

줄납자루 간장의 미토콘드리아 내 LDH isozyme과 미세구조에 미치는 카드뮴과 인삼의 영향

배민화 / 서울대학교 의과대학 피부과

■ 실험적 배경

어류를 비롯한 모든 수서동물이 수중 환경 내의 여러 가지 요인에 의하여 끊임없이 크고 작은 영향을 받고 있다. 특히 독성적 오염 물질인 중금속 이온에 의한 피해적 영향은 대단히 큰 것으로 이미 널리 알려져 있다. 카드뮴과 같은 중금속류는 생체 내로 흡수되는 경우 분해되거나 변화되지 않고 장기 내에 안정 상태로 축적되어 서서히 다양한 독성작용을 일으킨다 (Hoffmann *et al.*, 1975). 담수생물들은 수중 오염원인 중금속 이온 중 특히 카드뮴 독성에 매우 민감하며 어류도 생명 유지에 큰 영향을 받는다 (Tejendra and Eppel, 1992; Zelikoff *et al.*, 1995). 카드뮴은 단백질 구조의 변화 (Mikalsen *et al.*, 1989)와 세포질 내의 성분 변화 (Leysen and Espen, 1993) 등에도 크게 영향을 미친다. 카드뮴의 독성적 영향을 본 결과 어류의 몇몇 장기가 수중의 카드뮴 중독에 의한 병리적 변화를 나타내고 (이, 1980) 금붕어의 간장 미세구조도 크게 영향을 받았다 (Lee and Lee, 1987).

한편, 인삼 성분은 위장관에서 흡수되어 간장에서 활성 효과를 지속적으로 나타낸다 (Han and Chang, 1977). 인삼의 성분 중 saponin과 ginsenoside는 대사 조절 요인으로서 여러 가지 효소를 활성화시켜 기초대사율을 증진시킨다 (강과 주, 1986). Ginsenoside Re, Rg₁, Rb₂는 간장의 단백질합성을 촉진시키며 손상된 간장 조직을 재생시키는데 도움을 준다 (임 등, 1981).

이 연구에서는 우리나라 특산종이며 의압호의 우점종인 줄납자루 간장에서 추출한 미토콘드리아 내의 LDH isozyme의 활성과 간세포의 미세구조에 미치는 카드뮴의 영향과 카드뮴의 독성을 해독 내지 완화시키는 인삼의 효능을 연구하였다.

■ 결 과

1. Lactate Dehydrogenase 활성

줄납자루 간장의 미토콘드리아에서 분리한 각 LDH isozyme fraction의 활성은 시간별 총 LDH 활성과 각 LDH isozyme fraction의 비율로 환산하여 얻은 결과로서 표 1에 나타난 바와 같다.

카드뮴군의 LDH₁인 fraction 1과 2의 활성이 처리 12시간 후까지는

5,332 unit/ml로서 대조군의 2,652 unit/ml 보다 약 2배로 증가되었으나 처리 1일 경과 후에는 2,107 unit/ml로서 대조군에서 보다 약간 낮게 감소되었다. 이 결과는 처리 후 일정 시간이 경과되면 카드뮴이 호기적 대사 과정에 영향을 미침으로써 대사에 이상을 초래하는 것으로 추측된다. Endosulfan을 처리한 금붕어 (배와 이, 1997)와 수은을 처리한 메기의 간장 (이, 1985)에서도 이와 유사한 결과로 나타났다. 줄납자루의 미토콘드리아 내 LDH의 활성이 카드뮴에 의하여 저하된 이 결과는 간세포 미세구조에서 핵막 주변의 미토콘드리아가 카드뮴에 의하여 괴사현상을 일으켜 cristae가 불분명하게 되고 때로는 심하게 붕괴된 결과와 연관 된다(그림 3)고 할 수 있다. LDH₁인 fraction 6, 7, 8은 처리 1시간 후부터 3일 경과 시까지 거의 2배로 증가되었는데 이는 카드뮴이 체내에서 독성적 요인으로 작용할 때 혐기적 장기인 간장에서 LDH₁의 활성이 과잉반응을 일으킨 결과로 보인다.

