



항산화 활성의 평가를 위한 연구법: 타우린의 적용

김봉희 · 오정민 · 윤강욱 · 김충현 · 김상겸

충남대학교 약학대학, 충남대학교 형질전환 복제돼지 센터

Methods for Evaluation of Antioxidant Activity: Application to Taurine

Bong-Hee Kim, Jung Min Oh, Kang Uk Yun, Chung Hyeon Kim and Sang Kyum Kim

College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs,
Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

Received August 13, 2007; Accepted September 18, 2007

Although taurine (2-aminoethanesulfonic acid) can inhibit oxidative stress in both animal and epidemiological studies, it is obscure whether taurine directly scavenges oxy-radicals or indirectly regulates oxidant production and/or antioxidant defense system. The reason for this discrepancy remains unknown but may be due, in part, to the lack of a validated assay system for evaluating oxy-radical scavenging capacity. The antioxidant activities of taurine and hypotaurine (2-aminoethanesulfonic acid), a precursor of taurine, against peroxy radicals, hydroxyl radicals and peroxynitrites were determined by the total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) assay and cell-based assay using H4IIE cells. *tert*-Butylhydroperoxide or hydrogen peroxide-induced cell toxicity determined by MTT assay was markedly inhibited by 10 mM taurine or hypotaurine. The *tert*-butylhydroperoxide- or hydrogen peroxide-induced changes in oxidative stress markers, such as cellular glutathione and malondialdehyde, were ameliorated by 10 mM taurine or hypotaurine. However, specific TOSC values calculated from the slope of the linear regression for taurine against peroxy radicals, hydroxyl radicals or peroxynitrites were all less than 1 TOSC/mM. On the other hand specific TOSC values for hypotaurine against peroxy radicals, hydroxyl radicals or peroxynitrites were 48, 2096, or 69 TOSC/mM, respectively. These results suggest that taurine protects cells against oxidative insults, which is not ascribed to directly scavenging activity of taurine against oxy-radicals. These results support the idea that the oxidation state of sulfur in antioxidants may be a determinant of oxy-radical scavenging capacity.

Key words: TOSC assay, Taurine, Hypotaurine, Oxidative stress.

서 론

항산화 물질은 치료제뿐만 아니라 건강기능식품, 화장품 등의 소재로 광범위하게 연구되고 있다. 식품, 천연물, 합성품에서 유래된 단일 물질이나 전체 분획에서 항산화 활성을 측정하기 위해 다양한 연구 방법이 개발되어 이용되고 있다. 항산화 활성을 평가하는 방법은 반응 기전에 따라 수소의 공여를 통한 자유 라디칼의 포획 능력을 측정하는 것과 전자의 전달을 통해 산화성물질을 환원시키는 능

력을 측정하는 것으로 나눌 수 있다(Prior *et al.*, 2005). 전자의 예로는 oxygen radical absorbance capacity, total radical-trapping antioxidant parameter(TRAP)과 TRAP를 발전시킨 chemiluminescence 및 photochemiluminescence assay, total oxy-radical scavenging capacity(TOSC), low-density lipoprotein oxidation assay 등이 있으며 후자의 예로는 ferric reducing antioxidant power, trolox equivalent antioxidant capacity, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay 등이 있다. 항산화 활성을 평가하는 방법의 다양성은 실험결과와 불일치, 부적절한 산업적 적용, 항산화 물질의 상호 비교 및 관리에 문제를 유발할 수 있다. 최근 International Congress on Antioxidant Methods(2004, Orlando, FL)에서 항산화

Correspondence to: Sang Kyum Kim, College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea
E-mail: sangkim@cnu.ac.kr

활성을 평가하는 방법에 대한 표준화가 시급한 것으로 제안되었다.

항산화활성 평가방법을 표준화하기 위한 조건으로 연구 방법의 재현성, 편리성 등의 기본적인 측면 외에 생체에 존재하는 산화성물질에 대한 항산화 활성을 평가하는 것이 중요한 기준이 된다. 생체에서 발생하는 대표적인 산화성물질은 산소에서 유래된 singlet oxygen, superoxide radical, 과산화수소(hydrogen peroxide), hydroxyl radical, peroxy radical, alkoxy radical과 질소에서 유래된 nitric oxide와 peroxynitrite 그리고 myeloperoxidase에서 생성되는 hypochlorous acid 등이 있다(Bayir, 2005; Malle *et al.*, 2006). 이들 산화성물질 중에서 superoxide radical과 nitric oxide는 반응성이 낮아 생체의 거대분자를 산화시키는 능력은 낮으나 두 물질이 반응하여 생성되는 peroxynitrite는 매우 반응성이 강하여 세포에 독성을 유발한다(Kamat, 2006). 과산화수소는 반응성이 낮아 mM 농도에서 독성을 유발하나 세포막을 투과할 수 있으며 최근 신호전달물질로 작용하는 것으로 제안되고 있다(Rhee *et al.*, 2005). Hydroxyl radical의 공격에 의해 산화된 carbon-centered radical이 산소와 반응하여 생성되는 peroxy radical은 반응성이 강하며 hydroxyl radical에 비하여 긴 반감기를 가진다.

