

흰쥐에 초산납투여가 신장조직중 Free Radical 대사효소 활성과 초미형태학적 변화에 미치는 영향

김승필 · 윤종국* · 박관규**

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과, 계명대학교 의과대학 병리학교실**

Administration of Lead Acetate on the Activity of Free Radical Metabolizing Enzyme and Ultrastructural Changes in Rat Kidney

Seung Pil Kim, Chong-Guk Yoon* and Kwan Kyu Park**

Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University, Taegu 704-200, Korea

*Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine, Taegu 700-310, Korea

(Received May 9, 1995)

(Accepted May 12, 1995)

ABSTRACT : To investigate the ultrastructural changes of kidney and clarify to a cause of its changes in lead intoxicated rats, the 0.5% lead acetate administered orally to the rats and those were sacrificed at 2 day, 1, 2, 4, 6 and 8 week after the treatment of lead acetate. Each extirpated kidney was histopathologically examined under the electron microscopy and histochemical examination was also carried out. Concomitantly, the activity of free radical metabolizing enzyme was determined. The blood levels of lead concentration showed a gradual increase from the first group reaching the plateau at the one or two week group with the slightly decreasing value throughout the whole course of the experiment. And the urinary ALA concentration showed a gradual increase from the first group to the 8 week group. In the kidney tissue of rat sacrificed at 6 week, the proximal tubular cells showed dilatation of endoplasmic reticulum, mitochondrial swelling, increased numbers of secondary lysosomes and myelin figure-like residual bodies on electron microscope and oxygen free radicals are identified by histochemistry on light microscope whereas there were no differences in the activity of catalase and glutathione peroxidase between the lead acetate treated group and control group. But the activity of xanthine oxidase was more increased in lead acetate treated rats than control group. Furthermore, the superoxide dismutase activity was significantly increased in the experimental group than the control group. In conclusion, it is assumed the kidney damage in lead intoxicated rat may be induced by free radicals.

Key Word : Lead, Electron microscope, Free radical, Histochemistry

I. 서 론

산업 발전에 따른 산업 유해물질이 인간의 건강을 위협하게 하고 있다. 특히 중금속류에 의한 환경오염은 다른 유기오염 물질과는 달리 분해되거나 변화를 받지않고 환경중에 장기간 잔류하여 지속적으로 인체에 상해를 야기시킬 수 있다. 이들 중 납은 주위 환경에 흔히 존재하는 중금속으로서 초산납(lead acetate)을 비롯하여 40여종 이상의 화합물의 형태로 존재한다(Budavarie, 1989). 그리고 납은 위장관과 호흡기를 통해서 흡수되어(Kissane, J.

M., 1985) 인체에 독성을 나타 낸다고한다(Kissane, 1985). 납은 체내에서 골격계와 혈액 및 여러장기에 축적되고(Cotran, 등, 1989), 이로 인하여 인체의 여러장기에 상해를 초래한다고 한다(Wapnir 등 1979; Russo 등, 1988). 납 중독에 의한 신장의 형태학적 변화는 1862년 Lancereaux에 의해 보고된 이래 많은 형태 및 생화학적 연구가 진행되어 왔다(Heptinstall 1992; Galle, Morel-Maroger 1965; Goyer 등 1970). 납에 의한 세포상해 기전에는 저산소상해(Cotran 등, 1989)와 δ -Aminolevulinic acid(ALA)에 기인된 free radical injury(Hermes 등, 1991) 등의 설이 있다. 즉 저산소증일때 ATP가 감소되며 이로 인하여 oxygen free radical 생성에 관여하는 xanthine

*: To whom all correspondence should be addressed.

oxidase(XO) 활성이 증가됨이 Yonetani 등(1977) 및 Yoon(1984)에 의하여 관찰되었다. 그리고 Yonetani 등(1977)은 세포상해시 XO 효소에 있어서 type O 활성 증가되고 염성반응시 XO의 type O활성이 유도된다고 하였다. 한편 초산납 중독시 hemoglobin 합성의 중간 물질인 ALA가 축적되고 이로 인하여 산소유리기 생성이 증가되어 신세포 상해가 초래된다고 하였다(Hermes-Lima 등, 1991).

