

## 카드뮴 중독 흰쥐에 대한 Noninvasive Biomarker로서의 요중 Ascorbic Acid에 관한 연구

동아의료원 해부병리과<sup>1</sup>, 인제대학교 보건대학 임상병리학과<sup>2</sup>, 마산 전문대학 임상병리과<sup>3</sup>

안승주<sup>1</sup> · 김용호<sup>2\*</sup> · 류재두<sup>3</sup> · 이용우<sup>2</sup>

**국문초록:** 본 연구는 카드뮴의 이용 및 환경오염의 증가로 일어날 수 있는 카드뮴 중독에 대한 새로운 생물학적 지표로서의 요중 ascorbic acid를 평가하기 위하여 실험적으로 중독시킨 Sprague-Dawley 종의 흰쥐를 이용하여 요중 ascorbic acid 측정, 신장의 조직병리학적 조사 및 생화학적 간 기능 검사를 실시하였다. 측정된 요중 ascorbic acid 농도의 전 실험기간 (50일) 평균치는 실험군I (카드뮴 100 ppm)이 214.0 mg/dl, 실험군II (카드뮴 200 ppm)가 254.3 mg/dl로 대조군 9.0 mg/dl에 비해 각각 24배 및 28배의 증가를 보였다. 조직병리학적 소견으로는 신장의 근위 세뇨관에서 단백뇨의 원인으로 추정되는 호산성 초자양 물질이 관찰되어 신장의 손상이 있었고, 생화학적 분석에서 실험군I에서 AST, ALT의 수치가 대조군의 143 mg/dl, 50 mg/dl에 비해 각각 199 mg/dl, 88 mg/dl, 실험군II가 270 mg/dl, 226 mg/dl로 나타나 간 기능의 손상이 있었음을 알 수 있었다. 이상의 결과로 실험동물이 카드뮴에 노출됨에 따라 그 아만성 독성으로서 간장 및 신장 기능의 손상이 있었고 또한 요중의 ascorbic acid가 현저하게 증가되어 요중 ascorbic acid가 실험동물의 카드뮴 노출에 대한 noninvasive 진단 지표로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 서 론

인류의 오랜 역사와 더불어 산업화에 많은 기여를 해온 카드뮴은 제조·폐기 과정에서 발생하는 환경오염 문제 뿐만 아니라 산업장 근로자의 노출 및 비직업적 노출에 의한 건강장해가 국민 보건의 문제점으로 대두되고 있다. 특히 카드뮴의 증기 (fume)는 반응성이 커서 공기 중에 급속히 산화되며 카드뮴의 세립자를 만들어 인체의 호흡기를 통하여 쉽게 중독 된다<sup>18</sup>. 사람의 체내에 축적된 카드뮴은 각종 금속효소의 활성을 저해하고 생체가 필요로 하는 필수 금속과 비타민의 대사에 관여하여 뼈, 폐, 간장과 신장에 급만성 중독 증상을 일으킨다고 보고되었다<sup>9</sup>. 이와 같이 인체내 축적시 장기의 기능에 심각한 장해가 유발될 수 있는 카드뮴에 대한 정확한 측정이나 검사는 중독증의 초기 진단에 도움을 줄 수 있는

데, 현재 신장 카드뮴 축적량, 혈액중 카드뮴 농도, 요중 카드뮴 농도와 신 기능의 손상을 반영하는 지표로 요중 total protein, albumin, retinal binding protein (이하 RBP라 함), metallothionein (이하 MT라 함) 등과 같은 비특이적 지표, N-acetyl-β-glucosaminidase (이하 NAG라 함), alkaline phosphatase 등의 효소, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>와 같은 이온 물질 측정방법 등이 이용되고 있다<sup>10</sup>.

한편, Poon<sup>14</sup>)에 의하면 실험용 흰쥐에 단기간 gasoline이나 methanol/gasoline 혼합체를 흡입시킨 결과, 간에서 마노산 (hippuric acid)은 4배, ascorbic acid는 6배가 증가하였으며, ethanol과 같은 유기 용제와 polychlorinated biphenyls (이하 PCBs라 함)의 혼합 투여도 흰쥐의 요중 ascorbic acid 배설을 증가시켰다<sup>12,15</sup>. 이러한 ascorbic acid는 흰쥐 간장의 glucuronic acid 경로에서 특정 화학 물질이나 약품에 의해 합성이 증가되어 체외로 배설된다고 하였다<sup>3,11</sup>). 그러나 카드뮴 축적에 따른 요중 ascorbic acid 배설량을 측정한 연구보고는 없다. 따라서 본 연구는 Sprague-Dawley (이하 SD라 함) 흰쥐에 실험적으로 카드뮴을 중독 시켜 간·

\* 논문접수 1997년 11월 1일, 수정재접수 1998년 1월 26일

† 별책요청저자

폐·신장의 조직 병리학적 손상, 요중 ascorbic acid 배설량을 관찰하여 생체내에 축적된 카드뮴에 의한 반응을 조기에 진단할 수 있는 진단 지표로 이용하기 위한 기초 자료로 제공하고자 함이 본 연구의 목적이다.

