

## 생쥐 근위세뇨관에서 납에 의한 신장 독성에 대한 스쿠알렌의 효과

김 종 세\*, 이 유 현, 이 준 행<sup>1</sup>  
조선대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>1</sup>남부대학교 방사선과

### Effects of Squalene on Renal Toxicity Induced by Lead Acetate in Proximal Tubules of the Mice

Jong-Se Kim\*, Yu-Hyun Lee and Jun-Heung Lee<sup>1</sup>  
Dept. of Biology, College of Natural Science, Chosun University, Gwangju, Korea  
<sup>1</sup>Dept. of Radiology, Nambu University, Gwangju, Korea  
(Received July 28, 2004; Revised August 27, 2004; Accepted August 30, 2004)

#### ABSTRACT

To investigate the effect of the squalene against the lead toxicity and recovery of renal failure. Healthy male ICR mice were used for experiment. The activity of nitric oxide (NO) was observed after the intraperitoneal injection in mice. The ultrastructural changes of the kidney were observed after the intraperitoneal injection of lead acetate in mice. The experimental groups were divided into three groups. Group 1 was normal mouse. Group 2 was not treatment with squalene after intraperitoneal contamination of lead acetate (30 mg/kg). And, Group 3 was injected squalene (180 mg/kg) after intraperitoneal contamination of lead acetate. All groups were used to 10 mice. The results were as follow:

In the case of the group 2, swelling of the outer membrane and destruction of the inner membrane (cristae) of the mitochondria, dripping of the ribosomes from the rough endoplasmic reticulum were happened at 24 hours and 48 hour. These were gradually repaired after 72 hours. In the case of the group 3, damages of the mitochondria and the rough endoplasmic reticulum were showed less than the group 2 at 24 hours. Especially, after 48 hours, these were almost same as the group 1.

In the case of group 2, the level of NO was decreased. However, In the case of group 3, the level of NO was increased more than normal as well as repaired the decreased NO level by Pb ( $P < 0.05$ ).

It was concluded that the squalene was the protective and recovery effects for the toxicity of the lead in the renal proximal tubules.

**Key words** : Lead, Nitric oxide, Renal proximal tubules, Squalene

\* Correspondence should be addressed to Dr. Jong-Se Kim, Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, 375, Seosuk-dong, Gwangju 501-759, Korea. Ph: (062) 230-6641, FAX: (062) 230-7984.

## 서 론

중금속은 오래 전부터 사람에게 해로운 물질이라는 것이 알려져 있으며, 중금속은 다른 독성 물질과는 달리 사람에게 의해서 만들어지거나 파괴될 수 없는 물질로 몇 가지 종류의 중금속은 신장에 상해를 유발시키는 데 그 이유는 신장이 배설하기 전에 농축시키는 성질이 있어 농축된 중금속이 여러 가지 종류의 대사 과정을 저해하기 때문인데, 그 중 납(Pb)은 생태계 내에서 카드뮴과 더불어 매우 중요한 중금속류의 한 종류로써 다양한 형태로 존재하면서 흡수된 선량 중 단지 10%만이 위장관을 통해 흡수되어지고 남은 선량은 체내에 축적되어 심각한 기능 장애를 유발시키는 물질이다 (Yum et al., 1995; Teresa & Laura, 2003). 체내에 축적되는 납의 대부분은 뼈에 분포하며, 간, 신장, 폐 등에 존재하며, 혈액에서는 대부분 적혈구와 결합한다 (Barltrop et al., 1971; Smith et al., 1992; Fonia et al., 1995). 체내로 축적된 납은 주로 신장을 통해서 체외로 배설이 진행되며 노로 배설되지 않은 납은 근위세뇨관 표피세포 (proximal tubular epithelial cell)에 intranuclear body 형태로 축적된다 (Mistry et al., 1982). 납중독 시에는 빈혈, 식욕부진, 소화기 장애, 신경계에서 퇴행성 뇌질환, 신장 장애, 고환에 직접 작용하여 정자형성과 기능 저해, 기억력, 집중력 및 감정 반응의 저하 등이 유발된다 (Six & Goyer, 1972; Klauder & Petering, 1977; Cullen et al., 1984; Assenato et al., 1986; Karmarker et al., 1986; Huseman et al., 1992; Fonia et al., 1995; Russo et al., 1998).

