

방사선 조사가 쥐의 뇌와 간의 Monoamine Oxidase 활성도에 미치는 영향

고려대학교 의과대학 치료방사선과학교실¹⁾, 서울대학교 자연과학대학 생화학교실²⁾

김 주 영¹⁾ · 최 명 선¹⁾ · 최 명 언²⁾

= Abstract =

Effect of γ -ray Irradiation on the Activities of Monoamine Oxidase in Rat Brain and Liver

Joo Young Kim, M.D.¹⁾, Myung Sun Choi, M.D.¹⁾ and Myung Un Choi, Ph.D.²⁾

¹⁾Department of Radiation Oncology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

²⁾Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea

In order to evaluate the effects of radiation on mammalian neuronal system, we have examined the effect of gamma-ray radiation on the monoamine oxidase (MAO) activity in monoaminergic neurons. Following the whole body irradiation, MAO activity in the rat brain was measured as well as in the liver for the comparative studies between the neuronal and nonneuronal system. The effects of some radiation protectors and sensitizers were also examined in addition to the O₂ effect.

The results can be summarized as follows.

1) The MAO activity of rat brain was minimally affected by the radiation dose up to 1,700 cGy. Radiation dose above 2,500 cGy inhibited the brain MAO activity by no less than 10%. MAO-A form was found to be particularly sensitive to radiation. The liver MAO was somewhat inhibited (by about 5%) but hardly dependent on the dose of radiation.

2) The inhibitory effect on the brain was initiated immediately by the radiation dose of 2,500 cGy. On the contrary, for the liver, the inhibitory effect became apparent only 2 days after irradiation.

3) Two days after a dose of 2,500 cGy, Vmax and Km of the brain mitochondrial MAO decreased. For liver, Vmax decreased while Km increased, which indicates the kinetic patterns for the neuronal and nonneuronal systems are not affected similarly by radiation.

4) The effect of several known radiation protectors and sensitizers on MAO activity was tested but no definite results were obtained. The level of -SH group increased in some degree upon radiation but not by the compounds.

5) MAO activity was not affected by O₂ concentration, while an elevated level of lipid peroxidase was found under the same condition.

The results described here indicate that characteristics of MAO, one of the most important central nervous system enzymes, are liable to radiation, which is partially differentiated from the liver MAO. Also indicated are that the -SH groups are hardly related to the effect of radiation but the production of the lipid peroxide seems to be somewhat correlated to the effect of radiation.

Key Words: Brain and liver, MAO activity, Radiation

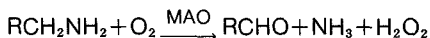
서 론

각종 방사선원은 여러 분야에서 다양한 목적으로 이용되고 있으며, 이와 동시에 이들에 의한 피폭 장애가 사회적 문제로 자두 대두되고 있다. 이와 같은 양면성은 의학계에서도 마찬가지로 여러형태의 방사선이 진단과 치료에 널리 활용되고 있으나, 이들에 의한 세포 손상도 무시할 수 없어 이의 손익 계산은 그 목적에 따라 적절히 조절되어야만 한다. 암의 방사선 치료법도 암세포에 방사선 효과를 극대화시키는 한편 정상조직의 손상을 최소화 하는 방법이 추구하고 있으며, 이의 기초는 방사선 생물학에 근거를 두고 있다고 하겠다.^{1,2)}

방사선 생물학의 여러 표적중 고등 동물의 효소계 연구는 초보단계를 벗어나지 못하고 있으며³⁾, 특히 신경계에 미치는 방사선 영향 연구는 더욱 제한되어 있다. 뇌의 신경 전달물질 대사에 관여하는 효소들에 대한 γ -중성자 혼합 방사선 영향 연구에서는 초기 4분 이내에 벌써 monoamine oxidase가 상당히 줄어들고 choline acetyltransferase와 RNA polymerase도 감소하나 acetylcholinesterase는 변하지 않고 있음이 관찰되었다⁴⁾. Hunt 연구팀에서는 고선량의 전리성 방사선에 의한 뇌 기능 연구를 지속적으로 수행하고 있어 방사선으로 인한 신경 전달물질의 방출, Na^+ 이온의 운반등의 신경화학 정보가 부분적으로 보고되고 있다⁵⁻⁸⁾.

그외 전리성 방사선에 의한 생쥐의 행동 변화가 endorphine과 연계되어 있으리라는 보고가 있으며⁹⁾ 낮은 양의 microwave도 choline uptake를 저해해 중추신경계의 cholinergic activity에 영향을 줄것으로 추정되고 있다¹⁰⁾. 따라서 여러 형태의 방사선이 중추신경계에 미묘한 변화를 가져온다는 것은 매우 흥미있는 사실이 되고 있다.

Monoamine oxidase (MAO)는 catecholamine계 열 신경 전달물질을 비롯하여 serotonin과 histamine 등에 작용하여 탈아민 산화반응을 촉매하여 이들 물질의 대사에 핵심역할을 한다. 이 효소는 여러 조직에 널리 분포되어 있으며 주로 mitochondria의 바깥 세포막에 위치하고 있는 것으로 알려져 있다.



따라서 MAO의 활성도는 세포막의 지방질과 불가분의 관계에 있으며^{11,12)} 기질과 여러 저해제에 대한 반응성에 따라 MAO를 A형과 B형으로 나눈다¹³⁾. 대표적 저해제로 clorgyline은 A형에, deprenyl은 B형에 각각 선택적으로 반응한다고 알려져 있다. MAO는 monoamine 신경 전달물질들의 조절에 관여하기 때문에 이 효소에 관한 연구는 매우 광범위하게 전개되고 있다. 최근의 예로 뇌의 국소 빈혈과 MAO의 관계¹⁴⁾, electroconvulsive shock과 MAO¹⁵⁾, 뇨 독증과 MAO¹⁶⁾, 노화현상과 MAO의 관계¹⁷⁾등을 들 수 있다. 특히 MAO의 촉매반응 결과 생성된 H_2O_2 의 영향¹⁸⁾이나 항산화제에 의한 MAO의 보호¹⁹⁾ 등은 MAO의 방사선 영향 연구에 좋은 정보를 제공해 주고 있다.

본 실험에서는 방사선이 신경계에 미치는 영향 연구의 일환으로 뇌와 간의 MAO를 비교연구하였다²⁰⁻²³⁾. 방사선 조사는 ⁶⁰Co 원격치료기를 사용하였으며 방사선 조사 전후의 kinetic parameter와 각종 방사선 보호제와 민감제의 영향을 살폈다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험동물은 4주 된 암컷 Wistar rat을 사용하였으며 서울대학교 동물사육장에서 기른것을 공급받았다. 각종 측정을 위해 대조군 2마리와 각 조건에 따른 실험군 2마리씩에 방사선을 조사하였으며, 각 조건에서의 실험을 위해 적어도 3회에서 5회까지 반복 조사하였다. 대조군과 실험군의 쥐를 희생시키기 전까지 모두 사료와 물을 충분히 주었다.

2. 시 약

Kynuramine 과 4-hydroxyquinoline, 1,1,3,3,-tetraethoxypropane (TEP), 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB), cystein은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였으며, 2-thiobarbituric acid (TBA)는 Hayashi Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)의 것을 사용하였다. Radiation 하에서의 "chemical effect"를 관찰하기 위한 실험에 사용된 시약중 diamide, buthionine sulfoximine (BSO), 2-oxo-triazolidine-4-carboxylate (OTZ), diethylmalate (DEM), N-ethylmaleimide

(NEM), clorgyline은 Sigma chemical 회사 제품이며, L-ascorbic acid는 shinyo Pure Chemicals Co., Ltd. (Osaka, Japan)의 것을, 그리고 misonidazol은 일본 로슈(ロシュ) 주식회사의 함량 100%짜리 의학 치료용 시약(Lot No. T81195)을 사용하였다. 기타 일반시약들은 모두 일급을 구입하여 사용하였다.

