

섬유주세포에서 Dipyridamole이 활성산소종과 산화스트레스에 미치는 영향

이근우 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

목적: 배양된 섬유주세포에서 dipyridamole (DPD)이 활성산소종의 생성과 산화스트레스에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: DPD의 항산화능은 DPPH assay로 조사하였다. 인체의 섬유주세포를 일차배양한 후 0, 20, 50 μ m DPD에 노출시켜 DCFHDA assay로 활성산소종의 생성에 미치는 영향을 조사하였으며, t-butylhydroperoxide (tBHP)로 유발한 산화스트레스에 대해 세포활성도에 미치는 영향을 resazurin assay로 조사하였다.

결과: DPD는 유의한 항산화능을 나타내었다($p < 0.05$). 인체의 섬유주세포에서 DPD는 유의하게 활성산소종의 생성을 감소시켰으며($p < 0.05$), tBHP로 유도된 산화스트레스에 대해 DPD는 유의하게 세포 활성도를 증가시켰다($p < 0.05$). DPD는 일산화질소의 생성에는 유의한 영향을 미치지 않았다.

결론: DPD는 섬유주세포에서 항산화능력과 세포보호작용을 나타낼 수 있을 것으로 생각한다.

〈대한안과학회지 2013;54(3):496-501〉

섬유주세포는 방수유출로의 조절에 중요한 역할을 하는데, 섬유주의 변성으로 인해 방수유출로의 저항이 증가되어 개방각녹내장을 유발하는 것으로 알려졌다.^{1,2} 따라서 섬유주세포를 보호하여 그 기능을 유지 또는 회복할 수 있다면 섬유주를 통한 방수유출을 조절하는데 많은 도움이 될 것이다. 섬유주세포는 내피세포와 식세포로서의 역할 외에도 형태학적 연구와 전기생리학적 연구에서 평활근과 유사한 성질을 가진 것으로 알려졌다.^{3,4} 일산화질소(Nitric oxide, NO)는 섬유주를 이완시킴으로써 섬유주를 통한 방수유출을 촉진하는 것으로 알려졌다.^{5,6} 녹내장의 경우 NO의 생성 저하에 의해 섬유주를 수축시켜 안압을 상승시킬 수 있으며, 또한 반응성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 유발하여 산화스트레스에 의해 섬유주의 손상을 유발할 수 있을 것이다.⁷

과다한 ROS의 생성에 의한 산화스트레스는 세포독성을 유발할 뿐만 아니라, 세포변성, 노화 등의 여러 병적 손상을 야기하게 되는데, NO의 생성이 저하된 경우에도 유해한 ROS의 생성이 증가하게 된다.^{8,9} 방수 내에도 항상 일정한

정도의 ROS가 생성되며 이에 대한 다양한 방어기전이 존재한다. ROS에 노출된 상태인 섬유주는 산화스트레스에 의해 병적인 손상을 받을 가능성이 매우 높은 조직이므로 과다한 ROS의 생성에 의한 산화스트레스를 줄이거나 방지할 수 있다면 섬유주의 손상을 줄여 섬유주의 기능을 유지 또는 회복할 수 있을 것이다. 이러한 섬유주세포를 대상으로 하여 산화스트레스를 줄이거나 방지하는 연구가 많이 시행되고 있다.^{10,11}

Dipyridamole (DPD)은 혈소판저해제로서 항혈전작용 외에 혈관이완을 유발하여 조직으로의 혈류를 증가시키는 작용이 있다.¹² 또한 DPD는 자유유리기를 제거하는 항산화제로의 성질을 가진 것으로 알려졌다.^{13,14} 따라서 DPD이 섬유주세포에 작용하는 활성산소종을 제거하는 항산화작용을 나타낼 가능성이 있으나 인체의 섬유주세포에 대한 DPD의 항산화작용에 대해서는 아직 자세히 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 DPD의 항산화능을 알아보고, 인체의 섬유주세포를 일차배양하여 활성산소종의 생성에 미치는 영향과 산화스트레스를 유발하여 DPD가 섬유주세포의 활성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

■ 접수 일: 2012년 7월 13일 ■ 심사통과일: 2012년 10월 11일
■ 게재허가일: 2013년 2월 14일

■ 책임저자: 김 재 우

대구광역시 남구 두류공원로 17길 33
대구가톨릭대학교병원 안과
Tel: 053-650-4728, Fax: 053-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

대상과 방법

DPPH assay

DPD (Sigma, St Louis, MO, USA)의 자유유리기 제거

효과를 알아보기 위하여 DPPH assay를 시행하였다.¹⁵⁻¹⁷ 자유유리기인 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma, St Louis, MO, USA)를 메탄올에 녹인 후 100 μ m DPD에 단계적으로 희석한 DPD를 섞은 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPD의 자유유리기 제거효과는 DPD를 넣지 않은 대조군에 대한 DPPH의 소거 정도를 소거활성률(%)로 나타내었다.

