

제초제인 Paraquat가 SAM의 간조직에서 항산화효소의 활성 및 지질과산화에 미치는 영향

양미경 · 박문숙
나주대학 환경위생과

Effects on Lipid Peroxidation and Antioxidants of Paraquat in the Liver of Senescence-Accelerated Mouse(SAM)

Mi-Kyong Yang · Mun-Sook Park

Department of Environmental Sanitation, Naju College, Chonnam, Korea

Abstract

This research employed a senescence-accelerated mouse(SAM) to explore the possibility that differences exist among the major antioxidants, lipid peroxidation in terms of ability to protect such animal treated with paraquat(PQ). To assess the antioxidants function and lipid peroxidation after treatment PQ, SAM-R/1 and SAM-P/8 were administered with PQ(200ppm/Kg) orally. The toxicity of PQ on SAM was determined as a bioassays of SOD, catalase and lipid peroxidation in the mouse liver.

The data show that the SOD activity was induced by paraquat treatment in both SAM-R/1 and SAM-P/8. The catalase activity of SAM-R/1 and SAM-P/8 was increased by additional PQ, too. The degree of lipid peroxidation was increased with PQ treatment. This means that SOD rather than catalase may protect against oxygen radical toxicity.

Finally, over data lead to the toxicity of PQ and its function may effect to the antioxidants including SOD, catalase and lipid peroxidation in both SAM R/1 and SAM P/8.

Key words: oxygen radicals, superoxide dismutase(SOD), catalase, lipid peroxidation, senescence-accelerated mouse(SAM)

I. 서 론

식물체에 비선택적인 제초제로 이용되는 paraquat(PQ)는 광범위한 영역에 걸쳐 잡초를 제거하는데 사용되고 있으며,¹⁾ 동시에 사람을 포함한 대다수의 동물체에 대해서도 매우 치명적인 것으로 알려져 있다.²⁾ 사람에 대한 PQ의 주요 손상은 폐

에서 관찰되며, 그 외 신장, 부신, 흉선, 간 등에서도 주목할만한 독성을 갖는다.³⁾ 이 화합물이 포유동물에서 나타내는 독성에 대한 생화학적 기전은 현재까지 명확하지 않으나 그 독성을 인위적으로 유도한 여러 실험에서 PQ가 에너지 의존적 흡수 기전에 의해 일차적으로 폐에 축적되는 것으로 이해된다.⁴⁾ 또한 Hassan과 Fridovich⁵⁾는 E. coli에

Table 1. Effects of treatment of paraquat on SOD, catalase and MDA between SAM-R/1 and SAM-P/8.

| Experimental group | SOD(Units/mg) | | | Catalase (Units/mg) | MDA (nmol/g) |
|--------------------|---------------|-----------|-------------|---------------------|--------------|
| | MnSOD | CuZnSOD | total SOD | | |
| SAM-R/1 | | | | | |
| control | 4.5±0.1 | 36.3±0.3 | 40.82±7.14 | 20.3±0.2 | 212.3±0.4 |
| PQ | 9.1±0.5* | 39.7±0.3* | 48.74±7.12* | 25.2±0.6* | 597.2±0.2* |
| SAM-P/8 | | | | | |
| control | 3.2±0.3 | 12.3±0.2 | 15.5±0.5 | 12.4±0.6 | 302.3±0.3 |
| PQ | 7.6±0.4 | 15.6±0.3 | 23.2±0.7 | 14.3±0.3* | 359.2±0.2* |

Values are means ±S.D.(N=5). *: p <0.05 against control.

PQ를 투여하여 독성 영향을 측정된 결과 PQ가 세포막을 통과해서 세포내로 확산될 수 있으며, 산소와 반응하여 superoxide(O₂⁻) 라디칼을 생성하고 이에 따라 세포내 독성이 야기된다는 사실을 보고한 바 있다.

PQ가 갖는 독성 영향으로 인해 세포내에서는 여러 종류의 산소라디칼(reactive oxygen radicals)이 생성되는데 superoxide 음이온(O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂) 그리고 OH(hydroxyl) 라디칼 등이 있다. 이들 산소라디칼은 생물체의 항상성 유지에 손상⁶⁾을 줄 뿐만 아니라 핵산, 단백질, 아미노산, 지질과산화 그리고 결합조직의 거대분자 등 많은 생화학적 손상을 초래한다.⁷⁾ 또한 이들 라디칼은 생물체가 호기적으로 성장하는 동안에 다량으로 생산되며, 비록 소량만 존재하여도 생명체는 치명적인 손상을 받는다.⁸⁾

이러한 superoxide 라디칼에 의한 세포내 손상에 대한 방호 역할로 생물체는 superoxide dismutase(SOD)라는 효소를 생산하며, 이들은 주로 세포질 또는 미토콘드리아내에 분포한다.⁹⁾ 일반적으로 SOD는 세가지의 형태로 존재하는데, erythrocytuprein type(CuZn)의 SOD는 진핵생물체의 세포질에 존재하고,^{9),10)} MnSOD는 원핵생물체 및 세포내 소기관에^{10),11)} 그리고 FeSOD는 원핵세포에서만 발견되는 것으로 알려져 있다.

