

## 흰쥐 측뇌실의 Metallothionein 유사단백질과 Stress Protein의 유도

원석준 · 손성향<sup>1</sup>

연세대학교 이과대학 생물학과, <sup>1</sup>아주대학교 의과대학 피부과학교실

흰쥐 뇌에서 카드뮴에 대한 metallothionein-like protein(MTLP)의 유도 생성 능력을 알아보기 위하여 stereotaxic apparatus를 이용하여 측뇌실에 카드뮴을 주사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 대조군과 생리식염수 처리군에서는 MTLP의 양적 변화가 없었고, 카드뮴 처리군은 대조군과 식염수 처리군에 비하여 MTLP가 2배 이상 유도되었다. MTLP의 분자량은 6,000-6,500 Da 정도였으며, 흡광도가 254 nm에서 높게 나타나고, 280 nm에서 낮게 나타나는 것으로 보아 thiol 함량이 높고 방향족 아미노산이 적은 단백질을 알 수 있었다. 또한 카드뮴 처리군에서는 MTLP 이외의 여러 종류의 protein-30, 64, 68, 80, 108 kDa-들이 유도되었다. 이와같은 결과로 카드뮴은 흰쥐 뇌에서도 MTLP의 유도 능력이 있음을 알 수 있었다.

**KEY WORDS: Cadmium, Brain, Metallothionein-like Protein, Stress Protein**

카드뮴(Cd)은 II B족의 중금속으로서 환경오염에 심각한 영향을 미치며, 생명체에 노출될 경우 세포내에 축적되는 독성물질이다(Berlin and Ullberg, 1963; Korte, 1982). 카드뮴의 주요 상해부위는 간, 신장 및 정소이며(Andersen and Andersen, 1988; Fowler, 1988; Suzuki and Cherian, 1989; Trakshel *et al.*, 1986), 간과 신장에서는 Margoshes와 Vallee(1957)에 의하여 처음으로 분리된 Metallothionein(MT)이라 하는 cystein이 풍부하고 분자량이 6,000-7,000 d 정도의 작은 금속결합단백질을 유도하여 이와 결합하게 된다(Dunn *et al.*, 1987; Hamer, 1986; Ohi *et al.*, 1981; Webb and Cain, 1982). MT와 관계되는 대사는 아직 밝혀져 있지 않으나 독성중금속, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 방사선으로 유도된 oxidative stress에 의해서 생성된 free radical에 의한 세포의 지질과산화물을 막아주며(Hidalgo *et al.*, 1988; Thornalley and Vařák, 1985; Webb, 1972), stress, 기아 및 Glucocorticoid Dexamethasone과 그외의

steroid계 호르몬에 의해서도 유도되고(Bremner and Davies, 1975; Hager and Palmiter, 1981; Hidalgo *et al.*, 1988; Hidalgo *et al.*, 1990; Mayo and Palmiter, 1982; Oh *et al.*, 1978), 아연(Zn)과 구리(Cu)와 같은 필수요소의 항상성 유지와 생체내 cystein의 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Blalock *et al.*, 1988; Brady, 1983; Etzel and Cousins, 1981; Fuller *et al.*, 1990; Hidalgo *et al.*, 1991; Leber and Miya, 1976; Sato *et al.*, 1984). 결합단백질인 MT 이외에도 아연, 납 및 카드뮴같은 중금속과 비금속 원소인 비소 및 열 충격과 같은 stress들에 의하여 다양한 분자량의 stress protein들이 유도되며(Locke *et al.*, 1990; Taketani *et al.*, 1990). 정확한 기능은 알려져 있지 않으나 Heat Shock protein은 stress에 대한 회복기능을 하는것으로 보고되어 있다(Schlesinger, 1986).

또한 카드뮴은 신경조직에서도 독성작용을 나타내는데 만성으로 나타날때에 말초신경조직인

좌골신경과 배근(dorsal roots)에서 란비에르결절로부터의 체절적인 탈수초현상과 슈반세포의 활성적인 자가식균작용과 glycogen 과립의 축적이 나타난다는 보고가 있다(Webster and Valois, 1981). 수태한 흰쥐에 카드뮴을 주사한 경우에 삼차신경의 감각신경절, 갓세르반월신경절 및 감각척수신경절에서 출혈성 홍조, 신경섬유와 세포가 파괴되며 혈뇌장벽 발생전인 배발생시기의 태아를 카드뮴에 노출시킬 경우 중추신경계에서 수두증과 함께 뇌전반에서 뇌피사와 점성출혈과 부종세포의 핵응축과 뇌랑, 미상핵, 피각 및 소뇌에서 병변이 나타나는 것으로 보고된 바 있다(Gabbiani *et al.*, 1967; Sato *et al.*, 1978; Swandulla and Armstrong, 1989; White *et al.*, 1990; Wong and Klaassen, 1982). 또한 axoplasmic transport의 방해와 고혈압증상을 나타내기도 한다(Gan *et al.*, 1985).

