

우라늄 투여후 간조직에서의 효소활성도의 변화

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

한국원자력연구소

요 약

우라늄 피폭후 효소활성도가 내부피폭의 biomarker로서의 가능성을 연구하기 위하여 수서생물인 잉어(*Caprinus carpio*)의 복강내 우라늄 투여시 간조직에서 일어나는 여러가지 효소계의 변화를 조사하였다. 이러한 효소활성도의 변화는 우라늄 내부피폭의 biomarker로서 가능성을 가지고 있으며 연구결과는 다음과 같다. 1) 6일째까지 우라늄을 주사하여 적출한 간에서의 전체단백질량은 계속 감소하고 있다. 2) 세포내의 lysosome내에 함유하고 있는 acid protease와 β -glucuronidase의 활성도는 6일째 투여후까지 활성도가 감소하고 있다. 3) Alkaline phosphatase의 경우 6일째 우라늄 투여후까지 증가하고 있으며 반대로 acid phosphatase의 경우 6일째 우라늄 투여후까지 활성도가 급격히 증가하였고 glutamate oxaloacetate transaminase의 활성도는 완만하게 증가하고 있다. 4) Creatine kinase의 활성도는 완만한 감소를 보이고 있으며 malate dehydrogenase는 첫번 우라늄 투여후에 활성도가 급격히 감소하였고 3일째 우라늄 투여후에는 활성도가 거의 나타나지 않았다.

Key word: lysome, 효소활성도

서 론

방사선의 방호목적 및 환경보호를 목적으로 biochemical indicator system의 연구가 시작된 것은 최근의 일이며 특히 해양 및 담수생물을 대상으로 환경오염에 생물학적 지표물질의 탐색연구가 활발하다[1, 2, 3, 4, 5]. 이런 biomonitoring 기술은 새로운 면이 있기는 하지만 비용이 저렴하고 기술적인 면에서 손쉽고 용이하다면 앞으로 실용화될 전망이 크다. 원래 biomonitoring이란 계절에 따른 어류의 행동양식같이 생물체를 추적,

관찰하는 방법이다. 다양한 외부 자극에 대한 생물체의 생리, 생화학적 변화 및 그 기작의 기초적 연구는 biomonitoring이나 환경보호측면에서는 별다른 관심을 보이지 않았다. 그러나 고도화된 산업발전에 따른 환경오염의 대두 및 방사선물질 등 다양한 오염물질에 대한 생물체의 반응에 관한 연구가 진전됨에 따라 실제적인 문제에 적용할 수 있게 되었으며 특히 생물체가 이러한 환경오염물질에 노출될 경우 생체내 분자수준에서의 생화학적 생리적 변화를 측정함으로써 생물체가 서식하는 주변환경 오염정도를 간접적으로 평가할

수 있으며 생태학적 영향을 평가할 수 있다. 예를 들어 생활하수로 오염된 용수가 사람이나 동물들에게는 일반적인 질병의 발병원인 중의 하나가 되고 있다. 이 질병의 원인은 오염때문에 저항성이 생긴 세균에 의한 것이라 할 수 있다. 따라서 대조(control)지역과 생활용수로 사용되고 있는 지역들의 antibiotic-resistance 세균의 분포와 정도를 조사, 비교하므로써 그 지역생활용수의 오염 정도와 더불어 오염의 심각성을 조기경고할 수 있고 인간의 질병예방에도 상당한 기여를 한다[6]. 즉 생물체는 환경독성물질에 노출되거나 독성물질이 특히 체내에 유입되었을 경우 이를 방어하는 생리기작의 하나로서 특정 생리물질의 생성이나 활성화의 변화를 일으킨다고 보고되어 있다[7]. 이러한 특정물질들은 독성물질의 종류와 환경오염의 유형에 따라 특징을 달리하기 때문에 환경오염을 감지할 수 있는 biomarker로서 활용이 가능하다. 따라서 값비싸고 생물학적 효과가 반영되지 않는 화학적 data의 미비점을 보완하고 연속적인 환경오염의 생태학적 영향, 인류보건학적인 중요성을 평가하는데 biomonitoring은 중요한 위치를 차지하리라 생각된다. 생물체의 사멸이나 암은 이러한 효소계가 감당할 수 없을 정도의 극한 오염상태나 혹은 유해 오염물질의 장시간 노출에 의한 비가역적 효과로서 오염의 정도를 극단적으로 나타내는 대표적인 경우이다. 이러한 상황을 방지하고 오염 및 방사선피폭의 조기경고를 위하여 이러한 다양하게 변화하는 효소계의 활성도를 측정하므로써 환경오염의 정도와 방사선을 포함한 총체적인 유해물질의 효과를 예상할 수 있으리라 생각된다. 환경오염물질중 많은종류의 유기물이나 약품, 일부 중금속 등이 생체내에서 생체변화(biotransformation)를 일으키거나 환경오염물질과 결합할 수 있는 새로운 물질이 간조직 등에서 유도되므로[8, 9, 10] 본 연구는 수서생

