

TPO 활성에 대한 체중 변화의 영향과 X-선에 의한 이원적 영향

연세대학교 이공대학 생물학과

정 노 팔

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

김 등 준

= Abstract =

Effect of Body Weight and Dual Effect of X-ray Irradiation on Tryptophan Pyrrolase Activity

Noh-Pal Jung

*Department of Biology, College of Science and Engineering, Yonsei University,
Seoul, Korea*

Dong Jun Kim

*Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University,
Seoul, Korea*

The effect based upon changes of body weight and effect of X-ray irradiation on tryptophan pyrrolase (TPO) activity in liver homogenate of albino rats was studied.

1. The average TPO activity of control group of 33 rats weighing 95~172 g was 2.372 ± 0.165 μ moles kynurenine/g protein/hr.
2. Correlation between body weight of 33 rats and its TPO activity was not showed practically ($r=0.011$).
3. TPO activity of whole-body X-ray irradiated rats (700r) was increased about double at 3 hours and increased for a period of 4 days after irradiation, but after 6 days it was decreased gradually. This result is that whote-body X-ray irradiation showed dual effect on TPO activity in rat liver.

서 론

Tryptophan peroxidase-oxidase (TPO, tryptophan pyrrolase) 활성은 그 기질인 tryptophan을 쥐에 주사했을 때 증가하는데(Knox and Mehler, 1951; Lee, 1956), Knox and Auerbach(1955)는 이것을 substrate induced enzyme adaptation이라고 하고, 부신적출 후 cortisone 치료로 증가한것을 hormone induced enzyme adaptation이라고 하였다. 이 밖에 Mehler et al. (1958)은 정상 쥐와 뇌하수체적출한 쥐에 cortisone 주사로 TPO 증가,

Schor and Frieden(1958)은 insulin의 TPO유도를 보고하였다. 또한 Horton and Franz (1958)는 ethionine 이 cortisone의 TPO 활성의 촉진을 감소, Auerbach et al. (1958)은 3-amino-1, 2, 4, -triazole(AT)의 TPO 활성과 기질유도적응의 감소, Fiola and Fiala(1959)는 carcinogenic azo dye의 TPO 적응합성저지 등을 보고하였다.

Riolin and Knox (1959)는 쥐의 나이, 크기, 성장 hormone 등의 TPO 특수 활성에 대한 영향, Nemeth and Nachimias(1958)는 발생중과 출생 전후의 불모트잔

의 TPO 활성변화를 보고하였다. Thomson and Mikuta (1952)는 1000 r의 X-선을, Cha (1961)는 900 r의 X-선을 쥐에 조사한 후, 120 시간까지의 TPO 활성의 변화를 관찰하였다.

저자는 95~172g까지의 쥐의 체중변화에 따른 TPO 활성에 미치는 영향을 관찰하였으며, 700 r의 X-선을 조사한 후 264 시간까지의 TPO 활성 변화를 추구하여 몇가지 결과를 보고하는 바이다.

실 험 방 법

이 실험에 사용한 재료는 숫 흰쥐로서 체중은 95~172g이며 20±2°C에서 사육되었다.

X-선조사는 원자력연구소에 비치된 X-선조사기를 사용하였다. 조사조건은 200 KVP, 5 mA, 0.5 mm Al filter, 거리 50 cm, 70 r/min으로 10분간 즉 700 r을 전신조사하였다.

동질액의 조제: 쥐를 단두하여 충분히 피를 뽑고 즉시 복벽을 잘라 간을 끊어내어 얼음을 채운 petri dish에 옮긴다. 이 간을 깨끗이 씻은 후 물기를 없애고 Torsion balance를 사용하여 1g을 취한다. 이를 0.0025 ml/l의 NaOH를 포함한 0.14 M KCl을 7 ml 넣고 얼음을 채운 Porter-Elvehjen glass homogenizer에 넣어 동질액을 만든다(pH=7.0). 이 동질액은 얼음을 채운채로 보존하였다.

