한국전자현미경학회지 제 32 권 제 3 호 2002
Korean J. Electron Microscopy 32(3), 205~211(2002)

납으로 유발된 흰쥐 신장 독성에 대한 키토산의 효과

김 영 호, 노 영 복*
조선대학교 자연과학대학 생물학과

Effects of Chitosan on the Rat Nephrotoxicity Induced by Lead

Young-Ho Kim and Young-Bok Roh*
Dept. of Biology, College of Natural Science, Chosun University
(Received May 3, 2002; Accepted July 27, 2002)

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect the lead toxicity of chitosan on the rats. A healthy male of Wistar rat was used for experiment. The lead acetate (30 mg/kg, Pb) was injected two times per a week into the abdomen. 0.1% chitosan solution (1 mg/ml) was supplied by feeding *ad libitum*. After 4 or 8 weeks, we was observed kidney by electron microscope. The experimental groups were divided into two groups. Group 1 was control group which was not treated with chitosan solution after contaminatation of lead acetate. Group 2 was experimental group which was treated with chitosan solution after contamination of lead acetate. All groups were used to 10 rats.

The results were as follow:

On the proximal convoluted tubules of the group with only Pb, the number of microvillis were decreased and the number of lysosomes were increased on the cytoplasm. The mitochondria and rough endoplasmic reticulum were extended and ribosomes dropped from the rough endoplasmic reticulum. On the proximal convoluted tubules of the group with Pb chitosan, the shapes and number of microvilli were not changed and the number of lysosomes were decreased. The shapes of mitochondria and endoplasmic reticulum observed not changes.

We concluded that chitosan has effect on reducing toxicity of lead in the rat kidney.

Key words : Chitosan, Lead, Rat kidney

서 론

납(Pb)은 우리 생태계 내에 다양한 농도로 존재하면서 미량으로도 독성을 일으킬 수 있는 물질로써 환경 중에서 물, 음식, 토양 등을 통해 일반적으로 접하게 된다. 납은 체내에 축적되었을 때 생체 기능 장해를 일으키는 환경독성물질로 보고되어 있다(Ma-

* Correspondence should be addressed to Dr. Young-Bok Roh, Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, 375, Seosuk-dong, Gwangju, 501-759, Korea. Ph.: 062-230-6654, FAX: 062-230-7984, E-mail:ybno@chosun.ac.kr
Copyright © 2002 Korean Society of Electron Microscopy

haffey, 1981; Woods, 1982; Karmakar et al., 1986; Rehm, 1990; Yum et al., 1995). 납중독은 공중위생환경과 관계가 있어 도시 내의 오염된 환경에서 생활하는 어린이들에게 두뇌발달 저하 등의 치명적인 손상을 일으킬 수 있다(Press, 1977). 납중독시에는 빈혈 등의 혈액장해, 식욕부진, 변비 등의 소화기 증상, 신경계 및 신장(Klauder & Petering, 1977; Karmarkar, 1986; Russo, 1988) 등에 심한 장해가 나타나며, 특히, 소아의 납중독은 기능저하 등의 중추신경증상을 나타낸다. 또한, 납은 적혈구의 수명을 단축시키고, heme의 생합성을 저해하고, 기타 철의 이용 및 적혈구 내에서의 globin 합성을 억제한다(Six & Goyer, 1972; Fonia et al., 1995).

중금속을 제거하는데 사용되어지는 것으로는 EDTA (Zinterhofer et al., 1971), 마늘(song et al., 1986), 양파즙(Ym, 1991) 등 화학약품과 자연식품을 이용한 많은 논문이 발표되어 있다. 최근, 학계에서 널리 연구가 되어지고 있는 물질 중 키토산이 있다. 키토산은 생체에 무독성이며(Kim & Roh, 2001), 2-amino-2-dwoxy-D-glucose의 단위로 금속 이온과 키토산 사이에 2당 잔기당 1개의 아미노기에 1개의 금속양이온과 2개의 음이온과 1개의 물분자가 배치된 착화모형을 나타낸다(Tong et al., 1991). 이러한 착화제 특성으로 인하여 2가 양이온을 흡착하는 성질이 있어 방사성동위원소 및 중금속의 흡착제로서 작용한다(Skjak et al., 1988; Kim et al., 1997, 1999). 최근 키토산은 인공피부(Hirano et al., 1991), 항암작용(Okamoto et al., 1995), 상처치료제(Tsurutani et al., 1995), 키틴분해효소 및 식물세포의 활성화제(Koga., 1993), 화장품(Skjak et al., 1998), 의약품 전달 및 면역보조제 등(Tokura et al., 1992) 여러 분야에 걸쳐 활발하게 이용 혹은 연구되어지고 있다.

