

키토산올리고당이 카드뮴을 투여한 생쥐의 간독성에 미치는 효과

윤 중 식, 노 영 복*
조선대학교 자연과학대학 생물과학부

Effects of Chitosan oligosaccharide on the Hepatotoxicity in Cadmium-treated Mice

Jung-Sik Yoon and Young-Bok Roh*

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chosun University
(Received February 13, 2003; Accepted March 28, 2003)

ABSTRACT

This research was conducted to determine the effects of chitosan oligosaccharide on liver poisoning induced by cadmium (Cd). Three groups of mice were used in this research. The first group was only injected with cadmium (5.0 mg/kg; i.p.) (group Cd) and the second one with cadmium and chitosan oligosaccharide (0.5% solution) at the same time (group Cd+Chi). The third one which had already been injected with chitosan oligosaccharide (0.5% Solution) a week before (group Chi7+Cd) was used. In order to investigate the inhibitory action of chitosan oligosaccharide on liver damage, enzyme activity in serum, glutathione peroxidase (GSH Px) activity and glutathione reductase (GR) activity were relatively measured. In addition, histological observations were made to determine the morphologic injury of liver tissues.

As the result of enzyme activity in serum, the activity of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) in chitosan oligosaccharide injected groups Cd+Chi and Chi7+Cd was lower than in group Cd. GSH Px activity was sharply increased in groups Cd+Chi and Chi7+Cd compared to group Cd. GR activity was conspicuously decreased in groups Cd+Chi and Chi7+Cd compared to group Cd.

As the result of light microscopic observation, liver cell necrosis caused by cadmium poisoning was observed in liver cells. The finding of group Cd+Chi and Chi7+Cd was similar total on of normal groups.

As the result of electron microscopic observation, mitochondria in group Cd showed a severe swelling phenomenon, RER fragment and ribosome dropout. However, in groups Cd+Chi and Chi7+Cd, mitochondria with high electron density were distributed and RER forming a typical lamellae with ribosome was observed.

From these results, cadmium toxicity on rat liver tissues could be lessened by chitosan oligosaccharide.

Key words : Cadmium chloride, Chitosan oligosaccharide, Liver, Serum

* Correspondence should be addressed to Dr. Young-Bok Roh, Department of Biological Science, College of Natural Science, Chosun University, #375 Seosuk-dong, Kwangju, 501-759, Korea. Ph.: (062)230-6654, FAX: (062) 230-7984
Copyright © 2003 Korean Society of Electron Microscopy

서 론

Itai Itai 질환의 원인물질인 카드뮴(Cadmium, 이하 Cd라 함)은 산업화로 인해 발생하는 공기, 토양, 물 오염의 주요 원인중 하나로(Ryan et al., 1982), 1946년 일본에서 쌀농사를 짓는 농민들로부터 심한 관절 및 근육통의 호소를 명명함으로써 널리 알려진 중금속이다(Lee & White, 1980). 최근에는 산성비가 오염된 Cd의 유흥성을 증가시킴으로써 Cd 오염문제는 점점 더 심각해지고 있다(Piscator, 1985). 카드뮴 독성을 나타내는 생화학적 기전은 아직까지 확실하게 밝혀지지 않았지만, 카드뮴이 체내 대사과정의 효소활성을 억제하는 기전과 세포막 단백질 중 sulfhydryl(-SH)기와 결합함으로써 나타나는 세포막투과 및 물질이동 방해기전으로 설명되어지고 있다(Jin & Nordberg, 1986; Waalkes et al., 1988).

카드뮴은 일단 체내에 유입되면 쉽게 배설되지 않으며, 반감기도 16년 이상으로 나이가 들어갈수록 Cd의 체내 축적은 증가하게 된다(Webb, 1972). 또한 생체내 Cd는 적혈구와 결합하여 혈중내로 이행되어지는 데 혈장내에선 고분자 단백질 특히 알부민과 결합하여 주로 간으로 이행되어지고(Nordberg, 1978; Kowal et al., 1979), 일부는 thionein과 결합하여 cadmium-metallothionein(Cd-MT)의 complex를 형성하여 Cd를 간과 신장조직으로부터 격리시킴으로써(Cherian & Nordberg, 1983) Cd 독성을 완화시키는 것으로 알려져있다(Leber & Miya, 1976; Squibb et al., 1976). Cd에 의한 조직 손상은 metallothionein과 결합하지 않은 유리 카드뮴에 의해 일어나며 감수성 있는 단백질 및 세포막의 sulfhydryl기에 작용하여 생체내의 주요 효소의 활성도를 변화시키고 세포막의 구조적 변화를 초래하는 것으로 보고되어 있다(Chan & Cherian, 1992). 체내에 흡수된 Cd는 일차적으로 간독성(Dudley et al., 1984)을 나타내고, 시간이 경과함에 따라 신독성(Goering & Klaassen, 1984)을 나타내게 된다. 인간과 동물의 Cd중독 증세로는 효소 활성을 저해하여 나타나는 hyperglycemia(Yargicoglu et al., 1999; Lorenzon et al., 2000; Medesani et al., 2001), dyslipidemia(Ramirez & Gimenez, 2002), proteinuria

(Piscator, 1966), aminoaciduria(Goyer et al., 1972), 성장장애(Webster, 1978) 등이 있으며, 조직의 형태를 변화시킴으로써 나타나는 증상으로는 hepatopathy(Dudley & Klaassen, 1984; Anderson & Anderson, 1988), nephropathy(Sudo et al., 1999; Liu et al., 2000; Garrett et al., 2002), anemia(Horiguchi et al., 1996; Liu et al., 1999), cardiovascular disease(Tomera et al., 1995; Basavaraju & Jones, 1998), osteopathy(Brzoska et al., 2001; Oda et al., 2001), gonadal lesions(Zhou et al., 1999; Lafuente et al., 2000) 등이 보고되고 있다. 따라서 Cd은 질병의 이환률(morbidity)과 사망률(mortality)을 증가시켜 수명을 감소시키는 요인으로 작용한다(Friberg, 1950).

최근 신소재로 각광 받고있는 키틴은 *N*-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 β -1,4 결합한 다당류로서 새우, 게 등의 갑각류의 외골격과 조류나 균류와 같은 식물의 세포벽에 함유되어 자연계에 널리 분포되어 있으며, 셀룰로스와 유사한 구조를 가지고 있는 천연고분자 재료로서 생분해성, 생체적합성 및 무해·무독성 뿐 아니라 여러 약리활성 등으로 의학, 의료분야에 응용가능성이 매우 크다. 그러나 키틴은 유기용매에 대한 용해성이 좋지 않아서 셀룰로스만큼 이용되지 못하였지만, 1970년 키틴의 용매개발과 함께 키틴을 강알카리로 탈아세틸화(deacetylation)시켜 얻은 키토산은 *D*-글루코사민(GlcN)이 β -1,4 결합한 구조를 가지고 있고, 키틴과 유사한 무해·무독성, 생분해성 등의 특성을 지니고 있으며, 희석산 용매 등에 쉽게 용해되는 특징을 이용하여 키틴의 성질을 충분히 활용할 수 있는 필름, 분리막, 섬유 등으로의 제조에 많은 연구가 진행되게 되었다. 그 응용분야로는 공업용 재료로서 폐수처리제 혹은 중금속 흡착제(Bough & Landes, 1976; Landes & Bough, 1976), 생물공학적 재료로서 효소 고정화용 담체(Spagna et al., 2001; Zhang & Neau, 2001), 크로마토그래피용 수지 및 기능성막(Dureja et al., 2001; Janes et al., 2001), 의료용 재료로서 인공피부(Prudden et al., 1970; Nakajima et al., 1986) 등 대부분 고분자물질로서 이용되어 왔다. 그러나 최근 10여년 전부터 키틴, 키토산 및 그 유도체가 면역증강 및 항암작용(Nishimura et al., 1986), 항균활성(Amako et al., 1987), 체내 콜레스테롤 개선

작용(Ormrod et al., 1998; Chen & Chen, 1998) 등 여러 가지 생리활성을 가지고 있다는 사실이 밝혀짐으로써 현재 생리기능성 신소재로서 연구개발이 활발히 진행되고 있다. 그런데 키틴, 키토산은 그 자체로서 대단히 고분자 물질이고 비수용성이어서 섭취하더라도 인체내에서 거의 대부분이 흡수되지 못하기 때문에, 키토산을 올리고당으로 가수분해하여 체내 흡수율이 높아진 키토산올리고당의 생리·약리 활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구는 천연착화제로 이용되고 있는 키토산올리고당을 이용하여 카드뮴 중독에 의하여 나타나는 혈청내 효소 활성도 측정, 형태학적 변화를 관찰하기 위해 광학현미경 및 전자현미경으로 조사하여 키토산올리고당에 의한 카드뮴 독성 완화와 항산화 효과에 대한 연구를 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물들은 삼육축산(주)에서 체중이 25 ± 2 gm 내외의 외관상 건강한 ICR계 웅성 mouse를 분양받아 사용하였다. Mouse를 polycarbonate cage ($40 \times 25 \times 17$ cm)에 담아 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 의 최적 환경조건을 유지시킨 실험실의 animal chamber(HB-404AS)에서 사육하였으며, 사료와 급수는 자유롭게 공급하였다. 채광은 12시간 주기로 하였고, 깔짚은 하루에 두 번씩 갈아주었다.

2. 실험동물 구분

실험동물들 카드뮴만을 단독으로 투여한 군(Group Cd), Cd과 chitosan oligosaccharide을 동시투여한 군(Group Cd-Chi) 그리고 chitosan oligosaccharide 1주일 전 처치한 후 카드뮴을 투여한 군(Group Chi7-Cd)으로 구분하였다. 다시 모든 군은 Cd 투여 후 24, 48, 72 및 168시간 경과군으로 세분하였다. 그리고 정상군(Group Normal)에는 0.9% 생리식염수만을 복강투여하였다. 각 군당 10마리씩 배정하였다.

3. Cadmium과 chitosan oligosaccharide 처치

Cadmium은 CdCl_2 을 2차 증류수에 희석시켜 복강투여 (5.0 mg/kg) 하였다. Chitosan 처치군은 chitosan oligosaccharide (0.5% solution)을 생리식염수에 녹여서 음용수로 공급하였다.

4. 혈액 및 장기 채취

실험 24시간전부터 절식시킨 mouse를 가벼운 ether 마취 하에서 개복한 후 heart puncture 방식으로 심장에서 혈액을 채취하여 5 ml vacuum tube (Greiner, Austria)에 담아 실온에서 30분 이상 방치한 후 3000 rpm에서 각각 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다.

간(liver)의 일부는 생리식염수로 씻어내고 무게를 측정 후 액체질소로 급속 동결시켜 -80°C 에 보관하였고, 나머지 간의 일부는 조직학적실험을 위해 고정액에 보관하였다.

5. 생화학적 분석

1) 혈청 중의 효소활성치 측정

각각 실험군의 혈청내 Total Protein (이하 TP라 함), Aspartate Aminotransferase (이하 AST라 함), Alanine Aminotransferase (이하 ALT라 함), Lactic Dehydrogenase (이하 LDH라 함), Albumin (이하 Alb라 함) 등 혈액 화학적 성분은 Vitrose 950 analyzer (U.S.A.)을 이용하여 측정하였다.

