

*Saccharomyces cerevisiae*에서 이온화 방사선과 *N*-acetyl-L-cysteine 처리에 따른 세포 생존과 Superoxide Dismutase와 Catalase 유전자 발현

박지영 · 백동원¹ · 모하마드닐리² · 김진규*

한국원자력연구원 방사선과학연구소, ¹경상대학교 대학원 응용생명과학부
²스페인 도네시방사선연구소

Cell Survival and Expression of Superoxide Dismutase and Catalase Genes in *Saccharomyces cerevisiae* Treated with *N*-acetyl-L-cysteine and Ionizing Radiation

Jiyoung Park, Dongwon Baek¹, Mohammad Nili² and Jin Kyu Kim*

Korea Atomic Energy Research Institute, Advanced Radiation Technology Institute,
Jeongeup 580-185, Korea

¹Division of Applied Life Sciences (World Class University Program),
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Dawnesh Radiation Research Institute, Barcelona 08007, Spain

Abstract – *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) having a thiol, a precursor for glutathione (GSH), is known as one of the antioxidants. NAC used as a radioprotector against ionizing radiation (IR)-induced injury and damage. The aim of this study was to evaluate the radioprotective effects of NAC against IR-induced cell damage in *Saccharomyces cerevisiae* and the antioxidative effect of NAC on transcriptional level of yeast antioxidant enzyme genes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase. In the present study, yeast cells were pretreated with various concentrations of NAC and/or irradiated with various doses of gamma rays. The cell viability was measured by counting the cell forming unit (CFU). The quantitative real-time PCR was performed for analysis of gene expression of SOD and catalase. The viability of irradiated cells was not improved by pretreatment with NAC. Ionizing radiation with 100 Gy highly induced the gene expression of antioxidant enzymes. In the irradiated group with NAC pretreatment, the gene expression of SOD and catalase was gradually reduced with the increased concentrations of NAC. These results indicate that NAC can act as a useful antioxidant to scavenge reactive oxygen species *in vivo*, but does not protect cells against IR-induced cell death in *S. cerevisiae*.

Key words : ionizing radiation, reactive oxygen species, SOD, catalase, *N*-acetyl-L-cysteine, defense system, gene expression

* Corresponding author: Jin Kyu Kim, Tel. 063-570-3130,
Fax. 063-570-3139, E-mail. jkkim@kaeri.re.kr

서 론

효모를 비롯한 모든 호기성 생물의 호기성 대사 과정에는 superoxide radical (O_2^{\cdot}), hydroxyl radical (OH^{\cdot})과 과산화수소(H_2O_2)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species)이 생성된다. 또한 고온, 이온화 방사선(ionizing radiation), UV, 중금속 등과 같은 외부 환경요인에 의해서도 활성산소종이 생성된다(Jamieson 1998). 이온화 방사선인 감마선의 조사는 세포 속에 존재하는 물 분자를 방사선분해하며, 이때 활성산소가 생성된다고 알려져 있다(Esnault *et al.* 2010). 이러한 이온화 방사선 조사는 세포와 조직에 비가역적 손상을 유발하여 세포를 사멸시킨다.

생성된 활성산소종들은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 야기하여 생체의 원활한 대사에 큰 장애요인으로 작용하며, DNA 두가닥 절단(DNA double-strand breaks), 염기 손상, 단백질의 구조 변성과 지질 과산화 같은 넓은 범위의 세포 손상을 초래하여, 노화촉진, 질병저항성 감소, 생식능력 저하 등 많은 생리적 장애 및 세포사멸을 유발시킨다(Ward 1985; Wolff *et al.* 1986; Jamieson 1998; Johnson 2002; Pandey *et al.* 2003) 생체는 이러한 산화적 스트레스로부터 세포 방어를 목적으로 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx)와 같은 항산화 효소들과 glutathione (GSH), 비타민 C와 비타민 E 같은 항산화제를 포함한 다양한 방어시스템을 구축하고 있으며 항산화 효소들을 발현 시킴으로써 생체방어 기능을 담당토록 하고 있다(Yu 1994; Jamieson 1998).

SOD는 metal cofactor에 따라 구분되는데 효모의 경우 두 형태의 SOD가 존재한다. SOD1은 cytosolic CuZn-SOD로 세포질에서, SOD2는 Mn-SOD로 미토콘드리아에서 활성산소 cascade 반응의 일차적 활성산소종인 O_2^{\cdot} 을 소거하는 역할을 한다(Sturtz *et al.* 2001). SOD는 두 O_2^{\cdot} 를 과산화수소와 물 분자로 전환하는 것을 촉진하여 활성산소종을 소거한다. 생체 내 대사과정과 SOD에 의해 생성된 과산화수소는 catalase에 의해 제거된다(Berg *et al.* 2004). Catalase는 ubiquitous heme 단백질로 과산화수소 두 분자를 물과 산소로 분해한다. 효모에는 페르옥시솜(peroxisome)에 위치한 catalase A와 세포질에 위치한 cytosolic catalase T가 존재한다(Petrova *et al.* 2004).

