

Superoxide Dismutase가 배양인체피부멜라닌세포의 산화적 스트레스에 미치는 영향

서영미 · 김남송[†]

원광대학교 대학원 보건학과, 원광대학교 의과대학 예방의학교실

Effect of Superoxide Dismutase on Oxidative Stress of Reactive Oxygen Species in Cultured Human Skin Melanocyte

Seo Young Mi · Nam Song Kim[†]

*Dept. of Public Health, Graduate School of Wonkwang University
Dept. of Preventive Medicine, Coll. of Medicine, Wonkwang University*

To evaluate the effect of antioxidant on the cytotoxicity induced by oxidative stress of reactive oxygen species (ROS) in cultured human skin melanocytes, colorimetric assay of XTT and tyrosinase activity assay were adopted after human skin melanocytes were preincubated for 2 hours in the media containing various concentrations of superoxide dismutase (SOD) before the treatment of hydrogen peroxide. Light microscopic study was carried out in same cultures.

The results of this study were as follows

1. Cell viability of human skin melanocytes was significantly decreased by 30 and 40 μ M of hydrogen peroxide(H_2O_2), respectively.

2. XTT50 was determined at 30 μ M after human skin melanocytes were treated with 10~40 μ M of hydrogen peroxide for 6 hours.

3. The cell viability of cultured human skin melanocytes pretreated with SOD was increased than that of cultured human skin melanocytes treated with H_2O_2 dose-dependently.

4. In tyrosinase activity of human skin melanocytes, the cell treated with SOD showed brown stain compared with H_2O_2

treated cells, dark stain.

5. In light microscopy, cultured human skin melanocytes exposed to H_2O_2 showed morphological changes such as the decreased cell number and cytoplasmic processes, compared with control.

6. In light microscopy, cultured human skin melanocytes pretreated with SOD showed the increase of cell number and cytoplasmic processes compared with H_2O_2 -treated group.

From these results, it is suggested that oxidative stress of ROS such as H_2O_2 has cytotoxicity by showing the decreased cell viability, the increased tyrosinase activity and morphological changes of the decreased cell number and cytoplasmic processes. While, antioxidant like SOD was effective in the prevention of oxidative stress-mediated cytotoxicity by the increased cell viability, decreased tyrosinase activity and the protection of degenerative morphological changes in cultured human skin melanocytes.

Key Words : Superoxide Dismutase, Oxidative Stress, Melanocyte

접수일 : 2009년 6월 29일, 채택일 : 2009년 9월 18일

† 교신저자 : 김남송(전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학 예방의학교실, Tel.063-850-6782, Fax063-854-1219, E-mail:knsong@wku.ac.kr)

I. 서론

피부는 외부환경으로부터 인체 내의 각종 장기의 보호역할을 하는 동시에 촉각이나 압각과 같은 많은 감각기관과 모발과 털, 손발톱과 같은 변형된 부속기관을 가지고 있어 다양한 생리적 작용을 수행하고 있다(Giebel 등, 1990; Dimri 등, 1995).

그러나 지금까지 알려진 피부의 손상과 노화를 유도하는 인자들을 살펴보면, 금속작업유를 취급하는 산업장의 근로자에게 높은 감각률을 일으키는 살균제를 비롯하여(허광희 등, 1996), 공단 근로자들에게서 발생하는 접촉성 피부염을 일으키는 수은, 카드뮴, 크롬과 같은 중금속류(연세대 산업의학연구위원회, 1997), 태양광선의 영향으로 산업장에서 집단적으로 직업성 피부질환을 발생하게 하는 콜타르 피치(정철, 1996), 곰팡이나 세균과 같은 다양한 외부적인 요인과(von-Zglinicki 등, 1995) 그 밖에 술, 담배와 같이 인체에 해로운 기호식품에 의한 장기손상에 의한 질병 및 영양부족과 같은 내적인 요인도 있다(한영수와 김수남, 1988). 이중 피부의 손상과 노화에 가장 크게 영향을 미치는 것은 햇빛의 자외선으로서 일단 자외선이 피부에 접촉하게 되면 그 즉시 과량의 활성산소가 생성되며(Fridovich, 1978; Dalton 등, 1999), 이는 건설업종 종사자나 해양수산업, 조선업 근로자에게 직접 해당될 수 있다.

이러한 산화적 스트레스는 피부세포를 공격함으로써 피부의 광노화를 유발할 뿐만 아니라(Chen 등, 1995; Dimri 등, 1996), 기미나 주근깨와 같은 색소침착(Lerner & Fitzpatrick, 1984; 원 등, 1991), 홍반이나 수포 및 피부암과 같은 각종 질환을 야기하게 된다(김광수 등, 1990; Kuwata 등, 1993). 특히, 피부의 광노화의 경우 자외선에 의해 생성된 다량의 활성산소에 의한 산화적 스트레스는 피부세포내 superoxide dimutase(SOD)를 비롯하여 catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소의 기능을 저해함으로써 피부세포의 생존율을 크게 떨어뜨리며(Liu 등, 1990; 송상호, 2002), 동시에 세포의 퇴행적 변화에 의한 노화유발은 물론이고(Polyak 등, 1997; Shea 등, 1992), 표피나 진피세포내 멜라닌세포의 소기관인 멜라노솜(melanosome)의 활성을 더욱 증가시키게 된다(Kikuchi 등, 1990; Oetting & King, 1993). 이와 같은 melanosome의 활성은 티로시나제(tyrosinase)의 효소활성을 촉진시켜 더욱 많은 멜라닌색소를 생성하기 때문에(Shibahara 등, 1988; Spritz 등, 1990), 피부에 과량의 기미나 주근깨와 같은 피부반점의 표출증가나(Spritz 등, 1991, 원 영호 등, 1991), 피부노화에 따른 노인성 색소반 또는 노인성 백반과 같은 색소침착현상을 증가시킨다(Giebel 등, 1990). 따라서 지금까지 알려진 활성산소에 의한 산화적 스트레스는 광노화에 의한 피부세

