

UV-A 반복노출로 인한 항산화효소의 구조변성과 효소활성의 상관관계

박미정, 유효정, 김종찬, 김소라*

서울과학기술대학교 안경광학과, 서울 139-743

투고일(2015년 2월 2일), 수정일(2015년 3월 10일), 게재확정일(2015년 3월 12일)

목적: 본 연구는 안구에 존재하는 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD)와 catalase(CAT)가 UV-A에 반복적으로 노출되었을 때 이들의 구조 및 활성의 변화가 유발되는지 알아보고 이들의 상관관계를 밝히고자 수행되었다. **방법:** SOD와 CAT의 표준품으로 각각의 효소용액을 제조하고 하루 30분, 1시간 및 2시간씩 365 nm의 UV-A에 노출시키는 조건으로 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 UV-A에 반복적으로 노출시켰다. UV-A 반복노출에 따른 SOD와 CAT의 구조변성은 전기영동분석으로 확인하였으며, 이들 효소의 활성은 분석키트를 이용하여 비색분석법으로 측정하였다. **결과:** UV-A에 반복노출된 SOD는 일일 1시간 이상 조건으로 반복노출되었을 때 전기영동분석에서 효소의 다중화(polymerization)가 관찰되었으나 활성의 변화는 12% 이내로 나타났다. 반면 UV-A에 반복노출된 CAT는 전기영동시 효소의 밴드크기가 감소하여 구조변성이 나타났음을 알 수 있었으며, 효소활성 또한 유의하게 감소됨을 확인하였다. 반복노출시간이 긴 경우 CAT은 전기영동분석에서는 효소밴드를 보임에도 불구하고 그 활성은 완전히 소실됨을 알 수 있었다. **결론:** 이상의 결과로 UV-A 반복노출에 따른 항산화효소의 구조변성은 효소의 종류에 따라 그 정도와 양상이 다르게 나타나며, 구조변성이 효소활성의 감소정도와 반드시 일치하는 것은 아님을 알 수 있었다.

주제어: 자외선 조사, 항산화효소, superoxide dismutase, catalase, 구조변성, 효소활성

서 론

급진적인 산업의 발달로 오존층의 파괴가 심화되어 대기권 내로의 자외선 유입이 증가하게 되었다. 가장 널리 알려진 자외선 노출에 따른 문제점으로는 피부의 급속한 노화나 손상을 들 수 있다. 그러나 빛에 민감하게 반응하는 감각기관인 안구 또한 자외선 노출에 취약하다.^[1] 즉, 자외선은 각막, 수정체, 홍채 등 안구 전반에 손상을 야기할 뿐만 아니라 만성적으로는 백내장, 편평 상피세포암, 안구 흑색종과 익상편, 검열반 등과 같은 각막과 결막의 다양한 병리학적 이상을 유발한다.^[2-4] 자외선 노출에 따른 안구손상의 원인으로는 지질, 단백질 및 DNA와 반응하여 세포손상을 일으키는 활성산소종의 과도한 생성을 들 수 있다.^[5,6]

안구는 항상 자외선에 노출되어 있을 뿐만 아니라 대기 중의 산소가 직접 전달되기 때문에 superoxide anion, singlet oxygen, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide와 같은 활성산소종이 과도하게 생성되기 쉽다. 그러나 안구를 포함한 모든 인체기관에서 생성되는 활성산소종은 정상적인 생체

조건 하에서는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase 등과 같은 항산화효소와 ascorbate, glutathione과 같은 항산화물질에 의해 제거된다.^[7-10] 산화적 스트레스로 인해 생성된 superoxide anion의 경우는 SOD에 의해 과산화수소와 분자 상태의 산소로 전환이 되며,^[11] 이 과정에서 생성된 과산화수소는 CAT에 의해 물과 산소로 분해되어 배출^[12]되므로 활성산소는 크게 감소하게 된다. 그러나 여러 연구진들의 선행연구에 의해 자외선 노출이 지속적으로 반복되었을 때 수정체와 같이 순환이 원활하지 못한 기관에서는 단백질 변성이 회복되기 어렵게 되어 항산화시스템의 불균형이 초래될 수 있음이 밝혀졌다.^[13-19] 안구 내 항산화효소활성의 변화 양상은 자외선 강도 및 조사시간을 포함한 실험조건 및 실험대상의 차이에 따라 다소 다르게 나타났으나 대부분의 연구에서 UV-B 조사에 따른 항산화효소활성의 차이를 보고하였으며, 자외선 중 상대적으로 에너지레벨이 낮은 UV-A 조사는 항산화효소활성에 미치는 영향이 미약하거나 없는 것으로 보고하였다. 이에 본 연구에서는 실험동물이나 세포 배양 시스템이 아닌 항산화효소인 SOD 및 CAT의 표준품

