

저농도 일산화탄소가 흰쥐 미상핵에 미치는 영향에 관한 조직화학적 연구

김진상
(서울대학교 수의과대학)
(1989. 8. 10 접수)

Histochemical studies on effect of low concentrated carbon monoxide on the caudate nucleus in rat

Jin-sang Kim
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Aug 10, 1989)

Abstract: This study was undertaken to investigate the changes of enzyme activities resulted from low concentrated carbon monoxide poisoning on the caudate nucleus in rat. The activities of cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase and lactate dehydrogenase were observed histochemically, after the experimental animals were poisoned to 100ppm carbon monoxide for 8 hours every day from one day to 16 days.

The materials were sliced from coronal section at the level of the optic chiasm and immediately frozen sections of 10 μ m thickness were cut on the cryostat at -15°C and incubated in the medium containing substrate for histochemical detection of cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. The sections were mounted in glycerol gelatin and observed under light microscope.

It was obtained that cytochrome oxidase activity decreased moderately and succinate dehydrogenase activity showed marked or moderate activity during entire poisoning period and lactate dehydrogenase activity showed marked or moderate activity from one to 8 days but recovered to normal condition at 16th day.

Key words: caudate nucleus, carbon monoxide poisoning, cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase activity

서론

대기오염은 수질오염과 함께 인류생존을 위협하는 최대의 공해요인으로 지적되고 있으나 이들은 날로 그 심각성을 더해가고 있는 실정이다. 특히 대기오염의 경우 교통기관과 공업시설의 급격한 증가에 의해 생산되는 일산화탄소는 가정연료로 사용되는 무연탄에서 발생하는 일산화탄소와 함께 매년 10여톤씩 누증되는 형편이며,¹ 전세계적으로는 2억여톤이 생성되어 극히 일

부만이 대기 중에서 광분해될 뿐 3년에 2배로 대기 중에 축적되는 실정이다.^{2,3}

탄화연료의 불완전연소에 의해 발생하는 이들 일산화탄소는 무색, 무취, 무미의 기체이나 생체에 흡입되는 경우 산소운반장애, 산소해리방해, 전자전달계 효소의 활성억제 등으로 각종 조직에 빈혈성 저산소증 상태를 유발하여⁴ 심근의 퇴행성변화,⁵ 폐장의 부종,⁶ 간세포의 변성,⁷ 신장 요세관의 괴사⁸ 등으로 치명적 손상을 야기한다.

특히 뇌조직의 경우는 추체의외계의 중추인 피카 (putamen)과 미상핵(caudate nucleus) 및 담창구 (globus pallidus)로 구성된 선조체(corpus striatum)의 대칭성연화(symmetrical demyelination)가 가장 현저한 소견이다.⁹⁻¹¹ 따라서 지금까지는 주로 선조체의 병리조직학적 연구가 주류를 이루고 있는 실정이었으나 병리조직학적 변화에 앞서 가장 민감하게 변화할 수 있는 것은 효소활성변화일 것이라는 점에 착안하여 이 분야에 관한 연구가 근간에 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 어떤 효소가 어떤 신경핵에서 어떻게 영향을 받게되는지에 관해서는 아직까지 불명한 상태이다.

저자는 저농도의 일산화탄소에 의하여 야기되는 미상핵 내 신경세포의 효소활성변화를 관찰하여 일산화탄소 중독기전을 규명하는 기초자료를 마련코자 조직화학적 연구를 시도한 바 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐 60마리를 무중독대조군에 10마리, 중독실험군에 50마리를 배정하였다. 중독실험군의 경우는 Conard법¹²에 따라 농황산에 개미산을 반응시켜 제조한 100ppm의 일산화탄소를 하루 8시간씩 1, 2, 4, 8, 16일간 흰쥐 환기량을 기준으로 중독시켰다. 일정시간 중독시킨 후에는 10마리씩을 단두도살하여 두개강을 열어 뇌를 적출한 다음 -30°C로 동결시켜 시신경교차(optic chiasm)를 중심으로 관찰절단을 하였다. 그 후 미상핵 내에 존재하는 cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase 등 효소의 활성을 관찰코자 -15°C에서 10μm의 동결절편을 만들어 다음과 같이 조직화학적 염색을 실시하였다.