Superoxide 라디칼에 의해 2차적으로 형성되는 과산화수소를 산소와 물로 전환시켜 그 독성을 감소시키는 기능을 갖는 catalase는 흔히 hydroper-

oxidase라고도 부르며, 오랜 기간 동안 연구의 대상이 되어 왔다.¹²⁾ catalase는 모든 호기성 미생물은 물론 동·식물의 세포를 포함하여 자연계에 널리 분포하고 있다. 포유동물의 조직에서 catalase의 활성은 매우 다양하게 나타나는데 특히 간과 신장에서는 그 활성도가 높은 반면 결합조직에서는 낮은 특성을 갖는다. 또한 미토콘드리아와 peroxisome 내에서는 임자에 결합한 상태로, 그리고 적혈구에서는 용해된 상태로 존재하기도 한다. Farr 등¹³⁾은 catalase가 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는데 결정적인 역할이 있음을 보고한 후 catalase의 항산화적 기능은 더욱 강조되고 있다.

산소라디칼의 생성에 따른 생물체내 손상의 한 형태인 지질과산화 현상은 화학적 측면 및 식품 공학적 연구가 주를 이루었으나 점차 생체막의 주요 구성원인 지질 성분의 분해 기작이 생화학적으로 중요시 되고 있다. 세포의 원형질막을 구성하는 다불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)의 과산화 현상은 산소라디칼의 매개체가 세포 자체의 국소적인 방어 기전을 초과하였을 때 나타나는 세포 손상의 주된 형태이다. 그리고 포유동물의 경우 세포내에서 나타나는 여러 생물학적 체계에서 형성된 superoxide 음이온과 과산화수소가 세포막의 지질과산화를 유발하는 절대적인 매개체라는 사실이 제기된 바 있다.¹⁰⁾

MDA(malondialdehyde)는 세포막의 지질과산화에 의한 손상의 결과를 측정하는 지표로써, 산소라디칼이 세포막의 지방산과 반응하여 과산화된 결

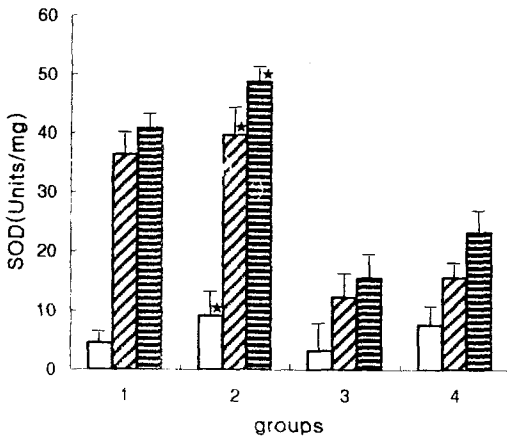


Fig. 1. The changes in superoxide dismutase activities in mouse liver after treatment with PQ.
 1, SAM-R/1 control; 2, SAM-R/1 + PQ;
 3, SAM-P/8 control; 4, SAM-P/8 + PQ;
 □, MnSOD; ▨, CuZnSOD; ▤, total SOD. *, p<0.05 against controls.

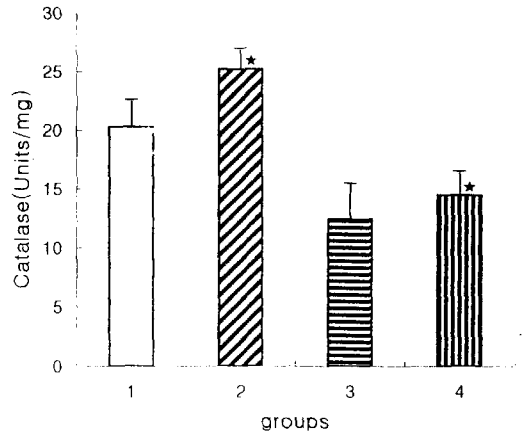


Fig. 2. The changes in catalase activities in mouse liver after treatment with PQ.
 1, SAM-R/1 control; 2, SAM-R/1 + PQ;
 3, SAM-P/8 control; 4, SAM-P/8 + PQ.
 *, p<0.05 against controls.

과 생성되는 최종 산물이다. 이때 생성된 MDA는 세포막과 상호작용하여 중합반응을 일으키며 결과적으로 세포막의 구조적 특성을 변형시킨다.¹⁴⁾ 또한 MDA는 지질과산화의 분산력을 갖기 때문에 DNA의 질소를 함유하는 염기들과도 반응하여 돌연변이와 발암 및 강한 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾

이러한 지질과산화 현상은 다른 어떤 종류의 독성물질에 의해 유도된 경우보다 훨씬 더 해로운 병리학적 현상을 유발할 수 있는데 특히 ischemia-reperfusion, Parkinson병, 근육의 영양장애, 중추신경계의 쇼크, 뇌졸중 등 여러 가지 질병이 발생한다.^{16),17)}

노화의 대표적인 실험 모델인 SAM(senescence-accelerated mice)은 AKR strain의 쥐를 자매교배하여 Takeda 등¹⁸⁾에 의해 최초로 개발되었다. 이들은 정상적인 노화과정을 갖는 생쥐와 비교했을 때 낮은 활성도, 탈모, hair glossiness의 결핍, 피부조각, 안구주위의 손상, 척추에서의 증가된 lordokyphosis 그리고 짧은 수명 등의 특성을 갖는다. 이들 중 심각한 손상을 나타내는 4개의 sub-strain을 선택하여 각각 -P/1, -P/2, -P/3, -P/4로