한편 인삼을 7일간 투여한 결과 LDH isozyme fraction의 수가 대조군의 경우보다 현저히 증가되어 8개의 fraction으로 분리되었다. LDH₁의 효소 활성은 fraction 6의 4,866 unit/ml, fraction 7의 2,557 unit/ml, fraction 8의 11,644 unit/ml, 즉 19,066 unit/ml로서 대조군에서 보다 약간 높게 나타났는데 이는 인삼이 작용하여 효소 반응을 크게 활성화하는 것으로 풀이된다.

카드뮴과 인삼을 함께 처리한 경우 처리 6시간 후에는 fraction 1의 활성은 2,523 unit/ml로서 대조군의 수치와 유사하게 나타났다. 이러한 현상은 생물들이 부적합한 환경에 처해 있을 때 인삼이 비특이적으로 생리적 기능을 활성화시키는 작용 (배와 이, 1997)으로 보이며 카드뮴의 독성적 영향을 경감시켜 준 결과라고 설명할 수 있다. 간장의 미토콘드리아 내 LDH에 미치는 인삼과 카드뮴의 작용으로 인하여 72시간 경과하였을 때 8개의 fraction이 분리되었다. 처리 72시간의 LDH₁ 활성은 41,823 unit/ml로서 대조군 및 카드뮴군에서 보다 현저하게 높았다. 이 결과로 보아 혐기적 LDH isozyme의 활성은 인삼의 작용으로 인하여 높게 나타난 것으로 추론된다.

간장의 미토콘드리아 내 총 LDH isozyme의 시간별 변화는 그림 1과 같다. 카드뮴 처리군에서는 처리 1시간 후 활성이 대조군에서보다 2배로 증가되다가 처리 6시간 후에 일시적으로 급격히 감소되다가 처리 12시간 후

표 1. The activities of LDH isozyme fractions in the liver mitochondria of fish treated with cadmium, ginseng, and cadmium-ginseng

Experimental group	Time of exposure (hours)	LDH isozyme fractions activity (unit/ml)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Control			2652,3	7390,2	12262,8	1044,7			17650,0
Cd	1	5404,0	4750,9	5247,6	5801,0	5126,1		7645,8	13024,5
	6	1992,5	677,1		3128,6	1577,5	1161,0	3189,1	28774,2
	12	4701,2	630,8	1255,7	1971,7	4690,0	830,5	2236,1	20184,2
	24	1657,7	449,1	3570,0	3904,5		1108,4	2207,7	26102,6
	48	810,2	666,9	585,3	1545,2	1692,7	1665,8	4155,9	27978,1
	72	1518,2	1770,7	3427,7		3564,7	2169,9	4484,1	25064,6
G		1948,0	3716,2	1883,7	5931,4	5454,4	4865,8	2556,7	11643,7
Cd+G	1	1409,0	3334,6	3049,3	4484,4	5215,8	3278,7	1089,2	17138,9
	6	2522,9	5381,9	1497,2	966,2	1624,5		737,3	7270,4
	12	2146,4	22114,2	4555,5	6358,4	5537,6			2287,9
	24	5171,8	12982,3	4954,2	8441,5	8133,9		786,6	4029,6
	48	3780,4	11854,4	3229,4	6457,7	4166,8		2535,8	12975,5
	72	1939,4	2964,3	633,3	1573,4	2066,8	4847,7	5104,9	31870,2

Cd, treated with cadmium; G, administrated with ginseng; Cd-G, treated with cadmium and ginseng.

부터 3일 경과 때 까지 대조군의 경우와 가까운 수치로 유지되었다. 저농도의 독성물질을 처리하는 경우 어느 정도의 시간 경과 후에는 효소의 활성이 정상과 가까운 상태로 회복되는 것으로 추측되며 수은을 처리한 메기(이, 1985)에서도 이와 유사한 결과가 나왔다.

인삼을 7일간 투여한 경우의 총 LDH활성은 대조군의 1.7배 정도의 증가된 수치를 보였는데 이는 인삼의 성분 (polysaccharide)이 생리적으로 피루브산에서 젖산으로 되는 대사과정의 LDH활성을 촉진시키는 것 (Yang *et al.*, 1990)으로 추측된다.