Cytochrome oxidase에 대한 조직화학적 염색은 Burstone¹³이 개발한 quinoline method에 따라 8-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline 50mg과 p-amino-diphenylamine 15mg을 0.5ml의 ethanol에 녹인 후 cytochrome C 20mg을 기질로 첨가한 후 0.5M tris buffer

(pH7.4) 15ml로 용해하여 실험에서 반응시켰다.

Succinate dehydrogenase는 Nachlas et al¹⁴의 방법에 따라 50ml의 0.1M glycyl-glycine buffer(pH7.8)에 50mg의 nitroblue tetrazolium을 첨가한 후, 기질로 0.68g의 sodium succinate를 용해시켜 37°C에서 반응시켰다.

Lactate dehydrogenase의 경우 Chayen et al¹⁵의 방법에 따라 0.05M phosphate buffer (pH8.0) 25ml에 nitroblue tetrazolium 25mg을 녹인 후 nicotinamide adenine dinucleotide 125mg을 혼합하여 만든 phosphate tetrazole액에 sodium lactate 0.2g을 기질로 첨가하여 37°C에서 반응시켰다.

조직화학적 염색을 마친 미상핵 내 효소활성의 광학현미경적 관찰은 미상핵 내 신경세포내에 나타나는 양성반응 정도에 따라 아주 강한 반응을 보인 것을 ≡, 중등도의 반응을 보인 것을 ≡, 미약한 반응을 보인 것은 +로 하여 비교하였다.

결 과

Cytochrome oxidase 활성변화 : 무중독대조군의 미상핵 내 존재하는 크고 작은 원형 신경세포 내에는 청자색으로 농염되는 과립이 충전되어 연접세포와의 경계조차 구별할 수 없을 정도의 강한 양성반응을 보였다(≡). 그러나 투사신경섬유(projection fibers)는 옅은 홍색으로 음성반응을 보였다(-)(Fig 1).

중독 1일군의 경우 청자색의 양성반응이 중등도로 저하된 소견을 보였으나(≡), 투사신경섬유는 대조군과 같은 음성반응을 보였다(-). 이와 같은 소견은 중독 2, 4, 8, 16일에도 유사하였다(Table 1, Fig 2).

Succinate dehydrogenase 활성변화 : 무중독대조군의 경우 적자색으로 짙게 염색되는 과립이 미상핵 내 신경세포 전체에 충전되어 강한 양성반응(≡)을 보였으나(Fig 5) 투사신경섬유는 음성반응을 보였다(-). 한편 중독실험군의 경우 1일군은 대조군과 같은 소견 내지 효소활성이 중등도로 저하된 소견을 보였다(≡/≡), 이와같은 소견은 일산화탄소 중독 2, 4, 8, 16일군

Table 1. Enzyme activities of glycolytic and respiratory chains in caudate nucleus of rat after carbon monoxide poisoning

Enzyme	Group	Control	1 day	2 day	4 day	8 day	16 day
Cytochrome oxidase		≡	≡	≡	≡	≡	≡
Succinate dehydrogenase		≡	≡/≡	≡/≡	≡/≡	≡/≡	≡/≡
Lactate dehydrogenase		≡	≡/≡	≡/≡	≡/≡	≡/≡	≡

Remark ≡: strong activity, ≡: moderate activity
+: mild activity

에서도 동일하였다(Fig 5). 그러나 투사신경섬유는 대조군과 동일한 음성반응의 소견을 보였다(-).

