

카드뮴과 비소의 생쥐 치사독성에 대한 카드뮴과 비소의 교차전처리효과

부 문 종

삼육대학교 생명과학과

Effects of Cross-Pretreatment of Cadmium and Arsenic on Lethality of Cadmium or Arsenic to Mice

Moon Jong Boo

Department of Life Science, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

Abstract - Whether the pretreatment of sublethal arsenic or cadmium may prevent from lethality of arsenic or cadmium to mice, respectively, and also the protection against to lethality of arsenic or cadmium which might be induced by pretreatment of arsenic or cadmium may be related with their hepatic glutathione contents were investigated. When sodium arsenite or cadmium chloride was subcutaneously injected to mice (ICR strain) using lethal doses, all mice of both group were killed. The mortality of mice which were subsequently injected with lethal arsenic 24 hours after pretreatment of sublethal arsenic was decreased, and the same result was obtained in the case of cadmium. Sublethal pretreatment of arsenic or cadmium prior to lethal arsenic or cadmium treatment to mice, respectively, didn't decrease hepatic glutathione contents of the survived mice, while decreases of that contents in liver were observed in the mice just after they died. Cadmium pretreatment decreased mortality of mice which subsequently injected with lethal arsenic, while arsenic pretreatment didn't protect against cadmium lethality. These results indicate that protection against arsenic or cadmium lethality to mice induced by pretreatment of sublethal arsenic or cadmium may be directly related to other factors induced by sublethal camium pretreatment, not to hepatic glutathione contents.

Key words : Cross-pretreatment of Cd and As, Protection against lethality of Cd or As, Hepatic glutathione contents

서 론

카드뮴은 대표적인 환경오염 중금속의 하나로서 카드뮴의 독성과 해독에 관한 연구는 환경오염문제에 대한

관심이 커지면서 초기부터 진행되어 왔으나, 카드뮴 독성에 대한 생체의 방어기전에 관한 연구는 비교적 늦게 시작되었다. 카드뮴 독성에 대한 방어기전의 하나로 카드뮴 특이성을 나타내는 카드뮴결합단백질인 metallothionein에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Coyle *et al.* 2000; Liu *et al.* 2000). 카드뮴 독성에 대한 방어기전의 하나로 비특이적인 것으로는 glutathione (Shukla *et*

* Corresponding author: Moon Jong Boo, Tel. 02-3399-3563, Fax. 02-971-6812, E-mail. boomj@syu.ac.kr

al. 2000), stress protein (Abe et al. 2000; Almazan et al. 2000)이 관여하는 것으로 알려지고 있다. 비소 또한 환경오염물질의 하나이지만 비금속물질로서 그 독성작용이 카드뮴과는 다를 것으로 추측되지만 카드뮴과 비소에 대한 생체의 방어기전에는 공통된 인자들이 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Alvares et al. 1992; Chen and Whang 1994; Hochadel and Waalkes 1997; Shimizu et al. 1998).

본 연구는 여러 환경오염물질들의 독성에 대하여 생체가 나타내는 방어인자로서 여러 오염물질들에 공통적인 특성을 가진 것들을 탐색하기 위하여 시도되었다. 따라서 이 연구는 먼저 생쥐에 비소를 전처리한 경우에 치사량의 비소에 의한 생쥐의 치사독성이 완화되는지, 카드뮴을 전처리한 경우에 치사량의 카드뮴에 의한 치사독성이 완화되는지를 조사하였다. 그리고 이 완화효과는 간조직의 glutathione 함량과 상관이 있는지를 조사하였다. 그리고 이를 토대로 하여, 면역원성이 없는 환경오염물질에 대한 생체의 방어작용의 공통 인자를 탐색하기 위하여, 카드뮴의 독성이 비소의 전처리에 의하여 완화될 수 있는지, 비소의 독성은 카드뮴의 전처리에 의하여 완화될 수 있는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물로는 표준사료로 사육한 4~5주령 되는 체중 20~30 g 정도의 수컷 생쥐 (*Mus molossinus*) (ICR계)를 사용하였고, 비소화합물로는 sodium arsenite를 카드뮴화합물로는 cadmium chloride를 0.1 ml의 생리식염수에 용해하여 사용하였다.

