

Cr⁶⁺가 흰쥐 신장세포내 미토콘드리아의 호흡에 미치는 영향과 저분자 크롬결합물질의 작용

姜壽吉 · 夫文鍾 · 崔林淳

Effects of Hexavalent Chromium on Mitochondrial Respiration of Rat Kidney and Function of Low-Molecular-Weight, Chromium-Binding Substances

Kang, Soo Gil, Moon Jong Boo and Rim Soon Choe

(Received November 7, 1989)

Abstract

To investigate the effects of hexavalent chromium on mitochondrial respiration of rat kidney, various hexavalent chromium concentrations were treated, then respiration and electron transfer enzyme activities were measured. Ultrastructural changes at state IV respiration of mitochondria were also observed. Then, to investigate protective role against hexavalent chromium in the body, low-molecular-weight, chromium-binding substances (LMCr) were purified from livers of rabbits 2hr after intravenously administered with sodium dichromate at a dose of 74mg per kg body weight. And then, respiration rates of mitochondria treated with LMCr, hexavalent chromium containing 0.7mM chromium were measured.

Hexavalent chromium decreased state IV respiration rates and electron transfer enzyme activities of mitochondria, and increased labile membrane and swelling. And partial inhibitions of condensed to orthodox conformational change were observed. Respiration rates of mitochondria treated with LMCr containing 0.7mM chromium did not differ from that of the non-treated mitochondria. But respiration rates of 0.7mM hexavalent chromium-treated mitochondria decreased by 42%, compared to non-treated mitochondria.

These results suggest that LMCr may play an important role in detoxification of toxic hexavalent chromium.

서 론

크롬은 염료, 축전지, 세라믹, 부식방지제 및 antincking제 등을 제조하는 산업에 이용되는 중금속으로써 인간을 비롯한 많은 생명체들은 크롬이 가지고 있는 독성에 직접, 간접으로 노출되어 있어서 여러가지 위험에 직면하고 있다(Stern, 1982). 특히 크롬 6가는 크롬 3가보다 그 독성이 현저하여 크롬 6가에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Mathur들, 1977 ; Laborda들, 1986). 크롬 6가로 인한 임상적 병면으로는 비중격 천공과 피부의 궤양, 만성적 불안과 동맥경화, 암 등을 일으킨다는 여러 보고들이 있다(Kleinfeld와 Rosso, 1965 ; Browning, 1969 ; Enterline, 1974 ; Royle, 1975. ; Flexon들, 1986 ; Levy와 Venitt, 1986).

또한 동물을 이용한 실험에서 크롬 6가는 신장과 간, 허파, 심근층, 정소 등에서 높은 용해도와 침투력때문에 뚜렷한 생화학적, 병리형태학적인 변화를 일으킨다고 보고되고 있다(Evan과 Dail, 1974 ; Kirschbaun들, 1981 ; Tandon들, 1978 ; Kumar들, 1974 ; Behari들, 1978).

지금까지 크롬 6가가 생체에 미치는 독성에 대해서 알려진 바로는, 물에 잘 녹는 크롬 6가가 세포막을 쉽게 통과하여 세포내에서 크롬 3가로 환원이 되어 세포내 구성물질과 안정한 복합체를 형성함으로써 세포의 대사기능을 저해할 것이라고 제안되고 있으며(Mertz, 1969 ; Sanderson, 1976 ; Gruber와 Jennette, 1978 ; Garcia와 Jennette, 1981 ; Banks와 Cooke, 1986 ; Dunaway-Marino와 Cleland, 1980 ; Pauls들 1980 ; Bossard와 Schuster, 1981 ; Tsapakos들 1983), 특히 Ryberg와 Alexander(1984)는 크롬 6가가 간조직 미토콘드리아의 호흡을 억제한다고 하였다.

한편 Yamamoto들(1981)은 생쥐에 크롬 6가를 부여하면 저분자 크롬결합물질(LMCr)

이 합성된다고 하였으며, 그 후 이 LMCr은 분자량이 1,500 정도로서 glutamic acid, cysteine, glycine을 주요 아미노산 구성성분으로 하는 음이온 성질을 가지는 물질임이 밝혀졌다(Wada들, 1983 ; Yamamoto들, 1987). 또한 LMCr은 체내로 들어온 크롬의 배출과 해독을 비롯하여 크롬의 운반체로서 크롬의 이동에 중요한 물질로 생각되고 있다(Wada들, 1983 ; Yamamoto들, 1981). 그러나 지금까지 세포수준에서 세포 소기관에 대한 연구는 거의 없는 편이다.

본 실험에서는 흰쥐 신장세포에서 분리한 미토콘드리아를 이용하여 여러 농도의 크롬 6가를 처리한 다음 호흡을 유도하여 호흡을 측정하고 미토콘드리아의 형태변화를 관찰하며 전자전달계의 활성을 측정하였다. 그래서 크롬 6가가 미토콘드리아의 호흡에 미치는 영향과 그 요인을 밝히는 한편, sodium dichromate를 토끼에 정맥주사한 후에 분리한 LMCr을 이용하여 같은 농도의 크롬이 포함된 LMCr과 크롬 6가를 미토콘드리아에 처리한 후 호흡을 측정해봄으로써 세포수준에서 LMCr이 크롬 6가로 인한 독성을 해독시킬 수 있는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

호흡율과 효소활성 측정 및 전자현미경 관찰을 위한 미토콘드리아는 250mg내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하여 분리하였고 저분자 크롬결합물질(LMCr)은 2.5kg내외의 New Zealand white계의 토끼를 사용하여 분리하였다.

