

식이 단백질과 Ca 수준이 흰쥐의 Cd 중독과정중 Metallothionein과 조직의 형태변화에 미치는 영향*

권 오 란·김 미 경**

국립보건원 위생부 영양과
이화여자대학교 식품영양학과**

The Effect of Dietary Protein and Calcium Levels on Metallothionein and Histopathological Changes during Cadmium Intoxication in Rats

Kwan, O Ran · Kim, Mi Kyung**

*Department of Nutrition, National Institute of Health
Department of Foods & Nutrition,** Ewha Womans University, Seoul, Korea*

ABSTRACT

This study was performed to investigate effect of dietary protein and calcium levels on cadmium intoxication in rats. Adult Sprague-Dawley male rats($245 \pm 21g$) were blocked into 18 groups of 7 animals according to body weight. Nine experimental diets different with protein(40%, 15%, 7%) and calcium(1.3%, 0.6%, 0.1%) levels were prepared. Nine groups of animals were fed each diet with 50ppm cadmium in drinking water, and the other 9 groups without cadmium for 30days.

Results were summarized as follows :

- 1) Body weight gain, F.E.R.(Food Efficiency Ratio) and weights of liver, kidney and femur were higher in high protein groups among cadmium exposed groups.
- 2) Cadmium contents in liver and intestine were higher in rats fed high protein diet or low calcium diet among cadmium exposed groups. Fecal cadmium excretion was highest in high protein-high calcium diet group among cadmium exposed animals. Metallothionein contents in liver, kidney and intestine were higher in animals exposed to cadmium and fed high protein diets.
- 3) Gel filtration chromatography of cytosolic solution showed that the higher dietary protein and calcium levels were, the more cadmium was found in metallothionein fractions.
- 4) No gross histopathological change was seen in liver, kidney and intestine of cadmium exposed rats. However a significant increase of smooth endoplasmic reticulum, which was

채택일자 : 1992년 6월 19일

* 본 연구는 1990~1991년도 진로문화재단 학술연구지원비에 의하여 이루어졌음.

alleveated by high protein-high calcium diet, was observed.

Results obtained indicated that not only high protein diet but also high calcium diet showed preventive effect on cadmium intoxication by increasing the induction of metallothionein synthesis and decreasing the cadmium absorption.

KEY WORDS : cadmium · metallothionein · histopathology.

서 론

물질 문명의 발달과 경제 수준의 향상은 “환경 오염”이라는 문제를 야기시키고 있다. 최근 우리나라에서도 경제성장과 산업화과정에서 토양, 하천, 해양이 오염되어 유독물질에 대한 안전성 문제가 새로운 과제로 대두되고 있다.

Cadmium은 산업화로 인해 발생하는 토양, 공기, 물오염의 주요 원인중 하나로¹⁾, 최근에는 산성비(acid rain)가 오염된 cadmium의 유용성(availability)을 증가시킴으로써 cadmium 오염문제는 점점 더 심각해지고 있다²⁾.

Cadmium은 금속을 필요로하는 효소의 활성을 저해하거나 조직의 형태를 변화시킴으로써 독성증세를 나타낸다. 효소의 활성을 저해하여 나타나는 증상으로는 hyperglycemia, dyslipidemia, hypoproteinemia, 성장장애등이 있으며, 조직의 형태를 변화시킴으로써 나타나는 증상으로는 nephropathy, hepatopathy, anemia, cardiovascular disease, osteopathy, gonadal lesion등이 보고되고 있다. 따라서 cadmium은 질병의 이환률(morbidity)과 사망률(mortality)을 증가시켜 수명을 감소시키는 요인으로 작용한다³⁾.

Cadmium의 체내 축적량이나, 독성을 초기에 판단할 수 있는 방법은 아직 없으므로, cadmium 중독은 초기에 발견되기 힘들고, 따라서 cadmium의 오염방지 및 중독예방은 무엇보다도 중요하다. Cadmium의 오염방지 문제는 유기농법, 철저한 감시감독, 기술개발등에 의해 어느 정도 해결할 수 있으나 이는 산업화에 따른 불가피한 결과로 완전한 해결은 불가능한 것 같다.

본 연구실에서는 유해성 중금속의 중독을 영양학적인 측면에서 해결하고자 하는 시도가 선행되

었으며 그 결과 단백질, calcium, 지방, 섬유질등의 식이 인자들이 흰쥐의 체내 중금속 대사에 영향을 미쳐 중금속의 분포와 배설을 변화시키는 것으로 나타났다. 이중 특히 단백질과 calcium의 영향이 큰 것으로 나타나 단백질 수준이 높은 경우에는 뇨와 변을 통한 cadmium 배설이 유의적으로 증가하였고 혈액등의 조직에서 cadmium 함량이 낮게 나타났으며⁴⁾, 식이 calcium 수준이 낮은 경우에는 각 조직에서 cadmium 함량이 높았으며 cadmium 배설량은 낮았다⁵⁾. Revis등도⁶⁾ 저단백(5.5%) 식이에 cystein(0.04%)를 첨가하였을 경우 고단백(67.5%)식이를 먹인 것과 비슷한 결과를 보여 cadmium 해독에 단백질중 특히 cystein이 중요함을 나타냈다.

한편 cadmium 중독 연구와 관계하여 metallothionein에 대한 연구가 진행되고 있다. Metallothionein은 분자량이 10,000~14,000 dalton정도로 작고 cystein이 풍부한 metalloprotein으로⁷⁾⁸⁾ 유독 중금속에 의해 체내에서 유도 합성되어 중금속을 격리시킴으로써 독성을 완화시키는 것으로 알려져있다⁹⁻¹²⁾. 그러나 cadmium 중독 및 식이요인 변화에 따른 metallothionein 함량 변화에 대한 정보는 아직 미약한 형편이다.

따라서 본 연구에서는 선행된 연구 결과 cadmium 중독 및 해독에 효과적인 것으로 보고된 단백질과 calcium을 실험 식이인자로 택하여 경구 투여된 cadmium의 흡수 부위인 소장과, cadmium의 주된 축적 부위인 간과 신장에서 metallothionein-cadmium profile과 metallothionein 함량을 측정하고 이를 중심으로 혈액, 간, 신장, 소장, 뼈에서의 cadmium 분포와, 뇨와 변을 통한 cadmium 배설 변화를 조사하였다. 또한 전자 현미경을 통해 cadmium과 metallothionein 함량 변화에 따른 조직의

식이 단백질, Ca과 Cd 중독

형태변화를 관찰하고 이를 앞서 얻은 생화학적 결과와 연결하여 cadmium 중독 기전을 규명하고자 하였다.

1. 실험동물의 사육

평균 체중이 245g인 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 126마리를 체중에 따라 randomized-block design에 의하여 7마리씩 18군으로 나누어 Table 1과 같은 내용으로 30일간 사육하였다.

실험동물은 한 마리씩 분리하여 stainless steel

실험재료 및 방법

Table 1. Classification of experimental groups

Groups ¹⁾	Diets	Cd level	Protein level	Ca level
		(drinking water) ppm	(diet) %	(diet) %
NHH		0	40	1.3
NHM		0	40	0.6
NHL		0	40	0.1
NMH		0	15	1.3
NMM		0	15	0.6
NML		0	15	0.1
NLH		0	7	1.3
NLM		0	7	0.6
NLL		0	7	0.1
CHH		50	40	1.3
CHM		50	40	0.6
CHL		50	40	0.1
CMH		50	15	1.3
CMM		50	15	0.6
CML		50	15	0.1
CLH		50	7	1.3
CLM		50	7	0.6
CLL		50	7	0.1

- 1) NHH : No Cd+high protein(40%) +high calcium(1.3%)
 NHM : No Cd+high protein +middle calcium(0.6%)
 NHL : No Cd+high protein +low calcium(0.1%)
 NMH : No Cd+middle protein(15%) +high calcium
 NMM : No Cd+middle protein +middle calcium
 NML : No Cd+middle protein +low calcium
 NLH : No Cd+low protein(7%) +high calcium
 NLM : No Cd+low protein +middle calcium
 NLL : No Cd+low protein +low calcium
 CHH : Cd(50ppm) +high protein +high calcium
 CHM : Cd +high protein +middle calcium
 CHL : Cd +high protein +low calcium
 CMH : Cd +middle protein +high calcium
 CMM : Cd +middle protein +middle calcium
 CML : Cd +middle protein +low calcium
 CLH : Cd +low protein +high calcium
 CLM : Cd +low protein +middle calcium
 CLL : Cd +low protein +low calcium

cage에서 사육하였으며 cage, 식이그릇, 물병 등 모든 기구는 무기질의 오염을 방지하기 위하여 0.4 % EDTA(Ethylene Diamine Tetra Acetic acid)용액으로 세척한 후 탈이온증류수로 행구어 사용하였다.

2. 실험동물의 식이

본 실험에 사용한 식이의 구성성분은 Table 2와 같다. 실험식이의 탄수화물 급원으로는 옥수수전분(corn starch, 두산곡산)과 glucose를 사용하였으며, 지방 급원으로는 옥수수유(corn oil, 제일제당)를 사용하였으며, 단백질 급원으로는 casein(Australian Cooperative Dairy Co)을 이용하였고, 무기질과 비타민류는 시약급을 이용하였다.

Cadmium은 탈이온증류수에 cadmium chloride (CdCl₂)를 용해시켜 50ppm 수준으로 음료수의 형태로 공급하였으며, cadmium 비공급군은 탈이온증류수를 음료수로 공급하였다.

