

## Hepatoma 세포주에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 Cu/Zn SOD의 발현

김영민<sup>1</sup> · 서원숙\*

<sup>1</sup>한남대학교 생명나노과학대학 바이오과학부 생명과학전공, 한국표준과학연구원

Received October 17, 2006 / Accepted December 7, 2006

**Expression of Cu/Zn SOD according to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Hepatoma cell line.** Youngmin Kim<sup>1</sup> and Wonsook Seo\*. <sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Hannam University, 306-791 Daejeon, Korea, Korea Research Institute of Standards and Science, 305-340 Daejeon, Korea - Oxygen is required for many important aerobic cellular reactions, it may undergo electrontransfer reactions, which generate highly reactive membrane-toxic intermediates (reactive oxygen species, ROS), such as hydrogen peroxide, singlet oxygen, superoxide radical, hydroxyl radical, hydroperoxyl radical, hydroxy ion. Various mechanisms are available to protect cells against damage caused by oxidative free radicals, including scavenging enzyme systems such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). This antioxidant defense system is a very complex and finely tuned system consisting of enzymes capable of detoxifying oxygen radicals as well as low molecular weight antioxidants. In addition, repair and turnover processes help to minimize subcellular damage resulting from free radical attack. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, one of the major ROS, is produced at a high rate as a product of normal aerobic metabolism. The primary cellular enzymatic defense systems against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are the glutathione redox cycle and catalase. From Northern blot analysis of total RNAs from cultured cell with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, various results were obtained. Expression of Cu/Zn SOD decreased when cell passage increased, but the level of the Cu/Zn SOD was scarcely expressed in 35 passage.

**Key words** - ROS, Cu/Zn SOD, antioxidants, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hepatoma

### 서 론

노화의 원인과 장수의 비결을 밝히기 위해 인간들은 끝없는 도전을 계속해 왔다. 20세기 초 불과 47살에 그쳤던 평균 수명은 100년 동안 2배 가까이 늘어났고, 노화로 인한 각종 질병도 상당 부분 해결할 수 있게 되었다. 하지만 다양한 스트레스, 담배, 자외선, 중금속 등에 의해서 활성산소(reactive oxygen)가 생성되고[7], 이로 인한 강한 산화력때문에 세포가 파괴되면서 노화가 진행된다. 생체는 이러한 활성산소들을 스스로 방어하고 제거하는 효소들을 생산하는데 이들을 항산화 효소(antioxydant enzyme)라고 한다[1,12].

항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등은 이러한 활성산소에 대한 방어 역할을 한다[3,11]. SOD는 초산화물을 과산화수소와 일반 산소로 전환시키며, 반응성이 큰 superoxide ion을 dismutation 시킴으로써 항산화 작용을 하게 된다. 또한 항산화제 (antioxidant)는 산소를 사용하는 생명체에서 산소로부터 생기는 자유기에 의한 손상과 자유기가 아닌 산소(단일 산소, 오존)에 의한 지질, 단백질, 핵산, 탄수화물의 손상들을 차단, 억제, 혹은 지연시키는 물질이다[4,15].

활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 단일 산소,

초산화물(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lipid peroxide, nitric oxide, peroxytrite (ONOO<sup>-</sup>), thiyl peroxy radical(RSOO<sup>-</sup>), ferryl radical (FeO<sup>2+</sup>), 수산 라디칼(OH<sup>-</sup>)들을 광범위하게 포함한다[2,10]. 특히 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 apoptosis와 necrosis에 의해 모든 세포의 조직에 손상을 가져오는 강력한 산화제이다[13]. 호기성 생물의 대사과정 산물인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 Fenton 반응을 통하여 hydroxyl radical로 전환되어 여러 생체조직에 손상을 일으킬 수 있는 생체 독성 물질이다[6]. 이러한 산화적 손상(oxidative damage)은 암, 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 허혈성 질환, 동맥경화증과 일반적 노화에 관여한다[5,9].

