

“Reduced Glutathione (GSH)이 單回 및 分割 X線

全身照射를 입은 마우스 腦組織의

- NPSH 에 미치는 影響*”

慶北大學校 醫科大學 放射線科學教室

吳 長 錫 · 禹 元 亨

-Abstract-

Effect of Reduced Glutathione on NP-SH of Mouse Brain Following Total or Fractionated Whole Body X-irradiation.

Jang Suk OH, M.D. and Won Hyung Woo, M.D.

Department of Radiology

Kyungpook National University, School of Medicine

Taegu, Korea

In an attempt to clarify the possible radio-protective action of reduced glutathione (GSH) on the cellular level following total or fractionated whole body X-irradiation, GSH was injected intraperitoneally to albino mouse prior to the X-irradiation.

In the groups where X-irradiation was done, X-ray dose was set to 1,000r, and single dose of 1,000 r was given in the total irradiation group(XT), whereas in the fractional X-irradiated group(XF), the dose was divided into 5 times, and 200 r of X-ray was given daily for 5 days.

Where GSH was used, the total amount of GSH injected into each mouse was 50mg, and the 50mg of GSH was used either as a single dose or fractionated dose of 10mg daily for 5 days.

Intrinsic NP-SH was measured at 30 minutes, 1, 5, and 24 hours in the following groups, i.e.,

- 1) Group which was X-irradiated with 1,000 r as a single dose (XT) without prior injection of GSH.
- 2) Group which was X-irradiated with 200 r each for five days without prior injection of GSH (XF).
- 3) Group which was injected with single dose of 50mg of GSH, but not X-irradiated (GSH).
- 4) Group in which single dose of 50mg of GSH was injected prior to the X-irradiation with single dose of 1,000 r (GSH+XT).
- 5) Group in which fractionated dose of 10mg each of GSH was injected prior to X-irradiation with fractionated X-ray dose of 200 r each for 5 days at daily intervals (GSH+XF), and the results were compared with the group of 6, that is the normal.

The results are summarized as follows:

1. Levels of NP-SH in the XT group were higher than in the XF group, and the highest value was noted at 30 min.
2. Injection of GSH alone produced the highest value of NP-SH at 30 min., and the recovery to the normal levels were observed soon thereafter.

* 本論文의 要旨은 1968年 11月 第23次 大韓放射線醫學會 席上에서 發表하였음.

3. Levels of NP-SH was found generally to be higher in the GSH+XT group comparing to the GSH+XF group, but no significant difference were noted between two groups.

4. Higher values of NP-SH were observed in the GSH+XT and GSH+XF groups than in the XT or XF groups.

緒 論

放射線 領域에 있어서 生體에 對한 放射線 防禦問題는 主로 物理學的 要件에 局限되어 왔으나 最近에 이르러 生體에 放射線이 照射되면 細胞 或은 組織에 化學的 變化가 일어나 各種代謝에 混亂이 일어나는 것이 알려졌다^{1, 11)} 어떤 化學物質을 放射線 照射 直前に 生體에 投與하므로써 生體를 放射線 障礙로 부터 部分的으로 保護할수있다는 것이 發見되었고^{3, 15)} 이中 特記 할만 한 것은 Sulfhydryl 基 (SH 基) 를 含有하는 化合物, 即 Cystein, Cysteamine, Cystamine, Glutathione 및 AET (Aminoethyl isothiuronium bromide) 등이며 이들로서 放射線 生物學 領域에 새로운 分野가 開拓되어있다고 하겠다.^{1, 2, 4, 5, 14, 15)} Pihl 및 Eldjarn 等¹⁵⁾은 이 化學物質이 細胞內에서 SH 基의 遊離를 促進시키며 이것이 곧 放射線에 對한 保護作用의 本態일것이라고 하였으며 實驗動物에 SH 化合物을 放射線照射 直前に 投與하여 그 生存率을 높였다고 말하였을 뿐¹⁰⁾, SH 化合物이 어떠한 機轉에 依해서 放射線의 損傷으로 부터 細胞 或은 組織을 保護하는 作用을 나타내는가에 對해서는 放射線 生物學的 見地에서 아직 定說이 確立되어 있지않다.^{3, 4, 5, 14, 15)} Glutathione 은 還元性物質이며 正常細胞 및 組織內에 널리 存在한다는 것은 오래 前부터 알려졌다으나, 1921年 Hopkins 가 이를 抽出하고 1935年 에는 結晶化되어서 그 化學構造가 決定되었다.

