

배양 간세포 (Chang)에서 항산화작용 및 항산화효소 활성에 미치는 계란 노른자 단백질 가수분해물의 영향

박표잠 · 송병권¹ · 남경수² · 김세권*

부경대학교 화학과
¹부산지방식품의약품청
²동국대학교 의과대학 약리학교실

Effect of Enzymatic Hydrolysate from Egg Yolk Protein on the Activity of Antioxidative Enzyme in Cultured Hepatocytes (Chang)

Pyo-Jam Park, Byung-Kwon Song¹, Kyung-Soo Nam² and Se-Kwon Kim*

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

¹Pusan Regional Food & Drug Administration, Pusan 608-080, Korea

²Department of Pharmacology, College of Medicine, University of Dongguk, Kyongju 780-714, Korea

Abstract

Normally, aerobic cells are protected from the damage of free radicals by antioxidative enzymes such as catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) peroxidase and GSH-S-transferase. In this study, we have investigated the effect of egg yolk protein hydrolysates on antioxidative activity and the activity of antioxidative enzyme in cultured hepatocytes (Chang). Without the pretreatment with hydrolysate, about 50% of the hepatocytes were killed within 2 h by 225 μ M *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP). By contrast, fewer than 20% of the 5 K hydrolysate (permeate from 5 kDa membrane and not passed through 1 kDa membrane)-pretreated hepatocytes were killed by the same concentrations of *t*-BHP. In addition, the activities of catalase, GSH peroxidase and GSH-transferase were significantly increased with the treatment of 5 K hydrolysate. These results suggest that 5 K hydrolysate exerts antioxidative effect by increasing activity of antioxidative enzymes.

Key Words — egg yolk protein, enzymatic hydrolysate, antioxidative enzyme, hepatocytes

서 론

항산화제란 산화를 방지하거나 지연시키는 물질을 통칭하는 것[7]으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유라디칼 scavenger, 과산화물을 비라디칼로 분

해하여 불활성시키는 과산화물 분해제, 미량금속의 산화촉진작용을 불활성화하는 금속불활성화제, 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화 작용을 증가시키는 상승제 및 각종 활성산소계를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류된다. 또한, Davies[4]는 세포계에서의 산화적인 방어기작을 primary defense system과 secondary defense system으로 나누고, primary defense system은 지질 과산화 반응의 과정에서 생성되는 자유라디칼 (free radical)

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: +82-51-620-6375, Fax: +82-51-628-8147
E-mail: sknkim@mail.pknu.ac.kr

형태의 지질을 보다 안정한 생성물로 변환시킴으로써 지질의 연속적인 산화를 방지하는 기작으로 chain-breaking antioxidant라고도 하였으며, α -tocopherol, ascorbic acid, β -carotene, uric acid와 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등이 여기에 속한다고 하였다. 이와는 달리 secondary defense system은 primary defense system을 벗어나 산화제나 자유라디칼 반응에 의해 손상을 입은 분자나 세포의 구성성분을 제거하기 위한 repair system으로 손상된 막지질 (phospholipid)을 수선하는데 관여하는 효소인 phospholipase A2와 fatty acyl transferase, 손상된 단백질을 분해시키는 catalytic/multi-functional proteinase complex [24] 및 산화적인 손상을 입은 DNA를 수리하는 DNA glycosylase와 DNA ligase[7] 등이 있다고 보고하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 항산화활성을 가진 물질은 생체내의 효소를 제외하면 대부분 페놀계 화합물이며, 그 외의 경우는 Tagashura 등[31]이 hop에서 β, β' -triketone 구조를 가진 항산화물질을 분리하였고, Osawa 및 Nami-ki[19]는 *Eucalyptus globulus*의 leaf wax에서 β -diketone 화합물이 강력한 항산화활성을 나타낸다고 보고하였다. 또한, 동물성 및 식물성 단백질을 효소분해하여 얻어진 펩타이드에서도 항산화활성이 나타나는 것으로 보고되어 있는데, Yamaguchi 등[32]은 대두단백질 및 우유카제인 가수분해물, Suetsuna 및 Osajima[29]는 어육단백질의 가수분해물이 항산화활성을 가지는 것으로 보고하였다.

한편, 세포내에서 활성산소의 생성메카니즘과 이로 인한 세포손상 및 그 방어기작을 살펴보면, 일반적으로 생리적인 조건하에서 우리가 섭취한 산소의 95%는 미토콘드리아의 호흡사슬 (respiratory chain)을 거쳐 전달된 네 개의 전자들을 받아 물 (H_2O)로 되지만, 일부의 산소 (미토콘드리아에서 사용되는 산소의 3~5%)는 활성산소로 변한다. 이렇게 생체 내에 생성된 활성산소종 (hydrogen peroxide species, ROS)인 superoxide radical과 hydroxyl radical들은 생체내의 지질, 단백질 및 핵산 등을 손상시켜 세포의 기능을 억제시키며[7], 더 나아가서는 체내의 항상성 (homeostasis)에 불균형화 현상을 초래한다[9,16,30]. 즉, 활성이 큰 산소종이 DNA에 작용하여 돌연변이 및 암을 유발하게 되며 [8,18], 동맥경화를 비롯한 혈관장애, 신장장애 및 당뇨병 등 많은 질병을 유발하는 것으로 추측되고 있다[10,26]. 그러

