

# 비용환자에서 Superoxide Free Radical 생성량과 항산화 효소들의 활성화도\*

계명대학교 의과대학 이비인후과학교실

김 덕 준

= Abstract =

## Levels of Superoxide Free Radicals and Antioxidant Enzymes in Nasal Polyps\*

Deok Jun Kim, M.D.

Department of Otolaryngology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

To investigate the protective function of antioxidant enzymes against reactive oxygen species (ROS) in nasal polyp formation I measured the activity of superoxide dismutase(SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase(GSH-Px), one of antioxidant enzymes of human being which detoxify the toxicity of ROS, also measured the superoxide free radical(one of ROS) production, in nasal polyp and control group. The superoxide free radical production and the activity of CAT increased significantly, that of SOD increased without significantly but the activity of GSH-Px decreased significantly. This result indicates that the decreased activity of GSH-Px causes the increase of production of superoxide free radical which may participate in nasal polyp formation. But the cause of increase and decrease of the activity of antioxidant enzymes in nasal polyp is not understood exactly. I think that further study is needed about the direct relationship between antioxidant enzymes and nasal polyp formation. (Korean J Otolaryngol 38 : 12, 1995)

KEY WORDS : Nasal polyps · Antioxidant enzymes.

## 서 론

비용은 불확실한 병인 및 술후 잦은 재발로 인해 치료에 있어 한계를 보이고 있으며 비과 영역에서 해결해야 할 숙제로 남아 있는 실정이다. 현재까지 비용의 병인에 대하여 많은 연구 보고가 있으나 명확한 생성기전은 알

려져 있지 않고 감염, 알레르기, 면역반응을 포함한 다인자 병인<sup>4)15)32)36)</sup> 등이 주로 언급되어 왔다.

저자는 각종 병적상태에<sup>8)14)16)21)22)23)27)31)33)</sup> 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 활성산소의 일종인 superoxide free radical과 이것의 주 생성효소인 xanthine oxidase를 측정하여 superoxide free radical이 비용형성에 관여한다고 보고한 바 있으며<sup>1)</sup> 본 연구에서는 이러한 활성산소를 무독화 시키는 생체의 방어기전의 하나인 항산화 효소들인 superoxide dimutase(SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase(GSH-Px)의 활성화도를 측정하여 비용형성시 생체의 방어작용에 대하여 알아보

\* 이 논문은 1994년도 계명대학교 신입교원정착연구비로 이루어 졌음.

논문접수일:1995년 8월 28일

심사통과일:1995년 10월 18일

고자 하였으며 superoxide free radical 생성량도 함께 측정하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

1994년 12월부터 1995년 5월까지 계명대학교 동산의료원 이비인후과를 방문한 환자 중 비용을 동반한 만성 부비동염의 진단하에 비내시경 수술을 실시받은 환자 53명(65검체)을 대상으로 2개군, 즉 비용군 52검체 및 부비동 전산화 단층촬영과 수술소견상 정상이라고 생각되는 부비동 점막(주로 후사골동 점막)을 채취한 대조군 13검체로 나누어 각각 superoxide free radical의 생성량과 항산화 효소인 CAT, SOD, GSH-Px의 활성을 측정 비교 분석하였고 검체의 양이 너무 적거나 조직 채취후 보관까지의 시간이 오래 경과되어 측정이 불가능한 경우는 대상에서 제외되어 CAT, SOD, GSH-Px는 각각 47검체, 26검체, 38검체에서 측정이 가능하였고 superoxide free radical의 생성량은 36검체에서만 측정하였다.

