

## 납으로 유발된 생쥐 간장 독성에 대한 스쿠알렌의 효과

김 종 세

조선대학교 자연과학대학 생물학과

## Effects of Squalene on the Mice Hepatotoxicity Induced by Lead Acetate

Jong-Se Kim

Dept. of Biology, College of Natural Science, Chosun University

(Received August 6, 2003; Accepted August 23, 2003)

### ABSTRACT

To investigate the effect of the squalene against the lead toxicity. A healthy male of ICR mice were used for experiment. The SOD was observed after the intraperitoneal injection in mice. The ultrastructural changes of the liver were observed after the intraperitoneal injection in mice. The experimental groups were divided into two groups. Group A was control group that squalene was not treated after intraperitoneal injection of lead acetate. Group B was squalene treatment group that squalene solution was injected after intraperitoneal injection of lead acetate. All groups were used to 10 mice. The results were as follow:

SOD activity in the liver, Group A was lower than in normal. But, Group B was higher than in Group A ( $P < 0.05$ ). In the histological observation, Group A were showed that the inner cavity of mitochondria swollen and development of cristae weakened. Swelling of lamellae of rough endoplasmic reticulum (rER) was showed.

It was concluded that the SQ will be effective for the recovery of hepatic cell at lead intoxication.

**Key words** : Lead, Liver, SOD, Squalene

### 서 론

Squalene (hexamethyltetracosahexane,  $C_{30}H_{50}$ , 이하 SQ라 함)은 콜레스테롤의 생합성에 아주 중요한 선구 물질로서, 심해상어, 올리브유 등에 많이 함유되어 있고, 동물에서는 주로 간에서 합성이 이루어진다(Liu et al., 1976). SQ는 6개의 이중결합이 있어 산소이온과

쉽게 결합할 수 있어서 유해 산소 제거능이 있으며(Kohno et al., 1995), 상처 치유, 혈관 확장, 동맥경화 억제 작용, 심근경색, 간질환 등(Budiarso, 1990)에 효과가 있으며, 화상 치료(Kim et al., 1999), 카드뮴 독성 완화(Kim & Yoon., 2000), 항암효과(Yamawaki et al., 1978) 등이 보고 되었다. 또한, Storm et al. (1993)은 SQ가 활성 산소종을 제거하고 세포면역반응을 증강시키며, 손상된 세포 회복 및 세포증식을 자극하는 기

이 논문은 2001학년도 조선대학교 학술연구비 지원을 받아 연구되었음.

\* Correspondence should be addressed to Dr. Jong-Se Kim, Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, 375, Seosuk-dong, Gwangju, 501-759, Korea. Ph.: (062) 230-6641, FAX: (062) 230-7984, E-mail: kyh5656@korea.com

Copyright © 2003 Korean Society of Electron Microscopy

능을 가지며 활성 산소를 안정화시키고 항산화제를 활성화시켜 조직을 보호하고 생명을 연장하는 효과가 있다고 보고하였다.

납(Pb)은 생태계내에서 다양한 형태로 존재하면서 미량으로 독성을 유발시키는 물질로 체내 축적시 심각한 기능 장애를 유발시키는 물질이다(Yum et al., 1995). 체내에 축적되는 납의 대부분은 뼈에 분포하며, 간, 신장, 폐 등에 존재하며, 혈액에서는 대부분 적혈구와 결합한다(Barltrap et al., 1971; Smith et al., 1992; Fonia et al., 1995). 납중독시에는 빈혈, 식욕부진, 소화기 장애, 신경 장애, 신장 장애 등이 유발된다(Six & Goyer, 1972; Klauder & Petering, 1977; Karmarker, 1986; Fonia et al., 1995; Russo, 1998). 중금속을 제거하는데 현재 이용 또는 연구되어지고 있는 대표적인 물질로는 EDTA (Zinterhofer et al., 1971), chitosan (Kim & Roh., 2002), Green tea (Chung & Roh., 2000), 마늘 (Song et al., 1986), DMSA (Maiorino et al., 1993) 등이 있다.

본 연구에서는 생쥐에 납을 투여한 후 SQ를 처치하였을 때 납중독에 의한 간독성을 억제하는 지에 관해 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 실험군 설정

본 실험에 사용한 실험동물로는 샘타코에서 생산, 공급하고 있는 ICR계 생쥐(체중 25~35g)를 사용하였다. 생쥐는  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $45 \pm 5\%$ 로 유지된 사육실에서 폴리카보네이트로 제작된 사육장(40×25×17cm)에서 사육하였으며, 사료(제일제당 제품)와 급수는 자유롭게 섭취시켰다. 실험군 1 (Group A)은 생쥐에 납(30 mg/kg)을 1회 복강 투여한 후 일반식이를 공급한 대조군, 실험군 2 (Group B)는 생쥐에 납(30 mg/kg)을 복강 투여한 후 SQ(180 mg/kg)를 1회 복강 투여한 군 등으로 각 실험군 당 쥐 10마리를 사용하였고, SQ는 (주)세보 제품을 사용하였다.

