

김동식의 박사학위 논문을 인준함

초산납 투여로 인한 백서소장 점막세포의 초미형태학적 연구

지도교수 장 은 숙
 박 영 춘

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

1993년 12월

계명대학교 대학원
의학과 병리학전공

김동식 1993년 12월 석

김동석의 박사학위 논문을 인준함

주심	강	창	수	
부심	박	영	춘	1
부심	장	은	숙	4
부심	이	태	숙	8
부심	이	상	숙	13
				19
				21
				26
				38

계 명 대 학 교 대 학 원

1993년 12월

목 차

서	론	1
재료	및 방법	4
성	적	8
고	찰	13
요	약	19
참고	문헌	21
사진	도보 및 설명	26
영문	초록	38

초산납 투여로 인한 백서소장 점막세포의 초미형태학적 연구

계명대학교 대학원
의학과 병리학전공

(지도교수 **장은숙**)
박영춘

김 동 석

서 론

중금속에 의한 환경오염은 산업사회의 급속한 발달로 인해 날로 심각해지고 있으며 중금속은 토양에 장기간 잔류하여 지속적으로 인체에 상해를 일으킬 수 있다. 이들중 납은 초산납 (lead acetate)을 비롯한 40 여종 이상의 화합물의 형태로 존재하며¹⁾ 주위 환경에서 흔히 발견되는 중금속의 하나이다^{2,3)}. 납은 소량으로 장기간 흡수되어 인체에 독성을 나타낼 수 있으며^{4,5)} 인체에 대한 독성은 고대 그리스시대부터 알려져 있다^{2,6)}. 납은 페인트, 축전지 제조, 납땀, 용접, 도기제조, 물, 공기, 토양등 많은 근원으로부터, 위장관과 호흡기를 통해서 인체에 흡수된다^{4,7,8)}. 위장관을 통한 흡수는 주로 십이지장을 통해서 이루어지며 먹은 양의 1~10% 정도가 흡수되나, 흡수정도는 연령에 따라 현저한 차이를 보여, 소아의 경우 먹은 양의 약 50%가 흡수된다^{2,4,9)}. 세포막을 통한 납의 통과는 능동적 수송 (active transport)과 수동적 확산 (passive

diffusion)에 의해 이루어 진다는 보고^{2,10,11)}와 세포내이입 (endocytosis)에 의해서도 흡수된다는 보고¹²⁾ 등 다양하다. 흡수된 납은 골격계와 혈액 특히 적혈구에 각각 80-85%, 5-10%정도 축적되며⁴⁾, 인체의 여러 장기에 상해를 초래하게 되는데, 이중 혈액, 신경계, 신장등에 미치는 영향에 대한 연구는 활발하나¹³⁻²⁰⁾ 흡수되는 장기로서 중요한 소장의 형태학적 병변에 대한 연구는 드문 실정이다. 조직내에 존재하는 중금속을 가시화하기 위한 방법으로 1958년 Timm에 의해 제시된 sulphide silver 방법 (Fig. 1)이 있다²¹⁻²³⁾.

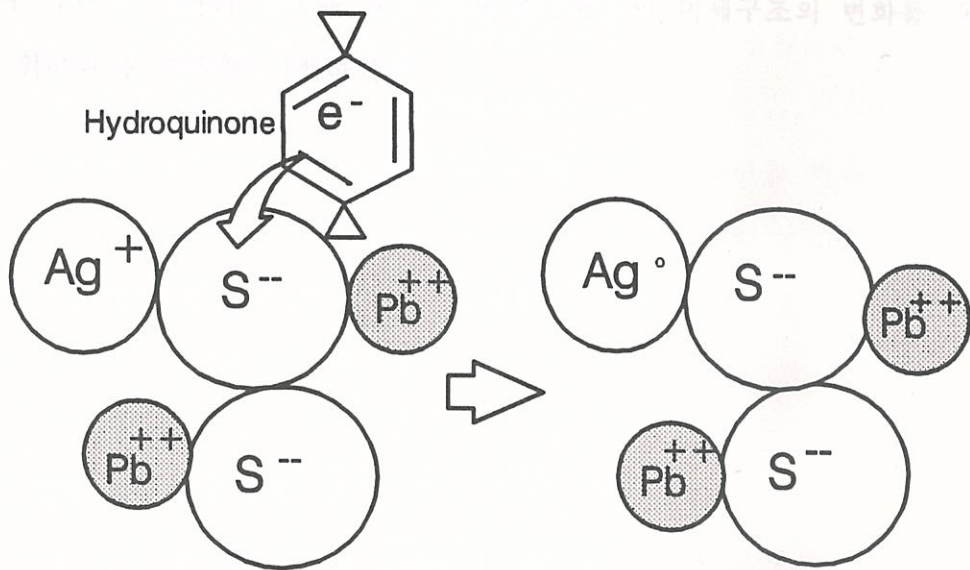


Fig. 1. Timm sulphide silver method. Lead sulphide which is previously formed during perfusion can be visualized after reduction of silver ions by hydroquinone on the surface of the lead sulphide molecule.

즉 조직중에 존재하는 중금속에 황 (S^{2-})을 결합시킨 후 음이온 (e^-)의 존재하에 은 (Ag^+)을 공급하면 조직내의 중금속이 가시화 된다는 원리이며, 이 방법을 이용하여 수은 (Hg), 카드뮴 (Cd), 망간 (Mn), 아연 (Zn), 철 (Fe), 납 (Pb) 등의 중금속을 가시화할 수 있고, 가시화된 중금속은 광학현미경소견상 갈색 과립으로 나타나며 투과전자현미경소견상 고전자밀도의 과립으로 나타나게 된다.

저자는 초산납을 흰쥐에 경구로 투여한 후 Timm sulphide silver 방법²¹⁻²³⁾을 이용하여 소장 흡수세포를 통한 납의 흡수경로를 규명함과 동시에, 초산납 경구 투여후 시간의 경과에 따른 소장 흡수세포의 미세구조의 변화를 관찰하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

초산납을 섞어 100배 농도로 투여하였고 대조군과 같은 시기에 사육을 위해 도란하얀과 도란을 섞어서 채워진 복부 정중선을 따라 절개하여 복부대동맥 주위부에 도란 (canula)을 침투시켜 방향으로 삽입하여 경동맥으로 도란을 통해 농도 0.3% 납을 주입하였다. 복벽을 5 ml 채워한 후 복벽막을 덮고 흡수동물체를 절제하였다.

1) 실험동물의 사육 방법

도란을 통해 대동맥 혈관에 $Na^{210}Pb^{210}$ 를 투여한 방법에 따라 ICP (inductively coupled plasma) 분석기를 사용하였다.

2) 납의 투여 방법

Timm²¹⁾의 방법과 일치하게 따라 되어 삽입된 도란을 통하여 0.1% sodium

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 250 g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐 수컷 54 마리를 사용하였다.

2. 실험방법

마시는 물은 증류수를 사용하였다. 대조군은 마시는 물에 초산나트륨 (sodium acetate)을 섞어 0.01%의 농도로 투여하였으며 투여후 0.5, 1, 1.5 시간 및 2, 7, 15, 30, 45, 60 일째 각 2 마리씩 도살하였고, 실험군은 마시는 물에 초산납을 섞어 0.01%의 농도로 투여하였으며 대조군과 같은 시기에 각 4 마리씩 도살하였다. 흰쥐를 에테르 마취하에 복부 정중선을 따라 절개한 후 복부대동맥 분지점에 도관 (cannula)을 혈류의 역방향으로 삽입하여 결찰하였고 도관을 통해 헤파린 0.3 ml을 주입하였다. 혈액을 5 ml 채취한 후 횡경막을 열고 흉부대동맥을 결찰하였다.

1) 혈중 납농도의 측정

도관을 통해 채취한 혈액을 Stahr²⁴⁾가 제시한 방법에 따라 ICP (inductively coupled plasma)로 측정하였다.

2) Sulphide의 공급

Danscher²⁵⁾가 제시한 방법에 따라 이미 삽입된 도관을 통하여 0.1% sodium

sulphide용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) 5 ml을 주입한 후 2.5% glutaraldehyde용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)을 3 분동안 주입하였고 다시 0.1% sodium sulphide 용액 250 ml를 주입하였다. 도관을 통한 관류를 마친 후 십이지장을 1 cm 채취하여 광학현미경적 관찰 및 전자현미경적 관찰을 위한 시료로 제공하였다.

3) 광학현미경적 관찰

채취된 십이지장 조직을 2.5% glutaraldehyde용액으로 2 시간동안 고정한 후 계열에탄올로 탈수하고 연질파라핀으로 45 °C에서 침투 및 포매를 실시하였다. 두께 4 μm 의 절편을 유리슬라이드에 부착시켜 탈파라핀 및 함수과정을 거친 다음 0.5% 젤라틴을 피복한 후 현상 (development) 하였으며 증류수로 세척한 다음 hematoxylin & eosin염색을 하였다.