신경조직에서도 중금속과 여러 stress에 의하여 Metallothionein-like protein(MTLP)과 몇개의 stress protein이 발견되었다(Andersen *et al.*, 1989; Gulati *et al.*, 1987; Hidalgo *et al.*, 1990; Itoh *et al.*, 1983). 그리고 신경조직을 배양했을 때 카드뮴 독성에 대하여 MT가 방어작용을 하는것으로 알려져있다(Sugawara *et al.*, 1983).

그러나 성숙한 흰쥐의 혈관에  $^{109}\text{Cd}$ 을 주사했을 때 카드뮴은 대부분이 간과 신장에서 축적되며 좌골신경과 배신경절에 다소 분포하나 중추신경계의 유조직에서는 검출되지 않았고 혈뇌장벽의 외부구조인 뇌하수체, 뇌수막, 맥락총 및 송과선에만 소량 검출되었다(Arvidson and Tjelve, 1986). 또한 아연, 구리 및 카드뮴을 주사하면 아연과 구리에 대한 MTLP는 생성되나 카드뮴에 의해서는 유도되지 않았다(Ebadi and Swanson, 1987).

본 실험은 흰쥐를 재료로 하여 카드뮴이 혈뇌장벽을 통과하지 못하기 때문에 MTLP를 생성하지 못하는 것인지 또는 중추신경조직에서는 카드뮴의 MTLP 유도능력이 없는 것인지를 알아보기 위해서 혈뇌장벽내로 직접 카드뮴을 주사하

여 MTLP의 생성과 카드뮴에 대한 중추신경계의 stress protein의 양상을 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험동물로는 표준사료로 사육한 생후 10주된 체중 180-220g인 흰쥐 수컷(Sprague Dawley 계)을 사용하였으며, 카드뮴은 cadmium chloride( $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ , Hanawa사)를 사용하였다.

### 카드뮴처리

이 실험에서는 3가지 군으로 나누었다. 대조군, 다른 2군을 희생시킬 때까지 아무런 처리없이 사육상자에 각각 보관하였다. Saline treatment, 생리식염수(0.85% NaCl)를 stereotaxic apparatus를 사용하여 측뇌실 부위인 흰쥐 두개골의 bregma에서 좌나 우로 수평으로 1.4 mm 이동한 위치에 tube를 심은 후 3일 동안 5  $\mu\text{l}$ 씩 주사한 후 48시간 경과한 다음 희생시켜 사용하였다. Cadmium treatment, 생리적 식염수에 용해시킨 카드뮴 1000 ppm을 식염수처리군과 같은 방법으로 주사한 후 48시간 후에 희생시켰다. 주사한 후 3군은 하나하나의 사육상자에 1마리씩 보관하였다.

### 뇌세포 cytosol 분리

흰쥐를 희생시킨 후 뇌를 빠른 시간안에 적출한 다음 135 mM NaCl과 5 mM 2-mercaptoethanol을 포함하는 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 사용하여 Potter-Elvehjem 균질기로 25%(W/V) 균질액을 만들었다. 이 균질액을 20,300  $\times g$ 에서 30분간 원심분리하여(Hitachi, 20PR-5) 상등액을 모은 후 80°C에서 3분간 증탕하고 다시 같은 방법으로 원심분리하여 상등액을 취하여 Lowry 방법(1951)으로 단백질을 정량하여 10 mg/ml로 조정하여 cytosol 분획으로 사용하였다. 이상의 모든 과정은 4°C에서 수행하였다.

### 카드뮴정량

시료에 Perchloric acid:c-HNO<sub>3</sub>를 1:5로 섞은 용액을 12 ml 첨가하여 300°C로 가열하여 유기물질을 분해하면서 산을 증발시킨 후 냉각하여 10 mM HNO<sub>3</sub> 10 ml로 희석하였다. Atomic absorption spectrophotometer (AAS)로 air-acetylene gas를 이용하여 228.8nm에서 시료의 흡광도를 측정하였으며 표준 카드뮴화합물로는 CdCl<sub>2</sub>·2<sup>1</sup>/<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O(Hanawa)를 사용하였다.

### 단백질 합성양상

실험군과 대조군의 cytosol을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 Laemmli (1970)의 방법으로 단백질 합성양상을 조사하였다. 전기영동 후 0.25% coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색한 후, 7.5% 빙초산과 5% methanol이 섞인 용액으로 탈색하고, 결과를 gel scanner (ISCO, UA-5)로 분석하였다.

### MTLP의 확인

Sephadex G-75 gel filtration chromatography 뇌에서 분리한 cytosol 분획을 Sephadex G-75 column(1.8 × 110cm)에 cadmium saturation method(Nolan and Shikh, 1986)를 약간 변형한 방법으로 CdCl<sub>2</sub>·2<sup>1</sup>/<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 500 µg/ml, 100 µl를 시료 6 ml에 넣은 후 incubation한 다음 loading하여 36

ml/h/cm<sup>2</sup>의 속도로 용출하여 fraction collector로 분획을 4.7 ml 씩 받아서 spectrophotometer(Hitachi, U-2000)으로 254 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각 분획의 유기물질을 제거시킨 후 카드뮴을 정량하였다. 또한 카드뮴을 포함하는 MTLP 분획을 모아 냉동건조법으로 농축하였다.

