

유청단백질 및 *Lactobacillus* spp. 추출물이 전립선 세포 내 항산화 활성에 미치는 영향

변정열 · 윤영호

중앙대학교 산업과학대학 동물자원학과

Effect of Whey Protein Isolate and *Lactobacillus* spp. Cell Extracts on Intracellular Antioxidative Activities in Human Prostate Epithelial Cells

J. R. Byun and Y. H. Yoon

Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University

ABSTRACT

Bovine whey protein are rich in cysteine, which is the rate limiting amino acid for synthesis of antioxidant glutathione(GSH). Some strains of *Lactobacillus casei* has been reported to contain high level of GSH in cell extracts. The objective of this study was to determine whether enzymatically hydrolyzed whey protein isolate(WPI) and cell extract of *Lb. casei* HY2782 could increase intracellular GSH concentrations and protect against oxidant induced cell death in human prostate epithelial cell line (designated as RWPE-1, and PC-3M-MM2 cells). Treatment of RWPE-1 cells and PC-3M-MM2 cells with hydrolyzed WPI (500g/ml) significantly increased GSH by 28.2% and 38.4% respectively. Compared with control cells receiving no hydrolyzed WPI(P<0.05), hydrolyzed WPI and *Lb casei* HY2782 cell extracts significantly protected RWPE-1 and PC-3M-MM2 cells from oxidant induced cell death compared with controls receiving no WPI. DNA damage associated with oxidant treatment was demonstrated by single cell gel (SCG) electrophoresis.

(Key words : *Lb. casei*, GSH, Oxidative stress, Prostate, Whey protein)

I. 서론

우유 내 구성물질인 유청단백질은 생명유지와 성장에 기여하는 영양원으로써의 기능과 경구섭취로 인한 면역계, 내분비계, 신경계 등의 생체조절에 관한 생리조절인자로써의 기능을 가지고 있다. 또한 유청단백질은 Glutathione의 구성 성분인 cysteine과 methione이 풍부하며,

이들 황이 포함된 아미노산들은 체내의 항산화력을 유지하고 세포분열 시 DNA를 안정하게 한다(Aimutis, 1998).

이 중 마우스에 분리 유청단백질 급여 시 면역계의 필수물질인 Glutathione sulphhydryl(GSH)의 농도상승과 IgM 생성 증가에 다른 단백질원보다도 활성이 높은 것으로 보고되었다. (Bounous, 1998)

* 본 연구는 중앙대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

Corresponding author : Y. H. Yoon, Dept. of Animal Science, Chung-Ang University, Ansong-Si, Kyounggi-Do, Korea 456-756. E-mail : yungh310@post.cau.ac.kr

호기성 생물은 산소를 전자수용체로 하는 호흡을 통하여 에너지를 생산한다. 그러나 이 산소는 각종 물리적, 화학적 및 환경적 요인에 의하여 다양한 활성산소로 전환될 수 있다. 사람을 비롯한 생물은 항산화 메커니즘을 가지고 있어 산화적 손상으로부터 스스로를 보호할 수 있으나 이들 손상을 완전히 제거하기에는 충분하지 않다(Simic, 1998).

생체 내에는 유해 라디칼들을 효과적으로 제거하기 위해 여러 항산화 효소 및 항산화제가 존재한다. 생체 내 항산화 방어계는 일차적으로 항산화 효소들의 광범위한 분포 및 유기적인 관련성에 의해 유지되고 있다. 즉 superoxide anion은 superoxide dismutase(SOD)에 의해 일단 hydrogen peroxide로 전환되고, catalase가 hydrogen peroxide를 물로 전환시킨다 (Archibald et al., 1981).

유산균 또한 활성산소로부터 자기자신을 방어하기 위한 항산화 메커니즘을 가지고 있으며, 이들 유산균의 항산화 효과에 대하여 최근 보고되기 시작하였다(Ahotupa et al., 1996; Korpela et al., 1997; Sanders et al., 1995). 그러나 아직까지 유산균의 항산화 효과에 대한 연구는 많이 부족한 실정이다.