TOSC 법은 TRAP를 발전시켜 hydroxyl, peroxy radical 및 peroxynitrite에 대한 개별적인 항산화 활성을 평가하는 방법으로 산화성물질이 alpha-keto-gamma-methiobutyric acid(KMBA)와 반응하여 생성되는 ethylene을 gas chromatography를 이용하여 검출한다(Regoli and Winston, 1998; Winston *et al.*, 1999). 이 방법은 시간에 따른 ethylene gas의 농도를 측정하여 area under the curve (AUC)를 산출하고 이 값을 대조군에서의 AUC와 비교함으로써 TOSC 값을 계산한다. 또한 대표적인 항산화 물질인 trolox나 glutathione(GSH)를 표준물질로 사용함으로써 정량적으로 항산화 활성을 실험간 및 실험실 간에 비교할 수 있다. 따라서 이 방법은 실질적인 체내 산화성물질에 대한 항산화 활성을 정량적으로 측정할 수 있다. TOSC assay는 항산화 활성 외에도 조직액이나, 혈장, 혈청 등에서 항산화 활성을 측정하여 산화적 스트레스의 biomarker로 사용되고 있다(Aruoma, 2003; Regoli *et al.*, 2002).

타우린(taurine)은 1927년에 소의 담즙에서 발견되었으며 1970년대에 이유식을 하는 유아와 비경구영양수액을 공급받는 환자에게서 타우린의 결핍에 기인한 증세가 발견되면서 주목을 받고 있다(Gaull *et al.*, 1977; Geggel *et al.*, 1985). Transsulfuration pathway를 통해 필수아미노산인 methionine으로부터 cysteine과 hypotaurine

을 거쳐 생성된 타우린은 담즙산의 포함체로 담즙으로 또는 자체 형태로 요로 배설된다. 담즙의 포함반응 외에 타우린의 주요 기능으로는 세포 원형질막의 안정화, organic osmolyte, neurotransmitter 및 면역반응의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(Huxtable, 1992; Santangelo, 2002; Yancey, 2005). 그러나 타우린의 항산화효과에 대한 연구는 일치하지 않는 결과들이 보고되고 있다(Milei *et al.*, 1992; Balkan *et al.*, 2002; Sener *et al.*, 2005a, b; Cetiner *et al.*, 2005; Aruoma *et al.*, 1988; Shi *et al.*, 1997; Mehta and Dawson, 2001).

본 연구에서는 타우린의 항산화 활성을 평가하기 위해 TOSC법과 tert-butylhydroperoxide(t-BHP) 및 과산화수소로 유발된 세포독성에 미치는 영향을 실험하였다. 양성 대조군으로 cysteine의 전구체인 N-acetylcysteine(NAC)과 GSH를 사용하였으며 타우린의 전구체인 hypotaurine(2-aminoethanesulfinic acid)의 항산화 활성을 함께 평가하였다.

재료 및 방법

시약. 타우린, hypotaurine, GSH, ascorbic acid, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), ferrous ammonium sulfate, t-BHP, H₂O₂, 2,2'-azobisamidinopropane(ABAP), 3-morpholinopyridone(SIN-1), KMBA, tBHP, tetraethoxypropane(TEPP), diethylenetriaminopentacetic acid(DTNB), 2,6-ditertbutyl-4-methylphenol(BHT), NADPH, glutathione reductase, pyruvate, L-alanine, fructose, 2-vinyl-pyrimidine, NAC 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin, fetal bovine serum은 GIBCO(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다.

TOSC assay. TOSC assay는 Winston *et al.*(1998)에 의해 제안되고 같은 저자들에 의해 수정된 방법(Regoli and Winston, 1999)을 사용하여 실시한다. Peroxy radical은 ABAP를 35°C에서 thermal homolysis시켜 발생시켰다(Winston *et al.*, 1998). Hydroxyl radical은 Fe와 ascorbate를 이용한 Fenton reaction으로, peroxynitrite는 SIN-1의 자발적인 붕괴를 통해 발생시켰다. 발생한 각각의 oxy-radical은 KMBA와 반응하여 ethylene을 발생하며 이때의 TOSC 값은 일정범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로 보고된 바 있다(Winston *et al.*, 1998). 반응은 1 ml의 반응액을 고무마개로 밀폐된 15 ml 용기에 넣어 진행시켰으며 생성된 ethylene은