포내 항산화계의 손상과(Yamamoto 등, 1983), 멜라닌세포의 활성을 증가시킴으로서 피부노화의 촉진과 미백에 커다란 영향을 미치는 가장 중요한 인자의 하나로 알려져 있다(Kuwata 등, 1993; Lee, 1994). 따라서 산업장에서 사용하는 피부의 보호나 노화방지를 위한 대부분의 화학제나 향장품, 식품의 추출제품들은 활성산소의 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과는 물론이고 미백효과를 동시에 가지고 있는 성분들을 포함하고 있다(Liu 등, 1990; Isuzugawa 등, 2001). 활성산소에 의한 산화적 스트레스는 인체내 멜라닌세포뿐만 아니라 신경세포나 근육세포의 손상은 물론이고 특히, 섬유모세포손상을 유도함으로써 콜라겐의 합성억제에 의한 주름형성과 피부노화를 촉진시킨다(Yamamoto 등, 1993; Krude, 1999). 이들은 세포내 항산화계의 손상은 물론이고 세포막의 지질과산화반응(lipid peroxidation) (Yamamoto 등, 1983), 세포소기관의 손상 및 세포내 protein kinase C(PKC)와 같은 신호전달체계에도 영향을 미침으로서 세포고사(apoptosis) 및 사멸을 유도한다고 알려져 있다(Isuzugawa 등, 2001). 또한 활성산소의 산화적 스트레스는 세포의 흥분성 아미노산(excitotoxic aminoacids, EAAs)의 분비를 촉진하여 신경전달물질의 생리활성에도 관여하는 동시에 세포내 질소자유기(nitrogen free radicals)와도 작용하여 산소자유기(oxygen free radicals) 보다 독성이 매우 강한 peroxynitrate(ONOO-)라는 물질을 생성한다고 알려져 있다(Kolodziej 등, 2001). 또한 칼슘이온채널과 밀접한 관련이 있는 glutamate 수용체를 과활성화시킴으로서 세포내 칼슘유입을 증가시켜 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다(Sakaguchi 등, 1998). SOD는 활성산소를 제거하는 항산화 효소의 일종으로 인체내에서 O_2 나 OH 또는 O_3 와 같은 산소자유기를 H_2O_2 로 환원시키며 이는 다시 catalase와 glutathione peroxidase에 의해 물과 산소로 분해됨으로서 인체세포에 아무런 영향을 미치지 않는다(Fridovich, 1978). 그러나 아직까지 활성산소의 산화적 스트레스에 대한 자세한 세포독성기전은 물론이고 이에 대한 항산화제의 방어작용에 대한 현상에 대해서도 잘 알려져 있지 않으며 더욱이 멜라닌세포를 대상으로 한 연구는 많이 되어 있지 않다.

따라서 이 연구는 배양 인체피부멜라닌세포를 재료로 활성산소의 산화적 스트레스에 대한 세포독성 및 항산화제의 일종인 SOD의 영향을 세포생존율과 tyrosinase의 활성 및 광학현미경적 관찰을 통해 알아보고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험재료 및 방법

1) 실험재료

본 실험에 사용한 인체피부멜라닌세포(SK-MEL-3)는 American Type Cell Culture (ATCC)에서 구입하여 사용하였다.

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 SOD(Sigma Co.)는 혈청이 포함되어 있지 않은 배양액으로 최종 농도가 각각 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml , 10 mg/ml 및 100 mg/ml 가 되도록 저장액을 만들어 사용하였다.

XTT(2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt, Sigma)는 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 mg/ml , 100 mg/ml 의 저장액을 각각 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 전날 최종 농도로 희석하여 사용하였거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 세포 배양

본 실험에 사용한 인체피부멜라닌세포는 RPMI 1640(Gibco Co.)배지에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco Co.)이 포함된 배양액에 부유시킨 다음 5×10^6 cells/well의 밀도로 96 배양용기(well plate)에 분주하였다. 분주가 완료된 세포는 72 시간 동안 배양한 후 본 실험에 사용하였으며 배양액은 3 일 간격으로 교환하여 주었다.

4) 활성산소 처리

일정 시간 동안 배양된 인체피부멜라닌세포를 H_2O_2 가 10 μM 에서 40 μM 까지 각각 포함된 배양액에서 6 시간 동안 배양한 후 이의 영향을 정량 분석하였다.

5) 항산화제 처리

일정수의 세포를 96 배양용기에 분주한 후 72 시간 동안 배양이 완료된 세포에 10 $\mu\text{g/ml}$ 부터 50 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 SOD가 여러 농도로 각각 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전배양한 후 SOD가 세포에 미치는 영향을 분석하였다. XTT나 MTT assay의 MCV값이 100 μM 이하이면 고독성으로 판정하였고 100-1,000 μM 인 경우 중간독성으로, 1,000-2,000 μM 이면 저독성으로, 2,000 μM 이상이면 무독성으로 판정하였다.

