

## 흰쥐 간조직에서의 비소처리 영향 및 비소 전처리 효과

노미경 · 손성향 · 부문종\* · 김옥용

### Effect of Arsenic Treatment and Pretreatment in Rat Liver Tissue

Ro, Mi Kyeong, Seonghyang Sohn, Moon Jong Boo and Ok Yong Kim

(Received November 18, 1994)

#### ABSTRACT

Sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ) was injected to the rat subcutaneously for the study of the acute toxicity of arsenite on hepatocytes, and the effects of pretreatment of arsenite and glutathione on the lethality of the arsenite treated rats. Arsenite treated rat hepatocytes showed vacuolated cytosol and shrank nuclear and expanded perinuclear space and cytoplasmic membrane whirl. Rats pretreated with BSO (L-Buthionine-SR-Sulfoximine), less survived than arsenite treated alone. It means that glutathione acts as a protecting agent against the arsenite. Subcutaneous sublethal dose (10mg/kg body weight) treatment was showed the protecting activity to lethality of lethal dose (15mg/kg body weight) treated rat. 10mg/kg body weight sublethal dose effects appeared in six hours intervals of between treatments.

의한 보호 효과에 대하여 알아보고자 하였다.

#### 서 론

비소(As)는 비금속 원소로 생체내에서 각종 질병을 일으키는데, 산업적 이용도가 증가하고 있으며 환경오염의 성분으로 간주되고 있다(Davies, 1980; Harper, 1988; Lagerkvist, 1986; Pershagen, 1985). 본 실험에서는 비소를 처리한 흰쥐의 간조직 변화를 전자현미경을 이용하여 관찰하였고, 비소의 독성과 독성물질에 대한 방어작용을 한다고 알려져 있는 glutathione(GSH) 함량간의 상호관련과, 비소의 치사 독성과 비소 전처리에

#### 실험재료 및 방법

##### 1. 실험재료

표준사료로 사육한 생후 10주된 흰쥐(Sprague Dawley계) 수컷으로 체중 180-220g의 것을 사용하였다. 비소화합물은 sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ , Sigma)를 사용하였으며, L-Buthionine-SR-Sulfoxide (BSO, Sigma)을 GSH 생합성억제제로 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 비소처리

비소처리 20시간 이전부터 사료공급을 중단하고 1, 2.5, 5, 7.5, 10mg/kg body weight로 NaAsO<sub>2</sub>를 흰 쥐에 피하주사하였다.

### 2) 전자현미경 관찰

간조직을 1mm<sup>3</sup>로 절단하여 Karnovsky's fixative solution에 상온에서 2시간 동안 전고정하고 0.1M cacodylate buffer에서 1.5시간씩 두번 세척하고, 1% osmium tetroxide에 2시간 동안 후고정한 다음, cacodylate buffer로 30분간 세척하고, alcohol로 탈수한 후, propylene oxide로 치환하고, epon mixture와 propylene oxide를 1:1로 섞은 용액에서 overnight shaking incubation한 후, epon mixture에 포매하여 36°C에서 6시간, 48°C에서 12시간, 60°C에서 24시간 이상 incubation하여 polymerization한다. 0.5 $\mu$ m 두께로 절단하여 toluidine blue로 염색한 후 광학현미경 하에서 관찰하여 전자현미경으로 관찰할 부위를 정한 다음, 50nm 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead nitrate로 이중염색하여 전자현미경으로 관찰하고 사진촬영하였다.

### 3) BSO 전처리에 의한 비소의 처사 영향

비소처리 14.5시간과 4.5시간 전에 0.5g/kg body weight(b.w.)의 BSO를 복강주사하였다. 그리고 5, 7.5, 10, 12.5, 15mg/kg b.w. NaAsO<sub>2</sub>를 피하주사하여 처사여부를 확인하였다. 대조군으로는 BSO 대신 생리식염수를 복강주사하였다.