그러므로 초산납에 의한 신손상은 ALA 축적에 의한 산소유리기 생성이와 XO효소기구에 기인된 점도 배제할 수 없다고 생각된다. 또한 조직의 손상은 free radical의 생성과 해독의 불균형에 기인되기 때문에 실험동물의 초산납 투여에 의한 신손상은 oxygen free radical의 생성에 관련된 XO 활성과 이의 해독효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase(GTP) 활성에 영향을 받을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 초산납에 의한 신세포의 형태학적 변화가 산소유리기에 기인된다는 점에 근거하여 초산납을 경구적으로 투여한 후 신장조직의 변화를 전자현미경을 통해 관찰하며 oxygen free radical을 조직화학적으로 확인함과 동시에 이의 원인을 규명하는 일환으로 요중 ALA 함량과 oxygen free radical의 generating system 및 scavenging system에 관여하는 효소 활성을 신조직중에서 측정하여 이들 성적을 비교 관찰코자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 투여물질

0.5% lead acetate 용액

2. 실험동물

실험에 사용된 Sprague-Dawley rat는 Life science사에서 구입하여 계명대학교 의과대학 동물사육실에서 25±4°C, 상대습도 55±45%, 환기횟수 10~13회/hr, 조도 130~180 Lux에서 사육한 250 g내외되는 건강한 숫컷을 사용하였다.

3. 투여방법

실험군은 0.5% 초산납 용액을 8주간 마시게 하였으며 형태학적 관찰과 혈중 납 농도를 측정하기 위하여 2일 및 1, 2, 4, 6, 8 주째 각각 5마리씩 도살하였고, 생화학적 측정과 조직화학적 관찰을 위해서는 6주째에 대조군과

실험군 각각 10마리씩 도살하였다. 이때 대조군은 초산납 대신 물만 마시게 하였다.

4. 실험동물의 처치

동물의 처치는 약한 ether 마취하에 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 실험사 시킨 후 신장은 이하 실험과 같이 처치하였다.

5. 투과전자현미경적 관찰

신장조직 절편을 1 mm³의 크기로 세절하여 4°C에서 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1 M PBS로 세척한 후 1% OsO₄ 용액에 2시간 후고정을 하고 ethanol과 acetone으로 탈수 하였다. Propylene oxide로 치환한 후 Luft방법(1961)에 의한 epon 혼합물로 포매하여 60°C에서 열중합 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두

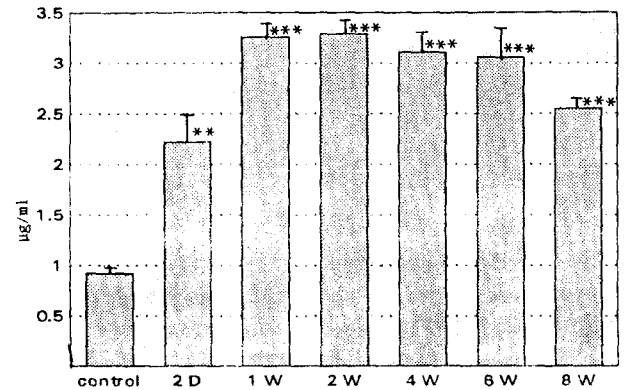


Fig. 1. Blood concentration of lead after oral administration of 0.5% lead acetate. Each value represents the mean ± SE of 5 rats. Significantly different from the control (**; p<0.01, ***; p<0.001).

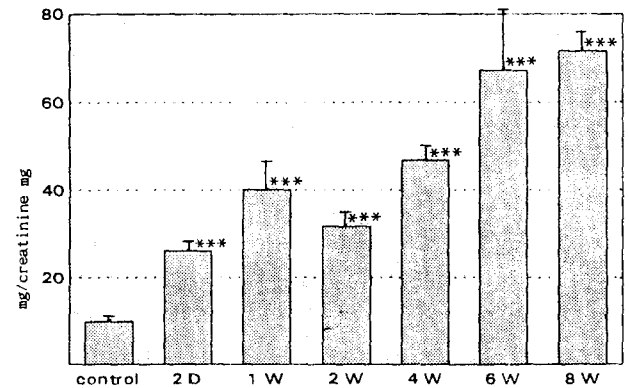


Fig. 2. Urinary concentration of δ-Aminolevulinic acid after oral administration of 0.5% lead acetate. Significantly different from the control (**; p<0.001).