본 연구에서는 간암 세포인 hepatoma를 배양하여 어린 세포와 노화된 세포를 4단계의 cell passage로 구분하였고, 항산화 효소인 Cu/Zn SOD를 mRNA level에서 규명하고자 하였다[14]. 또한 세포에 강력한 독성을 지니는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리 농도와 시간을 달리하여 hepatoma에 인위적으로 처리함으로써 각각 다른 단계의 passage에서 얼마만큼의 산화제를 수용하고 조절할 수 있는지에 대한 능력을 규명하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포 배양

Hepa-1c7 cell은 *Mus musculus* (mouse)의 hepatoma cell로서 American Type Tissue Culture (ATCC)에서 분양받았다. 이 세포주에 streptomycin과 penicilin을 각각 100 unit

#### \*Corresponding author

Tel : +82-42-868-5791, Fax : +82-42-868-5801

E-mail : wonssook@hanmail.net

/ml의 농도로 첨가하고, FBS는 10%가 되도록 첨가하여 사용 전까지 4°C에서 보관하였다. 세포주는 사용 전 37°C에서 녹인 후, FBS와 antibiotic을 포함하는 MEM- $\alpha$ 로 washing하여 6,500 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 T-flask에 분주하였다. 계대 배양은 배양 중인 T-flask에서 배양액을 버리고 PBS 10 ml로 두 번 세척 하고, trypsin 3 ml을 넣은 후, 4분 동안 incubator에서 배양 하였다. 새로운 T-flask에 배양액 25 ml을 넣고, 세포수가  $4 \times 10^6$  개/ml이 되도록 새로운 flask에 분주한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리 조건

80~90%로 confluent 하게 자란 hepatoma cell에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 대조군과 실험군에 각각 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 그리고 5 mM이 되게 처리하여, 30 분, 1 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 또한 cell passage에 따른 양상을 보기 위해서 5, 15, 25, 35 cell passage에 대해서도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 위와 같은 시간과 양에 따라 각각 처리하였다.

### Total RNA의 추출

T-flask에서 배양한 세포는 PBS 20 ml로 두 번 washing한 후, 0.25% Trypsin과 0.03% EDTA solution 3 ml을 넣고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3 분 동안 배양하여 세포를 culture flask에서 분리한 후, MEM- $\alpha$  5 ml을 첨가하여 세포를 회수하였다. 각각의 농도, 시간, cell passage의 조건에서 세포를 모은 다음, 다시 PBS로 두 번 washing 하였다. Trizol Reagent (Life Technologies, Glasgow, United Kingdom) 1 ml을 첨가하여 vortexing 한 후, 세포를 완전히 resuspension 하여 total RNA를 추출하였으며, 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

### Cu/Zn SOD와 $\beta$ -actin의 Reverse Transcriptase Reaction

추출한 total RNA를 template로 하여 각각(Cu/Zn SOD와  $\beta$ -actin)의 cDNA를 합성하였다. 각각의 primer들은 primerfinder v0.07 프로그램을 사용하여 gene specific하게 디자인 하였다(Cu/Zn SOD RS-1 primer: sense 5'-CCGTGTGCGTGCTGAAG-3', RS-2 primer: antisense 5'-GGCAATCCCAATCACACCA-3' /  $\beta$ -actin M $\beta$ -1 primer: sense 5'-GGCTGTATCCCCCTCCAT-3', M $\beta$ -2 primer: antisense 5'-TGCTGGAAGGTCGACAGTGA-3'). Total RNA 15  $\mu$ l을 DEPC로 처리한 ddH<sub>2</sub>O로 10  $\mu$ l 되게 첨가한 후, 10 $\times$ RT-amplification buffer 2  $\mu$ l, dNTPs (2.5 mM) 1  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 1  $\mu$ l, reverse primer (10 pmol) 1  $\mu$ l, RNase inhibitor 40 unit, AMV reverse transcriptase 5 unit, DEPC로 처리한 ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 60 분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

### PCR(Polymerase Chain Reaction)

합성된 Cu/Zn SOD와  $\beta$ -actin의 cDNA를 이용하여 PCR

(Polymerase Chain Reaction, Perkin Elmer 480, USA)을 수행하였다. 각각을 1.5% agarose gel상에서 분리한 후, Gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 elution하였다. DNA sequence는 Solgent사(Korea)에 의뢰하였으며 분석 결과 동일 서열임을 확인하였다.

