

수은으로 중독된 흰쥐의 간독성에 대한 키토산의 효과

노영복, 윤중식, 정경아, 정민주, 김영호
조선대학교 자연과학대학 생물과학부

Effects of Chitosan on the Mouse Hepatotoxicity Toxicated by Mercury

Young-Bok Roh, Jung-Sik Yoon, Kyung-Ah Chung,
Min-Ju Chung and Young-Ho Kim

Department of Biological Science, College of Natural Science, Chosun University
(Received April 8, 2001)

ABSTRACT

This study aims demonstrate the effect of chitosan, one of the natural chelator, on the ultrastructural changes in the mouse liver caused by $HgCl_2$.

The experimental group was divided in two groups; group A and group B. The group A administrated $HgCl_2$ (5.0 mg/kg) to the oral. The group B treated with $HgCl_2$ (5.0 mg/kg) and chitosan (3% solution, 2 times/day). Each group was observed 24, 48, 72 and 96 hours after treated $HgCl_2$ and chitosan.

Histological changes of the livers were investigated by electron microscope.

1. Group A

Nuclear membrane was shranked. The inner and outer membrane of the mitochondria were dilated. Destruction of lamellae of rough endoplasmic reticulum showed. Smooth endoplasmic reticulum showed over cytoplasm.

2. Group B

Nuclear membrane was more rounded, The cristae of the mitochondria were almost normal shape and electron-density showed compacted. Dilation of inner cavity of rough endoplasmic reticulum showed at the pre-time but formed typical lamellae at the 48Hrs. Smooth endoplasmic reticulum showed over cytoplasm.

Therefore, we concluded that chitosan has significantly protective effects in liver to harmful $HgCl_2$.

Key words : Chitosan, $HgCl_2$, Liver, Ultrastructural changes

이 논문은 1999학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

*Correspondence should be addressed to Dr. Young-Bok Roh, Department of Biological Science, College of Natural Science, Chosun University
#375 Seosuk-dong, Kwangju, 501-759, Korea. Ph.: 062-230-6654, FAX: 062-230-4326.

Copyright © 2001 Korean Society of Electron Microscopy

서 론

키틴(chitin)은 셀룰로스(cellulose)와 유사한 화학 구조를 가지고 있으며 환경중에 널리 분포되어 생물체에 의해 연간 1,000억톤 이상이 생성되며 N-acetyl-D-glucosamine β 1 \rightarrow 4 결합에 의해 이루어진 다당류의 일종으로서 사상균, 효모, 오징어, 동물성플랑크톤, 게, 새우 및 곤충 등의 균류 및 갑각류에 많이 분포되어 있다.

최근 국내·외 학자들에 의해서 분자생물학, 식품영양학, 생화학, 생리학, 생명공학적인 면에서 연구가 진행중이며, 일본등지에서는 인공피부(Hirano et al., 1991), 항암작용(Okamoto et al., 1995), 상처치유제(Tsurutani et al., 1995), 키틴분해효소 및 식물세포의 활성화제(Koga, 1993), 화장품(Skjak et al., 1988), 혈중 콜레스테롤 강화제(Sugano et al., 1988), 의약품 전달체(Tokura et al., 1992) 등 여러분야에 걸쳐 활발하게 이용 혹은 연구되고 있다.

키토산(chitosan)은 키틴의 탈아세틸화반응을 통해 유도된 물질로 2-amino-2-deoxy-D-glucose의 단위로 금속이온과 키토산 사이에 2당 잔기당 1개의 아미노기에 1개의 금속 양이온과 2개의 음이온과 1개의 물분자가 배치된 착화모형을 나타내며(Tong et al., 1991; Ogawa and Oka, 1993) 이러한 킬레이팅(chelating) 특성으로 인하여 2가 양이온을 흡착하는 성질이 있어 중금속의 흡착제로서 작용한다(Hall and Yalpani, 1980). 키틴과 키토산의 중금속 흡착능은 아미노기의 함량에 의존하며(Iwakura and Sannan, 1979), Muzzarelli and Spalla(1972)은 키틴과 키토산 칼럼(column)을 이용하여 핵연료수용액중의 방사성동위원소의 흡착에 관한 연구를 수행하여 방사능물질 제거제로써 키토산이 가능하다는 결과를 발표한 바 있다. Sakaguchi et al.(1981)은 인산키토산(chitosan phosphate)를 이용하여 우라늄(UO_2^{2+})을 포함한 다양한 중금속에 대한 흡착 가능 연구를 통해 인산키토산이 우라늄흡착에 가능성이 있음을 밝혔다.

