

환취 신장의 미토콘드리아 호흡에 미치는 Cadmium과 Cadmium Binding Protein의 영향

趙惠卿 · 夫文鍾 · 崔林淳

Effects of Cadmium and Cadmium Binding Protein on the Respiration of Mitochondria of Rat Kidney

Cho, Hae Kyoung, Moon Jong Boo and Rim Soon Choe

(Received November 7, 1989)

Abstract

To investigate the effect of cadmium and cadmium binding protein on the electron transport system and conformational changes of rat kidney mitochondria, various cadmium concentration were treated *in vitro* and respiration rate, NADH-CoQ reductase activity were measured. Ultrastructural changes at state IV respiration were also observed. CdBP was isolated from the rat liver by Sephadex G-75 column fractionation and treated *in vitro* with cadmium. Also mitochondrial state IV respiration rate was measured.

When cadmium was treated *in vitro*, state IV respiration and enzyme activity were decreased and ultrastructural transformation of mitochondria from a condensed to an orthodox conformation was inhibited under state IV respiration.

In case cadmium and CdBP were treated together, oxygen consumption was more increased than cadmium only. Conformational changes of mitochondria from a condensed to orthodox conformation were also observed. This indicates that CdBP have a protective effect against cadmium toxicity.

서 론

카드뮴(Cd)은 환경오염물질로서 그리고, 그것이 지니고 있는 독성 때문에 독물학에서 주요하게 취급되고 있는 중금속으로 많

은 체조직에서 다양하게 독성을 나타내는데 (Shukla와 Singhal, 1984) 만성 및 급성 투여시 투여된 양의 50~70%가 간 조직과 신장 조직에 축적되며(Kotsonis와 Klassen, 1977) 간 조직의 경우에 유조직 세포의 팽

윤, 세포질의 호산구다중, 조면소포체의 팽창 및 파괴, 활면소포체의 증식, 그리고 미토콘드리아 팽윤과 함입현상이 Hoffman들(1975)에 의하여 보고되었다.

신장 조직의 경우에는 만성 투여시에 기부선화소관의 위축과 퇴화, 신경화증을 일으키고, 또한 당뇨, 단백뇨증, 아미노산뇨증을 나타낸다는 보고가 있다.

간과 신장을 제외한 다른 조직에서의 독성 효과를 살펴보면 빈혈(Wilson과 Cox, 1941), CNS파괴, 고혈압의 유도 및 생식계에 대한 손상(John들, 1984)이 있으며, Ijaz과 Smith (1985)는 Cd이 지질과산화물을 증가시켜 심장 독증(cardiotoxicity)을 일으킨다고 하였고, Chowdbury와 Louria(1976)는 Cd가 α -1-antitrypsin활성을 감소시켜 폐독증을 초래한다고 하였다.

Cd은 포유류 미토콘드리아 전자전달계의 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)를 억제하는데(Jaccobs들, 1956) 간 조직에 있어서 분리된 미토콘드리아에 Cd를 10 nmole/mg protein of mitochondria의 농도로 처리할 경우에 완전한 호흡의 억제가 일어났으며(Sato들, 1978), 심장의 미토콘드리아를 분리하여 ADP-stimulated pyruvate-malate-supported mitochondrial respiration에 대한 Cd의 영향을 알아본 결과 억제제로서 작용함을 알았다(Gregory들, 1987).

이와 같이 Cd에 의한 독성이 발생할 경우 생체는 그에대한 조직 및 세포성 방어기작으로 금속성 결합 단백질(metal binding protein) 즉, 카드뮴 결합 단백질(cadmium binding protein, CdBP)을 생성하게 된다. Margoshes와 Valiee(1957)에 의하여 처음 분리되었던 금속성 결합단백질(metallothionein)은 작은 양의 Cd를 투여할 때 합성되는 low molecular weight(M.W. 6,500) cytoplasmic protein으로 금속결합에 관계하는 sulfhydryl groups인 cysteine잔여기를 지니고 있는 단백질이며(Kagi와 Vallee, 1960, 1961; Kagi

들, 1974) Cd에 대한 친화력이 높다(Cherian, 1974). Leber와 Miya(1976), Probst들(1977a, b)의 보고에 의하면 이와 같은 단백질이 간과 신장 등의 여러 기관에서 신생합성(*de novo synthesis*)이 된다고 하였는데 아직 그와 같은 학설은 확립되지는 않았다. 이러한 단백질이 갖는 생물학적 역할에 대한 연구와 보고들은 지금까지 대부분이 Cd 투여로 생성된 CdBP가 Cd의 독성을 저하시킨다고 하였다(Peter와 Klassen, 1984; Terhaar들, 1965; Leber와 Miya, 1976; Probst들, 1977; Stanley와 Schnell, 1982).

