

Quantification of Ceruloplasmin in Male Rats Exposed to γ -radiation by Enzyme Linked Immunosorbent Assay

In Gyu Kim, Seon Young Park, Kug Chan Kim, Kang Suk Lee
Korea Atomic Energy Research Institute

ELISA방법에 의한 방사선 피폭 후 흰쥐 혈액 내에서의 ceruloplasmin 정량

김인규 · 박선영 · 김국찬 · 이강석
한국원자력연구소

Abstract—Adult male rats were exposed to a whole body with a single dose of 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, and 7.0 Gy. The animals were sacrificed 48, 72, 96 and 216 hours following exposure. A competitive enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) with antigen immobilized on the solid phase has been developed to measure ceruloplasmin in rat serum and complete dose response curves. Ceruloplasmin was purified from the plasma of turpentine treated male rats. Coating of ceruloplasmin had more effectiveness in 10 mM Tris-HCl, 150 mM sodium chloride, pH 7.4 than in 50 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6. The coating range for ceruloplasmin was 70~140 ng/well. Levels of ceruloplasmin increased to maximum on the 72~96 hours after irradiation. Slope of between response and dose was greatest value 96 hours following irradiation. Normal ceruloplasmin levels were not recorded 216 hours following exposure. In 0.1 Gy irradiated group, levels of ceruloplasmin also increased to maximum on the 72~96 hours following irradiation. The concentration of this protein remained significantly different from control value, 196 hours after exposure. Ceruloplasmin was identified as one of the major acute phase protein following irradiation and further studies about gene expression and regulation would be necessary for radiation protection.

Key words : competitive ELISA, antigen, turpentine, ceruloplasmin, plasma, dose reponse curve, coating range

요약—수놈 흰쥐를 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 및 7.0 Gy 선량으로 전신 조사하였으며 조사 후 48, 72, 96시간과 216시간 경과 후 혈액을 채취하였다. 혈액내 ceruloplasmin을 측정하여 선량반응곡선을 완성하기 위하여 항원고정 방식의 경쟁적 효소면역측정법을 사용하였다. Ceruloplasmin의 정제는 turpentine을 주사한 수놈 흰쥐의 혈액을 사용하였다. Ceruloplasmin의 흡착효율은 50 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6보다 10 mM Tris-HCl, 150 mM sodium chloride, pH 7.4에서 더 효과적이었으며 정량을 위한 적절한 ceruloplasmin의 흡착범위는 well 당 70~140 ng이었다. Ceruloplasmin은 피폭 후 72~96시간에서 최대농도를 보

였으며 피폭 후 96시간에서 최대값을 지나는 선량반응관계를 보였다. Ceruloplasmin은 피폭 후 216시간에서도 피폭이전의 농도로 회복되지 않았다. 0.1 Gy로 피폭된 경우에도 ceruloplasmin의 농도는 피폭 후 72~96시간에서 최대로 증가하였으며 단백질의 농도는 대조군과 유의성 있는 변화를 관찰할 수 있었다. Ceruloplasmin은 방사선피폭 후 변화하는 중요한 급성반응물질중의 하나로 밝혀졌으며 방사선방호를 위한 유전자 발현 및 조절에 관한 연구가 필요하다.

중심어 : 항원고정 경쟁적 효소면역측정법, 항원, turpentine, ceruloplasmin, 혈청, 선량반응곡선, 흡착 범위

서 론

급성반응 단백질(acute phase reactant or protein)은 외부의 화학물질, 외상(trauma), 세균감염(infection) 및 염증(inflammation)등 다양한 자극에 의해 혈액내의 농도가 매우 빠르게 증가하는 비특이성 혈액단백질로 알려져 있다[1, 2, 3, 4]. 이 단백질들은 서로 다른 여러 종류의 cytokine(Interleukin-1, 6, 11, Tumor necrosis factor- α , Transforming growth factor- β)과 glucocorticoids등 hormone의 조절하에 간 조직이나 종류에 따라 일부 다른 조직에서 합성되며 매우 넓은 세포 및 조직손상에 대한 방어기능을 가지고 있을 것으로 추정하고 있다[5, 6].

