[UCI]I804:24011-200000234317

2007년 10월
석사학위 논문

Pycnogenol(PYC)에 의한 Human Fibrosarcoma Cells의 DNA 손상에 따른 항산화제의 prooxidant 역할

조선대학교 대학원

생 물 학 과

박 연 선

Pycnogenol(PYC)에 의한 Human Fibrosarcoma Cells의 DNA 손상에 따른 항산화제의 prooxidant 역할

Role of Prooxidant on DNA Damage of Human Fibrosarcoma Cells by Pycnogenol(PYC)

2007년 02월 23일

조선대학교대학원

생 물 학 과

박 연 선

학위신청논문제출서

Pycnogenol(PYC)에 의한 Human Fibrosarcoma Cells의 DNA 손상에 따른 항산화제의 prooxidant 역할

지도교수 김 영 곤

이 논문을 이 학 석사학위신청 논문으로 제출함

2006년 10월

조선대학교대학원

생 물 학 과

박 연 선

인준서

박연선의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조 선 대학교 교수 _____

위원 조 선 대학교 교수 _____

위원 조 선 대학교 교수 _____

2006년 11월 (석사)

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT
Ⅰ. 서 론 ---------- 1
Ⅱ. 재료 및 방법 ---------- 13
1. 시 약 ---------- 13
1) 항산화제 및 금속이온 ---------- 13
2) 세포 배양 및 추출 ---------- 13
3) HPLC와 ELISA ---------- 14
2. 금속이온과 항산화제에 의한 DNA 손상 ---------- 15
3. Pycnogenol의 Fibrosarcoma에서의 세포생존률 측정 16
1. Animal cell culture ---------- 16
1) 배양액 제조 ---------- 16
2) Serum inactivation ---------- 16
3) cell plating ---------- 17
4) Cell Maintaining ---------- 17
2. MTT와 XTT ---------- 18
4. 항산화제의 HPLC와 ELISA를 통한 8-OHdG 생성확인 - 19
1. HPLC ---------- 19
2. ELISA ---------- 20
Ⅲ. 결 과 ---------- 22
1. 금속이온과 항산화제에 의한 DNA손상정도 -------- 22

2. Pycnogenol의 Fibrosarcoma에서의 세포생존률 측정 --- 26
3. HPLC와 ELISA를 통한 8-OHdG 생성 확인 ---------- 28
Ⅳ. 고 찰 ---------- 33
Ⅳ. 참 고 문 헌 ---------- 37

그 림 목 차

Figure 1. 생체 내에서의 활성산소 생성양식 ---------- 2

Figure 2. 프리라디칼 을 발생하는 환경인자 ---------- 3

Figure 3. 프리라디칼에 관련된 질병 ---------- 3

Figure 4. 인체 내 항산화 방어계의 분포 및 특성 ---------- 5

Figure 5. 프리라디칼에 의한 산화적 손상에 대항하는 항산화 방어 ---------- 6

Figure 6. pBR322의 plasmid DNA에 Cu^{2+}와 Fe^{2+}의 손상에 따른 항산화제의 효과 ---------- 24

Figure 7. 금속이온의 영향에 따른 PYC의 농도별 효과 ------ 25

Figure 8. HT1080 cell의 MTT assay를 통한 세포의 생존률 측정 ----------27

Figure 9. HT1080 cell을 XTT method의 mitocondrial dehydro-genase을 통한 세포의 생존률 측정 ---------- 27

Figure 10. HPLC를 통한 항산화제의 8-OHdG 산물 측정 ------ 30

그 림 목 차

Figure 11. Fe^{2+}와 Cu^{2+}이온이 8-OHdG 형성에 미치는 영향에 따른 PYC의 농도별 효과 ---------- 31

Figure 12. ELISA kit를 이용한 HT1080 세포와 8-OHdG의 형성에 미치는 Fe^{2+}와 Cu^{2+}의 효과 ---------- 32

ABSTRACT

Role of Prooxidant on DNA Damage of Human Fibrosarcoma Cells by Pycnogenol(PYC)

Park Yeon-sun
Advisor : Prof. Young-Gon Kim, Ph.D
Department of Biology,
Graduate School of Chosun University

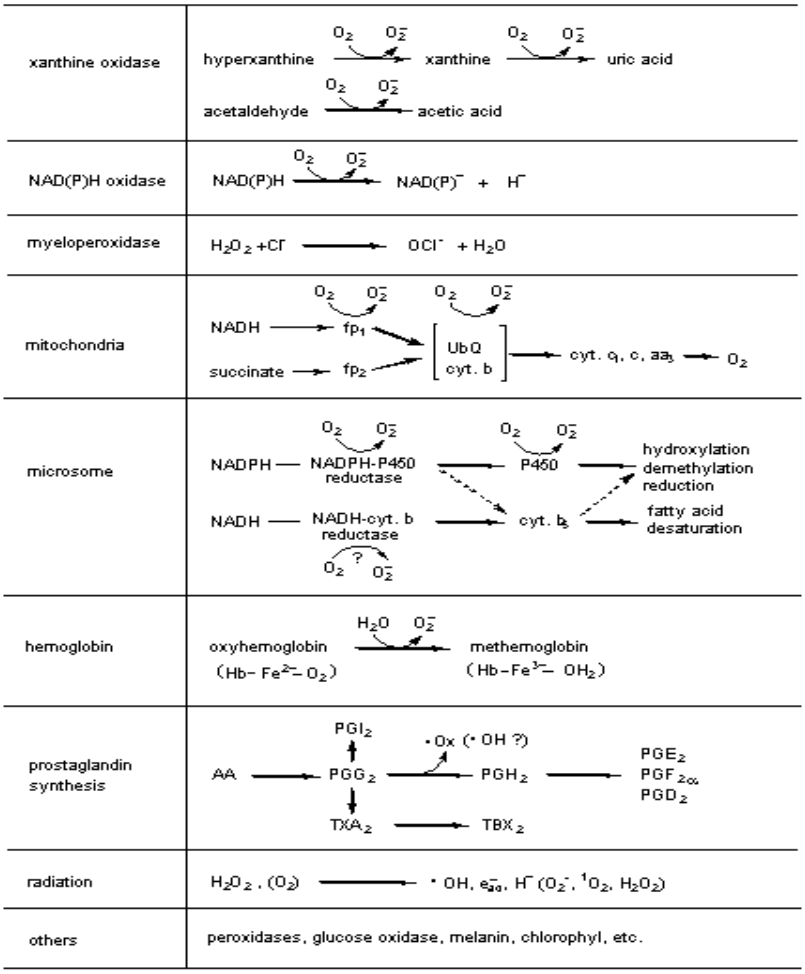
Flavonoids are a group of naturally occurring phenolic compounds which are widely distributed in nature. Although, many dietary flavonoids have been suggested to be beneficial for health as an antioxidants against oxidative stress, however, a number of studies show that these can also exhibit prooxidant role under certain condition. Pycnogenol (PYC), polyphenolyic compounds with antioxidative activity, acted as a prooxidant causing a copper and iron dependent DNA damage in human fibrosarcoma cells (HT1080). Treatment of DNA from plasmid pBR322 and human fibrosarcoma cells with PYC plus copper and iron caused strand scission and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in DNA. DNA strand breaks and formation of 8-OHdG were closely related to the metal ions and PYC concentrations. On the contrary, PYC further did not induce apoptosis of HT 1080 cells at higher concentrations of PYC in the presence of transition metals in cells, but rather protected cells from prooxidant-induced apotopsis. These results imply that intracellular metal ions induced reactive oxygen species and may have dependent upon

the concentrations of antioxidants for protection in the oxidative cleavage of DNA and apoptotic cell death.

Ⅰ. 서 론

산소는 지구상에서 가장 많은 원소로서 건조대기 중의 21%를 차지하고 있으며, 호기성 생물은 이렇게 풍부한 산소를 전자수용체로 하는 호흡을 통해 에너지를 획득한다. 그러나 이와 같이 생명유지에 절대적으로 필요한 산소이지만 안정한 분자상태인 기저삼중합산소 (ground state triplet oxygen)가 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical, $O_2^{\cdot}$) 하이드록실 라디칼 (hydroxyl radical, $^{\cdot}OH$), 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2), 일중항산소 (singlet oxygen, $1O_2$)와 같은 반응성이 매우 큰 활성산소 (active oxygen)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다 (Adelson, *et al.,* 1988; Sawyer 와 Valentine, 1981; Tolmasoff, *et al.*, 1980, figure 1). 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Afanas'ev, *et al.,* 1989; Halliwell, 1987). 또한 이들 활성산소에 의한 지질과산화 결과 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러 가지 체내 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 야기함으로써 노화와 질병의 원인이 되기도 한다 (Yun, *et al.,* 1996, figure 2, 3). 한편, 정상적인 세포에서도 대사과정 중 어느 정도의 프리라디칼과 기타 활성산소 및 과산화물이 생성되고 있으나 생체 내에는 이들에 대한 방어기구로서 superoxide dismutase (SOD) (Lushchak, 2006), catalase (Cui, *et al.,* 2006), peroxidase (Manzoori, *et al.,* 2006) 등의 항산화효소와 함께 vitamin E (Cemek, *et al.,* 2006; Sampayo-Reyes 와 Zakharyan, 2006), vitamin C (Szeto, *et al.,* 2006), glutathione (Kaszycki, *et al.,* 2006), ubiquinone(Bauerova, *et al.,* 2005) 등과 같은 항산화물질이 존재하여 스스로를 보호하고 있다. 그러나 이와 같은

생체방어기구에 이상이 초래되거나 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 활성산소의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)가 야기된다. 따라서 이와 같은 프리라디칼을 소거할 수 있는 생체 내에서 활성산소의 생성기작은 figure 1에서 보는 바와 같이 다양한 생체 내 반응에 의해서 이루어지는 독성물질이다.



fp : flavoprotein, UbQ : ubiquinone, cyt : cytochrome, AA : arachidonic acid, PG : prostaglandin, TX : thromboxane, eq_{aq} : aqueous electron

Figure 1. 생체 내에서의 활성산소 생성양식

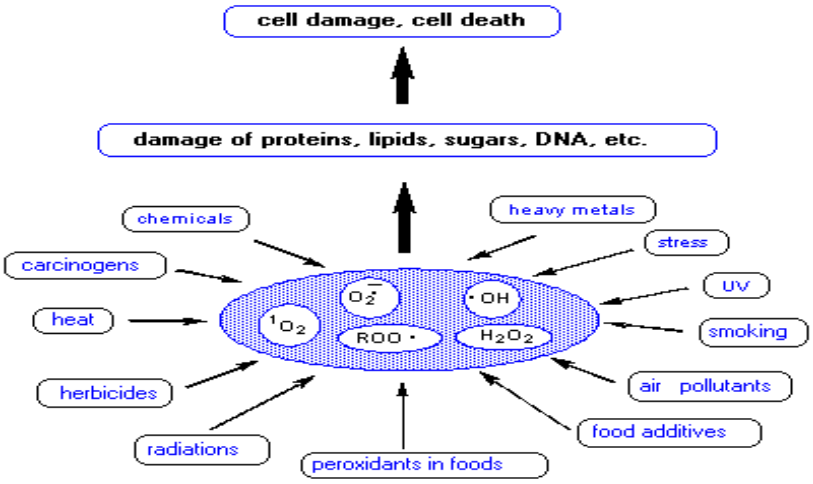


Figure 2. 프리라디칼 을 발생하는 환경인자

Inflammatory-immune injury
Glomerulonephritis (idopathic, membranous)
Vasculutis (hepatitis B virus, drugs)
Autoimmune diseases
Rheumatoid arthritis
Ischemia-reflow states
Stroke/myelocardial infarction/arrhythmias
Organ transplantation
Inflamed rheumatoid joint
Frostbite
Dupuytren's contracture
Dysberic osteonecrosis
Iron overload
Idopathic haemochromatisis
Dietary iron overload (Bantu)
Thalassemia and other chronic anemias treated with multiple blood transfusions
Nutritional deficiencies (kwashiorkor)
Alcoholism
Alcohol-induced iron overload
Alcohol myopathy
Radiation injury
Nuclear explosions
Accidental exposure
Radiotherapy
Hypoxic cell sensitizers
Aging
Disorders of premature aging
Red blood cells
Phenylhydrazine
Primaquine, related drugs
Lead poisoning
Protoporphyrin photooxidation
Malaria
Sickle cell anemia Multiple sclerosis
Favism
Fanconi's anemia
Hemolytic anemia of prematurity
Lung
Emphysema
Cigarette smoke effects
Bronchopulmonary dysplasia
Oxidant pollutants (O_3, NO_2)
Adult respiratory distress syndrome
Mineral dust pneumoconiosis
Asbestos carcinogenicity
Bleomycin toxicity
SO_2 toxicity
Paraquat toxicity

Heart and cardiovascular system
Alcohol cardiomyopathy
Keshan disease (selenium deficiency)
Atherosclerosis
Adriamycin cardiotoxicity
Kidney
Autoimmune nephrotic syndromes
Aminoglycoside nephrotoxicity
Heavy metal nephrotoxicity (Pb, Cd, Hg)
Gastrointestinal tract
Endotoxic liver injury
Halogenated hydrocarbon liver injury (bromobenzene, carbon tetrachloride, halothane)
Diabetogenic action of alloxan
Pancreatitis
NSAID-induced gastrointestinal tract lesions
Oral iron poisoning
Brain/nervous system/neuromuscular disorders
Hyperberic oxygen
Vitamin E deficiency
Neurotoxins, including lead
Parkinson's disease
Neuronal ceroid lipofuscinoses
Hypertensive cerebrovascular injury
Allergic encephalomyelitis and other demyelinating diseasesase)
Aluminum overload (Alzheimer's disease)
Potentiation of traumatic injury
Muscular dystrophy

Eye
Cataractogenesis
Ocular hemorrhage
Degenerative retinal damage
Retinopathy (retrental of prematurity fibroplasia)
Photic retinopathy
Skin
Solar radiation
Thermal injury
Porphyria
Hypericin, other photosensitizers
Contact dermatitis

Figure 3. 프리라디칼에 관련된 질병 (Cross, et al., 1987)

따라서 이러한 활성산소의 제거를 위한 항산화제를 통해 노화 (Guymer 와 Chong, 2006) 및 각종 질환의 억제 (Ito, *et al.,* 2006; Inatsu, *et al.,* 2006) 또는 치료제 (Attri, *et al.,* 2006; Arnott, 1997; Halliwell, *et al.,* 1989)로서 활용하고자 하는 노력이 활발하다. 항산화제 (antioxidants)는 전산화제 (prooxidants)와는 반대로 유지의 산화속도를 억제는 물질들이나 요인들로 일반적으로 항산화제 또는 산화방지제로 알려져 있다. 원래 항산화제란 식용 유지나 식품 중의 지방질 성분의 산패 (Afanas'ev, *et al.,* 1995)에만 관련된 용어는 아니며, 일반적으로 어떤 임의의 산화과정의 속도를 억제하여 주는 물질이나 요인이면 항산화제라고 표현할 수 있다 (Costa, *et al.,* 2006; Lin, *et al.,* 2005; Li, *et al.,* 2005). 항산화제를 산화나 전산화에 의한 산화반응 억제 물질로 규정하지만, Barry Halliwell은 “산화성 물질과 비견할 만한 낮은 농도에서 충분히 산화를 지연시키거나 방어할 수 있는 어떤 물질”이라고 포괄적으로 정의 내리고 있다 (Halliwell 와 Hoult, 1988). 또한 생물학적 관점에서 축소해석하면 항산화제는 생체 내에서 산화성 스트레스로 인하여 생성되는 산화물질의 불균화 및 산화 억제 기능을 위한 방어하는 물질 또는 효소라고 규정지을 수 있다 (Das, 1994; Ueda 와 Armstrong, 1996). 항산화제의 작용은 자가산화의 유도기에서 프리라디칼이나 peroxy-radical에서 hydroperoxide를 생성하는 속도를 효과적으로 억제하고 안정한 화합물로 전환시킴으로써 산화를 억제한다. 또한 항산화제는 hydroperoxide가 분해되어 최종 산화물인 carbonyl 화합물의 생성을 억제하는 효과가 없어 산화가 상당히 진행된 상태에서는 그 효과를 기대할 수 없다.

