

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2019.11.2.042>

ISSN 2383-5400 (Online)

어류병원성 세균 및 C2C12 근원세포에 대한 polyamine 계열 물질인 spermidine의 항균 및 항산화 활성

Antibacterial and Antioxidant Activity of Spermidine, a Natural Polyamine, on Fish Pathogenic Bacteria and C2C12 Myoblast Cells

황보현¹, 최은옥², 김민영³, 지선영³, 홍수현⁴, 박철⁵, 차희재⁶, 김석만⁷, 김희수⁸, 황혜진⁹, 최영현^{10,*}
Hyun Hwang-Bo¹, Eun-Ok Choi², Min Young Kim³, Seon Yeong Ji³, Su Hyun Hong⁴, Cheol Park⁵, Hee-Jae Cha⁶, Suhkmann Kim⁷, Heui-Soo Kim⁸, Hye-Jin Hwang⁹, Yung Hyun Choi^{10,*}

- ¹대학원생, 동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 항노화연구소, 부산광역시 47227, 대한민국
- ²박사후연구원, 동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 항노화연구소, 부산광역시 47227, 대한민국
- ³연구원, 동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 항노화연구소, 부산광역시 47227, 대한민국
- ⁴교수, 동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 항노화연구소, 부산광역시 47227, 대한민국
- ⁵교수, 동의대학교 자연과학대학 분자생물학과, 부산광역시 47227, 대한민국
- ⁶교수, 고신대학교 의과대학 기생충학 및 유전학교실, 부산광역시 49267, 대한민국
- ⁷교수, 부산대학교 자연과학대학 화학과, 부산광역시 46241, 대한민국
- ⁸교수, 부산대학교 자연과학대학 생명과학과, 부산광역시 46241, 대한민국
- ⁹교수, 동의대학교 의료보건생활대학 식품영양학과, 부산광역시 47227, 대한민국
- ¹⁰교수, 동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 항노화연구소, 부산광역시 47227, 대한민국

^{1,2,3,4,10}Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Dong-eui University, Busan-si 47227, Republic of Korea
⁵Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Dong-eui University, Busan-si 47227, Republic of Korea
⁶Department of Parasitology and Genetics, Kosin University College of Medicine, Busan-si 49267, Republic of Korea
⁷Department of Chemistry, Pusan National University, Busan-si 46241, Republic of Korea
⁸Department of Biological Sciences, Pusan National University, Busan-si 46241, Republic of Korea
⁹Department of Food and Nutrition, College of Nursing, Healthcare Sciences & Human Ecology, Dong-eui University, Busan-si 47227, Republic of Korea

(Received 19 November 2019, Revised 23 November 2019, Accepted 25 November 2019)

Abstract We compared the antibacterial activities of spermidine and astaxanthin against two gram-positive bacteria such as *Streptococcus parauberis* and *S. iniae* to find new antibacterial candidates. We also evaluated the preventive effects of spermidine against oxidative stress-induced cytotoxicity in C2C12 myoblasts. Our results indicated that spermidine has more significant antibacterial activities than astaxanthin against both two fish pathogenic bacteria as well as gram-negative bacteria *Escherichia coli* used as a control group. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of spermidine were 0.25 mM and 1 mM against *S. parauberis*, 1 mM and 3 mM against *S. iniae*, and 0.5 mM and 1.5 mM against *E. coli*, respectively. In addition, the postantibiotic effect lasted from 7 h, 5 h and 6 h for *S. parauberis*, *S. iniae* and *E. coli*, respectively. The results also showed that the decreased C2C12 cell viability by H₂O₂ could be attributed to the induction of DNA damage and apoptosis accompanied by the increased production of reactive oxygen species, which was remarkably protected by spermidine. Additionally, the antioxidant effect of spermidine was associated with the activation of Nrf2 signaling pathway. According to the data, spermidine may be a potential lead compound which can be further optimized to discover novel antibacterial and antioxidant agents.

Keywords : Spermidine, Antibacterial and antioxidant activity, ROS, DNA damage, Apoptosis

* Corresponding author
Phone: +82-51-890-3319 Fax: +82-51-853-4036
E-mail: choiyh@deu.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

서 론

현재 우리나라의 어류 양식장은 연안의 환경오염과 밀집 양식으로 인한 질병 증가, 영양 상태 불균형 등과 같은 요인들로 인하여 어류의 성장저하 및 세균성 질병으로 인해 폐사가 발생하는 문제가 심각하게 대두되고 있으며[1], 이에 어류 폐사를 막기 위한 예방 차원에서 통상적으로 사료에 항생제, 비타민제, 아미노산 공급제, 광물질 공급제, 효소제, 호르몬제 등을 첨가하여 사용하고 있다[2,3]. 그러나 최근 우리나라 국민의 생활 수준 향상으로 건강관리에 관한 관심이 높아지고 있어 항생제 및 호르몬제 등을 사용한 양식 어류에 대한 불신이 높아지고 있는 실정이다. 또한 양식 어류들이 약품에 대한 내성이 증가하여 약제 남용을 야기할 수 있으며, 이로 인하여 양식된 어류에는 유해물질들이 축적되어 어류 섭취 시 인체에 유해할 수 있는 유해물질을 간접적으로 섭취할 수 있다는 점이 수산물의 안전성 면에서 문제점을 갖게 된다.