3. 방사선 조사

방사선 조사는 고려대학교 의과대학의 코발트-60 원격치료기를 이용하여 SSD 60 cm 거리에서 조사하였다. In vivo인 경우 살아있는 Wistar 쥐(4주)를 아크릴로 만든 틀 속에 넣어 움직이지 못하게 한 뒤 방사선 조사야를 쥐의 수에 따라 10 cm×10 cm, 26 cm×26 cm에서 분당 선량을 266 cGy, 303 cGy로 조사하였으며, 효과적인 관찰을 위하여 효소의 활동도와 각종 정량 실험은 방사선 조사 후 48시간이 지난 뒤에 행하였다. In vitro의 경우에는 필요한 tissue homogenate를 시험관에 각각 1.5~2.0 ml씩 넣고 얼음을 채운 비이커에 꽂아 방사선 조사야를 10 cm×10 cm으로 하여 25 Gy 또는 50Gy 조사한 뒤 실험실로 옮겨 2시간 이내에 실험하였다.

Hyperbaric 또는 anaerobic 조건하에서의 실험을 위한 인위적인 hyperoxygen (O₂) 주입과 nitrogen (N₂) gas flushing시에는 sample이 담긴 시험관을 rubber cap으로 막은 뒤 10 cm 가량되는 주사바늘을 꽂아 사용하였다.

4. 쥐로부터 Assay Source의 분리

생후 약 4주된 Wistar 암컷을 참수하여 그 뇌와 간을 즉시 꺼내어 assay source로 사용하였다. 뇌로부터 효소원을 분리하는 방법은 Choi와 Suzuki의 방법²⁴⁾에 따랐다. 즉, whole brain을 0.32 M sucrose (10% w/v) 용액내에서 Elvehjem homogenizer를 사용하여 overhead motor로 5회 stroke하여 homogenation했다. Homogenate를 Sorvall RC5C형 원심분리기에 SS-34 rotor를 사용하여 900×g에서 15분 원심분리하고, 그 상층액을 취해서 다시 11,000×g에서 20분 원심분리하여 얻은 crude mitochondria pellet (P₂ fraction)을 처음 부피의 1/3만큼의 sucrose 용액으로 suspension하여 (0.8~1.0 mg protein/100 μl) 사용하였다. 간은 sottocasa 등의 방법²⁵⁾에 따라 잘게 다

져서 5배의 0.25 M sucrose 용액내에서 ultra-turrax homogenizer로 30초씩 3회 갈아 첫번째 homogenate를 얻었다. 이를 다시 2배의 sucrose 용액을 더하여 30초씩 2회 갈아 전체 무게의 15배의 부피로 homogenation한 것(0.6~0.8 mg protein/100 μl)을 효소원으로 사용하였다. 분리하는 동안에 온도는 4°C 이하를 유지하였다.

5. Monoamine Oxidase의 활동도 측정

Monoamine oxidase (MAO)의 활동도는 Mayanil 등의 방법²⁶⁾을 따랐으며, 기질 kynuramine의 농도와 완충용액의 pH, 그리고 반응 시간 등을 검토한 후 최적조건을 재수립 하였다. 약 1 mg protein이 함유된 효소원은 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)와 0.08 mM MgCl₂, 그리고 0.11 mM kynuramine을 넣고, 최종부피를 3.0 ml로 맞춘 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 차게 식힌 뒤 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)와 0.08 mM MgCl₂, 그리고 0.11 mM kynuramine을 넣고, 최종부피를 3.0 ml로 맞춘 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 차게 식힌 뒤 0.5 M NaOH 0.2 ml와 10% ZnSO₄ 0.4 ml를 넣어 반응을 종결시켰다. 실온에서 30분 이상 방치시키거나, 또는 끓는 물속에 5분 정도 두어 흰 침전물이 생기면 table top 원심분리기(Hanil Centrifuge Co., Ltd., HA-1000-3)를 사용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상층액을 채취하여 330 nm에서 흡광도값을 읽었다. UV값 측정에는 Shimadzu spectrophotometer UV-120-02를 사용하였다. 측정된 optical density (O.D.)는 4-hydroxyquinoline을 사용하여 얻은 standard curve와 비교하여 생성된 product를 n mole/mg/ protein/min으로 나타냈다. MAO 활동도는 duplicate로 측정하였으며, 한 몫의 실험에서는 대개의 경우 5% 이내의 오차를 보여주었다. Kinetic parameter를 구하기 위해선 kynuramine 농도를 바꿔가며 MAO의 활동도를 측정하였으며, MAO에 대한 각종 화학물의 영향을 검토하기 위해서 활동도 측정시 각 화학물의 최종 농도를 0.2 mM로 하였다(단, Misonidasol의 경우는 0.1 mM).

6. Lipid Peroxide 정량

Lipid peroxide 정량은 Noda 등의 방법^{27,28)}을 그

대로 이용하였다. 200 μ l와 assay source (약 2 mg protein)에 8.1% SDS 용액 200 μ l와 20% acetic acid-NaOH buffer (pH 3.5) 1.5 ml, 그리고 0.57% TBA (thiobarbituric acid) 용액 2.1 ml를 넣어 최종부피를 4.0 ml에 맞춘 다음 95°C에서 1시간 동안 가열하여 발색시켰다. 발색된 용액을 식힌 후 n-butanol:pyridine (15:1, v/v) 혼합 유기용매 4ml를 넣어 격렬히 섞어주었다. 이 혼합용액을 간단한 원심분리기에서 4,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 유기층을 취해 532 nm에서의 흡광도 값을 읽었다. TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane)를 사용하여 표준곡선을 만들었으며, 이로부터 생성된 malondialdehyde (MDA)의 n mole을 lipid peroxide의 값으로 계산할 수 있었다.

7. Cysteinyl (-SH)기 정량

DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) salt 만드는 방법과 cysteinyl기 정량법은 Kim등²⁹⁾의 방법을 따랐다. DTNB는 물에 불용성이기 때문에 salt로 만들어 사용해야 하므로 1 g의 DTNB에 소량의 증류수(1 ml이하)를 넣고, 얼음물 속에서 저어주면서 4 M KOH를 천천히 가하여 pH 7이 되도록 중화하였다. 여기에 황성탄 0.5 g을 두번에 나누어 0.25 g씩 넣은 후 상온에서 filter paper를 사용하여 여과하였으며, 맑은 오렌지색 용액이 얻어질 때까지 몇 번 더 재여과하였다. 최종 여과 용액에 동량의 ethanol을 넣고 4°C에서 1시간 동안 방치하였다. 얻어진 침전물은 Büchner funnel로 여과한 뒤 소량의 ethanol로 씻어준 후 공기 중에서 건조시켰다. 이렇게 해서 얻어진 DTNB dipotassium salt를 cysteinyl group 측정에 사용하였다. -SH기를 정량하기 위해 약 300 μ g protein에 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.4)와 0.5 mM EDTA, 0.2% SDS, 그리고 0.5 mM DTNB를 넣어, 최종 부피가 1.0 ml로 되게 한 다음 즉시 412 nm에서 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate anion의 노란색 용액의 흡광도를 읽었다. 상대적인 cystein의 양은 O.D./100 μ g protein으로 나타냈으며, 경우에 따라선 cystein을 이용하여 그린 표준곡선을 바탕으로 100 μ g protein 당 존재하는 cysteine을 n mole로 나타내었다.

