

흰쥐 간에 미치는 Ricin의 독성에 대한 조직학적 및 조직화학적 연구

조운복 · 최병태 · 조기진 · 김영기* · 김재호** · 장혜영***
부산대학교 생물교육과, *고신대학교 해부학교실,
경성대학교 생물학과, *고신대학교 생물학과
(1996년 6월 3일 접수)

Histological and Histochemical Study on the Toxicity of Ricin in the Rat Liver

Un-Bock Jo, Byung-Tae Choi, Gi-Jin Jo, Young-Gi Gil*,
Jae-Ho Kim** and Hae Young Jang***

Dept. of Biology Education, Pusan National University, Pusan 609-735

**Dept. of Anatomy, Kosin University, Pusan 602-702*

***Dept. of Biology, Kyungsoo University, Pusan 608-736*

****Dept. of Biology, Kosin University, Pusan 606-701*

(Manuscript received 3 June 1996)

The toxicity of purified ricin from *Ricinus communis* to rats was examined by histological and histochemical methods. Sprague-Dawley rats were injected intraperitoneally with 75µg/Kg body weight of ricin and were sacrificed at intervals of 6, 24, 48 and 120 hours after injection.

The major morphological changes, such as cloudy swelling, hydropic degeneration, necrosis, fatty change, blood congestion, increase of Kupffer cells in number and extension of sinusoids, were obvious in the liver of experimental group. These morphological changes of hepatic cells were mainly observed in both the periportal and midlobular region of hepatic lobule. The extension of sinusoids was obvious in the centrilobular region. And glycogen distribution of hepatic cells tended to decrease in the same region showing morphological changes as compared with the control group.

Key words: Ricin, Rat, Liver

1:서 론

Ricin은 피마자(*Ricinus communis*)의 씨에서 추출한 독성의 lectin으로 세포수준에서의 분자적 기작은 명확히 알려져 있지 않으나 2개의 polypeptide가 단일의 disulfide bond로 연결되어 있으며 chain B는 세포표면인지에 관

여하며 chain A는 ribosome에 작용하여 단백질합성을 불활성화 시켜 결국 세포를 죽게 한다(Simeral et al., 1980; Vitetta et al., 1987; Olsnes, 1987; Endo et al., 1987; Sharon and Lis, 1989). Ricin은 특정 carbohydrate 잔기에 대한 특이성을 가지고 있어 단일항체의 발달과 더불어 암세포를 목표로 화학치료요법

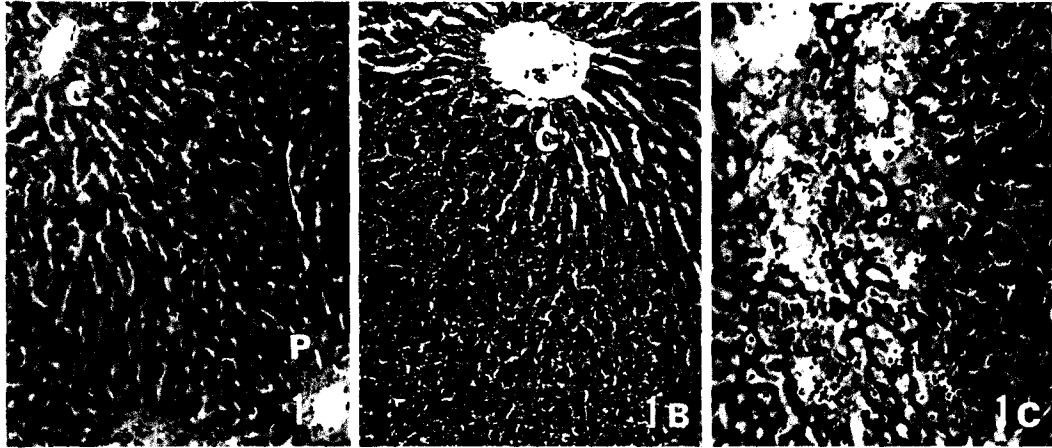


Fig. 1. The liver of rat showing the hepatic cells, central vein(C) and portal area(P) in the control(1A) and experimental groups(1B, 6hr. after injection; 1C, 48 hr. after injection). H-E staining. $\times 100$. Extensive damages including cloudy swelling and hydropic degeneration(1B) and necrosis(1C) showed in the hepatic cells.