2. 세포독성 측정

1) 세포생존율

XTT에 의한 정량방법은 Mosmann(1983)의 colorimetric assay의 방법에 의하였다. 즉, SOD를 처리하지 않은 배양 인체피부멜라닌세포를 5×10^5 세포수를 laminin으로 코팅한 배양용기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 약제를 처리하여 48 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 3 회 세척한 다음 실험전날 제조한 XTT를 sell당 200 μl 씩 넣어 37°C, 5% CO_2 로 조절된 정온기에서 3 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 효소추출액

으로 처리한 다음 Elizer reader(Molecular Devices)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

2) 형태학적 관찰

(1) 광학현미경적 관찰

SOD가 인체피부멜라닌세포에 미치는 영향을 형태학적으로 관찰하기 위하여 세포가 배양중인 배양용기를 직접 도립 위상차현미경(TE-2000, Japan)에 놓고 검경하였으며 세포의 형태변화를 사진형성화하기 위하여 필요시 현미경에 부착된 사진기로 촬영하였다.

(2) Tyrosinase 활성분석

약제를 처리한 인체피부멜라닌세포를 PBS로 3 회 세척한 후 0.1 M phosphate 완충액 (pH 7.4)으로 1 회 세척하였다. 세척 완료 후 도파기질액을 넣어 37°C로 조절된 항온기에서 24 시간 동안 처리하였다. 처리 후 증류수로 3 회 세척한 다음 해마톡실린으로 염색한 후 광학현미경(TE-2000, Japan)으로 검경하였다. 효소활성에 따른 염색정도의 판정은 변형된 Bartman과 James (1966)의 방법에 따랐다. 즉, 검은색 [매우 강함(++++)], 강함(+++)을 비롯하여 갈색 [보통(++), 약함(+)] 및 흰색 [없음(0)]으로 구분하였다.

3. 자료분석

대조군과 실험군간의 차이는 t-test로 분석하였다.

III. 결 과

1. 세포생존율

1) H_2O_2 의 세포생존율 측정

(1) XTT 정량

① 농도에 의한 영향

서로 다른 농도의 H_2O_2 를 첨가한 후의 인체피부멜라닌세포의 세포생존율은 각 농도에서 대조군의 경우 모두 100%인 반면 실험군인 10 μM 의 경우 88.4%, 20 μM 는 70.8%, 30 μM 50.6%, 40 μM 46.6%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$) (Table 1, Figure 1).

② 시간에 의한 영향

XTT값에 의한 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 시간에 따른 세포생존율은 대조군의 경우 모두 100%인데 비하여 실험군인 3시간 처리는 69.3%, 6시간은 49.0%, 9시간 46.7%, 12시간 46.2%로 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소하였다($p < 0.05$) (Table 2, Figure 2).

2) SOD의 영향

Table 1. The dosage-dependent cell viability of human skin melanocytes treated with H₂O₂ by XTT assay

Treatment	XTT assay	
H ₂ O ₂ (μ M)	Mean \pm S.D.	(% of control)
cont.	10.88 \pm 0.95	100
10	9.62 \pm 0.64	88.4
20	7.70 \pm 0.52	70.8
30	5.51 \pm 0.47	50.6*
40	5.07 \pm 0.51	46.6*

The XTT values of cultured human skin melanocytes treated with various concentrations of H₂O₂ for 6 hours. Asteriks indicate the significant difference from control(0 μ M of H₂O₂). *p<0.05

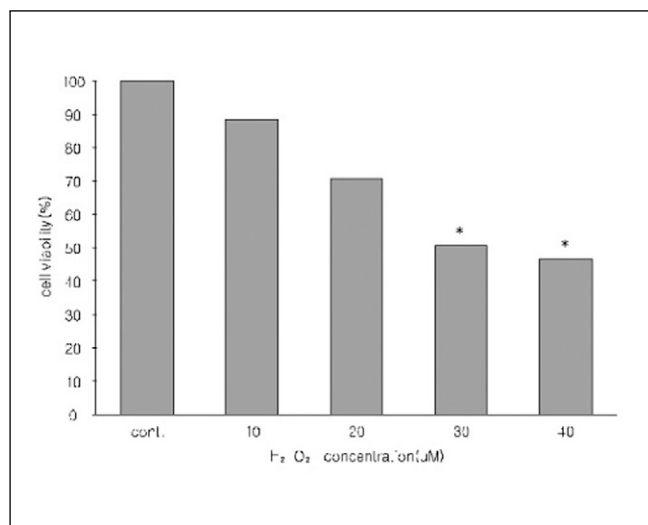


Figure 1. The cell viability by XTT assay in cultured human skin melanocytes treated with 10~40 μ M H₂O₂ for 6 hours, respectively. The results indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. Asteriks indicate the significant difference from control(0 μ M of H₂O₂). *p<0.05