### 4) 비소 전처리에 의한 비소의 처사 영향

전처리 비소량은 1, 2.5, 5, 7.5와 10mg/kg b.w.을 각각 투여하였으며 비소처리의 처사량은 15mg/kg b.w.으로 하였다. 전처리 비소 투여 후 20시간 경과한 다음 처사량의 비소를 피하주사하여 생존여부를 관찰하였다. 전처리 비소에 의한 glutathione의 함량은 전처리 비소 투여후 20시간 경과한 시점에서 흰쥐를 희생하여 간을 채취하였다.

### 5) 시간 경과에 따른 비소 전처리의 처사 영향

전처리 비소량은 10mg/kg b.w.으로 하였으며, 전처리 후 3, 6, 12와 20시간 후에 처사량인 15mg/kg b.w.을 피하주사하여 처사여부를 확인하였다.

## 6) Glutathione의 정량

Glutathione의 함량은 Chung and Mines(1981)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.

## 실험결과

### 1. 비소처리에 의한 간조직의 변화 관찰

NaAsO<sub>2</sub> 1mg/kg b.w. 처리한 흰쥐의 간세포 형태는 정상 흰쥐(Fig. 1)와 차이가 없었으며, 2.5mg/kg b.w.을 처리한 실험군부터 형태학적 변화가 나타나기 시작하였는데 세포질에 액포가 생겼으며 미토콘드리아 내에 electron dense body를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 5mg/kg b.w. 처리군에서 지질소적과 작은 세포질 소실이 생겼으며(Fig. 3), 7.5mg/kg b.w. 처리군에서는 세포질내에 액포가 확장되었으며 소포질 소실부분도 커졌고(Fig. 4a), 핵의 모양도 변형되어 perinuclear space가 넓어졌으며 membrane whirl도 관찰되었다(Fig. 4b). 10mg/kg b.w. 처리군에서는 간조직의 손상이 심해져서 핵내에서 지질소적이 관찰되었으며(Fig. 5a), 핵의 수축과 변형 및 세포질의 소실(Fig. 5b), 많은 수의 액포와 미토콘드리아의 팽윤현상과 핵의 심한 변형(Fig. 5c), 세포질내의 electron dense particle의 침적과 membrane whirl의 형성을 관찰하였다(Fig. 5d).

### 2. BSO 전처리에 의한 비소의 처사 영향

흰쥐에 비소를 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15mg/kg b.w. 처리하였을 때, 12.5mg/kg b.w. 처리군부터 치사하는 개체가 나타났으며, 15mg/kg b.w. 처리군에서는 모든 개체가 치사하였다. GSH 생합성 억제제인 BSO를 전처리한 경우에는 비소를 7.5mg/kg b.w. 처리한 실험군에서 치사하는 개체가 있었으며 10mg/kg b.w. 처리군에서는 모든 개체가 치사하였다(Table 1).

이때 BSO를 처리한 간조직의 GSH 함량은 0.62 $\mu$ moles GSH/g tissue였고, BSO를 처리하지 않은 간조직의 GSH의 함량은 3.75 $\mu$ moles GSH/g tissue로 BSO에 의하여 GSH의 생성이 1/5 이하로 감소하였다.

### 3. 비소 전처리에 의한 비소의 처사 영향

흰쥐에 비소를 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10mg/kg b.w. 전처리하고 20시간이 경과한 다음 처사량의 비소인 15mg/kg b.w.을 처리하였을 때, 전처리를 0, 1mg/kg b.w.으

로 한 실험군은 모두 치사하였으며, 2.5, 5mg/kg b.w. 를 전처리한 실험군에서는 5마리 중 4마리가 치사하였으며, 7.5mg/kg b.w. 전처리군에서는 5마리 중 1마리가 치사하였고, 10mg/kg b.w. 전처리군에서는 5마리 모두 생존하여 완전한 치사방지작용을 나타내었다. 각 실험군의 간조직에서의 GSH의 함량은 대조군과 차이가 없었다(Table 2).