반응용기의 head space 공기 0.4 ml을 취하여 GC(GC-2010, Shimadze, Tokyo, Japan)로 분석하여 검출하였다. Oven, injector와 flame ionization detector의 온도를 각각 60°C, 180°C, 180°C 로 설정하고 Supelco SPB-1 caillary column(30 m×0.32 mm×0.25 µm)를 장착한 gas chromatograph 장치를 사용하였다. Carrier gas로는 helium을 사용하였으며 split ratio 30 : 1로 설정하였다. TOSC 값은 $TOSC = 100 - (SA/CA \times 100)$ 의 식으로 구했다(Winston *et al.*, 1998). SA는 시간에 따른 sample의 적분 값이고, CA는 시간에 따른 control의 적분 값이다. Control로는 3차 증류수를 사용하였으며 시료로는 타우린 외에 양성대조군으로 GSH와 hypotaurine을 사용하였다. 따라서 oxy-radical scavenging capacity를 전혀 갖지 못하는 시료의 $\int SA / \int CA = 1$ 이 되며 TOSC = 0의 값을 갖는다. 반대로 $\int SA \rightarrow 0$ 일 때는 TOSC 값은 100에 접근한다. Specific TOSC 값은 얻어진 TOSC 값을 시험물질에 농도에 따라 좌표화하고 선형회귀분석(linear regression analysis)을 통해 기울기를 얻은 후 이 값을 시험물질의 농도로 나누어 구하였다. TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

Cell-based assay. 랫트의 hepatoma cell line인 H4IIE cell을 10% heat-inactivated FBS와 100 units/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin을 포함하는 DMEM을 배지로 이용하여 온도 37°C와 5% CO₂ 조건에서 배양했다. H4IIE cell을 96 well microplates에 옮기고 18~24시간 배양하여 세포가 80% 이상 confluent에 도달한 후 serum free media로 교체하고 overnight 배양했다. Serum free DMEM 배양액에 실험에 사용할 항산화 물질을 미리 설정한 농도로 녹이고 배양액을 교체한 후 1시간 동안 배양하고 t-BHP 또는 과산화수소를 처리하였다. 예비실험을 통해 t-BHP는 35 µM 그리고 과산화수소 100 µM을 선정하였다. 이 농도는 H4IIE 세포에서 약 50%의 세포 독성을 유발하였다. t-BHP와 과산화수소를 처리하고 각각 3과 24시간 후에 5 mg/ml로 MTT를 녹인 배양액으로 배지를 교체하고 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 배지를 제거하고 DMSO를 처리한 후 micro plate reader(Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정했다. 양성대조군으로 hypotaurine과 NAC을 사용하였다.

Biochemical analysis. 세포에서 GSH와 lipid peroxidation의 지표인 MDA 함량은 전에 보고된 방법을 사용하였다(Kim *et al.*, 2003, 2005, 2006). 세포에서 GSH

농도는 6% perchloric acid에서 끊어 1.5 ml tube에 모으고 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 상등액에 phosphate 완충액(phosphate 0.125 M, EDTA 6.3 mM, pH 7.5)을 사용하여 GSH 농도가 표준 검량선 농도 범위에 들도록 희석하였다. Eppendorf tubes에 0.3 mM NADPH 용액 0.7 ml, 6 mM DTNB(5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) 용액 0.1 ml, 검체 또는 GSH 표준액 0.2 ml을 가하여 잘 섞은 후 상온에서 4분간 방치하였다. 반응액에 5~20 units/ml 농도의 GSH reductase를 가지고 잘 섞은 후 412 nm에서 약 2분간 흡광도의 변화를 측정하여 linear 한 1분간의 기울기 변화를 구하고 검량선으로부터 GSH의 농도를 계산하였다. MDA은 역상 column과 fluorometric 검출기(RF-10A fluorescence detector, Shimadze, Tokyo, Japan)를 장착한 HPLC(pump, model LC-10AT; system controller, model SCL-10A; injector, 20-µl loop가 장착된 Rheodyne)로 분리 및 정량하였다(Kim *et al.*, 2005).

통계 분석. 실험군 사이의 통계적 차이는 analysis of variance 후 Newman-Keuls multiple comparison test ($p < 0.05$)로 검사하였다. 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

