

한국산 생약으로 부터 해독물질의 개발(제4보) 흰쥐 간장내의 카드뮴 축적에 미치는 인삼 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 4.

Effects of Panax ginseng C. A. Meyer 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 Panax ginseng C. A. Meyer in cadmium chloride intoxication. The results were as follows: Generally, detoxication effects by Panax ginseng C. A. Meyer extract increased proportionally to the increase of cadmium concentrations. When a 8 mg/g dosage of cadmium was administered, formation of the cadmium and EDTA complex showed the highest antitoxic effect. Also, when a 4 mg/g dosage of cadmium was administered, Panax ginseng C. A. Meyer extract showed the highest antitoxic effect in metallothionein induction. According to the above results, Panax ginseng C. A. Meyer extract administered with cadmium increased metallothionein concentration and decreased the toxicity of cadmium in liver.

Key Words : Panax ginseng C.A. Meyer, Cadmium chloride, Metallothionein, Detoxication effect

I. 서 론

우리나라의 경우 급속한 산업화 과정에서 부수되는 수 많은 환경오염 문제들이 크게 대두되고 있는데, 그 중에서도 실질적으로 가장 심각한 문제가 바로 중금속 오염인 것은 재론의 여지가 없으며, 그로 인한 심각한 중독현상이 선진국에서도 계속되고 있는 실정이다 (Clark 등, 1982). 분자량 7000정도의 cytoplasmic metalloprotein인 MT는 간장, 신장, 비장 등에 주로 존재하며, cysteine을 다량 함유하고 있는 저분자량의 수용성 단백질로서 그 조성이 금속과 유황으로 구성되어 있어 MT로 불리게 되었으며, 이중 sulfhydryl group이 수은, 카드뮴, 아연, 구리 등과 같은 중금속들을 포함하여 간장과 신장등의 기능을 보호하는 것으로 보고되었다

(Evans 등, 1970, Jaborouski 등, 1970). 그리고 다른 견해로 MT의 유해중금속에 대한 조직보호 혹은 해독작용은 표적장기에서 조직 손상효과를 나타내는 free metal ion을 MT가 포함하므로써 유독성을 감소시키기 때문이라는 보고가 있다(Suzuki 등, 1982).

인삼 구성성분으로 알려진 글리코사이드, 지방산, 펩타이드, 스테로이드, 폴리에틸렌계 화합물, 사포닌 등이 포함되어 있지만, 대표적 유효성분은 사포닌이라고 인정되고 있다(권 등, 1969). 사포닌의 약리작용은 단백질 합성촉진, 중추신경흥분 및 억제, 부교감신경 억제, 혈압상승 및 강하, 진통해열, 항염증, 조혈 및 중금속 배출촉진과 해독, 항암작용 등이 있다(Brekham 등, 1969, 이 등, 1974, 송 등, 1964, Ralph 등, 1987, Lee 등, 1971).

이에 본 연구는 카드뮴을 투여받은 실험동물의 간장에 대한 카드뮴 축적양상과 MT 농도를 측정하고 이들 상호간의 관계를 밝히고, 나아가 카드뮴의 생체내 흡수 및 축적을 방지할 수 있는 한국산 생약을 개발하는데 연구의 목적이 있다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험에 사용한 동물은 Sprague-Dawley 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 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 의 동물실내에서 흰쥐용 케이지에 깔집을 깔고, 5-6마리씩 넣어 사료(고령 pellet사료; 삼양유지)와 물을 충분히 공급하면서 사육하였다.

2) 검액의 조제

시료로 사용한 인삼 추출액의 조제는 충남 금산군 금산시장 경희 한약방에서 인삼을 구입하여, 인삼 50g씩을 둥근 플라스크(500 ml)에 넣고, 물(300 ml)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, 분석용기구는 원자흡광광도계(Varian, AA-30)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 카드뮴 및 인삼 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 4일이었다.

인삼 추출액의 투여량은 흰쥐 체중 kg당 매일 30 mg이 되도록하여, 흰쥐 사육용 음용수병에 용해시킨

후 자유롭게 음용하도록 하였다(Lee 등, 1993). 마우스의 하루 평균 물의 음용량은 2.52 ± 2.2 ml/일로 개체간의 큰 차이를 보였으나 하루의 평균 음용량을 측정하여 하루 평균 30 mg/kg되도록 음용수액을 조절하였다. 인삼 추출액은 카드뮴 투여 후 15일동안 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 습식산화 방법에 의하여 유기물을 분해시킨 후, 25%의 ammonium citrate용액 10 ml와 0.1% bromothymol blue indicator 용액을 2-3방울 넣고, 용액의 색이 황색에서 녹색으로 변할때까지 ammonium hydroxide용액을 가하여 중화시켰다. 여기에 10 ml의 40% ammonium sulfate용액과 10 ml의 sodium diethyl dithiocarbamate용액을 넣고, 세차게 혼든다음 수분간 방치한 후, 20 ml의 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 장기내의 카드뮴 함량을 측정하였다.

