

초기 계배에 대한 Actinomycin D와 Puromycin의 영향

최임순 · 주충노* · 최춘근 · 유동석

Effects of Actinomycin D and Puromycin on Early Chick Embryos

Choe, R.S., C.N. Joo,* C.K. Choi and D.S. Reu

(Received June 15, 1974)

Abstract

Chick embryos received a single injection of actinomycin D (0.01 μ g, 0.05 μ g or 0.1 μ g) or puromycin (10.0 μ g, 30.0 μ g or 50.0 μ g) into the yolk sac of Arbor acres chick embryos either prior to incubation or at certain periods of time (48, 96 and 144 hours) after incubation. After 10 days of incubation, surviving embryos were investigated morphologically and biochemically.

Embryos treated with actinomycin D or puromycin showed a high mortality when they were exposed prior to incubation and at 48 hours after incubation.

Electron micrographs of chondrocytes in tarso-metatarsal of antibiotics (actinomycin D or puromycin) treated embryos showed the destruction of cytoplasm and nuclei when they were exposed prior to incubation. Endoplasmic reticulum was expanded and mitochondria were damaged in chondrocytes of surviving embryos treated with low doses at 48 hours, 96 hours or 144 hours after incubation.

The activities of enzymes such as lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and succinate dehydrogenase in embryos treated with actinomycin D or puromycin were much less than those of the saline treated group. Also, the amounts of DNA, RNA and protein were greatly decreased.

서론

Actinomycin D는 종양치료에 광범위하게 사용되고 있으며 DNA의 guanosine residue들에 특이하게 결합하여 DNA dependent RNA의 합성을

억제하며 (Reich 등, 1962; Shatkin, 1962; Reich, 1964), puromycin은 ribosome에 결합된 peptidyl-tRNA와 반응하며 peptidyl puromycin산물을 형성하여 그 결과 단백질합성을 억제한다 (Darken, 1964). Pierro와 Coghill (1968)은 actinomycin D

연세대학교 생물학과 *생화학과

Dept. of Biology, Yonsei University. *Dept. of Biochemistry

이 논문은 1983년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

와 puromycin이 비정상 발생을 유발시킨다고 보고하였으며, 생물체에 대한 actinomycin D의 형태학 및 생화학적 영향에 관한 실험들이 많은 사람들에 의하여 이루어졌다(Piper와 Klein, 1969; Elis와 Dipaolo, 1970; Billet들, 1971; Molinaro들, 1972; Schwelchel과 Merker, 1973). 최근에는 puromycin이 단백질 합성뿐 아니라 RNA합성도 억제한다고 보고되었다(Nagata들, 1981; Fox와 Studzinski, 1982).

계배에서의 thalidomide에 의한 기형효과가 보고된(Cameron, 1962; Boylen들, 1963) 외에도 thalidomide가 쥐, 생쥐 및 토끼에서 기형발생을 일으킨다는 연구들(Christie, 1962; Seller, 1962)이 관심을 끌었으며, 초기계배에서의 6-mercapto-purine (Grubb와 Montiegel, 1974), papaverine (Lee와 Nagele, 1979), busulfan(Swartz, 1980), retinoic acid(Jelínek과 Kistler, 1981), diazepam (Nagele들, 1981), trypan blue(Weaver들, 1981) 및 caffeine (Lee들, 1982) 등에 의한 독성효과와 기형현상도 보고되었다. 이 연구들은 형태적인 기형현상에 관해서만 보고되었을 뿐 조직의 미세구조변화와 효소 및 단백질합성에 미치는 생화학적변화는 조사되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 중앙치료에 광범위하게 사용되고 있는 화학치료제로서 단백질합성 과정의 전사(transcription)단계에서 억제작용을 나타내는 actinomycin D와 번역(translation)단계에서 억제작용을 나타내는 puromycin을 발생중인 초기계배에 처리시기와 처리량을 다르게 하여 초기계배의 생존에 미치는 영향, 생존계배의 부척부(跗蹠部)연골세포에 미치는 영향 및 생존계배의 효소활성과 단백질합성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

정상사료로 사육한 Arbor acres(서울시 오류동, 유일농원)의 수정란(65±5 μ g)을 상대습도 60%, 37.5±0.5°C의 부란기에서 발생시켰다.

