

Effect of Chlorella Diet Supplementation on Blood and Urine Cadmium Levels in Cadmium Poisoned Rats

Yong-Ho Kim^{1†}, Yoo-Kyeong Hwang¹, Yong-Woo Lee², Ji-Young Yun²,
Jung-Min Hwang² and Jai-Du Yoo³

¹Department of Biohealth Products Research Center, Inje University, Kimhae, 621-749, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Kimhae, 621-749, Korea

³Department of Clinical Pathology, Masan College, Masan, 100, Korea

This study was conducted to investigate the influence of chlorella diet supplementation. Blood accumulation and urine excretion levels were measured after the Sprague-Dawley (SD) rats were fed on a chlorella diet supplementation mixed with 40 ppm of CdCl₂. Four groups tested for blood accumulation and urine excretion levels. All four groups fed on a basic diet with a cadmium mixture. The diet for the first group contained only basic diet and the cadmium added to the drinking water. The diet for the three other groups contained cadmium to the drinking water, and 1%, 5% and 10% of chlorella added to the basic diet. A concentration of cadmium for the first group showed a 3.2±0.4 µg/l blood accumulation level and 41.5±32.9 µg/l urinary excretion level, and the second group, which was fed on the basic diet with 1% of chlorella added and cadmium to the drinking water showed a 1.5±0.6 µg/l blood level and only 14.1±1.6 µg/l urinary excretion level. The other two groups, which were fed on 5% and 10% of chlorella concentration and cadmium to the drinking water did not exhibit any notable effects greater than the group fed on 1% concentration of chlorella. The results suggest that the blood accumulation and urinary excretion of Cadmium are influenced by the chlorella diet supplementation from the concentration of 1% of the basic diet.

Key Words: Chlorella, Cadmium, Blood accumulation, Urinary excretion

서 론

카드뮴은 인류의 역사와 함께 산업발전에 큰 부분을 차지해 온 인체대사에 불필요한 유해 금속물질 중의 하나이다. 카드뮴은 인체에 축적되어 여러 독작용을 나타내는 대표적인 환경오염물질이며, 만성적 노출은 심장질환, 빈혈, 골격 약화, 면역계의 반응저하, 신장질환, 간장질환 등과 같은 다양한 질병을 야기할 수 있다⁷⁾. 카드뮴은 인체축적에 따른 다양한 독성효과가 알려졌음에도 불구하고 산업적 유용성 때문에 오히려 사용분야, 사용량은 증가되었다¹²⁾. 현재 카드뮴은 전기제품의 도금, 페인트, 플라스틱 색소, 니켈카드뮴전지 제조 등 여러 산업분야에 이용되고 있다¹⁵⁾. 카드뮴의 이용증대에 따른 환경오염은 식품, 식수, 공기오염 등에 영향을 미

치게 되며 오염된 공기, 식물 및 식수를 통한 인체내 축적량도 증가되고 있다.

식품을 통하여 경구적으로 섭취되고 있는 카드뮴의 양은 성인의 경우 1일 15~40 µg으로써 이중 5~15%는 장관으로부터 흡수된다고 한다¹⁴⁾. 생체내에 축적된 카드뮴의 대사적 특징은 흡수과정을 통한 효율적인 항상성 조절기작이 없어 호흡기, 소화기 등을 통하여 과량의 카드뮴이 체내에 유입되어도 체내에 축적량이 계속 증가되게 되며, 반감기가 길어서 오랫동안 생체내에서 독작용을 나타내게 된다⁴⁾. 체내에 축적된 카드뮴의 인위적 배출축진을 위한 연구는 철분³⁾, 칼슘 및 단백질섭취수준⁹⁾이 카드뮴 중독에 미치는 영향에 대한 연구이다. 한편 녹조류에 속하는 클로렐라는 1955년 일본국 Toyama현의 Jinzu강변 지역 주민들에게 집단적으로 발생되었던 Itai-itai병에도 카드뮴 배출 촉진효과가 있었다는 임상보고가 있었으며⁵⁾, 실험적 납의 배출효과¹⁾, 다이옥신 배출효과 등의 연구보고가 있었다¹⁰⁾. 그러나 카드뮴에 중독된 실험동물에 투여된 클로렐라가 혈액 및 뇨 중 함량에 미치는 실험적인 연구보고는 없었다.

