

랫트 간에서 tert-Butylhydroperoxide 투여에 의한 글루타치온과 타우린의 생합성 변화

김선주 · 박현아 · 김영철[#]

서울대학교 약학대학

(Received April 1, 2009; Revised September 25, 2009; Accepted September 29, 2009)

Changes in Biosynthesis of Glutathione and Taurine in Rat Liver Challenged with tert-Butylhydroperoxide

Sun Ju Kim, Hyun Ah Park and Young Chul Kim[#]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — We examined metabolic conversion of cysteine into glutathione (GSH) and taurine in rat liver under oxidative stress. Administration of tert-butylhydroperoxide (t-BHP) into the portal vein of male rats resulted in a rapid elevation of serum sorbitol dehydrogenase, alanine aminotransferase, and aspartate aminotransferase activities, which decreased gradually in 24 hr. Hepatic cysteine concentration was reduced in 3 hr, and recovered progressively, reaching a level greater than 200% of the normal value in 24 hr. GSH was increased both in liver and blood at 9 hr after t-BHP challenge, whereas hypotaurine or taurine was not altered. γ -Glutamylcysteine synthetase (GCS) activity was increased from 9 hr after t-BHP treatment, but protein expression of the GCS-heavy subunit was not changed in liver. Activity or expression of cysteine dioxygenase was not affected by t-BHP treatment. Taken together, these data show that an acute oxidant challenge to the rats may induce upregulation of cysteine availability and GCS activity, resulting in an enhancement of hepatic GSH synthesis, but the increased cysteine level does not stimulate taurine synthesis via cysteine sulfinate pathway. It is indicated that the regulation of GSH and taurine biosynthesis from cysteine is not solely dependent on the cysteine concentration in rat liver under oxidative stress.

Keywords □ tert-butylhydroperoxide, glutathione, taurine, γ -glutamylcysteine synthetase, cysteine dioxygenase

간은 methionine 대사의 50%, 생체내 methylation 반응의 80% 이상이 일어나는 장기로서 유허합유아미노산 대사에서 중추적인 역할을 수행한다.¹⁾ 간에서 유허합유아미노산 대사는 유허전달경로(transsulfuration pathway)를 통해 일어나며 첫단계는 methionine의 S-adenosylmethionine(SAM)으로의 전환이다. 이 반응은 methionine adenosyltransferase(MAT)에 의해 촉매된다. 합성된 SAM은 다양한 methylation 반응에서 methyl donor로 사용되며 이 반응의 부산물인 S-adenosylhomocysteine(SAH)은 homocysteine과 adenosine으로 전환된다. Homocysteine은 cystathionine β -synthase의 작용에 의해 cystathionine을 합성하며, cystathionine은 cystathionine γ -lyase에 의해 cysteine으로

전환된다. Cysteine은 비가역적으로 taurine과 glutathione (GSH)으로 대사된다.

Cysteine의 주요 대사생성물의 하나인 taurine은 포유동물의 체내에 가장 높은 농도로 존재하는 유리아미노산으로 아미노기가 β -카본에 위치한 β -amino sulfonic acid이며 대부분 간에서 합성된다. Taurine은 오랫동안 단순한 배설형 물질로 간주되었으나 근래에 들어와 다양한 생리활성, 즉, bile acid conjugation, central nervous tissue regulation, 칼슘농도조절, 삼투압유지, membrane stabilization, 수소이온농도의 항상성유지, 항산화작용 등에 관여하는 것으로 제안되고 있다.²⁾ 반면, GSH는 활성산소종을 직접 제거하고 친전자성 물질을 무독화시켜 세포의 critical sites를 보호할 뿐만 아니라, 이 이외에도 γ -glutamyl cycle을 통한 아미노산의 대사, bile acid 비의존성 담즙분비의 유지, 여러 효소의 활성조절, prostaglandin A와 같은 내인성물질의 합성, 그리고 DNA 합성과 면역활성과 같은 critical cellular process의

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-880-7852 (팩스) 02-872-1795
(E-mail) youckim@snu.ac.kr

조절 등, 다양하고 중요한 생리기능을 갖고 있다.³⁾ 간은 cysteine으로부터 합성된 GSH의 대부분을 혈액을 통해 유리하여 다른 장기에 공급한다. 따라서 생체조직 사이의 유헴합유아미노산 순환에 간은 중요한 역할을 수행한다.

