

Ascorbate의 방사선 보호효과에 관한 연구

서해대학 방사선과
김동윤 · 박영순

- Abstract -

Radioprotective Effect of Ascorbate in the Liver of γ -Irradiated Mice

Dong Yun Kim · Young Soon Park

Department of Radiological technology, Sohae College

In the present study, to determine whether the ascorbate protect against radiation damage and the possible relationship among the radioprotective effects and antioxidant actions, the effects of ascorbate(240 mg/kg, i.p) pretreatment of mice on the survival ratio, splenic weight, major antioxidant enzymes(SOD, catalase and glutathione peroxidase) activities, glutathione contents and lipid peroxidation in the liver were examined for 2 weeks after whole-body γ -irradiation(6.5 Gy). The 30-day survival ratio increased from 10% to 47% for mice treated with ascorbate. The ascorbate decreased the extent of loss in splenic weight and stimulated recovery of splenic weight in irradiated mice($p < 0.01$). On the day of 14 after γ -irradiation, the ascorbate pretreatment produced a slight increase of antioxidant enzymes activities and significantly increased reduced glutathione(GSH) contents($p < 0.05$) in the liver compared with non-treated group. Pretreatment with the ascorbate significantly decreased GSSG/total GSH ratio($p < 0.05$) without the change of GSSG in the liver and inhibited the radiation-induced increase in the hepatic malondialdehyde levels($p < 0.05$). In these results, we found that its radioprotective effect by protecting antioxidant enzyme activities and glutathione contents from radiation induced a decrease, and thereby suppressing lipid peroxidation which is induced by free radicals.

I. 서 론

포유류는 호흡과정에서 소량의 활성산소종($\cdot O_2^-$: superoxide radical, 1O_2 : singlet oxygen, $\cdot OH$: hydroxyl radical, H_2O_2 : hydrogen peroxide)이나 지방산과 반응하는 alkoxy radicals($RO\cdot$), peroxy radicals($ROO\cdot$)과 같은 반응성이 강한 유리기들이 생성된다¹⁾. 이러한 유리기들은 자외선이나 감마선 조사와 같은 물리적 자극에 의해 생성이 촉진되며 방사선 장애의 발생기전은 조직내 물의 방사선 분해과정에서 생성되는 유리기들에 의한 간접작용의 결과라고 알려져 있다. 생체조직이 방사선 에너지를 흡수하면 조직의 물분자와 여기, 전리작용에 의해 개시되는 물리화학적 단계에서 hydrogen atom($\cdot H$), hydrated electron(e_{aq}^-) 그리고 hydroxyl radical($\cdot OH$)과 같은 일차 유리기들이 형성되며, 일차적으로 생성된 유리기들은 용존산소나 철, 구리 등 전이금속의 존재 하에 여러 반응 단계를 거쳐 2차 유리기들(superoxide radical, hydrogen

peroxide, alkoxy radical, peroxyradical 등)을 생성하게 된다²⁾.

이러한 유리기들은 생체 내에서 단백질의 SH기나 DNA와 반응하여 화학결합의 절단이나 가교결합의 형성 등 생체 구성 분자의 구조적 변화를 야기 시키고 이로 인해 효소활성의 저하와 DNA, 지질 및 단백질 등을 손상시킬 뿐만 아니라 세포막의 불포화지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화가 유발된다. 과산화지질의 증가는 세포에 산화적 손상을 주어 기관의 생리적 기능을 저하시킴으로서 동맥경화, 당뇨병, 심장병 및 암 등의 여러 질병을 초래하여 결국에는 노화와 유전적장애의 원인이 되는 것으로 알려져 있다³⁾.

그러나 생체에는 이와 같은 유리기들의 유해한 작용에 대하여 효율적으로 조절할 수 있는 방어체계를 갖추고 있으며 그 방어기전은 생체 내에 항산화 활성물질이 존재하여 유리기들의 생성을 억제하거나 생성된 유리기들을 제거하기 때문이라고 밝혀져 있다⁴⁾. Superoxide dismutase(SOD)는 superoxide radical을 과산화수소로 전환

시키는 반응을 촉매하는 효소이며, glutathione, tocopherol, ascorbate 등의 항산화 물질은 유리기들을 포착 제거하는 radical scavenger로서 작용한다. 또한 catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소는 과산화수소나 지질 hydroperoxide(LOOH)를 분해하므로써 세포독성의 최종 매개인자로 작용하는 alkoxy radical이나 hydroxyl radical의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

유리기 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인하여 야기되는 지질과산화 반응은 항산화 효소의 활성 및 glutathione의 항산화 작용과 관련이 있는데, 고선량의 방사선 조사로 인한 SOD 활성 저하는 지질과산화를 촉진시키며 저선량의 방사선 조사로 SOD 활성이 증가되어 지질과산화가 억제되었다는 보고⁷⁾들이 있다. 또한 환원형 glutathione(GSH)도 유리기의 scavenger로서 그리고 H₂O₂ 및 과산화지질을 대사시키는 glutathione peroxidase의 기질로서 세포내 항산화제들 중에서 중요한 역할을 담당하고 있는데, 생체내 glutathione의 결핍은 지질과산화 반응을 촉진시키며 환원형 GSH, 산화형 GSH(GSSG) 및 GSSG/GSH 비율의 측정은 조직세포내의 redox 및 detoxification 상태의 평가에 중요하며 GSSG 형성은 활성 산소종 생성의 유용한 정량적 지표가 되기 때문에 지질과산화 정도나 조직손상의 유발과 직접적으로 관련되어 있는 것으로 생각되고 있다⁸⁾. 따라서 생체조직에서 고선량의 방사선 조사로 인한 유리기 생성의 증가는 생체내 항산화 효소들의 활성 저하나 glutathione 등의 항산화제 함량 감소를 야기 시킴으로써 지질과산화 반응이 촉진되며 이때 항산화제의 첨가는 과산화 지질의 생성을 효과적으로 억제할 수 있기 때문에 전리방사선으로 인한 장애로부터 생체 방어능력이 향상 될 것으로 생각된다.

