

방사선 조사 후 생쥐(*Mus musculus*) 조직의 형태와 젖산탈수소효소 동위효소의 재분포

박 현 도 · 염 정 주

(청주대학교 생물학과)

적 요 - 생쥐에 1 Gray(Gy)와 3 Gy의 방사선을 조사한 후 시간에 따라 골격근, 심장, 신장, 간 및 정소조직의 형태적 변화를 확인하였다. H-E(hematoxylin-eosin)염색 결과 apoptotic body는 다른 조직에 비해 간조직에서 쉽게 관찰되었고, 조사량에 비례하였으며 대부분의 조직에서 조사 후 1일에, 정소조직에서는 7일에 많이 관찰되었다. TUNEL(terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling)염색에 의한 결과도 동일하게 나타났다. 방사선 조사 후 단백질량은 신장을 제외한 나머지 조직에서 감소되었으며, 3 Gy를 조사한 경우 1 Gy보다 모든 조직에서 초기 2시간까지 감소되었으나 7일에는 모두 증가되었다. 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, Lactate dehydrogenase: LDH) 활성은 모든 조직에서 증가되었고 1 Gy를 조사한 경우 초기에 더욱 증가되었으며 최고 활성은 3 Gy보다 빠른 시기에 나타났다. 골격근, 심장, 신장 및 정소조직은 일반적으로 A₄동위효소 활성이 감소되고 골격근과 심장은 B₄와 A₂B₂동위효소 활성이 증가되었으며 신장은 이질사량체의 활성이 증가되었다. 간은 A₄동위효소 활성이 높았고 정소는 C동위효소의 활성이 높았다. 따라서 LDH는 방사선 조사시 간조직을 제외한 나머지 조직에서 lactate oxidase로서 작용하여 호기적 대사가 우세한 것으로 사료된다.

서 론

Apoptosis는 개체의 항상성을 유지하기 위한 생리적·유전적인 조절기작으로 성숙한 세포에서 암유발 물질, 유독성 약물, 방사선 등 인위적인 요인에 의해 유발되는 것으로 보고되었다(Ronen & Heddlle 1984; Ijiri 1989).

Apoptosis가 진행되고 있는 세포는 인접한 주위세포와 분리된 후 세포소기관들의 형태가 유지되면서 응축이 일어나 부피가 감소되고 세포표면이 함입되어 작은 조각인 apoptotic body가 형성되며 인접세포에 의해서 죽어 가는 과정을 거치게 된다. 이러한 현상은 염증의 유발 없이 수 분 또는 몇 시간 내에 일어나게 된다. 또한 apoptosis와 관련된 생화학적 특성 중 가장 많이 알려져 있는 것은 핵 DNA의 변화이다. 세포핵의 응축과 분열로 핵 DNA의 분절이 일어나 apoptotic body가 형성되며 이것이 식균세포에 의해 포식되었을 때 핵내의 유전물질이 정확히 전달되지 않는다고 보고되었다(Arends *et al.* 1990; Majno & Joris 1995). Apoptosis가 진행되는 세포는 단백질과 RNA 합성이 저하되고(Martin

et al. 1990) 대사생리에 관여하는 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase; LDH), isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, malate dehydrogenase 및 catalase의 활성이 감소되었다(Wiley & Esterley 1975). 이들 효소중 LDH는 세포막이 손상을 입었을 경우, 세포 밖으로 유출되기 때문에 유출된 세포질의 LDH 양을 측정하여 세포의 죽음과 막의 손상 정도를 알 수 있고 생체 물질에 의해 유도되는 세포의 대사를 확인할 수 있다(Sochocka *et al.* 1994). LDH는 *Ldh-A*, *Ldh-B* 및 *Ldh-C*의 세 유전자에 의해 만들어지는 사량체의 동위효소로 A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃ 및 B₄를 만들며 *Ldh-C*의 경우는 포유류 및 조류의 성숙한 정소와 정원세포에서 발현되므로 동위효소에 따라 기능의 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다(Li *et al.* 1983). 또한 LDH 활성과 동위효소의 조성은 열, pH 등의 외부자극, 병적인 상태 그리고 습성이나 행동의 차이에 따라 변화된다(Mendiola & De Costa 1991; Rodrigue *et al.* 1995). 따라서 LDH 활성과 LDH 동위효소들의 변화 양상을 통하여 apoptosis시 각 조직에서의 대사생리의 변화를 확인할 수 있음에도 불구하고, 지금까지 apoptosis와 관련된 LDH 동위효소들의 활성 변화에 대

한 연구는 이루어져 있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 방사선에 의해 유도되는 조직의 apoptosis의 형태 및 대사생리적 변화를 알아보기 위하여 생쥐의 복부 전체에 방사선을 조사한 후 시간별로 생쥐의 골격근, 심장, 신장, 간 및 정소조직을 H-E 염색과 TUNEL 염색하여 관찰하였고 각 조직의 단백질량과 LDH의 활성 및 동위효소의 변화를 방사선량과 희생된 시간별로 분석하였다.