Glutathione 의 化學構造의 特色은 Glutamic acid, Cystein 및 Glycin 의 세가지 Amino acid 로 이루어진 tripeptide 이고 특히 SH 基 를 含有하고 있다는 것이다. Glutathione 은 SH 基를 含有하고 있는 다른 化合物에 比하여 毒性이 弱하다는 點과 Cystein 이 갖고 있는 水素가 떨어져서 그 S와 또 한個의 Glutathione 의 S와 結合(S-S 結合)한 化合物이 되나, 이것은 Glutathione 의 酸化型 (GSSG)이며 一般的으로 Glutathione 이라 함은 還元型 (GSH) 을 말한다.

Glutathione (GSH)은 臟器中 特히 肝臟, 脾臟, 副腎 등에 많이 含有되어있고 腦에는 그 含有量이 比較的 적다. 이들 臟器에 疾患이 있을 때는 GSH 의 減少를 볼수 있다고 하며, 또한 X線 照射等으로서도 GSH 의 變動이 있을 것이나 어떠한 機轉에 依하여 生體內의 GSH 의 量的變動이 일어나는가에 對하여서는 現在까지 別로 뚜렷

한 報告가 없다.

Bacq 및 Alexander^{1, 2)} 및 Pihl 및 Eldjarn 等^{14, 15)} 이 報告 한바와 같이 in vivo에서 SH 化合物이 數分以內로 蛋白質과 結合 한다면⁶⁾, 放射線 照射直前に SH 基 를 含有하고 있고, 毒性이 弱한 GSH 를 全體에 投與하므로써 近來에 와서 臨床的으로 放射線 治療의 對象이 많이 되는 傾向인 腦組織內의 Non-Protein SH (NP-SH) 의 量을 測定한다는 것은 매우 興味있는 일이라 하겠다.

한편 一定量의 放射線을 單回 生體에 照射하기 보다는 分割의 方法으로서 數回에 나누어 照射하므로써 癌 治療에서 더욱 有效한 結果를 얻고 있음은 臨床的으로 잘 알려져 있으며 또한 흔히 利用되고 있다⁹⁾. 即 放射線을 分割하여 照射할 때는 同一量의 放射線을 單回에 照射하는 것에 比하여 健康組織에 對한 損傷을 적게 하고, 따라서 患部에 對한 照射量을 相當히 增加시킬수 있는 利點이 있을 것이다.

以上과 같은 見地에서 著者들은 흰 마우스 를 材料로 하고 X線으로서 1,000 r 을 全身 照射한 群과 200 r 씩 5回 分割해서 照射한 群에서 腦組織內의 NP-SH 를 時間에 따라 比較 觀察 하였으며, 50mg 의 GSH 를 單回 投與한 後 1,000r 을 單回 照射한 群과, GSH 10mg 와 200 r 의 X線 照射를 24時間 間隔으로 5回 繼續한 群에서 腦組織의 NP-SH 를 定量하여 서로 比較하므로써 GSH 의 放射線 保護作用의 一端을 살펴보기 爲하여 本 實驗을 하였으며 그 結果를 얻었기에 報告하는 비이다.

實驗材料 및 實驗方法

I. 實驗材料

實驗動物은 慶北大學校 醫科大學에서 飼育中인 雜種 흰 마우스 로서 體重 20~25 Gm 의 成熟健康한 것을 任意로 選擇하여 總 212匹을 使用 하였다.

本 實驗에 使用한 GSH 는 Nutritional Biochemical Corporation 製品이다.

II. 實驗方法

實驗動物은 다음의 6群으로 나누었다.

即,

第1群: 正常群.

第2群: 1,000 r 의 X線을 單回에 照射한 群.(XT 群).

第3群: 1,000 r 의 X線을 1回에 200 r 씩 24時間 間

隙으로 5회 分割 照射한 群(XF 群).