물인 잉어에 우라늄 투여시 간조직에서 일어나는 효소계의 여러가지 생화학적 변화를 탐색하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 연구의 대상생물 및 사육

인공양식한 2년생(체장: 20×25cm, 체중: 평균 300g)의 잉어(*Cyprinus carpio*)를 실험실내에서 30×150×90cm의 수조에 보통 10-15마리의 개체를 넣어 3-4일간 수조안에서 방치, 순화(acclimatization)시켰다. 그후 계속적인 사육은 수온 18°C에서 부유성 pellet 먹이를 주어 aeration을 시키면서 시행하였다.

2. 우라늄의 형태 및 처리

실험실에서 사용된 우라늄의 형태는 Uranyl nitrate hexahydrate($UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) 용액을 사용하였으며 lysosomal 효소인 acid protease, acid phosphatase, β -glucuronidase와 alkaline phosphatase, malate dehydrogenase(MDH), creatine kinase, glutamate oxaloacetate transaminase(GOT) 등의 활성도변화를 측정하기 위하여 처치용량 1500ug uranium/kg-carp/day를 1일 1회씩 6일간 복강주사(intraperitoneal injection)하였으며 잉어의 간을 적출하여 -60°C의 deep freezer에 보관, 사용하였다.

3. 시료의 조제

1일째, 3일째와 6일째 우라늄을 투여한 잉어와 대조군의 잉어를 해부하여 즉시 간을 적출하였으며 일정량을 미리 냉각시킨 10mM의 phosphate buffer(pH 7.5)로 4배 용량을 가하여 유리 homogenizer로 균질화 하였다. 이 균질액을 4°C에서 초고속 원심분리기로 105,000g에서 60분 동안 초

원심분리하여 그 상층액을 효소계의 활성도 변화를 측정하는 시료 및 단백질 정량을 위한 시료로 사용하였다.

4. 단백질 정량

단백질 정량은 Coomassie Brilliant Blue G를 사용하여 Bradford(1976) 방법을 사용하였으며 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다. 단백질 정량 시약은 다음과 같은 방법으로 만든다[11]. Coomassie Brilliant Blue G 50mg을 95% ethanol 25ml에 녹여 빠르게 stirring 한다. 그후 85%(w/w) 인산(H_3PO_4)용액 50ml를 섞어 녹인 다음 500ml 증류수로 volume을 맞추어 Whatman No. 1 filter paper로 insoluble 물질을 제거시킨 다음 분석은 Spectrophotometer(Perkin Elmer Lambda 3B)로 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 효소계 활성도 측정