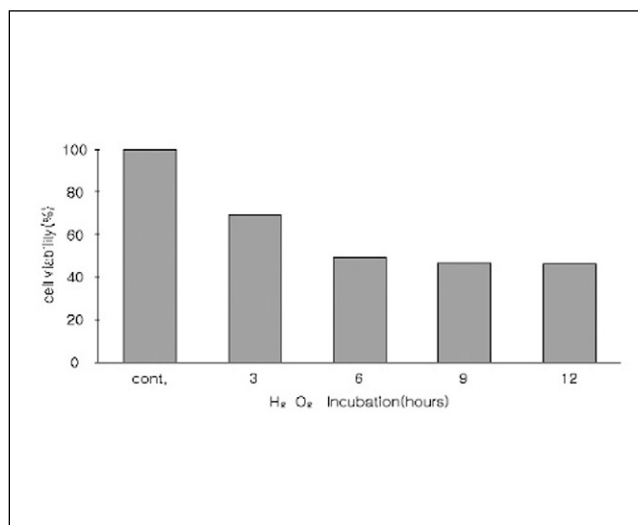


Figure 2. The cell viability by XTT assay in cultured human skin melanocytes treated with 30 μ M H₂O₂ for 3~12 hours, respectively. The results indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. Asteriks indicate the significant difference from control(0 hour of H₂O₂). *p<0.05

Table 2. The time-dependent cell viability of human skin melanocytes treated with H₂O₂ by XTT assay

Treatment	XTT assay	
H ₂ O ₂ (μ M)	Mean \pm S.D.	(% of control)
cont.	5.22 \pm 0.42	100
3	3.62 \pm 0.27	69.3
6	2.56 \pm 0.18	49.0*
9	2.44 \pm 0.13	46.7*
12	2.41 \pm 0.21	46.2*

The XTT values of cultured human skin melanocytes treated with concentrations of 30 μ M H₂O₂ for 3~12 hours, respectively. Asteriks indicate the significant difference from control(0 hour of H₂O₂). *p<0.05

배양중인 인체피부멜라닌세포를 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free인 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco)으로 3 회 세척 후 H_2O_2 가 30 μM 농도로 포함된 배양액에서 6 시간 동안 처리하기 전에 10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SOD가 각각 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전 처리한 후 XTT값에 의한 세포생존율을 대조군과 비교 조사 하였다. 그 결과 30 μM H_2O_2 만의 처리에 있어서 세포생존율은 대조군 100%에 비하여 48.1%로 나타난 반면, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SOD의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 51.1%로 나타났다. 또한, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SOD 처리에서는 각각 51.6%로 나타났다. 특히, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SOD의 처리에서는 세포생존율이 84.6%로 나타나 이는 H_2O_2 만의 처리에 비하여 매우 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)(Table 3, Figure 3).

2. 형태학적 관찰

1) 광학현미경적 관찰

(1) 대조군

H_2O_2 를 처리하지 않은 대조군에서는 배양 초기에 수적으로 많은 인체피부멜라닌세포들이 몇 개씩 모여 군락을 형성하고 있었으며, 서로 세포돌기를 내어 연결하고 있었다 (Figure 4).

(2) H_2O_2 처리군

H_2O_2 를 처리한 실험군에 있어서는 일부 손상을 입은 세포들이 배양용기로부터 떨어져 다각형에서 둥글게 변하면서 배양

Table 3. The cell viability of human skin melanocytes treated with SOD by XTT assay

Treatment	XTT assay	
Incubation time of SOD($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Mean \pm S.D.	(% of control)
0	4.62 \pm 0.37	100
30 H_2O_2	2.22 \pm 0.15	48.1
10	2.36 \pm 0.19	51.1
30	2.36 \pm 0.21	51.6
50	3.91 \pm 0.28	84.6*

The XTT values of cultured human skin melanocytes preincubated with concentrations of 10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SOD for 2 hours before the treatment of 30 μM H_2O_2 , respectively. Asterik indicates the significant difference between H_2O_2 -treated group and SOD-treated group. * $p < 0.05$

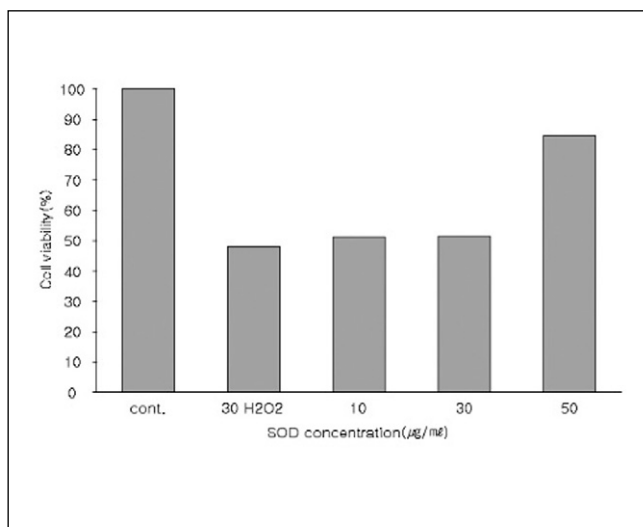


Figure 3. The cell viability by XTT assay in cultured human skin melanocytes pretreated with 10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SOD for 2 hours, respectively. The results indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. Asterik indicates the significant difference between H_2O_2 -treated group and SOD-treated group. * $p < 0.05$