세포 배양계에서 타우린, hypotaurine 및 NAC가 산화적 손상에 미치는 영향. H4IIE 랫트 간암세포주에서 타우린, hypotaurine 및 양성대조군인 NAC가 과산화수소에 의한 세포독성에 미치는 영향을 실험하였다(Fig. 1). 본 실험에서 사용한 최고농도인 10 mM의 타우린과 hypotaurine은 모두 H4IIE 세포에서 독성을 유발하지 못 하였다. 100 µM 과산화수소의 처리는 45~56%로 세포의 viability를 감소시켰으며 과산화수소의 독성은 타우린 처리에 의해 2 mM부터 유의적으로 감소되었다(Fig. 1A). Hypotaurine 역시 과산화수소의 독성을 2 mM부터 유의적으로 감소시켰다(Fig. 1B). 본 연구에서 사용한 최고 농도인 10 mM의 타우린과 hypotaurine은 각각 과산화수소에 의한 세포의 viability의 감소를 정상 대조군의 92와 96%로 증가시켰다. 양성 대조군으로 사용된 NAC는 5 mM에서 세포의 viability를 정상 대조군에 비하여 약 80%로 감소시켜 세포 독성이 없는 2 mM을 최고 농도로 설정하였다. NAC는 0.25 mM부터 과산화수소에 의한 세포독성을 억제하였으며 2 mM 농도에서 완벽한 억제효과가 관찰되었다(Fig. 1C).

동물실험과 세포실험 모두에서 산화적 스트레스를 유발

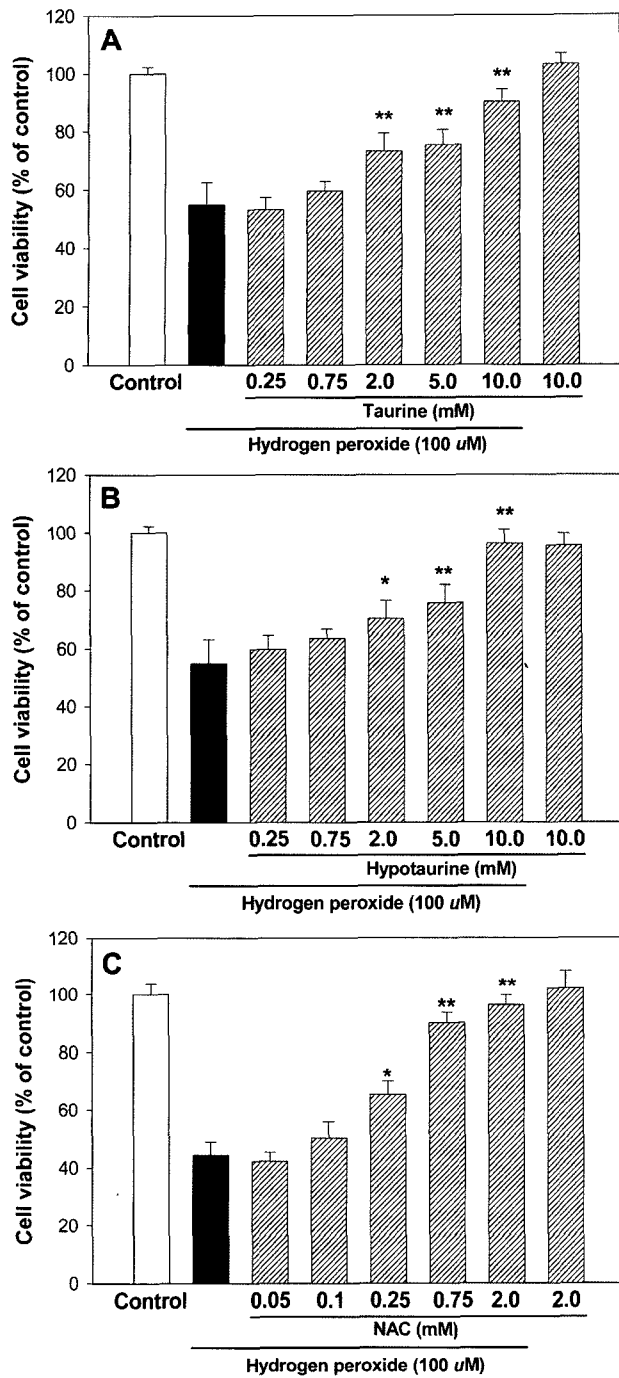


Fig. 1. Effect of taurine (A), hypotaurine (B) and NAC (C) on cytotoxicity induced by hydrogen peroxide in H4IIE cells. Cells were treated with taurine, hypotaurine or NAC (positive control) for 1 hour before addition of 100 μ M hydrogen peroxide for 24 hours. Data are means \pm S.D. of 5~7 experiments. *,** Significantly different from levels monitored in cells treated with hydrogen peroxide only, $p < 0.05$ or $p < 0.01$, respectively.