일반적으로 수은은 인체에 직·간접적으로 흡수, 축적되어 독성 및 기타 여러 질병을 유발시켜 이에 대한 심각성이 보고되어져 왔다(John and Klassen, 1975).

1700년대 이후 공업용으로 이용되면서 산업발달에 따른 환경오염에 의하여 수은 중독에 관한 폐해가 지적되었고, 공장폐수에 오염된 물고기나 조개의 섭취로 일본 Minamata 지역에서 발생한 사건으로 더욱 더 사회적인 문제가 되었다(Kurland et al., 1960; Klein et al., 1972; Bakir et al., 1973). 이러한 수은 관련 화합물의 생태계순환을 통해 노출된 농작물 및 해산물의 섭취로 수은중독이 심각한 문제가 되자 수은사용을 금지하거나 억제하고 있는 실정이다(Friberg, 1956).

수은은 흡수, 대사, 배설 및 독성의 화합물 형태에 따라 금속수은, 무기수은, 유기수은 화합물 상태로 분류되고, 체내 흡수경로는 경구 섭취, 흡입, 질점막 및 피부를 통하여 이루어진다(Koos and Longo, 1976). 수은의 독성과 대사작용에 관하여 학자들의 연구보고에 의하면(Rothstein and Hayes, 1960; Takeda and Ukita, 1970; Donaldson and Gubler, 1978; Yannai Sach, 1993), 체내에 흡수된 수은이 혈액 순환을 통해 각 조직으로 이동되며, 특히, 중추신경계, 간장, 신장 등에 축적되어 병리적 장애를 일으킨다고 보고하였다. 무기수은과 유기수은의 중독증상으로는 무기수은의 경우 구토, 설사, 식욕부진, 무기력증, 신기능부전, 구내염 등이 나타나며 유기수은의 경우는 처음에 구순 주변이나 사지말단의 지각이상으로 시작되어 운동실조, 구음장애, 청력장애, 구심성시야협착, 정신장애 등 신경계 장애가 일어난다(Lieutenant et al., 1951; Friberg, 1956; Roman et al., 1978). 본 실험에 사용되어진 염화제이수은($HgCl_2$)은 sulfhydryl group, phosphoryl group 또는 carboxyl group 등에 결합하여 효소활성에 억제적으로 작용하여 주로 간, 신장 및 소화관에 상해를 주며 대사과정이 비교적 빠르게 진행됨이 보고되어졌다(Oliver et al., 1951; Magos, 1976; Ruegg et al., 1987). 지금까지 수은의 저해작용에 대한 보호효과로 여러가지 화학적 착화제를 이용한 연구가 진행되어 동물실험 결과 유효한 착화제로 평가되었지만(Friedlheim and Corvi, 1975; Magos, 1976; Kachru and Tandon, 1986; Nielsin and Andersen, 1991; Shimada et al., 1993; Keith et al., 1997), 이들 화학적 착화제는 자체가 지닌 독성으로 많은 문제가 야기되므로 안정성이 높은 무독성 천연 착화제의 개발이 요구되는 실정이다.

본 실험에서는 염화수은이 흰쥐의 간에 미치는 독성에 대하여 천연착화제인 키토산의 방어 효과를 미세구조의 변화를 통해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 실험동물은 대한실험동물센터(8~10주령, 27 g ± 2 g)에서 분양받은 외관상 건강한 ICR계 웅성 마우스를 사용하였다. Mouse를 Polycarbonate cage (40 × 25 × 17 cm)에 담아 온도 23 ± 2°C, 습도 50 ± 5%의 환경조건을 유지시킨 실험실의 animal cage (HB-404AS)에서 사육하였다. 채광은 12시간 주기로 하였고, 먹이와 음용수는 제한없이 공급하였다.

