

알루미늄을 투여한 흰쥐의 해마와 대뇌피질에서 Reactive Oxygen Species 생성으로 인한 생체거대분자의 산화적 손상

문철진¹ · 고희철² · 신인철² · 이은희¹ · 문해란¹

¹의료법인 녹십자의료재단, ²한양대학교 의과대학 약리학교실

The Effects of Oxidative Stress Induced by Aluminum on Cellular Macromolecules in the Hippocampus and Cerebral Cortex of Rats

Chul-Jin Moon¹, Hyun-Chul Koh², In-Chul Shin², Eun-Hee Lee¹ and Hae-Ran Moon¹

¹Green Cross Reference Laboratory, Seoul 135-260

²Department of Pharmacology, College of Medicine, Hanyang University, 133-791, Korea

Received May 18, 2004; Accepted July 29, 2004

ABSTRACT. This work aimed to study the effectiveness of cellular oxidative parameter (malondialdehyde, protein carbonyl, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine). The experimental groups were aluminum treated rats and control rats. Aluminum treated rats were given intraperitoneally aluminum nitrate nonahydrate (Al^{3+} , 0.2 mmol/kg) daily for 30 days except Sunday. Control rats were injected 1 ml of saline. After the dose, rats were decapitated and hippocampus and cerebral cortex were removed. The measured parameters were tissue malondialdehyde (MDA, index of lipid peroxidation), protein carbonyl (index of protein oxidation), 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8-OHdG, index of DNA oxidation), reduced glutathione (GSH) levels as well as glutathione reductase (GR) and catalase. Al concentrations in the tissues were also measured. All results were corrected by tissue protein levels. The results were as followed; 1. The concentrations of Al in the cortex and hippocampus were significantly higher in the Al-treated rats than in the control rats. 2. Antioxidative enzyme's activity, catalase and GR, were significantly higher in the Al-treated rats than the control rats. GSH levels were also higher in the Al-treated rats. 3. MDA, protein carbonyl, and 8-OHdG concentration of Al-treated rats were significantly higher than those of control rats. 4. The concentrations of antioxidants, and oxidative stress parameter were correlated with the concentrations of Al in hippocampus and cerebral cortex. Catalase and GR activity were also correlated with the concentration of Al. Based on these results, it can be suggested that intraperitoneally injected Al was accumulated in the brain and induced the increase of antioxidant levels and antioxidative enzyme activity. Also, the oxidative products of cellular macromolecules are significantly related to tissue Al concentration. Therefore MDA, protein carbonyl, and 8-OHdG are useful markers for oxidative stress on cellular macromolecules.

Keywords: Aluminum, 8-OHdG, Malondialdehyde (MDA), Protein carbonyl, Oxidative stress.

서 론

과거 중금속 노출은 광산, 제련산업 근로자들만의 문제

Correspondence to: Chul-Jin Moon, Green Cross Reference Laboratory, Seoul 135-260, Korea
E-mail: kevin31@dreamwiz.com

Abbreviations list: Al, aluminum; ROS, Reactive oxygen species; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine; GR, Glutathion reductase; GSH, Glutathione; MDA, Malondialdehyde; TBA, Thiobarbituric acid

로 여겨졌으나, 중금속 독성원인에 대한 지식이 확대되면서 음식, 식수 및 공기 등의 환경오염으로 인한 사회전체로의 문제로 인식되게 되었다. 알루미늄은 환경에서 세 번째로 풍부한 중금속으로서 기구의 제조 및 의치의 기초에 사용된다. 알루미늄 화합물은 제산제와 수렴제로 사용되는 등 폭넓은 용도로 인하여 폭넓게 사람들에게 지속적으로 노출되고 있으며, 이에 알루미늄의 독성에 대한 연구가 보고되어 왔다(El-Maraghy *et al.*, 2001).

알루미늄의 신경독성기전은 명확하게 밝혀져 있지 않음

나 알루미늄과 운동신경세포손상의 연관성이 보고된 바 있다(Goyer *et al.*, 1995). 이외에도 알루미늄이 위장관독성, 간독성 및 골질환을 유발시킬 수 있을 뿐만 아니라, 조직내 알루미늄의 농도와 신경독성과의 관련성을 통하여 신경병증과도 관계가 있음이 보고되고 있다(Gupta and Shukla, 1995; Flaten *et al.*, 1996). 임상에서도 만성 신부전증 환자의 혈액투석으로 인한 투석성 뇌증(Alfrey *et al.*, 1976; Yokel *et al.*, 1996), 이신경외과(otoneurosurgery)에서 알루미늄이 함유된 bone cement에 의한 뇌병증 등이 보고된 바 있다(Renard *et al.*, 1994). 알츠하이머병(Markesberry, 1997)이나 근위축성 측삭경화증(Rosen *et al.*, 1993), 파킨슨병(Connor and Fine, 1986) 같은 퇴행성 신경병과 관련된 산화적 손상기전을 바탕으로 한 병인학적 접근도 있었으나(Garruto, 1991; Good *et al.*, 1992; McLachlan, 1995), 뇌조직의 알루미늄 농도증가에도 불구하고, 증가된 지질과산화반응이 관찰되지 않은 경우도 있었고(Golub, 1992; El-Maraghy, 2001), 알츠하이머병과 알루미늄의 관련성에 대한 이견도 있었다(Deloncle and Guillad, 1990; Landsberg *et al.*, 1992).

알루미늄의 신경독성기전에 관한 가설의 하나가 산화적 손상이다(Fulton and Jeffry, 1994). 알루미늄은 리포솜의 응집과 융합 및 세포막의 투과도 등에 영향을 미치며, 이러한 효과들은 세포막지질의 산화적 손상과 알루미늄 간에 양의 상관관계가 있다(Verstraeten *et al.*, 1995). 산화적 손상을 평가하기 위하여 ROS를 직접 정량하는 연구도 있었으나 불안정한 성질과 낮은 농도, 그리고 까다로운 실험조건 등으로 인하여 효과적이지 못하였다(Keilin, 1966; Janzen, 1980; Sies, 1986). 발생된 ROS는 짝지워지지 않은 전자쌍을 채우기 위하여 연쇄적으로 주변 분자와 반응을 하게 되며(Floyd, 1990) 세포내 거대분자도 그 대상이 된다.

ROS에 의한 세포의 산화적 손상은 크게 세 가지 관점에서 논의되어 왔다. 첫째는, 단백질의 thiol 그룹의 산화로 인한 투과막 대사산물과 이온 수송과 같은 효소 기능 상실, 둘째 다불포화지방산과 콜레스테롤의 과산화물 형성으로 인한 막의 투과성 성질의 변화, 셋째 핵산의 산화적 분리로 인한 돌연변이와 발암 등이다. 이들 세포내 거대분자의 산화적 손상을 평가하기 위한 표지물질로서 지질의 과산화물인 4-hydroxynonenal과 MDA, 단백질의 산화반응물인 산화된 LDL과 protein carbonyl 및 산화되어 불활성화된 glutamine synthetase, 핵산의 산화물인 8-OHdG, 8-hydroxyguanine 및 thymine glycol(Floyd *et al.*, 1986; Steinbrecher *et al.*, 1989; Oliver *et al.*, 1990) 등이 주로 분석되어 왔다.

기존의 알루미늄의 세포독성에 대한 대부분의 연구는 지질과산화 반응물과 항산화효소의 활성도 측정 및 항산

화제의 정량 등이 대부분이었으며, 지질을 제외한 단백질과 DNA의 산화적 손상 평가는 없었다.

