

식이 단백질과 Ca 수준이 흰쥐의 Cd 해독에 미치는 영향*

The Effect of Dietary Protein and Calcium Levels on the Cadmium Detoxication in Rats

이화여자대학교 식품영양학과
권오란·김미경

Department of Food & Nutrition, Ewha Womans University
Kwon, O Ran · Kim, Mi Kyung

〈목 차〉

I. 서론	IV. 고찰
II. 실험재료 및 방법	V. 요약 및 결론
III. 결과	VI. 참고문헌

〈Abstract〉

This study was performed to investigate the effect of dietary protein and calcium levels on cadmium detoxication in rats. Seventy male Sprague-Dawley rats weighing 208 ± 19 g were blocked into 10 groups of 7 animals according to body weight. Five groups were fed 15% protein-0.6% calcium diet with 100ppm cadmium in drinking water for first 15days and the other 5groups fed same diet without cadmium in drinking water for same period and served as controls. After this 15-day intoxication period, each one of cadmium intoxication and control groups were sacrificed. Remaining 8 groups of 4 intoxication and 4 control groups were fed each of 4 kinds of detoxifying diets different with protein(40%, 15%) and calcium(1.3%, 0.6%) levels without cadmium in drinking water for following 15 days of detoxifying period.

Results were summarized as follows:

1) Food intake, body weight gain, F.E.R. and weights of liver, kidney and femur were increased by detoxifying diets and high protein diet was most effective in weight gains of liver and kidney.

2) When cadmium and metallothionein contents of initial intoxication group and those of all detoxication groups were compared, cadmium and metallothionein

* 본 연구는 1990-1991년도 진로문화재단 학술연구지원비에 의하여 이루어졌음.

contents in the liver were not changed, but those in kidney increased, and those in intestine decreased markedly.

3) Only dietary protein level affected cadmium and metallothionein distribution among organs, and cadmium contents of whole blood, liver, kidney and femur were lower in high protein diet, but metallothionein contents in liver and kidney were higher in high protein diet.

4) Gel filtration chromatogram showed that most of cadmium in the cytosol was bound to metallothionein fractions in high protein-high calcium group.

Results obtained indicated that high protein diet was effective in cadmium detoxication by increasing the induction of metallothionein synthesis. But high calcium diet did not play a role in cadmium detoxication.

I. 서 론

공업적으로 전기도금, 배터리, 합금, 염료, 안정제 등의 생산에 이용되고 있는 cadmium은 1971년 이후 소비량이 급속히 증가되고 있으며^{1,2)} 이에 따라 cadmium의 독성문제가 새로운 과제로 대두되고 있다. Cadmium 중독에 대한 연구는 1950년 Friberg³⁾가 cadmium의 만성중독을 보고 한 이후 20여년간 직업병의 원인으로써 활발히 진행되어왔다. 그러나 1960년대 식품을 통한 cadmium 오염이 신장질환을 야기시킨다고 보고⁴⁾ 된 이후부터는 cadmium의 환경오염 문제에 대해서도 관심을 갖게 되었다.

일단 체내에 들어온 cadmium은 쉽게 배설되지 않으며, 반감기도 약 16년으로 대단히 길므로 나이가 들수록 cadmium의 체내 축적은 증가하게 된다.^{5,6)} Gross 등은⁷⁾ 사람에게서 연령이 높아질수록 간, 신장, 머리카락에서 cadmium 축적이 많아졌음을 보고하였다. 체내에서 cadmium은 대부분 간과 신장에 축적되며, 여기서 cadmium은 cadmium-metallothionein(Cd-MT)의 complex 상태로 존재하는 것으로 알려져있다.⁸⁻¹⁰⁾ Metallothionein의 정확한 작용기전은 아직 모르나 cadmium과 같은 중금속에 의해 체내에서 유도 합성된 metallothionein은²⁾ free cadmium ion과 결합하여 cadmium을 간과 신장조직으로 격리(sequestration)시킴으로써¹¹⁾ cadmium 독성을 완화시키는 것으로 알려져있다.¹⁰⁻¹²⁾

Metallothionein의 합성과 분해는 금속의 종류와 양뿐 아니라 식이요인, stress, 그리고 체내 각 기관에

따라 각기 다른 양상을 보이는 것으로 알려져 있다.^{13,14)} 세계 2차 대전 당시 일본에서 발생한 "Itai Itai" 병은 물과 쌀의 cadmium 오염이 그 원인으로 밝혀졌는데¹⁵⁾ 이 병의 이환율이 특히 다산(多産)의 여자들에게서 많았다는 점은 영양불량이 cadmium 중독의 중요한 이유가 됨을 증명해준다. 즉 영양상태가 불량함으로 말미암아 똑같은 정도의 cadmium 노출임에도 불구하고 방어능력이 저하 되었다고 말할 수 있다.

본 연구실에서는 수년간 cadmium이나 납과 같은 위해성 중금속의 중독을 영양학적 측면에서 해결하고자 하는 시도가 선행되어 왔으며, 그 결과 단백질, calcium, 지방, 섬유질 등의 식이인자가 중금속 대사에 영향을 미쳐 중금속의 분포와 배설을 변화시키는 것으로 나타났다. 이중 특히 단백질과 calcium의 영향이 큰 것으로 나타나 단백질 수준이 높은 경우에는 뇨와 변을 통한 cadmium 배설이 유의적으로 증가하였고 혈액등의 조직에서 cadmium 함량이 낮게 나타났으며,¹⁶⁾ 식이 calcium 수준이 낮은 경우에는 각 조직에서 cadmium 함량이 높았으며 cadmium 배설량은 낮았다.¹⁷⁾ 한편, 본 실험실 이외에서도 세포배양이나 실험동물을 이용하여 cadmium 독성에 대한 실험이 진행되고 있으나 대부분 parenteral route로 cadmium을 투여한 단기간의 실험이었으며, 각 조직의 metallothionein 수준에 대한 정보도 미약하였고, 또한 식이 요인이 cadmium 해독에 미치는 영향에 대한 연구도 드문 상태이다.

따라서 본 연구에서는 선행된 연구 결과 cadmium

중독 및 해독에 효과적인 것으로 보고된 단백질과 calcium을 실험 식이인자로 택하였으며, 음료를 통해 cadmium을 경구투여하여 cadmium 중독을 유발한 후 고단백질과 고calcium 식이가 cadmium 해독과정 중 cadmium 및 metallothionein 대사에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 실험을 수행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물의 사육

평균 체중이 209 g인 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 70마리를 체중에 따라 10군으로 나누어 15% 단백질 - 0.6% calcium 식이로 15일간 사육하면서 이 중 5군에게는 음료를 통하여 100ppm의 cadmium을 공급하여 중독을 유발하였다. Cadmium 중독을 확인하고 해독결과를 비교하기 위하여 15일 후 cadmium 공급군과 비공급군에서 각 1군씩을 희생하였으며, 나머지 8군은 Fig 1과 같이 분류하여 cadmium 공급을 중단한채 15일간 사육하였다.