2. 비소와 카드뮴의 치사독성과 전처리 조건결정

생쥐에 피하주사한 경우에 LD₉₉로 확인된 비소와 카드뮴을 체중 kg당 sodium arsenite 150 μ moles과 cadmium chloride 300 μ moles을 각각 피하주사하여 치사독성을 확인하였다. 비소와 카드뮴의 치사독성을 완화시키는데 최적의 전처리시간과 전처리 양을 결정하여, 이 최적조건으로 비소와 카드뮴을 전처리한 경우에 비소와 카드뮴 각각의 치사독성을 완화시키는 정도를 확인하였다. 비소와 카드뮴의 치사독성을 완화시키는 효과가 가장 좋은 비소와 카드뮴 전처리 양은 각각 체중 kg당 sodium arsenite 10 μ moles과 cadmium chloride 40 μ moles 이었고, 전처리 경과시간은 24시간이었다.

3. 비소와 카드뮴의 치사독성에 대한 비소와 카드뮴의 교차전처리 효과

한 실험군에는 체중 kg당 카드뮴 40 μ moles을 주사하여 24시간이 지난 후에 치사량의 비소 150 μ moles을 주사하고, 다른 실험군에는 비소 10 μ moles을 주사하여 24시간이 지난 후에 치사량의 카드뮴 40 μ moles을 주사하였다. 두 실험군 모두 치사량을 주사한 후 72시간 동안 관찰하여 각 개체의 생존여부를 확인하였다.

4. Cytosol의 분리

치사량의 비소와 카드뮴을 주사하여 죽은 개체는 죽은 직후 바로 간을 적출하였고, 생존한 개체는 경추이탈로 희생시켜 간을 적출하였다. 적출한 간조직은 5% 5-sulfosalicylic acid를 포함하는 10 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4)을 사용하여 Potter-Elvehjem 균질기로 17% (w/v) 균질액으로 만들었다. 이 균질액을 20,300 \times g에서 50분간 원심분리하여 상등액을 모아 glutathione을 정량할 시료로 사용하였다. 이상의 모든 과정은 4°C에서 수행하였다.

5. Glutathione 정량

Glutathione 정량은 Selig and Meister (1985)의 방법을 수정하여 실시하였다. 즉, 6.5 mM sodium ethylenediaminetetraacetate (Na₄EDTA), 143 mM sodium phosphate, 6 mM dithio-nitrobenzoic acid (DTNB)를 포함하는 반응액에 200 μ l의 시료를 혼합한 1 ml를 20분간 방치한 후에 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액은 환원 형태의 glutathione을 5% sulfosalicylic acid에 용해하여 사용하였다.

결 과

1. 비소와 카드뮴의 치사독성에 대한 비소와 카드뮴의 전처리 효과

생쥐에 치사량의 비소 150 μ moles을 주사한 경우에 주사한 모든 개체는 8시간 이내에 죽었고, 10 μ moles의 비소를 전처리 한 경우에 치사량의 비소에 의한 치사독성은 완화되어 50%가 생존하였다 (Fig. 1).

생쥐에 치사량의 카드뮴 300 μ moles을 주사한 경우에 주사한 모든 개체는 17시간 이내에 죽었고, 40 μ moles의 카드뮴을 전처리 한 경우에 치사량의 카드뮴에 의한 치사독성은 완화되어 40%가 생존하였다 (Fig. 2).

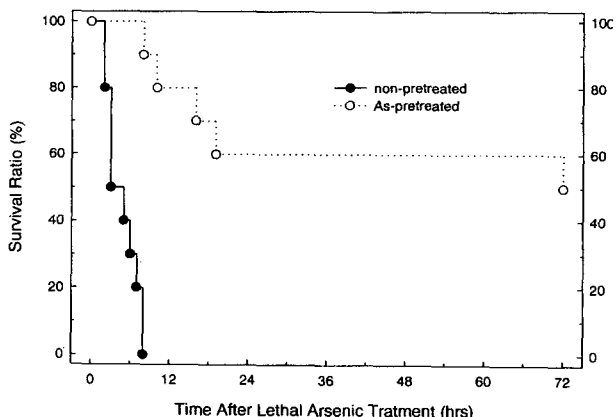


Fig. 1. Effect on arsenic pretreatment on survival of the mice which subsequently injected with lethal arsenic. 10 mice were used for each group.

