

放射線照射에 따른 Ribonuclease 活性 및 核酸量 變動에 對하여

Effect of X-irradiation on RNase activity and nucleic acid contents

서울大學 醫科大學 生化學教室

<指導 李 基 寧 教授>

崔 永祚

I. 序論

蛋白質合成에 至大한 役割을 하는 RNA 代謝의 調節 메카니즘에는 여럿이 있겠지만 RNA의 分解酵素로 볼 수 있는 RNase(ribonuclease)의 影響이 支配的일 것이라는 것은 쉽게 首肯되는 바이다. 따라서 RNase가 生理的 또는 病的狀態에 있어 生體內에서 遂行되는 機能은 實로 큰 바 있다. 哺乳動物組織에는 여러 種類의 RNase 가 있으나 다만 그活性에 對한 至適 pH로 acid RNase (pH 5.8)와 alkaline RNase (pH 7.8)로 區分하는 것이 普通이다.^(1,2) 一般으로 acid RNase는 단 acid hydrolase 와 같이 lysosome 分割 속에 局限되어 存在하고 있으나 alkaline RNase는 particulate 와 soluble 分割⁽³⁾ 속에 더 넓은 分布를 보여주고 또 cytoplasmic RNA 와 當密接한 關係가 있는 重要性이 더 큰 RNase이다. alkaline RNase는 特殊한 alkaline RNase inhibitor로 그活性이 抑制되는 것이 特有하며⁽⁴⁾ 이 inhibitor는 많은 高等動物組織속에 存在하고 있음이 證明되었다.⁽⁵⁾

放射線照射의 重要한 生物學的 作用으로 組織의 核酸代謝에 變化가 招來됨은 이미 널리 알려져 있는事實이다.^(6,7) 著者들도 前報^(8,9)에서 報告한 바와 같이 放射線全身照射로 組織의 DNA 및 DNA量特히 DNA量이 線量에 따라 크게 減少됨을 보았다. 放射線照射가 이와 같이 組織內 RNA量의 減少를 招來하는데 RNA代謝와 密接한 關係성이 있는 RNase活性에는 어떤 影響을 미칠 것인가는 것은 放射線의 生物學的 作用으로 보나 또는 核酸代謝面으로 보아 興味 있는 問題로 생각된다.

以上과 같은 趣旨에서 著者は 實驗動物로 白鼠를 使用하여 400r, 600r, 700r 및 800r의 線量別로 X線으로 全身照射한 後 放射線에 比較的 銳敏한 臟器로 脾臟을 指하여 脾組織內 RNase活性와 核酸量 및 血清內 RNase活性을 調査하여 여기 發表하는 바이다.

II. 實驗材料 및 實驗方法

實驗動物：本實驗에서는 Wistar系 雜種으로 140~160g의 白鼠(雄)를 指하여 同一한 食餌 및 生活條件으로 1週日間 飼育한 後 實驗動物로 使用하였다.

X線照射群은 400r, 600r, 700r, 및 800r의 4群으로 區分하여 對照群과 같이 每群當 6마리씩 實驗에 供하였다.

X線照射：X線은 240 Kv, 15 mA, 1.0 mm Cu의 濾過板을 使用하여 約 50 cm의 距離(target)를 두고 大略 70r/min의 rate로 總線量 400r, 600r, 700r 및 800r의 4群으로 區分하여 각群을 照射하였다. 또 sham irradiation을 한群을 對照群으로 삼았으며 以上各動物群은 X線照射後 24時間 斷食放置하였다가 採血한 後 直時斷頭로 犠牲시켜 所要 臟器를 얻어 實驗에 使用하였다.

實驗方法：

RNase活性測定法：RNase活性測定用試料는 다음과 같이 調製하였다. 屍殺直後 臟器를 摘出하여 所要 組織의 1g을 秤量하여 冰冷下에서 冷蒸溜水 5ml를 加한 다음 Teflon homogenizer로 잘 磨碎한 後 International PR-2 冷凍遠心分離機로 500×g에서 10分間 遠沈하였다. 細胞核과 未破碎細胞等을 除去한 後 그 上清液을 取하여 適當히 稀釋한 後 RNase酵素測定用試料로 삼았다.