Cysteine으로부터 taurine의 합성은 cysteine sulfinate pathway를 경유하여 일어난다.⁴⁾ Cysteine은 cysteine dioxygenase (CDO)에 의해 cysteine sulfinate로 산화되고 다시 cysteine sulfinate decarboxylase(CDC)에 의해 hypotaurine으로 대사된 후 taurine으로 전환된다. GSH의 생합성은 속도조절단계에 관여하는 γ -glutamylcysteine synthetase(GCS)의 활성과 기질인 cysteine의 유용성에 의해 결정된다.⁵⁾ 설치류에게 고단백식이나 유헴합유아미노산이 강화된 사료를 공급하면 CDO 활성이 증가하며,⁶⁾ 랫트 간세포 배지의 cysteine 농도증가에 따라 taurine의 생성량은 상승한다.⁷⁾ 일반적으로 methionine이나 cysteine, 단백질의 공급이 증가하면 급격하게 CDO의 활성이 증가하고, GCS의 활성은 감소한다. 반대로 식이를 통한 cysteine 공급량이 감소되면 CDO 활성은 저하되고 GCS 활성은 상승하여 보다 많은 양의 cysteine이 GSH 합성에 소모된다. 따라서 간내 cysteine 농도는 GCS와 CDO 활성을 조절하는 가장 중요한 인자로 제시되었다.⁸⁾

한편 최근에 본 실험실에서 수행된 연구결과는 cysteine의 taurine과 GSH로의 대사조절이 단순하게 cysteine 유용성에만 의존하지 않을 가능성을 제시하고 있다. 대사분해과정에서 산화적스트레스를 유발하는 ethanol의 급성적인 투여는 cysteine의 합성을 억제하였으나 동시에 taurine으로의 catabolism을 항진시켰다.^{9,10)} 이 결과는 세포내 산화적스트레스 상태에서 cysteine의 GSH나 taurine으로의 대사전환이 cysteine 농도에 의존하지 않음을 암시한다. 또 고지방식으로 유도된 비알콜성지방간에서도 GSH는 감소되고 taurine 및 hypotaurine의 간내 농도는 현저하게 상승되었다.¹¹⁾ 이 결과들은 GSH의 생체내 항산화물질로서의 중추적인 역할을 고려할 때 다소 역설적으로 보인다.

본 연구는 급성적인 산화적스트레스가 cysteine으로부터 taurine과 GSH의 생합성과정에 주는 변화를 측정하기 위해 수행되었다. 랫트의 문맥 내로 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)를 직접 투여하여 간세포에 산화적스트레스를 유발하고 24시간 경과시까지 taurine과 GSH 합성에 관련된 지표의 변화를 모니터링하였다.

실험방법

실험동물

체중 250~300 g의 웅성 Sprague-Dawley 랫트를 대한바이오텍(음성군, 충청북도)에서 구입하였다. 랫트를 55±5%의 습도, 22±2°C의 온도가 유지되는 사육실에서 일주일 이상 적응시켰으며 오전 7시를 기준으로 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다.

사료와 식수는 자유롭게 공급하였다. 에테르 마취시킨 랫트의 복강을 절개하고 간문맥을 통해 생리식염수에 희석시킨 t-BHP(1 mmol/ml/kg)를 투여하였다. 대조군은 같은 부피의 생리식염수를 투여하였다. 절개한 부분을 봉합하고 회복시켰으며 정해진 시점에 복대동맥으로부터 혈액을 채취하고 간을 적출하였다.

간독성 측정

Sorbitol dehydrogenase(SDH) 활성은 Gerlach의 방법으로 측정하였다.¹²⁾ 혈청과 NADH 용액을 혼합한 반응액에 fructose 용액을 가하고 흡광도 변화를 측정하였다. 효소 활성은 366 nm에서 1분간의 흡광도 변화를 측정하여 SDH unit/ml serum으로 나타내었다. Alanine aminotransferase(ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST) 활성은 Reitman과 Frankel의 방법으로 측정하였다.¹³⁾

유헴합유대사체의 측정

간과 혈장의 GSH는 enzymatic recycling method를 이용하여 측정하였다.¹⁴⁾ GSH disulfide(GSSG)는 시료에 2-vinylpyridine을 가해 GSH를 제거한 후 동일한 방법으로 측정하였다. 혈장과 간의 cysteine 함량은 Gaitonde의 방법을 이용하여 측정하였다.¹⁵⁾

Hypotaurine과 taurine은 HPLC 방법으로 측정하였다.¹⁶⁾ 적출한 간을 cold methanol 내에서 분쇄하고 원심분리하여 상등액을 취했다. 혈액은 원심분리하여 혈장을 얻고 methanol을 가하여 단백질을 제거한 다음 상등액을 시료로 사용하였다. O-Phthaldialdehyde로 유도체화하고 형광검출기(FP-920, Applied Biosystem, Foster, CA, U.S.A.)를 장착한 HPLC로 정량하였다. 0.1 M sodium acetic acid(Solvent A)와 methanol(97)+tetrahydrofuran(3)(v/v)(Solvent B)을 이동상으로 사용하였다. Solvent A를 0분에 90%, 0~4분에 82%로, 16~24분에 72%로, 27.5~35분에 55%로, 42.5~48분에 46%로, 48~50분에 30%로, 50~51분에 90%로 변화시키는 구배를 사용하였으며 유속은 1.2 ml/min 이었다.

