

노화촉진생쥐(SAM)의 간에서 금속이온이 SOD의 활성에 미치는 영향

양미경 · 박문숙*

나주대학 피부미용과, 나주대학 환경위생과*

Effects of Metal Ions on Superoxide Dismutase of the Liver in Senescence-Accelerated Mouse(SAM)

Mi-Kyong Yang · Mun-Sook Park*

Department of Skin and Beauty, Naju College

*Department of Environmental Sanitation, Naju College**

Abstract

This research employed a senescence-accelerated mouse(SAM) to explore the possibility that differences exist among the major antioxidants, superoxide dismutase(SOD), in terms of ability to protect such animal treated with Cu, Fe and Mn. To assess the antioxidants function of metal ions, SAM-R/1 and SAM-P/8 were administered with Cu, Fe and Mn orally. The effect of metal ions on SAM towards reversing oxygen sensitivity was determined as a bioassays of SOD in the mouse liver.

The data show that the SOD activity was induced by each metal ions in both SAM-R/1 and SAM-P/8. It suggested that induced SOD by each metal ions may protect against oxidative mediated stress. Finally, overall data lead to the possibility of metal ions as an antioxidants or each metal ions act producer of oxygen radicals in the liver of SAM-R/1 and SAM-P/8.

Key words : superoxide radical, superoxide dismutase(SOD), senescence-accelerated mouse(SAM), metal ions

I. 서론

노화란 환경적 영향과 유전적으로 제한된 여러 요인들간의 상호작용에 의해 나타나는 복잡한 과정이다. 현재까지 알려진 노화의 기전에 대해서는 10여개의 가설이 제안되고 있는데 이들을 분류하면 크게 유전설(genetic theory)과 손상축적설(damage-accumulation theory)로 구분된다. 유전설은 생물체가 태어나면서부터 개체의 게놈(genome)내

에 일련의 노화과정이 프로그램되어 있다는 이론이며, 손상축적설은 생물체가 대사를 진행하는 동안 활성산소라디칼(reactive oxygen species, ROS) 등의 생성에 의해 유해한 손상이 축적되고 결국 노화가 촉진된다는 이론이다. 이 중 현재는 손상축적설이 노화 이론 중 더 타당성이 있는 것으로 받아들여지고 있다¹⁾.

생물체는 정상적인 물질대사 과정을 거치는 동안 효소적 또는 비효소적 반응을 통해 supero-

xide(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical($OH\cdot$)과 같은 환원형의 산소라디칼이 형성되며 이들을 활성산소라디칼이라 한다²⁾. 이들 라디칼은 세포에 치명적인 손상을 유발하는데, 즉 세포 내 구성성분인 DNA^{3, 4)}, RNA⁵⁾, 단백질^{6, 7)} 그리고 지질⁷⁾ 등과 쉽게 반응하여 생물체에 돌연변이나 노화 및 각종 질병을 야기한다^{2, 8)}. 특히 hydroxyl radical은 DNA 손상의 주요인으로 알려져 있으며, 그밖에도 세포막의 손상을 유도하는 불포화지방산의 지질과산화 및 단백질의 아미노산 잔기의 산화적 변화를 초래한다.⁹⁾

호기적 대사 경로를 갖는 생물체가 산소에 노출되었을 때 산소가 부분적으로 환원되고 그 결과 1차 산물인 superoxide가 생성되는데 이는 세포핵¹⁰⁾, 엽록체¹¹⁾, 미토콘드리아²⁾, 사람의 단핵구와 중성구¹²⁾, 대식세포¹³⁾ 그리고 마이크로솜¹⁴⁾ 등에서 주로 생산되며, *in vitro*의 수많은 실험 과정에서 그 생성이 잘 관찰되고 있다. 또한 superoxide 라디칼은 *in vivo*에서도 생물체에 매우 치명적이라는 사실이 입증되었는데, 그 예로써 *Staphylococcus epidermidis*를 사멸시키고¹⁵⁾, Chinese hamster의 난세포에서는 세포 사망률이 50%에 이르며 동시에 돌연변이 발생률도 증가한다는 사실이 보고된 바 있다¹⁶⁾. 또한 superoxide 라디칼은 단백질의 thiol기를 산화시켜 투과막 대사와 이온수송 등의 효소 기능을 손실시키거나^{7, 17)}, 불포화지방산, 지질, 콜레스테롤을 과산화하여 막의 투과성을 변화시키기도 하며^{18, 19)}, 핵산의 산화적 절단 과정에도 관여하여 결국 유전적 손상을 야기시킨다^{3, 20)}.