DEAE-Sephadex A-25 ion exchange chromatography

Sephadex G-75 gel filtration chromatography를 통하여 얻은 MTLP 분획을 DEAE-Sephadex A-25 column(1.8 × 20 cm)에 loading하여 0.0-0.6 M까지의 NaCl을 넣고 표준완충용액으로 직선농도구배를 걸어주면서 30 ml/h/cm<sup>2</sup>의 속도로 용출시켜 각 분획을 시험관에 4.7 ml 씩 받아서 각 분획의 카드뮴량을 측정하였다.

## 결과

식염수와 카드뮴 처리에 의한 체중과 뇌중량의 변화

체중을 4일 동안 측정한 결과 식염수 처리군은 거의 변화가 없었으나 카드뮴 처리군의 체중은 다른 2군에 비하여 크게 감소하였고, 뇌의 중량은 카드뮴 처리군에서 약간 증가하였다(Table 1).

**Table 1.** Effect of saline and cadmium injection on body weight gain and brain weight

	Body Wt. Gain g/day	Brain Wt. g	Number
Basal	5.500 ± 0.750	1.813 ± 0.033	15
Saline treatment	3.438 ± 1.310	1.906 ± 0.052	13
Cadmium treatment	-7.650 ± 1.086★●	1.924 ± 0.031☆	27

Rats were given intracerebroventriculally saline and cadmium each day for 3 days, 5 l/1000 ppm on day 1 and then rested 1 day. The rats remained in each cage until being sacrificed. Basal rats remained in the cage until being sacrificed at the same times as saline and cadmium injected rats. ☆ : P < 0.05 compared with Basal ★ : P < 0.001 compared with basal ● : P < 0.001 compared with saline treatment

MTLP의 유도

Sephadex G-75 gel filtration chromatography  
 식염수 처리군과 대조군간의 변형된 cadmium saturation 방법에 의한 카드뮴 결합 분획은 49-59번 사이에서 거의 같은 수준의 양이 검출되었다. 카드뮴 처리군에 있어서는 같은 분획범위내에서 대조군과 식염수처리군에 비해서 2배 정도가 검출되었다. 그리고 21-23번의 큰 분자량 분획의 범위에서는 대조군, 식염수처리군 및 카드뮴처리군간에 카드뮴량의 변화가 거의 없었다(Fig. 1a-c).

DEAE-Sephadex A-25 ion exchange chromatography

Sephadex G-75 column에서 얻은 MTLP 분획을 모아서 0.0-0.6 M NaCl 농도구배로 이

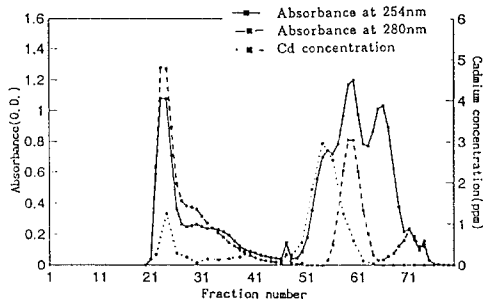


Fig. 1a. Elution profile from sephadex G-75 in brain cytosol of basal rats (n=6)

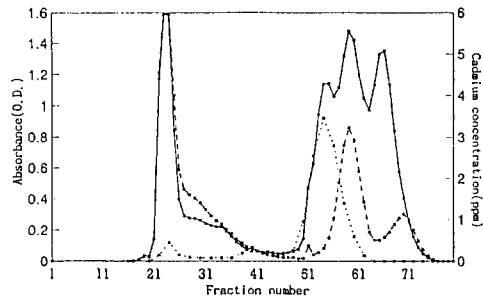


Fig. 1b. Elution profile from sephadex G-75 in brain cytosol of saline treatment rats (n=6)

은교환하여 용출시킨 결과 MTLP는 음이온물질이었으며 isoform은 없었다(Fig. 2).

MTLP 분자량

Sephadex G-75 gel filtration chromatography를 수행하여, 표준단백질과 비교하여 분자량을 측정 한 결과 6,000-6,500 Da 정도 이었다(Fig. 3).