실험군은 수은중독 후 일반 식이만을 공급한 군(A군), 수은중독 후 키토산(3%)을 1일 2회 구강투여한 군(B군)으로 구분하여 각 군당 20마리씩 총 40마리를 사용하였다. HgCl₂ 투여는 HgCl₂를 2차증류수에 희석시켜 5.0 mg/kg을 구강투여 하였고, 키토산(3% solution)은 생리 식염수에 희석시켜 구강투여하였다. 각 실험군은 24, 48, 72 그리고 96시간 간격으로 간을 1 mm³크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde용액(pH 7.4, 0.1 M cacodylate buffer, 4°C)에서 2시간 전고정하였고, 동일 완충액을 사용하여 15분씩 3회 수세하였다. 1% Osmium tetroxide (OsO₄)용액으로 2시간 후 고정된 후, 동일 완충액으로 15분씩 3회 수세하였다. 상승농도순의 ethanol 계열하에서 탈수하고 propylene oxide를 사용하여 치환하였다. Epon mixture를 만들어 Propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며 Epon mixture 원액에서 overnight 후 oven에 넣어 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 열중합하여 포매하였다. Epon block을 1 μm로 박절하여 1% Toluidine blue로 염색한 후, 광학현미경으로 관찰하여 특정부위를 정하고 삭정한 뒤 Diatome를 부착시킨 Ultramicrotome (MT-7000)으로 60 nm의 초박절편을 만들어 Uranyl acetate와 Lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경 (JEOL, JEM-100 CXII)으로 가속전압 80 kV 하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

수은의 체내 흡수경로는 경구섭취, 흡입, 질점막 및 피부를 통하여 이루어지며(Hwang et al., 1957; Silberberg et al., 1969), 흡수된 수은은 주로 뇌, 비장, 신장, 대장, 근육, 모발, 혈액 및 간에 축적된다(Garcia et al., 1974).

Ware et al. (1974)은 수은 중독시 많은 양이 간에 축적되며 흡수된 수은의 일부가 담즙으로 배설되는 것으로 보아 간도 손상이 초래되는 주요한 장기라고 보고하였다. Robbins and Angell (1976)은 수은중독시 초래되는 세포손상은 세포단백을 응고시켜 효소제중 특히 사립체내의 세포호흡에 관여하는 cytochrome oxidase를 불활성화 시키기 때문인 것으로 알려져 있으며 또한 수은이 sulfhydryl 및 phosphoryl group과 작용하여 세포막을 손상시키기 때문에 초래된다고 보고하였다.

본 실험의 염화수은(HgCl₂) 단독투여군에서도 24시간의 핵막은 다소 불규칙하고 사립체의 내외막이 파괴된 채로 관찰되었다. 과립형질내세망은 층판구조가 파괴되고 수조가 팽대되어 있으며, 무과립형질내세망은 세포질 전체에 퍼져있는 것이 관찰되었다(Fig. 1). 48시간의 핵막은 불규칙하며 과립형질내세망의 층판구조가 관찰되지 않았고, 무과립형질내세망이 24시간군과 같이 세포질 전반에 분포되어 있었다(Fig. 3). 72시간의 핵막도 불규칙한 형태를 보였고, 사립체의 내외막 구분이 불분명하였다. 과립형질내세망은 일부 층판구조를 형성하였지만 내강이 다소 팽대된 형태를 나타내었다. 무과립형질내세망은 과립형질내세망 주변에 산재하였다(Fig. 5). 96시간의 핵막은 비교적 원형을 유지하였고, 사립체의 일부는 내외막이 파괴된 것이 관찰되었다. 과립형질내세망은 층판구조를 형성하였다(Fig. 7).