이러한 superoxide 라디칼에 의한 세포 손상에 대하여 방호 기능을 나타내기 위해 생물체는 superoxide dismutase(SOD)라는 효소를 생산한다. 일반적으로 SOD는 세가지의 형태, 즉 CuZnSOD, MnSOD 그리고 FeSOD로 구분된다. Erythrocyte type(CuZn)의 SOD는 진핵생물체의 세포질내에 존재하고^{21, 22, 23)}, MnSOD는 원핵생물체 및 세포내소기관에^{11, 23, 24)} 그리고 FeSOD는 원핵세포에서만 생성되는 것으로 알려져 있다.

Senescence-Accelerated Mouse(SAM)는 노화연구에 사용되는 대표적인 실험동물로서 정상적인 AKR strain의 쥐를 자매교배하여 개발된 종이

다²⁵⁾. SAM은 정상적인 노화과정을 갖는 생쥐와 비교했을 때 세포의 활성도 감소, 탈모, hair glossiness의 결핍, 피부조각, periophthalmic 손상, 척추에서의 증가된 lordokyphosis 그리고 단축된 수명 등의 특성을 갖는다. 특히 SAM 중 심각한 손상을 나타내는 4개의 substrain을 선택하여 각각 -P/1, -P/2, -P/3, -P/4로 구분하여 accelerated senescence prone (P-series)으로 분류했고, 정상 노화과정을 갖는 3개의 substrain은 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 표기하여 동물 모델을 통한 노화 연구에 이용하고 있다²⁶⁾.

최근에 SAM-R/3와 SAM-P/2로부터 새로운 strain인 SAM-P/6와 SAM-P/8이 각각 분리되었는데, SAM-P/6는 특징적인 표현형, 즉 심각한 노쇠골다공증²⁷⁾을 나타내며, SAM-P/8은 노화성 유전분증과 능동적 회피반응에서 노화와 관련된 학습 및 기억 손실이 뚜렷히 나타남이 밝혀졌다²⁸⁾.

금속이온은 생물체가 중요 물질대사를 수행하기 위해 소량이지만 반드시 필요로 하는 물질로써 이들이 결핍되었을 경우 생물체는 각종 독성 영향 및 질병 등이 발생하는 중요한 미량원소이다. 특히 생물체의 생체 대사를 위해 요구되는 금속이온에는 여러 종류가 있는데 그 중 구리는 주로 체내에서 산화효소로서의 기능을 갖으며 알부민에 의해 전달된다. 그리고 망간은 몇몇 효소의 활성을 위해 요구되는 필수적인 미량원소로서 다량 섭취시에는 매우 큰 독성을 갖으며 또한 hydrolase, decarboxylase 또는 transferase로서 작용하고 동시에 현재까지 인간에 대해 갖는 어떤 종류의 독성이나 이상 증상에 대해서는 알려진 바가 없다²⁹⁾. 철은 heme 효소로서 결핍시에 빈혈을 야기시키는 무기물의 하나로 생물체를 구성하는 주요 구성성분으로서의 기능을 갖는다³⁰⁾. 이들 금속이온이 생물체에 미치는 영향에 대해서는 연구 결과가 다양하지만 노화현상 및 노화에 관여하는 단백질의 활성과 연관된 자료는 크게 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 노화촉진생쥐인 SAM-

P/8과 정상노화생쥐인 SAM-R/1에 각각 구리, 철, 망간을 투여하여 산화적 스트레스를 인위적으로 유발시켰을 때 세포내에서 생성되는 SOD의 활성도에 대한 변화를 측정하고자 하며 동시에 금속이온에 의한 산화적 자극이 세포내 단백질의 손상을 제거하는 역할을 갖는 항산화제적 기능을 갖는 또 다른 물질의 개발에 기초 자료로 활용하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 시 약

Nitroblue Tetrazolium(NBT), riboflavin, potassium phosphate, ammonium persulfate, bovine superoxide dismutase, TEMED, acrylamide, Trizma hydrochloride, Trizma base, EDTA 등의 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, 6317, USA)로부터 구입하였으며 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 등은 특급 시약을 사용하였다.

2. SAM의 사육

SAM은 한국화학연구소에서 분양받은 SAM-R/1과 SAM-P/8 두 strain을 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 10\%$ 가 유지되는 사육실에서 물과 배합사료를 자유롭게 섭취할 수 있는 조건으로 사육하였으며, 각각 생후 2개월된 것으로 체중 $25 \pm 2\text{g}$ 의 수컷 생쥐만을 선별하여 실험에 이용하였다.

