

초산납을 투여한 흰쥐 신장의 초미형태학적 변화

계명대학교 의과대학 내과학교실¹, 병리학교실², 의과학연구소³

김 현 철^{1,3} · 김 승 필^{2,3} · 박 관 규^{2,3}

Ultrastructural Changes in Rat Kidney after Lead Acetate Administration

Hyun Chul Kim, M.D.^{1,3}, Seung Pil Kim, M.S.^{2,3} and Kwan Kyu Park, M.D.^{2,3}

Department of Internal Medicine¹, Pathology² and Institute for Medical Science³
Keimyung University School of Medicine

This study was carried out to investigate the ultrastructural findings of rats after administration of 0.5% lead acetate with drinking water. The Sprague-Dawley rats were divided into control and experimental groups. The control group was composed of 12 rats and was orally administered with 0.5% sodium acetate. The experimental group was composed of 36 rats and orally administered with 0.5% lead acetate. Two rats in the control group and four rats in the experimental group were sacrificed on day 2, and week 1, 2, 4, 6 and 8 after administration.

The kidney was extirpated and examined by electron microscopy. The results obtained were as follows:

The blood lead concentration in the experimental group began to increase from the second day after administration and it increased gradually until the 6th week and it decreased at the 8 week. The urinary excretion of δ -ALA also increased from the secondary and gradually increased up to the 8th week.

On electron microscopic examination, the proximal tubular cells showed fat droplets, dilatation of the endoplasmic reticulum, mitochondrial swelling, increased numbers of secondary lysosomes and myelin figure-like residual bodies and intranuclear inclusion bodies. All these findings peaked at the eighth week after administration. Ultrastructural findings after Timm sulphide silver reaction revealed the lead granules in the proximal tubular lumen and between the microvilli of the proximal tubular cells without membrane-bounded.

It can be concluded that most of the changes of micro-organelles are compatible with degenerative changes of lead exposure and passive diffusion of lead granules are involved in the proximal tubular cells. (Korean J Pathol 1996; 30: 73~88)

Key Words: Lead, Kidney, Timm sulphide, Electron microscopy

접 수 : 1995년 2월 11일, 게재승인 : 1995년 7월 24일

주 소 : 대구시 중구 동산동 194번지, 우편번호 700-310

계명대학교 의과대학 병리학교실, 박관규

*본 논문은 1994년도 계명대학교 동산의료원 특수과제연구비로 이루어졌음.

서 론

산업이 발달함에 따른 과학문명의 고도성장은 그 부산물로서 생태계의 균형을 파괴할 정도로 환경을 오염시키고 있다. 특히 중금속류에 의한 환경오염은 다른 유기오염물질과는 달리 분해되거나 변화를 받지 아니하고 환경중에 장기간 잔류하여 지속적으로 인체에 상해를 일으킬 수 있다. 이들 중 납은 주위 환경에 흔히 존재하는 중금속의 하나로서 초산납(lead acetate)을 비롯한 40여종 이상의 화합물의 형태로 존재한다¹. 납은 페인트, 축전지 제조, 납땀, 용접, 도기제조, 오염된 물, 공기 및 토양등 많은 출처로부터 위장관과 호흡기를 통해서 흡수되어 인체에 대해 독성을 나타낸다고 알려져 있다²⁻⁴. 이렇게 흡수된 납은 골격계와 혈액에 각각 80~85% 및 5~10% 정도 축적되고², 기타 인체의 여러장기에 상해를 초래하게 된다⁵⁻¹².

납중독에 신장의 변화는 1862년 Lancereaux에 의해 처음 보고 되었다고 알려진 이래¹³ 지금까지 많은 문헌보고가 있어 왔다. 그러한 변화들 중 주된 것은 근위세뇨관의 기능이상을 초래하고 그것이 진행되어 간질의 섬유화와 함께 신세뇨관의 위축을 초래한다. 초기의 형태학적 변화는 핵내봉입체(intranuclear inclusion)와 미토콘드리아 구조의 변화로 알려져 있고¹⁴⁻¹⁷ 더욱 진행된 후에는 비가역성 변화로서 간질섬유화까지 초래된다고 알려져 있다^{18,19}. 기능상으로는 단백뇨가 초래되는데 이것은 사구체 세포구조의 변화와 관계가 있다고 한다²⁰.

납중독에 의한 신손상의 기전은 Goyer²¹에 의한 실험적 연구에서 제시되었는데 현재 납중독에 의한 신증(lead nephropathy)의 전형적인 소견으로 알려져 있는 근위세뇨관세포의 핵내봉입체가 납 및 납과 결합된 단백질의 복합체라고 하였다. 핵내봉입체는 Blackman²²에 의해 처음 보고되었으며 그 후 화학적 분석²³, 및 전자소식자 X선 미세분석(electron probe X-ray microanalysis)²⁴ 등의 방법에 의해 이 핵내봉입체내에 납이 포함되어 있다는 것이 제시되었다. 핵내봉입체는 납중독에 의한 신증의 초기에 많이 나타났다가 그후 계속적으로 납에 노출되는 경우에는 점차적으로 감소하게 되고 그와 동시에 세뇨관은 간질의 섬유화와 함께 점차 위축하게 되며 마지막으로 사구체경화증이 초래되어 신기능의 부전이 초래된다.

본 실험에서 조직내에 납의 존재를 확인하기 위한 방법으로 1958년 Timm에 의해 제시된 sulphide

silver 방법²⁵⁻²⁷을 사용하였다. 이 방법은 조직중에 존재하는 중금속에 황(S²⁻)을 결합시킨 후 음이온(e⁻)의 존재하에 은(Ag⁺)을 공급하면 조직내의 중금속이 가시화된다는 원리이며, 이 방법을 이용하여 수은(Hg), 카드뮴(Cd), 망간(Mn), 아연(Zn), 철(Fe), 납(Pb) 등의 중금속을 가시화 할 수 있고^{25,28}, 가시화된 중금속은 광학현미경상 갈색 과립으로 나타나며 투과전자현미경상 고전자밀도의 과립으로 나타나게 된다.

본 실험의 목적은 흰쥐에게 초산납을 경구로 투여한 후 신장을 적출한 뒤 그 변화를 초미형태학적으로 관찰하고 Timm 반응을 시킨후의 납의 축적 위치를 살펴봄으로서 형태학적인 신세포의 상해과정 및 납중독 기전의 일단을 규명하고자 하는데 있다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 250 g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐 수컷 48 마리를 사용하였다.

2. 실험방법

대조군은 증류수에 초산나트륨(sodium acetate)을 섞어 0.5%의 농도로 마시게 하였으며 투여 후 2일 및 1, 2, 4, 6, 8 주째 각 2 마리씩 도살하였고, 실험군은 증류수에 초산납을 섞어 0.5%의 농도로 마시게 하였고 대조군과 같은 시기에 각 6마리씩 에테르 마취하에 복부를 절개한 다음 신장을 적출하였다.

1) **혈중 납 농도의 측정:** 도관을 통해 채취한 혈액을 Stahr²⁹가 제시한 방법에 따라 ICP(inductively coupled plasma)로 측정하였다.

2) **뇨중 δ-aminolevulinic acid(ALA)의 측정:** Wada 방법³⁰에 따라 채취한 뇨 2 ml에 20% acetic acid 2.0 ml을 정확히 가한다. 여기에 n-butanol 8.0 ml을 가하여 흔들어 혼합하고 약 5분간 방치하면 2층으로 분리된다. 상층액을 스포이드로 제거하고 하층액을 두 개의 시험관에다가 각각 0.5 ml씩을 취한다. 그중 1개에는 phosphate buffer 용액 1.5 ml을 가하고 또다른 한개에는 ethyl acetoacetate(in phosphate buffer) 1.5 ml을 가하여 10분간 수욕장에서 가온한다. 냉각 후 Erlich 시약 2.0 ml을 가하면 10분 후에는 적색이 나타난다. 여기에 CHCl₃ 4.0 ml을 가하고 5분 후 CHCl₃ 층을 취하여 560 nm에서 흡광도를 측정하고 수치를 creatinine으로 보정한다.

3) **투과전자현미경적 관찰:** 투과전자현미경용으로

제공된 신장조직 절편을 1 mm³의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1 M PBS로 세척한 후 1% OsO₄ 용액에 2시간 후고정을 실시하고 같은 완충용액으로 세척하여 계열에탄올로 탈수하였다. Propylene oxide로 치환한 후 Luft방법³¹에 의한 epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절하고 toluidine blue염색을 하여 관찰 부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색(40~60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson³² 및 Reynolds 방법³³에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다.

4) Timm sulphide silver 기법을 이용한 전자현미경적 관찰: Danscher³⁴가 이미 제시한 방법에 따라 이미 삽입된 도관을 통하여 0.1% sodium sulphide용액(0.15 M phosphate buffer, pH 7.4) 5 ml를 주입한 후 2.5% glutaraldehyde용액(0.15 M phosphate buffer, pH 7.4)을 3분 동안 주입하였고 다시 0.1% sodium sulphide용액 250 ml를 주입하였다. 도관을 통한 관류를 마친 후 신장을 적출하여 전자현미경적 관찰을 위한 시료로 제공하였다. 신장 조직을 1 mm³의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde용액으로 1시간 동안 고정한 후 0.15 M sodium phosphate buffer로 세척한 다음 계열 에탄올로 탈수하였다. Propylene oxide로 치환한 후 Luft 방법³¹에 의한 epon 혼합물로 포매하여 45°C 이하에서 48~72시간 동안 열중합 시킨다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절하여

0.5% gelatin으로 coating된 slide에 후박절(semithin)한 절편을 올리고 건조시킨 다음 다시 gelatin으로 coating시켜 Danscher의 방법²⁵으로 현상한 다음 관찰 부위를 결정한 다음 초박절편을 얻어서 nickel grid에 부착한다. 투과전자현미경적 관찰시 이미 시료내에 존재하는 납을 가시화하기 위해 사용한 현상액은 gum arabic용액, citrate 완충액, 환원제 및 은용액을 각각 60 : 10 : 15 : 15의 비율로 섞어서 사용하였다. 시료가 부착된 grid를 현상액 속에 침수시킨 후 암실에서 26°C에 1시간 동안 방치하였다. Gum arabic 용액은 crystalline gum arabic 1 kg을 2 L의 증류수에 녹여 5일간 방치한 후 거르로 걸러서 사용하였으며, citrate 완충액은 25.5 g의 citric acid와 23.5 g의 sodium citrate를 100 ml의 증류수에 섞어서 사용하였다. 환원제로는 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 1시간 동안 방치한 후 증류수에 충분히 세척한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다.

성 적

1. 혈중 납 농도

전 실험기간 동안 대조군의 혈중 납 농도는 0.92 ± 0.010 μg/ml이었고 초산납 투여 2주째 군에서 평균 3.29 ± 0.138 μg/ml으로 최고치를 나타내다가 투여 후 6주째 군에서 3.06 ± 0.297 μg/ml, 투여 8주째군에서 2.55 ± 0.109 μg/ml으로 점차 감소하였다(Fig. 1).

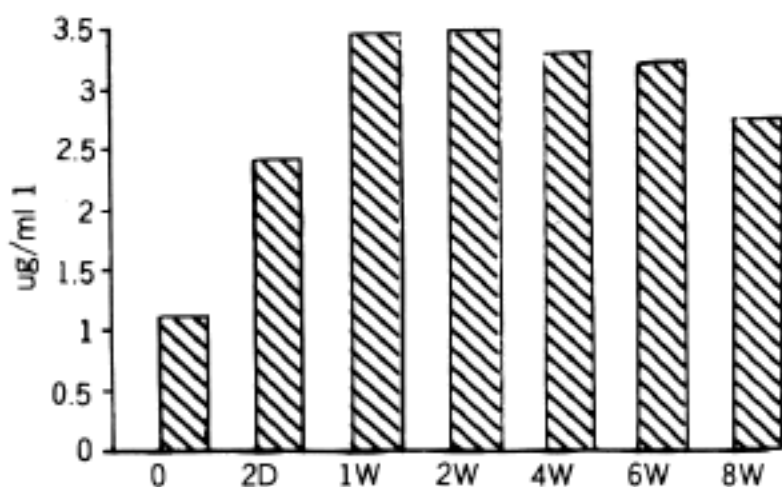


Fig. 1. Blood concentration of lead after oral administration of 0.5% lead acetate.