8. 기타 실험방법

Protein 정량은 BSA (bovine serum albumin)를

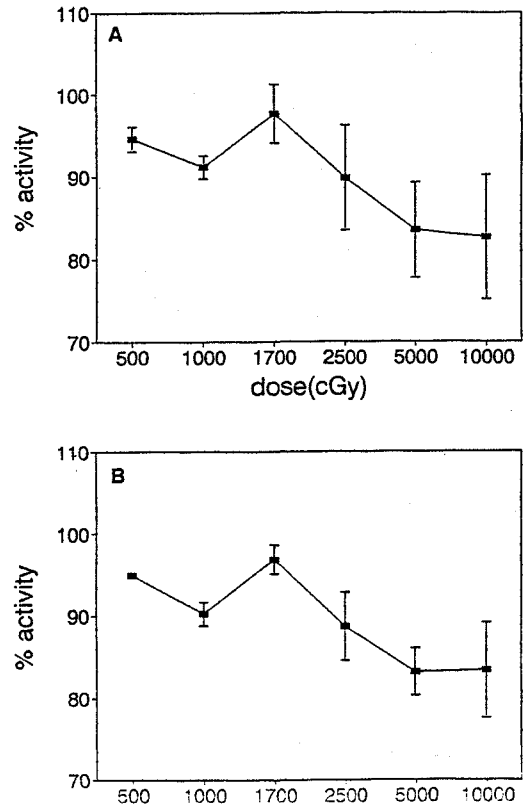


Fig. 1. Dose-response effect of γ -ray radiation on the MAO activity in rat brain. A, the activities of brain homogenate without clorgyline; B, the activities with 5 mM clorgyline.

표준으로 하여 Lowry 방법³⁰⁾으로 하였다.

결 과

1. 방사선량에 따른 영향

Wistar 쥐를 사용한 일련의 예비 실험 결과 MAO 활동도 측정 시기는 방사선 조사후 48시간이 가장 적합한 것으로 판단되었다. 그리고 MAO의 활동도는 밤과 낮에 따라 주기적으로 변하므로 가능한한 같은 시간대에 실험을 수행하였다. 방사선 조사선량에 따른 MAO 활동도의 변화를 관찰하기 위해 방사선량을 달리하여 쥐에게 각각 조사한 뒤 2일 후 뇌를 꺼내 MAO를 측정하여 정상쥐의 MAO와 비교하였다(Fig. 1). 각 조건에 따른 MAO 활동도 측정은 이중으로 행하였으며, 적어도 3회에서 5회까지의 결과를 평균하여 얻었다. 여기

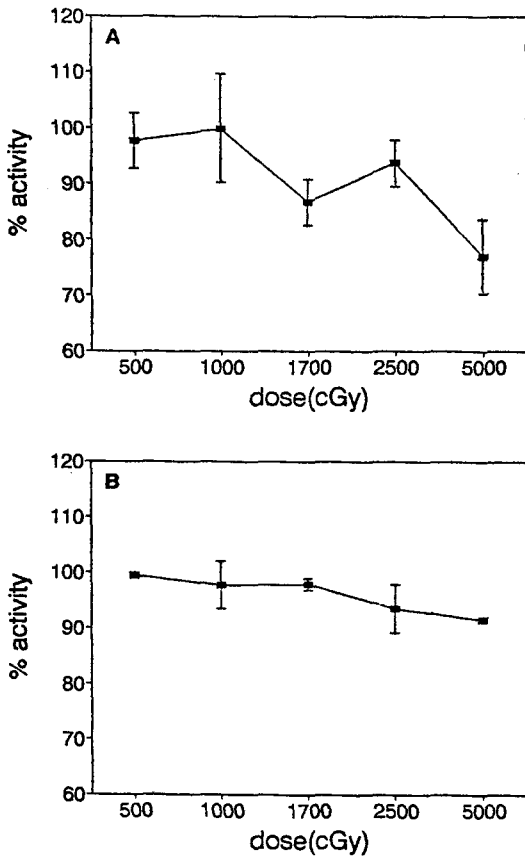


Fig. 2. Dose-response effect of γ -ray radiation on the MAO activity in mitochondrial fraction of rat brain. A, the activities of brain mitochondria without clorgyline; B, the activities of brain mitochondria with 5 mM clorgyline.

서 사용한 MAO 기질 kynuramine은 MAO-A와 MAO-B의 두 형태의 MAO에 의해 다 탈아민화 된다. 따라서 Fig. 1A는 MAO-A와 B의 활동도를 함께 나타내 주며, 1,700 cGy까지는 약간의 저해작용이 관찰되었으나 2,500 cGy부터는 더 심하게 활동도가 줄어 5,000 cGy에서는 15% 이상의 활동도가 감소하였다. Fig. 1B는 MAO-A의 활동도를 선택적으로 막는 clorgyline 존재하에서 실험하였으며, 그 결과 MAO-B의 활동도도 2,500 cGy 이상의 흡수선량에서는 그 활동도가 꽤 줄어들었다. 한편 MAO는 주로 mitochondria의 바깥 세포막에 존재한다고 알려져 있으므로 뇌 전체 파쇄액으로부터 mitochondria (P_2 fraction)를 분리하여 MAO 활동도를 측정하였다(Fig. 2). 이 실험조건

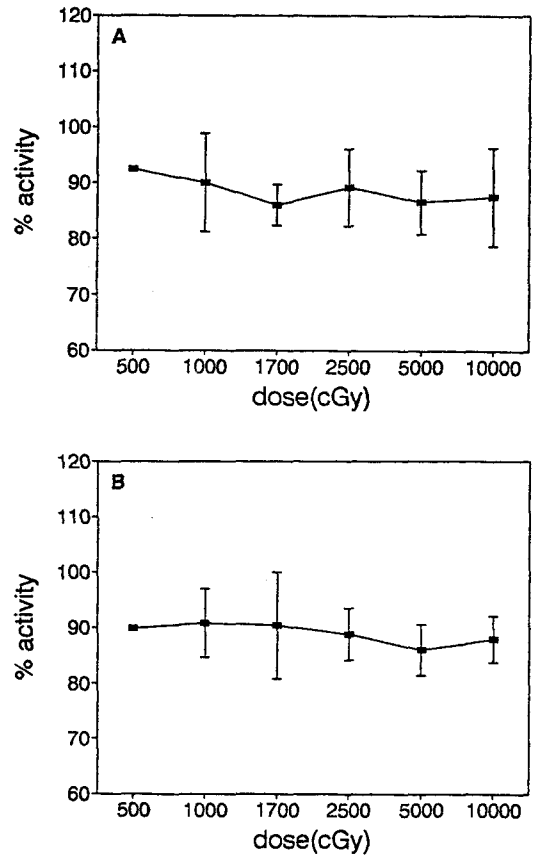


Fig. 3. Dose-response effect of γ -ray radiation on the MAO activity in rat liver. A, the activities of whole liver homogenate; B, the activities with 5 mM clorgyline.

하에서는 더 높은 MAO의 활동도가 측정되었으며, Fig. 2A 결과는 Fig. 1A와 비슷하나 1,700 cGy에서도 MAO 활동도가 꽤 줄어든 것처럼 보였다. MAO-A 저해제 clorgyline을 넣은 Fig. 2B에서의 활동도는 흡수선량 변화에 민감하지 않아 MAO-B 활동도가 γ 방사선 조사에 덜 영향을 받는 것처럼 보였다. 이 결과는 전체 파쇄액을 다 사용한 Fig. 1B와 일치하지 않았다.