2) 시 약

Malate, glutamate, menadione(2-methyl-1,4-naphthoquinone), NADH(β -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form), cytochrome c, Tris base, Diphenylcarbazide, sodium azide 등은 Sigma사 제품을

사용하였고, DEAE -Sephadex A-25, Sephadex G-25는 Phamacia 제품을 사용하였으며 그 밖의 시약은 시판중인 특급 내지 일급품을 사용하였다. 단백질 정량시 표준 단백질로는 bovine serum albumin(Sigma사)을 사용하였으며, 크롬 6가 화합물로는 sodium dichromate(Na₂Cr₂O₇·2H₂O)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) LMCr의 분리

토끼의 간으로부터 Yamamoto들(1987)의 방법을 응용하여 LMCr을 분리하였으며 모든 과정은 4°C에서 다음과 같이 행하였다 (Fig. 1).

가) 간의 적출

체중 kg당 74mg의 sodium dichromate를

증류수에 녹여 토끼의 귀에 정맥주사한 후 2시간이 경과한 다음 공기주사로 희생시켜서 간을 적출하였다.

나) Ethanol precipitation

적출한 간을 증류수로 25%(w/v) 희석된 파쇄액을 만들어 10분간 600×g로 원심분리 (Hitachi Model 20PR-5)한 다음 상등액만을 모아 50% ethanol 용액으로 만들어서 4°C에서 24시간동안 진탕한 후 6,500×g에서 60분간 원심분리하였다. 다시 상등액만을 모아 90% ethanol용액으로 만든 다음 4°C에서 48시간 동안 진탕한 후 12,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 desiccator에서 건조시켰다.

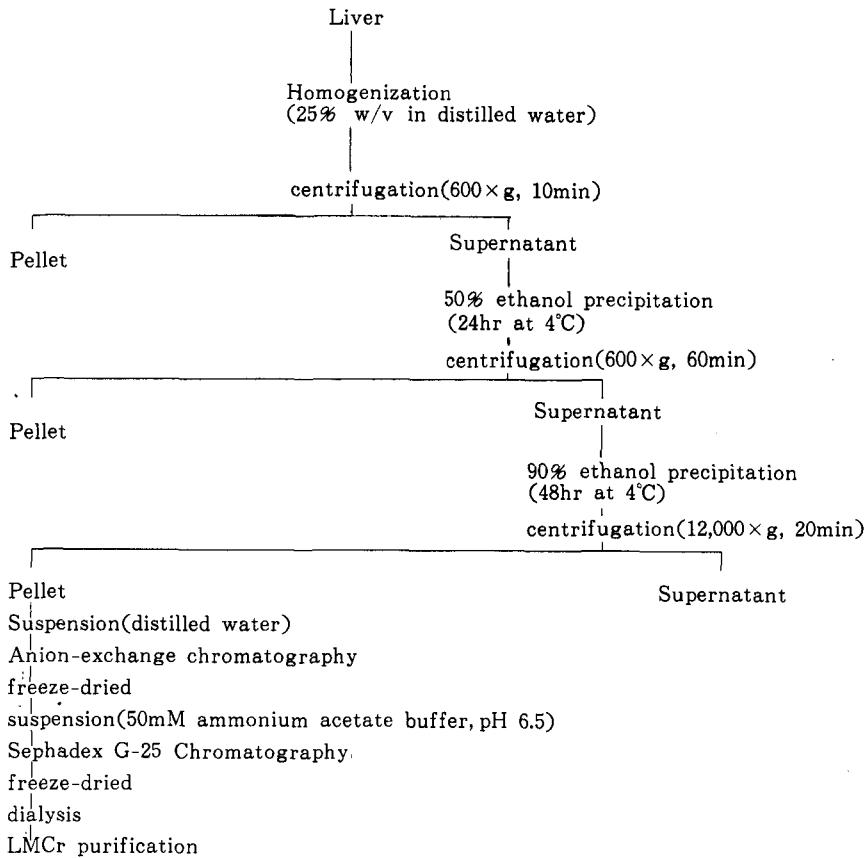


Fig. 1. Purification of LMCr from rabbit liver

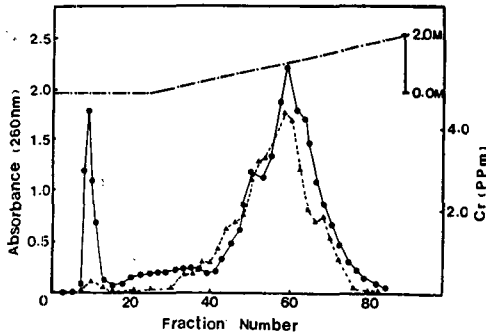


Fig. 2. Anion-exchange chromatography of LMCr on DEAE-Sephadex A-25. Ethanol powder extract(4ml) was applied to the column(3.2×15cm) equilibrated with distilled water and eluted with a linear NH₄Cl gradient(0-2M) at a flow rate of 18ml/hr. 5ml fractions were collected. Chromium content(▲), absorbance at 260nm(●), and NH₄Cl gradient(---)

다) DEAE-Sephadex ion-exchange chromatography

건조시킨 침전물을 증류수로 녹여, 미리 증류수로 equilibration시킨 DEAE-Sephadex column(3.2×15cm)에 loading하여 0M에서 2M의 ammonium chloride로 linear salt gradient를 걸어주면서 용출시켰다. 각 시험관은 fraction collector(LKB Bromma 2112 Redirac)를 이용하여 18ml/hr 속도로 각 5.0ml씩 받았으며, 크롬정량을 하여 크롬 농도가 높게 나타난 47번에서 64번까지 분획을 모아 냉동 건조시켰다(Fig. 2).