Stress protein의 합성

뇌세포 cytosol protein을 SDS-PAGE (12.5%, 10% gel)로 분리한 결과, 식염수 처리군에서는 14.3 kDa 이하 단백질과 90 kDa stress protein이 증가하였고, 카드뮴으로 처리했을 때에는 14.3 kDa 이하의 단백질과 30, 64, 68, 80 및 108 kDa의 stress protein이 증가하였으며, 식염수처리군에서는 90 kDa의 단백질이 대조군과 같은 수준에서 증가되었다

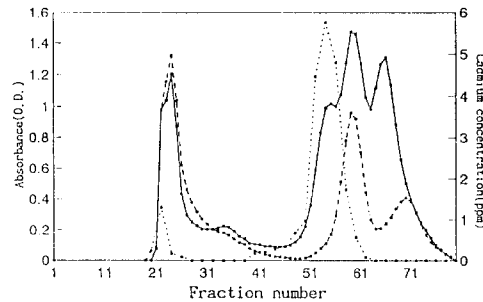


Fig. 1c. Elution profile from sephadex G-75 in brain cytosol of cadmium treated rats (n=15)

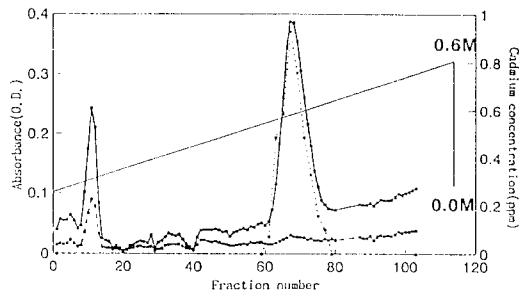
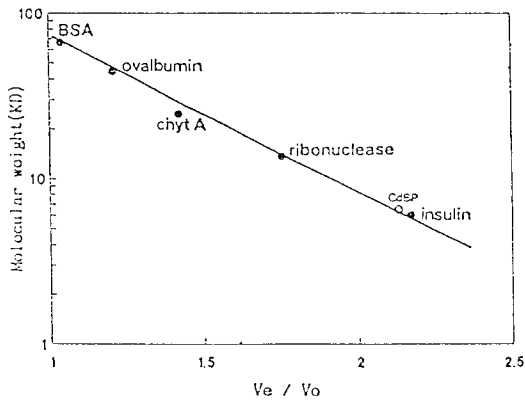


Fig. 2. Elution profile from DEAE sephadex A-25(n=5)

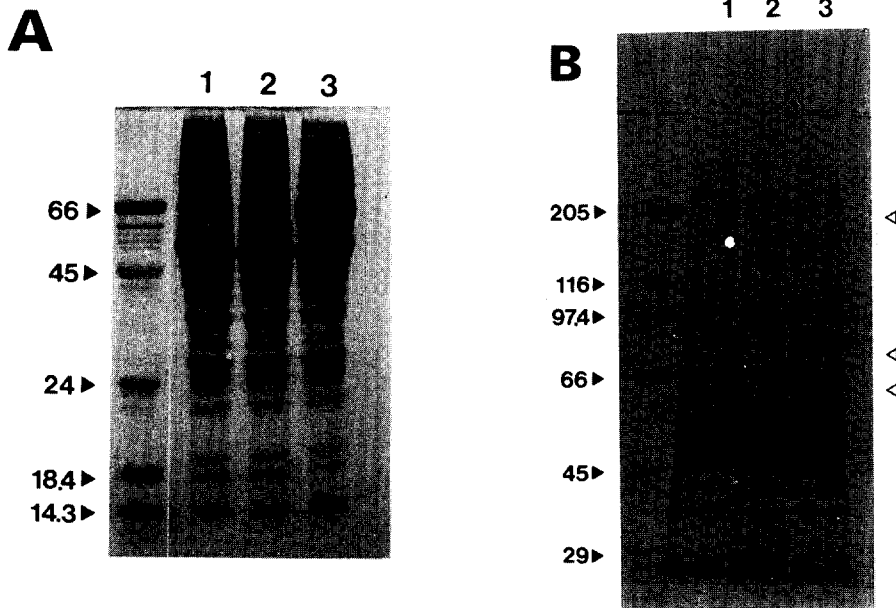


**Fig. 3.** Determination of molecular weight of cadmium binding protein (CdBP). Molecular weight was determined from plots of the ratio of elution volume ( $V_e$ ) to void volume ( $V_o$ ) of sephadex G-75 column ( $1.8 \times 110$ ) vs. log molecular weight for reference proteins of known molecular weight.

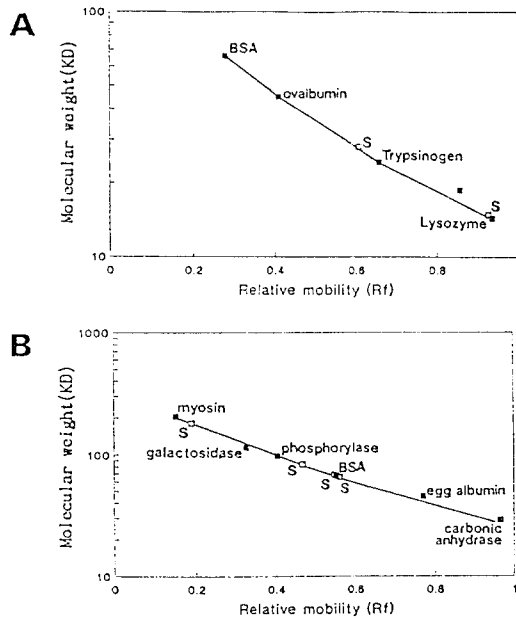
(Fig. 4-6).

