

## 흰쥐의 방사선 피폭후 생물학적 지표로서의 혈액효소

김인규 · 김상복 · 김진규 · 김국찬 · 천기정 · 박효국 · 이강석

한국원자력연구소

### 요 약

생물학적 선량평가를 위한 생화학적 지표 연구로서 흰쥐 혈액내 효소활성도의 변화를 조사한 결과는 다음과 같다. 1) Alkaline phosphatase 활성도는 0.1, 0.25, 0.5, 2, 4 Gy의 방사선 조사후 24시간까지 혈액내 활성도가 증가하였고 72시간 경과시에는 대조군과 비슷한 활성도를 보였다. Creatine kinase는 2, 4 Gy 방사선 조사후 혈액내에서 활성도가 72시간까지 증가하였으나 0.1, 0.25 Gy 방사선 조사시에는 커다란 변화를 보이지 않았다. 2) Malate dehydrogenase 활성도는 0.1, 0.25, 0.5 Gy 방사선 조사시에는 커다란 변화가 없었으며 lactate dehydrogenase는 방사선 조사후 활성도가 감소하였다. 3) GOT의 활성도는 선량률 0.1 Gy/min.로 0.1, 0.25, 0.5, 2, 4 Gy 조사후에는 어떠한 변화도 없었으며 선량률 0.5 Gy/sec.로 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7 Gy로 조사후에는 증가현상을 보이고 있다. Acid phosphatase 활성도는 상기의 어떠한 선량에서도 나타나지 않고 있다. 잠재적으로 이러한 효소들은 방사선 피폭의 지표물질로 사용될 수 있으며 생화학적 지식과 기술을 이용한 좀더 나은 지표물질을 찾기 위하여 계속적인 조사가 필요하다.

*Key words* : 효소활성도, 지표물질

### 서 론

산업사회의 여러분야에서 원자력이용의 급격한 증가로 인하여 방사선 방어에 대한 방법 및 개념의 급속한 진전을 보게 되었다. 이러한 방사선 방어를 목적으로 할때 중요한 문제중의 하나가 방사선 사고시 인간이 과피폭 되었을 경우 이를 인지할 수 있는 기술의 개발 및 적용이다. 따라서 방사선에 의한 손상의 개인적인 차이 때문에 물리적 선량평가방법외에 방사선 사고시 피폭의 유무를 결정할 수 있는 생물학적 지표를 필요로 하고 있다

[1]. 이러한 생물학적 지표의 이상적인 요구 조건은 방사선 과피폭을 인지할 수 있는 민감도 (sensitivity)뿐 아니라 피폭된 선량과 생물학적 지표간에 상관관계가 있어야하며(dose-effect relationship), 다른 물리적, 화학적, 생물학적 요인에 의한 변화보다는 방사선에 의해서만 영향을 받는 특이성(specificity)을 지녀야 하고, 방사선 피폭후 초기에 일어나 변화된 활성도가 지속적으로 유지되어야 하며(persistence), 방사선 피폭 환자에게 더이상의 부담이 되지 않게 손쉽게 측정할 수 있어야 한다. 그러나 지금까지 이러한 요구를 충족

시킬 수 있는 측정기법과 방사선에 의해 일어나는 다양하고 복잡한 생체내 변화를 하나로 대변할 수 있는 지표물질은 규명되지 않고 있다. 따라서 이러한 문제점의 해결 방안으로 생물학적 영향을 인지할 수 있는 기존의 지표들과 다양한 새로운 지표들의 측정을 통한 종합적인 평가가 요구되고 있다[2].

생물학적 지표는 크게 혈액내에서 세포의 증감을 추적하는 혈액학적 지표, 염색체의 이상을 분석하는 세포유전학적 지표, 혈액효소 및 핵산이나 단백질 분해산물을 측정하는 생화학적 지표 등으로 분류될 수 있다[3, 4].

