원 저

HepG2 세포의 산화적 손상에 대한 산삼 추출물의 보호효과
- DNA chip을 이용하여-

김형석* · 박희수* · 권기록*

* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

Protective Effect of Wild Ginseng Extract against t-BHP-induced Oxidative Damage in HepG2 Cells Using DNA Chip

Hyung-Seok Kim · Hee-Soo Park* · Ki-Rok Kwon*

* Dept. of Acup & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Sangji University

Abstract

Objectives : This study was carried out to examine protective effect of wild ginseng extract on HepG2 human hepatoma cell line against tert-Butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced oxidative damage.

Methods : To evaluate protective effect of wild ginseng extract against t-BHP induced cytotoxicity, LDH level and activity of glutathione peroxidase and reductase were measured. Gene expression was also measured using DNA microarray.

Results : Wild ginseng extract showed a significant protective effect against t-BHP-induced cytotoxicity in HepG2 cell line. It is not, however, related with the activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase. Analysis of gene expression using DNA chip, demonstrated that 28 genes were up-regulated in t-BHP only group. Five genes - selenoprotein P, glutathione peroxidase 3, sirtuin 2, peroxiredoxin 2, serfiredoxin 1 homolog - may be related with the protective effect of wild ginseng extract.

Conclusions : Based on the results, a protective effect of wild ginseng extract against t-BHP-induced oxidative damage in HepG2 cell line is not associated with the activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase, but with the expression of selenoprotein P, glutathione peroxidase 3, sirtuin 2, peroxiredoxin 2, and serfiredoxin 1 homolog.

Key words : *Wild ginseng extract, t-BHP, HepG2 cell line, DNA chip.*

Ⅰ. 서 론

蔘(Panax ginseng C.A. Meyer: Ginseng radix)은 한의학에서 대표적인 補氣劑로 氣는 溫하고 味는 甘, 苦하며 그 효능은 "大補元氣, 固脫生津, 安神[1]"하고 "大補肺中元氣[2]"한다.

蔘에 대한 최초의 문헌적 기록은 BC 48-33년대에 해당하는 중국 前漢의 『急就章』이며[3], 처방에 관한 기록으로는 『傷寒論』에서 21개의 처방에 인삼을 구성약물로 제시하고 있다[4].

삼의 인위적 재배가 14-15C 전 · 후부터 시작되었으므로 이전에 저술된 인삼은 山蔘을 의미하는 것이지만 생김새가 사람과 닮았다는 의미에서 人蔘이란 표현을 쓰고 있다[5].

우리나라의 경우에는 이미 그보다 훨씬 오래 전인 BC 57년, 삼국시대 때 민간에서 인삼이 약용으로 이용

※ 교신저자 : 강원도 원주시 우산동 283
상지대학교 부속 한방병원 침구과
(Tel : 033-741-9257 E-mail: beevenom@paran.com)

되면서 널리 알려지기 시작하였고, 『三國史記』와 陶弘景의 『名醫別錄』에 따르면 百濟 武寧王 12년이 되는 513년 12월에 梁나라의 武帝에게 人蔘이 조공으로 보내졌다는 내용이 있다[6].

인삼의 효능에 대한 연구로는 신경 기능 조절, 체액 및 신진대사기능의 조절[7], 강심, 항이뇨, 성기능 증강효과[8], stress에 대한 저항력 증강[9,10], 소화흡수 및 면역항체 생산 촉진 등[11,12] 많은 효과가 있음이 보고되고 있다.

또한 항산화와 관련한 연구로는 인삼을 복용하였을 때 항산화능이 증가되고[13], 백삼보다는 홍삼이 우수하며[14], 부위에 따라 다양한 항산화능이 있음이[15] 보고된 바 있다. 이러한 연구 결과는 재배되어진 인삼을 재료로 한 결과이고 가격이나 희귀성 등의 이유로 산삼에 대한 연구는 시도된 경우가 많지 않았다.

따라서 자연산 산삼의 산화스트레스에 대한 보호 효과를 확인하고자 tert-Butyl hydroperoxide(이하 t-BHP)를 HepG2 세포에 처리한 후 나타나는 유전자 발현의 변화를 whole DNA microarray를 사용하여 실험한 후 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 방법

1. 산삼 열수추출물의 준비

본 실험에 사용한 자연산 산삼은 2005년 7월 장백산에서 채집한 것으로 길이는 40 ㎝, 무게는 21.45 g, 그리고 추정 연령은 30년 전후이며 중국의 길림성 연길시에 있는 國家蔘茸 품질감독기관에서 인증 받은 후 실험에 사용하였다(Fig. 1).

상기 시료를 흐르는 물에 깨끗이 씻은 후 얇게 잘라 round flask에 넣고 삼의 중량의 10배에 해당하는 증류수를 가하여 충분히 약재를 불린 후 전탕을 시작하였다. 전탕 시에는 약재의 유효성분이 달아나지 못하도록 환류냉각을 시행하였고, impeller speed는 4.5-5로, 환류냉각관에는 5℃의 냉각수가 흐르도록 한 후 3시간 동안 100℃로 가열하여 열수추출물 200 ㎖를 얻었다.

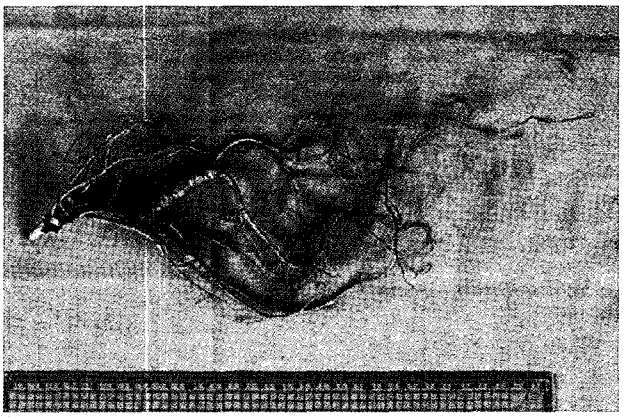

Fig. 1 Wild ginseng used in the experiment. Assumed age is around 30 years and it is about 40㎝ long from head to tip of the roots and weighs 21.45 g.

2. 연구 방법

1) 세포주

HepG2 세포주는 연세대학교 원주의과대학 기생충학교실에서 분양을 받아 사용하였다. 배양은 10% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 사용하여 37℃, CO2 5% 조건의 습도가 포화된 배양기에서 이루어졌다.

2) 세포독성 시험

세포독성 시험은 CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA)를 사용하여 배양액 상층액의 LDH(lactate dehydrogenase) 활성을 측정함으로써 수행하였다. Phenol red가 포함되지 않은 배양액을 사용하여 주어진 조건으로 세포를 배양하였다. 세포 배양액을 취하여 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 50 ㎕의 상층액을 96 well microtiterplate에 넣고 50 ㎕의 substrate mix (kit에 포함되어 있음)를 넣은 후 상온의 어두운 곳에 놓고 30 분 동안 반응시켰다. ELISA reader를 사용하여 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였으며 이 때 blank는 사용하지 않은 phenol red가 포함되지 않은 배양액을 sample로 반응시킨 것으로 하였다. 모든 sample은 세 배수로 실험하였다.

3) t-BHP에 의한 간세포 독성 억제 시험

2.5×106 개의 HepG2 세포를 6 well plate에 분주한 후 24 시간 동안 배양하였다. 세포가 plate에 부착되고 특징적인 형태를 나타내고 있음을 확인한 후 삼추출물이 포함된 배양액 2 ㎖을 넣고 2 시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후 같은 조건의 삼추출물에 t-BHP가 포함된 배양액 2 ㎖를 가하고 3 시간 동안 배양하였다.