N-acetyl-L-cysteine (NAC)는 thiol기를 포함하는 화합물로서 GSH의 전구체이며 항산화제 중 하나로 잘 알려져 있다(Zafarullah *et al.* 2003). 항산화제는 방사선 방어제로 사용될 수 있으며, 방사선 노출 이후에 발생하는 생체 내 영향을 감소시켜 생체 손상의 방호 및 회복에 도

움을 주게 된다. NAC의 항산화작용 기작은 NAC가 세포 내로 유입되어 deacetylation을 통해 cysteine으로 전환되고 산화적 스트레스로 인해 고갈된 GSH를 직접 공급함으로써 산화적 스트레스를 감소시키며, 발생된 활성산소종을 직접적으로 제거하는 것이다(Aruoma *et al.* 1989; Sjodin *et al.* 1989; Raftos *et al.* 2007). 이처럼 NAC는 방사선에 의해 GSH가 소모되는 것을 방지하고, GSH의 생성을 높이고 염증을 완화하며 glutathione peroxidase, alkaline phosphatase 등 효소 활성을 도와주는 역할을 한다. 마우스를 이용한 연구에서 NAC는 amifosine, cysteamine과 같은 방사선방어효과를 가진 여러 thiol 화합물 중 치사독성이 가장 낮다고 보고되었다(Weiss *et al.* 2000).

NAC의 방사선 방어 효과는 마우스, 효모, 세포 및 사람의 혈액 등을 대상으로 한 여러 *in vivo*, *in vitro* 연구에서 이루어지고 있다. NAC 처리는 방사선 조사에 의한 세포사멸을 방어하여 사람 골수의 과립구집락형성세포(granulocyte/macrophage colony-forming cells)의 생존력을 증가시켰으며(Selig *et al.* 1993), NAC의 이성질체인 L-NAC와 D-NAC 모두 마우스 조직과 적혈구에서 방사선 조사 후 고갈된 GSH를 공급하여 세포의 산화적 손상을 방어하였고(Neal *et al.* 2003), 사람 혈액에서 신체의 방어체계를 제어하고 자극하는 신호물질인 cytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-2d의 혈장 농도를 증가시켰다는 연구들이 발표되었다(Baier *et al.* 1996). 또한 NAC 처리는 마우스의 간에서 X선 조사에 의한 산화적 DNA 손상을 감소시키고(Liu *et al.* 2007), 사람 미세혈관 내피세포(Human microvascular endothelial cells, HMEC)를 이용한 *in vitro* 실험에서 방사선 조사에 의한 DNA 두 가닥 절단 형성(DSB double-strand breaks, DSBs)을 감소시킨다고 보고되었다(Kataoka *et al.* 2006; Kataoka *et al.* 2007). 이처럼 방사선에 의한 세포 손상 및 세포 사멸에 대해 NAC 방사선 방어효과를 검증한 연구들과 함께 그렇지 않은 연구들도 발표되었다. NAC 처리는 *in vitro*에서 방사선 조사된 사람 림프구의 DNA 손상여부를 comet assay로 확인한 결과 DNA 손상을 감소시키지 않았으며(Abt *et al.* 1997), 방사선 조사된 사람 미세혈관 내피세포의 세포 치사에도 효과적이지 않았다고 보고되었다(Kataoka *et al.* 2007).

본 연구에서 이용된 효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 인간을 포함한 모든 진핵 생물 중 가장 작으며, 진핵생물을 대표하는 최소 모델로 유전학, 분자생물학 및 세포생물학 연구에 폭넓게 이용되어왔다. *S. cerevisiae*는 세포 내에서 일어나는 여러 대사 과정 및 세포주기, DNA 복제, 유전자 재조합, 세포분열 등과 같은 분자수준의 연구에 이용되며, 인간 생물학에서 중요한 단백질 대부분이

효모를 이용한 연구에서 처음 발견되었다.