중금속을 제거하는데 현재 이용 또는 연구되어지고 있는 대표적인 물질로는 EDTA (Zinterhofer et al., 1971), chitosan (Kim & Roh., 2002), Green tea (Chung & Roh., 2000), 마늘 (Song et al., 1986), DMSA (Maiorino et al., 1993), vitamin E 혹은 C (Hsu et al., 1998) 등이 있다.

Squalene (hexamethyltetracosahexane,  $C_{30}H_{50}$ , 이하 SQ라 함)은 콜레스테롤의 생합성에 아주 중요한 선구 물질로서 척추동물 및 식물 등에서 합성이 이루어지며 특히, 심해 상어의 간, 올리브유 등에 많이 함유된 탄화수소로 피부, 복부지방조직, 피하지방조직, 림프절, 췌장 및 심근 등에 다량 함유되어있다 (Liu et al., 1976). SQ는 6개의 이중결합이 있어 산소이온과 쉽게

결합할 수 있어서 유해 산소 제거능이 있으며 (Kohno et al., 1995), 상처 치유, 혈관 확장, 동맥경화 억제 작용, 심근경색, 간질환 등 (Budiarmo, 1990)에 효과가 있으며, 화상 치료 (Kim et al., 1999), 카드뮴 독성 완화 (Kim & Yoon., 2000), 항암효과 (Yamawaki et al., 1978) 등이 보고 되었다. 또한, Storm (1993) 등은 SQ가 활성 산소종을 제거하고 세포면역반응을 증강시키며, 손상된 세포 회복 및 세포증식을 자극하는 기능을 가지며 활성 산소를 안정화시키고 항산화제를 활성화시켜 조직을 보호하고 생명을 연장하는 효과가 있다고 보고하였다.

Nitric oxide (이하, NO라 함)는 생리적·병리적인 과정에 관여하는 높은 반응성을 갖는 free radical이다 (Moncada et al., 1991). 포유류의 세포와 조직에서, NO와 citrulline을 생산하는 L-arginine (Arg)의 terminal guanidino nitrogen의 산화 (Palmer et al., 1988; Schmidt et al., 1989)는  $Ca^{2+}$ -의존성 표피 NO 합성효소와 신경 NO 합성효소, 그리고  $Ca^{2+}$ -비의존성유도 NO 합성효소 등과 같은 각각의 다른 NO 합성효소에 의해 촉진 된다 (Schmidt et al., 1991). NO의 역할은 혈관평활근의 이완 (Hassid et al., 1994), 사구체 신경절 세포의 mitogenesis와 성장 억제 (Rupprecht et al., 2000), 대식세포 독성 (Lakics & Vogel, 1998) 등에서 잘 증명되었다. NO는 암세포나 대식세포에서 감염된 미생물에 대한 세포독성 약제로써 면역학적으로 작용 한다 (Hibbs et al., 1987; Stuehr & Nathan, 1989). NO 또한 신경조직에서 유래된 PC 12 세포에서 종양피사인과 대식세포의 활성을 통해 염증을 유도하는 세포벽 구성물인 bacterial LPS에 의해 자극되어 발생하는 세포사를 조절 한다 (Heneka et al., 1998).

본 연구에서는 생쥐에 납을 투여한 후 SQ를 처치하였을 때 납중독에 의한 신장독성을 억제하는 지 여부와 NO 생성에 어떠한 영향을 주는 지에 관해 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

본 실험에 사용한 실험동물로는 샘타코에서 생산, 공

급하고 있는 ICR계 생쥐 (체중 25-35 g)를 사용하였다. 생쥐는  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $45 \pm 5\%$ 로 유지된 사육실에서 폴리카보네이트로 제작된 사육장 ( $40 \times 25 \times 17 \text{ cm}$ )에서 사육하였으며, 사료 (제일제당 제품)와 급수는 자유롭게 섭취시켰다. SQ는 (주)세모 제품을 사용하였다.

## 2. 실험군 설정

### 1) NO 관찰

실험군 1은 낱과 SQ를 처치하지 않은 정상군, 실험군 2는 SQ (180 mg/kg)를 1회 복강 투여하고 낱은 처치하지 군, 실험군 3은 생쥐에 낱 (30 mg/kg)을 복강 투여하고 SQ를 처치하지 않은 군, 실험군 4는 생쥐에 낱 (30 mg/kg)을 처치한 후, SQ (180 mg/kg)를 처치한 군 등으로 각 군별 24, 48, 72, 96시간별로 관찰하였으며, 각 실험군 당 생쥐 10마리를 사용하였고, SQ는 (주) 세모 제품을 사용하였다.

