

UV-B 반복노출에 따른 항산화효소의 변성 및 활성저하와 RGP렌즈의 차단효과

변현영, 이은정, 오대환, 김소라, 박미정*

서울과학기술대학교 안경광학과, 서울 139-743

투고일(2015년 4월 27일), 수정일(2015년 5월 21일), 게재확정일(2015년 5월 23일)

목적: 본 연구는 안구에 존재하는 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD)와 catalase(CAT)가 UV-B에 반복적으로 노출되었을 때 유발되는 구조변성 및 활성저하의 상관관계를 밝히며, 자외선 차단 RGP렌즈의 사용으로 효소의 변성과 활성저하가 효율적으로 차단되는가를 알아보기 위하여 수행되었다. **방법:** SOD와 CAT의 표준품으로 각각의 효소용액을 제조하고 하루 30분, 1시간 및 2시간씩 312 nm의 UV-B에 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 반복적으로 노출시켰다. 이 때 UV-B에 직접 노출시킨 항산화효소의 구조 및 활성변화를 자외선 차단기능이 있는 RGP렌즈로 UV-B를 차단시킨 경우와 비교하였다. UV-B 반복노출에 따른 SOD와 CAT의 구조변성은 전기영동분석으로 확인하였으며, 이들 효소활성은 분석키트를 이용하여 비색분석법으로 측정하였다. **결과:** UV-B에 반복노출된 SOD는 일일 30분 조사조건으로 반복노출되었을 때에도 전기영동분석에서 효소다중화(polymerization)가 관찰되었으나 활성의 변화는 10% 이내로 나타났다. 반면 UV-B에 반복노출된 CAT은 전기영동 시 효소밴드크기나 진하기가 감소하여 구조변성이 나타났음을 확인할 수 있었으며, 반복노출시간이 긴 경우 CAT은 전기영동분석에서 효소밴드를 보임에도 불구하고 그 활성은 완전히 소실되었다. 또한 UV-B 조사로 인한 CAT의 변성은 63.7%의 UV-B 차단기능을 가진 RGP렌즈의 사용으로 어느 정도 억제되었으나 완전히 억제되는 것은 아니었다. **결론:** 이상의 결과로 UV-B 반복노출에 따른 항산화효소의 구조변성은 그 종류에 따라 효소활성의 감소정도와 반드시 일치하는 것은 아님을 알 수 있었다. 따라서 자외선으로 인한 항산화효소의 손상을 막기 위하여서는 콘택트렌즈를 착용한 상태에서 자외선 노출시간을 최소화하거나, FDA Class I 차단제에 해당하는 UV 차단율을 가지는 콘택트렌즈를 착용 또는 이에 상응하는 UV차단율을 가지는 선글라스를 덧착용할 것을 권장한다.

주제어: UV-B 조사, 항산화효소, superoxide dismutase, catalase, 구조변성, 효소활성, 자외선 차단 RGP렌즈

서 론

최근 오존층의 파괴가 지속되면서 자외선 방사량 또한 증가하고 있다. 자외선은 '국제 비이온화방사선 방호협회'의 기준에 따라 315~400 nm의 UV-A, 280~315 nm의 UV-B 및 200~280 nm의 UV-C으로 분류된다.^[1] 오존층에서 대부분 흡수되는 UV-C와는 달리 각막과 수정체를 통과하여 망막에 도달되는 UV-A는 장시간 조사 시 안구조직의 광화학적 변화를 일으킬 수 있으며, 수정체 색소의 화학 반응을 유발하여 백내장 진행을 촉진하고, 설맹, 황반부 변성증, 일광 망막염증, 각막이영양증 등의 질병을 유발시킬 수 있다. 눈의 각막까지 흡수되는 UV-B는 파장은 짧지만 상대적으로 에너지가 강하여 설맹을 유발하고 각막손상은 물론, 각막화상을 일으켜 시력저하가 유발될 수 있으며, 장시간 노출로 각막실질이 손상되면 영구적인 실명이 야기될 수 있다.^[2,4]

자외선으로 과도하게 생성되는 활성산소종이 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT)와 같은 항산화효소나 glutathione이나 ascorbate와 같은 항산화물질에 의해 적절하게 제거^[5-8]되지 않는다면 지질, 단백질, DNA와 반응함으로써 세포 손상을 야기할 수 있다.^[9-10] 즉, 자외선 노출이 지속적으로 반복된다면 안구 내 다른 조직에 비해 혈액순환에 의한 영양공급이 제한적인 각막이나 수정체와 같은 기관에서는 단백질 변성의 회복이 용이하지 않아 자외선에 의한 영향이 누적되므로 항산화시스템의 붕괴가 초래될 수 있다.^[11-18] 안구 내 항산화효소활성의 변화 양상은 실험조건 및 실험대상의 차이에 따라 다소 다르게 나타났다.^[11-15] 그러나 본 연구진의 선행연구에서 UV-B에 비해 상대적으로 에너지 레벨이 낮은 UV-A의 장시간 조사^[16-17]나 반복조사^[18] 역시 항산화효소의 구조변성이나 활성저

*Corresponding author: Mijung Park, TEL: +82-2-970-6228, E-mail: mjpark@seoultech.ac.kr

하를 유발할 수 있으며 효소의 종류에 따라 그 양상은 달라짐을 밝힌 바 있다. 이에 본 연구에서는 항산화효소인 SOD 및 CAT의 표준품을 선택하여 단순화된 연구조건 하에서 반복적으로 UV-B에 노출시킨 후 SOD 및 CAT의 구조변성과 활성변화의 상관관계를 밝히고자 하였다. 또한 국내 유통되고 있는 RGP렌즈의 자외선 차단율을 조사하고, 가장 낮은 차단율을 가진 RGP렌즈의 사용으로도 UV-B 반복조사로 인해 유발되는 효소변화와 활성저하가 효율적으로 억제되는가를 검사하여 자외선으로부터 안구 내 효소를 보호할 수 있는 조건을 제시하고자 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 CAT Assay Kit은 Sigma-Aldrich사(USA)의 제품을, bis-acrylamide, glycerol, Tris base, glycine, 2-mercaptoethanol은 AMRESCO사(USA)의 제품을 사용하였다.