### 2. 방 법

수술시 채취한 검체는 가능한 빨리 영하 70℃에서 실험 전까지 보관하였고 검체의 전처치는 적절한 조직을 취한 후 9배량의 0.25M sucrose액을 넣어 teflon glass homogenizer(Thomas사 제품 chamber clearance 0.005~0.007 inch)로 2~4℃를 유지하면서 400rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10W/V%의 조직균질액을 만든 후 이 조직균질액은 refrigerated centrifuge(Dupont사 제품 Sorvall, RT600B)를 사용하여 3,000rpm에서 10분간 원침하여 얻은 상층액을 사용하였다. 검체의 superoxide free radical생성량은 Kim<sup>23)</sup> 등의 방법에 따라 Auchlar와 Voisin<sup>30)</sup>의 방법을 약간 수정하여 사용하였고 1분간에 1mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 nitro blue tetrazolium의 양으로 나타내었다. CAT의 활성측정은 Nelson<sup>24)</sup> 등의 방법에 따라 과산화수소를 기질로 파괴되는 과산화수소의 양을 측정하며 CAT의 활성은 1분간에 1mg의 단백질이 반응하여 파괴된 과산화수소의 양으로 나타내었다. SOD의 활성측정은 alkaline dimethylsulfoxide를 superoxide anion-generating system으로 사용하여 cytochrome C reduction으로 SOD 활성을 측정하는 Hyland<sup>12)</sup> 등의 방법에

의했으며 cytochrome C의 reduction을 50% 감소시키는 것을 1 unit로 하였다. GSH-Px의 활성측정은 GSH-Px에 의해 산화된 glutathione이 glutathione reductase에 의해 환원되면서 감소하는 NADPH의 양으로 GSH-Px의 합성을 측정하는 Palgia와 Valentine<sup>26)</sup>의 방법에 의했으며 GSH-Px의 활성은 1분간에 1mg의 단백질이 반응하여 산화된 NADPH의 양으로 나타내었다. 시료 중의 단백질량은 0.5N perchloric acid와 methanol-ether 3 : 1 혼합액으로 단백을 정제한 다음 biuret법으로 정량하였다. DU 650, Beckman 분광광도계를 사용하였고 유의성검정은 Student t-test에 의하여 검정하였다.

## 결 과

Superoxide free radical의 생성량은 비용군 27검체와 대조군 9검체에서 측정이 가능하였고 비용군에서  $8.28 \pm 3.74$ nmol nitro blue tetrazolium reduced/min/mg protein으로 대조군의  $3.13 \pm 1.72$ 보다 약 2.6배 증가를 보였다(Fig. 1).

CAT의 활성은 비용군 36검체와 대조군 11검체에서 측정이 가능하였으며 비용군과 대조군에서 각각  $8.90 \pm 5.03$ 과  $6.08 \pm 2.83$ μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced/min/mg protein으로 비용군에서 유의있는 증가를 보였다(Fig. 2).

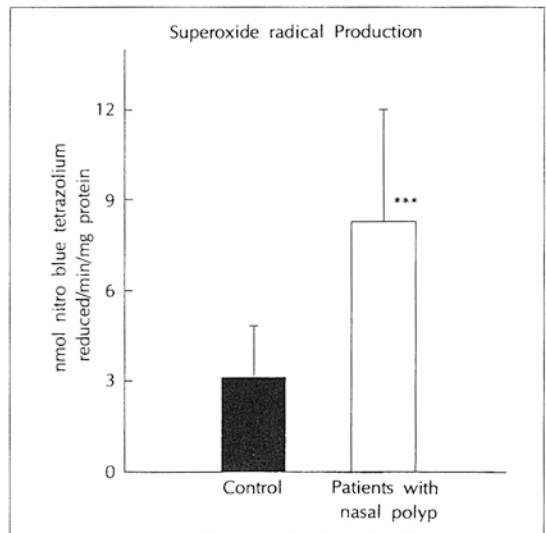


Fig. 1. The amount of superoxide radical production in patients with nasal polyp. Vertical bars are mean  $\pm$  SD. \*\*\*;  $p < 0.001$ .

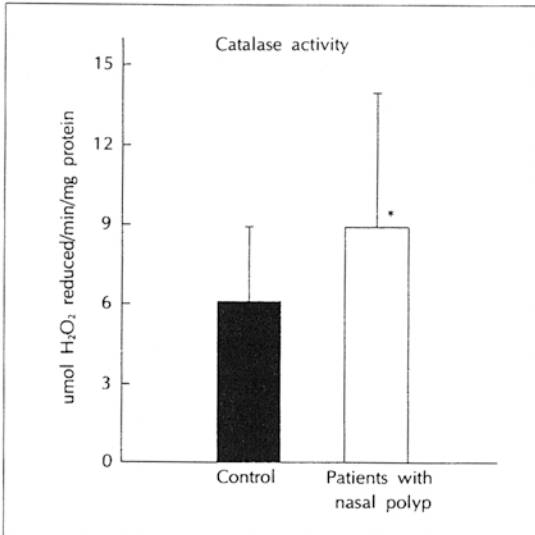


Fig. 2. Catalase activity in patients with nasal polyp. Vertical bars are mean  $\pm$  SD. \*;  $p < 0.05$ .

