

# Ethidium Bromide가 白鼠顎下腺細胞의 蛋白合成에 미치는 影響에 關한 研究

서울大學校 齒科大學 口腔解剖學教室

(指導 劉 鍾 德 教授)

李 書 海

## A STUDY ON THE EFFECTS OF ETHIDIUM BROMIDE ON PROTEIN SYNTHESIS OF SUBMANDIBULAR ACINAR CELLS OF MICE

Su Hae Lee, D.D.S.

*Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, Seoul National University*

*Director: Chong Duck Yoo, D.D.S., Ph. D.*

### .....> Abstract <.....

The purpose of the present study was to determine, by means of quantitative autoradiography, the effects of ethidium bromide on the protein synthesis of submandibular gland cells in mice. Sixty male mice, each weighed about 20 grams were used, 24 mice of which were used for preliminary dose response study and 36 mice for main experiment.

The animals of experimental groups were received a single intraperitoneal injection of  $3\mu\text{g/g}$  body weight of ethidium bromide prior to sacrifice.

One hour prior to sacrifice  $4\mu\text{c/g}$  body weight of the leucine- $\text{C}^{14}$  (specific activity  $278\text{mc/mM}$ ) were injected.

Following the ethidium bromide injection, each animals were sacrificed on days 1, 2, 4, 6, 8 and 12.

At the time of sacrifice, small pieces of submandibular gland were dissected and fixed in 2% paraformaldehyde.

Following fixation for two hours the tissue were dehydrated and embedded in paraffin to according routine manner.

Sections  $4\mu$  in thickness were made on a rotary microtome and stained with 1% toluidine blue O.

The results might be summarized as follows;

1. In the preliminary experiment, the proper dose of ethidium bromide for main experiment was  $3\mu\text{g}$  per gram of body weight.

2. The changes of weight of submandibular gland by ethidium bromide were not found.
3. The effects of ethidium bromide on leucine-C<sup>14</sup> incorporation by submandibular gland of mice were observed to decrease the number of silver grains on day 1 and showed the lowest in animals on day 6, reaching down to 55.1% of the control value. The recovery was proceeded thereafter and the number of silver grains began to increase.
4. It is suggested that ethidium bromide, which interferes with RNA and DNA polymerase affects nucleic acid and protein synthesis in vivo.

## I. 緒 論

Ethidium Bromide는 抗生劑로서 Trypanocidal Drug의 하나이고, 一般적으로 Actinomycin D와 같이 RNA Polymerase Inhibitors로 알려져 있다.

Waring(1936)<sup>12)</sup>은 Ethidium Bromide는 Acridine Orange와 같이 DNA Polymerase를 抑制하고, 또 Template DNA와 結合하므로써 DNA-dependent RNA Polymerase도 抑制한다고 하였고, Lepecq와 Paolietti(1937)<sup>13)</sup>는 Ethidium Bromide는 DNA와 RNA의 合成에 影響을 미친다고 하였고, Tomchick와 Mandel(1964)<sup>14)</sup>은 Ethidium Bromide가 細菌에 미치는 生化學的 影響을 說明하였고, Bouanchaud 외 2人(1969)<sup>15)</sup>은 微生物의 Antibiotic Resistance의 除去에 強한 作用을 한다고 하였다.

또 Newton(1957)<sup>16)</sup>은 Ethidium Bromide는 In Vitro에 있어서 뿐만 아니라 In Vivo에 있어서도 Nucleic Acid Synthesis를 抑制한다고 하였다.

先人の 業績을 보건데, In Vitro에 있어서 Ethidium Bromide에 依한 研究는 多數이나, In Vivo에 있어서의 研究는 찾아본 範圍內에서는 極히 少數이어서 今般 著者는 Ethidium Bromide를 白鼠에 投與하여 顎下腺의 蛋白合成에 어떠한 影響을 주는가를 追求하려고, Leucine-C<sup>14</sup>에 依한 定量的 自記放射法으로 實驗하였고 其 結果를 이에 報告하는 바이다.