2. RGP렌즈의 UV 차단율 측정

현재 국내 안경원에서 유통되고 있는 2개사의 RGP렌즈 12종 가운데 제조회사에서 자외선 차단효과를 가지지 않는다고 밝힌 3종을 제외한 9종의 RGP렌즈(구면도수 -3.00D, 베이스커브 8.0 mm)의 자외선 차단율을 측정하였다. 자동렌즈미터(CL-100, TOPCON, Japan)의 TM-1 모드로 자외선 투과도를 측정한 후 자외선 차단율을 산정하였으며 각 렌즈 당 3회 반복 측정 후 평균±표준편차로 결과값을 제시하였다.

3. UV-B의 반복노출

SOD 및 CAT 표준품을 40 µg/ml의 농도가 되도록 인산 완충액으로 제조하여 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 넣은 후 5 µM riboflavin을 첨가하여 산소자유라디칼의 생성을 활성화시키면서 자외선램프 (VL-6-LM, Vilber Lourmat,

France, 에너지효율 9 mW/cm²)를 이용하여 312 nm의 UV-B^[1]를 효소용액으로부터 상방으로 20 cm 떨어진 거리에서 조사하였다. UV-B의 하루 노출시간은 30분, 1시간 및 2시간이었으며, 조사 후에는 다음 자외선 조사 시까지 각 막표면의 평균온도인 35°C에서 배양하였으며, 동일한 조사 조건으로 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 반복적으로 조사하였다. UV-B에 반복조사된 효소액을 500 µL로 양분하여 전기영동분석과 효소활성분석에 각각 사용하였다. 자외선을 조사시키지 않은 SOD 및 CAT 대조군은 UV-B 조사를 제외하고는 모두 UV-B 조사군과 동일하게 처리한 것으로 하였다. 또한, UV-B조사에 의한 항산화효소의 구조변성 및 효소활성에 미치는 자외선차단 RGP렌즈의 영향을 알아보기 위하여 가장 낮은 UV-B 차단율(63.7%)을 보인 N사의 P제품인 RGP렌즈를 선정하여 자외선을 차단하면서 자외선 차단렌즈를 사용하지 않은 대조군과 비교하였다.

4. 전기영동분석을 이용한 항산화효소의 구조변성 확인

UV-B를 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, 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.^[18]

결과 및 고찰

1. 국내 유통 RGP렌즈의 자외선 차단율

현재 국내에서 유통되고 있는 RGP렌즈 중 안경원에서 구입이 가능한 제품은 N사의 7가지 제품과 D사의 5가지 제품으로 조사되었으며, 이 중 자외선 차단기능을 가진 RGP렌즈는 N사의 3가지 제품을 제외한 총 9가지 제품이였다. 그러나 각 제품에 대한 자외선 차단율은 제조회사로부터 제공되지 않은 실정이었다. 이에 9가지 제품 모두 동일하게 구면도수는 -3.00D, 베이스커브가 8.0 mm으로 선정 후 자동렌즈미터를 이용하여 자외선 차단율을 3회

Table 1. UV-blocking rate of RGP lenses distributed in domestic optical shop

manufacturer	N company				D company				
	P	C	G	O	Pr	Pl	Op	B	Cl
UV-A blocking rate(%)	14.0±3.6	33.7±3.5	40.7±1.2	36.0±1.0	28.0±2.7	15.0±3.6	35.3±2.3	17.3±2.1	34.0±2.7
UV-B blocking rate(%)	63.7±1.5	96.3±1.2	95.7±1.5	96.0±1.0	95.3±1.2	66.7±1.5	95.7±2.9	68.7±0.6	93.7±1.5

반복 측정하였다(Table 1).

이들 RGP렌즈의 UV-A 차단율은 최저 14%(N사 P제품)에서 최고 약 41%(N사 G제품)로 측정되었으며, UV-B 차단율은 최저 64%(N사 P제품)에서 최고 약 96%(N사 C제품)로 측정되었다. 즉, 지속적인 노출 시 안구조직에 손상을 주는 것으로 보고된 UV-B에 대하여서는 비교적 높은 차단율을 나타낸 반면, UV-A에 대하여서는 차단율이 비교적 낮은 것으로 나타났다. 미국국가표준기구(American National Standards Institute, ANSI)는 미용목적 선글라스의 UV-B 차단율은 70%, UV-A 차단율은 60% 이상, 일반적인 목적의 선글라스는 각각 95% 및 60% 이상, 특수목적의 선글라스는 각각 99% 및 60% 이상으로 선글라스의 사용목적에 따라 각기 다른 자외선 차단율을 권장하고 있으며,^[19] FDA에서는 렌즈의 UV-B 및 UV-A 차단율이 각각 99% 및 90% 이상인 class I 차단렌즈와 95% 및 70% 이상인 class II 차단렌즈로 분류하고 있다.^[20] 본 연구결과 국내 안경원에서 유통되고 있는 RGP렌즈는 ANSI의 기준이나 FDA분류 기준으로 볼 때 자외선 차단에 부합하지 않는 것으로 나타났다. 그러나 국내 유통되고 있는 안경렌즈의 경우는 여러가지 코팅을 하게 되고 코팅 시 사용된 자외선 흡수제에 의해 대부분의 경우 UV-B나 UV-A는 99% 이상 차단^[21]되는 것으로 보고된 바 있어 RGP렌즈의 경우와는 큰 차이를 나타낼 수 있었다.

2. UV-B 반복노출에 의한 항산화효소의 구조변화 및 RGP 렌즈의 억제효과

1) Superoxide dismutase

UV-B의 반복노출시간을 달리하였을 때 안구 내 항산화

효소 중 하나인 SOD의 변성 정도를 알아보기 위해 UV-B에 매일 30분, 1시간, 2시간씩 1, 2, 3, 4, 5일 동안 노출된 SOD를 10% SDS 아크릴아미드 겔 전기영동으로 단백질 분해 패턴을 관찰하였다.