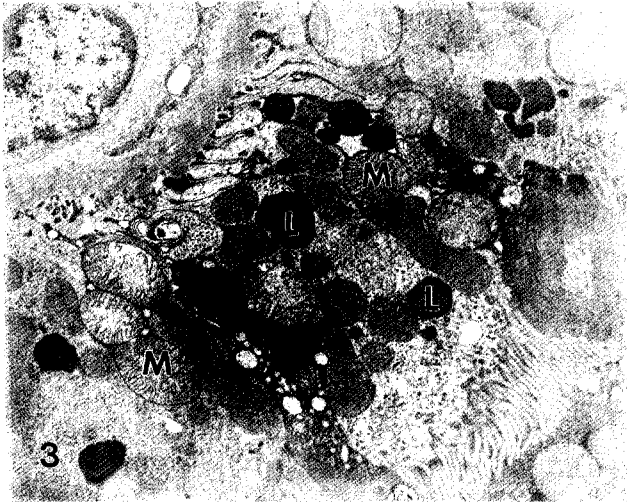


Fig. 3. Six weeks after lead acetate oral intake. The mitochondria (M) are edematous and the secondary lysosomes (L) are increased in numbers (TEM, $\times 10,200$).



Fig. 4. Six weeks after lead acetate oral intake. Numerous myelin figure-like residual bodies (RB) are seen in the cytoplasm of the proximal tubule cell (TEM, $\times 6,800$).

깨로 막질하고 toluidine blue 염색을 하여 관찰부위를 결정한 다음, 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont 나이어몬드 칼을 부착하여 회백색(40~60 nm)의 간접색을 나타내는 초박절편을 얻어 grid에 부착하여 Watson(1958) 및 Reynold방법(1963)에 의해 이중전자 염색후 관찰하였다.

5. 신장조직중 oxygen free radical의 조직화학적 관찰

실험동물을 ether 마취하에서 복강을 절개하고 심장에 0.3 ml heparin 투여 후 복대 동맥에 튜브를 밀어넣고 실로 묶는다. 대동맥을 묶고 100% 산소로 포화된 0.9% 생



Fig. 5. Control. The high manganese diamine stain of the kidney shows unremarkable change of the tubules ($\times 100$).



Fig. 6. Six weeks after lead acetate oral intake. Oxygen free radical is seen in the endothelial cells of the blood vessels (arrow) ($\times 400$).

리식염수 100 ml로 관류를 시작하면서 하대정맥을 자르고 high manganese/diamine buffer(HMD; 40 mM Magnanese chloride, 40 mM Trisodium citrate, 2 mM CaCl_2 , 4 mM KCl, 4 mM Tris(hydroxymethylaminomethane), 1 mM NaN_3 , 2.8 mM diaminobenzidine 및 0.1 mM allopurinol)로 3분간 관류하였다(40 mmHg). 이어 2.5% cold glutaraldehyde(GA)로 3분간 관류한 후 신장을 적출하고 2.5%의 cold GA용액에 24시간 고정한다 다음 $4\ \mu\text{m}$ 두께의 파라핀 절편을 만들어 hematoxylin이나 toluidine blue에 대조염색을 하여 갈색의 침착물을 관찰하였다.

6. 신장조직중 효소활성 측정

1) 효소시료의 조제

신장조직을 병냉하에서 절편을 만들고 그중 일정량에 4배량의 0.25 M sucrose용액을 가하여 glass teflon homogenizer로 20%(W/V) 마쇄관절액을 만들었다. 이 균질액을 $600\times g$ 에서 10 분간 원심분리하고 핵 및 미 마쇄부

