

## 발생중인 흰쥐 간에서의 Metallothionein 발현에 관한 면역세포화학적 연구

오승한, 안영모, 신길상, 김완중\*  
순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

### **Immunocytochemistry of Metallothionein Expression in Developing Rat Liver**

Seung-Han Oh, Young-Mo Ahn, Kil-Sang Shin and Wan-Jong Kim\*

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University,  
Chungnam, Asan 336-745, Korea

(Received July 2, 2004; Revised July 18, 2004; Accepted August 8, 2004)

#### **ABSTRACT**

Metallothionein (MT) is a family of ubiquitous, low molecular weight (6-7 kDa), cysteine-rich protein with a high affinity to metal ions and has no aromatic amino acids and histidine. Some of the known functions of MT include detoxification of heavy metals and alkylating agents and neutralization of free radicals. Also, this protein may affect a number of cellular processes including gene expression, apoptosis, proliferation and differentiation. But, its actual functions are still not clear. The present study was undertaken to examine immunocytochemically the localization of MT in developing rat liver. On the day 11 of gestation, the fetal rat liver has already been formed and contained numerous oval cells with high nuclear cytoplasmic ratio, which were the progenitors of hepatic parenchymal cells, but no reaction products of MT were detected at this time. And then, positive reactions against MT started to appear predominantly in the parenchymal cells of liver from the 13th day after gestation. Reaction products, immunogold particles or brown coloration, were localized at both the nucleus and the cytoplasm of the parenchymal cells, except mitochondria. The intensity of this reaction gradually increased, and exhibited the strongest at birth. The intensity of MT staining and immunogold labelling diminished with growth, and by the 15th day after birth weak positive reaction was observed in the cells. In brief, positive reactions for MT were observed in the oval cells and the parenchymal cells during fetal stage, meanwhile they were present only in the parenchymal cells after birth. The present results suggest that MT possibly involves parenchymal cell proliferation and differentiation through the storage or the supply of various metal ions in the developing rat liver.

**Key words** : Immunogold labelling, Metallothionein (MT), Rat liver

---

이 논문은 2002년도 순천향대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행되었음.

\* Correspondence should be addressed to Dr. Wan-Jong Kim, Department of Life Science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Chungnam, Asan 336-745, Korea. Ph.: (041) 530-1251, FAX: (041) 530-1256, E-mail: wjkim5609@empal.com

## 서 론

Metallothionein (MT)은 카드뮴, 아연 혹은 구리와 같은 2가 양이온들과 결합하고 있는 단백질로서, 특히 척추동물의 간, 신장 및 장에 많이 분포하고 있으며, 분자량이 6,000~7,000 dalton 정도인 저분자량의 단백질로 주로 세포질 내에 존재하고 있다 (Banerjee et al., 1982). 전체 아미노산의 22~23% 정도가 시스테인들로 이루어져 있는 비효소적 단백질 (nonenzymatic protein)이며, 방향족 아미노산들과 히스티딘이 존재하지 않는 것으로 밝혀져 있다 (Dunn et al., 1987). 사람의 경우 MT 유전자군의 염색체 좌위는 16q13인 것으로 알려져 있고, 이 단백질의 iso-form들로서 모든 기관들에 분포하는 MT-1과 MT-2가 있으며, 뇌에서 주로 발현되는 MT-3, 그리고 중추 편평상피조직에 분포하는 MT-4 등이 있다 (Haq et al., 2003).

MT의 기능은 필수 금속이온의 항상성 유지, 카드뮴이나 수은과 같은 중금속에 대한 해독작용이나 여러 화학물질들의 독성에 대한 방어작용을 하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 대사과정의 산물로 생성되는 자유기 (free radical) 혹은 ROS (reactive oxygen species)를 제거하는 기능도 있으며, 세포 간의 G1 및 S기에 구리이온 등을 세포질에서 핵내로 수송함으로써 DNA 합성 및 세포분열 과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (Deung et al., 1994; Klaassen et al., 1999; Romero-Isart et., 2002).