2) 간조직의 Glutathione Peroxidase 활성측정

Lawrence와 Burk의 방법(1976)에 준하여 1 mM의 EDTA를 함유하는 pH 7.0의 0.1 M potassium phosphate buffer 1.72 ml에 효소용액 0.05 ml와 0.2 mM NADPH 0.3 ml, glutathione reductase 100 unit, 1 mM sodium azide 0.3 ml 및 1 mM GSH 0.3 ml를 넣고 0.25 mM H_2O_2 0.3 ml를 가한 후 25°C 에서 반응시켜 340 nm에서 1분간 흡광도를 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위를 1분간 1 μmol 의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양으로 표시하였다.

3) 간조직의 Glutathione Reductase 활성측정

Carlberg와 Mannervik의 방법(1985)에 준하여 반

용액 3.0 ml 중에 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 0.9 mM EDTA, 4.6 mM oxidized glutathione, 0.16 mM NADPH 및 효소액 (400~600 µg protein)을 가한 후 0°C에서 10분 동안 반응시켜 감소되는 NADPH의 양을 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 준하여 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 생성하는 glutathione의 양을 nmol로 표시하였다.

6. 광학현미경적 관찰

광학현미경 관찰을 위해 적출된 간조직을 10% 중성 포르말린 용액으로 24시간 동안 고정하고, 흐르는 물에 수세한 다음 에탄올계열 (70%, 80%, 90%, 95%, 100%)로 탈수하였다. 그리고 xylene을 이용하여 투명화시킨 후 파라핀 침투과정을 거쳐, 경질파라핀에 포매하였다. 포매가 완료된 조직은 microtome(AO U.S.A. Co.)을 이용하여 5 µm 두께의 절편을 제작하였다. 그리고 염색은 H-E(hematoxylin-eosin) stain을 시행하였다.

7. 전자현미경적 관찰

투과전자현미경 표본을 제작하기 위해서는 적출된 간조직을 세절한 후, 2.5% glutaraldehyde 용액 (pH 7.4, 0.1 M cacodylate buffer, 4°C)에서 2시간 전고정하였고, 동일 완충액을 사용하여 15분씩 3회 수세하였다. 1% Osmium tetroxide (OsO₄) 용액으로 2시간 후 고정된 후, 동일 완충액으로 15분씩 3회 수세하였다. 상승농도순의 ethanol 계열하에서 탈수하고 propylene oxide를 사용하여 치환하였다. Epon mixture를 만들어 Propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며 Epon mixture 원액에서 overnight 후 oven에 넣어 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 열중합하여 포매하였다. Epon block을 1 µm로 박절하여 1% Toluidine blue로 염색한 후, 광학현미경으로 관찰하여 특정부 단위를 정하고 삭정한 뒤 Diatome을 부착시킨 Ultramicrotome (MT-7000)으로 60 nm의 초박 절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경 (JEOL, JEM-100CXII)으로 가속전압 80 kV 하에서 관찰하였다.

8. 단백질 정량

각 시료의 단백질 정량은 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry법 (Lowry et al., 1951)으로 정량하였다.

9. 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석 (ANOVA검증)을 수행하였으며, 분산분석결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's HSD test에 의해 분석하였다.

결 과

1. 혈청중 효소활성치 변화

1) Total protein (TP)

Cd군의 TP 활성도는 24, 48 그리고 72시간대에서 4.22 ± 0.26 , 4.3 ± 0.08 , 4.38 ± 0.23 g/dl로 정상군 4.92 ± 0.17 g/dl에 비해 유의한 ($P < 0.01$) 감소를 보였다.

Cd-Chi군의 TP 활성도는 4.49 ± 0.19 , 4.53 ± 0.19 , 4.61 ± 0.12 , 4.83 ± 0.14 g/dl로 Cd군보다 다소 효소 활성의 증가 현상이 나타났다. 그리고 Chi7-Cd군의 TP 활성도는 4.59 ± 0.15 , 4.65 ± 0.25 , 4.73 ± 0.25 , 4.91 ± 0.34 g/dl로 Cd군보다 효소 활성 증가 현상이 현저하게 나타났다. 그러나 키토산올리고당 처치군과 정상군 사이에서는 유의한 변화를 보이지 않았다.

2) Aspartate aminotransferase (AST)

Cd군의 AST 활성도는 24, 48 그리고 72시간대에서 269.5 ± 5.09 , 188.89 ± 4.94 , 168.11 ± 2.01 U/l로 정상군 130.12 ± 6.21 U/l에 비해 유의한 ($P < 0.01$) 증가를 보였다. Cd-Chi군의 AST 활성도는 24, 48 그리고 72시간대에서 179.75 ± 4.46 , 142.11 ± 4.21 , 114.56 ± 1.71 U/l로 Cd군보다 유의한 감소 ($P < 0.05$) 현상이 나타났다. Chi7-Cd군은 162.33 ± 2.09 , 139.78 ± 6.48 , 109.0 ± 3.80 , 93.78 ± 2.51 U/l로 모든 시간대에서 Cd군보다 유의한 감소 ($P < 0.05$) 현상이 나타났다.

3) Alanine aminotransferase (ALT)

Cd군의 ALT 활성도는 24, 48 그리고 72시간대에서 59.89±8.53, 55.22±6.49, 51.55±9.92 U/l로 정상군 43.86±7.58 U/l에 비해 유의한(P<0.01) 증가를 나타냈다. Cd-Chi군의 ALT 활성도는 46.0±1.92, 39.55±9.96, 38.60±3.80, 36.5±7.41 U/l로 모든 시간대에서 Cd군보다 유의한(P<0.05) 효소 활성의 감소 현상이 나타났다.

Chi7-Cd군의 ALT 활성도는 42.44±4.41, 39.33±4.39, 37.25±6.94, 34.8±3.67 U/l로 모든 시간대에서 Cd군보다 유의한(P<0.05) 효소 활성의 감소 현상이 나타났다.

4) Lactate dehydrogenase (LDH)

Cd군의 LDH 활성도는 24, 48 그리고 72시간대에서 2004.0±1.85, 1836.11±3.29, 1628.22±2.88 U/l로 정상군 1319.86±1.53 U/l에 비해 유의한(P<0.01) 증

가를 보였다. Cd-Chi군의 LDH 활성도는 1883.43±1.33, 1696.22±1.29, 1452.21±3.09, 1203.1±1.71 U/l로 모든 시간대에서 Cd군 보다 유의한(P<0.05) 효소 활성의 감소 현상이 나타났다. Chi7-Cd군의 LDH 활성도는 1726.78±2.77, 1583.89±2.01, 1342.81±1.14, 1165.75±1.31 U/l로 Cd군에서보다 유의한(P<0.05) 감소 현상을 나타냈다.

5) Albumin (Alb)

Cd군의 Alb 활성도는 24, 48 그리고 72시간대에서 2.42±0.13, 2.53±0.12, 2.58±0.16 g/dl로 정상군 2.66 0.11 g/dl에 비해 유의한(P<0.01) 감소 현상을 나타냈다. Cd-Chi군의 Alb 활성도는 Cd군 비해 유의한 변화를 보이지 않았다. 그러나 Chi7-Cd군은 24와 48 시간대에서 2.53±0.16, 2.61±0.09 g/dl로 Cd군에 비해 유의한(P<0.05) 증가 현상을 나타냈다.

Table 1. Serum chemical values after treatment of chitosan oligosaccharide in cadmium-treated mice (mean±S.D.)

| Group | | Time | | | |
|------------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 24 hours | 48 hours | 72 hours | 168 hours |
| TP (g/dl) | Normal | 4.92±0.17 | 4.92±0.17 | 4.92±0.17 | 4.92±0.17 |
| | Cd | 4.22±0.26* | 4.30±0.08* | 4.38±0.23* | 4.56±0.26 |
| | Cd+Chi | 4.49±0.19 | 4.53±0.19 | 4.61±0.12 | 4.83±0.14 |
| | Chi7+Cd | 4.59±0.15 | 4.65±0.25 | 4.73±0.25 | 4.91±0.34 |
| AST (U/l) | Normal | 130.12±6.21 | 130.12±6.21 | 130.12±6.21 | 130.12±6.21 |
| | Cd | 269.50±5.09* | 188.89±4.94* | 168.11±2.01* | 135.50±2.32 |
| | Cd+Chi | 179.75±4.46** | 142.11±4.21# | 114.56±1.71# | 102.71±2.72* |
| | Chi7+Cd | 162.33±2.09** | 139.78±6.48# | 109.00±3.80# | 93.78±2.51** |
| ALT (U/l) | Normal | 43.86±7.58 | 43.86±7.58 | 43.86±7.58 | 43.86±7.58 |
| | Cd | 59.89±8.53* | 55.22±6.49* | 51.55±9.92* | 46.60±8.76 |
| | Cd+Chi | 46.00±1.92# | 41.55±9.96# | 38.60±3.80# | 36.50±7.41# |
| | Chi7+Cd | 42.44±4.41# | 39.33±4.39# | 37.25±6.94# | 34.80±3.67** |
| LDH (U/l) | Normal | 1319.86±1.53 | 1319.86±1.53 | 1319.86±1.53 | 1319.86±1.53 |
| | Cd | 2004.00±1.85* | 1836.11±3.29* | 1628.22±2.83* | 1357.56±2.71 |
| | Cd+Chi | 1883.43±1.33** | 1696.22±1.29** | 1452.21±3.29** | 1203.10±1.71# |
| | Chi7+Cd | 1726.78±2.77** | 1583.89±2.01** | 1342.81±1.14# | 1165.75±1.31** |
| Alb (g/dl) | Normal | 2.66±0.11 | 2.66±0.11 | 2.66±0.11 | 2.66±0.11 |
| | Cd | 2.40±0.13* | 2.53±0.12* | 2.58±0.16* | 2.63±0.11 |
| | Cd+Chi | 2.46±0.08* | 2.56±0.05* | 2.62±0.19 | 2.70±0.18 |
| | Chi7+Cd | 2.51±0.16# | 2.61±0.09# | 2.65±0.09 | 2.72±0.17 |

T/P: total protein, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, LDH: lactic dehydrogenase, Alb: albumin
 * P<0.01 as compared with Normal.
 # P<0.05 as compared with Group Cd.
 Cd: Cadmium treated only
 Cd+Chi: cadmium+chitosan oligosaccharide posttreated mice
 Chi7+Cd: 7 days pretreated chitosan oligosaccharide+cadmium treated mice

Table 2. Activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver of mouse administered Cd or chitosan oligosaccharide (unit: $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)

| Group \ Times (hr) | 24 | 48 | 72 | 168 |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Normal | 77.34 \pm 1.46 | 76.83 \pm 1.21 | 76.15 \pm 0.23 | 74.25 \pm 2.49 |
| Cd | 104.57 \pm 1.7* | 99.22 \pm 1.09* | 92.14 \pm 1.36* | 86.08 \pm 1.17* |
| Cd-Chi | 95.41 \pm 1.16**# | 89.02 \pm 0.97**# | 81.93 \pm 0.96# | 75.87 \pm 0.99# |
| Chi7-Cd | 86.36 \pm 0.91**# | 78.80 \pm 1.13# | 72.71 \pm 0.85**# | 65.63 \pm 1.11**# |

