

## 카드뮴으로 유발된 생쥐 간독성에 대한 키토산올리고당의 효과

윤 중 식\*, 노 영 복  
조선대학교 자연과학대학 생물과학부

### Effects of Chitosan oligosaccharide on the Mouse Hepatotoxicity Induced by Cadmium

Jung-Sik Yoon\* and Young-Bok Roh

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chosun University

(Received November 21, 2002; Accepted December 10, 2002)

#### ABSTRACT

This research was conducted to determine the effects of chitosan oligosaccharide on liver poisoning induced by cadmium (Cd). Three groups of mice were used in this research. The group was only injected with cadmium (5.0 mg/kg; i.p.) (group Cd) and the other group was injected with cadmium and chitosan oligosaccharide (0.5% solution) at the same time (group Cd+Chi). In order to investigate the inhibitory action of chitosan oligosaccharide on liver damage, cadmium concentration in liver tissues and metallothionein (MT) concentration were relatively measured. In addition, histological observations were made to determine the morphologic injury of liver tissues.

Cadmium concentration in liver tissues was drastically lower in groups Cd+Chi than in group Cd. MT concentration in liver tissues was lower in group Cd than in groups Cd+Chi.

As the result of electron microscopic observation, mitochondria in group Cd showed a severe swelling phenomenon, RER fragment and ribosome dropout. However, in groups Cd+Chi, mitochondria with high electron density were distributed and RER forming a typical lamellae with ribosome was observed.

From these results, cadmium toxicity on rat liver tissues could be lessened by chitosan oligosaccharide.

**Key words :** Cadmium chloride, Chitosan oligosaccharide, Liver

#### 서 론

염기성 폴리머인 키텐(chitin)은 *N*-아세틸글루코사민 (GlcNAc)이  $\beta$ -1,4 결합한 다당류로서 새우, 게 등

의 갑각류의 외골격과 조류나 균류와 같은 식물의 세포벽에 함유되어 자연계에 널리 분포되어 있다 (Knorr, 1984). 그러나 키텐은 유기용매에 대한 용해성이 좋지 않아서 셀룰로스만큼 이용되지 못하였지만 물, 각종 유기용매, 산, 알칼리에 불용성인 천연 고

\* Correspondence should be addressed to Dr. Young-Bok Roh, Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chosun University, #375 Seosuk-dong, Kwangju, 501-759, Korea. Ph.: 062-230-6654, FAX: 062-230-7984  
Copyright © 2002 Korean Society of Electron Microscopy

분자로서 고온에서 강알칼리로 처리하면 70~95%의 acetyl기가 떨어지고 free amino group을 가진 chitosan이 만들어진다. 키토산(chitosan)은 D-글루코사민(GlcN)이  $\beta$ -1,4 결합한 구조를 가지고 있다. 키토보다 분자량이 약간 작고 초산 등 묽은 산에 녹는 성질을 지니며 free amino group이 존재하여 다가양이온성, 착화성, 분산성을 형성하는 성질이 있다(Austin et al., 1981). 하지만 키토, 키토산은 그 자체로서 대단히 고분자 물질이고 또한 셀룰로오스와 같이 사람의 소화관에서 흡수되지 못한다. 즉 사람의 소화관에는  $\beta$ -1,4 glycoside 결합을 분해할 수 있는 효소가 존재하지 않는다(Weiner, 1991). 따라서 키토, 키토산의 생체 내 활성물질로서 활용하기 위해서는 효율적인 생체 적합성을 가지고 있는 올리고당을 이용할 필요가 있다.

키토산은 무해, 무독성, 생분해성 등의 특성을 지니고 있으며, 희석산 용매 등에 쉽게 용해되는 특징을 이용하여 폐수처리제 혹은 중금속 흡착제(Bough & Landes, 1976; Landes & Bough, 1976), 의약품 재료로서 인공피부(Prudden et al., 1970; Nakajima et al., 1986), 생물공학적 재료로서 효소 고정화용 담체(Spagna et al., 2001), 크로마토그래피용 수지 및 기능성막(Dureja et al., 2001; Janes et al., 2001) 등 대부분 고분자물질로서 이용되어 왔다. 최근 키토, 키토산 및 그 유도체가 면역증강 및 항암작용(Nishimura et al., 1986; Suzuki et al., 1986), 항균활성(Amako et al., 1987), 체내 콜레스테롤 개선작용(Chen & Chen, 1998; Ormrodd et al., 1998) 등 여러 가지 생리활성을 가지고 있다는 사실이 밝혀짐으로써 현재 생리기능성 신소재로서 연구개발이 활발히 진행되고 있다. 키토산의 중요한 성질중의 하나는 전이금속과 결합할 수 있다는 것이다. 키토산은 금속이온과 배위결합을 하여 복합체를 형성하기 때문에 Fe, Cu, Mg와 같은 유용한 이온을 흡착할 뿐만 아니라 Cd, Hg, Pb, Ni, Cr과 같은 유독한 금속이온을 제거하는데 사용된다(Muzzarelli et al., 1972). Sakaguchi et al.(1981)은 chitin과 chitosan의 인산유도체의 합성 및 이들의 중금속과 우라늄 이온들에 대한 흡착 효과를 발표하였고, Eiden et al.(1980)은 Cr(III)과 Pb(II)의 흡착에 있어서도 chitin보다 chitosan이 더 우수하다고 보고하였으며, Muzzarelli et al.(1969)은 pH 5.8 이상의 중성영

역에서 금속이온흡착능을 이용한 chelation chromatography 담체로서의 기능을 보고한 바 있다.

카드뮴(Cadmium, 이하 Cd라 함)은 출생시에는 존재하지 않으나 살아가는 동안 공기중의 분진에 함유된 Cd가 호흡기를 통하여 흡수되는 경로와 음식물에 함유된 Cd가 소화기를 통하여 체내에 유입되면 쉽게 배설되지 않으며, 생물학적 반감기도 16년 이상으로 나이가 들어갈수록 Cd의 체내 축적은 증가하게 된다(Webb, 1972). 일단 체내에 유입된 Cd는 적혈구와 결합하여 혈중내로 이행되어지는데 혈장내에선 고분자 단백질 특히 알부민과 결합하여 주로 간으로 이행되어지고(Nordberg, 1978; Kowal et al., 1979), 일부는 thionein과 결합하여 cadmium-metallotionein(Cd-MT)의 복합체를 형성하여 Cd를 간과 신장조직으로부터 격리시킴으로써 Cd 독성을 완화시키는 것으로 알려져있다(Leber & Miya, 1976; Squibb et al., 1976; Cherian & Nordberg, 1983).

