

Cadmium 투여 흰쥐에 있어서 Metallothionein 합성과 항산화적 해독기구에 미치는 식이 Selenium의 영향*

이 순 재 · 전 수 영

효성여자대학교 식품영양학과

Effect of Dietary Selenium of Metallothionein Synthesis and Antioxidative Detoxification Mechanism in Cadmium Administered Rats

Rhee, Soon-Jae · Jun, Su-Young

Department of Food Science and Nutrition, Hyosung Women's University, Kyungbuk, Korea

ABSTRACT

In order to investigate the effect of selenium(Se) on the liver damage, metallothionein synthesis and hepatic antioxidative detoxification system in cadmium(Cd) administered rats, Sprague-Dawley male rats($60 \pm 5g$) were divided into two diet groups, depending on with(CdS groups) or without(Cd groups) 0.5ppm Se supplementation and fed experimental diets ad libidum for 4 weeks. And then each group was again subdivided into five groups, depending on injection number of Cd, i.e., 0, 1, 2, 3, and 4 times of 2.5mg Cd/kg of body wt once a day.

Hemoglobin concentration, hematocrit values, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities were decreased progressively with increasing number of Cd injection, but increased by the supplementation of Se. The reduced form of glutathione (GSH) contents in blood and liver and vitamin E content were decreased and oxidized form (GSSG) increased in Cd groups, but these of Se supplemented groups were not very different from controls.

Cd reduced liver vitamin E content which was not restored by Se supplementation. Liver lipid peroxide values were elevated with increasing doses of Cd, but Se supplementation reduced these elevated levels. Accumulation of metallothionein in liver and kidney was increased with increasing number of Cd injection, but Se did not affect on them.

Histological examination revealed that lysosomes were significantly increased and mitochondria and Golgi apparatus were enlarged by Cd, however, these changes were reduced by Se. It was concluded that Se administration promoted antioxidative detoxification and alleviated

채택일자 : 1993년 3월 17일

* To whom all correspondence should be addressed.

** 이 연구는 1991년도 한국과학재단 연구비지원(과제번호 : 911-1509-059-2)에 의한 결과의 일부임.

peroxidative damage in rat liver by Cd.

KEY WORDS : cadmium · oxygen free radical · selenium · peroxidative liver damage · metallothionein · hepatic antioxidative detoxification.

서 론

환경오염성 중금속중에서도 cadmium(Cd)은 인체내에서 맹독성의 임상적 중독성을 나타내기 때문에 날로 그 관심이 집중되어 그의 중독성과 해독에 관한 연구는 많이 보고되고 있다¹⁻⁶⁾. Cd은 오염된 공기나 식수, 식품등에 의해 무의식적으로 우리 인체내에 침입될 수 있는 가능성이 크다는 현실을 생각할 때 Cd을 취급하는 특수한 직업에 종사하는 직업인들의 일반인들에게도 Cd의 중독성은 심각한 문제라고 할 수 있다¹⁾²⁾. 더구나 동물체내의 영양상태가 중금속의 임상적 중독현상이나 해독기구에 영향을 미칠수 있다는 보고⁷⁻¹²⁾들을 미루어 볼때 영양상태의 적정한 수준향상과 중금속의 중독 현상의 완화 및 해독기구의 강화등에 관한 연구는 중요하다고 볼 수 있다. 저자등¹³⁾도 이러한 Cd 중독과 해독에 관한 연구의 일환으로 흰쥐에 Cd를 투여했을때 간조직에 과산화적 손상을 초래함을 관찰하였고 또한 Cd 투여시 생체내에서 중금속의 해독작용을 한다고 알려진 metallothionein(MT) 합성 양상을 연구보고¹⁴⁾한 바 있는데 이러한 Cd 투여로 인한 과산화적 손상은 Cd 투여로 인해 생체내에서의 oxygen free radical의 생성에 기인된 것으로 보고하였다.

그러므로 본 연구에서는 Cd 투여시에 일어나는 이러한 조직의 과산화적 손상으로 부터 생체를 보호하는 항산화적 해독기구인 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX), glutathione S-transferase(GST) 등의 효소활성 및 생체내 항산화물질인 vitamin E 및 glutathione의 조직중 함량과 또 중금속의 해독기구로 알려져 있고 또 아직 확실하게 규명은 되지 않았지만 free radical의 scavenger 역할도 가능하다고 알려진 MT¹²⁾¹⁴⁾ 합성과의 상호관련을 연구하고 아울러 생체내 항산화작용으로써 뿐만 아니라 중금속의 해독작용을

한다고 알려진 selenium(Se)이 이러한 해독기구에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 본연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

실험동물은 무게가 60±5g 정도되는 Sprague-Dawley종 숫컷을 구입하여 7일간 일정한 환경에서 적응시킨후 Se(0.5ppm) 첨가식이군과 비첨가식이군으로 나누어 4주간 사육하였으며 식이의 기본구성은(Table 1)과 같고, 물과 식이는 자유롭게 섭취케 하였다. 4주간 사육후 Table 2와 같이 Se 첨가식이군 및 비첨가식이군을 Cd 투여 횟수에 따라 다시 각각 5군씩으로 나누어 Cd으로서 체중 kg당 2.5mg을 24시간 간격으로 0, 1, 2, 3, 4회씩 반복하여 복강으로 주사하고 마지막 주사후 24시간만에 실험동물을 희생시켰다.

Table 1. Composition of basal diet

Ingredients	Composition (g/1,000g diet)
Corn starch ¹⁾	670
Casain ²⁾	180
Corn oil ³⁾	50
Salt mix ⁴⁾	40
Vitamin mix ⁵⁾	10
Cellulose ⁶⁾	50
Kcal/g	3.85

1) Pung Jin Chem. Co.

2) Lactic Casein, 30mesh, New Zealand Dairy Board, Wington, N.Z.

3) Dong Bang Oil Co.

4) Salt mix : per 100g of salt mix ; accordint to Harper's¹⁵⁾

5) Vitamin mix : per 1kg diet ; according to National Research Council

6) Sigma Chem. Co.