구분하여 accelerated senescence prone(P-series)으로 분류했다. 또 정상적인 노화 과정을 갖는 3개의 sub-strain을 선택하여 각각 -R/1, -R/2, -R/3로 구분하여 accelerated senescence resistant(R-series)로 분류했다. 그리고 이들 모델은 노화촉진과 관련지어 SAM으로 명명하여 각각 SAM-P/1, -P/2, -P/3, -P/4 그리고 SAM-R/1, -R/2, -R/3로 표기된 것으로 동물모델을 통한 노화 연구에 널리 이용되고 있다.¹⁹⁾

또 최근에는 SAM-R/3와 SAM-P/2로부터 새로운 strain인 SAM-P/6와 SAM-P/8이 각각 분리되었는데, 특히 SAM-P/8은 노화성 유전분증과 능동적 회피반응에서 노화와 관련된 학습 및 기억 손실이 뚜렷한 것으로 밝혀졌다.²⁰⁾

조기의 SAM에 대한 연구는 주로 척추동물 등에서 amyloid의 파괴, amyloid fibril protein의 분리, 백내장과 기타 눈의 손상, 학습과 기억 저하에 대한 변화도, bone mass, 면역반응 등에 대한 연구가 주를 이루다가 현재는 세포막의 손상 정도, DNA 수준에서의 접근, 면역조직학적 조사, 행동 및 신경병리학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 실제로 SAM내에 존재하는 여러 단백질의 분리 및 특성 분석 또는 이들의 기능 그리고 유전

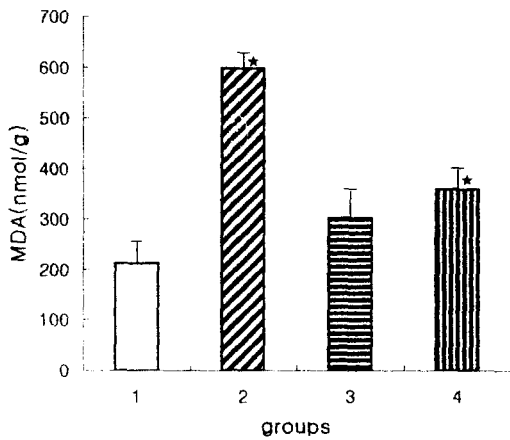


Fig. 3. The changes in lipid peroxidation value in mouse liver after treatment with PQ.
 1, SAM-R/1 control; 2, SAM-R/1 + PQ;
 3, SAM-P/8 control; 4, SAM-P/8 + PQ.
 *, $p < 0.05$ against controls.

인자 탐구를 포함한 분자생물학적 수준에서의 연구와 어떤 약물의 처치로 인해 나타날 수 있는 변화의 가능성 등의 측면에서는 아직도 연구가 부족한 실정이다. 특히 노화 현상과 관련하여 중요한 의미를 갖는 실험동물 모델로 고안되었음에도 불구하고 노화현상을 규명하는 결정적인 단서나 노화를 방지시키기 위한 보다 구체적인 연구가 필요하다는 사실로 본 연구는 동물세포를 분자생물학적 수준에서 연구함으로써 노화와 이에 관련된 항산화효소의 활성 그리고 생체막의 손상 정도를 측정하여 노화의 원인을 밝히는데 기초 자료로 활용하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 필요시약

paraquat(methyl viologen or 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride), nitroblue tetrazolium (NBT), riboflavin, potassium phosphate, 1,1,3,3-tetramethoxy propane(TMP), n-butanol, pyridine, sodium dodecyl sulfate(SDS), thiobarbituric acid, bovine superoxide dismutase, bovine liver catalase 등의 시약은Sigma사(St. Louis, MO,

6317, USA)로부터 그리고 KCl, acetic acid, hydrogen peroxide, sodium chloride 등 기타 시약은 특급 또는 1급을 사용하였다.

2. SAM의 사육조건

SAM은 일본 Clea Japan Inc.(Osaka, Japan)에서 분양받은 SAM-R/1과 SAM-P/8 두 strain을 사용하였으며, 실험동물의 사육은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 10\%$ 로 유지시킨 사육실에서 물과 배합 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였고, 이들 중 각각 생후 2개월령으로 체중 $25 \pm 2\text{g}$ 의 수컷 생쥐만을 선별하여 실험에 이용하였다.

3. PQ(200ppm/Kg)의 구강 투여

2개월령인 수컷 생쥐에 산화압 스트레스를 가하기 위하여 제초제인 PQ를 200ppm/Kg의 농도로 조제하여 위장관 튜브를 이용, 구강 투여하였다. 그리고 대조군에는 0.9% NaCl 용액을 구강 투여하였다. PQ 투여 이후 만 1일이 경과된 실험군과 대조군의 각 실험 생쥐들은 경추 탈골 방법으로 도살하여 간조직만을 절제하여 시료로 이용하였다.

