Rifampicin 이 家兔 膵臟外分泌腺에 미치는 影響

延世大學校 醫科大學 內科學 教室

咸 聖 淑

病理學 教室

金 貞 淑

The Effects of Rifampicin on the Exocrine Gland of Pancreas in Rabbits

Sung Sook Ham, M.D.

Department of Internal Medicine

Chung Sook Kim, M.D.

Department of Pathology

College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Rifampicin is a new semisynthetized antibiotics produced from the bacteria of rifampicin, which belongs to the streptomyces mediterani isolated from the soil of the mediterranean coast. Maggi(1966) and Arioli(1967) reported that this antibiotics has a high antibacterial action on the gram positive and negative organisms.

Subsequently, in 1967 Pallanza and Maggi found that this antibiotics has a high antibacterial action especially on tuberculous bacilli. But the mechanism of rifampicien antibacterial action is still unknown. Wehrli(1968), Ezekiel(1963) and Mauro(1969) reported that the basic of rifampicin's antibacterial action is to inhibit the DNA-dependent-RNA polymerase and repress the synthesis of RNA as many other antibiotics.

The purpose of this study is to observed the effects of Rifampicin on the pancreas of the rabbit, which is sensitive to the chemical substances and influence on the synthesis of proteins.

The Rifampicin was given in a single or multiple injections and the amount of serum amylase, and morphological changes of exocrine gland of the pancreas were examined.

1. All the experimental groups showed a little deminution in the amount of serum amylase at the early stage after Rifampicin injection.
2. Light microscopy revealed that crowdly swelling & decrease of RNA of the acinar cells of the pancreas. It was conspicuous in Group 2, but degeneration, atrophy, vacuole formation and the distribution, of the zymogen granules are substantially the same in Group 2 and 3.
3. In the ultrastructural changes of the exocrine gland of the pancreas, the dilation of Rough endoplasmic reticulum with detached ribosome are remarkable from 6 to 18 hours after the rifampicin injection, and autophagic vacuoles are observed after 24 to 48 hours at Group 3.
4. The increase of lipid in the cytoplasm is conspicuous in the Group 3 from 48 hours after injection.

緒 論

Rifampicin(RFF)은 1957年 地中海沿岸의 흙에서

분리된 담성균 Streptomyces mediterani에서 生成되는 Rifampicin菌에서 化學的으로 만들어 낸 半抗生物質로서 Maggi(1966) 및 Arioli(1967) 등이 이 抗生物

質이 gram 陽性 및 陰性菌에 높은 抗菌作用이 있다고 報告하였다. 계속하여 Pallanza 및 Maggi(1937) 등은 이 抗生物質이 특히 結核菌에 대하여 높은 抗菌作用이 있다고 보고하므로써 廣範圍한 抗生物質로 작광을 받기 시작하였다.

그러나 아직까지 Rifampicin의 抗菌作用의 機轉은 알려져 있지 않아 앞으로의 계속 연구 대상이 되고 있다.

Wehrl et al.(1968), Ezekiel et al.(1963) 및 Mauro et al.(1969), 등은 Rifampicin의 抗菌機轉이 다른 많은 抗生劑의 機轉과 같이 DNA에 의존된 RNA Polymerase에 作用하여 RNA 合成을 阻害하는 作用이 있어 細菌 내에서 활발한 RNA 合成을 하는 단계를 阻害하므로써 菌에 대한 抗菌作用을 하는 것이라고 報告하였다.

본 연구는 蛋白質合成 또는 分泌에 영향을 주는 化學物에 의하여 쉽게 손상을 받는 脾臟이 Rifampicin에 미치는 영향을 관찰코저 Rifampicin을 單回, 또는 여러 回로 分離투여하여 脾臟의 消化酵素인 Amylase 値와 脾臟外分泌腺에 미치는 形態學的變化를 관찰하였다.

實驗材料 및 方法

體重 2 kg 내외의 자웅 家兔를 使用하였고 다음과 같은 군으로 구분하였다<표 1>.

