

## Paraquat 유도 산화스트레스하의 배추 잎에서 Ascorbate-Glutathione 회로 효소의 활성도에 대한 산화질소 (Nitric oxide)의 효과

나호건 · 진창덕

### Effects of nitric oxide on ascorbate-glutathione cycle enzymes activities in chinese cabbage leaves under paraquat-induced oxidative stress

Ho-Gyun Na · Chang-Duck Jin

Received: 9 April 2014 / Revised: 19 April 2014 / Accepted: 26 May 2014  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Pretreatment of chinese cabbage leaves with 100  $\mu$ M sodium nitroprusside (SNP), a nitric oxide (NO) donor, effectively improved their tolerance to subsequent 2  $\mu$ M paraquat (PQ)-induced oxidative damage. The fresh weight, and chlorophyll and protein contents in primary leaves treated with PQ alone were noticeably reduced over 24 h light incubation. However, these leaf injury symptoms were significantly alleviated with 100  $\mu$ M SNP pretreatment for 3 h prior to PQ exposure. In additions, the increase of the contents of malondialdehyde (MDA) and  $H_2O_2$  due to PQ exposure were significantly inhibited by SNP pretreatment. Together with the protective effects of SNP against PQ toxicity in leaves, the changes of ascorbate-glutathione cycle enzymes activities were examined. In the PQ alone treatment, the activities of APX, DHAR, and GR after 6 h incubation were rapidly reduced and showed 19%, 50% and 39% respectively, compared with those of the control. However, the decreases in these enzyme activities were significantly inhibited by SNP pretreatment. As a result, their activities were higher than those of PQ alone treatment by 5 times, 2 times, and 1.5 times, respectively, at 6 h incubation. Thereafter, these enzymes decrease their activities gradually showing high levels than those of PQ alone. Based on the above results, it can be assumed that the activation of ascorbate-glutathione cycle by SNP pretreatment in chinese cabbage

leaves exposed to PQ can prevent  $H_2O_2$  accumulation, thereby leading to protection against PQ-induced oxidative stress. Also, these results indicate that NO acts as a protectant against PQ stress in the leaves of chinese cabbage.

**Keywords** Chinese cabbage, Paraquat, Oxidative stress, Ascorbate-glutathione cycle enzyme, Sodium nitroprusside

#### 서론

최근, 식물계에서 다양한 생리 과정에 대한 산화질소(Nitric Oxide : NO)의 조절 역할이 여러 연구에서 보고되었다(Beligni and Lamattina 2001). 즉, NO는 식물의 발아, 하배축 신장, 노쇠 과정 등 생장과 발달 반응(Beligni et al. 2002; Hu et al. 2007), 건조 스트레스, 열 스트레스, 병원균 감염과 같은 비 생물적 및 생물적 스트레스에 대한 방어반응에도 관여하고 있음이 보고되었다(Zeier and Schreiber 1997; Mata and Lamattina 2001; Uchida et al. 2002).

제초제 화합물의 일종인 paraquat (PQ; 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride)는 식물 세포내에서 엽록체 막 광계 I의 전자전달과 미토콘드리아 내막의 전자전달을 간섭하여 superoxide 라디칼,  $H_2O_2$  등과 같은 활성형 산소 분자 종(activated oxygen species: AOS)의 생성 및 축적을 유도하는 작용이 있어 식물에 산화스트레스를 유도하는 인위적 수단으로 이용되어왔다(Dodge 1971; Martinez et al. 2001). 식물체내에 축적된 이들 활성형 산소 분자 종들은 세포 구성 성분들을 산화적으로 파괴시켜 심각한 세포 손상을 초래하게 된다(Bowler et al. 1992; Price et al. 1994).

활성형 산소 분자 종에 의해 초래되는 산화스트레스에

H. G. Na · C. D. Jin (✉)  
강원대학교 자연과학대학 생명과학과  
(Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea)  
e-mail: cdjin@kangwon.ac.kr

대한 방어반응으로서 식물은 항산화 방어계(antioxidative defence system)를 발달시켜 왔는데, 이 항산화계의 두 가지 중심 구성요소는 superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), dehydroascorbate reductase (DHAR), glutathione reductase (GR) 등의 항산화 효소와 ascorbate, glutathione 등과 같은 항산화 저분자 화합물이다(Foyer et al. 1994). 산화스트레스와 관련하여 식물은 특히, ascorbate-glutathione 대사회로를 이용하여 활성형 산소종을 제거한다는 사실이 여러 보고에서 제시되었는데(Klapheck et al. 1990; Koshiba 1993; Ruan et al. 2005), 이 ascorbate-glutathione 회로는 APX, DHAR, GR 등의 항산화 효소와 ascorbate 및 glutathione 기질로 구성되어 있다(Foyer and Halliwell 1976; Noctor and Foyer 1998). Ascorbate-glutathione 회로 내에서 APX는 엽록체 및 세포질에서 생성된  $H_2O_2$ 를 직접  $H_2O$ 로 전환시켜 제거하며, 이 과정에서 APX에 의해 소모된 ascorbate는 이 회로 내의 또 다른 구성효소인 DHAR과 GR 효소의 상호작용에 의해 재생된다(Foyer and Halliwell 1976; Koshiba 1993). Dalton 등 (1993) 역시 콩과 식물의 뿌리에서 질소고정 시 발생하는  $H_2O_2$  제거 반응으로 ascorbate-glutathione 회로가 관여함을 보고하였다. 특히, 형질 전환 식물을 이용한 연구에서는 세포내 어느 하나의 특정 항산화효소 역할보다는 오히려 세포내 존재하는 여러 항산화효소의 상호작용이 산화스트레스에 의해 유도되는 세포 손상을 방어하는데 더욱 중요하다는 결과가 보고되었다(Slooten et al. 1995; Sen Gupta et al. 1993).