본 연구에서 사용된 SOD 표준품^[22]은 순도 97% 이상으로 16.3 kDa의 동일한 monomer 2개가 비공유결합으로 이루어진 분자량 32.5 kDa의 SOD이었다. 전기영동 시 10% SDS와의 반응에 의해 비공유결합이 분해되어 16.3 kDa에서 SOD monomer 밴드가 관찰되어야 하는데,^[18] 본 연구에서 UV-B에 노출되지 않은 SOD는 전기영동 시 14.2~20.0 kDa 사이에서 SOD monomer로 추정되는 band A의 효소밴드만이 관찰되었다(Fig. 1A). 반면 SOD를 반복적으로 UV-B에 노출시키면 전기영동 시 band A 이외에 새로운 교차결합(cross-linking)으로 인하여 형성된 dimer로 추정되는 band B가 29.0~36.0 kDa에서 관찰되었는데, 이는 본 연구진의 선행연구^[18]에서 UV-A에 반복노출시킨 SOD에서 나타났던 밴드패턴과 유사하였다. 뿐만 아니라 UV-B 반복노출시간이 증가함에 따라 일일 노출은 30분 및 1시간임에도 불구하고 band B가 더 진해지고 두꺼워지는 경향을 보였다(Fig. 1B). 일일 30분 및 1시간의 UV-B 노출을 5일간 반복한 경우와 일일 2시간의 UV-B 노출을 3일 이상 반복한 경우에는 SOD monomer(band A)나 dimer(band B)로 여겨지지 않는 새로운 band C 및 D가 각각 36.0~45.0 kDa 및 24.0~29.0 kDa에서 관찰되었는데 (Fig. 1A and B) 이는 UV-A 반복조사 시 새로운 교차결합에 의해 형성된 trimer 형태의 다중화(polymerization)와는 차이가 있는 새로운 밴드이었다. 따라서 본 연구와 선행연구결과를 비교하면 안구 내 효소의 구조변성은 노출

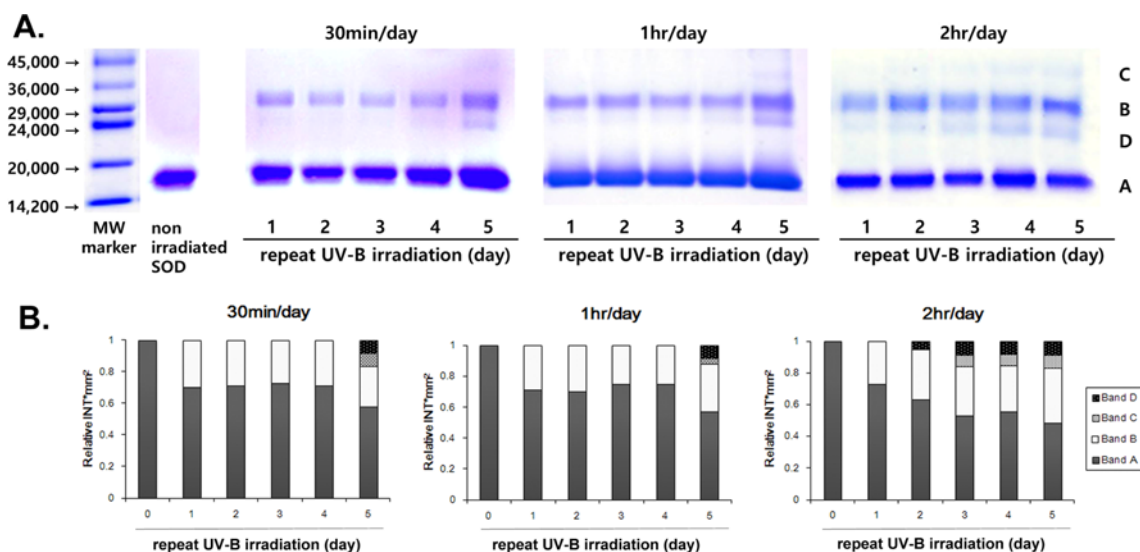


Fig. 1. Structural change of SOD induced by repeat UV-B irradiation. a: electrophoretic pattern of SOD, b: relative ratio of electrophoretic bands, 0: non-irradiated, 1: irradiated for 1 day, 2: repeatedly irradiated for 2 days, 3: repeatedly irradiated for 3 days, 4: repeatedly irradiated for 4 days,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

되는 자외선 파장(312 nm vs. 365 nm)에 따라 그 양상과 정도가 달라짐을 알 수 있었다. 즉, 전기영동분석을 통한 결과로 안구 내 항산화효소인 SOD는 UV-A보다 에너지 레벨이 높은 UV-B에 반복노출되었을 때 효소다중화가 좀 더 복잡한 형태로 유발되는 것으로 생각되었다. 항산화효소 표준품을 UV-B에 지속적으로 노출시킨 후 전기영동분석으로 구조변성 여부를 알아본 본 연구진의 또 다른 선행연구^[15]에서는 1~6시간의 연속조사 시에는 SOD의 구조변화는 나타나지 않았고, 24시간 및 96시간 연속조사 시에는 구조변성이 일어나는 결과를 얻은 바 있었으나 효소다중화 현상은 나타나지 않았다. 그러나 본 연구에서 실시한 일회 단시간 조사의 반복노출에서는 연속조사 때와는 다른 전기영동패턴을 보였으므로 동일한 자외선 파장이라 하더라도 노출조건에 따라 효소변성의 양상이 다를 수 있음을 알 수 있었다.^[15]

UV-B 차단율이 63.7%로 측정된 N사의 P제품인 RGP 렌즈를 사용하여 UV-B를 차단시키면서 SOD를 매일 30분, 1시간 및 2시간씩 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 UV-B에 반복노출시킨 후 효소의 구조변화에 미치는 영향을 전기영동분석을 통하여 알아보았다(Fig. 2). 이는 만약 가장 낮은 자외선 차단효율을 가진 RGP렌즈의 사용으로도 효소변성이 충분히 억제된다면 보다 높은 자외선 차단효율을 가진 렌즈는 그 이상의 억제효능을 가질 것이라 판단되었기 때문이었다.^[15]

자외선 차단 RGP렌즈로 UV-B를 차단시키면서 UV-B에 반복적으로 노출시킨 SOD의 전기영동패턴을 RGP렌즈를 사용하지 않고 UV-B에 반복노출시킨 SOD의 전기영동패

턴과 비교했을 때, RGP렌즈로 UV-B를 차단한 SOD의 band A(monomer)가 진하게 관찰되었으며, 일일 노출시간 및 반복노출기간이 증가하더라도 dimer로 추정되는 band B의 진하기 정도가 크지 않은 것으로 나타났다(Fig. 2A). RGP렌즈를 사용하지 않은 상태에서 UV-B에 반복노출되었던 SOD의 전기영동분석 시 나타났던 band C 및 D가 RGP렌즈로 UV-B를 차단한 상태에서 반복노출되었을 때에는 나타나지 않았다(Fig. 2A and B). 따라서 자외선 차단 기능을 가진 RGP렌즈를 착용하여 UV-B의 조사량이 감소된다면 UV-B 반복조사로 인한 SOD효소의 구조변화가 어느 정도 억제될 뿐만 아니라 효소다중화 현상도 단순화된 형태로 감소됨을 확인할 수 있었다.

