대한산업의학회지 제 15 권 제 4 호 (2003년 12월)
Korean J Occup Environ Med, 2003;15(4):323-334

랏트와 마우스에서 비소의 급성독성에 대한 연구

중앙대학교 의과대학 예방의학교실, 병리학교실[1], 국립독성연구원[2]

최병선 · 강대웅 · 이진영 · 박언섭[1] · 홍연표 · 양지선[2] · 이효민[2] · 박정덕

— **Abstract** —

Acute Toxicity of Arsenic in Rats and Mice

Byung-Sun Choi, Dae-Woong Kang, Jin-Young Lee, Eon-Sub Park[1],
Yeon-Pyo Hong, Ji-Sun Yang[2], Hyomin Lee[2], Jung-Duck Park

Department of Preventive Medicine, Department of Pathology[1], College of Medicine,
Chung-Ang University, Seoul, Korea
National Institute of Toxicological Research, Seoul, Korea[2]

Objectives: Arsenic (As) is ubiquitously distributed in the environment and is known as a human carcinogen. In this study, acute As toxicity at lethal dosage in rats and mice was evaluated, and As-induced hepatotoxicity was characterized.

Methods: Male Sprague-Dawley rats, male ICR mice and trivalent inorganic As, sodium arsenite, were used in this experiment. LD_{50} and LD_{100} were calculated from 24-hour lethality after the single subcutaneous administration of As into rats and mice. Serum and liver were collected from the surviving animals. The activities of ALT, AST and γGT in serum were determined, and the concentrations of MDA, GSH and CYP450 in liver were analyzed.

Results: The LD_{50} and LD_{100} of sodium arsenite were calculated as 12 mg/kg and 13 mg/kg for rats, and 16.5 mg/kg and 19 mg/kg for mice, respectively. Thus, the rat was more susceptible than the mouse to the acute lethal toxicity of As. The histopathological changes induced by As were similar between rats and mice. AST was increased in high-dose As-treated rats and mice, whereas ALT was increased in high-dose As-treated mice but not in rats. γGT was not significantly changed between the two animal groups. As increased lipid peroxidation, but decreased GSH and CYP450 in the liver of both rats and mice, in dose-dependent patterns. These results indicate that oxidative stress might be one of the mechanisms in As-induced hepatotoxicity.

Conclusion: Rats were more susceptive than mice to acute As toxicity, and oxidative stress might play a part in liver injury induced by As.

Key Words: Arsenic (As), Lethal dose, Hepatotoxicity, Oxidative stress

<접수일: 2003년 7월 29일, 채택일: 2003년 8월 25일>

교신저자: 박 정 덕 (Tel: 02-820-5668) E-mail: jdpark@cau.ac.kr

*본 연구는 국립독성연구원의 독성물질 국가관리체계 구축사업 지원에 의해 수행되었음.

서 론

비소(Arsenic)는 다양한 형태의 화합물로 환경 중에 널리 분포하는 금속물질로서 강한 독성을 가지고 있는 주요 환경오염물질이다. 오염원별 유해 환경오염물질 관리의 우선순위에 대한 미국의 자료를 보면 비소가 수년째 1 순위에 랭크되어 있다(ATSDR, 2001). 특히 비소는 사람에서 폐암, 피부암, 간암 등을 일으키는 인간 발암물질(human carcinogen)로서 IARC category A로 분류(IARC, 1987)되어 주목을 받고 있다. 또한 비소는 발암성뿐만 아니라 피부질환과 심혈관계질환 등 비발암성 독성에 의한 인체에 대한 위해성이 매우 큰 화학물질로서 주목받고 있다(Hsu et al., 1997; Lee et al., 2003, Mahata et al., 2003). 미국 EPA는 음용수중 비소 규제치를 현재의 50 ppb에서 10 ppb까지 강화하고 있으며(EPA, 2002), 일부 국가에서는 식품중의 비소량도 규제하고 있다. 그러나 우리나라에서는 아직까지 유해 화학물질 관리의 우선 순위뿐만 아니라 유해물질의 오염실태에 대한 연구·보고도 매우 미미한 실정이다. 그러나, 최근 수년 동안 환경부에서 폐광산 인근 지역에서의 오염물질 실태조사결과 비소의 토양오염도가 가장 높은 것으로 보고(환경부, 1998-2001)되어 국내·외적으로 비소의 오염에 대해 안심할 수만은 없는 실정이다.

비소의 인체에 대한 위해성은 이온의 상태나 화합물의 형태에 따라 다른 것으로 알려져 있다(Mandal & Suzuki, 2002). 즉, 3가 비소화합물이 5가 비소화합물에 비해 독성이 강하며, 무기비소화합물이 유기비소화합물에 비해 인체에 대한 독성이 크다. 비소의 독성은 비소 화합물의 물리적 상태, 입자의 크기, 생체내로의 흡수, 제거 비율, 공존하는 불순물, 노출되는 인체의 상태 등에 따라서도 서로 다른 독성을 나타낼 수 있다. 비소가 사람에게 노출되는 주요 경로는 호흡기와 소화기계이며 피부를 통한 노출은 매우 미미하다. 금속 제련업, 살충제 제조업, 목재 운반 및 가공업 등 비소화합물을 취급하는 산업장 근로자의 경우 비소의 주된 노출경로는 호흡기로서 주로 금속 또는 무기비소화합물이다. 그러나, 비소에 특별히 노출된 적이 없는 일반 주민들에 있어서 비소의 주요 노출경로는 소화기계이다. 즉, 공기나 물중에 주로 존재하는 무기비소화합물(공기: trivalent arsenic oxide, 물: pentavalent arsenate)이 환경 중에서 쉽게 물이나 토양으로 유입되고, 비소에 오염된 물과 토양에서 재배된 쌀 등 농작물 및 어패류 등을 섭취함으로서 비소에 오염된다. 특히, 우리나라 사람들이 즐겨 먹는 식품인 생선과 패류, 미역, 다시마 및 김 등에는 다량의 비소가 함유되어 있는 것으로 보고(김애정 등, 1998)되어 있으나 아직까지 우리나라에서는 각종 식품 중에 함유된 비소량이 제대로 파악 되어 있지 않을 뿐 더러 주요 식품 중 비소함유량에 대한 규제도 되어있지 않은 실정이다. 오염된 환경에 의한 비소 중독의 예가 중국, 대만, 칠레, 인디아, 방글라데시 및 아르헨티나 등 여러 국가에서 계속적으로 보고 되고 있는 실정이다(Wang, 1997; Smith et al., 1998; Tondel et al., 1999; Smith et al., 2000). 우리나라에서도 앞으로 비소에 의한 환경오염이 우려되며, 이로 인한 급·만성 건강장애로 발전될 수 있는 가능성에 대한 대책 마련이 필요하다. 따라서 이에 대한 치료방법 및 예방대책을 수립하기 위해서는 우선적으로 비소에 의해 발생될 수 있는 급·만성 독성과 그 기전에 대한 이해가 필요함에도 불구하고 지금까지 우리나라에서는 이 분야에 대한 독성학적 연구자료조차 매우 미미한 실정이다.