한편, 식물스트레스 방어 반응과 관련하여 NO의 역할에 많은 관심이 제시되고 있는데, Uchida 등 (2002)은 쌀 (*Oryza sativa*) 유식물에 염 스트레스와 열충격을 주었을 때 NO공여체인 sodium nitroprusside (SNP)를 전처리하면 처리하지 않은 대조구에 비해 살아있는 잎 면적 비율이 더 높았음을 보고하였고, 제초제인 diquat에 노출된 감자 잎 절편에서도 SNP 전처리 경우 엽록소 양이 diquat 단독 처리구에 비해 10배나 높은 결과가 발표되었다(Beligni and Lamattina 2001). 동시에, 염과 저온 스트레스 하에서 APX, DHAR, 및 GR 효소의 활성화에 의한 ascorbate와 glutathione 분자의 재생 조절에 NO가 관여하고 있음도 보고되었다(Ruan et al. 2005; Wu et al. 2009). 또한, Durzan (2002)은 식물이 영양상태의 변화, 염, 건조, 병원균공격과 같은 생물적, 비생물적 스트레스를 받았을 때 식물 조직내 NO의 방출이 증가되며, NO가 단백질, 산소 분자종에 빠르게 반응해 효소활성도를 조절하는 생화학적 신호분자를 생성한다는 것을 제시하였다.

따라서 본 연구에서는 배추 제1엽에서 PQ 유도 산화스트레스에 대한 NO의 생리적 조절역할 및 그 작용기작을 알아보기 위해 배추 잎의 생리, 생화학적 변화와 함께 잎 조직내  $H_2O_2$  함량 변화 및 ascorbate-glutathione 회로 구성효소인 APX, DHAR 및 GR 효소의 활성도 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 식물의 생육조건

크기, 모양, 색깔이 균일한 배추(*Brassica campestris* L. cv Seoul) 종자를 선별하여 1% (v/v) sodium hypochlorite 용액에 15분간 침윤 소독한 후 멸균 증류수를 이용하여 세척하였다. 투명한 폴리프로필렌 발아통(11.5 × 11.5 × 5 cm)에 Bio-pluge (홍농종묘) 상토를 2/3가량 넣어 증류수 120 mL로 충분히 적신 후 살균된 종자를 25개씩 파종하여 wrap을 씌우고 65%의 상대습도, 25/21°C (낮/밤)의 온도 및 18 h/6 h (낮/밤)의 광주기 조건으로 설정된 growth chamber에서 8일간 발아 생육시켰다. 파종한 후 2일째 wrap을 벗기고 증류수 20 mL 주었고, 3일째부터는 매일 40 mL씩 공급해주었다. 8일후 배추 유식물의 제1엽을 수확하여 재료로 사용하였다.

### Sodium nitroprusside (SNP)전처리 및 paraquat(PQ)처리

8일간 성장한 배추 유식물에서 비슷한 크기의 제 1엽을 수확하여 3그룹으로 나누어서 SNP 전처리구 잎은 100  $\mu$ M SNP 용액이 20 mL 담긴 petri dish에 띄우고, 증류수 대조구와 2  $\mu$ M PQ 단독 처리구 잎은 증류수 20 mL가 담긴 각 petri dish에 띄워, 27°C의 온도에서 3시간 광 배양 하였다. 3시간 광 배양 후 SNP 전처리구와 PQ 단독 처리구는 각각 2  $\mu$ M PQ 용액 20 mL가 담긴 petri dish로 옮기고, 증류수 대조구는 계속해서 증류수 20 mL가 담긴 petri dish에 띄워 24시간 광 배양하였다. 이때 24시간 광배양 동안 0, 6, 12, 18, 24 시간째에 시료를 채취하여 PQ 및 SNP 처리 효과를 조사하였다. 이 때 아래의 모든 측정은 3회 독립적으로 반복 실시하였다.

### Chlorophyll 및 soluble protein 함량 측정

엽록소 추출은 Hiscox와 Israelstam (1979)의 방법을 기초로 하였다. glass cap tube에 배추 제 1엽 5개와 DMSO (dimethylsulfoxide) 8 mL를 넣고 65°C, 55 rpm 조건의 항온수조에서 2시간 동안 진탕 배양하여 엽록소를 추출한 후 DMSO 용액으로 총 부피 8 mL가 되도록 보정하였다. 이때 얻어진 추출액의 흡광도( $A_{652}$ )를 측정 후 Arnon (1949)의 방정식에 대입해서 chlorophyll 함량을 계산하였다. 수용성 단백질 함량은 Bradford (1976)의 방법을 기초로 하여 측정하였다. 배추 제 1엽 5개를 미리 냉각된 막자사발을 이용하여 4 mL의 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5, 1% PVPP 포함)와 0.3 g의 석영사를 넣고 마쇄한 후 4°C에서 10,000 g으로 20분 동안 원심분리 하여 단백질 추출용액을 얻었다. 단백질 추출액 0.1 mL에 Bradford용액 5 mL를 혼합하

여 5분간 반응을 시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때의 흡광도를 BSA 단백질 표준곡선과 대조하여 단백질 함량을 정량 하였다.