2) Catalase

SOD의 실험과 같은 방법으로 UV-B에 매일 30분, 1시간, 2시간씩 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 반복노출시킨 CAT를 10% SDS 아크릴아미드 겔 전기영동으로 단백질 분해 패턴을 관찰하였다(Fig. 3).

본 연구에서 사용된 CAT 표준품^[23]은 60.0 kDa의 동일한 CAT monomer 4개가 결합된 분자량 250.0 kDa의 효소로 전기영동 시 10% SDS와의 반응에 의해 monomer로 분리되어 60.0 kDa에서 효소밴드가 관찰되어야 하는데, 본 연구에서 UV-B에 노출되지 않은 CAT는 45.0~66.0 kDa에서 CAT monomer인 band A가 진하게 관찰되었고, 29.0~36.0 kDa에서 band B가 흐리게 관찰되었다(Fig. 3A). UV-B의 반복노출에 의해 복잡한 효소다중화 양상을 보인 SOD의 경우와는 달리 UV-B에 반복노출된 CAT는 반복노출시간

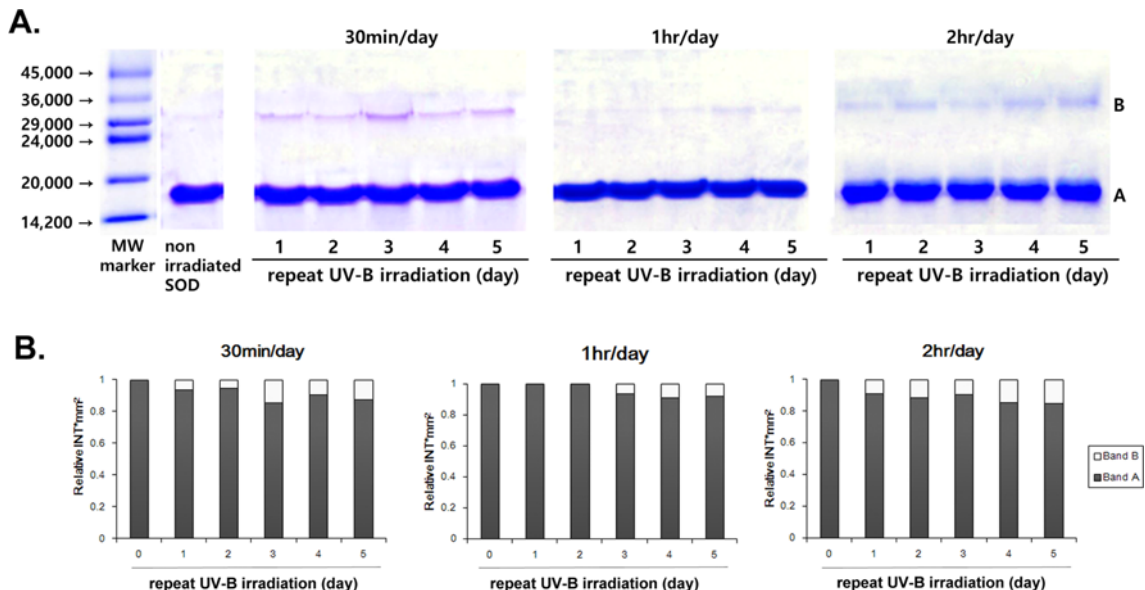


Fig. 2. Protective effect of RGP lens on structural change of SOD against repeat UV-B irradiation. a: electrophoretic pattern of SOD, b: relative ratio of electrophoretic bands, 0: non-irradiated, 1: irradiated for 1 day, 2: repeatedly irradiated for 2 days, 3: repeatedly irradiated for 3 days, 4: repeatedly irradiated for 4 days, 5: repeatedly irradiated for 5 days

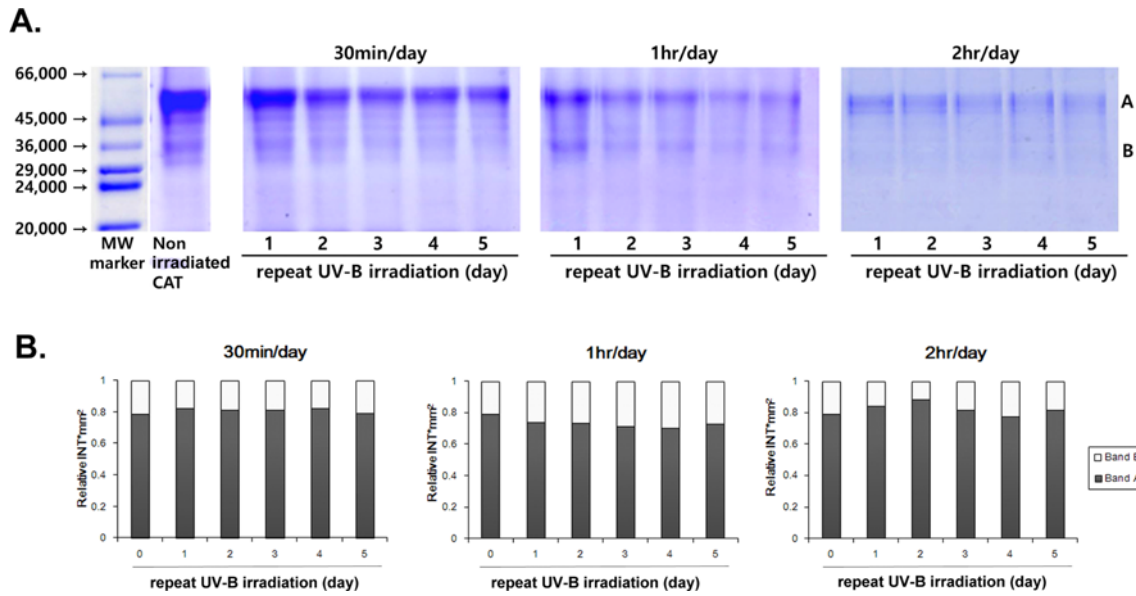


Fig. 3. Structural change of CAT induced by repeat UV-B irradiation. a: electrophoretic pattern of CAT, b. relative ratio of electrophoretic bands, 0: non-irradiated, 1: irradiated for 1 day, 2: repeatedly irradiated for 2 days, 3: repeatedly irradiated for 3 days, 4: repeatedly irradiated for 4 days,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