### 2) 신장의 전자현미경적 관찰

실험군 1은 낱과 SQ를 처치하지 않은 정상군, 실험군 2는 생쥐에 낱 (30 mg/kg)을 복강 투여하고 SQ를 처치하지 않은 군, 실험군 3은 생쥐에 낱 (30 mg/kg)을 처치한 후, SQ (180 mg/kg)를 처치한 군 등으로 각 군별 24, 48, 72, 96시간별로 관찰하였으며, 각 실험군 당 쥐 10마리를 사용하였고, SQ는 (주)세모 제품을 사용하였다.

## 3. 전자현미경의 관찰

각각의 적출된 신장조직은 신속하게  $1 \text{ mm}^3$ 의 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde 용액 (pH 7.4, 0.1 M cacodylate 완충액,  $4^\circ\text{C}$ )에서 2시간 전고정 하였다. 전고정 한 후, 동일 완충액을 사용하여 3회 수세하였다. 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) 용액 (pH 7.4, 0.1 M cacodylate 완충액,  $4^\circ\text{C}$ )로 2시간 후고정한 후, 동일 완충액으로 3회 수세하였다. 저농도의 ethanol (50%)로부터 ethanol 계열하에 탈수하고, propylene oxide를 사용하여 치환시켰다. epon mixture를 만들어 propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며, epon mixture 원액에서 over night 후 포매하였다. 그리고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 12시간,  $45^\circ\text{C}$ 에서 12시간,  $60^\circ\text{C}$ 에서 48시간

열중합하였다. epon block을  $1 \mu\text{m}$ 로 박절하여 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 특정부위를 정하고 삭정한 뒤 Diatome을 부착시킨 Ultramicrotome (MT-7000)으로 60 nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경 (Hitachi, 7,600, Japan)으로 가속전압 80KV 하에서 관찰하였다.

## 4. NO 측정

NO 측정 방법은 다음과 같다 (Traylor et al., 1996). 각각의 적출된 신장조직은 homogenization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, EDTA, 5 mM EGTA)로 분쇄하였다. 모든 buffer에는 Protease inhibitor (0.5  $\mu\text{g/ml}$  antipain, 0.1 mM PMSF, 140  $\mu\text{g/ml}$  trypsin inhibitor)를 포함하였다. 그 후, glass-teflon homogenizer를 이용하여 50-70 rpm의 속도에서 homogenization을 실행하고 다시 sonication (Sonics & Materials, VCX-400/SONICS, U.S.A.)을 시행하여 세포를 완전히 분쇄한 후 16,000 g로  $4^\circ\text{C}$ 에서 15분동안 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 분주한 후 Griess reagent (0.8% sulfanilamide/0.75% N-(naphthylethylene)diamine in 0.5 N HCl, Sigma) 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 15분간 실온에서 방치한 후, 540 nm 파장에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)을 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다. Sodium nitrate (0.5~100 M)를 nitrite 표준으로 이용하였다.

## 5. 단백질량 측정

단백질 농도는 Bicinchoninic acid protein assay kit (이하, BCA, Tierce, Rockford, IL U.S.A.)를 이용하여 분석하였다 (Tuszynski & Murphy, 1990). 소혈청알부민 (BCA)을 표준물질로 사용하여 각각의 단백 시료 25  $\mu\text{l}$ 를 96 well plate에 분주하고 시약 A와 시약 B (50:1)로 구성된 BCA 약물 (200  $\mu\text{l}$ )을 각각 첨가한 후,  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간동안 배양하였다. 배양 후, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 6. 통계처리

각 실험군 별 통계학적 유의성은 개인용 컴퓨터 프로그램인 SAS를 이용한 Anova test에 의하여 검정하였으며, 각 P값은 0.05 미만의 것을 유의한 수준으로 고려하였다.