현재 NAC를 비롯한 항산화제의 항산화 및 세포보호 기능은 DNA 손상 및 DNA 두 가닥 절단, comet assay, 세포 생존률, 항산화 효소들의 활성을 이용해 평가된다. 그러나 항산화제 처리 후 방사선 조사에 따른 세포 내 전자수준에서의 연구 및 세포신호전달 기작은 잘 알려져 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 효모를 이용해 NAC 전처리와 고선량 이온화 방사선 조사에 후 SOD와 catalase와 같은 항산화 효소들의 유전자 발현 분석을 통해 NAC의 세포 내 항산화 능력을 평가하였다. 또한 세포 성장의 증감을 확인 하여 효모에서 NAC 적정처리 농도를 확인하였고, NAC 전처리 와/또는 방사선 조사에 따른 세포 생존변화를 관찰하여, 효모에서 NAC의 방사선 방어효과를 알아보았다. 이러한 연구는 항산화제 처리에 따른 유전자 발현 및 세포신호전달 기작을 밝히는데 기초 연구로 이용될 수 있다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 배양

Saccharomyces cerevisiae W303-1A strain MATa (*leu2-3/112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11/15 ybp1-1*)은 1% Yeast extract, 2% Dextrose, 2% Bacto Peptone, 0.002% Adenine hemi-sulfate salt로 조성된 YPDA 배지에서 30°C, 48시간 조건으로 배양하였다.

2. N-acetyl-L-cysteine에 대한 민감성 측정

효모 W303-1A 종의 단일 균체를 YPDA 배지에 접종한 후 30°C, 48시간 배양하였다. Spotting assay 수행을 위해, OD600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 수를 측정하였고, 10^6 cells mL⁻¹로 정량 후 연속 희석하였다. 희석된 세포들은 0 mM에서 50 mM 농도의 NAC를 함유한 YPDA 배지에 10 µL씩 떨어뜨린 후, 30°C에서 48시간 배양하였다. Image J 프로그램을 이용하여, YPDA 배지 위에 자란 세포들의 면적을 측정하였다. 실험은 세 번 독립적으로 수행하였으며, 세포면적은 3회 반복된 실험값의 평균을 내어 수치화하였다.

3. 효모세포의 생존율 측정 및 감마선 조사

효모세포는 YPDA배지에서 30°C, 48시간 배양된 후 0 mM 에서 20 mM 농도의 NAC를 2시간 전처리하였다. 세포 생존율을 측정하기 위해 CFU (colony forming unit)을 이용하였다. 흡광도를 600 nm에서 측정하여 그 수치가 2

가 될 때까지 배양한 후 (600 nm에서 흡광도가 2일 경우 세포 밀도는 2×10^7 cells mL⁻¹), 세포가 A₆₀₀=10⁴ cells mL⁻¹ 되도록 YPDA 배지에서 희석하였다. 효모세포는 한국원자력연구원 방사선과학연구소내의 조사시설 ⁶⁰Co gamma irradiator (7.4 PBq of capacity; AECL, Canada)를 이용하여 최종흡수선량이 50, 100, 200, 300, 400 Gy가 되도록 조사하였다. 조사 후, 효모세포의 100 µL를 YPDA 배지에 도말하여 30°C에서 48시간 배양한 후 균체를 계수하였다. 실험은 세 번 독립적으로 수행하였으며, 세포 생존율은 3회 반복된 실험값의 평균을 내어 수치화하였다.

4. RNA 분리 및 역전사반응에 의한 cDNA 합성

유전자의 발현을 확인하기 위해 대조군과 각 실험군의 효모세포에서 TRIZOL Reagent (Invitrogen)를 이용하여 RNA를 추출하였다. RNA 분리를 위하여 각 시료에 TRIZOL 1 mL을 넣고 세포를 분해한 다음 chloroform 추출과 isopropanol 침전과정을 거쳐 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA의 총 양은 spectrophotometry를 이용하여 260 nm 파장에서 측정하였고, 전기영동을 수행하여 ribosomal RNA band를 확인하였다. 분리된 RNA에 DNase I (Sigma)을 실온에서 10분간 처리 후 DNaseI를 비활성화시키기 위해 72°C에서 10분간 처리하여 RNA내 DNA를 제거하였다. 추출한 총 RNA 1 µg은 Maxime™ RT Premix-Oligo (dT)15 primer (Intron)을 이용하여 45°C에서 60분 complementary DNA (cDNA) 합성과정과, 95°C에서 5분 RTase 비활성 과정을 거쳐 cDNA를 합성하였다.

