

흰쥐 간조직의 세포내 비소결합물질의 특성에 관한 연구

최임순 · 부문중 · 김충현

연세대학교 이과대학 생물학과

흰쥐 간세포에 존재하는 비소결합물질의 특성을 조사하기 위하여 4ppm의 비소를 포함하는 NaAsO_2 수용액을 식수로 15일간 흰쥐에 공급하였다. 비소처리군의 간 cytosol분획의 정상단백질의 함량은 감소하였으나 8종류의 stress protein의 함량은 증가하였다. Cytosol에 존재하는 비소결합물질은 한 종류이고, glycine, glutamic acid 및 cysteine의 3종류의 아미노산으로 구성되어있으며 분자량은 500D이었다. Glutathione은 비소와 5:1의 몰비로 결합하였으며 glutathione과 비소의 복합체는 gel filtration chromatography에서 비소결합물질과 같은 이동성을 나타내어 cytosol에 존재하는 비소결합물질은 glutathione으로 추정되었다. Glutathione에 결합한 비소는 미토콘드리아의 호흡, 형태전환 및 팽윤과 수축기능에 있어서 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과들로서, 생체에 직접 처리한 비소에 의하여 stress protein 합성이 촉진되며, 간 cytosol에 존재하는 비소결합물질은 glutathione으로 추정되고, 비소와 복합체를 형성함으로써 비소의 세포독성에 대한 방어기능을 나타내는 것으로 생각된다.

KEY WORDS: Arsenic, Stress protein, Arsenic-binding substance

비금속원소인 비소(As)는 1차대전 당시 전쟁용 독가스(lewisite)의 주성분으로 사용된 바 있는 독성이 매우 큰 원소로서(Squibb and Fowler, 1983) 비소의 산업적 이용도가 증가하면서 인류를 포함한 모든 생명체는 비소중독의 위험성에 노출되어 있다(Harper, 1988; Lagerkvist *et al.*, 1986).

생체로 주입된 비소는 거의 모든 기관에 분포하는데 간장, 신장, 폐, 뇌, 심맥관계 및 신경계 등의 각종 내장질과 골소, 피부, 근육 및 골격계 등의 체간에 병변을 유발한다(Alves and de Meis, 1987; Hood *et al.*, 1988; Shannon and Strayer, 1989; Shneidman and Belizaire, 1986). 또한, 염색체에 영향을 미쳐서 세포의 돌연변이와 개체의 기형발생을 유발하고(Lee *et al.*, 1985; Okui and Fujiwara, 1986), 세포분열에 영향을 미쳐서 각종 기관에서 악성종양을 일으키며(Chen *et al.*,

1985; Pershagen *et al.*, 1984), 면역반응에 이상을 초래하기도 한다(McCabe *et al.*, 1983). 이상과 같은 비소의 독성영향들에 대해서 생체 자체는 조식내로 들어온 비소를 독성이 작은 여러 형태들로 대사하여 체외로 배출함으로써 비소의 독성에 대항하는 기구를 가지고 있다(Maiorino and Aposhian, 1985; Yamauchi and Yamamura, 1984).

비소의 독성을 전쟁용 화학무기로 응용한 역사적 이유로 인해서 비소 중독의 해독에 관한 연구도 비교적 활발하게 병행되어 왔는데(Hood and Vedel-Macrande, 1984; Stine *et al.*, 1984), 최근의 연구는 비소 처리에 의하여 세포에서 합성되는 stress protein에 관한 연구가 활발한 경향이다.

여러 종류의 세포를 배양한 실험에서 정상온도보다 2.5°C 이상의 heat shock을 세포에 주었을 경우에 하나하나의 세포에서는 분자량이 다른 몇 가지의 heat shock protein 합성이 공통적으로 유도되는데(Darasch *et al.*, 1988; Hightower and Guidon, 1989; Westwood and Steinhardt,

이 논문은 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 사유광모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

1989), 아연, 납, 카드뮴 등의 중금속 stress에 의해서도 그 합성이 유도되고 있으며 (Shelton *et al.*, 1986; Taketani *et al.*, 1989; Whelan and Hightower, 1985), 비금속원소인 비소에 의해서도 그 합성이 공통적으로 유도되고 있어서 (Keyse and Tyrrell, 1989; Lee and Hahn, 1988) stress protein으로 통칭되고 있다. 특히 heat shock과 비소를 생체(토끼)에 직접 주었을 경우에도 간장과 신장 및 심장의 세포에서 한 종류의 stress protein이 합성된다는 보고도 있다 (Brown and Rush, 1984). 이러한 stress protein들은 적어도 배양중인 세포에 치사열을 가하였을 때 치사열에 대한 세포의 내성을 증가시켜 세포의 생존율을 1,000배 이상 증가시키는 작용을 하는 것으로 보고되어 있다 (Li, 1983).

동물조직세포는 중금속에 노출되었을 경우에 특정금속에 특이적으로 친화력이 큰 물질의 합성을 증가시키거나 신생합성하는데 이러한 물질들은 단백질이나 oligopeptide로서 금속결합단백질 (metal binding protein) 또는 금속결합물질 (metal binding substance)로 불리고 있으며 야비노산 구성성분 중 cyteine 함량이 대단히 높은 것이 공통적인 특징이다 (Oskarsson *et al.*, 1982; Yamamoto *et al.*, 1987). 이러한 금속결합물질들은 중금속의 독성에 대하여 방어작용을 할 수 있으리라 추정된다 (Jin *et al.*, 1987; Peter and Klassen, 1984).

한편, 비금속 원소인 비소를 아급성 (subacute) 중독시킨 무지개송어 (*Salmo gairdneri*)의 간세포에서는 분자량 20,000 D와 3,000 D인 두 종류의 비소결합물질 (비소결합단백질)이 존재하며 (Oladimeji, 1985), 급성 (acute) 중독된 토끼의 간세포에는 분자량이 서로 다른 세 종류의 비소결합물질이 존재한다 (Bertolero *et al.*, 1981; Marafante *et al.*, 1985). 이와 같이 비소결합물질은 비소의 중독 상태와 중독된 동물의 종에 따라 서로 다를 가능성이 있으며, 위의 보고에서처럼 비소결합물질의 존재만을 밝혔을 뿐 그의 특성에 관해서는 보고된 바가 없고 생물학적 기능에 관해서도 아무런 실험적 증거가 제시되지 않았다. 특히 stress protein과 비소결합단백질과의 관련성에 대해서는 전혀 연구가 되어있지 않다.

이상과 같은 연구결과들을 기초로 하여 본 연구에서는 다음과 같은 연구 목적을 가지고 해당하는 각종 실험을 수행하였다.

흰쥐를 실험동물로 하여 비소를 치사량 이하의 농도로 아급성 중독시켜서 간세포에서 나타나는 단백질 합성양상을 SDS-PAGE를 이용하여 확인하고 세포배양 실험에서 *in vitro* 처리된 heat shock이나 중금속 등의 stress에 의하여 여러 종류의 세포들에서 합성이 유도된 stress protein들이 직접 비소에 중독된 생체내의 간세포에서도 합성이 유도되는지를 확인하였고, 간세포 cytosol에 비소결합물질이 존재하는지를 gel filtration chromatography를 이용하여 확인하고, 이 비소결합물질이 간세포에서 신생합성되는지 또는 이미 존재하고 있는지를 대조군의 cytosol과 비교 실험하여 확인하였다. 비소결합물질의 존재 여부를 확인한 후에 gel filtration chromatography와 ion exchange chromatography를 이용하여 순수분리하고 비소결합물질의 특성을 분석하여 이미 무지개송어 (Oladimeji, 1985)와 토끼 (Bertolero *et al.*, 1981; Marafante *et al.*, 1985)에서 그 존재가 확인된 비소결합물질과의 연관성을 고찰하고 또한 stress protein과의 연관성도 관찰하였다.

그리고 비소결합물질이 비소의 독성영향에 대해 해독작용을 나타낼 수 있는지를 미토콘드리아의 호흡, 형태전환, 팽윤과 수축 등의 기능을 이용하여 조사함으로써 비소결합물질의 생물학적 기능에 관한 실험적인 증거를 제시하였다.

재료 및 방법

재료

실험동물로는 표준사료로 사육한 생후 2~3개월된 체중 200~250g인 수컷 흰쥐 (Sprague Dawley계)를 사용하였으며, 비소화합물은 sodium arsenite (NaAsO_2 , Sigma사)를 사용하였다.

비소중독

실험군은 치사량이하의 농도인 4 ppm의 비소를

포함하는 물을 흰쥐에 15일간 공급하여 아급성 중독시키고, 대조군은 비소가 포함되지 않은 물을 같은 기간 공급하였다.

간세포 cytosol의 분리

흰쥐를 경추이탈(cervical dkslocation)하여 희생시킨 후 간을 적출한 다음 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 7.4)을 사용하여 Potter-Elvehjem 균질기로 25%(w/v) 균질액을 만들었다. 이 균질액을 $105,000 \times g$ 에서 90분간 초원심분리하여(Beckman, L5-50) 상등액만을 취하여 Biuret 방법(Gornall *et al.*, 1949)으로 단백질을 정량하여 실험군과 대조군의 cytosol 단백질 양이 간도록(30 mg/ml) 동일 완충액으로 조정하여 cytosol 분획으로 사용하였다.

