

Estimation of Death Time by Changes of Postmortem Xanthine Oxidase Activity in Rats

Hyung-Won Yoon, Chong-Guk Yoon and Hyun Gug Cho^{1,†}

Department of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea.

¹*Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Gumi 730-739, Korea*

To evaluate the postmortem changes in activities of oxygen free radical metabolizing enzymes, the rats were sacrificed with cervical dislocation and were kept in an incubator at 25°C, 70% of humidity for 12 hours. The activities of aniline hydroxylase, catalase, glutathione-S-transferase and superoxide dismutase were decreased with the time. On the other hand, the activity and type conversion ratio (type D → type O) of hepatic xanthine oxidase (XO) were gradually increased. From these changes of XO, the estimation of death time (mathematical equation) could be determined with the least square method. To clarify the cause of increasing XO activity, enzyme kinetics were examined. The Km values of XO were decreased with the time. In conclusion, the determination of liver XO activity might be used for the estimation of death time in the early postmortem period.

Key Words: Words: Postmortem, Xanthine oxidase, Estimation of death time

인간이 건강한 상태로 수명을 다한 자연사의 경우 별다른 문제점이 발생하지 않으나, 각종 사고사의 경우 사망의 원인과 사망시기를 밝히는 것은 법의학적 측면에서 매우 중요한 사항으로 여겨지고 있다. 사고사 혹은 타살의 경우에는 사망 후의 사체변화가 사망원인을 규명하는 중요한 단서로 이용되고 있어서, 사망시각의 추정은 사망과 관련된 문제를 해결하는데 있어서 대단히 중요하다. 현재까지 세계적으로 사망시각의 추정과 관련된 지표는 체온하강 (Algor mortis) (Brown and Marshall, 1974; De Saram et al., 1956), 시반형성 (Livor mortis) 및 사후강직 (Rigor mortis) (Bate-Smith and Bendall, 1947a; 1947b) 등으로, 사체에서 이들의 변화정도를 측정하여 사망시각의 추정에 이용하고 있으며, 생화학적인 방법으로는 뇌척수액의 potassium 농도변화 (Manson et al., 1951), 초자체액의 비타민 C 농도변화 (Gantner et al., 1962) 및 체장용해소체 효소의 활성변동 (Tonaev, 1979) 정도가 이용되고 있을 뿐 시각추정에 대한 생화학적 방법은 미흡한 실정이다.

일반적으로 내·외적인 요인에 의한 질병이나 손상이 인체에 가해질 경우 체내 항상성을 유지하기 위하여 인체는 여러 가지 반응을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 내·외적인 스트레스가 생명현상을 유지하기 어려울 정도로 강한 상태라면 생체의 항상성은 파괴되고 비가역적인 손상이 진

행되어, 생명활동이 소멸되는 사망에 이르게 된다. 그리고 생체조직의 손상에 관여하는 것으로 알려져 있는 oxygen free radical은 살아있는 생체조직 내에서 뿐만 아니라 모든 생리적 반응이 정지된 사망상태에서도 일정시간까지는 변동이 초래될 것으로 사료되며, 이로 인하여 사망초기에 있어서 사체 조직세포의 변화과정에도 영향을 미칠 것으로 생각되지만 이에 대한 연구는 거의 없는 실정에 있다.

따라서 사망에 따른 oxygen free radical 관련 효소 단백질의 기능변화를 통해 사망의 시각추정 및 사망의 유형을 판정하는 유효한 자료를 얻을 수 있다면, 법의학적 측면 뿐만 아니라 공중보건학적 측면에서도 상당한 의의가 있을 것으로 추측되어진다. 본 연구에서는 흰쥐의 사후에 세포상해과 관련성이 있는 oxygen free radical 생성계와 해독계 효소의 활성변동 (Leibovitz and Siegel, 1980)을 경시별로 관찰하여 사후 지표로 이용될 수 있는 항목을 검색해 보고자 하였다.

실험은 생 후 6주령 된 체중 200±10 g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 대한실험동물센터로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용하기 전 동물은 25±1°C, 상대습도 50±5%의 조건에서 1주일간 적응사육 시킨 다음, 경추탈구법으로 희생시켜 25°C 항온기에 두고 2, 4, 8, 12시간 후에 각각 사체로부터 간을 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 후 여과지로 압박하여 장기 내에 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음, 무게를 측정하고 생화학적 분석에 사용하였다. 이 때 대조군은 경추탈구법으로 희생시킨 직후에 적출한 간으로 하였다.