Kim et al. (1993)은 키토산 및 알긴산 등을 방사성 스트론튬에 오염된 마우스에 처치했을 경우 ⁸⁵Sr의 골조직 침착을 억제하였다고 보고하였으며, 이와 같은 결과로 볼 때 ⁸⁵Sr에 오염되었을 경우 키토산을 공급하면 ⁸⁵Sr가 체내 소화관에서 흡수되기 전에 이들 물질이 착화제로서 작용하여 체외배출을 촉진시키는 것으로 판단하였다. Lee et al. (1985)은 한국산 마늘

이 diallydi-sulfide류의 -S-S-화합물과 glutathione, thiolactic acid 및 vitamin B₁ 등의 -SH화합물과 vitamin C를 풍부히 함유하고 있음을 고려하여 수은 및 카드뮴을 각각 마늘 일정량과 함께 백서에 장기간 동시 투여하여 장기내 금속 축적량 및 표적장기들의 병리조직학적 손상에 대하여 현저한 방어효과가 있음을 보고하였다.

본 실험의 키토산과 HgCl₂ 투여군에서도 24시간의 핵막은 비교적 원형을 유지하였고, 사립체는 내외막의 구분이 일부에서 불분명하게 관찰되었다. 과립형 질내세망의 내강 팽대가 관찰되었지만 층판구조를 형성하였다. 그리고 무과립형질내세망이 세포질주변에서 관찰되었다 (Fig. 2). 48시간의 핵막도 비교적 원형을 나타내었고, 사립체는 정상적인 형태를 보였다. 그리고 과립형질내세망의 층판구조가 핵주변에서 관찰되었고, 무과립형질내세망이 세포질의 일부에서 관찰되었다 (Fig. 4). 72시간의 핵은 원형을 유지하였으며, 사립체는 전자밀도가 높게 나타났다. 과립형질내세망은 전형적인 층판구조를 이루었으며 주변에는 무과립형질내세망이 분포하였다 (Fig. 6). 96시간의 핵도 원형을 유지하였고, 사립체는 정상적인 형태를 나타내었다. 과립형질내세망의 전형적인 층판구조가 세포질 전반에서 관찰되었고, 글리코겐도 세포질 주변에서 관찰되었다 (Fig. 8).

이상의 결과로 보아 키토산 투여가 간세포에 독성을 야기하는 염화수은을 착화하여 간에서 다른 기관으로 이동시키거나, 신장을 통해 체외로 배설하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bakir F, Damluji S, Amin-zaki L, Murtadha M, Khalidi A, Al-Rawis N, Tikriti S, Dhahir H, Clarkson T, Smith J, Doherty R: Methyl-mercury poisoning in Iraq. An inter-university report. *Science* 181 : 230-240, 1973.
- Donaldson ML, Gubler CJ: Biochemical effects of mercury poisoning in rat. *Am J Clin Nutr* 31 : 859-864, 1978.
- Friberg L: Studies on the accumulation, metabolism and excretion of inorganic mercury Hg-203 after prolonged subcutaneous administration to rats. *Acta Pharmacol* 12 : 411-427, 1956.
- Friedheim E, Corvi C: Meso-dimercaptosuccinic acid, a chelating agent for the treatment of mercury poisoning. *J Pharm Pharmacol* 27 : 624-626, 1975.
- Garcia JD, Yang MG, Wang JHC, Belo PS: Translocation and fluxes of mercury in neonatal and maternal rats treated with methyl mercuric chloride during gestation. *Proc Soc Exp Biol Med* 147 : 224-232, 1974.
- Hall DL, Yalpani M: Enhancement of the metal-chelating properties of chitin and chitosan. *Carbohydrate Res* 83 : C5-C7, 1980.
- Hwang JI, Bae ES, Cha CW: A study on the protective effect of the Korean garlic on the albino rat, chronically exposed to methyl mercury. *Korean J Med* 23 : 121-128, 1986. (Korean)
- Hirano SM, Iwata K, Nakayama H, Toda H: Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbit. *Agric Biol Chem* 55 : 2623-2625, 1991.
- Iwakura Y, Sannan T: Binding of metal cations. *J Applied Polymer Sci* 23 : 511-515, 1979.
- John D, Klassen CO: Casarett and Doull's toxicology; The basic science of poisons, 2nd ed, 1975.
- Lee MG, Cha CW, Bae ES: A study on the chronological changes of rat tissues and the effect of garlic in acute methyl mercury poisoning. *Korean J Med* 22(1) : 153-159, 1985. (Korean)
- Kachru DN, Tandon SK: Chelation in metal intoxication XX.: effect of pre-treatment with chelators on the distribution of mercury. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 52(3) : 399-402, 1986.
- Keith RL, Setiarahardjo L, Fernando Q, Aposhian HV, Gandolfi AJ: Utilization of renal slices to evaluate the efficacy of chelating agents for removing mercury from the kidney. *Toxicology* 116 : 67-75, 1997.
- Kim HK, Kim KY, Bom HS, Choi KH, Kim JY: Effect of oral injection of chitosan and alginate on the removal of orally injected radiostromium (⁸⁵Sr) in mice. *Korean J Nuclear Medicine* 27(1) : 130-134, 1993. (Korean)
- Klein R, Herman SP, Brubaker PE, Krigman MR, Hill C: A model of acute methyl mercury intoxication in rats. *Arch Pathol* 93 : 408-418, 1972.
- Koga D: Induction of chitinase for plant self-defense. *Chitin/Chitosan symposium*, in Japan 4-26, 1993.
- Koos BJ, Longo LD: Mercury toxicity in the pregnant woman,

