

# 成長發育 과정에 따른 白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 關한 研究

## Biochemical Studies on Rat Brain Tissues During Postnatal Growth

서울대학교 大學院 醫學科 小兒科學專攻

<指導 崔 漢 雄 教授>

洪 榮 植

### 目 次

- I. 序 論
- II. 實驗方法
  - 1. 核酸測定法
  - 2. 蛋白質定量法
  - 3. 總遊離 아미노酸定量法 및 paper electrophoresis 및 chromatography 法兼用에 의한 아미노酸定量法
  - 4. LDH 活性測定 및 cellulose acetate strip 電氣泳動法
  - 5. RNase 및 RNase inhibitor 活性測定法
  - 6. GDA 活性測定法
- III. 實驗結果
- IV. 考 察
- V. 結 論

### I. 序 論

腦組織에 關한 研究는 過去에는 主로 形態學 乃至 組織學의 方面에 集約되어 있었다고 하여도 過言은 아니다. 그러나 過去 數十年동안 生化學的의 領域의 技術의 進歩는 比약의이며 特히 放射線 tracer 追跡에 依한 生體 高分子物質의 代謝研究의 눈부신 發展과 電子顯微鏡技能의 發達 等으로 構造와 機能과의 關聯性을 分子 level 에서 究明하게끔 되어있다.

이러하여 腦組織에도 새로운 여러 生化學知見이 蓄積되어 最近에는 腦의 生化學이라는 새로운 分野가 큰 脚光을 받게 되었다.

腦組織은 主로 蛋白質과 脂質等으로 構成된 複雜한

化合物로서 構造나 機能으로 보아 大端히 heterogeneous 한 것이 만 器官과 다르다.

특히 核酸, 蛋白質(酵素包含)은 腦內高分子物質로서 이에 關한 研究는 世界各國에서 活潑히 進行되고 있다. “記憶의 分子說”로 腦의 核酸 特히 RNA와 蛋白質代謝에 關聯하여 많은 問題를 提示하고 있다.

또 腦의 生理學的研究가 크게 進展됨에 따라 腦의 部位別의 機能差며 neuron, glia 等の 細胞種의 差異에 依한 機能分層等이 漸次 밝혀지고 있기 때문에 生化學部分에서도 neuron, glia 等の 細胞들을 分離하여 各 物質 構成이며 物質代謝의 差異等에 對하여 새로운 아프로치를 하지 않을 수 없는 趨勢에 놓여있다.

腦조직에 있어 DNA가 成熟量에 到達하는 時期는 動物種에 따라 큰 差異가 있으나 各動物의 神經系의 機能의 分化에 있어 이 時期가 特히 重要하며 腦 deoxy-ribonucleic acid (DNA) 合成의 終了와 同時에 神經細胞의 分裂增殖이 停止되고 대신 腦의 에너지代謝와 行動面에 있어 새 發展을 본다고 한다.

또 腦의 成熟에 따라 여러 酵素活性에 큰 變動을 보며 同時에 腦의 核酸量과 代謝에도 顯著的한 變化가 일어난다. 放射線追跡實驗으로 腦 DNA 合成은 胎生期와 出生直後에 限하여 活潑하며 그後 一生을 通해 큰 變動이 없는 것으로 알려져 있다.

Adams(Adams, 1966)는 rat 腦의 ribosome의 ribonucleic acid (RNA)는 生後 18日까지는 徐徐히 增加하지만, 其後에는 減少한다고 한다. 또 細胞質 RNA의 合成은 生後 2,3日에 急速히 減少, 以後 約 11日까지 계속 減少한다고 한다.

腦蛋白質은 脂質等과 複雜한 化合物을 形成하여 分離 其他에 많은 隘路가 있어 腦機能面에 重要한 役割을 할 것은 疑心치 않으나, 이 方面研究는 比較的 뒤떨어져

있는 形便이다.

Moore 等(Moore & McGregor, 1965)은 腦에 特異한 酸性蛋白質을 分離하여 "S-100"으로 命名한 바 있다. 腦를 위치하여 神經조직에는 遊離 酸性아미노酸과 그 誘導體가 多量으로 存在하고 있는 것이 特徵인 것은 잘 알려진 事實이다. 이 中에 어떤 것이 synapse에서 化學的 傳達物質로 作用하는 것도 알려져 있다. (例  $\gamma$ -amino butyric acid 即 GABA).

過去 文獻을 보면 出生前後의 腦조직에 對하여 核酸 아미노酸代謝, GABA, lactic dehydrogenase(LDH) 活性等에 對하여 言及되어 있으나 大概 斷片的으로 이들에 關한 綜合的인 研究는 別로 찾아 볼 수 없다.

本 實驗에서 著者는 腦조직의 發育이 生後 2~3週에 現저하다고 하는 白鼠(Davison & Dobbing 1966)를 擇하여 出生後 週齡別로 腦조직의 核酸 및 蛋白質量, 또 蛋白質合成의 素材가 되는 遊離아미노酸의 變動 및 RNA代謝 따라서 蛋白質合成과 密接한 關係가 있는 것으로 推측되는 ribonuclease(RNase) 活性等的 變化를 測定比較하였다.

한편 腦조직에 있어 特殊한 代謝와 機能을 가진 酸性 아미노酸으로 glutamin 酸, asparagin 酸, glutamine, asparagine 및 glutamin 酸에서 유도되는 GABA 等の 量的變化도 調査하고 또 腦조직에 解糖活性이 높은 것은 잘 알려져 있는 事實인바 이에 關聯하여 腦조직의 LDH 活性과 그 isozyme pattern 이 生後 어떻게 變動되는 나를 아울러 살펴 여기 發表하는 바이다.

本 實驗에서는 rat 와 같은 小動物의 腦에서 여러 成分을 同時에 觀察하여야 하기 때문에 腦의 部位別로 檢査하는 것은 거의 不可能하기 때문에 全腦組織을 그대로 使用하였다.

## II. 實驗方法

生年月이 明確하게 記錄된 同一雌雄에서 繁殖시킨 Wistar 系 白鼠를 實驗에 使用하였으며, 動物은 出生後 第1週, 第2週, 第3週, 第4週 및 第8週의 5群으로 나누어 各群을 11首씩으로 하고 白鼠는 頸部를 過伸長으로 희생시켜 即時 全腦를 摘出하였다.

腦는 바로 冷 0.9% NaCl 溶液으로 洗滌하고 冷濾紙로 水分을 닦아낸 後 全腦의 重量을 冷凍室에서 稱量하고 腦組織의 一部는 即時 冷 10% trichloroacetic acid (TCA) 溶液으로 Teflon homogenizer 를 使用하여 10% homogenate 를 만들어 DNA, RNA 定量試料로 使用하였다. 腦組織의 一部는 冷 0.25M sucrose 溶液으로 Teflon homogenizer 를 使用하여 10% homogenate 를

만들었다. 同 homogenate 를 International Centrifuge PR-2 로 0°C 로 2,000rpm, 20分間 遠沈하여 核 및 未破壞細胞 等の 殘渣를 除去한 後 同上澄液을 試料로 하여 蛋白質量, 總아미노酸量 및 酵素活性等的 測量等に 使用하였다.

### 1. 核酸測定法

上記한 10% TCA 溶液으로 製成한 腦組織의 10% homogenate 를 Schneider 法 (Schneider 1945)에 準하여 DNA 및 RNA 를 分離定量하였다.

即 homogenate 1.0ml 를 取하여 2.5ml 의 冷 10% TCA 溶液을 넣고 흔들어 遠沈한 後 上澄液은 버리고, 殘渣에 다시 2.5ml 의 冷 10% TCA 溶液을 넣어 흔들어서 다시 遠沈한 뒤 殘渣를 얻어 다음 5.0ml 의 95% ethanol 을 넣어 잘 混合한 後 遠沈하였다.

이러한 조작을 2~3次 되풀이 한 뒤 마지막 殘渣에 1.3ml 의 중류수와 1.3ml 의 冷 10% TCA 溶液을 加하여 잘 섞은뒤 90°C 로 조절된 水槽에서 15分間 加溫하였다. 이 溶液을 다시 遠沈하여 上澄液을 얻어 核酸 定量用 試料로 삼았다.

以上 얻은 抽出物에 對하여 DNA 는 Dische 法 (Dische, 1930) RNA 는 Mejbaum (Mejbaum, 1939)에 依하여 呈色시켜 Spectronic 20 spectrophotometer 를 使用하여 測定하였다.

### 2. 蛋白質 定量法

上記 腦組織의 0.25M sucrose 溶液의 10% homogenate 를 低溫遠沈機로 0°C, 2,000rpm 로 遠沈하여 얻은 上澄液을 試料로 하여 Lowry 法 (Lowry et al, 1951)으로 蛋白質量을 定量하였다.

이때 牛血清 albumin (Nutritional Biochem. 製品)을 標準으로 하여 그 窒素含量을 미리 micro Kjeldahl 法으로 定量하여 製成한 蛋白質標準溶液을 使用하여 定量하였다.

