

## 아연결핍이 흰쥐에서 metallothionein의 발현과 카드뮴의 흡수 및 분포에 미치는 영향

전 용 욱, 최 병 선, 박 정 덕\*

중앙대학교 의과대학 예방의학교실

## The Effects of Dietary Zinc Deficiency on the Expression of Metallothionein, Absorption and Distribution of Cadmium in Rats

Yong-Wook Jeon, Byung-Sun Choi and Jung-Duck Park\*

Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University,  
Seoul 156-756, Korea

### ABSTRACT

Zinc (Zn) is an essential element in biological process, however inadequate Zn status in general population have been recognized. To update the knowledge for Zn-cadmium (Cd) interaction, we studied the intestinal uptake and transport, and the expression of metal transporter proteins (divalent metal transporter 1, DMT1; metal transporter protein 1, MTP1; zinc transporter 1, ZnT1; metallothionein 1, MT1) in duodenum after Cd exposure using Zn deficient animal model. Rats were fed Zn deficient (ZnD, 0.5~1.0 mg Zn/kg) or Zn supplemented (ZnS, 50 mg Zn/kg) diet for 4 weeks, and followed single administration of <sup>109</sup>CdCl<sub>2</sub> orally. The body Zn status and tissue Cd concentration were determined at 24 hrs after Cd administration. Total body burden of Cd and Cd absorption index (AI, %) were estimated based on the tissue Cd analyzed. DMT1, MTP1, ZnT1 and MT1 mRNA were analyzed by using RT-PCR method. Feeding of Zn deficient diet for 4 weeks produced a reduced body weight gain and a depletion of body Zn. Tissue Cd concentration, body burden of Cd and Cd absorption index were higher in the ZnD diet fed rats than the ZnS diet fed rats. Especially, Cd concentration in the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) and the colon of FeD diet fed rats were higher markedly than in the FeS diet group. The expression levels of DMT1, MTP1 and ZnT1 mRNA in FeD diet fed rats were similar to the FeS diet. The level of MT1 mRNA expression was significantly lower in the FeD than the FeS diet fed rats. Taken together, these results indicate that Zn deficiency in diet induce an increased intestinal absorption and tissue retention of Cd, and down-regulate the MT1 expression in the intestine which might be play a part of role in Cd absorption and transport in mammalian. These findings suggest that deficiency of essential metal could be enhanced the toxicity of toxic, non-essential metals through the metal-metal interaction.

**Key words** : zinc (Zn), cadmium (Cd), metallothionein 1 (MT1), Zn-Cd interaction, tissue Cd concentration

\* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-820-5668, E-mail: jdpark@cau.ac.kr

## 서 론

아연 (Zinc, Zn)은 인체의 물질대사에 필수적인 금속이온 (essential metal)으로서, DNA와 단백질의 구성요소일 뿐만 아니라 합성과정에 필요한 효소의 활성화 및 세포분화와 주기 등 다양한 생체 반응에 관여하고 있다 (Wu and Wu, 1987; Prasad, 1996; King *et al.*, 2000). 인체에서 아연은 항상성을 유지하고 있으나, 체내의 요구량이 증가되거나 부적절한 공급으로 인해 아연 부족현상이 초래될 수 있다. 사람에서 아연 결핍은 개발도상국에서 뿐만 아니라 선진국에서도 흔히 관찰되며, 간과 신장 및 소화기계 질환에서도 관찰된다. 성장이 왕성한 시기에 있어서 아연 결핍은 성장저하를 초래할 수 있으며, 그 외 고환발육의 저하와 혈액학적 이상소견, apoptosis 촉진, 소화기장애, 면역기능저하 및 피부 이상 등을 초래할 수 있다 (Millar *et al.*, 1958; Cho, 1991; Prasad, 1996; Cui *et al.*, 1999; Hendy *et al.*, 2001; Nodera *et al.*, 2001). 카드뮴 (cadmium, Cd)은 체내에서의 물질대사에 전혀 불필요한 유해금속물질 (non-essential toxic metal)로서 인간에게 다양한 독성작용 뿐만 아니라 발암작용 (human carcinogen)이 있는 것으로 알려져 있다 (IARC, 1993). 동물실험과 역학조사 등에서 혈중에서 아연, 철과 같은 필수 금속이온의 농도가 낮은 경우 유해 독성금속인 카드뮴, 납 등의 농도가 높은 것으로 보고된 바 있으며 (Ragan, 1977; Flanagan *et al.*, 1978; Fox *et al.*, 1984; Park *et al.*, 2002), 실험동물에서 아연결핍 시 카드뮴에 의한 독성에 더욱 민감한 것으로 보고된 바 있다 (Oteiza *et al.*, 1999). 동물실험에서 과량의 카드뮴은 아연의 흡수를 방해하며, 효소계에 존재하는 아연이 카드뮴으로 대체되어 카드뮴의 독성작용이 나타나는 것으로 알려져 있다 (Bauer *et al.*, 1980; Peraza *et al.*, 1998; Brzoska and Moniuszko-Jakoniuk, 2001). 또한, 아연을 전처리한 실험동물은 체내에서 metallothionein (MT) 발현이 증가됨으로써 치사량의 카드뮴에 대한 방어효과가 있는 것 (Goering and Klaassen, 1984)으로 관찰되어 필수금속인 아연과 비필수 독성금속인 카드뮴간에는 상호작용이 있는 것으로 이해되고 있다.

