

방사선 피폭에 의한 항산화 기능 단백질 ceruloplasmin의 specific ferroxidase activity의 변화

Radiation induces the change of specific ferroxidase activity in rat antioxidant protein ceruloplasmin

김인규, 박선영, 심혜원, 오태정, 김국찬, 이강석

한국원자력연구소
대전광역시 유성구 덕진동 150, 유성사서함 105호

요 약

흰쥐를 4.0Gy로 전신 조사시킨 후 68시간이 경과한 혈액에서 정제된 ceruloplasmin의 oxidase 활성을 측정하였다. 방사선 조사된 흰쥐혈액으로부터 정제된 ceruloplasmin의 specific activity는 *o*-dianisidine oxidation의 경우 조사되지 않은 대조군으로부터 정제된 ceruloplasmin의 활성과 변화가 없었지만 ferroxidase의 경우 약 2.5배 정도가 높았다. 그러나 ceruloplasmin의 Cu 함량은 분자당 5.9개에서 4.5개로 감소하였다. 이는 방사선 피폭에 의해 과량의 Fe^{2+} 가 혈액내 노출됨으로써 H_2O_2 의 존재 하에서 이차적인 반응으로 인한 oxygen free radical의 형성을 억제하기 위해 철의 산화를 효율적으로 증가시킬 수 있도록 ceruloplasmin이 구조적으로 변화된 것으로 사료된다.

Abstract

Male rats were exposed to a whole body with a single dose of 4.0Gy. The animals were sacrificed 68 hours following exposure. The specific amine (*o*-dianisidine) oxidase activity of ceruloplasmin purified from the γ -irradiated rat serum was not different from that of normal ceruloplasmin. On the other hand, the specific ferroxidase activity of ceruloplasmin from the γ -irradiated rat serum was 2.5 fold as high as compared to that of normal ceruloplasmin. The copper content in ceruloplasmin was also changed from 5.9 copper/molecule to 4.5 copper/molecule. It may be that irradiation induces the structural change of ceruloplasmin in the biosynthetic process. The ferroxidase activity of ceruloplasmin prevents free Fe^{2+} , which can be released by γ -irradiation, from producing oxygen free radicals in the presence of H_2O_2 .

1. 서론

Ceruloplasmin은 혈액내 존재하는 구리의 90% 이상을 함유하며 주로 간 조직에서 합성되는 급성반응단백질이다. Ceruloplasmin은 *in vitro*에서 여러 가지 기능이 제안되었지만 단백질이나 조직이 필요로 하는 구리를 운반하는 운반단백질의 기능과 항산화특성 및 특정 효소적 기능으로 크게 나눌 수 있다. 이러한 급성반응중에는 neutrophil이나 macrophage같은 phagocytic cell의 활성화를 들 수 있다. 이 과정에서 $\cdot O_2^-$, H_2O_2 및 $\cdot OH$ 같은 반응성이 강한 유해산소를 많이 생성하며 $\cdot OH$ 는 lipid의 peroxidation을 촉진시킴으로써 동맥경화증의 유발원인이 되기도 한다. Ceruloplasmin의 농도는 이러한 급성반응을 유발하는 염증(Semsei, 1991), 방사선 조사(Kim *et al.*, 1998) 및 임신 (Thomas *et al.*, 1995)등 다양한 자극에 의해 반응, 증가하는 단백질이다. Ceruloplasmin은 amine계열을 산화시키거나 Fe^{2+} 를 산화시키는 oxidase 기능이 있다(Ryan *et al.*, 1992). Ceruloplasmin의 amine oxidase에 대한 생체 내에서의 실질적인 생리적 기능은 아직 규명되지 않았지만 ferroxidase 기능은 transferrin에 철을 결합할 수 있도록 Fe^{2+} 를 Fe^{3+} 로 산화시켜 H_2O_2 의 존재 하에 철에 의한 라디칼 형성을 억제시킴으로써 항산화기능을 발휘한다고 보고되고 있다. 최근에는 환원된 glutathione의 존재 하에서 human ceruloplasmin은 H_2O_2 를 제거하는 peroxidase의 기능이 있다고 제시되기도 하였다(Kim *et al.*, 1998a; Kim and Park, 1998). 그러나 상기의 기능과는 반대되는 기능으로, ceruloplasmin에 결합되어 있는 구리가 low density lipoprotein등 고분자들을 산화시켜 손상을 일으킨다는 보고도 있다(Fox *et al.*, 1995; Ehrenwald *et al.*, 1994; Lamb and Leake, 1994). 따라서 ceruloplasmin의 생리적 기능은 분명하지 않으나 혈액 내에서 ceruloplasmin의 항산화 작용은 그 가능성에 대하여 연구가 계속 수행되고 있으며 염증이나 급성반응동안에 중요하게 작용하는 것으로 제안되고 있다. 본 연구는 방사선 조사 후 정제된 ceruloplasmin과 방사선이 조사되지 않은 대조군으로부터 정제된 ceruloplasmin의 specific oxidase활성도의 변화와 구리 함량의 변화를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