재료 및 방법

1. 방사선 조사

광학 현미경 표본의 제작과 효소의 활성을 측정하기 위해 체중이 25 ± 2 g 정도의 수컷 생쥐 (*Mus musculus*)를 각각 3마리씩 대조군으로 사용하였다. 실험군은 방사선 치료기 (ALCYON, Cobalt-60)를 사용하여 흡수선량을 1 Gy와 3 Gy로 복부 전체에 단일 조사한 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12시간과 1, 3, 7일에 각각 3~4마리씩 사용하였다.

2. 광학 현미경 표본 제작

광학 현미경 표본은 대조군과 조사 후 6, 12시간과 1, 7일 후에 희생시킨 생쥐의 조직으로 제작되었다. 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 사용한 4% paraformaldehyde를 적출한 조직에 20배 (v/w) 가하여 2일 동안 고정하여 3 μ m의 박절표본을 만든 후 hematoxylin-eosin (H-E)으로 염색하였다. 또한 apoptotic body를 관찰하기 위해 조직효소염색법 (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling, TUNEL)을 이용하였다. 즉, 3-aminopropyl-triethoxysilane과 acetone으로 피막을 입힌 후 신장, 간 및 정소를 3 μ m 두께로 절편을 만들어 xylene으로 파라핀을 제거하고 ethanol로 처리한 후 증류수로 씻었다. 0.5% hydrogen peroxide를 포함한 methanol, phosphate-buffered saline (pH 7.6, PBS)으로 희석한 methanol, 0.1% Triton X-100을 포함한 PBS로 씻었다. Proteinase K (7 μ g/ml)를 처리하고 TdT buffer (pH 6.6)로 씻은 후 TdT buffer, 25 mM cobalt chloride, TdT enzyme (25 units/ μ l)과 5 μ m biotinylated dUTP가 혼합된 용액을 조직에 처리하여 37°C에서 1시간 방치하였다. 조직에 TB buffer (300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate)를 가하여 실온에서 15분간 방치하고 2% bovine serum albumin (BSA)으로 10분간 처리한 후 PBS로 씻었으며 peroxidase를 가한 후 37°C에서 1시간 방치하였다. 0.02% hydrogen peroxide를 함유한 diaminobenzidine (DAB)

용액으로 발색시킨 후 증류수로 씻고 hematoxylin으로 1분간 대조 염색을 시행하였으며 암모니아수로 처리한 후 apoptotic body를 관찰하였다. Apoptotic body의 수는 광학현미경 800배상에서 무작위로 5군데를 선택하여 셈하였고 전체 세포수에 대해 백분율로 환산하였다.

3. LDH의 활성 측정 및 단백질 정량

대조군의 생쥐와 방사선을 조사한 생쥐를 시간별로 골격근, 심장, 신장, 간 및 정소를 적출한 후 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85)를 3배 (v/w) 가하여 파쇄한 후 4°C, 20,000 g에서 1시간씩 2회 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. LDH의 활성은 1.50 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 함유한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료를 가한 다음, NADH가 NAD⁺로 산화되는 정도를 spectrophotometer를 사용하여 25°C, 340 nm에서 측정하였다. 활성단위는 1분 동안 감소되는 흡광도 1.0을 1 unit로 하였다. 단백질은 Bradford (1976)의 방법에 따라 spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 1201)를 사용하여 595 nm에서 정량하였다.

4. LDH 전기영동과 동위효소 활성의 분석

Polyacrylamide gel은 Davis (1964) 방법에 따라 7.5% separation gel과 2.5% stacking gel을 만들어 사용하였으며, 전기영동은 Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100 V에서 15분, 200 V에서 2시간 30분 동안 실시하였다. 효소의 염색은 Whitt (1970) 방법에 따라 DL-Lactate, NBT, PMS 그리고 NAD⁺를 혼합한 용액으로 37°C에서 염색한 후 15% 초산용액으로 고정하였다. Gel 상에서의 동위효소의 활성은 image analyser (Viber Lourmat, Bio profil: BIO-ID⁺⁺)로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 광학 현미경 관찰

방사선을 조사한 결과 근섬유의 주변부에 위치한 핵들이 응축되고 가로무늬가 불규칙한 형태로 변하였다 (Fig. 1-1S). Apoptotic body의 생성은 1 Gy 7일에서 가장 많이 관찰되었고 3 Gy는 1일에서 31.3%로 가장 많이 나타났는데 (Table 1), 이것은 방사선에 급격하게 손상을 받았기 때문이다. 조사 후 심장조직은 섬유 다발에서 관찰되는 사이원반이 불규칙한 형태를 보였다 (Fig. 1-1H). Apoptotic body의 생성은 조사량에 관계없이 1일에 증가되고 7일에는 감소되었다 (Table 1). 신장의 근위세뇨관은 시간이 경과됨에 따라 세포의 부피가 감소

