

랫드의 조직 mitochondria 활성화에 대한 납 투여의 영향

조종후 · 권오덕 · 이주목

전북대학교 수의과대학
(1996년 3월 1일 접수)

Effect of lead on mitochondrial activity in rat tissues

Jong-hoo Cho, Oh-deog Kwon, Joo-mook Lee

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Mar 1, 1996)

Abstract : Cardiac, hepatic and renal mitochondria in rats fed lead containing diets were isolated and their activities were studied in terms of NADH oxidation.

In normal rats, cardiac and renal mitochondria had similar activities and showed activity values of higher than those in hepatic mitochondria.

Cardiac mitochondrial activities in rats fed lead containing diets were increased after 4 weeks of feeding but decreased to activity values close to normal.

Renal mitochondrial activities showed a trend of inhibition in all groups fed lead containing diets but were no differences by feeding periods of 4 and 8 weeks.

Feeding of lead containing diets could not be attributed to any changes in the hepatic mitochondrial activities at experimental doses during 4~8 weeks.

Key words : Lead acetate, lead containing diets, mitochondrial activity.

서 론

납에 의한 동물체내에서의 생화학적 독성효과는 많이 알려져 있지 않지만 납이 생체내의 단백질과 쉽게 결합하여 잘 축적될 뿐 아니라 대사작용에 큰 영향을 주는 것은 보고된 바 있다¹⁻³. 특히 납은 단백질중에 lysine 잔기의 ε-amino기, 산성아미노산 잔기중의 carboxyl기, cysteine 잔기중 sulfhydryl기 및 histidine 잔기중의 imidazole기와 용이하게 결합함으로써 체내 거의 모든 단백질과 결합할 수

있으며 따라서 효소단백질과 결합하여 대사장애를 일으키는 것으로 알려졌다^{1,2}. 가장 대표적인 예로서 heme 단백질 합성에 필요한 heme의 합성을 촉매하는 δ-aminolevulinic acid dehydratase(ALA-D)는 납과 결합하여 활성이 강하게 억제됨으로써 결국은 heme 합성은 물론 heme 단백질 합성이 저해되어 조혈작용이 억제되고 빈혈을 유발한다는 많은 보고예가 있으며^{1,4-9} 혈중 ALA-D의 활성측정은 신빙성있는 납중독 진단방법으로 현재 많이 이용되고 있다.

납은 또한 세포 소기관중에서는 mitochondria 및 lyso-

이 논문은 1996년도 전북대학교부속 생체안전성연구소 학술연구비의 일부지원으로 이루어졌음(CNU-BSRI, NO. 96-25).
Address reprint requests to Dr. Jong-hoo Cho, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea.

some과 잘 결합하는 것으로 알려져 있다¹. Mitochondria는 다양한 대사기능을 가진 소기관으로 세포호흡, 산화적 인산화, 대사산물의 수송 및 mitochondria와 관련된 부분적 반응들을 수행하며 주로 에너지 생성과 관련된 반응들을 수행한다. 특히 산화적 인산화반응은 다효소 연쇄반응(multienzyme sequence)에 의하여 에너지를 직접 생성하는 반응으로, 전자전달과정(electron transport system)과 겹쳐 있으며 heme 단백질인 여러종류의 cytochrome으로 구성된다. 그러나 heme 단백질인 cytochrome이 hemoglobin에서와 같이 납에 의하여 합성이 억제되는지는 아직 불명하다. Hammond와 Beliles⁷은 납에 의하여 cytochrome 합성이 영향을 받는지는 불확실하다고 하였으나 최근에 Taki et al¹⁰, Christenson et al¹¹은 납이 mitochondria 활성을 억제하였으며, microsome의 약물대사에 관여하는 cytochrome P450이 감소한다고 보고하여 납이 cytochrome들의 합성도 억제될 수 있음을 시사하였다.