나, 정상적인 생체 내에서는 체내의 항상성을 유지하기 위한 많은 효소들이 존재하여 반응성이 큰 활성산소종을 제거시키는데, 그 예로 간과 혈액에 존재하는 SOD는 생성된 $O_2^{\cdot -}$ 를 H_2O_2 로 전환하는 것을 촉매하고[15], 이렇게 생성된 H_2O_2 는 glutathione peroxide와 catalase등에 의해서 분해되어 자유라디칼과 과산화지질 (lipid peroxide, LPO)의 축적에 의한 세포 손상을 억제하는 것으로 보고되어 있다[1,11].

따라서 본 연구에서는 항산화물질에 대한 연구의 일환으로 현재 식품이나 의약품으로 사용하기 위해 계란 노른자로부터 레시틴을 추출하고 남은 잔사로부터 단백질을 추출하여 이를 효소로 가수분해시킨 후 3단계 막반용기를 사용하여 분자량별로 분획한 가수분해물들의 배양 간세포내에서의 항산화 작용 및 항산화효소활성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 계란 노른자는 레시틴을 추출하고 남은 잔사로 경기도 용인에 위치한 두산인제기술개발원에서 구입하여, 잔존하는 지질을 제거하고 남은 단백질을 2-mercaptoethanol로 환원시켜 사용하였다.

가수분해시 사용한 효소인 Alcalase는 Novo. Co. (Denmark)으로부터 구입하였으며, 계란 노른자 단백질을 가수분해시켜 분자량별로 분획하기 위해 사용한 한의여과막장치 (ultrafiltration membrane system)는 Millipore Co. (Bedford, MA, USA)으로부터 구입하였고, 사용된 막의 분자량 한계범위 (molecular weight cut-off : MWCO)는 각각 10 KDa, 5 KDa 및 1 KDa를 사용하였다.

세포 배양제에서의 항산화작용과 항산화 효소활성을 측정하기 위해 사용한 정상 간세포 (Chang)는 Japan Health Sciences Foundation (JHSF, Tokyo, Japan)으로부터 분주 받아 사용하였으며, 그 외의 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP), MTT (4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), dulbecco's modified eagle medium (DMEM), L-glutamine, hydrogen peroxide (H_2O_2), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), superoxide dismutase (SOD : from bovine liver), xanthine, xanthine oxidase (XOD), nitro blue tetrazolium (NBT), catalase (from bovine liver), diethylene triamine penta-

acetic acid (DETAPAC), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione-reductase (GSSG-reductase), ρ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), fetal bovine serum (FBS) 및 antibiotic/antimycotics는 Gibco Co. (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), malondialdehyde tetra butylammonium salt는 Fluka Co. (Fluka Chimie AG, Switzerland), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)과 NaN_3 는 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA)으로부터 구입하였으며, 그 외의 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

가수분해물의 제조

가수분해물은 Park 등[22]의 방법에 따라 계란노른자 단백질을 Alcalase로 가수분해시켜 각 단계별로 분자량 크기에 따라 분획하였다. 즉, Alcalase로 가수분해시킨 후 한외여과막장치를 사용하여 분자량 한계범위가 각각 10 KDa, 5 KDa 및 1 KDa인 막에 차례로 통과시켜 분획한 후 동결건조하여 가수분해물을 제조하였다.

세포배양

정상 간세포 (hepatocytes, Chang)를 fetal bovine serum (FBS)이 10% 함유된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM)으로 배양하였다. 즉, 75-cm² plastic flask (Falcon Co., Paigton, Devon, UK)에 Chang cell을 10% FBS, 7.5% NaHCO_3 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, glutamine 58.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 antibiotic/antimycotics 4.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 함유된 DMEM으로 37°C, 5% CO_2 의 조건에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 subculture 하여 세포주를 유지하였다.

세포정량

세포가 자란 75-cm² plastic flask에서 배지액을 제거하고, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 세척한 후, 0.25% trypsin/EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)로 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 다음 세포배양액으로 중화시켜서 원심분리 (80×g, 3 min) 하였다. 남은 세포의 pellet에 배양액을 가한 다음, 멸균 피펫으로 반복흡입하여 단일 세포부유액을 만든 후 trypan blue를 세포부유액과 9:1의 비율로 혼합하여 광학현미경상에서 혈구계산판 (Hemocytometer)을 이용하여 측정하였다.