그러나, 이와 같은 주장들이 현재까지는 가설로만 대두되어 있을 뿐이기에 본 실험에서는 Cd를 CdBP와 함께 처리한 후, Cd만을 처리한 실험군과 비교함으로써, 그와 같은 가설들을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험 동물로는 체중 150~220g의 Sprague-Dawley 암컷 쥐를 사용하였다. 실험 동물과 분리한 미토콘드리아에 투여한 Cd은 cadmium chloride($CdCl_2 \cdot 2H_2O$)의 특급품을 사용하였고, NADH(nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form), thymole blue indicator solution (thymolsulfonephthalein, sodium salt) 등은 Sigma사(U.S.A)제품을 사용하였으며, 그외의 시약은 시판중인 GR 및 특급품을 사용하였다. 단백질 용액의 용출을 위하여 Sephadex G-15와 Sephadex G-75(Pharmacia)를 사용하였으며 이외에도 단백질 정량시 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 투여 및 표본적출

$CdCl_2$ 형태의 Cd를 증류수에 녹여 사용하였다.

실험 동물은 체중 kg당 $CdCl_2$ 0.25mg에 해당하는 양을 0.5ml에 포함되도록 용해하여

6일동안 피하 주사하였다. 6일이 경과한 후 실험 동물을 경추이탈로써 희생시켜 개복한 후 간 조직을 적출하여 CdBP 분리를 위한 표본으로 사용하였다.

2) Cadmium binding protein(CdBP)의 분리

CdBP는 Cherian(1974)의 방법을 이용하여 분리하였다. 적출한 간을 냉각된 0.25M sucrose가 포함된 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)로 파쇄액을 만든 후, 600×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 얻은 상등액을 다시 9,000×g에서 10분간 원심분리하고 상등액만을 모아 105,000×g에서 1시간동안 초원심분리하였다. 초원심분리하여 얻은 상등액만을 모아 4°C에서 ammonium sulfate를 넣어 25% 포화용액을 만들어 8,000×g에서 10분간 원심분리하고 다시 ammonium sulfate를 넣어 35% 포화용액을 만들었다. 이 포화용액을 8,000×g에서 10분간 원심분리한 후 침전물만을 모아 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)에 현탁시켰다.

과도한 ammonium sulfate를 제거하기 위하여 현탁시킨 침전물을 0.01M ammonium formate buffer(pH 7.4)로 미리 equilibration시킨 Sephadex G-15 column(2.6×20cm)에서 용출시켰다.

280nm의 흡광도를 나타내는 용출액중 Cd 농도 확인을 위한 1ml를 제외하고 남은 용출액을 모아 Vir Tris freeze drier로 농축시켰다. 단백질의 함량은 Lowry들(1951)의 방법으로 정량하였다.

280nm의 흡광도를 나타내는 용출액을 모은 다음 1 ml를 취하여 conc. HNO₃(60%) 5ml를 가하여 고열로 단백질을 분해한 후 Atomic Absorption Spectrophotometer (Perkin-Elmer, 2380)로 Cd의 농도를 확인하였다.

동결건조 과정을 통하여 농축시킨 단백질 용액을 0.01M ammonium formate buffer (pH 7.4)로 미리 equilibration시킨 Sephadex

G-75 column(2.3×80cm, Pharmacia)에 올려 놓고 12ml h⁻¹의 속도(90cm. H₂O 정수압)로 용출시켰다. 이때 각 시험관은 drop counter(LKB, 2112)를 이용하여 6.0ml씩 받아 254nm에서 흡광도를 측정하고, 각 시험관의 용출액 중 1ml씩 취하여 conc. HNO₃ (60%)를 각각 5ml씩 첨가하여 고열로 단백질을 분해한 후 dithizone method로 Cd의 농도를 분획별로 측정하였고 분획번호(fraction number) 38~50번까지의 분획을 모아서 미토콘드리아의 Cd독성에 대한 CdBP의 영향을 알아보기 위한 시료로 사용하였다(Fig. 1).

3) Dithizone method에 의한 cadmium의 정량

단백질 용출액을 conc. HNO₃로 단백질 분해를 시킨 다음에 분액깔대기에 옮겨서 증류수를 넣어 25ml로 희석시킨 후 tymole blue를 첨가하였다. 이때 이 tymole blue에 의하여 노란색으로 발색이 되면 6N NaOH로 pH 2.8를 맞추고, 이어서 1ml sodium potassium tartrate용액, 5ml NaOH-KCN solution I, 1ml NH₂OH·HCl용액, 15ml stock dithizone solution를 넣었다. 매 첨가할 때마다 충분히 섞어주고, 다시 함께 1분동안 흔들어 준다음 25 ml의 tartrate 용액이 들어있는 두 번째 분액깔대기로 CHCl₃층을 유출시켰다. 그리고 첫 번째 깔대기에 CHCl₃를 10ml 넣어 1분간 흔든 다음 다시 CHCl₃층을 두 번째 깔대기로 유출시킨 후 두 번째 깔대기를 2분동안 흔들고 CHCl₃층을 버렸다. 두 번째 깔대기에 5ml의 CHCl₂를 넣고 1분동안 흔든 다음 CHCl₃층을 버리고, 0.25ml NH₂OH·HCl용액, 15ml working dithizone solution, 그리고 5ml NaOH·KCN solution II를 첨가하여 1분동안 섞은 후에 CHCl₃층을 dry photometer 용기로 옮겨 518nm의 흡광도를 측정하였다.