이들 지표중 생화학적 지표로 이용될 수 있는 creatine kinase, alkaline phosphatase, glutamate oxaloacetate transaminase, amylase 등은 특히 근육, 골수, 간, 침샘조직 등에서 방사선 손상으로 인하여 생성될 수 있으므로 혈액내 이들 효소활성도 변화[5, 6, 7, 8]의 측정은 사고시 방사선 피폭환자들의 예후뿐만 아니라, 의학적 치료 및 진단에 필수적이기 때문에 본 연구는 biological dosimetry를 위한 생물학적 지표선정 실험으로 실험동물을 사용하여 방사선 조사후 시간에 따른 다양한 효소 활성도의 변화를 추적하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 방사선 조사선량과 혈액

방사선 조사에 사용되는 실험동물은 대략 200g 정도의 흰쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였다. 대조군의 실험동물은 방사선을 조사하지 않고 실험실에서 48시간 지난 흰쥐를 사용하였으며 방사선 조사선원은  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray로 각 그룹의 선량률은 0.1 Gy/min.로 조절하여 전체 피폭선량이 0.1, 0.25, 0.5, 2, 4 Gy가 되게 각각 전신조사한 후 4, 24, 48, 72시간 경과된 다음 해부하여 후대정맥에서 혈

액을 채취하였다. 또다른 그룹의 선량률은 0.5 Gy/sec.씩하여 전체피폭선량이 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7 Gy씩 전신조사하였으며 4시간 및 24시간이 지난 흰쥐를 해부하여 후대정맥에서 혈액을 채취하였다. 대조군 및 각 실험군의 개체수는 8마리의 흰쥐를 사용하였으며 각 개체당 활성도의 측정은 7회씩 반복하였다. 이러한 측정자료는 각 개체의 평균값을 구하고 개체간의 차이를 mean  $\pm$  standard error로 표현하였다.

### 2. 혈청내 효소활성도의 측정

상기에서 채취한 혈액은 15,000rpm에서 20분간 원심분리하여 세포성분을 침전시킨후 상등액인 혈청부분을 효소활성도 측정의 재료로 사용하였다. 방사선 조사후 측정된 효소의 종류는 lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, alkaline phosphatase, creatine kinase, glutamate oxaloacetate transaminase, acid phosphatase이며 측정방법은 다음과 같다[9,10]. Lactate dehydrogenase는 기질로서 30mM pyruvate를 사용하였으며 6.6mM NADH, 0.2M Tris-HCl buffer(pH 7.3) 및 시료를 3ml cuvette에 넣어 spectrophotometer로 340nm에서 NAD 생성에 따른 흡광도감소를 측정하였다. Malate dehydrogenase 역시 기질로서 250mM oxaloacetate를 사용하여 6.6mM NADH, 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 시료를 섞어 340nm에서 흡광도감소량을 측정하였다. Alkaline phosphate는 기질로서 30mM p-nitrophenol phosphate를 사용하여, 50mM Tris-HCl buffer(pH 8.2) 및 시료를 섞어 p-nitrophenol의 생성에 의한 410nm에서의 흡광도를 측정하였다. Acid phosphatase 활성도 측정은 150mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 사용하였다. Creatine kinase의 활성도 측정은 연속적인 반응(coupling reaction)을 통하여 최종 6-phosphogluconate와 NADH 생성에 따른 340nm에서

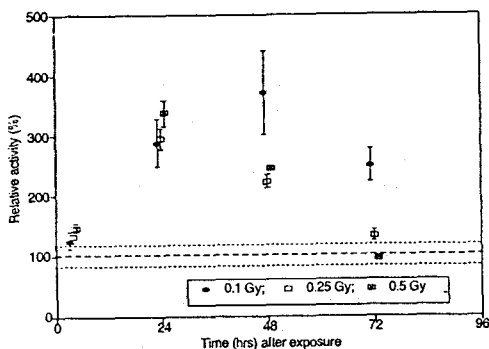
흡광도증가를 측정하였다.

본실험에서는 이러한 기질 및 반응 효소들이 혼합된 sigma사에서 구입한 kit를 사용하여 시료와 기질혼합용액을 1ml cuvette에 넣어 340nm에서 흡광도 증가를 측정하였다. Glutamate oxaloacetate transaminase(GOT)의 활성도 측정도 다음과 같은 연속적인 반응을 통하여 최종 NAD 생성에 따른 340nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 상기 효소활성도 측정 역시 기질 및 반응효소들의 혼합된 kit(sigma)를 사용하여 시료와 기질혼합용액 1ml cuvette에 넣어 340nm에서 흡광도 감소량을 측정하였다.