Table 3. Activity of glutathione reductase (GR) in liver of mouse administered Cd or chitosan oligosaccharide (unit: $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)

| Groups \ Time (hrs) | 24 | 48 | 72 | 168 |
|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| Normal | 90.14 \pm 3.20 | 90.14 \pm 3.20 | 90.14 \pm 3.20 | 90.14 \pm 3.20 |
| Cd | 66.31 \pm 2.94* | 73.90 \pm 3.97* | 81.37 \pm 2.97* | 94.91 \pm 3.51 |
| Cd-Chi | 72.97 \pm 3.31* | 81.32 \pm 1.32* | 93.49 \pm 1.49# | 102.02 \pm 4.97 |
| Chi7-Cd | 79.16 \pm 2.59**# | 87.89 \pm 2.67# | 95.21 \pm 1.41# | 107.71 \pm 3.86**# |

2. 간조직중 glutathione peroxidase (GSH-Px) 농도

Cd군의 GSH-Px 활성도는 24, 48, 72 그리고 168시간대에서 104.57 \pm 1.70, 99.22 \pm 1.09, 92.14 \pm 1.36, 86.08 \pm 1.17 mol/mg으로 정상군 77.34 \pm 1.46, 76.83 \pm 1.21, 76.15 \pm 0.23, 74.25 \pm 2.49 mol/mg에 비해 유의한 ($P < 0.01$) 증가 경향을 보였다. Cd-Chi군의 GSH-Px 활성도는 95.41 \pm 1.16, 89.02 \pm 0.97, 81.93 \pm 0.96, 75.87 \pm 0.99 mol/mg으로 시간경과에 따라 Cd군에 비해 유의한 ($P < 0.05$) 감소 경향을 보였다. Chi7-Cd군의 GSH-Px 활성도는 86.36 \pm 0.91, 78.80 \pm 1.13, 72.71 \pm 0.85, 65.63 \pm 1.11 mol/mg으로 시간 경과에 따라 Cd군에 비해 유의한 ($P < 0.05$) 감소 현상을 나타냈다 (Table 2).

3. 간조직중 glutathione reductase (GR) 농도

Cd군의 GR 활성도는 24, 48 그리고 72시간대에서 66.31 \pm 2.94, 73.9 \pm 3.97, 81.37 \pm 2.97 mol/min/mg으로 정상군 90.14 \pm 3.2, 91.43 \pm 2.5, 92.24 \pm 3.2 mol/min/mg에 비해 유의한 ($P < 0.01$) 감소 현상을 나타냈다. Cd-Chi군의 GR 활성도는 72.97 \pm 3.31, 81.32 \pm 1.32, 93.49 \pm 1.49, 102.02 \pm 4.97 mol/min/mg으로 Cd군에 비해 다소 증가된 경향을 보였다. Chi7-Cd군의 GR 활성도는 79.16 \pm 2.59, 87.89 \pm 2.67, 95.21 \pm 1.41,

107.71 \pm 3.86 mol/min/mg으로 시간 경과에 따라 Cd군에 비해 유의적인 ($P < 0.05$) 증가 경향을 보였다 (Table 3).

2. 광학현미경적 관찰

1) 24시간

정상군(N-1)에서는 간소엽은 잘 구분되어 나타났고 간세포도 잘 보존되어 있었다 (Fig. 1). Cd군(A-1)에서는 간소엽이 잘 구별되지 않았고 간세포삭은 무질서하게 배열되어 있으며 간소엽 주변부의 동양혈관의 내강은 넓어져 있었다. 많은 간세포의 핵이 위축되어 있고 피사상태의 간세포도 관찰되었으며, 간세포 전반에 걸쳐 염증세포의 침윤이 심하였다. Cd+Chi군(B-1)에서는 간소엽은 불안정하나 관찰되었고 동양혈관의 내강은 약간 넓어져 있었다. Chi7+Cd군(C-1)에서는 간소엽이 잘 구분되고 소엽의 주변부는 약간 진하게 염색되었다. 동양혈관의 내강은 정상군과 별 차이가 없었다 (Fig. 2).

2) 48시간

Cd군(A-2)에서 간세포삭은 24시간대보다 덜 무질서하게 배열되었고, 동양혈관의 내강은 팽대되었으며 피사세포가 관찰되었다. Cd+Chi군(B-2)에서 간세포삭은 비교적 고르게 배열되어 있었다. Chi7+Cd군(C-2)의 일부 세포질이 약간 진하게 염색되었다 (Fig. 3).

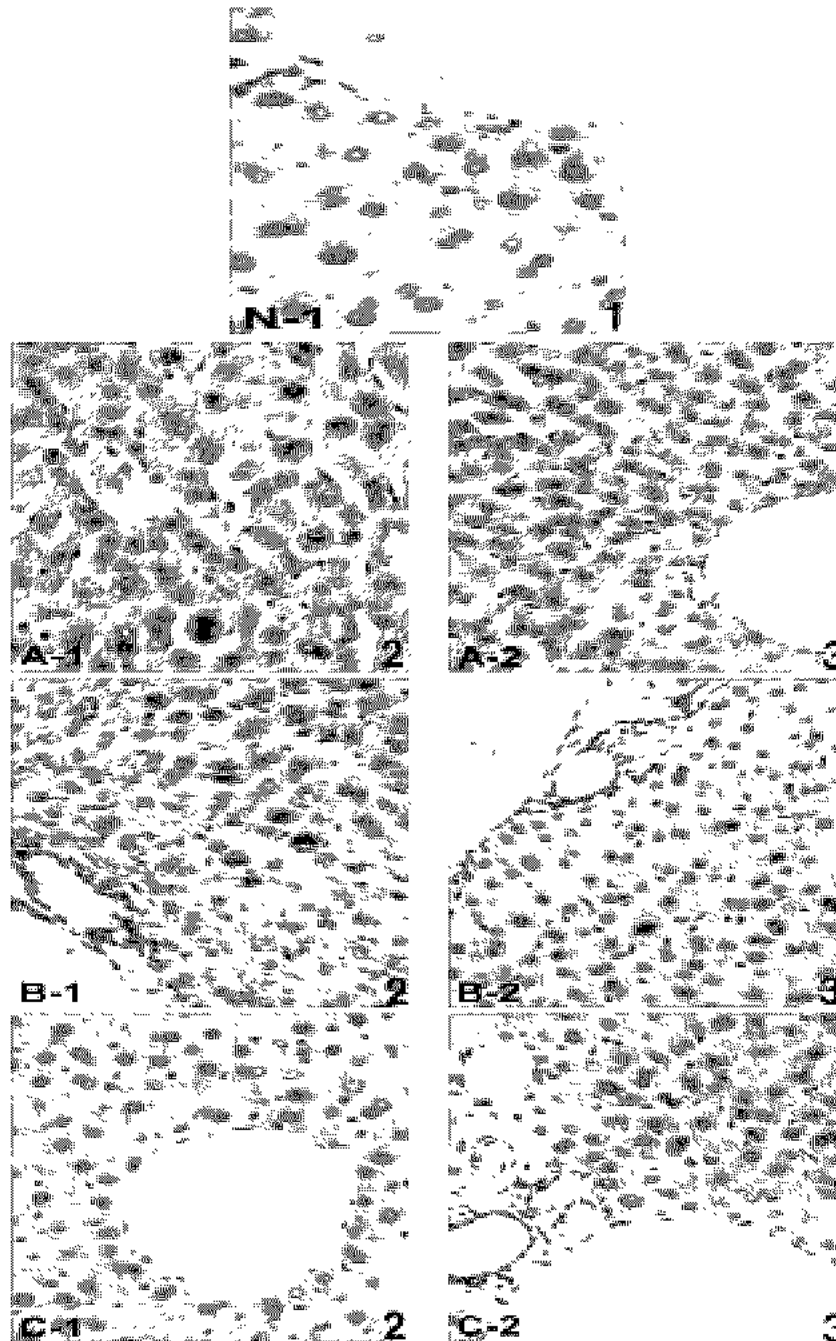


Fig. 1. A light micrograph of hepatic cell of normal. H-E stain, $\times 400$.

Fig. 2. A light micrograph of hepatic cell at 24 hours of each group. A-1: Group Cd; B-1: Group Cd-Chi; C-1: Group Chi7 + Cd. H-E stain, $\times 400$.

Fig. 3. A light micrograph of hepatic cell at 48 hours of each group. A-2: Group Cd; B-2: Group Cd-Chi; C-2: Group Chi7 + Cd. H-E stain, $\times 400$.