프리라디칼의 연쇄반응을 정지시키는 물질은 phenol성의 화합물이 다수를 이룬다. 이러한 항산화물질의 작용을 보면 유지의 자동산화의 생성물인 peroxy radical (R-OO˙)에 hydroxy radical (˙OH)를 제공하여 안정한 화합물로 전환시켜 프리라디칼의 연쇄반응을 억제한다 (Noda, *et al.*, 1997). 이때 항산화제는 프리라디칼이 되지만 비교적 안정한 phenol의 공명구조를 갖는다. 따라서 항산화제가 모두 소비되면, 또 자동산화의 연쇄반응이 시작된다. 결국 산화를 끝내 방지하는 것이 아니고, 산화에 이르기까지의 유도기를 연장시키는 작용이 있다.

$$ROO^{\cdot} + AH \rightarrow ROOH + A^{\cdot}$$

또한 peroxy-radical 생성 전에, 즉 기질 (RH)이 탈수소되어 프리라디칼이 생성되는데 이때 생성된 프리라디칼에 항산화제가 hydroxy radical (·OH)을 제공함으로서 radical 연쇄반응을 억제한다.

$$R^{\cdot} + AH \rightarrow RH + {}^{\cdot}A$$

$$A^{\cdot} + H^{\cdot} \rightarrow AH \text{ (synergist의 작용)}$$

항산화제에 대한 연구는 McCord와 Fridovich (1969)에서 superoxide radical을 소거하는 효소인 SOD를 발견한 것을 계기로 생체내의 활성산소의 발생, 생물독성 및 방어·소거기구 등에 관하여 관심을 갖게 되면서 본격적으로 진행되었다 (Park, *et al.,* 2005). 주로 식품 첨가물로서의 항산화제 개발을 위한 연구에서 최근 각종 질병 및 노화 등에 활성산소 및 과산화물이 직접적인 원인으로 작용한다는 사실이 밝혀지면서 항산화제 연구는 노화억제 및 질병치료제로서의 항산화제를 찾는 연구로 전환되고 있는 실정이다 (Fridovich, 1983; Fridovich, 1986; Challem, 1998). 호기성 생물에는 활성산소에 의한 산화적 손상을 방어하는 기구로서 라디칼 생성을 미연에 방지하는 예방적 항산화제 (preventive antioxidant)와 이미 생성된 radical을 빠르게 소거하는 연쇄절단형 항산화제 (chain-breaking antioxidant)가 있다.

전자에는 SOD, catalase, peroxidase 등의 효소류와 xanthine oxidase 저해제, 금속 chelator 등이 있다. 일반적으로 항산화제라 함은 지질의 과산화를 방지하는 작용을 가진 저분자화합물이라고 좁은 의미로 쓰이는 경우가 많으며, 연쇄절단형 항산화제를 일컫는다 (Lyon, 1971). 인체 내에서 항산화제로서 작용하는 방어체계의 분포와 특성을 요약하면 다음과 같다 (figure 4).

[항산화효소계]	
Superoxide dismutase (SOD)	전 조직세포
Cu/Zn 형	세포질, 적혈구내 (2,300 U/g Hb)
Mn 형	미토콘드리아내
Extracellular SOD	혈관 내피세포막 표면과 혈장 (활성은 낮다)
Catalase	Peroxisome, 적혈구내 (153,000 U/g Hb)
Glutathione peroxidase	세포질 (75%), 미토콘드리아 (25%), 적혈구내 (31 U/g Hb)
Glutathione reductase	NADPH로 glutathione를 환원형으로 유지
[결합단백질]	
Albumin (marcapt- and noncomercaptalbumin)	혈중농도는 0.5 mM로서 주요 'SH 기질', bilirubin복합체는 강한 항산화 활성을 나타낸다.
Ceruloplasmin	peroxidase 활성를 나타낸다. 15～60 mg/dl 혈장
Transferin	혈중 유리철 이온의 존재를 저지. 200～400 mg/dl 혈장
Ferritin	세포질내 유리철이온 농도를 저하시킨다.
[저분자 항산화물질]	
Glutathione	세포내외의 친수성구역에서 주요 항산화 작용. (세포내 2～10 mM, 동맥혈장 5～25 μM)
Vitamin C	친수성구역의 환원물질, vitamin E와 공동작업 0.7～2.5 mg/dl 혈장 (40～140 μM)
Vitamin E	세포막 지용성구역의 scavenger, LDL에 결합 0.5～1.6 mg/dl 혈장 (10～40 μM)
Uric acid	Adenosine 및 hypoxanthine의 최종대사산물. 강한 항산화 작용 (HO· 에 대하여) 2.6～7.5 mg/dl 혈장 (0.12～0.45 μM)
Bilirubin	Albumin에 결합하여 항산화 작용를 나타낸다.
CoQ	미토콘드리아 전자전달계의 성분, vitamin E의 재생.
기타 thiol계 화합물	cystein 등의 항산화 물질, GSH에 비해 적농도

Figure 4. 인체 내 항산화 방어계의 분포 및 특성

그리고 항산화제의 방어기작을 보면 예방적 기능, 라디칼 소거 기능으로 요약할 수 있다 (figure 5).

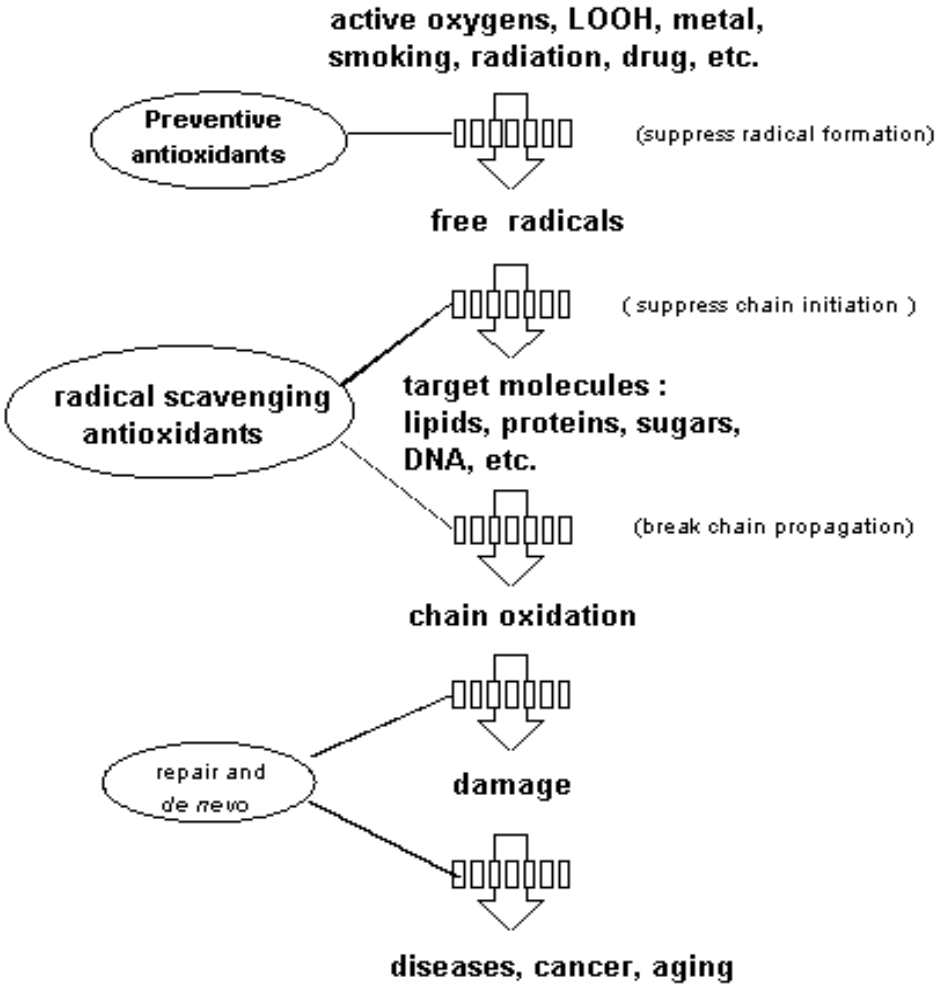


Figure 5. 프리라디칼에 의한 산화적 손상에 대항하는 항산화 방어

또는 크게 효소계와 비효소계로 분류할 수 있다. 이러한 분류는 유전인자에 의해 생성되는 단백질 효소와 화학물질인가의 차이로 구분된다. 전자를 생체 내에서 필연적으로 발생하는 악성 화학분자들을 억제하거나 그 기능을 발휘할 수

없도록 발달해온 유전적 특성으로 간주한다면, 후자는 외부로부터 섭취한 항산화 물질을 통해 방어할 수 있도록 갖추어진 체계이다. 모든 식용 물질 속에는 대부분 그 양의 정도에는 차이가 있으나 항산화제나 항산화 효소가 들어있다. 지금까지 알려진 항산화제는 수용성항산화제와 지용성항산화제, 그리고 항산화 효소로 나누어진다.

수용성항산화제인 bilirubin은 사람의 혈장 속에 약 5~20 μM 정도 들어 있으며 *in vitro* 실험에서 나타나듯이 비효소적 항산화성 방호 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (Hatfield 와 Barclay, 2004). Bilirubin의 항산화성 활성은 α-tocopherol보다 낮지만 산소농도가 낮은 조건하에서는 리소좀의 산화를 α-tocopherol보다 더 잘 억제시킨다. Bilirubin이 혈장 내 수용성 항산화제로서의 역할은 peroxyl radical로 유도된 linoleic acid의 산화를 효과적으로 억제하며, albumin의 광산화를 억제하며, xanthine oxidase로 매개되어 일어나는 근세포 손상 억제에서 잘 나타난다.

지용성항산화제인 Q-10 (Coenzyme Q-10)은 소의 심장에서 발견된 비타민의 일종으로 ubiquinone으로도 불린다. 그리고 ubiquinone의 환원형을 ubiquinol이라 부르며 높은 항산화력을 지닌다. Ubiquinone은 우리 몸 어디에나 분포되어있으며 에너지를 만드는 생체시스템에서 필요한 물질이다 (Michalkiewicz, 2006). Pycnogenol (PYC)은 oligomeric proanthocyanidins complexes 또는 polyphenol의 상표명이다. Pycnogenol은 화학물질이 아니며 적어도 40여 종류의 다른 물질로 구성되어 있다. Pycnogenol (PYC)는 French maritime pine bark (*Pinus pinaster* Ait.)에서 추출한 물질로서 다량의 polyphenol을 함유하고 있다 (Blazso, *et al.,* 1994; Blazso, *et al.,* 1995; Blazso, *et al.,* 1996; Blazso, *et al.,* 1997; Liu, *et al.,* 2004). 주성분으로서 catechin과 epicatechin을 단위로 하는 procyanidine으로 구성되어 있고 이에 taxifolin과 여러 종류의 phenolic acid로 구성된 bioflavonoids를 함유하고 있다.

항산화 효소들은 $O_2^{\cdot}$, H_2O_2 그리고 peroxide, $^{\cdot}HO$ 라디칼 등의 독성을 탈독성화 시키거나 억제시키는 기능을 지니고 있다. 이 중 catalase (hydrogen-peroxide : hydrogen-peroxide oxidoreductase)는 거의 모든 유기 호흡 생물에서 볼 수

있으며, 고 순도 상태로 분리된 효소 중 하나이다 (Hassan 와 Fridovich, 1978). Catalase는 서로 다른 세포형태에 따라 그 존재 위치가 다른데 간이나 신장의 peroxisome에서처럼 부세포 기관 내에 존재하거나 microperoxisome에서처럼 훨씬 더 작은 소기관내에 존재한다. E. *coli* 경우는 HP I 과 HP II (Hydroperoxidase)로 불리는 두 개의 catalase 또는 hydroperoxidase를 지니고 있다. HP I 은 2개의 protoheme IX 그룹을 지니는 84 kd의 동일 소단위의 tetramer로 catalase-peroxidase의 이중기능을 가지고 있으며, 이는 katG에 의해 발현되어지고, HP II는 93 kD의 동일 소단위의 Hexamer로써 한 단위당 하나의 heme를 지니는 단일 기능을 하며 (Loewen 와 Switala, 1986), HP II의 합성은 37.8 min에 위치한 katE (Loewen, 1984)와 59.0 min에 위치한 katF (Loewen 와 Triggs, 1984) 에 의해 영향을 받는다.

산화적 스트레스가 노화를 비롯하여 각종 질환을 일으키는 중요한 원인임이 입증됨으로써 프리라디칼 소거활성을 갖는 항산화제의 노화억제 및 질환의 치료제로서 가능성이 크게 부각되고 있다 (Johnson, *et al.,* 1988; Kedziora 와 Bartosz, 1988; Kim, *et al.,* 1997; Koshino, *et al.*, 1996). 그러나 천연 및 합성 항산화제는 의약품 또는 연구시약으로 사용되어 그 활용가능성을 늘여가고 있으나, 독성 및 *in vivo* 계에서의 여러 가지 문제점으로 인하여 산화적 스트레스에 의한 노화 및 각종 질병의 치료용 의약품으로서의 사용에 한계를 지니고 있다 (Kuhnau, 1976; Laughton, *et al.*, 1989). 이러한 한계를 보고 본 연구에서는 과연 이러한 항산화제가 *in vivo* 에서의 독성과 *in vitro* 상에서 어떤 차이를 보이는지를 확인하여 항산화제의 활성도와 이들의 활용가능성을 구명하고자 한다. 어떠한 생물체라도 DNA를 가지고 있고, 이 DNA를 통해 생물체의 특성을 짓게 된다. 이 중요한 물질은 세포 내부에 존재하고 있지만 그 생물체가 접하게 되는 환경에 따라 여러 위험 물질에 노출이 되기도 한다.