Cd에 의한 조직 손상은 metallotionein과 결합하지 않은 유리 카드뮴에 의해 일어나며 단백질 및 세포막의 sulfhydryl기에 작용하여 생체내의 주요 효소의 활성도를 변화시키고 세포막의 구조적 변화를 초래하는 것으로 보고되어 있다(Chan & Cherian, 1992). 주요 Cd중독 증세로는 효소 활성을 저해하여 나타나는 단백뇨(Piscator, 1966), 아미노산뇨(Goyer et al., 1972), 성장장애(Webster, 1978), 과황당증(Medesani et al., 2001), 과지질증(Ramirez & Gimenez, 2002) 등이 있으며, 조직의 형태를 변화시킴으로써 나타나는 증상으로는 간독성(Anderson & Anderson, 1988), 맥관계 질환(Basavaraju & Jones, 1998), 빈혈(Liu et al., 1999), 생식선 손상(Lafuente et al., 2000), 골장애(Oda et al., 2001), 신장독성(Garrett et al., 2002)등이 보고되고 있다. 위와 같은 Cd 중독의 예방 및 치료 방법에 대한 많은 연구 결과에 의하면, 치사량 투여 후 동물의 생존율을 향상시키기 위한 처치로 노분비 증가에 의한 Cd의 배출을 촉진시키거나 여러 조직내에서 Cd를 착화시키는 착화제를 구강 혹은 복강 투여하였다(Cantilena & Klaassen, 1981).

일반적으로 인체에는 세포를 이물질로부터 보호하는 수많은 방어물질들이 존재하는데 그 중의 하나가 세포내 티올(intracellular thiols)이다. 티올은 핵산화성

을 띠고 있으며 전자친화성을 가진 중금속, alkylating agents를 비롯한 몇 가지 항암제, 그리고 유해한 화합물들과 결합하여 이들을 무해한 수용성 산물로 전환시키는 역할을 한다. Metallothionein (이하 MT라 함)은 세포에 존재하는 가장 풍부한 티올 단백질이다 (Schilder et al., 1990).

MT는 매우 높은 수준의 금속(카드뮴, 아연, 구리)을 함유하고 황을 가진 저분자량(포유류의 경우 6.8 kDa MW) 단백질이다. 이 단백질은 1957년 Margoshes와 Vallee에 의해 말의 신장피질에서 카드뮴이 축적되는 기전을 연구하는 과정에서 카드뮴결합단백질로 발견된 이래로 전세계의 수많은 연구자들에 의해 생물학적 기전이 연구되고 있다 (Margoshes & Vallee, 1957). 지금까지 밝혀진 MT의 주된 생화학적 특징은 분자량이 매우 작고(10,000 이하), 금속함유량이 높으며(4~12 atoms/mole), 시스테인(cysteine) 함량(22~33%)이 높은 대신 방향족 및 소수성 아미노산과 히스티딘(histidine)이 없는 특이한 아미노산 조합을 보이고 있고, 금속 티올산(thiolates)의 시각적 배열에서의 특이성이 있다. 그리고 시스테인잔기 부위가 고정되어 있는 특이한 아미노산 서열구조로 되어 있다는 것이다(Ohta et al., 1993).

설치류를 비롯한 포유류 세포에서는 MT-I과 II는 대부분 기관의 많은 세포에서 발생의 모든 단계에서 발현된다(Palmiter, 1987). MT-III는 신경교와 남성생식기관뿐만 아니라 신경원에서 우선적으로 발현된다(Uchida et al., 1991; Masters et al., 1994). MT-IV는 분화중인 중추신경계에서 발현된다(Quaife et al., 1994). 이러한 MT의 구조적 특성과 세포내 발현을 조절하는 전사조절계에 대해서 많은 연구가 되어지고 있다(Hidalgo et al., 2001).

MT는 생물학적으로 필수 금속에 속하는 아연, 구리 등에 대한 세포내의 가장 풍부한 수용체로 존재하며 조직과 세포수준에서 이러한 금속들에 흡수 및 항상성 기전에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다(Ohta et al., 1993). 또한 MT는 Cd와 같은 중금속에 의해 세포내 합성이 유도되는데 중금속이 체내에 흡수될 경우 주로 간 및 신장조직에서 MT의 합성이 증가되므로써 중독성을 무독성의 물질로 만들어 그 독성을 완화시키며 간조직에서 신장조

직으로 중금속을 운반하여 뇨를 통한 중금속의 체외 배설을 돕는다(Hidalgo et al., 1992). 일반적으로 MT는 중금속들에 의해서 직접적 형성이 용이하나 알콜 또는 감염, 영양상태와 그밖의 여러 가지 스트레스나 환경적 요인에 의해서도 간접적 형성이 유도되는 것으로 알려져 있으며 또한 중금속의 투여경로에 따라서도 그 형성 정도에 차이가 있는 것으로 밝혀져 있다(Oh et al., 1978; Waalkes et al., 1984).

이러한 생체 자체의 방어작용에 앞서 지금까지 사용되는 중금속 해독제로는 penicillin의 유도체 중의 하나인 penicillamine으로 소화관에서 잘 흡수되는 장점을 가지고 있으나, 백혈구 감소증, 빈혈 등을 유발할 수 있는 것으로 알려졌다(Cantilena & Klaassen, 1981). 또한 Ca, Na-EDTA가 사용되었는데 이것은 중금속과 강한 친화성 착화제이지만 신장독성을 유발한다(Hilmy et al., 1986). 이와 같은 화학적 착화제의 문제점으로 인해, 최근에는 부작용이 없는 천연 착화제로의 연구가 진행중이다(Bough & Landes, 1976).

본 연구에서는 위와 같은 연구 흐름을 통해 천연 착화제로 이용되고 있는 키토산올리고당을 이용하여 카드뮴 중독에 따른 간조직내의 카드뮴 농도와 MT 농도를 측정하고, 형태학적 변화를 관찰하기 위해 전자현미경적 관찰을 시도하여 키토산올리고당의 처치에 따른 카드뮴 간독성 완화에 대해 연구를 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 실험동물들은 삼육축산(주)에서 8~10주령 된 체중이  $25 \pm 2$  gm 내외의 외관상 건강한 ICR계 웅성 mouse를 분양받아 사용하였다. Mouse를 polycarbonate cage ( $40 \times 25 \times 17$  cm)에 담아 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 5\%$ 의 최적 환경조건을 유지시킨 실험실의 animal chamber (HB-404AS)에서 사육하였으며, 사료와 급수는 자유롭게 공급하였다. 채광은 12시간 주기로 하였고, 깔짚은 하루에 두 번씩 갈아주었다.

### 2. 실험동물 구분

먼저 실험동물을 카드뮴만을 단독으로 투여한 군

(Group Cd), Cd과 chitosan oligosaccharide를 동시투여한 군(Group Cd+Chi)으로 구분하였다. 다시 모든 군은 Cd 투여후 24, 48, 72 및 168시간 경과군으로 세분하였다. 그리고 정상군(Group Normal)에는 0.9% 생리식염수만을 복강투여하였다. 각 군당 40마리씩 배정하여 총 120마리로 하였다. Cadmium은  $CdCl_2$ 을 2차 증류수에 희석시켜 복강투여 (5.0 mg/kg) 하였다. chitosan oligosaccharide (centi poise 5 이하, deacetyltaion 90% 이상, pH 7.4)은 수용성으로서 분자량 20,000 이하의 이코바이오제품을 생리식염수에 녹여서 0.5% solution으로 만들어 음용수로 공급하였다.