4. SAM의 간조직으로부터 SOD의 추출 및 활성도 측정

PQ를 구강 투여한 SAM-R/1과 SAM-P/8을 경추 탈골로 도살시킨 후 간조직만을 신속히 분리하여 SOD를 추출하였다. 채취된 간조직을 신선한 증류수로 세척한 후 0.1mM EDTA와 50mM phosphate buffer(pH 7.8)를 첨가하여 세절한 다음 균질액을 얻기 위해 homogenizer(JANKE & KUNKEL, GMBH & Co., ULTRA-TURRAX T25, Germany)를 이용하여 4°C 에서 균질화하였다. 이 균질액으로부터 핵 분획을 제거하기 위해 2,000xg로 5분동안 원심분리하였으며, 다시 4°C 의 22,000xg에서 30분동안 원심분리하여 세포질 분획과 미토콘드리아 분획으로 분리하였다. 분리된 분획 중 상층액을 제거한 후 순수 분리를 위해 16,000xg에서 10분동안 원심분리하여 순수 CuZnSOD를 얻었으며, 이 조효소액을 단백질 분석에 이용하였다. 미토콘드리아에 분포하는 MnSOD를 얻기 위해 전

단계에서의 pellet에 50mM phosphate buffer(pH 7.8), 0.25M sucrose, 0.1mM EDTA 용액을 첨가하여 부유시킨 다음 22,000xg로 30분동안 원심분리하여 상층액만을 분리한 후 다시 80,000xg로 30분간 원심분리하여 순수한 MnSOD를 얻었다. 단백질의 정량은 Bio-Rad assay를 이용하였다.

분리된 단백질에서 SOD의 활성도를 측정하기 위해 정량한 단백질 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 30mA로 전기영동하였다. SOD의 활성도를 측정하기 위해서는 Beauchamp과 Fridovich²¹⁾의 방법 및 Kim²²⁾의 방법을 이용하였으며, 그 결과는 densitometer(ImageMaster VDS, Pharmacia)를 이용하여 분석하였다.

5. SAM의 간조직으로부터

catalase의 추출 및 활성도 측정

SAM-R/1과 SAM-P/8으로부터 catalase를 분리하기 위해 먼저 제거된 간조직에 0.25M sucrose와 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 용액을 첨가하여 균질화하였다. 이 균질액을 1,000xg로 10분동안 원심분리한 후 상층액을 제거하였고 이를 다시 20,000xg에서 20분간 원심분리하여 상층액만을 분리하였다. 단백질의 정량을 위해서는 Bio-Rad assay를 실시하였다.

non-denaturing PAGE를 이용해 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 단백질을 전기영동하였으며, catalase의 활성도 측정은 horseradish peroxidase-diaminobenzidine²³⁾ 방법을 이용하였으며, 그 결과는 densitometer로 분석하였다.

6. SAM의 간조직으로부터 지질과산화산물(MDA)의 측정

산소라디칼에 의한 손상 중 세포막 지질과산화의 정도를 조사하기 위해 지질과산화의 최종 산물인 MDA를 Ohkawa 등²⁴⁾이 고안한 TBA(thiobarbituric acid) 방법을 이용하여 측정하였다. 먼저 간조직 시료를 1.15% KCl 용액으로 균질화하여 최종 10%의 균질액을 만든 다음 8.1% SDS, 20% acetic acid solution(pH 3.4-3.5), 0.8% TBA를 첨

가하였다. 그리고 95°C의 water bath에서 60분동안 가열한 다음 냉각시켰으며, n-butanol과 pyridine solution (15:1, v/v)을 첨가한 후 4,000xg에서 10분동안 원심분리하여 유기층인 상층액을 취하여 532nm에서의 흡광도를 측정함으로써 MDA (nmol/g of liver)의 값을 확인하였다. 이때 standard로는 1,1,3,3-tetramethoxy propane(TMP)을 이용하였다.

III. 결 과

1. SOD의 활성도 분석

PQ를 투여한 SAM의 간조직에서 SOD의 활성도를 측정된 결과 SAM-R/1의 경우 PQ를 투여한 실험군에서 MnSOD 및 CuZnSOD의 활성도가 유의하게 증가하는 결과를 나타냈으며, 특히 MnSOD의 경우 202%까지 그 활성이 증가하였다. 또한 대조군이나 PQ 투여군 모두 MnSOD보다는 세포질에 분포하는 CuZnSOD의 함량이 더 높음을 알 수 있었다.

노화촉진생쥐인 SAM-P/8의 경우 PQ를 투여함으로써 인해 MnSOD 및 CuZnSOD의 활성도는 대조군에 비해 각각 238%, 127%까지 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 이와같이 SAM-P/8에서 PQ의 투여로 인해 MnSOD나 CuZnSOD 모두 미미하게나마 그 발현이 증가한 것은 PQ의 투여가 세포내 산소라디칼의 생성을 야기시킨 결과로 보인다. 그리고 total SOD의 활성도를 비교했을 때 정상적인 노화과정을 갖는 SAM-R/1이 노화가 촉진된 SAM-P/8에 비해 대조군의 경우 263% 그리고 PQ 투여군에서는 210%까지 더 높은 발현 양상을 나타냈다(Table 1, Fig. 1).

2. catalase의 활성도 분석

PQ가 투여된 SAM의 간조직에서 발현되는 catalase의 활성도를 측정, 분석한 결과 정상적인 노화과정을 갖는 SAM-R/1의 경우 대조군과 비교했을 때 PQ를 투여한 실험군에서 그 발현이 124%까지 증가하였다. 이러한 결과는 SOD의 활성과 상호 비교했을 때 PQ의 투여로 인해 형성된 산소

라디칼의 독성을 제거하는데 있어서 catalase는 2차적으로 관여한다는 사실을 알 수 있었다.