산소라디칼은 세포 내에서 독성을 야기시키는 주요 요인으로서 단백질의 티올 그룹 (thiol group)의 산화를 유발하여 투과막 대사산물과 이온 수송과 같은 효소의 기능을 상실시키고 (Misra, 1974), 다불포화 지방산 지질과 콜레스테롤의 과산화물 형성으로 인한 막의 투과성 성질의 변화를 초래하며 (Halliwell 와 Gutteridge, 1984), 핵산의 산화적 분리로 (Adelman *et al.,*

1988) 돌연변이 (Storz *et al.,* 1987), 발암 (Cerutti *et al.,* 1988), 세포의 분화를 일으키는 체세포 손상 (Bradley, *et al.,* 1981; McBride, *et al.,* 1991)을 초래한다. 라디칼은 매우 불안정한 물질로 반응성이 크며, 수명도 짧아 10^{-3} ~ 10^{-9}/초의 수명을 가지고 있는데 이는 다른 반응에 비해 라디칼이 관여하는 반응은 활성화 에너지가 매우 작기 때문인 것으로 알려져 있다. 생체 내에서 라디칼은 여러 가지 원인에 의해 만들어진다. 과산화효소에 의해 라디칼이 만들어지기도 하는데 지질과산화 효소는 지방을 과산화지질로 만들어 라디칼을 생성하기도 하며, xanthine과 xanthine oxidase가 직접 하이드록실 라디칼 (이하 $^{\cdot}OH$로 표시)을 생성하는 명백한 증거가 없으며 오히려 킬레이트성 물질이 xanthine oxidase와 결합하여 chelated xanthine oxidase로 변화되어 $^{\cdot}OH$을 생성한다고 보고하였다 (Bradley 와 Sovitj, 1989). 한편 중금속같이 라디칼이 쉽게 생성되는 물질을 섭취하였을 때 라디칼이 만들어 진다 (Morel, *et al.,* 1993). 생체 내에서의 라디칼은 반응성이 매우 커서 조직이나 세포 내에 들어가 세포조직을 파괴하기도 하며 (Kvietys, *et al.,* 1989; Hong, *et al.,* 1989), 또한 체내에서 생성된 슈퍼옥사이드 ($O_2^{\cdot}$)와 $^{\cdot}OH$이 세포조직을 파괴하는 것으로 알려져 있는데 (Aruoma, *et al.,* 1989; Floyd, *et al.,* 1986; Floyd, 1990a), Okezie는 $O_2^{\cdot}$와 $^{\cdot}OH$이 DNA의 염기 구조에 손상을 준다고 보고하였다 (Diwadaroglu, *et al.,* 1990). $O_2^{\cdot}$와 $^{\cdot}OH$은 주로 Fenton 반응에 의해서 생성되는 철이온 (Ⅲ)과 과산화수소수의 반응식으로서 반응식은 아래와 같다.

$$Fe^{3+} + EDTA + 2H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+}\text{-}EDTA + O_2^{\cdot} + 2H^{+}$$
$$Fe^{3+}\text{-}EDTA + O_2^{\cdot} \rightarrow Fe^{2+}\text{-}EDTA + O_2$$
$$Fe^{2+}\text{-}EDTA + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}\text{-}EDTA + {}^{\cdot}OH + {}^{\cdot}OH$$

금속이온이 라디칼 생성에 미치는 영향은 금속이온의 산화환원반응에 의해 과산화수소수에서 $^{\cdot}OH$이나 $O_2^{\cdot}$를 생성하는 것으로 알려져 있다. 또한 $O_2^{\cdot}$는 Cr (Ⅳ)과 반응하여 $^{\cdot}OH$나 $^{\cdot}OH$ 라디칼을 생성하게 된다.

$$O_2^{\cdot} + Cr\ (Ⅳ) \rightarrow Cr\ (Ⅴ) + O_2$$
$$Cr\ (Ⅴ) + H_2O_2 \rightarrow Cr\ (Ⅳ) + {}^{\cdot}OH + {}^{\cdot}OH$$

위의 반응식을 더하면 아래와 같다.

$$O_2^{\cdot} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + {}^{\cdot}OH + {}^{\cdot}OH$$
$$O_2^{\cdot} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + {}^{\cdot}OH + {}^{\cdot}OH$$

Cr (IV)은 과산화수소수에서 라디칼생성반응을 촉진시키는 촉매로서 작용한다. 즉, 과산화수소수의 라디칼 생성 반응에서 Cr (IV)은 촉매로서 작용하며, 반응속도를 증가시킨다. 또한 NADH와 NADH oxidase에 의해 라디칼이 생성되는데 이 때의 반응을 Harber-Weiss 반응에 의해서 진행된다.

체내에서 생성되는 $O_2^{\cdot}$는 superoxide dismutase에 의해 라디칼이 소멸되는데 그 때의 반응은 다음과 같이 진행된다.

$$O_2^{\cdot} + O_2^{\cdot} + 2H^{+} \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

이러한 산화성 물질에 대한 제거 작용과 금속이온에 대한 킬레이트 작용에 의하여 항산화 작용을 갖고 있는 물질이 세포 성분의 산화성 손상을 억제한다고 추정하고 있다 (Fong, *et al.,* 1976). 이들 항산화제는 ·OH나 $O_2^{\cdot}$같은 반응성 산소대사물과 metal ion-oxygen 복합체에 대한 제거 작용을 통하여 금속이온에 의한 손상을 억제할 것으로 추정된다.

$$O_2^{\cdot} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + {}^{\cdot}OH + {}^{\cdot}OH$$

이와 같이 활성산소라디칼은 일차적으로 산화적 손상을 유발시키고, 라디칼 자체의 연속된 반응을 통해 다른 반응성산소라디칼, 즉 과산화수소 (H_2O_2)와 수산화라디칼 (·OH)을 형성하는데 이들 또한 생명체에 매우 위협적인 존재이다 (Demple, *et al.,* 1991; Imlay 와 Linn, 1986, 1988). 활성산소 라디칼은 일련의 연속된 반응 중에 형성되며 그 자체가 계속되는 것이 아니라 *in vivo* 상태에서 연구하는 것은 쉽지 않다. 따라서 *in vitro* 상에서 금속이온을 이용하여 인위적으로 라디칼을 형성한다. 생물에게 있어 라디칼에 의해 유도되는 DNA 손상은 세포의 손상과 더불어 나타나는 필연적인 결과로서 생명체에 치명적인 영향을 일으킨다는 점이 무엇보다 중요하다.

본 실험에서 사용된 항산화제인 Pycnogenl (PYC)는 PYC는 식물에서

천연적으로 생성되는 수용성 플라보노이드 (Gazella, 1998)로 현재 소나무 표피라던가 포도씨와 포도 껍질 그리고 cranberries에서 분리할 수 있는 bio-플라보노이드 로 주목받고 있다 (Rohdewald, *et al.*, 1998). 현재까지 연구된 PYC의 생리작용은 항산화제 (Grimm, *et al.*, 2004), 대사생리조절 (Devaraj, *et al.*, 2002; Virgili, 1997), 세포기능조절 (Packer, 1994, 1997; Veurink, *et al.*, 2003), LDL산화억제(Passwater, 1994), 지질산화억제 (Nelson, *et al.*, 1998), 항염증 작용 (O'Brien, 1997) 등으로 요약될 수 있다. PYC는 항산화 물질로서의 역할에 대한 연구 (Rong, 1995; Passwater 와 KandaswaWmi, 1994)가 지속적으로 이루어지고는 있지만 아직 암세포에 대한 영향에 대해서는 연구가 미비하다 할 수 있다 (Watson, *et al.*, 1998).

이에 따라 실험에 사용된 fibrosarcoma는 soft tissue sarcoma중 가장 흔하여 중년, 노년층에 남·여 모두에게서 발견되는 원발성 암세포로 fibroblast의 배열모양이 herringbone pattern (tumor cell의 배열이 생선가시모양으로 된다)으로 큰 방추형의 섬유아세포들이 다양한 크기의 묶음으로 얽혀져 있는 섬유아세포 유래의 악성종양으로 구분되어 성장속도가 빠르고 침윤성과 확산 전이가 빠르다 (Miki, *et al.*, 2000). 이에 실험에 사용하여 단시간내에 세포 포집과 결과 관찰이 용이하였기에 Human fibrosarcoma cell인 HT1080세포를 사용하게 되었다.

본 연구에서는 기존에 개발되어 시중으로 유통되고 있는 항산화제 중 6가지를 선별하여 *in vitro* 상에서 금속이온을 선택하여 손상을 입은 경우 어떤 효과가 있는 지를 실험 해본 결과 가장 심하게 DNA의 손상을 일으킨 PYC를 중심으로 인간의 Fibrosarcoma 세포에서 금속이온의 독성에 따른 DNA의 손상 정도에 어떤 효과가 있는 지를 규명하고자 한다. 따라서 본 연구에서는 먼저 *in vivo* 상에서의 세포들의 금속이온과 항산화제로 알려진 플라보노이드 계열의 Pycnogenol (PYC)을 첨가하여 이에 따른 반응을 보고, 세포의 손상정도를 DNA를 추출하여 ELISA 와 high performance liquid chromatography (HPLC)를 통해 측정하고자 한다. 그리고 *in vitro* 상에서는 Plasmid DNA에 직접적으로 금속이온으로 라디칼을 형성시켜, 항산화제와 함께 처리하였을 때의 DNA 손상 정도를 electrochemical detecter (ECD)를 이용한 high performance liquid

chromatography (HPLC)로 DNA의 산화적 손상지표인 8-OHdG (Floyd, 1990b)의 측정을 통해 분석함으로서, 중금속에 관한 DNA손상 정도와 중금속과 PYC를 함께 처리하였을 때를 비교하고자 한다. 이를 통해 *in vivo* 와 *in vitro* 상의 차이를 이해하고, PYC의 암세포에 적용 가능성을 탐구해 보고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시 약

1) 항산화제 및 금속이온

본 실험에 사용된 시약은 플라보노이드 계열의 항산화제인 Sigma사의 Bilirubin ($C_{33}H_{36}N_4O_6$), Astaxanthin ($C_{40}H_{52}O_4$), Coenzyme Q-10 ($C_{59}H_{90}O_4$), Butylated Hydroxytoluene (BHT=2,[6]-Di-tert-Buthl-p-cresol, $C_{15}H_{24}O$) 와 Catalase (from bovine liver)를 사용하였고, 다른 항산화제인 Pycnogenol (PYC, US patent # 4,698,360)는 신선한 해송에서 추출하여 파우더 형태로 만든 제품을 사용하였다. 항산화제를 녹인 유기 용매제로는 Sigma 사의 DMSO를 사용하여 각각 1 M의 원액을 만들어 실험 전에 3차 증류수로 희석하여 사용하였다. 금속이온으로는 Sigma사의 Copper Chloride ($CuCl_2$), Ion Chloride ($FeCl_2$)를 사용하였다. 모든 시약은 사용 전에 필터 (ADVANTEC, Inc., Dublin, CA, USA)를 통해 걸러낸 후 사용하였다.

2) 세포 배양 및 추출

DNA용 Buffer에 들어간 시약은 DNA 및 금속이온의 용매제로 Ambion사의 20X tris-buffer를 사용하였다. Buffer의 희석은 Mili-Q로 증류한 3차 증류수를 필터 (ADVANTEC, Inc. Dublin. CA. USA)를 사용하여 이를 필터하고 autoclave로 120 ℃에서 15 min 간 멸균한 증류수로 1X의 Tris-buffer (Ambion, USA)로 만들어 사용하였고, 실험에 사용된 Plasmid DNA는 pBR322이 형질전환된 E. *coli* (DH 5α-pGem R-eawy, hGMCSF[Hind Ⅲ], Chunnam National University)에서 QIAGEN의 DNA plasmid purification, plasmid midi kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 추출, 1X의 Tris-buffer (Ambion, USA)로 녹여 실험하였다. HT1080 (human fibrosarcoma cell, Dr. Lee at Medical Centre of Chunnam National University)은 실험하기 3일 전 액체질소에 저장되어있던 균주을 배양을 한 후

실험 전 cell counter로 cell counting (MTT와 XTT용에는 $5X10^4$ 세포를 사용, HPLC와 ELISA용에는 $1X10^6$ 세포를 사용)하여 사용하였다. HT1080의 배양은 CO_2 incubator에서 37 ℃, 18시간 배양시켰다. 이때 사용된 배양액은 Gemini사의 세포 배양용 배양액, serum, antibiotics, $NaHCO_3$ (cell culture grade, Sigma), Culture flask or dishes, PBS (cell culture grade, Gemini), Trypsin 혹은 Trypsin-EDTA (BRL사의 trypsin-EDTA는 0.5 % trypsin, 5.3 mM EDTA으로 판매되며 이를 PBS로 10배 희석하여 1X trypsin-EDTA로 사용한다.), 배양된 세포는 Hemocytometer 및 cell counter로 측정했다. HT1080의 DNA에 추출은 Protease K (QIAGEN, USA), RNase A (Sigma, USA), Nuclease P1 (Sigma, USA), Alkaline phosphatase (Takara kit, Japan), DNase 1 (Sigma, USA), Lysis buffer (mixture)를 사용하여 Freshney (1987)의 방법에 따라 분리하였다. DNA의 정량은 DNA concentrater (promega, USA)를 사용하였다.

3) HPLC와 ELISA

HPLC로 8-OHdG를 분석하기 위한 용매로 20 %의 mobile phase와 5 %의 methanol의 running buffer를 사용하였다. HPLC의 mobile phase는 Sigma사의 23 mM의 citric acid, 42 mM의 sodium acetate, 50 mM의 sodium hydroxide, 1 ml/L의 acetic acid의 조성으로 만들었으며, Aldrich사의 Methanol을 사용하였다. 8-OHdG 측정 시 Ethanol을 사용하여 column을 씻어준 후, 8-OH-2'-dG standard에 Rnase A (50 ㎍/ml), Nuclease P1 (1,800 unit/ml)를 첨가하여 배양기에서 1시간동안 반응시킨 것을 사용하여 8-OHdG의 기준을 잡았다. Buffer를 만들 때 사용된 증류수는 Mili-Q 증류수 제조 장치로 얻은 3차 증류를 사용, 필터 (ADVANTEC, Inc., Dublin, CA, USA) 후, autoclave로 120 ℃에서 15 min간 멸균하여 사용하였다. 이때 사용된 column은 ultrasphere ODS column (4.6 ㎜ X 25 ㎝. Beckman사)를 이용하였다. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)는 waters breeze (lc-10vp, Waters Co. Ltd.)를 사용하였으며, electrochemical detection (ECD)는 L-ECD-6A (Shimazu Co. Ltd.)를 사용하였다.

8-OHdG의 측정에 사용된 ELISA는 COSMOBIO사의 Highly Sensitive 8-OHdG Check kit를 사용하였다.