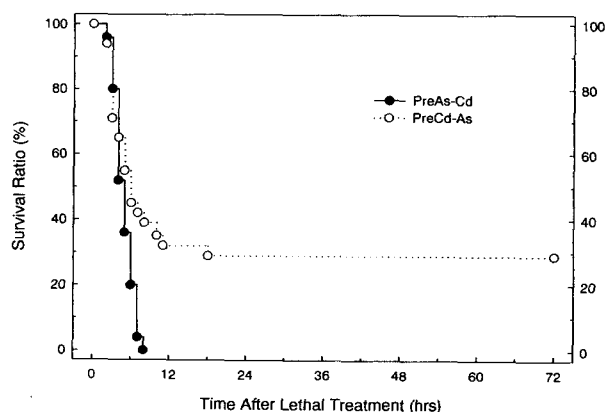


Fig. 3. Effect of cross-pretreatment of arsenic and cadmium on survival of mice which subsequently injected with lethal cadmium and arsenic, respectively. 40 mice were used for each group.

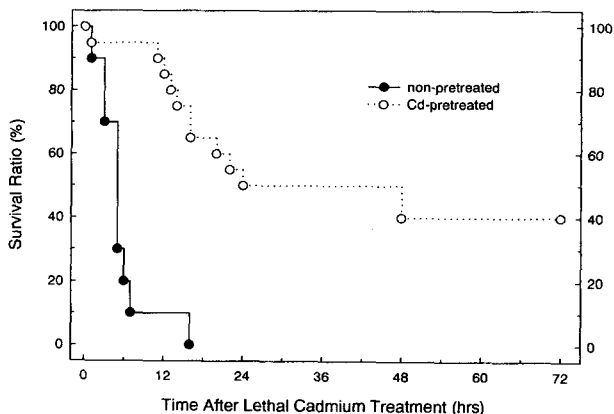


Fig. 2. Effect of cadmium pretreatment on survival of the mice which subsequently injected with lethal cadmium. 10 mice were used for each group.

비소나 카드뮴을 전처리한 후 24시간이 경과한 개체에서 간 조직의 glutathione 함량은 대조군과 별다른 차이가 없었다.

2. 비소와 카드뮴의 치사독성에 대한 비소와 카드뮴의 교차전처리 효과

생쥐에 40 μmoles 의 카드뮴을 전처리 하여 24시간이 지난 후에 치사량의 비소 150 μmoles 을 주사한 경우에 비소에 의한 치사독성은 완화되어 30%가 생존하였고, 생쥐에 10 μmoles 의 비소를 전처리 하여 24시간이 지난 후에 치사량의 카드뮴 300 μmoles 을 주사한 경우에 모든 개체가 죽었다(Fig. 3).

Table 1. Effect of Pretreatment of Arsenic or Cadmium on Hepatic Glutathione Contents of mice treated with lethal arsenic or cadmium, respectively

Groups	GSH levels ($\mu\text{moles/g}$ tissue)	% of control
Control	3.60 ± 0.336	100.0
preAs-As	3.69 ± 0.320 (1.89 ± 0.285)	102.5 (52.5)*
preCd-Cd	3.50 ± 0.430 (2.48 ± 0.357)	97.2 (68.9)*

Data were expressed as mean \pm S.D. with 4 experiments. Mice were pretreated with 10 $\mu\text{moles/kg}$ of arsenic or 40 $\mu\text{moles/kg}$ of cadmium, which subsequently injected with 150 $\mu\text{moles/kg}$ of lethal arsenic or 300 $\mu\text{moles/kg}$ of lethal cadmium, respectively. Values in parenthesis indicate hepatic GSH levels of the mice just after they died.

*: $p < 0.005$ (compared to control)

3. 치사완화효과와 간 조직 내 Glutathione 함량과의 상관성

비소와 카드뮴을 각각 전처리한 후에 치사량의 비소와 카드뮴을 주사한 경우에 생존한 개체의 간 조직 내 glutathione 함량은 대조군과 별다른 차이가 없었으나 죽은 개체의 간 조직 내 glutathione 함량은 두 처리군 모두에서 감소하였다(Table 1).

