

A Protective Effect of Chlorella Supplementation on Cadmium-induced Nephrotoxicity in the Rats

Yoo-Kyeong Hwang¹, Hyun-Jin Choi¹, Meng Nan¹, Jai-Du Yoo² and Yong-Ho Kim^{1,3†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea.

²Department of Clinical Pathology, Masan College, Masan 100, Korea.

³Department of Biohealth Products Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

The uptake of cadmium in animals is mainly accumulated in and affected to the liver and kidney by binding with red blood cells and serum albumin. The process accounts for more than 50% of the total accumulated cadmium in the body. The kidneys may be damaged without regarding the pathway uptake of cadmium. In a group of rats on supplements of 1% chlorella and 40 ppm cadmium, the concentration of cadmium in urine greatly decreased by 66% compared to control group, and the total synthesis of metallothionein decreased by 48.6% compared to control group. However, no previous study has assessed the protective effect on kidney damage induced by cadmium uptake through supplementation with chlorella. This study analyzed the biochemical marker for kidney damage in the rats after uptake of 40 ppm CdCl₂ and supplementation of the diet of Sprague Dawley (SD) rats with 1%, 5%, and 10% chlorella during 4 weeks. In a group of SD rats on supplementation with 1% chlorella and uptake of 40 ppm CdCl₂, β_2 microglobulin in the urine was found to be $3.1 \pm 0.6 \mu\text{g/L}$, a decrease of 58% compared to a group of SD rats on uptake of CdCl₂ only, in which the β_2 microglobulin was found to be $4.9 \pm 0.7 \mu\text{g/L}$. According to the results of histopathological observation, the accumulation of mild and localized chronic inflammatory cells in kidney tissues was observed in 50% of the SD rats on uptake of cadmium only. In contrast, only 30% of the SD rats on supplementation with 1% chlorella and uptake of 40 ppm CdCl₂, representing a histopathological abnormality, and there were no histopathological abnormalities at all in groups of SD rats on supplementation with 5% or 10% chlorella and uptake of 40 ppm CdCl₂. In conclusion, protein, calcium, and iron, which account for more than 50% of the total dried chlorella composition, may contribute to the reduction nephrotoxicity by stimulating both inhibited absorption of cadmium and increased excretion of accumulated cadmium in kidneys.

Key Words: Chlorella, Nephrotoxicity, Cadmium

서 론

체내에 흡수된 카드뮴은 적혈구, 혈청알부민과 결합되어 주로 간장, 신장 등에 분포하게 되며 여기에 축적된 카드뮴량은 생체 내 전체 축적량의 50% 이상을 차지하게 된다. 생체에 유입된 카드뮴은 생체 내 대사과정에 의하여 대사되지 못하고 천천히 배설되며 생물학적 반감기는 14~38년 정도이며 (Morit, 1984), 생체 내 유입경로와는 무관하게 소변, 대변, 모발, 손톱, 땀 등을 통하여 배설되며 그 중에서도 소변이 가장 중요한 배설경로이다 (WHO, 1992). 즉 신장의 경우

에는 카드뮴 흡입경로와 무관하게 카드뮴에 의한 손상을 크게 받을 수 있다 (Nordbery, 1992). 이러한 손상을 방어하기 위한 생체 내 역할은 metallothionein (MT) 생성과 결합 그리고 아연, 셀레늄, 철분, 단백질 등의 식이성 인자와 킬레이트화합물 생성 등이 있다 (Friberg et al., 1985). 클로렐라는 건조중량의 50% 이상이 단백질로 구성되어 있으며 철분, 엽록소 등이 풍부하며 (Kay, 1991), 1% 클로렐라를 40 ppm의 카드뮴과 동시에 환쥐에 투여한 경우 클로렐라 비투여 카드뮴 단독 투여군에 비하여 뇨 중 카드뮴 함량이 66% 낮았고 MT 중의 카드뮴 함량 37%, 총 MT 형성량 48.6%, 신장 내 유리 카드뮴량이 12.3%가 낮아 (Kim et al., 2003), 1% 클로렐라 투여에 의하여 카드뮴 흡입에 의한 신장 손상이 상당히 방어될 수 있을 것으로 예측되지만, 아직 카드뮴에 의한 신장 기능 손상의 직접적 지표 (Park et al., 1996)가 되는 β_2 microglobulin (β_2 MG)와 뇨 중 알부민 및 병리조직학적 변화에 대한 연구보고가 없다.