*Corresponding author: So Ra Kim, TEL: +82-2-970-6264, E-mail: srk2104@seoultech.ac.kr

(commercially available enzyme standard)을 선택하여 단순화된 연구조건 하에서 반복적으로 UV-A에 노출시킨 후 SOD 및 CAT의 구조변성과 활성변화 유무를 확인하고 이들의 상관관계를 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

1. 시약 및 재료

실험에 사용된 SOD, CAT, riboflavin, acrylamide, sodium dodecyl sulfate, coomassie brilliant blue R, ammonium persulfate, molecular weight marker, sodium phosphate dibasic anhydrous, sodium phosphate monobasic, SOD assay kit 및 catalase assay kit은 Sigma-Aldrich사(USA)의 제품을, bis-acrylamide, glycerol, Tris base, glycine, 2-mercaptoethanol은 AMRESCO사(USA)의 제품을 사용하였다.

2. UV-A 노출 조건

본 연구에서는 ‘국제 비이온화방사선 방호협회(ICNIRP)’의 기준에 따른 315~400 nm의 UV-A, 280~315 nm의 UV-B, 200~280 nm의 UV-C 가운데 눈의 각막과 수정체를 통과하여 망막까지 일부 도달하는 UV-A를 선정하여 실험하였다.^[20] SOD 및 CAT 표준품을 40 µg/mL이 되도록 인산 완충액을 이용하여 제조하여 1.5 mL 에펜도르프 튜브에 넣은 후 산소자유라디칼의 생성을 활성화시키는 5 µM riboflavin을 첨가하고 자외선패널(VL-6-LM, Vilber Lourmat, France, 에너지효율 9 mW/cm²)로 UV-A를 조사하였다. UV-A의 파장은 365 nm이었고 효소용액으로부터 상방으로 20 cm 떨어진 거리에서 조사하였다. UV-A의 하루 노출시간은 30분, 1시간 및 2시간이었으며, 조사 후에는 다음 자외선 조사 시까지 각막표면의 평균온도인 35°C에서 배양하였으며, 동일한 조사 조건으로 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 반복적으로 조사하였다. UV-A를 조사한 효소액을 500 µL로 양분하여 각각 전기영동분석과 효소활성분석에 사용하였다. 자외선을 조사시키지 않은 SOD 및 CAT 대조군은 UV-A 조사를 제외하고는 모두 UV-A 조사군과 동일하게 처리한 것으로 하였다.

3. 전기영동분석을 이용한 항산화효소의 구조변성 확인

UV-A를 조사한 SOD 및 CAT의 구조변성 여부는 효소용액의 5 µL(절대량=효소 200 ng)를 10% SDS 아크릴아미드 겔에 loading한 후 전기영동을 실시하고 밴드패턴을 분석하여 판단하였다. 겔 염색은 coomassie brilliant blue R로 하였으며 molecular weight marker의 전기영동 패턴을 비교하여 구조변성 여부를 판단하였으며,^[17-19,21] 시간에 따른 밴드의 density의 증감을 보기 위해 Quantity One

software(Quantity One 4.6.3, Bio-Rad)로 실험군 밴드 density/대조군 밴드 density로 상대적 실험값을 제시하였다.

4. 항산화효소의 활성 측정

SOD 및 CAT의 질적인 변성 정도는 각각 SOD assay kit, CAT assay kit(이상 Sigma-Aldrich)에 포함된 시약들과 함께 제조사에서 권장하는 비율^[22,23]에 맞춰 혼합한 후, 96 well Plate에서 20분 동안 배양하여 각각 450 nm 및 520 nm 조건 하에 마이크로플레이트 리더(BioTek IT/micro Quant MQX 200)로 각각의 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. UV-A 노출에 따른 항산화효소의 구조변성

1) Superoxide dismutase

UV-A의 노출시간을 달리하였을 때 안구 내에 존재하는 항산화효소의 변성 정도를 알아보기 위해 UV-A에 매일 30분, 1시간, 2시간씩 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 노출시킨 SOD를 10% SDS 아크릴아미드 겔 전기영동으로 단백질 분해 패턴을 관찰하였다.