뇌에서 알루미늄이 특이적으로 축적되는 부위는 선조체(striatum), 해마 및 대뇌피질로 알려져 있으며(Deloncle *et al.*, 1999), 특히 알루미늄에 의한 뇌병증의 특이적 병변으로 해마와 대뇌피질의 피라미트세포(pyramidal neuron)의 퇴화가 나타난다고 보고된 바 있다(Weinstock, 1995). 이에 본 연구는 해마와 대뇌피질에서 알루미늄에 의한 생체내 거대분자의 산화적 손상여부를 판단하기 위하여 기존의 지표 중 catalase와 GR의 활성도, GSH의 농도, MDA의 농도를 측정하였고, 새로운 지표로서 protein carbonyl, 8-OHdG의 정량평가를 시도하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험동물. 실험동물로서 생후 6주, 체중 200~250 g 내외의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였으며, 무작위로 7마리씩 대조군과 실험군으로 나누었다. 한 달 동안 유지시킨 사육실의 온도는 25°C였고, 흰쥐에게 제공된 사료와 물은 제한을 두지 않았다. 한 달 뒤 실험동물의 체중은 240~300 g으로 증가하였으며, 특이한 임상적 증상 및 행동의 변화는 관찰되지 않았다.

알루미늄 투여. Aluminum nitrate nonahydrate(Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 생리식염수에 녹여 사용하였고, 투여용량은 0.2 mmol/kg이었다. 알루미늄 처리군에서는 aluminum nitrate nonahydrate를 실험동물의 체중에 따라 부피를 조절하면서 복강내 주사하였고, 대조군에서는 생리식염수만을 1 ml씩 주사하였다. 알루미늄 투여기간은 1개월이었다.

뇌조직의 처리. 흰쥐를 희생시키기 1일 전에 절식시켰으며, 절두하여 희생시킨 다음 뇌에서 해마와 대뇌피질을 분리하였다. 뇌조직을 1 mM deferoxamine mesylate가 함유된 sodium-potassium phosphate buffer(pH 7.0) 3 ml에 넣어 homogenizer(IKA-ULTRA-TURRAY, T25, Janke & Kunkel GmbH Co., Staufen, Germany)로 균질화하였다. 균질액은 ultrasonic cell disruptor(450, Branson, U.S.A.)를 이용하여 7 watt의 power로 20초간 초음파처리하였으며, 4°C, 20000 g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 시료로 사용하였다.

실험방법

조직내의 알루미늄 정량. 시료 200 µl를 매질개선제(0.2% Triton X-100, 0.14 % Mg(NO₃)₂) 800 µl와 섞은 다음 비불꽃원자흡수분광광도계(PE 4100, Perkin Elmer,

Norwalk, CT, U.S.A.)에 20 μ l를 주입하여 흡광도를 측정하였다.

조직내의 MDA 정량. 조직내 MDA의 농도는 LPO 586 kit(Oxis, U.S.A.)를 이용하여 정량하였다. 시료 200 μ l에 butylated hydroxy toluen(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 10 μ l를 섞어 인위적인 산화를 방지한 다음 TBA 시약 650 μ l와 농염산 150 μ l를 첨가하였다. 45°C 온수조에서 1시간 동안 반응시켜 TBA adduct를 생성시킨 후 4°C, 15000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻은 다음 분광광도계(8451, Agilent, U.S.A.)를 이용하여 586 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준액은 malondialdehyde bis(diethyl acetal) 24 μ l를 0.01 M 염산에 희석하여 20 μ M의 농도로 만들어 사용하였다.

조직내의 protein carbonyl 정량. 조직내 protein carbonyl의 농도는 Levine의 방법으로 정량하였다(Levine *et al.*, 1990): 시료 0.5 ml를 1.5 ml 용량의 원심분리튜브에 분주한 다음 20%(w/v) trichloroacetic acid를 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 11000 g에서 5분간 원심분리하여 상층액 제거한 후 0.5 ml의 10 mM 2,4-DNPH 용액을 넣고 1시간 동안 실온에 방치하여 유도체화 시켰다. 1 ml의 ethanol-ethyl acetate(1 : 1) 용액을 침전물에 첨가하고 10분간 실온에 방치한 다음 11000 g에서 3분간 원심분리하여 상층의 잔존 반응시약을 제거해주는 과정을 3회 반복하였다. 6 M guanidine 용액을 1 ml 첨가하고 37°C의 온수조에서 1시간 동안 방치하여 단백질 침전물을 용해시켰다. 11000 g에서 3분간 원심분리하여 용해되지 않은 물질을 분리한 뒤 380 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 몰 흡광계수 22,000 M⁻¹cm⁻¹를 이용하여 농도를 계산하였다.

조직내의 8-OHdG 정량. 조직내 8-OHdG를 추출하기 위하여 Gupta의 방법(Gupta, 1984)을 수정하여 이용하였고, 추출된 8-OHdG의 정량은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 시료 1 ml를 1.5 ml 용량의 원심분리튜브에 넣고 proteinase K 용해 buffer 270 μ l를 첨가한 다음, proteinase K를 30 μ l씩 분주하였다. 56°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 용액을 400 μ l씩 분주하고 교반시켰다. 14000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액 0.35 ml를 원심분리튜브에 옮긴 다음 ethanol 0.7 ml를 첨가하고 섞어주었다. 1시간 동안 -20°C의 냉동실에 방치한 다음 4°C, 14000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층을 제거하였다. 남은 침사물을 70%(v/v) ethanol 1 ml로 세정시킨 뒤 다시 원심분리하여 상층액을 제거시켰다. 얻어진 DNA 침전물을 20 mM sodium acetate buffer(pH 4.8) 0.2 ml로 녹인 다음 Nuclease P1 20 μ g을 첨가한 뒤 37°C 온수조에서 30분간 반응시켰다. 1 M Tris-HCl buffer

(pH 7.5)를 20 μ l 첨가한 다음 alkaline phosphatase를 첨가하고, 37°C 온수조에서 1시간 반응시켜 DNA를 분해시킨 뒤 50 μ l의 시료를 HPLC에 주입하여 분석하였다. 2-deoxyguanosine은 UV 검출기(2487 dual UVD, Waters, U.S.A.)를 이용하여 245 nm의 파장에서 검출하였고, 8-OHdG는 전기화학검출기(464 ECD, Waters, U.S.A.)를 이용하여 600 mV, 10 nA/V의 조건으로 검출하였다. 펌프는 binary pump(1525, Waters, U.S.A.)를 이용하였고, 시료주입은 자동시료주입기(717, Waters, U.S.A.)를 사용하였다. 이동상은 100 mM ammonium acetate(pH 5.0), 컬럼은 역상컬럼(Atlantis dC18(5 μ m, 4.6 \times 150 mm), Waters, U.S.A) 데이터 처리는 chromatography program(Breeze ver. 3.0, Waters, U.S.A.)을 사용하였다.

조직내의 catalase 활성도. 조직내 catalase 활성도 측정 방법은 다음과 같았다. 시료 0.2 ml를 시험관에 분주하고, 37°C의 온수조에서 1분간 방치한 다음, 50 mM, pH 7.0의 인산완충용액으로 만든 1 ml의 기질용액(65 mmol H₂O₂)을 첨가하였다. 37°C의 온수조에서 정확히 1분간 반응시킨 뒤 1 ml의 반응정지용액(32.4 mM ammonium molybdate)을 섞어주었다. 공시료는 기질용액 1 ml와 반응정지용액 1 ml를 섞은 뒤, 시료 0.2 ml를 첨가한 다음 37°C 온수조에서 2분간 방치하였다. 시료와 공시료는 분광광도계를 이용하여 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 계산식은 다음과 같았다.