4) 투과전자현미경적 관찰

채취된 십이지장 조직을 1 x 1 x 1 mm의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde용액으로 2 시간동안 고정한 후 0.1 M phosphate buffer로 세척한 다음 계열에탄올로 탈수과정을 거친 후 propylene oxide로 치환하였다. Luft방법²⁶⁾에 의해 Poly/Bed[®] 812 Resin으로 포매하여 37 °C에서 12 시간, 45 °C에서 48 시간동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절하여 현상한 다음 toluidine blue로 염색하여 관찰부위를 선택하였다. Sorvall MT 500형 초박절기에 Dupont diamond칼을 부착하여 회백색 (40-60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 제작하여 니켈 그리드 (nickel grid)에

부착한 후 현상한 다음 Watson²⁷⁾과 Reynolds²⁸⁾에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 십이지장 용모의 중간부위를 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

5) 주사전자현미경적 관찰

십이지장 조직을 1 x 1 x 4 mm의 크기로 세절한 다음 2.5% glutaraldehyde용액으로 4 °C에서 2 시간동안 전고정한 후 0.1 M phosphate buffer로 세척하였다. 1% OsO₄용액으로 1 시간동안 후고정한 다음 2% tannic acid로 전도염색을 실시하였고 다시 1% OsO₄로 1 시간 고정된 다음 계열에탄올로 탈수한 후 isoamyl acetate로 침투시켰고 Hitachi HCP-2형 임계점건조기로 이산화탄소를 사용하여 임계점건조를 실시하였다. 건조된 시료를 시료판에 부착한 후 Eiko IB-3형 ion coater로 Pt-Pd를 사용하여 증착한 후 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

6) 현상

광학현미경적 관찰과 투과전자현미경적 관찰시 이미 시료내에 존재하는 납을 가시화하기 위해 Danscher²¹⁾가 제시한 현상방법을 따랐으며 사용한 현상액은 gum arabic용액, citrate완충액, 환원제와 은용액을 각각 60:10:15:15의 비율로 섞어서 사용하였다. 광학현미경적 관찰을 위해 유리슬라이드에 부착된 시료에 현상액을 떨어뜨린 후 암실에서 26 °C에 1 시간동안 방치하였으며, 투과전자현미경을 위해 시료가 부착된 그리드를 현상액 속에 침수시킨 후 암실에서 26 °C에 1 시간동안 방치하였다. Gum arabic용액은 crystalline gum

arabic 1 kg을 2 L의 증류수에 녹여 5 일간 방치한 후 거즈로 걸러서 사용하였으며, citrate완충액은 25.5 g의 citric acid와 23.5 g의 sodium citrate를 100 ml의 증류수에 섞어서 사용하였다. 환원제로서는 0.85 g의 hydroquinone을 15 ml의 증류수에 섞어서 사용하였으며, 은용액은 0.11 g의 silver lactate를 15 ml의 증류수에 섞어서 사용하였다. 은용액은 현상직전에 나머지 용액들과 섞어서 사용하였고 암실에서 26 °C를 유지하면서 1 시간 동안 방치하였다.

1. 혈중 납농도

1) 대조군: 전 실험기간 동안 0.01~0.02 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

2) 실험군: 초산납 투여 2 일째 군에서 평균 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 투여 45 일째 군에서 0.27 $\mu\text{g/ml}$ 이었고 투여 60 일째 군에서 0.22 $\mu\text{g/ml}$ 이었다 (Fig. 2).

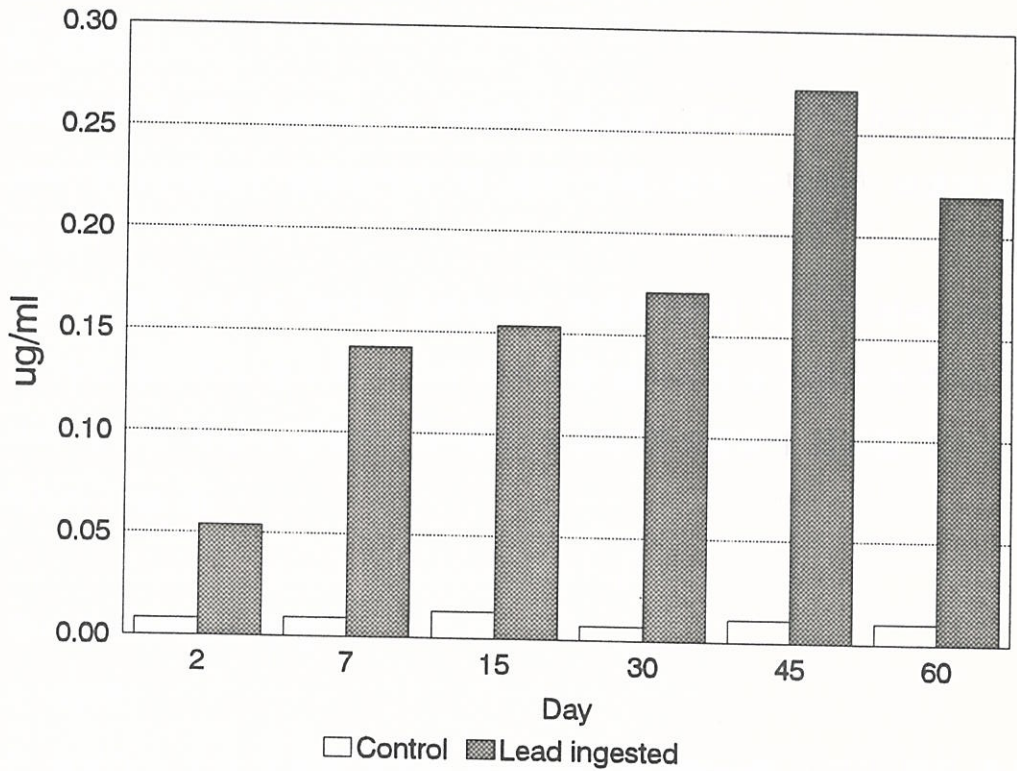


Fig. 2. Blood concentration of lead after oral administration of 0.01% lead acetate.

2. 육안적 소견

대조군과 실험군 모두에서 십이지장 점막은 연노랑 혹은 연녹색을 띄며 평탄하였고 장막은 연분홍색을 띄며 평탄하였다.

3. 광학현미경적 소견

1) 대조군:

전 실험기간 동안 용모는 가늘고 길며 쇠자연 (brush border)이 잘 발달되어 있었고 배상세포 (goblet cell)의 수적 변화는 없었다.

2) 실험군:

초산납 투여 0.5 시간부터 30 일째까지 용모는 가늘고 길게 유지되었으며 용모의 중간부위보다 끝부분에서 더 많은 수의 갈색 과립들이 관찰되었다 (Fig. 3).

투여 45 일째 용모의 경미한 둔화현상이 관찰되었으며 투여 60 일째 군에서는 4 마리 모두에서 용모의 길이가 경미하게 짧아지며 4 마리중 3 마리에서 용모의 림프관 확장이 관찰되었고 간혹 용모의 둔화현상이 중등도 이상으로 심해졌다 (Fig. 4).

4. 주사전자현미경적 소견

1) 대조군:

전 실험기간 동안 용모의 표면은 평탄하였으며 crease의 깊이가 얇고 용모의 탈락영역 (extrusion zone)의 불규칙성은 경미하였다 (Fig. 5).

2) 실험군:

초산납 투여 0.5 시간부터 30 일째까지는 대조군과 유사한 소견을 보였으며 투여 45 일째 용모의 둔화현상은 경미하였고 용모의 탈락영역의 불규칙성이 심해졌으나 crease의 깊이는 변화가 없었다. 투여 60 일째 용모의 둔화현상이 심해졌으며 crease는 더욱 깊어졌고 용모의 탈락영역의 불규칙성이 심해졌다. 투여 60 일째 4 마리중 3.마리에서 용모가 팽창되었다 (Table 1, Fig. 6).

Table 1. SEM findings of villi of rat duodenum after oral administration of 0.01% lead acetate.

	2 d	45 d	60 d
Shortening of villi	-	-	+
Blunting of tip	-	+	+
Increase of depth of crease	-	-	++
Irregularity of extrusion zone	-	+	+++
Ballooning of tip	-	-	+

d: day, -: absent, +: mild, ++: moderate, +++: severe

5. 투과전자현미경적 소견

1) 대조군:

내강쪽에는 미세용모가 잘 발달되어 있었으며 연접복합체 (junctional complex)인 tight junction, intermediate junction, desmosome, gap junction

및 intercellular digitation등도 잘 발달되어 있었다. 세포간강 (intercellular space)은 소수의 세포의 하부에서 경미하게 발달되어 있었다. 핵은 세포의 하부에 위치하며 난원형이었고 핵의 가장자리는 약간 울퉁불퉁하였다. 핵염색질은 핵막쪽으로 몰려 있었으며 핵인은 불분명하였다. 세포질의 최상층에는 terminal web이 관찰되었다. 세포내 소기관중 미토콘드리아가 가장 잘 발달되어 있었으며 세포의 장축을 따라 길쭉길쭉한 모양을 취하고 있었다. 미토콘드리아 사이사이에 조면세포질내세망 (rough endoplasmic reticulum)이 미토콘드리아와 나란히 배열되어 있었으며 polysome의 발달은 경미하였다. 핵의 상부에 골지 복합체가 관찰되었다. 소수의 이차리소솜 (secondary lysosome)과 post-lysosome이 관찰되었다 (Fig. 7).

2) 실험군:

초산납 투여 0.5 시간째 고전자밀도의 과립의 수가 증가되었으며, 1.5 시간째부터 고전자밀도의 과립의 수가 감소하여 (Fig. 8) 투여 2 일째는 대조군과 유사한 소견을 보였다.

투여 7 일과 15 일째는 연접복합체의 확장이나 소실은 없었다. 세포간강이 세포의 중상부에서도 확장되었다. 고전자밀도의 과립들은 세포내 특정 소기관에 국한되지 않고 미만성으로 관찰되었으며 핵내에서도 관찰되었다 (Fig. 9). 핵은 난원형을 유지하고 있었으며 핵염색질의 농축은 없었다. 미토콘드리아의 간질내에 소공포들이 나타나기 시작하였으며, 경미한 리보솜의 탈락이 보였으나 이차리소솜이나 post-lysosome등은 관찰되지 않았다 (Fig. 10). 투여 30 일과 45 일째는 연접복합체는 그대로 유지되었으며 세포간강이 세포의 중상부에서도 확장되었다. 고전자밀도의 과립들은 미만성으로 관

찰되었다 (Fig. 11). 이차리소솜이 나타나기 시작하였고 미토콘드리아의 간질이 농축되었으며 퇴행성 변화가 일어난 미토콘드리아내에서 미엘린상(myelin figure)의 형성이 관찰되었다 (Fig. 12).