第4群: GSH 50mg 만을 投與한 群(GSH 群).

第5群: GSH 50mg 를 單回에 投與한 後 1,000 r 의 X 線을 單回에 照射한 群(GSH+XT 群).

第6群: GSH 10mg 投與와 200r 의 X 線 照射를 24時間 間隙으로 5回 繼續한 群(GSH+XF 群).

(1) X 線 照射

實驗動物을 1回 10匹씩 Plexiglass 製의 圓筒狀 容器에 넣고 本 教室의 Picker 製 X 線 深部照射 裝置로서 200KV, 15mA, 1mm Al 및 0.5mm Cu filter와 target-Object 距離 50cm 等의 條件으로 照射하였다.

(2) GSH 의 投與

Yakovlev 및 Isupova¹⁷⁾의 實驗結果에 따라 GSH 는 마우스 體重 100gm 當 250mg 를 有效量으로 定하고 Krebs-Ringer-Phosphate buffer (KRP. PH 7.4) 溶液 0.5ml 中에 第4群과 第5群에서는 50mg, 그리고 第6群에서는 10mg 이 溶解되도록 하여 實驗動物의 腹腔內에 Tuberculin 注射器로서 單回에 注入하였으며 X 線 照射와 併用한 群에서는 照射 5分前에 注入 하였다.

(3) 腦組織의 摘出

各 實驗群에서 照射後 各各 30分, 1, 5, 및 24時間에서 實驗動物을 Cervical dislocation 으로 犧牲시킨 後 腦組織 全部를 實驗에 使用하였다.

(4) NP-SH 의 定量

NP-SH 의 定量은 Ellman 의 方法⁸⁾에 따랐다.

Table 1. Effect of Total and Fractionated X-ray Irradiation on NP-SH of Mouse Brain.

Time	XT	XF	GSH
	Mean*(S.E)	Mean*(S.E)	Mean*(S.E)
**	4.19(0.12)	4.19(0.12)	4.19(0.12)
30min.	5.90(0.31)	4.94(0.13)	5.95(0.10)
1 hr.	4.86(0.12)	4.38(0.10)	4.49(0.09)
5 hr.	4.60(0.11)	4.36(0.12)	4.23(0.10)
24 hr.	4.86(0.14)	4.36(0.12)	4.12(0.08)

* μ mol/gm wet weight.

** : normal group

S. E. : Standard Error.

XT : Total X-ray Irradiation with 1000 r.

XF : Fractionated X-ray Irradiation. (200r \times 5)

GSH : Reduced Glutathione, 50 mg Intra-peritoneal Injection. Number of Cases is 10 throughout the entire experiment except in Control Group. (n=12)

實驗成績

總 212匹의 흰 마우스를 實驗對象으로 한 實驗成績을 群別, 時間別, 實驗成績에 對한 算術平均值 및 標準誤差를 集約 해서 表示하고 正常群의 그것과 比較 하면 第1表 및 第1圖에서 보는 바와 같다. 여기서 定量한 NP-SH 의 單位는 μ mol/gm wet wt. 이다.

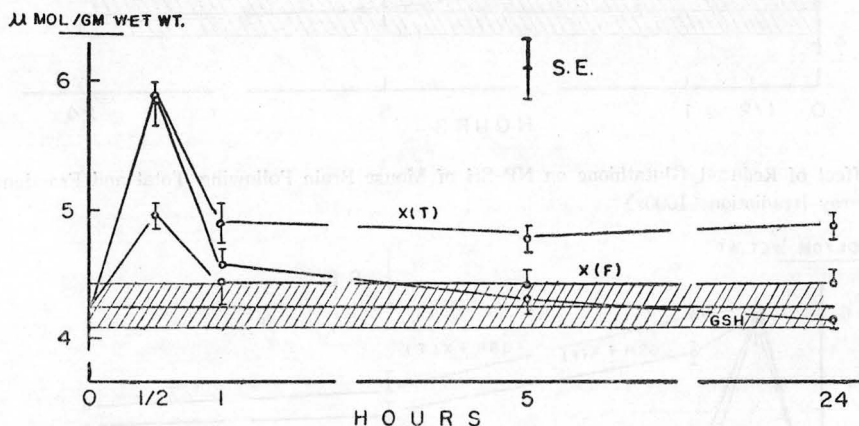


Fig. 1. Effect of Total and Fractionated X-ray Irradiation on NP-SH of Mouse Brain.