본 연구에서 사용된 SOD 표준품^[24]은 순도 97% 이상으로 16.3 kDa의 동일한 SOD monomer 2개가 비공유결합으로 이루어져 분자량이 32.5 kDa이며, 각 monomer는 하나의 intrachain disulfide와 하나의 자유 sulfhydryl기 그리고 Cu²⁺ 및 Zn²⁺ 이온을 가진다. SOD 표준품은 전기영동 시 10% SDS와의 반응에 의해 비공유결합이 분해되어 monomer로 나타나 16.3 kDa에서 효소밴드가 관찰되어야 하는데,^[25] 본 연구에서 UV-A에 노출되지 않은 SOD는 전기영동 시 14.2~20.0 kDa 사이에서 SOD monomer로 추정되는 band A의 효소밴드가 관찰되었다(Fig. 1a). 그러나 SOD를 반복적으로 UV-A에 노출시키면 전기영동 시 SOD monomer(band A) 이외에 29.0~36.0 kDa에서 band B가 생김을 확인할 수 있었는데, 이는 SOD가 monomer로 분리되지 않았거나 새로운 교차결합(cross-linking)이 형성되어 dimer의 형태로 존재하는 것으로 추정해 볼 수 있다. UV-A 반복노출시간이 증가함에 따라 일일 노출은 30분 및 1시간임에도 불구하고 band B가 더 진해지고 두꺼워지는 경향을 보여(Fig. 1b) UV-A 반복노출에 의해 monomer의 비공유결합 패턴이 변화된 형태로 polymerization이 이루어졌을 가능성이 있다고 판단되었다. 이러한 가능성은 일일 2시간의 조건으로 반복조사한 SOD의 전기영동분석으로 더욱 커졌는데, SOD monomer (band A)나 dimer(band B)로 여겨지지 않는 새로운 band C가 45.0~66.0 kDa에서 관찰됨에 따라(Fig. 1a and b) 흔히 dimer, tetramer 및 hexamer로 존재하는 사람이나 동물의 SOD^[26]와는 달리

새로운 교차결합에 의해 trimer의 형태가 되어 polymerization의 패턴이 달라진 것으로 생각해 볼 수 있다. 실제로 UV는 생체 내에서 단백질과 결합되어 있는 DNA의 pyrimidine 염기인 thymine이나 cytosine의 이중 결합에 흡수되어 이웃해 있는 단백질의 염기성 부분과 교차결합을 일으킨다.^[27,28] 이러한 자외선 조사에 의한 DNA와 단백질의 교차결합은 정상적인 경우라면 생체 내에서 빠르게 복구되거나 만약 복구되지 않는다면 DNA의 영구적인 변화를 초래하게 된다.^[28] 본 연구에서 사용된 SOD는 Cu/Zn-SOD로 주로 진핵세포의 세포질에 존재하며, Cu와 Zn의 리간드는 6개의 histidine과 1개의 aspartate의 side-chain이 있고 한 개의 histidine이 두 개의 이온 사이에 결합된다.^[26] 염기성 아미노산인 histidine과 Cu/Zn-SOD내의 disulfide bond는 자외선의 흡수가 가능하므로 pyrimidine 염기의 경우와 같이 교차결합을 유발하여 SOD polymerization이 일어난 것으로 생각되나 이를 뒷받침할 연구가 뒤따라야 할 것이다.

항산화효소 표준품을 UV-A에 노출시킨 후 전기영동분석을 통하여 구조변성 여부를 알아본 본 연구진의 선행연구^[17]에서 3~6시간 이상의 연속조사 시에는 SOD의 polymerization 양상이 나타났으며, 24시간 이상 연속조사 시에는 분절된 밴드양상을 보여 구조변성이 일어난다는 결과를 얻은 바 있다. 본 연구에서 실시한 일회 단시간 조사의 반복노출에서는 연속조사 때와는 다른 전기영동패턴을 보여 자외선 노출시간과 조건에 따라 효소변성의 양상이 다를 수 있음을 알 수 있었다.^[17,18] 일상생활에서는 강한 자외선에 24시간 이상 연속으로 노출되는 경우는 없으며

로 일일 2시간 정도의 자외선 노출로는 SOD의 분절이 일어나지 않을 것이라 생각할 수 있다. 그러나 이렇게 변형된 SOD의 polymerization이 지속된다면 궁극적으로 효소의 변성이 유발될 수도 있을 것이다.

2) Catalase

UV-A에 매일 30분, 1시간, 2시간씩 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 노출된 CAT를 SOD의 실험과 동일하게 10% SDS 아크릴아미드 겔 전기영동으로 단백질 분해 패턴을 관찰하였다.

본 연구에서 사용된 CAT 표준품^[29]은 60.0 kDa의 동일한 CAT monomer 4개가 결합된 분자량 250.0 kDa의 효소로, 철이 protoheme IX 그룹에 결합되어 있다. CAT표준품은 전기영동 시 10% SDS와의 반응에 의해 monomer로 분리되어 60.0 kDa에서 효소밴드가 관찰되어야 하는데, 본 연구에서 UV-A에 노출되지 않은 CAT는 24.0~66.0 kDa의 넓은 범위에서 밴드가 관찰되었으며, 특히 45.0~66.0 kDa에서 CAT monomer인 band A가 진하게 관찰되었고, 29.0~36.0 kDa에서 band B가 흐리게 관찰되었다(Fig. 2a).

