

한국인 간장 및 신장피질에 함유된 카드뮴, 구리, 수은, 아연 함량과 메탈로치오나인과의 관계

이상기, 유명찬², 윤여표², 양자열, 오승민¹, 정규혁^{1*}

국립과학수사연구소, ¹성균관대학교 약학부, ²충북대학교 약학대학

Relationships Between Cadmium, Copper, Mercury, Zinc Levels and Metallothionein in the Liver and Kidney Cortex of Korean

Sang Ki Lee, Young Chan Yoo², Yeo Pyo Yun², Ja Youl Yang,
Seung Min Oh¹ and Kyu Hyuck Chung^{1*}

National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-707, Korea

¹College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

²College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT

In order to elucidate the relationships between cadmium, copper, mercury, zinc levels and metallothionein in the liver and kidney cortex of Korean, the levels of Cd, Zn, Cu and metallothionein (MT) were determined in the kidney cortex and liver of 50 subjects deceased in the period of January–November, 2001 in the area of Seoul and Gyeonggi Province of Korea. The mean age of the population studied was 36.3±12.3 years. The tissues were digested with microwave digestion system and the elements were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. MT was determined by the Cd–hemoglobin affinity assay. The determined levels (mean±SD) were: 33.9±18.9 micrograms Cd/g wet weight; 47.5±12.6 micrograms Zn/g wet weight; 2.5±0.57 microgram Cu/g wet weight; 0.26±0.31 micrograms Hg/g wet weight, 4.0±3.1 mg MT/g wet weight in renal cortex and 2.5±1.9 micrograms Cd/g wet weight; 46.9±15.0 micrograms Zn/g wet weight; 6.2±2.5 micrograms Cu/g wet weight; 0.10±0.15 micrograms Hg/g wet weight, 0.92±0.57 mg MT/g wet weight in the liver. Positive relationships between Cd and MT, sum of four divalent metal and MT in the kidney cortex were observed. No other correlation was found between Cu and MT, Hg and MT, Zn and MT in either organs.

Key words : cadmium, mercury, metallothionein, liver, kidney cortex, Korean

서 론

인체는 환경에 존재하는 많은 중금속에 노출되

어 있으며 중금속에 의한 임상적 병변들로는 다양한 유형의 급만성 질환들은 물론 몸무게 감소, 식욕부진, 빈혈, 골다공증, 남성불임, 혼수상태, 심장마비 등이 나타나는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 중금속 노출에 의한 임상증상 즉 질병이 유발되기 이전에 그 노출정도를 효율적으로 감시할

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-31-290-7714, E-mail: khchung@skku.edu

수 있는 체계가 요구되었다. 중금속 노출에 대한 생물학적 감시체계에 적합한 biomarker로는 metallothionein (MT)이 있는데 이는 주로 비필수 2가 중금속인 Cd와 Zn, Cu, Hg 등에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다 (Searle *et al.*, 1984; Hamer, 1986). MT는 주로 세포의 세포질에 존재하고 핵 및 리소솜에서도 발견되는 6-7kDa의 저분자 단백질로 아미노산 중 약 30% 정도가 cysteine을 함유하고 있는 열에 안정한 단백질이다. MT는 폭넓은 장기에 분포하는데 주로 간, 췌장, 장 및 신장에서 발견되며 뇌 및 피부에서도 존재한다 (Davis and Cousins, 2000). MT는 주로 Cd 및 Zn에 의해 간에서 합성되며 신장에서는 Hg에 의해 합성된다 (Piotrowski *et al.*, 1974a, b; Piotrowski and Syzmannsaka, 1976). MT의 생리학적인 역할은 아직 분명하지는 않은 상태이나 조직내 다양한 역할을 하는 것으로 나타났다. 먼저 Zn나 Cu의 항상성에 관여하여 핵산 및 단백질 합성에 관계된 효소들에 대한 Zn의 reservoir 역할을 하고 카드뮴과 같은 중금속 독성에 대하여 간세포에서 MT의 생성을 유도하여 중금속물질과 강하게 결합한 뒤 생체 이용율을 감소시켜 세포밖으로 배출시킴으로써 세포의 독성을 경감시킴으로써 세포의 독성을 경감시키며 (Goering and Klassen, 1984a, b; Viarengo and Nott, 1993; Langston *et al.*, 1998), 또한 여러 유해한 약품의 산화적 손상에 대한 보호작용을 하는 것으로 나타났다 (Satoh *et al.*, 1988; Basu and Lazo, 1990). 만성적 중금속 노출에 대한 신기능 손상기전에 대한 MT는 중요한 역할을 하는데 이러한 MT의 발현은 신기능 저하를 반영할 뿐만 아니라 중금속 폭로에 대한 특이적인 지표로서의 가치가 있다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 국내 사체의 간 및 신장 피질 조직 각각 50개에서 발견되는 MT의 양을 측정하여 우리나라 사람들의 중금속 오염 및 그 독성 발현가능성에 대하여 평가하였다.