의 agent로 주목받고 있다(Simeral et al., 1980; Vitetta et al., 1987; Sharon and Lis, 1989), 이러한 immunotoxin에 대한 연구의 일환으로 Jang 과 Kim(1993)은 한국산 피마자에서 ricin을 분리하였다.

Ricin에 대한 연구는 주로 세포수준의 수용체에 대한 연구로 혈류의 ricin은 간실질세포보다 특정한 수용체를 가진 세망내피계에 의해서 제거되는 것으로 알려져 있으나(Fodstad et al., 1978; Hubbard et al., 1979; Maynard and Baenziger, 1981; Skilleter et al., 1981; Sandvig and Olsnes, 1982; Thorpe et al., 1985), 생체내에 정맥 주사하면 간이나 비장에 신속히 축적되어 이들 기관에 형태적 손상을 입힌다(Thorpe et al., 1985; Kanellos et al., 1988).

독성물질이 동물체내에 들어 왔을때 나타나는 독성발현에 대한 연구 중 동물체의 주요 장기 중의 하나인 간에 대한 조직학적 연구(Recknagel and Anthony, 1959; Smuckler et al., 1962; Taft et al., 1962; Smuckler and Benditt, 1963; Chopra et al., 1972; 이동식 외, 1983)와 간세포내 glycogen양상에 대한 연구(Singhal et al., 1974; Suzuki and Yoshida, 1978; 장영숙 외, 1986) 등이 다수 있다. 이상의 보고를 기초로 한국산 피마

자에서 분리된 ricin을 투여 했을 때 나타나는 간에 대한 독성을 알아 보기 위하여 조직학적 관찰과 더불어 glycogen 분포양상을 조직화학적으로 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. Ricin의 분리

Ricin은 Olsnes와 Phil(1973), Cawley et al.(1978), Lin 과 Li(1980)의 방법을 기초로 다음과 같이 보다 개선된 새로운 방법으로 추출하였다. 피마자(*Ricinus communis*)씨 200g의 껍질을 벗기고 4℃의 5% acetic acid에 overnight로 침지시킨 후 가정용믹서로 파쇄하였다. 먼 형집으로 거른 다음 tissue grinder로 갈았으며 9,800 xg(Beckman, JA-20 rotor)에 20분간 원심분리하였다. 불용해성 지방은 여과지로 걸러 제거하였고 고체 ammonium sulfate를 서서히 첨가하여 30%의 포화도로 만든 후 12,100 xg로 20분간 원심분리한 후 상등액을 60% ammonium sulfate로 적용시키고 다시 원심분리 하였다. 침전물을 10 ml의 증류수에 용해하여 4℃의 0.01M PB(phosphate buffer, pH 7.2)에 36시간 투석시킨 후 투명한 용액을 crude extract로 하였다.

Crude extract를 0.01 M PB(pH 7.2)로 전평형 및 용출시킨 DEAE-cellulose column

흰쥐 간에 미치는 Ricin의 독성에 대한 조직학적 및 조직화학적 연구

Table 1. Histological findings in the liver of rat

Group	Epithelial change				Stromatic change			
	CS	HD	N	FC	KC	ICI	F	PC
C	0>+	0	0	0>+	++	0	0	0
6hr	++	++	±	++	+++	0	0	+++
24hr	+++	+++	++	+++	+++	0	0	++
48hr	+++	+++	++++	+++	+++	0	0	++
120hr	+++	+++	+	+++	+++	0	0	+

Abbreviation: CS, cloudy swelling; HD, hydropic degeneration; N, necrosis; FC, fatty changes; KC, Kupffer's cells; ICI, inflammatory cells infiltration; F, fibrosis; PC, passive congestion; C, control; 0, absent; ±, trace; +, weak; ++, moderate; +++, intensive; +++++, very intensive.