사람의 ceruloplasmin은 급성반응 단백질의 하나로써 분자량은 1,046개의 아미노산으로 구성되어 있다. 종(species)에 따라 분자량은 대략 120,000~130,000 dalton정도이며 α_2 -glycoprotein으로 혈액 내에 존재하는 Cu의 90~95%와 결합하여 순수한 분자는 청색을 나타내며[7] 그 기능은 잘 정의되지 않았지만 ferroxidase, superoxide dismutase 및 phenol, amine oxidase등 다양한 효소적 기능과 혈청내의 항산화물질(antioxidant)로서의 기능을 가지고 있다[8, 9]. 생체 실험에서는 metal ion 유도 지질과산화(lipid peroxidation) 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다[10].

혈액내 단백질의 농도는 Wilson's disease에서 감소하며 류마티스관절염, hyperoxia 및 염증에서 증가한다[11, 12, 13, 14]. 또한 방사선 치료를 받은 환자에서도 free radical을 제거하기 위한 방사선방어(radioprotection) 기능으로써 ceruloplasmin 농도가 증가하였다[15]. 이러한 급성반응에 대한 ceruloplasmin은 외부자극에 대한 중요한 생물학적 지표로써

일부 사용되는데 p-phenylenediamine oxidase의 효소활성(enzyme activity) 측정이나 radial immunodiffusion의 방법으로 의해 정량화 되었다. 일반적으로 염색체이상(chromosome aberration), 돌연변이(mutation), DNA single 그리고 double strand breakage 등은 측정방법 등의 개선으로 방사선피폭에 의한 영향이 상당히 알려져 있으나 ceruloplasmin등 급성반응물질을 비롯하여 다양한 유전자발현의 유도가 생물학적 지표 및 생체영향측면에서 중요성이 점차 증대되고 있지만 보다 효율적이고 신속하며 정밀한 방법이 확립되어 있지 않다. 따라서, 본 연구는 급성반응물질의 외부자극에 대한 반응 및 합성메카니즘이 사람과 거의 유사한 흰쥐를 대상으로 효소면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay : ELISA)을 사용하여 ceruloplasmin의 정량조건을 확립하고 시간 경과에 따라 피폭선량에 대한 반응을 정량적으로 결정하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 시료의 준비

본 연구에 사용된 흰쥐(Sprague-Dawley, male)는 한국인삼연초연구원에서 분양받아, 항온사육실에서 온도와 습도를 23°C, 40~50%로 유지시키면서 사육하였다. 생후 9~10주가 된 흰쥐를 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 및 7.0 Gy로 전신조사(^{60}Co γ -ray)시킨 후 48, 72, 96 및 216 시간 경과 후 diethylether로 마취시켜 각각의 후대정맥(vena cava posterior)에서 채혈하였다. 혈액은 실온에서 30분간 응고시킨 후 4°C, 3500g(Sorval RC-5B, USA)에서 20분간 원심 분리하여 얻은 혈청을 ceruloplasmin의 정제와 ELISA 정량시 시료로 사용

하였다.

Ceruloplasmin의 정제

Ceruloplasmin은 단백질 분해효소에 의해 매우 빠르게 분해되므로 이들에 의한 영향을 최소로 줄이기 위해 흰쥐의 혈청에 최종 농도가 2mM이 되게 phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF)로 처리하였다. Ceruloplasmin은 chloroethylamine-Sepharose와 Zn-iminodiacetic acid-Sepharose(Sigma, USA)를 사용하여 정제하였다. Chloroethylamine-sepharose gel은 Calabrese와 Morris의 방법에 의해 합성하였다[7, 16].

Sepharose CL-6B 100 g을 4°C의 5N NaOH 250 ml에 넣어 0°C, 45분 동안 교반하여 반응시켰다. Epichlorohydrin 100 ml를 첨가하여 상온에서 24시간 동안 반응시킨 후 70°C에서 다시 45분 동안 반응을 시켰다. 그 후 10N NaOH 150 ml를 첨가하고 0°C를 유지시키면서 150 g의 chloroethylamine을 첨가하여 열이 발생하지 않을 때까지 교반한 후 70°C에서 2시간 동안 반응시켜 affinity gel로 사용하였다.

Zn-iminodiacetic acid-sepharose에 의한 정제는 Porath방법[17]을 고려하여 완충용액중 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl과 100 mM phosphate buffer, pH 6.5을 선택, 정제하였다. 정제된 단백질은 polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 순순하게 정제되었음을 확인하였다.