UV-A 조사에 의해 polymerization 양상을 보인 SOD의 경우와는 달리 UV-A에 노출된 CAT는 자외선에 노출되지 않은 CAT와 비슷한 밴드 양상을 보임에도 불구하고 반복 노출시간이 누적될수록 효소밴드가 전체적으로 흐려졌다(Fig. 2a). UV 조사로 효소의 polymerization이 이루어지기 위하여서는 효소가 산화형으로 전환되면서 side chain의 아미노산이 노출되어야 하는데^[27,30] 본 연구조건에서는 SOD가 배제된 조건이므로 CAT의 기질이 생성되지 않아 polymerization이 일어나지 않은 것으로 추정되었다. 뿐만

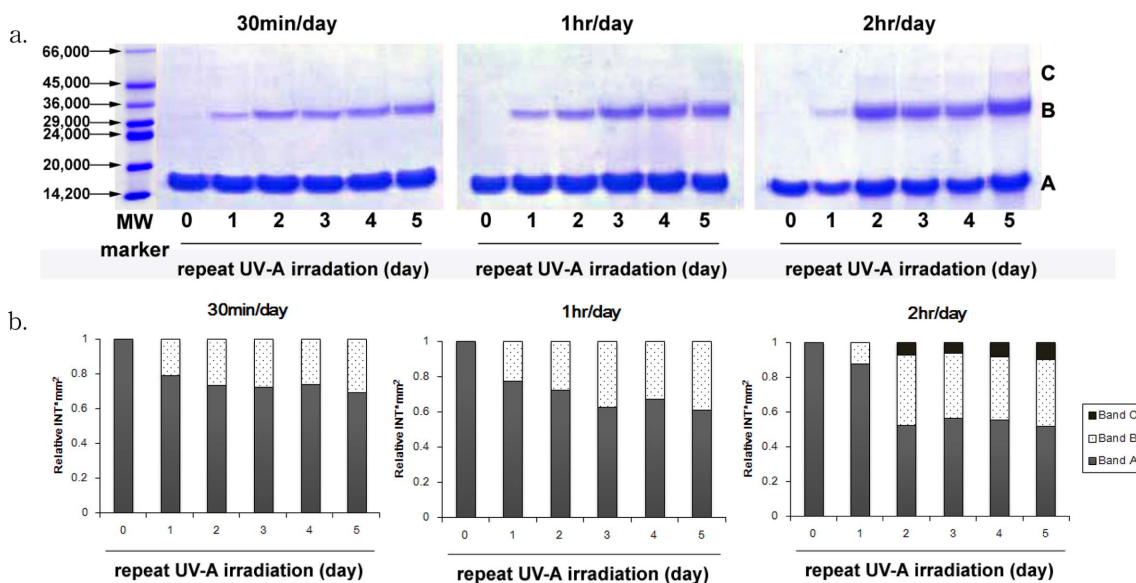


Fig. 1. Structural change of SOD induced by repeat UV-A irradiation. a. electrophoretic pattern of SOD, b. relative ratio of proteins for electrophoretic band of SOD, 0: non-irradiated, 1: irradiated for 1 day, 2: repeatedly irradiated for 2 days, 3: repeatedly irradiated for 3 days, 4: repeatedly irradiated for 4 days, 5: repeatedly irradiated for 5 days.