3) 간장 중의 metallothionein의 농도 측정

Onosaka 등의 방법에 따라 간장중의 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-Elvehjem homogenizer를 이용하여 균질화시키고, $18,000 \times g(4^\circ\text{C})$ 에서 20분간 냉동원심분리(Beckman, J 2-21)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 측정하였다. 최종적인 MT 농도 계산은 원자흡광광도계

Table 1. Concentration of cadmium in liver of rats by Panax ginseng C. A. Meyer extract

Unit: mg/kg

Dose	Control	Experimental		
		2	4	8
Cd	0.156±0.091	46.97*±6.72	73.5 ±11.19	132.11*±10.79
Cd+Pan.	0.154±0.072	44.51 ±7.51	72.11± 7.15	123.61*±15.31
Antitoxic of Cd (% decrease)	1.28	5.24	1.90	6.43

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 panax ginseng C. A. Meyer extract

Unit: mg/kg

Dose	Control	Experimental		
		2	4	8
Cd	0.06±0.02	0.06 ±0.01	0.10±0.03	0.12*±0.03
Cd+Pan.	0.06±0.01	0.08*±0.02	0.11±0.02	0.15*±0.02
MT (%) (% increase)	0.00	33.33	10.00	25.00

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).

Table 3. Concentration of cadmium in liver of rats by EDTA

Unit: mg/kg

Dose	Control	Experimental		
		2	4	8
Cd	0.151±0.091	46.72*±4.86	75.19±7.11	131.57*±7.58
Cd+EDTA	0.143±0.072	34.99 ±6.24	55.41±4.15	89.51*±3.91
Antitoxic of Cd (% decrease)	5.30	25.10	26.31	31.97

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).

(Varian, AA-30)에 의해 검출된 카드뮴의 양을 기초로 MT 분자량 6,050 g당 카드뮴 6 g 원자가 포함되는 것으로 환산하여 조직 μg 당 mgMT 농도로 표시하였다.

5) 실험결과의 통계학적 검정

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

III. 결과 및 고찰

1. 간장 중의 카드뮴의 농도변화(Lee 등, 1994, Park 등, 1992)

카드뮴과 인삼 추출물을 단독 혹은 병용투여한 후, 각 실험군의 간장 중의 카드뮴의 농도변화는 Table 1과 같다. 간장에서 카드뮴 투여량이 증가함에 따라, 인삼 추출물에 의한 카드뮴의 해독경감율은 증가하였다.

일반적으로 인삼 추출물에 의한 흰쥐 간장내 카드뮴

해독경감 정도는 대조군은 간장에서는 1.28%로 나타났고, 실험군에서 관찰한 카드뮴 제거율은 1.28-6.43%로 차이를 볼 수 있었다. 이와 같은 현상은 인삼의 구성성분으로 알려진 글리코사이드, 지방산, 펩타이드, 스테로이드, 사포닌 등이 카드뮴과 착물을 형성할 수 있는 리간드로써 작용하리라 사료되나(권 등, 1969), 이는 카드뮴과 결합할 수 있는 리간드의 결합자리가 약해 카드뮴 해독경감작용이 금은화 추출물보다 적은 것으로 추정된다(Baek 등, 1995).

EDTA와 BAL의 대조군에 대한 카드뮴 투여군에서는 인삼 추출물과 달리 간장내의 카드뮴 축적농도가 높게 나타났다. EDTA와 BAL에 의한 흰쥐의 카드뮴 해독경감효과는 간장에서 EDTA에 의하여 89.51 ± 3.91 mg/kg(약 32%)으로 가장 높게 나타났다(Table 3과 4).