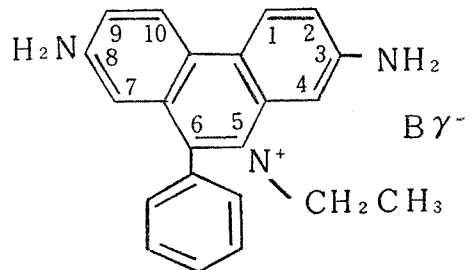
## II. 實驗材料 및 方法

實驗動物은 體重 20gm 內外의 雄性白鼠 60頭를 使用하였고, 이들 中 豫備實驗에 24頭, 本實驗에 36頭씩을 各各 使用하였다. 豫備實驗은 白鼠體重의 變動을 測定하기 爲한 것으로서 24頭中 12頭는 對照群에, 나머지 12頭는 實驗群(Ethidium Bromide의 濃度에 따라서 體

重 g當 1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g, 3 $\mu$ g 및 4 $\mu$ g)에 配當하였다.

本實驗은 36頭中 對照群에 18頭, 實驗群에 18頭씩 使用하였고, 對照群과 實驗群은 動物犧牲時間(1日, 2日, 4日, 6日, 8日 및 12日)에 따라서 各各 3頭씩 配定하였다. Leucine-C<sup>14</sup>을 追跡子로 使用하였고, Specific Activity는 278mc/mM이다.

研究方法에 있어서 豫備實驗은 本實驗의 目的을 達成하기 爲하여 適當한 Ethidium Bromide의 濃度를 選擇하기 爲한 것으로서 第1群에는 體重 1 $\mu$ g/g, 第2群에는 2 $\mu$ g/g, 第3群에는 3 $\mu$ g/g, 第4群에는 4 $\mu$ g/g을 腹腔內注射하고, 注射後 24時間이 되었을 때를 第1日로 잡아, 1日, 2日, 4日, 6日, 8日 및 12日 各々 體重을 測定하였다.



本實驗은 Ethidium Bromide(化學構造는 別圖參照)를 體重 g當 3 $\mu$ g을 腹腔內注射하고, 注射後 24時間이 되었을 때를 第1日로 하여, 第2日, 第4日, 第6日, 第8日 및 第12日 各々 犧牲시켰고, 動物犧牲 30分前에 Leucine-C<sup>14</sup>을 體重 g當 4 $\mu$ c를 腹腔內注射하고, Ether로 麻醉한 後 顎下腺을 떼어내어, 其의 重量을 測定하였다.

組織標本製作 및 自記放射法: 組織標本製作은 떼어낸 顎下腺을 2% Paraformaldehyde in Cacodylate Buffer에 3時間 固定하고, 固定된 組織은 通法에 依하여 Paraffin에 包埋하고, 4 $\mu$ 의 切片을 만들었다.

自記放射法은 標本을 染色 그릇에 넣어 暗室로 옮기

고, 이 標本을 Emulsion에 담그기 前에 Kodak KTB<sub>3</sub> Nuclear Track Emulsion을 Oven(45°C)에 넣어 먼저 溶解시키고, 溶解된 Emulsion을 oven에서 꺼내 Water Bath(45°C)에 담그고, 이 狀態에서 標本을 3~4秒間 담았다 빼낸다.

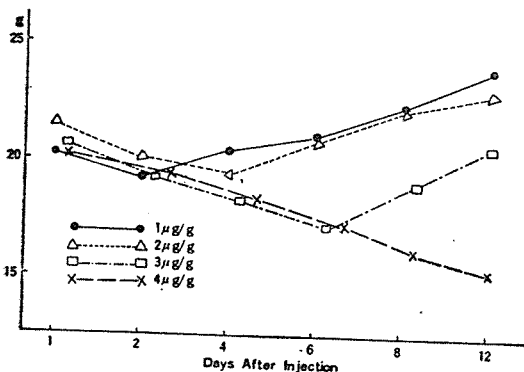
베넌 標本을 木溝板(60度 傾斜가 되게 판 나무판)에 꽃아 Drying Oven(45°C)에 約 15~30分間 乾燥시켰다. 이들 防濕劑가 들어 있는 標本箱子에 넣어 뚜껑을 닫은 後 전기용 테이프를 틈사이를 감고, 이를 다시 鉛板으로 縱橫 二重으로 감싼 後 銀紙로 싸서 비너루 주머

니에 넣고, 다시 모조지로 變 後 4°C의 冷藏庫에 保管하였다. 露出時間은 1個月이었고 暗室內에서 現像 및 固定을 하였다.