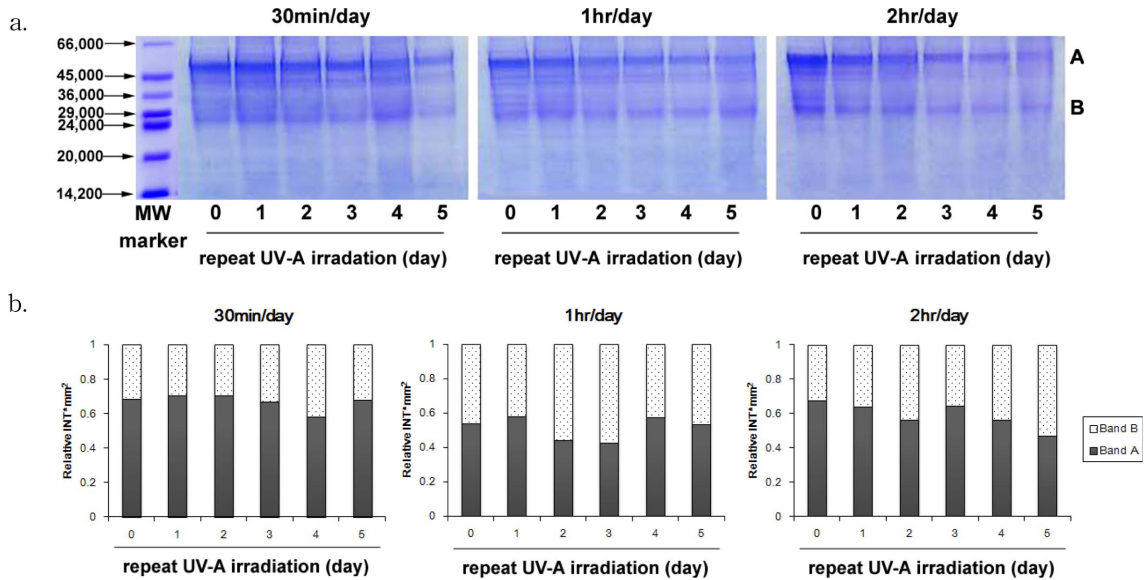


Fig. 2. Structural change of catalase induced by repeat UV-A irradiation. a. electrophoretic pattern of CAT, b. relative ratio of proteins for electrophoretic band of CAT, 0: non-irradiated, 1: irradiated for 1 day, 2: repeatedly irradiated for 2 days, 3: repeatedly irradiated for 3 days, 4: repeatedly irradiated for 4 days, 5: repeatedly irradiated for 5 days.

아니라 UV-A 반복노출에 따라 CAT가 미세하게 분해되어 CAT의 특징적인 밴드의 모습을 관찰하기 어려웠다. 따라서 CAT는 UV-A 조사에 의해 CAT의 양이 현저하게 감소하여 SOD보다 UV-A에 취약한 것으로 판단되었다(Fig. 2b).

이러한 본 연구결과는 Cejkov등의 면역조직화학기법 및 생화학분석기법을 이용한 선행연구결과^[14,15]인 UV-A는 항산화효소의 변화에는 영향을 미치지 않는다는 결과와는 상반된 결과이었다. *In vivo* 시스템인 토끼의 각막^[14]이나 배양 시스템인 수정체 상피세포^[15]를 이용한 연구와는 달리 본 연구는 *in vitro* 시스템인 SOD 및 CAT를 단독으로 연구하였기 때문에 각 효소들 간의 상호작용이나 *in vivo* 시스템이나 세포배양과 같은 연구시스템에서 관찰되어지는 세포 내 DNA변화에 따른 효소발현 변화의 가능성은 완전히 배제된 연구라는 차이가 있었기 때문으로 사료된다. 즉, *in vivo*나 세포배양 시스템에서는 UV-A 노출에 의해 생성된 산소라디칼이 SOD에 의해 H₂O₂로 전환되므로 CAT에 미치는 영향이 적게 나타났으나 본 연구에서는 CAT 단독으로 존재하는 조건이었으므로 UV-A 조사에 의해 구조나 활성이 모두 크게 영향을 받은 것으로 판단할 수 있다. 따라서 SOD와 CAT가 모두 존재하는 *in vivo* 시스템이라 하더라도 UV 조사에 따른 SOD의 polymerization이 원래의 상태로 복구되지 않고 지속된다면 CAT의 손상은 크게 나타날 수도 있을 것으로 예상할 수 있다.

2. UV-A 노출에 따른 항산화효소의 활성변화

1) SOD의 효소활성

UV-A 반복노출에 따른 SOD 구조변성의 가능성이 전기

영동분석을 통하여 제안되었으므로, SOD 활성 변화여부를 SOD assay kit^[26]을 이용하여 알아보았다.

본 연구에서 사용된 SOD는 6,000 mUnit/ μ g protein의 활성을 가진 표준품이었다.^[24] 따라서 UV-A에 노출되지 않은 효소활성을 100%로 하고 UV-A 반복노출에 따른 SOD활성을 상대적으로 나타내었다(Fig. 3). UV-A에 노출되지 않은 SOD 대조군의 활성은 5일 동안 유의한 변화가 없었으므로 riboflavin만을 첨가한 대조군의 경우는 SOD에 의해 생성된 자유산소라디칼이 효율적으로 제거되었던 것으로 일단은 생각할 수 있었다. 한편, UV-A 반복노출에 따른 SOD의 활성은 반복노출시간에 비례하여 지속적으로 감소되는 경향을 보였으며 반복노출시간과 효소활성과의 상관관계는 큰 것으로 나타났다. SOD활성저하 정도는 각 노출조건에 따른 추세선을 보면 그 기울기의 값이 작아지지 않았으며, 하루 2시간 조사조건으로 5일간 반복노출하여 전기영동 시 trimer 형태의 band C를 보였던 경우(Fig. 1)라도 최대 12% 내외의 SOD활성 저하를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 Cejkov등^[14]은 토끼의 각막에 4일 또는 8일 동안 매일 5분씩 UV-A에 노출시켰을 때 각막상피세포 내의 SOD 활성은 약간 증가하거나 변화가 없다는 연구결과와 비교하였을 때 다소 차이가 있었으나, UV-A 반복노출에 따른 SOD 전기영동의 밴드패턴에서는 UV-A 노출 전과 달리 polymerization된 패턴으로 나타났음에도 불구하고 효소활성에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 일단은 판단할 수 있었다. 그러나 본 연구에서 수행하였던 최장 반복노출인 하루 2시간의 총 5일 UV-A 반복노출에서 나타난 전기영동 상의 band C로 미루어