투여 60 일째 핵막이 불규칙해졌으며 세포간강이 세포의 최상부까지 확장되었다 (Fig. 13). 미토콘드리아의 간질에 소공포가 나타났으며 국소적으로 능선(cristae)의 소실이 있었다. 세포질내에서도 소공포의 형성이 자주 관찰되었다. 이차리소솜과 미엘린상의 수가 현저히 증가되었고 일부에서는 세포간강으로 배출되는 미엘린상도 보였다. 조면세포질내세망의 확장이 나타나기 시작하였으며 리보솜의 탈락이 심하였다 (Table 2, Fig. 14-16).

Table 2. TEM findings of absorptive cells in the midportion of villi of rat duodenum after oral administration of 0.01% lead acetate.

	2 d	7-15 d	30-45 d	60 d
Intercellular space				
Widening	-	+	++	++
Mitochondria				
Cristae loss	-	+	+	++
Vacuole of matrix	-	-	+	++
Lysosome				
Secondary lysosome	-	-	+	++
Residual body	-	-	+	+++
RER				
Ribosomal shedding	-	+	++	++
Dilatation	-	-	-	+

d: day, -: absent, +: mild, ++: moderate, +++: severe

물질의 세포내 흡수기전에는 4 가지 방법이 있는데 첫째, 농도의 차이에 의해 세포막을 통과하는 수동적 확산, 둘째, 기본적으로는 수동적 확산에 해당되나 carrier와 결합하여 흡수되는 촉진확산 (facilitated diffusion), 셋째, 농도의 차이와는 무관하게 에너지의 존재하에 세포막을 통과하는 능동적 수송, 넷째, 세포막에 의해 에워 싸인채 세포내로 함입되는 세포내이입 (endocytosis)이다^{29,30)}. DeMichele²⁾, Blair등¹⁰⁾, Gruden등¹¹⁾에 의하면 낮은 능동적 수송과 수동적 확산에 의해 흡수된다고 하였다. 본 연구에서는 납과립들이 세포내 특정 소기관에 국한되지 않고 미만성으로 관찰되었으며, GERL (Golgi-Endoplasmic Reticulum-Lysosome) 체계를 따라 단계적으로 관찰되지도 않았고, 비록 초산납 투여 7 일째 부터 나타나기는 했으나 미토콘드리아의 능선소실 또는 간질의 공포화 등 퇴행성 변화가 관찰됨에도 불구하고 납의 흡수가 관찰되었다. 이는 에너지 생산체계가 손상받은 상황에서도 납이 흡수되었다고 해석이 되어 형태학적인 측면에서 납의 세포내 흡수방법을 추정할때 수동적 확산도 일부 관여하리라고 생각된다. 이는 everted sac procedure를 이용하여 납이 수동적 확산에 의해 장막 (intestinal membrane)을 통과한다고 주장한 Blair등¹⁰⁾과 Gruden등¹¹⁾의 연구와 일치하는 소견이다.

세포막의 당피 (glycocalyx)층에는 sulfur 기가 풍부하므로 납이 sulfur 기와 결합하여 당피층의 변성을 초래함으로써 세포이입에 의해서도 흡수될 수 있을 것이라는 추정을 할 수 있는데, 본 연구에서는 전 실험기간동안 포음소포 (pinocytotic vesicle)내에 고전자밀도의 과립이 관찰되지 않았다. 이는 포음

소포가 많이 형성되면서 그 속에서 고전자밀도의 과립이 관찰되어 납의 흡수에 세포내이입이 관여할 것이라고 주장한 Tomczok¹²⁾의 연구와는 다르다. 그러나 Tomczok¹²⁾의 연구에서는 투과전자현미경용 시료제작 과정중 1% OsO₄에 의한 후고정을 하였다는 점이 후고정 과정을 생략한 본 연구와 큰 차이점으로 생각되며, Danscher²¹⁾가 제시한 시료제작 방법중 osmium에 의한 후고정시 metal sulphide대신 osmium sulphide가 생성됨으로써 투과전자현미경 소견상 위양성 반응이 초래된다는 점을 고려해 볼 때, 납이 세포내이입에 의해서도 일부 흡수된다는 사실을 입증하려면 위양성 반응을 없앨 수 있는 더욱 개선된 고정방법 또는 염색방법에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

납의 세포상해 기전에는 저산소상해 (hypoxic injury)⁴³¹⁾와 유리기상해 (free radical injury)^{32,33)}의 두가지 방법이 있다. 저산소상해 이론에 의하면 납은 sulfhydryl 기와 친화성이 있어 아연의존성 (zinc dependent) 효소계에 독성을 나타냄으로써 헵합성에 관여하는 2 가지의 효소인 δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALAD)와 ferrochelatase의 기능을 방해하게 된다. 결국 헤모글로빈과 cytochrome의 합성이 이루어지지 않게 되고 미토콘드리아의 고유의 기능인 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation)의 기능이 저하되어 ATP생산이 감소됨으로써 형태학적인 일련의 변화, 즉, 미토콘드리아의 종창, 능선 소실, 조면세포질내세망의 종창, 이차리소솜과 미엘린상의 증가, 핵막의 불규칙성, 리보솜의 탈락, 지방적의 축적 등이 초래된다.

본 연구에서도 초산납 투여 7 일째부터 미토콘드리아의 능선 소실, 간질내 소공포의 발생등의 퇴행성 변화와 리보솜의 탈락현상이 나타났으며, 투여 60 일째는 미토콘드리아의 퇴행성 변화가 심해졌으며 미엘린상의 수가 급격히 증

가하였고 핵막이 불규칙해지는 등 일련의 퇴행성 변화가 나타났는데, 이는 Karmakar등⁵⁾과 Tomczok등¹²⁾의 연구 결과와 일치하며, 투여방법의 차이는 있지만 복강내 주사를 이용한 Wapnir등¹³⁾이나, 먹는 물을 통해서 투여하지 않고 매일 규칙적으로 gavage를 이용하여 투여한 Grzybek등¹⁵⁾, 어미가 경구투여로 노출시 새끼의 소장을 관찰한 Tomczok등³⁴⁾의 결과와도 유사하였다. 이는 방사선 조사^{35,36)}나 에탄올 투여 또는 화학치료제의 투여³⁷⁾등에서 나타나는 일련의 퇴행성 변화와 같으며 모든 허혈성 상해시 초래되는 비특이적인 퇴행성 변화로 해석하였다. 리소솜은 다수의 단백분해 효소를 가지고 있는 세포질 내 소체로서, 단백분해 효소들은 조면세포질내세망에서 만들어지고 골지 복합체에서 농축되어 일차리소솜 (primary lysosome)이 형성된다. 일차리소솜은 소화될 물질과 융합하여 이차리소솜이 되는데, 이차리소솜에는 세포밖으로 부터 유입된 이물질을 소화처리하는 heterophagosome과 손상된 세포내 소기관을 소화처리하는 autophagosome등 2 가지의 종류가 있다⁴⁾. 본 연구에서 초산납 투여 45 일째부터 이차리소솜의 수가 증가하기 시작하여 투여 60 일째 이차리소솜의 수가 급격히 증가하였다. 이는 이미 7 일째부터 발생된 미토콘드리아의 손상등 세포내 소기관의 손상을 소화하기 위한 반응성 변화로 해석되며, 투여 60 일째 조면세포질내세망의 확장등이 세포내 소기관의 손상을 가중시키면서 이차리소솜의 수가 급격히 증가하였고 또한 미엘린상의 수도 증가한 것으로 해석하였다. 세포내 소기관의 손상된 소견이 투여후 조기에 나타나지 않은 것은 투여한 납의 농도가 낮기 때문으로 해석할 수 있으나 이는 납의 투여 농도를 여러가지로 조정하여 투여함으로써 더욱 확실한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각하였다.

본 연구에서는 관류효과를 방해할 수 있는 혈액응고를 방지하기 위하여 헤파린을 주입하였는데 헤파린에 의해 혈액이 희석되어 혈중 납농도가 낮게 측정 될 수 있으므로 투여하는 납의 농도에 따른 형태학적 변화를 정확하게 판단하기 위해서는 헤파린을 주입하지 않아야 할 것으로 생각된다. 실제로는 혈중 납농도가 표2의 수치보다 더 높을 것으로 사료되나 인체에 대한 납 증독 기준치¹⁾인 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 보다는 낮으므로, 저농도의 납에 장기간 노출될 때에도 납에 의한 세포상해가 일어날 수 있다고 생각된다. 한편 유리기상해 이론^{32,33)}에 의하면, 납에 의해 δ -ALAD의 기능이 저하되면서 δ -aminolevulinic acid (δ -ALA)가 증가하게 되는데 이 δ -ALA에 의해서 산소유리기 (oxygen free radical)가 증가되면서 세포상해를 초래한다는 이론이다. 납의 세포상해 기전으로서 어느 이론이 기전으로 작용하든지, 세포막의 투과성이 불안정해짐으로써 납의 흡수에도 영향을 미치리라 생각된다. 초산납 투여군에서 투여 2 일째부터 투여 45 일째까지 혈중 납농도가 증가하였다가 투여 60 일째 경미하게 하락하였는데, 이는 납에 의해 미토콘드리아의 산화적 인산화 기능이 방해받으면서 세포막의 능동적 수송기능이 저하되었기 때문으로 추정하였다. 또는 실험기간이 경과됨에 따른 흰쥐의 식욕감퇴가 관여할 수도 있겠으나, 본 연구에서는 매일 먹은 양을 측정하지 않았으므로 단정적으로 말할 수는 없다. 세포의 흡수기능을 반영하는 형태학적 소견으로서 세포간강의 확장이 있는데, 정상적으로 세포간강은 세포간 접합부의 하부 즉, 기저막쪽에서 관찰될 수 있으나 세포간 접합부의 상부 즉, 소장 내강쪽에는 세포간강이 없다^{38,39)}. 본 연구에서는 초산납 투여 7 일째부터 세포간강의 확장이 심해져서 세포간 접합부의 상부로 확대되기 시작하여 투여 60 일째 더욱 심해져서 세포간 접합부의