2.1.1 시약

Sepharose CL-4B, DEAE-Sepharose CL-6B, *o*-dianisidine dihydrochloride, epichlorohydrin, apotransferrin은 Sigma회사(St. Louis, MO, USA) 제품을, $FeSO_4$ 는 Waco회사(Japan) 제품을, 그리

고 2-Chloroethylamine monohydrochlorides는 Aldrich 회사(Milwaukee, WI, USA)제품을 사용하였다.

2.1.2 실험동물의 방사선조사

본 연구에 사용한 흰쥐(Sprague-Dawley rat, male, body weight : 200-250g)는 한국인삼연구소에서 구입하였다. 흰쥐를 4.0Gy(^{60}Co γ -ray)로 전신 조사시킨 뒤 68시간이 경과한 후 채혈하였다. 흰쥐를 ether로 마취시킨 후 후대정맥으로부터 채혈하였으며 채혈 후 즉시 신선한 혈액으로부터 ceruloplasmin을 정제하였다.

2.2 방법

2.2.1 흰쥐 ceruloplasmin의 준비

흰쥐의 ceruloplasmin은 chloroethylamine affinity gel과 DEAE-Sepharose gel로 4°C에서 정제하였다(Musci *et al.*, 1993). Chloroethylamine affinity gel은 Calabrese *et al*등(1988)의 방법을 변형하여 합성하였다. Ceruloplasmin의 정제도는 SDS polyacrylamid gel 전기영동하여 단백질 염색에 의해 확인되었으며(Laemmli, 1970) 단백질 농도는 ovalbumin을 표준단백질로 하여 Bradford (1976) 방법에 의해 정량하였다.

2.2.2 Ceruloplasmin의 Cu 함량 측정

일정량의 ceruloplasmin을 14N의 질산으로 끓이면서 유기물을 완전히 제거한 후 원자흡광분석기(Atomic Atomic Spectrometry: Varian spectrAA 220)로 측정하였다.

2.2.3 ceruloplasmin의 oxidase assay

o-Dianisidine oxidase activity : 1.6mM *o*-dianisidine을 함유한 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0) 1ml에 시료를 첨가하여 30°C에서 10분 동안 방치한 후 6M 황산용액 2ml로 반응을 정지시키고 540nm에서 흡광도 측정하였다. Ferroxidase activity : 0.25% apotransferrin과 0.12mM FeSO_4 를 함유한 0.2 M sodium acetate buffer(pH 6.0) 1ml에 시료를 첨가하여 Fe(III)-transferrin의 형성 정도를 460nm에서 흡광도 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