되고 내강이 커져 세포의 형태가 변화되어 세포간 결합이 약해진다는 보고와 일치하였다(Scott *et al.* 1989). 또한 사구체의 핵이 파괴되었으며 사구체내벽과 족세포(podocyte)의 파괴가 많이 관찰되었다(Fig. 1-1K). Apoptotic body는 1일에 증가되었고 3 Gy에서 증가되었다(Table 1). 간조직은 1 Gy 조사 후 1일에서 변형된 세포가 많이 관찰되었고 간동양혈관의 크기가 커졌다. 중심 정맥 주위의 간세포에서 핵이 응축되고 세포 사이가 분리되었으며, 죽은 간세포들이 간문맥을 통해 빠져나가는 것이 관찰되었다. 3 Gy 조사 후 1일에서 간세포간의 공간이 커지고 중심 정맥 주위에서 관찰된 간세포간 결합이 치밀하지 않았으며, 방사선을 조사한 간세포의 부피도 대조군보다 커졌다(Fig. 1-1L). Apoptotic body는 1 Gy 1일에서 24.9%, 3 Gy 12시간에서 20.5%로 가장 많이 관찰되어 7일과 큰 차이가 없었는데(Table 1) 이는 초기에 세포가 손상된 후 간조직이 빠르게 회복되었기 때문에 파괴된 세포의 변화가 적다는 보고와 일치되는 결과였다(Murray *et al.* 1984). 정소조직은 조사 후 세포의 응축 현상이 증가되었고 3 Gy 7일에서 31%로 1 Gy보다 높게 나타났다(Table 1). 1차정모세포의 핵이 응축되고 세포간극이 넓어졌으며 간질조직에 있는 근상피세포에서도 응축현상이 나타났다(Fig. 1-1T). 따라서 정소조직은 다른 조직에 비해 방사선에 민감하며 조사 후 정소의 무게와 정자의 수가 감소된다는 보고와 유사하였다(Gasinska 1985).

방사선 조사 후 apoptotic body는 정소조직에서만 7일에 가장 많이 생성되었고 나머지 조직은 1일에 많이 보였으며, 간조직을 제외한 조직에서는 조사량에 비례하여 증가하였다.

3 Gy 조사 후 1일에 희생시킨 생쥐의 신장, 간 및 정소조직을 TUNEL 방법으로 염색한 결과, H-E 염색 결과보다 뚜렷하게 apoptotic body를 관찰할 수 있었다(Figs. 1-2). 신장은 근위세뇨관보다 사구체 부위에 위치한 핵의 변화가 많이 관찰되었으며 간에서도 비특이적으로 염색된 세포가 많았지만 세포간 간격이 넓어진 것과 간동양혈관으로 들어간 apoptotic body 및 핵의 응축 형태를 관찰할 수 있었다. 정소조직에서도 응축된 핵의 형태가 관찰되었으나 유사분열이 활발하게 일어나기 때문에 많은 세포에서 효소 염색이 되었다. 도 응축된 핵의 형태가 관찰되었으나 유사분열이 활발하게 일어나기 때문에 많은 세포에서 효소 염색이 되었다.

2. 단백질 정량분석

생쥐에 1 Gy와 3 Gy의 방사선을 각각 조사한 후 조직의 단백질량을 시간에 따라 측정하였고, 대조군을 기준

Table 1. Relative ratio (%) of apoptotic body in mouse tissues after irradiation

	muscle		heart		kidney		liver		testis	
	1 Gy	3 Gy	1 Gy	3 Gy	1 Gy	3 Gy	1 Gy	3 Gy	1 Gy	3 Gy
0 hr	2.0		0.7		2.0		5.5		2.4	
6 hr	10.6	13.3	8.8	6.6	4.7	8.0	8.8	15.3	6.6	12.7
12 hr	11.9	9.5	14.5	14.0	8.2	10.5	23.2	20.5	13.5	11.8
1D	10.8	31.3	19.4	25.6	17.3	21.2	24.9	19.0	16.1	18.0
7D	16.8	24.1	15.2	22.8	16.7	18.6	24.8	20.3	22.7	31.0

D:day

으로 상대적 비율을 조사하였다(Table 2, 3). 그 결과 1 Gy를 조사한 경우 신장을 제외한 조직은 대부분 감소되었고 조사 후 4시간에서 골격근, 간 및 정소조직은 가장 낮았으며, 심장은 5시간과 3일에서 낮게 나타났다. 간조직은 12시간과 7일, 정소조직은 1시간과 7일, 골격근, 심장조직은 7일에서 가장 높았다. 따라서 신장을 제외한 조직들에서 4, 5시간에서 대체로 단백질량이 적고 7일에 모두 증가되어 대조군의 기준치와 유사하게 나타났다(Table 2). 그러나 신장은 모든 시간대에서 증가되고 7일에서 가장 높게 나타났다. 3 Gy 조사 후 골격근, 심장조직에서는 3시간, 정소는 5시간에서 가장 낮은 단백질량을 보였는데, 그 후 증가되어 모든 조직에서 3일에 기준치에 이르렀다(Table 3). 신장에서는 1 Gy를 조사한 경우와 유사하게 모든 시간대에서 높게 나타났다. 또한, 3 Gy 조사 후 모든 조직에서 1 Gy를 조사한 경우보다 1, 2 시간에서는 단백질량이 모두 낮았으나 기준치에 이르는 시기는 빨랐다. 방사선 조사 후 신장을 제외한 나머지 조직의 단백질량은 대부분 감소되어 변형된 세포의 경우 단백질과 RNA의 합성이 억제되어 세포가 죽게 된다는 결과와 유사하였다(Martin *et al.* 1990).