### 3. 생화학적 분석

#### 1) 간조직의 카드뮴 정량

적출된 간조직을 증류수로 3회 세척하고, dry oven에서 24시간 건조시킨 다음 200°C hot plate상에서 각각 질산, 황산 및 과염소산을 이용하여 유기물을 분해시키고, 25%의 ammonium citratedyddl 10 ml와 0.1% bromothymolblue (BTB) indicator 용액을 2~3방울 넣고, 용액의 색깔이 황색에서 녹색으로 변할 때까지 ammonium hydroxide 용액으로 중화시켰다. 여기에 10 ml의 40% ammonium sulfate 용액과 10 ml의 sodium diethyl dithiocarbamate (DDTC) 용액을 넣고 세차게 혼돈 후 수분간 방치한 다음, 20 ml의 methyl isobutyl ketone dithiocarbamate (MIBK)을 가하고 혼돈 후 방치한 다음, MIBK층을 취하여 120°C hot plate상에서 휘산시켜 0.1 N HCl로 희석한 후, 파장 214.438 nm에서 유도결합 플라즈마 방출분광계 (ICP: Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer; JY 70PLUS, Jobin Yvon Co.)를 이용하여 간조직내의 카드뮴 함량을 측정하였다.

#### 2) 간조직의 metallothionein 정량

조직내 MT량은 Scheuhammer & Cherian (1986)의 방법에 의해 정량을 측정하였다. 즉, 간 0.5g을 정량한 후 4배 용량의 0.25 M Sucrose를 첨가하여 20초씩 3회 균질화시킨 다음 원심분리 (4°C/18,000 rpm/20분)하여 상층액을 취하였다. 상층액 200  $\mu$ l에 0.03 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)를 첨가하여 0.8 ml로 조정한 다음, 10 ppm의  $CdCl_2$  용액 0.5 ml를 첨가하여 실온에

서 5분간 방치하여 MT의 금속결합부위에 Cd가 포화되게 하였다. 이어서 2% bovine hemoglobin 0.2 ml를 첨가하여 과량의 카드뮴과 MT 이외의 모든 bioligand를 제거하고, 100°C의 water bath에서 1분간 열처리하여 Cd-bound hemoglobin을 변성시킨 후, 원심분리 (실온/1,000 rpm/5분)하여 상층액을 취하였다. 이와 같이 2% bovine hemoglobin 첨가와 열처리 및 원심분리 과정을 3회 반복하여 얻은 상층액을 다시 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액에 함유된 Cd의 양을 원자흡광분광광도계 (AAS-6800, Shimadzu Co.)를 이용하여 분석하였다. 최종적인 MT 농도 계산은 원자흡광분광광도계에 의해 검출된 Cd의 양을 기초로, MT 분자량 6,050 g당 Cd 6 g 원자가 포함되는 것으로 환산하여 조직 g당  $\mu$ gMT 농도를 표시하였다.

### 4. 투과전자현미경적 관찰

투과전자현미경 표본을 제작하기 위해서는 적출된 간조직을 세절한 후, 2.5% glutaraldehyde 용액 (pH 7.4, 0.1 M cacodylate buffer, 4°C)에서 2시간 전고정 하였고, 동일 완충액을 사용하여 15분씩 3회 수세하였다. 1% Osmium tetroxide ( $OsO_4$ ) 용액으로 2시간 후고정한 후, 동일 완충액으로 15분씩 3회 수세하였다. 상승 농도순의 ethanol 계열하에서 탈수하고 propylene oxide를 사용하여 치환하였다. Epon mixture를 만들어 Propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며 Epon mixture 원액에서 overnight 후 oven에 넣어 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 열중합하여 포매하였다. Epon block을 1  $\mu$ m로 박절하여 1% Toluidine blue로 염색한 후, 광학현미경으로 관찰하여 특정 부위를 정하고 삭정한 뒤 Diatome를 부착시킨 Ultramicrotome (MT-7000)으로 60 nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경 (JEOL, JEM-100CXII)으로 가속전압 80 kV 하에서 관찰하였다.

### 5. 단백질 정량

각 시료의 단백질 정량은 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry법 (Lowry et al., 1951)으로 정량하였다.

## 6. 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA검증)을 수행하였으며, 분산분석결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's HSD test에 의해 분석하였다.

## 결 과

### 1. 간조직의 카드뮴 농도

Cd군의 카드뮴 농도는 24, 48, 72 그리고 168시간에서  $24.24 \pm 0.30$ ,  $21.67 \pm 0.15$ ,  $18.23 \pm 0.17$ ,  $14.33 \pm 0.11$   $\mu\text{g/g}$ 으로 정상군  $0.62 \pm 0.50$ ,  $0.62 \pm 0.50$ ,  $0.62 \pm 0.50$ ,  $0.62 \pm 0.50$   $\mu\text{g/g}$ 에 비해 유의적인 증가를 나타냈다( $P < 0.01$ ). Cd+Chi군의 카드뮴 농도는  $21.11 \pm 0.21$ ,  $18.97 \pm 0.12$ ,  $16.67 \pm 0.15$ ,  $11.33 \pm 0.60$   $\mu\text{g/g}$ 으로 Cd군에 비해 다소 감소된 경향을 나타냈다(Table 1).

**Table 1.** Cadmium concentration in liver of mouse administered cadmium and/or chitosan oligosaccharide.  
(unit:  $\mu\text{g/g}$  wet wt.)

Time (hrs)	24	48	72	168
Groups				
Normal	$0.62 \pm 0.50$	$0.62 \pm 0.50$	$0.62 \pm 0.50$	$0.62 \pm 0.50$
Cd	$24.24 \pm 0.30^*$	$21.67 \pm 0.15^*$	$18.23 \pm 0.17^*$	$14.33 \pm 0.11^*$
Cd-Chi	$21.11 \pm 0.21^*$	$18.97 \pm 0.12^*$	$16.67 \pm 0.15^*$	$11.33 \pm 0.60^*$

All values are average  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.01$  as compared with Normal.

Normal: Mice were treated with 0.9% saline.

Cd: Mice were treated with cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ; 5.0 mg/kg, i.p.).

Cd+Chi: Mice were treated with chitosan oligosaccharide (0.5% solution) after cadmium injection ( $\text{CdCl}_2$ ; 5.0 mg/kg, i.p.).

### 2. 간조직의 metallothionein 농도

Cd군의 MT 농도는 24, 48, 72 그리고 168시간에서  $16.75 \pm 2.33$ ,  $10.96 \pm 4.33$ ,  $6.28 \pm 0.66$ ,  $2.47 \pm 4.96$   $\mu\text{gMT/g}$ 으로 정상군  $1.53 \pm 0.12$ ,  $1.53 \pm 0.12$ ,  $1.53 \pm 0.12$ ,  $1.53 \pm 0.12$   $\mu\text{gMT/g}$ 에 비해 유의한 증가 현상을 보였다( $p < 0.01$ ). Cd+Chi군의 MT 농도는  $21.97 \pm 3.60$ ,  $14.66 \pm 1.58$ ,  $11.46 \pm 4.70$ ,  $6.26 \pm 4.63$   $\mu\text{gMT/g}$ 으로

**Table 2.** Metallothionein concentration in liver of mouse administered cadmium and/or chitosan oligosaccharide  
(unit:  $\mu\text{g MT/g}$  wet wt.)