**고찰**

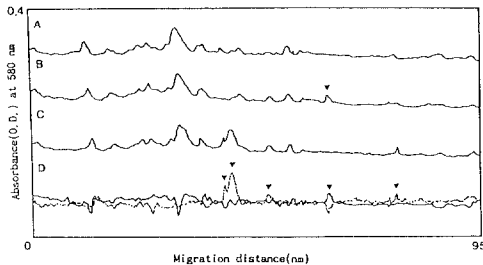
카드뮴은 불지용성 (lipid insoluble)인 독성 중금속으로서 체내로 들어오면 간과 신장에서 Metallothionein을 유도해 내어 이와 결합하므로써 MT는 방어작용을 하게 되는데, 이에 대해서는 1957년 이후로 많이 연구되어 왔다 (Webb and Cain, 1982). 그리고 카드뮴에 의해서 여러 동물에서 뿐만 아니라 식물에서도 MT와 이와 비슷한 MTLP가 발견되었으며 (Grill *et al.*, 1987; Sparla, 1990). 이 단백질의 합성은 조직에 대하여 특이성을 가지고 있는 것으로 보고되었다 (Blalock *et al.*, 1988; Hamer,



**Fig. 4.** SDS-PAGE of brain cytosols of saline and cadmium treated rats. A: 12.5% gel, B: 10% gel, 1: basal, 2: saline treated, 3: cadmium treated rats, ▷: stress protein, ▶: marker protein (250 kDa: myosin, 116:  $\beta$ -galactosidase, 97.4: phosphorylase B, 66: bovine serum albumin, 45: ovalbumin, 29: carbonic anhydrase, 24: trypsinogen, 18.4:  $\beta$ -lactoglobulin, 14.3: lysozyme)



**Fig. 5.** Determination of molecular weight of stress protein in brain cytosols of cadmium treated rats on SDS-PAGE. A: 12.5% gel, B: 10% gel, S: stress protein



**Fig. 6.** Scanning of SDS-PAGE (10% gel) shown in Fig. 4B. A: basal, B: saline, C: cadmium treatment rats, D: ..... C-B, \_\_\_\_\_ B-A, ▼: stress protein

1986).

그러나 뇌에서는 MTLP에 대한 연구가 거의 없었으며, Ebadi와 Swanson(1987)에 의하여 실험한 결과 아연과 구리에 의해서는 뇌에서 MTLP가 유도되었으나 카드뮴에 의해서는 유도되지 않는 것으로 보고되었다. 또한 아연을 피하주사한 경우에는 뇌에서 MTLP가 합성되지

않았으나, 뇌실내로 주사한 경우 MTLP가 합성되며 Actinomycin D에 의하여 합성이 억제된다고 보고하였다(Ebadi, 1984). 그러므로 이 MTLP는 금속에 의해 신경조직자체에서 합성되는 단백질임을 알 수 있었다.

따라서 본 실험에서는 카드뮴이 혈뇌장벽을 통과하지 못하므로 MTLP를 형성하지 못하는 것인지 또는 카드뮴이 중추신경조직에 대한 MTLP유도에 감수성이 없는 것인지를 알아보기 위하여 stereotaxic apparatus를 사용하여 흰쥐 측뇌실에 직접 카드뮴을 주입시켜서 중추신경조직으로 흡수될 수 있도록 하였다. 또한 측뇌실에 주사하는 것 자체의 stress에 대한 변화를 알아보기 위하여 대조군으로 기구를 사용하여 식염수를 처리한 군과 아무것도 처리하지 않은 군으로 나누었다.

예비실험한 결과 흰쥐 측뇌실에 카드뮴 5,000 ppm 용액을 5  $\mu$ l 주사한 결과 모두 치사하였으므로 신경조직이 카드뮴에 대하여 매우 감수성이 높다는 것을 알 수 있었다. 또한 간에서의 MT가 유도되었을 때에 카드뮴을 한번 주사하는 것보다 적은양을 반복 주사하는 것이 더 많은 양의 MT를 유발시킨다는 보고에 의하여 1,000 ppm을 5  $\mu$ l씩 3번 주사하였다(Andersen and Daae, 1988).

체중에 대하여 측정한 결과 대조군과 식염수처리군간에는 거의 변화가 없었으나 카드뮴처리군에서는 다른 2군에 비하여 상당량이 감소하였다(Table 1). 이는 카드뮴 주사의 1차적 원인에 의한 감소 보다는 카드뮴을 처리했을 때에 나타나는 경련으로 인한 2차적 원인에 의하여 체중이 감소된 것으로 사료된다. 또한 카드뮴을 처리했을 때에 뇌의 중량은 세가지군 사이에 큰 변화가 없었으나 카드뮴을 처리하였을 때 약간 증가하였는데 이는 Gill(1989)의 보고와 유사하였다.