* 논문 접수: 2006년 2월 20일

수정재접수: 2006년 3월 15일

† 교신저자: 김용호, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607번지,

인제대학교 임상병리학과

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

e-mail: mlskimyh@inje.ac.kr

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

| Group | Number | CdCl ₂ ppm in drinking water | <i>Chlorella</i> % in basic diet |
|--------------------------|--------|---|----------------------------------|
| Control | 6 | - | - |
| Cadmium | 10 | 40 | - |
| 1% Ch + Cd ¹⁾ | 10 | 40 | 1 |
| 5% Ch + Cd | 10 | 40 | 5 |
| 10% Ch + Cd | 10 | 40 | 10 |

¹⁾ *Chlorella* + Cadmium
All groups were fed on 4 weeks with basic diet

본 연구는 40 ppm의 카드뮴과 1%, 5% 및 10%의 클로렐라를 일정기간 동안 동시 투여하면서 흰쥐 신장 손상의 지표가 되는 혈청학적 마커 및 병리조직학적인 변화를 관찰하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험 설계

실험적으로 카드뮴 식이와 함께 클로렐라를 동시에 일정기간 동안 투여시킨 흰쥐의 간장 및 신장 조직 중의 MT 형성률에 대한 실험을 하고자 체중 150±20 g의 Sprague-Dawley 중 수컷 46마리를 5군으로 나누어 Table 1과 같이 실험하였다. 실험조건은 온도 24±3°C, 습도 55~60%를 유지하고 모든 사료와 물은 자유급식 시켰다. 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. 실험 식이

기본 실험 식이는 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 (삼양사)와 클로렐라 동시 투여군은 표준 고형사료의 1%, 5% 및 10%가 되도록 클로렐라 분말을 파쇄시킨 고형사료에 각각 혼합 후 다시 성형하여 식이시켰다.

3. 시료의 채취 및 분석

1) 혈액의 채취

실험동물은 4주 동안 사육시킨 후 단두로 희생시켜 경정맥 (jugular vein)에서 혈액을 0.3 ml씩 채취하여 실온에 30분 정도 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻어 -20°C에 실험 전까지 보관하였다.

2) 뇨 채취

뇨 중의 β₂ microglobulin 분석, 알부민 분석 등을 위하여

다음과 같이 뇨를 채취하였다. 실험동물은 희생시키기 2일 전에 한 마리씩 metabolic cage에 넣어 0.85% NaCl 용액 1 L에 칼슘 함량이 5 mEq/L를 부하 실험용으로 첨가시켜 6시간 동안 투여하였다. 식염 투여 2시간 후부터 2일에 걸쳐 뇨를 채취하였으며, 채취된 뇨는 뇨량을 측정하고 즉시 2,000 ×g에서 5분 간 원심분리 하여 상층액을 -20°C에 동결보존 하였다.

3) 장기의 채취

실험동물을 사육 마지막 일에 희생시키고 혈액을 채취한 다음 즉시 개복하여 신장을 절취하여 병리조직학적 염색을 위하여 10% neutral buffered formalin (NBF) 고정액에 고정시켰다.

4) 혈액 및 뇨 중의 β₂-microglobulin 분석

냉동시켰던 시료를 실온에서 완전히 용해시킨 후 micro-particle enzymeimmunoassay #2 (MEIA #2) 희석완충액으로 희석시킨 다음 반반씩 나누어 한 측은 MEIA #2 완충액을 다른 한 측에는 anti-β₂-MG가 코팅된 microparticles를 첨가한 후 incubation시켜 형성된 항원-항체 복합체를 MEIA optical assembly를 이용한 IMX system (Abbott Diagnostics)으로 2회 반복 측정하여 평균값을 취하였다.

5) 혈청 크레아티닌의 분석

동결보존한 혈청을 사용전 실온으로 녹인 후 Olympus AU5200 자동 생화학 분석기를 이용하여 분석하였다. 반응은 알칼리성 용액 중에서 크레아티닌이 picric acid와 반응하여 등적색의 creatine picrate를 형성하는 Jaffe 반응을 이용한 비색법 (Heinegard and Tiderstrom, 1973)을 이용하였다. 분석은 혈청 중의 크레아티닌을 2회 분석하고 그 평균값을 취하였다.

6) 뇨 중 알부민의 정성적 분석

원심분리한 뇨 검체에 tetrabromophenol blue가 포함된 뇨 단백질 정성시험지를 이용하여 뇨 중 알부민을 정성분석 하였다.