카드뮴과 인삼을 함께 처리한 경우에서의 총 LDH 활성은 처리 1시간 경과 시에는 대조군에 비하여 1.7배 정도 증가되다가 처리 6시간 후에서 급격히 감소된 수치를 보였으나 이 수치는 카드뮴만 처리하였을 때 보다는 대조군의 수치와 유사한 활성을 보였다. 이런 결과는 함께 투여한 인삼이 효소에 의한 기초대사율을 촉진시켜서 탄수화물 대사를 증진시키는 것 (강과 주, 1986; Park, 1982)으로 생각된다. 전반적인 면에서 볼 때 인삼을 카드뮴 처리 7일 전부터 처리 종료 시까지 계속하여 투여한 결과 카드뮴 독성에 의한 간세포의 손상이 어느 정도 완화되는 것으로 보이는데 이는 인삼이 체내 중금속 물질의 독성적 영향으로부터 간세포에 보호적으로 작용한다 (Wu and Zhu, 1990; Joo, 1993)는 보고로도 뒷받침된다.

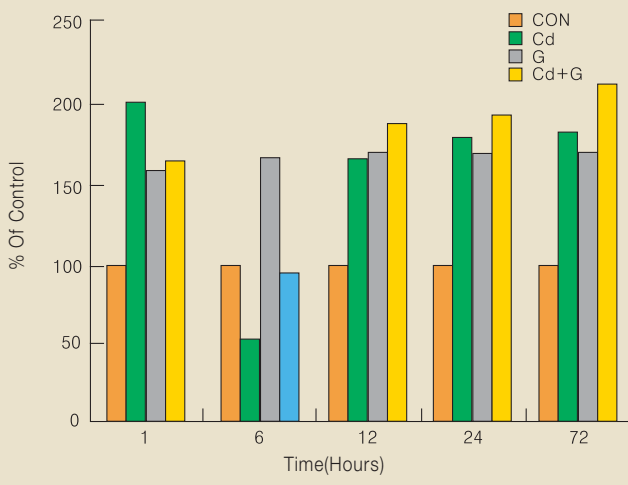
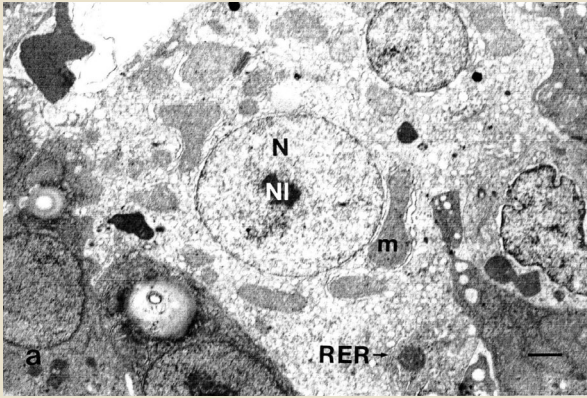


그림 1 Effects of cadmium, ginseng, and cadmium-ginseng on the total LDH activity of liver mitochondria in fish.

2. 간세포의 미세구조

정상인 줄납자루의 간세포는 전형적인 간세포의 미세구조를 가지고 있다. 원형의 핵 중앙에 인이 있고 인 주변에는 염색질이 고루 분포되어 있으며 핵막은 2중막으로 되어 있다(그림 2). 금붕어의 간세포(배 등, 1995)에서 관찰된 것과 유사하게 핵의 주변부에는 조면소포체가 적당하게 배열되고(그림 2B) cristae가 뚜렷한 원형 또는 타원형의 미토콘드리아가 분포되어 있다. 또한 이들의 주위에는 많은 glycogen 과립이 조밀하게 분포되어 있다. 카드뮴을 처리한 간세포에서는 핵막이 부분적으로 붕괴되어 핵의 형태가 일그러지고 핵의 중앙에 위치하고 있던 염색질은 핵 안에서 널리 산재되었다(그림 3). 핵 내의 크롬 농도가 임계치를 초과할 때 크롬이 핵 내 DNA의 합성을 억제하고(Uyeki and Nishio, 1985) 염색체에 이상을 일으키는 예(Uyeki and Nishio, 1983)로 보아 카드뮴군에서의 염색질의 산재 현상도 카드뮴 독성으로 인한 것으로 추측된다. 핵 주변에 있는 미토콘드리아의 cristae는 구조적으로 붕괴되어서 불분명하게 되어 공포를 형성하기도 하였다. 미토콘드리아의 변형은 세포 내 에너지 대사과 호흡 활성의 저하