Tryptophan pyrrolase assay: TPO assay는 Knox의 방법을 약간 변경하여 행하였다. TPO 활성은 간 homogenate에 tryptophan을 넣고 aerobic incubation하는 동안에 생성된 kynurenine의 양을 Beckmann's DU Spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. Homogenate는 같은 쥐의 간에서 반복하였는데, 이에 각각 tryptophan을 넣지 않은 blank를 control로 하였다. Table 1과 같이 20 ml의 reaction beaker의 4개에 반응액을 넣고 Warburg 씨 장치의 37°C 수조에 잠겨 10분간 온도평형에 이르게 한 후 homogenate의 1 ml를 각 test reaction flask에 넣고 공기의 접촉 밑에 60분간 incubate하여 homogenate 속에 있는 효소의 반응을 일으키게 하였다. Incubation이 끝난 후 이 반응을 5% zinc acetate 2.5 ml와 0.18 M NaOH 3.5 ml를 가하여 정지시키고 내용을 원심관에 옮긴 다음 10분간 원심분리하였다.

Kynurenine의 결정: zinc acetate와 NaOH로 반응을 정지시킨 다음 원심분리하여 생긴 맑은 상등액속에 있는 Kynurenine은 Spectrophotometer로 365 mμ에서 optical density를 측정했는데, kynurenine solution

Table 1. Composition of reaction solution

Reaction mixture	Blank	Test	Blank	Test
0.03 M tryptophan	—	0.3 ml	—	0.3 ml
0.2 M phosphate (pH: 7.0)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
H ₂ O	2 ml	1.7 ml	2 ml	1.7 ml
Homogenate	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Total volume	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml

의 1.0 micro mole/10 ml의 흡광계수가 0.454의 값을 사용하여 다음 식에 의해 효소활성을 μ moles kynurenine/g protein/hr.로서 표시하였다.

$$\frac{\text{Test O.D.} - \text{Blank O.D.}}{0.454} \times \frac{1,000}{\text{mg protein in 1.0 ml of 12\% liver homogenate}} = \mu \text{ moles kynurenine/g protein/hr.}$$

단백질정량은 biurette 법으로 하였다.

본 실험: 이 실험에서 사용한 95~172g의 33마리의 정상 쥐들의 TPO 활성은 Table 2에서와 같이 5군으로 나누고 각 군의 평균 활성치를 산출하고 각 군의 통계학적 유의성 검사를 하였으며 전체에 있어서 각 개체의 체중과 그 TPO 활성사이의 상관관계를 조사하였다.

X-선조사는 체중 100~126g의 쥐를 전술한 조건으로 전신조사한 후 쥐 간에서의 TPO 활성의 시간 경과에 따르는 변화를 측정하였다. Table 3에서와 같이 시간 경과의 간격을 정하고 각 구간의 평균활성치를 산출하고, 각 구간의 유의성 검사를 하였다.

Table 2. TPO activities in rats liver of different body weight

Body weight (g)	Average of body weight (g)	TPO activity ± S.E. (μ moles kyn./g protein/hr.)	P value
95~99	96.2	2.483 ± 0.624(6)	<0.02
100~109	104.3	2.290 ± 0.069(9)	<0.01
110~119	112.5	2.227 ± 0.440(6)	<0.01
120~129	122.8	2.441 ± 0.091(6)	<0.01
130~172	150.0	2.476 ± 0.558(6)	<0.01
Total average	116.0	2.372 ± 0.165(33)	<0.01

TPO activities are the average from separate homogenate.

(): the number of rats tested.

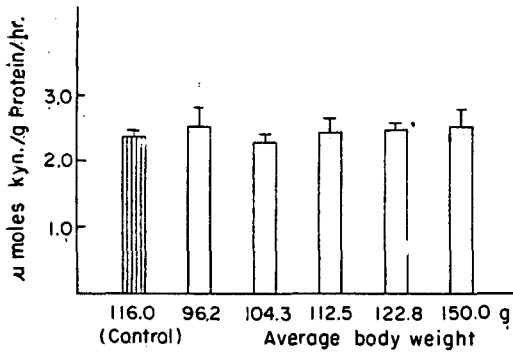


Fig. 1. Average TPO activity of each average body weight of rats.

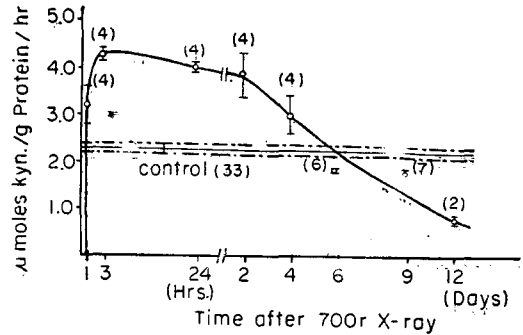


Fig. 2. Time-course changes of TPO activity in rats liver after whole body X-ray irradiation.