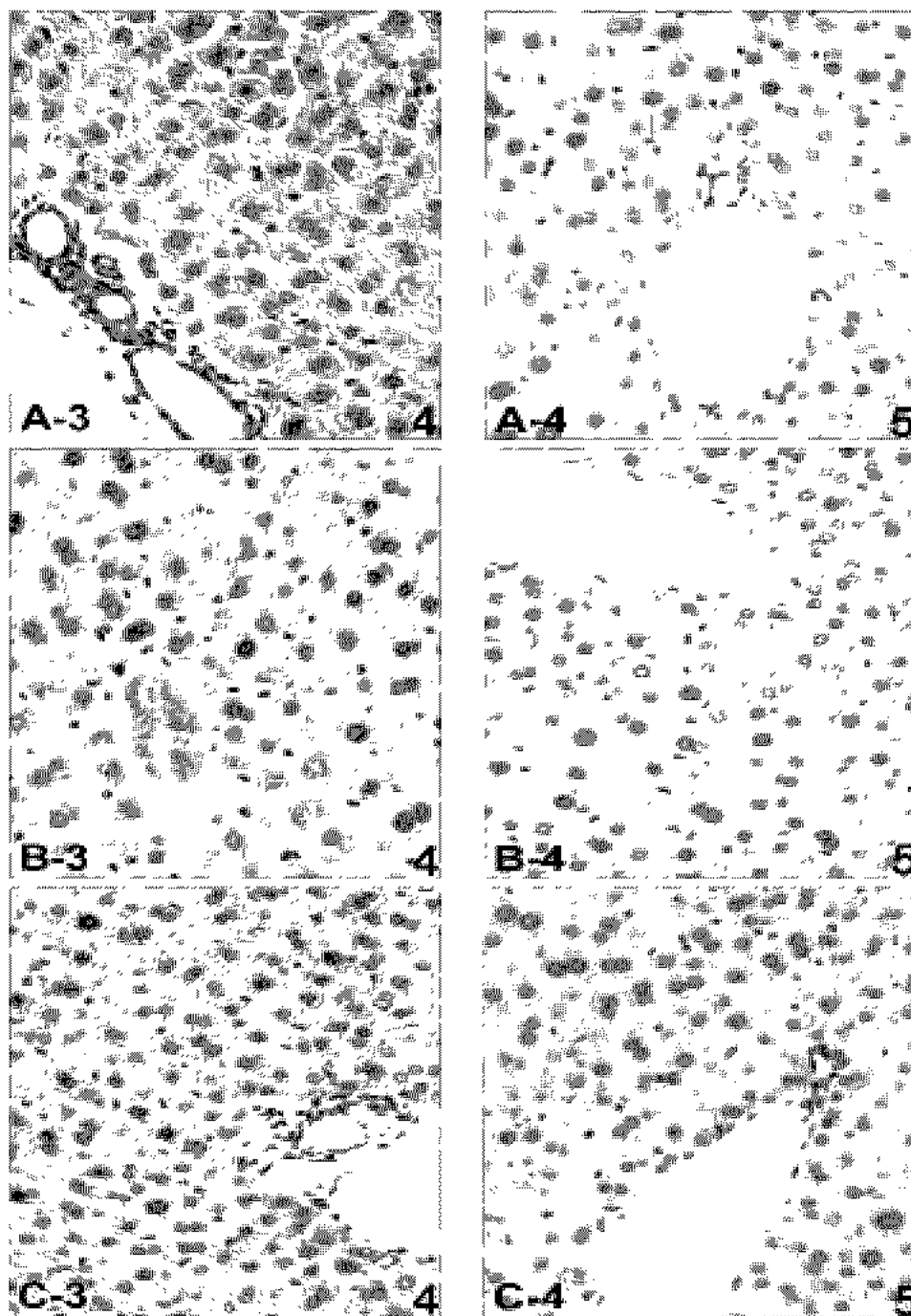


Fig. 4. A light micrograph of hepatic cell at 72 hours of each group. A-3: Group Cd; B-3: Group Cd-Chi; C-3: Group Chi7+Cd. H-E stain, $\times 400$.

Fig. 5. A light micrograph of hepatic cell at 168 hours of each group. A-4: Group Cd; B-4: Group Cd-Chi; C-4: Group Chi7+Cd. H-E stain, $\times 400$.

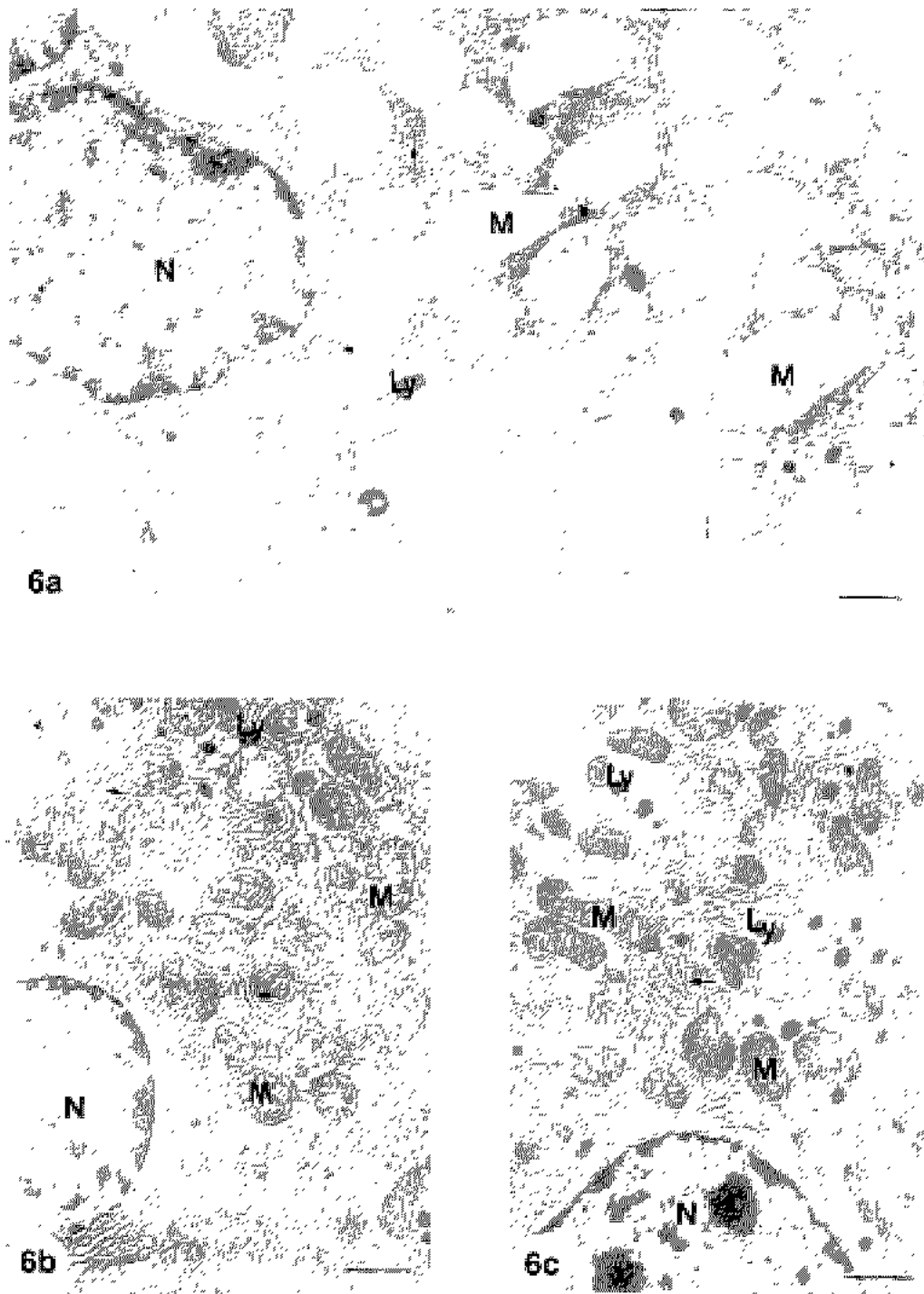


Fig. 6. An electron micrograph of hepatic cell 24 Hours of each group. a: Group Cd; b: Group Cd-Chi; c: Group Chi7 + Cd, M: Mitochondria; L: Lysosome; N: Nucleus; G: Glycogen; →: Rough endoplasmic reticulum (scale bar = 1 μ m).

3) 72시간

Cd군(A-3)에서 간세포의 핵은 어느 정도 질서있는 배열을 이루었지만, 간소엽의 일부에서 핵의 위축과 피사세포가 관찰되었다. Cd+Chi군(B-3)에서 간세포 핵이 비교적 고르게 배열되어 있었고 별다른 변화를 찾지 못했다. Chi7+Cd군(C-3)에서 간세포의 핵은 고른 배열이 관찰되었다(Fig. 4).

4) 168시간

Cd군(A-4)의 일부에서 피사세포가 관찰되었다. Cd+Chi군(B-4)에서 간세포의 핵은 고르게 배열되어 있었다. Chi7+Cd군(C-4)에서 간소엽은 잘 구분되어 관찰되었다(Fig. 5).

3. 전자현미경적 관찰

1) 24시간

Cd군에서 간세포의 핵은 매우 불규칙한 모양을 이루었다. 미토콘드리아가 팽대되어 보였고 cristae는 파괴된 채로 관찰되었으며 전자밀도가 낮게 관찰되었다. 그리고 조면소포체는 층판구조가 완전히 파괴되어 분절된 채로 관찰되었다. 이밖에도 용해소체가 세포질에서 관찰되었다(Fig. 6a). Cd+Chi군에서 간세포의 핵은 규칙적인 형태를 보였고, 구형의 미토콘드리아가 풍부하게 분포되어 있으며, 내부의 cristae도 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 조면소포체는 일부에서 수조의 팽창이 관찰되었지만, 일부에서 층판구조를 이루고 있었으며 세포질에서 용해소체가 관찰되었다(Fig. 6b). Chi7+Cd군에서 간세포의 핵은 비교적 원형을 이루고 있었으며, 여러 형태의 미토콘드리아가 풍부하게 분포되어 있으며, 미토콘드리아내의 cristae도 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 조면소포체는 층판구조를 형성하고 있었고, 일부에서는 수조의 팽창이 관찰되었다. 세포질에서 다수의 용해소체가 관찰되었다(Fig. 6c).

2) 48시간

Cd군에서 간세포의 핵은 약간 불규칙한 모양을 이루었다. 미토콘드리아의 cristae는 파괴된 채로 관찰되었으며 전자밀도가 낮게 나타났다. 또한 조면소포체는 일부에서 층판구조가 파괴되어 분절된 채로 나타

났고 세포질에서 용해소체가 관찰되었다(Fig. 7a). Cd+Chi군에서 간세포의 핵은 비교적 둥근 형태를 보였고, 일부에서 구형의 미토콘드리아가 관찰되었으며, 내부의 cristae가 파괴된 채로 관찰되었다. 또한 조면소포체는 일부에서 수조의 팽창이 관찰되었지만, 핵 주변에서 층판구조를 이루고 있었으며 용해소체가 관찰되었다(Fig. 7b). Chi7+Cd군에서 간세포의 핵은 원형을 이루고 있었으며, 전자밀도가 낮은 미토콘드리아가 분포되어 있었다. 그리고 조면소포체는 층판구조를 형성하고 있었고, 일부에서는 수조의 팽창이 관찰되었으며 세포질에서는 작은 지방적과 용해소체가 관찰되었다(Fig. 7c).

3) 72시간

Cd군에서 간세포의 핵은 비교적 규칙적인 형태를 이루었다. 미토콘드리아가 팽대되어 보였고, cristae가 관찰되었지만 전자밀도가 낮게 나타났다. 그리고 조면소포체는 일부에서 층판구조를 형성한 것이 보였고 세포질에서 용해소체가 관찰되었다(Fig. 8a). Cd+Chi군에서 간세포의 핵은 비교적 규칙적인 형태를 보였고, 미토콘드리아는 Cd군과 비슷한 소견을 보였다. 또한 조면소포체는 핵 주변부에서 층판구조를 이루고 있었으며 세포질에서 글리코겐과 용해소체가 관찰되었다(Fig. 8b). Chi7+Cd군에서 간세포의 핵은 비교적 원형을 이루고 있었으며, 전자밀도가 높은 미토콘드리아가 관찰되었다. 또한 조면소포체는 핵 주변에서 층판구조를 형성하였고, 세포질에서는 다수의 용해소체와 글리코겐이 관찰되었다(Fig. 8c).