4) Glutathione reductase 활성 시험

세포 배양액에 0.9% Triton X-100을 가하고 37℃에서 30 분간 반응시켰다. Lysate를 회수하여 12,000 rpm에서 20 분 간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 96 well microtiterplate에 50 ㎕의 상층액을 가하고 100 ㎕의 GR Buffer Mix(2 mM NADPH, 5 mM EDTA, 100 mM phosphate buffer, pH 7.6)를 가하였다. 50 ㎕의 GR Substrate Mix(4 mM oxidized glutathione)를 가하고 1 분 간격으로 10 분 동안 340 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

5) Glutathione peroxidase 활성 시험

세포 배양액에 0.9% Triton X-100을 가하고 37℃에서 30 분간 반응시켰다. Lysate를 회수하여 12,000 rpm에서 20 분 간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 96 well microtiterplate에 50 ㎕의 상층액을 가하고 100 ㎕의 GPx Buffer Mix(2 mM NADPH, 4 mM reduced glutathione, 25.6 mU/㎖ glutathione reductase, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.6)을 가하였다. 50 ㎕의 GPx Substrate Mix(16 mM hydroen peroxide)를 가하고 1 분 간격으로 10 분 동안 340 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

6) Glutathione 정량 시험

세포 배양액에 0.9% Triton X-100을 가하고 37℃에서 30 분간 반응시켰다. Lysate를 회수하여 12,000 rpm에서 20 분 간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. Lysate의 1/10 부피의 1 M 2-vinylpyridone을 가한 후 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이 반응은 환원형 glutathione을 제거하는 단계로 환원형 glutathione을 제거하지 않는 경우에는 수행하지 않고 다음 단계로 넘어갔다. Lysate와 같은 부피의 10% metaphosphoric acid를 가한 후 5 분 간 상온에 방치하였다. 12,000 rpm에서 2 분간 원심분리한 후 상층액을 회수하였다. 상층액의 1/5 부피의 4 M triethanolamine을 가하여 산화형/환원형 glutathione 정량용 sample을 준비하였다.

96 well microtiterplate에 2-vinylpyridone을 처리하였거나 처리하지 않은 sample 50 ㎕를 넣고 G Enzyme Mix(1.28 mU/㎕ glutathione reductase) 50 ㎕를 넣은 후 100 ㎕의 G Buffer Mix(2 mM NADPH, 20 mM DTNB, 0.4 M MES, 2 mM EDTA, 0.1 M disodium phosphate, pH 6.0)를 넣고 상온에서 10 분간 반응시킨 후 405 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

7) Total RNA 정제

Total RNA의 분리는 TRIzol® (Gibco BRL Co. USA)의 사용법에 따랐다. RNase가 불활성화된 튜브에 500 ㎕의 cell lysate와 5 ㎖의 TRIzol®을 가하고 격렬히 흔들어 준 후 5 분 동안 상온에 방치하였다. 1 ㎖의 chloroform을 가하고 15 초 동안 격렬히 흔들어 준 후 3 분 동안 상온에 방치하였다. 4℃, 12,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리한 후 위쪽의 수용액 층을 RNase가 불활성화된 튜브에 옮겼다. 2.5 ㎖의 isopropyl alcohol을 가하고 잘 섞은 후 10 분 동안 상온에 방치하였다. 4℃, 12,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리한 후 상층액을 버렸다. 5 ㎖의 75% ethanol 을 가한 후 4℃, 7,500 × g에서 5 분 동안 원심분리한 후 상층액을 버렸다. RNA 침전물을 가볍게 말린 후 500 ㎕의 DEPC가 처리된 증류수에 재용해시켰다.

정제된 total RNA의 순도를 확인하기 위해 260 ㎚와 280 ㎚에서 흡광도(A260과 A280)를 측정하여 그 비(A260/280)를 계산하였다. 그 값이 2.0에 가까울수록 정제된 total RNA의 순도가 높음을 의미한다. 또한 정제된 total RNA의 농도를 측정하기 위해 다음의 공식을 이용하였다.

Total RNA의 농도 (ng/㎕) = 260 ㎚에서의 흡광도×40

8) Fluorescent DNA probe의 준비 및 hybridization

본 실험에서 사용된 OpArray Human genome 35K (OPHSV4, Operon Biotechnologies, GmbH)는 human whole genome oligo subsets V4.0 중 31,387 개의 exon

sequence oligo, 3,396 개의 transcript sequence oligo 그리고 chip의 quality 확인과 normalization을 위하여 1,877 개의 control sample을 점적한 DNA chip이다. 35,035 개의 oligo에는 29,134 개의 기능이 알려진 유전자와 5,901 개의 아직 기능이 밝혀지지 않은 transcript와 EST sequence가 포함되어 있다(Fig. 2).

Ontology 분석 결과, 기능이 알려진 유전자들에는 19,884 개의 biological process에 관여하는 유전자와 18,541 개의 cellular component에 관여하는 유전자, 그리고 22,022 개의 molecular function에 관여하는 유전자가 포함되어 있다.

DNA chip을 이용한 실험 방법에 대한 개괄적인 방법은 다음과 같다(Fig. 3). 정제된 total RNA를 template로 하고 reverse transcriptase SuperScript Ⅱ (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이 때 사용되는 dNTP 중 dCTP (Amersharm, Piscataway, NJ)는 대조군에는 Cyanine(Cy3)가, 실험군에는 Cyanine(Cy5)가 conjugation되어 있는 것을 사용하였다. Labelling된 cDNA micture는 ethanol precipitation법에 의해 농축한 후 10 ㎕의 hybridization solution (GenoCheck, Korea)에 재용해 하였다. 두 labeled cDNA 샘플을 섞은 후 OpArray Human genome 35K (OPHSV4, Operon Biotechnologies, GmbH)에 넣고 hybridization chamber에 넣고 65℃에서 12시간 동안 반응시켰다. Hybridized slide는 상온 조건에서 2× SSC에서 2 분, 0.1% SDS (sodium dodecylsufate)에서 2 분, 1× SSC(soluble solid contents)에서 3 분, 0.2× SSC에서 2 분 동안 세척하였다. Slide를 3,000 rpm에서 20 초 동안 원심 분리하여 건조시켰다.

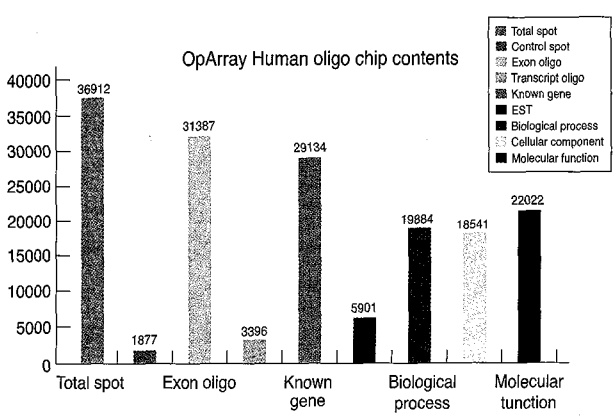

Fig. 2 Classification of gene expression to the OpArray Human genome 35K.

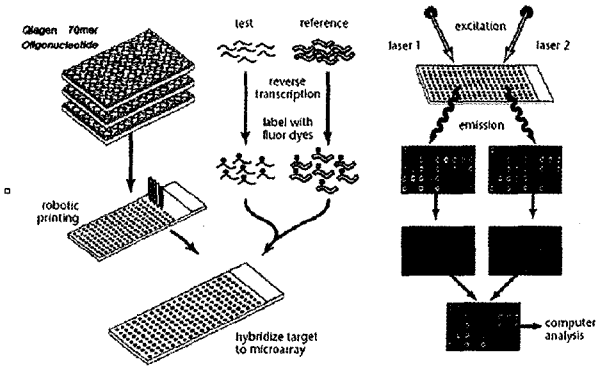

Fig. 3 Expression monitoring of DNA chip.

9) Microarray data analysis

Hybridized slide는 GenePix 4000B scanner(Axon Instrument, CA)를 이용하여 읽고 software program GenePix Pro 5.1 (Axon Instrument) and GeneSpring 7.2 (Sillicongenetics, CA)를 이용하여 분석하였다. Visual examination에 의해 기준 밖의 signal을 나타내는 spot은 이후의 분석에서 제외하였다. 먼지나 기타 원인에 의해 영향을 받은 spot은 수작업으로 제외하였다. 의심이 되는 데이터를 제외시키기 위해 signal-to-noise 비가 10 이하인 spot은 데이터에서 제외하였다. Global, lowess, print-tip, 그리고 scaled normalization을 수행하여 결과 값을 보정하였다. 대조군에 비해 2 배 이상 증가하거나 2 배 이하로 감소한 유전자를 유의하게 발현이 변화한 유전자로 판단하였다.

