

Hydrazine에 의한 간세포 거대 Mitochondria의 발생

경북대학교 의과대학 병리학교실

권일훈 · 이종기 · 손운경 · 손태중

서 론

Mitochondria는 세포질내 소기관으로는 그 존재가 가장 먼저 알려진 것으로 1850년대 이미 세포질내 소립자의 존재가 인정되었고, Benda¹⁾에 의해서 처음 mitochondria라 명명되었다. Mitochondria를 세포질로부터 분리할 수 있는 방법이 개선되면서 mitochondria 내에는 세포의 생존에 필수적인 호흡과 energy생산에 관여하는 효소들이 많이 분포되어 있음이 밝혀졌는데, 즉 외막에는 monoamine oxidase, cytochrome C reductase 등과 인지질 합성에 관련하는 효소가 있으며 산화적인 산화반응에 관계하는 효소는 주로 내막과 cristae에 존재하고 기질내에는 탄수화물, 지방산 등의 분해효소인 citric acid cycle에 관여하는 효소가 분포하고 있다는 사실은 이미 잘 알려져 있다^{2,3)}. 이와 같이 mitochondria는 세포의 생존에 필수적이며 그러므로 세포에 어떠한 종류의 자극이 가해지면 mitochondria가 민감하게 반응할 것이고 따라서 형태학적으로도 어떠한 변화가 일어날 서이 예상될 수 있으며 이중 대표적인 것으로 giant mitochondria의 형성을 들 수 있다. 인체에서 mitochondria는 병적 혹은 생리적 조건에서 그 크기가 커지는 소의 giant mitochondria로 변화된다. 예를 들면 여러 종류의 간질환⁴⁻⁶⁾이나 신증후군⁴⁾, 알코올 중독⁷⁾, halothane 마취⁸⁾, 당뇨병⁹⁾, 혹은 노화현상¹⁰⁾ 등에서 관찰되며 이와 유사한 변화가 실험적으로 약제를 투여한 경우에도 관찰될 수 있는데 예를 들면 cuprizone¹¹⁾, 인산¹²⁾, 부신피질 호르몬¹³⁾, glycerin¹⁴⁾, ethidium bromide¹⁵⁾등에서도 볼 수 있다고 한다. 이때 관찰되는 giant mitochondria는 cristae의 수나 길이가 감소되지 않았고 외막이나 내막의 구조가 파괴되지 않으며 기질의 밀도가 정상 mitochondria의 기질밀도와 동일한 양상을 나타내고 크거나 모양이 정상상태보다 커지거나,

budding등의 양상을 띄는 것을 의미하는 말로 이는 세포상에서 관찰되는 mitochondria의 종창^{17,18)}과는 다른 변화이다. 이러한 giant mitochondria의 생성기전에 대해서는 아직 확실히 규명된 바 없으며 Wakabayashi¹⁴⁾은 인접한 mitochondria의 fusion 혹은 분열의 장애로 생각하였고, Tandler¹⁹⁾은 직접적인 기관의 종대라 하였으며 Kimberg²⁰⁾은 fusion과 소기관 종대가 같이 겸하고 있다고 하는 등 다양한 학설들이 논란되어 왔으나 어느 것 하나도 그 실체를 규명하지 못하였다. 실험적으로 유도된 giant mitochondria의 생화학적 연구에서 monoamine oxidase의 감소가 현저하고 이와 더불어 ATPase와 cytochrome oxidase의 감소가 관찰되었다는 보고가 있으며¹⁹⁾ Chedid등은 mitochondria의 주기적인 호흡과 산화적 인산화반응의 장애를 보고하였으며⁴⁾ Albring 등²¹⁾은 chloramphenicol 투여로 인한 giant mitochondria 형성기전을 translation의 장애로 설명하였다. 그러나 이러한 많은 연구들에도 불구하고 giant mitochondria가 세포자체에 미치는 영향에 대해서는 아직 확실히 알려진 바가 없다. 또한 앞서 기술한 대부분의 실험적 연구들은 어떠한 약제들을 경구적으로 투여함으로써 발생하는 변화를 관찰하였으며 투여후 상당한 시간이 경과하여 관찰된 소견들을 위주로 하였다. 그래서 저자는 giant mitochondria가 형성되는 양상중 초기의 변화를 관찰하고 이와 관련된 형성기전 및 세포 전반에 걸친 형태학적 변화를 관찰함으로써 giant mitochondria가 세포에 미치는 영향을 알기 위해 hydrazine을 쥐의 복강내 주사하였으며 여기서 채취된 조직에 광학현미경 및 전자현미경적 검색을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 생후 4주된 체중 60 gm 정도의 Sprague-Dawley계 숫쥐를 실험에 사용하였다.

실험방법 : 실험군은 hydrazine(NH_2NH_2)을 200 mg/kg의 용량으로 복강내에 주사한 뒤 5, 10, 20, 30, 및 60분의 간격으로 도살하여 관찰하였으며 무처치군을 대조군으로 하였다.