세포독성 측정

정상 간세포 (Chang)에 대한 계란 노른자 단백질 가수분해물의 세포독성을 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 간세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 넣고 2시간 CO_2 배양기에서 배양시킨 후, 가수분해물을 0~7.5 mg/ml이 되도록 각각의 well에 첨가한 다음, 10% FBS가 포함된 DMEM으로 전체부피를 200 μl 로 조절하여 37°C, 5% CO_2 의 조건에서 18시간 배양한 후, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다 (이때 100% 세포피사는 0.9% 2-mercaptoethanol을 넣어 2시간 배양시킨 후, MTT assay로 세포의 생존율을 측정함 값으로 하였다).

t-BHP 농도별 세포피사에 대한 가수분해물의 효과

t-BHP의 농도별 세포피사에 대한 계란 노른자 단백질 가수분해물의 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 간세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 넣고 2시간 CO_2 배양기에서 배양시킨 다음, 가수분해물의 농도를 well당 5 mg/ml씩 첨가한 후, 10% FBS가 포함된 DMEM으로 전체부피를 200 μl 로 조절하여 37°C, 5% CO_2 의 조건에서 18시간 배양한 후, PBS로 세척하고 serum free medium (SFM)과 t-BHP를 0 μM 에서부터 300 μM 까지 농도별로 전체부피가 200 μl 가 되게 첨가하였다. 이를 다시 2시간 배양시킨 후, MTT assay로 측정하였다.

t-BHP의 세포피사에 대한 가수분해물의 농도별 효과

t-BHP의 세포피사에 대한 계란 노른자 단백질 가수분해물의 농도별 효과를 관찰하기 위하여, 96-well plate에 간세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 넣고 2시간 CO_2 배양기에서 배양시킨 다음, 가수분해물의 농도를 well당 0.5 mg/ml에서 7.5 mg/ml까지 첨가한 후, 10% FBS가 포함된 DMEM으로 전체부피를 200 μl 로 조절하여 37°C, 5% CO_2 의 조건에서 18시간 배양시킨 다음, PBS로 세척하고 SFM과 225 μM t-BHP의 전체부피가 200 μl 가 되게 첨가하였다. 이를 다시 2시간 배양시킨 후, MTT assay로 측정하였다.

MTT assay

MTT assay는 Sladowski 등[27]의 방법에 따라 실행하였다. 즉, 간세포를 배양시킨 96-well plate에 MTT를 총 용량의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음 원심분리 (80

×g, 10 min)하였다. 그 후, 배지를 제거하고 EtOH : DMSO (dimethyl sulfoxide)가 1:1 (v/v)인 용액을 150 μ l씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MIT dye [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 blue formazan을 형성하는 것을 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Catalase 활성에 미치는 가수분해물의 효과

배양세포내 catalase 활성도는 Aebi[1]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 먼저 50 mM phosphate buffer (KH_2PO_4 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0)로 희석 시킨 세포부유액 2 ml에 30 mM H_2O_2 용액 1 ml를 첨가하여 240 nm에서 H_2O_2 분해에 따른 흡광도의 감소를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분동안 분해된 1 μ mole의 H_2O_2 를 1 unit로 정의하였고 단백질 1 mg을 기준으로 하여 표기하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 활성에 미치는 가수분해물의 효과

배양세포내 superoxide dismutase 활성도는 Oyanagui [20]와 Oberley 등[17]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 50 mM phosphate buffer (KH_2PO_4 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7.8)로 희석시킨 세포부유액 0.1 ml에 반응혼합액 [1.333 mM diethylene triamine pentaacetic acid (DETAPAC) 13.0 ml, 40 units/ml catalase 0.5 ml, 2 mM nitro blue tetrazolium (NBT) 0.5 ml, 1.8 mM xanthine 1.7 ml와 0.33 M NaCN 0.3 ml가 50 mM phosphate buffer (pH 7.8)에 녹아있는 용액] 0.8 ml를 가한다. 이 혼합액에 0.01 U/ml XOD (xanthine oxidase)를 0.1 ml 가한 후, 25°C에서 1분간 배양시킨 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 cytochrome C의 최대 환원을 50% 저지하는 SOD의 양을 1 unit로 정의하였고, 단백질 농도를 기준으로 하여 SOD의 unit를 표기하였다.

Glutathione (GSH) peroxidase 활성에 미치는 가수분해물의 효과

배양세포내 glutathione peroxidase 활성도는 Paglia 및 Valentine[21]과 Lawrence 및 Burk[11]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 50 mM potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 -

K_2HPO_4 , pH 7.0)로 희석시킨 세포부유액 0.1 ml에 반응혼합액 [1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mM NaN_3 , 0.2 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 1 unit/ml oxidized glutathione-reductase (GSSG-reductase) 및 1 mM GSH가 50 mM potassium buffer (pH 7.0) 1 ml에 녹아 있는 용액] 0.8 ml를 넣고, 20°C에서 5분간 배양시킨 후, 2.2 mM H_2O_2 용액 0.1 ml를 첨가하여 340 nm에서의 NADPH 흡광도 감소를 측정하였다. 효소의 활성도는 단백질 mg당 1분간 산화되는 NADPH nmole로 표기하였다.

Glutathione-S-transferase (GST) 활성에 미치는 가수분해물의 효과

배양세포내 glutathione-S-transferase 활성도는 Habig 등 [6]과 Schöder 등[25]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 0.1 M potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 6.5)로 희석시킨 세포부유액 0.1 ml에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 1.2 ml를 가하고 reduced glutathione (GSH), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)가 전체부피에 대해서 각각 1 mM이 되게 첨가한 후, 흡광도 340 nm에서 측정하였다. 효소 활성도는 단백질 mg당 1분간 conjugate되는 CDNB의 nmole로 정의하였다.

