

납 중독 랫드의 말초신경내 *myo*-inositol 수송 체계에 관한 연구

정명규 · 조해용

선문대학교 환경공학과

A study on *myo*-inositol transport system in peripheral nerve isolated from lead-intoxicated rat.

Myung-Kiu Chung · Hae-Yong Cho

Department of Environmental Engineering, Sun Moon University

Abstract

In our previous studies, we reported that lead intoxicated nerve cell by inhibition of the $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity and reduction of *myo*-inositol in nerve cell. As the second series of experiments, in order to understand toxic mechanism of lead for nerve cell, the characteristics of *myo*-inositol transport system and the effect of lead on its system have been studied in the sciatic nerves of control and lead-treated rats. A lead intoxicated animal model was induced by feeding diet containing lead to Sprague-Dawley rat for two weeks. Four weeks aged Sprague-Dawley rats were divided into three groups : normal control group, 10ppm-lead treated group, 100ppm-lead treated group. All rats were sacrificed at the end of two weeks. The rate of *myo*-inositol transport by sciatic nerve isolated from lead-treated rat was significantly decreased compared with that of control rat. This deficit results from that *myo*-inositol transport system which is carrier mediated and sodium-potassium dependent was inhibited by the lead treatment (both 10ppm and 100ppm) due to increase of the K_m value without affecting V_{max} value for *myo*-inositol carrier. These observations suggest that the toxic mechanism of lead on nerve *myo*-inositol transport system might be a change of affinity without change of maximum transport velocity for carrier.

Key words : *myo*-inositol, sciatic nerve, transport system, carrier, V_{max} , K_m .

I 서 론

납중독에 의한 말초신경계 독성의 특성은 신경세포내 주요 물질인 *myo-inositol*의 농도가 현저하게 저하된다는 점이다.¹⁾ *myo-inositol*은 대부분의 동식물 세포에서 발견되는 *cyclohexitol*로서 세포의 여러 생리적 기능에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.²⁾ 특히 신경세포의 경우는 다른 세포에 비하여 100배 정도의 고농도로 존재하여 신경전달에 있어서 세포내 여러 생화학적 정보를 전달하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.³⁾ 최근 환경 오염물질에 대한 인체의 안전성 평가에 관한 연구의 필요성이 점고하고 있는 실정에서 본 연구실에서는 자동차 배기가스등에서 흔히 관찰되는 중금속인 납을 대상으로 신경계 독성에 관한 연구를 수행하였다. 납은 급성 독성을 전혀 유발하지 않는 단기간에 걸쳐 저농도에 노출되어도 말초 신경계는 임상적 증상을 보이지 않는 병변이 유발될 수 있다는 점과 Na^+-K^+ ATPase 활성 억제에 기인한 신경 세포내 *myo-inositol* 농도 저하가 독성 발현기전으로 설명될 수 있다는 연구 결과를 학계에 이미 보고 한바 있다.^{4,5)} 따라서 이러한 연구결과를 참고로 본 저자들은 연속되는 연구의 일환으로서 납이 신경세포내 *myo-inositol* 수송 체계에 미치는 영향을 살펴 봄으로써 납의 독성 발현 기전에 대하여 보다 구체적으로 설명하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 4주령 수컷 Sprague-Dawley rat (이하 "랫드"라 칭함)는 최소 일주간 실험 사육장 환경에 적응시킨후 사용하였다. 사육장은 인공 조명으로 아침 7:00 부터 저녁 7:00 까지 12시간의 조명시간과 조도 150Lux 밝기로 조절하였으며, 실내온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 사료는 고행사료(삼양사)를 사용하였고, 그 조성은 조단백 21%, 조지방 3.5%, 조 셀룰로즈 5.0%, 무기질 8.0% 등이었다. 급수는 탈염수를 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다. 실험동물의 납중독성 말초 신경병변을 유도하기 위하여 사용한 납은 lead acetate를 탈염수 초산용액 (1: 1000)에 용해시켜서 음용수 내

농도가 10ppm, 100ppm, 1000ppm등 3가지 농도로 조제하여 2주동안 자유롭게 섭취하도록 하였다 실험동물군은 정상군, 10ppm 납투여군, 100ppm 납투여군, 1000ppm 납투여군으로 분류하였다.