원위를 4Gy로 전신조사하고 68시간 경과한 후 채혈하여 정제한 ceruloplasmin과 방사선 조사되지 않은 대조군으로부터 정제한 ceruloplasmin의 A_{610nm}/A_{280nm} 비율은 0.060이상이며 또한 polyacrylamide gel로 전기영동한 결과 순수하게 정제되었음을 확인하였다(Fig. 1). Ceruloplasmin은 산소존재하에 Fe^{2+} 를 Fe^{3+} 로 산화시키는 ferroxidase 기능($Fe^{2+} + O_2 + 4H^+ \rightarrow Fe^{3+} + H_2O$) (Halliwell and Gutteridge, 1990)과 GSH 존재 하에 H_2O_2 의 제거(Kim *et al.*, 1998a) 등 extracellular 항산화제 특성이 있으며 방사선 조사 후 혈액내 ceruloplasmin의 농도가 빠르게 증가하는 급성반응 단백질이다(Kim *et al.*, 1998b). 본 실험에서는 각각 정제된 ceruloplasmin으로 구리의 함량 및 oxidase 활성을 측정하였다. 방사선 조사 후 정제된 Ceruloplasmin의 구리 함량은 분자당 5.9개에서 4.5개로 감소하였다(Table 1). *Amine(o-dianisidine) oxidase*의 활성은 대조군 및 방사선 조사 후 정제된 ceruloplasmin에 있어서 유사하였으나 ferroxidase 활성의 경우 방사선 조사 후 정제된 ceruloplasmin의 활성은 대조군보다 약 2.5배 정도가 높았다(Fig. 2). 혈액내 존재하는 적혈구는 세포 하나당 265,000,000개의 hemoglobin을 지니며 분당 1.4의 개 정도의 속도로 노화된 적혈구가 파괴되고 또한 그 만큼 생성됨으로써 항상 일정수가 혈액속에 순환된다. 파괴되어 방출된 hemoglobin과 Fe^{2+} 은 적혈구의 생성에 다시 사용되기 위해 재순환 과정을 거친다. 그러나 방사선에 피폭이 되었을 경우 비장 및 골수 같은 조혈기관이 손상되고 적혈구의 전구세포인 적아구는 감수성이 매우 커서 방사선 조사 후 수 시간 내에 그 수가 현저히 감소된다(강만식 등 1997). 따라서 조혈기관이 회복될 때까지 체내에는 다량의 Fe^{2+} 가 hemoglobin에 결합된 상태나 free ion인 Fe^{2+} 로 많이 축적될 것이다. 생체내에 존재하는 free Fe^{2+} 은 유해한 활성산소를 형성하는 것으로 보고되었으나 transferrin 단백질에 의해 결합되어 유해산소의 생성을 억제하고(Stock *et al.*, 1974) 철 이온을 필요로 하는 조직에 운반된다(Osaki *et al.*, 1966). 정상적인 환경에서 transferrin은 약 30% 만이 철 이온과 결합되어 있으므로 free 철 이온과 결합할 수 있는 능력이 매우 높으며 이외에도 여분의 이온은 ferritin에 결합되어 저장된다(Putnam, 1984). 그러나 이들 단백질과 결합될 수 있는 이온은 Fe^{3+} 이므로 Fe^{2+} 의 산화과정이 있어야 한다(Silva *et al.*, 1992). 혈액내에는 hemoglobin과 결합하는 haptoglobin이 존재하며 이 단백질은 신장에서 철 이온의 손실을 방지하며 간이나 비장의 reticuloendothelial system으로 운반한다(Putnam, 1984). Haptoglobin도 급성반응 단백질중 하나로 방사선 조사에 의해서도 많이 증가한다(Magic *et al.*, 1995). 이는 방사선피폭에 의해 haptoglobin이 보다 많은 기능을 수행해야 하기 때문인 것으로 생각된다. 즉

hemoglobin의 많은 양이 혈액내에 존재하여 이를 운반해야 하는 것으로 사료된다. 그러나 hemoglobin에 결합된 Fe^{2+} 가 H_2O_2 와 반응하여 유해산소를 발생하는 것으로 보고되었다(Packer and Glazer, 1996). 산소 존재하에 일어나는 Fe^{2+} 의 자연산화는 유해산소를 발생시켜 단백질 등을 손상시키므로 유해산소를 방출하지 않고 철을 산화시키는 ceruloplasmin의 ferroxidase 기능은 매우 중요하게 제시되고 있다. Rylkov 등(1991)은 hemoglobin이 존재하는 혈액내에 ceruloplasmin을 첨가함에 따라 oxy-hemoglobin이 met-hemoglobin으로 산화되는 것을 관찰함으로써 생리적조건에서 ceruloplasmin의 ferroxidase system이 작용할 것이라고 보고하였다. 또한 ceruloplasmin의 recrystalization후 ferroxidase 활성은 7-10배 정도 증가되었는데 이는 ceruloplasmin의 구조적 변화가 있으며 ceruloplasmin의 구조 및 활성부위는 ceruloplasmin이 존재하는 환경에 의존한다고 하였다.