即 正常群에서는 NP-SH 가 $4.19 \pm 0.12 \mu$ mol/gm wet wt. 일에 比하여 XT 群에서는 30分, 1, 5, 및 24時間에서 各各 5.90 ± 0.31 , 4.86 ± 0.12 , 4.60 ± 0.11 및 4.86 ± 0.14 로서 1,000 r 의 X 線 照射後 30分에 顯著히 腦組織의 NP-SH 가 增加되었다가 時間의 經過에 따라 漸次 低下되나 正常值 보다는 높은 값을 나타내고 있음을 알

수있다.

200 r 씩 5회 分割 照射한 XF 群에서는 30分에서 4.94 ± 0.13 으로서 正常值에 比해서 增加된 것을 보나 그後 時間의 經過에 따라 1, 5 및 24時間에서 各各 4.38 ± 0.10 , 4.36 ± 0.12 , 및 4.36 ± 0.12 로서 別로 變動이 없고 正常值와 거의 비슷한 數値를 나타내었다.

Table 2. Effect of Reduced Glutathione on NP-SH of Mouse Brain Following Total and Fractionated X-ray Irradiation. (1000r)

Time	GSH	GSH+XT	GSH+XF
	Mean*(S.E)	Mean*(S.E)	Mean*(S.E)
**	4.19(0.12)	4.19(0.12)	4.19(0.12)
30min.	5.95(0.20)	6.08(0.10)	5.98(0.10)
1 hr.	4.49(0.09)	5.95(0.12)	5.58(0.09)
5 hr.	4.23(0.10)	5.43(0.11)	5.25(0.09)
24 hr.	4.12(0.08)	5.37(0.08)	5.25(0.11)

*: μ mol gm wet weight.

** : normal group

S.E. : Standard Error.

GSH : Reduced Glutathione 50 mg Intra-peritoneal Injection.

GSH+XT : GSH 50mg+Total X-ray Irradiation with 1000r.

GSH+XF : GSH 10mg+X-ray Irradiation (200r \times 5)

Number of Cases is 10 throughout the entire experiment except in Control Group (n=12)

한편 第2表 및 第2圖에서 보는바와 같이 GSH 50mg 만을 投與한 群에서의 腦組織의 NP-SH 는 30分 1, 5, 및 24時間에서 各各 5.95 ± 0.10 , 4.49 ± 0.09 , 4.23 ± 0.10 및 4.12 ± 0.08 로서 正常値에 비해 30分에서 顯著히 높았으나 그後 時間의 經過에 따라 急激히 低下되어 1時間 以後부터는 正常値와 거의 同一하게 됨을 본다. 그러나 GSH 50mg 를 投與한後 1,000r 의 X線을 照射한 群 (GSH+XT 群)과 GSH 10mg 投與와 200r 의 X線照射를 5回 分割한 群. (GSH+XF 群)에서는 各實驗値가 모두 正常値에 비해서 顯著히 높고 24時間에 이르기 까지 높은 값을 維持하고 있음을 본다.

即 GSH+XT 群에서의 數値는 30分, 1, 5, 및 24時間에서 各各 6.08 ± 0.10 , 5.95 ± 0.12 , 5.43 ± 0.11 및 5.37 ± 0.08 이고 GSH+XF 群에서의 그것은 5.98 ± 0.10 , 5.58 ± 0.09 , 5.25 ± 0.10 및 5.25 ± 0.11 이다.