이번 연구에서는 비소 독성에 대한 실험적 연구를 함에 있어서 필수적으로 요구되는 비소의 투여량에 따른 생체반응 양상을 관찰하고, 실험동물의 종(랏트와 마우스)에 따른 비소 독성에 대한 반응의 차이를 관찰함으로서 앞으로 이 분야의 연구에 필요한 기초자료를 마련하고자 한다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 약 180 g의 male Sprague-Dawley 랏트와 약 30 g의 male ICR 마우스를 Samtac사로부터 구입하여 이용하였다. 구입한 실험동물은 온도 약 22℃, 습도 55%의 동물사육실에서 4일 동안 실험실 환경에 적응시켰다.

2. 실험동물처치

예비실험을 기반으로 랏트는 실험동물 체중 kg당 4~13 mg의 sodium arsenite($NaAsO_2$) 형태의 비소를 1회 피하주사 하였고, 마우스에는 실험동물 체중 kg당 4~19 mg의 sodium arsenite를 1회 피하주사 하였다. 랏트와 마우스에서 각각 대조군과 비소 투여량군 별로 각 군당 8~10마리를 무작위 배정하였다. 이때 주사량은 실험동물 체중 kg당 랏트는 5 ml, 마우스는 10 ml로 조정하였다. 대조군 랏트와 마우스에는 실험군과 동일한 양의 생리적 식염수를 주사하였다. 실험동물에 비소를 투여한 후 24시간에서 사망 여부를 관찰하였다. 비소투여 후 24시간에서 생존한 랏트와 마우스는 각각 경추탈골방법으로 희생시킨 후 간장과 혈액을 채취하였다. 각 실험동물로부터 채취한 간장의 무게를 정량한 후 일부는 조직병리학적 소견 관찰에 이용하였고, 나머지는 즉시 액체질소에 넣은 후 추후 분석때 까지 -80 ℃에서 냉동 · 보관하였다.

3. 조직병리학적 소견 관찰

비소 처치군과 대조군으로부터 적출한 간조직의 일부를 10% 포르말린에 침적 · 고정한 다음 통상적 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 4 μm 절편으로 만들어 hematoxylin-eosin 염색하여 광학현미경으로 형태학적 소견을 관찰하였다.

4. 혈청지표 분석

실험군과 대조군의 랏트와 마우스로부터 채취한 혈액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 급성 비소중독에 의한 간 독성 혈청지표로서는 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 및 γ-glutamyltransferase(γ-GT) 활성도를 이용하였다. 분리된 혈청내 ALT, AST 및 γ-GT의 활성도는 Sigma Diagnostic Kits(USA)를 이용하여 분광광도계(UVIKON, Kontron Inc.)로 측정하였다.

5. 간지표 분석

1) Lipid peroxidation

간조직내 lipid peroxidation은 Ohkawa et al. (1979)의 방법을 이용하여 TBARS(thiobarbituric acid reacting substance) assay를 통하여 측정하였다. 즉, 간조직에 10배 용량의 1.15% KCl 용액을 첨가하여 Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 2회 균질화한 후 4℃, ×1000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 시료로 사용하였다. 시료 0.75 ml를 8.1% SDS 0.1 ml, 20% acetic acid 1.5 ml, 0.8% thiobarbituric acid 0.75 ml, 증류수 0.3 ml의 혼합액에 첨가하여 95℃ oil bath에서 30분간 가열시킨 후 즉시 얼음물로 냉각하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액 1.8 ml에 증류수 0.5 ml 와 n-butanol-pyridine(15:1, v/v) 2.5 ml를 첨가하여 30초간 혼합한 후 ×1000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액의 흡광도를 형광광도계(SFM 25, Kontron Inst.)를 이용하여 excitation 515 nm, emission 535 nm에서 측정하여 생성된 malondialdehyde의 양을 nmol/g wet weight로 나타내었다.

2) GSH

간조직내 GSH는 van Klaveren et al. (1997)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 간조직에 10배 용량의 5% 5-sulfosalicylic acid 용액을 첨가하여 Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 2회 균질화한 후 4℃, ×1,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 시료로 사용하였다. 원심분리하여 얻은 상층액 20 μl를 daily buffer(0.248 mg/ml NADPH, 143 mM sodium phosphate, 6.3 mM Na_4-EDTA, pH 7.5) 700 μl, 6 mM DTNB 100 μl 및 증류수 180 μl와 혼화한 후 35℃에서 15분간 반응시켰다. 반응액에 GSSG reductase 10 μl를 첨가하여 35℃에서 20분간 반응시킨 후 분광광도계(UVIKON, Kontron Inc.)를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 간조직내에 GSH의 양은 μmol/g wet weight로 나타내었다.

3) Cytochrome P-450(CYP450)

간조직내의 microsome을 Guengerich(1994)의 방법을 이용하여 추출하였으며 CYP450은 추출한 microsome을 사용하여 Schenkman & Jansson

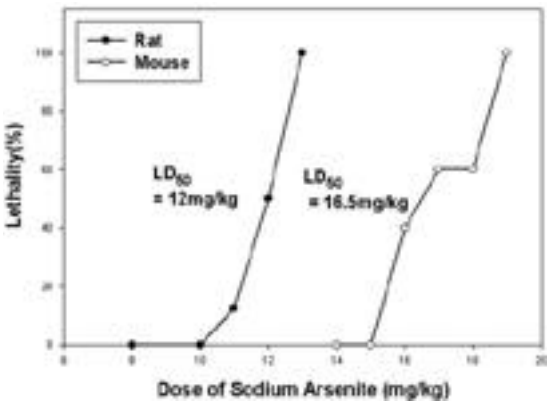

Fig. 1. Lethality at 24 hours after single administration of sodium arsenite subcutaneous in rat and mouse.