유산균이 체내에 미치는 영향은 다양하다. 유산균은 면역계조절을 통하여 설사와 변비를 개선시키며, 병원성 바이러스나 세균과 장 상피세포의 결합부위에서의 경합적인 작용을 함으로써 이들의 감염을 방지하는 역할을 한다고 알려져 있다(Havenaar et al., 1992; Hoe et al., 1999; Kent et al., 2000).

최근 몇 년 동안 유산균이 실험동물에서 몇 가지 종양 세포에 대하여 항암효과를 보인다고 보고되었다. 특히 *Lactobacillus casei*(Tomita et al., 1994; Yokokura et al., 1994), *Lactobacillus acidophilus*(Goldin et al., 1980; McIntosh et al., 1994; Reddy et al., 1996)와 같이 설치류에 이식 혹은 화학적으로 유도된 종양 세포의 성장을

현저하게 억제한다고 밝혀졌으며, 몇몇 유산균 발효식품들 역시 항종양 효과가 있음이 입증되었다.

이렇듯 인류의 오랜 역사를 통한 발효유의 섭취는 유산균의 안전성을 입증해 주는 것이며 또한 항미생물 효과, 면역증강효과, 항종양 효과 등의 여러 가지 건강증진 효과가 보고되었고, 어떠한 종들은 probiotics로서 일반적으로 사용되고 있다.

항산화 활성이 높은 능력의 유산균은 천연 항산화제와 면역증강제로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 인간의 전립선세포에 배양에 있어 유청단백질과 *Lactobacillus* spp. 추출물 첨가 시 산화제에 의한 세포 내 Glutathione sulphhydryl과 DNA 손상도를 측정하여 항산화 활성을 알아보기 위해 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 전립선 세포의 배양

본 실험에 사용한 세포배양을 위한 배지 조성은 다음과 같으며, 모두 ATCC(USA)제품을 구입하여 사용하였다.

WRPE-1(ATCC) (human prostate epithelial cells)
keratinocyte serum free medium + bovine pituitary extract (50 µg/ml) + epithelial growth factor (5 mg/ml)
PC-3M-MM2 (KCLB, Korean Cell line Bank)
RPMI 1640 + 10%FBS(heat inactivation)

모든 세포는 75 cm² 조직 배양용 플라스크를 사용하였고, 37°C에서 5% CO₂, 90% relative humidity를 함유하는 공기 조건하에서 배양하였다. 매주 2씩 feeding을 하면서 세포가 증식하여 confluency가 되는 시점에서 계대 배양하였다. 세포바닥에 생성된 monolayer는 0.25% trypsin / 1 mM EDTA 용액을 사용하여 단세포로 만들어 사용하였다.

2. 유청단백질과 카제인의 가수분해

유청단백질과 카제인은 Whey Protein Isolates (Alacean 955, newzealand), Sodium Caseinate(성원양행)을 사용하였고, 500 µg/ml의 농도에서 porcine trypsin (23,100 U), bovine chymotrypsin (186U), porcine peptidase (0.26 U)(Sigma. St Louis MO. USA)을 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시켰으며, 가수분해 후, 효소의 불활성화를 위해 85°C의 수조에서 10분간 열처리를 하였고, 0.2 µm membrane filter를 이용하여 filtering 후 4°C에서 보관하면서 사용하였다.

3. 세포내용물의 추출

Lb. casei HY2782을 MRS broth에서 37°C, 16시간 배양 후, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한다. saline으로 2회 washing 후, wet cell pellet 10 mg을 0°C에서 20분간 ultra sonicator로 분쇄한다. 분쇄된 cell을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 후, cell 추출물을 얻는다.

4. 산화제처리에 의한 세포 내 GSH농도 변화 및 DNA 손상도 측정

단백질가수분해효소에 의해 처리된 유청단백질과 *Lb. casei* HY2782의 세포 추출물을 인간 전립선 세포에 처리하여 세포 내 glutathione 농도 상승효과와 산화제 t-butyl hydroperoxide (TBHP)에 의한 핵산 손상 방지를 효과를 알아보기 위해 실시하였다.

