

*Saccharomyces cerevisiae*에서 *N*-acetyl-L-cysteine 처리와 감마선 조사에 따른 Glutathione Peroxidase 유전자 발현

박지영 · 백동원¹ · 모하마드닐리² · 김진규*

한국원자력연구원 방사선과학연구소, ¹경상대학교 대학원 응용생명과학부,
²스페인 도네시방사선연구소

Gene Expression of Glutathione Peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* Treated with *N*-acetyl-L-cysteine and Gamma-rays

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 – Glutathione (GSH) has important roles in cellular defense against oxidative stress, 1) direct scavenging of reactive oxygen species (ROS), and 2) coenzyme of ROS scavenging enzyme like glutathione peroxidases (GPx). GSH peroxidase reduces free hydrogen peroxide to water using 2GSH. *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), one of the antioxidants, is used as a precursor for intracellular GSH. In this study, relation of GSH, NAC, and GSH peroxidase was investigated through transcriptional expression of *GPX1* and *GPX2*, which are GSH peroxidase encoding genes, in yeast cells treated with 0 mM to 20 mM of NAC or in combination with 100 Gy gamma-rays. The transcriptional expression of *GPX1* and *GPX2* was induced by NAC and 100 Gy gamma-rays. The gene expression of both GSH peroxidases was decreased with increasing concentrations of NAC in irradiated yeast cells. These results suggest that elevation of intracellular GSH by NAC and oxidative stress and ROS generated from gamma-rays induces expression of GSH peroxidase genes, and that NAC can protect the yeast cells against ROS generated from gamma-rays through direct scavenging of ROS and transcriptional activation of GSH peroxidase.

Key words : glutathione peroxidase, gamma-rays, reactive oxygen species, *N*-acetyl-L-cysteine, gene expression

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

서론

고등 진핵생물들의 호기성 대사 과정이 일어나는 미토콘드리아에서 호흡과정 동안 superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (OH^{\cdot})과 과산화수소(H_2O_2)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 활성산소종은 병원균들에 대한 방어, 세포 내 신호전달, 유전자 전사적 발현, 단백질변역 후 변형(post-translational modification), 분야 증식(proliferation), 세포자멸사(apoptosis)와 같은 다양한 세포 기능의 조절에 관련되어 있으며(Powis *et al.* 1995; Sies 1997), 지질 과산화물(lipid peroxide)과 같은 2차 반응 생성물을 증가시킨다. 호기성 대사 등 생물학적 반응들에서 끊임없이 생성되는 활성산소종은 세포 내 산화환원반응 항상성(redox homeostasis)에 의해 유지·보호되지만, 완충용량초과의 활성산소종은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 야기하며, DNA, RNA, 단백질과 지질 등 세포 구성요소에 손상을 유발해, 결국 세포사멸을 초래한다(Jamieson 1998; Davis *et al.* 2001).

세포 내 활성산소종을 유발하는 요인 중의 하나인 이온화 방사선(ionizing radiation)은 큰 에너지를 가지고 있어, 생체에 여러 가지 손상을 유발한다. 강력한 이온화 방사선인 감마선에 노출되면 생체 구성성분인 단백질, 세포막, DNA 등이 이온화 되어 세포와 조직에 비가역적 손상이 유발되며, 특히 감마선에 의한 DNA 분자의 이온화는 유전자 돌연변이, DNA 손상 정도에 따른 여러 질병 유발과 세포사멸을 초래한다(Ward 1985; Brennan *et al.* 2001). 또한 감마선은 세포 내 존재하는 물 분자를 이온화하여 산화적 스트레스를 야기하는 활성산소종을 생성한다(Esnault *et al.* 2010).

생체는 생성된 활성산소종들과 산화스트레스에 대한 방어 기작으로 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx)와 같은 항산화 효소들, 비타민 C와 E, glutathione (GSH)와 thioredoxin (TRX)와 같은 sulfhydryl (thiol, SH)기를 포함하는 thiol reducing buffer를 구축하고 있다(Nakamuta *et al.* 1997; Jamieson 1998).

Glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine, GSH)은 thiol기를 포함하는 tripeptide로, 세포 내에 풍부하게 존재 한다(Schroeder *et al.* 1996). GSH는 직접적으로 활성산소종을 제거하거나, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, thioltransferase 등과 같은 항산화 효소들의 조효소(coenzyme)로 작용해 활성산소종과 산화적 스트레스로부터 세포를 방어한다(Dickinson *et al.* 2002). 세포 내에서 GSH는 생물학적 활성형인 환원된 thiol형태로 존재하지만, 산화적 스트레스 하에서 GSH 산화형태인 GSH

disulphide, GSSG가 되며 산화된 GSSG는 NADPH-dependent GSSG reductase에 의해 환원된 GSH로 전환된다(Circu *et al.* 2008). 산화 스트레스에 의해 증가된 GSSG는 세포 내 GSH/GSSG 비 불균형을 유발하고, 이로써 세포자멸사가 촉진된다(Circu *et al.* 2008). 그러나 보통 세포는 산화환원반응 신호전달을 통해 GSH/GSSG 비 불균형을 한 시간 내 회복한다. 세포 내 증가된 GSH level은 산화적 스트레스로부터 유도된 세포자멸사로부터 세포를 보호하는데, 이는 세포자멸사, 괴사, 염증에서 필수적인 역할을 하는 cysteins protease인 caspases의 촉매적 위치에 GSH가 작용하여 세포자멸사를 방어한다(Watson *et al.* 1997; Musallam *et al.* 2002; Friesen *et al.* 2004).

GSH을 이용해 과산화 지질을 분해하고, 과산화수소를 물로 변환시키는 항산화 효소인 GSH peroxidase는 효모 내 세 종류가 존재하는데(Inoue *et al.* 1999; Berg *et al.* 2004), GPx1은 세포 구성요소(cellular component)로써, GPx2는 세포질(cytoplasm)과 세포핵(nucleus)에 위치해 항산화 효소로서의 역할을 하며, GPx3/Hyr1은 thiol peroxidase로 세포 내 과산화수소량을 인지하는 과산화수소의 수용체 역할과, Yap1p의 전사인자로서 산화환원 신호를 변환하는 역할을 한다고 알려져 있다(Delaunay *et al.* 2002; Kho *et al.* 2006). GSH peroxidase는 활성 부위(active site)에 있는 selenocysteine residue로 과산화물(R-O-O-H)을 제거하는데 그 기작은 다음과 같다. GSH peroxidase의 활성 부위에 있는 selenolate ($E-Se^-$)는 과산화물(R-O-O-H)을 알콜(R-O-H)로 환원한 후 selenenic acid ($E-SeOH$)로 산화된다. GSH은 산화된 selenenic acid를 selenosulfide ($E-Se-S-G$)로 전환하고, 이 과정에서 물이 생성된다. 두 번째 GSH 분자는 selenosulfide에 반응해 산화된 형태(GSSG)로 전환되고, GSH peroxidase를 활성형태로 재생한다(Berg *et al.* 2004).

생성된 활성산소종은 항산화제 처리로도 제거가 가능한데, 항산화제는 방사선 방어제로도 이용되며, 방사선 노출 후 발생하는 생체 내 영향을 감소시켜준다. N-acetyl-L-cysteine (NAC)는 thiol기를 포함하는 화합물로 GSH의 전구물질이며, 방사선 방어제로 이용되는 대표적인 항산화제이다. NAC는 방사선 방어효과를 가진 여러 thiol 화합물 중 치사독성이 가장 낮으며(Reliene *et al.* 2009), NAC의 두 이성질체 모두 방사선방어효과가 있다는 연구가 발표되었다(Neal *et al.* 2003). NAC의 세포 내 작용 기작은 NAC가 세포 내로 유입된 후 deacetylation 되어 cysteine으로 전환되어(Aruoma *et al.* 1989; Sjodin *et al.* 1989; Raftos *et al.* 2007), 산화적 스트레스로 인해 고갈된 GSH을 직접 공급함으로써 산화적 스트레스 감소 및 활성산소종을 직접적으로 제거하며(Phelps *et al.* 1992;

Pocernich *et al.* 2000; Atkuri *et al.* 2007), GSH peroxidase 등의 효소 활성을 도와주는 역할을 한다. NAC는 효모와 포유동물, 사람 미세혈관 내피세포에서 DNA 두 가닥 절단 생성물을 감소시켰으며, 쥐의 간에서 산화적 DNA 손상을 줄여준다(Kataoka *et al.* 2007; Reliene *et al.* 2009). 또한 NAC 전처리는 산화적 스트레스에 의해 유도된 세포자멸사를 방어하며, 산화적 스트레스에 의한 GSH의 산화형인 GSSG 증가를 막는 데 효과적이지만, GSSG 생성이 증가된 후에 처리되었을 때는 효과 없었다고 보고되었다(Pias *et al.* 2002; Circu *et al.* 2008).