Lactate dehydrogenase 활성변화 : 무중독대조군의 경우 미상핵 신경세포 내에는 적자색으로 농염되는 과립이 충만하여 강한 양성반응을 보였으나(##)(Fig 3) 투사신경섬유는 담홍색으로 음성반응을 보였다(-). 중독 1일군에서는 대조군과 유사하거나 중등도로 효소활성이 저하된 소견을 보였다(##/##). 이와 같은 소견은 일산화탄소 중독 2, 4, 8 일군에서도 마찬가지로였으나(##/##) 16일군에서는 이들과 달리 대조군과 동일한 강한 양성반응을 보였다(Fig 4). 그러나 투사신경섬유는 전기간에 걸쳐 대조군과 동일한 음성반응을 보였다(-).

고 찰

미상핵은 중뇌(telencephalon) 수질 내에 있는 기저핵(basal ganglia) 구성분의 하나로 대뇌 피질과 척수를 잇는 운동신경전도로 또는 지각신경전도로의 중계핵이다. 이들은 피각, 담창구 등과 함께 추체의로계(extrapyramidal system)를 형성하나 신경해부학적 견지에서 추체의로계가 손상받는 경우 운동과소성 긴장증가증(hypokinetic hypertonism)인 파킨슨니즘(parkinsonism)이 유발된다. 즉, 운동실조, 도약불능, 지남력상실, 보행장애, 선회운동부진을 주증으로하는 증상이 야기된다.^{16,17}

추체의로계를 포함한 뇌조직은 다른 조직에 비해 일산화탄소에 치명적인 손상을 입는 것으로 알려져 있다. 그 이유는 기저핵을 비롯한 뇌조직은 산소요구도가 높은 동시에 호기성대사에 의해서만 포도당을 분해하여 에너지원으로 이용하므로 산소공급부족시에는 극심한 병변을 초래할 뿐 아니라 특히 기저핵의 경우 기저핵에 영양을 공급하는 렌즈-선조동맥(lenticulostriate artery)이 직각으로 분지되는 형태학적 특이성과 함께 기저핵에 분포하는 혈관망의 발달이 미약하여 혈류공급이 원활치 못한 경우 쉽게 손상을 받게되는 취약점이 있는 것으로 주장되고 있다.^{18,19}

한편 기저핵을 비롯한 뇌조직이 일산화탄소에 중독되는 경우 빈혈성저산소증(ischemic hypoxia)이 야기되는 기전은 상기한 바와 같은 생화학적 및 해부학적 특성 이외의 일산화탄소 자체의 생리학적 특성에도 기인된다. 즉, 일산화탄소는 혈액색소의 친화력이 산소와의 친화력에 비해 210배나 높아 일산화탄소가 폐포를 통해 흡입되는 경우 산소대신 일산화탄소가 혈액색소와 쉽게 결합하여 일산화탄소혈색소를 만들어 혈액색소 고유 기능인 산소운반을 방해할 뿐 아니라 산소해리도

방해하여 조직을 저산소증 상태에 빠뜨리며 나아가 일산화탄소는 cytochrome oxidase에 함유된 금속이온과 쉽게 착화합물을 만들어 전자전달을 방해하여 조직대사를 억제한다고 알려져 있다.⁴

저자는 100ppm의 일산화탄소를 원취에 하루 8시간씩 1, 2, 4, 8, 16일간 중독시킨 결과 미상핵 내 신경세포에서 전자전달계 효소인 cytochrome oxidase(CYO) 활성은 전기간에 걸쳐 중등도로 저하된 소견을 관찰할 수 있었으며 TCA회로 효소인 succinate dehydrogenase(SDH)나 EM 해당경로 효소인 lactate dehydrogenase(LDH) 효소 활성은 대조군과 유사하거나 중등도로 저하된 소견을 관찰할 수 있었다.