**Table 1.** Effect of BSO pretreatment on arsenic toxicity.

Dose of As (mg/kg b.w.)	No. of Survival (alive/total)	
	- BSO	+ BSO
0.0	—	5/5
5.0	5/5	5/5
7.5	5/5	1/5
10.0	5/5	0/5
12.5	2/5	0/5
15.0	0/5	0/5

**Table 2.** Effect of sublethal dose-pretreatment on GSH level.

Pretreatment NaAsO <sub>2</sub> (mg/kg b.w.)	Survival (alive/total)	GSH level ( $\mu$ moles GSH/g tissue)
0	0/5	4.49 $\pm$ 0.545
1	0/5	4.76 $\pm$ 0.155
2.5	1/5	4.81 $\pm$ 0.268
5	1/5	4.90 $\pm$ 0.660
7.5	4/5	4.55 $\pm$ 0.502
10	5/5	4.70 $\pm$ 0.357

Rats are pretreated with NaAsO<sub>2</sub>, and 20hrs later, administrated with lethal dose of NaAsO<sub>2</sub> (15mg/kg b. w.; s.c.). GSH level was determined at 20hrs later lethal dose treatment.

#### 4. 비소 전처리 후 시간경과에 따른 치사영향

Table 2에서 보는 바와 같이 10mg/kg b.w. 비소 전처리군에서 치사량(15mg/kg b.w.)의 비소에 대하여 모두 생존하여 완전한 치사방지작용을 나타내었다. 그러나 전처리후 경과시간 3시간까지는 모든 개체가 치사하였고, 6시간후부터는 모든 개체가 생존하여 완전한 전처

리 효과가 나타나기 시작하였다(Table 3). 전처리후 시간별로 간세포의 GSH 수준을 측정된 결과, 3시간 후에는 대조군에 비하여 22% 감소하였고, 6시간 후에는 9% 감소하였다. 12시간과 20시간 후에는 약간 증가하였으나 유의성은 없었다(Table 4).

**Table 3.** Effect of intervals between pretreatment and treatment of arsenic on the lethality.

Intervals(hrs)	No. of Survival(alive/total)
3	0/5
6	0/5
12	5/5
20	5/5

Rats are pretreated with 10mg/kg b.w. NaAsO<sub>2</sub>, and lethal dose of NaAsO<sub>2</sub> (15mg/kg b.w.; s.c.) was administered after the indicated time.

**Table 4.** Effect of intervals between pretreatment and treatment of arsenic on the glutathione level.

Time after injection(hrs)	GSH level $\mu$ moles/g tissue	% of control	p value
3 control	6.22 $\pm$ 0.215	100.0	p<0.001
As	4.84 $\pm$ 0.196	77.8	
6 control	6.02 $\pm$ 0.198	100.0	p<0.075
As	5.47 $\pm$ 0.269	90.8	
12 control	5.01 $\pm$ 0.200	100.0	N.S.
As	5.18 $\pm$ 0.131	103.3	
20 control	4.49 $\pm$ 0.545	100.0	N.S.
As	4.70 $\pm$ 0.357	104.6	

Rats are treated with 10mg/kg b.w. NaAsO<sub>2</sub>, and thiol level was determined after the indicated time. (N.S.: no significance)

## 고 찰

비소를 비롯한 여러 독성물질들이 생체내로 유입될 경우 방어작용을 하는 물질로 알려진 GSH는 glutamate, cysteine, glycine 세가지 아미노산으로 구성되어 있으며, 세포내에 0.1-10mM 정도로 존재한다(Reed *et al.*, 1983; Chasseud, 1979). GSH는 산화형 glutathione (GSSG)와 함께 일정한 비율(10 : 1)로 존재하며(Reed

and Fariss, 1984), 각 기관이나 조직에서 GSH의 함량은 전체 비단백질성 thiol 물질의 90% 정도를 차지한다 (Boyd et al., 1979). 세포내의 GSH의 농도는 일정하지 않고 하루를 주기로 하는 diurnal rhythm을 가지고 변하는데, 야간이나 새벽에 최대치를 나타내다가 늦은 오후에 최대치가 된다(Burk, 1983). 따라서 본 실험에서의 GSH 함량은 대조군과 같은 시간내에 측정 비교하였다.