2. 혈액 및 장기의 채취

혈액 및 장기의 채취는 실험 마지막 Cd 투여 24 시간 후에 ethyl ether으로 실험동물을 마취시켜 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하여 heparin이 처리된 용기에 담아 hemoglobin 함량과 hematocrit치 측정에 사용하였으며 간장과 신장을 적출하여 0.9% 생리식염수로 씻어내고, 무게 측정후 liquid nitrogen에 급동결시켜 -80°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. Hemoglobin 함량 및 hematocrit치 측정

Hemoglobin 측정은 Cyanmethemoglobin¹⁵⁾법으로 측정하였다. 즉, cyanide solution 5ml에 0.02ml의 혈액을 가하고 잘 혼합한 다음 spectrophotometer를 사용하여 540nm에서 비색정량 하였으며, hematocrit치는 혈액을 채취한 직후 heparin으로 처리된 모세관 튜브에 모세관 원리를 이용하여 2/3 정도 채운 다음 11,000rpm에서 5분간 원심분리 시킨 후

Table 2. Classification of experimental diet

Experimental Group	Se content ^{a)} (ppm)	Cd ^{b)} Injection X times
Control	—	0
ControlS	0.5	0
Cd1	—	1
Cd1S	0.5	1
Cd2	—	2
Cd2S	0.5	2
Cd3	—	3
Cd3S	0.5	3
Cd4	—	4
Cd4S	0.5	4

^{a)}Sodium selenite : Na_2SeO_3

^{b)}Cadmium dichloride : $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$

The rats of Control and ControlS groups were fed basal diet without and with 0.5ppm selenium, respectively. The rats of Cd1S, Cd2S, Cd3S, Cd4S and Cd1, Cd2, Cd3, Cd4 were fed basal diet with or without 0.5ppm selenium and were i.p. injected 1, 2, 3 and 4 times, respectively. The rats of Cd injection groups (Cd1~Cd4 and Cd1S~Cd4S) were given 2.5mg Cd^{++}/kg of body wt. by i.p.injection at an interval of 24hrs for 4 days. The rats were sacrificed for examination after 24hrs from the last injection of cadmium.

packed red cell volume의 백분율¹⁵⁾을 측정하였다.

4. 간조직중의 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 glutathione S-transferase 활성 측정

간조직중의 SOD 활성측정은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund등¹⁷⁾의 방법을 이용하였으며, GPX 활성측정은 산화형 glutathione(GSSG)이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원될 때 340nm에서 NADPH의 흡광도가 감소하는 것을 이용한 Lawrence 및 Burk¹⁸⁾의 방법에 따라 행하였다. 그리고 GST 활성측정은 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)과 환원형 glutathione을 기질로 하여 25°C 에서 20분간 반응하는 동안에 생성된 GSH-DNCB conjugate의 분자 흡광도 계수($E^{nm}/_{340nm} = 9.6\text{nm}^{-1}\text{Cm}^{-1}$)를 이용하여 효소활성을 산출하는 Habig등¹⁹⁾의 방법에 의하여 측정하였고, 이 효소 활성의 단위는 1분간 1mg의 단백질이 반응하여 생성한 conjugated DNCB의 nmol로 나타내었다.

5. 혈액 및 간조직중의 glutathione 농도

Glutathione의 농도 측정은 Bert와 Bergmeyer의 방법²⁰⁾에 따라서 실시하였다. 즉 혈액 및 간조직의 산추출물을 얻고 이 산추출액으로부터 산화형 glutathione(GSSG)은 glutathione reductase반응을 이용하였으며, 이 반응에서 소모된 NADPH량을 340nm에서 측정하여 정량하였으며, 환원형 glutathione(GSH)은 glyoxalase반응을 이용하여 생성된 s-lactosyl-GSH를 240nm에서 측정하여 정량하였다.

6. 간조직중의 vitamin E 함량 및 과산화지질 측정

간조직중의 vitamin E 측정은 간조직 마쇄액 1.0 ml를 Kayden등²¹⁾ 및 Tayler²²⁾의 방법에 따라 조직중의 vitamin E를 hexane으로 추출하여 30°C 에서 질소가스로 건조시킨 후 이것을 시료로하여 ferric-chloride dipyridyl법²³⁾에 의해 측정하였다. 과산화지질(Lipid peroxide value : LPO) 정량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하여 malondialdehyde량을 측정하는 Satoh 방법²⁴⁾을 이용하였다.

7. 조직중의 metallothionein 및 sulfhydryl group 측정

간조직 및 신장조직 일정량을 취해 일반법에 의하여 cytosol을 얻어서 Hidalgo등²⁵⁾의 방법에 준하여 MT를 측정하였다. 즉 일정량의 cytosol을 60~80% acetone침전 단백질분획을 얻어서 다시 acetone으로 씻어낸 후 증류수에 재구성시켜 atomic absorption spectrophotometer로 228.8nm에서 측정하였다.

간조직중의 sulfhydryl group 함량은 간조직 일정량을 취하여 0.1M sodium phosphate buffer(pH 8.0)로 homogenize 시켜 20% (w/v) 마쇄액을 만든 후 Elhan 방법²⁶⁾을 응용하여 측정하였다.

8. 간조직의 병리조직학적 연구

간을 절취한 즉시 1mm³ 크기로 잘라 4℃의 2.5% glutaraldehyde 용액에 2시간동안 전고정을 한후, 실온에서 후고정을 하였다. 고정된 조직은 ethanol 50%, 70%, 80%액에 각각 20분씩, 95% ethanol액에 30분, 그리고 무수 ethanol에 60분씩 처리하여 탈

수하였다. 이것을 propylene oxide에 10분간씩 3회 반복하여 침투시키고, Luft법²⁷⁾에 의해 cponc 812 로써 포매하여 gelatin capsul에 넣어서 35℃에서 12시간, 60℃에서 48시간 가온하여 경화시켰다. 경화된 조직은 ultramicrotome으로 400~600Å 되게 박절하여 Reynolds 방법²⁸⁾에 따라 lead citrate와 uranyl acetate로써 이중전자염색을 하여 JEM형(100-CX) 전자현미경으로써 관찰하였다.

9. 단백질 정량

간조직 및 혈액의 단백질량은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하여 Biuret²⁹⁾ 및 Lowry법³⁰⁾을 이용하여 정량하였다.

10. 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군의 평균간에 차이가 있는가를 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA검정)을 수행하였으며, 분산분석 결과 유의성이 발견된 경우 Tukey's HSD test에 의해 분석하였다.