Stock dithizone solution I 이란 1,000mg의 CHCl₃용액속에 100mg의 dithizone이 용

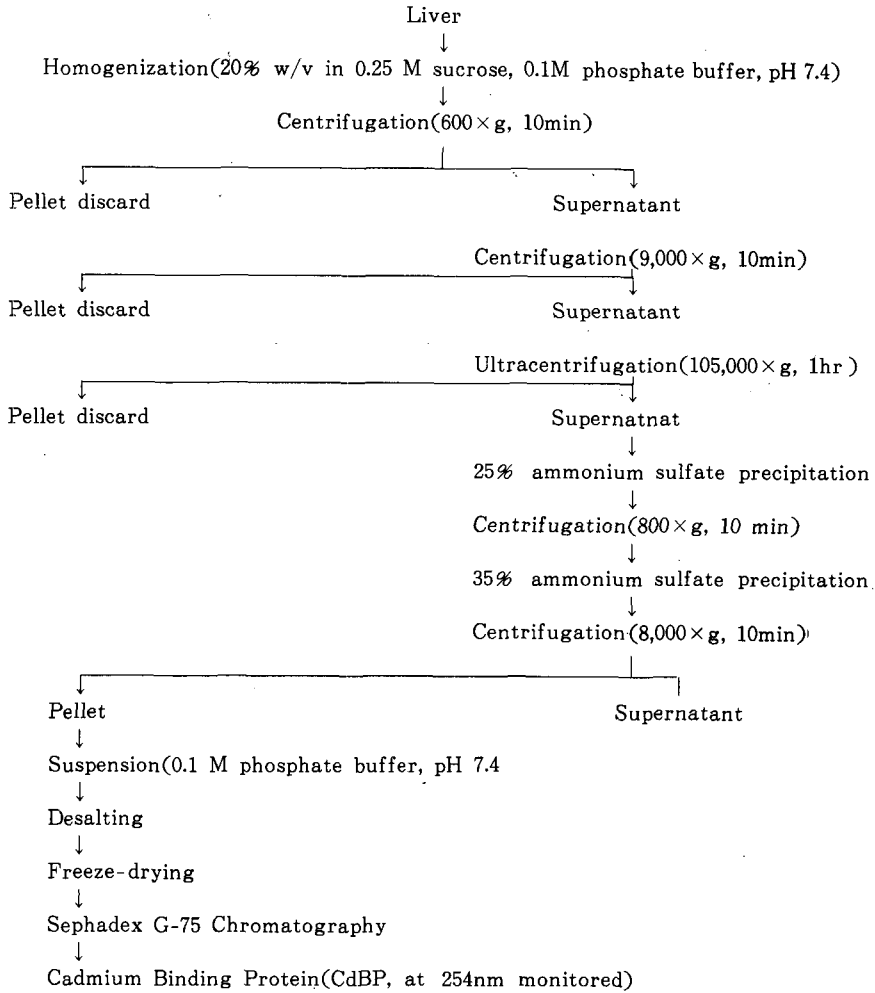


Fig. 1. Purification of CdBP from rat liver.

해되어 있는 용액이며, working dithizone solution은 매 사용할 때마다 stock dithizone solution을 CHCl_3 로 10mg/ml로 희석시켜서 사용하는 용액이다.

4) 미토콘드리아 분획의 분리

실험 동물을 경추이탈로써 희생시켜 개복한 후 신장 조직을 적출하여 0.25M sucrose (pH 7.4)용액으로 20%(w/v)로 희석된 파쇄액을 만들어 600×g로 10분간 원심분리하여 (Hitachi Model 20PR-5)상등액을 모아 10분간 8,500×g로 원심분리한 다음 침전물

만을 얻었다. 이 침전물을 0.25M sucrose (pH 7.4)에 현탁하여 8,500×g에서 10분간 원심분리하고 이 과정을 두 번 반복한 후 최종 미토콘드리아 침전물을 취하여 동일 완충액으로 단백질이 10mg/ml가 되도록 현탁하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다 (Fig. 2).

5) 호흡율 측정

분리한 미토콘드리아 분획의 호흡율은 Biological oxygen monitor(YSI Model 53)를 사용하여 측정하였다.

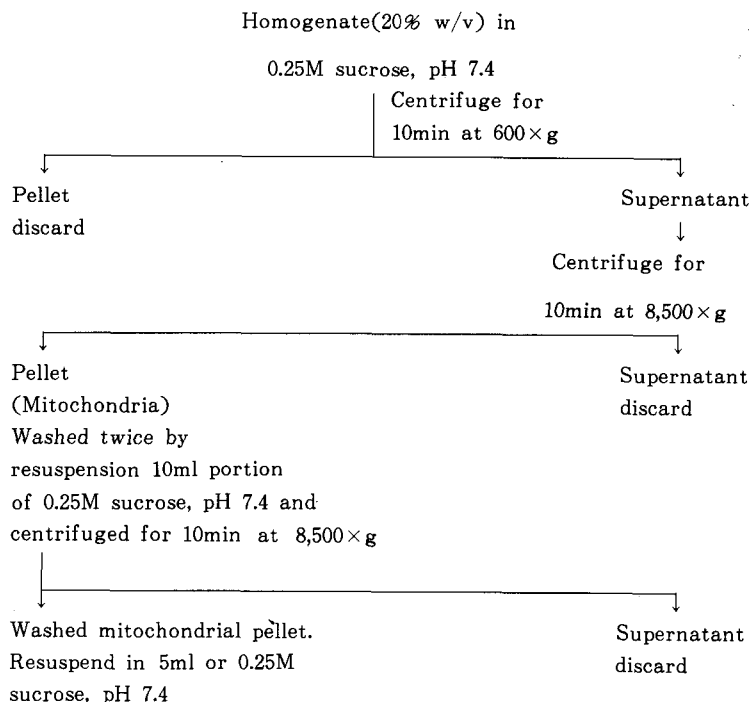


Fig. 2. Procedure for the isolation of mitochondrial fraction. All steps were carried out at 0-4°C