전자현미경적 검색 : 동물을 양와위로 고정하여 복부를 절개한 뒤 간문맥을 통해 2% glutaraldehyde(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)로 관류고정을 한 후 간조직을 절제하여 1 mm³로 세절하여 다시 2.5% glutaraldehyde(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 4°C)에서 2시간 전고정 하였다. 1% OsO_4 용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)에 2시간 후고정한 다음 계열 ethanol로 탈수하고, propylene oxide로 침투하였다. 포매는 Luft 방법²²⁾에 의한 epon 혼합물로 하였으며, 포매후 1 μm 두께로 잘라 methylene blue로 염색하여 관찰부위를 결정하고 Porter Blum MT-2B형 ultramicrotome으로 Du-pont diamond knife를 사용하여 40~60 nm 두께로 초박절을 한 뒤 Reynolds방법²³⁾에 의한 uranyl acetate 및 lead citrate로 이중염색을 하고 Jeol JEM 100CX 전자현미경으로 관찰하였다.

성 적

광학현미경적 소견

대조군 : 간조직은 일정하게 배열된 소엽구조를 하고 간세포는 중심정맥에서 문맥주변부까지 일렬의 방사성으로 배열되었으며 그 사이에 동양이 형성되어 있었다. 관류고정으로 인해 동양은 약간 확장되었으며 간혹 Kupffer 세포가 보였다. 각각의 간세포의 크기는 균등하며 중앙에 둥근핵을 가지고 균질의 세립자양 세포질을 풍부히 함유하고 있었다.

실험군 : 광학현미경상 실험군은 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았으며 정미한 세포질내 부종이 관찰되었으나 이는 시기에 관계없이 관찰되었다.

전자현미경적 소견

대조군 : 간 세포의 mitochondria는 cristae의 발달이 적은 대신 넓은 부위가 기질로 되어 있었고 외막 및 내막은 연속된 균일한 막구조로 그 사이의 간격은 일정하였다. cristae의 간격, 길이등은 고르지 않았다. 기질은 세립자양의 전자밀도가 균일한 무구조의 양상을 나타내었고 3~4개의 고밀도 기질내 과립이 관찰되었다.

실험군 : Hydrazine 투여 후 5분군에서부터 mitochondria가 커지는 것이 관찰되었다. 많은 수의 mitochondria가 길이가 길어지며 중간에 잘룩한 부위를 나타내었고 일측은 넓은 폭을 가지나 반대측에는 두개의 돌기가 있어 마치 2개의 mitochondria가 fusion 하는 양상을 나타내는 것도 있었으며 이들의 내부에는 변성된 막구조의 형태를 보이는 것이 있었다. 또한 U자모양, T자 모양 혹은 Y자모양의 budding 하는 것과 유사한 모양도 관찰되었다. 그러나 mitochondria의 cristae를 포함한 막구조는 일정하게 배열되어 있었고 기질의 전자밀도도 고른 분포를 나타내었으며 기질내 과립들이 자주 관찰되었다. 세포질내 RER을 비롯한 다른 소기관들은 원래 모양을 잘 유지하였고 glycogen particle이 많이 존재하고 있었다(Fig. 1, 2).

10분군에서는 상기한 변화가 같은 정도로 관찰되었으며 드물게 mitochondria를 가로지르는 내막구조를 가진 것이 관찰되었다(Fig. 3, 4).

20분 및 30분군에서는 상기한 giant mitochondria가 관찰되었으나 시간이 갈수록 그 수가 감소되고 정상초기의 mitochondria가 증가하였다(Fig. 5, 6).

60분군에서는 길쭉한 형태의 mitochondria가 소수 있기는 하나 대부분의 mitochondria가 대조군과 같은 크기와 모양을 보였으며 세포질의 다른 소기관들은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다.

고 찰

Giant mitochondria는 여러가지 실험적 연구나 인체의 질병시 채취된 장기에서 관찰되었으나^{4-15,18,19)} 형성되는 양상에 약간의 차이가 있으며 학자마다 생기는 기전에 대한 가설이 다양하였다.

본 연구에서 관찰된 소견을 요약하면 hydrazine을 복강내 주사한 후 5분부터 매우 급격한 mitochondria의 변화가 있었으며 이는 Wakabayashi등¹⁹⁾이 30분 이후부터 나타난다는 결과와 약간의 차이를 나타내었다. 이때 mitochondria는 길이가 길어지고 폭이 일정하지 않으며 중간에 잘룩한 부분을 가지며 굴곡되거나 접혀진 양상을 나타내었다. 또한 Y, Y, T자 모양의 budding과 giant mitochondria 형성을 같이 생각해 볼때 분열보다는 fusion으로 봄이 타당할 것으로 생각되었다. Mitochondria는크기나 모양을 변화하였으나 그 기질의 밀도나 막

구조는 잘 유지되어 있었으며 기질내 세립자도 잘 관찰되었다. 이와 더불어 세포질내 다른 소기관들 역시 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 사실들은 giant mitochondria가 일반적인 세포상해시에 관찰되는 mitochondria의 종창과는 차이가 있음을 시사하고 있다. 즉 세포상해시 mitochondria는 ATP의 고갈로 인해 막구조가 변성되어 이온불균형이 초래되어 기질내 종창이 생기나²⁴⁾ 본 연구에서 관찰된 giant mitochondria는 이러한 기질내 종창이 없이 크거나 모양이 변화한 것이므로 세포 상해시의 종창과는 다르다고 볼 수 있다. 또한 본 연구에서 giant mitochondria의 형성이 5분 및 10분군에서 가장 잘 관찰되며 그 이후 30분군까지는 그 수가 감소되었으며 60분이후는 정상크기로 돌아오는 가역적 변화를 보였으며 이는 다른 조건하의 실험¹⁹⁾과 유사한 결과를 나타내었다. 그러므로 이러한 세포질내와 소기관의 변화없이 단시간내의 mitochondria의 변화는 그 이전의 단순히 mitochondria의 호흡과 산화적 인산화반응의 억제로 인한 직접적인 종대 뿐만 아니라 이 소기관의 fusion이 관여할 것으로 생각된다.

mitochondria는 자체내에 DNA를 가지고 자가분열이 가능한 소기관²⁵⁾으로 실험적으로 유도된 giant mitochondria는 분열에 의해 정상크기로 된다는 보고들^{26,27)}이 있다.