Table 3. Effects of whole body X-ray irradiation on TPO activity in rats liver

Time after X-ray irradiation	Average TPO activity ± S.E. (μmoles kyn./g protein/hr.)	Changing rate of X-irradiated group to control (%)	P value
Control	2.372 ± 0.165 (33)	100	<0.01
1 hr.	3.165 ± 0.840 (2)	133	>0.05
3 hrs.	4.305 ± 0.160 (4)	185	<0.01
24 hrs. (1 day)	4.018 ± 0.140 (4)	169	<0.01
48 hrs. (2 days)	3.925 ± 0.910 (4)	166	<0.05
96 hrs. (4 ")	3.011 ± 0.820 (4)	127	<0.05
144 hrs. (6 ")	1.858 ± 0.007 (6)	80	<0.01
216 hrs. (9 ")	1.845 ± 0.260 (7)	77	<0.01
264 hrs. (12 ")	0.750 ± 0.200 (2)	32	>0.05

TPO activities are the average from separate homogenate.
() : the number of rats tested.

실험결과

1. 체중변화에 따르는 TPO 활성

체중이 95~172g의 흰쥐를 Table 2에서와 같이 체중의 크기 순서로 5군으로 정리하였는데 각 군의 수치는 그 군의 평균활성치이다. Fig. 1은 쥐의 평균체중에 대한 TPO의 평균활성치를 나타내는데 전체평균활성치와 각 군평균치를 비교하였다.

전부 33마리의 체중과 TPO 활성과의 상관관계를 계산한 결과 0.011이라는 상관계수를 얻었으며, 95~119g까지의 21마리에서는 0.040, 110~172g까지의 18마리에서는 0.031이라는 상관계수를 얻었다.

2. X-선조사후의 TPO 활성에 대한 시간경과의 영향

700 r을 X-선을 전신조사한 쥐의 간에서의 TPO 활성을 시간경과에 따라 나타낸 것이 Table 3이다. 조사군은 3시간이 최고치를 나타내었으며, 4일까지 정상군보다 증가되었으나, 6일 이후는 정상군보다 감소된 결과를 나타내었다(Fig. 2). 즉 TPO 활성은 X-선에 의해 유도적응이 되었다가 일정시간 후에 정상 수준에 복귀한 채로 유지되지 않고 계속 감소되었다.

고찰

Nemeth and Nachimias(1958)는 물모트의 TPO 활성이 출산후 1일에는 성체의 수준에 이르고 1주일에는 약 2배로 증가하다가 성체가 될 때에 다시 감소한다고 하였다. Riolin and Knox(1959)는 쥐의 체중이 증가함에 따라 TPO 활성이 증가한다고 하였다. 즉 408g(400일)이 114g(38일)보다 2배이상 증가하였다 한다. Corell et al.(1965)도 1, 3, 6, 12개월 된 흰쥐의 나이에 따른 TPO 유도의 변화를 보고하였다. 이 실험에서 95~172g까지의 체중과 TPO 활성사이에는 상관계수가 0.011로서 거의 상관관계를 인정할 수 없었다. 따라서 이런 정도의 체중범위안에서는 체중에 큰 구애없이 TPO 활성을 측정할 수 있으리라 생각된다. 그리고 이 실험에서 상기의 무처리군 전부의 활성을 평균하여 X-선의 처리군과 비교하는 기준으로 하였다.

Thomson and Mikuta(1952)는 1000 r의 X-선을 쥐에 전신조사하여 4시간에 TPO 활성이 2배로 증가하는 것을 보았고, Cha(1961)는 900 r을 쥐에 전신조사하여 2시간과 4시간에 4배의 증가를 보았는데, 이 실험

험에서는 700 r를 전신조사하여 3시간후에 최고치 즉 약 2배로 증가하였다.

Thomson and Mikuta(1952)는 TPO 활성의 증가가 불과 48~72시간에 정상으로 된다고 하였는데 이 실험에서는 96시간까지 정상보다 증가하였다. 이것은 선량이 많은 쪽이 쉽게 정상으로 되었다가 이 실험에서 나타난 바와 같이 정상이하로 줄어들기 때문일 것이다. 이 실험에서 144시간이후는 정상보다 감소되어 계속 줄어드는 경향을 나타낸 것이다.

X-선에 의한 TPO 활성의 축진은 X-선이 부신피질을 자극한 radiation induced secondary hormonal effect로 보고 있다. 이러한 것은 xanthine oxidase 활성에서도 이미 보고되어 있으며(Knox, 1957), 또한 부신피질을 적출한 쥐를 X-선으로 조사했을 때는 TPO 활성이 증가하지 않고 감소한다는(Thomson and Mikuta, 1952) 사실로 부터 수증할 수 있을 것이다.