라) Sephadex G-25 gel filtration chromatography

냉동 건조시킨 분획을 50mM ammonium acetate buffer(pH 6.5)로 equilibration시킨 Sephadex G-25 column(1.8×85cm)에 동일 완충액으로 녹여 loading시켰다. Fraction collector를 이용하여 각 시험관은 20ml/hr 속도로 각 5ml씩 받았으며 크롬농도가 높은 24번에서 37번까지 분획을 모아 냉동 건조시켰다(Fig. 3). 그런다음 다시 증류수

에 녹여 benzoylated dialysis tubing(Sigma D-2272)에 넣어 증류수를 2회 갈아주면서 투석시키고, 냉동 건조시켜 호흡실험에 LMCr로써 사용하였다.

마) 크롬 정량

Column을 통하여 받은 각 시험관의 크롬 정량은 Saltzman(1952)의 방법을 응용하였다. 즉 sample을 적당량 취하여 50ml digestion tube에 넣고 30% hydrogen peroxide와 60% nitric acid를 1:5의 비율로 첨가한 다음 180°C에서 가열하여 단백질을 digestion시켰다. 이 때 완전히 건조시키지는 않았다. 그런 다음 0.5N sulfuric acid 10ml를 넣고 거의 끓을 때까지 가열한 다음 potassium permanganate를 몇방울 넣고 10분 정도 가열한 후 1% sodium azide(w/v) 0.8ml를 넣어 2분 더 천천히 가열하고서 수도물에 식혔다. 여기에 증류수를 넣어 14ml로 맞춘 다음 0.5% diphenyl carbazide(w/v)를 1ml씩 넣고 잘 섞어 발색시킨 후 Spectrophotometer(Hitachi Model 200-20)로 543nm에서의 흡광도를 측정하였다.

2) 미토콘드리아의 분리

흰쥐를 경추이탈(cervical dislocation)로써 희생시켜 개복한 후 신장을 적출하여 0.25M sucrose(pH 7.4) 완충용액으로 20% (w/v)로 희석된 파쇄액을 만들어 Schneider (1948) 방법으로 다음과 같이 원심분리하였다(Fig. 4). 즉 파쇄액을 10분간 600×g로 원심분리한 후 상등액을 모아 8,500×g로 다시 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 동일완충액에 현탁하여 8,500×g에서 10분간 원심분리하고, 이 마지막 단계를 2회 반복한 후 최종 미토콘드리아 침전물을 얻은 후에 동일완충액으로 단백질이 10mg/ml 되게 현탁하여, 호흡실험과 효소활성 측정 및 전자현미경관찰 실험에 사용하였다.

3) 호흡율의 측정

분리한 미토콘드리아의 호흡율은 Biological Oxygen Monitor(YSI Model 53)를

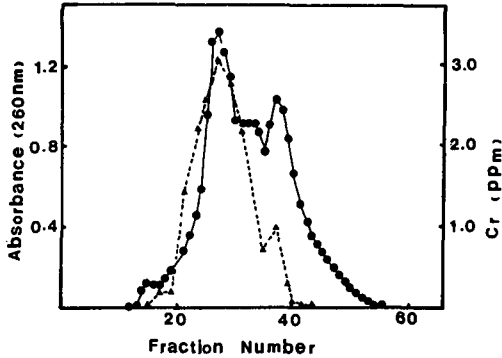


Fig. 3. Gel filtration chromatography of LMCr on Sephadex G-25. Number 47-64 fractions from the DEAE-Sephadex A-25 were pooled, and eluted with 50mM ammonium acetate buffer, pH 6.5(20 ml/hr). 5ml fractions were collected. Chromium content(▲), absorbance at 260nm(●). Column dimension ; 1.8×85cm.

사용하여 측정하였다. 즉 5mM magnesium chloride와 5M phosphate가 포함된 0.16M sucrose(pH 7.4) medium을 산소로 포화시킨 후 sample chamber에 반응 medium을 2.76ml 넣고 30°C를 만들어 미토콘드리아 1mg을 넣은 후 1분간 배양시키고 대조군에는 증류수 0.1ml, 실험군에는 여러 농도의 크롬 6가를 처리하고 2분간 더 배양시킨 후 10mM glutamate와 1mM malate를 첨가하여(total volume 3ml) state IV 호흡을 유도하고 30°C에서 5분동안 포화된 산소의 감소율을 측정하였다. 한편 LMCr이 크롬 6가의 독성을 해독시키는가를 알아보기 위하여 산소로 포화된 반응 medium에 미토콘드리아를 1mg 넣고 대조군에는 증류수를, 실험군에는 0.7mM의 크롬 6가와 0.7mM의 크롬을 포함하고

