

비소가 백서 신세뇨관 상피의 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Activated Adenosine Triphosphatase의 활성도에 미치는 영향에 관한 조직화학적 연구

고신대학 의학부 해부학교실

강종득, 김순옥

Histochemical Study of Effects of Arsenic on $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Activated Adenosine Triphosphatase Activity in Tubular Epithelial Cells of Rat Kidney

Jong Deuk Kang, Soon Ok Kim

Department of Anatomy

Kosin Medical College, Pusan 602-030, Korea

= Abstract =

Arsenic, especially trivalent form, produces highly toxic effects to living organisms. By binding to sulfhydryl groups in proteins, arsenic interferes with many enzymes essential to cellular metabolism. In this study, histochemical changes in ATPase activity in the rat kidney induced by arsenic were investigated

Male adult rats(Sprague-Dawley strain) were treated with arsenic (As_2O_3) in three different doses, 10, 13, and 16mg/kg body weight. The changes in the tubular epithelial cells of the kidney were investigated by enzyme histochemical methods.

With H-E and PAS staining, the control and experimental groups did not show appreciable difference in morphology. With ATPase reaction, the epithelial cells of the distal tubules of the control group exhibited stronger enzymatic reaction than the cells of the proximal tubules. In the arsenic-treated rats, the proximal and distal tubules showed decreased enzymatic activity, especially in the latter.

서 론

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 펌프는 실질적으로 모든 동물 세포의 세포막에 존재하는데 이것은 농도경사(concentration gradient)에 역행하여 Na^+ 을 세포밖으로 K^+ 을 세포안으로 능동적으로 운반한다. 이 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 펌프에 의해 유지되는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 의 농도경사는 세포막의 전압(potential)의 유지 뿐 아니라 세포의 용량을 조절하는 역할을 한다. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -activated adenosine triphosphatase(이하 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase로 약함)는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 펌프의 일부분으로 전해질의 능동적 이동에 필요한 에너지를 공급한다^{10, 22)}.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase에 영향을 미치는 물질 가운데 이 연구에서 비소를 선택한 것은 이 물질이 식품, 환경, 산업장 등 광범위한 분야에 분포되어 있어 이로 인한 급성 및 만성중독을 일으킬 수 있는 가능성이 높기 때문이다^{2, 9, 16, 20)}.

저자는 단백질독인 3가 비소(As_2O_3)가 신세뇨관 상피의 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase의 활성도에 미치는 영향을 조직화학적으로 연구하였다.

재료 및 방법

가) 재료

실험 동물로는 체중 250 g 내외의 건강한 웅성 백서(Sprague-Dawley strain)를 사용하였으며 대조군과 실험군으로 구분하고 실험군은 다시 3군으로 나누어 각 군 마다 비소의 양을 다르게 투여하였다.

비소(As_2O_3)를 수용액의 형태로 각 개체의 kg 당 10, 13, 16mg을 복강 내 주사하였다. 비소주사 5일후 ether마취하에 복벽을 절개하고 양쪽 신장을 적출하였다. 대조군은 아무런 처리없이 실험군과 동일한 조건 하에서 사육하여 실험에 사용하였다.

적출한 신장의 일부는 ATPase 반응 검출

에, 일부는 PAS(periodic acid-Schiff)반응 관찰에 사용하였고 비소 투여로 인한 신장의 광학 현미경적 구조의 변화를 대조, 비교하기 위하여 H-E(hematoxylin-eosin)염색을 병행하였다.

나) 조직화학적 방법

ATPase 반응을 관찰하기 위한 조직화학적 방법은 Vacca의 변법(25)을 사용하였다. 실험동물에서 신장을 적출하여 즉시 동결박절기로 10 μ m 두께의 동결절편을 만든다. 이 절편으로 다음과 같은 과정에 의하여 ATPase 활성 반응을 관찰하였다.

증류수 100ml에 ATP 125mg을 용해시켜 ATP용액을 만들고 증류수 500ml에 maleic acid 29g 과 tris-maleate 완충액, 0.1M MgSO_4 용액, 2% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 용액과 증류수를 20:20:5:3:2의 비율로 섞어 만든 incubation 용액을 0.1N NaOH 용액을 이용하여 pH 7.2에 맞추었다. 이 incubation 용액에 10 μ m의 두께로 동결절편한 조직을 담귀 37°C의 부란기에 10분 간 반응시킨 후 세번 증류수에 세척하였다. 그리고 다시 2분간 2% ammonium sulfide 용액에서 발색시킨 후 세번 증류수로 세척하고 glycerol jelly로 봉입하여 관찰하였다.