이 누적될수록 효소밴드가 전체적으로 흐려졌을 뿐만 아니라 미세하게 분해되어 CAT의 특징적인 밴드의 모습을 관찰하기 어려웠다(Fig. 3A and B). 이러한 결과는 CAT을 UV-A에 반복노출시켰던 선행연구와 동일한 연구조건인 SOD배제 하에서 얻어진 것으로 UV-B 반복조사로 인하여 과도하게 생성된 자유산소유리기가 SOD의 부재로 CAT의 기질로 전환되지 않은 상태이므로 활성산소에 의한 직접적인 효소의 불활성화와 단백질 구조파괴가 야기된 것

으로 추정되었다. 한편 UV-B 반복노출 후 CAT의 전기영동패턴을 UV-A 반복노출 후의 것과 비교하여 보면 일일 2시간씩 5일간 UV-A에 반복노출된 경우는 CAT의 전기영동밴드가 흐려지긴 했으나 band A 및 B가 모두 나타났던 반면^[18] 동일한 조사조건으로 UV-B에 반복노출된 CAT의 경우는 band B는 관찰이 어려웠다(Fig. 3A). 따라서 전기영동분석을 통하여 CAT는 UV-A 반복노출보다는 UV-B 반복노출에 더 취약한 것으로 일단은 판단할 수 있었다.

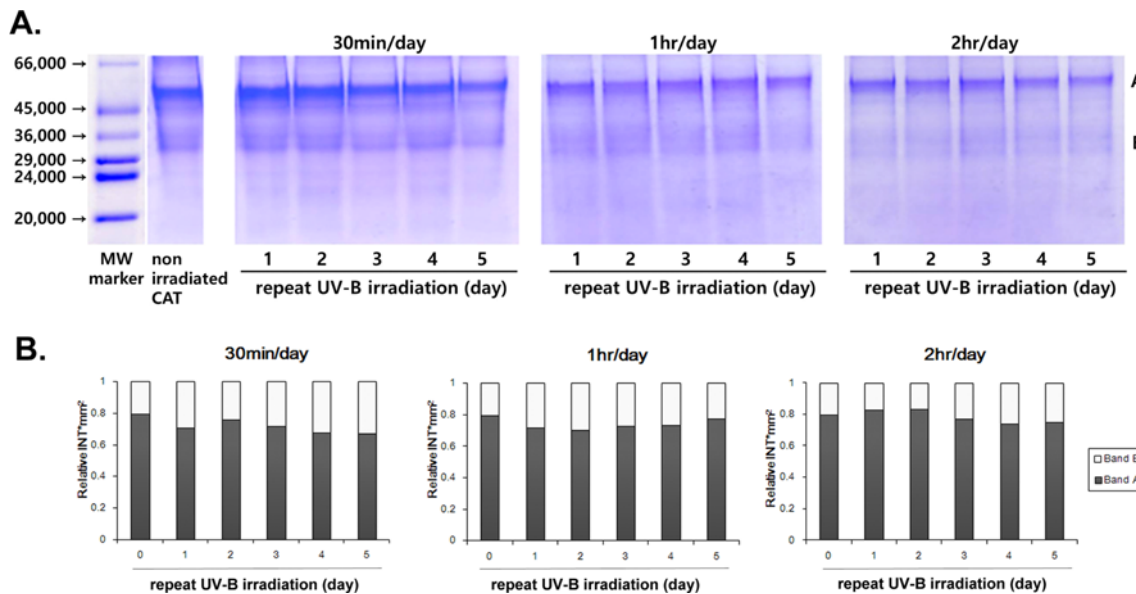


Fig. 4. Protective effect of RGP lens on structural change of CAT against repeat UV-B irradiation. a: electrophoretic pattern of CAT, b: relative ratio of electrophoretic bands, 0: non-irradiated, 1: irradiated for 1 day, 2: repeatedly irradiated for 2 days, 3: repeatedly irradiated for 3 days, 4: repeatedly irradiated for 4 days, 5: repeatedly irradiated for 5 days)

UV-B 차단율이 63.7%로 측정된 N사의 P제품인 RGP 렌즈를 사용하여 UV-B를 차단시키면서 CAT를 매일 30분, 1시간, 2시간씩 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 UV-B에 반복 노출시킨 후 효소의 구조변화에 미치는 영향을 전기영동 분석을 통하여 알아보았다(Fig. 4).

자외선 차단 RGP렌즈로 UV-B를 차단한 상태에서 UV-B에 반복노출시킨 CAT의 전기영동패턴은 UV-B에 노출되지 않은 대조군의 band 농도보다는 연하였으나 또한 동일조건에서 RGP렌즈로 UV-B를 차단하지 않은 상태로 노출된 CAT의 전기영동 band보다는 진한 양상을 나타내었다. 특히 일일 2시간씩 5일간 UV-B에 반복노출된 CAT의 경우는 band B의 관찰이 어려웠던 반면(Fig. 3A), RGP렌즈로 UV-B를 차단한 경우는 band B를 관찰할 수 있었다(Fig. 4A). 이러한 결과로 자외선 차단효과를 가진 RGP렌즈를 착용한다면 자유산소유리기의 발생이 감소되어 항산화효소의 구조변성이 어느 정도 억제되었음을 알 수 있었으나 UV-B에 노출되지 않은 CAT의 전기영동 band의 진하기나 두께와는 차이가 있었다. CAT를 안경렌즈를 사용한 상태에서 장시간동안 연속적으로 UV-B에 노출시킨 후 전기영동분석으로 구조변성을 관찰하였던 본 연구진의 선행연구^[15]에서는 3~6시간의 연속노출에서는 50%이상의 UV-B 차단 안경렌즈가 CAT의 변성을 완벽하게 억제하였으며, 24~96시간의 연속노출에서는 95%이상의 UV-B 차단 안경렌즈로 CAT의 변성을 완벽하게 억제하는 것으로 나타났던 반면, 본 연구에서는 일일 30분으로 3일 이내로 반복노출(누적 1.5시간 이내)되었을 때만 CAT의 변성이 완벽하게 억제되는 것으로 나타나 선행연구결과와 다소 차이가 있었다. 이들 결과의 차이는 안구가 강한 자외선에 장시간 연속으로 노출되는 것 뿐만 아니라 일일 단시간의 노출이 반복되어 총 누적노출시간이 증가될 때에도 안구내 효소의 손상이 유발될 수 있으며 자외선 차단 안경렌즈나 RGP렌즈의 사용으로도 완벽하게 억제되지 않을 수

있음을 시사한다.

