대한신장학회지 : 제12권 제 1 호 1993

카드뮴 신 손상에 관한 전자현미경적 연구

계명대학교 의과대학 병리학교실

박 관 규

서 론

중금속류에 의한 환경오염물질은 다른 유기오염물질과는 달리 분해되거나 변화를 받지 않고 환경중에 그대로 존재한다. 그중 카드뮴은 가장 널리 쓰이는 중금속의 하나로서 일본 신통천 유역서 집단으로 발병한 소위 "Itai-Itai"병이 카드뮴 화합물의 섭취로 인한 환경성 질환이었다는 것이 밝혀진 후[1] 크게 주목을 받게 되었다. 그후 산업체에서 카드뮴 분진에 만성적으로 노출된 환자의 임상양상에 관하여서는 보고가 있어왔으며[2~4] 또한 동물실험에 의해서도 카드뮴 중독에 관한 연구가 시도되어졌다[5~9]. 카드뮴 중독시에 주로 손상받는 장기는 신장[10~12]으로서 카드뮴의 침착이 주요 소견이며, 췌[13], 폐[14] 및 간[15]에 관하여도 병리조직학적 소견이 보고되어 있다. 카드뮴에 의한 신장의 손상은 근위세뇨관을 주로 침범하고 이 부위에 위축 및 변성과 세뇨관세포의 공포화를 특징으로 하며[10] 또한 이때 세포의 핵은 비후되고 핵소체는 뚜렷해지며 불규칙적인 염색질 양상을 보인다. 전자현미경적 소견에 관한 보고는 Kajikawa 등[16]이 근위세뇨간세포에서의 미토콘드리아의 종창, 포음소포(pinocytotic vesicle)의 증가, 세포질의 부종 및 리소솜의 증가등과 사구체에서의 보우만 주머니(Bowmann's capsule)의 경한 섬유화의 소견이 관찰되었다고 보고하면서 대체적으로 간질내 섬유화와 신세뇨관의 기저막 비후와 함께 신동맥경화가 초래된다고 하였다. 아울러 근위세뇨관세포의 기능도 저분자량 혈장단백 재흡수의 감소와[17,18] 사구체장애로 인한 단백뇨의 출현도 보고되고 있다[19].

본 실험의 목적은 흰쥐에서 급성 카드뮴 중독에 의한 신장의 전자현미경적 변화와 또한 그 신장조직에 카드뮴-옥신 반응을 시켜 카드뮴의 신장세포내 축적되는 위치를 규명해 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물로는 생후 8주된 체중 250 mg 내외의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 사용하였으며 다음과 같이 4개의 군으로 나누어 실험하였다.

대조군 I : 아무 처치도 하지 않은 군…… (12)마리

대조군 II : 1.0 ml의 생리식염수를 복강에 주사한 군 …… (12)마리

실험군 I : 염화 카드뮴($CdCl_2$, No C-3141, Sigma, USA)을 증류수에 녹여 체중 1 kg당 2.5 mg을 하루 1번씩 3일간 복강에 주사한 군…… (12)마리

실험군 II : 염화 카드뮴을 체중 1 kg당 5.0 mg씩 실험군 I과 같은 방법으로 주사한 군…… (12)마리

대조군 및 카드뮴을 투여한 실험군을 마지막 투여 후 1시간, 3시간, 8시간 및 24시간에 3마리씩 도살하여 에테르 마취하에 흉복부를 절개한 다음 신장조직을 채취하였다.

채취된 신장조직은 두 절편으로 나누었으며 첫번째 절편은 조직을 1 mm^3의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1M phosphate 완충액, pH 7.4)으로 1~4℃에서 2시간 전고정을 하고 0.1M phosphate 완충액(PBS)으로 세척한 후 1% OsO_4 용액에 2시간 후고정을 한 뒤 PBS로 세척하여 알코올로 탈수하고 propylene oxide로 치환한 후 Luft방법[20]에 의한 epoxy 혼합물로 포매하여 37℃에 12시간, 45℃에 12시간, 60℃에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절한 후 toluidine blue 염색을 실시하여 관찰부위를 선택한 다음, Sorvall MT-5000형 ultramicrotome에 Dupont diamond knife를 부착하여 회백색

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제 학술연구조성비에 의하여 연구 되었음.