효소활성 측정

적출된 간을 1 mM의 EDTA와 50 mM의 Tris-HCl을 포함하는 0.154 M KCl 용액(pH 7.4)에서 분쇄한 후 4°C, 10000 g로 20분간 원심분리하였다. 상등액을 104000 g에서 1시간 동안 초원심분리하고 상등액(cytosol)을 취해 효소활성측정에 사용하였다.

GCS 활성은 Sekura와 Meister의 방법으로 측정하였다.¹⁷⁾ 반응액에 cysteine을 가하고 37°C에서 15분 동안 배양하였다. 생성된 γ -glutamylcysteine을 O-phthaldialdehyde으로 유도체화하고 Yan과 Huxtable의 HPLC 방법을 사용하여 정량하였다.¹⁸⁾ CDO의 활성은 Bagley 등의 방법에 따라 측정하였다.¹⁹⁾ 반응액

을 37°C에서 17분간 배양하고 methanol로 반응을 종결시켰다. 생성물인 cysteine sulfinat을 *O*-phthaldialdehyde/2-mercaptoethanol으로 유도체화하고 형광검출기와 3.5 μ m Kromasil C18 column(4.6 \times 100 mm, Eka Chemicals, Bohus, Sweden)이 장착된 HPLC로 정량하였다.

Western blotting analysis

Cytosol의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 electroblotting하여 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 이 membrane을 5% nonfat milk를 함유하는 PBS-T 완충액으로 4°C에서 하룻밤 동안 처리하였다. Nitrocellulose membrane을 5% bovine serum albumin으로 희석한 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체로는 polyclonal anti-rat CDO serum과 anti-rat GCS heavy catalytic subunit(GCS-HS) serum을 사용하였다. Anti-CDO는 Yu Hosokawa 교수(Jissen Women's University, Tokyo, Japan)로부터 기증받았으며, Anti-GCS-HS는 Detroit R&D(Detroit, MI, U.S.A.)에서 구입하였다. PBS-T로 세척 후 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, U.S.A.)로 2시간 동안 처리하였다. 실험결과는 microcomputer imaging device(Model M1, Imaging Research, St. Catharines, Canada)로 scanning densitometry 하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며 two-tailed Student's *t*-test로 비교하였다. 유의적인 차이는 별도로 표시하지 않은 한 *P* 값이 0.05 이하인 경우를 기준으로 판정하였다.

실험결과 고찰

Cysteine은 다양한 단백질을 구성하는 building block으로 사용될 뿐만 아니라 inorganic sulfate, taurine과 GSH 합성에 사용된다. 이 유황함유아미노산은 다양한 생체물질의 합성에 필수적이거나 자체로 세포나 신경계에 독성이 있으므로 생체조직의 cysteine 농도는 일정범위 내에 존재하도록 유지되어야 한다. 따라서 식이 중의 단백질이나 유황전달경로를 경유한 cysteine의 공급과 GSH, taurine, inorganic sulfate, 단백질 합성원료로의 소모 간의 균형은 엄격하게 조절되고 있다. 일반적으로 식이 중의 methionine이나 cysteine의 공급이 증가하면 CDO는 upregulation되어 taurine과 sulfate로의 catabolism이 증가하며,^{6,7} 반대로 유황아미노산의 공급이 충분하지 않은 경우 CDO 활성은 저하되고 GCS 활성은 상승하여 cysteine은 GSH 합성에 효과적으로 사용된다.^{29,30} 따라서 cysteine의 농도가 CDO와 GCS 활성의 조절에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 제안되었다.⁸