(3X30 cm)에 걸었으며 다시 동결건조시켜 양을 줄인 후 0.14 N NaCl가 함유된 0.01 M PB(pH 7.2)로 평형시키고 동일 buffer로 용출시킨 Sepharose 4B affinity column에 적용시켜 독성의 ricin을 분리하였다.

2.2. 흰쥐의 간에 미치는 ricin의 독성검사

실험동물은 12~15주된 무게 250~300g의 Sprague-Dawley계 흰쥐로서 복강내에 PBS(phosphate buffered saline)를 주사한 대조군과 75µg/Kg의 ricin을 함유한 PBS를 복강내 주사한 후 6시간, 24시간, 48시간 및 120시간이 경과한 실험군으로 나누어 사용하였다. 각 군을 ether로 마취시켜 복부를 절개한 후 간을 절취하여 10% 중성포르말린 용액에 24시간 고정한 다음 수세 및 탈수과정을 거쳐 paraplast(융점, 56℃)에 포매한 후 6µm두께의 파라핀연속절편을 만들었다.

간의 조직학적 구조를 관찰하기 위해 hematoxylin-eosin염색법을, 간조직내 glycogen 검색은 PAS반응법(McManus, 1948)을 사용하였다. 간조직의 조직병리학적 인 변화는 정도에 따라 변화 없는 경우는 0, 흔적적인 변화는 ±, 약한 변화는 +, 중등도의 변화는 ++, 강한 변화는 +++로 나누어 표시하였으며, 간소엽을 중심정맥과 문맥아를 기준으로 하여 간소엽중심대, 중간대 및 문맥아주변대로 나누어 간세포내 glycogen분포를 조사하였으며 과립의 분포정도에 따라 흔적적인 분포는 ±, 소량분포 +, 중등량 분포 ++, 상당량

분포 +++, 다량분포 ++++등 5등급으로 나누어 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 간의 조직병리학적 소견

Ricin을 투여한 후 많은 조직학적 변화를 수반 하는데 간질변화보다 상피성 변화가 심하였으며 이는 Table 1에서 보는 바와 같다.

대조군에서 간세포는 대부분 정상적이었으나 약간의 세포에서 소수의 지방소구 및 약한 혼탁종창(cloudy swelling)이 관찰되었으며 간동양혈관에 Kupffer세포가 중등도로 관찰되었다. Ricin투여 후에는 전 실험군에서 간세포에 심한 혼탁종창과 더불어 대조군에서 나타나지 않던 수포성 변성(hydropic degeneration), 괴사(necrosis) 및 지방변화 등의 상피성변화가 관찰되었다. 괴사는 48시간군에서 가장 현저하다가 120시간군에서 다소 감소한 반면 그의 상피성 변화는 24시간군부터 그 정도가 현저하였다. 이상의 상피성 변화는 간소엽의 중간대와 문맥아주변대에서 주로 관찰되었다. Kupffer세포수는 6시간군부터 모든 시간군에서 증가되었으며 특히 24시간군부터는 동양모세혈관내피에서 분리된 손상된 Kupffer세포가 다수 관찰되었다. 또한 6시간군부터 중심정맥 주변의 동양모세혈관이 확장되었으며 24시간군과 48시간군에서 가장 현저하였다. 간질의 변화는 모든 실험군에서 울혈(blood congestion)만이 관찰되었으며 울혈은 6시간군에서 가장 현저하였