4) 168시간

Cd군에서 간세포의 핵은 비교적 둥그런 모양을 이루었다. 미토콘드리아는 내외막이 파괴된 것이 관찰되었고, 전자밀도도 낮게 나타났다. 그리고 조면소포체는 층판구조를 형성한 것과 분절된 것이 모두 관찰되었으며 용해소체가 세포질에서 관찰되었다(Fig. 9a). Cd+Chi군에서 간세포의 핵은 규칙적인 형태를 보였고, 미토콘드리아내의 cristae가 관찰되었고, 전자밀도가 높은 것과 낮은 것이 모두 관찰되었다. 또한 조면소포체는 일부에서 수조의 팽창이 관찰되었지만, 층판구조를 이루고 있었으며 세포질에서는 용해소체가 관찰되었다(Fig. 9b). Chi7+Cd군에서 간세포의

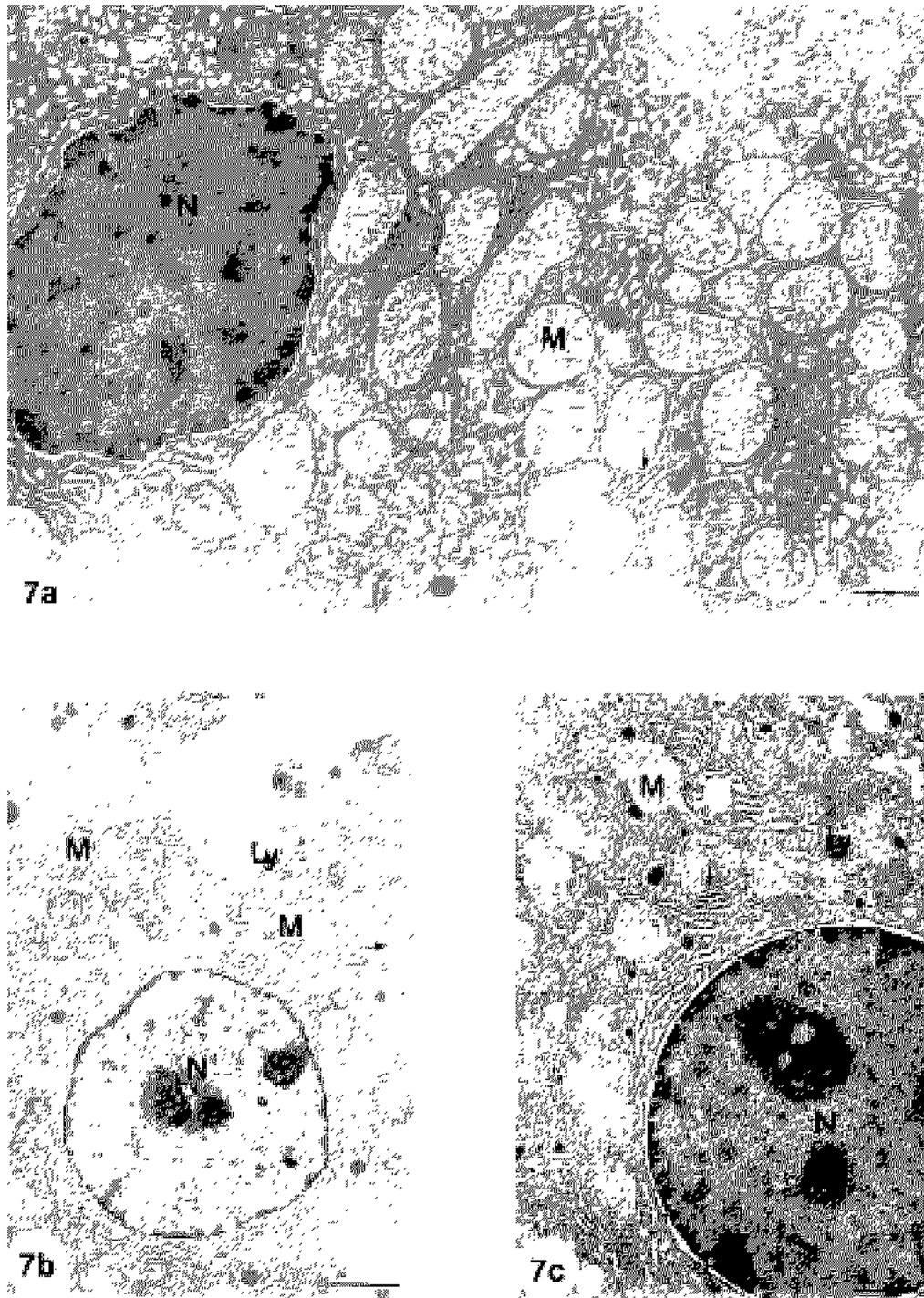


Fig. 7. An electron micrograph of hepatic cell 48 Hours of each group. a: Group Cd; b: Group Cd-Chi; c: Group Chi7 + Cd, M: Mitochondria; L: Lysosome; N: Nucleus; G: Glycogen; →: Rough endoplasmic reticulum (scale bar = 1 μ m).

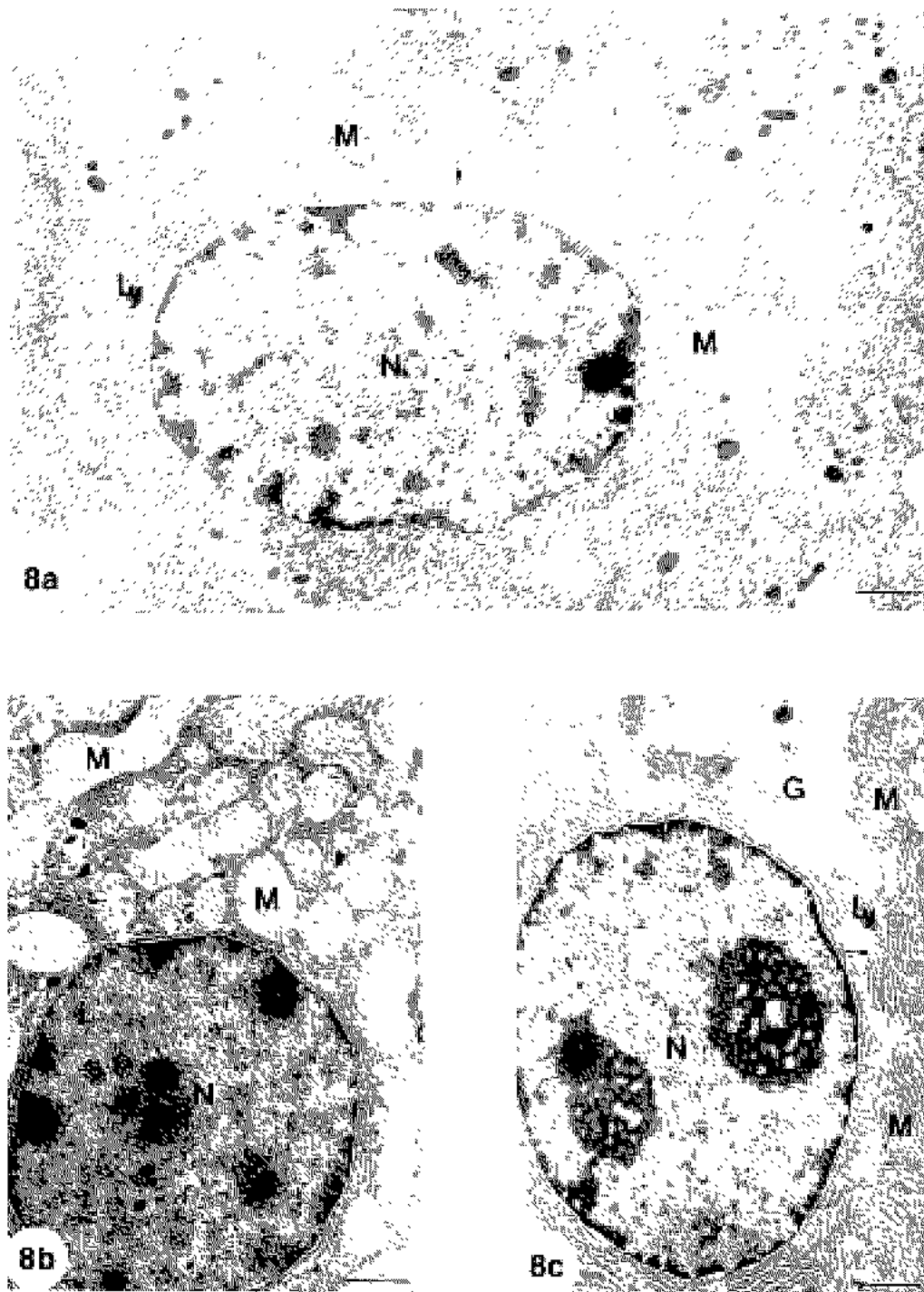


Fig. 8. An electron micrograph of hepatic cell 72 Hours of each group. a: Group Cd; b: Group Cd-Chi; c: Group Chi7+Cd, M: Mitochondria; L: Lysosome; N: Nucleus; G: Glycogen; →: Rough endoplasmic reticulum (scale bar = 1 μ m).

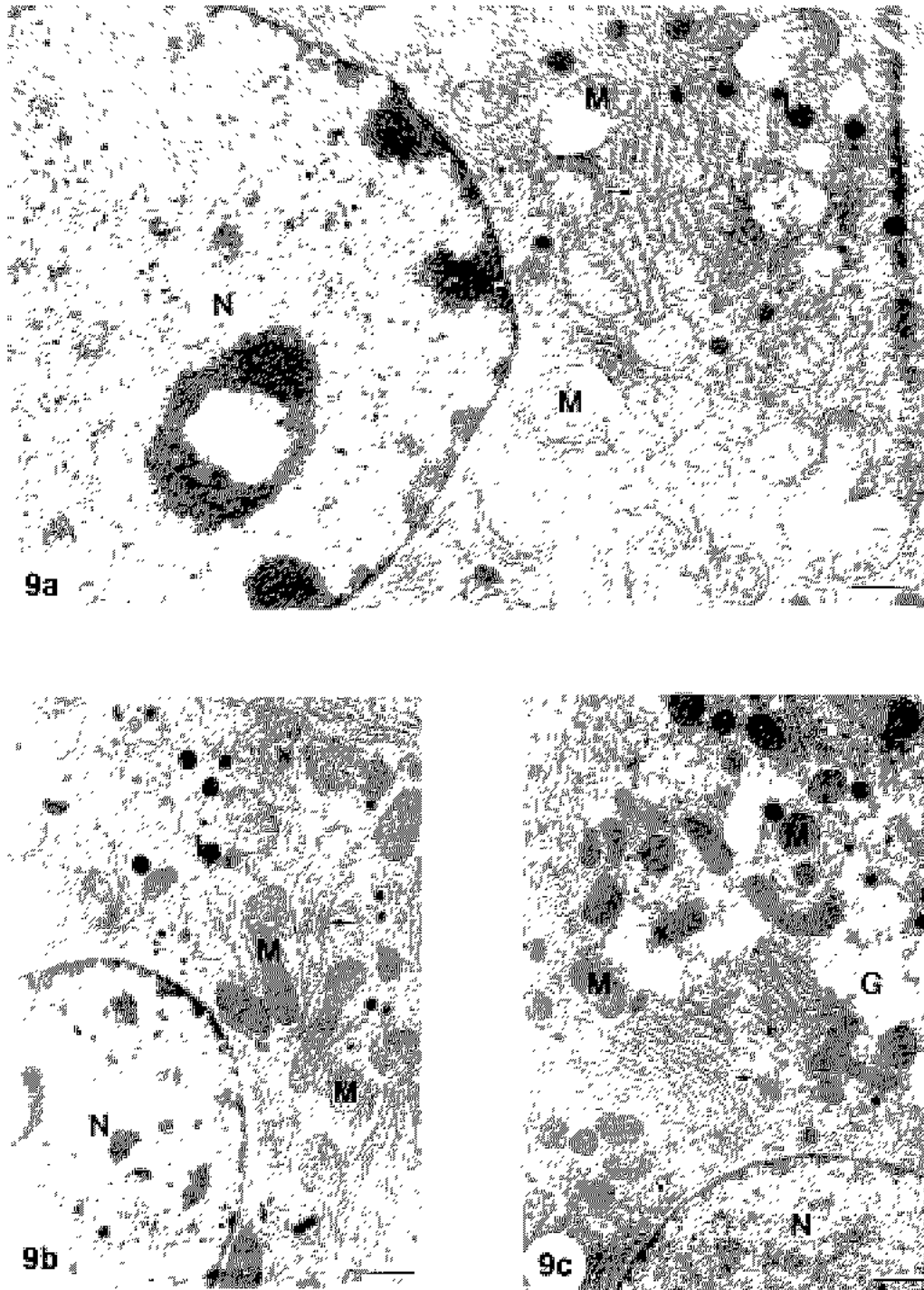


Fig. 9. An electron micrograph of hepatic cell 168 Hours of each group. a: Group Cd; b: Group Cd-Chi; c: Group Chi7 + Cd; M: Mitochondria; L: Lysosome; N: Nucleus; G: Glycogen; →: Rough endoplasmic reticulum (scale bar = 1 μ m).