### 2. 전자현미경의 관찰

각각의 세대별로 적출된 간조직은 신속하게  $1\text{mm}^3$

의 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde용액(pH 7.4, 0.1 M cacodylate완충액,  $4^\circ\text{C}$ )에서 2시간 전고정 하였다. 전고정 한 후, 동일 완충액을 사용하여 3회 수세하였다. 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ )용액(pH 7.4, 0.1 M cacodylate완충액,  $4^\circ\text{C}$ )로 2시간 후고정한 후, 동일 완충액으로 3회 수세하였다. 저농도의 ethanol (50%)로부터 ethanol 계열하에 탈수하고, propylene oxide를 사용하여 치환시켰다. epon mixture를 만들어 propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며, epon mixture원액에서 over night 후 포매하였다. 그리고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 12시간,  $45^\circ\text{C}$ 에서 12시간,  $60^\circ\text{C}$ 에서 48시간 열중합하였다. epon block을  $1\mu\text{m}$ 로 박절하여 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 특정부위를 정하고 삭정한 뒤 Diatome을 부착시킨 Ultramicrotome (MT-7000)으로 60 nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(JEOL, JEM-100CXII)으로 가속전압 80 kV 하에서 관찰하였다.

### 3. SOD 측정

간조직 1g당 4배량의 0.25M sucrose buffer(pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 homogenizer(10,000×g, 2min)로 균질화하였다. 이 균질액을  $4^\circ\text{C}$ , 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미균질액 부분을 제거한 후 상층액을  $4^\circ\text{C}$ , 15,000×g에서 20분간 원심분리하여 SOD 활성도 측정의 효소원으로 사용하였다. SOD 활성도를 측정하는 kit는 OxisResearch™ (U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 실험 순서는 다음과 같다.

kit에 준비된 buffer 900  $\mu\text{l}$ 에 시료 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고 vortex에서 잘 섞었다. 40  $\mu\text{l}$ 를 추출하여 kit R2 용액 30  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 1분간  $37^\circ\text{C}$ 에서 incubation 시키고, vortex에서 잘 섞었다. 그 후, kit R1 용액 30  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 vortex에서 시료를 잘 섞은 다음 시료 100  $\mu\text{l}$ 를 추출한 후, UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 사용하여 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하여 SOD 활성도를 확인하였다.

### 4. 통계처리

각 실험군 별 통계학적 유의성은 개인용 컴퓨터 프

로그그램인 SAS를 이용한 Anova test에 의하여 검정하였으며, 각 p값은 0.05 미만의 것을 유의한 수준으로 고려하였다.

## 결 과

### 1. 간의 전자현미경적 관찰

24시간 : 납 단독 처치군의 경우 사립체의 팽대가 관찰되었으며, rER은 팽대되고, 절단된 상태로 나타났다(Fig. 1). 납과 함께 스쿠알렌을 처치한 군에서는 사립체가 약간 팽대됨이 관찰되었다(Fig. 2).

48시간 : 납 단독 처치군의 경우 사립체의 팽대가 관찰되었으며, rER은 팽대되고, 절단된 상태로 조직의 심한 손상이 관찰되었다(Fig. 3). 납과 함께 스쿠알렌을 처치한 군에서는 사립체의 팽대, rER이 팽대되었으나, 납 단독 처치군에 비해 조직의 손상이 그리 심하지 않음이 관찰되었다(Fig. 4).

72시간 : 납 단독 처치군의 경우 사립체의 팽대가 관찰되었으며, rER은 팽대되고, 절단된 상태로 나타났다(Fig. 5). 납과 함께 스쿠알렌을 처치한 군에서는 사립체가 약간 팽대됨이 관찰되었다(Fig. 6).

96시간 : 납 단독 처치군의 경우 사립체가 아직까지 약간 팽대됨이 관찰되었으며, rER은 부분적으로 절단된 상태로 나타났다(Fig. 7). 납과 함께 스쿠알렌을 처치한 군에서는 사립체가 약간 팽대되었으나, 정상에 가까웠으며, rER은 정상으로 관찰되었다(Fig. 8).

### 2. 간조직내 SOD 활성도 관찰

24시간 : 정상군에서  $8.11 \pm 0.15$ , 납 단독 투여군에서  $5.14 \pm 0.42$ , 스쿠알렌을 처치한 군에서는  $6.86 \pm 0.21$ 을 관찰하였다( $P < 0.05$ ) (Table 1 참조).

48시간 : 납 단독 투여군에서  $6.12 \pm 1.17$ , 스쿠알렌을 처치한 군에서는  $6.59 \pm 0.33$ 을 관찰하였다(Table 1 참조).

72시간 : 납 단독 투여군에서  $7.05 \pm 1.10$ , 스쿠알렌을 처치한 군에서는  $7.15 \pm 1.15$ 을 관찰하였다(Table 1 참조).

96시간 : 납 단독 투여군에서  $8.06 \pm 0.22$ , 스쿠알렌

**Table 1.** The activity of superoxide dismutase after treatment with lead acetate

	Normal	Group 1	Group 2
24 h	$8.11 \pm 0.15$	$5.14 \pm 0.42$	$6.86 \pm 0.21^*$
48 h	$8.12 \pm 0.24$	$6.21 \pm 1.17$	$6.59 \pm 0.33$
72 h	$8.15 \pm 0.15$	$7.05 \pm 1.10$	$7.15 \pm 1.15$
96 h	$8.14 \pm 0.41$	$8.06 \pm 0.22$	$8.15 \pm 0.27$

\* $P < 0.05$  as compared with control

Normal: Normal mice.

Group 1: No treatment with squalene after intraperitoneal contamination of lead acetate.

Group 2: Squalene (180 mg/kg) was injected after intraperitoneal contamination of lead acetate.