최상부에서도 관찰되었다. 이는 물과 전해질의 흡수시에 세포간강의 확장이 초래된다는 Tomasini등⁴⁰⁾의 주장과 일치되는 소견이다. 그러나 투여후 시간이 경과 할수록 세포간강의 확장이 세포의 상부로 확대되는 현상은 흡수력을 최대화하려는 반응성 변화로 추정하였다. 한편, 광학현미경 소견상 투여 2 일째 용모의 끝부분에서 갈색과립에 의해 진하게 염색된 것은 용모의 끝에 있는 흡수세포가 최대의 흡수력을 갖기 때문³⁸⁾으로 해석하였다. 투여 60 일째 대조군에서 보다 용모의 길이가 경미하게 짧아지며 간혹 용모의 끝이 둔화된 점은 상피세포의 퇴행성 변화에 기인한 용모의 위축에 기인한다고 생각된다. 이러한 소견은 주사전자현미경으로도 잘 관찰되었다. 즉, 정상소견⁴¹⁾ 보다 용모끝의 탈락영역의 표면이 거칠어지면서 둔화되었으며 용모의 길이가 경하게 짧아졌고 crease가 깊어졌다. 이러한 소견은 Tomczok등^{39,42)}의 연구결과와 유사하였고 흡수세포의 퇴행성 변화가 심해지면서 초래된 일련의 비특이성 변화로 생각된다. 초산납 투여 60 일째 군에서 4 마리중 3 마리에서 주사전자현미경상 용모끝의 팽창이 관찰되었는데 이는 광학현미경상 관찰된 림프관 확장 때문으로 생각된다. 이러한 림프관 확장은, 납에 의해 초래된 세포막의 투과성 장애로 인해 당분이나 아미노산의 흡수가 감소하면서 발생했을 것으로 사료되나 이는 실험기간의 연장, 납의 투여농도 조정, 실험동물의 변경, 혈중 아미노산 또는 단백질양의 측정등 다양한 조건을 부여함으로써 더 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각하였다.

이상의 소견으로 납의 세포내 흡수기전으로서 능동적 수송뿐만 아니라 수동적 확산도 일부 관여하며, 초산납 투여 후 0.5 시간 이내에 대부분의 납이 흡수되고 납에 의한 세포상해 소견은 비특이적 퇴행성 변화로 생각하였다. 또한

납에 의한 소장 흡수 세포의 상해는 저농도의 납에 장기간 노출되어도 유발될 수 있다고 생각하였다.

저자는 초산납을 흰쥐에게 경구로 투여한 후 소장 흡수세포를 통한 납의 흡수 경로와 납에 의한 소장 흡수세포의 상해를 규명하기 위하여 Sprague-Dawley종 흰쥐에 0.01% 초산납을 먹는물로 투여한 후 0.5, 1, 1.5 시간 및 2, 7, 15, 30, 45, 60 일째 각각 4 마리씩 도살하여 십이지장 조직을 채취하였다. 이미 조직내에 존재하는 납을 가시화하기 위하여 Timm sulphide silver방법을 이용하여 현상한 후 광학현미경, 주사전자현미경 및 투과전자현미경으로 관찰하였다. 그 성적을 요약하면 다음과 같다.

1. 혈중 납농도는 초산납 투여 2 일째부터 45 일째까지 지속적으로 증가하였다가 투여 60 일째 하락하였다.

2. 광학현미경적 소견으로는 초산납 투여 0.5 시간째 용모의 끝부분에서 많은 수의 갈색 납과립들이 관찰되었으며, 투여 30 일째까지 정상소견을 보이다가 투여 45 일째 용모의 둔화현상이 나타나기 시작하여 투여 60 일째는 용모의 길이가 짧아지며 일부에서 용모의 림프관 확장과 함께 간혹 용모의 둔화현상이 심해졌다.

3. 주사전자현미경적 소견으로는 초산납 투여 45 일째 용모의 경미한 둔화현상과 용모의 탈락영역이 불규칙해지기 시작하여 투여 60 일째 용모의 둔화현상 및 팽창과 탈락영역의 불규칙성이 더욱 심해졌으며 crease는 더욱 깊어졌다.

4. 투과전자현미경적 소견으로는 초산납 투여 0.5 시간째 납과립의 수가 가장 많이 미만성으로 관찰되었으며 1 시간 이후에는 점차 감소하였다. 또한

세포내 특정 소기관에 국한되어 관찰되지는 않았다. 초산납 투여 2 일째에서는 정상소견을 보였으며 투여 7 일째부터 세포간강의 확장이 심해지면서 미토콘드리아의 간질내에 소공포가 나타나기 시작하였고 리보솜의 탈락이 관찰되었으나 이차리소솜이나 post-lysosome 등은 관찰되지 않았다. 이러한 소견은 투여 15 일째까지 지속되었다. 투여 30 일과 45 일째 이차리소솜들이 나타나기 시작했으며 미토콘드리아의 간질의 농축과 미토콘드리아내에 미엘린상의 형성이 관찰되었다. 투여 60 일째에서는 핵막이 불규칙해졌으며 세포간강의 확장은 심했고 미토콘드리아의 능선의 소실, 소공포의 생성, 그리고 세포질내에서도 소공포의 형성이 자주 관찰되었다. 이차리소솜과 미엘린상의 수도 현저히 증가되었다. 조면세포질내세망의 경미한 확장이 관찰되었고 리보솜의 탈락이 심하였다.

이상의 성적으로 보아 납의 세포내 흡수경로로써 능동적 수송뿐 아니라 수동적 확산도 관여할 것으로 생각되며 초산납 투여로 초래되는 세포내 소기관의 상해는 미토콘드리아의 산화적 인산화 기능을 방해함으로 초래되는 비특이적인 퇴행성 변화로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Budavarie S: Merck index, ed 11. Rahway, Merck & Co., Inc., 1989, pp 851-854.
2. DeMichele SJ: Nutrition of lead. *Comp Biochem Physiol* 1984; 78A: 401-408.
3. Talcott PA, Koller LD: The effect of inorganic lead and/or a polychlorinated biphenyl on the developing immune system of mice. *J Toxicol Environ Health* 1983; 12: 337-352.
4. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: Robbins pathologic basis of disease, ed 4. Philadelphia, WB Saunders Co., 1989, pp 492-494.
5. Karmakar N, Saxena R, Anand S: Histopathological changes induced in rat tissues by oral intake of lead acetate. *Environ Res* 1986; 41: 23-28.
6. Perrelli G, Capellaro E, Pira E, Maina G, Vergnano P: Further cases of lead poisoning from wine. *Am J Ind Med* 1984; 5: 377-381.
7. Kissane JM: Anderson's pathology, ed 8. St. Louis, Mosby Co., 1985, pp 200-201.
8. World Health Organization: Environmental health criteria for Lead, Geneva, World Health Organization, 1977, pp 19-135.
9. Conrad ME, Barton JC: Factors affecting the absorption and excretion of lead in the rat. *Gastroenterology* 1978; 74: 731-740.

10. Blair JA, Coleman IPL, Hilburn ME: The transport of the lead cation across the intestinal membrane. *J Physiol* 1979; 286: 343-350.
11. Gruden N, Stantic M: Transfer of lead through the rat's intestinal wall. *Sci Total Environ* 1975; 3: 288-292.
12. Tomczok J, Tomczok WS, Grzybek H: The small intestinal enterocytes of rats during lead poisoning. The application of the Timm sulphide silver method and an ultrastructural study. *Exp Pathol* 1991; 42: 107-113.
13. Wapnir RA, Moak SA, Lifshitz F, Teichberg S: Alterations of intestinal and renal functions in rats after intraperitoneal injections of lead acetate. *J Lab Clin Med* 1979; 94: 144-151.
14. Russo MA, Kapoor SC, Rossum GDV: 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* 1988; 69: 221-234.
15. Grzybek H, Jonek J, Kochanska D, Panz B: Submicroscopic changes in various organs under the influence of lead acetate poisoning. *Acta Med Pol* 1971; 12: 235-239.
16. Emmerson BT: Lead stores in patients with renal insufficiency. *Nephron* 1991; 58: 233-234.
17. Manesh FR, Gonick HC, Cohen AH, Alinovi R, Bergamaschi E, Mutti A, Rosen VJ: Experimental model of lead nephropathy. I. Continuous

- high dose lead administration. *Kidney Int* 1992; 41: 1192-1203.
18. Pagliuca A, Mufti GJ, Baldwin D, Leatas AN, Wallis RM, Bellingham AJ: Lead poisoning: Clinical, biochemical and hematological aspects of a recent outbreak. *J Clin Pathol* 1990; 43: 277-281.
 19. Tomczok WS, Tomczok J, Matysiak N: Effect of acute lead intoxication on the ultrastructure of neutrophils in the peripheral blood of the rat. *Exp Pathol* 1991; 43: 149-154.
 20. Vandeputte DF, Jacob WA, Grieken RV: Influence of fixation procedures on the microanalysis of lead-induced intranuclear inclusions in rat kidney. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 331-337.
 21. Danscher G: Histochemical demonstration of heavy metals. *Histochemistry* 1981; 71: 1-16.
 22. Graumann W, Drukker J: Histo- and cytochemistry as a tool in environmental toxicology. *Prog Histochem Cytochem* 1991; 23: 273-285.
 23. Danscher G: Applications of autometallography to heavy metal toxicology. *Pharmacol Toxicol* 1991; 69: 414-423.
 24. Stahr HM: Analytical methods in toxicology, New York, John Wiley & Sons Inc., 1991, pp 55-57.
 25. Danscher G, Zimmer J: An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biologic tissue. *Histochemistry* 1978; 55: 27-41.
 26. Luft JH: Improvement in embedding method. *J Biophysic Biochem Cytol*