핵은 등그란 원형을 이루고 있었으며, 여러 형태의 미토콘드리아가 풍부하게 분포되어 있었으며, 전자밀도가 높게 관찰되었다. 또한 조면소포체는 전형적인 층판구조를 형성하고 있었으며 세포질에서는 용해소체와 글리코겐이 관찰되었다(Fig. 9c).

고 찰

생체내에서 키틴, 키토산의 다양한 약리작용은 이들의 화학구조의 차이에 따라 달리 나타나는 것으로 보고되어져 있다. 즉, 키토산의 면역증강작용(Suzuki et al., 1984; Suzuki et al., 1987)이나 항암작용(Suzuki et al., 1986; Tokoro et al., 1988)은 체내에 흡수된 이후에 발휘될 수 있기 때문에 키토산 그 자체보다도 키토산올리고당이 유리한 반면, 콜레스테롤저하작용(Sugano et al., 1980)이나 혈압강화작용(Okuda et al., 1997)은 체내에 흡수되지 않은 식이섬유로서의 작용에 의존하기 때문에 고분자 키토산이 유리하다. 이러한 이유로 최근 키틴, 키토산 분야에서의 관심은 키틴·키토산올리고당의 생리기능성 쪽으로 점차 옮겨가고 있는 추세이다.

지금까지 키틴, 키토산은 의료용 재료로서 사용될 만큼 생체친화성이 높다. 특히 키틴은 대부분의 독성 시험검사에서 생체 안전성이 매우 우수한 것으로 보고되어졌다(Landes & Bough, 1976). 키토산 또한 생체내에서 매우 안전한 것으로 보고되었다(Deuchi et al., 1995), Nishimura et al.(1994)의 보고에 의하면, 키토산은 생체내 중금속 및 방사성오염물질의 제거에 상당한 효과를 발휘한다는 사실을 보고하였다.

Jeon et al.(1999)은 키토산올리고당의 생체내 칼슘 흡수에 미치는 영향을 조사한 결과, 흰쥐 대퇴골의 칼슘 함량이 약 15% 증가되었음을 보고하였다. 이들의 결과는 키토산이 생체내에서 식이섬유로서의 작용이 강한 것에 비하여 키토산올리고당은 생체내에서 쉽게 흡수된다는 것을 의미한다.

Tong et al.(1991)에 의하면 키틴과 키토산은 2-amino-2-deoxy-D-glucose unit의 존재로 인하여 천연금속이온과 결합할 수 있는 특성을 가지고 있다고 하였으며, Ogawa et al.(1984)은 금속이온과 키토산

사이의 착체구조는 두 개의 잔기당 1개의 금속이온과 2개의 음이온 및 1개의 물분자가 배치한 펜탄모형을 하고 있다고 발표하였다. Muzzarelli et al.(1972)은 키토산을 충전시킨 column을 사용하여 해수 중의 중금속 이온과 우라늄 흡착 효과에 대한 연구와 황산 및 질산 등의 용액 중에서 키토산의 중금속 및 음이온의 흡착 효과를 발표하였고, 국내에서도 최근에 키토산의 중금속 이온과 방사성 동위원소 흡착 효과를 실험하여 보고하였다(Kim et al., 1993; Kim et al., 1999).

혈청 중의 AST, ALT의 활성은 정상상태에서는 효소의 활성이 낮으나 조직이 병적 상태에 빠지거나 혹은 붕괴되어 질병이 발생하면 세포내에 존재하는 효소가 다량으로 혈중에 이동하여 효소 활성도의 농도가 높아지기 때문에 일반적으로 만성간염, 급성간염, 지방간, 알콜성 간염, 간암 등 주로 간세포의 변성이나 괴사를 반영할 수 있는 효소이다(Cheroret et al., 1994).

Novelli et al.(1998)은 CdCl₂ 100 mg/l을 음용수로 7일동안 공급한 후에 혈청에서 ALT 활성도를 측정한 결과, 대조군은 13.6±1.7 U/ml이었고, CdCl₂ 투여군은 24.2±2.0 U/ml로 증가하였다고 보고하였다. Dudley et al.(1982)은 Cd의 농도를 0.9~3.9 mg/kg(i.v.)으로 증가시켜 흰쥐에 투여한 후에 10시간대에서 혈장 AST와 ALT 활성치가 정상군보다 약 45배 증가하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 Cd+Chi군과 Chi7-Cd군이 Cd군에 비해 AST와 ALT의 활성이 현저하게 감소된 것(Table 1)은 간에서 카드뮴에 의한 효소장애 독성을 키토산올리고당이 어느 정도 저하시킨 것으로 사료된다.

혈청 총단백(total protein; TP)이 증가하는 경우는 수분섭취부족, 설사, 결핵 등이며, 감소하는 경우는 혈장단백질의 누출, 영양부족, 간기능장애 등이다. Novelli et al.(1998)은 CdCl₂ 100 mg/l을 음용수로 7일동안 공급한 후에 혈청에서 TP 활성도를 측정한 결과, 대조군은 8.3±0.9 g/dl이었고, CdCl₂ 투여군은 7.4 0.8 g/dl로 감소하였다고 보고하였다. Suzuki et al.(1985)은 암컷 흰쥐에 Cd 1.5 mg/kg을 피하주사한 후 혈청의 TP 활성도가 감소하였다고 보고하였다. Guilhermino et al.(1998)의 실험에서도 숫컷 흰쥐에

Cd 6 mg/kg을 1회 투여하고 24시간 후, 대조군에서 TP의 활성도는 55.4 ± 2.5 g/l인 반면에 카드뮴 투여군은 47.4 ± 1.5 g/l로 감소하였다고 보고하였다.

본 실험의 결과에서도 Cd군이 Cd+Chi군과 Chi7-Cd군에 비해 TP의 활성도가 다소 감소한 것은 카드뮴이 간단백합성기능을 저하시킨 것으로 사료된다 (Table 1).

혈청중의 LDH는 심장, 간, 골격근, 혈액 등의 장기의 염증, 괴사, 종양 등에서 세포손상이 일어났을 때 효소활성이 상당히 증가한다 (Davies & Maloney, 1976). Guilhermino et al. (1998)은 숫컷 흰쥐에 Cd 6 mg/kg을 1회 투여하고 24시간 후, 대조군에서 LDH의 활성도는 115 ± 5 U/l인 반면에 카드뮴 투여군은 422 ± 49 U/l로 증가하였다고 보고하였다. 본 실험의 결과에서도 Cd군은 정상군에 비해 유의한 ($P < 0.01$) 증가를 보여 카드뮴에 의한 간조직 손상을 야기한 것으로 사료되며, 키토산올리고당을 처치한 Cd+Chi군과 Chi7+Cd군은 Cd군에 비해 유의한 ($P < 0.05$) 감소를 나타낸 것은 (Table 1) 키토산올리고당이 카드뮴 투여로 인한 간손상을 어느 정도 억제한 것으로 사료된다.

Albumin은 간에서의 합성능 저하 (중증 간장해), 혈장단백의 누출 (출혈, 화상, 부종), 사구체신염, 영양불량, 호흡장해 등으로 인해 albumin이 감소한다 (Springate et al., 1991; Pannacciulli et al., 2001). Guilhermino et al. (1998)은 숫컷 흰쥐에 6 mgCd/kg을 1회 투여하고 24시간후, 대조군에서 Alb의 활성도는 30.0 ± 0.2 g/l인 반면에 카드뮴 투여군은 26.8 ± 0.5 g/l로 감소하였다고 보고하였는데, 본 실험의 24시간대에서 Cd군은 24.2 ± 0.2 g/dl로 정상군 2.66 ± 0.11 g/dl에 비해 유의한 감소를 보였으나 ($P < 0.01$), 키토산올리고당을 처치한 Cd+Chi군과 Chi7+Cd군은 Cd군에 비해 유의한 증가를 나타내었다 ($P < 0.05$) (Table 1).

GSH-Px는 Se를 함유하며 체내에서 glutathione을 기질로 하여 H_2O_2 를 처리하는 항산화계 효소로서 철분, 비타민 E, 필수지방산의 결핍시 활성이 감소되고 산화적 스트레스에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다 (Mutanen & Mykkanen, 1984).

Shimizu & Morita (1990)는 흰쥐에 $CdCl_2$ 75 mg/kg을 구강투여하고 4, 24시간째에 GSH-Px와 GR의 활

성도를 측정 한 결과, 4시간대에 269.5 ± 7.0 nmol/mg, 43.2 ± 1.5 nmol/mg이었고, 24시간대에는 216.9 ± 6.0 nmol/mg, 45.5 ± 1.3 nmol/mg으로 측정되어 시간 경과에 따라 GSH-Px는 감소하며 GR은 증가한다고 보고하였다.

본 실험에서도 Cd군의 GSH-Px 활성도는 104.57 1.70 , 99.22 ± 1.09 , 92.14 ± 1.36 , 86.08 ± 1.17 nmol/mg으로 시간 경과에 따라 감소하였고, GR 활성도는 66.31 ± 2.94 , 73.90 ± 3.97 , 81.37 ± 2.97 , 94.91 ± 3.51 nmol/mg으로 시간 경과에 따라 증가하였다 (Table 2).

따라서 본 실험의 Cd군에서 GSH-Px 활성도가 정상군에 비해 증가한 것은 카드뮴에 의한 간독성 작용에 의해 H_2O_2 의 생성이 증가되어 GSH-Px의 활성이 증가된 것으로 생각되며 이와 같은 결과는 카드뮴의 투여량이 증가될수록 간세포 손상이 더욱 심화되어 GSH-Px의 활성이 증가되었다는 Rhee et al. (1992)의 보고와 일치하였으며, 키토산올리고당을 처치한 군의 경우에서 정상군보다 GSH-Px의 활성이 낮게 나타난 것은 키토산올리고당이 카드뮴 투여에 의한 H_2O_2 의 생성을 억제시켜 GSH-Px 활성을 감소 시킴으로 인해 해독작용을 나타낼 수 있을 뿐만 아니라 정상적인 간의 기능도 보호할 수 있을 것으로 여겨진다.

