

## Orotic Acid에 의한 지방간 형성과정의 초미형태학적 연구

慶北大學校 醫科大學 病理學教室

朴 載 福 · 徐 仁 壽 · 孫 泰 重

### 서 론

지방간에 대한 연구의 역사를 볼 때 1767년 Richard Mead가 당뇨병으로 사망한 환자에 발생한 지방간에 대해 기술한 것이 최초의 임상기록이며, 지방간을 실험적으로 유발시킨 것은 1889년 Mering과 Minkowski가 췌장을 절제한 개에 발생한 지방간에 대하여 보고한 것이 최초인 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

지방간이란 간세포내에 지방간이 과도하게 축적된 상태로서 이는 간세포내로 지방 유입의 증가, 간세포내에서 지방대사의 장애 내지는 간세포에서의 지방간의 분비 장애등으로 야기될 수 있다. 따라서 간세포에 지방이 축적된다는 것은 전신적인 지방대사 장애의 일환이기도 하며, 또 간세포 자체의 상해로서도 야기될 수 있다. 간세포는 신체 지방대사의 주역으로 작용하는데 그 중에서도 지질단백질의 합성 특히 very low density lipoprotein (이하 VLDL)의 합성과 분비에 핵심적 역할을 한다는 것은 잘 알려진 사실이다<sup>2-12)</sup>. 간세포내에서의 VLDL 합성 및 분비과정에 대한 형태적 연구<sup>13-16)</sup>나 생화학적 연구<sup>17-22)</sup>에 의하면 지질단백의 지질분획 즉 triglyceride의 합성은 smooth surfaced endoplasmic reticulum (이하 RER)에서 합성되어 지질과 단백질이 RER에서 조합된다. RER에서 조합된 지질단백을 미숙지질단백이라 하는데 이들은 Golgi체로 운반되어 여기에 탄수화물 분획이 첨가되어 완성된 VLDL이 만들어 진다<sup>23-25)</sup>. 이렇게 하여 합성된 지질단백은 exocytosis에 의하여 Disse강으로 분비되는데 이 분비과정에는 microtubule이 관계되며 이는 colchicine처리가 분비를 억제하는 것으로 증명된다<sup>26,27)</sup>.

그러므로 상기한 대사과정중 어느 과정에서라도 장애

가 일어나면 간세포에 지방이 축적된다. Orotic acid는 오래 전 부터 지방간을 야기한다<sup>28)</sup>는 것이 알려져 있으며 Creasy등<sup>29)</sup>은 이때 축적된 지방이 triglyceride라 하였으며 Windmueller<sup>30-32)</sup>, Lombardi<sup>33)</sup> 및 Roheim등<sup>34)</sup>은 지방간 형성과 더불어 혈장지방치의 감소가 있음을 보고 하였다. Rajalakshmi 등<sup>35)</sup>은 orotic acid가 pyrimidine nucleotide 합성과정은 중간산물이므로 핵상대사에 장애를 초래할 것으로 보았고 Hankin<sup>36)</sup>은 지질단백 합성장애로, Windmiller 및 Levi<sup>32)</sup>는  $\beta$ -lipoprotein의 합성장애로, Roheim등<sup>34)</sup>은 VLDL 합성 장애로 인한 것이라 하였다. 이와 같은 초기의 개괄적 연구에 이어 지질단백의 대사과정이 밝혀짐에 따라 orotic acid에 의한 지방간 형성은 triglyceride 합성과정이나 apoprotein의 합성장애가 아닌<sup>37,38)</sup>, RER에서 조합된 미숙지질단백질에 탄수화물 분획이 첨가되는 과정의 장애로 인하여 일어난다<sup>39,40)</sup>고 밝혀져 있다. Novicoff등<sup>41-45)</sup>은 RER에서 Golgi체로의 지질단백의 운반장애가 원인일 것으로 주장하였다.

이와 같은 연구 결과들에 의해 대체로 orotic acid에 의한 지방축적의 기전 그리고 장애의 주된 장소는 Golgi체 및 그의 기능에 대체로 집중되고 있는 현실이다. Orotic acid에 특이적 작용 즉 간세포에 상해를 주지 않고 VLDL 합성과정에만 선택적으로 작용한다는 점은 간세포의 대사과정 특히 세포내 소기관들의 상호관계에 대한 연구에도 많은 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

본 교실에서는 세포내 소기관들의 상호이행에 관심을 가지고 일련의 연구들<sup>46-49)</sup>을 진행시켜 왔으며 세포기능의 변화에 따른 소기관들의 형태변화 그리고 막의 상호이행에 많은 관심을 가지고 있다. 이에 대하여 Arstila 등<sup>50)</sup>은 세포내 소기관들 중 mitochondria를 제외한 막성구조물들은 서로 관계가 있으며 이들의 막에 상호 이

행성이 있음을 강조하면서 이들 구조물을 통칭하여 cytocavitary network라는 용어를 쓰자고 제창하였고 이어서 막의 상호이행은 conformational change라고 명명한 바 있다.

본 연구는 상기한 바와 같이 지견들을 토대로 orotic acid에 의한 지방축적의 기전을 형태학적으로 규명함과 동시에 이때 야기되는 세포내 막성 소기관들의 동태를 관찰함으로써 막의 상호이행에 관한 의문의 일단을 해명하기 위해 막의 기능에 결정적인 역할을 하는 막내 효소 특히 glucose-6phosphatase(이하 G-6-Pase) 및 thiamine-pyrophosphatase(이하 TPPase)의 분포를 추적하였다.

### 재료 및 방법

**실험 동물** : 체중 200~250 gm의 Sprague-Dawley종 숫컷 흰쥐를 일정기간 사육하여 건강이 양호하다고 생각되는 것을 골라 실험에 사용하였다.

**실험 방법** : 실험군은 orotic acid (6-carboxy-2-dihydroxypyrimidine, Sigma, USA)가 첨가된 규정식 (orotic acid 1%, 전분 50%, dextrose 10%, 설탕 10%, casein 28%, 무기질 및 비타민 1%)을 투여하였으며 각각 1, 2, 3, 5 및 7일 후 도살하여 간을 채취하였다. 일부는 Orotic acid투여 8일째 부터 일반식을 섭취시킨 후 1, 3, 5일 및 7일 제 관찰하였다.

대조군은 상기 규정식 중 1% Orotic acid가 첨가되지 않은 규정식을 먹인 군과 일반식을 먹인 군으로 각각 7일 제 간을 채취하였다. 각각의 실험군 및 대조군에는 3마리 이상의 동물을 사용하였다.

**광학현미경적 관찰** : 채취된 간의 일부는 고정하지 않고 즉시 동결시켜 동결절편을 만든 후 oil red O로 지방 염색하였고, 나머지는 중성 formalin에 고정하고 paraffin에 포매한 후 hematoxylin-eosin 염색과 periodic acid-Schiff염색을 시행하였다.

**전자현미경적 관찰** : 관찰할 실험동물들은 ether마취 후 양와위로 고정하고 복벽을 절개하여 간을 노출시킨 후 간 문맥정맥을 통하여 50~100 ml의 생리식염수를 2분간 관류 세척하고 이어서 0.5% glutaraldehyd용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 0-4°C)용액에 2시간 전고정하고 phosphate buffer(0.1 M)로 세척한 후 1% O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub> 용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 실온)에 2시간

후 고정하였다. 계열 ethanol로 탈수한 후 propylene oxide로 치환하고 Luft방법<sup>51)</sup>에 의하여 epon혼합물에 포매하여 열중합 시킨뒤 1 μm두께로 잘라 alkali toluidine blue염색을 하여 관찰할 부위를 결정하였다. 초박절은 Dupont diamond knife를 이용하여 Porter Blum MT 2B로 하였으며 Reynolds방법<sup>52)</sup>에 의하여 uranyl acetate와 lead citrate의 이중 전자염색을 하여 Hitachi H600A 및 Jeol JEM100CX형 전자현미경으로 가속전압 75 KV에서 관찰하였다.

