

카드뮴 전처리에 의한 생쥐의 카드뮴 치사 완화효과와 간 glutathione 함량과의 상관성

부 문 중

(삼육대학교 생물학과)

적 요 - 생쥐에서 카드뮴 전 처리에 의하여 카드뮴의 치사독성이 완화되는지를 조사하고 치사완화 효과와 간 조직내의 glutathione (GSH) 함량이 상관성이 있는지를 조사하였다. 치사량의 카드뮴을 주사하기 전에 치사량 이하의 카드뮴을 주사하면 치사량의 카드뮴에 의한 치사작용이 완화되는 효과가 나타났으며 카드뮴의 전 처리의 경과시간은 48시간의 경우에, 전 처리량은 체중 kg당 40 μ moles을 주사한 경우에 효과가 가장 좋았다. 카드뮴을 전 처리한 생쥐는 카드뮴에 의해 치사되는 경우에도 그 생존기간이 최대 72시간까지 연장되었다. 치사량의 카드뮴을 주사한 경우에 카드뮴 전 처리에 의하여 생존한 개체들은 간조직내의 glutathione 함량은 대조군에 비하여 별다른 차이가 없었으나 치사한 개체들은 glutathione 함량이 감소하였고 또한 전처리를 하지 않은 실험군은 치사량의 카드뮴에 의하여 glutathione 함량이 감소하였다. 이러한 실험결과는 치사량 이하의 카드뮴을 생쥐에 전 처리하면 치사작용을 완화하는 인자들이 유도되어 후속 주사하는 치사량의 카드뮴에 의한 치사작용을 완화하고, 간 조직내의 glutathione이 카드뮴 치사작용에 대한 방어인자가 될 수 있음을 암시한다.

서 론

중금속은 여러 기관들에서 독성을 다양하게 나타내지만, 생체는 그 중금속들에 대한 방어 시스템을 가지고 있으며 이 방어 시스템에는 금속결합 단백질 (Mistry *et al.* 1985; Yamamoto *et al.* 1987; Zheng *et al.* 1996), 스트레스 단백질 (Taketani *et al.* 1989; Salminen *et al.* 1996), 항산화 시스템 (Singhal *et al.* 1987; Sumathi *et al.* 1996; Bagchi *et al.* 1996) 등이 있는 것으로 알려지고 있다.

대표적인 중금속의 하나로서 카드뮴에 대한 연구는 활발하게 진행되고 있다. 이러한 연구의 하나로 연구자는 흰쥐에 치사량 이하의 카드뮴을 전 처리하고 일정 시간이 지난 후에 치사량의 카드뮴을 투여한 경우에 흰쥐의 생존율이 증가하였으며, 또한 치사량의 카드뮴에 의해 간 조직의 환원형 glutathione의 함량이 감소되지만 카드뮴을 전 처리하면 치사량의 카드뮴에 의해 glutathione의 함량이 감소되지 않는 것으로 이전의 연구에서 확인되었다(부와 김 1994).

또한 흰쥐와 생쥐에 비소를 오염원으로 한 다른 연구에서도 치사량 이하의 비소를 전 처리한 경우에도 치사량의 비소에 의한 치사독성은 상당한 정도로 완화되어 두 종에서 유사한 결과가 나타났다(부 1996, 1998). 따

라서 치사량의 비소에 의한 간 조직의 glutathione의 함량 감소는 전 처리한 비소에 의해 상당히 완화되었다. 또한 치사량 이하의 아연을 전 처리한 경우에도 카드뮴이나 비소 등의 독성을 완화하는 효과가 있었다(Ishido *et al.* 1995).