간세포 미토콘드리아의 분리

미토콘드리아는 Cain과 Skilleter(1987)의 방법으로 분리하였다. 간을 적출하여 0.25 M sucrose/ 5 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)으로 20%(w/v) 균질액을 만들어 $460 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상등액만을 모아 다시 $12,500 \times g$ 에서 7분간 원심분리하여 형성된 3층의 침전물에서 중간층만을 취하여 1~2 ml의 동일 완충액에 현탁한 후 Biuret 방법으로 단백질을 정량하여 단백질 양이 약 30 mg/ml 이 되도록 동일 완충액으로 조정하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다.

단백질 합성양상

실험군과 대조군의 cytosol을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrohoresis)를 이용하여 두 군의 단백질 합성양상을 조사하였다. 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 vertical slab gel 장치(Manhattan)를 이용하여 polyacrylamide gel 상에서 실시하였다. Cytosol 단백질 $150\sim 300 \mu\text{g}$ 을 Laemmli sample buffer와 혼합한 후 12.5%(w/v) ployacrylamide와 0.1%(w/v) SDS가 포함되어 있는 gel에 loading하였다. 전기영동은 150 V의 전압으로 20 mA의 전류를 일정하게 유지하면서 5시간 실시하였고, 전기영동이 끝난 gel

을 0.25% Coomassie brilliant blue로 1시간동안 염색한 후(Weber and Osborn, 1969), 7.5% acetic acid와 5% methanol의 혼합액으로 탈색시켰으며, 7.5% acetic acid에 보관하였다. 단백질의 분자량 측정을 위한 표준단백질은 다음과 같다: Bovine serum albumin(66,000 D), ovalbumin(45,000 D), carbonic anhydrase(29,000 D), trypsinogen(24,000 D), trypsin inhibitor(20,000 D), α -lactoalbumin(14,200 D).

비소정량

시료에 포함된 비소의 양은 Gupta와 Gupta(1986)의 방법과 standard methods(Franson, 1985)의 방법을 혼합 수정하여 결정하였다.

비소결합물질(AsBS)의 분리

(1) Sephadex G-75 gel filtration chromatography

Cytosol 단백질 6 ml(bed volume의 1.8%)를 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 7.4)으로 평형화시킨 Sephadex G-75 column($2.3 \times 80 \text{ cm}$)에 loading하여 $2 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 의 속도로 용출시켰다. 이때 각 분획을 fraction collector(Bio Rad 2110)를 이용하여 drop counting으로 4.3 ml 씩 시험관에 받아서 spectrophotometer로 파장 250 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 각 분획의 비소의 양을 측정하여 비소를 포함하고 있는 68~76번의 분획을 모아 냉동 건조법으로 농축하였다(Fig. 2, 3).

(2) Sephadex A-25 ion exchange chromatography

Sephadex G-75 gel filtration chromatography에서 분리 농축한 시료를 증류수 2 ml에 현탁시켜 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.5)으로 평형화시킨 Sephadex A-25 column($2.3 \times 19 \text{ cm}$)에 loading하여 0~0.5 M NaCl의 직선농도 구배를 걸어 $21.3 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 의 속도로 용출시켰다. 각 분획을 6.2 ml 씩 시험관에 받아서 각 분획의 비소의 양을 측정하여 비소를 포함하고 있는 21~30번 분획을 모아 냉동 건조법으로 농축시켰다(Fig. 4).

(3) Sephadex G-15 gel filtration chromatography

Sephadex A-25 ion exchange chromatography에서 분리 농축한 시료를 증류수 2 ml에 현탁시켜 증류수로 평형화시킨 Sephadex G-15 column(1.3 × 195 cm)에 loading하여 0.36 ml · h⁻¹ · cm⁻²의 속도로 용출시켰다. 이때 각 분획을 3.2 ml씩 시험관에 받아서 각 분획을 비소를 포함하고 있는 61~66번의 분획을 모아 냉동 건조법으로 농축한 후 증류수 1 ml에 현탁하여 비소결합물질(arsenic binding substance, AsBS)로 명칭하고 특성 분석에 이용하였다(Fig. 5).

비소결합물질의 특성

(1) 비소결합물질의 분자량 측정

AsBS의 분자량은 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 7.4)으로 평형화시킨 Sephadex G-5 gel filtration chromatography(column size: 1.3 × 195 cm)를 이용하여 결정하였다. Blue dextran(M. W. 2,000,000 D)으로 void volume(V₀)을 결정한 후 분자량 측정을 위한 표준물질로는 oxidized glutathione(GSSG, 913.66 D), reduced glutathione(GSH, 307.33 D), cysteine(121.16 D)을 사용하여 각각의 elution volume(V_e)을 결정하여 V₀에 대한 V_e의 비(V_e/V₀)와 분자량과의 관계로 표준곡선을 만들어 결정하였다.

(2) 비소결합물질의 아미노산 조성 분석

AsBS의 아미노산 조성은 Duggan(1957)의 방법으로 1차원 paper chromatography를 이용하여 분석하였다.

AsBS를 6N HCl을 처리하여 진공상태를 유지하면서 105°C에서 24시간 열처리하여 분해한 후 *n*-butanol: glacial acetic acid: 증류수(100 : 22 : 50, v/v/v)를 용매로 하여 paper(Whatman, 1 Chr) 상에서 전개거리가 24 cm가 되게 상행전개하였다. 전개를 마친 후 0.25% ninhydrin in 95% ethanol을 살포하고 70°C oven에 수 분간 방치하여 발색시켜 반점을 확인하여 R_f 값을 표준 아미노산이나 분해된 GSH의 아미노산들과 비교하여 하나하나의 아미노산을 결정하였다.

Glutathione-arsenic interaction *in vitro*

시험관에서 GSH(13 mg/ml)와 NaAsO₂(2.6 또는 26 mg/ml)를 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에서 반응시킨 후 증류수로 평형화시킨 Sephadex G-15 column(1.3 × 195 cm)에 loading하여 chromatography를 수행한 후 각 분획에서 GSH와 비소의 양을 측정하여 GSH와 비소간의 결합물비를 확인하였다.

Glutathione 정량

GSH의 양은 Chung과 Maines(1981)의 방법을 수정하여 결정하였다.

간세포 미토콘드리아내로의 비소의 수송

Microcentrifuge 시험관에서 0.25 M sucrose (pH 7.4) 용액으로 완충된 미토콘드리아(3.6 mg protein)에 1 mM NaAsO₂를 처리하여 30°C에서 0~5분간 반응시킨 후, 0.5 mM NEM을 첨가하여 반응을 정지시켰다(Harris and Achenjang, 1977). 이 반응액을 microcentrifuge로 2,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상등액을 버리고 동일 완충액 1 ml를 첨가하여 다시 원심분리한 후 침전물을 취하여 비소의 양을 측정하였다.

미토콘드리아의 호흡률

미토콘드리아의 호흡률은 Cain과 Skilleter(1987)의 방법을 일부 수정하여 Clark type oxygen electrode를 부착한 biological oxygen monitor(YSI-5300)를 이용하여 측정하였다. 0.25 M sucrose, 5 mM KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl이 포함된 호흡완충액(pH 7.4)을 공기포로 포화시킨 후 호흡완충액 2.9 ml에 미토콘드리아 분획 0.1 ml를 첨가하여(반응부피 3 ml) 1분동안 방치한 후, 기질로 5 mM의 pyruvate와 malate의 혼합액을 첨가하여 state IV 호흡을 유도하여 5분동안의 반응액내의 산소포화도 감소로 측정하였다. 이상의 반응은 30°C에서 수행하였다.

미토콘드리아의 형태전환

호흡을 15분간 계속 유지시켜 state IV 호흡 (Chance and Williams, 1955)에서의 미토콘드리아의 형태전환을 유도하였다. 15분간의 호흡후에 25% glutaraldehyde 0.12 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 4°C에서 1시간 이상 현탁 상태로 방치하였다가 35,000 × g에서 5분간 원심분리하여 미토콘드리아 침전물을 얻어 (Goyer and Krall, 1969), 통상적인 전자현미경 표본제작법으로 표본을 만들어 투과전자현미경으로 관찰하였다.

미토콘드리아의 팽윤과 수축

0.25 M sucrose(pH 7.4)와 미토콘드리아 분획 (3.6 mg protein)을 spectrophotometer cuvette에 넣고(반응부피 3 ml) 파장 520 nm에서의 흡광도를 추적하여 미토콘드리아의 팽윤을 측정하였다 (Tedeshi and Harris, 1955). 반응 15분 후에 cuvette에 5 mM ATP를 첨가하여 미토콘드리아의 수축을 유도하여 계속 흡광도를 추적하였다 (Mints *et al.*, 1967).

비소결합물질의 해독작용

AsBS에 결합된 0.4 mM의 비소를 미토콘드리아에 처리하여 미토콘드리아의 호흡률, 형태전환, 팽윤과 수축을 상기의 방법으로 측정하였다.

결 과

단백질 합성양상

4ppm의 비소에 중독된 흰쥐 간세포 cytosol은 정상단백질의 함량은 감소하였으나 분자량 74,000, 61,000, 35,000, 31,000, 30,000, 23,000, 17,000, 12,000 D인 8종류의 stress protein의 함량은 증가하였다(Fig. 1).