Fig. 1. *The cytoplasm of the podocyte shows numerous myelin-like residual bodies (TEM, ×13,600).*

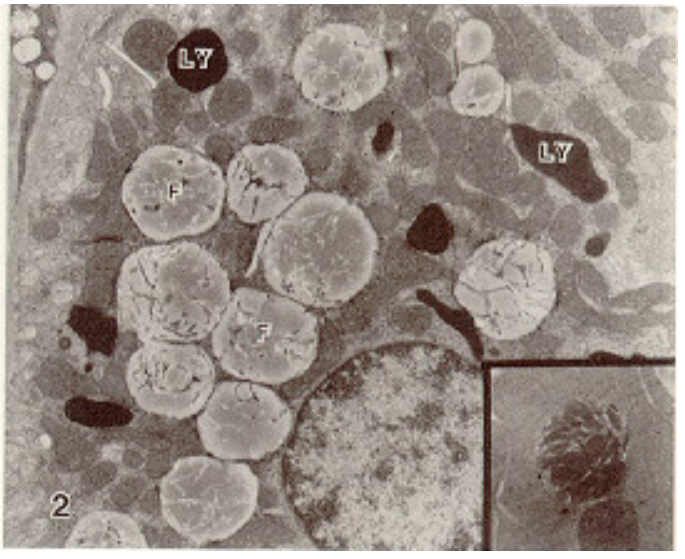

Fig. 2. *The proximal tubular cell shows numerous secondary lysosomes and fat droplets containing cleftlike spaces (TEM, ×10,200). Inset: These fat droplets are electron-dense after treatment with oxine.*

(40~60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어 grid에 부착시킨 뒤 Watson[21] 및 Reynolds 방법[22]에 의한 uranyl acetate 및 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다. 두번째 절편은 Mizuhira와 Kimura[23]의 방법으로 카드뮴-옥신 반응을 시키기 위하여 동량의 4% glutaraldehyde와 1/7M Veronal acetate buffer (pH 7.0)에 침전시키고 옥신(8-hydroxyquinoline)을 포화시켰