이와 같은 결과는 Smialek²⁰이 1% 일산화탄소를 원취에 흡입시켜 혈중 일산화탄소 포화도를 76.6±0.9%가 되도록 60분간 중독시켰을 때 CYO 활성이 58.3%나 감소되었다고 한 보고나 Hoppe²¹가 생후 1일된 원취 소뇌를 조직배양하면서 10% 일산화탄소를 1시간동안 계속 공급하였을 때 CYO, SDH, LDH 등의 효소활성이 50% 내외로 모두 저하된 소견을 관찰할 수 있었다고 한 연구, 그리고 Szumanska²²가 1% 일산화탄소를 원취에 1.5시간 중독시켜 혈중 일산화탄소포화도를 65~80%로 유지한 경우 SDH활성이 40% 저하된 소견을 관찰할 수 있었다는 보고 등과 상응되는 결과로 사료된다. 그러나 이들 연구보고의 대부분이 고농도의 일산화탄소를 단시간 중독시킨 급성중독에 의한 효소활성 변화라는 점에서 본 실험과 연관지어 고찰하기에는 무리가 있는 것으로 사료된다.

하지만 Lewey와 Drabkin²³이 0.01%에 지나지 않는 저농도의 일산화탄소를 하루 5 3/4 시간씩 11주간 개에 중독시켰을 때 선조체 니슬소체(Nissl body)의 변화가 가장 뚜렷하였다는 보고 및 Korthal et al,²⁴ Miyagishi와 Suwa,²⁵ Takeichi,²⁶ Hager et al²⁷, Hartman et al²⁸이 일산화탄소 중독 시 전자현미경소견상 기저핵 신경세포의 미세구조 변화는 주로 사립체의 종창, 사립체능의 분절과 소실 및 rER 소조의 확장, 골지복합체의 공포화 현상 등이 가장 현저한 소견이었다는 보고에 비추어 본실험 결과 얻어진 CYO, SDH, LDH 등 효소활성의 변화는 일산화탄소 중독으로 인하여 일차적으로 CYO가 관여하는 생물학적 호흡연쇄반응계가 방해되어 ATP생성이 감소되면서 Na-K pump에 변화가 생겨 막성제인 사립체에 구조적 변화가 생기고 동시에 ER과 골지복합체에 형태학적 변화가 야기되어 단백질 합성이 억제되어 일어난 일련의 병리변화로 사료된다.

한편 SDH나 LDH의 활성변화에 비하여 CYO의 활성변화가 보다 현저하게 관찰된 것은 일산화탄소 흡입

과 동시에 일산화탄소가 호흡효소인 cytochrome A₃의 경우 cytochrome C의 산화형을 환원시키지 못해 Fe²⁺→Fe³⁺+e⁻의 전자전달이 신속히 영향받아 야기된 것으로 사료된다. 나아가서 SDH와 LDH 활성이 CYO 활성변화보다 지연되어 관찰된 것은 일산화탄소에 의해 CYO 활성이 저하된 후 이로 인해 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)가 억제되어 EM경로를 통해 생성된 많은 양의 pyruvic acid가 lactic acid로 분해되지 못한 채 축적되어 야기된 positive feed back mechanism으로 사료된다.

한편 LDH 활성변화가 크지 않았던 점은 Dibias et al²⁹이 100ppm으로 24주간 원숭이에 중독시켰을 때 LDH 활성변화가 없었다는 보고나 Eckardt et al³⁰이 65.46ppm으로 2년간 중독시켰을 때 LDH 활성변화가 없었다고 한 보고 등에 미루어 저농도로 중독시킨 경우 별다른 변화가 없는 것으로 사료된다.

특히 LDH의 경우 중독 16일에 이르러서는 대조군과 같은 정도의 강한 양성반응을 나타내었는데 이것은 아마도 내성증가에 의한 순화현상에 기인된 것으로 추론된다. 즉, Syverteen과 Harris³¹가 195ppm으로 72시간 동안 중독시켰을 때 혈구생산자극물질인 erythropoietin이 중독 48시간부터 유의하게 증가한다고 한 보고와

Fogh³²가 0.41%부터 1.45%까지의 일산화탄소를 순차적으로 중독시킨 바 중독 15일에 erythropoietin이 30%나 증가되었다고 한 보고 등에 비추어 중독기간 장기화에 따른 보상성 회복으로 사료되며 아울러 세포의 기질적 변화 후 시간경과에 따라 일부 세포내소기관이 내성 증가로 재생 내지 신생되어 회복된 것으로도 보여진다.