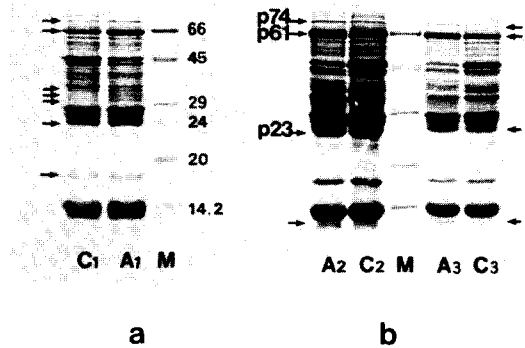


Fig. 1. SDS-PAGE of liver cytosol from rats treated with arsenic. a and b are carried out separately. C: cytosol from control rat liver. A: cytosol from As-fed rat liver. C₁, A₁, C₃, A₃: 150 μg cytosol protein loaded. C₂, A₂: 300 μg cytosol protein loaded. M: molecular weight marker proteins.

비소결합물질의 분리

1) Sephadex G-75 gel filtration chromatography

4 ppm 비소 처리군의 cytosol은 68~76번 분획에서 AsBS가 용출되었고 73번 분획에서 peak를 나타내었으며 68~76번 분획의 UV 흡광도는 파장 250 nm에서 280 nm 보다 높았다(Fig. 2).

대조군의 cytosol은 비소처리군과 같은 양상의 UV 흡광도를 나타내었고 AsBS가 존재하는 분획도 같은 양상으로 나타났다(Fig. 3).

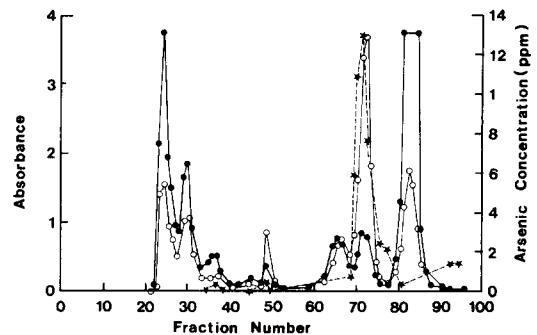


Fig. 2. Sephadex G-75 gel filtration chromatographic profiles of cytosol from rats fed on water containing As(4ppm). ○—○: absorbance at 250nm. ●—●: absorbance at 280nm. ★—★: As concentration

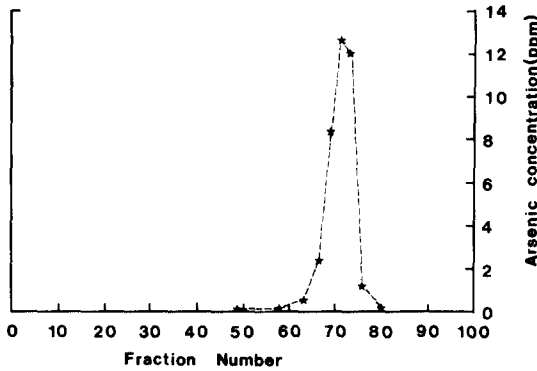


Fig. 3. Sephadex G-75 gel filtration chromatographic profiles of cytosol from rats fed on normal water. ★—: As concentration.

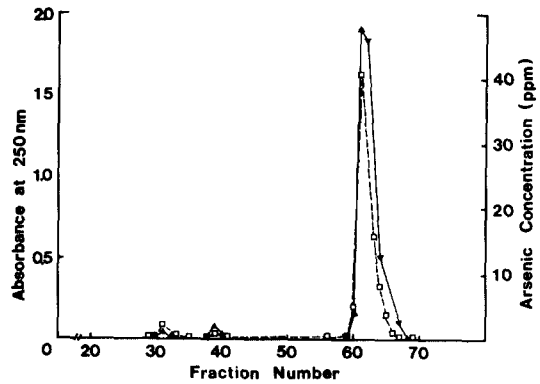


Fig. 5. Sephadex G-15 gel filtration chromatographic profiles of arsenic binding substance. □—□: absorbance at 250nm, ▲—▲: As concentration.

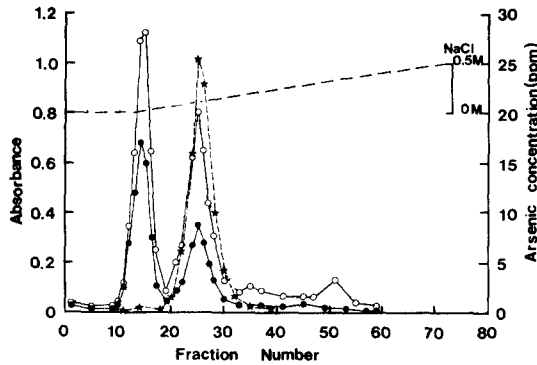


Fig. 4. Sephadex A-25 ion exchange chromatographic profiles of arsenic binding substance. ○—○: absorbance at 250nm, ●—●: absorbance at 280nm ★—★: As concentration.

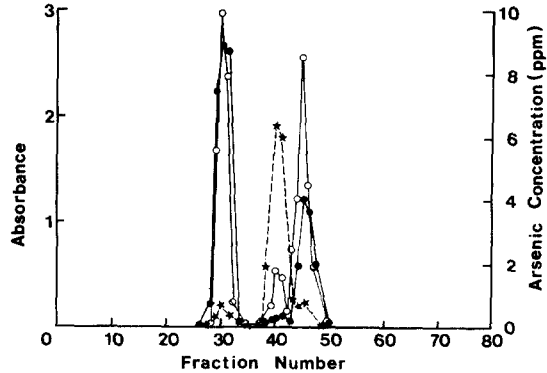


Fig. 6. Sephadex G-15 gel filtration chromatographic profiles of cytosol without proteins more than 10kD. ○—○: absorbance at 250nm, ●—●: absorbance at 280nm ★—★: As concentration

2) Sephadex A-25 ion exchange chromatography

Fig. 6의 68~76번 분획을 모은 AsBS는 0.07~0.15 M NaCl의 농도 기울기에서 이온교환되어 20~30번 분획에 용출되었고 25번에서 peak를 나타내었으며 파장 250 nm에서의 흡광도가 280 nm 보다 높았다(Fig. 4).

3) Sephadex G-15 gel filtration chromatography

Fig. 8의 20~30번 분획의 AsBS는 G-15 column 상에서 60~70번 분획에서 용출되었고 63번 분획에서 peak를 나타내었다. (fig. 5).

Cytosol을 Amicon ultrafiltration으로 분자량 10,000 D 이상을 제거한 여과액에서 AsBS는 37

~47번 분획에서 용출되었고 40번 분획에서 peak를 나타내었다. (Fig. 6).

비소결합물질의 특성

1) 비소결합물질의 분자량

Sephadex G-15 column 상에서 표준분자량곡선을 이용한 결과 AsBS의 분자량은 500 D이었다 (Fig. 7).

2) 비소결합물질의 아미노산 조성

6 N HCl로 105°C에서 24시간 분해한 AsBS를 paper chromatography로 아미노산 주성을 분석한

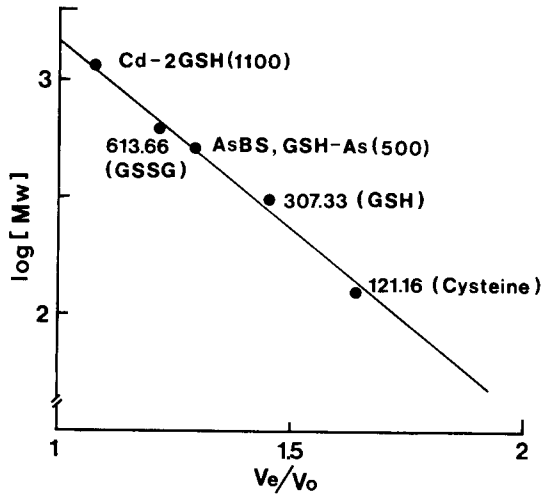


Fig. 7. Determination of molecular weight of arsenic binding substance by Sephadex G-15 gel filtration chromatography. Bed size: 1.3 × 195 cm.

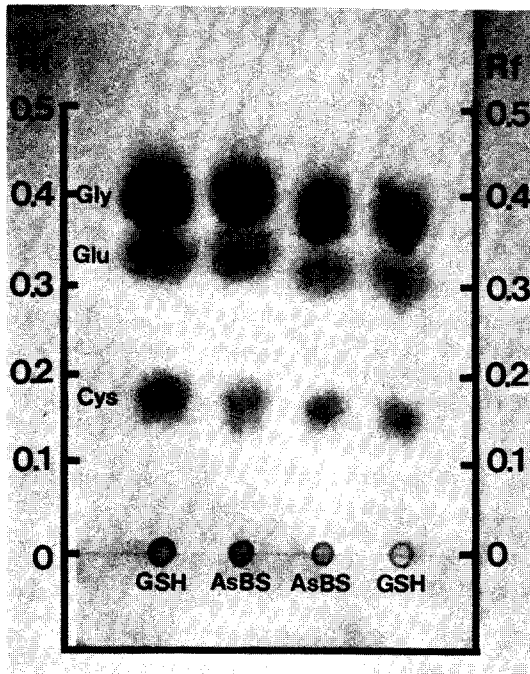


Fig. 8. Amino acid analysis of purified arsenic binding substance. Solvent for development: *n*-butanol/glacial acetic acid/d.w. (100/25/50, v/v/v).

결과 Rf 값이 0.36, 0.30, 0.15인 세 종류의 아미노산 반점이 관찰되었고 GSH의 아미노산 성분과 같은 cysteine, glycine 및 glutamic acid의 세 종류의 아미노산들로 구성되어 있었다(Fig. 8).