(1999)의 방법으로 측정하였다. 즉, 간조직내에 4배 용량의 STKM buffer(250 mM Sucrose, 50 mM Trizma, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7.5)를 첨가하여 Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 균질화하여 4℃, $\times 10^4$ g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 4℃, $\times 10^5$ g에서 60분간 초고속 원심분리(Optima XL-100K Ultracentrifuge, Beckman, U.S.A)한 후 침전물을 취하였다. 이 침전물에 500 μℓ buffer를 넣고 Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 균질화하여 시료로 사용하였다. 시료 즉, microsome 0.3 ml에 0.05 M Trizma(pH 7.4) 5.7 ml를 넣고 2개의 cuvette에 등분 한 후 분광광도계(UVIKON, Kontron Inc.)를 이용하여 450 nm 와 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. Carbon monoxide gas를 30초간 주입(1 bubble/sec)한 후 양쪽의 cuvette에 소량의 sodium hydrosulfite를 넣고 흡광도 차이를 측정하고 몰흡광계수 91 $mM^{-1}cm^{-1}$를 이용하여 계산하였다. 간조직내에 CYP450의 양은 protein으로 보정하여 nmol/mg protein로 나타내었다.

4) 자료분석

연구결과 얻은 자료의 통계학적 분석은 SAS package (version 8.01)를 이용하였다. 랏트와 마우스에서 sodium arsenite에 대한 LD_{50}와 LD_{100}은 probit방법으로 산출하였다. 통계분석 결과 얻은 자료는 평균±표준오차로 나타내었고, 각 군간의 평균치 비교는 ANOVA 및 Duncan 다중검정을 이용하였다.

결 과

1. 비소(NaAsO2)의 치사량: LD_{50}, LD_{100}

Sodium arsenite 형태의 비소를 랏트의 체중 kg당 4 13 mg을 1회 피하주사한 후 24시간에서의 사망여부를 관찰한 결과, 비소 투여량 10 mg까지는 실험동물의 사망이 관찰되지 않았으나 11 mg 투여군에서는 12.5%, 12 mg 투여군에서는 50%, 13 mg 투여군에서는 실험동물의 100%가 사망하여 male Sprague-Dawley 랏트에 대한 sodium arsenite의 LD_{50}은 12 mg/kg, LD_{100}은 13 mg/kg로 관찰되었다. 마우스의 체중 kg당 4 19 mg의 Sodium arsenite를 1회 피하주사한 후 24시간에서 비소 15 mg/kg 이하 투여군에서는 실험동물이 사망하지 않았으며, 16 mg 투여군에서는 40%, 17 또는 18 mg/kg 투여군에서는 60%, 19 mg/kg 투여군에서는 실험동물의 100%가 사망하여 male ICR 마우스에 대한 sodium arsenite의 LD_{50}은 16.5 mg/kg, LD_{100}은 19 mg/kg로 산출되었다(Fig. 1).

2. 조직병리학적 소견

랏트의 간에서는 비소 6 mg/kg 투여군에서부터 간세포의 Kuffer cell 증가와 비정형적으로 보이는 유사분열상이 관찰되었다. 8~10 mg/kg 투여군에서는 일부에서 간세포의 모양이 난원형으로 되면서 세포질내 유리질체가 관찰되었고, 12 mg/kg 투여군에서는 간세포의 apoptosis가 증가되었고 초점성 괴사가 흔하게 관찰되었다(Fig. 2). 마우스에서는 비소 12 mg/kg 투여군에서 간조직의 형태학적 이상소견이 관찰되어 대조군에 비해 Kuffer cell의 증가와 함께 비정형 유사분열이 관찰되었다. 14 16 mg/kg 투여군에서는 간세포에서 Kuffer cell의 뚜렷한 증가와 apoptotic 세포가 관찰되었고, 18 mg/kg 투여군에서는 apoptosis 변화가 더욱 증가되었고 국소적인 핵의 소실이 관찰되었다(Fig. 3).