실험동물은 한 마리씩 분리하여 stainless steel cage에서 사육하였으며, cage, 식이그릇, 물병의 모든 기구는 무기질의 오염을 방지하기 위하여 0.4% EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid)용액으로 세척한 후 탈이온증류수로 행구어 사용하였다.

2. 실험동물의 식이

본 실험에 사용한 식이의 구성성분은 Table 1과 같다. 실험식이의 탄수화물 급원으로는 옥수수전분 (corn starch, 두산곡산)과 glucose를 사용하였으며, 지방 급원으로는 옥수수유 (corn oil, 제일제당)를 사용하였으며, 단백질 급원으로는 casin(Australian Cooperative Dairy Co)을 이용하였고, 무기질과 비타민류는 시약급을 이용하였다.

Cadmium 공급군은 탈이온증류수에 cadmium chloride ($CdCl_2$)를 용해시켜 100ppm 수준의 cadmium을 음료를의 형태로 공급하였으며, cadmium 비공급군은 탈이온증류수를 음료수로 공급하였다.

3. 실험방법

1) 식이 섭취량, 체중 및 식이 효율의 측정

식이 섭취량은 식이를 무제한 자유급식시킨 후 매주 2회 일정한 시간에 측정하였다. 체중은 일주일에 한 번 일정한 시간에 측정하였고, 식이 섭취에서 오는 갑작스런 체중변화를 막기 위하여 체중 측정 2시간 전에 식이그릇을 빼주었다. 이상에 측정된 식이 섭취량과 체중을 이용하여 일주일간의 체중증가량을 같은 기간의 식이섭취량으로 나누어 식이효율(F.E.R.)을 산출하였다.

2) 각종 장기, 혈액, 뇨, 변의 채취

혈액은 실험동물을 실험기간의 종료 전 12시간을 굶긴 뒤 ethyl ether로 마취하고 단두로 희생시켜 채취하였으며, 이를 heparin으로 처리된 시험관에 받아 냉동 보관하였다.

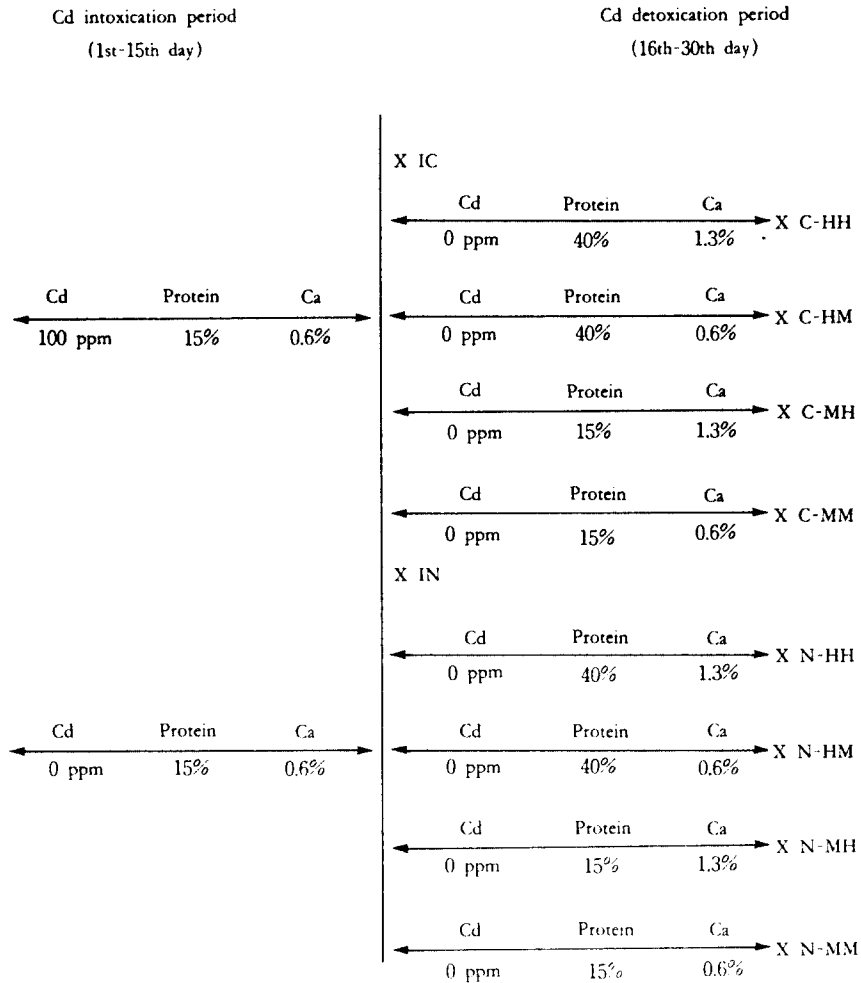
혈액 채취 즉시 실험동물을 해부하여 간, 신장, 소장을 떼어내고 무게를 측정된 후 절반은 metallothionein의 측정을 위하여 $-80^{\circ}C$ 의 deep freezer에 보관하였으며, 나머지는 cadmium의 분석을 위하여 $105 \pm 5^{\circ}C$ 의 drying oven에서 말린 후 dessicator에 보관하였다.

뇨와 변은 실험종료전 2일간 채취하였고, 변은 젖은 상태로 냉동 보관하였으며, 뇨는 증류수로 희석하여 50ml로 만든 후 일정량을 취하여 7,000 rpm에서 10분간 원심 분리시켜 상청액을 냉동 보관하였다.

3) 시료의 분석

혈액과 뇨의 cadmium 함량은 시료의 일정량을 취하여 Kjeldahl flask에 넣고 습식분해시킨 후 증류수로 희석하여 파장 214.438nm에서 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP; Laban International PTY, LTD. Scanning Monochromator Model 750)로 측정하였다.¹⁸⁾

간, 신장, 소장, 대퇴골, 변의 cadmium 함량은 시료의 일정량을 취하여, $550^{\circ}C$ 의 muffle furnace에서 24시간동안 건식분해시켜 농질산으로 녹인 후 1N HCl로 희석하여 파장 214.438nm에서 ICP로 측정하였다.¹⁸⁾



- X : Sacrifying point

- Initial groups were fed following diets for first 15 days of Cd intoxication period.

IN : No Cd + Middle protein(15%) + Middle calcium(0.6%)

IC : Cd(100ppm) + Middle protein + Middle calcium

- Detoxication groups were fed 100ppm Cd, 15% protein and 0.6% calcium diet for first 15 days of Cd intoxication period, then fed following diets for last 15 days of detoxication period. Control groups were fed no Cd, 15% protein and 0.6% calcium diet for first 15 days of Cd intoxication period, then fed following diet for last 15 days of detoxication period.