따라서 방사선 조사에 의해 혈액내 ceruloplasmin이 철 이온에 의한 유해산소의 생성을 억제하기 위해 농도가 증가도 되지만 방사선에 의한 혈액내 단백질 성분 및 환경의 변화나 혹은 생합성 과정에서 ceruloplasmin이 보다 효율적으로 철을 산화시키는 구조로 변화되어 활성부위가 노출됨으로써 ferroxidase의 specific activity도 증가되는 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

4. 참고문헌

1. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 727, 248-254.
2. Calabrese, L., Carbonaro, M. and Musci, G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6480-6483.
3. Ehrenwald, E., Chisolm, G. M. and Fox, P. L.(1994) *J. Clin. Invest.* 93, 1493-1401.
4. Fox, P.L., Mukhopadhyay, C. and Ehrenwald, E. (1995) *Life sciences*, 56, 1749-1758.
5. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 1-8.
6. Kim, I. G., Park, S. Y. and Kim, K. C. (1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45, 599-608.
7. Kim, I. G., Park, S. Y., Kim, K. C. and Yum, J. J. (1998) *FEBS Lett.* 431, 473-475.
8. Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-683.
9. Lamb, D.J. and Leake, D. S. (1994) *FEBS letters*, 338, 122-126.
10. Magic, Z., Matic-Ivanovic, S., Savic, J. and Pozznnoiv, G. (1995) *Radiation Research*, 143, 187-193.
11. Musci, G., Patti, M. C. B., Fagiolo, U. and Calabrese, L. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 13388-13395.

12. Osaki, S., Johnson, D. A. and Freiden, E. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2746-2751.
13. Packer, L. and Glazer, N. (1996) "Oxygen Radicals in Biological Systems" Academic Press, Inc.
14. Putnam, F. W. (1984) "The Plasma Protein(2rd Ed.)" Academic Press, Inc.
15. Ryan T. P., Grover, T. A. and Aust, S. D. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 1-8.
16. Rylkov, V. V., Tarasiev, M. Yu. and Moshkov, K. A. (1991) *Eur. J. Biochem.* 197, 185-189.
17. Thomas T., Macpherson, A. and Rogers, P. (1995) *Biochimica Biophysica Acta*, 1261, 77-82.
18. Semsei, I. (1991) *Gerontology*, 37, 199-207.
19. Silva, D., Miller, D. M., Rief, D. W. and Aust, S. D. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 409-415.
20. Stocks, J., Gutteridge, J. M. C. Sharp, R. J. and Doemandy, T. L. (1974) *Clin. Sci. Mol. Med.* 47, 215-222.
21. 강만식, 김종봉, 민봉희, 정규희, 정해원 (1997) "방사선생물학" 교학연구사.

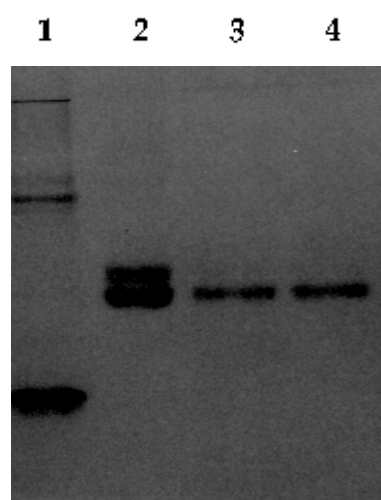


Fig. 1. Native polyacrylamide gel electrophoresis analysis of ceruloplasmin. Lane 1: sample from serum; lane 2: sample from chloroethylamine-sepharose chromatography; lane 3: sample from DEAE-Separose chromatography(normal ceruloplasmin); lane 4: ceruloplasmin from the irradiated rat serum.

Table 1. Copper content per ceruloplasmin molecule

	irradiated rat	normal rat
copper content (atoms)	4.5/Cp molecule	5.9/Cp molecule

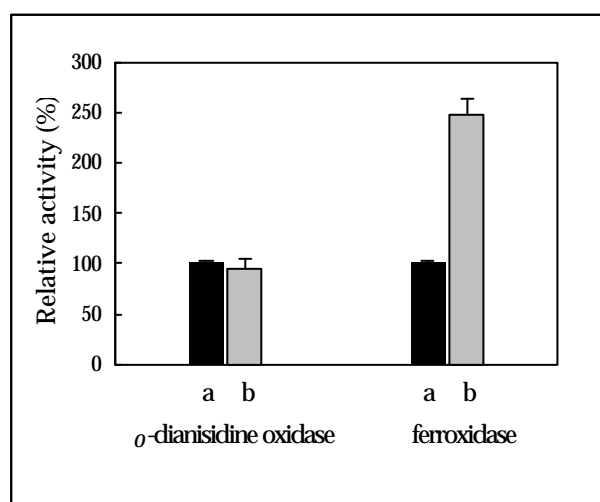


Fig. 2. Specific *o*-dianisidine oxidase and ferroxidase activity of ceruloplasmin. a; ceruloplasmin purified from the irradiated rat serum; b: ceruloplasmin purified from the normal rat serum.