대한위생학회지. 제18권 제2호(2003)
Korean J. Sanitation. Vol. 18, No. 2, pp60~66(2003)

Molybdenum이 납 중독 랫드의 말초신경내 myo-inositol uptake 시스템에 미치는 영향

송진호 · 정명규
선문대학교 환경공학과

Effects of molybdenum on myo-inositol uptake system in peripheral nerve isolated from lead-intoxicated rat.

Jin-Ho Song · Myung-Kiu Chung
Department of Environmental Engineering, Sunmoon University

Abstract

This study was carried out to elucidate the preventive mechanism of molybdenum on lead-induced neuropathy. An animal model of lead neuropathy was induced by feeding diet containing lead to Sprague-Dawley rat for three weeks. Four weeks aged Sprague-Dawley rats were divided into four groups : normal control group, 10ppm-lead treated group, 1mg/kg-molybdenum treated group, 10ppm-lead and 1mg/kg-molybdenum treated group. The parameters on neuropathy were examined by measuring concentration of myo-inositol and myo-inosito uptake in sciatic nerve. In the lead-treated rats, myo-inositol concentration and myo-inositol uptake rate were reduced by from 54% to 33% respectively. This deficit results from that myo-inositol uptake system which is carrier mediated and sodium-potassium dependent was inhibited by the lead treatment. However, the molybdenum administration significantly eliminated the impairment and maintained myo-inositol concentration to about 82% of normal level. These results suggest that lead-induced neurotoxicity was significantly reduced by administration of molybdenum and the mechanism might be partly normalization of myo-inositol uptake system in sciatic nerve.

Key words : molybdenum, lead, neurotoxicity, myo-inositol, myo-inositol uptake system.

I. 서 론

본 실험실에서는 생체내에 존재하는 다양한 효소작용에 조인자 역활을 하는 molybdenum(Mo)의 경우, 중금속 특히 납으로 인한 신경계 독성을 신경 조직내 납배설을 촉진하는 방법과 신경기능 유지에 필수 물질인 myo-inositol의 조직내 농도를 증가시키는 방법으로 말초신경계 병변을 개선한다는 연구결과를 이미 발표한 바 있다[1,2]. 여기서 myo-inositol은 대부분의 동식물 세포에서 발견되는 cyclohexitol로서 적혈구 세포에 있어서 칼슘이온의 수송[3,4], 효모에 있어서 세포벽 합성 기능과

거대분자들의 전위 포합 기능[5] 등 다양한 생리 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 신경세포의 경우는 다른 세포에 비하여 100 배정도 고농도로 존재하여 신경전달 기능에 결정적인 역할을 하는 것으로 보고 되고 있다[6]. 저자는 이러한 연구결과들을 기초로 하여 Mo의 신경계 독성저감 메커니즘을 보다 정확하게 이해하기 위한 연구의 일환으로서 납중독 상태에서 myo-inositol uptake 시스템에 미치는 Mo의 영향을 검토하였다.

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 인공조명으로 아침 7:00 부터 저녁 7:00 까지 12시간의 조명시간과 조도 150Lux 밝기로 조절하였으며, 실내온도는 22℃ ± 5℃로 유지하였다. 사료는 고형사료(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. 납중독성 말초신경병변을 유도하기 위하여 초산납 [$Pb(CH_3CO_2)_2 \cdot 3H_2O$]을 증류수에 녹여 10 ppm으로 조제한 다음 음용수를 통하여 3주 동안 노출시켰다. 또한 Mo($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)는 증류수에 녹여 1 mg/kg 용량으로 하루에 한번 씩 3주 동안 경구로 투여하였다. 실험동물군은 정상군, 10ppm 납투여군, 1mg/kg Mo투여군, 10ppm 납과 1mg/kg Mo를 함께 투여한 군으로 분류하였다.