단백질 정량

배양세포의 단백질 정량은 Smith 등[28]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, bicinchonimic acid protein kit를 이용하여 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 표준검량선으로부터 그 양을 산출하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 실험군간의 결과에 대하여 student's t-test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, p값이 0.05이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

결과 및 고찰

배양 정상 간세포에 대한 계란 노른자 단백질 가수분해물의 세포독성

계란 노른자 단백질을 Alcalase로 가수분해시켜 한외여과

막장치를 사용하여 분자량 한계범위가 각각 10 KDa, 5 KDa 및 1 KDa인 막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물들 (10 K, 5 K 및 1 K 가수분해물)을 배양 정상 간세포 (Chang)에서의 세포독성을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 가수분해물을 첨가하지 않은 균의 세포 생존율을 100%로 볼 때 가수분해물을 첨가한 첨가군에서는 모두 100% 이상의 세포 생존율을 나타내었고, 특히 분자량 한계범위가 5 KDa인 막은 통과하고 1 KDa인 막은 통과하지 않은 가수분해물 (5 K 가수분해물)의 경우 5 mg/ml을 첨가하였을 때 세포 생존율이 130% 이상으로 가장 높게 나타났다. 따라서 본 실험에서 사용한 가수분해물들은 배양 정상 간세포에 독성을 나타내지 않을 뿐만 아니라 오히려 세포 증식효과가 있는 것으로 나타났다.

t-BHP 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물들의 항산화 작용

t-BHP의 농도에 따른 정상 간세포의 생존력을 *t*-BHP 2 시간 처리 후 측정한 결과, 225 μ M의 *t*-BHP 처리군에서 50% 정도의 세포생존을 보였으므로 225 μ M *t*-BHP를 IC₅₀

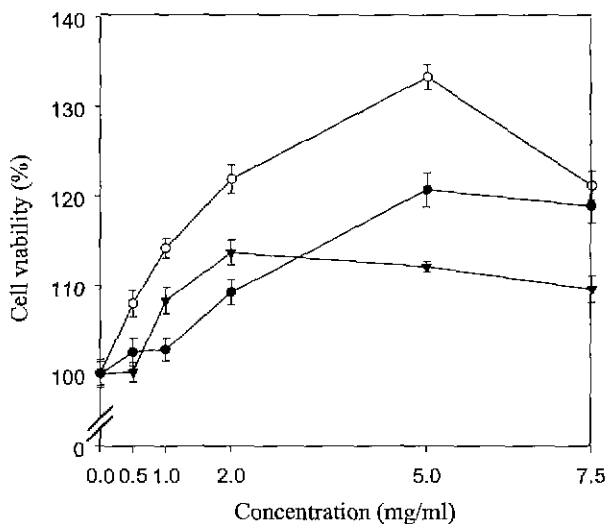


Fig. 1. Cytotoxicity of hydrolysates of Alcalase from egg yolk protein on cultured hepatocytes. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C. Viable cells were detected by MTT assay. Values are given as the mean \pm standard error of the mean. ●, 10 KDa hydrolysate; ○, 5 KDa hydrolysate; ▼, 1 KDa hydrolysate.

으로 정하였다 (Fig. 2). 또한, *t*-BHP 농도별 세포괴사에 대한 계란 노른자 단백질 가수분해물들의 항산화작용을 측정 한 결과, IC₅₀의 *t*-BHP농도에서 가수분해물 첨가군이 비첨가군에 비해 5~21% 정도 세포 생존율이 증가하였으며, 특히 5 K 가수분해물의 세포 생존율이 가장 높게 나타났다.

현재까지 *t*-BHP에 의한 간세포의 괴사를 설명하기 위하여 2가지의 메카니즘이 사용되고 있는데, 하나는 Masaki 등[13,14]에 의해 보고된 것으로 *t*-BHP에 의해 유발된 세포 막의 지질과산화는 DPPD (N,N'-diphenyl-*p*-phenylene diamine)와 같은 항산화제들에 의해 방지될 수 있다는 것이다. 다른 하나는 세포괴사의 메카니즘은 항산화제의 영향을 받지 않고 지질과산화를 발생하여 미토콘드리아의 기능을 손실시킨다는 것이다. 또한, Pascoe 등[23]은 \cdot OH (hydroxyl radical)나 LOO \cdot (lipid radical)과 같은 활성산소제는 α -tocopherol과 같은 소수성 막과 결합되어 있는 항산화제의 소비를 유도하여 세포의 방어효과를 감소시킨