- 1961; 9: 409-417.
27. Watson ML: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophysic Biochem Cytol* 1958; 6: 475-479.
 28. Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17: 208-212.
 29. Ghadially FN: Ultrastructural pathology of the cell and matrix, ed 3. London, Butterworths, 1988, pp 446-447.
 30. Burkitt HG, Young B, Heath JW: Wheater's functional histology, ed 3. Edinberg, Churchill Livingstone Co., 1993, pp 6-7.
 31. Sullivan JB, Krieger GR: Hazardous materials toxicology, Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1992, pp 834-844.
 32. Hermes-Lima M, Pereica B, Bechara EJ: Are free radicals involved in lead poisoning?. *Xenobiotica* 1991; 21: 1085-1090.
 33. Hermes-Lima M, Valle VG, Vercesi AE, Bechara EJ: 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* 1991; 1056: 57-63.
 34. Tomczok J, Sliwa W, Grzybek H, Panz B: Ultrastructural alterations of the small intestine enterocytes in rats associated with lead poisoning. *Folia Histochem Cytobiol* 1986; 24: 344-345.
 35. Wartiovaara J, Tarpila S: Cell contacts and polysomes in irradiated human jejunal mucosa at onset of epithelial repair. *Lab Invest* 1977;

- 36: 660-665.
36. Trier JS, Browning TH: Morphologic response of the mucosa of human small intestine to x-ray exposure. *J Clin Invest* 1966; 45: 194-204.
 37. Trump BF, Jones R: Diagnostic electron microscopy, New York, John Wiley & Sons, 1978, pp259-268.
 38. Trier JS, Rubin CE: Electron microscopy of the small intestine: A review. *Gastroenterology* 1965; 49: 574-602.
 39. Bloom W, Fawcett DW: A textbook of histology, ed 11. Philadelphia, WB Saunders Co., 1986, pp 641-660.
 40. Tomasini JT, Dobbins WO: Intestinal mucosal morphology during water and electrolyte absorption. *Dig Dis* 1970; 15: 226-238.
 41. Johannessen JV: Electron microscopy in human medicine. Vol 7, Digestive system, New York, McGraw-Hill Co., 1980, pp 132-143.
 42. Tomczok J, Grzybek H, Sliwa W, Panz B: Ultrastructural aspects of the small intestinal lead toxicology. *Exp Pathol* 1988; 35: 49-55.

Key for Abbreviation

- D : Desmosome
GC : Golgi complex
ID : Intercellular digitation
IS : Intercellular space
Ly : Secondary lysosome
MF : Myelin figure
M : Mitochondria
Mv : Microvilli
N : Nucleus
RER : Rough endoplasmic reticulum
TW : Terminal web

LEGEND

- Fig. 3. Thirty minutes after oral administration of 0.01% lead acetate. Villi are long and slender. Lead granules are mostly noted at the tip of villi (arrow) (H&E, $\times 40$).
- Fig. 4. Sixty days after administration of 0.01% lead acetate. Most of the villi are mildly shortened and some of them show lymphangiectasia (arrow). One villus shows blunting of the tip (arrow head) (H&E, $\times 40$).
- Fig. 5. Control group. The surface of villi is smooth and the extrusion zone is slightly irregular (arrow). The creases are shallow (arrow head) (SEM, $\times 180$).
- Fig. 6. Sixty days after administration of 0.01% lead acetate. The surface of villi is coarse and the extrusion zone is markedly irregular (arrow). The creases are deep. Also noted is ballooning of the villi tip (arrow head) (SEM, $\times 180$).
- Fig. 7. Control group. Most of the microorganelles show normal structures and arrangement (TEM, $\times 5,100$).
- Fig. 8. Many lead granules are randomly distributed in the cytoplasm. The concentration of lead granules is highest at 0.5 hour after administration (A), but decreased gradually at 1 hour (B) and 1.5 hours after administration (TEM, $\times 20,000$).

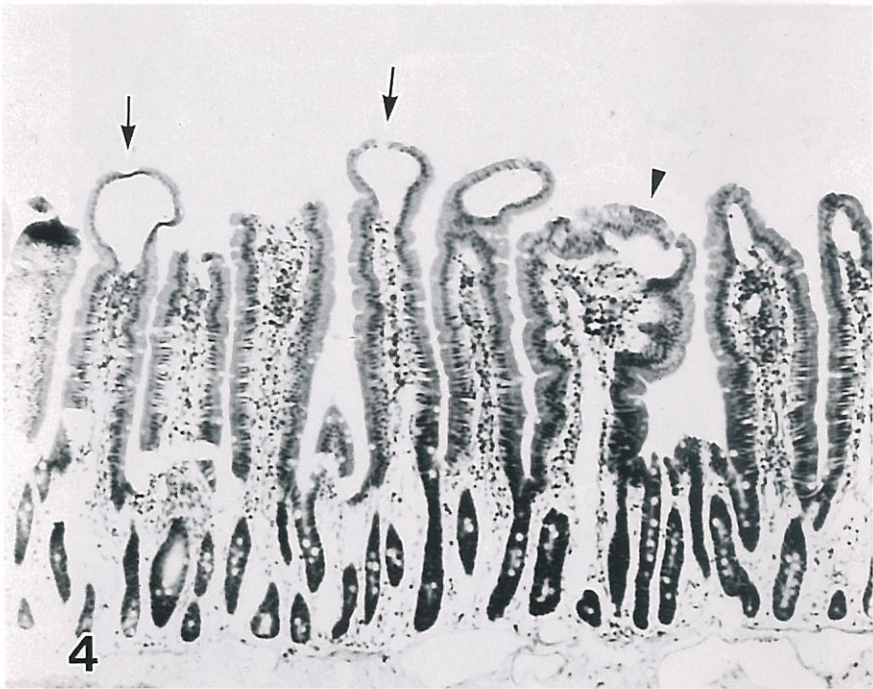
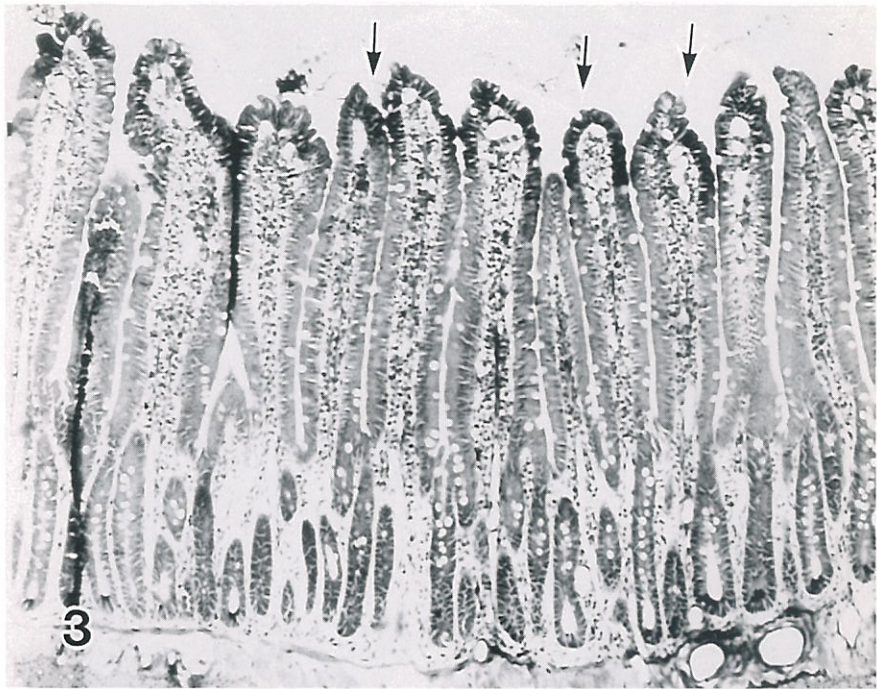
- Fig. 9. Seven and fifteen days after administration of 0.01% lead acetate. Intercellular spaces are widened and extend to upper part of the cells (arrow). Lead granules are diffusely scattered (TEM, $\times 4,200$).
- Fig.10. Seven and fifteen days after administration of 0.01% lead acetate. Lead granules are diffusely scattered and several vacuoles (arrow) appear in the cytoplasm (TEM, $\times 13,600$). (Inset: ribosomal shedding (arrow head) and cristae loss of mitochondria (open arrow) (TEM, $\times 34,000$)).
- Fig.11. Thirty and forty-five days after administration of 0.01% lead acetate. Extremely widened intercellular spaces and randomly distributed lead granules (TEM, $\times 6,800$).
- Fig.12. Thirty and forty-five days after administration of 0.01% lead acetate. Increased number of degenerating mitochondria (arrow head) and secondary lysosomes is found along with early formation of myelin figure in degenerating mitochondria (arrow) (TEM, $\times 29,000$).
- Fig.13. Sixty days after administration of 0.01% lead acetate. Intercellular spaces are severely widened and extend to the upper most portion of the cells. Increased number of secondary lysosomes and myelin figures is found (TEM, $\times 10,000$). (Inset: myelin figure is evacuated into the intercellular space (TEM, $\times 34,000$)).

Fig.14. Sixty days after administration of 0.01% lead acetate. Numerous secondary lysosomes and ribosomal shedding are present (arrow) (TEM, \times 34,000).