### Cu/Zn SOD and $\beta$ -actin의 TA cloning

Cu/Zn SOD and  $\beta$ -actin의 PCR product를 1.5% agarose에서 elution하여 실온에서 30 분 반응시켜 TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen)에 삽입하였다.

### DNA labeling

PCR product를 Ready-To-Go DNA labeling Kit (dCTP, Pharmacia Biotech, USA)을 사용하여 Cu/Zn SOD과  $\beta$ -actin의 probe를 제작하였다. 제공한 protocol에 따라 50 ng의 DNA를 37°C에서 30 분 동안 반응시켜 labeling 하였다. Labeling이 끝난 후, 반응액 중에 labeling 되지 않은 DNA를 제거하기 위해 Qiaquick nucleotide removal kit를 이용하였다.

### Northern blotting

Cell passage 5, 15, 25, 35에서 각각 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 5 mM 되도록 처리하여 30 분, 1 시간 동안 incubator에서 배양한 후, 세포에서 total RNA를 분리하고, 전기 영동하여 Immobilon-Ny+membrane (Millipore)에 transfer한 후, Cu/Zn SOD과  $\beta$ -actin의 probe로 각각 hybridization 하였다.

Total RNA를 전기 영동하여 transfer한 membrane을 hybridization buffer 30 ml을 넣은 bottle에 넣고, 60°C에서 2 시간 동안 prehybridization을 수행하였다. Labeling한 probe를 첨가하여 18 시간 동안 hybridization을 수행하였다. Hybridization이 끝난 membrane은 68°C의 washing buffer I (2 $\times$ SSC, 0.1% SDS)으로 5 분씩 두 번, washing buffer II (0.1 $\times$  SSC, 1% SDS)로 5 분씩 두 번 수행하였고, washing buffer III (1 $\times$ SSC)에서 washing할 때는 방사능 측정기 (Geiger counter)로 감지하면서 시간을 적절히 조절하였다. 세척이 끝난 membrane은 -75°C에서 약 일주일 동안 감광시킨 후에 현상하였다.

## 결과 및 고찰

### Cu/Zn SOD 및 $\beta$ -actin probe의 제작

배양한 세포에서 추출한 total RNA 15 $\mu$ g을 이용하여 합성한 first cDNA를 template로 하여 RS-1, RS-2 primers를 이용하여 RT-PCR을 수행하고 1% agarose gel에서 전기 영동하였다. 그 결과 Cu/Zn SOD은 446 bp,  $\beta$ -actin은 1 kb의 밴드로 확인되었다. 이러한 PCR product를 TOPO vector에 삽입하여 transformation 시킨 후, 플라스미드를 추출하여

*EcoRI*으로 digestion하여 1% agarose gel에 전기 영동하였다. 그 결과 3.9 kb의 TOPO vector에 446 bp의 Cu/Zn SOD insert DNA가 transformation 되었음을 확인하였다(Fig. 1).

**Northern blot analysis**

유전자의 발현 정도를 비교하기 위하여 housekeeping 유전자인  $\beta$ -actin을 선택하여 동일한 조건으로 Northern blot 분석을 수행하였다. Cu/Zn SOD는 600 bp의 위치에서 밴드가 확인되었다. 강력한 산화력을 지니는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30 분 처리했을 경우, 5 passage에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 증가시켜도 비슷한 양상을 보였다. 15 passage의 경우 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 500  $\mu$ M, 1 mM, 5 mM로 각각 처리했을 때, Cu/Zn SOD의 발현양이