1) 전립선세포에서 WPI 급여에 의한 세포 내 GSH 수준

(1) 세포 내 GSH content

Cell을 96-well plate의 한 well 당 10^6 cells/ml의 농도로 seeding 후 24시간 incubation 한 다음 hydrolyzed WPI(500 µg/ml)와 Sodium caseinate (500 µg/ml), GSH 합성제해제인 Buthionine sul-

focimin(BSO) 500µM, NAC (500M), *Lb. casei* HY2782(10^9 /ml) Cell extract를 처리 후 24시간 더 incubation하였다.

각각의 처리구의 GSH 농도는 Glutathione Assay kit(Calbiochem, Cat. No.354102. USA)를 이용하여 측정하였다. 측정값은 umol/tissue g으로 나타내었고, GSH 함량은 아래의 계산식에 따라 환산하였다.

$$[\text{GSH}] = \frac{(A - A_0)}{\epsilon} \times D$$

A : sample의 OD값

A₀ : Blank값

D : sample의 dilution factor

ε : 400 nm에서의 standard의 질량계수

(2) 세포의 생존율 측정

Prostate cells을 96-well tissue culture plate에 10^5 cells/ml의 농도로 seeding 후 24시간 동안 incubation한 다음, growth medium을 제거한다. 각각의 well은 hydrolyzed WPI (0-2000 µg/ml)이 함유된 새 배지로 교체한 후 48시간 동안 incubation한다.

세포의 생존율을 알아보기 위해 MTT dye (600 M final concentration)를 각각의 well에 첨가 후 4시간 동안 더 배양한다. growth medium을 제거 한 후에 MTT dye의 oxidation에 의해 formazan crystals이 형성된다. 100 µl의 0.04 M HCl in isopropanol로 formazan crystals을 용해시킨 후 Micro plate reader (Biorad Model 680. USA)를 이용하여 620 nm에서 세포의 생존율을 측정하고 % control로 표시한다.

2) Single Cell Gel electrophoresis Assay SCGE/Comet

Comet assay는 comet assay kit(TRIVIGEN, U.S.A. Cat # 4250-050-k)를 이용하여 수행하였다. Cell(1×10^5 cells/ml)에 10 mM TBHP, 100 mM TBHP를 medium에 37°C 1시간 처리한다.

Comet assay

Gelcasting

↓
Cell(1×10^5 cells/ml)과 Molten LMAgarose(42 ℃)를 1:10의 비율로 혼합 후, 즉시 comet slide의 circle 위에 75 μ l를 흘리고 4℃의 어두운 곳에서 Gel을 형성 시켰다.

↓
Lysis

↓
Gel이 형성된 slide를 Lysis solution(4℃)에 1시간 동안 담구어 lysis 하였다

↓
전기영동: Alkaline Eletrophoresis

Lysis 시킨 slide들을 buffer(300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH13)로 슬라이드 표면 위 0.7 cm 까지 가득 채운 후 20분간 수평상태에서 25V/300 mA로 20분간 실시하였다.

전기영동 후 70% ethanol에 5분간 담근 후 Air dry한다. 희석된 SYBR Green(1:10,000)으로 50 μ l로 염색 및 건조하였다.

염색된 slide는 형광현미경(250배)(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 산화제처리에 의한 세포 내 GSH 농도 변화 및 DNA 손상도 측정

단백질 가수분해효소에 의해 처리 된 유청단백질과 *Lb. casei* HY2782의 세포 추출물을 인간 전립선 세포에 처리하여 세포 내 glutathione 농도 상승효과와 산화제 t-butyl hydroperoxide (TBHP)에 의한 핵산 손상 방지를 효과를 알아 보기 위해 실시하였다.

