

## 올레산과 미생물 유래 트랜스글루타미나제를 첨가한 우유 알파-락트알부민의 암세포사멸 효과

정지은 · 홍윤호<sup>†</sup>

전남대학교 생활과학대학 식품영양학과 · 생활과학연구소

### Effects of Bovine $\alpha$ -Lactalbumin Added with Oleic Acid and Microbial Transglutaminase on Cancer Cell Apoptosis

Ji-Eun Jeong and Youn-Ho Hong<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition · Human Ecology Research Institute, College of Human Ecology,  
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

#### Abstract

In order to investigate the biological effects of conformational changes in the folding state of bovine  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La), the protein was prepared and classified as apo form, microbial transglutaminase (MTGase) added form, or bovine  $\alpha$ -La made lethal to tumor cell (BAMLET) form. Apo  $\alpha$ -La form showed weaker cancer cell inhibitory activity (apoptosis) than native  $\alpha$ -La, which suggests that the metal ion-like  $Ca^{2+}$  had a positive effect, whereas BAMLET form showed strong cancer cell apoptotic activity. The BAMLET form seemed to be a molten globule structure that increased hydrophobicity. MTGase added to apo  $\alpha$ -La polymer showed similar anti-cancer activity as native  $\alpha$ -La, and it was well hydrolyzed by digestive enzymes. NMR results showed that BAMLET interacted with oleic acid and produced a complex.

**Key words:** bovine  $\alpha$ -lactalbumin, oleic acid, transglutaminase, apoptosis

#### 서 론

유청 단백질의 하나인  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ -La)은 우유 1 L당 약 1.2 g이 함유되어 있으며 분자량이 14,186 Da이고 등전점이 4.8인 산성 단백질로 123개의 아미노산으로 구성되어 있다(1).  $\alpha$ -La은 4개의 S-S 결합에 의해 안정화되고  $Ca^{2+}$ 과 잘 결합하며 올레산( $C_{18:1}$ , 9cis)과 같은 지방산과도 상호 반응하는 특성을 나타낸다. 이 반응은 단백질의 결합상태와 칼슘양이온 존재 여부에 따라 의존적이다. 자연상태의  $\alpha$ -La은 지방산과 결합할 수 없으나 구조가 개열(unfolding)되거나 ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA) 같은 chelation agent 처리로  $Ca^{2+}$ 이 제거된 apo 형태가 될 경우, 지방산과 잘 결합한다(2-5). 이렇게 결합된 분자복합체는 bovine  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cell(BAMLET)로 명명되는데 세포사멸(apoptosis) 효과가 있는 것으로 보고되었다(6, 7). 영양생리학적으로 자연 상태의  $\alpha$ -La은 포유동물 유선에서 유당의 합성, 칼슘의 운반, 면역조절, 항미생물 활성, opioid 활성, 항고혈압 활성 등과 같은 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다(8-11). Apo  $\alpha$ -La, BAMLET 등은 올레산과 결합하는 경우, 병원성 미생물 세포, 암세포 등에

대한 억제 기능이 있으나 정상 세포의 활성을 저해하지 않는다(5-7).

미생물에서 기원한 트랜스글루타미나제(microbial transglutaminase, MTGase, protein-glutamine  $\gamma$ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13)는 우유 단백질 내 혹은 단백질 상호호간의  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysyl isopeptide 결합(GL cross-linking)을 촉매하므로(12-14), 최근 이를 이용하여 단백질의 기능적 특성들을 향상시키려는 연구와 제품화가 활발하게 진행되어 왔다(15-19). 그러나 이 MTGase를 유제품에 첨가할 경우 BAMLET과의 작용, 특정 종양세포의 사멸활성 여부, 알레르기 유발 가능성, 부작용 등에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 우유  $\alpha$ -La을 apo 상태, apo 상태에서 MTGase처리군(T), 그리고 BAMLET으로 제조, 분류하고 구조적 상태 및 접힘의 상태에 따라 의존적으로 생물학적 기능이 변화할 수 있는 가능성에 대하여 관찰하고자 하였다. 그리고 Hep 3B, NCI-N87 암세포주의 생육에 대한 *in vitro* 세포독성 측정과 항암활성을 나타내는 시료에 대하여 세포사멸 발현 양상을 알아보기 위하여 DNA 분절형성, 핵C를 함유하며 전자전달에 작용하는 시토크롬(cyt) C의 방출,

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: yhhong@chonnam.ac.kr  
Phone: 82-62-530-1330, Fax: 82-62-530-1339

Western blot 등을 분석함으로써 BAMLET의 종양억제 기전을 탐색하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험 재료 제조 및 암세포의 선정

본 실험에 사용된 native  $\alpha$ -La(Davisco Foods International, Le Sueur, MN, USA)은 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 완충용액에 해리하였다. 이  $\alpha$ -La에 3.5 mM EDTA(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 apo  $\alpha$ -La을 제조하였다. BAMLET은 어두운 곳에서 올레산( $C_{18:1}$ , Sigma)을 ethanol(Merck, Whitehouse Station, NJ, USA)에 녹여 초음파 파쇄기(Jeio Tech, Daejeon, Korea)로 수분 간 처리하였다. 이를 apo  $\alpha$ -La에 첨가하여 Svensson 등(4)의 방법에 따라 제조하였다. 또한 apo  $\alpha$ -La에 MTGase(또는 T, Ajinomoto, Tokyo, Japan)를 10,000:1(S : E)로 3시간 반응시킨 시료를 apo  $\alpha$ -La(T)으로 배지에 희석하여 처리하였다. 실험조건에 따라 동결건조기(SFDTS 10K, Samwon Freezing Engineering Co., Busan, Korea)로 건조 후 분말을 얻었으며 실험할 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하면서 사용하였다. 실험대상 세포주로는 인간유래 암세포인 Hep3B, NCI-N87, SJSJ-1 cell line(Table 1)으로서 한국 세포주은행에서 분양받아 사용하였다.

#### 기기 및 시약

본 실험에 사용된 기기는 동결튜브(Nalgene, Rochester, NY, USA), 세포 계수기(Mariefeld-Superior, Lauda-Königshofen, Germany), 세포 배양용 접시(100 mm $\times$ 20 mm, Corning Costar, Corning, NY, USA), 원심분리기(Micro 17R, Hanil, Inchun, Korea), 초원심분리기(Combi-514R, Hanil), 항온 배양기(MCO-175, Sanyo, Moriguchi, Japan), 현미경(TMS-F, Nikon, Tokyo, Japan), microplate reader(MQX 200, Biotek, Winooski, Vermont, USA), 96 well plate(Corning Costar) 등이었고 시약들은 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid(ANS), sulforhodamine B (SRB), 그리고 tetramethylsilane(TMS)은 Sigma사의 특급 시약을 사용하였다.

10% formalin 용액, penicillin, streptomycin, 0.25% trypsin은 Sigma사의 제품을 사용하였고, Dulbecco's modified Eagles's medium(DMEM), Fetal bovine serum(FBS),

phosphate buffered saline(PBS) 및 RPMI 1640 배지는 Life Technologies사(BRL Pro., Grand Island, NY, USA)의 제품을 사용하였다. Cyt C 방출을 단백질 수준에서 확인하기 위해 MitoScience(Eugene, OR, USA) MS 852 kit와 anti-cyt C는 Pharmingen(San Diego, CA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 또한 anti-mouse IgG conjugated horse-radish peroxidase와 ECL plus Western blotting kit는 Amersham(Arlington Heights, IL, USA)사 제품을 사용하였다.