결 과

비소투여가 백서 신세뇨관 상피의 ATPase 활성도에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

가) ATPase반응

ATPase활성 반응은 대조군 피질의 근위세뇨관과 원위세뇨관 모두에서 관찰되는데 원위세뇨관에서의 활성도가 근위세뇨관에서보다 강하였다.(Figs.1 and 3). 실험군에서는 근위세뇨관과 원위세뇨관에서 활성도가 더 감소하여 근위세뇨관과 거의 비슷하게 약한 활성도

를 보였다. 각 실험군들 사이에서는 비소 투여량이 증가할수록 활성도의 경미한 감소가 관찰되었다. (Figs. 2 and 4).

나) PAS 염색

비소 투여 후 신장 피질 신세뇨관의 brush border와 기저막의 상태를 관찰하기 위하여 PAS반응을 실시하였던 바 대조군과 실험군 모두에게 기저막 및 brush border에서 PAS양성 반응이 관찰되는데 두군 사이에 유의한 차이는 없었다. (Figs. 5 and 6).

다) H-E염색

대조군과 실험군의 신세뇨관 상피세포 사이에 광학 현미경하에서의 형태학적 차이는 관찰되지 않았다 (Figs. 7 and 8).

고 찰

비소는 고대로부터 치료약제와 독약으로 사용되어 초기 약리학자들에 의해 많은 연구가 행하여졌다. 그러나 현재는 몇몇 열대병을 제외하고는 치료약제로써 거의 쓰이지 않는 반면^{2, 6, 11} 살충제, 제초제 등의 원료로 사용되어 농산물 재배과정에서 이들을 오염시켜 자연식품과 가공식품에서 의의있는 양이 검출되고 있다^{2, 21}. 또 토양, 바닷물 등에도 포함되어 있어 식수, 물고기, 조개류 등의 해산물에서도 검출되고^{9, 15} 반도체, 합금, 유리제조 등 다양한 용도에 사용되어 환경을 오염시키며^{16, 22} 제련소, 석유 산업장에서는 arsine gas의 형태로 노출되어 이에 중사하는 종사자들에게 암 등의 질병을 일으킬 수도 있다^{3, 7, 15, 27}. 또한 DNA repair를 억제하여 태아의 기형을 유발할 수도 있으며^{7, 15} 임파구 등의 세포에 작용하여 염색체 이상을 일으킨다는 사실도 실험적으로 밝혀졌다¹.

비소는 흔히 폐, 소화관, 피부를 통해서 흡수되며 흡수된 비소는 골, 모발, 피부, 간, 신장 그리고 소화관의 벽 등에 저장된다. 신경계와 근육에서는 의의있는 저장량이 측정되

지 않았다고 보고되었다^{2, 6}.

비소중독의 증상은 구토, 혈변 등 소화기계 의 장애로 시작되는데 헤모글로빈뇨를 동반한 급성용혈이 특징이며 황달이 나타나는 경우도 있다^{2, 3, 23}. 치명적인 양의 복용시에는 보통 말초혈관이 확장되어 실질적 순환혈액이 감소하여 shock을 일으킨다. 이는 중추신경계 순환 중추의 조절을 마비시킨 때문으로 생각된다²³.

중독의 해부학적 변화는 혈관계, 신경계, 소화기계 피부 등에서부터 일어나기 시작하여 궁극적으로는 신부전을 일으킨다^{2, 23}. 비소 중독 시 신세뇨관 세포의 손상을 보이는데 순환 장애와 용혈의 효과가 신세뇨관 세포의 손상을 일으켜 급성신부전의 생성에 기여할 것으로 추측되기도 하지만 그보다는 비소 유도체의 직접적인 독성이 중요한 역할을 하는 것 같다^{2, 23}.

비소는 맛과 냄새가 없는 유독한 물질이다. 비소가 체내로 흡수될 때 물에 대한 용해도에 영향을 받는다. 3가 형태의 비소가 5가 형태보다 물에 덜 녹기 때문에 흡수가 잘 안되며 또한 더 느리게 체외로 배출된다^{1, 9, 15, 25, 26}. 이 3가 형태의 비소가 효소에 미치는 영향이 강하여 수황기(sulphydryl group)에 친화성을 가지며 이를 억제함으로써 생물학적 작용에서 중요한 역할을 하는 여러 효소의 작용을 거하시킨다^{2, 9, 15, 23}.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 펌프의 일부 분으로 전해질의 능동적 이동에 필요한 에너지를 공급하는 생리학적으로 중요한 효소이다^{1, 22}. 조직화학적 반응에서 이 효소는 원위세뇨관에서 근위세뇨관보다 더 강한 활성도를 보인다^{4, 5, 6, 8, 12, 12, 14, 15, 17, 18, 21, 22}.