급, 만성적인 간손상에서 유황함유아미노산의 대사는 현저하게 교란된다. 본 실험실에서는 선행연구를 통해 산화적스트레스가 주요 작용기전인 간독성물질에 의해 cysteine으로부터 GSH와 taurine으로의 대사는 현격하게 변화됨을 관찰하였다. 즉, 급성적인 ethanol 투여나 만성적인 고지방식 공급은 cysteine과 GSH의 간내 농도를 저하시키나 이 유황아미노산의 taurine으로의 전환은 역설적으로 증가하였다.⁹⁻¹¹ 이 결과들은 유황전달경로 상에서 taurine과 GSH으로의 대사조절이 전적으로 cysteine 유용성에 의존하고 있지는 않음을 암시하고 있다. 따라서 본 연구에서는 직접적으로 간문맥 내로 강력한 산화성물질을 투여하고 cysteine으로부터 GSH와 taurine으로의 대사전환에 관여하는 인자들의 시간 경과에 따른 변화를 측정하였다. t-BHP는 산화적스트레스에 의한 세포손상기전 연구를 위해 널리 사용되는 강력한 thiol oxidizing agent로 세포내의 GSH를 산화시켜 t-butyl alcohol과 GSSG를 생성하고, GSSG는 glutathione reductase에 의해 GSH로 환원되는 과정에서 NADPH를 소모한다.²² GSH 고갈과 NADPH의 산화는 Ca²⁺ homeostasis를 파괴하여 세포독성을 유발한다.²³ 또 t-BHP는 간세포의 cytochrome P450 효소나 적혈구의 hemoglobin에 의해 free radical로 전환되어 지질과산화물을 유발하고 세포 및 DNA 손상을 일으킨다.²⁴ 이러한 병변은 세포나 조직에서 일어나는 지속적인 산화적스트레스 효과와 동일한 것으로 알려져 있다.

혈청 간독성지표로 사용되는 ALT, AST와 SDH는 간세포손상과 독성에 민감하게 반응하며, 특히 SDH는 혈청지표 중에서 가장 예민한 간독성지표로 간주된다.²⁵ 또한 t-BHP는 랫트의 간에서 신속하게 산화적 손상을 유발하여 혈청 지표를 상승시킨다.²⁶ 본 실험에서 간문맥 내로 투여한 t-BHP에 의해 혈청 SDH 활성은 급격하게 상승하였으며 24시간 경과하였을 때에 최고값의 약 1/10 정도로 저하되었으나 여전히 정상값에 비해 현저하게 높았다(Table I). ALT 및 AST 활성도 SDH 활성과 비슷한 양상의 변화를 보였다. 따라서 사용된 용량과 투여조건에서 t-BHP는 산화적손상을 통해 급성적인 간독성을 유발함을 보여준다.

간의 cysteine 함량은 t-BHP 투여에 의해 일시적으로 감소하였으나 t-BHP 투여 9시간 후에 정상값으로 회복되었으며 24시간 후에는 정상값의 약 2배까지 증가하였다(Table II). Cysteine으로부터 합성되는 GSH는 t-BHP 투여 9시간 후에 유의적으로 상승하였으며 24시간대에서는 정상값보다 약 50% 증가하였다. Cysteine의 또다른 주요 대사생성물인 taurine과 그 전구체인 hypotaurine은 대조동물군에서도 간조직 내에서 24시간 동안 상당히 큰 폭의 변동을 보였다. 이 결과는 taurine으로의 catabolism이 적절한 cysteine 농도 유지를 위해 중요한 기능을 할 것이라는 Stipanuk 등의 제안을 지지하고 있는 것으로 보인다.^{8,20,21} 그러나 t-BHP에 의한 급성적인 산화적스트레스는 hypotaurine과 taurine 간내 농도에 아무런 영향을 주지 못했다.

Table I – Changes in serum enzyme activities

	Treatment	Time after treatment		
		3 hr	9 hr	24 hr
SDH	Control	5.8±1.5	3.1±0.8	4.7±0.5
	t-BHP	602.3±61.4***	398.6±57.8**	59.1±4.3***
AST	Control	82.8±1.9	90.1±3.6	46.2±4.4
	t-BHP	4057.7±332.4***	3596.9±295.7***	1410.4±73.5***
ALT	Control	35.6±2.6	30.4±3.6	22.3±2.0
	t-BHP	2615.0±200.7***	2872.1±458.9**	547.4±136.3***

Value given is mean±SEM for 4 rats. ***Significantly different from control (Student's *t*-test, $P < 0.01$, 0.001, respectively).

Table II – Changes in sulfur-containing substances in liver

	Treatment	Time after treatment		
		3 hr	9 hr	24 hr
Cysteine (nmol/g liver)	Control	96.9±10.4	98.9±4.5	82.7±11.8
	t-BHP	70.6±3.9*	90.4±12.1	173.3±13.3**
GSH (umol/g liver)	Control	5.47±0.44	3.54±0.20	4.83±0.32
	t-BHP	4.58±0.50	4.28±0.07*	6.69±0.15**
GSSG (nmol/g liver)	Control	112.3±7.0	88.4±6.0	117.9±6.0
	t-BHP	105.5±7.6	100.4±3.9	141.8±5.1*
Hypotaurine (nmol/mg protein)	Control	2.19±0.36	3.97±0.62	1.60±0.63
	t-BHP	1.72±0.49	3.23±1.60	2.36±0.39
Taurine (umol/g liver)	Control	1.89±0.12	6.05±1.76	1.27±0.58
	t-BHP	2.39±0.60	3.12±0.47	2.68±0.82

Value given is mean±SEM for 4 rats. ***Significantly different from control (Student's *t*-test, $P < 0.05$, 0.01, respectively).