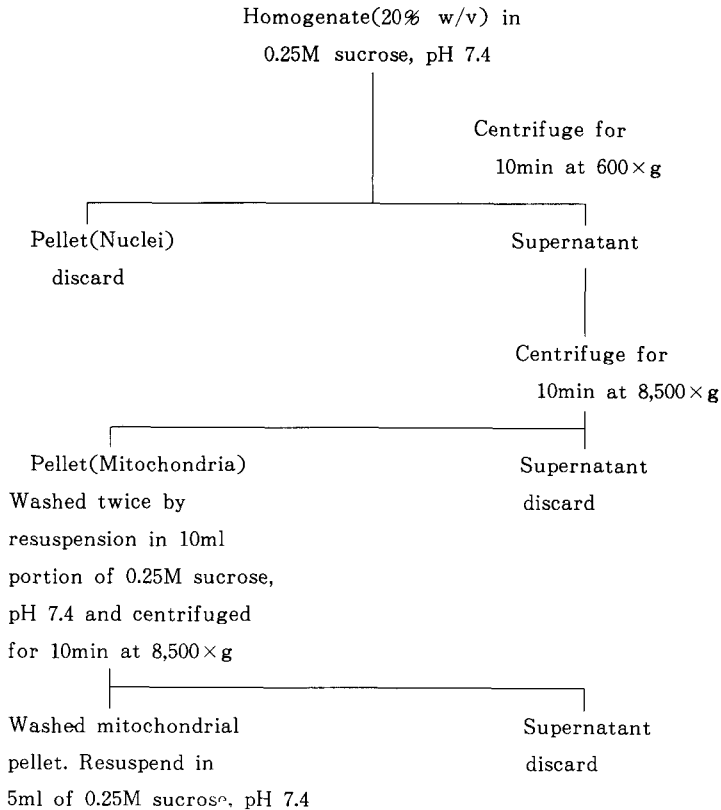


Fig. 4. Procedure for the isolation of mitochondrial fraction. All steps were carried out at 0-4°C

있는 LMCr을 처리한 후 30°C로 유지하면서 3분간 배양시켰다. 그런다음 10mM의 glutamate와 1mM의 malate를 첨가하여 state IV 호흡을 유도한 후 5분동안 포화된 산소의 감소율을 Spectrophotometer의 Pen recorder를 이용하여 처음부터 그대로 scanning하였다.

4) 효소 활성도 측정

효소활성도의 측정은 미토콘드리아 분획에 대조군에는 증류수, 실험군에는 여러 농도의 크롬 6가를 처리하고 30°C에서 2분간 배양시킨 후 Spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

가) NADH-CoQ(Ubiquinone) reductase(EC 1.6.99.5)

CoQ에 의하여 NADH가 산화되는 과정을 Sanadi들(1967)의 방법을 수정하여 측정하였다. 즉 2차증류수 1.95ml, 0.5M Tris-HCl 완충용액(pH 8.0) 0.3ml, 10mM menadione 0.05ml, 30mM KCN 0.1ml, 4mM NADH 0.1ml를 첨가하여 혼합시킨 반응액을 30°C에서 2.5분간 물증탕하였다. 그리고 미토콘드리아 분획 0.2ml를 첨가하여 반응부피를 3ml로 한 후 30°C를 유지하면서 340nm에서 1분동안의 흡광도 감소를 측정하였다. Blank로는 NADH를 제외한 반응혼합액을 사용하였다.

나) Cytochrome c oxidase(EC 1.9.3.1)

Ferrocycytochrome c가 산화되는 율을 Wharton과 Tzagoloff의 방법(1967)을 수정하여 측정하였다. 즉 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0) 0.1ml, 1% ferrocycytochrome c 0.07ml, 2차증류수 0.78ml가 혼합된 반응액에 미토콘드리아 분획 0.05ml를 첨가하여 반응부피가 1.0ml되게 하였다. 그리고 반응액을 30°C로 유지하면서 550nm에서 1분동안 cytochrome c의 α -band 흡광도 감소를 측정하였다. Blank는 0.1M potassium ferricyanide 0.01ml를 첨가하여 산화시켜 사용하였다. Ferrocycytochrome c는 cytochrome c를 sodium ascorbate로 환원시킨 후에 투석

하여 과잉의 sodium ascorbate를 제거함으로써 만들었다. 만든 ferrocycytochrome c는 550nm와 565nm에서 흡광도를 측정하여 565nm에 대한 550nm에서의 흡광도비가 6이상인 경우만 사용하였다(Smith, 1965). 본 실험에 사용된 ferrocycytochrome c의 흡광도비는 7.23이었다.

5) 단백질 정량

미토콘드리아 분획의 단백질 정량은 Gornall들(1949)의 Biuret method를 이용하였으며 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

6) 전자현미경 관찰

호흡을 측정실험에서, 대조군에는 증류수, 실험군에는 여러 농도의 크롬 6가를 처리하고 미토콘드리아를 5분동안 state IV 호흡시킨 뒤에 25% glutaraldehyde 0.125ml를 반응액에 첨가하여 반응을 중지시킨 후 4°C에서 2시간이상 방치하였다가 28,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 미토콘드리아 침전물을 얻었다. 이 침전물을 1mm³의 크기로 세절하여 0.1M potassium phosphate완충용액(pH 7.4)로 조정된 glutaraldehyde에 2시간 전고정하고 동일완충액으로 3회 세척한 후 0.1M potassium phosphate완충용액(pH 7.4)으로 고정된 1% osmium tetroxide로 2시간 후고정하였다(Bone과 Denton, 1971). 고정 후에 동일완충액으로 3회 세척하고 ethanol 농도 상승순으로 탈수한 다음propylene oxide로 치환하고난 후에 epoxy resin으로 포매하였다(Luft, 1951). 포매한 표본을 37°C에서 24시간, 67°C에서 48시간 배양하여 중합시킨 후에 ultramicrotome(Sorvall MT2-B)으로 1 μ m정도의 두께로 잘라 광학현미경으로 부위를 확인한 후 500Å-600Å의 두께로 초박 절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색(Reynolds, 1963)하여 투과 전자현미경(Hitachi H-500)으로 관찰하였다.

결 과

1. 미토콘드리아에 미치는 크롬 6가의 영향

1) 호흡율에 미치는 영향

처리한 크롬 6가의 농도가 높을수록 대조군과 비교하여 미토콘드리아의 state IV 호흡율은 많이 감소하였다. 0.1mM의 크롬 6가를 처리하였을 때 25% 정도 호흡율이 감소하였으며 1mM을 처리하였을 때 50% 정도가 감소하였고 4mM을 처리하였을 때는 90% 정도 감소하였다(Fig. 5).