다. 또 血清은 10倍로 稀釋하여 그 1.0 ml에 對하여 酶素를 測定하였다. RNase 活性 測定은 Roth¹¹法에 按하여 上記 RNase 活性測定用 組織抽出液 1.0 ml에 다 Vischer & Chargaff 法¹²으로 精製한 RNA의 1% 溶液 1.0 ml를 加하되 alkaline RNase 活性測定用으로는 pH 7.7의 veronal acetate buffer 1.0 ml를 加하고 또 acid RNase 活性測定用으로는 pH 5.5의 veronal acetate buffer 1.0 ml를 加하여 37°C에서 15分間 肥置하였다. 다음 acid-alcohol 溶液(蒸溜水 30 ml에 濃 HCl 20 ml를 加한 다음 酒精으로 全量이 250 ml가 되게 稀釋한 것) 3.0 ml를 加하고 上清液을 取한 다음 稀釋하여 acid soluble nucleotide를 波長 260 mμ에서 Beckman DU Spectrophotometer를 使用하여 酶素活性을 測定하였으며 한편 組織 homogenate의 塗素量을 mikro Kjeldahl 法으로 定量하여 RNase活性의 基準으로 삼았다. RNase活性은 血清 RNase에서는 血清 1 ml에 對하여 37°C時 15分間 處理로 分解된 RNA即酸溶性 nucleotide mg 數로 單位를 定하였으며 한편 組織에서는

塗素 1 mg當 37°C時에 15分間 分解된 RNA即酸溶性 nucleotide mg 數로 表示하였다. 組織의 核酸量은 Schneider¹³ 및 Schmidt¹⁴ & Thannhauser¹⁴ 法에 依하여 RNA, DNA를 抽出한 다음 Fiske & Subbarow¹⁵ 方法으로 RNA-P와 DNA-P를 各各 定量하였다.

II. 實驗結果

白鼠에 線量을 400r, 600r, 700r 및 800r로 달리하여 X線으로 全身照射한 後 脾組織 및 血清內 RNase活性 및 脾組織內 RNA 및 DNA量의 變動을 보면 다음과 같다.

1) X線照射에 依한 脾組織 및 血清內 RNase活性의 變動 :

脾組織內 alkaline 및 acid RNase活性과 血清 alkaline RNase活性의 變動을 보면 第1, 2, 3表 및 第1圖에 表示한 바와 같이 400r에서는 對照群에 比하여 acid 및 alkaline RNase活性에 큰 變動이 없었으나 600r에서는 脾組織內 acid RNase活性과 血清 alkaline RNase

Table 1. Variation of spleen alkaline RNase activity of rats after X-irradiation

Dose Experiment No	400r		600r		700r		800r	
	control	irradiated	control	irradiated	control	irradiated	control	irradiated
1	2.23	2.22	3.09	3.07	2.36	1.37	2.91	1.95
2	2.48	2.32	2.70	2.65	2.22	1.13	2.73	1.91
3	2.67	2.33	2.66	2.55	2.25	1.24	2.58	1.23
4	1.91	2.18	2.35	2.55	2.17	1.25	1.32	1.11
5	2.28	2.24	2.28	2.52	1.63	1.85	1.58	1.02
6	2.13	2.28	0.56	0.80	1.56	1.50	1.03	1.02
Mean	2.29	2.26	2.27	2.35	2.03	1.39	2.02	13.7
S. D.	±0.29	±0.05	±0.46	±0.71	0.24	0.22	0.74	0.47

RNase activity was expressed as mg RNA split per mg nitrogen spleen homogenate per 15 minutes.