C-HH, N-HH : No Cd + High Protein (40%) + High calcium(1.3%)

C-HM, N-HM : No Cd + High Protein + Middle calcium(0.6%)

C-MH, N-MH : No Cd + Middle Protein (15%) + High calcium

C-MM, N-MM : No Cd + Middle Protein + Middle calcium

Fig 1. Design and classification of experimental groups

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	HH	HM	MH	MM
Protein	40	40	15	15
Calcium	1.3	0.6	1.3	0.6
g / kg diet				
Corn Starch	84.7	102.2	330.3	347.8
Glucose	350.0	350.0	350.0	350.0
Corn oil	100.0	100.0	100.0	100.0
Choline chloride	2.0	2.0	2.0	2.0
Casein	400.0	400.0	150.0	150.0
Vitamin premix ¹⁾	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mix ²⁾	15.432	15.432	15.432	15.432
KH ₂ PO ₄	4.136	4.136	12.534	12.534
K ₂ CO ₃	6.610	6.610	2.346	2.346
CaCO ₃	32.144	14.662	32.346	14.863
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	1.1	1.1	1.4	1.4

- 1) V: tamin premix(/Kg diet) : Retinyl palmitate 4,000 IU ; Cholecalciferol 400 IU ; α-tocopherol acetate 5.0mg ; Menadione 0.5mg ; Thiamine HCl 5.0mg ; Riboflavin 5.0mg ; Pyridoxine HCl 5.0mg ; Niacin 25.0mg ; Calcium pantothenate 20.0mg ; Cyanocobalamin 0.030ug ; Folic acid 0.5mg ; Biotin 0.2mg ; Ascorbic acid 50.0mg ; Glucose monohydrate to make 5,000mg
- 2) Mineral mix(mg / kg diet) : NaCl 12,430.0 ; MgSO₄ 2,440.0 ; FeC₆H₅O₇ · 6H₂O 312.0 ; MnSO₄ · H₂O 151.0 ; CuSO₄ 78.0 ; ZnCl 20.0 ; (NH₄)MO₇ O₂₄ · 4H₂O 1.25 ; KI 0.25

간, 신장, 소장의 metallothionein 함량은 cadmium/hemoglobin affinity assay 방법¹⁹⁾⁻²¹⁾을 이용하여 측정하였다. 즉, 각 조직을 0.25M sucrose 용액으로 균질화한 후 4℃를 유지하며 18,000×g에서 20분간 원심분리하여 cytosol을 얻은 다음 10ppm의 Cd 용액을 첨가하여 in vitro에서 metallothionein을 saturation시킨다. 여기에 Scheuhammer의 변형법^{20) 22)}에 따라 준비한 RBC hemolysate를 첨가하고, 열처리와 원심분리를 행한다. 이 과정에 의하여 과량의 cadmium과 metallothionein 이외의 기타 단백질에 붙은 cadmium을 제거한 후, atomic absorption spectrophotometer(AAS: Perkin Elmer Co, Model 2380)로 cytosol의 cadmium 농도를 측정하여 metallothionein의 함량을 구한다.

Metallothionein의 cadmium profile은 다음과 같은 방법으로 구하였다. 즉, 간, 신장, 소장의 pooled sample 5g에 동일한 volume의 1mM Tris-HCl buffer, pH 7.4를 넣어 균질화시킨 후 4℃를 유지하며 42,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상청액을 다시

4℃를 유지하며 42,000×g에서 2시간동안 원심분리하여 cytosol을 얻는다. 0.02% sodium azide를 함유한 1mM Tris-HCl buffer, pH 8.6으로 equilibration시킨 90×1.6cm의 Sephadex G-75 gel filtration column(L. K.B.)에 cytosol액 일부를 취하여 주입하고 1mM Tris-HCl buffer, pH 8.6으로 용출시키면서 254nm에서 흡광도를 측정한다. 용출액은 10분 간격으로 받아 각 용출액의 Cd 농도를 AAS로 측정하여 metallothionein의 cadmium profile을 구한다.^{23) 24)}

4. 통계처리

본 연구의 모든 실험결과와 각 실험군당 평균치와 표준오차를 계산하였고, 초기 증독기간 이후 희생된 2군(IC, IN)간의 유의성은 t-test를 이용하여 검정하였다. 후기 해독기간 이후 희생된 8군당 평균치의 비교는 분산분석(analysis of variance)을 한 후 α = 0.05 수준에서 Scheffé의 다중비교(multiple comparison)

을 하였으며, 각 실험인자(A: Cadmium 수준, B: 단백질 수준, C: Calcium 수준)에 의한 영향과 이들의 상호작용(AB: Cadmium×단백질, AC: Cadmium×Calcium, BC: 단백질×Calcium, ABC: Cadmium×단백질×Calcium)에 의한 영향은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 3요인 분산분석으로 유의성을 검정하였다. 또한 초기 15일간 cadmium을 투여한 후 회생시킨 군(IC)과 cadmium 투여 후 15일간 해독식이를 공급하였던 군들(C-HH, C-HM, C-MH, C-MM)의 차이는 각각 t-test를 사용하여 유의성을 검정하였다.^{25,26)}

III. 결 과

Table 1은 cadmium의 중독 확인과 해독 결과의 비교를 위해 1차 회생시킨 cadmium 중독군(IC)과 cadmium 비중독군(IN)의 평균치를 t-test한 결과로 대퇴골의 무게와 대퇴골의 cadmium 함량을 제외한

모든 결과가 유의적인 차이를 나타냈다. 즉 cadmium 중독군의 사료효율과 기관무게는 현저히 낮았으며, 각 조직의 cadmium과 metallothionein 함량은 유의적으로 높았다.

중독기간중 유의적으로 낮았던 식이 섭취량은 해독기간중 현저히 증가하여 cadmium 비공급군과 비슷한 수준을 나타냈다. 체중증가량과 사료 효율은 중독기간중 유의적으로 낮았으나 해독기간중에는 오히려 유의적으로 높은 수준을 나타냈다. 그러나 단백질이나 calcium의 효과는 볼 수 없었다.(Table 2)

간의 무게는 cadmium 공급유무뿐 아니라 단백질 수준 그리고 cadmium과 calcium의 상호작용에 의해 영향을 받아 cadmium 중독군중 고단백해독식이군(C-HH, C-HM)에서는 cadmium 비공급군과 비슷한 수준을 나타냈으나, 중단백해독식이군(C-MH, C-MM)에서는 유의적으로 낮았다. 신장의 무게도 cadmium과 단백질 수준의 상호작용에 의해 영향받

Table 1. Comparison of biochemical values between no cadmium group(IN) and cadmium group(IC)

Biochemical values	IN		IC
	1)	2)	
Food intake (g/day)	22.57 ± 0.82	*	16.69 ± 0.99
Body weight gain (g)	39.42 ± 5.38	*	0.71 ± 5.40
F.F.K	0.11 ± 0.01	*	0.01 ± 0.02
Organ weight(g) : Liver	8.01 ± 0.49	*	6.85 ± 0.58
Kidney	1.17 ± 0.06	*	1.01 ± 0.07
Femur (dry)	0.44 ± 0.01	NS	0.43 ± 0.01
(ash)	0.23 ± 0.00	NS	0.21 ± 0.00
Cd content : blood (µg/100ml)	2.40 ± 0.17	*	6.60 ± 0.60
liver (µg/g)	5.32 ± 1.76	*	20.28 ± 3.26
kidney (µg/g)	3.81 ± 0.84	*	32.65 ± 3.20
intstine (µg/g)	1.32 ± 0.39	*	13.19 ± 7.92
femur (µg/g)	1.41 ± 0.04	NS	1.89 ± 0.26
Cd excretion(µg/day) : urine	0.64 ± 0.07	*	2.57 ± 0.43
feces	1.52 ± 0.36	*	8163.82 ± 82.73
MT content(µg/g) : liver	87.00 ± 6.61	*	207.32 ± 14.54
kidney	16.91 ± 2.28	*	29.60 ± 2.45
intestine	72.30 ± 11.16	*	164.60 ± 13.28

1) Mean ± S. E.