주요한 어병 세균 중 *Streptococcus* spp.는 우리나라를 포함한 미국, 오스트레일리아, 일본 등지의 담수 및 해수 양식에 막대한 경제적 손실을 입히는 베타용혈성 연쇄구균증을 일으키는 병원체로 알려져 있다[4-6]. 특히 이는 우리나라 주요 양식어종인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 연쇄구균병 원인체의 대부분을 차지하고 있고, 고수온기 양식 넙치에 발생하여 30% 이상의 폐사를 일으키는 고질적인 세균성 질병으로 에드워드병(*Edwardsiella tarda*)과 유행 시기가 같아 에드워드병과 혼합 감염되면 더욱 피해가 크고 치료가 어려운 질병이다[4,7]. 현재 수산용으로 사용 승인을 받은 각각의 약품은 사용할 수 있는 어종과 질병이 한정되어 있으며, 투여량과 투여기간이 엄격히 규정되어 있지만, 식품으로 사용하는 양식어에 항생물질 사용은 잠재적인 위험성이 내포되어 있기 때문에 가능하다면 항생물질을 피해야 한다. 아울러 양식현장에서는 여러 가지 약제를 사용한 결과 내성균이 출현하여 치료 효과를 기대할 수 없게 되어 큰 문제가 되고 있다[8]. 한편 다양한 병원체에 대한 양식어 항생물질의 내성은 산화적 스트레스의 저항과도 깊은 연관성을 가진다[9,10]. 이러한 산화적 스트레스에 대한 저항성 증가는 세포내 항산화계의 오류 또는 활성 저하에 기인하며, 과도한 활성산소종

(reactive oxygen species, ROS)의 생성에 따른 세포 수준에서 다양한 구성 물질들에 대한 산화적 변성의 증가와 근육계의 항상성을 저하시킨다[11,12]. 특히 미토콘드리아(mitochondria)는 세포 내 소기관들 중에서 ROS의 생성을 담당하는 중요한 기관으로 산화적 스트레스에 의한 ROS 과잉 생산을 통한 미토콘드리아 기능 장애는 DNA 손상과 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 중요한 기전 중 하나로 인식되고 있다[13,14]. 이러한 문제점을 해결하기 위해 항산화력이 우수한 천연에서 추출된 물질 중에서 항생물질을 대체하거나 항생제와 병용 시에 그 효과를 상승시켜 항생제 사용량을 저감할 수 있는 항생제 대체물질 개발의 연구가 시급히 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 천연 항균 소재 개발의 일환으로 해양생물 유래 두 가지 천연물(spermidine과 astaxanthin)에 대한 항균 활성을 *S. parauberis* 및 *S. iniae*를 대상으로 조사하였다. 아울러 항균 활성이 우수하였던 spermidine을 대상으로 C2C12 근원세포(myoblast cells)에서 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)에 의한 ROS 생산 억제를 통해 DNA 손상과 세포사멸을 효과적으로 감소시켜 주었음을 확인하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 어병 균주

본 연구에서 사용한 spermidine과 astaxanthin은 Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 멸균 증류수에 각각 1 M 농도로 녹여 stock으로 사용하였다. 어류 병원성 세균인 *S. parauberis* 및 *S. iniae*는 폐사된 넙치로부터 분리, 동정된 것으로서 부경대학교 수산생명의학과 김도형 교수로부터 분양 받았으며 대조균으로 사용된 대장균(*Escherichia coli*)은 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양을 받아 25°C에서 100 rpm으로 진탕하면서 18시간 배양하여 실험에 사용하였다. 1% NaCl이 첨가된 brain heart infusion (BHI) broth, BHI agar, Luria-Bertani (LB) broth 및 LB agar 배지와 양성대조균으로 사용한 항생제인 ampicillin은 Difco-BBL (Lawrence, KS, USA)로 부터 구입하였다.

항균활성 측정

Spermidine과 astaxanthin은 멸균 증류수에 희석한

후 무균 여과하여 paper disc (직경 8 mm, Advantec, Japan)에 50 µl씩 흡습시킨 후 무균작업대에서 자연 건조하였으며, 이때 disc당 spermidine과 astaxanthin의 함유량은 100, 250 및 500 µM이 되도록 하였다. *S. parauberis*, *S. iniae* 및 *E. coli*는 각각 MacFaland No. 0.5가 되도록 멸균 생리식염수로 현탁 조정하였다. BHI 평판배지에 현탁액 200 µl씩을 골고루 도말한 다음, spermidine과 astaxanthin이 함유된 paper disc를 올려놓고 25°C에서 24시간 동안 배양한 후, 배지 위에 형성된 clear zone을 vernier caliper를 사용하여 측정하였다.

최소생장억제 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

Spermidine과 astaxanthin을 1% NaCl이 첨가된 BHI 배지로 희석한 후 무균 여과하여 액체배지희석법에 준하여 단계적으로 희석하여 최소발육 저지농도를 구하였다[15]. 각각의 접종 균은 96 well tissue culture plate에 1×10^6 CFU/ml이 되도록 조절하여 spermidine 및 astaxanthin을 각 균에 혼합(1:1) 처리하여 25°C에서 24시간 동안 배양한 후, 육안 및 현미경으로 균의 성장을 관찰하였고, 0.2 mg의 p-iodonitrotetrazolium violet (INT)를 40 µl 씩 well 마다 첨가하여, INT-formazan의 생성에 의한 red color가 발색되지 않는 항균활성 농도를 540 nm에서 흡광도를 측정하여 최소억제농도로 결정하였다.

항균지속 효과(Postantibiotic effect, PAE) 측정

Spermidine에 노출된 후 병원성 세균에 대한 살균력 지속시간을 측정하기 위하여 1×10^6 CFU/ml로 조절된 균주에 $2 \times$ MIC 값 농도의 spermidine과 함께 1시간 동안 배양한 후 원심분리와 배지 희석법을 사용하여 spermidine을 제거하였다[16]. 이후 새로운 배지로 교환하여 25°C 배양기에서 배양하며 2시간 간격으로 균수를 측정하였다. 이때 PAE 수치가 클수록 항균 지속 효과가 우수하다고 할 수 있으며, PAE를 구하는 식은 아래와 같다.

$$PAE = T - C$$

T: spermidine 제거 직후 세균의 수가 $1 \log_{10}$ 성장하는데 걸리는 시간

C: spermidine 노출을 시키지 않은 균이 $1 \log_{10}$ 성장하는데 걸리는 시간

C2C12 세포의 배양

마우스 유래 근원세포(myoblast)인 C2C12 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (WELGENE, Daegu, Republic of Korea) 및 100 µg/ml penicillin/streptomycin antibiotics가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (WELGENE)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포의 적정 수 유지를 위하여 48시간마다 trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 처리에 의한 계대 배양을 실시하였다.