Activity(kU/L)

$$= \frac{\text{sample blank} - \text{sample absorbance}}{\text{blank 1} - \text{blank 2}} \times 271$$

조직내의 GR 활성도. 조직의 GR의 활성도는 GR 340 kit(Oxis, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다. 0.2 ml의 시료를 cuvette에 넣고 0.4 ml의 NADPH 용액을 분주한 뒤 피펫을 이용하여 섞어주었다. 10초 간격으로 2분간 340 nm의 파장에서 흡광도를 측정한 뒤, 직선성이 좋은 두 구간을 선택하여 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다($\epsilon = 6.22 \times 10^3$).

$$\text{mU/mL} = (\Delta A_{340}/\text{min})/6.22 \times 10^3 \text{ ml/nmol}$$

조직내의 GSH 정량. 조직의 GSH 정량은 GSH-400 kit(Oxis, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다. 0.3 ml의 시료에 0.1 ml의 5%(w/v) metaphosphoric acid를 첨가하여 인위적인 산화를 방지시킨 뒤, 4°C, 3000 g에서 10분간 원심분리하여 상층을 분리하였다. 상층액 0.3 ml에 인산완충용액 0.6 ml를 분주하고 50 μ l의 4-chloro-1-methyl-7-trifluoromethyl-quinolinium methylsulafate 용액을 첨가하여 thioether를 형성시켰다. 30%(w/v) 수산

화나트륨 용액 50 μ l를 섞고, 25 \pm 3°C의 암실에서 10분간 반응시켜 thione을 얻은 뒤 분광광도계를 이용하여 400 nm의 파장에서 10초 간격으로 2분간 흡광도를 측정하였다. 계산식은 다음과 같았다($\epsilon = 0.0118$).

$$\text{mM} = \{(A - A_0)/0.0118\}$$

조직내의 단백질 정량. 조직의 단백질 정량은 Lowry의 방법을 이용하였으며(Lowry *et al.*, 1951), 각 실험변수의 값을 해당 시료의 단백질의 농도로 나누어 조직의 질량차이에 의한 오차를 보정하였다. 시료 0.1 ml에 2 N 수산화나트륨 용액 0.1 ml를 섞은 뒤, 끓는 물에서 10분간 반응시킨 다음 실온으로 식혔다. 1 ml의 complex-forming 시약(2%(w/v) Na_2CO_3 : 1%(w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 2%(w/v) sodium potassium tartrate = 100 : 1 : 1)을 섞고 실온에서 10분간 반응시킨 뒤, 0.1 ml의 folin 시약을 첨가하였다. 한시간 동안 실온에 방치한 다음 분광광도계를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준액으로는 0.3%(w/v) bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 희석하여 사용하였다.

통계분석

실험결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였고 실험변수간 평균비교는 Mann-Whitney test, 조직내 알루미늄과 각 실험변수간의 상관관계는 Spearman's rho test로 검정하였다. 유의수준은 0.05였으며 사용한 통계 프로그램은 SPSS 7.5였다.

결 과

조직내 알루미늄 농도

알루미늄 투여군의 대뇌피질내 알루미늄 농도는 6.54 \pm

0.46으로 대조군의 3.74 \pm 0.46 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 보다 유의하게 높았다. 해마내 알루미늄 농도는 실험군 14.90 \pm 1.33, 대조군 7.41 \pm 0.80 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Fig. 1).

항산화효소 활성도와 항산화제 농도

대뇌피질에서 catalase의 활성도는 대조군이 1.45 \pm 0.29, 실험군이 2.79 \pm 0.28 $\text{kU}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 이었고, 해마에서는 대조군이 0.87 \pm 0.19, 실험군이 1.66 \pm 0.34 $\text{kU}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 으로 모두 유의한 차이가 있었다(Fig. 2). GR의 활성도는 대뇌피질에서 대조군이 11.17 \pm 1.25, 실험군이 15.51 \pm 1.63 $\text{U}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 이었고, 해마에서는 대조군이 10.77 \pm 1.40, 실험군이 17.19 \pm 1.10 $\text{U}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Fig. 3). GSH의 농도는 대뇌피질에서 대조군이 2.87 \pm 0.05, 실험군이 3.09 \pm 0.06 $\text{mmol}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 이었고, 해마에서는 대조군이 4.68 \pm 0.19, 실험군이 6.03 \pm 0.33 $\text{mmol}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 으로 유의한 차이가 있었다(Fig. 4).

세포내 거대분자들의 산화적 손상

MDA는 대뇌피질에서 대조군 0.50 \pm 0.01, 실험군 0.62 \pm 0.04 $\mu\text{mol}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 이었고, 해마에서는 대조군 0.79 \pm 0.03, 실험군 0.97 \pm 0.06 $\mu\text{mol}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 으로 유의한 차이가 있었다(Fig. 5). 대뇌피질의 protein carbonyl 농도는 대조군이 0.57 \pm 0.01, 실험군이 0.70 \pm 0.04 $\mu\text{mol}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 이었고, 해마에서는 대조군이 0.76 \pm 0.03, 실험군이 0.92 \pm 0.07 $\mu\text{mol}/\text{mg}_{\text{protein}}$ 으로 차이가 유의하였다(Fig. 6). 8-OHdG의 대뇌피질 농도는 10⁶ dG당 대조군 1.00 \pm 0.13, 실험군 1.63 \pm 0.21이었고, 해마에서는 10⁶ dG당 대조군 1.17 \pm 0.12, 실험군 1.92 \pm 0.25로 유의한 차이가 있었다(Fig. 7).

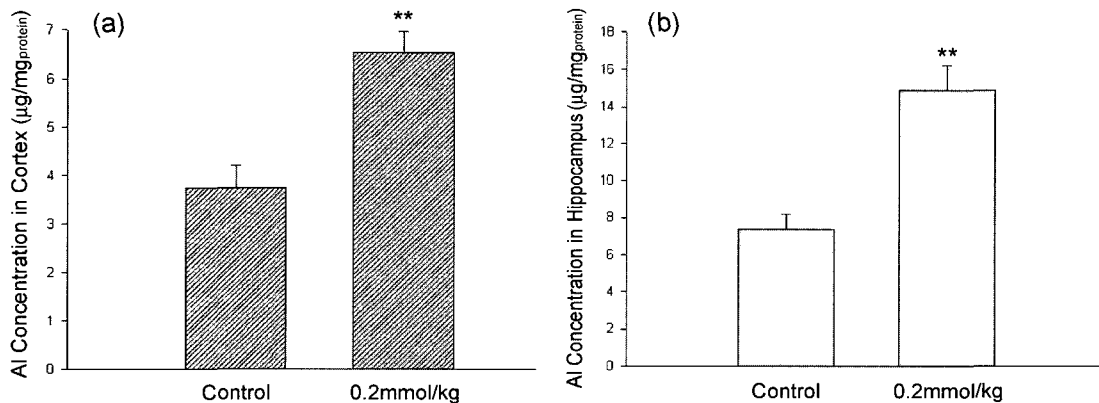


Fig. 1. Comparison of aluminum concentration between control and Al-treated rats. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus. Data are the mean \pm S.E. ** $p < 0.01$.

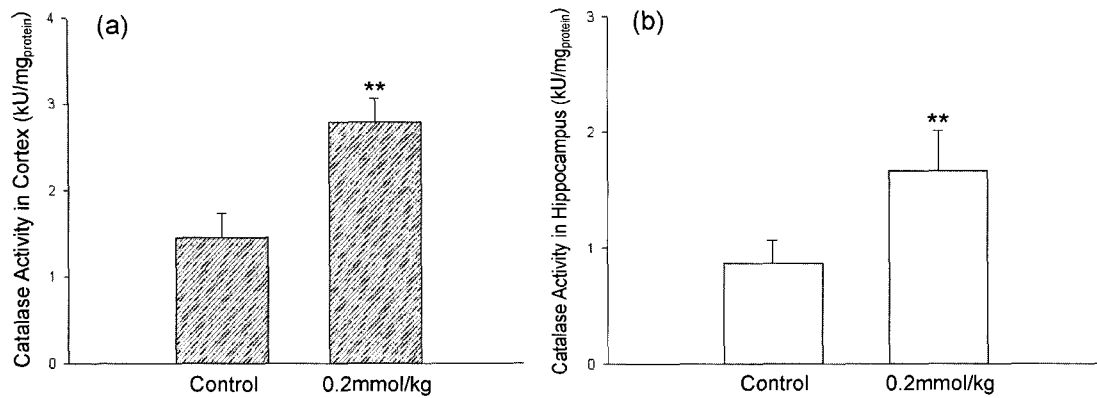


Fig. 2. Comparison of catalase activity between control and Al-treated rats. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus. Data are the mean \pm S.E. ** p <0.01.