2. 금속이온과 항산화제에 의한 DNA 손상

금속이온에 따른 DNA의 손상과 항산화제의 방어 효과를 규명하기 위하여 pBR322 플라스미드를 사용하였다. 이 plasmid의 크기는 3.4 kb이다.

DNA에 반응 시킬 시료로 금속이온은 Cu^{2+} (Copper Chloride, $CuCl_2$)과 Fe^{2+} (Ion Chloride, $FeCl_2$)을 사용하였다. 이 금속이온은 1X tris-buffer에 녹여 각각 1 mM의 원액을 만들어 사용하였고, 항산화제인 PYC는 1 ㎍/ml, 10 ㎍/ml, 100 ㎍/ml를 DMSO를 사용하여 원액으로 만들어 사용하였다. 그리고 Bilirubin, Astaxanthin, Coenzyme Q-10, Butylated Hydroxytoluene (BHT)와 Catalase는 DMSO를 사용하여 1 mM의 원액을 만들어 사용하였다.

시료의 양은 총 부피 20 ㎕에서 Plasmid DNA는 1 ㎍/ml로 정량하여 냉동 보관된 DNA를 0.5 ㎍/ml씩 사용하고 (약 0.5 ㎕), 금속이온인 $CuCl_2$, $FeCl_2$는 1X tris- buffer에 녹여 각각 1 mM/ml의 원액으로 보관된 것을 200 μM/ml의 농도가 되도록 사용했다 (4 ㎕). Pycnogenol (PYC)은 1, 10, 100 ㎍/ml의 원액을 만들어 놓고 1, 3, 5, 10, 20, 50, 100 ㎍/ml. 그리고 Bilirubin, Astaxanthin, Coenzyme Q-10, BHT는 1 mM/ml의 원액을 만들어 각각 200 μM/ml씩을 처리 (4 ㎕), Catalase는 1,000 unit/ml의 원액을 만들어 놓고 200 unit/ml씩 사용했다 (4 ㎕). 결과적으로 1.5 ml EP tube에 총량을 20 ㎕으로 하여 시료들을 제외한 나머지 량은 autoclave 후 filteration (ADVANTEC, Inc., Dublin, CA, USA)한 3차 증류수로 고정했다.

Tube에 시료와 D.W.를 넣고 37 ℃ incubator에 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 0.8 % agarose gel에 20분간 전기 영동하여 EtBr (ethidium bromide)로 5분간 염색하여 image master (Pharmacia Biotech, USA)로 측정했다.

3. Pycnogenol의 Fibrosarcoma에서의 세포생존률 측정

1. Animal cell culture

1) 배양액 제조

먼저 실험에 사용되는 배양액은 Harrison (1989)의 방법을 따랐다. 배양액은 Gemini사의 FBS (Fetal Bovine Sera)를 사용하였다. 배양액은 DMEM powder 1 pack, Sodiun Biocarbonate powder ($NaHCO_3$), Antibiotics (BRL), Fetal calf serum (FCS), 1.0 N NaOH 및 1.0 N HCl (세포 배양용)을 섞어, Bottle top filter로 필터링한 후, 멸균한 500 ml bottle에 담아 4 ℃에 보관했다. 기타 사용하는 모든 시약들은 cell culture grade의 제품을 사용했다.

배양액 제조방법은 DMEM 1 pack을 3.7 g의 $NaHCO_3$와 함께 4차 증류수 1 liter에 교반하여 완전히 녹인 후 NaOH와 HCl을 이용하여 pH 7.2로 고정했다. Filtering 장치를 culture bench 안에 setting하고 무균적인 조건을 유지하면서 clean bench에서 Stirring 하여 완전히 녹인 pH 7.2의 DMEM을 filter하였다. Filtering 한 배양액을 멸균해 놓은 bottle 2개에 450 ml로 나누고, 남은 100 ml의 배양액은 멸균한 cornical tube에 보관하였다가 transfection 등 serum free 배양액이 필요할 때에 사용하였다. 450 ml에 FCS 50 ml, antibiotic antimicotics. (AA; Gibco.BRL)을 5 ml를 첨가하고 표기한 뒤 4 ℃에 보관하며 사용하였다.

2) Serum inactivation

Serum은 사용하기 전에 비활성화의 전처리를 하기위해서 Serum을 56 ℃에서 30분 동안 가열하여 serum 속에 존재하는 항체 및 조성 물질을 불활성화 시켰다. 본 실험에서 이용한 HT1080 세포의 배양을 위해 serum을 비활성화 시켰으며, Serum은 50 ml 씩 cornical tube에 나누어 놓고 -20 ℃에 보관하여 유지했다.

먼저 냉동상태의 serum을 먼저 상온에서 완전히 녹이고, water bath는 56 ℃

로 조절시켰다. 이때 serum 이 들어있는 용기와 같은 용기에 증류수를 500 ml 채우고 온도계를 설치했다. 그리고 이 증류수 병과 serum bottle을 함께 water bath에 담근 후 증류수가 56 ℃될 때부터 30분간 water bath에 방치하여 사용했다 .

3) Cell Plating

HT1080 세포는 ATCC (American type culture collection) 에서 구입하였으며, 성장배지 (serum, 항생제, 배양액)를 제조하고 사용하기 30분 전에 미리 37 ℃ water bath에 담가 두어 배양액의 온도를 37 ℃가 되게 준비. 받은 cell storage vial 을 floating rack에 끼우거나 뚜껑 부분을 손으로 잡고 37 ℃ water bath에 잠시 담가 녹인다. 녹기 시작하면 즉시 꺼내 cell culture bench 에서 10 cm culture dish에 배양액을 10 ml 넣고, Pasteur pipette 이나 blue tip 등 끝이 뾰족한 pipette을 이용하여 vial 속의 내용물을 옮기고 suspension 했다. Culture flask를 사용할 경우 뚜껑을 완전히 잠그지 않고, 뚜껑을 헐겁게 닫아 배양기 내에서 CO_2 교환이 잘되도록 조절했다. CO_2 배양기에서 배양 후 24 시간이 된 세포를 포집하여 세포가 바닥에 붙어 살아있음을 확인하고 새로운 배양액으로 교환했다.

4) Cell Maintaining

바닥에 붙어있는 세포들은 분열을 하여 서서히 성장하게 되는데, 이때 세포의 성장에 필요한 영양소 및 성장인자 등은 배양액으로부터 공급 받으므로, 2 내지 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교체했다. HT1080 세포의 항산화제와 금속이온에 따른 세포증식 효과를 보기 위해 XTT와 MTT를 병행하여 실험하였다. 이를 위해 cell counting을 통해 $5X10^4$의 세포수가 되도록 조절하여 96 well의 growth dish에 계대배양을 시행했다. 그리고 HPLC와 ELISA에 사용될 HT1080 세포는 6 well의 growth dish에 $1X10^6$로 cell counting 하여 계대배양을 시행했다.

먼저 사용할 PBS (phosphate buffered saline)와 배양액, 그리고 1X trypsin-EDTA 를 37 ℃ water bath에 담가 놓아 사용 전 37 ℃가 되도록 조정하였다. 기존의 배양용 배양액을 모두 분리하여 제거해 내고 PBS를 5 ml를 가하였다.

뚜껑을 덮고 dish를 살짝 흔들어 모든 면에 PBS가 퍼지도록 하고 이 PBS를 분리하여 제거하였다. 남아있는 배양액 및 serum을 모두 제거하고자 PBS 세척을 한번 더 반복하였다. 37 ℃ 의 trypsin-EDTA solution을 1 ml를 가하여 dish의 표면이 모두 덮이게 하였다 (10 cm dish 기준, 0.5 - 1 ml).

표면이 모두 덮인 것을 확인한 후 dish의 뚜껑을 닫고 옆면에 약간의 두드림을 주어 세포가 바닥에서 떨어지게 유도 하였다. trypsin-EDTA solution으로 세포가 떨어진 것을 확인하고 배양액을 5 - 10 ml 넣고 well의 바닥을 씻어 주어 혹시 남아있을 지도 모르는 세포까지 모두 포집한 후, 50 ml cornical tube 로 옮긴 후 pipette으로 몇 번 up and down 하여 세포가 단일세포들로 잘 분산될 수 있도록 하였다. 세포를 포집하기 위해 사용한 trypsin을 제거를 위해 약 200 Xg 정도에서 2분 정도 약하게 원심분리를 한 후, 상층의 배양액을 분리하여 제거해 내고 배양에 사용할 배양액을 5 ml 정도 넣고 pipette으로 현탁시켰다. 여기에 70 ml의 배양액을 가해 다시 잘 섞어준 다음 0.1 ml씩 96 well의 dish에, 2 ml씩 6 well의 dish에 각각 나누어 넣었다. 각기 나누어 담은 dish는 흔들리지 않도록 조심하면서 37 ℃의 CO_2 배양기에 넣고 18시간동안 배양하였다.

2. MTT와 XTT

세포을 나눈 것 중 96 well에 계대배양을 해 over-night한 dish에 MTT와 XTT를 하여 세포생존율과 증식율을 측정하였다. MTT assay의 실험원리는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. XTT의 실험원리는 dehydrogenase를 통하여 생세포의 활성을 측정하는 방법, XTT에 첨가되는 PMS (phenazine methosulfate)는 일종의 electron coupling agent로서 bioreduction을 증가시키게 된다. 생세포에 XTT와 PMS를 첨가하면 생세포의 mitocondrial dehydrogenase에 의해 XTT의 tetrazolium ring이 분해되어 formazan crystal을 생성하게 되며, formazan crystal은 수용액에 녹아 오렌지

색을 나타내게 된다.

본 실험을 위해 먼저 MTT는 96 well dish에 각 농도의 금속이온, PYC와 배지 혼합액을 분주하고 24시간 배양 후 5 mg/mol 의 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dephenyltetrazolium bromide] 시약을 well당 25 ㎕를 첨가해 4시간 더 배양한 후 ELISA reader (Mac. USA)에 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

XTT는 96 well dish에 각 농도의 금속이온, PYC와 배지 혼합액을 분주하고 24시간 배양 후 미리 37 ℃에서 완전 용해된 용액을 1 ml의 XTT 용액 (JBI XTT kit)과 20 ㎕의 PMS 용액 (JBI XTT kit)으로 혼합하여 사용 후 14시간동안 CO_2 배양기에서 반응시킨 후 ELISA reader에 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 MTT와 XTT 모두 빛을 받을 경우 결과 나오지 않게 되므로 암실에서 실험하였다. 금속이온인 $CuCl_2$와 $FeCl_2$는 1 mM/ml의 원액을 만들어 놓고, 200 μM/ml의 농도로 넣어주는데 MTT와 XTT는 96 well의 dish에서 행하므로 0.2 ml가 넘지 않도록 계산하였다. PYC는 1, 10, 100 ㎍/ml의 원액을 먼저 만들어 놓고, 1, 3, 5, 10, 20, 50, 100 ㎍/ml의 농도로 처리했다.

4. 항산화제의 HPLC와 ELISA를 통한 8-OHdG 생성 확인

1. HPLC

실험 전 계대배양 해 놓은 6 well의 dish들에 HT1080세포에 금속이온인 $CuCl_2$와 $FeCl_2$는 1 mM/ml의 원액에서 각 tube 당, 전체 부피당 200 μM/ml의 농도가 되도록 넣어주었다. Bilirubin, Astaxanthin, Q-10, BHT는 1 mM/ml의 원액에서 200 μM/ml의 농도를 넣고, Pycnogenol (PYC)은 100 ㎍/ml의 원액에서 10 ㎍/ml의 농도를 넣고, Catalase는 1,000 unit/ml의 원액에서 200 unit/ml이 되도록 넣어 24시간동안 37 ℃, CO_2 배양기에서 반응시켰다.

반응이 끝난 후 배양액을 모두 분리, 제거한 후 PBS 1 ml를 가하였다. 뚜껑을 덮고 dish를 살짝 흔든 후 PBS를 suction으로 제거했다. 37 ℃ 의 trypsin-

EDTA solution을 소량 가하여 dish의 표면이 모두 덮이게 한 후(10 cm dish 기준, 0.5 - 1 ml), 약간의 두드림을 주어 세포가 바닥에서 박리되도록 했다.

증류수를 0.1 ml 더 첨가 하여 포집하여 pipette으로 1.5 ml tube로 옮겨 원심분리 (5,000 rpm, 2 min)를 하여 세포를 포집하여 세척한 후, lysis buffer (5 M Guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 100 mM 2-mercaptoethanol, 2000unit protease K, 50 ㎍/ml RNase A)를 0.2 ml씩 넣고 1시간동안 실온에서 반응시켜 세포를 분해했다. 그 후 동량의 isopropyl alcohol을 첨가하고 ice에서 1시간 후 원심분리 (14,000 rpm, 4 ℃, 20 min)시켜 상층액을 제거하고 70 % ethanol로 세척했으며, 원심분리를 통해 알콜을 제거하고 추출했다. 그리고 최종 1X tris-buffer로 녹여 정량했다. 그리고 HT1080 세포의 DNA 량은 값은 0.5 ㎍/ml로 정량하여 사용하였다.

정량된 HT1080의 DNA는 HPLC-ECD system (Breeze, USA)을 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 column은 ultrasphere ODS column (4.6 ㎜ X 25 ㎝. Beckman사), 8-OHdG는 8-OHdG standard (Shigma)를 사용하여 프로토콜에 따라 조정하였다.

8-OHdG를 분석하기 위한 용매로 20 %의 mobile phase와 5 %의 methanol의 running buffer를 사용하였다. Mobile phase의 조성은 23 mM의 citric acid, 42 mM의 sodium acetate, 50 mM의 sodium hydroxide, 1 ㎖/L의 acetic acid을 사용하였고, 분석조건은 column의 bath 온도는 35 ℃, pressurization 시간은 15 min, 속도는 1 ml/min, 시료의 양은 5 ㎕를 이용했다. 검출 된 8-OHdG의 양은 4 min대의 peak의 높이를 측정하였다. 8-OHdG 측정 시 peak의 겹침 현상을 방지하기 위해 시료 측정 후 3차 증류수를 주입해 column을 씻은 후 다음 시료를 주입하여 사용했다.