일반적으로 흰쥐의 간장내 카드뮴 해독경감효과는 EDTA와 BAL이 인삼 추출물보다 상당히 높게 나타났다, 이와 같은 카드뮴 해독경감효과는 카드뮴과 착물을 형성할 수 있는 인삼 추출물의 구성성분보다

Table 4. Concentration of cadmium in liver of rats by BAL

Unit: mg/kg

Dose	Control	Experimental		
		2	4	8
Cd	0.151±0.091	46.72*±4.86	75.19± 7.11	131.57*±7.58
Cd+BAL.	0.149±0.093	35.41 ±7.16	59.42±10.27	94.36*±8.86
Antitoxic of Cd (% decrease)	1.33	24.21	20.97	28.28

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 5. Metallothionein concentration of in liver of rats by EDTA

Unit: mg/kg

Dose	Control	Experimental		
		2	4	8
Cd	0.04±0.01	0.07 ±0.03	0.09±0.03	0.11±0.03
Cd+EDTA	0.06±0.01	0.09*±0.02	0.11±0.01	0.13±0.03
MT (% increase)	50.00	28.57	22.22	18.18

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).

Table 6. Metallothionein concentration of in liver of rats by BAL

Unit: mg/kg

Dose	Control	Experimental		
		2	4	8
Cd	0.04±0.01	0.07±0.03	0.09±0.03	0.11±0.03
Cd+EDTA	0.05*±0.02	0.08*±0.01	0.10±0.03	0.13±0.04
MT (% increase)	25.00	14.29	11.11	18.18

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).

EDTA와 BAL이 리간드로서 결합력이 강함을 나타내며, 이 중에 EDTA에 있어 가장 높은 해독경감효과는 카드뮴과 안정한 정팔면체의 입체구조로 착물(Skoog 등, 1992)이 형성되었으리라 생각된다.

2. 간장 중의 metallothionein의 농도변화

카드뮴과 인삼 추출물을 단독 혹은 병용투여한 후, 간장내의 MT농도를 측정된 결과는 Table 2와 같다. 대조군에서는 MT농도가 간장에서 카드뮴 단독투여군의 경우 간장에서의 0.06 mg/g 농도로 나타났으며, 인삼 추출물을 투여한 경우도, MT량은 실험군과 대조군에서 농도의 변화가 없으나, 카드뮴 2 mg/g 투여군에서 8 mg/g 투여군으로 증가했을 때, 전 실험군에서는 MT량이 증가하였으나, 카드뮴의 투여량이 2 mg/g일때, 간장에서 가장 높은 33.33%의 MT량이 증가하는 것을 알 수 있었다. 카드뮴과 EDTA, BAL을 단독 혹은 병용투여한 후 간장내의 MT농도를 측정된 결과는 Table

5와 6과 같다. 대조군의 간장에서 MT농도가 나타났으나, 실험군에 비하여 많은 양의 MT가 생성됨을 알 수 있었다. 전 실험군에서 카드뮴의 농도가 증가함에 따라 MT량이 감소하였으나, 오히려 카드뮴 투여량 8 mg/g군에서 BAL에 의한 MT량은 18.18%로 증가하였다. 대체로 EDTA에 의한 MT량은 카드뮴 투여량 8 mg/g군의 MT량이 같은 것을 제외하고는 BAL에 의한 변화량보다 약 2배 정도로 높게 나타났다.

본 연구결과에서는 전 실험군에 대체로 간장에서 카드뮴 경감농도가 카드뮴 투여군보다 인삼 추출물 투여군이 높아짐을 관찰할 수 있었으며, 일반적으로 인삼 추출물 투여군은 카드뮴 경감농도(1.28-6.43%)보다 MT농도(10.00-33.33%)가 더 높았던 것으로 보아, 카드뮴 중독에 대한 인삼 추출물의 해독경감 작용에 관여하는 점을 고려하여 볼 때, 조직내의 카드뮴 농도변화와 그 밖의 여러가지 요인들을 고려하지는 않으나, 높게 형성된 MT는 인삼 추출물에 의한 간접유도라고 생각된다(Waalkes 등, 1984).

IV. 결 론

흰쥐에 카드뮴 투여시 인삼 추출액의 해독경감효과를 metallothionein 형성을 중심으로 관찰한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었다.

실험군에서 카드뮴 해독경감율은 4 mg/kg 투여시를 제외하고는, 전체적으로 카드뮴의 투여량이 증가함에 따라, 인삼 추출액에 의한 카드뮴 해독경감율이 증가하였다. 그러나 EDTA에 의한 착물형성 정도는 카드뮴 8 mg/g 투여군에서 가장 높은 카드뮴 해독경감율(32%)이 증가하였다. 실험군에서 간장의 metallothionein 형성 정도는 카드뮴 2 mg/g 투여군에서는 가장 높은 metallothionein(33.33%) 증가를 보였다.