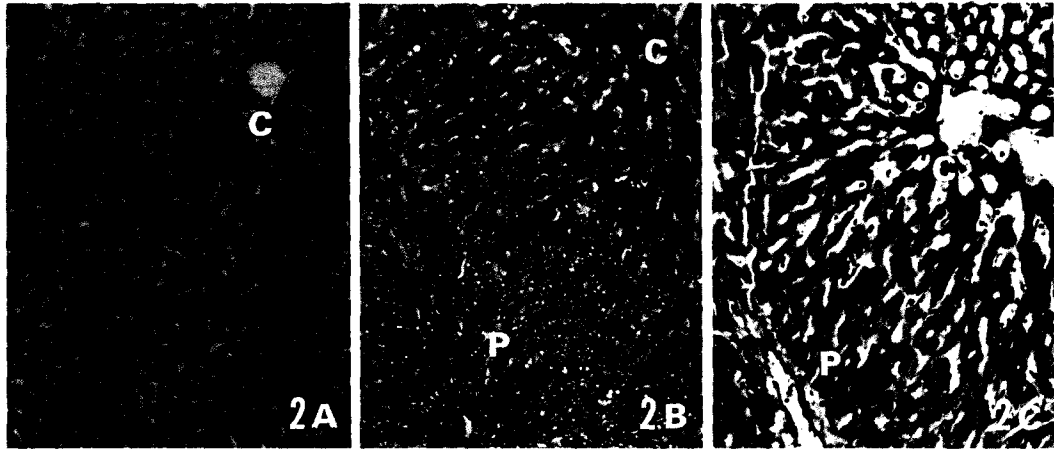


Fig. 2. The liver of rat showing the hepatic cells, central vein(C) and portal area(P) in the control(2A) and experimental groups(2B, 24hr. after injection; 2C, 48 hr. after injection). PAS reaction. $\times 100$. The stainability for glycogen appeared to decrease in the periportal and midlobular regions of hepatic lobule(2B, 2C). The notable extension of sinusoids was observed in the centrolobular region(2C).

다.

Ricin 투여시 간세포에 미치는 영향은 주로 간에 의한 ricin제거에 대한 간세포 수용체연구가 많으며 간실질세포보다는 Kupffer세포와 같은 내피세포에서 선별적인 손상을 보인다고 하였다(Fodstad et al., 1976; Hubbard et al., 1979; Maynard and Baenziger, 1981; Skilleter et al., 1981; Sandvig et al., 1982; Thorpe et al., 1985). Thorpe et al.(1985)와 Kanellos et al.(1988)는 ricin투여시 다른 조직에서는 별반 영향을 미치지 않으나 간, 비장 및 림프절에 영향을 미치며 특히 간에서는 간실질세포에는 영향을 주지 않으나 동양모세혈관세포들에 심한 손상을 준다고 하였다.

다른 이물질투여시 간세포의 변화에 대한 연구를 보면 parathion 투여시 간세포의 조면소포체의 확장 또는 낭상화, 조면소포체의 ribosome탈락 및 지방소적 형성 등의 변화가 일어나며(이동식 외, 1983), 5-FU 투여시는 간세포의 퇴행성 변화, 지방변화 및 동양혈관의 확장 등의 간세포 손상을 일으킨다고 하였다(Sarvin and Martin, 1981). 사염화탄소는 간실질세포에 혼탁종창과 수포성 변성(Smuckler et al., 1962; Taft et al., 1962; Smuckler and Benditt, 1963), 간세포의 피

사 및 지방침착(Recknagel and Anthony, 1959), 간소염 중심대의 지방침착(Chopra et al., 1972)을 일으키며 Jo와 Kim(1994)도 gramoxone을 함유한 식이를 장기간 투여하면 간세포에 혼탁종창 및 지방변성을 형성하며 지방변성이 더 현저하다고 하였다.

이물질이 동물체내에 들어 왔을때 간에 미치는 독성은 물질에 따라 차이가 있으나 간세포의 혼탁종창, 간세포내 소포 및 공포형성, 간세포내 지방침착, 동양혈관 확장 및 간실질의 피사를 일으킬수 있다. Ricin을 투여한 결과 본 실험에서 다른 이물질에 비해 간세포의 혼탁종창 및 수포성변성이 심하며 나아가 간세포의 피사를 유발하는 것으로 보아 ricin의 독성이 강함을 알 수 있다. 그리고 Thorpe et al.(1985)과 Kanellos et al.(1988)의 간세포내 동양혈관세포에 현저한 손상을 나타낸다는 보고와 일치하는데 이는 Hubbard et al.(1979), Maynard와 Baenziger(1981)의 보고처럼 간세포의 세망내피계에 의해 ricin이 제거됨에 그 원인이 있는 것으로 사료된다. 그러나 간실질세포에 명확한 손상을 주지 않는다는 것과는 일치하지 않는데 이는 ricin의 투여량과 실험동물의 표본추출시간의 차이로 보이며 계속적인 연구가 더 필요하다고 생각된다.