을 처치한 군에서는  $8.15 \pm 0.27$ 을 관찰하였다(Table 1 참조).

## 고 찰

납 중독은 reactive oxygen species (이하, ROS)를 증가시키는데 항산화물의 일종인 vitamin E, C, B<sub>6</sub>,  $\beta$ -carotene, zinc, selenium 등이 납으로 유도된 산화적 스트레스를 경감시키는 것으로 알려져 왔다(Ping & Yueliang, 2002; Shalini et al., 2003). Lee et al. (1993)은 납중독 된 흰쥐에 식이 중에 각각 vitamin E: selenium 농도를 OE (vitamin E, 0 mg/kg diet; Se 0), 40E (vitamin E, 40 mg/kg diet; Se 0), 200E (vitamin E, 200 mg/kg diet; Se 0), 200ES (vitamin E, 200 mg/kg diet; Se 0.5 ppm), OBS (vitamin E, 0 mg/kg diet; Se 0.5 ppm)을 공급한 후 비타민 E와 selenium이 항산화적 방어에 미치는 영향을 관찰한 실험에서 Pb 단독 처리군과 OE군의 경우 SOD 수치가 감소하였으나, 다른 실험군에서는 SOD 수치가 약간 증가하였다고 보고하였다. 또한, Lim & Lee (2001) 등은 selenium의 Pb에 대한 항산화작용을 알아보기 위하여 식이 중에 각각 0.5 ppm, 1.0 ppm의 selenium을 공급한 후 간조직에서 SOD 활성을 측정된 결과 납 투여군이면서 selenium을 첨가하지 않은 군에서 SOD 수치가 정상군에 비해 높게 나왔지만, selenium을 첨가한 군에서는 SOD 수치가 낮게 나타나 selenium이 항산화작용이 있음을 보고하였다. 본 실험에서는 스쿠알렌(180 mg/kg)을 첨가하지 않은 군에서 정상군에 비해 SOD 수치가 현저하게 낮

게 나왔지만, 스쿠알렌을 첨가한 군에서는 정상군의 수치보다는 낮지만, 처치하지 않은 군보다는 높게 나타나는 경향을 관찰할 수 있었다.

Lee et al.(2001)은 마늘 속에 다량의 황화합물이 납 중독시 착화제 작용을 하는지 여부를 관찰하기 위하여 마늘 500 mg/kg을 흰쥐에 투여한 후 다른 착화제 물질인 EDTA, DPEN, DMSA와의 비교를 통해 납 중독에 대한 조직 회복이 타 착화제와 비교해서 큰 차이가 없다고 보고하였다. Swaran et al.(2003) 등은 DMSA (50 mg/kg), MiADMSA (50 mg/kg), vitamin E (5 mg/kg), vitamin C (25 mg/kg)의 납의 체내 축적 억제 효과를 관찰한 실험에서 실험에 사용한 물질들이 간 조직내 납의 축적을 억제하는 효과가 관찰되었지만, vitamin은 효과가 미미하지만, DMSA, MiADMSA와 병행해 사용할 경우 효과가 증대됨을 보고하였다. 본 연구에서는 스쿠알렌 단독 처치에 관한 연구만 수행하였지만, 간 조직의 회복 정도와 SOD 측정 결과로 볼 때 단독 사용의 경우 효과가 있다고 할 수 있겠다.

Manisha & Flora(2002) 등은 alpha lipoic acid (10 mg/kg)을 납 중독 된 쥐에 복강투여한 후 SOD를 측정 한 결과 납 단독 투여군에서 SOD 수치가 정상군( $6.36 \pm 0.23$ )에 비해 감소하였지만( $4.96 \pm 0.58$ ), alpha lipoic acid를 투여한 군에서는 SOD 수치가 증가( $5.55 \pm 0.51$ )하여 alpha lipoic acid이 납 중독에 효과가 있다고 보고하였다. Shyam et al.(2002) 등은 *Withania somnifera*를 납 중독 된 생쥐에 각각(0.7 g/kg, 1.4 g/kg)을 구강 투여한 실험에서 납 단독 투여군에서 SOD 수치가 정상군( $5.58 \pm 0.49$ )에 비해 감소하였지만( $3.86 \pm 0.36$ ), *Withania somnifera*를 투여한 군에서는 SOD 수치가 증가( $4.63 \pm 0.39$ ,  $5.48 \pm 0.38$ )하여 납 중독에 효과가 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 생쥐에 납을 복강 투여한 후 SOD를 측정 한 결과 정상군에서 24 시간째  $8.11 \pm 0.15$ 에 비해 납 단독 투여군에서  $5.14 \pm 0.42$ 로 정상군에 현감소하였지만, 스쿠알렌을 처치한 군에서는  $6.86 \pm 0.21$ 로 SOD 수치가 증가하여 납 중독에 효과가 있다고 생각된다( $P < 0.05$ )

Ernesto et al.(1974)은 비비에 납을 중독시킨 후 간 조직의 변화를 관찰한 결과 사립체의 내강이 팽대되고, 사립체능이 굴곡, 수축되며, 모양의 불규칙, 핵의 수축 및 핵막의 확장 등이 관찰되었다고 보고하였다.