세포 생존을 측정 및 세포 형태 관찰

산화적 스트레스에 대한 spermidine의 세포독성 여부를 조사하기 위하여 C2C12 세포를 spermidine 또는 H₂O₂ (1 mM)를 단독 처리하거나, 적정 농도의 spermidine을 1시간 전 처리한 후 1 mM의 H₂O₂ (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 처리하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 0.5 mg/ml 농도의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 시약을 넣고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)로 생성된 formazan을 모두 녹인 후 540 nm에서 enzyme-linked immunosorbent assay reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 각 세포에 대한 생존율은 대조군 기준으로 백분율로 나타내었다. 아울러 동일 조건에서 세포의 형태적 변화는 위상차 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany, 200배)을 이용하여 관찰하였다.

세포사멸 유도 정량적 분석

정상 및 spermidine과 H₂O₂가 단독 또는 동시에 함유된 배지에서 배양된 C2C12 세포에서 세포사멸 유도에 대한 정량적 분석을 위하여, 준비된 세포를 PBS로 수세 후 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리로 모아진 세포를 PBS로 잘 부유시키고, ethanol을 이용하여 4°C에서 1시간 동안 고정시켰다. 고정된 세포들을 50 µg/ml의 propidium iodide (PI)와 10 kunit의 RNase (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 처리하여 암실, 4°C에서 1시간 동안 염

색하였다. PBS로 두 번 수세 후 DNA flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시킨 형광 반응에 따른 histogram을 분석하였으며, 세포주기 sub-G1기에 속하는 세포들을 세포사멸이 유발된 세포 집단으로 평가하였다.

ROS 생성의 측정

H₂O₂의 자극에 의한 C2C12 세포에서 ROS 생성에 미치는 spermidine의 영향을 조사하기 위하여 C2C12 세포에 1 mM의 spermidine을 1시간 동안 처리하거나, 1시간 동안 spermidine을 처리한 후 1 mM의 H₂O₂를 다시 1시간 처리하였다. 이들 세포에 10 μM의 2',7'-di-chlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 처리하여 37°C에서 반응시켰다. 20분 후, non-specific staining을 제거하기 위하여 PBS로 수세한 후 flow cytometer를 이용하여 ROS의 생성량을 비교하였다.

단백질의 분리 및 Western blot 분석

Spermidine과 H₂O₂가 단독 또는 동시 처리된 조건에서 배양된 세포에 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet-P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol]를 첨가하여 1시간 동안 4°C에서 반응시켰으며, 14,000 rpm, 30분 원심 분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 정량 후 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane에 적정 1차 항체와 2차 항체를 각각 4°C에서 overnight, 상온에서 2시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane을 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Biosciences Co., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시켜 특정 단백질의 발현을 분석하였다. 본 연구에 사용된 1차 항체와 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

통계처리

Data는 평균 ± 표준오차로 표현하였으며, 유의성 검정에는 GraphPad PRISM version 5.03 program을 사용하여 분산 분석(ANOVA: analysis of variance)을 한

후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검증법(Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

Streptococcus spp.에서 spermidine과 astaxanthin의 항균 활성 비교

우리나라의 양식 넙치에서 분리한 병원성 세균에 대한 tetracycline과 ampicillin 등과 같은 항균제에 대한 내성률은 42.6~94.6%로 매우 높은데, 특히 *Streptococcus* spp.는 tetracycline과 ampicillin을 포함한 2종류 이상의 항균제에 다중 약제 내성을 나타내는 것으로 보고되어져 있다[17]. 따라서 항균제에 대한 내성을 극복하기 위한 방안으로 안전성이 확보된 천연물의 활용에 대한 관심이 매우 높아지고 있다.

본 연구에서 사용한 spermidine은 polyamine 계열 천연물의 일종으로 음전하를 띠는 단백질 및 핵산과 결합하는 특징으로 인하여 세포의 성장과 생존, 증식 등에 관여하는 것으로 알려져 있다[18,19]. 다양한 종류의 polyamine 중에서 spermidine은 감염성 질병에 대한 유의적인 효과가 있음이 보고된 바 있으며[20], 이러한 효과는 강력한 항염증 효능과도 연계성을 지닐 것으로 추정된다[21]. Astaxanthin은 β-carotene과 매우 유사한 구조를 지니는 색소 물질로서 polyisoprenoid와 oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid ring의 결합 구조로 강력한 항산화 물질로 알려져 있다[22,23]. Astaxanthin의 항산화 효능은 ROS 소거능과 과산화물 연쇄반응 차단 등과 연관성이 있으며[24,25], 면역 증강 및 항염증 등의 효과와도 관련이 있을 것으로 보고되고 있다[26,27]. 그러나 현재까지 두 종류의 물질이 어류병원성 세균에 대한 항균활성 효과에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 어류 질병의 원인 세균으로 잘 알려진 *Streptococcus* spp. 2종(*S. parauberis* 및 *S. iniae*)을 대상으로 spermidine과 astaxanthin의 항균활성을 조사하였다.