본 연구에서는 실험적으로 카드뮴을 식수와 함께 투여시

*는 문 접수: 2003년 8월 1일

수정재접수: 2003년 9월 15일

†별책 요청 저자: 김용호, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607번지 인제대학교 임상병리학과

Tel: 055-320-3481, Fax: 055-334-3426

e-mail: mlskimyh@inje.ac.kr

키고 클로렐라를 식이에 첨가 투여시킨 후 혈액·뇨 중의 카드뮴 함량의 변화에 대하여 연구하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험설계

실험적으로 카드뮴과 식이와 함께 클로렐라를 동시에 일정기간 동안 투여시킨 흰쥐의 혈중·뇨 중 카드뮴 농도변화에 대한 실험을 하고자 체중 150 ± 20 g의 Sprague Dawley (SD) rat 수컷 46마리를 5군으로 나누어 Table 1과 같이 실험하였다.

실험조건은 온도 $24 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 55~60%를 유지하고 모든 사료와 물은 자유급식시켰다. 무기물질 오염방지를 위하여 사육 cage, 사료통, 물통을 0.4% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 용액에 24시간 동안 담근 후 증류수로 세척한 다음 건조시켜 사용하였다.

2. 실험식이

기본 실험식은 단백질 21.1% 이상, 지방질 3.5% 이상, 섬유질 5.0% 이하, 회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상의 조성비율로 제조된 표준 고형사료 (삼양사료 Co.)와 클로렐라 동시 투여군은 표준고형사료의 1, 5, 10%가 되도록 클로렐라 분말을 파쇄시킨 고형사료에 각각 혼합 후 다시 고형화시켜 식이시켰다.

3. 시료의 채취 및 분석

1) 혈액의 채취

실험동물은 4주 동안 실험사육 시킨 후 단두로 희생시켜 즉시 경정맥으로부터 카드뮴 분석을 위한 EDTA 2Na 처리된 혈액분석용 시험관에 혈액을 3.0 ml씩 취하고 잘 혼합하여 분석전까지 냉장 보관하였다.

2) 뇨 채취

실험군 및 대조군의 뇨 중 카드뮴을 분석하여 혈액 중 농도와 비교하기 위하여 실험완료 후 실험동물을 희생시키기 2일 전부터 한마리씩 metabolic cage에 넣어 0.85% NaCl 용액 1 l에 KCl 5 mg/l를 부하시험용으로 첨가하여 6시간 동안 투여하면서 투여 후 2시간부터 4시간 동안 2일 동안 2회에 걸쳐서 뇨를 채취하여 뇨량을 측정하고 즉시 2,000 g에서 10분 동안 원심분리 후 상층액을 -20°C 에 분석 전까지 동결 보존시켰다.

3) 카드뮴의 분석

혈액 검체는 WAKO standard solution (1,000 ppm, Japan)을 희석액으로 1,000배 희석시켜 표준용액 첨가법에 따라서 검량선을 작성하였으며, 분석 예정인 혈액 검체는 희석액으로 10배 희석 후 분석하였다.

Table 1. Experimental design for supplementation of Chlorella, Cadmium to basic diet

Group	Number	CdCl ₂ ppm in drinking water	Chlorella % in basic diet
Control	6	-	-
Cadmium	10	40	-
1% Ch + Cd	10	40	1
5% Ch + Cd	10	40	5
10% Ch + Cd	10	40	10

Ch + Cd: Chlorella + Cadmium
All groups were fed on 4 weeks with basic diet

뇨 검체는 SRM's 2670 freeze-dried urine (88 ppm)을 희석액으로 1.1, 2.2, 3.3 및 4.4 ppm으로 희석하여 검량선을 작성하였고, 피검뇨는 희석액으로 5배 희석하였으며 희석된 혈액, 뇨 검체 분석은 Zeeman A. A. S 4100 (Perkin Elmer, Germany)을 이용하여 flame-less 방법으로 228.8 nm에서 2회 반복 측정하여 그 평균값을 측정하였다.