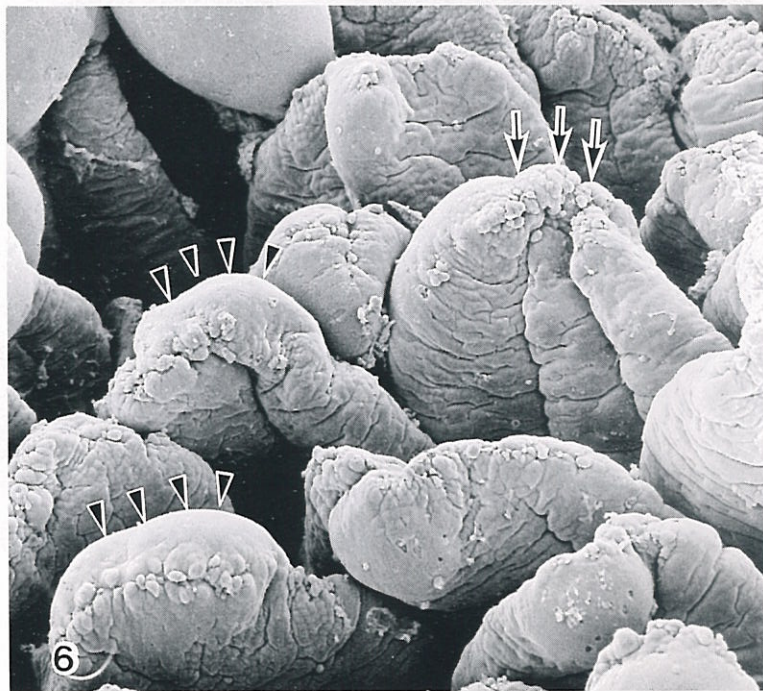
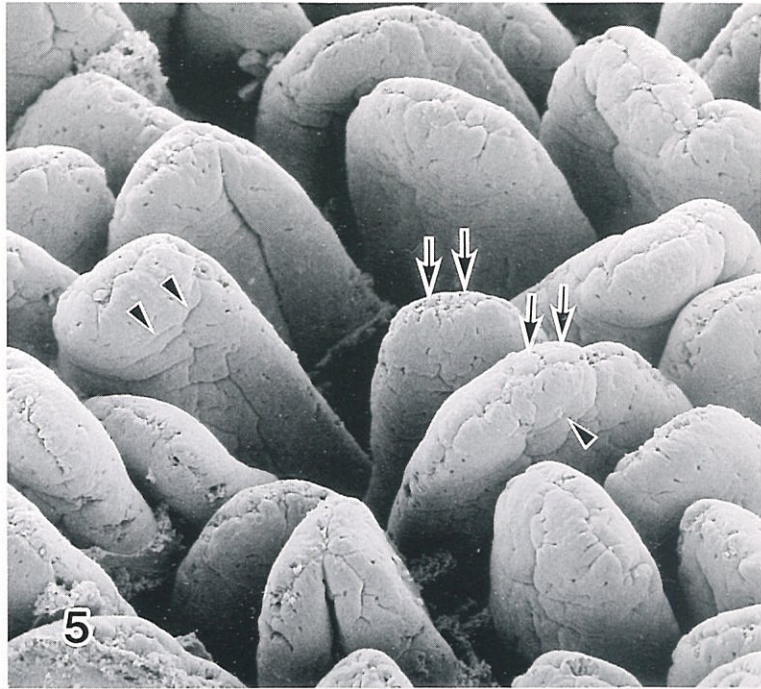
Fig.15. Sixty days after administration of 0.01% lead acetate. Marked vacuolar degeneration of mitochondria and cytoplasm (arrow head). Several lead granules are noted (arrow) (TEM, \times 34,000).

Fig.16. Sixty days after administration of 0.01% lead acetate. RERs are mildly dilated and some of them are cystically dilated (arrow). Moderate shedding of ribosomes (arrow head) and cristae loss of mitochondria is also present (TEM, \times 34,000).

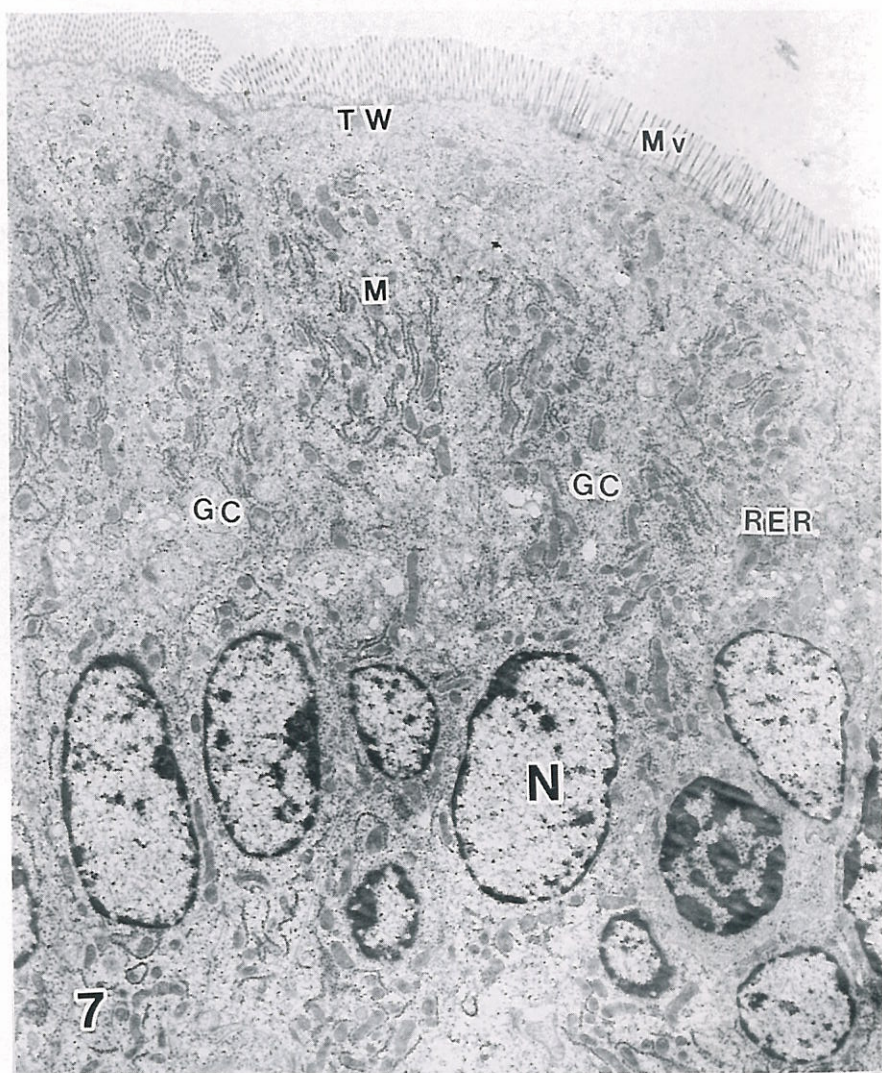
김동석 논문 사진도보 (I)



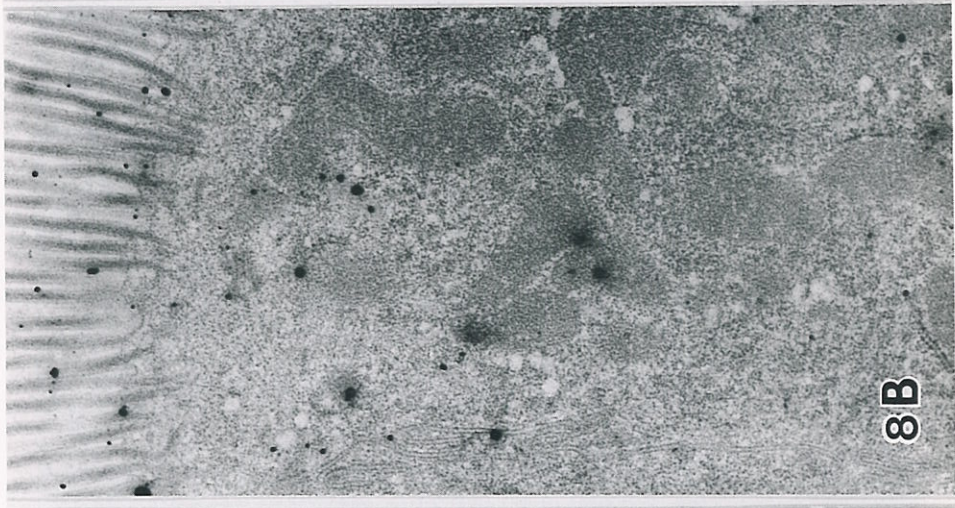
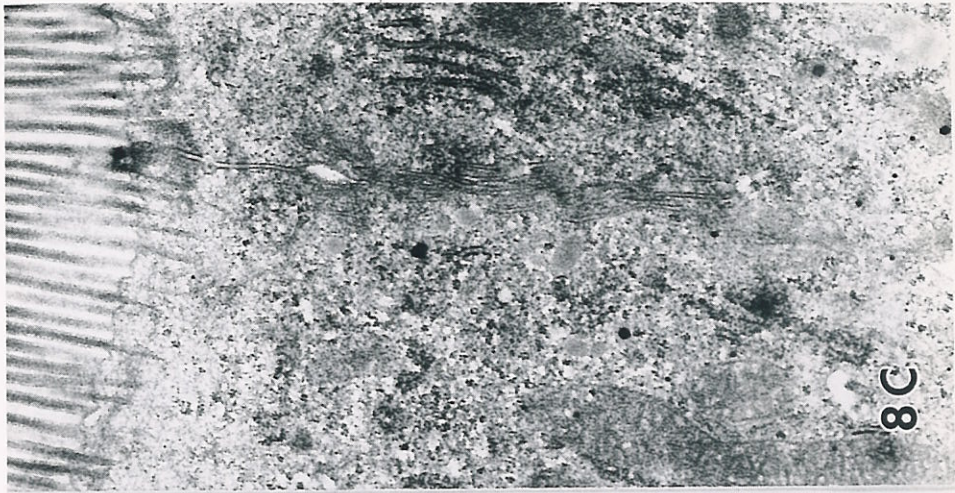
김동석 논문 사진도보 (II)