방사선 조사 2일 경과후 비 신경계인 간을 꺼내 파쇄하여 흡수선량에 따른 효소 활동도를 측정한 결과, 전반적으로 MAO 활동도는 약 5% 내외가 줄어들었으나 조사선량에 따라 큰 변화를 보여주지 않았다(Fig. 3). Clorgyline 존재하에서도 같은 결과를 보여주고 있어 간의 MAO-A와 B는 방사선에 대한 영향을 비슷하게 받고 있는 것으로 간주 되었다(Fig. 3B).

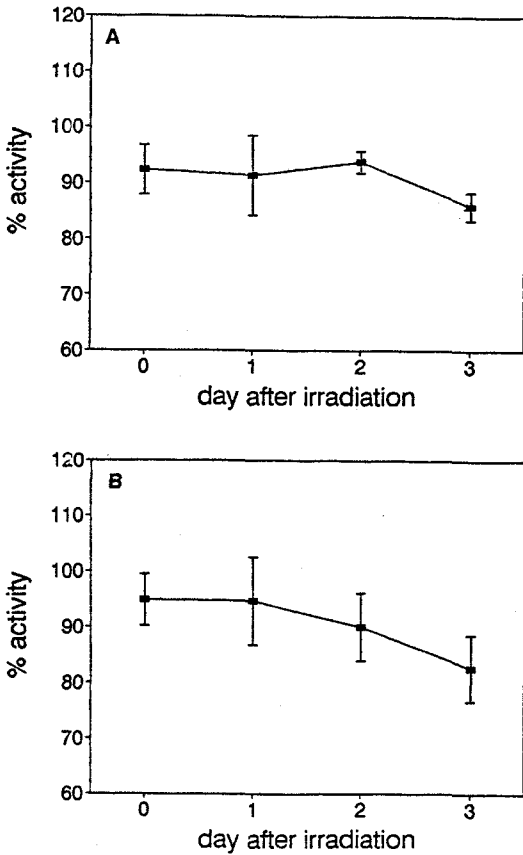


Fig. 4. Alteration of MAO activities in brain after a dose of 2,500 cGy. A, the activities of whole brain homogenate; B, the activities of brain homogenate with 5 mM clorgyline.

2. 방사선 조사후 시간에 따른 변화

흡수선량이 2,500 cGy 일때부터 MAO가 비교적 많은 방사선 영향을 받고 있으므로 이 조건하에서 방사선을 조사한 후 시간에 따라 각 조직에서의 MAO 활동도가 어떻게 변화하는가를 관찰하였다(Fig. 4). 뇌 전체 파쇄액에서의 MAO의 활동도는 방사선 조사후 즉시 그 활동도가 줄어들었으며 그 후 시간에 따라선 큰 변화가 없음이 관찰되었다(Fig. 4A). 그리고 clorgyline을 넣은 조건 하에서 MAO-B는 상대적으로 좀 더 시간에 따라 영향을 받는 것처럼 나타났다(Fig. 4B). 간의 MAO의 경우는 뇌의 MAO 보다 시간에 따라 더 민감하게 MAO 활동도가 줄어들었으며(Fig. 5B), 특히 clorgyline 존재하에서 MAO-B는 2일 경과 후 더 심하

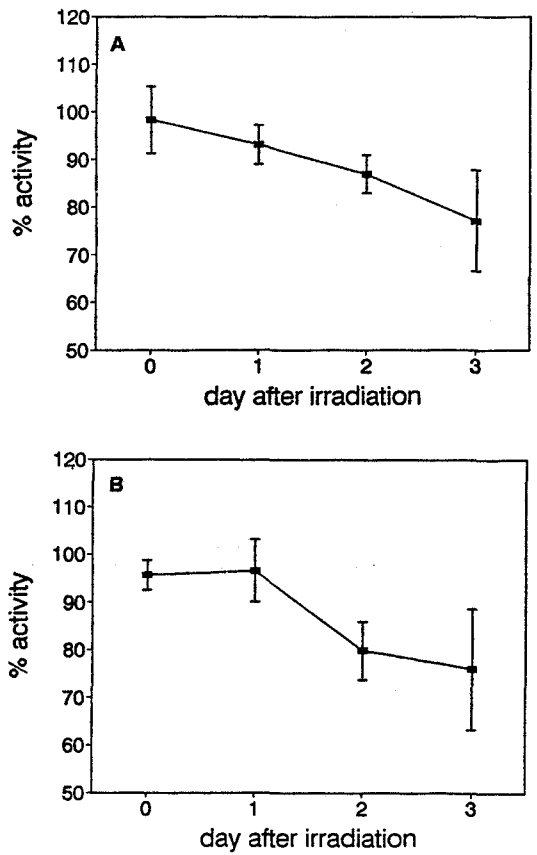


Fig. 5. Alteration of MAO activities in liver after a dose of 2,500 cGy. A, the activities of whole liver homogenate; B, the activities of liver homogenate with 5 mM clorgyline.

게 활동도가 줄어들어(-20% 정도) 것으로 나타났다(Fig. 5B). 이 결과는 뇌의 MAO에서의 결과와 대조적이며 흡수선량의 영향과 함께 비교하면 두 조직간의 차이가 더 뚜렷해진다.

3. Monoamine Oxidase의 기질 의존성

대개의 효소들은 어떤 형태로든 그 특성이 변하면 그 kinetic parameter가 영향을 받는다. 따라서 방사선 조사후 MAO 활동도가 감소하였으므로 이들 효소들의 기질 의존성을 검토하였다. 2,500 cGy 조사전과 후 쥐의 뇌 전체 파쇄액과 mitochondria 분획(P₂ 분획)에서의 Michaelis-Menten 형태의 효소 반응속도론적 실험이 수행되었으며, 비교적 이상적인 기질에 대한 포화 곡선이 얻어졌다(Fig. 6A). 이 실험값으로부터 Km 값

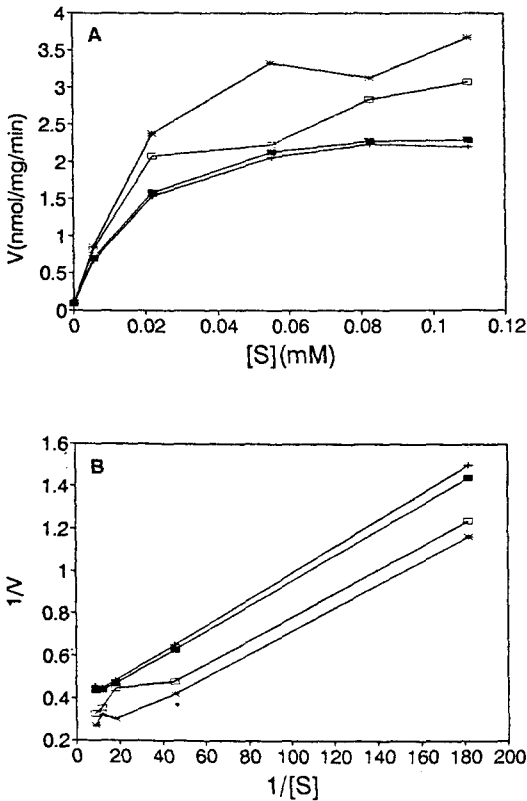


Fig. 6. Kynuramine dependence of brain MAO activity. The enzyme kinetics of A was carried out 2 days after a dose of 2,500 cGy. B is the Lineweaver-Burk plot of A. ■, control kinetics of brain homogenate; *, control kinetics of brain mitochondria fraction; +, irradiated kinetics of brain homogenate; □, irradiated kinetics of brain mitochondria fraction.