GSH의 생합성 억제제인 BSO를 흰쥐에 복강주사하여 전처리한 후 sodium arsenite를 피하주사하였을 때  $\text{NaAsO}_2$  7.5mg/kg b.w. 처리군에서 치사하기 시작하였다. 이 양은 전처리 없이 비소에 의한 치사가 시작되는 농도인 12.5mg/kg b.w. 보다 낮은 농도이다. 이는 BSO를 전처리하면 GSH의 감소가 생겨 카드뮴에 의한 치사가 더 낮은 농도에서 이루어진다는 Singhal 등의 보고(1987)와 같이, GSH가 비소에 대해서도 방어작용을 하는 것으로 확인하였다. BSO의 무해성은 비소를 처리하지 않고 BSO만을 처리한 군에서의 생존으로 확인된다고 하겠다.

치사량 이하의 전처리 작용이 치사량의 비소로부터 개체의 치사를 막는지 알아보기 위하여, 여러 농도로 전처리한 다음 20시간 후에 치사량인 15mg/kg b.w. 비소를 투여하였다. 그 결과 전처리량의 증가와 함께 생존율도 증가하였고, 10mg/kg b.w.의 전처리에서는 완전한 치사방지효과를 가져왔다. 치사량 이하의 비소 전처리후 치사량의 비소를 처리하는 시간인 20시간 후에 간세포의 thiol 수준을 조사하여 본 결과, 전처리 농도에 따른 유의성있는 변화는 없었다. 결국 GSH를 포함한 비단백질성 thiol 물질은 20시간 이후의 치사방지에 별다른 도움을 주지 않는 것으로 사료된다.

완전한 치사방지효과를 가져온 10mg/kg b.w. 전처리 농도에서, 방어작용과 치사량 처리까지의 시간간격에 대한 상관성을 조사하였을 때, 3시간에서는 모두 치사하였고, 6시간부터는 모두 생존하였다. 비소 치사량에 대한 방어작용이 이 시간부터 생겼다는 것을 알 수 있으며, 시간간격이 3시간이었을 때 GSH 함량이 대조군에 비하여 22% 감소하였으나, 시간이 지남에 따라 대조군 수준까지 회복되었다. 이는 GSH가 초기방어작용에 사용되었기 때문이라고 사료되며 Singhal 등(1987)의 결과와 일치한다. 전처리 비소량에 관계없이 간조직에서의 GSH 함량은 비슷하게 나타났으나, 전처리 비소량이

10mg/kg b.w.일 경우 생존율이 가장 높게 나타난 것은, GSH 이외에 치사방지효과가 있는 다른 물질이 간조직 뿐만 아니라 다른 기관에서도 활성화되어 생명유지에 관여하는 독성방어작용을 수행할 것으로 기대하며, 이에 대한 연구가 앞으로 더 많이 진행되어야 할 것으로 생각한다.

## 결 론

비소 독성에 의한 간조직 변화와 비소 독성에 대한 생체내 방어기작을 알아보기 위하여 흰쥐에 비소를 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 비소 처리량이 증가함에 따라 간조직 변화가 점차로 심해졌으며, 투여 후 치사하지 않는 최대량인 10mg/kg b.w. 투여군에서는 심한 간조직의 손상이 나타났다.
2. 비소 단독 처리의 경우 치사량은 15mg/kg b.w.이었으며 GSH 생합성 억제제인 BSO를 처리한 경우에는 치사량이 7.5mg/kg b.w.이었다. 따라서 GSH가 비소에 대한 초기 방어작용에 관여한다는 것을 알 수 있다.
3. 치사량 이하의 비소를 전처리한 후 치사량의 비소를 처리하면 전처리 비소량이 증가함에 따라 생존율이 증가하였다. 10mg/kg b.w.의 비소 전처리는 15mg/kg b.w.의 비소 치사량에 대하여 완전한 치사방지작용을 하였다. 치사방지작용은 전처리후 6시간 이후에 생성되었다.