상기한 사실들을 두고 볼 때 giant mitochondria는 단순한 세포상해로 인한 종창과는 다르며 그 자체가 세포 대사에서 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다. 또한 giant mitochondria의 형성기전은 Chedid⁴⁾등이 주장한 mitochondria내의 효소장애뿐 아니라 이와 더불어 mitochondria내의 대사이상으로 인한 비정상적인 fusion이 관여할 것으로 생각된다. 또한 이러한 장애들은 가역적인 반응이며 영구적인 mitochondria의 상해를 일으키지 않을 것으로 생각된다.

요 약

저자들은 간세포의 giant mitochondria 발생에 관해 알아보고자 Sprague-Dawley계 흰쥐의 복강내에 hydrazine을 200 mg/kg 주사하고 5, 10, 20, 30분 및 60분후 도살하여 간을 채취한 다음 광학 및 전자 현미경으로 관찰하였으며 결과는 다음과 같다.

광학현미경으로대조군과 실험군사이에 큰차이를 발견

할 수 없었다.

전자현미경으로는 hydrazine 주사 5분후 부터 잘록한 부위를 가진 길이가 긴 mitochondria나 Y자 모양의 budding하는 것, 혹은 U자 C자 모양의 giant mitochondria들이 관찰되었다. 이들의 수는 5, 및 10분군에서 가장 많았으며, 시간이 갈수록 감소하였다. 세포질내 타 소기관의 변화는 거의 관찰되지 않았다.

이상의 성적으로 보아 hydrazine 투여로 인한 giant mitochondria 형성을 일련의 가역적인 변화이며, 세포상해시의 mitochondria 종창과는 다른 변화임을 알 수 있다. 또한 이러한 giant mitochondria의 형성기전을 인접한 mitochondria의 fusion이나 개개 mitochondria의 budding이 관여할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Benda C: *Weitere Mitteilungen über die Mitochondria*, Berlin, *Verh Physiol Ges*, 1898, p 376
- 2) Pearse AGE, Scarpelli DG: *Intramitochondrial localization of oxidative exnzyme systems*. *Exp Cell Res (suppl)* 7:50, 1979
- 3) Tzagloff A: *Mitochondria*. New York, Plenum, 1982, p 27
- 4) Chedid A, Jao W, Port J: *Megamitochondria in hepatic and renal disease*. *Am J Gastroenterol* 73: 319, 1980
- 5) Ruffolo R, Covington H: *Matrix inclusion bodies in the mitochondria of the human liver. Evidence of hepatocellular injury*. *Am J Pathol* 51:101, 1967
- 6) Sternlieb I: *Mitochondrial and fatty changes in hepatocytes of patients with Wilson's disease*. *Gastroenterology* 55:254, 1968
- 7) Rubin E, Beattie DS, Liver CS: *Effects of ethanol on the biogenesis of mitochondrial membranes and associated mitochondrial functions*. *Lab Invest* 23: 620, 1970
- 8) Wills EJ, Walton B: *A morphologic study of unexplained hepatitis following halothane anesthesia*. *Am J Pathol* 91:11, 1973
- 9) Bhagwat AG, Walton B: *Hepatic intramitochondrial crystalloids*. *Arch pathol* 91:70, 1971
- 10) Sato T, Tauchi H: *The formation of enlarged and giant mitochondria in the aging process of human hepatic cells*. *Acta Pathol Jpn*, 25:403, 1975
- 11) Suzuki K: *Giant mitochondria, Production in mice*

- fed with cuprizone. *Science* 163:81, 1969
- 12) Myron DR, Conelly JL: *The morphology of the swelling process in rat liver mitochondria. J Cell Biol* 48:291, 1971
 - 13) Kimberg DV, Lond AV, Wiener J: *Cortisone induced alterations in mitochondrial function and structure. J Cell Biol* 37:63, 1968
 - 14) Suzuki T, Mostofi FK: *Intramitochondrial filamentous bodies in the thick limb of Henle of the rat kidney. J Cell Biol* 33:605, 1967
 - 15) Soslau G, Nass MMK: *Effects of ethidium bromide on the cytochrome content and ultrastructure of liver cell mitochondria. J Cell Biol* 51:517, 1971
 - 16) Tandler B, Erlandson RA, Wynder EL: *Riboflavin and mouse hepatic cell structure and function. I. Ultrastructural alterations in simple deficiency. Am J Pathol* 52:69, 1968
 - 17) Chappell JB, Crofts AR: *Calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria. Calcium ion induced swelling. Biochem J* 95:378, 1965
 - 18) Trump BF, Ericsson JLE: *The inflammatory process. New York, Academic press, 1965, p 35*
 - 19) Wakabayashi T, Horiuchi M, Sakaguchi M, Onda H, Misawa K: *Induction of megamitochondria in the mucosa and rat livers by hydrazine. Exp Mol Biol* 39:139, 1983
 - 20) Kimberg DV, Loeb JN: *Effects of cortisone administration on rat liver mitochondria. Support for the concept of mitochondrial function. J Cell Biol* 55: 635, 1972
 - 21) Albring M, Radsak D, Thoenes W: *Chloramphenicol induced giant hepatic mitochondria. Naturwissen Schäften* 62:43, 1975
 - 22) Luft JH: *Improvement in embedding method. J Biophys Biochem Cytol*, 409, 1961
 - 23) Reynolds ES: *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol*, 17:208, 1963
 - 24) Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE: *Studies on necrosis of mouse liver in vitro. Ultrastructural alterations in the mitochondria of hepatic parenchymal cells. Lab Invest* 14:343, 1965
 - 25) Tzagoloff A: *Mitochondria. New York, Prentice-Hall, 1982, p 267*
 - 26) Tandler B, Erlandson RA, Smith AL, Wynder EL: *Riboflavin and mouse hepatic cell structure and function. II. Division of mitochondria during recovery from simple deficiency. J Cell Biol* 41:477, 1969
 - 27) Tandler B, Hoppel CL: *Division of giant mitochondria during recovery from cuprizone intoxication. J Cell Biol* 56:266, 1973

