

□ 원 저 □

Paraquat에 의한 생쥐 폐의 Superoxide Dismutases와 Metallothionein의 유도능과 노화와의 관계

조선대학교 의과대학 약리학교실, 내과학교실*

이태범, 박유환*, 최철희

= Abstract =

Role of Inducibility of Superoxide Dismutases and Metallothionein of Mouse Lungs by Paraquat in Aging

Tae-Bum Lee, Yoo-Hwan Park, M.D.*, Cheol-Hee Choi, M.D.

*Department of Pharmacology, Department of Internal Medicine
Chosun University Medical School, Kwangju, Korea*

Background : The aging process may be induced, at least in part, by reactive oxygen species(ROS). It has been thought that the lung could be a good source of ROS because it has a high oxygen tension. In the present study, we investigated the inducibility of the first and last lines against oxidative stress, superoxide dismutases (Cu/Zn-SOD and Mn-SOD) as a scavenger of $O_2^{\cdot -}$ and metallothionein(MT) as a scavenger of OH^{\cdot} , respectively, in mouse lungs with age.

Methods : Oxidative stress was induced by paraquat, an intracellular superoxide generator, at 1, 4, 8, and 12 months of age and then SODs and MT mRNAs were determined by RT-PCR method.

Results : The steady-state level of Mn-SOD mRNA increased from 1 to 8 months but decreased thereafter. However, Mn-SOD mRNA was not induced by paraquat after 1 month. On the other hand, there was no change in the steady-state level of Cu/Zn-SOD mRNA, which decreased abruptly at 12 months of age. Additionally, Cu/Zn-SOD mRNA was not induced by paraquat at any age. There was no change in the steady-state level of MT mRNA with age whereas its inducibility by paraquat was intact at all ages.

Conclusion : These results indicate that lack of induction of SODs with age may be one of the causative fac-

Address for correspondence :

Cheol-Hee Choi, M.D.

Department of Pharmacology, Chosun University Medical School

375 Seosuk-dong, Dong-gu, Kwangju 501-759, South Korea

Phone : 062-220-3660 Fax : 062-232-4045 E-mail : chchoi@mail.chosun.ac.kr

tors in the aging process while induction of MT may play an important role in the defense against oxidative stress. It is therefore implicated that the tissue antioxidant/prooxidant balance could be one of determinants of mean life span. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 579-590)

Key words : Aging, Reactive oxygen speices, Oxidative stress, Superoxide dismutases, Metallothionein, Paraquat.

서론

노화의 가설을 크게 두 가지로 나누면 노화란 유전자 수준에서 결정된다는 '유전자 프로그램설'과 세포의 손상이 축적되어 기능이 약해져서 노화가 초래된다는 '손상축적설'로 나눌 수 있다¹. 후자의 가설중의 하나로 반응성 산소종에 의한 손상이 노화와 수명결정에 중요한 역할을 하며^{2,3}, 이러한 반응성 산소종은 정상적인 대사과정에서 부수적으로 생성되며 이들에 의하여 생체구성 성분들이 산화적 손상을 받게 되고 이러한 손상들이 축적되어 노화와 죽음에 이르게 된다는 것이다(Fig. 1). 포유류에서 산화적 손상을 초래하는 것은 산소대사 과정에서 발생하는 반응성 산소종으로 알려져 있다⁴⁻⁶. 생체에서 반응성 산소종은 산소 분자의 부분적 환원에 의해서 생성되며 superoxide anion($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxy radical(OH^{\cdot}) 등이 있으며, 이 중에서 OH^{\cdot} 이 가장 반응성이 강하다. 반응성 산소종에 의한 손상들은 생체가 가지고 있는 방어능력으로 대처되고 있지만 방어가 100% 완전치 못하므로 일부 제거되지 않은 반응성 산소종에 의한 유해작용을 받게된다. 이 유해작용은 천천히, 경우에 따라서 수년 내지는 일생을 통하여 만성적으로 일어나 누적되어 DNA, 단백질, 세포소기관, 세포막에 막대한 손상을 주며⁷⁻⁹, 이것이 곧 암과 같은 각종 질환 및 신체의 노화의 원인이 될 수 있다^{10,11}. 즉 반응성 산소종에 의한 손상이 장시간에 걸쳐 축적되게 되어 조직이나 세포의 기능의 이상을 바로 노화과정이라고 보는 것이다.

한편 세포 혹은 조직은 생체 내에서 여러 경로로 생기는 반응성 산소종에 대해 항산화 효소들(antioxi-

dant enzymes)을 포함한 여러 방어기전을 동원하여 방어하고 있다¹². 항산화 방어체계는 크게 효소계와 비효소계로 나눌 수 있다. 산화 방어체계는 크게 효소계와 비효소계로 나눌 수 있는데 $O_2^{\cdot-}$ 를 제거하는 효소인 SOD¹³는 산화적 손상에 대한 방어기전으로 가장 잘 알려져 있다. Catalase는 해독 효소로서, 간세포의 peroxisome에 많이 함유되어 있으며¹⁴, 주로 H_2O_2 의 분해를 촉매하고 있으나 ethanol의 산화 과정에서도 촉매를 담당하고 있다¹⁵. GSH peroxidase (GSHpx)는 생체 내에서 H_2O_2 와 glutathione (GSH)로부터 산화형 glutathione(GSSG), 물 그리고 기타 과산화물($ROOH$)과 GSH로부터 GSSG, alcohol(ROH) 및 물을 생성하는 반응을 촉매하는 효소로서¹⁶⁻¹⁸, 조직의 산화적 손상을 방지하는 역할을 담당하는 효소이다^{17,19-22}. 그리고 GSHpx는 포유류에서는 매우 중요한 역할을 하는 반면 파리나 선충에는 존재하지 않는다. 이외에도 glutathione S-transferase, glutathione reductase, glucose-6-phos-

