

마우스에 있어서 카드뮴의 免疫毒性에 미치는
人蔘석유 Ether 分劃의 影響(I)

安榮根 · 金正勳 · 李相根 · 黃甲洙

圓光大學校 藥學大學

Effect of Ginseng petroleum Ether Fraction on
the Immunotoxicity of Cadmium in Mice (I)

Young Keun Ahn, Jung Hook Kim, Sang Keun Lee and Gab Soo Hwang

College of pharmacy, Won Kwang University

ABSTRACT

Experiment was performed to investigate the immunotoxicity of cadmium administered orally and the effect of ginseng petroleum ether fraction on it.

Mice were given 3, 30, or 300 ppm cadmium as cadmium chloride orally in the drinking water and injection of ginseng petroleum ether fraction intraperitoneally for 4 weeks. Mice were sensitized and challenged with sheep red blood cells (S-RBC).

Humoral immune response was evaluated by antibody production and Arthus reaction. Body weight gain, spleen weight, thymus weight, and liver weight were also measured.

In the present study, cadmium generally suppressed the humoral immunity. There was decrease in the rate of body weight gain and liver weight to body weight by cadmium-administration.

Ginseng petroleum ether fraction showed restoring effect, to some extent, on the decrease in PFC and in the rate of liver weight to body weight by cadmium-administration. But it more suppressed Arthus reaction.

緒 論

環境汚染物質 中の 하나인 카드뮴(以下 Cd)은

이따이-이따이病(Itai-Itai disease)의 原因物質로 우리에게 잘 알려져 있으며 페인트, 플라스틱 안정劑, 축전지, 살충제, 비료, varnish, 담배종이, 自動車연료, 新聞用紙, 땀납, 담배等 우리生活과

밀접한分野에 널리 分布되어 있다. 따서 그 汚染에 對한 深刻性이 날로 增大되고 있으며 만성중독時 肺氣終腫, 단백질, 腎毒性, 肝毒性, 貧血, 高血症, 고환염 (testitis), 骨軟化症, 自然骨折 등을 誘發할 수 있음은 周知의 事實이다.

Cd의 免疫毒性에 對해서는 그동안 投與量, 投與經路, 投與期間 및 實驗動物 등에 따른 여러가지 相異한 結果들이 報告되어 왔다. Cook 등은 rat에 體重 100 g當 0.60 mg의 Cd를 靜脈注射時 E. coli에 對한 感受性이 1000배 增加하였다고 하였으며⁹⁾ Koller 등은 Cd 0.15 mg을 mouse에 1回 經口 投與時 IgM 및 IgG의 생성이 현저히 抑制된다고 보고하였으며¹²⁾ Bozelka 등은 mouse에 Cd 2 ppm을 40日 동안 복강투여時 IgM 및 IgG의 생성이 현저히 抑制된다고 하였다. 또한 Malave 등은 300 ppm의 Cd를 3~4週 또는 9~10週 동안 飲用시켰을 때 S-RBC에 對한 抗體反應이 抑制됨을 보고하였으며¹⁷⁾ Koller 등은 mouse에 3 ppm의 Cd를 10週 동안 經口 投與時 IgM 및 IgG의 合成이 抑制되며 그 IgG에 對한 抑制는 數週 동안 持續된다고 하였다¹⁸⁾. 반면에 Chowdhury 등은 mouse에 50 ppm의 Cd를 3週 동안 飲用케 하였을 때 IgM 생성세포 및 IgG 생성세포가 현저히 增加하고 suppressor-T cell이 현저히 減少한다고 報告하였으며¹⁹⁾ Fujimaki 등은 in vitro에서 4~8 μ M의 Cd에 의해 抗體 생성세포가 增加되었으나 20~40 μ M의 Cd에 의해서는 抗體 생성세포가 減少되었다고 하였다²⁰⁾ 또한 Balter 등은 Cd가 lipopoly saccharide (LPS) 및 concanavalin A (Con A)의 mitogenesis를 增強시킨다고 하였으며²¹⁾ Koller 등은 mouse에 0.15 mg의 Cd를 腹腔注射로 1回 投與時 IgM 생성세포가 약간 增加되었고 Cd에 의해 mouse의 peritoneal macro phage 活性이 增加되었다고 하였다^{12,22)}.

한편 人蔘은 東洋의 靈藥 또는 仙藥으로 유명하며 日華子諸家本草에 의하면 食을 開하고 胃를 開하며 中을 調하고 氣를 活하며 金石의 毒藥을 殺함 이라고 하였고, 최근 中國에서는 人蔘七効說, 즉 補氣救脫, 益血復脈, 良心安神, 生津止渴, 補

肺定喘 健脾止渴, 托毒合瘡이라고 人蔘의 効能을 기술하고 있어 그 藥効의 多元性을 알 수 있다³⁰⁾ Kim 등은 人蔘水浸液이 납중독 rat에 있어서 납排泄을 促進하고 납에 의한 amino levulinic acid dehydratase (ALAD)의 低下를 抑制하여 납해독 작용이 있음을 報告하였고³¹⁾ Lee 등은 人蔘의 ether ex.가 抗腫瘍 効果가 있음을 밝혔으며³²⁾ Ahn 등은 人蔘 석유 ether 分割이 體液性 및 細胞性 免疫修飾作用이 현저하다고 報告하였다³³⁾.