### Malondialdehyde (MDA) 함량 측정

Dhindsa 등 (1981)의 방법을 기초로 하여 MDA 함량을 정량 하였다. 배추 제 1엽 5개를 미리 냉각된 막자 사발을 이용하여 2 mL의 0.1% trichloroacetic acid (TCA)용액과 0.3 g의 석영사를 넣고 마쇄한 후 4°C에서 10,000 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 1 mL 상등액을 취해 glass cap tube에 넣고, 2 mL의 20% TCA (0.5% thiobarbituric acid 포함)을 섞은 후 95°C에서 30분간 배양한 다음 급속히 냉각시켰다. 이 혼합물을 다시 microfuge (12,500 rpm, 10 min)로 원심분리한 후 상등액을 취하여 532 nm와 600 nm에서 흡광도를 각각 측정하였다. MDA함량은 두 흡광도 값의 차이를 이용해 MDA의 몰흡광계수  $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Heath and Packer 1968)로부터 산출하였다.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량은 Hung과 Kao (2003)의 방법을 기초로 하여 측정하였다. 10개의 배추 제1엽을 미리 냉각된 mortar와 pestle을 이용해서 3 mL의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5, 1 mM hydroxylamine 포함)와 0.3 g의 sea sand를 넣고 마쇄한 후 4°C에서 원심분리(6,000 g, 20 min)하여 상등액을 얻었다. 이 상등액 중 2 mL를 취하여 여기에 20% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액에 녹인 1 mL의 0.1% titanium sulfate와 혼합한 후 혼합물을 원심분리(6,000g, 20 min)하여 얻은 상등액의 흡광도를 410 nm에서 측정하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 몰흡광계수  $0.28 \text{ } \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 산출하였다.

### 효소 추출 및 활성도 분석

APX 효소 용액은 Asada (1984)의 방법을 기초로 10개의 배추 제1엽을 냉각된 막자사발에 넣고, 3 mL의 0.1 M K-PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.5, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 5 mM ascorbate 포함)와 0.3 g의 석영사를 넣고 마쇄한 후 4°C에서 20,000 g로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 취해 효소원액으로 사용하였다. GR 효소 용액은 Rao 등 (1996)의 방법을 변형하여 10개의 배추 제1엽을 냉각된 막자사발에 넣고, 3 mL의 0.1 M K-PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.5, 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 1% PVPP 포함)와 0.3 g의 석영사를 넣고 마쇄한 후 4°C에서 20,000 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취해 효소원액으로 사용하였다. DHAR 효소 용액은 Asada (1984)의 방법을 기초로 10개의 배추 제1엽을 냉각된 막자사발에 넣고, 3 mL의 70 mM K-PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.8)와 0.3 g의 석영사를 넣

고 마쇄한 후 4°C에서 20,000 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취해 효소원액으로 사용하였다.

### APX 활성도 측정

APX 활성도는 Asada (1984)의 방법을 이용하여 측정하였다. 효소 활성도는 ascorbate가 산화될 때 290 nm에서의 흡광도 감소값 ( $\epsilon_{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )을 측정하여 산출하였다. 이때 효소반응은 62.5 mM K-PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0) 1.6 mL, 5 mM ascorbate 200  $\mu\text{L}$ , 효소 용액 200  $\mu\text{L}$  및 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu\text{L}$ 가 포함된 반응액에서 진행되었다.

### GR 활성도 측정

GR 활성도는 Rao 등 (1996)의 방법을 따라 측정하였다. 효소 활성도는 반응액내의 NADPH가 산화될 때 340 nm에서의 흡광도 감소값( $\epsilon_{340} = 6.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )을 측정하여 산출하였다. 이때 효소반응은 0.1 M K-PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.8) 1.5 mL, 80 mM Na<sub>2</sub>-EDTA 50  $\mu\text{L}$ , 20 mM GSSG 50  $\mu\text{L}$  및 효소 추출액 300  $\mu\text{L}$ 가 포함된 반응액에 4 mM NADPH 100  $\mu\text{L}$ 를 가하여 진행시켰다.

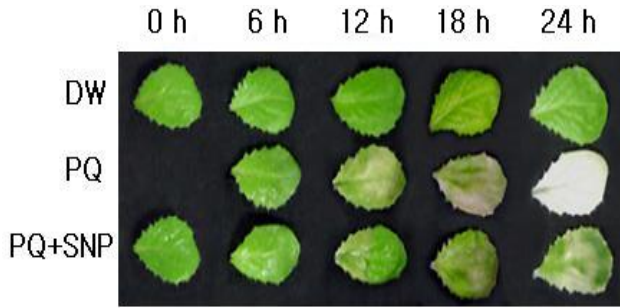
### DHAR 활성도 측정

DHAR 활성도는 Asada (1984)의 방법을 기초로 측정하였다. 효소 활성도는 반응액내에서 glutathione에 의해 dehydroascorbate가 ascorbate로 환원 될 때 265 nm에서의 흡광도 증가값 ( $\epsilon_{265} = 14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )을 측정하여 산출하였다. 이때 효소반응은 62.5 mM K-PO<sub>4</sub> buffer (pH 6.5, 0.125 mM Na<sub>2</sub>-EDTA 포함) 1.65 mL, 100 mM GSH 100  $\mu\text{L}$ , 10 mM DHA 100  $\mu\text{L}$  및 효소추출액 150  $\mu\text{L}$ 가 포함된 반응액에서 진행되었다.