한편, 흰쥐 간은 배발생 9일경에 간 계실 (liver diverticulum)이 형성되기 시작하여, 간 세포들의 증식에 의해 중배엽내로 확장하여 조혈세포들이 이주하며, 발생 13일 경에는 조혈작용이 일어난다. 발생 15일 경에 담세관과 보세혈관의 분포가 뚜렷해지며, 간의 형태형성과 성장이 빠르게 진행된다는 사실은 이미 잘 알려져 있다 (Petkov et al., 2004).

현재까지 국내외적으로, 중금속에 노출된 조직이나 다양한 종류의 암조직에서 이루어진 MT 분포에 관한 면역화학적 연구들은 대부분 광학현미경적 수준에서만 이루어져 왔으며, 발생중인 간 조직 내 MT 분포에 대한 대부분의 연구들도 특정한 발생단계에 한정되어 이루어져 왔다. 특히 발생중인 흰쥐 간에서 일련의 시

간적 연속성을 가지고 전자현미경 수준에서 금 입자 표지법으로 조사된 경우는 매우 드물다.

본 연구는 MT가 세포분열 혹은 세포증식과 연관이 있을 것이라는 보고들을 기초로 하여, 간의 발생과정을 형태학적으로 관찰하였고, 발생중 혹은 출생후 성장중인 흰쥐 간 조직에서 MT의 분포를 세포화학적 방법을 이용하여 조사함으로써, 흰쥐 간 발생에 관련된 MT의 기능을 알아보고, 이들의 상관성을 고찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 연구에 사용된 실험동물은 생후 6주 이상 경과한 Sprague-Dawley 계통의 흰쥐로서, 온도와 습도가 일정하게 조절된 동물사육실내에서 시판중인 고품사료와 물로 보름동안 기초사육하였다. 오후 7시에 암, 수의 비율을 4:1로 합사시켜 다음날 오전 9시에 질도 말법으로 임신을 확인하였다. 정자가 확인된 날을 임신 0일로 정하였고, 임신한 쥐는 격리하여 사육하였다. 임신 11일째부터 출생 직전까지 수일 간격으로 흰쥐를 희생시켜 자궁에서 배아를 적출하여 해부현미경 하에서 간을 분리하였고, 출생 후의 흰쥐는 육안으로 간을 분리해내었다.

### 2. 미세구조 관찰 및 면역 세포화학 표본 제작

발생중인 흰쥐 간 세포의 미세구조를 관찰하기 위하여 적출된 간 조직을 4% glutaraldehyde와 1% OsO<sub>4</sub>에 각각 고정된 후, 세척하여 Epon 혼합액에 포매하고, 초박절편을 제작하였다. 초박절편은 Uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과 전자현미경 (JEOL-1010)으로 관찰하였다.

한편, 세포내 MT의 분포와 위치를 전자현미경으로 관찰하기 위하여 면역 금 입자를 표지하는 면역 세포화학적 방법을 실시하였다. 반응액의 침투가 용이하도록 표본의 크기를 1mm<sup>3</sup> 이하로 세절하여 4°C에서 2% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde 용액에 2시간동안 고정된 후, sodium cacodylate buffer로 세척

하고, ethanol 농도 상승순으로 탈수한 후 LR White 혼합액에 포매하여 중합시켰다. 블록을 ultramicrotome 으로 초박절편한 후 nickel grid 위에 mount하여 반응액들로 처리하였다. 우선 항체에 대한 비특이적 반응을 막기 위해 토기 혈청으로 20분간 처리하고, 50배 희석된 MT에 대한 1차 항체를 4°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후 immunogold buffer로 세척하고, immunogold buffer로 희석시킨 10 nm gold-conjugated goat anti-mouse IgG를 2시간동안 처리하였다. Uranyl acetate와 lead citrate로 대조 염색하여, 투과 전자현미경 (JEM-1010 TEM)으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 전자현미경적 관찰