## 재료 및 방법

### 기구 및 시약

실험 기기는 요중 ascorbic acid 분석은 High Performance Liquid Chromatography (이하 HPLC라 함; Hewlette-Packard 1050 series, U.S.A)를 사용하였고, 자동 생화학 분석기는 Hitachi7170 (Hitachi7170 Chemistry automatic analyzer, Japan), 조직학적 검사를 위해서는 ETP 270BV (Sakura, Japan)를 자동침투기로, 부유온수조와 신전기는 Medax (Leichert-Jung, Germany)를, 조직 절편은 Jung-Histocut 820 (Leichert-Jung, Germany)의 회전형 박절기를 사용하였다. 투과전자현미경 (Transmission Electronic Microscopy, 이하 TEM이라 함)은 Hitachi H 600 (Hitachi, Japan)을, 초박절편은 Ultracut-E (Leichert-Jung, Germany)를 사용하였다. 시약으로는 HPLC법에서는 L-form ascorbic acid (Junsei, Japan), methanol, acetic acid (Junsei, Japan)를 사용했고, 자동혈청 분석기에는 aspartate transaminase (이하 AST라 함)와 alanine transaminase (이하 ALT라 함)는 Asan Pharm (Korea) 시약을, glucose 및 blood urea nitrogen (이하 BUN이라 함)에는 BM (Germany) 시약, total protein, albumin, creatinine 및 lactic dehydrogenase (이하 LDH라 함)의 시약에는 Daiichi (Japan)를 사용하였고, 요검사 시약지는 YDstrip (영동제약, Korea), 조직검사에는 10% 중화완충 포르말린 (Neutral Buffered Formalin, 이하 NBF라 함)의 고정액 (Junsei, Japan), 70, 80, 95 (v/v)% alcohol 및 무수 alcohol (Hayman, England)의 탈수제, xylene (덕산화공, Korea)의 투명제, 경질 paraffin (Paraplast, Germany)의 침투제, Gill's V hematoxylin (Muto, Japan)의 핵염색 시약을 사용하였다. TEM에서는 osmium tetroxide (E.M.S사, U.S.A), epon수지 (TAAB사, England), propylene oxide (Merck사, Germany), uranyl acetate (Merck사, Germany) 및 lead citrate (Junsei, Japan)를 사용하였다.

### 실험적 중독

#### 1) 실험동물

실험동물은 체중  $150 \pm 5$  g의 SD종의 흰쥐 수컷을 실험전 1주일간 일정한 환경에서 적응 시킨 후, 50일 동안 카드뮴을 경구적으로 투여하였다. 사료는 표준 고형사료 (삼양사)를 공급하였고 사육기간 동안 사육실의 온도는  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 낮과 밤의 주기는 오전 8시부터 오후 6시로 하였다.

#### 2) 카드뮴 투여

대조군, 실험군I, II 모두 5마리씩으로 하여 대조군에는 정상식이와 식수, 실험군I에서는 정상식이와 100 ppm의  $\text{CdCl}_2$  (Junsei, Japan), 실험군II에서는 정상식이와 200 ppm의  $\text{CdCl}_2$ 를 식수에 타서 이순재 등<sup>1)</sup>의 방법으로 투여하였다.

### 시료의 채취

#### 1) 요

대사성 케이지에 한마리씩 사육하였으며 보존제로 100 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  0.5 ml와 4 N HCl 0.5 ml를 24시간 소변 채취용기에 첨가하였고 채취한 소변은 원심분리기 (Vision2000, Korea)를 이용하여 3,000 x g에서 10분간 원심분리 후 상층액을 sample vial에 1 ml씩 분주하여  $-80^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다가 HPLC법을 이용하여 ascorbic acid를 분석하였다.

#### 2) 혈액

카드뮴 투여 기간이 끝난 후 SD 흰쥐를 에테르 (ether)로 마취시켜 개복한 다음 심장천자하여 항응고제  $\text{K}_2\text{-EDTA}$ 가 첨가된 시험관과 혈청을 얻기 위해 자동 혈청 분리 시험관인 SST vacuum tube (Becton-Dickinson Co, U.S.A)에 나누어 채혈하여 3,000 x g에서 15분간 원심 후 혈청을 분리하였다.

#### 3) 장기 채취

폐, 간장 및 신장을 적출한 후 10% NBF 고정액에서 24시간 고정하였다.

### 측정방법

#### 1) 요중 Ascorbic acid의 측정

요중 ascorbic acid는 HPLC로 측정하여 그 농도를 구하였다. 표준용액은 고체 L-ascorbic acid (Junsei, Japan) 1.0 g을 평량하여 3차 증류수로 1 g/l가 되게 만들고 이것을 urine과 1:1로 혼합하여 1, 10, 20, 50, 100 mg/l로 하였다. 각 시료는 3차

증류수로 100배 희석하여 3,000 x g에서 15분 동안 원심분리시켜 상층액 20 µl를 autosampler에서 mobile phase (methanol: acetic acid: distilled water= 18:2:80, v/v, pH 4.8)로 1.5 l병에 채워서 stock solution으로 하였다. 본 연구에서 사용한 HPLC의 분석 조건은 다음과 같다 (Table 1).