Chung & Roh(2000)는 간에서 납 독성에 대한 녹차의 간 조직 회복 효과를 알아보기 위하여 4, 8주간 녹차액(3 g of tea/100 ml of water)을 식수로 공급하고 전자현미경적 관찰을 통해 납 단독 투여군의 경우 rER의 수조 팽대, 유리리보솜 수 증가, 핵의 함입 및 불규칙, 사립체능의 손실 및 절단과 변형이 심한 반면, 녹차 처리군의 경우 회복 정도가 빠르게 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 납 단독 처치군의 경우 사립체의 팽대와 rER은 팽대 및 절단된 상태가 관찰되었으나, 스쿠알렌을 처치한 군에서는 납 단독 처치군에 비해 손상 정도가 덜하였으며, 회복의 시간도 빠름을 관찰할 수 있었다.

본 연구를 통해 스쿠알렌이 납 중독에 의한 간장 조직의 손상 회복에 대해 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Liu GCK, Ahrens Jr EH, Sreibman PH, Crouse JR: Measurement of squalene in human tissues and plasma. *J Lipid Res* 17(1): 38-45, 1976.
- Kohno Y, Egawa Y, Itoh W, Nagoka S, Takahashi M, Mukai K: Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochem Biophys Acta* 1256(1): 52-56, 1995.
- Budiarso IT: Fish oil versus olive oil. *Lancet* 336: 1313-1314, 1990.
- Kim JS, Yoon JS, Choi YB, Choi KP, Kim JS, Chung SM: Healing effects of squalene on the epidermis in burned mouse. *Kor J Electron Microscopy* 29(2): 163-175, 1999.
- Kim JS, Yoon JS: Effects of squalene on mouse liver toxicity with cadmium. *Kor J Electron Microscopy* 30(2): 141-152, 2000.
- Yamawaki M, Azuma I, Saiki I, Uemiyama M, Aoki O, Ennyu K, Yamamura Y: Antitumor activity of squalene treated cell wall skeleton of *Nocardia rubra* in mice. *Gann* 69: 619-629, 1978.
- Storm HM, Oh SY, Kimler BF, Norton S: Radioprotection of mice by dietary squalene. *Lipid* 28: 555-559, 1993.
- Yum KS, Park KH, Yang NK, Ahn LT, Ko JS: Ultrastructural influence of heavy metallic agents on the proximal convo-

- luted tubule of mice. J Soonchunhyang Med 1(2) : 719 733, 1995.
- Barltrop D, Barrett AJ, Dingle JT: Subcellular distribution of lead in the rat. J Lib Clin Med 77(5) : 705 712, 1971.
- Fonia O: Down regulation of hepatic peripheral type benzodiazepine receptors caused by acute lead intoxication. Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol Sect 293 : 335 339, 1995.
- Smith DR, Osterloh JD, Niemeyer S, Flegal AR: Stable isotope labeling of lead compartments in rats with ultralow lead concentration. Environ Res 57 : 190 207, 1992.
- Karmakar N, Saxena R, Anand S: Histopathological changes induced in rat tissues by oral intake of lead acetate. Environ Res 41 : 23 28, 1986.
- Klauder DS, Petering HG: Anemia of lead intoxication, A role of for copper. J Nutr 107 : 1779 1785, 1977.
- Russo MA, Kapoor SC, Von Rossum GD: Localization of lead in the kidney and liver of rats treated in vivo with lead acetate, ultrastructural studies on unstained sections. Br J Exp Path 69 : 221 234, 1994.
- Six MK, Goyer RA: The influence of iron deficiency on tissue content and toxicity of ingested lead in the rat. J Lab Clin Med 79(1) : 128 136, 1972.
- Song TB, Bae ES, Yum YT: A study on the effect of garlic and 2, 3 Dimercaptosuccinic acid on the cadmium poisoning of pregnant rat. J Kor Med 24(1) : 237 245, 1986.
- Chung KA, Roh YB: Histological study on the effects of the green tea in rat liver toxicated by lead. Kor J Electron Microscopy 30(2) : 165 172, 2000.
- Kim YH, Roh YB: Effects of chitosan on the rat nephrotoxicity induced by lead. Kor J Electron Microscopy 32(3) : 205 211, 2002.
- Maiorino RMMM, Aposhian ZFX, Xu YL, Aposhian HV: Determination and metabolism of dithiol chelating agents. The meso 2, 3 dimercaptosuccinic acid cysteine (1 : 2) mixed disulfide, a major urinary excretion of metabolism of DMSA in the human, increase the urinary excretion of lead in the rat. J Pharmacol Exp Ther 267 : 1221 1226, 1993.
- Zinterhofer LHM, Jatlaw PI, Fappiano A: Atomic absorption determination of lead in blood and urine in the presence of EDTA. J Lab Clin Med 78(4) : 664 674, 1971.
- Manisha P, Flora SJS: Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of  $\alpha$  lipoic acid and succimers in rats. Toxicol 177 : 187 196, 2002.
- Shyam SC, Sunanda P, Anand K: *Withania somnifera* root extract in the regulation of lead induced oxidative damage in male mouse. Pharmacol Res 41(6) : 663 666, 2000.
- Ping CH, Yueliang LG: Antioxidant nutrients and lead toxicity. Toxicol 180 : 33 44, 2002.
- Swaran JSF, Manisha P, Ashish M: Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. Chemico Biological Interactions 145 : 267 280, 2003.
- Shalini V, Dubey RS: Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci 164 : 645 655, 2003.