3. LDH 활성 측정

방사선 조사 후 LDH 활성은 모든 조직에서 대조군보다 증가하였다(Table 4, 5). 1 Gy 조사 후 1시간에 모두 급격한 증가를 보이며 3~5시간에서 조금 낮아지고 1, 2시간에는 3 Gy보다 높게 나타났으나 이후에는 3 Gy 조사시 대부분의 활성이 높았다. 그리고 골격근, 심장 및 정소조직은 12시간에서, 간과 신장은 3일과 7일에서 활성이 높게 나타났다(Table 4). 3 Gy 조사 후 조직들은 3일에서 최대 활성을 보였다(Table 5). 3 Gy 조사시 모든 조직의 LDH 활성이 초기에 증가되고 골격근, 심장 및 간은 5시간에서 조금 낮아지나, 신장과 정소는 2시간에서 낮은 활성을 보이다가 다시 증가되었다. 골격근과 신장조직이 방사선에 의해 급성으로 손상을 받는다는 Rojas와 Joiner(1989)의 결과와는 달리 모든 조직에서

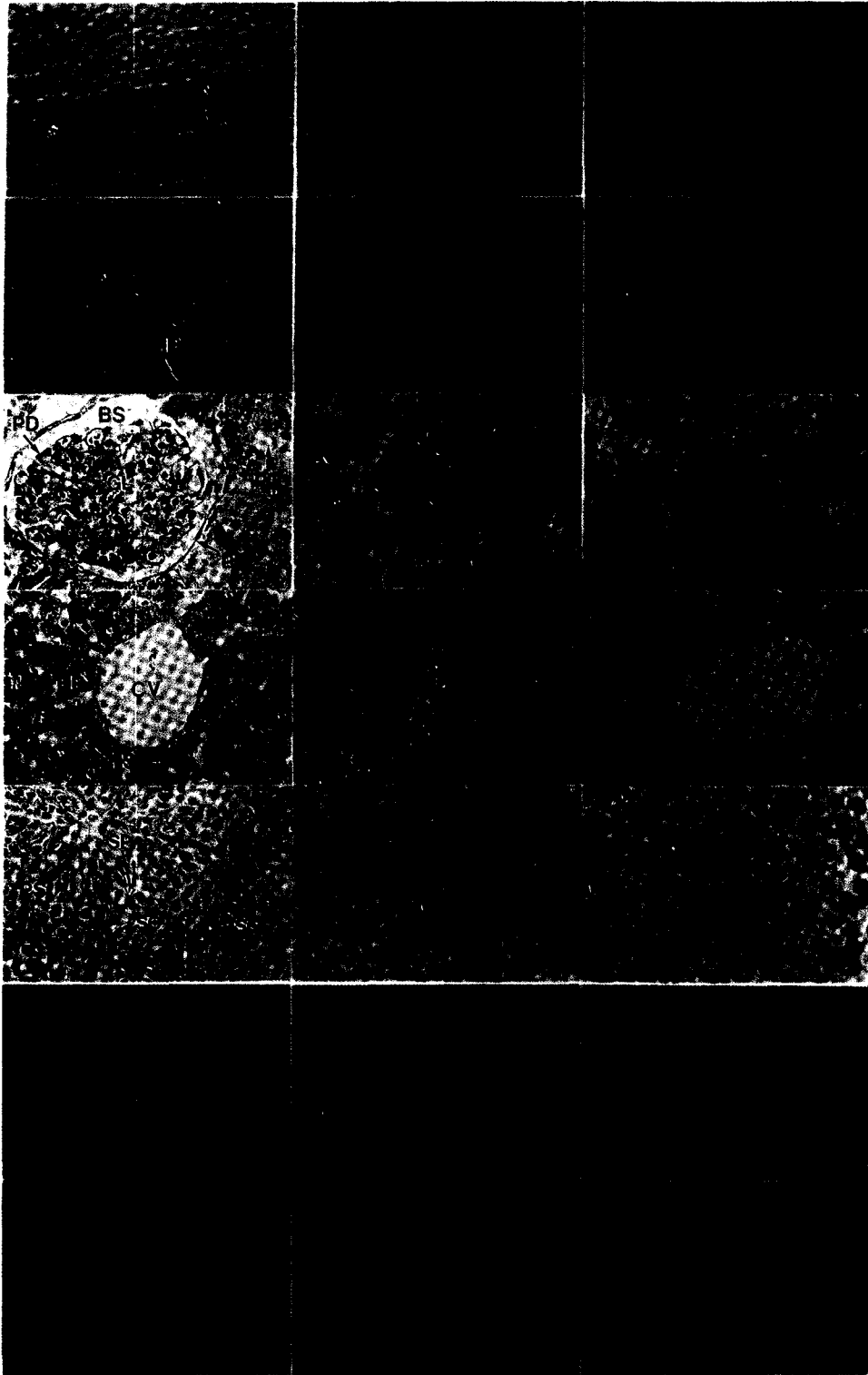


Fig. 1-1. Light micrographs by H-E stain of skeletal muscle (SM, control; SM1, 1 Gy 1 day; SM3, 3 Gy 1 Day), heart (H, H1, H3), kidney (K, K1, K3), liver (L, L1, L3), testis (T, T1, T3) from mouse after irradiation. arrow, apoptotic body. $\times 800$. N, nucleus; S, cross striation; ID, intercalated disk; PL, parietal layer; PD, podocyte; PT, proximal convoluted tubule; GL, glomerulus; BS, Bowman's space; CV, central vein; EC, endothelial cell; HS, hepatic sinusoids; HP, hepatocyte; PS, primary spermatocyte; SC, sertoli cell; SP, sperm

1-2. Light micrographs by TUNEL method of kidney (K, K3), liver (L, L3), testis (T, T3) from mouse after irradiation. arrow, apoptotic body. $\times 800$.