본 실험에서 ATPase활성 반응은 근위세뇨관과 원위세뇨관 모두에서 비소 처리에 의해 감소하였다. H-E와 PAS 염색에서는 대조군과 실험군 사이에 차이를 보이지 않는데 ATPase 반응의 결과와 비교해 볼 때 신세뇨관 상피세포의 H-E염색상에서 나타날만한 형

태적 손상을 주기 전의 용량에서부터 효소의 활성도에 영향을 미치는 것으로 생각되어진다.

요 약

신장에서 전해질의 이동에 중요한 역할을 하는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 활성에 미치는 영향을 조직화학적으로 연구하였다.

비소(As_2O_3)를 kg 당 10, 13, 16mg씩 각각 투여한 백서의 신장을 5일후 적출하여 H-E와 PAS염색, 그리고 신세뇨관의 ATPase반응의 변화를 관찰하였다.

ATPase염색에서 대조군에서는 원위세뇨관이 근위세뇨관보다 높은 활성도를 보였고 실험군에서는 원위세뇨관과 근위세뇨관 모두에서 감소하여 비슷한 정도의 활성도를 보였다. H-E와 PAS염색에서는 실험군과 대조군 사이에 차이를 보이지 않았다.

신세뇨관의 ATPase 반응 및 PAS와 H-E염색의 결과를 비교, 종합하여 보면 비소가 신세뇨관의 상피세포에 광학 현미경에서 관찰되는 형태적 변화를 일으키기 전의 용량에서부터 효소의 활성도에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Beckman L, Nordenson I : Interaction between some common genotoxic agents. Hum Hered 36 : 397-401, 1986.
2. Brenner BM, Rector FC : The kidney. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1986, pp 1507-1508.
3. Earley LE, Gottschalk CW : Strauss and Welt's disease of the kidney. 3rd ed. Boston, Little, Brown and Company, 1979, p 1447.
4. Ernst SA, Schreider JH : Ultrastructural localization of Na^+ , $\text{K}^+ - \text{ATPase}$ in rat and rabbit kidney medulla. J Cell Biol 91 : 803-813, 1981.
6. Frith JA : Quantitative assessment of Na^+ , $\text{K}^+ - \text{ATPase}$ localization by direct and indirect p-nitrophenyl phosphatase methods. J Histochem Cytochem 35 : 507-513, 1987.
7. Frost F, Harter L, Milham S, Royce R, Smith AH, Hartley J, Enterline P : Lung cancer among women residing close to an arsenic emitting copper smelter. Arch Environ Health 42 : 148-152, 1987.
8. Fullmer CS, Wasserman RH : Intestinal absorption of arsenate in the chick, Environ Res 36 : 206-207, 1986.
9. Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Muras F : Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 7th ed. New York, Macmillan Publishing Company, 1985, pp 1629-1637.
10. Guth L, Albers RW : Histochemical demonstration of ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-activated adenosine triphosphatase. J Histochem Biochem 22 : 320-326, 1974.
11. Haider SG, Rolaufts D, Goslar HG, Stuhl O, Birkofer L : Effects of an organosilicon compound on the tubular apparatus of rat kidney. Acta Anat 131 : 9-12, 1988.
12. Hender ED, Torretti J, Epstein FH : The distribution of sodium-potassium activated adenosine triphosphatase in medulla and cortex of the kidney. J Clin Inv 50 : 1329-1337, 1971.
13. Hood RD, Vedel GC, Eavorotko MJ, Tatum FM, Meeks RG : Distribution, metabolism, and fetal uptake of pentavalent arsenic in pre-