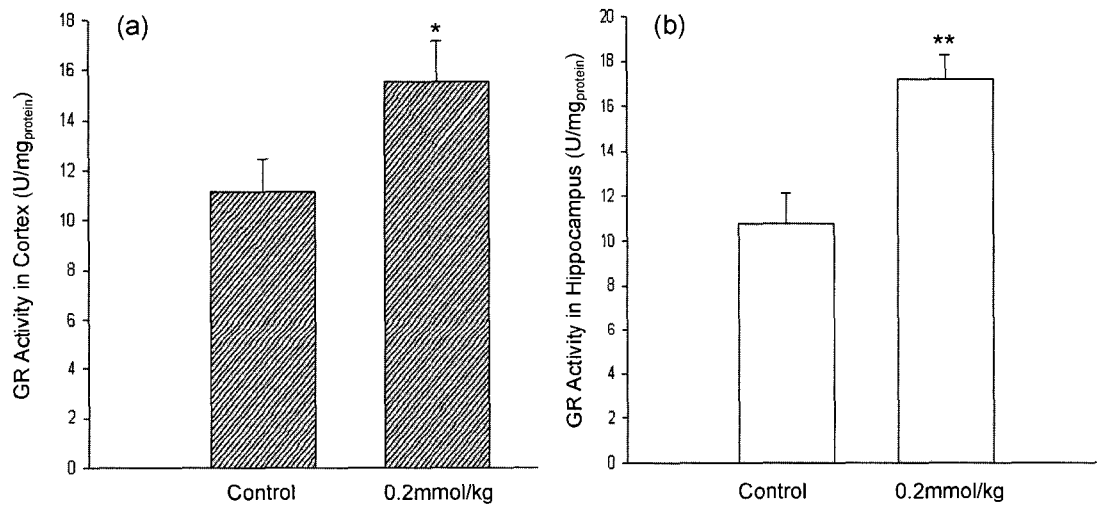


Fig. 3. Comparison of GR activity between control and Al-treated rats. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus. Data are the mean \pm S.E. * p <0.05, ** p <0.01.

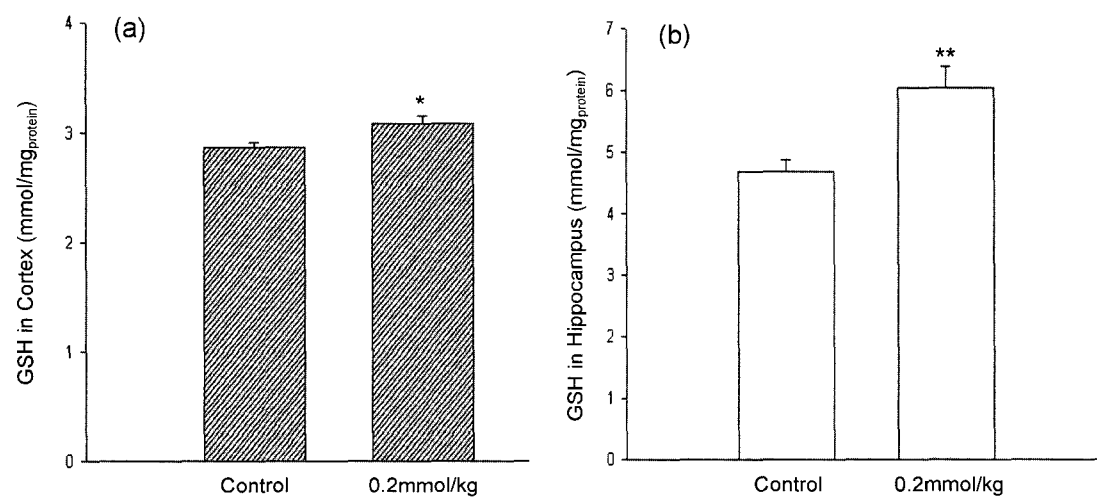


Fig. 4. Comparison of glutathione concentration between control and Al-treated rats. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus. Data are the mean \pm S.E. * p <0.05, ** p <0.01.

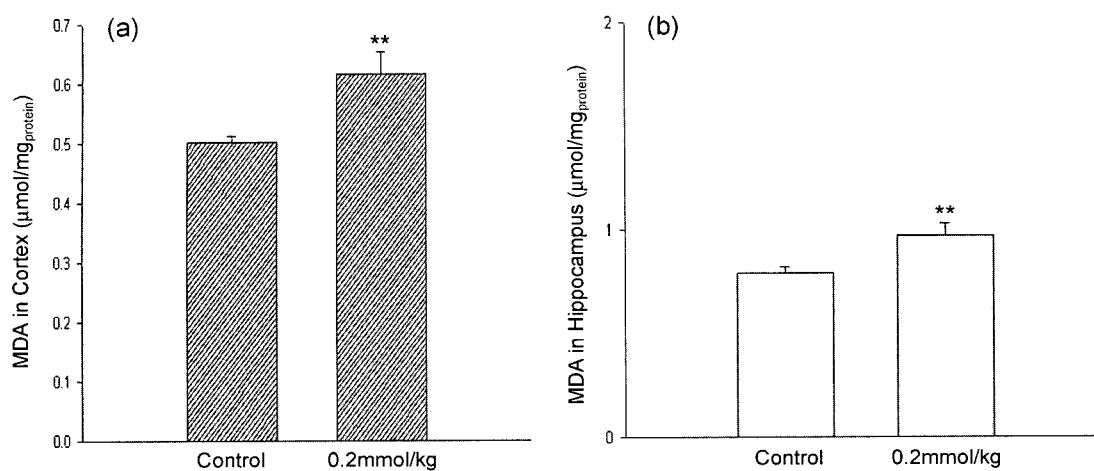


Fig. 5. Comparison of MDA concentration between control and AI-treated rats. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus. Data are the mean \pm S.E. ** $p < 0.01$.

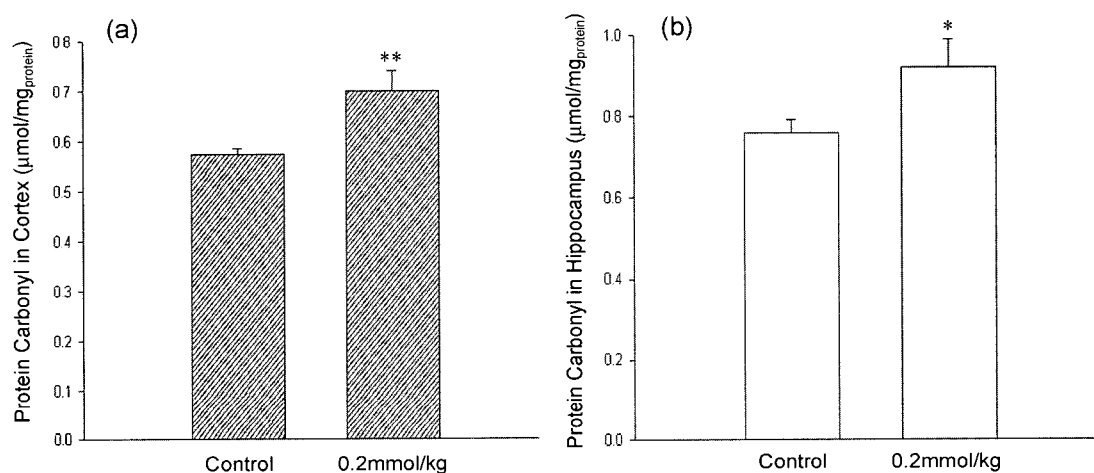


Fig. 6. Comparison of protein carbonyl concentration between control and AI-treated rats. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus. Data are the mean \pm S.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