2) 조직병리 및 전자 현미경 표본의 제작

고정된 조직을 자동 침투기 (Sakura, Japan)로 저농도에서 고농도 알코올 탈수과정과 파라핀 침투, 포매과정을 거쳐 회전형 박절기로 4 µm의 절편을 얻어 45°C 부유온수조에서 주름을 펴고 60°C 신전기에서 탈 파라핀한 후, 핵과 세포질염색을 위해 퇴행성 염색방법으로 Gill's V hematoxylin & eosin 염색 (이하 H&E 염색이라 함)을 하여 관찰하였다. 전자 현미경 표본은 파라핀 포매된 블록의 신 피질 (renal cortex) 일부를 절취한 후 용해된 파라핀 (60°C)에 30분간 조직을 용해시킨 후 xylene으로 15분씩 2회 탈 파라핀 하였다. 탈 파라핀, 탈 치환, 수화, 세절, 고정 (1% OsO<sub>4</sub>, pH 7.4), 수세, 탈수, propylene oxide로 치환, epon 혼합물에 의한 포매, 중합, 60 nm 초박절, uranyl acetate와

lead citrate 이중염색의 과정을 거쳐 투과형 전자현미경으로 100 Kv 에서 관찰하였다.

3) 생화학적 분석

혈청은 Hitachi7170 자동 생화학 분석기를 이용하여 International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)에 의한 rate assay법으로 AST와 ALT분석, hexokinase method로 glucose분석, urease-GLDH (L-glutamate dehydrogenase) enzyme method로 BUN분석을 하였고, total protein은 Buret method, albumin은 bromocresolgreen method, creatinine은 kinetic Jaffe method, LDH는 rate assay법으로 분석하였다.

4) 요의 정성분석

카드뮴 투여 종료 후 보존제를 첨가하지 않고 채뇨한 후 분석하였다. 즉, 요단백질은 tetrabromophenol 지시약법, 요당은 glucose oxidase와 peroxidase법, 적혈구는 hydroperoxide와 O-toluidine 반응법, 백혈구는 esterase 측정법, 비중 (specific gravity)은 이온 농도에 관계하는 polyelectrolyte의 ok값의 변화에 기초하여, pH는 이중 지시계를 이용하여 측정하였다.

Table 1. The operating condition of HPLC for the analysis of urinary ascorbic acid

| Item          | Method  |
|---------------|---|
| Instrument    | Hewlette-Packard1050                          |
| Column        | ODS-hypersil (5 µm 200×4.6 mm)                |
| Mobile phase  | methanol: acetic acid: water=18:2:80 (pH 4.8) |
| Flow rate     | 0.7 ml/min                                    |
| Detector      | UV detector (HP1050)의 λ=265 nm                |
| Column temp.  | Room temperature                              |
| Chart speed   | 0.25 min                                      |
| Analysis time | 16 min  |

Table 2. Levels of urinary ascorbic acid during experimental period

| Group   | Period of CdCl <sub>2</sub> administration (days) |            |            |            |                 | unit: mg/dl |
|---------|---|------------|------------|------------|-----------------|-------------|
|         | 10  | 20         | 30         | 40         | 50 <sup>†</sup> |             |
| Control | 9.27±3.27   | 9.05±3.39  | 8.89±2.85  | 8.89±3.26  | 8.91±3.15       |             |
| 100 ppm | 172.4±48.4  | 208.0±48.2 | 247.7±57.2 | 217.1±93.8 | 224.9±81.2      |             |
| 200 ppm | 220.0±29.1  | 200.9±44.1 | 252.1±31.5 | 247.6±57.3 | 351.1±24.5      |             |

The value represents the mean±SD (n=5), and statistical analysis was performed by using the Student's t test. The levels in the treated groups are significantly increased, compared with the control group (p<0.0005 and p<0.0025 for the 100 ppm group at day 50)

<sup>†</sup>; significant increase when the 200 ppm group is compared with the 100 ppm group (p<0.01)

## 결 과

### 요중 Ascorbic acid의 분석

카드뮴 중독에 의한 요중의 ascorbic acid 배설 여부를 측정하기 위해 실험 환쥐에 인위적으로 카드뮴을 중독시키고 채취된 요를 HPLC법으로 분석을 하였다. HPLC의 diode assay detector에 나타난 ascorbic acid의 특징적 peak 곡선은 365 nm에서 최고치를 나타내었고, 이 때의 retention time은 약 3.28 min이었다 (Fig. 1). 이와 함께 각 시료에 대한 peak 곡선의 면적을 농도로 계산한 결과 대조군 (control)과 각 실험군에서의 요중 ascorbic acid 농도는 Table 2와 같이 나타났다. 대조군의 평균은  $9.0 \pm 1.64$  mg/dl인데 비하여 100 ppm군의 경우 평균  $214.0 \pm 27.5$  mg/dl로서 대조군보다 약 24배의 증가치를 보였다. 200 ppm을 투여한 실험군에서는 평균  $254.3 \pm 57.9$  mg/ml로서 대조군보다 약 28배 높게 나타났다. 따라서 카드뮴 투여 용량에 따른 두 실험군은 대조군에 비하여 모두 ascorbic acid 배설량이 현저하게 증가하였으며 ( $p < 0.0005$  또는  $p < 0.0025$ ), 특히 실험군 중 100 ppm군에 비해 카드뮴 투여 용량이 많았던 200 ppm군의 경우 ascorbic acid 배설량이 50일째에 통계적으로 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2).