5. Quantitative Real-time PCR

cDNA를 합성 후, 각 유전자에 맞는 primer (Table 1)를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR 반응 조성 총 용액 10 µL는 10배 희석한 cDNA 3 µL, 각

Table 1. Primer sequences used in the quantitative real-time PCR method

Primers	Sequence of primers	
<i>CTA1</i>	F	5'-CAA CTT CGG CTC AGA ACC TAC-3'
	R	5'-ACG AAA TCT ACA TCA CCT GGG-3'
<i>CTT1</i>	F	5'-TGA TTC CGT TCT ACA AGC CAG-3'
	R	5'-TGT TCG GCA GTG TAT TGG G-3'
<i>SOD1</i>	F	5'-AGT GTT AAA GGG TGA TGC CG-3'
	R	5'-TTC TGC GTT AGG ACT GTT ACC-3'
<i>SOD2</i>	F	5'-ACC AAC ACA AAG CTA GCA GG-3'
	R	5'-CGT CAA TGG CAA CTA GAG GAA C-3'
<i>ACT1</i>	F	5'-GAA TTG AGA GTT GCC CCA GA-3'
	R	5'-GGC TTG GAT GGA AAC GTA GA-3'

primer 0.3 μM 와 1X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) 5 μL 를 포함한다. 반응조건은 먼저 95°C에서 15분 가열한 후, 95°C에서 10초, 55°C에서 15초, 72°C에서 20초간의 과정을 50회 반복하여 행해졌다. Real-time PCR은 Rotor-Gene® Q system (Qiagen)을 이용하여 수행하였고, 도출된 정보는 Roter-Gene 6000 series software 1.7로 분석하였다. 상대적인 transcript양은 comparative C_T method를 이용하여 계산하였다. 본 실험에서 *Actin1*은 표준 대조 유전자로 이용하였다. ΔC_T ($C_{T, \text{gene of interest}} - C_{T, \text{actin1}}$), $\Delta\Delta C_T$ [$\Delta C_T - \Delta C_{T, 0 \text{ Gy and no NAC}}$] 수식을 이용하여 각 값을 구하고, 상대적인 유전자 발현량은 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 수식을 이용해 계산하였다. 감마선과 NAC를 처리하지 않은 대조군의 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 값은 1로 표준화하였다 [$2^{-\Delta\Delta C_T} (\Delta C_{T, 0 \text{ Gy and no NAC}} - \Delta C_{T, 0 \text{ Gy and no NAC}}) = 2^0 = 1$].

결과 및 고찰

1. 효모에서 NAC 민감성 평가

NAC를 이용한 실험을 진행하기 위해 우선, 최종 농도

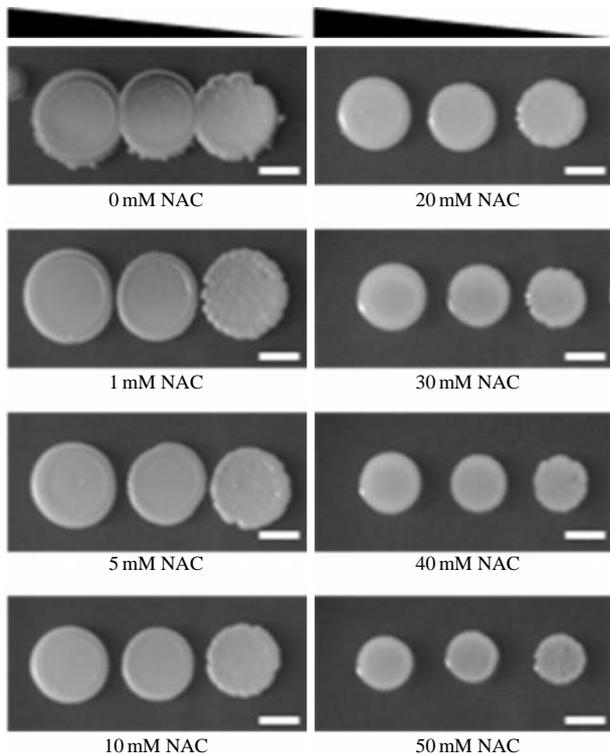


Fig. 1. NAC sensitivity of *S. cerevisiae* W303-1A strain. Sensitivity to NAC was determined by spotting assays. Ten-fold serial dilutions of yeast cells spotted onto the YPDA agar medium containing various concentrations of NAC. Plates were incubated at 30°C for 48 hr. Scale bar, 5 mm.

Table 2. Cell areas of yeast on the YPDA medium supplemented with various concentrations of NAC

Treatment concentration	Cell area (mm^2)
0 mM NAC	77.5 \pm 6.6
1 mM NAC	75.7 \pm 6.3
5 mM NAC	64.7 \pm 3.4
10 mM NAC	54.9 \pm 4.3
20 mM NAC	49.6 \pm 1.4
30 mM NAC	43.6 \pm 2.6
40 mM NAC	34.3 \pm 2.2
50 mM NAC	27.3 \pm 1.4

Yeast cells were dropped onto the YPDA agar medium containing 0 to 50 mM of NAC. Plates were incubated at 30°C for 48 hr. Cell areas were measured using Image J program. Data are means \pm SE ($n=3$).