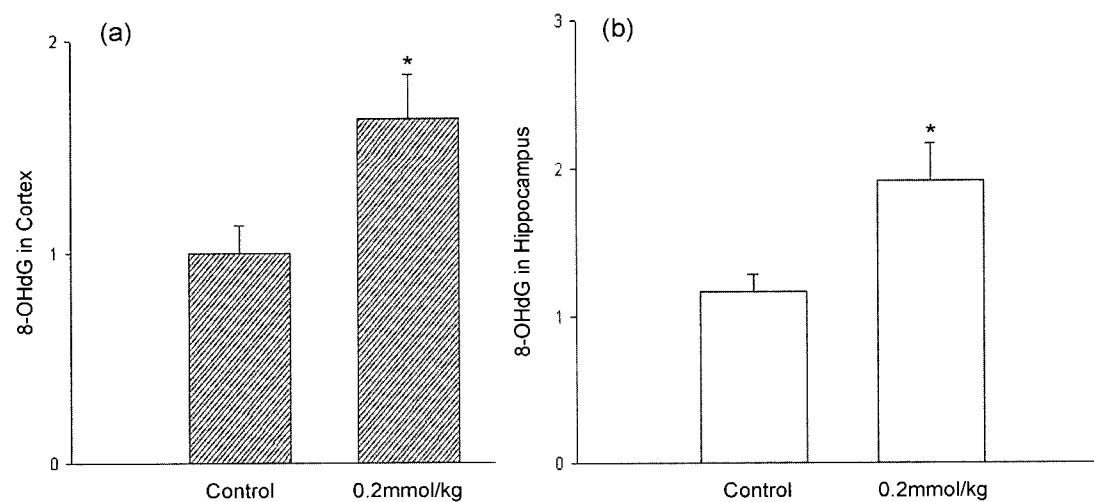


Fig. 7. Comparison of 8-OHdG concentration between control and AI-treated rats. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus. Data are the mean \pm S.E. * $p < 0.05$.

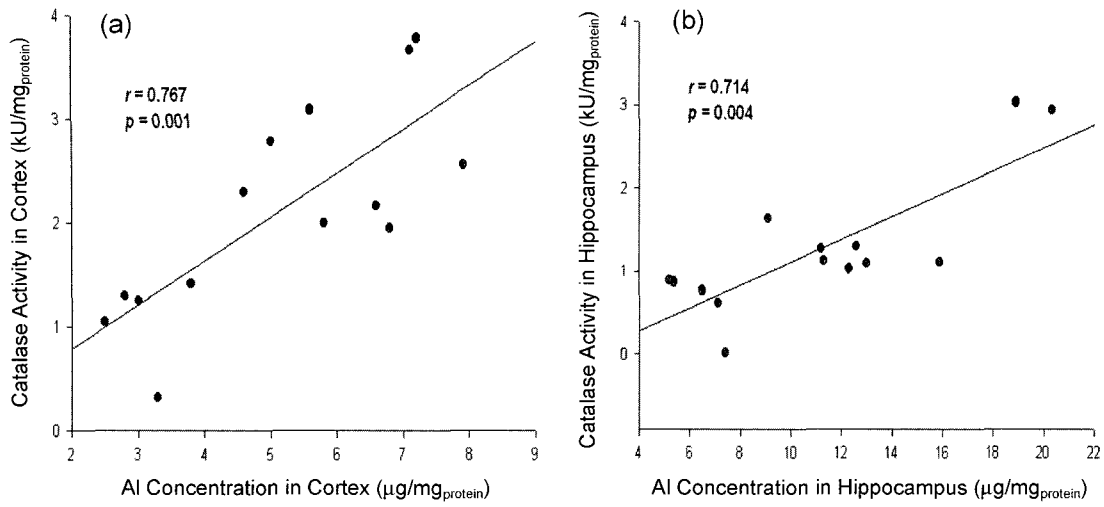


Fig. 8. Correlation between tissue aluminum and catalase activity. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus.

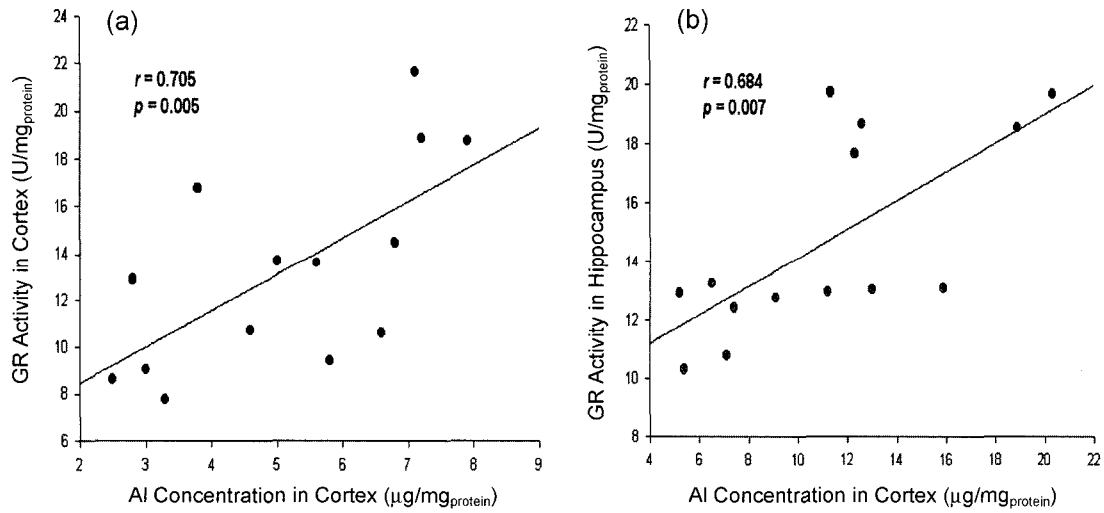


Fig. 9. Correlation between tissue aluminum and GR activity. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus.

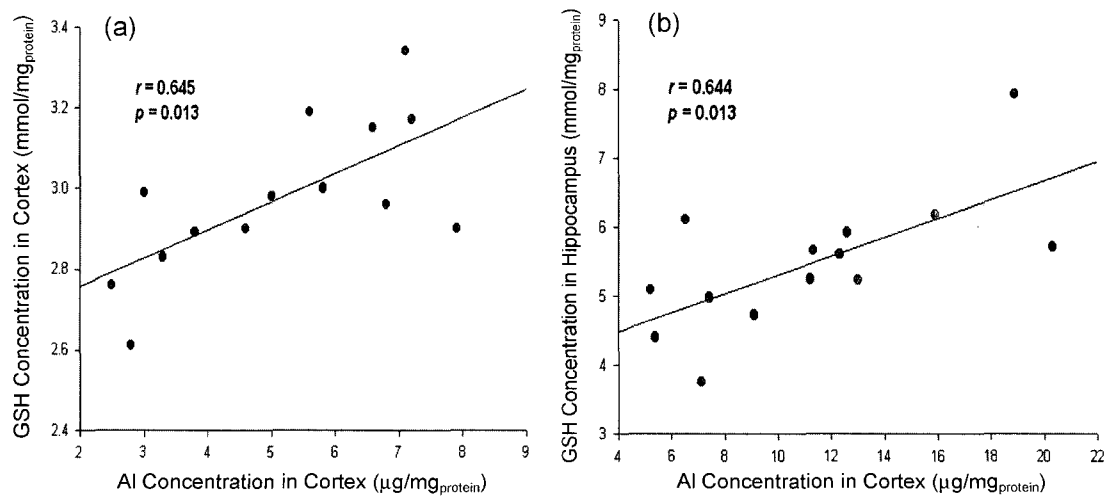


Fig. 10. Correlation between tissue aluminum and GSH. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus.