하는 t-BHP에 의한 독성에 타우린과 hypotaurine이 미치는 영향을 실험하였다(Fig. 2). t-BHP는 과산화수소에 비

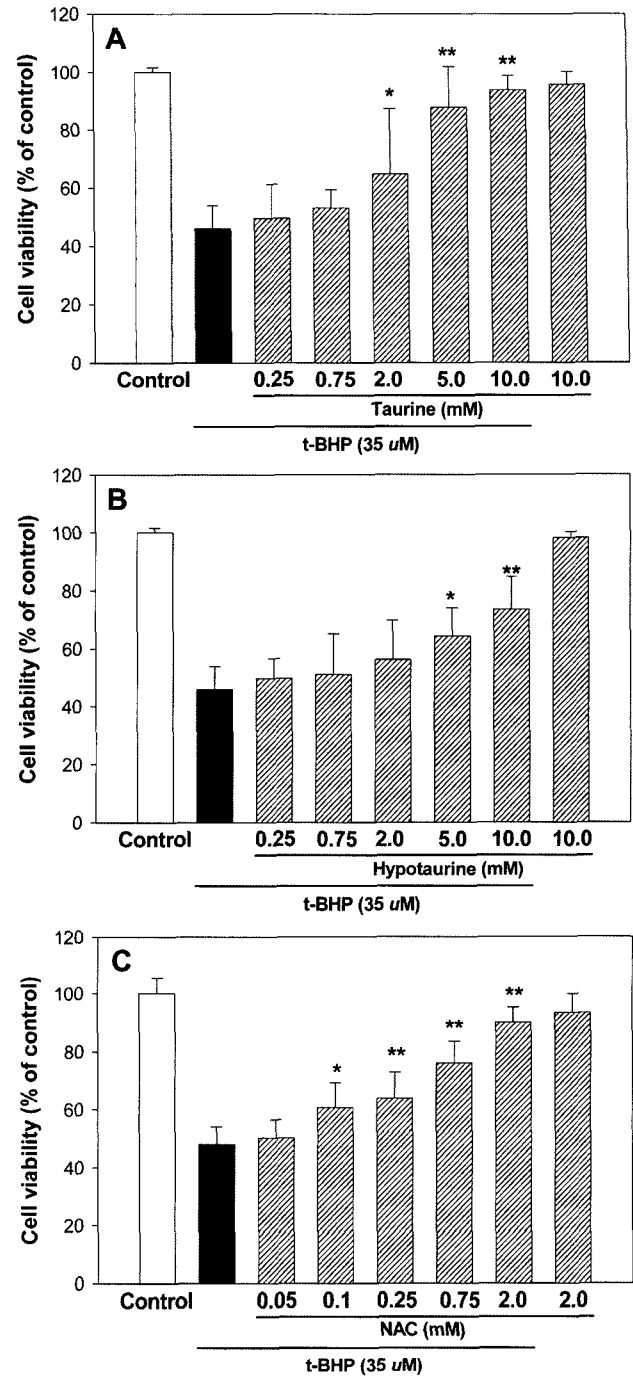


Fig. 2. Effect of taurine (A), hypotaurine (B) and NAC (C) on cytotoxicity induced by t-BHP in H4IIE cells. Cells were treated with taurine, hypotaurine or NAC (positive control) for 1 hour before addition of 35 μ M t-BHP for 3 hours. Data are means \pm S.D. of 5~7 experiments. *,** Significantly different from levels monitored in cells treated with t-BHP only, $p < 0.05$ or $p < 0.01$, respectively.

하여 매우 신속하게 독성을 유발하였으며 예비실험을 통하여 35 μ M의 t-BHP를 3시간 동안 처리하였다(data not

Table 1. Effects of taurine and hypotaurine on intracellular GSH and MDA levels in H4IIE cells treated with hydrogen peroxide or t-BHP

	GSH (nmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Control	41.2 ± 3.3	0.028 ± 0.002
100 μM Hydrogen peroxide	32.2 ± 3.4	0.048 ± 0.004
10 mM Taurine + 100 μM H ₂ O ₂	36.2 ± 4.1	0.036 ± 0.003*
10 mM Hypotaurine + 100 μM H ₂ O ₂	39.2 ± 2.1*	0.034 ± 0.003**
2 mM NAC + 100 μM H ₂ O ₂	45.3 ± 2.2*	0.026 ± 0.003**
Control	38.6 ± 2.2	0.026 ± 0.005
35 μM t-BHP	19.8 ± 3.3	0.064 ± 0.004
10 mM Taurine + 35 μM t-BHP	35.1 ± 3.2**	0.034 ± 0.004**
10 mM Hypotaurine + 35 μM t-BHP	27.3 ± 2.3**	0.042 ± 0.002**
2 mM NAC + 35 μM t-BHP	42.1 ± 4.2**	0.022 ± 0.003**

Cells were treated with taurine (10 mM), hypotaurine (10 mM) or NAC (2 mM) for 1 hour before addition of 100 μM hydrogen peroxide or 35 μM t-BHP. MDA levels were monitored at 15 min after treatment of hydrogen peroxide or t-BHP, and GSH levels were determined at 2 hours after hydrogen peroxide or 3 hours after t-BHP treatment, respectively. Data are means ± S.D. of 4-5 experiments. *,** Significantly different from levels monitored in cells treated with hydrogen peroxide or t-BHP only, $p < 0.05$ or $p < 0.01$, respectively.

