

硫酸銅 中毒이 랫트 肝臟의 微細構造에 미치는 影響

尹和重 · 李相穆 · 張炳峻
建國大學校 畜產大學 獸醫學科
(1989. 9. 7 접수)

Effects of copper sulfate poisoning on the fine structure of rat liver

Hwa-joong Yoon · Sang-mog Lee · Byoung-joon Jang
Department of Veterinary Medicine, College of Animal Husbandary, Kon Kuk University
(Received Sept 7, 1989)

Abstract: This study was designed in order to investigate the effect of copper sulfate to the ultrastructural changes of the hepatocytes in Sprague Dawley rats. The animals were administered with copper sulfate (10mg/kg B.W.), which was dissolved in normal saline. The solution was injected into abdominal cavity every day. The animals were sacrificed at the 6th, 12th, and 24th day from the beginning of administration. The specimens obtained from the liver were observed with electron microscope and significant changes were as follows.

1. A prominent dilatation and disruption of the cisternae of rough endoplasmic reticulum were recognized. Also, the detachment of membrane bound ribosomes was shown.
2. The proliferation of smooth endoplasmic reticulum and the depletion of glycogen particles were noted.
3. The increase of primary lysosomes and autophagic vacuoles was observed.
4. The dilatation of mitochondrial cristae was observed. And it was irregularly scattered in the stroma of mitochondria.
5. The atrophy of microvilli in the bile canaliculi and space of Disse was prominent.
6. Membrane of hepatocytes was damaged and significant hydrophic degeneration was observed in the perisinusoidal regions.
7. The damage of Fat-storing cells was more significant than that of hepatocytes.

Key words: copper sulfate, rat liver, poisoning, electron microscopy.

緒 論

근래 급격한 환경 오염으로 자연 생태계가 파괴되고
人畜의 건강이 위협받고 있는데, 각종 重金屬 化合物
의 오염 및 남용도 중요한 요인의 하나이다. 이중 硫
酸銅은 각종 銅製農藥의 원료로 사용될 뿐만 아니라
食品 및 飼料 添加物, 染料, 塗料, 石油精製, 電氣施
設 등 人類生活에 필수불가결한 것이다.

이것은 또 微量元素로서 동물체내에 존재하면서 酸

化還元酵素의 助酵素 역할을 하고 鐵分의 腸吸收와 조
직 및 혈장에서의 이동을 도와줌으로써 hemoglobin의
형성을 향상시켜 貧血을 방지한다.¹

그러나 硫酸銅이 동물체내에 장기간 과다하게 蓄積
되면 심각한 中毒症狀이 나타나는데 Ishmael et al²은
緬羊에서 肝臟에 銅이 蓄積될 때 肝實質細胞가 腫脹
혹은 壞死되고 acid phosphatase 농도가 증가하고 PAS
양성물질 및 抗 diastase물질이 존재함을 보고했다. 또
Bal과 Halder,³ Wolf⁴는 實驗的 銅中毒에서 肝細胞의

變性和壞死, 肝硬變, Kupffer細胞의 動員, 肝細胞內色素形成 등이 일어난다고 했다.

以上の 研究結果를 토대로 著者들은 硫酸銅이 체내에 蓄積될 때 肝臟의 微細構造에도 상당한 영향을 미칠것으로 思料되어 랫트에 實驗的 硫酸銅中毒을 유발하여 肝臟의 電子顯微鏡의 所見을 관찰하여 그 結果를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

實驗動物은 體重 150gm내외의 健康한 Sprague-Dawley系 雄性 랫트 20마리를 사용했고 飼料는 마우스용 pellet飼料(三養飼料)를 實驗期間中 食水와 함께 제한없이 공급했다.

實驗動物을 對照群 및 實驗群으로 분류하여 實驗群은 生理食鹽水에 녹인 0.5% 硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 國產化學)을 體重 kg당 10mg씩 6, 12, 24일간 각각 복강내로 반복 투여 하였다. 對照群은 生理食鹽水만 매일 0.3ml씩 24일간 투여했다.