발생과 성장과정에서 흰쥐 간 세포의 미세구조적인 변화를 관찰하기 위해 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 11일된 배아의 간에서 다수 관찰되는 난형 세포 (oval cell)는 핵/세포질 비(nuclear cytoplasmic ratio)가 크고, 핵이 둥글며, 인이 1개 이상 발달하였다. 또한 세포질에는 미토콘드리아 (mitochondria)와 조면소포체 (rough ER, rER)가 소수 존재하였으며, 유리리보솜들이 매우 발달하였다. 이 세포들은 밀착결합(tight junction)과 데스모솜(desmosome)으로 결합하고 있었으며, 세포막의 함입과 돌출로 인해 세포들이 틈나처럼 맞붙어 있는 형태로 관찰되었다. 13일된 배아에서, 간 실질세포는 별모양으로 관찰되었고, 미토콘드리아와 조면소포체가 발달한 세포의 형태로 나타나기 시작하였다. 이 세포의 세포질 돌기는 이웃한 세포와 결합하고 있어서, 그물 구조와 유사한 형태를 보였으며, 내강에서는 분화중인 여러 형태의 조혈세포들이 분포하였다.

15일된 태아에서 두 가지 형태의 간 실질세포가 관찰되었다. 주로 관찰되는 type I 간 실질세포는 세포질에 미토콘드리아와 조면소포체가 발달하였고, 핵은 진염색질 (euchromatin)이 대부분이었으며, 세포질은 전자밀도가 높게 관찰되었다 (Fig. 1). Type II 간 실질세포는 type I에 비해 크기가 매우 크며, 다수의 혈구모세포 (특히, 적혈구 모세포)들과 인접하여 조혈도

(erythropoietic island)를 형성하고 있는 것으로 관찰되었다. 이 세포의 세포질에는 type I에 비해 미토콘드리아가 소수 존재하였고, 활면소포체(smooth ER, sER)가 발달했다. 세포질은 전자밀도가 낮게 관찰되었으며, 핵은 이질 염색질 (heterochromatin)의 농도가 높게 관찰되었다 (Fig. 2). 17일 된 배아의 type I 간 실질세포는 이웃한 세포와 밀착결합 및 데스모솜으로 연결되어 있었으며, 연결부위에서 담세관 (bile canaliculus)과 유사한 세포사이 공간을 관찰할 수 있었다. 19일 된 배아에서는 작은 지질 소포 (lipid droplet)를 포함하는 간 실질세포 (liver parenchymal cell)가 다수 존재하였다. 출생 이후 흰쥐 간 세포는 핵이 둥글며, 지질 소포, 미토콘드리아 및 조면소포체가 발달한 세포들의 수가 증가하였다. 생후 5일 된 흰쥐의 간 세포에서는 큰 지질 소포가 나타났고, 성체와 비슷한 형태의 담세관 간 실질세포 사이에서 관찰되었다. 생후 20일 된 흰쥐의 간 실질세포는 성체와 유사하게 핵이 둥글며, 미토콘드리아와 조면소포체가 발달하였다. 또한 담세관은 배아 19일 째에 불완전한 형태로 관찰되어 성체 시기까지 계속 발달하는 양상을 보였다.

### 2. 면역세포화학적 관찰

발생과 성장시기에 따라 흰쥐 간에서 metallothionein (MT)에 대한 분포를 미세구조적으로 알아보기 위하여, 면역 금 입자 표지법을 이용한 세포화학적 방법으로 조사하였다. 실험 결과에 대한 대조군으로 MT 분포가 가장 많은 그룹을 선택한 뒤, anti-MT 항체를 제외한 모든 과정을 동일하게 처리하여 실험한 결과 어떤 세포에서도 금 입자가 관찰되지 않았음을 확인하였다 (Fig. 3). 발생 13일 된 태아의 간 실질세포의 핵 안에서 처음으로 금 입자들이 관찰되었다 (Figs. 4~5). 발생 17일 된 배아에서 금 입자들의 분포는 급격히 증가하는 양상을 보였고 (Fig. 6), 생후 1일째에는 핵과 세포질에 다수의 금 입자들이 관찰되었다 (Fig. 7). 출생 후 5일째에서 MT와 결합한 금 입자들의 수는 크게 감소한 것으로 나타났다. 이와 같은 금 입자의 감소현상은 계속 진행되어, 생후 30일째에 이르면 성체와 비슷한 수준으로 낮게 관찰되었다 (Fig. 8).