여기서 GSH+XT 群과 GSH+XF 群을 比較해 볼때 GSH+XT 群이 GSH+XF 群에 비해 全 時間 經過에서

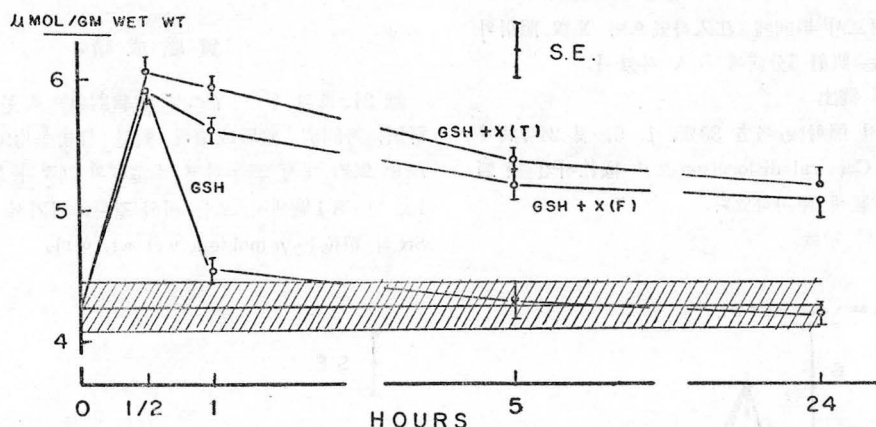


Fig. 2. Effect of Reduced Glutathione on NP-SH of Mouse Brain Following Total and Fractionated X-ray Irradiation (1000r)

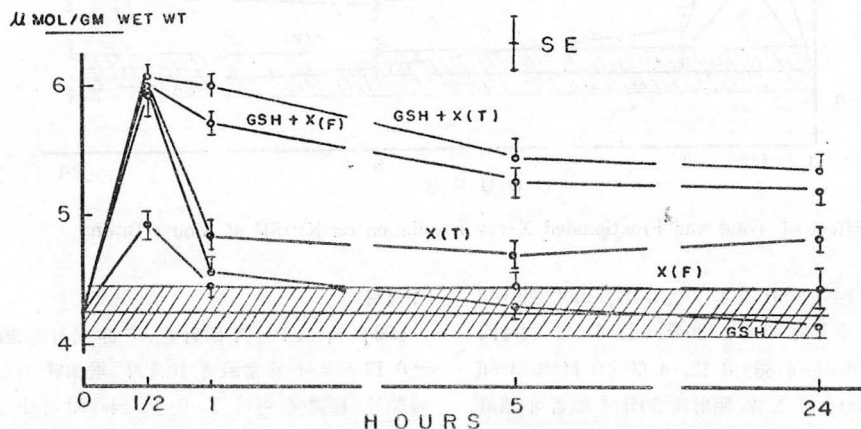


Fig. 3. Effect of Total, Fractionated and Reduced Glutathione on NP-SH of Mouse Brain Following X-ray Irradiation. (1000r)

모두 약간 높은 數値를 나타내나 큰 差異가 없음을 알 수있다.

以上の NP-SH 의 結果를 綜合해서 圖示한것이 第3圖인데 여기서 보는 바와 같이 GSH+XT 나 GSH+XF 의 兩群은 다른 어느 群 보다도 NP-SH 의 값이 全般的으로 顯著히 높음을 알수있다.

考 察

著者들은 SH 化合物中 가장 毒性이 적고 生體內에서 Glutathione Reductase 에 依하여 Glutathione 還元型이 維持되는 GSH 를 마우스에 投與하고 1,000 γ 의 X 線을 單回및 200 γ 씩 5回 分割하여 全身照射하므로서 時間에 따라 腦組織의 NP-SH 의 變動을 살펴봐서 果然 腦組織의 NP-SH 가 投與된 GSH 로서 어떠한 影響을 받을 것이며 單回및 分割 X 線照射로서 어떻게 變換한 것이며 또한 GSH 와 X 線을 併用하였을 때는 어떠한 樣相을 나타낼 것인가 등을 알고 따라서 GSH 와 NP-SH 의 關係를 좀더 究明코져 本實驗을 한것이다.