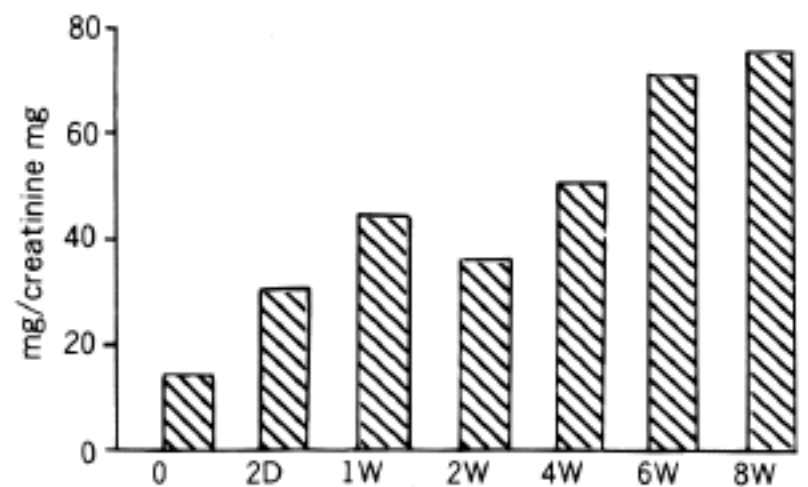


Fig. 2. Urinary concentration of delta-aminolevulinic acid after oral administration of 0.5% lead acetate.

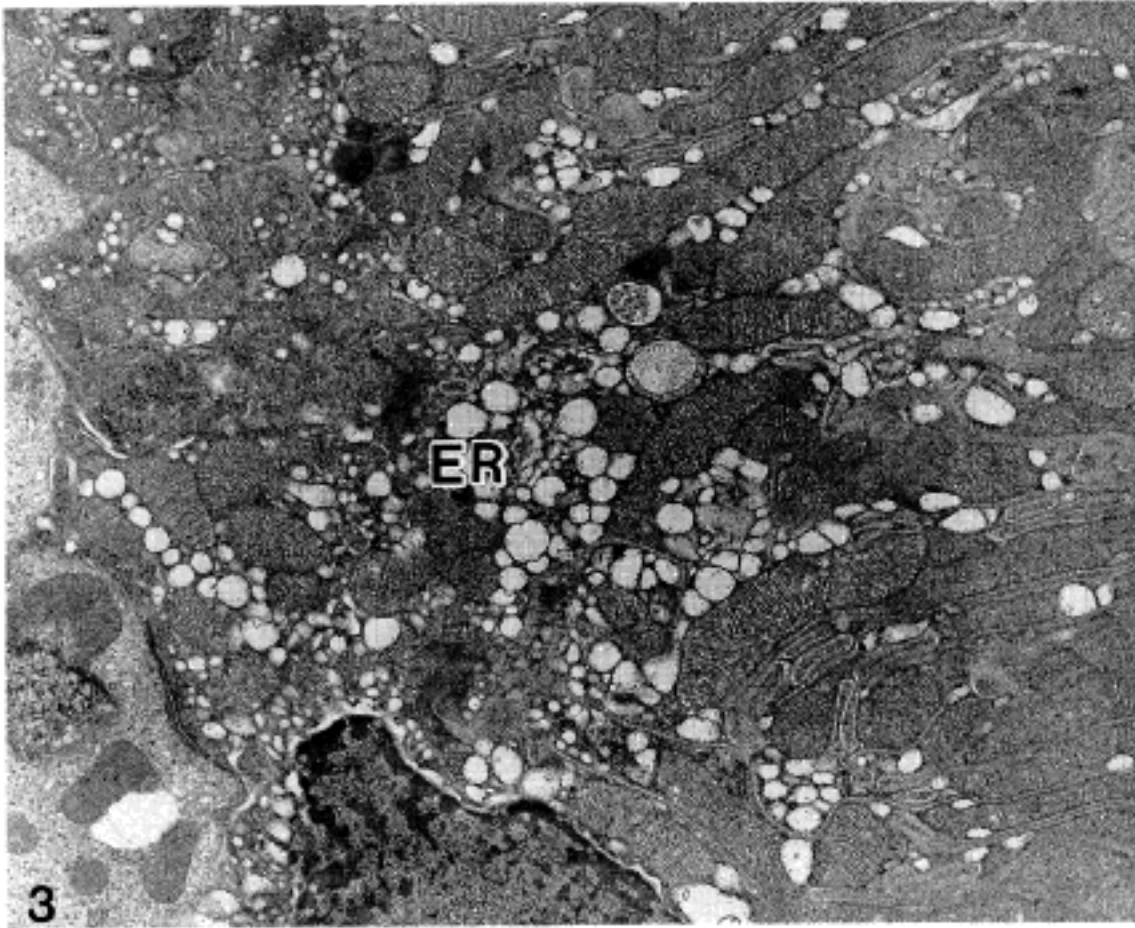


Fig. 3. Two days after lead acetate ingestion. The proximal tubular cell shows dilatation and vacuolization of endoplasmic reticulum(TEM, $\times 10,200$).

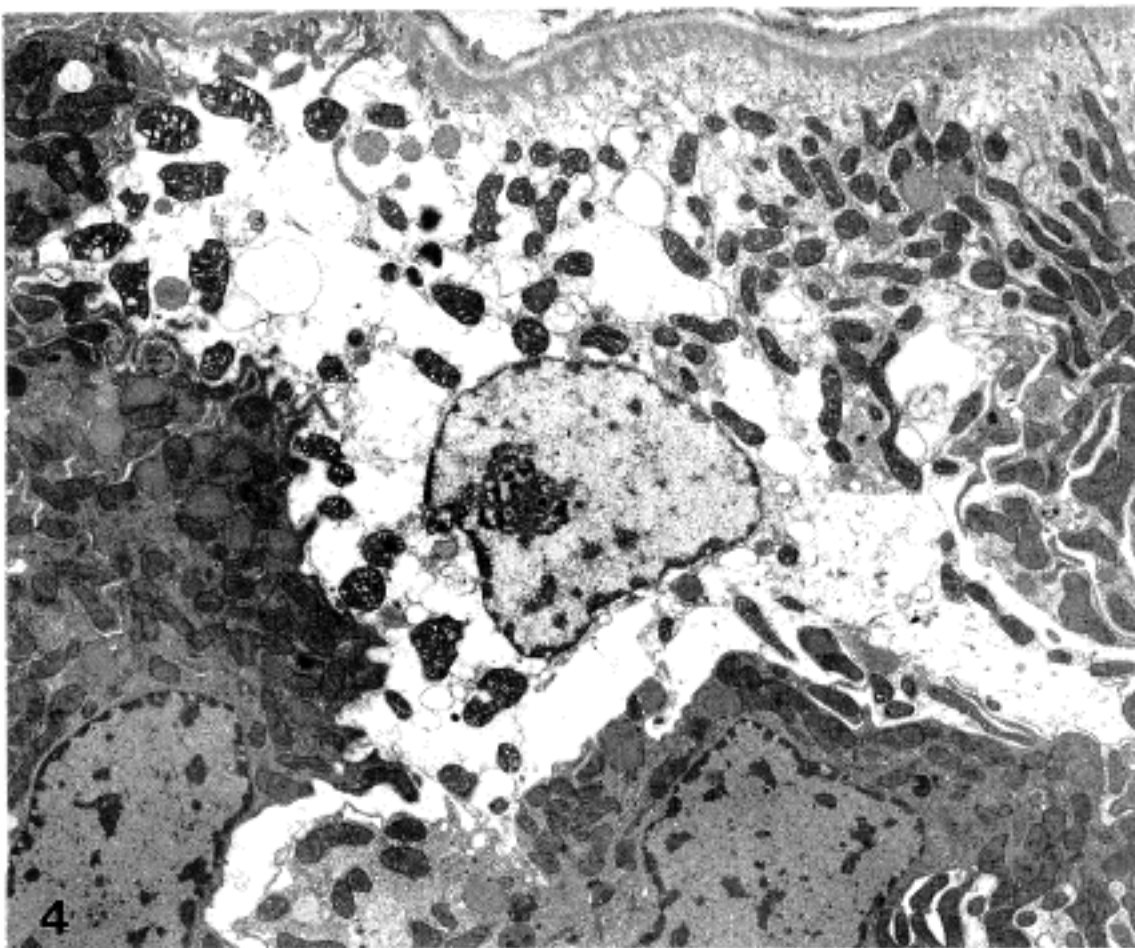


Fig. 4. One week after lead acetate ingestion. The cytoplasm of the proximal tubular cell shows edema and cystic change(TEM, $\times 6,000$).

2. 뇨중 δ -aminolevulinic acid(ALA)

뇨중 δ -aminolevulinic acid는 뇨중 creatinine 1 mg 당 비교치로 계산하였으며, 대조군은 9.8 mg이었고

초산납을 투여한 군은 1주째에는 45.5 mg으로 대조군에 비해 현저히 증가되는 소견을 보였고, 2주군에서는 31.7 mg으로 감소되었다가, 8주군에는 71.7로 다시 증가되었다(Fig. 2).

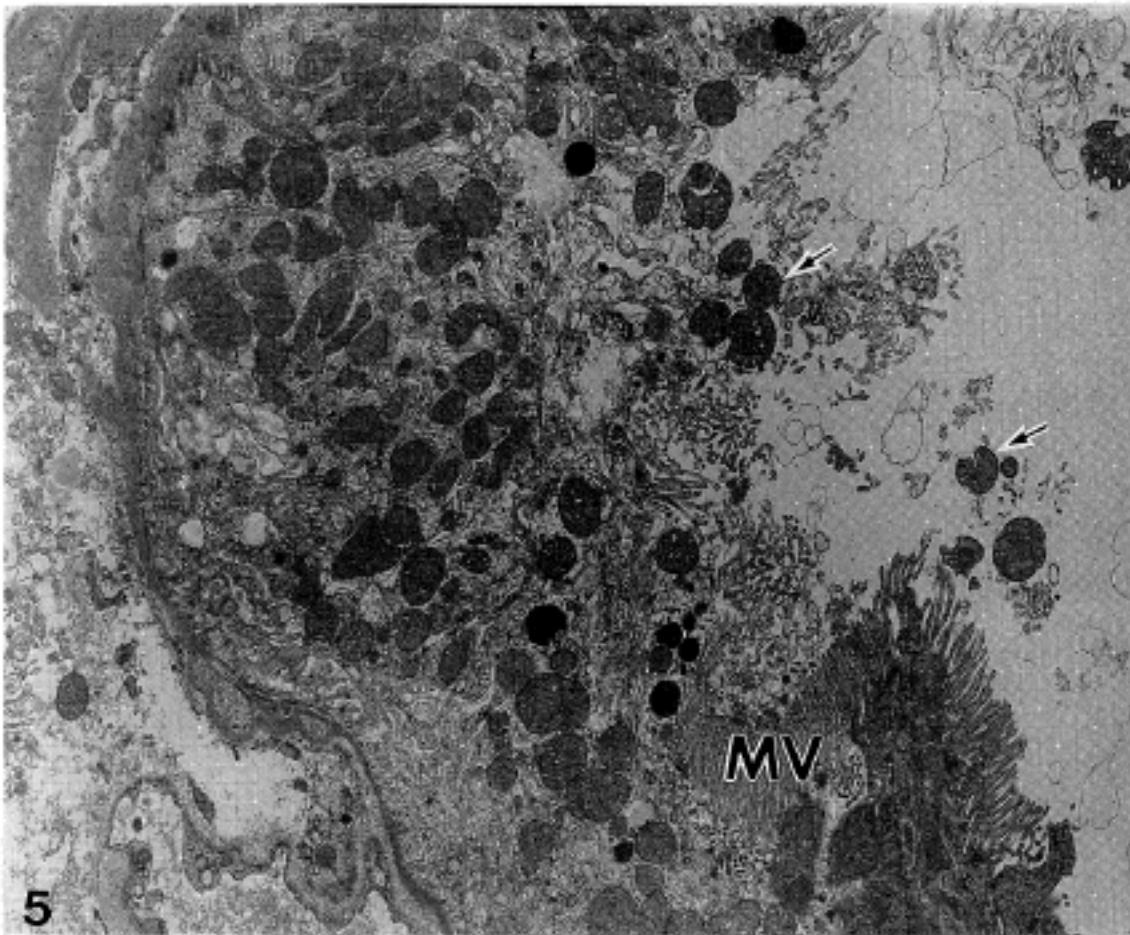


Fig. 5. Two days after lead acetate ingestion. Destructed proximal tubular cell shows irregularly scattered cytoplasmic organelles and microvilli(TEM, $\times 6,000$).