## 참 고 문 헌

- Boyd, S.C., H.A. Sesame and M.R. Boyd. 1979. High concentration of glutathione in glandular stomach: Possible implication for carcinogenesis. *Science* 205 : 1010-1012.
- Burk, R.F. 1983. Glutathione-dependent protection by rat liver microsomal protein against lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Acta.* 757 : 21-28.
- Chasseud, L.F. 1979. Role of glutathione and glutathione S-transferase in the metabolism of chemical carcinogen and other electrophilic agent. *Adv. Cancer Res.* 29 : 175-274.
- Chung, A.S. and M.D. Maines. 1981. Effects on selenium on glutathione metabolism induction of

- $\sigma$ -glutamylcystein synthetase and glutathione reductase in the rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 30 : 3217-3223.
- Davies, J.M. 1980. Lung cancer among pesticide workers exposed to inorganic arsenicals <letter>. *Arch. environ. Health* 35 : 123-124.
- Harper, M. 1988. Occupational health aspects of the arsenic extractive industry in Britain. *Br. J. Ind. Med.* 45 : 602-605.
- 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.
- Pershagen, G. 1985. Lung cancer mortality among man living near an arsenic-emitting smelter. *Am. J. Epidemiol.* 122 : 684-694.
- Reed, D.J., A.E. Brodie and M.J. Meredith. 1983. Cellular heterogeneity in the status and function of cysteine and glutathione. *Function of glutathione: Biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects: A. Larsson et al. ed. Raven Press, N.Y. pp. 38-48.*
- Reed, J.D. and M.W. Fariss. 1984. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.* 36 : 25s-33s.
- Singhal, R.K., M.E. Anderson and A. Meister. 1987. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J.* 1 : 220-223.
- Taketani, S., H. Kohno, T. Toshinaga 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.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Electron micrograph of the normal rat hepatocyte ( $\times 8,000$ ). Nu: nucleus, No: nucleolus, M: mitochondria, rER: rough endoplasmic reticulum
- Fig. 2.** Electron micrograph of the 2.5mg/kg b.w. NaAsO<sub>2</sub> injected rat hepatocyte ( $\times 8,000$ ). V: vacuole,  $\rightarrow$ : electron dense particle in mitochondria (inlet:  $\times 16,000$ ). Vacuoles are appeared in the cytoplasm.
- Fig. 3.** Electron micrograph of the 5.0mg/kg b.w. NaAsO<sub>2</sub> injected rat hepatocyte ( $\times 8,000$ ). LD: lipid droplet, \*: cytoplasm depletion
- Fig. 4.** Electron micrograph of the 7.5mg/kg b.w. NaAsO<sub>2</sub> injected rat hepatocyte ( $\times 8,000$ ).  
 a. Vacuoles are enlarged.  
 b.  $\rightarrow$ : membrane whirl  
 Nuclear membrane was destructed ( $\blacktriangleright$ ) and nucleus was shrinked.
- Fig. 5.** Electron micrograph of the 10.0mg/kg b.w. NaAsO<sub>2</sub> injected rat hepatocyte ( $\times 8,000$ ).  
 a. Lipid droplet (LD) was appeared in nucleus.  
 b. Nucleus was severely shrinked.  
 c. Mitochondria was swollen ( $\star$ ).  
 d. Inclusion body ( $\blacktriangleright$ ) and membrane whirl ( $\square\rangle$ ) in the cytoplasm