2) 전자전달효소의 활성화에 미치는 영향

처리한 크롬 6가의 농도가 높을수록 전자전달효소의 활성화도 대조군과 비교하여 많이 감소하였는데, 1mM의 크롬 6가를 처리하였을 때는 대조군에 비하여 NADH-CoQ reductase는 41.7%, cytochrome c oxidase는 28.3% 감소하였으며, 2mM을 처리하였을 때에는 각기 52.1%와 34.2%가 감소하였다(Table 1, 2). 그렇지만 전자전달계의 초기단계인 NADH-CoQ reductase가 후기단계인 cytochrome c oxidase보다 많이 억제되었다.

3) 형태변화에 미치는 영향

크롬 6가를 처리하지 않은 정상적인 미토콘드리아는 분리 직후에 응축된 형태(condensed conformation)로 존재하였으며(Fig. 7), 5분간 state IV 호흡을 시킨 후에는 완전히

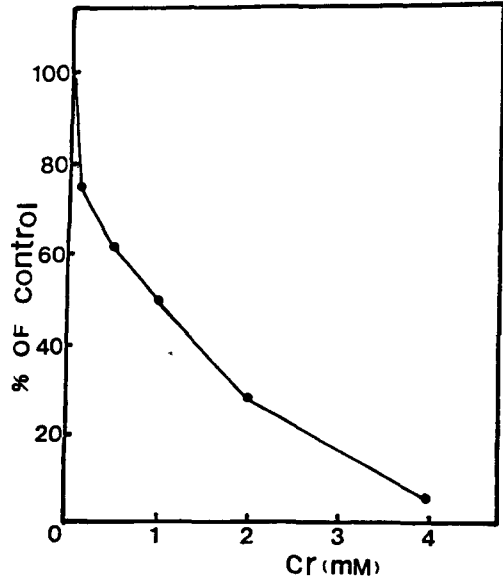


Fig. 5. Mitochondrial state IV respiration rate at different various hexavalent chromium concentrations as percent of the control. Each point represent the mean of three experiments. Respiration was initiated by adding of glutamate(10mM) + malate(1mM) to reaction medium. Mean respiratory rates of the controls were 9.8 nmole O₂/min/mg protein.

정상형태로 변하였다(Fig. 8). 0.5mM의 크롬 6가를 처리하고 5분간 state IV 호흡을 시킨 후에는 정상형태로 변한 것도 있었으

Table 1. NADH-CoQ Reductase Activities of Rat Kidney Mitochondria treated with various Concentrations of Hexavalent Chromium.

Hexavalent Chromium(mM)	No ^a	Enzyme Activity (Δ O. D./min/mg protein)	% of control	P value
Control ^b	3	0.140 ± 0.0057	100.0	
0.1	3	0.118 ± 0.0071	84.3	<0.05
0.5	3	0.105 ± 0.0035	75.0	<0.01
1.0	3	0.083 ± 0.0064	59.3	<0.01
2.0	3	0.067 ± 0.0035	47.9	<0.01

★ Data are expressed as means ± S. D.

Data were statistically tested with student's t-test.

a : Number of experiments.

b : Chromium not added.

Table 2. Cytochrome c Oxidase Activities of Rat Kidney Mitochondria treated with various Concentrations of Hexavalent Chromium.

Hexavalent Chromium(mM)	No ^a	Enzyme Activity (Δ O. D./min/mg protein)	% of control	P value
Control ^b	3	0.474 ± 0.0532	100.0	
0.5	3	0.416 ± 0.0570	87.8	N. S.
1.0	3	0.340 ± 0.0283	71.7	<0.025
2.0	3	0.312 ± 0.0288	65.8	<0.025

★ Data are expressed as means ± S. D.

Data were statistically tested with student's t-test.

a : Number of experiments.

b : Chromium not added.

나 부분적으로 중간형태도 존재하였으며 팽윤현상이 관찰되었다(Fig. 9). 1mM을 처리한 경우에는 정상형태도 관찰되었으나 응축형태에 가까운 중간형태도 나타났으며 matrix 도가 낮았고 파괴된 막들이 관찰되었다(Fig. 10). 4mM을 처리하였을 때는 정상형태 외에 중간형태와 응축형태가 혼재하여 있었으며 불완전한 막과 팽윤현상이 관찰되었다(Fig. 11).

2. 미토콘드리아의 호흡에 미치는 크롬 6가 영향에 대한 LMCr의 작용

3분동안 미토콘드리아의 state I 호흡을 시킨 후에 기질을 넣고 5분동안 state IV 호흡을 유도하였을 때 0.7mM의 크롬 6가를 처리한 경우에는 증류수를 처리한 대조군에 비하여 42% 정도 호흡율이 감소하였다. 그러나 같은 0.7mM을 포함하고 있는 LMCr은 대조군과 별다른 호흡율의 차이를 나타내지 않았다(Fig. 6).

한편 분리한 LMCr에 diphenylcarbazide를 넣어 보았을 때 발색이 되지 않았으며 크롬 6가로 산화된 후에야 발색이 되었다.