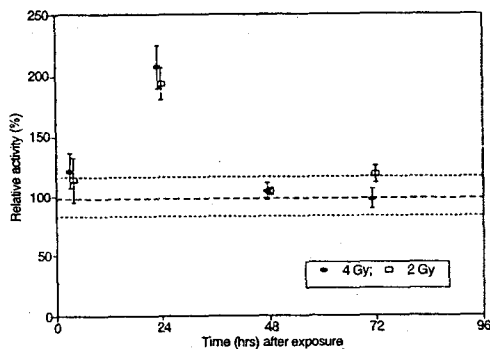
### 결과 및 고찰

#### 1. Alkaline phosphatase

Alkaline phosphatase는 phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phosphoric anhydrase 등으로 분류될 수 있는데 phosphomonoesterase의 경우 십이지장이나 장의 mucosa에 상당히 많은 양이 있으나 신장, 고등동물의 선(gland), bone, 정상적인 혈액에서는 적은 농도로 존재하고 있다. 따라서 이러한 정상적인 조직에 이상이 생기거나 osteosarcoma의 경우 혈청내에서 alkaline phosphatase의 활성도가 증가하게 된다. 선량률이 0.1 Gy/min.일 경우 전신피폭선량이 0.1, 0.25, 0.5, 2, 4 Gy인 흰쥐의 혈액에서 시간경과에 따라 활성도를 측정한 결과 0.1, 0.25, 0.5 Gy에서 4시간 이후부터 활성도가 증가하기 시작하여 24, 48시간에서는 대조군보다 200-300% 정도 활성도가 증가하였으며 0.1 Gy에서는 72시간까지 200% 이상의 활성도를 유지하고 있었다(그림 1). 반면 2, 4 Gy에서는 조사후 24시간 경과후에 활성도가 증가하였다가 48시간에는 급격히 감소하고 있었다(그림 2). 이러한 Alkaline phosphatase는 방사선

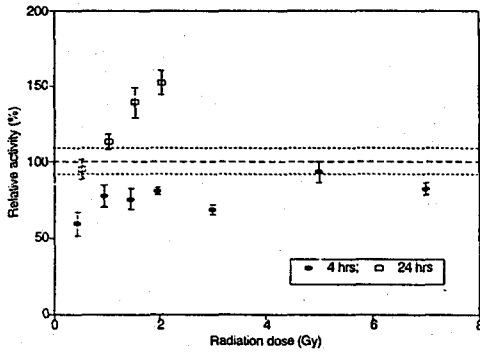


**Fig. 1. Radiation-induced alkaline phosphatase activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation(0.1 Gy/min.), 0.1, 0.25 and 0.5 Gy. The experimental data represent mean value +/- SE.**



**Fig. 2. Radiation-induced alkaline phosphatase activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation(0.1 Gy/min.), 2 and 4 Gy. The experimental data represent mean value +/- SE.**

피폭후 짧은 시간안에 급격한 활성도의 증가를 보이나 24시간 이후 급격한 감소현상을 보이면서 정상화되는데 고선량일수록 정상화가 빨리 이루어지는 것을 볼 수 있었다. 선량률이 0.5 Gy/sec.인 경우 전체 피폭선량이 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7 Gy의

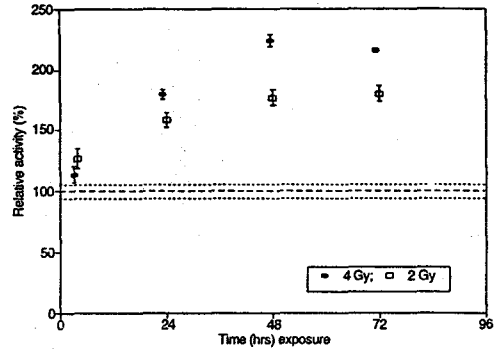


**Fig. 3.** Radiation-induced alkaline phosphatase activity changes in rat blood at different radiation dose (0.5 Gy/second). The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.

흰쥐에서 4시간 경과후 혈액을 채취하여 활성도를 측정한 결과 전체적으로 대조군보다 낮은 활성도를 보이고 있으며 24시간 경과후에는 2 Gy까지 피폭선량에 따라 활성도가 증가하고 있음을 볼 수 있었다(그림 3).