① 분리한 미토콘드리아 분획에 cadmium 처리

30°C에서 1분동안 배양시킨 미토콘드리아 분획 0.1ml에 0.25M sucrose, 5mM KH₂PO₄, 10mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl 이 포함된 반응 혼합액(pH 7.4) 2.8ml과 함께 대조군은 증류수를, 그리고 실험군에는 여러 농도의 Cd를 각각 0.1ml씩 첨가하여 2분동안 배양시킨 다음 기질(10mM pyruvate + 10mM malate)를 첨가하고 sample chamber 를 30°C로 유지하면서 Clark type electrode 로써 5분동안 state IV 호흡율을 산소포화비율 감소로 측정하였다. 그리고 2분동안 호흡을 더 유도한 후 25% glutaraldehyde 0.12ml 를 반응액에 첨가하여 호흡을 정지시켰다. 이를 4°C에서 1시간 이상 현탁한 상태로 방치하였다가 15,000×g에서 10분간 원심분리 하여 미토콘드리아 침전물을 얻어 전자현미

경 재료로 사용하였다(Goyer와 Krall, 1969)

② 분리한 미토콘드리아 분획에 CdBP 처리
동일한 반응 혼합액 2.7ml과 함께 0.133mM 의 Cd와 같은 농도의 CdBP를 각각 0.1ml씩 첨가하여 1분동안 배양시킨 다음 미토콘드리아 분획 0.1ml를 첨가하고 다시 2분동안 배양시킨 후 기질을 넣어 5분동안의 호흡율을 Cd를 처리하여 측정된 과정(①)과 동일하게 측정하였다. 이어서 호흡을 정지시키고 원심분리하여 얻은 미토콘드리아 침전물을 전자현미경 재료로 사용하였다.

6) 효소(NADH-CoQ reductase) 활성도 측정

효소활성도의 흡광도 측정은 Spectrophotometer(Hitachi Model 200-20)를 이용하여 측정하였다.

반응액인 0.5M Tris-sulfonate (pH 8.0) 0.3ml, 10mM menadione 0.05ml, 30mM KCN

0.1ml, 4mM NADH 0.1ml, 2차 증류수 2.35ml를 참가할 때마다 흔들어 혼합한 후 혼합된 반응액을 2.5분동안 30°C에서 물중탕하여 3ml cuvette에 옮긴 후 미토콘드리아 분획 0.1ml를 첨가하고 대조군은 증류수, 실험군은 여러 농도의 Cd를 0.1ml씩 첨가하여 30°C를 유지하면서 340nm에서 1분동안 흡광도의 감소를 측정하였다. Blank로는 NADH만 제외한 혼합액을 사용하였다.

7) 단백질 정량

미토콘드리아 분획의 단백질 함량 Lowry들(1951)의 방법으로 정량하였으며 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

8) 전자현미경 관찰

미토콘드리아 침전물 가운데 부위를 1mm³의 크기로 세절하여 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde에서 2시간 전고정하여 동일 완충액으로 3회 세척한 후 1% osmium tetroxide (pH 7.4)로 2시간 후고정하였다 (Bone과 Denton, 1971). 고정 후에 동일 완충액으로 3회 세척한 후 ethanol농도 상승 순으로 탈수하여 propylene oxide로 치환하고 epoxy resin으로 포매하였다 (Luft, 1951). 포매한 표본은 37°C에서 24시간, 67°C에서 48시간 배양하여 polymerization한 후에 ultramicrotome (Sovall MT-2B)으로 1μm 정도의 두께로 잘라 광학현미경으로 부위를 확인한 후 500~600Å의 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 (Reynolds, 1963) 투과전자현미경 (Hitachi H-500)으로 관찰하였다.

결 과

1. Cadmium binding protein (CdBP)의 Sephadex G-75 column chromatography 결과

Dithizone method에 의하여 Cd를 정량한 후에 254nm 흡광도와 Cd의 peak가 일치하

는 부분의 분획에서 CdBP의 존재를 추측하였다. Cd의 peak는 분획번호 42에서, 그리고 254nm 흡광도는 void volume (분획번호 15~16)을 제외하고 분획번호 43에서 peak를 나타내었다. 따라서 분획번호 38~50번 사이의 분획들을 모아서 미토콘드리아의 Cd독성에 대한 CdBP의 영향을 알아보기 위한 시료로 사용하였다 (Fig. 3).