1) Prostate cell에서 WPI 급여에 의한 세포 내 GSH 수준

Fig.1에서는 전립선 세포 RWPE-1과 PC-3M-MM2에 hydrolyzed WPI(500 g/m)를 48시간 동안 처리 시, 가수분해 시키지 않은 WPI 보다 각각 28.2%, 38.4%씩 GSH 농도가 증가하는 것을 유의적으로 확인할 수 있었고($p < 0.05$), 카제인의 경우 RWPE-1과 PC-3M-MM2에 처리 시 가수분해 시킨 카제인과의 유의차가 보이지 않았으며($p < 0.05$), glutathione 합성저해제인 Buthionine sulfoximi(BSO) 처리 시 Glutathione 농도가 현저하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

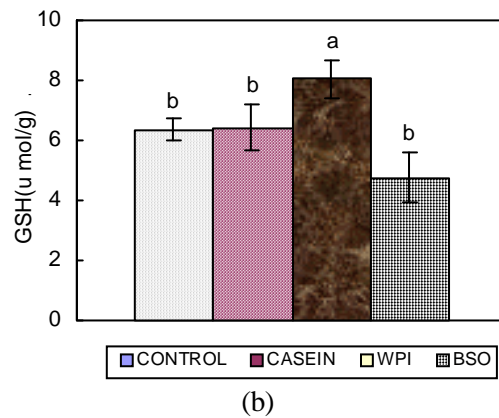
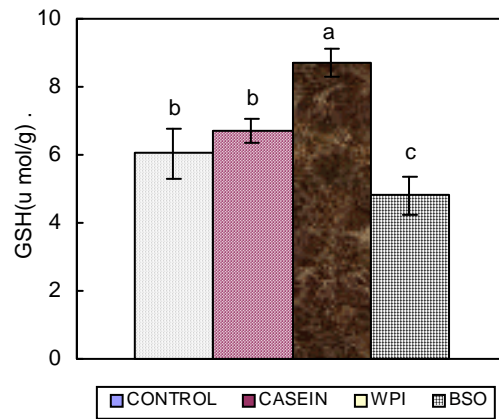


Fig. 1. Concentration of GSH affected by hydrolyzed WPI and casein in prostate epithelial cells, a) RWPE-1 b) PC-3M-MM2. Each value Presents the Mean \pm Standard Deviation. $p < 0.05$.

2) 전립선 세포에서의 *Lb. casei* 추출물에 의한 세포 내 GSH 증가

Fig. 2 에서는 전립선 세포 RWPE-1 cells 와 PC-3M-MM2 cells에 *Lb. casei* HY2782 세포 추출물 처리 시 PC-3M-MM2 cell에서는 GSH의 농도가 유의적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었고($p < 0.05$), RWPE-1 cell에서는 증가 성향을 확인 할 수가 있었다.

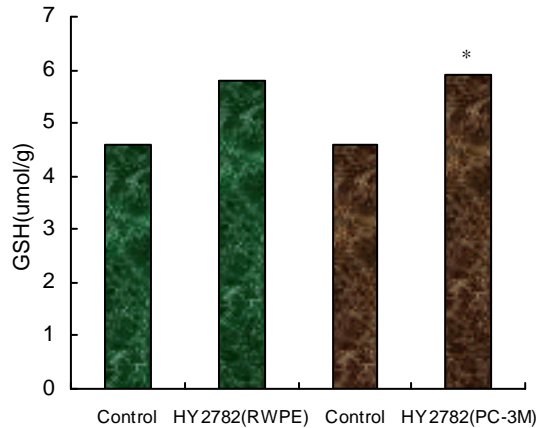


Fig. 2 Elevation of GSH by Cell extract of *Lb. casei* HY 2782 Each value Presents the Mean \pm Standard Deviation. $p < 0.05$

3) whey protein 및 probiotics 처리시 산화제에 의한 사멸율의 변화와 세포의 DNA 손상 억제정도

Fig. 3에서는 WPI hydrolysates와 *Lb. casei* cell extract 처리 시 산화제에 의한 세포의 DNA 손상 억제정도와 사멸율의 변화를 나타내었다.