이때 Lowry 法을 약간 고쳐 0.1N NaOH 溶液에 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液과 0.2% K-tartrate 를 同時에 溶解시킨 溶液 A 와 0.5%  $\text{CuSO}_4$  溶液 (溶液 B)을 50:1의 容量比로 每番 세롭게 混合하여 working 溶液 (溶液 C)를 만들어 使用하였다.

이것은 Lowry 原法에서는 K-tartrate 가  $\text{CuSO}_4$  와 함께 溶解되어 생기는 copper-tartrate 溶液이 長時間 放置되면 沈澱이 생기는 것을 防止하기 위하여서다. 分析方法은 試料를 중류수로 100倍 稀釋하여 그 1.0ml 를 取한 後 前記 working 溶液을 5.0ml 加하여 10分間 室溫에

放置하였다가 stock phenol 試藥 (Folin-Ciocalteu)을 2배로 희釋한 試藥 0.5ml를 試驗管을 흔들면서 빨리 加하여 呈色시켜 室溫에 30分間 放置한 다음 Spectronic 20 spectrophotometer를 使用하여 750nm에서 O. D.를 읽어 蛋白質을 定量하였다.

定量用 標準曲線은 上記 牛血清 albumin 溶液으로 만든 것을 使用하였다.

Phenol (Folin-Ciocalteu) 試藥 (Folin & Ciocalteu, 1927)은 다음과 같이 調製하였다.

150ml 들이 flask에 Na-tungstate ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 100g, Na-molybdate ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 25g, 증류수 700ml, 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 50ml 및 conc. HCl 100ml를 차례로 加하여 10時間以上 弱하게 加熱하여 reflux시켰으며, 이 溶液에 다시 lithium sulfate 150g, 증류수 50ml, 그리고 bromine 水 서너방울을 滴下하여 condenser를 使用하지 않고 15分間 煮沸시켜 過量的 bromine을 除去하고 이 溶液을 室溫에서 식혀 1 liter로 稀釋시킨 뒤 Whatman No. 2濾紙로 여과시켜 그 濾液을 얻어 이를 stock phenol (Folin-Ciocalteu) 試藥으로 使用하였다.

### 3. 總遊離 아미노酸定量法 및 paper electrophoresis 法 및 chromatography 法 兼用에 의한 遊離 아미노酸定量法

總遊離 아미노酸은 fluorodinitrobenzene (FDNB)를 使用하여 다음과 같이 定量하였다. (Rapp, 1963)

上記한 0.25M 'sucrose 溶液으로 調製한 腦組織의 10% homogenate 1.0ml를 取한 다음 1/12N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 8.0ml, 10%  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶液 1.0ml를 加하여 Whatman No. 2 여지로 濾過시킨後 그 濾液 1.0ml를 取하여 여기에 pH 10.0의 0.1M borate buffer 溶液 1.0ml와 stock FDNB 液을 上記 borate buffer 溶液으로 10배로 稀釋한 FDNB 液 0.1ml를 加하여 56°C 水槽에서 10分間 加溫한後 증류수 1.0ml와 conc. HCl 0.1ml를 加하여 呈色시켜 잘 섞은 다음 spectrophotometer로 420nm에서 O. D.를 읽어 같은 方法으로 處理한 標準 아미노酸을 使用하여 總 아미노酸을 定量하였다.

腦組織을 秤量하여 75% ethanol 適當量으로 Teflon homogenizer로 homogenize하여 International Refrigerating Centrifuge PR-2로 2,000rpm에서 10分間 遠沈하여 얻은 上澄液을 lyophilize시켰다.

殘渣를 다시 75% ethanol 2ml에 녹여 high voltage electrophoresis 法의 試料로 삼았다. (Efron, 1968)

CAMAG 社製 高壓 electrophoresis 裝置를 使用하여 Whatman 3MM 濾紙로 pH 1.6의 蟻酸 buffer 溶液을 써서 2KV에서 20分間 高壓으로 電氣泳動시켰다. 標準 아미노酸은 Sigma 製의 glutamin 酸, glutamine, asparagin 酸, asparagine, gamma-aminobutyric acid (GABA) 등을 利用하였다.

高壓 電氣泳動法으로 一次의 아미노酸分離가 끝난 濾紙를 110°C의 drying oven에 넣어 10分間 건조시킨後 butanol-acetic acid-water (12:3:5)의 溶媒로 10時間上昇法으로 展開시킨後 다시 110°C의 drying oven에서 10分間 건조시켰다.

以上과 같이 paper chromatography 法으로 2次展開後 건조시킨 濾紙를 0.2% ninhydrin (아세톤) 溶液으로 充分히 spray시킨後 110°C의 oven에서 1分間 發色시켰다. 同時에 미리 標準 아미노酸으로 똑같은 方法으로 處理하여 얻은 paper electrophero-chromatogram에서 展開된 各種 아미노酸의 位置를 파악하여 上記 試料를 使用한 發色된 paper chromatogram에서 各 該當 아미노酸部를 切取한後 다시 이것을 1~2mm의 폭과 길이로 잘게 잘라 glass stoppered tube에 넣고 2.0ml의 75% ethanol과 3.0ml의 증류수를 加하여 1時間 30°C로 加溫하고 또 濾紙의 非呈色部分을 같은 size로 分取하여 blank 用으로 삼았다.

또한 標準 아미노酸을 ninhydrin으로 發色시켜 이것을 標準으로 하여 試料의 各 아미노酸의 呈色液을 spectrophotometer를 使用하여 570nm에서 O. D.를 읽어 定量하였다.

### 4. LDH의 總活性 測定法

Neiland 方法 (Neiland, 1952)에 準하여 NAD 還元에 의한 O. D. 增加를 15秒 간격으로 Beckman DU spectrophotometer를 使用하여 340nm에서 읽어 NADH extinction coefficient로 LDH 活性值를 算出하였다. 但 LDH 1 unit는 酵素試料 1ml가 1分동안 還元시킨 NAD의  $1\mu\text{M}$ 로 定하였다. LDH isozyme의 cellulose acetate strip electrophoresis 法에 의한 分離法은 Gelman 社 electrophoresis 裝置를 使用하여 Schleicher-Schuell cellulose acetate membrane strip로 施行하였다. (Preston et al 1965)

即 電氣泳動은 strip 當 3mA의 電流를 흐르게 하며 Tris-veronal buffer 液 pH 8.6, ionic strength 0.06으로 하고 電氣泳動 5時間前에 미리 同一한 buffer 液에 담겨둔 cellulose acetate strip의 陰極에 3cm 되는 곳에 試料  $10\mu\text{l}$ 를 spot하여 1ml의 phenazine

methosulfate 液 (1mg/ml), iodonitrö-tétrazolium 液 (INT 液) (1mg/ml) 3.0ml, 그리고 NAD 10mg 를 섞어 만든 染色液에 미리 적시어둔 cellulose acetate strip 에다 試料의 上記 strip 을 重疊시킨 다음 이 strip 을 暗室에서 37°C, 15分間 formazon 反應을 야기시켜 LDH 活性을 可視시킨 다음, 이들 strip 을 5% HAc 溶液에 5時間以上 담구어두었다가 건조시켜, Helena 製 quickscanner 로 densitogram 을 그려 LDH 各 isozyme 分割의 活性을 算出하였다.

### 5. RNase 및 RNase inhibitor 活性值測定法

遊離 alkaline RNase 活性은 Roth 法 (Roth, Mils-tein 1952), 總 RNase 活性은 Little 法 (Little, 1970), RNase inhibitor 活性은 Gribnau 法 (Gribnau et al 1970)에 準하여 다음과 같이 各各 測定하였다.

RNase inhibitor 活性의 測定에는 Sigma 製의 牛 pancreatic RNase 를 gelatin 溶液에 섞어 0.05mg/ml 의 濃도로 하여 stock 用으로 하고 또 PHMB(P-hydroxymercuribenzoate)는 2mM 濃도로 Tris-HCl buffer 液에 미리 녹여두었다가 使用하였다.

遊離 RNase 活性測定에는 酵素試料 0.2ml 에 Tris-HCl buffer 液 (pH 7.8, 0.1M)을 加하여 稀釋하고, 總 RNase 活性 測定에는 0.2ml 의 酵素試料에 0.1ml 의 Tris-HCl buffer 液과 0.2ml 의 PHMB 液을 加하였고 또 RNase inhibitor 活性 測定에는 0.2ml 酵素試料液에 working RNase 溶液 (RNase gelatin stock 溶液을 Tris-HCl buffer 液으로 5倍 稀釋한 것) 0.2ml 와 Tris-HCl buffer 液 0.1ml 를 加하였다.

以上과 같이 處理한 것을 모두 0°C 에서 20分間 incubate 시킨 다음 各 試料에 再精製한 RNA 溶液 0.2ml 를 加하여 30°C 에서 45分間 incubate 시킨 後 各 試料에 0.7ml 의 acid alcohol 을 添加하여 酵素反應을 中止시킨 다음 20分間 0°C 에서 2,000rpm 으로 冷遠沈 하여 그 上澄液을 중류水로 5倍로 稀釋하여 Beckman DU spectrophotometer 를 利用하여 260nm 에서 O. D. 를 읽어 各 活性을 測定하였다.