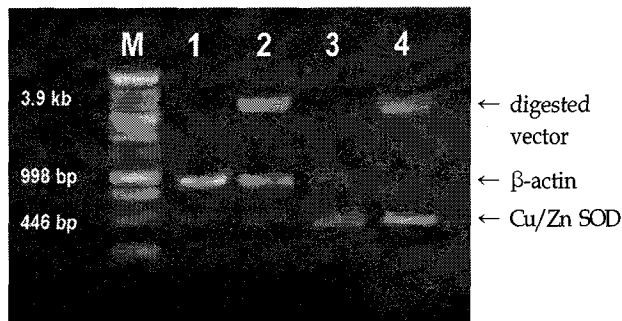


Fig. 1. RT-PCR products using each specific primers and digestion of vectors contained insert using *EcoRI*. M, DNA weight marker; lane 1,  $\beta$ -actin PCR product; lane 2,  $\beta$ -actin-vector digestion; lane 3, Cu/Zn SOD PCR product; and lane 4, Cu/Zn SOD-vector digestion.

점차 증가하였다. 25 passage에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1 mM과 5 mM로 각각 처리 했을 때, Cu/Zn SOD의 발현양이 가장 많은 것으로 나타났으며, 노화가 충분히 진행된 35 passage에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 증가시켜도 Cu/Zn SOD의 발현에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

위와 동일한 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 각각 1 시간 동안 처리했을 경우, 5 passage에서 25 passage까지의 세포에서 산화제 처리를 하지 않은 control에서의 발현이 점차 증가하는 양상과 같이 각각의 산화제 농도에서도 Cu/Zn SOD의 발현양이 점차 증가하였으나, 30 분 동안 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리 했을 때와 같이 35 passage에서는 발현 정도의 차이가 거의 나타나지 않았다(Fig. 3).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30 분과 1 시간 동안 각각 처리했을 경우에 전반적인 발현양을 비교했을 때, 30분 동안 처리한 세포에서 발현이 더 높은 것으로 나타났다. 즉 5 passage는 유아기 상태로 강력한 산화제에 대하여 방어할 수 있는 능력이 부족한 것으로 보이며, 15, 25 passage는 중, 장년층으로 환경에 대해 적응할 수 있는 능력이 갖추었기 때문에 항산화력도 증가한 것으로 보인다. 노화가 많이 진행된 35 passage는 산화제에 대한 방어능력이 부족한 것으로 나타났으며, 따라서 항산화효소의 발현 정도도 낮은 것으로 보인다. 그러나 많은 다른 연구들의 결과를 보면, 산화제를 농도와 시간별로 처리했을 때 다른 항산화 효소보다 Cu/Zn SOD의 발현정도는 거의 비슷한 것으로 나타났다. 본 연구의 결과도 농도와 시간이 증가하여도 그 발현 정도에서 미미한 차이가 나타남을 알 수 있었다. 이것은 투여한 산화제의 농도가 배양한 세포에서