과 Vmax 값을 계산하였다(Fig. 6B). 방사선 조사 전후의 결과를 비교하면 전체 파쇄액의 경우 매우 근소한 차이만을 보여 주었으나 P₂ 분획에서는 방사선 조사 후 Km 값은 0.023 mM에서 0.017 mM로 줄어들었으며, Vmax 값은 4.52 nmol/mg protein/min에서 3.40 nmol/mg protein/min으로 바뀌었다. 이는 방사선 조사 후 mitochondria의 MAO의 효소특성에서 기질에 대한 친화성이 어느 정도 증가되었으나 활동도는 상대적으로 감소되었음을 의미한다. 간의 MAO의 경우는 Vmax에는 약간의 감소가 관찰되나 Km 값은 커져서 전체 파쇄액의 경우 방사선 조사 후 0.073 mM에서 0.086 mM로 증가했으며 mitochondria 분획인 경우 0.

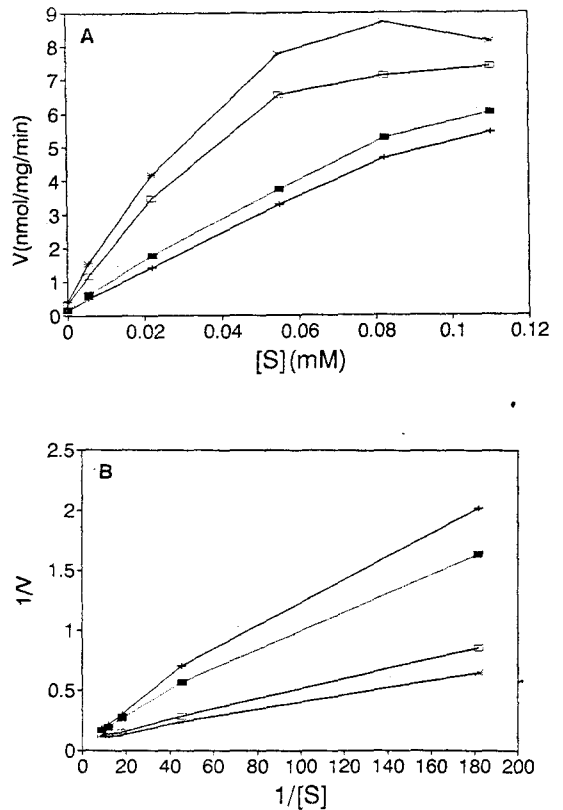


Fig. 7. Kynuramine dependence of liver MAO activity. The enzyme kinetics of A was carried out 2 days after a dose of 2,500 cGy. B is the Lineweaver-Burk plot of A. ■, control kinetics of liver homogenate; *, control kinetics of liver mitochondria fraction; +, irradiated kinetics of liver homogenate; □, irradiated kinetics of liver mitochondria fraction.

Table 1. Effect of γ -ray Irradiation on Kinetic Parameters of MAO Activity in Mitochondria Fraction of Rat Brain

Irradiation (cGy)	Km (mM)	Vmax (nmol/mg protein/min)
control	0.030	5.9
1,000	0.028	5.3
2,500	0.025	4.8

037 mM에서 0.047 mM로 증가했음을 나타내준다 (Fig. 7). 따라서 간의 MAO는 방사선 조사 후 기질에 대한 친화성이 꽤 감소함을 보여주어 이 kinetic parameter 역시 뇌와 간의 MAO가 각각 틀리게 방사

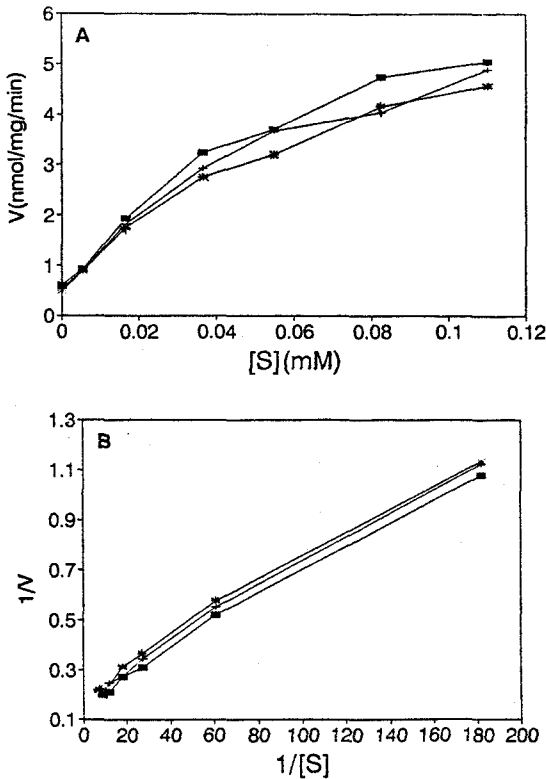


Fig. 8. Effect of γ -ray radiation on the kinetics of brain mitochondria MAO. The enzyme assay of A was carried out 2 days after irradiation. B is the Lineweaver-Burk plot of A. ■, control kinetics; +, a dose of 1,000 cGy kinetics; *, a dose of 2,500 cGy kinetics.

선 영향을 받고 있음을 말해주고 있다.

뇌 MAO 효소의 반응속도론적 변화 양상을 좀 더 자세히 밝히기 위해 방사선 조사선량에 따른 MAO 활동도의 변화를 관찰하였다(Fig. 8). 이 결과는 Fig. 6에서와 같이 조사선량이 증가함에 따라 K_m 값과 V_{max} 값이 함께 줄어들고 있다(Table 1).

4. 각종 화합물에 의한 영향

암의 방사선 치료를 효과적으로 하기 위해 보호제나 민감제로 여러 화합물들을 사용하고 있다. 이 실험에서도 몇가지 화합물을 동원하여 cysteinyl group을 제거하거나 또는 antioxidant를 넣어 단백질의 산화를 막을 경우 MAO의 활동도에 어떤 영향을 미치는가를 검토하였다. 검토한 화합물은 diamide, buthionine sulfox-

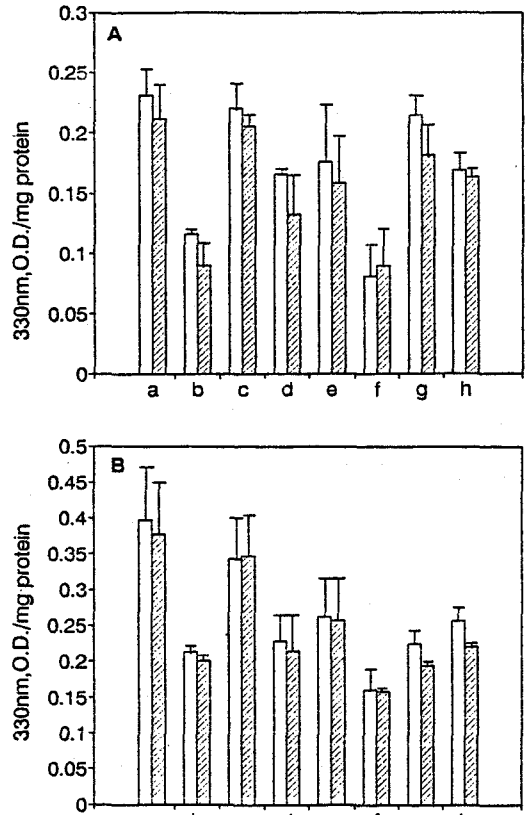


Fig. 9. Effect of some chemicals on the MAO activities of rat tissues after the irradiation of 2,500 cGy. A, the activities of brain mitochondria fraction; B, the activities of liver homogenate. □, control activities before irradiation; ▨, activities after irradiation. a, no chemical; b, diamide; c, buthionine sulfoxiamine (BSO); d, 2-oxo-triazolidine (OTZ); e, ascorbic acid; f, N-ethylmaleimide (NEM); g, diethylmalate (DEM); h, misonidasol.