2. Actinomycin D 및 puromycin 처리

Actinomycin D (Sigma 사)와 puromycin (Sig-

ma 사)은 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며 부란 전, 부란 후 48, 96 및 144시간에 actinomycin D는 0.01, 0.05 및 0.1 μ g을, puromycin은 10.0, 30.0 및 50.0 μ g을 각각 한번씩 처리하였다. 이때의 처리액은 0.05ml였으며, 수정란의 둔한 쪽 난각에 23 gauge 주사바늘로 난황 내에 주입시키고 난각에 생긴 구멍은 hard paraffin으로 봉한 다음 부란 후 10일째까지 계속 발생시켰다. 대조군은 0.05ml의 생리식염수만 처리하였다.

3. 사망을 조사 및 跗蹠部 연골세포의 미세구조 관찰

부란 후 10일째에 계배를 적출하여 사망율을 조사하였으며 생존계배의 후지 跗蹠部 연골조직 일부를 1mm³이도록 절단하여 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde에 2시간 전고정한 후 동일한 phosphate buffer로 2회 세척한 다음 상기한 phosphate buffer로 조정된 1% OsO₄ 용액으로 2시간 후고정하였다. 이를 ethanol농도 상승순으로 탈수하고 propylene oxide로 치환한 후 epoxy resin mixture로 포매하였다. 유리칼을 사용하여 LKB-V형 초박절편기로 thick section 한 후 toluidine blue로 염색하여 연골조직 부위를 광학현미경으로 확인하고, 50~30nm의 두께로 초박절편을 만들어 lead citrate와 uranyl acetate로 이중염색한 후 전자현미경(Hitachi H-500형과 ISI-LEM 2,000)으로 관찰하였다.

4. 생화학적 관찰

부란 후 10일째에 계배를 적출하여 생존계배는 생리식염수로 두 번 세척하여 계배 개체마다 10ml의 파쇄액으로 만든 다음 효소, 핵산 및 단백질정량에 사용하였다.

① Lactate dehydrogenase(E.C. 1, 1, 1, 27)의 활성 측정

Lactate dehydrogenase의 활성 측정은 반응액에 효소시료를 가한 후 spectrophotometer(Hitachi 200-20)를 사용하여 상온에서 1분동안에 감소되는 NADH양을 340nm에서의 흡광도 감소로 추적하였다. 반응액(전체부피 3ml)의 최종농도는 50mM phosphate buffer(pH 7.4), 0.6mM Na-pyruvate, 2.13mM nicotinamide, 0.18mM NaOH

와 효소시료 0.02ml였다 (Neilands, 1955).

② Malate dehydrogenase (E.C. 1, 1, 1, 37)의 활성 측정

Malate dehydrogenase는 반응액에 효소시료를 가한 후 상온에서 spectrophotometer (Hitachi 200-20)를 사용하여 1분 동안에 환원되는 2,6-dichlorophenolindophenol (DICPIP)의 양을 600nm에서의 흡광도 감소로 추적하였다. 반응액 (전체부피 3ml)의 최종농도는 14mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.43mM NAD⁺, 30mM nicotinamide, 0.86mM KCN, 0.034mM DICPIP, 7.1mM Na-malate와 효소시료 0.1ml였다 (Joo와 Han, 1976).

③ Succinate dehydrogenase (E.C. 1, 3, 99, 1)의 활성 측정

Succinate dehydrogenase의 활성은 반응액에 효소시료를 가하고 상온에서 spectrophotometer (Hitachi 200-20)를 사용하여 1분 동안에 환원되는 DICPIP의 양을 600nm에서의 흡광도 감소로 추적하였다. 반응액 (전체부피 3ml)의 최종농도는 50 mM phosphate buffer (pH 7.6), 1mM KCN, 0.04mM DICPIP, 20mM Na-succinate와 효소시료 0.2ml였다 (Joo와 Han, 1974).

④ 단백질, DNA 및 RNA 분획의 분리

0.1ml의 파쇄액에 10% TCA (Trichloroacetic acid) 3ml를 가하고 원심분리 (600g×5분)하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 위와 같은 방법으로 두번 세척한 후 chloroform-methanol 혼합용액 (2:1, v/v) 3ml와 10% TCA 1ml를 가하여 완전히 섞은 다음 원심분리 (600g×5분)하여 지질을 제거하고 다시 같은 방법으로 세척하였다. 이때 얻은 침전물에 1ml의 0.4N KCN을 가하고 완전히 섞은 후 37°C에서 18시간 가수분해시켰다. 가수분해시킨 혼합물에 진한 염산 0.34ml와 10% TCA 1ml를 넣고 완전히 섞은 다음 침전이 생길 때까지 냉장조에 보관하고 원심분리 (600g×5분)하여 상등액을 RNA 정량에 사용하였으며, 이때에 생긴 침전물에 10% TCA 2ml를 가하고 90°C에서 15분간 물증탕한 후 원심분리 (600g×5분)하여 상등액을 DNA 정량에 사용하였다. 이때에 생긴 침전물은 0.2N의 NaOH를 가하고 15분간 90°C에서

가열하여 용해시킨 후 단백질 정량의 시료로 사용하였다 (Schneider, 1957).