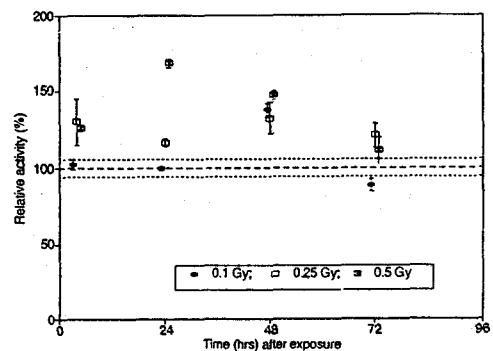
## 2. Creatine kinase

Creatine kinase는 근육 운동에 필요한 ATP 합성에 중요한 효소이며 근육 조직에 많은 양이 존재하고 있다. 선량률이 0.1 Gy/min.인 경우 피폭선량이 2, 4 Gy인 실험군에서는 4시간 이후부터 활성도가 증가하기 시작하여 72시간까지 활성도가 증가하는 현상(2 Gy : 178%, 4 Gy : 223%)을 보이고 있다(그림 4). 그러나 저선량인 0.1, 0.25, 0.5 Gy에서는 고선량에서 보다 뚜렷한 활성도의 변화는 보이고 있지 않다. 0.1, 0.25 Gy에서는 시간 경과에 따른 활성도 차이는 보이지 않으며 0.5 Gy에서는 4시간 이후부터 활성도가 증가하면서 24시간 경과시에는 대조군보다 168%의 활성도 증가를 보이고 있으나 그 이후에도 활성도가 감소하여 72시간 경과후에는 대조군과 비슷한 활성

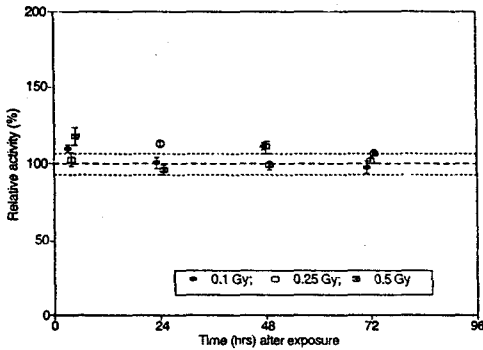


**Fig. 4.** Radiation-induced creatine kinase activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation (0.1 Gy/min.), 2 and 4 Gy. The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.

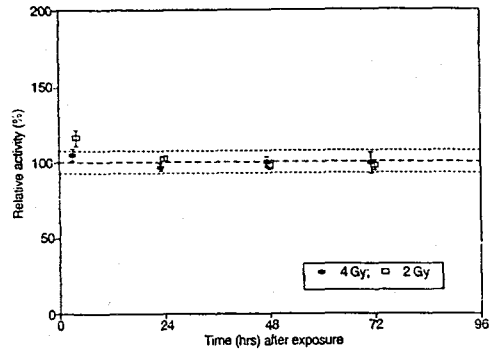
도준위로 떨어지고 있다(그림 5). 이러한 실험적 자료를 볼때 2 Gy이상의 고선량 피폭시 활성도의 변화가 어느 시간 경과시까지 유지할 수 있는지의 조사가 필요하며 0.5 Gy이하의 선량에서는 방사선 피폭의 유무를 판정할 수 없다고 사료되어 진다. 그러나 0.5 Gy 이상의 선량에서는 활성도의 변화가



**Fig. 5.** Radiation-induced creatine kinase activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation (0.1 Gy/min.), 0.1, 0.25 and 0.5 Gy. The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.



**Fig. 6.** Radiation-induced glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation (0.1 Gy/min.), 0.1, 0.25 and 0.5 Gy. The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.



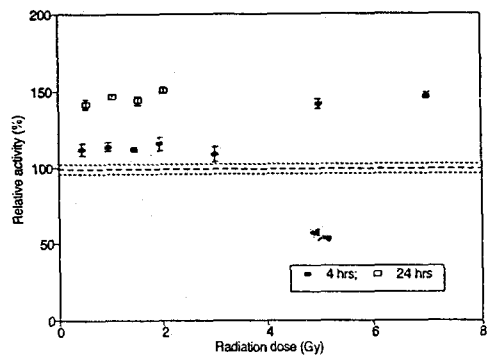
**Fig. 7.** Radiation-induced glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation (0.1 Gy/min.), 2 and 4 Gy. The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.

72시간까지 증가 유지되므로 그 이후의 활성도의 유지가 얼마만큼 되느냐를 연구한다면 0.5 Gy 이상에서 방사선피폭을 감지할 수 있는 중요한 지표가 될 수 있다고 판단된다.