10) Statistical analysis

통계처리는 SPSS (Windows ver. 11.0, Chicago, IL)로 수행하였다. 대조군과 실험군 간의 평균비교는 student's t-test를 이용하였다. P 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의성 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 산삼추출물의 세포독성 시험

세포배양을 활용하여 산삼추출물의 생물활성 효과를 시험하기 위해 산삼추출물 자체에서 세포에 유발되는

독성이 최소화 된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 산삼추출물을 가하고 이 배양액을 HepG2 세포에 12 시간 또는 24 시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상을 받는지를 LDH assay를 통해 시험하였고 농도는 0 - 10% 범위로 하였다. 그 결과, 산삼추출물의 시험한 농도 범위 내에서는 유의한 세포독성을 확인할 수 없었다(Fig. 4). 오히려 삼추출물의 농도가 증가할수록 세포손상으로 인해 배양액으로 유출되는 LDH의 양이 감소하는 경향을 나타내었다. 12 시간의 결과와 비교하였을 때 24 시간의 결과는 상대적으로 높게 나타났고, 이는 실험 과정 중에 HepG2 세포가 증식하여 total lysate의 LDH 활성이 증가한 것으로 판단되어 10%를 실험농도로 결정하였다.

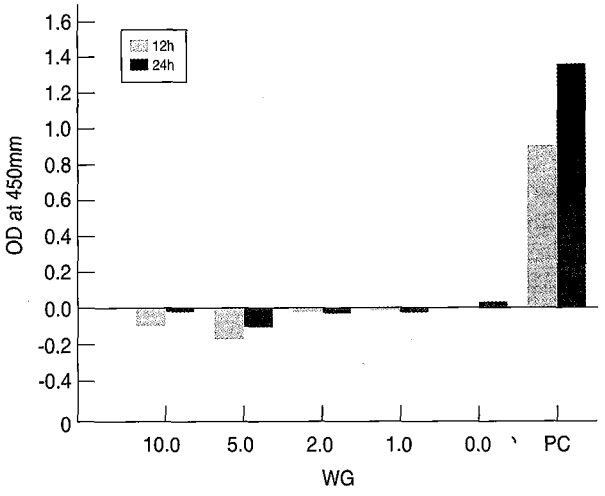

Fig. 4 Cytotoxicity assay of wild ginseng extract.
1×104 HepG2 cells were dispensed in 96 well plate and incubated overnight. The culture supernatant was replaced with the medium including wild ginseng extract and incubated for 12 or 24 hrs. LDH activity was assayed with the culture supernatant. WG, Concentration of wild ginseng extract.

2. t-BHP 투여량 결정 실험

Lee 등[19]에 의하면 HepG2 세포에 처리하는 적정 t-BHP의 농도는 100 μM이라고 하였으나 실험의 목적과 조건과 세포의 상태 등에 따라 이 농도는 변할 수 있으므로 본 연구에 적합한 적정 t-BHP 농도를 결정하고자 0.9% Triton X-100을 HepG2 세포에 처리하여 완전히 lysis시킨 조건을 기준으로 한 결과, 500 μM t-BHP를 처리하였을 때 50% 이상의 세포 독성을 나타내었고 200 μM t-BHP를 처리하였을 때 약 25% 수준의 세포 독성을 나타내었다. 이에 따라 t-BHP 처리 농도는 350 μM로 결정되었다(Fig. 5).

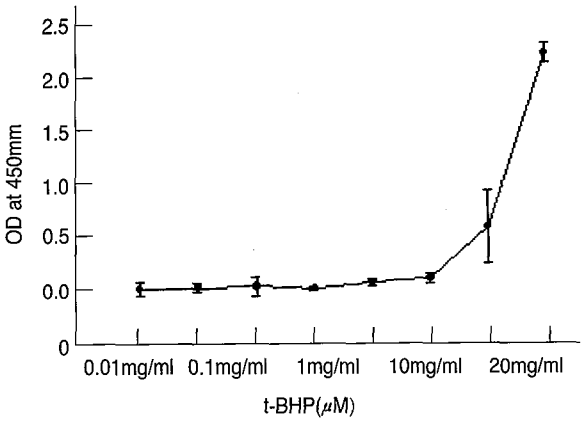

Fig. 4 Cytotoxicity of t-BHP in HepG2 cell line.
Cells were treated with 10 - 500 μM t-BHP for 2 hrs in the 96 well plate to induce oxidative damage followed by LDH assay.

3. t-BHP 유도 독성에 노출된 HepG2 세포에 대한 산삼 추출물의 독성 억제 효과

HepG2 세포에 처리하는 삼추출물의 농도 (10%)와 t-BHP 처리 농도 (350 μM)를 적용하여 산삼 추출물의 t-BHP 독성 억제 효과를 시험한 결과 아무것도 처리하지 않은 경우 (untreated, UT)에 비해 t-BHP를 처리한 경우 (BHP) 배양액 내의 LDH 활성은 약 2 배를 나타내었다 (Fig. 6). 그러나 산삼 추출액을 처리하면 350 μM의 t-BHP를 처리했음에도 불구하고 LDH 활성이 감소하는 것을 보였으며(2.5 % 산삼추출물: $p < 0.01$, 10% 산삼추출물: $p < 0.05$), 특히 5% 이상의 농도에서는 비처리군 (UT)의 경우와 비슷한 수준의 LDH 활성을 나타내었다. 이를 통하여 산삼 추출액이 t-BHP에 의해 유도되는 세포독성을 농도 의존적으로 보호하고 있음을 알 수 있었다.

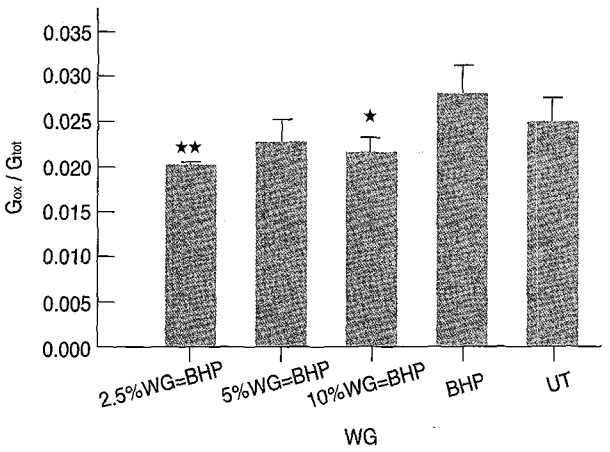

Fig. 6 LDH activity of HepG2 cells treated with wild ginseng extract and t-BHP.
Data were triplicated and expressed as mean ± SD. Statistical significance was evaluated in comparison with BHP only group by Student' s t-test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; WG, wild ginseng extract; BHP, tert-butylhydroperoxide; UT, untreated.

이는 산삼 추출물이 glutathione의 환원형 유지를 도움으로써 t-BHP에 의한 세포독성을 억제해 주지만 glutathione reductase와 glutathione peroxidase의 활성에 크게 영향을 주는 수준은 아님을 알 수 있었다.

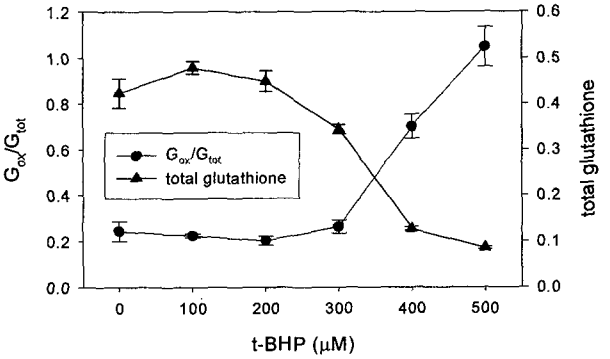

Fig. 7 Ratio of total glutathione and oxidized glutathione on HepG2 cells treated with wild ginseng extract and t-BHP.