이상과 같은 연구결과들로 볼 때 중금속이 해롭기는 하지만 실험동물을 소량의 중금속에 적절하게 노출시키면 오히려 중금속 자체의 독성이 감소하는 효과가 있는 것이 확인되었으므로 본 연구는 생쥐에서 카드뮴의 치사독성이 카드뮴 전처리에 의하여 완화되는지, 그리고 카드뮴 전 처리에 의한 치사독성의 완화효과는 간 조직의 glutathione 함량과 연관성이 있는지를 확인하고자 시도되었다. 또한 이 연구는 비금속 원소인 비소와 중금속인 카드뮴의 작용 양상을 비교하고, 서로 다른 종류의 중금속들을 전 처리한 경우에 독성완화에 관련된 인자들이 중금속 특이성을 갖는지를 조사하기 위한 추가연구의 기초자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험동물로는 표준사료로 사육한 4~5주령 되는 체중 20~30 g 정도의 수컷 생쥐 (*Mus molossinus*) (ICR계)를

Table 1. Effect of cadmium pretreatment doses on cadmium lethality to mice

Cd pretreatment doses ($\mu\text{moles/kg}$)	Intervals between pretreatment and lethal treatment	
	12 hours (alive/total)	24 hours (alive/total)
1	0/10	0/10
5	0/10	1/10
20	0/10	1/10
40	0/10	2/10
80	0/10	2/10

* Mice were subcutaneously injected with 300 $\mu\text{moles/kg}$ of lethal cadmium.

사용하였고 카드뮴 화합물로는 cadmium chloride (Sigma)를 0.1 ml의 생리식염수에 용해하여 사용하였다.

2. 카드뮴 치사량 결정

생쥐에 체중 kg당 염화카드뮴 50, 80, 100, 200, 300, 400, 500 μmoles 을 각각 피하 주사하여 생쥐가 죽는 것을 확인하였다. 카드뮴을 300 $\mu\text{moles/kg}$ 이상 주사한 경우에는 모든 개체가 24시간 이내에 치사하여 이 양을 LD₉₉로 결정하였다.

3. 카드뮴 전 처리 양과 전 처리 경과시간에 따른 치사정도

전 처리할 카드뮴의 양은 1 $\mu\text{moles/kg}$ 에서부터 5, 10, 20, 40, 그리고 치사효과가 나타나지 않은 최대 양인 80 $\mu\text{moles/kg}$ 까지 각각 주사하였고 2그룹으로 나누어 각각 12시간과 24시간이 경과한 후에 치사량의 카드뮴을 투여하여 72시간 동안 관찰하였다. 각 개체의 생존여부를 확인하고 생존율이 가장 높은 경우를 카드뮴의 전 처리 양으로 결정하였다.

전 처리 효과가 가장 좋은 양의 카드뮴을 생체에 전 처리한 후에 경과시간을 3, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168시간으로 각각 달리한 후에 치사량의 카드뮴을 투여하였으며 72시간 동안 관찰하였다. 각 개체의 생존여부를 확인하고 생존율이 가장 높은 경우를 적절한 전 처리 경과시간으로 결정하였다.

4. Cytosol의 분리

생쥐를 경추이탈로 희생시켜 간을 적출한 다음 5% 5-sulfosalicylic acid를 포함하는 10 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4)을 사용하여 Potter-Elvehjem 균질기로 17% (w/v) 균질액을 만들었다. 이 균질액을 20,300 \times g에서 50분간 원심분리하여 상등액을 모아 glutathione을 정량할 시료로 사용하였다. 이상의 모든 과정은 4°C에서 수

Table 2. Effect of intervals between pretreatment and treatment of cadmium on cadmium lethality to mice

Interval between pretreatment and lethal treatment (hours)	Number of animals (alive/total)
3	0/10
6	1/10
12	1/20
24	4/20
48	8/20
72	0/10
120	0/10
168	1/10

* Mice were pretreated with 40 $\mu\text{moles/kg}$ of cadmium, which subsequently injected with 300 $\mu\text{moles/kg}$ of lethal cadmium.

행하였다.