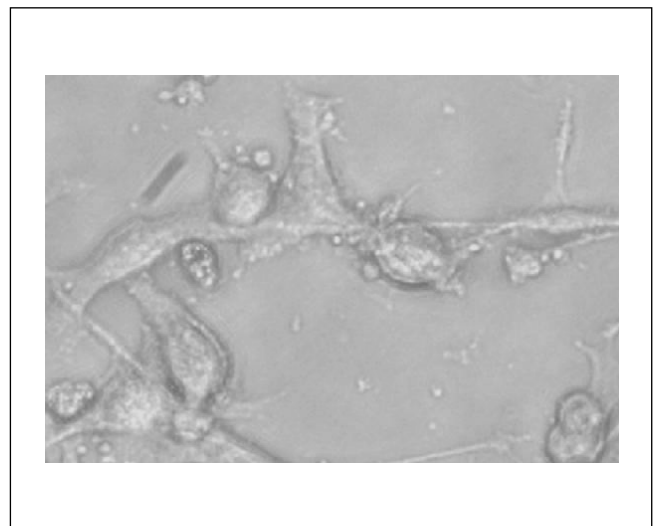


Figure 4. In control group, some of human skin melanocytes were formed cell cluster and connected each other by protoplasmic processes. Many of human skin melanocytes were grown on culture bottle compactly. x 120

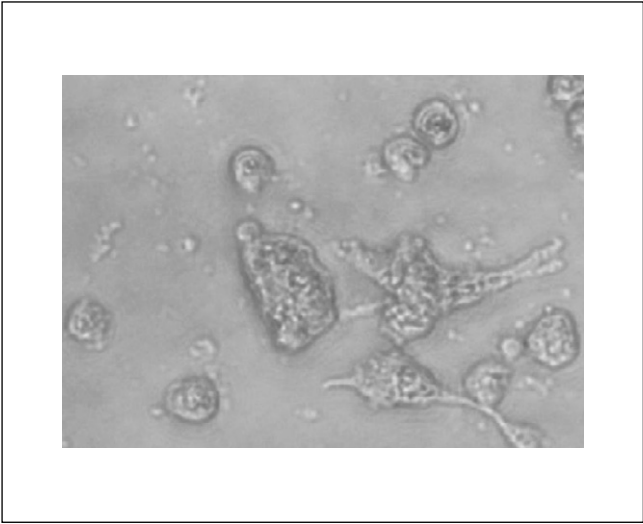


Figure 5. Some of human skin melanocytes treated with 30 μ M concentration of H_2O_2 for 6 hours showed morphological changes such as the decrease of cell number and the loss of cytoplasmic process. x 120



Fig. 6. Some of human skin melanocytes pretreated with 50 μ g/ml concentration of SOD for 2 hours showed morphological changes such as the increase of cell number and the cytoplasmic process compared with H_2O_2 -treated group. x 120

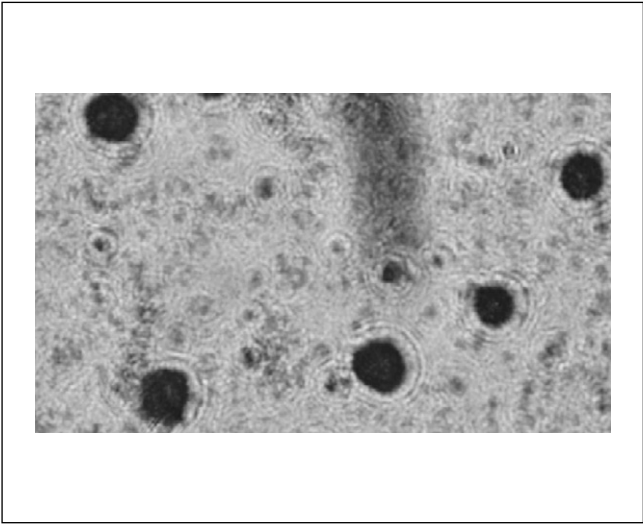


Figure 7. Cultured human skin melanocytes treated with H_2O_2 showed dark stain. x 120

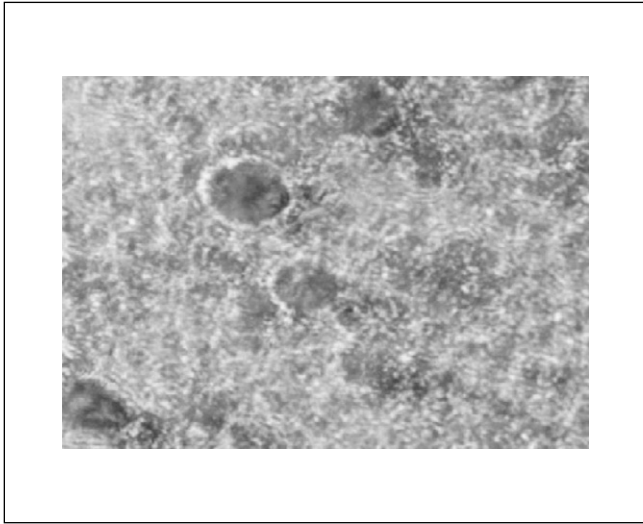


Figure 8. Cultured human skin melanocytes treated with SOD showed brown stain. x 120

액 위로 떠올라 부유하고 있었으며 세포들도 대조군에 비하여 수가 감소하였고 세포돌기도 많이 소실되었다(Figure 5).

(3) SOD 처리군

SOD를 처리한 실험군에서는 H_2O_2 만을 처리한 실험군에 비하여 세포수가 더욱 많았으며 세포돌기소실도 감소한 것으로 나타났다(Figure 6).