Table 2. Variation of spleen acid RNase activity of rats after X-irradiation

Dose Experiment No	400r		600r		700r		800r	
	control	irradiated	control	irradiated	control	irradiated	control	irradiated
1	3.22	3.51	2.93	2.71	2.64	2.40	2.27	1.21
2	2.62	2.76	2.88	3.34	2.60	2.36	2.15	1.36
3	3.48	2.53	2.51	2.99	2.49	2.29	2.14	1.13
4	2.93	3.02	2.33	2.56	3.34	2.11	2.01	1.15
5	2.62	2.55	2.31	2.39	2.28	2.07	2.15	1.24
6	2.68	2.61	1.62	2.17	2.87	1.54	2.06	1.36
Mean	2.92	2.82	2.43	2.86	2.70	2.13	2.13	1.24
S. D.	±0.32	±0.35	±0.39	±0.52	±0.30	±0.23	±0.08	±0.09

RNase activity was expressed as mg RNA split per mg nitrogen spleen homogenate per 15 minutes

Table 3. Variation of serum alkaline RNase activity of rats after X-irradiation

Dose Experiment No	400r		800r		700r		800r	
	control	irradiated	control	irradiated	control	irradiated	control	irradiated
1	34.49	40.49	45.00	47.80	42.18	37.03	39.84	24.84
2	33.74	42.59	43.12	45.92	34.06	29.06	37.72	24.24
3	34.49	38.00	34.14	44.00	33.28	26.25	36.29	23.65
4	38.24	32.25	27.64	42.18	37.65	24.84	34.53	22.36
5	34.25	31.48	26.70	42.18	32.96	21.09	33.55	22.36
6	34.00	30.73	28.73	31.50	32.50	20.15	29.79	20.35
Mean	35.36	35.99	34.23	42.25	35.43	26.40	35.28	22.96
S. D.	±1.80	±4.65	±7.37	±5.23	±3.56	±5.61	±3.19	±1.45

RNase activity was expressed as mg RNA split per ml serum per 15 minutes

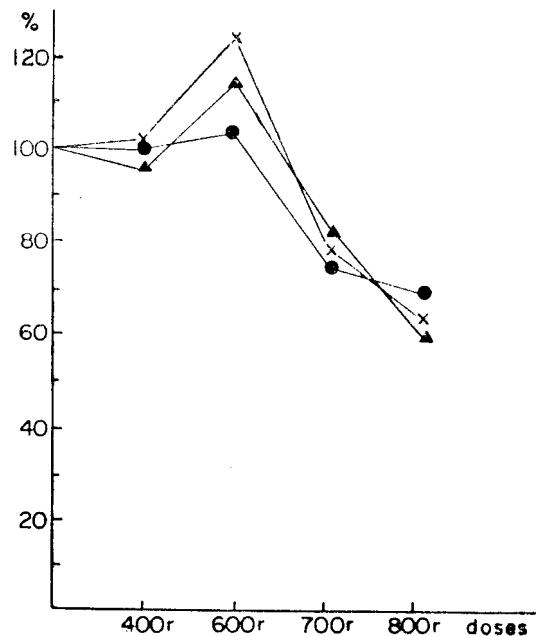


Fig. 1. Percentage variation in the activity of spleen alkaline RNase (●), acid RNase (▲) and serum alkaline RNase (×) activities after X-irradiation. The control value was taken 100%

活性은 모두增加하는倾向이나 700r 및 800r의線量에서는脾組織 및 血清의 RNase活性은 모두顯著하게減少되어있다. 即對照群의 RNase活性에 對한百分率로表示하면脾組織內 alkaline RNase活性值는 線量이 400r 및 600r에서는變動이 없으나 700r와 800r에서는約 32%가減少되었다. 또脾組織內 acid RNase活性值는 400r照射時에는對照群에比하여差異가 없었으나線量 600r에서는 17%의增加率을 보였고 700r 및 800r에서는各各 20% 및 40%의減少率을 보여주고 있다. 血清 alkaline活性值를 보면 400r에서는對照值와 같으나 600r에서는 23%의增加率을 보였으며 700r 및 800r에서는 25% 및 35%가各各減少되었다

2) X線照射에依한脾組織內核酸量의變化：

X線照射時線量에따르는脾組織內RNA 및 DNA量의變化를보면第4,5表 및 第2圖와같다. 即脾組織內RNA量은線量이높아짐에따라특히600r以上이되면僅少하나마確實히減少되는倾向이며또DNA量은亦是600r에서10%가減少되고線量이커짐에따라顯著하게低下되어800r에서는對照值에比하여34%나減少되어있다.