imine (BSO), 2-oxo-triazolidine (OTZ), ascorbic acid, N-ethylmaleimide (NEM), diethylmalate (DEM), misonidazol 이며, 방사선 조사 전후에 이들 화합물들의 MAO에 대한 영향을 in vitro로 비교했다(Fig. 9). 전체적으로 특별한 영향은 관찰되지 않았으나, BSO나 ascorbic acid의 경우 간에서 매우 미미한 보호 효과가 있는 것처럼 보였다. 뇌의 경우 N-ethylmaleimide (NEM)가 MAO를 보호한 것처럼 나타났으나 활동도 절대값이 낮아서 믿을만한 결과로 말하기 어려우며, 간의 경우 buthionine sulfoximine

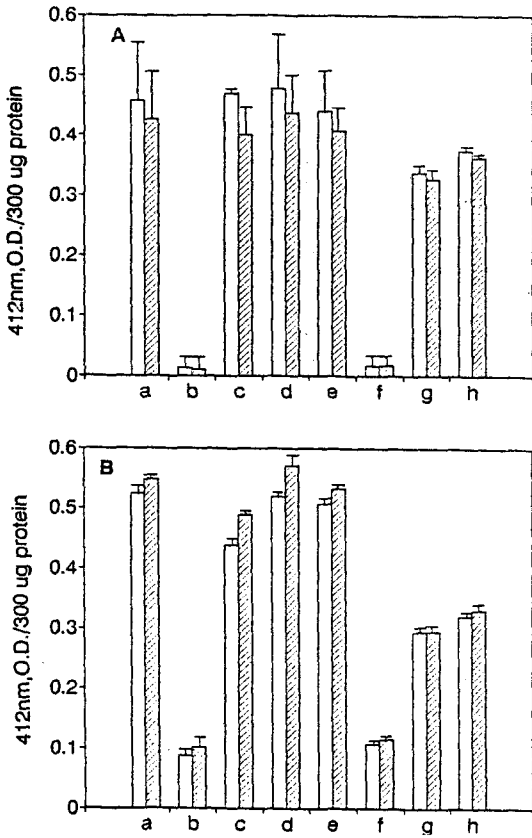


Fig. 10. Effect of some chemicals on the levels of cysteinyl group in tissues of brain and liver after the irradiation of 2500 cGy. A, the activities of brain mitochondria fraction; B, the activities of liver homogenate. □, control activities before the irradiation; ▨, activities after the irradiation. a, no chemical; b, diamide; c, buth ionine sulfoxiamine (BSO); d, 2-oxotriazolidine (OTZ); e, ascorbic acid; f, N-ethylmaleimide (NEM); g, diethylmalate (DEM); h, misonidasol

(BSO)이 약간의 보호제로써 작용하는 것 같다. 한편 cysteinyl group이 각종 단백질의 구조와 기능에 중요한 역할을 한다고 알려져 있어 방사선 조사후의 -SH기의 변화양상을 독립적으로 검토하였다(Fig. 10). 이 실험에서도 검토한 화합물들에 의한 큰 영향은 관찰되지 못했으나(diamide와 NEM은 -SH기를 제거함), 특기할 것은 뇌에서는 방사선 조사후 -SH기가 약간 감소하나 간의 경우는 약간 증가하는 것으로 나타났다.

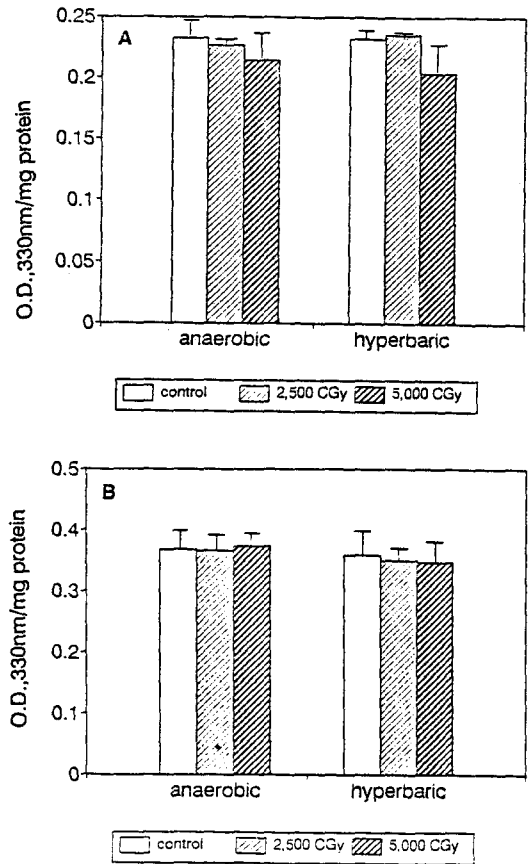


Fig. 11. Effect of oxygen on the activities of MAO in rat tissues after irradiation. A, mitochondria fraction of brain; B, whole homogenate of liver.

5. 산소량에 따른 영향

산소량에 따른 방사선의 생물학적 영향은 이미 산호 효과로서 널리 인식되어 있다. 따라서 in vitro로 산소를 제거하거나 또는 과외로 산소를 더 넣어준 상태에서 MAO의 활동도 변화를 관찰 하였다(Fig. 11). MAO 활동도는 방사선 조사 전후 별다른 큰 변화를 보여주지 않고 있다. 아마도 이는 in vitro 방사선 조사 조건하에서는 산소량의 변화만으로 MAO 단백질을 변형시키기에 충분치 않기 때문인 것으로 추정된다. 하지만 Fig. 12에서 측정된 지방질 과산화물은 이런 조건하에서도 꽤 민감하게 조사선량과 산소량에 따라 변화함을 나타내 주고 있다. 특히 뇌의 경우 5,000 cGy 조사시 거의 갑절 가까이 과산화물이 증가하고 있다. 이 지방

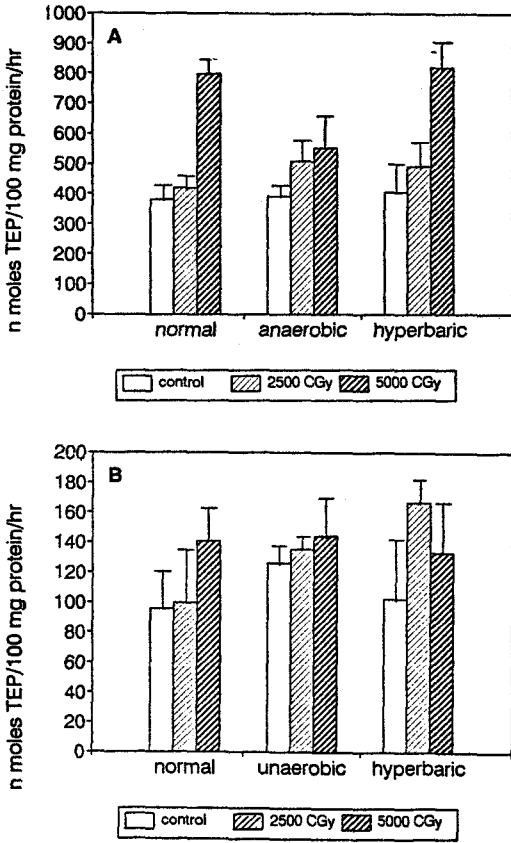


Fig. 12. Effect of oxygen on the levels of lipid peroxide in rat tissues after the irradiation. A, mitochondria fraction of brain; B, whole homogenate of liver.