생물체에서 유리기들에 의한 생화학적 손상은 방사선 조사 후 일반적으로 수초에서 수일 동안 지속적으로 발현되며 생물학적 손상은 DNA, RNA, 효소와 같은 거대 분자의 생화학적 변화단계를 거쳐 발생되어 neoplasia와 같은 병리학적인 손상을 받기까지는 오랜 시간이 경과하게 된다. 이러한 장애 발생과정에서 방사선에 의한 손상을 경감시키는 작용이 있는 생체 내·외의 화합물을 방사선 보호제라 하며 그러한 물질로서는 cysteine, cystamine 등과 같은 -SH계 화합물이나 [S-2-(3-Aminopropylamino) ethylphosphorothiotic acid : WR 2721]과 같은 sulfhydryl 화합물⁹⁾이 알려져 있다. 이러한 방사선 보호제의 작용기전은 대부분 분자적 수준, 세포적 수준 및 개체적 수준에서 각각 다르나 thiols 화합물은 유리기와 반응성이 강하기 때문에 유리기에 수소 원자를 제공하여 비교적 반응성이 약한 thiol radicals를 생성시키며 thiol radicals들은 주로 무독성의 disulfide 화합물을 형성시킴으로써 (RSH + R'· → RS· + R'H, RS· + RS· → RSSR) 방사선 보호작용을 나타낸다는 수소원자 전달설과 일반적으로 thiols 화합물은 산화되기 쉽기 때문에 산소를 많이 소비하여 조직내 용액의 산소분압을 낮추어 방사선에 의한 산소효과를 경감시킨다는 저산소 상태설이 제시되고

있다¹⁰⁾. 그러나 방사선 보호제로서 가장 효과적인 것으로 알려진 WR 2721도 투여시 메스꺼움, 구토 또는 순환계의 교란 등의 부작용으로 실제 임상에서의 이용은 제한적이다.

대부분의 방사선 보호제가 유리기 scavenger로 작용하여 유리기에 의한 지질과산화와 조직의 산화적 손상을 억제한다는 사실과 수용성인 ascorbate의 항산화 작용기전은 세포내 지질수용성 부분내의 ·O₂⁻이나 RO·들과 같은 유리기를 분해하며 지질 과산화 과정에서 다불포화 지방산이 파괴되는 산화적 손상을 보호함으로써 결과적으로 지질막을 보호하기 때문이라는 주장¹¹⁾들을 종합하여 볼 때 ascorbate의 방사선 보호효과의 작용기전은 항산화 작용과 관련이 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 생쥐에 반치사선량 정도의 감마선 조사 전에 항산화제로 알려진 ascorbate를 투여한 다음, 간조직에서의 SOD, catalase, glutathione peroxidase의 활성과 환원형 glutathione(GSH), 산화형 glutathione(GSSG) 및 지질과산화의 최종 산물인 MDA의 함량을 측정하고 급성 방사선 장애에 따른 30일 생존율, 비장의 무게 변화 등을 검사하여 방사선 조사로 인한 항산화 효소들의 활성 및 glutathione의 함량 변화가 지질과산화에 미치는 영향과 ascorbate의 항산화 작용과 방사선 보호효과와의 상호관련성에 대하여 검토하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 4주령의 ICR계 수컷 생쥐를 실온이 24±4℃로 유지되는 사육실에서 사료와 물을 자의로 먹을 수 있게 하였다. 분양받은 생쥐는 이와 같은 조건에서 일주일간 적응시킨 후 각 실험군으로 분류하였으며 실험에는 체중이 20~25g인 생쥐만을 사용하였다. 생쥐에 투여한 ascorbate 및 실험에 사용한 표준시약은 Sigma사 제품을 사용하였으며 기타 시약은 일급시약을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험동물 처리

체중 20~25g의 수컷 생쥐 5마리를 1군으로 하여 정상 대조군, 생리식염수 투여 후 방사선조사군(R), ascorbate 투여 후 방사선조사군(A + R)으로 분류하였다(Table 1).

Ascorbate의 투여는 방사선조사 24시간 전에 ascorbate를 생리식염수에 녹여 240mg/kg/0.1ml 용량으로 복강주사하였으며 ⁶⁰Co gamma 선원을 이용하여 6.5Gy(1.01Gy/min)의 선량을 1회 전신조사 하였다. 급성방사선장애에 따른 30일 생존율을 검사하기 위해서는 생쥐를 각 실험군당 30마리씩 분류하여 이상과 같은 방법으로 처리하였

Table 1. Classification of experimental groups

Groups*	Irradiation	Ascorbate
	(Gy/whole body)	(mg/kg, body wt.)
Control	-	-
R	6.5	-
A+R	6.5	240

* Control : saline(0.1 ml) was only intraperitoneally(ip) injected, R : saline was ip injected at 24 hr before γ -irradiation, A + R : ascorbate was ip injected at 24 hr before γ -irradiation.

으며 방사선조사 후 30일간 동일조건으로 사육하면서 1일 2회씩 생존여부를 조사하였다.

2) 분석시료 제조

감마선조사 후 4시간, 1일, 3일, 7일 그리고 14일째에 16시간 절식시킨 생쥐는 경추탈구로 희생시켜 간을 적출하여 차가운 생리식염수로 세척한 다음 무게를 달고 간 조직을 얼음 결정상태의 생리식염수에 넣어 세절하고 3회 수세하여 혈액을 제거하였으며 sucrose/EDTA(0.25 M/1 mM) 용액내에서 마쇄기(Potter-Elvehjem homogenizer)로 분쇄하여 10% 균질액을 만들었다. 간 균질액을 원심분리(1,000×g, 10분)하여 얻어진 상등액을 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 활성 및 지질과산화(malondialdehyde : MDA) 함량의 측정시료로 사용하였다. 위 상등액 일부를 취하여 다시 원심분리(15,000×g)하여 얻어진 상등액을 total glutathione(GSH+GSSG)과 glutathione disulphide(GSSG) 함량 측정시료로 사용하였으며 이상의 모든 조작은 0~4°C에서 시행하였다.