### 결과 및 고찰

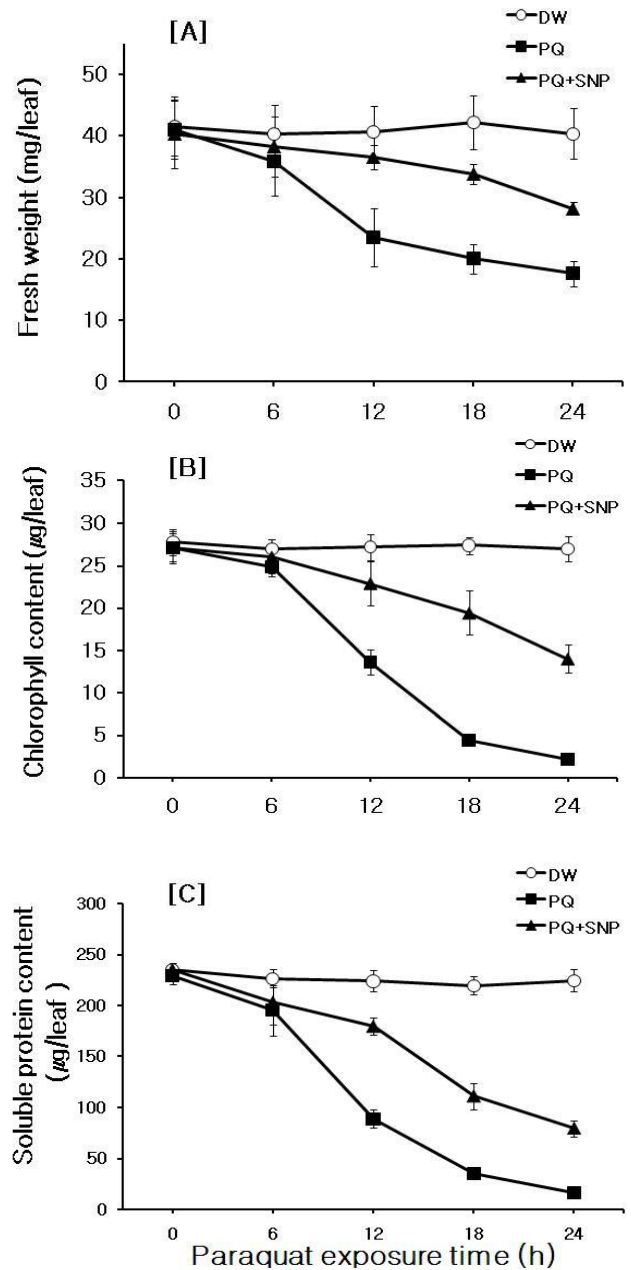
배추 잎에서 paraquat (PQ)에 의한 산화적 손상과 SNP 효과

제조제 화합물인 PQ는 염록체 틸라코이드 막에서 빛에너지에 의해 활성화된 광계 I로부터 이탈된 전자를 받아 PQ 라디칼로 환원된다. 이 PQ 라디칼은 인접해있는 산소 분자를 다시 환원시켜 강력한 산화제로 작용하는 superoxide radical을 생성케 함과 동시에 superoxide radical 일부는 superoxide dismutase (SOD)에 의해 또 다른 활성 산소 분자인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분자로 전환됨으로서 산화적 손상을 일으키는 산화스트레스 유발 인자로 알려져 있다(Dodge 1971; Martinez et al. 2001). 본 실험에서는 먼저 배추 제1엽에서 PQ 독성과 이에 대한 NO공여체인 sodium nitroprusside (SNP)의 생리적



**Fig. 1** Protective effect of 100  $\mu\text{M}$  SNP pretreatment on the paraquat (PQ)-induced leaf damage. Detached leaves from 8-d-old chinese cabbage seedlings were pre-incubated with 100  $\mu\text{M}$  SNP for 3 h and transferred into 2  $\mu\text{M}$  PQ solutions for further 24 h in the light. (DW: control leaves, PQ: leaves treated with 2  $\mu\text{M}$  paraquat alone, PQ+SNP: leaves pre-treated with 100  $\mu\text{M}$  SNP before 2  $\mu\text{M}$  PQ application)