以上과같이放射線線量이700r, 800r로높아지면

Table 4. Variation of spleen RNA content of rats after X-irradiation

Dose Experiment No	400r		600r		700r		800r	
	control	irradiated	control	irradiated	control	irradiated	control	irradiated
1	705.0	645.3	774.4	739.2	740.2	708.9	880.0	782.0
2	674.6	762.6	756.8	704.0	825.8	708.9	810.0	710.0
3	850.6	792.0	739.2	739.2	807.0	705.8	914.0	684.0
4	645.3	792.0	739.2	686.4	712.9	708.1	756.0	654.0
5	733.3	792.0	704.4	686.4	804.5	698.9	704.0	654.0
6	733.3	704.0	704.0	668.8	721.2	626.6	622.0	634.0
Mean	723.5	747.8	736.3	704.0	768.6	692.8	781.0	686.3
S. D.	±40.4	±55.2	±25.5	±26.9	±45.0	±29.8	±100.1	±49.2

The concentration of RNA was expressed as μg RNA-P per 100 mg delipidated dry powder.

Table 5. Variation of spleen DNA content of rats after X-irradiation

Experiment No	Dose		400r		600r		700r		800r	
	control	irradiated								
1	76.8	95.2	96.0	86.4	96.5	86.0	76.0	86.0	86.0	86.0
2	67.2	85.6	86.4	81.6	47.2	42.2	84.0	46.4		
3	86.4	86.4	86.4	73.2	85.4	48.2	88.4	41.6		
4	96.0	84.8	73.2	72.0	87.0	43.0	92.2	41.6		
5	86.4	76.8	72.0	62.0	86.2	65.4	93.1	26.0		
6	76.8	76.8	72.0	61.2	78.2	69.2	72.9	71.8		
Mean	81.6	84.2	81.0	72.7	80.1	59.0	87.9	58.2		
S. D.	±9.2	±6.3	±9.2	±6.3	±12.3	±15.9	±7.6	±16.6		

The concentration of DNA was expressed as μg DNA-P per 100 mg delipidated dry powder.

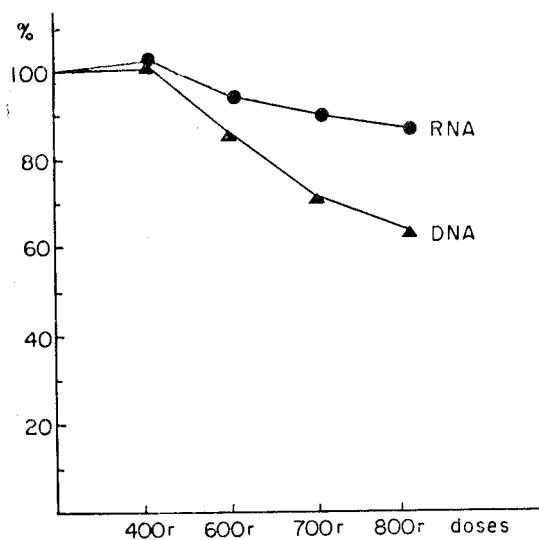


Fig. 2. Percentage variation in the content of spleen RNA and DNA after X-irradiation. The control value was taken 100%

RNase活性이 显著히降低되는데 이와 同時に 組織의 RNA量도 低下됨을 알 수 있다.