- gnant mice following oral or intraperitoneal administration. *Teratol* 35 : 19-25, 1986.
14. Jorgensen PL : Structure, function and regulation of Na, K-ATPase in the kidney. *Kidney Int* 29 : 21-31, 1986.
15. Katz AI : Distribution and function of classes of ATPase along the nephron. *Kidney Int* 29 : 21-31, 1986.
16. Katzung BG : Basic & Clinical pharmacology. 1st ed. California, Lange Medical Publications, 1982, pp 698-699.
17. Kyte J : Immunoferritin determination of the distribution of($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules. I. Distal segment. *J Cell Biol* 68 : 287-303, 1976.
18. Kyte J : Immunoferritin determination of the distribution of($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules. II. Proximal segment. *J Cell Biol* 68 : 287-303, 1976.
19. Massey EW, Wold D, Heyman A : Arsenic : Homicidal intoxication. *South Med J* 77 : 848-851, 1984.
20. Robbins ST, Cotran RS, Kumar V : Pathologic basis of disease. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1984, pp 1026-1029.
21. Schmidt U, Dubach UC : Activity of($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-stimulated adenosine triphosphatase in the rat nephron. *Pflugers Arch* 306 : 219-226, 1969.
22. Schmidt U, Dubach UC : Na-K stimulated adenosine triphosphatase : Intracellular localization within the proximal tubule of the rat nephron. *Pflugers Arch* 330 : 265-270, 1971.
23. Schreider HA, Balassa JJ : Abnormal trace metals in man : arsenic. *J Chronic Dis* 19 : 35-38, 1974.
24. Thienes CH, Haley TJ : Poisons with symptoms referable to the digestive tract. *Clin Toxicol* 5th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1972, pp 169-184.
25. Vacca LL : Laboratory manual of histochemistry. 1st ed. New York, Raven Press, 1985, pp 505-508.
26. Webb DR, Sipes IG, Carter DE : In vitro solubility and in vivo toxicity of gallium arsenide. *Toxicol Appl Pharmacol* 76 : 96-104, 1984.
27. Yamamoto A, Hisanaga A, Ishimishi N : Tumorigenicity of inorganic arsenic compounds following intratracheal instillations to the lungs of hamster. *Int J Cancer* 50 : 220-223, 1987.
28. Yamauchi H, Takahashi K, Yamamura Y : Metabolism and excretion of orally and intraperitoneally administered gallium arsenide in the hamster. *Toxicol* 40 : 237-246, 1986.



Fig. 1. ATPase reaction in tubular epithelial cells in the control rat. G=glomerulus; T=renal tubule. $\times 200$.



Fig. 2. ATPase reaction in tubular epithelial cells in the arsenic-treated rat(16mg/kg) shows decreased reactivity. G=glomerulus; T=renal tubule. $\times 200$.

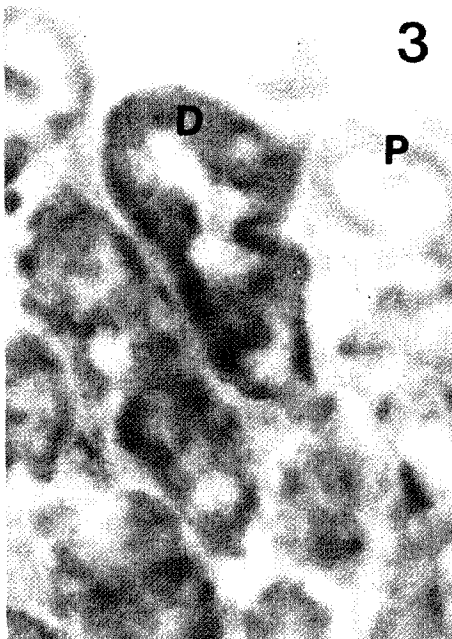


Fig. 3. ATPase reaction in the same rat as in Fig. 1 as a higher magnification. D=distal tubule; P=proximal tubule. $\times 400$.

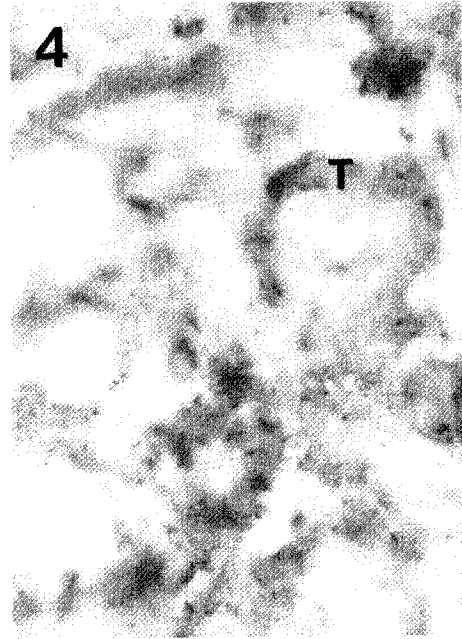


Fig. 4. ATPase reaction in the same rat as in Fig. 2 as a higher magnification. T=renal tubule. $\times 400$.



Fig. 5. PAS staining in the tubular epithelial cells in the same rat as in Fig. 1. Arrow=basement membrane ; arrowhead=brush border. $\times 200$.



Fig. 6. PAS staining in the tubular epithelial cells in the same arsenic-treated rat as in Fig. 2. Arrow=basement membrane ; arrowhead=brush border. $\times 200$.



Fig. 7. H-E staining in the tubular epithelial cells in the same rat as in Fig. 1. T=renal tubule. $\times 200$.



Fig. 8. H-E staining in the tubular epithelial cells in the same arsenic-treated rat as in Fig. 2. T=renal tubule. $\times 200$.