3. 실험방법

1) 식이 섭취량, 체중 및 식이 효율의 측정

식이 섭취량은 식이를 무제한 자유급식시킨 후 매주 2회 일정한 시간에 측정하였다. 체중은 일주일에 한 번 일정한 시간에 측정하였고, 식이 섭취에서 오는 갑작스런 체중변화를 막기 위하여 체중 측정 2시간 전에 식이그릇을 빼주었다. 이상에서 측정된 식이섭취량과 체중을 이용하여 일주일간의 체중증가량을 같은 기간의 식이섭취량으로 나누어 식이효율(F.E.R.)을 산출하였다.

2) 뇨와 변, 혈액, 각종 장기의 채취

Cadmium의 보유율을 측정하기 위하여 실험종료전 7일 동안 음료수로의 cadmium 공급을 중단한 채, 800ppm의 cadmium 용액 1ml를 하루에 한 번 tube feeding 하였으며, cadmium 비공급군에게는 동량의 탈이온증류수를 tube feeding 하였다. 뇨와 변은 마지막 2일동안 채취하여, 변은 젖은 상태로 냉동 보관하였고, 뇨는 증류수로 희석하여 50ml로 만든 후 일정량을 취하여 7,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 상청액을 냉동 보관하였다.

혈액은 실험기간의 종료 전 12시간을 굶긴 뒤

Table 2. Composition of experimental diets

Ingredient	HH	HM	HL	MH	MM	ML	LH	LM	LL
	%								
Protein	40	40	40	15	15	15	7	7	7
Calcium	1.3	0.6	0.1	1.3	0.6	0.1	1.3	0.6	0.1
	g/kg diet								
Corn Starch	84.7	102.2	114.6	330.3	347.8	360.3	409.0	426.4	438.9
Glucose	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0
Corn oil	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Choline chloride	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Casein	400.0	400.0	400.0	150.0	150.0	150.0	70.0	70.0	70.0
Vitamin premix ¹⁾	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mix ²⁾	15.432	15.432	15.43	15.432	15.432	15.432	15.432	15.432	15.432
KH ₂ PO ₄	4.136	4.136	4.13	12.534	12.534	12.534	15.223	15.223	15.223
K ₂ CO ₃	6.610	6.610	6.61	2.346	2.346	2.346	0.981	0.981	0.981
CaCO ₃	32.144	14.662	2.17	32.346	14.863	2.376	32.410	14.928	2.440
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	1.1	1.1	1.1	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4

1) Vitamin premix(/Kg diet) : Retinyl palmitate 4,000IU ; Cholecalciferol 400 IU ; α-tocopherol acetate 5.0 mg ; Menadione 0.5mg ; Thiamine HCl 5.0mg ; Riboflavin 5.0mg ; Pyridoxine HCl 5.0mg ; Niacin 25.0mg ; calcium pantothenate 20.0mg ; Cyanocobalamin 0.030µg ; Folic acid 0.5mg ; Biotin 0.2mg ; Ascorbic acid 50.0mg ; Glucose monohydrate to make 5,000mg

2) Mineral mix(mg/kg diet) : NaCl 12,430.0 ; MgSO₄ 2,440.0 ; FeC₆H₅O₇ · 6H₂O 312.0 ; MnSO₄ · H₂O 151.0 ; CuSO₄ 78.0 ; ZnCl 20.0 ; (NH₄)₂MO₇O₂₄ · 4H₂O 1.25 ; KI 0.25

ethyl ether로 마취하고 단두로 희생시켜 채취하였으며, 채취 직후 heparin으로 처리된 시험관에 받아 냉동 보관하였다.

혈액 채취 즉시 실험동물을 해부하여 간, 신장, 소장을 떼어내고 무게를 측정후 절반은 metallothionein의 측정을 위하여 -80°C 의 deep freezer에 보관하였으며, 나머지는 $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 의 drying oven에서 말린 후 dessicator에 보관하였다. 단, 각 실험군중 2마리씩은 전자현미경과 광학현미경적 관찰을 위해 장기의 무게를 측정후 즉시 일정 부위를 1mm^3 의 크기로 잘라 각각 고정액에 고정하였다. 또한 뼈는 오른쪽 뒷다리에서 대퇴골과 경골을 떼어내어 무게를 측정후 $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 의 drying oven에서 말린 후 dessicator에 보관하였다.

3) 생화학적 분석

혈액과 뇨의 cadmium 함량은 시료의 일정량을 취하여 Kjeldahl flask에 넣고 습식분해시킨 후 증류수로 희석하여 파장 214.438nm 에서 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP; Labtan International PTY, LTD. Scanning Monochromator Model 750)로 측정하였다¹³⁾.

간, 신장, 소장, 대퇴골, 변의 cadmium 함량은 시료의 일정량을 취하여, 550°C 의 muffle furnace에서 24시간동안 건식분해시켜 농질산으로 녹인 후 1N HCl로 희석하여 파장 214.438nm 에서 ICP로 측정하였다¹³⁾.

간, 신장, 소장의 metallothionein 함량은 Scheuhammer의 변형법¹⁴⁾¹⁵⁾에 따라 준비한 RBC hemolysate를 이용하여 cadmium/hemoglobin affinity assay 방법¹⁵⁾¹⁸⁾으로 측정하였다.

간, 신장, 소장의 metallothionein-cadmium profile은 다음과 같은 방법으로 구하였다. 즉, 각 조직의 pooled sample 5g에 동일한 volume의 1mM Tris-HCl buffer, pH 7.4를 넣어 균질화와 원심분리하여 얻은 cytosol을 1mM Tris-HCl buffer, pH 8.6으로 equilibration시킨 $90 \times 1.6\text{cm}$ 의 Sephadex G-75 gel filtration column(L.K.B.)에 주입하고 1mM Tris-HCl buffer, pH 8.6으로 용출시키면서 254nm에서 흡광도를 측정한다. 10분 간격으로 받은 각

fraction의 Cd농도를 AAS로 측정하여 metallothionein-cadmium profile을 구한다¹⁹⁾.

간의 총단백질 함량은 microkjeldahl법으로 측정하였다.

4) 전자현미경적 관찰

절취 즉시 조직을 2.5% glutaraldehyde-1% paraformaldehyde 혼합고정액 (phosphate buffer, pH 7.3)에 1일간 전고정한 후, 4% sucrose(0.1M phosphate buffer)로 씻어 1% osmium tetroxide(phosphate buffer, pH 7.3)에서 2시간 동안 후고정하고 다시 4% sucrose(0.1M phosphate buffer)로 2회 수세하였다. 수세된 조직은 ethyl alcohol series(60%~100%) 및 acetone(100% 2회)의 탈수과정을 거친 다음 epon 812 수지에 포매하고 40°C oven에서 1일간 그리고 60°C oven에서 2일간 중합시켰다. 수지에 포매된 조직은 ultramicrotome(Sorvall MT-5000)으로 $1\mu\text{m}$ 두께의 절편을 만들어서 0.5% toluidine blue로 염색한 다음 광학현미경하에서 각 조직을 확인 하였고, 확인된 조직은 다시 50nm 두께의 초박절편으로 만든 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(Hitachi H-600)으로 관찰하고 사진촬영하였다.

4. 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 실험군당 평균치와 표준오차를 계산하였고, 각 실험군당 평균치의 비교는 분산분석(analysis of variance)을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Scheffé의 다중비교(multiple comparison)를 하였다. 또한 각 실험인자(A : Cadmium 수준, B : 단백질 수준, C : Calcium 수준)의 영향과 이들의 상호작용(AB : Cadmium×단백질, AC : Cadmium×Calcium, BC : 단백질×Calcium, ABC : Cadmium×단백질×Calcium)에 의한 영향은 $\alpha=0.05$ 수준에서 3요인 분산분석으로 유의성을 검정하였다²⁰⁾²¹⁾.

결 과

식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 효율(Table 3)은 cadmium 공급군에서 모두 낮았으며, 또한 식이

Table 3. Food intake, body weight gain and food efficiency ratio

Group	Food intake (g/day)		Body weight gain (g/30days)	F.E.R.
	1)	2)		
NHH	21.61±0.68 ^{N.S.}		113.85±8.58 ^c	0.17±0.01 ^d
NHM	20.68±0.49		112.28±5.26 ^c	0.18±0.00 ^d
NHL	20.14±0.42		97.66±10.33 ^{cde}	0.15±0.01 ^{cd}
NMH	20.32±0.65		94.85±8.75 ^{cde}	0.18±0.02 ^d
NMM	18.89±0.48		71.57±13.63 ^{bcde}	0.12±0.02 ^{cd}
NML	20.82±0.41		108.14±7.80 ^{dc}	0.17±0.01 ^d
NLH	19.74±0.38		53.28±7.80 ^{abcde}	0.09±0.01 ^{abcd}
NLM	18.42±1.06		44.33±17.53 ^{abcde}	0.08±0.03 ^{abcd}
NLL	19.86±0.58		48.42±8.70 ^{abcde}	0.08±0.01 ^{abcd}
CHH	19.34±1.62		42.42±8.73 ^{abcd}	0.07±0.01 ^{abcd}
CHM	19.75±1.25		50.00±6.19 ^{abcde}	0.08±0.01 ^{abcd}
CHL	16.16±1.01		14.85±9.86 ^{ab}	0.03±0.02 ^{abc}
CMH	20.84±0.77		69.28±3.44 ^{bcde}	0.11±0.00 ^{cd}
CMM	19.49±0.62		53.00±10.41 ^{abcde}	0.08±0.01 ^{abcd}
CML	16.23±0.93		-4.14±9.71 ^a	-0.01±0.02 ^{ab}
CLH	18.67±0.68		25.14±5.98 ^{abc}	0.04±0.01 ^{abc}
CLM	18.81±0.92		19.50±6.97 ^{ab}	0.03±0.01 ^{abc}
CLL	16.93±1.18		-11.85±9.13 ^a	-0.02±0.01 ^a
Significant factor ⁴⁾	A,C,AC		A,B,C,AC	A,B,C,AC

1) Mean±S.E.