고 찰

환경오염물질은 분자량이 작은 간단한 유기물이거나 무기물들이다. 따라서 이들의 독성작용에 대한 생체의 방어 시스템은 면역원과는 다른 방법으로 존재할 것으로 생각된다. 이러한 방어 시스템은 항원의 경우처럼 생

체에 독성이 없을 정도의 소량의 환경오염물질을 투여 하면 가동되어 그 이후에 연속적으로 노출되는 오염물질의 독성을 완화시킬 수 있다(Hochadel and Waalkes 1997; Romach *et al.* 2000).

치사량의 비소를 주사하기 24시간 전에 치사량 이하의 비소를 전처리하면 치사량의 비소에 의한 치사독성이 50%정도 완화되었고 죽은 개체들도 생존기간이 상당기간 연장되었다(Fig. 1). 이와 비슷한 현상은 카드뮴의 경우에도 나타났다(Fig. 2). 이 두 결과로써 전처리한 비소와 카드뮴에 의하여 생체에서 유도된 어떠한 인자가 비소와 카드뮴의 치사독성을 완화시킨 것임을 추측할 수 있다.

비소나 카드뮴과 같은 여러 독성물질에 대한 공통적 방어인자의 하나로 glutathione이 제시되고 있다(Shimizu *et al.* 1998; Singhal *et al.* 1987; Sumati *et al.* 1996). glutathione은 세포 내에 비교적 많은 양으로 존재하면서 항산화작용과 이물질과의 접합(conjugation) 등을 통하여 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서도 비소와 카드뮴의 치사독성 완화에 glutathione이 관련되어 있는지를 조사하였다. 비소와 카드뮴을 전처리 한 경우에 생존한 개체들은 간조직 내 glutathione 함량이 대조군과 별다른 차이가 없었으나 죽은 개체들은 glutathione 함량이 상당량 감소하였다(Table 1). 따라서 비소와 카드뮴의 전처리에 의하여 비소와 카드뮴의 치사독성이 완화된 것은 간조직 내의 glutathione 함량과 상관이 있는 것으로 생각된다. 즉, 전처리한 비소나 카드뮴에 의하여 glutathione 합성을 촉진시켜(Picioto and Graziano 1980; Shukla *et al.* 2000) glutathione 함량을 정상적인 농도로 유지한 것으로 생각된다. Glutathione은 비소나 카드뮴에 결합하여 체내에 있는 비소나 카드뮴의 독성작용을 억제하므로 세포 내의 glutathione 함량은 비소와 카드뮴의 치사독성 완화에 관련이 있는 것으로 생각된다.

Glutathione이 여러 독성물질에 공통적으로 작용하는 방어인자의 하나라면 비소의 치사독성은 카드뮴 전처리에 의해서도 완화되어야 하며 이와 같은 완화효과는 비소를 전처리한 후 치사량의 카드뮴을 주사한 경우에도 똑같이 나타나야 한다. 본 연구에서 비소의 치사독성은 카드뮴 전처리에 의하여 완화되었으나 카드뮴의 치사독성은 비소 전처리에 의하여 완화되지 않았다(Fig. 3). 비소와 카드뮴을 독립적으로 주사한 경우에 두 경우 모두 치사독성이 완화되는 효과가 있었으나 비소와 카드뮴을 서로 교차하여 처리한 경우에는 카드뮴을 전처리한 경우에만 치사독성이 완화되었다. 이러한 결과는 간조직의 glutathione 함량이 비소나 카드뮴의 치사독성 완화와는

직접적인 관련이 없음을 의미하며, 세포수준에서 비소의 전처리에 의한 비소의 독성완화 효과는 세포내의 glutathione 함량과 직접적인 관련이 없다는 Romach *et al.* (2000)의 연구와도 유사하다. 따라서 카드뮴의 전처리에 의하여 생체에서 유도된 어떠한 방어인자가 카드뮴과 비소의 치사독성을 공히 완화시킨 것으로 생각되며, 비소와 카드뮴의 전처리에 의하여 방어인자가 유도되는 양상이 각각 다를 가능성도 있을 것으로 생각된다.

