

급성 카드뮴 중독시 랫트의 고환조직내 Catalase 및 Superoxide Dismutase 활성도와의 양-반응관계

중앙대학교 의과대학 예방의학교실
박보영·박정덕·정규철

= Abstract =

Dose-Response Relationship between Catalase and Superoxide Dismutase Activity in Testes of Acutely Intoxicated Rats by Cadmium

Bo Young Park, Jung Duck Park, Kyou Chull Chung

*Department of Preventive Medicine and Community Health,
College of Medicine, Chung-Ang University*

Dose-response relationship among blood cadmium concentrations, catalase and superoxide dismutase activities were studied with acutely intoxicated rats by cadmium. The Sprague-Dawley male rats to which single dose of 1~32 mg/kg CdCl₂ were administered into peritoneal cavity were sacrificed by decapitation at 3~36 hours after the administration.

Cadmium concentrations in blood increased significantly with dose of CdCl₂ administered and reached peak level at 3 hours later. Catalase activities in rats' testes were not correlated with exposure time elapsed after the administration in rats to which 1~2 mg/kg of CdCl₂ were administered, but they showed linear relationship with time in groups to which 4~32 mg/kg of CdCl₂ were administered. Cu, Zn-SOD activities in testes of acutely intoxicated rats by cadmium were not altered either by dosage or by time elapsed after the administration. Mn-SOD activities in the testes were also not influenced by dosage of 1~2 mg/kg CdCl₂, but remarkably inactivated by dosage of 4~32 mg/kg CdCl₂ with time elapsed after the administration. Neither catalase, Cu, Zn-SOD nor Mn-SOD activities of testes were correlated with blood cadmium concentrations in acutely intoxicated rats by cadmium.

I. 머리말

산업이 발달함에 따라 인체에 해가 되는 오염물질이 산업환경은 물론이고 생활환경 중에도 증가되고 있는 것은 주지의 사실이다. 그중에서도 체내물질대사에 불필요한 중금속오염이 문제시되어, 수은중독으로 인한 Mina-

mata병(Abelson, 1970), 카드뮴중독으로 인한 Itai-Itai병(Tsuchiya, 1969) 및 납중독(Forni 등 1976; Davis와 Svendsgaard, 1987) 등이 끊임없이 보고되고 있다. 그중에서 카드뮴이 체내에 흡수되었을 때의 표적장기는 신장과 간장인 것으로 알려져 왔으나(Lucis 등, 1969; Suzuki, 1980; Ridlington 등, 1981), 한편, Parizek와 Zahor(1956)에 의하여 간과 신장에 거의 영향을 미치지 않는

저농도의 cadmium에 의하여 고환조직이 손상된다는 것이 보고된 이래 고환에 미치는 cadmium의 영향에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Meek, 1959; Gunn 등, 1961; Mason 등, 1964; Wong과 Klaassen, 1980; Walker 등, 1984; Chellman 등, 1985).

고환에 미치는 cadmium의 작용으로는 고환혈관의 투과성을 증가시키고(Clegg와 Carr, 1967), 정세관의 변성, 간질내 부종, 출혈 및 고환조직의 괴사, 위축을 일으키고(Parizek와 Zahor, 1956; Meek, 1959; Mason 등, 1964), alkaline phosphatase의 감소(Landolt와 Gutwein, 1971), catalase활성도의 증가 및 superoxide dismutase 활성도의 감소(Sajiki 등, 1983), citrate synthetase, succinic dehydrogenase, cytochrome C oxidase 활성도의 감소(Prasada, 1983) 등이 보고되어 있다.

국내에서도 cadmium에 의한 랫트 고환조직의 손상에 대해서는 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있다(Moon, 1971; Lee 등, 1984). 그러나, 어떤 유해물질의 손상기전 및 그에 대한 예방대책과 치료방안을 연구하기 위해서는 특정독성물질과 대상 장기간에 양-반응관계가 우선적으로 규명되어야 할 것으로 생각된다. Cadmium의 투여량과 폭로시간에 따른 고환조직의 손상정도는 국내외 여러학 자들에 의해 비교적 잘 밝혀져 있으나(Meek, 1959; Mason 등, 1964; Moon, 1971), cadmium에 의한 고환조직의 효소계의 변화에 대한 생체내 양-반응관계에 대해서는 일부만이 규명되어 있는 실정이다(Sajiki 등, 1983).

그리하여 본 연구에서는 랫트의 복강내로 cadmium을 투여한 후, 투여량 및 폭로후 시간경과에 따라 유해물질에 대한 방어효과가 있다고 알려진 catalase와 superoxide dismutase활성도(Hassan과 Moody, 1982; Schwartz 등, 1983)간의 양-반응관계를 규명함으로써, 앞으로 고환조직에 대한 cadmium의 손상기전 및 방어효과를 연구하는데 필요한 기본자료를 제시하고자 한다.

II. 연구방법

(1) 실험동물

체중 200g 내외의 Sprague-Dawley 종 랫트 수컷을 약 1주일간 본 실험실에서 사육하여 특별한 이상이 없음을 확인한 후 실험에 사용하였다.

(2) 시 약

Cytochrome C, xanthine, xanthine oxidase, bovine se-

rum albumin, heparin 등은 Sigma Chemical Co.(USA)에서, cupric sulfate, potassium phosphate, hydrogen peroxide, potassium cyanide 등은 Kanto Chemical Co.(Jap.)에서, 원자흡광분석용 cadmium standard 용액, phenol reagent는 Hayashi Pure Chemical Indust.(Jap.)에서, sodium citrate는 Ishizu Pharmaceutical Co.(Jap.), sodium deoxycholate는 Fluka AG.(Switz.), EDTA는 BDH Chemical Ltd.(Eng.)제품을 구입하여 사용하였으며, 그밖의 시약은 분석용 시약을 사용하였다.

(3) 실험동물처치

실험동물을 대조군과 cadmium처리군으로 구별하여 실험군에는 랫트의 체중 1 kg 당 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg의 cadmium chloride($CdCl_2$)을 복강내로 1회 주사하였으며, 대조군에는 정맥주사용 생리식염수 0.5 ml를 복강내로 주사하였다. 이때 cadmium용액은 $CdCl_2$ 를 정맥주사용 생리식염수에 녹여 사용하였고, 1~8 mg/kg 투여군에는 0.1% 용액을 사용하였으며, 16~32 mg/kg 투여군에는 0.3% 용액을 만들어 사용하였다. 실험군의 랫트는 cadmium 용액을 주사한지 3, 6, 12, 24, 36 시간 후에 후두부를 강타하여 실신시켜 목을 잘라 죽인후 미리 heparin으로 처리된 채혈병에 경부혈관에서 흐르는 혈액을 채취하여 cadmium을 정량하기 위하여 냉동보관하였다. 이어 곧 고환을 적출하여 시료로 사용하였다.