⑤ 단백질 정량

단백질은 Lowry들 (1951)의 방법에 따라 정량하였다. 시료 0.5ml에 Carbonate-copper 용액 1ml를 가하고 완전히 섞은 다음 15분간 상온에 방치시키고 0.2N Folin-phenol 시약 3ml를 가한 즉시 완전히 섞어 45분간 상온에 방치한 후 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준단백질 용액으로는 일정농도의 bovine serum albumin (BSA) 용액을 사용하였다.

⑥ DNA 정량

DNA는 Schneider (1957)의 방법에 따라 정량하였다. Diphenylamine 1g을 100ml의 빙초산에 녹이고 진한 황산 2.75ml를 가하여 만든 diphenylamine용액 4ml를 0.5ml의 시료에 가하고 90°C에서 10분간 가열한 다음 상온에서 냉각시켰다. 냉각시킨 후 600nm에서의 흡광도를 측정하였으며 표준 DNA용액으로는 일정농도의 calf thymus DNA용액을 사용하였다.

⑦ RNA 정량

RNA는 Schneider (1951)의 방법에 따라 정량하였다. 6% Orcinol용액 3.5ml와 진한 염산 100ml에 100mg의 FeCl₃를 녹인 용액 2ml를 시료 0.5ml에 가한 다음 90°C로 10분간 가열하고 상온에서 냉각시킨 후 670nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준 RNA용액으로는 일정농도의 calf liver RNA 용액을 사용하였다.

결 과

초기계배의 생존에 미치는 actinomycin D의 영향은 처리시기와 처리양에 따라 다르게 나타났으며 (Table 1), 0.01μg을 처리받은 계배들은 생리 식염수만을 처리한 대조군에서처럼 비교적 사망율이 낮았으나, 부란 전 및 부란 후 48시간에 0.05μg이상, 그리고 부란 후 96 및 144시간에 0.1μg을 처리받은 계배들에서는 사망율이 비교적 높았다 (Table 1).

Puromycin을 부란 전 및 부란 후 48시간에 10.0μg이상 처리받은 계배들과 부란 후 96 및 144

시간에 30.0 μ g 이상 처리받은 계배들의 사망율은 매우 높았으며 처리량이 많아 질수록 사망율도 높았고 처리시기가 늦어질 수록 사망율은 낮았다 (Table 2).

Table 1. Effect of Actinomycin D on Chick Embryos Treated at Different Times of Incubation.

Injection Time*	μ g Dosage	No. of Embryos	No. of Survivors	% Mortality
	Vehicle**	23	21	8.7
0	0.01	16	13	18.8
	0.05	21	12	42.9
	0.1	23	10	56.5
	0.01	16	14	12.5
48	0.05	19	11	42.1
	0.1	21	10	52.4
	0.01	18	16	11.1
96	0.05	18	12	33.3
	0.1	21	11	47.6
	0.01	19	17	10.5
144	0.05	18	13	27.8
	0.1	18	10	44.4

*Hrs. of incubation prior to actinomycin D injection.

**Equal volume(0.05ml) of saline was treated instead of actinomycin D.

부란 전 0.05ml의 생리식염수만 처리받은 생존 계배의 후지 附鰾部 연골세포의 핵은 원형 또는 타원형이었으며 세포질에는 mitochondria, 소포체, ribosome 등이 골고루 분포되어 있었다 (Fig. 1). 생존계배들의 연골세포는 세포질 및 핵이 심하게 파괴되어 골소강 내에 서로 얽혀 있었으며 (Fig. 2) 부란 후 48시간에 0.01 μ g을 처리하였을 때는 연골세포의 세포질 일부가 파괴되었고 소포체는 팽창되었다 (Fig. 3). 같은 시간에 0.05 μ g을 처리하였을 때는 세포질이 심하게 파괴되었고 핵막의 변화를 보였다 (Fig. 4). 부란 후 96시간에 0.01 μ g을 처리받은 연골세포는 소포체의 팽창을 보였으며

Table 2. Effect of Puromycin on Chick Embryos Treated at Different Times of Incubation.