2. 신경전달속도 및 *myo-inositol* 함량 측정

말초 신경전달속도를 측정하는 방법의 하나로 보편적으로 응용되고 있는 axon내 두 종류의 효소- acetylcholinesterase와 choline acetyltransferase-의 축적율을 Ellman등⁷⁾과 Glover 등⁸⁾의 방법에 따라 측정하였으며 *myo-inositol* 함량 측정은 Laine등⁹⁾의 방법을 이용하였다.

3. 신경조직내 *myo-inositol* 수송체계의 특성 분석

*myo-inositol uptake*의 측정은 Green등¹⁰⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 88cycle/min의 속도로 왕복운동하는 진탕배양기를 이용하여 대퇴 신경을 플라스틱바이알에 넣고 1ml Krebs-Ringer bicarbonate buffer를 가하여 37°C 에서 1시간 동안 전단계 배양을 실시하였다. 전단계 배양을 실시한 대퇴신경을 2- ^3H] *myo-inositol* (0.5uCi/vial)을 함유하는 1ml Krebs-Ringer bicarbonate buffer용액이 들어있는 바이알로 옮긴후 배양하였다. 그 후 일정 시간 간격으로 대퇴신경을 배지로 부터 꺼내어 냉 Krebs-Ringer bicarbonate buffer로서 3-4회 씻은후 0.5ml의 Protozol(NEW)로서 용해시킨다. 용해시킨 대퇴신경 0.2ml을 취하여 5.0ml의 toluene scintillation fluid에 넣고 liquid scintillation counter로서 방사능 세기를 측정하였다. 대퇴신경의 *myo-inositol* 수송 특성에 대한 여러 실험 조건중 주변 *myo-inositol*농도 변화에 대한 특성을 알아보기위하여 배지에 *myo-inositol*을 $0.1 \mu\text{M}$ 에서 $500 \mu\text{M}$ 범위의 농도를 가하였다.

4. 통계분석

실험 결과는 평균 \pm SE로 표시하였다. 실험에 사용한 각 동물군간의 유의성 검증을 위하여 Anova test와 Duncan's multiple range test를 실시하였으며 P값이 0.05 이하인 경우에만 유의성이 있는것으로 간주하였다.¹¹⁾

III. 결과 및 고찰

1. 실험동물의 성장 특성 및 조직학적 관찰

본 실험에서 사용한 랫드군의 2주동안의 몸무게, 식이량과 물섭취량, 체온 변화, 조직학적 병변 여부등을 Table 1에 제시하였다. Table 1에서 나타난 바와 같이 실험 동물군간에 이들 지표에 대하여 어떤 유의성 있는 변화도 관찰되지 않았다. 이는 납이외의 다른 외적인 요소의 영향이 배제된 상태로 실험이 진행되고 있음을 나타낸다.

Table 1. General characteristics of experimental animals.

Group	Body weight(g)		Water intake(ml/day/rat)		Food intake(g/day/rat)	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
NC (9)	160±15	230±20	355±2.0	365±2.0	215±2.5	245±2.2
LT1(9)	170±14	235±14	375±2.3	372±2.2	225±3.3	272±3.2
LT2(7)	165±15	234±14	372±3.3	372±2.2	252±3.3	262±4.3
LT3(6)	158±15	220±14	369±3.2	371±2.2	259±2.2	30.1±3.4

Each value represents mean±SE. The number of experimental animals are given in parenthesis. Initial and Final represent the values before and after treatment, respectively. NC; normal control group, LT1; lead-treated group(10ppm), LT2; lead-treated group(100ppm) , LT3; lead-treated group(1000ppm)

2. 신경 전달 속도와 myo-inositol 함량에 미치는 납의 영향

Table 2에서 제시된 바와같이 납중독에 의한 랫드 대퇴 신경의 acetyl cholinesterase와 cholin acetyltransferase 두 효소의 이동속도가 현저히 감소된 것을 알 수 있다. 아울러 납중독성 랫드의 경우는 정상 랫드에 비하여 신경조직 내의 myo-inositol의 양이 현저하게 감소되어 있는데 이러한 실험 결과는 납중독성 말초 신경 병변의 원인이 신경 조직내에 있는 myo-inositol 대사 이상에 기인하고 있다는 점을 시사하고 있다.

Table 2. Effects of lead on nerve conduction velocity and myo-inositol concentration in sciatic nerve.