결 론

저농도 일산화탄소 중독으로 야기되는 미상핵 내 신경세포의 효소활성 변화를 관찰코자 체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대상으로 100ppm의 일산화탄소를 매일 8시간씩 1~16일간 중독시킨 후 cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase 활성을 조직화학적으로 관찰하였다.

그 결과 cytochrome oxidase 활성은 중독 1~16일에 걸쳐 중등도로 저하되었으나 succinate dehydrogenase는 대조군과 유사하거나 중등도로 저하된 소견을 보였고 lactate dehydrogenase는 1~8일군에서는 대조군과 유사하거나 중등도로 저하된 활성변화를 보였으나 16일에는 대조군과 동일한 정상 소견을 보였다.

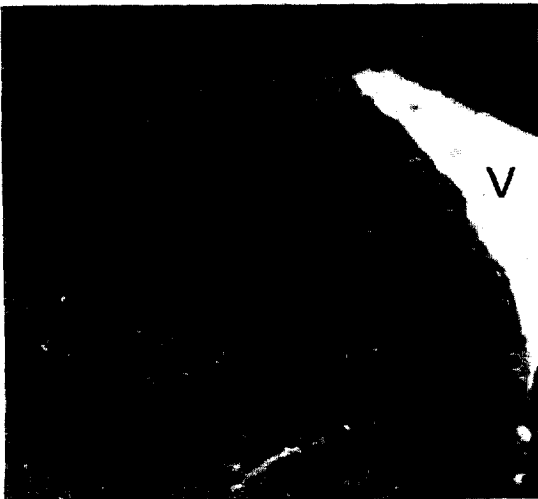
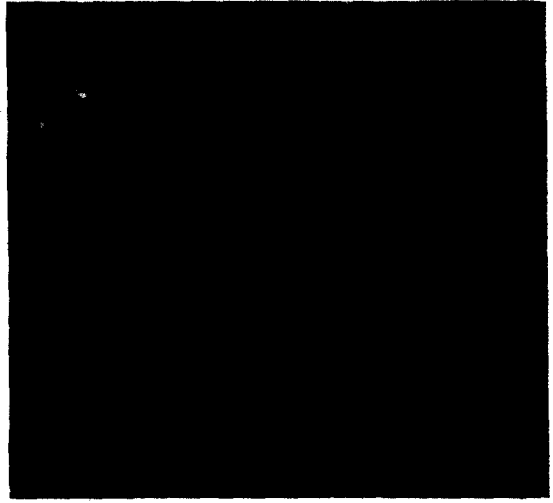
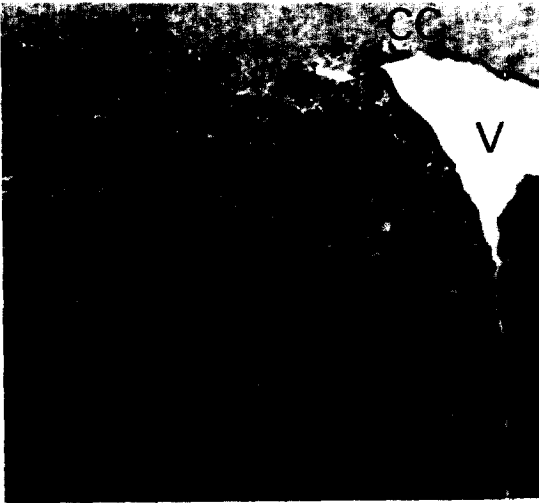
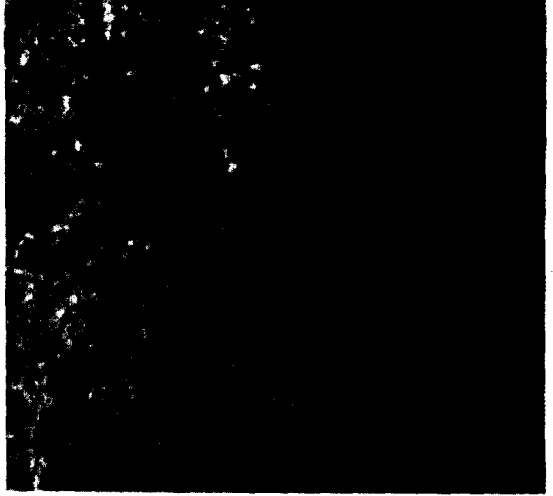
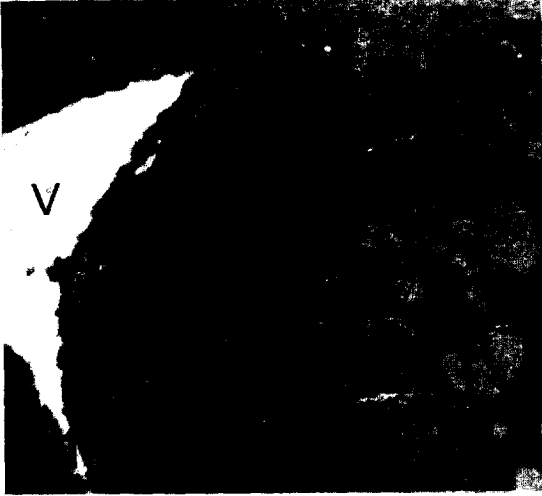
Legends for figures

