

미토콘드리아의 팽윤과 수축에 따른 분광흡광도와 미세구조간의 비연관성

부문종 · 이강오 · 김재진* · 최임순*

No Relationship Between Spectrophotometric Absorbance and Ultrastructure in Mitochondrial Swelling and Contraction

Boo, Moon Jong, Kang Oh Lee, Jae Jin Kim* and Rim Soon Choe*
(Received October 29, 1990)

Abstract

Ultrastructural and spectrophotometric studies on mitochondrial swelling and contraction were carried out. All mitochondria just after isolated from rat liver showed condensed conformation. When mitochondria were incubated in 0.25 M sucrose only, they were moderately swollen and the absorbance at 520 nm was slightly decreased. Adding ATP to sucrose caused the absorbance to increase and the mitochondria to contract partially. KCl solution of 0.3 M induced marked decrease of absorbance and swelling of mitochondria. When ATP was added to KCl, increase of the absorbance and no contraction of the mitochondria excluding increased electron density of mitochondrial intermembranes were observed. Markedly decreased absorbance and somewhat largely swelled mitochondria in sodium arsenite solution of 0.4 or 1.0 mM were observed. When ATP was added to sodium arsenite, the absorbance increased slightly but mitochondria were more contracted than those in KCl-treated group. Above results indicate that the absorbance may not be correlated to morphological observations in the mitochondrial swelling and contraction.

삼육대학 생물학과, *연세대학교 이과대학 생물학과
Department of Biology, Sahmyook University.

*Department of Biology, College of Science, Yonsei University.

서 론

미토콘드리아는 세포의 생리적 상태나 분리된 미토콘드리아 배양액에 따라 내막의 공간적 배열이 달라져 응축형태(condensed conformation)에서 정상형태(orthodox conformation)로 형태전환을 한다(Tzagoloff, 1982). 이렇게 응축형태와 정상형태로 서로 형태전환하는 양상은 가역적인 반응으로 이해되고 있다(Hackenbrock, 1966, 1968). 미토콘드리아의 내부적 형태(internal conformation)는 호흡상태(respiratory state)에 따라 변화하며 ADP나 ATP의 비는 이러한 형태 변화에 특히 중요한 영향을 준다(Flickinger *et al.*, 1979).

실험실 내에서 미토콘드리아는 저장성 완충액(hypotonic buffer)에 넣거나 팽윤유도제를 처리하면 팽윤(swelling)되는데 이때의 흡광도는 현저하게 감소하여 안정상태에 이르므로 미토콘드리아의 팽윤현상은 분광흡광기(spectrophotometer)를 이용한 결과와 전자현미경을 이용한 방법의 결과가 서로 일치되는 것으로 알려져 있다(Mints *et al.*, 1967). 팽윤된 미토콘드리아에 ATP를 처리하면 520 nm에서의 흡광도는 급격하게 감소하여 거의 초기값으로 회복되는 데, 이 현상을 미토콘드리아의 수축(contraction)이라고 하였다(Fowler *et al.*, 1970; Mints *et al.*, 1967).

이러한 미토콘드리아의 형태 변환에 관한 연구에 있어서 생체내의 미토콘드리아의 형태전환은 주로 전자현미경을 이용하고 있으며 실험실내에서 미토콘드리아의 팽윤과 수축에 관한 연구는 주로 520 nm에서의 흡광도를 측정하는 방법들이 이용되고 있다(Kim *et al.*, 1990; Fowler *et al.*, 1979). 그러나 미토콘드리아의 팽윤시에 그에 대한 형태학적 증거는 극히 일부분만이 제시되었고(Hackenbrock, 1966) 수축시 미토콘드리아

의 형태에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 미토콘드리아의 팽윤과 수축시에 그 형태를 관찰하여 분광흡광기를 이용한 연구방법이 형태학적으로도 일치하는지를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험 재료로는 표준자료로 사육한 생후 2-3개월된 체중 200 - 300 g인 수컷 흰쥐(Sprague Dawley계)의 간을 사용하였다.