數種의 Sulfur 含有物質, 特히 Sulfhydryl (SH) 化合物를 放射線照射 直前に 投與하므로서 放射線의 生物學的 影響을 弱화시킬수 있다고 함은 이미 많이 報告되어 있는 事實이다.^{1, 3, 4, 15)}

그러나 이러한 保護物質을 生體에 投與한 後에 組織內의 SH 基가 어떻게 變化하는가에 關한 報告는 그렇게 많지않다. 다만 李¹³⁾는 in vitro 에서 30°C 및 35°C 에서 各種 Cystein 溶液에 마우스 肝組織을 incubate 하니 NP-SH 나 NP-SS 가 時間의 經過에 따라, 또한 Cytsein 의 濃度가 높을수록 增加되었다고 하며, 李¹²⁾는 in vitro 에서 好氣 및 嫌氣狀態에서 마우스 肝組織을 X 線照射後 35°C 에서 30mg Cystein 溶液中에서 incubate 하였더니 時間의 經過에 따라 NP-SH 및 NP-SS 値가 顯著히 增加하였다고 報告하고있다. 著者들의 實驗結果를 綜合해 보면 總量 1,000 γ 의 X 線을 單回에 照射한 群(XT 群)과 200 γ 씩 5回 分割하여 照射한 群(XF 群)을 比較할 때 各實驗時間에서 모두 XT 群의 NP-SH 가 XF 群의 그것보다 높은 數値를 나타내며 兩群에서 모두 30分에서는 正常値에 比해서 뚜렷이 높은 값을 보이고 있다.

이처럼 X 線照射 만으로도 腦組織의 NP-SH 가 正常에 比해서 增加된은 放射線의 照射 만으로도 細胞는 一種의 自家防禦의 方法으로서 細胞內 SH 基가 增加되는 것이 아닌가 생각되며 上記實驗의 結果로서 X 線照射量이 클 수록, 그리고 經過된 時間이 짧을수록, NP-SH 量은 높음을 알수있다. 더욱이 XF 群에서는 XT 群에 比해서 NP-SH 値가 낮으며 正常群의 그것에 比하여 큰 差異가 없다. 即 同一量의 放射線일지라도 分割照射함이 單回 照射에 比하여 組織 또는 細胞에 주는 影響이

적어 損을 分明히 알수 있다. GSH 만을 投與한 群에서는 30分에 NP-SH 가 正常値에 比하여 顯著히 높았으나 1時間 以後 時間의 經過에 따라 急激하게 減少하여 거의 正常値와 비슷함을 본다. 이것은 GSH 가 腦組織內의 SH 基를 一時的으로 增加시키나 時間의 經過로서, 即 1時間以後엔 投與된 SH 基가 排泄 또는 腦組織을 通過해 버림을 示唆한다고 하겠고 Pihl 및 Eldjarn 等^{2, 15, 16)}이 報告한 바와 같이 Cysteine, Cysteamine, Glutathione 等 SH 基를 含有하고 있는 化合物은 細胞內로 容易하게 들어갈 뿐 아니라 細胞內에서 內在 SH 基의 遊離도 促進시킬 수 있다는 點 등으로 미루어 볼 때 쉽게 理解될 수 있는 것이라 하겠다.

GSH 와 X 線을 併用하였을 때는 GSH+XT 群이 GSH+XF 群에 比하여 NP-SH 値가 24時間繼續해서 약간 높은 數値를 維持하였으나 大體의으로 볼 때 큰 差異가 없음을 나타내고 있다. 이로서 單回에 大量의 X 線을 照射해서 細胞 및 組織의 損傷 乃至 破壞를 招來하는 危險性보다 少量을 分割照射하면서 GSH 를 併用하는 것이 그러한 危險性을 排除하면서 비슷한 效果를 얻을수 있음을 示唆한다고 하겠다.

結 論

成熟한 흰 마우스를 材料로 하고 X 線을 單回에 1,000 γ 照射한 群과 200 γ 씩 24時間 간격으로 5回 分割하여 照射한 群, GSH 50mg 를 投與한 後 1,000 γ 의 X 線을 照射한 群 및 GSH 10mg 과 200 γ 의 X 線을 24時間 간격으로 5回 分割 照射한 群에서 腦組織의 NP-SH 의 變動을 30分, 1, 5 및 24時間에서 時間의 經過에 따라 觀察하고 GSH 만 投與한 群 및 正常群의 그것과 各各 比較한 結果 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) X 線照射만을 單回에 1,000 γ 및 200 γ 씩 5回 分割한 兩群을 時間의 經過에 따라 正常群과 比較할 때 兩群 모두 正常群에 比해서 NP-SH 가 照射後 30分에서 顯著히 높은 數値를 나타냈고 單回照射群(XT)에서는 繼續 높은 數値를 維持하고 있으나 分割照射群(XF)에서는 1時間後 부터 正常値와 거의 비슷하게 下降되었다.