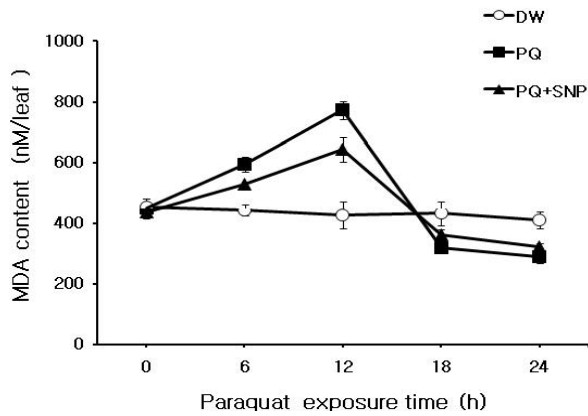
효과를 알아보았다. 대조구 잎의 경우 광 배양 시간이 경과함에도 엽록소의 파괴가 거의 없는 반면 PQ 단독 처리구 잎의 경우 12시간 때부터 엽록소 파괴로 인한 잎의 황백화가 진행되기 시작하여 24시간 때에는 잎이 대부분 황백화 된 것을 볼 수 있었다. 그러나 SNP 전처리 후 PQ로 처리된 잎의 경우 모든 시간대에서 PQ 단독처리구보다 잎의 황백화가 억제된 것을 볼 수 있었다(Fig. 1, Fig. 2B). Fig. 1의 사진 결과에 대한 정량적인 생리·생화학적 분석을 위해 잎의 생체량, 엽록소, 수용성 단백질 함량 변화를 측정 하였다. 생체량의 경우 대조구는 광 배양 시간이 경과함에도 일정한 수준을 나타낸 반면 PQ 단독 처리구에서는 배양시간이 경과함에 따라 생체량이 급격히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 SNP 전처리구의 경우 생체량 감소가 억제되어 PQ 단독처리구보다 높은 수준을 유지하면서 감소하는 추세를 보였다(Fig. 2A). 엽록소와 수용성 단백질 함량 변화의 경우에도 대조구는 시간이 경과함에도 일정한 수준을 나타낸 반면 PQ 단독처리구는 배양시간이 경과함에 따라 이들 함량이 급격히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 SNP 전처리구의 경우 엽록소와 단백질 함량의 감소가 효과적으로 억제되어 PQ 단독처리구보다 높은 수준을 유지하면서 감소하는 추세를 보여(Figs. 2B, C) 이들 결과로부터 PQ 독성에 대한 SNP의 방어 효과를 입증할 수 있었다. Beligni와 Lamattina (2001)는 감자 잎 절편에 산화스트레스 유발인자로 제초제인 diquat를 처리해 주었을 때에 SNP로 전처리한 절편 조직의 엽록소 양이 diquat 단독 처리구에 비해 10배나 높게 나타났다는 결과를 보고한 바 있으며, Chen 등 (2004)은 NO가 염 스트레스에 노출된 밀 유식물 뿌리의 산화적 손상을 완화시킨다는 결과를 제시한바 있다. 이들 보고 및 본 실험에서 얻어진 결과는 NO가 PQ에 의한 배추 잎의 산화적 손상에 대해 방어효과가 있음을 입증하는 것이다.



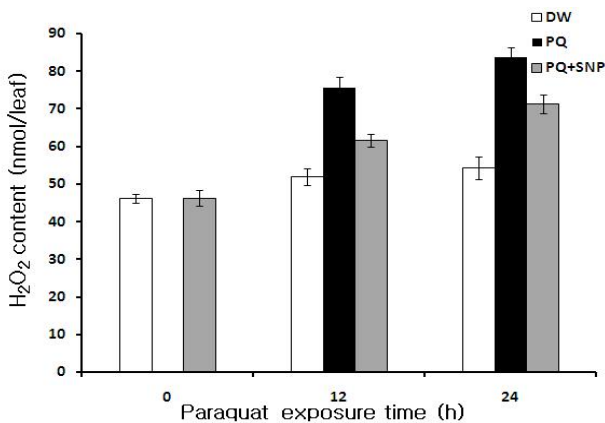
**Fig. 2** Effects of 100  $\mu\text{M}$  SNP pretreatment on 2  $\mu\text{M}$  PQ-induced leaf-injury symptoms in detached chinese cabbage leaves. Detached leaves were treated as the same manners shown in Figure 1. ([A]:fresh weight, [B]:chlorophyll content, [C]:soluble protein content)

배추 잎의 malondialdehyde (MDA) 및  $\text{H}_2\text{O}_2$  함량 변화에 대한 PQ와 SNP 효과

식물이 산화스트레스를 받았을 때 나타나는 또 다른 현상으로 세포막 구성 지질 분자의 과산화 반응으로 인한 세포막 파괴가 일어난다(Dhindsa et al. 1981). 특히, 세포막 손상시 세포 밖으로 세포 내용물의 누출이 일어나 세포 손상이 더욱 가속화 된다. 그러므로 세포막 손상에 대



**Fig. 3** Effect of 100  $\mu$ M SNP pretreatment on the changes of malodialdehyde(MDA) content in detached chinese cabbage leaves. Detached leaves were treated as the same manners shown in Figure 1



**Fig. 4** Effect of 100  $\mu$ M SNP pretreatment on the changes of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in detached chinese cabbage leaves. Detached leaves were treated as the same manners shown in Figure 1

한 PQ독성 및 이에 대한 SNP의 효과를 알아보기 위하여 세포막 지질의 과산화산물인 MDA 함량 변화를 조사하였다(Fig. 3). 대조구의 경우 광 배양 시간이 경과함에도 MDA 함량이 낮은 상태로 일정한 수준을 보인 반면, PQ 단독처리구의 경우 12시간 때까지 MDA 함량이 급격히 증가하여 대조구보다 1.8배 높게 나타났다. 그러나 SNP 전처리 후 PQ 처리 시 MDA 축적이 억제되어 12시간 때의 PQ 단독 처리구 값의 80% 수준을 보였다. 한편, 12시간 이후 대조구를 제외한 나머지 처리구에서 MDA 함량이 감소하는 이유는 강한 PQ독성으로 인해 MDA조차도 파괴되기 때문이다. 앞서서와 같이 PQ로 처리된 배추 잎에서 생체량, 엽록소, 단백질 등의 함량 감소 및 MDA 함량 증가가 PQ 처리로 인하여 배추 잎에 과다하게 생성되는 활성 산소 분자종(activated oxygen species: AOS) 때문 인지를 입증하기 위하여 AOS의 한 형태인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량 변화를 조사하였다(Fig. 4). 대조구는 광배양 시간이 경과함에도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량이 일정한 수준을 보인 반면, PQ 단독처

