

랫드의 神經組織에 미치는 tellurium의 毒性에 관한 研究

金基錫 · 鄭文鎬*

국립독성연구소, *서울대학교 保健大學院

A Study on the Neurotoxic Effects of Tellurium on Murine Nervous System

Ki Sok Kim and Moon Ho Chung*

National Institute of Toxicological Research

*Graduate School of Public Health, Seoul National University

ABSTRACT

This study was conducted to examine the pathological changes of rat peripheral nervous system during exposure to tellurium known to be a demyelinating agent by using teasing nerve fiber method and quantitative light microscopic analysis by image analyzer. The pellet containing 1.2% of tellurium were fed for 3, 5, 7, 9, 13 days to male wistar rats (21 days old) and then neurologic symptom and the feature of nerve fiber myelination were studied. From this study, following results were obtained. In 3 days treated group, it showed various neurologic symptom and teased nerve fiber showed slight irregularity of the myeline sheath. In 5 days and 7 days treated groups, it showed the segmental demyelination in larger size fiber and widening of nodes of ranvier. In 9 days and 13 days treated groups, the remyelinated fibers were observed and it was generally small in size. We consequently suggest that teasing nerve fiber method and quantitative analysis of nerve fiber were useful pathologic screening method of neurotoxicity of the peripheral nervous system.

Keywords : Tellurium, Segmental demyelination, Teasing nerve fiber, Quantitative analysis

I. 서 론

금속은 인간의 생체에 필수적이면서도 각종 산업 활동에 유용하게 이용되어 왔지만 여러 경로에 의한 환경오염금속에 폭로되는 인간에 대한 보건학적 위협을 주고 있다. 이러한 금속 중 탈수초화 물질로 알려진 tellurium은 원소주기율표 6a군에 속하고 selenium과 함께 자연계에 널리 분포되어 있으며 의학, 생물학분야를 비롯한 다양한 산업용으로 사용되고 있어서 폭로의 기회가 날로 증가되고 있다. 주된 폭로원은 대부분 산업장에서 발생하는 흙에 의한 것이지만 사고에 의한 섭취도 일부 보고되고 있다.

Tellurium의 독성기전은 squalene epoxidase 수준에서 cholesterol 합성저해와 myelin Po 단백질에 대한 mRNA 발현 수준 저하에 기인하고 있으며¹⁾ nerve growth factor receptor에 대한 mRNA 발현 증가가 이러한 tellurium에 의해 유발되는 수초의

손상과 재생에 대한 분자수준의 민감한 marker가 될 수 있다는 보고도 있다.²⁾

Tellurium에 의한 독성은 신경계, 호흡기계, 심혈관계, 소화계, 비노생식기계, 피부 등에서 다양하게 나타나지만 신경계에 미치는 독성이 가장 대표적이어서 신경독성에 대한 병리학적 과정을 규명하는데 중요한 역할을 한다. Tellurium을 21일령된 wistar계 수컷 랫드에 투여하면 신경증상으로서 마비가 관찰되고 병리학적으로 분절 탈수초화가 관찰된다고 보고되어 있는데 이러한 tellurium의 독성은 말초신경에서 schwann세포에 주로 나타나고 축삭에는 영향을 나타내지 않는다고 하였지만 최근의 연구에 의하면 축삭에도 영향을 미친다는 주장도 있다.³⁾

신경조직의 병리학적 변화, 특히 말초신경의 waller변성, 축삭변성, 탈수초화 등의 병변을 연구하기 위해서 신경분리법이 이용되는데 이는 말초신경의 기본적 병리학적 검색법으로 파라핀 절편이나

플라스틱 절편에 비해 감수성이 높고 간단하면서도 신경섬유를 포괄적으로 관찰할 수 있다.⁴⁾ 또한 신경 손상과 재생의 정량적 분석을 위한 화상분석기³⁾를 이용한 연구가 진행되어 왔다.^{5,7)}

이에 본 연구에서는 tellurium에 의한 말초신경의 병변에 대한 병리학적 과정을 규명하기 위해 랫드에 tellurium을 투여하여 말초신경 병변에 의한 증상을 관찰하고 신경분리법과 화상분석기를 이용하여 신경 조직 손상을 정량적으로 분석하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험동물 및 투여물질