(4) 고환조직의 효소추출

적출된 고환을 미리 4°C로 냉각된 생리적 식염수로 4~5차례 씻은 후, 4배용량의 5mM phosphate buffer(pH 7.8)을 첨가하였다. 이를 polytron 조직분쇄기(Brinkmann, Model PT-20)로 15초씩 2회 균질화한 후, 다시 teflon glass homogenizer로 균질화한 다음, 냉동원심분리기(Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Dupont Instr.)에서 700×g로 5분간 냉동 원심분리하여 결체조직 및 핵분획을 제거한 상층액 100μl를 채취하여 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 10배 희석해서 catalase 활성도 측정시료로 사용하였다. 위에서 얻은 상층액으로부터 세포질의 superoxide dismutase와 mitochondria의 superoxide dismutase의 추출은 Weisiger와 Fridovich(1973)의 방법에 의하여 하였다. 즉, 상층액을 다시 14,000×g로 15분간 냉동원심분리하여 세포질과 mitochondria를 분리하였으며, 그 상층액을 구리와 아연을 함유한 세포질 SOD의 조효소(crude enzyme)로

사용하였다. 상기와 같이하여 얻은 조mitochondria를 0.25 M sucrose가 함유된 10mM phosphate buffer(pH 7.8)를 첨가하여 부유시킨 후 15,000×g로 15분간 냉동원심분리하여 그 상층액을 제거하였다. 이런 조작을 2회 반복하여 정제한 후 0.1 mM EDTA를 함유한 50 mM phosphate buffer(pH 7.8)을 5배 용량 첨가하여 부유시킨 후, 얼리고 녹히는 과정을 2회 반복한 후 Sonifier cell distributor(Mode W185D, Heat Systems, Ultrasonics, INC.)로 55 watt에서 4분씩 3회 반복하여 sonication 후 20,000×g에서 60분간 냉동원심분리하여 그 상층액을 취해 망간을 함유하는 superoxide dismutase의 조효소(crude enzyme)로 사용하였다.

각 효소 추출과정의 모든 조작은 0~4°C에서 시행하였다.

(5) 혈중 cadmium의 정량

혈중 cadmium의 분석은 Perry 등(1975)의 방법에 따라 정량하였다. 즉, heparin으로 처리된 전혈 0.5 ml를 채취하여 진한 질산 1ml를 첨가 후 저온에서 서서히 가온하여 시료가 끓기전의 온도에서 약 3 시간 동안 소화하였다. 시료의 양이 약 절반으로 감소하였을 때 30% 과산화수소 0.4 ml를 첨가하여 같은 온도에서 가온증발시켰다. 상기와 같이 처리한 시료를 상온에서 식힌다음 0.5% 질산으로 희석하여 5ml가 되게 하였다. 이때 시료에 함유된 cadmium의 함량을 원자흡광분광분석계(Baird Ltd. Model A5100)을 사용하여 double beam flameless 방법으로 정량하였다. 이때 혈액중의 cadmium농도는 $\mu\text{g}/\text{dl}$ of blood로 환산하여 표시하였다.

(6) Catalase 활성도의 측정

고환조직의 catalase 활성도는 Abei(1974)의 방법으로 측정하였다. 즉, 3 ml 용량의 cuvet에 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)와 시료의 균질액을 혼합하여 혼합액의 단백질량이 0.1 mg/ml가 되도록 한다음, 25°C의 물중탕에서 5분간 preincubation 한후 1 M H_2O_2 을 30 μl 첨가하여 혼합액의 H_2O_2 농도가 10 mM에서 반응이 시작되게 하였다.

각 시료에 의해 분해되는 H_2O_2 의 양을 Beckman spectrophotometer(Model 35)을 이용하여 240 nm(ϵ . C.=39. 43M⁻¹Cm⁻¹)에서 시간이 경과함에 따라 흡광도가 감소되는 것에 의해 catalase의 활성도를 계산하였다. 각 장기의 catalase 활성도는 units/g wet weight, units/mg pro-

tein으로 환산하여 나타내었다.

(7) Superoxide dismutase의 활성도 측정

랏트 고환조직의 superoxide dismutase 활성도의 측정은 xanthine과 xanthine oxidase의 존재하에서 생성되는 superoxide에 의하여 ferricytochrome C의 환원을 억제시키는 원리를 이용한 McCord와 Fridovich(1969)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 3 ml 용 cuvet에 0.1 mM EDTA를 함유한 50 mM phosphate buffer(pH 7.8) 2.3ml, 0.5 mM xanthine 0.3 ml, 0.1 mM ferricytochrome C 0.1 ml를 첨가하여 혼합한 후, 25°C의 물중탕에서 5분간 preincubation한 후, xanthine oxidase 0.1 ml를 첨가하여 파장 550nm에서 흡광도가 증가되는 속도를 측정하였다. 이때 흡광도의 증가속도를 0.020/min이 되게 xanthine oxidase의 농도를 조절하였다. 위와 같이 조정된 반응액에 추출한 세포질의 superoxide dismutase를 첨가하여 파장 550nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

Mitochondria에서 추출한 superoxide dismutase의 활성도는 위와 같은 반응조건에서 0.033% sodium deoxycholate, 2 mM potassium cyanide로 조정하여 세포질의 SOD 활성도를 억제한 후 측정하였다(Dryer 등, 1980; Geller와 Winge, 1982). 이때 세포질 또는 mitochondria의 SOD 활성도는 ferricytochrome C의 환원속도를 50%로 억제시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. 개개효소의 활성도는 units/g wet weight, units/mg protein으로 환산하여 나타내었다.