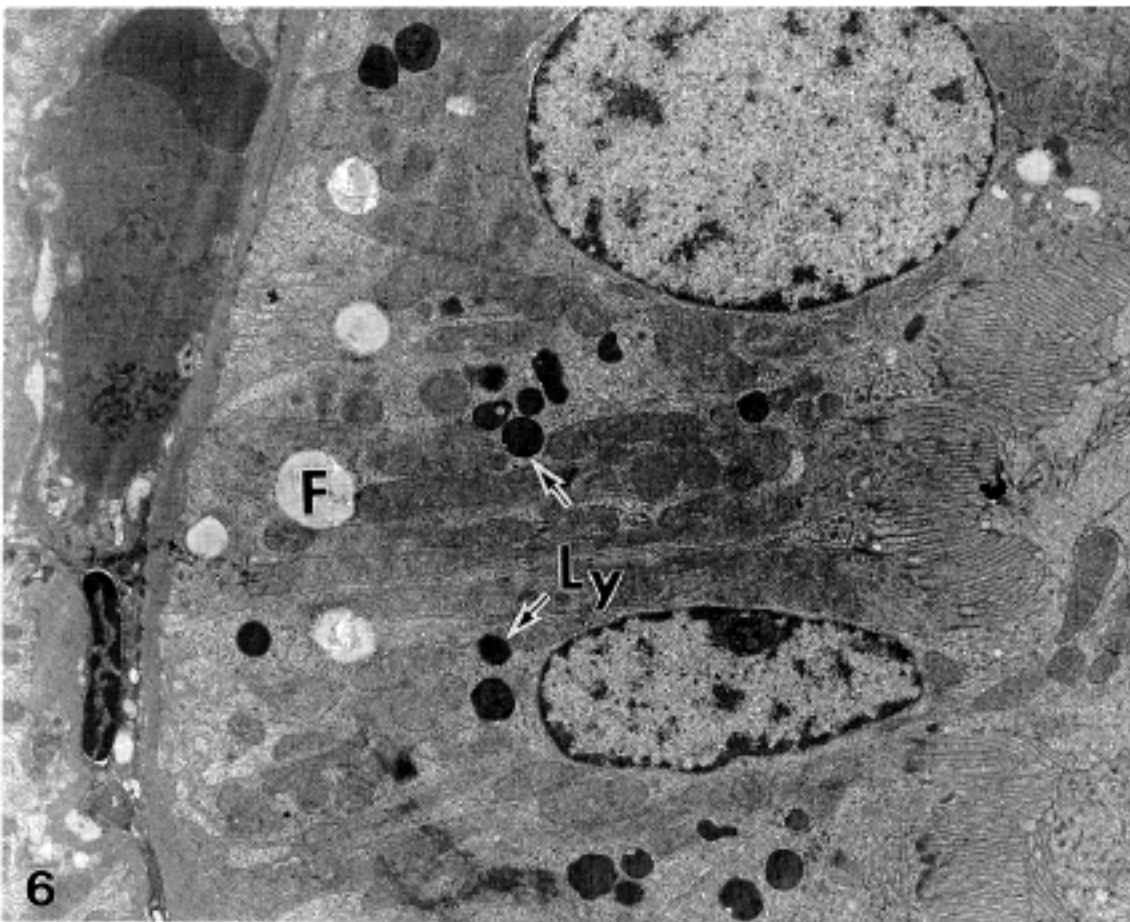


Fig. 6. Two days after lead acetate ingestion. The proximal tubular cells show increased numbers of lysosomes and fat droplets near the basal infoldings(TEM, $\times 6,800$).

3. 투과전자현미경적 소견

초산납 투여후의 초기변화는 주로 근위세뇨관세포의 세포질에서 이루어 졌으며(Table 1) 그들 소견

중 중요한 것으로는 내형질세망의 확장 및 공포화와 basal infolding의 간격이 넓어지는 등의 세포내 부종의 소견이 2일군부터 시작되어 4주군까지 많이 관찰되었으며(Fig. 3), 심해지는 경우에는 세포질내

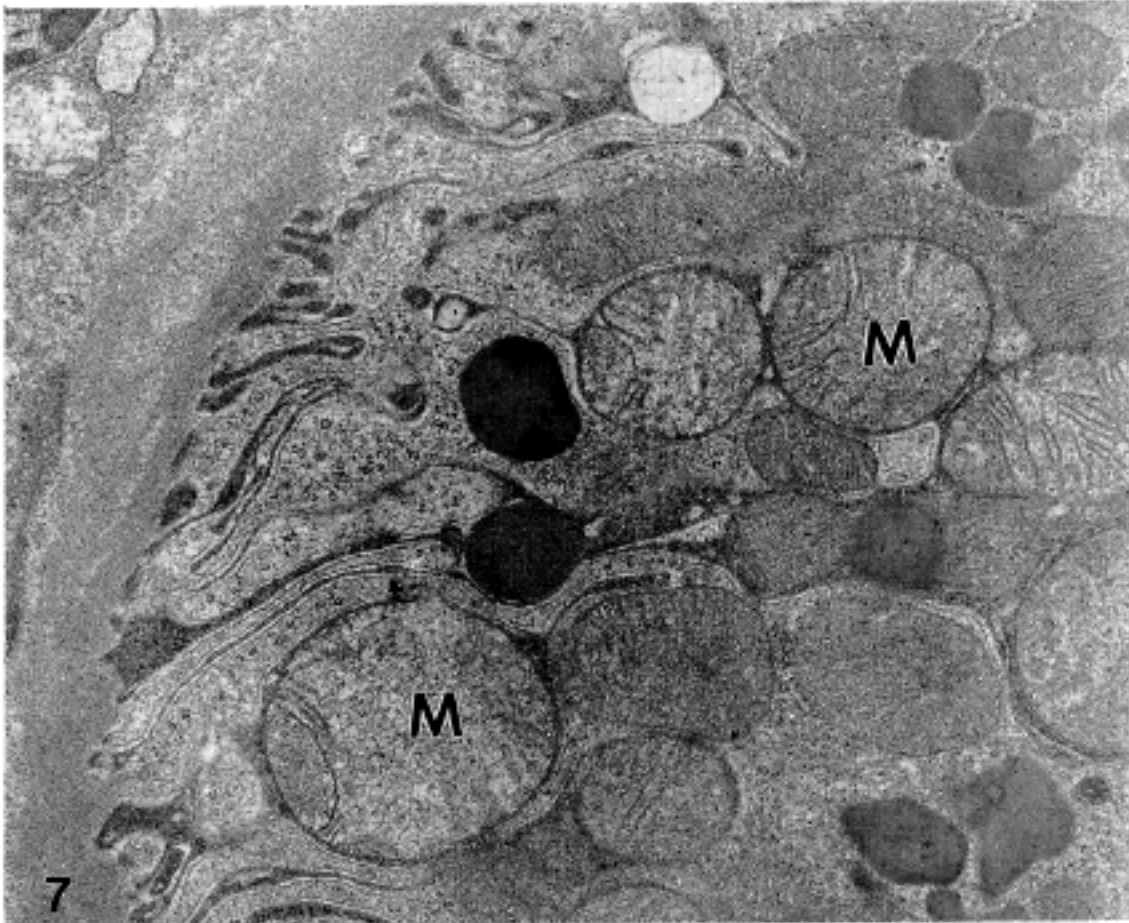


Fig. 7. Two days after lead acetate ingestion. The mitochondria show edema and loss of cristae(TEM, $\times 17,000$).

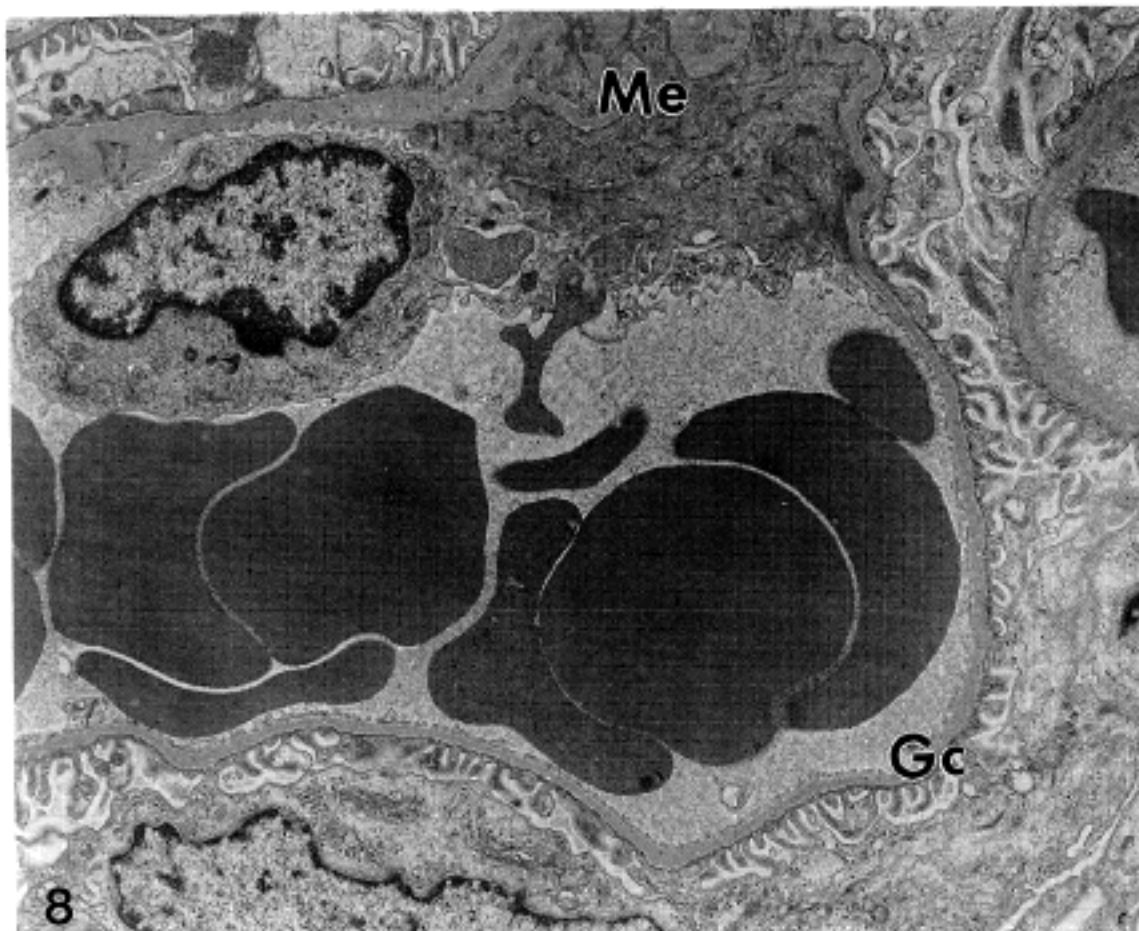


Fig. 8. One week after lead acetate ingestion. The glomerular capillary wall is congested and the mesangium shows no evidence of deposits(TEM, $\times 6,800$).