Table III – Changes in sulfur-containing substances in blood

	Treatment	Time after treatment		
		3 hr	9 hr	24 hr
Cysteine (nmol/ml)	Control	17.00±1.52	16.69±0.29	14.70±1.29
	t-BHP	14.56±0.91	17.78±2.30	18.08±0.75
GSH (nmol/ml)	Control	4.70±0.43	3.24±0.51	4.74±0.58
	t-BHP	4.92±0.39	6.61±0.80*	3.25±0.30
Taurine (nmol/ml)	Control	168.23±18.36	168.17±20.92	129.09±15.25
	t-BHP	133.22±13.96	165.11±19.37	138.02±13.44

Value given is mean±SEM for 4 rats. *Significantly different from control (Student's *t*-test, $P < 0.05$).

본 실험에서 t-BHP 투여가 cysteine 함량을 신속하게 저하시킨 이유는 분명하지 않다. 그러나 이 시간대에서 cysteine의 주요 대사생성물인 GSH와 taurine 농도는 변화하지 않았으므로 cysteine 감소는 이 아미노산의 catabolism 증가보다는 유허전달 경로에서의 합성 억제에 기인한 것으로 판단된다. 반면 t-BHP 투여 후 시간 경과에 따라 유허전달경로를 통한 유허함유아미노산의 공급은 점차 증가하는 것으로 추정되며, 24시간대에 정상 값의 두배에 달한 간 cysteine 농도는 간과 혈액의 GSH 함량 증가(Table II, III) 및 GCS 활성의 상승과(Table IV) 연계되어 있는 것으로 보인다. 즉, 점차 증가된 간의 cysteine 유용성 및 GCS 활성에 의해 GSH 합성이 촉진되고 간으로부터의 GSH efflux 또

한 증가한 것으로 사료된다. 실제로 급성적인 사염화탄소 투여나 급, 만성적인 ethanol 섭취는 혈액으로의 GSH efflux를 증가시키는 것으로 본 실험실 및 타 연구지들에 의해 보고되었다.^{27,30)} 산화적스트레스 상태에서 간의 GSH efflux 증가는 methionine을 cysteine으로 전환시킬 수 없는, 즉, 간외조직(extrahepatic tissues)으로 cysteine의 안정적인 공급을 위한 기전이라는 가설이 Kaplowitz 등에 의해 제안된 바 있으며,³¹⁾ 본 연구실험에서 관찰된 급성적인 간독성 발생과 동반한 GSH의 생합성 증가와 혈액 내 GSH 함량증가는 이 제안을 지지하는 것으로 보인다.

GSH는 glutamate와 제한기질인 cysteine으로부터 γ -glutamylcysteine의 생성과 이 dipeptide와 glycine으로부터 GSH

Table IV – Changes in enzyme activities in liver

	Treatment	Time after treatment		
		3 hr	9 hr	24 hr
GCS (nmol/min/mg protein)	Control	5.31±1.42	5.91±0.72	5.04±0.31
	t-BHP	6.34±2.32	13.26±2.17*	8.38±1.91
CDO (nmol/min/mg protein)	Control	0.04±0.010	0.06±0.010	0.03±0.003
	t-BHP	0.05±0.010	0.04±0.003	0.04±0.001

Value given is mean±S.E.M. for 4 rats. *Significantly different from control (Student's *t*-test, $P < 0.05$).