실험동물은 출생 21일령된 SPF Wistar계 수컷 랫드를 사용하였다. 고형사료(실험동물용, 신촌사료(주)) 및 수돗물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물사육조건은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 환기횟수 15회/hr, 명암교대 12시간(조명/7:00-19:00)으로 하였다. 투여물질인 tellurium은 aldrich사(cat. no: 13494-80-9)에서 입수하였다

2. 처치

실험동물을 투여 3일, 5일, 7일, 9일, 13일군 각 10마리씩 총 5개군으로 나누고 각 군마다 5마리에게 tellurium이 함유된 고형사료를 공급하였으며 나머지 5마리는 정상적인 사료를 공급하는 대조군으로 하였다. Tellurium은 분말 사료에 1.2% 농도로 혼합하여 고형사료제조기에 의해 제조하였으며 부검 전까지 모든 동물에게 무제한적으로 고형사료를 제공하였다. 각 군별로 투여 기간 후 실험동물의 흉곽을 절개하고 우심을 절개한 후 좌심실을 통하여 3% glutaraldehyde 및 1% paraformaldehyde 혼합액으로 관류한 후 좌골신경을 적출하였다.

3. 신경증상 관찰

Tellurium 투여 기간에 따른 신경증상의 정도를 관찰하기 위해 실험동물 26마리에 tellurium을 투여

Grade	Symptoms
0	Normal
1	Clumsy walking
2	Toe spread(±) & moderate difficulty in walking
3	Total toe spread & difficulty in walking
4	Total paralysis

하여 3일, 5일, 7일, 9일, 13일 후의 신경증상 정도를 다음의 5등급으로 나누었다.

4. 신경분리법

적출된 신경조직을 Dalton용액에 하루동안 고정 및 염색을 시행하고 7.5%, 15%, 30% 및 60% glycerin용액에 순서대로 매 2시간마다 연속적으로 처리하여 역상 현미경하에서 분리하여 관찰하였다.

5. 화상분석기를 이용한 정량적 측정법

적출된 신경조직을 OSO₄에 염색하고 epon에 포매한 후 1 μm두께로 박절하여 toluidine blue에 염색하고 화상분석기를 사용하여 각 군의 대조군과 투여군의 손상 받지 않은 신경섬유 수와 손상받지 않은 신경섬유의 수초두께, 축삭두께를 각각 측정하였다.

6. 통계처리

실험을 통해 얻은 자료는 각 평균치와 표준편차를 구하여 사용하였다. 통계적 유의성 검정은 SAS 프로그램을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 투여군과 대조군간에 Student t-test를 실시하였다.

III. 결 과

1. 신경증상 관찰결과

투여 3일째부터 다양한 정도의 신경증상이 나타나기 시작하여 투여 5일째 대부분 신경마비를 나타내는 가장 심한 신경증상을 보였지만, 투여 7일째부터 증상이 회복되기 시작하여 투여 13일째는 완전히 회복되는 개체도 관찰되었다(Table 1).

2. 신경섬유의 분리결과

투여 3일째는 단순히 수초면의 불규칙한 관찰되었

Table 1. No. of rat distribution according to paralytic grade after tellurium treatment

Paralytic grade	Duration of treatment (day)				
	3	5	7	9	13
Normal	0	0	0	0	8
Clumsy walking	6	0	0	7	12
Toe spread(±) & moderate difficulty in walking	5	0	13	17	6
Total toe spread & difficulty in walking	6	3	9	2	0
Total paralysis	9	23	4	0	0