납은 또한 mitochondria 막에 직접적으로 손상을 주는 것으로 보고되었다¹²⁻¹⁴. Mitochondria에서의 에너지 생성 과정에는 반드시 산소를 필요로 하며 이 과정에서 막지질의 과산화(lipid peroxidation)를 촉진하는 것으로 보고되고 있다. Skozynska et al¹⁴에 의하면 납이 superoxide dismutase의 활성을 억제하여 지질과산화 생성물에 의한 막지질의 손상을 일으킨다고 하였으며 따라서 mitochondria 막에서도 이와같은 영향이 있을 것으로 추정된다.

이상의 보고 등으로 보아 납이 다양한 방법으로 체내의 호기성 에너지 생성기관인 mitochondria의 활성에 영향을 줄 것으로 추정되어 왔으며, 일부는 사실로 확인되고 있다. 이에 따라 본 연구에서 납을 흰쥐에 투여한 후 mitochondria의 활성에 영향을 주는지를 확인하고자 산화적 인산화 과정에서 소실되는 β -nicotinamide adenine dinucleotide reduced form(β -NADH)의 흡광도 변화를 측정하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

공시동물 : 5주령의 Wistar계 자성 랫드 30수를 국립보전원으로 부터 분양받아 6두씩 5군으로 나누어 기초사료로 24일간 사육하여 표준화한 후 각군에 대하여 다음과 같이 사육하였다. 1군은 대조군으로 기초사료만을 계속하여 급여하였고 2군, 3군, 4군 및 5군은 각기 납 10ppm,

100ppm, 1,000ppm 및 5,000ppm을 함유하는 사료를 급여하면서 각군에 대하여 4주째와 8주째에 3두씩을 방혈 치사시켜 즉시 심장, 간장 및 신장을 채취하여 mitochondria를 분리하였다.

공시자료 : 제일제당 생산의 흰쥐용 pellet 사료를 기초사료로 하였다. 납 함유사료는 기초사료를 분쇄하여 초산납($Pb(CH_3COO)_2$, Wako, Japan)을 물에 녹여 필요량 만큼 분무시킨후 다시 압착하여 납 함유량이 10ppm, 100ppm, 1,000ppm 및 5,000ppm이 되는 사료를 만들었다.

Mitochondria의 분리 : 심장조직세포의 mitochondria 분리는 Lee와 Lee¹⁵ 및 Smith¹⁶의 방법을 준용하여 다음과 같이 하였다. 즉, 조직 2.5g을 유발에 취하고 정제 해사(海砂)소량을 가하여 유봉으로 5분간 마쇄한 후 Eastabrook 완충액(0.225M sucrose(Wako), 10mM sodium phosphate(Wako), pH 7.4, 5mM triethanolamine(Hayashi), pH 7.4) 30ml를 가하여 부유시킨 homogenate에 2M tris 용액을 가하여 pH 7.8로 조절하였다. Homogenate를 냉상상태에서 1,200×g에서 6분간 원심분리하고 그 상청액을 다시 18,000×g에서 15분간 원심분리하여 mitochondria 침전을 얻었다. 이 침전에 다시 완충액 30ml를 가하여 같은 조작을 1회 더 반복하여 얻은 침전물에 완충액 5ml를 가하여 부유시킨 homogenate(mitochondria suspension)를 즉시 mitochondria 활성 측정에 사용하였으며 부득이 할 때에는 -20℃ 냉동기에 보관하면서 3일 이내에 mitochondria 활성 측정에 사용하였다.

간장과 신장조직세포의 mitochondria 분리는 Johnson과 Lardy¹⁷의 방법에 준하였다. 즉, 조직 2.5g을 심장조직에서와 같이 마쇄시켜 Eastabrook 완충액 30ml를 가하여 부유시킨 homogenate를 700×g에서 5분간 원심분리하였다. 상청액을 다시 14,000×g에서 10분간 원심분리하여 mitochondria 침전을 얻었다. Mitochondria 침전에 완충액을 사용하여 동일한 방법으로 2회 더 원심분리하여 정제된 mitochondria 침전물에 완충액 5ml를 가하여 부유시킨 mitochondrial suspension을 즉시 mitochondria 활성측정에 사용하거나 부득이 할 때에는 -20℃에 보존하면서 3일 이내에 실험에 사용하였다. Mitochondria의 분리에 사용한 원심분리기는 Sorval RC-5B refrigerated superspeed centrifuge(Dupont)였다.