세포배양

안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 안구의 앞방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma, St. Louis, Mo. USA)으로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 15% 우태아혈청(Hyclone, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 충만해지면 10% 우태아혈청(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 포함한 배지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대배양하였다.

Dichlorofluorescein diacetate assay

섬유주세포에서 DPD가 활성산소종의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 dichlorofluorescein diacetate assay를 시행하였다.¹⁸ 인체의 섬유주세포를 일차배양한 후 0, 20, 50 μ m의 DPD에 노출시킨 다음 배지를 제거하고 D-PBS로 세척한 후 10 μ m의 dichlorofluorescein diacetate (Sigma, St Louis, MO, USA)를 넣어 30분간 배양한 다음 D-PBS로 씻어낸 후 산화된 dichlorofluorescein을 형광분석계(FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Germany)를 이용하여 excitation 488 nm, emission 535 nm의 파장에서 2시간 후 형광도의 변화를 측정하였으며 이때 시간의 변화에 따라 8개의 well에서 각각 측정하여 평균치를 사용하였다. Bradford assay를 이용하여 세포단백질의 양을 측정한 다음 측정된 형광도 수치를 정상화하였다.

Resazurin assay

섬유주세포에서 유도된 산화스트레스에 대해 DPD가 미치는 영향을 알아보기 위하여 resazurin assay를 이용하여 세포활성도를 측정하였다.¹⁹ 0.1, 0.25 mM의 t-butylhy-

droperoxide (tBHP, Sigma, St Louis, MO, USA)을 배지에 첨가하여 산화스트레스를 유발하였으며 0.5 μ m의 DPD를 단독 또는 첨가하여 2시간 동안 노출시킨 후 10% resazurin (Sigma, St Louis, MO, USA)을 넣은 다음 형광도를 측정하였다(excitation 550, emission 570 nm). Bradford assay를 이용하여 세포단백질의 양을 측정한 다음 측정된 형광도 수치를 정상화하였다.

MTT and Griess assays

DPD가 섬유주세포에서 내인성 일산화질소의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Griess assay를²⁰ 시행하여 배지에서의 nitrite 생성량을 측정하였으며 DPD가 섬유주세포에 대한 세포 독성의 정도를 알아보기 위하여 screening test로 흔히 이용되고 있는 발색검사법의 일종인 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, St. Louis, MO, USA) assay를 시행하였다.^{21,22} MTT assay는 약물처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 μ l씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염류용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각 well당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200 μ l씩 옮겨 spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG labtech, Offenberg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다. Griess assay는 3일 동안 약물처리한 세포의 배지에 동량의 Griess 반응액 (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 섞은 후 96-well plate에 옮겨 NO생성의 반응물인 아질산염의 양을 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 unpaired t-test를 사용하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

결 과

DPPH assay에서 DPD는 20, 50, 100 μ m의 농도에서 대조군에 비해 농도에 비례하여 자유유리기인 DPPH를 유의

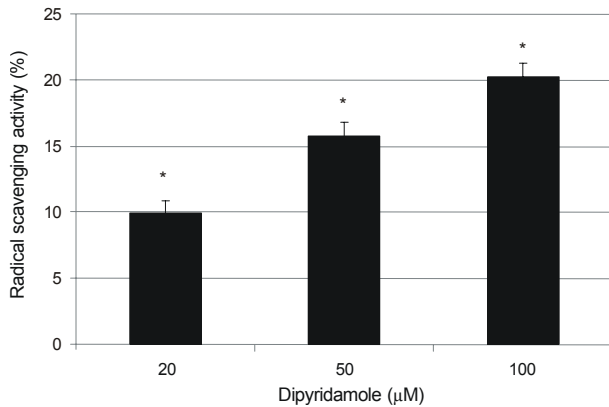


Figure 1. Antioxidant property of dipyrindamole with DPPH assay. Dipyrindamole reduced DPPH in a dose-dependent manner (* $p < 0.05$).