shown). 타우린과 hypotaurine은 각각 2와 5 mM 농도에서 유의적으로 t-BHP에 의한 세포독성을 억제하였다 (Fig. 2A and 2B). 본 연구에서 사용한 최고 농도인 10 mM의 타우린과 hypotaurine은 각각 t-BHP에 의한 세포의 viability의 감소를 정상 대조군의 93와 73%로 증가시켰다. 이 결과는 타우린이 hypotaurine에 비하여 t-BHP에 의한 산화적 손상을 보다 효과적으로 억제함을 보인다. 양성 대조군으로 사용한 NAC 역시 0.1 mM 농도부터 유의적으로 t-BHP의 독성을 억제하였으며 이 효과는 농도의 의존적이었다(Fig. 2C).

H4IIE에서 타우린, hypotaurine 및 양성대조군인 NAC가 산화적 손상의 지표인 GSH와 MDA 함량에 미치는 영향을 실험하였다(Table 1). GSH는 대표적인 항산화 물질로 산화적 손상에 의해 감소하며 MDA는 지질과산화의 생성물로 산화적 손상에 의해 증가한다. 예비실험을 통하여 MDA는 과산화수소와 t-BHP 처리 후 모두 15분에 그리고 GSH는 과산화수소와 t-BHP 처리 후 각각 2와 3시간에 측정하였다. 100 μM의 과산화수소는 10시간 이상 경과할 경우 유의적으로 GSH의 농도를 상승시켰다(data not shown). 100 μM의 과산화수소는 간세포에서 GSH의 함량을 약 20% 감소시키고 MDA 함량을 약 170%로 증가시켰다(Table 1). 양성 대조군으로 사용된 NAC는 과산화수소에 의한 GSH의 감소와 MDA의 증가를 완벽하게 차단하였다. 이 결과는 2 mM의 NAC가 완벽하게 과산화수소의 독성을 차단하는 것과 일치한다. 타우린은 과산화수소에 의한 MDA 증가를 부분적으로 억제하였으나 GSH 함량에는 유의적인 변화를 유발하지 못 하였다. Hypotaurine은 과산화수소에 의한 MDA의 증가와 GSH의 감소를 부분적으로 억제하였다.

35 μM의 t-BHP는 GSH의 함량을 정상 대조군의 약

50% 그리고 MDA 함량을 약 250%로 증가시켜 100 μM의 과산화수소에 비하여 이들 지표를 현격하게 변화시켰다. 양성 대조군으로 사용한 NAC는 t-BHP에 의한 GSH의 감소와 MDA의 증가를 완벽하게 차단하였으며 이 결과는 NAC가 세포 배양실험계에서 효과적인 항산화 물질임을 시사한다. 타우린의 전처리는 t-BHP에 의한 GSH의 감소를 완벽하게 차단하였으며 MDA의 상승 역시 현격히 억제하였다. Hypotaurine은 t-BHP에 의한 GSH 및 MDA의 변화를 유의적으로 억제하였으나 타우린에 비하여 그 효과는 약하였다.

TOSC 법을 이용한 타우린의 oxy-radical 포획능 평가.

Peroxyl radical, hydroxyl radical 및 peroxynitrite에 대한 타우린, hypotaurine과 GSH의 포획능을 TOSC 법으로 평가하였다(Table 2). 타우린은 peroxyl radical, hydroxyl radical 및 peroxynitrite에 대해서 모두 1 TOSC/mM 이하의 포획능을 보였으며 이 결과는 타우린이 직접적으로 이들 oxy-radical에 대한 포획능이 매우 미약함을 보인다. 타우린의 전구체로 sulfenic acid(RSO(OH))인 hypotaurine은 타우린에 비하여 현격히 강한 oxy-radical 포획능을 보였다. 특히, hydroxyl radical에 대한 포획능은 양성 대조군으로 사용한 GSH에 비하여 약 36배로 높게 관찰되었다. 이 결과는 hypotaurine이 hydroxyl radical에 대한 강력한 포획능을 가지고 있음을 시사한다.

타우린은 황을 함유하고 있는 아미노산인 methionine과 cysteine의 최종 배설형태로 황이 sulfonic acid(R-S(=O)₂-OH)로 산화되어 있다. 타우린은 간에서 담즙산과 포합체를 형성하여 담즙으로 배설되는 경로가 있으나 대부분의 타우린은 요를 통하여 배설된다. 담즙산과 포합체 형성 외에 타우린은 신장과 간에서 삼투압의 조절에 관여

Table 2. Specific TOSC values of taurine, hypotaurine and GSH against peroxy radicals, hydroxyl radicals and peroxy-nitrites

	Peroxy radicals	Hydroxyl radicals	Peroxy-nitrites
	TOSC/mM		
Taurine	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Hypotaurine	48.2 ± 4.2	2096.3 ± 272.3	60.2 ± 13.9
GSH	156.2 ± 44.2	57.7 ± 9.9	99.6 ± 35.9

Data are means ± S.D. Values varied by no more than 5% between experiments.