NAC 처리는 세포 내 GSH 증가 및 그에 따른 세포자멸사 방어, GSH peroxidase 활성증가 등으로 방사선 조사 후 발생하는 활성산소종 제거 및 산화스트레스 감소에 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 NAC 처리 후 세포 내 증가된 GSH에 의한 전사적 수준에서의 연구는 잘 알려져 있지 않으며, NAC에 의해 세포 내 감소된 활성산소종에 따른 유전자 발현 변화에 대한 연구 역시 미비한 상황이다. 따라서, 본 연구에서는 효모세포에서 GSH와 밀접한 관계에 있는 항산화 효소 GSH peroxidase 유전자 *GPX1*과 *GPX2*의 전사적 발현을 확인하여 NAC, GSH, GSH peroxidase의 연관성을 밝히고자 하였다. 또한 활성산소종 생성 및 산화적 스트레스를 유도하는 감마선 조사 전 NAC를 처리하여 감소된 활성산소종에 따른 GSH peroxidase 유전자의 발현량 변화를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 배양

효모 *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 효모세포 성장률 측정

효모세포 성장률은 spectrophotometer analysis로 측정하였다. 효모 W303-1A 종의 colony를 YPDA 배지에 접종한 후 30°C, 48시간 배양한 후, OD 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 수를 측정하였다. 전 배양된 효모세포를 0 mM에서 30 mM N-acetyl-L-cysteine (Sigma사, 미국)를 포함한 YPDA 배지에 초기 OD 값이 0.1이 되도록 접종한 후 30°C에서 배양하여 각 시간 별로 효모세포의 성장률을 확인하였다. 배양액 중 1 mL를 분취하여 표시

된 시간 동안 흡광도를 측정하여 세포성장을 관찰하였다. 실험은 세 번 독립적으로 수행하였으며, 3회 반복된 실험값의 평균을 산출하였다.

3. NAC 처리 및 감마선 조사

효모세포를 YPDA 배지에서 30°C, 48시간 배양한 후 NAC를 0 mM에서 20 mM까지 농도별로 2시간 전처리하였다. 효모세포는 한국원자력연구원 방사선과학연구소 내의 조사시설 ⁶⁰Co gamma irradiator (7.4 PBq of capacity; AECL, Canada)를 이용하여 실온에서, 최종흡수선량이 100 Gy가 되도록 조사하였다.

4. RNA 분리 및 역전사반응에 의한 cDNA 합성

NAC 전처리 및 방사선 조사 후, 효모 내 glutathione peroxidase 유전자 발현을 확인하기 위해 대조군과 각 실험군의 효모세포에서 TRIZOL Reagent (Invitrogen사, 미국)를 이용하여 RNA를 추출하였다. RNA 분리를 위하여 각 시료에 TRIZOL 1 mL를 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 RNA 시료 내 오염되어 있는 DNA들을 제거하기 위해 DNaseI (Sigma사, 미국)을 실온에서 10분간 처리하였고, 반응이 끝난 DNaseI을 비활성화시키기 위해 72°C에서 10분간 처리하였다. 추출한 총 RNA 1 µg은 Maxime™ RT Premix-Oligo (dT)15 primer (Intron사, 한국)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, *GPX1*, *GPX2*, *ACTIN1* primer (Table 1)들을 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR 반응 조성 총 용액 10 µL는 10배 희석한 cDNA 3 µL,