세포소기관에서 MT를 분리해내는 방법중의 하나인 Sephadex G-75 gel filtration chromatography를 이용하여 뇌에서 MT를 분리해 내었다. 간에서 이와같은 방법을 이용하였을 때에 분자량 약 14,000 Da의 분획과 약 7,000 Da의 분획에서 얻어지는데 이는 MT 유

도실험 과정에서 산화작용에 의하여 단백질들이 polymer를 형성하여 원래 분자량보다 큰 분자량이 나오는 분획에서 얻어지기 때문이다 (Minkel *et al.*, 1980). 이런 MTLP의 분산된 용출을 최소화하기 위하여 Gulati(1987)의 자료를 토대로 완충액에 5 mM 2-mercaptoethanol을 넣어서 MTLP를 monomer 형태로 얻어 내었다. 뇌에서 Sephadex G-75 column으로 용출된 각 분획에서의 카드뮴함량을 측정한 결과 세가지군 모두 분자량이 큰 것과 작은 두 구획에서 카드뮴이 검출되었다(Fig. 1a-c). 분자량이 큰 구획에서 검출된 카드뮴의 양이 세 군에서 거의 일정하고 254 nm에서 높은 값을 갖는 것으로 보아 기존에 존재하는 소량의 카드뮴과 결합할 수 있는 단백질로 사료된다. MTLP라고 생각되어지는 분자량이 작은 단백질에서 다량의 카드뮴 검출은 Metallothionein이 기존의 세포질내에 존재하는 단백질이라는 것과 관련있음을 보여준다. 대조군과 식염수처리군 간에는 양적변화가 거의 없었으므로 stereotaxics 자체에 의한 stress는 MTLP 유도에 거의 자극을 주지 않는 것으로 사료된다. 카드뮴처리군에서는 다른 두군에 비하여 2배 이상의 카드뮴량이 검출된 것으로 보아 2배 이상의 cadmium binding protein이 형성된 것을 알 수 있었다. 이 MTLP 분획을 모아 anion exchange chromatography를 한 결과 음이온성임을 알 수 있었고(Fig. 2), 흡광도를 측정했을 때에 254 nm 에서 높은 값이 나타나나 280 nm 에서는 낮게 나타난 것으로 보아 많은 양의 thiol기를 가지고 있으며, 방향족 계열의 아미노산이 적은 단백질을 알 수 있었다. 이는 이전에 간에서 분리된 MT와 같은 특성을 가지고 있는 것으로 사료된다(Leber and Miya, 1976; Madapallimatam and Riordan, 1977). 그러나 Hamer 등(1986)의 보고에 의하면 흰쥐에서 분리된 간 MT는 2가지 isoform을 가지며 원숭이 뇌에서 분리된 MTLP는 3가지 isoform을 가진다는 보고가 있다(Gulati *et al.*, 1987). 본 실험에서는 한가지 형태만이 관찰된 것으로 보아 다른 종류의

MTLP로 사료된다.

흰쥐 뇌에서는 카드뮴에 의하여 MT가 유도되지 않는다는 Ebadi와 Swanson(1987)의 보고는 불지용성인 카드뮴이 성상세포가 감싸고 있는 혈뇌장벽을 통과하지 못하였기 때문인 것으로 사료된다. MT가 신경세포에서 독성물질에 대한 방어기능이 있다는 보고(Sugawara *et al.*, 1983)에 따라 카드뮴이 혈뇌장벽을 통과하게 된다면 중추신경계에서 MT가 유도되어 자체방어 기능을 갖게 될 것으로 사료된다.

카드뮴 주사에 의해 흰쥐의 해마(Hippocampus)부위에서는 8 Kd와 20 Kd의 stress protein만이 형성된다는 보고가 있다(Andersen *et al.*, 1988). 본 실험에서는 식염수로 처리하였을 때 14.3 Kd 이하의 단백질과 90 Kd 정도의 stress protein이 미량 생성됨을 알았고, 이는 식염수 자체에 의해서나 주사방법에 의해서 유도되는 단백질인 것으로 사료된다. 카드뮴을 처리했을 때에는 14.3 Kd 이하의 단백질과 30 Kd, 64 Kd, 68 Kd, 80 Kd 및 108 Kd의 stress protein이 관찰되었고, 14.3 Kd 이하의 단백질을 제외한 모두가 흰쥐의 뇌에서는 보고되지 않은 것들 이었다(Fig. 4, 5).

Stereotaxic apparatus를 이용하여 카드뮴을 뇌에 투여한 경우, 식염수를 처리했을 때에 일어나지 않는 경련과 간질등의 발작증상이 나타났는데, 이는 카드뮴이 신경세포에서 흥분성 신경전달물질인 glutamate와 억제성 신경전달물질인 GABA의 분비에 이상을 주었거나 카드뮴이 Ca<sup>++</sup> channel에 관계하여 막전위와 Ca<sup>++</sup> 농도에 이상을 준것으로 생각할 수 있다. 그러나 뇌에 있어서 카드뮴과 신경전달물질에 대한 대사에 관해서는 더 많은 연구가 되어야 할 것이다.