또 RNase 1 mU 는 對照群과 酵素群에서의 O. D. 差가 0.001배로 定義하였다. (Little, 1970). 但 RNase 活性 測定用 RNA 基質溶液은 再結晶한 精製 RNA (Vischer & Chargaff, 1952) 200mg 을 0.1M Tris -HCl buffer 液 (pH 7.8) 100ml 에 녹여 만들었다.

### 6. GDA 活性 測定法

GDA 活性은 guanine 이 지니고있는 波長 245nm 에

서의 最高吸光度 低下를 利用하여 測定하는 Roush 法 (Roush & Norris, 1950)에 準하여 다음과 같이 測定하였다.

酵素測定用 試料 0.2ml 에다 基質로써 1.2μM guanine 溶液을 加하여 30°C 에서 30分間 incubate 한 다음 10% HClO<sub>4</sub> 를 加하여 反應을 中止시켰다. 遠沈하여 얻은 上澄液을 中류水로 10倍로 稀釋하여 Beckman DU spectrophotometer 로 波長 245nm 에서 O. D. 를 읽었다. 이것을 incubate 시키지 않고 바로 10% HClO<sub>4</sub> 를 加한 對照用試料에서 얻은 O. D. 와 比較하여 GDA 측매로 減少된 guanine 의 量을 guanine extinction coefficient 로 算出하였다.

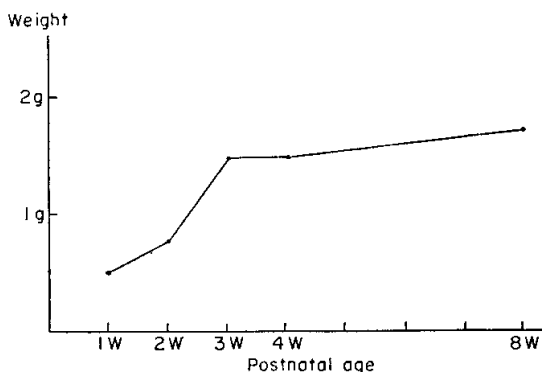


Fig. 1. Whole brain weight of rats during postnatal growth

Table 1. Whole brain weight of rats during postnatal growth

Animal group	Brain weight (g)
1st week	0.49±0.02
2nd week	0.77±0.09
3rd week	1.40±0.04
4th week	1.45±0.06
5th week	1.70±0.04

## Ⅲ. 實驗 結果

### 1. 腦組織 重量의 變動

白鼠全腦組織重量은 Table 1, Fig. 1에 表示한 바와 같이 第2週와 第3週에 急激한 增加를 보이며, 第3週 이후로는 全腦重量의 變化가 顯著하지 못하다. 特히 各 群間의 週別成長率을 百分率로 換算하여 보면 第2週群

은 第1週群에 比하여 腦組織重量이 57.1%, 第3週群은 第2週群에 比하여 81.8%, 第4週群은 第3週群에 比하여 3.6%, 그리고 第8週群은 第4週群에 比하여 17.2% 增加되어 第3週 以後로는 每週平均 3~4% 정도의 重量 증가를 보여준다.

이와 같이 生後 第1週~第3週間의 白鼠全腦組織 重量의 顯著한 增加와 生後 第3週以後의 緩慢한 增加는 좋은 對照를 이루며 腦組織 成長의 特徵적인 一面을 보여 준다.

특히 本實驗에 있어 腦組織內 核酸量, 蛋白質量의 이 期間中의 變化와 잘 符合되고 있다.

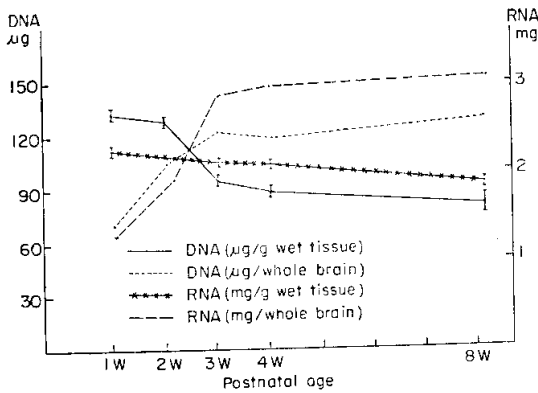


Fig. 2. Variation of nucleic acid contents in rat brain tissue during postnatal growth

Table 2. Variation of nucleic acid contents in rat brain tissue during postnatal growth

Animal group	DNA µg/g wet tissue	DNA µg/whole brain	RNA mg/g wet tissue	RNA mg/whole brain
1st week	121.0 ± 1.2	59.3	2.28 ± 0.07	1.12
2nd week	119.4 ± 1.9	92.0	2.17 ± 0.06	1.67
3rd week	83.0 ± 2.2	116.2	2.08 ± 0.05	2.91
4th week	77.4 ± 3.7	112.2	2.08 ± 0.05	3.02
8th week	70.2 ± 4.3	119.3	1.80 ± 0.08	3.06

## 2. 腦組織核酸量의 變動

白鼠腦組織內核酸量의 變動을 보면 DNA 量(µg DNA/g wet tissue)은 生後 第2週와 第3週 사이에 急激한 量的變化를 나타내었고, 反面 RNA 量(mg RNA/g wet tissue)은 組織단위 重量當 減少率이 顯著하지 않았다. 그러나 白鼠全腦組織의 總DNA 量, RNA 量으로 換算하여 보면, 總 DNA (µg DNA/全腦組織) 量은

第2週群은 第1週群보다 55.1%, 第3週群은 第2週群보다 26.3%, 第4週群은 第8週群보다 별로 增加가 없었고 第8週群은 第4週群보다 6.3%의 增加를 보여 實質的인 總 DNA 量의 增加는 第1週에서 第2週 사이에 가장 顯著한 을 알 수 있다.

또한, RNA 總量 (mg RNA/全腦組織)은 第2週는 第1週보다 49.1%, 第3週는 第2週보다 74.3%, 第4週는 第3週보다 3.8%, 第8週는 第4週보다 1.3%의 增加를 보여, 總 RNA 量의 增加는 總 DNA 量의 增加 보다는 1週 늦은 第2週와 第3週 사이에 顯著하였고 특히 이는 後述하는 蛋白質量의 顯著한 增加時期와 相符合한다.

Table 3. Variation of protein content in rat brain tissue during postnatal growth

Animal group	Protein content (mg/g wet tissue)
1st week	64.6 ± 0.9
2nd week	73.2 ± 1.2
3rd week	87.0 ± 1.1
4th week	94.6 ± 0.5
5th week	98.0 ± 0.3

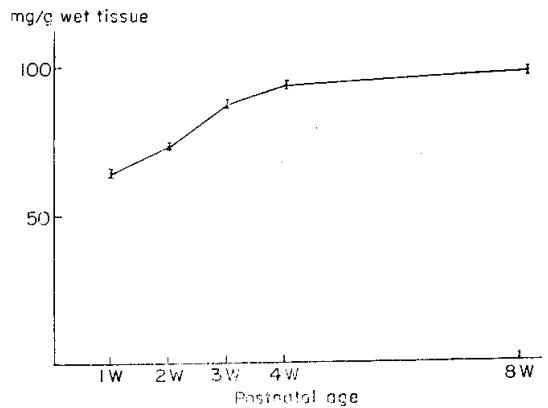


Fig. 3. Variation of protein content in rat brain tissue during postnatal growth

## 3. 腦組織內蛋白質量의 變動

白鼠腦組織의 蛋白質含量變化는 Table 3, Fig. 3에 表示한 바와 같으며 腦組織단위 重量當 蛋白質量은 出生後 第1週에서 第4週에 이르는 동안 繼續 增加되지만 其後 第8週까지는 별로 增加를 못본다. 이를 全腦組織의 總蛋白質量으로 換算하여 보면, 腦組織內總蛋白質量增加 率은 훨씬 顯著하여진다. 即 全腦蛋白質總量은 第2週는 第1週에 比하여 77.9%, 第3週는 第2週에 比하여

116.0%, 第4週는 第3週에 比하여 12.6% 그리고 第8週는 第4週에 比하여 21.4%의 增加를 보여준다. 이러한 蛋白質量의 變化는 全腦組織의 DNA 總量增加 보다는 1週 늦게 增加를 보인 RNA 量의 變動時期와 一致하며 또 全腦重量의 顯著한 變化時期에 一致되어 蛋白質量이 腦重量增加에 크게 寄與하는 要素임을 알 수 있고 또한 腦組織 단위 重量當 DNA 量의 減少를 說明할 수 있는 하나의 根據가 된다. 即 腦組織重量增加에 따라 腦組織 단위 重量當 DNA 量의 減少와 全腦總 DNA 量의 增加는, DNA가 腦細胞의 成長됨에 따라 稀釋되는 效果를 빚어 실질적인 總量은 增加되었으나, 단위 重量當 DNA 量은 減少되었음을 보여준다. 蛋白質量의 Table 3, Fig. 3.에 表示된 變動은 이러한 DNA의 稀釋效果에 크게 寄與한다고 보겠다.