실험 방법

1. 시료의 채취

서울경기지역에 거주하다 약물중독이나 질병에 의해 사망하지 않고 외인성 요인에 의해 사망한 한

Table 1. Distribution of age and gender of individual subjects

Age group	Female	Male	Total
Teens	3	-	3
Twenties	6	9	15
Thirties	6	5	11
Forties	7	6	13
Fifties	3	2	5
Sixties	-	3	3
Total	25	25	50

국인의 간장 및 신장피질은 2001년 1월부터 11월까지 국립과학수사연구소에 부검 의뢰된 사체 50구에 대하여 채취한 후 -40°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 남녀 25구씩 총 50구의 사체는 19~65세의 범위였으며, 성별, 연령별 분포는 Table 1에 표시하였다.

2. Cd-Hemoglobin affinity assay에 의한 metallothionein 농도 측정

Metallothionein 농도 측정은 Eaton과 Toal의 방

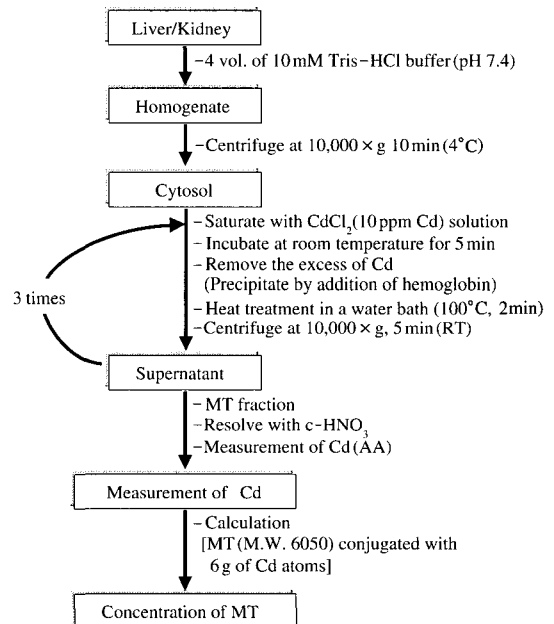


Fig. 1. Scheme of Cd-hemoglobin affinity assay for measuring metallothionein concentration.

법(Eaton and Toal, 1982)을 약간 변형시켜 수행하였다. 간과 신장조직을 일정량 취하여 생리식염수로 세척한 다음, 10 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4)으로 20% (w/v)의 균질액을 만들었다. 이 균질액을 10,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액만 모은 후 100°C 수욕에서 2분간 열처리하고 다시 10,000×g에서 2분 동안 원심분리하여 침전된 단백질을 제거하고 상층용액을 취하였다. 이 상층액을 적당량 취한 후 Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 녹인 10 ppm CdCl₂를 넣어 포화시키고, 실온에 10분간 방치하여 Cd와 MT와의 결합을 유도하였다. 여기에 hemoglobin (2%)을 100 μL 가하여 과량의 Cd와 MT이외의 모든 bioligand를 제거하고 100°C 수욕에 2분간 정지시켜 Cd-bound hemoglobin을 변성시킨 후, 원심분리(10,000g, 2 min)하여 MT가 존재하고 있는 상층을 취하였다. 이와 같이 hemoglobin 첨가와 열처리 및 원심분리 과정을 3회 반복하여 MT 분획층을 분리하였다. 원자흡광광도계(Atomic absorbance spectrophotometer)에 의한 측정 효율을 높이기 위해 MT 분획층에 농질산을 가하여 MT에 결합된 Cd를 유리시켜 Cd의 양을 측정한다. 최종적인 MT의 농도계산은 원자흡광광도계에 의해 검출된 카드뮴의 양을 기초로 MT 분자량 6,050 g당 카드뮴 6 g 원자가 포함되는 것으로 환산하여 조직 g당 mg MT농도로 표시하였다.