가수분해 WPI를 처리 후 Oxidant t-butyl hydroperoxide (TBHP)(500 mM)를 이용하여 PC-3M-MM2 세포에 산화적인 스트레스를 주었을 시, TBHP만 처리한 구에서는 62.0%의 생존율을 나타내었고, glutathione 합성저해제인 BSO를 첨가시킨 처리구에서는 33.7%의 생존율을 나타내었다. 가수분해 시킨 WPI와 카제인 처리 구에서는 각각 86.7%, 63.6%의 생존율을 나타내

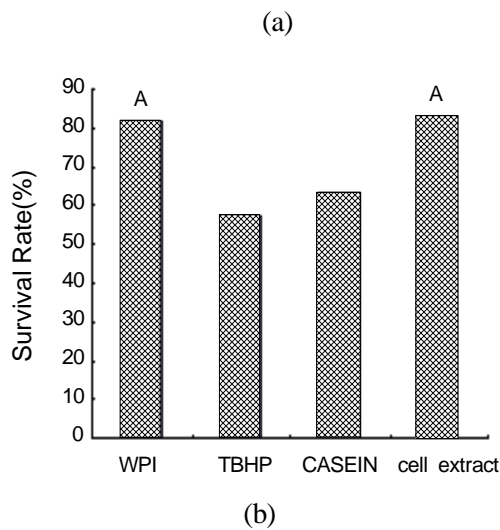
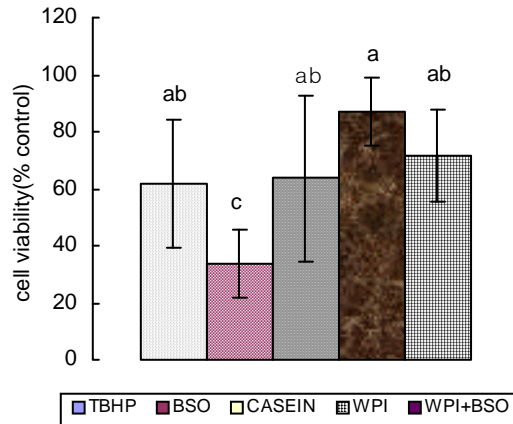


Fig. 3. Effect of hydrolyzed WPI and casein(a) and *Lb. casei* cell extract (b) on viability on PC-3M-MM2 cells. Each value presents the Mean \pm Standard Deviation. $p < 0.05$

었고, WPI와 BSO를 함께 처리한 구에서는 71.5%의 생존율을 나타내었다. 이는 BSO에 의해 GSH의 생성이 저해되어 나타난 결과로 보여지며 (Anderson, 1988), 가수분해 시킨 WPI가 가수분해 시킨 카제인 보다는 높은 생존율을 나타내는 것을 유의적으로 확인할 수가 있었다 ($p < 0.05$).

Lb. casei 세포 추출물처리에 의한 생존율에서는 가수분해 시킨 WPI와 유사한 수준의 82.4%의 생존율을 보였다.

Fig. 4에 나타난 정상적으로 배양된 PC-3M-MM2 세포의 a)의 핵의 경우 산화제 처리 없이 comet assay를 한 결과 DNA tail이 거의 확인되지 않았으나, 산화제인 TBHP 처리구 b)에서는 긴 DNA tail을 확인 할 수가 있었다. 가수분해 카제인 처리구 c)와 가수분해 WPI 처리구 d)에서는 산화제 처리구 b) 보다는 짧은 DNA tail을 확인 할 수가 있었다.