#### 4. 腦組織의 總遊離 아미노酸量 및 酸性遊離아미노酸系列의 量的變動

白鼠腦組織의 단위 重量當 遊離아미노酸總量은 Table 4, Fig. 4.에 表示된 바와 같이 第1週에서 64 $\mu$ M/g wet tissue, 第2週 62  $\mu$ M/g wet tissue, 第3週 58 $\mu$ M/g wet

tissue, 第4週 53 $\mu$ M/g wet tissue 및 第8週 54 $\mu$ M/g wet tissue 로 緩慢히 減少되는 傾向을 보여준다.

이러한 遊離아미노酸量의 變化는 Fig. 3에 表示된 蛋白質量增加 추세와 符合되어 遊離아미노酸들이 蛋白質의 合成에 적극 利用되고 있음을 示唆한다. 그러나 總아미노酸量의 減少와는 反對로 特別히 酸性아미노酸系列의 아미노酸은 增加추세를 보이는데 特別히 glutamin酸은 g wet tissue 當 第1週에 5.7  $\mu$ M, 第2週에 6.3 $\mu$ M, 第3週에 8.5  $\mu$ M, 第4週에 10.3 $\mu$ M 및 第8週에 10.3 $\mu$ M 으로 出生後 第1週에서 第4週까지 크게 增加하였으며, 그 이후로는 거의 變化가 없다. glutamine 量은 出生後 第1週에서 第8週까지 若干 增加되는 傾向을 보여주었다. 또 glutamin酸 유도體인 GABA와 asparagin酸量, 亦是 生後 第2週와 第4週 사이에 漸次增加되는 傾向이 나, asparagine 量은 全實驗期間中 거의 變動이 없다.

以上과 같이 增加된 遊離아미노酸은 대개 非必須아미노酸으로서 酸性아미노酸系이지만 이 아미노酸들은 動物物組織에 가장 量이 많으며 다른 아미노酸은 勿論 다른 生體重要成分代謝와도 密接한 關係가 있는 아미노酸들이다.

#### 5. 腦組織內 LDH 活性의 變動 및 LDH isozyme Pattern의 變動

白鼠腦組織內 LDH 全活性은 Table 5, Fig. 5에 表示한바와 같이 生後 전반적으로 그 比活性이 增加되는 傾向을 보였다. 即 生後 第1, 2, 3, 4 및 8週를 通해 各 4.98 $\times 10^{-2}$  I. U./mg protein, 5.05 $\times 10^{-2}$  I. U./mg protein, 5.36 $\times 10^{-2}$  I. U./mg protein, 6.12 $\times 10^{-2}$  I. U./mg protein, 5.91 $\times 10^{-2}$  I. U./mg protein 정도로 緩慢히 增加되었으며, cellulose acetate strip electrophoresis에 依한 LDH isozyme pattern을 보면 Table 6 Fig. 6.에 表示된 바와 같이 相當한 變化를 보였는데, 特別히 LDH M 分割의 活性은 漸次 減少되고 LDH H 分割의 活性은 漸次 增加되는 추세를 보였다. 이 중 LDH

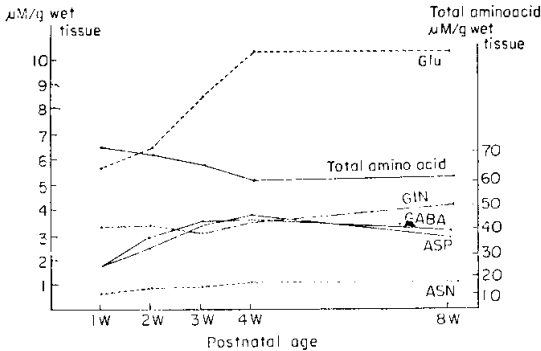


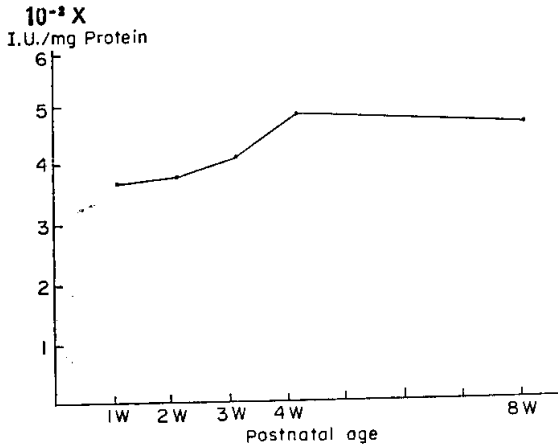
Fig. 4. Variation of several amino acid contents in rat brain tissue during postnatal growth

Table 4. Variation of several amino acid contents in rat brain tissue during postnatal growth

Animal group	Aspartic acid ( $\mu$ M/g wet tissue)	Asparagine ( $\mu$ M/g wet tissue)	Glutamic acid ( $\mu$ M/g wet tissue)	Glutamine ( $\mu$ M/g wet tissue)	GABA ( $\mu$ M/g wet tissue)	Total amino acid ( $\mu$ M/g wet tissue)
1st week	1.6	0.6	5.7	3.1	1.6	64
2nd week	2.4	0.8	6.3	3.3	2.8	62
3rd week	3.3	0.8	8.5	3.1	3.3	58
4th week	3.7	1.0	10.3	3.5	3.5	53
8th week	2.9	1.0	10.3	4.3	3.1	54

**Table 5.** Variation of total LDH activity in rat brain tissue during postnatal growth

Animal group	Total LDH activity (I. U./ml homogenate)	Protein content (mg/ml homogenate)	Specific activity (I. U./mg protein)
1st week	0.322	6.46	$4.98 \times 10^{-2}$
2nd week	0.370	7.32	$5.05 \times 10^{-2}$
3rd week	0.466	8.70	$5.36 \times 10^{-2}$
4th week	0.579	9.46	$6.12 \times 10^{-2}$
8th week	0.579	9.80	$5.91 \times 10^{-2}$



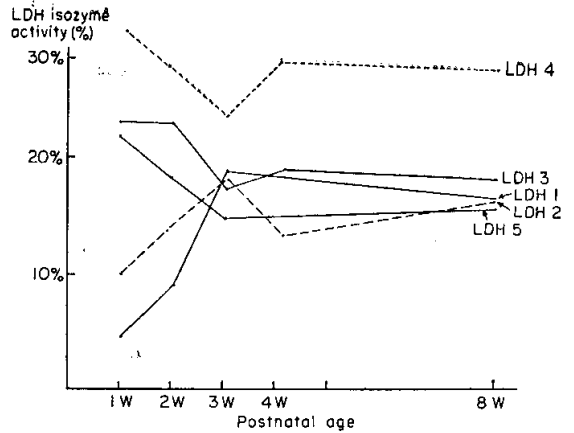
**Fig. 5.** Variation of total LDH activity in rat brain tissue during postnatal growth

1 isozyme 활성을 보면 第1週에 4.3%, 第2週에 9.2%, 第3週에 20.1%, 第4週에 19.5% 및 第8週에 17.0%로 처음 적은 활성值에서 生後 第3週까지 激增하였다. 또 LDH 2 isozyme 활성도 生後 第3週까지 처음 低值에서 漸次 急增하나 LDH 1 isozyme 활성에 未及하지만 그 pattern은 LDH 1과 같다.

한편 LDH 5 isozyme 활성은 第1週에 23.7%, 第2週

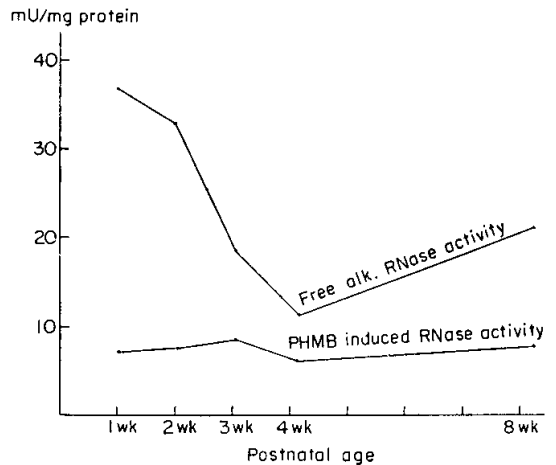
**Table 6.** Variation of individual LDH isozyme activity (%) in rat brain tissue during postnatal growth.

Animal group	Isozyme				
	LDH 1 (%)	LDH 2 (%)	LDH 3 (%)	LDH 4 (%)	LDH 5 (%)
1st week	4.3	11.3	25.2	35.3	23.7
2nd week	9.2	15.4	24.9	31.0	19.5
3rd week	20.1	19.6	18.1	25.8	16.8
4th week	19.5	13.0	20.1	30.9	16.5
8th week	17.0	17.5	19.6	29.7	16.1



**Fig. 6.** Variation of individual LDH isozyme activity (%) in rat brain tissue during postnatal growth

에 19.5%, 第3週에 16.8%, 第4週에 16.5% 및 第8週에 16.1%로 처음 높은 활성值에서 生後 第3週까지 감소되는데 LDH 3 isozyme 활성도 LDH 5 isozyme 과 같이 生後 第2週에서 第3週까지 처음 高值에서 漸次減少된다. 即 LDH 1 및 2나 LDH 5 및 4의 활성은 共히 腦組織成長과 腦組織內物質의 變動이 심한 第2週와 第3週間에 역시 큰 變動을 보였고, 대개 腦組織이 未熟하였을 때는 成熟하였을 때 보다 낮은 酸素分壓狀態를 나타낸다고 보겠다.