### 조직병리 및 전자 현미경 표본분석

카드뮴 중독에 의한 SD환쥐의 조직 및 장기에

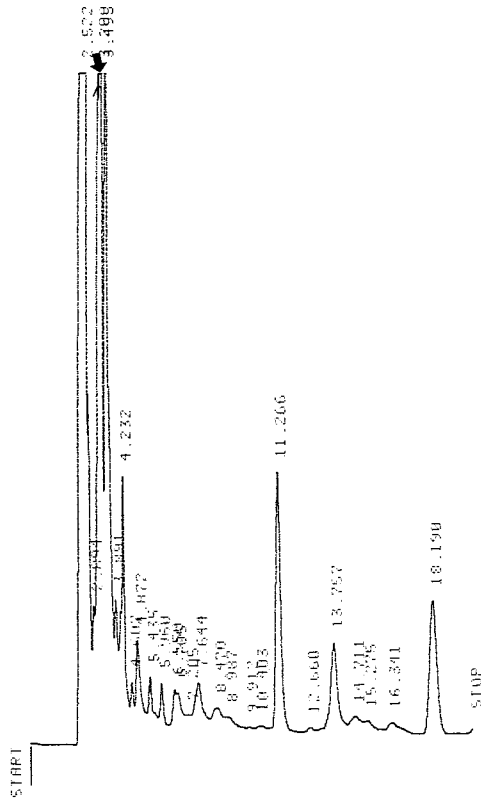


Fig. 1. HPLC elution profile of urine specimen from a rat treated with  $\text{CdCl}_2$ . Arrow indicates the peak of ascorbic acid (eluted approximately at 3.28 min).

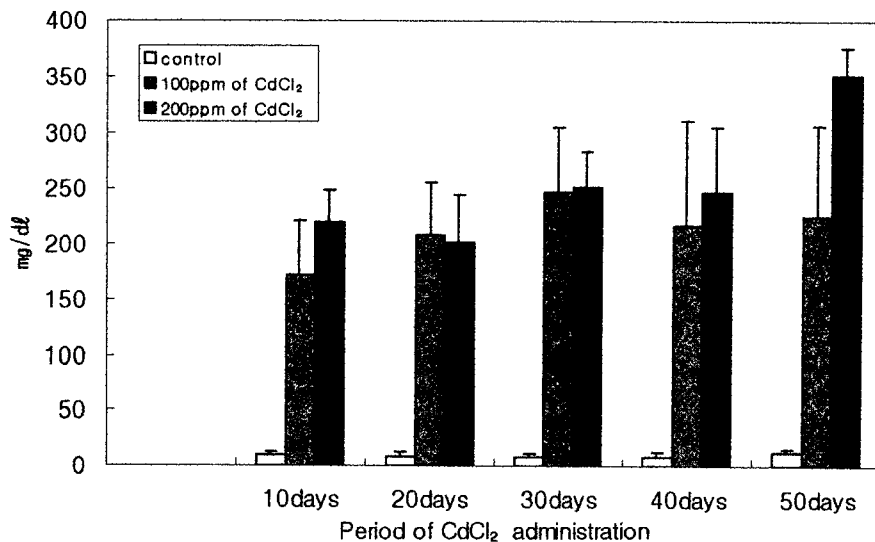
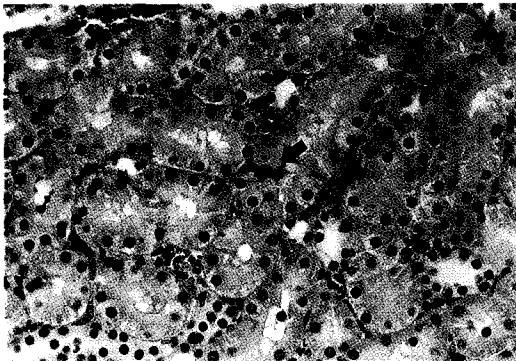


Fig. 2. Excretion levels of urinary ascorbic acid during various periods of  $\text{CdCl}_2$  chloride administration.

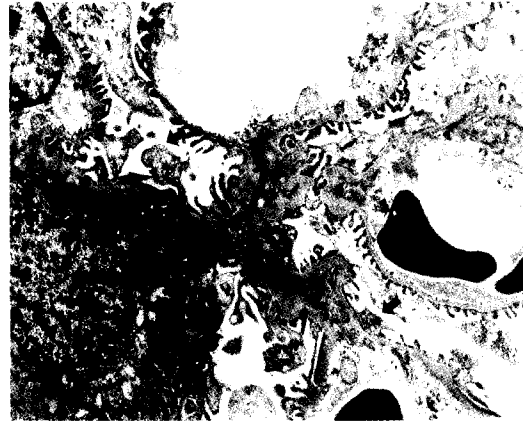
**Table 3.** Biochemical analysis of the blood

| Group   | Biochemical marker |                    |             |                 |                |
|---------|--------------------|--------------------|-------------|-----------------|----------------|
|         | Glucose (mg/dl)    | Creatinine (mg/dl) | BUN (mg/dl) | protein (mg/dl) | Albumin (g/dl) |
| Control | 173±8.1            | 0.5                | 19.9±1.1    | 6.4±0.2         | 2.1±0.1        |
| 100 ppm | 150±17.6           | 0.5                | 22.6±2.4    | 6.3±0.3         | 2.7±0.2        |
| 200 ppm | 155±6.5            | 0.4                | 15.9±2.2    | 6.0±0.2         | 2.4±0.1        |

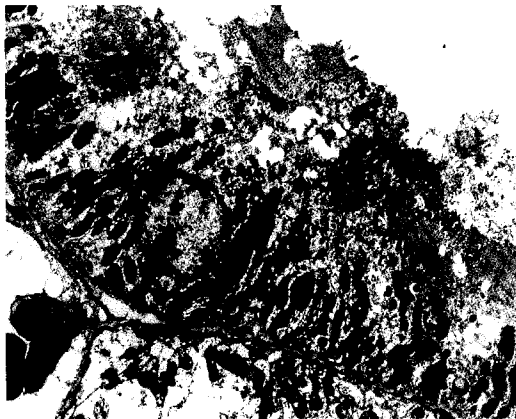
The value represents the mean±SD (n=5), BUN: blood urea nitrogen



**Fig. 3.** Micrograph shows occasional eosinophilic hyaline material (filled arrow) at the proximal tubule in the kidney of rat, treated with 200 ppm CdCl<sub>2</sub> for 50 days (H&E, x200).