간세포 미토콘드리아의 분리

미토콘드리아는 Cain과 Skilleter(1987)의 방법으로 분리하였다. 희생시킨 흰쥐에서 간을 적출하여 0.25 M sucrose/5 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)으로 20% (w/v) 균질액을 만들어 460 × g에서 10분간 원심분리하여 상정액만을 모아 다시 12,500 × g에서 7분간 원심분리하여 형성된 3층의 침전물에서 중간층만을 취하였다. 이 중간층 침전물을 동일 완충액 40 ml로 현탁하여 12,500 × g에서 7분간 원심분리하여 다시 중간층 침전물만을 취하여 1 - 2 ml의 동일 완충액에 현탁한 후 Biuret 방법(Gornall *et al.*, 1949)으로 단백질을 정량하여 단백질 양이 약 30 mg/ml이 되도록 동일 완충액으로 조정하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다. 이상의 모든 과정은 0 - 4°C 에서 수행하였다.

미토콘드리아의 팽윤과 수축

0.25 M sucrose(pH 7.4)와 미토콘드리아 분획(3.6 mg protein)을 spectrophotometer cuvette에 넣고 팽윤유도제로서 0.3 M KCl 용액과, 0.4 mM 및 1.0 mM의 NaAsO₂를 각각 첨가한 후(반응부피 3 ml) 파장 520 nm에서의 흡광도를 측정하였다(Tedeschi and Harris, 1955). 미토콘드리아의 수축을 유도

하기 위하여 반응 15분 후에 cuvette에 5 mM ATP를 첨가한 후 계속 흡광도를 조사하였다(Mints *et al.*, 1967).

미토콘드리아의 팽윤유도제 첨가 후 15분과 ATP를 첨가한 후 10분에 각각 25% glutaraldehyde 0.12 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 4°C에서 1시간 이상 현탁상태로 방치하였다가 35,000 × g에서 5분간 원심분리하여 미토콘드리아 침전물을 얻어(Goyer and Krall, 1969) 전자현미경 표본을 제작하여 팽윤과 수축 유도제 첨가 후의 미토콘드리아 형태를 투과전자현미경으로 관찰하였다.

전자현미경 표본제작 및 관찰

미토콘드리아 침전물의 중앙부위를 1 mm³의 크기로 세절하여 0.1 M phosphate완충액(pH 7.4)으로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 2시간 동안 전고정한 후(Sabatini *et al.*, 1963) 동일 완충액으로 세척하여 다시 1% osmium tetroxide로 2시간 동안 후고정하였다(Millonig, 1962). 후고정한 표본을 동일완충액으로 세척한 후 ethyl alcohol 농도 상승순으로(50 - 100%) 탈수하여, propylene oxide로 10분씩 2회 치환한 다음 최종적으로 Epon 812 혼합액에 포매하였다(Luft, 1967). 포매한 표본을 37°C에서 24시간, 60°C에서 48시간 방치하여 중합시킨 후에 ultramicrotome(Sorvall, MT-2B)으로 50-60 nm의 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate(Watson, 1958)와 lead citrate(Reynolds, 1963)로 이중전자염색하여 투과전자현미경(Hitachi, H-500)으로 관찰하였다.

결 과

분리한 미토콘드리아는 분리 직후에 모두 응축 형태를 하고 있었다(Fig. 2). 0.25 M sucrose 완충액에 방치한 경우에 흡광도가 약간의 감소를 보이나 5 mM ATP를 첨가하

면 초기의 값으로 회복되었다(Fig. 1-a). Sucrose 용액에 배양된 미토콘드리아는 조금 커져 있었고 기질(matrix)의 전자밀도는 약간 낮았으나(Fig. 3), ATP를 첨가한 후에는 미토콘드리아의 일부가 수축되었으나 다수는 크기가 약간 더 커져 있었고 외막과 내막이 밀접하여 하나의 막으로 전자밀도가 높게 나타났다(Fig. 4).

0.3 M KCl에 의하여 흡광도는 크게 감소하였으나 ATP를 처리하면 급격하게 초기의 값으로 증가하였다(Fig. 1-b). 미토콘드리아의 형태는 sucrose용액에 배양하였을 때에 비해 크기가 훨씬 증가하였고 기질의 전자밀도도 많이 낮았으며 내막이 외막에 매우 근접하여 있었다(Fig. 5). 여기에 ATP를 첨가하면 미토콘드리아는 조금 더 커지고 기질의 전자밀도는 거의 없는 것으로 보였으며 외막과 내막은 거의 하나의 막으로 두껍게 형성되어 전자밀도가 높게 나타났다(Fig. 6).