#### < 국문초록 >

본 연구의 목적은 스쿠알렌이 납 중독에 대해 효과가 있는지를 관찰하고자 하였다. 건강한 ICR계 생쥐를 사용하였다. 납을 복용 투여한 후 SOD와 간 조직의 미세구조를 관찰하였다. 실험군은 다음과 같다. Group 1은 납을 복용 투여한 후 스쿠알렌을 처치하지 않은 대조군, Group 2는 납을 복용 투여한 후 스쿠알렌을 처치한 군으로 각 실험군당 생쥐 10마리를 사용하였다. 실험 결과는 다음과 같다.

SOD 측정 결과 대조군은 정상군에 비해 수치가 훨씬 낮게 나타났지만, 스쿠알렌을 처치한 군에서는 정상군에 비해 낮지만, 대조군 보다 수치가 높게 나타남을 관찰할 수 있었다( $P < 0.05$ ). 간 조직의 미세구조에의 경우 납 단독 처치군의 경우사립체의 팽대와 rER은 팽대 및 절단된 상태가 관찰되었으나, 스쿠알렌을 처치한 군에서는 납 단독 처치군에 비해 손상 정도가 덜하였다.

본 연구를 통해 스쿠알렌이 납 중독에 의한 간장 조직의 손상 회복에 대해 효과가 있는 것으로 생각되어진다.

**FIGURE LEGENDS**

## Abbreviations

N : nucleus,            M : mitochondria,            rER (➡) : rough endoplasmic reticulum  
\* Each scale bar on the figures equals 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 1.** An electron micrograph of hepatic cell from 1 day lead treated group.

**Fig. 2.** An electron micrograph of hepatic cell from 1 day lead and squalene treated group.

**Fig. 3.** An electron micrograph of hepatic cell from 2 day lead treated group.

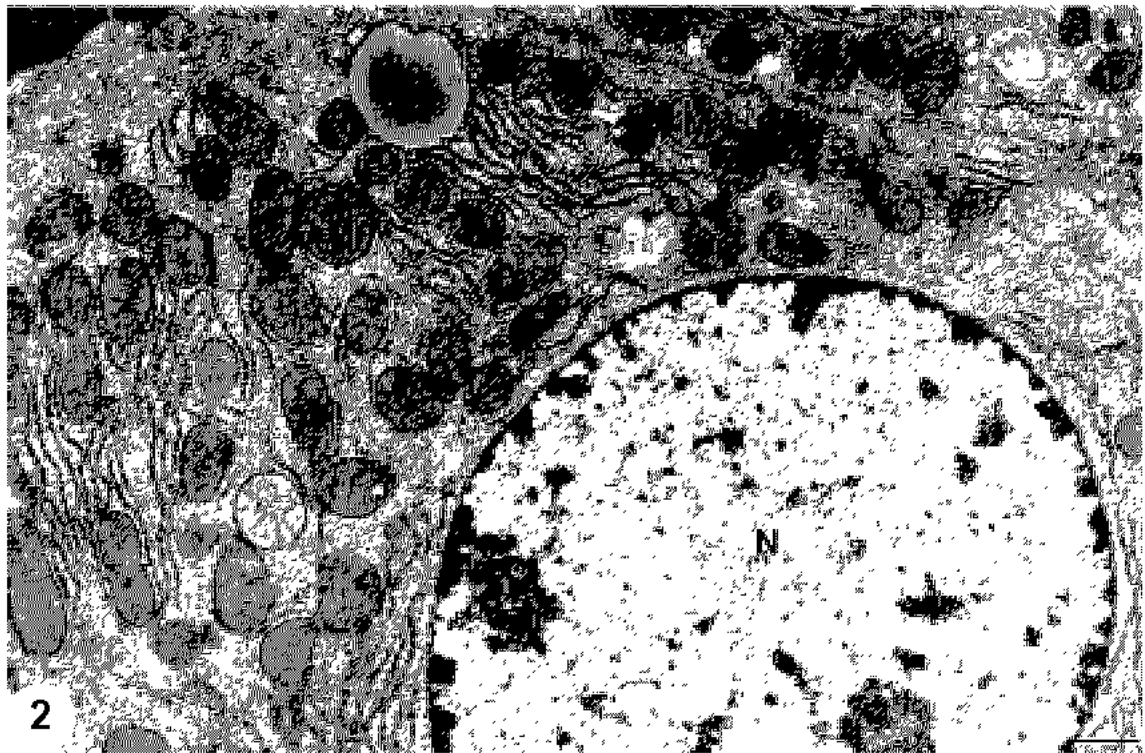
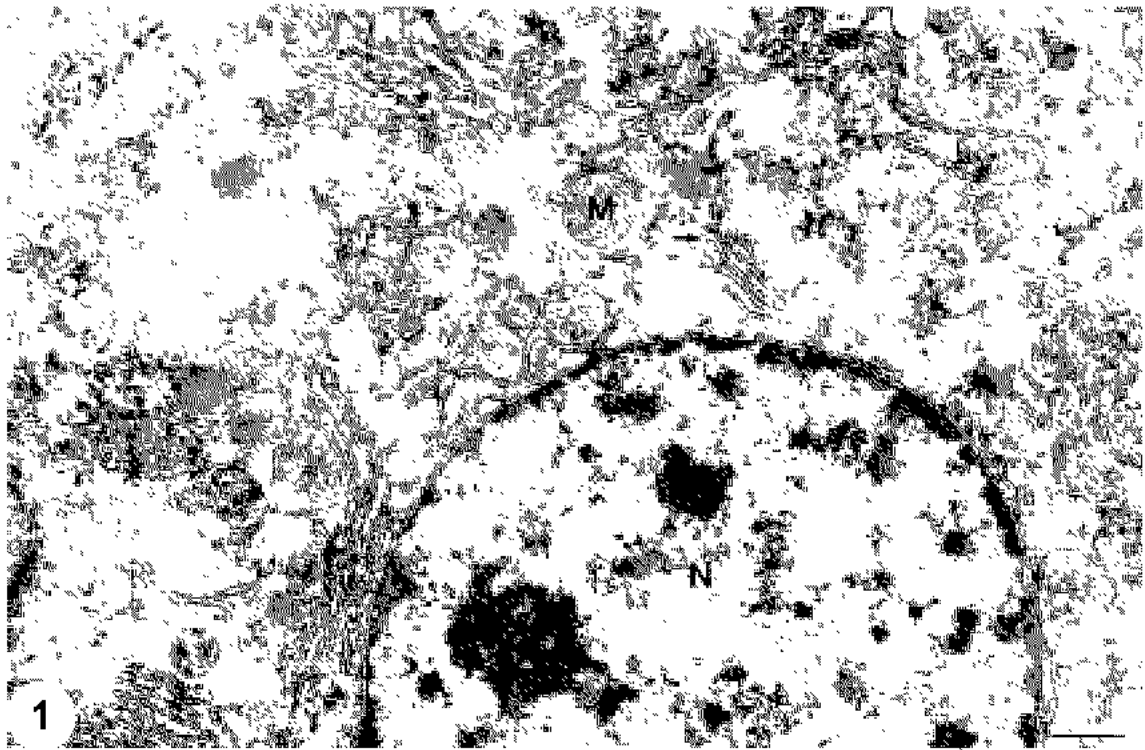
**Fig. 4.** An electron micrograph of hepatic cell from 2 day lead and squalene treated group.