단백질 정량

단백질은 ovalbumin을 표준단백질로 사용하여 Bradford[18] 방법에 의해 정량 하였다.

항체의 준비

순순하게 정제된 ceruloplasmin 500 µg을 0.5 ml의 phosphate buffered saline(PBS)에 녹여 동량의 Freund's complete adjuvant로 유화시킨 후 1주일 간격으로 근육주사를 4회 근육주사하였다. 마지막 근육 조사한 6일 후 심장천공법으로 혈액 60 ml를 채혈하였다. IgG는 ammonium sulfate 0~33%의 침전 분획을 얻어 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 투석시킨 후 DEAE-Sepharose column과 Blue-Se-

pharose column으로 정제하였다.

효소면역측정법(ELISA)

각 혈청내 ceruloplasmin의 양은 항원고정 경쟁적 효소면역측정법(antigen immobilized competitive ELISA)으로 실시하였다. 정제된 ceruloplasmin을 10 mM Tris-HCl, 150 mM sodium chloride, pH 7.4 (TBS)으로 희석하여 flatted bottom microtiter plates (Costar 9018)에 100 µl씩 넣어 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 그 후 0.05% Tween 20을 함유하고 있는 TBS(TBS-tween)와 TBS로 3회씩 세척하였다. 표준 곡선과 시료의 정량을 위하여 항체 및 항원과 측정 혈청을 TBS-tween으로 2배씩 연속적으로 희석하여 사용하였다. 항체의 농도는 10 µg/ml로 결정하였다. 각각의 well에 혈청과 항체를 50 µg씩 취하여 교반 하면서 항원-항체반응을 시켜준 후 상기와 동일한 방법으로 세척하였다. Horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-rabbit IgG에 대한 항체를 TBS-tween으로 1/3000로 희석하여 각 well에 100 µl씩 넣은 후 2차 항원-항체반응을 시켰다. 상기의 모든 반응은 37°C에서 1시간 동안 실시하였다. Well을 다시 3회 세척한 후 o-penylendiamine 10 mg과 35% H₂O₂, 10 µl을 첨가한 50 mM phosphate-citric acid buffer, 25 ml(pH 5.0)를 사용하여 well에 100 µl씩 넣고 37°C에서 10분간 발색시켰다. 효소에 의한 발색반응은 3.0M 황산용액을 100 µl을 첨가하여 정지시키고 492 nm에서 ELISA reader(Bio-Rad model 450)로 측정 하였다.

결과 및 고찰

항체 형성을 위한 단백질의 분리

흰쥐의 경우 분리된 혈청내의 ceruloplasmin은 단백질 분해효소인 plasmin에 의하여 분해되기 쉬우나 사람의 ceruloplasmin 분자처럼 분해효소에 민감하지는 않다. 그러나 채취된 혈청은 이러한 현상을 최소화 하기 위하여 동결보관하지 않고 바로 정제과정으로 들어간다[19]. 그림 1A는 흰쥐 혈청을 chloroethylamine-Sepharose에 통과시켜 얻은 단백질 분리