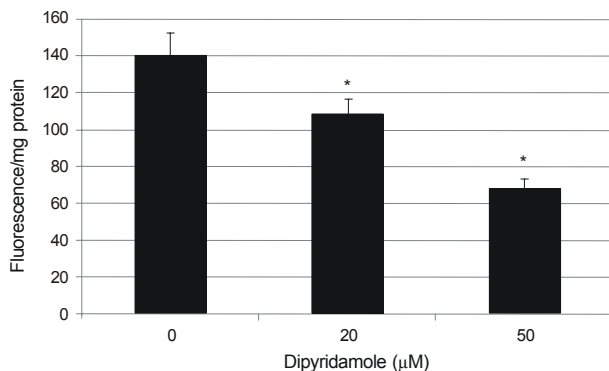


Figure 2. Effect of dipyrindamole on the generation of reactive oxygen species (ROS) in trabecular meshwork cells with DCFHDA assay. Dipyrindamole decreased ROS significantly in a dose-dependent manner (* $p < 0.05$).

하게 감소시켜 DPD가 자유유리기를 제거하는 항산화능을 가지고 있음을 알 수 있었다($p < 0.05$) (Fig. 1).

인체의 섬유주세포를 일차배양한 결과 초대배양 7일째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유주세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 세포들이 밀집해서 단층을 형성하며 세포들 사이에 분지를 내어 서로 연결하며 약간 길다란 모양의 세포체를 가지는 편평한 모양의 특징적 형태학적인 양상과 섬유주 조직의 이식편 주위에서 위 성장상으로 자라나는 섬유주세포의 특징적인 성장양상으로 확인하였다.^{23,24}

DPD가 가진 항산화능이 섬유주세포에서의 ROS 생성에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 섬유주세포에서 DCFHDA assay로 활성산소종의 생성에 미치는 영향을 측정한 결과 20 μM과 50 μM DPD를 첨가하였을 경우 대조군에 비해 단위 mg당 형광도가 32.34, 72.55로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$) (Fig. 2).

산화스트레스에 의해 미토콘드리아의 호흡활성도가 저

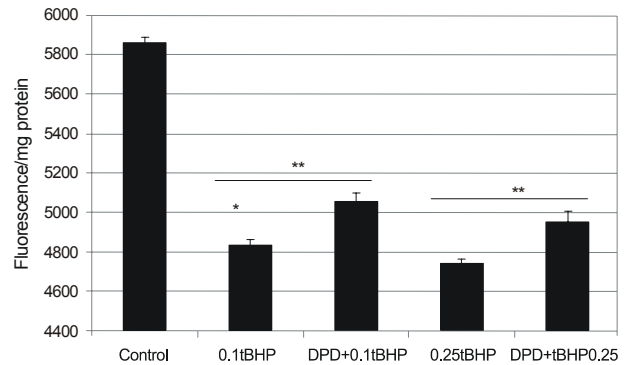


Figure 3. Effect of dipyrindamole on the tBHP-induced oxidative stress in trabecular meshwork cells with resazurin assay. Exposure to tBHP decreased cellular activity significantly compared to non-exposed control (* $p < 0.05$). Dipyrindamole improved cellular activity significantly after treatment with tBHP (** $p < 0.05$).

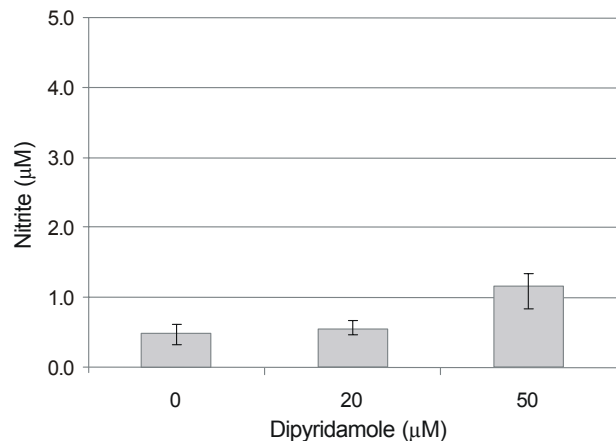


Figure 4. Effect of dipyrindamole on the production of nitric oxide in trabecular meshwork cells with Griess assay. Dipyrindamole did not affect the production of nitric oxide significantly ($p > 0.05$).

하되게 되는데, 약물을 처리하지 않은 대조군에 비해서 tBHP는 0.1 mM과 0.25 mM의 농도에서 유의하게 섬유주세포의 세포활성도를 감소시켰으며, 이때 5 μM DPD를 첨가하였을 경우 0.1 mM과 0.25 mM의 tBHP 농도에서 단위 mg당 형광도가 각각 221, 214로 유의하게 증가하여($p < 0.05$) DPD가 tBHP에 의해 유도된 산화스트레스에 대해 세포의 호흡활성도를 증가시키는 작용을 나타내었다(Fig. 3).