**Fig. 5.** Ultrastructural findings of Fig. 3, showing mild, focal fusion and effacement (filled arrows) of foot processes in the visceral epithelial cell of glomerulus (E.M, 6,000X).



**Fig. 4.** Ultrastructural findings of Fig. 3, showing unremarkable proximal tubule except for the artifact caused by poor fixation with formalin in the paraffin-embedded tissue (E.M, 6,000X).

증반응인 문정맥 주변의 단핵구, 림프구의 침윤이 100% 관찰되었고 폐에서는 실험군의 30%에서 폐포 중격의 비후와 염증 세포 침윤이 관찰되었다. 그리고 신장의 병리 조직학적 염색 표본의 소견은 실험군에서 호산성 초자양 변화가 근위 세뇨관에서 80% 관찰되었으나 (Fig. 3), 전자 현미경적 소견에서는 조직표본 제작 중 발생된 세포질 보존 불량 소견 외에 어떠한 변화도 관찰되지 않았고 (Fig. 4), 사구체의 전자 현미경적 소견은 경도의 foot process의 융합과 effacement 소실이 국소적으로 실험군에서 관찰되어, 카드뮴의 생체내 흡입 침착시 발생하는 신장 손상의 직접적 원인이 사구체 손상에 의해 진행되었음을 알 수 있었다 (Fig. 5).

#### 생화학적 분석

카드뮴의 축적이 당대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈당량을 측정된 결과 대조군의 혈당량은 173±8.1 mg/dl, 100 ppm에서 150±17.6

미치는 영향을 병리학적으로 관찰하기 위하여 H&E 염색 표본을 제작하여 관찰하였다. 생체내 장기 중 카드뮴이 주로 영향을 미친다고 알려진 간장에서는 대조군과 실험군 모두 비특이적인 염

mg/dl, 200 ppm에서  $155 \pm 6.5$  mg/dl로 나타나 대조군에 비하여 실험군의 혈당량 값이 다소 낮았다. 신장의 기능을 보기 위한 creatinine은 대조군이 0.5 mg/dl, 100 ppm군이 0.5 mg/dl, 200 ppm군의 경우 0.4 mg/dl로 나타났다. 또한 혈액 요소 질소 (BUN)는 대조군이  $19.9 \pm 1.1$  mg/dl, 100 ppm의 경우  $22.6 \pm 2.4$  mg/dl, 200 ppm에서  $15.9 \pm 2.2$  mg/dl로 나타났다. 총 단백질은 대조군이  $6.4 \pm 0.2$  g/dl, 100 ppm군이  $6.3 \pm 0.3$  g/dl, 200 ppm군이  $6.0 \pm 0.2$  g/dl로 나타났으며 albumin은 대조군이  $2.1 \pm 0.1$  g/dl, 100 ppm군이  $2.7 \pm 0.2$  g/dl, 200 ppm군이  $2.4 \pm 0.1$  g/dl로 측정되었다. 전체적으로 albumin이 실험군에서 다소 높게 나타났으나 기타 항목은 대조군과 매우 유사하여 의의가 없었다 (Table 3).

카드뮴이 간장, 신장, 근육 등에 미치는 영향을 알아보기 위하여 AST의 경우 대조군, 100 ppm, 200 ppm군이 각각  $143 \pm 16.5$  IU/l,  $199 \pm 95.9$  IU/l,  $270 \pm 165.5$  IU/l로 나타나 대조군에 비하여 실험군이 다소 증가되었고, 100 ppm군에 비하여 200 ppm군이 35.6% 증가된 값을 나타내었다. ALT는 대조군, 100 ppm, 200 ppm군이  $50 \pm 13.6$  IU/l,  $88 \pm 14.6$  IU/l,  $226 \pm 218.1$  IU/l로 나타나 AST의

경우와 같이 대조군에 비하여 100 ppm군이 76% 증가되었고, 100 ppm군에 비하여 200 ppm군에는 352%가 증가되었다. LDH는 대조군이  $344 \pm 142.2$  U/l인데 비하여 100 ppm군과 200 ppm군이 각각  $1190 \pm 203.8$  U/l,  $760 \pm 264.8$  U/l로 측정되어 대조군에 비하여 실험군이 현저하게 증가된 경향을 보였다 (Table 4).

#### 요의 정성분석

카드뮴이 신장에 미치는 영향을 제외 실험에 의하여 간편하게 예비 평가할 수 있도록 방부제를 첨가하지 않은 요를 채취하여 요의 화학적 구성성분에 대한 정성분석을 하였다. 요단백질은 실험군에서만 모두 양성으로 나타났고, 적혈구는 실험군 I 중에서 2마리에서만 정상적인 경우에 가끔 나타날 수 있는 현상으로 유의성이 없는 약한 양성을 보였을 뿐 모두 음성으로 나타났다. pH는 모두 알칼리성(평균 8.5)을 띄었으며 비중은 평균 1.015이었다. 요당, 백혈구는 모두 음성의 결과를 보였다(Table 5).