4. t-BHP 유도 독성에 노출된 HepG2 세포에 산삼 추출물의 glutathione level에 대한 영향

Glutathione은 산화형과 환원형으로 존재하는데 대부분 환원형으로 존재하면서 무작위로 생성되거나 유입되는 산화제를 환원시키고 자신은 산화형으로 바뀌게 된다. 따라서 전체 glutathione의 양에 대한 산화형 glutathione의 양을 알면 세포가 받고 있는 산화 스트레스의 양을 예상할 수 있다.

실제로 t-BHP를 농도별로 처리했을 때 HepG2 세포 내의 glutathione의 수준을 확인한 결과 Total glutathione의 경우, 200 μM t-BHP 이하의 조건에서는 level이 높게 유지되다가 300 μM t-BHP 이상의 농도에서 감소하는 양상을 나타내었다(Fig. 7). 산화형 glutathione level의 경우에서도 300 μM 이하의 t-BHP 농도에서는 정상적인 비율을 유지하다가 300 μM 이상의 농도에서 t-BHP의 농도에 비례하여 증가하였다.

이를 통하여 350 μM t-BHP 농도의 조건이 적절한 농도임을 다시 한 번 확인할 수 있었다. 이 조건에서 10% 산삼 추출물을 처리한 후 t-BHP의 독성 억제 효과를 관찰한 결과 비처리군(UT)에 비해 t-BHP를 처리한 군에서 산화형 glutathione의 비율이 증가하였으나 산삼 추출액을 처리한 군에서는 낮게 유지되었다(Fig. 8).

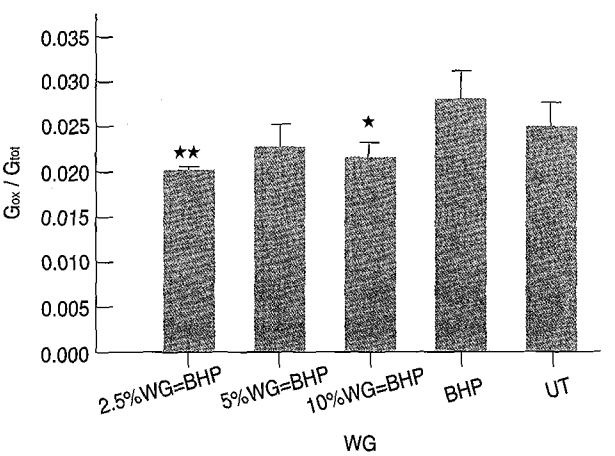

Fig. 8. Glutathione levels in HepG2 cells treated with wild ginseng extract and t-BHP.
Data were triplicated and expressed as mean ± SD. Statistical significance was evaluated in comparison with BHP only group by Student' s t-test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; GE, wild ginseng extract; BHP, tert-butylhydroperoxide; UT, untreated; WG, concentration of wild ginseng extract.

5. DNA chip 분석을 위한 total RNA 정제

t-BHP를 처리한 HepG2 세포에 대한 세포독성 억제 효과를 배양액 내의 LDH 활성으로 측정하였을 때 유의한 차이가 나타났음에도 불구하고 세포 내에 존재하는 glutathione peroxidase와 glutathione reductase의 활성에는 큰 차이가 나타나지 않아 그 원인을 확인하고자 whole DNA chip을 이용하여 산삼 추출물의 세포보호 효과를 total gene 수준에서 관찰하였다.

본 연구에서는 t-BHP에 대한 방어 반응에 작용되는 유전자의 발현을 확인하기 위하여 total RNA를 추출하기 위한 t-BHP 처리 시간을 1.5 시간으로 하여 관찰한 결과 현미경 하에서 HepG2 세포의 형태는 아무것도 처리하지 않은 대조군과 처치군이 큰 차이를 나타내지 않았다.

이 세 군의 HepG2 세포로부터 total RNA를 추출하고 그 순도를 측정한 결과는 Fig. 9와 Table 1과 같았다. 모든 실험군에서 A260/A280의 값이 2.0에 가깝게 나타나 RNA의 정제 · 추출이 원만히 수행되었음을 알 수 있었다.

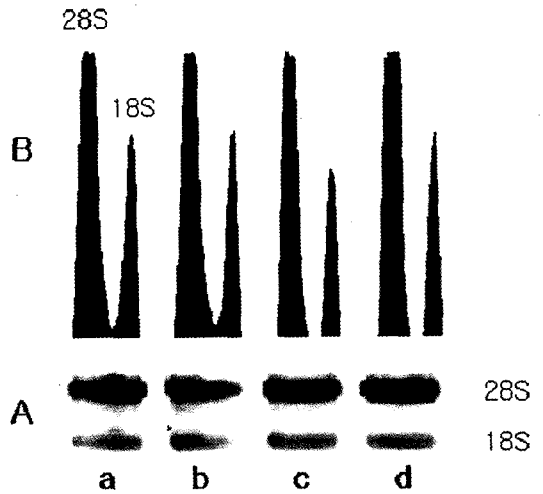

Fig. 9 Total RNA preparation for DNA chip.
A. 1.0% agarose gel electrophoresis of total RNA from (a), RNA standard; (b), control group; (c), t-BHP group; (d), t-BHP+WG group.
B. Histogram of the scanned gel. 28S: 28S ribosomal RNA; 18S: 18S ribosomal RNA.
WG, wild ginseng extract.

Table 1. Total RNA preparation for DNA chip.

Group		A260	A280	A260/280	Conc.(μg/μl)	total vol.(μl)	total RNA(μg)
BHP		1.163	0.593				
		1.146	0.598				
		1.161	0.602				
	mean	1.157	0.600	1.94	4.63	28.00	129.55
BHP+ WG		1.667	0.851				
		1.627	0.838				
		1.619	0.853				
	mean	1.638	0.850	1.93	6.55	28.00	183.42
UT		1.921	1.001				
		2.078	1.036				
		1.977	1.020				
	mean	1.992	1.020	1.95	7.97	28.00	223.10

BHP, tert-butylhydroperoxide; UT, untreated; WG, wild ginseng extract.

6. DNA chip analysis

Hybridization 후 slide를 scanning한 이미지는 Fig. 10과 같다. 이 이미지로부터 유전자 발현을 분석하기 전에 normalization한 결과 scanning된 값의 편자를 보정할 수 있었다(Fig. 11).

보정한 결과를 그래프로 나타낸 것이 Fig. 12와 13이다. Fig. 14는 보정된 결과를 이용하여 t-BHP와 산삼 추출물을 처리한 HepG2 세포에서의 발현 증가와 감소 양상을 나타낸 것인데 빨간색은 증가, 녹색은 감소한 것을 나타낸다.

Hybridization 결과 BHP group의 UT group에 대비한 유전자 발현 변이를 확인한 결과, 총 1,722개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상 발현 변이를 나타내었다. 그 중에 ANGPTL4, BTG1, CARD9, CDKN1A, DFFB, ERN1, GML, PAK1, TNFSF9, TNFSF14, TRAF1 gene 등의 세포사에 관여하는 유전자들과 BCL6, BTG2, CLK1, IL12B, IL15, ING1, PGF, REG1A, RUNX3, SERTAD1 gene 등의 세포 증식에 관여하는 유전자들을 포함하여 520개의 유전자들이 2 fold 이상 over expression을 나타내었다. 그 외에 AKT1, API5, BCL2L1, PIK3R2, RELA, MCL1, SPHK1, HIPK3, HDAC3 gene 등의 anti-apoptosis에 관여하는 유전자들, E2F6, GRLF1, ILF3, KLF10, MBD, MYST4, NKRF, PHB, TGIF, TRIM33, VHL gene 등의 negative regulation of transciption에 관여하는 유전자들을 포함하여 1,202개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상 down expression을 나타내었다.