Table 2. Relative content (%) of protein in mouse tissues after 1 Gy irradiation

	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr	12 hr	1 D	3 D	7 D
Mu	94	86	66	62	67	89	91	93	65	102
He	95	75	74	76	69	92	76	77	63	102
Ki	148	145	117	120	129	129	156	134	141	166
Li	90	99	83	77	91	97	106	84	94	102
Te	111	69	73	53	58	74	83	71	72	93

Table 3. Relative content (%) of protein in mouse tissues after 3 Gy irradiation

	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr	12 hr	1 D	3 D	7 D
Mu	67	78	64	84	66	90	103	90	111	111
He	68	71	67	73	97	82	78	84	99	94
Ki	112	122	138	140	125	131	150	135	157	181
Li	83	89	102	98	100	99	98	77	109	118
Te	78	67	82	79	59	71	95	76	99	114

유사하였다.

본 실험에서 LDH의 활성은 대조군에 비해 모두 높게 나타나 방사선을 조사한 흰쥐 혈청의 LDH 활성이 증가되고(Basu *et al.* 1992) 저산소 조건에 노출시에 LDH의 방출이 증가된다는 결과(Sochocka *et al.* 1994)와는 유사하나 곤충의 apoptosis과정에서 LDH 활성이 감소된다는 결과(Bidlack & Lockshin 1976)와는 다르게 나타났다. 방사선 조사 후 단백질량은 감소되었지만 효소의 활성은 증가되는 결과를 보였다. 그리고 1 Gy 경우 12시간에서 효소 활성이 크게 나타나 3 Gy의 3일보다 빠르게 조사량에 따라 차이를 나타냈다.

4. LDH 동위효소 분석

생쥐의 골격근은 A₄동위효소의 활성이 높고 B₄동위효소의 활성은 낮았으며 C동위효소는 아주 낮게 나타났다. 심장과 신장에서 5가지 동위효소의 활성은 비슷하게 나타났고 C동위효소는 낮게 나타났다. 간은 A₄동위효소의 활성이 매우 높았고 C동위효소의 활성은 약하게 나타났으나 B₄동위효소는 나타나지 않았다. 정소에서는 5가지 동위효소의 활성이 비슷하였으며 C동위효소는 나머지 조직에 비해 높게 나타났다(Table 6, Fig. 2).

1 Gy를 조사한 골격근은 A₄동위효소의 활성이 감소되었고 B₄동위효소의 활성은 증가되었으며 C동위효소도 증가되었다(Table 6). 3 Gy에서 A₄동위효소는 감소되었고 B₄동위효소는 1시간을 제외하고 모두 증가되었다(Table 7). 심장은 조사량에 관계없이 A₄동위효소의 활성이 모든 시간대에서 감소되었으며 1 Gy 2시간, 3 Gy 1시간에서 활성이 크게 감소되었다. 조사 후 B₄동위효소의

Table 4. Relative activity (%) of LDH in mouse tissues after 1 Gy irradiation

	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr	12 hr	1 D	3 D	7 D
Mu	175	127	125	144	133	133	181	143	178	128
He	188	183	152	166	158	149	205	125	205	189
Ki	233	160	209	144	188	146	211	198	184	242
Li	253	225	219	178	177	183	238	241	323	299
Te	259	206	182	181	187	213	307	215	250	287

Table 5. Relative activity (%) of LDH in mouse tissues after 3 Gy irradiation

	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr	12 hr	1 D	3 D	7 D
Mu	120	123	126	168	104	217	170	234	253	175
He	165	152	164	205	150	203	193	158	206	180
Ki	176	145	158	270	184	197	181	284	306	179
Li	218	215	249	254	171	258	302	391	438	362
Te	160	129	189	249	235	245	280	267	289	243

*Non-irradiation tiissues use as criterion (100%).

*hr, hour; D, day; Mu, skeletal muscle; He, heart; Ki, kidney; Li, liver; Te, testis

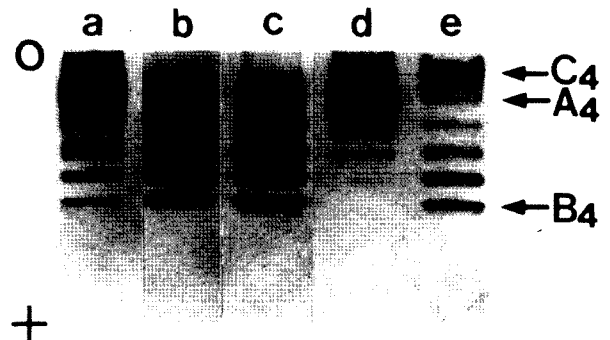


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of LDH isozymes in *Mus musculus*. a, skeletal muscle; b, heart; c, kidney; d, liver; e, testis; o, origin.

