

*bcl-2*와 *bax*의 전사수준에 따르는 아스타잔틴의 항산화효과검사

박유성, 김유신, 라영복

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학, 화학을 발전시키는것은 인민들의 먹고 입는 문제를 비롯하여 인민생활을 높이는 데서 매우 중요한 의의를 가집니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487페이지)

지금 물고기(련어와 칠색송어)나 갑각류(새우와 가재)로부터 추출되는 천연항산화제인 아스타잔틴(Astaxanthin: AST)은 크산토피에 속하는 붉은색의 천연색소로서 기능성식품, 화장품, 약품, 먹이첨가제 등으로 리용되고있다.[1, 2, 4]

세계적으로 아픍토시스관련유전자들인 *bcl-2*(B cell lymphoma-2)와 *bax*(Bcl-2 associated X protein) 등을 리용하여 항산화능력을 평가하기 위한 실험들이 많이 진행되고있다.[3]

우리 나라에서도 이미 사립체관련유전자들을 리용하여 천연활성물질들에 대한 효과를 분석하기 위한 연구가 진행되고있다. 그러나 기능성식품으로 전망이 큰 아스타잔틴의 항산화능력을 생물공학적인 방법으로 분석한 연구자료는 발표된것이 없다.

이로부터 우리는 과산화수소로 처리한 세포에 아스타잔틴을 작용시켜 그 항산화효과를 분자수준에서 평가하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

아스타잔틴조제품은 다음과 같이 제조하였다.

새우껍질→균마기에서 분쇄→산처리에 의한 칼시움제거→에틸알콜에 의한 추출→농축→HCl에 의한 침전→랭동건조

랭동한 새우대가리와 껍질을 3mm정도 되게 분쇄하고 1mol/L HCl처리를 10h 진행한 다음 물로 여러번 세척하여 중성상태로 되게 한다. 50℃ 건열기에서 건조시킨 후 에틸알콜에서 추출하고 려과하여 조추출액을 만든다. 이것을 농축한 다음 1mol/L HCl을 첨가하여 pH 2.0으로 조절한다. 다음 랭장고(4℃)에 방치하고 침전시키며 그것을 건조시켜 조제품으로 리용한다.

세포그룹으로는 C6세포를 리용하였다.

시약으로는 DL2000, IMDM배지(《Thermo》), 소태아혈청(《Gibco》), DEPC(diethyl pyrocarbonate, 디에틸피로탄산염), 트리줄, RT-PCR시약키트(《Invitrogen》), *Taq*DNA폴리메라제, M-MLV역전사효소(《TAKARA》)를 리용하였다.

프라이머로는 *gapdh*(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) Sense Primer: 5'-GGGTGATGCTGGTGCTGAGTATGT-3', Antisense Primer: 5'-AAGAATGGGTGTTGCTGTTGAAGTC-3', 증폭단편크기 700bp, *bcl-2* Sense Primer: 5'-AACACCAGAATCAAGTGTTTCG-3', Antisense Primer: 5'-TCAGGTGGACCACAGGTGGC-3', 증폭단편크기 447bp, *bax* Sense Primer: 5'-AGGGTTTCATCCAGGATCGAGC-3', Antisense Primer: 5'-AGGCGGTGAGGACTCCAGCC-3', 증폭단편크기 468bp를 리용하였다.

설비로는 도립현미경(《Olympus IML400》), 저온고속원심분리기(《Bioguge》), 겔촬영장치(《Tanon》)를 이용하였다.

총RNA분리, 역전사반응, RT-PCR반응은 선행연구[1]에 기초하여 진행하였다.

PCR조건은 다음과 같다. 94℃에서 예비변성 30s→28회전의 94℃에서 변성 1min, 58℃에서 어닐링 30s, 72℃에서 연장 1min→72℃에서 최종연장반응 10min으로 설정하였다.

PCR산물을 4℃에서 1h 냉장시킨다.

결과 및 논의

1) *bcl-2*의 전사수준에 따르는 아스락산틴의 항산화효과검사

IMDM배지(소태아혈청 20%)에서 C6세포를 70%정도 배양하고 과산화수소(H_2O_2)를 500 μ mol/L로 12h 처리한 다음 아스락산틴조제품을 50ng/mL농도로 12h 처리하였다. 다음 원심분리하여 세포를 침전시키고 총RNA를 분리하여 역전사반응을 진행한 다음 *bcl-2*의 전사수준을 검사하였다.

*bcl-2*의 전사수준을 검사하기 전에 먼저 *gapdh*의 RT-PCR를 진행하고(그림 1) 주형시료의 양을 결정하기 위한 실험을 진행하였다.

그림 1에서 보는바와 같이 *gapdh*의 RT-PCR산물은 예상되는 700bp크기로 균일하게 나타났다. 이로부터 RT-PCR의 정확성을 확인하였고 유전자들의 RT-PCR주형의 양을 결정하였다.

다음 *bcl-2*의 전사수준을 검사하기 위한 실험을 진행하였다.