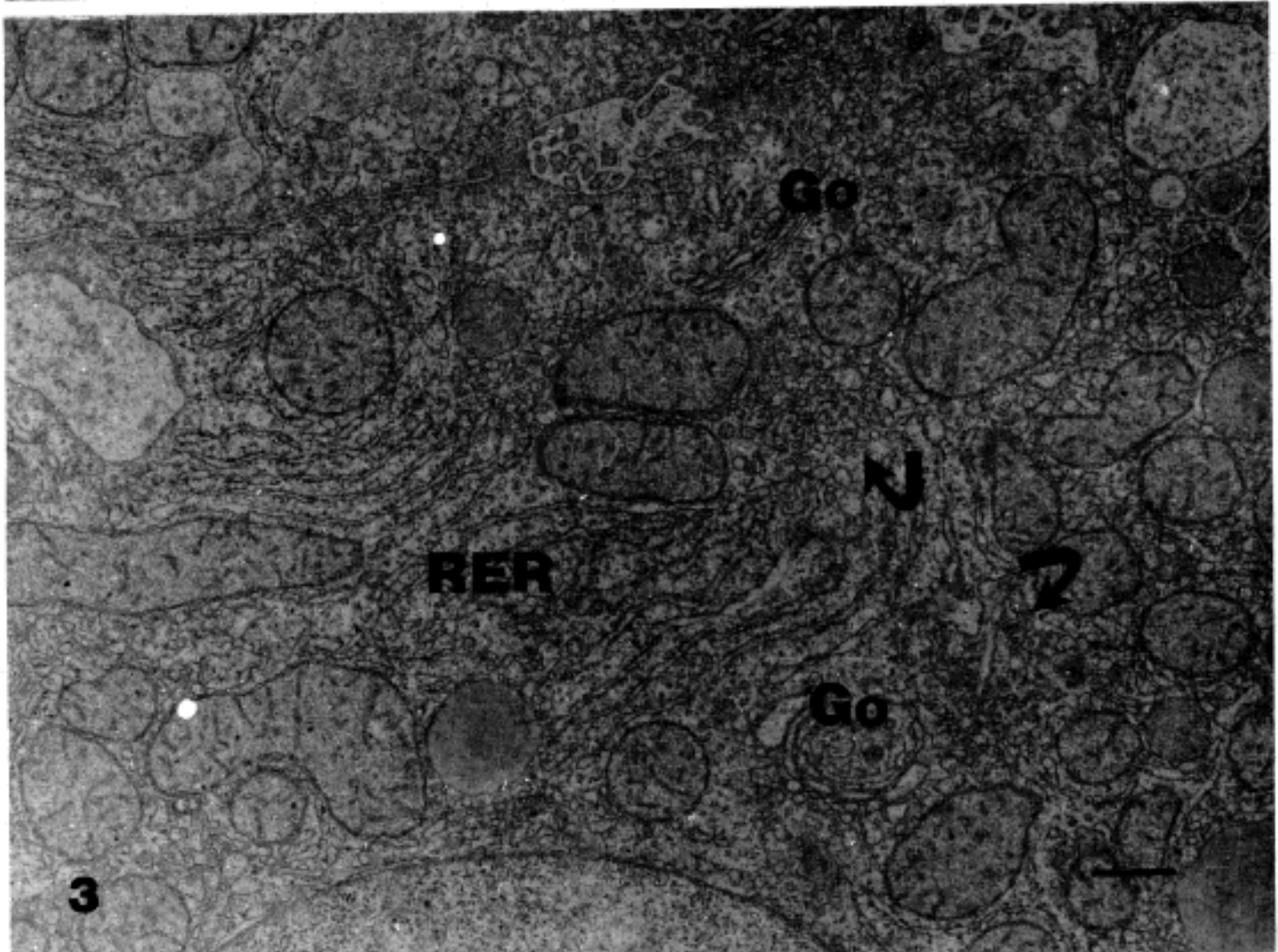
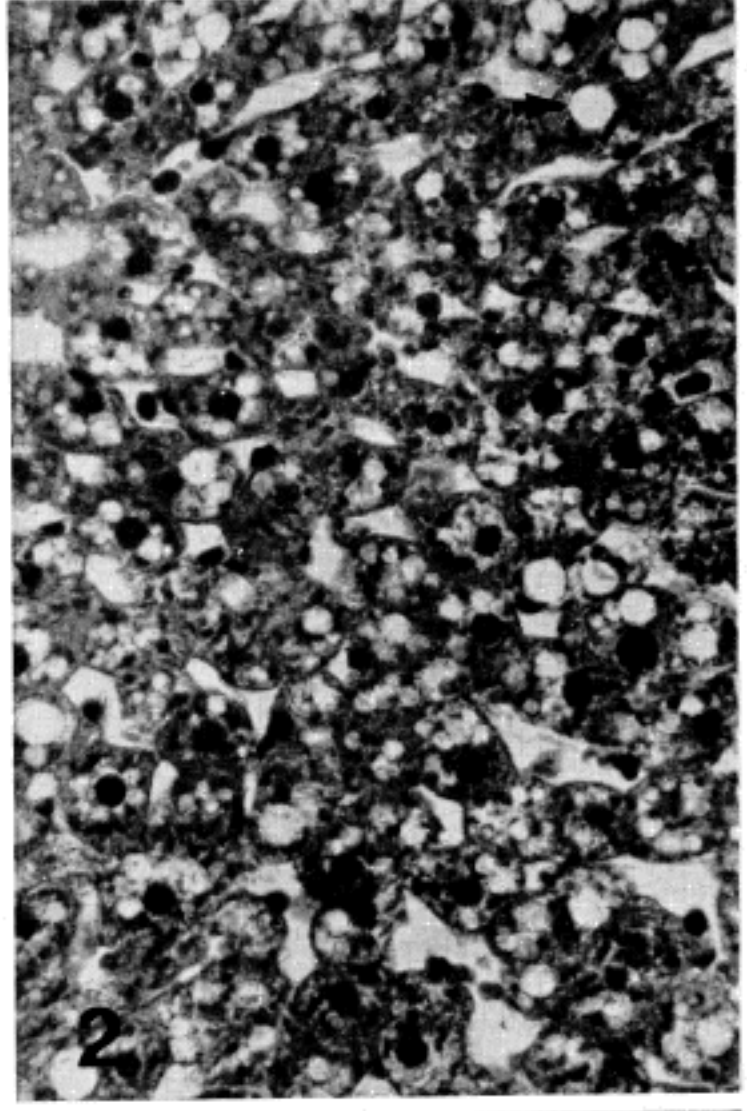
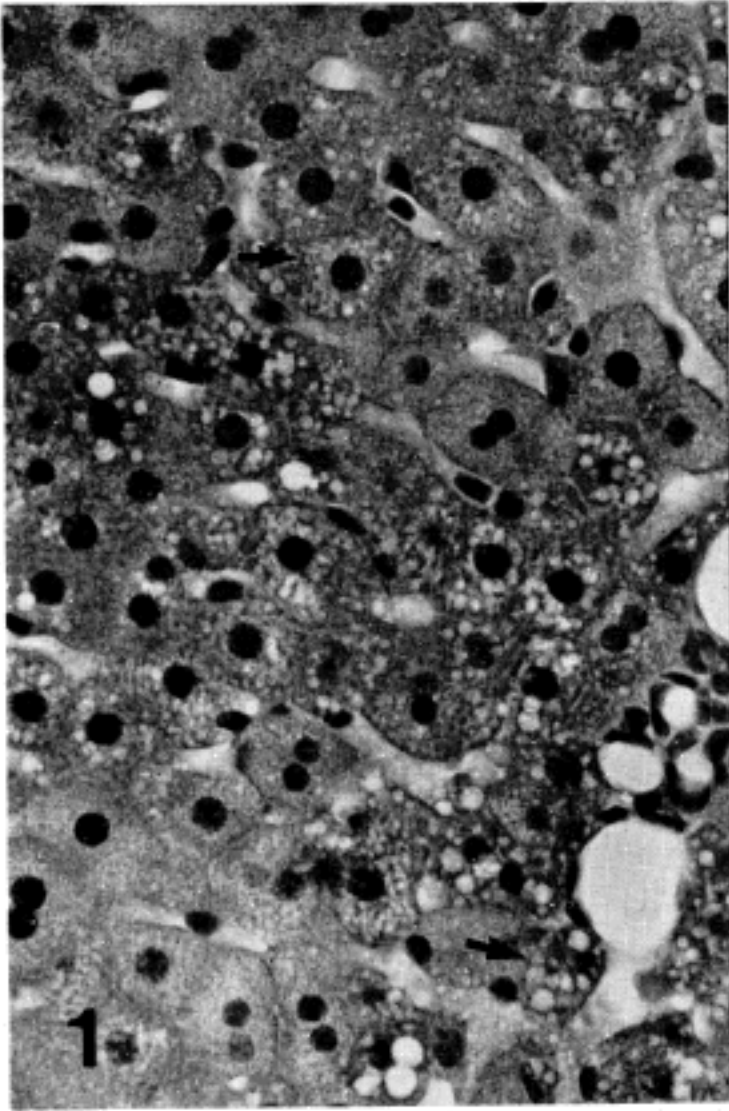
**전자현미경적 효소세포 화학적 관찰** : TPPase반응을 위하여 상기한 방법대로 절취한 간의 조직편을 즉시 5×3×2 mm<sup>3</sup>의 크기로 자른 다음 Karnovsky 방법<sup>53)</sup>에 준하여 만든 Karnovsky용액(2% paraformaldehyde, 1, 25% glutaraldehyde, 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, 4°C)에 1시간 동안 고정한 후 cacodylate buffer(0.1 M, pH 7.4, 4°C)에 10분간 세척하고 microslicer (DTK-100, Dosaka, Japan)를 이용하여 40 μm두께의 절편으로 만들어 Novikoff와 Goldfisher방법<sup>54)</sup>에 따른 반응액(증류수 7 ml, 0.2M trismaleic acid, pH 7.2 thymine pyronic acid 24 mg, 1% lead citrate 3 ml, 0.025 M MnCl<sub>2</sub>에 20분간 실온에서 반응시켰다. 다음 0.05 M trismaleic buffer(pH 7.4, 4°C) 10분간씩 3회 세척하고 0.1 M cacodylate bufer에 세척한 후 1% O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub> 용액에 1시간 고정하여 그 후는 통상의 전자현미경의 표본제작과 같은 과정을 거친뒤 염색은 lead citrate의 단 염색을 하였다.

G-6-Pase반응을 보기 위하여서는 TPPase의 관찰시와 같은 과정을 거쳤으나 반응은 Wachstein과 Meisel 법<sup>55)</sup>에 따른 반응액(0.2 M trismaleic acid 20 ml, pH 6.7, glucose-6-phosphate bibasic 25 mg, 2% lead nitrate 3 ml, sucrose 4 g, 증류수 27 ml)을 사용하였다.