출생 후 성장과정에 있는 흰쥐 간 세포에서 MT와

결합되어 있는 금 입자들의 분포는 주로 간 실질세포에 집중되어 있었으며, 세포 내에서 미토콘드리아 혹은 지질 소포를 제외한 대부분의 세포질과 핵질에 분포하고 있었다. 즉, 핵질의 이질염색질, 인 연관 염색질 혹은 인 내부에서도 관찰되었으며, 세포질 내 조면소포체 막에도 위치하는 것으로 조사되었다. 한편, 발생 중 혹은 신생 흰쥐의 간에 존재하는 혈구모세포들의 세포질 내에서도 MT에 대한 반응성이 비교적 약하게 관찰되었다 (Figs. 4~8).

## 고 찰

분열중인 세포에서 metallothionein (MT)이 높게 발현된다는 점에 기초하여 압조직, 발생중인 태아 또는 신생아 뿐만 아니라 간 손상으로 간 세포의 분열을 유도하여 세포분열과 MT의 발현의 관계에 대해 연구되어 보고된 바 있다. 또한 필수 금속이온을 포함한 중금속이나 세포독성 물질에 대한 방어 작용을 증명하기 위해 여러 가지 물질을 실험동물에게 경구 투여하거나 혈관내 주사하여 MT의 변화를 측정하여 보고된 바가 있다 (Nishimura et al., 1989; Klaassen et al., 1999; Jayasurya et al., 2000; Eklund et al., 2004). 한편 흰쥐의 간을 모델로하여 발생중인 태아에서부터 출생 후 혹은 성장하는 과정 중에 MT의 발현과 세포내 분포에 대한 연구는 현재까지 특정한 시기에만 한정되어 이루어져 왔다.

이에, 본 연구는 세포분열이 활발한 발생중에 있는 태아 또는 생후 흰쥐를 모델로 하여, 발생에 따른 간 세포의 미세구조적 분화를 관찰하고, 이것을 기초로 하여 발생 시간 별로 간에서의 MT 분포와 발현 양상을 확인하기 위하여 면역세포화학적 방법을 수행하였다. 발생 초기의 간에서는 간 세포의 조상세포인 난형 세포가 다수 관찰되었다. 이 난형 세포의 특징은 핵/세포질 비 (nuclear cytoplasmic ratio)가 크고, 핵이 둥글며, 인이 한 개 이상 발달하였다. 또한, 세포질 내에서는 미토콘드리아와 조면소포체 (rough ER, rER)를 관찰할 수 있었고, 특히 유리리보솜들은 세포질 전체에 걸쳐 조밀하게 분포하고 있었다. 이러한 미세구조적 특징으로 볼 때, 이 난형 세포는 단백질 합성이 활발