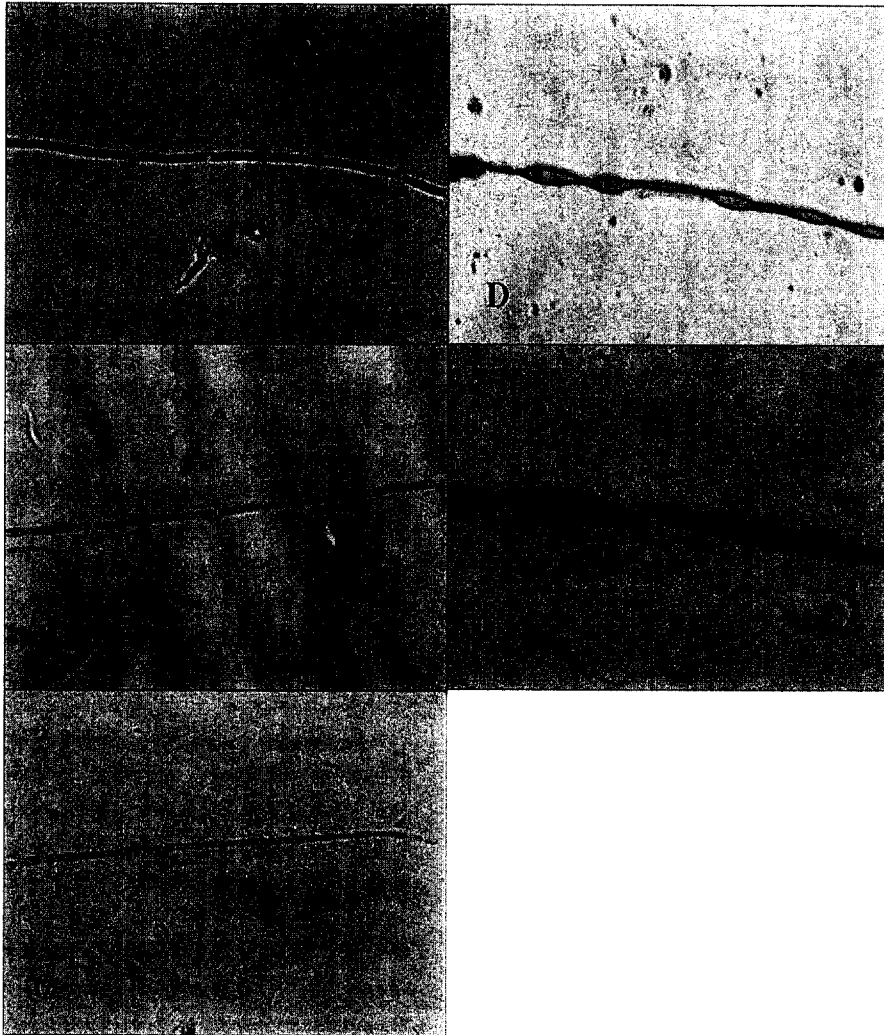


Fig. 1. Teased nerve fiber preparation from rat sciatic nerve.

- A) Control, teased nerve fibre showing normal myelin sheath and ranvier nodes.($\times 200$)
 B) On 3 days tellurium treated group, teased nerve fibre showing slight irregularity of the shape of the myelin sheath.($\times 200$)
 C) On 5 days tellurium treated group, teased nerve fibre showing widening of the nodes of renvier.($\times 200$)
 D) On 9 days tellurium treated group, teased nerve fibre showing presence of ovoids and balls of myelin all along the fibre.($\times 400$)
 E) On 13 days tellurium treated group, teased nerve fibre showing beginning of remyelination.($\times 200$)

고 투여 5일째는 넓어진 ranvier절을 보이는 분절 탈수초화가 관찰되었지만 수초면의 심한 불규칙은 관찰되지 않았다. 투여 7일째와 9일째는 심하게 진행된 반원형의 수초가 관찰되었고 투여 13일째 일부에서 탈수초화된 분절사이를 가늘게 연결하는 수초의 재생이 관찰되었다(Fig. 1)

3. 화상분석기를 이용한 형태학적 변화의 정량적 측정결과

투여 5일째부터 손상되지 않은 신경섬유수가 감소하기 시작하여 투여 7일째 가장 많이 감소하였고 투여 9일째부터는 다시 증가하기 시작하였다(Fig. 2). 7일 대조군과 투여군에서 수초두께의 분포를 비교해

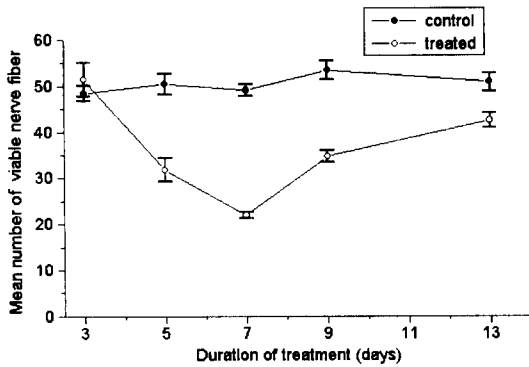


Fig. 2. Mean number of viable nerve fiber according to duration of tellurium treatment. Results are shown as mean and S.D.