활성은 증가되었는데 1 Gy 1시간과 7일에서, 3 Gy 1시간에서 크게 증가되었으며 3가지 이질사량체도 증가되는 경향을 보였고, C동위효소는 감소되었다. 지금까지 심장은 호기적 조직으로 B₄동위효소의 활성이 우세한 것으로 보고되어 왔으나(Li *et al.* 1983), 본 실험 결과 대조군에서 A₄동위효소의 활성이 B₄보다 크게 나타났으나 조사 후에는 B₄동위효소의 활성이 증가되는 양상을 보였다. 신장에 1 Gy 조사 후 A₄동위효소는 1시간에서 감소되고 2시간부터 큰 변화가 없었으며 B₄동위효소의 활성은 증가되고 감소되는 변화가 반복적으로 나타났다. 그러나 이질사량체 A₃B동위효소의 활성은 증가되는 양상을 보였다. 3 Gy 경우 A₄와 B₄동위효소의 활성은 감소

Table 6. Relative activity (%) of LDH isozymes in mouse tissues after 1 Gy irradiation

		control	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	12 hr	1 D	3 D	7 D
Skeletal muscle	A ₄	52.0	43.2	40.7	42.8	44.4	49.4	40.0	50.6	41.2
	A ₃ B	17.7	17.5	20.2	18.8	16.7	13.4	15.7	14.0	18.6
	A ₂ B ₂	13.8	14.8	14.8	14.0	14.7	11.7	13.9	11.9	16.0
	AB ₃	8.9	11.5	9.5	9.7	10.0	8.1	10.6	8.1	10.4
	B ₄	4.2	8.2	6.3	6.7	6.3	6.4	10.7	6.7	8.5
	C hybrid	3.4	4.8	8.5	8.0	7.9	11.0	9.1	8.7	5.3
Heart	A ₄	20.6	14.7	12.7	18.7	19.3	19.1	16.5	19.9	16.4
	A ₃ B	19.5	19.2	21.3	21.3	18.2	20.6	19.5	22.1	19.7
	A ₂ B ₂	21.2	22.5	28.8	25.6	21.0	22.4	22.0	24.0	22.9
	AB ₃	17.8	21.3	21.2	20.3	17.8	17.9	18.7	18.4	19.1
	B ₄	13.3	18.8	14.6	14.1	14.6	15.3	16.3	15.6	18.0
	C hybrid	7.6	3.5	1.4	-	9.1	4.7	7.0	-	3.9
Kidney	A ₄	23.0	15.9	24.6	22.4	23.1	23.5	21.6	29.3	18.8
	A ₃ B	21.0	22.5	24.1	24.3	20.5	22.6	22.6	22.4	24.0
	A ₂ B ₂	22.9	20.7	21.7	23.9	20.5	20.4	20.1	18.6	20.7
	AB ₃	17.1	18.5	15.6	16.5	15.9	15.0	15.7	14.4	15.7
	B ₄	13.9	17.1	10.5	12.9	15.0	12.8	14.0	12.7	15.0
	C hybrid	2.1	5.3	3.5	-	5.0	5.7	6.0	2.6	5.8
Liver	A ₄	66.8	56.6	69.4	75.4	58.5	69.7	62.1	52.8	65.0
	A ₃ B	15.5	18.5	13.2	10.2	13.6	11.9	11.8	9.7	14.2
	A ₂ B ₂	9.2	13.4	9.0	7.5	10.5	5.8	9.4	4.8	9.6
	AB ₃	3.2	-	1.5	1.3	-	-	-	-	-
	C hybrid	5.3	11.5	6.9	5.6	17.4	12.6	16.7	32.7	11.2
	Testis	A ₄	12.1	10.5	9.5	7.8	11.7	17.2	11.8	8.3
A ₃ B		8.9	8.7	5.4	5.4	9.8	7.6	10.0	5.5	8.3
A ₂ B ₂		14.3	13.9	11.3	14.0	11.7	12.8	12.0	11.0	13.0
AB ₃		15.7	15.5	13.4	15.8	11.9	12.7	11.3	12.5	13.4
B ₄		14.6	16.2	12.9	18.4	12.3	12.3	11.5	11.8	15.3
C hybrid		34.4	35.2	47.5	38.6	42.6	37.4	43.4	50.9	40.0

Table 7. Relative activity (%) of LDH isozymes in mouse tissues after 3 Gy irradiation