섬유주세포에서 DPD가 일산화질소의 생성과 세포의 생존에 미치는 영향

DPD는 일산화질소의 생성에는 유의한 영향을 미치지 않았으며(Fig. 4), MTT assay의 결과 25, 50 μM DPD는 약물처리를 하지 않은 대조군에 비해 섬유주세포에서 유의한

세포 독성을 나타내지 않았다(Data not shown).

고 찰

자유유리기는 산화스트레스를 유발하여 인체의 노화를 유발하는 주요한 요인으로 알려졌으며 녹내장의 경우에도 산화스트레스는 섬유주세포의 손상을 유발할 뿐만 아니라 섬유주세포의 노화를 촉진할 수 있는 것으로 알려졌고 안압상승과 시야손상의 정도가 섬유주에서의 산화스트레스에 의한 핵산의 손상 정도와 비례하는 것으로도 알려졌다.²⁵ 혈관내피세포의 경우 고농도의 포도당에 노출되면 NO의 생성이 저하되며 산화스트레스가 유발되는 것으로 알려졌다.²⁶ 섬유주세포에 ROS가 지속적으로 노출될 경우 섬유주세포에서의 생리적 NO의 생성에 영향을 미칠 수 있고 산화스트레스도 유발할 수 있다. 따라서 산화스트레스는 섬유주세포의 기능에 영향을 줄 뿐만 아니라 섬유주세포의 노화를 촉진시킬 수 있을 것이다.

항혈전작용을 가진 DPD은 자유유리기를 제거하는 작용이 있어 세포막과 미토콘드리아의 과산화물을 방지하거나 저밀도지방단백의 산화변성을 유발하여 항산화작용을 나타내는데^{13,27-29} 직접적으로 내인성 자유유리기 또는 질소종의 생성을 변화시키는 지는 아직 자세히 알려져 있지 않다. 섬유주세포는 혈관 내피세포의 성질을 가지고 있으므로 DPD가 섬유주세포의 산화스트레스에 미치는 영향을 알아 보기 위해 시행한 본 연구의 결과에서 DPD의 항산화능을 확인하였으며, DPD를 추가하여 섬유주세포를 배양한 경우 ROS의 생성이 유의하게 억제되었다. 또한 산화스트레스를 유발하여 DPD를 추가한 경우에도 DPD를 추가하지 않은 대조군에 비해 유의하게 세포의 활성도를 증가시켰으므로 DPD이 산화스트레스에 노출된 섬유주세포에 대해서도 유의하게 세포보호작용을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 DPD의 세포보호작용은 신경세포에서도 나타나는 것으로 알려졌다.³⁰

본 연구의 결과에서 DPD은 NO의 생성에는 유의한 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 DPD이 phosphodiesterase 저해제로서 작용하며 이는 혈관에서 DPD이 NO의 생성 증가 또는 cGMP의 강화작용 보다는 adenosine 강화작용에 의한 것이라도 볼 수 있다는 기존의 보고와 일치한다.³¹ 또한 세포의 생존에는 유의한 영향을 미치지 않아 세포에 대한 독성은 낮은 것으로 생각한다. 따라서 섬유주세포에서 DPD는 NO의 생성에는 유의한 영향을 미치지 않아 방수유출작용은 나타내지 않을 것으로 생각하나 항산화작용을 나타내어 개방각녹내장의 병인 중 하나로 생각하는 섬유주세포의 변성 내지 노화를 억제하는 작용을 나타낼 수 있을 것이다.

결론적으로 DPD은 배양된 사람의 섬유주세포에서 유해한 산화물질의 생성을 억제하였으며 산화스트레스에 대하여 섬유주세포를 보호하는 효과도 나타내었으므로 비록 생체 내에서의 연구는 아니지만 본 연구의 결과는 DPD이 항산화작용을 통한 섬유주세포 보호작용을 나타낼 가능성이 있음을 시사하며 향후 그 기전과 임상적 효과에 대해 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