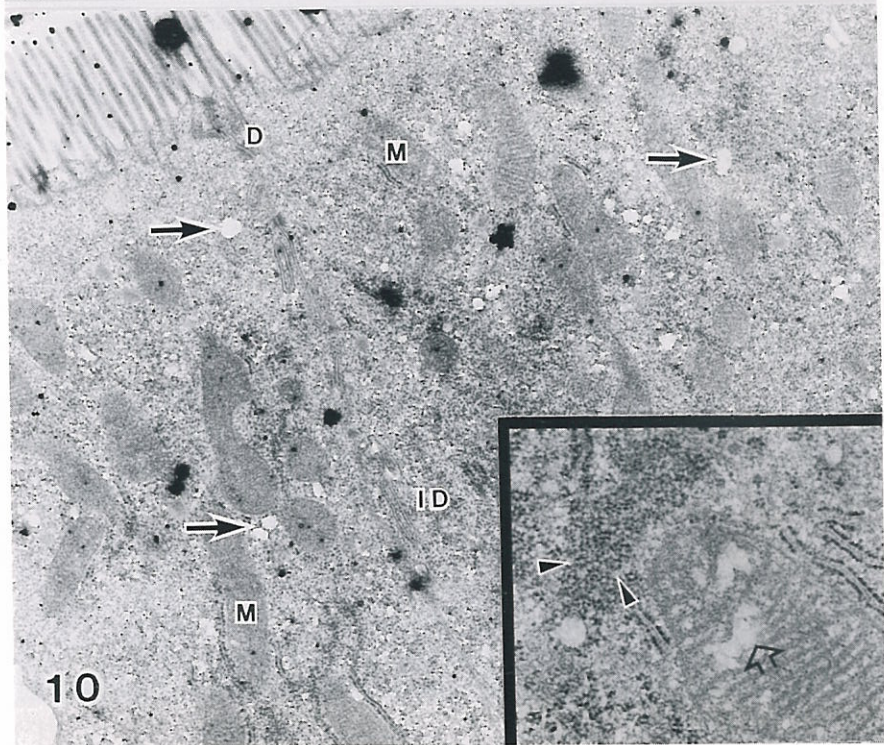
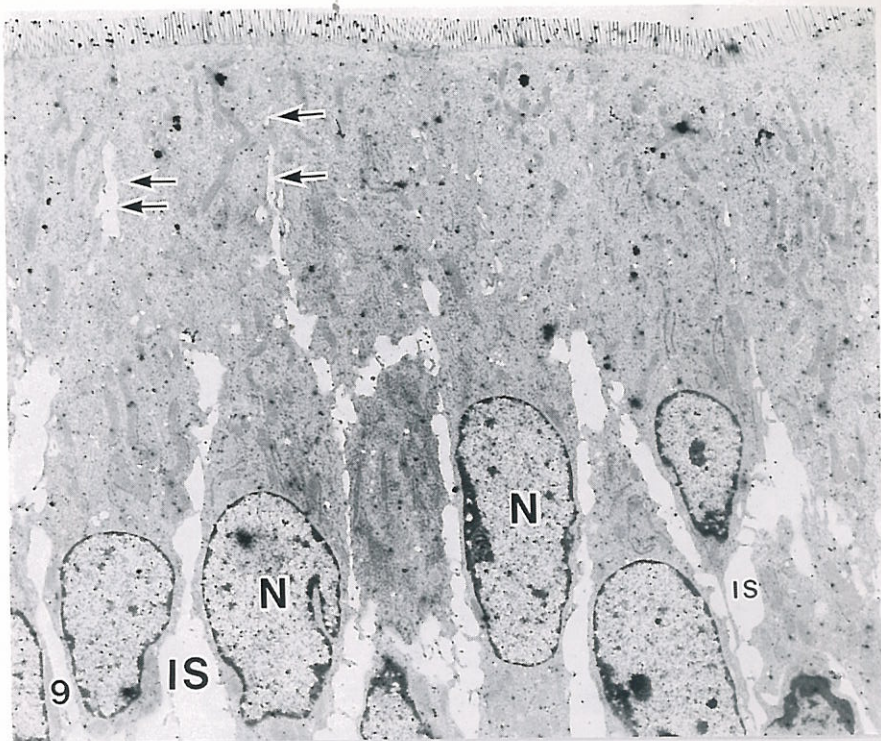
김동석 논문 사진도보 (III)



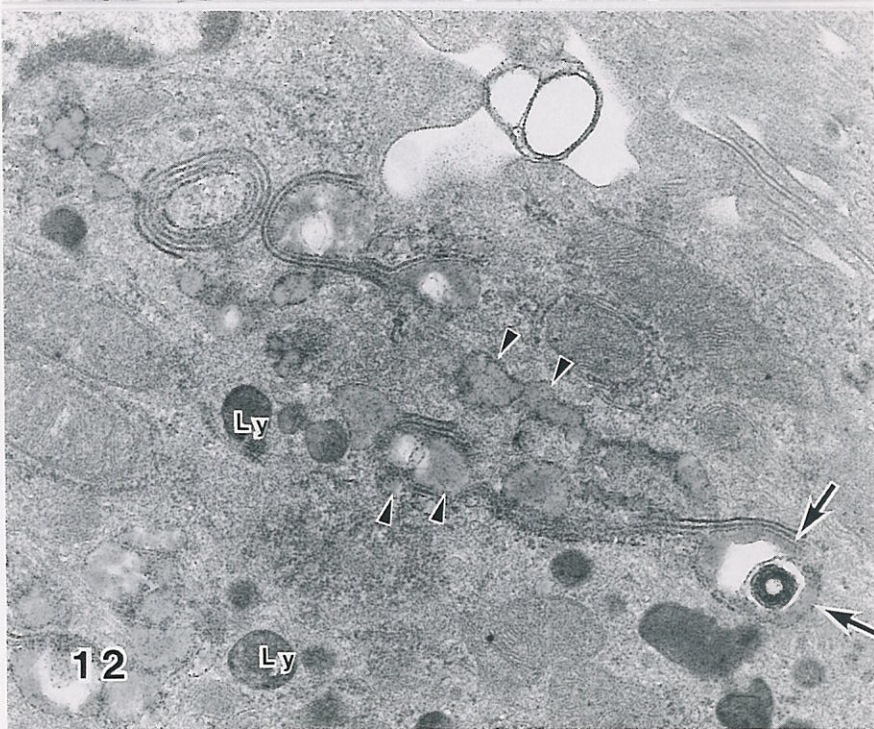
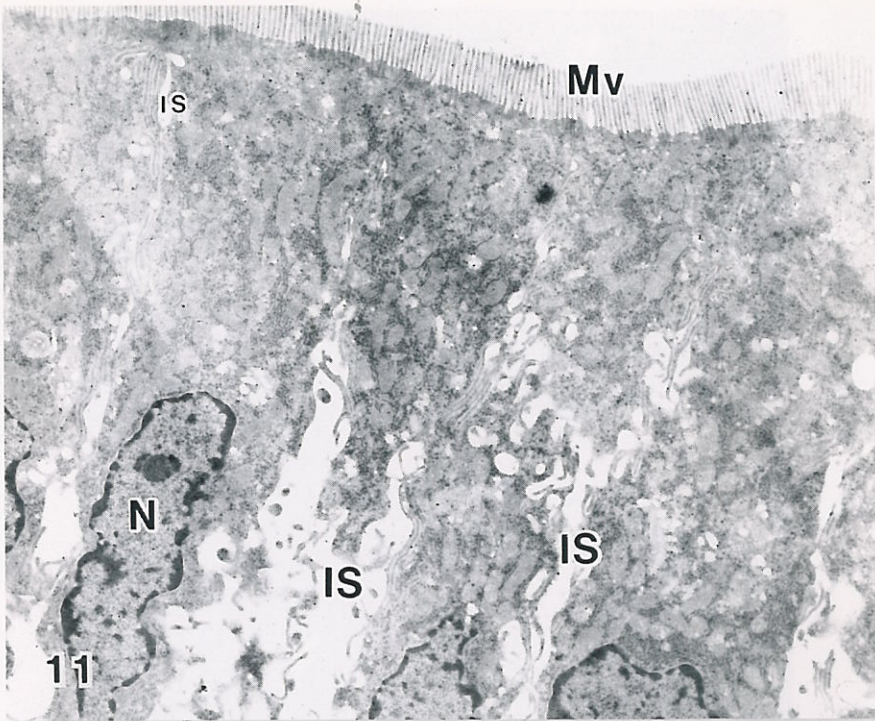
김동석 논문 사진도보 (IV)