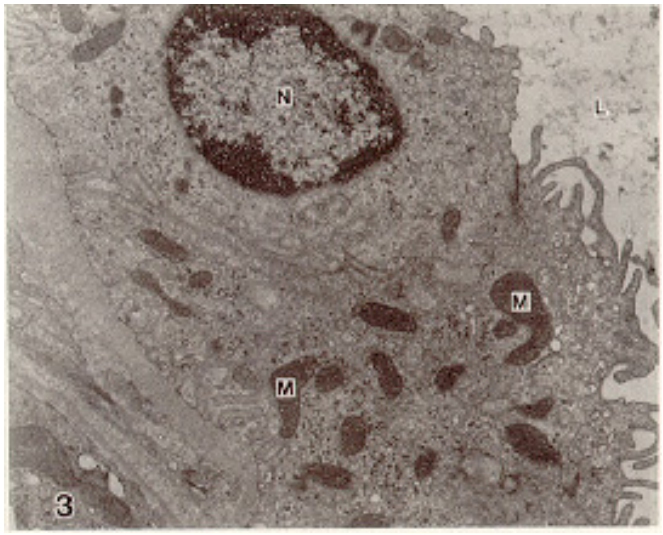

Fig. 3. *The distal tubular cell in relatively well preserved (TEM, ×13, 600).*

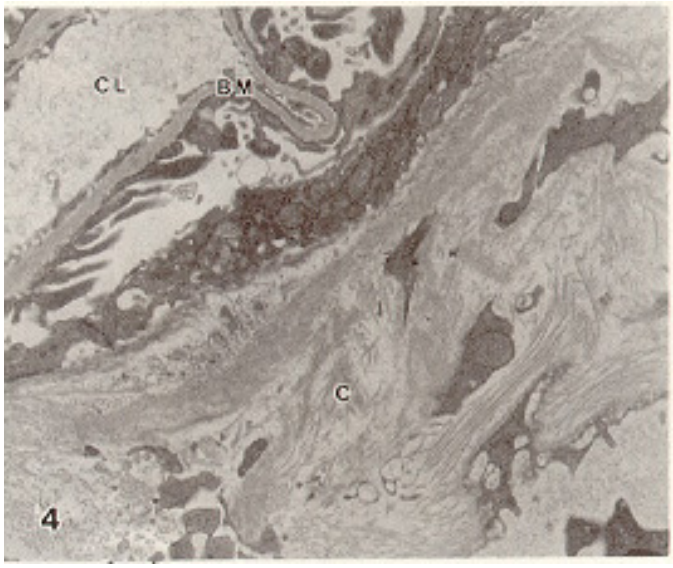

Fig. 4. *The periglomerular fibrosis is seen and the glomerular basement membrane is relatively intact (TEM, ×10,200).*

다. 조직을 고정액속에서 작은 절편으로 세절 후 1.5시간 동안 고정시켰다. 고정된 조직을 epon에 포매시킨 후 통상적인 투과전자현미경적 관찰을 위한 방법으로 진행시킨 후 관찰하였다.

결 과

염화카드뮴 마지막 투여 후 1시간 군부터 신세포의 변화가 일어나고 있었다. 신사구체의 기저막은 비교적 잘

유지되었으나 족세포내에는 내형질세망이 확장되어 있었으며 다수의 수초모양 잔류체(myelin-figure like residual body)가 관찰되었다(Fig. 1).

근위세뇨관에는 내형질세망의 확장, 다수의 리소솜과 함께 지방적이 세포질내에 관찰되었고(Fig. 2) 경한 미토콘드리아의 종창 및 핵내에 뚜렷한 핵소체가 관찰되었다. 지방적내에는 많은 구열(cleft)이 있었다. 이때의 원위세뇨관세포는 비교적 잘 유지되었다(Fig. 2). 3시간 군에서의 사구체의 기저막은 비교적 유지되었고 부분적으로 내피세포의 종창과 함께 사구체주위의 섬유화가

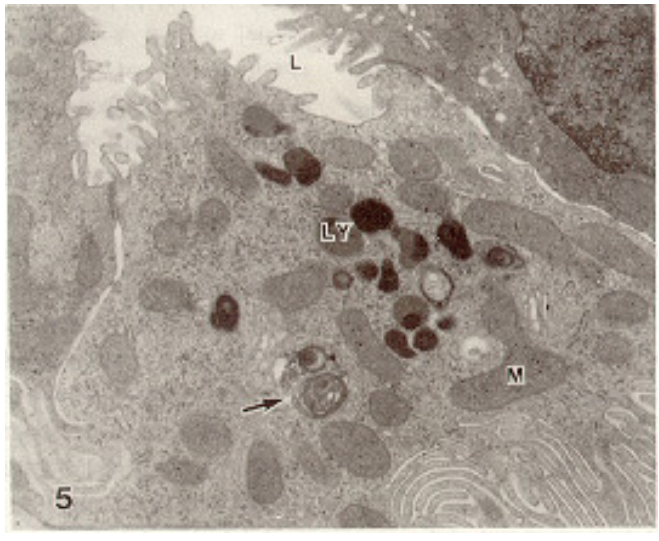

Fig. 5. *The distal tubular cell shows abnormal shaped mitochondrium (arrow) and numerous secondary lysosmes (TEM, ×17,000).*