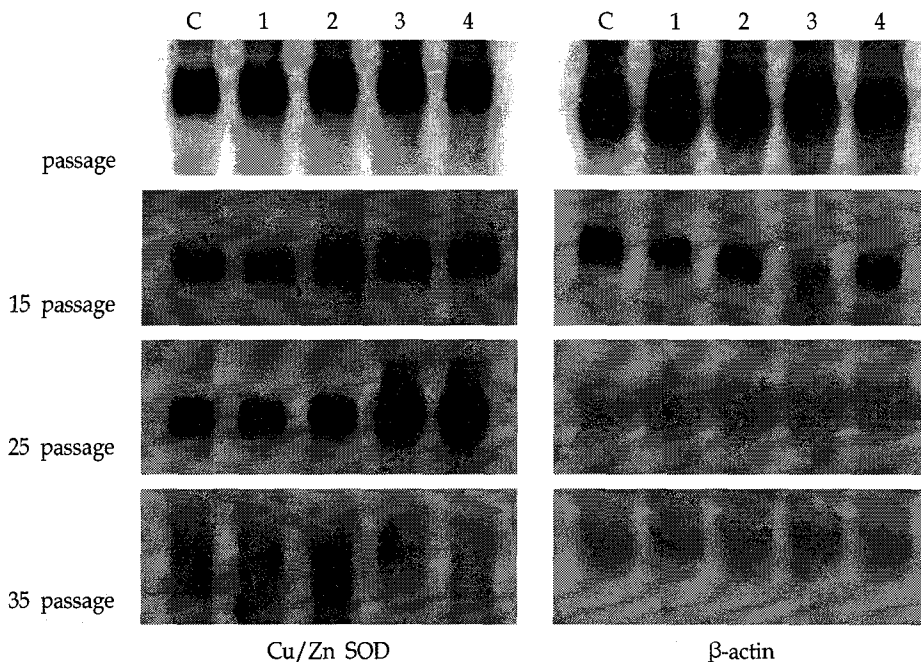


Fig. 2. Cu/Zn SOD and  $\beta$ -actin mRNA expression in 5, 15, 25, 35 passage cultured cell with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment for 30 min. C, control; lane 1, 100  $\mu$ M; lane 2, 500  $\mu$ M; lane 3, 1 mM; and lane 4, 5 mM.

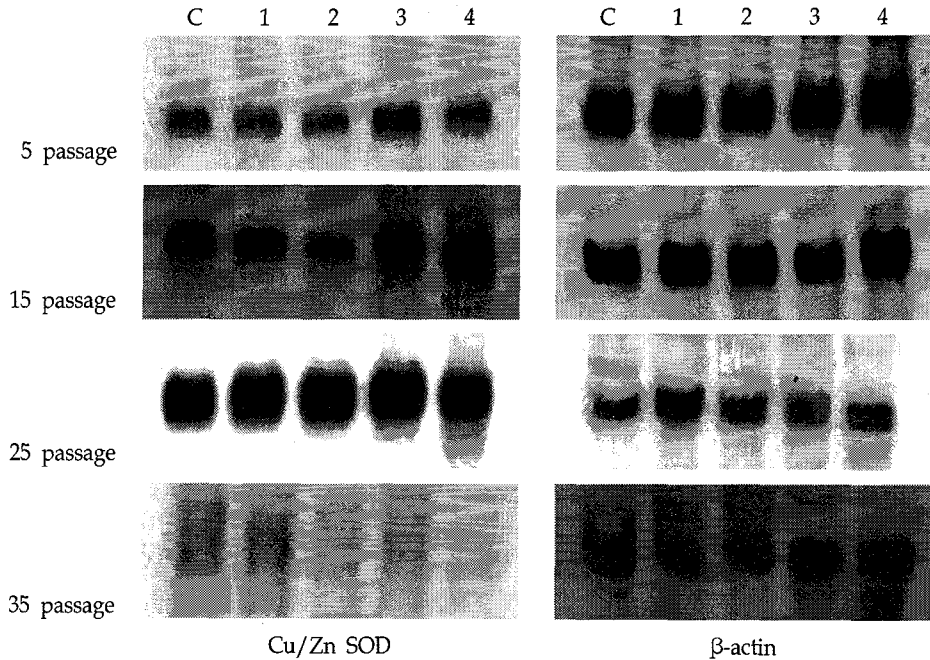


Fig. 3. Cu/Zn SOD and β-actin mRNA expression in 5, 15, 25, 35 passage cultured cell with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment for 1 hour. C, control; lane 1, 100 μM; lane 2, 500 μM; lane 3, 1 mM; and lane 4, 5 mM.

물로 전환시킬 수 있을 정도의 농도이기 때문에 산화제의 농도가 증가하여도 항산화 효소의 발현양은 미미하지만 증가한 것으로 보인다. 또한 산화제로써 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 A549 cell (human lung adenocarcinoma)에서 짧은 시간동안 고농도로 처리했을 때, cell death와 apoptosis가 나타나는 것으로 보고되었다[8,10]. 따라서 인위적으로 산화제를 투여하여 항산화 효소의 발현양을 측정하고, 산화제와 항산화제를 함께 투여했을 때 항산화 능력이 어떻게 변화되는지를 알 수 있다면 노화와 관련된 만성 질환을 치료하고 더 나아가 장수와도 연관을 지을 수 있을 것으로 보인다.