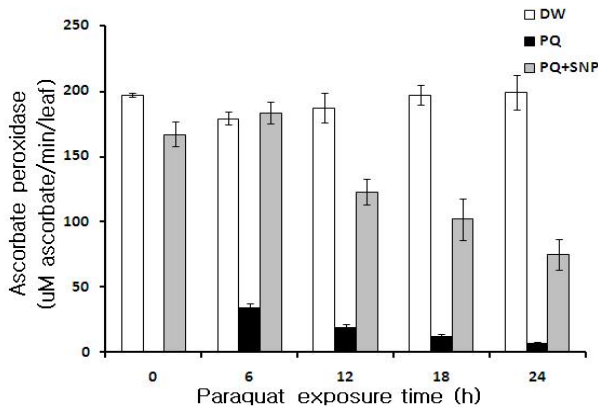
리의 경우 12시간 때의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량이 대조구보다 1.5배 높게 나타났다. 그러나 SNP 전처리구의 경우 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량 증가가 억제되어 12시간 때의 PQ 단독 처리구 값의 80% 수준을 보였다.

스트레스하에서 식물 세포내 정상적인 대사가 교란을 받아 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 AOS가 축적되면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 세포내 지질, 단백질 및 DNA와 같은 세포 구성 성분의 산화적 파괴와 효소의 불활성화를 초래한다고 알려졌다(Laloi et al. 2004). 반면에 식물에 NO를 처리하였을 때 NO가 직접적으로 AOS를 제거하거나, 또는 세포 내 항산화계를 활성화시켜 AOS를 제거함으로써 염, PQ, 중금속 등에 의해 기원되는 산화스트레스를 완화시켜준다는 보고가 제시된 바 있다(Beligni and Lamattina 1999; Laspina et al. 2005; Zhao et al. 2004; Hung et al. 2002). 이들 보고와 Figure 3과 Figure 4의 결과로부터 NO가 배추 잎 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량 증가를 억제함으로써 세포막 지질의 과산화 반응을 저해하여 PQ에 의한 산화적 손상을 방어하는 것으로 생각되었다.

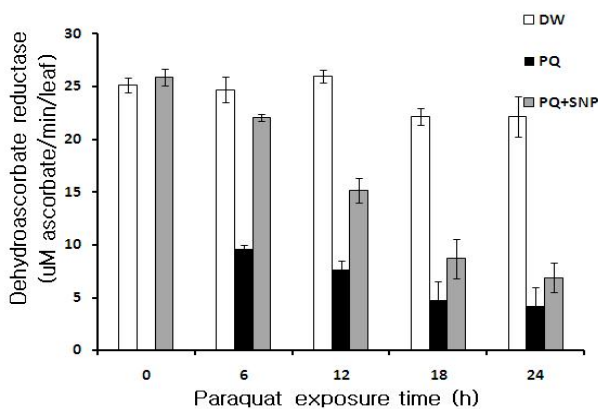
#### Ascorbate-glutathione 회로 효소의 활성도 변화에 대한 SNP의 효과

산화스트레스에 대한 식물의 방어 반응에는 스트레스에 의해 생성된 superoxide radical과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 활성 산소 라디칼 분자의 제거 능력이 관련되어 있다고 알려져 왔다. 이러한 식물의 능력은 SOD, CAT, APX, GR와 같은 대표적인 항산화효소와 ascorbate, glutathione과 같은 항산화 저분자를 이용한 세포 내 활성 산소 라디칼 대사의 조절을 통해 발현되어 산화적 손상으로부터 식물을 보호한다(Foyer et al. 1994; Mittler 2002; Hu et al. 2007). 항산화계 역할과 관련하여 ascorbate-의존성 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 제거 대사 회로인 ascorbate-glutathione 회로가 광합성으로 인해 풍부한 산소 환경 하에 있는 엽록체에서 최초 보고된 후(Foyer and Halliwell 1976), 이 회로는 암말아 중인 피마자 배유조직에서 시토솔의 호흡(Klapheck et al. 1990) 및 콩과 식물 뿌리세포에서 질소고정 반응 중 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 제거 수단(Dalton et al. 1993)으로 그 중요성이 입증되었다. 따라서 본 연구에서는 앞에서 분석된 PQ에 의해 유도된 산화스트레스 방어효과에 대한 NO의 작용기작을 알아보기 위해 SNP로 전처리된 배추 제1엽에 PQ를 처리한 후 ascorbate-glutathione 회로 구성효소의 활성도 변화를 조사해 보았다.

APX는 ascorbate-glutathione 회로 내 첫 번째 반응 단계 관여 효소로서 ascorbate를 환원제로 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 무독성인 H<sub>2</sub>O로 전환시켜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거한다. 그리고 DHAR은 APX작용에 의해 생성된 dehydroascorbate를 glutathione을 환원제로 이용하여 ascorbate로 다시 재생시켜주는 과정을 촉매 함으로써 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분해 활성과 연관되어 있고, GR은 dehydroascorbate를 ascorbate로 재생시키는 DHAR 효