Acid protease의 측정은 기질용액인 1% bovine serum albumin(BSA) 1ml와 1M sodium acetate buffer(pH 3.5) 2ml, 시료 0.5ml를 섞어 시료를 섞지 않은 대조군과 25°C에서 30분간 incubation시킨후 15% Trichloroacetic acid 1ml를 첨가하여 10분후에 500g로 원심분리하여 그 상층액을 280nm에서 측정하였다. Acid protease 1 unit은 분당 흡광도의 변화(ΔA_{280})가 0.001이 되게 하는 효소의 양으로 정의하였다. Phosphatase 활성도 변화를 측정하기 위하여는 기질로서 30mM p-nitrophenylphosphate를 사용하여 Alkaline phosphatase의 경우 기질, 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 및 시료를 취하여 25°C에서 4-5분간 incubation시킨 다음 410nm에서 3-4분간 흡광도의 변화(ΔA_{410})를 측정하였다. Acid phosphatase의 경우에는 0.1M Sodium acetate buffer(pH 3.5)를 사용하였으며 측

정방법은 alkaline phosphatase와 동일하였다. Phosphatase 1 unit은 분당 1μmole의 p-nitrophenylphosphate가 p-nitrophenol로 가수분해 시킬 수 있는 효소의 양으로 정의하였다. MDH의 측정은 기질로서 62.5mM oxaloacetate를 사용하여 1.77mM NADH, 100mM Tris-HCl buffer(pH 9.0) 및 시료를 섞어 340nm에서 NADH 분해에 따른 흡광도의 감소를 측정하였다. MDH 1unit은 분당 1μmole의 NADH가 NAD로 가수분해시킬 수 있는 효소의 양으로 정의하였다[12,13]. Creatine kinase, GOT, β-glucuronidase 등은 sigma사에서 구입한 kit를 사용하였다. 대조군 및 실험군은 각각 10개체씩 사용하였으며 각 개체당 각각의 효소 활성도의 측정은 8회씩 반복하였다. 이러한 측정 자료는 각 개체의 평균값을 구하고 개체간의 차이를 mean \pm standard error로 표현하였다.

연구결과 및 고찰

1. 우라늄 투여에 의한 단백질 및 효소계 활성도의 변화

잉어에 우라늄 투여후 간에서 전체단백질의 변화량을 측정하였다. 우라늄을 투여하지 않은

Table 1. Total protein concentration in carp liver injected with uranium. The experimental data represent mean value \pm SE

uranium injection	total protein concentration (mg/g fresh-weight)
control	67.2 \pm 4.7mg
first injection	59.2 \pm 10.3mg
second injection	42.8 \pm 6.8mg
sixth injection	22.4 \pm 4.4mg

잉어의 간에서는 67.2mg/g-fresh weight이었으며 첫번째 우라늄 투여후 적출한 잉어의 간에서는

59.2mg/g-fresh weight, 3일째 우라늄을 투여한 잉어의 간에서는 42.8mg/g-fresh weight, 6일간 투여한 잉어에서는 22.4mg/g-fresh weight으로 현저하게 감소하고 있었다(표 1).

이러한 현상은 독성이 강한 우라늄의 영향으로 세포막의 파괴로 인한 lysis 현상등 세포의 사멸(necrosis) 때문에 일어나는 현상이라고 볼 수 있다. 대조군 잉어의 간에서 alkaline phosphatase는 어떠한 활성도도 보이지 않고 있다가 첫번째 우라늄 투여후 적출한 간에서 0.4×10^{-3} unit/mg protein의 활성도를 보이고 있으며 3일간 우라늄 투여후에는 0.83×10^{-3} unit/mg protein, 6일간 우라늄을 투여후 적출한 잉어의 간에서는 7.8×10^{-3} unit/mg protein으로 3일후 급격한 증가 현상을 보이고 있다(그림 1).

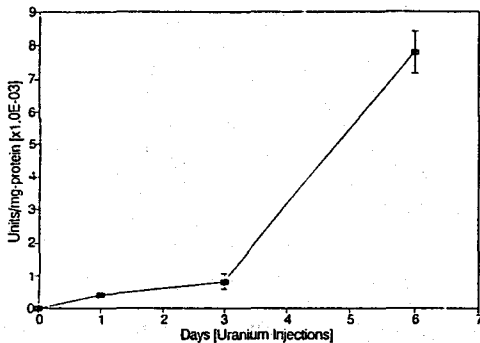


Fig. 1. Alkaline phosphatase activity changes in carp liver injected with uranium. (The experimental data in all figures represent mean value \pm standard error.)