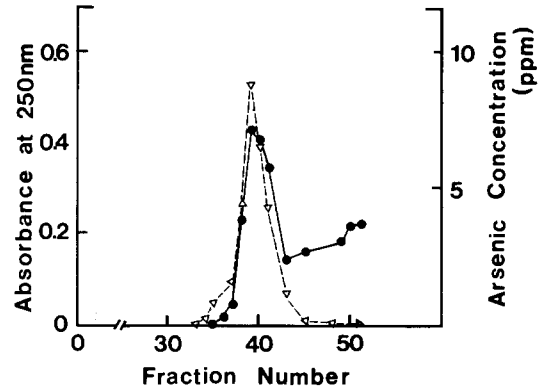


Fig. 9. Sephadex G-15 gel filtration chromatographic profiles of GSH-As (1 : 5) mixture. Molar ratio of GSH and As mixed is 1:5. ∇ — ∇ : absorbance at 250nm. ●—●: As concentration.

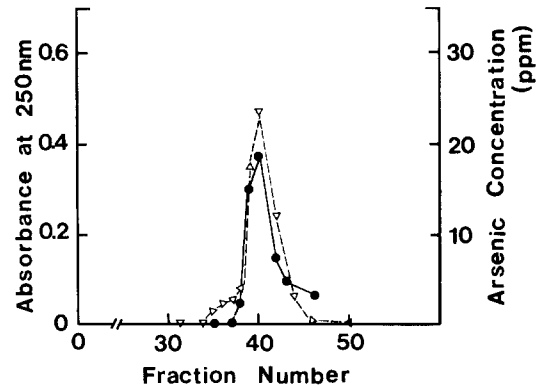


Fig. 10. Sephadex G-15 gel filtration chromatographic profiles of GSH-As (5 : 1) mixture. Molar ratio of GSH and As mixed is 5 : 1. ∇ — ∇ : absorbance at 250nm. ●—●: As concentration.

3) GSH-As interaction *in vitro*

GSH:As의 볼비를 1 : 5로 하여 반응시킨 시료를 Sephadex G-15 column으로 용출시킨 결과 GSH와 As의 peak는 일치하였고(Fig. 9), GSH:As의 결합 볼비는 6.01 : 1이었다(Table 1).

GSH:As의 볼비를 5 : 1로 하여 반응시킨 시료도 GSH와 As의 peak가 일치하였고 40번 분획에서 peak를 나타내었으며(Fig. 10), GSH:As의 결합 볼비는 4.76 : 1이었다(Table 2).

간세포 미토콘드리아내로 비소의 수송

처리된 1 mM As는 미토콘드리아 내로 수송되

Table 1. The binding of arsenic to glutathione from Fig. 9

Fraction Number	GSH Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Arsenic Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Molar Ratio (GSH/As)	Average molar ratio
38	105.9	3.9	6.60	6.06
39	189.2	7.2	6.35	
40	149.8	6.9	5.24	

Table 2. The binding of arsenic to glutathione from Fig. 10

Fraction Number	GSH Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Arsenic Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Molar Ratio (GSH/As)	Average molar ratio
39	112.5	5.28	4.69	4.76
40	142.5	7.20	4.83	
41	96.5	4.95	4.75	

Table 3. The effect of arsenic on mitochondrial respiration with the substrate of 5 mM (pyruvate + malate).

Group	Respiration rate	% of control	p value
Control	4.00 \pm 0.158	100.0	p < 0.005 N. S.
0.4 mM As	2.75 \pm 0.227	68.8	
GSH-0.4mM As	3.73 \pm 0.184	93.3	

Data are expressed as mean \pm S.E. with 6 experiments. Units of respiration rates are nmoles of O₂ consumed/mg protein/min.

며 2분 이내에 포화되는 양상을 나타내었으며 mg protein당 6 nmoles 정도의 비소가 미토콘드리아 내에 포화되었다(Fig. 11).

비소결합물질의 해독작용

1) 미토콘드리아의 호흡

pyruvate와 malate의 혼합액을 호흡기질로 사용한 경우에 0.1~1.0 mM의 As에 의하여 호흡이 억제되었다(Fig. 12). 0.4 mM As는 미토콘드리아의 호흡을 32% 감소시켰으나 GSH에 결합된 0.4 mM As는 거의 영향을 미치지 않았다(Table 3).

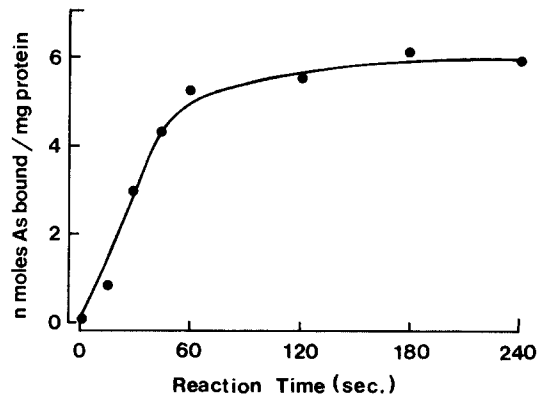


Fig. 11. Arsenic uptake by mitochondria. 1mM As is added.

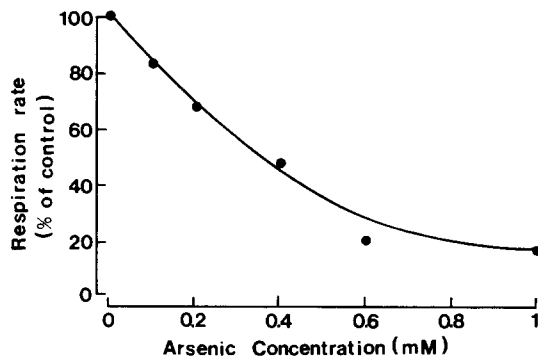


Fig. 12. Mitochondrial respiration depending on As concentration with the substrate of pyruvate and malate.

2) 미토콘드리아의 형태 전환

미토콘드리아는 분리 직후에 응축(condensed) 형태를 하고 있었다(Fig. 13). pyruvate와 malate의 혼합액을 기질로 사용한 호흡 15분 후에는 정상(orthodox)형태로 전환되었고(Fig. 14), 0.4 mM As(Fig. 15)를 처리한 경우에는 일부가 중간(intermediate) 형태를 나타내었으며 팽윤된(swollen) 형태도 존재하였다. 그러나 GSH에 결합된 0.4 mM As를 처리한 경우에는 거의 모든 미토콘드리아가 정상형태였다(Fig. 16).

3) 미토콘드리아의 팽윤과 수축

미토콘드리아는 0.25 M sucrose 완충액(pH 7.4)에서 자발적인 팽윤(swelling)이 작은 크기로 일어났으나 5 mM ATP를 처리하면 수축(contraction)하는 현상이 나타났다(Fig. 17-a). 0.3 M KCl로 팽윤을 유도한 경우에는 팽윤이 크게 일어나며, ATP 처리시에 빠른 속도로 수축하였다(Fig. 17-b).

0.4 mM As 처리시에는 비교적 큰 크기의 팽윤을 유발하였으며, ATP를 처리한 경우에는 자발적인 팽윤이나 KCl에 의하여 유도되는 경우보다 수축이 덜되는 경향을 나타내었다(Fig. 17-c).

GSH에 결합된 0.4 mM As의 처리는 작은 크기의 팽윤을 유발하였으며, ATP를 처리한 경우에 빠르게 수축하였다(Fig. 17-d).

고 찰

+3가 비소화합물인 sodium arsenite(NaAsO_2 ; 비소농도 4 ppm)를 포함하는 물을 15일간 흰쥐에 공급한 결과 각 개체가 sodium arsenite를 섭취한 총량은 2 mg 정도로서, 흰쥐에 sodium arsenite를 구강으로 급성투여한 경우의 LD_{50} 인 10 mg NaAsO_2/Kg body weight에 해당하는 양이다(Squibb and Fowler, 1983).

비소에 중독된 흰쥐 간세포의 cytosol protein을 SDS-PAGE로 분리한 결과 정상단백질들의 함량은 감소하였으나 분자량 74, 61, 35, 31, 30, 23, 17, 12 KD 정도인 8종류의 stress protein 함량이 증가하였다(Fig. 1). 세포배양 실험에서 +3가 비소를 배지에 처리하였을 경우에 계배(chick embryo) 세포에서는 분자량 89, 73, 35, 27 KD인 4종류의 단백질이 가장 많이 합성되며(Johnston *et al.*, 1980), 무지개송어의 섬유아세포(fibroblast)에서는 분자량이 87, 70, 62, 42, 32, 30 KD인 stress protein이 합성되며, 그 중 30과 70 KD의 단백질이 가장 많이 합성된다(Kothary and Canido, 1982). 본 실험에서는 74, 61, 23 KD의 단백질이 가장 현저하게 합성되는 것으로 나타났다.

비소를 생체에 직접 주사한 경우에도 간, 신장 및 심장의 cytosol에 분자량 74 KD인 한 종류의 stress protein이 합성된 것이 확인되었다(Brown and Rush, 1984). 따라서 stress protein은 *in vitro*나 *in vivo*에 가해진 stress에 의하여 합성이 증가하는 것으로 생각된다.