3. UV-B 반복노출에 의한 항산화효소의 활성저하 및 RGP 렌즈의 억제효과

1) Superoxide dismutase

UV-B 반복노출에 따른 SOD의 구조변성의 가능성이 전기영동분석을 통하여 제안되었으므로, SOD 활성 변화여부를 SOD assay kit을 이용하여 알아보았다.

본 연구에서 사용된 SOD는 6,000 mUnit/ μ g protein의 활성을 가진 표준품으로,^[22] UV-B에 노출되지 않은 효소 활성을 100%로 하고 UV-B 반복노출에 따른 SOD활성을 상대적으로 나타내었다(Fig. 5A). UV-B에 노출되지 않은 SOD 대조군의 활성은 5일 동안 유의한 변화가 없었다. UV-B 반복노출에 따른 SOD의 활성은 반복노출시간에 비례하여 지속적으로 감소되는 경향을 보여 반복노출시간과 효소활성과의 상관관계를 나타내는 r²값은 큰 것으로 나타났으나 SOD활성저하 정도는 크지 않았다. 즉, 일일 30분, 1시간 및 2시간 조사조건으로 5일간 반복노출 후 전기영동 시 monomer 및 dimer로 추정되는 band A 및 B이외에 band C 및 D를 보였던 경우(Fig. 1)라 하더라도 최대 10% 이내의 SOD활성 저하를 보이는 것으로 나타났(Fig. 5A). 이러한 결과는 UV-A 반복노출 시 UV-B 반복노출 시와는 다른 효소다중화 양상을 보였던 SOD의 경우는 최대 12%까지 활성이 감소되었던 것에 비해 적은 감소이었다. 따라서 UV-B 반복노출에서 관찰되었던 band C 및 D는 SOD의 활성에 영향을 주는 부위가 분해되어 나타나는 밴드는 아니라고 판단되었으며, UV-B 반복노출에 의해 효소다중화가 나타났더라도 효소의 활성부위(active site)는 영향을 미비하게 받았거나 받지 않은 것으로 판단할 수 있었다. UV 종류에 따라 이렇듯 항산화효소의 활성저하가 다르게 나타나는 것은 UV-A 및 -B의 특징에 기인된 것으로 생각할 수 있다. 즉, UV-A는 DNA에 흡수되는 정

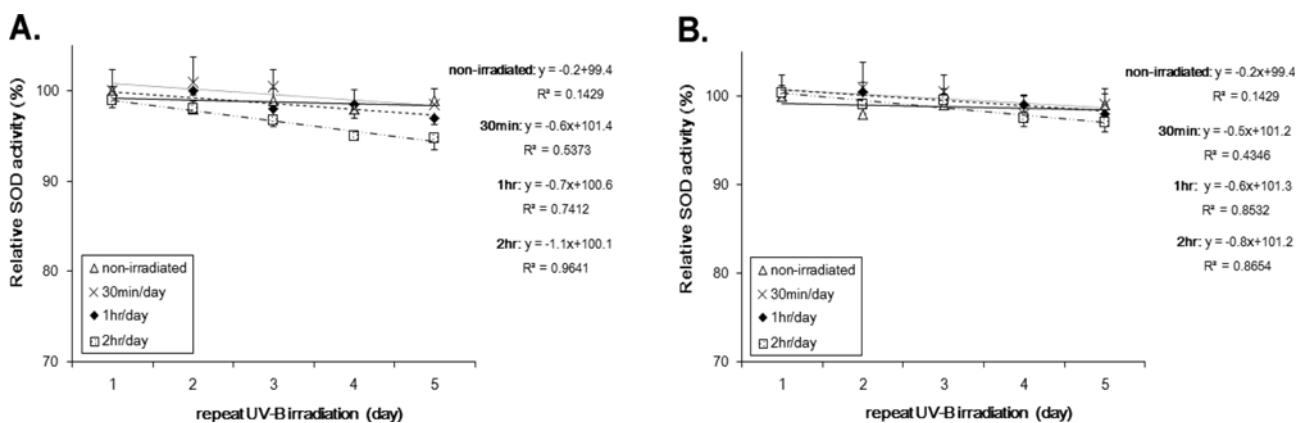


Fig. 5. Change in relative ratio of SOD activity by repeat UV-B irradiation. A: without RGP lens, B: with RGP lens

도가 크지 않으며, 주로 활성산소종의 생성을 통해 activator protein-1(활성화 단백질-1) 및 heme oxygenase와 같은 다양한 세포구성요소에 영향을 주는 반면, UV-B는 DNA에 일차적으로 흡수되어 직접적으로 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다.^[23] 본 연구뿐만 아니라 선행연구^[18]결과는 모두 정제된 효소단백질 만을 사용하여 얻은 결과로 DNA 손상에 따른 구조변화 및 활성저하는 배제된 상태이므로 UV-A에 의한 활성저하가 다소 크게 나타난 것이라 생각되었다.

한편 UV-B 차단율이 63.7%인 N사의 P제품 RGP 렌즈를 사용하여 UV-B를 차단시키면서 SOD를 매일 30분, 1시간 및 2시간씩 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 UV-B에 반복노출시키게 되면 SOD의 활성은 UV-B에 노출되지 않은 수준으로 유지됨을 알 수 있었다(Fig. 5B). 선행연구결과를 통하여 UV-B는 상대적으로 높은 에너지레벨을 가져 항산화효소에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있으나 본 연구결과를 통하여 SOD의 활성이나 구조변화에는 UV-B의 영향이 크지 않으며, 60% 정도의 UV-B차단효과를 가지는 RGP렌즈를 착용한다면 효율적으로 활성저하나 구조변화가 억제됨을 알 수 있었다.

2) Catalase

본 연구에서 전기영동분석 시 UV-B 반복노출에 따른 CAT 밴드의 진하기나 크기의 변화(Fig. 3)로 CAT의 양이 크게 감소하였음을 확인하였으므로 CAT 활성 변화여부를 CAT assay kit을 이용하여 알아보았다.