#### 세포 배양

암 세포주 기원, 특성 및 배지 등은 Table 1에 기술되어 있는 바와 같으며 이를 실험에 적용하였다. 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin 및 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  streptomycin을 첨가한 배양액을 이용하여 5%  $\text{CO}_2$ 의 존재 하에  $37^{\circ}\text{C}$  항온배양기에서 배양하였다. 모든 세포는 세포배양용 접시에서 계대배양하며 세포의 상태에 따라 충분히 배양된 것을 확인하고, 일주일에 2~3회 80~90% 이상의 배지를 교환하여 실시하였다. 세포 수집은 0.25% trypsin/1 mM EDTA 용액을 이용하여 단세포로 만들었고, 세포수는 세포 계수기를 사용하여 계수하였다. 세포주의 보존을 위해 모든 세포주는 DMSO와 FBS가 혼합된 저장용액을 제조하여 혼합하였다. 이를 극저온에도 깨지거나 변형되지 않는 특수 플라스틱으로 만든 동결튜브에 분주하여  $-90^{\circ}\text{C}$ 의 초저온 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

#### Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

단백질의 활성 거동을 확인하기 위하여 Laemmli(20)의 방법에 의한 SDS-PAGE는 SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol이 존재하는 조건에서 15.0% 폴리아크릴아마이드 겔에서 수행하였다. SDS용 resolving 겔(pH 8.8)과 stacking 겔(pH 6.8)을 제조하였으며 단백질 시료에 전기영동용 시료 완충용액(10% SDS, 1 M Tris, 50% glycerol, 4% bromophenol blue, 2-mercaptoethanol)을 가하고  $90^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열한 후 두께 1.0 mm의 겔에 시료를 주입하여 20 mA의 직류전기로 전기영동을 실시하였다. 그 겔을 0.25% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고, 45% 메탄올과 10% 초산을 혼합한 용액으로 탈색한 후 단백질 띠의 양상을 확인, 비교하였다.

#### 원편광 이색성 분광분석

원편광 이색성분광(circular dichroism, CD)은 JASCO

Table 1. List of selected cell lines in this study

Cell lines	Source	Note	Media
Hep3B	Human hepatic carcinoma cancer cell line	HBV infected, HBV surface antigen secretion	DMEM (Gibco, USA)
NCI-N87	Human gastric cancer cell line	minimally positive for vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors and lacked gastrin receptors	RPMI 1640 (Gibco, USA)
SJSA-1	Human bone cancer cell line	—	RPMI 1640 (Gibco, USA)

PTC-343(Tokyo, Japan)에 미세한 온도를 검출하는 온도조절기가 부착된 분광광도계(JASCO J-720)를 사용하여 측정하였다.

석영 큐벳(quartz cuvette)은 1 cm 길이로, 분광은 220 nm에서 260 nm까지 기록하였다. 파장단계는 1 nm, 반응시간은 4 sec이며 주사속도는 분당 10 nm로 지정하였다. 분석값은 3번씩 기록하여 평균치를 계산하였다. 대조군 분광은 PBS (pH 7.4)로 기록하였다.

#### ANS 형광 분광분석

ANS 형광 분광분석(fluorescence emission spectra)은 석영 큐벳을 1 cm 길이로 400 nm와 600 nm(step, 1 nm) 중 385 nm의 여기상태(excitation)에서 25°C에서 분광계(LS-50B, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 얻었다.

동결건조된 20 µM의 시료를 pH 7.5, 10 mM 인산 2수소 칼륨(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 완충용액으로 해리시켜 준비했다. 그리고 이것에 3 mM ANS를 순차적으로 첨가하여 형광 분광을 나타냈다.

#### 핵자기 공명 분광분석

핵자기 공명(nuclear magnetic resonance, <sup>1</sup>H NMR) 분광 분석은 INOVA 500 spectrometer(500 MHz, Varian, Walnut Creek, CA, USA)를 사용하였다. 동결건조된 시료를 중수(D<sub>2</sub>O)에 해리시키고, 수산화나트륨을 이용하여 pH 7로 조정하였다. 올레산은 에탄올(d6)로 해리시킨 다음 중수에 첨가하였다. 분석용매는 내부표준 물질로 TMA(δ=0)를 함유한 중수소 메탄올(deuterium methanol, Acros, Geel, Belgium)을 사용하였다.

#### 세포사멸의 평가

**성장억제 평가: SRB 분석:** 핑크색의 aminoxanthene 염료인 SRB를 이용하는 이 분석은 세포 단백질을 Houghton 등(21)의 방법에 따라 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 Hep3B, NCI-N87 및 SJS-1 세포에 최적 세포수인 3~6×10<sup>4</sup> cells/mL의 농도로 조정하여 실시하였다. 세포 부유액을 180 µL씩 분주하고, 다른 곳은 시료가 들어가지 않는 배지만을 200 µL 가해 흡광도 측정 시 비교군으로 사용하였다. 각각의 가수분해물인 검색 시료를 배지 내 최종농도가 5, 10, 50, 100 µg/mL가 되도록 20 µL씩 가하였다. 암세포와 가수분해물이 접종된 plate를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 3일간 배양 후 well plate에 부착된 암세포는 상정액을 제거하고, 10% formalin 용액 100 µL로 1시간 동안 실온에 방치한 후 바닥에 형성된 formazan 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 모든 well에 배지를 제거하기 위하여 4~5회 세척하였다. 실온에서 plate를 24시간 건조한 다음 각 well에 1%(v/v) 초산에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 100 µL씩 첨가하고 30분간 염색하였다. 그 후 1% 초산으로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris

완충용액(pH 7.0) 200 µL를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(22,23). 측정된 흡광도는 SRB 염료가 살아있는 세포핵만을 염색시키므로 이 값은 살아있는 세포수와 비례하였다. 각 시료의 LD(%)를 바탕으로 세포를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양인 LD<sub>50</sub>(mg/mL)을 구하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\% inhibition)} = (1 - T/C) \times 100$$

T: 반응군의 평균 Abs 값, C: 대조군의 평균 Abs 값

**세포 형태학적 평가:** SJS-1을 RPMI 1640 배지로 배양한 후, cover glass가 깔린 12 well plate에 3×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 분주하여 하루 동안 부착시켰으며, 각각의 시료를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>의 존재 하에 37°C 항온배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 새로운 배지로 교환한 후 레이저 공초점 주사현미경(Leica TCS SP5/Tandem/AOBS, Leica Microscope Systems, Solms, Germany)을 이용하여 세포사멸을 관찰하였다.

#### 미토콘드리아 관련 평가

**Cyt C 이동:** 미토콘드리아 안에 존재하는 cyt C와 세포질에 존재하는 것을 구분해 관찰하기 위하여 우유 α-La과 BAMLET을 이용하여 세포사멸을 유도한 후 세포를 4% paraformaldehyde로 상온에서 20분간 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. 그런 다음 blocking 용액(3% BSA)을 넣고 30분 적용시켰다. 1:200배로 희석된 anti-cyt C에 대한 항체를 처리한 후 4°C에서 24시간 동안 반응한 후 blocking 용액으로 5회 세척하였다. 암소에서 FITC가 결합된 2차 항체를 1시간 반응시킨 뒤 5회 세척하였다. 또한 세포의 핵은 DAPI로 염색하여 관찰하였다. 위의 분석은 한국기초과학지원연구원(광주센터)의 서영우 박사팀의 도움을 받아 형광현미경(Leica DMI 6000CS, Leica Microscope Systems)으로 미토콘드리아에서 세포질 내로 이동하는 cyt C를 확인하였다.