Time (hrs)	24	48	72	168
Groups				
Normal	$1.53 \pm 0.12$	$1.53 \pm 0.12$	$1.53 \pm 0.12$	$1.53 \pm 0.12$
Cd	$16.75 \pm 2.33^*$	$10.96 \pm 4.33^*$	$6.28 \pm 0.66^*$	$2.47 \pm 4.96^*$
Cd-Chi	$21.97 \pm 3.60^{**}$	$14.66 \pm 1.58^{**}$	$11.46 \pm 4.70^{**}$	$6.26 \pm 4.63^{**}$

# $P < 0.05$  as compared with Group Cd.

로 Cd군에 비해 유의한 증가 경향을 보였다( $P < 0.05$ ) (Table 2).

### 3. 투과전자현미경적 관찰

#### 1) 24시간

Cd군에서 간세포의 핵은 매우 불규칙한 모양을 이루었다. 미토콘드리아가 팽대되어 보였고, cristae는 파괴된 채로 관찰되었으며 전자밀도가 낮게 관찰되었다. 그리고 조면소포체는 층판구조가 완전히 파괴되어 분절된 채로 관찰되었다. 이밖에도 용해소체가 세포질에서 관찰되었다(Fig. 1). Cd+Chi군에서 간세포의 핵은 규칙적인 형태를 보였고, 구형의 미토콘드리아가 풍부하게 분포되어 있으며, 내부의 cristae도 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 조면소포체는 일부에서 수조의 팽창이 관찰되었지만, 일부에서 층판구조를 이루고 있었으며 세포질에서 용해소체가 관찰되었다(Fig. 2).

#### 2) 48시간

Cd군에서 간세포의 핵은 약간 불규칙한 모양을 이루었다. 미토콘드리아의 cristae는 파괴된 채로 관찰되었으며 전자밀도가 낮게 나타났다. 또한 조면소포체는 일부에서 층판구조가 파괴되어 분절된 채로 나타났다. 세포질에서 용해소체가 관찰되었다(Fig. 3). Cd+Chi군에서 간세포의 핵은 비교적 둥그런 형태를 보였고, 일부에서 구형의 미토콘드리아가 관찰되었으며, 내부의 cristae가 파괴된 채로 관찰되었다. 또한 조면소포체는 일부에서 수조의 팽창이 관찰되었지만, 핵 주변에서 층판구조를 이루고 있었으며 용해소체가 관찰되었다(Fig. 4).

### 3) 72시간

Cd군에서 간세포의 핵은 비교적 규칙적인 형태를 이루었다. 미토콘드리아는 팽대되어 보였고, cristae가 관찰되었지만 전자밀도가 낮게 나타났다. 그리고 조면소포체는 일부에서 층판구조를 형성한 것이 보였고 세포질에서 용해소체가 관찰되었다(Fig. 5). Cd+Chi군에서 간세포의 핵은 비교적 규칙적인 형태를 보였고, 미토콘드리아는 팽대되어 보였다. 또한 조면소포체는 핵 주변부에서 층판구조를 이루고 있었으며 세포질에서 글리코겐과 용해소체가 관찰되었다(Fig. 6).

### 4) 168시간

Cd군에서 간세포의 핵은 비교적 둥그런 모양을 이루었다. 미토콘드리아는 내외막이 파괴된 것이 관찰되었고, 전자밀도도 낮게 나타났다. 그리고 조면소포체는 층판구조를 형성한 것과 분절된 것이 모두 관찰되었으며 용해소체가 세포질에서 관찰되었다(Fig. 7). Cd+Chi군에서 간세포의 핵은 규칙적인 형태를 보였고, 미토콘드리아내의 cristae가 관찰되었고, 전자밀도가 높은 것과 낮은 것이 모두 관찰되었다. 또한 조면소포체는 일부에서 수조의 팽창이 관찰되었지만, 층판구조를 이루고 있었으며 세포질에서는 용해소체가 관찰되었다(Fig. 8).

## 고 찰

일반적으로 소화기관에 흡수된 Cd는 주로 간으로 이동하여 간에서 MT의 생합성이 일어나 Cd와 MT가 결합하여 비독성형태로 전환되어 간, 신장등의 조직에 축적된다고 알려져 있다(Onosaka & Cherian, 1981). 그러나 과잉의 Cd이 체내에 흡수되면 MT와 결합할 수 있는 thionein이 부족하여 독작용을 나타내며(Suzuki & Yamamura, 1980), 일단 MT와 결합된 Cd는 그대로 머물러 있지 않고 혈액으로 방출되어 나오며, 혈액의 Cd-MT는 다른 기관의 막을 통과하지 못하나 신장의 사구체막을 선택적으로 통과하기 때문에 빠르게 신장으로 이행되어 서서히 뇨로 배설된다(Suzuki, 1981). 따라서 MT는 세포에서 Cd를 non-toxic한 형태로 격리시키거나, 순환계에서 Cd를

빠르게 제거하여 중앙신경계나 기타 생체기관에서 Cd이 작용하는 것을 방지함으로써 Cd의 독성을 완화시키는 것으로 알려져 있다(Mustafa & Cross, 1971).

Sugawara(1977)는 생쥐에 2.5 mg/kg의 Cd를 피하 주사하여 간내 Cd농도를 조사한 결과  $5.3 \pm 2.6$  (0.5 hrs),  $15.9 \pm 6.0$  (4 hrs),  $23.3 \pm 2.8$  (10 hrs),  $25.8 \pm 7.5$  (144 hrs)  $\mu\text{g/g}$ 으로 시간의 경과에 따라 간조직내에서 점진적으로 증가하였다고 보고하였다. 본 실험결과에서도 Cd+Chi군은  $21.11 \pm 0.21$  (24 hrs),  $18.97 \pm 0.12$  (48 hrs),  $16.67 \pm 0.15$  (72 hrs),  $11.33 \pm 0.60$  (168 hrs)  $\mu\text{g/g}$ 으로 Cd군의  $24.24 \pm 0.30$ ,  $21.67 \pm 0.15$ ,  $18.23 \pm 0.17$ ,  $14.33 \pm 0.11$   $\mu\text{g/g}$ 에 비해 유의적으로 감소하였다( $P < 0.05$ ) (Table 1). 이는 간내의 Cd 축적 및 해독 작용에 따른 MT와의 결합으로 인하여 Cd군에서 현저히 증가된 것으로 사료되며, 키토산올리고당 처리군은 간조직에서 MT 생성을 촉진하여 Cd-MT를 형성하여 Cd의 축적을 더욱 감소시킬 수 있었음을 알 수 있었다.

Cantilena & Klaassen (1981)은 방사성 Cd (1 mg/kg, i.v.)를 투여 후에 EDTA, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), 2, 3-dimercapto-succinic acid (DMSA)을 시간대별로 투여한 결과, 72시간대의 처리보다 바로 처치시에 착화의 효과가 더 큰 것으로 나타났고, 조직중의 Cd 농도에 있어서도 Cd 투여후에 바로 처치한 군에서 간과 신장의 Cd 농도가 확실히 감소하였다고 보고하였다. Cherian & Rodgers (1982)는 흰쥐에 1 mg/kg의  $\text{CdCl}_2$ 를 투여하고 착화제로서 2, 3-dimercaptopropanol (BAL; 50 mg/kg)과 diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA; 50 mg/kg)을 각각 또는 혼합 투여한 다음 간조직에서 Cd의 농도를 확인한 결과, 대조군은  $47.3 \pm 3.4$   $\mu\text{g/g}$ , BAL을 투여한 군에서는  $35.8 \pm 3.4$   $\mu\text{g/g}$ , DTPA를 투여한 군에서는  $48.1 \pm 2.2$   $\mu\text{g/g}$  그리고 BAL과 DTPA를 혼합투여한 군에서는  $31.4 \pm 2.9$   $\mu\text{g/g}$ 으로 착화제의 투여시 간조직내 Cd의 농도가 감소하였다고 보고하였다.