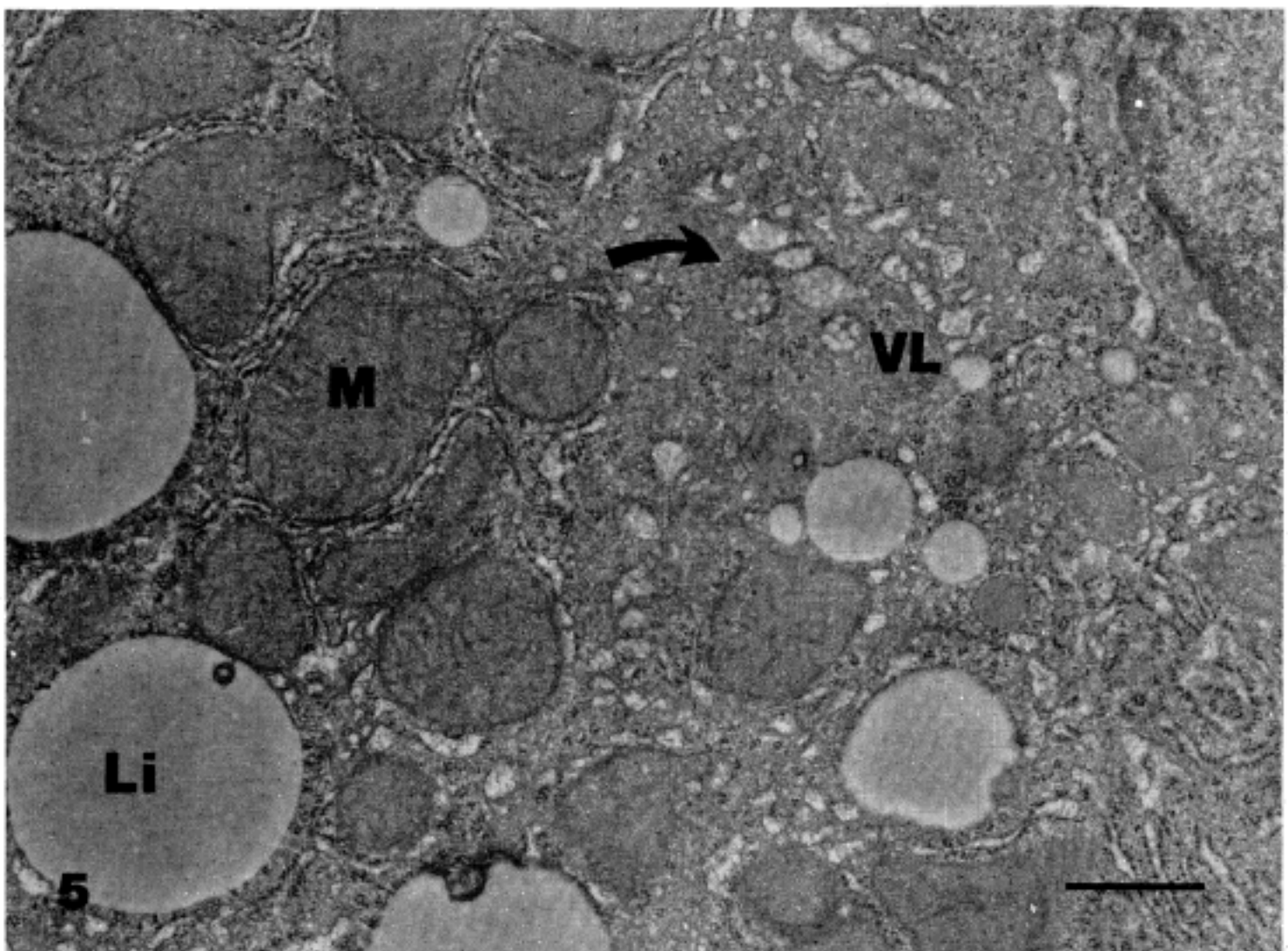
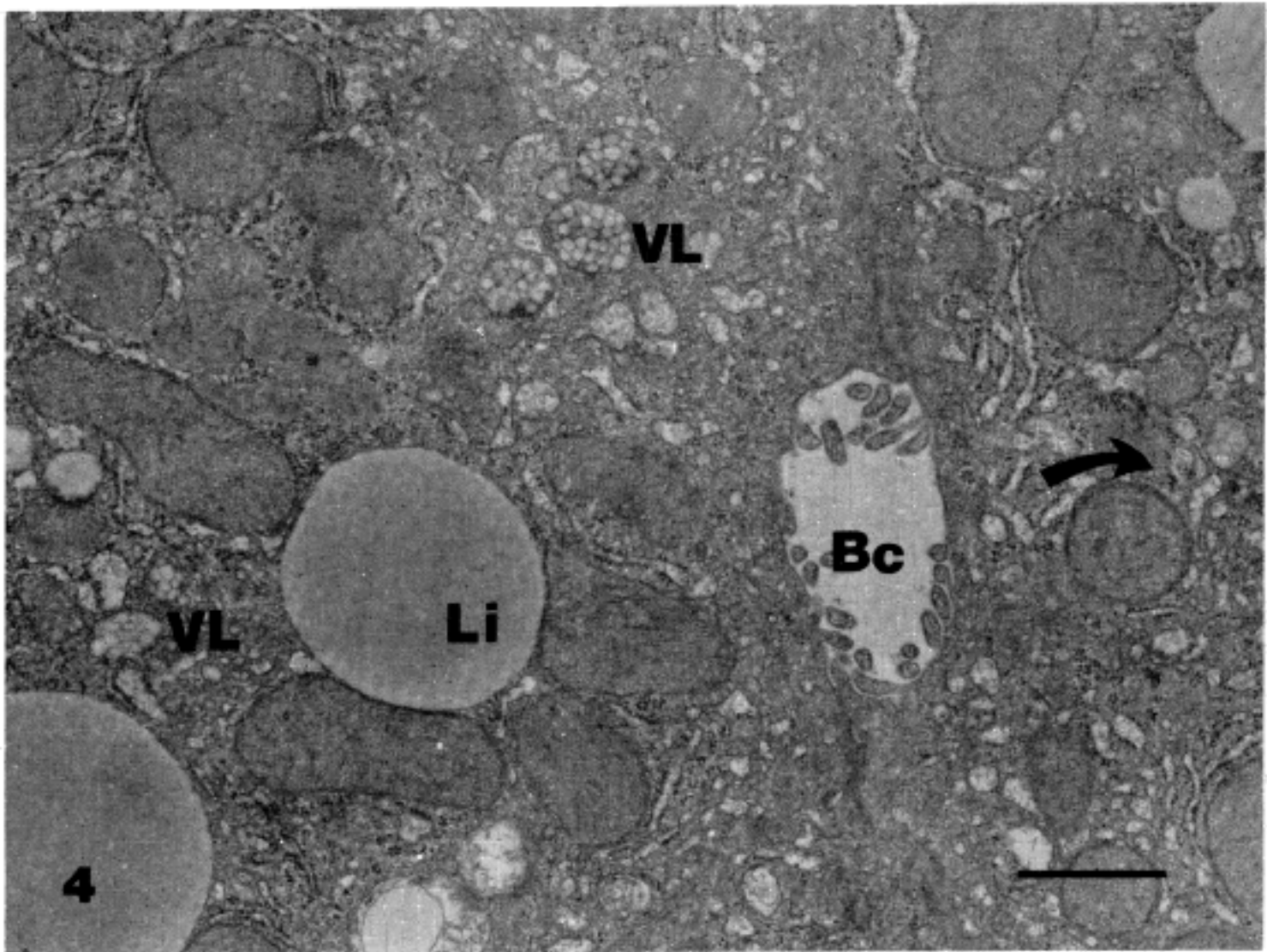
### 성 적

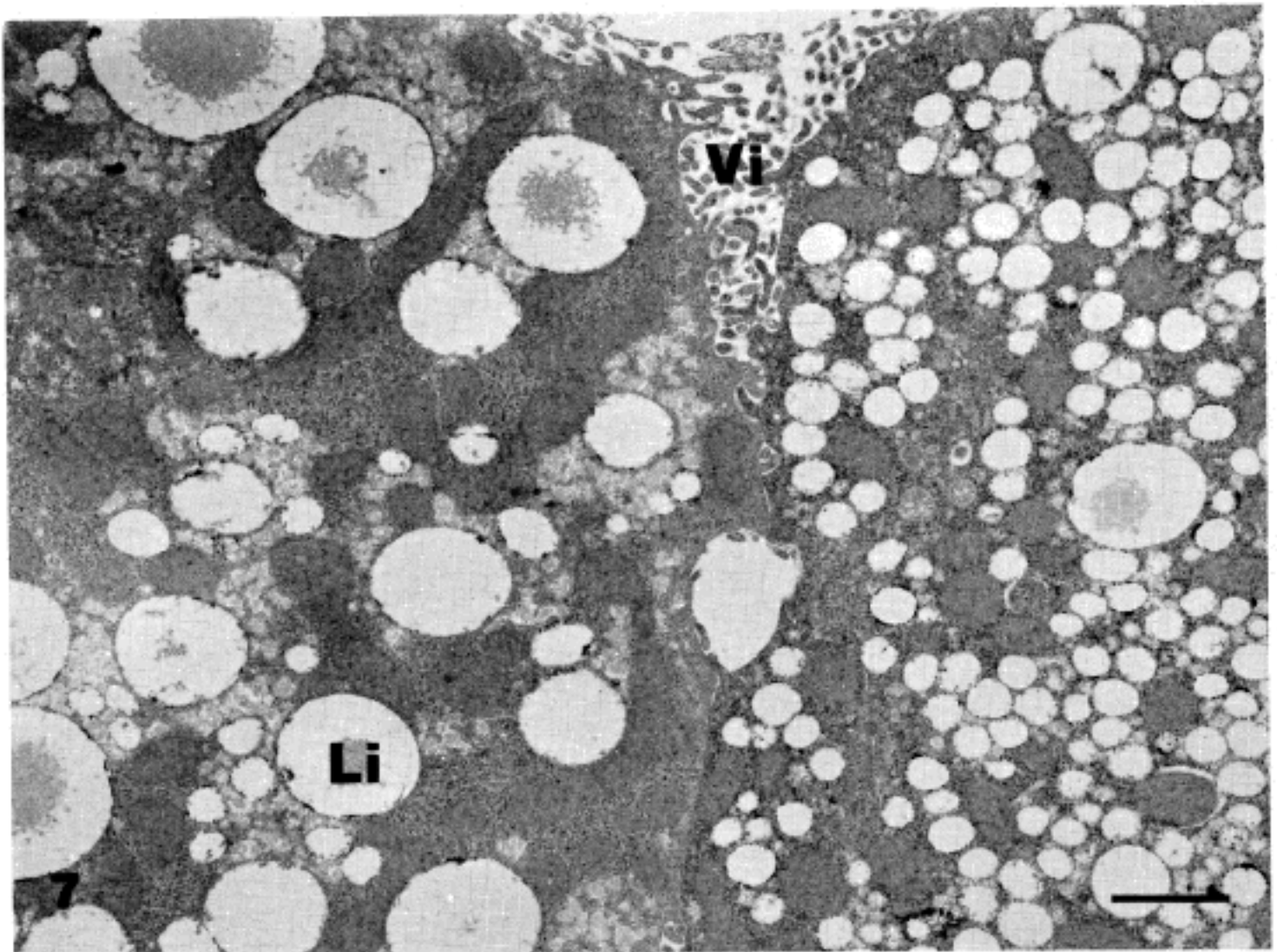
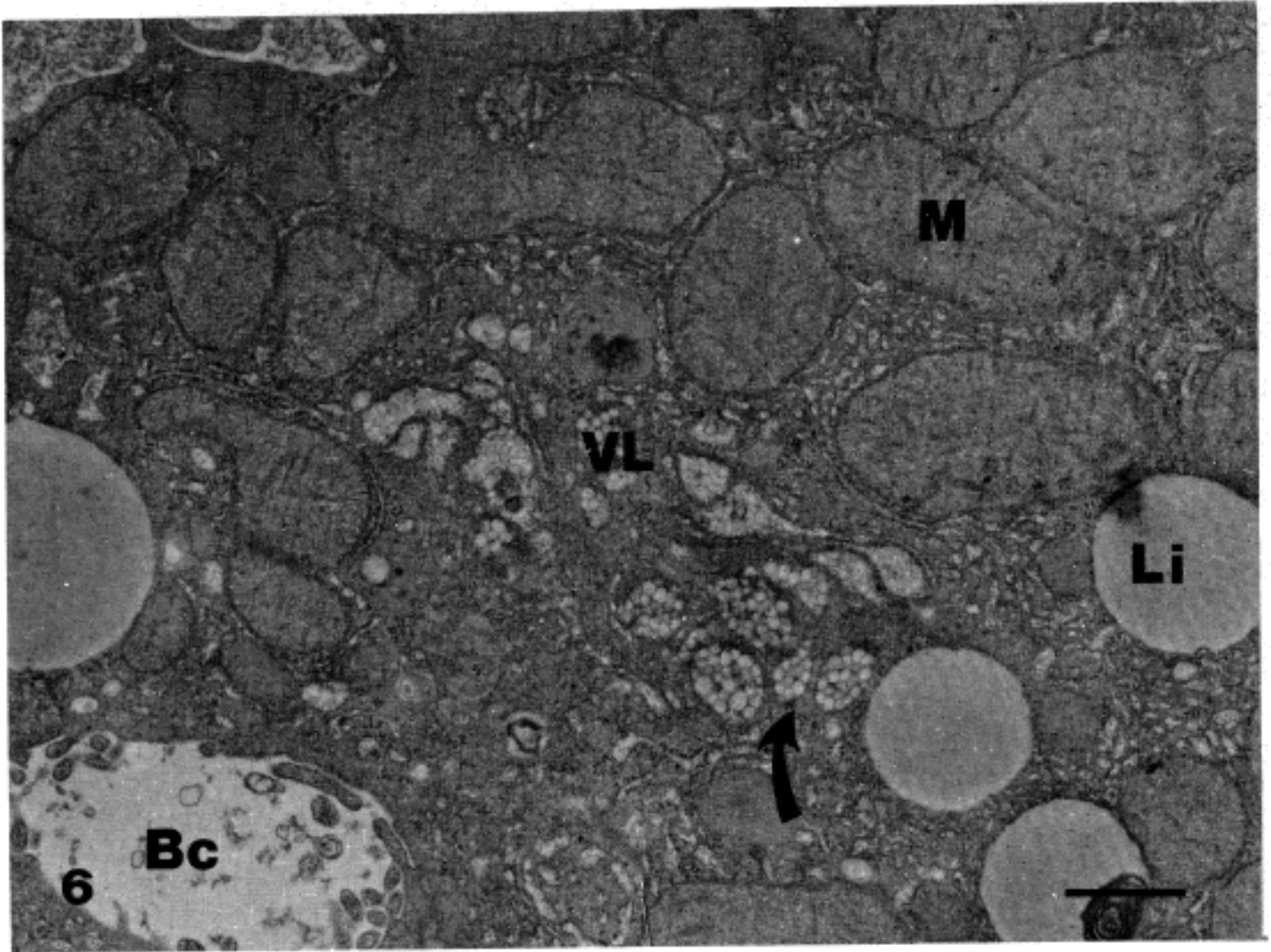
**광학현미경적 소견** : Orotic acid투여후 1일과 2일이 경과한 실험군에서는 간소엽이나 간세포에 특별한 변화는 보이지 않았으나 3일후에는 간소엽내 작은 지방적이 간혹 있는 부분적인 지방변화가 있었으며 이러한 지방변화는 간소엽을 중심으로 관찰되었고 세포질의 호염성이 다소 감소하였다(Fig. 1).