**Western blot 분석:** SJS-1에 우유 α-La, BAMLET을 처리하여 cyt C 방출을 단백질 수준에서 확인하기 위해 MitoScience kit를 이용하여 미토콘드리아와 세포질의 단백질을 분리하고 cyt C의 수준을 검출하였다. 우유 α-La과 BAMLET을 이용하여 세포사멸을 유도한 후 세포질 단백질 추출물을 확보하였다. 수집된 세포를 현탁시킨 후 얼음에서 10분 동안 배양하였다. Dounce형 균질화기(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)로 균질화시킨 후 RIPA buffer를 이용하여 전체세포 가수분해물을 추출하였고 propidium iodide(PI)가 첨가되어 있는 용액을 처리하여 12,000×g에서 15분간 원심분리 후 얻은 침전물을 미토콘드리아 내 단백질로 상층액을 세포질의 단백질로 간주하였다.

Western blotting을 위하여 SDS-PAGE로 분리된 단백질을 나이트로셀로오스 막(nitrocellulose, NC membrane)에 밀착시키고 전기이동용 완충용액(25 mM Tris, 192 mM

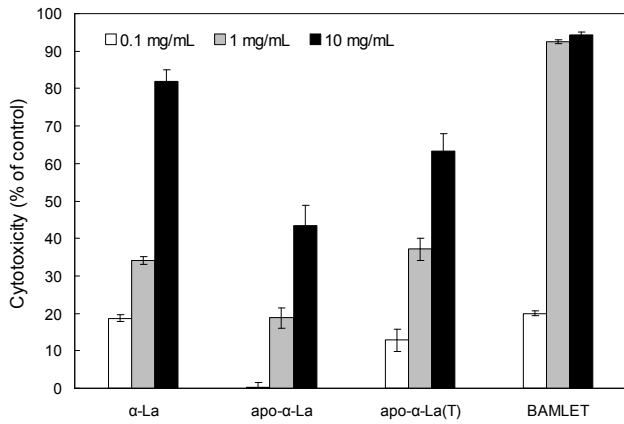


Fig. 1. Cytotoxicity of α-La against of Hep3B cell. BAMLET is a molecular complex of α-lactalbumin and oleic acid (C<sub>18:1</sub>) from milk and converted by treatment with EDTA, which removes Ca<sup>2+</sup> and by the addition of oleic acid (C<sub>18:1</sub>). Then cell viability (%) was tested by SRB assay in human hepatic carcinoma cell, Hep3B.

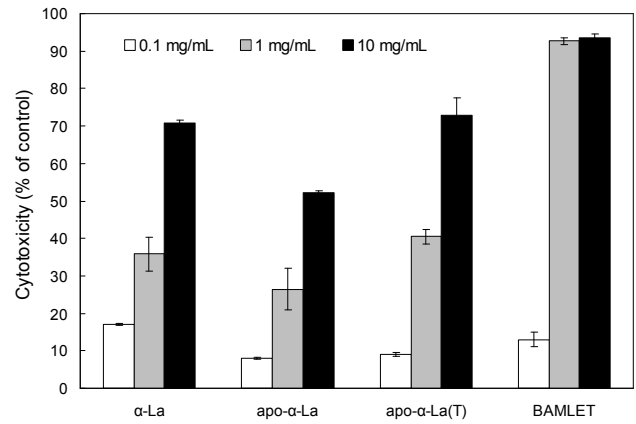


Fig. 2. Cytotoxicity of α-La against of NCI-N87 cell. BAMLET is a molecular complex of α-lactalbumin and oleic acid (C<sub>18:1</sub>) from milk and converted by treatment with EDTA, which removes Ca<sup>2+</sup> and by the addition of oleic acid (C<sub>18:1</sub>). Then cell viability (%) was tested by SRB assay in human gastric cancer cell line, NCI-N87.

glycine, 20% methanol)에 채워 전기적으로 이동시켰다. 이어서 NC membrane blot을 blocking 완충용액(1X TBS, 0.1% Tween-20, 5% skim milk)으로 실온에서 4시간 처리하고, 세척한 다음 1차 항체로 하룻밤 동안 반응시켰다. PVDF 막에 2차 항체로써 horse radish peroxidase conjugated anti-mouse를 90분간 반응시킨 후 세척한 다음, enhanced chemiluminescence(ECL) 방법으로 발색시키고, X-ray 필름에 감광하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### α-La이 세포의 세포생존율에 미치는 영향

각종 α-La이 인체의 Hep3B, NCI-N87 암세포의 생존에 미치는 영향에 대해서는 Fig. 1과 2에 나타났다. 시료를 적정 농도로 희석하여 72시간 동안 처리한 결과, Hep3B 세포에 α-La을 처리한 경우 저 농도(0.1 mg/mL)에서는 변화가 미약하다가 고농도 처리군에서 세포 성장 저해율이 증가하였고 처리농도에 의존적으로 세포 성장 저해율이 증가하였음을 알 수 있었다. Apo α-La의 경우 자연 상태의 α-La에 비하여 세포 성장 저해율이 낮아 Ca<sup>2+</sup>과 같은 금속이온이 세포독성에 관여하고 있음을 시사하는 것으로 보인다. 우유의 apo α-La과 올레산이 결합된 물질을 BAMLET으로 명명하였는데, 이것의 처리 농도가 1 mg/mL 이상에서는 세포 성장 저해율이 약 95%를 상회하여 암세포의 증식을 강하게 억제한

다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). NCI-N87에서 LD<sub>50</sub>(mg/mL) 값은 자연 상태의 α-La과 apo 상태에 MTGase를 처리한 α-La은 3.14와 3.83 mg/mL로 유사하게 나타난 반면, apo 상태의 α-La은 8.61 mg/mL로 다소 높게 나타났다. 이는 다른 시료보다 apo 상태에서 항암활성이 낮았음을 시사하는 것으로 생각된다. BAMLET은 LD<sub>50</sub>(mg/mL) 값이 0.14 mg/mL로써 높은 항암활성을 보였다(Table 2).