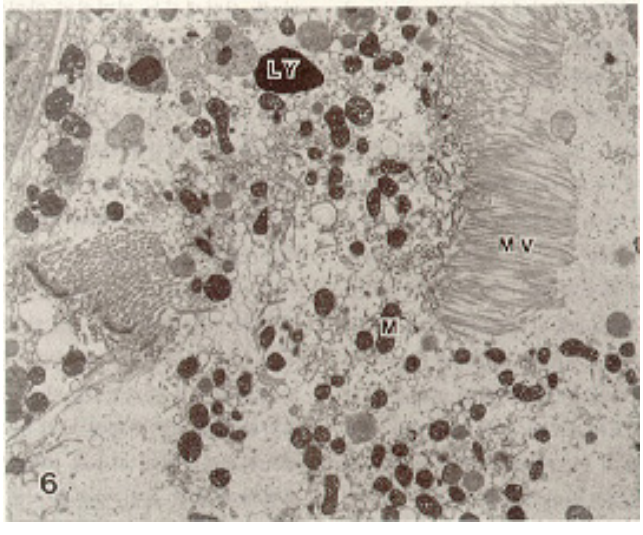

Fig. 6. *Destructed Proximal tubular cells show irregulary scattered cytoplasmic organelles and microvilli (TEM, ×6,800).*

관찰되었다(Fig. 4). 근위세뇨관세포는 많은 지방적이 세포질의 기저부에 위치하였고, 세뇨관강은 괴사된 부스러기로 차 있었다. 근위세뇨관세포는 1시간군과 같이 비교적 잘 유지되었다. 이때 근위세뇨관세포에 카드뮴-옥신 반응시킨 후 관찰한 지방적은 전자밀도가 증가되어 있었다(Fig. 2). 8시간 군에서의 근위세뇨관세포의 소견 역시 3시간군과 비슷하였으며 내형질세망의 확장, 지방적 및 이차 리소솜이 관찰되었으며 농축된 핵도 나타나기 시작하였다. 원위세뇨관세포는 3시간군에 비해 일차 및 이차 리소솜의 숫자가 증가되어 있었다(Fig. 5). 사구체내에는 호중구의 침윤과 사구체주위의 섬유화가 관찰되었고 족세포에는 내형질세망의 종창 및 이차 리소솜이 관찰되었다. 24시간에서는 위의 제소견들이 더욱 심해짐과 더불어 근위 및 원위세뇨관세포의 기저막이 파괴되기 시작하였다(Fig. 6). 이차 리소솜, 내형질세망의 확장 및 공포화 현상등은 더욱 심해지면서 파괴된 근위 및 원위세뇨관세포가 더욱 증가되어 관찰되었으며 농축된 핵 또한 증가되어 있었다.