Orotic acid투여 7일후에는 상기한 지방변화가 더욱

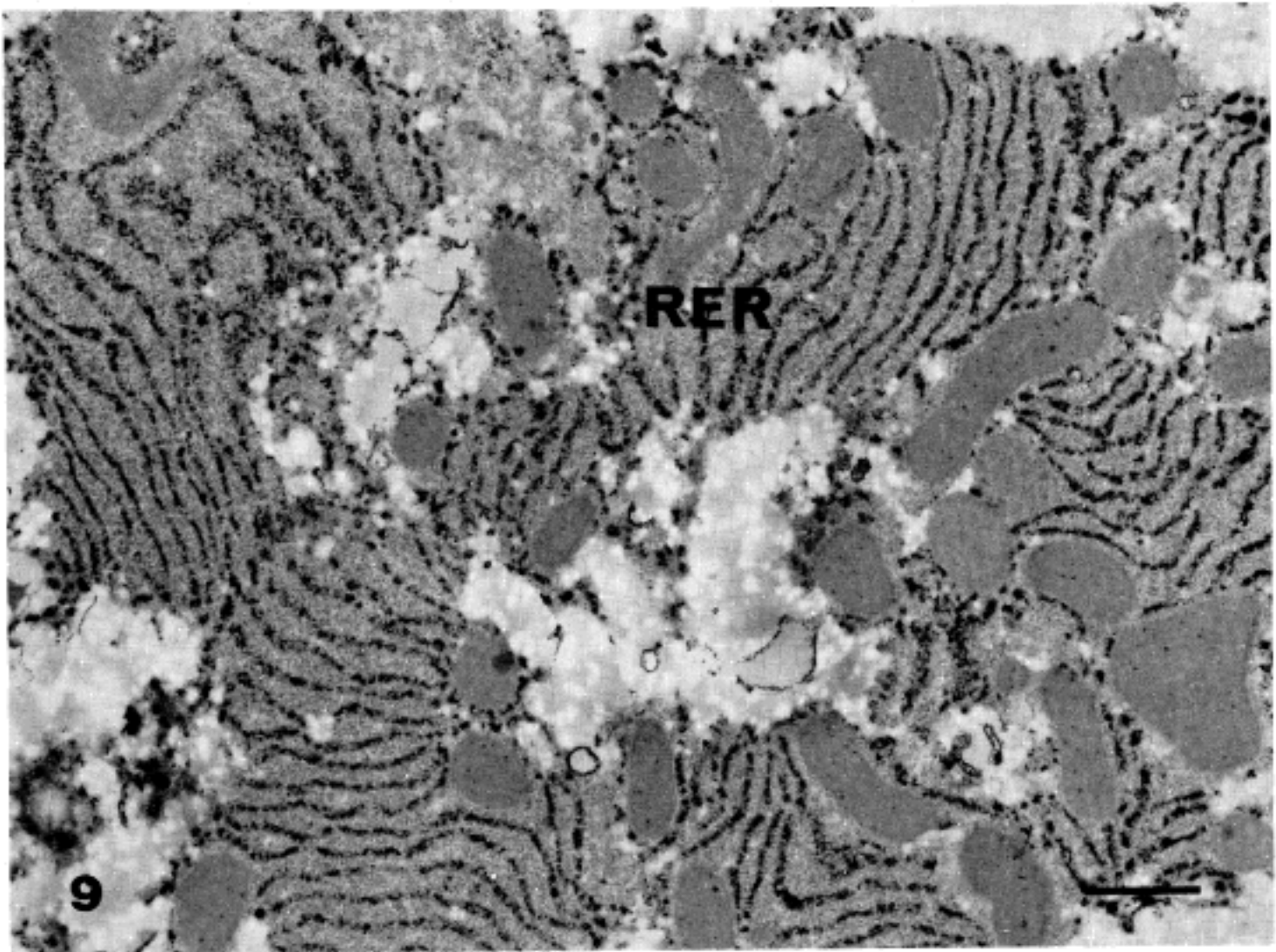
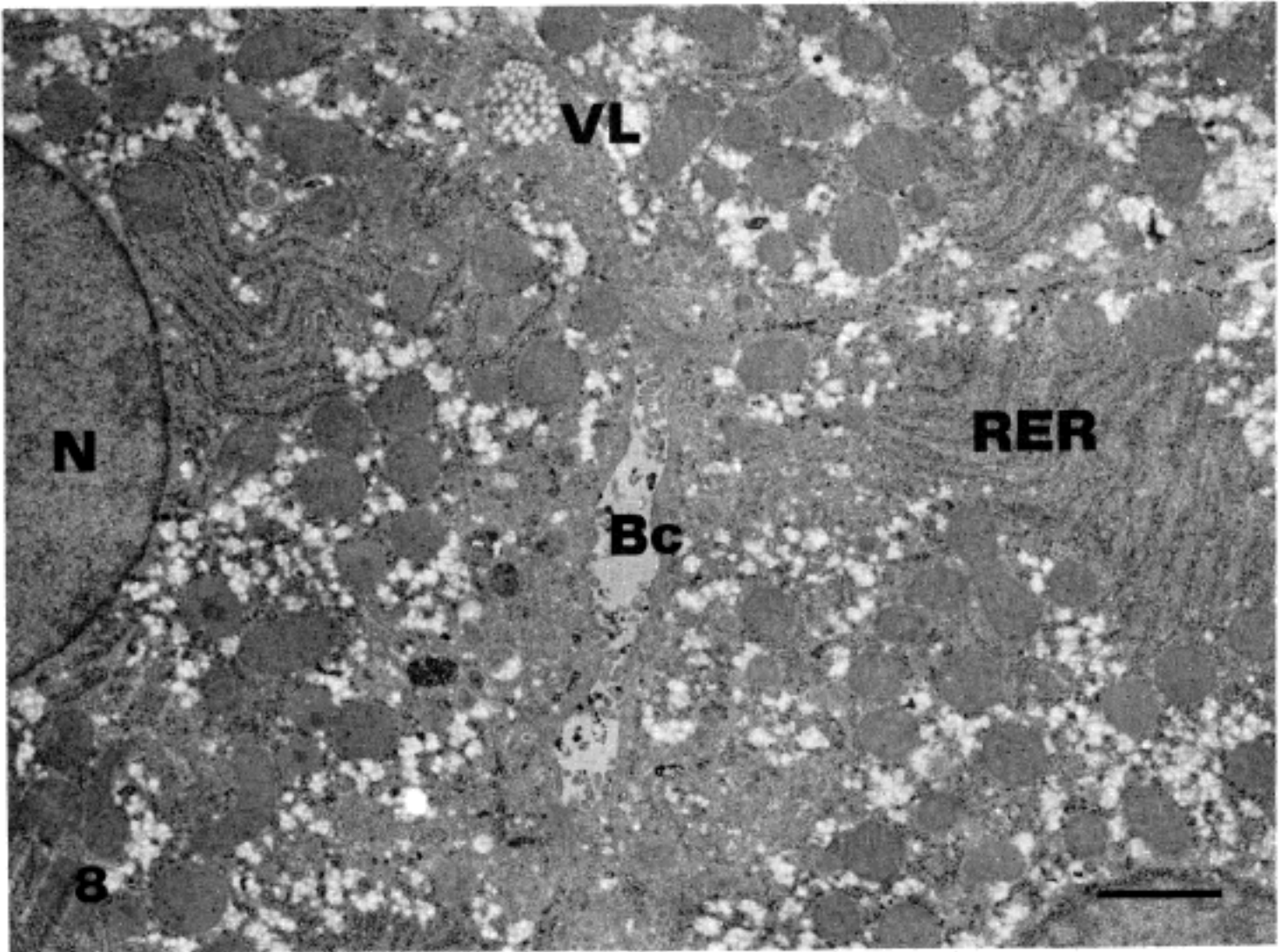