(A)



(B)

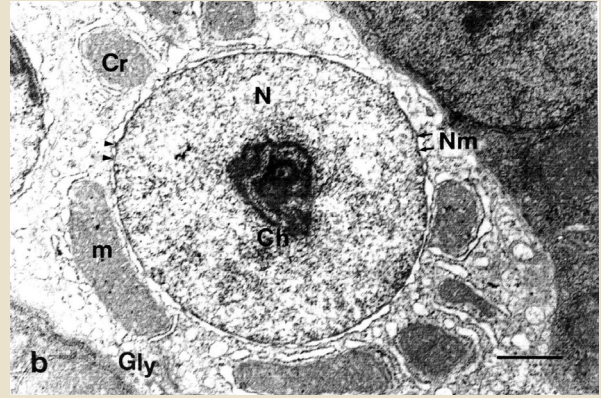
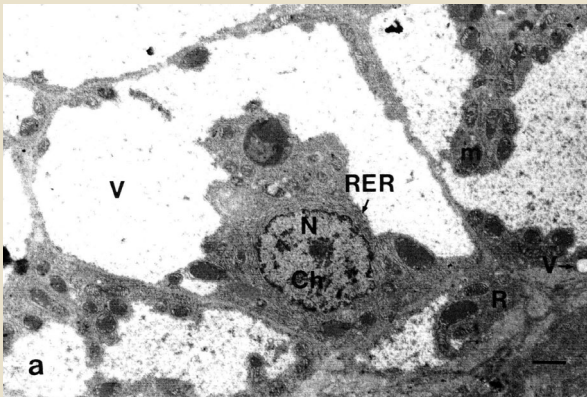


그림 2 (A) an electron micrograph of hepatocytes from normal fish showing normal nucleus (N), mitochondria (m), and rough endoplasmic reticula (RER), NI, nucleolus. Scale bar is 0,8 μm . (B) Glycogen granules (GL) were widely distributed throughout the cytoplasm. Nm, nuclear membrane; Ch, chromatin; Cr, cristae. Scale bar is 1,6 μm .

(A)



(B)

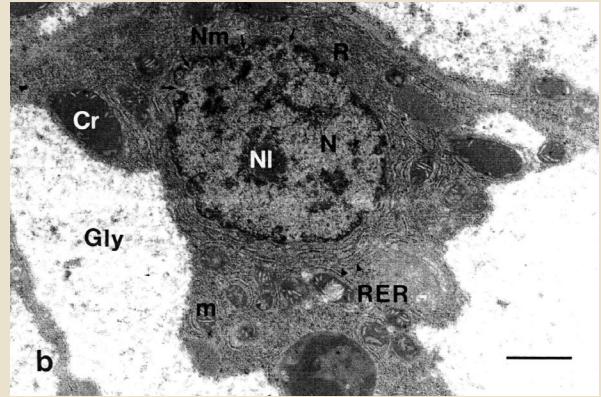
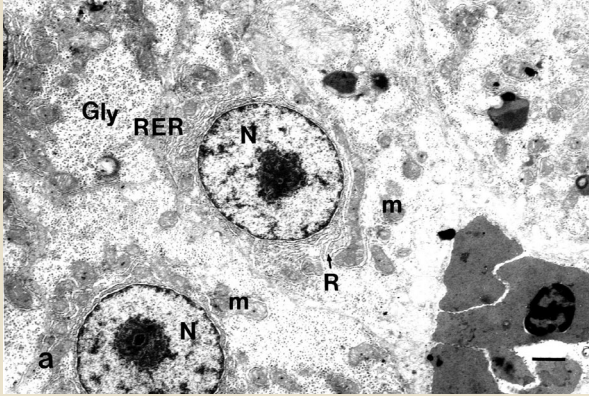