III. 考 察

Roth¹⁶에 依하면 白鼠를 線量 600r의 X線으로 全身照射한 結果 肝組織의 mitochondria分割에서는 alkaline RNase活性이相當히 抑制되었다 하며 同上清液에 있어 RNase inhibitor活性이 X線照射後 1日에 減少되고 또 肝組織의 homogenate內 RNase活性에는 큰 變化를 보지 못하였다고 한다. 本實驗에서 X線으로 全身照射한 白鼠 脾組織의 alkaline RNase活性은 400r 및 600r의 線量으로는 別變動이 없었으나 700r 및 800r에서는 相當히 減少(30%)되었고 또 脾組織의 acid RNase活性은 400r에서 變化가 없다가 600r으로 높아지면 若干(17%)增加되었다가 700r부터 急速히 下

落되어 800r에서는 40%의 減少率을 본다. 또 血清內 alkaline RNase活性은 600r에서 亦是 增加(23%)되었다가 700r, 800r로 增加되면 隨即 減少되어 35%나 低下된다. 文獻을 보면 RNase 용액에 *in vitro*로 X線을 照射하여 그活性이 減少되는 것은 放射線照射로 惹起되는 RNase分子의 aggregation 및 酶素 RNase分子內의 S-S基의 變化로 보고 있다.¹⁷ 또 Mueller¹⁸에 依하면 紫外線의 *in vitro* 照射에 因される RNase의 部分的不活性화는 RNase分子內 disulfide bridge의 部分的切断으로 보고 있다. RNase는 過剩하게 存在하는 inhibitor와 結合되어 組織에서는 所謂 latent RNase로서 不活性狀態로 存在하여 있다한다^{19, 20} 따라서 本實驗에 있어 600r의 X線照射로 RNase活性이若干增加되는 傾向은 放射線照射로 RNase inhibitor의一部가 不活性화되어 RNase活性이 그만큼 커진 것이 아닌가 볼 수 있으며 또 700r 및 800r의 線量에서 RNase活性이 显著하게 減少되는 것은 放射線에 依한 RNase分子自體內의 變化 特히 disulfide bridge의 開裂等에 起因되지 않나 推測된다. X線照射로 組織의 核酸量이 低下되는 것을 보면 그合成에 必要한 酶素生產이 放射線으로 抑制되는 結果로 볼 수 있는 故로 放射線에 依한 RNase酶素의 生產抑制도 그原因의 一部로 생각하지 않을 수 없다. 脾組織內 RNA量은 線量이 높아짐에 따라 僅少하나마 隨即 減少되는 傾向이고 한편 DNA量은 RNA에 比하여 월선 显著한 減少率을 보여준다. 前報⁸에서 報告한 바 ^{60}Co 의 γ 線照射(500r 및 800r)로 骨髓 및 脾臟의 核酸 特司 DNA量이 減少되는事實을 다시 確認한 것이다.

IV. 結 論

白鼠을 4群으로 區分하여 X線을 400r, 600r, 700r 및 800r의 線量으로 각각 全身照射하여 24時間 後에 脾

組織의 alkaline 및 acid RNase 活性值과 血清內 alkaline RNase 活性值 및 脾組織內 核酸量의 變動을 調查하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) 400r의 照射로는 脾組織의 alkaline 및 acid RNase 活性值과 血清 alkaline RNase 活性值은 對照值와 거의 差異가 없다.

2) 脾組織內 alkaline RNase 活性值은 700r 및 800r에서 約 30%가 減少되었고 acid RNase 活性值은 600r에서 17%가 增加하였으나 700r 및 800r에서 각각 20% 및 40%가 低下되었다.

3) 血清內 alkaline RNase 活性值은 600r에서는 23%의 增加率을 보였으나 700r 및 800r에서는 25% 및 35%가 각각 減少되었다.

4) 脾組織의 RNA 含量은 線量이 높아짐에 따라 特히 600r 以上이 되면 僅少하나마 減少되는 傾向이며 DNA 量은 600r에서 10%가 減少되고 線量이 커짐에 따라 顯著하게 低下되어 800r에서는 34%의 減少率를 보여 주고 있다. 또 線量이 커짐에 따라 DNA 量의 減少率은 RNA 量의 그것보다 훨씬 크다.