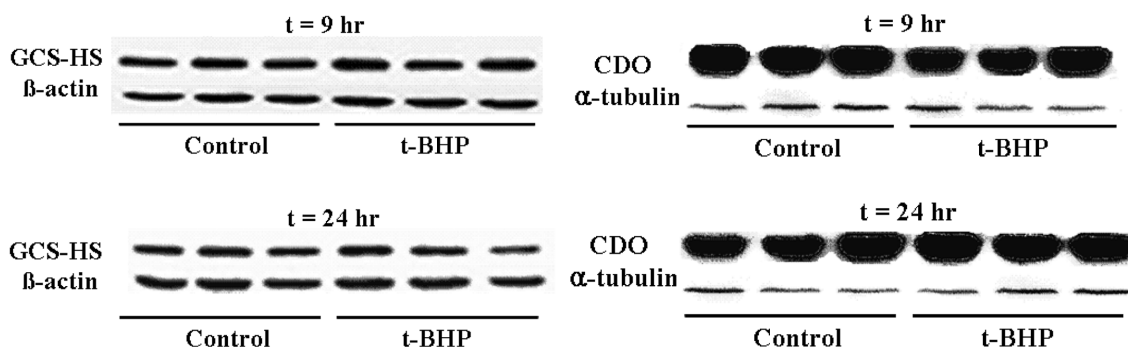


Fig. 1 – Expression of enzyme proteins in liver. Different rats were sacrificed at 9 and 24 hr after t-BHP challenge. Bands quantified densitometrically were compared statistically. There were no significant differences in CDO or GCS-HS levels between the control rats and the rats challenged with t-BHP either at $t=9$ hr or 24 hr (two-tailed Student's *t*-test, $P > 0.05$).

생성의 두 단계를 거쳐 합성되며 GCS에 의해 촉매되는 첫번째 과정인 γ -glutamylcysteine의 생성이 속도조절단계로 알려져 있다. GCS는 세포 내에서 GSH에 의해 경쟁적으로 feedback inhibition 된다.³²⁾ GCS는 heavy subunit(GCS-HS; ~73 kDa)과 light subunit(GCS-LS; ~30 kDa)으로 이루어져 있다.³³⁾ GCS-HS는 GCS 활성 및 GSH에 의한 feedback inhibition과 관련이 있으며 GCS-LS는 효소활성과 직접적인 관계는 없으나 GCS의 glutamate나 GSH와의 affinity 조절기능을 갖는다.³⁴⁾ 많은 연구자들은 산화적스트레스 상태에서 GCS subunits의 regulation에 대해서 연구를 수행해왔다. 실제로 buthioninesulfoximine, diethyl maleate, tert-butylhydroquinone, okadaic acid, TNF- α 등의 산화성물질은 in vitro에서 GCS-HS의 transcription 증가를 통해 GCS의 활성을 항진시킨다.³⁵⁻³⁷⁾ 또한 동물실험에서도 수주간의 thioacetamide, ethanol, 또는 고지방사료 투여는 간의 GSH를 감소시키고 GCS를 upregulation하는 것으로 본 실험실 및 몇몇 연구자들에 의해 보고되었다.^{11,38,39)} 본 연구실험에서 간과 혈액의 GSH는 t-BHP 투여 9시간 후에 현저하게 증가하였다. GCS 활성 또한 투여 9시간 후에 정상값의 2배 이상으로 크게 증가하였다. 이 결과는 급성적으로 유발된 산화적스트레스 상태에서 GCS 활성의 regulation은 단순히 GSH 함량에 의존하지는 않음을 보여주며 이것은 급성적인 사염화탄소나 ethanol 투여시 GSH와 GCS 모두의 증가를 보고한 본 실험실의 최근 연구결과와 일치한다.^{9,29,30)} 한편 사용된 실험조건에서 t-BHP는

GCS-HS의 단백질 양에는 아무런 변화를 주지 않았다(Fig. 1). 따라서 급성적인 산화적스트레스 하에서 GCS 활성의 regulation에는 세포내 GSH나 cysteine 농도 이외에 아직 알려지지 않은 인자가 개재되어 있음을 본 실험결과는 암시하고 있다.

CDO는 비가역적인 cysteine catabolism에서 중심적인 역할을 수행하므로 간세포 내 cysteine 농도 조절기능을 갖는다.²⁰⁾ 반대로 cysteine 투여는 CDO mRNA에는 영향을 주지 않으나 CDO의 turn-over 억제를 통해 이 효소의 양을 증가시킨다.⁴⁰⁾ 결국 GSH와 taurine 합성은 cysteine 농도에 따라 서로 상반되게 변화하므로 이 유흡합유아미노산은 CDO와 GCS 활성 조절의 initial signal로 제안되었다.^{8,41)} 본 연구실험에서 간의 hypotaurine과 taurine의 농도는 CDO의 활성이 거의 일정 범위로 유지되는 것에 비해 상당히 큰 폭의 변화를 보였으며(Table II, IV), 이 변화는 간내 cysteine 농도와도 높은 상관성을 보이지 않았다. 한편 CDO의 활성과 효소단백질 발현은 t-BHP 투여 후 9시간과 24시간대에 측정하였을 때 대조군에 비해 차이를 보이지 않았다(Fig. 1, Table IV). 이 결과는 본 실험에서 사용된 조건에서 CDO 단백질 발현이나 효소활성의 regulation은 cysteine 유흡성에 의존하지 않음을 보여준다.