투여기간이 끝난 群은 각 群당 무작위로 1마리씩 선발하여 최종투여 24시간후 6.5% pentobarbital sodium (pitman Moore) 0.3ml를 복강주사하여 전신마취시킨 다음 복부를 절개하여 肝組織을 摘出하였고 摘出した 肝組織을 0.1M phosphate buffer로 緩衝된 2.5% glutaraldehyde—2% paraformaldehyde 混合液(pH7.2)으로 4°C에서 2시간 前固定한 後 같은 buffer로 緩衝된 1% osmium tetroxide 溶液(pH 7.2)으로 4°C에서 2시간 後固定하였다.

固定된 組織片은 ethanol과 propylene oxide로 脫水한 다음 Epon 812 混合液에 包埋하였다. 組織의 薄切에는 Reichert Jung Ultramicrotome을 사용하였으며 70nm 초박편절을 얻어서 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 Zeiss 109 透過多 電子顯微鏡으로 관찰하였다.

結 果

對照群: 肝細胞는 대체로 多角形이었으며 核은 원형 또는 난원형으로 核質에는 眞染色質과 異染色質이 각각 분포되어 있었다. 粗面內形質細網은 襄狀 혹은 細管狀의 小槽가 몇겹으로 중첩되어서 細胞質內에 폭넓게 分布되어 있었는데 小槽의 表面에는 膜부착 ribosome이 부착되어 있었다.

滑面內形質細網은 分枝하거나 서로 문합된 細管狀으로 그 주위에는 電子密度가 높은 glycogen粒子가 관찰되었다.

絲粒體는 원형 또는 난원형으로 細胞質 全域에 고르

게 分布되어 있었고 그 內部에는 짧은 細管狀의 絲粒體陵이 규칙적으로 배열되어 있었다.

溶解小體는 電子密度가 높은 물질을 함유하고 있었으며 膽細管근처에서 종종 관찰되었다. 膽細管 및 Disse 腔에는 微絨毛가 매우 발달되어 있었다.

肝細胞사이 含요부의 Disse腔에 존재하는 지방저장세포(Ito세포)는 지방소체를 함유하고 있었고 비교적 발달한 粗面內形質細網이 관찰되었다.

硫酸銅 6일 투여군: 膽細管 주위 細胞質에 溶解小體의 수가 증가되고 膽細管內의 微絨毛의 위축이 인정되었으나 Disse 腔內의 微絨毛는 비교적 잘 발달되어 있었다. 기타 所見은 對照群의 所見과 유사하였다.

硫酸銅 12일 투여군: 肝細胞의 粗面內形質細網의 小槽는 다소 확장되어 襄狀化되었고 그 일부가 단절 혹은 파열된 것도 있었으며 小槽의 膜表面에 부착된 ribosome이 탈락되었다.

滑面內形質細網은 증식되고 小槽가 확장되었으며 그 주변의 細胞質에 존재하는 glycogen 粒子가 감소되었다.

溶解小體의 수가 크게 증가되었으며 膽細管內의 微絨毛는 극도로 위축되어 그 형태를 거의 볼 수 없었다. Disse腔은 損傷되어 그 속의 微絨毛는 매우 위축되었다.

硫酸銅 24일 투여군: 肝細胞의 核의 소견은 對照群과 유사하였으나 다소 위축되고 異染色質이 증가된 것이 가끔 관찰되었다.

粗面內形質細網의 小槽는 심하게 확장되고 단절 혹은 파열되었으며 그 表面에 부착된 ribosome이 脫落되었다.

絲粒體는 絲粒體陵이 확장되어 불규칙한 모양으로 基質內에 散在하였다.

細胞質內에는 壞死된 小器管을 탐식한 自食空胞가 매우 많이 관찰되었으며 多小胞體도 가끔 관찰되었다.

또 細胞膜의 전형적인 이중막구조가 파괴된 것이 관찰되었고 洞樣血管 주위의 細胞質에는 심한 水腫變性이 관찰되었다.

지방저장세포는 상당히 큰 溶해소체를 함유하고 있었으며 粗面內形質細網의 小槽가 매우 확장되었다.