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

Primers	Sequence of primers
<i>GPX1</i>	F 5'-ATT CAG TAA GCG GGA AGT CTG-3' R 5'-TTG GAC AAA GCT CTA GTG GC-3'
<i>GPX2</i>	F 5'-GAC CAA CTG AAA GGC AAA GTA G-3' R 5'-GAA CCC CAA AAT AAC AAA CCC C-3'
<i>ACTIN1</i>	F 5'-GAA TTG AGA GTT GCC CCA GA-3' R 5'-GGC TTG GAT GGA AAC GTA GA-3'

각 primer 0.3 μ M와 1X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen사, 독일) 5 μ L를 포함한다. Real-time PCR 반응은 우선 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 (Qiagen사, 독일)을 이용하여 수행하였고, 도출된 정보는 Roter-Gene 6000 series software 1.7로 분석하였다. 상대적인 transcript 양은 comparative C_T method를 이용하여 계산하였다. 본 실험에서 *ACT1N1*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 표준화 하였다 [$2^{-\Delta\Delta C_T} (\Delta C_T, 0 \text{ Gy and no NAC} - \Delta C_T, 0 \text{ Gy and no NAC}) = 2^0 = 1$].

결과 및 고찰

NAC 처리가 효모세포 성장에 주는 영향을 확인하기 위해 0 mM에서 30 mM 농도의 NAC를 처리한 후 spectrophotometer assay를 이용하여 OD값을 측정해 효모세포 성장률을 관찰하였다. 효모세포 성장률은 세포분열기(log phase, exponential phase)인 24시간까지는 차이를 보이지 않았으나, 24시간 이후인 정지상(stationary phase)에서 NAC의 농도가 증가함에 따라 성장률이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 특히, 72시간에 이른 시점에서는 NAC 농도의 증가에 따라 세포 수가 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 결과로, 효모세포 성장률에서 NAC 처리는 분열기보다 정지상에 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 이전 연구에서, 0 mM에서 50 mM의 NAC가 포함된 고체배지에서 효모세포의 성장을 확인 하였는데, 30 mM 이상의 고농도 NAC는 효모세포의 성장을 저해한다는 결과가 발표되었다(박 등 2011). 이러한 결과들을 바탕으로 본 연구에서는 0 mM에서 20 mM의 NAC 농도를 이용하였다.

NAC 전처리 및 방사선 조사 후, GSH peroxidase의 두 유전자 *GPX1*과 *GPX2*의 발현을 각각 quantitative real-time PCR을 이용하여 확인하였다. NAC만 처리한 효모세포에서, NAC 농도가 증가함에 따라 *GPX1*의 발현량이 증가하였으며, 20 mM NAC 처리 후 약 3.4배 발현이 증가하였다. 100 Gy의 감마선만 조사하였을 때, *GPX1*은 약 2.7배 발현이 증가하였다. NAC 전처리 후 100 Gy 감마선 조사하였을 때, *GPX1*은 NAC의 농도가 증가함에 따라, 발현이 감소하였다(Fig. 2). 감마선만 조사된 실험군에 비해 5 mM의 NAC 전처리 후 감마선 조사한 실험군의