에 더욱 큰 크기의 낭성공간(cystic space)을 만들거나 세포막의 파괴가 초래되기도 하였다(Fig. 4, 5). 역시 초기의 변화들중 2일군부터 4주군 사이에 지방적이 근위세뇨관세포의 기저막 근처에 위치하여

관찰되기도 하였다(Fig. 6). 미토콘드리아의 부종과 능선(cristae)의 소실도 초기에 관찰되었다(Fig. 7). 사구체는 모세혈관들의 울혈이나 호중구의 침윤이 간혹 관찰되었으며 메산지움이나 기저막등에 심한 변

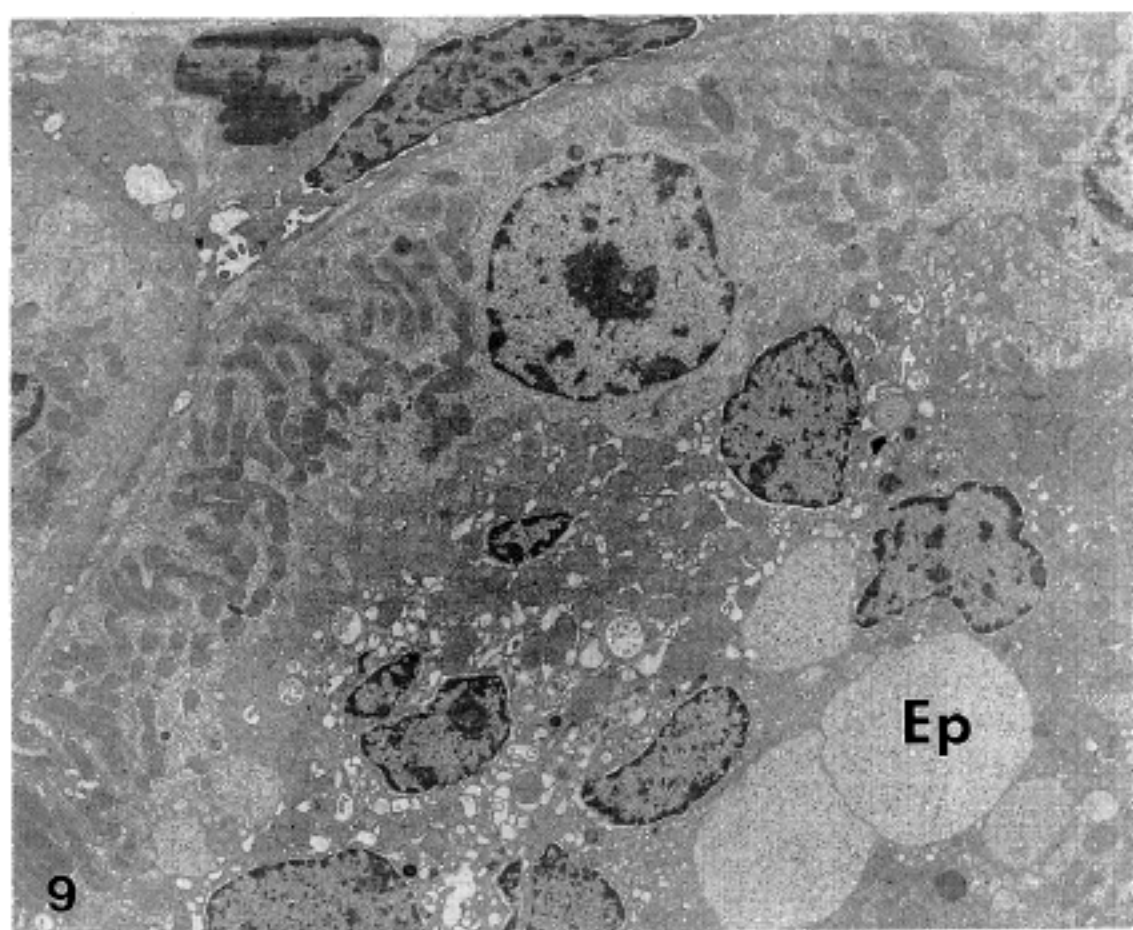


Fig. 9. Two days after lead acetate ingestion. The distal tubular cell is relatively well preserved and numerous epithelial cell casts are seen in the lumen(TEM, $\times 5,100$).

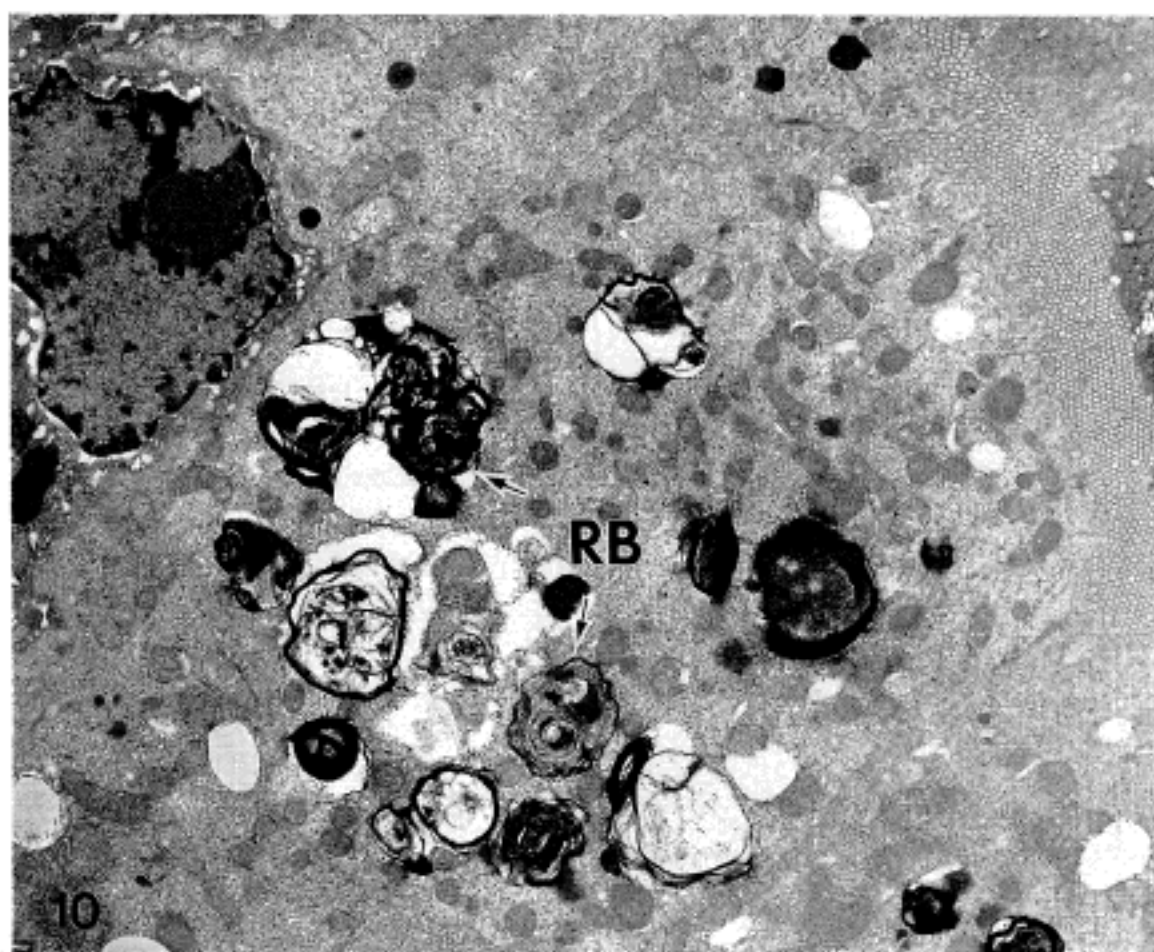


Fig. 10. Six weeks after lead acetate ingestion. The proximal tubular cells show numerous myelin figure-like residual bodies(TEM, $\times 6,800$).

화는 관찰되지 않았다(Fig. 8). 원위세뇨관세포는 근위세뇨관세포의 변화 만큼 심하지 않았으며, 단지 간혹 세뇨관강내에 세포원주들이 관찰되는 정도였다(Fig. 9). 세포질내에 다수의 이차리소솜들이 2일

군부터 다수 관찰되었으며 6주군까지 관찰되었다. 수초모양잔류체(myelin figure-like residual body)는 2주군부터 8주군까지 비교적 이차리소솜 보다 늦게 출현되어 오래까지 관찰되었다(Fig. 10). 핵의 변화

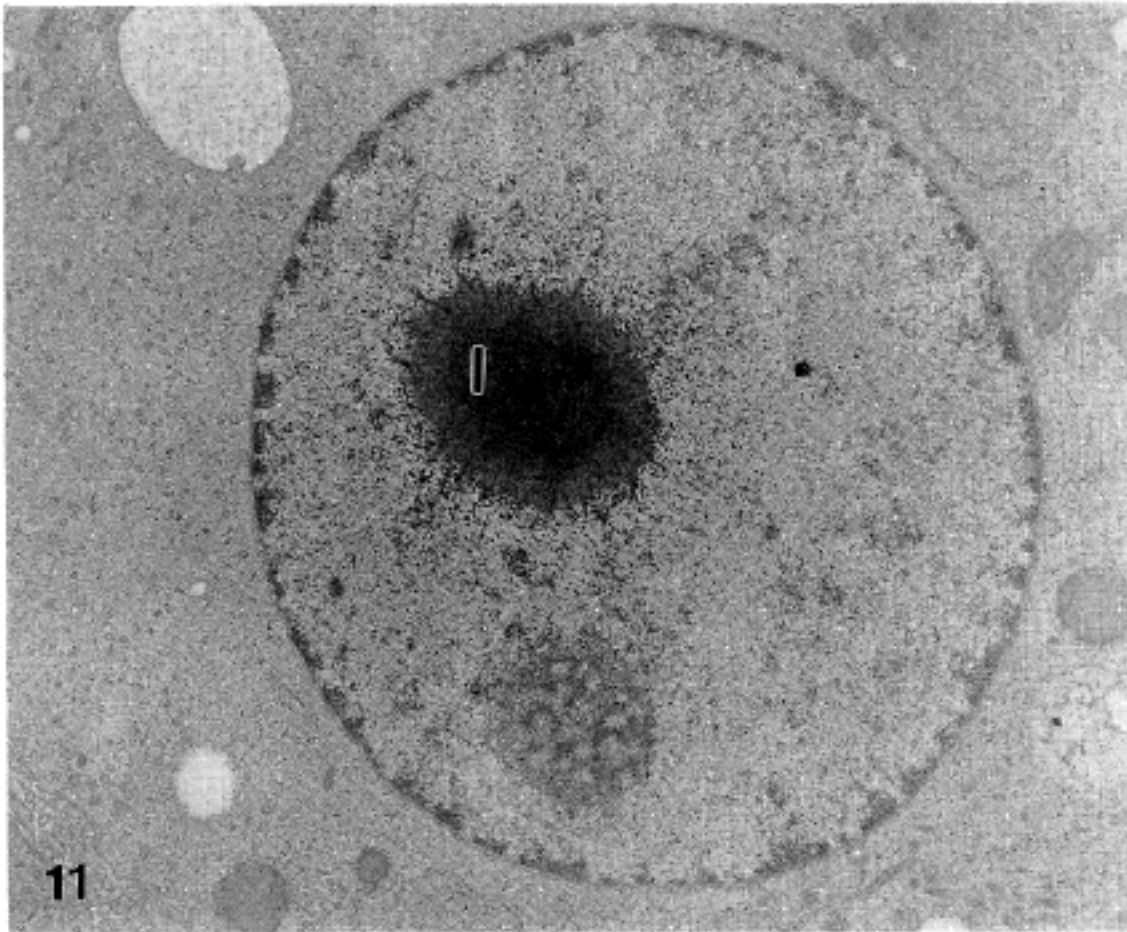


Fig. 11. Eight weeks after lead acetate ingestion. The nucleus of the proximal tubular cells show huge inclusion bodies with dense central and peripheral loose fibrillary meshwork and electron dense particles(TEM, $\times 13,600$).