앞에서 言及하였듯이 Cd의 免疫反應에 對해서는 그동안 많은 報告들이 있었지만 아직 그에 對한 明確한 體系的인 解明이 부족한 바 근간의 날로 더해가는 環境問題의 심각성에 비추어 그에 대한 더 많은 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다. 이에 著者는 우리 人體가 실제로 Cd에 暴露되는 主要經路인 經口를 通하여 Cd를 mouse에 用量別로 投與한 後 體液性 免疫反應에 미치는 影響을 檢討하고 同時에 그에 對한 人蔘 석유 ether 分割의 効果가 기대되어 本 實驗을 實施하여 몇가지 有意한 結論을 얻었기에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗動物

生後 5~6週齡 體重 17~21 g의 雄性 ICR mouse를 경남축산(경기도 화성군 소재)에서 分讓받아 實驗動物用 飼料(第一飼料 Co.)로 1주일간 適應시킨 後 各 實驗群으로 分類하여 溫度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 溫度 50~60%로 유지되는 飼育實에서 사육하였다.

2. 群의 分類

群의 分類는 Table 1과 같이 하였으며 各 群當 實驗動物數는 30마리로 하였다.

3. 供試藥物的 調製 및 投與

1) Cadmium chloride 溶液의 調製 및 投與
Cadmium chloride (Sigma Co.)를 증류수에 잘

溶解하여 Cd 3 ppm溶液, Cd 30 ppm溶液, Cd 300 ppm 溶液을 調製하였으며 Table 1에 따라 4 주동안 任意로 飲用케 하였다.

2) 人蔘 석유 Ether抽出物の 調製 및 投與

人蔘細末 50 g을 300 ml의 석유ether에 넣고 15 時間동안 soxhlet製置로 抽出하고 NO₂ gas를 充 填시켜 人蔘 석유ether分劃을 얻은 後 그 中 100 mg을 小量의 無水ethanol에 溫潤시키고 phos- phate buffered saline(以下 PBS) 100 ml에 溶解 하여 Table 1과 같이 10 mg/kg, body wt. 를 1日 1回 定한 時刻에 腹腔內 注射하였다.

Table 1. Exposure schedule of cadmium and ginseng petroleum ether fraction.

| Group | Ginseng fraction (mg/kg body wt.) |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Normal | - |
| Cd 3 ppm | - |
| Cd 3 ppm + Ginseng fr. | 10 |
| Cd 30 ppm | - |
| Cd 30 ppm + Ginseng fr. | 10 |
| Cd 300 ppm | - |
| Cd 300 ppm + Ginseng fr. | 10 |
| Ginseng fr. | 10 |

Mice were given cadmium as cadmium chloride orally in the drinking water.

4. 體重 및 臟器의 重量計測

1) 體重; 實驗動物의 體重은 Cadmium chlo- ride溶液 및 人蔘 석유 Ether 分劃의 研究 開始日 과 最終日에 測定하였다.

2) 臟器重量; 實驗動物의 頸動脈을 切斷, 採血 後 肝臟, 脾臟 및 胸腺을 摘出하고 그 重量을 測定하여 對體重百分化를 구하였다.

5. 抗原의 調製 및 免疫

1) 抗原; 本 實驗에서는 緬羊赤血球(Sheep red blood cell; 以下 S-RBC)를 使用하였는데 그 方法은 雄性 緬羊의 頸動脈으로부터 Heparin을 加한 注射器 採血한 後 同量의 Alserver'氏液(pH 6. 1)을 加하여 4°C에서 保存하여 그 週日 以內에 使

用하였다. 保存 中인 S-RBC를 使用할 때에는 使用 直前 PBS로 3回 遠心洗滌한 後 적절한 濃度로 Hank's balanced salt solution(以下 HBSS)에 浮遊시켜 使用하였다.

2) 免疫; 上記 抗原浮遊液 0.1 ml(1×10^7 S-RBC)를 Reed等의 報告를 參考로 mouse의 尾靜脈에 注射하여 1次免疫을 實施하였다³⁶⁾. 二次免疫은 1次免疫 4日 後 mouse의 左側後肢足蹠皮內에 2×10^9 S-RBC/ml 浮遊液 0.05 ml(1×10^8 S-RBC)를 注射하여 實施하였다.

6. 赤血球凝集素價 및 溶血素價의 測定

1) 血清의 分離 및 非動化

Mouse의 頸動脈을 切斷하여 血液을 採取 凝固시킨 後에 遠心分離하여 血清을 分離하고 56°C에서 30分間 非動化시킨 後 4°C에서 保存하여 使用하였다.

2) 赤血球凝集素價(Hemagglutinin titer; 以下 HA titer)의 測定

S-RBC의 凝集素價를 microtitration tray를 使用하여 다음과 같이 實施하였다. 즉 各 實驗動物로 부터 얻은 個個의 非動化 血清을 各 well에 HBSS로 2倍 系列稀釋한 後 HBSS에 浮遊한 0.5 % S-RBC 0.025 ml를 잘 混和한 다음 37°C에서 18時間 放置하여 赤血球의 凝集類型을 觀察 判讀하였으며 凝集을 일으키는 血清의 最高稀釋度를 그 血清의 凝集素價로 하였다³⁷⁾.

3) 赤血球溶血素價(Hemolysin titer; 以下 HY titer)의 測定

S-RBC의 量 및 血清의 稀釋은 凝集素價 測定時와 同一하게 實施하였으며 S-RBC와 稀釋血清이 들어있는 各 well에 guinea pig complement 를 20倍로 稀釋하여 0.025 ml씩 加한 다음 37°C에서 1時間 放置하여 溶血여부를 觀察하였다. 이때에 完全溶血을 일으키는 血清의 最高稀釋度를 그 力價로 判讀하였다³⁷⁾.