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

참고문헌

- Baek, S.H., You, I.S., Lee, J.S. and Han, D.S.: Development of antitoxic agents from Korean medicinal plants. Part 2. Effects of Lonicerae flos extract on the accumulation of cadmium in rats. *Kor. J. Toxicol. in printed*
- Brekham, I. and Dardymov, I. (1969): New substance of plant origin which increase nonspecific resistances. *Ann. Res. Pharmacol.* **9**, 419-426.
- Clark, J.A., Kasselberg, A.G., Glick, A. D. and Onell, J. A. (1982): Mercury poisoning from mebromin therapy of omphalocele. *Clin. Ped.*, **21**, 445-447.
- Evans, D.L., Stacey, N.H., Wong, K. and Klaassen, C.D. (1970): Mechanism for cadmium and zinc antagonism of copper metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1142.
- Jaborouski, M., Pitrowski, J. and TroJanowska, B. (1970): Binding of mercury in the rat; Studies using $^{203}\text{HgCl}_2$ and gel filtration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **16**, 743-753.
- Lee, J.H. and Kim, J.H. (1993): A study on the enzyme in liver and kidney of mouse administered mercury chloride in the drinking water. *Kor. J. Env. Soc.*, **19**, 78-87
- Lee, J.H., You, I.S. and Lee, K.N. (1988): The study on the concentrations of lead and cadmium in hair of the inhabitant of Jeonju industrial area. *Kor. J. Env. Soc.*, **14**, 89-96
- Lee, K.D. and Hueme, R.P. (1971): Antitumor activity of panax ginseng extracts. *Jap. J. Pharmacol.*, **21**, 299-301.
- Lee, J.H., Kim, J.H., Kim, N.S., Kim, J.H. and Ki, N.S. (1994): A study on accumulation of cadmium and induction of metallothionein in organs of rats by cadmium and zinc. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.*, **20**(2), 64-72.
- 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.
- Pitrowski, J.K. Trojanowska, B., Wisniewska-Knypl, J.M. and Biolnowska, W. (1974): Mercury bind in the kidney and liver of rat repeatedly exposed to mercuric chloride; Induction of metallothionein by mercury and cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 11-19.
- Park, J.S., Lee, H.M., Chung, Y., Shin, D.C., Roh, J.H. and Moon, Y.H. (1992): Interaction of sodium selenite on neurotoxicity induced by methylmercuric chloride. *Kor J. Prev. Med.*, **25**(1), 13-25.
- Ralph, J.S., Ronald, R.R., Marie, M.M., Robert, W.L. and Lela, D. (1987): Effects of manganese, calcium, magnesium and zinc on nickel-induced suppression of murine natural killer activity. *J. Toxicol. Environ. Hel.*, **20**, 67-80.
- Skoog, D.A., West, D.M., and Holler, F.J. (1992): Fundamental of analytical chemistry 6th ed., Saunders College Publishing, Vol.13.
- Suzuki, K.T. (1982): Induction and degradation of metallothionein and their relation to the toxicity of cadmium. In Foulkes EC. (ed); Biological roles of metallothioneins. *Eisevier, New York*, p.215-235.
- Waalkes, M.P., Hjelle, J.J. and Klaassen, C.D. (1984): Transient induction of hepatic metallothionein following oral ethanol administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **74**, 314-320.
- You, I.S., Lee, J.S. and Soh, C.T. (1991): Heavy methals in water, sediments and molluscs along coast line close to the esturies of Gungang River and Mangyeong Gang. *Kor. J. Malacol.*, **7**, 1-9.
- Yang, Y.H., Lee, H.M., Shin, O.C. and Chung, Y. (1989): Effect of sodium selenite on metallothionein induction by the treatment of mercuric chloride to rats. *Kor. J. Occup. Med.*, **1**, 236-259.
- 권소영, 오진섭 (1969): 인삼 Alkaloidal fraction이 지질대사에 미치는 영향 대한 약리학 잡지, **5**, 55-56.
- 이기영, 박상철 (1974): 각 동물조직 및 암조직의 LDH isoenzyme 및 R-Nase inhibitor 활성에 관한 연구. 서울의대 잡지, **15**, 224-234.
- 송응규 (1964): 인삼정유 및 지방유의 serotonin 유리작용. 대한생화학회지, **1**, 93-101.