Mitochondrial activity의 측정 : 전자전달반응(electron transport reaction)과 짝진 반응인 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)과정에서 mitochondrial suspension에 가

해진 NADH와 ADP에 의하여 소실되는 NADH의 흡광도 감소로 측정하였다¹⁵. Mitochondrial suspension의 단백질 함량을 Lowry법으로 측정하고, 3ml당 100 μ g 단백질을 함유하도록 완충액으로 희석하여 비색관에 취하고 여기에 0.025M ADP(Sigma)용액 50 μ l과 0.025M β -NADH(Sigma)용액 40 μ l를 가하여 즉시 혼합한 후 36 $^{\circ}$ C에서 280-400nm까지의 흡광곡선을 2분 간격으로 작성하여 정상 랫드의 장기별 mitochondrial activity의 차이를 조사하였다. 아울러 위와 동일한 방법으로 납 함유사료로 사육한 랫드의 mitochondrial suspension에 의하여 작성된 흡광곡선으로부터 NADH의 최대 흡광파장인 340nm에서의 흡광도 변화를 조사하여 비교하였다.

또한 조직의 단위 중량당 분리된 mitochondria에 의한 NADH-산화의 비교를 위하여 심장조직 16.7mg, 간장조직 667.7mg 및 신장조직 66.7mg으로부터 분리된 mitochondrial suspension을 3ml로 정용하고 여기에 위와 같이 ADP 용액과 β -NADH 용액을 가하여 36 $^{\circ}$ C에서 340nm에서의 흡광도 변화를 그래프로 작성하여 비교하였다. 아울러 280-400nm에서의 흡광곡선을 작성하여 비교하였다. 흡광도 및 흡광곡선의 작성은 UV-recording spectrophotometer(UV-2100, Shimadzu)를 이용하였다.

결 과

정상사료로 사육한 랫드의 주요 장기조직별 세포의 mitochondria 활성을 비교하기 위하여 기초사료로 8주간 사육한 랫드를 사혈사시킨 후 즉시 채취한 심장, 간장 및 신장 mitochondria의 흡광곡선의 변화는 Fig 1과 같았다.

Fig 1에서와 같이 각 조직별 mitochondrial suspension

에 의한 β -NADH의 산화에 따른 흡광곡선의 변화에서 조직별 mitochondria 활성의 차이를 알 수 있으며, 심장의 mitochondria 활성이 가장 높았고, 간장은 심장의 약 27%, 신장은 심장의 약 60% 수준이었다.

납 투여군들의 4주 및 8주후, 단백질 100 μ g을 함유하는 mitochondrial suspension에 의한 340nm에서의 1분당 β -NADH의 흡광도 감소를 측정하여 Table 1에 나타내었다. 심장조직의 mitochondria 활성은 4주후 납 급여 전군에서 상승하였으며 특히 10ppm 납 함유 사료급여군에서는 2배에 가까운 높은 상승을 보였다. 그러나 납 급여량의 증가와 mitochondria 활성과는 직접적 상관성이 없었다. 8주 후에는 납 함유 사료급여 전군이 대조군과 차이가 없었다.

간장조직의 mitochondria 활성은 4주 및 8주후 공히 전 납급여군에서 대조군과 차이가 없었다. 신장조직의 mitochondria 활성은 4주후 전 납급여군에서 감소경향이 뚜렷하였으나 납 급여량에 따른 차이는 없었다. 8주 후에는 10ppm 납함유사료 급여군을 제외한 모든 납 급여군에서 감소경향을 보였으나 4주 후에서 보다 낮았다.

각 장기조직의 단위중량당 mitochondria 활성의 납 투여에 의한 영향을 조사하고자 심장조직은 16.7mg, 간장조직은 666.7mg, 신장조직은 66.7mg으로부터 분리한 mitochondrial suspension을 3ml로 정용하고 전의 방법에서와 같이 340nm에서의 흡광도 변화로서 mitochondria 활성을 측정하였다.