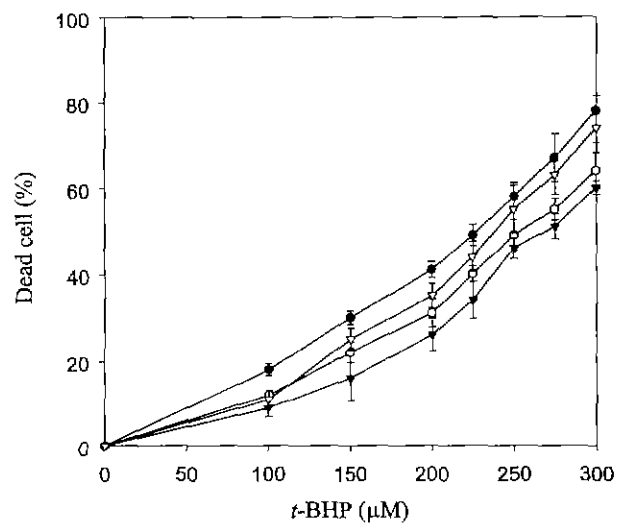


Fig. 2. Effect of *t*-BHP concentration on cell killing of cultured hepatocytes without and with 10 KDa, 5 KDa and 1 KDa hydrolysate. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C. After 18 h, the cells were placed in DMEM without serum, and incubated with the designated concentration of *t*-BHP for 2 h. Viable cells were detected by MTT assay. Values given as the mean \pm standard error of the mean. ●, control; ○, 10 KDa hydrolysate; ▼, 5 KDa hydrolysate; ▽, 1 KDa hydrolysate.

다고 보고하였으며, Fariss 등[5]은 간세포 세포질에서 가장 풍부한 비단백질 thiol기를 가진 reduced glutathione (GSH)의 감소가 세포의 생존에 영향을 미친다고 보고하였고, Masaki 등[13,14]은 *t*-BHP의 세포독성에 대해 철 킬레이트제인 deferoxamine이 GSH의 소비를 억제함으로써 세포괴사를 지연시켰으며, 항산화제인 DPPD나 catechol은 GSH의 대사과정이나, 칼슘의 세포내 항상성에는 관계없이 *t*-butyl alkoxy radical에 의해 생성되는 L·을 소거함으로써 세포괴사를 지연시킨다고 보고하였다. Benjamin 등[2]은 calf thymus로부터 분리한 6 KDa 정도의 thymic 펩타이드가 간의 MDA생성을 감소시키는 동시에 간 GSH의 감소를 막으며 vascular endothelial cell에서는 endogenous 항산화물질을 증가시켜서 세포괴사를 지연시킨다고 보고한 바 있다.

t-BHP로 유발된 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도에 따른 항산화작용

계란 노른자 단백질 가수분해물의 농도에 따른 항산화 효과를 관찰하기 위하여 세포괴사를 유발하는 *t*-BHP를 첨가하였을 때 세포 생존율이 가장 높은 5 K 가수분해물을 사용하여 배양 간세포에 전처리한 다음, *t*-BHP로 세포의 산화작용을 유발시켜 세포의 생존율을 측정하였다 (Fig. 3). 가수분해물을 농도별로 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 및 7.5 mg/ml를 첨가하여 측정된 결과 1.0 mg/ml 일 때 80% 정도로 가장 높은 세포 생존율을 나타내었다. Pascoe 및 Reed[23]는 항암제로 glutathione (GSH)를 소비하여 반응산소종을 생성하는 adriamycin (ADR)의 사용에 의해 발생되는 심근경색은 ADR이 산화-환원되는 동안 활성 산소계의 생성과 GSH의 소비와 관련이 있다고 판단하여 이에 대한 α -tocopherol의 효과를 측정된 결과, 세포내 α -tocopherol의 농도가 0.6~1.0 nmole/cells일 때 세포생존율이 가장 높게 나타나 α -tocopherol은 자유라디칼 소거제로서 작용한다고 추정하였다. 또한, Younes 및 Siegers[33]는 세포의 지질과산화는 α -tocopherol의 함량에 의존한다고 보고하였으며, Liebler 등[12]은 간세포내에서 α -tocopherol의 항산화효과에 있어서 ascorbic acid의 작용을 검토한 결과, ascorbic acid 단독으로 사용했을 때는 prooxidant로 작용하였으나 α -tocopherol과 병용사용에 의해 α -tocopherol의 감소를 방지하는 것으로 보아 상승제로 작용한다고 보고하였다.

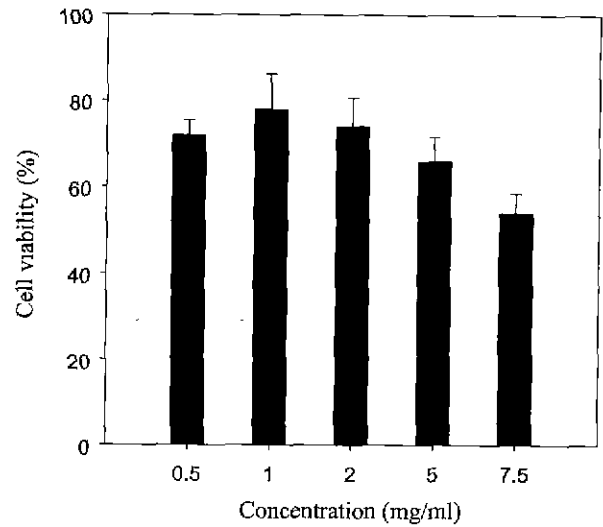


Fig. 3. Effects of various concentrations of 5 KDa hydrolysate on cell viability of cultured hepatocytes exposed to *t*-BHP. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C. After 18 h, the cells were placed in DMEM without serum, and incubated with 225 μM *t*-BHP for 2 h. Viable cells were detected by MTT assay. Values are given as the mean ± standard error of the mean.