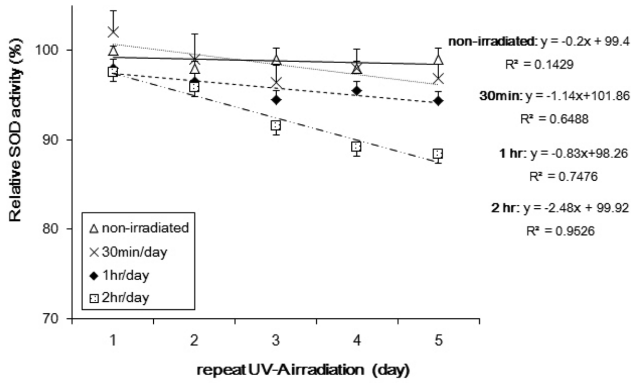


Fig. 3. Change of relative SOD activity induced by repeat UV-A irradiation.

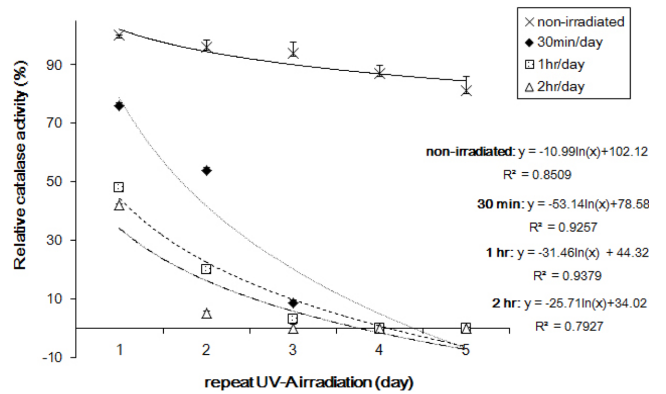


Fig. 4. Change of relative catalase activity induced by repeat UV-A irradiation.

볼 때 반복노출이 그 이상으로 반복된다면 SOD활성의 변화가 가속화될 가능성도 있다.

2) Catalase

UV-A는 에너지레벨이 DNA나 단백질의 교차결합을 유발할 정도로 높지 않은 것으로 보고되었음에도 불구하고^[27] 본 연구조건에서는 전기영동분석 시 UV-A 반복노출에 따른 CAT 밴드의 진하기나 크기의 변화(Fig. 2b)로 CAT의 양이 크게 감소하였음을 확인하였으므로 CAT 활성 변화 여부를 CAT assay kit^[23]을 이용하여 알아보았다.

본 연구에서 사용된 CAT는 12.5 Unit/ μ g protein의 활성을 가진 표준품이었다.^[24] 따라서 UV-A에 노출되지 않은 효소활성을 100%로 하고 UV-A 반복노출에 따른 CAT활성을 상대적으로 나타내었다(Fig. 4). UV-A에 노출되지 않은 CAT 대조군의 활성은 SOD 대조군과는 달리 5일 동안 어느 정도 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과로부터 SOD와는 달리 CAT의 활성은 산소자유라디칼 생성을 위해 넣은 riboflavin에 의해서도 어느 정도 감소하였음을 확인할 수 있었다. UV-A 반복노출에 따른 SOD의 활성이 크게 감소하지 않은 것과는 달리 UV-A에 노출된 CAT는 UV-A에 노출되지 않은 대조군과 비교하였을 때 활성감소가 크게 나타났을 뿐만 아니라 반복노출시간에 비례하여 그 활성이 급속하게 감소하였으며, 반복노출시간에 따라 활성의 감소 정도는 다르게 나타났다. 이로써 CAT 활성의 감소는 UV-A 조사에 의해 생성된 산소자유라디칼에 의한 결과임을 알 수 있었다. CAT의 전기영동분석에서는 UV-A 반복노출에 따른 밴드의 크기나 진하기가 감소함에도 불구하고 모든 반복노출조건 하에서 CAT의 분자밴드를 확인할 수 있었으나(Fig. 2) 효소활성의 감소는 이와는 일치하지 않는 양상으로 나타났다. 즉, 일일 30분씩 UV-A에 3일 동안 노출시킨 경우는 전기영동분석에서 효소밴드의 크기나 진하기가 UV-A에 노출되지 않은 경우보다 크게