2) Not significant at α=0.05 by Scheffé test

3) Values with different alphabet within the column were significantly different at α=0.05 by Scheffé test

4) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA.

A : Cadmium effect was significant at α=0.05

B : Dietary protein effect was significant at α=0.05

C : Dietary calcium effect was significant at α=0.05

AB : Effect of cadmium×protein was significant at α=0.05

AC : Effect of cadmium×calcium was significant at α=0.05

BC : Effect of protein×calcium was significant at α=0.05

ABC : Effect of cadmium×protein×calcium was significant at α=0.05

섭취량은 calcium 수준에 의해 영향받아 calcium 수준이 낮은 군에서 비교적 낮은 경향을 보였다. 그러나 체중증가량과 식이 효율은 calcium 수준뿐 아니라 단백질 수준에 의해서도 영향받아 cadmium을 공급하면서 저단백 또는 저calcium 식이를 공급한 군들에서 유의적으로 낮게 나타났다. 특히 cadmium을 공급하면서 저calcium을 공급한 군들(CML, CLL)에서는 음의 수치를 보였으며, 식이

calcium 수준이 낮아도 단백질 수준이 높은 경우(CHL)에는 음의 수치가 나타나지 않았다.

간의 무게는 cadmium과 단백질 수준, 단백질과 calcium의 상호작용, 그리고 세 가지 실험요인의 상호작용에 의한 영향을 받아 cadmium을 공급한 저단백군들(CLH, CLM, CLL)에서 특히 낮았다. 신장의 무게는 세 실험요인의 상호작용에 의해 영향받아 cadmium을 공급한 저단백-저calcium군

식이 단백질, Ca과 Cd 중독

Table 4. Organ weights

(g)

Group	Liver		Kidney	Femur	
	1)	2)		Dry weight	Ash
NHH	9.86 ± 0.39 ^{abcd}		1.43 ± 0.06 ^{NS}	0.62 ± 0.01 ^b	0.35 ± 0.01 ^{NS}
NHM	11.66 ± 0.77 ^d		1.43 ± 0.06	0.61 ± 0.02 ^{ab}	0.35 ± 0.01
NHL	11.21 ± 0.42 ^{cd}		1.47 ± 0.06	0.52 ± 0.00 ^{ab}	0.28 ± 0.00
NMH	8.89 ± 0.28 ^{abcd}		1.27 ± 0.10	0.63 ± 0.02 ^b	0.35 ± 0.01
NMM	8.36 ± 0.30 ^{abcd}		1.19 ± 0.10	0.55 ± 0.02 ^{ab}	0.30 ± 0.01
NML	10.31 ± 0.59 ^{bcd}		1.39 ± 0.12	0.55 ± 0.01 ^{ab}	0.29 ± 0.00
NLH	8.92 ± 0.37 ^{abcd}		1.13 ± 0.08	0.57 ± 0.00 ^{ab}	0.32 ± 0.00
NLM	7.57 ± 0.54 ^{ab}		1.15 ± 0.12	0.53 ± 0.02 ^{ab}	0.29 ± 0.01
NLL	7.54 ± 0.22 ^{ab}		1.13 ± 0.13	0.51 ± 0.01 ^{ab}	0.27 ± 0.00
CHH	8.57 ± 0.52 ^{abcd}		1.26 ± 0.08	0.60 ± 0.02 ^{ab}	0.33 ± 0.01
CHM	8.88 ± 0.51 ^{abcd}		1.33 ± 0.11	0.56 ± 0.02 ^{ab}	0.29 ± 0.01
CHL	8.92 ± 0.58 ^{abcd}		1.26 ± 0.11	0.50 ± 0.01 ^{ab}	0.24 ± 0.00
CMH	8.17 ± 0.52 ^{abcd}		1.22 ± 0.15	0.60 ± 0.01 ^{ab}	0.34 ± 0.00
CMM	8.23 ± 0.25 ^{abcd}		1.20 ± 0.06	0.55 ± 0.01 ^{ab}	0.30 ± 0.00
CML	7.84 ± 0.29 ^{abcd}		1.15 ± 0.10	0.48 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.00
CLH	6.82 ± 0.13 ^a		1.09 ± 0.10	0.56 ± 0.00 ^{ab}	0.31 ± 0.00
CLM	6.89 ± 0.47 ^{ab}		1.15 ± 0.11	0.53 ± 0.02 ^{ab}	0.29 ± 0.01
CLL	6.54 ± 0.44 ^a		1.03 ± 0.07	0.49 ± 0.01 ^{ab}	0.23 ± 0.01
Significant factor ⁴⁾	A,B,BC,ABC		ABC	A,B,C	A,B,C

1) Mean ± S.E.

2) Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffé test

3) Not significant at $\alpha=0.05$ by Scheffé test

4) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA(See Table 3).

(CLL)에서 가장 낮았으나 실험군간에 통계적인 유의성이나 일정한 경향은 나타나지 않았다. 대퇴골의 무게는 세 가지 실험인자의 영향이 모두 유의적이어서 cadmium 공급군들이 비공급군에 비하여 낮고, 식이 단백질과 calcium 수준이 낮아질수록 낮았다. 회분 함량도 같은 경향을 보였으나 실험군간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 4).

Table 5와 같이 혈액의 cadmium 함량은 cadmium 공급군중 식이 요인에 의한 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 calcium 수준이 낮은 경우 높아지는 경향을 나타냈다. Cadmium 공급으로 인한 각 조직의 cadmium 함량 증가는 간에서 가장 컸으며, 간의 cadmium 함량은 단백질과 calcium에 의한 영향 및 이들의 상호작용에 의해서도 유의적인

영향을 받아 cadmium 공급군들 중 단백질 수준이 높을수록 그리고 calcium 수준은 낮을수록 cadmium 함량이 높게 나타나 고단백-저calcium군(CHL)에서 가장 높은 결과를 보였다. 신장의 cadmium 함량은 cadmium 공급군 중 calcium 수준이 낮을수록 높은 경향을 나타냈으며, 또한 단백질 수준이 낮은 군들에서 높았다. 소장 of cadmium 함량은 calcium 수준에 의한 영향이 비교적 뚜렷이 나타나, cadmium 공급군들 중 calcium 수준이 낮을수록 cadmium 함량이 높았으며, 특히 저단백-저calcium군(CLL)에서 가장 높았다. 대퇴골의 cadmium 함량은 cadmium 공급군중 calcium 수준이 낮을수록 높은 경향을 나타냈으나 간, 신장, 소장 등의 연조직에 비해 cadmium 공급여부에 의한

Table 5. Cadmium contents in blood, liver, kidney, intestine and femur

Group	Whole blood ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Liver ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Kidney ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Intestine ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Femur ($\mu\text{g}/\text{g}$)
	1) 2)	3)			
NHH	$0.46 \pm 0.06^{\text{NS}}$	$1.05 \pm 0.48^{\text{abc}}$	$2.08 \pm 1.21^{\text{NS}}$	$0.73 \pm 0.37^{\text{a}}$	$0.66 \pm 0.04^{\text{ab}}$
NHM	0.51 ± 0.06	$0.70 \pm 0.27^{\text{abc}}$	0.55 ± 0.30	$0.84 \pm 0.58^{\text{a}}$	$0.63 \pm 0.03^{\text{ab}}$
NHL	0.52 ± 0.04	$1.73 \pm 1.09^{\text{abcd}}$	0.40 ± 0.12	$0.31 \pm 0.24^{\text{a}}$	$0.46 \pm 0.07^{\text{a}}$
NMH	0.35 ± 0.06	$0.77 \pm 0.14^{\text{abc}}$	0.59 ± 0.35	$0.24 \pm 0.11^{\text{a}}$	$0.83 \pm 0.10^{\text{ab}}$
NMM	0.51 ± 0.07	$0.75 \pm 0.20^{\text{abc}}$	0.76 ± 0.45	$0.20 \pm 0.13^{\text{a}}$	$0.69 \pm 0.05^{\text{ab}}$
NML	0.50 ± 0.07	$0.61 \pm 0.09^{\text{a}}$	0.29 ± 0.21	$0.56 \pm 0.30^{\text{a}}$	$0.51 \pm 0.05^{\text{a}}$
NLH	0.41 ± 0.05	$2.08 \pm 1.20^{\text{abcd}}$	1.35 ± 1.45	$0.61 \pm 0.35^{\text{a}}$	$0.70 \pm 0.03^{\text{ab}}$
NLM	0.46 ± 0.08	$0.63 \pm 0.06^{\text{ab}}$	0.26 ± 0.20	$0.34 \pm 0.18^{\text{a}}$	$0.68 \pm 0.05^{\text{ab}}$
NLL	0.45 ± 0.04	$0.67 \pm 0.08^{\text{abc}}$	1.61 ± 2.25	$0.67 \pm 0.19^{\text{a}}$	$0.81 \pm 0.11^{\text{ab}}$
CHH	2.00 ± 0.50	$42.85 \pm 4.61^{\text{fg}}$	6.50 ± 1.35	$7.81 \pm 1.28^{\text{ab}}$	$0.83 \pm 0.04^{\text{ab}}$
CHM	1.72 ± 0.23	$42.00 \pm 4.47^{\text{fg}}$	6.12 ± 1.20	$6.69 \pm 1.65^{\text{ab}}$	$0.71 \pm 0.06^{\text{ab}}$
CHL	3.96 ± 1.01	$59.44 \pm 11.04^{\text{f}}$	9.45 ± 2.62	$12.05 \pm 1.89^{\text{ab}}$	$1.20 \pm 0.19^{\text{b}}$
CMH	2.15 ± 0.46	$32.90 \pm 3.03^{\text{abcdefg}}$	4.01 ± 0.49	$5.28 \pm 1.92^{\text{ab}}$	$0.90 \pm 0.08^{\text{ab}}$
CMM	1.95 ± 0.30	$34.13 \pm 3.38^{\text{bdefg}}$	5.18 ± 1.19	$5.81 \pm 1.57^{\text{ab}}$	$0.84 \pm 0.05^{\text{ab}}$
CML	3.61 ± 1.26	$48.82 \pm 8.54^{\text{fg}}$	7.68 ± 1.50	$10.94 \pm 2.13^{\text{ab}}$	$0.84 \pm 0.05^{\text{ab}}$
CLH	1.71 ± 0.19	$17.44 \pm 3.07^{\text{abcdef}}$	10.05 ± 3.19	$4.03 \pm 1.72^{\text{ab}}$	$0.88 \pm 0.09^{\text{ab}}$
CLM	4.10 ± 0.74	$26.26 \pm 5.72^{\text{abcdefg}}$	8.42 ± 2.26	$5.75 \pm 1.97^{\text{ab}}$	$0.81 \pm 0.12^{\text{ab}}$
CLL	2.90 ± 0.81	$35.28 \pm 5.62^{\text{dfr}}$	9.87 ± 2.03	$13.77 \pm 4.40^{\text{a}}$	$0.95 \pm 0.05^{\text{ab}}$
Significant factor ⁴⁾	A	A,B,C,AB,ABC	A	A,C,AC	A,AC

1) Mean \pm S.E.