Human α-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET)는 α-La에 결합된 Ca<sup>2+</sup>을 제거하고 이것이 올레산과 복합체를 이룬 형태로써 암세포에서는 세포사멸을 유도하지만 건강한 세포에서는 사멸이 일어나게 하지는 않는다고 보고되었다(24). 이 복합체는 순수 성분인 α-La과 올레산으로부터 형성되며 세포사멸 분석 시 활성화된다. 접힘(folding)과 지방산 보조인자가 위의 항암활성을 갖게 되는데 꼭 필요한 것으로 사료된다. 이에 관하여 Svensson 등(4)은 새로운 기능을 갖는 보조인자로서 지방질의 탄소사슬 길이, 포화도, cis 또는 trans 구조를 달리한 형태 등에 관해 연구하였다. 이온 교환 크로마토그래피로 분석한 결과 cis 형태의 불포화지방산인 C<sub>18</sub>이 α-La와 가장 높은 안정한 복합체를 형성하였고 수율도 높았다고 보고하였다. 또한 C<sub>18:1:9 cis</sub>는 첨가된 apo α-La를 90% 이상 전환시키는 반면, C<sub>18:1:11 cis</sub>는 70% 이하의 수율로 다소 낮았고 다른 C<sub>18</sub>계 cis 지방산들(C<sub>18:1:6 cis</sub>, C<sub>18:2:9 cis</sub>, 12 cis, C<sub>18:2:9 cis</sub>, 12 cis, 15 cis)도 더 낮은 수율이 나타났다고 보고했다(4). BAMLET은 암세

Table 2. Antiproliferation activity of α-La, apo α-La, apo α-La(T), and BAMLET on NCI-N87 and Hep3B cell

	Hep3B cell				NCI-N87 cell			
	α-La	apo α-La	apo α-La (T <sup>2)</sup>	BAMLET	α-La	apo α-La	apo α-La (T)	BAMLET
Antiproliferation activity <sup>1)</sup> (LD <sub>50</sub> : mg/mL)	2.97	>10	2.04	0.156	3.14	8.61	3.83	0.14

<sup>1)</sup> Amount required for 50% reduction of cancer cell by SRB assay.

<sup>2)</sup> T means microbial transglutaminase (MTGase) treated.

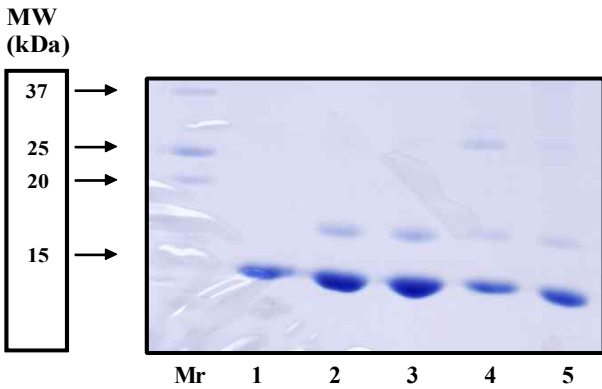


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of purified  $\alpha$ -La, native  $\alpha$ -La, apo  $\alpha$ -La, MTGase treated apo  $\alpha$ -La, and BAMLET. Proteins were mixed with reducing sample buffer and then separated by 15% polyacrylamide, follow by visualization with Coomassie Brilliant Blue R-250. Mr: marker protein, lane 1: purified  $\alpha$ -La, lane 2: native  $\alpha$ -La, lane 3: apo  $\alpha$ -La, lane 4: MTGase treated apo  $\alpha$ -La, lane 5: BAMLET.

포의 표면과 결합하여 세포 안으로 들어가고 미토콘드리아와 상호작용하며 리보솜을 타겟으로 하여 caspases를 활성화시킨 것으로 보인다. 항종양 활성은 40가지 다른 림프종(lymphoma)과 함께 나타났다고 보고하였다(25). HAMLET의 조건에서는 초기영아의 위에서 유사하게 형성된다. HAMLET과 같은 분자가 생후 1개월 이내의 신생아의 위로부터 종양을 제거함으로써 모유로 키운 아이의 암 발생을 낮추는 것에 도움을 줄 수 있다고 알려졌다(4,24,26).

SDS-PAGE에 의한 분석

정제된  $\alpha$ -La, 자연상태  $\alpha$ -La, apo  $\alpha$ -La, apo  $\alpha$ -La(T) 및 BAMLET 등을  $\beta$ -mercaptoethanol이 함유된 환원조건인 15% SDS-PAGE로 분석하였을 때 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다.

정제된  $\alpha$ -La(Sigma)의 경우 14 kDa의 위치에서 단일 단백질 밴드가 확인된 바, 고 순도의 제품임이 확인되었다. 유청단백질에서 유도된 자연 상태의  $\alpha$ -La은 시판되는 것으로 역시 14 kDa의 위치에서 단백질 띠가 확인되었으며 18 kDa 범위에  $\beta$ -Lg으로 추정되는 추가적인 밴드도 확인되었다. 이는 유제품의 분리, 정제, 가공 과정, 이화학적 상호작용 등에 의해 완전히 분리되지 않고 소량의  $\beta$ -Lg이 포함된 것으로 사료된다. Apo  $\alpha$ -La은 자연 상태와 유사하였으며 MTGase 처리 후 25 kDa 이하에 중합체가 형성되었다. BAMLET은 SDS-PAGE 상에서 native 및 apo  $\alpha$ -La과 유사한 단백질 띠들을 보였다.

원편광 이색성 분광

본 연구에서는  $\alpha$ -La이 구조적 상태에 따라 의존적으로 생물학적 기능이 변화할 수 있는 가능성에 대하여 알아보고자 하였다. 자연 상태의  $\alpha$ -La, apo  $\alpha$ -La, apo  $\alpha$ -La(T), BAMLET 용액에서 이차구조의 특성을 원형 이색성 분광계로 관찰하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 자연 상태의  $\alpha$ -La

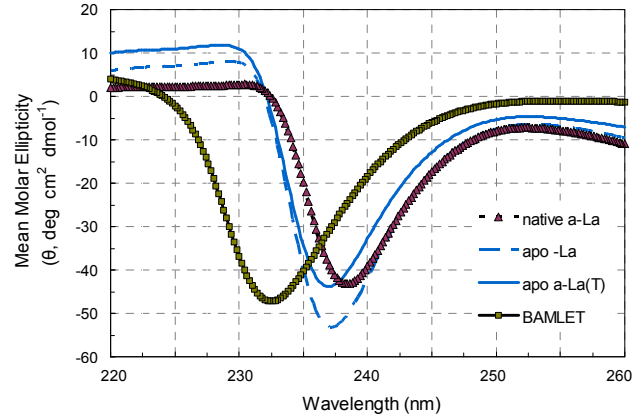


Fig. 4. CD spectra of  $\alpha$ -La. Molar ellipticity,  $[\theta]$  has the unit of  $\text{deg}/\text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Protein samples were  $150 \mu\text{g}/360 \mu\text{L}$  in phosphate buffered saline (pH 7.4). CD spectra of  $\alpha$ -La samples were measured from 220 to 260 nm.

은 240~230 nm 근처에서 분자적 타원율(molar ellipticity)을 보이나 이차구조가 손상된 개열상태의 apo  $\alpha$ -La은 240 nm 근처에서 분자적 타원율이 자연 상태의 그것보다 더 높은 값인 spectrum을 보였다. 그런데 BAMLET의 CD 분광 스펙트럼은 232 nm 근처에서 완만하고 분광 최저값이 232 nm 근처로 옮겨간 양상을 나타냈다. 분광의 변화는  $\alpha$ -helix 구조가 상당히 와해되었기 때문으로 생각된다. 무엇보다도 명확한 사실은 BAMLET에서의 CD 분광이 자연 상태도 개열상태도 아닌 구조를 가지고 있음을 보여주는 Fig. 5의 ANS 형광분광(fluorescence spectrum)의 결과와 유사하였다. 더욱이 220 nm에서의 분자적 타원율 값은 이차구조의 양을 정량적으로 나타내는데(27), 자연 상태에서의 값과 BAMLET에서의 값이  $4.95 \pm 1.34 \text{ deg}/\text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 로 큰 차이가 없었다. 이것은 BAMLET상태에서 자연 상태도 아니고 개열상태도 아닌 그러나 상당량의 이차구조를 지니고 있다