본 연구에서 사용된 CAT는 12.5 Unit/μg protein의 활성을 가진 표준품^[24]으로 UV-B에 노출되지 않은 효소활성을 100%로 하고 UV-B 반복노출에 따른 CAT활성을 상대적으로 나타내었다(Fig. 6). UV-B에 노출되지 않은 CAT 대조군의 활성은 SOD와는 달리 5일 동안 그 정도가 크지는 않았으나 지속적으로 감소하였다. UV-B 반복노출에 따른

SOD의 활성이 크게 감소하지 않은 것과는 달리 UV-B에 노출된 CAT는 반복노출시간에 비례하여 급속하게 감소하였고, 반복노출시간에 따라 활성의 감소 정도는 다르게 나타났다. UV-B에 노출되지 않은 대조군과 비교하여 활성 감소가 컸다. 이로써 CAT 활성의 감소는 UV-B 조사에 생성된 산소자유라디칼에 의한 결과임을 알 수 있었다. CAT의 전기영동분석에서는 밴드의 크기나 진하기가 UV-B 반복노출시간에 따라 감소함에도 불구하고(Fig. 3), 효소활성의 감소는 반복노출 초기(2일 이내)와 반복노출 후기(3일 이상)에 따라 다르게 나타나 구조변화와 활성이 일치하지 않는 양상으로 나타났다. 즉, 일일 30분이나 1시간씩 UV-B에 2일 이내로 노출시킨 반복노출 초기에 해당하는 경우는 전기영동분석에서 효소밴드의 크기나 진하기가 UV-B에 노출되지 않은 경우에 비해 크게 감소하였으나(Fig. 3A), 활성은 각각 60% 및 55%로 나타나 어느 정도 활성이 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 6A). 그러나 반복노출 후기에 해당하는 3일 이상 반복노출조건에서 CAT의 활성은 크게 감소하여 전기영동패턴에서는 밴드가 관찰됨에도 불구하고 일일 30분 조건으로 3일 이상 반복노출한 경우 그 활성은 20% 미만으로, 일일 1시간씩 3일 이상 반복노출한 경우는 15% 미만으로, 일일 2시간씩 3일 이상 반복노출한 경우는 5% 미만으로 측정되었다. 선행연구에서 UV-A에 반복노출된 CAT는 구조변성보다는 활성저하가 빠르게 나타나 일일 30분 및 1시간 조사조건에서는 반복노출 4일째에, 일일 2시간 조사조건에서는 반복노출 3일째에 완전히 소실됨을 확인한 바 있으나^[18] 본 연구에서는 UV-B 반복노출 초기에는 어느 정도 그 활성이 유지되다가 반복노출 후기에 들어 갑자기 활성이 저하되는 것으로 나타나 CAT는 자외선의 종류에 따라 구조변화와 활성저하의 양상이 달라짐을 알 수 있었다. 즉, 동일한 실험조건 하에서 CAT는 UV-A 반복노출 시에는 구조변성이 일어난다는 속도보다 그 활성을 소실하는 속도가 훨씬 빠른

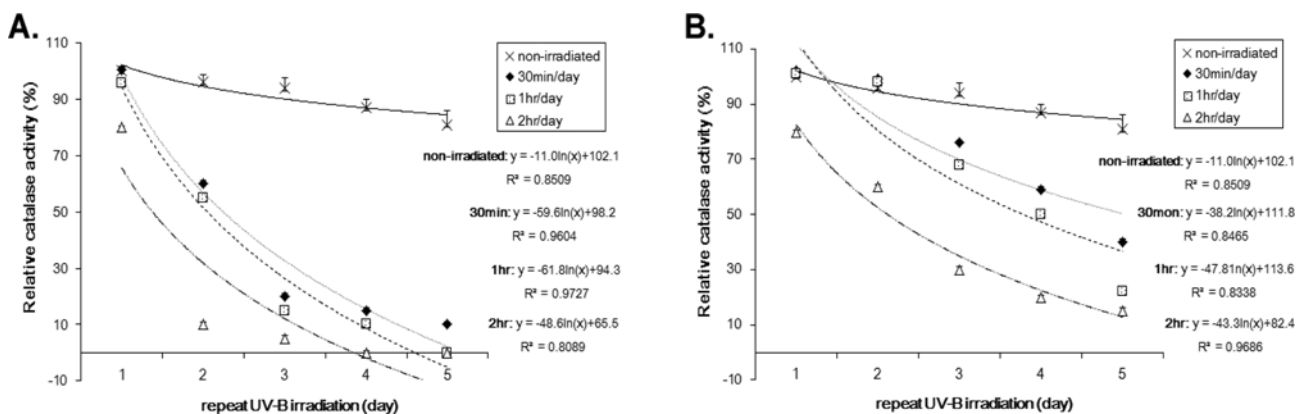


Fig. 6. Change in relative ratio of CAT activity by repeat UV-B irradiation. A: without RGP lens, B: with RGP lens

것으로 판단되었으며, UV-B 반복노출 시에는 구조변성이 일어나는 속도가 활성을 소실하는 속도보다 빠른 것으로 생각되었다. Rezvani 등의 선행연구^[23]에서 따르면 표피에 CAT를 과다하게 발현시키면 UV-A 조사에 의한 조직비대 와 DNA산화 정도가 뚜렷이 감소되며, UV-B 조사에 따른 세포화상, caspase-3 활성화, p53 축적이 유의하게 감소됨 이 관찰되었다. 동일한 실험조건에서 SOD를 과다발현시 킨 경우는 UV-A 및 -B 조사에 의한 손상의 감소가 관찰 되지 않았다. 따라서 UV조사로 인한 세포 내 단백질의 손 상을 억제하기 위하여서는 SOD보다는 CAT의 활성유지 가 중요하다고 판단된다.

한편 UV-B 차단율이 63.7%인 N사의 P제품 RGP 렌즈 를 사용하여 UV-B를 차단시키면서 CAT을 매일 30분, 1 시간 및 2시간씩 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 UV-B에 반복노 출 시키게 되면 CAT의 활성은 반복노출 초기에는 최저 60%(일일 2시간 조사)에서 최고 100%(일일 30분 조사)까 지 효율적으로 유지되나 UV-B 반복노출 후기에는 그 활 성이 유지되지 않았으며 특히, 일일 2시간 조건으로 3일 이상 UV-B에 반복노출시킨 경우는 RGP렌즈를 사용하더 라도 그 활성이 30% 미만으로 나타났다(Fig. 6B). 그러나 자외선차단 안경렌즈를 이용한 본 연구진의 선행연구^[15] 에서는 3~6시간의 연속노출에서는 50% 이상의 UV-B 차 단렌즈가, 24~96시간의 연속노출에서는 95% 이상의 UV-B 차단렌즈가 CAT의 구조변성을 억제하는 것으로 나타 났으므로 자외선 차단효율이 높은 RGP렌즈를 사용한다 면 CAT 활성이 어느 정도 유지될 가능성이 높다고 판단 되었다.