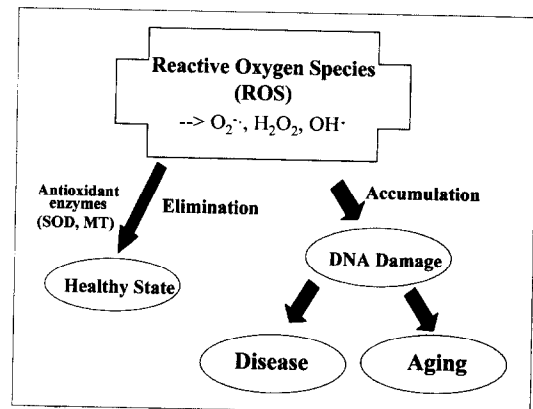


Fig. 1. Free radical theory of aging.

phate dehydrogenase 등이 있다. 지금까지 위와 같은 항산화 효소와 노화와의 관련성에 대한 보고가 있었다^{23, 24}. 비효소계로는 α -tocopherol(vitamin E), β -carotene, ascorbic acid(vitamin C), metallothionein(MT) 등이 있다²⁵.

O_2^- · 는 산소분자가 전자를 한 개 받음으로써 제일 먼저 생성되는 라디칼로서 Haber-Weiss 반응($H_2O_2 + O_2 \rightarrow OH \cdot + OH^- + O_2$)에 의해 보다 강력한 radical인 $OH \cdot$ 를 생성할 뿐 아니라²⁶, Cu^{+} 나 Fe^{++} 에 의해 촉매되는 Fenton 반응($Fe^{++} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+++} + OH \cdot + OH^-$ 또는 $Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{++} + OH \cdot + OH^-$)에서 전이금속인 Cu^{++} 나 Fe^{+++} 를 환원시키는 데도 관여하므로 중요한 산소 라디칼이다²⁷. 그러므로 O_2^- · 를 제거하는 효소인 SOD¹³가 산화적 손상에 대한 초기 방어기전으로 가장 중요한 것으로 잘 알려져 있다. 포유동물에는 3종류의 SOD가 있는데 세포질에 있는 copper/zinc-SOD(CuZn-SOD), mitochondria에 있는 manganese-SOD(Mn-SOD), 세포 외에 존재하는 extracellular SOD(EC-SOD)들로서, 각 SOD들의 세포 내 분포가 다르다.

비효소계의 내인성 방어기전으로서 MT의 역할이 강조되고 있다. 뿐만 아니라, 노화와 관련되어 있다고 알려진 효소 중 SOD는 O_2^- · 를 제거하므로 산화적 손상의 중요한 방어인자인 것은 사실이나 $OH \cdot$ 에 의한 손상을 완벽하게 억제하지 못하므로 산화적 손상을 억제할 수 있는 물질로서 MT의 역할에 대한 연구가 필요한 시점이다. MT는 말의 신장 조직에서 카드뮴의 분포를 밝히는 과정에 처음으로 알려지게 되었다. 그 후 이 단백질은 박테리아, 균류, 식물 및 진핵생물에서 폭넓게 발견되고 있다. 이 단백질은 여러 가지 면에서 다른 단백질들과는 다른 특이한 점을 가지고 있다. 약 60여개의 아미노산으로 구성된 작은 단백질로서 그 삼분의 일이 시스테인 잔기이며 8개의 리신 잔기도 가지고 있는 반면, 방향족 아미노산이나 히스티딘은 전혀 함유하고 있지 않다^{28, 29}. MT는 주로 2가 양이온체인 카드뮴, 아연, 혹은 구리와 결합하고

있는 것으로 알려져 있다. MT는 높은 금속 함량, 특이한 생무기화학적 구조, 반응속도론적 불안전성, 신속한 금속전달기능 등에서 다른 금속단백질과는 다르다. 이 단백질은 분열이 활발한 종양조직이나 신생아 쥐³⁰, 생쥐, 토끼와 햄스터³¹에서 발견되었다. 그리고 인간³², 양, 소³³, 쥐³⁴, 토끼³⁵의 간에서 다량으로 분포하는 양상을 나타내고, 특히 척추동물의 간, 비장, 췌장, 고환, 폐, 장, 뇌와 심장에 많이 분포하고 있다^{36, 37}. MT의 효소적 기능은 아직 알려져 있지 않기 때문에 구조에 따라 흔히 MT I, II, III, IV로 분류된다. MT I 과 MT II는 가장 풍부한 형태로 발현이 되지만 그 생리적 기능은 밝혀지지 않고 있다. MT III는 뉴런의 성장을 방해한다는 사실이 알려졌으며 최근에 알츠하이머병 환자의 뇌에서 발견되었다³⁸. 그러나 그것은 그런 특이한 생물학적 기능을 가지는 유일한 동위형태이다. MT IV는 피부, 혀 및 소화관의 상피층에서 발견되었다. MT는 1957년 발견 이래로 아직까지 MT의 기능에 대하여 여러 가지 가설이 제안되었지만 아직 명확하게 밝혀진 것은 거의 없다³⁹. 흔히 금속독성에 대한 방어, 세포내 금속 농도 유지와 전이, 항산화제 기능⁴⁰, 자외선 또는 X-ray에 의해 손상되는 세포의 수선⁴¹등이 기능으로 추정되고 있다. 최근에는 MT의 항산화제나 항스트레스제로서의 역할에 대한 논의가 활발해지고 있다.