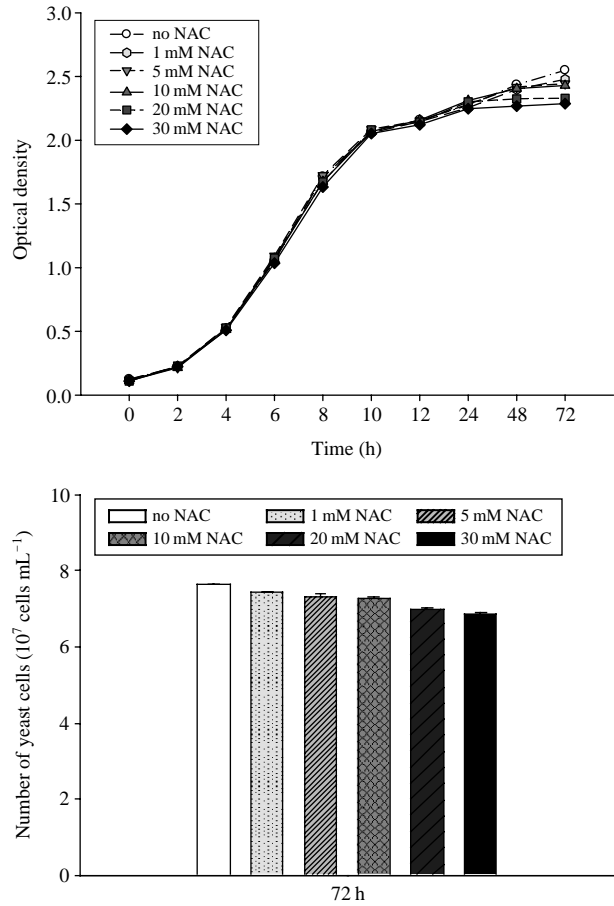


Fig. 1. Cell growth in *S. cerevisiae* W303-1A strain treated with NAC. Growth rate of yeast cells was measured at indicated time points in the presence of 5 mM to 30 mM of NAC (A). Number of yeast cells at 72 h (B). Error bars represent means \pm SD ($n=3$).

GPX1 발현량은 약 54% 감소하였다.

NAC만 처리한 효모세포에서, NAC 농도가 증가함에 따라 *GPX2*의 발현은 증가하였으며, 15 mM과 20 mM NAC 농도에서 각각 약 1.7배, 3.8배 증가하였다. 100 Gy 감마선만 조사하였을 때, *GPX2*의 발현은 약 16배 증가하였다. 효모세포에 NAC 전처리 후 100 Gy 감마선 조사하였을 때, NAC 농도 증가에 따라 *GPX2*의 발현은 감소하였다(Fig. 3). 15 mM과 20 mM 농도의 NAC 전처리와 감마선 조사 후 *GPX2*의 발현은 대조군에 비해 각각 약 4.7배, 2.9배 증가하였으며, 이는 100 Gy 감마선만 조사된 실험군에 비해 약 71%, 82% 각각 감소한 유전자 발현을 보였다. 이러한 결과로부터 GSH peroxidase의 두 유전자 *GPX1*과 *GPX2*는 NAC에 의해 발현이 유도되며, 감마선 조사 후 발현이 증가하였다. 또한 NAC 전처리는 방사선 조사 후 생성되는 세포 내 활성산소종을 제거하여 항산화 효소 GSH peroxidase의 전사적 발현이 감소되는 것

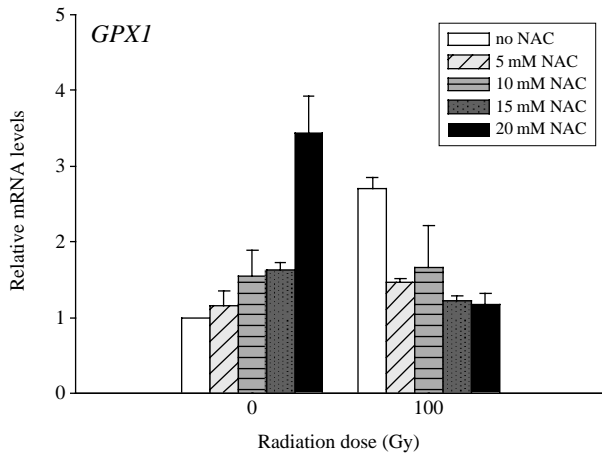


Fig. 2. *GPXI* expression in response to NAC and gamma-rays. *GPXI* expression in yeast treated with 5 mM to 20 mM of NAC or in combination with 100 Gy gamma-rays. Error bars represent means \pm SD ($n=3$).

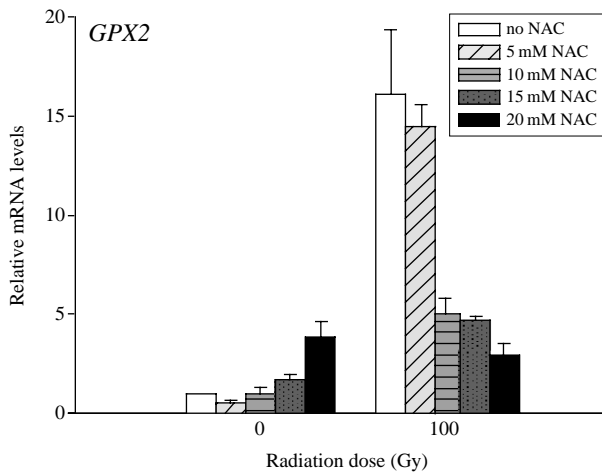


Fig. 3. *GPX2* expression in response to NAC and gamma-rays. *GPX2* expression in yeast treated with 5 mM to 20 mM of NAC or in combination with 100 Gy gamma-rays. Error bars represent means \pm SD ($n=3$).