Group	Acetylcholinesterase Cholinacetyltransferase		myo-inositol concentration
	(nmoles/nervehr.)	(μmoles/g wet wt.)	
NC(9)	203±15	4.79±0.5	2.95±0.3
LT1(9)	120±14*	2.28±0.3*	1.55±0.2*
LT2(7)	105±15**	1.56±0.4**	1.35±0.2**

Each value represents mean±SE. The number of experimental animals are given in parenthesis. NC; normal control group, LT1; lead-treated group(10ppm), LT2; lead-treated group(100ppm). *,**: P<0.05, compared to normal control.

따라서 계속하여 납에 의한 신경 조직내 myo-inositol 농도 변화에 관여하는 myo-inositol 수송 체계에 납이 미치는 영향을 살펴보았다.

3. myo-inositol 수송 체계의 여러 가지 특성에 미치는 납의 영향

랫트 대퇴신경의 myo-inositol 수송 체계 특성 실험에 가장 적합한 배양 시간을 설정하기 위하여 2시간에 걸쳐 myo-inositol 수송 양상을 측정하였다.

3.1 시간에 따른 myo-inositol 수송을 변화

대퇴 신경에 의해 배지에서 조직으로 수송되는 myo-inositol의 양은 30분 이내에서는 직선성으로 증가를 보였으나 그 이후 35분 경에 포화되어 거의 2시간 까지 일정하였다(30분까지만 그래프로 표시하였음).

이러한 실험 결과는 myo-inositol 수송 연구에 필요한 시간은 가급적 30분 이내에 실시 하는 것이 바람직한 결과를 도출 할수 있음을 시사하고 있어 본 실험에서는 35분경에 포화점에 도달하는 점, 가장 직선성이 좋은 시간대를 설정한다는 점 그리고 신경 조직의 활성과 조직내 myo-inositol 농도 분석능 등을 고려하여 배양 시간을 15분으로 설정하였다.

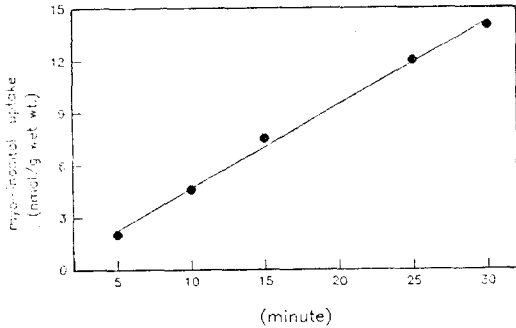


Fig.1. Time course of $2\text{-}^3\text{H}$ myo-inositol transport in sciatic nerves of normal control rats. Each incubation vial contained $0.5\mu\text{Ci } 2\text{-}^3\text{H}$ myo-inositol (18.2Ci/mmol). Values are mean \pm SE for three separate experiments and the lines of best fit were derived by the method of least squares.

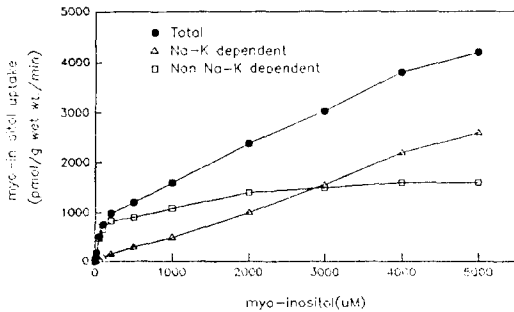


Fig.2. $2\text{-}^3\text{H}$ myo-inositol transport by the rat sciatic nerve as a function of myo-inositol concentration in medium. $2\text{-}^3\text{H}$ myo-inositol transport was measured at varying medium concentrations after 15min incubation in the presence (open triangle), absence (open square) or total (filled circle) of sodium ion. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -dependent transport was computed by subtracting the transport in $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -free medium from the composite transport measured in the presence of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ions. Each point represents the mean of at least three determinations.

계속하여 외부 myo-inositol 농도 증가에 따른 조직내로 수송 특성을 알아보기 위하여 배지중 myo-inositol 농도를 $0.1\mu\text{M}$ 에서 $5000\mu\text{M}$ 범위까지 변화 시켜 실험하였다.