0.4 mM과 1.0 mM의 sodium arsenite를 각각 처리한 경우에 두 경우 모두 다 흡광도는 급격하게 크게 감소하였다가 ATP를 처리하면 흡광도는 약간 증가하였으나 초기의 값으로 돌아오지 않았다(Fig. 1-c, d). 미토콘드리아는 팽윤되어 두 경우 모두 크기가 조금 증가하였고 기질의 전자밀도는 약간 낮아서 KCl을 처리한 경우보다 덜 팽윤되었으며(Fig. 7, 9), ATP를 첨가한 후에는 기질의 전자밀도가 더욱 낮아졌고 부분적으로 수축된 미토콘드리아도 관찰되었다(Fig. 8, 10).

고 찰

생체내에서 미토콘드리아의 팽윤을 유발하는 물질로는 phosphate, Ca⁺⁺, reduced glutathione 및 갑상선 호르몬 등이 알려져 있으며(De Robertis and De Robertis, 1987), 중금속으로는 카드뮴(Rasheed *et al.*, 1984),

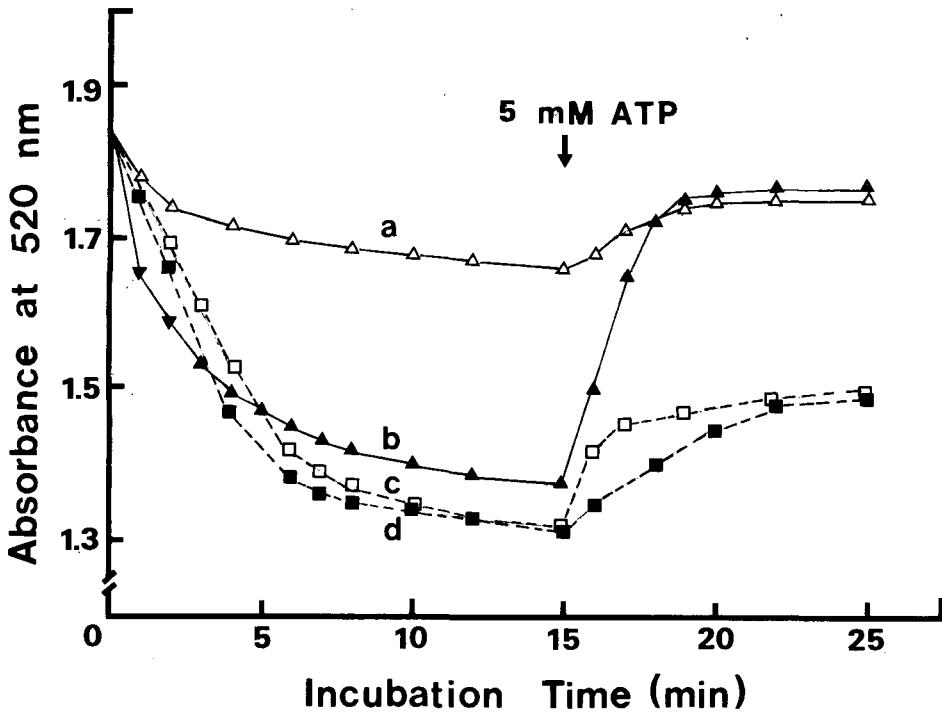


Fig. 1. Absorbance of mitochondrial suspension incubated with swelling - and contraction-inducing agents.

- △—△ : absorbance in 0.25 M sucrose only
- ▲—▲ : absorbance in 0.25 M sucrose + 0.3 M KCl
- : absorbance in 0.25 M sucrose + 0.4 mM sodium arsenite
- : absorbance in 0.25 M sucrose + 1.0 mM sodium arsenite

Five millimole ATP was added 15 min after incubation.

크롬(Evan and Dall, 1974; Kang *et al.*, 1989), 수은(Weinberg *et al.*, 1982) 등도 생체 내에서 미토콘드리아의 팽윤을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 Hackenbrock(1986)과 Tedeschi와 Harris (1955) 등이 팽윤유도제로 사용한 KCl외에 sodium arsenite를 사용하였는데 시험관 내에서 전자현미경상 미토콘드리아의 팽윤을 유발하였다.

또한 수축 유도제로는 state IV 호흡상태

에서는 ADP가 이용되고 있으나 (Hackenbrock, 1966), 본 실험에서는 Mints들(1967)과 Fowler들(1974) 등이 시험관 내에서 미토콘드리아의 수축 유도에 이용한 ATP를 사용하였다.