Injection Time*	μ g Dosage	No. of Embryos	No. of Survivors	% Mortality
	Vehicle**	23	21	8.7
0	10.0	17	8	52.9
	30.0	17	7	58.8
	50.0	16	3	81.3
	10.0	16	9	43.8
48	30.0	17	8	52.9
	50.0	19	4	78.9
	10.0	17	13	23.5
96	30.0	19	9	52.6
	50.0	18	4	77.8
	10.0	14	11	21.4
144	30.0	16	8	50.0
	50.0	16	6	62.5

*Hrs. of incubation prior to puromycin injection.

**Equal volume(0.05ml) of saline was treated instead of puromycin.

(Fig. 5), 0.05 μ g을 처리받은 경우에는 mitochondria의 cristae가 심하게 손상되었고 소포체도 팽창하였다 (Fig. 6). 부란 후 144시간에 0.01 μ g의 actinomycin D를 처리받은 계배들의 연골세포에서도 소포체가 팽창되었다 (Fig. 7).

Puromycin을 부란 전에 10.0 μ g을 처리받은 생존계배의 연골세포는 세포질과 핵막이 파괴되었으며 (Fig. 8), 부란 후 48시간에 10.0 μ g을 처리받은 경우에는 소포체의 팽창이 나타났으나 핵에는 영향이 나타나지 않았다 (Fig. 9). 같은 시기에 50.0 μ g을 처리하였을 때는 연골세포의 세포질은 파괴되었고 핵막의 변화와 염색질의 응집이 보였다 (Fig. 10). 부란 후 96시간에 10.0 μ g을 처리받은 연골세포는 소포체의 팽창과 mitochondria의 손상을 보였으나 핵에는 영향이 없었으며 (Fig. 11), 부란 후 144시간에 30.0 μ g을 처리받은 연골 세포

Table 3. Enzyme activities of 10-day-old chick embryos which have received actinomycin D.

Injection time*	µg dosage	No. of sample	Lactate dehydrogenase (EC, 1, 1, 1, 27)		Malate dehydrogenase (EC, 1, 1, 1, 37)		Succinate dehydrogenase (EC, 1, 3, 99, 1)	
			Activity** (unit) / g tissue	Relative activity***	Activity** (unit) / g tissue	Relative activity***	Activity** (unit) / g tissue	Relative activity***
	**** Vehicle	5	380.9±19.7	100	117.4± 7.3	100	68.9±2.2	100
0	0.01	5	299.5±36.2	79	91.2± 9.3	78	62.0±3.2	90
	0.05	5	281.7±12.0	74	86.0±16.5	73	48.5±3.7	70
	0.1	5	283.8±12.1	75	67.3± 4.8	57	36.8±8.1	53
	0.01	5	310.5± 9.8	82	97.6± 6.0	83	60.9±6.8	88
48	0.05	5	269.2±24.3	71	89.6± 4.9	76	48.6±4.2	71
	0.1	5	240.5±20.6	63	81.8±11.6	70	45.2±4.3	66
96	0.01	5	322.4±21.7	85	106.3±10.1	91	66.3±4.1	96
	0.05	5	279.7±14.1	73	90.4±10.6	77	55.6±5.3	81
	0.1	5	237.3±19.7	62	76.9± 3.1	65	44.1±5.3	64
144	0.01	5	332.8±30.8	87	110.1± 7.8	94	62.5±8.8	91
	0.05	5	295.2±12.3	78	96.6± 5.6	82	51.9±2.7	75
	0.1	5	248.0±14.7	65	90.4± 7.7	77	48.7±4.9	71

* Hrs. of incubation prior to actinomycin D injection.
 ** One unit of the enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition.
 *** Relative activities were expressed assuming that of vehicle being 100.
 **** Equal volume (0.05 ml) of saline was treated instead of actinomycin D.

는 소포체의 팽창, mitochondria의 손상 뿐 아니라 염색질이 핵 중앙부에 부분적으로 응집되어 있었다(Fig. 12).

Actinomycin D를 처리받은 생존계배들의 lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase 및 succinate dehydrogenase는 처리시기와 처리양에 관계없이 활성이 감소되었으며(Table 3), puromycin을 처리받은 계배들에서도 처리시기와 처리양에 관계없이 활성이 감소되었으며 처리양이 많을수록 크게 감소하였고 처리시기가 늦을수록 감소는 적었다(Table 4). DNA, RNA 및 단백질양도 actinomycin D와 puromycin을 처리받은 생존계배들에서 크게 감소되었으며 처리시기가 늦을수록 감소량은 적었고, 처리양이 많았을 때 크게 감소하였다(Table 5, 6).