노화과정에 방어기전의 함량만으로 노화의 원인과 결과를 설명하는데는 한계가 있다. Niwa 등^{42, 43}은 사람의 백혈구에 산화성 스트레스를 유발하는 paraquat를 처치한 후 SOD 유도능을 조사한 결과 나이가 많아지면서 유도능이 감소한다고 보고하였다. 이와 같이 방어기전의 유도능이 오히려 노화를 설명할 수 있는 좋은 기능일 수가 있다. 그러므로 본 연구에서는 산화적 스트레스에 의한 방어기전의 역할을 관찰하기 위하여 산소의 분압이 높아 반응성 산소종의 생성이 높을 곳으로 보이는 폐를 선정하고, 산화적 스트레스는 superoxide을 생성하는 것으로 잘 알려진 paraquat로 유도하였다. 산화적 스트레스의 방어기전으로는 반응

성 산소종 생성의 초기에 중요한 방어기전인 superoxide dismutases(SODs)와 hydroxy radical($\text{OH}\cdot$)에 의한 산화적 손상의 마지막 방어기전인 metallothionein(MT)을 선정하여 이들의 mRNA의 함량과 paraquat에 의한 유도능을 조사하여 노화와의 관계를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 일본 교토대학 의학부로부터 정상발육을 하는 AKR strain인 R-1 계열 생쥐(수컷)를 분양 받아 사용하였다. 생쥐는 $24 \pm 4^\circ\text{C}$ 항온에서 상온화된 사료와 수돗물을 마음대로 먹을 수 있게 하였다. 실험에 사용한 생쥐는 생후 1, 4, 8, 12개월령을 사용하였다. 실험에 사용된 생쥐의 수는 생리식염수를 투여한 군(대조군)은 4마리, paraquat(Sigma)를 처리한 군은 5마리를 사용하였다. Paraquat는 64.3 mg/kg을 복강 내로 투여하였다. 투여 후 24시간에 폐를 일정량 떼어내어 합하여 -70°C 에 보관하였다. RNA는 일주일 내에 추출하여 cDNA을 합성한 후 보관하였다. 실험결과와 재현성을 확인하기 위해서 12개월된 생쥐의 폐의 조직을 합하지 않고 각각으로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR한 결과를 통계 처리하였다.

2. RNA의 분리와 역전사 중합효소 연쇄반응

1) 총 RNA의 추출

Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출방법⁴⁾을 이용하여 총 RNA를 분리 추출하였다. 자세한 방법은 다음과 같다. 조직을 차가운 PBS로 두 번 세척한 후 세포침전물에 변성용액(4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7.0, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol) 1 ml를 넣어 피펫으로 여러 번 섞은 후 poly-

propylene tube에 옮긴 후 변성용액 1 ml당 2 M sodium acetate 용액(pH 4.0) 0.1 ml, 수화된 phenol 1 ml, chloroform-isoamylalcohol(24:1) 0.3 ml를 넣어 혼합하고 15분 이상 얼음에 두었다. 시료를 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 수층을 깨끗한 Corex[®] 유리 튜브에 옮긴 다음 차가운 isopropanol 동량을 넣고 -20°C 에서 최소 1시간 이상 방치하였다. 이를 다시 10,000 g에서 20분간 원심 분리하여 얻은 RNA 침전물에 변성용액과 isopropanol을 동량 넣어 섞은 후 -20°C 에서 1시간 방치한 후 10,000 g로 15분간 RNA를 재원침시켰다. RNA 침전물을 75% ethanol로 씻은 후, 침전물을 수분간 실온에서 건조시켜 DEPC water에 녹였다. RNA 농도(10D = 40 g/ml)는 260 nm에서 측정하고(DUR 650 spectrophotometer), RNA 순도는 A260/A280 비로, RNA 보존도는 RNA 5 g를 전기영동하여 28S와 18S band들을 확인하여 각각 결정하였다. 이 상에서 사용된 모든 초자제품은 180°C 에서 8시간 이상 구웠고 Tris, SDS 이외의 모든 용액은 DEPC 농도를 0.1%가 되도록 제조한 후 하룻밤 동안 방치 후 고압 증기 멸균하였다.

