Korean J. Toxicol.
Vol. 11, No. 2, pp. 223-227, 1995

한국산 생약으로부터 해독물질의 개발(제2보)
흰쥐 간장내의 카드뮴 축적에 미치는 금은화 추출물의 영향

백승화* · 유일수 · 이종섭** · 한두석***

*원광대학교 자연과학대학 화학과, 이리농공전문대학 화공과,
**원광대학교 의과대학 예방의학교실, ***치과대학 구강해부학교실

Development of Antitoxic Agents from Korean Medicinal Plants. Part 2.
Effects of Lonicerae flos Extract on the Accumulation of Cadmium in Liver

Seung Hwa Baek*, Il Soo You, Jong Sub Lee** and Du Seok Han***

**Dept. of Chemistry, College of Natural Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Dept. of Chemical Engineering, Iri Agricultural and Technical Junior College, Iksan, 570-110. **Dept. of Preventive Medicine, School of Medicine, and ***Dept. of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea*

(Received August 16, 1995)
(Accepted September 10, 1995)

ABSTRACT : *This study was conducted to investigate the metallothionein (MT) induction by Lonicerae flos in cadmium chloride intoxication. The results were as follows: Generally, detoxication effects by Lonicerae flos extract increased to the increase of extract concentrations. When 90 mg/kg dosage of Lonicerae flos extract was administered, it showed the highest antitoxic effects in metallothionein induction. From the above results, Lonicerae flos extract increased metallothionein concentration and decreased the toxicity of cadmium in liver.*

Key Word : *Lonicerae flos, Cadmium chloride, Metallothionein, Detoxication effect*

I. 서 론

근대산업의 급속한 발달과 더불어 인간에게 피해를 입히기 시작한 중금속은 산업의 발달이 진행될수록 인간과의 밀착력이 증대되어 다양한 양상으로 독성을 나타내고 있다(Suzuki 등, 1969). 이들 중금속 중 카드뮴은 납이나 아연광산의 광물용해시 생성되는 부산물로서, 산업에 사용되는 곳으로는 합금형성이나 전기도금, 페인트, 도자기염료, 부식방지제, 카드뮴-니켈전지, 살균제 등에 다양하게 쓰여지고 있으며, 그 소비량도 산업이 발달함에 따라 증가하고 있는 실정이다(William 등, 1985). 카드뮴은 노출되는 양과 형태(Dudley 등, 1982), 폭로기간(Sendelbach 등, 1988) 및 체내 유입경로(Goyer 등, 1986) 등에 따라 다양한 독성을 나타내는데, 일반적으로 신기능장애, 간조직손상, 중추신경장애, 고혈압, 골연화증, 구토, 호흡곤란, 폐기종, 근육통 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(Dudley 등, 1982, Sendelbach 등, 1988, Goyer 등, 1986, Murakami 등, 1981). 그 외에도 약물대사 효소의 억제, 고혈압유도 및 면역계에 이상 현상을 일으킨다는 보고도 있다(Henry 등 1964, Malave 등. 1984).

일반적으로 생체내에 유해성 중금속이 흡수되었을 경우, 자체 해독기전으로 배설이 용이한 metallothionein (MT)을 형성하는 것으로 알려져 있다(Oh 등, 1981). MT의 생리학적 기전에 관해서는 아직도 확실이 정립되어 있지 않으며, 그 의견이 분분하다. MT가 유해중금속을 수용성으로 전환시켜 배설함으로써 해독작용에 관여한다는 견해도 있다(Oh 등, 1979).

근래에 중금속 해독물질로 사용하고 있는 BAL이나 EDTA 등은 신장에 손상을 주는 등 2차적인 독성유발로 문제가 되고 있어(WHO 등, 1977), 자연산물을 이용한 중금속 해독물질을 개발하려 하고 있으나, 아직 그 연구는 미진한 상태이다(Han 등, 1994, Lee 등, 1994).