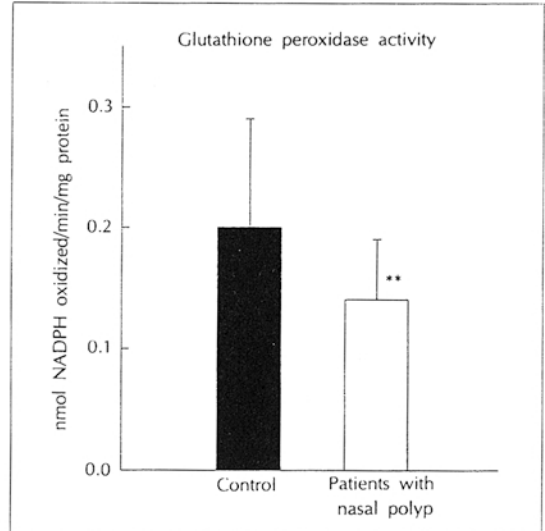


Fig. 4. Glutathione peroxidase activity in patients with nasal polyp. Vertical bars are mean  $\pm$  SD. \*\*;  $p < 0.01$ .

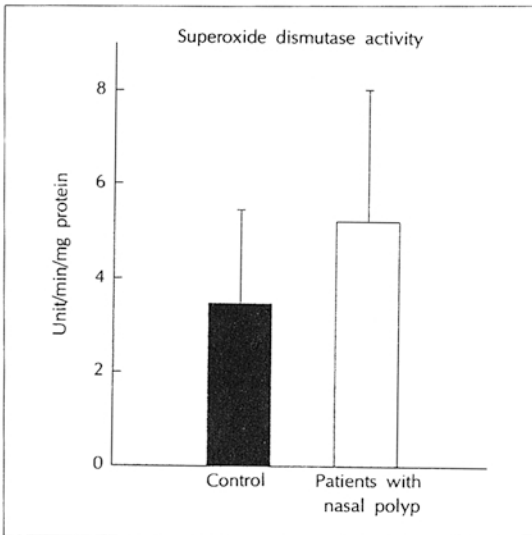


Fig. 3. Superoxide dismutase activity in patients with nasal polyp. Vertical bars are mean  $\pm$  SD. One unit is defined as the amount which inhibited the reduction of cytochrome C by 50%.

SOD의 활성은 비용군 21검체와 대조군 5검체에서 측정이 가능하였고 비용군과 대조군에서 각각  $5.20 \pm 2.83$ 과  $3.47 \pm 1.97$  Unit/min/mg protein으로 비용군에서 증가하였으나 통계학적인 의의는 찾을 수 없었다 (Fig. 3).

GSH-Px의 활성은 비용군 29검체와 대조군 9검체에서 측정이 가능하였고 비용군과 대조군에서 각각  $0.14 \pm 0.05$ 와  $0.20 \pm 0.09$ nmol NADPH oxidized/min/

mg protein으로 비용군에서 유의있는 감소를 보였다 (Fig. 4).

## 고 찰

비용의 병인에 대한 연구는 계속되어져 왔으나 현재까지 명확한 발생기전을 밝혀내지 못하고 있는 실정이며 알레르기성 비염<sup>4)15)36)</sup>, 부비동염<sup>36)</sup>, 천식<sup>5)</sup>, 아스피린불내성(aspirin intolerance)<sup>28)29)</sup>, 낭포성섬유증<sup>30)</sup> 등의 만성질환과 자주 동반되고 현재까지 감염, 알레르기, 면역반응을 포함한 다인자 병인<sup>4)15)32)36)</sup> 등이 주로 언급되어 왔다. 비용의 병인을 밝히기 위한 연구 방법으로는 비용 조직의 생화학적 분석을 통하여 병인을 밝히려는 생화학적 방법(biochemical method)과 비용의 형태학적인 특징을 연구하여 병인을 밝히려는 조직병리학적 방법(histopathologic method) 및 전술한 2가지 방법에 면역학적인 방법을 추가한 면역조직화학적 방법(immunohistochemical method) 등을 들 수 있고 본 연구는 이 중에서 생화학적 방법에 속한다고 볼 수 있다. 1972년 Cauna<sup>6)</sup> 등은 자율신경계의 탈신경(denervation)이 점막에 있는 선의 분비능력을 감소시키고 혈관투과성을 증가시켜 비용을 형성한다고 주장하였고 1977년 Tos<sup>17)35)</sup> 등은 비용형성의 초기단계로서 상피세포가 파열되고 이곳으로 섬유성 조직이 탈출 및 증식되며 상피결손부위로 주위의 상피세포가 이동 및 증식되어