BHP+WG group의 UT group에 대비한 유전자 발현 변이를 확인한 결과, 총 1,014개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상 발현 변이를 나타내었다. 그 중 ALOX12, BTG1, CDX1, DPYSL5, FOXC1, KLF6, MAS, PGF, TBX5, SOCS1 gene 등의 morphogenesis에 관여하는 유전자들과 ATF3, CITED2, DMRT2, FOS, FOSB, HOXD1, IRF5, NR4A1, SMARCD2, SOX18 gene 등의 대사조절에 관여하는 유전자들을 포함하여 420개의 유전자들이 2 fold 이상 over expression을 나타내었다. 그 외에 ASPH, CDK6, CUL4A, EDD1, FBXO10, FBXO42, FGFR2, MAP2K6, MAP3K2, MAP4K5, NEK7, NEK9, STK38 gene 등의 protein modification에 관여하는 유전자들, CCNL2, FUBP1, MAFG, MAZ, MLL, MLLT10, NFIC, RREB1, STAT6, TBX6 gene 등의 transcription (GO:6350, p-value:0.001)에 관여하는 유전자들을 포함하여 594개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상 down expression을 나타내었다.

두 실험에 대해서 산삼추출물 처리에 대한 발현 변이를 분석한 결과, AKT1, BIRC3, GSN, KLF10, RELA gene 등의 negative regulation of cellular process에 관여하는 유전자들을 포함하여 320개의 유전자들이 산삼 추출물 처리에 의해 2 fold 이상 up regulation을 나타내었다. 또한 BCL6, IL12B, REG1A, NPY, TGFB2 gene 등의 세포 증식에 관여하는 유전자들을 포함하여 133개의 유전자들이 산삼 추출물 처리에 의해 2 fold 이상 down regulation을 나타내었다. 5% variation 내에서 산삼 추출물 처리에 의해 발현 변이를 보이지 않는 유전자들은 4,141개를 확인할 수 있었다.

특히 항산화와 관련한 유전자 중 산삼 추출물의 처리를 통하여 유의한 변화를 나타낸 유전자는 selenoprotein P (BCO30009), glutathione peroxidase 3 (NM002084), sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog-NM012237), peroxiredoxin 2 (NM005809), 그리고 sulfiredoxin 1 homolog (AK125343)이 있었다(Table 2).

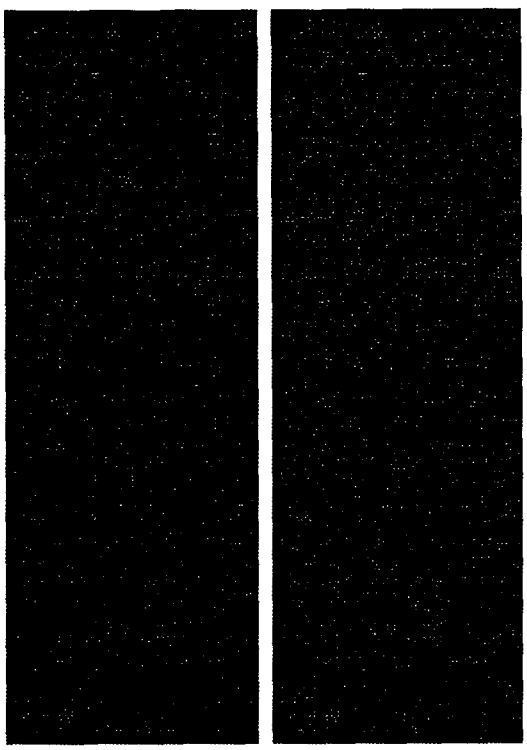

Fig. 10 Microarray fluorescence image.

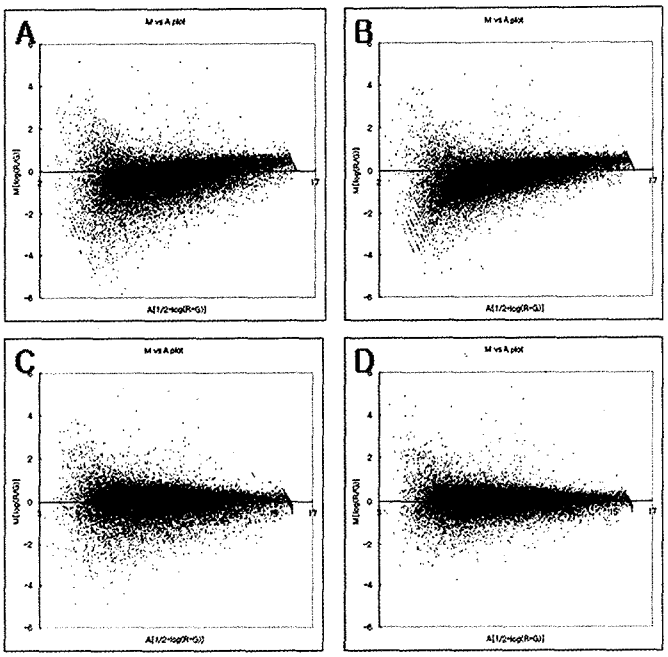

Fig. 11 Box plot normalization of DNA chip data.
(A), t-BHP group before normalization; (B), t-BHP+WG group before normalization; (C), t-BHP group after normalization; (D), t-BHP+WG group after normalization; WG, wild ginseng extract.

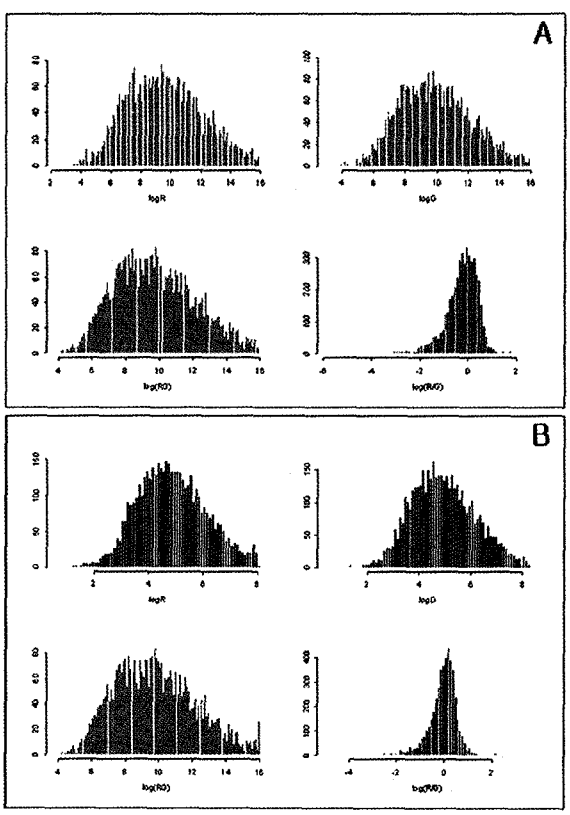

Fig. 12 Raw data intensity histograph of t-BHP group.
(A), before normalization; (B), after normalization.

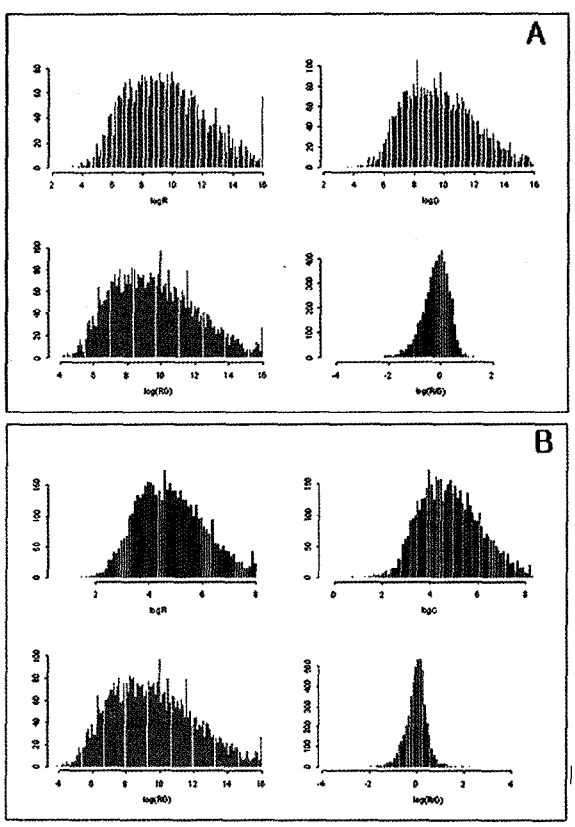

Fig. 13 Raw data intensity histograph of t-BHP+WG group.
(A), before normalization; (B), after normalizationl WG, wild ginseng extract.