3. 금속이온의 투여

SAM-R/1과 SAM-P/8에 구리, 철, 망간의 금속이온을 각각 50mg/Kg 의 농도로 조제하여 실험군을 1일, 3일, 5일 투여군으로 구분하여 위장관 튜브를 이용, 구강 투여하였다. 이때 실험군은 SAM-R/1과 SAM-P/8 모두 대조군, 구리 투여군, 철 투여군, 망간 투여군의 4 그룹으로 분류하였으며, 대조군에는 0.9% NaCl 용액 0.1ml 만을 구강 투여하였다.

4. SAM의 간조직으로부터 SOD의

추출

구리, 철, 망간의 금속이온을 각각 1일, 3일, 5일

동안 구강 투여한 SAM-R/1과 SAM-P/8을 경추 탈골법으로 도살한 후 실험에 이용할 간조직만을 신속히 분리하여 SOD를 추출하였다. 먼저 채취한 간조직을 신선한 증류수로 세척한 후 0.1mM EDTA와 50mM phosphate buffer(pH 7.8) 용액을 간조직 시료의 4배량으로 첨가하여 세절한 다음 homogenizer(JANKE & KUNKEL, GMBH & Co., ULTRA-TURRAX T25, Germany)를 이용하여 4°C 에서 균질화하여 10% 균질액을 만들었다. 이 균질액을 4°C 에서 $2,000 \times \text{g}$ 로 5분 동안 원심분리하여 핵분획을 제거하였으며, 다시 $22,000 \times \text{g}$ 에서 30분간 원심분리하여 세포질분획과 미토콘드리아분획을 분리하였다. 분리한 분획 중 상층액만을 제거하여 순수 분리를 위해 $16,000 \times \text{g}$ 에서 10분 동안 원심분리함으로써 순수 CuZnSOD를 얻었고, 이 조효소액을 단백질 분석에 이용하였다. MnSOD의 추출을 위해서는 전 단계의 pellet에 50mM phosphate buffer(pH 7.8), 0.25M sucrose, 0.1mM EDTA 용액 1ml 를 첨가하여 부유시킨 다음 4°C 에서 $22,000 \times \text{g}$ 로 30분 동안 원심분리하여 상층액만을 분리한 후 다시 $80,000 \times \text{g}$ 로 30분간 원심분리하여 순수한 MnSOD를 획득하였다. 분리한 단백질의 정량은 Bio-rad assay를 이용하였으며, -70°C 의 deep freezer에 보관, 실험에 이용하였다.

5. SOD의 활성도 측정

분리한 단백질로부터 SOD의 활성을 측정하기 위해 정량한 단백질 $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 30mA 로 전기영동하였다. SOD의 활성도는 Beauchamp과 Fridovich³¹⁾의 방법 및 Kim³²⁾의 방법을 이용하였는데, 즉 전기영동이 끝난 gel을 0.05M KH_2PO_4 (pH 7.8), $1 \times 10^{-4}\text{M}$ EDTA, $2.45 \times 10^{-3}\text{M}$ NBT 용액에서 1차 염색한 후 다시 0.05M KH_2PO_4 (pH 7.8), $1 \times 10^{-4}\text{M}$ EDTA, 0.028M TEMED, $2.8 \times 10^{-5}\text{M}$ riboflavin 용액에서 2차 염색하며, 그 결과는 densitometer (ImageMaster VDS, Pharmacia)를 이용하여 분석하였다.

6. 통계처리

본 실험의 결과는 Sigma Plot에 의한 Student

t-test에 의하여 검정하였으며, P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

SOD는 처음 소의 적혈구와 간조직에서 발견되었는데 이들이 금속성분인 구리를 함유하고 있었기 때문에 hemocuprein 또는 hepatocuprein이라 명명하였으며, 이후 인간의 뇌세포에서도 유사 단백질이 분리되어 cerebropcuprein이라 칭하였다.³³⁾ 이들 단백질은 생화학적 및 면역학적으로 서로 유사한 특징을 지닌다는 사실이 밝혀졌고 동시에 생물체내의 산소라디칼 제거 기능이 있다는 것과 함께 고등식물의 여러 부위에 고농도로 존재한다는 것도 밝혀졌다.^{34, 35)}