- fetus, and newborn infant. A review. *Am J Obstet Gynecol* 126: 390-409, 1976.
- Kuland LT, Faro SN, Siedler H: Minamata disease. *World. Neruology* 1: 370-391, 1960.
- Lieutenant Philip troen, MC, Lieutenant Seymour A, Kaufuman MC, Kermit H, Kats MD: Mercuric bichloride poisoning. *New Eng Med* 244(13): 459-463, 1951.
- Magos L: The effects of dimercaptosuccinic acid on the excretion and distribution of mercury in rats and mice treated with mercuric chloride and methyl mercury chloride. *Br J Pharmacol* 56: 479-484, 1976.
- Muzzarelli RAA, Spalla B: Removal of cyanide and phosphate trace from brines and sea-water on metal ion derivatives of chitosan. *J Radioanalytical Chemistry* 10: 27-33, 1972.
- Nielsen JB, Andersen O: Effect of four thiol-containing chelators on disposition of orally administered mercuric chloride. *Human & Experimental Toxicology* 10: 423-430, 1991.
- Ogawa K, Oka K: X-ray study of chitosan-transition metal complexes. *Chem Materials* 726-728, 1993.
- Okamoto Y, Ohmi H, Minami S, Matsuhashi A, Shikemasa Y, Okumura M, Fujinaga T: Anti-tumor of chitin and chitosan on canine transmissible sarcoma. *Chitin/Chitosan symposium, in Japan Chitin/Chitosan research* 1(2): 76-77, 1995.
- Oliver J, McDowell M, Tracy A: The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury, renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. *J Clin Invest* 30: 1307-1351, 1951.
- Robbins SL, Angell M: *Basic Pathology* (2nd ed.). W.B. Saunders Company. Philadelphia. London. Toronto, 1976.
- Roman-Franco AA, Twirello M, Abini B, Ossi E: Antibasement membrane antibodies with antigen-antibody complexes in rabbits injected with mercuric chloride. *Clin Immunol pathol* 9: 404-411, 1978.
- Rothstein A, Hayes AD: The metabolism of mercury in the fat studies by isotope techniques. *J P Phamacol Exp Ther* 130: 166-176, 1960.
- Ruegg CE, Gandolfi AJ, Nagle RB, Brendel K: Differential patterns of exposure to mercuric chloride, potassium dichromate, or hypoxic condition. *Toxicol Appl Pharmacol* 90: 261-273, 1987.
- Sakaguchi T, Horikoshi T, Nakajima A: Adsorption of uranium by chitin phosphate and chitosan phosphate. *Agric Biol Chem* 45(10): 2191-2195, 1981.
- Shimada H, Rukudome S, Kiyozumi M, Runakoshi T, Adachi T, Yasutake A, Kojima S: Further study of effects of chelating agents on excretion of inorganic mercury in rats. *Toxicology* 77: 157-169, 1993.
- Silberberg I, Prutkin L, Leider M: Electron microscopic studies of transplacental absorption of mercury histochemical methods for demonstration of electron densities in mercury-treated skin. *Arch Environ Health* 19: 7-12, 1969.
- Skjak G, Anthonen H, Sandford P: *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application.* Elsevier applied science 1988.
- Sugano M, Watanabe S, Kishi A, Izume M, Ohtakara A: Hypocholesterolemic action of chitosan with different viscosity in rats. *Lipid* 23: 187-191, 1988.
- Takeda Y, Ukita T: Metabolism of ethylmercuric chloride-²⁰³Hg in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 17: 181-188, 1970.
- Tokura S, Miura Y, Kaneda Y, Uraki Y: Drug delivery system using biodegradable carrier. *Chitin/Chitosan research* 314-324, 1992.
- Tong P, Baba Y, Adachi Y, Kawazu K: Adsorption of metal ions on a new chelating ion-exchanges resin chemically derived from chitosan. *Chemistry Letters* 1529-1532, 1991.
- Tsurutani R, Yoshimura M, Tanimoto N, Hasegawa A, Kifune K: Clinical application of chitin materials of ulcers. *Chitin/Chitosan symposium, in Japan* 1(2): 78-79, 1995.
- Ware RA, Burkholder PM, Chang LW, Cashwell RJ: Time dependent distribution of organic and inorganic mercury compounds in rats following chronic and acute intoxication. *Fed Proc* 33: 227-238, 1974.
- Yannai S, Sach K: Absorption and accumulation of cadmium, lead and mercury from foods by rats. *Food Chem Toxicol* 31(5): 351-355, 1993.