고 찰

화학물질에 대한 배시기의 반응이 처리시기에 따라 다르다는 것은 잘 알려져 있으며, David (1975)는 부란 전에 DDT를 처리하였을 때 계배 생식소 내의 생식세포 수가 뚜렷이 감소한다고 하였다. 백혈병 치료제인 6-mercaptopurine이나 busulfan을 부란 전에 처리받은 계배에서는 사망율이 매우 높으며(Grubb와 Montiegel, 1974; Swartz, 1980), 처리시기보다는 영향을 받은 기간이 중요하다고 하였다(Swartz, 1980).

단백질합성 과정의 전사(transcription)단계에서 억제작용을 나타내는 actinomycin D는 단백질합성 억제작용 뿐 아니라 세포분열을 방해하며 독성도 강하여 정상세포에도 손상을 준다고 하였다(Koenig들 1970). 계배의 초기발생때 actinomycin

Table. 4. Enzyme activities of 10-day-old chick embryos which have received puromycin.

Injection time*	µg dosage	No. of sample	Lacate dehydrogenase (EC, 1, 1, 1, 27)		Malate dehydrogenase (EC, 1, 1, 1, 37)		Succinate dehydrogenase (EC, 1, 3, 99; 1)	
			Activity** (unit) g tissue	Relative activity**	Activity** (unit) g tissue	Relative activity***	Activity** (unit) g tissue	Relative activity***
0	**** Vehicle	5	380.9±19.7	100	117.4±7.3	100	68.9±2.2	100
	10.0	5	315.7±18.3	83	89.2±5.5	76	62.5±2.3	91
	30.0	5	290.3± 5.8	76	81.6±6.5	70	49.8±1.0	72
	50.0	3	256.9±31.2	67	77.4±3.8	66	45.1±4.0	66
48	10.0	5	320.0±29.0	84	104.1± 6.4	89	57.9±4.4	84
	30.0	5	276.7±26.8	73	83.2± 6.3	71	50.4±1.4	73
	50.0	4	260.0±24.0	68	75.8± 6.6	65	48.3±1.4	70
96	10.0	5	345.1±10.3	91	108.0± 1.8	92	56.4±5.0	82
	30.0	5	267.0±15.9	70	94.5± 8.5	80	52.6±3.8	76
	50.0	4	255.8± 8.3	67	78.5± 7.2	67	48.4±3.3	70
144	10.0	5	328.3±35.8	86	111.0± 6.1	95	57.9±4.5	84
	30.0	5	281.3±34.9	74	98.9±12.2	84	56.5±4.7	82
	50.0	5	275.4± 7.4	72	83.6± 2.0	71	49.9±5.9	72

* Hrs.of incubation prior to puromycin injection.

** One unit of the enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition.

*** Relative activities were expressed assuming that of vehicle being 100.

**** Equal volume (0.05ml) of saline was treated instead of puromycin.

D 0.05µg 처리에 의해서도 높은 사망율을 보여 actinomycin D가 초기계배에 독성을 나타내며 같은 양의 actinomycin D는 부란 전에 처리받은 계배에서의 사망율이 부란 후 처리받은 계배에서 보다 높아 영향을 받은 기간이 길수록 치사작용이 큰 것으로 생각된다.

Puromycin은 단백질합성의 번역(translation) 단계에서 억제 작용을 나타내고(Darken, 1964), 효소를 합성·분비하는 정상 exocrine pancreatic cell과 gastric cell에서도 괴사를 일으키며(Longnecker와 Farber, 1967; Longnecker들, 1968), 최근에는 단백질합성과 RNA합성을 억제한다고 보고하고 있다(Nagata들, 1981; Fox와 Studzinski, 1982). Puromycin을 처리받은 계배들에서도 초기발생때 높은 사망율을 보여 puromycin이 초

기계배에 독성작용을 미치는 것으로 생각되며 actinomycin D를 처리받은 계배들과 같이 영향을 받은 기간이 길수록 치사작용이 큰 것으로 나타났다.

생존계배의 후지 跗蹠部 연골세포는 actinomycin D를 부란 전 또는 부란 후 많은 양 처리하면 핵이 파괴되는데 이는 발생분화 중에 actinomycin D에 의해 세포분열을 계속해서 방해받거나, hemoglobin합성이 억제되어 물질대사과정을 차단한 결과이며(Hell, 1964; Wilt, 1965), puromycin을 처리받은 연골세포의 세포질과 핵이 파괴되는 것은 puromycin에 의한 괴사결과로 생각된다.

Actinomycin D와 puromycin 처리에 의해 소포체가 팽창한 것은 조면소포체의 ribosome에서 합성된 단백질이 세포질로 빠져 나가지 못한 결과

Table 5. DNA, RNA and protein levels of 10-day-old chick embryos which have received actinomycin D.