먼저 어류 병원성 세균에 대한 spermidine 및 astaxanthin의 항균활성 효능을 비교하기 위하여 폐사한 넙치로부터 분리한 *S. parauberis* 및 *S. iniae*에 대한 항균활성을 조사한 결과는 Figure 1에 나타내었다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이, spermidine은 *Streptococcus* spp. 속한 두 종류의 그람 양성균과 대조군으로 사용된 그람 음성균 *E. coli*에서 모두 항균 효능을 보였으며, 특히 그람 양성균

*S. parauberis*에서 항균 활성이 상대적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 그러나 astaxanthin은 *S. parauberis* 및 *S. iniae*와 *E. coli*에서 모두 유의적인 항균 효능을 갖지 못하

는 것을 확인하였다. 따라서 이후 실험에서는 spermidine을 대상으로 최소생장억제 및 최소살균 농도의 설정과 항균력 지속 효과를 추가적으로 조사하였다.

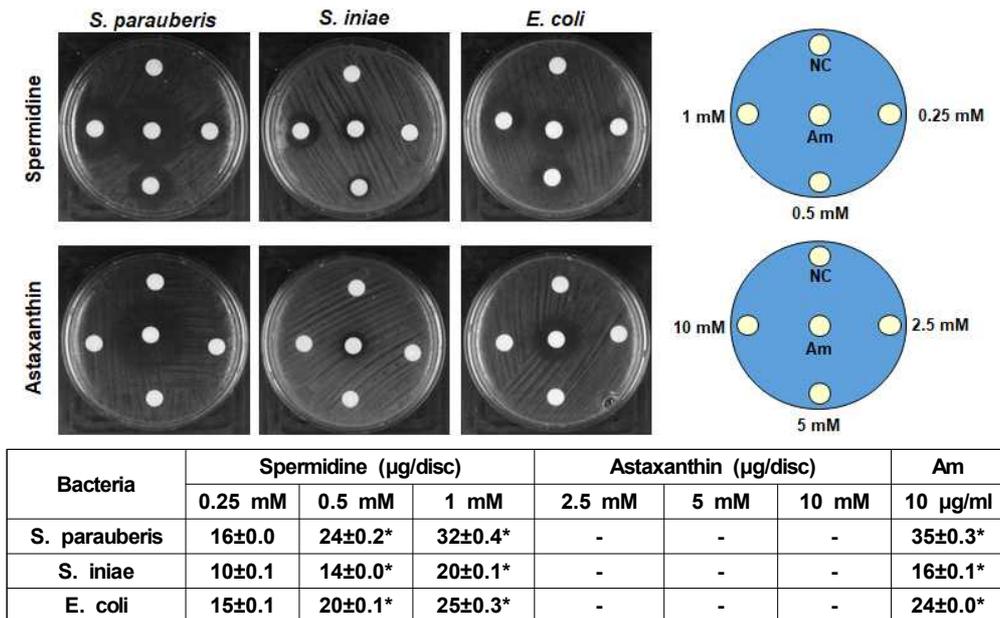


Figure 1. Anti-bacterial activities of spermidine and astaxanthin on the fish pathogenic bacteria (Diameter of inhibition zone, mm). Results shown are expressed as the mean of three independent experiments. NC, non-treated control; Am, ampicillin (*p<0.001 vs 0.25 mM spermidine-treated group).

S. parauberis, *S. iniae* 및 *E. coli*에 대한 spermidine의 최소생장억제 농도(MIC) 및 최소살균 농도(MBC)를 측정 결과는 Figure 2에 나타낸 바와 같이 최소생장억제는 *S. iniae* 및 *E. coli* 균에서 각각 1 mM 및 0.5 mM 정도로 나타났으며, 가장 효능이 좋은 *S. parauberis*에서는 0.25 mM 정도였다. 또한 최소살균농도에서는 *S. parauberis*에서 1 mM이었으며, *S. iniae*와

*E. coli*에서는 지정 농도를 벗어난 3 mM 및 1.5 mM로 나타났다. 한편 어류 질병에 상용화되고 있는 항생제에 대한 주요 어류 질병 세균의 최소생장억제농도를 측정한 결과 ampicillin과 amoxicillin 등이 약 100 µg/ml인 점을 고려할 때[28], spermidine이 본 연구에서 사용된 균주에서 1~3 mM 정도로 관찰되어 비교적 강한 항균활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

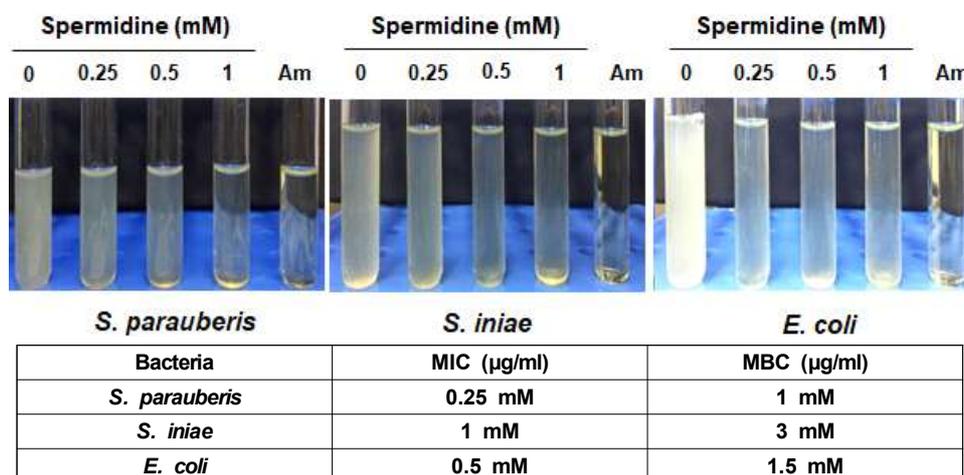


Figure 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of spermidine against fish pathogenic bacteria. Data represent the means of three independent experiments. Am, ampicillin.