(8) 단백질 정량

고환조직의 catalase와 세포질 및 mitochondria의 SOD를 추출한 분획의 단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법에 의해 정량하였으며, 이때 표준단백질로서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

III. 연구결과

(1) 혈중 cadmium 농도

정상 랏트의 혈중 cadmium 농도는 $0.07 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{dl}$ 였으며, 랏트의 체중 kg 당 1, 2, 4, 8, 16, 32mg의 cadmium을 복강내로 투여한 후 3, 6, 12, 24, 36시간에 측정된 혈중 cadmium농도는 cadmium투여량에 따라 거의 직선적으로 증가하였고(Fig. 1), 투여량과 혈중 cadmium함량과는 매우 유의한 상관관이 있었다(Table 1, $r=0.9636 \sim 0.9868$,

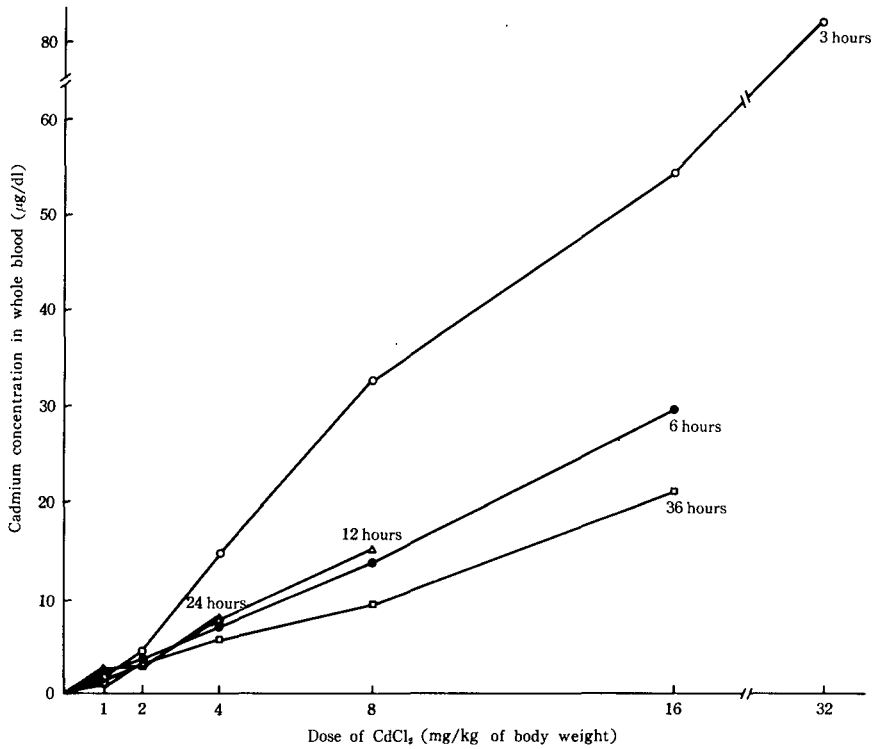


Fig. 1 Cadmium concentrations in whole blood according to exposure time and dosage after intraperitoneal injection of cadmium chloride solution into rats.

Table 1. Cadmium concentration in whole blood ($\mu\text{g/dl}$) according to dosage at different exposure time after intraperitoneal injection of cadmium chloride solution into rats.

Dose (mg/kg)	1	2	4	8	16	32	Regression equation	No.	sy \ x	r	F	p-value
3 hrs	1.70	4.35	14.88	32.80	54.35	82.0	2.8089 Dose + 2.6323	14	7.4977	0.9636	155.717	0.0000
6	(1)	(1)	(2)	(2)	(2)	(1)	1.8125 Dose - 0.1376	13	1.5206	0.9867	404.810	0.0000
12	(1)	(1)	(2)	(1)	-	-	1.8778 Dose + 0.0092	10	0.8742	0.9869	299.422	0.0000
24	(1)	(1)	(3)	-	-	-	1.9272 Dose - 0.0808	10	0.9798	0.9677	117.995	0.0000
36	(1)	(1)	(2)	(1)	(2)	-	1.3042 Dose + 0.1198	12	1.3793	0.9862	354.258	0.0000

* Control : Mean \pm S.D. = $0.07 \pm 0.12 \mu\text{g/dl}$ (n=5)

p<0.01). 폭로시간별 각군에서의 혈중 cadmium농도는 투여량과 직선적인 회귀관계가 성립되었다(Table 1, p<0.01).

Cadmium을 랫트의 복강내로 1~32 mg/kg 투여하였을 때, 투여량에 관한 혈중 cadmium농도의 회귀계수를 시간별로 보면 3시간 폭로군에서 2.8089로서 가장 컸고, 6

시간, 12시간, 24시간 폭로군에서는 회귀계수가 각각 1.8125, 1.8778, 1.9272로서 투여량에 관계없이 혈액내 cadmium농도의 증가가 비슷하였으나, 36시간 폭로군에서는 회귀계수가 1.3042로서 가장 작게 나타났다(Table 1, Fig. 1.).

Table 2. Catalase activities in testes according to exposure time at different dosage after intraperitoneal injection of cadmium chloride solution into rats.

Dose	Time Units	3hrs	6hrs	12hrs	24hrs	36hrs	Regression Equation	No.	sy\ x	r	F	p-value
1(mg/kg)	Units/ g wet wt	487.7 (1)	437.6 (1)	498.0 (1)	523.3 (1)	454.6 (1)	1.8762 Time +433.613	10	54.7412	0.4135	1.650	0.2349
	Units/ mg protein	5.38 (1)	6.97 (1)	6.34 (1)	6.34 (1)	6.34 (1)	0.0168 Time +5.9241	10	0.9701	0.2235	0.421	0.5348
2(mg/kg)	Units/ g wet wt	392.3 (1)	365.5 (1)	494.3 (1)	497.1 (1)	442.3 (1)	1.7792 Time +413.428	10	55.9139	0.3886	1.423	0.2672
	Units/ mg protein	6.26 (1)	6.97 (1)	6.34 (1)	6.34 (1)	6.34 (1)	0.0136 Time +6.0379	10	0.9464	0.1869	0.290	0.6051
4(mg/kg)	Units/ g wet wt	503.4 ± 125.4 (2)	428.2 ± 51.3 (2)	610.5 ± 21.1 (2)	979.7 ± 288.4 (3)	1086.6 ± 31.6 (2)	20.5233 Time +404.129	16	134.714	0.8988	58.854	0.0000
	Units/ mg protein	6.64 ± 1.31 (2)	5.45 ± 0.82 (2)	7.69 ± 0.40 (2)	14.58 ± 4.95 (3)	16.34 ± 0.01 (2)	0.3266 Time +5.3116	16	2.3376	0.8829	49.495	0.0000
8(mg/kg)	Units/ g wet wt	501.2 ± 1.8 (2)	600.6 ± 171.7 (3)	824.1 (1)	-	1148.1 (1)	21.0397 Time +445.687	12	99.3862	0.9141	50.821	0.0000
	Units/ mg protein	6.50 ± 0.23 (2)	7.50 ± 1.68 (3)	12.05 (1)	-	16.00 (1)	0.2980 Time +5.9429	12	1.3838	0.9166	52.585	0.0000
16(mg/kg)	Units/ g wet wt	553.8 ± 114.3 (2)	1103.6 (1)	967.0 (1)	-	1378.6 ± 126.0 (2)	26.0198 Time +502.209	11	185.440	0.9001	38.434	0.0002
	Units/ mg protein	7.61 ± 1.80 (2)	12.05 (1)	13.31 (1)	-	19.67 ± 0.01 (2)	0.3798 Time +6.6086	11	1.7540	0.9542	91.512	0.0000
32(mg/kg)	Units/ g wet wt	696.4 ± 38.0 (2)	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	Units/ mg protein	10.03 ± 0.54 (2)	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-