2) Not significant at $\alpha=0.05$ by Scheffé test

3) Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffé test

4) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA(See Table 3).

차이가 가장 작게 나타났다.

Cadmium배설에 대한 식이 요인의 영향은 뇨보다 변에서 더욱 현저히 나타났으며(Table 6), cadmium 공급군중 단백질과 calcium 수준이 높을수록 변을 통한 cadmium 배설량이 뚜렷하게 높아서 고단백-고calcium군(CHH)군에서 가장 높았으며 따라서 cadmium 보유율은 가장 낮았다. 뇨를 통한 1일 cadmium 배설량은 단백질이나 calcium에 의한 일정한 경향을 나타내지 않았다.

Metallothionein 함량(Table 7)은 간, 신장, 소장에서 모두 cadmium을 공급한 군들에서 유의적으로 높은 수준을 나타냈으며, 또한 단백질 수준에 의해서도 유의적인 영향을 받아 cadmium 공급군 중 단백질 수준이 높은 군일수록 metallothionein 함

량이 높은 결과를 보였다. 단, 소장의 경우에는 cadmium과 단백질 수준 뿐 아니라 calcium 수준도 유의적인 영향을 나타내어 cadmium을 공급한 고단백-고calcium군(CHH)에서 가장 높은 경향이 었다.

Fig. 1, 2, 3은 간, 신장, 소장 조직의 cytosol fraction에서 살펴본 MT-Cd profile로 단백질과 calcium 수준이 높은 경우 metallothionein과 cadmium의 결합이 증가되었다.

Fig. 4, 5, 6은 각 조직의 일정부위의 손상정도를 전자현미경으로 관찰한 결과로 모든 조직에서 공통적으로 cadmium과 저단백-저calcium 식이 (CLL)를 공급한 경우 RER의 감소와 SER의 증가가 뚜렷하였다. 그러나 cadmium을 공급한 군 중 고

식이 단백질, Ca과 Cd 중독

Table 6. Urinary and fecal excretion of cadmium and cadmium retention ratio

Group	Urine ($\mu\text{g/day}$)	Feces ($\mu\text{g/day}$)	Cadmium retention ratio (%)
	1) 2)	3)	
NHH	1.93 \pm 0.20 ^{NS}	6.02 \pm 2.70 ^a	—
NHM	1.82 \pm 0.42	2.02 \pm 0.61 ^a	—
NHL	1.32 \pm 0.14	3.68 \pm 1.52 ^a	—
NMH	1.53 \pm 0.21	1.57 \pm 0.50 ^a	—
NMM	1.77 \pm 0.28	4.12 \pm 1.77 ^a	—
NML	1.78 \pm 0.40	3.47 \pm 0.92 ^a	—
NLH	2.31 \pm 0.80	1.37 \pm 0.41 ^a	—
NLM	1.55 \pm 0.67	4.37 \pm 2.32 ^a	—
NLL	1.08 \pm 0.34	1.67 \pm 0.57 ^a	—
CHH	69.58 \pm 25.14	490.76 \pm 68.80 ^{cd}	29.95
CHM	59.58 \pm 20.62	399.70 \pm 52.50 ^{bcd}	42.59
CHL	25.70 \pm 2.03	473.90 \pm 82.20 ^{cd}	37.55
CMH	65.38 \pm 23.50	485.24 \pm 71.38 ^d	31.17
CMM	61.27 \pm 17.86	250.23 \pm 61.72 ^{abc}	61.06
CML	36.44 \pm 9.73	181.60 \pm 67.13 ^{abc}	72.74
CLH	47.90 \pm 17.06	262.07 \pm 16.36 ^{abc}	61.25
CLM	60.75 \pm 20.33	167.34 \pm 38.96 ^{abc}	71.48
CLL	67.55 \pm 27.14	103.01 \pm 34.01 ^{ab}	78.68
Significant factor ⁴⁾	A	A,B,C,AB,AC,BC,ABC	

1) Mean \pm S.E.

2) Not significant at $\alpha=0.05$ by Scheffé test

3) Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffé test

4) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA(See Table 3).

단백-고calcium 식이를 공급한 경우(CHH)에는 비교적 RER의 감소가 적었다.

단위 gram당 간의 총단백질 함량은 cadmium과 각 실험 요인들에 의해 영향받지 않았다. 그러나 전체 간의 총단백질 함량은, cadmium과 단백질의 상호작용에 의한 영향을 받아 cadmium을 공급한 저단백군들(CL-)에서 낮은 경향을 보였다(Table 8).

고 찰

Cadmium은 아직까지 기능이 잘 알려지지 않은 미량 중금속으로 비교적 유독한 것으로만 알려졌을 뿐 cadmium의 대사와 initial target등은 확실히 밝혀지지 않고 있다. 단지 metallothionein이라 불리

우는 분자량이 작고 cystein은 풍부하며, aromatic amino acid와 histidine은 없는 single chain protein이 해독과정에 관여한다는 정도가 알려져있다⁷⁾⁸⁾.

일반적으로 경구투여된 cadmium은 흡수율이 매우 낮는데 이것은 mucosal cell로 부터 혈액으로의 cadmium 흡수율이 lumen으로 부터 mucosal cell로의 이행량에 비해 훨씬 작기 때문으로 설명되고있다²²⁾. 이 결과 mucosal cell에는 다량의 cadmium이 축적되고, 이 cadmium을 유독하지 않은 형태로 trapping 시키는 것이 소장에서의 metallothionein의 역할이다²³⁾. 본 실험 결과 소장의 cadmium 함량은 식이 calcium 수준과 역의 관계를 나타냈는데 이는 Bredderman등과 Washko등의 보고²⁴⁾와 일치하는 것으로 이들은 저calcium 식이로

Table 7. Metallothionein contents in liver, kidney and intestine

Group	Liver ($\mu\text{g/g}$)		Kidney ($\mu\text{g/g}$)	Intestine ($\mu\text{g/g}$)
	1)	2)		
NHH	48.80 \pm 3.39 ^a		27.04 \pm 3.41 ^a	83.38 \pm 7.28 ^{abcd}
NHM	52.74 \pm 9.11 ^a		31.81 \pm 6.00 ^a	70.64 \pm 10.45 ^a
NHL	46.90 \pm 7.70 ^a		33.02 \pm 6.68 ^{ab}	73.75 \pm 3.51 ^{ab}
NMH	55.11 \pm 4.98 ^a		53.37 \pm 10.21 ^{abc}	81.01 \pm 4.10 ^{abcd}
NMM	41.54 \pm 6.06 ^a		57.79 \pm 9.70 ^{abcd}	74.07 \pm 1.55 ^{abc}
NML	44.97 \pm 7.02 ^a		94.71 \pm 9.18 ^{abcde}	80.18 \pm 3.76 ^{abcd}
NLH	53.11 \pm 4.46 ^a		106.34 \pm 15.03 ^{abcde}	84.97 \pm 9.80 ^{abcd}
NLM	46.96 \pm 9.48 ^a		82.33 \pm 19.19 ^{abcde}	81.06 \pm 17.10 ^{abcd}
NLL	59.67 \pm 4.14 ^a		85.65 \pm 10.86 ^{abcde}	81.41 \pm 10.95 ^{abcd}
CHH	213.37 \pm 10.31 ^{de}		217.30 \pm 10.68 ^{ef}	267.91 \pm 28.79 ^c
CHM	199.10 \pm 13.80 ^{erc}		221.32 \pm 15.85 ^{ef}	212.62 \pm 47.80 ^{bcdc}
CHL	238.93 \pm 23.20 ^c		279.34 \pm 26.97 ^f	268.33 \pm 24.48 ^c
CMH	169.80 \pm 34.78 ^{bcdc}		198.85 \pm 32.19 ^{cdef}	196.64 \pm 24.34 ^{abcde}
CMM	178.55 \pm 12.43 ^{bcdc}		208.27 \pm 12.89 ^{ef}	155.83 \pm 15.09 ^{abcde}
CML	124.88 \pm 10.22 ^{abcd}		208.15 \pm 37.98 ^{def}	134.95 \pm 9.25 ^{abcde}
CLH	82.51 \pm 10.10 ^{ab}		145.88 \pm 9.01 ^{abcdef}	132.26 \pm 20.72 ^{abcde}
CLM	112.13 \pm 14.64 ^{abc}		192.93 \pm 31.50 ^{bcdcf}	114.80 \pm 14.58 ^{abcd}
CLL	167.04 \pm 5.97 ^{bcdc}		233.88 \pm 35.61 ^{cf}	161.75 \pm 7.08 ^{abcde}
Significant factor ³⁾	A,B,AB		A,AB	A,B,C,AB

1) Mean \pm S.E.

2) Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffé test

3) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA(See Table 3).

인해 CaBP의 합성이 증가함으로써 cadmium의 흡수가 증가된다고 설명하였다. 한편 소장의 metallothionein 함량은 단백질 수준 뿐 아니라 calcium 수준에 의해서도 유의적인 영향을 받아 cadmium을 공급한 고단백-고calcium군(CHH)에서 가장 높았는데, 이는 저calcium식으로 인해 cadmium이 mucosal cell로 많이 이행되고 이에 대한 해독기전으로 metallothionein의 합성이 증가하게 되는데 특히 고단백식을 공급한 경우 metallothionein이 더욱 많이 합성되는 것으로 생각할 수 있다. Revis등⁶⁾도 식이 단백질을 충분히 공급하면 metallothionein의 합성이 증가되고 cadmium이 Cd-MT의 형태로 조직내에서 격리됨으로써 cadmium의 독성이 완화될 수 있다고 하였다.

본 연구에서 각 실험군당 1일 변 cadmium 배

설량은 소장의 metallothionein 함량과 같은 경향을 보여 고단백군과 고calcium 군에서 배설량이 많아지는 경향을 보였으며 특히 고단백-고calcium군(CHH)군에서 가장 높았는데, 이에 대한 기전으로는 다음과 같은 것들을 생각할 수 있다. 첫째, 고단백식이와 고calcium 식이 공급에 의해 식이 섭취량이 증가됨으로써 일일 변 배설량이 많아진다²⁵⁾. 둘째, 고단백식이에 의해 mucosal cell에서 metallothionein 합성이 증가하고 따라서 다량의 cadmium이 metallothionein과 결합되어 non-toxic한 상태로 mucosal cell에 머물다가 mucosal cell의 박리시 함께 변으로 배설된다.¹¹⁾²³⁾²⁶⁾²⁷⁻²⁹⁾ 셋째, 고calcium 식이에 의해 cadmium의 흡수가 저하된다³⁰⁾.

Sugawara등²⁶⁾은 소장에서 metallothionein의 주된 기능은 간이나 신장에서와 달리 mucosal cell로의

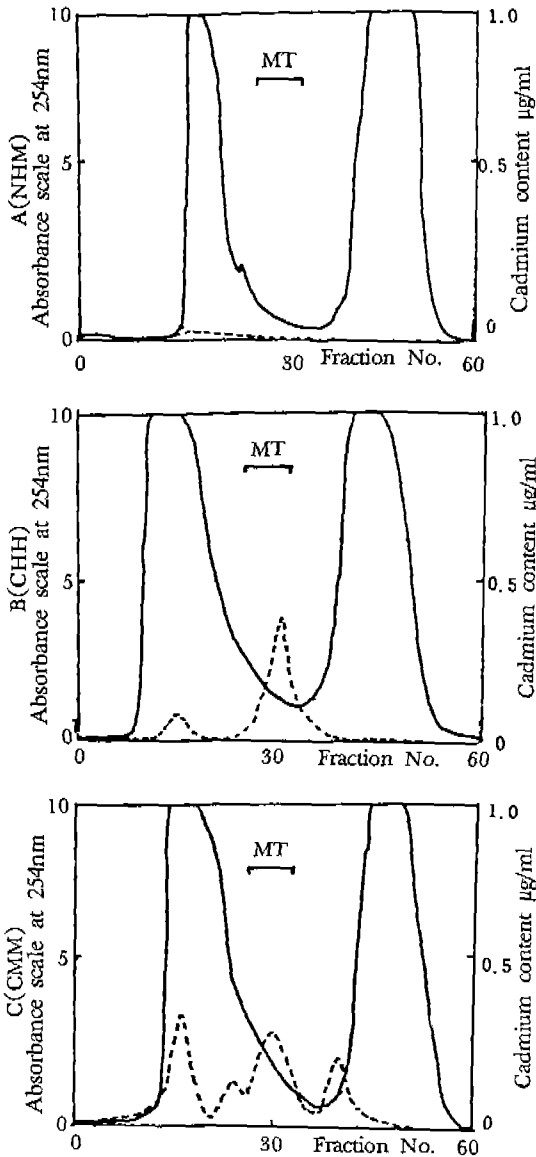


Fig. 1. Gel filtration chromatography of the soluble liver protein. (—) Absorbance scale at 254nm : (-----) cadmium conc $\mu\text{g/ml}$. A : rats fed the no Cd, 15% protein and 0.6% Ca diet (NMM) B : rats fed the 50ppm Cd, 40% protein and 1.3% Ca diet (CHH) C : rats fed the 50ppm Cd, 15% protein and 0.6% Ca diet (CMM).

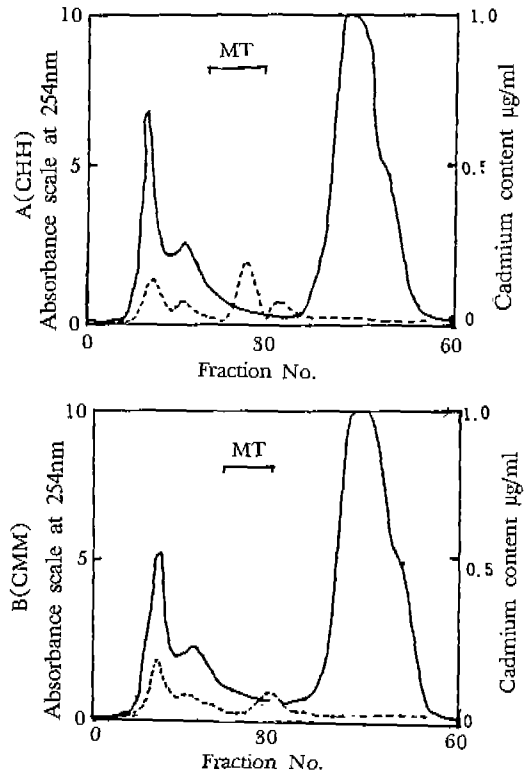


Fig. 2. Gel filtration chromatography of the soluble kidney protein. (—) Absorbance scale at 254nm : (-----) cadmium conc $\mu\text{g/ml}$. A : rats fed the 50ppm Cd, 40% protein and 1.3% Ca diet (CHH) B : rats fed the 50ppm Cd, 15% protein and 0.6% Ca diet (CMM).

cadmium 이행만 증진시킬 뿐, 혈액으로의 cadmium 운반은 증가시키지 않는다고 하였다. 따라서 gastrointestinal tract에서 흡수된 cadmium은 혈액에서 albumin과 같은 고분자단백질과 결합된 다음 주로 간으로 이행된다²⁴⁾³¹⁾. 본 실험에서는 cadmium 공급군들의 혈액 cadmium 함량에 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 식이 calcium 수준이 낮을수록 더 높은 경향을 보여, cadmium 중독시 저calcium 영양이 특히 불리함을 나타내 주었다.

간으로 이행된 cadmium은 MT-Cd의 non-toxic한 형태로 격리되기 위하여 metallothionein을 합성할

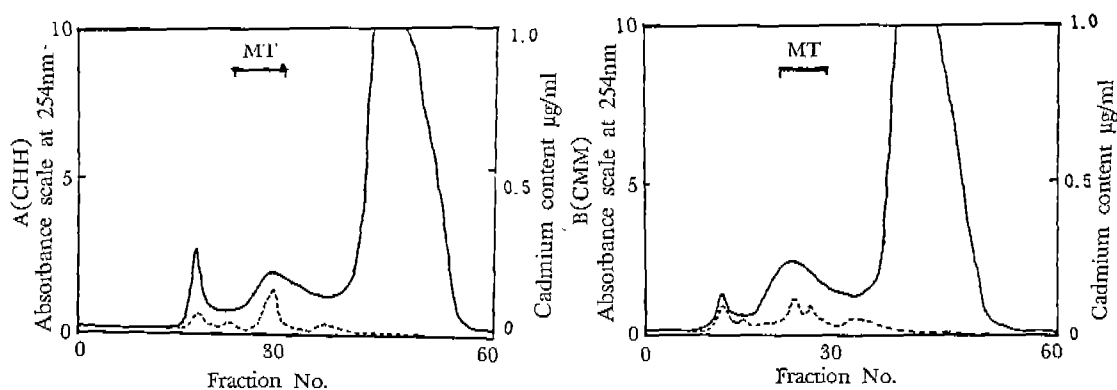


Fig. 3. Gel filtration chromatography of soluble proteins of intestinal mucosa.

(—) Absorbance scale at 254nm : (-----) cadmium conc $\mu\text{g/ml}$. A : rats fed the 50ppm Cd, 40% protein and 1.3% Ca diet (CHH) B : rats fed the 50ppm Cd, 15% protein and 0.6% Ca diet (CMM).

Table 8. Total protein content of liver

Group	mg/g liver		mg/total liver
	1)	2)	
NHH	358.00 \pm 6.21 ^{N.S.}		3763.40 \pm 12.35 ^{N.S.}
NHM	338.40 \pm 14.78		3971.65 \pm 199.36
NHL	354.00 \pm 24.73		4004.10 \pm 133.53
NMH	348.00 \pm 11.52		3165.07 \pm 174.95
NMM	367.00 \pm 5.00		3068.66 \pm 131.44
NML	350.00 \pm 17.16		3906.36 \pm 339.77
NLH	360.00 \pm 13.46		3125.40 \pm 153.76
NLM	361.33 \pm 7.05		2603.64 \pm 308.01
NLL	367.00 \pm 10.37		2669.82 \pm 198.73
CHH	341.00 \pm 25.68		2858.31 \pm 162.86
CHM	326.00 \pm 24.79		2898.32 \pm 259.31
CHL	324.00 \pm 24.89		3216.10 \pm 502.85
CMH	356.00 \pm 14.23		3048.40 \pm 390.05
CMM	324.00 \pm 16.16		2829.84 \pm 189.61
CML	379.00 \pm 20.28		3087.88 \pm 184.25
CLH	389.00 \pm 19.55		2665.85 \pm 192.34
CLM	365.00 \pm 27.87		2367.20 \pm 220.37
CLL	354.00 \pm 16.20		2293.48 \pm 152.29
Significant factor ³⁾			AB

1) Mean \pm S.E.