<표 1> 실험 방법(실험군)			
군 별 실험 시일	I 군 정상대조군 (15 마리)	II 군 RFP 단회 투여군 (20 마리)	III 군 RFP 4일간 투여군 (20 마리)
6 시 간	3 마리	4 마리	4 마리
18 "	3	4	4
24 "	3	4	4
48 "	3	4	4
5 일	3	4	4

제1군 정상대조군은 0.5% Carboxy methyl cellulose 1.0ml를 腹腔內에 주사하였다.

제 II 군은 Rifampicin 200mg/kg를 單回 腹腔內에 주사한 후, 6, 18, 24, 48 時間 및 5 日 간격으로 도살하였고,

제 III 군은 Rifampicin을 1日 50mg/kg씩 4日間 매일 腹腔內에 주사한 후 6, 8, 24, 48 時間 및 5 日 간격으로 도살하였다.

Rifampicin은 (Lepetit Co.) 0.5% Carboxy methyl cellulose에 용해하였다.

대상은 血清에서 Amylase를 측정하고 脾臟外分泌腺의 形態學的變化를 관찰코저 光學 및 電子顯微鏡으로 관찰하였다. 病理組織檢査를 위하여서는 10% 中性

Formalin에 固定하고 Faraffin에 포매하여 일반적인 變화를 관찰코저 Hematoxylin-eosin 염색을 하였고 RNA의 分佈를 위하여 Methyl green pyronin 염색을 하였고 Zyn ogen granule의 양상을 보기 위하여 Chrom alum hematoxylin phloxine 염색을 시행하였다.

電子顯微鏡의 관찰을 위하여는 1% Osmium tetroxide in phosphate buffer에 고정하고(Palade, 1952), Epen 812로 포매하여(Luft, 1961), Uranyl acetate 및 Lead citrate로 염색(Watson, 1958)하여 Hitachi HU-11 電子顯微鏡으로 관찰하였다.

實驗成績

血清 Amylase 量變動: 血清 Amylase 値는 부검시 股脈에서 採血하여 血清을 分離하고 Nelson(1944) method를 응용하여 澱粉基質에서 유리되는 maltose 量을 測定하였다.

血清 Amylase 値는 실험군(II 및 III 군)에서 Rifampicin 투여 6時間後에 다같이 輕한 감소를 보였고 II 군의 18, 24, 48時間에서는 오히려 약간 증가한 것을 관찰할 수 있었다. <표 2>

<표 2> 혈청 AMYLASE 치

	I 군	II 군	III 군
6 시 간	3114.0	2974.1	2765.3
18 "	3100.6	3674.6	2994.5
24 "	3097.1	4362.4	3264.2
48 "	3018.5	4016.2	3810.7
5 일	3167.4	3109.2	3625.4

病理組織學的의 所見: 脾臟外分泌腺所見 정상대조군의 脾臟外分泌腺의 腺胞는 規則적으로 배열되어 있고 細胞質은 好酸性으로 풍부하며 腺胞의 기저부위에 다수 배열되어 있었다(부도 1).

실험 제 II 및 III 군의 위장의 분비선의 腺胞의 解離는 정상대조군에 비하여 현저하였고, II 군 Rifampicin 투여 후 6時間 및 18時間에서 輕한 變性을 관찰하였고 제 III 군에서는 II 군보다 輕한 變性을 관찰하였다(부도 2).

細胞質內的 空胞形成은 실험군 제 II 및 III 군에서 Rifampicin 투여 6시간 후부터 24시간까지 유사하게 나타났다. 파사는 제 II 군 Rifampicin 투여 48시간 및 5일 군에서 현저하였고 Zymogen 顆粒 및 RNA分佈는 대조군에 비하여 실험 II 및 III 군에서 輕한減少를 보였다.