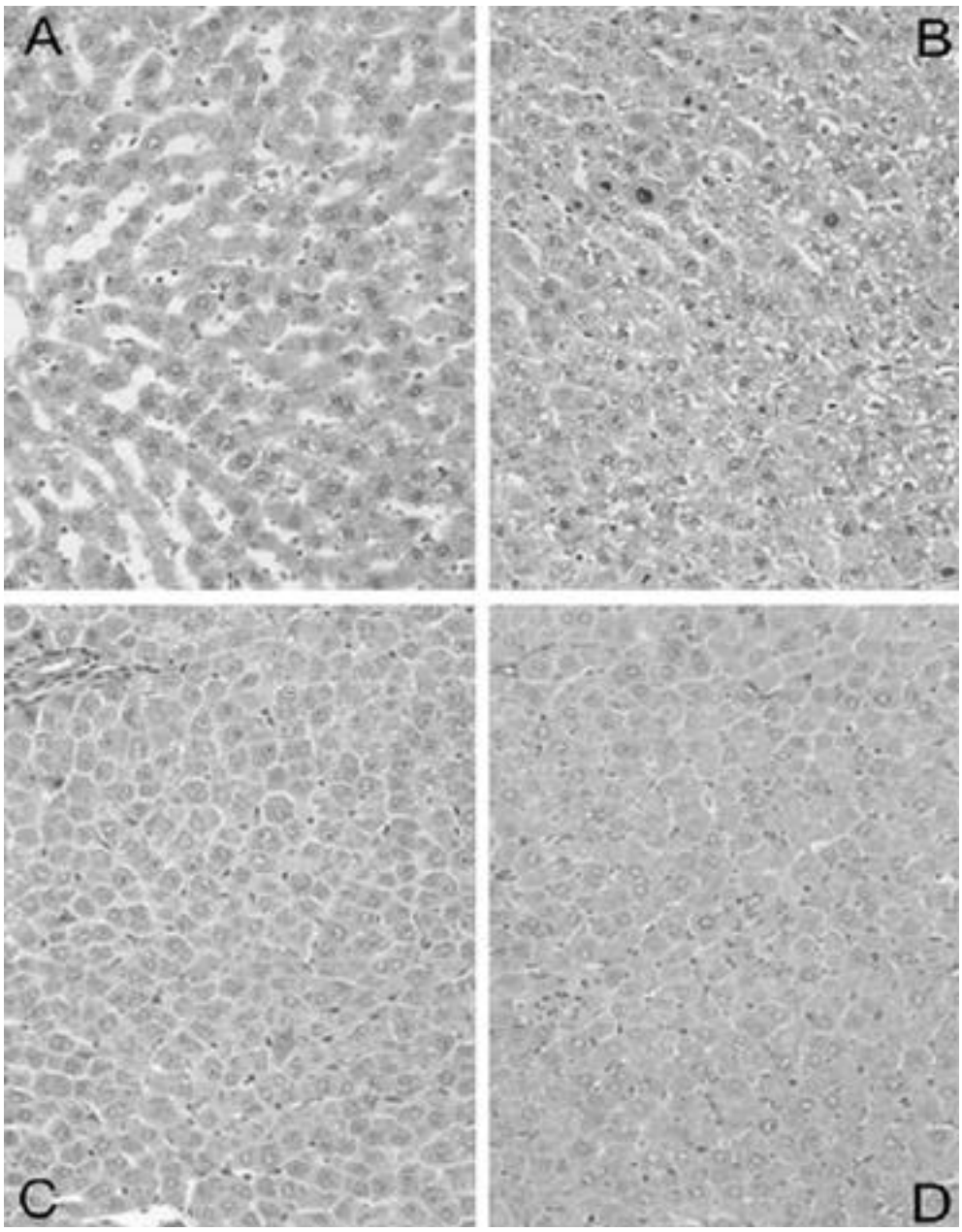

Fig. 2. Histopathological findings in liver at 24 hours after single administration of arsenic subcutaneous with various doses into rats (**A**: Control, **B**: As 6 mg/kg, **C**: As 10 mg/kg, **D**: As 12 mg/kg).

3. 혈청지표

여러 단계 용량의 비소를 랏트와 마우스에 1회 피하주사한 다음 24시간에서 간독성을 반영하는 혈청지표로 ALT, AST 및 γGT를 분석한 결과 Fig. 4와 같다. 즉, 랏트의 경우 비소 투여량에 따른 ALT와 γGT 활성도의 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으며, AST 활성도는 비소투여량에 따라 대조군에 비해 점차 증가하여 비소 10 mg/kg 이상 투여군에서는 대조군에 비해 유의하게 높은 것으로 관찰되었다. 마우스에서는 비소 16 mg/kg와 18 mg/kg 투여군

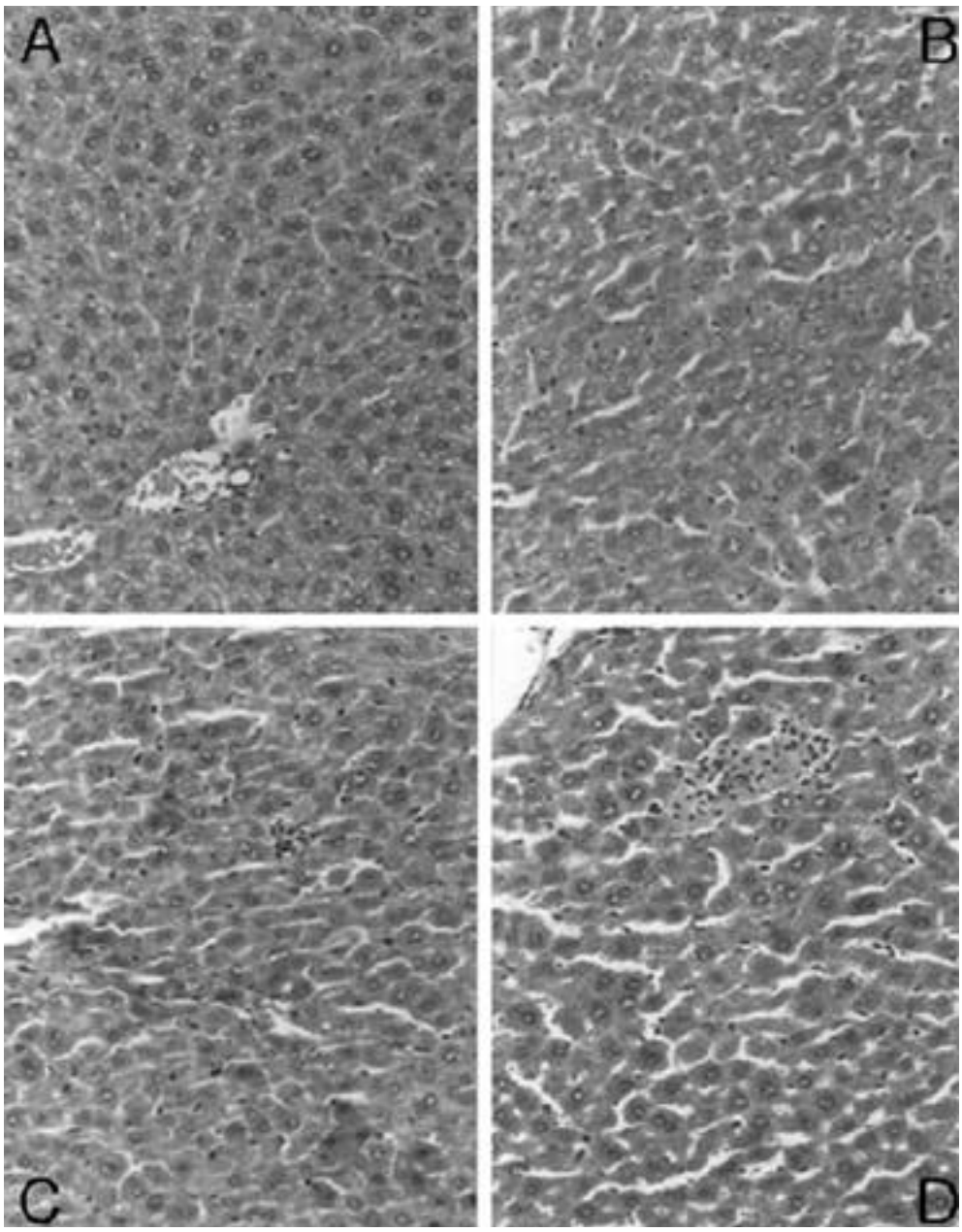

Fig. 3. Histopathological findings in liver at 24 hours after single administration of arsenic subcutaneous with various doses into mice (**A**: Control, **B**: As 12 mg/kg, **C**: As 16 mg/kg, **D**: As 18 mg/kg).