4) 자료처리

본 실험에서 얻어지는 모든 자료는 Mean \pm S.D를 구하였고 one-way ANOVA 분석과 SAS program을 이용하여 각 군간의 평균값 분석, 유의성 검정을 하였다.

결 과

실험 완료시 최종 체중량, 식이 섭취량, 물 및 카드뮴 섭취량은 Table 2와 같다.

실험 전 150 ± 20 g SD rats의 체중이 실험기간 중 가장 심하게 변화된 실험군은 카드뮴 투여군으로 202.0 ± 29.3 g이었으며 가장 작은 체중변화를 보인 실험군은 대조군으로 162.5 ± 34.8 g이었다. 평균 식이 섭취량은 21.5~26.0 g 사이의 섭취량을 보여 비슷한 결과를 나타내었으며 1% 클로렐라 투여군에서 가장 높은 섭취량인 26.0 g을 보였다. 음용수 섭취량은 카드뮴 양성 대조군 32.2 ml/day이었으며, 평균 카드뮴 섭취량은 24.3~25.0 ppm/day로 군간 섭취량의 차이는 매우 근소하였다.

1. 혈액 중의 카드뮴 분석

혈액 중에서 분석된 카드뮴 측정값은 Table 3과 같으며 카드뮴만 투여시킨 Cd군은 3.2 ± 0.4 g/l이었다. 동일한 양의 카드뮴과 1% 클로렐라를 동시에 투여한 실험군의 측정값은 1.5 ± 0.6 $\mu\text{g/l}$ 이었으며, 5% 클로렐라 투여군은 1.5 ± 0.4 $\mu\text{g/l}$, 10% 클로렐라 투여군은 1.5 ± 0.5 $\mu\text{g/l}$ 이었다.

카드뮴 단독 투여군에 비하여 클로렐라 투여은 현저하게 저하된 혈중 카드뮴 농도를 나타내었으나 투여된 클로렐라

Table 2. The body weight, food, water and Cadmium intake

Group	Body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)	Cadmium intake (ppm/day)
Control	162.5±34.8	24.3	40.1	-
Cadmium	202.0±29.3	22.1	32.2	24.3
1% Ch + Cd	175.0±26.0	26.0	39.3	25.0
5% Ch + Cd	198.0±14.7	23.0	42.0	24.3
10% Ch + Cd	183.5±20.7	21.5	41.4	24.7

Control 3 group: fed on only basic diet and tap water

Cadmium group: fed on 40 ppm CdCl₂ in drinking water and basic diet

Ch + Cd group: fed on 40 ppm CdCl₂ in drinking water, basic diet supplemented with 1, 5, 10% Chlorella

Table 3. Effect of Chlorella diet supplementation on Cadmium levels in blood of SD rats

Group	Unit: µg/l		
	Mean	±SD	Mean Rank
Control	0.3	0.1	3.5
Cadmium	3.2	0.4	34.4
1% Ch + Cd	1.5	0.6	17.8
5% Ch + Cd	1.5	0.4	19.4
10% Ch + Cd	1.5	0.5	18.5

one-way ANOVA: $F_{(4,33)} = 39.892, P=0.0001$

Cadmium VS 1% Chlorella + Cd Kruskal-Wallis test: $\chi^2 = 27.040, df = 4, P=0.0001$

농도별 차이는 거의 없었다.

2. 뇨 중 카드뮴 분석

각 실험군으로부터 2회에 걸쳐서 채취한 후 원심분리하여 상층액은 -20℃에 냉동 보존하였다가 실험 전 실온에 녹힌 후 분석된 측정값은 Table 4와 같다.