— Abstract —

The Formation of Giant Mitochondria in the Liver Cells Induced by Hydrazine

Il Hoon Kwon, M.D., Jong Gi Lee, M.D.

Yoon Kyung Sohn, M.D. and Tae Joong Sohn, M.D.

Department of Pathology
Kyungpook National University,
Taegu, Korea

The authors studied the formation of giant mitochondria in liver cell. The Sprague Dawley rats were sacrificed following intervals; 5, 10, 20, 30, and 60 minutes after intraperitoneal injection of hydrazine in the amount of 200 ml/kg. And the extracted liver tissues were examined with light and electron microscopes.

The results obtained were summarized as follow; Light microscopically, there is little difference between control and experimental groups. Electron microscopically, elongated, bizarre shaped mitochondria are appears 5 minutes after hydrazine injection. Those show attenuated portion, Y, U, or C shaped feature suggesting fusion or budding of mitochondria. The number of giant mitochondria is decreased after 10 minutes group and rarely present in 60 minutes group.

The results suggest in this experiment that the formation of giant mitochondria is a kind of reversible change and it is different from the mitochondrial swelling of cellular injury. Intermitochondrial fusion and mitochondrial budding may be related with the formation of giant mitochondria.

Key for Abbreviation

Bc: Bile canaliculus

sEr: Smooth endoplasmic reticulum

Ld: Lipid droplet

rEr: Rough endoplasmic reticulum

Gp: Glycogen particle

N: Nucleus

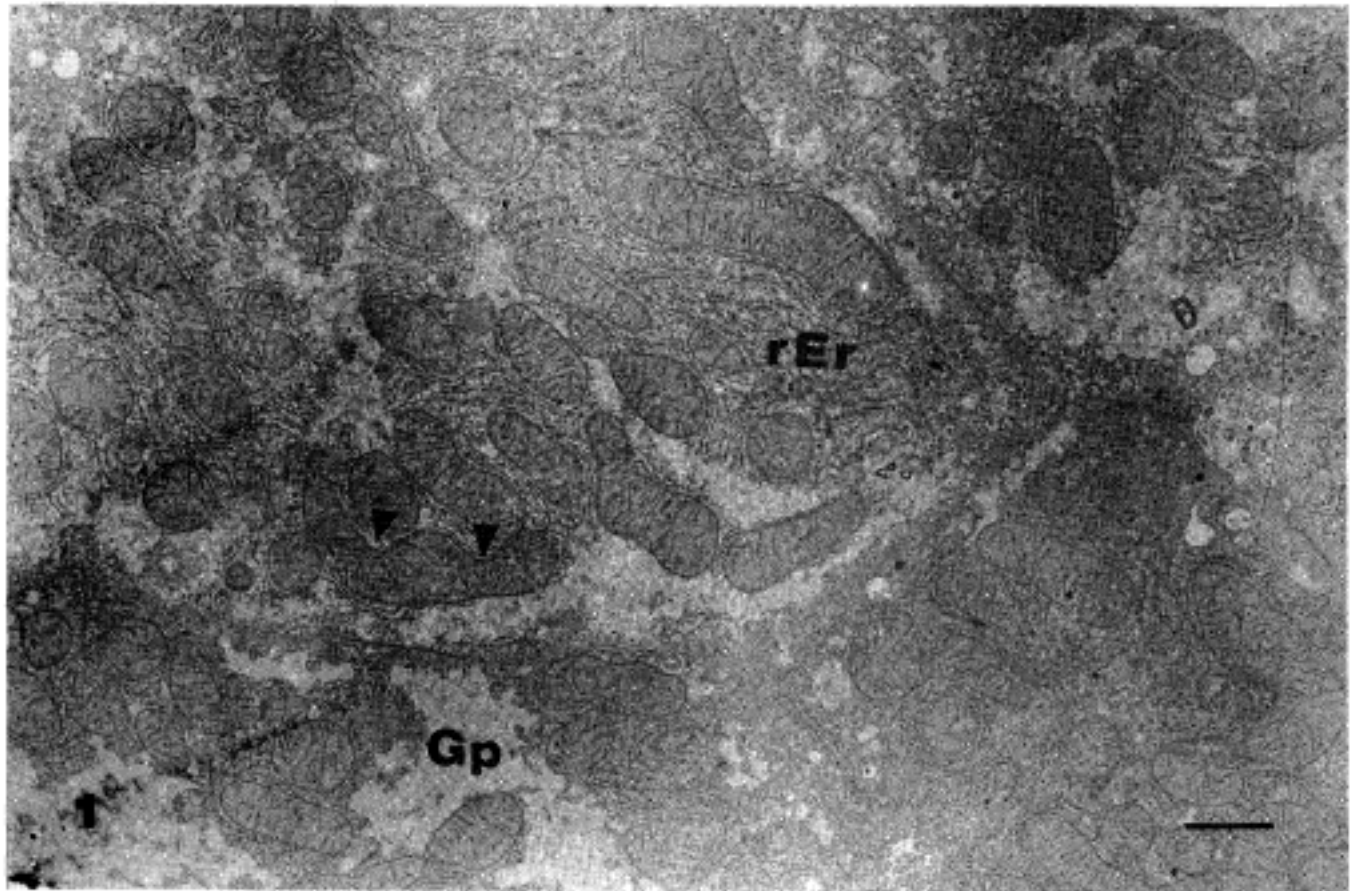


Fig. 1. Liver cell, rat, 5 minutes after hydrazine injection. Several elongated mitochondria are scattered. Note attenuation of the diameter of mitochondria (arrow head). Bar = 1 μ m

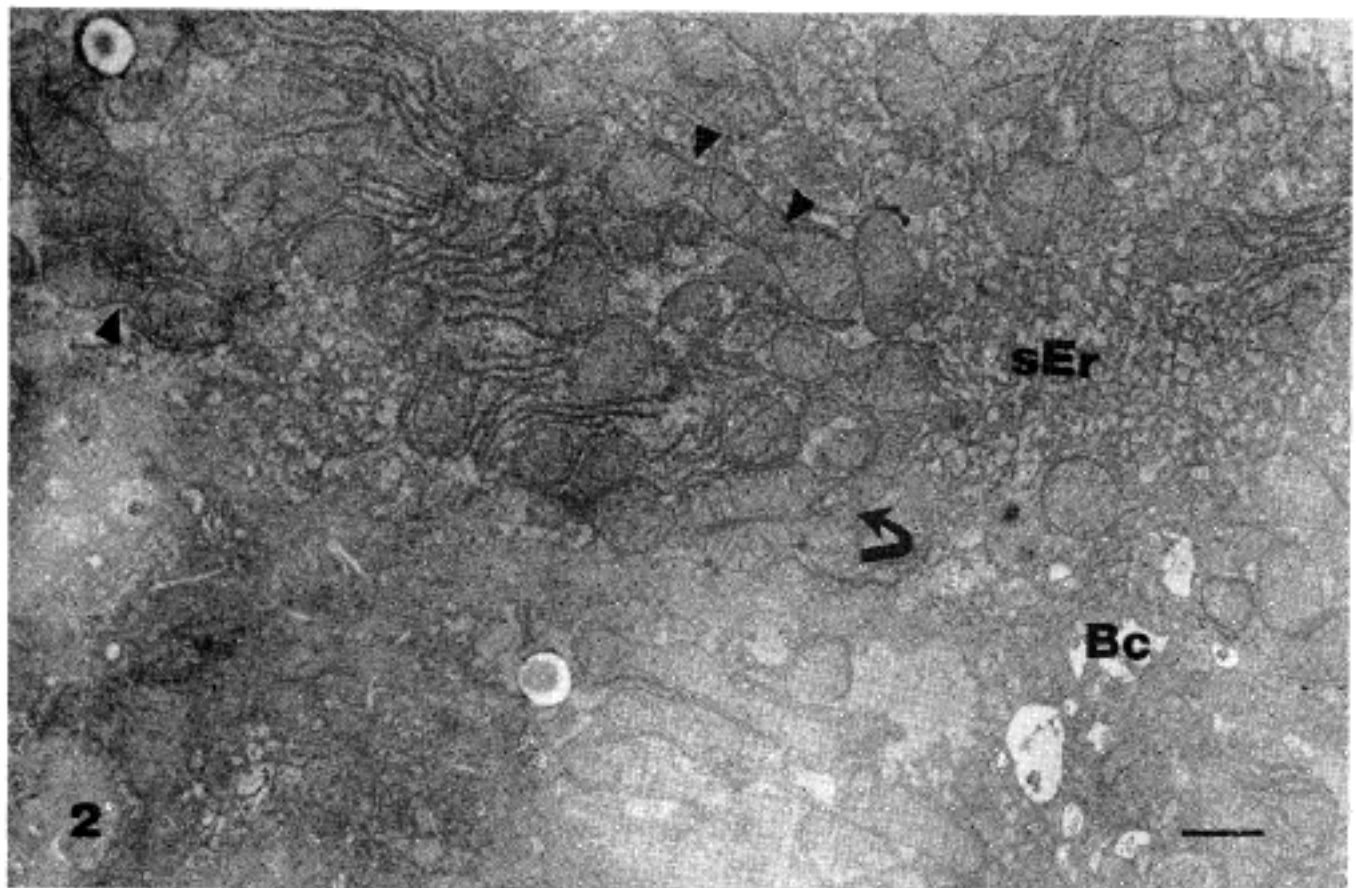


Fig. 2. Liver cell, rat, 5 minutes after hydrazine injection. Irregularly shaped and elongated mitochondria are noted. Attenuation of the diameter (arrow head) and marked narrowing portions suggesting mitochondrial fusion (curved arrow) are noted. Bar = 1 μ m