그림 3 (A) an electron micrograph of hepatocytes from fish exposed to cadmium of 2 ppm for one day. Nucleus (N) was partially disintegrated and chromatin granules (Ch) were scattered throughout the nucleoplasm. Mitochondria (m) were considerably disintegrated and some of them were vacuolated (V). R, ribosomes; RER, rough endoplasmic reticula. Scale bar is 0,8 μm . (B) Nuclear membrane (Nm) was partially degenerated (arrows). Glycogen granules (GL) were decreased in number as compared to those of the control. Structures of mitochondrial cristae (Cr) were disintegrated. Rough endoplasmic reticula (RER) were partially fragmented (arrow heads). NI, nucleolus. Scale bar is 1,6 μm .

를 초래하는 원인(전 등, 1993)으로서 비정상적인 세포 기능을 야기하는 것으로 생각된다. 이 사실은 카드뮴 이온이 조직 내의 단백질과 반응하여 금속성 단백질 화합물을 만들어서 효소의 활성을 저해하여 미토콘드리아의 산화 및 인산화 기능을 저해한다(You *et al.*, 1978)는 보고로 설명된다. 조면소포체는 부분적으로 분절되고 glycogen 과립이 정상의 간세포에서 보다 감소되었는데 이는 카드뮴이 glycogen 합성과 분해에 관여하는 효소의 활성에 영향을 미쳐서 탄수화물 대사에 이상을 초래한 결과(Park, 1982) 때문인 것으로 생각된다. Endosulfan을 처리한 금붕어에서도 간세포가 괴사되면 glycogen 과립의 밀도가 감소되어(배 등, 1995), 위의 결과와 경향이 같았다. 세포질 내에는 단백질 합성에 관여하는 ribosome이 산재되고(Stacey *et al.*, 1980) phagosome 형성을 거쳐 공포화 현상(Hoffmann *et al.*, 1975)이 일어났다(그림 3A). 인삼 처리군의 간세포에서는 핵 중앙의 염색질이 다소 산재되어 있는 것을

제외하고는 핵이 정상적인 원형의 형태를 가지고 있다(그림 4). 핵 주변에는 조면소포체가 있고 원형 또는 타원형의 미토콘드리아가 정상군에서 보다 많이 존재하고 있다. 세포 호흡과 에너지 생성 등에 관여하는 여러 가지 중요한 효소를 가지고 있는 미토콘드리아가 대조군에서 보다 증가된 것은 인삼 투여가 여러 효소를 활성화시켜서 기초대사율을 증진시키는 인삼의 작용(광과 주, 1986)과 관계있는 것으로 추측된다. Ribosome도 정상군에서 보다 증가되었는데 이는 인삼의 성분 중 ginsenoside Re, Rg₁, Rb₂가 간장의 단백질 합성을 촉진시킨다(임 등, 1981)는 연구 결과로 설명할 수 있다. 카드뮴과 인삼을 병행 처리한 줄납자루의 간세포에서는 핵의 형태가 정상 세포의 것보다 약간 일그러졌지만(그림 5), 카드뮴만 단독 처리했을 때(그림 3) 보다는 정상 세포와 비슷한 정도를 유지하였다. 미토콘드리아의 cristae는 카드뮴 처리군의 것보다 선명하고 미토콘드리아의 공포화 현상도 적었으며 인삼 처리군의 것과 유사한 형태를 보였다. Glycogen 과립이 카드뮴 단독

(A)



(B)