2. ELISA

전날 계대배양 해 놓은 6 well의 dish들에 금속이온과 PYC를 넣고 24시간 CO_2 배양기에서 반응 시켰다. HT1080 세포에 $CuCl_2$와 $FeCl_2$는 1 mM/ml의 원액에서 각 tube 당 200 μM/ml의 농도가 되도록 고정시켰다. Pycnogenol (PYC)는 1, 10,

100 ㎍/ml의 원액에서 1, 5, 50, 100 ㎍/ml의 농도로 각각 조절했다. 그리고 24 시간동안 37 ℃, CO_2 배양기에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 배양용 배양액을 모두 제거해 내고 PBS 1 ml를 가했다. 뚜껑을 덮고 dish를 살짝 흔든 후 PBS를 suction으로 제거한다. 37 ℃ 의 trypsin-EDTA solution을 소량 가하여 dish의 표면이 모두 덮이게 한 후 (10 cm dish 기준, 0.5 - 1 ml), 약간의 두드림을 주어 세포가 바닥에서 떨어지게 했다. 증류수를 0.1 ml 더 첨가 하여 pipette으로 1.5 ml EP tube로 옮겼다. 원심분리 (5,000 rpm, 2 min)를 하여 세포를 모와 세척을 하고 lysis buffer (5 M Guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 100 mM 2-mercaptoethanol, 2,000 unit protease K, 50 ㎍/ml RNase A)를 0.2 ml씩 넣고 1시간동안 실온에서 반응시켜 세포를 분해시켰다. 이때 동량의 isopropyl alcohol을 첨가하고 ice에 1시간동안 반응시킨 후 원심분리 (14,000 rpm, 4 ℃, 20 min) 시켰다. 상층액을 제거하고 70 % 알콜로 세척시켰다. 최종적으로 1X의 tris-buffer로 녹여 정량했다. HT1080 세포의 DNA의 정량한 값은 0.5 ㎍/ml로 환산했다. 이 정량한 DNA를 ELISA로 실험하여 ELISA reader기로 측정했다.

실험 전 미리 primary antibody 와 the primary antibody solution을 섞어 준비 한 후, 추출한 HT1080 DNA 시료를 50 ㎕씩 각 well에 넣어주었다. 준비된 primary antibody를 각 well에 50 ㎕씩 넣고 뚜껑을 닫고 잘 흔든 후 over night incubate하여 primary antibody와 시료를 부착시켰다. Well에 들어 있는 상층액을 제거한 후 250 ㎕ washing solution으로 각각의 well을 잘 씻어 주었다. 이를 3번 반복하여 남은 antibody를 완전히 제거하였다. Secondary antibody와 secondary antibody solution을 실험 직전에 만들어 100 ㎕씩 각 well에 넣고 잘 흔든 후, 실온에서 1시간동안 반응시켰다. Well에 들어 있는 상층액을 제거한 후 250 ㎕ washing solution으로 각각의 well을 잘 씻어 주었다. 이를 3번 반복하여 남은 antibody를 완전히 제거하였다. Chromatic solution (enzyme substrate solution)을 1/100으로 희석제에 희석하여 각 well에 100 ㎕씩 넣고 어두운 곳에 두고 실온에서 15 min간 반응시켰다. Reaction terminating solution을 100 ㎕을 첨가하여 잘 흔들어 주어 반응의 종결을 시켰다. 실온에서 5분 반응 후 ELISA reader에 넣고 450 nm의 흡광도로 측정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 금속이온과 항산화제에 의한 DNA 손상정도

항산화제를 처리하였을 때의 반응을 보기위해 bilirubin, astaxanthin, Q-10, catalase, PYC, BHT를 0.2 mM의 $FeCl_2$와 0.2 mM의 $CuCl_2$ 을 처리하여 1시간동안 37℃의 배양기에서 반응시켰다 (Figure 6). Plasmid DNA는 Fe^{2+}와 Cu^{2+}만 처리하였을 때 단일가닥이던 DNA가 두 가닥으로 끊어지는 것을 확인할 수 있다. 여기에 항산화제인 bilirubin, astaxanthin, Q-10, BHT를 0.2 mM 농도로, catalase는 200 unit/ml, PYC는 20 ㎍/ml를 처리하면 DNA의 손상이 더 심해지는 것을 볼 수 있다. 기존에는 항산화제가 ·OH를 제거하여 DNA 상의 손상을 줄이는 것이라는 결과가 있었지만 이 실험에서는 금속이온이 존재하기 전 항산화제만으로도 DNA에 손상을 주면 더불어 금속이온을 처리하면 그 전산화제로서의 역할이 더 커지는 것을 볼 수 있다.

결과적으로 plasmid DNA의 agarose gel에 전기영동 패턴은 Fe^{2+}와 Cu^{2+}가 존재할 때 항산화제에 의해 보호받지 못하고 항산화제는 prooxidants로 작용한 것을 볼 수 있다. 항산화제 중 PYC가 가장 DNA의 손상인 단일가닥 분리에 전산화제로서 작용에 활성화를 보였고 PYC 〉 astaxanthin 〉 catalase 〉 BHT 〉 Q-10 〉 bilirubin의 순서로 DNA 손상 정도의 결과를 볼 수 있었다. 이러한 사실로 보아 항산화제로 활용된 본 샘플들은 금속이온의 반응으로 인한 DNA의 회복에 결정적으로 항산화제의 기능보다는 전산화제로서 작용함을 알 수 있었다. 다른 항산화제들에게서도 나타나는 현상이나 특히 PYC는 Fe^{2+}와 Cu^{2+}이 같이 반응하였을 경우 전산화제로서 작용이 활성화됨을 알 수 있다.

한편 figure 7에서 보는 바와 같이 금속이온의 영향에 따른 PYC의 농도별 효과를 통해 볼 수 있듯이 150 ㎍의 PYC에서 가장 단일가닥의 DNA의 손상이 높았고, PYC의 농도가 증가함에 따라서 Fe^{2+}와 Cu^{2+}의 처리에 따른 효과를 이들 모두에서 비슷한 양상을 보였음을 알 수 있었다. Plasmid DNA의 손상은 Cu^{2+}

(figure, A)와 Fe^{2+} (figure, B)가 존재할 때 PYC의 농도가 증가할수록 더 심해지는 것을 볼 수 있다.

DNA에 첨가된 PYC만 존재하였을 때도 DNA의 손상이 일어나며 PYC농도에 의존적인 것을 볼 수 있다. 단일가닥 plasmid의 슈퍼코일구조는 전기영동 패턴을 통해 금속이온이 존재할 경우 PYC는 prooxidant로서 작용하는 것을 볼 수 있다.

결과적으로 Plasmid DNA의 agarose gel에 전기영동패턴은 Fe^{2+}와 Cu^{2+}가 존재할 때 PYC의 농도가 증가할수록 손상이 더 심해지는 것을 확인하였다.

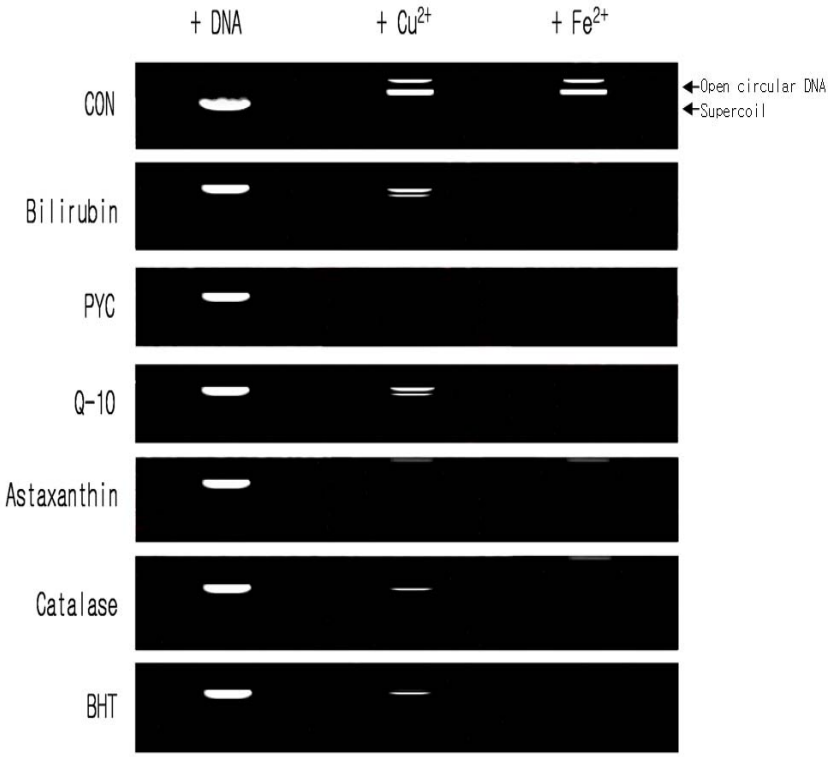


Figure 6. pBR322의 plasmid DNA에 Cu^{2+}와 Fe^{2+}의 손상에 따른 항산화제의 효과

: bilirubin, astaxanthin, Q-10, BHT를 0.2 mM, catalase는 200 unit/ml, PYC는 20 ㎍/ml를 0.2 mM의 $FeCl_2$와 0.2 mM의 $CuCl_2$ 을 처리하여 1시간동안 37℃의 배양기에서 반응.

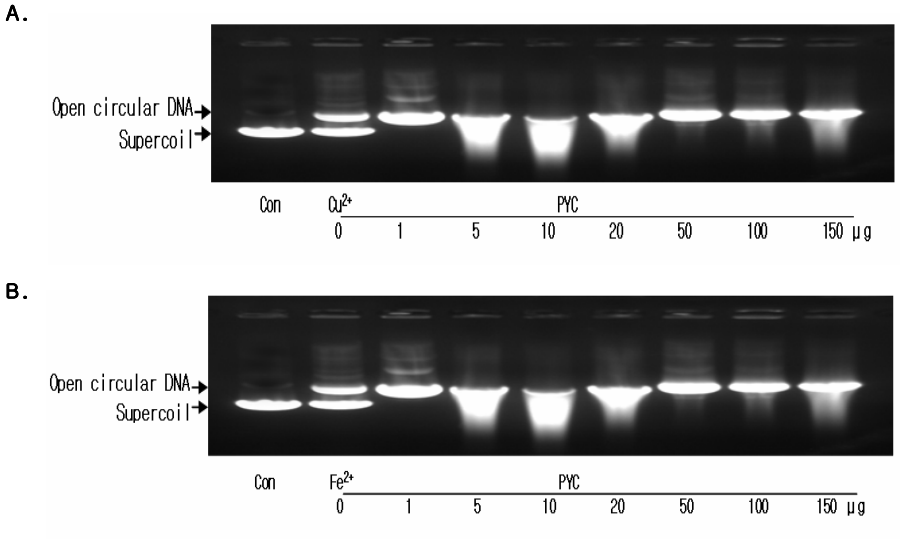


Figure 7. 금속이온의 영향에 따른 PYC의 농도별 효과

: pBR322 plasmid (0.5 ㎍) 을 0.2 mM의 $FeCl_2$와 0.2 mM의 $CuCl_2$를 첨가하여 1시간동안 37℃의 배양기에서 반응하여 line 1은 control로 line 2는 오로지 금속이온인 Cu^{2+}와 Fe^{2+}만을 처리한 것이다. 남은 line은 PYC를 농도별 (1, 5, 10, 20, 50, 100, 150 ㎍/ml)로 처리.

2. Pycnogenol의 Fibrosarcoma에서의 세포생존률 측정

MTT 결과 (Figure 8) PYC만 처리하였을 때 농도별로 세포생존률이 낮아지는 것을 볼 수 있다, 이는 금속이온인 Fe^{2+}와 Cu^{2+}가 먼저 처리되어 있을 경우 더 많은 손상을 주어 세포 생존률이 낮아지는 것을 볼 수 있다. 특히 Cu^{2+}를 처리하였을 때는 Cu^{2+}만으로도 많은 손상을 주는 것을 볼 수 있다. 이는 PYC가 prooxidants로 작용했다는 것과 금속이온인 Fe^{2+}와 Cu^{2+}가 존재할 경우 PYC는 방어기작으로 작용하지 않는다는 것을 알 수 있다.

XTT 결과 PYC만 처리하였을 때 높은 민감성을 보이는데, 이는 금속이온인 Fe^{2+}와 Cu^{2+}가 먼저 처리되어 있을 경우 더 많은 손상을 주어 세포생존률이 낮아지는 것을 볼 수 있다 (Figure 9). 특히 Cu^{2+}를 처리하였을 때는 Cu^{2+}만으로도 많은 손상을 주는 것을 볼 수 있다. 여기에 항산화제인 PYC를 처리하게 되면 PYC가 금속이온에 대한 방어기작으로 작용하지 않고, 더 많은 손상을 주는 것을 알 수 있다. PYC와 Fe^{2+}가 처리된 세포와 PYC만을 처리한 세포에서는 20 ㎍/ml의 PYC 농도에서 급격하게 생존률이 낮아지는 것을 볼 수 있다. 이는 PYC가 prooxidants로 작용했다는 것과 금속이온인 Fe^{2+}와 Cu^{2+}가 존재할 경우 PYC는 방어기작으로 작용하지 않는다는 것을 알 수 있다.

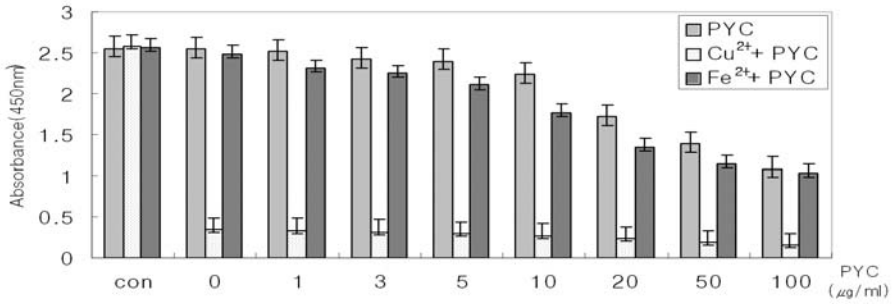


Figure 8. HT1080 세포의 MTT assay를 통한 세포의 생존률 측정

: Human fibrosarcoma 세포에 0.2 mM의 Fe^{2+}와 0.2 mM의 Cu^{2+}와 함께 PYC를 1, 3, 5, 10, 20, 50, 100 ㎍/ml의 농도로 처리하여 24시간동안 반응 시킨 후 암실에서 25 ㎕의 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol -2-yl)-2,5-dephenyltetrazolium bromide]를 처리, 4시간동안 반응시켰다. 그 후 450 nm의 흡광도에서 ELISA reader 사용하여 측정.

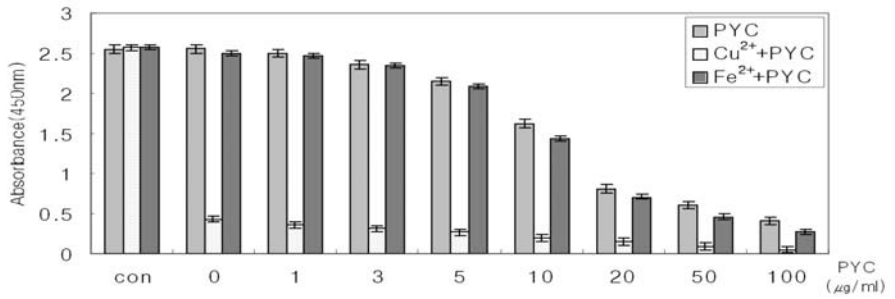


Figure 9. HT1080 세포를 XTT method의 mitocondrial dehydrogenase을 통한 세포의 생존률 측정

: Human *fibrosarcoma* 세포에 0.2 mM의 Fe^{2+}와 0.2 mM의 Cu^{2+}와 함께 PYC를 1, 3, 5, 10, 20, 50, 100 ㎍/ml의 농도로 처리하여 24시간동안 반응 시킨 후 암실에서 1 ml의 XTT 용액 (JBI XTT kit)과 20 μl의 PMS 용액 (JBI XTT kit)을 섞어 50 ㎕씩 처리, 14시간동안 반응시켰다. 그 후 450 nm의 흡광도에서 ELISA reader 사용하여 측정.