감소하지 않았음에도 불구하고 그 활성은 10%까지 감소되었으며, 일일 1시간씩 3일 동안 UV-A에 반복적으로 노출시킨 CAT의 경우는 5% 미만의 활성을 나타내었고, 일일 2시간씩 반복노출시킨 경우에서는 노출 2일째에 이미 5% 미만의 CAT 활성을 보였다. UV-A에 반복노출된 CAT의 활성은 일일 30분 및 1시간 조사조건에서는 반복노출 4일째에, 일일 2시간 조사조건에서는 반복노출 3일째에 완전히 소실됨을 확인하였다. 따라서 구조변성의 가능성이 활성변화보다 빨랐던 SOD와는 달리 CAT는 구조변성이 일어나는 속도보다 그 활성을 소실하는 속도가 훨씬 빠른 것으로 판단되었으며, 효소단독조건에서는 CAT가 SOD에 비해 UV-A에 훨씬 많이 예민하게 반응한다는 것을 알 수 있었다. 본 연구결과는 UV-A는 항산화효소의 활성에 영향을 미치지 않는다는 선행연구의 결과^[14,16]와는 상반되는 결과이었는데 그 원인으로서는 노출지속시간, UV-A 조사 시 에너지효율 및 조사대상의 차이를 들 수 있다. 따라서 자외선 노출조건이 달라지게 되면 개인별로 항산화효소의 변성이나 활성 변화양상도 달라질 수 있음을 의미한다 하겠다.

결론

본 연구에서는 안구 내에 존재하는 것으로 알려진 SOD 및 CAT가 UV-A에 반복노출되면 구조변성과 효소활성의 변화가 나타남을 확인하였으나, 구조변성과 효소활성이 반드시 비례적으로 변화하는 것은 아니라는 것을 알 수 있었다. 또한, SOD는 UV-A 반복노출에 의한 구조변성 및 활성이 CAT에 비해 적었으나, CAT는 구조변성보다 활성의 변화가 더 크고 빠르게 나타났으므로 생체 내에 초래된 항산화시스템의 불균형이 가속화될 것으로 판단할 수 있었다. 따라서 자외선 중 에너지레벨에 상대적으로 높지 않은 UV-A라 하더라도 그 조사량이나 조사기간에 따라

항산화효소의 손상을 유발할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 서울과학기술대학교 교내 학술연구비로 수행되었습니다.