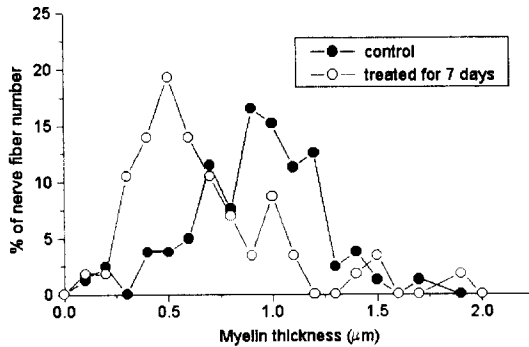


Fig. 3. The difference of % of nerve fiber number according to myelin thickness between 7 days control group and 7 days tellurium treated group.

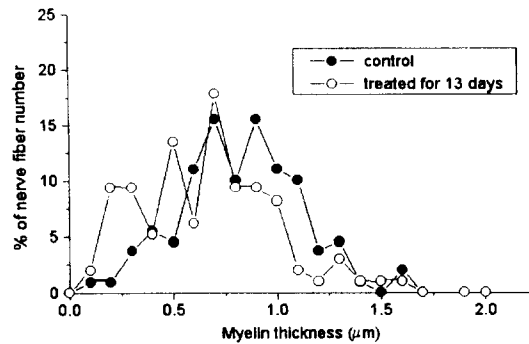


Fig. 4. The difference of % of nerve fiber number according to myelin thickness between 13 days control group and 13 days tellurium treated group.

보았을 때 7일 대조군에 비해 7일 투여군에서 수초의 두께가 작은 신경섬유의 상대적인 비율이 높은

것으로 보아 두꺼운 수초가 더 많이 손상되었다 (Fig. 3). 수초가 재생될 때인 13일째에 수초의 두께를 비교해 보았을 때 13일 대조군에 비해 13일 투여군에서 수초의 두께의 평균값이 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하는 것으로 수초의 두께는 가늘게 재생되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

IV. 고 찰

수초는 축삭돌래를 원통상으로 둘러싸는 껍질로써 그 두께는 신경섬유의 종류에 따라 다르다. 수초화의 시작은 사람에 있어서 발생 18주에 sural nerve에서 관찰되며 출생 후 5세 이전에 완성된다고 알려져 있다.⁶⁾ 또한 마우스 및 랫드에서는 출생 2주말 이후에는 수반세포의 증식이 관찰되지 않는다고 알려져 있다.⁸⁾ 수초에 손상을 가져오는 의약품이나 화학물질들은 hexachlorophene,⁹⁾ isoniazid,¹⁰⁾ lead, tellurium, lysolethicin, chronic sodium cyanate 등이 있는데 그 중에서 tellurium, lead, hexachlorophen 등은 분절 탈수초화를 일으키는 수초손상을 가져온다.

Tellurium을 여러 실험동물에 투여함으로써 연구되어져 왔는데 임신한 랫드에게 투여했을 때, 그 태아가 골격과 soft tissue에 기형과 수뇌증을 보이며¹¹⁾ 성숙된 랫드에게 투여했을 때는 중추신경계에 영향을 끼치지 않는다고 알려져 있으나 대뇌 회백질에 tellurium침착이 관찰된다고 하였다.¹²⁾ 이유기 때에 투여했을 때 좌골신경의 분절 탈수초화에 의해 후구마비가 일어나게 되는데 이 말초신경의 손상은 수초화가 완성된 무렵인 출생 제 15-25일 사이 투여 시 야기된다고 하였다.¹³⁾ Said 및 duckett¹⁴⁾는 랫드에 tellurium을 투여하면 어린 랫드에서 성숙된 랫드에서 보다 더욱더 신경손상을 일으키며 그 이유는 어린 랫드에서는 tellurium에 대한 혈액, 신경 투과성이 높기 때문이라고 하였다. 이유기 랫드에게 투여했을 때 tellurium을 탈수초화가 일어난 후에 투여를 중지한 경우가 계속 투여한 경우보다 더 빨리 재수초화가 일어나지만 3일째 가장 심한 후구마비가 관찰되고 계속 투여하더라도 9일째 되는 날 운동신경이 거의 회복된다고 하였는데 본 실험에서는 투여 3일째 완전한 마비에서 미약한 변화까지 여러 정도의 신경증상이 동시에 나타나고 투여 5일째 되어서야 거의 대부분에서 완전한 후구마비가 관찰되었으며 투여 7일째부터 회복되기 시작하였는데 후구마비가