7. 足蹠腫脹反應 測定(Foot pad swelling test)

Arthus 反應을 測定하기 위하여 Reed 等이 記述한 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다³⁶⁾. 즉 1차 免疫 4日 後에 S-RBC 0.05 ml (1×10^8 cell)를 mouse의 左側後肢足蹠에 皮內注射하였다. 注射 後 3~4時間이 經過한 後 腫脹의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper로 測定하였으며 腫脹 程度의 測定價는 誤差를 避하기 위하여 2回 測定한 數値를 平均하였다. 足蹠腫脹指數는 다음과 같이 表示하였다.

$$\text{Foot pad swelling index (F.P.S.I)} \\ = \frac{\text{腫脹두께} - \text{正常두께}}{\text{正常두께}} \times 100$$

8. 脾臟細胞의 溶血斑 形成細胞(Plaque forming cell; 以下 PFC)의 檢出

1) 脾臟細胞의 溶血斑 形成細胞 數를 Cunningham의 方法을 使用하여 다음과 같이 測定하였다³⁸⁾. 摘出した 脾臟을 氷冷의 HBSS와 함께 粉碎하여 脾臟細胞를 유리시키고 400×g에서 5分間 遠心分離하였다. 上澄液을 除去한 後 37°C의 0.83% NH_4Cl 溶液에 浮遊시켜 3分間 放置하여 赤血球를 溶解, 除去시킨 後 脾臟細胞 數를 血球計算板에서 檢鏡, 觀察하였다.

2) S-RBC를 PBS로 4回 洗滌하고 (400×g) PBS에 4×10^8 S-RBC의 濃度로 浮遊시켰다.

3) 4×10^8 S-RBC 250 μl , guinea pig complement (Gibco Lab. Ltd) 500 μl 를 混合하여 ice bath 上에서 30分間 放置한 後 使用하였다.

4) 上記 guinea pig complement 와 4×10^8 S-RBC 混合液 150 μl , 脾臟細胞 浮遊液 650 μl 를 잘 混合하여 microchamber (76×26 mm)에 100 μl 씩 注入하고 wax-vaseline(1:1)으로 밀봉하여 CO_2 incubator에서 37°C, 1시간 배양 後 形成된 溶血斑數를 間接광선下에서 測定하였다.

5) 100단개의 脾臟細胞 中の 溶血斑形成細胞數 (PFC/ 10^6 spleen cells)를 求하였다.

實驗 結果

Mouse에 있어서 Cd의 免疫毒性 및 그에 미치는 人蔘 석유 ether分劃의 影響을 알아보고자 實施한 本 實驗의 結果는 다음과 같다.

1. 體重, 脾臟, 胸腺 및 肝臟의 重量變化

1) 體重의 變化

各 群의 體重의 變化는 Table 2와 같다. 正常群의 體重增加率이 $45.78 \pm 17.66\%$ 인데 非해 Cd 30 ppm 投與群과 Cd 300 ppm 投與群에서 各各 $25.50 \pm 11.98\%$, $25.30 \pm 10.05\%$ 로 매우 有意性있게 減少하였다. 各 Cd 投與群에 비해 Cd 3 ppm 및 人蔘 석유 ether分劃 병용 投與群에서는 體重增加率이 減少現象을, Cd 30 ppm 및 人蔘 석유 ether分劃 병용 投與群과 Cd 300 ppm 및 人蔘 석유 ether分劃 병용 投與群에서는 體重增加率이 增加現象을 보였으나 모두 有意성은 없었다. (Table 2)

Table 2. Changes in body weight by cadmium and the effect of ginseng petroleum ether fraction on it.

| Group | Initial wt. (gm) | Final wt. (gm) | Increased rate (%) |
|--------------------------|------------------|----------------|--------------------|
| Normal | 16.95±1.32 | 24.71±2.57 | 45.78±17.66 |
| Cd 3 ppm | 16.86±1.37 | 24.58±3.75 | 45.29±18.71 |
| Cd 3 ppm + Ginseng fr. | 18.72±1.54 | 26.05±2.26 | 40.20±13.62 |
| Cd 30 ppm | 17.59±0.83 | 21.90±4.70 | 25.50±11.98** |
| Cd 30 ppm + Ginseng fr. | 18.15±1.15 | 24.00±2.99 | 32.23±16.72 |
| Cd 300 ppm | 17.67±1.42 | 22.14±3.63 | 25.30±10.05** |
| Cd 300 ppm + Ginseng fr. | 16.87±1.41 | 23.20±2.91 | 37.52±15.15 |
| Ginseng fr. | 16.92±5.49 | 24.96±4.68 | 51.80±14.69 |

Each value is the mean±S.D. of 8~10 mice.

Significant difference from normal group. (*p<0.05, **p<0.01)

2) 肝臟의 重量變化

Table 3에서 보는 바와 같이 肝臟의 對體重非는 正常群이 5.73±1.15%인데 비해 Cd 投與群들에서 各各 4.44±0.94%, 4.20±0.38%, 3.97±0.34로 容량의존적으로 減少하였으며 特히 Cd 30 ppm 投與群과 Cd 300 ppm 投與群에서는 매우 有意性있게 減少하였다. 한편 各 Cd 投與群에 비해 Cd 3 ppm 및 人蔘 석유 ether分劃 병용 投與群과 Cd 30 ppm 및 人蔘 석유 ether分劃 병용 投與群

에서는 增加現象은 보였으나 有意성은 없었고 Cd 300 ppm 및 人蔘 石油 ether分劃 병용 投與群에서 有意性있게 增加하였다.

3) 脾臟 및 胸腺의 重量變化

脾臟의 重量變化는 Table 4에서 보는 바와 같이 脾臟重量의 對體重比가 正常群에 비해 Cd 投與群들에서 減少현상을 보였으나 有意성은 없었고 各 Cd 投與群에 비해 Cd 3 ppm 및 人蔘 석유 ether分劃 병용 投與群과 Cd 30 ppm 및 人蔘 석유 ether分劃 병용 投與群에서 有意性있게 增加하였다.

胸腺重量 對體重比는 正常群에 비해 Cd 300 ppm 投與群에서 매우 有意性있게 증가하였으며 各 Cd 投與群에 비해 Cd 및 人蔘 석유 ether分劃 병용 投與群에서는 有意성이 없었다(Table 4).