심장조직의 단위중량으로 부터 분리한 mitochondria의 활성에 대한 납 투여효과는 Fig 2-1에 나타내었다. 납 급여 4주후 전군에서 활성증가를 보였으며 납 급여량에 따른 차이는 거의 없었다. 8주 후에는 4주 후보다 더 낮은 활

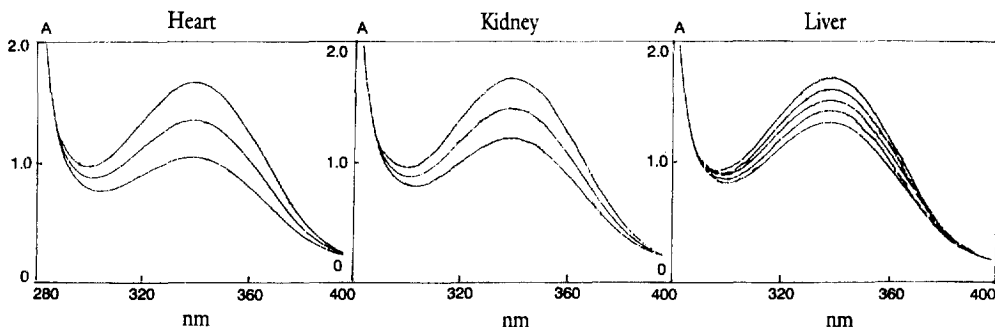


Fig 1. Comparison of NADH-oxidation by mitochondrial suspension of normal rats. UV-spectrophotometrical tracings were started after adding of 50 μ l of 0.025M ADP and 40 μ l of 0.025M NADH to 3ml of mitochondrial suspension(equal to 100 μ g protein) isolated from tissues. Tracings were graphed at an interval of 2 minutes.

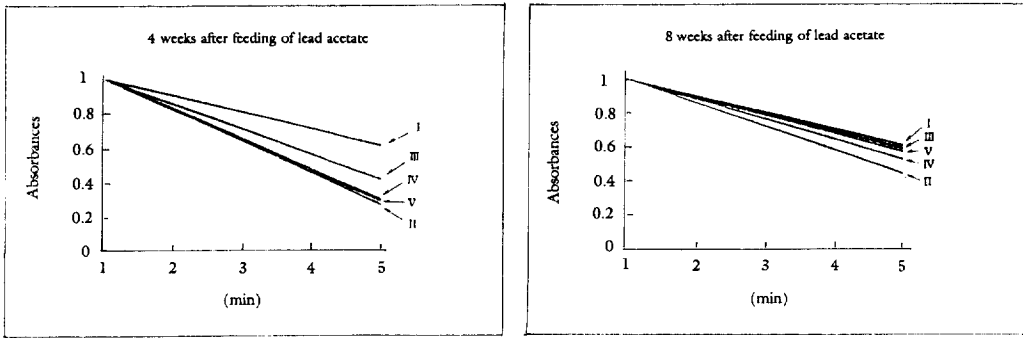


Fig 2-1. Changes of absorbances at 340nm according to oxidation of NADH added to mitochondrial suspension from heart of rats treated with lead acetate.

I : Untreated II : Group fed 10ppm lead acetate III : Group fed 100ppm lead acetate
 IV : Group fed 1,000ppm lead acetate V : Group fed 5,000ppm lead acetate

* Expressed as changes of absorbances per minute per 3ml of mitochondrial suspension from 16.7mg cardiac muscle.