*Control : Mean ± S. D. = 417.4 ± 59.9units/g wet wt, 5.85 ± 1.24units/mg protein(n=5)

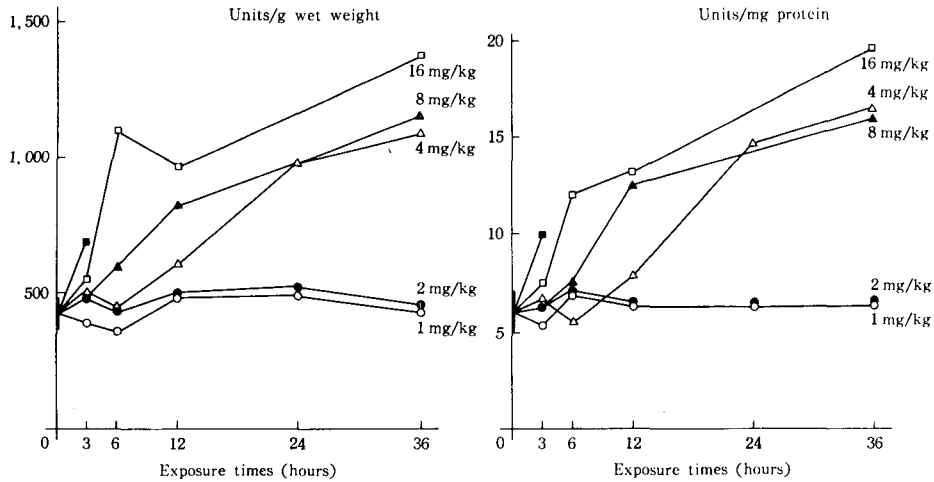


Fig. 2 Catalase activities in testes according to exposure time at different dosage after intraperitoneal injection of cadmium chloride solution into rats.

(2) Catalase 활성도

정상고환조직의 catalase 활성도는 417.4 ± 59.9 units/g wet weight, 5.85 ± 1.24 units/mg protein였으며, 1~32 mg/kg의 cadmium을 복강내로 투여하였을 때의 catalase 활성도는 1 mg/kg 투여군과 2mg/kg 투여군에서는 폭로 시간에 따른 활성도의 변화가 없었으나(Table 2, Fig. 2, $p > 0.05$), 4 mg/kg 이상 투여군에서는 폭로 시간에 따라 catalase 활성도가 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 즉, cadmium 투여후 36시간에서의 catalase 활성도가 4 mg/kg 투여군에서는 1086.6 ± 31.6 units/g wet weight, 16.34 ± 0.01 units/mg protein, 8 mg/kg 투여군에서는

1148.1 units/g wet weight, 16.00 units/mg protein, 16 mg/kg 투여군에서는 1378.6 ± 126.0 units/g wet weight, 19.67 ± 0.01 units/mg protein로서 각각 대조군에 비해 2.5~3.5배 정도 증가하였다(Table 2). Cadmium 4mg/kg 이상 투여군에서 고환조직의 catalase 활성도는 각각의 투여군에서 폭로 시간에 따라 매우 유의하게 증가하였으며, 폭로 시간에 관한 고환의 catalase 활성도는 직선적인 회귀관계가 성립되었다(Table 2, $r = 0.8829 \sim 0.9542$, $p < 0.01$).

(3) 세포질내(Cu,Zn-)superoxide dismutase 활성도

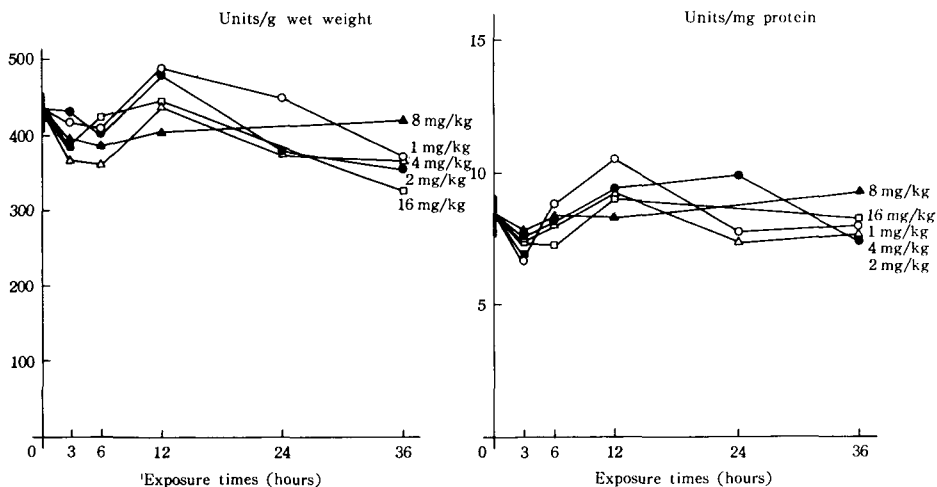


Fig. 3 Cytosolic(Cu,Zn-) superoxide dismutase activities in testes according to exposure time at different dosage after intraperitoneal injection of cadmium chloride solution into rats.

정상 랫트의 고환조직내 Cu, Zn-SOD 활성도는 434.2 ± 35.2 units/g wet weight, 8.49 ± 0.92 units/mg protein였으며, 1~32 mg/kg의 cadmium을 랫트의 복강내로 투여한 후, 3~36시간 후에 측정된 고환조직내의 Cu, Zn-SOD의 활성도는 cadmium투여량 및 폭로시간에 따라 큰 차이를 보여주지 않을뿐더러(Fig. 3), 각각의 cadmium투여량군

에서 폭로시간과 고환조직의 Cu, Zn-SOD활성도간에는 통계적으로 유의한 회귀 및 상관관계가 성립되지 않았다 (Table 3, $p > 0.05$).