2. 미토콘드리아 분획에 대한 cadmium의 영향

1) 호흡율에 미치는 영향

Cd농도를 0.033mM에서 1.330mM로 증가시켜 가면서 첨가하였을 때 미토콘드리아 state IV 호흡율은 계속 감소하였다. 0.333mM의 농도에서는 호흡율이 52.6%로 감소하였으며, 1.330mM에서는 약 80%의 호흡을 감소와 함께 20%정도의 산소소비만 나타내었다 (Table 1).

2) 전자 전달계 효소에 미치는 영향

0.033mM의 Cd농도에서는 대조군과 별차 없이 효소활성이 일어났으나 0.067mM

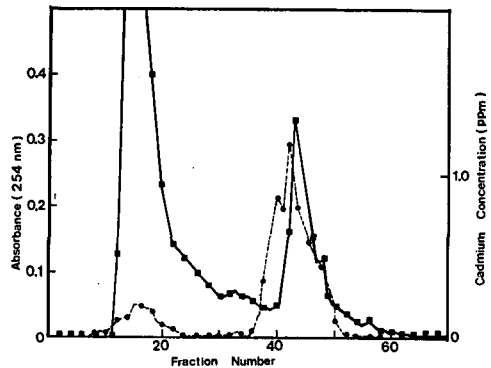


Fig. 3. Sephadex G-75 column chromatography of liver cytosol from the rat after 6 days subcutaneous injection with 0.25mg cadmium chloride per kg body weight. The column (2.3 × 80cm) was operated at 4°C and eluted with 0.01M ammonium formate buffer (pH 7.4), at a flow rate of 12 ml/h. The elution profiles of absorbance at 254nm (■——■) and Cd (●·····●) are indicated.

Table 1. Effect of various cadmium chloride concentrations on state IV respiration of mitochondria isolated from the rat kidney^a

Cadmium chloride added(mM)	Respiration rate ^b	% of control	P value
0	11.4 ± 0.400	100.0	
0.033	8.8 ± 0.200	77.2	< 0.05
0.067	8.3 ± 0.100	72.8	< 0.05
0.133	7.7 ± 0.100	67.5	< 0.05
0.333	5.4 ± 0.200	47.4	< 0.01
0.665	4.7 ± 0.500	41.2	< 0.01
1.330	2.6 ± 0.200	22.8	< 0.01

a : Data are expressed as means ± S.E. with 4-5 experiments. Reaction mixture for state IV respiration contained 10mM pyruvate/malate, 5mM KH₂PO₄, 10mM KCl, 5mM MgCl₂ and 0.25 M sucrose.

All reagents were adjusted to pH 7.4 with 10mM Tris-HCl. Data of each group were tested for that of control with student's t-test.

b : The respiration rate is defined as Δ% decrease of O₂ saturation/5mins/mg protein.

Table 2. Effect of various cadmium chloride concentrations on the NADH-CoQ reductase activity of mitochondria isolated from rat kidney^a

Cadmium chloride added(mM)	Enzyme activity (Δ O.D./min/mg protein)	% of control ^b	P value
0	0.143 ± 0.0038	100.0	
0.033	0.142 ± 0.0080	99.3	N.S.
0.067	0.110 ± 0.0040	76.9	< 0.01
0.133	0.081 ± 0.0023	56.6	< 0.01
0.333	0.062 ± 0.0020	43.4	< 0.01
0.665	0.033 ± 0.0067	23.1	< 0.01
1.330	0.017 ± 0.0035	11.9	< 0.01

a : Data are expressed as means ± S.E. with 4-5 experiments. Data of each group were tested for that of control with student's t-test.

b : Control was treated with D.W. instead of CdCl₂.

이상의 농도로 첨가하였을 경우에는 농도가 증가함에 따라 NADH-CoQ reductase의 활성이 감소하여 0.333mM에서는 56.6%, 1.330mM에서는 약 90%까지의 효소활성감소를 나타내었다(Table 2).

3) 미세구조 및 형태변화에 미치는 영향
정상의 Sprague-Dawley 암컷 쥐에서 적

출, 분리한 미토콘드리아는 응축된 형태이었으며(Fig. 5) 5분동안 state IV 호흡을 유도한 결과 대부분이 응축된 형태에서 정상형태로 변화하였다(Fig. 6). 0.033mM, 0.333mM의 Cd를 각각 처리한 후 5분간 호흡(state IV)을 유도한 경우에 미토콘드리아는 정상형태로 변하지 않은 응축형태와 중간형태로

관찰되었고(Figs. 7,8) 1.330mM에서는 미토콘드리아의 대부분이 형태변화가 억제되었고, 어떤 미토콘드리아는 파괴되기도 하였으며 팽윤현상이 일어난 미토콘드리아도 관찰되었다(Fig. 8).

3. 미토콘드리아의 cadmium 독성에 대한 cadmium binding protein의 영향

1) 호흡율에 미치는 영향

Cd의 농도를 0.133mM로 첨가해준 실험군은 대조군에 비해서 산소 소비감소가 약 32%로 나타났고, CdBP를 Cd와 같은 농도로 함께 처리해준 실험군의 경우에는 대조군에 비하여 약 12%의 산소 소비감소를 나타내었다. CdBP와 Cd를 함께 처리한 실험군은 Cd만을 처리하였던 실험군보다 20%의 산소 소비가 증가하였다(Fig. 4).