이에 연구자들은 생약 중에서 해독작용이 있는 것으

로 알려진 금은화를(Han 등, 1994) 대상으로 물을 사용하여 금은화 추출물을 만들어, 카드뮴에 중독된 흰쥐에 추출액을 투여한 후, 카드뮴 축적량이 많은 것으로 알려진 간장에서 카드뮴 잔유량과 MT량을 측정하여 해독경감 효과로 이용가능함을 인지하였으므로 보고한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험에 사용한 동물은 Sprague-Dawely 계통의 웅성 흰쥐로 원광대학교 실험동물 사육장에서 사육한 생후 8-12주령의 것을 사용하였다. 실험에 사용된 흰쥐는 실험군당 10마리씩 30마리 3개 실험군과 대조군 10마리로 총 40마리였다. 사육은 온도 22±2°C, 습도 50±10%의 동물실내에서 흰쥐용 케이지에 깔집을 깔고, 5-6마리씩 넣어 사료(고령 pellet사료; 삼양유지)와 물을 충분히 공급하면서 사육하였다.

2) 검액의 조제

시료로 사용한 금은화 추출액의 조제는 충남 금산군 금산시장 경희 한약방에서 금은화를 구입하여, 금은화 50 g씩을 둥근 플라스크(500 m*l*)에 넣고, 물(300 m*l*)을 부은 다음 냉각기를 부착하여, 수조에서 3시간씩 3회 추출하여 추출액을 여과, 농축하였다. 이 추출액을 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

흰쥐 간장내 카드뮴함량 분석에 사용된 시약은 GR급을 사용하였으며, 카드뮴의 표준용액은 Sigma제를 사용하였다. 전처리시에 사용된 초자기구는 질산으로 세척하여 중금속을 제거한 후 사용하였으며, 분석용 기기는 원자흡광광도계(Varian, AA-30)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 카드뮴 및 금은화 추출액 투여

카드뮴($CdCL_2$)을 3차 증류수로 용해시켜 카드뮴의 투여량이 흰쥐 체중 kg당 매일 8.0 mg이 되게하여, 흰쥐에 주사기를 이용하여 복부피하에 주사하는 방법을 이용하였으며, 투여기간은 4일 이었다.

금은화 추출액의 투여량은 흰쥐 체중 kg당 매일 30 mg이 되도록하여, 흰쥐 사육용 음용수병에 용해시킨 후 자유롭게 음용하도록 하였다(Han 등, 1994, Lee 등, 1994, Lee 등, 1993). 마우스의 하루 평균 물의 음용량은 2.52±2.2 m*l*/일로 개체간의 큰 차이를 보였으나 하루의 평균 음용량을 측정하여 하루 평균 30 mg/kg되도록 음용수액을 조절하였다. 금은화 추출액은 카드뮴 투여 후 15일 동안 투여하였다.

2) 간장 중의 카드뮴의 농도 측정(Lee 등, 1988, You 등, 1991)

실험 24시간 전부터 절식한 흰쥐를 에테르로 마취시키고, 간장을 적출한 후, 3차 증류수로 3회 세척하여 진공건조기(110°C)내에서 24시간 건조시킨 다음, 200°C hot plate상에서 각각 질산, 황산 및 과염소산을 이용한 습식탄화 방법에 의하여 유기물을 분해시킨 후, 25%의 ammonium citrate용액 10 m*l*와 0.1% bromothymol blue indicator 용액을 2-3방울 넣고, 용액의 색이 황색에서 녹색으로 변할때까지 ammonium hydroxide용액을 가하여 중화시켰다. 여기에 10 m*l*의 40% ammonium sulfate용액과 10 m*l*의 sodium diethyl dithiocarbamate용액을 넣고, 세차게 흔든 다음 수분간 방치한 후, 20 m*l*의 methyl isobutyl ketone을 가하여 격렬하게 흔들어 방치한 다음, methyl isobutyl ketone 층을 취하여 120°C hot plate 상에서 휘산시켜 0.1 N HCl로 용해한 후, wave length 228.8 nm, slit path 0.5 nm의 분석조건에서 원자흡광광도계(Varian, AA-30)로 간장내의 카드뮴 함량을 측정하였다.