3. HPLC와 ELISA를 통한 8-OHdG 생성 확인

Cu^{2+}와 Fe^{2+}은 DNA 가닥을 분해하고, 항산화제인 bilirubin, astaxanthin, Q-10, catalase, PYC와 BHT에 의해서도 DNA가 분해되는 것을 알 수 있었다 (Figure 6). Bilirubin, astaxanthin, Q-10, catalase, PYC와 BHT를 HT1080 세포에 처리하고 37℃에서 24시간동안 반응시켜 8-OHdG의 생성정도를 측정하였다 (Figure 10). Fe^{2+}와 Cu^{2+}를 세포에 처리하였을 때, $^{\cdot}OH$, $O_2^{\cdot}$ 그리고 과산화수소에 의한 산화적 스트레스에 의해 DNA 가닥의 분해가 되는 것으로 관찰되었다. HT1080 세포에 bilirubin 만을 처리했을 때, 8-OHdG의 생성이 줄어든 것을 볼 수 있다 (Figure 10, A). 이는 Fe^{2+}와 Cu^{2+}를 처리한 세포에 bilirubin을 처리하면 8-OHdG의 감소를 더 확실히 볼 수 있다. *In vitro* 상에서는 DNA에 손상을 주어 prooxidants로 작용하였던 항산화제가 HT1080 세포에 *in vivo* 상에 직접적으로 투여할 경우에는 antioxidants로 작용하는 것을 볼 수 있다. 이런 경향은 astaxanthin (Figure 10, B), Q-10 (Figure 10, C), PYC (Figure 10, D), catalase (Figure 10, E) 와 BHT (Figure 10, F) 에서도 볼 수 있고, bilirubin과 astaxanthin가 처리되었을 때 금속이온에 의한 산화적 스트레스에 가장 방어적이라 할 수 있다. 그러나 항산화제에 의한 세포 생존률 측정 시 세포의 수가 줄어 든 것을 볼 수 있으므로 (Figure 9), 항산화제와 금속이온인 Fe^{2+}와 Cu^{2+}에 의한 세포의 수가 줄어듦에 의해 측정된 8-OHdG의 양이 줄어들었을 수 도 있다. 이러한 유의점에 따라 가장 낮은 변화를 보인 PYC를 농도별로 처리하여 금속이온이 존재할 때에 따른 8-OHdG의 변화를 측정하였다 (Figure 11). Figure 11, A 와 같이 PYC의 농도가 증가 할수록 8-OHdG의 양은 줄어드는 것을 볼 수 있다. Cu^{2+}를 처리 후 PYC를 처리하면 PYC의 농도에 따라 8-OHdG의 양이 줄어드는 것을 확인할 수 있다 (Figure 11, B). Fe^{2+}를 처리하였을 경우 PYC의 농도에 따라 10 ㎍/ml의 PYC 농도 까지는 다른 Cu^{2+}를 처리 했을 때와 같은 패턴을 보이나, 50 ㎍/ml의 PYC 농도부터는 8-OHdG의 양이 증가함을 볼 수 있다 (Figure 11, C). 이는 50 ㎍/ml의 PYC 농도에서 Fenton reaction이 세포에 일어나 8-OHdG의 양이 증가했다고 볼 수

있다.

Figure 12는 HT1080 세포와 8-OHdG의 형성에 미치는 Fe^{2+}와 Cu^{2+}의 효과를 ELISA kit를 이용하여 측정한 것이다. PYC를 24시간 처리 시 농도가 증가할 수록 8-OHdG의 양이 줄어드는 것을 볼 수 있다. Cu^{2+}를 처리하고 PYC를 농도별로 처리하였을 경우도 8-OHdG의 양이 줄어드는 것을 볼 수 있다. 그러나 Fe^{2+}의 경우에는 PYC의 농도가 증가하였을 때 10 ㎍/ml 농도의 PYC까지는 8-OHdG의 양이 줄어들지만, 그 보다 높은 농도인 50 ㎍/ml부터는 8-OHdG의 양이 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 Fe^{2+}에 의한 Fenton reaction이 일어나고 이를 PYC가 방어하지 못하게 됨으로서 8-OHdG가 증가된 것이라 볼 수 있다. PYC의 농도에 따라 8-OHdG의 양이 감소하게 되고 Cu^{2+}의 경우도 PYC의 농도에 의존하여 8-OHdG의 양이 감소함을 볼 수 있다. 그러나 Fe^{2+}는 PYC의 농도에 의존적이지 않다는 것을 볼 수 있다.

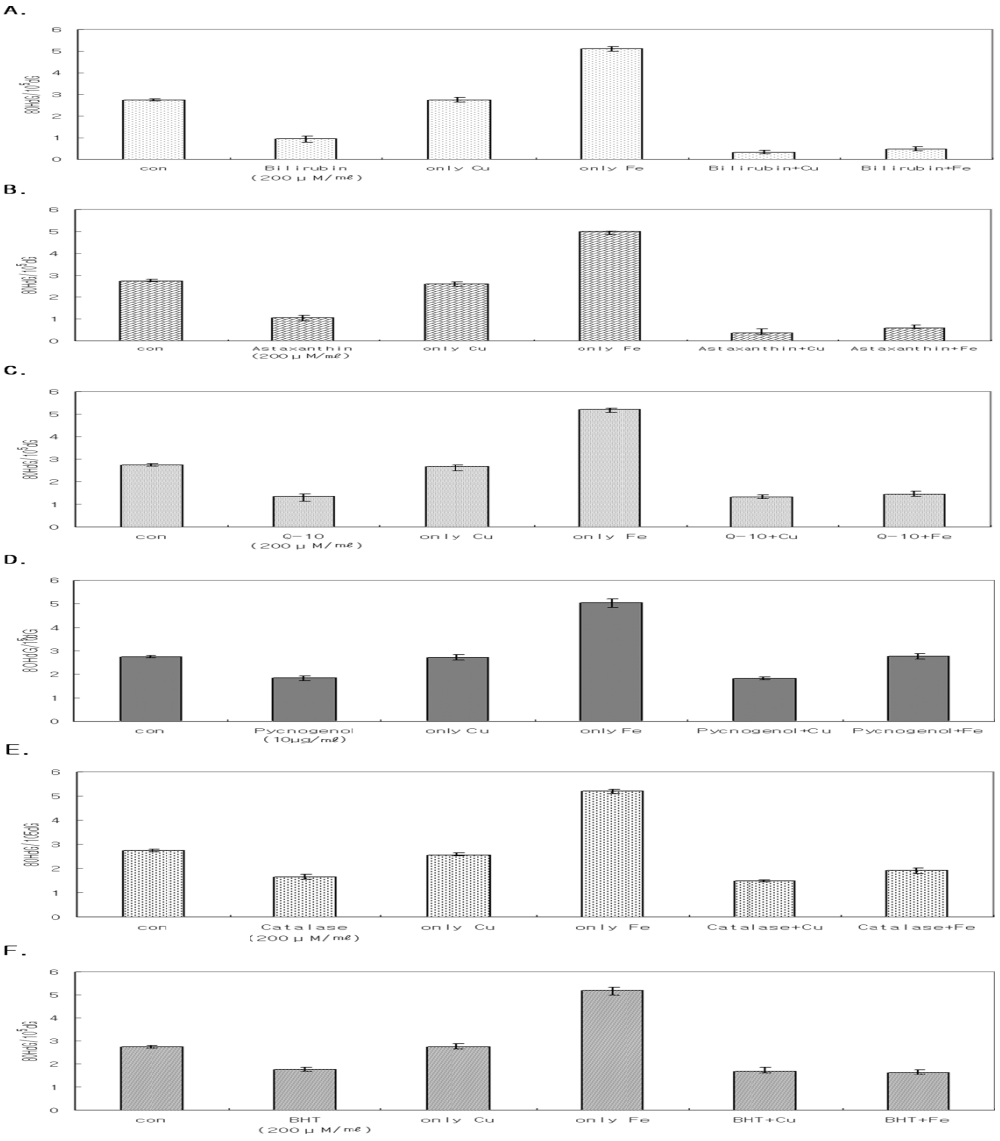


Figure 10. HPLC를 통한 항산화제의 8-OHdG 산물 측정

: (A) Bilirubin 200μM/ml와 0.2 mM의 Cu^{2+}와 Fe^{2+}, (B) Astaxanthin 200 μM/ml와 0.2 mM의 Cu^{2+}와 Fe^{2+}, (C) Q-10 200 μM/ml와 0.2 mM의 Cu^{2+}와 Fe^{2+}, (D) Pycnogenol 10 ㎍/ml와 0.2 mM의 Cu^{2+}와 Fe^{2+}, (E) Catalase 200 unit/ml와 0.2 mM의 Cu^{2+}와 Fe^{2+}, (F) BHT 200 μM/ml와 0.2 mM의 Cu^{2+}와 Fe^{2+}로 처리하여 24시간 배양기에서 반응 후 DMA를 추출하여 HPLC로 측정.

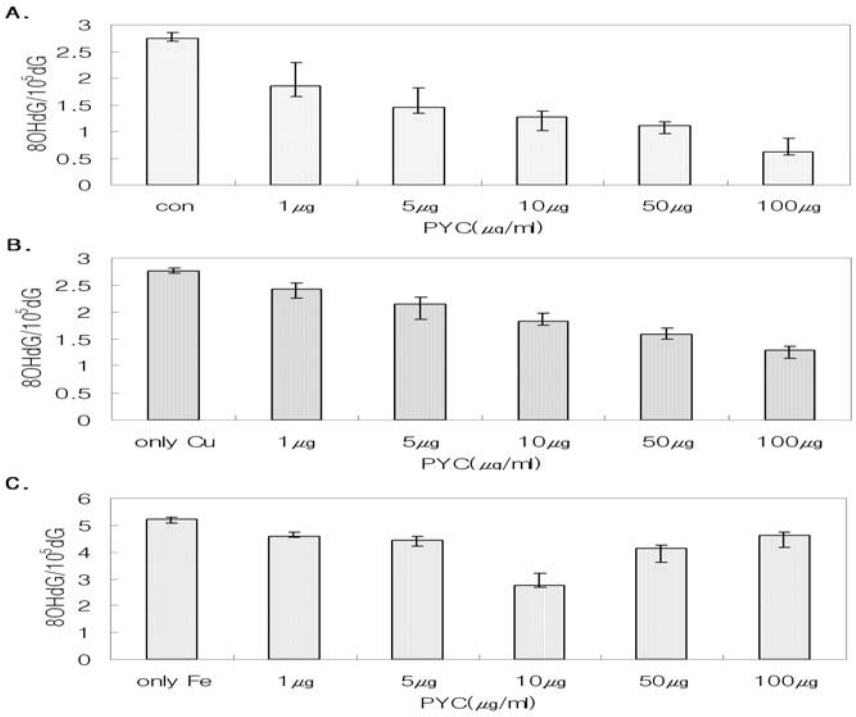


Figure 11. Fe^{2+}와 Cu^{2+}이온이 8-OHdG 형성에 미치는 영향에 따른 PYC의 농도별 효과

: (A) PYC만을 1, 5, 10, 50, 100 ㎍/ml의 농도로 처리, (B) PYC 1, 5, 10, 50, 100 ㎍/ml의 농도에 금속이온인 Cu^{2+}를 200 μM/ml 처리, (C) PYC 1, 5, 10, 50, 100 ㎍/ml의 농도에 금속이온인 Fe^{2+}를 200 μM/ml 처리하여 24시간 배양기에서 반응 후 DMA를 추출하여 HPLC로 측정.

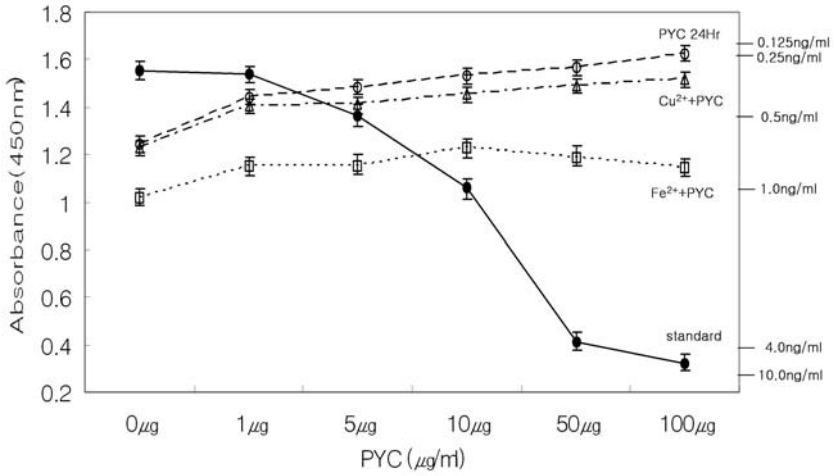


Figure 12. ELISA kit를 이용한 HT1080 세포와 8-OHdG의 형성에 미치는 Fe^{2+}와 Cu^{2+}의 효과

: PYC 24hr은 PYC만을 1, 5, 10, 50, 100 ㎍/ml의 농도로 처리하여 , Cu^{2+}+PYC는 PYC 1, 5, 10, 50, 100 ㎍/ml의 농도에 금속이온인 Cu^{2+}를 200 μM/ml 처리, Fe^{2+}+PYC는 PYC 1, 5, 10, 50, 100 ㎍/ml의 농도에 금속이온인 Fe^{2+}를 200 μM/ml 처리하여 24시간 배양기에서 반응 후 DMA를 추출하여 ELISA를 이용해 측정, ELISA reader 이용하여 450 nM에서 absorbance 측정. 오른쪽의 값 (10.0 ng/ml ~ 0.125 ng/ml)은 ELISA kit에 사용된 8-OHdG standard 값.