		Control	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	12 hr	1 D	3 D	7 D
Skeletal muscle	A ₄	52.0	48.7	52.1	43.8	49.2	48.8	43.6	39.8	40.0
	A ₃ B	17.7	18.7	17.1	19.1	17.2	16.4	16.5	20.0	17.3
	A ₂ B ₂	13.8	13.3	13.8	16.5	13.4	13.0	14.2	18.2	17.0
	AB ₃	8.9	9.1	7.8	12.1	8.7	6.1	9.8	10.8	10.2
	B ₄	4.2	0.7	7.5	4.6	5.4	5.0	8.5	5.5	6.2
	C hybrid	3.4	9.5	1.7	3.9	6.1	10.7	7.4	5.7	9.3
Heart	A ₄	20.6	11.9	14.1	17.5	14.7	19.2	17.7	16.6	14.5
	A ₃ B	19.5	15.3	20.4	22.2	24.2	19.7	20.5	17.4	20.6
	A ₂ B ₂	21.2	26.2	26.3	24.3	25.6	25.3	24.2	23.7	24.8
	AB ₃	17.8	23.3	20.0	20.2	19.2	19.9	18.0	21.0	20.8
	B ₄	13.3	21.6	17.9	14.4	16.3	15.9	19.6	17.2	15.8
	C hybrid	7.6	1.7	1.3	1.4	-	-	-	4.1	3.5
Kidney	A ₄	23.0	20.1	22.9	19.6	25.0	21.5	20.4	18.5	24.0
	A ₃ B	21.0	21.0	24.7	25.5	24.1	25.5	22.6	22.8	24.7
	A ₂ B ₂	22.9	23.0	24.5	24.5	23.8	24.2	24.6	23.7	20.2
	AB ₃	17.1	20.7	14.2	18.9	15.3	16.0	15.3	19.8	16.2
	B ₄	13.9	13.7	12.6	11.5	11.8	12.8	15.6	13.1	11.4
	C hybrid	2.1	1.5	1.1	-	-	-	1.5	2.1	3.5
Liver	A ₄	66.8	86.1	76.7	68.3	75.8	70.3	70.6	73.6	63.1
	A ₃ B	15.5	-	14.0	12.8	13.6	10.6	14.3	16.0	13.7
	A ₂ B ₂	9.2	4.7	5.4	7.0	4.2	5.2	5.4	6.4	8.0
	AB ₃	3.2	-	-	4.3	-	-	-	-	-
	C hybrid	5.3	9.2	3.9	7.6	6.4	13.9	9.7	4.0	15.2
	Testis	A ₄	12.1	11.1	5.8	12.5	12.4	7.5	11.4	19.0
A ₃ B		8.9	7.5	4.5	8.1	8.4	6.1	5.7	8.7	8.6
A ₂ B ₂		14.3	14.6	12.5	14.0	11.4	14.7	10.8	15.7	13.5
AB ₃		15.7	19.8	13.2	17.3	11.1	16.2	9.0	18.7	15.1
B ₄		14.6	16.1	18.8	11.2	13.2	14.9	14.1	16.4	12.3
C hybrid		34.4	30.9	45.2	36.9	43.5	40.6	49.0	21.5	38.8

되는 경향을 보였고 이질사량체 A₃B와 A₂B₂는 증가되었다. C동위효소는 1 Gy 조사 후 증가되어 대조군보다 높은 활성을 보였으며, 3 Gy에서는 감소되었으나 7일에서 증가되었다. 간조직에 1 Gy를 조사한 후 A₄동위효소의 활성은 2시간부터 증가되며 6시간과 3일에서 낮은 활성을 보였으며 B₄동위효소는 확인되지 않았다. 3 Gy 경우 A₄동위효소의 활성은 증가되었으며 C동위효소의 활성은 1 Gy와 3 Gy에서 모두 증가되었고 특히 1 Gy의 1시간에서 많이 증가되었으며 3일에서 가장 높았다. 일반적으로 신장과 간은 호기적 대사를 수행하는 조직으로 알려져 있으나 본 실험 결과 A₄동위효소의 활성이 우세하게 나타났다. 정소에 1 Gy 조사 후 A₄동위효소는 감소되다가 12시간에서 높았고 3일에서 가장 낮았으며 3 Gy 경우는 감소되다가 3일에서 증가되었다. 허부단위체 B의 활성은 증감의 변화가 많았으며 C동위효소의 활성은 1 Gy에서 모두 증가되고 3 Gy에서는 1시간과 3일에 감소되었으나 이후에는 증가되었다.

