 변화를 PMT로 측정된 결과 거의 변화는 없었지만 농도별 biophoton 양의 변화는 CsA의 양에 따라 농도에 의존한 다른 결과를 얻을 수 있었으며 Fig. 2에서 알 수 있듯이 CsA를 4일째 처리하고 biophotone 양을 측정된 결과 약물 처리한 4일째 되던 날 포톤 양은 증가되고 시간의 경과에 따라 세포사에 이르는 수치가 거의 일정함을 알 수가 있었다. 이 결과 CsA의 반응 시간과 농도별 변화를 측정할 수 있었다.

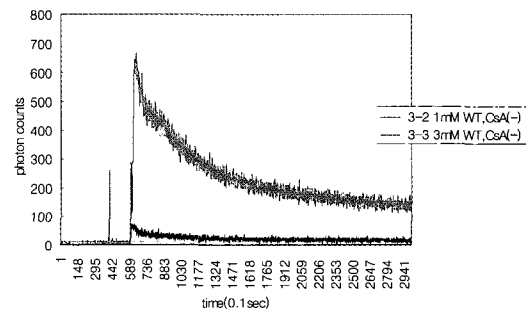
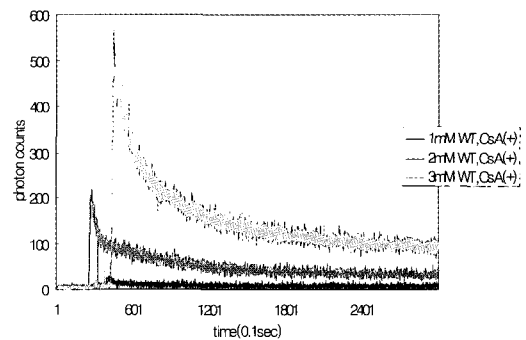


Figure 2. Kidney cells were treated with various concentration of CsA. Three different regions are shown clearly. Dark count is responsible for the first one. Magnitude of a peak at the beginning of the region relies on the concentration of CsA applied.

R55A mutant type에서의 CsA 처리에 의한 biophoton 양의 변화

CsA를 처리한 것과 미처리한 것과의 세포의 형태 변화는 거의 차이가 없었으나 CsA를 처리한 배양세포에서 biophoton

양이 증가함을 알 수가 있었다. R55A CsA(-)의 경우는 DL인 것처럼 떨어졌으나 CsA(+)인 경우는 떨어지는 가운데 fluctuation이 있는 것으로 관찰되었다.

총 biophoton의 평균값은 (-)일 경우 13.09에 비해 (+)일 경우는 19.08의 수치를 나타냈다. 이 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

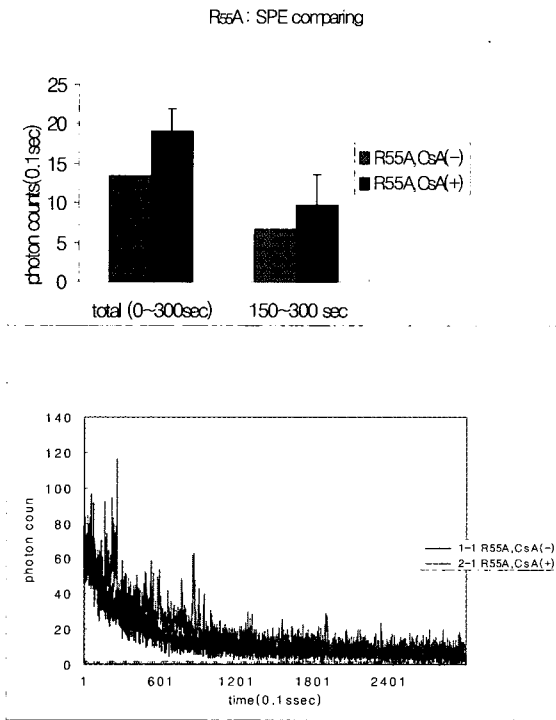


Figure 3. The concentration dependency of kidney cell is plotted as a function of time. For this measurement, 1 ml of 1 mM H₂O₂ and the cell concentration of R55A CsA(+,-) 0.5mM were used. The figure clearly depicts the concentration dependency of chemiluminescence intensity.

Wild type 세포에서 CsA 처리에 의한 biophoton 양의 변화

CsA를 미처리한 것에서의 세포의 형태 변화는 거의 차이가 없었으나 CsA 처리한 배양세포에서는 biophoton 양이 증가추세를 나타냈다. Fig. 4의 막대 그래프에서 나타낸 것과 같이 약간의 변화를 나타내었다.

Mock cell에서의 CsA 처리에 의한 biophoton 양의 변화

CsA(+)가 CsA(-)에 비해 약간 크게 나타났다. 그리고 mock CsA(-)의 경우도 약간의 변동이 있으나 CsA(+)의 경우의 변동값이 현저하게 크다는 것을 알 수 있었다. 총 평균값은 mock CsA(-)가 5.72, CsA(+)에서 11.30으로 2배 가량 높은 것으로 나타났다. 이것을 Fig. 5에 나타내었다.