금속성분을 함유하는 특성 때문에 metalloenzymes라고도 불리는 SOD에는 각각의 활성부위에 Cu, Zn, Mn 그리고 Fe 등의 금속이온을 갖고 있으며 이에 따라 CuZnSOD, MnSOD 그리고 FeSOD로 분류한다.³⁶⁾ 이합체(dimer)로 되어 있는 CuZnSOD의 경우 분자량, 아미노산의 서열, 결정구조, 금속이온의 결합부위 등이 이미 밝혀져 있다(Table 1). 또한 원핵세포에 주로 분포하는 FeSOD와 MnSOD는 아미노산의 서열에 있어서 상당히 많은 상동성을 갖는 반면 CuZnSOD와는 무관하다는 특성을 갖는다. FeSOD와 MnSOD를 동시에 함유하는 생물체 중 일부에서도 이들 효소의 분자량 및 소단위체의 구조, 금속이온의 함량 등을 포함한 몇가지 특성이 밝혀져 있다(Table 2). 흥미롭게도 *Photobacterium leiognathi*와 *Caulobacter crescentus*는 원핵생물임에도 불구하고 FeSOD와 CuZnSOD를 함유하는데 이러한 사실은 진화과정 동안 일부 환경적 조건 하에서 생물체에 유해한 어떤 영향들에 대해 방어기능으로써 발달된 것이라는 가설이 제기되기도 했다.³⁷⁾

1. 구리가 SOD의 활성에 미치는 영향

노화촉진생쥐인 SAM에서 구리의 투여가 SOD의 활성에 어떠한 영향을 미치는지를 측정된 결과 먼저 SAM-R/1에서는 MnSOD와 CuZnSOD 모두 1, 3, 5일간 구리를 누적 투여함에 따라 계속해서

Table 1. Some properties of CuZnSOD (Fridovich, 1974)

Organism	Molecular weight (Numbers of subunit)	Metal contents
Bovine erythrocytes	31,200 (2)	2 Cu, 2 Zn
Yeast cytoplasm	31,200 (2)	2 Cu, 2 Zn
<i>Photobacterium leiognathi</i>	32,000 (2)	1 Cu, 2 Zn

Table 2. Some properties of FeSOD and MnSOD(Fridovich, 1974)

Organism	Molecular weight (Numbers of subunit)	Metal contents
Yeast mitochondria	96,000 (2)	4 Mn
<i>Escherichia coli</i>	40,000 (2)	2 Mn, 2 Fe
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	45,000 (2)	1 Mn
<i>Photobacterium leiognathi</i>	40,000 (2)	1 Fe

SOD의 활성이 증가하는 양상을 보였다. 그리고 대조군과 비교했을 때 1일 투여군에서는 그 값이 감소하는 반면 5일 투여군에서는 1.15배 증가하였다(Table 3, Fig. 1, 3).

SAM-P/8의 경우도 SAM-R/1과 유사한 양상을 보여 구리의 투여 일수가 증가함에 따라 SOD의 활성 역시 점차적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 그러나 대조군의 경우 SAM-R/1에서와는 달리 구리 1일 투여군부터 5일 투여군까지 모두 더 높은 활성도를 나타냈는데 특히 5일 투여군에서는 대조군보다 1.34배까지 그 활성이 유도되었다(Table 4, Fig. 2, 4).

Saud 등³⁸⁾은 쥐에 구리 복합체를 투여한 것과 투여하지 않은 그룹으로 분류하여 구리가 간내 SOD의 활성에 미치는 영향을 조사하였는데 그 결과 구리 투여군에서 SOD의 활성이 크게 증가하였다는 결과를 보고하였다. 그리고 대체적으로 안정적인 구리 복합체가 쥐의 간이나 적혈구 세포에서

Table 3. Effects of metal ions on SOD amount in the SAM-R/1 liver

	SOD amount(ng)		
	MnSOD	CuZnSOD	Sum
control	61.189±2.25	111.90±2.43	172.279±4.65
Cu(1)	27.082±1.87*	101.18±2.27	127.262±4.02
Cu(3)	65.079±3.02*	122.32±2.15*	187.399±5.11
Cu(5)	64.330±2.69	133.58±1.45	197.910±4.03
Fe(1)	59.269±2.17	134.13±1.98	193.399±4.10
Fe(3)	59.154±3.03	136.52±2.39	195.674±5.31
Fe(5)	68.401±2.56	143.26±2.71	211.661±5.17
Mn(1)	54.191±1.20	115.98±2.69	170.171±3.82
Mn(3)	55.872±2.19*	121.17±3.21*	177.042±5.31
Mn(5)	60.816±2.40	134.91±2.98	197.726±5.35

Values are means ± S.D.(N=5), given as ng SOD/g wet wt. ★p<0.05 against control.