고 찰

지금까지 문헌상 신장의 카드뮴 중독에 관한 소견은 인간과[2,24] 동물들[8,25~27] 모두에 있어서 주로 신세뇨관에 손상이 일어난다고 알려져 있다. 실제로 만성 카드뮴 중독에 의한 신장기능을 연구한 문헌에서 당뇨, 아미노산뇨, 고인산뇨등 세뇨관장애의 소견을 보이는 임상증례들이 보고되기도 한다[19]. 카드뮴의 손상기전은 그것이 이론적인 중요성 뿐만 아니라 현실적인 관심때문에 지금까지 많은 연구가 있어왔다. 일부 연구자는 카드뮴 이온이 조직단백과 결합하여 불용성의 금속성 단백(metal proteinates)과 안정된 금속성 메르캅티드(sulfhydryl group)를 형성하고 구조의 변화를 초래하며 용해도(solubility)를 감소시켜 효소활성의 장애를 초래한다고 한다[28,29]. 그러나 그러한 소견들은 광학현미경상에서는 손상정도나 심지어 손상의 소견조차 정확하지 않으며 전자현미경에 의한 관찰이라야 손상으로 인한 변화를 관찰할 수 있다[10]. 신장의 세뇨관세포의 손상으로 인한 변화는 백서에 있어서 고농도의 카드뮴에 장시간 노출될 경우 리소솜의 증가와 미토콘드리아의 종창이 주된 변화로 알려져 있으며, 미토콘드리아가 난원형으로 되거나 수포화되며 사립체능선이 주변부에 위치하게 되고(marginal cristae) 기질 전자밀도의 감소가 일어나며, 종창 혹은 외막의 파괴가 관찰된다고 알려져 있다[10]. 세포에너지의 주된 공급원은 미토콘드리아로 알려져 있기 때문에 이러한 미토콘드리아의 변화는 역으로 세포기능의 장애가 초래된다고 유추해 볼 수 있다. 또한 본 실험에서 이차 리소솜의 증가와 수초모양 잔류체들이 1시간부터 관찰되기 시작하여 시간이 지날수록 증가하였는데 이러한 이차 리소솜은 두가지 경로를 통해 형성된다고 한다[30,31]. 한가지는 세포내 이입(endocytosis)의 과정을 통해 세포밖에 있는 물질을 섭취하는 과정이고 또 다른 한가지는 개개의 세포기관들, 예를 들면 미토콘드리아나 내형질세망등이 국소적인 상해를 받은 후에 그 세포가 정상 기능을 유지하기 위해서 이들을 분해 처리해야만 할 경우에서 볼 수 있다고 알려져 있다. 이러한 변화는 실험군에서 시간이 흐를수록, 또 같은 실험군에서도 농도가 증가할수록 현저해졌다. 또한 수초모양 잔류체들이 세뇨관세포의 세포질내에서 관찰되었는데 이러한 잔류체들은 미분해된 조직파편을 포함한 리소솜이 세포질내에 잔류함으로써 야기된다고 알려져 있다. 일부의 용해된 핵과 농축된 핵이 관찰되었는데 이것은 비가역성 세포괴사의 한 형태로 알려져 있다[32]. 납중독의 특징으로 알려져 있는 핵내 봉입체가 카드뮴 중독때도 나타난다고 하는 문헌보고가 있는데[33] 이는 RNA 및 DNA의 합성장애와 어느정도 연관이 있는 것처럼 설명하고 있으나 본 실험에서는 저명하지 않았다. 이것은 만성카드뮴 중독때에는 관찰될 수 있는지의 여부는 추후 연구해 볼 과제로 생각된다. 내형질세망의 응집은 중독 과정의 초기에 나타나는 변화로 알려져 있다. 이것이 신장의 세포기능에 어떤 역할을 하는지는 분명치 않지만 해독과정에 관여되는 것으로 생각된다[34,35]. 실험 1시간군부터 근위세뇨관세포의 세포질내에 많은 지방적이 관찰되었는데 이는 동물실험에서의 간세포에서도 관찰된 바가 있다[15]. Watari등[13]은 흰쥐 췌장조직의 카드뮴 축적세포에 관해 기술하면서 이 세포의 세포질내에 많은 지방적이 있는데 화학반응인 옥신반응을 시킨 후 이들 지방적의 전자밀도가 증가됨으로서 이들 지방적내에 카드뮴이 침착되어 있다고 기술한 바가 있다. 본 실험에서도 근위세뇨관세포질내에 다수의 지방적이 관찰되었는데 신장조직에 카드뮴-옥신 반응을 시킨 후의 지방적은 전자밀도가 증가되어 있어서 여기에 카드뮴이 축적되어 있을 것으로 추측되어진다.

요 약

염화카드뮴을 흰쥐의 복강내에 투여하여 신장을 적출한 뒤 투과전자현미경을 이용하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