## 결 과

### 1. 전자현미경적 관찰

**24시간** : 납 단독 투여군의 경우 사립체가 심하게 팽대되었고, 사립체 내막이 심하게 파괴되었다. 소포체는 내강이 팽대되어 파괴 되었으며, 리보솜의 탈락이 관찰되었다 (Fig. 2A). 납과 SQ를 함께 처치한 군에서는 사립체가 약간 팽대되었으며, 사립체내막도 부분적으로 파괴되었다. 소포체는 내강이 팽대, 파괴되었으나 정도가 약하며 리보솜은 탈락이 관찰되었다 (Fig. 2B).

**48시간** : 납 단독 투여군의 경우 사립체는 여전히 심하게 팽대되었고, 사립체 내막은 파괴되었다. 소포체는 심하게 파괴되어 일부분만 관찰되었다 (Fig. 3A). 납과 SQ를 함께 처치한 군에서는 사립체가 거의 정상에 가깝게 회복되었고, 소포체는 부분적으로 파괴되었으며, 리보솜은 약간 탈락됨이 관찰되었다 (Fig. 3B).

**72시간** : 납 단독 투여군의 경우 사립체는 팽대가 회복 단계에 있고, 사립체 내막도 회복 단계가 관찰되었다. 소포체는 상당히 회복되었으며, 리보솜은 여전히 탈락이 관찰되었다 (Fig. 4A). 납과 SQ를 함께 처치한 군에서는 사립체가 거의 회복되었으나, 부분적인 팽대가 관찰되었고, 사립체 내막도 거의 회복 단계로 관찰되었다. 소포체는 뚜렷하게 관찰되며, 리보솜도 부착되었음이 관찰되었다 (Fig. 4B).

**96시간** : 납 단독 투여군의 경우 사립체는 거의 정상으로 회복되었으나, 부분적인 팽대가 관찰되었고, 사립체 내막은 거의 회복되었다. 소포체는 거의 정상이며 리보솜도 부착되었음이 관찰되었다 (Fig. 5A). 납과 SQ를 함께 처치한 군에서는 사립체가 정상에 가깝게 회복되었고, 소포체 내막도 정상이었다. 소포체는 정상이며, 리보솜도 정상으로 부착됨이 관찰되었다

(Fig. 5B).

### 2. Nitric Oxide 생성

**24시간** : 정상군에서  $0.13 \pm 0.01$ , 납 단독 투여군에서  $0.07 \pm 0.03$ , 스쿠알렌을 처치한 군에서는  $0.30 \pm 0.04$ 을 관찰하였다 ( $P < 0.05$ ) (Table 1 참조).

**48시간** : 납 단독 투여군에서  $0.09 \pm 0.01$ , 스쿠알렌을 처치한 군에서는  $0.19 \pm 0.07$ 을 관찰하였다 (Table 1 참조).

**72시간** : 납 단독 투여군에서  $0.13 \pm 0.02$ , 스쿠알렌을 처치한 군에서는  $0.13 \pm 0.03$ 을 관찰하였다 (Table 1 참조).

**96시간** : 납 단독 투여군에서  $0.13 \pm 0.01$ , 스쿠알렌을 처치한 군에서는  $0.12 \pm 0.04$ 을 관찰하였다 (Table 1 참조).

**Table 1.** The production of Nitric Oxide Induced by Lead Acetate in Mice Kidney

	Group1	Group 2	Group 3	Group 4
24 h	$0.13 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.03$	$0.07 \pm 0.03$	$0.30 \pm 0.04^*$
48 h	$0.12 \pm 0.02$	$0.13 \pm 0.01$	$0.09 \pm 0.01$	$0.19 \pm 0.07$
72 h	$0.12 \pm 0.05$	$0.13 \pm 0.02$	$0.13 \pm 0.02$	$0.13 \pm 0.03$
96 h	$0.13 \pm 0.03$	$0.13 \pm 0.01$	$0.13 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.04$

\* $P < 0.05$  as compared with Group 3

Group 1 : Normal mice

Group 2 : Squalene (180 mg/kg) was injected only.

Group 3 : No treatment with squalene after intraperitoneal contamination of lead acetate (30 mg/kg)

Group 4 : Squalene (180 mg/kg) was injected after intraperitoneal contamination of lead acetate.