에서 ALT와 AST 활성도가 대조군에 비해 높았으나, γGT는 각 군간에 차이가 관찰되지 않았다.

4. 간지표

비소에 의한 간독성의 지표로서 지질과산화반응과 항산화계인 GSH 및 phase I 효소계인 CYP450를 여러 단계 용량의 비소를 투여한 랏트와 마우스의 간조직에서 분석한 결과 Fig. 5와 같다. 즉, 비소투여군에서 지질과산화반응의 대사산물인 MDA 생성량이 랏트와 마우스 모두에서 비소 투여량에 따라 용량-반응적으로 증가하여 랏트에서는 10, 11, 12

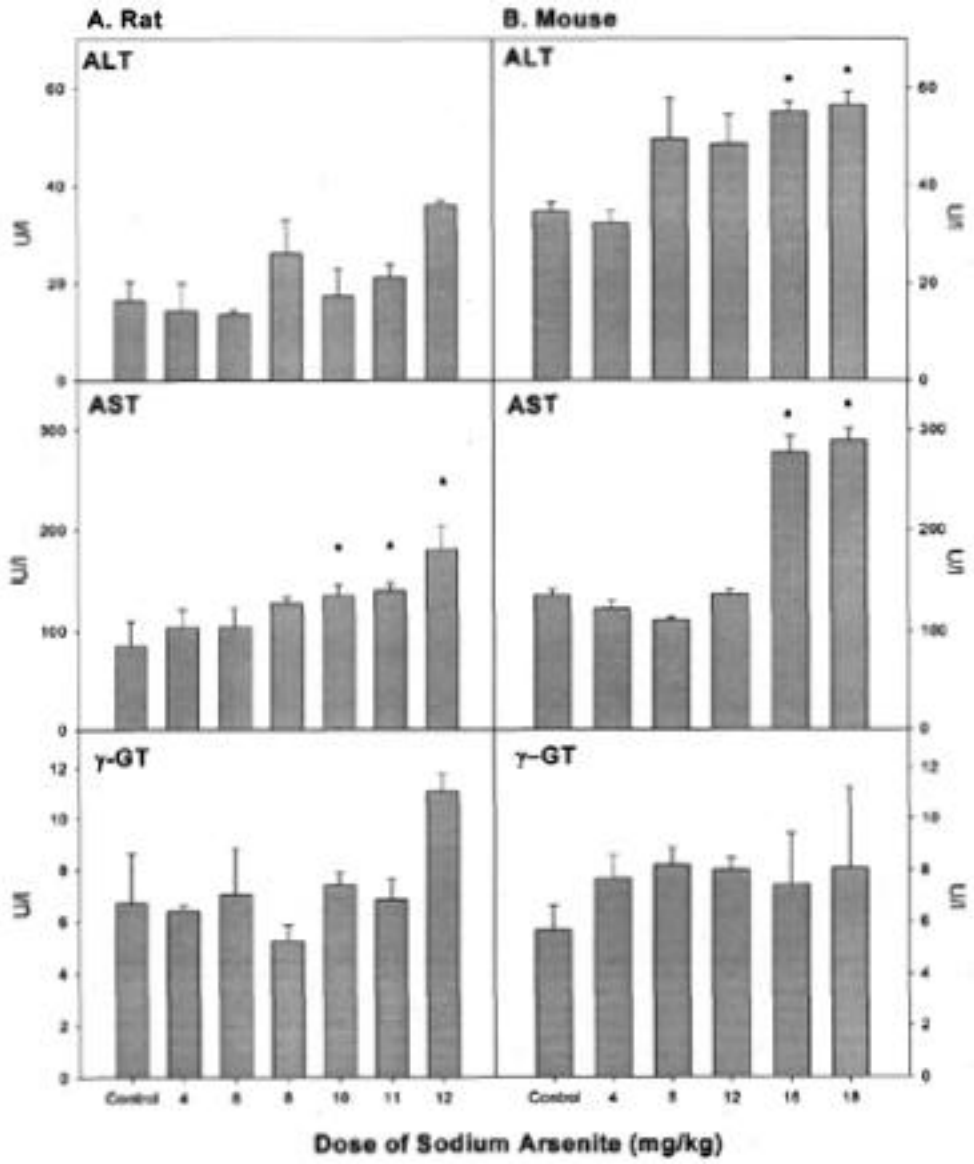

Fig. 4. ALT, AST and γGT activities in serum of As-treated rats(A) or mice(B). Data are expressed as mean±standard error. *Arsenic treated animals significantly different from control ($p<0.05$).

mg/kg 투여군에서, 마우스는 8, 12, 16 및 18 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 높았다. 간조직내 GSH 농도는 비소투여량이 증가함에 따라 감소되는 것으로 관찰되어 랏트에서는 비소 10, 11, 12 mg/kg 투여군에서, 마우스에서는 비소 16과 18 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 감소되었다. 간조직내 CYP450 농도는 랏트에서는 비소 10 mg/kg 이상 투여군에서, 마우스에서는 12 mg/kg 이상 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 감소되었다.