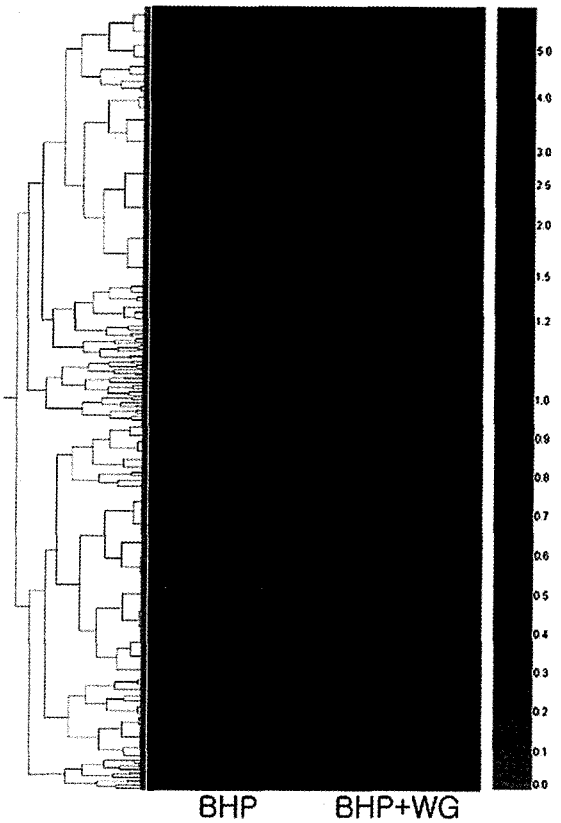

Fig. 13 Hierarchial clustering.
BHP, t-BHP; WG, wild ginseng extract.

Ⅳ. 고 찰

蔘은 오가과(Araliaceae)에 속하는 다년생 식물로 Panax 속 식물에 해당된다[1].

Panax 속은 지구상에 십여 종이 알려져 있으며, 대표적인 종으로 고려삼(Panax ginseng), 서양삼(Panax quinquefolia), 전칠삼(삼칠, Panax notoginseng), 죽절삼(Panax japonica), 삼엽삼 (Panax trifolia), 히말라야삼(Panax pseudoginseng), 베트남삼 (Panax vietnamensis) 등이 있다.

蔘은 그 형태가 사람을 닮았다고 하여 인삼이라고 부르는데, 한의학의 대표적인 補氣劑로 大補元氣, 止渴生津, 補脾益肺, 安神益智, 益氣生血, 扶正祛邪 등의 작용이 있어서 勞傷虛損, 食少倦怠, 自汗暴泄, 驚悸, 健忘 등에 유효하다.

예로부터 山蔘은 靈藥으로 여겨졌고, 인삼의 재배시기를 14-15C 전후로 보았을 때 그 이전에 저술된 서적의 처방에서 제시하고 있는 인삼은 자연산 산삼이라고 할 수 있다[5].

하지만 산삼은 매우 희귀하고 가격 또한 고가이므로 학문적 연구를 위해서는 제약이 많은 재료라 이전에 보고된 내용도 많지 않다.

김 등[16]이 사람의 급성 백혈병 세포주인 HL-60을 이용하여 자연산 산삼과 산양삼 그리고 인삼의 apoptosis에 미치는 영향을 연구한 결과 세포 활성도의 감소와 cell membrane bleb를 형성하여 apoptotic body를 형성하는데 자연산 산삼 > 산양삼 > 인삼의 순서로 효과를 나타내었음을 보고한 바 있고, 동물모델에서 Yun 등[17]이 고혈당과 비만에 효과가 있음을 보고한 바 있다.

따라서 자연산 산삼의 효능을 평가하기 위한 일환으로 산화스트레스에 대한 보호 효과를 확인하고자 t-BHP를 HepG2 세포에 처리한 후 나타나는 유전자 발현의 변화를 whole DNA microarray를 사용하여 산삼 열수 추출물의 산화 스트레스 감소 효과를 확인하고자 하였다.

산삼의 열수 추출물은 수령 30년 전후의 삼을 3차 증

Table 2. Effect of wild ginseng extract on gene expression in HepG2 cells treated with t-BHP.

GenBank ID	Gene title	Group		WG
		BHP	BHP+WG	effect
NM_002083	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	1.034	1.088	1.052
NM_000041	apolipoprotein E	1.089	1.382	1.269
XM_497092	similar to Glutathione peroxidase 1 (GSHPx-1) (Cellular glutathione peroxidase)	1.148	1.272	1.108
NM_183063	ring finger protein 7	1.182	1.221	1.033
NM_005809	peroxiredoxin 2	1.196	1.223	1.023
NM_015696	glutathione peroxidase 7	1.324	1.381	1.043
NM_183063	ring finger protein 7	1.268	1.294	1.020
NM_002452	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1	1.283	1.399	1.090
BC007927	glutathione synthetase	1.164	1.234	1.060
BC013034	polynucleotide kinase 3' -phosphatase	1.578	1.536	0.973
AK127679	dual specificity phosphatase 1	12.426	11.735	0.944
NM_000636	superoxide dismutase 2, mitochondrial	1.277	1.235	0.967
AK097395	superoxide dismutase 2, mitochondrial	1.242	1.138	0.916
BC006523	serμM/glucocorticoid regulated kinase 2	0.994	1.239	1.246
NM_001752	catalase	1.093	0.955	0.873
NM_012331	methionine sulfoxide reductase A	1.042	0.997	0.957
NM_202002	forkhead box M1	1.157	0.974	0.842
AK097395	superoxide dismutase 2, mitochondrial	1.100	1.015	0.922
NM_005109	oxidative-stress responsive 1	0.833	0.867	1.041
NM_203472	selenoprotein S	0.897	0.911	1.015
NM_005109	oxidative-stress responsive 1	0.806	0.861	1.069
BC030009	selenoprotein P, plasma, 1	0.699	0.913	1.307*
NM_002084	glutathione peroxidase 3 (plasma)	0.300	0.582	1.939*
NM_014931	SAPS domain family, member 1	0.604	0.786	1.300
NM_012237	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2 (S. cerevisiae)	0.296	0.604	2.041*
NM_005809	peroxiredoxin 2	0.875	1.018	1.164*
CR936874	serine/threonine kinase 25 (STE20 homolog, yeast)	0.898	0.998	1.111
AK125343	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	0.869	1.104	1.271*

BHP, t-BHP; WG, wild ginseng extract.

류수로 환류냉각을 수행하면서 3시간 동안 충분히 유효성분들이 추출될 수 있도록 하여 실험에 사용하였다.

t-BHP는 산화적 스트레스를 유발하는데 광범위하게 사용되고 있는 모델로 reactive oxygen species(ROS)의 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[18].

Lee 등[19]의 보고에서는 100 μM의 t-BHP를 처리하였는데, 그 농도에서는 같은 시간 처리하였을 때 배양 상층액 내의 LDH 활성에 유의한 차이를 얻기 힘들었다. 이에 따라 처리하는 t-BHP의 농도를 증가시키면서 배양 상층액 내의 LDH 활성이 유의하게 차이가 나는 농도를 확인한 결과 350 μM이 결정되었다.

산삼 추출물을 처리했을 때 t-BHP에 의한 세포독성을 유의하게 감소시킨 결과에 비해 HepG2 세포 내에 존재하는 항산화 효소의 활성은 유의한 차이를 보이지 않은 점은 매우 의외의 결과였다. t-BHP는 유기 hydroperoxide로 세포내 산화스트레스를 유발하는 대표적인 물질이며, 기존의 보고에서도 ginsenoside를 처리함으로써 glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase 등의 항산화 효소들의 활성이 증가하는 것으로 보고되어 있기 때문이다[18]. 그러나 세포내 산화형 glutahione의 수준이 t-BHP group에 비해 t-BHP+산삼 추출물 처리군에서 유의하게 감소하는 양상

을 나타낸 것은 산삼 추출물 처리가 HepG2 세포의 산화 상태를 환원형으로 유지하는데 도움을 주는 것으로 판단되었고, 이는 glutathione을 이용한 항산화 효소의 활성을 증가시키는 기작에 의한 것이라기보다는 그 외의 기작에 의한 것일 가능성이 있다고 판단되었다.