## 고 찰

Chishti & Rotkiweicz (1992)는 염화제이수은이 신장내 근위곱슬세관에서 미세용모 손실, 무과립형질내세망의 증가, 세포상부 세포질에 커다란 액포의 증가, 과립형질내세망의 수조 확장 및 리보솜의 탈락, 사립체의 변화, 상피세포의 기저막 탈락 등이 관찰되었다고 보고하였다. Cheong (1998)은 납 중독에 대한 활성탄의 효과를 알아보기 위하여 납 (20 mg/kg)과 활성탄 (40 mg/kg)을 1일/1회씩 경구투여한 후 3주, 6주째에 신장 조직을 관찰하였는데, 세뇨관세포에서 미세

용모의 손실, 세포질 상부에 크고 작은 액포, 미세소체, 용해소체가 증가되었고, 사립체, 무과립형질내세망 및 과립형질내세망 수조 내강의 팽대와 과립형질내세망으로 부터 리보솜의 탈락이 관찰되었다고 보고하였다. 본 실험은 급성 납 중독에 관한 실험으로 납 단독 투여군과 납과 함께 스쿠알렌을 함께 처치한 군에서 손상 정도의 차이는 있었지만, 사립체의 과립형질내세망 수조의 팽대 및 리보솜 탈락이 관찰되었다. Kim & Roh(2002)는 납 중독 된 쥐의 신장에서 키토산의 효과를 알아보기 위하여 납(30 mg/kg)을 1주 2회 복강 투여하고, 0.1% 키토산(1 mg/kg)수용액을 ad libitum 방식으로 공급하고 4주, 8주 후 키토산 투여군에서 세뇨관 세포에서 미세용모의 변화는 없었으며 용해소체의 수 감소 및 기다란 모양의 사립체와 리보솜이 부착된 과립형질내세망이 정상적으로 관찰되어 키토산의 신장에 미치는 납 중독을 감소시키는 데 효과가 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 기다란 모양의 사립체와 탈락된 리보솜이 많이 관찰되었으나, 스쿠알렌을 처치한 군에서는 좀 더 빠른 회복이 진행됨을 관찰할 수 있었고, 미세용모의 변화는 관찰할 수 없었다. Goyer(1968)는 납에 의한 장애가 세포질소기관까지 포함되며 근위 세뇨관 상피세포의 피사, 핵과 세포의 종창 및 붕괴 등이 형성된다고 보고하였다. Kwon & Jang(1997)은 1% 초산납(2 g/kg)을 개에 12주동안 매 7일에 나누어 경구투여한 후 D-penicillamine(50 mg/kg)을 경구투여한 후 신장 조직내에서의 납 중독에 관한 병리검사를 실시한 바, 신장의 사구체 위축과 피사, 근위극세뇨관의 세포질 종창, 핵의 종대 또는 농축, 세포의 변성 및 피사소견이 관찰되었으나, D-penicillamine을 투여한 군에서는 납 중독에 대한 조직 손상 정도가 경미하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 핵이 대체적으로 중간 형태를 이루면서 정상으로 관찰되었으며 피사 현상은 관찰되지 아니하였다. Tilvis & Miettinen(1980) 등은 인간의 지방조직은 특이하게도 SQ의 농도가 다른 포유동물에 비해 높게 나타나며 20%는 세포내에 부착된 microsome에 존재하면서 SQ가 막계형성에 빠르게 작용한다고 보고하였다. 본 실험에서도 SQ를 처치한 군에서 납 중독에 대한 빠른 회복 효과가 관찰되었다.