다음은 spermidine에 대한 항균력 지속 효과(PAE)를 조사하기 위하여 *S. parauberis*에 대한 spermidine 최소생장억제 농도(0.25 mM)의 2배(0.5 mM)로 각각의 세균에 처리하여 1시간 동안 반응을 시킨 후 일정 시간 간격으로 해당 균들의 성장 정도를 비교하였다. Figure 3의 결과에서 알 수 있듯이, spermidine의 항균력 지속 효과는 정상 조건에서 배양된(No Drug) *S. iniae* 및 *E. coli*에서 각각 5시간 및 6시간 정도였으며, *S. parauberis*에서는 7시간 동안 균의 생장이 억제되어 spermidine은 본 연구에서 조사된 3가지 균주 중, *S. parauberis*에 대한 항균력이 비교적 우수함을 알 수 있었다. 따라서 spermidine이 어류 병원성 세균에 대한 우수한 항균력을 가질 수 있을 것으로 판단되며, 향후 어류의 질병 예방과 치료에 유용하게 사용될 수 있을 후보 물질로 제시하고자 한다.

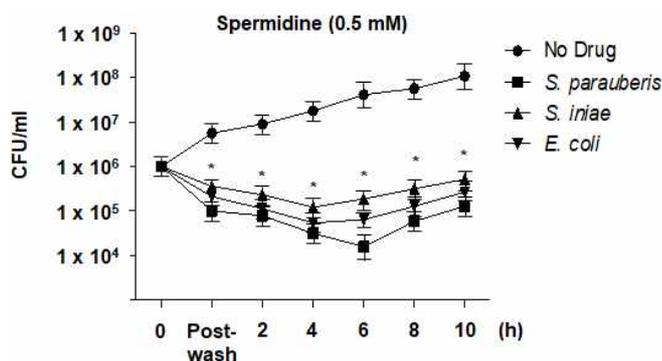


Figure 3. Postantibiotic effect of spermidine against fish pathogenic bacteria. Results shown are expressed as the mean of three independent experiments (* $p < 0.001$ vs control group).

C2C12 세포에서 spermidine의 항산화 효능 검증

산화적 스트레스에 따른 과도한 ROS의 생성은 감염성 질병을 포함한 다양한 질환의 원인 요인으로 작용하며, 산화적 스트레스의 부하는 지질 과산화, 핵산 및 단백질 손상을 거쳐 세포의 사멸을 유도하며, 이 과정에 ATP 고갈에 의한 세포 에너지 대사의 방해와 같은 신진대사의 복잡한 변화가 동반된다[29,30]. 특히 어류에서의 특정 약물의 항균 작용 증대 및 약제 내성의 극복을 위한 전략으로 산화적 스트레스를 차단하는 것이 매우 중요하다[31,32]. 따라서 우수한 항균력이 확인된 spermidine의 항산화력을 조사하기 위하여 H_2O_2 로 유도된 DNA 손상 및 세포사멸 유도에 대한 spermidine의 효과를 C2C12 세포를 대상으로 조사하였다. 산화적 스트레스의 유발을 위한 H_2O_2 의 농도는 약 50% 정도의 생존력을 보인 1 mM로 선정하였으며(Figure 4A), 세포독성을 나타내지 않는 범위(data not shown)의 spermidine을 1시간 전처리하고 1 mM의 H_2O_2 가 단독 및 동시 처리된 조건에서 24시간 배양 후 MTT 분석을 실시하였다. Figure 4A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, spermidine은 H_2O_2 에 의한 C2C12 세포의 생존력 저하를 처리 농도 의존적으로 억제하였다. 동일 조건에서 세포의 형태 관찰에서도 H_2O_2 가 단독 처리된 세포에서는 전체적인 세포의 수가 감소됨과 동시에 분지를 형성하며, 세포질이 응축되는 현상과 공포의 형성 및 부착력 상실에 의한 배양 배지로의 부유된 세포의 수가 증가되었으나, spermidine이 존재하는 조건에서는 이러한 현상이 현저하게 감소되었다(Figure 4B).

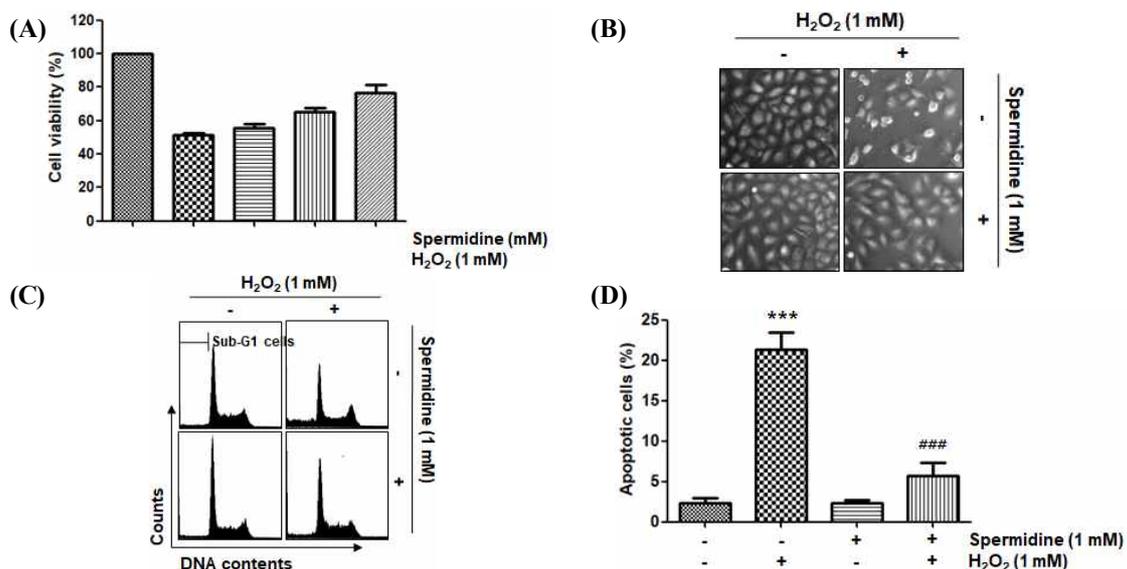


Figure 4. Inhibition of H_2O_2 -induced cytotoxicity and apoptosis by spermidine in C2C12 myoblasts. Cells were treated with the indicated concentrations of spermidine for 24 h, or pretreated with or without spermidine for 1 h, and then stimulated