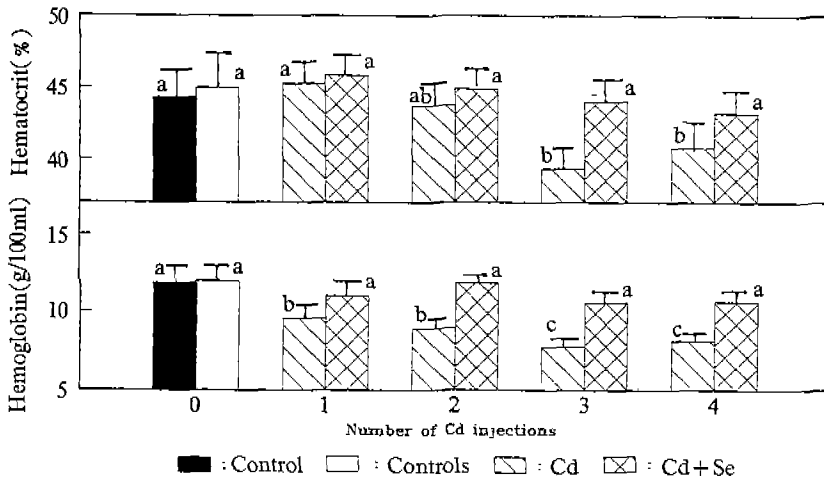


Fig. 1. Effect of dietary selenium and cadmium injection on values of hemoglobin and hematocrit in rat blood. All values are mean±SE(n=10).

Values with different superscript are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

Treatment : The rats of control and Cd groups(Cd1~Cd4) were fed basal diet without selenium. The rats of controlS and CdS groups(Cd1S~Cd4S) were fed basal diet with 0.5ppm selenium. The rats of Cd groups and CdS groups were given 2.5mg Cd⁺⁺/kg of body wt. by i.p. injection at an interval of 24hrs.

The rats were sacrificed for examination after 24hrs from the last injection of cadmium.

결과 및 고찰

1. Hemoglobin 함량 및 Hematocrit 치

Hb 함량은 Fig. 1에서와 같이 대조군에 비해 Cd의 투여 횟수에 따라 점진적으로 감소되는 경향이였으나 Se를 첨가한 실험군들에서는 대조군과 차이가 없었다. Hematocrit 치(Fig. 1)는 Cd를 3, 4회 투여한 Cd3, Cd4는 대조군에 비해 감소하였으나, 같은 조건에서 Se를 첨가했던 Cd3S, Cd4S group군은 대조군과 비슷한 수준이었다.

2. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 glutathione S-transferase 활성의 변동

간조직의 SOD 활성의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 대조군에 비해 SOD 활성이 Cd1에서는 증가되었으나 투여 횟수가 차츰 증가될수록 점진적으로 감소되었다. 그러나 Se 첨가군(Cd2S, Cd3S,

Cd4S군)은 비첨가군에 비해 유의적으로 증가되었다($p < 0.05$). 이와같이 대조군에 비해 Cd1, Cd1S 군에서 SOD가 증가하는 것을 볼때 Cd이 생체내에 oxygen free radical을 생성한다고 볼 수 있는데 이러한 결과는 이⁸⁾의 식이중에 첨가한 Pb의 실험에서도 같은 결과이었다. 그러나 Cd투여 횟수가 증가됨에 따라 SOD가 감소되는 것은 Cd투여횟수가 증가됨으로써 oxygen free radical에 의한 cell membrane의 지질과산화나 구조적 손상등 조직의 과산화적 손상으로 효소활성이 저해된 것으로 볼 수 있는데 Se를 첨가했을 때는 그 활성이 증가되는 결과는 이러한 이론을 뒷받침한다고 생각된다.

간장에서의 glutathione peroxidase 활성의 변동을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. Cd 투여군은 투여 횟수 1, 2, 3, 4회(Cd1, Cd2, Cd3, Cd4군)에 따라 대조군에 비해 각각 10, 40, 50, 60%씩 감소되었다. 그러나 같은 투여횟수군이라도 Se 첨가군인 Cd1S,

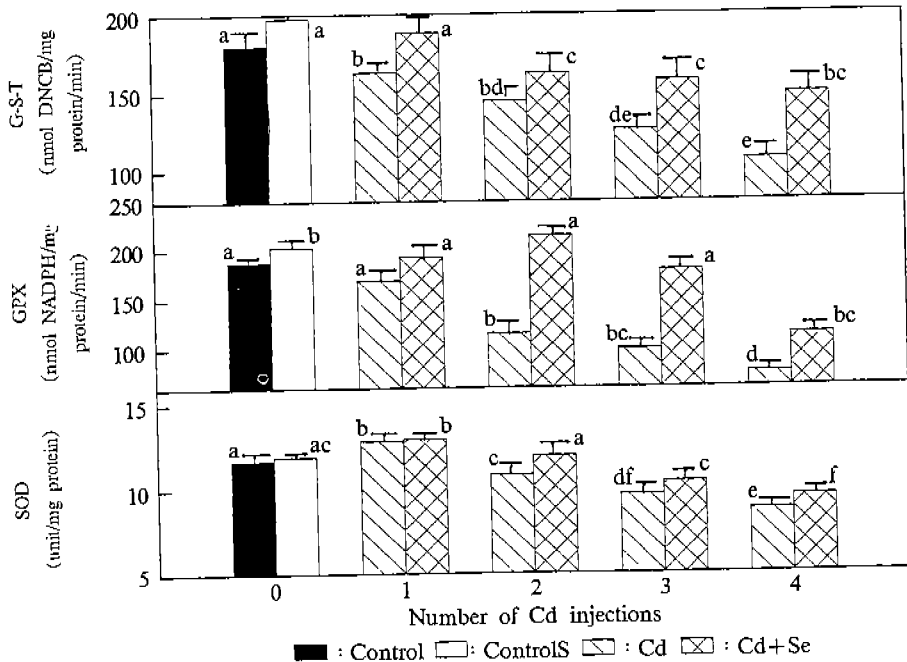


Fig. 2. Effect of dietary selenium and cadmium injection on superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities in rat liver. All values are mean \pm SE (n=10). Values with different superscript are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test. Experimental conditions are as given in Fig. 1.

Cd2S, Cd3S, Cd4S군은 비첨가군에 비해 각각 30, 86, 80, 100%씩 각각 증가되어 Cd1S, Cd2S 및 Cd3S군은 대조군과 유의적 차이가 없었다.

간장에서 GST 활성을 관찰한 결과는 Fig. 2에서와 같으며 GPX와 비슷한 경향을 나타내었으나 Se의 영향이 GPX보다는 경하였다. 이러한 GPX, GST활성이 Cd 투여로 감소되는 것은 SOD활성에서와 같이 Cd투여로 인한 조직의 과산화적 손상에 기인하며 Se첨가시는 Se이 이들의 구성물질 및 관련 물질로써 혹은 세포막을 과산화로부터 보호하는데 기여하기 때문으로 생각된다.