## 인용문헌

- Andersen, H.R. and O. Andersen, 1988. Effect of cadmium chloride on hepatic lipid peroxidation in mice. *Pharmacol. Toxicol.* **63**: 173-177.
- Andersen, R.A. and H.L. Daae, 1988. Preparation of metallothionein from rat liver and studies of its

- properties with respect to use as a standard in gel permeation chromatography, polyacrylamid gel systems, autoradiography and western blotting. *Comp. Biochem. Physiol.* **90B**: 59-67.
- Andersen, R.A., H.L. Daae, A. Mikalsen, and J. Alexander, 1989. Occurrence of various forms of metallothionein in the rat after a short-term cadmium injection regimen. *Comp. Biochem. Physiol.* **93C**: 367-375.
- Arvidson, B. and H. Tjalve, 1986. Distribution of <sup>109</sup>Cd in the nervous system of rats after intravenous injection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **69**: 111-116.
- Berlin, M. and S. Ullberg, 1963. The fate of <sup>109</sup>Cd in the mouse. *Archi. Enviro. Health.* **7**: 72-79.
- Blalock, T.L., M.A. Dunn, and R.J. Cousins, 1988. Metallothionein gene expression in rat: Tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J. Nutr.* **118**: 222-228.
- Brady, F.O., 1983. Metabolism of zinc and copper in the neonate: Zinc thionein in developing rat brain, heart, lung, spleen and thymus. *Life Science* **32**: 2981-2987.
- Bremner, I. and N.T. Davies, 1975. The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem. J.* **149**: 733-738.
- Dunn, M.A., T.L. Blalock, and R.J. Cousins, 1987. Metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **185**: 107-119.
- Ebadi, M., 1984. The presence of metallothionein-like protein (MTLP) in rat brain. *Fed. Proc.* **43**: 851.
- Ebadi, M and S. Swanson, 1987. Characterization of metallothionein-like protein in rat brain. *Experimentiasupple.* **52**: 289-291.
- Etzel, K.R. and R.J. Cousins, 1981. Hormonal regulation of liver metallothionein zinc. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **167**: 233-236.
- Fowler, B.A., 1988. Mechanism of metal-induced renal cell injury: Roles of high-affinity metal-binding proteins. *Contr. Nephrol.* **64**: 83-92.
- Fuller, C.E., M.E. Elmes, and B. Jasani, 1990. Age-related changed in metallothionein, copper, copper-associated protein, and lipofuscin in human liver. *J. Pathol.* **161**: 167-172.
- Gabbiani, G., D. Baic, and C. Deziel, 1967. Toxicity of cadmium for the central nervous system. *Exp. Neurol.* **18**: 154-160.
- Gan, S.D., M.M. Fan, and G.P. He, 1986. The role of microtubules in axoplasmic transport in vivo. *Brain Research.* **369**: 72-82.
- Gill, K.D., R. Pal, and R. Nath, 1989. Effect of cadmium on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in undernourished weaning rat brain. *Pharmacol. Toxicol.* **65**: 73-77.
- Grill, E., E.L. Winnacker, and M.H. Zenk, 1987. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 439-443.
- Gulati, S., V.K. Pariwal, M. Sharma, K.D. Grill, and R. Nath. 1987. Isolation and characterization of metallothionein protein from monkey brain. *Toxicology.* **45**: 53-64.
- Hager, L.J. and R.D. Palmiter, 1981. Transcriptional regulation of mouse liver metallothionein-I gene by glucocorticoids. *Nature.* **291**: 340-342.
- Hamer, D.H., 1986. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 913-951.
- Hidalgo, J., L. Campmany, M. Borrás, J.S. Garvey, and A. Armario, 1988a. Metallothionein response to stress in rats: Role in free radical scavenging. *Am. J. Physiol.* **254**: E518- E524.
- Hidalgo, J., M. Giralt, J.S. Garvey, and A. Armario, 1988b. Physiological role of glucocorticoids on rat serum and liver metallothionein in basal and stress conditions. *Am. J. Physiol.* **254**: E72-E78.
- Hidalgo, J., J.S. Garvey, and A. Armario, 1990. On the metallothionein, glutathion and cystein relationship in rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **225**: 554-564.
- Hidalgo, J., M. Giralt, J.S. Garvey, and A. Armario, 1991. Effect of morphin administration on rat liver metallothionein and zinc metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **259**: 274-278.
- Hidalgo, J., M. Borrás, J.S. Garvey, and A. Armario, 1990. Liver, brain and heart metallothionein induction by stress. *J. Neurochem.* **55**: 651-654.
- Itoh, M., M. Ebbadi, and S. Swanson, 1983. The presence of zinc-binding proteins in brain. *J. Neurochem.* **41**: 823-829.
- Korte, F., 1982. Ecotoxicology of cadmium. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2**: 184-208.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- 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.
- Locke, M., E.G. Noble, and B.G. Atkinson, 1990. Exercising mammals synthesize stress protein. *Am. J. Physiol.* **C723-C729**.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenberg, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.