2) 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

First strand cDNA을 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM DTT(Promega), 1 U/ μl RNasin(Promega), 1 mM each dNTP, oligo (dT)₂₀ 100 ng과 MMLV reverse transcriptase (Promega) 200 U가 함유된 20 μl 의 용액에서 총 RNA 1 μg 으로부터 합성하였다. PCR은 1xPCR 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gelatin, 0.05% triton X-100)에 25 ng의 RNA로부터 합성된 cDNA, 각각의 primer 20 pmole, 50 μM dNTP와 taq DNA polymerase(Perkin Elmer) 2.5 unit가 함유된 25 μl 의 반응액에서 시행하였다(GeneAmp PCR system 2400, USA). 정량을 위해서 5 μCi 의 [α - ^{32}P] dCTP를 반응 혼합물에 첨가하였다. 사용한 primer

Table 1. PCR Primers of Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, MT and β -actin

Gene	S&AS ²⁾	Primer sequences	Sequence region ³⁾	Reference ⁴⁾
Cu/Zn-SOD	S	5'-AAGGCCGTGTGCGTGCTGAA	2-21	El Mouatassim
	AS	5'-CAGGTCTCCAACATGCCTCT	247-228	등, 2000 ⁴⁵
Mn-SOD	S	5'-TTCTGAGGAGAGCAGCGG	1-18	Sun 등,
	AS	5'-TTCATAGTGCTGCAATGCTCTA	779-759	1993 ⁴⁶
MT	S	5'-CCGGCTCCTGCAAATGCAAA	47-66	Lambert 등,
	AS	5'-TGTACAACCCTGACCGTGAC	266-247	1996 ⁴⁷
β -actin ¹⁾	S	5'-ATGGATGACGATATCGCT	81-98	Benavides 등,
	AS	5'-ATGAGGTAGTCTGTTCAGGT	649-631	1995 ⁴⁸

1) β -actin, PCR control (house keeping gene).

2) Sense and antisense.

3) The oligonucleotide primers constructed for PCR correspond to the sense and antisense based within these reported sequences.

4) References for primer sequences.

Table 2. PCR condition of Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, MT and β -actin

Gene	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	72℃에서 5분간 반응 시킨 후 4℃에 보관	Size of PCR product
Cu/Zn-SOD	94℃, 12min	94℃, 30sec	58℃, 30sec	72℃, 1min		246bp
Mn-SOD		94℃, 30sec	56℃, 30sec	72℃, 1min		779bp
MT		94℃, 30sec	58℃, 30sec	72℃, 1min		220bp
β -actin		94℃, 30sec	53℃, 30sec	72℃, 1min		569bp

와 PCR 조건은 Table 1, 2와 같다.

PCR 산물 25 μ l로부터 MT, Cu/Zn-SOD와 Mn-SOD 산물 각각 10 μ l와 β -actin 5 μ l를 섞은 후 7% 비변성 polyacrylamide gel 상에서 각각 전기영동하여 분리하였다. 전기영동 후 gel를 건조 후 X-ray 필름에 노출시켜 autoradiography를 시행하였다.

3. 통계분석

실험 결과는 평균 \pm 표준편차 형태로 나타내며 두 그룹간의 통계적인 분석은 Student's *t*-test 방법을 이용하였으며 $p < 0.05$ 인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

연구결과

본 연구에서는 1, 4, 8, 12개월된 정상 생쥐의 폐를 적출하여 모은 후 추출한 RNA로부터 SODs와 MT mRNA의 항정상태 농도와 1, 4, 8, 12개월된 정상생쥐에 paraquat를 투여한 후 24시간에 폐를 적출하여 SODs와 MT mRNAs의 발현정도를 RT-PCR 방법으로 측정하였다. 대표적인 autoradiographs는 Fig. 2과 같다. Mn-SOD mRNA의 항정상태의 양은 1개월에서 극히 소량만이 검출되었으나, 1개월과 비교시 4개월에서 116%, 8개월에서 456%이었다. 그러나 12개월에서는 201%로 8개월 수준보다 오히려 감소하였다(Fig. 3). Paraquat 처치에 의한 Mn-SOD mRNA는 1개월에서 대조군과 비교시 277%로 현재

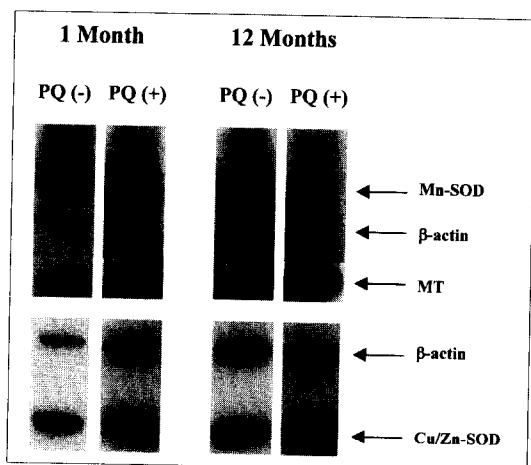


Fig. 2. Representative autoradiographs for the inducibility of Mn-SOD, Cu/Zn-SOD and MT mRNA by paraquat in aging process of lungs. Expression was determined by RT-PCR assay.

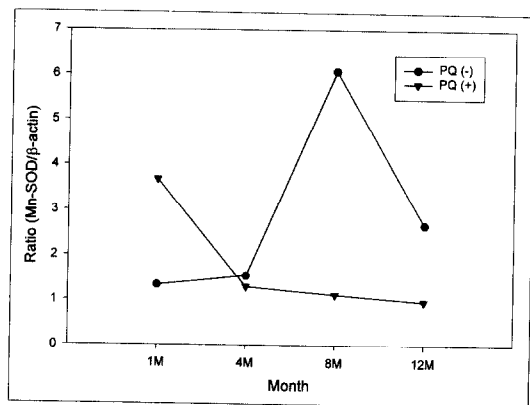


Fig. 3. Steady-state levels of Mn-SOD mRNA and its inducibility by paraquat in aging process of lungs. Mn-SOD mRNA levels were determined using RT-PCR method as in Fig. 2.