한 것으로 생각되며, 다른 세포로 분화할 수 있는 미분화세포라고 판단된다. 태아 시기에 난형 세포들은 배쪽 전장 (ventral foregut)에서 이주하며, 성체 시기에는 굴수와 작은 담관 (canals of Hering, small bile duct)에서 기원하는 것으로 알려져 있으며, 중간엽성 조직 (mesenchymal tissue)과 접촉한 후, 위치 환경 요소 (local environmental factor)에 의존하여, 간 실질세포 (liver parenchymal cell)와 담관세포 (cholangiocyte, bile duct cell)로 분화되는 것으로 알려져 있다 (Mitaka, 2001; Beath, 2003). 한편, 간 실질세포들은 미세구조적으로 두 가지의 유형을 보였다. Type I 간 실질세포는 미토콘드리아와 조면소포체가 발달했고, 초기 담세관의 구조를 형성하는 것으로 볼 때, 출생 후 간의 담즙 분비와 같은 실질적인 기능을 하는 세포로 분화할 것으로 사료된다. Type II 간 실질세포는 type I 세포에 비해 세포질내 물질들의 농도가 낮은 것으로 나타났고, 이는 흰쥐 성체의 비장에서 조혈도 (erythropoietic island)를 구성하는 세포와 유사한 미세구조를 나타내는 것으로 보아, 간에서 일어나는 조혈작용에 실질적으로 관여하는 것으로 판단된다. 세포내 MT의 분포 정도와 세포내 위치를 확인하기 위하여 면역세포화학적 금 입자 표지법을 이용하여 관찰한 결과, MT는 간 실질세포들에서 주로 관찰되었다. 발생 17일 된 태아 간 세포의 세포질과 핵에서 공통적으로 MT에 대한 금 입자들의 분포가 뚜렷하게 증가하였는데, 이러한 경향은 특히 출생후 1일 된 신생 흰쥐에서 가장 높게 관찰되었다. 한편, 출생후 5일이 경과한 신생 흰쥐의 간 세포에서 MT의 분포는 세포질과 핵에서 크게 감소하였으며, 시간이 경과함에 따라 이러한 경향은 더욱 뚜렷하게 관찰되었다. 한편 어떤 실험군에서도 미토콘드리아 막과 내부에서는 MT 반응이 전혀 관찰되지 않았는데, 이는 MT가 에너지대사에 무관함을 나타내는 것이라고 생각한다. 또한 발생과 성장에 있어서 간 세포내 MT 분포의 변화에 대한 결과와 같은 시기에 아연과 구리의 농도에 대해 조사한 연구 결과를 비교해 보았을 때, 태아의 간에서 발현되는 MT는 발생과정 동안 모체에서 공급된 금속 이온을 간에 고농도로 저장하였다가, 태아의 발생 또는 분화에 필요한 금속 이온을 다른 조직이나 기관에 공급하는 기능을 수행하는 것으로 보인다. 또한 성장과정에

서는 금속 이온의 저장은 물론 간 세포의 분열에 연관된 유전자를 발현시키거나, 핵안으로 아연과 구리 같은 금속성 효소활성인자를 공급하여 세포분열 또는 분화에 관련된 유전자의 발현을 유도할 것으로 사료된다 (Panemangalore et al., 1983; Templeton et al., 1984; Chmielnicka et al., 2000). 최근 연구에서 MTF-1 (metal response element transcription factor-1)은 MT 유전자의 유도인자로 밝혀졌다. MTF-1을 knock out 시킨 생쥐로 발생실험을 수행한 결과, 생쥐 태아는 발생 14일 시기에 간이 퇴화되어, 태아가 사망하였다. 이 실험 결과에서도 태아의 발생시기에 MT가 아연과 구리 대사기능 뿐만 아니라 세포 분열과 분화에도 중요한 기능을 수행할 것이라고 제안하고 있다 (Gunes et al., 1998; Anderews et al., 2001).

이 실험을 통해 MT에 대한 생리적 기능을 고찰한 결과, 세포질에 존재하는 MT는 필수 금속이온의 대사와 저장 기능을 수행하며, 핵질에 존재하는 MT의 기능은 세포분열에 관여하는 유전자를 발현시키고, 핵질에 아연과 구리를 공급하여, 핵내에 존재하는 효소들의 활성을 유도할 것으로 판단된다. 특히 흰쥐 태아와 수유기동안 어린 흰쥐의 간 세포질내에 MT가 높은 농도로 분포하는 것은 성장에 필요한 아연과 구리를 저장하고, 다른 조직에 공급하는 기능에 따른 결과로 사료된다.