(4) Mitochondria내 (Mn-) superoxide dismutase 활성도

Table 3. Cytosolic(Cu,Zn-) superoxide dismutase activities in testes according to exposure time at different dosage after intraperitoneal injection of cadmium chloride solution into rats.

Dose	Time Units	Time					Regression Equation	No.	Sy\,x	r	F	p-value
		3hrs	6hrs	12hrs	24hrs	36hrs						
1(mg/kg)	Units/ g wet wt	414.5 (1)	406.3 (1)	487.5 (1)	449.6 (1)	373.2 (1)	-0.7782Time +436.554	10	38.6040	0.2581	0.571	0.4715
	Units/ mg protein	6.69 (1)	8.80 (1)	10.5 (1)	7.74 (1)	7.95 (1)	-0.0075Time +8.4728	10	1.1996	0.0826	0.055	0.8205
2(mg/kg)	Units/ g wet wt	430.5 (1)	400.4 (1)	483.9 (1)	378.9 (1)	357.4 (1)	-1.9514Time +438.057	10	36.6881	0.5761	3.975	0.0813
	Units/ mg protein	7.68 (1)	8.15 (1)	9.33 (1)	9.92 (1)	7.41 (1)	0.0006Time +8.4884	10	1.0069	0.0076	0.0005	0.9835
4(mg/kg)	Units/ g wet wt	366.1 ± 49.0 (2)	360.7 ± 12.9 (2)	435.5 ± 37.5 (2)	374.0 ± 43.9 (3)	361.4 ± 45.6 (2)	-1.4930Time ± 413.643	16	44.5729	0.4110	2.845	0.1138
	Units/ mg protein	7.38 ± 0.26 (2)	8.00 ± 2.23 (2)	9.27 ± 0.69 (2)	7.35 ± 1.72 (3)	7.45 ± 0.37 (2)	-0.0266Time +8.3524	16	1.2035	0.2851	1.239	0.2844
8(mg/kg)	Units/ g wet wt	392.0 ± 26.3 (2)	385.7 ± 21.5 (3)	403.5 (1)	-	417.4 (1)	-0.3857Time +413.431	12	34.4434	0.1184	0.142	0.7140
	Units/ mg protein	7.72 ± 1.05 (2)	8.31 ± 1.50 (3)	8.24 (1)	-	9.25 (1)	0.0229Time +8.2200	12	1.0073	0.2354	0.587	0.4614
16(mg/kg)	Units/ g wet wt	384.5 ± 20.9 (2)	421.3 (1)	440.1 (1)	-	325.6 ± 18.5 (2)	-2.7166Time +428.527	11	34.2714	0.7595	12.266	0.0067
	Units/ mg protein	7.35 ± 0.01 (2)	7.20 (1)	8.96 (1)	-	8.17 ± 2.25 (2)	0.0004Time +8.1446	11	1.1501	0.0053	0.0003	0.9877
32(mg/kg)	Units/ g wet wt	381.6 ± 6.6 (2)	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	Units/ mg protein	7.29 ± 0.76 (2)	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-

*Control : Mean ± S. D. = 434.3 ± 35.2 units/g wet wt, 8.49 ± 0.92 units/mg protein (n=5)

정상 랫트의 고환조직내 Mn-SOD 활성도는 45.7 ± 3.6 units/g wet weight, 9.94 ± 1.66 units/mg protein였으며, cadmium을 랫트의 복강내로 투여하였을 때 고환조직의 Mn-SOD 활성도는 1 mg/kg 투여군과 2 mg/kg 투여군에서는 측정시간에 따른 활성도의 변화가 없었으나(Table 4, Fig. 4, $p > 0.05$), 4 mg/kg 이상 투여군에서는 폭로시

간이 경과함에 따라 Mn-SOD 활성도가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 4). 즉, cadmium에 폭로된 후 36시간에서의 Mn-SOD 활성도가 4 mg/kg 투여군에서는 28.4 ± 3.0 units/g wet weight, 6.49 ± 0.43 units/mg protein, 8 mg/kg 투여군에서는 21.1 units/g wet weight, 6.50 units/mg protein, 16mg/kg투여군에서는 11.5 ± 3.3

Table 4. Mitochondrial (Mn-) superoxide dismutase activities in testes according to exposure time at different dosage after intraperitoneal injection of cadmium chloride solution into rats.

Dose	Time Units	3hrs	6hrs	12hrs	24hrs	36hrs	Regression Equation	No.	Sy\ x	r	F	p-value
1(mg/kg)	Units/ g wet wt	48.6 (1)	42.2 (1)	42.5 (1)	43.6 (1)	45.3 (1)	-0.0470Time +45.4409	10	3.1768	0.1925	0.308	0.5942
	Units/ mg protein	7.58 (1)	5.99 (1)	7.62 (1)	7.82 (1)	6.51 (1)	-0.0840Time +9.2016	10	1.7239	0.5425	3.337	0.1052
2(mg/kg)	Units/ g wet wt	39.2 (1)	36.7 (1)	44.3 (1)	40.9 (1)	37.9 (1)	0.1761Time +44.1761	10	4.0397	0.5001	2.669	0.1410
	Units/ mg protein	8.36 (1)	6.10 (1)	7.30 (1)	7.01 (1)	6.72 (1)	-0.0929Time +9.2705	10	1.6520	0.5975	4.443	0.0681
4(mg/kg)	Units/ g wet wt	41.9 ± 5.3 (2)	41.1 ± 2.9 (2)	40.1 ± 1.0 (2)	32.3 ± 10.5 (3)	28.4 ± 3.0 (2)	-0.4851Time +44.8889	16	4.8853	0.8006	24.999	0.0002
	Units/ mg protein	10.28 ± 1.29 (2)	8.15 ± 0.98 (2)	9.33 ± 0.19 (2)	7.39 ± 0.86 (3)	6.49 ± 0.43 (2)	-0.0982Time +9.9127	16	1.1888	0.7435	17.301	0.0010
8(mg/kg)	Units/ g wet wt	42.5 ± 2.5 (2)	37.7 ± 3.5 (3)	31.5 (1)	-	21.1 (1)	-0.7090Time +44.1873	12	3.6515	0.9002	42.752	0.0000
	Units/ mg protein	9.48 ± 0.47 (2)	6.81 ± 0.39 (3)	7.05 (1)	-	6.50 (1)	-0.1038Time +9.1744	12	1.6189	0.5638	4.660	0.0562
16(mg/kg)	Units/ g wet wt	39.7 ± 0.9 (2)	37.9 (1)	33.8 (1)	-	11.5 ± 3.3 (2)	-0.9305Time +44.7028	11	2.9964	0.9769	188.267	0.0000
	Units/ mg protein	8.24 ± 1.10 (2)	7.65 (1)	6.67 (1)	-	3.09 ± 0.81 (2)	-0.1836Time +9.4808	11	1.3281	0.8976	37.321	0.0002
32(mg/kg)	Units/ g wet wt	38.3 ± 5.1 (2)	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	Units/ mg protein	7.52 ± 3.24 (2)	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-