히 증가하였으나 4개월 이후에는 대조군에 비해 오히려 감소하였으며 그 농도는 1개월의 대조군 수준에 머물렀다(Fig. 3). 그리고 Cu/Zn-SOD mRNA의 항정상상태 농도는 1개월부터 8개월까지는 약간 증가하다가 12개월에서는 1개월과 비교시 48%로 현저히

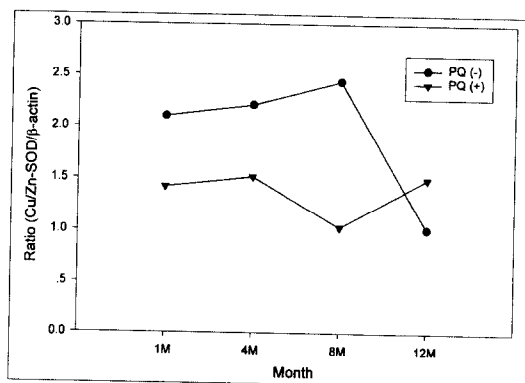


Fig. 4. Steady-state levels of Cu/Zn-SOD mRNA and its inducibility by paraquat in aging process of lungs. Cu/Zn-SOD mRNA levels were determined using RT-PCR method as in Fig. 2.

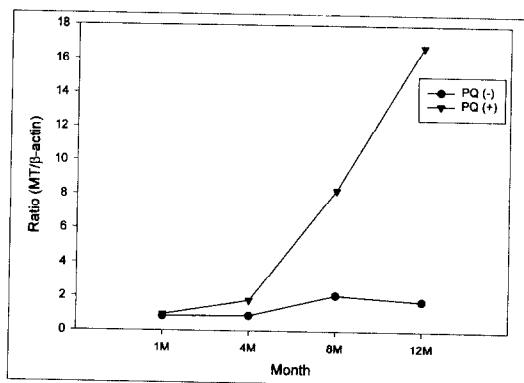


Fig. 5. Steady-state levels of MT mRNA and its inducibility by paraquat in aging process of lungs. MT mRNA levels were determined using RT-PCR method as in Fig. 2.

감소하였으며 paraquat 처치에 의한 Cu/Zn-SOD mRNA는 12개월에서 대조군과 비교시 148%로 약간 증가하였으나 1, 4, 8개월에서는 Cu/Zn-SOD mRNA가 전혀 유도되지 않았다(Fig. 4). 그러나 MT mRNA의 항정상상태의 양은 1, 4, 8, 12개월에서 큰 차이를 보이지 않았으며 paraquat 처치에 의한 MT mRNA는 1개월에서 대조군과 큰 차이는 없었으

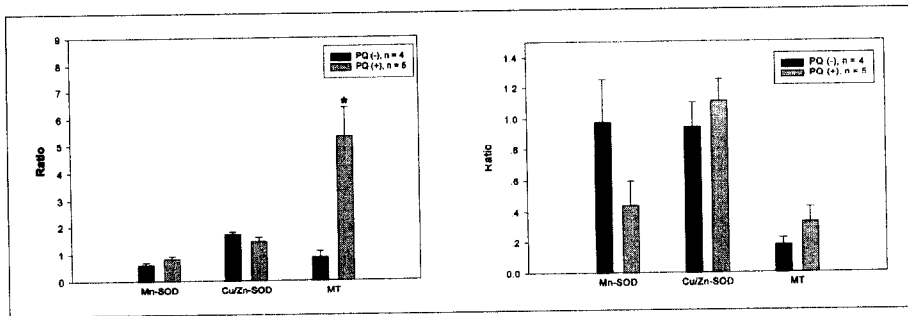


Fig. 6. Inducibility of SODs and MT mRNA by paraquat in lungs of 4- (A) and 12-month-old mice (B). *, statistically significant from the control ($P < 0.05$) n, the number of samples; Bar, standard error.

나 4, 8, 12개월에서는 대조군과 비교시 각각 205%, 396%, 및 964%로 연령의 증가에 비례하여 현저히 증가하였다(Fig. 5).