- Madapallimatam, G. and J.R. Riordan, 1977. Antibodies to the low molecular weight copper binding protein from liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **77**: 1286-1293.
- Margoshes, M. and B.L. Vallee, 1957. Acadmium protein from equine kidney cortex. *J. Amer. Chem. Soc.* **79**: 4813-4814.
- Mayo, K.E. and R.D. Palmiter, 1982. Glucocorticoid regulation of the mouse metallothionein I gene is selectively lost following ampication of the Gene. *J. Biol. Chem.* **257**: 3061-3067.
- Minkel, D.T., K. Poulsen, S. Weilgus, C.F. Shaw, and D. H. Petering, 1980. On the sensitivity of metallothioneins to oxidation during isolation. *Biochem. J.* **191**: 475-485.
- Oh, S.H., T. Deagen, P.D. Whanger, and H. Weswig. 1978. Biological function of metallothionein. *Am. J. Physiol.* E283-E285.
- Ohi, S., G. Cardenosa, R. Pine, and P.C. Huang, 1981. Cadmium-induced accumulation of metallothionein messenger RNA in rat liver. *J. Biol. Chem.* **256**: 2180-2184.
- Sato, K., T. Iwamasa, T. Tsuru, and T. Takeuchi, 1978. An ultrastructural study of chronic cadmium chloride-induced neuropathy. *Acta. Neuropath. (Berl)*. **41**: 185-190.
- Sato, M., R.K. Mehra, and I. Bremner, 1984. Measurment of plasma metallothionein-I in the assessment of the zinc status of zinc-deficient and stressed rats. *J. Nutr.* **114**: 1683-1689.
- Schlesinger, M.J., 1986. Heat shock protein: The search for funtions. *J. Cell. Biol.* **103**: 321-325.
- Sparla, A.M. and J. Overnell, 1990. The binding of cadmium to crab cadmium metallothionein. *Biochem. J.* **267**: 539-540.
- Sugawara, N., K. Aoshima, and M. Kasuya. 1983. Effect of cadmium chloride and cd-metallothionein on the nervous tissue culture. *Toxicol. Lett.* **16**: 95-101.
- Suzuki, C.A.M. and M.G. Chrian, 1989. Renal glutathion and nephrotoxicity of cadmium-metallothionein in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **98**: 544-552.
- Swandulla, D. and C.M. Armstrong, 1989. Calcium channel block by cadmium in chicken sensory neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 1736-1740.
- Taketani, S., H. Sato, T. Yoshinaga, R. Tokunaga, T. Ishil, and S. Bannai, 1990. Induction in mouse peritoneal macrophage of 34 kDa stress protein and heme oxygenase by sulfhydryl-reactive agents. *J. Biochem.* **108**: 28-32.
- Thornally, P.J. and M. Vasak, 1985. Possible role of metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl medicals. *Biochem. Biophysic. Acta* **827**: 36-44.
- Trakshel, G.M., M.D. Maines, and R.K. Kutty, 1986. *Arch. Biochem. Biophs.* **251**: 175-187.
- Waalke, M.P., A. Perantoni, M.R. Bhave, and S. Rehm. 1988. Strain dependence in mice of resistance and susceptibility to the testicular effects of cadmium: Assessment of the role of testicular cadmium-binding proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **93**: 47-61.
- Webb, M., 1972. Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **21**: 2767-2771.
- Webb, M. and K. Cain, 1982. Functions of metallothionein. *Biochem. Phamacol.* **31**: 137-142.
- Webster, W.S. and A.A. Valois, 1981. The toxic effects of cadmium on the neonatal mouse CNS. *J. Neuropathol.* **40**: 247-257.
- White, T.E., R.B. Baggs, and R.K. Miller, 1990. Central nervous system lesions in the wistar rat fetus following direct fetal injections of cadmium. *Teratology.* **42**: 7-13.
- Wong, K.L. and C.D. Klaassen, 1982. Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **63**: 330-337.

(Accepted February 18, 1995)

---

**Induction of Metallothionein-like Protein in the Rat Brain by Intracerebroventricular  
Cadmium Treatment**

Seok-Joon Won and Seong-hyang Sohn<sup>1</sup> (Department of Biology, College of Natural Sciences,  
Yonsei University, Seoul 120-749; <sup>1</sup>Department of Dermatology, School of Medicine,  
Ajou University, Suwon 441-749, Korea)

To study whether cadmium (Cd) could induce metallothionein like protein (MTLP) in the rat brain, Cd was directly injected by using stereotaxic apparatus into the lateral ventricle and changes in amount of Cd binding protein in the brain was examined.

In the case of Cd-treatment, 2 fold increase in the amount of a Cd-binding protein of a relative MW of 6,000-6,500 Da which had a high content of amino acids with thiol group and a low content of aromatic amino acids was observed. With the increase of the 6.5 kDa protein, Cd treatment also induced several stress proteins - 30, 64, 68, 80 and 108 kDa - which were not reported in the rat brain. In the case of saline injection, the Cd-binding protein was slightly increased and new 90 kDa was observed.