*Control : Mean ± S. D. = 45.7 ± 3.6 units/g wet wt, 9.94 ± 1.66 units/mg protein (n=5)

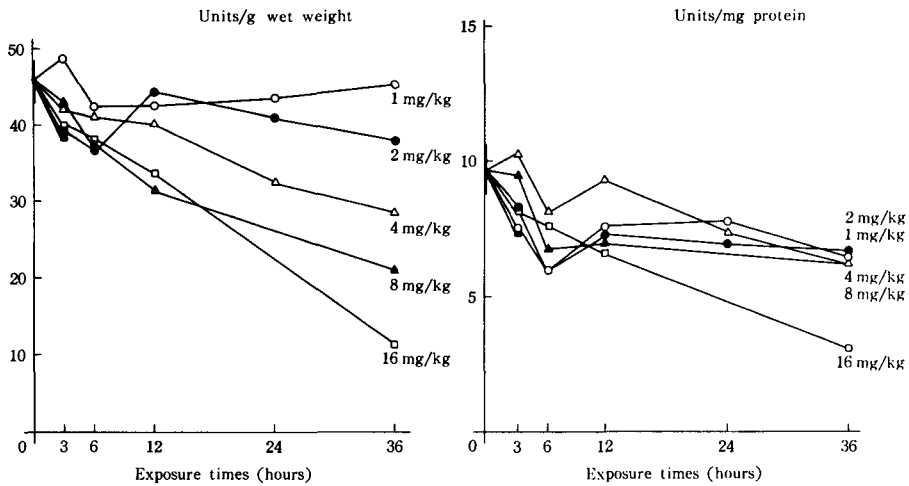


Fig. 4 Mitochondrial (Mn-) superoxide dismutase activities in testes according to exposure time at different dosage after intraperitoneal injection of cadmium chloride solution into rats.

Table 5. Correlation coefficients between blood cadmium concentrations and catalase, cytosolic(Cu,Zn-) superoxide dismutase and mitochondrial(Mn-) superoxide dismutase activities in testes.

	No. of case	Catalase		Cu, Zn-SOD		Mn-SOD	
		units/g wet weight	units/mg protein	units/mg weight	units/mg protein	units/mg weight	units/mg protein
Blood Cd concentrations	39	0.1458	0.1340	-0.2350	-0.2880	-0.1024	-0.1674

units/g wet weight, 3.09 ± 0.81 units/mg protein으로서 대조군에 비해 약 35~75%가 감소하였다(Table 4). Cadmium 4 mg/kg 이상 투여군에서는 각각의 투여군에서 고환조직내 Mn-SOD 활성도는 폭로시간에 따라 매우 유의하게 감소하였으며, 폭로시간에 관한 Mn-SOD 활성도는 직선적인 회귀관계가 성립되었다(Table 4, $r=0.7435 \sim 0.9769$, $p < 0.01$). 그러나, 8 mg/kg 투여군에서 specific activity(units/mg protein)로 나타낸 Mn-SOD의 활성도의 폭로시간에 관한 회귀 및 상관계수는 통계적으로 유의하지 않았다($r=0.5638$, $F=4.660$, $p=0.0562$).

(5) 혈중 cadmium 농도와 고환조직의 catalase 및 superoxide dismutase 활성도와의 상관관계

1~32 mg/kg의 cadmium을 랫트의 복강내로 투여한 후, 3~36시간후에 측정된 고환조직 내의 catalase, Cu, Zn-SOD 및 Mn-SOD의 활성도는 모두 혈중 cadmium농도와 유의한 상관관계를 없었다(Table 5, $r = -0.2880 \sim 0.1458$, $p > 0.05$).

IV. 고찰

Cadmium에 폭로되었을 때는 생체 방어기전의 하나로서 체내의 각 장기, 특히 신장 및 간장에서 metallothionein(MT)이 생성되어 카드뮴과 결합함으로써 cadmium의 독작용을 약화시키는 것으로 알려져 있다(Ridlington, 1981; Chellman 등, 1985). 또한, cadmium과 소량의 금속이온을 동시에 투여하거나(Gunn 등, 1961), cadmium에 폭로되기전에 소량의 금속이온을 전(前)투여함으로써 cadmium의 독성에 대한 방어효과가 있다고 알려져 있다(Yoshikawa, 1970; Yoshikawa, 1973; Goering와 Klaassen, 1983; Jin과 Nordberg, 1986).

Cadmium에 의한 고환조직의 손상은 cadmium이 고환혈관의 변조를 초래하여 조직의 괴사를 유발하는 것으로 알려져 왔으나(Gunn 등, 1963; Clegg와 Carr, 1967), 최근에 와서 active oxygen species이 생성되어 지질과

산화반응(lipid peroxidation)을 일으킴으로서 유발되는 고환조직에 대한 독작용이 보고되고 있다(Sajiki 등, 1981; Sajiki 등, 1983).

Active oxygen species의 조직손상에 대해서 superoxide dismutase와 catalase가 scavenger로서 작용하여 방어효과를 나타낸다고 알려져 있으며(Goldberg와 Stern, 1977; Hassan과 Moody, 1982; Turrens 등, 1984), 랫트의 고환조직에는 세포질에 존재하는 구리와 아연을 함유하는 SOD와 mitochondria에 존재하는 망간을 함유하는 SOD가 있다(McCord와 Fridovich, 1969; Weisiger와 Fridovich, 1973; Lee 등, 1983).