考 察

肝臟은 銅化合物 代謝에 가장 중요한 역할을 담당하는 臟器인데,⁵ 혈청 albumin으로부터 銅을 供給받아서 貯藏하고 ceruloplasmin을 合成해서 이에 結合한 銅의 이동에 関여하며⁶ 膽道를 통해 銅을 배설하는 작용을 한다.⁷

Gregoriadis와 Sourkes,⁸ Milne와 Weswig⁹는 硫酸銅이 肝臟에 도달하면 肝細胞의 絲粒體, 微粒體, 核, 溶解小體등에 結合되어서 貯藏되거나 ceruloplasmin 같은 蛋白質結合物 形態로 血液內로 방출된다고 했다.

Todd¹⁰,¹¹는 晩性 銅中毒에서 수 주 혹은 수 개월 까지는 肝臟에 多量의 銅이 蓄積되는데 이 때는 특징적인 臨床症狀이 나타나지 않고 溶血性發症期에 이르면 미로소 突發性 溶血, 血色素尿, 貧血, 黃疸 등 臨床症狀이 나타난다고 했다.

臨床症狀이 發現되지 않는 시기와 發現되는 시기의 肝臟의 微細構造의 차이는 흥미있는 것이다.

Barka et al¹²은 體重 kg당 10mg의 硫酸銅을 2일 복강주사한 랫트에서 粗面內形質細網의 小槽가 擴張되었음을 보고했는데 본 研究에서도 6일간 硫酸銅을 투여한 群에서 小槽의 경미한 확장이 일어났으며 투여기간이 길어질수록 그 정도가 심하여서 위의 研究結果와 일치하였다. 다른 肝毒性物質¹³⁻¹⁶ 혹은 抗生物質¹⁷에 의한 肝細胞의 粗面內形質細網의 변화에 대한 보고도 많은데 그 공통된 소견은 小槽의 擴張과 膜부착 ribosome의 脫落이다. 이것으로 미루어 肝毒性物質은 모두 肝細胞의 粗面內形質細網을 損傷시켜 蛋白質合成을 저해하는 것 같다.

硫酸銅 투여에 의해 肝細胞의 滑面內形質細網이 증식되고 小槽가 擴張된은 이 化合物의 代謝를 촉진시키기 위한 것 같다.

Gooneratne et al¹⁸은 硫酸銅 10mg/kg B.W.을 48일간 반복투여한 群에서 絲粒體의 변화는 관찰되지 않았으나 그 이상의 기간동안 투여한 群에서 絲粒體가 증창되고 絲粒體陵이 消失되고 基質이 空胞化되고 基質內에 숨겨진 물질을 존재함을 보고했다. 또 Barka et al¹²은 硫酸銅 10mg/kg B.W.을 4일간 투여한 랫트에서 絲粒體陵의 배열이 膜에 평행하게 되고 基質內에 불규칙한 전자치밀질이 존재한다고 보고했다. 본 研究에서는 24일간 硫酸銅을 반복투여한 群에서 絲粒體陵이 확장되었는데 以上の 研究를 종합하여 볼 때 絲粒體의 변화는 먼저 絲粒體陵의 배열이 흔트러지고 그 후 擴張과 파열이 일어남을 알 수 있다.

Lindquist¹⁹는 鹽化銅에 中毒된 랫트에서 肝內에 銅의 含量이 증가됨에 따라 acid phosphatase活性이 증가되고 肝細胞의 溶解小體의 수가 많아지고 그 속에는

細胞小器管의 破片이나 異原性치밀질을 함유하고 있다고 했다. 또 Goldfisher,²⁰ Lal과 Sourkes²¹는 銅化合物이 투여된 랫트와 마우스에서 肝細胞의 溶解小體에 銅이 蓄積된다고 보고했다. 본 研究에서도 硫酸銅의 투여기간이 길수록 溶解小體의 출현이 많아지고 많은 自食空胞가 나타나 위의 研究와 유사한 結果를 얻었다.

本 研究에서 膽細管內 微絨毛가 위축된 것은 Hazelrig et al⁷이 銅化合物 代謝에 대한 肝臟의 作用에서 지적한 바와 같이 膽道를 통한 銅의 배설을 원활하게 하기 위한 것으로 思料되나, Disse 腔內의 微絨毛의 위축은 血液으로 부터 硫酸銅의 흡수과정에서 일어나는 현상인 것 같다.

銅에 대한 지방저장세포의 반응은 아직 보고된 바 없는 데 肝細胞보다 지방저장세포의 변화가 심한 것은 肝臟內 지질대사와 관련하여 더 추후에 불 과제이다.