### 3. Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)

Glutamate oxaloacetate transaminase는 간조직 등의 세포의 원형질과 mitochondria에 존재하며 reducing equivalent (NADH)의 이동에 이용되는 효소로서 간기능의 이상유무를 검사하는 중요한 효소이다. 선량률이 0.1 Gy/min.인 경우, 전체피폭 선량이 0.1, 0.25, 0.5 Gy 등의 비교적 저선량뿐 아니라 2, 4 Gy의 선량에서도 시간 경과후 혈액 내에서는 어떠한 활성도 변화를 관찰할 수 없었다 (그림 6, 7). 그러나 선량률이 0.5 Gy/second인 경우에는 4시간 경과후부터 활성도가 증가하기 시작하여 전체피폭선량이 0.5-3 Gy에서 110% 활성도와 3-7 Gy에서는 150% 활성도 증가를 보이고 있었으며 0.5-2 Gy에서 24시간 경과후에는 150% 정도의 활성도 증가현상을 보이고 있다(그림

8). 그러므로 이러한 선량률에서는 좀더 시간 경과에 따른 활성도의 변화를 추적하는 것이 바람직하다고 판단되며 방사선 피폭에 대한 생화학적 지표로서 가능성을 내포하고 있는 것으로 사료된다.



**Fig. 8.** Radiation-induced glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) activity changes in rat blood at different radiation dose (0.5 Gy/sec.). The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.

#### 4. Malate dehydrogenase

Malate dehydrogenase의 대사적 기능으로서 간 조직에서 malateaspartate shuttle, lipogenesis, gluconeogenesis, ATP 합성 등 다양한 대사 기능에 관여하고 있다. 선량률이 0.1 Gy/min.로 전체피폭 선량이 0.1, 0.25, 0.5 Gy인 실험군에서는 대조군에서의 malate dehydrogenase 활성도 보다 시간 경과에 따른 차이를 보이고 있지 않다(그림 9). 반면 전체피폭선량 2 Gy인 실험군에서는 조사후 24시간 경과후 165%, 48시간에서는 205%의 활성도 증가현상을 보이다 72시간 후에는 대조군과 비슷한 활성도로 복구된다(그림 10). 이러한 경향은 alkaline phosphatase의 경우처럼 피폭후 짧은 시간안에 활성도 증가현상을 보이고 있지만 그 활성도가 장시간 유지되지 못하므로 피폭후 장시간이 지난후에는 피폭의 유무를 판단할 수 없게 된다.

#### 5. Lactate dehydrogenase

Lactate dehydrogenase는 해당작용에 관여하는

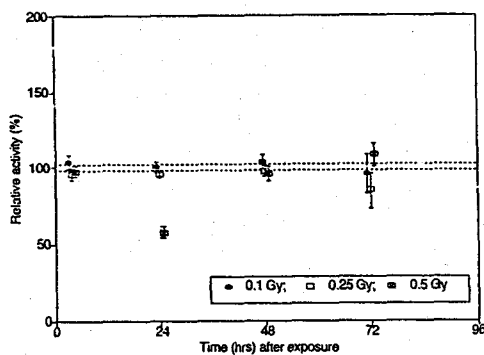


Fig. 9. Radiation-induced malate dehydrogenase activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation(0.1 Gy/min.), 0.1, 0.25 and 0.5 Gy. The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.

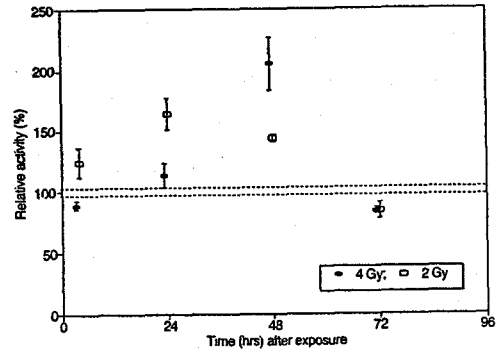


Fig. 10. Radiation-induced malate dehydrogenase activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation (0.1 Gy/min.), 2 and 4 Gy. The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.