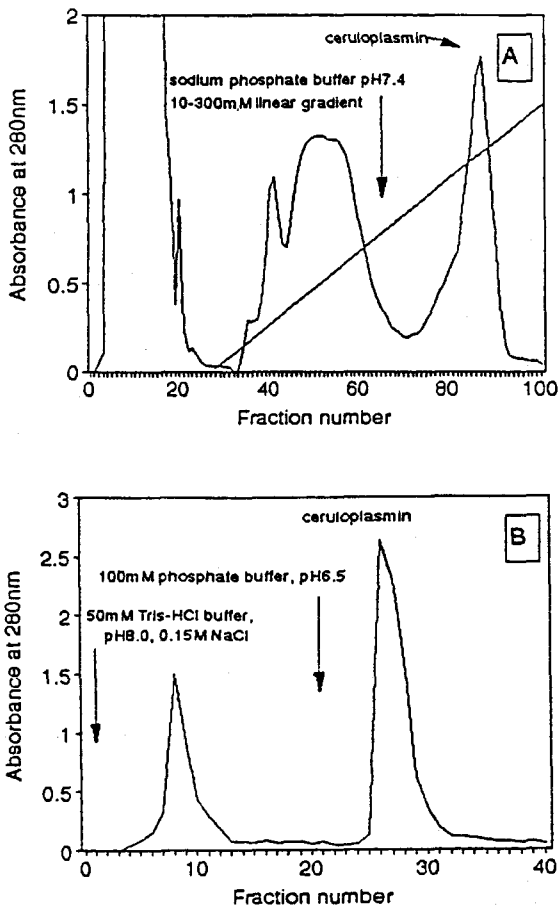


Fig. 1. Chromatographic purification of ceruloplasmin from rat blood serum. A) Chloroethylamine-Sepharose affinity chromatography, B) Zn-Imminodiacetate affinity chromatography.

양상을 보여주고 있다. Chloroethylamine-Sepharose에 흡착된 단백질은 sodium phosphate buffer, pH 7.4로 10~300mM 사이의 농도구배로 단백질을 분리하였다. 사람과는 달리 흰쥐의 ceruloplasmin에 대한 항체를 얻기 위한 단백질분리의 경우 상기의 단일 분리방법만으로는 부족하다. 따라서 Porath방법에 의하여 chloroethylamine-Sepharose방법에 의하여 분리된 분획을 Zn-iminodiacetic acid-sepharose에 통과시켜 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl로 미리 용출시키고 여기에 결합되어 있는 ceru-

loplasmin을 100 mM phosphate buffer, pH 6.5로 용출시키면 항체 형성을 위한 고순도의 단백질이 분리된다(그림 1B). 정제된 단백질의 순도는 변성 및 비변성방법의 전기영동방법을 사용하여 확인하였다(그림 2).

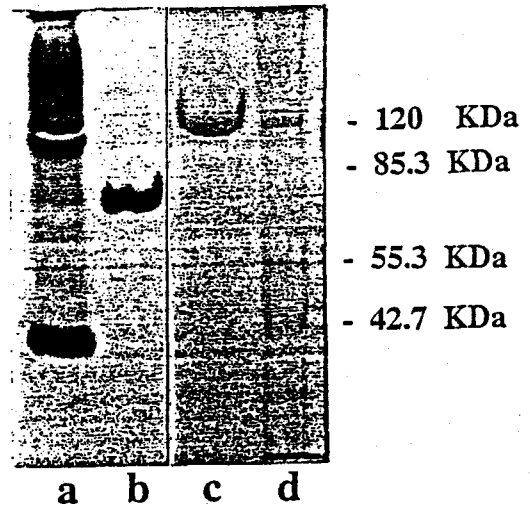


Fig. 2. Native(a, b) and SDS(c, d) polyacrylamide gel electrophoresis of purified ceruloplasmin. a) crude serum, b,c) purified ceruloplasmin, d) protein markers.

효소면역 측정법의 표준화

정량적인 방법으로 항원고정 경쟁적 효소면역측정법을 시행할 경우 항원 및 항체의 양을 결정하기 위하여 항원 흡착 최적조건과 항체의 양 등을 결정하여야 한다. 단백질의 흡착은 단백질의 소수성(hydrophobicity)이 중요하며 이는 단백질이 용해되어 있는 용매의 pH에 의한 net charge와 관련이 있다. 그림 3A는 간접방법의 ELISA를 사용하여 microtiter plates에 정제된 항원인 ceruloplasmin의 흡착효율을 관찰한 것이다. 흡착효율은 pH 9.6(0.1M carbonate buffer)보다 pH 7.4(TBS)에서 높으며 같은 pH에서도 PBS보다는 TBS에서 흡착효율이 좋은 것으로 나타났다. 이러한 이유는 ceruloplasmin의 pI점이 대략 4.5~5.5으로 pH가 낮을 수록 소수성이 증가하는 것으로 생각된다. 현재 혈액내 ceruloplasmin의 정량을

위하여는 항원의 흡착량을 TBS에서 70 ng~140 ng으로 첨가되는 항체의 양은 800 ng으로 결정하였다. 그림 3B는 대표적인 표준곡선을 나타낸 것으로 표준곡선 작성을 위한 경쟁적 항원(competitive antigen)의 working range는 0.01 µg~20 µg/100 µl 이었다. 일반적으로 많은 양의 시료를 측정하기 위하여 coefficient of variation(CV)값을 측정하지만 데이터의 정확성을 위하여 측정할 때마다 표준곡선을 작성하여 시료를 정량화하였다.