노화촉진생쥐인 SAM-P/8에서 역시 PQ의 투여가 catalase의 활성에 어떠한 영향을 미치는가를 확인한 결과 SAM-R/1과 동일한 양상을 나타냄을 알 수 있었으며, 그 발현은 115%까지 유의하게 증가하였다. 또한 정상노화과정의 SAM-R/1은 대조군의 경우 노화촉진생쥐인 SAM-P/8보다 164%까지 더 높은 catalase 활성을 나타냈으며, PQ를 투여한 실험군에서는 176%까지 차이를 나타냈다 (Table 1, Fig. 2).

3. 지질과산화에 따른 MDA함량 분석

200ppm/Kg의 PQ를 처치한 SAM의 간조직에서 발생하는 세포막 손상의 정도를 이해하기 위하여 지질과산화의 최종 산물인 MDA의 양을 측정해 결과 정상적인 노화 과정을 갖는 SAM-R/1의 경우 PQ를 투여하지 않은 대조군에서 간조직 g당 212.3nmol의 MDA 함량을 나타냈다. 반면 PQ를 만1일 동안 투여한 실험군에서는 597.2nmol로 대조군에 비해 281%까지 유의한 증가 결과를 나타냈다.

SAM-P/8의 경우 역시 SAM-R/1과 유사한 양상을 보여 대조군에 비해 PQ를 투여했을 때 MDA의 양이 119%의 유의한 증가를 보였다.

SAM-R/1과 SAM-P/8을 비교해 볼 때 대조군의 경우 SAM-P/8의 MDA 함량이 SAM-R/1보다 142% 더 높게 나타남으로써 노화촉진생쥐가 정상적인 노화과정을 갖는 생쥐보다 더 큰 세포막 손상으로 인해 지질과산화가 촉진된 상태임을 알 수 있었다 (Table 1, Fig. 3).

IV. 고 찰

노화란 환경적 영향과 유전적으로 제한된 여러 요인들간의 상호작용에 의해 나타나는 복잡한 과정이다. 이러한 현상은 생물체내에 형성되어 있는 죽음에 대한 엄격한 유전적 프로그램에 의해 유도되거나 또는 DNA 및 신체의 활동을 정상적으로 유지시키는데 관여하는 중요 효소들에 대한 임의적

손상에 의해서도 가능하며, 생체내 호르몬 양의 변화에 따른 면역 시스템의 활성 기능의 감소나 산소 라디칼이라고 하는 잠재적으로 세포 손상 능력이 있는 반응성의 물질에 의해 발생할 수도 있다.²⁵⁾

현재까지 노화 연구를 위해 주로 사용되어온 실험동물은 주로 배양세포³⁶⁾나 초파리³⁷⁾ 등의 곤충을 이용하여 노화에 따른 수명을 관찰하고자 하였으며, Selye 등³⁸⁾은 dihydrotachysterol을 그리고 Alexander와 Connel³⁹⁾은 X선을 조사하여 만들어진 동물을 실험에 이용하기도 하였다. 그러나 이러한 실험 모델들은 노화현상이 부분적으로 나타나거나 노화현상이 지연되는 등 노화 연구에 적당한 실험동물이 되지 못했다. 그러나 Takeda 등¹⁸⁾에 의해 개발된 노화촉진생쥐의 등장으로 인해 노화현상을 규명하기 위한 연구가 활기를 띠기 시작했다. 지금까지의 연구에 의하면 동물의 경우 쥐의 표피세포,³⁰⁾ 암세포의 배양³¹⁾과 허파,³²⁾ 간,³³⁾ 신장,³⁴⁾ 심장³⁵⁾과 같은 기관의 조직에서 superoxide 라디칼의 생성에 따른 항산화효소의 측정이 활발히 탐구되어 왔다.

SAM-R/1과 SAM-P/8에 PQ를 투여하였을 때 이들의 간조직에서 나타나는 SOD의 활성도 측정에서 정상노화과정을 갖는 SAM-R/1에 PQ를 투여하였을 때 그 독성에 대한 1차 방어라인인 SOD의 합성이 증가함으로써 세포내 독성은 감소되었다. 노화촉진생쥐인 SAM-P/8에 PQ를 투여한 결과에서도 SOD의 발현이 대조군에 비해 증가하였는데 이는 PQ에 대한 독성 방호를 위해 세포내에서 라디칼 방호를 위한 SOD의 필요성이 증가된 때문으로 보인다. 이러한 PQ의 독성은 체내에서 어느 정도 지속할 수 있을 것이라는 사실도 배제할 수 없는데 이는 계속되는 실험을 통해 보다 더 장기간의 투여로 PQ의 독성을 측정하고자 한다 (Table 1, Fig. 1). Rao 등³⁶⁾은 쥐에서 항산화효소의 발현이 나이에 따라 어떻게 달라지는지를 뇌, 심장, 신장 등에서 조사한 결과 모든 조직들에서 SOD는 노화에 따라 점차 감소되며, catalase는 뇌와 간세포, 신장에서 감소됨을 밝혔고 이들 항산화효소들은 보통 연령에 따라 mRNA의 상대적인 수준을 유사한 수준에서 변화시킴으로써 평형적인 관계에서 유사하게 감소됨을 지적한 바 있다. 이는 본 실험에서 실

시한 바와 같이 SAM-R/1과 SAM-P/8에서 SOD의 활성 정도가 큰 차이를 보이는 것과 같은 의미로 해석된다.