이상과 같이 발생중 혹은 출생 이후 성장기까지의 흰쥐 간을 실험모델로 하여, 세포의 증식과 연관이 있다고 알려진 MT의 분포와 발현 양상을 세포면역화학적 방법을 이용하여 조사하였던 바, 출생 직후 MT의 발현이 가장 높게 나타났고, 세포내 핵 및 세포질에 분포하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 MT가 세포 증식 혹은 세포의 분화 뿐만 아니라, 물질대사 조절에도 관여하는 것으로 판단되며, 이후 이에 대한 보다 깊이 있는 연구가 요구된다.

## 참 고 문 헌

- Andrews GK, Lee DK, Ravindra R, Lichtlen P, Sirito M, Sawadogo M, Schaffner W: The transcription factors MTF 1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *EMBO J* 20(5): 1114-22, 2001.
- Banerjee D, Onosaka S, Cherian MG: Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicology* 24(2):95-105, 1982.
- Beath SV: Hepatic function and physiology in the newborn. *Semin Neonatol* 8(5):337-46, 2003.
- Chmielnicka J, Sowa B: Variations in metallothionein, Zn, Cu, and Fe concentrations and ceruloplasmin activity in pregnant rat dams and their fetuses. *Ecotoxicol Environ Saf* 46(2):130-6, 2000.
- Deung YK, Kim DH, Kim WJ: A study on the protective roles of metallothionein in cadmium treated rat liver. *J. Wonju College Med* 7:50-60, 1994. (Korean)
- Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ: Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med* 185(2):107-19, 1987.
- Eklund G, Tallkvist J, Oskarsson A: A piglet model for studies of gastrointestinal uptake of cadmium in neonates. *Toxicol Lett* 146(3):237-47, 2004.
- Gunes C, Heuchel R, Georgiev O, Muller KH, Lichtlen P, Bluthmann H, Marino S, Aguzzi A, Schaffner W: Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal responsive transcriptional activator MTF 1. *EMBO J* 17(10):2846-54, 1998.
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J: Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* 533(1-2):211-26, 2003.
- Jayasurya A, Bay BH, Yap WM, Tan NG: Correlation of metallothionein expression with apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 82(6):1198-203, 2000.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S: Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:267-94, 1999.
- Mitaka T: Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 281(1):1-5, 2001.
- Nishimura H, Nishimura N, Tohyama C: Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues. *J Histochem Cytochem* 37(5):715-22, 1989.
- Panemangalore M, Banerjee D, Onosaka S, Cherian MG: Changes in the intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development. *Dev Biol* 97(1):95-102, 1983.
- Petkov PM, Zavdil J, Goetz D, Chu T, Carver R, Rogler CE,

Andrews GK, Lee DK, Ravindra R, Lichtlen P, Sirito M, Sawadogo M, Schaffner W: The transcription factors MTF 1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein I expression in response to the essential metal zinc in visceral

Bottinger EP, Shafritz DA, Dabeva MD: Gene expression pattern in hepatic stem/progenitor cells during rat fetal development using complementary DNA microarrays. *Hepatology* 39(3):617-27, 2004.

Templeton DM, Banerjee D, Cherian MG: Metallothionein synthesis and localization in relation to metal storage in rat liver during gestation. *Can J Biochem Cell Biol* 63(1):16-22, 1985.

### <국문초록>

메탈로사이오닌 (metallothionein: MT)은 시스테인 (cysteine)이 다수 포함되어 있고, 저분자량인 단백질로서 중금속이온이나 다양한 세포 독성 인자에 의해 유도되며, 최근 발암과정 (carcinogenesis)이나 혹은 세포분화와 관련하여 활발하게 연구가 이루어지고 있다. 본 연구는 흰쥐를 수정시킨 후 발생과정 또는 출생 후 성장과정 단계에서 태아와 신생 흰쥐의 간 조직 및 세포내 MT의 분포 양상을 조사하고자 하였다.