Table 4. Effects of metal ions on SOD amount in the SAM-P/8 liver

	SOD amount(ng)		
	MnSOD	CuZnSOD	Sum
control	47.792±3.06	95.576±1.58	143.368±4.50
Cu(1)	69.697±2.18	100.100±1.26	169.797±3.32
Cu(3)	65.949±2.45	105.850±3.05*	171.799±5.39
Cu(5)	83.980±1.06	108.200±2.48	192.000±3.52
Fe(1)	57.484±2.11	98.005±3.45*	155.489±5.46*
Fe(3)	56.830±2.98	102.900±1.97	159.730±4.87
Fe(5)	76.198±4.01	112.820±2.38	189.018±5.36
Mn(1)	32.521±2.56*	86.751±3.14	119.272±5.60
Mn(3)	57.869±2.39	98.988±1.95	156.857±5.14
Mn(5)	55.610±2.11	96.708±2.34*	162.318±4.39

Values are means ± S.D.(N=5), given as ng SOD/g wet wt. ★p<0.05 against control.

SOD의 활성을 증가시키는데, 이는 구리가 세포 내에서 superoxide 라디칼과 유사하게 작용하거나 또는 구리 복합체가 갖는 또 다른 특성 때문인 것으로 해석했다.

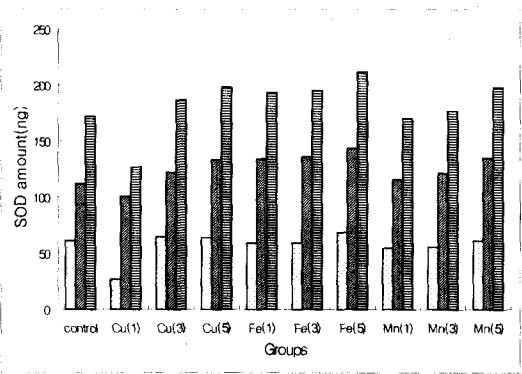


Figure 1. Comparison of SOD amount in the liver of SAM-R/1 after treatment with metal ions. □, MnSOD; ▨, CuZnSOD; ▩, total SOD. Values are means ± S.D.(N=5), given as ng SOD/g wet wt. *p<0.05 against control.

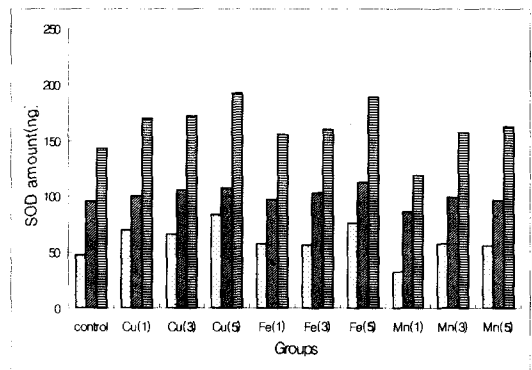


Figure 2. Comparison of SOD amount in the liver of SAM-P/8 after treatment with metal ions. □, MnSOD; ▨, CuZnSOD; ▩, total SOD. Values are means ± S.D.(N=5), given as ng SOD/g wet wt. *p<0.05 against control.

2. 철이 SOD의 활성에 미치는 영향

철의 투여가 SAM의 간조직에서 SOD 활성에 미치는 영향을 측정된 결과 정상적인 노화과정을 갖는 SAM-R/1과 노화촉진생쥐인 SAM-P/8 모두에서 동일한 양상의 결과를 보였다. SAM-R/1의 경우 철을 누적 투여함에 따라 SOD의 전체 발현률은 증가하는 경향을 나타냈다. MnSOD의 발현

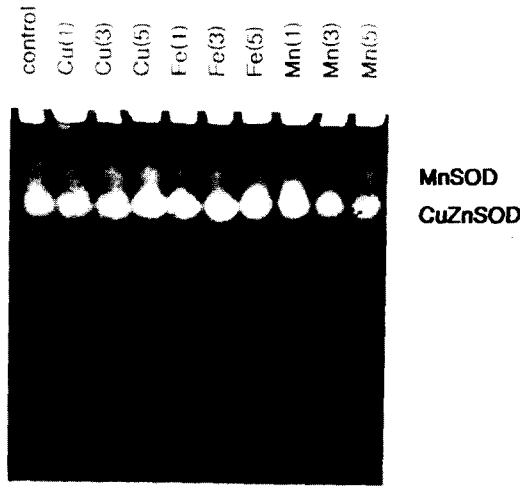


Figure 3. Non-denaturing PAGE for total SOD in the liver tissue of SAM-R/1 treated with metal ions. Each lane was loaded with $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of total protein.