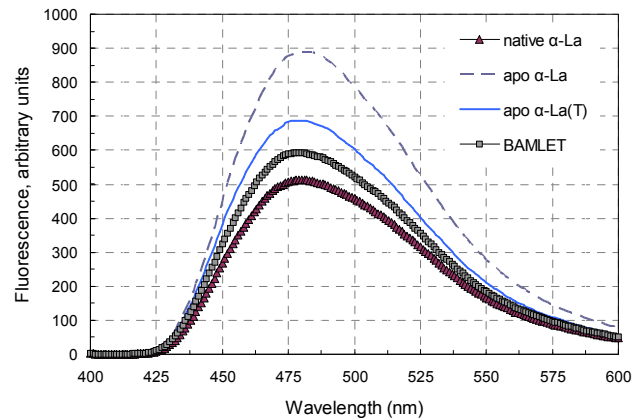


Fig. 5. ANS fluorescence spectra of  $\alpha$ -La. Native  $\alpha$ -La (solid, first line from the bottom), apo  $\alpha$ -La (dashed, top line), MTGase treatment for apo  $\alpha$ -La (T) (solid, third line from the bottom) and BAMLET (solid, second line from the bottom). The low signal at 400 nm at  $25^\circ\text{C}$ , and apo  $\alpha$ -La showed significant ANS binding with enhanced intensity and a maximum at 480 nm, as expected from the increased hydrophobicity of this fold. AU stands for arbitrary unit.

는 것으로 추측된다. 이러한 형광분광법과 CD 분광의 결과에서 보면 BAMLET은 소수성 내부가 견고하지는 않지만, 상당량의 이차구조를 가지고 있는 molten globule(MG)과 유사한 성질을 띠고 있다고 사료된다.

**ANS 형광 분광**

자연상태의 우유 α-La, apo α-La, apo α-La(T), BAMLET 및 올레산의 분자 사이에 접힘 정도를 비교하기 위하여 형광 분광법으로 분석하였다. MG 구조는 3차 구조가 견고하게 되어 있지 않아서 소수성 부분이 상당히 노출되어 있고 따라서 소수성 염색물질인 ANS와 결합하는 성질이 있다. ANS는 hydrophobic 환경에서 형광분광법의 강도가 증가하고 수용액에서보다 더 짧은 파장에서 형광분광 최고점을 보인다고 알려져 있다(28).

ANS는 단일체 농도와 관련하여 20 μM 농도로 실시하였다. 3 mM ANS에서의 분광은 Fig. 5에 나타냈다. α-La의 자연 상태와 개열 구조를 이루는 조건에서 ANS의 형광 스펙트럼은 475 nm 범위에서 유의적인 차이를 보였다. 자연 상태의 단일체인 α-La은 상대적으로 낮은 ANS 결합력에 의해 낮은 강도의 스펙트럼이 확인되었으며, pH 7.5 MG인 apo α-La은 ANS 결합력이 가장 높아 증가된 강도를 나타냈다. ANS의 형광 강도는 무처리 시료보다 apo 상태에서 MTGase를 처리한 군과 BAMLET 상태에서 더 감소하였고 형광 발광 최대점은 475 nm로 유사하였다. 이것은 α-La이 자연 상태에서 소수성 중심부가 견고하게 보존되어 소수성 염료가 결합할 소수성 표면이 존재하지 않으며, 개열된 상태에서는 소수성 중심부가 와해되어서 ANS가 결합할 수 있는 소수성 부분이 없어진 것으로 보인다. 반면에, apo 상태에서

는 소수성 염료가 결합할 수 있는 느슨한 구조를 가지고 있음을 알 수 있었다. 이상의 실험결과를 볼 때, 자연 상태의 구조를 약화시키는 apo의 용액에서 MG 형태를 형성하고 있다고 할 수 있다. Nieuwenhuizen 등(29)도 유사한 현상을 보고하였다. 소수성이 증가한 apo 용액은 자연 상태도 아니고 개열상태도 아닌 MG 상태를 보이는 것은 단백질의 삼차 구조를 안정시키는 비공유결합(noncovalent)과 단백질의 삼차구조를 약화시키는 전자반발작용(charge repulsion)이 MG 상태에서 적절히 균형을 이루기 때문으로 여겨진다. 전자반발작용은 단백질의 자연 상태를 유지하려는 소수성 결합, 반데르발스(van der Waals)결합, 수소결합과는 대조적으로 단백질의 삼차구조를 파괴하는 방향으로 작용하는 것으로 알려져 있다(27). 이러한 분광학적 관찰은 BAMLET이 apo 상태에서 상당량의 이차구조를 지니고 있지만, 소수성 중심부는 느슨하게 형성된 MG와 같은 형태를 지니고 있음을 추정할 수 있었다. 다른 연구에서도 단백질의 삼차구조를 불안정하게 해주는 조건에서 나타나는 MG 형태의 이차구조의 양이나 밀집정도는 단백질의 종류에 따라서 다양하게 나타날 수 있다고 보고되었다(30).

**올레산과의 결합**

자연 상태의 α-La, apo α-La, apo α-La(T), BAMLET 및 올레산의 <sup>1</sup>H NMR를 수행한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 자연 상태의 α-La의 <sup>1</sup>H NMR spectra는 다양한 메틸 신호(0.6~0.9 ppm), 방향성 신호(대략 7 ppm)에서 많은 수의 예리한 신호들(sharp signals), 유의적인 분산 이동, 좁은 선의 특징 등으로 보아 질서가 잡힌 단백질로써 접힘 상태로 생각된다. Apo α-La의 경우 많은 공명(resonances)의 화학적 이

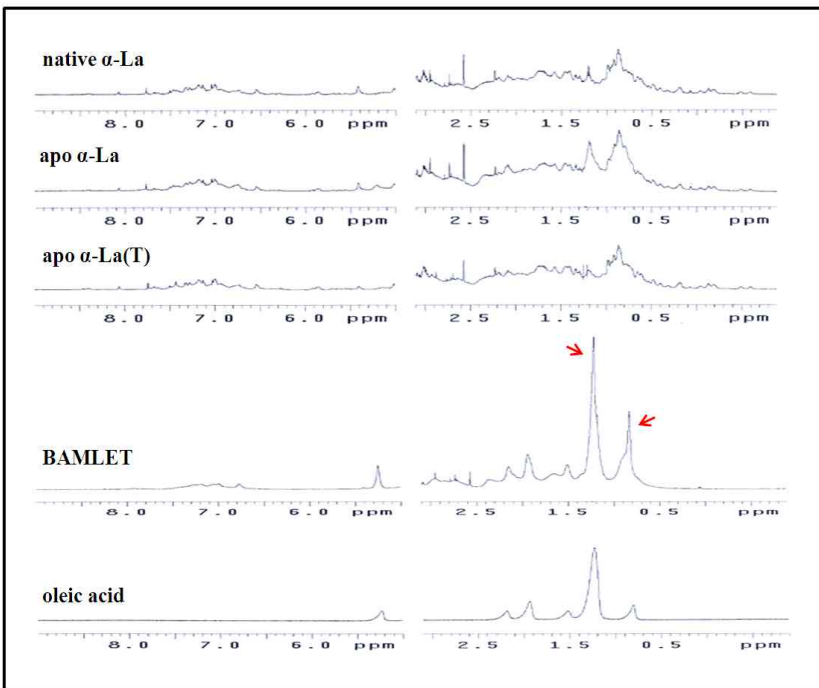


Fig. 6. <sup>1</sup>H NMR of native α-La, apo α-La, apo α-La (T), BAMLET, and oleic acid. The proteins were dissolved in D<sub>2</sub>O (pH 7.0). The aromatic and methylated regions are shown left and right, respectively. The broad lines and lack of out-shifted methyl signals suggest that BAMLET is in a partially unfolded state that is significantly different from the native form of the protein, which displays narrow lines and a large shift dispersion. Furthermore, signals arising from oleic acid are much broader in the BAMLET spectrum (arrow) than in the oleic acid spectrum.