고 찰

이번 연구에서 2종의 실험동물 즉, male Sprague-Dawley 랏트와 male ICR 마우스를 대

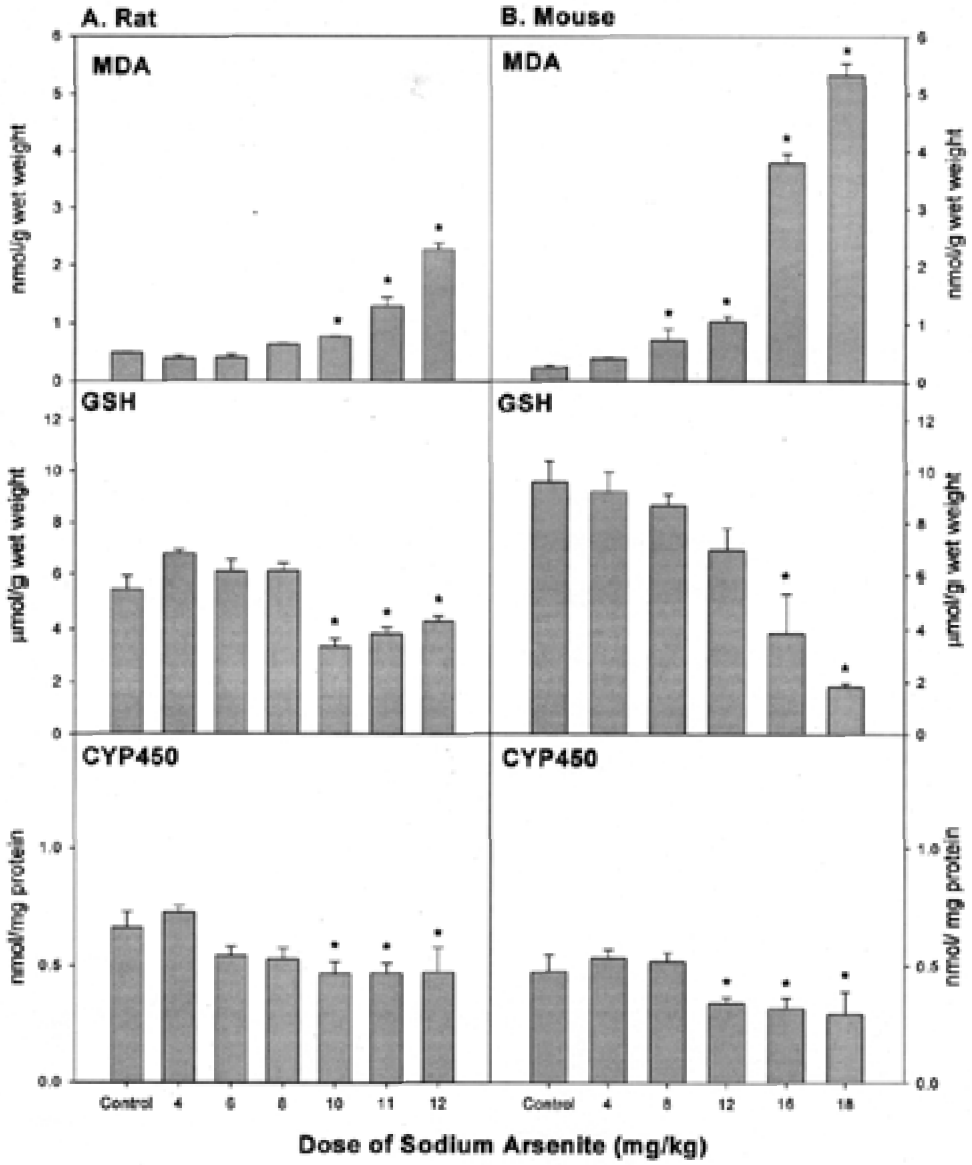

Fig. 5. The levels of MDA, GSH and CYP450 in liver of As-treated rats(A) or mice(B). Data are expressed as mean ±standard error. *Arsenic treated animals significantly different from control ($p<0.05$).

상으로 sodium arsenite 형태의 비소에 대한 급성 독성을 평가하기 위하여 비소를 피하로 1회 투여한 후 24시간에서 치사율을 조사한 결과, rat에서 LD_{50}와 LD_{100}은 각각 12 mg/kg와 13 mg/kg이었고, mouse에서는 LD_{50}은 16.5 mg/kg, LD_{100}은 19 mg/kg로 산출되었다. 즉, 랏트가 마우스에 비해 비소의 급성독성에 더욱 민감한 것으로 관찰되었으며, 이는 이전의 연구결과와 일치하였다(Mitchell et al., 2000). 유해 화학물질에 대한 감수성은 실험동물의 종에 따라 차이가 있을 뿐만 아니라 계통, 연령, 성 또는 개체에 따라서도 서로 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Wong & Klaassen, 1980; Shaikh et al., 1993). 이번 연구에서 산출된 랏트와 마우스에 대한 LD_{50}은 이번 연구와 동일한 형태의 비소를 사용한 연구일지라도 실험동물의 계통과 투여방법 등이 일치한 연구가 많지 않아 직접적인

비교는 다소 어려우나 male Sparague-Dawley 랏트를 대상으로 구강으로 투여한 연구에서의 LD_{50}이 15 mg/kg(Hughes, 2002) 이었고, male Wistar 랏트의 복강내로 투여한 연구에서 10, 13.6 및 15.86 mg/kg 등으로 보고(Diaz-Barriga et al., 1990; Yanez et al., 1991; Maiti & Chatterjee, 2001) 되었고, hairless 마우스를 대상으로 피하주사한 연구에서는 14.5 mg/kg (Liu et al., 2002), 그리고 여러 종류의 마우스를 대상으로 구강으로 투여한 연구에서 26 40 mg/kg 등(ATSDR, 1993; Hughes, 2002)으로 관찰된 연구결과들을 종합적으로 고려해 볼 때 이번 연구에서 산출된 LD_{50}은 타당성이 있는 값이라고 생각한다. 비소의 독성은 화합물의 형태에 따라서도 차이가 있어 유기비소의 경우 실험동물에서의 LD_{50} 값이 약 520 961 mg/kg 범위로서 무기비소에 비해 독성이 낮은 것으로 평가되고 있다(Verschueren, 1983; Lewis, 1996). 이번 연구에서 산출된 비소의 랏트와 마우스에 대한 LD_{100}은 각각 13 mg/kg, 19 mg/kg로서 비소에 의한 급성 독성의 안전영역이 상대적으로 좁은 것으로 관찰되었다. 이번 결과와 직접적으로 비교할 수 있는 자료는 제한적이었으나 이번 연구의 치사량 산출을 위한 반복적인 예비실험에서 비슷한 결과를 얻어 비교적 타당성이 있는 자료로 사료된다.

과량의 무기비소에 노출되었을 때 나타나는 급성독성으로는 심한 소화기계 장애와 중추신경계 장애 및 순환기계 장애가 유발되며 간과 콩팥의 손상이 동반된다. 그러나, 미량의 비소에 만성적으로 노출되는 경우 폐암, 피부암, 간암, 조혈기계 암종 등 발암작용과 피부각화증과 흑피종, 간기능 장애, 심장기능 이상과 흑족증과 같은 심혈관계 장애 등 다양한 건강장애를 일으킨다(Mahata et al., 2003). 호흡기 또는 소화기계를 통해 체내로 들어온 비소는 주로 간에서 methylation 과정을 통해 대사된다(Csanaky et al., 2003).