Skidmore와 Beebee (1991)는 생쥐의 정소조직에서 *Ldh-C*가 발현되는 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 정소조직 뿐만 아니라 골격근, 심장, 신장 및 간 조직에서도 *Ldh-C*가 확인되었으며, C동위효소의 활성은 정소조직에서 가장 높게 나타났다. 3 Gy 방사선에 의해 심장과 신장에서는 C동위효소의 발현 정도가 저하되었으나 골격근, 간 및 정소조직에서는 증가되었다. 특히 포유류의 정소조직에서는 방사선에 대한 LDH의 반응은 *Ldh-C*에 의해 조절이 되고, 간조직을 제외한 나머지 조직에서는 조사량이 많은 경우 허부단위체 B가 증가되는 경향을 보여 LDH가 lactate oxidase로서의 역할을 하는 것으로 볼 수 있으므로 호기적 대사가 우세한 것으로 사료된다. 이것은 외부 자극에 대해 생체가 극복하려는 반응을 보이는 것으로 apoptosis로 세포는 죽지만 세포 피사와는 다르게 주변세포에는 영향을 주지 않고 진행되므로 전체적인 기능을 상실하지 않는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Arends MJ, RG Morris & AH Wyllie (1990) Apoptosis; the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* **136** : 593-608.
- Basu SK, MN Srinivasan, K Chuttani & S George (1992) Protection to glycolysis by a combination of 5-hydroxy-L-tryptophan and 2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide in lethally irradiated rats. *Indian J. Exp. Biol.* **30** : 785-787.
- Bidlack JM & RA Lockshin (1976) Evolution of LDH isozyme during programmed cell death. *Comp. Biochem. Physiol.* **55B** : 161-166.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- Davis BJ (1964) Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121** : 404-427.
- Gasinska A (1985) Mouse testis weight loss and survival of differentiated spermatogonia following irradiation with 250 kV X-rays and 5.5MeV fast neutrons. *Neoplasma* **32** : 443-449.
- Ijiri K (1989) Apoptosis (cell death) induced in mouse bowel by 1, 2-dimethylhydrazine, methylazoxymethanol acetate and γ rays. *Cancer Res.* **49** : 6342-6346.
- Li SS-L, WM Fitch, Y-CE Pan & FS Sharief (1983) evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes A₄ (muscle), B₄ (heart), and C₄ (testis). *J. Biol. Chem.* **258** : 7029-7032.
- Majno G & I Joris (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146** : 3-15.
- Martin SJ, SV Lennon, AM Bonham & TG Cotter (1990) Induced of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J. Immunol.* **145** : 1859-1867.
- Mendiola P & J De Costa (1991) The effects of temperature and pH on the kinetic properties of heart muscle lactate dehydrogenase from anuran amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B** : 529-534.
- Murray D, WT Jenkins & RE Meyn (1984) The efficiency of DNA strand-break repair in two fibrosarcoma tumors and in normal tissues of mice irradiation *in vivo* with X rays. *Rad. Res.* **100** : 171-181.
- Rodrigue F, O Boyer, F Fellet & A Lemonnier (1995) Lactate dehydrogenase isozyme LD(5)/LD(2) ratio as an indicator of early graft function and complications following pediatric orthopic live ansplantation. *Tran. Proc.* **27** : 1871-1874.
- Rojas A & MC Joiner (1989) The influence of dose per fraction on repair kinetics. *Radiotherapy Oncol.* **14** : 329-336.
- Ronen A & JA Henddle (1984) Site-specific induction of nuclear anomalies (apoptotic bodies and micronuclei) by carcinogens in mice. *Cancer Res.* **44** : 1536-1540.
- Scott WJ, JM Brayer, PH Bartels & RE Anderson (1989) Quantitative morphology of late renal radiation injury. *Int. J. Rad. Oncol.* **16** : 101-106.
- Skidmore AF & TJC Beebee (1991) Changes in testicular lactate dehydrogenases of the rat (*Rattus norvegicus*)

- during growth and development. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B** : 279-282.
- Sochocka E, BH Juulink, WE Code, V Hertz, L Peng & L Hertz (1994) Cell death in primary cultures of mouse neurons and astrocytes during exposure to and 'recovery' from hypoxia, substrate deprivation and simulated ischemia. *Brain Research* **638** : 21-28.
- Whitt GS (1970) Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175** : 1156-1158.
- Wiley CA & JR Esterley (1975) Histochemical studies of the corpus luteum. *Am. J. Pathol.* **78A** : 60-67.

Redistribution of Lactate Dehydrogenase Isozymes and Morphology of Tissues in *Mus musculus* after Irradiation

Hyun-Do Park and Jung-Joo Yum

(Department of Biology, Chongju University, Chongju 360-764, Korea)

Abstract - In order to identify the morphological changes of tissues in mouse after irradiation. We have observed the redistribution of LDH isozymes and the morphological changes of skeletal muscle, heart, kidney, liver and testis in mouse according to variation amount with the time after the 1 Gray and 3 Gray irradiation each. As a result of H-E (hematoxylin-eosin) stain, the apoptotic bodies were more easily observed in the liver than the other tissues and the quantity of the apoptotic bodies was proportionated to radiation amount. The number of apoptotic bodies was shown the highest at 1 day in most tissues and at 7 day in testis after irradiation. TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) staining was shown the same results as H-E staining. After the irradiation, the protein content was reduced in tissues except kidney. And protein content was reduced in all tissues at the initial period of 2 hours after 3 Gy irradiation. But it increased at 7 days after irradiation. LDH (EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase) activity was increased mostly in tissues at the early stage after 1 Gy irradiation. The maximum activity was detected earlier stage after 1 Gy irradiation than 3 Gy irradiation. The activity of LDH A₄ isozyme was decreased in the skeletal muscle, heart, kidney, and testis. The activity of B₄ and A₂B₂ isozyme was increased in the skeletal muscle and heart, and the activity of heterotetramer isozyme was increased in kidney. The activity of A₄ isozyme in liver was detected high level and the activity of isozyme including subunit C elevated in testis. Therefore, LDH isozyme seems to play a role of lactate oxidase in most tissues except liver after irradiation. These data support that LDH isozyme is predominantly involved in the aerobic metabolism. [irradiation, tissue, apoptosis, lactate dehydrogenase, *Mus musculus*].