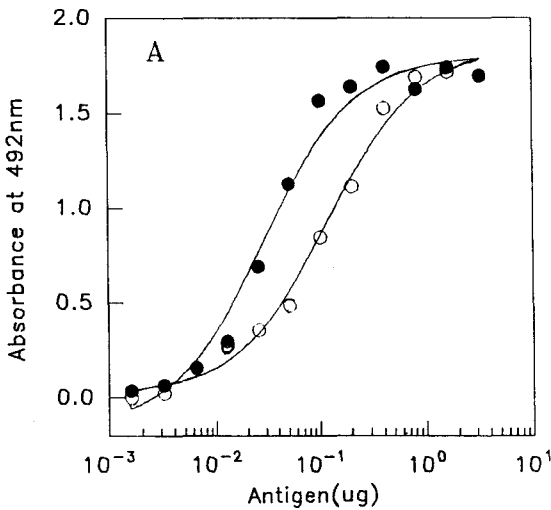


Fig. 3A. Coating efficiency of purified rat ceruloplasmin to the microtiter plate. (○), pH 9.6; (●), pH 7.4.

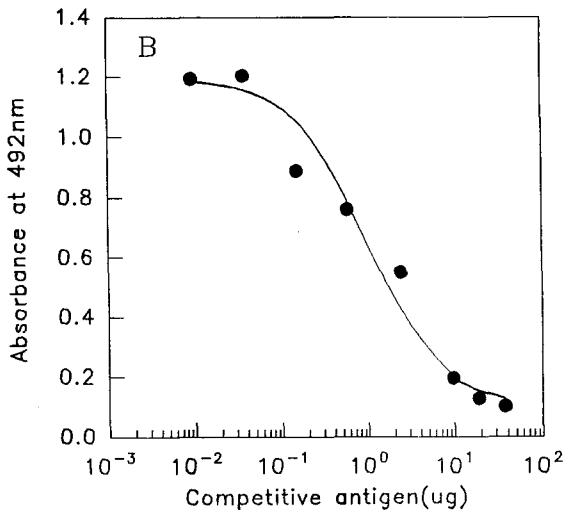


Fig. 3B. Typical competitive ELISA standard curve for ceruloplasmin.

방사선 피폭 후 ceruloplasmin의 변화

각 선량에 따라 피폭 후 48, 72, 96 및 216 시간대에서 나타나는 선량반응곡선은 그림 4와 같다. 전반적으로 선량반응곡선은 line 형태의 반응곡선을 보이고 있으며 48($y=172x+446$)시간 이후 96시간($y=534x+526$)까지 slope가 증가되는 선량반응관계를 나타내고 있다. 216시간 경과후에는 96시간대보다 slope가 떨어지는 선량반응곡선을 보이고 있으나 정상적인 수준보다는 높은 혈청내 농도를 유지하고 있다 ($y=368x+428$). 그림 5는 1.0 Gy 이하선량에서도 혈청내 변화가 일어나는지를 관찰하기 위하여 0.1 Gy에서 시간경과에 따른 ceruloplasmin의 혈청내 변화를 나타낸 것이다. 방사선 피폭 후 72시간과 96시간 사이에서 최고 농도를 보이고 있으며 증가된 ceruloplasmin은 196시간까지 혈중농도를 유지하고 있다. 0.1 Gy와 대조군사이에서 유의성 있는 차이를 확인하기 위하여 paired t test를 사용한 결과 $t=3.61, p<0.05$ 를 나타냄으로서 대조군과 선량간에는 유의성 있는 변화를 관찰할 수 있었다. 이러한 경향성은 rat, syrian hamster 및 bovine을 대상으로 실시한 실험에서 방사선이 아닌 turpentine을 주입하였을 경우와 비슷한 양상을 보이고 있다[4, 13]. 특히 이러한 선량에서의 변화는 현재 조사하고 있는 다른 급성반응물질보다는 낮은 선량한계를 가지고 있는데 이러한 현상으로 대부분의 급성반응물질이 간에서 합성되어지는 반면 이러한 ceruloplasmin은 간의외의 합성장소에서 만들어질 가능성을 배제하지 못한다. 특히 근래에 이르러 사람과 흰쥐의 림프구세포 등, 면역세포에서 낮은 수준이지만 human liver cell line인 HepG-2 세포와 비교할 때 0.2% 정도 ceruloplasmin의 gene이 발현된다고 보고되고 있다[20]. 현재 효소면역측정법에 의한 ceruloplasmin의 정량측정의 장점은 과거 amylase, GOT등 대부분의 혈액효소계등의 측정선량하한치가 보통 1~2 Gy 이었으나[21] 0.1 Gy에서도 변화가 있다는 것이며 이와 함께 정량방법 및 조건의 개선으로 96 plates의 분석시간이 3~5시간 안에 이루어질 수 있어 체르노빌과 같은 대형사고시 빠른 시간 내에 대량의 시료를 신속하게 1차적인 피폭유무를 screening을 할 수 있다는 점이다. 이러한 ceru-