한다(Haussinger, 2004; Yancey, 2005). 또한 타우린은 염증반응 동안 활성화되는 myeloperoxidase에 의해 형성되는 hypochlorous acid(HOCl)와 반응하여 염증반응을 조절한다(Santangelo, 2002). 타우린의 약리학적인 효과로는 주로 화학물질에 의한 간독성의 억제가 보고되고 있다(Kim and Kim, 2002; Miyazaki *et al.*, 2005). 최근 타우린 transporter를 knockout 시켜 간에서 타우린의 농도를 감소시킨 마우스에서 혈장 TNF-alpha의 증가, 간 stellate 세포의 증식, mitochondria의 비정상 등이 관찰되었으며 이 마우스는 1년 안에 간섬유화가 유발되었다(Warskulat *et al.*, 2006). 이 결과는 타우린의 함량이 간장의 기능조절에 중요한 역할을 수행할 가능성을 시사한다.

타우린에 의한 간 보호 효과의 기전은 불분명하나 항산화 활성이 주요 기전으로 제안되고 있다(Yildirim *et al.*, 2007). 그러나 타우린은 cysteine이나 GSH와는 달리 환원력을 가지는 sulfhydryl group이 sulfonic acid의 형태로 산화되어 있어 직접적인 항산화 활성에 대해서는 논란 중이다. 본 연구에서 TOSC법을 이용하여 peroxy radical, hydroxyl radical 및 peroxy-nitrite에 대한 직접적인 포획능을 평가한 결과 타우린은 대조군인 GSH에 비하여 포획능이 매우 미약하였다. 반면 황이 sulfinic acid로 부분적으로 산화되어 있는 타우린의 전구체인 hypotaurine은 높은 oxy-radical 포획능을 보였다. 특히 hydroxyl radical에 대한 포획능은 양성대조군인 GSH에 비하여 월등하였다. 이 결과는 hypotaurine과 같이 부분적으로 황이 산화되어 있을 경우 oxy-radical에 대한 항산화 활성을 가지나 황이 sulfonic acid로 산화될 경우 포획능이 현저히 낮아짐을 시사한다. 이 결과는 peroxy-nitrite에 의해 dihydro-rhodamine 123이 rhodamine으로 전환되는 방법을 이용하여 타우린의 항산화 활성을 평가한 결과와 일치한다(Mehta and Dawson, 2001).

본 연구에서 타우린은 직접적인 oxy-radical에 대한 포획능은 매우 낮음에도 불구하고 과산화수소와 t-BHP에 의해 유도된 세포독성과 산화적 손상의 지표 변화를 현격

히 억제하였다. 본 연구에서 사용한 타우린의 최고 농도는 10 mM이었으며, 마우스와 랫트의 간에서 타우린의 농도가 각각 약 20과 3 µmol/g liver(Warskulat *et al.*, 2006; Kim and Kim, 2002)임을 생각할 때 본 연구에서 사용한 타우린의 농도는 생리적 범위인 것으로 판단된다. 따라서 10 mM에 의한 세포독성 억제 효과는 타우린의 과도한 농도에 의한 인위적인 효과는 아닌 것으로 보인다. 또한 상대적으로 oxy-radical에 대한 포획능이 강한 hypotaurine에 비하여 타우린은 t-BHP에 의한 세포독성과 산화적 손상의 지표 변화를 더욱 강력하게 억제하였다.

종합적으로 타우린은 직접적인 oxy-radical 포획능은 매우 약함에도 불구하고 산화적 손상을 유발하는 대표적인 물질인 과산화수소와 t-BHP에 의해 유도된 세포독성과 산화적 손상 지표의 변화를 생리적 농도범위에서 억제하였다. 본 연구 결과는 타우린이 산화적 손상을 억제한다는 보고가 직접적인 oxy-radical 포획을 통한 산화적 손상의 억제보다는 세포막을 안정화하거나 세포의 삼투압을 조절하는 등의 기전을 통해 매개될 가능성을 시사한다. 또한 본 연구결과는 항산화 물질의 효과가 황에 의해 매개될 경우 oxy-radical에 대한 포획능은 황의 산화 상태에 의존적임을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070501-034-004-007-01-01)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M. and Butler, J. (1988). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem. J.*, **256**, 251-255.
- Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.*, **523-524**, 9-20.
- Balkan, J., Kanbagli, O., Aykac-Toker, G. and Uysal, M. (2002). Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol-treated rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1231-1233.
- Bayir, H. (2005). Reactive oxygen species. *Crit. Care Med.*, **33**, S498-501.
- Cetiner, M., Sener, G., Sehirli, A.O., Eksioglu-Demiralp, E., Ercan, F., Sirvanci, S., Gedik, N., Akpulat, S., Tecimer, T. and Yegen, B.C. (2005). Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **209**, 39-50.
- Gaull, G.E., Rassin, D.K., Raiha, N.C. and Heinonen, K. (1977). Milk protein quantity and quality in low-birth-weight infants. III. Effects on sulfur amino acids in plasma and