미토콘드리아에 팽윤 유도제를 처리하거나 저장성 완충액에 배양한 경우에 분광흡광기로 파장 520 nm에서 흡광도를 조사하면 반응초기에는 흡광도가 급격히 감소하고 시간이 지나면서 점차 감소하는 경향이 줄

어 안정상태가 된다. 이 상태를 미토콘드리아의 팽윤이라고 하였다(Tedeschi and Harris, 1955). 팽윤상태에서 미토콘드리아의 형태는 크기가 매우 커져 있었고 기질의 전자밀도는 매우 낮고 외막과 내막은 거의 밀접하여 있다(Hackenbrock, 1966). 팽윤된 미토콘드리아에 ATP를 첨가하면 흡광도가 급격하게 증가하여 거의 초기의 값으로 회복되는 데 이 상태를 미토콘드리아의 수축현상이라고 하였다(Fowler *et al.*, 1979; Verity *et al.*, 1974).

본 연구에서 KCl을 처리한 미토콘드리아의 경우에 흡광도가 급격하게 감소하였으며 ATP를 첨가한 후에는 흡광도가 급격하게 증가하여 초기의 값으로 회복함으로써 다른 팽윤유도제들과 같은 양상을 나타내었다. 미토콘드리아의 팽윤된 형태는 Hackenbrock(1966)의 결과와 같게 나타났으나 수축유도제로 사용한 ATP를 처리하여도 팽윤유도제로 처리한 경우와 유사한 미세구조를 보였다. 즉 기질의 전자밀도도 더욱 감소하여 팽윤유도제만 처리하였을 때보다 오히려 더 팽윤된 것처럼 보여 분리한 직후의 초기 형태와는 많은 차이가 있었다.

Sodium arsenite를 처리한 경우에 흡광도는 KCl을 처리한 경우보다 더 감소하였지만(Fig. 1), 미토콘드리아의 형태는 sodium arsenite를 처리한 경우에서 기질의 전자밀도가 더 높게 관찰되어 팽윤이 덜 일어난 것으로 나타났다(Fig. 5, 7, 9). Sodium arsenite 처리에 의하여 팽윤된 미토콘드리아는 ATP 첨가후에 흡광도가 조금만 증가하여 초기의 값으로 회복되지 않았으므로 수축이 덜 된 것으로 생각할 수 있는데(Fig. 1) 미토콘드리아의 형태를 전자현미경으로 관찰해 본 결과 KCl처리군에 비하여 크기가 약간 작아지고 일부 수축된 미토콘드리아도 관찰되어 흡광도의 차이에 의해 추측한 미토콘드리아 수축이나 팽윤이 전자현미

경을 이용한 실제 관찰과는 차이가 있음을 알 수 있었다.

이상과 같은 관찰 결과를 종합하여 볼 때 미토콘드리아의 팽윤과 수축기능에 관한 연구시에 이용되는 연구방법으로서 분광흡광기에 의한 결과들은 전자현미경관찰에 의하여 나타난 결과들과 일치하지 않고 상반되는 부분들이 있으므로 연구방법의 보완이 필요하다고 생각된다. 또한 미토콘드리아의 팽윤과 수축은 가역적인 현상으로 이해되어 왔는데 전자현미경을 이용한 본 연구 결과 ATP처리에 의하여 유도된 수축은 분리 직후의 초기 상태와는 많은 차이가 있으므로 미토콘드리아의 팽윤과 수축이 가역적인 현상을 뒷받침하기가 어렵다. 따라서 이러한 이해는 보다 복잡적이며 자세한 연구가 필요하며 미토콘드리아의 수축기전에 관한 체계적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

미토콘드리아의 팽윤과 수축현상에 관한 연구에서 분광흡광기를 이용한 연구 결과가 전자현미경을 이용한 결과와 일치하는지를 조사하였던 바, 분리 직후의 미토콘드리아는 0.25 M sucrose용액(pH 7.4)에서 약간 팽윤되었으나, 0.3 M KCl을 처리한 경우에는 심하게 팽윤되었으며 520 nm에서의 흡광도는 급격하게 감소하였다. ATP를 첨가한 후에 흡광도는 초기의 값으로 증가하였으나 형태는 초기의 상태로 환원되지 않았다. 0.4 mM과 1.0 mM의 sodium arsenite를 처리한 경우에 흡광도가 KCl을 처리하였을 때보다 더 감소하였으나 형태는 KCl처리시에 비하여 덜 팽윤되었다. ATP를 첨가한 후에 흡광도는 약간 증가하였지만 초기의 값으로 회복되지 않았고 형태도 초기의 상태로 수축하지 않았으나 KCl을 처리한 경우보다는 조금 더 수축하였다.