3. 시료의 분해 및 중금속 함량 측정

각 장기는 실온이 될 때까지 방치한 후 여과지로 장기외부에 묻은 혈액을 제거한 다음 전보(유영찬, 1998)에 보고한 방법에 따라 microwave digestion system (Milestone s.r.l., mls 1200 mega, Italy)으로 분해한 다음 유도결합형 플라즈마 원자발광광도계(Thermo Jarrell Ash Co., Atomscan 25, USA)를 사용하여 장기조직중 중금속의 함량을 측정하였다.

4. 통계학적 분석

각 인체 부위에서 측정된 인체 장기별 중금속 함량의 평균 및 표준편차, 중금속함량과 MT와의 상관계수와 유의성 검정 등 통계학적 분석은 SPSS program을 이용하였으며, t-검정 결과 p값이 0.05 이하인 경우만 표기하였다.

결과 및 고찰

1. 시료중 MT 및 중금속류의 함량

한국인의 중금속 노출을 평가하기 위해 만성적 중금속 노출, 특히 2가 중금속의 노출 지표인 MT의 함량을 측정하였다. 남녀 25명씩 총 50구의 부검시료에서 채취한 간장 및 신장피질을 대상으로 MT의 함량을 측정하여 Cd, Cu, Hg 및 Zn과의 함량과 비교 분석함으로써 한국인의 중금속에 대한 노출과 그 독성 발현가능성에 대하여 평가하였다.

조사기간 동안 채취한 간장 및 신장피질 시료 50개의 MT함량과 중금속류의 함량은 Table 2에서 보는 바와 같다. 또한 시료인 간장 및 신장피질 중

Table 2. Cadmium, copper, mercury, zinc and metallothionein concentration in the kidney cortex and liver. (Heavy metals : μg/g · wet weight, MT : mg /g · wet weight)

Element	Kidney cortex		Liver	
	N	Mean (SD)	N	Mean (SD)
Cd	49	33.9 (18.9)	50	2.5 (1.9)
Cu	50	2.5 (0.57)	49	6.2 (2.5)
Hg	50	0.26 (0.31)	49	0.10 (0.15)
Zn	49	47.5 (12.6)	48	46.9 (15.0)
MT	47	4.0 (3.1)	46	0.92 (0.57)

N : Number of specimens, SD : Standard deviation

Table 3. MT induction in kidney cortex and liver by sex difference

	Kidney cortex		Liver	
	Male	Female	Male	Female
Age (years)	38.04 ± 12.59	34.56 ± 11.93	38.04 ± 12.59	34.56 ± 11.93
Four divalent metal (ppm) ¹⁾	75.81 ± 24.04	95.13 ± 25.33	49.30 ± 15.56	61.95 ± 18.67
MT (mg/g)	4.02 ± 2.84	3.94 ± 3.47	0.99 ± 0.60	0.84 ± 0.55

¹⁾ Total values of Cd, Cu, Hg and Zn

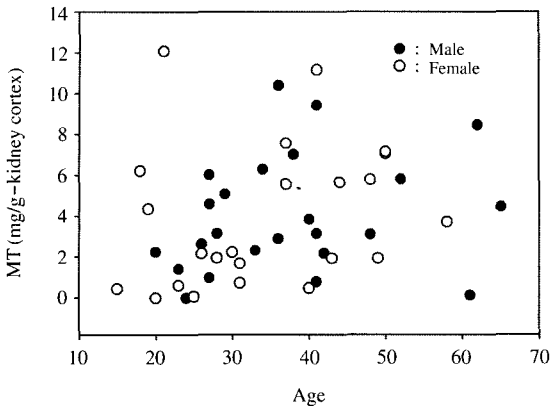


Fig. 2. MT induction in kidney cortex by age and sex difference.