카드뮴만 투여한 실험군의 뇨 중 평균 카드뮴 배설량은 41.5±32.9 µg/l로써 개체간 차이가 크게 나타났다. 카드뮴과 클로렐라를 동시에 투여한 실험군에서는 1% 클로렐라 투여군 14.1±1.6 µg/l로 가장 낮은 뇨 중 카드뮴 배설량을 보였고 5% 클로렐라 투여군 24.9±12.7 µg/l로써 클로렐라 투여군 중 가장 높은 카드뮴 배설량을 나타내었다. 10% 클로렐라 투여군에서는 20.9±16.8 µg/l를 보여 5% 클로렐라 투여군에 비하여 뇨 중 배설량이 다소 감소된 경향을 나타내었다.

고 찰

카드뮴이 산업용으로 이용되기 시작한 것은 불과 50여 년 전이지만 여러 산업분야에 유용성이 높아 사용량이 현저하게 증가되었다¹⁾. 사용량 및 빈도의 증가는 하천, 토양 등과

Table 4. Urinary excretion of Cadmium in SD rats

Group	Unit: µg/l		
	Mean	±SD	Mean Rank
Control	5.1	2.6	3.0
Cadmium	41.5	32.9	19.5
1% Ch + Cd	14.1	1.6	14.0
5% Ch + Cd	24.9	12.7	17.2
10% Ch + Cd	20.9	16.8	13.9

one-way ANOVA: $F_{(4,33)} = 2.672, P=0.062$

Kruskal-Wallis test: $\chi^2 = 10.761, df = 4 P=0.0294$

Ch + Cd: a given dose of chlorella + 40 ppm Cd

같은 환경오염을 초래하게 됨에 따라 직업적 노출뿐만 아니라 비직업적 노출로 인한 사람, 가축 및 식물 체내에 축적이 높아지게 되었다²⁾. 그러나, 일단 생체내에 축적된 카드뮴은 쉽게 배출되지 않기 때문에 여러 가지 생체대사에 바람직하지 못한 부작용을 초래하게 되지만 아직 생체내에 축적된 카드뮴의 배출을 촉진시킬 수 있는 적절한 방법이 보고된 바 없다.

한편 클로렐라는 이미 실험적으로 납을 투여시킨 흰쥐에서 납 투여군의 폐장 중 46.21±0.52%에 비하여 2% 클로렐라를 동시에 투여한 실험군의 폐장내 납 농도는 24.59±0.83%로 현저하게 저하된 납 농도를 나타내었으며³⁾, 이외에도 카드뮴이 원인이 된 Itai-itai병에서도 뇨·분변을 통한 카드뮴 배출이 효과가 있었다고 한 임상적인 보고⁴⁾와 다이옥신 배출효과¹⁰⁾ 등을 참조할 때 클로렐라 투여는 생체내 카드뮴 배출 촉진효과가 있을 것으로 예측된다. 본 연구에서는 현대인들의 경구적 최대 섭취량으로 보고된 40 ppm의 카드뮴¹⁴⁾을 실험적으로 흰쥐에게 단독, 클로렐라와 동시에 4주 동안 투여한 후 혈중 카드뮴 농도를 측정된 결과 3.2±0.4 µg/l를 보여 Lee Myug Hee의 연구에서 21일 동안 투여한 결과 혈액 중 농도 2.4±0.9 ng/ml보다 다소 높은 함량을 보였으나 본 실험에서는 일주일 더 많이 투여되었다. 1% 클로렐라를 카드