만성신장질환에 대한 표본으로서 사구체 신염을 사

용한 연구에서, 신장조직에서의 L-arginine에서 L-citrulline으로 변화시켜 NOS활성도를 측정하였고, 조직의 단백질을 western blot을 시행하여 NOS의 양을 확인하였다. 이러한 방법으로 NO에 대한 변화를 관찰한 결과, 내인성 NOS 억제제의 순환을 증가하고 신장의 nNOS 양을 감소시켜 신장의 NOS 활성이 감소됨이 보고 되었다(Wagner et al., 2002). 납에 의해 유도된 고혈압을 갖는 rats을 사용하여, 소변과 함께 배출되어 나온 NO의 양의 조사와 뇌, 심장, 간, 신장 등 다양한 조직에 존재하는 ROS에 의한 NO 산화의 지시(표)자인 nitrotyrosine을 확인하기 위해 antinitrotyrosine monoclonal 항체를 사용하여 western blot을 시행한 결과, 증가된 ROS에 의한 NO의 불활성과 감소가 신장 뿐만 아니라 다른 조직에서도 조직에 손상을 일으키며, 소변으로의 NO 배출을 감소시키는 것이 보고되었다(Nosratola et al., 1999). 또한 만성신장질환을 갖는 환자에서 24시간동안 채취한 소변에서 Griess assay를 이용하여 NO의 양을 측정한 결과로써 NO의 배출량이 감소하는 것을 확인하였고 또한 reverse-phase HPLC를 이용하여 세포질내에서 내인성 NO 합성 억제자인 dimethyl-L-arginine의 수준을 측정한 결과에서 그 수준이 올라가는 것을 볼 때, 만성신장질환자에서 NO의 생성은 감소되어지며, 이러한 NO의 감소가 신장질환의 진행에 기여한다는 것이 보고되었다(Rebecca et al., 2000). 이러한 연구 결과와는 반대로, MRL/lpr mice에게 두 개의 다른 NOS 억제자인 Either NG-monomethyl-L-arginine(L-NMMA, a nonspecific NOS inhibitor)와 L-N<sup>6</sup>-(1-imino-ethyl) lysine(L-NIL, an iNOS specific inhibitor)를 사용하여 신장염의 발병에 대한 iNOS의 역할을 밝히기 위한 연구에서 iNOS를 특별하게 억제하면 신장질환의 진행을 막을 수 있다는 결과도 보고 되었으며(Christopher et al., 2002), 근위세뇨관 세포의 NO 증가를 위해서 NO를 세포에 직접 공급하는 sodium nitroprusside를 사용한 연구에서 신장질환자의 신장근위세뇨관에서 소변으로 유리되는 양이 정상인에 비해 감소되어지는 것으로 알려진 renal dipeptidase가 NO에 의해 세포에서 유리되는 양이 감소되는 것이 보고 되었다(Park et al., 2002). 위의 보고된 내용에 따르면, NO는 신장질환에 대하여 유익함과 무익함의 두 가지의 가능성을 모두

가지고 있다. 이에 본 연구는 SQ가 납에 의해 유도된 NO의 변화에 영향을 미치는 지와 그 영향이 신장질환에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하기 위해 실행되었다. 정상군과 비교하여 납 투여군에서는 조직에서의 NO의 생성량이 48시간까지는 감소하지만, 72시간 이후부터는 비슷해지는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 납과 함께 SQ를 처리한 처리군에서는 납 단독 처리군과 비교하여 48시간까지의 NO 생성량이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 그 생성량이 정상군보다도 많음을 보여주고 있다. 이들 결과는 납이 투여된 후 48시간까지는 신장의 손상을 통해 NO의 생성을 억제하지만 72시간 이후에는 자연적인 회복이 이루어지는 것을 보여주며, 또한 SQ가 신장 손상에 의한 NO 생성의 감소를 자연적인 것보다는 빠르게 회복을 시키는 것으로 보인다. 또한, Chitosan이 NO의 생성을 촉진한다는 연구 결과가 있는데 (Yoon et al., 2003), 본 연구에서는 SQ도 chitosan과 마찬가지로 NO의 생성에 영향을 미치는 것을 결과에서 보여주고 있다. 그러나 SQ에 의한 NO의 증가가 어떠한 기작을 통하여 일어나는지를 밝히지 못하였으며 추후 더 많은 연구를 통해 기작을 밝혀내야 할 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 SQ가 납 중독된 신장의 근위세뇨관에서 빠른 회복과 NO 생성에 영향을 주는 것을 관찰되었고, SQ가 납의 착화제로 작용하였다고 생각되어진다.