2) Tyrosinase 활성분석

(1) H_2O_2 처리군

H_2O_2 를 처리한 실험군의 배양 인체피부멜라닌세포에서는 염색 전에는 대조군에서 처럼 세포들이 흰색이었으나 염색 시간이 경과함에 따라 점차 검은색으로 변하였고 세포돌기도 염색을 하지 않은 세포에 비하여 더욱 짧게 관찰되었다(Figure 7).

(2) SOD 처리군

세포에 H_2O_2 를 처리하기 전 SOD를 전처리한 실험군의 배양 인체피부멜라닌세포에서는 염색 전에는 흰색이었으나

염색시간이 지남에 따라 점차 갈색으로 변하였고 세포돌기와 세포체는 구분되어 관찰되지 않았으며 세포들은 과립형 여러 모양으로 관찰되었다(Figure 8).

IV. 고찰

세포의 노화가 진행되는 경우에는 세포내 β -galactosidase의 활성을 비롯하여 (Dimri 등, 1995), lipofuscin의 축적과 같은 세포노화형질이 증가하게 된다(von Zglinicki 등, 1995; 김현진, 1997). 이에 따라 세포증식이 저해되면서 이와 관련이 깊은 c-fos와 같은 세포내 신호전달체계에 영향을 주며 (Dimri 등, 1996), 동시에 세포증식을 억제하는 p53을 비롯한 p21WAF1이나 p16INK4a와 같은 인자들의 활성이 증가하게 된다 (Sermo 등, 1997; Bringold와 Serrano, 2000). 특히, 활성산소의 산화적 스트레스는 c-fos나 c-jun과 같은 유전자의 발현을 제어하며(Dalton 등, 1999), 8-oxo-guanine과 같이 DNA를 산화하여 손상을 줄 수 있는 물질의 생산과 밀접한 관련이 있음은 이미 잘 알려져 있다(Chen 등, 1995). 피부노화가 진행되는 경우에도 피부세포에 위와 같은 동일한 현상이 나타나며 노화가 진행될수록 세포내 cyclooxygenase(COX)를 비롯한 NADPH oxidase 및 xanthine oxidase와 같은 효소들이 superoxide(O⁻²)와 hydroxy radical(OH⁻)과 같은 산소자유기의 생산을 촉진시킴으로서 산화적 스트레스를 더욱 유발하게 된다(송상호, 2002; 김광수 등, 1990). 따라서 본 연구에서는 먼저 활성산소의 산화적 스트레스가 배양 인간피부멜라닌 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10~40 μ M 농도의 H₂O₂가 각각 포함된 배양액에서 6 시간 동안 각각 처리한 결과 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 점차 감소시켰다. 특히, 30 μ M 이상의 H₂O₂의 처리에서는 대조군에 비하여 세포생존율이 거의 50% 이하로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다(p<0.05). 본 실험 결과는 H₂O₂가 배양 인체피부멜라닌세포에 독성을 가지고 있음을 말해주고 있다(Chen 등, 1995). H₂O₂의 독성효과는 처리한 H₂O₂가 세포막을 침투한 후 세포막의 불포화지방산을 산화시켜 막지질과산화반응에 의하여 세포손상을 초래하였을 가능성이(Yamamoto 등, 1983), 또는 H₂O₂가 세포내 DNA나 RNA와 같은 핵산물질을 손상시킴으로서 세포의 퇴화를 유발하여 세포생존율의 감소를 가져왔을 가능성을 배제할 수는 없다(Chen 등, 1995; Krude, 1999). 그러나 한편으로는 H₂O₂가 세포내 항산화효소의 활성을 억제하였거나 또는 호흡 전자전달계와 관련이 깊은 사립체(mitochondria)와 같은 세포소기관을 손상시켜 관련 효소활성을 저해함으로써 세포에 독성을 나타냈을 가능성이 클 것으로 생각된다(Liu 등, 1990).