고 찰

본 실험의 결과 크롬 6가는 신장세포내 미토콘드리아의 호흡율을 감소시켰으며 전자전달계의 Complex I에 해당하는 NADH-CoQ reductase의 활성을 감소시켰다. 이것

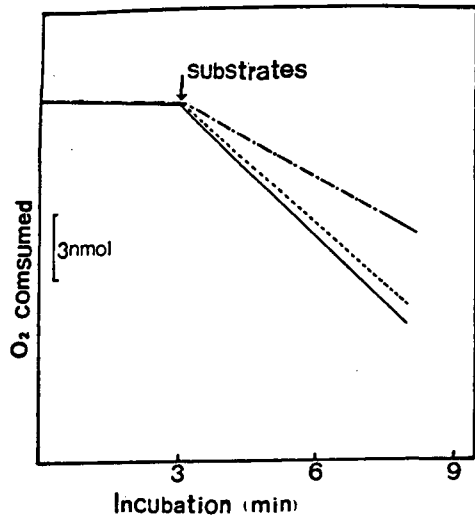


Fig. 6. The effect of hexavalent chromium and LMCr on state IV respiration. The figures indicated are nmole O₂ consumed/min/mg protein. Cr-IV(---), LMCr(.....), Control(—). Substrates ; glutamate(10mM)+malate (1mM).

은 Ryberg와 Alexander(1984)가 제안한 미토콘드리아의 호흡을 감소는 크롬 6가가 3가로 환원되면서 생기는 산화력으로 인하여 Complex I이 손상을 입기 때문이라는 견해와 일치한다. 그러나 본 실험에서 나타난 cytochrome c oxidase의 활성 역시 어느정

도 감소한 결과는 크롬 6가가 전자전달 후기단계인 Complex IV에도 손상을 입힌다는 것을 시사하여 주고있다.

한편 Hackenbrock(1966)은 정상적인 미토콘드리아는 state IV 호흡동안 응축형태에서 정상형태로 완전히 형태가 변한다고 하였으며 Hackenbrock(1968)은 uncoupling agent인 DNP를 처리한 경우에 이런 형태 변화에는 아무런 영향이 없으나 amytal, antimycin A, cyanide 등 전자전달 억제물질을 처리한 경우에는 이러한 형태변화가 억제된다고 하였다. 또한 Evan과 Dail(1974)은 크롬 6가가 신장기부선회소관의 미토콘드리아를 팽윤시킨다고 하였으며 Matlib와 Srere(1976)는 팽윤된 미토콘드리아는 정상적인 미토콘드리아보다 호흡율이 감소하였다고 보고하였다.

본 실험의 결과 크롬 6가를 처리하였을 때 미토콘드리아가 정상형태로 완전히 변화되지 못한 중간형태 및 응축형태가 부분적으로 관찰되었으며 대체적으로 팽윤된 미토콘드리아가 많이 나타났다. 이는 미토콘드리아의 전자전달이 제대로 이루어지지 않았다는 것을 나타내주는 것이며 이로 인하여 호흡율이 감소하였다고 볼 수 있다. 또한 불완전한 막들이 많이 존재하였고 심한 경우 막이 파괴되었으며 matrix내의 전자밀도가 감소하였는데 이것 역시 미토콘드리아의 호흡율이 감소된 원인이라고 생각할 수 있다. 그러나 본 실험에서 크롬 6가를 처리하였을 때 나타난 호흡율의 감소와 형태상의 변화가 일치하지 않는 것을 볼 수 있다.

그러므로 크롬 6가로 인한 미토콘드리아의 호흡율이 감소하는 원인을 두가지로 생각할 수 있다. 첫째는 본 실험에서도 확인할 수 있듯이 크롬 6가가 미토콘드리아의 막을 통과하면서 막 자체에 일차적으로 손상을 끼치며 또한 미토콘드리아내로 빠르게 수송된 크롬 6가는 크롬 3가로 환원되면서 전자전달계에 산화적 손상을 입힘과 동시에 전

자전달계와 복합체를 형성함으로써(Tandon 등, 1979 ; Alexander 등, 1982 ; Bianchi 등, 1982 ; Debetto 등, 1982 ; Ryberg 등, 1984), 전자전달이 제대로 일어나지 못하게 하여 호흡율을 억제시킬 것이라고 생각할 수 있다. 둘째는 크롬 6가가 미토콘드리아의 호흡에 필요한 선구물질 수송을 경쟁적으로 억제함으로써(Crompton 등, 1974 ; Lanoue와 Schoolwerth, 1979) 미토콘드리아내에 대사물질의 부족을 초래하게 되어 호흡율이 감소할 것이라고 생각할 수 있다. 즉 크롬 6가를 처리하였을 때 나타나는 호흡율의 감소현상은 앞서 제안한 두가지의 요인이 복합적으로 나타난 결과라고 할 수 있는 것이다.

한편 sodium dichromate를 토끼에 주사한 후 간을 적출하여 ethanol precipitation, anion exchange, gel filtration을 거쳐 저분자크롬 결합물질(LMCR)을 분리하였는데 이 LMCR은 혈장, 오줌, 똥에서도 발견되었다(Yamamoto 등, 1981).

이 크롬뿐만 아니라 납이나 카드뮴 등도 생체내에 투여되었을 때 특이한 단백질이 생성된다는 보고들이 있다. 납의 경우에는 11.5kd, 63kd, 200kd 정도의 납과 결합하는 단백질이 신생합성되며 카드뮴의 경우에는 6.5kd 정도의 카드뮴 결합단백질이 생성되는데 이 단백질들은 모두 금속이온들이 미칠 수 있는 여러가지 독성을 막기 위하여 생체내에서 방어작용으로 합성되는 것으로 추정하고 있다(Oskarsson 등, 1982 ; Jin 등, 1982).