비용이 생긴다는 상피파열설(epithelial rupture theory)을 주장하였다. 1984년 Drake 와 Bickerton<sup>9)</sup> 등은 히스타민 증가가 비용형성의 최종공통경로(final common pathway)의 원인이라 주장하였고 1994년 Liu<sup>10)</sup> 등은 비용조직에서 임파구아파(lymphocyte subset)와 항원에 대한 특이 Ig E항체를 분석하여 알레르기군과 비알레르기군에서 차이점이 없음을 발견하여 알레르기 학설을 반박하고 cytokine을 포함한 세포면역이 비용형성에 관여한다고 주장하였다.

저자는 활성산소의 일종인 superoxide free radical의 생성량 증가가 비용형성의 최종공통경로에 주된 역할을 한다는 가설을 보고한 바 있고<sup>11)</sup> 비용군에서 대조군에 비해 superoxide free radical이 증가한 결과를 보여준 본 연구는 다시 한번 비용형성에 superoxide free radical이 관여한다는 사실을 입증하였다.

인체는 생명을 유지하기 위해 산소를 이용하여 에너지를 얻는다. 이 과정에서 인체에 해가되는 산소화합물의 일종인 활성산소가 생성되며 이 물질은 화학적으로 반응성이 매우 높고 불안정하며 각종 병적상태에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 인체는 이러한 세포독성을 가지고 있는 활성산소를 무독화 시키는 방어기전을 또한 보유하고 있으며 이 중에서 항산화효소가 방어기전의 주된 역할을 하고 있다. 대표적인 항산화 효소들은 SOD, CAT, GSH-Px 등을 들 수 있으며 SOD는 superoxide free radical을 과산화수소와 산소로 대사시키고 CAT와 GSH-Px는 과산화수소를 물과 산소로 대사시키며 GSH-Px는 또한 lipid hydroperoxide를 nontoxic alcohol로 대사시키는 작용도 가지고 있다 (Fig. 5). 비효소적 항산화물질은 Vit E, ascorbate, beta-carotene, 불포화 아미노산 및 지방산, 요산, calcium channel blocker, Ginkgo biloba 등을 들 수 있다<sup>10)25)34)</sup>.

각종 질환에서 항산화 효소를 측정하여 병인을 밝히려는 시도가 계속되고 있으며 1982년 Matkovic<sup>20)</sup> 등은 Duchene muscular dystrophy 환자에서 SOD와 CAT의 활성과 lipid peroxidation이 정상인에 비해 증

가한 것을 발견하여 이러한 항산화 효소들의 진단 및 치료적 가치를 언급하였고 1982년 Marklund<sup>19)</sup> 등은 SOD가 암세포에서 정상세포에 비해 약간 감소하고 CAT나 GSH-Px는 암세포와 정상세포간에 별 차이를 발견할 수 없었다고 보고하였다. 1985년 Atalla<sup>2)</sup> 등은 개의 간을 이용한 실험에서 CAT와 SOD가 free radical이 관여하는 허혈성 손상에 방어역할을 한다고 보고하였고 1986년 Guice<sup>11)</sup> 등은 인공적으로 쥐의 췌장염을 유발시킨 실험에서 free radical이 췌장염의 발생에 관여하며 SOD와 CAT가 방어적 역할을 한다고 보고하였다. 1992년 Jiang<sup>13)</sup> 등은 전신성홍반성루프스 환자의 혈청에서 질병이 활동기에는 SOD의 활성이 정상인에 비해 감소하고 비활동기로 넘어가면서 SOD의 활성이 점차 증가함을 발견하여 전신성홍반성루프스의 병인에 있어 SOD의 활성감소로 인해 과도하게 생성된 free radical이 중요한 역할을 한다고 주장하였고 1993년 Das<sup>7)</sup> 등은 쥐를 움직이지 못하게 고정시키고 4℃에서 2시간 방치하여 위궤양을 유발시키는 실험에서 항산화 물질을 투여한 쥐에서는 위궤양이 적게 발생하는 사실을 발견하여 위궤양 발생에 활성산소가 관여함을 보고하였다.