電子顯微鏡의 所見: 微細構造의 觀察은 蛋白代謝 장애의 初期變化를 보고저 細胞質內的 Rough endoplasmic reticulum(RER)의 擴張有無, Ribosome의 탈락

<표 3> 脾臟外分泌腺의 組織學的 所見

		細胞質							核
		腺胞解離	變性	空胞形成	萎縮	局所壞死	Z顆粒分布	RNA分布	
I 군	정상대조군	—	—	—	—	—	卅	卅	—
II 군	6 시 간	卅	卅	+	—	—	卅	卅	+
	18 "	卅	卅	卅	—	—	+	卅	+
	24 "	+	+	卅	—	+	卅	卅	—
	48 "	+	—	+	+	+	卅	卅	—
	5 일	—	—	—	+	+	卅	卅	—
III 군	6 시 간	卅	+	卅	—	—	卅	卅	+
	18 "	卅	+	卅	+	+	卅	卅	—
	24 "	+	+	+	+	+	卅	卅	—
	48 "	—	—	—	+	—	卅	卅	—
	5 일	—	—	—	—	—	卅	卅	—

유무, Golgi membrane, Zymogen granule 등의 변화를 대상으로 하였다.

정상대조군에서는 이들 미세구조의 소견은 이미 報告된 것과 같았고(부도 3), 실험 제 II 군에서 Rifampicin 투여 6시간 후에 이들 미세구조 중 RER이 다소擴張되면서 Ribosome이 탈락되어 있음을 보이는데(부도 4), 이러한 변화는 Rifampicin 투여 후 18시간에서 더욱 뚜렷하였고, 24시간 후부터는 별로 현저한 변화가 없었다. Golgi membrane의擴張 및 Golgi vacuole의 증가 등은 部分的이나 Rifampicin 투여 18, 24 및 48 시간 후에도 觀察되었다.

Autophagic vacuole의 數가 Rifampicin 투여 18 및 24시간에 현저하게 증가되어 있으며(부도 5), Rifampicin 투여 5일 후에는 大部分 恢復된 것을 보여 주었다. 이러한 미세구조 등의 변화는 실험 제 III 군에서도 유사하게 관찰하였으나 제 II 군보다 경한 所見들이었고(부도 6), 脂質의 出現은 제 III 군 Rifampicin 투여 48시간 후에 제일 많이 관찰되었다(부도 7).

總括 및 考察

본 실험을 綜合하여 보면 Rifampicin 單回 주사한 제 II 군에서는 Rifampicin 투여 6시간 후부터 脾臟外分泌腺의 腺胞解離, 空胞가 나타나고 RNA 및 zymogen granule의 輕한 감소를 보였으며, 투여 48시간 후부터는 大部分 正常으로 恢復되었음을 관찰하였다.

제 III 군에서는 제 II 군보다 약간 경한 所見을 관찰할 수 있었고 다만 脂質의 出現이 제 II 군보다 현저한 것을 보여 주었다.

血清 Amylase는 실험군 제 II 군에서 Rifampicin 투여 18시간 후에 輕한 上昇을 보이기 시작하여 투여 5

일 후에는 다시 恢復되는 것을 보았다. 그러나 제 III 군에서는 투여 24시간 후부터 輕한 上昇을 보였다.

脾臟外分泌腺 機能과 蛋白質代謝와는 相互 밀접한 관계가 있어 어느 한쪽에 變化를 가져오면 다른 한쪽이 영향을 받게 되며, 脾臟細胞의 形態變化에 따라 酵素에 영향을 가져오는 것으로 알려졌다. 本實驗에서 Amylase의 變化가 있었으나, 현저한 變化는 아니었다. 그것은 脾臟에 어떤 장애를 받아 酵素에 이상을 가져올 때 가장 예민하게 酵素의 이상을 가져오는 것이 Lipase 및 Trypsin이며 Amylase는 그리 뚜렷한 변동을 가져오지 않는다는 Veghelyi(1948)의 報告와 유사한 결과라고 생각한다.