을 확인하였다.

Kim 등은 NAC가 환원적 활성을 통해 간선상세포 (hepatic stellate cells)의 세포주기 억제 (cell cycle arrest)를 유발한다는 연구를 발표하였다 (Kim *et al.* 2001). 효모세포에 NAC 처리에 따른 세포 성장률의 감소는 정지상에서 나타났으며, NAC 농도 증가에 따라 세포성장률이 감소하였다. 이러한 결과는 세포분열이 왕성한 세포분열기보다 정지상에서 NAC에 의한 세포주기 억제와 관련되어 있을 것이라 사료된다. 이전 연구에서 효모에서 NAC와 감마선 처리에 따른 항산화 효소인 SOD과 catalase의 유전자 *SOD1*, *SOD2*, *CTA1*, *CTT1*의 발현을 확인하였다.

NAC만 처리된 조건에서 *CTT1*을 제외한 나머지 유전자들의 발현 변화는 없었으며, *CTT1*은 20mM NAC가 처리되었을 때 약 2배 발현이 증가하였다. 감마선만 처리된 조건에서는 모든 유전자의 발현이 증가하였다. 또한 NAC 전처리 후 감마선이 조사된 조건에서, 모든 유전자의 발현은 NAC 농도가 증가함에 따라 감소하였다 (박 등 2011). NAC 만을 단독 처리한 경우, GSH peroxidase 유전자는 발현이 증가되었으나 다른 항산화 효소의 유전자는 NAC 처리에 따른 변화를 나타내지 않았다. 이는 GSH를 이용하여 과산화수소를 제거하는 GSH peroxidase의 유전자가 NAC에 의해 증가된 세포 내 GSH에 의해 유도된 것이라 사료된다. 한편, NAC 전처리 후 이온화 방사선을 조사한 경우, 100 Gy 감마선에 의해 발현된 GSH peroxidase의 두 유전자는 NAC의 처리농도가 증가함에 따라 감소되었다. 이것은 항산화제 NAC에 의해 감마선 조사 후 효모세포 내에 생성된 활성산소종이 제거되었기 때문인 것으로 사료된다. 이로써, 생체 내에서 활성산소종을 제거하는 효소들 SOD, catalase, GSH peroxidase의 유전자 발현은 감마선에 의해 유도되며, 항산화제 NAC 처리로 인해 생체 내 활성산소종이 제거됨으로써 감소된다는 것이 밝혀졌다.

적 요

Glutathione (GSH)은 직접적으로 활성산소종을 제거하거나 GSH peroxidase와 같은 활성산소종 제거 효소의 조효소로써, 산화적 스트레스로부터 세포를 방어하는 데 중요한 역할을 한다. GSH peroxidase는 두 분자의 GSH를 이용해 세포 내 과산화수소를 물로 전환한다. *N*-acetyl-L cysteine (NAC)은 항산화제 중 하나로 세포 내 GSH의 전구물질로 이용된다. 본 연구는, 0mM에서 20mM의 NAC 단독 처리 또는 100 Gy 감마선과 복합 처리한 효모세포에서 GSH peroxidase를 코드화 (encoding)하는 유전자인 *GPX1*과 *GPX2*의 전사적 발현을 통해 GSH, NAC와 GSH peroxidase의 연관성을 알아보았다. *GPX1*과 *GPX2*의 전사적 발현은 NAC와 100 Gy 감마선에 의해 유도되었다. 조사된 효모세포에서 NAC의 증가 농도에 따라 GSH peroxidase 두 유전자의 발현은 감소되었다. 이러한 결과로, NAC에 의해 증가된 세포 내 GSH는 GSH peroxidase 유전자의 전사적 발현을 유도하며, NAC는 감마선으로부터 생성된 활성산소종 직접적 제거와 GSH peroxidase 유전자의 전사적 발현을 유도함으로써 세포를 보호할 수 있다는 것이 밝혀졌다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부에서 시행하는 주요사업의 지원으로 수행되었으며 한국-스페인 국제협력의 일환으로 수행된 실험의 결과를 일부 포함하고 있습니다.