동상에서 자연 상태와 관련 있는 유의적인 분산 이동과 좁은 선이 확인됐다. Apo  $\alpha$ -La(T)는 apo 상태와 비교할 때 메틸 (1.2~1.4 ppm) 신호가 약하게 확인되었다. BAMLET은 더 넓은 라인과 메틸 신호(0.6~0.9 ppm)가 적게 보였는데, 이것은 대부분 개열된(unfolding) 상태로 추측할 수 있다. 이러한 라인은 방향성 범위에서 더 많이 운집되어 있고, 0.7 ppm 이하 범위인 메틸 신호에서는 보이지 않았다. 또한 BAMLET의 한 신호는 1.2 ppm에서 포화된 반면, 다른 하나는 0.8 ppm이었다. NMR에 의해 BAMLET과  $\alpha$ -La의 apo 형태의 의미 있는 차이는 지방산 보조인자와 상호작용함으로써 변화하는 구조로 확인되었다.  $C_{18:1}$  지방산은 BAMLET(Fig. 6)의 spectrum에서 확인되었으며, 신호도 넓어서 그 지방산은 BAMLET의 구성요소가 됨을 나타낸다고 유추할 수 있었다.

SJSA-1 세포의 형태에 미치는 BAMLET의 영향

위에서 살펴 본 BAMLET에 의한 생존율의 감소 및 증식 억제에 따른 암세포의 형태 변화를 알아보기 위하여 농도별로(0~10 mg/mL) 24시간 동안 처리한 후, 위상차 현미경을 이용하여 정상 및 BAMLET이 처리된 조건에서 배양된 인체

골육종양 세포의 모양을 관찰한 결과를 나타내었다(Fig. 7).

인체 골육종양세포의 형태에 미치는 BAMLET의 영향에 대해서는 Fig. 7에서 볼 수 있듯이 자연 상태의  $\alpha$ -La의 경우는 고농도 처리군에서 세포의 형태적 변형이 관찰되었지만, BAMLET의 경우 0.5 mg/mL에서부터 농도 증가에 따라 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 농도가 증가될수록 점진적으로 세포질이 응축되면서 배양접시의 바닥에 낮게 부착되는 듯한 모습을 보였다. 또한 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하였고, 고농도 처리군에서는 많은 암세포들이 배양 초기 부착 능력이 상실되어 배지위로 부유하기 시작하였으며, 배양 접시에 부착된 세포들도 형태적 변이를 수반한 것으로 여겨진다. 이는 암세포 생존율 감소 및 증식억제와 부합되는 결과라 할 수 있다.

0.5 mg/mL의 자연 상태  $\alpha$ -La 및 BAMLET을 각각 골육종양세포에 처리하여 12, 24, 36시간 배양하면서 암세포를 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다(Fig. 8). 자연 상태의  $\alpha$ -La로 12시간 배양한 세포는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았으며 배양 시간이 길어짐에 세포의 수가 점차 감소되었다.

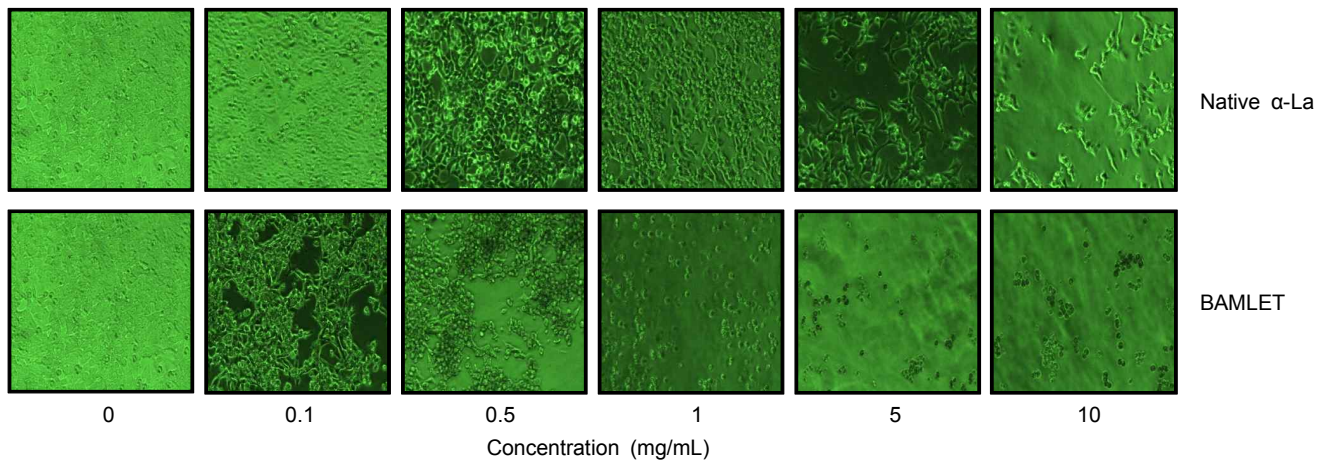


Fig. 7. Morphological changes of SJSA-1 cell after treatment with native  $\alpha$ -La and BAMLET (mg/mL, 24 hr). Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification,  $\times 200$ .