이 실험(in vivo)에서 X-선에 의해 조사초기는 TPO 활성이 증가하다가 4일후에 정상으로 되지만 이것이 계속되는 것이 아니고 그 이후부터는 오히려 X-선에 의한 상해효과가 결국 나타난 것이다. 이러한 사실은 X-선조사가 TPO 활성에 대하여 이원적인 영향을 일으킨다는 것이다. 6일 이후 TPO 활성이 계속 감소하게 된 것은 부신피질의 축진작용이 점차 쇠퇴되었거나 간세포의 상해에 의하여 TPO의 유도적응에 영향을 미쳐 TPO 활성이 감소한 것이 아닌가 생각되는데, 더 추구하여야 할 문제이다.

결 론

95~172 g의 흰쥐의 간 homogenate에서의 TPO 활성에 미치는 체중변화의 영향과 X-선조사의 영향을 추구하였다.

1. 평균체중이 116.0 g인 흰쥐의 TPO 활성은 평균 $2.372 \pm 0.165 \mu$ moles kynurenin/g protein/hr.이었다

2. 체중이 95~172 g의 33마리의 흰쥐의 체중에 따르는 TPO 활성은 상관관계(상관계수 $r=0.011$)를 거의 인정할 수 없었다.

3. 700 r의 X-선을 전신조사하였을 때 TPO 활성은 3시간에 약 2배의 증가를 나타내며, 4일까지 증가되었으나, 6일, 9일은 약 20% 감소하여 그 후 계속 감소하는 경향을 보여 이원적인 영향을 나타내었다.

참 고 문 헌

1) Auerbach, V.H., A. R. Pieringer, and H. A. Waisman: *The effect of 3-amino-1,2,4, -triazole on*

the synthesis of tryptophan peroxidase-oxidase. Arch. Biochem. & Biophys. 82(2):370, 1959.

- 2) Cha, H.S.: *Effects of X-ray Irradiation on Tryptophan pyrrolase induction in vivo & in vitro.* Bull. Yamaguchi Med. School 8:73, 1961.
- 3) Corell, W. W., M. D. Turner, and J. L. Haining: *Changes in tryptophan pyrrolase induction with age.* J. Gerontol. 20(4):507, 1965.
- 4) Fiola, S., and A. E. Fiala: *Prevention of adaptive formation of tryptophan peroxidase by a carcinogenic azo dye.* Nature 183(4674):1532, 1959.
- 5) Horton, H. R. and J. M. Franz: *Effect of ethionine on the cortisone-evoked stimulation of tryptophan peroxidase-oxidase activity.* Endocrinology 64(2):258, 1959.
- 6) Knox, W.E.: *Adaptive Enzyme Formation in Animals.* In *Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry.* Maruzen, Tokyo. Vol. II:414, 1957.
- 7) Knox, W. E., and V.H. Auerbach: *The hormonal control of tryptophan peroxidase in the rats.* J. Biol. Chem. 214:307, 1955.
- 8) Knox, W.E., and A.H. Mehler: *The adaptive increase of the tryptophan peroxidase-oxidase system of liver.* Science 113:237, 1951.
- 9) Mehler, A.H., E.G. Mc Daniel, and J.M. Hundley: *Changes in the Enzymatic composition of liver. II. Influence of hormones on picolinic carboxylase and tryptophan peroxidase.* J. Biol. Chem. 232:331, 1958.
- 10) Lee, N.D.: *The induced increase in the tryptophan peroxidase activity of rat liver: Time Studies.* J. Biol. Chem. 219:211, 1956.
- 11) Nemeth, A. M., and V. T. Nachmias: *Changes in tryptophan peroxidase activity in developing liver.* Science 128(3331):1085, 1958.
- 12) Riolin, R. S., W.E. Knox: *Effects of age, body size & growth hormone on level of tryptophan peroxidase-oxidase in rat liver.* Amer. Jour. Physiol. 197(1):65, 1959.
- 13) Schor, J.M., and E. Frieden: *Induction of tryptophan peroxidase of rat liver by insulin & alloxan.* J. Biol. Chem. 233:612, 1958.
- 14) Thomson, J. F., and E. T. Mikuta: 1952. In *Fundamentals of Radiobiology (by Z.M. Bacq and Peter Alexander)* Pergamon Press. 1961, p. 334.