보통 alkaline phosphatase는 간, bone, 정상적인 혈장에서는 적은 농도로 존재하고 있으며 그외의 다른 조직에서는 일정량이 존재하고 있다. 따라서 osteosarcoma 발생시, 방사선에 피폭되었을 경우 등 정상적인 세포에 이상이 일어났을 경우에는

혈장내에 alkaline phosphatase의 활성도가 증가하게 된다고 보고되고 있다[11]. 그러므로 현재 정상적인 잉어의 간에서는 활성도를 보이지 않고 있는 alkaline phosphatase의 경우 6일간 우라늄 투여후 활성도가 증가하였다는 것은 일차적으로 간조직의 이상이거나 혹은 다른 조직의 이상으로 혈액내 방출된 alkaline phosphatase가 간조직으로 유입될 가능성도 있다. 그러므로 이러한 변화가 환경오염의 생화학적 indicator로서 가능성이 있다는 사실을 배제할 수 없다.

MDH는 대사기능으로는 간조직에서 oxaloacetate를 malate로 가역적으로 전환시킴으로서 malate-aspartate shuttle, 지방생합성, 탄수화물생합성, 세포내 기관인 mitochondria에서는 동위효소 형태가 존재하여 TCA회로에 관여하는 등 민감한 대사기능에 관여하기 때문에 외부 환경오염원에 의하여 민감하게 반응할 가능성이 있다. 이러한 MDH를 우라늄 투여후 활성도의 변화를 조사하였다. 대조군의 잉어에서 적출한 간에서의 MDH는 8.9×10^{-2} unit/mg protein이었으며, 첫번째 우라늄 투여후에는 0.9×10^{-2} unit/mg protein을 보여 급격히 활성도가 감소하는 현상을 보였고 3일간 우라늄 투여후에는 활성도가 나타나지 않았다(그림 2). 따라서 상기의 alkaline phosphatase 등의 증감현상보다는 훨씬 민감하게 반응하고 있으므로 현재 투여한 우라늄의 양보다 적은 우라늄의 농도에서 내부피폭의 생화학적 지표로서의 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Creatine kinase의 활성도는 3일째 우라늄 투여 후까지는 완만한 활성도의 증가현상을 보이다가 6일간 우라늄을 투여한 간에서는 1.84×10^{-1} unit/mg protein으로 대조군에서의 활성도 3.29×10^{-1} unit/mg protein보다 56% 정도의 활성도를 보여 상당히 감소하고 있다(그림 3). 사람이나 고등동물의 간질환의 중요한 지표 중의 하나인 GOT의

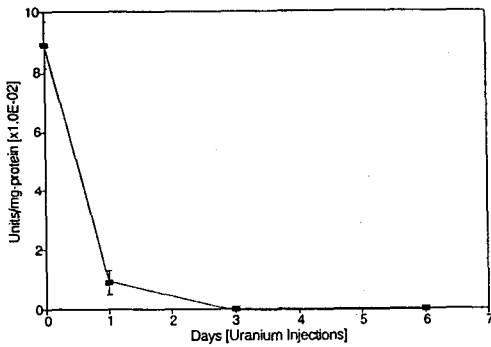


Fig. 2. MDH activity changes in carp liver injected with uranium.

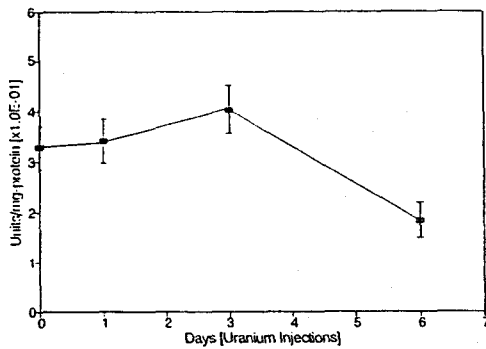


Fig. 3. Creatine kinase activity changes in carp liver injected with uranium.