2. 대퇴신경 자극에 대한 전달속도의 측정

납중독으로 인한 말초신경병변을 관찰하는 조직은 대퇴신경을, 신경병변유도 여부에 관한 지표로서는 신경전달속도를 선정하여 Sharma 등[6]의 방법에 따라 측정하였다. 요약하면, 랫드를 에테르로 마취한 다음 온도가 일정하게 유지되는 수술대 위에 묶은 다음 후부 대퇴 부위의 근육에 온도 측정용 소자를 넣어 온도를 측정한다. 다음으로 신경전달속도 측정용 전극을 근육에 삽입한 다음 대퇴신경 결절 부위와 경골신경의 후부 돌기 중간을 전자침으로 자극을 주어 이로 인하여 발생된 근육의 활동 전위를 측정하여 이를 증폭시킨다. 계속하여 자극점 간의 거리를 기준으로 신경전달 속도 등을 분석한다.

3. 대퇴신경내 myo-inositol 농도의 측정

말초신경병변 발생시에 변화되는 대표적 생화학적 지표중의 하나인 myo-inositol 함량 측정은 Laine등[7]의 방법을 이용하였다. 요약하면 랫드의 대퇴신경을 적출하여 결체 조직, 지방등을 제거하고 미량천칭을 사용하여 무게를 재고 2차 증류수 2ml를 가하여 균질화한다. 균질액 500ul를 취하여 0.3N barium hydroxide 0.2ml와 5% $ZnSO_4$ 0.2ml을 넣어 단백질을 침전시킨후 1000g로 2분간 원심분리후 상층액을 취하여 내부 표준물질로서 α-methyl mannoside를 가하고 동결 건조하였다. myo-inositol을 휘발성인 trimethysilyl-O-methyl oxime의 형태로 만들기 위해 동결건조 시킨 잔사가 들어있는 teflon-bined screw cap-vial에 dry pyridine에 녹인 1%-methoxylamine hydrochloride (vol/vol) 500ul를 넣고 80℃에서 2시간동안 가온한다. 계속하여 150ul의 bis (trimethylsilyl) trifluoro-acetamide를 가하고 15분 더 가온한 후 질소로 용매를 날려보내고, 이를 hexane에 녹여 gas-chromatography capillary columm을 사용하여 분석하였다.

4. 대퇴신경내 myo-inositol uptake의 측정

신경조직내로 유입되는 myo-inositol uptake의 측정은 Green등[8]의 방법을 이용하여 측정하였다. 요약하면 대퇴신경을 플라스틱바이알에 넣고 1ml Krebs-Ringer bicarbonate buffer를 가하여 37℃에서 1시간 동안 전단계 배양을 실시하였다. 전단계 배양을 실시한 대퇴신경을 2-[^{3}H]myo-inositol (0.5uCi/vial)을 함유하는 1ml Krebs-Ringer bicar-

bonate buffer용액이 들어있는 바이알로 옮긴후 배양하였다. 그후 일정 시간 간격으로 대퇴신경을 배지로 부터 꺼내어 냉 Krebs-Ringer bicarbonate buffer로서 3-4회 씻은 후 0.5ml의 Protozol로서 용해시킨다. 용해시킨 대퇴신경 0.2ml을 취하여 5.0ml의 toluene scintillation fluid에 넣고 liquid scitillation counter로서 방사능 세기를 측정하였다. 또한 대퇴신경의 myo-inositol uptake 시스템에 대한 여러 실험 조건 중 주변 myo-inositol농도 변화에 대한 특성을 알아보기 위하여 배지에 myo-inositol을 0.1uM에서 5000mM 범위의 농도를 가하였다

5. 통계분석

실험 결과는 평균±SE로 표시하였다. 실험에 사용한 각 동물군간의 유의성 검증을 위하여 Anova test와 Duncan's multiple range test를 실시하였으며 P값이 0.05이하인 경우에만 유의성이 있는 것으로 간주하였다.[9]

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 실험동물의 성장 및 신경전달속도에 미치는 Mo의 영향

본 실험에 사용한 실험 동물군의 몸무게, 물과 식이 섭취량, 체온변화 그리고 신경전달속도 등에 관한 변화를 Table 1과 Fig. 1에 제시하였다.