흰쥐 간 조직내 MT의 분포는 면역조직화학적 방법을 적용하여 광학현미경으로 관찰하였고, 세포내 미세구조적 위치 (localization)는 금 입자 표지를 이용한 면역세포화학적 방법을 이용하여 투과전자현미경으로

관찰하였다.

MT는 발생 13일이 경과한 흰쥐 태아의 간에서 처음으로 관찰되기 시작하여, 출생 당일의 신생 흰쥐에서 가장 높게 관찰되었다. 면역 조직화학 및 세포화학 적 방법으로 관찰한 결과, MT 염색성은 발생 후기에 서 출생후 10일까지 비교적 높게 나타났다. MT에 대한 양성반응은 난형 세포 (oval cell)들과 간 실질세포 (liver parenchymal cell)들에서 뚜렷하게 존재하였다. 발생과정과 신생 흰쥐의 간 조직에서는 핵과 세포질 양쪽에서 공통적으로 양성 반응을 보였으나, 생후 30일 이후부터 성체에 이르는 시기까지는 세포질에 한정되어 있는 양상을 보였다. 금 입자 표지법에 의한 MT의 세포질내 분포를 보면, 발생 중인 흰쥐 간 세포에서는 핵과 세포질내에 고르게 산재되어 있었다. 즉, 핵내 염색질, 인, 조면소포체 및 cytosol에서도 MT에 대한 면역 금 입자들이 관찰되었으나, 미토콘드리아와 지질 소포 등에서는 거의 관찰되지 않았다.

상기의 결과들은 발생중 혹은 성장중인 흰쥐의 간에서 MT가 점차 증가하는 것으로 요약될 수 있는 것으로서, 이는 MT가 세포들의 증식과 분화에 금속 이온의 저장과 방출 혹은 전사인자 (transcription factor)로서 작용할 수 있음을 암시하는 것으로 판단된다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Electron micrograph of liver parenchymal cell of fetal day 15 rat showing typical structures in terms of nucleus, nucleolus, mitochondria, and rough endoplasmic reticulum. Mi: mitochondrion, N: nucleus, No: nucleolus.
- Fig. 2.** Electron micrograph of liver parenchymal cell of fetal day 15 rat showing typical structures in terms of nucleus, nucleolus, mitochondria, and smooth endoplasmic reticulum. Hematopoietic cells are outside the parenchymal cell. E: erythrocyte, H: hematoheiotic cell, Mi: mitochondrion N: nucleus, No: nucleolus.
- Figs. 3-8.** Immunocytochemical staining for metallothionein in the liver of rats at different developmental stages.
- Fig. 3.** Negative staining omitting primary anti-MT in liver parenchymal cell of neonatal rat. No gold particles are observed. L: lipid droplet, Mi: mitochondrion, N: nucleus, No: nucleolus.
- Fig. 4.** Liver parenchymal cell of fetal 13 days rat. Labelling for MT is observed within the nucleus. ←: gold particle, Thin arrow: nuclear envelope, N: nucleus, C: cytoplasm.
- Fig. 5.** Liver parenchymal cell of fetal 15 days rat. Gold particles indicating the presence of MT are located in both nucleolus and karyoplasm. ←: gold particle, N: nucleus, No: nucleolus.
- Fig. 6.** Liver parenchymal cell of fetal 17 days rat. Labelling for MT is observed throughout the nucleus and cytoplasm, but not located in mitochondria. ←: gold particle, N: nucleus, \*: mitochondrion.
- Fig. 7.** Liver parenchymal cell of neonatal rat. More gold particles for MT are observed throughout the nucleus and cytoplasm, but not located in mitochondria. ←: gold particle, Mi: mitochondrion, N: nucleus, No: nucleolus.
- Fig. 8.** Localization of MT in adult liver parenchymal cell. A few gold particles in cytoplasm are localized at rough endoplasmic reticulum. ←: gold particle, Mi: mitochondrion, N: nucleus.