3. 혈액 및 간장조직중의 glutathione농도

혈액 및 간조직중의 환원형 glutathione(GSH)와 산화형 glutathione(GSSG) 농도는 Fig. 3 및 4와 같다. 혈액중 GSH는 Cd투여 횟수에 따라 대조군에 비해 점차 감소하여 투여 4회인 Cd4군은 대조군에 비해 153%나 감소하였다. 그러나 이때 Se를 첨가한 Cd1S, Cd2S, Cd3S, Cd4S군은 비첨가군에 비해 48,

64, 64 및 30%씩 각각 증가하였다. 산화형 GSSG 함량은 GSH 함량과는 반대로 Cd 투여에 의해 증가되는 경향이였다. 간조직중에서의 Cd 투여에 의한 GSH 함량의 감소나 GSSG의 증가 경향은 혈액에서와 비슷한 경향으로 Cd투여로 인한 과산화에 적응하기 위해 GSH가 많이 소모되고 GSSG 생성이 증가된것으로 본다. Cd에 의해 크게 감소된 간조직중의 GSH 값이 Se에 의해 현저하게 증가되어 Cd2S, Cd3S, Cd4S군이 대조군의 값과 같은 수준으로 되었으며 혈액에서보다 간장에서 Se의 영향이 더 큼을 알 수 있었다.

4. 간조직중의 Vitamin E 농도

간조직중의 vitamin E 함량(Fig. 5)은 Cd 투여 횟수가 증가됨에 따라 현저하게 감소되어 Cd4군에서는 대조군에 비해 약 1/2 수준으로 감소되어 GSH함량처럼 vitamin E가 과산화의 방지에 소모가 많았음을 알 수 있었으며 식이 Se의 영향은 없었다.

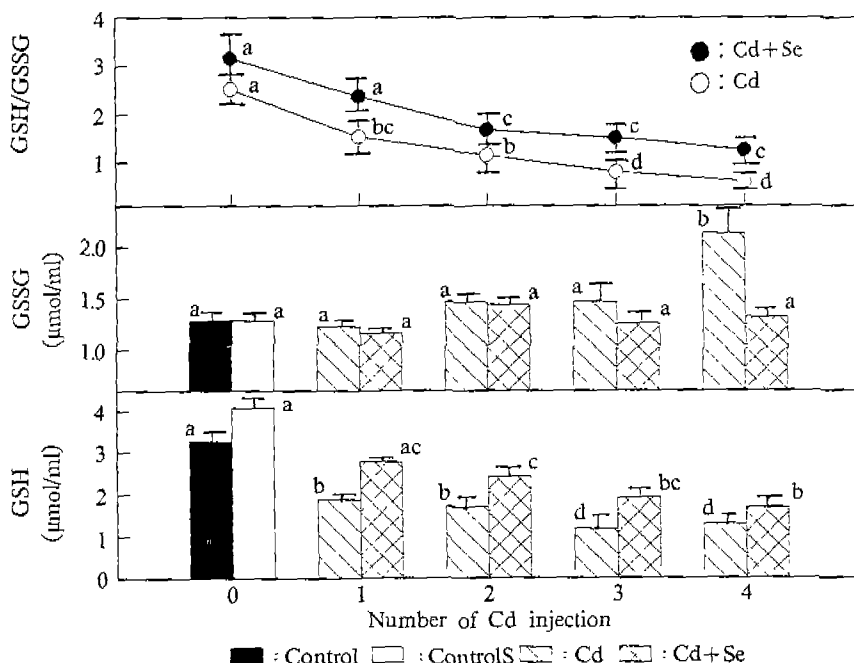


Fig. 3. Effect of dietary selenium and cadmium injection on glutathione content in rat blood. All values are mean \pm SE (n=10). Values with different superscript are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test. Experimental conditions are as given in Fig. 1.

5. 간조직중의 과산화지질량의 변동

조직중의 과산화적 손상의 기준이 되는 간조직중의 과산화지질량의 변동은 Fig. 5과 같이 투여 횟수에 따라 점진적으로 증가되어 Cd2, Cd3 및 Cd4 군이 대조군에 비해 각각 1.5, 1.8 및 2배씩 높았다. 그러나 Se를 투여했을 때는 그 값이 현저하게 감소되어 Cd3S, Cd4S군은 대조군보다 약 18%, 49% 정도 높았지만 Cd1S, Cd2S군은 대조군과 차이가 없었다. 이와같이 과산화지질량이 Cd투여 횟수의 증가에 따라 점진적으로 높아지는 것은 전술한 바와 같이 Cd투여로 항산화계 효소인 SOD, GPX 및 GST 효소활성이 저해됨으로써 지질과산화가 현저하게 높았으나 Se이 이러한 효소들의 활성을 증가시킴으로써 지질과산화를 크게 감소시켜 주었다.

6. 간조직중의 -SH group

간조직중의 -SH group 함량 변화는 Fig. 5와

같다. 대조군에 비해 Cd 투여 횟수에 따라 유의적으로 증가하였으며 Se의 영향은 없었다. 이러한 결과는 MT가 cysteine, cystine 및 methionine 등의 -SH 함유 amino acid를 많이 함유함을 뜻하고 Se의 영향이 없는 것은 MT 합성에 Se의 영향이 없었던 것(Fig. 5)과 일맥 상통한다고 볼 수 있다.

7. 간장 및 신장조직중의 Metallothionein 합성량

간장 및 신장조직중의 MT합성량을 측정 한 결과는 Fig. 6과 같다. 간장조직에서는 Cd1 군에서는 대조군에 비해 약 40배, Cd2, Cd3 및 Cd4 군에서는 각각 약 50배, 60배, 80배씩 MT가 합성되었다. 신장조직중의 MT 합성량을 보면 간장조직에서 보다 합성량은 적었지만 경향은 비슷하였다. 간장조직에 대한 신장조직에서의 MT 합성비율을 보면 Cd1, Cd2, Cd3, Cd4군에서 각각 0.18, 0.39, 0.55, 0.71로 간장조직에서보다 신장조직에서의 MT합성비율이 투여횟수의 증가에 따라 점진적으로 증가되었다.