세포배양계에서 항산화효소 활성에 미치는 가수분해물의 영향

세포배양계에서의 계란 노른자 단백질의 5 K 가수분해물이 항산화 효소활성에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 catalase, SOD, glutathione peroxidase 및 glutathione-S-transferase (GST)의 활성을 검토하였다. H₂O₂를 H₂O로 분해하여 무독화시키는 catalase의 경우, *t*-BHP로 유도된 실험군을 *t*-BHP를 첨가하지 않은 대조군과 비교하였을 때는 유의성있는 변화가 관찰되지 않았지만, 5 K 가수분해물과 *t*-BHP를 함께 첨가한 실험군을 대조군과 비교하였을 때는 대조군보다 1.5배 유의성있게 증가하였다 (P<0.05, Fig. 4). 이러한 catalase 활성의 증가는 H₂O₂ 및 유기과산화물의 축적을 방지하며, 나아가서 ·OH의 생성도 감소시켜 지질, 단백질 및 DNA 등의 세포구성 성분의 산화를 억제할 것으로 사료된다.

Superoxide anion을 제거하는 SOD 활성의 경우, *t*-BHP로 유도된 실험군에서는 *t*-BHP를 첨가하지 않은 대조군에 비해 활성이 약간 증가하였고, 5 K 가수분해물과 *t*-BHP를

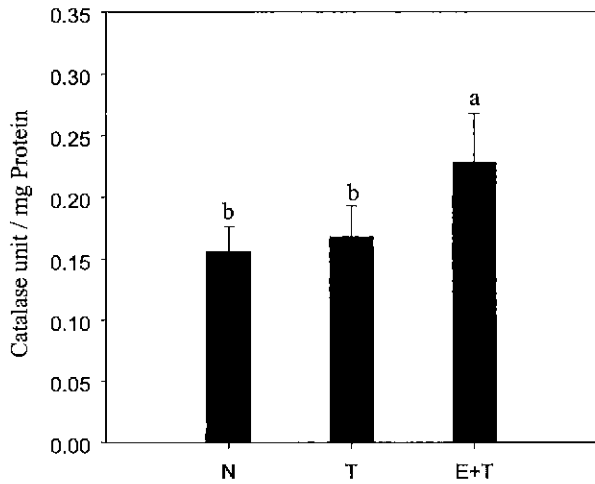


Fig. 4. Effect of 5 KDa hydrolysate on catalase activity induced by *t*-BHP treatment in cultured hepatocytes. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C. After 18 h, the cells were placed in DMEM without serum, and incubated with the designed concentration of *t*-BHP for 2 h. Values are given as the mean ± standard error of the mean. N, normal; T, *t*-BHP treatment; E+T, 5 K hydrolysate of egg yolk protein and *t*-BHP treatment.

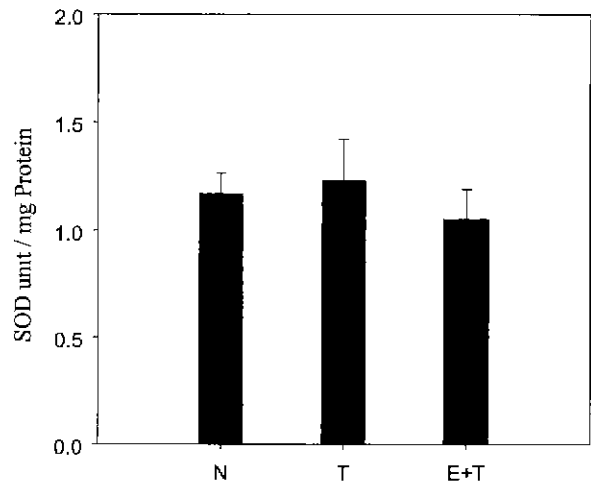


Fig. 5. Effect of 5 KDa hydrolysate on superoxide dismutase activity induced by *t*-BHP treatment in cultured hepatocytes. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C. After 18 h, the cells were placed in DMEM without serum, and incubated with the designed concentration of *t*-BHP for 2 h. Values are given as the mean ± standard error of the mean. N, normal; T, *t*-BHP treatment; E+T, 5 K hydrolysate of egg yolk protein and *t*-BHP treatment.