시작되는 때보다 비교적 많은 예에서 동시에 신경증상 회복을 보였는데 이는 신경증상의 발현과정에서 개체의 차이에서 기인하는 것으로 생각되어졌다. 본 실험에서는 toe spread가 거의 동시에 일어나고, 완전히 후구마비가 나타났는데 신경독성물질에 의한 말초신경 손상이 물리적인 손상보다 더욱 급격한 것으로 생각되어졌다.

말초신경의 신경분리법은 진행중인 탈수초화와 수초의 재생과정을 관찰할 수 있고, 섬유를 포괄적으로 관찰할 수 있으며, 면역조직화학적 염색법을 도입할 수 있는 방법도 비교적 간단하여 말초신경 수초병변을 관찰하기 위한 기본적인 병리학적 검색법으로 가장 적합한 것으로 이러한 신경분리법을 이용한 말초신경 연구가 꾸준히 이루어져왔다. 신경분리법에 의한 말초신경의 변화에 대해서 isoniazid를 투여한 경우 축삭과 수초가 동시에 변성을 보여 waller변성과 유사한 소견을 보였지만¹⁵⁾ 본 실험에서는 신경분리상 뚜렷한 축삭변성이 관찰되지 않았는데 광학현미경하에서 주로 수초병변으로 생각되어졌다. 본 실험에서 대부분의 신경섬유의 탈수초화는 투여 5일째 가장 많았고 투여 13일째에 분명한 재생섬유가 관찰되었는데 더 많은 예에서 전 신경섬유의 정량적인 관찰과 임상증상과의 연관성을 연구하는 것이 신경분리법을 이용해서 신경손상의 정도를 정확히 예측하는데 필요하리라 생각된다.

화상분석기를 이용하여 말초신경변화에 대한 조직계측학적 연구도 수행되어져 왔다.¹⁵⁾ 화상분석기를 이용한 연구에서 internodal length가 슈만세포의 손상에 대한 민감도가 증가한다고도 하였으며³⁾ 손상에 대한 생화학적 분석(myelin-specific Po protein의 농도)을 보면 5일째 손상이 가장 심하고 그후에 재수초화가 시작되어 30일 후에는 정상으로 돌아온다고 하였다.¹⁶⁾ 본 실험에서는 임상증상이 5일째 가장 심한 것과 달리 광학현미경상 7일째 손상된 신경섬유수가 가장 많았다. 이것은 임상증상이 형태학적 변화에 선행되는 것으로 생각되었는데 said 등¹⁴⁾은 오히려 분절 탈수초화가 먼저 일어난 다음 마비증상이 나타난다고 하였는데 개체별 각각의 형태학적 연구가 더 필요하리라 생각된다. Bouldin 등³⁾은 직경이 큰 신경섬유에서 더 손상을 받는다고 하였는데 본 실험에서도 가장 손상이 심한 7일 투여군에서 직경이 큰 신경섬유에서 더 많이 손상을 받은 것이 관찰되어 직경이 작은 신경섬유 손상 때보다 더 심한 신경증상을 예측할 수 있었다. isoniazid

를 투여한 경우에서 관찰된 바와 같이 본 실험에서도 투여 13일째에도 수초의 두께가 상대적으로 얇은 점으로 보아 수초의 발생 때와 같이 재생이 계속 진행중임을 알 수 있었다.

따라서 말초신경의 수초손상에 대한 병리학적 검색법으로 말초신경의 수초손상의 소견 관찰에 가장 적합한 신경섬유 분리와 화상분석기를 이용한 손상과 재생의 정도에 대한 정량적 측정이 앞으로 독성물질에 의한 말초신경손상에 대한 독성학적 평가에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

Tellurium에 의한 말초신경의 병변에 대한 병리학 과정의 규명하기 위해 랫드에 tellurium을 투여하여 말초신경 병변에 의한 증상을 관찰하고 신경분리법과 화상분석기를 이용하여 신경 조직 손상을 정량적으로 분석한 결과는 다음과 같다.