결론

본 연구실험에서는 급성적인 산화적스트레스에 의해 간의 유

황전달경로 상에서 일어나는 cysteine의 GSH와 taurine으로의 대사변화를 측정하였다. 간문맥으로 투여된 t-BHP는 신속하게 혈청 내 간독성지표를 상승시켜 3시간대에 최고값에 도달하였으며 이후 점차 감소되었다. 간내 cysteine은 일시적인 감소 이후 회복되어 24시간대에는 정상값의 두배 이상으로 증가하였다. GSH는 간과 혈액 모두에서 t-BHP 투여 9시간 후에 증가하였으나 cysteine의 또다른 주요 대사생성물인 hypotaurine과 taurine의 농도는 t-BHP 투여에 의해 변화하지 않았다. GSH 합성과정에서 속도제한단계를 조절하는 GCS 활성 또한 9시간대부터 증가하였으나 GCS-HS 단백질 발현에는 차이가 없었다. CDO의 활성화와 단백질 발현은 급성적인 산화적스트레스에 의해 변화하지 않았다. 결론적으로 본 실험결과는 산화성물질에 의해 급성적으로 손상된 간에서는 cysteine 유용성과 GCS 활성의 증가에 의해 GSH 합성이 촉진되나 이때 cysteine의 증가는 cysteine sulfinate pathway를 통한 taurine 합성에는 영향을 주지 않음을 보여주고 있다. 따라서 급성적으로 유도한 산화적스트레스 상태의 간에서 cysteine으로부터 GSH와 taurine으로의 대사조절에는 단순히 cysteine 유용성 이외에 복합적인 인자들이 관여하고 있음을 본 실험결과는 시사하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2008년도 교육과학기술부의 재원으로 한국과학재단의 부분적인 지원을 받아 수행되었음(R01-2008-000-10622-0).

참고문헌

- 1) Mudd, S. H. and Poole, J. R. : Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* **24**, 721 (1975).
- 2) Timbrell, J. A., Seabra, V. and Waterfield, C. J. : The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Gen. Pharmacol.* **26**, 453 (1995).
- 3) Lu, S. C. : Regulation of glutathione synthesis. *Cur. Top. Cell. Regul.* **36**, 95 (2000).
- 4) Cooper, A. J. : Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 187 (1983).
- 5) Meister, A. and Anderson, M. E. : Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711 (1983).
- 6) Kohashi, N., Yamaguchi, K., Hosokawa, Y., Kori, Y., Fujii, O. and Ueda, I. : Dietary control of cysteine dioxygenase in rat liver. *J. Biochem.* **84**, 159 (1978).
- 7) Stipanuk, M. H., Coloso, R. M., Garcia, R. A. and Banks, M. F. : Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione, sulfate and taurine in rat hepatocytes. *J. Nutr.* **122**, 420 (1992).

- 8) Stipanuk, M. H. : Role of the liver in regulation of body cysteine and taurine levels: a brief review. *Neurochem. Res.* **29**, 105 (2004).
- 9) Kim, S. K., Seo, J. M., Jung, Y. S., Kwak, H. E. and Kim, Y. C. : Alterations in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids induced by ethanol in rats. *Amino Acids* **24**, 103 (2003).
- 10) Kim, S. J., Jung, Y. S., Kwon, D. Y. and Kim, Y. C. : Alleviation of acute ethanol-induced liver injury and impaired metabolomics of S-containing substances by betaine supplementation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 893 (2008).
- 11) Kwon, D. Y., Jung, Y. S., Kim, S. J., Park, H. K., Park, J. H. and Kim, Y. C. : Impaired sulfur-amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by betaine supplementation in rats. *J. Nutr.* **139**, 63 (2009).
- 12) Gerlach, U. E. : Sorbitol dehydrogenase. In *Methods in Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. (ed.). Vol 3, Verlag Chemie, Weinheim, p. 112 (1983).
- 13) Reitman, S. and Frankel, S. A. : Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Amer. J. Clin. Pathol.* **28**, 56 (1957).
- 14) Griffith, O. W. : Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207 (1980).
- 15) Gaitonde, M. K. : A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.* **104**, 627 (1967).
- 16) Ranjendra, W. : High performance liquid chromatographic determination of amino acids in biological samples by pre-column derivatation with o-phthalaldehyde. *J. Liq. Chromatogr.* **10**, 941 (1987).
- 17) Sekura, R. and Meister, A. : γ -Glutamylcysteine synthetase. Further purification, "half of the sites" reactivity, subunits, and specificity. *J. Biol. Chem.* **252**, 2599 (1977).
- 18) Yan, C. C. and Huxtable, R. J. : Fluorimetric determination of monobromobimane and o-phthalaldehyde adducts of γ -glutamylcysteine and glutathione: application to assay of γ -glutamylcysteinyl synthetase activity and glutathione concentration in liver. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **672**, 217 (1995).
- 19) Bagley, P. J., Hirschberger, L. L. and Stipanuk, M. H. : Evaluation and modification of an assay procedure for cysteine dioxygenase activity: high-performance liquid chromatography method for measurement of cysteine sulfinate and demonstration of physiological relevance of cysteine dioxygenase activity in cysteine catabolism. *Anal. Biochem.* **227**, 40 (1995).
- 20) Stipanuk, M. H., Londono, M., Lee, J. I., Hu, M. and Yu, A. F. : Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acid levels. *J. Nutr.* **132**, 3369