또 24일간 硫酸銅 투여군에서 肝細胞膜의 損傷은 심한 水腫變性和 세포중창에 의한 파열에 기인한 것으로 思料되나 이것 역시 더 연구해 불 과제이다.

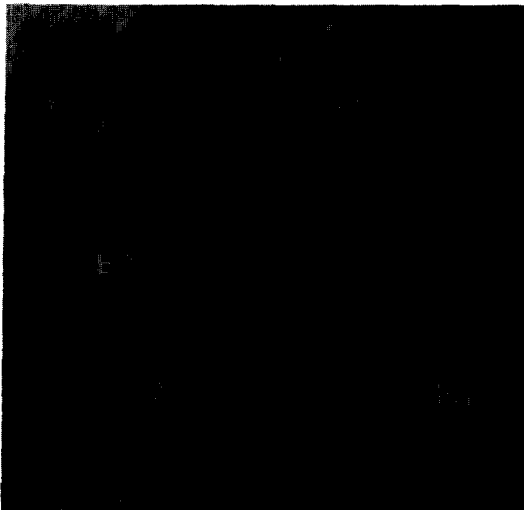
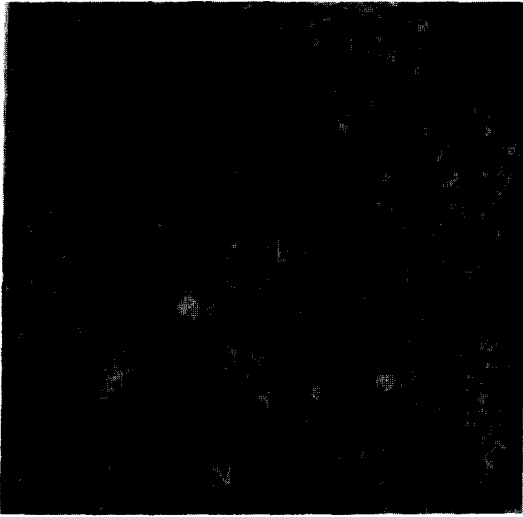
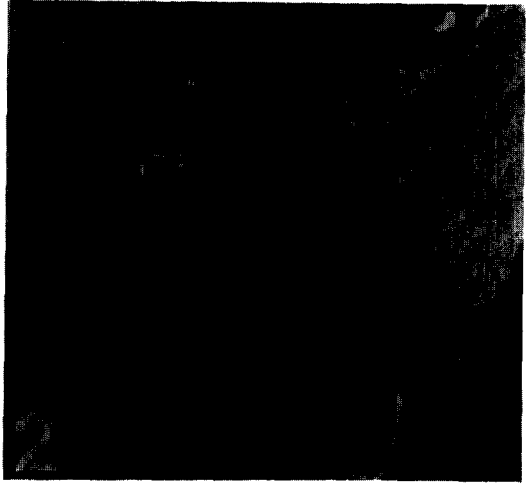
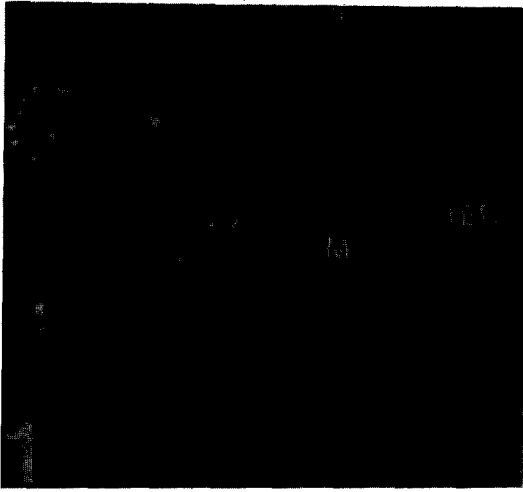
結 論