3) 효소의 활성화 측정

Total SOD이 활성은 Flohe와 Otting¹²⁾의 ferricytochrome c reduction assay에 의하여 측정하였으며 SOD 활성도는 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

Catalase의 활성은 Aebi¹³⁾의 방법에 따라 측정하였으며 활성도는 1분 동안에 1 μ mol의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 표시했다.

Glutathione peroxidase 활성은 Flohe 등¹⁴⁾의 방법으로 측정하였으며 단위는 분당 산화된 NADPH μ mol를 효소 활성으로 하였다.

4) Glutathione 함량의 측정

간조직에서의 total glutathione(GSH+GSSG)와 산화형 glutathione(GSSG) 함량은 Tietze 방법을 변형한 Griffith의 방법¹⁵⁾에 의해 측정하였다.

5) 지질과산화 수준의 측정

측정시료의 지질과산화 수준은 지질의 과산화의 최종 산물인 malondialdehyde(MDA)를 Ohkawa 등¹⁶⁾의 tri-

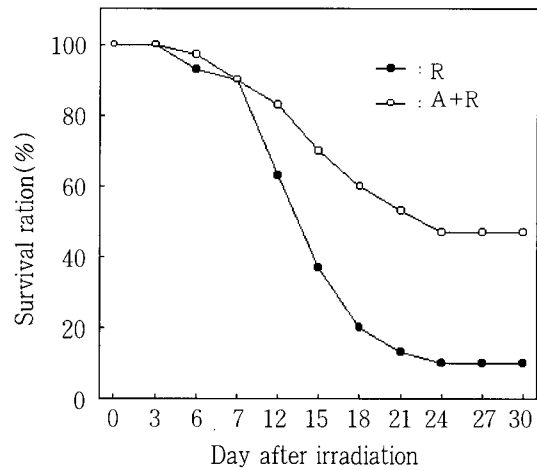


Fig. 1. Effects of ascorbate on 30 days survival ratio of γ -irradiated mice. —●— : γ -irradiated group, —○— : ascorbate treated before γ -irradiated group.

babutaric acid(TBA)법에 의해 측정하였으며 표준 검량선을 얻기 위하여 1,1,3,3, - tetramethoxypropane(TMP)을 표준품으로 사용하였다.

6) 단백질 정량 및 실험결과의 유의성 판정

단백질의 함량은 Lowry 등¹⁷⁾의 방법으로 측정하였으며 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하였다. 한편, 모든 실험 결과의 통계처리는 Sigma plot에 의한 student's t-test를 이용하여 상호 유의성을 검정하였다.

III. 실험결과

1. 생존율의 변화

생쥐에 ascorbate(240 mg/Kg)을 투여한 후 6.5 Gy의 감마선을 1회 전신조사하고 급성방사선장해로 인한 생존 여부를 검사한 결과, 생쥐들은 대부분 10~20일 사이에 치사되었으며 30일 생존율은 방사선조사전 생리식염수 투여군이 10%인데 비해 ascorbate 투여군은 47%로서 모두 유의성있는 증가를 보였다(Fig. 1).

2. 비장 무게의 변화

생쥐 체중당 비장 무게비의 변화는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 정상대조군의 체중당 비장 무게비는 0.89±0.10%이었으나 방사선조사로 인한 생쥐 체중당 비장 무게비는 방사선조사 직후부터 급속히 감소하여 3일후에는 0.16±0.02%로 대조군의 18%로 가장 낮았으며 14일후에는 0.32±0.04%로 점차 증가하는 경향을 보였다. 방사선조사전에

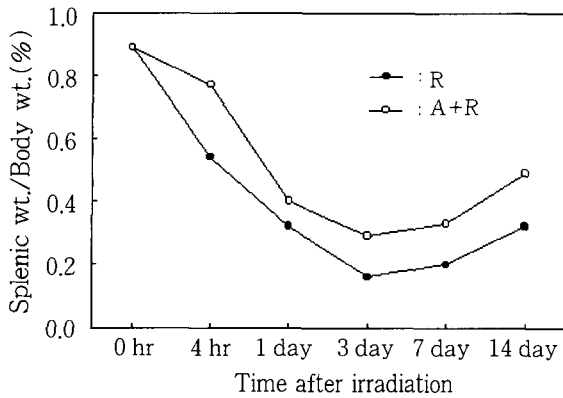


Fig. 2. Time-dependent changes of relative splenic weight affected ascorbate and post-irradiation. —●—: γ -irradiated group, —○—: ascorbate treated before γ -irradiated group.

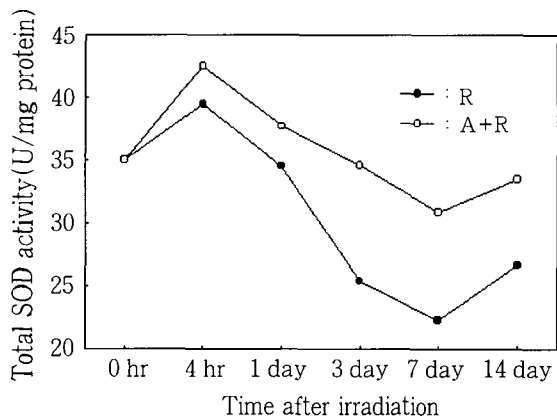


Fig. 3. Time-dependent changes of total SOD activities affected ascorbate and post-irradiation. —●—: γ -irradiated group, —○—: ascorbate treated before γ -irradiated group.

ascorbate를 투여한 군에서도 방사선조사후 감소하여 3일 후에 $0.29 \pm 0.04\%$ 로 가장 낮은 값으로 대조군에 대하여 33%로 감소하였으며 점차 증가하여 방사선조사 후 14일째에는 방사선조사 전 생리식염수 투여군에 비하여 1.53 배 빠르게 회복되는 경향을 보였다.