2) 미세구조 및 형태변화에 미치는 영향

0.133mM의 Cd만을 처리한 것(Fig. 7)과 같은농도의 CdBP와 Cd를 함께 처리한 실험군을 비교할 경우에 CdBP를 처리한 실험군

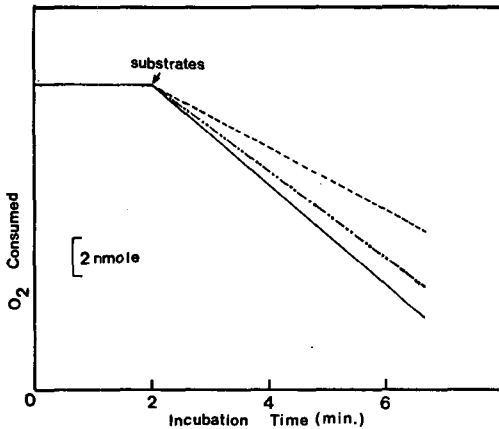


Fig. 4. The effect of cadmium chloride and CdBP on state IV respiration of mitochondria.

The figures indicated are nmole O₂ consumed/min.

Substrates : pyruvate(10mM)+malate (10mM).

Symbols : —, contol ; ·····, 0.133mM Cd ; - · - , CdBP(1mg)

에서는 거의 모든 미토콘드리아가 정상형태로 형태변화가 일어났음을 관찰하였다(Fig. 9).

고 찰

Clerian(1974)의 cadmium binding protein (CdBP) 분리과정을 주요하게 사용하여 Cd peak와 254nm 흡광도 peak가 일치하는 부분의 분획에서 CdBP의 존재를 추측하였는데, 그의 Sephadex G-75 gel filtration 결과에서는 약 25번 분획에서 하나의 일치하는 peak가 나타났었는데 비하여 본 실험에서는 42~43번 분획에서 일치하는 peak가 나타났다. 이것은 사용한 column의 크기와 유출속도(flow rate) 및 정수압의 차이에서 기인한 것이다.

Cadmium(Cd)은 간과 심장의 미코콘드리아에서 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에 대해서 강력한 저해제(uncoupler)로 작용한다는 보고(Jaccobs들, 1956)가 있고, 또한 쥐의 신장 미토콘드리아도 낮은 농도의 Cd에 의하여 산화적 인산화를 억제받는다라는 보고가 있는데 낮은 농도의 Cd를 처리하였을 경우 분리된 미토콘드리아의 호흡 조절이 감소하고 높은 농도의 Cd는 미토콘드리아 호흡연쇄 활성을 방해하므로써 미토콘드리아 호흡을 억제하게 되는 것이라 하였다(Chavez들, 1985). 따라서, Cd가 결합하는 specific site가 있다는 것을 기대할 수 있으며 미토콘드리아에 대한 Cd의 영향이 투여되는 Cd의 농도에 의존하리라 생각할 수 있다.

미토콘드리아의 형태변화는 전자전달계와 아주 긴밀한 연관이 있음이 보고(Hackenbrock, 1966)되었는데, 정상적인 미토콘드리아는 state IV 호흡 동안에 응축형태에서 정상형태로의 형태변화가 완전히 이루어진다. 그리고 Hackenbrock(1968)은 인산화 효소와 uncoupling되어도 즉, 인산화를 저해하는 uncoupling agent를 처리하여도 정상형태로의 변화가 일어나지만 전자전달역

제제를 처리할 경우에 있어서는 이와 같은 정상형태로의 형태변화가 억제된다 함으로써 미토콘드리아의 형태변화가 억제되는 것은 전자전달계가 억제를 받았기 때문이라 하였다.

본 실험에서는 0.033mM 이상의 Cd농도를 처리하였을 때 농도가 증가함에 따라 미토콘드리아 호흡율도 계속 감소하여 1.330mM에서는 80%의 감소를 보였고(Table 1), 이와 함께 전자전달계의 효소활성도 역시 계속 감소하여 1.330mM에서는 약 90% 정도 감소하였다(Table 2).

미토콘드리아 형태변화는(state IV) 농도 증가를 따라 응축형태에서 정상형태로의 형태변화가 억제되는 것이 두드러지게 나타났다(Figs. 7,8). 따라서 Cd가 미토콘드리아의 전자전달을 억제한다는 것을 알 수 있었으며, 이것은 Jaccobs들(1956)이 Cd^{2+} 이 산화적 인산화의 uncoupling agent로 작용하여 state IV 호흡을 증가시킨다는 견해와는 상반되는데, Sato들(1978)의 실험결과에서 $1\mu M$ (ca. 1nmole/mg protein of mitochondria) 미만의 농도에서는 미토콘드리아 호흡이 증가하지만, $3\mu M$ 이상의 Cd^{2+} 농도는 호흡의 억제와 더불어 호흡연쇄에 있는 b-type cytochromes의 산화를 야기시키고, $10\mu M$ 의 농도에서는 완전하게 호흡이 억제되었다는 사실을 감안할 때 상반되는 앞의 결과를 미토콘드리아에 대한 Cd의 영향이 농도에 관계있다는 입장에서 설명할 수가 있다.