1 mM에서 50 mM NAC를 함유한 배지에서 야생 형 효모 W303-1A의 성장 촉진 및 저해를 확인함으로써 NAC에 대한 민감성 및 독성을 측정하였다 (Fig. 1). 1 mM NAC를 포함한 YPDA배지에서 자란 효모세포의 면적은 NAC를 처리하지 않은 YPDA 배지에서 자란 대조군 효모세포와 비교하여 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1). 이와 대조적으로, 5 mM에서 50 mM로 NAC의 농도가 증가함에 따라 효모세포의 성장은 저해되었고, 30 mM에서 50 mM의 NAC를 포함한 YPDA 배지에서 자란 효모세포의 성장은 특히 저해되었다. 효모세포의 면적을 측정하여 수치로 확인해본 결과, 세포성장은 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM 농도에서 각각 2.3%, 16.5%, 29.2%, 36%, 43.7%, 55.7%, 64.8% 감소되었다 (Table 2). 이와 같은 결과로 보아 30 mM 이상 고농도 NAC는 효모세포의 성장을 저해하므로, 따라서 본 연구에서는 5 mM에서 20 mM 농도범위의 NAC를 이용하였다.

2. 이온화 방사선 조사 후 효모세포의 생존율 측정

이온화 방사선 조사는 효모세포에 비가역적 손상을 유발하여 세포를 사멸시킨다. 반수체 W303-1A에서 이온화 방사선 조사에 따른 세포치사율을 알아보기 위해, 30°C에서 48시간 배양한 효모세포를 최종흡수율이 50, 100, 200, 300, 400 Gy이 되도록 감마선을 조사하였다. 세포의 생존율은 50 Gy 2 hr⁻¹, 100 Gy 2 hr⁻¹ 방사선량에서 각각 24.5%, 15.7%였으며 (Fig. 2), 최종흡수선량이 300 Gy 이상의 높은 방사선이 조사된 후에는 효모세포의 90% 이상이 생존하지 못했다. 효모세포 생존율 (percent of survival)의 방사선량-반응 관계는 다음 식으로 정의된다.

$$\text{효모세포 생존율} = \frac{99.9925 + 0.2921D}{1 + 0.0725D} \quad (R^2 = 0.9996)$$

(Percent of survival)

여기서, D는 방사선 선량 (radiation dose)을 나타낸다.

이 수식을 이용하면 방사선 선량에 따른 효모세포 생존율을 값의 수치로 나타낼 수 있으며, 실험을 통해 산출된 효모세포 생존율을 식에 대입하여 조사된 감마선의 선량을 추론하는 데도 유용한 데이터로 이용될 수 있을 것이다.

3. 세포 생존에서 NAC의 방사선 방어효과 평가

Kataoka 등은 NAC의 효과가 cell cycle에서 독립적으로 나타났으며, 이온화 방사선에 의한 세포 사멸에 대해서는 세포를 보호하지 않았다고 발표하였다 (Kataoka *et al.* 2007). NAC 전처리가 이온화 방사선에 의한 세포사멸을 방어하여 세포를 보호하는지 알아보기 위하여 30°C에서 48시간 배양한 효모세포에 5 mM에서 20 mM NAC를

두 시간 전처리 한 후, 다양한 선량의 방사선 (10~1,200 Gy)을 조사하였다. 조사된 효모세포 중 일정액을 YPDA 배지에 도말하여 30°C에서 48시간 배양 후, 생존한 세포 수를 계수하였다. NAC 농도와 관계없이 NAC 전처리에 따른 세포생존율은 NAC를 처리하지 않은 세포생존율 (Fig. 2)과 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). 이러한 결과로, 효모세포에 NAC의 전처리는 이온화 방사선 조사에 따른 세포사멸을 보호하지 않음을 알 수 있었다.

4. NAC 전처리 후 이온화 방사선 조사에 따른 SOD와 Catalase 유전자 발현

효모세포에 많은 손상을 주는 고선량 100 Gy 감마선 조사 후 전사적 수준에서 항산화 효소들 SOD, catalase

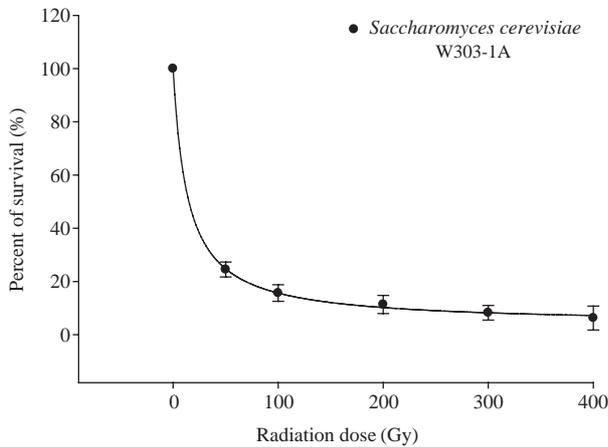


Fig. 2. Cell viability of the yeast strain W303-1A after irradiation with gamma rays. Error bars represent means \pm SD ($n=3$).