Cadmium에 의한 생체의 반응은 실험동물의 종, 성, 장기 및 연령에 따라서 다를 뿐 아니라 투여경로, 투여량 및 폭로시간에 따라 서로 다르게 나타난다(Colucci, 1975; Teare 등, 1978; Wong과 Klaassen, 1980; Tandon과 Asokan, 1981; Jahn과 Klinger, 1982; Sato 등, 1983). 그리하여 cadmium을 랫트의 복강내로 투여하였을 때 투여량과 폭로시간에 따른 고환조직내의 superoxide dismutase와 catalase활성도의 변화를 관찰한 결과, cadmium을 1~2 mg/kg을 투여한 군에서는 폭로시간이 경과하더라도 catalase활성도에 변화가 없었으나, 4 mg/kg 이상 투여군에서는 경과시간에 따라 catalase 활성도는 거의 직선적으로 증가하였고(Fig. 2), cadmium 투여후 36시간에서의 catalase 활성도는 대조군에 비해 2.5~3.5배로 증가하였다(Table 2, $r=0.8829\sim0.9542$, $p<0.01$). 그러나 랫트 고환조직내의 Cu, Zn-SOD의 활성도는 cadmium의 투여량과 경과시간에 따른 변화를 나타내지 않았다(Table 3, Fig. 3, $p>0.05$). Mn-SOD의 활성도는 cadmium 1 mg/kg 투여군과 2 mg/kg 투여군에서는 경과시간에 따라 뚜렷한 변화를 나타내지 않았으나, 4 mg/kg 이상 투여군에서는 폭로시간에 따라 Mn-SOD 활성도가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 4). 4 mg/kg 이상 투여군에서의 Mn-SOD 활성도는 폭로시간에 따라 거의 직선적으로 감소하였고(Table 4, $r=0.7435\sim0.9769$, $p<0.01$), 36시간 경과하였을 때의 Mn-SOD활성도는 대조군에 비하여 약 35~75%가 감소하였다.

Sajiki 등(1983)은 cadmium 5 mg/kg을 랫트의 복강내로 투여하였을 때 고환 조직내의 catalase 활성도는 시간에 따라 증가하여 48시간에서 가장 높았으며, SOD의 활성도는 시간에 따라 감소하여 48시간에 가장 낮았다고 보고하였다. 이는 이번 조사결과 cadmium 1~2 mg/kg

투여군에서는 catalase와 SOD 활성도에 영향을 미치지 않았으나, 4 mg/kg 이상 투여군 즉, catalase와 SOD활성도에 변화를 일으키기 시작하는 농도이상의 cadmium을 투여하였을 때의 catalase와 SOD활성도에 미치는 영향은 폭로량보다 폭로시간에 따라 활성도의 변화가 현저함과 같은 양상을 보였다.

급성 카드뮴중독을 유발한 동물에서 혈중 cadmium 함량은 cadmium을 복강내로 투여한 후, 30 분이내에 최고치를 나타내었다가 시간이 경과함에 따라 감소하며, 간에 축적되는 cadmium 함량은 처음에 급격히 증가하였다가 시간이 경과함에 따라 감소하고, 신의 cadmium 함량은 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 나타낸다고 한다(Lucis 등, 1969; Teare 등, 1978; Tandon과 Asokan, 1981). 그러나, cadmium에 급성 폭로시 혈액 및 조직내의 카드뮴 함량은 cadmium투여량에 따라서 거의 배증하여(Colucci, 1975; Kim과 Cho, 1986; Chung 등, 1988) 폭로시간보다는 투여량에 더 잘 일치하였다. 이번 연구에서도 혈중 cadmium 농도는 경과시간 3시간에서 가장 높았으며, 점차 감소하여 36시간 폭로시 가장 낮게 나타났으나, 카드뮴 투여량에 따라서는 거의 직선적으로 증가하여(Fig. 1, Table 1, $p<0.01$), 혈중 cadmium농도의 변화는 폭로시간보다는 투여량에 더 잘 일치하였다. 또한, 고환조직내의 catalase 활성도 및 superoxide dismutase 활성도는 혈중 cadmium함량과 유의한 상관성이 없었다(Table 5, $p>0.1$).

이상의 결과를 종합해 볼때 cadmium에 폭로된 후 혈액 및 장기내의 cadmium 함량의 변화는 폭로시간보다는 폭로량에 의해 더 큰 영향을 받으나, 효소의 활성도는 혈중 cadmium함량에 따른 영향을 받지 않으며, 일정량 이상의 cadmium에 폭로되었을 때 폭로량보다는 폭로시간에 따른 변화가 큰 것으로 나타났다.

V. 맺음말

Cadmium에 의한 고환조직의 손상 및 방어기전을 밝히기 위한 기본적인 조사로서 cadmium 투여량과 폭로시간에 따른 혈중 cadmium 농도와 고환조직내의 catalase 및 superoxide dismutase 활성도와의 양-반응관계를 조사하고자 랫트의 복강내로 1~32 mg/kg의 cadmium을 일회 투여한 후, 3~36시간 동안 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 혈중 cadmium농도는 cadmium투여량이 증가함에 따라 거의 직선적으로 증가하였고, cadmium을 투여한 후 3시간째 가장 높은 값을 나타내었다.
2. 고환조직내 catalase 활성도는 cadmium 1~2 mg/kg 투여군에서는 경과시간에 따른 변화가 없었으나, 4 mg/kg 이상 투여군에서는 경과시간에 따라 catalase활성도가 직선적으로 증가하였다.
3. 고환조직내 Cu, Zn-SOD의 활성도는 cadmium 투여량 및 경과시간에 따른 변화가 없었다.
4. 고환조직내 Mn-SOD 활성도는 cadmium 1~2 mg/kg 투여군에서는 경과시간에 따른 변화가 없었으나, 4 mg/kg 이상 투여군에서는 경과시간에 따라 Mn-SOD 활성도가 감소하였다.
5. 고환조직의 catalase, Cu, Zn-SOD 및 Mn-SOD 활성도는 혈중 cadmium농도와 상관관계가 없었다.