본 실험에서 분리한 LMCR에 크롬 6가와 반응하여 발색되는 diphenylcarbazide를 넣어보면 전혀 발색이 되지않고 다만 potassium permanganate를 이용하여 산화시켰을 때만 발색이 되었는데 이는 LMCR에 결합하고 있는 크롬이 6가형태가 아니라 3가형태라는 것을 말하여 준다. 그러므로 본 실험의 결과에서 나타난 같은 농도의 0.7mM의 크롬이 포함되어 있는데도 불구하고 크롬 6가와는

달리 LMCr을 처리하였을 때 별다른 호흡율의 감소가 일어나지 않는 이유는 미토콘드리아내에서 크롬 6가가 3가로 환원되면서 미칠 수 있는 산화적 손상을 LMCr이 막아주기 때문이라고 할 수 있다.

LMCr이 크롬 6가의 산화력을 어떻게 막아줄 것인가에 대하여서는 지금까지 별로 알려진 것이 없다. 하지만 glutathione의 경우에는 풍부한 -SH기를 이용하여 세포질에서 빠르게 크롬 6가를 3가로 환원시키면서 크롬과 복합체를 형성한다는 보고가 있다 (Jocelyn, 1972). 그러므로 LMCr의 경우도 그 자체의 음이온성질과 cysteine기에 포함된 -SH기를 이용하여 크롬 6가를 3가로 환원시키면서 동시에 복합체를 형성할 것이라고 제안할 수 있다. 그러나 이에 대한 정확한 기작은 더 연구가 필요한 실정이다. 단지 지금 단계에서는 세포막을 통과하여 세포질내로 들어온 크롬 6가의 독성을 방어하기 위하여 생체내에서 LMCr을 합성하고 이 LMCr이 세포질에서 크롬과 결합하여 크롬 6가의 산화력을 제거시킬 것이라고 추정할 수 있다.

앞으로 LMCr의 정확한 작용기작과 이동 경로 등을 밝히기 위한 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

크롬 6가가 미토콘드리아의 호흡과 전자 전달효소의 활성 및 형태변화에 미치는 영향, 그리고 미토콘드리아의 호흡에 미치는 크롬 6가의 영향에 대한 저분자크롬결합물질(LMCr)의 작용에 대한 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 흰쥐의 신장세포에서 분리한 미토콘드리아에 여러 농도의 크롬 6가를 처리한 경우, 농도에 비례하여 호흡율이 감소하였고 NADH-CoQ reductase의 활성과 cytochrome c oxidase활성이 감소하였다. 또한 전자현미경상에서 응축형태에서 정상형태로

변하지 못한 중간형태들이 존재하였으며 불완전한 막과 팽윤현상이 관찰되었다.

2. Sodium dichromate를 토끼에 정맥주사한 후 분리한 LMCr은 같은 0.7mM의 크롬농도에서, 미토콘드리아의 호흡율을 거의 감소시키지 않았으나 크롬 6가는 대조군에 비하여 42% 정도 감소시켰다.

References

Alexander, J., J. Aaseth and T. Norseth. 1982. Uptake of chromium by rat liver mitochondria. *Toxicology*. 24, 115-122.

Banks, R. B. and R. T. Cooke. 1986. Chromate reduction by rabbit liver aldehyde oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 8-14.

Behari, J., S. V. Chandra and S. K. Tandon. 1978. Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to rabbits: III. Biochemical and histological changes in testicular tissue. *Acta Biol. Med.*

Bianchi, V., L. Celotti, G. Lanfranchi, F. Majone, G. Marin, A. Montald, G. Sponza, G. Tamino, P. Venier, A. Zentedeschi and A.G. Levis. 1983. Genetic effects of chromium compounds. *Mut. Res.* 117, 279-300.

Bone, Q. and E. J. Denton. 1971. The osmotic effects of electron microscope fixatives. *J. Cell Biol.* 49, 571-581.

Bossard, M. J. and S. M. Schuster. 1981. Structural preferences for the binding of chromium nucleotides by beef heart mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* 256, 6617-6622.

Browning, E. 1969. *Toxicity of industrial Metals*, 2nd ed. pp. 119-131. Butterworth, London.

Crompton, M., F. Palmieri, M. Capano and

- E. Quagliariello. 1974. The transport of sulphate and sulphite in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 142, 127-137.
- Debetto, P., R. Dal Toso, R. Varotto, V. Bianchi and S. Luciani. 1982. Effects of potassium dichromate on ATP content of mammalian cells cultured *in vitro*. *Chem. Biol. Interact.* 41, 15-24.
- Dunaway-Mariano, D. and W. W. Cleland. 1980. Preparation and properties of chromium(III) adenosine 5'-triphosphate, chromium(III) adenosine 5'-diphosphate, and related chromium(III) complexes. *Biochemistry.* 19, 1496-1506.
- Enterline, P. E. 1974. Respiratory cancer among chromate workers. *J. Occup. Med.* 16, 523-526.
- Evan, A. P. and W. G. Dail. 1974. The effects of sodium dichromate on the proximal tubules of the rat kidney: Fine structural damage and lysozymuria. *Lab. Invest.* 30, 704-715.
- Flexon, P., M. Khan and M. H. Luria. 1986. Effects of potassium chromate on atherosclerosis prevention and regression in rabbits. *Atherosclerosis.* 59, 31-35.
- Garcia, J. D. and K. W. Jennette. 1981. Electron-transport cytochrome P-450 system is involved in the microsomal metabolism of the carcinogen chromate. *J. Inorg. Biochem.* 14, 195-281.
- Gornall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David. 1949. Determination of serum proteins by means the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
- Gruber, J. E. and K. W. Jennette. 1978. Metabolism of the carcinogen chromate by rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 700-706.
- Hackenbrock, C. R. 1966. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria: I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 37, 345-369.
- Jin, T., G. F. Nordberg and M. Nordberg. 1987. Resistance to acute nephrotoxicity induced by Cd-MT dependency on pretreatment with CdCl. *Pharmacol. Toxicol.* 61, 89-93.
- Jocelyn, P. C. 1972. *Biochemistry of the SH group.* Academic press. London.
- Kirschbaun, B. B., M. Sprinkel and D. E. Oken. 1981. Proximal tubule brush border alteration during the course of chromate nephropathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 58, 19-30.
- Kleinfeld, M. and A. Rosso. 1965. Ulcerations for the nasal septum due to inhalation of chromic acid mist. *Ind. Med. Surg.* 34, 242-243.
- Kumar, A., S. V. S. Rana and R. Prakash, 1985. Dysenzymia induced by hexavalent chromium in rat liver. *Int. J. Tiss. React.* 7, 333-338.
- Laborda, R., J. Diaz-Mayans and A. Nunez. 1986. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of chromium compounds in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 332-336.
- LaNoue, K. F. and A. C. Schoolwerth. 1979. Metabolite transport in mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 871-922.
- Levy, L. S. and S. Venitt. 1986. Carcinogenicity and mutagenicity of chromium compounds: The association between bronchial metaplasia and neoplasia. *Carcinogenesis* 7, 831-835.
- Luft, J. H. 1951. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409-414.