2) * : Values between IC and IN were significantly different at $\alpha = 0.05$ by t-test

NS : Not significant at $\alpha = 0.05$ by t-test

Table 2. Food intake, body weight gain and F.E.R.

Group	Food intake		Body weight gain		F.E.R.	
	Intoxication period (g / 15days)	Detoxication period (g / 15days)	Intoxication period (g / 15days)	Detoxication period (g / 15days)	Intoxication period (g / 15days)	Detoxication period (g / 15days)
C-HH	239.23±14.24 a	331.06±19.63NS	4.42±10.32 a	67.28±5.31 cd	0.02±0.04 a	0.20±0.02 b
C-HM	248.33±18.74 ab	315.43±17.22	8.00± 8.02 a	58.28±4.49 bcd	0.03±0.03 ab	0.18±0.01 ab
C-MH	254.68±12.34 ab	347.33±11.49	8.85± 6.57 ab	62.85±1.92 bcd	0.07±0.02 abc	0.18±0.00 ab
C-MM	261.84±19.54 ab	339.32±20.16	6.71± 7.58 a	67.71±7.07 d	0.02±0.02 a	0.20±0.03 b
N-HH	331.03±24.17 c	317.32±14.66	58.85± 7.62 c	40.85±2.96 ab	0.17±0.02 bc	0.13±0.01 ab
N-HM	360.08± 9.09 bc	327.61± 9.60	65.14± 6.44 c	43.85±3.80 abc	0.18±0.01 bc	0.13±0.01 ab
N-MH	329.69±12.66 c	325.04±13.48	60.71± 7.06 c	32.71±2.81 a	0.18±0.02 c	0.10±0.01 a
N-MM	360.36±11.15 bc	361.26±16.33	64.00± 4.52 c	43.28±3.42 ab	0.17±0.01 bc	0.12±0.00 ab
Significant factor ⁴⁾	A	-	A	A	A	A

1) Mean±S.E.

2) Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffé' test.

3) Not significant at $\alpha=0.05$ by Scheffé' test.

4) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA.

A : Cadmium effect was significant at $\alpha=0.05$.

B : Dietary protein effect was significant at $\alpha=0.05$.

C : Dietary calcium effect was significant at $\alpha=0.05$.

AB : Effect of cadmium×protein was significant at $\alpha=0.05$.

AC : Effect of cadmium×calcium was significant at $\alpha=0.05$.

BC : Effect of protein×calcium was significant at $\alpha=0.05$.

ABC: Effect of cadmium×protein×calcium was significant at $\alpha=0.05$.

Table 3. Organ weights

Group	Liver	Kidney	Femur (g)	
			Dry weight	Ash
IC	1) 6.85±0.58	1.01±0.07	0.43±0.01	0.21±0.00
C-HH	2) 9.15±0.38 ab	3) 1.29±0.05 NS	0.52±0.02 NS	0.29±0.01 NS
C-HM	9.06±0.42 ab	1.26±0.03	0.51±0.02	0.29±0.01
C-MH	8.27±0.43 a	1.15±0.03	0.49±0.01	0.27±0.01
C-MM	8.45±0.44 a	1.11±0.05	0.50±0.01	0.28±0.00
N-HH	9.84±0.44 ab	1.32±0.06	0.56±0.01	0.28±0.01
N-HM	10.82±0.32 b	1.48±0.05	0.57±0.02	0.32±0.01
N-MH	8.59±0.35 ab	1.20±0.06	0.58±0.02	0.32±0.01
N-MM	9.62±0.45 ab	1.30±0.06	0.57±0.01	0.32±0.01
Significant factor ⁴⁾	A, B, AC	AB	A	A

1) Mean ± S.E.

2) Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffé' test.

3) Not significant at $\alpha=0.05$ by Scheffé' test.

4) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA. (See Table 2)

Table 4. Cadmium contents in serum, liver, kidney, intestine and femur

Group	Whole Blood ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Liver ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Kidney ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Intestine ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Femur ($\mu\text{g}/\text{g}$)
IC	1) 6.60 \pm 0.60	20.28 \pm 3.26	32.65 \pm 3.2	43.49 \pm 7.9	1.89 \pm 0.26
C-HH	2) 3) 2.38 \pm 0.14ab **	15.63 \pm 1.34b NS	46.94 \pm 10.21b NS	4) 11.04 \pm 4.40NS **	1.39 \pm 0.06 NS
C-HM	3.01 \pm 0.59ab **	16.61 \pm 2.47b NS	39.26 \pm 4.34b NS	8.96 \pm 3.21 **	1.86 \pm 0.36 NS
C-MH	3.31 \pm 1.04b **	19.26 \pm 2.72b NS	41.98 \pm 2.00b **	8.72 \pm 2.97 **	2.12 \pm 0.27 NS
C-MM	2.61 \pm 0.85ab **	19.70 \pm 1.70b NS	52.67 \pm 2.78b **	7.07 \pm 0.68 **	2.05 \pm 0.53 NS
N-HH	2.47 \pm 0.16 ab	2.29 \pm 0.83 a	8.21 \pm 3.47 a	1.26 \pm 0.16	1.07 \pm 0.04
N-HM	2.34 \pm 0.18 ab	1.46 \pm 0.26 a	6.75 \pm 3.21 a	1.80 \pm 0.47	1.05 \pm 0.12
N-MH	1.94 \pm 0.12 a	2.86 \pm 0.45 a	9.87 \pm 4.28 a	3.01 \pm 0.95	1.12 \pm 0.06
N-MM	2.15 \pm 0.13 ab	3.29 \pm 1.49 a	4.80 \pm 1.44 a	2.38 \pm 0.31	1.22 \pm 0.06
Significant factor ⁵⁾	A, B	B, AB	A	A, ABC	A, B, AB, AC

1) Mean \pm S.E.

2) Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffé test.

3) **: Each values of detoxication groups(C-HH, C-HM, C-MH, C-MM) were significantly different from IC values at $\alpha=0.05$ by t-test.

NS: Each values of detoxication groups were not significantly different from IC values at $\alpha=0.05$ by t-test.

4) Not significant at $\alpha=0.05$ by Scheffé test.

5) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA. (See Table 2)

아 cadmium 공급군중 단백질 수준이 낮은 군에서 낮은 경향을 보였다. 그러나 대퇴골의 경우에는 연조직과 달리 cadmium의 영향만이 나타나 cadmium 공급군에서 다소 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었다.(Table 3)

혈액등 각 조직의 cadmium 함량은 Table 4와 같았다. 혈액의 cadmium 함량은 15일간의 해독식이 공급 결과 유의적으로 감소하여 cadmium 비공급군과 거의 비슷한 수준을 나타냈으며, 특히 고단백-고calcium군(C-HH)에서 가장 낮았으나 각 식이군간에 유의적인 차이는 없었다. Cadmium 공급으로 유의적으로 높아졌던 간의 cadmium 함량은 해독기간 후에도 낮아지지 않고 비슷한 수준을 유지하였으며, 단백질 수준이 높은 군에서 낮은 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 아니었다. 신장의 cadmium 함량은 15일간의 해독기간 후 더욱 증가하는 경향이있으며,

특히 중단백군(C-MH, C-MM)에서는 유의적인 증가가 있었다. 그러나 단백질 수준 또는 cadmium 수준에 의한 일정한 경향은 나타나지 않았다. 소장의 cadmium 함량은 cadmium 중독 후 유의하게 높다가 해독기간 후 현저히 감소하였으며 각 실험요인의 상호작용에 의해 영향을 받아 cadmium 공급군중 단백질 수준과 cadmium 수준이 높을수록 높은 경향을 나타냈다. 대퇴골의 cadmium 함량은 간동의 연조직과 달리 해독 전후에 큰 차이를 나타내지 않았으며, 단백질 수준이 낮은 경우에 더 높은 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 보이지 않았다.

Table 5와 같이 뇨와 변을 통한 cadmium 배설량은 해독기간중 현저히 낮아졌으며, 뇨의 cadmium 배설량은 고단백군(C-HH, C-HM)에서 높은 경향을 보였다. 변의 cadmium 배설량은 고단백-중calcium군(C-HM)에서 유의적으로 높은 결과를 나

타냈으나 이는 실험군간의 오차가 컸기 때문으로 나타났다.

간, 신장, 소장의 metallothionein 함량은 Table 6과 같았다. 간의 metallothionein은 중독 및 해독기간 후 함량 변화가 거의 없이 cadmium공급군에 비해 유의적으로 높았으며 단백질수준에 의해 유의적인 영향을 받아 단백질수준이 높을수록 높은 경향을 보여 주었다. 신장의 경우에는 해독기간후 metallothionein 함량이 유의적으로 증가하는 결과를 나타냈다. 또한 cadmium과 단백질의 상호작용에 의해 유의적인 영향을 받아 cadmium 공급군중 식이 단백질 수준이 낮

을수록 높은 경향을 보여 고단백-고cadmium군(C-HH)에서 가장 낮았으며, 중단백-중cadmium군(C-MM)에서 가장 높았다. 소장의 경우에는 해독기간 후 metallothionein 함량이 유의적으로 감소하여 cadmium 비공급군과 비슷한 수준을 나타냈으며, 각 실험요인에 의해 영향을 받았으나 유의적인 차이나 일정한 경향은 찾아볼 수 없었다.

간, 신장, 소장의 cytosol액을 취해 gel filtration chromatography를 행하고, 얻어진 각 fraction의 cadmium 함량을 구한 결과 단백질과 calcium 수준이 높을수록 cadmium과 metallothionein의 결합비율이 증가하였다. Fig. 2는 신장의 경우 고단백-고calcium군(C-HH)에서는 세포질내 cadmium이 대부분 metallothionein과 결합되어 있으나 중단백-중calcium군(C-MM)에서는 cadmium이 다량 고분자량(HMW) 단백질과 결합되어있음을 나타낸다. Fig. 3은 단백질-고calcium군(C-HH)의 간과 소장에서도 세포질내 cadmium이 대부분 metallothionein과 결합되어있음을 나타낸다.

Table 5. Urinary and fecal excretion of cadmium

Group	Urine ($\mu\text{g/day}$)		Feces ($\mu\text{g/day}$)	
IC	1)		816.82 \pm 82.73	
	2)	3)	4)	
C-HH	1.32 \pm 0.14NS	**	4.54 \pm 0.98ab	**
C-HM	1.76 \pm 0.46	NS	7.30 \pm 2.61c	**
C-MH	1.23 \pm 0.34	**	4.24 \pm 2.54ab	**
C-MM	1.30 \pm 0.14	**	4.39 \pm 0.71ab	**
N-HH	0.95 \pm 0.16		2.61 \pm 0.30ab	
N-HM	1.60 \pm 0.11		1.33 \pm 0.28a	
N-MH	1.76 \pm 0.06		1.49 \pm 0.34ab	
N-MM	1.61 \pm 0.08		1.40 \pm 0.13a	
Significant factor ⁵⁾				

- 1) Mean \pm S.E.
- 2) Not significant at $\alpha=0.05$ by Scheffé test.
- 3) **: Each values of detoxication groups(C-HH, C-HM, C-MH, C-MM) were significantly different from IC values at $\alpha=0.05$ by t-test.
NS: Each values of detoxication groups were not significantly different from IC values at $\alpha=0.05$ by t-test.
- 4) Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffé test.
- 5) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA. (See Table 2)

IV. 고 찰

식이 섭취량 저하와 체중증가율의 감소는 돼지, 흰 쥐, 닭, Japanese quail등에게 cadmium을 경구투여 또는 피하주사한 연구에서 많이 보고 되고 있다.¹⁵⁾²⁷⁾⁻³³⁾ 대부분의 학자들은 cadmium에 의해 식이 섭취량이 저하되고 이에 따른 2차적 결과로 체중증가율이 감소된다고 설명하고 있으나,²⁷⁾³¹⁾³³⁾ Mustafa와 Cross³²⁾ 등 일부 학자들은 cadmium이 electron transport와 열량대사를 방해함으로써 직접적으로 성장저하를 가져 온다고 설명하기도 한다. 본 실험에서도 cadmium 중독으로 인해 식이 섭취량, 체중증가율과 식이효율이 현저히 낮아졌으나, 해독식이 공급 후 cadmium 공급군에서 모두 유의적으로 증가하였으며 식이 단백질과 cadmium 수준에 따른 차이는 없었다. 따라서 중 정도 이상의 식이 단백질과 cadmium 수준에서는 cadmium으로 인한 체중감소가 어느정도 회복되는 것으로 나타났다.

Cadmium의 해독과정에서 가장 중요한 기관이라 할 수 있는 간과 신장의 무게는 cadmium 공급 후 감소되는 것으로 알려져 있으며,¹²⁾³⁴⁾ 본 실험에서도

Table 6. Metallothionein contents in liver, kidney and intestine

Group	Liver ($\mu\text{g/g}$)		Kidney ($\mu\text{g/g}$)		Intestine ($\mu\text{g/g}$)	
IC	1) 207.32 \pm 14.54		29.60 \pm 2.45		164.60 \pm 13.28	
C-HH	2) 199.28 \pm 30.62b	3) NS	38.88 \pm 1.54b	**	4) 64.60 \pm 10.07NS	**
C-HM	219.28 \pm 17.75b	NS	43.36 \pm 1.66b	**	103.14 \pm 9.46	**
C-MH	193.80 \pm 18.85b	NS	39.33 \pm 2.34b	**	83.54 \pm 48.80	**
C-MM	184.18 \pm 22.24b	NS	46.97 \pm 0.74b	**	94.45 \pm 7.63	**
N-HH	58.14 \pm 8.58a		18.47 \pm 1.38a		79.93 \pm 6.44	
N-HM	54.40 \pm 3.84a		16.68 \pm 1.70a		69.54 \pm 4.67	
N-MH	80.01 \pm 9.14a		15.46 \pm 1.19a		77.88 \pm 8.29	
N-MM	70.41 \pm 7.13a		17.06 \pm 1.12a		86.68 \pm 15.37	
Significant factor ⁵⁾	A, B, AB		A, AB		A, B, C, AB	

1) Mean \pm S.E.

2) Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffé test.

3) **: Each values of detoxication groups(C-HH, C-HM, C-MH, C-MM) were significantly different from IC values at $\alpha=0.05$ by t-test.

NS: Each values of detoxication groups were not significantly different from IC values at $\alpha=0.05$ by t-test.

4) Not significant at $\alpha=0.05$ by Scheffé test.

5) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA. (See Table 2)

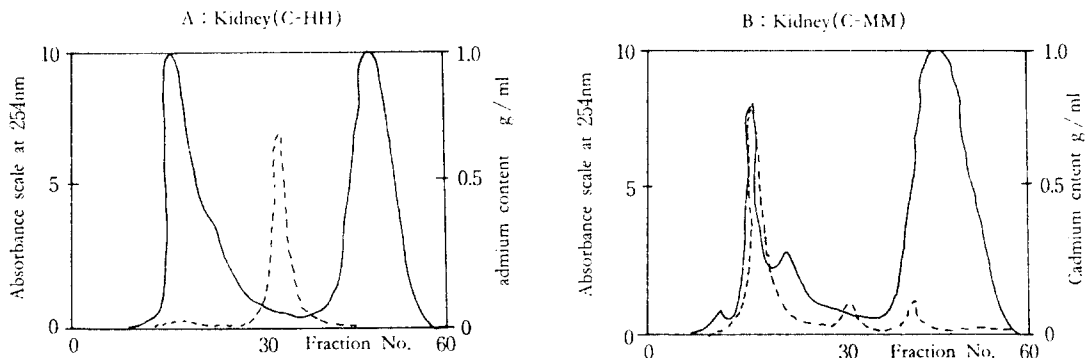


Fig 2. Gel filtration chromatography of the soluble kidney proteins.

(—) Absorbance scale at 254nm; (---) cadmium concentration $\mu\text{g/ml}$. A: from rats fed 100ppm Cd for intoxication period and 40% protein and 1.3% calcium diet for detoxication period(C-HH) B: from rats fed 100ppm Cd for intoxication period and 15% protein and 0.6% calcium diet for detoxication period(C-MM).

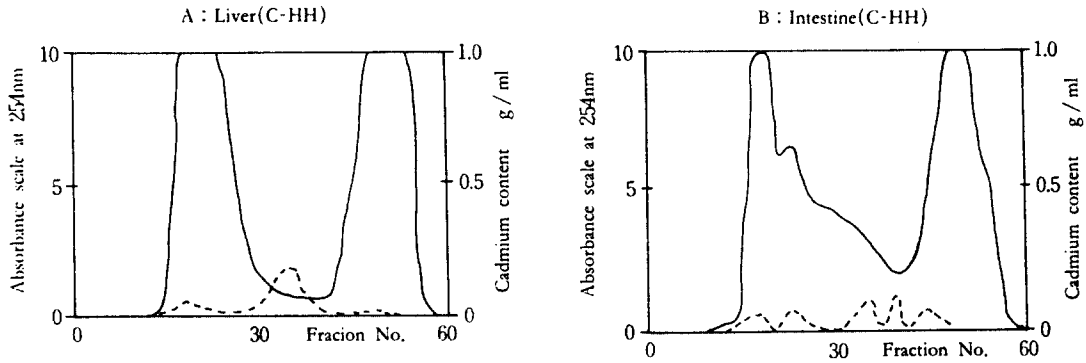


Fig 3. Gel filtration chromatography of the soluble proteins of liver and intestine.

(—) Absorbance scale at 254nm ; (--) cadmium concentration $\mu\text{g} / \text{ml}$. A : liver from rats fed 100ppm

Cd for intoxication period and 40% protein and 1.3% calcium diet for detoxication period(C-HH)

B : intestine from rats fed 100ppm Cd for intoxication period and 40% protein and 1.3% calcium diet for detoxication period(C-HH)

cadmium 중독으로 현저한 감소를 나타냈다. 그러나 해독기간 후 간과 신장의 무게가 cadmium 비공급군과 유사한 수준까지 증가하였으며 특히 고단백군에서 높은 경향을 보여 고단백식이 효과적인 것으로 나타났다.

경구투여된 후 체내로 흡수된 cadmium은 albumin과 같은 고분자단백질과 결합하여 주로 간으로 이행된 후^{35,36)} 간세포에서 metallothionein의 합성을 유도하여 Cd-MT의 형태로 non-toxic하게 격리되어진다.³⁹⁾ 그러나 간의 Cd-MT는 그대로 머물러있지 않고 혈액으로 방출되어 나오며, 혈액의 Cd-MT는 다른 기관의 막은 통과하지 못하나 신장의 사구체막을 선택적으로 통과하기 때문에 빠르게 신장으로 이행된 후 서서히 뇨로 배설된다.³⁷⁾ 따라서 metallothionein은 세포에서 cadmium을 non-toxic한 형태로 격리시키거나,³⁹⁾ 순환계에서 cadmium을 빠르게 제거하여 중앙신경계나 기타 vital organ에서 cadmium이 작용하는 것을 방지함으로써³²⁾ cadmium의 독성을 완화시키는 것으로 알려져있다.

본 연구에서는 해독전후의 간, 신장, 소장외의 cadmium과 metallothionein 함량 변화가 기관마다 서로 다른 경향을 보여 간의 경우에는 해독전후에 함량 변화가 거의 없었으며, 신장의 경우에는 오히려 증가하였으며, 소장의 경우에는 현저히 감소하였다.

간의 경우 해독기간 후 cadmium과 metallothionein 함량이 거의 비슷한 수준이었던 것은 Kotsonis와 Klaassen의 실험³⁸⁾결과와 일치하는 것으로 이들은 쥐에게 cadmium을 1회 피하주사한 후 2일~14일 동안 cadmium 함량을 측정해 본 결과 간의 cadmium 함량은 일정한 수준을 유지하였으나 spleen, testes, muscle, brain등의 cadmium 함량은 50%까지 감소하였음을 관찰하고 이는 간의 이외의 기타 조직으로부터 cadmium이 빠르게 재분배되기 때문이라고 하여, 간으로의 cadmium 이행과 손실이 거의 비슷하게 이루어지고 있음을 주장하였다. 흡수된 후 일단 간에 격리된 cadmium은 차츰 간으로부터 신장으로 이동하여 결국 신장의 cadmium 농도가 간의 농도보다 훨씬 높게 될 것이라고 한 보고³⁹⁾처럼 본 실험에서도 신장의 cadmium과 metallothionein 함량은 중독기간보다 해독기간 후에 더 높아졌다.