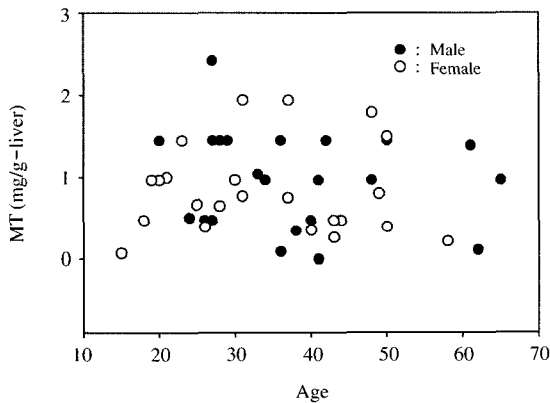


Fig. 3. MT induction in liver by age and sex difference.

Table 4. MT induction in kidney cortex and liver by age difference

Ages	Organs	
	MT (mg/g · wet weight)	
	Kidney cortex	Liver
10~19	3.67 ± 2.95 (n*=3)	0.51 ± 0.45 (n=3)
20~29	2.87 ± 3.16 (n=15)	1.09 ± 0.57 (n=15)
30~39	4.67 ± 3.14 (n=10)	1.03 ± 0.61 (n=10)
40~49	4.13 ± 3.34 (n=12)	0.73 ± 0.53 (n=11)
50~59	5.93 ± 1.59 (n=4)	0.89 ± 0.68 (n=4)
>60	4.35 ± 4.17 (n=3)	0.82 ± 0.65 (n=3)

* n = Sample numbers

의 MT함량을 성별 평균값을 구한 결과 Table 3에서 보는 바와 같다. 신장의 MT함량이 간에 비해

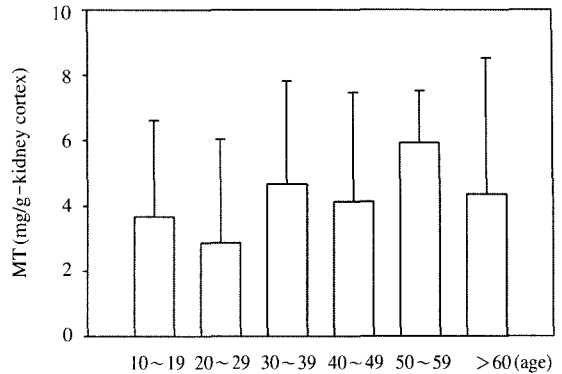


Fig. 4. MT induction in kidney cortex by age difference.

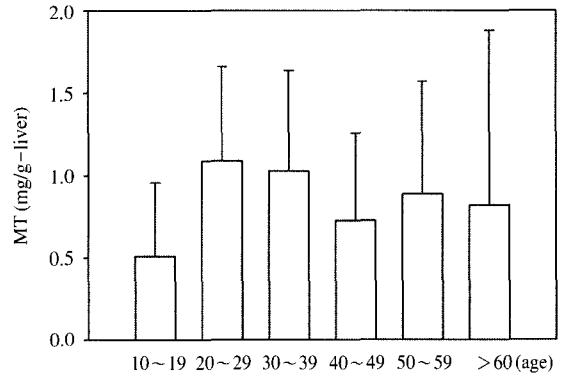


Fig. 5. MT induction in liver by age difference.

높게 나타났다. 성별로 비교한 결과 Table 3 및 Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 여성의 신장피질 중의 MT함량은 3.94 ± 3.47 mg/g로 남자의 4.02 ± 2.84 mg/g과 거의 차이가 없었으며, 간장 조직 중의 MT함량은 여자의 경우 0.84 ± 0.55 mg/g인데 비해 남자의 경우 0.99 ± 0.60 mg/g로 남자가 약간 높았으나 유의성은 없었다.

연령별 간장 및 신장피질 중 MT함량의 평균값을 비교한 결과 Table 4에서 보는 바와 같다. 신장피질 중의 MT함량을 10년간의 연령별로 구분하여 도표로 나타낸 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 50대에서 가장 높은 MT함량을 나타내었으며 20대에서 가장 낮았다. 간장 조직 중의 MT함량의 연령별 평균값은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 10대를 제외 한 전 연령층에 고르게 분포하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 간장 및 신장피질의

Table 5. Correlation coefficient in the kidney cortex and liver.