REFERENCES

- [1] Gallagher RP, Lee TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92(1): 119-131.
- [2] Zigman S. Ocular light damage. *Photochem Photobiol.* 1993; 57(6):1060-1068.
- [3] Youn HY, McCanna DJ, Sivak JG, Jones LW. In vitro ultraviolet-induced damage in human corneal, lens, and retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis.* 2011;17(1):237-246.
- [4] Merriam JC, Lofgren S, Michael R, Soderberg P, Dillon J, Zheng L et al. An action spectrum for UV-B radiation and the rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2642-2647.
- [5] Babizhayev MA. Mitochondria induce oxidative stress, generation of reactive oxygen species and redox state unbalance of the eye lens leading to human cataract formation: disruption of redox lens organization by phospholipid hydroperoxides as a common basis for cataract disease. *Cell Biochem Funct.* 2011;29(3):183-206.
- [6] Mittag T. Role of oxygen radicals in ocular inflammation and cellular damage. *Exp Eye Res.* 1984;39(6):759-769.
- [7] Rose RC, Richer SP, Bode AM. Ocular oxidants and antioxidant protection. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998;217(4):397-407.
- [8] Reddy VN, Kasahara E, Hiraoka M, Lin LR, Ho YS. Effects of variation in superoxide dismutases (SOD) on oxidative stress and apoptosis in lens epithelium. *Exp Eye Res.* 2004;79(6):859-868.
- [9] Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004;52:794-804.
- [10] Melov S. Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging. *Ann NY Acad Sci.* 2002;959:330-340.
- [11] Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and mitochondrial localization. *J Biol Chem.* 1973;248(13):4793-4796.
- [12] Atalla L, Fernandez MA, Rao NA. Immunohistochemical localization of catalase in ocular tissue. *Curr Eye Res* 1987;6(1):1181-1187.
- [13] Hong NS, Ko SM, Shyn KH. The effect of UVB radiation on the cultured rabbit lens epithelial cells. *J Korean Ophthalmol Soc.* 1997;38(1):46-56.
- [14] Čejková J, Štípek S, Crkovská J, Ardan T, Pláteník J, Ččejka Č, et al. UV Rays, the prooxidant/antioxidant imbalance in the cornea and oxidative eye damage. *Physiol Res.* 2004;53(1):1-10.
- [15] Čejková J, Štípek S, Crkovská J, Ardan T. Changes of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the corneal epithelium after UVB rays. *Histochemical and biochemical study. Histol Histopathol.* 2000;15(4): 1043-1050.
- [16] Formicki G, Stawarz R. Ultraviolet influence on catalase activity and mineral content in eyeballs of gibel carp. *Science Total Environ.* 2006;369(1-3):447-450.
- [17] Park CS, Park YM, Kim DH, Park MJ. The effect of UV blocking lens on the denaturation of antioxidative enzymes induced by UV-A. *J Korean Ophthalmic Opt Soc.* 2007; 12(3):97-103.
- [18] Park MJ, Lee KH, Lee EK, Park SH, Kim SR, Lee HS. Effects of UV-A blocking contact lenses on the enzymes denaturation induced by UV-A irradiation. *J Korean Ophthalmic Opt Soc.* 2008;13(4):43-49.
- [19] Kim SR, Lee JH, Choi J-I, Park MJ. The inhibitory UV-B blocking rate of eyeglasses lens on the enzymes denaturation in cornea. *J Korean Ophthalmic Opt Soc.* 2013;18(3):253-260.
- [20] ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection). Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 and 400 nm (incoherent optical radiation). *Health Phys.* 2004;87(2):171-186.
- [21] Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 1998;9(6):255-262.
- [22] Sigma-Aldrich Co. Production information: SOD determination kit, 2011. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/19160dat.pdf>, (13 May, 2014).
- [23] Sigma-Aldrich Co. Production information: Catalase assay kit, 2011. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/cat100bul.pdf>, (13 May, 2014).
- [24] Sigma-Aldrich Co. Production information: superoxide dismutase from bovine erythrocyte, 2011. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/5/s7446dat.pdf>, (13 May, 2014).
- [25] Sigma-Aldrich Co. SDS-PAGE (4-20%) of SOD (Cat. No. S7446) under reducing conditions and stained with Coomassie blue, 2011. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s7446?lang=en®ion=US#>, (13 May, 2014).
- [26] Goodsell DS. The molecular perspective: Ultraviolet light and pyrimidine dimers. *Oncologist.* 2001;6(3):298-299.
- [27] Neves-Petersen MT, Petersen S, Gajula GP. UV Light effects on proteins: From photochemistry to nanomedicine.

- cine, in *Molecular Photochemistry-Various Aspects*, 1st Ed. Rijeka(Croatia):InTech, 2012;125-158.
- [28] Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*. 1983;306(5940): 284-287.
- [29] Sigma-Aldrich Co. Production information: catalase from bovine liver, 2011 http://www.sigma-aldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c40pis.pdf,(13 May, 2014).
- [30] Murthy M, Reid T, Sicignano A, Tanaka N, Rossmann M. Structure of beef liver catalase. *J Mol Biol*. 1981;152(2): 465-486.

The Relationship between Structural Denaturation of Antioxidative Enzymes and Their Enzyme Activity due to Repeated Exposure to UV-A

Mijung Park, Hyo Jung Yoo, Jong Chan Kim, and So Ra Kim*

Dept. of Optometry, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea
(Received February 2, 2015: Revised March 10, 2015: Accepted March 12, 2015)

Purpose: The present study was conducted to investigate whether the changes in structure and activity of antioxidative enzymes, superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT) present in the eyes appeared when they were repeatedly exposed to UV-A, and reveal the correlation of these changes. **Methods:** Each enzyme solution was prepared from the standardized SOD and CAT, and repeatedly exposed to UV-A of 365 nm under the condition of 30 minutes, 1 hour and 2 hours a day over 1, 2, 3, 4 and 5 days. Structural denaturation of SOD and CAT induced by repeat UV-A irradiation was confirmed by the electrophoretic analysis, and their enzyme activity was determined by the colorimetric assay using the proper assay kit. **Results:** SOD exposed repeatedly to UV-A showed the polymerization pattern through the electrophoretic analysis when it was repeatedly exposed under the condition of at least 1 hour a day however, the change of its activity was found to be less than 12%. On the other hand, CAT repeatedly exposed to UV-A showed reduced size of the electrophoretic band which indicated a structure denaturation and its activity was significantly decreased. In the case of that the repeat exposure time was longer, CAT activity was completely lost even though some enzyme band was shown in the electrophoretic analysis. **Conclusions:** From these results, it was revealed that the degree and pattern in structural denaturation of antioxidative enzymes differently appeared according to the type of enzyme, and the degree of structural denaturation was not always consistent with the reduction in enzyme activity.

Key words: UV irradiation, Antioxidative enzyme, Superoxide dismutase, Catalase, Structural denaturation, Enzyme activity