본 실험에서도 정상군은  $0.62 \pm 0.50$   $\mu\text{g/g}$ , 카드뮴 단독투여군은  $24.24 \pm 0.30$   $\mu\text{g/g}$ , 카드뮴과 키토산올리고당 동시 투여군은  $21.11 \pm 0.21$   $\mu\text{g/g}$ 으로 키토산올리고당을 처치시에 간조직에서의 Cd 농도 감소를 확

인하여 위의 결과와 유사한 소견을 보였다.

Kim et al. (1993)은 키토산과 알긴산을 방사성스트론튬 ( $^{85}\text{Sr}$ ;  $0.25 \mu\text{Ci/ml}$ )에 오염된 마우스에 처치했을 경우  $^{85}\text{Sr}$ 의 골조직 침착을 억제하였다고 보고하였으며,  $^{85}\text{Sr}$ 에 오염되었을 경우 키토산을 공급하면 체내 소화관에서 흡수되기 전에 키토산과 알긴산이 착화제로서 작용하여 체외배출을 촉진시키는 것으로 판단하였다.

본 실험에서도 키토산올리고당을 처치한 Cd+Chi군은 카드뮴만을 투여한 Cd군에 비해 간조직내의 Cd 농도가 확실히 감소하였다. 이는 키토산올리고당이 Cd의 착화제로서 작용하여 신장을 통한 체외배출 때문이라 사료되며, Kim et al. (1993)의 결과와 유사한 소견을 보였다.

체내의 Cd는 대부분 간과 신장에 축적되며, 여기서 Cd는 cadmium-metallothionein (Cd-MT)의 복합체 상태로 존재하는 것으로 알려져 있다 (Cherian & Nordberg, 1983). 생체내에서 Cd 해독에 관여하는 단백질인 MT는 분자량이 약 6000~7000 dalton이며 61개의 아미노산으로 구성되어 있고, 분자내에 cysteine을 다량 함유하고 있다 (Cherian & Goyer, 1978). 방향족 아미노산이나 소수성 아미노산 잔기가 적은 저분자량 복합단백질로서 7개의 metal binding site를 갖고 있어 여러 금속이온의 대사를 조절하고, 중금속의 독성 완화와 면역반응에도 관련되며, 또한 tissue damage를 막는 free radical scavenger로서 작용한다고 한다 (Nordberg, 1984). MT는 Margoshes & Vallee (1957)에 의해 말의 신장에서 처음 분리된 후 인간을 포함한 거의 모든 동물의 조직에서 검출되는 것으로 밝혀졌다 (Onosaka et al., 1984). MT는 정상상태의 조직에는 미량으로 존재하나 stress, starvation, glucocorticoid 투여 및 중금속노출 등의 요인에 의해 증가된다 (Cherian & Goyer, 1978; Dunn et al., 1987). 특히 소량의 중금속은 MT생성을 유도하는 가장 강력한 요인이며, 카드뮴, 수은, 납, 아연 및 구리 등 2가 중금속은 대표적인 MT 유도제로 알려져 있다. Cadmium과 mercury와 같은 중금속류들에 의해 생체내에서 생성이 촉진 (Onosaka & Cherian, 1981)되어지므로 이들 중금속의 독성을 방해하는 생체방어 기구에 관여하고 있을 것으로 예상이 되나 그 작용기전에 대해

서는 명확하게 밝혀져 있지 않고 있다. 지금까지 알려진 보고에 의하여 MT의 생합성 증가현상은 중금속뿐만 아니라 많은 종류의 xenobiotics들에 의해서도 생합성이 유도되어지고 있음이 확인되었고 (Kotsonis & Klaassen, 1979; Min et al., 1991), MT가 유해중금속을 수용성으로 전환시켜 배설함으로써 해독작용에 관여한다는 견해도 있다 (Oh et al., 1978).

Kotsonis & Klaassen (1977)은 카드뮴에 급성중독된 흰쥐에서 간독성이 현저하게 관찰되며 카드뮴을 저농도로 장기간 섭취시켰을 때는 간에서 MT의 농도가 증가하여 카드뮴에 대해 내성을 나타냈다는 결과를 고찰하여 볼 때, 체조직의 카드뮴 축적농도는 유사하나 MT형성정도가 높다는 것은 체조직을 보호한다는 의미로 사료된다.

Panemangalore & Cherian (1983)은 생후 5일된 흰쥐에 Cd  $1 \text{ mg/kg}$ 과  $^{109}\text{Cd}$   $2.5 \mu\text{Ci}$ 를 투여하고 24시간 후에 간조직의 MT 농도는  $739.1 \pm 35.7 \mu\text{g/g}$ 이었고, Cd  $1 \text{ mg/kg}$ 과 cysteine  $5 \mu\text{Ci}$ 를 투여한 군에서 간조직의 MT 농도는  $795.6 \pm 61.3 \mu\text{g/g}$ 으로 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서도 24시간대의 MT 농도는 Cd군이  $16.75 \pm 2.33 \mu\text{g/g}$ , Cd+Chi군이  $21.97 \pm 3.60 \mu\text{g/g}$ 으로 키토산올리고당 처치시 MT의 농도가 증가하여 위의 결과와 유사한 소견을 보였다 (Table 2).

Dudley et al. (1984)은  $\text{CdCl}_2$   $0.5 \text{ mg/kg}$ 을 흰쥐에 26주동안 피하주사하여 조직내 Cd 축적 및 MT의 농도를 조사하여 투여기간에 따른 표적 장기의 변화를 관찰한 바, 간과 신장내 Cd 및 MT 농도는 지속적으로 증가하여 10~12주째 최고농도에 이른 다음 이후 완만한 증가를 보이고 조직학적으로는 신장손상의 소견에 앞서 간손상의 소견이 있었다고 보고하였다. 본 실험에서도 Cd군의 카드뮴 농도는 키토산올리고당을 처치한 Cd+Chi군의 카드뮴 농도에 비해 현저히 증가되었음을 알 수 있었다.

Kudo et al. (1986)은 아연을 전처치한 다음 24시간 후에  $0.10 \text{ mmol/kg}$  또는  $0.03 \text{ mmol/kg}$ 의 카드뮴을 흰쥐에 투여한 결과, 간에서 MT 농도가 아연을 전처치하지 않은 군 ( $0.45 \pm 0.18 \mu\text{g/g}$ )에서보다 아연을 전처치한 군 ( $13.82 \pm 1.58 \mu\text{g/g}$ )에서 더 높았다고 보고하였다.