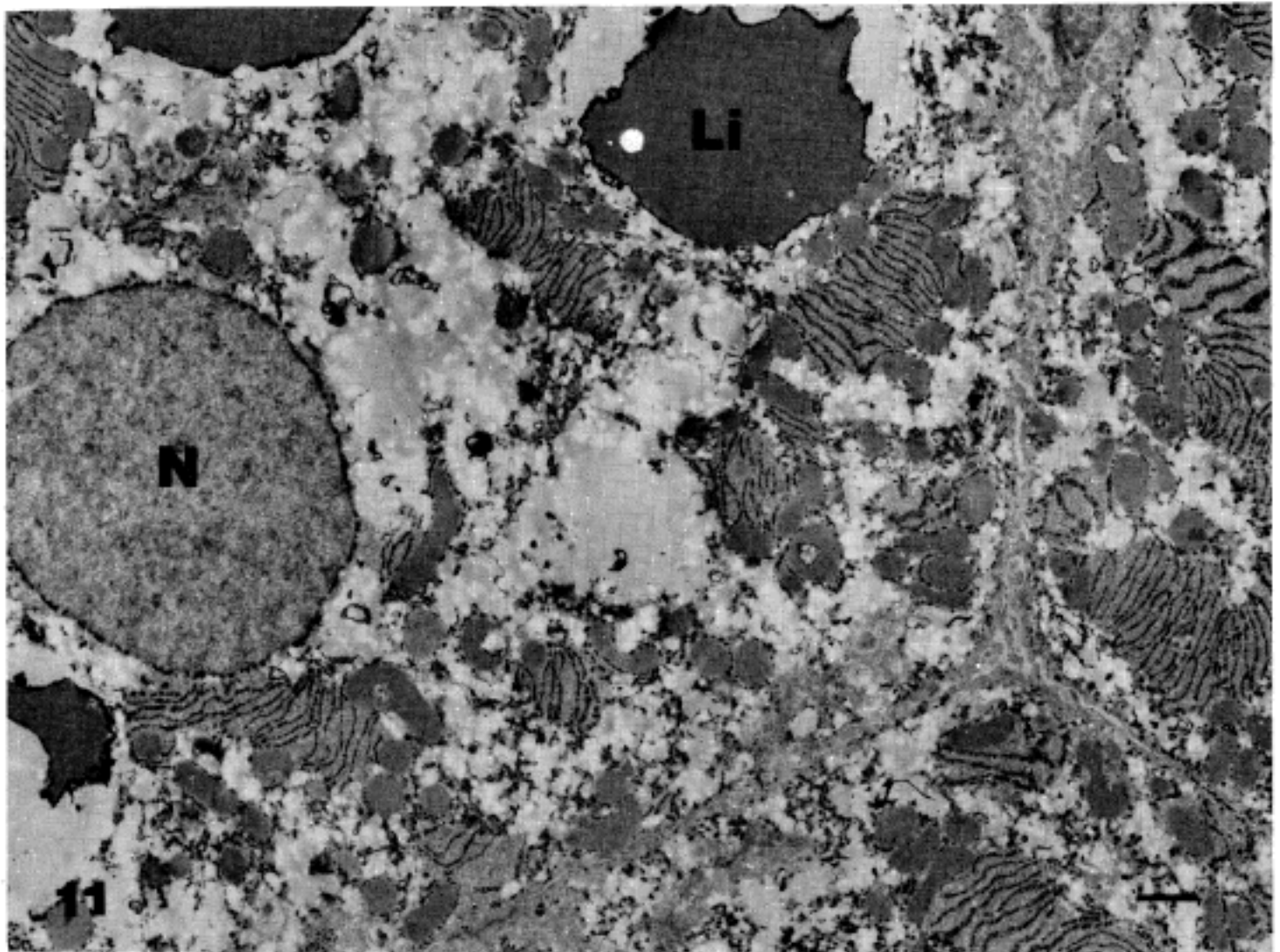
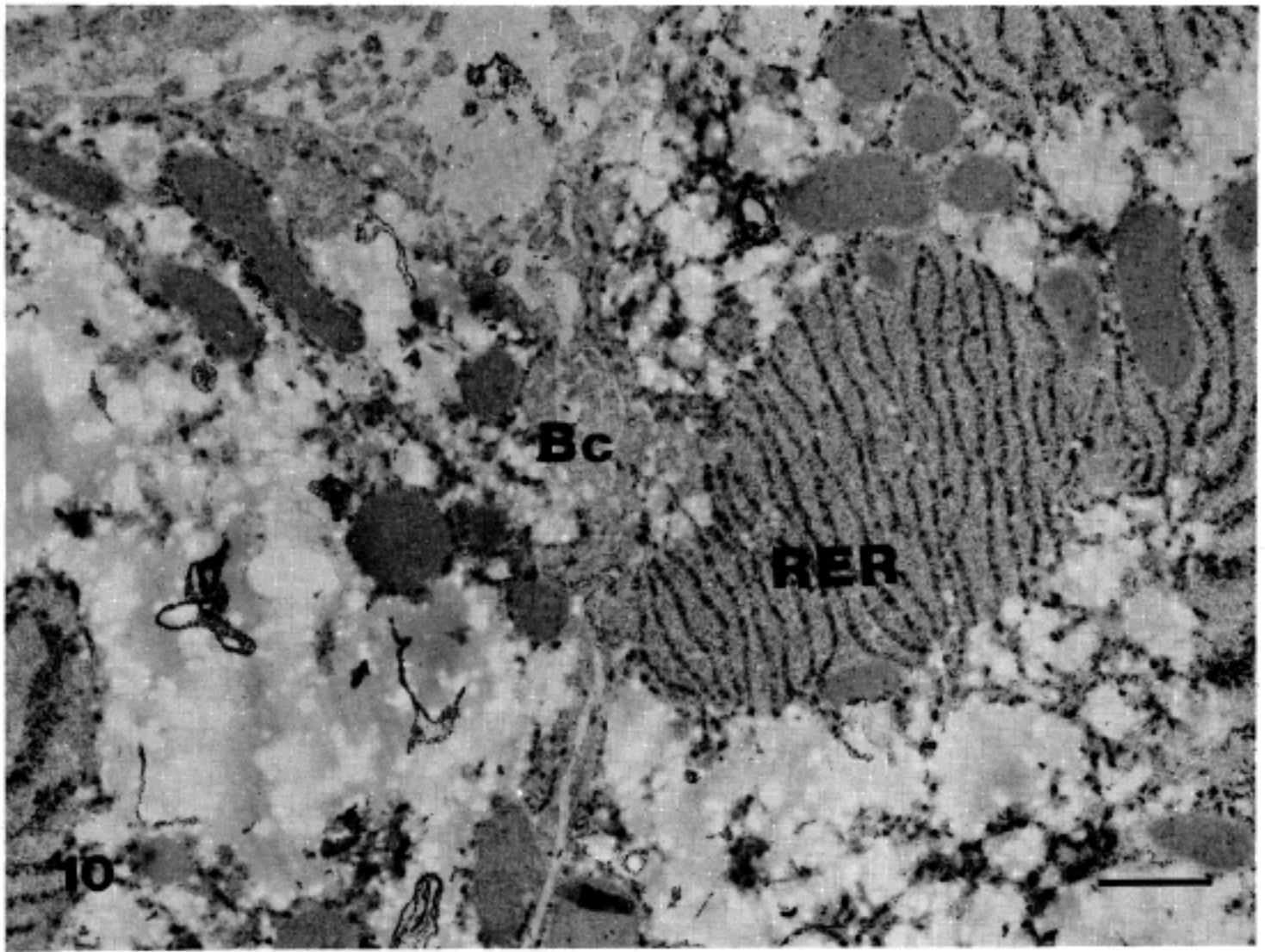














현저하였으며 간세포내에는 작은 지방적이 들어차 있어 마치 비말세포와 같은 양상을 하였다. 간세포는 지방적으로 인해 다소 커져있었고 둥근 모양을 하였다. 간세포의 괴사, 백혈구 침윤이나 담즙저류는 일어나지 않았고 유동을 이루는 Kupffer세포, 내피세포 그리고 Ito세포는 별 변화를 보이지 않았다(Fig. 2). 세포질의 호염기성이 많이 감소하였으며 PAS염색에서 규정식을 먹인 대조군보다 강하게 염색되는 점을 보아 당원이 증가한 것으로 생각된다.

1%의 Orotic acid가 함유된 규정식을 중단하고 일반식으로 전환한 실험군에서는 전환 3일후에 거의 대부분의 지방적이 사라졌으며 5일 후에는 거의 정상에 가까운 세포의 모양을 하였다.

**전자현미경적 소견 :** Orotic acid투여 1일 후의 간세포는 거의 정상적인 모양을 하였으며 세포소기관의 변화는 관찰되지 않았다. Orotic acid투여 2일째에는 소수의 RER의 cistern이 확장되었으며 지방적이 간혹 출현하였다. 다른 세포소기관의 변화는 보이지 않았다(Fig. 3).

Orotic acid투여 3일 후에는 RER의 확장과 ribosome의 탈락이 있었고 RER의 배열이 다소 흩어져 있었으며 세포질내에 지방적들이 산재하였다. Golgi체 주변에는 Sabesin 등<sup>6)</sup>이 지적인 VLDL크기의 입자(크기 300~900 A)를 다수 함유한 공포상 구조물이 관찰되었으며, 이중 어떤 것들은 일렬로 비열하여 Golgi stack의 cis면에 나란히 배열하는 상도 관찰되었다(Fig. 4, 5). Orotic acid투여 5일 후에는 거의 모든 간세포에 비교적 균일한 크기의 지방적이 있었고 상당수의 RER이 심한 확장과 공포화를 보였으며 RER의 평행배열이 매우 흩어져 있었다. RER에 부착된 ribosome의 수가 감소되었다.

Golgi체 주변에 VLDL입자를 가진 공포상 구조물의 수가 증가하였고 이들은 간혹 확장된 cis면의 Golgi stack내에도 볼 수 있었다. Peroxisome의 수는 현저하게 감소하였다(Fig. 6).

Orotic acid투여 7일 후에는 모든 간세포들이 지방적으로 차 있었고 지방적의 크기는 비교적 균일 하나 간혹 큰 것들도 섞여 있었으며 분포는 유동을 면한 세포변연 부위에서 부터 담세관까지 고루 퍼져있었다. 간혹 지방적을 싸고 있는 막에 ribosome이 부착된 것이 관찰되었다. Golgi체의 수가 현저하게 증가되었으며 작은 공포들이 서로 몇 층씩 나란히 밀집하여 Golgi체를 형성하는 것

처럼 보였다(Fig. 7).

RER과 Golgi체 사이의 이행성 수포는 orotic acid투여 후 3일까지는 관찰되었으나 이후는 볼 수 없었으며 peroxisome은 거의 나타나지 않았다. Mitochondria는 위축되어 기질의 전자밀도가 높게 관찰되었고 내막과 외막의 경계가 불분명하였다. 또한 이들 mitochondria는 지방적에 인접하여 분포하는 경향을 보였으며 담세관은 내강이 약간 좁아졌으며 미용모의 수는 다소 감소하였다.

Orotic acid투여 후 일반식으로 전환한 실험군에서는 일반식으로 전환한 2일 후 부터 지방적의 수가 현저하게 감소하였고 RER은 평행의 배열상을 다시 나타내었다. 일반식이 대체 5일 후에는 거의 모든 간세포에서 지방적이 소실되었고 RER은 원래의 평행배열상을 보였다.

**효소세포화학적 소견 :** TPPase의 활성도에 대한 염색에서 대조군은 Golgi stack의 trans면에 uranyl의 침착이 강하게 나타났으나 RER이나 핵막에는 반응이 거의 일어나지 않았다. 실험군에서는 orotic acid투여 1일후에 Golgi체의 막에서 uranyl에의 염색성이 현저히 감소함을 보아 그 활성도가 저하되었음을 알 수 있었다. Orotic acid투여 2일 후에는 Golgi체 막에서 TPPase의 반응을 거의 볼 수 없었다(Fig. 8).

G-6-Pase에 대한 반응 염색에서 대조군은 간세포의 RER과 핵막에 강한 양성 반응을 나타내었으며 mitochondria를 위시한 다른 세포소기관에는 반응이 거의 일어나지 않았다. 실험군에서는 RER과 핵막의 반응은 orotic acid투여 초기나 7일 경과군에서나 큰 차이를 나타내지 않아 G-6-Pase의 활성에는 orotic acid의 영향이 크게 미치지 않는 것으로 사료되었다. 지방적을 싸고 있는 막의 대다수에서 G-6-Pase반응이 일어나는 것을 보아 지방적을 싸고 있는 막이 ER에서 기원한 것으로 생각되었다. 또한 Golgi체 주변의 VLDL입자를 가진 공포상 구조물의 막에도 G-6-Pase반응이 일어나므로 이들도 ER에서 유래한 것으로 보아졌다. 그러나 orotic acid투여 5일이나 7일 후에는 VLDL을 가진 cis면의 Golgi stack은 음성 반응을 나타내었다. Golgi체는 대조군보다 실험군 모두에서 음성반응을 보였으므로 Golgi체에는 G-6-Pase가 없거나 있어도 아주 미량일 것으로 추측되었다(Fig. 9, 10, 11).