덧붙여서, 전자전달효소(NADH-CoQ reductase)의 활성이 Cd농도 증가에 따라 감소하는 결과를 통해 Cd이 complex I에 직접적으로 영향을 끼쳐 호흡이 억제되었으며 이로 인하여 미토콘드리아의 정상상태로의 형태변화가 역시 억제되었다고 생각할 수 있다.

이와 같은 Cd의 독성은 Cd를 전처리해 줌으로써 합성되는 CdBP에 의하여 일종의 내항력과 같은 작용이 일어나 그 독성이 감소

된다는 보고들(Stanley와 Schnell, 1982; Peter와 Klassen, 1984; Terhaar들, 1965; Webb과 Verschoyle, 1976)이 있는데, 본 실험에서는 적출한 쥐의 간에서 분리한 CdBP를 Cd와 같은 농도로 함께 처리하여 준 후 state IV 호흡에서의 산소 소비량을 측정하여 Cd만을 처리하여 준 실험군과 비교한 결과 Cd단독 처리군에 비하여 산소 소비가 20% 증가하였는데(Fig. 4), 이는 Cd에 의해 억제되었던 호흡이 CdBP에 의하여 회복되므로써 Cd의 독성이 감소한 결과이며 아마도 CdBP의 α 및 β domain에 있는 7개의 cadmium binding site중에(Nielson과 Winge, 1983) Cd가 결합되지 않은 남아있는 여분의 결합 자리에서 처리하여 준 Cd이 결합하여 미토콘드리아 내로 축적될 수 있는 Cd의 양을 감소시켜 미토콘드리아에 대한 Cd독성을 완화시킨 것이라 생각된다. 미토콘드리아 형태변화에서도 응축형태에서 정상형태로 변화하였음을 관찰하였다(Fig. 9). 또한 팽윤이 일어난 미토콘드리아를 발견할 수 있었는데 이것은 Cd가 미토콘드리아 팽윤을 일으킨다는 보고(Rasheed들, 1984)에 의하여 Cd에 의한 팽윤 현상이라 여겨지며, 처리하여 준 CdBP에 의한 현상이라 보기에 어렵다. 1.330mM의 Cd처리에 관찰된 팽윤이 그와 같은 사실을 뒷받침해주고 있다.

그러나, Cd-metallothionein complex의 신세포독소능(nephrotoxicity)에 대한 연구 보고(Nordberg들, 1975)가 있는데, 생쥐에 cdmethallothionein complex를 주사하였을 때 기부선회소관의 선세포에서 괴사 현상이 관찰되었다(Nordberg들, 1975).

따라서 CdBP가 갖는 생물학적 역할을 증진에 의한 독성을 감소시킬 수 있는 즉, 조직 및 세포 자체적인 보호역할에만 한정시켜서 생각할 수는 없겠지만, 본 실험결과는 지금까지 많이 주장되고 있는 CdBP 보호 효과에 관한 가설을 뒷받침하는 하나의 증거가 될 것이라 생각한다.

결 론

Cadmium(Cd)이 미토콘드리아의 전자전달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 여러 농도의 Cd를 *in vitro* 상태로 처리하여 전자전달계 효소인 NADH-CoQ reductase의 활성을 측정하고 state IV 호흡에서 미토콘드리아 호흡율과 형태변화를 관찰하였으며, cadmium binding protein(CdBP)이 미토콘드리아 호흡에 있어서 Cd독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Cd와 CdBP를 동일 농도로 처리한 후 state IV 호흡에서의 미토콘드리아 호흡율 및 형태변화를 같은 농도의 Cd만을 처리한 실험군과 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 쥐의 신장 조직에서 분리한 미토콘드리아에 여러 농도의 Cd를 처리한 경우, 호흡율이 Cd 농도가 증가함에 따라 계속 감소하였으며, NADH-CoQ reductase의 활성도 0.067 mM 이상의 Cd농도에서 농도가 증가함에 따라 계속 감소하였다.

전자현미경 관찰 결과 미토콘드리아는 응축형태에서 정상형태로의 변화가 억제되었다.

2. 체중 kg당 0.25mg의 Cd를 피하로 6일 동안 주사한 후 적출한 간 조직의 세포질에서 분리한 CdBP를 Cd와 함께 같은 농도로 미토콘드리아에 처리하였을 경우 대조군에 비하여 산소 소비감소가 12%로 나타났으며, 이는 동일한 농도의 Cd만을 처리한 실험군이 대조군에 대하여 산소 소비감소가 32%라는 사실과 비교하였을 때 20%의 산소 소비감소율이 증가하였으며 호흡율이 회복되었다. 또한 미토콘드리아는 응축형태에서 정상형태로 변화하였다.

References

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

Chavez, E., R. Briones, C. Bravo and D. Jay. 1985. Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport : Studies with cadmium. *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 493-497.

Cherian, M.G. 1974. Isolation and purification of cadmium binding protein from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 61, 920.

Chowdbury, P. and D.B. Louria. 1976. Influence of cadmium and other trace elements on human α_1 antitrypsins ; an *in vitro* study. *Science.* 191, 480-481.