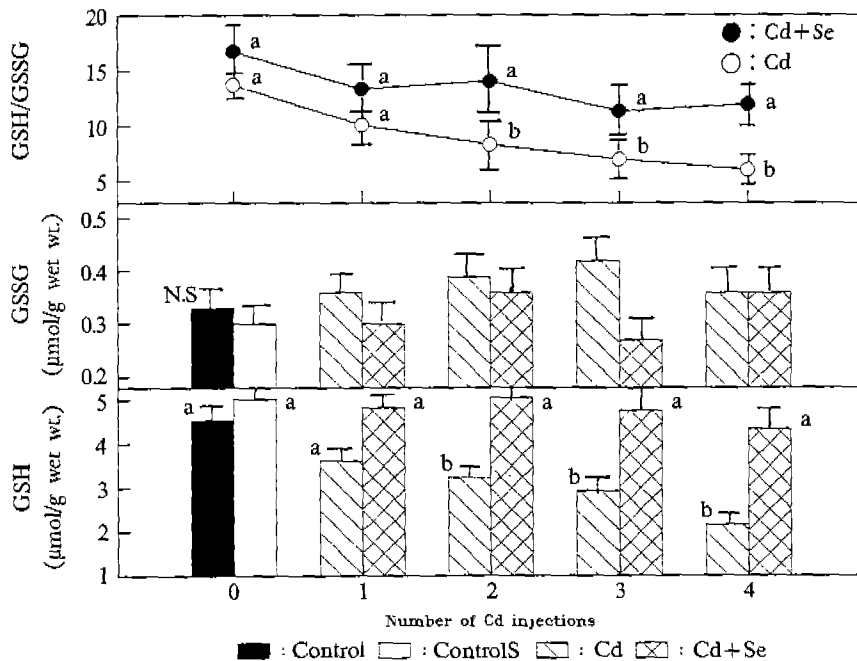


Fig. 4. Effect of dietary selenium and cadmium injection on glutathione content in rat liver. All values are mean \pm SE (n=10). Values with different superscript are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test. Experimental conditions are as given in Fig. 1.

그러나 Se의 투여에 의한 영향은 없었다.

8. 간장조직의 병리조직학적 관찰

간장조직의 병리조직학적 관찰에서 대조군은 mitochondria가 잘 발달되어 있고 RER이 풍부하였으나 lysosome은 드물었다(Fig. 7).

Cd를 4회 투여한 군(Cd4 group)에서는 lysosome이 현저히 증가되고 mitochondria가 팽창되었으며 확장된 Golgi apparatus가 발달되어 있었다(Fig. 8). 그러나 Se를 첨가시킨 Cd4S군(Fig. 9)에서는 그 경향이 경미하였다.

고찰

이상의 결과에서 흰쥐에 Cd를 투여했을때 hemoglobin, hematocrit치가 감소되고 항산화적 방어효소계인 SOD, GPX 및 GST 효소활성의 감소 및 생리적 항산화 물질인 GSH, vitamin E의 값이 현

저하게 감소되고 LPO값이 대조군에 비해 현저하게 높았다. 이러한 결과는 전보¹³⁾에서도 기술했듯이 Cd에 의해 oxygen free radical이 생성되고 생성된 oxygen free radical에 의해 조직의 과산화적 손상을 초래하여 세포가 구조적·기능적으로 손상되어 이러한 효소활성이 저해됨으로써 일어나며 이러한 생체내 필수적인 여러 효소활성의 저해로 인하여 Cd이 조직의 과산화적 손상을 비롯한 여러독성을 초래한다고 볼 수 있다.

Cd 투여에 의한 생체내에서의 oxygen free radical의 생성을 더욱 확실히하고 또 이러한 oxygen free radical에 의한 과산화적 손상으로 부터 보호하는 생체의 항산화적 방어계의 강화에 미치는 영향을 관찰코저 식이내에 Se를 첨가한 결과, 같은 횟수의 Cd를 투여한 군이라도 Se 첨가군들이 비첨가군보다 SOD, GPX 및 GST활성이 증가되었으며 특히 Se 의존성 효소인 GPX는 현저하게 증가되어 Cd4S만을 제외한 Cd1S, Cd2S, Cd3S군은 대조군과

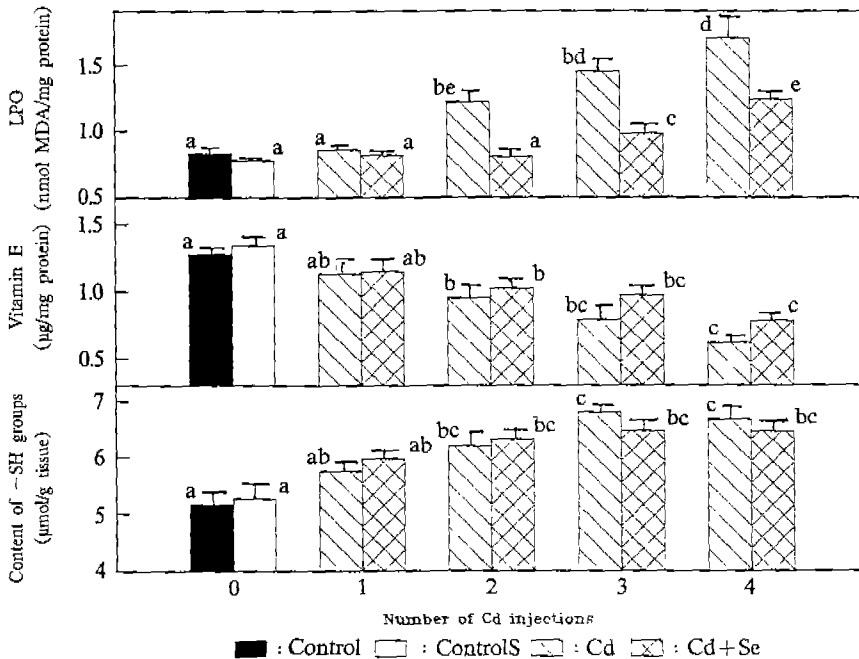


Fig. 5. Effect of dietary selenium and cadmium injection on vitamin E, LPO value and sulfhydryl group contents in rat liver. All values are mean±SE(n=10). Values with different superscript are significantly different at p<0.05 by Tukey's test. Experimental conditions are as given in Fig. 1.

Cd 중독에 대한 Se의 영향

차이가 없을 정도로 그 독성이 완화되었다. 뿐만 아니라 Cd2, Cd3, Cd4군에서 대조군보다 약 1.5, 1.8 및 2배나 높았던 LPO 값이 Se 첨가로 현저하게 감소되어 Cd3S군, Cd4S군은 대조군보다 각각 약 18%, 49%씩 높았지만 Cd1S, Cd2S군에서는 대조군과 차이가 없었다. 이와 같이 Cd투여에 의한 효소활성의 저하와 LPO값의 상승은 밀접한 상관 관계를 보여주고 있다. 그러므로 이러한 LPO값의 정상수준을 위해서는 이러한 항산화계 효소활성을 대조군의 수준으로 유지시킬 수 있는 연구가 필요하다고 생각된다. 현미경적 관찰에서도 Se 투여 군에서는 세포의 손상이 경함을 보여주었다.