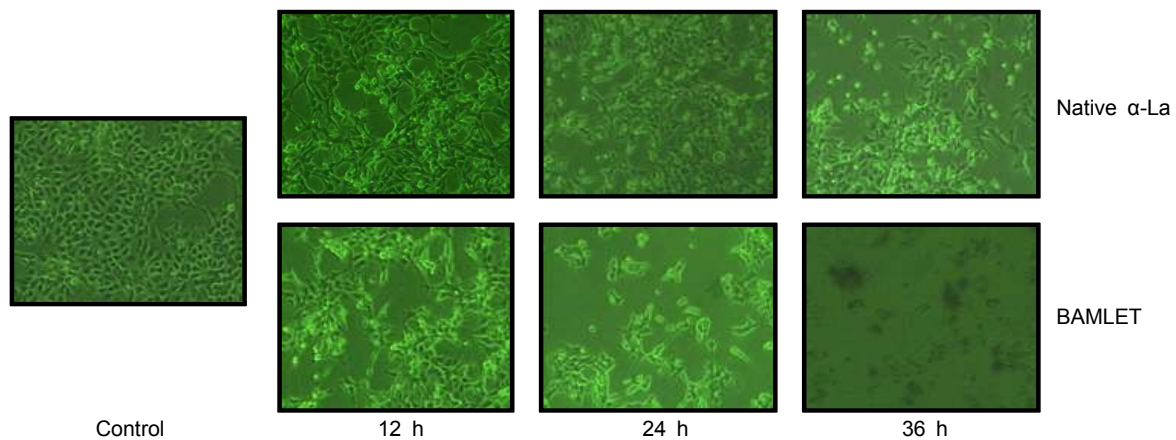
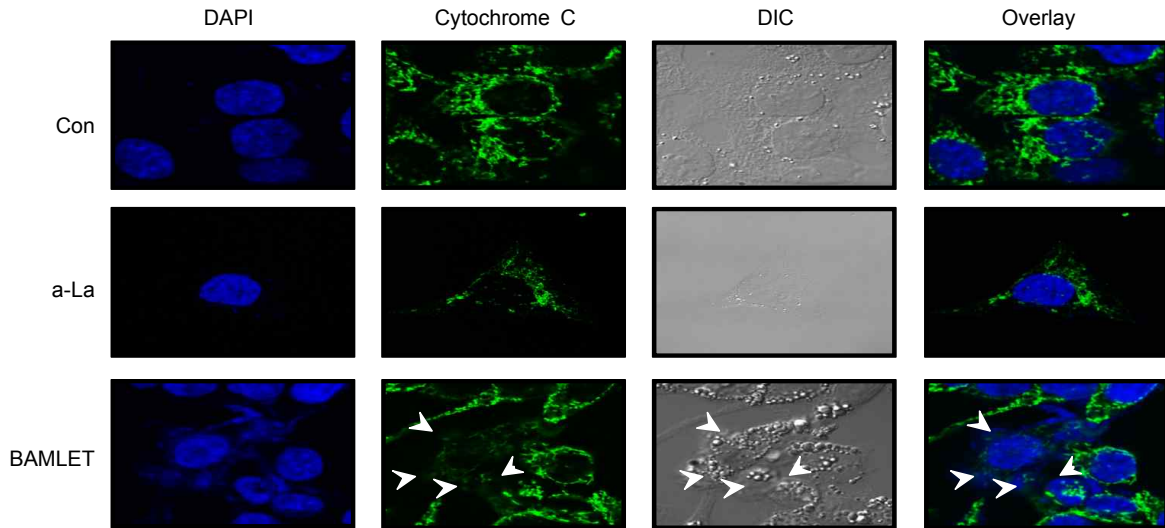


Fig. 8. Morphological changes of SJSA-1 cell after treatment with native  $\alpha$ -La and BAMLET (0.5 mg/mL, 12, 24, 36 hr). Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification,  $\times 200$ .



**Fig. 9.** Cyt C release from mitochondria for  $\alpha$ -La and BAMLET. SJS-A1 cells were treated with  $\alpha$ -La and BAMLET (0.5 mg/mL). After 24 hr cells were fixed and processed for immunofluorescence to visualize cyt C. Images were obtained using a Leica DMI 6000CS confocal microscopy and are displayed in pseudocolors. Arrows indicate cyt C staining (release or obvious) in the cells.

BAMLET을 처리하여 12시간 배양한 세포는 모양이 길어지면서 돌기가 확인되고 24시간 동안 배양 후 세포수는 현저히 감소한 것으로 보였으며 배양 36시간 이후 많은 암세포들이 거의 사멸하여 배지위로 부유하였다.

**BAMLET에 의한 SJS-A1 세포의 미토콘드리아 cyt C 방출**

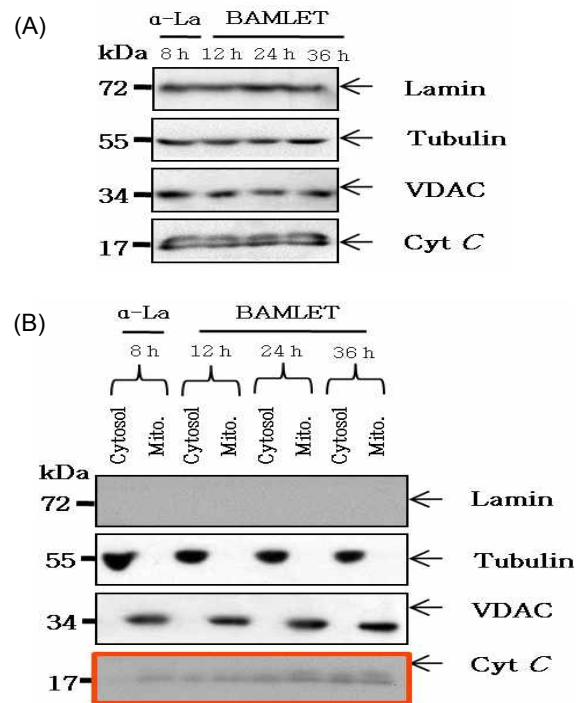
자연 상태의  $\alpha$ -La과 BAMLET에 의해 유도되는 세포고사 신호전달과정에서 세포내 미토콘드리아에 영향을 주어 미토콘드리아내의 cyt C를 세포질 내로 방출시켜 세포고사에 영향을 주는지 관찰하였다(Fig. 9). 이는 세포의 핵을 DAPI 염색, cyt C는 형광면역 염색, DIA 현미경, 상 겹침을 통하여 확인하였다. 미토콘드리아에 위치한 cyt C는 BAMLET 처리 후 세포질로 방출되었다. 뿐만 아니라 DIC 현미경 관찰 결과, 세포막의 기포 형성(membrane blebbing)으로 세포사멸과정을 겪고 있는 것으로 사료된다. 이에 반하여 SJS-A1 세포에서는 자연 상태의  $\alpha$ -La의 처리에 의해서 cyt C의 방출이 확인되지 않았다.

자연 상태의  $\alpha$ -La 및 BAMLET을 처리하여 세포를 배양한 후 전체 세포 가수분해물로부터 세포핵, 세포질, 그리고 미토콘드리아에 특이적으로 존재하는 단백질(A)과 세포질 부분과 미토콘드리아 부분을 분리하여(B) Western blot을 통해 각각의 cyt C를 확인, 제시하였다(Fig. 10). 전체 세포 가수분해물 중 핵에 존재하는 단백질 lamin, 세포질에 존재하는 tubulin, 미토콘드리아에 존재하는 VDAC, 그리고 cyt C가 검출되었고(Fig. 10A), 세포의 세포질과 미토콘드리아 부분을 분리하여 각각의 cyt C를 관찰한 결과 SJS-A1에서 BAMLET의 처리시간에 의존적으로 cyt C의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 10B).

따라서 이러한 SJS-A1에서 BAMLET에 의한 세포 고사

현상은 미토콘드리아 내에서 cyt C의 방출을 유도하여 하부 경로의 단백질에 영향을 주어 세포고사를 유도하고 있음을 알 수 있었다. 암세포 사멸에 대한 세포고사 기전 중 세포질로의 미토콘드리아 cyt C 방출이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(31,32).

$\alpha$ -La 및 활성 복합체의 형태는 영양적 측면뿐만 아니라



**Fig. 10.** Western blot analysis of whole cell lysates (A) and cellular fractionation (B) in SJS-A1 cells after treatment with  $\alpha$ -La and BAMLET. SJS-A1 cells were incubated with  $\alpha$ -La and BAMLET (0.5 mg/mL) for 8, 12, 24, 36 hr and subjected subcellular fractionation.