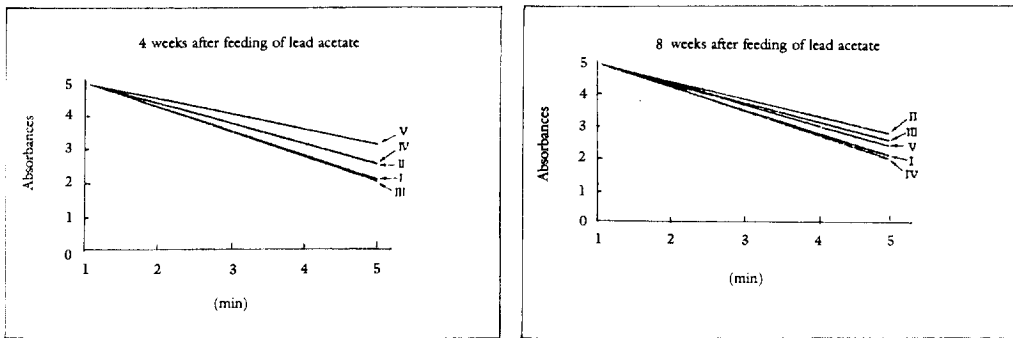


Fig 2-2. Changes of absorbances at 340nm according to oxidation of NADH added to mitochondrial suspension from liver of rats treated with lead acetate.

I : Untreated II : Group fed 10ppm lead acetate III : Group fed 100ppm lead acetate
 IV : Group fed 1,000ppm lead acetate V : Group fed 5,000ppm lead acetate

* Expressed as changes of absorbances per minute per 3ml of mitochondrial suspension from 666.7mg hepatic tissues.

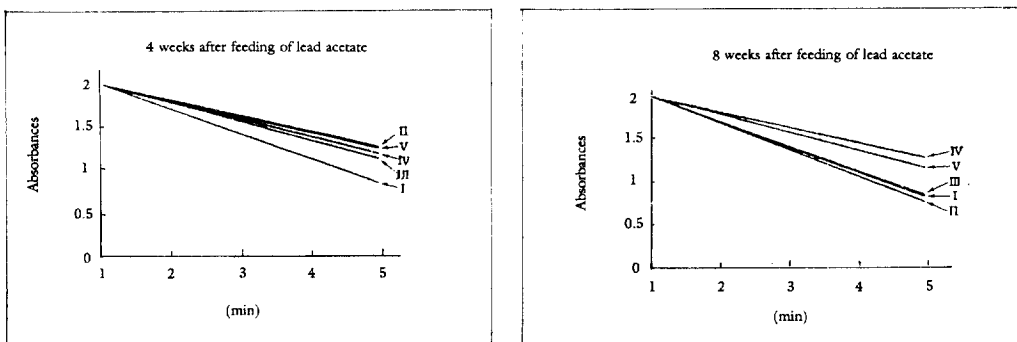


Fig 2-3. Changes of absorbances at 340nm according to oxidation of NADH added to mitochondrial suspension from kidney of rats treated with lead acetate.

I : Untreated II : Group fed 10ppm lead acetate III : Group fed 100ppm lead acetate
 IV : Group fed 1,000ppm lead acetate V : Group fed 5,000ppm lead acetate

* Expressed as changes of absorbances per minute per 3ml of mitochondrial suspension from 66.7mg hepatic tissues.

성증가를 보였다.

간장조직의 단위중량으로 부터 분리한 mitochondria의 활성에 대한 납 급여효과에 Fig 2-2에 나타내었다. 납 급여 4주후 5,000ppm 납 함유 사료급여군에서 다소 활성저하 경향을 보였으나 기타 급여군은 대조군과 차이가 거의 없었으며 8주 후에도 전 납급여군의 활성이 대조군과 차이를 보이지 않았다.

신장조직의 단위중량으로 부터 분리한 mitochondria의 활성에 대한 납 급여효과에 Fig 2-3에 나타내었다. 납 급여 4주후 전군에서 대조군보다 약간 저하하는 경향을 보였으며 8주 후에는 1,000ppm 및 5,000ppm 납 함유 사료급여군에서 다소 저하하는 경향을 보였으나 납 급여량에 따른 큰 차이는 없었다.