with 1 mM H₂O₂ for 24 h. (A) Cell viability was assessed by an MTT reduction assay. The results are the mean ± SD obtained from three independent experiments. (B) To investigate morphological changes, cells cultured under the same conditions were photographed using an inverted microscope (×200). (C) The cells were collected and stained with PI solution, and the percentages of apoptotic sub-G1 cells were then analyzed by a flow cytometer. (D) The results are the mean ± SD obtained from three independent experiments (***p<0.001 vs control group, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs H₂O₂-treated group).

C2C12 세포에서 산화적 스트레스에 대한 spermidine의 세포보호 효과가 세포사멸 유발 억제와 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 flow cytometry 분석을 실시하였다. Figure 5에 나타난 바와 같이 H₂O₂가 단독 처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포에서는 세포사멸이 유발되었음을 의미하는 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 현저히 증가하였으나, spermidine의 전처리군에서는 유의적인 감소를 보였다. 따라서 C2C12 세포에서 spermidine의 세포보호 및 세포사멸

억제 효과가 산화적 스트레스의 직접적인 차단에 의한 것인지를 조사하기 위하여 ROS의 생성에 미치는 영향을 조사하였으며, spermidine 단독 처리군에서는 대조군과 비교하여 유의적인 변화는 관찰되지 않았지만 1 mM의 H₂O₂ 단독 처리군에서는 ROS 생성이 현저하게 증가되었으며, spermidine은 H₂O₂에 의하여 유도된 ROS의 생성을 유의적으로 차단하였다 (Figure 6).

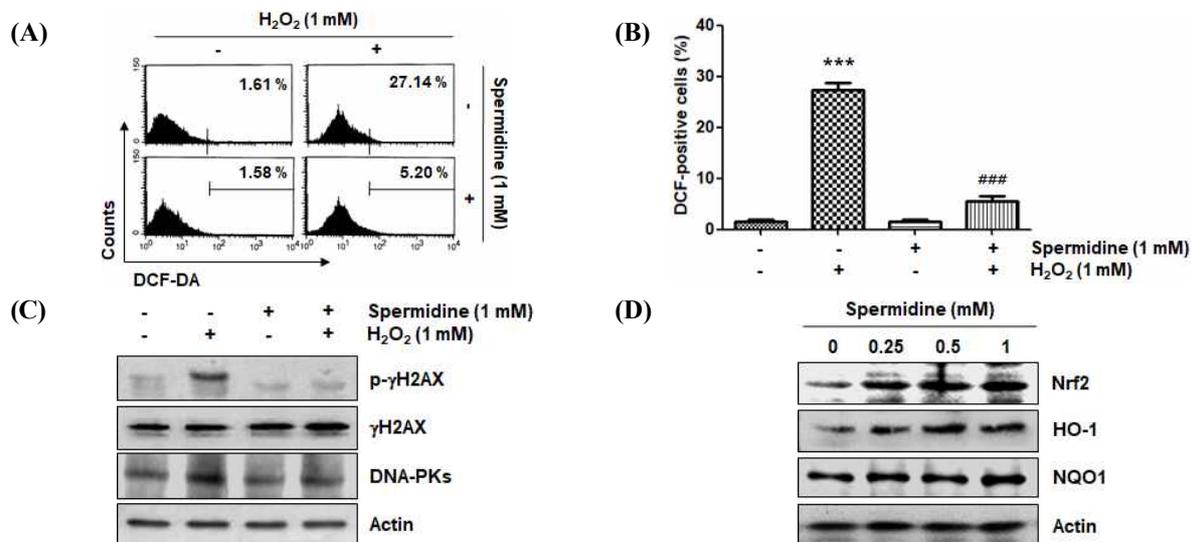


Figure 5. Attenuation of H₂O₂-induced ROS generation and protection of H₂O₂-induced DNA damage and activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway by spermidine in C2C12 cells. (A and B) Cells were pretreated with 1 mM spermidine for 1 h, and then stimulated with or without 1 mM H₂O₂ for 1 h. (A) The cells were incubated with DCF-DA, and DCF fluorescence was measured by a flow cytometer. (B) The values represent the mean ± SD obtained from three independent experiments (***p<0.001 vs control group, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs H₂O₂-treated group). (C and D) Cells were pretreated with 1 mM spermidine for 1 h, and then stimulated with or without 1 mM H₂O₂ for 1 h (C), or cells were treated with the+ indicated concentrations of spermidine for 24 h (D). Equal amounts of cell lysates were used for Western blot analysis. Actin was used as an internal control.

이상에서 관찰된 spermidine의 산화적 스트레스에 의한 ROS의 생성 억제 효과와 연관된 생존력 회복이 DNA 손상의 차단과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 DNA 이중 나선 손상 지표로 널리 사용되는 γH2AX 단백질의 인산화(p-γH2AX, serine 139) 및 DNA-PKs의 발현 변화 조사하였다. Figure 7A의

immunoblotting 결과에 의하면 H₂O₂가 처리된 C2C12 세포에서는 대조군에 비하여 γH2AX 단백질의 전체적인 발현에는 큰 변화 없이 인산화가 매우 증가하였으며 DNA-PKs 발현 또한 증가하였으나, spermidine이 전처리된 세포에서는 이러한 현상이 대조군 수준으로 감소되었다.