3. 생쥐 간에서 항산화 효소의 활성변화

생쥐에 ascorbate를 투여한 후 6.5 Gy의 감마선을 전신 조사한 다음 4시간, 1일, 3일, 7일 그리고 14일째 간조직에서의 total-SOD 활성도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같이 정상대조군에서는 34.94 ± 1.22 U/mg protein이었으며 방사선 조사전 생리식염수만을 투여한 군에서의 SOD 활성은 방사선조사 직후에 약간 증가한 후 감소하기 시작

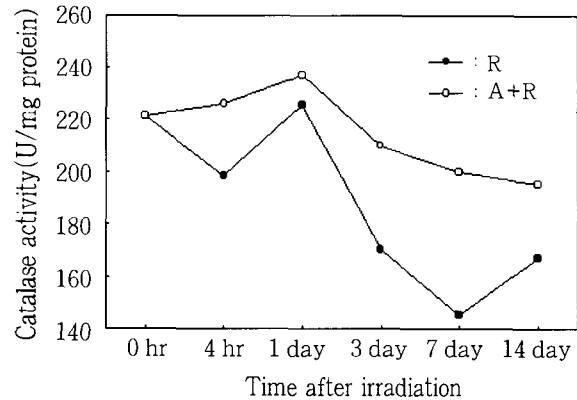


Fig. 4. Time-dependent changes of catalase activities affected ascorbate and post-irradiation. —●—: γ -irradiated group, —○—: ascorbate treated before γ -irradiated group.

하여 7일째에 22.30 ± 1.61 U/mg protein으로 가장 낮은 활성도를 보인 다음 방사선조사후 14일째에는 약간 증가하는 경향을 보여 정상대조군에 대하여 67%의 활성을 보였다. 방사선 조사전에 ascorbate를 투여받은 생쥐 간에서의 SOD 활성 변화는 방사선 조사후 초기에 약간 증가한 후 감소하였으나 그 감소폭은 방사선조사전 생리식염수 투여군에 비하여 둔화되었으며 7일째에 22.86 ± 1.87 U/mg protein으로 최저치를 나타낸 후 14일째에는 활성이 증가하여 방사선조사전 생리식염수 투여군에 비하여 32% 상승되었다.

방사선조사 전에 생리식염수 및 ascorbate 투여로 인한 생쥐 간에서의 시간 경과별 catalase의 활성도 변화는 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 정상대조군의 활성은 221.38 ± 15.10 U/mg protein이었으며 방사선조사전 생리식염수 투여군에서의 활성도는 방사선조사 후 4시간째에 감소된 후 1일째에 약간 증가하였으나 그 후 계속 감소하여 7일째에는 145.00 ± 28.83 U/mg protein으로 정상대조군에 대하여 67%로 유의성 있게 감소된 후 14일째에는 76%로 약간 증가하는 추세를 보였다. 방사선조사전에 ascorbate를 투여 받은 생쥐들에서의 활성은 방사선조사전 생리식염수 투여군과 비슷한 경향을 보였으나 그 감소폭이 둔화되어 방사선조사 후 14일째에는 방사선조사전 생리식염수 투여군에 비하여 16% 높게 나타났다.

생쥐 간조직에서 glutathione peroxidase의 활성도 변화는 Fig. 5에 나타내었다. 정상대조군에서의 활성도는 2.10 ± 0.12 U/mg protein이었으며 방사선조사전 생리식염수 투여군에서의 활성은 방사선조사 직후부터 감소하여 3일째에 1.54 ± 0.15 U/mg protein으로 정상대조군에 대하여 73%로 가장 낮은 활성을 보인 후 14일째에는 정상대조군에 대하여 78%로 약간 증가하는 경향을 보였다. Ascorbate 투여 후 방사선을 조사한 군에서도 방사선조사전 생리식염수 투여군과 같이 방사선조사 직후부터 그 활성이 감소하여 방

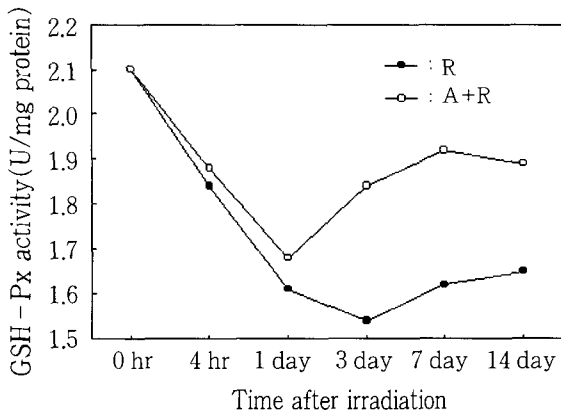


Fig. 5. Time-dependent changes of glutathione peroxidase activities affected ascorbate and post-irradiation. —●—: γ -irradiated group, —○—: ascorbate treated before γ -irradiated group.

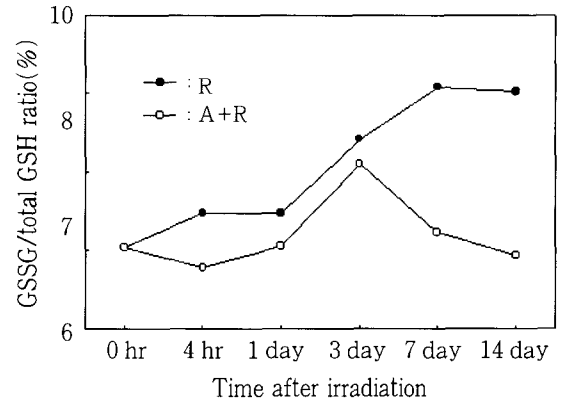


Fig. 6. Time-dependent changes of GSSG/total GSH ratio affected ascorbate and post-irradiation. —●—: γ -irradiated group, —○—: ascorbate treated before γ -irradiated group.