- Mathur, A.K., S. V. Chandra and S. K. Tandon. 1977. Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to rabbits : II. Morphological changes in some organs. *Toxicology*. 8, 53-61.
- Matlib, M.A. and P.A. Srere. 1976. Oxidative properties of swollen Rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 705-712.
- Mertz, W. 1969. Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol. Rev.* 42, 163-239.
- Oskarsson, A., K. S. Squibb and B. A. Fowler. 1982. Intracellular binding of lead in the kidney : The partial isolation and characterization of postmitochondrial lead binding components. *Biochem. Biophys. Res. Commum* 104, 290-298.
- Pauls, H., B. Bredenbrocker and W. Schoner. 1980. Inactivation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ by chromium(III) complexes of nucleotide triphosphates. *Eur. J. Biochem.* 109, 523-533.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of citrate at high pH and an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-213.
- Royle, H. 1975. Toxicity of chromic acid in chromium plating industry. *Environ. Res.* 10, 39-53.
- Ryberg, D. and J. Alexander. 1984. Inhibitory action of hexavalent chromium(Cr(VI)) on the mitochondrial respiration and a possible coupling to the reduction of Cr(VI). *Biochem. Pharmacol.* 33, 2461-2466.
- Saltzman, B. E. 1952. Microdetermination of chromium with diphenylcarbazide by permanganate oxidation. *Anal. Chem.* 24, 1016-1020.
- Sanadi, D. R., R. L. Pharo and L. A. Sordahl. 1967. NADH-CoQ reductase : Assay and purification. *Method in Enzymology*, Vol. 10, pp. 297-305, Academic Press, New York.
- Sanderson, C. J. 1976. The uptake and retention of chromium by cells. *Transplantation*. 21, 526-529.
- Smith, L. 1955. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 2, pp. 427-434, Interscience. New York.
- Stern, R. M. 1982. Chromium compounds : Production and occupational exposure. *Biological and Environmental Aspects of chromium*, pp. 5-47, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Schneider, W. C. 1948. Intracellular distribution of enzymes. III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fraction. *J. Biol. Chem.* 176, 259-266.
- Tandon, S. K., D. K. Saxena, J. S. Gaur and S. V. Chandra. 1978. Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium : Alteration in blood and liver. *Environ. Res.* 15, 90-99.
- Tandon, S. K., J. R. Behari and D.N. Kachru. 1979. Distribution of chromium in poisoned Rats. *Toxicology*. 13, 29-34.
- Tsapakos, M. J., T. H. Hampton and K. E. Wetterhahn. 1983. Chromium(VI) induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver and lung. *Cancer Res.* 43, 5662-5667.
- Wada, O., W. Guo, A. Yamamoto, W. Manabe and T. Ono. 1983. Purification and chromium-excretory function of low-molecular-weight, chromium binding substances from dog-liver. *Environ. Res.* 32, 228-239.

- Wharton, D. C. and A. Tzagoloff. 1967. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods in Enzymology*, Vol. 10, 245-246, Academic Press, New York.
- Yamamoto, A., H. Suxuki, H. Matsui and T. Ono. 1981. A low-molecular-weight, chromium-binding substances in mammals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59, 515-523.
- 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.

Figure Legends

- Fig. 7. Electron micrograph of mitochondria just after isolation from liver of normal rat. All the mitochondria have condensed conformation(CON).
- Fig. 8. Electron micrograph of mitochondria after 5 minutes of state IV respiration. Nearly all the mitochondria are transformed from the condensed to the orthodox conformation(ORT).
- Fig. 9. Electron micrograph of 0.5 mM chromium(VI)-treated mitochondria after 5 minutes of state IV respiration. Some mitochondria are transformed from condensed to orthodox conformation, and intermediate conformation is seen(IC). Swollen mitochondria(S) and labile membranes(arrow) are seen.
- Fig. 10. Electron micrograph of 1mM chromium(VI)-treated mitochondria after 5 minutes of state IV respiration. Some mitochondria are transformed from condensed to orthodox conformation, and ruptured mitochondrion(arrow) is seen.
- Fig. 11. Electron micrograph of 4 mM chromium(VI)-treated mitochondria after 5 minutes of state IV respiration. Condensed(CON) and intermediate conformation (IC) are seen. Labile membrane(arrow) and swollen mitochondria(S) are seen.