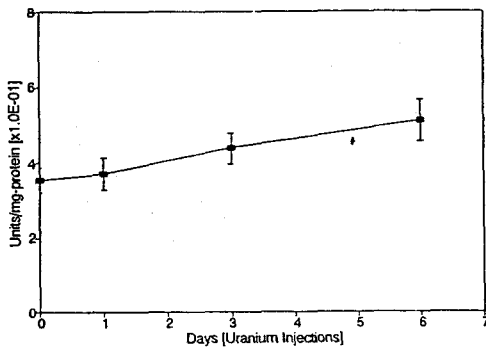


Fig. 4. GOT activity changes in carp liver injected with uranium.

경우에는 잉어의 대조군에서는 3.54×10^{-1} unit/mg protein, 3일째 투여후에는 4.39×10^{-1} unit/mg protein, 6일째 투여후에는 5.11×10^{-1} unit/mg protein로 대조군보다 147%의 활성도 증가를 보이나 다른 효소활성도의 변화보다는 변화의 폭이 크지 않았다(그림 4).

2. Lysosomal enzyme

Lysosomal enzyme은 세포의 사멸 및 자기분해와 관련이 있는 것으로 특히 발생과정중 특정한 생리적 기능을 나타내고 있는 것으로 알려져 있다. 대표적인 lysosome 효소인 acid phosphatase의 활성도는 대조군의 잉어의 간에서는 3.01×10^{-2} unit/mg protein이었으며 첫번째 우라늄 투여후에는 2.81×10^{-2} unit/mg protein, 3일째에는 1.91×10^{-2} unit/mg protein으로 점차적으로 감소하여 6일간 우라늄을 투여한 간에서는 0.89×10^{-2} unit/mg protein으로 대조구의 38%의 활성도를 보이고 있다(그림 5). 이것은 alkaline phosphatase나 같은 lysosomal 효소인 acid protease나 β -glucuronidase와는 반대현상으로 독성이 강한 우라늄이 직접적이건 아니면 간접적이건간에 이 효소를 만드는 유전인자를 억제하는지 아니면 lysosome을 파괴

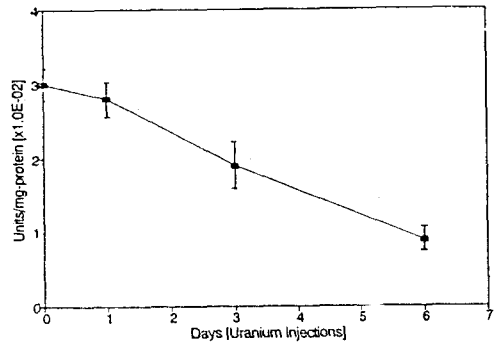


Fig. 5. Acid phosphatase activity changes in carp liver injected with uranium.

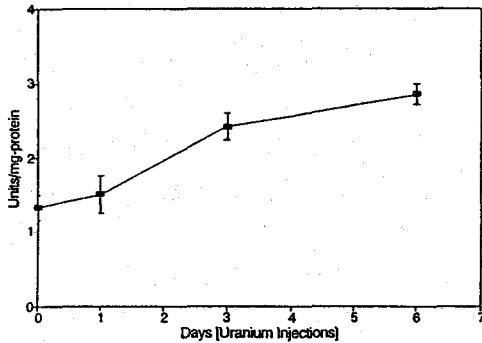


Fig. 6. Acid protease activity changes in carp liver injected with uranium.