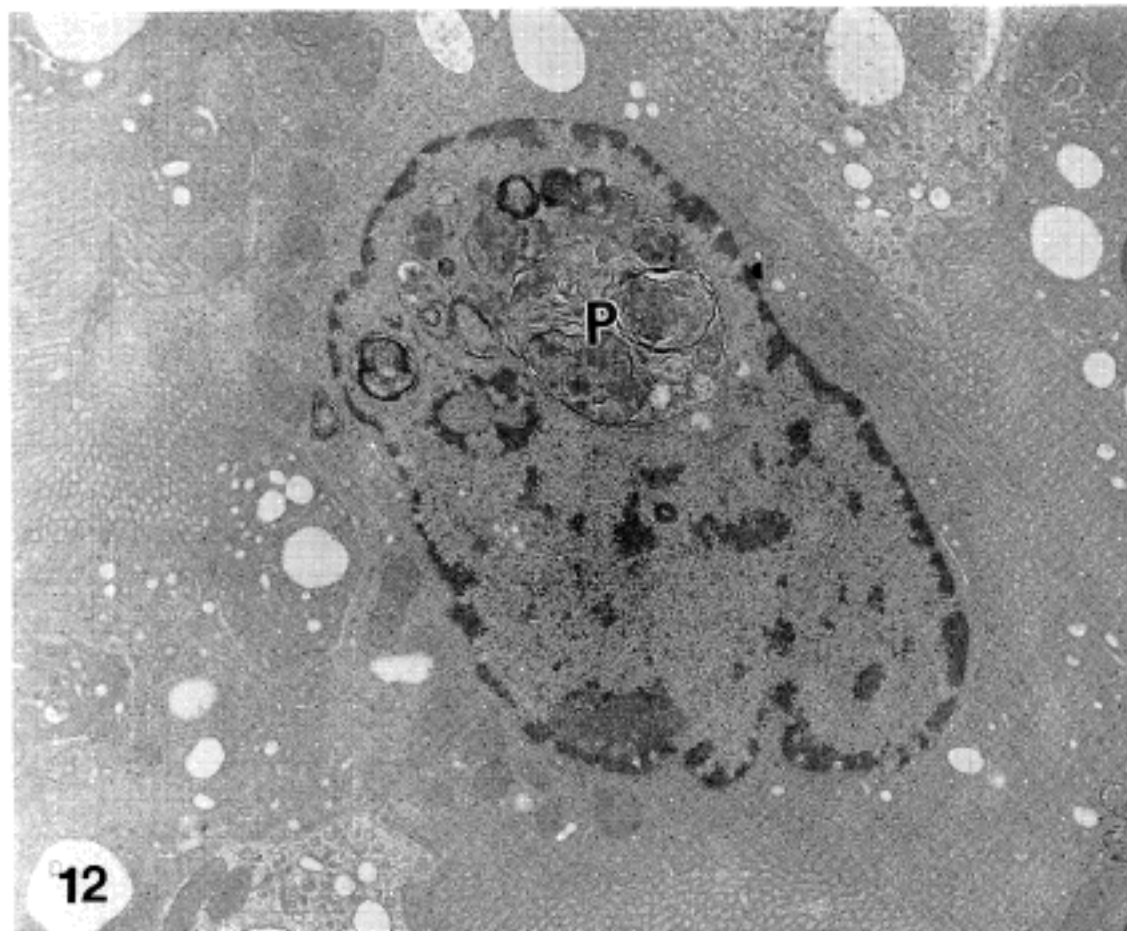


Fig. 12. Eight weeks after lead acetate ingestion. Intranuclear pseudo-inclusion due to cytoplasmic invagination is also seen in the proximal tubular cells(TEM, $\times 10,200$).

는 6주 및 8주군에서 저명하게 나타났으며 핵내에 진성 및 가성봉입체가 관찰되었다. 핵내봉입체의 모양은 중심부의 진한 core와 주위의 덜 진한 부위 및 더 바깥쪽으로는 원섬유성 물질과 전자밀도가 높은

과립들이 관찰되었다(Fig. 11). 이차리소솜 및 수초 모양잔류체 등의 세포질내의 물질들이 핵내로 함입되어 존재하는 가성봉입체도 핵내에 관찰되면서 진성봉입체와 동시에 존재하거나 또한 핵막의 주름

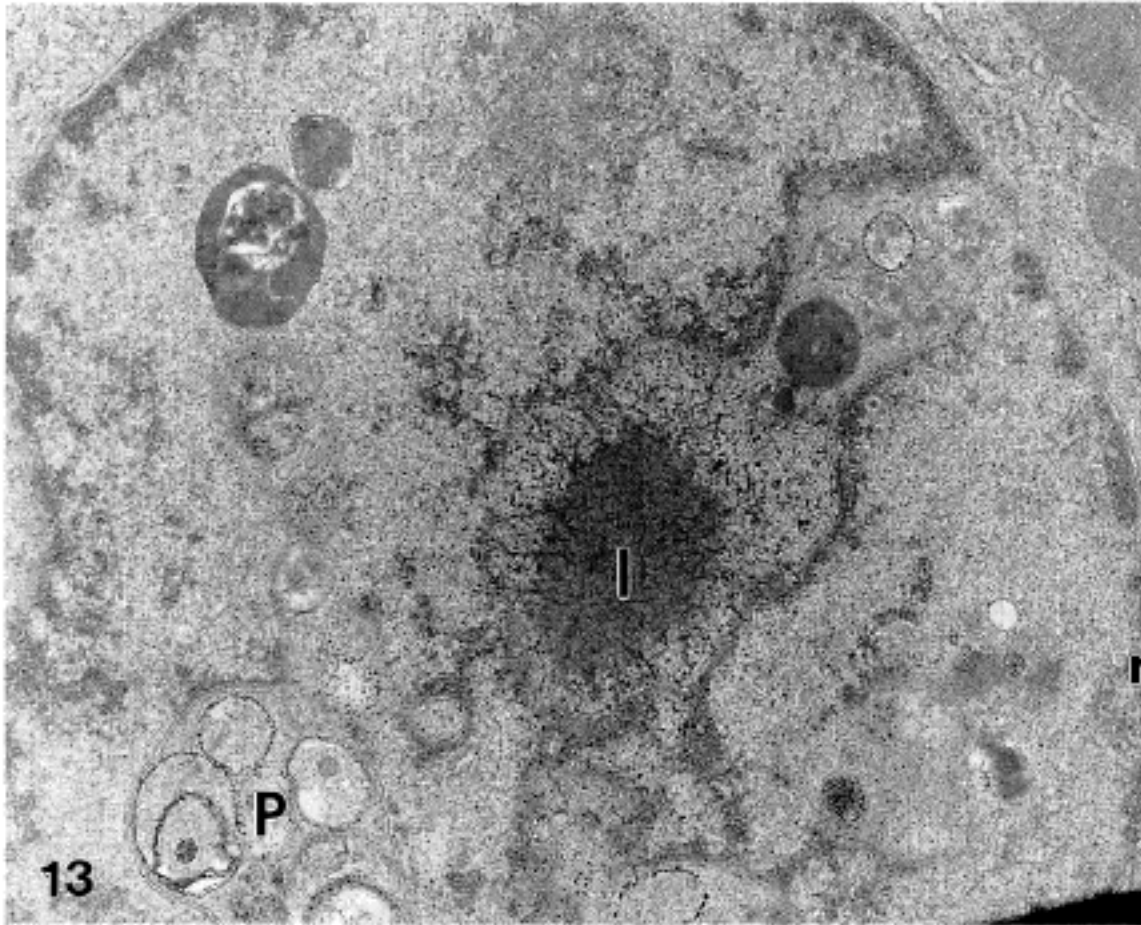


Fig. 13. Eight weeks after lead acetate ingestion. Intranuclear true inclusion and pseudo-inclusions of the cytoplasmic invagination are concurrently seen in the proximal tubular cells(TEM, $\times 25,500$).

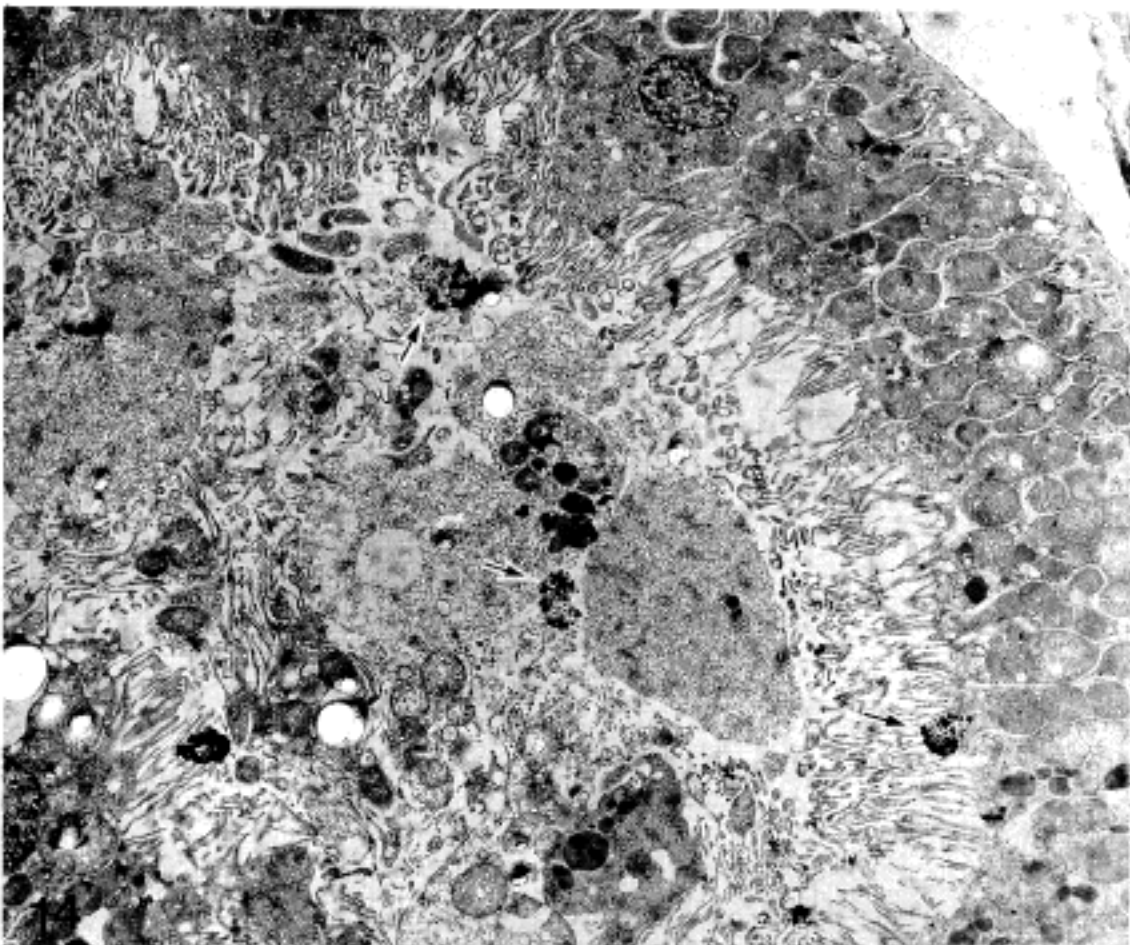


Fig. 14. Timm sulphide silver reaction. Six weeks after lead acetate ingestion. Many lumps of lead granules are seen in the lumen and also between the microvilli of the proximal tubular cells(TEM, $\times 6,000$).