DNA microarray를 이용하여 whole gene의 변화를 확인한 것은 이러한 가능성을 뒷받침해 주었다. DNA microarray는 반도체 제작 기술을 이용하여 평면상에 oligo DNA의 array를 제작하여 고집적화된 소자로 만들고, 짧은 시간에 많은 DNA를 분석할 수 있는 강력하면서도 효과적인 도구이다.

Ontology 분석에서 항산화와 관련되는 유전자로 알려진 53 가지의 유전자 중 HepG2 세포를 이용한 t-BHP 모델에서 발현된 유전자는 28개였고, 이 중 산삼추출물 처리에 의해 유의하게 변화한 유전자는 selenoprotein P, glutathione peroxidase 3, sirtuin 2, peroxiredoxin 2, serfiredoxin 1 homolog 등 다섯 가지 유전자였다.

Selenoprotein P는 또 다른 selenoprotein인 glutathione peroxidase에 이어 두 번째로 발견된 extracellular glycoprotein으로 기질선택성이 강한 peroxidase로 보여진다[20]. 거의 모든 조직에서 selenoprotein P를 발현하지만 75%는 간에서 만들어지기 때문에 간 손상이 있을 경우 plasma selenoprotein P의 수준은 감소하며[21], selenoprotein P의 반감기가 3-4 시간일 정도로 대사가 매우 빠르다[22]. Selenoprotein은 selenium homeostasis와 항산화 기작에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다[23]. 특히 plasma의 selenoprotein P의 수준과 hepatic endothelial cell injury와 상관관계가 있고, Selenium이 결핍된 환자에게 selenium을 투여했을 때 glutathione peroxidase의 활성이 최적화된다는 것이 보고되어 있다.

이런 결과들을 종합해 보았을 때 HepG2 세포가 t-BHP에 의해 산화적 손상을 받아 selenoprotein P의 발현이 저하되지만 산삼 추출물을 전처리함으로써 그 손상의 정도를 최소화 하여 HepG2 세포가 정상적인 수준의 selenoprotein P를 발현할 수 있도록 해 준 것으로 해석된다.

Glutathione peroxidase 3(GPx3)는 selenium을 포함한다는 면에서 selenoprotein P와 관련성이 있다. 다른 GPx family의 효소들과는 달리 GPx3는 유일한 extracellular isoform으로[24] 주로 hydrogen peroxide와 lipid peroxide를 제거하는 효소로[25] 본 연구에서 사용한 t-BHP-induced hepatotoxicity 모델을 이용한 실험 결과를 설명해 주는 중요한 효소 중의 하나이다.

GPx3는 주로 신장 세포에서 발현되지만 간세포에서도 발현되고[26-28], 사람에서 간경변의 정도와 GPx3의 활성에 상관관계가 있음이 보고되어 있다[29].

본 연구의 결과, 산삼추출물은 HepG2 세포에서 GPx3의 발현을 증가시켜 주지만 정상 대조군에 비해서는 그 수준이 약 58%로 비교적 낮은 수준이었다. 그러나 t-BHP만 처리한 군에 비해 그 발현이 약 1.9 배 증가하였다는 것은 산삼추출물이 비교적 유의하게 GPx3의 발현을 증가시킨다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 t-BHP를 간세포주에 처리하는 모델을 이용하였으나 이후의 연구에서 신장세포주에 처리하는 모델을 활용하면 이 결과보다 좀 더 유의한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

Peroxiredoxin(이하 Prx)은 또 다른 항산화 효소 중의 한가지로 사람의 경우 6 개의 isoform이 존재한다[30]. N-terminal과 C-terminal 양쪽에 cystein이 존재하는 2-Cys Prx와 N-terminal 말단에만 cysteine이 존재하는 1-Cys Prx의 두 가지 Prx subgroup으로 분류할 수 있다[31]. Prx 2는 2-Cys Prx subgroup에 포함되는 네 가지 Prx 중 하나로, 생리적인 조건 하에서 growth factor에 반응하여 유발되는 hydrogen peroxide를 제거하며, 실험적인 조건 하에서 hydrogen peroxide에 의해 유발되는 NF-κB의 활성화를 억제하는 작용을 한다[32]. 또한 Prx 2는 serum, ceramide, etoposide 등의 부족에서 오는 apoptosis를 막아주고[31], hydrogen peroxide 자극에 의해 발현이 증가함이 확인되었다[33].

본 연구에서 Prx 2의 수준이 대조군에 비하여 t-BHP만 처리하였을 때 87.5% (0.875)이었고, 산삼추출물을 같이 처리하였을 때 101.8% (1.018)를 나타내어 16.4%의 유전자 발현 증가를 나타내었다. 다른 다섯 가지 단백질들에 비해 발현의 변화는 비교적 적었지만 peroxide의 해독에 관여한다는 사실에 비추어 보았을 때 다른 산화스트레스 모델을 적용하여 그 변화의 수준을 주의 깊게 관찰할 필요가 있는 유전자로 추정되었다.

Sulfiredoxin(Srx)은 산화적 손상을 환원시키는데 관여하는 신호전달에 관여하는 항산화 단백질로 최근에 확인되었다[34]. Srx는 Prx의 조절 기작을 연구하는 과정 중 발견되었으며 hydrogen peroxide에 대한 반응으로 발현이 증가한다. Srx는 발견된 지 얼마 되지 않기 때문에 생리적 중요성을 직접적으로 연구한 보고는 없지만 Prx

와 thioredoxin의 작용을 조절함으로써 세포내 산화스트레스에 대한 반응에 관여하는 것은 알려져 있다.

본 연구에서는 t-BHP를 처리했을 때 86.9% (0.869) 수준으로 발현했지만 산삼추출물을 전처리함으로써 110% (1.104)의 발현 양상을 나타내어 27.1%의 증가를 나타내었다. Srx의 작용은 Prx와 결부된 연구 결과가 필요하므로 향후 Prx 또는 Srx의 발현에 보다 적절한 실험 모델을 이용한 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

Sirtuin 2는 NAD+-dependent protein deacetylase family의 하나로 기존에 알려져 있는 nicotinamide ring의 산화환원과는 연관이 없는 별개의 신호전달기작에 중요한 역할을 하는 효소이다[35]. Sirtuin 2의 생리학적 중요성은 아직 잘 알려져 있지는 않지만 대체적으로 nuclear protein을 deacetylation시킴으로써 chromatin의 transcription을 억제하여 궁극적으로 발생, cell cycling, aging에 영향을 주는 것으로 예상을 하고 있다[36,37]. 따라서 Ontology에 따른 분류에서 sirtuin 2가 항산화에 관련되는 유전자로 구분되었지만, 유전자 조절의 단계 중에서 매우 높은 단계에 관여하기 때문에 그 효과는 비교적 넓을 것으로 예상된다.

본 연구에서 t-BHP 단독으로 처리하든, 산삼추출물과 t-BHP를 같이 처리하든 어느 경우에 있어서도 대조군에 비해 sirtuin 2의 발현량이 증가된 것을 보았을 때 대조군에 비해 활발한 유전자 발현을 예상할 수 있지만 그러한 활발한 유전자의 발현이 HepG2 세포의 항산화 기작과 얼마나 관련이 있는지는 현재까지의 연구 결과로는 알 수 없었다.

본 연구는 HepG2 세포에 대한 t-BHP의 독성을 산삼추출물이 해독하는데 어떤 유전자가 관여하는지 screening 하고자 시도되었다. 산삼은 근본적으로 대량생산을 할 수 없기 때문에 상업적인 측면에서 그 효용성이 매우 낮다. 하지만 삼의 효능을 판정하는 기준을 어떻게 과학적으로 마련할 것인가에 대한 실험 모델을 연구하는 것은 인삼이나 산양삼의 연구 등에 의미가 있다고 할 수 있다.