본 실험에서는 쥐에 납을 투여한 후 키토산을 처치하였을 때 키토산이 납중독에 의한 신장 독성을 억제하는지의 여부를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 실험동물은 샘타코에서 생산, 공급하고 있는 Wistar계 수컷 쥐(250~350 g)를 구입하였다. 실험군은 다음과 같다. 실험군의 경우 Group 1은 납 중독 후 키토산용액을 처치하지 않은 군, Group 2는 납 중독 후 키토산용액을 처치한 군으로 각 군당 10마리의 쥐를 사용하였다. 실험 후 4주, 8주 경과 후 각각의 실험군에서 신장을 적출하여 전자현미경적 관찰을 실시하였다. Lead acetate (30 mg/kg)는 1주 2회 복강 투여하였으며, 0.1% 키토산 수용액(1 mg/ml) 투여군의 경우는 *ad libitum* 방식으로 공급하였다.

적출된 신장은 1 mm^3 크기로 세절하여 2% Glutaraldehyde (pH 7.4, 0.1 M Cacodylate완충액) 용액으로 4°C에서 2시간 전고정하고, 동일 완충액으로 15분씩 3회 수세하였다. 1% Osmium tetroxide 용액(4°C, pH 7.4, 0.1 M Cacodylate완충액)으로 1시간 동안 후고정하고 동일 완충액으로 15분씩 3회 수세하였다. 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ethanol에서 각 20분씩 1회, 100% ethanol로 20분씩 3회 탈수시켰다. Propylene oxide로 25분간 3회 치환하였으며 Propylene oxide : Epon 812를 1 : 1의 비율에서 3시간, 1 : 2에서 3시간, Epon mixture 원액에서 하룻밤 포매하여 oven에 넣어 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 열중합하였다. Ultramicrotome (MT-7000)을 이용하여 1 μm두께의 준초박절편을 만들어 1% Toluidine blue로 염색한 후 LM으로 관찰하여 특정 부위만을 남겨놓고 나머지 부분을 삭정하였다. Diatome으로 60 nm 두께의 초박절편을 만들어 Uranyl acetate와 Lead citrate로 이중 염색하여 JEM-100CX II형 전자현미경(80 kV)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

Group 1의 경우 : 4주군에서 핵은 둥근 형태로 보였으며, 긴 미세융모가 약간 팽창되었다. 그리고 사립체는 팽대되었고, 일부 과립형질내세망에서 수조의 팽대와 리보솜의 탈락이 관찰되었다(Fig. 1). 8주군에서 핵은 둥근 형태였으며, 미세융모의 수가 더욱 감소되었다. 그리고 액포의 수가 증가되었으며, 사립체에서는 팽대로 인한 내부 능선의 파괴가 관찰되었다.

용해소체의 수가 증가되었으며 과립형질내세망의 수조가 심하게 팽대되었고, 리보솜의 탈락이 관찰되었다(Fig. 3).

Group 2의 경우 : 4주군에서 핵과 미세융모는 정상적인 형태를 보였으며, 사립체는 기다란 형태로 다수 존재하였다. 그리고 리보솜이 부착된 정상적인 형태의 과립형질내세망이 관찰되었다(Fig. 2). 8주군에서 핵은 둥근 형태로 존재하였으며, 긴 미세융모가 빽빽하게 배열되어 있었다. 사립체는 약간 팽대된 타원형의 형태로 나타났으며 용해소체의 수가 감소되었다. 또한 과립형질내세망의 내강이 약간 확장된 상태로 관찰되었다(Fig. 4).