(folding)이 심한 부위가 관찰되기도 하였다(Fig. 12, 13). Timm 반응을 시행한 후의 전자현미경적 소견에서는 납으로 생각되는 과립들이 주로 근위세뇨관강내에 또는 미세융모들 사이에서 관찰되었고(Fig.

14), 미세융모내의 납과립들도 덩어리져서 미세융모 사이에 존재하며 포음소포(pinocytotic vesicle)등의 막에 둘러싸여져 있지 않아서 수동적 확산에 의한 재흡수로 생각되기도 하였다(Fig. 15). 사구체내에서의

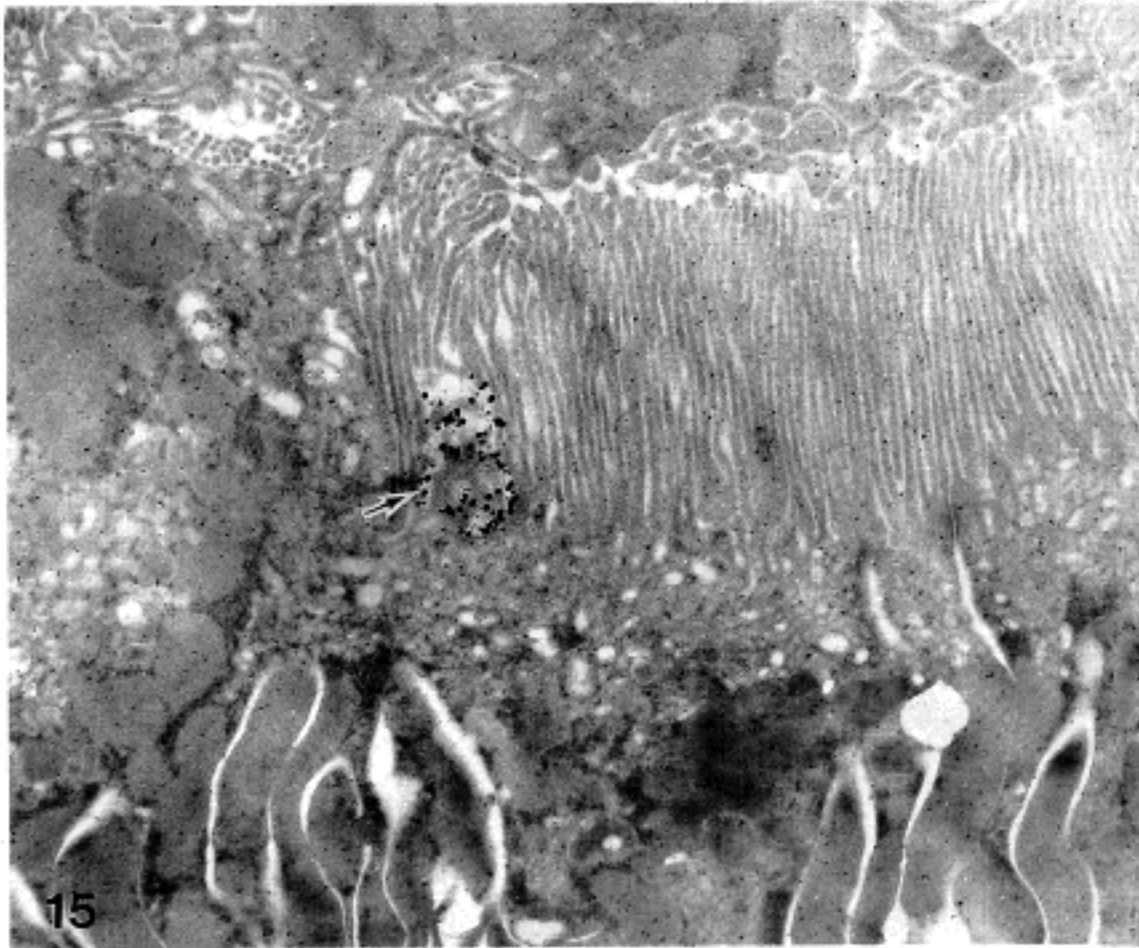


Fig. 15. Timm sulphide silver reaction. Eight weeks after lead acetate ingestion. A lump of lead granules without membrane-bounded is seen between the microvilli of the proximal tubular cells(TEM, $\times 13,600$).

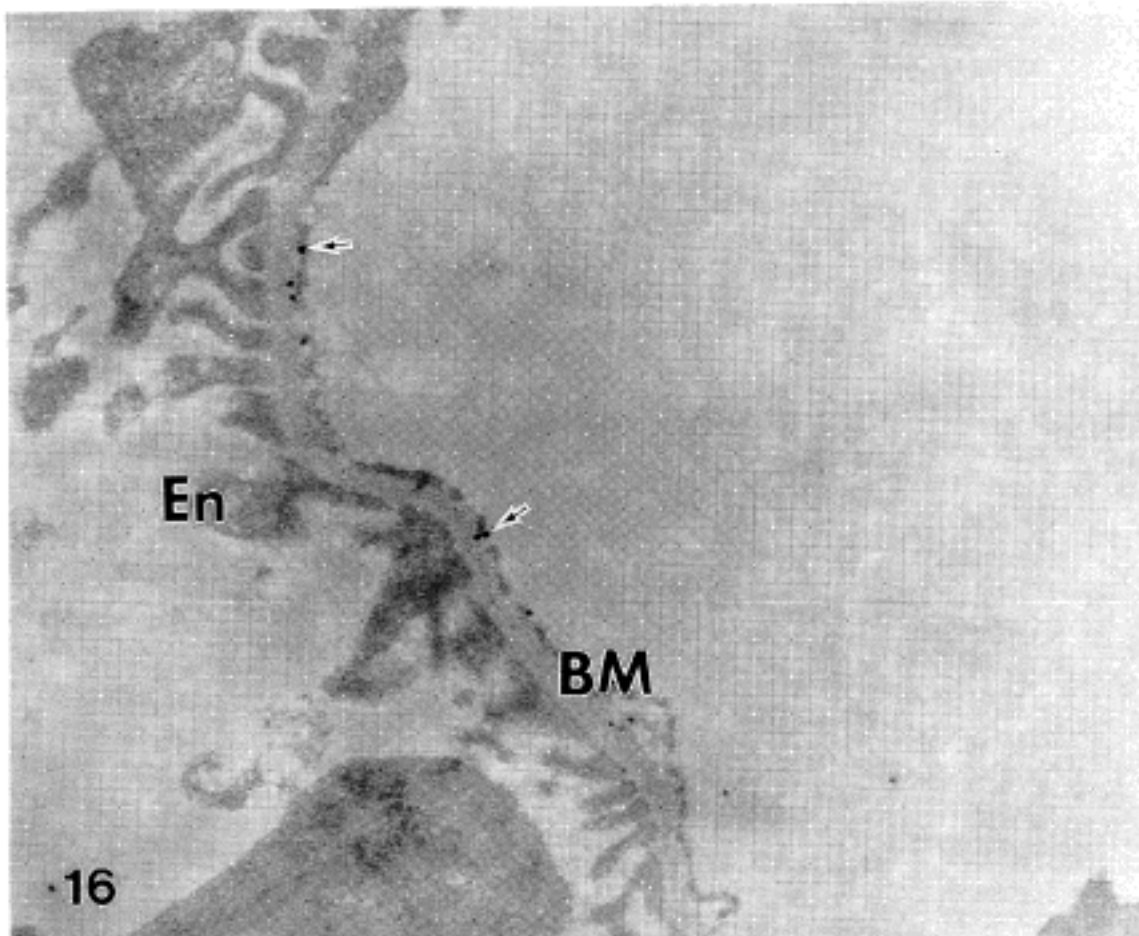


Fig. 16. Timm sulphide silver reaction. Two days after lead acetate ingestion. Lead granules are seen in the endothelial cell and basement membrane of the glomerular capillary wall(TEM, $\times 25,500$).

납과립들은 모세혈관의 내피세포 및 기저막에 주로 위치하여 관찰되었다(Fig. 16).

고 찰

납중독에 의한 신장애는 납성분이 포함된 페인트

Table 1. Ultrastructural findings of proximal tubular cells of rat kidney after lead acetate administration

Findings \ Time	2d	1w	2w	4w	6w	8w
ER dilatation	±	+	++~+++	++	±	-
Mitochondrial swelling	±	+	++~+++	++	±	-
Cystic space	±	+	+~++	++	+	-
Cytoplasmic rupture	-	-	+	+	+	-
Fat droplet	±	+	++	++	±	-
Secondary lysosome	+	+	++	++	+	±
Residual body	-	±	+	++	+	++
Nuclear change	-	-	-	±	+	+
Pseudo-inclusion	-	-	-	+	++	++
True inclusion	-	-	±	+	++	++

d: day, w: week, -: absent, +: mild, ++: moderate, +++: severe, ER: endoplasmic reticulum

를 특히 어린시절때 섭취한 후의 성인에서 많이 발생된다고 보고되고 있다³⁵. 그러나 지속적인 직업적으로 납에 노출되는 성인의 경우에서도 서서히 진행되는 만성 신 부전증을 초래할 수 있으며 이렇게 생긴 변화들은 신장의 비가역성 변화를 초래하는 경우가 많은 것으로 알려져 있다³⁶.

납 신증의 초기 실험적 모델에 의하면 신 병변의 정도는 실험동물의 종류, 노출기간 및 농도에 달려 있다^{37,38}. Vyskocil등³⁷에 의하면 음용수에 2% 초산납을 2개월간 투여할 경우 신장에 형태학적인 변화가 초래된다고 하고 그 반면에 0.5% 초산납을 2개월간 투여한 경우에는 조직학적이거나 기능적 변화를 초래하지 않는다고 하였다. Fowler등¹⁶은 저농도의 납(0.005%~0.025%)에 9개월간 노출된 경우 조직학적으로 근위세뇨관세포에 핵내봉입체, 미토콘드리아의 종창, 리소솜의 증가등이 초래된다고 하였다. 흰쥐에서 지속적인 고농도(1% 초산납) 노출에 의한 진행성 신 병변은 Goyer등²¹에 의해 자세히 밝혀졌으며 1% 초산납에 노출된 흰쥐에서 10주 후의 변화는 근위세뇨관세포에서의 세포질의 부종, 핵내봉입체 및 미토콘드리아의 변화라고 하였다. 노출 후 10~20주째에는 근위세뇨관세포의 이형성(dysplasia)이 초래되며 계속적으로 노출될 경우에는 모든 세뇨관세포들의 위축 및 확장과 비가역적 변화인 간질섬유화까지 초래된다고 하였다. 세뇨관위축 및 섬유화가 진행될 수록 상대적으로 핵내봉입체의 수는 감소하게 되고 납 투여 후 1년 후에는 심한 섬유화와 사구체 경화 및 심지어 신 종양까지 초래되는 경우도 있다고 한다. 인체에서의 보고는 Cramer등¹⁹이 납에

노출된 근로자의 생검상에서 노출 1년 미만때에 전형적인 핵내봉입체를 관찰하였으나 노출기간이 4~30년된 근로자에서는 핵내봉입체가 관찰되지 않았으며 세뇨관주위 및 간질내에 심한 섬유화가 관찰되었다고 하였다. 0.5%의 초산납을 흰쥐에 투여한 본 실험에서의 변화 역시 지금까지 문헌상에 보고된 변화들과 유사하였으며 시기적으로 6주 및 8주째에 내형질세망 미토콘드리아의 종창, 세포질내의 지방적, 리소솜의 증가, 수초모양 잔류체의 출현 및 핵내봉입체들이 저명하게 관찰되었다.