Table 2. Effects of ascorbate pretreatment on hepatic glutathione contents of γ -irradiated mice.

Time after irradiation	GSH (μ mole/g liver)		GSSG (μ mole/g liver)	
	R	A + R	R	A + R
4 hr	49.44 \pm 3.79	56.34 \pm 8.28	4.33 \pm 0.40	4.38 \pm 0.44
1 day	45.78 \pm 4.21	50.68 \pm 3.81	4.00 \pm 0.46	4.16 \pm 0.36
3 day	37.58 \pm 2.85**	40.68 \pm 6.21*	3.72 \pm 0.41	3.90 \pm 0.47
7 day	35.46 \pm 5.92*	41.02 \pm 3.73*	3.92 \pm 0.61	3.91 \pm 0.48*
14 day	37.50 \pm 3.75**	42.70 \pm 4.78*	4.10 \pm 0.32	3.85 \pm 0.30
Control	53.24 \pm 4.04		4.36 \pm 0.38	

*Statistical significance: *p<0.05, **p<0.01 compare with control.

사선조사 후 1일째에 1.68 \pm 0.18 U/mg protein으로 정상대조군에 대하여 80%로 유의성 있게 감소된 후 점차 증가되는 경향을 보여 14일째에는 방사선조사전 생리식염수 투여군에 비해 15% 증가하여 방사선조사전 생리식염수 투여군에 비하여 활성이 빠르게 회복되는 것으로 나타났다.

4. 생쥐 간에서 Glutathione 함량의 변화

방사선조사전에 생리식염수 및 ascorbate를 투여 받은 생쥐 간에서 glutathione의 함량 변화를 알아보기 위해 GSH와 GSSG의 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 정상대조군에서의 GSH와 GSSG 함량은 각각 53.24 \pm 4.04 μ mol/g liver, 4.36 \pm 0.38 μ mol/g liver 그리고 GSSG/total GSH 비율은 7.04 \pm 0.47%로 나타났으며, 방사선조사전 생리식염수 투여군에서는 GSH 함량은 방사선조사후 감소하여 7일째에 35.46 \pm 5.92 μ mol/g liver로 정상대조군에 대하여 67%로 최저값을 보였다. GSSG 함량도 GSH와 유

사한 경향으로 감소하여 방사선조사후 3일째에는 정상대조군에 대하여 85%로 감소되었으나 14일째에는 그 함량이 4.10 \pm 0.32 μ mol/g liver로 증가되어 정상대조군과의 유의한 차이를 관찰할 수는 없었으며 방사선조사로 인한 glutathione 함량의 변화폭은 GSSG보다 GSH에서 더 큰 것으로 나타났다. 조직에서 산화적 손상의 지표가 되는 GSSG/total GSH 비율은 방사선조사 직후부터 상승하여 7일째에는 정상대조군에 대하여 129%로 유의하게 증가되었다. 방사선조사전에 ascorbate를 투여 받은 생쥐에서의 GSSG 함량은 방사선조사후 감소하는 경향을 보였으나 정상대조군에 대하여 유의한 차이는 없었다. GSH의 함량도 GSSG와 같이 방사선조사 후 감소하는 경향을 보였으나 정상대조군에 대해 유의한 차이는 없었으나 생리식염수 투여군에 비해서는 방사선조사후 14일째에 10% 증가되어 방사선조사로 인한 GSH 함량의 변화폭은 유의하게 감소된 것으로 나타났다. 또한 GSSG/total GSH 비율도 GSH 변화와 비슷한 경향을 보여 방사선조사후 14일째에는 생리식염수 투여군에 비하여 15% 저하되었으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

5. 생쥐 간에서 지질과산화 수준의 변화

방사선조사전에 생리식염수 및 ascorbate를 투여 받은 생쥐 간에서의 지질과산화 수준 변화를 관찰하기 위해 지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정된 결과, 정상대조군은 59.24 \pm 4.76 nmol/g liver 인데 비해 방사선조사전 생리식염수 투여군에서는 방사선조사 직후부터 증가하여 7일째에 85.22 \pm 5.03 nmol/g liver로 정상대조군에 대하여 144%로 가장 높은 값을 보인 후, 14일째에는 135%로 약간 감소되었다. 방사선조사전에 ascorbate를 투여 받은 생쥐군에서도 방사선조사 직후부터 MDA 함량이 증가되는 경향을 보였으나 14일째에 63.76 \pm 7.02 nmol/g liver로 생리식염수 투여군에 비하

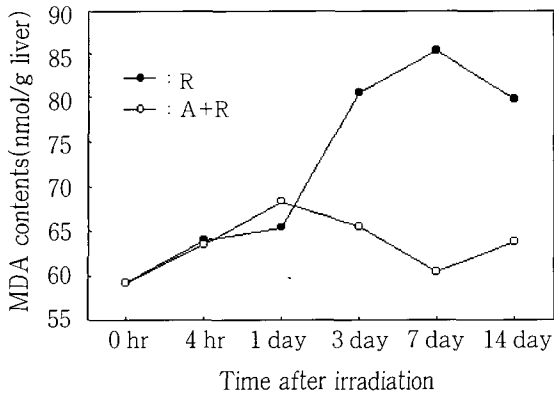


Fig. 7. Time-dependent changes of lipid peroxidation (MDA) levels affected ascorbate and post-irradiation. —●—: γ -irradiated group, —○—: ascorbate treated before γ -irradiated group.

여 20% 감소하여 유의성 있는 차이를 보였다(Fig. 7).