Table 1과 Fig. 1에서 알 수 있듯이 실험동물간에 신경전달 속도를 제외한 다른 지표들에 대해서는 어떤 유의적인 변화도 관찰되지 않았다. 다만 몸무게의 경우, 납중독 랫드에 있어서 정상 랫드에 비하여 몸무게가 27% 정도 감소하는 것으로 관찰되었다. 그러나 체중 감소에도 불구하고 식이 섭취 능력과 직장의 온도는 정상으로 유지되고 있어 이러한 현상이 급성의 중금속 중독 초기에 흔히 관찰되는 대사 이상에 기인한 체중 감소 현상으로 사료된다.

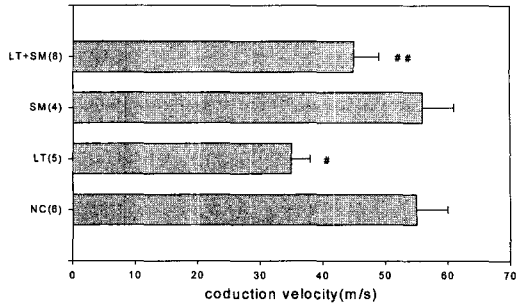

Fig. 1. Effects of Mo on conduction velocity in sciatic nerves isolated from experimental rats. Values are means±SE. The number of experimental rats are given in parenthesis. Mo was administered per oral for 3 weeks. The same volume of distilled water was administered to a control group. NC; normal control group, LT; lead-treated group (10ppm) , SM; Mo-treated group (1mg/kg), LT+SM; lead (10ppm), and Mo (1mg/kg)-treated group. # : Significantly different from normal control group at $p<0.05$. ## : Significantly different from lead-treated group at $p<0.05$.

Table 1. General characteristics of experimental rats.

Groups	Body weight (g)	Water intake (ml/day/rat)	Food intake (g/day/rat)	Rectal temperature (°C)
NC (6)	170±14	42.5±5.5	32.2±6.2	37.5±0.3
LT (9)	125±12 #	38.5±6.5	28.2±6.5	36.6±0.5
SM (6)	174±15	37.5±4.5	35.2±7.5	35.9±0.6
LT+SM (9)	145±13	45.5±5.5	38.2±5.2	36.9±0.6

Each value is mean±SE. The number of experimental rats are given in parenthesis. Mo was administered per oral for 3 weeks. The same volume of distilled water was administered to a control group. NC; normal control group, LT; lead-treated group(10ppm) , SM; Mo-treated group(1mg/kg), LT+SM; lead (10ppm), and Mo(1mg/kg)-treated group. #$P<0.05$, compared with normal control group.

특히 Mo 투여로 체중 감소를 예방 할 수 있을 가능성은 제시되고 있으나 이 문제는 신경 대사보다는 또 다른 체내 대사인 탄수화물과 단백질 대사와 관련이 있을 것으로 추정되어 본 연구의 범위에서 다루지는 않는다.

또한 신경전달속도가 다른 인자에 의하여 영향을 받는 것을 배제하기 위하여 체온과 체중에 대한 영향을 검토하였다. 먼저 체중의 경우, 일반적으로 신경전달속도와 체중은 상관성이 없으나 본 실험 조건의 안정성 여부를 판단하기 위하여 납중독 랫드와 몸무게가 비슷한 정상 랫드를 대상으로 신경전달속도를 측정한 결과 어떤 유의성 있는 차이도 발견하지 못하였다. 다음으로 체온의 경우는 신경전달속도에 영향을 주는 인자인 만큼, 마취로 인한 체온 변화의 가능성을 검토하기 위하여 전체 실험 동물군을 대상으로 마취 후부터 실험이 완료될 때까지 두 시간 간격으로 체온의 변화를 측정하였으나 역시 어떤 유의성 있는 변화도 관찰하지 못하였다.

이상의 실험 결과는 적어도 납중독 랫드에서 나타나는 신경 기능 저하가 체중이나 체온의 차이에 의한 것이 아니라 납의 독성에 기인한 결과임을 전제로 실험이 진행되고 있음을 시사하고 있다. 따라서 본 실험 조건은 납중독으로 인하여 감소된 신경의 기능을 얼마나 Mo가 개선할 수 있는 지 여부를 확인하는데 충분한 조건으로 사료된다. 계속하여 신경기능을 유지하는데 필수적인 myo-inositol 농도에 미치는 납의 영향과 Mo의 개선정도를 측정하였다.