## 고 안

간세포내 지방은 주로 인지질, 지방산, triglyceride,



cholesterol 및 cholesterol ester 등으로 구성되어 있으며 정상 간 무게의 약 5%를 차지하는 반면, 지방간에서 축적되는 지방은 주로 triglyceride이며 이때는 전체 간 무게의 40~50%에 달할 수도 있다<sup>56)</sup>.

본 실험과 같은 orotic acid에 의한 지방간에서도 축적되는 지방성분은 주로 triglyceride이다<sup>30,45,57)</sup>. Orotic acid에 의한 간의 지방변화는  $\beta$ -lipoprotein의 분비감소<sup>31)</sup> 즉 다시 말하면 VLDL의 합성장애<sup>33)</sup>로 인한 것이므로 따라서 간세포에 축적되는 지방은 주로 triglyceride가 된다. Orotic acid에 의한 지방의 축적은 가역적이며 orotic acid의 투여를 중단하면 빠른 시간내에 회복되며<sup>32)</sup> adenine의 투여<sup>31)</sup>나 clofibrate의 병합투여<sup>45)</sup>로 orotic acid에 의한 지방축적이 경감하거나 혹은 예방될 수 있다.

본 실험에서도 orotic acid을 일정기간 투여한 후 orotic acid의 투여를 중단한 경우 간에서 축적된 지방이 현저하게 감소하는 것이 관찰되었다. 따라서 orotic acid에 의한 간의 지방축적은 orotic acid투여가 중단되면 원상으로 회복되는 가역적인 변화라 할 수 있다. 그러므로 orotic acid에 의한 간세포의 지방변화는 간세포의 구조적 상해에 의한 것이라기 보다는 지방대사의 과정에서 특히 어느 한 단계의 특정 효소 또는 효소군의 기능이나 생산을 억제하기 때문이라고 추측할 수 있다.

한편 단백질합성 저해제로 알려진 ethionine<sup>58-60)</sup>, 사염화탄소<sup>61-62)</sup>, puromycin<sup>63)</sup> 및 actinomycin D<sup>64)</sup>로 인한 지방축적 혹은 choline의 결핍<sup>65)</sup>등에 있어서는 apoprotein을 비롯한 전 단백질의 합성장애로 VLDL의 생성이 장애되어 지방축적이 야기되므로 이때는 대사의 장애가 VLDL의 생성 뿐만 아니라 세포전반에 걸쳐 영향을 미치게 되며 세포 소기관들에게도 상해의 소견들이 관찰되고 따라서 원상의 회복이 지연된다. 그러나 본 실험에서와 마찬가지로 orotic acid에 의한 지방축적에서는 지방적의 증가 이외에는 세포 소기관에서 세포상해를 시사하는 변화가 없었으며, 따라서 orotic acid는 극히 제한된 범위에 한해서 작용한다고 볼 수 있다.

VLDL은 주로 triglyceride가 함유된 core와 그것을 싸고 있는 apoprotein으로 구성되어 있는데, apoprotein이 VLDL의 물리적 특성을 결정하며, 지질단백에서도 생리적 기능의 조절에는 glycoprotein으로 알려진 단백질성분이 주로 관여한다<sup>66)</sup>. 사람에서는 VLDL apoprotein의 약 40%가 B-apoprotein(이하 Apo B)이며 나머지

는 C-III, E-, 및 A-apoprotein으로 구성되어 있다<sup>67)</sup>. 간세포의 SER에서 합성된 triglyceride는 RER에서 합성된 Apo B등의 apoprotein과 SER과 RER의 이행부분에서 조합되는데<sup>68,69)</sup> 이것을 미숙지질단백이라 하고 이들은 Golgi체에 이송되어<sup>23,24)</sup> 탄수화물 분획이 첨가됨<sup>25)</sup>으로서 합성이 완성된다. 혈액내로 분비된 VLDL은 다시 lipoprotein lipase의 작용으로 점차 triglyceride를 잃고 cholesterol ester가 증가하여 intermediate density lipoprotein(이하 IDL)을 거쳐 low density lipoprotein(이하 LDL)으로 된다<sup>70)</sup>. 지질단백의 크기는 지질단백의 종류에 따라 달라서 chylomicrone은 800-5000A, VLDL은 280~800, LDL은 200A내외, high density lipoprotein(이하 HDL은 50~150A정도이다.

Orotic acid는 간세포내에서 uridine치를 상승시키고 adenine 및 cystine치를 감소시키는 작용이 있고<sup>31,71,72)</sup>, 간세포의 adenine 및 cystidine nucleotide치도 감소시킨다<sup>72)</sup>. Pottenger등<sup>46,73)</sup>은 orotic acid로 유발한 지방간의 VLDL apoprotein에는 N-acetylglucosamine, galactose 및 N-acetylneuraminic acid등이 결여되어 있으므로 이는 apoprotein이 Golgi체에서 glycosylating enzyme에 노출되지 않았음을 반영하는 것이라고 주장하였다. Wetmore등<sup>72)</sup>은 Golgi체에 있는 sialyltransferase가 CMP-N-acetylneuraminic acid로 부터 sialic acid를 빼내어 Apo-C peptide에 옮겨주는 역할을 하는데 orotic acid로 인하여 cystidine nucleotide가 감소되면 sialic acid로 인해 VLDL의 생산에서 탄수화물 분획의 첨가가 장애된다는 것을 지적하는 소견이라 사료된다.

Sabesin등<sup>57)</sup> 및 Glickman과 Sabesin<sup>68)</sup>은 이에 대하여 단순히 Golgi 체단계의 장애라 하였다. 즉 orotic acid투여 24시간 후부터 Golgi체에 VLDL 소적이 축적되기 시작하고 이어서 ER 강내에도 VLDL의 축적을 볼 수 있으므로 Golgi체에서 당 첨가 장애로 인한 대사과정이 더 진행하지 못하고 지방과 apoprotein이 저류된다는 것이다.

한편 Novikoff등<sup>45,74)</sup>은 orotic acid투여시 Golgi체가 편평하면서 VLDL입자는 볼 수 없으며, orotic acid에 의해 영향을 처음으로 받는 소기관은 ER로서 이는 형태학적으로 층상 구조가 파괴되면서 분절되어 소포상이 된다고 하였다. 또한 ER의 소포상 변화로 인하여 소포체

와 형태학적으로 그리고 기능적으로 연관이 있는 구조물 즉 transitional vesicles, Golgi체, GERL 및 peroxisome등에 영향을 미치게 된다고 하였다. Sabesin등<sup>57)</sup>은 같은 실험을 하여 VLDL입자의 저류가 Golgi체에서부터 시작된다는 것을 보고 orotic acid에 의한 지방간의 기전을 Golgi체의 기능 장애로 인한 역행적 저류로 설명하였다. 반면 Novikoff는 Sabesin이 가장 주안점을 둔 VLDL입자의 절류를 Golgi체에서 볼 수 없고 ER의 소포상 변화로 인하여 다음 연결 장소인 Golgi체 및 GERL로의 전달에 장애가 된 것 즉 Golgi에 이전 단계의 장애를 주장하였다.

본 실험에서는 orotic acid투여 3일째부터 ER의 총상구조 변화와 분절이 관찰되었고 동시에 GOLGI체 부변에 VLDL 입자를 가진 공포의 출현이 있었다. VLDL 입자를 가진 공포는 또한 일렬로 배열하여 Golgi stack의 cis면에 평행하게 배열한 것도 있었다. Orotic acid투여 5일 후에는 상기한 양상이 더욱 현저하였으며 Golgi stack의 cis면은 확장되었고 그 안에서 VLDL입자가 인정되었다. 이와 같은 소견은 VLDL입자를 가진 공포상 구조물이 서로 나란히 배열한 후 유합하여 Golgi stack의 cis면에 Golgi stack의 하나로 새로이 들어온 것이라 생각된다. 단백질 합성과 분비에서 Golgi체와 ER의 상호관계를 보면 RER에서 단백질 합성되면 RER의 끝이 소포상으로 분절하고 분절된 소포들은 Golgi체 가까이로 이동하여 cis면의 Golgi stack에 나란히 배열하였다가 유합하여 새로운 Golgi stack이 조합되면 여기서 농축되고 다시 trans면의 Golgi stack에서 공포상으로 분절되었다가 유합하여 lysosome이 되거나<sup>75,76)</sup> 분비 과립이 되기도 한다<sup>48-50)</sup>. 본 실험의 결과는 이와 같은 Golgi체와 RER의 상호관계를 시사하는 소견으로 보아진다. 본 실험의 결과에서 orotic acid투여 3일째부터 Golgi stack의 cis면 가까이의 VLDL을 가진 수포의 막에 G-G-Pase가 양성되었는데 이는 이들 막이 ER에서 유래한 것을 의미한다. 또한 orotic acid 투여 5일 및 7일 후에는 같은 VLDL입자를 가진 Golgi stack이 G-G-Pase에 음성 반응을 보였는데 이는 VLDL입자를 가진 공포가 다시 Golgi stack으로 유입되었기 때문이라 추측된다. 이와 같은 본 실험의 성적은 미숙지질단백이 적어도 Golgi체로 이송되는 과정까지는 이루어진다고 보아지며 따라서 Novikoff등<sup>45,74)</sup>이 주장한 ER에서의 차단이라는 논리와는 배치되는 결과라 사료된다.

Redman과 Cherian<sup>76)</sup> 및 Lo와 Marsch<sup>77)</sup>는 쥐의 간 세포에서 glycoprotein 합성과정 중 모든 manose와 N-acetylglucosamine의 반은 RER에서 첨가되거나 N-acetyl glucosamine의 나머지 반과 모든 galactose는 SER이나 Golgi체에서 첨가된다고 하였다. 즉 glycosylation의 시작은 RER에서 일어나며 Golgi stack에서 완성된다. 또한 Glycosyl transferase는 Golgi stack의 trans면에 만 존재한다<sup>78)</sup>는 것도 알려져 있다. 이와같은 사실은 본 실험의 결과와 부합되는 것으로 즉 orotic acid가 apoprotein에 당첨가를 억제하는 장소가 Golgi stack의 trans면이며 그 이전까지는 장애가 없다는 것으로 이는 Sabesin등<sup>56)</sup>의 주장과 부합된다. 본 실험에서는 이 관계를 규명하기 위해 glycosyl transferase와 같이 있는 TPPase의 활성을 조사하였으며 결과는 TPPase의 활성은 orotic acid투여 1일 후부터 Golgi stack의 trans면에서 현저하게 감소하였고 2일째부터는 TPPase의 활성이 완전히 소실되어 이후의 orotic acid투여 기간동안은 그 활성이 전혀 나타나지 않았다.