다음은 이들을 Toluidine Blue O로 染色하였고, 自記放射法에서 選元된 銀粒子의 判讀에는 20個의 腺胞를 選擇하고, 各 腺胞는 Acini의 數로 다시 나누었다. 여기에서 얻은 數值의 統計的處理로는 算術平均(M), 標準偏差(S.D.) 有意性檢査(P) 및 百分比(%)를 各各算出하였다.

Table 1. Changes in Body Weights of Mice After Different Doses of Ethidium Bromide Injection (g)

Day	1μg/g		2μg/g		3μg/g		4μg/g	
	Mean(S. D.)	% of Control	Mean(S. D.)	% of Control	Mean(S. D.)	% of Control	Mean(S. D.)	% of Control
1	20.4 (1.3)	97.1	21.6 (1.8)	98.1	20.8 (2.4)	99.0	20.3 (2.1)	96.6
2	19.1 (2.3)	90.9	20.1 (1.7)	91.3	19.2 (2.1)	91.4	19.4 (1.8)	92.3
4	20.7 (1.8)	98.5	19.3 (1.9)	87.2	18.4 (2.3)	87.6	18.5 (1.9)	88.0
6	21.2 (1.4)	100.9	21.0 (2.1)	95.4	17.2 (1.9)	81.9	17.2 (1.7)	81.9
8	22.8 (2.1)	108.5	22.3 (1.8)	101.3	18.8 (1.3)	89.5	16.0 (1.3)	76.1
12	24.1 (2.0)	114.7	23.2 (2.3)	105.4	20.6 (1.7)	98.0	15.3 (1.5)	72.3



Text-Fig. 1. Body Weights of Mice Receiving Different Doses of Ethidium Bromide Injection (g)

### Ⅲ. 實驗成績

1. Ethidium Bromide의 諸 用量이 體重에 미치는 影響;

Ethidium Bromide의 濃度가 體重에 미치는 影響은

第1表 및 第1圖에서 보는 바와같이 體重 1μg/g은 Ethidium Bromide注射後 第2日까지는 體重이 減少하다가, 其 以後부터는 回復되고 體重 2μg/g은 注射後 第4日까지는 體重이 減少하다가 其 以後부터는 增加하기 始作하고, 體重 3μg/g은 注射後 第6日까지는 體重이 減少하고, 以後부터는 回復하나 實驗最終日인 第12日에 이르러서 겨우 實驗初日의 成績에 到達하게 된다.

體重 4μg/g은 이 實體의 最終日인 第12日까지 繼續 體重減少를 보였다. 이 豫備實驗에 있어서 本 研究에 使用될 Ethidium Bromide의 用量은 3μg/g이 蛋白合成關係를 追求하는데 適合하다고 생각된다.

Table 2. Weights of Submandibular Gland of Mice following an Injection of Ethidium Bromide (3μg/g)

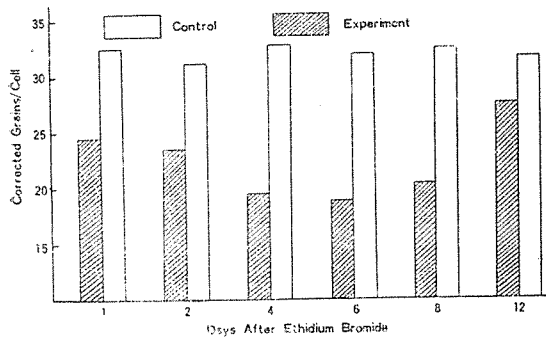
Day	Mean(S. D.)	% of Control	Probability
1	92.3 (8.3)	99.2	>0.3
2	94.8 (7.2)	101.9	>0.5
4	91.7 (9.0)	98.6	>0.1
6	93.9 (8.7)	100.9	>0.5
8	91.2 (7.9)	98.0	>0.3
12	90.8 (8.1)	97.6	>0.1

Table 3. Incorporation of Leucine-C<sup>14</sup> by Submandibular Acinar Cells of Mice Receiving Ethidium Bromide (3μg/g)

Day	Experiment		Control		% of Control	Probability
	Mean Grain No.	S. D.	Mean Grain No.	S. D.		
1	24.5	3.1	32.6	3.4	75.8	<0.03
2	22.9	2.3	31.4	2.7	70.8	<0.001
4	19.3	1.8	33.0	3.1	59.7	<0.001
6	17.8	1.4	32.2	2.4	55.1	<0.001
8	20.1	2.0	32.8	3.0	62.2	<0.001
12	27.4	2.2	31.9	3.3	84.8	<0.05

2. Ethidium Bromide가 白鼠顎下腺重量에 미치는 影響 :

Ethidium Bromide가 顎下腺重量에 미치는 影響은 第2表에서 보는 바와같이 全期間을 通하여 別로 變動이 없었고, 有意性檢査에 있어서도 各期間에 있어서 實驗群과 對照群과는  $P > 0.1 \sim P > 0.5$ 이었다.