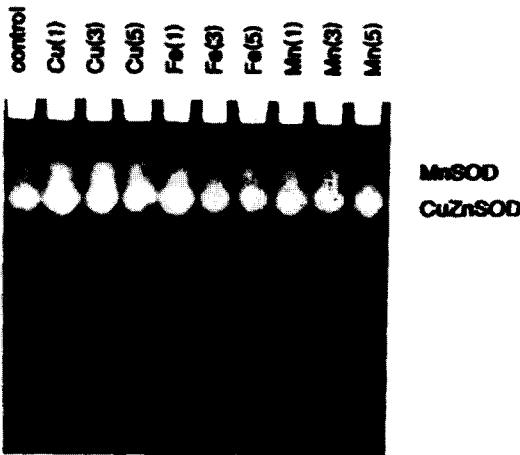


Figure 4. Non-denaturing PAGE for total SOD in the liver tissue of SAM-P/8 treated with metal ions. Each lane was loaded with $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of total protein.

물은 철 1일 투여군과 3일 투여군에서는 거의 차이가 없었으나 5일 투여군에서는 1일 투여군의 1.15배까지 증가하였다. 또한 CuZnSOD도 투여 일수가 증가함에 따라 그 발현이 계속해서 증가하였

다. 특히 MnSOD의 경우 1일 투여군과 3일 투여군은 비교군보다 더 낮은 발현 양상을 보였는데 이는 철의 투여가 일시적으로 MnSOD의 활성을 감소시키고 지속적인 투여로 인해 다시 그 활성이 회복되거나 또는 철 자체가 MnSOD의 발현을 조절하는 특정 기전을 갖기 때문인 것으로 생각되며 이에 대해서는 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다. 전체 SOD 발현률의 경우 대조군과 비교하였을 때 1일 투여군에서는 1.12배, 3일 투여군에서는 1.14배 그리고 5일 투여군에서는 1.23배까지 각각 증가된 활성을 보였다(Table 3, Fig. 1, 3).

SAM-P/8의 경우 역시 철의 투여 일수가 경과함에 따라 SOD의 활성이 점차적으로 증가하였는데 이는 MnSOD와 CuZnSOD 둘 다에서 동일한 경향으로 나타났다. MnSOD의 경우 철 5일 투여군에서는 76.198로 1일 투여군의 1.33배까지 그 활성이 증가하였으며, CuZnSOD에서는 5일 투여군이 1일 투여군의 1.15배까지 유도되었다. 또한 대조군과 비교했을 때 5일 투여군에서는 1.32배까지 전체 SOD의 활성이 증가하였다(Table 4, Fig. 2, 4).

이러한 결과는 SAM의 간조직에 구리를 투여했을 때와 동일한 경향을 나타낸 것으로 철 역시 SOD의 활성을 유도하는데 영향을 미치는 것으로 이해된다.

쥐의 소장내 상피세포를 조직배양한 후 이 세포에 철을 첨가하여 MnSOD의 생산 및 활성에 대해 첨가된 철이 어떠한 영향을 미치는가를 조사한 연구에서 철의 첨가가 MnSOD의 양과 활성을 증가시키는데 관여한다는 결과가 보고된 바 있는데,³⁹⁾ 결국 첨가된 철이 산화적 스트레스를 증가시키기 때문에 MnSOD의 발현 역시 증가하는 것으로 해석된다.

Listeria monocytogenes 19112, Scott A 그리고 10403S를 TSB(tryptic soy broth) 배지와 25~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 철이 첨가된 TSB 배지 그리고 0.5~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 셀레늄(Se)이 첨가된 TSB 배지 각각에서 배양하여 이 생물이 갖는 단백질 중 catalase와 SOD의 활성을 확인한 실험의 결과⁴⁰⁾ 본 실험에서 노화촉진생쥐에 철을 투여한 결과와 동일하였다. 즉 철이 함유된 TSB 배지에서 배양한 생물체는 SOD와 catalase의 활성이 *Listeria monocytogenes*

3종 모두에서 크게 증가하였으나 반대로 TSB 배지에 세레늄을 첨가한 경우에는 *L. monocytogenes* 19112에서만 유일하게 catalase의 활성이 증가하였고 나머지 두 종에서는 어떤 영향도 관찰되지 않았다. 따라서 이러한 실험 결과는 철이 세포내 catalase나 SOD 등 항산화효소의 활성을 증가시키는데 큰 역할을 하는 것으로 생각되며 이때 세레늄은 무관하다는 사실을 유추하게 하였다.

3. 망간이 SOD의 활성에 미치는 영향

SAM-R/1과 SAM-P/8에서 망간의 투여가 세포내 SOD의 활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 2개월령인 수컷 SAM에 망간을 구강 투여하여 간조직내의 SOD를 추출, 분석하였다. 그 결과 정상적인 노화과정을 갖는 SAM-R/1의 경우 미토콘드리아내에 분포하는 MnSOD는 망간의 투여가 누적됨에 따라 점차적으로 그 활성이 증가하였으며 또한 CuZnSOD도 계속적으로 그 활성이 증가하는 결과를 나타냈다. 특히 대조군과 전체 SOD 값을 비교했을 때 5일 투여군에서는 1.10배까지 활성이 증가하였다(Table 4, Fig. 1, 3).