동일한 실험 조건에서 산화압 스트레스에 대한 catalase의 방호 기능을 조사한 결과 SAM-R/1은 PQ를 투여했을 때 catalase의 발현이 다소 증가하는 양상을 보였는데 이는 PQ가 세포내에 형성한 superoxide 라디칼을 체내 방어의 1차 라인인 SOD가 방호하고 계속해서 형성된 라디칼을 catalase가 해독하는 것으로 이해된다. 따라서 catalase의 발현 정도는 SOD에 비해 낮은 수준이기는 하지만 catalase 역시 산소라디칼을 제거하는 중요한 항산화효소임을 알 수 있었다. 또한 SAM-P/8에서도 PQ는 catalase의 발현을 유도시키는 과정에 관여하며, 대조군과 비교하여 115%의 활성 증대를 나타냈으며, 노화촉진생쥐에서도 catalase는 산소라디칼을 제거하는 2차 방어라인임을 알 수 있었다(Table 1, Fig. 2). Carrillo 등³⁷⁾은 세포내 노화과정 동안 간조직의 산화적 손상에 대한 잠재적 세포독성 감소에 관여하는 SOD와 catalase의 활성을 연령에 따라 조사한 바 있는데, 즉 간에서 노화와 관련된 이들 항산화제의 변화는 성에 크게 의존적이며, catalase와 같은 효소의 활성은 노화된 쥐에서 오히려 그 활성이 더 높게 나타난다는 결과를 보고하였다. 이는 SAM-P/8 군과는 차이가 있는 점으로 보아 노화촉진생쥐로서의 SAM-P/8은 항산화효소의 기능 뿐만 아니라 노화를 지배하는 또 다른 요인이 있는 것으로 생각된다.

노화에 따른 과산화물의 증가는 세포병리학적인 측면에서 중요한 의미를 갖으며, 더 나아가 DNA의 아미노 그룹과 지질과산화산물간의 상호 교차반응은 유전적 손상까지도 유도할 수 있다. 따라서 유전물질의 손실, 돌연변이 그리고 유사분열 후 세포의 노화를 촉진시킬 뿐만 아니라 세포막성 구조가 다량의 중합 불포화지방산으로 구성된 인지질을 불안정 상태로 변화시킬 수도 있다. SAM-R/1과 SAM-P/8에 PQ를 처리하여 활성산소라디칼의 형성에 따른 세포막 손상을 야기시킨 결과를 세포막 손상의 최종 산물인 MDA의 함량을 측정하는 방법으로 확인하였다. 먼저 SAM-R/1에서 MDA의 함량을 측정된 결과 PQ의 투여가 MDA의 양을 유의

하게 증가시켜 PQ에 의해 형성된 산소라디칼이 세포막의 손상에도 밀접히 연관됨을 알 수 있었다. SAM-P/8 역시 SAM-R/1과 그 양상이 동일하였는데 PQ 투여군에서 MDA 양이 SAM-R/1보다 더 낮게 나타난 결과는 특이할 만하다. 이는 SAM-P/8이 SAM-R/1보다 대조군에서 현저히 높은 MDA 함량을 보였고 계속해서 PQ를 투여했을 때 이미 유전인자 수준에서 손상을 받은 SAM-P/8에서 MDA 생성물은 더 낮아진다는 사실을 알 수 있었다(Table 1, Fig. 3). 최근 Yang³⁸⁾은 SAM을 모델로 하여 세포막의 과산화산물인 conjugated dien과 lipofuscin의 양을 측정된 결과 R계열보다 P계열에서 더 높은 수준치가 나타남을 보고한 바 있는데, 이는 본 실험에서 과산화산물의 하나인 MDA의 함량을 측정하여 정상노화과정을 갖는 그룹보다 노화촉진 그룹에서 더 높은 과산화산물이 검출됨으로써 동일한 양상을 나타냈다. 또한 Park 등³⁹⁾은 홍삼의 방사선 방호 효과와 방사선 장해 그리고 항산화효소 활성도 사이의 상호관계를 규명하기 위해 생쥐에 홍삼을 투여한 후 γ 선을 전신 조사하여 생쥐의 생존률에 미치는 효과, 간내의 지질과산화 정도, SOD, catalase 그리고 peroxidase와 같은 항산화효소의 활성도를 조사하였는데, 그 결과 투여된 홍삼이 지질과산화를 상당량 감소시켰을 뿐만 아니라 SOD, catalase의 활성 수준도 크게 증가된 것을 밝혔으며, 동시에 본 실험의 결과와 일치된 지질과산화와 항산화효소 활성도 사이의 상관관계를 보고한 바 있다. Bartoli 등⁴⁰⁾은 발암과 관련하여 쥐의 간 microsomal membrane에서 SOD의 고갈과 지질과산화에 대한 연구를 통해 간의 발암 현상동안 SOD의 손실이 세포막의 지질과산화를 유도하는 산화적 스트레스와 밀접하게 연관되어 세포막 구조 및 특성을 영구적으로 변형시키는데 관여하는 더 많은 포화지방산을 형성함으로써 세포반응을 나타낸다는 사실을 밝혀 SOD의 활성도와 지질과산화 사이의 상관관계를 제시한 바 있다. 또한 Oh 등⁴¹⁾은 ginsenoside RB2를 SAM-R/1에 복강 투여한 결과 MDA가 감소됨을 확인하고 이는 SOD 및 catalase의 활성 증가에 의한 것이라는 추측을 제기하였는데, 이러한 연구 결과로 노화와 항산화효소간의 유관성을 이해할 수 있다. Balevska