질 과산화물의 변화는 MAO-A의 활동도가 인지질에 의존한다는 사실을 고려할 때 매우 흥미로운 결과라고 하겠다.

고찰

Monoamine oxidase는 histamine등의 대사에 관여하여 이들의 생체내 양을 조절하므로써 이 효소의 활동도 변화는 신경계와 내분비계에 지대한 영향을 미친다³¹⁾. 본 실험에서는 MAO의 방사선 영향을 관찰하기 위해 쥐를 전신 조사하고 뇌 MAO의 특성 변화를 비신경계인 간의 그것과 비교하였다. 여기서 선택한 방사선은 ⁶⁰Co γ 선으로 다른 연구실의 고 에너지 전자선과는

대조를 이룬다³⁾. MAO의 기질로는 A형과 B형에 다 작용하는 kynuramine을 사용했으며, 경우에 따라 A형 MAO에 선택적으로 작용하는 inhibitor로 clorgyline를 첨가하였다. Fig. 1에서 검토한 방사선 흡수선량에 따른 MAO 활동도는 2,500 cGy 이상의 선량에서 유의적 감소를 나타내주었으며, 감소정도는 약 15%로 γ -neutron에 의한 30% 이상의 감소보다는 작게 나타났다⁴⁾. MAO는 세포내에서 주로 mitochondria에 존재하므로 이 분획을 따로 꺼내 실험한 결과(Fig. 2)도 비슷하거나 약간 더 활동도가 감소한 것으로 나타났다. MAO-A의 저해제 clorgyline에 의한 MAO-B의 활동도는 상대적으로 γ 선에 덜 영향받는 것으로 나타나, MAO-A가 세포막 인지질과 더 연관있다는 사실과 일치한다¹¹⁾. 비신경계 조직인 간의 MAO에 대한 결과(Fig. 3)는 뇌의 MAO보다 그 활동도가 덜 줄어들었으며 아울러 조사선량에 대해서도 큰 변화가 없음을 보여주고 있다. 이는 다른 실험에서는 발견되지 않은 새로운 사실로 뇌의 MAO가 상대적으로 방사선 조사에 더 민감함을 말해주고 있다.

이런 실험결과로부터 MAO 활동도가 상대적으로 상당히 감소되기 시작하는 조사선량 2,500 cGy를 기준으로 조사후 시간에 따른 MAO 활동도 변화를 관찰하였다(Fig. 4와 5). 실험은 3일까지 행했으며(조사선량이 치사선량 이상이라 3일 이후에는 대개의 쥐가 사망함), 결과는 흥미롭게도 각 조직의 MAO가 시간에 따라 상이하게 대응하는 것으로 나타났다. 즉 뇌의 MAO는 즉시 그 활동도가 저해되었으나 시간에 따라 별 변화가 없는 반면에 간의 MAO는 상대적으로 시간이 경과함에 따라 그 활동도가 더 줄어드는 것으로 나타났다. 이는 간의 MAO-B인 경우 더 급격히 변화함을 보여 주어 뇌의 MAO와 뚜렷한 특성차이를 나타내고 있다. 아마도 이런 현상은 방사선에 민감한 뇌의 MAO는 즉시(또는 수분 이내) 그 활동도가 감소되어⁴⁾ 그 이상의 시간 경과에는 더 이상 변하지 못하나, 간의 경우 서서히 효소 활동도가 저해되므로 시간경과에 따른 감소가 현저해 지는 것으로 판단된다. 결과적으로 뇌의 MAO는(간의 것에 비해) 방사선량에 민감하고, 간의 MAO는(뇌의 것에 비해) 방사선 조사후의 시간 경과에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다.

방사선량과 조사후 시간에 따른 MAO의 변화양상은 이들 두 조직의 MAO kinetic parameter에서도 나

타났다(Fig. 6과 7). 뇌의 MAO는 방사선 조사후 기질에 대한 친화성은 어느정도 증가하나 활동도는 상대적으로 감소하는 것으로 보인다. 한편 간의 경우 Vmax 값에는 약간의 감소가 관측되나 Km 값은 증가하여 현저히 기질에 대한 친화성이 감소함을 보여주었다. 따라서 뇌와 간의 MAO는 방사선에 의한 비활성화 과정이 상당히 틀리게 일어남을 추측할 수 있다. 서로 다른 효소인 경우 방사선에 의한 Michaelis-Menten constants의 변화가 틀린것은 이미 보고되어 있으나³²⁾ 여기서처럼 같은 효소가 다른 조직에서 상이한 변화를 보여주는 것은 특이한 현상이라고 볼 수 있다. 뇌의 mitochondria 분획을 사용한 MAO의 효소 반응속도론적 계수들은 조사선량이 증가함에 따라 거의 규칙적으로 Km 값과 Vmax 값이 감소함을 보여주고 있어 Fig. 6의 결과를 재확인해 주고 있다(Fig. 8과 Table 1).

방사선 조사에 의한 단백질의 변성으로는 방사선에 의해 생성된 free radical 등으로 disulfide 결합이 끊어지는 경우가 있다³³⁾. 이에 따라 각종 보호제가 추가로 첨가되어 방사선 영향을 검토하기도 한다. 여기에서도 -SH기를 없애주는(따라서 disulfide 결합을 보호해주는) diamide, N-ethylmaleimide와 buthionine sulfoximine을 비롯하여 항 산화제로 ascorbic acid등을 방사선 조사 전후의 MAO 활동도 측정시 첨가해 실험하였으나 MAO 활동도에는 이렇다할 변화를 가져오지 못했다(Fig. 9). 방사선 조사전후 직접적으로 -SH기를 정량하였으나 이 경우도 첨가한 화합물에 의한 특별한 영향은 관측되지 못하였다(Fig. 10). 단지 흥미로운 점은 방사선 조사후 뇌에서는 약간의 -SH기가 감소되었으나 간의 경우 약간 증가한 것으로 나타났다는 것이다.

산소의 존재는 방사선 영향에 커다란 요인으로 작용하고 있으며 이를 산소효과라고 부른다³⁴⁾. MAO가 방사선에 꽤 민감하게 영향 받으므로 이에 대한 산소 효과를 검토하였다(Fig. 11). 이 경우도 위의 화합물 영향과 같이 in vitro로 행해졌으며, 이런 조건에서는 산소량이 MAO에 별 다른 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 하지만 따로 지방질 과산화물을 측정하였을 경우는 조사선량에 따라 상당한 변화가 관찰되었다(Fig. 12). 특히 뇌의 경우 거의 두배 가까이 과산화물이 생겨 이는 뇌의 많은 지방질이 원인임을 말해 주고 있으며, 이와 아울러 산소의 양도 과산화물의 생성에 직접

적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다(Fig. 12A). 이 현상은 이미 상당히 체계적으로 연구되어 있으며²⁹⁾ 실제로 적지않은 방사선 손상이 이들 지방질 과산화물에 의한 것으로 알려졌다²⁾. 따라서 MAO에 의해 생성된 H₂O₂ (Sandriemd, 1990)와 방사선에 의해 유도된 과산화물이 서로 상승 작용을 한다면 세포에 커다란 손상을 가져올 것으로 추정된다. 아마도 방사선 영향에 민감한 뇌의 MAO도 상당히 이들 세포막의 인지질로부터 생성된 과산화물과 연관되어 있을것으로 짐작된다.