한편, Hochadel and Waalkes (1997)에 의하면 흰쥐를 재료로 한 실험에서 비소(22.5 $\mu\text{moles/kg}$)를 전처리하고 24시간 후에 많은 양의 카드뮴(30 $\mu\text{moles/kg}$)을 주사한 경우에는 카드뮴에 의한 치사독성이 상당한 수준으로 완화되었으나, 카드뮴(3 $\mu\text{moles/kg}$)을 전처리한 후에 많은 양의 비소(90 $\mu\text{moles/kg}$)를 주사한 경우에는 비소의 치사독성이 완화되지 않았다. 이 연구결과는 카드뮴을 전처리한 경우에 비소의 치사독성이 완화된 본 연구결과와는 상반된다. 각 실험군 당 10마리의 흰쥐를 재료로 한 Hochadel and Waalkes (1997)의 연구결과와 각 실험군 당 40마리의 생쥐를 재료로 한 본 연구가 상반되는 결과를 얻은 것은 실험재료의 차이에서 오는 것인지, 아니면 실험동물의 치사효과에 사용된 실험동물의 수가 너무 적은 때문에 생긴 실험상의 오차인지는 더 확인해야 할 것이다. 어쨌든 두 상반된 연구결과로부터 얻은 공통적인 현상은 비소와 카드뮴을 서로 교차 전처리한 경우에 비소나 카드뮴의 치사독성 완화효과는 각 한 경우에서만 나타났다는 것이다.

그리고 Hochadel and Waalkes (1997)는 비소의 전처리에 의하여 간조직의 metallothionein은 8배 이상 증가하지만 카드뮴을 전처리한 경우에는 26배 이상 증가하므로 비소 전처리에 의한 카드뮴의 치사독성 완화는 간조직에서 합성된 metallothionein과는 직접적인 관련이 없을 것이라고 하였으며, 다른 연구에서도 이와 유사한 연구결과가 보고되었다(Romach *et al.* 2000). 따라서, 카드뮴이나 비소에 의하여 간조직에서 합성이 유도되는 metallothionein도 여러 환경오염물질의 독성에 대한 공통적인 방어인자로서 작용할 가능성은 작다고 생각된다.

다른 한편, 세포나 개체 수준에서 비소(Li, 1983; Taketani *et al.* 1989)나 카드뮴(Salminen *et al.* 1996; Abe *et al.* 2000; Almazan *et al.* 2000) 등 여러 종류의 스트레스를 받은 경우에 세포에서는 여러 종류의 스트레스 단백질(stress protein)이 유도되며 이 단백질은 생체의 방어에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그리고 이 단백질에 의한 생체의 방어작용은 스트레스의 종류에 비교적 특이성이 없는 것 같다. 따라서 카드뮴과 비소에 의하여 생체에서 스트레스 단백질이 유도되는지 그리고

이 유도된 단백질이 비소나 카드뮴 전처리에 의하여 비소와 카드뮴의 치사독성이 완화되는 효과와 관련성이 있는지를 조사할 필요가 있는 것으로 생각된다.

또 다른 방어인자로서 혈중 포도당 농도가 제시되고 있는데 (Szinicz and Forth 1988; Reichl *et al.* 1990, 1991; Liebl *et al.* 1995a, b; Coyle *et al.* 2000), 혈당의 급격한 저하는 뇌조직에 치명적인 영향을 초래하여 치사독성과 관련이 있을 것이므로 혈당 농도의 관련성도 함께 조사되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

생쥐에서 카드뮴이나 비소의 전처리에 의하여 카드뮴과 비소의 치사독성이 완화되는 효과가 카드뮴과 비소를 교차 전처리 한 경우에도 이 같은 효과가 나타나는지를 조사하였다. 치사량의 비소를 주사하기 전에 치사량 이하의 비소를 생쥐에 주사하면 치사량의 비소에 의한 치사작용이 완화되는 효과가 나타나며 카드뮴 전처리에 의해서도 카드뮴의 치사독성은 완화되었다. 두 경우에서 생존한 개체의 간조직의 glutathione 함량은 대조군과 별 차이가 없었으나 치사한 개체는 그 함량이 상당량 감소하였다. 이러한 결과는 카드뮴이나 비소의 전처리에 의하여 카드뮴과 비소의 치사독성이 완화되는 효과가 간조직의 glutathione 함량과 관련이 있음을 제시한다. 치사량의 카드뮴을 주사하기 24시간 전에 치사량 이하의 비소를 전처리한 경우에 카드뮴의 치사독성은 완화되지 않았으나 치사량의 비소를 주사하기 24시간 전에 카드뮴을 전처리한 경우에 비소의 치사독성은 완화되었다. 이상과 같은 실험결과는 간조직의 glutathione 함량이 카드뮴이나 비소의 치사독성 완화효과에 직접적인 관련성은 있는 것이 아니라, 카드뮴 전처리에 의하여 유도된 어떤 다른 인자들이 후속 주사하는 치사량의 카드뮴에 의한 치사독성을 완화하고, 이 인자들 중에는 비소의 치사독성도 완화할 수 있는 공통의 인자가 존재함을 암시한다.