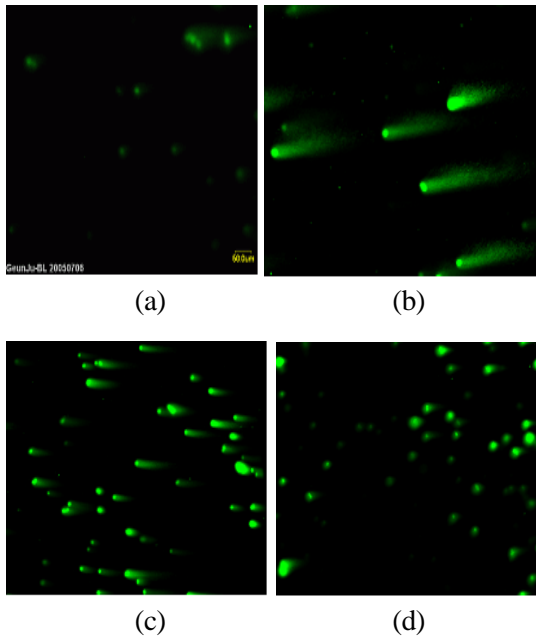


Fig. 4. SCGE fluoromicroscopy ($\times 200$) of prostate cells showing a) normal cell with intact DNA b) Cell treated with TBHP(1 mM) c) Cell were pretreated with hydrolyzed casein(500 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h d) Cell were pretreated with hydrolyzed WPI(500 $\mu\text{g/ml}$) for 24h.

IV. 요약

본 실험은 가수분해 시킨 유청단백질과 *Lb. casei* HY2782의 세포 추출물을 인간 전립선 세포에 처리하여 세포 내 glutathione 농도 상승효과와 산화제 t-butyl hydroperoxide (TBHP)에 의한 핵산 손상 방지 효과를 알아보기 위한 실

험으로 전립선 세포 RWPE-1 cells와 PC-3M-MM2 cells에 hydrolyzed WPI(500 g/m)를 48시간 동안 처리 시, 가수분해 시키지 않은 WPI 보다 각각 28.2%, 38.4%씩 GSH 농도가 증가하는 것을 유의적으로 확인할 수 있었고($p < 0.05$), 카제인의 경우 RWPE-1 cells and PC-3M-MM2 cells에 처리 시 가수분해 시킨 카제인과의 유의차가 보이지 않았으며 ($p < 0.05$), glutathione 합성저해제인 Buthionine sulfoximin (BSO) 처리 시 Glutathione 농도가 현저하게 낮아지는 것을 확인할 수가 있었다(Anderson, 1998).

전립선 세포 RWPE-1 cells 와 PC-3M-MM2 cells에 *Lb. casei* HY2782 세포 추출물 처리 시 PC-3M-MM2 cell에서는 GSH의 농도가 유의적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었고($p < 0.05$), RWPE-1 cell에서는 증가 성향을 확인 할 수가 있었다.

가수분해 시킨 유청단백질과 *Lb. casei* cell 세포추출물 처리 시 산화제에 의한 세포의 DNA 손상 억제정도와 사멸율의 변화를 확인 한 결과, 가수분해 WPI를 처리 후 Oxidant t-butyl hydroperoxide (TBHP)(500 mM)를 이용하여 PC-3M-MM2 세포에 산화적인 스트레스를 주었을 시, TBHP만 처리한 구에서는 62.0%의 생존율을 나타내었고, glutathione 합성저해제인 BSO를 첨가시킨 처리구에서는 33.7%의 생존율을 나타내었다. 가수분해 시킨 WPI와 카제인 처리구에서는 각각 86.7%, 63.6%의 생존율을 나타내었고, WPI와 BSO를 함께 처리한 구에서는 71.5%의 생존율을 나타내었다. 이는 BSO에 의해 GSH의 생성이 저해되어 나타난 결과로 보여지며(Anderson, 1988), 가수분해시킨 WPI가 가수분해 시킨 카제인보다는 높은 생존율을 나타내는 것을 유의적으로 확인할 수가 있었다. ($p < 0.05$)

Lb. casei 세포 추출물처리에 의한 생존율에서는 가수분해시킨 WPI와 유사한 수준의 82.4%의 생존율을 보였다.

가수분해시킨 유청단백질과 *Lb. casei* cell 세

포추출물에 의한 세포에서의 glutathione 농도 증가에 의해 산화제에 의한 DNA의 손상이 적었던 것으로 사료되어지고, 이로 인해 생존율이 높았던 것으로 판단된다.