4 ppm의 비소에 중독된 흰쥐의 간세포 cytosol을 Sephadex G-75 gel filtration chromatography로 분리하여 용출된 각 분획에서 비소의 양을 측정하였으나 포함된 비소의 양이 너무 적어서 측정할 수가 없었다. 비소처리된 간세포의 cytosol 내에 포함된 비소의 함량을 조사하였더니 cytosol protein 1 mg 당 7 ng 정도의 비소가 포함된 것으로 측정되었는데 bed size 2.3×80 cm인 column 상에 loading되는 cytosol protein 양은 100~500 mg 범위이므로 비소의 양은 0.7~3.5 μg 범위에 있게 되어 gel filtration chromatography 결과 용

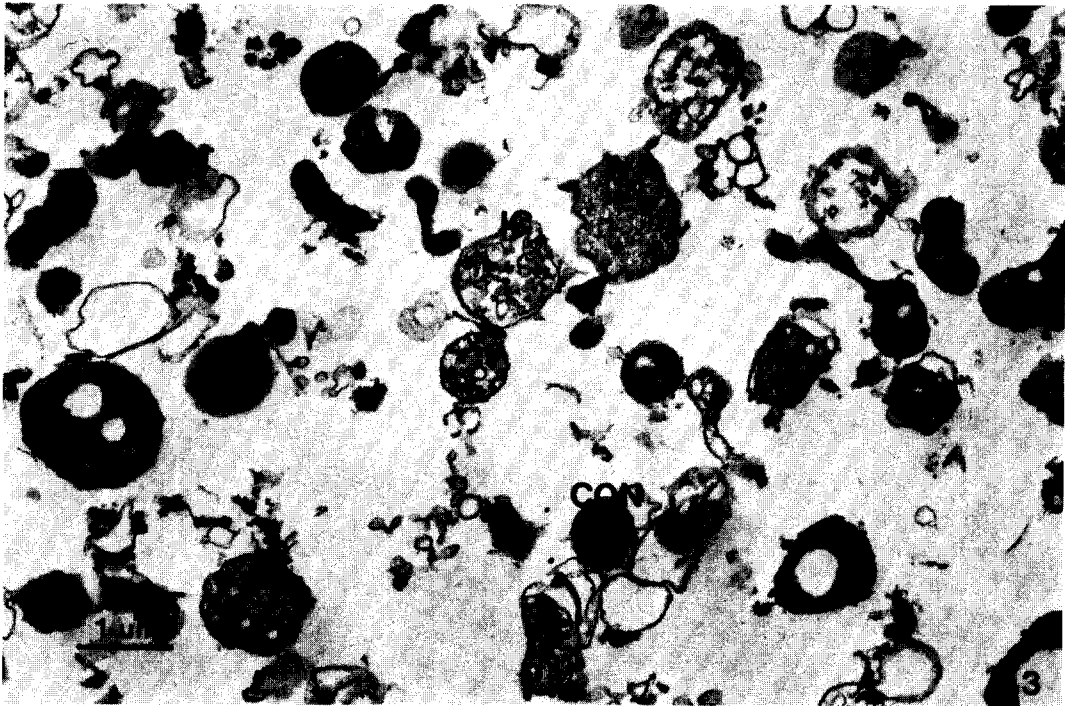


Fig. 13. Mitochondria just after isolation from rat liver. Most mitochondria have condensed conformation(CON) and some have intermediated conformation(IC).

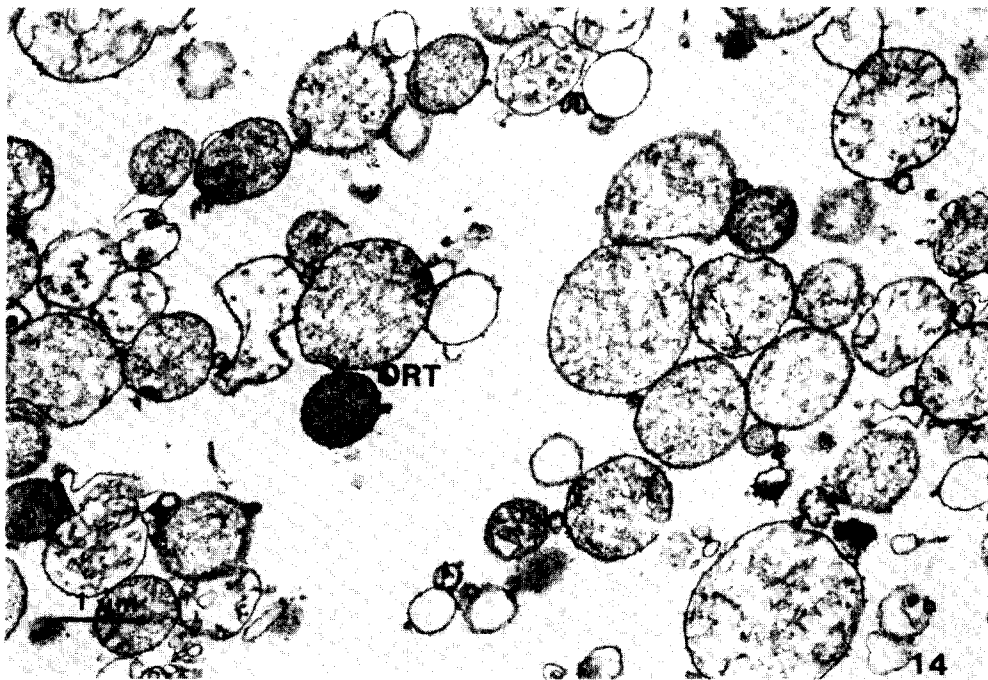


Fig. 14. Normal mitochondria after 15min of respiration with pyruvate and malate. All mitochondria are transformed from condensed to orthodox conformation(ORT).

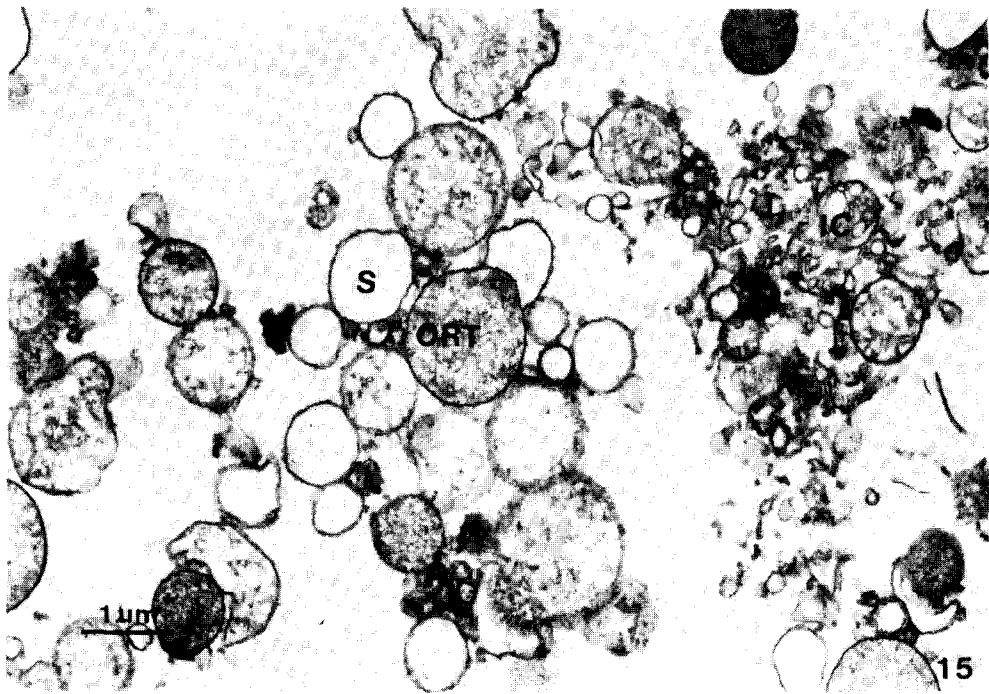


Fig. 15. 0.4mM As-treated mitochondria after 15min of respiration with pyruvate and malate. Orthodox and intermediate conformation are seen, and swollen mitochondria are seen, too.

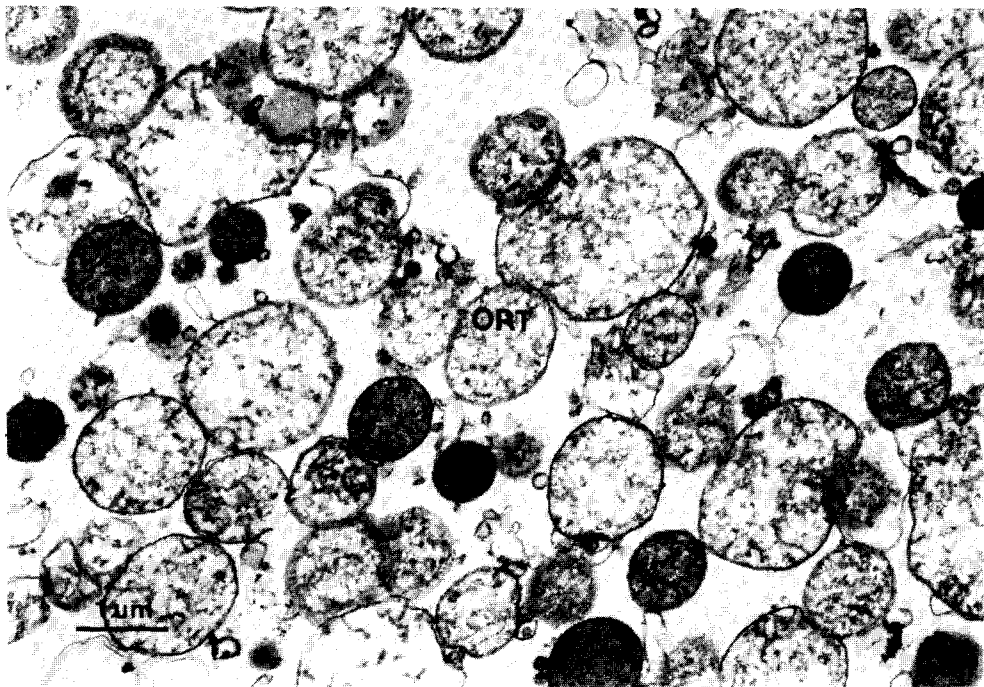


Fig. 16. 0.4mM As-GSH complex-treated mitochondria after 15min of respiration with pyruvate and malate. All mitochondria have orthodox conformation.