그러나 비용환자에서는 활성산소와의 관계가 연구된 바 없으며 특히 활성산소를 처리하는 항산화 효소들에 대한 연구는 없었다. 본 연구에서는 비용형성에 관여한다고 보고한 바 있는 활성산소를 무독화 시키는 중요한 3가지 항산화 효소중 CAT와 SOD는 활성이 비용군에서 대조군에 비해 증가되었으며 이는 비용조직에서 증가된 활성산소를 처리하여 항산성을 유지하려는 인체의 노력의 결과가 아닌가 생각되어지고 SOD의 경우 통계학적인 의의가 없었던 것은 SOD가 비용발생에 중요한 요인이 되지 않거나, 검체의 갯수가 적어 통계처리시 이와 같은 결과가 나왔을 가능성도 배제할 수 없다고 생각된다. 반면에 GSH-Px는 비용군에서 그 활성의 감소를 보였으며 이는 활성산소가 비용조직에서 증가하는 한가지 요소로 작용하는 것으로 생각된다.

## 결 론

비용군에서 대조군에 비해 superoxide free radical의 생성량은 약 2.6배 증가를 보였고 항산화 효소인 CAT와 SOD의 활성은 비용군에서 대조군에 비해 증가

1. SOD :  $2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
2. CAT :  $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$
3. GSH-Px :  $2H_2O_2 + \text{reduced glutathione} \longrightarrow 2H_2O + O_2 + \text{oxidized glutathione}$   
lipid hydroperoxides  $\longrightarrow$  nontoxic alcohol

Fig. 5. Detoxifying mechanism of antioxidant enzymes.

하였으며 CAT는 통계적 의의를 찾을 수 있었다. GSH-Px의 활성은 비용균에서 오히려 감소하였다. 이러한 결과는 비용조직에서 활성산소의 증가에는 항산화 효소중 GSH-Px의 활성감소가 주된 역할을 하는 것으로 생각되며 각 항산화 효소의 활성증가에 대한 원인과 비용발생과의 직접적인 관계에 대하여는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## References