3) 간장 중의 metallothionein의 농도 측정

Onosaka 등(1978)의 방법에 따라 간장중의 metallothionein(MT) 농도 측정을 실시하였다. 즉 장기채취 직후 간조직을 1 g 취하여, 생리식염수로 세척한 후, 서당용액(sucrose solution; 0.25 mol/L) 4 mL를 가하면서 Teflon-glass Potter-Elvejehem homogenizer를 이용하여 균질화시키고. 18,000×g(4°C)에서 20분간 냉동원심분리(Beckman, J2-21)하여 세포액(Cytosol)층을 얻었다. 상층에 떠오른 세포액(0.2 mL)층을 0.03 M Tri-HCl(pH=8.0) 완충용액에 첨가한 후, 10 ppm의 $CdCL_2$(Standard solution) 1 mL를 포화시키고. 실온에서 5분간 배양하였다. 여기에 rat RBC hemolysate 0.2 mL를 가하여, 과량의 Cd과 MT 이외의 모든 bioligand를 제거하고. 100°C 수욕탕에 1분간 정치시켜 Cd-bound hemoglobin을 변성시킨 후, 원심분리하여 상등액을 취하였다.

이상의 rat RBC hemolysate 첨가와 열처리 및 원심분리 과정을 3회 반복하여 MT 분획층(fraction)을 분리 측

정하였다. 최종적인 MT 농도 계산은 원자흡광강도계(Varian, AA-30)에 의해 검출된 카드뮴의 양을 기초로 MT 분자량 6,050 g 당 카드뮴 6 g 원자가 포합되는 것으로 환산하여 조직 μg 당 mgMT 농도로 표시하였다.

4) 실험결과의 통계학적 검정

실험결과의 통계처리는 T-test에 준하였고, P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

카드뮴은 니켈, 바나디움, 크롬 등과 함께 공업지역의 중요한 대기오염원의 하나로써 호흡기계에 위험한 금속 오염물질로 알려져 있다(Ferm 등, 1977, Hwang 등, 1992).

이에 실제 생체시료중에 들어있는 카드뮴 분석에 응용하기 위하여 생체 시료중의 카드뮴의 함량을 분석하면, 카드뮴의 경감율 또는 회복율이 된다. 실험에 사용된 음용수에서는 카드뮴이 검출되지 않았으며, 금은화 추출액중에서 극미량의 카드뮴(2.16 ppb)이 검출되었으나, 이와 같은 함량은 실험결과에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다. 한 등(1993)은 금은화 추출액중에 극성용매를 사용한 추출액의 투여가 카드뮴과 결합력이 강한 것으로 나타났으며, 그 중에 methanol을 용매로 사용한 추출액의 투여가 카드뮴의 배출을 촉진시켜서, 간장에서 카드뮴 축적량을 약 20% 정도 감소시켰다. 그러나 헥산을 용매로 하여 추출한 추출액은 카드뮴 투여군에서 카드뮴 축적에 대한 추출액의 효과는 아주 적은 것으로 보고한 바 있다.

1. 간장 중의 카드뮴의 농도변화

카드뮴과 금은화 추출물을 단독 혹은 병용투여한후, 각 실험군의 간장중의 카드뮴의 농도변화는 Table 1과 같다. 간장에서 금은화 추출물의 투여량이 증가함에 따라, 금은화 추출물에 의한 카드뮴의 해독경감율은 증가하였다.