All the figures are photomicrographs of the caudate nucleus of the rat after carbon monoxide poisoning. The sections are stained histochemically for cytochrome oxidase(CYO), lactate dehydrogenase(LDH) and succinate dehydrogenase(SDH).

- Fig 1.** The CYO activities of control rat show very strong. (×50)
- Fig 2.** The CYO activities of rat after one day show moderate decrease. (×100)
- Fig 3.** The LDH activities of control rat show very strong. (×50)
- Fig 4.** The LDH activities of rat after 16 days show as control. (×100)
- Fig 5.** The SDH activities of control rat show very strong. (×50)
- Fig 6.** The SDH activities of rat after 2 days show moderate decrease. (×100)

All the projecting fiber bundles in the caudate nucleus show pale pink as negative reaction.

CC: corpus callosum. V : lateral ventricle.



참 고 문 헌

1. 채일석. 대기오염물질의 대기중 배출량에 관한 연구. *公衆保健雜誌* 1969;6:33~43.
- 2.鈴木武夫. 一酸化炭素(CO)による大氣汚染の測定と人への影響. *大氣汚染研究* 1972;7:695~743.
3. Robinson E, Robbins RC. Atmospheric background concentrations of carbon monoxide. *Ann N Y Acad Sci* 1970;174:89~95.
4. 이흥식. 일산화탄소중독, 군진수의 단잠지 1976;2:37~48.
5. Ehrich WE, Bellet S, Lewey FH. Cardiac changes from carbon monoxide poisoning. *Am J Med Sci* 1944;208:511~528.
6. Mosinger M, Rochette J. Histological reactions of the lungs after inhalation of certain and toxic gases. *Zentral Gewerbehygiene Unfallverhütung* 1940;27:227~229.
7. Fisher R. Leberparenchymschaden durch chronische CO-intoxikation. *Med Dtsch Arztebl* 1968;65:856.
8. Makiya S, Tahara I, Sugimoto T. Acute renal failure caused by carbon monoxide poisoning. *Surg Ther (Osaka)* 1972;26:223.
9. Campbell JA. Comparison of the pathologic effects of prolonged exposure to carbon monoxide with those produced by very low oxygen pressure. *Brith Exp Path* 1929;103:304~311.
10. Lapresle J, Fardeau M. The central nervous system and carbon monoxide poisoning. II. Anatomical study of brain lesions following intoxication with carbon monoxide. *Progress Brain Res* 1967;24:31~74.
11. Courville CB. The process of demyelination in the central nervous system. IV. Demyelination as a delayed residual of carbon monoxide asphyxia. *J Neuro Men Dis* 1957;125:534~546.
12. Conard FW. *Inorganic syntheses*. Vol 2, N.Y.: McGraw-Hill, 1946:81.
13. Burstone MS. Modifications of histochemical techniques for the demonstration of cytochrome oxidase. *J Histochem Cytochem* 1961;9:59~62.
14. Nachlas MM, Tsou KC, De Souza E. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole, *J Histochem Cytochem* 1957;5:420~436.