등¹²⁾도 쥐 간조직의 미토콘드리아와 microsome에서 구리를 결핍시킨 조건으로 지질과산화에 대한 연구를 실시한 결과 구리의 결핍이 lipid peroxide를 2배까지 증가시켰으며, CuZnSOD의 활성은 30%까지 감소하는 반면 MnSOD는 거의 변화가 없었음을 보고한 바 있다.

이상의 실험 결과로써 제조제로 널리 쓰이는 PQ가 세포 노화에 결정적인 역할을 하는 산소라디칼의 생성에 밀접히 연관되어 있음을 알 수 있었고 또한 PQ 독성에 대한 항산화효소의 활성 및 세포막 수준에서의 변화 역시 확인할 수 있었다. 결국 세포의 노화는 항산화효소의 활성에 의해 방어될 수 있으리라는 것과 PQ의 세포내 독성의 중요성을 검증케 하였다.

계속되는 연구를 통해 SAM P/8에서 나타나는 노화촉진 현상을 유전인자 수준에서 조사하여 그 기전을 명확히 규명하며, 또한 이 현상과 관련된 회복 시스템을 활성화시키는 방안 및 노화현상에 대해 예방 기능을 갖는 치료제의 개발 등에 대한 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

제조제로 널리 이용되는 paraquat를 정상적인 노화과정을 갖는 SAM R/1과 노화촉진 생쥐인 SAM P/8에 각각 경구 투여하여 간에서 나타나는 SOD와 catalase 등의 항산화효소의 활성과 지질과산화의 정도를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SOD는 PQ를 투여한 실험군에서 PQ에 의해 형성된 O₂⁻ 라디칼을 제거하는데 관여하였고, 그 결과 SAM R/1과 SAM P/8 모두 대조군에서 보다 PQ 투여군에서 더 증가된 SOD 활성을 확인할 수 있었다.
2. catalase는 PQ의 투여로 인해 생성된 산소라디칼을 제거하는데 있어서 2차적인 방어 기능을 나타냈으며, 이는 SAM R/1과 SAM P/8 모두에서 PQ 투여 이후 증가된 catalase의 활성으로 입증되었다.
3. PQ의 투여는 세포막에도 치명적인 손상을 야

기하며, 세포막 손상의 최종 산물인 MDA의 함량은 SAM R/1과 SAM P/8 모두 대조군보다 PQ 투여군에서 더 높게 나타났다.

참 고 문 헌

1. Calderbank, A. Proc. Br. Weed Control Conf. 7, 312-320, 1964.
2. Fisher, H. K., J. A. Clements, and R. R. Wright: Am. Rev. Respir. Dis. 107, 246-252, 1973.
3. Clark, D. G., T. F. McElligott, and E. W. Hurst: Br. J. Ind. Med. 23, 126-132, 1966.
4. Rose, M. S., E. A. Lock, L. L. Smith, and I. Wyatt: Biochem. Pharmacol. 25, 419-423, 1976.
5. Hassan, H. M., and I. Fridovich: Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds, Arch. Biochem. Biophys. 196, 385-395, 1979.
6. Strehler, B. L.: Time, cells and aging. Academic Press, New York, 1977.
7. Johnson, J. E., Jr. R. Walford, D. Harman, and J. Miguel: Free radicals. Aging and degenerative diseases, NY. Alan R. Liss. Inc. 680, 1986.
8. Ames, B. N., R. Cathcart, E. Schiviers, and P. Hochstein: Uric acid provides antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer. A hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 6858-6862, 1981.
9. Fridovich, I.: Superoxide and superoxide dismutases, Adv. Inorg. Biochem. 1, 67-90, 1979.
10. Fridovich, I.: Superoxide dismutases. Adv. Enzymol. 58, 62-97, 1986.
11. Hewitt, J., and Morris.: Superoxide dismutase in some obligately anaerobic bacteria. FEBS Lett. 50, 315-318, 1975.