7) 병리조직학적 염색

NBF 고정액에 고정시켰던 신장 조직을 자동 파라핀 침투기 (Sakura, Japan)를 사용하여 저농도에서 고농도로의 알코올 탈수과정을 거쳐 파라핀 침투하였고, 이어 포매과정을 거쳐 회전형 박절기로 4 μm 두께의 절편을 얻어 45°C 부유 온수조에서 주름을 편 후 60°C 신진기에서 탈 파라핀 후 핵 염색을 위해 퇴행성 염색법으로 Gill's V hematoxylin & eosin 염색 (H&E 염색)을 하여 현미경으로 관찰하였다.

8) 자료처리

본 실험에서 얻어지는 모든 자료는 mean ± S.D를 구하였고 one-way ANOVA 분석과 SAS program을 이용하여 각 군 간의 평균값 분석, 유의성 검정을 하였다.

Table 2. β_2 -Microglobulin levels in serum and urine

| Group | unit: $\mu\text{g/L}$ | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Serum Mean \pm S.D. | Urine Mean \pm S.D. |
| Control | 2.9 \pm 0.5 | 3.8 \pm 0.2 |
| Cadmium | 3.4 \pm 0.4 | 4.9 \pm 0.7 |
| 1% Ch + Cd ¹⁾ | 3.3 \pm 1.6 | 3.1 \pm 0.6 |
| 5% Ch + Cd | 4.0 \pm 0.6 | 3.0 \pm 1.1 |
| 10% Cd + Cd | 3.4 \pm 0.4 | 3.1 \pm 0.3 |

serum: one-way ANOVA: $F_{(4,29)} = 2.195$, $P = 0.0944$

Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 7.975$, $df = 4$, $P = 0.0925$

urine : one-way ANOVA: $F_{(4,29)} = 11.169$, $P = 0.0001$

Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 19.759$, $df = 4$, $P = 0.0006$

¹⁾Chlorella + Cadmium: a given dose of chlorella + 40 ppm Cd

Table 3. Creatinine levels in serum

| Group | unit: mg/dl | |
|--------------------------|-----------------|-----------|
| | Mean \pm S.D. | Mean rank |
| Control | 0.58 \pm 0.05 | 23.4 |
| Cadmium | 0.56 \pm 0.08 | 19.4 |
| 1% Ch + Cd ¹⁾ | 0.56 \pm 0.07 | 19.3 |
| 5% Ch + Cd | 0.54 \pm 0.09 | 19.9 |
| 10% Ch + Cd | 0.53 \pm 0.05 | 15.1 |

one-way ANOVA: $F_{(4,32)} = 0.407$, $P = 0.8023$

Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 20135$, $df = 4$, $P = 0.7110$

¹⁾Chlorella + : a given dose of chlorella + 40 ppm Cd

결 과

1. 혈청 및 뇨 중의 β_2 MG 분석

혈청 중의 β_2 MG 분석은 모든 실험군 및 대조군에서 근소한 값을 나타내어 통계적 의의가 없었으나 뇨 중 β_2 MG 분석은 카드뮴 단독 투여군에서 4.9 \pm 0.7 $\mu\text{g/L}$ 의 값을 나타낸데 비하여 1% 클로렐라 카드뮴 동시 투여군은 58%가 저하된 3.1 \pm 0.6 $\mu\text{g/L}$ 의 값을 보였으며 1%, 5% 및 10% 클로렐라 투여군사이의 유의할만한 차이는 없었다 (Table 2).

2. 혈청 중의 크레아티닌 분석

신장의 사구체 여과 기능에 대한 정보를 얻을 목적으로 혈청 중의 크레아티닌 농도를 분석하였다. 대조군, 카드뮴 단독 투여군 및 클로렐라와 카드뮴 동시 투여군은 모두 유사한 혈청 중 크레아티닌 분석값을 보여 통계적 의의가 없었다.

카드뮴 단독 투여군의 분석값 0.56 \pm 0.08 mg/dl에 비교하여 1% 클로렐라와 카드뮴 동시 투여군은 0.56 \pm 0.07 mg/dl 이므로 거의 동일한 결과를 보였다 (Table 3).