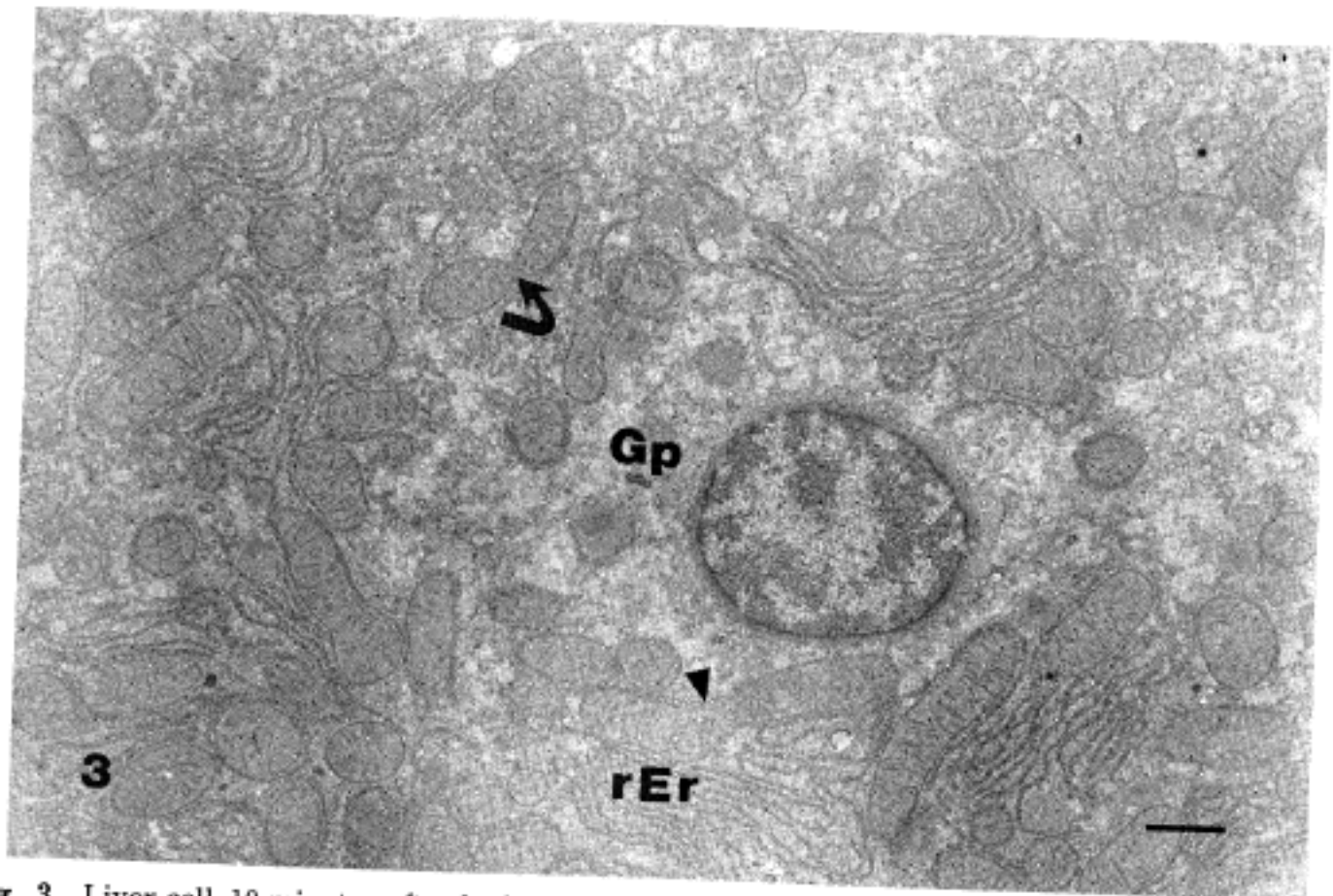


Fig. 3. Liver cell, 10 minutes after hydrazine injection. The curved arrow noted the point suggesting mitochondrial fusion. Point of attenuation (arrow head) is noted. Bar=1 μ m