以上과 같이 線量 700r 以上에서는 放射線照射로 RNA 量이나 alkaline RNase 活性이 모두 減少된다.

ABSTRACT

Effect of X-irradiation on RNase Activity and Nucleic Acid Contents

Young Jo Choi

Department of Biochemistry of College of Medicine,
Seoul National University

Male rats of Wistar hybrid, weighing 140 to 160 g, were divided into 5 groups, each consisting of 6 rats. Four groups of animals were whole-body X-irradiated with the respective doses of 400r, 600r, 700r, and 800r. Animals were killed with the control group 24 hours after whole-body X-irradiation and examined the variation of content of nucleic acids of splenic tissue, and assayed the alkaline and acid RNase activities of spleen and serum alkaline RNase activity.

The following results were obtained.

1. There was no marked change of the activity of splenic alkaline and acid RNase and of serum alkaline RNase with the dose of 400r, comparing to normal value.

2. The activity of splenic alkaline RNase was

lowered around 30% with the doses of 700r and 800r, while that of splenic acid RNase was increased 17% with the 600r dose, but decreased 20% and 40% respectively with 700r and 800r doses.

3. The serum alkaline RNase activity was increased 23% with 600r but decreased 25% and 35% respectively with 700r and 800r doses.

4. No distinct variation of the spleen RNA content was observed with the low dose of 400r. But the RNA content of spleen was decreased slightly but steadily with increasing doses of irradiation. The spleen DNA content was decreased 10%, 27%, and 33%, respectively with the doses of 600r, 700r and 800r. Thus the effect of whole-body X-irradiation was much more marked on DNA than RNA in the spleen.

6. The significance of variation of RNase activity was discussed.

REFERENCES

1. De Lamirande, G., Allarde, C., Dacosta, H.C. and Cantero, A., *Science*, **119**, 351 (1954)
2. Roth, J. S., *J. Biol. Chem.*, **208**, 181 (1954)
3. Reid, E. and Nodes, J. T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **81**, 618 (1959)
4. Roth, J. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 34 (1965)
5. Kraft, N. and Shortman, K., *Australian J. Biol. Sci.*, **23**, 175 (1970)
6. Holmes, B.E., *Ann. Rev. Nuclear Sci.*, **7**, 89 (1957)
7. Painter, R. B. and Rasmussen, R. E., *Nature*, **201**, 162 (1964)
8. Lee, K. Y., Kim, H. S., Cheon, H. W., Ahn, H. J. and Choi, Y. J., *Korean Biochem. J.*, **2**, 35 (1969)
9. Lee, K. Y., Kim, H. S., Cheon, H. W., Choi, Y. J., and Ahn, H. J., *Ibid.*, **2**, 19 (1969)
10. Choi, Y. J., *Seoul J. of Med.*, **13**, 1 (1972)
11. Roth, J. S. and Milsten, S. W., *J. Biol. Chem.*, **196**, 489 (1952)
12. Vischer, E. and Chargaff, E., *Ibid.*, **176**, 715 (1948)
13. Schneider, W. C., *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945)
14. Schmidt, G. and Thannhauser, S. T., *J. Biol. Chem.*, **161**, 83 (1945)
15. Fiske, C. H., and Subbarow, T., *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925)

16. Roth, J. S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **60**, 7 (1956)
17. Mol. Strukt., Strahlenwirkung, Jahrestag.
Deut. Ges. Biophys. Tagungsber., p. 151 (1966)
Edited by Glubrecht, H.
-
18. Mueller, H. G., *Stud. Biophys.*, **7**, 17 (1968)
19. Roth, J. S., *J. Biol. Chem.*, **231**, 1097 (1958)
20. Kraft, N. and Shortman, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **217**, 164 (1970)