납 투여시 여러 장기에서 나타나는 병변에 대한 보고를 보면 Wapnir et al. (1979)은 초산납(20 mg/kg)을 복막내 투여하였을 경우 성장율이 지연되고 glucose의 장내 흡수율이 감소되며 또한 Na과 K의 수송, 아미노산 수송이 감소되고, 신장내 Alkaline phosphatase도 감소된다고 보고하였다. Press (1977)는 납중독시 뇌 전체에 걸쳐 출혈성 상해가 나타나며 유동액이 축적되어진 뇌부종 증상을 보인다고 보고하였으며, 소뇌내에 과립상 층, 혈관외 적혈구, 세포외 공간이 확대되어진 뇌장애의 특징적 상해를 나타냈다고 보고하였다. P'an & Kennedy (1989)는 납 10, 20 mg/kg을 투여한 후 여러 조직과 뇨, 변에서의 납 분포를 조사한 결과 10 mg/kg에 노출된 경우 신장의 납 함량은 혈액내 납 수준과 관계가 있는 반면에 20 mg/kg에 노출된 경우는 신장의 납 함량이 뇨의 납 수준과 상관관계가 있다고 보고하였다.

이와 같이 임상학적 측면에서의 연구들은 많이 보고 되어 있으나, 신장에서의 미세구조적 연구는 매우 드문 상태이고(Mahaffey et al., 1981; Karmakar, 1986; Russo, 1988), 더욱이 키토산을 이용한 납 독성 감소에 관한 미세구조적, 형태학적 및 조직학적 연구는 거의 없는 실정이어서 신장조직에서의 키토산이 납을 제거하는 효과를 조직학적으로 밝히고자 본 연구를 실시하였다.

Russo et al. (1988)은 초산납(600 ppm)을 26주간 투여하였을 때 납이 축적된 것으로 보이는 작은 미립자들이 매우 높은 전자밀도로 나타났고, 근위세관에는 미립자들이 분포되어 있다고 보고하였다. 또한 기저막내에는 전자밀도가 높은 납 미립자들이 커다란 덩어리로 나타나고, 상피세포 핵내에서 작은 뭉치 또는 독특한 미립자가 나타나고 세포질에 함입체나 액포가 나타난다고 보고하였다. Kim (1994)은 0.5%의 초산납을 2일, 1, 2, 4, 6, 8주별로 관찰한 결과 내형질세망이 확장되고 공포화 현상이 나타나며, 세포질내에 커다란 낭성공간이 형성되거나 세포막의 파괴가 나타난다고 보고하였다. 또한 미토콘드리아의 부종과 능선의 소실이 관찰되며 다수의 이차 리소좀들이 관찰된다고 보고하였다. 핵의 변화는 6주와 8주군에서 확실히 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 30 mg/kg 초산납을 4주, 8주간 투여하였을 때 Kim (1994)의 결과와 비슷하게 미토콘드리아와 과립형질내세망이 팽태현상이 관찰되었으나 핵의 변화는 관찰되지 않았다. Yum et al. (1995)은 염화제이수은($HgCl_2$)과 중크롬산칼륨($K_2Cr_2O_7$)을 피하주사한 후 6시간, 3일, 2주별로 관찰한 결과 시간이 지남에 따라 미세융모의 소실, 상부세포질에 커다란 액포의 증가, 과립형질내세망의 수조 확장 및 리보소체의 이탈, 사립체의 변화 등이 관찰되었다고 하였다. 본 연구에서는 30 mg/kg 초산납을 4주, 8주간 투여하였을 때 Yum et al. (1995)의 결과와 비슷한 조직 변화가 나타났다. Hoang (1985)은 Methyl 수은과 마늘을 10주간 투여하였을 때 마늘 6.7%에서는 근위세뇨관 상피에 경도의 변성변화와 세뇨관 내강에 소수의 원주가 관찰되었고 마늘 8.0%에서는 정상적인 소견을 나타냈다고 보고하였다. 본 연구에서는 0.1% 키토산을 투여한 군에서 거의 정상적인 미세구조를 보여 중금속에 대해 마늘과 비슷한 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 키토산 섭취가 신장에 독성을 야기하는 납을 흡착하여 체외로 배설시킴으로써 납 중독을 완화시키는 효과가 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

Fonia O: Down regulation of hepatic peripheral type benzodiazepine receptors caused by acute lead intoxication. Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmarcol 293 : 335 339, 1995.

Hirano SM, Iwata K, Nakayama H, Toda H: Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan-oligosaccharides intravenously in rabbit. Agric Biol Chem 55 : 2623 2625, 1991.

Karmakar N, Saxena R, Anand S: Histopathological changes induced in rat tissues by oral intake of lead acetate. Enviro Res 41 : 23 28, 1986.