*논문 접수: 2006년 11월 15일

수정재접수: 2006년 12월 2일

†교신저자: 조현국, (우) 730-739 경북 구미시 산동면 인덕리 55번지, 경운대학교 안경광학과

Tel: 054-479-1333, e-mail: hgcho@ikw.ac.kr

간은 일정량을 잘라내어 4배의 0.1 M potassium phosphate buffer (KPB)를 가한 다음 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄균질액을 만들었다. 이 균질액을 600 ×g에서 20분간 원심분리하여 다시 상층액을 얻고, 이 상층액을 105,000 ×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsomal 분획을 얻었다. Cytosol 분획은 xanthine oxidase (XO), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) 및 glutathione-S-transferase (GST) 활성도 측정에 사용하였고, microsomal 분획은 일정량의 0.1 M KPB 용액으로 재현탁 시킨 다음 aniline hydroxylase (AH) 활성도 측정에 사용하였다.

조직 중 AH 활성도는 aniline을 기질로 하여 37°C에서 15분간 반응시켜 유리되는 *p*-aminophenol을 발색시켜 640 nm에서 흡광도를 측정하는 Bidlack과 Lowry의 방법 (1982)에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1시간 동안 반응하여 기질로부터 생성시킨 *p*-aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다. XO 활성도는 xanthine을 기질로 사용하여 생성된 uric acid에 phosphotungstic acid를 가하여 710 nm에서 비색정량하는 Yoon의 방법 (1984)에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 기질인 xanthine으로부터 생성시킨 uric acid의 양을 nmole로 표시하였다. 한편 XO의 type 전환율은 효소반응액에 NAD를 넣고 반응시켜 측정된 활성도를 total type (dehydrogenase form + oxidase form; D+O type)으로 하고, NAD를 넣지 않고 반응시켜 측정된 활성도는 type O로 하여 O/D+O (%)로 나타내었다.

SOD의 활성도는 hematoxylin 자동산화의 억제 정도를 관찰하는 Martin 등의 방법 (1987)에 따라 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM KPB (pH 7.5)에 10 μM hematoxylin 및 효소액을

가해 25°C에서 반응시켜 생성된 hematein을 560 nm에서 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않은 반응액 중의 hematoxylin 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 나타내었다. GPX 활성도는 Paglia와 Valentine의 방법 (1967)에 따라 측정하였다. 기질인 glutathione과 조효소인 NADPH를 시료와 함께 25°C에서 5분간 반응시키는 동안 340 nm에서 흡광도 감소율을 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분간 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다. GST의 활성도는 Habig 등의 방법 (1974)에 따라 측정하였다. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione을 기질로 하여 25°C에서 10분간 반응시켜 생성된 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate 양을 340 nm에서 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 생성시킨 conjugate의 양을 nmole로 나타내었다.

Mitochondria 분획의 catalase (CAT) 활성도 측정은 hydrogen peroxide를 기질로 하여 환원되는 정도를 240 nm에서 흡광도를 읽고 분자흡광계수를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi의 방법 (1974)에 준하였다. 활성도 단위는 간 조직 효소액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안에 반응하여 분해시킨 hydrogen peroxide의 양을 nmole로 표시하였다.

사망 후 시간경과에 따라 나타난 oxygen free radical 생성계와 해독계 효소들의 활성변동을 살펴보면 (Table 1), XO 활성은 사후 8시간까지는 점진적으로 증가되다가 12시간 후에는 대조군과 비교하여 현저하게 증가되었다. AH, SOD, CAT, GST의 활성은 전 실험기간 동안 점진적으로 감소되었으며, 사망 12시간 후의 활성은 대조군과 비교하여 그 값이 모두 유의하게 감소되었다. 그러나 GPX의 활성은 전 실험기간 동안 별다른 변화를 보이지 않았다.

Table 1. Changes of the activities of hepatic oxygen free radical metabolizing enzymes in postmortem rats

Time(hrs)	0 (control)	2	4	8	12
XO ¹⁾	0.48±0.04	0.52±0.12	0.70±0.16	0.83±0.31	1.84±0.08 ^a
AH ²⁾	10.88±0.28	7.51±0.84 ^b	7.20±0.35 ^c	6.13±0.54 ^c	4.51±0.33 ^c
SOD ³⁾	13.52±4.49	6.40±0.62	4.73±0.81	4.58±0.71	2.29±0.26 ^a
CAT ⁴⁾	172.46±9.46	154.66±10.64	112.62±5.76 ^c	75.71±6.35 ^c	72.65±10.57 ^c
GPX ⁵⁾	23.79±1.95	27.58±2.78	29.71±1.95	29.06±2.20	25.66±1.70
GST ⁶⁾	406.39±12.33	317.96±18.32 ^b	329.47±19.67 ^a	335.36±8.14 ^b	293.51±29.65 ^b

Data are expressed as mean ± SE of 5 rats.