**Fig. 7.** Variation of RNase and RNase inhibitor activities in rat brain tissue during postnatal growth

**Table 7.** Variation of RNase and RNase inhibitor activities in rat brain tissue during postnatal growth

Animal group		RNase activity m. u./ml (m. u.) homogenate	Protein content (mg protein/ml homogenate)	Specific activity m. u. / (m. u.) mg protein
1st week	Free RNase	237.9	6.46	36.8
	Total RNase	281.5		43.6
	Pancreatic RNase	404.4		62.6
2nd Week	Free RNase	234.6	7.32	32.1
	Total RNase	290.1		39.6
	Pancreatic RNase	349.0		47.7
3rd week	Free RNase	162.9	8.70	18.7
	Total RNase	217.9		25.1
	Pancreatic RNase	231.7		26.6
4th week	Free RNase	97.3	9.46	10.3
	Total RNase	143.8		15.2
	Pancreatic RNase	199.4		21.1
8th week	Free RNase	198.1	9.80	20.2
	Total RNase	272.5		27.8
	Pancreatic RNase	357.3		36.5

**6. 腦組織內 alkaline RNase 및 RNase inhibitor  
活性的變動**

白鼠腦組織內 alk. RNase 및 RNase inhibitor 活性的 成長發育에 따른 變化를 보면 Table 7.에 表示한 바와 같으며, 腦組織內 遊離 RNase의 比活性은 生後 漸次 크게 減少하는 傾向을 보였다. 即 第1週에 36.8mμ/mg protein, 第2週에 32.1', 第3週에 18.7', 第4週에 10.3' 및 第8週에 20.2' 로 生後第4週까지 RNase 活性은 急激히 減少되었다. 이러한 成績은 Fig. 2와 Fig. 3에서 볼수있는 RNA 量과 蛋白質量의 變動과 比較하여 볼때 RNase 活性이 減少됨으로써 RNA의 異化가 지연되고 따라서 RNA에 依한 蛋白質의 合成이 增加된다는 事實을 考慮하면 잘 符合됨을 알 수 있다. 그러나 RNase inhibitor를 選擇的으로 抑制한다고 되어 있는 PHMB (para-hydroxymercuri benzoate)를 添加하여 RNase inhibitor를 抑制시키고 RNase 活性을 增加시켜 본 결과는 그 RNase 活性增加도가 生後 第1週부터 第8週까지 거의 變化가 없어 期待한 것과 相反되는 結果이었으며, RNase inhibitor는 RNase와는 別個의 調節機轉을 갖

는 것으로 推測된다.

**7. 腦組織內 GDA 活性的變動**

出生後 白鼠成長發育 과정에 따른 腦組織의 GDA 活性을 測定하여본 결과 그 比活性의 變化는 Table 8, Fig. 8에 表示된 바와 같다. 即 第1週에  $8.58 \times 10^{-3}$  I. U./m<sup>3</sup> protein, 第2週에  $12.76 \times 10^{-3}$  I. U./mg protein, 第3週에  $9.21 \times 10^{-3}$  I. U./mg protein, 第4週에  $10.34 \times 10^{-3}$  I. U./mg protein 및 第8週에  $10.15 \times 10^{-3}$  I. U./mg

**Table 8.** Variation of GDA activity in rat brain tissue during postnatal growth

Animal group	GDA activity I. U./ml homogenate	Protein content mg/ml homogenate	Specific activity I. U./mg protein
1st week	$5.54 \times 10^{-2}$	6.46	$8.58 \times 10^{-3}$
2nd week	$9.34 \times 10^{-2}$	7.32	$12.76 \times 10^{-3}$
3rd week	$8.01 \times 10^{-2}$	8.70	$9.21 \times 10^{-3}$
4th week	$9.78 \times 10^{-2}$	9.46	$10.34 \times 10^{-3}$
5th week	$9.95 \times 10^{-2}$	9.80	$10.15 \times 10^{-3}$



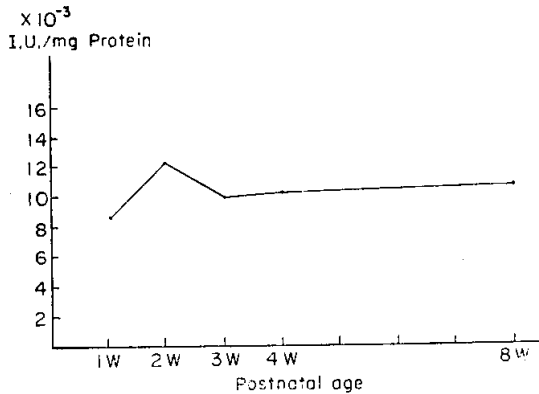


Fig. 8. Variation of GDA activity in rat brain tissue during postnatal growth

protein으로 나타나 出生後 第2週의 증가를 除外하고는 實驗全期間中 別變化를 보지 못하였다. 그러나 GDA 比活性이 第2週에 높은 것은 DNA, RNA 含量的 變化가 같은 時期에 顯著한 事實과 잘 符合된다.

#### IV. 考 察

動物의 成長發育과정에서 다른 腦組織의 變化에 있어 重量의 變化에 對하여서는 Cobb (1965)은 充分히 成長 못한 未熟한 腦組織에는 水分含量이 많다가 成熟함에 따라 그 水分이 myelin 또는 其他 固型脂質로 置換된다고 하였다. 本實驗에서는 Table 1에 表示된 바와같이 全重量이 生後 第2~3週間に 急激히 增加됨을 보았고, 이는 水分含量의 變化, 그리고 脂質의 置換만으로는 說明하기 困難하며, 또한 腦組織의 發育狀態를 重量이나 크기만으로는 評價하기 어렵다. O'Connell 등 (1965)은 腦組織重量이 平均値보다 2 S. D. 가 더 적을 때 microcephaly라 규정하고, Dobbing (1968)은 腦重量/體重比를 求하여, 이 比로 腦組織發育狀態를 評하기도 하였으나 이러한 單純한 形態學的인 考察만으로는 腦組織의 複雜한 機能的 測面을 理解할 수 없어서 腦組織發育狀態判定에 좋은 指針이 될 수 없다.

모든 세포 (diploid)는 DNA 含量이 거의 같으므로 우선 全腦組織의 DNA 總量의 變化를 알아봄으로써 그 數的인 增加, 即 腦組織의 增殖의 정도를 추측 할수있다 即 Table 2에서 보는 바와 같이 第1~2週間に DNA 總量의 增加가 가장 뚜렷하였으나, DNA 總量의 增加는 第3週에 極大值에 達하였다가 그後는 別變化가 없었다.

全腦組織의 DNA 總量을 DNA 濃度로 換算하여 보면

Table 2에 表示된 바와같이, 腦組織 단위 重量당 DNA 重量比는 成長함에 따라 漸次 減少되었고, 특히 그 減少比는 第2~3週群間에 顯著하였다.

또한 腦組織內 蛋白質 含量의 變化를 測定하여 본 結果 Table 3에 表示한 바와같이 總蛋白質量도 增加되었지만, 蛋白質 濃度도 成長함에 따라 계속 增加되었다. 특히 그 增加比는 第2~3週 群間에 顯著하여 DNA 濃度의 顯著한 減少 時期와 一致된다. 即 全腦組織의 DNA 總量이 白鼠成長發育에 따라 增加된다는 것은 結局 腦細胞의 數的인 增加, 即 腦細胞 增殖을 意味하지만, 腦組織 단위 重量당 DNA 含量比가 減少된다는 事實은 成長發育에 따라 腦細胞 역시 커졌음을 생각할 수 있다.

따라서 Davison 등 (1961, 1966)은 腦細胞 특히 神經細胞가 增殖된 뒤, 成長함에 따라 漸次 많은 樹狀突起를 내고, 이 위에 myelin이 침착되어 神經鞘를 形成하며 結局 DNA 濃度가 成長發育됨에 따라 稀釋된다고 하였으며, 腦組織內 myelin 含量을 測定함으로써 myelin 濃度(myelin 重量/g wet tissue)가 成長發育에 따른 腦細胞發育評價에 있어 DNA 總量과 더불어 좋은 指針이 된다고 하였다.

그러나 本實驗成績에 依하면 DNA 濃度比의 減少時期와 蛋白含量增加時期가 一致되고, 또한 腦組織重量增加時期와도 一致되어 蛋白質濃度 (mg 蛋白質/g wet tissue)가 myelin 濃度(myelin mg/g wet tissue)에 못지 않은 좋은 指針이 됨을 보여준다.