- urine. *J. Pediatr.*, **90**, 348-355.
- Geggel, H.S., Ament, M.E., Heckenlively, J.R., Martin, D.A. and Kopple, J.D. (1985). Nutritional requirement for taurine in patients receiving long-term parenteral nutrition. *N. Engl. J. Med.*, **312**, 142-146.
- Haussinger, D. (2004). Neural control of hepatic osmolytes and parenchymal cell hydration. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, **280**, 893-900.
- Huxtable, R.J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.*, **72**, 101-163.
- Kamat, J.P. (2006). Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. *Indian J. Exp. Biol.*, **44**, 436-447.
- Kim, S.K., Abdelmegeed, M.A. and Novak, R.F. (2006). The mitogen-activated protein kinase kinase (mek) inhibitor PD98059 elevates primary cultured rat hepatocyte glutathione levels independent of inhibiting mek. *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 683-689.
- Kim, S.K., Choi, K.H. and Kim, Y.C. (2003). Effect of acute betaine administration on hepatic metabolism of S-amino acids in rats and mice. *Biochem Pharmacol.*, **65**, 1565-1574.
- Kim, S.K. and Kim, Y.C. (2002). Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 545-549.
- Kim, S.K., Woodcroft, K.J., Oh, S.J., Abdelmegeed, M.A. and Novak, R.F. (2005). Role of mechanical and redox stress in activation of mitogen-activated protein kinases in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 1785-1795.
- Malle, E., Marsche, G., Arnhold, J. and Davies, M.J. (2006). Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 392-415.
- Mehta, T.R. and Dawson, R. Jr. (2001). Taurine is a weak scavenger of peroxynitrite and does not attenuate sodium nitroprusside toxicity to cells in culture. *Amino Acids*, **20**, 419-433.
- Milei, J., Ferreira, R., Llesuy, S., Forcada, P., Covarrubias, J. and Boveris, A. (1992). Reduction of reperfusion injury with preoperative rapid intravenous infusion of taurine during myocardial revascularization. *Am. Heart J.*, **123**, 339-345.
- Miyazaki, T., Karube, M., Matsuzaki, Y., Ikegami, T., Doy, M., Tanaka, N. and Bouscarel, B. (2005). Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J. Hepatol.*, **43**, 117-125.
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302.
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S. and Winston, G.W. (2002). Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.*, **54**, 419-423.
- Regoli, F. and Winston, G.W. (1999). Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **156**, 96-105.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S. and Woo, H.A. (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol.*, **17**, 183-189.
- Santangelo, F. (2002). The regulation of sulphurated amino acid junctions: fact or fiction in the field of inflammation? *Amino Acids*, **23**, 359-365.
- Sener, G., Ozer Sehirli, A., Ipci, Y., Cetinel, S., Cikler, E., Gedik, N. and Alican, I. (2005b). Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **19**, 155-164.
- Sener, G., Sehirli, O., Ipci, Y., Cetinel, S., Cikler, E., Gedik, N. and Alican, I. (2005b). Protective effects of taurine against nicotine-induced oxidative damage of rat urinary bladder and kidney. *Pharmacology*, **74**, 37-44.
- Shi, X., Flynn, D.C., Porter, D.W., Leonard, S.S., Vallyathan, V. and Castranova, V. (1997). Efficacy of taurine based compounds as hydroxyl radical scavengers in silica induced peroxidation. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **27**, 365-374.
- Warskulat, U., Borsch, E., Reinehr, R., Heller-Stilb, B., Monnighoff, I., Buchczyk, D., Donner, M., Flogel, U., Kappert, G., Soboll, S., Beer, S., Pfeffer, K., Marschall, H.U., Gabrielsen, M., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O.P., Dienes, H.P. and Haussinger, D. (2006). Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse. *FASEB J.*, **20**, 574-576.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J. Jr., Fong, J.H. and Blanchard, K.A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 480-493.
- Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.*, **208**, 2819-2830.
- Yildirim, Z., Kilic, N., Ozer, C., Babul A, Take, G. and Erdogan, D. (2007). Effects of taurine in cellular responses to oxidative stress in young and middle-aged rat liver. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1100**, 553-561.