본 실험의 결과에서도, 간조직내 MT 농도는 Cd군

에 비해 Cd+Chi군에서 유의적으로 높게 나타나( $P < 0.05$ ) 키토산올리고당이 MT형성을 현저히 촉진시켰음을 알 수 있었다.

Tandon et al. (2002)은 카드뮴으로 중독된 흰쥐에서 hepatic-MT에 대한 cysteine, N-acetyl cysteine 그리고 DMPS의 영향을 알아보기 위하여 암컷 흰쥐에  $\text{CdCl}_2$  (1.5 mg/kg)을 복강투여하고, cysteine (1.34 mmol/kg), N-acetyl cysteine (1.34 mmol/kg) 그리고 2, 3-dimercaptopropane-1-sulphoric acid (DMPS; 0.3 mmol/kg)을 전처치하여 간조직의 MT 농도를 구한 결과, Cd-control 군에서는  $1042.40 \pm 45.89 \mu\text{g/g}$ , Cd-cysteine 군에서는  $418.68 \pm 47.39 \mu\text{g/g}$ , Cd-N-acetyl cysteine 군에서는  $835.15 \pm 88.86 \mu\text{g/g}$ 이었고, Cd-DMPS 군에서는  $1087.82 \pm 99.75 \mu\text{g/g}$ 으로 확인되어 DMPS가 cysteine이나 N-acetyl cysteine에 비해 더 많은 hepatic-MT 생성을 한 것으로 보고하였다.

본 실험에서도 Cd군은  $16.75 \pm 2.33 \mu\text{g/g}$ , Cd+Chi군은  $21.97 \pm 3.60 \mu\text{g/g}$ 으로 키토산올리고당을 처치시 간조직의 MT 생성이 더 증가됨이 확인되어 Tandon et al. (2002)의 결과와 유사한 소견을 보였다.

이러한 MT의 기능에 대해서는 최근 세포분화 혹은 발암과정과도 연관되어 진행되고 있어서 이 단백질에 관한 보다 깊은 연구가 필요한 실정이다(Maitani et al., 1986; Nishimura et al., 1989; Tsujikawa et al., 1994).

세포내에서 free cadmium은 중요 효소의 기능을 방해함으로써 독성효과를 나타내며, 또한 세포내 소기관과 결합하여 세포의 형태를 바꿈에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 본 실험의 생화학적 분석 결과 카드뮴만을 단독 투여한 Cd군에서 MT의 함량과 Cd-MT의 결합력이 저하되는 것으로 나타났다. 따라서 MT에 결합되지 않은 카드뮴이 세포내에서 핵, 미토콘드리아, 소포체 등과 같은 critical organelles에 결합될 것이며, 이것이 간세포내에 영향을 미칠것으로 생각하여 간조직을 전자현미경으로 관찰하였다.

Hoffmann et al. (1975)은 흰쥐 정맥내에 Cd를 0.6 mg/100 g으로 주사한 다음 간 및 신장을 전자현미경으로 관찰한 결과 Cd 투여 후 16시간에 90~95%의 동물에서 간과 신장에서 병변이 야기됨을 관찰하였다. 간의 경우 조면소포체의 퇴화, 활면소포체의 확장, 미토콘드리아의 퇴행성 변화, Kupffer cell의 증가 및

염증세포의 침윤이 확인되었다고 보고하였다. Dudley et al. (1984)은  $\text{CdCl}_2$  3.9 mg/kg을 흰쥐에 투여하고 4 시간대에 사립체에서 기질과립과 구별되는 전자밀도가 높은 구조가 나타났으며 균질한 섬유성 물질이 세포질에서 관찰되었다. 6시간대에 조면소포체의 심각한 팽대와 소포형성, 조면소포체에서 리보솜의 탈락, 사립체의 팽윤현상이 나타났으며 10시간대에는 핵의 농축, 사립체의 심한 팽윤과 cristae의 파괴가 나타났다며 주된 변형은 조면소포체의 소포 형성이었다고 보고하였다. Kuester et al. (2002)은 Fischer 344 (F344)와 Sprague-Dawley rats에  $\text{CdCl}_2$ 를 1.5, 3.0 그리고 4.5 mg/kg을 각각 투여하여 전자현미경으로 관찰한 결과, 3.0 mg/kg을 투여한 간조직에서 소포체의 팽창과 반투명한 소포가 관찰되었다고 하였다. 본 실험의 전자현미경적 소견에서는 Cd군의 24와 48시간에 조면소포체의 층판구조 파괴와 내강 팽대 및 미토콘드리아의 내강 팽대가 관찰되어 비슷한 결과를 나타내었으나 Chi+Cd군에서는 전형적인 층판구조와 리보솜의 부착이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 키토산올리고당의 처치는 카드뮴에 의해 야기되는 독성을 방어할 수 있는 것으로 사료되며, 향후 MT의 새로운 검출방법이나 방어기전에 대한 연구가 필요할 것으로 또한 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Amako K, Shimodori S, Imoto T, Miale S, Umeda A: Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 53(3): 603-605, 1987.
- Anderson HR, Anderson O: Effect of cadmium on hepatic lipid peroxidation in mice. *Pharmacol Toxicol* 63: 173-177, 1988.
- Austin PR, Brine CJ, Castle JE, Zikakis JP: Chitin: New facets of research. *Science* 212(4496): 749-753, 1981.
- Basavaraju SR, Jones TD: Atherosclerotic risks from chemicals: Part I. Toxicological observations and mechanisms of atherosclerosis. *Arch Environ Contam Toxicol* 35: 152-164, 1998.
- Bough WA, Landes DR: Recovery and nutritional evaluation of proteinaceous solids separated from whey by coagula-