- 1) Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984;91:564-79.
- 2) Rohen JW, Lütjen-Drecoll E, Flügge C, et al. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma (POAG). *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
- 3) Wiederholt M, Dörschner N, Groth J. Effect of diuretics, channel modulators and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork. *Ophthalmologica* 1997;211:153-60.
- 4) Wiederholt M, Stumpf F. The trabecular meshwork and aqueous humor reabsorption. In: Civan MM, ed. *Current topics in membranes. The eye's aqueous Humor: from secretion to glaucoma*. v. 45. San Diego: Academic Press; 1998:163-202.
- 5) Wiederholt M, Sturm A, Lepple-Wienhues A. Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2515-20.
- 6) Behar-Cohen FF, Goureau O, D'Hermies F, Courtois Y. Decreased intraocular pressure induced by nitric oxide donors is correlated to nitrite production in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1711-5.
- 7) Saccà SC, Izzotti A, Rossi P, Traverso C. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res* 2007;84:389-99.
- 8) Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* 2003;111:785-93.
- 9) Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 2003;111:163-9.
- 10) Hong JH, Kim YY, Kim JW. Effect of genistein on the survival and production of nitric oxide in trabecular meshwork cells. *J Korean Ophthalmol Soc* 2011;52:970-4.
- 11) Lee SH, Kim JW. Effect of erythropoietin on the production of nitric oxide in trabecular meshwork cells. *J Korean Ophthalmol Soc* 2011;52:1514-8.
- 12) Chakrabarti S, Vitseva O, Iyu D, et al. The effect of dipyridamole on vascular cell-derived reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:494-500.
- 13) Iuliano L, Ghiselli A, Alessandri C, et al. Superoxide anion scavenging property of dipyridamole. *Thromb Haemost* 1989;61:149.
- 14) Iuliano L, Piccheri C, Coppola I, et al. Fluorescence quenching of dipyridamole associated to peroxyl radical scavenging: a versatile probe to measure the chain breaking antioxidant activity of biomolecules. *Biochim Biophys Acta* 2000;1474:177-82.
- 15) Liu F, Ng TB. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sci* 2000;66:725-35.
- 16) Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, et al. Screening of medicinal plant ex-

- tracts for antioxidant activity. *Life Sci* 2003;73:167-79.
- 17) Parejo I, Viladomat F, Bastida J, et al. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci* 2003;73:1667-81.
- 18) Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612-6.
- 19) Abu-Amero KK, Bosley TM. Detection of mitochondrial respiratory dysfunction in circulating lymphocytes using resazurin. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:1295-8.
- 20) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- 21) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 22) Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3727-9.
- 23) Polansky JR, Weinreb RN, Baxter JD, Alvarado J. Human trabecular cells. I. Establishment in tissue culture and growth characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:1043-9.
- 24) Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
- 25) Saccà SC, Pascotto A, Camicione P, et al. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005;123:458-63.
- 26) El-Remessy AB, Abou-Mohamed G, Caldwell RW, Caldwell RB. High glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role of eNOS uncoupling and aldose reductase activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3135-43.
- 27) Iuliano L, Colavita AR, Camastra C, et al. Protection of low density lipoprotein oxidation at chemical and cellular level by the antioxidant drug dipyrindamole. *Br J Pharmacol* 1996;119:1438-46.
- 28) Iuliano L, Piccheri C, Coppola I, et al. Fluorescence quenching of dipyrindamole associated to peroxyl radical scavenging: a versatile probe to measure the chain breaking antioxidant activity of biomolecules. *Biochim Biophys Acta* 2000;1474:177-82.
- 29) Selley ML, Czeti AL, McGuinness JA, Ardlie NG. Dipyrindamole inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1994;111:91-7.
- 30) Farinelli SE, Greene LA, Friedman WJ. Neuroprotective actions of dipyrindamole on cultured CNS neurons. *J Neurosci* 1998;18:5112-23.
- 31) Gamboa A, Abraham R, Diedrich A, et al. Role of adenosine and nitric oxide on the mechanisms of action of dipyrindamole. *Stroke* 2005;36:2170-5.

=ABSTRACT=

Effect of Dipyridamole on the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Trabecular Meshwork Cells

Keun Woo Lee, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: To investigate the effects of dipyridamole (DPD) on the production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress in cultured human trabecular meshwork cells (HTMC).

Methods: Antioxidant activity of DPD was determined by DPPH assay. Primarily cultured HTMC were exposed to 0, 20, and 50 μ M DPD using serum-deprived media. The effect of DPD on the production of ROS was assessed with the DCHFDA assay. The effect of DPD on the t-butyl hydroperoxide (tBHP)-induced oxidative stress was assessed with resazurin assay.

Results: DPD showed significant antioxidant activity. DPD significantly decreased the production of ROS ($p < 0.05$) and improved cellular activity significantly after treatment with t-BHP ($p < 0.05$). DPD did not affect the generation of nitric oxides.

Conclusions: DPD suppressed the formation of ROS and possessed cytoprotective activity against the oxidative stress in HTMC.

J Korean Ophthalmol Soc 2013;54(3):496-501

Key Words: Antioxidant, Dipyridamole, Reactive oxygen species, Trabecular meshwork cells

Address reprint requests to **Jae Woo Kim, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University Medical Center

#33 17-gil Duryugongwon-ro, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea

Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133, E-mail: jwkim@cu.ac.kr