5. Glutathione 정량

Glutathione 정량은 Selig & Meister (1985)의 방법을 수정하여 실시하였다. 즉, 6.5 mM Na₂EDTA, 143 mM sodium phosphate, 6 mM DTNB를 포함하는 반응액에 200 μl 의 시료를 혼합한 1 ml를 20분간 방치한 후에 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액은 환원 형태의 glutathione을 5% sulfosalicylic acid에 용해하여 사용하였다.

결 과

1. 카드뮴 치사량 결정

생쥐에 카드뮴을 50 $\mu\text{moles/kg}$ 에서 500 $\mu\text{moles/kg}$ 까지 각각 주사한 경우에 80 $\mu\text{moles/kg}$ 이하에서는 모든 개체가 생존하였고 300 $\mu\text{moles/kg}$ 이상 주사한 경우에는 모든 개체가 24시간 이내에 치사하였다.

2. 카드뮴 전 처리 양에 따른 치사정도

생쥐에 전 처리할 카드뮴의 양을 1 $\mu\text{moles/kg}$ 에서 80 $\mu\text{moles/kg}$ 까지 각각 주사하고 12시간 또는 24시간이 각각 경과한 후에 치사량의 카드뮴을 투여하여 72시간 동안 관찰하였다. 카드뮴을 전 처리한 후 12시간이 경과한 경우에는 전 처리한 카드뮴의 양에 상관없이 모든 개체가 치사하였다. 24시간이 경과한 경우에는 일부 실험군에서 일부 개체가 생존하였다 (Table 1). 죽은 개체들도 전 처리 양을 5 $\mu\text{moles/kg}$ 이상으로 하였을 경우에는 생존 기간이 연장되었다.

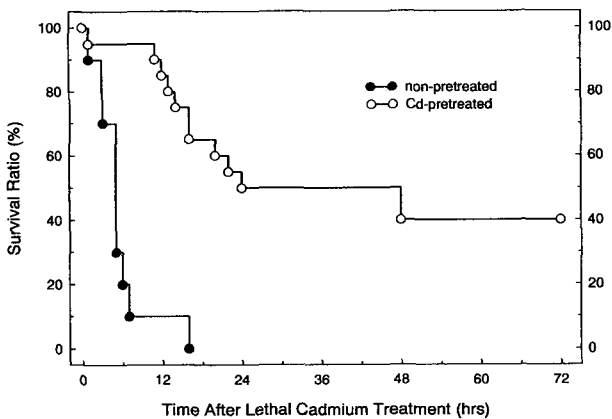


Fig. 1. Effect of cadmium pretreatment on survival of the mice which subsequently injected with lethal Cadmium. Lethal cadmium was treated to mice 48 hours after 40 $\mu\text{moles/kg}$ of Cd pretreatment.

3. 카드뮴 전 처리 경과시간에 따른 치사정도

카드뮴 40 $\mu\text{moles/kg}$ 을 24시간 전처리 한 경우에 치사완화 효과가 비교적 양호하여 40 $\mu\text{moles/kg}$ 을 전 처리 양으로 결정하고, 치사완화 효과가 가장 좋은 전 처리 경과시간을 결정하기 위하여 전 처리 경과시간을 다양하게 하여 실험을 한 결과, 카드뮴 40 $\mu\text{moles/kg}$ 을 전 처리하고 48시간이 경과한 후에 치사량의 카드뮴을 주사한 경우에 치사완화 효과가 가장 컸다 (Table 2). 죽은 개체들도 전 처리 경과시간을 6시간 이상으로 하였을 경우에 생존 기간이 3배까지 연장되었다 (Fig. 1).

4. 간 조직내의 Glutathione 함량

0~40 mg의 glutathione 표준용액의 흡광도는 0~0.332에서 직선구배를 나타내었다. 40 μmoles 의 카드뮴을 주사하고 24시간과 48시간 경과한 후에 치사량의 카드뮴을 주사한 실험군에서 생존한 개체들은 대조군에 비하여 간 조직의 glutathione 함량에 차이가 없었으나 전처리를 하지 않은 실험군은 대조군에 비하여 glutathione 함량이 감소하였다. 카드뮴을 전처리한 실험군내에서도 치사군은 대조군에 비하여 glutathione 함량이 감소하였다 (Table 3).