여러 단계 용량의 비소를 1회 실험동물에 피하주사한 후 24시간에서 간조직을 광학현미경으로 관찰한 결과, 랏트에서는 실험동물 체중 kg당 비소 6 mg 투여군에서부터 형태학적 이상소견이 관찰되었으며 12 mg 투여군에서는 apoptosis의 증가와 초점성 괴사도 관찰되었다. 마우스에서는 체중 kg당 비소 12 mg 투여군에서부터 형태학적 이상소견이 관찰되었으며 비소의 투여량이 증가함에 따라 Kuffer cell의 증가, apoptosis의 증가 및 핵의 소실 등이 관찰되어 이전의 연구결과와 비슷한 소견을 나타내었다(Flora et al., 1997; Liu et al., 2002). 비소에 대한 형태학적인 변화는 랏트가 마우스에 비해 민감하게 반응하였으나 형태학적인 변화 소견은 종간에 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다. 이번 연구에서 비소에 의한 간독성을 반영할 수 있는 혈청지표중 AST 활성도는 고농도의 비소투여군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. ALT는 랏트에서는 군간에 있어서 평균활성도의 차이가 관찰되지 않았고 고농도의 비소를 투여한 마우스에서 대조군에 비해 높게 나타났다. γGT의 경우 랏트와 마우스 모두에서 비소투여량에 따른 차이가 관찰되지 않았다. 혈청지표의 변화와 간조직의 형태학적인 소견을 함께 고려해 볼 때, 비소 노출후 급성독성에 의한 간의 손상이 실험동물을 사망에 까지 이르게 하는 치명적인 표적장기(target organ)는 아닌 것으로 판단된다. 그러나, 치사량 이하의 비소에 대한 반복적 또는 만성적 노출환경에서 이번 연구결과와는 달리 혈청지표가 간 손상을 반영하는 지표로서 유용한 것으로 보고된 바 있다(Flora et al., 1997; Flora et al., 1998; Liu et al., 2002). 이는 비소에 의한 독성이 비소의 노출량과 노출기간 등에 따라 표적장기가 다를 수 있음을 시사하는 것으로 향 후 비소의 급 · 만성 독성 연구를 수행함에 있어서 고려되어져야 할 것으로 사료된다.

이번 연구에서 랏트와 마우스 모두에서 비소 투여량이 증가함에 따라 간조직에서 지질과산화반응 산물인 MDA의 생성이 용량-반응적으로 증가되었고, 항산화계인 GSH의 농도가 감소되는 것으로 관찰되었다. 이는 비소의 급성독성중 간에서 산소반응성 손상이 간 독성 기전의 하나로 작용함을 시사하는 결과로서, 치사량 이하의 비소를 반복적 또는 만성적으로 투여한 연구에서 제시된 비소의 산소반응성 기전에 의한 간 손상과 일치하는 소견이다(Ramos et al., 1995; Flora, 1999; Maiti & Chatterjee, 2001). GSH는 간에서 과잉 생성된 반응성 산소에 대한 방어효과를 가질 뿐만 아니라 비소의 methylation 과정에서 5가 비소의 3가로의 환원에 관여하는 필수적인 보조요소(co-factor)이다

(Mandal & Suzuki, 2002). 비소에 의한 간조직 내 GSH의 감소는 비소가 'SH-'기가 풍부한 GSH와 직접적인 반응 및 비소에 의해 생성·유도된 산소반응성산물에 의한 소실로 설명될 수 있다 (Tripathi & Flora, 1998). CYP450는 phase I 효소계로서 다양한 대사과정에 관여하고 있다. 이번 연구에서 비소 10 mg/kg 이상 투여한 랏트와 12 mg/kg 이상 투여한 마우스에서 간조직내 CYP450 농도가 감소되었다. 비소를 투여한 실험동물에서의 CYP450 감소에 대해서는 향 후 좀 더 연구되어져야 할 것으로 생각되나, CYP450의 감소는 비소를 투여한 실험동물의 간에서 tryptophan pyrrolase의 heme saturation에 영향을 미쳐 heme 생성과정의 장애 초래와 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Cebrian et al., 1988).

요 약

목적: 비소(Arsenic)는 환경중에 널리 분포하는 금속물질로서 인간발암물질이다. 이번 연구에서는 2종의 실험동물을 대상으로 비소 투여량에 따른 치사율을 이용한 급성독성을 평가하였고, 간조직의 형태학적 소견과 혈청지표 및 간지표를 이용하여 간독성을 평가하였다.

방법: 실험동물은 male Sprague-Dawley 랏트와 male ICR 마우스를 사용하였고, 비소는 sodium arsenite 형태의 3가 무기비소를 이용하였다. 랏트와 마우스에 여러 단계별 용량의 비소를 1회 피하주사한 후 24시간에서의 치사율을 이용하여 LD_{50}과 LD_{100}을 산출하였다. 생존한 실험동물은 즉시 희생시켜 혈청과 간조직을 채취·분리하여 혈청에서는 ALT, AST 및 γ-GT 활성도를 측정하였고, 간조직에서는 지질과산화반응, GSH 및 CYP450 농도를 분석하였다.

결과: 랏트에 대한 3가 무기비소의 LD_{50}과 LD_{100}은 12 mg/kg와 13 mg/kg 이었고, 마우스에서는 LD_{50} 16.5 mg/kg, LD_{100} 19 mg/kg 로서 랏트가 마우스에 비해 비소의 급성독성에 민감하였다. 비소에 의한 간조직의 형태학적 이상소견은 랏트와 마우스에서 비슷한 양상으로 관찰되었으나, 랏트가 마우스보다 민감한 것으로 나타났다. 혈청 AST 활성도는 비소 고농도군에서는 대조군에 비해 증가되었으나, ALT는 마우스의 고농도군에서만 증가되었고 γ-GT는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다. 랏트와 마우스 모두에서 비소 투여량이 증가함에 따라 간조직에서 지질과산화반응이 증가되었고, GSH와 CYP450 농도는 감소되었다. 이러한 결과는 비소에 의한 산소 산화성 손상이 간독성의 한 기전으로 작용함을 시사한다.