또 SAM-P/8에서도 SAM-R/1과 동일하게 SOD의 활성이 증가하는 결과를 나타냈으나 대조군과 비교했을 때 1일 투여군의 값들은 모두 감소하는 반면 3일 투여군부터는 대조군보다 더 증가된 활성 값을 보였다(Table 3, Fig. 2, 4).

Hussain과 Ali⁽⁴¹⁾는 수컷 쥐에 MnCl₂를 투여하여 뇌에서 MnSOD 활성도를 측정한 실험을 하였는데 그 결과 망간의 투여가 MnSOD의 활성을 증가시킴을 확인하였고 이는 본 실험의 결과와 일치하였다. 그리고 이러한 현상은 망간이 산화적 손상으로 부터 생물체를 보호할 수 있는 필수적인 요소중의 하나라는 사실과 고농도의 망간은 오히려 산소라디칼의 발생을 증가시킴으로써 신경독성 영향을 보일 수도 있다는 가설을 입증하였다.

Chloride manganese를 50mg/kg의 농도로 10일 동안 폐지에 투여하여 중독 영향을 조사한 실험에서는 특히 간과 신장에서 SOD의 활성 증가 및 간내 지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde 함량의 증가 그리고 회복된 glutathione이나 ATP의

농도는 낮다는 결과가 보고된 바 있다.⁽⁴²⁾

이상의 결과를 볼 때 노화 기전을 효과적으로 관찰할 수 있는 SAM에서 구리, 철 그리고 망간의 금속이온을 투여하였을 때 노화촉진생쥐의 간조직내에서 항산화제의 하나인 SOD의 활성은 비교군과는 현저한 차이를 나타냄을 관찰할 수 있었다. 즉 실험에서 사용한 3가지의 금속이온이 공통적으로 SAM의 간조직에서 3일 투여 이후에 SOD의 활성을 증가시켰는데 이러한 결과는 이들 금속이온이 체내에서 활성산소라디칼과 동일하게 작용을 하였거나 또는 세포내 또다른 기전에 의한 것으로 해석된다. 계속되는 연구를 통해 SOD 이외의 효소, 즉 catalase나 glutathione peroxidase의 효소 활성도 측정 및 지질과산화의 산물인 MDA(malondialdehyde) 함량 등을 조사함으로써 금속이온에 의한 체내 항산화효소의 정확한 대사과정과 영향을 규명하고자 한다.

감사의 말

본 논문은 나주대학 학술연구비에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Harman, D. 1956. Aging. A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300
2. Hassan, H.M., and I. Fridovich. 1979. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 385-395
3. Brawn, K., and I. Fridovich. 1981. DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Arch. Biochem.* 206, 414-419
4. Inoue, S., and S. Kawanishi. 1987. Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res.* 47, 6522-6527
5. Kellogg, E.W., and I. Fridovich. 1976. Su-