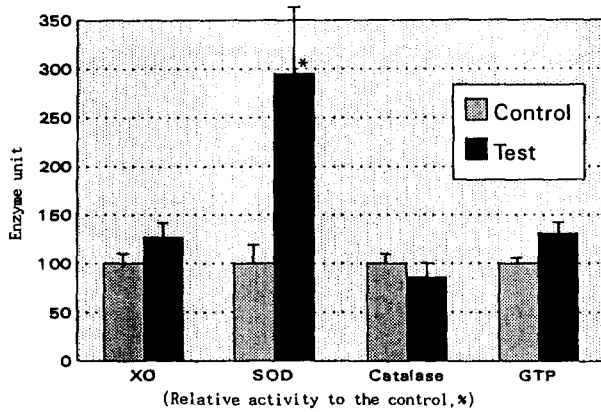


Fig. 7. Effect of lead acetate on the enzyme activity in rats. Each value represents the mean \pm SE of 10 rats. Significantly different from the control (*; $p < 0.05$).

분을 제거한 다음, 상층액을 10,000 \times g에서 20 분간 원심 분리하여 mitochondria 분획을 얻고 그 상층액을 105,000 \times g에서 1 시간 동안 원심분리하여 cytosol과 microsome분획을 얻었다.

2) 효소 활성도 측정

신장조직에 있어서 cytosol 분획의 XO활성은 Stirpe와 Della Corte(1969)법, SOD 활성은 Martin등(1987) 방법 및 GTP 활성은 Paglia 등(1967) 방법에 의하여 측정하였으며 mitochondria 분획중 catalase 활성은 Aebi(1974) 방법에 의하여 측정하였다.

3) 혈중 납 농도측정 및 요중 δ -aminovulnic acid (ALA) 측정

혈중 납 농도는 Stahr(1991) 방법에 따라 ICP(inductively coupled plasma)로 측정하였으며, 요중 ALA 함량은 n-butanol로 ALA를 추출하여 Wada 방법(1969)에 하였다.

III. 결 과

1. 혈중 납 농도 및 요중 ALA 함량

전 실험기간 동안 혈중 납 농도에 있어서는 대조군 1.2 μ g/ml 내외이었고 초산납 투여 2주째에는 대조군에 비하여 약 2.9배의 유의한 증가를 보였으며 이후 대체적으로 유사한 농도를 유지하였다(Fig. 1). 한편 요중 ALA 함량은 대조군에서는 약 10 mg/creatinine mg이었고 이후 8주째 전실험 기간을 통하여 점진적인 증가를 보였다(Fig. 2).

2. 광학 및 전자현미경 소견

전실험 기간중 신장조직의 광학 및 전자현미경적 소견에서 대체적으로 근위극 세뇨관에서 변화가 관찰되었으며 6주째 실험군에서 가장 심한 organelles의 손상이 보였다. 실험군에서의 전자현미경적 소견은 주로 근위극 세뇨관에서 mitochondria와 내형질세망의 종창(Fig. 3), secondary lysosome의 증가 및 수초양 잔류체(myelin figure-like residual body)가 관찰되었다(Fig. 4). 광학현미경적 소견상 oxygen free radical을 감지하기 위한 HMD 염색에서 대조군은 별다른 변화가 관찰되지 않았으나(Fig. 5) 실험군에서는 진한 갈색의 색소가 혈관 주위에 침착되었다(Fig. 6).

3. 효소활성 변동

비교적 신장조직의 손상이 심하게 관찰된 6주째에 있어서 신장조직중 free radical생성 및 해독에 관련된 효소 활성을 나타낸 것이 Fig. 7과 같다. XO활성은 대조군에 비하여 약 27% 증가 되었으며 catalase 활성은 대조군과 실험군간에 별다른 차이를 볼 수 없었다. 간조직중 GTP 함량은 대조군에 비하여 실험군은 약 32% 증가되었다. 그리고 SOD 활성은 실험군이 대조군 보다 약 3배의 유의한 증가를 보였다.

IV. 고 찰

본 실험에서 초산납 투여한 6주째 신장조직학적 소견에서는 근위세뇨관 세포의 mitochondria 종창, ER확장, 이차리소솜의 증가, 수초양 잔류체 출현등의 세포상해의 양상이 관찰되었다. 이 결과는 Farhad(1992) 등의 보고와 유사하였다.