GR은 간 손상시 혈중으로 유리되는 것 (Taniguchi et al., 1974; Tor et al., 1981)으로 알려져 있다. Karmakar & Chatterjee (1998)는 생쥐에 2.5 mg/kg의 $CdCl_2$ 를 피하주사하여 reduced glutathione level을 조사한 결과 대조군은 28.11 ± 1.25 nmol/mg으로 나타났고, 15일에는 20.95 ± 2.00 nmol/mg, 30일째는 16.00 ± 1.90 nmol/mg 그리고 45일에는 13.92 ± 1.95 nmol/mg으로 시간 경과에 따라 감소하였다고 보고하였다.

Sunitha et al. (2001)은 흰쥐에 lupeol (150 mg/kg)과 lupeol linoleate (150 mg/kg)을 3일 동안 전처치하고 $CdCl_2$ (3 mg/kg, i.v.)을 투여한 다음 24시간에 GR 활성도를 측정 한 결과, $CdCl_2$ 단독투여군은 0.03 ± 0.003 U/mg, $CdCl_2$ +lupeol 투여군은 0.24 ± 0.01 U/mg 그리고 $CdCl_2$ +lupeol linoleate는 0.34 ± 0.02 U/mg로 나타났다고 하였다.

본 실험에서도 Cd군이 정상군에 비해 GR 활성이 유의하게 ($P < 0.01$) 감소된 것은 GR의 thiol기와 Cd

와의 상호결합으로 인해 그 활성이 저하된다는 보고 (Cartana et al., 1992)와 일치하였다. 그리고 Chi7-Cd 군이 Cd군에 비해 GR활성이 유의하게 ($P < 0.05$) 증가한 것 (Table 3)은 키토산올리고당이 GR의 환원능력을 상승시키는 작용 때문이라 사료된다.

카드뎀 단독성에 대한 광학현미경 및 전자현미경적 결과를 보면, 흰쥐에 Cd 3.2 mg/kg을 투여한 Engstrom & Nordberg (1978)의 실험에서 24시간 후, 카드뎀 단독투여군은 대부분의 간세포가 괴사되었으나, Cd-EDTA 투여군에서는 부분적인 괴사가 관찰되어 간손상의 감소를 EDTA가 유도했다고 보고하였다. 본 실험의 Cd군에서도 간세포의 괴사가 관찰되었으나, 키토산올리고당을 처치한 Cd+Chi군과 Chi7+Cd군에서는 일부에서만 괴사가 관찰되어 위의 결과와 일치한 소견을 보였으며, 키토산올리고당에 의하여 간조직 손상이 감소되었다고 사료된다.

흰쥐에 CdCl₂ 100 mg/kg을 투여한 Morita (1984)의 실험결과 간세포의 변성과 괴사, 간경변, Kupffer cell의 증가가 관찰되었다고 보고하였는데, 본 실험에서도 Cd군의 간세포는 초기에 간세포사의 불규칙적인 배열, 팽창 그리고 염증세포의 출현이 관찰되어 Morita의 결과와 일치하였다.

Goering & Klaassen (1983, 1984)은 2.0 mg/kg의 CdCl₂ 혹은 12.0 mg/kg의 ZnCl₂를 1회 피하주사한 후, 고농도의 카드뎀을 정맥주사한 결과, 생리식염수 전처치후 고농도의 카드뎀을 투여하여 나타난 간조직의 염증세포 침윤, 간소엽의 부종, 핵위축 및 간괴사 등의 간세포 손상을 관찰하지 못하였는데, 이는 본 실험의 Chi7+Cd군의 광학현미경적 소견과 일치하며, 키토산올리고당 전처치에 의해 생성된 MT가 투여된 카드뎀 독성을 억제하는데 효과가 있음을 보여주고 있다.

Kudo et al. (1986)은 아연을 전처치한 다음 24시간 후에 0.10 mmol/kg 또는 0.03 mmol/kg의 카드뎀을 rats에 투여하고 광학현미경으로 관찰한 결과, 카드뎀 단독투여군은 국소적인 괴사, 괴사세포에서 핵의 퇴색과 세포질의 공포화가 관찰되었으나, 아연 전처치군에서는 경미한 동양모세혈관의 팽대가 관찰되었을 뿐 병리학적인 변화는 없었다고 보고하였다. 본 실험에서도 키토산올리고당을 처치한 군들의 간세포에서

는 별다른 변화를 찾을 수 없었으나, 카드뎀 단독투여군에서는 괴사세포의 출현과 핵염색의 창백함이 관찰되어 위의 결과와 유사한 소견을 보여주었다.

Hoffmann et al. (1975)은 흰쥐 정맥내에 Cd를 0.6 mg/100 g으로 주사한 다음 간 및 신장으로 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰한 결과 Cd 투여 후 16시간에 90~95%의 동물에서 간과 신장에서 병변이 야기됨을 관찰하였다. 간의 경우 소엽중 중간 구역에 있는 간세포의 국소성 괴사, 조면소포체의 퇴화, 활면소포체의 확장, 미토콘드리아의 퇴행성 변화, Kupffer cell의 증가 및 염증세포의 침윤이 확인되었다고 보고하였다. 본 실험의 광학현미경적 소견에서도 Cd군의 24, 48, 72시간에 일부 괴사성 세포가 관찰되었으며, 전자현미경적 소견에서는 Cdms의 24와 48시간에 조면소포체의 층판구조 파괴와 내강 팽대 및 미토콘드리아의 내강 팽대가 관찰되어 비슷한 결과를 나타내었다.

Dudley et al. (1984)은 CdCl₂ 3.9 mg/kg을 흰쥐에 투여하고 1~2시간 후에 광학현미경상으로 실질세포 팽윤의 확산과 감소된 세포길호염기성을 관찰하였고, 6시간 후에는 부가역적인 세포 피해 현상, 광범위한 실질세포 괴사가 나타났다고 보고하였다. 전자현미경상에서는 4시간에 사립체에서 기질라피과 구별되는 전자밀도가 높은 구조가 나타났으며 균질한 섬유성 물질이 세포질에서 관찰되었다. 6시간에 조면소포체의 심각한 팽대와 소포형성, 조면소포체에서 리보솜의 탈락, 사립체의 팽윤현상이 나타났으며 10시간 대에는 핵의 농축, 사립체의 심한 팽윤과 cristae의 파괴가 나타났으며 주된 변형은 조면소포체의 소포형성이었다고 보고하였다. 본 실험의 Cd군에서 RER의 분절과 수조 팽대가 관찰되었고, Chi7+Cdms에서는 전형적인 층판구조와 리보솜의 부착이 관찰되어 위의 결과와 비슷한 소견을 보였다.

이상의 결과로 보아 키토산올리고당의 전처치는 카드뎀에 의해 야기되는 단독성을 방어할 수 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Amako K, Shimodori S, Imoto T, Miake S, Umeda A: Effects

- of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 53(3) : 603-605, 1987.
- Anderson HR, Anderson O: Effect of cadmium on hepatic lipid peroxidation in mice. *Pharmacol Toxicol* 63 : 173-177, 1988.
- Basavaraju SR, Jones TD: Atherosclerotic risks from chemicals: Part I. Toxicological observations and mechanisms of atherosclerosis. *Arch Environ Contam Toxicol* 35 : 152-164, 1998.
- Bough WA, Landes DR: Recovery and nutritional evaluation of proteinaceous solids separated from whey by coagulation with chitosan. *J Dairy Sci* 59(11) : 1874-1880, 1976.
- Erzowska MM, Moniuszko Jakoniuk J, Jureczuk M, Galazyn Sidoreczuk M, Rogalska J: The effect of zinc supply on cadmium induced changes in the tibia of rats. *Food Chem Toxicol* 39 : 729-737, 2001.
- Carlberg I, Mannervik B: Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113 : 484-490, 1985.
- Cartana J, Romeu A, Arola L: Effects of copper, cadmium and nickel on liver and kidney glutathione redox cycle of rats. *Comp Biochem Physiol* 101(2) : 209-213, 1992.
- Chan HM, Cherian MG: Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium. *Toxicology* 72(3) : 281-290, 1992.
- Chen JP, Chen JY: Preparation and characterization of immobilized phospholipase A₂ on chitosan beads for lowering serum cholesterol concentration. *J Mole Cataly B: Enzymatic* 5 : 483-490, 1998.
- Cherian MG, Nordberg M: Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* 28 : 1-15, 1983.
- Cheroret G, Dessor D, Lehr PR: *In vitro* effects of aluminum chloride on choline acetyltransferase activity of the rat brain during postnatal growth. *Bull Environ Contam Toxicol* 52 : 487-490, 1994.
- Davies P, Maloney AFJ: Selective loss of cholinergic neurons in alzheimer's disease. *Lancet* 2 : 1403-1409, 1976.
- Deuchi K, Kanauchi O, Shizukuishi M, Kobayashi E: Continuous and massive intake of chitosan affects mineral and fat soluble vitamin status in rats fed on a high fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 59(7) : 1211-1216, 1995.
- Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen CD: Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 65(2) : 302-313, 1982.
- Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen CD: Time course of Cd induced ultrastructural change in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 76 : 150-160, 1984.
- Dureja H, Tiwary AK, Gupta S: Simulation of skin permeability in chitosan membranes. *Int J Pharm* 213(1-2) : 193-8, 2001.
- Engstrom B, Nordberg GF: Effects of detergent fomular chelating agent on the metabolism and toxicity of cadmium in mice. *Acta Pharmacol Toxicol* 43 : 387-397, 1978.
- Garrett SH, Phillips V, Somji S, Sens MA, Dutta R, Park SM, Kim DY, Sens DA: Transient induction of metallothionein isoform 3 (MT 3), *c fos*, *c jun* and *c myc* in human proximal tubule cells exposed to cadmium. *Toxicol Lett* 126 : 69-80, 2002.
- Goering PL, Klaassen CD: Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: possible mechanism of tolerance to cadmium induced lethality. *Toxicol Appl Pharmacol* 70(2) : 195-203, 1983.
- Goering PL, Klaassen CD: Tolerance to cadmium induced hepatotoxicity following cadmium pretreatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 74(3) : 308-313, 1984.
- Goyer RA, Tsuchiya R, Leonard DL, Kahyo H: Aminoaciduria in japanese workers in the lead and cadmium industries. *Am J Clin Pathol* 57 : 635-642, 1972.
- Guilhermino L, Soares AM, Carvalho AP, Lopes MC: Effects of cadmium and parathion exposure on hematology and blood biochemistry of adult male rats. *Bull Environ Contm Toxicol* 60(1) : 52-59, 1998.
- Hoffmann EO, Cook JA, di Luzio NR, Coover JA: The effects of acute cadmium administration in the liver and kidney of the rat. Light and electron microscopic studies. *Lab Invest* 32(5) : 655-664, 1975.
- Horiguchi H, Oguma E, Kayama F, Sato M, Fukushima M: Dexamethasone prevents acute cadmium induced hepatic injury but exacerbates kidney dysfunction in rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol* 174(3) : 225-234, 2001.
- Janes KA, Calvo P, Alonso MJ: Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev* 47(1) : 83-97, 2001.
- Jeon YJ, Kim GH, Park PJ, Kim SK: Calcium absorption accelerating effect of chitosan oligosaccharides prepared by ultrafiltration membrane enzymatic reactor. *J Kor Fish Soc* 32(3) : 247-251, 1999.
- Karmakar R, Chatterjee M: Cadmium induced time depen-