금과 동시에 투여한 실험군의 혈중 카드뮴 농도는 카드뮴 단독 투여군보다 48%가 저하된 $1.5 \pm 0.6 \mu\text{g/l}$ 값을 보여 클로렐라 동시 투여가 혈중 카드뮴 함량을 현저하게 낮출 수 있음을 나타내었다. 그러나 이러한 원인이 흡수 저하인지 혹은 배출촉진에 의한 것인지는 알 수 없었다. 클로렐라 농도를 5, 10%로 높인 결과 클로렐라 농도 증가에 따른 혈액내 카드뮴 함유량은 거의 변화를 보이지 않고 모두 유사한 함량을 보여 1% 이상의 클로렐라 투여에 따른 클로렐라 농도의 존적 혈액내 카드뮴 함량 저하효과는 기대할 수 없었으며, 이는 클로렐라를 이용한 실험적인 납 배출효과를 연구보고한 Baek 등의 연구보고¹⁾에서 2~5%라고 한 연구보고 경향과도 유사하였다. 카드뮴 단독 투여군에 대한 뇨 중 배설량의 측정은 $41.5 \pm 32.9 \mu\text{g/l}$ 를 보여 혈액 중 카드뮴의 약 13배 정도 높았으며 이는 뇨 중 카드뮴 배설량이 혈액 중 카드뮴 함량보다 5~10배 높다고 한 Kae Higashikawa 등⁶⁾의 연구 결과와 유사하다. 또한 실험적으로 카드뮴을 전혀 투여시키지 않고 일반식이, 식수만을 투여한 대조군의 뇨 중 배설량도 $5.1 \pm 2.6 \mu\text{g/l}$ 를 보여 실험실내 환경, 식이 및 식수에서 자연적으로 흡수된 카드뮴량이 비교적 높은 양을 보이고 있었다.

1% 클로렐라를 동시 투여한 실험군의 뇨 중 배설량은 $14.1 \pm 1.6 \mu\text{g/l}$ 를 보여 카드뮴 단독 실험군에 비하여 66%가 감소된 뇨 중 배설량을 나타내었다. 1% 클로렐라를 카드뮴과 동시에 투여하였을 때 혈액과 비교한 뇨 중 배설율은 9.4배, 카드뮴 단독 투여군의 혈액과 비교한 뇨 중 배설율은 약 13배 이므로 1% 클로렐라 동시 투여에 따른 신장 카드뮴 배설율은 28%가 감소되어 뇨 중 카드뮴 배설량으로부터 예측될 수 있는 신장 손상이 훨씬 낮아진 것으로 생각할 수 있다¹³⁾.

5% 클로렐라 동시 투여군 24.9 ± 12.7 , 1% 클로렐라 동시 투여군 $20.9 \pm 16.8 \mu\text{g/l}$ 을 보여 혈액 중 카드뮴 함량변화에서 보여 주었던 경향과 유사하게 클로렐라 농도 증가와 카드뮴 배설량과의 관련성은 없었으나 혈액 중 농도와는 다르게 5% 클로렐라 투여군에서 가장 높은 배설량을 나타내었고 10% 클로렐라 투여군에서도 1% 클로렐라 투여군보다 높은 뇨 중 배설량을 나타내었다. 클로렐라 투여에 의한 혈액 중 카드뮴 함량 저하 및 뇨 중 배설량 저하에 대한 원인은 생체내 카드뮴 보유 정도는 생체의 영양상태, 식이 중의 영양조성이 영향을 미친다고 한 연구 결과와 일치되는 것으로 생각된다²⁾. 즉 클로렐라 건조중량의 50~70% 이상이 단백질이고, 비타민, 미네랄이 풍부한 클로렐라는⁸⁾ 이들이 함유하고 있는 단백질, 비타민, 미네랄 등에 의한 영향으로 혈액 중 카드뮴 함량이 현저하게 낮춘 결과를 초래하였고 정상적인 신장 기능 조건 하에서는 혈액 중의 카드뮴 함량에 따라서 뇨 중 배설량이 달라지게 되므로 클로렐라 동시 투여군에서도 카드뮴 단독 투여군에 비하여 뇨 중 배설량이 66% 감소된 것으로 본다. 이는 뉴질랜드 어린이들이 500 μg 이상의 카드뮴이 포함된 굴

섭취 후 생체내의 축적량에 비하여 동일한 500 μg 이상의 카드뮴 함량을 보인 쌀을 섭취한 일본 농민들이 현저하게 높았다고 한 Nordberg 등¹¹⁾의 보고와 Mi-Kyeong Choi 등³⁾의 연구결과 40% 고단백질과 1.3% 칼슘을 공급한 실험군에서 대변 중의 현저한 카드뮴 배출이 증가되어 카드뮴 흡수가 현저하게 저하하였다고 한 보고와 일치된 경향을 보이고 있다.