Tellurium의 경구투여에 의해 백서의 말초신경에서 투여 3일째 초기손상, 투여 5, 7일째 수초의 파괴, 투여 9, 13일째 수초의 재생이 관찰되었다. 신경섬유 분리법 및 화상분석기를 이용해 독성물질에 의한 말초신경 손상의 초기병변, 포괄적인 수초손상 및 이들 손상정도들을 정량적으로 측정할 결과 투여 5일째부터 손상되지 않은 신경섬유수가 감소하기 시작하여 투여 7일째 가장 많이 감소하였고 투여 9일째부터는 다시 증가하기 시작하였다. 또한 수초의 두께는 두께운 것이 더 많이 손상되었다. 수초가 재생될 때인 13일째에 수초의 두께를 비교해 보았을 때 수초의 두께는 가늘게 재생되는 것을 알 수 있었다

위의 결과들로부터 신경섬유 분리와 화상분석기를 이용한 손상과 재생의 정도에 대한 정량적 측정이 앞으로 독성물질에 의한 말초신경손상에 대한 독성학적 평가에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Toews, A.D., Roe, E.B., Goodrum, J.F., Bouldin, T. W., Weaver, J., Goines, N.D. and Morell P.: Tellurium causes dose-dependent coordinate down-regulation of myelin gene expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **49**(1-2), 113-119, 1997.
- 2) Morell, P. and Toews, A.D.: Schwann cells as targets for neurotoxicants. *Neurotoxicology*, **17**(3-4), 685-695, 1996.

- 3) Bouldin, T.W., Samsa, G., Earnhardt, T.S. and Krigman, M.R.: Schwann cell vulnerability to demyelination is associated with internodal length in tellurium neuropathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **47**, 41-47, 1988.
- 4) Griffin, J.W.: Basic pathologic processes in the nervous system. *Toxicologic Pathology*, **18**(1), 619-623, 1990.
- 5) Lincini, A., England, J.D., Rhee, E.K., Duckett, S. W. and Sumner, A.J.: Tellurium-induced demyelination: An electrophysiological and morphological study. *Muscle & Nerve*, **11**, 871-879, 1988.
- 6) Shetty, V.P. and Antia, N.H.: Myelination around multiple axons in the peripheral nerve an unusual ultrastructural observation. *Acta Neuropathol*, **50**, 147-151, 1980.
- 7) Wisniewski, H. and Raine, C.S.: An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. V: Central and peripheral nervous system lesions caused by diphtheria toxin. *Laboratory Investigation*, **25**, 73-80, 1971.
- 8) Webster, H.D.: The Geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves. *The Journal of Cell Biology*, **4**, 348-367, 1971.
- 9) Towfighi, J., Gonatas, N.k. and Mccree, L.: Hexachlorophene neuropathy in rats. *Laboratory Investigation*, **29**, 428, 1973.
- 10) Jacobs, J.M., Miller, R.H., Whittle, A. and Cavanagh, J.B.: Studies on the early changes in acute isoniazid neuropathy in the rat. *Acta Neuropathol*, **47**, 85-92, 1979.
- 11) Johnson, E.M., Christian, A.M., Hoberman, C.J., Kilpper, D.R. and Mermelstein, R.: Developmental toxicology investigation of tellurium. *Fundamental and Applied Toxicology*, **11**, 691-702, 1988.
- 12) Walbran, B.B. and Robins, E.: Effects of central nervous system accumulation of tellurium on behavior in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, **9**, 297-300, 1978.
- 13) Tatsuro, T.: Experimental study on segmental demyelination in tellurium neuropathy. 복해도의 학잡지, **56**(2), 104-131, 1981.
- 14) Said, G., Duckett, S. and Sauron, B.: Proliferation of schwann cells in tellurium-induced demyelination in young rats. *Acta Neuropathol*, **53**, 173-179, 1981.
- 15) 박중경: Isoniazid로 인한 말초신경의 변화에 대한 조직학적 및 조직계측학적 연구. 연세대학교 학위논문집, 1985.
- 16) Harry, G.J., Goodrum, J.F., Bouldin, T.W., Wagner-Recio, M., Toews, A.D. and Morell, P.: Tellurium-Induced neuropathy: Metabolic alterations associated with demyelination and remyelination in rat sciatic nerve. *Journal of Neurochemistry*, **52**, 938-945, 1989.