Text-Fig. 2. Protein Synthesis in Mice Receiving Ethidium Bromide (3μg/g)

3. Ethidium Bromide가 白鼠顎下腺의 蛋白合成에 미치는 影響 :

Ethidium Bromide가 白鼠顎下腺의 蛋白合成에 미치는 影響은 第3表 및 第2圖에서 보는 바와 같고, 放射線炭素로 標識된 Amino酸 即 Leucine-C<sup>14</sup>에 依하여 自記放射法으로 分析하였고 對照群에 있어서 銀粒子의 平均値는 第1日에는 36.6이고, 第2日에는 31.4, 第4日에는 33.0, 第6日에는 32.2, 第8日에는 32.8, 第12日에는 31.9로서 全期間을 通하여 큰 變動이 없었으나, 實驗群에 있어서는 第1日부터 急激히 銀粒子의 數가 減少하여 24.5이고, 第2日에는 22.9, 第4日에는 19.3, 第6日에는 17.8, 第8日에는 20.1, 第

12日에는 27.4이었고, 또 第1日에는 對照群의 75.8% 第2日에는 對照群의 70.8%, 第4日에는 對照群의 59.7%, 第6日에는 對照群의 55.1%, 第8日에는 對照群의 62.2%, 第12日에는 對照群의 84.8%이었다. Ethidium Bromide를 注射後 第1日부터 銀粒子의 數가 급격히 減少하고, 第6日이 가장 낮은 數値를 보이고 其 以後부터는 回復하기 始作하여 實驗最終日인 第12日에는 實驗初日인 第1日의 것보다 많이 回復되어 높은 數値를 보였다.

對照群과 實驗群과의 有意性關係를 檢討하여 보면 第1日에는  $P < 0.03$ , 第2日에는  $P < 0.001$ , 第4日에는  $P < 0.001$ , 第6日에는  $P < 0.001$ , 第8日에는  $P < 0.001$ , 第12日에는  $P < 0.05$ 로서 모두 有意性한 差異를 보였다.

IV. 總括 및 考察

그동안 Ethidium Bromide는 in Vitro에 있어서 微生物의 DNA, RNA 및 蛋白合成에 關한 研究가 大部分이고, 또 Ethidium Bromide가 Antibiotic Resistance Determinants를 除去한다고 報告된 以來, 많은 研究가 되어 오고 있다. 本實驗은 Ethidium Bromide를 白鼠에 注射하여 顎下腺의 蛋白合成關係를 自記放射法으로 追求한 것이고, 이들의 成績을 要約하면 다음과 같다. 本實驗을 함에 있어서 適當한 Ethidium Bromide의 用量은 體重 3μg/g이었고, 顎下腺의 重量은 變動이 없어서, 아무런 影響을 미치지 않았고, 自記放射法의 定量分析은 銀粒子의 平均値는 第1日부터 급격히 減少하여 第6日이 가장 낮은 數値를 보이고, 其 以後부터는 回復하기 始作하여 實驗最終日인 第12日에는 實驗初日의 것보다 많이 回復되었다.

Bouanchaud 外 2人(1969)<sup>2)</sup>은 Staphylococcus Aureus에 있어서 Penicillin Resistance와 Erythromycin