질병 치료, 회복의 기능 및 특정용도의 조합 식품의 소재로서 가치가 있다고 여겨진다. 유제품 유래의 항암 물질은 그 효과가 의약품보다 낮다 하더라도 항상 섭취가 가능하며, 가공식품 내에 용이하게 적용할 수 있는 장점을 가진다. 이러한 기능성 물질들이 차별화 되어 다른 식품 원료와 쉽게 가공할 수 있는 기능성식품 소재 등으로 이용될 수 있도록 연구개발이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 기능적 특성이 우수한 우유 단백질 소재를 개발하여 식품산업에 응용하고자 우유  $\alpha$ -La의 영양생리학적 특성에 대하여 분석하였다. 우유  $\alpha$ -La의 기능성을 향상 시키려는 시도로써 MTGase의 첨가가 이 단백질의 이화학적 및 면역학적 특성에 미치는 영향을 조사하고, 수종의 암 세포주의 생육에 대한 억제 효과를 탐색하였으며,  $\alpha$ -La의 구조적 상태에 따라 항암활성의 관련성을 검토하였다.  $\alpha$ -La에 반응한 MTGase에 의해 생성된 중합체는 인체 내 가수분해효소에 의해 분해가 용이한 것으로 확인되었다. 위암 세포주에  $\alpha$ -La을 10 mg/mL 농도로 처리한 경우 높은 세포독성을 나타냈다.  $\alpha$ -La과 올레산의 복합체인 BAMLET은 간암 세포주에서  $\alpha$ -La에 비해 더 강한 활성을 보였다. BAMLET은 apo 상태로 상당량의 이차구조를 지니고 있지만, 소수성 중심부는 느슨하게 형성된 MG와 같은 형태를 지니고 있을 것으로 추정되었다. NMR 분석 결과, BAMLET은 1.2 ppm과 0.8 ppm에서 지방산 보조인자인 올레산과 상호 작용하는 것으로 분석되었다.

## 감사의 글

이 논문은 전남대학교 2009년도 특성화 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이 연구에 사용된  $\alpha$ -La과 MTGase를 각각 제공해준 Davisco Foods International과 Ajinomoto사에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Brew K. 2003.  $\alpha$ -Lactalbumin. In *Advanced in Dairy Chemistry*. 3rd ed. Fox PF, McSweeney PLH, eds. Kluwer Academic/Plenum Press, New York, USA. Vol I, p 387-421.
2. Barbana C, Perez MD, Sanchez L, Dalgalarondo M, Chobert JM, Haertle T, Calvo M. 2006. Interaction of bovine  $\alpha$ -lactalbumin with fatty acids as determined by partition equilibrium and fluorescence spectroscopy. *Int Dairy J* 61: 52-81.
3. Kamijima T, Ohmura A, Sato T, Akimoto K, Itabashi M, Mizuguchi M, Kamiya M, Kikukawa T, Aizawa T, Takahashi M, Kawano K, Demura M. 2008. Heat-treatment method for producing fatty acid-bound  $\alpha$ -lactalbumin that induces tumor cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 211-214.
4. Svensson M, Hakansson A, Mossberg AK, Linse S, Svanborg C. 2000. Conversion of  $\alpha$ -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4221-4226.
5. Wijesinha-Bettoni R, Dobson CM, Redfield C. 2001. Comparison of the structural and dynamical properties of holo and apo bovine  $\alpha$ -lactalbumin by NMR spectroscopy. *J Mol Biol* 307: 885-898.
6. Barbana C, Sanchez L, Perez MD. 2011. Bioactivity of  $\alpha$ -lactalbumin related to its interaction with fatty acids: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51: 783-794.
7. Svensson M, Fast J, Mossberg AK, Dueringer C, Gustafsson L, Hallgren O, Brooks CL, Berliner L, Linse S, Svanborg C. 2003.  $\alpha$ -Lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Sci* 12: 2794-2804.
8. FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 134: 980S-988S.
9. Mills S, Ross RP, Hill C, Fitzgerald GF, Stanton C. 2011. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int Dairy J* 21: 377-401.
10. Nagendra PS. 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Brit J Nutr* 84: S3-S10.
11. Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, von Fellenberg R. 1999. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. *Biochem Biophys Acta* 1426: 439-448.
12. Bonisch MP, Heidebach TC, Kulozik U. 2008. Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. *Food Hydrocoll* 22: 288-297.
13. Motoki M, Nio N. 1983. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *J Food Sci* 48: 561-566.
14. Motoki M, Segura K. 1998. Transglutaminase and its uses for food processing. *Trends Food Sci Technol* 9: 204-210.
15. Jeong JE, Hong YH. 2005. Properties of transglutaminase treated milk product powders. *Korean J Food Sci Technol* 37: 345-351.
16. Jeong JE, Hong YH. 2006. Electrophoretic properties of transglutaminase treated milk product powders. *Korean J Food Sci Technol* 38: 304-308.
17. Jeong JE, Hong YH. 2009. Effect of transglutaminase addition on the physicochemical properties of sodium caseinate and whey proteins. *Korean J Food Sci Ani Resour* 29: 415-422.
18. O'Sullivan MM, Kelly AL, Fox PF. 2002. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *J Dairy Res* 69: 433-442.
19. Sibbel A. 2007. The sustainability of functional foods. *Soc Sci Medic* 64: 554-561.
20. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
21. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* 42: 377-387.
22. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83: 757-766.
23. Skehan P. 1999. Cell growth and cytotoxicity assays. In

- Cell Growth, Differentiation and Senescence*. Oxford University Press, Oxford, UK. p 41 - 42.
24. Fast J, Mossberg AK, Nilsson H, Svanborg C, Akke M, Linse S. 2005. Compact oleic acid in HAMLET. *FEBS* 579: 6095-6100.
  25. Hakansson A. 1999. Apoptosis induced by a human milk protein complex. *PhD Dissertation*. Lund University, Lund, Sweden. p 1-98.
  26. Gustafsson L, Hallgren O, Mossberg AK, Pettersson J, Fischer W, Aronsson A, Svanborg C. 2005. HAMLET kills tumor cells by apoptosis: structure, cellular mechanisms, and therapy. *J Nutr* 135: 1299-1303.
  27. Park SH. 2003. Spectroscopic analysis of partially folded state of ubiquitin. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 305-310.
  28. Svensson M, Sabharwal H, Hakansson A, Mossberg AK, Lipniunas P, Leffler H, Svanborg C, Linse S. 1999. Molecular characterization of  $\alpha$ -lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem* 274: 6388-6396.
  29. Nieuwenhuizen WF, Dekker HL, De Koning L, Groneveld T, De Koster CG, De Jong GA. 2003. Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo  $\alpha$ -lactalbumin with microbial transglutaminase. *J Agric Food Chem* 51: 7132-7139.
  30. Ptitsyn CB. 1995. Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem* 47: 83-229.
  31. Bonfils C, Bec N, Larroque C, Rio MD, Gongora C, Pugnère M, Martineau P. 2010. Cyclophilin A as negative regulator of apoptosis by sequestering cytochrome C. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 325-330.
  32. Jiang J, Serinkan BF, Tyurina YY, Borisenko GG, Mi Z, Robbins PD, Schroit AJ, Kagan VE. 2003. Peroxidation and externalization of phosphatidylserine associated with release of cytochrome C from mitochondria. *Free Radic Biol Med* 35: 814-825.

(2011년 12월 9일 접수; 2012년 1월 8일 채택)