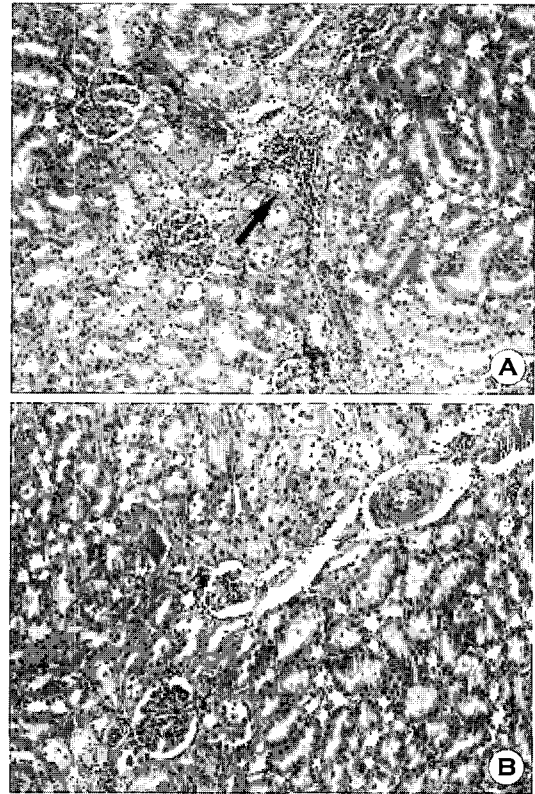


Fig. 1. (A) Mild focal interstitial mononuclear leukocytic infiltration (arrow) in the kidney of cadmium-treated rat (H & E, $\times 100$). (B) Well preserved renal parenchyma with no conspicuous inflammatory reaction in the kidney of chlorella-cadmium treated rats (H & E, $\times 100$).

3. 뇨 중 알부민의 정성분석

뇨 중 알부민에 대한 정성분석 결과 클로렐라 단독 투여군에서는 60%가 양성반응을 보인 반면 1% 클로렐라, 카드뮴 동시 투여군에서는 24%에서 뇨 중 알부민 양성반응을 보였다. 5% 및 10% 클로렐라 카드뮴 동시 투여군에서는 모두 음성 결과를 보였다.

4. 신장 조직의 병리학적 분석

H&E 염색 후 현미경적 관찰 결과 카드뮴 단독 투여군에서는 10예 중 5예에서 신장의 기질 부위에 중도의 국소적 만성염증세포 침윤이 관찰되었다 (Fig. 1A). 그러나 1% 클로렐라 카드뮴 동시 투여군에서는 10예 중 3예에서 중도의 국소적 염증반응이 나타났으며 5 및 10% 클로렐라 카드뮴 동시 투여군에서는 이상소견이 관찰되지 않았다 (Fig. 1B).

고 찰

카드뮴의 병리학적 기전은 아직 정확히 알려진 바가 없고

동물실험 결과 등을 토대로 몇몇 가설이 제기되고 있다.

Goyer 등이 쥐에 카드뮴을 주입한 후 신장의 원위세뇨관에서의 병리조직학적 소견을 관찰한 결과를 보면 세포막의 변성, 미토콘드리아 등 세포 내 소기관들의 변성 및 세포의 부분적 괴사 등이 관찰되었다 (Goyer et al., 1984). MT와 결합하지 못한 유리 카드뮴은 단백질대사와 신세뇨관에서 단백질의 재흡수에 중요한 역할을 하는 leucine aminopeptidase의 작용을 억제한다고 하였다 (Cherian et al., 1976; Aughey et al., 1984).

한편, β_2 MG는 저분자 단백질로서 신사구체를 통과하여 신장근위세뇨관에서 쉽게 재흡수되지만, 만약 신장근위세뇨관의 재흡수 기능이 저하되면 비정상적으로 뇨 중 배설량이 증가하게 된다 (Aughey, 1984). 본 연구 결과에서도 대조 및 실험군의 혈청 내 측정값은 유사한 값을 보임에도 불구하고 카드뮴 단독 투여군에 대한 뇨 중 β_2 MG 값은 1% 클로렐라와 카드뮴 동시 투여군에 비하여 58%가 증가 되었다. 따라서 카드뮴 단독 투여군 사구체 여과 기능은 정상일지라도 신장 재흡수 기능이 저하되어 뇨 중 β_2 MG 배설량이 크게 증가 되었으나 1% 이상의 클로렐라를 동시에 투여한 경우에는 카드뮴 독성에 의한 신장 재흡수 기능 손상이 저하된 것으로 생각된다 (Koong et al., 1985). 또한 뇨 중 알부민 분석 결과 카드뮴 단독 투여군은 60%에서 양성을 보인 반면 1% 클로렐라와 카드뮴 동시 투여군에서는 24%가 양성을 보여 1% 이상의 클로렐라를 카드뮴과 동시에 투여한 경우는 뇨 중 카드뮴 배설 감소, 유리 카드뮴을 감소시킬 뿐 만 아니라 신장의 재흡수 기능 손상을 방지한다고 생각된다 (Bernard, 1981).