고 찰

납이 heme 합성을 억제하여 조혈기능이 저하된다는 많은 보고가 있으나^{1,4-9} 세포내 hemeprotein인 cytochrome의 합성에도 영향을 주는지에 대한 연구보고가 거의 없다. 세포내에서 cytochrome의 대부분은 mitochondria에 존재하며 endoplasmic reticulum에도 cytochrome p450이 존재한다. Mitochondria에 존재하는 cytochrome b, cytochrome c, cytochrome aa₃ 등은 electron transport system을 구성하여 NADH로부터 수소와 전자를 분자산소(O₂)에 전달하여 물을 생성하며 이 과정에서 전자가 가진 에너지 포착이 이루어져 산화적 인산화에 의한 에너지 추출결과로 ATP가 생성된다. 납이 개개 cytochrome들의 합성을 억제하는지는 직접적으로 측정하기 어려우나 electron transport chain과 산화적 인산화의 연관반응에서 소실되는 NADH량 또는 생성되는 ATP량을 측정함으로써 납에 의한 mitochondria의 기능을 측정할 수 있고 따라서 각종 cytochrome 합성에 영향을 주는지를 파악할 수 있다. 또한 생체조직은 조직에 따라 mitochondria 활성에서 차이가 있고 납에 의한 영향도 다르게 나타날 것이다. 본 연구에서 정상 랫드의 심장, 간장 및 신장에서 분리한 100µg 단백질질을 함유하는 mitochondria의 활성에서 큰 차이가 있었으며 심장이 가장 높았고 다음으로 심장, 간장의 순서였다. 이는 조직의 에너지 요구량에 따라 차이가 있는 것으로 심박동을 위한 계속적 에너지 요구에 의한 것으로 생각된다.

납 투여 전군에서 심장의 mitochondria 활성이 4주 후에 높게 나타났으며 그중 10ppm 납 급여군에서 가장 높

았고 이보다 납 투여량이 높은 군들에서는 다소 낮아졌으나 대조군보다 높은 활성을 보였고 납 투여량에 따른 차이는 거의 없었다. 8주 후에는 납 투여 전군이 대조군과 차이가 없었다. 납 투여 초기에 mitochondria 활성을 일시적으로 상승시키나 시일이 경과함에 따라 정상으로 복귀하는 것이 아닌가 생각되며 hemoglobin의 합성을 억제하는 기왕의 보고들^{2,7-9}과는 달리 납이 cytochrome의 합성 또는 기능을 억제하지 않는 것으로 사료된다.

조직의 단위중량당 mitochondria 합성에서도 심장이 가장 높았고 다음으로 심장, 간장의 순서였으며 납에 의한 영향에서도 단백질 합성을 기준으로 했을 때의 효과와 유사하였다. 즉, 심장조직에서 납 투여 4주후 mitochondria 활성이 증가하였고 납 투여량에 따른 차이는 없었으며, 8주 후에는 4주 후에서 보다 활성의 상승이 낮았다. 간장 조직은 납 투여 4주 및 8주후 공히 납 투여량에 관계없이 대조군과 차이가 거의 없이 대등한 수준을 보여 납에 의한 영향이 없음이 확인되었다. 신장조직에서도 단위조직량에 대한 mitochondria 활성에서 납 투여에 의하여 억제되는 경향이었으며 8주 후보다 4주후 약간 더 낮은 활성의 저하를 보여 납 투여기간에 따른 차이를 보였다. 이상의 결과들은 대체로 납에 의한 세포독성을 반영하는 mitochondria 활성에 큰 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. 그러나 예상과 달리 심장의 mitochondria 활성을 상승시킴으로서 제한적으로 대사를 활성화시킬 수 있음이 확인되었으며 이는 Taki et al¹⁰에 의한 보고와도 일치하는 것으로 주목할만 하다고 사료된다. 그러나 납이 다량 축적되는 신장에서는 mitochondria 활성이 다소 저하되는 상반되는 결과를 보였으며, 납이 다량 축적되는 조직에서의 활성은 억제되는 경향이 있는 것이 아닌가 사료된다.