- tion with chitosan. *J Dairy Sci* 59(11): 1874-1880, 1976.
- Boucher I, Duphy A, Vidal P, Neugebauer WA, Brzezinski R: Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 188-193, 1992.
- Cantilena LR Jr, Klaassen CD: Comparison of the effectiveness of several chelators after single administration on the toxicity, excretion, and distribution of cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 58(3): 452-460, 1981.
- Chan HM, Cherian MG: Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium. *Toxicology* 72(3): 281-290, 1992.
- Chen JP, Chen JY: Preparation and characterization of immobilized phospholipase A<sub>2</sub> on chitosan beads for lowering serum cholesterol concentration. *J Mole Catal B: Enzymatic* 5: 483-490, 1998.
- Cherian MG, Goyer RA: Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci* 23(1): 1-9, 1978.
- Cherian MG, Rodgers K: Chelation of cadmium from metallothionein in vivo and its excretion in rats repeatedly injected with cadmium chloride. *J Pharmacol Exp Ther* 222(3): 699-704, 1982.
- Cherian MG, Nordberg M: Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* 28: 1-15, 1983.
- Churchill TA, Wu BM, Mercer DF, Kneteman NM: The role of protein kinase A in anaerobic energy production during liver storage. *J Hepatol* 32(3): 473-480, 2000.
- Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen CD: Time course of Cd induced ultrastructural change in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 76: 150-160, 1984.
- Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ: Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med* 185: 107-119, 1987.
- Dureja H, Tiwary AK, Gupta S: Simulation of skin permeability in chitosan membranes. *Int J Pharm* 213(1-2): 193-8, 2001.
- Eiden CA, Jewell CJ, Wightman JP: Interaction of lead and chromium with chitin and chitosan. *J Appl Polym Sci* 25: 1587-1599, 1980.
- Evdokimova E, Taper H, Buc Calderon P: Role of ATP and glycogen reserves in both paracetamol sulfation and glucuronidation by cultured precision cut rat liver slices. *Toxicol In Vitro* 15(6): 683-690, 2001.
- Garrett SH, Phillips V, Somji S, Sens MA, Dutta R, Park SM, Kim DY, Sens DA: Transient induction of metallothionein isoform 3 (MT 3), *c fos*, *c jun* and *c myc* in human proximal tubule cells exposed to cadmium. *Toxicol Lett* 126: 69-80, 2002.
- Goyer RA, Tsuchiya R, Leonard DL, Kahyo H: Aminoaciduria in Japanese workers in the lead and cadmium industries. *Am J Clin Pathol* 57: 635-642, 1972.
- Hidalgo J, Rhee SJ, Huang PC, Garvey JS: Differential effect of adrenalectomy on rat liver metallothionein mRNA levels in basal and stress condition. *Horm Metab Res* 24: 233-236, 1992.
- Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasak M: Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull* 55(2): 133-145, 2001.
- Hilmy AM, el Domaity N, Daabees AY: Toxicity of cadmium administration to the toad and the treatment of its poisoning with EDTA. *Comp Biochem Physiol* 85(1): 249-252, 1986.
- Hoffmann EO, Cook JA, di Luzio NR, Coover JA: The effects of acute cadmium administration in the liver and kidney of the rat. Light and electron microscopic studies. *Lab Invest* 32(5): 655-664, 1975.
- Janes KA, Calvo P, Alonso MJ: Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev* 47(1): 83-97, 2001.
- Kim HK, Kim KY, Bom HS, Choi KH, Kim JY: Effect of oral injection of chitosan and alginate on the removal of orally injected radiostromium (<sup>85</sup>Sr) in mice. *J Kor Nucl Med* 27(1): 130-134, 1993.
- Knorr D: Use of chitinous polymers in food. *Food Technol* 23: 85-97, 1984.
- Kotsonis FN, Klaassen CD: Comparison of methods for estimating hepatic metallothionein in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 42(3): 583-588, 1977.
- Kotsonis FN, Klaassen CD: Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents. *Toxicol Appl Pharmacol* 51(1): 19-27, 1979.
- Kowel NE, Johnson DE, Kaemer DF, Pahren HR: Normal levels of cadmium in diet, urine, blood and tissues of inhabitants of the United States. *J Toxicol Environ Health* 5: 995-998, 1979.
- Kuester RK, Waalkes MP, Goering PL, Fisher BL, McCuskey RS, Sipes IC: Differential hepatotoxicity induced by cadmium in Fischer 344 and Sprague Dawley rats.

- Toxicol Sci 65(1):151-159, 2002.
- Lafuente A, Marquez N, Perez Lorenzo M, Pazo D, Esquifino AI: Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic-pituitary-testicular axis function in the rat. *Food Chem Toxicol* 38:913-923, 2000.
- Landes DR, Bough WA: Effects of chitosan—a coagulating agent for food processing wastes—in the diets of rats on growth and liver and blood composition. *Bull Environ Contam Toxicol* 15(5):555-63, 1976.
- Leber AP, Miya TS: A mechanism for cadmium- and zinc-induced tolerance to cadmium toxicity: Involvement of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 37:403-414, 1976.
- Liu J, Liu Y, Sultan S, Habeebu SS, Klaassen CD: Metallothionein-null mice are highly susceptible to the hematotoxic and immunotoxic effects of chronic CdCl<sub>2</sub> exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 159:98-108, 1999.
- Maitani T, Watahiki A, Suzuki KT: Induction of metallothionein after lead administration by three injection routes in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 83(2):211-217, 1986.
- Margoshes M, Vallee BL: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Amer Chem Soc* 79:4813-4822, 1957.
- Masters BA, Quaife CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD: Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* 14(10):5844-5857, 1994.
- Medesani DA, Lopez Greco LS, Rodriguez EM: Effects of cadmium and copper on hormonal regulation of glycemia by the eyestalks in the Crab *Chasmagnathus granulata*. *Bull Environ Contam Toxicol* 66:71-76, 2001.
- Min KS, Terano Y, Onosaka S, Tanaka K: Induction of hepatic metallothionein by nonmetallic compounds associated with acute phase response in inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 111(1):152-162, 1991.
- Mustafa MG, Cross CE: Oxidative metabolism of isolated cells and mitochondria and effect of cadmium ion on electron and energy transfer reactions. *Biochemistry* 10:4176-4185, 1971.
- Muzzarelli RAA, Tubertini O: Chitin and chitosan as chromatographic supports and adsorbents for collection of metal ions from organic and aqueous solutions and sea water. *Talanta* 16:1571-1577, 1969.
- Muzzarelli RAA, Ferrero A, Pizzoli M: Light scattering, X-ray diffraction, elemental analysis and infrared spectrophotometry characterization of chitosan, a chelating polymer. *Talanta* 19(10):1222-1226, 1972.
- Nakajima M, Atsumi K, Kifune K, Miura K, Kanamaru H: Chitin is an effective material for sutures. *Jpn J Surg* 16(6):418-424, 1986.
- Nishimura K, Ishihara C, Ukei S, Tokura S, Azuma I: Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine* 4(3):151-156, 1986.
- Nishimura H, Nishimura N, Tohyama C: Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues. *J Histochem Cytochem* 37(5):715-722, 1989.
- Nordberg M: Studies on metallothionein and cadmium. *Environ Res* 15:381-404, 1978.
- Nordberg M: General aspects of cadmium: Transport, uptake, and metabolism by the kidney. *Environ Health Perspect* 54:13-20, 1984.
- Oda N, Sogawa CA, Sogawa N, Onodera K, Fyryta H, Yamamoto T: Metallothionein expression and localization in rat bone tissue after cadmium injection. *Toxicol Lett* 123:143-150, 2001.
- Oh SH, Deagen JT, Whanger PD, Weswig PH: Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Am J Physiol* 234(3):E282-E285, 1978.
- Ohta H, Seki Y, Imamiya S: Possible role of metallothionein on the gastrointestinal absorption and distribution of cadmium. *Kitasato Arch Exp Med* 65(Suppl.):137-145, 1993.
- Okuda H, Kato H, Tsujita T: Antihypertensive and antihyperlipemic actions of chitosan. *Kor J Chitin Chitosan* 2(3):49-59, 1997.
- Onosaka S, Cherian MG: The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rat in response to metals. I. Effect of repeated injection of cadmium salts. *Toxicology* 22(2):91-101, 1981.
- Onosaka S, Tanaka K, Cherian MG: Effects of cadmium and zinc on tissue levels of metallothionein. *Environ Health Perspect* 54:67-72, 1984.
- Ormrod DJ, Holmes CC, Miller TE: Dietary chitosan inhibits hypercholesterolemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 138:329-334, 1998.
- Palmiter RD: Molecular biology of metallothionein gene expression. *Experientia Suppl* 52:63-80, 1987.