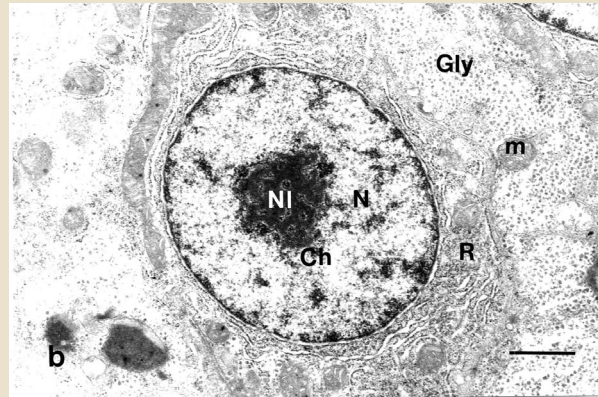
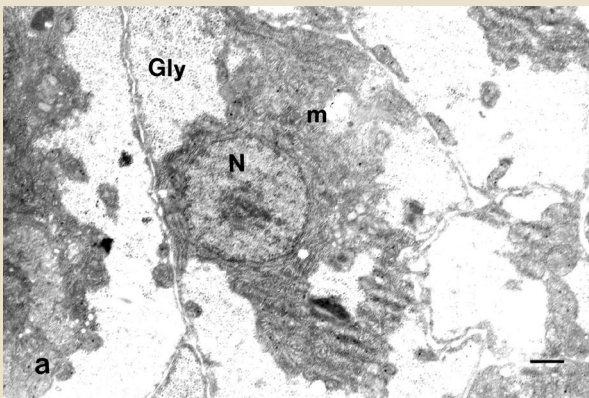


그림 4 (A) an electron micrograph of hepatocytes from fish administered with ginseng (0.1 g/50 fish/day) for 7 days, Features of nucleus (N) and rough endoplasmic reticula (RER) were similar to those of the control, Mitochondria (M) and ribosomes (R) were increased in number as compared to the control, Scale bar is 0.8 μm , (B) Chromatin granules (Ch) were scattered throughout the nucleoplasm, NI, nucleolus; GL, glycogen granules, Scale bar is 1.6 μm .

(A)



(B)

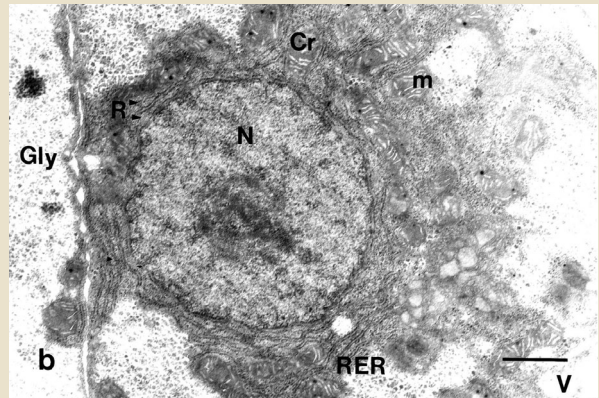


그림 5 (A) an electron micrograph of hepatocytes from fish treated with cadmium of 2 ppm after administration of ginseng for 7 days, Nucleus (N) was partially degenerated, Glycogen granules (GL) were increased in comparison with those of cadmium group, M, mitochondrion, Scale bar is 0.8 μm , (B) Features of mitochondrial cristae (Cr) and rough endoplasmic reticula (RER) were similar to those of ginseng group, M, mitochondrion; V, vacuole, Scale bar is 1.6 μm .

처리군에서 보다 많았는데 이는 함께 투여한 인삼이 여러 가지 효소에 의한 기초 대사를 촉진시켜서 (강과 주, 1986) 탄수화물 대사가 증진된 결과 (Park, 1982) 때문인 것으로 생각된다. 인삼을 카드뮴 처리 7일 전부터 처리 종료 시까지 계속하여 투여한 결과 카드뮴 독성에 의한 간세포의 손상이 어느 정도 완화된 것으로 보이는데 이는 인삼이 체내 중금속 물질의 축적을 감소시켜서 독성적 영향에 대하여 완화적으로 작용한다 (Joo, 1993)는 보고로 뒷받침된다.

[참고문헌]

1) 강철호, 주충노. 1986. 인삼 사포닌이 효모의 몇가지 해당효소에 미치는 영향. *고려인삼학회지* 10: 200-208.
 2) 배인화, 최신석, 이춘구. 1995. 금붕어의 간장과 신장의 미세구조에 미치는 endosulfan과 홍삼의 영향. *육수지* 28: 463-474.