Injection Time*	μg dosage	No. of sample	DNA		RNA		Protein	
			mg per g tissue	Relative** amount	mg per g tissue	Relative** amount	mg per g tissue	Relative** amount
0	*** Vehicle	5	1.00±0.09	100	1.51±1.09	100	10.18±0.97	100
	0.01	5	0.58±0.06	58	1.11±0.04	74	8.40±1.50	83
	0.05	5	0.52±0.04	52	1.04±0.05	69	6.97±0.75	69
	0.1	5	0.42±0.05	42	0.81±0.02	54	6.66±0.63	65
48	0.01	5	0.66±0.05	66	0.97±0.03	65	7.21±1.14	71
	0.05	5	0.63±0.05	63	0.90±0.03	60	6.50±0.56	64
	0.1	5	0.54±0.04	54	0.79±0.04	53	6.21±0.80	60
96	0.01	5	0.73±0.08	73	1.02±0.08	67	7.61±0.98	75
	0.05	5	0.67±0.08	67	1.03±0.07	68	7.36±0.65	72
	0.1	5	0.62±0.05	62	0.93±0.04	61	6.49±0.62	64
144	0.01	5	0.81±0.02	81	1.19±0.01	79	8.14±1.38	80
	0.05	5	0.75±0.04	75	1.13±0.04	75	7.47±1.51	73
	0.1	5	0.65±0.06	65	0.97±0.04	65	7.16±1.21	70

* Hrs. of incubation prior to actinomycin D injection.

** Relative amounts were expressed assuming that of vehicle being 100.

*** Equal volume (0.05ml) of saline was treated instead of actinomycin D.

로 생각되며 mitochondria의 손상은 actinomycin D와 puromycin의 독성을 해독(detoxication)하기 위한 호흡작용부위에 영향을 미친 것으로 보인다.

한편 actinomycin D와 puromycin을 처리받은 생존계배의 lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase 및 succinate dehydrogenase의 활성이 생리식염수만 처리받은 생존계배에서 보다 크게 감소하였는데 이는 actinomycin D나 puromycin이 정상 단백질합성을 저해한 결과이다(Skatkin, 1962; Reich, 1964; Nagata들, 1981; Fox와 Studzinski, 1982; Choe들, 1982). 계배에 영향을 미친 기간이 길거나 많은 처리양에서 효소활성이 크게 감소한 것은 이들 항생물질이 오랫동안 또는 강하게 단백질합성을 저해한 것으로 보인다. DNA, RNA 및 단백질양도 actinomycin D나 puromycin을 처리받은 생존계배에서 생리식염수

만 처리받은 생존계배보다 크게 감소하였는데 이는 actinomycin D와 puromycin이 정상 단백질합성을 억제함으로써 DNA 복제, DNA전사 등에 관여하는 효소들의 합성을 저해한 결과로 생각된다.

결론

초기계배에 미치는 actinomycin D와 puromycin의 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1 : Actinomycin D와 puromycin을 부란전에 처리하였을 때 사망율이 높았으며 처리시기가 늦어질수록 사망율은 낮았다. Actinomycin D는 낮은 처리양(0.05μg)에서도 높은 사망율을 보여 puromycin보다 독성작용이 큰 것으로 나타났다.

2 : 생존계배의 후지 부척부 연골세포는 actinomycin D와 puromycin을 부란 전, 또는 많은 양(Actinomycin D; 0.1μg, puromycin; 50.0μg)을

Table 6. DNA, RNA and protein levels of 10-day-old chick embryos which have received puromycin.

Injection Time	μg dosage	No. of sample	DNA		RNA		Protein	
			mg per g tissue	Relative** amount	mg per g tissue	Relative** amount	mg per g tissue	Relative** amount
	Vehicle**	5	1.00±0.09	100	1.51±0.09	100	10.18±0.97	100
	10.0	5	0.51±0.02	51	0.90±0.06	60	8.74±0.74	86
0	30.0	5	0.41±0.04	41	0.83±0.04	55	7.53±1.21	74
	50.0	3	0.36±0.02	36	0.71±0.02	47	6.79±1.04	67
	10.0	5	0.62±0.04	62	1.00±0.02	67	9.33±0.86	92
48	30.0	5	0.56±0.06	56	0.96±0.02	64	8.09±0.54	79
	50.0	4	0.45±0.05	45	0.87±0.03	58	7.60±0.74	75
	10.0	5	0.96±0.02	69	1.01±0.03	67	9.50±0.99	93
96	30.0	5	0.63±0.02	63	0.92±0.02	61	8.31±0.85	82
	50.0	4	0.59±0.02	59	0.91±0.05	60	7.61±1.20	75
	10.0	5	0.77±0.03	77	1.03±0.02	68	9.76±0.39	96
144	30.0	5	0.70±0.02	70	1.01±0.02	67	9.18±0.72	90
	50.0	5	0.64±0.04	64	0.88±0.03	58	8.92±0.57	88

* Hrs. of incubation prior to puromycin injection.