시켜 acid phosphatase의 방출을 유도하여 이 우라늄이 분자구조 등에 영향을 주어 활성도 감소를 유도하는지의 명확한 원인 규명을 위해 더 많은 실험이 요구된다. 이러한 acid phosphatase는 병리학적으로 중요한 역할을 하고 있는데 전립선 등의 조직에 이상이 생기면 혈장내에 활성도가 증가하게 된다. 따라서 이러한 acid phosphatase 활성도의 변화가 중요한 생화학적 지표가 될 가능성이 있다.

같은 lysosomal enzyme이면서도 acid protease와 β -glucuronidase의 경우는 우라늄 투여에 따라 활성도의 증가를 보이고 있다. 대조군 잉어의 간에서는 1.33unit/mg protein, 첫번째 우라늄 투여후에는 1.51unit/mg protein, 3일간 우라늄 투여후에는 2.43unit/mg protein, 6일간 우라늄 투여후에는 2.86unit/mg protein을 보이고 있으며 β -glucuronidase의 경우 대조군에서는 3.23unit/mg protein, 1일째 투여후에는 3.86unit/mg protein, 3일째 투여후에는 6.67unit/mg protein, 17.36unit/mg protein으로 대조군보다 536%의 급격한 활성도증가를 보이고 있다(그림 6, 7). 그러나 Acid protease의 활성도 증가는 상기의 다른 효소처럼 특정한 효소의 활성도를 측정된 것이 아니고 lysosome내에 있는 total protease를 측정된 것이므로 cathepsin

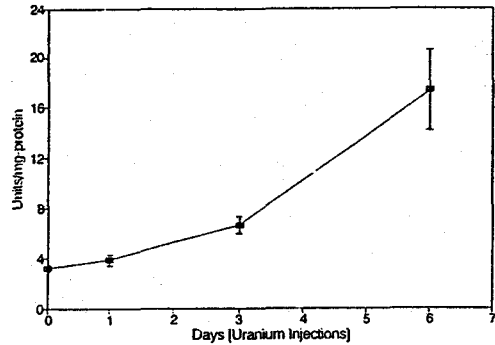


Fig. 7. Beta-glucuronidase activity changes in carp liver injected with uranium.

D 등의 endopeptidase를 중심으로 분리정제가 이루어져 분자적 특성을 밝히는 것이 biomarker로서의 이용가능성을 인지할 수 있는 좋은 방법으로 사료된다. 이러한 간에서의 활성도의 변화는 특정한 중금속이나 방사선물질의 생태계내로의 유입을 인지할 수 있는 biomonitoring의 중요한 인자가 될 수 있다.

결론

우라늄 및 핵시설물의 증가로 인하여 노출될 수 있는 방사선의 생체영향은 카드뮴이나 납 등 다른 중금속 이상으로 유해하다. 따라서 환경내로의 우라늄의 방출이나 방사선물질의 노출시 이를 감지할 수 있고 biomonitoring에 응용될 수 있는 biomarker에 관하여 추적, 탐색하였다. 우라늄 투여후 변화하는 lysosome 효소 및 alkaline phosphatase, creatine kinase, GOT, MDH의 활성도의 변화를 관찰한 연구결과는 다음과 같다. 잉어에 우라늄을 주사하여 적출한 간으로부터 단백질 양상을 살펴본 결과 6일째 까지 주사한 간에서 세포의 사멸로 인하여 전체 단백질량은 계속 감소하였다. lysosome 효소인 acid protease, β -glucuronidase의 경우 우라늄 주사 6일째까지 활성

도가 증가하고 있는 반면 같은 lysosome 효소인 acid phosphatase는 우라늄 주사 6일째까지 반대로 활성도가 감소추세를 보이고 있다. 병리학적으로 골조직 등의 이상의 경우처럼 방사선 피폭시 alkaline phosphatase 활성도는 우라늄투여 6일째까지 증가하는 현상을 보이고 있었으며 GOT활성도 역시 증가현상을 보이고 있었다. creatine kinase, MDH는 우라늄 투여후에 따라 활성도가 감소하는 현상을 보였고 특히 MDH는 다른 효소들 보다 우라늄 투여후 매우 민감한 활성도의 변화를 보이고 있었다. 이러한 변화의 정도를 정량화 할 수 있다면 환경오염의 중요한 지표로 활용될 수 있다.