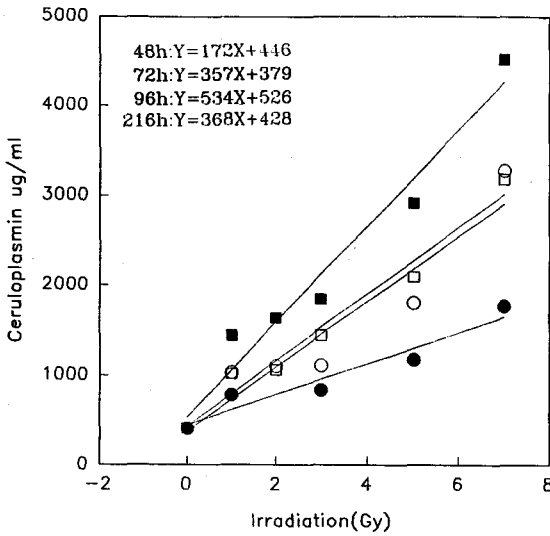


Fig 4. Dose response curves by changes in concentration of ceruloplasmin. Each data represents mean value (n=5, independent experiment). (●), 48 hours; (○), 72 hours; (■), 96 hours; (□), 216 hours.

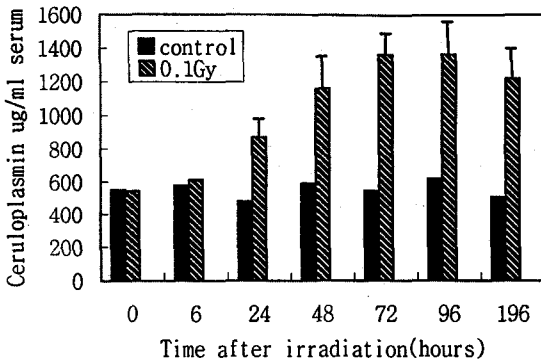


Fig. 5. Levels of blood ceruloplasmin in 0.1 Gy irradiated rat. Each data represents mean value and the bars indicate the standard deviation (n=6, independent experiment).

loplasmin의 합성과정은 rat와 mouse의 경우, 메카니즘이 사람과 동일하며 분자적 특성 및 기능 역시 사람과 유사하기 때문에 [6, 7, 19] 합성기관 및 개체의 방사선피폭에 대한 민감도 등을 고려한다면 충분히 적절한 적용성을 가지는 방사선피폭의 생물학적 지

표로서의 가능성을 가지고 있다. 한편 사람의 경우 ceruloplasmin은 연령 [22], 질병 등에 의하여 혈액내 단백질 농도가 다르기 때문에 사고시 피폭 후 수년이 지난 경우와 방사선치료환자 등의 만성영향 등의 추적자의 대상으로 연구할 가치도 고려할 수 있으리라 생각한다.

결론

본 실험에서 0.1 Gy에서도 유의성 있는 변화를 볼 때 저선량방사선에 반응하는 중요한 지표로서의 가능성과 대량의 시료를 빠른 시간안에 정량할 수 있는 지표로서 뿐만 아니라 방사선치료환자들의 만성영향 등을 추적할 수 있는 기능으로서의 가능성도 고려할 수 있으리라 본다. 한편 ceruloplasmin을 비롯한 대부분의 급성반응물질은 주된 기능이 단정적으로 밝혀진 면은 없으나 Cu이온의 운반기능이외에 밝혀진 각각의 부분적 기능을 살펴볼 때 세포 및 조직손상의 방어기능 등 host defense기능에 관련이 있을 것으로 추정하고 있고 단백질 합성자체가 간에서 합성되어 혈액내에서 순환된다는 보고 이외에 일부 다른 세포군, 특히 면역세포에서도 합성된다는 사실로 살펴볼 때 방사선 생체영향의 방어적 측면에서 유전자 발현의 modulation기능 등을 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