효소로서 H와 M type으로 구성되어 있는 4량체 (tetramer)의 분자이다. 선량률이 0.1 Gy/min.인 경우 전체피폭선량이 0.1, 0.25, 0.5, 2 Gy인 실험군에서는 피폭후 짧은시간에 대조군에 비해 같거나 비교적 낮은 활성도를 보이다가(51%~90%)

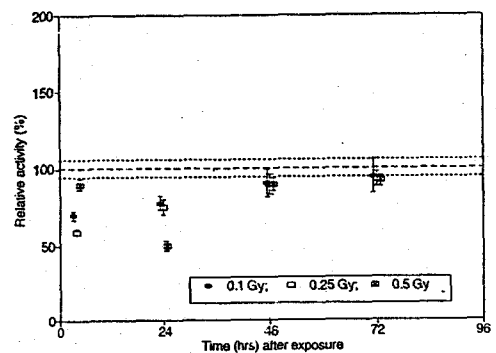
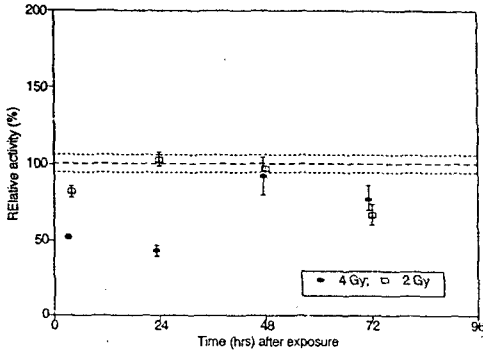


Fig. 11. Radiation-induced lactate dehydrogenase activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation (0.1 Gy/min.), 0.1, 0.25 and 0.5 Gy. The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.



**Fig. 12.** Radiation-induced lactate dehydrogenase activity changes in rat blood at various hours of post-irradiation (0.1 Gy/min.), 2 and 4 Gy. The experimental data represent mean value  $\pm$  SE.

48시간 이후에는 대조군과 같은 활성도를 보이고 있다(그림 11). 4 Gy에서는 전체적으로 대조군의 활성도 보다 낮은 활성도를 보이고 있다(그림 12). 이는 LDH가 방사선에 영향을 받지 않거나 negative indicator로 작용할 가능성이 있음을 시사하여 주고 있다.

**6. Acid phosphatase**

Lysosome은 세포내에 존재하는 단일막 기관으로 세포내 거대분자를 적절하게 분해하는 가수분해효소를 많이 함유하고 있는데 protease, nuclease, glycosidase, lipase, phosphatase, sulphatase 등 40여 종류에 이르고 있으며 모두가 산성 가수분해효소로서 최적 pH가 5.0 정도이다. 이러한 lysosome은 단일막으로 되어 있어 노화, 삼투압, 외부의 독성물질에 의하여 쉽게 손상을 받기 때문에 상기의 효소들이 세포내로 방출되어 세포의 자기분해를 촉진하게 된다. 따라서 방사선 피폭이나 중금속 오염 등에 의하여 lysosome의 단일막이 손상을 받을 가능성이 크므로 단백질 분해

효소나 acid phosphatase 등의 활성도 변화를 측정하므로써 생화학적 지표로서의 사용가능성을 암시할 수 있다. 본 실험에서 선량률이 0.1 Gy/min. 나 0.5 Gy/sec.로 전체피폭선량이 0.1~7 Gy인 실험군의 혈액에서는 피폭후 72시간 경과후까지 acid phosphatase의 활성도는 대조군에서처럼 나타나고 있지 않다. 그러나 이러한 acid phosphatase는 병원에서의 방사선 치료시 국부적인 조사에 따른 생화학적 지표나 lethal dose에 대한 지표로서 이용할 수 있으므로 LET(Linear energy transfer)나 피폭후 경과 시간에 따른 명확한 실험결과가 밝혀져야 한다고 판단된다.

**결론**

본 실험에서 조사한 효소중 alkaline phosphatase와 creatine kinase는 각각 단점을 가지고 있으나 방사선 피폭후 중요한 indicator가 될 수 있다고 판단되었다. 즉 Alkaline phosphatase는 방사선 피폭후 즉시 활성도가 급격히 증가하며 0.5 Gy 이하의 피폭선량에서도 인지가 가능하다는 장점은 있으나 변화한 활성도가 72시간안에 원상태로 회복되는 단점이 있다. 반면 creatine kinase는 1 Gy 이하의 피폭선량에서는 방사선 피폭유무를 인지할 수 없으나 1 Gy 이상의 선량에서는 변화된 활성도가 72시간까지 유지되므로 dose-effect 관계를 조사한다면 좋은 지표가 될 수 있다. GOT의 경우 선량률이 0.1 Gy/min.의 경우에는 활성도의 변화를 관찰할 수 없었으나 0.5 Gy/sec.인 경우 활성도의 변화를 관찰할 수 있었다. 0.5 Gy 이하의 피폭선량에서는 malate dehydrogenase 활성도 측정으로는 방사선 피폭 유무를 인지할 수 없었고 2 Gy 이상의 선량에서는 alkaline phosphatase 보다 변화된 활성도가 짧은 시간안에 소멸되므로 피폭후 장시간 후에는 피폭유무를

인지할 수 없었다.