납에 의한 세포상해 기전은 납의 단백질의 sulfhydryl기와의 친화성(Cotran 등 1989)과 납에 의하여 δ -aminolevulinic acid dehydrogenase(δ -ALAD)와 ferrochelatase 활성저하로 δ -ALA 함량 증가에 따른 oxygen free radical의 증가로 인하여 세포상해가 초래된다고 한다(Hermes 등 1991).

본 연구에서 초산납 투여 2주 이후에 혈액중 납의 농도가 유의하게 증가되었다. 이는 신장조직에 납의 폭포를 시사해 주고 있으며 본 논문에는 제시되지 않았으나 신장조직중 납의 침착을 Timm sulphide 반응을 시도한 전자현미경 소견으로 확인되었다. 또한 요중 ALA 함량 역시 전 실험기간 동안 점진적인 증가를 보였으며 초산납 투여 6주째부터는 현저한 증가를 보였다. 따라서 요중

ALA 함량 증가와 oxygen free radical 생성과의 관련성에 대한 가설을 증명하기 위하여 본실험에서 신장조직중 oxygen free radical을 HMD염색에서 조직화학적으로 확인하였다.

한편 Matteo(1988) 및 Cotran(1989)의 보고에 의하면 납에 의한 세포상해시 mitochondria내 산화적인 산화의 기능이 저하되어 ATP 생성이 감소된다는 보고와 ATP가 감소하면 oxygen free radical 생성에 관여하는 XO의 활성이 증가된다는 점(Yonetani 등 1977)을 고려해 볼 때 납 투여시 oxygen free radical에 의한 신장손상은 신장조직중 XO효소 활성과도 관련성이 있다고 생각된다. 본 실험에서 납 투여시 xanthine oxidase활성이 대조군 보다 높게 나타난 결과가 이를 뒷받침해 주고 있다. 일반적으로 oxygen free radical에 의한 세포상해는 이들 유해산소의 generating 및 scavenging system의 불균형으로 초래되기 때문에 본 실험에서 유리산소 해독에 관여하는 SOD 활성을 측정할 결과 대조군에 비하여 실험군에서 오히려 유의하게 증가되었으나 신조직중 GTP 및 catalase활성은 대조군과 실험군에서 별다른 차이를 볼 수 없었다. 따라서 신장조직중 상당한 양의 free radical이 존재하고 있음을 암시해주고 있으며 이로 인하여 세포손상이 초래되는 것으로 생각된다. 그리고 본 실험조건에서 신장조직중 SOD 활성이 현저히 증가된 것은 oxygen free radical의 기질유도성에 기인된 결과로 생각된다.

이상 실험결과와 문헌을 종합하여 볼때 초산납 투여시 신장세포의 상해는 δ -ALA 축적과 더불어 xanthine oxidase 활성증가로 인한 산소유리기의 생성증가에 기인된 결과로 생각된다.

V. 요 약

납에 의한 신장손상의 기전을 규명하는 일환으로 흰쥐에 초산납 (0.5%)을 8주까지 음용시킨 다음 경시별로 처치한 후 요중 ALA 농도와 혈중 납 농도를 측정함과 동시에 신세포의 초미형태학적으로 관찰하여 신세포의 손상을 관찰하였다. 또한 신세포의 oxygen free radical을 조직화학적으로 확인한 후 oxygen free radical의 대사에 관련된 효소 활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

초산납 투여후 2일째부터 혈중 납농도가 유의하게 증가되었으나 이때 요중 δ -ALA 농도 역시 전 실험기간 동안 점진적인 증가를 보였으며 6주째 부터 현저한 증가를 보였다. 또한 초산납 투여 6주째 전자현미경상에는 mitochondria와 ER의 종창등이 보였고 산소유리기의 염색에서는 양성 반응을 나타내었으며 이때 신조직중 xanthine oxidase 활성이 대조군에 비하여 증가되었으며 su-

peroxide dismutase 활성은 대조군 보다 현저히 증가되었다. Catalase 및 glutathione peroxidase 활성은 초산납 투여군과 대조군간에는 별다른 차이를 볼 수 없었다.

이상 실험결과를 종합해 볼 때 납에 의한 신장손상은 oxygen free radical에 기인된결과로 생각된다.