해독기간 후 간과 신장의 cadmium의 함량은 역시 식이 요인에 의해 변화되는 경향을 보여 간의 cadmium 함량은 식이 단백질 수준이 높을수록 낮은 경향이었고, 신장의 cadmium 함량도 고단백이나 고calcium 식이를 공급한 경우에 비해 중단백-중calcium군(C-MM)에서 가장 높았고, 뇨를 통한 cadmium 배설량은 고단백군에서 높은 경향을 나타냈다. 또한 해독기간 후 감소된 혈액의 cadmium 함량은 특히 고단백-고calcium 식이군(C-HH)에서 가

장 낮았다. 이러한 결과로 미루어 고단백식을 공급한 경우 체내에 축적된 cadmium은 신장으로 빠르게 이행되어 뇨를 통해 배설되며, 그 결과 간과 신장 및 혈액의 cadmium 함량은 감소하고 뇨의 cadmium 배설량은 증가하는 경향을 나타내는 것으로 생각된다.

한편 소장과 변의 cadmium 함량은 해독 기간 후 유의적으로 감소하였으며, 소장의 metallothionein 함량도 유의적으로 감소하였는데, 이는 cadmium공급에 의해 합성유도 되었던 Cd-MT가 mucosal cell에 trapping되어 있다가 세포의 박리와 함께 변으로 배설되어졌으며,⁴⁰⁻⁴³⁾ cadmium 공급중단으로 더 이상의 cadmium 흡수가 없었으며 따라서 metallothionein의 합성유도가 저하되었기 때문으로 생각할 수 있다.

Cadmium은 생물학적 반감기가 매우 길어 체내에서 서서히 대사되는 반면 metallothionein의 반감기는 비교적 짧으므로⁵⁶⁾ metallothionein이 detoxifying ligand로 작용한다는 의미에서 볼 때 metallothionein이 계속적으로 합성되어 Cd-MT수준이 균형을 이루어야만 지속적인 방어효과가 나타날 수 있다.³⁹⁾ 본 실험 결과 metallothionein 함량은 간의 경우 식이단백질 수준이 높을수록 높았으며, 반대로 신장의 경우는 단백질 수준이 낮을수록 높은 경향을 보였다. 신장의 경우 중단백-중calcium군(C-MM)에서 metallothionein 함량이 높아진 것은 뇨를 통한 cadmium 배설이 적어 신장의 cadmium 농도가 높아진 결과라 볼 수 있다. 따라서 조직의 cadmium 농도만으로는 cadmium의 독성을 평가하기 힘들다. Morselt 등⁴⁴⁾은 Wistar종의 암컷 흰쥐에게 CdCl₂를 피하주사하여 enzyme histochemistry 연구를 실시한 결과 cadmium-thiolate cluster는 유독하지 않으며 cadmium의 독성은 세포가 cadmium을 얼마나 많이 격리시킬 수 있으나, 다시말해 metallothionein을 얼마나 많이 합성할 수 있는가에 달려있다고 설명하였다. 본 실험에서는 cadmium과 metallothionein의 binding profile을 조사하기 위하여 Sephadex G-75 chromatography를 실시해 본 결과 특히 신장의 경우 고단백-고calcium 해독식이군(C-HH)에서는 다량의 cadmium이 metallothionein과 결합되어 있는 반면, 중단백-중calcium군(C-MM)에서는 high molecular weight (HMW) 단백질과 결합되어있어 cadmium의 비율이

높은것으로 나타나 고단백-고calcium식이 신장의 cadmium 해독에 효과적인 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 고단백식을 공급한 경우 간과 신장의 무게가 높았으며, metallothionein의 합성 증가와 함께 조직내 cadmium 함량은 저하되고 뇨를 통한 cadmium의 배설은 증가하였다. 또한 cadmium과 metallothionein의 결합율도 높았다. 따라서 고단백식은 cadmium 해독에 효과적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 반면 고calcium 식이 공급에 의한 효과는 거의 나타나지 않았다.

V. 요약 및 결론

고단백질과 고calcium 식이가 경구투여된 cadmium의 해독과정에 미치는 영향을 연구하기 위하여 Sprague-Dawley종 흰쥐를 대상으로 실험을 수행하였다.

평균체중이 208g인 흰쥐에게 cadmium을 음료수로 공급하면서 15% 단백질과 0.6% cadmium이 함유된 식이로 15일간 사육하여 cadmium 중독을 유도한후(incubation period), cadmium투여를 중단하고 단백질 수준은 40%와 15%로 달리하고 calcium 수준은 1.3%와 0.6%로 달리하여 15일 동안 사육한 후(detoxication period) cadmium 대사와 metallothionein 합성능력을 살펴보았다.

Cadmium 중독으로 현저히 감소하였던 체중증가량과 식이 효율은 해독기간중 유의적으로 증가하였으나 각 식이군간의 차이는 없었다. 간, 신장, 그리고 대퇴골의 무게는 대퇴골을 제외하고는 모두 cadmium 중독군에서 유의적으로 낮았으며 해독기간 후 중단백식이군에 비해 고단백식이군에서 높은 경향을 나타냈다. 혈액 cadmium 함량은 해독기간 후 현저히 감소하였으며 특히 고단백-고calcium 식이군(C-HH)에서 가장 감소량이 컸다. 간의 cadmium과 metallothionein 함량은 해독기간 전후의 차이가 거의 없었으며, cadmium 함량은 고단백식이군에서 낮았으나, metallothionein 함량은 고단백군에서 높은 경향을 보였다. 신장의 cadmium과 metallothionein 함량은 해독기간이후 오히려 증가하였으며, 식이 단백질과 calcium 수준이 낮을수록 증가율이 컸다. 반면 소장의 cadmium과 metallothionein

함량은 해독기간이후 현저히 감소하였으며 cadmium 함량은 고단백이나 고calcium 군에서 높은 경향을 나타냈다. 대퇴골의 cadmium 함량은 간등의 연조직과 달리 각 실험요인에 의한 유의적 차이를 나타내지 않았다. 뇨와 변으로의 cadmium 배설은 해독기간중 현저히 감소되었으며, 뇨의 cadmium 배설량은 고단백군에서 높은 경향을 보였다. 또한 단백질과 calcium 수준이 높을수록 간, 신장, 소장의 cytosol에서 cadmium과 metallothionein의 결합율이 증가되어, 고단백-고calcium 군(C-HH)에서는 대부분의 cadmium이 metallothionein과 결합되어 있는 것으로 나타났다.