## 고 찰

카드뮴 중독증을 진단하기 위한 진단 방법은 혈액이나 요중 카드뮴량을 직접 측정하는 것이 확실한 진단 방법이 되지만 수기의 복잡성, 고가장비, 집단 검진시 대량검체 분석상의 문제 등으로 인하여 간접적인 진단방법들이 연구 보고되고 있다. 이러한 간접 측정 방법으로는 생체내 카드뮴의 가장 중요한 배설 경로인 신장의 기능이 손상된 경우 검출될 수 있는 요중 단백질 또는  $\beta_2$ -microglobulin, MT, RBP 등을 이용하기도 한다<sup>10)</sup>. 이 중 만성 카드뮴 중독시 신장 이상의 초기 지표로

Table 4. Enzymatic analysis of the blood

| Group   | Biochemical marker |                 |                  |
|---------|--------------------|-----------------|------------------|
|         | AST (IU/l)         | ALT (IU/l)      | LDH (U/l)        |
| Control | $143 \pm 16.5$     | $50 \pm 13.6$   | $334 \pm 142.2$  |
| 100 ppm | $199 \pm 95.9$     | $88 \pm 14.6$   | $1190 \pm 203.8$ |
| 200 ppm | $270 \pm 165.5$    | $226 \pm 218.1$ | $760 \pm 264.8$  |

The results are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=5)  
AST: aspartate aminotransaminase, ALT: alanine aminotransaminase, LDH: lactate dehydrogenase

Table 5. Qualitative analysis of the urine

| Items   | Group I (100 ppm) |       |       |       |       | Group II (200 ppm) |       |       |       |       |
|---------|-------------------|-------|-------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
|         | 1                 | 2     | 3     | 4     | 5     | 1                  | 2     | 3     | 4     | 5     |
| Protein | +                 | +     | +     | +     | +     | +                  | +     | +     | ++    | ++    |
| Glucose | -                 | -     | -     | -     | -     | -                  | -     | -     | -     | -     |
| RBC     | -                 | -     | ±     | -     | ±     | -                  | -     | -     | -     | -     |
| WBC     | -                 | -     | -     | -     | -     | -                  | -     | -     | -     | -     |
| pH      | 9                 | 9     | 8     | 8     | 8.5   | 8.5                | 8.5   | 9     | 9     | 8.5   |
| SG      | 1.010             | 1.015 | 1.015 | 1.020 | 1.015 | 1.015              | 1.015 | 1.010 | 1.020 | 1.015 |

-: negative, ±: nonspecific or insignificant, +: 30 mg/dl, ++: 100 mg/dl  
RBC: Red Blood Cell, WBC: White Blood Cell, SG: specific gravity

요중 단백질의 측정을 이용하기도 하나 초기에는 일반 검사상 정상 값을 보일 수 있어 초기 만성적 카드뮴 중독 측정에는 큰 도움이 되지 못할 것으로 생각된다.

급성 카드뮴 중독증일 경우 경구 섭취나 흡입에 과량의 카드뮴이 요구되며 노출된 초기 장기 및 조직에 영향을 미치게 되고 만성중독의 효과는 주로 호흡기계와 신장에서 발생할 수 있으며 특히 경구적 경로를 통한 섭취는 주로 신장에 영향을 주는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 만성적 카드뮴 노출이 폐에 미치는 영향은 주로 흡입에 의한 영향이 크다. 그러나 경구적 노출에 의한 이차적인 만성 카드뮴에 의한 노출도 폐에 장해를 가져오고, 폐쇄성 폐질환을 유발할 수 있다. 본 연구의 실험군에 대한 병리 조직학적 소견은 대조군에 비하여 실험군의 30%에서 폐포 중격 비후와 염증 세포 침윤이 관찰되어 신장이나 간장에 미치는 장해에 비하여 경구적으로 미치는 영향이 적은 것을 알 수 있다. 그러나 신장이나 간장은 흡입 경로에 관계없이 급성 또는 만성 중독효과가 나타나는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 경구적 섭취로 만성중독효과를 시도한 본 연구에서는 실험군 흰쥐 100%에서 단백뇨가 검출되었으나 당뇨는 검출되지 않았다. 카드뮴 중독이 신장에 영향을 미칠 경우 근위 세뇨관에 기능부전을 초래하여 요중에 단백뇨, 아미노산뇨, 당뇨 등을 초래한다고 한 Nomiyama 등<sup>13)</sup>의 연구보고와 일부 일치하였다. 또한 실험군 신장의 조직 병리학적 소견으로 대조군에서 관찰되지 않는 호산성 초사양 물질이 근위 세뇨관 주변부에 80% 관찰되었고, 신피질 부위의 전자 현미경적 소견상 사구체에 경도의 foot process의 융합과 effacement 소실이 국소적으로 관찰되어 카드뮴에 의한 신장 손상의 직접적 원인으로 생각된다. 그러나 염화 카드뮴을 농도별로 흰쥐의 꼬리정맥주사 후 장기별 카드뮴 축적량과 조직 손상의 변화를 관찰한 결과에서 신장 조직의 근위 세뇨관 상피 세포의 부종과 국소적으로 신사구체 모세혈관 기저막이 비후되었다고 보고한 이 영구 등<sup>2)</sup>의 연구 결과와는 일치하지 않았으나 간장의 병리학적 소견은 대조군과 실험군 모두에서 문정맥 주변에 monocyte, lymphocyte가 관찰되는 등 비특이적 염증반응의 소견은 만성 카드뮴 중독에 의한 조직학적 변화는 없다고 한 Sendelbach<sup>16)</sup>의 보고와 일치하였다. 이러한 차이는 실험방법 특히 카드뮴의 노출경로

가 달라 카드뮴의 독물동역학 및 표적장기에의 생체이용율이 크게 다른 것에 기인하는 것으로 생각된다.