참 고 문 헌

- 박지영, 백동원, 모하마드닐리, 김진규. 2011. *Saccharomyces cerevisiae*에서 이온화 방사선과 N-acetyl-L-cysteine 처리에 따른 세포 생존과 superoxide dismutase and catalase 유전자 발현. 환경생물. 29:61-67.
- 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.
- Atkuri KR, JJ Mantovani and LA Herzenberg. 2007. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Curr. Opin. Pharmacol. 7:1-5.
- Berg JM, JL Tymoczko and L Stryer. 2004. Biochemistry, Fifth edition. p.506.
- Brennan RJ and RH Schiestl. 2001. Persistent genomic instability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* induced by ionizing radiation and DNA-damaging agents. Radiat. Res. 155: 768-777.
- Circu ML and TY AW. 2008. Glutathione and apoptosis. Free Radical Research 42:689-706.
- Davis W, Z Ronai and KD Tew. 2001. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug induced apoptosis. Perspectives in Pharmacology 296:900017-869993.
- Delaunay A, D Pflieger, MB Barrault, J Vinh and MB Toledano. 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. Cell 111:471-481.
- Dickinson DA and HJ Forman. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem. Pharmacol. 64:1019-1026.
- Esnault M, F Legue and C Chenal. 2010. Ionizing radiation: Advances in plant response. Environmental and Experimental Botany 68:231-237.
- Friesen C, Y Kiess and KM Debatin. 2004. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. Cell Death Differ. 11:S73-S85.
- Inoue Y, T Matsuda, K Sugiyama, S Izawa and A Kimura. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 274: 27002-27009.
- Jamieson DJ. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14:1511-1527.
- 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.
- Kho CW, PY Lee, KH Bae, S Cho, ZW Lee, BC Park, S Kang, DH Lee and SG Park. 2006. Glutathione peroxidase 3 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates the activity of methionine sulfoxide reductase in a redox state-dependent way. Biochem. Biophys. Res. Commun. 348:25-35.
- Kim KY, TY Rhim, I Choi and SS Kim. 2001. N-Acetylcysteine induces cell cycle arrest in hepatic stellate cells through its reducing activity. J. Biol. Chem. 276:40591-40598.
- Musallam L, C Ethier, PS Haddad, F Denizeau and M Bilodeau. 2002. Resistance to Fas-induced apoptosis in hepatocytes: role of GSH depletion by cell isolation and culture. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 283:G709-G718.
- Nakamura H, K Nakamura and J Yodoi. 1997. Redox regulation of cellular activation. Annu. Res. Immunol. 15:351-369.
- 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.
- Phelps DT, SM Deneke, DL Daley and BL Fanburg. 1992. Elevation of glutathione levels in bovine pulmonary artery endothelial cells by N-acetylcysteine. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 7:293-299.
- Pias EK and TY Aw. 2002. Apoptosis in mitotic competent undifferentiated cells is induced by cellular redox imbalance independent of reactive oxygen species production. Raseb. J. 16: 781-790.
- Pocernich CB, ML Fontaine and DA Butterfield. 2000. In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain. Neurochem. Int. 36: 185-191.
- Powis G, M Briehl and J Oblong. 1995. Redox signaling and the control of cell growth and death. Pharmacol. Ther. 68: 149-173.
- 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.
- Schroeder CP, AK Godwin, PJ O'Dwyer, KD Tew, TC Hamilton and RF Ozols. 1996. Glutathione and drug resistance. Cancer Invest. 14:158-168.
- Sies H. 1997 Oxidative stress: oxidant and antioxidants. Exp.

Physiol. 82:291-295.

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.

Ward JF. 1985. Biochemistry of DNA lesions. *Radiat. Res. Suppl.* 8:S103-111.

Watson RW, OD Rotstein, M Jimenez, J Parodo, JC Marshall.

1997. Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils. *Blood* 89:4175-4181.

Manuscript Received: August 16, 2011

Revision Accepted: October 18, 2011

Responsible Editor: Man Kyu Huh