고 찰

중금속들의 독성작용에 대해 생체의 방어 시스템들이 존재하며 이러한 방어 시스템을 가동시키는 자극원들은 다양하지만 그 가운데 하나가 생체에 독성이 없을 정도의 소량의 중금속을 투여하는 것이다. 그러한 한 연구로

Table 3. Effect of intervals between pretreatment and treatment of cadmium on hepatic glutathione contents

Intervals (hours)	GSH levels ($\mu\text{moles/g}$ tissue)	% of control
control	3.60 ± 0.336	100
non-pretreated	2.75 ± 0.320	76.4
12	3.00 ± 0.308	83.3
24	3.50 ± 0.430 (2.48 ± 0.357)	97.2 (68.9)
48	3.63 ± 0.506 (2.35 ± 0.295)	100.8 (65.3)
72	2.23 ± 0.370	61.9

* Mice were pretreated with 40 $\mu\text{moles/kg}$ of cadmium, which subsequently injected with 300 $\mu\text{moles/kg}$ of lethal cadmium.

* Numbers in parenthesis indicate hepatic GSH levels of the mice just after died.

서 카드뮴을 흰쥐에 주사한 경우에 카드뮴 전 처리에 의해 카드뮴에 의한 치사작용이 완화되는 것을 다른 연구에서 이미 보고하였다 (부와 김 1994).

치사량의 카드뮴 (300 $\mu\text{moles/kg}$)을 생쥐에 주사하면 모든 개체가 24시간 이내에 죽었으나 카드뮴의 전 처리 양 (40 $\mu\text{moles/kg}$)과 전 처리 경과시간 (48시간)을 최적으로 하여 카드뮴을 전 처리한 경우에는 치사량의 카드뮴을 후속 주사하여도 생쥐의 생존율은 40%에 이르며 (Table 2), 죽은 개체들도 그 생존기간은 72시간까지 연장되어 (Fig. 1) 카드뮴의 전 처리에 의해 카드뮴의 치사완화 효과가 유도되었음이 확인되었다. 이러한 실험 결과는 흰쥐를 실험동물로 한 이전의 연구 결과와 일치하며 (부와 김 1994) 카드뮴의 치사량, 카드뮴의 전 처리 양과 전 처리 경과시간도 흰쥐의 경우와 비슷한 경향을 보였다.

비소를 오염원으로 사용한 연구에서도 치사량의 비소에 의한 치사독성이 비소의 전 처리에 의해서 완화되는 것으로 확인되었으며 (부 1996, 1998) 카드뮴의 경우와 비슷한 경향을 보였다.

카드뮴의 전 처리에 의해서 카드뮴의 치사완화 효과가 나타난 것을 볼 때 카드뮴의 치사작용을 완화할 수 있는 인자들이 카드뮴의 전 처리에 의하여 생체 내에 유도되었을 것으로 생각된다. 이는 전 처리한 카드뮴의 양이 너무 적거나 (Table 1), 전 처리 경과시간을 6시간 이하로 너무 짧게 하였거나 72시간 이상으로 너무 길게 하였을 경우에 (Table 2) 전 처리에 의한 치사완화 효과가 나타나지 않는 것으로 알 수 있다. 즉, 전 처리한 양이 너무 적어서 치사완화에 관련된 인자들이 유도되지 못 했거나, 전 처리 경과시간이 너무 짧아서 그 인자들

이 유도될 수가 없거나, 전 처리 경과시간이 너무 길어서 유도된 인자들이 생물학적 활성상태를 잃어버린 때문으로 추정할 수 있다.