** Relative amounts were expressed assuming that of vehicle being 100.

*** Equal volume (0.05ml) of saline was treated instead of puromycin.

처리받으면 세포질과 핵이 파괴되었으며 부란 후 적은 양(Actinomycin D; 0.01μg, puromycin; 10.0μg 또는 30.0μg)을 처리받으면 소포체의 팽창과 mitochondria의 손상 등이 나타났다.

3: Actinomycin D와 puromycin은 생존계배의 lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase 및 succinate dehydrogenase의 활성을 감소시켰으며 DNA, RNA 및 단백질양도 크게 감소시켰다.

References

Billett, F.S., P. Bowman and D. Pugh. 1971. The effects of actinomycin D on the early development of quail and chick embryos. J. Embryol. exp. Morph. 25, 385~403.
 Boylen, J.B., H.H. Hornb and W.J. Johnson.

1963. Teratogenic effects of thalidomide and related substances. The Lancet 552.
 Cameron, J.M. 1962. Thalidomide and congenital abnormalities. The Lancet 937.
 Choe, R.S., C.N. Joo and C.K. Choi. 1982. Effects of actinomycin D on cell differentiation during the developing rat fetus. J. of NSRI 9, 155~173.
 Christie, G.A. 1962. Thalidomide and congenital abnormalities. The Lancet 249.
 Darken, M.A. 1964. Puromycin inhibition of protein synthesis. Pharmacol. Rev. 16, 233.
 David, D. 1975. DDT et population germinale des gonades embryo-nuaires d'oiseau. Traitement des oerfs a divers stades l'incubation. C.R. Acad. Sci. (Paris) 280, 745~748.

- Fox, N. and C.P. Studzinski. 1982. DNA dependence and inhibition by novobycin and coumermycin of the nucleolar adenosine triphosphatase (ATPase) of human fibroblasts. *The J. of Histochemistry and Cytochemistry* 30(4), 364~370.
- Grubb, R.B. and E.C. Montiegel. 1974. The teratogenic effects of 6-mercaptapurine on chick embryos in vivo. *Teratology* 11, 179~186.
- Hell, A. 1964. The initial synthesis of haemoglobin in de-embryonated chick blastoderms. II. The effect of metabolic inhibitors on the blastodisc cultured in vitro. *J. Embryol. exp. Morph.* 12, 621~632.
- Jelínek, R. and A. Kistler. 1981. Effect of retinoic acid upon the chick embryonic morphogenetic systems. 1. The embryotoxicity dose range. *Teratology* 23, 191~195.
- Joo, C.N. and J.H. Han. 1976. The effect of ginseng saponins on chicken's hepatic mitochondrial succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase. *Korean Biochem. J.* 9(1), 43~51.
- Koenig, H., C. Lu, S. Jacobson, P. Sanghavi and R. Nayyar. 1970. Effects of actinomycin D on RNA transcription, protein synthesis and nuclear structure. In "Metabolic Relation in the Nervous system. (Ed. Lagtha, A.)" Plenum Press. New York.
- Lee, H. and R.G. Nagele. 1979. Neural tube closure defects caused by papaverine in explanted early chick embryos. *Teratology* 20, 321~332.
- Lee, H., R.G. Nagele and J.F. Pietrolungo. 1982. Toxic and teratologic effects of caffeine on explanted early chick embryos. *Teratology* 25, 19~25.
- Longnecker, D.S., H. Shinozuka and E. Farber. 1968. Molecular pathology of in vivo inhibition of protein synthesis. *Electron microscopy of rat pancreatic acinar cells in puromycin-induced necrosis.* *Amer. J. Path.* 52, 891~915.
- Longnecker, D.S. and E. Farber. 1967. Acute pancreatic necrosis induced by puromycin. *Lab Invest.* 16, 321~329.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265~275.
- Molinaro, M., G. Siracusa and V. Monesi. 1972. Differential effects of metabolic inhibitors on early development in the mouse embryo, at various stages of the cell cycle. *Exptl. Cell Res.* 71, 261~264.
- Nagata, K., T. Enmoto and M.A. Yamada. 1981. A system of DNA replication in HeLa nuclei treated with inhibitors of protein synthesis. *Biochemica et Biophysica* 653, 316~330.
- Nagele, R.G., J.F. Pietrolungo, H. Lee and F. Roisen. 1981. Diazepam-induced neural tube closure defects in explanted early chick embryos. *Teratology* 23, 343~349.
- Neilands, J.B. 1955. Lactic dehydrogenase of heart muscle. *Methods in Enzymol.* 1, 449.
- Norseth, T. 1981. The carcinogenicity of chromium. *Environmental Health Perspectives* 40, 121~130.
- Pierro, L.J. and J.E. Coghill. 1968. Interaction in teratogenesis: Actinomycin D, puromycin and deoxyguanosine. *Teratology* 1, 21~32.
- Piper, J.A. and N.W. Klein. 1969. The differential sensitivity of cultured chick mesodermal cells to actinomycin D. *The J. of Cell Bio.* 40, 209~215.
- Reich, E. 1964. Actinomycin: Correlation of structure and function of its complexes with purines and DNA. *Science* 143, 684~689.
- Reich, E., Goldberg, I.H. and M. Rabinowitz.