이외에도 병리조직학적 관찰에서도 카드뮴 단독 투여군의 50%에서 신장기질부위의 정도의 국소적 만성염증세포 침윤이 관찰되었으나 1% 클로렐라와 카드뮴 동시 투여군에서는 30%, 그리고 5% 이상 클로렐라 투여군에서는 비정상적인 조직 검사소견을 전혀 보이지 않아 앞에 기술한 β_2 MG, 뇨 중 알부민 결과와도 일치된 경향을 나타내고 있다 (Cherian et al., 1976; Bernard et al., 1981; Aughey et al., 1984). 이러한 실험적 결과는 이해영 등이 연구보고한 단백질 농도의 증가가 카드뮴 흡수억제, 뇨를 통한 배설 증가 및 체내 카드뮴 보유량을 감소시킨다고 한 보고 (Lee and Kim, 1988)와 유사한 경향을 보였고, 이외에도 식이 중의 칼슘, 철분 함량이 카드뮴 독성을 감소시켰다고 한 연구보고 (Hamilton and Valbery, 1977; Lee and Cho, 1991)와 유사한 경향을 보여 클로렐라 중의 50% 이상을 차지하는 단백질 그리고 칼슘, 철분 등에 의하여 카드뮴 흡수억제, 배설 증가 등을 촉진하여 카드뮴에 의한 신장 기능 저하를 경감시킨 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Aughey E, Fell GS, Scott R, Black M. Histopathology of early effects of oral cadmium in the rat kidney. *Environ Health Perspectives* 1984. 54: 153-161.
- Bernard A, Lauwerys R, Gengoux P. Characterization of the proteinuria induced by prolonged oral of cadmium in female rats *Toxicology* 1981. 20: 345-357.
- Cherian MG, Goyer RA, Richardson LD. Cadmium-metallothionein-induced nephropathy. *Toxicol Appl pharmacol.* 1976. 38: 399-408.
- Friberg L, Elinder CG, Kjellström T, Nordberg GF. Cadmium and health: A Toxicology and Epidemiological Appraisal. 1985. Vol I, pp 162-163. CRC press. NY, USA.
- Goyer RA, Cherian MG, Delaquerriere RL. Correlation for parameters of cadmium exposure with onset of cadmium-induced nephropathy in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1984. 5: 89-100.
- Hamilton DL, Valbery LS. Relationship between cadmium and iron absorption. *Am J Physiol.* 1977. 227: 1035-1037.
- Heinegard D, Tiderstrom G. Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta.* 1973. 43: 305.
- Kay RA. Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1991. 30: 555-573.
- Kim YH, Hwang YK, Lee YW, Yun JY, Hwang YM, Yoo JD. Effect of chlorella diet supplementation on blood and urine cadmium level in cadmium poisoned rats. *J Biomed Lab Sci.* 2003. 9: 133-137.
- Koong SS, Oh HY, Han JS, Lee JS. The significance of serum beta₂-microglobulin measurement in various renal diseases. *Kor J Nuclear Med.* 1985. 19: 127-136.
- Lee HY, Kim MK. Effects of dietary cadmium and protein levels on the body protein metabolism and cadmium toxicity in growing rats. *Kor J Nutr.* 1988. 21: 410-420.
- Lee JS, Cho SY. Effects of dietary protein and calcium levels on hematological properties and renal functions of the Pb-administered rats. *J Kor Soc Food Sci Nutr.* 1991. 20: 337-345.
- Morit S. Defense mechanisms against cadmium toxicity. *Japan J Pharmacol.* 1984. 35: 129. 1
- Nordberg GF. Application of the 'critical effect' and 'critical concentration' concept to human risk assessment for cadmium. *IARC Sci Publ.* 1992. 118: 3-14.
- Park JD, Lee WS, Kong Y, Hong YP, Chang IW. Biological Index

for cadmium exposure: Assay of metallothionein by competitive ELISA. Kor J Occup Med. 1996, 8: 258-271.

WHO. Cadmium. World Health Organization. 1992. Geneva meeting.