Table 2. Glycogen distribution in the liver of rat

Zones	Hours after injection				
	C	6hr	24hr	48hr	120hr
Zone I	++	+>++	±-+>++	±-+>++	+>++
Zone II	++	+>++	±-+>++	±-+>++	+>++
Zone III	+++----	+++----	+++----	+++----	+++----

Zone I, periportal region; Zone II, midlobular region; Zone III, centrolobular region.

Abbreviations are the same as in the Table 1.

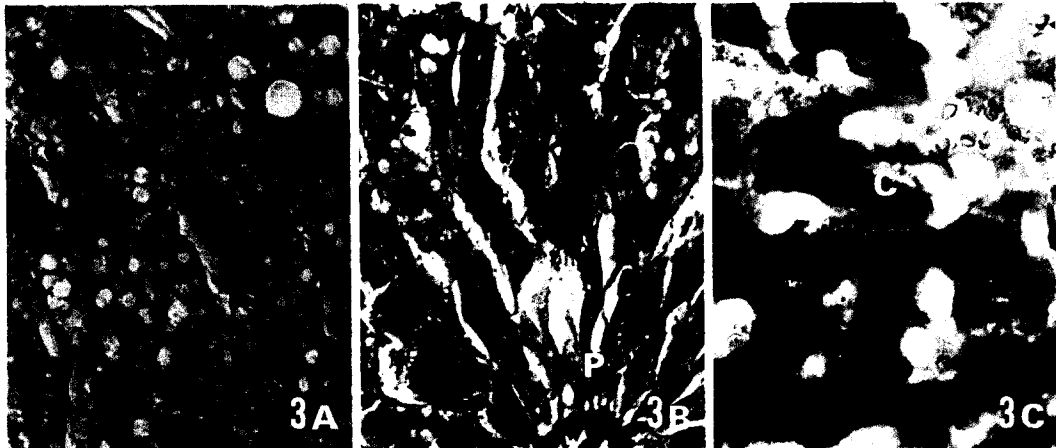


Fig. 3. The higher magnification of liver in the experimental groups(3A, B, and C were 24hr., 48hr. and 120hr. after injection, respectively). PAS reaction. $\times 400$. The fatty changes of hepatic cells occurred severely in the midlobular(3A) and periportal regions(3B), however in the centrolobular region(3C), these changes were not significant.

3.2. 간의 glycogen분포양상

Ricin을 투여한 실험군에서 정상대조군에 비해 간세포의 glycogen분포양상에 현저한 변화가 나타나며 Table 2에서 보는 바와 같다.

간세포의 glycogen분포는 대조군에서 간소엽의 문맥야주변대 및 중간대에는 중등량을, 간소엽중심대에는 중등량 내지 상당량 함유하였다. Ricin투여 후 간소엽 중심대의 glycogen분포에 대한 차이는 없었으나 문맥야주변대 및 중간대에서 대부분의 간세포가 6시간군은 소량을, 24시간군부터는 미량내지 소량을, 120부터는 소량함유하여 대조군에 비해 현저히 감소하였으나 일부 세포는 대조군과

유사한 중등량 함유하고 있었다.

정상적인 간세포에서 glycogen분포양상을 보면 Babcoke과 Cardell (1974)은 절식후 재급식시 간소엽중심대의 간세포가 glycogen침적이 시작되고 문맥야주변대에서 가장 늦게 침적된다고 하였다. 장영숙 외(1986)는 간소엽의 모든 간세포에서 상당량의 glycogen을, 박해춘 (1976)은 간소엽중간대와 중심대는 미량내지 소량이고 문맥야주변대 간세포에는 소량 내지 중등량 glycogen을 함유하며, Jo와 Kim(1994)은 미량 내지 소량 함유하나 문맥야주변대가 더 많다고 하였다. 이상에서 간세포의 glycogen함량이 각 보고에 따라 상이한데 이는

실험전 절식시간에 의한 차이로 보인다.