Correlation	Kidney cortex	Liver
MT-four divalent metal	0.410**	0.194
MT-Cd	0.460**	0.095
MT-Cu	-0.150	0.174
MT-Hg	0.207	-0.105
MT-Zn	0.224	0.158

Figures in the table are coefficients between metallothionein and elemental concentration which are significant at 1% (**).

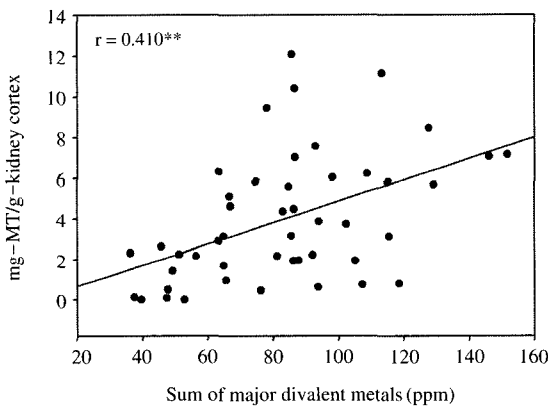


Fig. 6. The relationship between four divalent metal concentration (Cd, Cu, Hg, and Zn) and metallothionein in human kidney cortex ($p < 0.01$).

MT함량은 성별에 따른 차이가 없었으며, 신장피질에서의 MT함량이 높은 것은 카드뮴이 이곳에 축적하기 때문으로 사료되며, 연령이 증가할수록 중금속의 노출의 증가로 인하여 MT함량이 증가되며 노년기에 접어들면 간 및 신장조직 중 MT의 생성량이 감소되는 것을 추정할 수 있었다.

2. 시료중 MT함량과 중금속 함량의 비교

Table 5는 시료중 중금속류와 MT 함량간의 상관성을 보여주고 있다. 신장피질 중 MT 함량과 Cd, Cu, Hg 및 Zn 등 4가지의 2가 중금속 함량의 총합과 비교한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 r값이 0.410 ($p < 0.01$)으로 순상관성을 보여 주었다. 4가지 2가 중금속 각각의 함량과 MT 함량의 상관성을 조사한 결과 r값이 Cd과 MT는 0.460 ($p < 0.01$, Fig. 7), Cu와 MT는 -0.150, Hg와 MT는 0.207, Zn

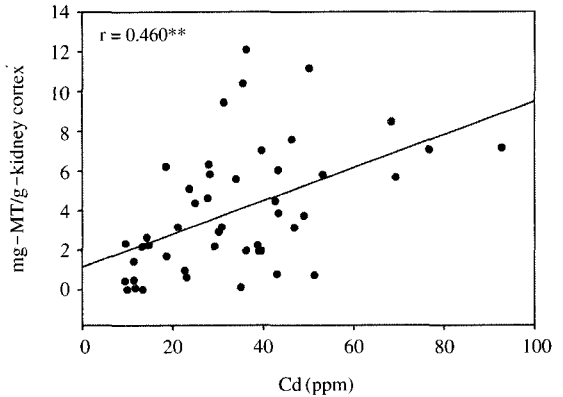


Fig. 7. The relationship between Cd and metallothionein in human kidney cortex ($p < 0.01$).

과 MT는 0.224로 나타나 Cd와 MT와의 상관성을 제외하고는 유의성있는 결과가 나타나지 않았다.

간 조직 중의 MT 함량과 Cd, Cu, Hg 및 Zn 등 4가지의 2가 중금속 함량의 총합과 비교한 결과 r값이 0.194으로 비교적 낮은 상관성을 보여 주었다. 네 가지 2가 중금속 각각의 함량과 MT 함량의 상관성을 조사한 결과 r값이 Cd과 MT는 0.095, Cu와 MT는 0.174, Hg와 MT는 -0.105, Zn과 MT는 0.158로 나타나 유의성있는 상관성이 관찰되지 않았다.