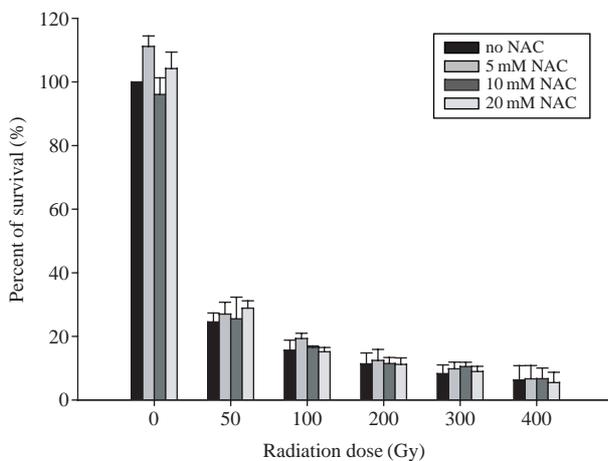


Fig. 3. Cell viability of the yeast strain W303-1A pretreated with 0 to 20 mM of NAC after irradiation with gamma rays. Error bars represent means \pm SD ($n=3$).

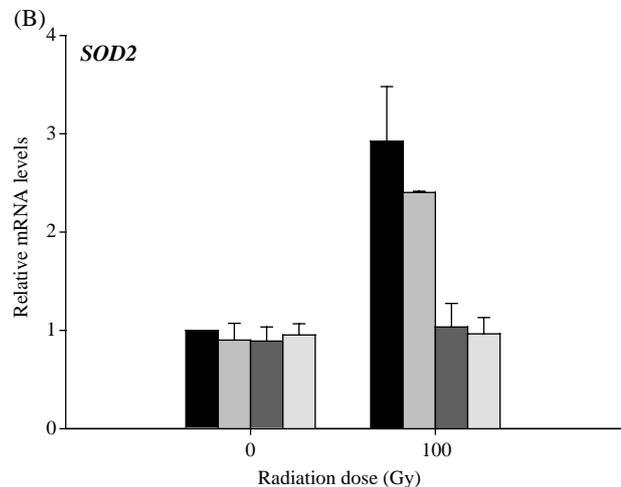
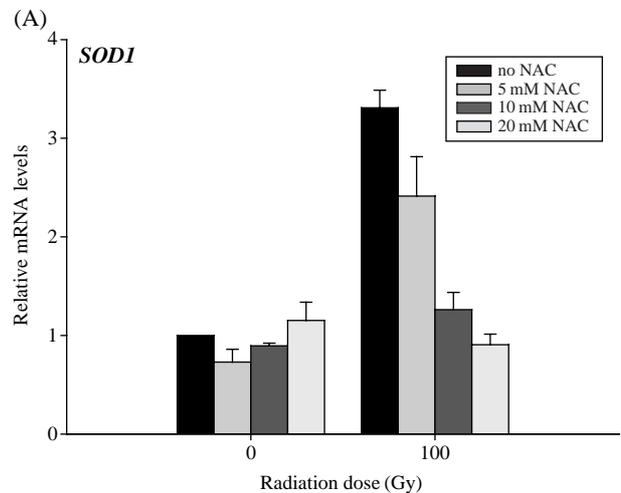


Fig. 4. Superoxide dismutase gene expression in response to ionizing radiation and NAC. SOD1 (A) and SOD2 (B) expression in yeast treated with 5 to 20 mM of NAC and 100 Gy gamma rays. Error bars represent means \pm SD ($n=3$).

유전자 발현 정도를 알아보기 위해 real-time PCR을 수행하였다. 또한 항산화제인 NAC가 세포 내 항산화 효소들의 유전자 발현에 어떤 영향을 주는지 알아보았다. 효모세포에 0 mM에서 20 mM의 NAC를 두 시간 전처리 한 후 100 Gy 감마선을 조사한 뒤 RNA를 분리하여 각 유전자 발현을 확인하였다. 100 Gy 감마선을 조사하였을 때, *SOD1*과 *SOD2* 두 유전자의 발현이 약 3배 증가되었다(Fig. 4A,B). NAC만 처리하였을 경우 *SOD1*과 *SOD2*의 발현은 변화 없었으며, NAC 전처리 후 100 Gy 감마선을 조사하였을 때, *SOD1*과 *SOD2*의 발현은 NAC의 농도가 증가함에 따라 점차 감소하였다. NAC 전처리로 이온화 방사선 조사 후 생성되는 ROS가 감소하여, 효모 내 SOD 전사적 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