이와 같은 결과가 얼마나 재현성이 있는지를 확인하기 위해서 4개월과 12개월된 정상생쥐 4마리를 대조군으로 하고 5마리에 paraquat를 투여한 후 24시간 후에 폐를 적출하여 각각의 폐로부터 얻어진 결과를 통계 처리하였다(Fig. 6). 4개월에서 Mn-SOD mRNA의 항정상태 농도(평균 \pm 표준오차)는 0.591 ± 0.084 이었으며, paraquat 투여시 1.703 ± 0.083 으로 증가하였으나 통계학적 의의는 없었다($P = 0.153$). Cu/Zn-SOD mRNA는 대조군에서 1.703 ± 0.083 , paraquat 투여군에서는 1.437 ± 0.156 으로 Fig. 3에서처럼 약간 감소하였다($P = 0.184$). MT mRNA도 대조군에서 0.857 ± 0.222 , paraquat군에서는 5.322 ± 1.075 로 Fig. 4에서처럼 증가하였다($p < 0.01$). 12개월에서 paraquat에 의해 Mn-SOD mRNA의 항정상태 농도(평균 \pm 표준오차)는 0.975 ± 0.275 였으며, paraquat 투여시 0.437 ± 0.155 로 감소하여 Fig. 3에서와 같은 결과를 보여주었으나 통계학적 의의는 없었다($p = 0.128$). Cu/Zn-SOD mRNA는 대조군에서 0.941 ± 0.159 , paraquat군에서는 1.108 ± 0.140 으로 약간 증가하였으나 통계학적 의의는 없었다($p = 0.461$). MT mRNA도 대조군에서 0.175 ± 0.045 , paraquat군에서는 0.321 ± 0.102 로 증가하였으나 통계학적 의의는 없었다($p = 0.241$).

이와 같이 각각의 결과를 통계처리한 것과 장기를 합하여 얻어진 결과는 증감의 양상은 비슷하였으나 paraquat에 의한 MT의 유도를 제외하고는 통계학적으로 유의한 차이를 보여주지는 못했다.

고 찰

일반적으로 노화는 '나이를 더함에 따라 누구에게나 찾아오는 생체기능의 불가역적인 저하'라고 정의할 수 있다. 이처럼 인간 누구에게나 찾아오는 노화의 원인에 대해서는 지금까지 많은 가설들이 제창되고 있으며 최근 많은 과학자들은 다시 노화는 우리 몸에서 끊임 없이 생성되는 반응성 산소종에 의한 산화적 손상이 노화와 수명결정에 중요하다고 생각하고 있다. 그러나 세포는 이러한 산화적 손상에 대한 방어기전을 가지고 있으며 산화적 손상과 방어기전의 불균형으로 산화적 손상이 축적이 일시에 나타나면 질병을 일으키겠지만 장시간에 걸쳐 조금씩 축적되어 세포의 기능저하라는 표현형으로 나타나는 것이 노화로 생각하고 있다. 본 연구에서는 1, 4, 8, 12개월된 정상생쥐의 폐에서의 노화과정중 산화성 스트레스 SODs와 MT MRNAs의 함량과 paraquat에 대한 SOD와 MT mRNA의 유도능을 조사하였다.

그 동안 노화와 폐의 SOD와 관련된 다른 연구가 있었다. 즉 쥐의 폐에서 paraquat에 대한 독성효과를 조사하였는데, 늙은 쥐는 젊은 쥐보다 독성에 훨씬 민

감하였다⁴⁹. 그리고 늙은 쥐의 폐에서 분리된 SOD는 젊은 쥐의 그것보다 열에 약하고 활성도도 낮았다⁵⁰. 1개월된 젊은 쥐, 4~5개월된 성인 쥐, 24개월된 늙은 쥐의 폐에서 Cu/Zn-SOD를 조사한 결과, 성인과 늙은 쥐의 평균 Cu/Zn-SOD는 젊은 쥐 보다 높았다⁵¹. 이상은 주로 나이에 따른 SOD 단백질의 함량과 활성도에 관한 연구이다. 본 연구에서 폐에서 SODs와 MT mRNA의 함량과 paraquat에 의한 유도능을 조사한 결과 폐에서는 Mn-SOD mRNA 유도능이 4개월부터 소실되었다. 이와 같은 결과는 나이가 들면서 유전자 수준에서 SOD발현에 이상이 발생하여 산화적 손상을 더 받게 된다는 사실을 시사한다. 환언하면 Mn-SOD mRNA의 발현의 이상이 노화의 원인으로 작용할 가능성이 있다. Lopez-Torres 등⁵²은 개구리의 간과 신장에서 SOD와 같은 항산화제가 유도되지 않으면 치사율이 높아 항산화제와 항산화제간의 균형이 평균수명을 좌우한다고 하였다.

노화와 폐의 MT와 관련해서 Wormser와 Nir⁵³는 3, 12, 24개월 된 흰쥐에 카드뮴을 투여한 후 노화가 진행됨에 따라 폐에서의 MT 유도능을 조사한 결과, 카드뮴을 처리하지 않은 것과 비교하였을 때 각각 2, 10, 8배 증가하였다. 이와 같이 MT의 유도능은 연령이 증가하여도 크게 변하지 않음을 알 수 있다. 본 연구에서는 산화적 스트레스에 의해 MT mRNA는 연령이 증가함에 따라 다소 감소하였으나 Mn-SOD mRNA와는 달리 정상적으로 발현이 되었다. 암세포로 형질전환된 세포에서도 MT promotor의 이상으로 정상세포보다는 MT의 발현은 감소하나 유도는 정상적으로 일어난다고 하였다⁵⁴. MT유전자발현은 중금속, 반응성 산소종, 여러 종류의 스트레스에 의해서 유도되며 MT유전자발현에 관여하는 인자는 cis-acting elements, trans-acting element(MTF-1)와 epigenetic elements(promotor 부위의 hypermethylation 등)가 있다⁵⁵. 뿐만아니라 연령이 증가하면서 SODs와 같은 항산화효소가 유도되지 않는다 하더라도 다른 항산화제의 증가로 보상될 수 있다⁵⁶는 사실과 Cu/Zn-SOD를 homozygous deletion