본 연구에서는 HepG2 세포에 대한 t-BHP의 영향이라는 한가지의 모델을 이용하였으나, 기존의 연구에서 개발되어 있는 항산화 모델 또는 산화스트레스 모델의 종류가 매우 많으므로 산삼의 효과를 보다 심층적으로 확인하기 위해서는 보다 많은 모델을 적용하여 시험함으로써 산삼의 효과를 가장 잘 보여줄 수 있는 모델을 찾는 것이 필요하다.

DNA chip을 이용한 연구는 많은 장점에도 불구하고 그 재현성이 기존의 연구 방법에 비해 떨어지는 단점이 있다. 따라서 최근의 DNA chip을 이용한 연구에서는 실험 횟수를 증가시키거나 기존의 방법에 의한 확인 과정을 요구하고 있다. 따라서 본 연구 결과 또한 앞으로 비슷한 수령 및 비슷한 품질의 다른 종류의 산삼을 이용하여 재현성 실험을 수행하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.

V. 결 론

자연산 산삼의 산화스트레스에 대한 보호 효과를 확인하고자 tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)를 HepG2 세포에 처리한 후 나타나는 유전자 발현의 변화를 whole DNA microarray를 사용한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 산삼 추출물의 처리는 t-BHP에 의한 세포독성을 농도 의존적 경향을 나타내지 않으면서 유의하게 감소시켰다.

2. 산삼 추출물의 처리는 HepG2 세포 내에 존재하는 항산화 효소인 glutathione peroxidase와 glutathione reductase의 활성에 유의한 차이를 보이지 않았다.

3. 항산화와 관련되는 유전자로 알려진 53 가지의 유전자 중 HepG2 세포를 이용한 t-BHP 모델에서 발현된 유전자는 28개였다.

4. 산삼추출물 처리에 의해 유의하게 변화한 유전자는 selenoprotein P, glutathione peroxidase 3, sirtuin 2, peroxiredoxin 2, serfiredoxin 1 homolog의 다섯 가지 유전자였다.

이상의 결과를 바탕으로 산삼추출물의 세포독성 완화효과는 glutathione peroxidase나 glutathione reductase 등의 항산화 이전단계에서 관여하는 것으로 추정되었다.

Acknowledgement

"This study was supported by a grant of the Oriental

Medicine R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (B050054)"

참고문헌

1. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울, 영림사. 1985 ; 531.
2. 중약대사전편찬위원회. 완역중약대사전 권7. 서울, 정담. 1997 ; 3473-3479.
3. 신순식. 산삼 감정 기준의 객관성. 동의 한의연 제5집. 2001 ; 107-114.
4. 최진호, 인삼의 신비, 서울, 교문사, p13-14, 1984.
5. 권기록, 위종성, 김성욱. 산삼에 대한 문헌적 고찰. 대한약침학회지. 2003 ; 6(2) : 67-76.
6. 朝鮮總督府專賣局, 人蔘史. 서울, 法人文化社, 1960 ; 3-4.
7. 하대유. 인삼에 대한 세포학 및 면역학적 연구. 대한 면역학회지. 1979 ; 1(1) : 45-52.
8. 山田昌之. 朝鮮人蔘의 硏究. 日本藥理學會誌. 1955 ; 51 : 390.
9. Brekhman. I.I, Panax ginseng, Gosudarst Isdat et Med, Lit. Leningard, 1957 ; 1.
10. Kim, MJ., Jung, NP. The effect of ginseng saponin on the mouse immune system. Korean J. Ginseng Sci. 11 : 1987 ; 130-135.
11. 남기열. 최신 고려인삼. 경기도, 천일인쇄소. 1996 ; 56.
12. Takagi, K, Proceedings International Ginseng Symposium, The Central Research Institute, Office of Monopoly, Seoul, Korea, 1974 ; 119.
13. 김승환, 장명제, 이성규, 장완성, 최현희, 성종환. 인삼복용시 과산화지질과 총항산화능에 미치는 영향. 한국체육학회지. 2003 ; 42(3) : 661-668.
14. Choi, KJ., Kim, MW., Hong, SK., Kim, DH. Effect of solvents on the yield, brown color intensity, UV absorbance, reducing and antioxident activities of extracts from white and red ginseng. J. Korean Agric. Chem. Soc. 1983 ; 26 : 8-18.
15. 이승은, 이성우, 방진기, 유영주, 성낙술. 인삼의 부위별 항산화활성. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 2004 ; 12(3) : 237-242.
16. 김성진, 신순식, 서부일, 지선영. 산삼, 장뇌삼, 인삼의 항암효과 비교연구. 대한본초학회지. 2004 ; 19(2) ; 41-50.
17. Se Na Yun, Sang Jung Moon, Sung Kwon Ko, Byung Ok Im, Sung Hyun Chung. Wild Ginseng Prevents the Onset of High-Fat Diet Induced Hyperglycemia and Obesity in ICR mice. Arch Pham Res. 2004 ; 27(7) : 790-796.
18. Davies, M.J. Detection of peroxyl and alkoxyl radicals produced by reaction of hydroperoxydase with rat liver microsomal fractions. Biochem. J. 1989 ; 257 : 603-606.
19. Lee HU, Bae EA, Han MJ, Kim DH. Hepatoprotective effect of 20(S)-ginsenosides Rg3 and its metabolite 20(S)-ginsenoside Rh2 on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury. Biol Pharm Bull. 2005 ; 28 : 1992-1994.
20. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in seleniμM homeostasis. Annu Rev Nutr. 2005 ; 25 : 215-235.
21. Carlson BA, Novoselov SV, KμMaraswamy E, Lee BJ, Anver MR, Gladyshev VN, Hatfield DL. Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function. J Biol Chem. 2004 ; 279 : 8011-8017.
22. Burk RF, Hill KE, Read R, Bellew T. Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium. Am J Physiol. 1991 ; 261 : E26-30.
23. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Ursini F. Selenium and male reproduction. 2001; 157-178.
24. Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. Purification and characterization of hμMan plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. Arch Biochem Biophys. 1987 ; 256 : 677-686.
25. Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. J

Biol Chem. 2002 ; 277 : 41254-41258.
26. Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. HμMan kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. Am J Physiol. 1994 ; 266 : C367-375.
27. Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH, Doan K, Liu XF. Expression of plasma glutathione peroxidase in hμMan liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in hμ Mans and rodents. Blood. 1992 ; 79 : 3233-3238.
28. Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by hμMan renal proximal tubule cells. Am J Physiol Renal Physiol. 2002 ; 283 : F20-28.
29. Burk RF, Early DS, Hill KE, Palmer IS, Boeglin ME. Plasma seleniμM in patients with cirrhosis. Hepatology. 1998 ; 27 : 794-798.
30. Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. J Biol Chem. 2000 ; 275 : 20346-20354.
31. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. IUBMB Life. 2001. 52 : 35-41.
32. Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tμMor necrosis factor-alpha. J Biol Chem. 1998 ; 273 : 6297-6302.
33. Ishii T, Yamada M, Sato H, Matsue M, Taketani S, Nakayama K, Sugita Y, Bannai S. Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. J Biol Chem. 1993. 268 : 18633-18636.
34. Findlay VJ, Tapiero H, Townsend DM. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? Biomed Pharmacother. 2005 ; 59 : 374-379.
35. Denu JM. Vitamin B3 and sirtuin function. Trends Biochem Sci. 2005. 30 : 479-483.
36. Bell SD, Botting CH, Wardleworth BN, Jackson SP, White MF. The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. Science. 2002 ; 296 : 148-151.
37. Borra MT, O' Neill FJ, Jackson MD, Marshall B, Verdin E, Foltz KR, Denu JM. Conserved enzymatic production and biological effect of O-acetyl-ADP-ribose by silent information regulator 2-like NAD+-dependent deacetylases. J Biol Chem. 2002 ; 277 : 12632-12641.