### 요 약

생체는 산소를 소비하는 대사 과정 중에 초산화물 (superoxide, O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 수산 라디칼(OH)과 같은 다양한 활성산소(reactive oxygen)들을 생성하게 되며, 그 중에서도 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)는 biological membrane을 자유롭게 통과하며, 세포내에서 hydroxyl radical 등의 반응성이 큰 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 발생시키는 작용을 하는 강력한 산화제이다. 세포를 계대 배양 (5, 15, 25, 35 passage)하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 농도별(100 μM, 500 μM, 1 mM, 5 mM)로 처리하고, 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리 시간(30 분, 1 시간)을 변화시킴으로써, Hepatoma 세포주에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 Cu/Zn SOD의 발현을 Northern blot을 통하여 다음과 같이 분석하였다. 1)Hepatoma 세포주에서 시간별, 농도별로 산화제를 처리 했을 때 각각의 경우에서 발현양의 차이

는 적었지만, 오랜 시간동안 고농도의 산화제에 노출시켰을 때 항산화 능력이 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. 2)계대 배양을 증가시키는 것은 노화가 진행된다는 것을 의미하므로, 산화제를 처리 했을 때 25 passage에서 35 passage 단계에서 항산화 효소의 발현 정도가 급격히 감소되는 것으로 미루어 보아 이 단계에서 노화가 진행되었음을 추측할 수 있었다. 3)동일한 시간과 농도로 처리했을 때 각각의 passage의 발현 level에서 보이는 양상과는 다르게 35 passage에서는 500μM이상의 농도를 1 시간동안 노출시켰을 경우에 Cu/Zn SOD가 거의 발현되지 않았으며, 30 분 동안 노출시켰을 때에는 500 μM의 농도까지 방어 할 수 있는 능력을 가진 것으로 보인다.

### 감사의 글

본 논문은 2006 학년도 한남대학교 교비학술연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Allen, R. G. and M. Tresini. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free. Radic. Biol. Med.* **28**, 463-499.
2. Ames, B. N. 1989. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.* **214**, 41-46.
3. Diguisseppi, J. and I. Fridovich. 1984. The toxicity of molecular oxygen. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **12**, 315-342.
4. Finkel, T. 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Cell*

- Biol.* **15**, 247-254.
5. Gorman, A. M., A. McGowan, C. O'Neill and T. Cotter. 1996. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J. Neurosci.* **139**, 45-52.
  6. Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge, 1991. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 501-504.
  7. Harman, D. 1981. The aging process, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 7124-7128.
  8. Kazzaz, J. A., J. Xu, T. A. Palaia, L. Mantell, A. M. Fein and S. Horowitz. 1996. Cellular oxygen Toxicity. *J. Biol. Chem.* **25**, 15182-15186.
  9. Mattson, M. P. and Y. Goodman. 1995. Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium. *Brain Res.* **676**, 219-224.
  10. Prosenjit, S, S. Mukherjee, G. Bhaumik, P. Das, S. Ganguly, N. Choudhury and S. Raha. 2003. Enhancement of catalase activity by repetitive low-grade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposures protects fibroblasts from subsequent stress-induced apoptosis. *Mutat. Res.* **529**, 87-94.
  11. Shinyashiki, S., Y. Kumagai, H. T. Shino, J. Nagafune, N. Takasawa, J. Suzuki, I. Matsuzaki, S. Satoh, M. Sagai and N. Shimojo. 1996. Selective inhibition of the mouse brain Mn-SOD by methylmercury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2**, 359-366.
  12. Shull, S., N. H. Heintz, M. Periasamy, M. Manohar, Y. M. W. Janssen, J. P. Marsh and B. T. Mossman. 1991. Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J. Biol. Chem.* **266**, 24398-24403.
  13. Stadtman, E. R. and Oliver, C. N. 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins physiological consequences. *J. Biol. Chem.* **266**, 2005-2008.
  14. Teixeira, H. D. and Meneghini, R. 1996. Chinese hamster fibroblasts overexpressing Cu/Zn-superoxide dismutase undergo a global reduction in antioxidant and an increasing sensitivity of DNA to oxidative damage. *Biochem. J.* **315**, 821-825.
  15. Urso, M. L. and P. M. Clarkson. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol.* **189**, 41-54.