함께 첨가한 실험군에서는 대조군에 비해 약간 감소하였지만, 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다 ($P < 0.05$, Fig. 5). 또한, Lipid peroxide 및 H₂O₂의 분해를 촉매하는 GSH peroxidase의 경우, *t*-BHP로 유도된 실험군은 대조군보다 1.4배, 5 K 가수분해물과 함께 사용한 실험군은 대조군보다 1.8배 증가하여 대조군보다 활성이 유의성있게 증가하였다 ($P < 0.05$, Fig. 6). 한편, 생체내에서 GSH와 conjugation되면서 여러 가지 세포독성을 가지는 이물질의 무독화 작용과 산화적 피해로부터 세포를 방어하는 역할을 하는 GST의 경우, *t*-BHP로 유도된 실험군에서는 *t*-BHP를 첨가하지 않은 대조군에 비해 활성이 1.5배, 5 K 가수분해물과 *t*-BHP를 함께 첨가한 실험군에서는 대조군에 비해 1.8배 증가하는 경향을 나타내었다 ($P < 0.05$, Fig. 7)

이 결과는 최 등[3]이 배양간세포 (AC₂F)에서 녹용의 항산화효소 활성을 측정된 결과, catalase, GSH peroxidase 및 GST 활성은 *t*-BHP 처리군보다 녹용과 *t*-BHP를 함께 처리한 실험군에서 더 높은 활성을 나타내었고, SOD 활성만 실험군이 대조군에 비해서 약간 낮은 활성을 나타내었

다고 보고한 결과와 일치하였다.

이상의 결과로 볼 때 *t*-BHP의 처리로 세포괴사를 유발시킨 후, 5 K 가수분해물을 첨가하였을 때 세포 생존율이 증가하는 것은 catalase, GSH peroxidase 및 GSH reductase 등의 항산화효소 활성의 증가에 기인하는 것으로 사료된다.

요 약

계란 노른자로부터 레시틴을 추출하고 남은 잔사를 효율적으로 이용하기 위하여 효소로 가수분해시킨 후 한외여과막을 사용하여 분자량별로 분획하여, 이들 가수분해물들에 대한 배양세포내에서의 항산화작용 및 항산화효소 활성에 미치는 영향을 검토하였다.

계란 노른자 단백질을 Alcalase로 가수분해시켜 한외여과막장치를 사용하여 분자량 한계범위가 각각 10 KDa, 5 KDa 및 1 KDa인 막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물 10 K, 5 K 및 1 K 가수분해물들은 배양간세포에 대하여 독성이 전혀 없는 것으로 나타났다. 또한, *t*-BHP의 농도에 따른 배양간세포의 생존력을 *t*-BHP 처리 2시간 후에 측정

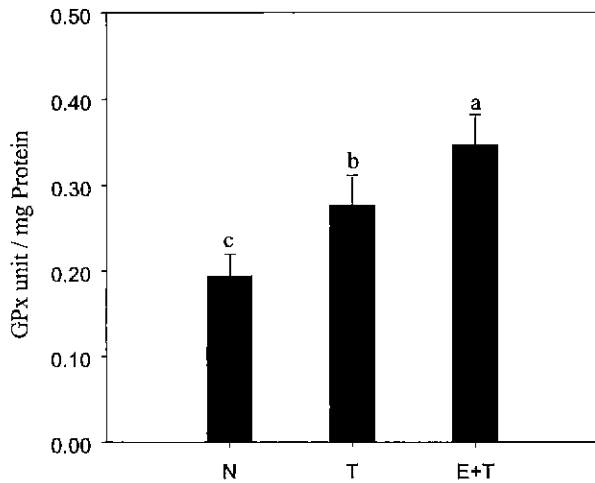


Fig. 6. Effect of 5 KDa hydrolysate on glutathione peroxidase activity induced by *t*-BHP treatment in cultured hepatocytes. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C. After 18 h, the cells were placed in DMEM without serum, and incubated with the designated concentration of *t*-BHP for 2 h. Values are given as the mean ± standard error of the mean. N, normal; T, *t*-BHP treatment; E+T, 5 K hydrolysate of egg yolk protein and *t*-BHP treatment.

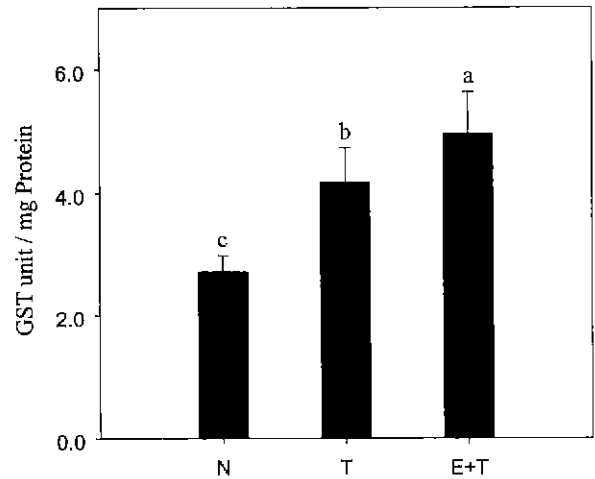


Fig. 7. Effect of 5 KDa hydrolysate on glutathione S-transferase activity induced by *t*-BHP treatment in cultured liver cells. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C. After 18 h, the cells were placed in DMEM without serum, and incubated with the designated concentration of *t*-BHP for 2 h. Values are given as the mean ± standard error of the mean. N, normal; T, *t*-BHP treatment; E+T, 5 K hydrolysate of egg yolk protein and *t*-BHP treatment.