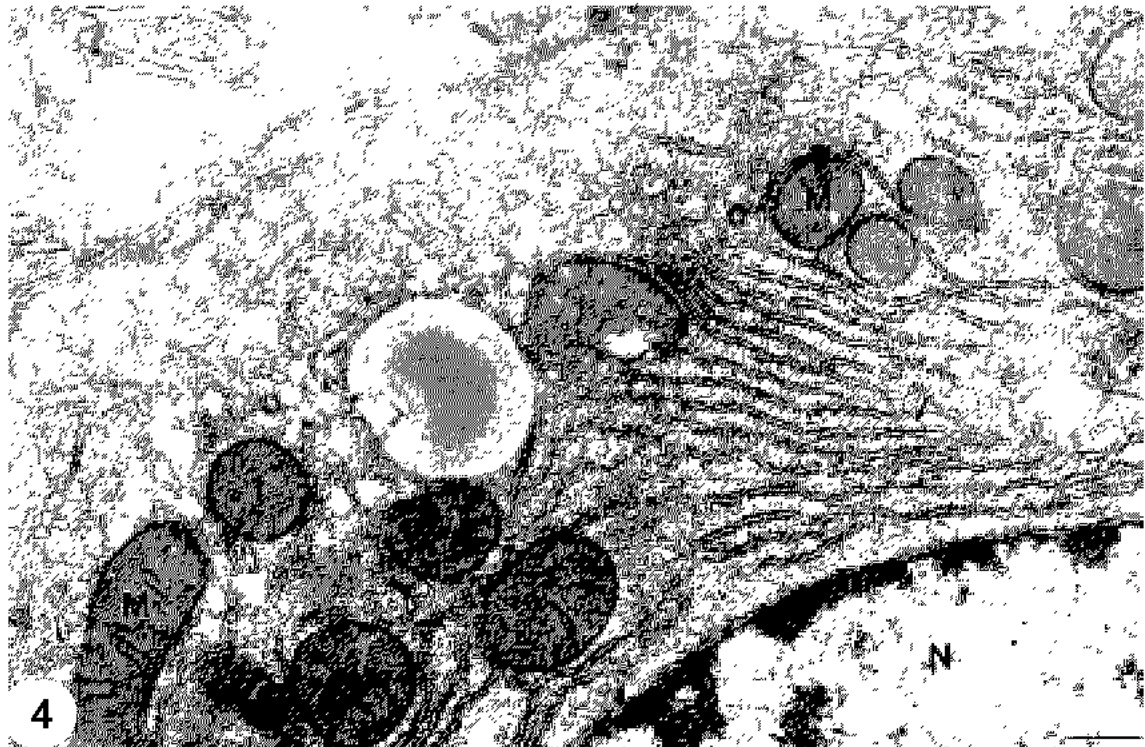
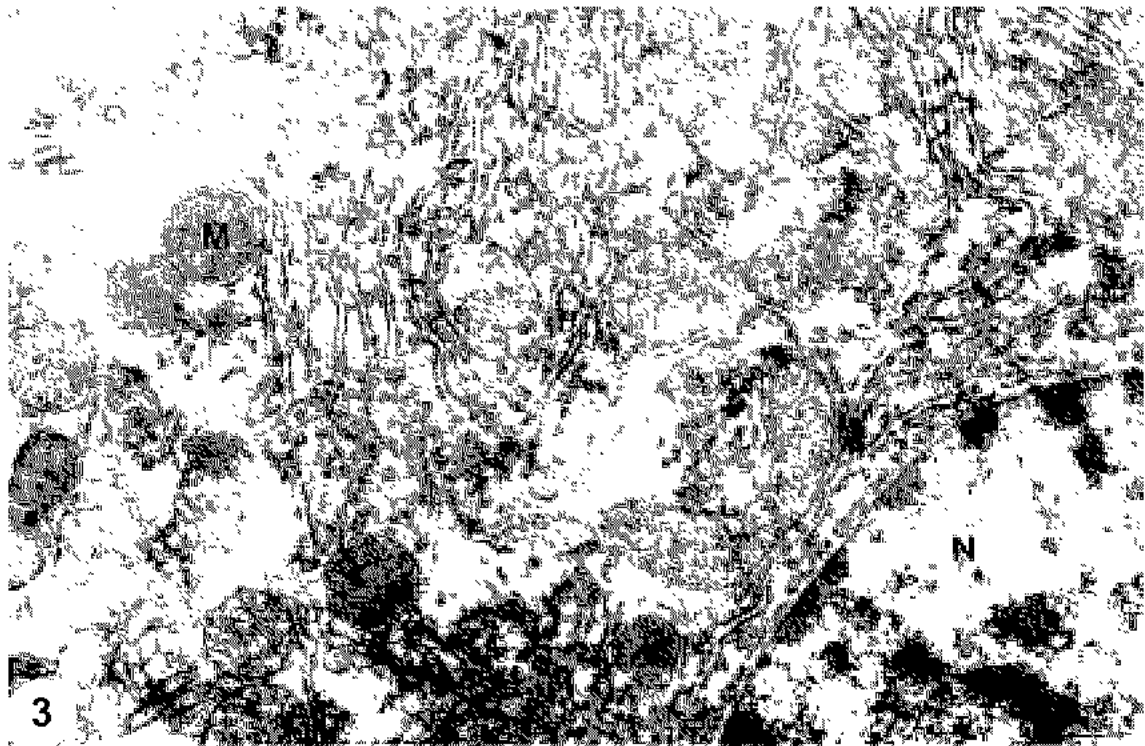
**Fig. 5.** An electron micrograph of hepatic cell from 3 day lead treated group.