2. 대퇴신경내 myo-inositol 농도에 미치는 Mo의 영향

Fig. 2는 신경기능에서 자극에 대한 신호전달에 중추적 역할을 하는 myo-inositol의 농도 변화에 미치는 Mo의 영향을 관찰하기 위하여 납중독 랫드를 대상으로 1mg/kg 용량의 Mo를 3주 동안 투여한 결과를 나타낸 것이다. 여기서 myo-inositol의 경우는 다른 조직에 비하여 신경조직에 고농도로 (혈중에 비하여 100배정도) 존재하는 물질로서 신경병변시 일차적으로 변화를 나타낸다. 이러한

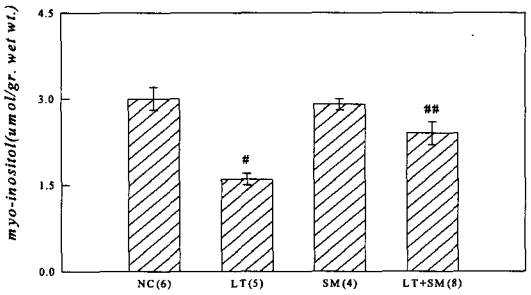

Fig. 2. Effects of Mo on myo-inositol concentration in sciatic nerves isolated from experimental rats. Values are means±SE. The number of experimental rats are given in parenthesis. Mo was administered per oral for 3 weeks. The same volume of distilled water was administered to a control group. NC; normal control group, LT; lead-treated group(10ppm) , SM; Mo-treated group (1mg/kg), LT+SM; lead (10ppm), and Mo (1mg/kg)-treated group. # : Significantly different from normal control group at $p<0.05$. ## : Significantly different from lead-treated group at $p<0.05$.

실험 결과는 본 연구실에서도 납을 대상으로 한 신경독성 메커니즘 연구 결과에서도 이미 확인한 바 있다.[10]

본 실험의 경우, 납중독 랫드에 Mo를 투여하면 납중독으로 인하여 감소된 대퇴신경내 myo-inositol의 농도가 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수가 있다.

여기서 Mo 자체가 myo-inositol 농도에 영향을 줄 가능성을 알아보기 위하여 정상 랫드를 대상으로 투여한 결과 어떤 유의성 있는 변화도 관찰할 수 없었다(Fig. 2의 컬럼 3 참조).

이상의 실험 결과는 Mo가 납중독으로 인하여 감소된 말초신경병변을 myo-inositol 농도 조절을 통하여 예방 혹은 개선할 수 있음을 시사한다. 뿐만아니라 Mo의 말초신경병변의 개선효과는 정상 랫드에는 별다른 영향없이 납중독 랫드에만 선택적으로 작용하는 것을 알 수가 있다. 계속하여 조직외부에서 신경조직내로 유입되는 myo-inositol uptake 시스템에 미치는 Mo의 영향을 살펴보았다.

3. 대퇴신경내 myo-inositol 수송능 및 수송특성에 미치는 Mo의 영향

신경조직 내 myo-inositol uptake 시스템 중 먼저 수송능에 미치는 Mo의 영향을 알아보기 위하여 배지중 myo-inositol 농도를 0.1uM에서 5000uM 범위까지 변화시키면서 수송능 변화를 측정하여 Fig. 3에 표시하였다.

Fig. 3에서 알 수 있듯이 납중독 랫드의 경우, myo-inositol 수송능이 현저하게 감소되어 있으나 Mo를 투여하면 감소된 수송능이 유의성 있게 정상화되는 것을 알 수가 있다. 여기서 본 항목의 실험 결과를 Fig. 2의 대퇴신경내 myo-inositol의 농도 증가 정도와 비교해 보면 상관관계가 잘 성립됨을 알 수가 있다. 즉 이러한 실험 결과는 납중독으로 인하여 감소된 대퇴신경내 myo-inositol의 농도는 myo-inositol의 조직내로 수송능 감소에 기인하며, Mo의 신경병변 개선 메커니즘의 일부가 이러한 수송능의 정상화와 관련이 있다는 사실을 알 수 있다.