XO: xanthine oxidase, AH: aniline hydroxylase, SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GPX: glutathione peroxidase, GST: glutathione-S-transferase

Unit: ¹⁾ nmole uric acid formed/mg protein/min

²⁾ nmole *p*-aminophenol formed/mg protein/min

³⁾ unit/mg protein (1 unit = 50% inhibition of autoxidation of hematoxylin)

⁴⁾ nmole H₂O₂ reduced/mg protein/min

⁵⁾ nmole NADPH oxidized/mg protein/min

⁶⁾ nmole 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate/mg protein/min

Significantly different from the control (^a*P*<0.05; ^b*P*<0.01; ^c*P*<0.001)

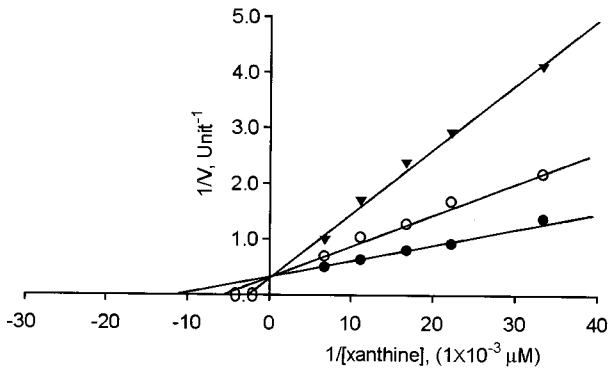


Fig. 1. Double reciprocal plots of hepatic xanthine oxidase activity using xanthine as a substrate in postmortem rats. ▼-▼: control, ○-○: 4 hrs, ●-●: 12 hrs. Unit: nmoles uric acid formed/mg protein/min.

사후 XO의 활성 증가기전을 반응 속도론적 측면에서 검토해 본 결과 (Fig. 1), 사후 4시간 및 12시간 경과군과 대조군 모두 V_{max} 는 동일하였으나, K_m 값은 대조군이 $3.77 \times 10^4 \mu\text{mole}$, 4시간 경과군은 $2.1 \times 10^4 \mu\text{mole}$, 그리고 12시간 경과군이 $1.0 \times 10^4 \mu\text{mole}$ 로 나타나 대조군과 비교하여 사후 4시간 경과군은 약 50%, 12시간 경과군은 약 70% 감소되었다. 이러한 XO의 활성변동은 다음과 같은 함수식으로 나타났다.

$T = A - \log(91.6421)/0.1075$, T: 추정 사망시간, A: 사후 간 조직의 XO 효소활성도.

사후 시간경과에 따른 XO의 type 전환을 변화 (Fig. 2)를 살펴보면 대조군의 경우 type 전환율은 약 13%였고, 12시간 경과 후에는 약 49%로 나타나 대조군과 비교하여 유의하게 증가되는 것으로 나타났다. 사망 후 시간경과에 따라 사체는 체온하강, 시반형성 및 사후강직 등과 같은 변화가 초래되는 것으로 알려져 있다. 본 연구자들은 이전연구 (Yoon et al., 2002)에서 경추탈구법으로 사망시킨 흰쥐에서 시간경과에 따른 체온변동과 사후강직, 그리고 간세포막의 손상변화에 대해서 논의하였다. 본 연구에서는 세포막 손상과 관련된 oxygen free radical 대사효소들의 활성변화 (Leivovitz and Siegel, 1980)를 살펴보고 사후 지표로 이용될 수 있는 항목을 검출해 보고자 하였다.

실험결과 AH, SOD, CAT 및 GST 등은 정도의 차이는 있으나 모두 시간경과에 따라 활성이 감소되었다. 이와 같은 결과는 사후 ATP가 감소되고 (Langill and Gill, 1984) 세포 내 단위막인 lysosome의 막손상으로 가수분해효소의 세포질 내 축적이 증가된다 (Cataldo et al., 1990)는 주장들로 볼 때, oxygen free radical 관련효소들의 단백질합성이 억제될 뿐만 아니라 가수분해효소에 의한 이들 효소단백의 분해로 인해 나타난 현상으로 생각되었다. 그러나 다른 효소들의 활성변동