그러나 아직 脾臟의 形態變化와 機能變化, 相互關係性에 대하여는 상세히 밝혀져 있지 않으며 腺胞解離가 酵素活動性的의 어떤 特有性을 갖고 있는지는 아직 究明이 되어 있지 않고 있다.

微細構造의 變化로 Rough endoplasmic reticulum cisternae의擴張 및 ribosome의 脫落이 Rifampicin 투여 6시간 후부터 部分的으로 뚜렷하게 관찰되었는데 이것은 Rough endoplasmic reticulum이 外分泌消化酵素를 合成하고 이동하는데 관여하는 것으로 消化酵素의 分泌를 抑制하고 蛋白質合成을 抑制하는 것이라고 생각된다. 勿論 이러한 變化는 Rifampicin 뿐만 아니라 여러 종류의 損傷에 대한 反應으로서 여러 種類의 細胞內에서도 일어난다고 보고되었고 이러한 變化의 機能變化에 대한 特異性은 明白하지는 않다.

Golgi vacuole의 팽창과 增加는 酵素蛋白의 貯藏과 移動이 방해되어 나타나는 것으로 생각되며 이러한 變化는 β -3-thienylalanine을 투여한 후 脾臟에서 이와

부도1. 正常對照群 脾臟外分泌腺 所見으로 正常인 脾臟細胞와 islet cell을 보임.
H-E염색, 430X.

부도2. 제Ⅱ군 (18시간후)의 脾臟外分泌腺所見으로 細胞의 解離 및 腔胞 形成을 보임.
H-E염색, 430X.

부도3. 正常 脾臟外分泌腺의 전자 현미경 所見. 腺腔(Lu) 주위로 多數의 成熟된 Zymogen granule(Z)이 보임. 16,000X.

부도4. 제Ⅱ군 Rifampicin 투여 6시간후 脾臟外分泌腺의 所見으로 擴張된 Golgi complex (Go) 주위로 多數의 Vacuole이 보이며 電子密度가 낮은 小胞體가 보임. 22,500X.

부도5. 제Ⅱ군 Rifampicin 투여 18시간후 脾臟外分泌腺의 所見, 擴張된 Endoplasmic Reticulum Cisternae에 ribosome의 脫落과 多數의 Autophagic vacuole (→표) 및 Zymogen granule (Z)을 보임. 22,500X.

부도6. 제Ⅲ군 Rifampicin 투여 18시간후 脾臟外分泌腺의 所見으로 細胞質內에 多數의 Zymogen granule (Z) 및 Autophagic Vacuole (→표)를 보임. 22,500X.

부도7. 제Ⅲ군 Rifampicin 투여 48시간후 脾臟外分泌腺의 所見으로 細胞質內의 多數의 脂質(Li)을 보임. 16,000X.

유사한 소견을 보였다고 Hruban 등(1963)이 報告한 바 있다.

Rifampicin을 투여하는 동안 점차적으로 增加하여 나타나는 자가포식성공포(Autophagic vacuole)의 크기와 數가 增加하는 것을 볼 수 있었는데 이것은 여러 가지 毒物質이나 어떤 物質에 缺如狀態後에 볼 수 있으며, 이들의 内容物은 여러 단계의 變성된 미세기관들이라고 Hruban 및 Swift(1964)가 보고하면서 이것은 部分的인 細胞質의 파괴라고 지적한 것으로 보아 아마 Lysosome과 같은 意義를 갖는 것이라고 생각된다.

Rifampicin 투여 후에 나타나는 脂質(Lipid) 蓄積은 Lysin 결핍, 蛋白質 결핍 및 Ethionin을 투여한 후에 나타나는 소견들이라고 Baglio(1965)는 報告하였다. 이러한 變化는 Rifampicin이 Lipoprotein 合成의 抑制에 의한 新陳代謝의 不均衡을 나타내는 것이라고 생각한다.

이상과 같은 成績은 Rifampicin의 毒性은 强하지 않으나 蛋白質合成을 抑制하고 脂質을 生成하는 것으로 보아 脂質沈着의 成因而 對한 研究은 앞으로의 과제라고 생각한다.