- Panemangalore M, Cherian MG: Metabolism of parenterally administered zinc and cadmium in livers of newborn rats. *Chem Biol Interact* 45(3): 327-339, 1983.
- Piscator M: Proteinuria in chronic cadmium poisoning. *Arch Environ Health* 12: 345-359, 1966.
- Prudden JF, Migel P, Hanson P, Friedrich L, Balassa L: The discovery of a potent pure chemical wound healing accelerator. *Am J Surg* 119(5): 560-564, 1970.
- Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palminter RD: Induction of a new metallothionein isoform (MT IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33(23): 7250-7259, 1994.
- Ramirez DC, Gimenez MS: Lipid modification in mouse peritoneal macrophages after chronic cadmium exposure. *Toxicology* 172: 1-12, 2002.
- Sakaguchi T, Horikoshi T, Nakajima A: Adsorption of uranium by chitin phosphate and chitosan phosphate. *Agric Biol Chem* 45(10): 2191-2195, 1981.
- Sato M, Apostolova MD, Hamaya M, Yamaki J, Choo KHA, Michalska AE, Kodama N, Tohyama C: Susceptibility of metallothionein null mice to paraquat. *Environ Toxicol Pharmacol* 1(4): 221-225, 1996.
- Scheuhammer AM, Cherian MG: Quantification of metallothioneins by a silver saturation method. *Toxicol Appl Pharmacol* 82(3): 417-425, 1986.
- Schilder RJ, Hall L, Monks A, Handel LM, Fornace Jr AJ, Ozols RF, Fojo AT, Hamilton TC: Metallothionein gene expression and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *Int J Cancer* 45(3): 416-422, 1990.
- Spagna G, Barbagallo RN, Casarini D: A novel chitosan derivative to immobilize alpha-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzyme Microb Technol* 28(4-5): 427-438, 2001.
- Squibb KS, Cousins RJ, Silbon BL, Levin S: Liver and intestinal metallothionein function in acute cadmium toxicity. *Exp Mol Pathol* 25: 163-171, 1976.
- Sugano M, Fujikawa T, Hiratsuji Y, Nakashima K, Fukuda N, Hasegawa Y: A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am J Clin Nutr* 33(4): 787-793, 1980.
- Sugawara N: Influence of cadmium on zinc distribution in the mouse liver and kidney: Role of Metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 42: 377-386, 1977.
- Suzuki KT, Yamamura M: Changes of metal contents and isometallothionein levels in rat tissues cadmium loading. *Biochem Pharmacol* 29(18): 2407-2412, 1980.
- Suzuki Y: Cd, Cu and Zn distribution in blood of rats after long term cadmium administration. *J Toxicol Environ Health* 7: 251-262, 1981.
- Suzuki K, Okawa Y, Hashimoto K, Suzuki S, Suzuki M: Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol Immunol* 28(8): 903-912, 1984.
- Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, Suzuki M: Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr Res* 151: 403-408, 1986.
- Suzuki K, Okawa Y, Suzuki S, Suzuki M: Candidacidal effect of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin or chitosan: the role of serine protease on the mechanism of oxygen independent candidacidal effect. *Microbiol Immunol* 31(4): 375-379, 1987.
- Tandon SK, Prasad S, Singh S: Chelation in metal intoxication: influence of cysteine or N-acetyl cysteine on the efficacy of 2,3-dimercaptopropane-1-sulphonate in the treatment of cadmium toxicity. *J Appl Toxicol* 22(1): 67-71, 2002.
- Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S, Suzuki M: Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth A solid tumor. *Chem Pharm Bull* 36(2): 784-790, 1988.
- Tsujikawa K, Suzuki N, Sagawa K, Itoh M, Sugiyama T, Kohama Y, Otaki N, Kimura M, Mimura T: Induction and subcellular localization of metallothionein in regenerating rat liver. *Eur J Cell Biol* 63(2): 240-246, 1994.
- Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M: The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7(2): 337-347, 1991.
- Waalkes MP, Hjelle JJ, Klaassen CD: Transient induction of hepatic metallothionein following oral ethanol administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 74(2): 230-236, 1984.
- Webb M: Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem Pharmacol* 21(20): 2767-2771, 1972.
- Webster WS: Cadmium induced fetal growth retardation in the mouse. *Arch Environ Health* 33(1): 36-42, 1978.
- Weiner ML: An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients, in *Proceeding from the 5th International*

Conference on Chitin and Chitosan 5:663-672, 1991.  
 Zatta P, Zambenedetti P, Wittkowski W, Carpen E: Localization of metallothionein I-II immunoreactivity in bovine pituitary gland. Life Sci 70(6):659-667, 2001.

### <국문초록>

본 연구는 카드뮴으로 유발된 생쥐 간중독에 대한 키토산올리고당의 효과를 알아보기 위하여 시도되었다. Mouse를 대상으로 카드뮴 (5.0 mg/kg; i.p.) 단독투여군 (group Cd), 카드뮴과 키토산올리고당 (0.5% solution) 동시투여군 (group Cd+Chi)으로 구분한 후 간손상 억제 효과를 알아보기 위해 간조직 중의 카드뮴 농도와 me-

tallothionein 농도를 비교측정하였다. 또한 간조직의 형태학적 손상을 확인하기 위해 조직학적 관찰을 실시하였다. 간조직의 카드뮴 농도는 Cd군에 비해 Cd+Chi군에서 현저하게 낮게 나타났다. 간조직의 MT 농도는 Cd군이 Cd+Chi군에 비해서 낮게 나타났다. 전자현미경적 관찰 결과, Cd군에서 미토콘드리아는 심한 팽윤현상이 나타났으며, RER의 분절과 리보조옴 탈락이 관찰되었다. 그러나 Cd+Chi군에서는 전자밀도가 높은 다양한 형태의 미토콘드리아가 분포되어 있었으며, 리보조옴이 부착된 채로 전형적인 층판구조를 형성한 RER이 관찰되었다.

이상과 같은 결과로, 키토산올리고당이 생쥐 간조직에 미치는 카드뮴의 독성을 감소시킴을 알 수 있었다.

## FIGURE LEGENDS

### \* Abbreviations

Mitochondria (M)

Nucleus (N)

Lysosome (L)

rough endoplasmic reticulum (rER)

**Fig. 1.** An electron micrograph of liver from mouse 24Hr after treatment with CdCl<sub>2</sub>.

**Fig. 2.** An electron micrograph of liver from mouse 24Hr after treatment with CdCl<sub>2</sub> and chitoanligosaccharide.

**Fig. 3.** An electron micrograph of liver from mouse 48Hr after treatment with CdCl<sub>2</sub>.

**Fig. 4.** An electron micrograph of liver from mouse 48Hr after treatment with CdCl<sub>2</sub> and chitoanligosaccharide.

**Fig. 5.** An electron micrograph of liver from mouse 72Hr after treatment with CdCl<sub>2</sub>.

**Fig. 6.** An electron micrograph of liver from mouse 72Hr after treatment with CdCl<sub>2</sub> and chitoanligosaccharide.

**Fig. 7.** An electron micrograph of liver from mouse 168Hr after treatment with CdCl<sub>2</sub>.

**Fig. 8.** An electron micrograph of liver from mouse 168Hr after treatment with CdCl<sub>2</sub> and chitoanligosaccharide.