## 참 고 문 헌

- Barltrop D, Barrett AJ, Dingle JT: Subcellular distribution of lead in the rat. *J Lib Clin Med* 77(5): 705-712, 1971.
- Budiarso IT: Fish oil versus olive oil. *Lancet* 336: 1313-1314, 1990.
- Cheong MJ: Morphologic study of the effect of activated carbon treatment on the mouse kidney treated with lead. Chosun Graduate School, 1998.
- Chishti MA, Rotkiewicz T: Ultrastructural alternations produced in cockerels after mercuric chloride toxicity and subsequent interaction with an organophosphate insecticide. *Arch Environ Contam Toxicol* 24: 445-451, 1992.
- Chung KA, Roh YB: Histological study on the effects of the green tea in rat liver toxicated by lead. *Kor J Electron Microscopy* 30(2): 165-172, 2000.
- Fonia O: Down regulation of hepatic peripheral type benzodiazepine receptors caused by acute lead intoxication. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol Sect* 293: 335-339, 1995.
- Goyer RA: The renal tubule in lead poisoning. *Lab Invest* 19: 71-77, 1968.
- Hassid A, Arabshahi H, Bourcier T, Dhaunsi GS, Matthews C: Nitric oxide selectively amplifies FGF 2 induced mitogenesis in primary rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 267, H1040-1048, 1994.
- Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wullner U, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z: Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476, 1987.
- Hsu PC, Liu MY, Hsu CC, Chen LY, Guo YL: Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species related lead toxicity in the rat sperm. *Toxicol* 128: 169-179, 1998.
- Karmakar N, Saxena R, Anand S: Histopathological changes induced in rat tissues by oral intake of lead acetate. *Environ Res* 41: 23-28, 1986.
- Kim JS, Lee KH: Effects of squalene in the mouse kidney with contamination mercury. *Kor J Electron Microscopy* 30(4): 389-401, 2000.
- Kim JS, Yoon JS, Choi YB, Choi KP, Kim JS, Chung SM: Healing effects of squalene on the epidermis in burned mouse. *Kor J Electron Microscopy* 29(2): 163-175, 1999.
- Kim JS, Yoon JS: Effects of squalene on mouse liver toxicity with cadmium. *Kor J Electron Microscopy* 30(2): 141-152, 2000.
- Kim YH, Roh YB: Effects of chitosan on the rat nephrotoxicity induced by lead. *Kor J Electron Microscopy* 32(3): 205-211, 2002.
- Klockgether T: Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor  $\alpha$ /lipopolysaccharide. *J Neurochem* 71: 88-94, 1998.
- Klauder DS, Petering HG: Anemia of lead intoxication, A role of for copper. *J Nutr* 107: 1779-1785, 1977.
- Kohno Y, Egawa Y, Itoh W, Nagoka S, Takahashi M, Mukai K: Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen

- and scavenging reaction of free radical by squalene in n butanol. *Biochem Biophys Acta* 1256(1):52-56, 1995.
- Kwon YB, Jang KS: Pathological study on the antidotal effects of D-penicillamine in lead poisoned dogs. *Kor J Lab Sci* 13(1):25-32, 1997.
- Lakics V, Vogel SN: Lipopolysaccharide and ceramide use divergent signaling pathways to induce cell death in murine macrophages. *J Immunol* 161, 2490-2500, 1998.
- Liu GCK, Ahrens Jr. EH, Sreibman PH, Crouse JR: Measurement of squalene in human tissues and plasma. *J Lipid Res* 17(1):38-45, 1976.
- Maiorino RMMM, Aposhian ZFX, Xu YL, Aposhian HV: Determination and metabolism of dithiol chelating agents. The meso-2,3-dimercaptosuccinic acid-cysteine (1:2) mixed disulfide, a major urinary excretion of metabolism of DMSA in the human, increase the urinary excretion of lead in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 267:1221-1226, 1993.
- Mistry P, Lucier GW, Fowler BA: Characterization studies on the 63,000 dalton 203-Pb binding component of rat kidney cytosol. *Fed Proc* 42:527-535, 1982.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666, 1988.
- Rupprecht HD, Akagi Y, Keil A, Hofer G: Nitric oxide inhibits growth of glomerular mesangial cells: role of the transcription factor EGR-1. *Kidney Int* 57:70-82, 2000.
- 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.
- Schmidt HH, Murad F: Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 181:1372-1377, 1991.
- Schmidt HH, Seifert R, Bohme E: Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B<sub>4</sub>. *FEBS Lett* 244:357-360, 1989.
- 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.
- Smith DR, Osterloh JD, Niemeyer S, Flegal AR: Stable isotope labeling of lead compartments in rats with ultralow lead concentration. *Environ Res* 57:190-207, 1992.
- Soles K: Pathogenesis of acute renal failure. *Int Rev Exp* 24:277-333, 1983.
- Song TB, Bae ES, Yum YT: A study on the effect of garlic and 2,3-dimercaptosuccinic acid on the cadmium poisoning of pregnant rat. *J Kor Med* 24(1):237-245, 1986.
- Storm HM, Oh SY, Kimler BF, Norton S: Radioprotection of mice by dietary squalene. *Lipid* 28:555-559, 1993.
- Stuehr DJ, Nathan CF: Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:1543-1555, 1989.
- Teresa AG, Laura C: Biochemical changes in the kidneys after perinatal intoxication with lead and/or cadmium and their antagonistic effects when coadministered. *Ecotoxicol and Environmental Safety* 1-6, 2003.
- Tilvis RS, Miettinen TA: Squalene, methylesterol, and cholesterol levels in human organs. *Arch Pathol Lab Med* 104:35-40, 1980.
- Traylor LA, Proksch JW, Bealum VC, Mayeux PR: Nitric oxide generation by renal proximal tubules: role of nitric oxide in the cytotoxicity of lipid A. *J Pharmacol Exp Ther* 279:91-96, 1996.
- Tuszynski GP, Murphy A: Spectrophotometric quantitation of anchorage-dependent cell numbers using the bicinchoninic acid protein assay reagent. *Anal. Biochem.* 184(1):189-191, 1990.
- Yamawaki M, Azuma I, Saiki I, Uemiyama M, Aoki O, Ennyu K, Yamamura Y: Antitumor activity of squalene-treated cell wall skeleton of *Nocardia rubra* in mice. *Gann* 69:619-629, 1978.
- Yoon HJ, Kim YH, Park SW, Lee HH, Park HS: Chitosan increase the release of renal dipeptidase from porcine renal proximal tubule cells. *Korean J Biol Sci* 7:309-315, 2003.
- 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.
- 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 납중독에 의한 신장 기능 손상에 대한 스쿠알렌의 효과를 관찰하고자 하였다. ICR계 건강한 생쥐를 사용하여 납과 스쿠알렌을 복합 투여한 후, NO와 조직학적 변화를 관찰하였다. 실험군 설정은 다음과 같다. 실험군 1은 정상군, 실험군 2는 납 (30 mg/kg)만 처치한 군, 실험군 3은 납을 처치하고 스쿠알렌 (180 mg/kg)도 함께 처치한 군으로 각 실험군 당 생쥐 10마리를 사용하였다. 결과는 다음과 같다.