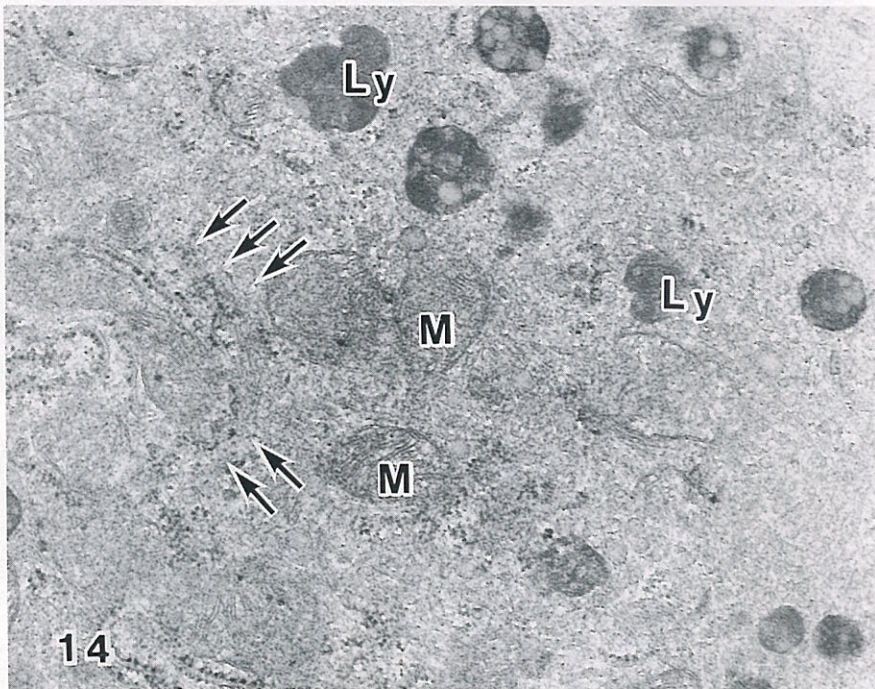
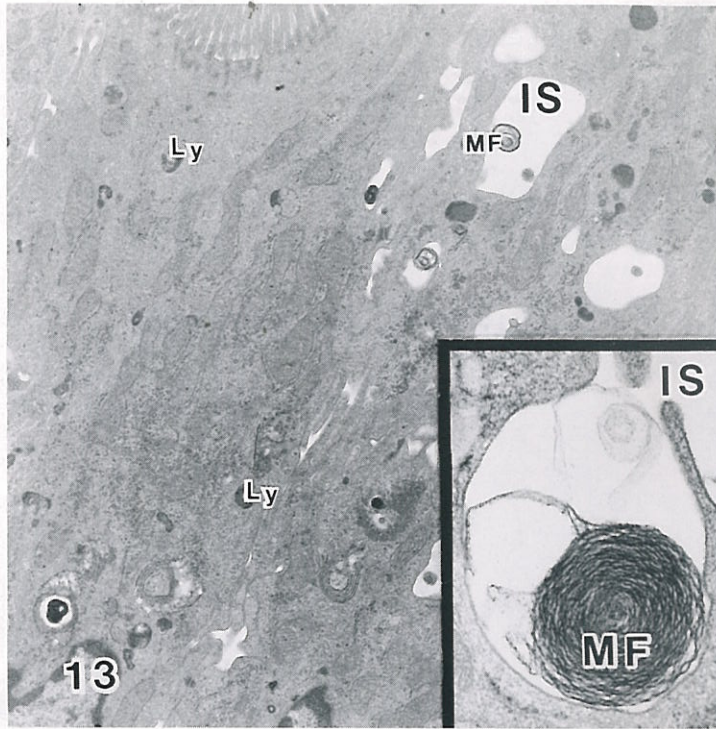


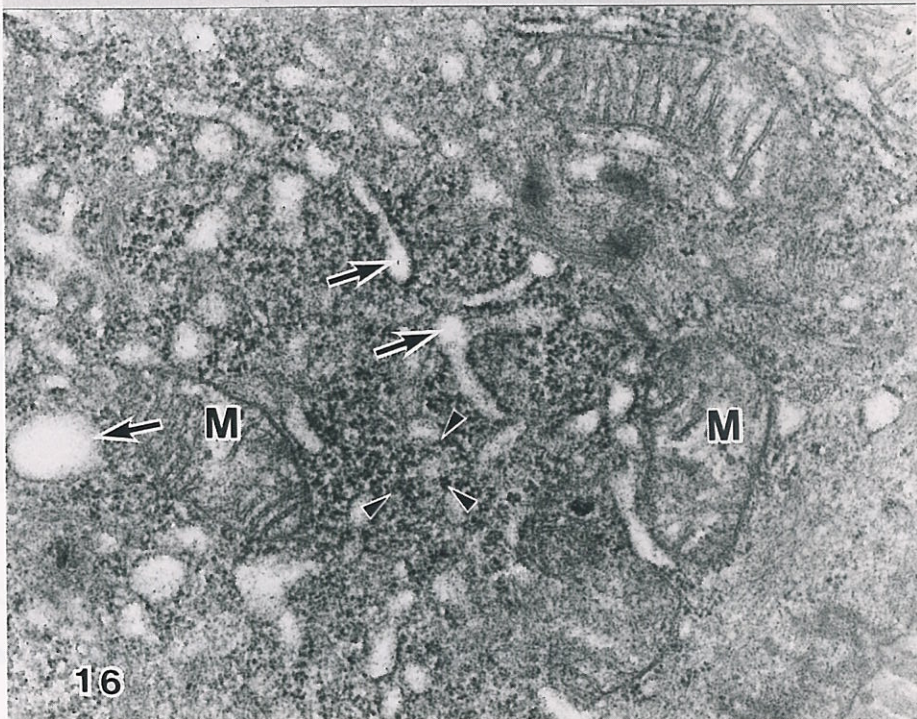
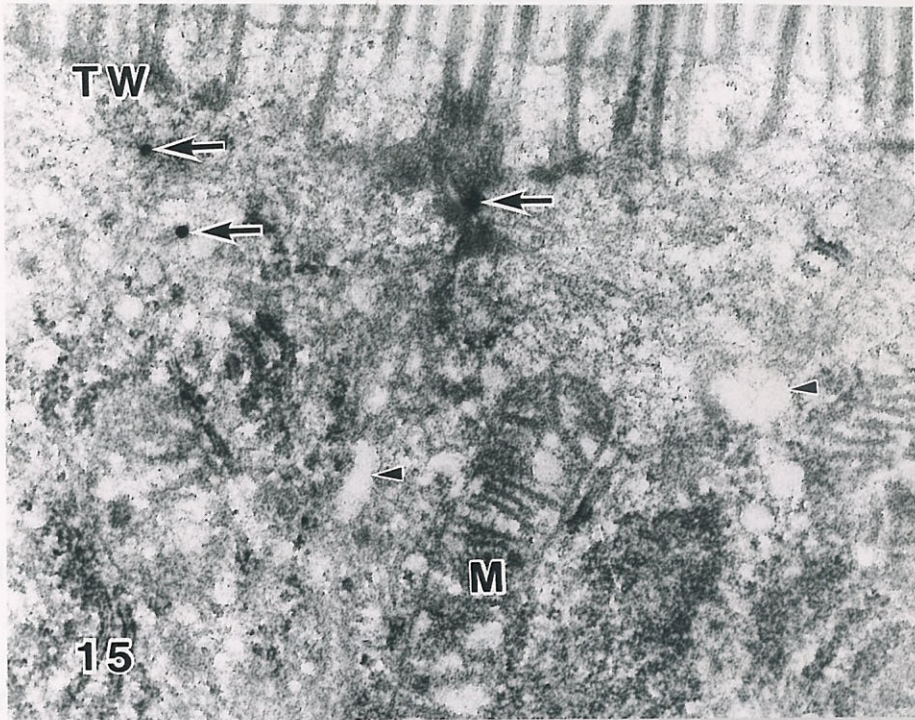
김동석 논문 사진도보 (V)



김동석 논문 사진도보 (VI)







An Ultrastructural Study on the Small Intestinal Absorptive Cells of Rat after Administration of Lead Acetate*

Kim, Dong Sug

Department of Pathology
Graduate School, Keimyung University

(Supervised by Professors Chang, Eun Sook and Park, Young Choon)

(Abstract)

This study was carried out to visualize lead by Timm sulphide silver method and to define lead-induced change of duodenal absorptive cells of rat after administration of 0.01% lead acetate with drinking water.

Sprague-Dawley rats, weighing 250 g, were divided into control group and experimental groups.

The control group was composed of 18 rats and was orally administered with 0.01% sodium acetate. Experimental group was composed of 36 rats and was orally administered with 0.01% lead acetate.

* A dissertation submitted to the committee of the Graduate School of Keimyung University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Medical Science, December 1993.

Two rats in control group and 4 rats in experimental group were sacrificed at 0.5, 1, 1.5 hours and 2, 7, 15, 30, 45, 60 days after administration. Under ether anesthesia, 0.1% sodium sulphide and 2.5% glutaraldehyde were perfused through the lower portion of the abdominal aorta. A portion of duodenal tissue was observed under light microscope, scanning and transmission electron microscopes after development with Danscher method.

The results are as follows:

The blood lead concentration in experimental group began to increase from the 2nd day after administration, and it increased gradually until the 45th days and decreased at the 60th days.

On light microscope, many brown lead granules were observed at the villi tip at 2 days exposure rats. There is mild blunting of villi tip at 45 days exposure rats. At 60 days exposure rats, most of the villi were mildly shortened and showed lymphangiectasia at the villi tip in 3 out of 4 rats. Mild blunting of villi tip was also observed in a few villi.

On scanning electron microscope, the villi tip was mildly blunted and the extrusion zone became irregular at 45 days exposure rats. The depth of creases did not change. At 60 days exposure rats, the villi tip was moderately blunted and the extrusion zone was markedly irregular. The depth of creases increased.

On transmission electron microscope, at 0.5 hour after oral admini-

stration, numerous lead granules were diffusely scattered and were not confined to any specific microorganelles. The lead granules decreased with time. At 2 days exposure rats, the absorptive cells show normal findings. At 7 days exposure rats the intercellular spaces were widened and several vacuoles appeared in the mitochondrial matrix. There was also ribosomal detachment from RER, and there was neither secondary lysosomes or post-lysosomes. These findings persisted until 15 days after exposure.

At 30 and 45 days exposure rats, secondary lysosomes appeared and the condensation of mitochondrial matrix with early formation of myelin figures was noted. At 60 days exposure rats, the intercellular space widening became severe and extended to the upper most portion of the cells. Frequent cristae loss and vacuole formations were noted in mitochondria. Many vacuoles appeared in the cytoplasm. Secondary lysosomes and myelin figures markedly increased. RER was mildly dilated and ribosomal shedding was severe.

In view of above mentioned findings, it can be concluded that passive diffusion as well as active transport was partly involved in the absorption of lead. Most of the changes of microorganelle are compatible with nonspecific degenerative changes which could occur due to impairment of oxidative phosphorylation.