**Fig. 6.** An electron micrograph of hepatic cell from 3 day lead and squalene treated group.

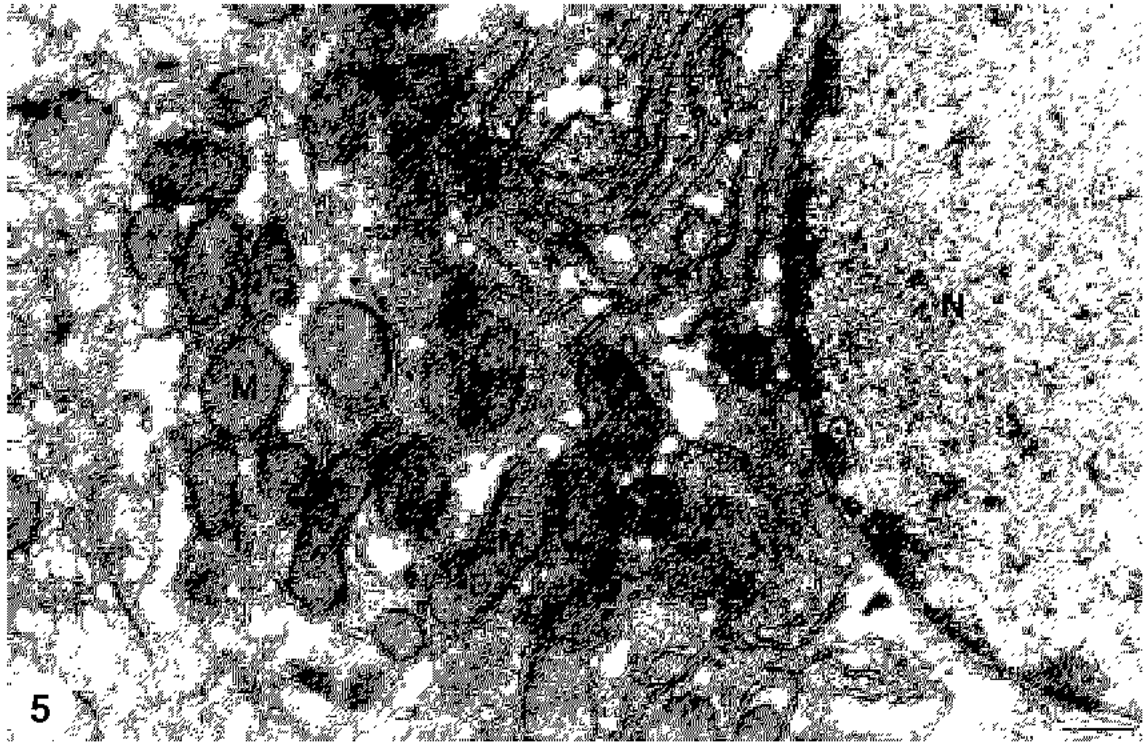
**Fig. 7.** An electron micrograph of hepatic cell from 4 day lead treated group.