카드뮴에 대해서는 직업적으로 카드뮴을 취급하는 산업장 근로자 뿐만 아니라 일반주민들도 오염

된 생활환경을 통하여 미량이지만 만성적으로 노출되고 있다. 일반 지역주민들의 카드뮴에 대한 주된 노출경로는 오염된 환경으로부터 토양, 물 및 식품 등의 매개체를 통한 소화기계 (oral exposure)이다. 소화기계에서의 카드뮴 흡수기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 편이다. 최근, *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 금속이동단백질인 divalent metal transporter 1 (DMT1)과 metal transporter protein 1 (MTP1)이 카드뮴의 소화기계 흡수에 관여하는 것으로 제시된 바 있다 (Gunshin *et al.*, 1997; Abboud and Haile, 2000; Zoller *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2004). 또한, 아연 이동에 관여하는 것으로 이해되는 금속이동단백질로서 zinc transporters가 Palmiter and Findley (1995), Palmiter *et al.* (1996a,b) 및 Huang and Gitschier (1997) 등에 의해 보고된 바 있다. MT는 저분자량 단백질로서 체내에서 아연농도의 유지·조절 기능 뿐만 아니라 카드뮴의 독성에 대한 방어효과와 체내에서 카드뮴의 이동에도 관여하는 것으로 이해되고 있다.

이번 연구에서는 아연 제한식이를 이용하여 아연 결핍 실험동물 모델을 만들고, 이 동물모델을 이용하여 아연 결핍상태에서 카드뮴을 경구로 투여한 후 주요 장기를 대상으로 조직내 카드뮴 농도를 분석하여 아연결핍에 따른 카드뮴의 소화기계에서의 흡수와 장기내 분포에 미치는 영향을 평가하고 금속이온의 주 흡수부위인 십이지장에서 카드뮴과 아연의 대사와 관련이 있을 것으로 기대되는 금속이동단백질들의 발현정도를 관찰함으로써 카드뮴 독성에 있어서 아연의 역할에 대한 이해를 높이고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 21일령의 수컷 Sprague-Dawley male rat를 Samtaco사로부터 구입하여 이용하였다. 구입한 실험동물은 온도 약 22°C, 습도 55%, 채광 12시간인 동물사육실에서 4일 동안 사육하여 특별한 이상이 없음을 확인한 다음 실험에 사용하였다.

### 2. 실험모델

생후 25일된 실험동물을 실험군과 대조군으로

구분하여 각 군당 7마리씩 무작위 배당한 다음, 실험군에는 Zn 결핍 식이 (ZnD diet)를, 대조군에는 Zn 보완 식이 (ZnS diet)를 공급하였다. 실험동물의 식이는 American Institute of Nutrition (Bieri *et al.*, 1977)의 권장량을 근거로 하여 ZnD diet는 0.5~1.0 mg Zn/kg, ZnS diet는 50 mg Zn/kg이 되도록 조성을 조절하였다. ZnD와 ZnS diet는 주문제작하여 Harlen사(USA)로부터 구입하였으며, Zn 농도 이외에는 동일한 구성성분으로 조성하였다. 각 군의 실험동물에 ZnD diet 또는 ZnS diet를 4주 동안 공급하였다. 이때 물은 증류수를 공급함으로써 Zn이 추가로 공급되는 것을 방지하였다. 실험기간동안 주당 2~3회 체중을 측정하여 실험동물의 체중변화를 관찰하였다. 4주 동안 ZnD diet 또는 ZnS diet로 사육한 실험동물을 약 15시간 동안 굶긴 후 카드뮴을 1회 경구투여 하였다. 이 때 투여한 카드뮴은 실험동물 체중 kg당 100  $\mu$ g으로서 60  $\mu$ Ci의  $^{109}$ CdCl<sub>2</sub> 방사선 동위원소(Perkin Elmer Life Sciences, USA)로 labelling한 염화카드뮴(CdCl<sub>2</sub>, Sigma)을 이용하였으며 투여량은 실험동물 체중 kg당 4 ml가 되도록 조절하였다.