이와같이 식이내 Se첨가로 Cd투여로 인해 감소된 항산화계 효소활성 및 생리적 항산화물질의 함량을 증가시키고 조직의 과산화물질을 감소시킬 수 있음은 Se이 GPX나 GSH의 구성물질로써 관여하거나 혹은 세포막의 지질과산화물 막는등의 세포의 미세구조를 보존³¹⁻³³⁾하는데 기여하기 때문으로 생

각된다.

또 이러한 결과로부터 제안할 수 있는 것은 체내에 흡수된 Cd이 생체내에서 oxygen free radical을 생성했음을 간접적으로 시사해준다고 할 수 있는데, oxygen free radical 생성시에 그 활성이 증가될수 있는 SOD값이 Cd를 1회 투여한 Cd1군에서 상승되었던 결과와 간조직중의 vitamin E와 GSH농도 감소가 Cd 투여횟수 증가에 따라 점진적으로 감소되는 결과는 이를 더욱 뒷받침 해 주고 있다.

또한 생체는 중금속이 침입시 그 독성을 해독하기 위한 반응으로써 metallothionein(MT)을 합성하여 무독화 시킨다. MT는 분자량이 작은 금속결합단백질로써 61개의 아미노산으로 구성되어 있고 분자내에 cystein이 풍부하며, 방향족 아미노산이나 소수성 잔기가 적은 저분자성 단백질³⁴⁾³⁵⁾이다. MT는 Cd와 같은 중금속에 의해 세포내 합성이 유도되는데 중금속이 체내에 흡수될 경우 주로 간장

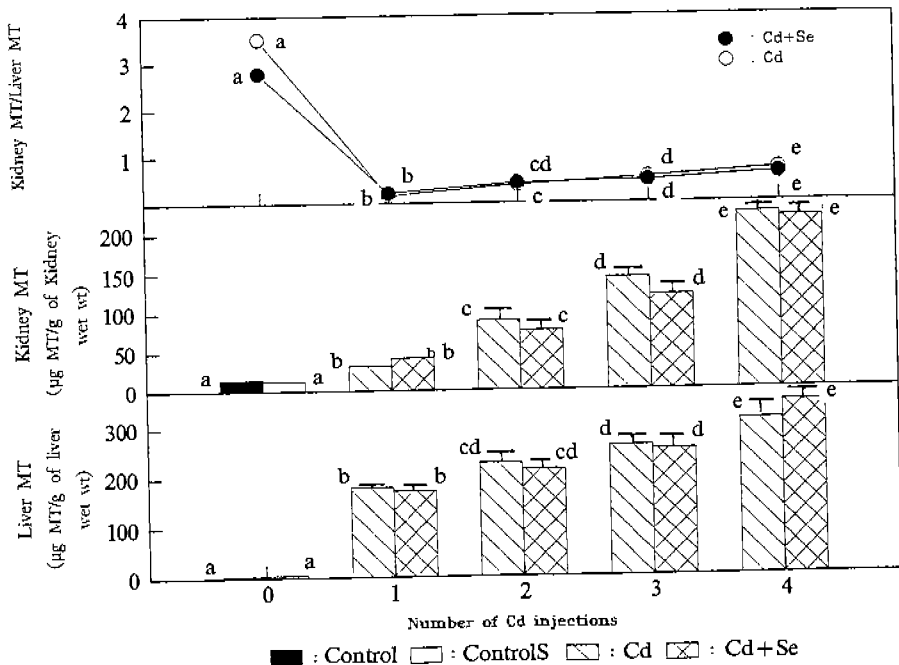


Fig. 6. Effect of dietary selenium and cadmium injection on metallothionein synthesis in liver and kidney of rats.

All values are mean±SE(n=10)

Values with different superscript are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

Experimental conditions are as given in Fig. 1.

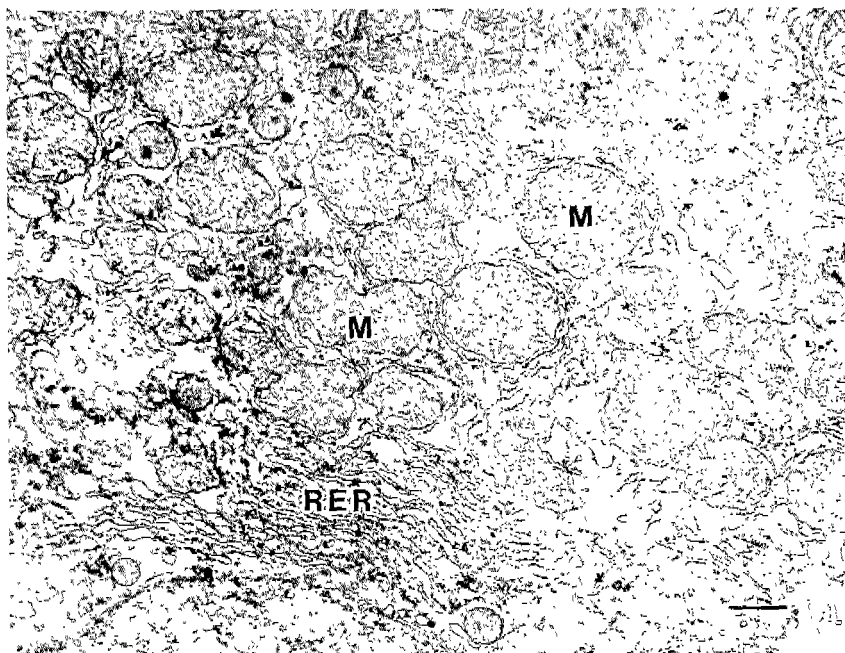


Fig. 7. Rat liver, control group, fed basal diet without injection of cadmium. The hepatocytes demonstrate numerous mitochondria(M) and abundant rough-surfaced endoplasmic reticulum(RER). Lysosome is lack. Uranyl acetate and lead citrate stain($\times 9,000$).