Table 3. Changes in liver weight by cadmium and the effect of ginseng petroleum ether fraction in mice.

| Group | Liver wt. (gm) | Rate to body wt. (%) |
|--------------------------|----------------|----------------------|
| Normal | 1.42±0.38 | 5.73±1.15 |
| Cd 3 ppm | 1.09±0.27 | 4.44±0.94 |
| Cd 3 ppm + Ginseng fr. | 1.32±0.35 | 5.43±1.60 |
| Cd 30 ppm | 1.10±0.12 | 4.20±0.38** |
| Cd 30 ppm + Ginseng fr. | 1.08±0.22 | 4.65±1.10 |
| Cd 300 ppm | 0.87±0.17 | 3.97±0.37** |
| Cd 300 ppm + Ginseng fr. | 1.26±0.32 | 5.24±1.41☆ |
| Ginseng fr. | 1.97±0.17 | 5.90±0.31 |

Each value is the mean±S.D. of 8~10 mice.
 Significant difference from normal group. (*p<0.05, **p<0.01)
 Significant difference from each Cd control group. (☆p<0.05, ☆☆p<0.01)

2. 體液性 免疫에 미치는 影響

1) 赤血球凝集素價 및 赤血球溶血素價

Table 5에서는 보는 바와 같이 赤血球凝集素價 (HA titer)는 正常群이 3.80±0.75인데 비해 Cd 30 ppm 投與群과 Cd 300 ppm 投與群에서 各各 2.25±0.29, 2.50±0.50으로 매우 有意性있게 減少하고 人蔘 석유 ether分劃 投與群에서 4.50±0.50으로 정상군에 비해 有意性있게 증가하였으며 各 Cd 投與群에 비해 Cd 3 ppm 및 人蔘 석유 ether分劃 병용 投與群에서는 增加現象을 보였으나 유

Table 4. Changes in lymphoid organ weight by cadmium and the effect of ginseng petroleum ether fraction in mice.

| Group | Spleen wt. (gm) | Rate to Body wt. (%) | Thymus wt. (gm) | Rate to Body wt. (%) |
|--------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| Normal | 0.33±0.19 | 0.78±0.29 | 0.027±0.008 | 0.11±0.03 |
| Cd 3 ppm | 0.16±0.06 | 0.68±0.24 | 0.028±0.013 | 0.11±0.05 |
| Cd 3 ppm + Ginseng fr. | 0.25±0.13 | 1.02±0.56 | 0.039±0.022 | 0.15±0.08 |
| Cd 30 ppm | 0.16±0.06 | 0.65±0.22 | 0.039±0.016 | 0.13±0.07 |
| Cd 30 ppm + Ginseng fr. | 0.18±0.05 | 0.81±0.30 | 0.036±0.017 | 0.14±0.06 |
| Cd 300 ppm | 0.12±0.07 | 0.56±0.27 | 0.037±0.013 | 0.24±0.17** |
| Cd 300 ppm + Ginseng fr. | 0.20±0.07 | 0.83±0.28☆ | 0.045±0.017 | 0.20±0.05 |
| Ginseng fr. | 0.15±0.02 | 0.60±0.12 | 0.034±0.014 | 0.13±0.04 |

Each value is the mean±S.D. of 8~10 mice.
 Significant difference from normal group. (*p<0.05, **p<0.01)
 Significant difference from each Cd control group. (☆p<0.05, ☆☆p<0.01)

의성은 없었으며 Cd 30 ppm 및 人蔘 석유 ether 分割 병용 투여군에서 유의성있게 증가하였다.

한편 赤血球溶血素價(HY titer)는 正常群에 비해 Cd 30 ppm 投與群에서는 매우 유의성있게, Cd 300 ppm 投與群에서는 유의성있게 감소하였으며 각 Cd 投與群에 비해 Cd 및 人蔘 석유 ether 分割 병용 投與群에 비해 Cd 및 人蔘 석유 ether 分割 병용 投與群들에서는 유의성있는 변화가 없었다.

Table 5. HA and HY titer by cadmium and the effect of ginseng petroleum ether fraction.

| Group | HA titer (\log_2) | HY titer (\log_2) |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Normal | 3.80±0.75 | 4.60±1.01 |
| Cd 3 ppm | 3.60±0.48 | 4.40±1.01 |
| Cd 3 ppm + Ginseng fr. | 4.20±0.97 | 4.40±4.49 |
| Cd 30 ppm | 2.25±0.29** | 2.80±0.97** |
| Cd 30 ppm + Ginseng fr. | 2.75±0.47☆ | 3.60±0.80 |
| Cd 300 ppm | 2.50±0.50** | 3.06±0.73** |
| Cd 300 ppm + Ginseng fr. | 2.56±0.54 | 3.00±1.09 |
| Ginseng fr. | 4.50±0.50* | 5.20±0.74 |

Mice were challenged with 1×10^8 S-RBC 4 days after sensitization.

On the 5th day. HA titer and HY titer were assayed.

Each value is the mean±S.D. of 8~10 mice.

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

Significant difference from each Cd control group.

(☆p<0.05, ☆☆p<0.01)

2) Arthus 反應

Arthus 反應의 結果는 Table 6에서 보는바와 같이 足蹠腫脹指數(F.P.S.I)가 正常群에 비해 Cd 投與群들에서는 유의성있는 변화가 없었고 人蔘 석유 ether 分割 投與群에서 正常群에 비해 매우 유의성있게 감소하였으며 각 Cd 投與群에 비해 Cd 30 ppm 및 人蔘 석유 ether 分割 병용 投與群과 Cd 300 ppm 및 人蔘 석유 ether 分割 병용 投與群에서 유의성있게 감소하였다(Table 6).