참고문헌

1. McCarthy, J. F., Halbrook, R. S. and Shugart, L. R. Conceptual Strategy for design, Implementation, and Validation of a biomarker-Based Biomonitoring Capability. Oak Ridge National Laboratory Report, ORNL/TM-11783 (1991).
2. Haasch, M. L., Quardokus, E. M., Sutherland, L. A., Goodrich, M. S., Prince, R., Cooper K. R. and Lech, J. J. CYP1A1 protein and mRNA in teleosts as an environmental bioindicator: laboratory and environmental studies. *Marine Environmental Research* 34, 139-145(1992).
3. Hightower, L. E. A brief perspective on the heat-shock response and stress proteins. *Marine Environmental Research* 35, 79-83 (1993).
4. Bradley, B. P. Are the stress protein indicators exposure or effect? *Marine Environmental Research* 35, 79-83(1993).
5. Steinert, S. A. Induction of HSP70 proteins in mussels by ingestion of tributyltin. *Marine Environmental Research* 35, 89-93(1993).
6. Al-Ghazali, M. R., Jazrawi, S. F. and Al-Doori Z. A., Antibiotic resistance among pollution indicator bacteria isolated from AL-Khar river, BAGHDAD. *Water Res.* Vol. 222, No. 5, pp. 641-644(1988).
7. Bathori, E., Gottwald, G. and Soltesz, L. Veränderungen der alkalischen phosphatase, glutamin-oxalessigsäure-transaminase bzw. Lipidfraktion des serums und der leber bei ratten nach loka(1973).
8. Aposhian, H. V. and Bruce, D. C., Short communication: Binding of polonium-210 to liver metallothionein, *Radiation Research.* Vol. 126, 379-382(1991).
9. Singh, S.V., Iqbal, J. and Krishan, A., Cytochrome p450 reductase, antioxidant enzymes and cellular resistance to doxorubicin. *Biochemical Pharmacology.* Vol. 40, No. 2, 385-387(1990).
10. Sobocinski, P. Z., Canterbury, W. J., and Beall, F. A., Induction of Hypozincemia and Hepatic Metallothionein Synthesis in Hypersensitivity Reactions. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* Vol. 160, 175-179(1979).
11. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254(1976).
12. Bergemeyer, H. U., Methods of enzymatic analysis. vol. I. Verlag Chemic Weinheim. Academic Press, Inc. New York and London(1974).
13. Eisenthal, R. and Danson, M. J., Enzyme Assay A Practical Approach. OIRL PRESS AT OX-

FORD UNIVERSITY PRESS(1992).

14. Stepan, J., Havranek, T. and Jojkova, K. Serum alkaline phosphatases as indicators of radiation

damage in rats. *Radiation research* 70, 406-414(1977).

Enzyme activity changes by intraperitoneal injection of uranium in the carp liver

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

Korea Atomic Energy Research Institute

ABSTRACT

We examined various enzyme activity changes by intraperitoneal injection uranium in the carp liver. These enzyme activity changes can be used as biochemical indicators of internal exposure to uranium. The results were followings ; 1) Total protein concentration decreased by intraperitoneal injection in the carp liver. 2) Lysosomal acid protease and β -glucuronidase activities increased in the liver until sixth intraperitoneal injection of uranium, but Lysosomal acid phosphatase activities decreased in the liver until the sixth injection of uranium. 3) Alkaline phosphatase activities sharply increased and Glutamate oxaloacetate Transaminase activities steadily decreased in the liver until the sixth injection of uranium. 4) Creatine kinase activities steadily decreased and malate dehydrogenase activities sharply decreased in the liver after the primary injection of uranium. Any malate dehydrogenase activities was not detected after sixth injection of uranium.