이상과 같이 고단백질 해독식은 간과 신장의 무게를 증가시키며, 혈액, 간, 신장 조직의 cadmium 함량을 낮추며, 뇨를 통한 cadmium 배설을 증가시켰다. 또한 metallothionein 합성을 증가하여 cadmium과 metallothionein의 결합율을 높힘으로써 cadmium 해독에 효과적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 반면 식이 calcium은 특별한 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

[참고문헌]

- 1) Squibb, K.S. and B.A. Fowler(1984), Intracellular metabolism and effects of circulating cadmium-metallothionein in the kidney. *Health Perspect* 54:31-35.
- 2) Gontzea, I and F.Popescu(1978), The effect of body protein supply on resistance to cadmium. *Brit J Ind Med* 35:154-160.
- 3) Friberg, L.(1950), Health hazards in the manufacture of alkaline accumulation with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med Scand* 138: 1-124.
- 4) Piscator, M.(1985), Dietary exposure to cadmium and health effects: Impact of environmental changes. *Environ Health Perspect* 63:127-132.
- 5) Webb, M.(1972), Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem pharmacol* 21:2751-2765.
- 6) 장성길(1983), 한국인 각 장기조직중의 지방 중 금속 원소분포. 중앙대학교 대학원 박사학위 논문.
- 7) Gross, S.B., D.W. Yeager and M.S. Middendorf (1976), Cadmium in liver, kidney and hair of human, fetal through old age. *J Toxicol Environ Health* 2:153-167.
- 8) Din, W.S. and J.M. Frazier(1985), Protective effect of metallothionein on cadmium toxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 230:395-402.
- 9) Cherian, M.G. and M. Nordberg(1983), Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* 28:1-15.
- 10) Leber, A.P. and T.S. Miya(1976), A mechanism for cadmium- and zinc-induced tolerance to cadmium toxicity: Involvement of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 37:403-414.
- 11) Squibb, K.S., R.J. Cousins, B.L. Silbon and S. Levin(1976), Liver and intestinal metallothionein function in acute cadmium toxicity. *Exp Mol Pathol* 25: 163-171.
- 12) Nordberg, G.F., M. Piscator and B. Lind(1971), Distribution of cadmium among protein fractions of mouse liver. *Acta Pharmacol Toxicol* 29:456-470.
- 13) Oh, S.H. and P.D. Whanger(1979), Biological function of metallothionein. VII. Effect of age on its metabolism in rats. *Am J Physiol* 237:E18-E22.
- 14) Kági, J.H.R. and A. Schäffer(1988), Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27:8509-8515.
- 15) Muto, Y. and M. Omori(1977), Nutritional influence on the onset of renal damage due to long-term administration of cadmium in young and adult rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 23:349-360.
- 16) Lee, H.Y. and M.K. Kim(1988), Effect of dietary cadmium and protein levels on the body protein metabolism and cadmium toxicity in growing rats. *Kor J Nutr* 21:27-37.
- 17) 배계현(1989), 식이내 cadmium 수준이 흰쥐의 cadmium 중독에 미치는 영향. 이화여자대학교 대학원 석사학위 논문.
- 18) Suzuki, K.T., K. Yaguchi, R. Chunki, M.

- Nishikawa, Y.K. Yamada(1983), Extents of cadmium accumulation and its effect on essential metals in liver, kidney and body fluids. *J Toxicol Environ Health* 11:713-726.
- 19) Onosaka, S. and G. Cherian(1982), Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods. *Toxicol Appl Pharmacol* 63:270-274.
- 20) Scheuhammer, A.M., M.G. Cherian(1986), Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicol Appl Pharmacol* 82:417-425.
- 21) Eaton, D.L., B.F. Toal(1982), Evaluation of Cd / Hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 66:134-142.
- 22) Scheuhammer, A.M.(1988), The dose-dependent disposition of cadmium into organs of Japanese quail following oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 95:153-161.
- 23) Asokan, P. and S.K. Tandon(1981), Effect of cadmium on hepatic metallothionein levels in early development of the rat. *Environ Res* 24:201-206.
- 24) Parizek, J. and Z. Zahor(1956), Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature* 177: 1036-1037.
- 25) Snedecor, G.W. and W.G. Cochran(1980), "Statistical Methods" 17th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- 26) 채서일, 김범종(1988), "SPSS/PC를 이용한 통계분석", 법문사.
- 27) Juhlshamn, K., F. Utne and O.R. Brackkan(1977), Interactions of cadmium with copper, zinc, and iron in different organs and tissues of the rat. *Acta Pharmacol Toxicol* 41:515-524.
- 28) Toraason, M. and E.C. Foulkes(1984), Interaction between calcium and cadmium in the 1,25-dihydroxy vitamin D₃ stimulated rat duodenum. *Toxicol Appl Pharmacol* 75:98-104.
- 29) Bunn, C.R. and G. Matrone(1966), In vivo interaction of Cd, Cu, Zn, and Fe in the mouse and rat. *J Nutr* 90:395-399.
- 30) Hill, C.H., G. Matrone, W.I. Payne and C.W. Barber(1963), In vivo interactions of cadmium with Cu, Zn, and Fe. *J Nutr* 80:227-235.
- 31) Cousins, R.J., A.K. Barber and J.R. Trout(1973), Cadmium toxicity in growing swine. *J Nutr* 103: 964-972.
- 32) Mustafa, M.G. and C.E. Cross(1971), Oxidative metabolism of isolated cells and mitochondria and effect of cadmium ion on electron and energy transfer reactions. *Biochemistry* 10:4176-4185.
- 33) Omori, M. and Y. Muto(1977), Effects of dietary protein, calcium, phosphorus and fiber on renal accumulation of exogenous cadmium in young rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 23:361-373.
- 34) Faeder, E.J., S.Q. Chaney, L.C. King, T.A. Hinners, R. Bruce and B.A. Fowler(1977), Biochemical and ultrastructural change in livers of cadmium treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 39:473-487.
- 35) Webb, M.(1986), Role of Metallothionein in Cadmium Metabolism. In "Cadmium" (E.C. Foulkes, Ed.), pp.281-325, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 36) Nordberg, M.(1978), Studies on metallothionein and cadmium. *Environ Res* 15:381-404.
- 37) Suzuki, Y.(1981), Cd, Cu and Zn distribution in blood of rats after long-term cadmium administration. *J Toxicol Environ Health* 7:251-262.
- 38) Kotsonis, F.N. and C.D. Klaassen(1977), Comparison of methods for estimating hepatic metallothionein in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 41:583-588.
- 39) Gunn, S.A. and T.C. Gould(1957), Protective effect of thiol compounds against cadmium-induced vascular damage to testis. *Proc Soc Exp Biol Med* 96:820-823.
- 40) Revis, N.W. and T.R. Osborne(1984), Dietary protein effects on cadmium and metallothionein accumulation in the liver and kidney of rats. *Environ Health Perspect* 54:83-91.
- 41) Kagi, J.H.R., M. Vosak, K. Lerch, D.E.O. Gilg, P. Hunziker, W.R. Bernhard and M. Good(1984),

- Structure of mammalian metallothionein. *Environ Health Perspect* 54:93-103.
- 42) Bhattacharyya, M.H., B.D. Whelton, D.P. Peterson, B.A. Carnes, M.S. Guram and E.S. Moretti(1988), Kidney changes in multiporous mice fed a nutrient-sufficient diet containing cadmium. *Toxicology* 50:205-215.
- 43) Koo, S.I., C.S. Fullmer and R.H. Wasserman (1978), Intestinal absorption and retention of ¹⁰⁹Cd: Effects of cholecalciferol, cadmium status and other variables. *J Nutr* 108:1812-1822.
- 44) Morselt, A.F.W., K.T. Suzuki, A.M. Roelofsen, W.H. Roelfzema and J.H.J.C. Peereboom-Stegeman (1986), Increase of cadmium-thiolate clusters as a measure of morphological non-toxic cadmium accumulation in the rat liver. *Toxicology* 41:33-41.