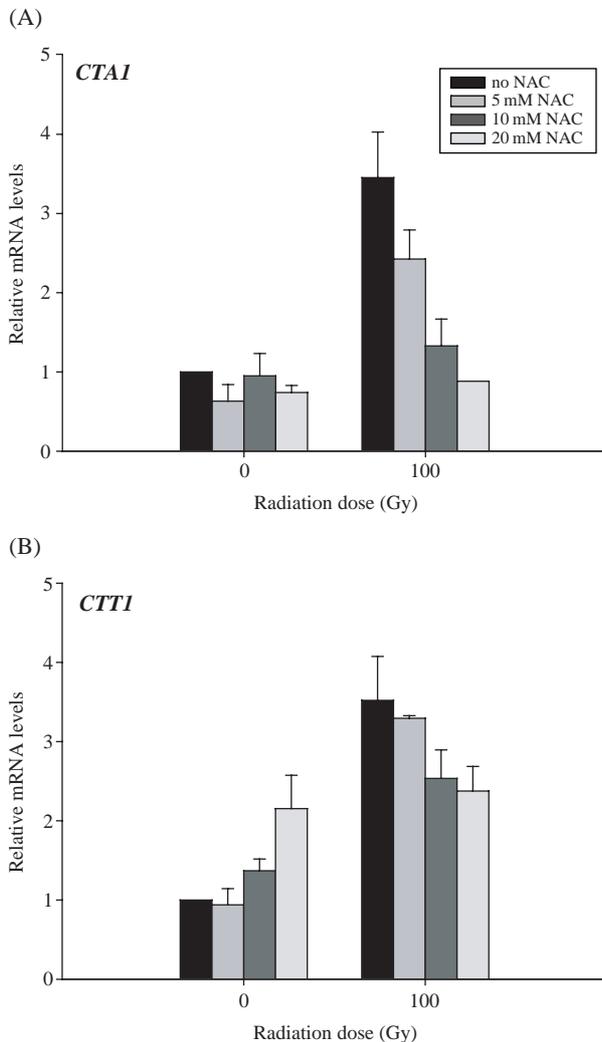


Fig. 5. Catalase gene expression in response to ionizing radiation and NAC. *CTA1* (A) and *CTT1* (B) expression in yeast treated with 5 to 20 mM of NAC and 100 Gy gamma rays. Error bars represent means \pm SD ($n=3$).

NAC 전처리 후 감마선 조사에 따라 Catalase 유전자 *CTA1*과 *CTT1*의 발현변화를 알아보기 위해, 효모세포에 0 mM에서 20 mM NAC를 전처리 및 100 Gy 감마선조사 후 RNA를 분리하여 real-time PCR을 수행하였다. 100 Gy 감마선을 조사하였을 때, *CTA1*과 *CTT1*의 발현은 약 3.5배 증가하였다(Fig. 5A, B). 다양한 농도의 NAC 전처리에 의해 *CTA1*의 발현은 변화가 없었지만, *CTT1*의 발현은 NAC 농도에 따라 점점 증가하여 20 mM NAC를 처리 하였을 때 2.1배 발현이 증가하였다. 다양한 농도의 NAC 전처리 후 100 Gy 감마선 조사를 하였을 때 *CTA1*과 *CTT1*의 발현은 NAC 농도 증가에 따라 감소하였다. 이는 항산화제인 NAC에 의해 세포 내 감소된 활성산소종과 과산화수소에 의한 것으로 보여진다.

결론적으로 본 연구에 사용된 NAC는 효모에 높은 농도로 이용될 시 세포성장 저해를 유발하며, 이온화 방사선 조사에 의한 세포사멸은 방어할 수 없었으나, 이온화 방사선에 의해 생성된 활성산소종을 제거하여 세포를 보호하는 데 유용한 항산화제임을 알 수 있었다.