Ⅳ. 고 찰

항산화제의 다양한 생리활성 작용은 근본적으로 이의 효소활성억제능과 항산화능 때문으로 여기고 있다 (Havesteen, 1983). 이 중에서 항산화능은 주로 활성산소인 superoxide, hydroxyl, peroxyl및 alkoxy 유릭의 소거능 (Bors 와 Saran, 1987; Hanasaki *et al.* 1994; Husain, *et al.* 1987; Robak 와 Gryglewski, 1988; Salah, *et al.* 1995)과 Fe^{2+}과 Cu^{2+} 등, 금속이온에 대한 착염작용 (Morel, *et al.* 1994)에 기인한다 할 수 있다. 이런 활성산소에 이해 유도되는 프리라디칼에 의한 DNA 손상은 궁극적으로 세포의 손상에 따른 필연적인 결과로서 생명체에 치명적인 결과를 불러일으킨다. DNA 손상은 DNA 복제 또는 전사의 기능이나 DNA가 지니는 성질을 변화시킬 수 있는 DNA의 변형을 뜻하며, DNA의 단일가닥과 이중가닥은 물론 염색체의 변화는 이들 라디칼로 인하여 생길 수 있는 결과라 하겠다. 이러한 DNA의 변형은 여러 가지 산화적 요인에 의해 생성될 수 있고 생물체의 자연적인 대사과정으로 인한 산화적 손상으로 생성될 수도 있다. Hypoxanthine, xanthine oxidase나 활성화된 neutrophils, bleomycin, iron anion, H_2O_2, 금속이온, 이온화된 방사선 구리이온과 같은 프리라디칼을 생성시킬 수 있는 물질들에 의해 DNA 내의 purine 또는 pyrimidine 염기의 결손과 변형이 생기게 된다. 이때 활성산소에 의해 유발되는 DNA의 산화적 손상에 의해 생성되는 8-OHdG는 DNA의 손상 정도를 상징하는 생물학적 지표가 되는데, Daniel (1988)은 Fenton reactions에 의해 유발되는 DNA의 손상정도를 HPLC-ECD system을 이용한 8-OHdG 생성물의 비교를 통하여 설명하였으며, Madoka (1996)는 여러 산화적 요인에 노출된 인간세포에서 8-OHdG를 측정하여 DNA의 손상정도를 보고자 했다.

항산화제에 의한 DNA 손상의 방어효과 역시 8-OHdG의 검출을 통해 알 수 있는데 일반적으로 Haenen (1987)의 연구에서 소의 thymus DNA를 phorbol ester (PMA)로 자극된 사람의 neutrophil로 처치했을 때 형성된 8-OHdG가 catalase나 OH^-분해 원인인 DMSO를 첨가함으로서 억제된 결과를 나타낸 것과 Susanne (2001)

이 N^1-acetyl-N^2-formyl-5-methoxyky -nur-amine, melatonin, resveratrol and uric acid의 항산화제를 농도별로 처리했을 때 산소 라디칼로부터 방어효과를 연구한 결과 8-OHdG 생성물이 감소하여 그 효과를 알 수 있다고 했다.

그러나 본 연구에서 항산화제로 많이 알려져 있는 bilirubin, PYC, BHT, catalase, astaxanthin과 Q-10은 이전의 연구와는 달리 *in vitro* 상에서 DNA에 손상을 주고 있는 것을 알 수 있으며, 더불어 금속이온을 첨가한 상태의 DNA에 항산화제를 처리하면 기존의 이론처럼 금속이온을 치완 시켜 DNA의 손상을 줄이지 못하고 더 심한 손상을 주는 것으로 나타났다. DNA에 아무런 처리를 하지 않은 상태에서 항산화제를 처리하였을 때 PYC가 가장 큰 손상을 일으켰다. 이는 agarose gel에서 확인하였을 때 일반적으로 DNA 만을 전기영동하였을 때보다 항산화제를 처리하였을 때 더 많은 손상을 보여 주므로, 항산화제가 가지는 자동산화에 따른 활성산소의 발생으로 인한 손상이라 생각된다. DNA에 손상을 최소한으로 줄만큼의 중금속 농도를 처리를 한 후 여기에 각각의 항산화제를 처리하였을 때 bilirubin, astaxanthin, Q-10, PYC, Catalase, BHT 모두 DNA상에 손상을 주었다. 그 중 철과 구리를 처리했던 경우는 모든 항산화제에서 심각한 손상을 입는 것으로 보아 항산화제의 prooxidants의 기능을 확인할 수 있었다.

이런 *in vitro* 상의 실험에도 불구하고 HT1080 세포에 금속이온과 항산화제를 처리하였을 경우 이를 HPLC로 확인한 결과, bilirubin, astaxanthin, Q-10, PYC, Catalase, BHT를 처리 시 8-OHdG의 양이 줄어드는 것을 확인하게 됨에 따라 항산화능을 가진다는 것을 확인 할 수 있었다. 이런 항산화능은 금속이온이 존재할 때 더 많이 일어나는 것을 볼 수 있는데 이는 *in vitro* 상의 실험과는 정 반대의 결과라 볼 수 있겠다. ELISA를 통한 결과도 동일한 결과를 보였다. 항산화제를 처리하였을 경우 가지게 되는 세포 독성으로 세포의 수가 줄었다 할지라도 금속이온과 항산화제를 반응시킨 후, 세포를 포집하고 DNA를 추출하여 그 DNA의 양을 정량하여 동일한 양이 되도록 실험 조건을 맞추었기 때문에 세포 수 감소에 따른 8-OHdG의 감소라고는 볼 수 없다. *In vivo* 에서의 항산화제는 8-OHdG의 양으로는 항산화능으로서 기능이 크다는 것을 볼 수 있다. 세포 독성

도 커 PYC를 처리하였을 때 금속이온이 존재하여 세포 생존률을 줄이는 것도 있다. 그러나 PYC의 농도에 따라 그 생존률이 확연히 낮아지는 것을 볼 수 있다. 이는 항산화제라고 하여 항상 항산화능만을 가지는 것이 아니며, prooxidants의 기능을 가진다는 것을 보여준다.

항산화제는 때로 방어 효과를 보이지만, 때로는 더 악화된 상태로 만든다는 것으로 이는 주변의 상태에 따라 달라질 수 있는 것이라 보고 있다. 전이 금속 이온은 산화적 손상에 의해 일어나는 일차적인 기작으로서 metalloprotein으로부터 자유롭게 해리될 수 있다 (Shinenaga, *et al.,* 1989; Sies, 1985; Srinivasan 와 Glauert, 1990). 이때 해리된 금속이온은 환원상태에서는 프리라디칼의 촉매제로서 작용하기 쉬울 것이다. 따라서 아무런 제약 없는 *in vitro* 상의 DNA에 직접적인 산화적 손상 후에 강력한 항산화제를 투여하는 것은 오히려 전 산화제로서 작용할 수 있기 때문에 DNA 손상을 오히려 촉진하는 것으로 보인다. 이러한 상태라면 강력한 항산화제는 더 DNA 손상 유발원인으로서 작용할 수 있을 것이다. 예를 들어 동물의 먹이에 중금속이온이 묻어있어 이를 먼저 섭취 후 항산화제를 공급한 경우에는 전이금속의 해리와 더불어 중금속의 상호작용에 의해 일어나는 손상 정도가 더욱 심각하게 됨을 알 수 있다. 그러나 *in vivo* 상에 세포에 산화적 손상이 일어난 후 항산화제를 처리하면 세포간의 어떠한 작용에 의해 손상에 대한 보상이 생겨, DNA를 보호하게 되어 8-OHdG의 생성을 줄이게 되는 것이다. 물론 금속이온간의 차이는 있다. Cu^{2+}의 경우는 항산화제인 PYC의 농도에 따라 그 손상도가 낮아짐에 비해 Fe^{2+}는 얼마간의 농도 이상의 항산화제에 노출 시 더 심한 손상을 초래하게 된다 (Xiaowei, *et al.,* 2004).

그러나 이번 실험을 통해 *in vitro* 와 in vivo 상에서의 항산화제로서의 기능을 확인하였지만, 그 정확한 기작을 알 수 없고 어떤 주변의 환경 변화를 통해 prooxidant와 antioxidant간의 차이가 생기는지 알 수 없다. 현재 항산화제로 사용되고 있는 물질들이 항산화제로서의 역할만을 가진 것이 아니라는 것을 밝힘에 의의를 두고, 그 기작을 추후에 구명해야 할 것이다.

먼저 항산화제의 분자 구조식에 따른 차이를 확인하고, 각 항산화제의 항-,

전산화제를 측정함에 있어 이를 DNA에서 한 단계 더 나아간 단백질계열에 사용하여 측정을 해 구명할 필요가 있다. 그 후 항산화제가 *in vivo* 상에서 처리하였을 때 그 항산화제들의 작용기작을 알아보는 연구와 항산화제의 자동산화 과정 중에 활성산소가 발생하는지, 그리고 어느 정도 발생되는 지에 대한 정확한 연구가 필요하다.

Ⅴ. 참고문헌

Adelson, R., R.L. Saul and B.N. Ames. 1988. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2706-2708.

Afanas'ev, B.I., I.A. Doronzhko, V.A. Brodskii and A.V. Kostyuk. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763-1769.

Afanas'ev, B.I., A.E. Ostrachovitch, E.N. Abramova, and G.L. Korkina. 1995. Different antioxidant activities of bio flavonoidrutin in normal and iron-overloading rats. *Biochem. Pharmacol.* 50: 627-635.

Arnott, N. 1997. Discover the all-natural French youth drug, *Women's World*. 14; 12-23.

Aruoma, O.I., B. Halliwell, E. Gajewski, *et al.* 1989. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxidd and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.* 264(34): 20509-20512

Attri, S., N. Sharma, S. Jahagirdar, B.R. Thapa, and R. Prasad. 2006. Erythrocyte metabolism and antioxidant status of patients with Wilson disease with hemolytic anemia. *Pediatr Res.* 59(4 Pt 1): 593-597.

Bauerova, K,, J. Kucharska, D. Mihalova, J. Navarova, A. Gvozdjakova, and Z. Sumbalova. 2005. Effect of coenzyme Q(10) supplementation in the rat model of adjuvant arthritis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 149(2): 501-503.

Blazso, G., R. Gaspar, M. Gabor, H.J. Re and P. Rohdewald. 1996. ACE inhibition and hypotensive effect of procyanidins containing extracts from the bark of Pinus pinaster. *Sol. Pharm. Pharmacol. Lett.* 6: 8-11.

Blazso, G., P. Rohdewald, R. Sibbel and M. Gabor. 1995. Antiinflammatory activities of procyanidin-containing extracts from Pinus pinaster Sol. In : "Flavonoids and Bioflavonoids" (S. Antus, M. Gabor and K. Vetschera, eds). *Proceedings of the International Bio-flavonoid Symposium.* 231-238.

Blazso, G., M. Gabor and P. Rohdewald. 1997. Antiinflammatory activities of procyanidin-containing extracts from Pinus pinaster Ait. after oral and cutaneous application. *Pharmazie.* 52: 380-382.

Blazso, G., M. Gabor, R. Sibbel and P. Rohewald. 1994. Antiinflammatory and superoxide radical scavenging activities of procyanidins containing extract from the bark of Pinus pinaster Sol. and its fractions. *Pharm. Pharmacol. Lett*. 3: 217-220.

Bradley, E.B., P. Sovitj, M.R. Gerald, *et al.* 1989. Hydroxyl radical is not a product of the reaction of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. *J. Biol. Chem.* 264: 9880-9884.

Bors, W. and M. Saran. 1987. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic. Tes. Comm.* 2: 289-294.

Cemek, M., S. Dede, F. Bayiroglu, H. Caksen, F. Cemek, and N. Mert. 2006. Relationship between antioxidant capacity and oxidative stress in children with acute hepatitis A. *World J Gastroenterol.* 12(38): 6212-6215.

Cerutti, P., R. Isrsson, G. Krupitza, D. Muehlematter, D. Crawford and P. Amestad. 1988. Proceeding of the UCLA symphonia on molecular biology and cellular biology. Oxyradicals in molecular biology and pathology. eds. *Alan. R. Lis.* 82: 493-507.

Challem, J. 1998. Colourful Antioxidants : Flavonoids add colour to your fruits and vegetables. They also add powerful nutrients to your diet. Here are the ones you should pay attention to, Let's Live.

Costa, D., L. Moutinho, J.L. Lima, and E. Fernandes. 2006. Antioxidant

activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 29(8): 659-1670.

Cross, E.E., Halliwell B., E.T. Borish, W.A. Pryor, B.N. Ames, R.L. Saul and J.M. McCord. 1987. Oxygen radicals and human disease (clinical conference). *Ann. Intern. Med.* 107: 526-545.

Cui, Y., J.P. Barford, and R. Renneberg. 2006. A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Anal. Sci.* 22(10): 1279-1281.

Daniel R.L., P.L. Carmichael and D.H. Phillips. 1988. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and Single- and Double-strand Breaks in DNA Mediated by Fenton Reactions." *Chem. Res. Toxicol.* 11: 420-427.

Das, D.K. 1994. Naturally occuring flavonoids: structure, chemistry, and High performance liquid chromatography methods for separation and characterization. *Methods Enzymol.* 24: 410-420.

Demple, B., T. Herman and D.S. Chen. 1991. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: Definition of a family of DNA repair enzymes. *PNAS.* 88: 11450-11454.

Devaraj, S., S. Vega-Lopez, N. Kaul, F. Schonlau, P. Rohdewald, and I. Jialal. 2002. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids.* 37: 931-934.

Diwadaroglu, M., O.I. Aruoma and B. Halliwell. 1990. Modification of bases in DNA by copper ion-1, 10-phenanthriline complexes. *Bio. Chem.* 29: 8447-8451.

Floyd. R.A., J.J. Watson, P.K. Wong and D.H. Altmiller. 1986. Rickard. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine : sensitive detection

and mechanisms of formation. *Free Rad. Res. Commus.* 1: 163-172.

Floyd. R.A. 1990a. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB. J.* 4: 2578-2597.

Floyd. R.A. 1990b. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 11: 1450-1477.

Fong, K.L., P.B. McCay, J.L. Poyer, H.P. Misra and B.B. Kelle. 1976. Evidencd for superoxide-dependent reduction of Fe^{++} and its role in enzyme generated hydroxyl radical formation. *Chem. Biol. Interactions.* 15: 77-89.

Fridovich, I. 1983. Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 239-257.

Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11.

Gazella, K.A. 1998. The pine tree punch. *Nature.* 64; 111-119.

Grimm, T., A. Schafer and P. Hogger. 2004. Antioxidant activitiy and inhibition of matrix metalloproteinase by metabolites of maritime pine bark extract(pycnogenol). *Free Radical Biol. Med.* 36: 811-822

Guymer, R.H., and E.W. Chong. 2006. Modifiable risk factors for age-related macular degeneration. *Med. J. Aust.* 184(9): 455-458.

Haenen, G.R., J.N. Tai Tin Tsoi, N.P. Vermeulen, H. Timmerman, A. Bast. 1987. 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal stimulates microsomal lipid peroxidation by reducing the glutathione-dependent protection. *Arch. Biochem. Biophys.* 259(2): 449-456.

Halliwell, B. 1987. Oxidant and human disease : Some new concepts. *FASEB J.* 1: 358-364.

Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1984. Lipid peroxidation, oxygenradicals transition metals an disease. *Biochem. J.* 19 :1-14.

Halliwell, B and J.R.S. Hoult. 1988. Oxidants, inflammatory and antiinflammatory drugs. *FASEB J.* 2: 2867-2873.

Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge (ed.), 1989. Free radicals in biology and medicine. *Clarendon Press, Oxford*. Pp. 1-21,

Hanasaki, Y., S. Ogawa, and S. Fukui. 1994. The corelation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 845-850.

Harrison, J.H., F.R. Valdez, and S.C. Fransen. 1989. Effect of forage stabilizers on fer- mentation and digestibility of silage nutrients. *J. Dairy. Sci.* 69: 186.