Kim BK, Lee SS, Ahn KD, Lee BK: Provocative chelation test with DMSA in lead workers. Soonchunhyang J of Ind Med 2(1) : 53 60, 1996.(Korea)

Kim YH, Roh YB: Ultrastructural study of the liver by chitosanoligosaccharide administration in rat. Kor J Elect Micrp 31(4) : 385 392.

Kim YH, Bom HS, Kim KY, Kim HK, Kim JY: Inhibitory effect of chitosan on the milk transfer of radiostrontium from contaminated mice to their sucklers. Kor J Chitin Chitosan 4 : 15 18, 1999.

Kim YH, Bom HS, Kim JY, Roh YB: The effect of calcium and chitosan metabolism to the excretion of radiostrontium in mice. J Kor Asso Radiat Prot 22 : 9 14, 1997.

Klauder DS, Petering HG: Anemia of lead intoxication, A role for copper. J Nutr 107 : 1779 1785, 1977.

Koga D: Induction of chitinase for plant self defense. Chitin/Chitosan symposium, in Japan Chitin/Chitosan research 4 26, 1993.

Mushak P, Crocetti AF: Determination of numbers of lead exposed american children as a function of lead soured, integrated summary of a report to the U. S. congress on childhood. Environ Res 50 : 210 229, 1989.

Okamoto Y, Ohmi H, Minami S, Muhashi A, Shigemasa Y, Okumura M, Fujinaga T: Anti tumor effect of chitin and chitosan on canine transmissible sarcoma. Chitin/Chitosan symposium, in japan chitin/Chitosan research 1 : 76 77, 1995.

P'an, AYS, Kennedy C: Lead distribution in rats repeatedly treated with low doses of lead acetate. Environ Res 48 : 238 247, 1989.

Press MF: Lead Encephalopathy in Cildren. Am J Pathol 86 (2) : 485 488, 1977.

Rehm S, Waalkes MP: Acute cadmium chloride induced renal toxicity in the syrian hamster. Toxicol Appl Pharma 104 : 94 105, 1990.

Russo MA, Kapoor SC, Von Rossum GD: Localization of lead in the kidney and liver of rats treated *in vivo* with lead acetate, ultrastructural studies on unstained sections. Br J Exp Path 69 : 221 234, 1994.

Six MK, Goyer RA: The influence of iron deficiency on tissue content and toxicity of ingested lead in the rat. J Lab Clin Med 79(1) : 128 136, 1972.

Skjak G, Anthonsen T, Sandford P: Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. Elsevier Applied science 1988.

Song TB, Bae ES, Yum YT: A study on the effect of garlic and 2, 3 Dimercaptosuccinic acid on the cadmium posoning of pregnant rat. J Korea Med 24(1) : 237 245, 1986.

Tokuar S, Miura Y, Kaneda Y, Uraki Y: Drug delivery system using biodegradable carrier. Chitin/Chitosan research 314 324, 1992.

Tong P, Baba Y, Adachi Y, Kawazu K: Adsorption of metal ions in a new chelating ion exchanges resin chemically derived from chitosan. Chemistry Letters 1529 1532, 1991.

Tsurutani R, Yoshimura M, Tanimoto N, Hasegawa A, Kifune K: Clinical application of chitin materials to ulcers. Chitin/Chitosan symposium, in Japan Chitin/ Chitosan research. 1 : 78 79, 1995.

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 94(1) : 144 151, 1979.

Woods JS, Fowler BA: Selective inhibition of δ aminolevulinic acid dehydratase by indium chloride in rat kidney, biochemical and ultrastructural studies. Exp Mol Pathol 36 : 306 315, 1982.

Ym HJ: Effect of onion juice inhibition of lead absorption and detoxication of liver in growing rats. M Sc Thesis Degree, Chosun University, 1991.(Korea)

Yum KS, Park KH, Yang NK, Ahn LT, Ko JS: Ultrastructural influence of heavy metallic agents on the proximal convoluted tubule of mice. J Soonchunhyang Med 1(2) : 719 733, 1995.(Korea)

Zinterhofer LHM, Jatlaw PI, Fappiano A: Atomic absorption determination of lead in blood and urine in the presence of EDTA. J Lab Clin Med 78(4) : 664 674, 1971.

<국문초록>

본 연구의 목적은 납 중독된 쥐의 신장에서 키토산

효과를 연구하고자 하였다.