계속하여 myo-inositol 수송특성에 미치는 Mo의 영향을 알아보기 위하여 납중독 상태의 kinetic parameters에 미치는 Mo의 영향에 대한 실험 결과를 구한 다음, 두 가지 방정식으로 변환하여

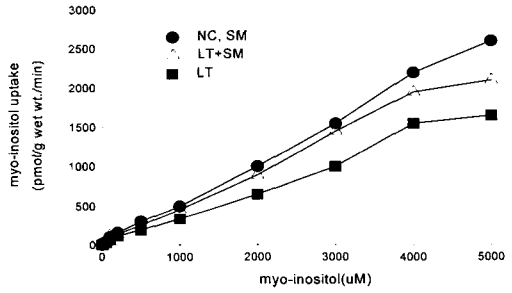

Fig. 3. Effect of Mo on myo-inositol uptake by Na^+/K^+ATPase in sciatic nerve of rat. Values are the mean±SE for three separate determinations and the lines of best fit were derived by the method of lwast squares. NC; normal control group, LT; lead-treated group(10ppm), SM; Mo-treated group (1mg/kg), LT+SM; lead (10ppm), and Mo (1mg/kg)-treated group.

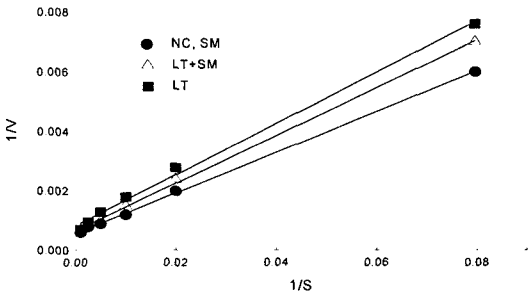

Fig. 4. Myo-inositol uptake plotted in double reciprocal fashion(Lineweaver-Burk transformation). Each data point represents the mean of at least three determinations. V : rate of myo-inositol uptake(pmol/gr. wet wt./min.), S: medium myo-inositol concentration (uM.). NC; normal control group, LT; lead-treated group(10ppm), SM; Mo-treated group (1mg/kg), LT+SM; lead (10ppm), and Mo (1mg/kg)-treated group.

myo-inositol 수송에 관여하는 carrier의 Vmax 값과 Km 값을 구하였다. 즉 하나는 이들 측정값을 myo-inositol의 수송 속도 역수를 배지중의 myo-inositol 농도역수의 함수비로 표시하는 방법(Lineweaver-Burk transformation ; Fig. 4)과 또 하나는 배지중의 myo-inositol 농도에 대한 함수비(Eadie-Hofstee transformation ; Fig. 5)로 표시하는 방법이다.

Fig. 4와 Fig. 5에서 알 수 있듯이 실험값이 변환 후 직선 관계가 성립되는 것으로 미루어 (γ =0.922와 γ=0.952) myo-inositol uptake 시스템은 Michaleis-Menten 방정식에 따르는 것을 알 수가 있다. 계속하여 이들 변환 곡선을 이용하여 대퇴신경내 myo-inositol 수송 carrier의 Vmax 값과 Km 값을 구하여 Table 2에 제시하였다.