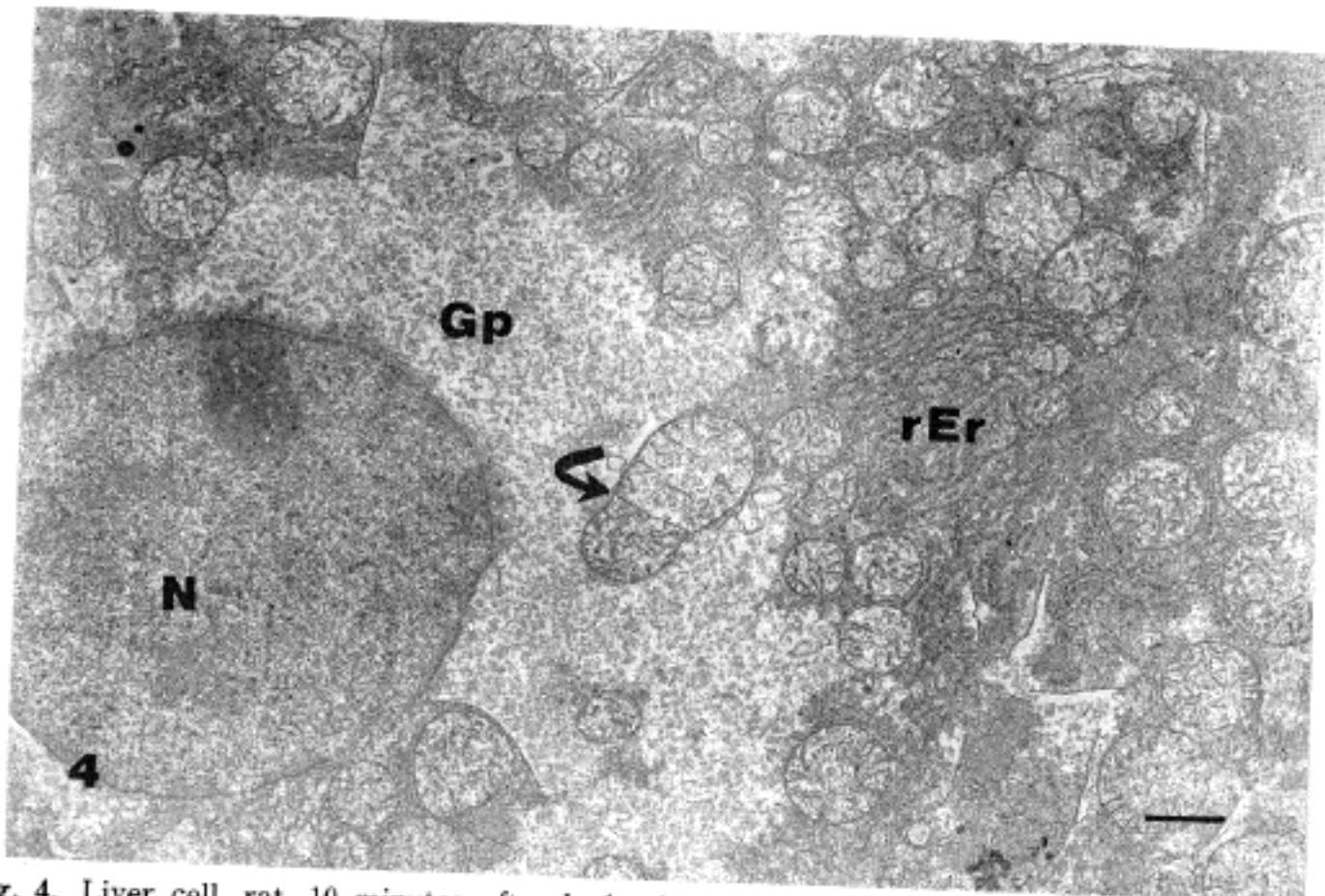


Fig. 4. Liver cell, rat, 10 minutes after hydrazine injection. Mitochondria show low amplitude swelling without membranous destruction. One of them reveals a membranous structure acrossing the midportion of mitochondrial matrix (curved arrow). Bar=1 μ m