3) 脾臟細胞의 Plaque形成細胞(PFC)

脾臟細胞의 PFC는 Table 7에서 보는 바와 같

Table 6. Arthus reaction by cadmium and the effect of ginseng petroleum ether fraction on it in mice.

| Group | F.P.S.I |
|--------------------------|-------------|
| Normal | 13.51±4.68 |
| Cd 3 ppm | 13.29±3.65 |
| Cd 3 ppm + Ginseng fr. | 13.16±3.88 |
| Cd 30 ppm | 16.47±4.64 |
| Cd 30 ppm + Ginseng fr. | 10.42±4.43☆ |
| Cd 300 ppm | 12.31±4.47 |
| Cd 300 ppm + Ginseng fr. | 7.59±3.73☆ |
| Ginseng fr. | 6.84±2.47** |

Each value is the mean±S.D. of 8~10 mice.

Foot pad swelling was measured after intradermal challenge of 1×10^8 /ml F.P.S.I.=thickness of foot pad after challenge-thickness of foot pad

$\frac{\text{thickness of foot pad before challenge}}{\text{thickness of foot pad before challenge}} \times 100$

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

Significant difference from each Cd control group.

(☆p<0.05, ☆☆p<0.01)

Table 7. PFC by cadmium and the effect of ginseng petroleum ether fraction on it in mice.

| Group | PFC/ 10^6 Spleen cells |
|--------------------------|--------------------------|
| Normal | 1264±350 |
| Cd 3 ppm | 755±340** |
| Cd 3 ppm + Ginseng fr. | 1274±68☆☆ |
| Cd 30 ppm | 754±125** |
| Cd 30 ppm + Ginseng fr. | 845±345 |
| Cd 300 ppm | 505±125** |
| Cd 300 ppm + Ginseng fr. | 605±126 |
| Ginseng fr. | 1472±221 |

Each value is the mean±S.D. of 8~10 mice.

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

Significant difference from each Cd control group.

(☆p<0.05, ☆☆p<0.01)

이 正常群에 비해 Cd 投與群들에서 각 각 매우 유의성있게 減少하였으며 각 Cd 投與群들에 비해 Cd 3 ppm 및 人蔘 석유 ether 分割 병용 投與群에 있어서는 매우 유의성있게 增加하였고 Cd 30 ppm 및 人蔘 석유 ether 分割 병용 投與群과 Cd 300 ppm 및 人蔘 석유 ether 分割 병용 投與群에 있어서는 있어서는 增加現象을 보였으나 유의성

은 없었다.

고 찰

Cd의 免疫反應에 對하여 Koller等은 Cd의 投與에 의해 抗體生産이 현저히 抑制되며 이와 같은 抑制는 그후 數개월 동안이나 持續된다고 하였으나¹⁸⁾ 反面에 Balter等은 Cd의 投與에 의해 mitogen에 의한 mitogenesis가 增強된다고 하였으며²¹⁾, Wesenberg等은 rat에 있어서 Cd의 投與에 의해 抗體反應의 變化가 없었다고 報告하였다²³⁾. 또한 mouse 50 ppm의 Cd를 飲用시켜 3주 동안 投與時 Blakley等은 抗體生産이 抑制되었다고 하였으나¹⁶⁾ Chowdhury等은 抗體生産이 增加하였다고 하였다¹⁹⁾.

이와같이 그 免疫反應에 對하여 明確히 해명되어 있지 않은 Cd를 飲用시켜 經口投與하였을 때 免疫反應에 미치는 영향을 면밀히 檢討하고 同時에 그에 對한 人體의 免疫修飾效果가 期待되어 실시한 本實驗의 結果에 對한 考察은 다음과 같다.

1. Cd가 免疫反應에 미치는 影響

1) 體重 및 臟器重量에 對한 영향

體重增加率은 正常群에 比하여 本實驗에서 가장 低用量的 Cd 投與群인 Cd 3 ppm 投與群에서는 별다른 變化가 없었으나 Cd 30 ppm 投與群과 Cd 300 ppm 投與群에서 매우 有意성있게 減少하여 Ohsawa等과 Hill等이 報告한 Cd에 의한 發育阻害現象을 확인할 수 있었다^{26,27)}.

肝重量의 對體重比는 正常群에 比해 Cd 3 ppm 投與群에서는 減少現象을 보였으나 有意성은 없었고 Cd 30 ppm 投與群과 Cd 300 ppm 投與群에서 매우 有意성있게 減少하였다. 이는 Carol等과 Gamulin等の 報告로 미루어 Cd가 1次的으로 肝內皮細胞에 對한 損傷과 低酸素症(hypoxia)을 일으키고 그에 따라 肝實質(parenchyma)의 hepatocyte에 전반적인 細胞毒性을 나타내 肝의 protein合成, ribosome의 構造 및 Cd이온等の 恒常性에 negative한 影響을 끼친 것으로 생각된

다^{7,8)}.

胸腺重量의 對體重比는 正常群에 比해 Cd 3 ppm 投與群과 Cd 30 ppm 投與群에서는 有意성 있는 變化가 없어 mouse에 Cd 3~300 ppm을 10週 동안 飲用시켰을 때 胸腺重量의 變化가 없었던 Ohsawa等の 報告와는 一致하였으나²⁴⁾, mouse에 1.8 mg Cd/kg을 腹腔注射로 1回 投與하였을 때 胸腺委縮이 일어났다고 한 Yamada等の 報告와는 相異하였다²⁸⁾. 또한 本實驗에서 300 ppm 投與群에서는 正常群에 比해 매우 현저히 增加한 바 이에 對해서는 앞으로 많은 檢討가 필요할 것으로 思料된다.