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.

Gregory, M.K., J.K. Stephen, J.P. Dennis, L.H. Philip and P.T. June. 1987. Inhibition of rat heart mitochondrial respiration by cadmium chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 89, 295-304.

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.* 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.

Hoffmann, E.O., J.A. Cook, N.R. Di Luzio and J.A. Coover. 1975. The effect of acute cadmium administration in the liver and kidney of the rat. *Lab. Invest.* 32, 655-664.

- Ijaz, S.J. and J.C. Smith. 1985. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation in the rat heart; possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80, 33-42.
- Jaccobs, E.E., M. Jaccobs, D.R. and L.B. Bradly. 1956. Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. *J. Biol. Chem.* 223, 147-156.
- John, W.L., L.R. Georgia, C.L. Susan and F.H. Joy. 1984. Reproductive effects of low acute doses of cadmium chloride in adult male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 250-255.
- Kagi, H.R. and B.L. Vallee. 1960. Metallothionein : A cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235 : 3460-3465.
- Kagi, H.R. and B.L. Vallee. 1961. Metallothionein : A cadmium-zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* 236, 2335-2442.
- Kagi, H.R., S.R. Himmelhoch, P.D. Whanger, J.L. Bethune and B.L. Vallee. 1974. Equine Hepatic and Renal Metallothionein. *J. Biol. Chem.* 41, 667-680.
- Kotsonis, F.N. and C.D. Klassen. 1977. Toxicity and distribution of cadmium administered to rat at sublethal doses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 41, 667-680.
- Leber, A.D. and T.S. Miya. 1976. A mechanism for cadmium- and zinc-induced tolerance to cadmium toxicity; Involvement of metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 37, 403-414.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luft, J.H., 1951. Improvements in epoxy resin embedding method. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409-414.
- Margoshes, M. and B.L. Vallee. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 4813-4814
- Nielson, K.B. and D.R. Winge. 1983. Order of metal binding in metallothionein. *J. Biol. Chem.* 258, 13063-13069.
- Nordberg, C.F., R.A. Goyer and M. Nordberg. 1975. Comparative toxicity of cadmium-metallothionein and cadmium chloride on mouse kidney. *Arch. Pathol.* 99, 192-197.
- Peter, L.G. and C.D. Klassen. 1984. Tolerance to cadmium-induced hepatotoxicity following cadmium pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74, 308-314.
- Probst, G.S., W.F. Bousquet and T.S. Miya. 1977a. Kinetics of cadmium-induced hepatic and renal metallothionein synthesis in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39, 51-60.
- Probst, G.S., W.F. Bousquet and T.S. Miya. 1977b. Correlation of hepatic metallothionein concentrations with acute cadmium toxicity in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39, 61-69.
- Rasheed, B.K., J.J. Diwan and D.R. Sanadi. 1984. Activation of potassium ion transport in mitochondria by cadmium ion. *Eur. J. Biochem.* 144, 643-647.
- 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.
- Sato, N., T. Kamada, T. Suematsu, H. Abe, F. Furuyama and B. Hagihara. 1978. Protective effect of hepatic soluble fraction

- against cadmium-induced mitochondrial disfunction, *J. Biochem.* 84, 127-133.
- Shukla, G.S. and R.L. Singhal. 1984. The present status of biological effects of toxic metals in the environment : lead, cadmium and manganese. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62, 1015-1031.
- Stanley, A.R. and R.C. Schnell. 1982. Cadmium-induced inhibition of hepatic drug oxidation in the rat : Time dependency of tolerance development and metallothionein synthesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64, 42-51.
- Terhaar, C.J., E. Vis, R.L. Roudabush and D.W. Fassett. 1965. Protective effects of low doses of cadmium chloride against subsequent high oral doses in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7, 500.
- Webb, M. and R.D. Verschoyle. 1976. An investigation of the role of metallothioneins in protein against the acute toxicity of the cadmium ion. *Biochem. Pharmacol.* 2, 373-379.
- Wilson, R.H. and A.J. Cox. 1941. Effects of continued cadmium feeding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 71, 225-235.

Figure Legends

- Fig. 5. Mitochondria just after isolation from kidney of normal rat. Nearly all the mitochondria have the condensed conformation(CON).
- Fig. 6. Normal mitochondria after 5 mins of state IV respiration. All mitochondria have transformed from the condensed to the orthodox conformation(ORT).
- Fig. 7. Cadmium chloride(0.033mM) - treated mitochondria after 5 mins of state IV respiration. Some mitochondria have not transformed from the condensed to the orthodox conformation(ORT). Intermediate conformation are seen(IC).
- Fig. 8. Cadmium chloride(1.330mM) - treated mitochondria after 5 mins of state IV respiration. Nearly all the mitochondria have the condensed conformation(CON). Few mitochondria indicate ruptured membranes(arrow). Intermediate conformation are seen(IC). Swelling is seen(S).
- Fig. 9. Cadmium chloride and CdBP (0.333mM) - treated mitochondria after 5 mins of state IV respiration. Nearly all the mitochondria have transformed from the condensed to the orthodox conformation(ORT). Swelling is seen(S).