지금까지의 결과에서와 같이 sample의 전체 5분간 측정 결과에 의해 평균값과 peak가 없어지고 안정된 구간인 150-300초구간의 평균값 및 표준편차 자발광 (spontaneous photon emission, SPE)을 측정할 것이다.

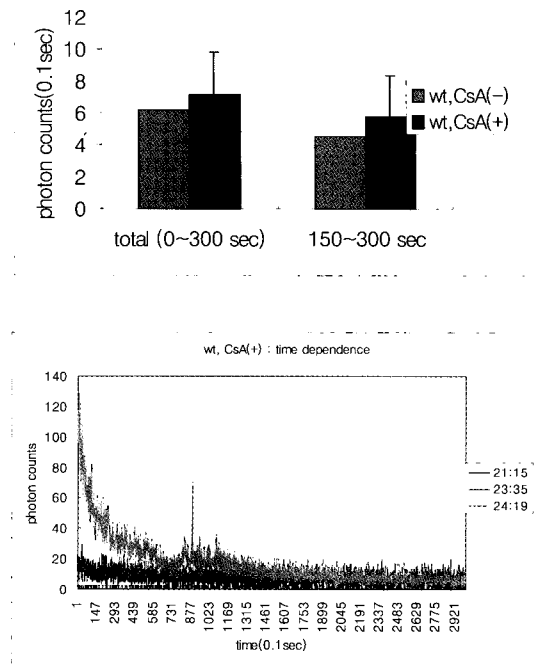


Figure 4. The concentration dependency of kidney cell is plotted as a function of time. For this measurement, 1 ml of 1 mM H₂O₂ and the cell concentration of wt, CsA(+,-) 0.5mM were used. The figure clearly depicts the concentration dependency of chemiluminescence intensity.

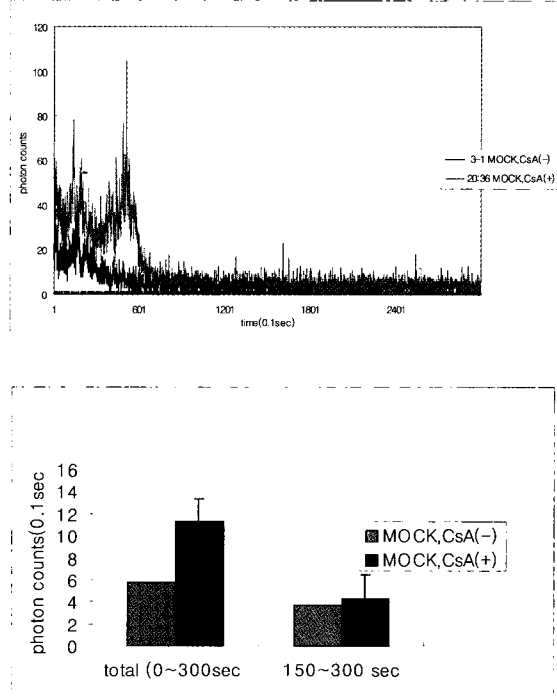


Figure 5. The concentration dependency of kidney cell is plotted as a function of time. For this measurement, 1 ml of 1 mM H₂O₂ and the cell concentration of Mock, CsA(+,-) 0.5mM were used. The figure clearly depicts the concentration dependency of chemiluminescence intensity.

조금의 정도의 차이는 있지만 모두 CsA(+)인 경우에 자체적인 빛이 많이 측정되었다. 절대량의 비교는 측정 시간에 차이가 있었기 때문에 비교하지 않았으나 각각의 경우는 비교가 가능하다고 생각한다. 시간에 따른 변화는 4시간동안 CsA를 처리한 후 자발광은 거의 측정되지 않았으나 처음 150-300초 사이에서 광자량의 변화는 있었으나 시간이 지나면서 아무 변화가 없는 것으로 보아 CsA가 일시적으로 세포에 영향을 끼치는 시간대가 4시간에서 작용하는 것으로 보아 CsA에 의한 신장독성은 주사 등에 의해 인체에 주입된 후 얼마간의 시간 간격을 두고 작용된 것으로 사료된다. 물론 세포 수준에서의 결과는 임상에서의 결과보다 조금의 차이가 있을 것으로 사료된다. 즉 CypA를 over expression 시키는 활성 조절 물질을 이용하여 CsA 신장독성을 감소시킬 수 있으리라 추측되지만 지속적인 양의 CsA의 투여가 가능하여 진다면 면역 부작용의 효과에 대해서는 예방이 가능하리라 생각한다. CsA의 신장독성에는 활성화 산소 (ROS)가 관여한다는 사실은 이미 밝혀졌지만 아직 이러한 분야의 연구는 세포 수준, 분자생물학적 기법에만 그 기전을 알아낼 수 있다는 일조일단의 기존의 생각에만 치우치게 되었다. 본 연구에서는 물리학으로 빛을 이용한 PMT사용 기법으로 간편히 신장 독성의 진의를 밝혀낼 수 있으리라 사료된다. 또한 세포사에서의 항산화 억제 물질을 찾아내는 데에도 이 PMT를 이용한다면 자연산 추출물에서의 항산화물질 억제제를 찾아낼 수 있으리라 사료된다. 특히 본 실험에서 사용한 cell line은 CsA binding mutant type으로 각 cell line에 따라 pplase activity가 서로 다른 것을 사용하였다. 일반적으로 3 타입에서의 막대 그래프의 비교에서 알 수 있듯이 wild type, R55A type에서는 활성화 산소에 의한 세포사는 광자량의 차로 거의 비슷한 수치를 나타냈다. Mock type에서는 ROS 증가에 의해 세포에 약 영향을 끼친 것으로 나타났다. 본 실험에서는 조금의 예상 수치는 빛나간 부분도 있었으나 다방면의 연구와 지속적인 연구의 결과를 데이터 베이스화하여 측정 기준치 설정을 기대한다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 biophoton의 양에 따른 생물학에의 도입은 여러 방면에서 손쉽게 응용 가능하리라 사료된다.