결론

한국인 간장과 신장피질에 함유된 카드뮴, 구리, 수은, 아연함량과 metallothionein (MT)과의 상관성을 규명하기 위해, 2001년 1월부터 11월 사이에 수도권에서 사망하여 부검의뢰된 사체 50구에서 간장과 신장피질을 적출한 다음 카드뮴, 구리, 수은, 아연 및 MT의 함량을 측정하였다. 시료는 남녀 각 25구였으며 평균연령은 36.3 ± 12.3 세 이었다. 중금속 함량은 조직을 microwave digestion system으로 분해한 후 ICP-AES로, MT는 Cd-hemoglobin affinity assay법으로 측정하였다. 측정된 중금속(평균±표준편차, micrograms/g · wet weight) 및 MT의 함량은 다음과 같다. 신장피질에서 카드뮴: $33.9 \pm 18.9 \mu\text{g/g}$, 아연 $47.5 \pm 12.6 \mu\text{g/g}$, 구리 $2.5 \pm 0.57 \mu\text{g/g}$, 수은 $0.26 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$, MT $4.0 \pm 3.1 \mu\text{g/g wet}$

weight. 간장에서는 카드뮴 $2.5 \pm 1.9 \mu\text{g/g}$, 아연 $46.9 \pm 15.0 \mu\text{g/g}$, 구리 $6.2 \pm 2.5 \mu\text{g/g}$, 수은 $0.10 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$, MT $0.92 \pm 0.57 \text{ mg/g wet weight}$. 신장피질에서 Cd와 MT, 4개의 2가 중금속 총합과 MT사이에 유의성있는 순상관성이 나타났으며, 간장에서는 유의성있는 상관성이 관찰되지 않았다.

감사의 말씀

이 연구는 국립환경연구원의 환경기술연구개발사업의 공공기반기술 개발사업 연구비에 의해 수행되었습니다. 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

- 유영찬. 인체 장기조직중 미량 유해 금속원소의 신속 정량법에 관한 연구. 국립과학수사연구소보 1998; 30: 33-42.
- Basu A and Lazo JS. A hypothesis regarding the protective role of metallothioneins against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs, *Toxicol. Lett.* 1990; 50: 123-135.
- Davis SR and Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function, *J. Nutr.* 2000; 130: 1085-1088.
- Eaton DL and Toal BF. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1982; 66: 134-142.
- Goering PL and Klassen CD. Zinc-induced tolerance to cadmium hepatotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984a; 74: 299-307.
- Goering PL and Klassen CD. Tolerance to cadmium-induced hepatotoxicity following cadmium pretreatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984b; 74: 308-313.
- Goering PL and Klassen CD. Tolerance to cadmium induced toxicity depends on presynthesized metallothionein in liver, *J. Toxicol. Environ. Health* 1984; 14: 803-812.
- Hamer DH. Metallothionein, *Ann. Rev. Biochem.* 1986; 55: 913-951.
- Langston WJ, Bebianno MJ and Burt G. Metabolic pathways in marine invertebrates. In Langston W.J., Bebianno M.J., editors. *Metal metabolism in aquatic environments*. London: Champmann and Hall. 1998; pp. 209-283.
- Piotrowski JK, Trojanowska B and Sapota A. Binding of cadmium and mercury by metallothionein in the kidneys and liver of rats following repeated administration, *Arch. Toxicol.* 1974a; 32: 351-360.
- Piotrowski JK, Trojanowska B, Wisniewska Knypl JM and Bolanowska W. Mercury binding in the kidneys and liver of rats repeatedly exposed to mercuric chloride: induction of metallothionein by mercury and cadmium, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1974b; 27: 11-19.
- Piotrowski JK and Syzmanska J. Influence of certain metals on the level of metallothionein-like proteins in the liver and kidneys of rats, *J. Toxicol. Environ. Health* 1976; 1: 991-1002.
- Satoh M, Naganuma A and Imura N. Metallothionein induction prevents toxic side effects of cisplatin and adriamycin used in combination, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1988; 21: 176-178.
- Searle PF, Davisom BL, Stuart GW, Wikie TM, Norstedt G and Palmiter RD. Regulation, linkage and sequence of mouse metallothionein 1 and 2 genes, *Molec. Cell Biol.* 1984; 4: 1221-1230.
- Viarengo A and Nott JA. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates, *Comp. Biochem. Physiol.* 1993; 104C: 355-372.