12. Imlay, J. A., and S. Linn.: Biomodel pattern of killing of DNA repair-defective or anaerobically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 166, 797-799, 1986.
13. Farr, S. B., D. Touati, and T. Kogoma: Effects of oxygen stress on membrane functions in *Escherichia coli*: role of HPI catalase. *J. Bacteriol.* 170, 1837-1842, 1988.
14. Hochstein, P., and S.K. Jain: *Fed. Proc.* 40, 183-188, 1981.
15. Bird, R.P., and H.H. Draper: *J. Toxicol. Environ. Health.* 6, 811-823, 1980.
16. Murphy, M.E., and J.P. Kehrer: *Chem. Biol. Interactions.* 69, 101-173, 1989.
17. Hall, E.D., and J.M. Braugher: *Free Rad. Biol. Med.* 6, 303-313, 1989.
18. Takeda, T., M. Hosokawa, S. Takeshita, M. Irino, K. Higuchi, T. Matsushita, Y. Tomita, K. Yasuhira, H. Hamamoto, K. Shimizu, M. Ishii, and T. Yamamuro: A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* 17, 183-194, 1981.
19. Hosokawa, H., R. Kasai, K. Higuchi, S. Takeshita, K. Shimizu, H. Hamamoto, A. Honma, M. Irino, K. Toda, A. Matsumura, and M. Matsushita: Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.* 26, 91-102, 1984.
20. Miyamoto, M., Y. Kiyota, N. Yamazaki, A. Nagaoka, T. Matsuo, Y. Nagawa, and T. Takeda: Age-related changes in learning and memory in the senescence accelerated mouse (SAM). *Physiol. Behav.* 38, 399-406, 1986.
21. Beauchamp, C., and I. Fridovich: Superoxide dismutase, Improved assays and applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-287, 1971.
22. Kim, Y. G.: 1971. Superoxide dismutase, Gene replacement studies. Ph.D. dissertation. pp.1-58. University of New Mexico. USA, 1970.
23. Clare, D. A., M. N. Duong, D. Darr, F. Archibald, and I. Fridovich: Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal. Biochem.* 140, 532-537, 1984.
24. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358, 1979.
25. Rusting, R. L.: Why do we age? In *Scientific American.* 87-95, 1992.
26. Tajima, T., T. Watanabe, K. Iijima, Y. Ohshika, and H. Yamaguchi: The increase of glycosaminoglycan synthesis and accumulation on the cell surface of cultures skin fibroblasts in Werner's syndrome, *Exp. Pathol.* 20, 221-229, 1981.
27. Clark, A. M.: Genetic factors associated with ageing. In: *Advances in gerontological research.* Vol. 1. edited by B.L. Strehler. Academic Press, New York. 207-255, 1964.
28. Selye, H., R. Strebele, and L. Mikulaji: Progeria-like syndrome produced by dihydrocholesterol and its prevention by methyltestosterone and ferric dextran, *J. Am. Geriatr. Soc.* 11, 1-160, 1963.
29. Alexander, P., and D. I. Connell: Differences between radiation-induced life span shortening in mice and normal aging as revealed by serial killing. In *Cellular basis and etiology of late somatic effects of ionizing radiation.* Harris, R. J. C (Ed). New York. Academic Press. p.277, 1963.
30. Nakamura, K., K. Nomoto, K. Kariya, and Y. Nakajima, H. Nishimoto, S. Uga, M. Miyata, T. Osawa, S. Kawakishi, and N. Kakimoto.: Prevention and reversible solubilization of advanced glycation and products (AGE) by

- organic germanium compounds as derivatives of amino acid. *Amino Acids*. 1, 263-278, 1991.
31. Oberley, L. W., and G. R. Buettner: Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Research*. 39, 1141-1149, 1979.
 32. Mossman, B. T., J. P. Marsh, and M. A. Shatos: Alteration of superoxide dismutase-activity in tracheal epithelial cells by asbestos and inhibition of cytotoxicity by antioxidants. *Lab. Invest.* 54, 204-212, 1986.
 33. Oberley, L. W., I. B. Bize, S. K. Sahu, S. W. H. C. Leuthauser, and H. E. Gruber: Superoxide dismutase activity of normal murine liver, regenerating liver, and H6 hepatome. *J. Natl. Cancer Inst.* 61, 375-379, 1978.
 34. Baud, L., and R. Ardaillou: Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am. J. Physiol.* 251, 765-776, 1986.
 35. Thompson, J. A., and M. L. Hess: The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 28, 449-462, 1986.
 36. Rao, G., E. Xia, and A. Richardson: Effect of age on the expression of antioxidant-enzymes in male fischer F344 rats. *Mechanisms of ageing and development*. 53, 49-60, 1990.
 37. Carrillo, M.C., S. Kanai, Y. Sato, and K. Kitani: Age-related changes in antioxidant enzyme activities are region and organ, as well as sex, selective in the rat. *Mech. Ageing Dev.* 65, 187-198, 1992.
 38. Yang, J. S.: 노화촉진생쥐에서 산소 라디칼 관련물질의 검색에 관한 연구(Ph.D), 1989.
 39. Park, Y. S., Y. G. Kim, J. C. Chang, and D.Y. Kim: Radioprotective effects of redginseng extracts on antioxidants and lipid peroxidation of the liver in γ -irradiated mice. *K. Biochem. J.* 26, 184-191, 1993.
 40. Bartoli, G. M., B. Giannattasio, P. Palozza, and A. Cittadini: Superoxide dismutase-depletion and lipid peroxidation in rat liver microsomal membranes: correlation with livercarcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 966, 214-221, 1988.
 41. Oh, M. H., H. Y. Chung, H. S. Yong, K. W. Kim, H. Ouram and T. Yozozawa: Effect of ginsenoside Rb2 on the antioxidants in SAM-R/1 mice. *K. Biochem. J.* 25, 492-497, 1992.
 42. Balevska, P. S., E. M. Russanov, and T. A. Kassabova: Studies on lipid peroxidation in rat liver by copper deficiency. *J. Biol. Chem.* 13, 489-493, 1981.