1962. Structure activity correlations of actinomycins and their derivatives. *Nature, Lond.*, 196, 743~748.
- Schneider, W.C. 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In "Methods in Enzymology. Vol. III (Ed. Colowick, S.P. and N.O. Kaplan)" pp. 680~681, Academic Press Inc., Publishers. New York.
- Schwelchel, J.U. and H.J. Merker. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253~266.
- Seller, M.J. 1962. Thalidomide and congenital abnormalities. *The Lancet* 249.
- Shatkin, A.J. 1962. Actinomycin inhibition of ribonucleic acid synthesis and polio virus infection of HeLa cells. *Biochemi. Biophys. Acta* 61, 310~313.
- Swartz, W.J. 1980. Response of early chick embryos to busulfan. *Teratology* 21, 1~7.
- Weaver, T.E., S. Kaplan and G.M. Rajala. 1981. Vascular hypervolemia and hematoma formation in chick embryos treated with trypan blue. *Teratology* 23, 403~409.
- Wilt, F.H. 1965. Regulation of the initiation of chick haemoglobin synthesis. *J. molec. Biol.* 12, 331~341.

Figure Legends

- Fig. 1.** An electron micrograph of chondrocytes in tarso-metatarsal of 10-day-old chick embryos treated with 0.05 ml saline water prior to incubation. Nuclei (N) are round or oval. Mitochondria (M) and Endoplasmic reticulum (ER) distributed in the cytoplasm. (X 6,000)
- Figs. 2~13.** Electron micrographs of chondrocytes in tarso-metatarsal of 10 day old chick embryos treated with antibiotics.
- Fig. 2.** 0.01 μ g actinomycin D prior to incubation. Cytoplasm and nucleus were severely destructed. (X 6,000)
- Fig. 3.** 0.01 μ g actinomycin D at 48 hours after incubation. A part of cytoplasm was destructed and expansions of endoplasmic reticulum were seen. (X 18,000)
- Fig. 4.** 0.05 μ g actinomycin D at 48 hours after incubation. Cytoplasm was severely destructed. (X 24,000)
- Fig. 5.** 0.01 μ g actinomycin D at 96 hours after incubation. Endoplasmic reticulum was expanded. (X 18,000)
- Fig. 6.** 0.05 μ g actinomycin D at 96 hours after incubation. Mitochondria were severely damaged and expansions of endoplasmic reticulum were seen. (X 15,000)
- Fig. 7.** 0.01 μ g actinomycin D at 144 hours after incubation. Expansions of endoplasmic reticulum were seen. (X 18,000)
- Fig. 8.** 10.0 μ g puromycin prior to incubation. A nuclear membrane and cytoplasm were severely destructed. (X 20,000)
- Fig. 9.** 10.0 μ g puromycin at 48 hours after incubation. Endoplasmic reticulum was expanded. (X 8,000)
- Fig. 10.** 50.0 μ g puromycin at 48 hours after incubation. Cytoplasm was destructed, a nuclear membrane was changed, and chromatin was clumped. (X 18,000)

Fig. 11. 10.0 μ g puromycin at 96 hours after incubation. Endoplasmic reticulum was expanded and mitochondria were damaged. (X 18,000)

Fig. 12. 30.0 μ g puromycin at 144 hours after incubation. Chromatin was clumped, endoplasmic reticulum was expanded, and mitochondrial changes were seen. (X 16,000)