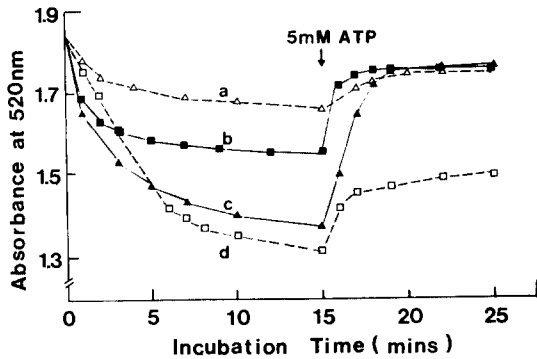


Fig. 17. Effect of arsenic on swelling-contraction of mitochondria. \triangle — \triangle spontaneous swelling. \blacktriangle — \blacktriangle swelling induced by 0.3M KCl. \square — \square 0.4mM As-induced swelling. \blacksquare — \blacksquare swelling induced by 0.4mM As-GSH complex.

출된 각 분획에서 비소의 양을 측정하는 것은 비소정량방법의 민감성에도 불구하고 불가능한 것으로 생각되었다. 따라서 통상적인 단백질 분리 방법을 수정하여 cytosol protein에 200 mg의 sodium arsenite(NaAsO_2)를 처리하여 10분 정도 방치한 후 Sephadex G-75 gel filtration chromatography를 수행하였다.

용출된 각 분획에서 비소의 함량을 측정한 결과 68~76번 분획에서 비소가 포함되어 있었고 73번 분획에서 하나의 peak를 나타내었다(Fig. 2). 따라서 이들 분획에 비소결합물질(AsBS)이 존재하며, 이들 68~76번 분획의 UV 흡광도가 파장 280 nm에서 보다 250 nm에서 훨씬 높은 것으로 보아 아미노산 구성성분 중 cysteine 함량이 크다는 것을 추측할 수 있었다(Katoh et al., 1984).

한편 정상인 물만을 공급한 대조군 흰쥐의 간세포 cytosol을 비소처리군과 같은 방법으로 Sephadex G-75 gel filtration chromatography를 수행한 결과, cytosol protein이 용출되는 양상은 비소처리군의 cytosol(Fig. 2)과 비슷하여 비소의 용출양상만을 표시하였는데(Fig. 3) 비소결합물질의 peak는 비소처리군과 같은 73번 분획에서 나타났으며 peak의 높이에서도 별다른 차이는 없었다. 이 두 군의 chromatography는 cytosol protein의 농도를 30 mg/ml로 같게 조정하고 동일한 부피(6 ml)를 동일한 column 상에 loading 하여 용출한 것이므로 비소결합물질은 투여한 비

소에 의하여 신생합성(*de novo synthesis*)되는 것이 아니라 이미 간세포의 cytosol에 존재하는 물질임을 확인할 수 있었다.

또한 분자량 13 KD 정도인 cytochrome c를 표준물질로 사용하여 비교하여 보았을 때 이보다는 분자량이 훨씬 작은 것으로 추측되어 분자량이 307.33 D인 GSH을 다시 표준물질로 이용하였다. GSH 용출액은 AsBS peak와 비슷한 분획에서 peak를 나타내었으므로 AsBS는 분자량이 매우 작은 oligopeptide 정도로 생각되었다. 따라서, AsBS의 순수도를 높이기 위하여 다음의 실험단계로 AsBS를 모아 농축한 후에 소량의 증류수에 현탁한 후 완충액 성분으로 포함되어 있는 Tris염을 제거하지 않은 상태에서 바로 Sephadex A-75 ion exchange chromatography를 수행하였다.

AsBS는 0.07~0.15 M NaCl의 농도기울기에서 음이온 교환되어 20~30번 분획에 용출되었다(Fig. 4). 음이온 교환으로 순도를 높인 AsBS를 농축하여 다시 소량의 증류수에 현탁하여 음이온 교환 과정에서 포함된 염을 제거하지 않은 상태의 AsBS를 Sephadex G-15 gel filtration chromatography하였다. 이 결과 용출양상은 매우 큰 변화를 초래하여 AsBS는 60~70번 분획에서 용출되어 63번 분획에서 peak를 나타내었다(Fig. 5). 이를 보충하기 위하여 cytosol에 sodium arsenite를 처리한 후 Amicon ultrafiltration으로 분자량 10 KD 이상인 단백질을 제거하여 Sephadex G-15 gel filtration chromatography를 수행한 결과 AsBS는 37~47번 분획에서 용출되었으며 40번 분획에서 peak를 나타내었다(Fig. 6).

Sephadex G-15 gel filtration chromatography에서 AsBS의 정상적인 용출 peak는 40번 분획인데, 음이온 교환 후의 분리과정에서 이 peak가 63번 분획으로 이동한 것은 음이온 교환 과정에서 포함된 Tris염과 NaCl이 AsBS 분획 농축에 의해서 고농도로 포함되어 있기 때문으로 생각된다. 그러나 60~70번 분획(Fig. 5)의 AsBS 용출양상은 단일 peak를 보일 뿐 아니라 peak가 대단히 날카롭게 형성되어 순도가 높을 것으로 생각되어 이 분획을 모아 농축시킨 후 소량의 증류수에 현탁하여 AsBS의 특성을 조사할 시료로 사용하였다.

Sephadex G-15 Gel filtration chromatography

로써 AsBS의 분자량을 측정 한 결과 500 D이었으며 GSH-As 복합체 분자량과 동일한 것으로 나타났다. AsBS를 6 N HCl 용액하에서 105°C, 24시간 열처리 하여 완전 가수분해하여 paper chromatography를 수행한 결과 Rf값이 0.36, 0.30, 0.15인 세 종류의 아미노산 반점이 관찰되었으며, GSH를 가수분해한 용액을 표준 아미노산으로 사용한 결과와 동일하였다. 따라서 AsBS는 glycine, glutamic acid, cysteine의 세 종류의 아미노산으로 구성된 peptide임을 알 수 있었다.

AsBS에 대한 분자량 측정(Fig. 7)과 아미노산 조성 분석(Fig. 8) 등의 결과로부터 AsBS는 GSH와 비소가 복합체를 이루고 있는 것으로 추측되며, 따라서 간세포에 존재하는 비소결합물질(AsBS)은 GSH일 것으로 추측되었다.

추측된 비소결합물질(AsBS)과 비소간의 결합비를 조사하기 위하여 glutathione과 sodium arsenite를 시험관내에서 반응시켜 Sephadex G-15 gel filtration chromatography를 수행하여 GSH와 비소의 반응몰비(molar ratio)를 1:5로 하여 비소가 반응액에 과잉으로 존재하여 비소복합체를 형성하지 않는 GSH가 존재하지 않게 하였다.

이 결과 GSH와 비소의 peak는 일치하였으며 과잉의 비소가 훨씬 뒷쪽의 분획에서 용출되었다(Fig. 9). Peak 주변의 분획들에서 각각 GSH와 비소의 결합비를 조사한 결과 평균결합몰비는 6.06:1로서 GSH 6분자와 비소 1분자가 복합체를 형성하는 것이 확인되었다(Table 1). GSH와 비소의 반응몰비를 5:1로 한 경우에도 GSH와 비소의 peak는 일치하였고(Fig. 10) GSH와 비소의 평균결합몰비는 4.76:1로서 GSH 5분자와 비소 1분자가 복합체를 이루고 있는 것으로 나타났는데(Table 2), 비소가 과잉으로 존재한 반응에서의 결합몰비 6.06:1보다 작은 것은 비소가 충분히 많은 상태에서 비소에 결합하지 않은 GSH가 자동산화되어(Meister and Anderson, 1983) 산화된 GSH는 DTNB 방법으로는 측정되지 않기 때문으로 생각된다(Chung and Maines, 1981).

Oladimeji(1985)는 아급성 중독시킨 무지개송어의 간세포에 분자량 20 KD와 3 KD인 두 종류의 비소결합단백질이 존재한다고 보고하였는데 본 연구에서 흰쥐 간세포에는 분자량이 500 D인

한 종류의 비소결합물질만이 확인되었다. 무지개송어와 흰쥐의 간세포에 존재하는 AsBS는 종류의 차이가 있으므로 서로 다를 것으로 생각되지만 무지개송어의 분자량 3 KD인 AsBS는 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography에 의하여 분자량이 결정된 것으로서 Sephacryl S-200 gel을 구성하는 bead들의 low exclusion limit가 5 KD인 것을 고려하면 분자량 3 KD인 AsBS를 Sephacryl S-200 gel을 이용하여 분자량을 측정 한데서 생긴 차이일 수 있다. 또한 Oladimeji(1985)가 사용한 column의 bed size가 2.6×100 cm로서 분자량이 작은 물질을 분리확인하는데는 또한 어려운 점이 있는 것이다.