참 고 문 헌

- Abei H. *Catalase. In Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed., Bergmeyer HU, New York, Academic Press Inc., 1974, pp. 673-678*
- Abelson PH. *Methyl mercury. Science 1970; 169: 237*
- Chellman GJ, Shaikh ZA, Baggs RB, Diamond GL. *Resistance to cadmium-induced necrosis in testes of inbred mice: Possible role of a metallothionein-like cadmium-binding protein. Toxicol Appl Pharmacol 1985; 79: 511-523*
- Chung KC, Park JD, Cho BH. *Lethal dose and effects of cadmium on blood and liver in acute cadmium intoxication. Chung-Ang J Med 1988; 13: 31-43*
- Colucci AV, Winge D, Krasno J. *Cadmium accumulation in rat liver. Arch Environ Health 1975; 30: 153-157*
- Clegg EJ, Carr I. *Changes in the blood vessels of the rat testis and epididymis produced by cadmium chloride. J Path Bact 1967; 94: 317-322*
- Davis JM, Svendsgaard DJ. *Lead and children development. Nature 1987; 329: 297-300*
- Dryer SE, Dryer RL, Autor AP. *Enhancement of mitochondrial, cyanide-resistant superoxide dismutase in the livers of rats treated with 2, 4-dinitrophenol. J Biol Chem 1980; 255: 1054-1057*
- Forni A, Cambiaghi G, Secchi GC. *Initial occupational exposure to lead. Arch Environ Health 1976; 31: 73-78*
- Geller BL, Winge DR. *Rat liver Cu, Zn-superoxide dismutase: Subcellular location in lysosomes. J Biol Chem 1982; 257: 8945-8952*
- Goering PL, Klaassen CD. *Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: Possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality. Toxicol Appl pharmacol 1983; 70: 195-203*
- Goldberg B, Stern A. *The role of the superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte. Arch Biochem Biophys 1977; 178: 218-225*
- Gunn SA, Gould TC, Anderson WAD. *Zinc protection against cadmium injury of rat testis. Arch Pathol 1961; 71: 274-281*
- Gunn SA, Gould TC, Anderson WAD. *The selective injurious response of testicular and epididymal blood vessels to cadmium its prevention by zinc. Amer J Path 1963; 42: 685-702*
- Hassan HM, Moody CS. *Superoxide dismutase protects against paraquat-mediated dioxygen toxicity and mutagenicity: studies in Salmonella typhimurium. Can J Physiol Pharmacol 1982; 60: 1367-1373*
- Jahn F, Klinger W. *Influence of age on in vitro effect of cadmium on rat liver cytochrome p-450 concentration and monooxygenases activity. Acta Pharmacol Toxicol 1982; 50: 85-88*
- Jin T, Nordberg GF. *Cadmium toxicity in kidney cells. Resistance induced by short term pretreatment in vitro and in vivo. Acta Pharmacol Toxicol 1986; 58: 137-143*
- Kim SK, Cho KS. *Effect of pretreatment with small doses of metals on acute cadmium intoxication in mice. J Cathol Med Col 1986; 39: 1129-1144*
- Landolf R, Gutwein EE. *Alpha-particle autoradiography of alkaline phosphatase inhibition by cadmium. Inter J Appl Rad Isot 1971; 22: 127-128*
- Lee JY, Kwon NS, Lee HS. *Distribution of superoxide dismutase in various organs of mouse. Chung-Ang J Med 1983; 8: 87-95*
- Lee HS, Bae ES, Cha CW. *The effect of garlic on pathological damages of testis due to cadmium poisoning. Kor Univ Med J 1984; 21(3): 39-47*
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275*
- Lucis OJ, Lynk ME, Lucis R. *Turnover of cadmium 109 in rats. Arch Environ Health 1969; 18: 307-310*
- Mason KE, Brown JA, Young JO, Nesbit RR. *Cadmium-induced injury of the rat testis. Anat Rec 1964; 149: 135-148*
- McCord JM, Fridovich I. *Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte protein (hematocyprein). J Biol Chem 1969; 244: 6049-6055*

- Meek ES. *Cellular changes induced by cadmium in mouse testis and liver. Brit J Exp Path* 1959; 40: 503–506
- Moon IC. *Effect of cadmium chloride on the mature rat testis. Kor J Uro* 1971; 12: 351–360
- Parizek J, Zahor Z. *Effect of cadmium salts on testicular tissue. Nature* 1956; 177: 1036
- Perry EF, Koirtzohann SR, Perry Jr HM. *Determination of cadmium in blood and urine by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. Clin Chem* 1975; 21: 626–629
- Prasada Rao PVV. *Effects of intraperitoneal cadmium administration on mitochondrial enzymes in rat tissues. Toxicol* 1983; 27: 81–87
- Ridlington JW, Winge DR, Fowler BA. *Long-term turnover of cadmium metallothionein in liver and kidney following a single low dose of cadmium in rats. Biochem Biophys Acta* 1981; 673: 177–183
- Sajiki J, Fukuda Y, Fukushima E. *On the lipoperoxide concentrations in the viscera of rats intoxicated by cadmium chloride. J Appl Biochem* 1981; 3: 467–471
- Sajiki J, Hirai A, Tamura Y. *The role of radical oxygen in the mechanism of incidence of injury in rat testis administered CdCl₂. Jap J Infl* 1983; 3: 217–221
- Sato M, Yamanobe K, Nagai Y. *Sex-related differences in cadmium-induced lipid peroxidation in the rat. Life Sci* 1983; 83: 903–908
- Schwartz CE, Krall J, Norton L, McKay K, Kay D, Lynch RE. *Catalase and superoxide dismutase in Esherichia coli. J Biol Chem* 1983; 258: 6277–6281
- Suzuki Y. *Cadmium metabolism and toxicity in rats after long-term subcutaneous administration. J Toxicol Environ Health* 1980; 6: 469–482
- Tandon SK, Asokan P. *Distribution of intratracheally administered cadmium in rats. Acta Pharmacol Toxicol* 1981; 49: 381–383
- Teare FW, Read PR, Pyttel RB, Jasansky PA. *Short- and long- term cadmium distribution in rat livers after different routes of administration. Arch Environ Health* 1978; 33: 53–58
- Tsuchiya KC. *Causation of ouch-ouch disease, Part II, Epidemiology and evaluation. Keio J Med* 1969; 18: 181–211
- Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. *Protection against oxygen toxicity intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. J Clin Invest* 1984; 73: 87–95
- Walker EM Jr, Gale GR, Greene WB, Vesely J, Nicholson JH, Atkins LM, Smith AB, Jones MM, Hennigar GR. *Effects of substituted dithiocarbamates on the testicular toxicity of cadmium. Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1984; 46: 449–467
- Weisiger RA, Fridovich I. *Superoxide dismutase: Organelle specificity. J Biol Chem* 1973; 248: 3582–3592
- Wong KL, Klaassen CD. *Age difference in the susceptibility to cadmium-induced testicular damage in rats. Toxicol Pharmacol* 1980; 55: 456–466
- Yoshikawa H. *Preventive effect of pretreatment with low dose of metals on the acute toxicity of metals in mice. Ind Health* 1970; 8: 184–191
- Yoshikawa H. *Preventive effects of pretreatment with cadmium on acute cadmium poisoning in rats. Ind Health* 1973; 11: 113–119