혈청중의 효소로 간장기능을 나타내는 지표인 AST, ALT, LDH는 대조군에 비하여 100 ppm군과 200 ppm군에서 높게 나타나 카드뮴이 간과 사 등 간장손상을 유발한다고 한 Dudley 등<sup>5)</sup>의 연구 보고와 일치하였다. 즉, 카드뮴 중독시에 카드뮴이 생체에 미치는 독성을 감소시키기 위한 방어 기전으로 간장에서 MT를 합성하게 되는데 합성된 MT는 카드뮴에 대하여 높은 친화력을 가지고 있으므로 Cd-MT 복합물로 결합하고 남은 유리 카드뮴이 독성을 나타내며<sup>4)</sup>, 이 유리 카드뮴에 의해 생산된 free radical에 의한 조직 손상에 대한 방어 기전으로 superoxide dismutase와 catalase 등이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. 카드뮴은 직접 배설되기보다는 반감기가 길어 장기간에 걸쳐 생체내 저장에 의하여 해독된다. 그러나 Cd-MT 복합체가 신장에서 독성을 나타내는 것과 같이 간장에 축적된 경우에도 간장내 독성을 나타낼 수 있는 것으로 보이며, 이 결과 간장내 효소인 AST, ALT, LDH가 혈청에서 증가하게 된 원인으로 생각된다.

Hollman과 Touster<sup>6)</sup>는 barbital, chlorotone 및 3, 4-benzopyrene 등을 투여한 결과 요중에 현저한 ascorbic acid 증가가 관찰된다고 하였으며 또한 Poon 등의 연구결과에서는 ethanol과 같은 유기 용제나 ethanol과 결합된 PCBs의 투여로 요중 ascorbic acid가 현저하게 증가하였음을 보여주었다<sup>15)</sup>. 또다른 보고에서는 gasoline이나 methanol/gasoline 혼합물을 증기형태로 흡입시킨 실험군에서는 요중 ascorbic acid가 대조군에 비해 6배가 증가되어 요중 ascorbic acid를 노출되는 독성 물질에 대한 간장 반응의 지표인 noninvasive biomarker로 이용할 수 있다고 하였다<sup>14)</sup>. 이와 같이 약제나 일부 특정한 독성 물질에 대한 반응으로 요중 ascorbic acid의 배출은 잘 알려져 있으나 카드뮴에 의한 ascorbic acid의 배출은 현재 연구된 바 없다. 흰쥐의 간장에서 화학 물질에 의한 ascorbic acid 생합성 기전은 아직 명확하게 밝혀진 바 없으나 Hollman과 Touster<sup>6)</sup>는 간장내 glucuronic acid 경로에서 glucuronosyltransferase 효소의 유도로 인하여 ascorbic acid의 생합성이 증가되어 요중에 배설된다고 생각하였으며 Horio와 Yoshida 등<sup>7)</sup>에 의하면 어떤 xenobiotics에 의하여 glucuronic acid 대

사경로에 영향을 미쳐 glucuronide 형성이 촉진되어 ascorbic acid 생합성이 촉진된다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 요중 ascorbic acid를 측정 한 결과 대조군  $9.27 \pm 3.27$  mg/dl에 비하여 100 ppm 투여군에서 카드뮴 투여 10일째부터 19배가 높은  $172.4 \pm 48.4$  mg/dl가 배출되었다. 200 ppm 투여군에서는 24배가 증가된  $220.0 \pm 29.1$  mg/dl가 검출되었으며 전기간 평균이 각각 24배와 28배 증가되어 카드뮴에 의한 중독이 요중 ascorbic acid를 증가시킬 수 있음을 처음으로 밝혀 주었다. 따라서 본 실험군에서 카드뮴 노출시 조기에 현저하게 증가된 요중 ascorbic acid는 우선 시료채취가 용이하고 gasoline이나 PCBs 중독 때와 마찬가지로 카드뮴 중독 증진단을 위한 noninvasive biomarker로서 그 이용 가능성이 크다고 생각된다. 그리고 본 실험적 연구는 SD 흰쥐를 이용한 실험이므로 인체에 적용하기 위해서는 ascorbic acid와 유사한 인체 간장 대사 과정의 산화 환원계 물질을 정량 한다면 SD 흰쥐의 ascorbic acid와 유사한 결과를 기대할 수 있을 것으로 생각되며, 이를 인체에 대한 카드뮴중독의 진단에도 응용될 것이므로 추후 이에 대한 지속적인 연구가 요망된다.