많은 선행 연구들의 결과에 의하면 과도한 ROS 생성은 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하고, 부적절한 전자 전달계의 손상으로 인한 ROS의 축적은 세포사멸의 경로를 활성화시킨다[33,34]. 본 연구에서 MTT 분석을 통하여 spermidine이 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스로부터 C2C12 세포를 보호한다는 것을 확인하였다. 그리고 spermidine이 H₂O₂가 처리된 세포에서 관찰되는 DNA 손상 표지자들의 발현을 억제하였음을 확인하여 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상을 차단할 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과에서 DNA 손상의 차단은 ROS의 생성 감소와 관련이 있으며, 이는 spermidine에 의한 과도한 ROS 생성의 억제가 H₂O₂에 의해 유도된 DNA 손상의 감소에 기여하였음을 의미한다.

한편 전사조절인자인 nuclear factor erythroid-derived-2-like 2 (Nrf2)와 연계된 항산화 반응 요소(antioxidant responsive element, ARE) 시스템은 대부분의 세포에서 필수적인 항산화 경로로 중요한 역할을 한다[35,36]. 생리적 조건에서 Nrf2는 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)과 결합하여 세포질에 비활성의 형태로 존재한다. 그러나 세포가 산화적 스트레스를 방어해야 하거나 항산화 촉진 인자들에 노출될 경우, Nrf2는 Keap1로부터 분리되어 핵으로 이동하여 ARE에 결합하고 ARE 의존성 항산화 효소들의 전사 활성을 촉진한다[36,37]. 그 중 대표적인 Nrf2 의존적 유전자인 heme oxygenase-1 (HO-1)은 heme의 분해뿐만 아니라 산화적 손상을 받는 세포를 보호하기 위한 핵심적인 세포보호 효소로 작용한다. NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1) 또한 Nrf2에 의하여 암호화되는 항효소로서 정상적인 산화적 스트레스로부터 세포보호의 기능을 가진다[35,36]. 아울러 다양한 해양생물 모델에서 항산화 효능을 갖는 천연물들이 Nrf2 신호 경로를 활성화시켜 산화적 스트레스로부터 개체를 보호할 수 있음이 입증되고 있다[38-40]. 따라서 spermidine의 항산화 작용이 Nrf2 신호계의 활성화와 연관성이 있는지를 조사한 결과, spermidine은 세포독성을 보이는 범위에서 처리 농도 의존적으로 Nrf2 및 HO-1의 발현을 현저히 증가시켰으며, NQO1 또한 부분적인 발현 증가를 유도하였다(Figure 7B).

이상의 결과에서 spermidine은 H₂O₂에 의한 ROS의 생성을 차단함으로써 DNA 손상과 세포사멸로부

터 C2C12 세포를 보호하였음을 알 수 있다. 이 과정에서 Nrf2 신호계의 활성화 촉진 가능성을 제시하였으며, 이는 선행 연구에서 밝혀진 spermidine의 간 기능 보호 작용에서 Nrf2의 활성화가 산화적 손상 방어에 핵심적인 역할을 한다는 결과와 유사함을 알 수 있었다[41]. 비록 본 연구에서 spermidine이 항균 및 항산화 작용이 우수함을 제시하였으나, 다양한 어병 세균에 관한 이 효능에 관한 정확한 기전 연구는 추가적으로 이루어져야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(20150242, 환경변화에 대응한 오믹스 기반 수산생물 감염성질병 제어기술 개발)

References

1. Kang, S. Y. 2005. The antimicrobial compound of *Rhus verniciflua* barks against fish pathogenic gram-negative bacteria, *Edwardsiella tarda* and *Vivrio anguillarum*. *J. Fish Pathol.* **18**, 227-237.
2. Kim, N. K., Kweon, D. H. and Kim, S. K. 2012. Effects of natural compounds from various plant eradicate the persister cell of *Edwardsiella tarda* treated with antibiotics of florfenicol and amoxicillin. *J. Life Sci.* **22**, 788-793.
3. Lee, N. S., Jeong, S. H. and Jee, B. Y. 2010. Anti-fish pathogenic efficacy of hot water extracts obtained from 5 herbs *in vitro*, and efficacy and toxicity in flounder of the one selected herb, skullcap. *J. Fish Pathol.* **23**, 137-143.
4. Berridge, B. R., Fuller, J. D., Azavedo, J., Low, D. E., Bercovier, H. and Frelie, P. E. 1998. Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2778-2781.
5. Bragg, R. R., Todd, J. M., Lordan, S. M. and Combrink, M. E. 1989. A selective procedure for the field isolation of pathogenic *Streptococcus* spp. of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Onderstepoort. J. Vet. Res.* **56**, 179-184.
6. La Frenz, B. R., Shoemaker, C. A. and Klesius, P. H. 2011. Immunoproteomic analysis of the antibody response obtained in *Nile tilapia* following vaccination with a *Streptococcus iniae* vaccine. *Vet. Microbiol.* **152**, 346-352.