카드뮴의 치사완화 인자의 하나로 여겨지는 간 조직의 glutathione 함량이 치사량의 카드뮴에 의해 감소하지만 카드뮴 전 처리에 의해서 glutathione 함량에 변화가 없는 것이 확인되었고(Table 3) 이러한 현상은 흰쥐를 실험동물로 한 연구에서도 확인되었다(부와 김 1994). 또한 다른 연구들에서도 glutathione이 중금속의 항독성 인자로 작용할 것이라고 보고되었다(Singhal *et al.* 1987; Sumathi *et al.* 1996).

따라서 glutathione의 합성이나 대사 등에 관한 세부적인 연구가 필요하며, 카드뮴에 특이성을 갖는 중금속 결합 단백질로 알려진 metallothionein과 여러 종류의 스트레스에 대한 스트레스 단백질의 유도 여부 등 다른 방어인자들에 대해서도 추가 연구가 필요하다.

한편, 비소 처리에 의한 치사작용의 요인에 관한 연구들이 보고되고 있는데 그 요인의 하나로서 세포내의 탄수화물 대사의 이상을 제시하고 있다. 배양 중인 세포에서 많은 양의 비소는 세포를 죽였으나(Yih *et al.* 1994; Ishido *et al.* 1995) 배양액에 첨가한 포도당은 비소의 세포치사를 억제하였다(Liebl *et al.* 1995a). 또한 생쥐에 치사량의 비소를 주사한 후에 포도당을 주사하면 생존시간이 연장되고 죽은 개체는 여러 조직내의 포도당과 글리코젠 함량이 크게 감소하지만 생존한 개체는 그 함량의 변화가 없었다(Reichl *et al.* 1990, 1991). 그리고 비소는 세포의 포도당 흡수를 억제하고(Liebl *et al.* 1995b) 포도당의 신생합성을 억제하며(Szinicz & Forth 1988) 글리코젠의 고갈을 일으키는(Reichl *et al.* 1991; Albores *et al.* 1996) 등 탄수화물 대사에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

그러므로 비금속 물질인 비소와의 비교 연구를 위해서 탄수화물의 대사의 안전성을 확보하는 인자에 카드뮴 전 처리가 미칠 수 있는 효과에 대한 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

- 부문종, 김선희(1994) 흰쥐에서 카드뮴 전처리에 의한 치사방지효과와 간과 뇌의 glutathione과 glucose 수준과의 상관성. *생명과학(삼육대학교부설 생명과학연구소 논문집)* 1 : 7-15.
- 부문종(1996) 생쥐 간의 glutathione과 glucose 함량에 미치는 비소의 영향. *생명과학(삼육대학교부설 생명과학연구소 논문집)* 3 : 13-20.
- 부문종(1998) 비소에 의한 생쥐의 치사독성과 간 글리코젠 함량과의 상관성. *생명과학(삼육대학교부설 생명과학연구소 논문집)* 4 : 44-50.
- Albores A, ME Cebrian, GG Garcia-Vargas, JC Connelly, SC Price, RH Hinton, PH Bach & JW Bridges (1996) Enhanced arsenite-induced hepatic morphological and biochemical changes in phenobarbital-pretreated rats. *Toxicol. Pathol.* 24 : 172-180.
- Bagchi D, M Bagchi, EA Hassoun & SJ Stohs (1996) Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 52 : 43-54.
- Ishido M, ST Homma, PS Leung & C Tohyama (1995) Cadmium-induced DNA fragmentation is inhibitable by zinc porcine kidney LLC-PK1 cells. *Life Sci.* 56 : PL351-356.
- Liebl B, H Muckter, E Doklea, FX Reichl, B Fichtl & W Forth (1995a) Influence of glucose on the toxicity of oxophenylarsine in MDCK cells. *Arch. Toxicol.* 69 : 421-424.
- Liebl B, H Muckter, E Doklea, B Fichtl & W Forth (1995b) Reversal of oxophenylarsine-induced inhibition of glucose uptake in MDCK cells. *Fundam. Appl. Toxicol.* 27 : 1-8.
- Mistry P, GW Lucier & BA Fowler (1985) High-affinity lead binding proteins in rat kidney cytosol mediate cell-free nuclear translocation of lead. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 232 : 462-469.
- Reichl FX, L Szinicz, H Kreppel, B Fichtl & W Forth (1990) Effect of glucose in mice after acute experimental poisoning with arsenic trioxide (As₂O₃). *Arch. Toxicol.* 64 : 336-338.
- Reichl FX, H Kreppel, L Szinicz, B Fichtl & W Forth, (1991) Effects of glucose treatment on carbohydrate content in various organs on mice after acute As₂O₃ poisoning. *Vet. Hum. Toxicol.* 33 : 230-235.
- Salminen WFJr, R Voellmy & SM Roberts (1996) Induction of hsp70 in HepG2 cells in response to hepatotoxicants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141 : 117-123.
- Selig GF & A Meister (1985) Glutathione biosynthesis. pp.379-382. *In Methods in Enzymology* V. 113 (Meister A ed). Academic Press, New York.
- Singhal RK, ME Anderson & A Meister (1987) Glutathione, a first line defense against cadmium. *FASEB J.* 1 : 220-223.
- Sumathi R, G Baskaran & P Varalakshmi (1996) Relationship between glutathione and DL alpha-lipoic acid against cadmium-induced hepatotoxicity. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 49 : 39-48.