IV. 고찰

산소는 동물체의 생명 유지에 필수적이지만 산소대사과정에서 소량의 활성산소종이 생성되어 생체에 여러 유해한 작용을 내는데 이러한 유리기들에 의한 독성은 주로 $\cdot\text{OH}$ 형성에 의해 간접적으로 나타나며 산소독성의 기전은 전리방사선에 의한 생물학적 장애의 발생 기전과 유사하다¹⁸⁾. 그러나 생체내에는 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화효소나 glutathione이나 albumin 등의 항산화물질이 존재하여 유리기들을 제거하기 때문에 조직내의 항산화효소 활성이나 항산화물질의 수준은 생체의 방어체계에 중요한 영향을 미칠 수 있다. Scott¹⁹⁾는 동물체에서 전리방사선은 반응성이 강한 유리기의 생성원인이 되며 항산화효소들은 방사선에 대한 생체의 저항성을 결정하는데 중요할 것이라고 주장하였는데 이는 동물 조직에서 SOD 활성의 증가가 방사선에 대한 저항성을 증가시켰다는 보고²⁰⁾와 일치하는 것이다.

유리기에 의한 세포손상의 지표가 되는 지질과산화는 유리기나 금속이온이 세포막의 불포화지방산과 반응하여 과산화지질의 형성이나 이중결합의 위치가 재배치되는 복합적인 일련의 반응으로서 NAD(P)H가 관여하는 효소반응에 의한 경우와 $\cdot\text{O}_2^-$ 이나 $\cdot\text{OH}$ 등의 유리기들에 의한 비효소적 반응에 의해 항산화적 방어력의 약화로 인해 야기되기 때문에 생체내 항산화 관련효소의 활성이나 항산화물질의 작용과 관련이 있을 수 있는데, 이는 흰쥐에 고선량(5~10 Gy)의 방사선을 조사시켰을 때 골수에서 SOD 활성은 저하되었으나 골수세포당 SOD 활성은 증가하였으며 SOD의 활성 저하는 지질과산화의 촉진을 유발시켰

다는 보고²¹⁾, 그리고 흰쥐에 저선량(0.25 Gy)의 방사선조사는 간에서의 SOD 활성을 증가시켰으며 이로 인하여 과산화지질의 함량은 저하되었다는 보고²²⁾ 등과 같은 연구결과에서 확실해 졌다.

본 연구에서 6.5 Gy의 감마선을 조사 받은 생쥐 간에서 SOD나 catalase의 활성은 방사선조사 직후 약간 증가한 후 저하되었으며 glutathione peroxidase의 활성은 방사선조사 직후부터 감소한 다음 14일째에는 약간 상승되는 경향을 보인 반면, MDA 함량은 방사선조사 직후부터 지속적으로 상승된 후 역시 14일째에 약간 감소하는 것으로 나타났는데 초기에 SOD의 활성이 약간 증가된 것은 유리기들의 생성은 방사선조사 후 약 4시간경에 최대가 되기 때문에 생성이 촉진된 유리기들을 제거하기 위한 생체 방어기전의 일종이거나 방사선조사로 인한 조직내 산소분압의 일시적 상승이 SOD 합성 증가를 유도한 것이며 SOD의 작용에 의해 생성된 H_2O_2 를 분해하기 위해 catalase의 활성도 증가된 것으로 생각되며 그 후 지속적으로 저하된 것은 방사선의 직접작용이나 간접작용에 의해 조직세포들이 손상되거나 괴사되어 항산화 효소들의 합성이 저해되거나 그 활성이 저하되어 그로 인한 항산화적 방어력의 약화로 인하여 지질과산화가 촉진된 것으로 생각된다.

Glutathione은 γ -glutamylcystine synthetase와 GSH synthetase에 의해 cysteine과 glutamate로부터 합성된 tripeptide로서 단백질의 분해 및 합성과 DNA의 합성에 관여하며 유리기나 독성화합물 그리고 방사선조사 등의 손상으로부터 세포를 보호하는 기능을 가지고 있는데, 그 작용기전은 GSH는 glutathione peroxidase에 의해 H_2O_2 를 제거하면서 GSSG로 전환되고 GSSG는 glutathione reductase에 의해 NADPH를 소모하면서 다시 GSH로 환원되는 과정에서 세포내의 유리기를 제거하며 지질과산화 초기에 형성된 alkyl 또는 lipoxyl radical을 분해하기 때문이라 할 수 있다²³⁾. 따라서 GSH 및 GSSG의 생체내 수준은 지질과산화 정도나 방사선조사로 인한 조직 손상의 유발과 직접적으로 관련되어 있는 것으로 생각되는데, 이러한 증거로서 *in vitro*에서 방사선 조사는 GSH 함량을 저하시키며 GSH 저하는 방사선 감수성을 증가시킨다는 보고²⁴⁾, GSH가 결핍된 조건에서는 방사선 보호제의 방사선 보호효과는 없었다는 보고²⁵⁾ 그리고 GSH의 결핍은 저산소나 과산화세포들에 대하여 방사선 증감제로 작용될 수 있다는 주장²³⁾들이 있다.

본 연구에서 방사선조사로 인하여 생쥐 간에서의 GSH 함량이 유의성있게 감소된 반면 GSSG/total GSH 비율은 증가하였는데 이는 GSSG 함량이 변화하지 않은 것으로 볼 때 GSH의 유의한 감소때문이라 생각된다. 또한 GSH의 감소 원인은 GSH가 유리기의 직접적인 scavenger로서 H_2O_2 및 lipoperoxides로부터 세포를 보호하기 위한 glutathione peroxidase의 기질로서, 수소 기여에 의한 DNA radicals와 같은 분자 손상의 회복이나 단백질의 -SH를 환원상태로 유지하기 위해 더욱 소모되었거나 MDA 수

준의 증가로 볼 때 과산화지질의 증가로 조직이 손상받
아 glutathione의 합성 능력이 저해되었기 때문으로 생각
된다²⁶⁾.