결론적으로 단백질 함량이 높고 비타민, 미네랄 등이 풍부한 클로렐라를 전체 식이량의 1% 이상 첨가시키면 구강을 통하여 섭취되어 혈액에 이르는 카드뮴 함량을 48% 이상 낮출 수 있고, 뇨 중 배설량을 66% 이상 낮출 수 있음을 보여 생체내 카드뮴 축적을 현저하게 낮출 수 있음을 보였다. 클로렐라에 의한 생체내 카드뮴 축적 저하는 본 연구결과 생체내에 흡수된 카드뮴의 배출이 촉진된 결과라기 보다는 장벽을 통한 흡수 저하로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Baek SH, Kim SJ, Han JH and Hoe JW (2001): Detoxification of lead poisoned rats with chlorella. The 3rd International symposium on chlorella, 65-76.
- 2) Barltrop D and Strehlow CD (1982): Clinical and biochemical indices of cadmium exposure in the population of shipham. pp 112-114, *In Cadmium 81, Proc. 3rd Int. cadmium Conf. Miami, Cadmium Association, London.*
- 3) Choi MK, Kim AJ, Jun YS, Kim HN, Rho SN and Sung CJ (1994): Effect of dietary iron levels on the cadmium accumulation in cadmium poisoned rats. *Korean J Nutrition*, **27(7)**: 709-716.
- 4) Cotzias GC, Borg DC and Selleck B (1961): Virtual absence of turnover in cadmium metabolism: Cd109 studies in the mouse. *Am J Physiol*, **201**: 927-930.
- 5) Hagino N and Ichimura S (1975): Effect of chlorella on fecal and urinary cadmium excretion in "Itai-itai" disease. *Nippon Eiseigaku Zasshi*, **30(1)**: 77.
- 6) Kae Higashikawa, Zuo-Wen Zhang, Shinichiro shimbo, Chan-Seok Moon, Takao watanabe, Haruo Nakatsuka, Naoko Matsuda-Inoguchi and Masayuki Ikeda (2000): Correlation between concentration in urine and in blood of cadmium and lead among women in Asia. *The science of the Total Environment*, **246**: 97-107.
- 7) Kawada T, Tohyama C and 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(1)**: 95-100.
- 8) Kay RA (1991): Microalgae as food and supplement. *Crit Rev*

Food Sci Nutr, **30(6)**: 555-573.

- 9) Lee MH (1994): Accumulation and organ distribution of protein bound cadmium in rats compared with CdCl₂. *Korean J nutrition*, **27(8)**: 828-836.
- 10) Morrita (1997): Excretion of Dioxine from the human body. *Kewpie News*, 285.
- 11) Nordberg M, cherian MG and Kjillstrom T (1983): Defence mechanisms against metal toxicity and their potential importance for risk assessments with particular reference to the importance of various binding forms in food. *Stuff Rep Ser*, No. 55, "Project Coal-Health-Environment, Swedish State Power Board, Valling by, Sweden.
- 12) Page AL, El-Amamy MM and Chang AC (1986): Cadmium in the environment and its entry into terrestrial food chain crops. pp. 33-74. "In handbook of experimental pharmacology", Foulkes EC, Ed., Berlin, Springer-Verlag.
- 13) Vallee BL and Ulmer DD (1972): Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu Rev Biochem*, **41(10)**: 91-128.
- 14) Walter Mertz (1986): Cadmium, pp.319. "Trace elements in human and animal nutrition", 5th Ed., Academic press, New York.
- 15) Zenz C (1988): Occupational medicine, Principles and practical application, pp.527. 2nd Ed., Year Book Medica Publisher, Chicago.