Arstila등<sup>59)</sup>이 제시한 것 같이 세포내 cyto-cavitary network에서의 막의 이동은 RER-SER-Golgi 체-분비과립-세포막으로 이어지고, 세포막으로 부터는 Phagosome-lysosome으로 이동되는 것이 확실하나 pinocytotic vesicle로 세포내로 유입된 막의 운명은 확실하지 않다. 여하튼 세포내 막성 구조물 사이의 막의 이동에 관해서는 단순히 막의 이동에 그치지 않고 각 구조물들은 자체의 고유한 기능이 있으므로 각기 독특한 효소체계를 가지게 된다. 그러면 이런 연속적 막의 이동 중에 구조물 개개의 독특한 효소체계를 어디서 어떻게 획득하게 되는가 하는 문제는 매우 흥미롭다. 즉 RER-Golgi체로의 막의 이동 중에 Golgi체에 고유한 효소체계를 어디서 획득하게 되었겠는가 하는 문제이다. 유추하건대 효소는 단백질이며 단백질은 ribosome이 생산하며 아직까지 Golgi체나 SER등에 밀접하게 ribosome이 존재한다는 소견은 볼 수 없으므로 Golgi체 혹은 SER, 막에 국재하는 고유의 단백질도 RER에서 생산한다고 전제하는 것이 옳다고 생각된다. 그렇다면 Golgi체 혹은 SER에 이행되어서야 그 활성이 발휘되는 효소는 RER의 막에 이미 내재한 체로 막의 이동이 일어난다고 보아야 할 것이다. 그리고 그 장소에 가서야 비로서 그 작용이 활성화 된다고 생각된다. 무엇이 이 효소를 활성화시



킬 것인가 하는 문제는 본 실험의 주제가 아니므로 다루지는 않았지만 이 사실 즉 RER에서 이미 막내에 내재한 채 이동된다는 사실은 본 실험에서 간접적으로 증명된다고 생각한다. 즉 orotic acid투여로 Golgi stack의 trans면에서 작용하는 효소 즉 glycosyl transferase 및 TPPase모두가 그 활성을 볼 수 없었다는 점이다. 이것은 orotic acid가 다른 단백질 합성은 전혀 장애하지 않는다는 점으로 보아 특히 이 두가지 효소의 생산만 억제한다고 하기는 무리가 있고 오히려 Golgi stack의 trans면에서 효소를 활성화시키는 어떤 인자의 작동장애 혹은 결핍으로 해석하는 것이 더 타당하다고 생각하기 때문이다.

본 실험에서 orotic acid 투여 5일 내지 7일 후에 Golgi 체의 증식을 볼 수 있었는데 이는 Arstila등<sup>50)</sup> 및 본 교실에서 그간 수행해온 일련의 연구들<sup>46-49)</sup>에 비추어 매우 의미 있는 것으로 받아들여진다. 즉 Golgi 체로의 ER막의 이동 과정이 Golgi체내에서 trans면에서의 차단이 야기 되었으나 ER막 이동은 계속되어 trans면이 형성되지 않은 Golgi 체의 수가 계속 증가하였기 때문으로 유추된다. 이렇게 본다면 Golgi 체나 ER이나 모두 막의 이동에 따라 형성된 일시적 혹은 잠시적 구조물이고 항구적 구조물은 아니라는 점이다. 이는 orotic acid투여를 중단한 후 세포내에 축적되었던 지방이 감소되면서 Golgi 체의 수가 다시 줄어들었다는 점에서도 증명된다 하겠다.

### 요 약

저자들은 orotic acid에 의한 지방간 생성의 병리기전을 규명하기 위하여 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에 1% orotic acid가 첨가된 규정식을 일주일간 먹인 뒤 간을 채취하여 형태학적 변화를 관찰하였다.

실험군은 orotic acid 함유 규정식을 먹인 1, 3, 5, 7일 후에 각각 도살한 것과 orotic acid를 1주일간 먹인 뒤 다시 일반식으로 전환한 군으로 나누었으며 대조군은 orotic acid를 넣지 않는 규정식과 일반식일 먹인 것을 사용하였다. 간조직은 광학현미경 및 전자현미경적으로 관찰하였으며 더하여 G-6-Pase와 TPPase의 전자현미경적 세포화학적 검사를 시도하였다. 결과를 요약하면 광학현미경적으로 orotic acid투여 3일 후부터 지방적이 보였으며 7일후에는 전체 간세포에서 관찰되었다.

전자현미경적으로 orotic acid투여 3일 후 ER이 수포

상으로 분절되었으며 Golgi체 주변에 VLDL입자를 가진 수포가 분포하였다. 5일 후에는 상기한 VLDL입자를 가진 수포가 배열하여 Golgi stack을 형성하였다. 7일 후에는 Golgi체의 수가 증가하였다.

Orotic acid투여 3일 후부터 지방적의 수가 증가하였으며 7일 후에는 세포질의 상당 부분이 지방적에 밀렸다.

세포화학적 검사에서 지방적을 싸는 막은 TPPase양성 반응을 보여 RER에서 유래한 것으로 생각되었다. Golgi체는 orotic acid투여 1일 후부터 TPPase활성이 감소하였으며 그 후에는 나타나지 않았다.

이상의 성적으로 보아 orotic acid는 Golgi stack의 trans면의 기능과 VLDL의 성숙을 장애하여 VLDL의 분비를 억제하고 결과적으로 VLDL의 축적을 유발한다. Golgi stack의 cis면과 RER에는 VLDL입자가 축적되고 결과적으로 VLDL입자를 가진 수포가 합쳐져서 지방적을 만든다. 이와 같은 RER과 Golgi체의 연속적인 변화는 막 구조의 변화에서 cyto-cavitary network의 개념을 뒷받침한다고 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Best CH, Hartroft WS, Sellers EA: *The protection of the liver dietary factors. Gastroenterology* 20:375-384, 1952
- 2) Eisenberg S, Levy RI: *Lipoprotein metabolism. Adv Lipid Res* 13:1-89, 1975
- 3) Eisenberg S: *Lipoprotein metabolism and hyperlipidemia. In Atherosclerosis Reviews, edited by R Paoletti and AM Gotto. New York Raven press* 1976, p 23-60
- 4) Morrisett JD, Jackson RL Gotto AM: *Lipoproteins: Structure and function. Ann Rev Biochem* 44:183-207, 1975
- 5) Jackson RL, Morrisett JD, Gotto AM Jr: *Lipoprotein structure and metabolism. Physiol Rev* 56:259, 1976
- 6) Schaefer EJ, Eisenberg S, Levy RI: *Lipoprotein apoprotein metabolism. J Lipid Res* 19:667, 1978
- 7) Smith LC, Pownall HJ, Gotto AM Jr: *The plasma lipoproteins: Structure and metabolism. Ann Rev Biochem* 47:751-777, 1978
- 8) Havel RJ: *Lipoprotein and lipid transport. Adv Exp Med Biol* 63:37-59, 1975
- 9) Kane JP: *Plasma lipoproteins: Structure and metabolism. In: Lipid metabolism in mammals edited by*

- F Synder New York Plenum 1977, p 209*
- 10) **Morrisett JD, Jackson RL, Gotto AM, Jr:** Lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 472:93, 1977
  - 11) **Osborne JC, Jr Brewer HB Jr:** The plasma lipoproteins. *Adv Protein Chem* 31:253, 1977
  - 12) **Tall AR, Small DM:** Plasma high-density lipoproteins. *N Engl J Med* 299:1232, 1978
  - 13) **Stein O, Bar-on H, Stein Y:** Lipoproteins and the liver. In: *Progress in Liver Disease. Vol IV* edited by H Popper and F Schaffner New York Grune and Stratton 1972, p 45-62
  - 14) **Hamilton RI, Regen DM, Gray ME, LeQuire VS:** Lipid transport in liver. I Electron microscopic identification of very low density lipoproteins in perfused rat liver. *Lab Invest* 16:305-319, 1967
  - 15) **Jones AL, Ruderman NB, Herrera MG:** Electron microscopic and biochemical study of lipoprotein synthesis in the isolated perfused rat liver. *J Lipid Res* 8:429-446, 1967
  - 16) **Claude A:** Growth and differentiation of cytoplasmic in the hepatic cell. I Elaboration of elements of the Golgi complex. *J Cell Biol* 47:745-766, 1970
  - 17) **Heimberg M, Gohn EH, Klausner HA, SolerArgilaga C, Weinstein I, Wilcox HG:** Regulation of hepatic metabolism of free fatty acids. Interrelationships among secretion of very low density lipoproteins, Ketogenesis and cholesterogenesis. In: *Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism* edited by JM Dietschy AM Gotto Jr and JA Ontko Clinical physiology Series American Physiologic Society Washington DC 1978, p 251-284
  - 18) **Ockner RK, Manning JM, Pappenhausen RB, Ho WKL:** A binding Protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa liver myocardium and other tissues. *Science* 177:56-58, 1972
  - 19) **Ockner RK, Manning JM, Pappenhausen RB, Ho WKL:** A binding Protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa liver myocardium and other tissues. *Science* 177:56-58, 1972
  - 20) **Ockner RK, Burnett DA, Lysenko N, Manning JA:** Sex differences in long chain fatty acid utilization and fatty acid binding protein concentration in rat liver. *J Clin Invest* 64:172-181, 1979
  - 21) **Heimberg M, Wilcox HG:** The effects of palmitic and oleic acid on the properties and composition of the very low density lipoproteins secreted by the liver. *J Biol Chem* 247:875-880, 1972
  - 22) **Ockner RK, Hughes FB, Isselbacher KJ:** Very low density lipoproteins in intestinal lymph: Role in triacylglyceride and cholesterol transport during fat absorption. *J Clin Invest* 48:2367-2373, 1969
  - 23) **Sabesin SM, Rase S, Finerg RP:** Biogenesis of rat hepatocyte Golgi During the induction of lipoprotein secretion by sucrose feeding. *Gastroenterology(Abstr)* 75:963, 1978
  - 24) **Palade GE:** Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* 189:347-358, 1975
  - 24) **Palade GE:** Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* 189:347-358, 1975
  - 25) **Mahley RW, Brown WV, Schachter H:** Incorporation of sialic acid into sialidase-treated apolipoprotein of human, very low density lipoprotein by a pork liver sialyltransferase. *Can J Biochem* 52:655-664, 1974
  - 26) **Le Marchan Y, Singh A, Assimacopoulos-Jeannet F, Orci L, Rouiller C, Jeanrenaud B:** A role for the microtubule system in the release of very low density lipoproteins by perfused mouse liver. *J Biol Chem* 248:6862-6870, 1973
  - 27) **Reaven E, Reaven GM:** Dissociation between rate of hepatic lipoprotein secretion and hepatocyte microtubule content. *J Cell Biol* 77:734-742, 1978
  - 28) **Standerfer SB, Handler R:** Fatty liver induced by orotic acid feeding. *Proc Soc Ex Biol Med* 90:270-271, 1955
  - 29) **Creasey WA, Hankin L, Handschumacher RE:** Fatty liver induced by orotic acid: I accumulation and metabolism of lipids. *J Biol Chem* 236:2064-2070, 1961
  - 30) **Windmueller HG:** An orotic acid-induced adenine reversed inhibition of hepatic lipoprotein secretion in rat. *J Biol Chem* 239:530-537, 1964
  - 31) **Wzindmueller HG:** Hepatic nucleotide levels and NAD-synthesis as influenced by dietary orotic acid and adenine. *J Nutr* 85:221-230, 1965
  - 32) **Windmueller HG, Levy RI:** Total inhibition of hepatic B-lipoprotein production in rat by orotic acid. *J Biol Chem* 242:2246-2254, 1967
  - 33) **Lombardi B:** Considerations on the pathogenesis of fatty liver. *Lab Invest* 15:1QJ8, 1966
  - 34) **Roheim PS, Switzer S, Girard A, Eder HA:** Alterations of lipoprotein metabolism in orotic acid induced fatty liver. *Lab invest* 15:21-23, 1966
  - 35) **Rajalakshmi S, Sarma DSR, Sarma PS:** Studies on orotic acid Fatty liver. *Biochem J* 80:375-377, 1961