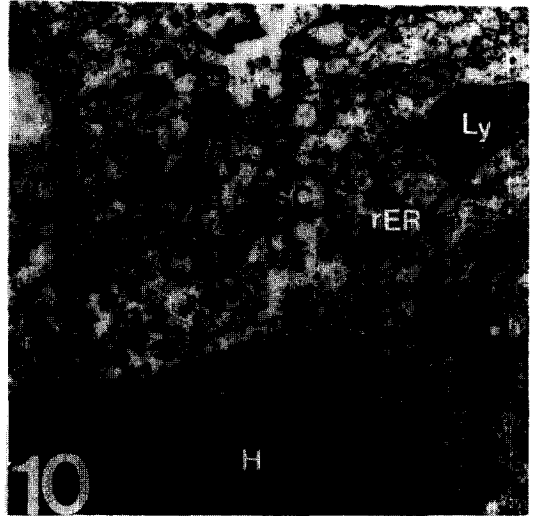
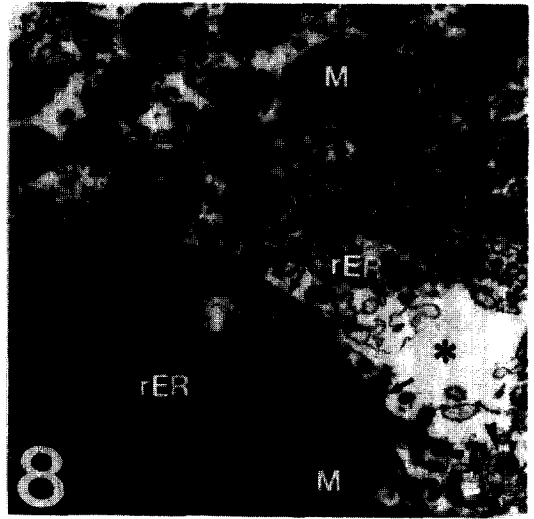
溶血前期에 肝臟의 微細構造에 미치는 硫酸銅의 영향을 규명하기 위하여 Sprague Dawley系 雄性 랫트에 硫酸銅 10mg/kg B.W.을 生理食鹽水에 희석하여 6, 12, 24일간 群별로 각각 복강내에 투여한 후 肝組織의 形態學的 變化를 電子顯微鏡으로 관찰하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 粗面內形質細網의 小槽가 擴張되었고 일부는 斷絶, 破裂되었으며 膜부착 ribosome이 脫落되었다.
2. 滑面內形質細網이 增殖되고 그 주변의 細胞質에 散在하는 glycogen粒子가 감소되었다.
3. 自食溶解小體의 수가 증가되었고 自食空胞도 다수 나타났다.
4. 絲粒體陵이 擴張되어 基質內에 불규칙하게 散在했다.
5. 膽細管 및 Disse腔內의 微絨毛가 위축되었다.
6. 肝細胞膜이 損傷되었고 洞樣血管주위에 심한 水腫變性이 관찰되었다.
7. 肝細胞보다 지방저장세포가 더 심한 變化를 받았다.

Legends for Figures

- Fig 1.** An electron micrograph of rat hepatocytes, control group. Microvilli of bile canaliculus (BC) are well developed. rER: rough endoplasmic reticulum. M: mitochondria. $\times 11700$.
- Fig 2.** An electron micrograph of rat hepatocytes and sinusoid (SN), control group. Microvilli in the space of Disse (SD) are well developed. rER: rough endoplasmic reticulum. M: mitochondria. $\times 11700$.
- Fig 3.** An electron micrograph of rat fat storing cell, control group. Rough endoplasmic reticula (rER) are well developed. N: nucleus. Ld: lipid droplet. SD: space of Disse. $\times 18400$.
- Fig 4.** An electron micrograph of rat hepatocytes, 6 days of copper sulfate treated group. Moderate atrophy of microvilli in the bile canaliculus (BC) is observed. rER: rough endoplasmic reticulum. M: mitochondria Gly: glycogen particles. $\times 11700$.
- Fig 5.** An electron micrograph of rat hepatocytes, 6 days of copper sulfate treated group. Microvilli in the space of Disse (SD) are well developed. rER: rough endoplasmic reticulum. sER: smooth endoplasmic reticulum. M: mitochondria. $\times 18400$.
- Fig 6.** An electron micrograph of rat hepatocytes, 12 days of copper sulfate treated group. Microvilli in the bile canaliculi (BC) are severely atrophied. N: nucleus. rER: rough endoplasmic reticulum. M: mitochondria. Ly: lysosomes. $\times 11700$.
- Fig 7.** An electron micrograph of rat hepatocyte and sinusoid (SN), 12 days copper sulfate treated group. Microvilli in the space of Disse (asterisk) are atrophied. rER: rough endoplasmic reticulum. M: mitochondria. $\times 18400$.
- Fig 8.** An electron micrograph of rat hepatocytes, 24 days of copper sulfate treated group. The dilatation of mitochondrial cristae and rough endoplasmic reticulum (rER) is prominent. Arrows: portion of damaged membrane. Arrow heads: autophagic vesicles. Asterisk: portion of hydrophic degeneration. rER: rough endoplasmic reticulum. M: mitochondria. $\times 11700$.
- Fig 9.** An electron micrograph of rat hepatocytes, 24 days of copper sulfate treated group. Atrophied nucleus (N) is observed. Asterisk: portion of hydrophic degeneration. $\times 11700$.
- Fig 10.** An electron micrograph of rat hepatocytes (H) and fat storing cell (FSC), 24 days of copper sulfate treated group. Rough endoplasmic reticulum (rER) of fat storing cell is more severely damaged than that of hepatocytes. Ly: lysosome. $\times 11700$.