납(30 mg/kg)은 1주 2회 복강투여하고, 0.1% 키토산(1 mg/ml) 수용액은 음용수를 통해 자유자재로 공급하였다. 실험 후, 4주, 8주째에 각각의 신장을 적출해서 투과전자현미경으로 관찰하였다. 실험군의 경우 Group 1은 납 중독 후 키토산용액을 처치하지 않은 군, Group 2는 납 중독 후 키토산용액을 처치한 군으로 각 군당 10마리의 쥐를 사용하였다. 실험 결과는 다음과 같다.

납 단독투여군의 경우 세뇨관 세포에서 미세융모의 소실이 나타났으며 용해소체가 증가되었다. 사립체 및 과립형질내세망 수조 내강의 팽대와 과립형질내세망으로부터 리보솜의 탈락이 관찰되었다.

납 키토산 투여군의 경우 세뇨관 세포에서 미세융모의 변화는 없었으며 용해소체의 수가 감소되었다. 기다란 모양의 사립체와 리보솜이 부착된 과립형질내세망이 정상적인 상태로 관찰되었다.

결론적으로, 키토산이 쥐의 신장에 미치는 납의 독성을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

FIGURE LEGENDS

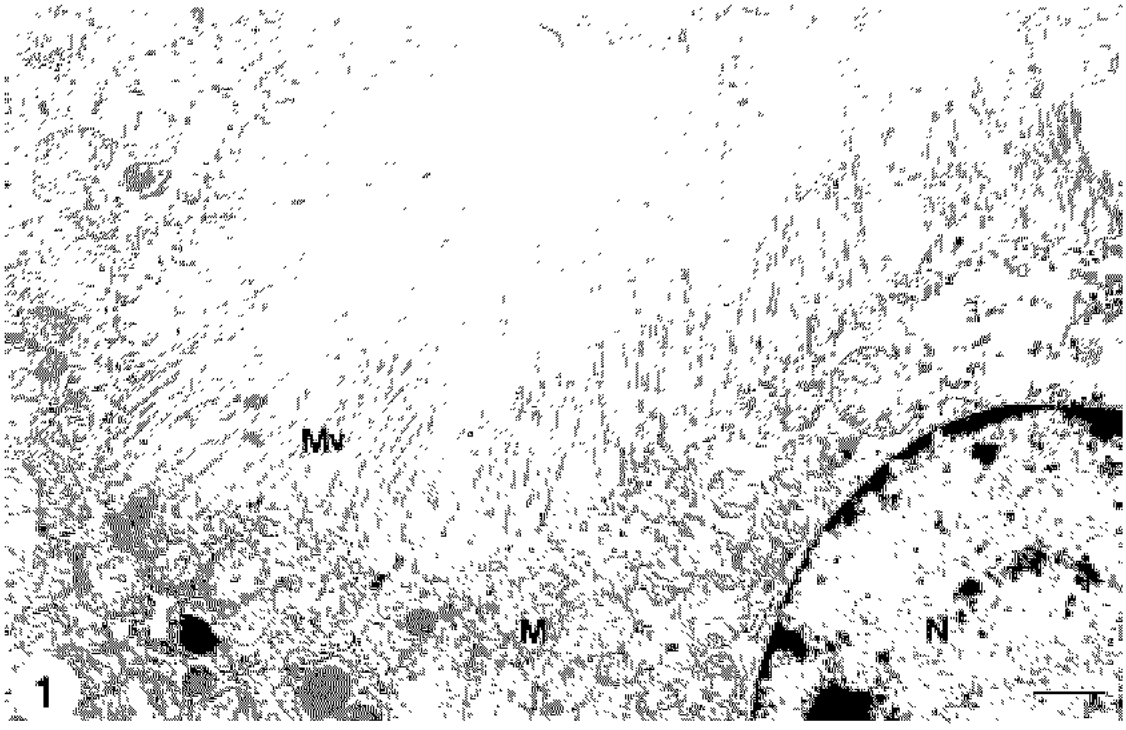
*All bar indicate 1 μm.