- 36) **Hankin L:** Effect of dietary orotic acid on liver protein. *J Nutr* 79:519-522, 1963
- 37) **Mahley RW, Hamilton RL, LeQuire VS:** Characterization of lipoprotein particles isolated from Golgi apparatus of rat liver. *J Lipid Res* 10:433-439, 1969
- 38) **Mahley RW, Bersort TP, LeQuire VS, Levy RI, Windmueller HG, Brown WVS:** Identity of very low density lipoprotein apoproteins in plasma and liver Golgi apparatus. *Science* 168:380-382, 1970
- 39) **Marsh JB:** Lipoproteins in a nonrecirculating perfusate of rat liver. *J Lipid Res* 15:544-567, 1974
- 40) **Pottenger LA, Getz GS:** Serum lipoprotein accumulation in the livers of orotic acid fed rats. *J Lipid Res* 12:450, 1971
- 41) **Novikoff AB:** The endoplasmic reticulum: A cytochemist's view (A review). *Proc Natl Acad Sci USA* 43:2781-2787, 1976
- 42) **Novikoff PM, Novikoff AB, Novikoff PM:** Cytochemical studies on Golgi apparatus and GERSL. *Histochem J* 9:525-551, 1977
- 43) **Novikoff PM, Novikoff AN, Quintana N, Hauw JJ:** Golgi apparatus, GERL and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J Cell Biol* 50:850-886, 1971
- 44) **Novikoff PM, Yam A:** Sites of lipoprotein particles. *J Cell Biol* 76:1-11, 1978
- 45) **Novikoff PM, Edelstein D:** Reversal of orotic acid-induced fatty liver in rats by clofibrate. *Lab Invest* 36:215-231, 1977
- 46) **이창수, 권세훈, 손태중:** 항원성 자극을 받은 임파절 세포의 rough-surfaced endoplasmic reticulum의 변화. *한국전자 현미경학회지* 3(1):23-28, 1973
- 47) **김판석, 손태중:** 가용성 항원 투여로 인한 임파절세포 내 항체 항성기구들의 형태적 변화에 대하여. *경북의대잡지* 15(1):263-277, 1974
- 48) **권세훈, 손태중:** 헤장선방세포에 있어서 분비과정에 수반되는 cytocavitary network의 변화에 대하여. *경북의대잡지* 15(2):85-79, 1975
- 49) **이동구, 홍석재, 손태중:** 분비항진시에 타액선 선방세포 분비기구의 conformational change에 대하여. *경북의대잡지* 16(1):219-228, 1975
- 50) **Arstila AU, Bradford WD, Kinney TD, Tramp BF:** Iron metabolism and cell membrane. I The relationship of ferritin to the cytocavitary network in rat hepatic parenchymal cells. *Am J Path* 58:419-450, 1970
- 51) **Luft JH:** Improvement in embedding method. *J Biopsy Biochem Cytol* 9:409-417, 1961
- 52) **Reynolds ES:** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212, 1963
- 53) **Karnovsky MJ:** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of osmolarity from use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137-153, 1965
- 54) **Novikoff AB, Goldfisher S:** Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc Natl Acad Sci* 47:802-810, 1961
- 55) **Wachstein M, Meisel E:** Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH. *Am J Clin Pathol* 27:13-23, 1957
- 56) **Sabesin SM, Frase S, Ragland J:** Accumulation of nascent lipoproteins in rat hepatic golgi during induction of fatty liver by orotic acid. *Lab Invest* 37:127-135, 1977
- 57) **Alpers DH, Isselbacher KT:** Fatty liver: Biochemical Aspects. In: *Diseases of the liver*, 4th ed. by L Schiff Philadelphia, JG Lippincott Co, 1975, p 815
- 58) **Farber E:** Biochemical pathology of acute hepatic adenosine triphosphate deficiency. *Nature (London)* 203:34-40, 1964
- 59) **서정욱:** DL-ethionine의 장기투여로 인한 간세포 변화의 전자현미경적 연구. *경북의대잡지* 12(1):159-173, 1971
- 60) **신철야, 손태중:** Adenine이 ethionine으로 야기된 간세포 상해의 회복에 미치는 영향에 관한 연구. *경북의대잡지* 13(2):157-169, 1972
- 61) **Smuckler EA:** An intracellular defect in protein synthesis induced by carbon tetrachloride. *J Exp Med* 116:55-72, 1962
- 62) **박정환, 주창수, 민병훈, 서인수:** 사염화탄소 장기투여로 인한 간세포 smooth surface endoplasmic reticulum의 변화. *경북의대잡지* 14(2):451-457, 1973
- 63) **Robinson BS:** The development in the rat of fatty livers associated with reduced plasma lipoprotein synthesis. *Biochim Biophys Acta* 62:163, 1962
- 64) **신은식, 손태중:** Actinomycin D가 헤장선방세포의 재생에 미치는 영향에 관한 전자현미경적 연구. *경북의대잡지* 14(1):179-192, 1973
- 65) **Lucas CL, Lidout JH:** Fatty liver and lipotropic phenomena. *Prog Chem Fats Other Lipids* 10:1, 1967
- 66) **Bersot TP, Brown WV, Levy RI, Windmueller HG, Fredrickson DS, Lequire VS:** Further charac-

- terization of the apolipoproteins of rat plasma lipoproteins. *Biochemistry* 9:3427-3433, 1970
- 67) Eisenberg S, Bilheimer DW, Levy RI, Lindgren FT: On the metabolic conversion of human plasma very low density lipoprotein to low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 326:361-377, 1973
- 68) Glickman RM, Sabesin SM: Lipid metabolism. In *The liver: Biology and Pathobiology*, EDITED BY I Arias H Popper D Schachter DA Shafritz New York Raven Press 1982, pp 123-142
- 69) Alexander CA, Hamilton RL, Havel RJ: Subcellular localization of B apoprotein of Plasma lipoproteins in rat liver. *J Cel Biol* 69:241-263, 1976
- 70) Fieding PE: Lipoprotein lipase: Properties of the enzyme isolated from post-heparin plasma. *Biochemistry* 13:4318-4325, 1977
- 71) Marchetti M, Puddu P, Calderera CH: Metabolic Aspects of orotic acid fatty liver. Nucleotide control mechanisms of lipid metabolism. *Biochem J* 2:46-51, 1964
- 72) Wetmore S, Mahley RW, Brown WV, Schachter H: Incorporation of sialic acid into sialidase-treated apolipoprotein of human, very low density lipoprotein by pork liver sialyltransferase can. *J Biochem* 52:655-664, 1974
- 73) Pottenger LA, Frazier LE, Dubien LH, Getz Wissler RW: Carbonhydrate composition of lipoprotein apoproteins isolated from rat plasma and from livers of rats fed orotic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 54:770-1973
- 74) Novikoff PM: Intracellular organelles and lipoprotein metabolism in normal and fatty livers. In *The Liver: Biology and Pathology*, ed by I Arias H Popper D Schachter DA Shafritz. New York Raven Press 1982, p 143
- 75) Bainton DF, Farquhar MG: Differences on enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes: I Histochemical staining of bone marrow smears. *J Cell Biol* 39:286-298, 1968
- 76) Redman CM, Cherian MG: The secretory Pathways of rat serum proteins within the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 52:231-245, 1972
- 77) Lo CH, Marsh JB: Biosynthesis of Plasma lipoproteins. Incorporation of  $^{14}C$ -glucosamine by cells and subcellular fractions of rat liver. *J Biol Chem* 245:5001, 1970
- 78) Farquhar MG, Bergerson JJM, Palade GE: Cyto-

chemistry of Golgi fractions prepared from rat liver. *J Cell Biol* 60:8-25, 1974

— Abstract —

**An Ultrastructural Cytochemical Study on the Mechanism in the Development of Fatty Liver Induced by the Orotic Acid**

Jae Bok Park, M.D., In Soo Suh, M.D.  
and Tae Joong Sohn, M.D.

Department of Pathology,  
Kyungpook National University  
School of Medicine

For the elucidation of a possible pathogenetic mechanism of fatty accumulation by the orotic acid in the liver, male Sprague-Dawley rats were fed on semisynthetic diet containing 1 per cent orotic acid for a week, and followed by the morphological examination on the rat livers.

The experimental animals were sacrificed on the 1st, 2nd, 3rd, and the 7th day of orotic acid feeding and daily sacrifice was performed after conversion to normal diet feeding during the performed after conversion to normal diet feeding during the period of successive 7 days.

The control group animals were fed on normal regular diet, or semisynthetic diet without orotic acid. The liver tissues were examined by the light and electron microscopy, together with electron microscopic cytochemical study for glucose-6-phosphatase and thiamine pyrophosphatase. On the light microscopy, the lipid droplets began to appear in the 3rd day of orotic acid feeding and then occupy through the all hepatic lobules in the 7th day of orotic acid feeding.

On the electron microscopy, in the 3rd day of orotic acid administration, the endoplasmic reticulum were fragmented and vesiculated, and vesicles containing VLDL particles were demonstrated closely around the Golgi complex. In the 5th day, these enriched vesicles were arranged in a row, and assembled in the form of Golgi stack. In the 7th day, Golgi complex were increased in numbers.

The limiting membranes of lipid vacuoles were regarded to originated from rough-surfaced endoplasmic reticulum of account of demonstration of glucose-6-phosphatase in them. In the Golgi complex the activity of thiamine pyrophosphatase were markedly decreased



in the 1st day of orotic acid feeding, and then the activity of this enzyme is failed to present afterthat.

On the above findngs it is assumed that orotic acid depresses the function of trans aspect of Golgi stack and the VLDL maturation is inhibited, so the excretion process of VLDL is interrupted and followed by the retrograde accumulation of VLDL. The cis aspect of

Golgi stack and rough-surfaced endoplasmic reticulum were accumulated with VLDL particles, and eventually coalesced vesicles of VLDL with become lipid vacuole. The sequential alteration of endoplasmic reticulum and Golgi complex is supporting the concept of conformational change of membranes in cytocavitary network.