산소는 방사선에 의한 생물학적 손상을 증강시키는 작
용을 하며 방사선 장애의 일차적 원인이 방사선 조사에
의해 생성된 유리기들의 생체 구성 분자들에 대한 공격
에 기인되기 때문에 이러한 유리기를 포착 제거하는 항
산화제들은 방사선 보호제로서 작용할 수 있을 것이다.
본 연구에서 생쥐에 6.5 Gy의 감마선을 전신조사하기 전
에 ascorbate를 투여한 후 방사선 보호효과의 여부를 알
아보기 위해 30일 생존율과 비장무게의 변화를 측정하였
는데 방사선 조사전 ascorbate 투여군의 30일 생존율은 방
사선 조사전 생리식염수 투여군에 비하여 4.7배 증가하였
고 비장 무게의 손실 정도는 유의성있게 감소됨으로서 방
사선장애로 부터의 회복능력이 강화된 것으로 나타났다.
또한 방사선에 조사된 생쥐들의 사망율은 방사선 조사 후
10~20일 사이에 급격히 상승하였으며 비장 무게의 손실
정도도 방사선조사 초기에 뚜렷하게 증가하였는데 이는
비장이 조혈장기이며 비교적 방사선 감수성이 높은 장기
임을 감안할 때 방사선 감수성이 매우 높은 골수세포의
치사로 인한 결과라고 생각되며 ascorbate를 투여 받은 생
쥐들에서 사망율과 비장 무게의 손실 정도가 둔화되고 빠
르게 회복되는 경향을 보인 것은 ascorbate가 직, 간접적
으로 방사선에 대한 저항성을 증가시켰거나 방사선에 의
해 손상 받은 골수나 비장세포의 수복과 재생능력을 향상
시킨 결과²⁷⁾라고 생각된다.

Ascorbate가 방사선에 의한 장애를 경감시키는 작용이
어떠한 작용에 기인하는 지를 알아보기 위해 유리기 억
제계에 관여하는 항산화 효소인 SOD, catalase 및 glu-
tathione peroxidase의 활성 변화와 비효소계 항산화 물질
인 glutathione의 함량 변화 그리고 유리기 생성의 증가
및 항산화적 방어력의 감소로 인하여 야기되는 지질과산
화의 최종산물인 MDA의 함량 변화를 생쥐 간에서 관찰
하였다. 항산화제를 투여하지 않은 생쥐군에서는 방사선
조사 후 14일째에 total-SOD, catalase, glutathione per-
oxidase의 활성과 GSH의 함량은 정상대조군에 비하여 현
저하게 저하되었으며 산화적 손상의 지표가 되는 GSSG/
total GSH 비율 및 MDA의 함량은 뚜렷하게 증가한 반
면 GSSG의 함량은 방사선을 조사한 군에서 정상대조군
에 대하여 유의한 변화는 보이지 않았다. 방사선조사전에
ascorbate를 투여한 경우에는 이러한 변화폭이 감소되어
방사선조사 후 14일째에 생리식염수 투여군에 비하여 항
산화효소의 활성과 GSH의 함량은 유의하게 증가하였고
MDA의 함량 증가는 현저하게 억제되었다. 이와 같은 결
과는 ascorbate가 in vitro에서 방사선조사로 야기되는 지
질과산화의 촉진을 억제시켰으며 in vivo에서 방사선에
의한 생존율을 증가시켰다는 연구 결과²⁸⁾와 일치하는 것
으로서 ascorbate의 방사선 보호효과를 확인할 수 있었으
며 이러한 방사선보호작용의 기전은 방사선조사로 인해
생성된 superoxide radical과 H₂O₂가 반응하여 가장 반응

성이 강하며 유독한 hydroxyl radical의 형성에 관여하는
Fe⁺³을 Fe⁺²로 환원시키기 때문이라는 주장²⁹⁾같이 SOD
와 같은 항산화효소의 활성이 증가하므로서 생성이 증가
된 유리기를 제거하여 지질과산화 반응의 촉진을 억제하
는 유리기 scavenger로 작용했기 때문이라 생각된다.

방사선보호제의 작용기전이 생물체에서 방사선 감수성
은 산소 존재하에 증강되며 또한 방사선 조사로 인해 생
성되는 1차 유리기들은 산소 존재하에 여러 연쇄 반응을
통하여 반응성이 매우 강한 hydroxyl radical이나 peroxy
radical같은 2차 유리기를 생성하기 때문에 방사선 보호제
는 방사선 조사후 유리기 생성단계에서 1차 유리기들과
경쟁적으로 산소와 반응하여 2차 유리기의 생성을 억제
하는 유리기 scavenger로 작용하기 때문이라는 주장을 고
려하여 볼 때 ascorbate는 방사선에 보호효과가 있는 것
으로 볼 수 있으며, 일종의 산화 스트레스라고 할 수 있
는 방사선조사로 인하여 항산화제의 양이 현저히 감소되
고 ascorbate의 투여로 지질과산화가 효과적으로 억제된
것으로 볼 때, ascorbate의 방사선 보호작용은 항산화 작
용과 관련이 있다고 생각된다.

V. 결 론

Ascorbate의 방사선 보호효과 및 항산화 작용과의 관련
성을 알아보기 위하여 ICR계 생쥐에 ascorbate(240 mg/kg)
를 투여한 후 γ 선을 1회 전신조사(6.5 Gy)하여 30일 생존
율과 비장의 무게 변화 그리고 간에서의 SOD, catalase,
glutathione peroxidase 활성 및 glutathione 함량과 지질과
산화 수준의 변화를 2주 동안 관찰하였다. 방사선조사전
에 ascorbate의 투여로 30일 생존율은 10%에서 47%로 증
가되었으며 방사선조사후 14일째에 방사선조사전 생리식
염수 투여군에 비하여 비장의 무게는 유의하게 증가되었
다(p < 0.01). 또한 간의 MDA 함량은 방사선조사후 14일
째에 20% 저하되었으며(p < 0.05) 항산화효소인 SOD, ca-
talase, glutathione peroxidase의 활성은 방사선조사전 생
리식염수 투여군에 비하여 각각 26%, 16%, 15% 그리고
GSH 함량은 14%(p < 0.05) 증가되었으나 GSSG 함량은
변화가 없었으며 GSSG/total GSH 비율은 22%(p < 0.05)
저하되었다. 이상의 결과에서 ascorbate는 방사선 보호효
과에 유효한 성분으로 유리기를 포착 제거하여 지질과산
화를 효과적으로 억제하는 항산화 작용에 의해 방사선 보
호효과를 나타내는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Singh, A. : Chemical and biochemical aspects of ac-
tivated oxygen : In "CRC hand book of free radical
and antioxidants in biomedicine" Miquel, J., Quin-
tanilha, A. T. and Weber, H.(eds). Vol, I, CRC