금은화 추출물에 의한 흰쥐 간장내 카드뮴 해독경감 정도는 실험군에서 관찰한 카드뮴 제거율은 6.73-17.58%로 큰 차이를 볼 수 있었다. 이와 같은 현상은 금은화의 구성성분으로 알려진 페놀산(caffeic acid, chlorogenic acid와 tannic acid)이 카드뮴과 착물을 형성할 수 있는 리간드로써 작용하리라 사료된다(Oh 등, 1981). 이는 카드뮴착물이 수용성으로 전환되어 배설함으로써 카드뮴 해독작용에 관여하리라 생각된다.

2. 간장 중의 metallothionein의 농도변화

카드뮴과 금은화 추출물을 단독 혹은 병용투여한 후, 간장내의 metallothionein 농도를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 간장에서 금은화 추출물의 투여량이 증가함에 따라, 금은화 추출물에 의한 MT량이 증가하

Table 1. Concentration of cadmium in liver of rats by Lonicerae japonica Thunb extract Unit: mg/kg

Dose	Control	Experimental		
		10	30	90
Cd	129.72±7.39	130.25±10.26	128.86±9.95*	129.57±10.21
Cd+Lon.	----	121.48± 7.86	108.62±6.97	106.79±12.39
Antitoxic of Cd (% decrease)	----	6.73	15.71	17.58

Each value represents the mean±S.D. Experimental animal were treated with cadmium by single intraperitoneal injection. Significantly different from control group (*$p < 0.05$).

Table 2. Metallothionein concentration of in liver of rats by Lonicerae japonica Thunb extract Unit: mg/kg

Dose	Control	Experimental		
		10	30	90
Cd	0.12±0.02	0.12±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02
Cd+Lon.	0.13±0.01	0.15±0.03	0.15±0.02	106.79±12.39
MT (%) (% increase)	----	8.33	25.00	36.36

Each value represents the mean±S.D. Experimental animal were treated with cadmium by single intraperitoneal injection. Significantly different from experimental group and comparing with control group (*$p < 0.05$).

였다(Onosaka 등, 1984). 금은화 추출물의 투여량이 증가함에 따라, 간장에서 MT량이 증가함을 볼 수 있는데, 이는 카드뮴의 해독경감율이 MT량과 일치하는 것을 알 수 있었다.

본 연구결과에서는 전 실험군에 대체로 간장에서 카드뮴 경감농도가 금은화 추출물 투여량에 따라 높아짐을 관찰할 수 있었으며. 일반적으로 금은화 추출물 투여군은 카드뮴 경감농도(6.73-17.58%)보다 MT 농도(8.33-36.36%)가 더 높았던 것으로 보아, 카드뮴 중독에 대한 금은화 추출물의 해독경감 작용에 관여하는 점을 고려하여 볼 때, 조직내의 카드뮴 농도변화와 그 밖의 여러가지 요인들을 고려하지는 않으나, 높게 형성된 MT는 금은화 추출액에 의한 간접유도라고 추측된다(Waalkes 등, 1984).

IV. 결 론

흰쥐의 카드뮴 투여시 금은화 추출액의 해독경감효과를 metallothionein 형성을 중심으로 관찰한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었다.

일반적으로 카드뮴의 투여량이 증가함에 따라, 금은화 추출액에 의한 카드뮴 해독경감율이 증가하였으며, 실험군에서 간장의 metallothionein 형성정도는 금은화 추출액의 투여량이 증가함에 따라 metallothionein 증가를 보였다.

이상의 실험결과를 종합해보면, 금은화 추출물을 투여하였을 때, 간장에서 카드뮴 축적을 감소시키고, 간장에서의 metallothionein 형성을 촉진하며, 카드뮴의 유해작용을 감소시켰다.

참고문헌

Dudley, R.E., Svovoda, D.J. and Klassen, C.D. (1982): Acute exposure to cadmium causes serve liver injury in rats, *Toxicol, Appl. Pharmacol.* **65**, 302-313.

Ferm, V.H. and Carpenter, S.J. (1977): Developmental malformations resulting from the administration of lead salts, *Exp. Mol. Pathol*, **7**, 208-213.