(*sod1* -/-)시킨 흰쥐의 간에서 MT mRNA가 10배 이상 증가하였다⁵⁷는 결과를 비취 볼때 본 연구에서도 SOD와 같은 항산화효소 발현의 감소로 산화적 스트레스 상태에서 MT발현이 증가됨으로써 산화적 손상에 방어적으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면, 노화과정에서 SODs유도능의 이상이 노화의 원인 인자로 작용하고, 반면에 MT의 정상적인 유도능이 산화적 스트레스에 대하여 방어 역할을 할 가능성을 시사해주고 있다. 이와 같은 결과는 연령이 증가함에 따라 Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, 및 MT의 발현과 유도능의 차이로 인하여 반응성 산소종에 의한 산화적 손상의 정도의 차이가 노화의 속도를 결정하는 하나의 인자로 작용할 가능성이 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

노화란 반응성산소종에 의한 산화적 손상이 축적되어 세포의 기능의 저하로 초래된다고 주장되고 있다. 본 연구에서 1, 4, 8, 12개월된 정상 생쥐의 폐에서 반응성 산소종 생성의 초기에 중요한 방어기전인 superoxide dismutases(SODs) mRNA와 hydroxy radical(OH·)에 의한 산화적 손상의 마지막 방어기전인 metallothionein(MT) mRNA의 함량과 paraquat에 의한 유도능을 조사하였다.

방 법 :

산화적손상은 세포내에서 superoxide을 생성하는 paraquat를 투여한 후 SODs와 MT mRNAs를 RT-PCR방법으로 측정하였다.

결 과 :

정상생쥐의 폐의 노화과정에서 Mn-SOD와 Cu/Zn-SOD, 그리고 MT mRNA의 항정상태 함량을 조사한 결과, Mn-SOD mRNA는 8개월까지는 증가하다가 12개월에서 감소하였으나, Cu/Zn-SOD mRNA는 별 변화가 없었고 12개월에 감소하였다. 그러나 MT mRNA는 어느 연령에도 변화가 없었다. 산화성 스트

레스를 유발하는 paraquat에 의하여 Mn-SOD mRNA는 4개월 부터 유도되지 않았으며, Cu/Zn-SOD mRNA는 전혀 유도되지 않았다. MT mRNA는 관찰한 전 연령에서 유도되었다.

결 론 :

노화과정에서 SODs유도능의 이상이 노화의 원인 인자로 작용하고, 반면에 MT의 정상적인 유도능이 산화적 스트레스에 대하여 방어 역할을 할 가능성을 시사해주고 있다. 이와 같은 결과는 연령이 증가함에 따라 Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, 및 MT의 발현과 유도능의 차이로 인하여 반응성 산소종에 의한 산화적 손상의 정도의 차이가 노화의 속도를 결정하는 하나의 인자로 작용할 가능성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 조선대학교 학술연구비(2000년)의 지원을 받아 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals, ageing, and disease ; Halliwell B(eds) and Gutteridge JMC. in Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press Oxford 1989;450-7.
2. Harman D. The free radical theory of aging ; Pryor WA(eds). in Free Radicals in Biology. Academic Press New York 1982;255-75.
3. Culter RG, Antioxidants, longevity : in Free Radicals ; in Armstrong D(eds), Sohal RS, Culter RG, Slater TF. Molecular Biology, Aging, and Disease. Raven Press New York 1984;235-66.
4. Cohen G. The generation of hydroxyl radicals in biological system. Photobiol 1978;28:669-75.
5. Fridovich I. The Biology of oxygen radicals. Science 1978;201:875-80.
6. Kappus H. Overview of enzyme systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling. Biochem Pharmacol 1986;35(1):1-6.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 1984;219(1):1-14.
8. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neu rodegenerative disorders. Science 1993;62:689-95.
9. Vusse GJ, Bilsen M. Reneman Ischemia and reperfusion- induced alterations in membrane phospholipids ; an overview ; in Das DK(eds), Cellular, Biochemical, and Molecular Aspects of Reperfusion Injury. New York, Ann. New York Acad Sci 1994;1-14.
10. Jamieson D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. Free Radic Biol Med 1989;7(1):87-108.
11. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86(24):9697-701.
12. Girtten B, Oloff C, Plato P. Skeletal muscle antioxidant enzyme levels in rats after simulated weightless, exercise and dobutamine. The Physiologist 1989;32:s59-s60.
13. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem 1992;59(5):1609-23.
14. Lazarow PB, de Duve C. The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes : V. Intracellular pathway of catalase synthesis. J Cell Biol 1973;59:507-24.
15. Cederbaum AI, Qureshi A. Role of catalase and hydroxyl radicals in the oxidation of methanol by rat liver microsomes. Biochem Pharmacol 1982;31:329-35.
16. Pierce A, Tappel L. Glutathione peroxidase