적 요

NAC는 GSH의 전구물질로, thiol기를 포함하는 항산화제 중 하나로 잘 알려져 있으며, 방사선 조사 시 발생하는 생체 내 영향을 감소시켜 생체 손상의 방호 및 회복에 도움을 주는 방사선 방어제로 이용된다. *S. cerevisiae*에서 항산화제 NAC를 전처리 함에 따라 이온화 방사선 조사에 따른 효모의 세포사멸 방어효과 및 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx)와 같은 항산화 효소들의 유전자 발현을 분석하여 NAC의 항산화적 효과를 확인하였다. 효모는 다양한 농도의 NAC 전처리 후 다양한 선량의 이온화 방사선에 조사되었으며, 세포생존율은 세포형성단위 (CFU)를 계수해 측정되었고, 항산화 효소의 유전자 발현은 real-time PCR 수행 후 분석하였다. 우선적으로 효모에 NAC 처리를 위한 적정농도를 확인하였는데, 35 mM 이상의 NAC 농도에서 효모세포의 성장이 억제 되었다. NAC 전처리는 감마선 조사에 의한 세포사멸을 방어하지 않았으며, 100 Gy 방사선 조사는 항산화 효소들의 유전자 발현을 유도하였다. NAC 전처리 후 항산화 효소들의 유전자 발현은 NAC의 농도 증가에 따라 감소하였다. 이러한 결과로, NAC의 높은 농도(35 mM 이상)는 효모세포의 성장을 저해하며, NAC는 이온화 방사선 조사에 따른 세포사멸을 방어할 수 없으나, 생체 내에서 활성산소종을 제거 하여 세포를 보호하는 유용한 항산화제임을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부에서 시행하는 주요사업의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Abt G, H Vaghef, E Gebhart, CV Dahlgren and B Hellman. 1997. The role of N-acetylcysteine as a putative radioprotective agent on X-ray-induced DNA damage as evaluated by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutat. Res.* 384:55-64.
- Aruoma OI, B Halliwell, BM Hoey and J Butler. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 6:593-597.
- Baier JE, HA Neumann, T Moeller, M Kissler, D Borchardt and D Ricken. 1996. Radiation protection through cytokine release by N-acetylcysteine, *Strahlenther. Onkol.* 172:91-98.
- Berg JM, JL Tymoczko and L Stryer. 2004. *Biochemistry*, Fifth edition. p. 506.
- Esnault M, F Legue and C Chenal. 2010. Ionizing radiation: Advances in plant response. *Environmental and Experimental Botany.* 68:231-237.
- Jamieson DJ. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14:1511-1527.
- Johnson P. 2002. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 133:493-505.
- Kataoka Y, JS Murley, KL Baker and DJ Grdina. 2007. Relationship between phosphorylated histone H2AX formation and cell survival in human microvascular endothelial cells (HMEC) as a function of ionizing radiation exposure in the presence or absence of thiol-containing drugs. *Radiat. Res.* 168:106-114.
- Kataoka Y, VP Bindokas, RC Duggan, JS Murley and DJ Grdina. 2006. Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 47:245-257.
- Liu Y, H Zhang, L Zhang, Q Zhou, X Wang, J Long, T Dong and W Zhao. 2007. Antioxidant N-acetylcysteine attenuates the acute liver injury caused by X-ray in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 575:142-148.
- Neal R, RH Matthews, P Lutz and N Ercal. 2003. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. *Free Radic. Biol. Med.* 34:689-695.
- Pandey S, S Parvez, I Sayeed, R Haque, B Bin-Hafeez and S Raisuddin. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.* 309:105-115.
- Petrova VY, D Drescher, AV Kujumdzieva and MJ. Schmitt. 2004. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* 380:393-400.
- Raftos JE, S Whillier, BE Chapman and PW Kuchel. 2007. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39:1698-1706.
- Reliene R, JM Pollard, Z Sobol, B Trouiller, RA Gatti and RH Schiestl. 2009. N-acetyl cysteine protects against ionizing radiation-induced DNA damage but not against cell killing in yeast and mammals. *Mutat. Res.* 665:37-43.
- Selig C, W Nothdurft and TM Fliedner. 1993. Radioprotective effect of N-acetylcysteine on granulocyte/macrophage colony-forming cells of human bone marrow. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119:346-349.
- Sjodin K, E Nilsson, A Hallberg and A Tunek. 1989. Metabolism of N-acetyl-L-cysteine. Some structural requirements for the deacetylation and consequences for the oral bioavailability. *Biochem. Pharmacol.* 38:3981-3985.
- Sturtz LA, K Diekert, LT Jensen, R Lill and VC Culotta. 2001. A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localizes to the intermembrane space of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276:38084-38089
- Ward JF. 1985. Biochemistry of DNA lesions. *Radiat. Res. Suppl.* 8:S103-111.
- Weiss JF and MR Landauer. 2000. Radioprotection by antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899:44-60.
- Wolff SP, A Garner and RT Dean. 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS.* 11:27-31.
- Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74:139-162.
- Zafarullah M, WQ Li, J Sylvester and M Ahmad. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:6-20.

Manuscript Received: January 14, 2011

Revision Accepted: February 13, 2011

Responsible Editor: Man Kyu Huh