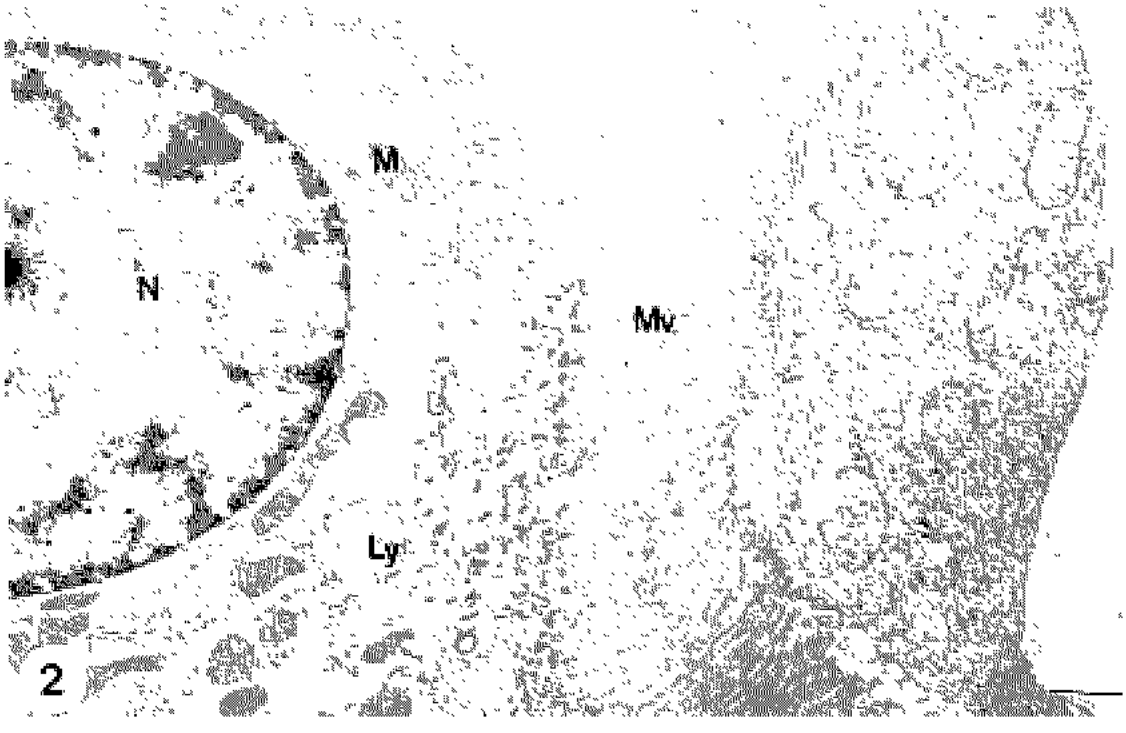
Fig. 1. An electron micrograph of proximal renal tubules from cell rat 4 weeks after treatment with lead. microwilli (Mv), mitochondria (M), lysosome (Ly), rough endoplasmic reticulum (rER) and Nucleus (N).

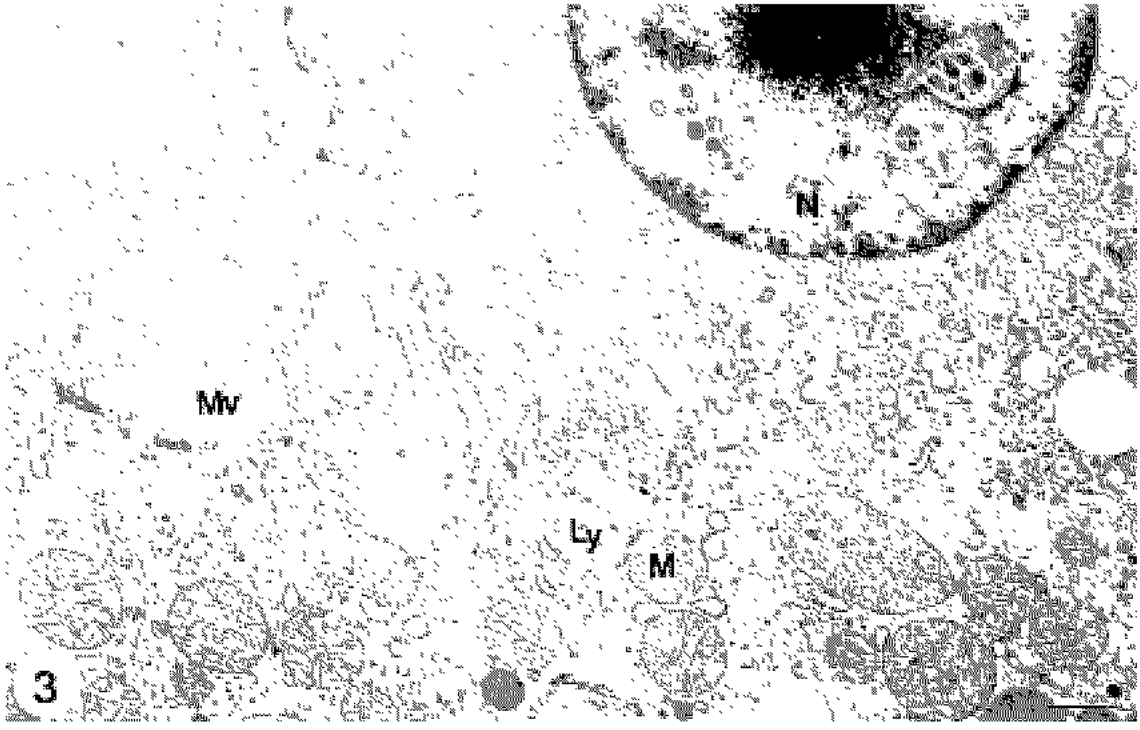
Fig. 2. An electron micrograph of proximal renal tubules cell from rat 4 weeks after treatment with lead and Chitosan.