카드뮴결합단백질들 중에서 분자량이 1.4 KD인 저분자 카드뮴결합물질(LMCdBS)을 분리 확인한 Katoh 등(1984)은 Sephadex G-15 gel과 bed size 0.9×180 cm인 column을 사용하여 확인한 것으로 볼때, bed size 1.3×195 cm인 column을 사용한 본 연구와 Oladimeji(1985)의 연구 결과에 차이가 있는 것으로 생각된다. 따라서 무지개송어의 간세포에 존재하는 분자량 3 KD인 AsBS(Oladimeji, 1985)는 본 연구에서 추측된 GSH와 관련되어 있을 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

비소를 급성중독시킨 토끼의 간세포에는 세 종류의 AsBS가 존재하는데(Bertolero *et al.*, 1981; Marafante *et al.*, 1985) 이들 중 분자량이 가장 작은 AsBS는 분자량이 결정되지 않았지만, 본 연구 결과에서 대조군의 cytosol에도 AsBS가 이미 존재하고 있으므로, GSH일 가능성 또한 배제할 수 없다. 본 연구 결과에서 분자량이 큰 AsBS는 확인되지 않았으며 Oladimeji(1985), Bertolero 등(1981), Marafante 등(1985)의 연구결과들을 통해서 볼때, AsBS는 동물의 종에 따라, 그리고 비소의 중독방법에 따라 다를 것으로 생각되며 적어도 분자량이 작은 AsBS는 동물의 종이나 비소의 중독방법과는 무관하게 공통적으로 존재하는 것으로 추측된다.

카드뮴, 크롬, 납 등의 중금속에 의해서 각각 여러 종류의 서로 다른 금속결합단백질들이 세포에서 신생합성되거나 이미 존재하고 있는 것으로 알려져 있는데(Goering and Fowler, 1985; Katoh

et al., 1984; Yamamoto et al., 1987), 이중 분자량이 가장 작은 것은 카드뮴의 경우에는 GSH인 것이 확인되었고(Katoh et al., 1984), 크롬의 경우에는 아미노산 구성성분이 GSH와 같다는 것이 확인되었으며(Yamamoto et al., 1987), 납에 의해서도 분자량이 매우 작은 납결합물질이 존재한다고 보고되었다(Lim et al., 1987).

본 연구결과에서 추측된 AsBS는 중금속의 저분자 결합물질들과 동일한 것으로 생각되며, 고분자 결합물질의 존재에 대해서는 비소의 중독방법을 급성으로하여 자세한 연구를 할 필요성이 있다.

한편, Kim(1990)의 연구결과에 의하면 *in vitro*에서 GSH는 Cd과 결합하여 Cd-2GSH 복합체를 형성하며 그 결합물비는 약 2:1로서 GSH 2분자와 Cd 1분자가 결합한다고 하였다. 이 Cd-2GSH 복합체의 분자량을 측정된 결과 1,100 D로 확인되었다(Fig. 7). *in vitro*에서 GSH와 비소는 서로 결합하여 GSH-As 복합체를 형성하며(Fig. 9, 10) GSH와 비소의 결합물비는 약 5:1 또는 6:1로서 GSH 5-6 분자와 비소 1분자가 결합하였다(Table 1, 2). 2개의 GSH가 복합체를 이룬 Cd-2GSH 복합체의 분자량은 1,100 D인데 비하여 5-6개의 GSH가 복합체를 이룬 GSH-As 복합체의 분자량이 500 D로서 오히려 작았다. 이러한 결과는 Cd-GSH 간의 결합과 GSH-As 간의 결합 형태에는 차이가 있음을 암시한다.

흰쥐와 토끼에 비소를 급성중독시킨 경우에 위장관 점막에서는 GSH의 함량에 변화가 나타나는데 중독초기에는 함량이 감소하나 중독 후 3시간 이후에 정상수준 보다 훨씬 함량이 증가하였다가 점차 정상수준으로 회복된다(Piscioto and Graziano, 1980). GSH 함량이 초기에 감소한 것은 세포내로 들어온 비소를 GSH가 결합하여 체외로 배출하기 때문이며, 이러한 기작으로 GSH가 비소에 대한 세포의 방어작용을 한다고 하였다.

본 연구의 Sephadex G-75 gel filtration 상에서 비소처리군과 대조군의 GSH에 해당하는 분획의 peak가 별다른 차이가 없다는 것은 아급성 중독된 비소의 양이 간조직에 적어 GSH 함량에 영향을 미치지 않았기 때문으로 생각된다.

*in vitro*에서 비소는 미토콘드리아내로 수송되는

데 2분 이내에 단백질 mg당 6 nmoles 정도의 비소가 미토콘드리아내에 포화되는 양상으로 나타났는데(Fig. 11) Harris와 Achenjang(1977)의 결과와 비슷하였다.

간세포의 미토콘드리아는 state IV 호흡시에 응축형태에서 정상형태로의 형태 전환이 일어나는데(Hackenbeock, 1966) 전자전달이 특이적으로 억제된 경우에 이러한 형태 전환은 일어나지 않는다(Hackenbrock, 1968). 또한, 미토콘드리아는 팽윤시에 파장 520 nm에서의 흡광도가 감소하며 ATP 첨가에 의하여 다시 수축되면서 흡광도가 증가하는 양상을 나타낸다(Fowler et al., 1979).

5 mM의 pyruvate와 malate의 혼합액을 기질로 사용한 경우에 0.1~1.0 mM의 비소에 의하여 미토콘드리아의 호흡이 억제되었고(Fig. 12), 0.4 mM As를 처리한 경우에 미토콘드리아의 호흡은 32% 감소하였으나 GSH에 결합된 0.4 mM As를 처리한 경우에는 대조군과 별다른 차이가 없었다(Table 3).

0.4 mM의 비소를 처리한 경우에 형태 전환(Fig. 15)은 억제되었으나 GSH에 결합된 0.4 mM As 처리군은 대조군과 같은 정상형태로 전환되었다(Fig. 16). 또한 0.4 mM의 비소는 비교적 큰 크기의 팽윤현상을 유발하였고 ATP 첨가에 의한 수축현상을 억제하였으나(Fig. 17-c), GSH에 결합된 비소는 작은 크기의 팽윤을 유발하고 ATP 처리시에 미토콘드리아는 빠르게 수축하였다(Fig. 17-d). 이와 같은 결과들로 보아 GSH는 비소에 결합함으로써 비소의 활성을 제거하여 비소의 독성영향에 대한 방어기능을 나타낼 수 있을 것으로 생각되며, 이것은 Kim(1990)의 연구 결과와도 일치하는 것이며, 여러 연구자들의 견해도 부합된다(Jin et al., 1987; Katoh et al., 1984; Peter and Klassen, 1984; Yamamoto et al., 1987).

*in vivo*에서 중금속 카드뮴과 GSH간의 결합에는 glutathione S-transferase가 관여하는 것으로 알려져 있는데(Meister and Anderson, 1983), 세포내에서 비금속 원소인 비소와 GSH간의 결합에 작용하는 인자들에 관한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