만성 납중독때의 신장의 육안적 변화는 아주 비특이적이라고 알려져 있지만³⁹ Goyer²¹와 O'Flaherty등⁴⁰에 의하면 납 투여후 처음 3개월째에 신장의 무게가 증가되었으며, Khalil-Manesh등⁴¹은 이러한 신장 무게의 증가는 근위세뇨관의 비대와 직접적인 관련이 있고 이것은 납이 직·간접적으로 세뇨관비대와 과투과를 초래하여 사구체여과율(glomerular filtration rate)의 증가를 초래한다고 하였다. 이러한 이론은 최근 인체의 연구에서 어린시절때 납중독 병력이 있던 성인이 대조군에 비해 더 높은 creatinine clearance를 나타낸다는 보고⁴²와도 일치한다. 납 노출후에 근위세뇨관의 비대가 초래되는 기전에 대해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않다. 그러나 납의 농도가 높은 핵내봉입체가 근위세뇨관에서 많이 관찰되는데서 보듯이 세뇨관의 비대는 직접적인 납의 축적에 의한다는 설과²¹, 납에 반응되어 신 피질에서 단백질 합성의 증가에 의해 초래된다는 설⁴³이 있다.

광학현미경적 변화는 세뇨관 변화를 동반한 혈관의 손상이라고 알려져 있고³⁹ 세뇨관은 세뇨관내에

칼슘과 혼합된 납염으로 여겨지는 물질들이 관찰되며 신 기능상에서도 당뇨, 아미노산뇨, 과인산뇨 등의 소견이 보고되고 있는데⁴⁴⁻⁴⁶ 이러한 검사 소견들 역시 세뇨관의 기능이상을 의미한다. 본 실험에서도 혈관의 울혈과 세뇨관내에 상피세포원주들이 관찰되었으며 Timm 반응을 통한 관찰에서 세뇨관내에 다수의 납 과립들이 관찰되었다.

Blackman²²에 의해 처음 보고된 이래 납에 의한 신 병변의 전형적인 소견으로 알려진 핵내봉입체에 관해서는 그동안에 많은 논쟁이 있어 왔지만⁴⁷⁻⁵⁰ 그 중 가장 많은 주목을 받고 있는 학설은 여기에는 소량의 핵산단백질과 지질 그리고 많은 양의 단백질 및 이 단백질내에 고농도의 sulfhydryl group이 함유되어 있다는 것이다. 핵내봉입체의 전자현미경적 구조는 본 실험에서도 관찰된 바와 같이 중심부의 진한 core와 주위에 다양한 두께의 덜 진한 원섬유 소성 물질들로 구성되어 있다. 핵내봉입체의 존재는 세뇨관세포 뿐만 아니라 간세포²², 파골세포⁵¹, 배양된 신 상피세포⁵²와 심지어 식물⁵³에서도 보고되고 있다. 이것은 인체에서의 납중독의 특징적인 소견이지만 납에 노출된 후에 아주 초기에 나타나는 것으로 알려져 있다^{54,55}. 특히 이 납 중독에 의한 봉입체는 bismuth 치료에 의해 초래되는 봉입체와 같이 Ziehl-Neelsen 염색에 acid-fast로 염색된다는 사실이며 이것이 바이러스에 의한 핵내봉입체와의 중요한 감별점 중의 하나이다⁴⁷. 본 실험에서도 모든 예를 대상으로 acid-fast 염색을 시도하여 보았으나 핵내봉입체에 약한 양성으로 염색되어 결과에서 제외하였으며 그 이유가 저농도 투여 때문인지 투여 기간이 짧아서 그런지는 알 수 없으며 이에 관해 추후 더 연구해야 할 것으로 사료된다. 그러나 왜 acid-fast로 염색되는지에 관해서는 아직 알려져 있지 않다. 이러한 봉입체들은 뇨를 통해 배설되기도 하고⁵⁰ 또한 acid-fast 봉입체를 관찰함으로써 납중독의 병력이 있는 환자의 뇨를 acid-fast 염색을 하여 진단하는데에도 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험의 전자현미경적 소견상 세뇨관세포들의 변화는 미토콘드리아 및 내형질세망의 확장, 세포질내의 공포화, 다수의 지방적, 리소솜의 증가와 수초모양 잔류체의 출현과 핵내봉입체등이며 핵소체의 변화는 관찰되지 않았다. 실험전에는 봉입체가 혹시 핵소체의 변화와 관련이 있을 것으로 추측하였으나 아무 변화가 없었으며 이는 Angevine³⁹의 주장과 일치하였다. 봉입체의 크기는 납에 대한 노출기간과 관계있을 것으로 추정되나 아직까지는 정확히 밝혀져 있지 않은 실정이다. 그러나 본 실험을 통해

서 본 봉입체의 크기는 초기에는 작은 크기로 나타나기 시작해서 8주째에 점차로 큰 크기가 다량으로 나타나는 것으로 보아서 노출기간과 관계있을 것으로 추정된다. 전자현미경에 관한 문헌보고상에서 미토콘드리아내에 납이 축적되는 것으로 보고되고 있으며⁶ 또 한편 간세포에서의 미토콘드리아에서 X-ray contact microscopy나 electron diffraction에서는 납이 확인되지 않는 등³⁹ 논란이 많으나 Timm 반응을 시도한 본 실험에서의 미토콘드리아에서는 납이 확인되지 않았고 납 과립들이 주로 근위세뇨관강과 미세음모들 사이에서 관찰이 되었으며 미세음모내의 납 과립들도 덩어리져서 미세음모 사이에 존재하며 포음소포등의 막에 둘러싸여져 있지 않아서 수동적 확산에 의한 세포내로의 합입으로 생각되기도 하였다. 또한 본 실험에서 이차리소솜의 증가와 수초모양 잔류체들이 노출시간이 경과될수록 증가하였는데 이러한 이차리소솜들은 2가지 경로를 통해 형성된다^{56,57}. 한가지는 세포내 이입의 과정을 통해 세포밖의 물질을 섭취하는 과정이고 또다른 한가지는 개개의 세포기관들, 예를 들면 미토콘드리아나 내형질세망등이 국소적인 상해를 받은 후에 그 세포가 정상기능을 유지하기 위해서 이들을 분해처리 해야만 할 경우에서 볼 수 있고 수초모양 잔류체들은 미분해된 조직파편을 포함한 리소솜이 세포질내에 잔류함으로써 야기된다고 알려져 있다.

실험 2일군부터 근위세뇨관세포의 세포질내에 다수의 지방적이 관찰되었는데 이는 동물실험을 통한 cadmium 노출시의 간세포 및 신세뇨관 세포에서도 관찰된 바가 있으며^{58,59} 이 지방적내에 중금속이 있을 것으로 추측되기도 하였다. 그러나 본 실험에서 Timm 반응후의 결과에서는 이 지방적내에 납성분은 관찰되지 않았다. 신장에서의 납이 존재하는 부위에 관해서는 Russo⁶의 보고에 의하면 전자밀도가 높은 입자들이 사구체에서는 내피세포, 기저막, 상피세포 및 메산지움세포에 존재하고 이것은 Vostál⁶⁰의 Pb^{2+} 는 가용성 형태로 혈액으로부터 여과 된다는 이론을 뒷받침하며 또한 본 실험의 결과와도 일치한다. 즉 여과되는 Pb^{2+} 의 일부가 내피세포와 기저막에 침착되거나, 여과되면서 pinocytosis 또는 endocytosis에 의해 상피세포와 메산지움세포내에 공포화의 형태로 존재하게 된다. Pb^{2+} 에 초래되는 내피세포 및 상피세포의 구조변화와 기저막이 두꺼워지는 것은 진행성 신증의 징후이다. 세뇨관에서의 Pb^{2+} 의 존재는 사구체에 여과된 납이 근위세뇨관에 존재하던지, 혈관으로부터 여과된 Pb^{2+} 가 기저막을 통과하여 세뇨관세포에 의해 endocytosis과정을 거쳐 세뇨

관세포에 존재하다가 세포관강내로 exocytosis에 의해 배출되어 뇨로 배출되던지 하게 된다.

납의 세포상해 기전에는 저산소 상해(hypoxic injury)^{2,61}와 유리기상해(free radical injury)^{62,63}의 두가지 방법이 있다. 저산소 상해 이론에 의하면 납은 sulfhydryl기와 친화성이 있어서 아연의존성 효소계에 독성을 나타냄으로서 heme합성에 관여하는 2가지 효소인 δ -aminolevulinic acid dehydratase(δ -ALAD)와 ferrochelatase의 기능을 방해하게 된다. 결국 헤모글로빈과 cytochrome의 합성이 이루어지지 않게되고 미토콘드리아 고유의 기능인 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)의 기능이 저하되어 ATP 생산이 감소됨으로서 형태학적인 일련의 변화, 즉 본 실험에서 관찰된 바와 같은 미토콘드리아의 종창이나 cristae의 소실, 내형질세망의 종창, 이차리소솜과 수초모양 잔류체의 증가, 지방적의 증가등이 초래된다. 유리기 상해 이론에 의하면 납에 의해 δ -ALAD의 기능이 저하되면서 δ -ALA가 증가하게 되는데 이 δ -ALA에 의해서 산소유리기가 증가되면서 세포상해를 초래한다는 이론이다. 어느 이론이 기전으로 작용하든지 세포막의 투과성이 불안정해짐으로써 형태학적인 변화가 초래된다고 생각한다. 본 실험에서 측정된 뇨중 δ -ALA는 납에 노출되었을 때 뇨중 배설량이 증가되어 납 중독을 의심할 수 있는 아주 좋은 방법중의 하나로 알려져 있고⁶⁴⁻⁶⁶ 본 실험에서도 대조군에 비해 실험군에서 2일째 부터 증가하기 시작하여 8주까지 계속 증가되었다. 또한 본 실험에서 측정된 초산납 투여군에서 혈중의 납 농도는 투여 2일째 부터 투여 후 6주째 까지 계속 증가하다가 8주째에 경미하게 하락하였는데 이는 실험기간이 경과함에 따른 여러장기의 기능부전에 따른 식욕감퇴가 원인으로 추정된다.

이상의 성적으로 보아 0.5%의 초산납을 흰쥐에 경구로 투여한 후의 전자현미경적 소견은 미토콘드리아 및 내형질세망의 종창, 세포질내의 공포화, 다수의 지방적, 리소솜 및 수초모양 잔류체의 증가와 핵내봉입체의 출현 등이며 이들 변화는 투여후 2일째 부터 시작되어 8주째에 가장 심해지는 것으로 관찰되었다. 납의 존재를 확인하기 위한 Timm 반응을 시도한 후의 전자현미경적 소견에서는 납 과립들이 주로 근위세뇨관강과 근위세뇨관 세포들의 미세용모 사이에서 원형질막에 둘러싸이지 않은 채 관찰되어 수동적 확산에 의한 세포내 함입으로 생각된다.