한편 RNA는 DNA 만큼 그 濃度의 減少比가 크지 못하였고 全腦조직의 RNA 總量의 增加양상은 全腦 DNA 總量의 증가양상보다는, 오히려 蛋白質增加양상과 비슷하여 그 總量의 顯著한 變化가 第2週와 第3週 사이에 있었으나 RNA 濃度는 DNA 濃도와 비슷한 傾向으로, 成長發育됨에 따라 減少하여 蛋白質이 細胞成長에 가장 重要한 因子임을 보여주었다.

以上과 같이 腦組織內의 核酸量과 蛋白質量은 成長發育에 따라 큰 變化를 보였으나, 文獻에 依하면 甚한 飢餓 등 큰 環境의 要因에 의하여서도, 그 含量에 큰 變化가 없다는 사실은 腦組織이 動物의 其他 組織과는 달리 動物個體에서 特殊한 位置를 차지하고 있고 한편 代謝의 으로 保護가 잘 되어있다고 보겠다. (Voit 1889, Peters & Boyd 1966, Lehr & Gayet 1963, Smith 1963)

白鼠生後 成長發育에 따른 腦組織內 遊離아미노酸을 測定하여 본 結果는 Table 4 表示한 바와같이 總遊離아미노酸量은 成長發育에 따라 生後 第1週群의 64μM/g wet tissue에서 漸次減少되어 成長한 第8週群에서는 54μM/g wet tissue까지 減少되었다. 이러한 遊

離아미노酸량의 減少는 Table 3 에서 보는 蛋白質量 增加와는 對照的으로, 이것은 遊離아미노酸이 蛋白質合成에 利用되어, 減少된다고 解釋할 수 있다. 特히 蛋白質合成이 旺盛한 生後 第2週와 第3週에서 역시 遊離 아미노酸減少가 顯著하여, 遊離아미노酸에서의 蛋白質 合成의 turnover rate가 높음을 意味한다. 이러한 遊離아미노酸 總量의 變化와는 對照的으로 酸性아미노酸系列의 遊離아미노酸은 成長發育에 따라 오히려 增加되는 結果를 本實驗에서 보여 주었는데, 即 Table 4에 表示된 바와같이, glutamin 酸, glutamine, asparagine 酸, asperagine, 7-aminobutyric acid(GABA) 등이 共に 增加되는 傾向을 보이고, 特히 glutamin 酸 量은 他遊離 아미노酸보다 높았으며, 그 增加 양상이 顯著하였다. 即 生後 第1週群에서 5.7 $\mu$ M/g wet tissue 이던 것이 生後 第4週에서 10.3 $\mu$ M/g wet tissue 로 增加되었다.

Waelsch(1951)도 腦組織內 glutamin 酸量이 其他 臟器보다 越等히 높다고 報告하였고, 또한 glutamine, phosphoethanolamine, taurine, serine, threonine 等도 比較的 높은 便이라고 하였다.

한편 腦組織에는 glutamin 酸 誘導體인 GABA (Roberts, Frankel 1950), N-acetyl-aspartic acid (Tallan et al 1956), Cystathionine (Tallan et al 1958), homocarnosine (Pisano et al 1961) 等 特異한 아미노酸 誘導體가 存在하고 있다고 報告되어 있다.

그러나 그 機能的인 面에서는 아직도 諸論의 一致를 보지 못하고 있다. 本實驗 成績에 依하면 特히 glutamin 酸은 總遊離아미노酸量의 20%나 차지하고 있는데, glutamin 酸은 TCA 環 (tricarboxylic acid cycle) 中의  $\alpha$ -ketoglutar 酸에서 쉽게 形成되고, 또 glutamine 合成酵素에 依해 glutamine 으로 變하는 以外에 腦組織의 特異한 酵素인 glutamic acid decarboxylase 에 依하여 GABA 로도 變한다. 이 GABA 는 特히 神經細胞의 傳導 (neurotransmitter)에 關與된다고 알려져 (Roberts, Frankel, 1950) 많은 研究가 되어 있다.

特히 glutamin 酸과 GABA 는 腦組織內에서도 存在部位를 달리하여 Glutamin 酸은 皮質에, GABA 는 亞皮質에 많이 있다고 報告되었으며 (Singh, Malhorta 1962), 腦細胞種에 따라서도 glutamine, glutamin 酸, GABA 等의 濃도가 달라 腦細胞의 機能面에 各各 寄與하는바 크다고 報告하였다. (Berl et al 1961, Bayer, McMurray 1967).

한편 asparagin 酸은 glutamin 酸처럼 變動량이 뚜렷하지 못하나 腦組織의 成長發育에 따라 若干 增加되는 傾向을 보였다. 文獻에 依하면 glutamin 酸과 asparagin

酸 共に 增加된다고 하였으며 (Oja, Piha 1966, Vernadakis, Woodbury 1962), 反面 taurine, phosphoethanolamine 等은 減少된다고 하였다. (Agraval et al 1966, Clonet & Gaitonde 1956, Bayer & McMurray, 1967).

Glutamin 酸과 asparagin 酸은 共に 非必須아미노酸으로 TCA 環에서 쉽게 合成되며 (Beloff-Chain et al 1955), 또한 窒素異化代謝에 크게 利用되는 추출물이 되어 아미노酸代謝의 中樞의 役割을 擔當한다는 事實은 周知하는 바와 같다.

한편 本實驗에서 腦組織內 LDH 活性變動을 살핀 結果를 보면, LDH의 全活性은 白鼠가 成長함에 따라 增加되는 傾向이고, 또 增加의 樣相은 全腦重量 및 뇌조직의 核酸量, 蛋白質量의 變動이 컸던 時期에 一致하여 LDH 比活性의 減少도 컸다. 그리고 Table 6에 表示된 바와 같이 電氣泳動에 依한 LDH isozyme 의 樣相은 未熟하였을 때는 LDH 4와 5의 比活性이 컸고 成熟함에 따라 LDH 1 및 2의 活性이 오히려 크게 增加하는 양상을 보여 주었다. LDH 는 周知하는 바와 같이 解糖作用時 細胞呼吸 및 에너지 生成에 重要한 役割을 하며 그 構造는 H 型과 M 型의 2種의 polypeptide가 4개 모여 蛋白質의 4次元의 構造를 이루고 있다 (Kaplan, 1960, Apella & Markert, 1961, Markert & Moller 1959).

또한 2種의 polypeptide 는 遺傳的 調節도 달리 받으며 (Rabinowitz, Dietz 1967), 物理的, 化學的 免疫學的으로 差異가 있다고 報告되었다 (Vessel 1964, Vessel et al 1969, Hellung & Larsen & Anderson 1969, Kaplan, & Ciotii 1961, Zondag 1963) 또한 LDH 는 系統發生學的으로 (Kaplan et al 1964), 個體發生學的으로 (Cahn et al 1962), 그 isozyme 活性의 差에 對하여 많은 研究가 報告되었다. 特히 뇌조직內 LDH 活性에 對하여는 Kuhman 等 (1965)이 成熟함에 따라 LDH 全活性이 增加된다고 報告하였고 特히 腦皮質 各層別로 LDH 活性에 差異가 있다고 하였다.

Bonavita 等 (1964)에 依하면 電氣泳動에 依한 LDH isozyme 相이, 成熟함에 따라 LDH 活性은 漸次 增加되고 反面 LDH4와 5 活性은 漸次 減少된다고 報告하여 本實驗成績과 거의 一致하는 바이며, 특히 Bonavita 等 (1965)에 依하면 이러한 LDH isozyme 相의 變化가 放射線照射에 依하여 促進된다고 하였다.

한편 成長發育에 따른 白鼠腦組織內 alk. RNase 및 RNase inhibitor 活性을 比較하여 본 結果, Table 7에 表示한 바와 같이 遊離 alk. RNase 比活性이 成長함에 따라 漸次 減少하는 傾向이었고 그 減少率을 腦組織

內 核 酸 量 과 蛋 白 質 量 의 變 動 과 比 較 하 면 RNA 總 量 과 蛋 白 質 總 量 의 增 加 가 顯 著 한 第 3 週 ~ 4 週 間 에 역 시 현 지 한 감 소 를 보 여 alk. RNase 가 細 胞 質 RNA 와 蛋 白 質 의 代 謝 에 重 要 한 酵 素 임 을 보 여 주 다. RNase 은 RNA 分 解 酵 素 로 細 胞 內 最 適 水 素 이 온 濃 度 에 따 라 acid RNase 와 alk. RNase 로 나 누 는 데, acid RNase 는 주 로 lysosome 分 割 內 다 른 acid hydrolase 와 같 이 들 어 있 는 反 面 alk. RNase 는 細 胞 質 內 에 있 어 細 胞 質 RNA 와 密 接 한 關 係 를 가 지 고 있 다 (Roth 1954, Reid & Nodes 1959).