V. 인 용 문 헌

1. Abraham Goldin. 1980. Host - tumor - drug inter-relationships in the tumorous murine model. *Advances in Enzyme Regulation*.18:323-334.
2. Ahotupa, M., Saxelin, M. and Korpela, R. 1996. Antioxidative properties of lactobacillus GG. *Nutr. Today(suppl)*. 31:518-528.
3. Anderson, M. E. 1998. Glutathione: overview of biosynthesis and modulation *Chemico-biological interactions*. :1-14.
4. Archibalad, F. S. and Fidovich, I. 1981. Magnase, superoxide dismutase and oxygen tolerance in lactic acid bacteria. *J. Bacteriol*. 146, 928-936
5. Brauchel, S. and Viau, G. 1996. *In vitro* selective modulation of cellular glutathione by humanized native milk protein isolate in normal cells and rat mammary carcinoma model. *Anticancer Research*. 16:1095-1100.
6. Brunner, J. R. 1977. Milk proteins. In J. R. Whitaker and S.R. Tannenbaum, Editors, *Food Proteins*, AVI, Co. Westport, CT (1977) pp. 175-204.
7. Bounous, G. 2000. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research*. 20:4785-4792.
8. Devaux, C., Varin, R., Mulder, P., Richard, V. and Thuillez, C. 2001. Oxidative stress and endothelial dysfunction in heart failure. *Therapie* 56(5) 575-581.
9. DeWeese, T. L., Hruszkewycz, A. M. and Marnett, L. J. 2001. Oxidative stress in chemoprevention trials. *Urology* 57 Suppl. 4A:137-140.
10. Fleshner, R. B. and Kucuk, O. 2001. Antioxidant dietary supplements: rationale and current status as chemopreventive agents for prostate cancer *Urology* 57 Suppl. 4 A:90-94.
11. Gardiner, C. S. and Reed, D. J. 1995. Glutathione redox cycle-driven recovery of reduced glutathione after oxidation by tertiarybutyl hydroperoxide in preimplantation mouse embryos. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 321:6-12.
12. Griffith, O. W. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 27:922-935.
13. Kennedy, D. O., Matsumoto, M., Kojima, A. and Matsui-Yuasa, I. 1999. Cellular thiols status and cell death in the effect of green tea polyphenols *Chemico-Biological interactions* 122:59-71.
14. Korpela, R., Peuhkuri, Lahten aki T., Sievi, E., Saxelin, M. and Vapaatalo, H. 1997. *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture. *Milchwissenschaft* 52, 503-505.
15. Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J. and Ahnstrom, G. 1996. The comet assay; Mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*. 363: 89-96.
16. Kullisaar, M., Zilmer, T., Vihalemm, H., Annuk, C., Kariane and Kilk, A. 2002. Two Antioxidative Lactobacilli strains as promixing probiotics. *Int. J. Food Microbiol*. 72:215-224.
17. McKelvey-Martin, V. J., Melia, N., Walsh, I. K., Johnston, S. R., Hughs, C. M., Lewis, S. E. M. and Thompson, W. 1997. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay. human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder and 2) human sperm and male infertility. *Mutation Research* 375:93-104.
18. Micke, P., Beech, K. M., Schlaak, J. F. and Buhl, R. 2001. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels *HIV*

- infected patients. European Journal of Clinical Investigation 31:171-178.
19. Simic, J. B. 1988 Mechanism of inhibition of free radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res. 202, 377-386.
20. Teramoto, S., Tomita, T., Matsui, H., Ohga, E., Matsuse, T. and Ouchi, Y. 1999. Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts, protective role of glutathione. Jap. J. Pharmacol. 79:33-40.
21. Yoon, Yung H. and Byun, J. R. 2004. Occurrence of glutathione sulphhydryl(GSH) and antioxidant activities in probiotic *Lactobacillus* spp. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 17(11):1582-1585.
22. Yokokura, T. Kato Ikuo and Endo Kazuko. 1994. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. International Journal of Immunopharmacology. 16(1):29-36.
- (접수일자 : 2006. 6. 20. / 채택일자 : 2006. 10. 2.)