위의 실험에서 결정된 주형의 양을 리용하여 RT-PCR를 진행하였다.(그림 2)

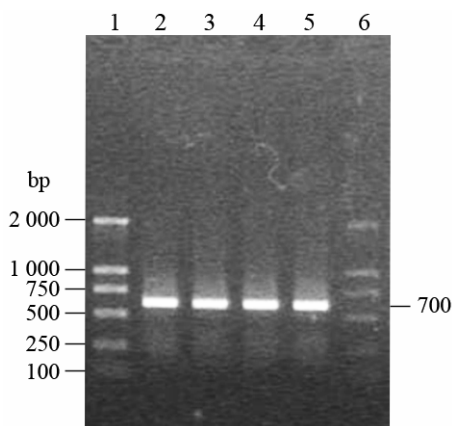


그림 1. *gapdh*의 RT-PCR산물의 전기영동상사진
1, 6-DNA크기표식자(DL2000), 2- H_2O_2 +AST처리구, 3-대조, 4- H_2O_2 처리구, 5-AST처리구

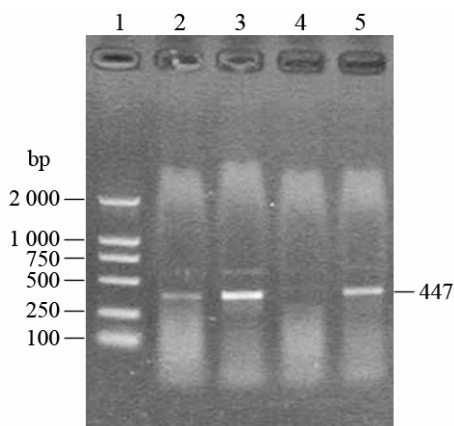


그림 2. *bcl-2*의 RT-PCR산물의 전기영동상사진
1-DNA크기표식자(DL2000), 2- H_2O_2 +AST처리구, 3-대조, 4- H_2O_2 처리구, 5-AST처리구

*bcl-2*는 항아포토시스인자로서 아포토시스촉진제인 H_2O_2 의 처리를 받으면 전사산물의 양이 적어지며 반대로 항아포토시스촉진제인 항산화제의 자극을 받으면 전사산물의 양이 많아진다. 즉 세포의 생존률을 반영한다.

그림 2에서 보는것처럼 H_2O_2 을 처리하면 *bcl-2*의 전사산물(그림 2의 4)은 거의 보이지 않으며 반대로 H_2O_2 +AST처리구에서는 전사산물이 보인다.(그림 2의 2) 이로부터 AST가 H_2O_2 의 아포토시스촉진작용을 방지한다는것을 알수 있다. 즉 항산화효과를 가진다는것을 알수 있다.

2) bax의 전사수준에 따르는 아스타잔틴의 항산화효과검사

bax는 아폽토시스촉진인자로서 아폽토시스촉진제인 H_2O_2 의 처리를 받으면 전사산물의 양이 많아지며 반대로 항아폽토시스촉진제인 항산화제의 자극을 받으면 전사산물의 양이 적어진다. 즉 bcl-2처럼 세포의 생존률을 반영하지만 bcl-2와 반대로 작용한다. 이로부터 bcl-2와 반대로 작용하는 bax의 전사수준을 검사하여 AST의 항산화효과를 정확히 평가하기 위한 실험을 진행하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는것처럼 H_2O_2 을 처리하면 bax의 전사산물(그림 3의 4)은 진하게 나타나며 반대로 H_2O_2 +AST처리구에서는 전사산물이 연하게 보이지만(그림 3의 2) 대조(그림 3의 3)보다는 조금 진하게 보인다. 이로부터 AST가 H_2O_2 의 항아폽토시스작용을 한다는것을 알수 있다. 즉 항산화효과를 가진다는것을 알수 있다.

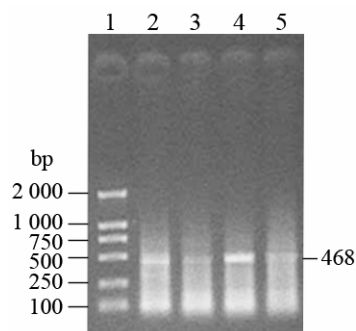


그림 3. bax의 RT-PCR산물의 전기영동상사진

1-DNA 크기표식자(DL2000),
2- H_2O_2 +AST처리구, 3-대조,
4- H_2O_2 처리구, 5-AST처리구

맺는 말

bcl-2는 항아폽토시스인자로서 아폽토시스촉진제인 H_2O_2 의 처리를 받으면 전사산물의 양이 적어지나 항산화제인 아스타잔틴을 처리하면 전사산물의 양이 많아진다.

bax는 아폽토시스촉진인자로서 아폽토시스촉진제인 H_2O_2 의 처리를 받으면 전사산물의 양이 많아지며 반대로 항산화제인 아스타잔틴을 처리하면 전사산물의 양이 적어진다.

참고 문헌

- [1] 박형범; 조선생물공학학회지, 3, 6, 주체102(2013).
- [2] S. Bastianetto et al.; Neurobiology of Aging, 23, 5, 891, 2002.
- [3] N. Zamzami et al.; Oncogene, 16, 2265, 2017.
- [4] J. Pu et al.; Biosystems Engineering, 107, 4, 363, 2010.

주체109(2020)년 1월 5일 원고접수

Antioxidant Effect Test of Astaxanthin by Transcription of bcl-2 and bax Genes

Pak Yu Song, Kim Yu Sin and Ra Yong Bok

bcl-2 gene is an anti-apoptosis factor and if this gene is treated with apoptosis accelerator H_2O_2 , the amount of transcriptional products is decreased but if it is treated with antioxidant-astaxanthin, the amount of transcriptional products is increased.

bax gene is an apoptosis acceleration factor and if this gene is treated with apoptosis accelerator H_2O_2 , the amount of transcriptional products is increased but if it is treated with antioxidant-astaxanthin, the amount of transcriptional products is decreased.

Keywords: astaxanthin, apoptosis, bcl-2, bax