또 한 alk. RNase 는 組 織 上 滲 液 中 의 alk. RNase inhibitor 라는 物 質 에 의 하 여 調 節 을 받 는 다 고 하 는 데 (Rath 1956), 이 inhibitor 는 動 物 組 織 에 두 루 存 在 하 여, ribosome, messenger RNA 등 의 상 태 를 유 지 자 동 하 게 하 는 데 重 要 하 다 고 한 다 (Blobel, & Potter 1966, Gribnau et al 1969, Kraft & Shortman 1970, Little 1970). 이 RNase inhibitor 는 SH 試 藥 극 소 량 에 도 銳 敏 하 게 反 應 하 는 데 (Shortman 1962) 本 實 驗 에 서 이 러 한 SH 試 藥 中 PHMB 를 使 用 하 여 抑 制 되 었 던 RNase 의 活 性 을 促 進 시 켜 본 結 果 는 Fig. 7 과 같 이 全 實 驗 期 間 거 의 變 動 이 없 어 alk. RNase 의 比 活 性 의 變 化 와 는 對 照 의 이 다. 豫 期 지 못 한 事 實 이 나 至 今 適 當 한 解 釋 을 내 릴 수 는 없 다.

그 리 고 腦 조 직 內 GDA 의 活 性 을 檢 討 하 여 본 結 果 는 Table 8 에 表 示 된 바 와 같 이 成 長 에 따 라 현 지 한 變 動 은 없 었 으 나 核 酸 量 의 變 動 이 제 일 컸 던 生 後 第 2 週 에 서 (Table 2) 역 시 活 性 이 높 아 核 酸 代 謝 에 어 떤 關 聯 性 을 示 唆 한 다.

GDA 는 purine 의 異 化 作 用 에 重 要 한 役 割 을 하 며 (Kumar et al 1965, 金 1974), 其 他 장 기 에 비 하 여 특 히 腦 와 肝 組 織 에 活 性 이 높 아 (Kumar et al 1965, 1972, Talwar et al 1961) 注 目 을 끌 고 있 다.

## V. 結 論

同 一 兩 親 에 서 繁 殖 한 Wistar 系 白 鼠 를 雌 雄 區 別 없 이 出 生 後 第 1 週 群, 第 2 週 群, 第 3 週 群, 第 4 週 群 및 第 8 週 群 의 5 群 으 로 나 누 고 每 群 은 各 11 首 씩 으 로 하 였 다. 各 動 物 은 剖 生 直 後 直 時 腦 全 體 를 摘 出 하 여 重 量 을 秤 量 한 後 바 로 腦 組 織 의 homogenate 를 만 들 어 各 核 酸 量, 蛋 白 質 量 및 遊 離 아 미 노 酸 量 들 을 定 量 하 고 한 편 LDH 活 性, LDH isozyme 의 電 氣 泳 動 相, RNase 및 RNase inhibitor 活 性 및 GDA 活 性 들 을 測 定 하 여 生 後 腦 조 직 發 育 成 長 에 따 르 는 變 動 을 比 較 檢 討 하 였 다.

얻 은 結 果 를 要 約 하 면 다 음 과 같 다.

1. 白 鼠 腦 조 직 의 重 量 은 第 1 週 의 0.49g 에 서 第 8 週 의 1.7g 까 지 漸 次 增 加 되 었 으 나 특 히 第 2 週 와 第 3 週 사 이 에 顯 著 한 增 加 를 보 였 다.

2. 腦 조 직 단 위 重 量 당 核 酸 量 의 變 動 을 보 면 RNA 量 은 生 後 第 1 週 에 서 第 8 週 까 지 漸 次 繼 속 적 인 減 少 傾 向 을 보 이 나, DNA 量 은 生 後 第 1 週 에 서 第 3 週 까 지 顯 著 한 減 少 率 을 보 이 고 第 4 週 와 第 8 週 는 完 全 한 減 少 傾 向 이 다. 그 러 나 DNA 濃 度 가 第 2 週 와 第 3 週 사 이 에 크 게 減 少 된 이 특 이 하 다.

한 편 全 腦 조 직 內 總 DNA 量 및 總 RNA 量 은 모 두 生 後 第 3 週 까 지 크 게 增 加 되 는 데 특 히 RNA 에 있 어 뚜 렷 하 다. 특 히 DNA 量 은 生 後 第 1 週 에 서 第 2 週 사 이 에 그 리 고 RNA 量 은 第 2 週 와 第 3 週 사 이 에 서 顯 著 한 增 加 를 보 였 다.

3. 腦 조 직 단 위 中 量 당 蛋 白 質 量 은 生 後 第 2 週 에 서 第 4 週 까 지 繼 속 增 加 되 었 으 나 특 히 第 2 週 와 第 3 週 사 이 에 서 그 增 加 度 가 顯 著 하 였 다. 그 러 나 第 4 週 이 후 에 는 蛋 白 質 量 에 變 化 가 없 다.

4. 腦 조 직 의 總 遊 離 아 미 노 산 量 은 漸 次 減 少 되 는 傾 向 이 나 第 4 週 이 후 에 는 變 化 가 없 다.

또 遊 離 酸 性 아 미 노 산 系 列 특 히 glutamin 酸 量 은 生 後 第 1 週 에 서 第 4 週 사 이 에, 더 욱 이 第 2 週 와 第 4 週 사 이 에 크 게 增 加 하 였 으 며 第 4 週 이 후 에 는 變 化 가 없 었 다.

glutamine 量 은 生 後 第 1 週 에 서 第 8 週 까 지 若 干 增 加 傾 向 을 보 였 다. GABA 와 asparagin 酸 量 은 亦 是 生 後 第 2 週 와 第 4 週 사 이 에 漸 次 增 加 되 는 傾 向 이 나 asparagine 量 은 全 期 間 中 거 의 變 動 이 없 다.

5. 腦 조 직 의 總 LDH 比 活 性 은 生 後 第 4 週 까 지 繼 속 增 加 되 나 第 4 週 이 후 에 는 變 化 가 없 다. 한 편 LDH isozyme pattern 을 보 면 LDH 1 과 LDH 2 比 活 性 은 生 後 第 3 週 까 지 急 增 하 는 데 특 히 LDH 1 isozyme 에 있 어 顯 著 하 다. 그 러 나 이 와 反 對 로 LDH 4 와 LDH 5 比 活 性 은 生 後 第 2 週 에 서 第 3 週 까 지 漸 次 減 少 된 다.

6. 腦 조 직 內 alk. RNase 比 活 性 은 生 後 第 2 週 와 第 4 週 사 이 에 繼 속 激 減 되 고 第 4 週 이 후 에 는 이 보 다 若 干 增 加 되 어 있 다. 그 러 나 RNase inhibitor 活 性 은 實 驗 全 期 間 中 別 變 動 은 없 다.

7. 腦 조 직 內 GDA 比 活 性 은 實 驗 全 期 間 中 큰 變 動 은 없 으 나 生 後 第 2 週 에 서 即 核 酸 量 의 變 動 이 甚 한 時 期 에 最 高 值 를 보 였 다.

## ABSTRACT

### Biochemical studies on rat brain tissues during postnatal growth

Young Shik Hong. M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine  
Seoul National University

(Director: Prof. Han Woong Choi, M.D.)

Wistar rats were used without sex discrimination in these studies. Rats of a family derived from same parent were divided into 5 groups such as 1st week-, 2nd week-, 3rd week-, 4th week- and 8th week-postnatal age groups, consisted of 11 rats each.

Whole brain tissue homogenates were prepared without delay after removal of brains and were immediately subjected to varying biochemical assays. The variations were examined and discussed in the course of 8 weeks of postnatal age on the amounts of nucleic acids, protein, total free amino acids, acid amino acids and GABA, and the activities of RNase, RNase inhibitor, LDH, and GDA. The results obtained were summarized as follows.

1. Whole brain weight of rats showed a marked increase from 0.49 of first week age to 1.4g of third week age, and steady but a much lesser increase thereafter until 8th week.

2. There occurred a marked decrease in brain DNA level at g wet weight tissue basis during first to third week after birth, followed by a slight decrease until 8th week postnatal age. Its steady decline was more notable during 2nd to 3rd postnatal week. There showed a slight but steady decrease in brain RNA level at g wet tissue basis in the course of 8 weeks after birth. But total DNA contents of whole brain tissue showed a marked increase during same period, but latter being more noticeable.

3. The brain protein content at g wet tissue basis increased markedly during first to third week after birth, showing same pattern of increase in whole brain weights.

4. The total free amino acid content tended to decrease at g wet tissue basis until 4th postnatal week from birth. The glutamic acid level was shown a marked rise until 4th week after birth,

showing just same trend of increase in whole brain weight and protein content. The contents of aspartic acid and GABA in brain tissue increased slightly during 3rd week after birth.

5. The total LDH activity in brain tissue increased until 3rd postnatal week, and the LDH isozyme pattern varied during 3 postnatal weeks, thus LDH 1 and LDH 2 isozyme activities showed a sharp increase during first to third week after birth, whereas the isozymes activities of LDH 5 and LDH 4 showed a decrease during same period.

6. The activity of free alkaline RNase in brain tissue decreased sharply during first to fourth week after birth, followed by a slight increase at 8th week. In contrast, the RNase inhibitor activity showed no variation during experimental period.

7. The activity of GDA in brain tissue showed no marked change except its increase at 2nd week during the same period coinciding with the most marked variation of nucleic acids.