요약

3 가지 세포 타입 (Mock, wt, R55A)에 CsA를 처리하여 세포에 영향을 주는 원인과의 관계를 PMT를 가지고 측정했다. ROS와 CsA를 사용하여 활성화 산소 (ROS)의 변화를 측정하였다. 3 가지 세포 타입 (Mock, wt, R55A)의 CsA 처리에 영향을 끼치는 광자를 측정했을 때 광자 양이 증가함을 알 수가 있었다. 이러한 광자 양으로부터 ROS를 발생하게 되는 사실을 발견했다. 따라서 PMT에 의한 측정은 ROS의 생화학적 상태 변화를 측정하는 새로운 분석의 하나이다.

사사

본 연구는 경희의대 지도 하에 서울대 물리학과 생물물리학과와 공동으로 수행되었으며 서울대 과기부 과제번호 (R01-2001-00-00023-0)의 지원 하에서 이루어졌기에 깊은 감사 표한다.

REFERENCES

1. Editorials (2003), Sacrifice for the grater good?, *Nature* **421**, 875.
2. Foe, V. F. (1989), Mitotic domains reveal early commitment of cells in drosophila, *Emboys. development* **107**, 1-22.
3. Popp, F. A. (1979), Electromagnetic bio-information, *Urban and Schwarzenberg*, p123, Munchen.
4. Popp, F. A., W. Nagel, and H. Klima (1983), In coherent excitations in biological systems, p117, Springer, Berlin.
5. Kobayashi, M., M. Takeda, K. Ito, H. Kato, and H. Inaba (1999), Two-dimensional photon counting imaging and spatiotemporal characterization of ultraweak photon emission from a rat's brain in vivo, *J. Neuroscience Method* **93**, 163.
6. Kobayashi, M., M. Takeda, T. Sato, Y. Yamazaki, K. Kaneko, K. Ito, H. Kato, and H. Inaba (1999), In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated cerebral energy metabolism and oxidative stress, *J. Neuroscience Research* **34**, 103.
7. Popp, F. A., B. Ruth, W. Bahr, J. Bohm, P. Grass, G. Grolig, M. Rattermeyer, H. G. Herzog, Z. Yan, and Y. Yan (2002), Delayed luminescence of biological system in terms of coherent states, *Phys. Lett. A* **293**, 98.
8. Kai, S., T. Ohya, K. Moriya, and T. Fujimoto (1995), Growth control and biophoton radiation by plant hormones in red bean, *J. Appl. Phys.* **34**, 6530.
9. Amano, T., M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, and H. Inaba (1995), Ultraweak biophoton emission imaging of transplanted bladder cancer, *Urol. Res.* **23**, 315.
10. Biring. M.S., M. Fournier., D.J. Ross and M.I Lewis(1988), Cellular adaptations of skeletal muscles to cyclosporine, *J. Appl.Physiol.* **84**, 1967-1975.
11. Bagchi, D., E. A. Hassoun, M. Bagchi, S. J. Stohs, (1995), Chromium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, nitric oxide production, and generation of reactive oxygen species in sprague-dawley rats, *biochem. physiol. C* **110**(2), 177-187.
12. Cadenas, E. (1985), Oxidative stress and formation of excited species In: sies, H (Hd), Oxidative stress, Academic press. San diego. pp311-330.
13. Chacce, B., H. Sies, A. Boveris, (1979), Hydroperoxide metabolism in mammalian tissues, *physiol. Rev.* **59**, 527-605.
14. Li, C. Y., F. Theriault, R. S. Lin (1997), Residential exposure to 60Hz magnetic fields and adult cancers in Taiwan, *Epidemiology* **8**, 25-30.