결론: 비소의 급성독성은 랏트가 마우스에 비해 민감하였고, 비소에 의한 간독성 기전의 하나로서 산소 산화성 손상이 관여하는 것으로 사료된다.

참고문헌

김애정, 김선여, 이완주, 박미정. 서해안 지역 수산물의 비소함량에 대한 연구. 한국식품위생안전성학회지 1998;13:201-5.

환경부. '97 폐금속광산 오염실태 정밀조사 결과, 서울. 1998.

환경부. '98 폐금속광산 오염실태 정밀조사 결과. 국감I, 서울. 1999. p 468.

환경부. '99 폐금속광산 오염실태 정밀조사 결과, 서울. 2000.

환경부. 2000 폐금속광산 토양오염방지시설 설치사업 추진현황. 국감V, 서울. 2001. p 368.

ATSDR. Toxicology profile for arsenic. U.S. Department of Health and Human Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1993. p 23.

ATSDR. 2001. http://www.epa.gov/reg3hwmd/fr/2001/10/25.htm.

Cebrian ME, Albores A, Connelly JC, Bridges JW. Assessment of arsenic effects on cytosolic heme status using tryptophan pyrrolase as an index. Biochem Toxicol 1988;3:77-86.

Csanaky I, Nemeti B, Gregus Z. Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats - not S-adenosylmethionine depletion impairs arsenic methylation at high dose. Toxicology 2003;183:77-91.

Diaz-Barriga F, Llamas E, Mejia JJ, Carrizales L, Santoyo ME, Vega-Vega L, Yanez L. Arsenic-cadmium interaction in rats. Toxicology 1990;64:191-203.

EPA. 2002. http://www. epa. gov/epahome/hi-arsenic.htm.

Flora SJS, Pant SC, Malhotra PR, Kannan GM. Biochemical and histopathological changes in arsenic-intoxicated rats coexposed to ethanol. Alcohol 1997;14:563-8.

Flora SJS, Pradeep K, Kannan GM, Rai GP. Acute oral gallium arsenide exposure and changes in certain hematological, hepatic, renal and immunological indices at different time intervals in male Wistar rats. Toxicol Lett 1998;94:103-13.

Flora SJS. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. Clin Exper Pharmaco Physicol 1999;26:865-9.

Guengerich. Analysis and characterization of enzyme. In: Hayes AW. Principles and methods of toxicology. 3th ed. New York: Raven, 1994. pp 1267-8.

Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. Toxicol Lett 2002;133: 1-16.

Hsu YH, Li SY, Chiou HY, Yeh PM, Liou JC, Hsueh YM, Chang SH, Chen CJ. Spontaneous and induced sister chromatid exchanges and delayed cell proliferation in peripheral lymphocytes of Bowen's disease patients and matched controls of arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. Mutat Res 1997;386:241-51.

IARC(International Agency for Research on Cancer). Arsenic and arsenic compounds. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC monographys 1-42, Suppl. 7. Lyon, France, International Agency for Research on cancer, 1987. pp 100-206.

Lee MY, Jung BI, Chung SM, Bae ON, Lee JY, Park JD, Yang JS, Lee H, Chung JH. Arsenic-induced dysfunction in relaxation of blood vessels. Environ Health Perspect 2003;111: 513-7.

Liu J, Liu Y, Powell DA, Waalkes MP, Klaassen CD. Multidrug-resistance mdr1a/1b double knockout mice are more sensitive than wild type mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues. Toxicology 2002;170:55-62.

Lewis RJ. Sax's dangerous properties of industrial materials. 9th ed. volumes 1-3. New York, NY: Van Nostrand Reinhold, 1996. p 2181.

Mahata J, Basu A, Ghoshal S, Sarkar JN, Roy AK, Poddar G, Nandy AK, Banerjee A, Ray K, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK. Chromo - somal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. Mutat Res 2003;534:133-43.

Maiti S, Chatterjee AK. Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. Arch Toxicol 2001;75:531-7.

Mandal BK, Suzuki KT. Arsenic round the world: a review. Talanta 2002;58:201-35.

Mitchell RD, Ayala-Fierro F, Carter DE. Systemic indicators of inorganic arsenic toxicity in four species. J Toxicol Environ Health A 2000;59: 119-34.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95:351-8.

Ramos O, Carrizales L, Mejia J, Batres L, Ortiz D, Diazbarriga F. Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissue by a mechanism independent of glutathione levels. Environ Health Perspect 1995;103[Suppl 1]:85-8.

Schenkman JB, Jansson I. Measurement of cytochrome p-450. In: Maines et al. Current protocols in toxicology. New York: John Wiley and Sones 1999. 4.1.9-4.1.11.

Shaikh ZA, Jordan SA, Tewari PC. Cadmium disposition and metallothionein induction in mice: strain-, sex-, age- and dose-dependent differences. Toxicology 1993;80:51-70.

Smith AH, Goycolea M, Haque R, Biggs ML. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. Am J Epidemiol 1998;147:660-9.

Smith AH, Lingas EO, Rahman M. Contamination of drinkig-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. Bull World Health Org 2000;78:1093-103.

Tondel M, Rahman M, Magnuson A, Chowdhury IA, Faruquee MH, Ahmad SA. The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh. Environ Health Perspect 1999;107:727-9.

Tripathi N, Flora SJS. Effect of some thiol chela-

tors on enzymatic activities in blood, liver and kidneys of acute arsenic(Ⅲ) exposed mice. Biomed Environ Sci 1998;11:38-45.

van Klaveren RJ. Hoet PH, Pype JL, Demedts M, Nemery B. Increase in gamma-glutamyl-transferase by glutathione depletion in rat type Ⅱ pneumocytes. Free Radic Biol Med 1997;22:525-34.

Verchueren K. Handbook of environmental data of organic chemicals. 2nd ed. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Co 1983. p 329.

Wang L. Arsenic in environment and endemic arsenism guangdong. Trace Elem Sci 1997; 4:7-12.

Wong KL, Klaassen CD. Age difference in the susceptibility to cadmium-induced testicular damage in rats. Toxicol Appl Pharmacol 1980;55:456-66.

Yanez L, Carrizales L, Zanatta MT, Mejia JJ, Batres L, Diaz-Barriga F. Arsenic-cadmium interaction in rats: toxic effects in the heart and tissue metal shifts. Toxicology 1991 ;67:227-34.