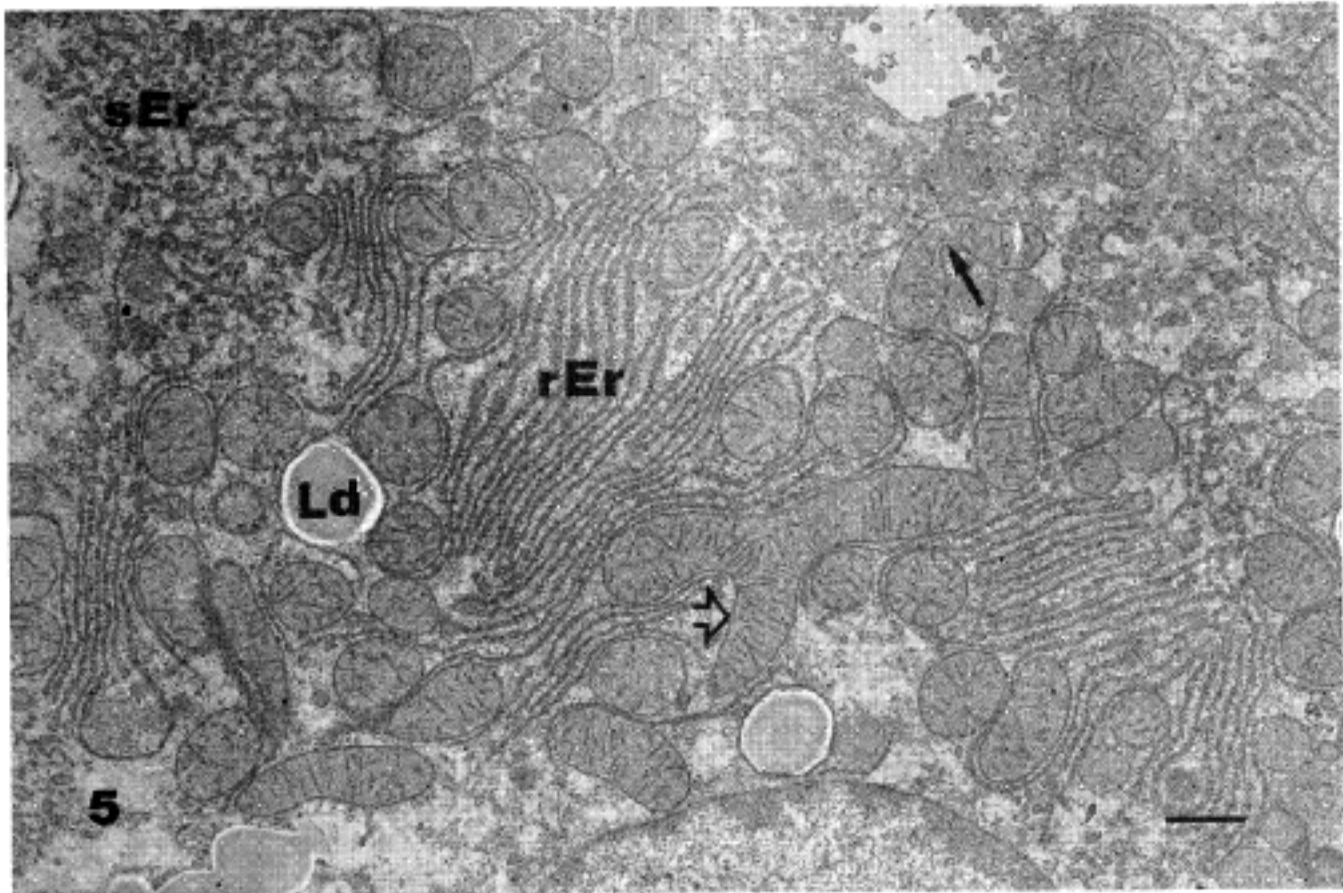


Fig. 5. Liver cell, rat, 30 minutes after hydrazine injection. Mitochondria show elongation with attenuation (solid arrow). Y shaped mitochondria (open arrow) is seen. Bar=1 μ m

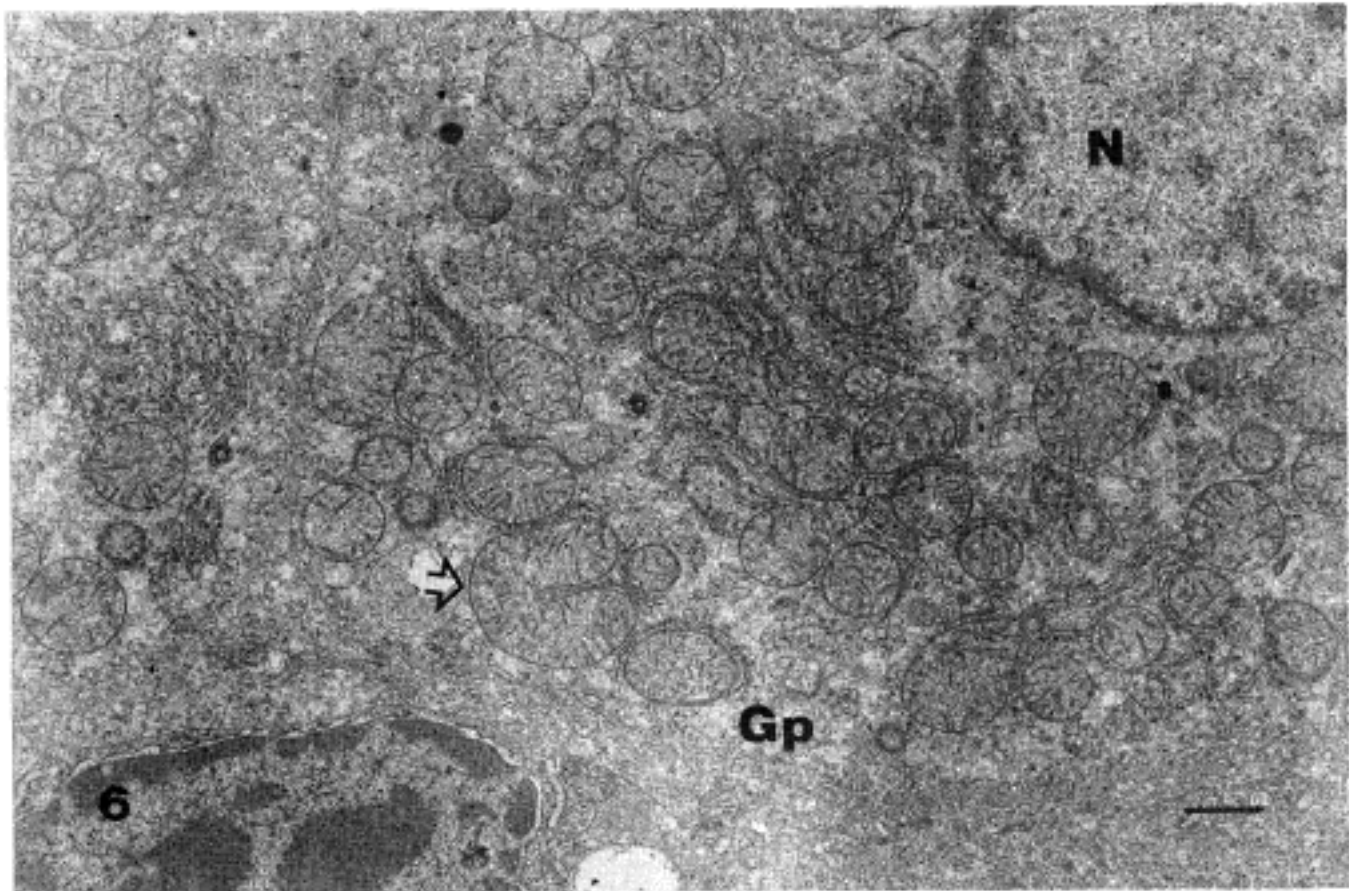


Fig. 6. Liver cell, rat, 30 minutes after hydrazine injection. U ahaped curved mitochondria is seen (open arrow). Bar=1 μ m