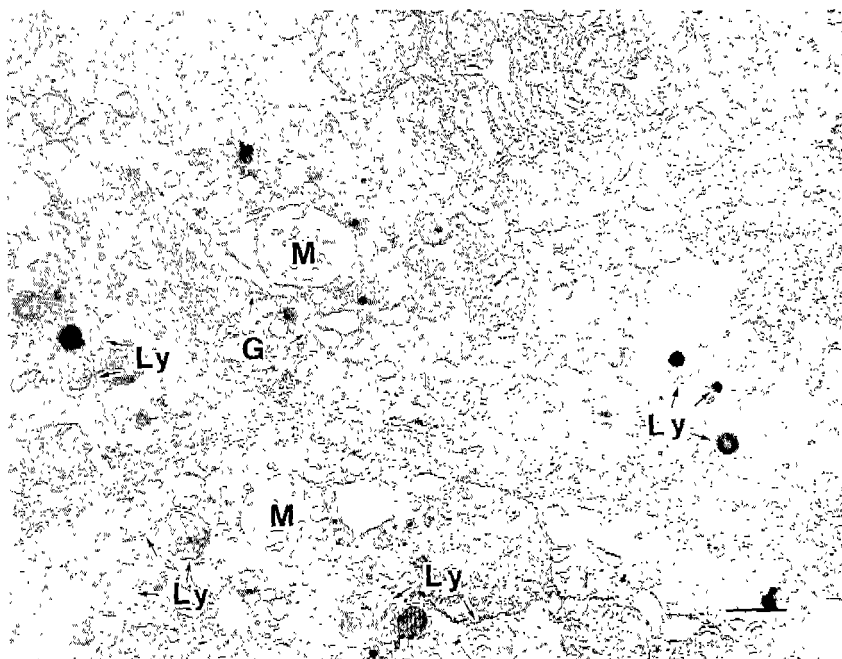


Fig. 8. Rat liver fed basal diet with intraperitoneal injection of cadmium (2.5mg/kg/day) for 4 days. Mitochondria (M) are markedly swollen. Lysosomes(Ly) are significantly increased in number. Golgi apparatus(G) is dilated. Uranyl acetate and lead citrate stain($\times 9,000$).

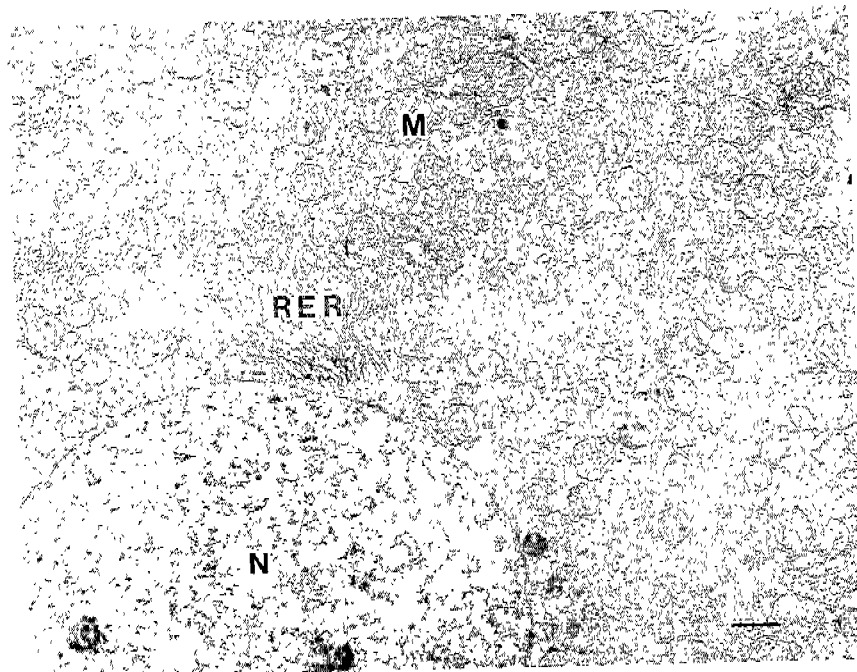


Fig. 9. Rat liver fed basal diet containing 0.5ppm of selenium with intraperitoneal injection of cadmium(2.5 mg/kg/day) for 4days. Mitochondria(M) and rough-surfaced endoplasmic reticulum(RER) including other cell organelles are well preserved. Uranyl acetate and lead citrate stain($\times 7,000$).

및 신장조직에서 MT의 합성이 크게 증가되므로써 중독성을 무독성의 물질로 만들어 그 독성을 완화시키며 간장조직에서 신장조직으로 중금속을 운반하여 뇨를 통해 중금속의 체외로의 배설등을 돕는다¹⁴⁾³¹⁻³⁶⁾.

본 실험에서도 Cd 투여횟수를 증가시킬수록 Cd-MT 합성이 크게 증가되므로써 위의 사실을 입증할 수 있고 이것은 Rhee 등³⁷⁾이 CHO Cd^r cell에 lead 투여농도를 증가시켰을때 MT mRNA 합성 및 MT protein이 증가된다는 보고에 의해서도 뒷받침된다. 또 Cd 투여가 계속 될수록 간장에 대한 신장에서의 MT 합성 비율이 높아지는 것으로 보아 유리 Cd 및 Cd-MT가 무독성 물질화하여 신장으로 배설하기 위해 신장으로 이행됨을 볼 수 있었다. 그러나 Cd 중독을 해독시킨다고 알려진 Se이 이러한 MT 합성에 영향을 미치는가를 관찰해 보았으나 본 실험조건에서는 간장 및 신장조직에서의 MT 생성에 미치는 뚜렷한 영향을 볼 수 없었다. 그러나 상술한 바와 같이 Se은 조직을 과산화로부터 보호하는 항

산화적 방어기구를 강화시킴으로써 Cd중독으로 인한 과산화적 손상을 현저하게 완화시킬 수 있음을 알 수 있었다.

요약 및 결론

본 연구는 생체내에 Cd 투여시 oxygen free radical 생성에 의한 과산화적 손상과 항산화적 해독기구에 미치는 식이 Se의 영향을 관찰코져 체중이 60 ± 5 g되는 Sprague-Dawley종 숫컷을 0.5ppm Se을 첨가한 식이군(CdS)과 비첨가식이군(Cd)으로 나누어 4주간 사육한 후 다시 Cd 투여횟수에 따라 각각 5군씩 나누어 Cd으로서 체중 kg당 2.5mg을 24시간 간격으로 0, 1, 2, 3, 4회씩 주사한 후 24시간후에 쥐를 희생시켰다.

1) 혈액중 hemoglobin, hematocrit 치가 Cd 투여 횟수가 증가됨에 따라 대조군에 비해 점진적으로 감소되었으나, Se 첨가에 의해 증가되었다.

2) 간조직중의 superoxide dismutase, glutathione

peroxidase 및 glutathione S-transferase 활성은 투여 횟수에 따라 점진적으로 감소되었으나 Se를 첨가했을 때는 비첨가군에 비해 현저하게 증가되었다.