2) GSH 만을 投與한 群에서는 投與後 30分에서 NP-SH 値가 顯著히 上昇되었으나 後 急激히 減少되어 時間의 經過로서 正常値와 비슷하게 되었다.

3) GSH 投與와 X 線을 併용 하였을 때는 50mg 의 GSH 를 單回에 投與한 後 1,000 γ 의 X 線을 照射한 群(GSH+XT)과 GSH 10mg 씩, 그리고 200 γ 씩 5回 分割하여 X 線을 照射한 群(GSH+XF)에서 兩群 모두 正常値에 比해서 繼續 顯著히 높은 數値를 나타 냈으며, GSH+XT 群과 GSH+XF 群을 比較하면 GSH+XT 群이 약간 더 높은 數値를 나타내고 있으나 大體의으로 큰 差異가

없었다.

4) X線 만을 照射한 群에 比해서 GSH와 X線을 併用한 群에서 NP-SH가 經時的으로 大體로 높은 數値를 나타내었다.

REFERENCES

- 1) Bacq, Z. M. and Alexander, P. : *Fundamentals of Radiology*, London, Pergamon Press, 1961.
- 2) Bacq, Z. M. and Alexander, P. : *Importance for Radioprotection of the reaction of cells to sulfhydryl and disulphide compounds*, *Nature*, 203:162, 1964.
- 3) Bacq, Z. M. and Herve, A. : *Ein Chemischer Schutz gegen Roentgen-Strahlungen*, *Strahlentherapie*, 95:215-237, 1954.
- 4) Balabukha, V. S. : *Chemical Protection of the Body against Ionizing Radiation*, London, Pergamon Press, 1963.
- 5) Doherty, D. G. : *Radiation Protection and Recovery*, London, Pergamon Press, P. 45, 1960.
- 6) Eldjarn, L. : 18th Ann. Symp. Fund. Cancer Res. and Cell Rad. Biol., Univ. Texas, 1964.
- 7) Elkind, M. M. : *Cellular aspects of Tumor therapy*, *Radiology*, 74:529-41, 1960.
- 8) Ellman, G. L. : *Determination of non-protein bound Sulfhydryl groups.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82:70, 1959.
- 9) Glasser, O., Quimby, E. H., Taylor, L. S., Weatherwax, J. L. and Morgan, R. H. : *Physical Foundations of Radiology*, 3rd Ed. Paul B. Hoeber, Inc. p. 302, 1961.
- 10) Hulse, E. V. : *The acute Toxic Effects of Cysteine and their Modification by X-irradiation.*, *Int. J. Rad. Biol.*, 6: 323-329, 1963.
- 11) Lea, D. E. : *Actions of Radiation on Living Cells*, Cambridge Univ. Press, 2nd., 1962.
- 12) 李鶴九 : Cystein의 好氣 및 嫌氣狀態에서 X-線照射을 입은 마우스 肝組織의 內在 NP-SH 및 NP-SS 및 蛋白質에 미치는 影響 : 綜合醫學 13-489-496, 1968.
- 13) 李三英 : Cystein이 마우스 肝組織의 內在 NP-SH, NP-SS 및 蛋白質에 미치는 影響, 綜合醫學, 13:443~450, 1968.
- 14) Pihl, A. and Eldjarn, L. : *Advances in Radiology*, Edinburgh, Oliver and Boyd, p. 147, 1957.
- 15) Pihl, A. and Eldjarn, L. : *Pharmacological Aspects of Ionizing Radiation and of Chemical Protection in Mammals.*, *Pharmacol. Revs.*, 10:437-474, 1958.
- 16) Revesz, L., Bergstrand, H. and Modig, H. : *Intrinsic non-protein Sulfhydryl Levels and Cellular Radiosensitivity*, *Nature*, 198:4887, 1275-1277, 1963.
- 17) Yakovlev, V. G. and Isupova, L. S. : *In Chemical Protection of the body against Ionizing Radiation*, London, Pergamon Press, 1963.