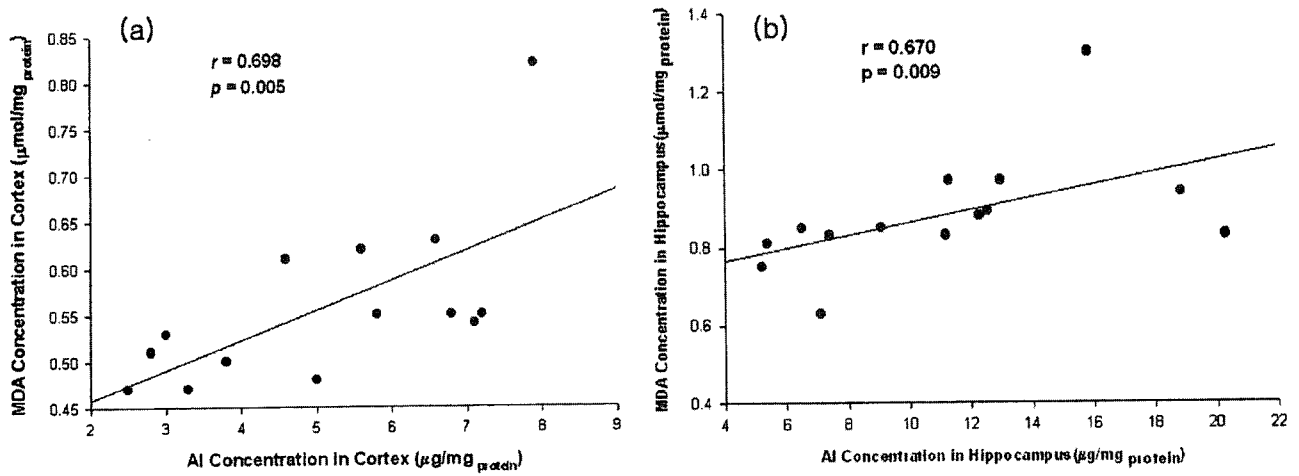


Fig. 11. Correlation between tissue aluminum and MDA. Panel (a) was cortex and panel (b) was hippocampus.

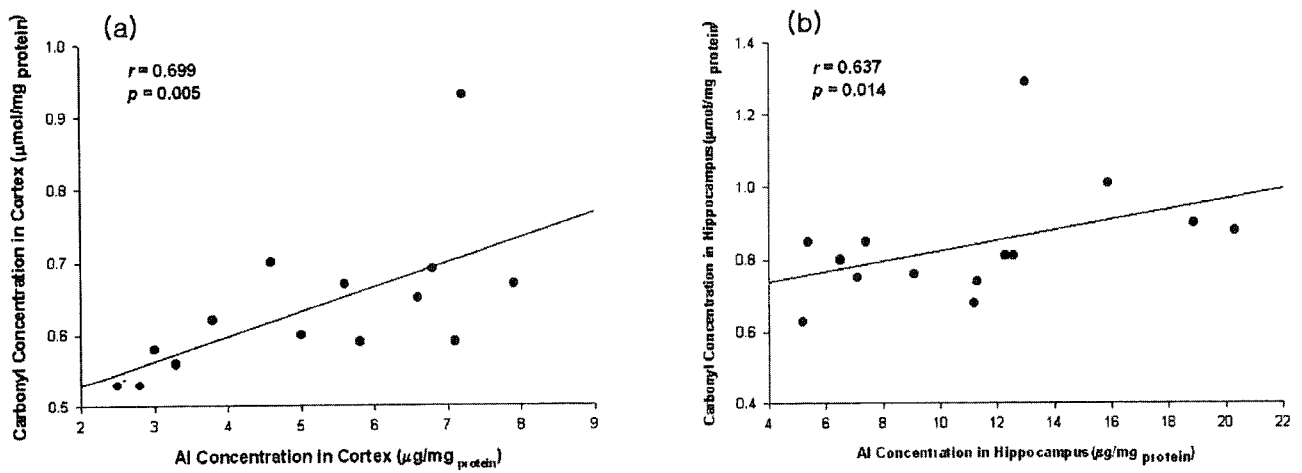


Fig. 12. Correlation between tissue aluminum and protein carbonyl. Panel (a) was cortex and panel (b) was hippocampus.

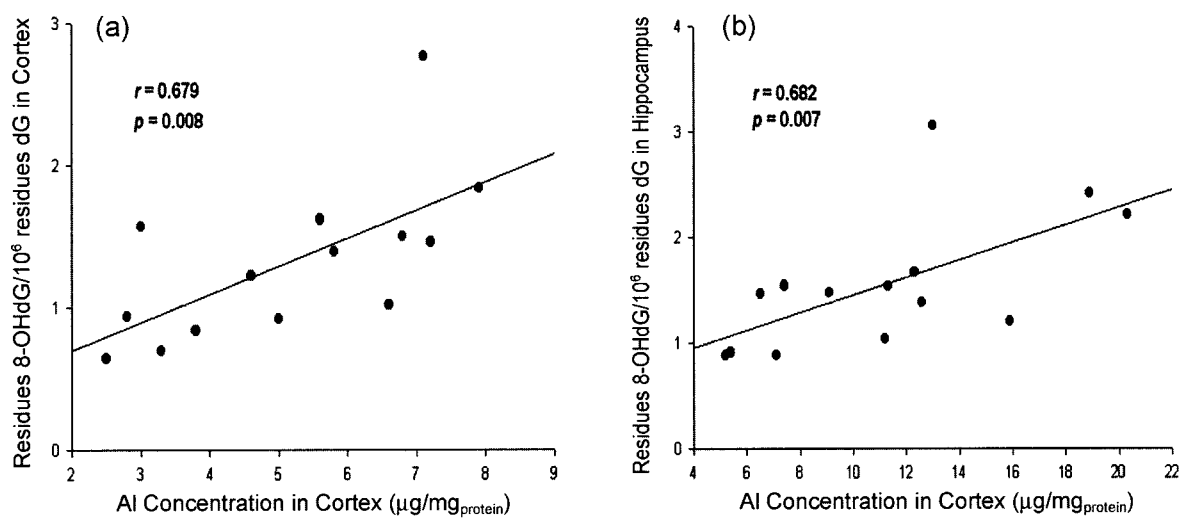


Fig. 13. Correlation between tissue aluminum and 8-OHdG. (a) cerebral cortex, (b) hippocampus.

조직내 알루미늄 농도와의 상관관계

조직중 알루미늄의 농도와 catalase 활성도간의 상관관계는 대뇌피질에서 0.767, 해마에서 0.714로 양의 상관관계가 있었으며, 통계적으로 유의하였다(Fig. 8). GR 활성도간의 상관계수는 대뇌피질이 0.705, 해마가 0.684였고(Fig. 9), GSH 농도간의 상관계수는 대뇌피질 0.645, 해마 0.644로 유의한 양의 상관관계가 있었다(Fig. 10). MDA와의 상관계수는 대뇌피질 0.698, 해마 0.670이었고(Fig. 11), protein carbonyl과의 상관계수는 대뇌피질 0.699, 해마 0.637(Fig. 12), 8-OHdG와의 상관관계는 대뇌피질 0.679, 해마 0.682로(Fig. 13) 양의 상관관계를 보였으며 통계적으로 유의하였다.

고찰

혈액속의 알루미늄은 ferritin에 결합되어 운반되며 철과 경쟁적이다. Transferrin-metal complex는 receptor-mediated endocytosis를 통해 조직 속으로 들어간다(Goyer *et al.*, 1995). 선초체에서 ferritin과 철의 양이 높다는 것은 알루미늄이 철처럼 ferritin과 결합하여 쉽게 뇌-혈관 장막(blood brain barrier)을 통과할 수 있음을 의미한다(Fleming and Joshi, 1997). 본 실험에서 해마와 대뇌피질에서 대조군보다 유의하게 높은 알루미늄 농도를 보였으므로, 복강내 주사한 알루미늄이 뇌조직으로 효과적으로 운반되었음을 알 수 있었다.