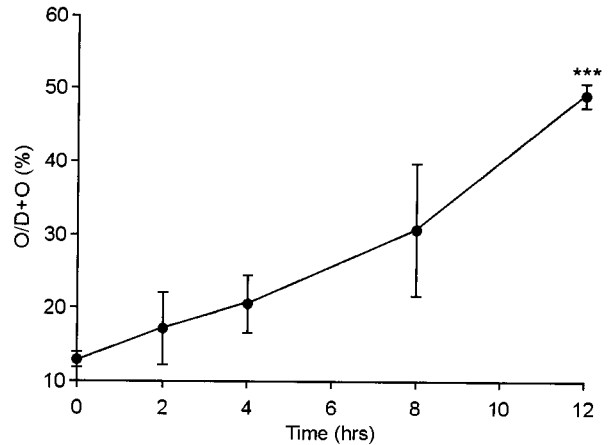


Fig. 2. Changes of the type conversion rate (O/D + O, %) of hepatic xanthine oxidase in postmortem rats. Significantly different from the control (***) $P < 0.001$.

과는 상반되게 XO의 type O 활성이 급격히 증가되었는데, Della Corte와 Stripe (1969)에 의하면 냉동, 계면활성제 혹은 단백분해효소 처리 시 XO 활성이 증가되며, lysosome의 단백질분해효소는 XO type D로부터 type O로의 전환을 유도한다고 하였다. 이러한 사실들로 미루어 볼 때 본 실험결과에서 나타난 XO의 급격한 활성 증가는 사후 많은 양의 lysosome 단백질분해효소가 간 세포질 내로 다량 유리되었기 때문 (Cataldo et al., 1990)으로 생각되었다. 그리고 사후 XO type O의 활성 증가 현상이 어떤 기전에 의해 나타나는지를 검토한 반응속도 관찰에서 사후 4시간 및 12시간 경과군들이 대조군과 같은 V_{max} 를 보였으나 K_m 값은 대조군과 비교하여 두 군 모두 약 50%와 80% 정도의 감소되는 것으로 나타나 사후 시간경과에 따른 XO의 활성 증가 원인은 효소단백의 3차구조 변화에 따른 것으로 생각되었다.

이와 같은 결과들을 종합해 볼 때, 흰쥐에 있어서 사후 초기 사망시간의 경과에 따라 간 조직의 XO 활성이 점진적으로 증가되고, 그 증가 양상이 함수식으로 산출될 수 있어서 간 조직 내 XO 활성변동을 측정해 봄으로써 초기 사망시간을 예측하는데 지표로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Aebi H. Catalase. In Bergmeyer HU. Ed., Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 2, Academic Press, New York. 1974. 673-684.
- Bate-Smith EC, Bendall JR. Factors determining the time course of rigor mortis. J Physiol. 1947a. 110: 47-52.
- Bate-Smith EC, Bendall JR. Rigor mortis and adenosine triphosphate. J Physiol. 1947b. 106: 177-188.
- Bidlack WR, Lowry GL. Multiple drug metabolism: p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. Biochem

- Pharmacol. 1982. 31: 311-317.
- Brown A, Marshall TK. Body temperature as a means of estimating the time of death. *J Forensic Sci.* 1974. 4: 125-141.
- Cataldo AM, Thayer CY, Bird ED, Wheelock TR, Nixon RA. Lysosomal proteinase antigens are prominently localized within senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1990. 2: 221-232.
- De Saram GSW, Webster G, Kathirgamatamby N. Postmortem temperature and the time of death. *J Clin Law Criminol.* 1956. 46: 562-572.
- Della-Corte E, Stripe F. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 1969. 244: 3855-3892.
- Gantner GE, Stumer WQ, Caffrey PR, Brenneman C. Ascorbic acid levels in the postmortem aqueous humor. *J Forensic Med.* 1962. 9: 150-168.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974. 249: 7130-7139.
- Langill SM, Gill TA. Postmortem metabolism of short-finned squid muscle. *Comp Biochem Physiol.* 1984. 79: 361-371.
- Leibovitz BE, Siegel BV. Aspects of free radical reaction in biological system. *Aging J Gerontol.* 1980. 35: 45-56.
- Manson JK, Klyne W, Lennox B. Potassium levels in the cerebrospinal fluid after death. *J Forensic Sci.* 1951. 4: 231-243.
- Martin JP Jr, Dailey M, Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Ach Biochem Biophys.* 1987. 255: 329-336.
- Paglia ED, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967. 70: 158-169.
- Tonaev DA. Effect of the cause of death on the change in pancreatic lysosomal enzymatic activity in establishing the time of death. *Sud Med Ekspert.* 1979. 3: 37-38.
- Yoon CG. A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Res J.* 1984. 2: 295-308.
- Yoon HW, Yoon CG, Cho HG. Hepatic cell membrane changes of rats in the early postmortem period. *J Biomed Lab Sci.* 2002. 8: 89-93.
-