참고문헌

- Aebi H. (1974): Catalase in "Method of Enzymatic Analysis" (H.V. Bergme yer, eds), Academic press, New York, Vol. 2. pp. 673-684.
- Budavarie S. (1989): Merck index, ed 11. Rahway, Merck & Co., Inc., pp. 851-854.
- Charles F.B., Meloney D.C., John J.T., Stephen F.B. and William A.H. (1991): Methods in laboratory investigation. Endothelial superoxide production in bupper perfused rat lungs, demonstrated by a new histochemical technique, **65** (4) : 484-496.
- Cotran R.S., Kumar V. and Robbins S.L. (1989): Robbins pathologic basis of disease, ed 4. Philadelphia, W.B. Saunders Co., pp. 492-494.
- Cotran R.S., Kumar V. and Robbins S.L. (1989) :Robbins pathologic basis of diseases 4th ed. W.B. Saunders Company, pp 4-8.
- Galle P., Morel-Maroger L. (1965): Les l sions r nales du Saturnisme humain et exp rimental. *Nephron*, **2**, 273-286.
- Goyer R.A., Leonard D.L., Moore J.F., Rhyne B.C. and Krigman M.R. (1970): Lead dosage and the role of the intranuclear inclusion body. An experimental study. *Arch Environ Health*, **20**, 705-711.
- Goyer R.A., May P., Cates M., Krigman M.R. (1970) : Lead and protein content of isolated intranuclear inclusion bodies from kidneys of lead poisoned rats. *Lab Invest*, **22**, pp. 245-251.
- Heptinstall R.H. (1992) :Pathology of the kidney, ed 4. Boston, Little, Brown and Company, pp. 2098-2106.
- Hermes-Lima M, Pereica B. and Bechara E.J. (1991): Are free radicals involved in lead poisoning Xenobiotica, **21**, 1085-1090.
- Hermes-Lima M., Valle V.G., Vercesi A.E. and Bechara E.J. (1991): Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: Connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochem Biophysic Acta*, **1056**, 57-63.
- Kissane J.M. (1961): Anderson's pathology, ed 8. St. Louis, Mosby Co., 1985, pp. 200-201.
- Luft J.H. (1961): Improvement in epoxy resin emb-

- edding method. *J Biophysic Biochem Cytol*, **9**, pp. 409-417.
- Martin J.P., Dailey M. and Sugarman E. (1987): Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys*, **255**(2), pp. 329-336.
- Matteo A.R., Shiv C.K. and George D.V. (1988): Localization of lead in the kidney and liver of rats treated in vivo with lead acetate: Ultrastructural studies on unstained sections. *Br J Exp Pathol*, **69**, pp. 221-234.
- Paglia E.A. and Valentine W.N. (1967): Studie, on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathion peroxidase. *J Lab Clin Med*, **70**, pp. 158-169.
- Reynolds E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**, pp. 208-212.
- Stahr H.M. (1991): Analytical methods in toxicology. New York, John Wiley & Sons Inc., pp. 55-57.
- Stirpe F. and Della Corte E. (1969): The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem*; **244**(14), 3855-3863.
- Wada O, Toyokawa K, Urata G, Yano Y. and Nakao K. (1969): A simple method for the quantitative analysis of urinary delta-aminolevulinic acid to evaluate lead absorption. *Br J Ind Med*, **26**, pp. 240-243.
- Wapnir R.A., Moak S.A., Lifshitz F. and Teichberg S. (1979): Alterations of intestinal and renal functions in rats after intraperitoneal injections of lead acetate. *J Lab Clin Med*, **94**, pp. 144-151.
- Watson M.L. (1958): Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophysic Biochem Cytol*, **6**, pp. 475-479.
- Yonetani Y. Ishii M., Yamada K. and Ogawa Y. (1977): Origin of plasma uric acid induced by l-epinephrine. *Chem Pharm Bull*, **25**(3), pp. 457-463.
- Yoon C.G. (1984): A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal* (Keimyung Junior College), **2**, pp. 295-308.
- Yonetani Y. Douzaki T. and Ogawa Y. (1977): Epinephrine-induced hyperuricemia in experimental animals. *Chem Pharm Bull*, **25**, pp. 441-447.