Table 2에서 알 수 있듯이 납중독 랫드는 정상 랫드에 비하여 carrier의 Vmax 값은 변화가 없었으나 Km 값이 증가되는 것으로 밝혀졌다. 이는 납이 myo-inositol을 수송하는 carrier의 최대 수송속도에는 영향을 주지 않고 친화력만 감소시켜 신경조직내로의 myo-inositol 수송농도를 감소시키는 것을 의미한다. 그러나 Mo을 투여하면 납중독으로 인하여 높아진 Km 값을 낮추어 주어 조직내로 수

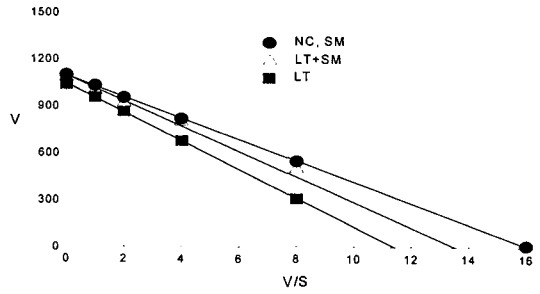

Fig. 5. Myo-inositol uptake as a function of the ratio of uptake velocity to medium myo-inositol concentration(Eadie-Hofstee transformation). Each data point represents the mean of at least three determinations. V : rate of myo-inositol uptake(pmol/gr. wet wt./min.), S: medium myo-inositol concentration (uM.). NC; normal control group, LT; lead- treated group(10ppm), SM; Mo-treated group (1mg/kg), LT+SM; lead (10ppm), and Mo (1mg/kg)-treated group.

송되는 myo-inositol의 양을 증가시킴으로써 중독 상태를 해소하는 것으로 밝혀졌다.

지금까지의 모든 실험 결과를 종합하면 Mo은 납으로 인하여 높아진 대퇴신경내 myo-inositol 수송 carrier의 Km 값을 감소시켜 조직내로 수송되는 myo-inositol 농도를 증가시키는 메커니즘으로 납중독성 말초신경병변을 예방하는 것으로 사료된다.

향후 Mo가 조직내로 유입된 myo-inositol의 대사 과정에 미치는 영향을 계속 연구함으로써 신경 조직의 정보 전달 체계에 대한 납중독 개선 메커니즘을 보다 정확하게 이해 할 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅳ. 참 고 문 헌

1. 박성환, 정명규, 곽영규, Sodium molybdate의 납중독 랫드의 말초신경내 인지질 대사에 미치는 영향, 대한위생학회지, 16(3), 14, 2001.
2. 박성환, 정명규, 조해용, 최창하, 김명녀, Sodium molybdate의 납중독 랫드의 말초신경내 myo-inositol 인지질 대사 관련 효소에 미치는 영향, 대한위생학회지, 16(4), 1, 2001.
3. Ferris C.D. and Snyder S.H., Inositol 1,4,5-triphosphate-activated calcium channels Annu. Rev. Physiol. 54, 469, 1992.
4. Posternak T.H. : Cyclitols and Phosphoinositides., 31, Pregamon press oxford 1976.
5. Michell R.H., Inositol phospholipids and cell surface receptor function, Biochimica et Biophysica Acta, 415, 81, 1975.
6. Berridge M.J. and Irvine R.F., Inositol phosphate and cell signaling, Nature, 341, 197, 1989.
7. Laine, R. A. : Analysis of trimethylsilyl O-methyloximes of carbohydrates by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry, Anal. Biochem. 43, 533, 1971.

Table 2. Estimates of kinetic parameters of sodium-dependent 2-[^{3}H] *myo-inositol* uptake by the sciatic nerve of experimental rat.

Group	Vmax (pmol/g/min.)	Km (uM)	N
NC	1109±37	74.5±4.6	5
LT	1031±57	92.6±5.8 #	5
SM	1090±40	76.6±4.8	5
LT+SM	1202±30	80.6±6.7 ##	5

Each value represents mean±SE. The number of experimental animals are given in parenthesis. LT; lead-treated group(10ppm) , SM; Mo-treated group(1mg/kg), LT+SM; lead(10ppm), and Mo(1mg/kg)-treated group. N represents number of experimental animal. # : Significantly different from normal control group at $p<0.05$. ## : Significantly different from lead-treated group at $p<0.05$.

8. Green D.A. and Lattimer S.A. : Sodium and energy dependent uptake of myo-inositol by rabbit peripheral nerve., J.Neurochem., 17, 317, 1977.
9. Jerry L.H. : "Number, Cruuncher, Statistical system(Ver 5.0)", Kaysville Uta 1987.
10. 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.