Resistance는 Ethidium Bromide에 의하여 除去된다고 하였고, Roodyn(1960)<sup>13)</sup>은 Bacillus Cereus System이 Ethidium Bromide에 의하여 抑制된 蛋白質보다 核酸合成의 妨害때문이라 하였고, Mandel(1961)<sup>14)</sup>은 Bacillus Cereus에 있어서 Chloramphenicol에 의하여 Growth Inhibition을 볼 수 있는 Cell Wall Biosynthesis는 Ethidium Bromide에 의하여는 別로 影響이 없었다고 하였고, Kandaswamy 外 1人(1961)<sup>15)</sup>은 Ethidium Bromide가 Escherichia Coli의 Pyrimidine Biosynthesis에 影響을 미치지 못한다고 하였고, Waring (1966)<sup>12)</sup>은 Ethidium Bromide는 DNA Polymerase를 抑制하고, 또 Template DNA와 結合하므로서 DNA-Dependent RNA Polymerase도 抑制한다고 하였고, Lepecq와 Paoletti (1967)<sup>9)</sup>는 Ethidium Bromide는 DNA 및 RNA와 相互作用한다고 하였고, Tomchick 와 Mandel (1964)<sup>11)</sup>은 Ethidium Bromide가 細菌의 諸 合成에 미치는 影響을 生化學적으로 窺明하였고, Newton (1957)<sup>7)</sup>은 Ethidium Bromide는 in Vivo에 있어서 核酸合成의 抑制를 나타낸다고 하였다.

著者の 例도 Newton<sup>7)</sup>의 實驗境遇와 같이 in Vivo에 있어서도 Ethidium Bromide가 白鼠顎下腺細胞의 蛋白質合成에 影響을 미침을 알 수 있었다.

## V. 結 論

體重 20gm 内外의 雌性白鼠 60頭를 使用하였고, 60頭中 24頭는 Ethidium Bromide의 適當한 用量을 찾아내기 爲에 豫備實驗에 使用하였고, 나머지 36頭는 本實驗에 使用하였다.

本實驗은 實驗群과 對照群으로 區分하고, 實驗群에는 Ethidium Bromide를 體重 3 $\mu$ g/g을 腹腔內注射하고, Ethidium Bromide를 注射한 後 24時間이 經過한 다음부터 1日, 2日, 4日, 6日, 8日 및 12日 間隔으로 犧牲시켰고, 犧牲 1時間前에 Leucine-C<sup>14</sup>을 體重 g當 4 $\mu$ c를 腹腔內注射를 하였다.

이 研究는 Ethidium Bromide가 白鼠顎下腺細胞의 蛋白質合成機構에 어떤한 影響을 미치는가를 自記放射法으로 調査한것이고, 其 結果는 다음과 같다.

1. Ethidium Bromide의 濃度는 體重 3 $\mu$ g/g가 適當하였다.
2. Ethidium Bromide는 白鼠顎下腺의 重量에는 아무런 影響을 미치지 않았다.
3. Leucine-C<sup>14</sup>에 依한 Ethidium Bromide가 白鼠顎下腺細胞의 蛋白質合成에 미치는 影響은 注射後 第1日부터 銀粒子가 급속히 減少하고, 第6日이 가장 낮은

數値를 보이고, 其 以後부터는 回復되어 實驗最終日인 第12日에는 對照群의 것 보다 높은 數値를 보였다.

4. 本實驗을 통하여 Ethidium Bromide는 In Vivo에 있어서도 RNA 및 DNA Polymerase를 抑制하므로 結果적으로 核酸 및 蛋白質合成을 妨害하는 抗生劑로 볼 수 있을 것이다.

## REFERENCES

- 1) Elliott, W.H.: The Effects of Antimicrobial Agents on Deoxyribonucleic Acid Polymerase. Biochem. J. 86:562, 1963.
- 2) Bouanchaud, D.H. et 2: Elimination by Ethidium Bromide of Antibiotic Resistance in Enterobacteria and Staphylococci. J. Gen. Microbiol. 54:417, 1969.
- 3) Kandaswamy, T.S. & Henderson, J.F.: Alteration of the Biochemical Effects of Ethidium Bromide by Exposure of Cells to Hypotonic Media. Nature, Lond. 199:807, 1963.
- 4) Kerridge, D.: The Effect of Actidione and other Antifungal Agents on Nucleic Acid and Protein Synthesis in Saccharomyces Carlsbergensis. J. Gen. Microbiol. 19:492, 1958.
- 5) Lepecq, J.B. & Paoletti, G.: A Fluorescent Complex Between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. J. Molec. Biol. 27:106, 1967.
- 6) Leith, J. D.: Acridine Orange and Acriflavin Inhibit Deoxyribonuclease Action. Biochim. Biophys. Acta 72:643, 1963.
- 7) Newton, B.A.: The Mode of Action of Phenanthridines. The Effect of Ethidium Bromide on Cell Division and Nucleic Acid Synthesis. J. Gen. Microbiol. 17:718, 1957.
- 8) Seaman, A. & Woodbine, M.: The Therapeutic Index of Chemotherapeutic Agents. The Effect of Nucleic Acid on Ethidium Bromide. J. Appl. Bact. 18:397:1955.
- 9) Tomchick, R. & Mandel, H.G.: The Growth Inhibition of Ethidium Bromide in Bacillus Cereus. Proc. Am. Assoc. Cancer Rec. 3:358, 1962.
- 10) Tomchick, R. & Mandel, H.G.: Effects Produced by Ethidium Bromide in Bacillus Cereus and Escherichia Coli. Abstr. 3rd Intersci. Conf.