족세포에는 내형질세망의 확장과 많은 수초모양 잔류체가 관찰되었으며 부분적인 내피세포의 손상과 사구체 주위의 섬유화가 관찰되었다. 주된 변화는 근위세뇨관 세포에서 일어났으며 구열을 가지는 지방적과 내형질세망의 확장, 미토콘드리아의 종창 및 많은 이차 리소솜이 관찰되었으며 농도 및 투여기간이 길수록 농축된 핵이 많아지고 세뇨관강내에 괴사된 물질이 많아지며 기저막 및 세포막의 파괴가 일어났다. 원위세뇨관에의 변화는 근위세뇨관만큼 변화가 심하지 않았으며 내형질세망 확장과 리소솜의 증가 및 약간의 농축된 핵이 관찰되었다. 이러한 변화들은 카드뮴이 신세포에 직접 내독소로 작용하여 세포상해를 초래하였을 것으로 보여지며 손상의 초기에는 세포질의 소기관의 변화가 초래되는 가역성 변화가 초래되고 후기에는 핵의 농축과 세포막의 파괴까지 초래되는 비가역성 변화가 일어나는 것으로 생각되며 이 과정에서 카드뮴은 신세뇨관세포의 지방적내에 축적되는 것으로 보여진다.

= *Abstract* =

Electron Microscopic Study of Cadmium Nephrotoxicity

Kwan Kyu Park, M.D.

Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

This study was carried out to investigate the electron microscopic findings of the kidneys of rats after intraperitoneal injection of cadmium chloride. The Sprague-Dawley rats were intraperitoneally injected with cadmium chloride dissolved in water, once a day for three days.

These animals were sacrificed at 1, 3, 8, and 24 hr after the last injection. Control groups of the rats were also sacrificed in the same manner. The kidney was extirpated and examined by transmission electron microscopy. The results obtained are as follows:

The podocytes show dilatation of endoplasmic reticulum and numerous myelin-like residual bodies. The periglomerular fibrosis is also seen. The proximal tubular cells show fat droplets, dilatation of endoplasmic reticulum, mitochondrial swelling, secondary lysosomes and occasional pyknotic nuclei. The basement membrane of the proximal tubule is ruptured and necrotic material is filled within it. The distal tubular cell is not so changed as proximal tubular cell, but endoplasmic reticulum is dilated and lysosomes are increased. The fat droplets in the proximal tubular cells are electron-dense after treatment with oxine, suggesting that the fat droplets may contain cadmium itself or related substances. Therefore, it can be concluded that the cadmium is directly acted to proximal tubular cells resulting in cellular injury and deposits the fat droplets in the cytoplasm of the proximal tubule. The cadmium is suggested to be deposited in the fat droplets.

Key Words: Cadmium, Kidney, Electron microscopy, Rat

REFERENCES

1) Tsuchiya KC: *Causation of ouch-ouch disease, Part II, Epidemiology and evaluation. Keio J Med* ***18****: 181-211, 1969*
2) Friberg L: *Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. Acta Med Scand* ***138****(Suppl 240):1-124, 1950*
3) Friberg L: *Chronic cadmium poisoning. Arch Industr Health* ***20****:401-407, 1959*
4) Piscator M: *Proteinuria in chronic cadmium poisoning: I. An electrophoretic and chemical study of urinary and serum proteins from workers with chronic cadmium poisoning. Arch Environ Health* ***4****: 607-621, 1962*
5) Potts AM, et al: *Distribution and fate of cadmium in the animal body. Arch Industr Hyg Occup Med* ***2****: 175-188, 1950*
6) Bonnell JA, Ross JH, King E: *Renal lesions in experimental cadmium poisoning. Brit J Industr Med* ***17****:69-80, 1960*
7) Friberg L: *Further investigations on chronic cadmium poisoning. Arch Industr Hyg Occup Med* ***5****:30-36, 1952*
8) Dalhamn T, Friberg L: *Morphological investigations on kidney damage in chronic cadmium poisoning:*

An experimental investigation on rabbits. Acta Path Microbiol Scand ***40****:475-479, 1957*

9) Axelsson B, Piscator M: *Renal damage after prolonged exposure to cadmium: An experimental study. Arch Environ Health* ***12****:360-373, 1966*

10) Nishizumi M: *Electron microscopic study of cadmium nephrotoxicity in the rat. Arch Environ Health* ***24****:215-225, 1972*

11) Kendrey G, Roe FJC: *Cadmium toxicology. Lancet* ***1****: 1206-1207, 1969*

12) Stowe HD, Wilson M, Goyer RA: *Clinical and morphological effects of oral cadmium toxicity in rabbits. Archs Path* ***94****:389-405, 1972*

13) Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y: *Ultrastructural studies on a cadmium-storing cell in rat pancreatic tissues following cadmium chloride adminintration. J Electron Microsc* ***38****:235-241, 1989*

14) Damiano VV, Cherian PV, Frankel FR, Steeger JR, Sohn M, Oppenheim D, Weinbaum G: *Intraluminal fibrosis induced unilaterally by lobar instillation of* $CdCl_2$ *into the rat lung. Am J Pathol* ***137****:883-894, 1990*

15) Park KK, Kim YH, Kwon KY, Chang ES: *Light and electron microscopic study in rat livers following cadmium chloride administration. Korean J Pathol* ***26****:28-39, 1992*

16) Kajikawa K, Nakanishi I, Kuroda K: *Morphological changes of the kidney and bone of rats in chronic cadmium poisoning. Exp Molec Path* ***34****:9-24, 1981*

17) Bernard A, Goret A, Roels H, Buchet JP, Lauwerys R: *Experimental confirmation in rats of the mixed type proteinuria observed in workers exposed to cadmium. Toxicology* ***10****:369-375, 1978*

18) Bernard A, Viau C, Lauwerys R: *Renal handing of human beta-2-microglobulin in normal and cadmium poisoned rats. Archs Toxicol* ***53****:49-57, 1983*

19) Bernard A, Buchet JP, Roels H, Masson P, Lauwerys R: *Renal excretion of proteins and enzymes in workers exposed to cadmium. Eur J Clin Invest* ***9****:11 -22, 1979*

20) Luft JH: *Improvement in epoxy resin embedding method. J Biophysic Biochem Cytol* ***9****:409-414, 1961*

21) Watson ML: *Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J Biophsic Biochem Cytol* ***226****:475-479, 1958*

22) Reynolds ES: *The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol* ***17****:208-212, 1963*

23) Mizuhira V, Kimura M: *Clinic all-around (Japanese Journal, "Kuriikku Ooru Araundo"),* ***23****:76-84, 1974*

24) Creeth JM, Kekwick RA: *An ultracentrifuge study of urine proteins with particular reference to the proteinuria of renal tubular disorders. Clin Chim Acta* ***8****:406-414, 1963*

25) Prodan L: *Cadmium poisoning: II. Experimental cadmium poisoning. J Industr Hyg* ***14****:174-196, 1932*

26) Wilson RH, et al: *Effects of continued cadmium feeding. J Pharmacol Exp Ther* ***71****:222-235, 1941*

27) Anwar RA, Langham RF, Hoppert CA, et al: *Chronic toxicity studies: III. Chronic toxicity of cadmium and chromium in dogs. Arch Environ Health* ***3****:456-460, 1961*

28) Simon FP, Potts AM, Gerard RW: *Action of cadmium and thiols on tissue and enzymes. Arch Biochem* ***12****:283-291, 1947*

29) Jacobs EE, Jacobs M: *Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. J Biol Chem* ***223****:147 -156, 1956*

30) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: *Robbins pathologic basis of diseases 4th ed. W.B. Saunders Company, 1989, pp 26-28*

31) de Duve C, Wattiaux R: *Functions of lysosomes. Ann Rev Physiol* ***28****:435-492, 1966*

32) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: *Robbins pathologic basis of diseases 4th ed. W.B. Saunders Company 1989, pp 4-8*

33) Angevine JM, Kappas A, DeGowin RL, et al: *Renal tubular nuclear inclusions of lead poisoning: A clinical and experimental study. Arch Path* ***73****:486 -494, 1962*

34) Reynolds ES: *Liver parenchymal cell injury: I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. J Cell Biol* ***19****:139-157, 1963*

35) Suzuki T, Mostofi FK: *Electron microscopic studies of acute tubular necrosis: Early changes in the proximal convoluted tubules of the rat kidney following subcutaneous injection of glycerin. Lab Invest* ***15****:1225-1247, 1966*