3.2 myo-inositol 수송 특성

Figure 2에서 알수 있듯이 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 의존성 수송능은 농도에 따라 직선성으로 증가(open triangle) 하였으나, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 비의존성 수송능(open square)은 여러 농도에 걸쳐 포화점이 관찰되었다.

이러한 결과를 좀더 자세히 분석하면 배지의 myo-inositol 농도가 0.1 에서 $100\mu\text{M}$ 사이에서는 상관계수(γ)가 0.079 이며 기울기가 $18.9\text{ pmol/g/min}/\mu\text{M}$ 의 값을 가지며, $50\mu\text{M}$ 과 $200\mu\text{M}$ 사이에서 부분적인 포화가 관찰되었다(filled circle : left side).

그 이상의 농도에서는 전체적인 수송은 농도에 비례하여 증가하였지만 γ 는 0.973 , slope는 $0.69\text{ pmol/g/min}/\mu\text{M}$ 의 훨씬 낮은 값을 갖는 것으로 밝혀졌다(filled circle : right side).

이상은 총 myo-inositol 수송 정도는 적어도 두개의 다른 수송 체계 즉 완전하게 포화되는 high affinity carrier와 포화되지 않는 low affinity carrier에 의해 매개되고있음을 시사하고 있으며 남이 이중 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 의존성 수송 체계 즉 high affinity carrier에 영향을 준다는 실험 결과로서 이는 기존의 연구 결과와 잘 부합되고 있다.⁵⁾

따라서 계속하여 myo-inositol carrier 특성을 알아보기 위하여 kinetic parameter에 미치는 납의 영향을 살펴 보았다.

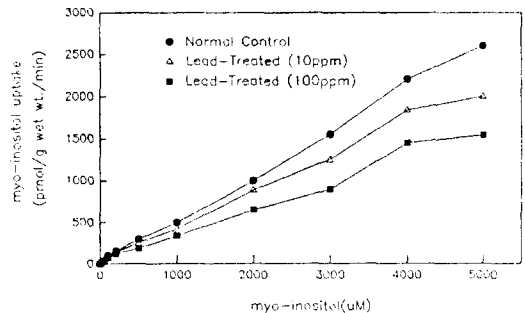


Fig.3. Effect of lead on $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -dependent transport by the rat sciatic nerve. Values are mean three separate experiments and the lines of best fit were derived by the method of least squares.

Figure 3에 표시된 그래프중 Na^+-K^+ 의존성 수송에 관여하는 carrier의 V_{max} 값과 K_m 값을 구한후 실험 결과치를 두가지 방법으로 변환하였다. 즉 Na^+-K^+ 의존성 수송 속도 역수를 하나는 배지중의 myo-inositol 농도역수의 함수비로 표시하는 방법(Lineweaver-Burk transformation ; Figure 4)과 또 하나는 배지중의 myo-inositol 농도에 대한 함수비(Eadie-Hofstee transformation ; Figure 5)로 표시 하는 방법이다.

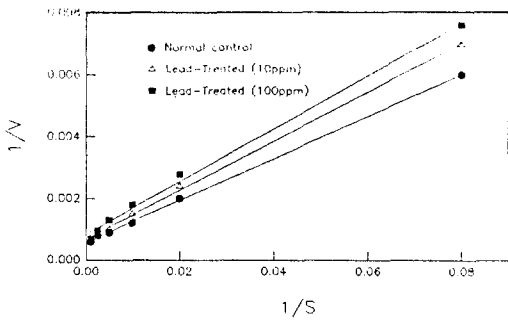


Fig. 4. Na^+-K^+ -dependent 2- 3H myo-inositol transport plotted in double reciprocal fashion (Lineweaver-Burk transformation). Each data point represents the mean of at least three determinations. V; rate of sodium-dependent 2- 3H myo-inositol transport (pmol/g wet wt./min.). S; medium myo-inositol concentration (μM).

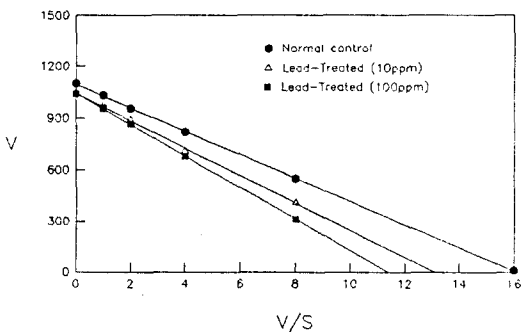


Fig. 5. Na^+-K^+ -dependent 2- 3H myo-inositol transport as a function of the ratio of transport velocity to medium myo-inositol concentration (Eadie-Hofstee transformation). Each data point represents the mean of at least three determinations. V; rate of sodium-dependent 2- 3H myo-inositol transport (pmol/g wet wt./min.). S; medium myo-inositol concentration (μM).