이물질 투여시 간세포의 glycogen침적에 미치는 영향을 살펴보면 Suzuki와 Yoshida (1978)는 카드뮴을 함유하는 식이에서 간세포의 glycogen변화가 일어나지 않는다고 하였으나 Singhalet al.(1974)은 cadmium chloride주입시 간세포 glycogen이 감소한다고 보고하였다. 또한 5-FU투여 후 glycogen의 감소는 간손상에 의한 것(Sarvin and Martin, 1981)이라고 하였으며 Baribault와 Marceau(1986)는 간세포 성장억제제인 dimethyl sulfoxide (DMSO) 처리시 초기에 glycogen이 감소하나 시간경과에 따라 glycogen함량이 증가하는 것으로 보아 해당과정대사에 영향을 미칠 것이라고 하였다. Jo와 Kim(1994)은 gramoxone처리군의 손상된 간세포에서 glycogen함량이 증가하며 특히 지방변화가 일어난 간세포에 많이 축적된다고 하였다.

본실험의 간소염 문맥야주변대와 중간대의 glycogen침적량 감소는 조직학적 소견에서 이 부위에 지방변화, 혼탁종창 및 수포성변화가 현저한 점으로 보아 Sarvin과 Martin(1981)의 보고와 같이 ricin에 의한 간손상에 기인한 glycogen함량저하로 보이며 Ricin은 간의 다른 부위보다 간소염의 문맥야주변대 및 중간부에 심한 손상을 주는 것으로 사료된다.

4.요 약

S/D계 흰쥐에 피마자(*Ricinus communis*)의 씨에서 추출한 ricin 75 μ g/Kg을 복강내에 주사한 후 6시간, 24시간, 48시간 및 120시간의 실험군을 대조군과 비교한 결과는 다음과 같다.

실험군의 간에서 혼탁종창, 수포성 변성, 괴사, 울혈, 지방변화, Kupffer세포수의 증가 및 중심정맥 주변의 동양모세혈관 확장등을 수반하는데 간세포의 혼탁종창, 수포성 변성, 지방변화 및 괴사는 간문맥주변대와 간소염중간대에서 주로 관찰되었다. Glycogen양은 간문맥주변대와 간소염중간대에서 정상대조군에 비해 현저히 감소하였다.

참 고 문 헌

박해춘, 1976, 생후 발육기에 있는 흰쥐의 간

조직내 glycogen 분포 및 몇종 효소의 분포상태에 관한 조직화학적 연구, 부산의대잡지, 16, 11-22.

이동식, 김숙영, 이규식, 1983, Parathion이 mouse간세포의 미세구조에 미치는 영향, 대한해부학회지, 11, 145-156.

장영숙, 전병득, 이무삼, 1986, 백서에서 비만 세포 탈과립, 간의 당원함량 및 효소활성, 담즙생산에 미치는 compound 48/80의 영향, 대한해부학회지, 19, 329-338.

Babcoke, B.B. and R.R. Cardell, 1974, Hepatic glycogen pattern in fasted and fed rats, Am. J. Anat., 140, 299-338.

Baribault, H. and N. Mareau, 1986, Dexamethasone and dimethyl sulfoxide as distinct regulators of growth and differentiation of cultured suckling rat hepatocytes, J. Cell Physiol., 129, 77-84.

Cawley, D.B., M.L. Hedblom and L.L. Houston, 1978, Homology between ricin and *Ricinus communis* agglutinin: Amino terminal sequence analysis and protein synthesis inhibition studies, Arch. Biochem. Biophysic., 190, 744-755.

Chopra, P., S. Roy, V. Ramalingaswami and N.C. Nayak, 1972, Mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity, Lab. Invest., 26, 716-727.

Endo, Y., K. Mitsui, M. Motizuki and K. Tsurungi, 1987, The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes, J. Biol. Chem., 262, 5908-5912.

Fodstad, Ø., S. Olsnes and A. Pihl, 1978, Toxicity, distribution and elimination of the cancerostatic lectins abrin and ricin after parenteral injection into mice. Br. J. Cancer, 34, 418-425.