2) Not significant at $\alpha=0.05$ by Scheffé test

3) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 3-way ANOVA(See Table 3).

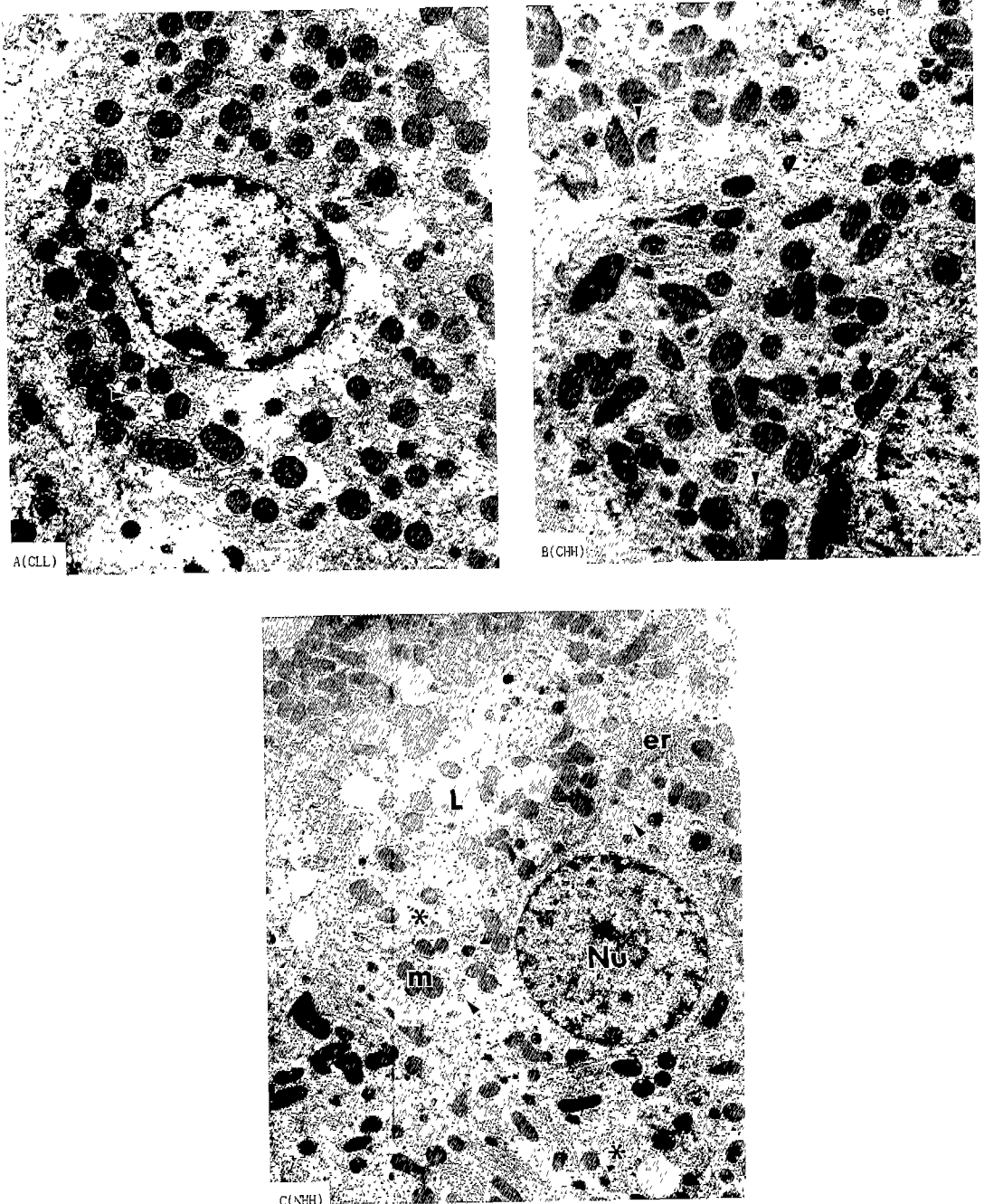


Fig. 4. Electron micrograph of liver cells. A: rats fed 50ppm Cd, 7% protein and 0.1% Ca diet (CLL). The loss of rer and an increase of ser are marked (12,000 \times). B: rats fed 50ppm Cd, 40% protein and 1.3% Ca diet (CHH) showing detachment of ribosomes from rough endoplasmic reticulum (arrowhead) and increase of smooth endoplasmic reticulum (ser) (12,000 \times). C: rats fed no Cd, 40% protein and 1.3% Ca diet (NHH). Nucleus (Nu), mitochondria (m), stacks of rough endoplasmic reticulum (rer), lipid droplets (L), smooth endoplasmic reticulum (arrowheads), and glycogen particles (asterisks) are indicated (7,000 \times).

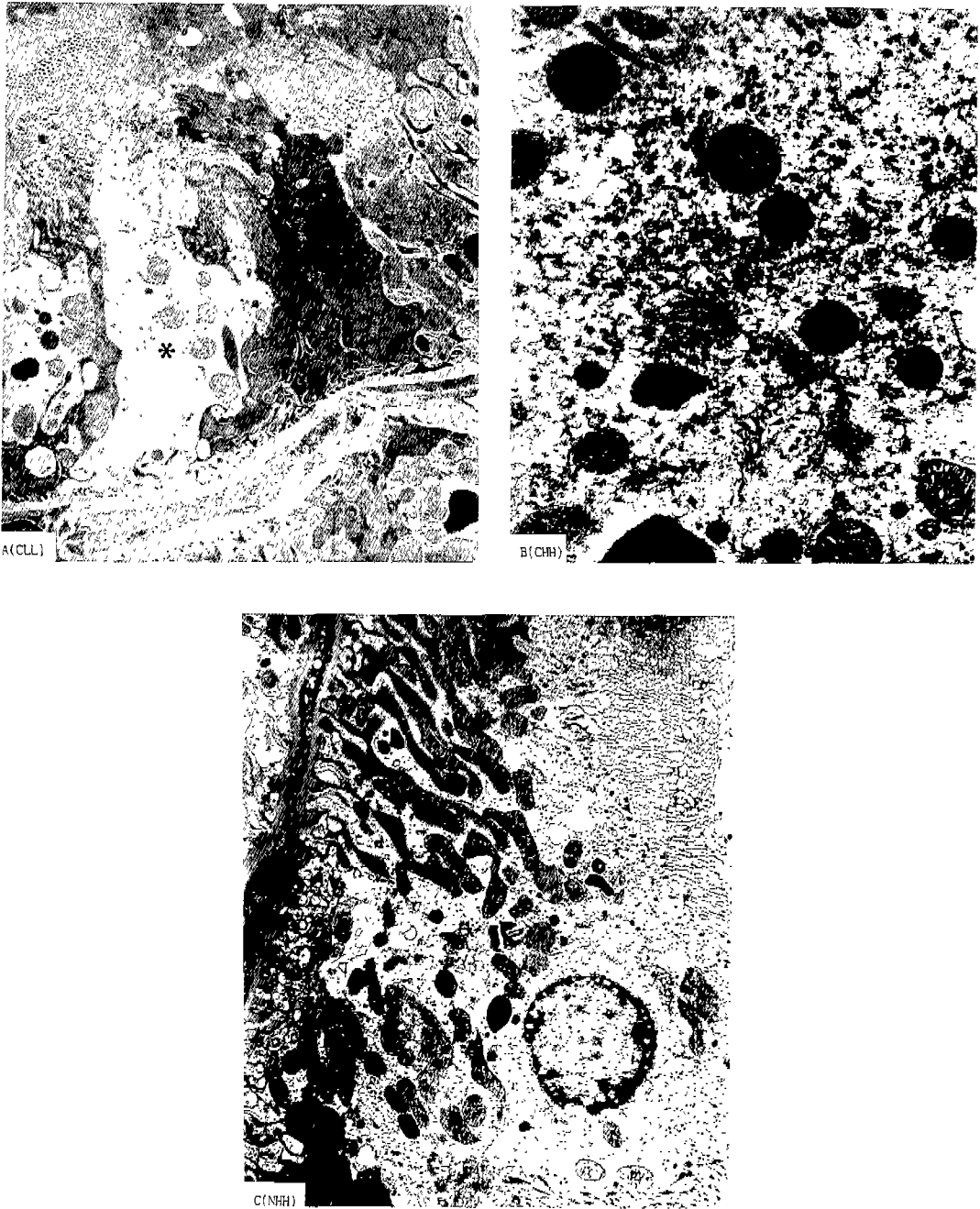


Fig. 5. Electron micrograph of kidney proximal tubule.

A : rats fed 50ppm Cd, 7% protein and 0.1% Ca diet(CLL) showing swollen cell with pale cytoplasm(asterisk)(8,000 \times). B : rats fed 50ppm Cd, 40% protein and 1.3% Ca diet(CHH). The smooth endoplasmic reticula(arrowhead) are well developed(24,000 \times). C : rats fed no Cd, 40% protein and 1.3% Ca diet(NHH). Well developed microvilli and densely packed mitochondria are noticed(8,000 \times).