첫째, 이러한 이유의 하나로서 처리한 H₂O₂가 세포막을 손상시킨 후 세포내로 들어가 직접 세포소기관이나 이와 연관된 효소활성을 저해하였을 것으로 생각된다(Fridovich, 1978). 둘째로, 본 실험에서 적용한 XTT assay가 세포소기관인 사립체의 활성과 밀접한 관련이 있음을 고려해 볼 때 H₂O₂의 산화적 스트레스가 세포소기관의 효소활성을 저해한 결과라고 생각된다(Mosmann, 1983). 한편, 본 실험에서 H₂O₂의 산화적 스트레스는 배양 인체피부멜라닌세포에 고독성인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Borenfreund 등(1988)의 연구에서 보면 모든 화학약제의 독성을 colorimetric assay의 중간값(MCV, midcytotoxicity value)으로 정하였다. 본 연구의 경우 MTT50 값이 30 μ M을 보여 고독성으로 나타났다. 한편, 항산화제의 일종인 SOD가 H₂O₂의 산화적 스트레스에 미치는 영향을 조사하기 위하여 SOD가 10~50 μ g/ml로 각각 포함된 배양액에서 인체피부멜라닌세포를 2 시간 동안 전처리한 후 이의 영향을 조사한 결과 30 μ M H₂O₂만을 처리한 실험군에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 48.1%로 나타났는데 비하여 10~50 μ g/ml SOD를 처리한 실험군에 있어서는 처리농도에 의존적으로 세포생존율이 증가하였으며 특히, 50 μ g/ml 처리에서는 84.6%로 나타나 H₂O₂만을 처리한 실험군에 비하여 매우 유의하게 증가하였다(p<0.05). 이같은 본 실험의 결과는 세포에 전처리한 SOD가 H₂O₂의 산화적 스트레스를 제거함으로써 H₂O₂로 손상되는 세포를 보호한 결과라고 생각된다(Dalton 등, 1999). Liu 등(1990)은 허혈로 인한 뇌손상에 SOD를 전처리한 결과 지질의 과산화가 방어됨으로서 SOD가 산화적 스트레스에 유효한 효과가 있다고 보고하였는데 이는 본 실험과 일치함을 알 수 있었다. 한편, 본 실험의 티로시나제의 활성조사에 있어서 배양 인체피부멜라닌세포에 H₂O₂만을 처리한 실험군에서는 세포들이 검게 염색 [매우 강함(++++)~강함(+++)]된 반면, SOD를 전처리한 실험군에서는 갈색으로 염색 [보통(++~약함(+)]되었다. 이러한 결과는 SOD가 H₂O₂의 산화적 스트레스를 감소함으로써 배양 인체피부멜라닌세포내 tirosinase의 활성을 억제한 결과로 생각된다(Bartman과 James, 1966). 특히, tirosinase는 활성산소의 산화적 손상에 의하여 활성화되며 이는 산화된 티로신이 tirosinase에 의해 도파로 되고 이는 다시 도파퀴논(dopa quinon)으로 변형된 후 유멜라닌으로 형성된다(Lerner와 Fitzpate, 1984; Spritz 등, 1990). 한편, 본 실험의 광학현미경적 관찰에 있어서 H₂O₂를 처리한 실험군에서는 대조군에 비하여 세포수의 감소를 비롯하여 세포돌기의 소실과 같은 세포 퇴행적 변화를 보였다. 이는 H₂O₂의 산화적 스트레스가 본 실험에서 세포생존율의 감소를 나타냈다는 정량적 분석과 일치함을 알 수 있다. 특히, 세포돌기의 소실은 세포의 단백질합성능과 밀접한 관련이 있기 때문에 이는 H₂O₂의 산화적

스트레스가 세포내 단백질합성계와 밀접한 관련이 있는 리보솜(ribosome)이나 내형질세망(endoplasmic reticulum, ER)과 같은 세포소기관에 손상을 준 결과라고 생각된다(Krude, 1999). 반면, SOD를 전처리한 실험군에 있어서는 H₂O₂만을 처리한 실험군에 비하여 세포수의 증가나 세포돌기소실의 방지와 같은 세포형태적 변화를 보임으로서 SOD가 세포생존율이나 단백질합성계의 손상을 H₂O₂의 산화적 스트레스로부터 방어한 것으로 생각된다(Liu 등, 1990). 위와같은 방어 효과들은 H₂O₂가 이온화되면서 산소자유기로 해리되는데 이 해리된 산소자유기를 SOD가 화학적반응을 통해 산소자유기를 제거시킨 결과로 생각된다. 그러나 활성산소의 산화적 스트레스에 대한 세포독성기전을 더욱 자세히 규명하기 위하여서는 세포내 항산화계를 비롯하여 신호전달체계, 유전자발현등과 같은 다양한 측면에서 체계적으로 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

항산화제인 SOD가 활성산소(ROS)의 산화적 스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위하여 먼저 인체피부멜라닌세포를 배양한 후 활성산소의 일종인 H₂O₂를 여러 농도로 처리하여 H₂O₂의 세포독성을 세포생존율을 측정하였으며 또한 이에 대한 SOD의 영향을 colorimetric assay에 의한 세포생존율을 비롯하여 tyrosinase의 활성을 측정하였다. 동시에 H₂O₂의 산화적 스트레스에 대한 SOD의 영향을 광학현미경적 관찰에 의하여 세포의 형태적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. H₂O₂는 배양인체피부멜라닌세포의 세포생존율을 유의하게 감소시켰다.
2. H₂O₂에 의한 배양 인체피부멜라닌세포의 XTT[®]값은 30 μM에서 나타났다 (XTT[®]<100 μM).
3. SOD를 전처리한 배양인체피부멜라닌세포는 H₂O₂를 처리한 실험군에 비하여 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하였다.
4. 배양 인체피부멜라닌세포에 대한 tyrosinase의 활성조사에 있어서 H₂O₂의 처리군에서는 검게 염색되었으며 SOD의 전처리군에서는 갈색으로 나타남으로써 SOD가 tyrosinase의 활성을 감소시킨 것으로 나타났다.
5. 배양 인체피부멜라닌세포에 H₂O₂를 처리한 실험군에서는 대조군에 비하여 세포수의 감소 및 세포돌기의 소실과 같은 세포의 퇴행적 변화를 나타내었다.
6. 배양 인체피부멜라닌세포에 SOD의 전처리는 H₂O₂만을 처리한 실험군에 비하여 세포수의 증가와 세포돌기소실의

감소와 같은 형태적 변화를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 H₂O₂와 같은 활성산소의 산화적 스트레스는 세포생존율의 감소를 비롯하여 tyrosinase 활성증가 및 세포수와 세포돌기의 감소를 나타냄으로서 배양 인체피부멜라닌세포에 고독성을 나타냈다. 반면, SOD와 같은 항산화제는 H₂O₂의 산화적 스트레스에 대하여 세포생존율의 증가를 비롯하여 세포수와 세포돌기의 증가 및 tyrosinase의 활성감소를 보임으로서 활성산소의 산화적 스트레스에 대한 방어효과를 나타냈다.