## 参 考 文 献

1. Adams, D.H., *Biochem. J.*, **98**, 636, 1966: *The relationship between cellular nucleic acids in the developing rat cerebral Cortex.*
2. Agrawal, H. C., Davis, J.M., Himwich, W. A., *J. Neurochem.* **13**, 607, 1966: *Postnatal changes in free amino acid pool of rat brain.*
3. Apella, E., Markert, C.L., B.B. R.C., **6**, 171, 1961: *LDH isozymes; dissociation and denaturation by dilution.*
4. Bayer, S.M., McMurray, W.C., *J. Neurochem.*, **14**, 695, 1967: *The metabolism of amino acid in developing rat brain.*
5. Beloff-Chain, A., Catanzaro, R., Chaun, E.B., Masi, I., Pocchiari, F., *Proc. Roy. Soc. Biol.*, **144**, 22, 1955: *Fate of uniformly labelled <sup>14</sup>C glucose in brain slices.*
6. Berl, S., Lajtha, A., Waelsch, H.: *J. Neurochem.*, **7**, 186, 1951: *Amino acid protein metabolism; VI Cerebral compartmentation of glutamic acid metabolism.*
7. Berl, S., Takagaki, G., Clarke, D.D., Waelsch, H., *J. Neurochem.*, **7**, 198, 1961: *Metabolic compartments in vivo of ammonia glutamic*

- metabolism in brain and liver.*
8. Blobel, G., Potter, V.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **55**, 1283, 1966; *Relation of ribonuclease and ribonuclease inhibitor to the isolation of polysomes from rat liver.*
  9. Bonavita, V., Ponte, F., Amore, G.: *Neurochem.*, **11**, 39, 1964: *LDH isozymes in the nervous tissue: IV An ontogenetic study on the rat.*
  10. Bonavita, V., Amore, G. Avellone, S., Guaneri, R.: *ibid.*, **12**, 37, 1965: *LDH isoenzymes in the nervous tissue: V The effect of X-rays on the enzyme of developing and adult rat brain.*
  11. Cahn, R.D., Kaplan, N.O., Levine, L., Zwillig, E.: *Science*, **136**, 962, 1962: *Nature and development of LDH.*
  12. Clonet, D.H., Gaitonde, M.K., *J. Neurochem.*, **1**, 126, 1956.: *Changes with age in the protein composition of the rat brain.*
  13. Cobb, S., *Arch. Neurol.*, **12**, 555, 1965: *Brain size.*
  14. Davison, A.N., Dobbing, J., *Nature*, **191**, 844, 1961: *Metabolic stability of body constituents.*
  15. Davison, A.N., Dobbing, J., *Brit. Med. Bull.*, **22**, 40, 1966: *Myelination as a vulnerable period in brain development.*
  16. Dische, Z., *Microchemie*, **8**, 4, 1930.
  17. Dobbing, J., *Malnutrition, Learning and Behavior* (ed. by Scrimshaw & Gordon), Boston, M.I.T., 1968: *Effect of experimental undernutrition on development of the nervous system.*
  18. Efron, M.L., *Chromatographic & electrophoretic technique Vol. II* (ed. by Ivor Smith), John Wiley & Sons, 1968.
  19. Elliot, K.A.C., *Brit. Med. Bull.* **21**, 70, 1965: *GABA and other inhibitory substances.*
  20. Folin, O., Ciocalteau, V., *J. Biol. Chem.*, **73**, 627, 1927 in *Hawk's Physiological Chemistry*, 14th ed., 1965, McGraw Hill Co.
  21. Gribnau, A.A.M., Schoenmakers, J.G.G., Kraaikamp, M.V., Hilak, M., Bloemendal, H., *Biochim. Biophys. Acta.* **224**, 55, 1970: *Further studies on the RNase inhibitor from rat liver: Stability and other properties.*
  22. Gribnau, A.A.M., Schoenmakers, J. G. G., Bloemendal, H., *Arch. Biol. Biochem.* **130**, 48, 1969: *Purification of rat liver RNase inhibitor and its effect on polysome integrity.*
  23. Hellung-Larsen, P., Anderson, V., *Exp. Cell Res.*, **54**, 201, 1969. *Kinetics of O<sub>2</sub>-induced changes in LDH isoenzymes of human lymphocytes in culture.*
  24. Kaplan, N.O., *Science*, **131**, 393, 1960: *Hybridization of LDH isoenzymes.*
  25. Kaplan, N.O., Ciotii, M.M., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 701, 1961: *Evolution and differentiation of dehydrogenases.*
  26. Kaplan, N.O., Wilson, A.C., Levines L., Pesece, A., Reichlin, M., Allison, W.S., *Fed. Proceedings*, **23**, 1258, 1964. *Evolution of lactic dehydrogenase.*
  27. 金昇元, 수도분원 의학지, **1**, 5, 1974: *Guanine deaminase.*
  28. Kraft, N., Shortman, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **217**, 164, 1970: *A suggested control function for the animal tissue RNase-inhibitor system-based on studies of isolated cells and PHA transformed lymphocytes.*
  29. Kuhman, R.E., Lowry, O.H., *J. Neurochem.*, **1**, 173, 1956: *Quantitative histochemical changes during the development of the rat cerebral cortex.*
  30. Kumar, K.S., Tewari, K.K., Krishnan, P.S., *Biochem. J.*, **95**, 797, 1965: *GDA in rat liver and mouse liver and brain.*
  31. Kumar, K.S., Sitaramayya, A., Krishnan, P.S., *Biochem. J.*, **128**, 1079, 1972: *GDA activity in rat brain and liver.*
  32. Lehr, P., Gayet, J., *J. Neurochem.*, **10**, 169, 1963: *Response of the cerebral cortex of the rat to prolonged protein depletion.*
  33. Little, B.W. *Science*, **170**, 747, 1970: *RNase inhibitor system abnormality in dystrophic mouse skeletal muscle.*
  34. Lowry, O.H., Posenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1961: *Protein measurement with the Folin-phenol reagent.*
  35. Markert, L.L., Moller, F., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**, 753, 1959: *Multiple formes of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns.*
  36. Mebjaum, W., *Z. Physiol. Chem.*, **258**, 117,

37. Moore, B.W., McGregor, D., *J. Biol. Chem.*, **240**, 1947, 1965. *Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver.*
38. Neiland, J.B., *J. Biochem.*, **199**, 373, 1952
39. Q'connell, E.T., Feldt, R.H., Stickler, G.B., *Pediatrics*, **36**, 62, 1965: *Head circumference, mental retardation and growth failure.*
40. Oja, S.S., Pika, R.S., *Life Sci.*, **5**, 865, 1966: *Changes in the concentration of free amino acids in rat brain during postnatal development.*
41. Peter, J.M., Boyd, E.M., *J. Nutr.*, **90**, 354, 1966: *Organ weight and water levels of the rat following reduced food intake.*
42. Pisano, J.J., Wilson, J.D., Cohen, L., Abraham, D., Udenfriend, S., *J. Biol. Chem.*, **236**, 499, 1961: *Isolation of gamma-aminobutyryl histidine (homocarnosine) from brain.*
43. Preston, J.A., Briere, R.O. Batsakis, J.G., *Amer. J. Clin. Path.*, **43**, 266, 1965: *Rapid electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate.*
44. Rabinowitz, Y., Diety, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **139**, 254, 1967: *Genetic control of LDH and MDH isozymes in cultures of lymphocytes and granulocytes: effect of addition of PHA, actinomycin D, or puromycin.*
45. Rapp, R.D., *Clin. Chem.*, **9**, 27, 1963: *Determination of serum amino acids.*
46. Reid, E., Nodes, J.T., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **81**, 618, 1959
47. Roberts, E., Frankel, S., *J. Biol. Chem.*, **187**, 55, 1950: *Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid.*
48. Roth, J.S., *Nature, London*, **174**, 129, 1954: *Possible function of intracellular ribonuclease.*
49. Roth, J.S., *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 34, 1956: *Ribonuclease: studies on properties and distribution of ribonuclease inhibitor in rat.*
50. Roush, A., Norris, E.R., *Arch. Biochem.*, **29**, 124, 1950: *Deamination of 8-azaguanine by guanase.*
51. Schneider, W.C., *J. Biol. Chem.*, **161**, 293, 1945.
52. Shorman, K., *Biophys. Acta*, **55**, 88, 1962.
53. Singh, S.I., Malhorta, L.L., *J. Neurochem.*, **9**, 37, 1962: *Amino acid content of monkey brain, general pattern and quantitation value of Gln, GABA and aspartic acid.*
54. Smith, H. E., *J. Neurochem.*, **10**, 531, 1963: *The effect of fasting on lipid metabolism of the CNS of the rat.*
55. Tallan, H.H., Moore, S., Stein, W.H., *J. Biol. Chem.*, **219**, 257, 1956. *N-acetyl-L-aspartic acid in brain.*
56. Tallan, H.H., Moore, S., Stein, W.H., *ibid.* **230**, 707, 1958: *L-cystathionine in human brain.*
57. Talwar, G.P., Goel, B.K., Mansoor, M., Pande, N.C., *J. Neurochem.* **8**, 310, 1961: *Guanase activity in brain.*