- Szinicz L & W Forth (1988) Effect of As_2O_3 on gluconeogenesis. *Arch. Toxicol.* **61** : 449-449.
- Taketani S, H Kohno, T Yoshinaga & R Tokunaga (1989) The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett.* **245** : 173-176.
- Yamamoto A, O Wada & T Ono (1987) Isolation of biologically active low-molecular mass, chromium binding compounds from rabbit liver. *Eur. J. Biochem.* **165** : 627-631.
- Yih LH & TC Lee (1994) A proteolytic activity enhanced by arsenite in chinese hamster ovary cells : possible involvement in arsenite-induced cell killing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202** : 1015-1022.
- Zheng H, J Liu, Y Liu & DD Klaassen (1996) Hepatocytes from metallothionein-I and II knock-out mice are sensitive to cadmium- and tert-butylhydroperoxide-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* **87** : 139-145.

Is Cadmium Pretreatment-Induced Protection against Cadmium Lethality to Mice Related to the Hepatic Glutathione Contents?

Moon Jong Boo

(Department of Biology, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea)

Abstract - Which sublethal cadmium pretreatment may prevent from lethal cadmium's killing mice and which cadmium pretreatment-induced protection against cadmium lethality to mice may be related with their hepatic glutathione contents were investigated. When cadmium chloride was subcutaneously injected to mice (ICR strain) at various doses, all mice died, which treated with cadmium at dose of 300 μ moles/kg or more, and none died, which treated with cadmium at dose of 80 μ moles/kg or less. Subcutaneous pretreatment of sublethal cadmium decreased sacrifice of mice which subsequently injected with lethal cadmium, with most effectiveness at pretreatment dose of cadmium of 40 μ moles/kg b.w. and at 48 hours of interval between sublethal cadmium pretreatment and lethal cadmium treatment. Even if a great part of the cadmium-pretreated mice were sacrificed while treated with lethal cadmium, they survived longer than the non-pretreated mice. Sublethal cadmium pretreatment (40 μ moles/kg b.w.) 48 hours before lethal cadmium treatment to mice didn't decrease hepatic glutathione contents of the survived mice, while decreases in the glutathione in livers were observed in the mice just after died. These results indicate that sublethal cadmium pretreatment-induced protection against cadmium lethality to mice may be related to their hepatic glutathione contents. [Cd pretreatment, Cd lethality, Hepatic glutathione contents].