Hubbard, A.L., G. Wilson, G. Ashwell and H. StuKenbrok, 1979, An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems

- in rat liver, *J. Cell Biol.*, 83, 47-64.
- Jang, H.Y. and J.H. Kim, 1993, Isolation and biochemical properties of ricin from *Ricinus communis*, *Korean Biochem. J.*, 26, 98-104.
- Jo, U.B. and S.R. Kim, 1994, Alleviating effects of vitamin C on the gramoxone toxicity in rat liver, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23, 380-386.
- Kanellos, J.K., I.F.C. MacKenzie and G.A. Pietersz, 1988, In vivo studies of whole ricin monoclonal antibody immunoconjugates for the treatment of murine tumors, *Immunol. Cell Biol.*, 66, 403-415.
- Lin, T. and S. Li, 1980, Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*, *Eur. J. Biochem.*, 105, 453-459.
- Maynard, Y. and J.U. Baenziger, 1981, Oligosaccharide specific endocytosis by isolated rat hepatic reticuloendothelial cells, *J. Biol. Chem.*, 256, 8063-8068.
- McManus, J.F.A., 1948, Periodic acid Schiff's reaction, *Stain Tech.*, 23, 99-108.
- Olsnes, S., 1987, Closing in ricin action, *Nature*, 328, 474-475.
- Olsnes, S. and A. Phil, 1973, Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibitory protein synthesis, *Biochemistry*, 12, 3121-3126.
- Recknagel, R.O. and O.D. Anthony, 1959, Biochemical changes in carbon tetrachloride fatty liver: Separation of fatty changes from mitochondrial degeneration, *J. Biol. Chem.*, 234, 1052-1059.
- Sandvig, K. and S. Olsnes, 1982, Entry of the toxic proteins abrin, modeccin, ricin and diphtheria toxin into cells, *J. Biol. Chem.* 257, 7504-7513.
- Sarvin, R.A. and E.W. Martin, 1981, The relationship of the possible hepatic toxicity of chemotherapeutic drugs and carcinoembryonic antigen elevation, *Cancer*, 47, 481.
- Sharon, N. and H. Lis, 1989, *Lectins*, Chapman and Hall Ltd., New York, 33-34pp.
- Simeral, L.S., W. Kapmeyer, W.P. MacConnell and N.O. Kaplan, 1980, On the role of the covalent carbohydrate in the action of ricin, *J. Biol. Chem.* 255, 11098-11101.
- Singhal, R.L., Z. Merall, S. Kacew and D.J. B. Sutherland, 1974, Persistence of cadmium-induced metabolic changes in liver and kidney, *Science*, 183, 1094.
- Skilleter, D.N., A.J. Paine and F. Stirpe, 1981, A comparison of the accumulation of ricin by hepatic parenchymal and non-parenchymal cells and its inhibition of protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 677, 495-500.
- Smuckler, E.A., O.A. Iseri and E.P. Benditt, 1962, An intracellular defect in protein synthesis induced by carbon tetrachloride, *J. Exp. Med.*, 116, 55-71.
- Smuckler, E.A. and E.P. Benditt, 1963, Carbon tetrachloride poisoning in rats; Alteration in ribosomes of the liver, *Science*, 140, 308-310.
- Suzuki, T. and A. Yoshida, 1978, Long-term effectiveness of dietary iron and ascorbic acid in the prevention and cure of cadmium toxicity in rats, *Am. J. Clin. Nutr.*, 31, 1491-1498.
- Taft, E.B., J.F. Scott and J.B. Caufeld, 1962, Acute carbon tetrachloride effects in mouse liver, *Fed. Proc.*, 21, 302-306.
- Thorpe, P.E., S.I. Detre, B.M.J. Foxwell, A. N.F. Brown, D.N. Skilleter, G. Wilson,

J.A. Forrester and F. Stirpe, 1985, Modification of the carbohydrate in ricin with metaperiodate-cyanoborohydride mixtures, Eur. J. Biochem, 147, 197-206.

Vitetta, E.S., R.J. Fulton, R.D. May, M. Till and J.W. Uhr, 1987, Redesigning nature's poisons to create anti-tumor reagents, Science, 238, 1098-1104.