호기성세포는 항상 superoxide(O₂⁻)나 과산화수소(H₂O₂) 및 hydroxyl radical(OH·)과 같은 ROS에 노출되어 산화적 손상을 입고 있다. 산화적 손상에 대한 세포방어는 다양한 효소적, 비효소적 방법을 통하여 이루어지는데, 여기에는 catalase, glutathione peroxidase, glutathion reductase 및 superoxide dismutase 등의 항산화효소와, glutathione, tocopherol 및 ascorbic acid 등의 항산화제가 있다(Floyd, 1990). 발생한 ROS를 제거하기 위한 초기 방어기전은 항산화효소의 활성화와 항산화제, 그리고 철-결합단백질 등이다(Thomas *et al.*, 1990). 본 연구에서도 초기 방어효소인 catalase의 활성도가 대조군보다 증가하였다. 대뇌피질과 해마 모두 항산화제인 GSH의 농도가 증가되고, 산화된 GSH를 환원시키기 위한 GR의 활성도가 대조군보다 증가되었다. GSH는 세포내에서 풍부한 thiol기를 가지고 있는 tripeptide이며, 지질과산화의 초기에 형성된 alkyl 또는 lipoxyl 라디칼을 분해한다. 진전된 파킨슨병이나 알츠하이머병환자의 뇌조직에서는 GSH의 농도가 감소된 것으로 보고되어 있으나(Sian *et al.*, 1994), 운동으로 인한 산화적 손상시에는 혈장과 골격근에서의 GSH 농도는 높아지지만 간에서는 상당량이

감소되는 것으로 나타나 있다(Sies, 1986). 본 연구에서 산화적 손상이 예상되면서도 GSH의 농도가 증가한 것은 산화적 손상 초기에는 GSH의 소모가 있었으나 GR의 활성도가 증가하면서 oxidized GSH(GSSG)가 GSH로 환원되었으며, 지속적인 알루미늄의 투여로 유도된 자체적인 GSH 합성과 간으로부터의 GSH 공급이 농도를 증가시킨 것으로 사료된다.

알루미늄은 자체적인 redox 능력이 없으나, 세포막의 지질과 단백질에 대하여 Fe²⁺을 통해 개시되는 산화반응을 유발시킬 수 있으므로, 초기의 산화적 손상은 지질과 산화반응으로부터 유도된 것으로 보인다(Verstraeten *et al.*, 1998; Deloncle *et al.*, 1999). 본 연구의 실험결과 지질의 산화지표인 MDA의 농도가 대조군보다 유의하게 높았으므로, 지질외의 세포내 분자들에 대해서 효과적으로 산화반응이 유도되어진 것으로 생각된다.

Al³⁺은 음전하를 띤 인지질에 결합하여 acyl기의 유동성을 제한시키며, 그 결과 응집이 일어나 막의 물리적 성질이 변화하여 지질과산화반응이 유도되는 것으로 보고되었다(Verstraeten *et al.*, 1998). 지질과산화반응은 세포막의 구조적, 기능적 영향을 미치며, 세포병리학적 효과를 일으킨다(Girotti, 1985; Kappus, 1985). 불포화지방산에서 라디칼 연쇄반응이 민감하게 일어나는 이유는 triglyceride 또는 인지질내 acyl 그룹의 두 개의 이중결합 사이에 놓여 있는 메틸렌 그룹(-CH₂-)으로부터 탄소중심라디칼(-CH·)이 쉽게 발생되기 때문이다. 지질은 ROS에 의하여 불포화지방산의 이중결합이 재배치되고, 그 결과 막지질의 분해를 초래하게 되며, 산물로서 alcohol과 MDA, 4-hydroxyalkenal과 같은 ketone류를 발생시킨다. MDA는 단백질의 제 1차 아미노 그룹과 격렬하게 반응할 수 있기 때문에 세포막에 결합된 효소의 활성도를 떨어뜨리거나 지질층의 단단한 견고성을 증가시킨다. 지질의 유동성 변화는 지질층의 비대칭 구조의 역할에 영향을 줄 수 있고, 막단백질의 횡적 확산을 방해한다. 또한 세포막의 변형으로 세포 내의 이온의 세기, 휴지전위의 변화 및 수분의 손실을 초래하여 세포의 기능성 마비와 세포사멸로 발전될 수 있다(Halliwell and Gutteridge, 1998).

ROS에 대하여 민감하게 산화반응이 일어나는 아미노산은 histidine, proline, tryptophan, cysteine 및 tyrosine 등이며, arginine, lysine 및 methionine 등은 비교적 덜 민감하다. 단백질의 ROS에 의한 손상은 carbonyl 잔기가 아미노산들과의 산화로 형성되거나, 단백질이 4-hydroxynonenal과 같은 지질과산화반응물과 공유결합을 만드는 과정을 통해 일어난다(Uchida and Stadtmand, 1992). 폴리펩타이드의 1차 구조 내에서 ROS와의 반응은 단백질의 풀림을 포함한 구조적 변형을 유발하여 특수 리간드

나 수용기와의 결합에 변화를 초래하거나 단백질의 가수 분해 확률을 커지게 만든다. 또한 70 kD 열 쇼크 단백질과 함께 변성된 단백질의 안정적인 상호작용을 위해 스트레스 단백질의 합성이 유도되어 진다. 산화된 단백질 내에서 가장 흔한 화학적 변형은 carbonyl 그룹의 출현이기 때문에 여러 생리적인 조건 속에서 ROS에 의해 생긴 손상을 측정하기 위해 carbonyl 그룹을 가진 단백질을 정량하는 것이 효과적이다(Halliwell and Gutteridge, 1998). 본 연구에서 대조군보다 증가한 protein carbonyl의 농도로 미루어 지질의 과산화로 발생한 4-hydroxyalkenal과의 공유결합이 증가했을 것으로 여겨진다.

ROS가 매개하는 반응은 DNA의 결실, 염기쌍 변이 및 염기배열 등의 구조적 변화를 일으킬 수 있고, 내재적인 손상으로는 oxidation, methylation, depurination 및 deamination 등을 발생시킨다(Ames, 1989). DNA의 산화적 손상의 지표물질인 8-OHdG은 DNA의 guanine 염기가 8-hydroxylation 후 효소에 의해 잘려진 산물이다(Chung *et al.*, 1991). Guanine 염기가 8-OHdG로 변화를 일으키면 염기특이성을 가지고 있는 glycosylase가 이를 잘라내게 되는데, 잘려지지 않은 8-OHdG의 존재는 DNA 복제시 GC쌍을 GG나 AT로 치환을 일으키게 하는 요인이 된다(Kamiya, 1995). 복구되지 않은 DNA는 정상 세포기능을 저하시키고, 암이나 알츠하이머와 같은 연령 의존적인 퇴행성 질병을 유발하게 된다(Fraga *et al.*, 1990). 산화적 손상을 입은 알츠하이머 환자의 CSF에서 DNA 상에 남아있는 8-OHdG의 양은 증가되나, 유리된 8-OHdG의 양은 감소된다는 보고가 있었다(Lovell *et al.*, 1999). 본 연구에서 정량한 8-OHdG는 유리된 8-OHdG와 DNA를 분해하여 분리시킨 DNA상의 8-OHdG의 합이었다. 대조군보다 증가된 8-OHdG의 농도는 DNA 염기쌍에 알루미늄으로 유도된 ROS에 의한 산화적 손상이 있었음을 의미한다.

각 개체마다의 조직내 알루미늄 농도가 알루미늄으로 유도된 산화적 손상지표의 농도와 상관성이 있는지 알아보기 위하여 대조군과 실험군을 합하여 상관관계를 분석하였다. 해마와 대뇌피질에서 알루미늄과 모든 산화적 손상지표간에 양의 상관관계가 있었으며, 이로 미루어 알루미늄의 농도증가는 산화적 손상을 양적으로 증가시킨다고 여겨진다. 일부 연구에서는 생리적인 철의 농도가 유지될 때, 알루미늄은 오히려 항산화제의 역할을 하고, 고농도로 존재할 때 알루미늄이 prooxidant의 효과를 나타낸다는 결과를 보였다(El-Maraghy *et al.*, 2001). 알루미늄의 항산화효과는 생체막에 잘 결합하는 성질로 인하여, 생체막에 이미 결합되어 있던 철을 대체함으로써 철이 촉매하는 산화반응을 억제한다는 데 기인한다. 그러나 알루미늄의

투여경로가 구강이거나, 주입농도가 0.1 mmol/kg 정도였기 때문에 산화적 손상을 입히기에 충분한 농도가 축적되지 못했던 것으로 생각된다. 또한 사용했던 알루미늄 염의 종류가 달랐던 것도 알루미늄의 흡수에 영향을 준 요인으로 여겨진다.