脾臟重量의 對體重比는 正常群에 比해 Cd 投與群들에서 減少하는 傾向을 보였으나 有意성은 없었다. 이는 Bozelka等 및 Ohsawa等の 報告와는 相異한 것으로 Cd를 投與한 mouse에서 Bozelka等은 FC 受容體와 表面 또는 細胞質 면역 globin (surface or cytoplasmic immunoglobulin)을 갖는 cell type의 增加 및 이들의 red pulp 內로의 spill-over에 의한 splenomegaly를 Ohsawa等은 Cd투여에 의한 임파구의 재분배(redistribution)에 起因하는 것으로 推定한 splenomegaly를 각각 고하였다^{15,24)}. 그러나 同時에 Ohsawa等은 inhalation chamber를 통하여 0.1 mg Cd/m³ 또는 1 mg Cd/m³의 變化가 없었다하였고²⁶⁾ Chowdhury等도 mouse에 Cd 50 ppm을 3주 동안 飲用시켰을 때 脾臟重量의 變化가 없었음을 報告하였다¹⁹⁾. 以上에서 볼때 Ohsawa等이 지적하였듯이 splenomegaly가 Cd 투여에 의한 primary effect라고 보기는 어려울 것으로 생각된다.

2) 體液性 免疫에 對한 影響

PFC는 Cd 投與에 의해 各群에서 正常群에 比해 매우 有意성있게 減少하였다. Cd 投與에 의한 PFC測定結果에 對해서는 여러 相異한 報告들이 있으나 本實驗의 結果는 Koller等¹⁸⁾ Bozelka等¹⁵⁾ 및 Blakely等¹⁶⁾과 一致하였다. Chowdhury等은 Cd를 經구투여 時 比較적 低用量的 Cd 投與에 의해 suppressor T cell이 抑制됨으로서 IgG, IgM의 生成이 增加하고 比較적 高用量的 Cd 投與에

의해서는 모든 T cell이 抑制됨으로써, 抗體生産이 阻害된다고 하였으나¹⁹⁾ 本 實驗의 結果 Chowdhury等의 報告에 비추어 低用量에 對되는 Cd 3 ppm과 Cd 30 ppm 投與에 의해서도 PFC는 매우 有用性있게 減少하였다. 이와같은 Cd에 의한 PFC의 減少에 對하여 Koller等은 Cd의 投與에 의하여 IgG의 合成이 현저히 抑制되었음을 根據로 helper T cell이 Cd의 重要な 標的이라고 推定하였다¹⁸⁾. 또한 Bozelka等은 이에 對하여 Cd와 같은 금속은 最初에 B cell의 mitosis 및 blastogenic transformation을 일으킬 수 있는 weak mitogen으로 작용할 수 있으나 그것들의 體內蓄積이 增加함에 따라 더욱 進展된 細胞分化에 必要한 여러 酵素의 活性 혹은 단백질合成이 점차 阻害될 수 있다 하였으며 어떤 狀況에서는 DNA, RNA polymerase와 같은 많은 酵素들과 관계가 있고 단백질, 탄수화물, 脂質 및 核酸等の 代謝에 重要な 많은 금속효소들의 機能과 構造에 必須인 아연 leucine amino peptidase와 carboxy peptidase에서의 같이 Cd에 의해 置換되어 酵素의 非機能化가 일어날 수 있다고 하였다¹⁵⁾. 그러나 Blakely等은 mouse에 Cd 0~50 ppm 사이의 用量을 飲用시켜 投與한 後 mitogen 實驗을 한 結果 Cd 投與에 의한 PFC 減少는 Cd의 B cell 增殖에 미치는 影響에 起因하지 않는다고 하였다¹⁶⁾. 以上 本 實驗에서의 PFC 減少는 本 實驗에서의 全體의 인 結果와 함께 미루어 볼 때 Cd의 T cell에 對한 抑制에 크게 起因할 것으로 생각되나 Koller等の 다른 報告等으로 미루어¹⁴⁾ Cd의 生體酵素 및 단백질合成에 미치는 影響을 目的으로 排除하기는 어려운 것으로 보여지며 앞으로도 이에 對한 研究가 必要할 것으로 思料된다.

赤血球 凝集素價 및 赤血球 溶血素價 測定에서 HA titer와 HY titer는 모두 Cd 30 ppm 投與群과 Cd 300 ppm 投與群에서 현저히 減少한 바 이는 本 實驗에서 PFC 減少와 함께 Cd의 投與에 의해 抗體生成能이 阻害됨을 보여주고 있다.

抗原-抗體 複合體(antigen-antibody complex)의 補體系 活性化 Hageman 因子의 活性化 및 血

小板 응집등에 의해 일어나는 抗體媒介型 組織障礙性 過敏反應인 Arthus反應은 正常群에 비해 Cd 投與群들에서 유의성 있는 變化가 없었다. 이에 對해서는 Cd의 thromboxane 및 prostacycline等の 生成에 미치는 影響等이 考慮될 수 있을 것이며²⁹⁾ 앞으로 더 많은 研究가 있어야 할 것이다.

2. Cd의 免疫毒性에 미치는 人蔘석유 Ether 分割의 影響

1) 體重 및 臟器重量에 對한 影響

本 實驗에서 人蔘석유 ether 分割은 Cd 30 ppm 投與와 Cd 300 ppm 投與에 의해 현저히 減少한 體重增加率에 對해 약간의 回復效果를 나타내었으나 유의성은 없었다.