이 논문은 과거처 국가 원자력 중장기 연구개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고 문헌

1. S. P. Kunapuli and A. Kumar, "Induction of the ceruloplasmin mRNA in Balb/C 3T3 cells after rous-sarcoma virus transfection." *Cancer Letters*. 35, 173-179(1987).
2. A. R. Aldred, A. Grimew, G. Schreiber and J.

- F. B. Mercer, "Rat ceruloplasmin." *J. Biol. Chem.* 262(6), 2875-2878(1987).
3. K. Zahedi, W. A. Gonnerman, F. C. Debeer, M. C. Debeer, D. M. Steel, J. D. Sipe and A. S. Whitehead, "Major acute-phase reactant synthesis during chronic inflammation in amyloid-susceptible and-resistant mouse strains." *Inflammation* 15(1), 1-14(1991).
 4. J. G. Conner, P. D. Eckersall, A. Wiseman, T. C. Aitchison and T. A. Douglas, "Bovine acute phase response following turpentine injection." *Res. Vet. Sci.* 44, 82-88(1988).
 5. C. Richards, J. Gaudie and H. Baumann, "Cytokine control of acute phase protein expression." *Eur. Cytokine Netw.* 2, 89-98(1991).
 6. H. Baumann and J. Gaudie, "The acute phase response." *Immunol. Today.* 15, 74- 80(1994).
 7. L. Calabrese, M. Carbonaro and G. Musci, "Chicken ceruloplasmin." *J. Biol. Chem.* 263(14), 6480-6483(1988).
 8. F. W. Sunderman, Jr and S. Nomoto, "Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity." *Clin. Chem.* 16(11), 903-910(1970).
 9. S. Osaki, D. A. Johnson and E. Frieden, "The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum." *J. Biol. Chem.* 241(12), 2746-2751(1966).
 10. D. J. Altimini and T. L. Dormandy, "The inhibition of lipid autooxidation by human ceruloplasmin." *Biochem. J.* 168, 283-291(1977)
 11. S. A. Moak and R. A. Greenwald, "Enhancement of rat serum ceruloplasmin levels by exposure to hyperoxia." *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 177, 97-107(1984).
 12. H. P. Roeser, G. R. Lee and G. E. Cartwright, "Role of ceruloplasmin in hypoferrremia associated with chronic inflammation and endotoxin." *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 142, 1155-1163(1973).
 13. J. D. Gitlin, "Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation." *J. Biol. Chem.* 263(13), 6281-6287(1988).
 14. M. C. Powanda, "Systematic alterations in metal metabolism during inflammation as part of an integrated response to inflammation." *Agent and Actions Suppl.* 8, 121-129(1981).
 15. K. Chlebovska and O. Chlenovsky, "Serum proteins in rats irradiated continuously over a long period at diminishing radiation dose rates." *Physiol. Bohemislov.* 35(2), 134-139(1986).
 16. S. J. Morris, "The fraction of yeast tRNA and proteins on nucleoside derivatives of cellulose." *J. Chromatog.* 82, 349-357(1973).
 17. J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson and G. Belfrage, "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." *Nature.* 258, 598-599(1975).
 18. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyeing." *Anal. Biochem.* 72, 248-254(1976).
 19. T. P. Ryan, T. A. Grover and S. D. Aust, "Rat ceruloplasmin resistance to proteolysis and kinetic comparison." *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 1-8(1992)
 20. Y. Pan, K. Katula and M. L. Failla, "Expression of ceruloplasmin gene in human and rat lymphocytes" *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expr.* 1307, 223-238(1996)
 21. C. Lushbaugh, "Current status of biological indicators to detect and quantify previous exposure to radiation." *Health phys.* 60, 103-109 (1991)
 22. G. Musci, D. C. B. Patti, U. Fagiolo and L. Calabrese "Age-related changes in human ceruloplasmin." *J. Biol. Chem.* 268(18), 13388-13395 (1993).