참 고 문 헌

- Abe T, O Yamamoto, S Gotoh, Y Yan and N Todaka. 2000. Cadmium-induced mRNA expression of Hsp32 is augmented in metallothionein-I and -II knock-out mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 382:81-88.
- Almazan G, H Liu, A Khorchid, S Sundarajan, AK Martinez-Bermudez and S Chemtob. 2000. Exposure of developing oligodendrocyte to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 29:858-869.
- Alvares A, J Koropatnick, MG Cheria and AJ Zelazowski. 1992. Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 85:127-140.
- Chen CL and PD Whanger. 1994. Interaction of selenium and arsenic with metallothionein: effect of vitamin B12. *J. Inorg. Biochem* 54:267-276.
- Coyle P, G Niezing, TL Shelton, JC Philcox and AM Rofe. 2000. Tolerance to cadmium hepatotoxicity by metallothionein and zinc: in vivo and in vitro studies with MT-null mice. *Toxicology* 150:53-67.
- Hochadel JF and MP Waalkes. 1997. Sequence of exposure to cadmium and arsenic determines the extent of toxic effects in male Fischer rats. *Toxicology* 116:89-98.
- Li GC. 1983. Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol. *J. cell. Physiol.* 115:116-122.
- Liebl B, H Muckter, E Doklea, B Fichtl and W Forth. 1995a. Reversal of oxophenylarsine-induced inhibition of glucose uptake in MDCK cells. *Fundam. Appl. Toxicol.* 27:1-8.
- Liebl B, H Muckter, E Doklea, FX Reichl, B Fichtl and W Forth. 1995b. Influence of glucose on the toxicity of oxophenylarsine in MDCK cells. *Arch. Toxicol.* 69:421-424.
- Liu Y, J Liu, SM Habeebu, MP Waalkes and CD Klassen. 2000. Metallothionein-I/II null mice are sensitive to chronic oral cadmium-induced nephrotoxicity. *Toxicol. Sci.* 57:167-176.
- Picioto PT and JH Graziano. 1980. Induction of mucosal glutathione synthesis by arsenic. *Biochim. Biophys. Acta* 628:241-243.
- Reichl FX, H Kreppel, L Szinicz, B Fichtl and 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.
- Reichl FX, L Szinicz, H Kreppel, B Fichtl and W Forth. 1990. Effect of glucose in mice after acute experimental poisoning with arsenic trioxide (As₂O₃). *Arch. Toxicol.* 64:336-338.
- Romach EH, CQ Zhao, LM Del Razo and ME Chebrian. 2000. Studies on the mechanisms of arsenic-induced self tolerance developed in liver epithelial cells through continuous low-level arsenite exposure. *Toxicol. Sci.* 54:500-508.

- Salminen WFJr, R Voellmy and SM Roberts. 1996. Induction of hsp70 in HepG2 cells in response to hepatotoxins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141:117-123.
- Selig GF and A Meister. 1985. Glutathione biosynthesis. pp.379-382. In *Methods in Enzymology V.113* (Meister A ed). Academic Press, New York.
- Shimizu M, JF Hochadel, BA Fulmer and MP Waalkes. 1998. Effect of glutathione depletion and metallothionein gene expression on arsenic-induced cytotoxicity and c-myc expression in vitro. *Toxicol. Sci.* 45:204-211.
- Shukla GS, J Chiu and BA Hart. 2000. Cadmium-induced elevations in the gene expression of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology* 151:45-54.
- Singhal RK, ME Anderson and A Meister. 1987. Glutathione, a first line defense against cadmium. *FASEB J.* 1: 220-223.
- Sumathi R, G Baskaran and 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 and W Forth. 1988. Effect of As₂O₃ on gluconogenesis. *Arch. Toxicol.* 61:449-449.
- Taketani S, H Kohno, T Yoshinaga and 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.

(Received 25 March 2001, accepted 30 May 2001)