Goyer, R.A. (1986): Toxic effect of metals, In Klassen, C.D., Amdur, M.D. and Doull, J. eds., *Casarett and Doull's Toxicology, 4th ed.*, Macmillian Publishing Co., New York, p.623-680.

Henry, S.A. (1964): Cadmium hypertention in rats, *Am. J. Physiol.* **207**, 62-66.

Han, D.S., You, I.S., Lee, J.S. and Baek, S.H. (1994): Effect of medicinal plant s on the accumulation of cadmium in mice, *Kor. J. Toxicol.* **10**, 169-179.

Hwang, I.D. and You I.S. (1992): The contents of heavy metal in air factories and blood, urine and hair at employees of Iri industrial park area, *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **18**(1), 22-33.

Han, D.S., Baek, S.H. and Kim, Y.O. (1994): Repared effects of caffeic acid in cultured rat fibroblast and neuroglial cells treated with cadmium, *Kor. J. Oral. Anat.* **18**(1), 29-38.

Lee, J.H., You, I.S. and Lee, K.N. (1988): The study on th e concentrations of lead and cadmium in hair of the inhabitants of Jeonju industrial area, *Kor. J. Env. Soc.* **14**, 89-96.

Lee, K.N., I.S. You, and Lee, J.S. (1994).: A study on antitoxic effects of natural products against nickel toxicity, *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **20**, 85-95.

Lee, J.H. and Kim, J.H. (1993): A study on the enzyme activity in liver and kidney of mouse administered mercury chloride in the drinking water, *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **19**, 78-87.

Murakami, M. and Webb, M. (1981): A morphological and biochemical study of the effects of L-cystein on the renal uptake and nephrotoxicity of cadmium. *Br. J. Exp. Pathol.* **62**, 115-130.

Malave, I. and Ruffino, D.H. (1984): Altered immune response during cadmium administration on mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **74**, 46-56.

Onosaka, S., Tanaka, K. and Cherian, M.E. (1984): Effects of cadmium and zinc on tissue levels of metallothionein, *Environ. Health Perspect.* **54**, 67-72.

Oh, S.H., Whanger, P.D. and Deagen, J.T. (1981): Tissue metallothionein: Dietary interaction of cadmium and zinc with copper, mercury and silver. *J. Toxicol. Environ. Health*, **7**, 547-560.

Oh, S.H. and Whanger, P.D. (1979): Biological function of metallothionein VII. Effect of age on its metabolism in rats, *Am. J. Physiol.* **237**(1), E18-E 22.

Onosaka, S., Tanak, K., Doi, M. and Okahara, K. (1978): A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues, *Eisei Kagaku*, **24**, 128-133.

Suzuki, S. Taguchl, T.and Yokohashi, G. (1969): Dietary factors influence upon the retention rate of orally administered $^{115}CdCl_2$ in mice with special refer ence to calcium and protein concentration in diet, *Ind. Health*, **7**, 155-162.

Sendelbach, L.E. and Klassen, C.D. (1988): Kidney synthesizes less metallothionein than liver in response to cadmium chloride and cadmium-metallothionein, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **92**, 95-102.

Williams, P.L. and Burson, J.L. (1985): *Industrial Tox-*

icology, eds., Van Nostrand Reinhold, p.197-210.

World Health Organization (1977): Lead environmental health criteria 3, Geneva, WHO, 160.

Waalkes, M.P., Hjelle, J.J. and Klaasen, C.D. (1984): Transient induction of hep atic metallothionein following oral ethanol administration, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **74**, 314-320.

You, I.S., Lee, J.S. and Soh, C.T. (1991): Heavy metals in water,sediments and molluscs along coast line close to the esturies of Gumgang River and Mangyeo ng Gang, *Kor. J. Malacol.* **7**, 1-9.

한종현, 백승화, 김일광, 한두석 (1993): Study on the cytotoxicity of Lonicerae flos extracts, 원광한의학, **3**(1), 23-32.