7. Kim, H. J., Woo, S. H., Kim, J. W. and Park, S. I. 2005. Morphological characteristics and pathogenicity of *Streptococcus iniae*. *J. Kor. Fish Soc.* **18**, 167-178.
8. Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 564-582.
9. Sculley, D. V. 2014. Periodontal disease: modulation of the inflammatory cascade by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Periodontal Res.* **49**, 277-281.
10. Wiegertjes, G. F. and Forlenza, M. 2010. Nitrosative stress during infection-induced inflammation in fish: lessons from a host-parasite infection model. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 4194-4202.
11. Moloney, J. N. and Cotter, T. G. 2018. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **80**, 50-64.
12. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. and Bitto, A. 2017. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 8416763.
13. Zimmermann, M. and Reichert, A. S. 2017. How to get rid of mitochondria: crosstalk and regulation of multiple mitophagy pathways. *Biol. Chem.* **399**, 29-45.
14. Rigoulet, M., Yoboue, E. D. and Devin, A. 2011. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H₂O₂ signaling. *Antioxid. Redox. Signal.* **14**, 459-68.
15. Wu, M. and Hancock, R. E. 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 29-35.
16. Matthew, E. and Levison, M. D. 2004. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **18**, 451-465.
17. Kim, M. S., Seo, J. S., Park, M. A., Cho, J. Y., Hwang, J. Y., Kwon, M. G. and Jung, S. H. 2010. Antimicrobial resistance of *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., and *Streptococcus* spp. isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.* **23**, 37-45.
18. Bjelaković, G., Stojanović, I., Jevtović Stoimenov, T., Pavlović, D., Kocić, G., Rossi, S., Tabolacci, C., Nikolić, J., Sokolović, D. and Bjelakovic, L. 2010. Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis. *Amino Acids* **39**, 29-43.
19. Chattopadhyay, M. K., Keembiyehetty, C. N., Chen, W. and Tabor, H. 2015. Polyamines stimulate the level of the σ 38 subunit (RpoS) of *Escherichia coli* RNA polymerase, resulting in the induction of the glutamate decarboxylase-dependent acid response system via the gadE regulon. *J. Biol. Chem.* **290**, 17809-17821.
20. Ozogul, F., Tabanelli, G., Toy, N. and Gardini, F. 2015. Impact of cell-free supernatant of lactic acid bacteria on putrescine and other polyamine formation by foodborne pathogens in ornithine decarboxylase broth. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 5828-5835.
21. Choi, Y. H. and Park, H. Y. 2012. Anti-inflammatory effects of spermidine in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *J. Biomed. Sci.* **19**, 1-8.
22. Shimidzu, N., Goto, M. and Miki, W. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish. Sci.* **62**, 134-137.
23. Stahl, W. and Sies, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **24**, 345-351.
25. Nakagawa, K., Kang, S. D., Park, D. K., Handelman, G. J. and Miyazawa, T. 1997. Inhibition of β -carotene and astaxanthin of NADPH-dependent microsomal phospholipid peroxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **43**, 345-355.
26. Chew, B. P. and Park, J. S. 2004. Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.* **134**, 257S-261S.
27. Naguib, Y. M. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1150-1154.
28. Jung, S. H. and Kim, J. W. 2000. *In vitro* antimicrobial activity in combination of antibacterials against fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.* **13**, 45-51.
29. Ost, M., Keipert, S. and Klaus, S. 2017. Targeted mitochondrial uncoupling beyond UCP1 - The fine line between death and metabolic health. *Biochimie* **134**, 77-85.
30. Auger, C., Alhasawi A, Contavadoo M and Appanna VD. 2015. Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**, 40.
31. Deepika, M. S., Thangam, R., Vijayakumar, T. S., Sasirekha, R., Vimala, R. T. V., Sivasubramanian, S., Arun, S., Babu, M. D. and Thirumurugan, R. 2019. Antibacterial synergy between rutin and florfenicol enhances therapeutic spectrum against drug resistant *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* **135**, 103612.
32. Wang, C., Pan, X., Fan, Y., Chen, Y. and Mu, W. 2017. The oxidative stress response of oxytetracycline in the ciliate *Pseudocohnilembus persalinus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **56**, 35-42.
33. Cardaci, S., Filomeni, G. and Ciriolo, M. R. 2012. Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. *J. Cell. Sci.* **125**, 2115-2125.
34. Mammucari, C. and Rizzuto, R. 2010. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 536-543.
35. Li, Z., Dong, X., Liu, H., Chen, X., Shi, H., Fan, Y., Hou, D. and Zhang, X. 2013. Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. *Mol. Vis.* **19**, 1656-1666.
36. Zhang, D. D. 2006. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* **38**, 769-789.

37. Kaspar, J. W., Niture, S. K. and Jaiswal, A. K. 2009. Nrf2:Keap1 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1304-1309.
38. Xie, J., Fang, H., Liao, S., Guo, T., Yin, P., Liu, Y., Tian, L. and Niu, J. 2019. Study on *Schizochytrium* sp. improving the growth performance and non-specific immunity of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) while not affecting the antioxidant capacity. *Fish Shellfish Immunol.* **S1050-4648**, 30987-30988.
39. Zhang, D. M., Guo, Z. X., Zhao, Y. L., Wang, Q. J., Gao, Y. S., Yu, T., Chen, Y. K., Chen, X. M. and Wang, G. Q. 2019. L-carnitine regulated Nrf2/Keap1 activation *in vitro* and *in vivo* and protected oxidized fish oil-induced inflammation response by inhibiting the NF- κ B signaling pathway in *Rhynchocypris lagowski* Dybowski. *Fish Shellfish Immunol.* **93**, 1100-1110.
40. Wang, H., Pan, L., Xu, R., Si, L. and Zhang, X. 2019. The molecular mechanism of Nrf2-Keap1 signaling pathway in the antioxidant defense response induced by BaP in the scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* **92**, 489-499.
41. Liu, P., de la Vega, M. R., Dodson, M., Yue, F., Shi, B., Fang, D., Chapman, E., Liu, L. and Zhang, D. D. 2019. Spermidine confers liver protection by enhancing NRF2 signaling through a MAP1S-mediated noncanonical mechanism. *Hepatology* **70**, 372-388.