結 論

Rifampicin을 單回 또는 數回 投與하여 脾臟의 消化酵素인 amylase 値와 脾臟外分泌腺細胞에 미치는 形態學的變化를 觀察하였다.

① 血清 amylase 値는 對照群에 비하여 實驗群(Ⅱ 및 Ⅲ) 모두에서 投與 初期에 輕한 減소를 보였다.

② 光學顯微鏡의 所見으로는 臟外分泌細胞의 腺胞解離와 RNA 減소는 實驗群 제Ⅱ군에서 顯저하였으나 變性, 萎縮, 空胞形成 및 zymogen 顆粒의 分布 등을 實驗群 Ⅱ 및 Ⅲ군에서 大同小異하였다.

③ 脾臟外分泌細胞의 微細構造變化로는 제Ⅱ군에서 Rough endoplasmic reticulum의 확장과 ribosome의 脫落이 Rifampicin 투여 후 6 및 18시간에서 顯저하였고 autophagic materials은 24, 48시간 후에 多數 관찰되었는데 實驗群 제Ⅲ군에서는 이러한 所見이 제Ⅱ군 보다 약간 輕하게 觀察되었다.

④ 細胞質내에 脂質의 증가는 제Ⅲ군 Rifampicin 투여 48시간 후부터 顯저하였다.

(本研究은 1973年度 延世大學校醫科大學 教授研究費에서 補助 받았음을 감사드립니다.)

References:

1. Arioli, V., R. Pallanza, S. Furesz and G. Carniti: Rifampicin: A new rifampicin I. *Bacteriological studies. Arzneim, Forsch*, 17:523-529, 1967.

2. Boglio, C.M. and Farber, E.: *Reversal by adenine of the ethionine induced lipid accumulation in the endoplasmic reticulum of the rat liver. A preliminary report.* J. Cell Biol., 27: 591, 1965.
3. Ezekiel, D.H. and J.E. Mutchins: *Mutation affecting RNA polymerase associated with Rifampicin Resistance in Escherichia coli.* Nature 220: 276-277, 1963.
4. Hruban, Z., H. Swift, and R. Wissler: *Alteration in the fine structure hepatocytes produced by 3-thienylalanine.* J. Ultrastructure Res. 8:236, 1963.
5. Luft, H.H.: *Improvements in epoxy resin embedding method.* J. Biophys. Biochem. Cytol., 11: 736, 1961.
6. Maggi N., C.R. Pasqualucci, H. Ballota: *Rifampicin, A new orally active rifamycin.* Chemotherapia 11: 285-295, 1966.
7. Mauro E. di., L. Snyder, P. Marino, A. Coppo and C.P. Tochini-Valentini. *Rifampicin sensitivity of the components of DNA dependent RNA polymerase Nature.* 222: 533-537, 1969.
8. Nelson N.: *A photometric adaptation of the somogy: Method for the determination of glucose.* J. Biol. Chem. 153: 375, 1944.
9. Fa'ade, C.E.: *A study of fixation for electron microscopy.* J. Exp. Med. 95: 285, 1952.
10. Pallanza R., V. Arioli, S. Furesz and G. Boloni: *Rifampicin, A new rifamycin II. Laboratory studies on the antituberculous activity and preliminary clinical observations.* Arzneim. Forsch. 17: 529-534, 1967.
11. Swift, H and Z. Hruban: *Focal degradation as a biological process.* Federation proceedings 23, 5 1026-1037, 1964.
12. Veghelyi, P.V.: *Pancreatic function in nutritional edema.* Lancet, 1: 497. 1948.
13. Watson, M.L.: *Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.* J. Biophys Biochem Cytol., 4: 475, 1958.
14. Wehrl, W., F. Knusel, K. Schmid and M. Staherin: *Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. proc. Natl. Acad. Sci.* 61: 667-673, 1968.