결 론

본 연구에서는 국내에서 유통되는 RGP렌즈의 자외선 차단실태를 조사하고, RGP렌즈의 사용이 UV-B 반복조사 로 인해 유발되는 안구 내 항산화효소인 SOD 및 CAT의 구조변화와 활성에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아보았 다. SOD는 UV-B에 반복노출되면 구조변화는 관찰되나 활성저하에는 크게 영향을 받지 않는 반면, CAT는 구조변 화가 나타나며 이에 따른 활성저하는 반복노출시기에 따 라 다르게 나타남을 알 수 있었다. UV-B 반복노출에 따른 SOD와 CAT의 구조변화와 활성저하는 국내 유통되는 자 외선차단 RGP렌즈 중 가장 낮은 자외선 차단율을 보였던 N사 P제품의 사용으로도 어느 정도 억제되었으나 반복노 출시간이 길어졌을 때에는 그 효과는 크지 않았다. 따라서 자외선으로부터 안구 내 효소를 보호하기 위하여서는 FDA 의료기기방사선보건센터의 자외선 차단 분류지침에 따른 class I이나 II 차단제에 해당하는 콘택트렌즈나 안경

렌즈를 사용하거나, 자외선 노출시간을 최소화하여야 할 것이다. 또한 자외선으로부터 안구를 보호할 수 있도록 국 내 자외선 차단분류기준의 확립을 제안하는 바이다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 서울과학기술대학교 교내 학술연구 비로 수행되었습니다.

REFERENCES

- [1] ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection). Guidelines on limits of exposure to ultra-violet radiation of wavelengths between 180 and 400 nm (incoherent optical radiation). *Health Phys.* 1994;87(2):171-186.
- [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(9):2642-2647.
- [5] Rose RC, Richer SP, Bode AM. Ocular oxidants and anti-oxidant protection. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998;217(4):397-407.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Melov S. Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging. *Ann NY Acad Sci.* 2002;959:330-340.
- [9] 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.
- [10] Mittag T. Role of oxygen radicals in ocular inflammation and cellular damage. *Exp Eye Res.* 1984;39(6):759-769.
- [11] 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.
- [12] Čejková J, Štípek S, Crkovská J, Ardan T, Pláteník J,

- Cejka C et al. UV rays, the prooxidant/antioxidant imbalance in the cornea and oxidative eye damage. *Physiol Res.* 2004;53:1-10.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Kim SR, Lee JH, Choi JI, Park M. 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.
- [16] Park CS, Park YM, Kim DH, Park M. 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.
- [17] Park M, 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.
- [18] Park M, Yoo HJ, Kim JC, Kim SR. The relationship between structural denaturation of antioxidative enzymes and their enzyme activity due to repeated exposure to UV-A. *J Korean Ophthalmic Opt Soc.* 2015;20(1):75-81.
- [19] American National Standards Institute (ANSI). *American National Standard Requirements for Non-Prescription Sunglasses and Fashion Eyewear, Z80.3.* New York: ANSI, 1996.
- [20] American Optometric Association. *UV Protection with Contact Lenses.* <http://www.aoa.org/patients-and-public/caring-for-your-vision/uv-protection/uv-protection-with-contact-lenses?sso=y>(20 March, 2015).
- [21] Yu DS, Yoo JS. Evaluation of ultraviolet blocking of ophthalmic lenses. *J Korean Ophthalmic Opt Soc.* 2008;13(3):7-12.
- [22] Sigma-Aldrich Co. Production information: superoxide dismutase from bovine erythrocyte. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/5/s7446dat.pdf> (13 May, 2014).
- [23] Sigma-Aldrich Co. Production information: catalase from bovine liver. http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c40pis.pdf(13 May, 2014).

Denaturation and Inactivation of Antioxidative Enzymes due to Repeated Exposure to UV-B and Inhibitory Effect of RGP Lens

Hyun Young Byun, Eun Jung Lee, Dae Hwan Oh, So Ra Kim, and Mijung Park*

Dept. of Optometry, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea

(Received April 27, 2015; Revised May 21, 2015; Accepted May 23, 2015)

Purpose: The present study was conducted to reveal the correlation of structural denaturation and decrease of enzyme activity when the antioxidative enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were repeatedly exposed to UV-B, and further investigate whether the denaturation and inactivation of those enzymes can be effectively blocked by using UV-inhibitory RGP lens. **Methods:** Each enzyme solution was prepared from the standardized SOD and CAT, and repeatedly exposed to UV-B of 312 nm for 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-B irradiation was confirmed by the electrophoretic analysis, and their enzyme activity was determined by the colorimetric assay using the proper assay kit. At that time, the change in structure and activity of the antioxidant enzymes directly exposed to UV-B was compared to the case that UV-B was blocked by UV-inhibitory RGP lens. **Results:** SOD exposed repeatedly to UV-B showed the polymerization pattern in the electrophoretic analysis when it repeatedly exposed for 30 min a day, however, the change of its activity was less than 10%. On the other hand, CAT repeatedly exposed to UV-B reduced size and density of the electrophoretic band which indicated a structure denaturation, and its activity was significantly decreased. In the case that the repeat exposure time was longer, CAT activity was completely lost even though some enzyme band occurred in the electrophoretic analysis. In addition, the degeneration of CAT due to UV-B irradiation was inhibited to some extent by using RGP lens with a UV-B blocking of 63.7%, however, it was not completely inhibited. **Conclusions:** From these results, it was revealed that the structural denaturation of antioxidative enzymes was not perfectly correlated with the reduction in enzyme activity according to the type of enzyme. It is recommended to minimize the exposure time to UV when wearing contact lens, or wear the contact lenses having UV blocking rate of the FDA Class I blocker or the sunglasses having equivalent UV-blocking rate for reducing the damage of antioxidative enzymes induced by UV.

Key words: UV-B irradiation, Antioxidative enzyme, Superoxide dismutase, Catalase, Structural denaturation, Enzyme activity, UV-inhibitory RGP lens