식이 단백질, Ca과 Cd 중독

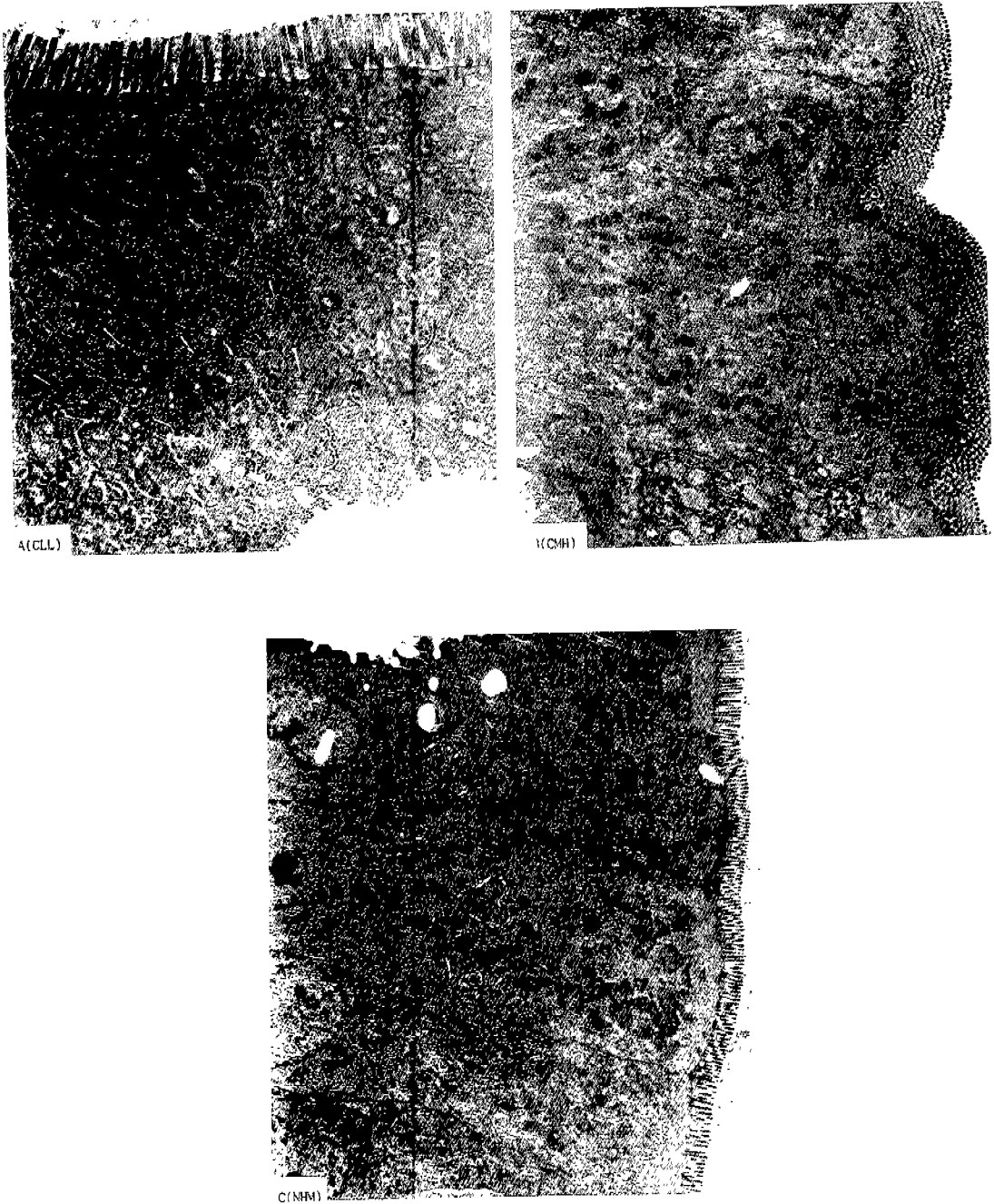


Fig. 6. Electron micrograph of duodenal columnar cells. A : rats fed 50ppm Cd, 7% protein and 0.1% Ca diet(CLL) showing stacks of rough endoplasmic reticulum diminished remarkably all over the cytoplasm(16,000 \times). B : rats fed 50ppm Cd, 15% protein and 1.3% Ca diet(CMH) showing slight decrease of rough endoplasmic reticulum in the cytoplasm(8,000 \times). C : rats fed no Cd, 40% protein and 0.6% Ca diet(NHM). The most of cell organelles in the supranuclear cytoplasm are well preserved(6,000 \times).

다. 본 실험에서 간의 cadmium 함량은 단백질 수준이 높을수록 그리고 calcium 수준은 낮을수록 높게 나타났으며, metallothionein의 함량은 고단백 질군에서 뚜렷이 증가하는 경향을 보였으며 cadmium과 metallothionein의 결합도 증가되었다.

간의 Cd-MT은 간에 그대로 머물러 있지않고 혈액으로 방출되어 나오며, 혈액의 Cd-MT는 다른 기관의 막을 통과하지 못하나 신장의 사구체막을 선택적으로 통과하기 때문에 빠르게 신장으로 이행된 후 서서히 노로 배설된다³²⁾. 사구체막을 통해 여과된 Cd-MT는 pinocytosis에 의해 tubular cell로 재흡수된 후³³⁾ lysosome에서 분해되어 free cadmium이 방출되고 이에 의해 tubular cell에서 metallothionein의 재합성이 시작되어 또다시 유독하지 않은 형태의 Cd-MT가 형성된다³⁴⁾. 그러나 degradation 과정에서 metallothionein으로 부터 다량의 cadmium이 방출되면 tubular cell에서는 더 이상의 metallothionein을 합성할 수 없으므로 과량의 cadmium은 Cd-MT의 형태로 격리되지 못하고 신장의 손상이 오기 시작한다고 하였으며, 이러한 critical한 cadmium의 농도는 흰쥐에서 약 200 μ g/g renal cortex로 보고되고 있다²⁴⁾³⁵⁾. 따라서 만성적 cadmium 중독시 가장 손상받기 쉬운 기관이 신장이라 할 수 있다.

신장이 손상받기 전에는 신장의 cadmium 축적량과 뇨의 cadmium 배설량이 서로 상관성을 보여, Roels등³⁶⁾은 뇨의 cadmium 함량은 체내에 축적된 cadmium 함량에 대한 좋은 척도가 될 수 있다고 하였다. 그러나 신장이 손상받은 후에는 뇨를 통한 cadmium 배설이 갑작스럽게 증가하고 신장의 cadmium 함량은 감소한다고 한다³⁷⁾. 본 연구 결과 신장의 cadmium 함량은 cadmium 공급군중 식이 calcium 수준이 낮을수록 높은 경향이였으며, metallothionein 함량은 식이 단백질 수준이 높을수록 그리고 식이 calcium 수준은 낮을수록 높은 경향을 보여 고단백-저calcium군(CHL)군에서 가장 높았다. 반면 신장의 cadmium 함량은 저calcium군에서 높은 경향을 보였으므로 뇨를 통한 cadmium 배설량도 저calcium군에서 많을 것으로 예상하였으나, 기대하였던 효과를 볼 수 없었다.

이는 각 군을 구성하는 개체들간의 차이가 컸기 때문으로 생각된다.

세포내에서 free cadmium은 중요 효소의 기능을 방해함으로써 독성효과를 나타내며, 또한 세포내 organelle과 결합하여 세포의 형태를 바꿈에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 본 실험의 생화학적 분석 결과는 cadmium을 공급하고 저단백-저calcium 식이를 준 경우(CLL) metallothionein 함량과 Cd-MT의 결합력이 저하되는 것으로 나타났다. 따라서 metallothionein에 결합되지 않은 cadmium이 세포내에서 핵, mitochondria, endoplasmic reticulum등과 같은 critical organelle에 결합될 것이며, 이것이 세포에 영향미칠 것으로 생각하여 간, 신장, 소장의 조직을 전자 현미경으로 관찰하였다.

대부분의 실험에서 cadmium을 경구투여한 경우 조직의 심각한 형태 변화는 없었다고 보고되고 있다³⁶⁾. 본 실험 결과에서도 명확한 조직 손상은 없었으며, cadmium 공급군에서 가장 현저히 나타난 변화는 rough endoplasmic reticulum(RER)에서 ribosome이 떨어져나와 smooth endoplasmic reticulum(SER)이 많이 증가 된 것이다. 이것은 Miyahara등이³⁸⁾ osteogenic cell line, MC3T3-E1을 cadmium과 함께 배양하였을 때 RER이 감소하였다고 한 결과와 일치하였다. Endoplasmic reticulum에서 분리되어진 free ribosome에서 만들어진 단백질은 주로 세포질에서 이용되며, endoplasmic reticulum에 붙은 ribosome에서 만들어진 단백질은 세포 밖으로 이동되어 이용된다고 알려져있다³⁹⁾. 따라서 본 실험 결과 cadmium 공급군에서 free ribosome이 많아진 것과 세포질 단백질인 metallothionein의 합성은 서로 관계있다고 할 수 있다. Din과 Frazier는⁴⁰⁾ 간 세포를 분리하여 (3H)leucine이 trichloro-acetic acid-precipitable cellular protein으로 들어가는 과정을 관찰 해 봄으로써 cadmium이 단백질 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 이 결과 cadmium에 의해 단백질 합성이 저하되었다고 보고하였으며, 이에 대한 이유로 첫째, cadmium이 chromatin내 특정 부위에 결합됨으로써 mRNA의 transcription이 방해되고, 둘째, cadmium이 polyribosome structure를 방해하여 mRNA의 translation을

방해한다고도 하였다. 본 실험에서도 RER감소와 SER증가로 총단백질 합성이 감소될 것이라는 가정하에 micro-Kjeldahl법에 의해 간의 총단백질 함량을 측정된 결과(Table 7), 단위 gram당 총단백질 함량은 각 군간의 차이가 나타나지 않았다. 그러나 총단백질 함량/간의 총 무게의 비율로 환산 해 보면 유의적은 아니나 cadmium 공급군중 저단백군에서 가장 낮은 경향을 보였다.