15. Chayen J, Bitensky L, Butcher RC, et al. *A guide to practical histochemistry*. Philadelphia: Lippincott Co, 1969:195~203.
16. Laursen AM. Corpus striatum. *Acta Physiol Scand* 1963;59 (suppl.):211.
17. Jacob A. The anatomy, clinical syndromes and physiology of extrapyramidal system. *Arch Neurol Psychiat (Chic)* 1925;13:596~620.
18. Siesjö BK, Johannsson H, Ljunggren B, Norberg K. Brain dysfunction in cerebral hypoxia and ischemia. *Res Publ Ass Nerv Ment Dis* 1974;53:75~112.
19. Kety SS. Circulation and metabolism of human brain in health and disease. *Am J Med* 1950;8:205~217.
20. Smialek M. Cytochrome oxidase activity in isolated giant cell of the reticular formation from the rat brain stem following carbon monoxide intoxication. *Neuropat Pol* 1975;12:397~401.
21. Hoppe B. The structural and histochemical picture of carbon monoxide gliopathy in vitro. *Neuropat Pol* 1974;12:374~385.
22. Szumanska G. Histochemical picture of rat brain in experimental acute carbon monoxide intoxication. *Neuropat Pol* 1973;11:301~314.
23. Lewey FH, Drabkin DL. Experimental chronic carbon monoxide poisoning of dogs. *Am J Med Sci* 1944;208:502~523.
24. Korthals J, Mossakowski MJ, Smialek M. Histochemical and electron microscopic picture of experimental carbon monoxide encephalopathy. *Neuropat Pol* 1973;11:279~300.
25. Miyagishi T, Suwa N. Electron microscopic studies on the cerebral lesions of rats in experimental carbon monoxide poisoning. *Acta Neuropath* 1969;14:118~125.
26. Takeichi M. Electron microscopic observation on occipital lobes of experimentally induced CO poisoning cats. *J Electron Microscopy* 1968;17:87.
27. Hager H, Hirschberger W, Scholz W. Electron microscopic changes in brain tissue of syrian

- hamsters following acute hypoxia. *Aerospace Med* 1961;31:379~389.
28. Hartmann JF, Becker RA, Cohen MM. Cerebral ultrastructure in experimental hypoxia and ischemia. *Monogr Neural Sci* 1973;1:50~64.
29. Debias DA, Banerjee CM, Birkhead NC, et al. Carbon monoxide inhalation effects following myocardial infarction in monkey. *Arch Environ Health* 1973;27:161~167.
30. Eckardt RE, MacFarland HN, Alarie CE, et al. The biologic effect from long term exposure of primates to carbon monoxide. *Arch Environ Health* 1972;25:381~387.
31. Syverteen GR, Harris JA. Erythropoietin production in dogs exposed to high altitude carbon monoxide. *Am J Physiol* 1973;225:293~299.
32. Fogh J. A sensitive erythropoietin assay on mice exposed to carbon monoxide hypoxia. *Scand J Clin Lab Invest* 1966;18:33~44.