한 결과, 225 μM에서 50% 정도의 세포생존율을 보였으며, 이 *t*-BHP의 농도에서 각 가수분해물들의 첨가군은 비첨가군에 비해 5~21% 정도 세포 생존율이 증가하였고, 특히 5 K 가수분해물을 첨가하였을 때 가장 높은 세포생존율을 보였다. 또한, 가수분해물 첨가 농도에 따른 항산화작용은 5 K 가수분해물을 1.0 mg/ml를 첨가하였을 때 80% 정도로 가장 높은 세포 생존율을 나타내었다. 한편, *t*-BHP로 세포괴사를 유발시킨 실험군에 가수분해물을 첨가하였을 때 catalase, GSH peroxidase, GST의 활성을 증가하였으나, SOD의 활성은 약간 감소하였다.

참 고 문 헌

1. Aebi, H. 1974. *Methods of enzymatic analysis*. pp. 673-135, 2nd eds., Academic Press, New York.
2. Benjamin, H. S., L. L. Li and P. Yoon. 1993. Thymic peptide protects vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Life Sci.* **52**, 1787-1796.
3. Choi, M. J., M. W. Choi, Y. K. Kim, C. H. Kim, J. Y.

- Moon and K. S. Nam. 1997. Effects of pilose antler on lipid peroxidation and antioxidative enzymes in cultured liver cells. *Korean J. Immun.* **19**, 49-57.
4. Davies, K. J. A. 1986. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses : a hypothesis. *J. Free Rad. Biol. Med.* **2**, 155-173.
5. Fariss, M. W., K. Olafsdottir and D. J. Reed. 1984. Extracellular calcium protects isolated rat hepatocytes from injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121**, 102-110.
6. Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jabby. 1974. Glutathion-S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biochem.* **249**, 7130- 7139.
7. Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 501-514.
8. Hamilton-Koch, W., R. D. Snyder and J. M. Lavelle. 1986. Metal-induced DNA damage and repair in human diploid fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Chem. Biol. Interact.* **59**, 17-28.

9. Jakoby, W. B. 1980. "Glutathion peroxidase" enzymatic basis of detoxication I. pp. 333-353, Academic Press, New York.
10. Kator, K. 1988. Aging, pp 475-483, In Nakano, M. (eds.), *Active oxygen-molecular mechanism of its production, scavenging and effect in organism*. Kyourits Press, Tokyo.
11. Lawrence, R. A and R. F. Burk. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 952-958.
12. Liebler, D. C., D. S. Kling and D. J. Reed. 1986. Antioxidant protection of phospholipid bilayer by α -tocopherol : Control of α -tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J. Biol. Chem.* **261**, 12114-12119
13. Masaki, N., M. E. Kyle and A. L. Farber. 1989. *Tert*-butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 390-399.
14. Masaki, N., M. E. Kyle, M. E. Serroni and A. L. Farber. 1989. Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by *tert*-butyl hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 672-680.
15. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase : Enzymatic function erythrocyte (hematocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
16. Nelson, S. D. 1995. Mechanism of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. *Drug Meta. Rev.* **27**, 147-177.
17. Oberley, L. W. and P. R. Spitz. 1984. *Methods in Enzymology*. Vol. **105**, pp. 457-464, Acad. Press, New York.
18. Oleinick, N. L., S. Chiu, N. Ramarkrishnan and L. Xue. 1987. The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br. J. Cancer.* **55**, 135-140.
19. Osawa, T and M. Namiki. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 735-739.
20. Oyanagui, Y. 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **42**, 290-296.
21. Paglia, D. E. and W. N. Valentine. 1967. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158-169.
22. Park, P. J., W. K. Jung, Y. R. Choi and S. K. Kim. 2000. Antioxidative effect of enzymatic protein hydrolysate from lecithin-free egg yolk. *Kor. J. Life Sci.* **10**, 131-139.
23. Pascoe, G. A. and D. J. Reed. 1987. Relationship between cellular calcium and vitamin E metabolism during protection against cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.* **254**, 287-296.
24. Rivett, A. J. 1989. The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 1-8.
25. Schröder, K. R., E. Hallier, H. Peter and H. M. Bolt. 1992. Dissociation of a new glutathione S-transferase activity in human erythrocytes. *Biochem. Pharm.* **43**, 1671-1674.
26. Schwarz, K. B. 1996. Oxidative stress during viral infection. *Free Radic. Med.* **21**, 641-649.
27. Sladowski, D., S. J. Steer, R. H. Clothier and M. Balls. 1993. An improved MTT assay. *J. Immunol. Methods.* **157**, 203-207.
28. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, B. J. Goeke and D. C. Klent. 1985. Measurement of protein using bicichoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
29. Suetsuna, K. and K. Osajima. 1989. Blood pressure reduction and vasolatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, **42**, 47-54.
30. Sunderman, F. W. Jr. 1986. Carcinogenicity and mutagenicity of some metals and their compounds, Vol **71**, pp.17-43, Lyon, IARC, Scientific Publications, France.
31. Tagashira, M., M. Watanabe and N. Uemitsu. 1995. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. *Biosci. Biotechol. Biochem.* **59**, 740-742.
32. Yamaguchi, N., Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1979. Antioxidative activities of protein hydrolysates. *Nippon shokuin Kogyo Gakkaish*, **26**, 65-70.
33. Younes, M. and C. P. Siegers. 1984. Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic events. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2001-2003.