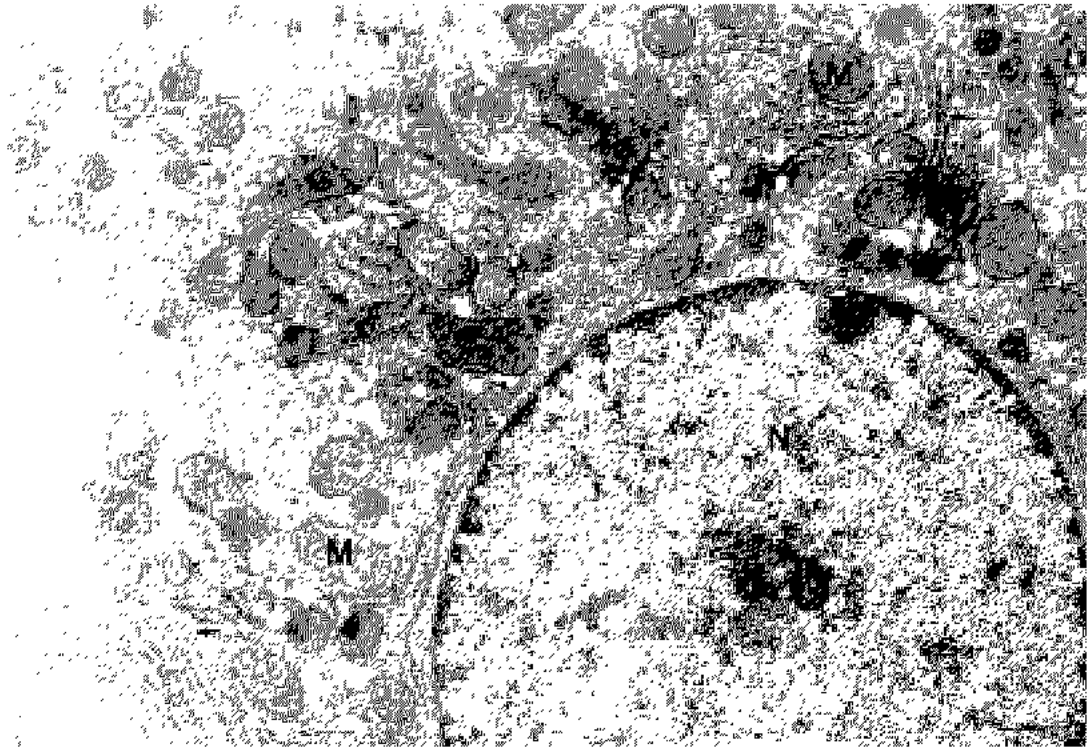
**Fig. 8.** An electron micrograph of hepatic cell from 4 day lead and squalene treated group.



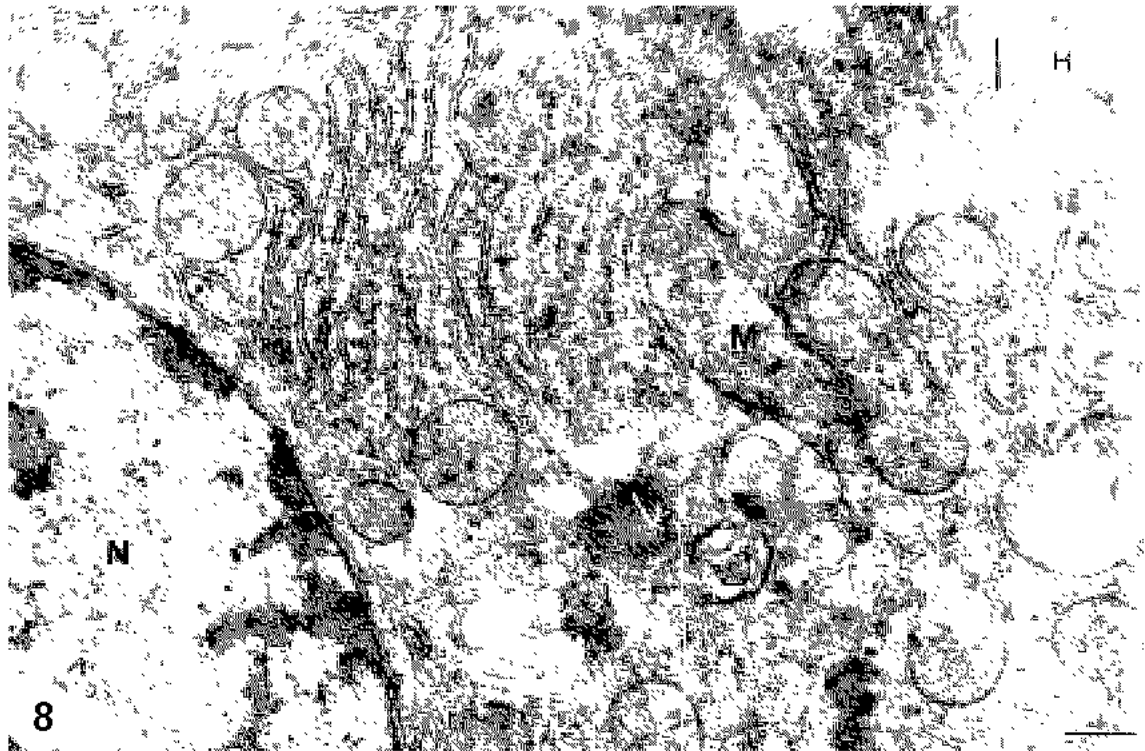








7



8