- (2002).
- 21) Cresenzi, C. L., Lee, J. I. and Stipanuk, M. H. : Cysteine is the metabolic signal responsible for dietary regulation of hepatic cysteine dioxygenase and glutamate cysteine ligase in intact rats. *J. Nutr.* **133**, 2697 (2003).
 - 22) Rush, G. F., Gorski, J. R., Ripple, M. G., Sowinski, J., Bugelski, F. and Hewitt, W. R. : Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **78**, 473 (1985).
 - 23) Bellomo, G., Jewell, S. A., Thor, H. and Orrenius, S. : Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6842 (1982).
 - 24) Davies, M. J. : Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fraction. *Biochem. J.* **257**, 603 (1989).
 - 25) Plaa, G. L. and Charbonneau, M. : Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principles and Methods of Toxicology*, Hayes, A. W. (ed.). Raven Press, New York, p. 839 (1994).
 - 26) Wang, C. J., Wang, J. M., Lin, W. L., Chu, C. Y., Chou, F. P. and Tseng, T. H. : Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 411 (2000).
 - 27) Fernandez-Checa, J. C., Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. : Effects of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Relationship of cytosolic glutathione to efflux and mitochondrial sequestration. *J. Clin. Invest.* **83**, 1247 (1989).
 - 28) Kadiiska, M. B., Gladen, B. C., Baird, D. D., Dikalova, A. E., Sohal, R. S., Hatch, G. E., Jones, D. P., Mason, R. P. and Barrett, J. C. : Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 838 (2000).
 - 29) Choi, D. W., Kim, S. Y., Kim, S. K. and Kim, Y. C. : Factors involved in hepatic glutathione depletion induced by acute ethanol administration. *J. Toxicol. Environ. Health A* **60**, 459 (2000).
 - 30) Kim, S. J., Kwon, D. Y., Choi, K. H., Choi, D. W. and Kim, Y. C. : Impaired metabolomics of sulfur-containing substances in rats treated with carbon tetrachloride acutely. *Toxicol. Res.* **24**, 281 (2008).
 - 31) Kaplowitz, N., Aw, T. Y. and Ookhtens, M. : The regulation of hepatic glutathione. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**, 715 (1985).
 - 32) Richman, P. G. and Meister, A. : Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* **250**, 1422 (1975).
 - 33) Seelig, G. F., Simonsen, R. P. and Meister, A. : Reversible dissociation of γ -glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J. Biol. Chem.* **259**, 9345 (1984).
 - 34) Huang, C. S., Chang, L. S., Anderson, M. E. and Meister, A. : Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **268**, 19675 (1993).
 - 35) Shi, M. M., Kugelman, A., Iwamoto, T., Tian, L. and Forman, H. J. : Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces γ -glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 26512 (1994).
 - 36) Rahman, I., Bel, A., Mulier, B., Lawson, M. F., Harrison, D. J., Macnee, W. and Smith, C. A. : Transcriptional regulation of γ -glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 832 (1996).
 - 37) Takamura, Y., Fatma, N., Kubo, E. and Singh, D. P. : Regulation of heavy subunit chain of γ -glutamylcysteine synthetase by tumor necrosis factor- α in lens epithelial cells: role of LEDGF/p75. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* **290**, C554 (2006).
 - 38) Lu, S. C., Huang, Z. Z., Yang, H. and Tsukamoto, H. : Effect of thioacetamide on the hepatic expression of γ -glutamylcysteine synthetase subunits in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **159**, 161 (1999).
 - 39) Lu, S. C., Huang, Z. Z., Yang, H., Mato, J. M., Avila, M. A. and Tsukamoto, H. : Changes in methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine homeostasis in alcoholic rat liver. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G178 (2000).
 - 40) Lee, J. I., Londono, M., Hirschberger, L. L. and Stipanuk, M. H. : Regulation of cysteine dioxygenase and γ -glutamylcysteine synthetase is associated with hepatic cysteine level. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 112 (2004).
 - 41) Kwon, Y. H. and Stipanuk, M. H. : Cysteine regulates expression of cysteine dioxygenase and γ -glutamylcysteine synthetase in cultured rat hepatocytes. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E804 (2001).