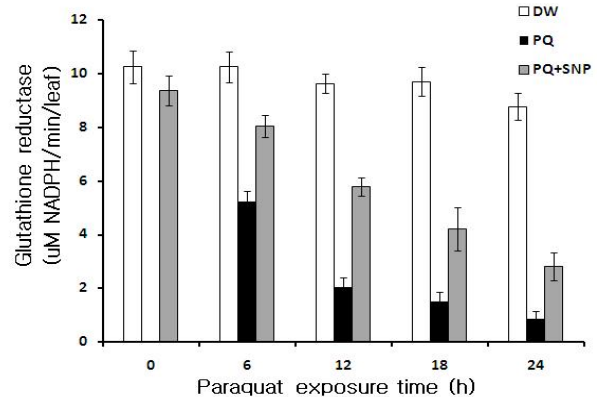
**Fig. 5** Effect of 100  $\mu$ M SNP pretreatment on the changes of ascorbate peroxidase activities in detached chinese cabbage leaves. Detached leaves were treated as the same manners shown in Figure 1



**Fig. 6** Effect of 100  $\mu$ M SNP pretreatment on the changes of dehydroascorbate reductase activities in detached chinese cabbage leaves. Detached leaves were treated as the same manners shown in Figure 1

소의 촉매 반응에 요구되는 환원형 glutathione을 제공하여 줌으로써 ascorbate-glutathione 회로의 마지막 단계를 촉매하는 것으로 알려져 있다(Foyer and Halliwell 1976). 먼저 24시간 광배양 동안 APX 활성도 변화를 조사한 결과 (Fig. 5), 대조구의 경우 배양시간이 경과함에도 APX 활성도가 일정한 수준을 보인 반면 PQ 단독처리구의 경우 배양시간 6시간 때부터 APX 활성도가 급격히 감소하여 대조구의 19% 수준을 보였다. 그러나 SNP 전처리구의 경우 APX 활성도 감소가 효과적으로 억제되어 6시간 때의 효소활성도는 PQ 단독처리구보다 5배 높게 나타났다. 이후 광배양 시간 경과에 따라 SNP 전처리구의 APX 활성도는 PQ 단독처리구보다 높은 수준을 보이면서 감소하는 추세를 보였다.

APX 활성도 변화와 더불어 DHAR 활성도 변화를 조사하였다(Fig. 6). 대조구의 경우 전체 배양시간동안 DHAR 활성도가 거의 일정한 수준을 보이는 것을 볼 수 있었지만, PQ 단독처리구의 경우 배양시간 6시간때부터 APX



**Fig. 7** Effect of 100  $\mu$ M SNP pretreatment on the changes of glutathione reductase activities in detached chinese cabbage leaves. Detached leaves were treated as the same manners shown in Figure 1

활성도 변화와 유사하게 DHAR 활성도가 급격히 감소하여 대조구의 39% 수준을 나타냈다. 그러나 SNP 전처리구의 경우 광배양 6시간 때에 PQ 단독처리구의 DHAR 활성도 보다 2배 높게 나타나, PQ 처리에 의한 DHAR 활성도 감소가 효과적으로 억제 된 것을 알 수 있었다. 이후 광 배양시간 경과에 따라 SNP 전처리구의 DHAR 활성도는 PQ 단독처리구보다 높은 수준을 유지하면서 감소하는 추세를 보였다.

GR 활성도 변화에서도 APX 및 DHAR 활성도 변화 양상과 유사하여(Fig. 7), 대조구는 24 시간 배양동안 GR 활성도가 일정한 수준을 나타낸 반면, PQ 단독처리구의 경우 6시간 때부터 GR 활성도가 급격히 감소하여 대조구의 50% 수준을 보였다. 그러나 SNP 전처리구의 경우 GR 활성도 감소가 효과적으로 억제되어 6시간 때의 GR 활성도는 PQ 단독처리구보다 1.5배 높게 나타났다. 이후 광배양시간이 지남에 따라 SNP 전처리구의 GR 활성도는 PQ 단독처리구보다 높은 수준을 유지하면서 감소하는 추세를 보였다.

형질 전환된 식물을 이용한 여러 연구 결과들은 세포내 특정 항산화효소의 역할보다는 오히려 세포내 존재하는 여러 항산화효소의 상호 협력작용이 산화스트레스에 의해 유도되는 세포 손상을 방어하는데 더욱 중요하다고 제시하였다(Slooten et al. 1995; Sen Gupta et al. 1993). 최근에 Zhang 등 (2007)은 NO가 수분 스트레스 조건하에서 APX 활성도를 증가시켰음을 보고하였고, Wu 등(2009) 역시 NO가 저온 스트레스하의 비파나무 잎에서 ascorbate 함량 증가와 더불어 APX, DHAR 활성도 증가를 유도하였음을 보고하였다. 또한 수분 스트레스로 인해 산화적 손상을 받고 있는 *Agropyron cristatum* 잎에서 내재성 NO가 ascorbate와 glutathione 대사의 촉진을 이끄는 신호분자가 되며, 이때 NO가 수분 스트레스 내성 획득을 위해 중요한 역할을 한다고 보고하였다(Shan et al. 2012).