결과를 종합하면, 첫째, 복강주사한 알루미늄은 뇌-혈관 장막을 통과하여 해마와 대뇌피질에 효과적으로 축적되었고, 둘째, 조직에 축적된 알루미늄은 ROS 발생의 원인이 되어, 이에 따른 항산화기전의 활성화뿐만 아니라 생체내 거대분자의 산화적 손상을 유도하여 지질의 산화지표인 MDA, 단백질의 산화지표인 protein carbonyl 및 DNA의 산화지표인 8-OHdG 농도를 증가시켰다. 셋째, 조직에 축적된 알루미늄의 농도와 산화적 손상에 관련된 인자들간에 나타난 양의 상관관계는 조직내 알루미늄의 농도가 높을수록 산화적 손상도 증가된다는 것을 의미하였다. 이상의 결과로 생체에 흡수된 알루미늄으로 유도되어진 생체내 거대분자의 산화적 손상 측정에 MDA, protein carbonyl 및 8-OHdG가 유효한 것으로 사료된다.

참고문헌

- Alfrey, A.C., Legendre, G.R. and Kaehny, W.D. (1976): The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *New Engl. J. Med.*, **294**, 184-188.
- Ames, B.N. (1989): Endogeneous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radical Res. Commun.*, **7**, 121-128.
- Chung, M.H., Kim, H.S., Ohtsuka, E., Kasai, H., Yamamoto, F. and Nishimura, S. (1991): An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 1472-1478.
- Connor, J.R. and Fine, R.E. (1986): The distribution of transferrin immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res.*, **368**, 319-328.
- Deloncle, R. and Guillard, O. (1990): Mechanism of Alzheimer's disease: arguments for a neurotransmitter-aluminum complex implication. *Neurochem. Res.*, **15**, 1239-1245.
- Deloncle, R., Huguet, F., Babin, P., Fernandez, B., Quillard, N. and Guillard, O. (1999): Chronic administration of aluminum L-glutamate in young mature rats: effects in iron levels and lipid peroxidation in selected brain areas. *Toxicology Letters*, **10**, 65-73.
- El-Maraghy, S.A., Gad, M.Z., Fahim, A.T. and Hamdy, M.A. (2001): Effect of cadmium and aluminum intake in the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *J. Biochem. Molecular Toxicology*, **15**, 207-214.
- Flaten, T.P., Alfrey, A.C., Birchall, J.D., Savory, J. and Yokel, R.A. (1996): Status and future concerns of clinical and environmental aluminum toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, **48**, 527-541.
- Fleming, J. and Joshi, J.G. (1997): Ferritin: isolation of aluminum-ferritin complex from brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA, **84**, 7866-7870.
- Floyd, R.A. (1990): Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB*, **4**, 2587-2597.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Harris, J., West, M. and Wong, P.K. (1986): Formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**, 841-846.
- Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P. and Ames, B.N. (1990): Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4533-4537.
- Fulton, B. and Jeffry, E.H. (1994): The temporal relationship between hepatic glutathione loss, heme oxygenase induction and cytochrome P-450 loss following intraperitoneal aluminum administration to mice. *Toxicol. App. Pharmacol.*, **127**, 291-297.
- Garruto, R.M. (1991): Pacific paradigms of environmentally-induced neurological disorders: clinical, epidemiological, and molecular perspectives. *Neurotoxicology*, **12**, 347-378.
- Girotti, A.W. (1985): Mechanism of lipid peroxidation. *J. Free Rad. Biol. Med.*, **1**, 87-95.
- Golub, M.S., Han, B., Keen, C.L. and Gershwin, M.E. (1992): Effect of dietary aluminum excess and manganese deficiency on neurobehavioral endpoints in adult mice. *Toxicol. App. Pharmacol.*, **112**, 154-160.
- Good, P.F., Olanow, C.W. and Perl, D.P. (1992): Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res.*, **593**, 343-346.
- Goyer, R.A., Klaassen, C.D. and Waalkes, M.P. (1995): Metal Toxicology. *Academic Press*, London, pp. 199-235.
- Gupta, R.C. (1984): Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetyl-aminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6943-6947.
- Gupta, A. and Shukla, G.S. (1995): Effect of chronic aluminum exposure in the levels of conjugated dienes and enzymatic antioxidants in hippocampus and whole brain of rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **55**, 716-722.
- Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C. (1998): Oxidative stress: adaptation, damage, repair, and death. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford university press, New York, pp. 246-350.
- Janzen, E.G. (1980): A critical review of spin trapping in biological systems. In *Free radicals in Biology*, Academic press, New York, pp. 115-154.
- Kappus, H. (1985): *in Oxidative stress*. Academic press, New York, pp. 273-310.
- Kamiya, H., Murata-Kamiya, N., Fujimuro, M. and Kido, K. (1995): Comparison of incorporation and extension of nucleotides *in vitro* opposite 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene. *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 270-276.
- Keilin, D. (1966): *In the history of cell respiration and cytochrome*. Cambridge University Press, London, pp. 132.
- Landsberg, J.P., Mc Donald, B. and Watt, F. (1992): Absence of aluminum in neuritic plaque cores in Alzheimer's disease. *Nature*, **360**, 65-68.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, J., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. and Stadtman, E.R. (1990): Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **186**, 464-478.
- Lovell, M.A., Gabbita, S.P. and Markesbery, W.R. (1999): Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J. Neurochem.*, **72**, 771-776.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Markesbery, W.R. (1997): Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad. Biol. Med.*, **23**, 134-147.
- McLachlan, D.R.C. (1995): Aluminum and the risk for Alzheimer's disease. *Environmetrics*, **6**, 233-275.
- Oliver, C.N., Stark-Reed, P., Stadtman, E.R., Liu, G.L., Carney, J.M. and Floyd, R.A. (1990): Ischemia/reperfusion induced oxidative damage to proteins in gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5144-5147.
- Renard, J.L., Felton, D. and Bequet, D. (1994): Post-otoneurosurgery aluminum encephalopathy. *Lancet*, **344**, 63-64.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Figlewicz, D.A. and Sapp, P. (1993): Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **362**, 59-62.
- Sian J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1994): Alteration in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.*, **36**, 348-355.
- Sies, H. (1986): Oxidative stress: introductory remarks. *In Oxidative stress*, Academic. Orlando, Florida. pp. 1-8.
- Steinbrecher, U.P., Loughheed, M., Kwan, W.-C. and Dirks, M. (1989): Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoproteins B by products of fatty acid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, **264**, 15216-15223.
- Thomas, J.P., Maiorino, M., Ursini, F. and Girotti, A.W. (1990): Protective action of phospholipid hydroxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, **265**, 454-461.
- Uchida, K. and Stadtman, E.R. (1992): Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4544-4548.
- Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S. and Oteiza, P.I. (1995): Sc³⁺, Ga³⁺, In³⁺, Y³⁺, and Be³⁺ promote changes in membrane physical properties and facilitate Fe²⁺-initiated lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 284-290.
- Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Golub, M.S. and Oteiza, P.I. (1998): Membrane composition can influence the rate of Al³⁺-mediated lipid oxidation: effect of galactolipids. *Biochem. J.*, **333**, 833-838.
- Weinstock, M. (1995): The pharmacotherapy of Alzheimer's disease based on the cholinergic hypothesis: an uptake. *Neurodegeneration*, **4**, 349-356.
- Yokel, R.A., Ackrill, P. and Burgess, E. (1996): Prevention and treatment of aluminum toxicity including chelation therapy: status and research needs. *J. Toxicol. Environ. Health*, **48**, 667-683.