3) 배인화, 이춘구. 1997. 금붕어의 간장과 신장의 LDH isozyme에 미치는 endosulfan과 홍삼의 영향. *육수지* 30: 29-35.
 4) 이춘구. 1980. 메기의 조직에 미치는 cadmium의 영향에 관한 전자현미경적 연구. *수대 논문집* 20: 619-633.
 5) 이춘구. 1985. 메기의 장기내 LDH isozyme과 단백질에 미치는 급성수는 중독의 영향에 관한 연구. *육수지* 18: 73-84.
 6) 임창진, 이동권, 박은희, 홍순근. 1981. 인삼 총 사포닌, 디올게 및 트리올게 사포닌의 효과. *고려인삼학회지* 5: 49-55.
 7) 전진석, 김진숙, 구본철. 1993. 카드뮴 투여가 생쥐 정소의 정소관 상피에 미치는 영향: 전자현미경적 연구. *한국전자현미경학회지* 23: 125-138.
 8) Han, B.H. and I.M. Chang. 1977. Metabolism of dammarane triterpene glycosides of Korean ginseng (I). *Kor. J. Ginseng*

Sci. **2**: 17-19.

9) Hoffmann, E.O., J.A. Cook, N.R. Luzio and J.A. Coover. 1975. The effects of acute cadmium administration in the liver and kidney of rat. *Lab. Invest.* **32**: 655-663.

10) Joo, C.N. 1993. Defence function of ginsenosides against several biochemical disorders in the animal body. Proceedings 6th International Ginseng Symp. 25.

11) Lee, K.A. and C.K. Lee. 1987. Antitoxic effect of red ginseng extract on toxicity of cadmium in goldfish(Ⅲ): Effect on ultrastructure of hepatocytes. *Kor. J. Lim.* **20**: 243-249.

12) Leyshon, K. and S. Espen. 1993. The ultrastructural localization of metallothionein in cadmium exposed rat liver. *Histochem. J.* **25**: 857-864.

13) Mikalson, A., H.L. Daae, J. Alexander and R.A. Anderson. 1989. Is metallothionein involved in deposition of cadmium in bile. *Gen. Pharmacol.* **20**: 11-15.

14) Park, D.S. 1982. Histochemical studies on the effect of the organochloride pesticide, Thiodan, in the rat intestine. *J. Pusan Med. Coll., Pusan National Univ.* **22**: 13-35.

15) Stacey, N.H., L.R. Cantilena and C.D. Klaassen. 1980. Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **53**: 470-480.

16) Tejendra, S.G. and A. Eppel. 1992. Impact of cadmium on the mummichog *Fundulus heteroclitus* and the role of calcium in suppressing heavy metal toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.* **101**: 519-523.

17) Uyeki, E.M. and A. Nishio. 1983. Antiproliferative and genotoxic effects of chromium on cultured mammalian cells. *J. Toxicol. Environ. Health* **11**: 227-243.

18) Uyeki, E.M. and A. Nishio. 1985. Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J. Toxicol. Environ. Health* **15**: 237-242.

19) Wu, X. G. and D. H. Zhu. 1990. Influence of ginseng upon the development of liver cancer induced by diethylnitrosamine in rats. *J. Tongji Med. Univ.* **10**: 141-145.

20) Yang, M., B. X. Wang, Y. L. Jin, Y. Wang and Z. Y. Cui. 1990. Effects of ginseng polysaccharides on reducing blood glucose and liver glycogen. *Chung Kuo Yao Hsueh Pao* **11**: 520-524.

21) You, K.H., C.K. Choi, R.S. Choe and Y.K. Deung. 1978. Ultrastructural studies on cadmium poisoning in the liver, kidney and gills of *Carassius carassius*. *Korean J. Electron Microscopy* **8**: 33-48.

22) Zelikoff, J.T., D. Bowser, KWS. Squibb and K. Frenkel. 1995. Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: An alternative animal model for immunotoxicological studies. *J. Toxicol. Environ. Health* **45**: 235-248.



배인화 (inbae0127@hanmail.net)

이학박사
서울대학교 의과대학 피부노화연구실

1992년 숙명여자대학교 생물학과 이학학사

1994년 숙명여자대학교 대학원 동물학 전공 이학석사

1999년 숙명여자대학교 대학원 동물학 전공 이학박사

1999년 - 2000년 원자력병원, Post doc.

2000년 - 현재 서울대학교 의과대학 피부노화 연구실, 선임연구원