이상의 결과들을 종합해 볼 때, PQ에 노출된 배추 잎에서 NO는 APX, DHAR, GR의 활성도 감소를 억제함으로써 ascorbate-glutathione 회로의 활성화를 통해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량 축적을 억제하여 PQ 유도 산화스트레스에 대한 방어 효과를 나타냈다고 생각되었다. 그러나 NO가 어떻게 APX, DHAR, GR의 활성도 감소를 억제시키는지에 대해서는 더 연구를 통해 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

## 적 요

산화질소(nitric oxide: NO) 공여체인 100 μM sodium nitroprusside (SNP)를 배추 잎에 전처리한 후 이어서 2 μM paraquat (PQ) 처리 시, PQ에 의해 유도된 산화적 손상에 대한 잎의 내성이 효과적으로 증진되었다. 24 시간 광 배양기간 동안 PQ 단독 처리구 잎에서는 생체량, 엽록소 및 단백질 함량이 현저하게 감소하였으나 PQ 노출 전에 3시간 SNP 전처리로 이들 잎 손상이 의미 있게 완화되었다. 게다가 PQ 처리에 기인된 malondialdehyde (MDA)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량 증가도 SNP 전처리에 의해 유의하게 억제되었다. 잎에서 이들 PQ 독성에 대한 SNP의 방어효과와 관련하여 ascorbate-glutathione 회로 구성 효소의 활성도 변화를 조사하였다. PQ 단독 처리구에서 APX, DHAR 및 GR 효소 활성도는 배양 6시간 후에 급격히 감소되어 대조구 잎과 비교 시 각각 대조구의 19%, 50%, 39% 수준의 활성도 값을 보였다. 그러나, 이들 효소 활성도 값 감소는 SNP 전처리에 의해 현저하게 억제되어 6시간 배양 후에 PQ 단독처리구 보다 각각 5배, 2배, 1.5배 높은 값을 나타내었다. 또한, 그 이후 24시간 배양 때까지 PQ 단독 처리구보다 계속 높은 활성도를 보이면서 점차로 감소하였다. 이들 결과로부터, PQ에 노출된 배추 잎에서 SNP 전처리에 의한 ascorbate-glutathione 회로의 활성도가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 축적을 억제하며 그로인해 PQ에 의해 유도된 산화스트레스로부터 잎을 방어하는 것으로 생각되었다. 동시에 이들 결과는 산화질소가 배추 잎에서 PQ 스트레스에 대한 항산화 방어자로서의 역할을 하는 것을 의미한다.

## References

- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Betavulgaris*. Plant Physiol 24:1-15
- Asada K (1984) Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. Methods Enzymol 105:422-429
- Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in Aleurone Layers. Plant Physiol 129:1642-1650
- Beligni MV, Lamattina L (1999) Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. Nitric Oxide 3:199-208
- Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. Plant, Cell and Environ 24:267-278
- Bowler C, Montagu MV, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Review of Plant Physiol and Plant Mol Biol 43:83-116
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72:248-254
- Chen M, Shen WB, Ruan HH, Xu LL (2004) Effects of nitric oxide on root growth and its oxidative damage in wheat seedling under salt stress. J Plant Physiol and Mol Biol 30:569-576
- Dalton DA, Langeberg L, Treneman NC (1993) Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. Plant Physiol 87:365-360
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981) Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J Exp 32:93-198
- Dodge AD (1971) The mode of action of bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. Endeavour 30:130
- Durzan DJ (2002) Stress-induced nitric oxide and adaptive plasticity in conifers. Journal of Forest Sci 48:281-291
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plant. Plant Cell and Environ 17:507-523
- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133:21-25
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys 125:189-198
- Hiscox JD, Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. CAN. J Bot 57:1332-1334
- Hu KD, Hu LY, Li YH, Zhang H (2007) Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. Plant Growth Regul 53:173-183
- Hung KT, Chang CJ, Kao CH (2002) Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. J Plant Physiol 159:159-166
- Hung KT, Kao CH (2003) Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. J Plant Physiol 160: 871-879
- Klapheck S, Zimmer I, Cosse H (1990) Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. Plant Cell Physiol 31:1005-1013
- Koshiba T (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). Plant Cell Physiol 34:713-721
- Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. Curr Opin Plant Biol 7:323-328
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML, Benarides MP (2005) Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Sci 169:323-330
- Martinez CA, Loureiro ME, Oliva MA, Maestri M (2001)

- Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum curtilobum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Sci* 160:505-515
- Mata CG, Lamattina L (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* 126:1196-1204
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-410
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol, Plant Mol Biol* 49:249-279
- Price AH, Taylor A, Ripley SJ, Griffiths A, Trewavas AJ, Knight MR (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6:1301-1310
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996) Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 110:125-136
- Ruan HH, Shen WB, Liu KL, Xu LL (2005) Effects of exogenous NO donor on glutathione-dependent antioxidative system in wheat seedling leaf under salt stress. *Acta Agron* 31:1144-1149
- Sen Gupta A, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1629-1633
- Shan C, He F, Xu G, Han R, Liang Z (2012) Nitric oxide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. *Biologia Plantarum* 56:187-191
- Slooten L, Capiou K, Van Camp W, Van Montagu M, Subesma C, Inze D (1995) Factors affecting the enhancements of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol* 107:737-750
- Uchida A, Jagendorf AT, Hivino T, Takabe T (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and eat stress tolerance in rice. *Plant Sci* 163:515-523
- Wu JC, Chen JQ, Liang J, Yang WB, Wu JJ, Chen LQ, Liu MQ, Chen LQ (2009) Effects of exogenous NO on ascorbate-glutathione cycle in loquat leaves under low temperature stress. *Chin. J. Appl. Ecol* 20:1395-1400
- Zeier J, Schreiber L (1997) Chemical composition of hypodermal and endodermal cell walls and xylem vessels isolated from *Clivia miniata*. *Plant Physiol* 113:1223-1231
- Zhang A, Jiang M, Zhang J, Ding H, Xu S, Hu X, Tan M (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytol* 175:36-50
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotype of reed. *Plant Physiol* 134:849-857