- Press, Florida, p. 17, 1989.
2. Singh, A. and Singh, H. : Time-scale and nature of radiation biological damage : approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 39, 69, 1982.
 3. Stocker, R. and Frei, B. : Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In "Oxidative stress" Sies, H.(eds.), Academic Press, New York, p.213, 1991.
 4. Fridovich, I. : Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem. Biophys.*, 247, 1, 1986.
 5. Burton, G. W. and Ingold, K. U. : Mechanisms of antioxidant action : Preventive and chainbreaking antioxidants. In "CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine" Miquel, J., Quintanilha, A. T. and Weber, H.(eds.), Vol. 1. CRC Press, Florida, p. 29, 1989.
 6. Kergonue, J. F., Thiriot, C., Braquet, M., Ducouso, R. and Rocquet, G. : Influence of whole-body gamma-irradiation upon rat erythrocyte : lipid peroxidation and Osmotic fragility. *Biochimie.*, 68(2). 311, 1986.
 7. Yamaoka, K., Edamatsu, R. and Mori, A. : Increased SOD activities and decreased lipid peroxide levels induced by low dose X-irradiation in rat organs. *Free. Rad. Biol. Med.*, 11, 299, 1991.
 8. Benderitter, M., Maingon, P., Abadie, C., Assem, M., Maupoil, V., Briot, F., Horiot, J. C. and Rochette, L. : Effect of in vivo heart irradiation on the development of antioxidant defenses and cardiac functions in the rat. *Radiat. Res.*, 144(1), 64, 1995.
 9. Ayene, S. I. and Srivastava, P. N. : Effect of WR-2721 on radiation-induced lipid peroxidation and enzyme release in erythrocytes and microsomes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 56(3), 265, 1989.
 10. Omerod, M. G. and Alexander, P. : On the mechanism of radiation protection by cysteamine : an investigation by means of electron spin resonance. *Radiat. Res.*, 18, 495, 1963.
 11. Bendich, A. : The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Rad. Biol. Med.* 2, 419, 1986.
 12. Flohe, L. and Otting, F. : Superoxide dismutase assay. In "Methods in Enzymology" Packer, L.(eds.), Academic Press, Inc., New York, p. 93, 1984.
 13. Aebi, H. E. : Catalase. In "Methods of Enzymatic Analysis" Bergmyer, H. U.(eds.), Third edition, Vol. 3, Verlag. Chemi. Weinheim, p. 273, 1982.
 14. Flohe, L. and Gunxler, W. A. : Assay of glutathion peroxidase : In "Methods in Enzymology" Packer, L.(eds.), Academic Press, Inc., New York, p. 114, 1984.
 15. Griffith, O. W. : Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine. *Anal. Biochem.*, 106, 207, 1980.
 16. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351, 1979.
 17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. chem.*, 193, 265, 1951.
 18. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. and Fenn, W. O. : Oxygen poisoning and X-irradiation. A mechanism in common. *Science.*, 119, 623, 1954.
 19. Scott, M. D., Meshnick, S. R. and Eaton, J. W. : Superoxide dismutase amplified organismal sensitivity to ionizing radiation. *J. Biochem.*, 264, 2498, 1989.
 20. Petkau, A. : Radiation protection by superoxide dismutase. *Photochem. Photobiol.*, 28, 276, 1978.
 21. Krizala, J., Stocklasova, A., Kovarova, H. and Ledvina, M. : The effect of γ -irradiation and cystamine on superoxide dismutase activity in the bone marrow and erythrocytes of rats. *Radiat. Res.*, 91, 507, 1982.
 22. Kimball, R. E., Reddy, K., Peirce, T. H., Schwartz, L. W., Mustafa, M. G. and Cross, C. E. : Oxygen toxicity. Augumentation of antioxidant defense mechanisms in rat lung. *Am. J. Physiol.* 230(5), 1425, 1976.
 23. Bump, E. A. and Brown, J. M. : Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharmacol. Ther.*, 47(1), 117, 1990.
 24. Rybina, V. V., Korystov, I. N., Degtiareva, O. V., Dobrovinskaia, O. R. and Eidus, L. K. : The role of glutathione in the interphase death of dividing cells. *Radiobiologia.*, 28(4), 435, 1988.
 25. Patt, H. M., Tyree, E. B., Straube, R. L. and Smith, D. E. : Cysteine protection against X-irradiation. *Science.*, 110, 213, 1949.
 26. Adams, J. D., Lauterburg, B. H. and Mitchell, J. R. : Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat : Regulation and response to oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 227(3), 749, 1983.
 27. Kim, S. H., Cho, C. K., Yoo, S. Y., Koh, K. H., Yun, H. G. and Kim, T. H. : In vivo radioprotective activity of Panax ginseng and diethyldithiocarbamate. *In-Vivo.*, 7(5), 467, 1993.
 28. Singh, A., Singh, H. and Henderson, J. S. : Radio-

protection by Ascorbic Acid, Desferal, and Merca-
ptoethylamine. In "Methods in Enzymology" Packer,
L.(eds.), New York, Academic Press, p. 686, 1990.
29. Shaheen, A. A. and Hassan, S. M. : Radioprotection

of whole-body gamma-irradiation-induced alteration
in some haematological parameters by cystein, vi-
tamin E and combination in rats. Strahlenther.
Onkol., 167(8), 498, 1991.