Hassan H.M. and I. Fridovich. 1978. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in Escherichia coli. *J. Biol. Chem*. 253: 445-450.

Hatfield, G.L. and L.R. Barclay. 2004. Bilifubin as an antioxidant: kinetic studies of the reaction of bilirubin with peroxyl radicals in solution, micells, and lipid bilayers. *Org. Lett*. 6: 1539-1542.

Havsteen, B. 1983. Flavonoids: A class of natural products of high oharmacological potenty. *Biochem. Pharmacol.* 32; 1141-1148

Hong, K.W., B.Y. Rhim and W.S. Lee. 1989. Release of superoxide-dependent relaxing factor(s) from endothelial cells. *Am. Physiol. Soc*. 1340-1345.

Husain, S.R., J. Cillard and P. Cillard. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Photochemistry*, 26: 2489-2491.

Imlay, J.A. and S. Linn. 1986. Biomodel pattern of killing of DNA repair-defective or anoxically grown Escherichia coli by grdrige oerixued. *J. Bacteriol*. 166: 797-799.

Imlay, J.A. and S. Linn. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* 240: 1302-1309.

Inatsu, S., A. Ohsaki, and K. Nagata. 2006. Idebenone acts against growth of Helicobacter pylori by inhibiting its respiration. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(6): 2237-2239.

Ito, Y., M. Kurata, K. Suzuki, N. Hamajima, H. Hishida, and K. Aoki. 2006. Cardiovascular disease mortality and serum carotenoid levels: a Japanese population-based follow-up study. *J. Epidemiol.* 16(4): 154-160.

Johnson, K.J., A. Rehan and P.A. Ward. 1988. The role of oxygen radicals in kidney disease. In Halliwell, B.(ed.), Proceedings of the Upjohn Symposium on oxidants and Disease. *Allen Press, Kansas.*

Kaszycki, P., K. Czechowska, P. Petryszak, J. Miedzobrodzki, B. Pawlik, and H. Koloczek. 2006. Methylotrophic extremophilic yeast Trichosporon sp.: a soil-derived isolate with potential applications in environmental biotechnology. *Acta. Biochim. Pol.* 53(3): 463-473.

Kedziora, J. and G. Bartosz. 1988. Downs syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radical Biol. Med.* 4: 317-330.

Kim, W.G., J.P. Kim, H. Koshino, K. Shin-Ya, H. Seto and I.D. Yoo. 1997. Benzastatin E, F, and G : new indoline alkaloids with neronal cell protecting activity from Streptomyces nitrosporeus. *Tetrahedron.* 53: 4309-4316.

Koshino H., I.K. Lee, J.P. Kim, W.G. Kim, J. Uzawa and I.D. Yoo. 1996. Agrocybenine, novel class alkaloid from the Korean mushroom Agrocybe cylindracea. *Tetrahedron Letters.* 37: 4549-4550

Kvietys, P.R., W. Inauen, B.R. and Bacon, *et al.* 1989. Xanthine oxidase-induced injury to endothelium : role of intracellular iron and hydroxyl radical. *Am. Physion. Soc.* 1640-1646.

Kuhnau, J. 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24: 117-191.

Laughton, M.J., B. Halliwell, P.J. Evans, and J.R.S. Hoult. 1989. Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin,

gossupol and myricetin. Dffects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and blemycin-dependent damage to DNA. Biochem.*Pharmacol.* 38: 2859-2865.

Li, J., X. Wei, and T. Peng. 2005. Fabrication of herbicide biosensors based on the inhibition of enzyme activity that catalyzes the scavenging of hydrogen peroxide in a thylakoid membrane. *Anal. Sci.* 21(10): 1217-1222.

Lin, C.F., T.C. Chang, C.C. Chiang, H.J. Tsai, and L.Y. Hsu. 2005. Synthesis of selenium-containing polyphenolic acid esters and evaluation of their effects on antioxidation and 5-lipoxygenase inhibition. *Chem. Pharm. Bull.* 53(11): 1402-1407.

Liu, X., J. Wei, F. Tan, S. Zhou, G. Wurthwein and P. Rohdewald. 2004. Pycnogenol. French maritime pine bark extract, improves endothelial func- tion of hypertensive patients. *Life Sci.* 74: 855-862.

Loewen, P.C. 1984. Isolation of catalase-deficient Escherichia coli mutants and genetic mapping of katE, a locus that affects catalase activity.Loewen PC. *J. Bacteriol.* 157(2): 622-626.

Loewen, P.C., J. Switala. 1986. Purification and characterization of catalase HPII from Escherichia coli K12. *Biochem. Cell Biol.* 64(7): 638-646.

Loewen, P.C., B.L. Triggs. 1984. Genetic mapping of katF, a locus that with katE affects the synthesis of a second catalase species in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 160(2): 668-675.

Lushchak, V.I. 2006. Budding yeast Saccharomyces cerevisiae as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta. Biochim. Pol.* 24; 72-89.

Lyon, I.C., A.M., Veale, I.B., Houston. 1971. Neonatal blood tyrosine elevations. *N. Z. Med. J.* 74(471): 83-86.

Madoka, N., T. Takeuchi and K. Morimoto. 1996. Determination of

8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. *Carainogenesis.* 17: 787-797.

Manzoori, J.L., Amjadi, M., Orooji, M. 2006. Application of crude extract of Kohlrabi (Brassica oleracea gongylodes) as a rich source of peroxidase in the spectrofluorometric determination of hydrogen peroxide in honey samples. *Anal. Sci.* 22(9): 1201-1206.

McBride, T.J., B.D. Preston and L.A. Loeb. 1991. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry.* 30: 207-213.

McCord, J.M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

Michalkiewicz, S. 2006. Cathodic reduction of coenzyme Q(10) on glassy carbon electrode in acetic acid-acetonitrile solutions. *Bioelectro-chemistry.* Sep 1.

Miki, K., W. Al-Refaie, M. Xu, P. Jiang, Y. Tan, M. Bouvet, M. Zhao, A. Gupta, T. Chishima, H. Shimada, M. Makuuchi, A.R. Moossa, R.M. Hoffman. 2000. Methioninase gene therapy of human cancer cells is synergistic with recombinant methioninase treatment. *Cancer Res.* 60(10): 2696-2702.

Misra, H.P. 1974. Generation of superoxide free radicals during the antioxidation of thiols. *J. Biol. Chem.* 249: 2154.

Morel, I., G. Lescoat, P. Cogrel, O. Sergent, N. Pasdeloup, P. Cillard, and J. Cillard. 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* 45: 13-19.

Morel, I., G. Lescoat, P. Cillard, and J. Cillard. 1994. Role of flavonoids and iron chelation on antioxidant action. *Methods Enzymol.* 234: 437-443.

Nelson, A.B., H.S. Lau Benjamin, Ide Nagatoshi and Rong Yongqi. 1998. Pycnogenol inhibits macrophage oxidative burst, lipoprotein oxidation and hydroxyl radical-induced DNA damage. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 24 (2): 139-144.

Noda, Y., K. Anzai,A. Mori, M. Kohno, M. Shinmei and L. Packer. 1997. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerised JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochemistry and Molecular Biology International* 42: 35-44.

O'Brien, J. 1997. The world's most powerful antioxidant, Your Health, 40-43.

Packer, L. (ed.). 1994. Meth. Enzymol. Oxygen radicals in biological systems. *Academic Press, San Diego*. 233; 1-15. 234; 23-33.

Packer, L. 1997. Natural source antioxidants : free radical scavenging activity. American Chemical Society, Washington DC, *ACS. National Meeting*. 213; 33.

Park, S., X. You and J.A. Imlay. 2005. Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 28;102(26): 9317-22.

Passwater, R.A. and C.H. Kandaswami. 1994. Pycnogenol, the Super "Protector" Nutrient, Keats Publishing. *Peter Rohdewald, Whole Foods.* 12-27

Passwater, R.A. 1994. Pycnogenol - Safe and Effective : In Interview with Prof. *Peter Rohdewald, Whole Foods.* 34-36.

Robak, J. and R.J. Gryglewski. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anion. *Biochem. Pharmacol.* 37: 837-841.

Rohdewald, P., C.A. Rice-Evans, L. Packer, D. Marcel. 1998. Pycnogenol- Chapter 17 In : Flavonoids in Health and Disease. 405-419.

Rong, Y., L. Li, V. Shah and B. Lau. 1995. Pycnogenol protects vascular endothelial cells from t-butyl hydroperoxide induced oxidant injury. *Biotechnology Therapeutics.* 5: 117-126.

Salah, N., J.N. Miler, G. Paganga, L. Tijburg, G.P. Bilwell and C. Rice-Evans. 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys*. 322: 339-346.

Sampayo-Reyes, A., and R.A. Zakharyan. 2006. Tocopherol esters inhibit human glutathione S-transferase omega. *Acta. Biochim. Pol.* 53(3): 547-552.

Sawyer, D.T. and J.S. Valentine. 1981. How super is superoxide? *Acc. Chem. Res*. 14: 393.

Shinenaga, M.K., C.L. Gimeno, and B.N. Ames. 1989. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 9697-9701.

Sies, H. (ed.). 1985. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Academic Press, NewYork.* 72-88.

Srinivasan, S. and H.P. Glauert. 1990. Formation of 5-hydroxydethyl-2'-deoxyuridine in hepatic DNA of rats treated with gamma-irradiation, diethynitrosamine, 2-acetylaminofluorence or the peroxisome proliferator ciprofibrate." *Carcinogenesis.* 11: 2012-2024.

Storz, G., M.F. Christman, H. Sies, and B.N. Ames. 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in Salmonella typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84(24): 8917-8921.

Susanne, C., E. Rebato, J. Rosique, A. Vinagre, I. Salces, L. San Martin. 2001. Nutritional status by socioeconomic level in an urban sample from Bilbao (Basque Country). *Am. J. Hum. Biol*. 13(5): 668-678.

Szeto, Y.T., W.K. Chu, and I.F. Benzie. 2006. Antioxidants in fruits and vegetables: a study of cellular availability and direct effects on

human DNA. *Biosci. Biotech. Biochem.* 70(10): 2551-2555.

Tolmasoff, J.M., T. Ono and R.G. Culter. 1980. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in promate species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 2777-2781.

Ueda, T., T. Ueda . and D. Armstrong. 1996. Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. *Ophthalmic Res.* 28: 184-192.

Veurink G., D, Liu, K. Taddei, G. Perry, M.A. Smith, T.A. Robertson, E. Hone, D.M. Groth, C.S. Atwood, and R.N. Martins. 2003. Reduction of incl- usion body in ApoE-deficient mice fed a combination of antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1070-1077.

Virgili, F., H. Kobuchi and L. Packer. 1997. Nitrogen monoxide (NO) metabolism : Antioxidant properties and modulation of inducible NO synthase activity in activated macrophages by procyanidins extracted from Pinus maritima. 405-419.

Watson, R.R., M. Putter, P. Rohdewald and S. Hosseini. 1998. Pycnogenol inhibits platelet aggregation in vivo. Arizona Prevention Centre, University of Arizona, Tucsoni; Institute. *Pharm. Chem. Westfische W.*

Xiaowei. Z., S.S.W. Rudolf, F. Wenyu, X. Lihong and K.S.L. Paul. 2004. Production of reactive oxygen species and 8-hydroxy-2'deoxyguanosine in KB cell co-exposed to benxo[α]pyrene and UV-A radication. *Chemosphere*. 55: 1303-1308.

Yun, B.S., I.J. Ryoo, W.G. Kim, J.P. Kim, H. Koshino, H. Seto and I.D. Yoo 1996. Structures of phenazostatins A and B, Neuronal cell protecting substances of microbial origin. *Tetrahedron Letters.* 37: 8529-8530.

저작물 이용 허락서

학 과	생물학과	학 번	20047593	과 정	석사
성 명	한글: 박 연 선 한문 : 朴 淵 先 영문 : Park Yeon-sun				
주 소	광주광역시 북구 문흥1동 우미1차 101동 305호				
연락처	E-MAIL : ayrnl@hanmail.net				
논문제목	한글 : Pycnogenol(PYC)에 의한 Human Fibrosarcoma Cells의 DNA 손상에 따른 항산화제의 prooxidant 역할				
	영문 : Role of Prooxidant on DNA damage of Human Fibrosarcoma Cells by Pycnogenol(PYC)				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2007년 2월 23일

저작자: 박 연 선 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하

감사의 글

아침이면 온 세상이 서리로 인해 하얗게 변하는 추운 날들이 되어 모든 만물이 다음을 준비하기위해 긴 휴식을 취하는 겨울을 어느덧 세 번째 맞아왔음을 새삼스럽게 느낍니다. 지난 2.5년 동안 인생의 한 단계를 가꿔 왔고 곧 마무리 짓게 되는 이 시점에서 저에게 사심 없는 도움을 주신 모든 분들께 감사의 글을 드리고자 합니다.

논문이 완성되기까지 많은 시련이 있었지만 늘 옆에서 저에게 관심과 배려로 학위의 길로 이끌어 주시고, 학문의 의미를 다시금 되새김하게 해주신 지도교수님 김영곤 교수님께 진심으로 되는 감사를 드리며 경의의 인사를 올립니다. 항상 묵묵히 지켜봐주시고 웃음으로 대해 주시고 논문심사에 수고 많으신 박현용 교수님, 매일 같이 사랑과 격려를 아끼지 않으신 이현화 교수님께 고개 숙여 감사를 드립니다. 학위과정동안 항상 제게 웃음과 격려를 해 주신 최영복 교수님께 감사드립니다. 한번 스승은 영원한 스승입니다. 스승님들이 항상 건강하시기를 기원합니다.

연구가 진행되는 동안 실험실과 세포들을 제공해 주시고, 많은 실험적 조언과 도움을 주신 이상록 선생님께 감사드립니다.

학위과정동안 함께 해오면서 많이 정들어 버린 손수진 후배에게 고마움을 표하면서 좋은 미래가 항상 같이 하기를 진심으로 바랍니다. 옆에 있어서 항상 힘이 됐고 언제든지 도움을 청하면 함께 해주었던 친구 은정이에게 고맙다는 말 한마디 전합니다.

실험실에서 동거동락하며 늘 웃음으로 힘을 줬던 지민이에게 고맙고, 늘 바쁘다는 핑계로 연락만 받았던 친구들에게 미안한 마음을 전합니다. 이 외에도 지면에는 열거되지 않았지만 제게 사랑과 도움을 주신 모든 분들께 감사드립니다.

끝으로 항상 좌절하지 않고 인내하며, 더 많은 것을 주시기 위해 격려해주신 내 사랑하는 부모님께 두 손 모아 절을 올리며 이 학위를 드립니다. 학위에 대한 열의 때문에 다하지 못한 효도 장차 꼭 보답하겠습니다. 그리고 항상 곁에 있어준 Azlael에게 너무 고맙다는 말을 하고 싶습니다.

석사논문을 마무리 지으면서 연선 올림

2006. 11. 30.