이상의 결과로써 미토콘드리아 팽윤과 수축에 있어서 분광흡광기를 이용한 결과는 전자현미경을 이용한 형태학적 연구 결과와는 일치하지 않는 것으로 생각된다.

References

- Cain, K. and D. N. Skilleter. 1987. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: Biochemical Toxicology (Eds. Snell, K. and B. Mullock), pp. 217-254, IRL Press, Oxford.
- De Robertis, E. D. P. and E. M. F. De Robertis, Jr. 1987. Cell and molecular biology. pp. 1-734, Lea & Febiger, Philadelphia.
- Evan, A. P. and W. G. Dall. 1974. The effects of sodium dichromate on the proximal tubules of the rat kidney: Fine structural damage and lysozymuria. Lab. Invest. 30, 704-715.
- Flickinger, C. J., Brown, J. C., H. C. Kutchai and J. W. Gilnie. 1979. Medical cell biology. pp. 1-566, WB Saunders Co., Philadelphia.
- 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.
- Gornall, 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.
- 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.
- Kang, S. G., M. J. Boo and R. S. Choe. 1989. Effects of hexavalent chromium on mitochondrial respiration of rat kidney and function of low-molecular-weight, chromium-binding substances. Korean J. Electron Microscopy 19(2), 43-58.
- Kim, H. S., K. S. Koh and R. S. Choe. 1990. Effect of glutathione on the cadmium toxicity in the hepatic mitochondria of rats. Korean J. Environ. Biol. 8(2), (*in press*).
- Luft, J. H. 1967. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409-414.
- Millonig, B. 1962. Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation. In: Electron Microscopy (Ed. Breese, S. S), pp. 8-9, Academic Press, New York.
- Mints, H. A., D. H. Yawn, B. Safer, E. Bresnick, A. G. Liebelt, Z. R. Blailock, 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.
- Rasheed, B. K., J. J. Diwan and D. R. Sanadi. 1984. Activation of potassium ion

- transport in mitochondria by cadmium. Eur. J. Biochem. 144, 643-647.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy J. Cell Biol. 17, 208-212.
- Sabatini, D. D., K. Bensch and R. J. Barnett. 1963. Cytochemistry and electron microscopy: Their reservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity of aldehyde fixation. J. Cell Biol. 17, 19-58.
- Tedeschi, H. and D. L. Harris. 1955. The osmotic behavior and permeability to non-electrolytes of mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 58, 52-67.
- Tzagoloff, A. 1982. Mitochondria. pp. 1-342, Plenum Press, New York.
- Verity, M. A., W. J. Brown and M. Cheung. 1974. Mitochondrial conformation and swelling-contraction reactivity during early liver regeneration. Am. J. Pathol. 74, 241-262.
- Watson, M. L. 1958. Staining of tissue sections of electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 475-478.
- Weinberg, J. M., P. G. Harding and H. D. Humes. 1982. Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride-induced renal injury. J. Biol. Chem. 257, 60-74.

Figure Legends

- Fig. 2.** Mitochondria just after isolated from rat liver.
Most mitochondria were condensed conformation(CON) and some were intermediate conformation(IC)
- Fig. 3.** Normal mitochondria incubated with 0.25 M sucrose for 15 min.
Swollen(S) and orthodox conformation(ORT) of mitochondria were observed.
- Fig. 4.** Mitochondria incubated with 0.25 M sucrose and added ATP.
Contracted(C), intermediate(IC), and swollen(S) mitochondria are seen.
- Fig. 5.** Mitochondria incubated with 0.3 M KCl for 15min.
Mitochondria are swollen and intermembrane space are narrowed.
- Fig. 6.** Mitochondria incubated with 0.3 M KCl-adding medium and ATP treated after 15 min of incubation.
Most mitochondria are swollen(S) to a large extent, and some are contracted(CT).
- Fig. 7.** Mitochondria incubated with 0.4 mM sodium arsenite-adding medium.
Most mitochondria are swollen to a mild extent.
- Fig. 8.** Mitochondria incubated with 0.4 M sodium arsenite-adding medium and ATP treated after 15 min of incubation.
Most mitochondria are swollen to a large extent, some are contracted.
- Fig. 9.** Mitochondria incubated with 1.0 M sodium arsenite-adding medium.
Mitochondria are swollen to a mild extent.
- Fig. 10.** Mitochondria incubated with 1.0 M sodium arsenite-adding medium and ATP treated after 15min of incubation.