요약 및 결론

식이 단백질과 calcium 수준을 달리한 식이가 경구투여된 cadmium의 중독에 미치는 영향을 연구하기 위하여 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 대상으로 실험을 수행하였다.

평균체중이 245g인 흰쥐에서 50ppm의 cadmium을 음료수로 공급하면서 식이 단백질 수준을 40%, 15%, 7%로 달리하고, 식이 calcium 수준을 1.3%, 0.6%, 0.1%로 달리한 식이로 30일간 사육하여 cadmium 대사와 metallothionein 합성능력, metallothionein-cadmium profile, 그리고 간, 신장, 소장 조직의 형태학적 변화를 살펴보았다.

실험 결과를 실험 요인별로 요약하면 다음과 같다.

1) Cadmium 투여시에는 체중증가를 감소와 식이효율 저하가 일어나며, 간, 신장, 소장에서 metallothionein의 de novo 합성이 증가되며, 각 조직내 cadmium 보유량도 증가되었다. 또한, 간, 신장, 소장의 rough endoplasmic reticulum에서 ribosome이 분리되어 smooth endoplasmic reticulum이 증가되었다.

2) 식이 단백질은 cadmium 투여로 인한 체중증가량 감소와 식이 효율저하를 완화시켜주며, 간과 신장의 무게를 증가시킨다. 또한 간, 신장, 소장의 metallothionein 함량과 유독하지 않은 형태의 간 cadmium 보유량과 변으로의 cadmium 배설량을 증가시킨다.

3) 식이 calcium도 cadmium 투여로 인한 체중증가량 감소와 식이 효율저하를 완화시켜주며, 대퇴골의 무게를 증가시키고, 신장과 소장, 대퇴골의

cadmium 보유량을 증가시키며, 변으로의 cadmium 배설을 증가시키고, 소장의 metallothionein 함량을 증가시켰다.

4) 고단백-고calcium 식이는 cadmium 흡수를 저하시켜 1일 변 cadmium 배설량을 증가시켰다. 또한 조직에 보유된 cadmium과 metallothionein의 결합율을 증가시켰으며, cadmium 공급으로 인한 간, 신장, 소장 조직의 손상도 가장 적었다.

이상의 결과로 식이 단백질과 calcium은 모두 cadmium 중독 예방에 효과적으로 나타났으나 이들의 작용기전은 다르게 나타났다. 단백질은 주로 general condition(식이 섭취, 성장등)의 유지와 metallothionein 합성을 증가시켜 간, 소장, 신장에서 cadmium을 non-toxic한 형태로 격리시킬 뿐 아니라, 혈액에서 간이나 신장으로의 cadmium 이행을 조절함으로써 cadmium이 중추신경계나 vital organ에서 작용하지 못하도록 하는 것으로 생각된다. 한편 calcium은 cadmium의 흡수를 저해하여 순환계, 신장, 뼈의 cadmium 함량을 낮추는 것으로 생각된다.

단백질과 calcium을 동시에 높은 수준 공급하였을 때에는 calcium으로 인해 lumen으로부터 mucosal cell로의 cadmium 이행이 감소되고, mucosal cell로 이행된 cadmium은 고단백질로 인해 합성증가된 metallothionein과 결합하여 non-toxic한 형태로 trapping 되었다가 소장세포의 박리시 함께 변으로 배설되므로 두 식이요인의 상승 효과가 나타날 것으로 생각할 수 있으며, 본 실험에서도 고단백-고calcium군에서 1일변 cadmium 배설량이 가장 높았다.

Literature cited

- 1) Ryan JA, Pahren HR, Lucas JB. Controlling cadmium in the human food chain : a review and rationale based in health effects. *Environ Res* 28 : 251, 1982
- 2) Piscator M. Dietary exposure to cadmium and health effects : Impact of environmental changes. *Environ Health Perspect* 63 : 127, 1985
- 3) Friberg L. Health hazards in the manufacture of

- alkaline accumulation with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med Scand* 138 : 1, 1950
- 4) Lee HY, Kim, MK. Effects of dietary cadmium and protein levels on the body protein metabolism and cadmium toxicity in growing rats. *Korean J Nutr* 21(6) : 27-37, 1988
 - 5) 배계현. 식이내 calcium 수준이 흰쥐의 cadmium 중독에 미치는 영향. 이화여자대학교 대학원 석사학위 논문, 1989
 - 6) Revis NW, Osborne TR. Dietary protein effects on cadmium and metallothionein accumulation in the liver, and kidney of rats. *Environ Health Perspect* 54 : 83, 1984
 - 7) Feldman SL, Cousins RJ. Influence of cadmium on the metabolism of 25-hydroxycholecalciferol in chicks. *Nutr Rep Int* 8 : 251, 1975
 - 8) Kägi JHR, Vallee BL. Metallothionein : a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem* 235 : 3460, 1969
 - 9) Din WS, Frazier JM. Protective effect of metallothionein on cadmium toxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 230 : 395, 1985
 - 10) Cherian MG, Nordberg M. Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* 28 : 1, 1983
 - 11) Squibb KS, Cousins RJ, Silbon BL, Levin S. Liver and intestinal metallothionein function in acute cadmium toxicity. *Exp Mol Pathol* 25 : 163, 1976
 - 12) Nordberg GF, Piscator M, Lind B. Distribution of cadmium among protein fractions of mouse liver. *Acta Pharmacol Toxicol* 29 : 456, 1971
 - 13) Pharmaceutical Society of Japan. Standard methods of analysis for hygienic chemistry, pp17-32, 金原出版株式会社, Japan, 1990
 - 14) Scheuhammer AM. The dose-dependent disposition of cadmium into organs of Japanese quail following oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 95 : 153, 1988
 - 15) Scheuhammer AM, Cherian MG. Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicol Appl Pharmacol* 82 : 417, 1986
 - 16) Eaton DL, Toal BF. Evaluation of Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 66 : 134, 1982
 - 17) Onosaka S, Cherian G. Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods. *Toxicol Appl Pharmacol* 63 : 270, 1982
 - 18) Onosaka S, Tanaka K, Doi M, Okahara K. A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues. *Eisei Kagaku* 24 : 128, 1978
 - 19) Asokan P, Tandon SK. Effect of cadmium on hepatic metallothionein levels in early development of the rat. *Environ Res* 24 : 201, 1981
 - 20) Snedecor GW, Cochran WG. "Statistical Methods" 17th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1980
 - 21) 채서일·김범중. "Spss/PC+를 이용한 통계분석". 법문사
 - 22) Foulkes EC. Absorption of Cadmium. In "Cadmium"(EC Foulkes, Ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp75-97, 1986
 - 23) Nordberg M. Studies on metallothionein and cadmium. *Environ Res* 15 : 381, 1978
 - 24) Bredderman PJ, Wasserman RH. Chemical composition, affinity for calcium and some related properties of the vitamin D dependent calcium-binding protein. *Biochemistry* 13 : 1687, 1974
 - 25) Omori M, Muto Y. Effects of dietary protein, calcium, phosphorus and fiber on renal accumulation of exogenous cadmium in young rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 23 : 361, 1977
 - 26) Sugawara N, Sugawara C, Miyake H. Binding of CdCl₂ and Cd-MT to mucosal brush border membrane of the rat small intestinal tract. *Bull Environ Contam Toxicol* 40 : 418, 1988
 - 27) Lehman LD, Klaassen CD. Dose-dependent disposition of cadmium administered orally to rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 84 : 159, 1986
 - 28) Koo SI, Fullmer CS, Wasserman RH. Intestinal absorption and retention of ¹⁰⁹Cd : Effects of cholecalciferol, calcium status and other variables. *J Nutr* 108 : 1812, 1978
 - 29) Nordberg M, Nordberg GF. On the role of metallothionein in cadmium-induced renal toxicity. *Ex-*

- perientia(Suppl)* 52 : 669, 1987
- 30) Bunn CR, Matrone G. In vivo interaction of Cd, Cu, Zn and Fe in the mouse and rat. *J Nutr* 90 : 395, 1966
- 31) Webb M. Role of Metallothionein in Cadmium Metabolism. In "Cadmium" (EC Foulkes, Ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp281-325, 1986
- 32) Suzuki Y. Cd, Cu and Zn distribution in blood of rats after long-term cadmium administration. *J Toxicol Environ Health* 7 : 251, 1981
- 33) Nath R, Paliwal VK, Prasad R, Kambadur R. Role of metallothionein in metal detoxification and metal tolerance in PCM and Ca-deficient monkeys. *Experientia(Suppl)* 52 : 631, 1987
- 34) Nordberg M. General aspects of cadmium transport, uptake and metabolism by the kidney. *Environ Health Perspect* 54 : 13, 1984
- 35) Elinder CG, Lundgren G, Nordberg M, Palm B, Piscator M. Metallothionein in rabbit kidneys prepared for transplantation. *Environ Health Perspect* 54 : 275, 1984
- 36) Roels HA, Lauwerys RR, Buchet JP. In vivo measurements of liver and kidney cadmium in workers exposed to this metal. *Environ Res* 26 : 217, 1981
- 37) Bhattacharyya MH, Whelton BD, Peterson DP. Kidney changes in multiporous mice fed a nutrient sufficient diet containing cadmium. *Toxicology* 50 : 205, 1988
- 38) Mirayahara T, Yamada H, Takeuchi M. Inhibitory effects of cadmium on in vitro calcification of a clonal osteogenic cell. *Toxicol Appl Pharmacol* 96 : 52, 1988
- 39) Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS. Cell Structure. In "Human Physiology", McGraw-Hill Book Company, pp13-23, 1985
- 40) Din WS, Frazier JM. Protective effect of metallothionein on cadmium toxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 230 : 395, 1985