Figure 4와 Figure 5의 실험에서 알수 있듯이 우선 변환후 직선 관계가 성립되는 것으로 미루어 ($\gamma=0.922$ 와 $\gamma=0.952$) Na^+-K^+ 의존성 myo-inositol 수송 체계는 Michaleis-Menten 방정식에 따르는 것을 알수가 있다. 따라서 납중독성 상태에서 myo-inositol 수송 carrier의 V_{max} 값과 K_m 값을 구하여 Table 3에 제시하였다.

Table 3. Estimates of kinetic parameters of sodium-dependent 2- 3H myo-inositol uptake by the sciatic nerve of experimental rat.

Group	V_{max} (pmol/g/min.)	K_m (μM)	N
NC	1088±37	73.5±4.6	5
LT1	1121±47	90.6±6.8 *	6
LT2	1102±30	92.4±7.9 **	5

Each value represents mean±SE. The number of experimental animals are given in parenthesis. NC; normal control group, LT1; lead-treated group(10ppm), LT2; lead-treated group(100ppm). Kinetic parameters were estimated graphically by linear regression analysis as described in methods. N represents number of data points. *,**: $P<0.05$, compared to normal control.

Table 3에서 알수 있듯이 납은 carrier의 V_{max} 값에는 별다른 영향을 주지않고 단지 K_m 값을 증가 시켜 독성을 발현 하는 것으로 나타났다. 즉 납은 myo-inositol을 수송하는 carrier의 친화력을 감소시키는 것으로 밝혀졌다.

이상의 모든 실험 결과를 종합하면 납은 랫드 말초 신경인 대퇴 신경 조직내 myo-inositol 수송을 담당하는 carrier의 최대 전달 속도에는 영향을 주지않고 결합력을 감소 시켜 조직내 myo-inositol 농도를 감소 시킨다. 그 결과 감소된 myo-inositol 농도는 신경 조직이 외부 자극에 대한 반응을 전달하는 능력이 떨어지게 됨으로써 병변을 유발시키는 것으로 독성 기전을 설명할수 있다.

향후 조직내로 유입된 myo-inositol의 대사 과정에 대한 연구를 계속 함으로써 신경 조직의 정보 전달 체계에 대한 납 독성 기전을 보다 정확하게 이해 할수 있을것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Chung M.K. : Effect of lead on phospholipid metabolism in rat sciatic nerve, J. Kor. Soc. Environ. Toxicol., 9(3-4), 13, 1994.
2. Robert H.M. : Inositol phospholipids and cell surface receptor function, Biochim. Biophys. Acta, 415, 81, 1975.
3. Posternak T.H. : Cyclitols and Phosphoinositides., 31, Pergamon press Oxford 1976.
4. Chung M.K. : A study on the toxic mechanism of environmental pollutant., Sung Hwa Forum , 3, 411 1993.
5. Chung M.K. : Lim G. T. and Jung H.O., Effects of lead on axonal transport in the sciatic nerve of SD rats., J. Kor. Soc. Environ. Eng., 16(5), 601, 1994.
6. Chung M.K. : Effects of lead on sodium/ potassium ATPase in the sciatic nerve of SD rats., J. Kor. Soc. Environ. Toxicol., 16(5), 601, 1994.
7. Ellman, G. L. : A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. pharmacol. 7, 88, 1961.
8. Glover, V. : A simple quick microassay for choline acetyltransferase, J. Neurochem. 19, 2465, 1972.
9. Laine, R. A. : Analysis of trimethylsilyl O-methyloximes of carbohydrates by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry, Anal. Biochem. 43, 533, 1971.
10. Greene D.A. and Lattimer S.A. : Sodium and energy dependent uptake of *myo*-inositol by rabbit peripheral nerve., J. Neurochem., 17, 317, 1977.
11. Jerry L.H. : "Number, Cruncher, Statistical system(Ver 5.0)", Kaysville Uta 1987.