실험군 2의 경우, 미토콘드리아 신장, 사립체내막의 파

괴, 소포체에서 리보솜의 탈락이 24, 48시간동안 관찰되었고, 72시간부터 서서히 회복 되는 것을 관찰할 수 있었다. 실험군 3의 경우 실험군 2에 비해 손상 정도가 덜 하였으며, 48시간 이후부터 정상군과 유사한 소견을 보였다. NO의 경우 실험군 2에서는 NO 수치가 감소하였다. 하지만, 실험군 3의 경우 정상군보다 NO가 증가하였을 뿐만 아니라 납에 의한 NO 수치 감소에 대해 회복 효과를 보였다.

위와 같은 결과로 보아, 스쿠알렌이 신장 근위세뇨관에 미치는 납 독성을 감소시키면서 빠른 회복에 효과가 있을 것으로 사료된다.

## FIGURE LEGENDS

### Abbreviations

N: nucleus M: mitochondria, MBB: microvillus brush border

\* Each scale bar on the figures equals 1  $\mu$ m.

**Fig. 1.** An electron micrograph of normal proximal tubules in mouse ( $\times 3,000$ ).

**Fig. 2A.** An electron micrograph of proximal tubules at 24 hours of Pb treated mouse ( $\times 8,000$ ).

**Fig. 2B.** An electron micrograph of proximal tubules at 24 hours of Pb and SQ simultaneous treated mouse ( $\times 3,500$ ).

**Fig. 3A.** An electron micrograph of proximal tubules at 48 hours of Pb treated mouse ( $\times 4,000$ ).

**Fig. 3B.** An electron micrograph of proximal tubules at 48 hours of Pb and SQ simultaneous treated mouse ( $\times 3,500$ ).

**Fig. 4A.** An electron micrograph of proximal tubules at 72 hours of Pb treated mouse ( $\times 3,500$ ).

**Fig. 4B.** An electron micrograph of proximal tubules at 72 hours of Pb and SQ simultaneous treated mouse ( $\times 3,500$ ).

**Fig. 5A.** An electron micrograph of proximal tubules at 96 hours of Pb treated mouse ( $\times 3,500$ ).

**Fig. 5B.** An electron micrograph of proximal tubules at 96 hours of Pb and SQ simultaneous treated mouse ( $\times 3,500$ ).