결 론

본 실험에서는 monoamine 신경세포에 널리 분포되어 있는 monoamine oxidase (MAO)의 방사선 영향을 검토하였다. 쥐를 전신조사 한 후 뇌와 간에서의 MAO 활동도를 측정하였으며, 몇 방사선 보호제와 감작제의 영향과 산소 효과를 함께 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 방사선 조사선량에 대한 MAO의 영향은 뇌의 경우 2,500 cGy 이상에서 10% 이상의 감소 효과가 나타났다. 간의 경우 상대적으로 적은 감소 효과가 관찰되었으며, 조사선량의 변화에는 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

2) 방사선 조사후(2,500 cGy) 시간에 따른 영향 검토에서 뇌의 경우 즉시 감소 현상이 관찰되었으나, 간의 경우는 2일째 부터 현저하게 나타나기 시작하여 간은 일정시간 경과후 그 저해 효과가 나타남을 알 수 있었다.

3) 각 효소의 kinetic parameter를 2,500 cGy 조사후 2일째 되는 날 검토하였으며, 뇌의 mitochondria 분획의 MAO의 경우 Vmax와 Km 값이 방사선 조사 후 각각 줄어 들었다. 간의 경우 Vmax 값은 약간 줄었으나 Km 값은 증가하여 신경계와 비신경계 간의 틀린 양상을 보여 주었다.

4) 시험관 내에서 몇개의 알려진 방사선 보호제와 감작제의 MAO에 대한 영향을 방사선 조사 전후 비교하였으나 커다란 변화는 관찰하지 못하였다.

5) 방사선 조사에 대한 산소 효과를 검토하였으며, MAO의 경우 산소량에 따라 아무런 영향을 받지 않았으나 지방질 과산화물의 경우 방사선 조사후 상당한 량이 증가됨을 관찰할 수 있었다.

이들 결과는 중추신경계의 주요 효소인 MAO가 방사선 조사후 비교적 민감하게 그 효소특성이 바뀌고 있음을 보여주고 있으며, 이 변화는 간의 MAO와 틀린 양상을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. von Sonntag C: The chemical basis of radiation biology, Taylore Francis, London, 1987
2. Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A: introduction to radiobiology. Taylore Francis, London, 1990
3. Lee K: The effects of radiation on the mammalian enzyme system. Korea Atomic Energy Research Institute, Seoul, 1979
4. Catravas GN, Mchale CG: Transient alterations in neurotransmitter activity in the caudate nucleus of rat brain after a high dose of ionizing radiation. *Radiation Res.* 80:556-562, 1979
5. Hunt WA, Dalton TK, Darden JH: Transient alterations in neurotransmitter activity in the caudate nucleus of rat brain after a high dose of ionizing radiation. *Radiation Res.* 80:556-562, 1979
6. Hunt WA, Dalton TK: Reduction in cyclic nucleotide levels in the brain after a high dose of ionizing radiation. *Radiation Res* 83:210-215, 1980
7. Wixon N, Hunt WA: Ionizing radiation decreases veratridine-stimulated uptake of sodium in rat brain synaptosomes. *Science* 220:1073-1074, 1983
8. Mullin MJ, Hunt WA, Harris RA: Ionizing radiation alters the properties of sodium channels in rat brain synaptosomes, *J Neurochem* 47:489-495, 1986
9. Mickley GA, Stevens KE, White GA, Gibbs GL: Endogenous opiates mediate radiogenic behavioral changes. *Science* 220:1185-1187, 1983
10. Lai H, Morita A, Chou CK, Guy AW: Low-level microwave irradiations affect central cholinergic activity in the rat. *J Neurochem* 48:40-45, 1987
11. Chung SK, Choi MU: Solubilization and characterization of lipid depleted rat brain monoamine oxidase by organic solvents, *Korean Biochem J* 18:245-252, 1985
12. Fu RC, Liu XF, Chen S: Inhibition of monoamine oxidase by 7-chloro-4-nitrobenzofurazan. *J Neurochem* 5:813-818, 1990
13. Matsui Y, Kumagae Y: Monoamine oxidase inhibitors prevent striatal neuronal necrosis induced by transient brain ischemia. *Neurosci Lett* 126:175-178, 1991
14. Bhattacharya SK, Banerjee PK, Iyer V, Sandler M: Augmentation of rat brain endogenous monoamine oxidase inhibitory activity (tribulin) by electroconvulsive shock. *Neurosci Lett* 125:65-68, 1991
15. Ali FM, El-Attar H, shobokshi O, Attallah A: Impaired monoamine oxidase activity in rats with acute and chronic uremia. *Clin Chem Enzymol Commun* 1:25-33, 1988
16. Benedetti MS, Dostert P: Monoamine oxidase, Brain aging and degenerative diseases. *Biochem Pharmacol* 38:555-561, 1989
17. Sandri G, panfili E, Ernster L: Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: Its effect on glutathione level and Ca²⁺ efflux. *Biochem Biophys Acta.* 1035: 300-305, 1990
18. Antipov AD, Tyurin VA, Avrova NF, Khovanskikh AE, Kagan VE: Protection of monoamine oxidase by lipo- and water soluble antioxidants during lipid peroxidation in the brain synaptosomal membranes. *Byull Eksp Biol Med* 107:169-171, 1989
19. Choi M-U, Suzuki K: A cholesterol-esterifying enzyme in rat central nervous system myelin. *J Neurochem* 31:879-885, 1978
20. Sottocasa, GL, Kuylenstierna B, Ernster L, Bergstrand A: An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J Cell Biology* 32:415, 1967
21. Mayanil CSK, Kazmi SMI, Baquer NZ: Changes in Monoamine Oxidase Activity in Rat Brain During Alloxan Diabetes, *J Neurochem* 38:179-183, 1982
22. Noda Y, McGeer PL, McGeer EG: Lipid peroxide distribution in brain and the effect of hyperbaric oxygen. *J Neurochem* 40:1329-1332, 1983
23. Kim B-S, Kwon H-J, Choi M-U, Koh E-H: Molecular characteristics of cysteinyl groups of metallothionein by 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Korean Biochem J* 20:223-229, 1987
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Boil Chem* 193:265-275, 1951
25. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH: The biochemical basis of neuropharmacology. Sixth Ed Oxford University Press, New York, 1991
26. Bernard P, Rocquet G: Effect of Whole-body irradi-

- ation on Michaelis-Menten constants of microsomal enzymes of rat liver. *FEBS Letters* 98: 260-262, 1979
27. **Favandon V, Toubez H, Houee-Levin C, Lhoste J-M:** CO₂ radical induced cleavage of disulfide bonds in proteins. A γ -ray and pulse radiolysis mechanistic investigation. *Biochemistry* 29:10979-10989, 1990
28. **Cadenas E:** Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 58:79-110, 1989
29. **Edwards JC, Chapman D, Cramp WA, Yatvin MB:** The effect of ionizing radiation on biomembrane structure and function. *Prog Biophys Molec Biol* 43:71-93, 1984
30. **Shashlov SV, Rabkina EY:** A morphofunctional liver characteristic with the cerebral form of acute radiation sickness. *Radiobiologica* 30:477-481, 1990
31. **Subbarao K, Richardson JS, Ang LC:** Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 55:342-345, 1990
32. **Debler EA, Sershen H, Lajtha A, Gennaro JF, Jr:** Superoxide radical mediated alteration of synaptosome membrane structure and high-affinity of γ -[C¹⁴] aminobutyric acid uptake. *J Neurochem* 47:1804-1913, 1986
33. **Harris EJ, Cooper MB:** Monoamine oxidase activity of mitochondria prepared from rat liver and rat heart. *J Neurochem* 38:1068-1071, 1982
34. **Lenzen S, Freisinger-Treichel M, Panten U:** Monoamine oxidase in rat and bovine endocrine tissues. *J Neurochem* 49:1183-1190, 1987