본 실험은 임상적으로도 납중독으로 인한 신장애가 의심되는 환자에서 신생검을 통한 형태학적 변

화와, 특히 Timm 반응후에는 신장내 납과립들의 존재유무까지 확인할 수 있어서 다른 간질성 신질환들과의 감별에도 크게 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

저자는 Sprague-Dawley 흰쥐 48마리를 대상으로 종류수에 초산납을 섞어 0.5%의 농도로 마시게한 후 신장을 적출하여 그 변화를 초미형태학적으로 관찰하고 Timm 반응을 시킨 후의 납의 축적위치를 투과전자현미경으로 관찰한 성적을 요약하면 다음과 같다.

1. 혈중 납 농도는 대조군에서는 0.92 $\mu\text{g/ml}$ 이었고 초산납 투여 후 2주째군에서 평균 3.29 $\mu\text{g/ml}$ 로 최고치를 나타내었다.

2. 뇨중 δ -aminolevulinic acid는 대조군은 9.8 mg/creatinine mg이었고 2일군부터 증가되기 시작하여 8주군에서 71.7 mg/creatinine을 나타내었다.

3. 전자현미경적 소견으로는 주로 근위세뇨관에서 많은 변화가 이루어 졌으며 지방적의 증가, 내형질세망의 확장 및 공포화, 미토콘드리아의 종창, 리소솜 및 수초모양 잔류체의 증가와 핵내봉입체의 출현등이며 이러한 변화들은 초산납 투여후 8주째군에서 가장 저명하였다.

4. Timm 반응을 일으킨 후의 투과전자현미경적 소견은 납 과립들이 주로 근위세뇨관강에 존재해 있었고 일부는 원형질막에 둘러싸이지 않은채 근위세뇨관세포의 미세용모 사이에 존재해 있어서 단순 확산에 의한 재흡수로 사료되었다.

이상의 소견을 종합해 보면 흰쥐에게 초산납을 경구 투여했을 때의 주된 손상부위는 근위세뇨관으로 생각되고, 초기에는 가역적인 변화이나 나중에는 핵의 변화 및 파괴까지 초래되는 비가역적인 변화까지 초래되었다. 납의 축적 부위는 사구체를 통해 뇨강으로 빠져 나간뒤 근위세뇨관세포에서 단순확산에 의한 재흡수과정을 통해 근위세뇨관 세포내로 함입된다고 믿어지나 세포내 정확한 소기관의 축적 부위에 관해서는 추후 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Budavarie S. Merck index, ed 11. Rahway, Merck & Co., Inc., 1989, pp 851-854.
2. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease, ed 4. Philadelphia, W.B. Saunders

- Co., 1989, pp 492-494.
3. Kissane JM. Anderson's pathology, ed 8. St. Louis, Mosby Co., 1985, pp 200-201.
 4. World Health Organization. Environmental health criteria for Lead, Geneva, World Health Organization, 1977, pp 19-135.
 5. 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.
 6. Russo MA, Kapoor SC, van 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.
 7. 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.
 8. Emmerson BT. Lead stores in patients with renal insufficiency. *Nephron* 1991; 58: 233-234.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Vandeputte DF, Jacob WA, van Grieken RE. Influence of fixation procedures on the microanalysis of lead-induced intranuclear inclusions in rat kidney. *Histochem Cytochem* 1990; 38: 331-337.
 13. Heptinstall RH. Pathology of the kidney, ed 4. Boston, Little, Brown and Company, 1992, pp 2098-2106.
 14. Galle P, Morel-Maroger L. Les lésions rénales du Saturnisme humain et expérimental. *Nephron* 1965; 2: 273-286.
 15. Goyer RA, Leonard DL, Moore JF, Rhyne BC, Krigman MR. Lead dosage and the role of the intranuclear inclusion body. An experimental study. *Arch Environ Health* 1970; 20: 705-711.
 16. Fowler BA, Kimmel CA, Woods JS, McConnell EE, Grant LD. Chronic low level lead toxicity in the rat. III. An integrated assessment of long-term toxicity with special reference to the kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 56: 59-77.
 17. Spit BJ, Wibowo AAE, Feron VJ, Zielhuis RL. Ultrasonic changes in the kidneys of rabbits treated with lead acetate. *Arch Toxicol* 1981; 49: 85-91.
 18. Goyer RA. Lead toxicity: A problem in environmental pathology. *Am J Pathol* 1971; 64: 167-181.
 19. Cramer K, Goyer RA, Jagenburg R, Wilson MH. Renal ultrastructure, renal function and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure. *Br J Ind Med* 1974; 31: 113-127.
 20. Macadam RF. The early glomerular lesion in human and rabbit lead poisoning. *Br J Exp Pathol* 1969; 50: 239-240.
 21. Goyer RA. Lead and the kidney. *Curr Top Pathol* 1971; 55: 147-166.
 22. Blackman SS Jr. Intranuclear inclusion bodies in the kidney and liver caused by lead poisoning, *Bull Johns Hopkins Hosp* 1936; 58: 384-404.
 23. Goyer RA, May P, Cates M, Krigman MR. Lead and protein content of isolated intranuclear inclusion bodies from kidneys of lead poisoned rats. *Lab Invest* 1970; 22: 245-251.
 24. Carroll KG, Spinelli FE, Goyer RA. Electron probe microanalyzer localization of lead in kidney tissue of poisoned rats. *Nature* 1970; 227: 1056.
 25. Danscher G. Histochemical demonstration of heavy metals. *Histochemistry* 1981; 71: 1-16.
 26. Graumann W, Drukker J. Histo- and cytochemistry as a tool in environmental toxicology. *Prog Histochem Cytochem* 1991; 23: 273-285.
 27. Danscher G. Applications of autometallography to heavy metal toxicology. *Pharmacol Toxicol* 1991; 69: 414-423.
 28. Danscher G. Detection of metals in tissues: Histochemical tracing of zinc, mercury, silver and gold. *Histochem Cytochem* 1991; 23: 273-285.
 29. Stahr HM. Analytical methods in toxicology, New York, John Wiley & Sons Inc., 1991, pp 55-57.
 30. Wada O, Toyokawa K, Urata G, Yano Y, Nakao K. A simple method for the quantitative analysis of urinary delta-aminolevulinic acid to evaluate lead absorption. *Br J Ind Med* 1969; 26: 240-243.
 31. Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophysic Biochem Cytol* 1961; 9: 409-417.
 32. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophysic Biochem Cytol* 1958; 6: 475-479.
 33. 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.
34. 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.
 35. Henderson DA. The aetiology of chronic nephritis in queensland. *Med J Aust* 1958; 1: 377-386.
 36. Wedeen RP, Maesaka JK, Weiner B, Lipat GA, Lyons MM, Vitale LF, Joselow MM. Occupational lead nephropathy. *Am J Med* 1975; 59: 630-641.
 37. Vyskocil A, Pancl J, Miloslav T, Ettlerova E, Semecky V, Kasparova L, Lauwerys R, Bernard A. Dose-related proximal tubular dysfunction in male rats chronically exposed to lead. *J Appl Toxicol* 1989; 9: 395-399.
 38. Revis NW, Shaw J, Bull R. A comparative study of lead nephrotoxicity and tissue deposition between rats, mice, and pigeons exposed to drinking water containing 2, 20 or 200 ppm lead. *J Am College Toxicol* 1983; 2: 155-163.
 39. Angevine JM, Kappas A, DeGowin RL, Spargo BH. Renal tubular nuclear inclusions of lead poisoning: A clinical and experimental study. *Archiv Pathol* 1962; 73: 486-494.
 40. O'Flaherty EJ, Adams WD, Hammond PB, Taylor E. Resistance of the rat to development of lead-induced renal functional deficits. *J Toxicol Environ Health* 1986; 18: 61-75.
 41. Khalil-Manesh F, 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.
 42. Hu H. A 50-year follow-up of childhood plumbism: Hypertension, renal function and hemoglobin levels among survivors. *Am J Dis Child* 1991; 45: 681-687.
 43. Choie DD, Richter GW. Cell proliferation in mouse kidney induced by lead. I. Synthesis of deoxyribonucleic acid. *Lab Invest* 1974; 30: 647-651.
 44. McKhann CF. Lead poisoning in children. *Am J Dis Child* 1926; 32: 386-392.
 45. Goetsch E, Mason HH. Glycosuria in lead poisoning. *Am J Dis Child* 1940; 59: 119-128.
 46. Wilson VK, Thomson ML, Dent CE. Amino-Aciduria in lead poisoning: A case in childhood. *Lancet* 1953; 2: 66-68.
 47. Wachstein M. Studies on inclusion bodies: I. Acid-fastness of nuclear inclusion bodies that are induced by ingestion of lead and bismuth. *Am J Clin Pathol* 1949; 19: 608-614.
 48. Bracken EC, Beaver DL, Randall CC. Histochemical studies of viral and lead induced intranuclear bodies. *J Path Bact* 1958; 75: 253-256.
 49. Finner LL, Calvery HO. Pathologic changes in rats and in dogs fed diets containing lead and arsenic compounds: Compounds used: lead arsenate, arsenic trioxide, calcium arsenate and lead acetate. *Arch Pathol* 1939; 27: 433-446.
 50. Landing BH, Nakai H. Histochemical properties of renal lead-inclusions and their demonstration in urinary sediment. *Am J Clin Pathol* 1959; 31: 499-503.
 51. Hsu FS, Kroox L, Shively JN, Duncan JR. Lead inclusion bodies in osteoclasts. *Science* 1973; 181: 447-448.
 52. Walton J, Buckley JK. The lead-poisoned cell: A fine structural study using cultured kidney cells. *Exp Mol Pathol* 1977; 27: 167-182.
 53. Murakami M, Kawamura R, Nishii S, Katsunuma H. Early appearance and localization of intranuclear inclusions in the segments of renal proximal tubules of rats following ingestion of lead. *Br J Exp Pathol* 1983; 64: 144-155.
 54. McLachlin JR, Goyer RA, Cherian MG. Formation of lead-induced inclusion bodies in primary rat kidney epithelial cell cultures: Effect of actinomycin D and cycloheximide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 56: 418-431.
 55. Oskarsson A, Johansson A. Lead-induced inclusion bodies in rat kidney after perinatal treatment with lead and disulfiram. *Toxicology* 1987; 44: 61-72.
 56. de Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Ann Rev Physiol* 1966; 28: 435-492.
 57. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of diseases 4th ed. W.B. Saunders Company 1989, pp 4-8.
 58. 박관규, 김영호, 권건영, 장은숙. 염화 카드뮴 간 손상에 관한 광학 및 전자현미경적 연구. *대한병리학회지* 1992; 26: 28-39.
 59. 박관규. 카드뮴 신 손상에 관한 전자현미경적 연구. *대한신장학회지* 1993; 12: 20-26.
 60. Vostál J, Heller J. Renal excretory mechanism of heavy metals. I. Transtubular transport of heavy metal ions in avian kidney. *Environ Res* 1968; 2: 1-10.
 61. Sullivan JB, Krieger GR. Hazardous materials toxicology, Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1992, pp 834-844.
 62. Hermes-Lima M, Pereica B, Bechara EJ. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* 1991;

- 21: 1085-1090.
63. 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.
64. Cramér K, Selander S. Studies in lead poisoning. Comparison between different laboratory tests. *Br J Ind Med* 1965; 22: 311-314.
65. Gibson SLM, Mackenzie JC, Goldberg A. The diagnosis of industrial lead poisoning. *Br J Ind Med* 1968; 25: 40-51.
66. Nakao K, Wada O, Yano Y. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning. *Clin Chim Acta* 1968; 19: 319-325.
-