3) 혈액 및 간장조직중의 환원형 glutathione 농도는 대조군에 비해 투여 횟수의 증가에 따라 현저하게 감소되었으나 Se 첨가로 증가되었다. 산화형 glutathione 농도는 환원형 glutathione과 반대의 현상이었다.

4) 간조직중의 vitamin E의 함량은 Cd투여 횟수의 증가에 따라 점진적으로 감소되었으며 Se 영향은 없었다.

5) 간조직의 과산화지질량은 Cd투여 횟수의 증가에 따라 점진적으로 증가되어 투여 2, 3, 4회때는 대조군의 1.5, 1.8, 2배로 증가되었다. 그러나 Se를 첨가하는 현저하게 감소되었다.

6) 간장 및 신장조직에서의 MT 함성은 Cd의 1, 2, 3 및 4회 투여에 따라 대조군에 비해 약 40, 50, 60, 80배씩 MT 함성이 증가되었으나 Se의 투여에 의한 영향은 없었다. 신장조직에도 간장조직에서 보다 함성량은 적었지만 비슷한 경향이었다.

7) 간장조직중의 -SH group은 Cd투여 횟수에 따라 유의적으로 증가하였으나, Se 첨가의 영향은 없었다.

8) 간세포의 현미경적 관찰에서 Cd 투여군에서는 lysosome이 현저히 증가되었으며 mitochondria가 팽창되고 확장된 Golgi apparatus가 발달되었다. 그러나 0.5ppm의 Se를 투여했을 때는 그러한 현상이 경하였다.

Literature cited

- 1) Page AL, Chang AC. Cadmium. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany pp33-75, 1986
- 2) Clausen J, Rastogi SC. Heavy meatal pollution among autoworkers : lead. *Bri J Ind Med* 34 : 208-215, 1977
- 3) Yoshikawa H, Ohsawa M. Protective effect of phenobarbital on cadmium toxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 34 : 517-520, 1975
- 4) Kazantizis G. Renal tubular disfunction and abnormalities of calcium metabolism in cadmium workers.

Environ Health Perspect 28 : 155-159, 1979

- 5) Schroeder HA, Vinton WH. Hypertension induced in rats by small doses of cadmium. *Am J Physiol* 202 : 515-518, 1962
- 6) Tsuchiya K. Lethal dose and modification of the toxicity, In *Toxicology of Cadmium*. pp36-37, 1984
- 7) Thomas AG, John CS. Interactions of cadmium and selenium in rat plasma in vivo and vitro. *Biochim et Biophys Acta* 428 : 113-122, 1976
- 8) 이순재. 식이 selenium이 납중독된 흰쥐 간장의 항산화적 해독기구에 미치는 영향. *한국노화학회지* 1(2) : 125-130, 1991
- 9) 이혜영 · 김미경. 식이내 Cadmium과 단백질 수준이 흰쥐의 체내 단백질대사 및 Cadmium 중독에 미치는 영향. *한국영양학회지* 21(6) : 410-420, 1988
- 10) 방진숙 · 이순재. 식이 selenium이 납중독된 흰쥐에 있어서 δ-aminolevulinic acid dehydratase 활성에 미치는 영향. *한국영양학회지* 24(6) : 526-533, 1991
- 11) Mahaffey KR. Nutritional factors in lead poisoning. *Nutr Rev* 39 : 353-362, 1981
- 12) Revis NW, Osborne TR. Dietary protein effects on cadmium and metallothionein accumulation in the liver and kidney of rats. *Environ Health Perspect* 54 : 83, 1984
- 13) 이순재 · 김성욱 · 최원경 · 조성희. 카드뮴투여가 흰쥐 간조직의 과산화적 손상에 미치는 영향. *한국영양학회지* 21(6) : 601-607, 1992
- 14) 전수영 · 이순재. 카드뮴으로 중독된 흰쥐의 간장 및 신장에서의 metallothionein 함성에 관한 연구. *한국영양학회지* 26(2) : 237-247, 1993
- 15) 백태홍 · 김천호 · 전세열. 영양학 실험. 수학사 pp 35-36, 1984
- 16) Davidshon I, Nelson DA. Clinical diagnosis by laboratory methods. Saunders Co Philadelphia. pp125-130, 1969
- 17) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47 : 469-474, 1974
- 18) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71 : 952-958, 1976

- 19) Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. Glutathione S-transferase : the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249 : 7130-7139, 1974
- 20) Bernt E, Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis : Glutathione. 2nd English Ed. *Academic Press* 4 : 1641-1650, 1974
- 21) Kayden HJ, Chow CK and Bjornson LK. Spectrophotometric method for determination of α -tocopherol in red cell. *J Lipid Res* 14 : 553-540, 1973
- 22) Tayler SL. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipid* 11 : 530-538, 1976
- 23) Hawk PB, Oser BL and Summerson WH. Ferric chloride dipyriddy method(Emmenrie-Engel reaction). *Practical Phsio Chem* 13th ed. J LA Churchill LTD, pp1272-1273, 1956
- 24) Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chemica Acta* 90 : 37-43, 1978
- 25) Hidalgo J, Armario A, Flos R and Garvey JS. Restraint stress-induced changes in rat liver and serum metallothionein and in zinc metabolism. *Experientia Basel* 42 : 1006-1010, 1986
- 26) Elahan GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 82 : 70-77, 1959
- 27) Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 9 : 409-414, 1961
- 28) Reynolds ES. The use of lead citrate at high PH as an electron-oprague stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17 : 208-212, 1963
- 29) Gornall AG, Bardawill CJ and David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177 : 751-766, 1949
- 30) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 : 265-275, 1951
- 31) Cerkilewasaki FN, Forbes RM. Influence of dutary seleniumm on lead toxicity in the rat. *J Nutr* 106 : 778-783, 1976
- 32) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *J Biochem Biophys Res Commun* 71 : 952-958, 1976
- 33) Burk RF, Frank WH and Person WN. Tissue Se levels during the development of dietary liver necrosis in rats fed Torula yeast diet. *J Nutr* 95 : 420-428, 1968
- 34) Hidalgo J, Rhee SJ, Huang PC and Garvey JS. Differential effect of adrenalectomy on rat liver metallothionein mRNA levels in basal and stress condition. *Horm Metab Res* 24 : 233-236, 1992
- 35) Cherian MG, Robert AG. Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Science* 23 : 1-10, 1978
- 36) Foulkes EC ed. Biological roles of metallothionein. Elsevier North Holland New York, 1982
- 37) Rhee SJ, Huang PC. Metallothionein accumulation in CHO Cd^r cells in response to lead treatment. *Chem Biol Interactions* 72 : 347-361, 1989