- activities from rat liver. *Biochem Biophys Acta* 1978;523:27-36.
17. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.
18. Kim BK. *Enzyme Nomenclature*. IUB New York, Academic Press 1979;92-93:106-107 & 186-7.
19. Chow CK, Tappel AL. An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone exposed rats. *Lipids* 1972;7:518-24.
20. Chow CK, Tappel AL. Activities of pentose shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone exposed rats. *Arch Environ Health* 1973;26:205-8.
21. Player TJ, Mills DL, Horton AA. Age dependent changes in rat liver microsomal and mitochondrial NADPH dependent lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;78:1397-402.
22. Wendel A. Glutathione peroxidase; in Jakoby WN(eds), *Enzymatic Basis of Detoxication*. New York, Academic Press 1980;333-48.
23. Ji LL, Dillon D, Wu E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 1990; 258:R918-23.
24. Sanz N, Diez-Fernandez C, Alvarez A, Cascales M. Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J Hepatol* 1997;27(3):525-34.
25. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987;1(6):441-5.
26. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond* 1934;147: 332-51.
27. Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* 1996;145(5):523-31.
28. Cherian MG, Goyer RA. Methallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci* 1978;23(1):1-9.
29. Vallee BL, Metallothionein, historical review and perspectives; in Kagi JHR and Nordberg M (eds), *Metallothionein*. Birkhauser, Verlag Basel, Boston 1979;19.
30. Wong KL, Klaassen CD. Isolation and characterization of metallothionein which is highly concentrated in newborn rat liver. *J Biol Chem* 1979; 254(24):12399-403.
31. Bakka A, Webb M. Metabolism of zinc and copper in the neonate: changes in the concentrations and contents of thionein-bound Zn and Cu with age in the livers of the newborn of various mammalian species. *Biochem Pharmacol* 1981;30(7): 721-5.
32. Riordan JR, Richards V. Human fetal liver contains both zinc- and copper-rich forms of metallothionein. *J Biol Chem* 1980;255(11):5380-3.
33. Hartmann HJ, Weser U. Copper-thionein from fetal bovine liver. *Biochim Biophys Acta* 1977; 491(1):211-22.
34. Bell JU. A metallothionein-like protein in the hepatic cytosol of the term rat fetus. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979;48:139-44.
35. Waalkes MP, Bell JU. Isolation and partial characterization of native metallothionein in fetal rabbit liver. *Life Sci* 1980;27(7):585-93.
36. Onosaka S, Cherian MG. The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rats in response to metals. II. Influence of zinc status and specific effect on pancreatic metallothionein. *Toxicology* 1982;23(1):11-20.
37. Waalkes MP, Klaassen CD. Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals. *Fundam Appl*

- Toxicol 1985;5(3):473-7.
38. Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991;7(2):337-47.
39. Palmiter RD. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;95(15):8428-30.
40. Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ. Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987;185(2):107-19.
41. Matsubara J, Tajima Y, Karasawa M. Promotion of radioresistance by metallothionein induction prior to irradiation. *Environ Res* 1987;43(1):66-74.
42. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood* 1990;76(4):835-41.
43. Niwa Y, Iizawa O, Ishimoto K, Akamatsu H, Kanoh T. Age-dependent basal level and induction capacity of copper-zinc and manganese superoxide dismutase and other scavenging enzyme activities in leukocytes from young and elderly adults. *Am J Pathol* 1993;143(1):312-20.
44. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
45. El Moutassim, S Guerin P, Menezo Y. Mammalian oviduct and protection against free oxygen radicals: expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;89(1):1-6.
46. Sun Y, Hegamyer G, Colburn NH. Sequence of manganese superoxide dismutase-encoding cDNAs from multiple mouse organs. *Gene* 1993;131(2):301-2.
47. Lambert E, Kille P, Swaminathan R. Cloning and sequencing a novel metallothionein I isoform expressed in human reticulocytes. *FEBS Lett* 1996;389(2):210-2.
48. Benavides GR, Hubby B, Grosse WM, McGraw RA, Tarleton RL. Construction and use of a multi-competitor gene for quantitative RT-PCR using existing primer sets. *J Immunol Methods* 1995;181(2):145-56.
49. Petrovic VM, Spasic M, Milic B. Age-dependent resistance to the toxic effects of paraquat in relation to superoxide dismutase activity in rat lung. *Free Radic Res Commun* 1986;1(5):305-9.
50. Santa Maria C, Ayala A, Revilla E. Changes in superoxide dismutase activity in liver and lung of old rats. *Free Radic Res* 1996;25(5):401-5.
51. Ischiropoulos H, Nadziejko CE, Kikkawa Y. Effect of aging on pulmonary superoxide dismutase. *Mech Ageing Dev* 1990;52(1):11-26.
52. Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G. Simultaneous induction of sod, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging. *Free Radic Biol Med* 1993;15(2):133-42.
53. Wormser U, Nir I. Effect of age on cadmium-induced metallothionein synthesis in the rat. *Arch Toxicol* 1988;62(5):392-4.
54. Duncan EL, Reddel RR. Downregulation of metallothionein-IIA expression occurs at immortalization *Oncogene* 1999;18(4):897-903.
55. Ghoshal K, Jacob ST. Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000;66:357-84.
56. Matsuo M, Gomi F, Dooley MM. Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid

- peroxidation in brain, liver, and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats. *Mech Ageing Dev* Jul 15 1992;64(3):273-92.
57. Ghoshal K, Majumder S, Li Z, Bray TM, Jacob ST. Transcriptional induction of metallothionein-I and -II genes in the livers of Cu,Zn-superoxide dismutase knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264(3):735-42.
-