< 국문초록 >

본 연구의 목적은 염화수은이 간 미세구조에 미치는 독성에 대한 키토산의 억제효과를 연구하는데 있다. 염화수은 단독 투여군(A군)에는 HgCl₂ (5.0 mg/kg)만을 구강투여하였다. 그리고 키토산과 염화수은 동시투여군(B군)에는 키토산 (3% solution, 2times/day)과 HgCl₂ (5.0 mg/kg)을 구강투여하였다. 그리고 각 군은 24, 48, 72, 96 시간대에 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. A군

핵막은 다소 불규칙한 상태를 유지하였고, 사립체는 내외막이 파괴된 채로 관찰되었다. 과립형질내세망은 층판구조가 파괴되었고, 무과립형질내세망은 세포질 전체에 퍼져있는 것이 관찰되었다.

2. B군

핵막은 비교적 원형을 유지하였고, 사립체는 내외막의

구분이 일부에서 불분명하게 관찰되었지만, 전자밀도가 높게 관찰되었다. 과립형질내세망의 내강 팽대가 앞시간대에서 관찰되었지만 전형적인 층판구조를 형성하였다. 그리고 무과립형질내세망이 세포질주변에서 관찰되었다.

이상의 결과는 키토산이 마우스 간중독을 야기한 염화수은의 독성을 감소시키는 것으로 사료된다.

FIGURE LEGENDS

*Abbreviations

Mitochondria (M) Lysosome (L)
Nucleus (N) Glycogen (G)

Fig. 1. An electron micrograph of liver from mouse 24Hr after treatment with HgCl₂.

Rough endoplasmic reticulum (→), smooth endoplasmic reticulum (▲).

Fig. 2. An electron micrograph of liver from mouse 24Hr after treatment with HgCl₂ and Chitoan (2 time/1 day).

Fig. 3. An electron micrograph of liver from mouse 48Hr after treatment with HgCl₂.

Fig. 4. An electron micrograph of liver from mouse 48Hr after treatment with HgCl₂ and Chitoan (2 time/1 day).

Fig. 5. An electron micrograph of liver from mouse 72Hr after treatment with HgCl₂.

Fig. 6. An electron micrograph of liver from mouse 72Hr after treatment with HgCl₂ and Chitoan (2 time/1 day).

Fig. 7. An electron micrograph of liver from mouse 96Hr after treatment with HgCl₂.

Fig. 8. An electron micrograph of liver from mouse 96Hr after treatment with HgCl₂ and Chitoan (2 time/1 day)