- 1) 김덕준 · 김일태 : 비용환자에서의 *Superoxide Free Radical* 및 *Xanthine Oxidase* 측정. *한이인지* 38(1) : 75-80, 1995
- 2) Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, Mackenzie GH, et al : *Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. Transplantation* 40(6) : 584-590, 1985
- 3) Auchlar C, Voisin E : *Nitro blue tetrazolium reduction. In CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*(ed. Boca Raton), Florida, CRC Press Inc, pp123-132, 1984
- 4) Blumstein GI : *Nasal polyps. Arch Otolaryngol* 83 : 266-269, 1966
- 5) Blumstein GI, Tuft L : *Allergy treatment in recurrent nasal polyposis. Amer J Med Sci* 234 : 269-280, 1957
- 6) Cauna H, Hinderer KH, Manzetti GW, et al : *Fine structure of nasal polyps. Ann Otol* 81 : 41-58, 1972
- 7) Das D, Banerjee RK : *Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. Molecular and Cellular Biochem* 125 : 115-125, 1993
- 8) Dashti HM, Al-Sayer H, Behbehani A, et al : *Liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride and the effect of superoxide dismutase and xanthine oxidase inhibitor treatment. L R Coll Surg Edinb* 37 : 23-28, 1992
- 9) Drake-Lee AB, Bickerton R, McLaughlan P : *Free histamine in nasal polyp fluid. Rhinology* 22 : 133-138, 1984
- 10) Freeman BA, Crapo JD : *Biology of Disease : Free radicals and tissue injury. Lab Investigation* 47(5) : 412-426, 1982
- 11) Guice KS, Miller DE, Oldham KT, et al : *Superoxide dismutase and catalase : A possible role in established pancreatitis. Amer J Surgery* 151 : 163-169, 1986
- 12) Hyland K, Voisin E, Banoun H, et al : *Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generation system. Anal Biochem* 135 : 280-287, 1983
- 13) Jiang X, Chen F : *The effect of lipid peroxides and superoxide dismutase on systemic lupus erythematosus : A preliminary study. Clin Immunol and Immunopathol* 63(1) : 39-44, 1992
- 14) Kakimoto K, Kojima Y, Ishii K, et al : *The suppressive effect of gelatin-conjugated superoxide dismutase on disease development and severity of collagen-induced arthritis in mice. Clin Exp Immunol* 94(2) : 241-246, 1993
- 15) Kern RA, Schenck HP : *Allergy : A constant feature in the etiology of so-called mucous nasal polyps. J Allergy* 4 : 485-497, 1933
- 16) Mun KC : *Correlation between superoxide radical production and hepatic damage induced by bile duct ligation. Korean Biochem J* 27 : 346-349, 1994
- 17) Larsen PL, Tos M, Kuijpers W, et al : *The early stage of polyp formation. Laryngoscope* 102 : 670-677, 1992
- 18) Liu CM, Shun CT, Hsu MM : *Lymphocyte subsets and antigen-specific Ig E antibody in nasal polyps. Ann Allergy* 72(1) : 19-24, 1994
- 19) Marklund SL, Westman G, Lundgren E, et al : *Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. Cancer Research* 42 : 1955-1961, 1982
- 20) Matkovic B, Lszl A, Szab L : *A comparative study of superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in red blood cells from muscular dystrophy patients and normal controls. Clinica Chimica Acta* 118 : 289-292, 1982
- 21) Mc Cord JM, Roy RS : *The pathophysiology of superoxide : roles in inflammation and ischemia. Can J Physiol Pharmacol* 60 : 1346-1351, 1982
- 22) Mc Cord JM : *The superoxide free radical; Its biochemistry and pathophysiology. Surgery* 94(3) : 412-414, 1983
- 23) Kim MC, Lee BR, Koh KS : *Calcium and NADH potentiate the superoxide radical production in renal ischemia/reflow of rats. Korean J Biochem* 25 : 1-8, 1993
- 24) Nelson DP, Kiesow LA : *Enthalpy of decomposition*

- of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in UV). *Anal Biochem* 49 : 474-478, 1972
- 25) Oyama Y, Hayashi A, Ueha T, et al : Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons : estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Research* 635 : 113-117, 1994
  - 26) Palgia ED, Valentine WN : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70 : 158-169, 1967
  - 27) Park DA, Bulkley GB, Granger DN : Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 94(3) : 415-422, 1983
  - 28) Samter M, Beers RF Jr : Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy* 40 : 281-293, 1967
  - 29) Samter M, Beers RF Jr : Intolerance to aspirin. *Clinical studies and consideration of its pathogenesis. Ann Intern Med* 68 : 975-983, 1968
  - 30) Shapiro GG, Webb DR : Complications associated with rhinitis : sinusitis, otitis, and nasal polyps. In *Clinical Allergy and Immunology* (ed. Altman LC), Boston, Massachusetts, G.K. Hall Medical Publishers, pp195-202, 1984
  - 31) Slater TF : Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222 : 1-15, 1984
  - 32) Small P, Frenkiel S, Black M : Multifactorial etiology of nasal polyps. *Ann Allergy* 46 : 317-320, 1981
  - 33) Tappel AL : Lipid peroxidation damage to cell components. *Federation Proceedings* 32(8) : 1870-1874, 1973
  - 34) Tong MI, Boehme P, Weglicki WB : Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells. *Circulation Research* 70 : 1099-1103, 1992
  - 35) Tos M, Mogensen C : Pathogenesis of nasal polyps. *Rhinology* 15 : 87-95, 1977
  - 36) Mygind N : Nasal polyps. In *Nasal Allergy* (ed. Mygind N), 2nd Ed. Oxford, London, Blackwell Scientific Publications, pp233-238, 1979