Acknowledgements

이 논문은 2009년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었으며, 논문을 심사해주신 분들께 감사드립니다.

REFERENCES

김광수, 안규중, 이철현. 피부종양 2205예에 대한 통계적 고찰. 대한피부과학회지 1990;28(6):28-37

김현진. 노화과정 안의 via NF-κB 염증성 효소의 조절. 부산대학교 석사학위논문, 1997.

송상호. 노화과정에서 식이제한에 대한 xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase 유전자 발현 및 효소변화에 관한 연구. 부산대학교 석사학위논문, 2002.

연세대 산업의학연구위원회. 직업성 피부질환 1. 산업보건 1997;105(1)

정철. 콜타르 피치 취급 근로자의 광독성 피부질환. 동국대학교 석사학위논문, 1996

한영수, 김수남. 피부종양 1302예에 대한 고찰. 대한피부과학회지 1988;26(2):189

허광희, 김희옥, 박시룡, 오철환. 금속작업유 취급 근로자의 직업성 피부질환에 관한 연구. 대한피부과학회지 1996;34(3):407-414

원영호, 허수경, 이승철, 전인기, 김영표. 최근 10년간 악성색종의 임상 및 병리조직학적 연구. 대한피부과학회지 1991;29(2):193

Bartman J, James FD. Histochemical analysis of micro-dissected nephrons: enzyme stain. Strain Tech 1966;41(4):229-233

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alcuacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red(NR) and tetrazolium MTT test. Toxic In Vitro 1988;2:1-6

- Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000;35:317-329
- Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4337-4341
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:67-101
- Dimri GP, Testori A, Acosta M, Campisi J. Replicative senescence, aging and growth-regulatory transcription factors. *Biol Signals* 1996;5:154-162
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and aging skin in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9363-9367
- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978;201:875-880
- Giebel LB, Strunk KM, King RA, Hanifin JM, Spritz RA. A frequent tyrosinase gene mutation in classic tyrosinase negative(type IA) oculocutaneous albinism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3255-3258
- Hearing VJ, Jimenez M. Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level. *Pigment Cell Res* 1989;2:75-85
- Isuzugawa K, Ogihara Y, Inoue M. Different generation of inhibitors against gallic acid-induced apoptosis produces different sensitivity to gallic acid. *Biol Pharm Bull* 2001;24(3):249-253
- Kikuchi H, Hara S, Ishiguro S, Tamai M, Watanabe M. Detection of point mutation in the tyrosinase of a Japanese albino patient by a direct sequencing of amplified DNA. *Hum Genet* 1990;85:123-124
- Kolodziej H, Kayser O, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Foo LY. Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α release in macrophages in vitro. *Planta Med* 2001;67(9):825-832
- Krude T. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res* 1999;247:148-159
- Kuwata T, Kitagawa M, Kasuga T. Proliferative activity of primary cutaneous melanocytic tumors. *Virchows Archiv Pathol Anat* 1993;423:359
- Lee YS. p53 expression in pseudoepithelomatous hyperplasia, kerato-acanthoma, and squamous cell carcinoma of skin. *Cancer* 1994;73:2317
- Lerner AB, Fitzpatrick TB. Biochemistry of melanin formation. *Physiol Rev* 1984;30:92-126
- Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY. Polyethylene glycolconjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 1990;256:H589-H593
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65:55-63
- Oetting WS, King RA. Molecular basis of type I(tyrosinase-related) oculocutaneous albinism: Mutations and polymorphism of the human tyrosinase gene. *Human Mutation* 1993;2(1):1-6
- Polyak K, Xia Y, Zwier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997;389:300-305
- Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. Reactive oxygen species and intercellular Ca^{2+} , common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1973-1981
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593-602
- Shea CR, McNutt NS, Volkenandt M, Lugk J, Prioleau PG, Albino AP. Overexpression of p53 protein basal cell carcinomas of human skin. *Am J Pathol* 1992;14:25
- Shibahara S, Tomita Y, Tagani H, Muller RM, Cohen T. Molecular basis for the heterogeneity of human tyrosinase. *Tohoku J Exp Med* 1988;156:403-414
- Spritz RA, Strunk K, Giebel LB, King RA. Detection of mutations in the tyrosinase gene in a patient with type IA oculocutaneous albinism. *N Engl J Med* 1990;322:1724-1728
- Spritz RA, Strunk KM, Hsieh CL, Sckhon S, Francke U. Homozygous tyrosinase gene mutation in an American Black with tyrosinase-negative(type IA) oculocutaneous albinism. *Am J Hum Genet* 1991;8:318-324
- von Zglinicki T, Nilsson E, Docke WD, Brunk UT. Lipofuscin accumulation and aging of fibroblasts. *Gerontology*. 41 (Suppl. 2) 1995:95-108
- Yamamoto M, Shima T, Uozumi T, Sogabe T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke* 1983; 14:977-982
- Yamamoto M, Takahashi H. Immunohistochemical detection of the p53 onco-protein in tumors of melanocytic origin. *Virchows Archiv Pathol Anat* 1993;422:127