결 론

납이 랫드의 세포활성에 미치는 영향을 조사하고자 5주령의 자성 랫드에 초산납(lead acetate)을 첨가하여 납 10, 100, 1,000, 및 5,000ppm을 함유하는 사료를 만들어 급여하면서 4주후 및 8주후 심장, 간장 및 신장을 적출하여 mitochondria 활성을 측정하였다.

정상 랫드의 조직중 mitochondria 활성은 단백질 100µg에 해당하는 mitochondria를 기준으로 할 때 심장이 가장 높았고 다음으로 신장, 간장의 순서였다.

심장 mitochondria 활성은 납 투여 4주 후에 증가하였

으며 납 투여량에 따른 차이는 없었다. 8주 후에도 4주 후보다 활성증가가 낮았으며 정상사료 급여군에 가까웠다.

간장 mitochondria 활성은 납 투여 4주 및 8주후 공히 정상사료 급여군과 차이가 없었다.

신장 mitochondria 활성은 납 투여 4주 및 8주후 공히 낮아지는 경향이었으며 납 투여량에 따른 차이는 거의 없었다.

참 고 문 헌

1. Bartik M. Poisoning by lead and its compounds. In : Bartik M, Piskac A, ed. *Veterinary toxicology*, New York : Elsevier Scientific Publishing Co. 108-118.
2. Cain K, Skilleter DN. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In : Snell K, Mullock B, ed. *Biochemical toxicology. A practice approach*. Oxford : IRL, Press, 217-254, 1987.
3. Mauman RB, Heavy metals. In : Guthrie FE, Perry JJ, ed. *Introduction to environmental toxicology*. New York : Elsevier Scientific Publishing Co, 34-41, 1980.
4. K Davis JR, Andelman SA, Urinary delta-aminolevulinic acid levels in lead poisoning. *Arch Environ Health*, 15 : 53-59, 1967.
5. Bruin A. Certain biological effects of lead upon the animal organism. *Arch Environ Health*, 23 : 249-311, 1971.
6. Hapke HJ, Prigge E. Interaction of lead and glutathione with delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Arch Toxicol*, 31 : 153-161, 1973.
7. Hammond PB, Beliles RP, Metals. In : Doull J, Klassen CD, Amdur MO, ed. *Casarett and Doull's toxicology*. 2nd ed. New York : Macmillan Publishing Co, 409-421, 1980.
8. Donaldson WE. Nonnutritive trace elements as environmental contaminants. In : Hodgson E, Guthrie FE, ed. *Introduction to biochemical toxicology*. New York : Elsevier Scientific Publishing Co, 337-340, 1982.
9. Swarup D, Maiti SK, Dwivedi SK. Diagnostic use of blood porphyrin and radiographic changes in lead exposure in goats. *Vet Human Toxicol* 32, : 549-551, 1990.
10. Taki Y, Shimahara Y, Isselhard W. Derrangement of hepatic energy metabolism in leadsensitized endotoxycosis.(abstract). *Europian Surgical Research*, 17 : 140-149, 1985.
11. Christenson WR, Bestervelt LL, Piper WN. Evidence for pteridine regulation of lead mediated inhibition of uroporphyrinogen and heme formation in rat bone marrow. *Toxicol Appl Pharmacol*, 113 : 138-143, 1992.
12. Gaudel Y, Menashe P, Duvelleroy M. Enzyme release and mitochondrial activity in reoxygenated cardiac muscle relationship with oxygen induced lipid peroxidation. *Gen Physiol Biophys*, 8 : 327-340, 1989.
13. Hearse DJ. Free radicals and the heart(abstract). *Bratislavske Lekarske Listy*, 92 : 115-118, 1991.
14. Skozynska A, Smolik R, Jelen M. Lipid abnormalitis in rats given small doses of lead.(abstract). *Arch Toxicol*, 67 : 200-204, 1993.
15. Lee SJ, Lee JY. Mitochondrial activities of bovine tissues for external electron transport. *Korean biochem J*, 25 : 717-719, 1993.
16. Smith AI. Preperation, properties and conditions for assay of mitochondria : Slaughter house, material, small scale. *Methods in Enzymology*, 10 : 81-84. 1967.