- peroxide dismutase in the rat and mouse as a function of age and longevity. *J. Gerontol.* 31, 405-408
6. Lesko, S.A., R.J. Lorentzem, and P.P. Tso. 1980. Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. *Biochem.* 19, 3023-3028
 7. Misra, H.P. 1974. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J. Biol. Chem.* 249, 2151-2153
 8. Kappus, H. 1985. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem.* 35, 1-6
 9. Dizdaroglu, M. 1985. Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on γ -irradiation in aqueous solution. *Biochem.* 24, 4476-4481
 10. Touati, D. 1983. Cloning and mapping of the manganese superoxide dismutase gene(sodA) of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 155, 1078-1087
 11. Gregory, E.M., F.J. Yost, and I. Fridovich. 1973. Superoxide dismutases and oxygen toxicity of *Escherichia coli*: Intracellular localization and functions. *J. Bacteriol.* 115, 987-991
 12. Hassan, H.M., and C.S. Moody. 1984. Induction of the manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli* by nalidixic acid and iron chelators. *FEBS Lett.* 25, 233-236
 13. Moody, C.S., and H.M. Hassan. 1982. Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2856-2859
 14. Pugh, S.Y.R., and I. Fridovich. 1985. Induction of superoxide dismutases in *Escherichia coli* B by metal chelators. *J. Bacteriol.* 162, 196-202
 15. Tragester, M., and G. Uden. 1989. Role of cysteine residues and of metal ions in the regulatory functioning of Fnr, the transcriptional regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3, 593-599
 16. Iuchi, S., V. Chepuri, H.A. Fu, R.B. Gennis, and E.C.C. Lin. 1990. Requirement for terminal cytochromes in generation of the aerobic signal for the *arc* regulatory system in *Escherichia coli*: study utilizing deletions and *lac* fusions of *cyo* and *cyd*. *J. Bacteriol.* 172, 6020-6025
 17. Heinecke, J.W. 1988. Superoxide-mediated oxidation of low density lipoprotein by thiols. Oxy-radicals in molecular biology and pathology. ed. Cerutti, P.A., I. Fridovich, and J.M. McCord. pp. 443-457. Alan. R. Liss. Inc. New York
 18. Mead, J. 1972. Free radical mechanism of lipid damage and consequence for cellular membranes. *Free radicals in biology*, vol. 1. ed. Pryor, W.A. pp. 51-68. Academic Press. Now York
 19. Halliwell, B., and J.M.C. Gutteridge. 1984. *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press. Oxford
 20. Adelman, R., R.L. Saul, and B.N. Ames. 1988. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 27906-2708
 21. Fridovich, I. 1979a. Superoxide and superoxide dismutases. *Adv. Inorg. Biochem.* 1, 67-90
 22. Fridovich, I. 1979b. Oxygen free radicals and tissue damage. ed. Ciba Foundation. pp. 717-793. Ciba Foundation. New York
 23. Fridovich, I. 1986. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 58, 62-97
 24. Hewitt, J., and Morris. 1975. Superoxide dismutase in some obligately anaerobic bacteria. *FEBS Lett.* 50, 315-318
 25. 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. 1981. A new murine

- model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* 17, 183-194
26. Hosokawa, H., R. Kasai, K. Higuchi, S. Takeshita, K. Shimizu, H. Hamamoto, A. Honma, M. Irino, K. Toda, A. Matsumura, and M. Matsushita. 1984. Grading score system : a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse(SAM). *Mech. Ageing Dev.* 26, 91-102
 27. Matsushita, M., T. Tsuboyama, R. Kasai, H. Okumura, T. Yamamuro, K. Higuchi, A. Kohno, T. Yonezu, A. Utani, M. Umezawa, and T. Takeda. 1986. Age-related changes in bone mass in the senescence-accelerated mouse(SAM) SAM-R/3 and SAM-P/6 as new model for senile osteoporosis. *Am. J. Pathol.* 125, 276-283
 28. Miyamoto, M., Y. Kiyota, N. Yamazaki, A. Nagaoka, T. Matsuo, Y. Nagawa, and T. Takeda. 1986. Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse(SAM). *Physiol. Behav.* 38, 399-406
 29. Finley, J.W., and C.D. Davis. 1999. Manganese deficiency and toxicity: are high or low dietary amounts of manganese cause for concern? *Biofactors.* 10, 15-24
 30. Nielsen, H. 1981. *Lipids.* 16, 215-222
 31. Beauchamp, C., and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase : Improved assays and applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-287
 32. Kim, Y.G. 1990. Superoxide dismutase : Gene replacement studies. Ph. D. dissertation. pp. 1-58. University of New Mexico. USA
 33. Mann, T., and D. Keilin. 1939. Haemocuprein and heterocuprei, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc. R. Soc. London. Ser. 128,* 303-315
 34. McCord, J.M., and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase - an enzymatic function for erythrocuprein(hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049
 35. Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutases. *J. Biol. Chem.* 264, 7761-7764
 36. Fridovich, I. 1974. Superoxide dismutases. *Advances in enzymology.* Meister, A. John Wiley and Sons, Inc. New York. 41, 35-97
 37. Steinman, H.M. 1987. Bacteriocuprein superoxide dismutase of *Photobacterium leiognathi*. *J. Biol. Chem.* 262, 1882-1887
 38. Saud I., Dashti, T. Martha, S. Mustafa, Mameesh. 1995. Effects of copper deficiency and Cu complexes on superoxide dismutase in rats. *Nutrition.* 11, 564-567
 39. Kuratko, C.N. 1999. Iron increases manganese superoxide dismutase activity in intestinal epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 104, 151-158
 40. Fisher, C.W., and S.E. Martin. 1999. Effects of iron and selenium on the production of catalase, superoxide dismutase, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes*. *J. Food. Prot.* 62, 1206-1209
 41. Hussain, S., and S.F. Ali. 1999. Manganese scavenges superoxide and hydroxyl radicals: an *in vitro* study in rats. *Neurosci. Lett.* 261, 21-24
 42. Tsebrzhinskii, O.I. 1998. Antioxidant status in manganese poisoning. *WMJ.* 70, 79-84