肝重量의 對體重比는 Cd 3 ppm 投與와 Cd 30 ppm 投與에 의해 減少하였던 것이 人蔘석유 ether 分割 병용投與에 의해 有意성은 없으나 回復現象을 보였으며 Cd 300 ppm 投與에 의한 肝重量 對體重比의 減少는 人蔘석유 ether 分割並用投與에 의해 有意性있게 回復되었다. 이는 人蔘석유 ether 分割이 肝 endothelial cell에 對한 Cd의 1차의인 障害를 抑制하였거나, 또는 다른 금속과는 달리 Cd 投與에 의해 直接的인 濃度의 變化는 없었지만 Cd과 강한 親和力을 갖는 modulating agent인 glutathione(G.S.H) 濃度에 人蔘석유 ether 分割이 影響을 미쳐^{6,35)} nuclei, mitochondria, endoplasmic reticulum等の 重要な 小器管(organelle) 및 여러 酵素들이 Cd와 結合하는 것을 防害함으로써 Cd 투여에 의해 阻害된 肝의 protein 合成能과 이온의 恒常性等을 回復시킨 것으로 생각할 수 있으며 따라서 人蔘석유 ether 分割이 Cd 투여에 의한 肝毒性어느정도 回復 效果가 있음을 示唆하는 것으로 볼 수 있다.

脾臟重量의 對體重比는 各 Cd 投與群에 비해 Cd 3 ppm 및 人蔘석유 ether 分割병용投與群과 Cd 30 ppm 및 人蔘석유 ether 分割병용投與群에서 增加現象을 보였으나 유의성을 없었고 Cd 300 ppm 및 人蔘석유 ether 分割병용投與群에서 Cd

300 ppm 投與群에 비해 有意性있게 增加하였다. 그러나 人蔘석유 ether 分劃 단독투여에 의해서는 正常群에 비해 有意성은 없으나 오히려 減少現象을 보인바 이들에 관해서는 앞으로 많은 研究가 필요할 것으로 思料된다.

胸腺重量의 對體重比는 各 Cd 投與群들에 比하여 Cd 및 人蔘석유 ether 分劃병용投與群들에서 有意한 變化가 없었다.

2) 體液性 免疫에 對한 影響

Arthus 反應은 人蔘석유 ether 分劃단독投與群에서 正常群에 비해 현저히 低下하였고 各 Cd 投與群에 比하여 Cd 30 ppm 및 人蔘석유 ether 分劃병용投與群 및 Cd 300 ppm 및 人蔘석유 ether 分劃병용投與群에서 有意성있게 低下하였다. 이는 人蔘석유 ether 分劃이 抗原-抗體 免疫複合體 (antigen-antibody immune complex)에 의한 補體系의 活性化를 抑制함으로써, 1) neutrophil accumulation의 抑制 2) 血小板의 응집억제 3) anaphylatoxin 生成 抑制 등의 效果를 나타낸 것으로 생각할 수 있으며 이에 對한 正確한 mechanism에 관해서는 앞으로 더 많은 研究가 進行되어야 할 것이다.

赤血球 凝集素價 및 赤血球 溶血素價에 있어서는 Cd 30 ppm 및 人蔘석유 ether 分劃병용投與群에서 Cd 30 ppm 投與群에 비해 HA titer가 有意性있게 增加하였고 Cd 3 ppm 및 人蔘석유 ether 分劃병용投與群에서는 Cd 3 ppm 投與群에 비해 HA titer가 增加現象을 보였으나 有意성은 없었으며 HY titer는 各 Cd 投與群들에 比하여 人蔘석유 ether 分劃의 並用投與에 의한 有意性 있는 變化가 없었다.

脾臟細胞의 PFC는 各 Cd 投與群에 비해 Cd 3 ppm 增加하였고 Cd 30 ppm 및 人蔘석유 ether 分劃병용投與群과 Cd 300 ppm 및 人蔘석유 ether 分劃병용投與群에서는 增加現象을 보였으나 有意성은 없었다.

以上の HA titer, HY titer 및 PFC에 對한 結果를 綜合해 보면 人蔘석유 ether 分劃은 Cd의 抗體生産 抑制에 對하여 어느정도 回復效果가 있는

것으로 보여지며 대체로 Cd의 投與用量이 적을수록 그 回復效果가 클 것으로 생각된다.

結 論

Mouse에 cadmium chloride를 飲水에 溶解하여 4週동안 投與하였을 때 카드뮴의 免疫反應에 미치는 影響과 그에 對한 人蔘석유 ether 分劃의 效果는 다음과 같다.

1. 카드뮴은 體重增加率 및 肝重量의 對體重比를 減少시켰다.
2. 카드뮴은 體液性 免疫을 全般的으로 抑制시켰다.
3. 人蔘석유 ether 分劃은 카드뮴에 의한 肝重量의 對體重比 減少에 對해 어느정도 회복효과를 나타내었다.
4. 人蔘석유 ether 分劃은 카드뮴에 의한 PFC 減少에 對해서는 회복효과를 나타내었으나 Arthus 反應은 더욱 低下시켰다.

REFERENCES

1. Edward J.: Nutrition and environmental health. John Wiley & sons Inc. 2 (1981)
2. A.L. Powell, B. Joshi, C. Dwivedi and L. Green: Immunopathological changes in Cd-treated rats. *Vet. Pathol.*, **16**, 116~118 (1979)
3. Fay M. Martin and H.P. Witschi: Cadmium-induced lung injury: Cell kinetics and long-term effects. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **80**, 215~227 (1985)
4. Gary J. Challman, Zahir A. Shaikh, et al.: Resistance to cadmium-induced necrosis in testes of inbred mice. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **79**, 511~523 (1985)
5. Robert E. Dudley and Curtis D. Klaassen: Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **77**, 414~426 (1985)
6. Robert E. Dudley, and Curtis D. Klaassen:

- Changes in hepatic glutathione concentration modify Cd-induced hepatotoxicity. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **72**, 530~538 (1984)
7. Carol Quaife, Diane Durnam and N. Karle Mottet: Cd hypersusceptibility in the C3H mouse liver. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **76**, 9~17 (1984)
 8. S. Gamulin, N. Car and P. Narancsic: Effect of cadmium on polyribosome structure and function in mouse liver. *Experientia*, **33**, No. 9, 1144~1155 (1977)
 9. J.A. Cook, E.O. Hoffmann, and N.R. Di Luzio: Influence of lead and cadmium on the susceptibility of rats to bacterial challenge. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **150**, 741~747 (1985)
 10. L.D. Koller, D.V.M.: Immunosuppression produced by lead, cadmium, and mercury. *Am. J. Vet. Res.*, **34**, No. 11, 1457~1459 (1973)
 11. Motoyasu Ohsawa, Kazue Masuko-Sato, Kazuko Takahashi, and Fuminori Otsuka: Strain differences in cadmium-mediated suppression of lymphocyte proliferation in mice. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **84**, 379~388 (1986)
 12. L.D. Koller, Jerry H. Exon and Judy G. Roan: Humoral antibody responses in mice after single dose exposure to lead or cadmium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **151**, 339~342 (1976)
 13. Ronald H. Jones, R.L. Williams, and Alice M. Jones: Effects of heavy metal on the immune response. Preliminary findings for cadmium in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**, 1231~1235 (1971)
 14. L.D. Koller, and J.A. Brauner: Decreased B-lymphocyte response after exposure to lead and cadmium. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **42**, 621~624 (1977)
 15. B.E. Bozelka, Peter M. Burkholder, and Louis W. Chang: Cadmium, a metallic inhibitor of antibody-mediated immunity in mice. *Environ. Research*, **17**, 390~402 (1978)
 16. B.R. Blakley: The effect of cadmium chloride on the immune response in mice. *Can. J. Comp. Med.*, **49**, 104~108 (1985)
 17. Ines Malave and Donatella T. De Ruffino: Altered immune response during cadmium administration in mice. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **74**, 46~56 (1984)
 18. L.D. Koller, Jerry H. Exon, Judith G. Roan: Antibody suppression by cadmium. *Arch. Environ. Health*, **30**, 598~601 (1975)
 19. Badrul Alam Chowdhury, James K. Friel, and Ranjit Kumar Chandra: Cadmium-induced immunopathology is prevented by zinc administration in mice. *J. Nutrition*, **117**, 1788~1794 (1987)
 20. H. Fujimaki, M. Murakami, and K. Kubota: In vitro evaluation of cadmium-induced augmentation of the antibody response. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **62**, 288~293 (1982)
 21. Nancy J. Balter, and Irving Gray: Enhancement of mitogen responsiveness in mice exposed to low concentrations of cadmium in drinking water. *Journal of Washington Academy of Science*, **75**, No. 4, 104~110 (1985)
 22. L.D. Koller, and Judith G. Roan: Effects of lead and cadmium on mouse peritoneal macrophages. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, **21**, 7~12 (1977)
 23. Gro B. Ramsten. Wesenberg and Finn Wesenberg: Effect of cadmium on the immune response in rats. *Environ. Research*, **31**, 413~419 (1983)
 24. Motoyasu Ohsawa, Kazue Sato, Kazuko Takahashi, and Takafumi Ochi: Modified distribution of lymphocyte subpopulation in blood and spleen from mice exposed to cadmium. *Toxicology Letters*, **19**, 29~35 (1983)
 25. Peter T. Thomas, Helen V. Ratajczak, Catherine Aranyi, Robert Gibbons and James D. Fenters: Evaluation of host resistance and immune function in cadmium-exposed mice. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **80**, 446

- ~456 (1985)
26. Motoyasu Ohsawa, and Kiyoyuki Kawai: Cytological shift in lymphocytes induced by cadmium in mice and rats. *Environ. Research*, **24**, 192~200 (1981)
 27. C.H. Hill: Dietary influence on resistance to Salmonella infection in chicks. *Federation Proc.*, **38**, 2129~2133 (1979)
 28. Yasuko K. Yamada, Fujio Shimizu, Ryoko Kawamura, and Kentaro Kubota: Thymic atrophy in mice induced by cadmium administration. *Toxicology Letters*, **8**, 49~55 (1981)
 29. L. Caprino, N. Dolci, G. Togna, P. Villa, R. Bucci, and V. Carunchio: Effects of cadmium on platelet thromboxane and vascular prostacycline production. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, **65**, 185~188 (1982)
 30. Sa Ack Hong and Hang Yong Cho: Pharmacological actions of Ginseng. Korean Ginseng Science Symposium, *Korean Soc. of Pharmacognosy*, 113~139 (1974)
 31. Y.Y. Kim: Studies on the detoxicating effect of water extracts of Korean Ginseng Radix in lead poisoning. Choongahang Univ. 1983 treatise collection 27, 183~194 (1983)
 32. K.D. Lee, and R.P. Huemer: Antitumoral activity of Panax Ginseng Extracts. *Japan J. Pharmacol.*, **21**, 229~302 (1971)
 33. Y.K. Ahn, H.B. Kim, et al.: The effect of ginseng petroleum ether fraction on immunosuppressed mice by lead acetate. Wonkwang University treatise collection (1985)
 34. H. Oura, S. Nakashima, and K. Tsukada: Effect of radix Ginseng extract on serum protein synthesis. *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, No. 5, 980~986 (1972)
 35. N.D. Kim, S.H. Kim, and S.K. Kim: The effect of Ginseng on hepatic glutathion S-transferase activity. *Korean Yakhak Hoeji*, **25**, No. 4, 153~160 (1981)
 36. N.D. Reed, P.K. Crowl, et al.: Use of mast cell-deficient mice to study host parasite relationships in immuno-deficient animals. Bssordet ed. Korgex Baselip. 184 (1984)
 37. T.Y. Ha and H.K. Rhee: Effect of inosiplex on cellular and humoral immune response. *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **1**, 57 (1981)
 38. A. Cunningham: Plaque assay for antibody producing cells. *Allergy*, **17**, 5 (1973)