- Antimicrob. Agents. Chemother. : 64, 1963.
- 11) Tomchick, R. & Mandel, H.G.: Biochemical Effects of Ethidium Bromide in Microorganisms, *J. Gen. Microbiol.* 36:225, 1964.
  - 12) Waring, H.J.: Cross-Linking and Intercalation in Nucleic Acids. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 16:235, 1966.
  - 13) Roodyn, D.B.: A Simple Membrane Fractionation Method for Determining the Distribution of Radioactivity in Chemical Fractions of *Bacillus Cereus*. *Biochim. Biophys. Acta* 41: 80, 1960.
  - 14) Mandel, H.G. and Altman, R.L.: Some Effects of Chloramphenicol on Biosynthesis in *Bacillus Cereus*. *J. Pharmac. Exp. Therap.* 133:151, 1961.
  - 15) Kim, M.K. and Han, S.S.: Effects of 5-Fluorouracil on Exocrine Glands. I. Gland Weights in Mice Receiving Synthetic Polynucleotides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 159: 12 46, 1972.
  - 16) Tiber, A.: Radioautographic and Histochemical Study of Protein Synthesis in the Hamster Submandibular Gland. *J. Dent. Res.* 50:837, 1971.
  - 17) Jacoby, F. and Leeson, C.R.: The Postnatal Development of the Rat Submandibular Gland. *J. Anat.* 93:201, 1959.
  - 18) Messier, B. and Leblond, C.P.: Preparation of Coated Radioautograms by Dipping Sections in Fluid Emulsion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96:7, 1957.
  - 19) Droz, B. and Warshawsky, H.: Reliability of the Radioautographic Technique for the Detection of Newly Synthesized Protein. *J. Histochem, Cytochem.* 11: 426, 1963.
  - 20) Flon, H. and Gerstner, R.: Salivary Glands of Hamster: I. The Submandibular Gland: A Histochemical Study after Preservation with Various Fixatives. *Acta Histochem.* 31:234, 1968.
  - 21) Kim, J.H.: Effects of Prenatal Anoxic Exposure on Leucine-H<sup>3</sup> Incorporation by the Pancreas and Submandibular Gland in Rat Neonates. *J. Korean Dent. Ass.* 10:437, 1972.
  - 22) Gallagher, J.T., Marsden, J.C. and Robards, A.W.: Electron Microscopic Investigations of Submaxillary Salivary Gland Proteins. 14:731, 1969.
  - 23) Scott, B.L. and Pease, D.C: Electron Microscopy of the Salivary and Lacrimal Glands of the Rat. *Am. J. Anat.* 104:115, 1959.
  - 24) Gottschalk, A. and McKenzie, H.A.: On the Molecular Shape and Size of Ovine Submaxillary Gland Glycoprotein. *Biochem. Biophys. Acta* 54:226, 1961.
  - 25) Bettelheim, F.A. and Dey, S.K.: Molecular Parameters of Submaxillary Mucins. *Archs Biochem. Biophys.* 109:259. 1965.

---

### — EXPLANATION OF FIGURES —

- Fig. 1.** Control animal sacrificed on day 6 after ethidium bromide injection. (400 x)  
The number of silver grains are more than Figure 2.
  - Fig. 2.** Experimental submandibular gland on day 6. Only a few grains are seen. (400 x)
  - Fig. 3.** Experimental submandibular gland on day 8. (400 x)
  - Fig. 4.** Experimental submandibular gland on day 2. (400 x)
  - Fig. 5.** Experimental submandibular gland on day 4. (400 x)
  - Fig. 6.** Experimental submandibular gland on day 12. A large number of grains are visible. (400 x)
-

— 李書海 論文 寫真附圖 —