### 참 고 문 헌

1. 이순재, 김미리, 윤연희 (1995): 한국산 녹차, 우롱차 및 홍차 음료의 중금속제거 및 해독 작용. 식품과학과 산업, **28**(4): 17-28.
2. 이영구, 박정덕, 최병선, 등 (1994): 카드뮴 폭로 후 고환, 신장 및 간장내 카드뮴 축적량과 조직손상의 변화. 대한산업의학학회지, **6**(1): 56-68.
3. Burns JJ, Conney AH, Dayton PG, Evans C, Martin GR and Taller D (1960): Observations on the drug induced synthesis of D-glucuronic, L-gulonic and L-ascorbic acids in rats. *J Pharmacol Exp Therap*, **129**: 132-138.
4. Din WS and Frazier JM (1985): Protective effect of metallothionein on cadmium toxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem J*, **230**: 395-402.
5. Dudley RE, Gammal LM and Klaassen CD (1985): Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: Likely role of cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, **77**: 414-426.
6. Hollmann S and Touster O (1962): Alterations in tissue levels of uridine diphosphate glucose dehydrogenase, uridine diphosphate glucuronic acid pyrophosphatase and glucuronyl transferase induced by substances influencing the production of ascorbic acid. *Biochem Biophys Acta*, **26**: 338-352.
7. Horio F and Yoshida A (1982): Effects of some xenobiotics on ascorbic acid metabolism in rats. *J Nutr*, **112**: 416-425.
8. Hussain T, Shukla GS and Chandra SV (1987): Effects of cadmium on superoxide in liver and kidney of growing rats: In vivo and in vitro studies. *Pharmacol Toxicol*, **60**: 355-358.
9. Itokawa Y, Abe T and Tanaka S (1973): Bone changes in experimental chronic cadmium poisoning. Radiological and biological approaches. *Arch Environ Pharmacol*, **80**: 33-42.
10. Kawada T, Tohyama C, Suzuki S (1990): Significance of the excretion of urinary indicator proteins for a low level of occupational exposure to cadmium. *Int Arch Occup Environ Health*, **62**: 95-100.
11. Longnecker HE, Fricke HM and King CG (1940): The effect of organic compounds upon vitamin C synthesis in the rat. *J Biol Chem*, **135**: 497-510.
12. Mochizuki S, Watanabe Y, Kato K and Yoshida A (1992): Effects of ethanol and polychlorinated biphenyls in combination on ascorbic acid metabolism, liver drug-metabolizing enzymes, and lipid metabolism in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **56**: 2037-2040.
13. Poon R, Chu I, Lecavalier P, Berman A and Villeneuve DC (1994): Urinary ascorbic acid-HPLC determination and application as a noninvasive biomarker of hepatic response. *J Biochem Toxicol*, **9**(6): 297-304.
14. Poon R, Chu I, Bjarnason S, Vincent R, Potvin M, Miller RB and Valli VE (1995): Short-term inhalation toxicity of methanol, gasoline, and methanol/gasoline in the rat. *Toxicol Ind Health*, **11**(3): 343-361.



15. Nomiya K (1986): The chronic toxicity of cadmium influence of environmental and other variables, pp. 101-131. *In* Foulkes EC(ed.), "Handbook of Experimental Pharmacology", Springer-Verlag, Berlin.
16. Sendelbach LE and Klassen CD (1988): Kidney synthesizes less metallothionein than liver in response to cadmium chloride and cadmium-metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol*, **92**: 95-102.
17. Suzuki Y (1980): Cadmium metabolism and toxicity in rats after long-term subcutaneous administration. *J Toxicol Environ Health*, **6**: 469-482.
18. Zenz C (1988): Principles and practical application, p. 527. *In* Zenz C (ed.), "Occupational Medicine", 2nd Ed., Year Book Medical Publisher, Chicago.

=Abstract=

**A Study of Urinary Ascorbic Acid as a Noninvasive Biomarker for Cadmium-Intoxication in Rats**

**Seung-Ju Ahn<sup>1</sup>, Yong-Ho Kim<sup>2†\*</sup>, Jai-Du Yoo and Yong-Woo Lee<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Anatomical Pathology, Dong-A Medical Center, Pusan 602-103, Korea*

<sup>2</sup>*Department of Medical Laboratory Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea*

<sup>3</sup>*Department of Clinical Pathology, Masan Junior College, Masan, 630-729, Korea*

This study was planned to evaluate the urinary ascorbic acid as a new biological marker for the intoxication of cadmium, which could possibly be driven by its increased utilization and environmental pollution. In order to meet this goal, we have performed measurement of urinary ascorbic acid concentration, histopathological examination of the kidney, and biochemical test for the liver function using cadmium-intoxicated rats by oral administration. The average concentrations of urinary ascorbic acid in the CdCl<sub>2</sub>-treated rats were 214.0 mg/dl for 100 ppm group and 254.3 mg/dl for 200 ppm group during experimental period of 50 days. These levels are 24 and 28 times higher than one in the control group (9.0 mg/dl), respectively. Ultrastructural study showed the eosinophilic hyaline cast and focal effacement, fusion in the renal tubules, as well as loss of foot processes on the glomerular epithelial cells. These results suggested that cadmium may be responsible for renal glomerular injury. The blood levels of AST, ALT and LDH in the treated groups (199 IU/l, 88 IU/l, 1190 U/l for the 100 ppm group and 270 IU/l, 226 IU/l, 760 U/l for the 200 ppm group) were higher than ones in the control group (143 IU/l, 50 IU/l, 334 U/l). These results indicated the cadmium induced the damage of liver function. In conclusion, the administration of cadmium showed a remarkable increase of urinary ascorbic acid with renal and hepatic damage. Therefore, it is expected that measurement of urinary ascorbic acid would be an powerful method as a noninvasive biomarker for cadmium intoxication.

**Key Words:** Urinary ascorbic acid, Noninvasive biomarker, Cadmium, Hepatic/renal damage

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 3(2): 151-160, December, 1997]

---

<sup>†</sup>Corresponding author