參 考 文 獻

1. 韓仁圭, 鄭天容. 家畜營養學. 서울: 放送通信大學出版部 1988;184~185.
2. Ishmael J, Gopinath C, Howell IM. Experimental chronic copper toxicity in sheep. Histological and histochemical changes during the development of the lesions in the liver. *Res Vet Sci* 1971;12:358~366.
3. Bal H, Haldar D. Studies on toxic hepatic injury produced by copper sulfate injection in rats. *Ann Biochem Exp Med* 1961;21:253~256.
4. Wolff SM. Copper deposition in rat. *AMA Arch Path* 1960;69:217~223.
5. Dempsey H, Cartwright GE, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism XXV. Relationship between serum and liver copper. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1958;98:520.
6. Owen CA Jr, Hazelrig JB. Metabolism of Cu^{54} -labeled copper by the isolated rat liver. *Am J Physiol* 1966;210:1059.
7. Hazelrig JB, Owen CA Jr, Ackerman E. A mathematical model for copper metabolism and its relation to Wilson's disease. *Am J Physiol* 1966;211:1075.
8. Gregoriadis G, Sourkes TL. Intracellular distribution of copper in the liver of the rat. *Can J Biochem* 1967;45:1841~1851.
9. Milne PB, Weswig PH. Effect of Supplementary copper on blood and liver copper containing fractions in rats. *J Nutr* 1968;95:429~433.
10. Todd JR. Chronic copper poisoning in farm animals. *Vet Bull* 1962;31:573~580.
11. Todd JR. Chronic copper toxicity of ruminants. *Proc Nutr Soc* 1969;28:189~198.
12. Barka T, Scheuer PJ, Popper H. Structural changes of liver cells in copper intoxication. *Arch Path* 1964;78:331~349.
13. Reynolds ES. Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. *J Cell Biol* 1963;19:139~157.
14. Duley RE, Svoboda DJ, Klaassen KD. Time course of cadmium induced ultrastructural changes in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;76:150~160.
15. 李東植, 金淑英, 李圭植. Parathion이 mouse 간 세포의 미세구조에 미치는 영향. 大韓解剖學會誌 1983;16(2):145~160.
16. 金秀吉, 李圭植. Dimethyl Sulfoxide가 Mouse 肝細胞內 微細構造에 미치는 影響. 漢陽醫大學術誌 1983;3(2):339~351.
17. Conney AH, Gilman AG. Puromycin of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. *J Biol Chem* 1963;238:3682~3685.
18. Gooneratne SR, Howell J Mc C, Cook RD. An ultrastructural and morphometric study of the liver of normal and copper-poisoned sheep. *Am J Pathol* 1980;99:429~450.
19. Lindquist RR. Studies on the pathogenesis of hepatolenticular degeneration. I. Acid phosphatase activity in copper loaded rat livers. *Am J Pathol* 1967;51:471~481.
20. Goldfischer S. Demonstration of copper and acid phosphatase activity in hepatocyte lysosomes in experimental copper toxicity. *Nature* 1967;215:74~75.
21. Lal S, Sourkes TL. Intracellular distribution of copper in the liver during chronic administration of copper sulfate to the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1971;18:562~572.