- dent oxidative stress in liver of mice: a correlation with kidney. *Environ Toxicol Pharmacol* 6 : 201-207, 1998.
- Kim HK, Kim KY, Bom HS, Choi KH, Kim JY: Effect of oral injection of chitosan and alginate on the removal of orally injected radiostrontium (^{85}Sr) in mice. *J Kor Nucl Med* 27(1): 130-134, 1993.
- Kim YH, Bom HS, Kim KY, Kim HK, Kim JY: Inhibitory effect of chitosan on the milk transfer of radiostrontium from contaminated mice to their sucklers. *J Chitin Chitosan* 4(1): 15-18, 1999.
- Kowel NE, Johnson DE, Kaemer DF, Pahren HR: Normal levels of cadmium in diet, urine, blood and tissues of inhabitants of the United States. *J Toxicol Environ Health* 5 : 995-998, 1979.
- Kudo N, Yamashina S, Waku K: Protection against cadmium toxicity by zinc: Decrease in the Cd high molecular weight protein fraction in rat liver and kidney on Zn pretreatment. *Toxicology* 40(3) : 267-277, 1986.
- Lafuente A, Marquez N, Perez Lorenzo M, Pazo D, Esquifino AI: Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic-pituitary-testicular axis function in the rat. *Food Chem Toxicol* 38 : 913-923, 2000.
- Landes DR, Bough WA: Effects of chitosan—a coagulating agent for food processing wastes—in the diets of rats on growth and liver and blood composition. *Bull Environ Contam Toxicol* 15(5) : 555-563, 1976.
- Lawrence RA, Burk RF: Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71(4) : 952-958, 1976.
- Leber AP, Miya TS: A mechanism for cadmium and zinc induced tolerance to cadmium toxicity: Involvement of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 37 : 403-414, 1976.
- Lee JS, White KL: A review of the health effects of cadmium. *Am J Ind Med* 1(3-4) : 307-317, 1980.
- Liu J, Liu Y, Sultan S, Habeebu SS, Klaassen CD: Metallothionein null mice are highly susceptible to the hematotoxic and immunotoxic effects of chronic CdCl_2 exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 159 : 98-108, 1999.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951.
- Medesani DA, Lopez Greco LS, Rodriguez EM: Effects of cadmium and copper on hormonal regulation of glycemia by the eyestalks in the Crab *Chasmagnathus granulata*. *Bull Environ Contam Toxicol* 66 : 71-76, 2001.
- Morita S: Defense mechanisms against cadmium toxicity. *Jpn J Pharmacol* 35(2) : 129-141, 1984.
- Mutanen ML, Mykkanen HM: Effect of dietary fat on plasma glutathione peroxidase levels and intestinal absorption of ^{75}Se labeled sodium selenite in chicks. *J Nutr* 114(5) : 829-834, 1984.
- Muzzarelli RAA, Ferrero A, Pizzoli M: Light scattering, X-ray diffraction, elemental analysis and infrared spectrophotometry characterization of chitosan, a chelating polymer. *Talanta* 19(10) : 1222-1226, 1972.
- Nakajima M, Atsumi K, Kifune K, Miura K, Kanamaru H: Chitin is an effective material for sutures. *Jpn J Surg* 16(6) : 418-424, 1986.
- Nishimura K, Ishihara C, Ukei S, Tokura S, Azuma I: Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine* 4(3) : 151-156, 1986.
- Nishimura Y, Kakuta I, Takeda H, Inaba J, Imai K, Watari K, Matsusaka N: Effect of natural chelating agents on the intestinal absorption of radiostrontium in rats. *Radiat Protect Dosim* 53 : 331-334, 1994.
- Nordberg M: Studies on metallothionein and cadmium. *Environ Res* 15 : 381-404, 1978.
- Novelli EL, Vieira EP, Rodrigues NL, Ribas BO: Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats. *Environ Res* 79(2) : 102-105, 1998.
- Oda N, Sogawa CA, Sogawa N, Onodera K, Fyryta H, Yamamoto T: Metallothionein expression and localization in rat bone tissue after cadmium injection. *Toxicol Lett* 123 : 143-150, 2001.
- Ogawa K, Oka K, Miyanishi T: Chitin and Chitosan and related enzymes. *Likakis JP* (Ed.), pp. 327-345, 1984.
- Okuda H, Kato H, Tsujita T: Antihypertensive and antihyperlipemic actions of chitosan. *Kor J Chitin Chitosan* 2(3) : 49-59, 1997.
- Ormrod DJ, Holmes CC, Miller TE: Dietary chitosan inhibits hypercholesterolemia and atherogenesis in the apolipoprotein E deficient mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 138 : 329-334, 1998.
- Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G: Urinary albumin excretion is independently associated with C-reactive protein levels in

- overweight and obese nondiabetic premenopausal women. *J Intern Med* 250(6) : 502-507, 2001.
- Piscator M: Proteinuria in chronic cadmium poisoning. *Arch Environ Health* 12 : 345-359, 1966.
- Piscator M: Dietary exposure to cadmium and health effects: Impact of environmental changes. *Environ Health Perspect* 63 : 127-131, 1985.
- Prudden JF, Migel P, Hanson P, Friedrich L, Balassa L: The discovery of a potent pure chemical wound healing accelerator. *Am J Surg* 119(5) : 560-564, 1970.
- Ramirez DC, Gimenez MS: Lipid modification in mouse peritoneal macrophages after chronic cadmium exposure. *Toxicology* 172 : 1-12, 2002.
- Rhee SJ, Kim SO, Choe WK, Cho SH: Effect of cadmium dose injection on peroxidative damage in rat liver. *J Kor Soc Food Nutr* 21(6) : 601-607, 1992.
- Shimizu M, Morita S: Effects of fasting on cadmium toxicity, glutathione metabolism, and metallothionein synthesis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 103(1) : 28-39, 1990.
- Spagna G, Barbagallo RN, Casarini D: A novel chitosan derivative to immobilize alpha-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzyme Microb Technol* 28(4-5) : 427-438, 2001.
- Springate JE, Van Lies JB, Noble B, Feld LG: Progressive glomerular injury after recovery from acute glomerulonephritis in rats. *Clin Immunol Immunopathol* 61(3) : 309-319, 1991.
- Squibb KS, Cousins RJ, Silbon BL, Levin S: Liver and intestinal metallothionein function in acute cadmium toxicity. *Exp Mol Pathol* 25 : 163-171, 1976.
- Sugano M, Fujikawa T, Hiratsuji Y, Nakashima K, Fukuda N, Hasegawa Y: A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am J Clin Nutr* 33(4) : 787-793, 1980.
- Sunitha S, Nagaraj M, Varalakshmi P: Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia* 72(5) : 516-523, 2001.
- Suzuki K, Okawa Y, Hashimoto K, Suzuki S, Suzuki M: Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol Immunol* 28(8) : 903-912, 1984.
- Suzuki KT, Uehara H, Takano Y, Aoki Y: Inhibition of protein secretion from liver by cadmium. *Biochem Pharmacol* 34(23) : 4171-4173, 1985.
- Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, Suzuki M: Antitumor effect of hexa-N-acetylchitoheptaose and chitoheptaose. *Carbohydr Res* 151 : 403-408, 1986.
- Suzuki K, Okawa Y, Suzuki S, Suzuki M: Candidacidal effect of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin or chitosan: the role of serine protease on the mechanism of oxygen independent candidacidal effect. *Microbiol Immunol* 31(4) : 375-379, 1987.
- Taniguchi N, Tsukada Y, Hirai H: Acquisition of fetal properties in hepatoma on glutathione metabolism. *Biochim Biophys Acta* 354 : 161-167, 1974.
- Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S, Suzuki M: Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitoheptaose and chitoheptaose against Meth-A solid tumor. *Chem Pharm Bull* 36(2) : 784-790, 1988.
- Tong P, Baba Y, Adachi Y: Adsorption of metal ions on a new chelating ion exchange resin chemically derived from chitosan. *Chem Lett* 7 : 1529-1532, 1991.
- Tor J, Pascual C, Segura RM, Vilaseca J, Schwartz S, Guardia J: Glucose phosphate isomerase and glutathione reductase in benign and malignant extrahepatic cholestasis. *Clin Chem* 27(4) : 634-635, 1981.
- Waalkes MP, Hjelle JJ, Klaassen CD: Transient induction of hepatic metallothionein following oral ethanol administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 74(2) : 230-236, 1984.
- Webb M: Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem Pharmacol* 21(20) : 2767-2771, 1972.
- Webster WS: Cadmium induced fetal growth retardation in the mouse. *Arch Environ Health* 33(1) : 36-42, 1978.

< 국문초록 >

본 연구는 카드뮴으로 유발된 생쥐 간종독에 대한 키토산올리고당의 효과를 알아보기 위하여 시도되었다. Mouse를 대상으로 카드뮴 (5.0 mg/kg; i.p.) 단독투여군 (group Cd), 카드뮴과 키토산올리고당 (0.5% solution) 동시투여군 (group Cd+Chi) 그리고 키토산올리고당 1주일 전처치군 (group Chi7+Cd)으로 구분한 후 간손상 억제 효과를 알아보기 위해 혈청중 효소활성도와 glutathione peroxidase (GSH Px)의 활성도 그리고 glutathione reductase (GR)의 활성도를 비교측정하였다. 또한 간조직의 형태학적 손상을 확인하기 위해 조직학적 관찰을 실시하였다. 혈청 효소활성결과, AST, ALT 그리고 LDH의

활성도는 키토산올리고당을 처리한 Cd+Chi군과 Chi7+Cd군이 Cd군보다 감소되었다. 그러나 TP와 Alb의 활성도는 키토산올리고당을 처리한 Cd+Chi군과 Chi7+Cd군이 Cd군보다 증가되었다. GSH Px활성은 Cd군에 비해 Cd+Chi군과 Chi7+Cd군이 현저하게 증가되었다. GR활성은 Cd군에 비해 Cd+Chi군과 Chi7+

Cd군이 현저하게 감소하였다. 광학현미경적 관찰 결과, Cd군은 카드뮴 독성에 의한 간세포의 괴사가 관찰되었다. Cd+Chi군과 Chi7+Cd군은 정상군과 유사한 소견을 보였다.

이상과 같은 결과로, 키토산올리고당이 생쥐 간조직에 미치는 카드뮴의 독성을 감소시킴을 알 수 있었다.