### 참고문헌

1. Koteles, G. J., and Bianco, A. The need for and importance of biological indicators of radiation effects with special reference to injuries in radiation accidents. IAEA-TECDOC-273: pp. 7-22. IAEA Vienna(1982).
2. Hubner, K. F., Littlefield, L. G. and Dufrein, R. J. Experience in the Pratical Application of Biological Indicators. bga-Schriften, 2:17-34 (1986).
3. Bogel, W., Stamm, A., Heide, L., Reich, E., and Stumpf, E. Biochemical indicators of radiation exposure. Experimental studies on the erythrocyte membrane, the activities of acid phosphatase and amylase, and DNA synthesis. 16th annual meeting of Fachverband fuer Strahlenschutz E.V.: Radiation protection measurements and method. Munich(Germany): pp. 19-22. Oct. 1982. FS-83-30-T.
4. Stamm, A., Schreiber, G., Hofman, R., and Boegl, K. W. Biochemical indicators in human blood for radiation dose assesment. European Society for radiation Biology 21. Annual meeting. Program and Abstracts: pp. 99-141 (1988).
5. Albaum, H. G., Serum enzymes following whole body radiation in the rabbit. Radiat. Res., 12: 186-194(1960).
6. Stepan, J., Havranek, T., and Jojkova, K. Serum alkaline phosphatase as indicators of radiation damage in rat. Radiat. Res., 70: 406-414 (1977).
7. Tamulevicious, P., and Streffer, C. The effects of radiation tryptophan metabolism. Nuklenika-Poland, 26(4-5-6): 717-728(1981).
8. Ohyma, H. Radiation induced biochemical changes in blood and urine: A review 19. NIRS symposium. Chiba(Japan). 10-11. Dec. 1987. NIRS-M-71(1987).
9. Bergemeyer, H. U. Methods of enzymatic Analysis. vol. I. Verlag Chemic Weinheim. Academic Press, Inc. New York and London.(1974)
10. Eisenthal, R. and Danson, M. J. Enzyme Assay A Practical Approach. OIRL PRESS AT OXFORD UNIVERSITY PRESS(1992)



## Serum enzymes as indicators of radiation exposure in rat

In-Gyu Kim, Sang-Bok Kim, Jin-Gyu Kim, Kug-Chan Kim,  
Ki-Chung Chun, Hyo-Kook Park, Kang-Suk Lee

*Korea Atomic Energy Research Institute*

### ABSTRACT

Enzyme activity changes in rat blood as biochemical indicator useful for evaluating exposure dose were experimentally studied. The experimental results obtained are as follows: 1) Alkaline phosphatase activities increased in the blood serum until 24 hours after 0.1, 0.25, 0.5, 2 and 4 Gy irradiation and its activities returned normal condition after 72 hours of post-irradiation. Creatine kinase activities increased in the blood serum until 72 hours after 2 and 4 Gy irradiation but any significant activity changes were not detected after 0.1, 0.25 Gy irradiation. 2) Malate dehydrogenase activities did not reveal available changes after 0.1, 0.25, 0.5 Gy irradiation and lactate dehydrogenase activities decreased in the blood serum after 0.1, 0.25, 0.5 Gy irradiation. 3) Glutamate oxaloacetate transaminase activity changes were detected in the blood serum after 0.1, 0.25, 0.5, 2, 4 Gy(0.1 Gy/min.) and GOT activities increased after 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7 Gy(0.5 Gy/sec.). Any acid phosphatase activities were detected in the blood serum after 0.1, 0.25, 0.5, 2, 4 Gy(0.1 Gy/min.) and 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7 Gy(0.5 Gy/sec.) irradiation.

Potentially some of these enzymes can be used as indicator protein for radiation injury. Further investigation is needed to find better biochemical indicators utilizing recent knowledge and techniques of biochemistry.