이상에서는 관찰한 바와 같이 생체에 직접 비소

를 투여한 경우에도 간세포에서는 stress protein 이 합성되며, cytosol에 존재하는 비소결합물질인 glutathione은 비소의 독성형향에 대한 세포의 방어기능에 관련되어 있는 것으로 생각된다. 한편 급성중독시에 그 존재가 보고된 고분자의 비소결합물질에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Alves, E. W. and L. de Meis, 1987. Effects of arsenate on the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* **166**: 647-651.
- Bertolero, F., E. Marafante, J. D. Rade, R. Pietra, and E. Sabbioni, 1981. Biotransformation and intracellular binding of arsenic in tissues of rabbits after intraperitoneal administration of ^{74}As -labelled arsenite. *Toxicology* **20**: 35-44.
- Brown, I. R. and S. J. Rush, 1984. Induction of a 'stress' protein in intact mammalian organs after the intravenous administration of sodium arsenite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**: 150-155.
- Cain, K. and D. N. Skilleter, 1987. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: *Biochemical Toxicology* (Snell, K. and B. Mullock, eds.), IRL press, Oxford, pp. 217-254.
- Chance, B. and G. R. Williams, 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: II. The steady state. *J. Biol. Chem.* **217**: 409-427.
- Chen, B., C. T. Burt, P. L. Goering, B. A. Fowler, and R. E. London, 1986. *In vivo* ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of arsenite induced changes in hepatic phosphate levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**: 228-234.
- Chen, C. T., Y. C. Chuang, T. M. Lin and H. Y. Wu, 1985. Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: High arsenic artesian well water and cancers. *Cancer Res.* **45**: 5895-5899.
- Chung, A. S. and M. D. Maines, 1981. Effects of selenium on glutathione metabolism induction of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione reductase in the rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 3217-3223.
- Darasch, S., D. D. Mosser, N. C. Bols and J. J. Heikkila, 1988. Heat shock gene expression in *Xenopus laevis* A6 cells in response to heat shock and sodium arsenite treatments. *Biochem. Cell. Biol.* **66**: 862-870.
- Duggan, E. L., 1957. Measurement of amino acids by column chromatography. In: *Methods in Enzymology*, Vol. III, Academic Press, New York, pp. 492-504.
- Fowler, B. A., J. S. Woods, and C. M. Schiller, 1979. Studies of hepatic mitochondrial structure and function: Morphometric and biochemical evaluation of *in vivo* perturbation by arsenate. *Lab. Invest.* **41**: 313-320.
- Franson, M. A. H., 1985. Arsenic, In: *Standard Methods* (Franson, M. A. H. ed.), APHA, AWWA, WPCF, Washington, DC., pp. 187-191.
- Goering, P. L. and B. A. Fowler, 1985. Mechanism of renal lead-binding protein reversal of δ -aminolevulinic acid dehydratase inhibition by lead. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **234**: 365-371.
- Gomall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David, 1949. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751-766.
- Goyer, R. A. and R. Krall, 1969. Ultrastructural transformation in mitochondria isolated from kidneys of normal and lead-intoxicated rats. *J. Cell Biol.* **41**: 393-400.
- Gupta, P. K. and P. K. Gupta, 1986. Microdetermination of arsenic in water, spectrophotometrically, by arsine-silver diethylthiocarbamate-morpholine-chloroform system. *Microchem. J.* **33**: 243-251.
- Hackenbrock, C. R., 1966. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria: I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **30**: 269-297.
- Hackenbrock, C. R., 1968. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria: II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J. Cell Biol.* **37**: 345-369.
- Harper, M., 1988. Occupational health aspects of the arsenic extractive industry in Britain. *Br. J. Ind. Med.* **45**: 602-605.
- Harris, E. J. and F. M. Achenjang, 1977. Energy-dependent uptake of arsenite by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **168**: 129-132.
- Hightower, L. E. and P. T. Guidon, 1989. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble Glia-axon transfer proteins. *J. Cell. Physiol.* **138**: 257-266.
- Hood, R. D. and G. C. Vedel-Macrandner, 1984. Evaluation of the effect of BAL (2, 3-dimercaptopropanol) on arsenite-induced teratogenesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **73**: 1-7.
- Hood, R. D., G. C. Vedel, M. J. Zaworotko, F. M. Tatum and R. G. Meeks, 1988. Uptake, distribution, and metabolism of trivalent arsenic in the pregnant mouse. *J. Toxicol. Environ. Health.* **25**: 423-434.
- Jin, T., G. F. Nordberg and M. Nordberg, 1987. Resist-

- ance to acute nephrotoxicity induced by Cd-MT dependence on pretreatment with CdCl₂. *Pharmacol. Toxicol.* **61**: 89-93.
- Johnston, D., H. Oppermann, J. Jackson, and W. Levinson, 1980. Induction of four proteins in chick embryo cells by sodium arsenite. *J. Biol. Chem.* **255**: 6975-6980.
- Katoh, M., N. Mizutani, H. Keino, and S. Kashiwamata, 1984. A low molecular-weight cadmium-binding substance in human and rat livers and human blood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **73**: 97-104.
- Keyse, S. M. Tyrrell, 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 99-103.
- Kim, H. S., 1990. Effect of glutathione on the cadmium toxicity in the hepatic mitochondria of rats. M. S. Thesis, Yonsei University.
- Kothary, R. K. and E. P. M. Candido, 1982. Induction of a novel set of polypeptides by heat shock or sodium arsenite in cultured cells of rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Can. J. Biochem.* **60**: 347-355.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lagerkvist, B., H. Linderholm, and G. F. Nordberg, 1986. Vasospastic tendency and Raynaud's phenomenon in smelter workers exposed to arsenic. *Environ. Res.* **39**: 465-474.
- Lee, K. J. and G. M. Hahn, 1988. Abnormal proteins as the trigger for the induction of stress responses: Heat, diamide, and sodium arsenite. *J. Cell. Physiol.* **136**: 411-420.
- Lee, T. C., R. Y. Huang, and K. Y. Jan, 1985. Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity, and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **148**: 83-89.
- Li, G. C., 1983. Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol. *J. Cell. Physiol.* **115**: 116-122.
- Lim, S. S., C. K. Yoo, and U. S. Choe, 1987. Effects of lead on the ultrastructure and the electron transport system of mitochondria of mouse kidney. *Korean J. Electron Microscopy* **17**: 55-71.
- Maiorino, R. M. and M. V. Aposhian, 1985. Dimercaptan metal-binding agents influence the biotransformation of arsenite in the rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **77**: 240-250.
- Marafante, E., M. Vahter, and J. Envall, 1985. The role of the methylation in the detoxication of arsenate in the rabbit. *Chem.-Biol. Interact.* **56**: 225-238.
- Massey, E. W., 1981. Arsenic neuropathy. *Neurology* **31**: 1057-1058.
- McCabe, M., D. Maguire, and M. Nowak, 1983. The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis *in vitro*. *Environ. Res.* **31**: 323-331.
- Meister, A. and M. E. Anderson, 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711-760.
- Mints, H. A., D. H. Yawn, b. Safer, E. Bresnick, A. G. Liebelt, Z. R. Blalock, E. R. Rabin, and A. Schwartz, 1967. Morphological and biochemical studies of isolated mitochondria from fetal neonatal and adult liver and neoplastic tissues. *J. Cell Biol.* **34**: 514-523.
- Okui, t. and Y. Fujiwara, 1986. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **172**: 69-76.
- Oladimeji, A. A., 1985. An arsenic-binding protein in rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **9**:1-5.
- Oskarsson, A., K. S. Squibb, and B. A. Fowler, 1982. Intracellular binding of lead in the kidney: The partial isolation and characterization of post-mitochondrial lead binding components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**:290-298.
- Pershagen, G., G. Nordberg, and N. E. Bjorklund, 1984. Carcinomas of the respiratory tract in hamsters given arsenic trioxide and/or benzopyrene by the pulmonary route. *Environ. Res.* **34**:227-241.
- Peter, L. G. and C. D. Klassen, 1984. Tolerance to cadmium-induced hepatotoxicity following cadmium pretreatment. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **74**:308-314.
- Pisciotta, P. T. and J. H. Graziano, 1980. Induction of mucosal glutathione synthesis by arsenic. *Biochim. Biophys. Acta* **628**:241-243.
- Shannon, R. L. and D. S. Strayer, 1989. Arsenic-induced skin toxicity. *Hum. Toxicol.* **8**:99-104.
- Shelton, K. R., J. M. Todd, and P. M. Egle, 1986. The induction of stress-related proteins by lead. *J. Biol. Chem.* **261**:1935-1940.
- Shneidman, D. and R. Belizaire, 1986. Arsenic exposure followed by the development of dermatofibrosarcoma protuberans. *Cancer* **58**:1585-1587.
- Squibb, K. S. and B. A. Fowler, 1983. The toxicity of arsenic and its compound. *In*: Biological and Environmental Effects of Arsenic (Fowler, B. A. ed.), Vol. 6, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 233-269.
- Stine, E. R., C. A. Hsu, T. D. Hoover, H. V. Aposhian, and D. E. Carter, 1984. N-(2, 3-dimercaptopropyl) phthalamidic acid: Protection, *in vivo* and *in vitro*, against arsenic intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **75**:329-336.
- Taketani, S., H. Kohno, T. Yoshinaga, and R. Tokunaga,

1989. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS. Lett.* **245**:173-176.
- Tedeschi, H. and D. L. Harris, 1955. The osmotic behavior and permeability to non-electrolytes of mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **58**:52-67.
- Westwood, J. T. and R. A. Steinhardt, 1989. Effects of heat and other inducers of the stress response on protein degradation in Chinese hamster and *Drosophila* cells. *J. Cell. Physiol.* **139**:196-209.
- Whelan, S. A. and L. E. Hightower, 1985. Induction of stress proteins in chicken embryo cells by low-level zinc contamination in amino acid-free media. *J. Cell. Physiol.* **122**:205-209.
- Yamamoto, A., O. Wada, and T. Ono, 1987. Isolation of biologically active low-molecular mass, chromium binding compounds from rabbit liver. *Eur. J. Biochem.* **165**:627-631.
- Yamauchi, H. and Y. Yamamura, 1984. Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsinic acid in the hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **74**:134-140.

(Accepted July 30, 1990)

**Studies on the Properties of Intracellular Arsenic Binding
Substances in the Rat Liver**

Rim Soon Choe, Moon Jong Boo and Chung Hyon Kim (Department of Biology, Yonsei University, Seoul 120-759, Korea)

Sodium arsenite (As) aqueous solution containing 4 ppm was given to male rats for 15 days as drinking water. Electrophoretic pattern of liver cytosol from As-fed rats appeared to be significantly different from that of the control rats. Although the normal protein content of the cytosol fraction of As-fed rat liver was decreased, 8 stress proteins were increased. In liver cytosol fractions of As-treated rat, one kind of arsenic-binding substance (AsBS) was observed. Molecular weight of AsBS was identified to be 500 D and composition of amino acid was glycine, glutamic acid and cysteine. Glutathione (GSH) appeared to bind to arsenic and GSH-As complex showed the same mobility as AsBS on gel filtration chromatography. GSH conjugated As prevented As from inhibiting respiration, conformational change and swelling-contraction of mitochondria. According to the above results, it is concluded that *in vivo* treated arsenic stimulated synthesis of stress protein, and arsenic-binding substance might be glutathione and have a protective role against arsenic toxicity.