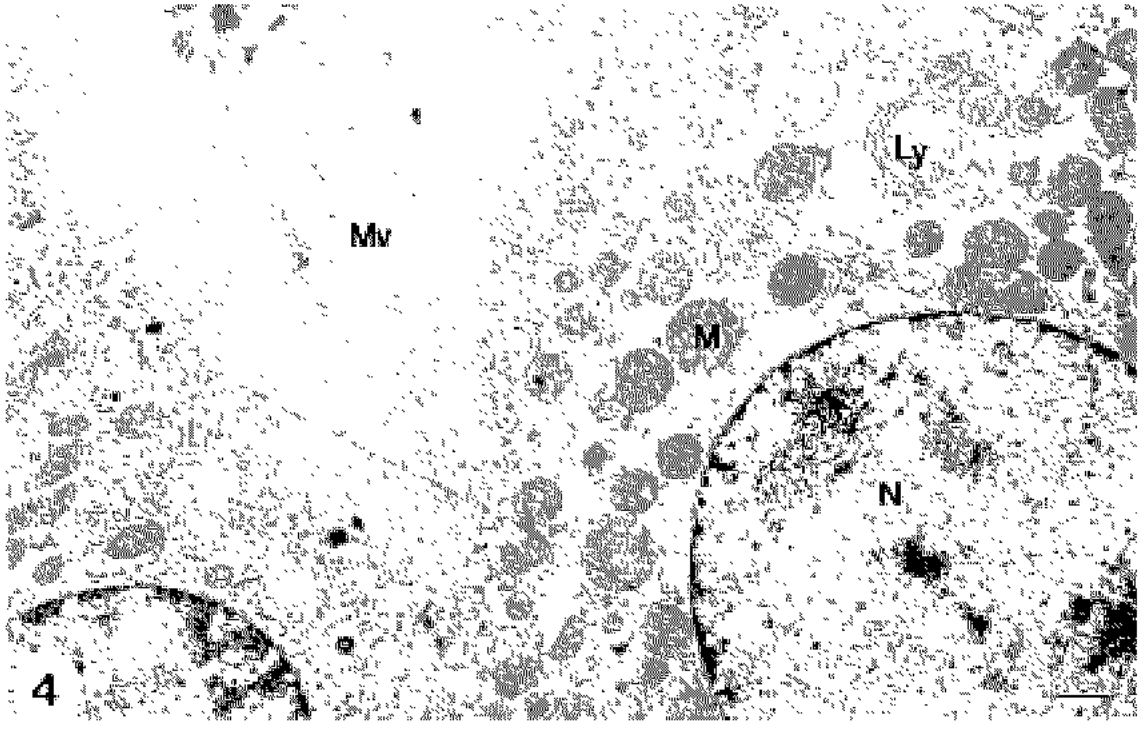
Fig. 3. An electron micrograph of proximal renal tubules cell from rat 8 weeks after treatment with lead.

Fig. 4. An electron micrograph of proximal renal tubules cell from rat 8 weeks after treatment with lead and Chitosan.


Mv
M
N
1


M
N
Mv
Ly
2


N
Mv
Ly
M
3


Ly
Mv
M
N
4