### 3. 시료채취

실험동물에 카드뮴을 1회 경구투여한 다음 24시간 후에 정추탈골방법으로 실험동물을 희생시켰다. 실험동물을 희생시킨 후 즉시 혈액을 채취한 후 간, 신장, 심장, 폐, 비장, 뇌, 고환, 위, 소장, 대장 및 뼈를 적출하였다. 이때 적출한 소장은 3부위로 나누어 상부 1/3은 duodenum, 중간 1/3 jejunum 및 하부 1/3 ileum로 구분하였다. 십이지장의 상부 1/2은 DMT1, MTP1, ZnT1 및 MT1 등의 mRNA를 분석하기 위하여 적출한 후 즉시 액체질소에 넣은 다음 추후 분석 때 까지 -80°C에서 냉동 보관하였고, 하부 1/2은 카드뮴 정량에 이용하였다. 채취한 혈액 일부는 카드뮴 정량에 이용하였고 나머지는 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

### 4. 실험동물의 체내 Zn 수준 평가

ZnS diet 또는 Zn D diet를 4주 동안 공급한 실험동물의 체내 아연 수준을 평가하기 위하여 혈청내 아연농도를 정량하였다. 혈청내 아연농도는 원자흡광분광광도계 (Atomic Absorption Spectrophotometer,

Perkin-Elmer 5100 PC)를 이용하여 flame 방법으로 분석하였다.

### 5. 조직내 카드뮴 정량

실험동물의 조직내 카드뮴 농도는 각 조직내  $^{109}$ CdCl<sub>2</sub>의 방사성 활성도를 gamma counter (Wallac 1470, Perkin Elmer Life Sci.)를 이용하여 분석하였다. 이때 경구 투여한 카드뮴 용액에 첨가된  $^{109}$ CdCl<sub>2</sub>의 방사성 활성도를 이용하여 각 조직에서 측정된 방사성 활성도를 표준화함으로써 각 조직내 카드뮴농도를 산출하였다. 각 조직내 카드뮴농도는 ng CdCl<sub>2</sub>/g wet weight로 환산하여 나타내었다.

### 6. 실험동물의 체내 총 카드뮴 부하량 산출

실험동물의 체내 축적된 총 카드뮴량은 적출된 각 장기내 카드뮴 함량을 모두 합한 값으로서 실험동물 체중 100 g당 카드뮴량으로 산출하였다. 이때 혈액과 뼈는 각각 체중의 6.7%와 10%로 환산하여 계산하였다 (Kreppel *et al.*, 1994). 실험동물에서 카드뮴의 흡수지수 (absorption index, AI, %)를 카드뮴 투여량에 대한 카드뮴 투여후 24시간에서의 체내 총 카드뮴 부하량으로부터 산출하였다.

### 7. DMT1, MTP1, ZnT1 및 MT1 mRNA 분석

십이지장내 DMT1, MTP1, ZnT1 및 MT1 mRNA의 발현정도는 RT-PCR방법을 이용하여 분석하였다. 즉, 십이지장으로부터 Tri Reagent® (Molecular Research Center, Inc.)를 이용하여 총 RNA를 분리하였으며, 분리된 각각의 RNA는 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 정량하고 formaldehyde agarose gel 전기영동방법으로 확인하였다. 십이지장에서 얻은 RNA로부터 first strand cDNA를 Roche社로부터 구입한 1st strand cDNA synthesis kit를 이용하여 제작하였다. 즉, RNA를 65°C에서 15분간 보온한 후 얼음에서 식힌 다음 미리 준비된 RT mixture (10x reaction buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, deoxynucleotide mix, random primer, RNase inhibitor, AMV reverse transcriptase 등)에 2  $\mu$ g의 RNA를 첨가하여 42°C 1시간, 94°C 10분, 4°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 제작한 cDNA로부터 PCR 방법을 이용하여 DMT1, MTP1, ZnT1 또는 MT1만을 특이적으로 증

폭시켰다. 즉, cDNA를 미리 준비된 PCR mixture (10x Taq buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA, dNTP, up and down primer 등)에 2 µl 첨가한 후 25 또는 30 cycle의 PCR 반응(94°C 5분, 94°C 60초, 55°C 60초, 72°C 60초)를 시행하였다. 이때 특이적으로 DMT1, MTP1, ZnT1 또는 MT1을 증폭하기 위하여 Gene Bank로부터 얻은 랫트의 DMT1 (Accession No. AF008439)과 MTP1 (Accession No. AF394785), ZnT1 (Accession No. U17133) 및 MT1 (Accession No. NM138826)의 complete coding sequence를 이용하여 미리 주문 제작한 특이적인 probe (5' primer, ATTCCAGACGATGGTGCTTC; 3' primer, TTGGGATACTGACGGTGACA for DMT1, 5' primer, CCCTGCTCTGGCTGTAAAAG; 3' primer, AACAAAGGCCACATTTTCGAC for MTP1, 5' primer, GTGTGAACCCGTGTTTTCT; 3' primer, GCGTGAATCCATGATTGTG for ZnT1, 5' primer, CCCAACTGCTCCTGCTCCAC; 3' primer, GCACTTGTCGGAGGCACCTT for MT1)를 이용하였다. DMT1과 MTP1, ZnT1 및 MT1의 발현정도를 표준화하기 위하여 GAPDH (Accession No. AF106860; 5' primer, ACATCAAATGGGGTGATGCT; 3' primer, ACTGTGGTCATGAGCCCTTC for GAPDH)를 internal standard로 사용하였다. PCR 결과 얻은 증폭된 DNA는 2% agarose gel을 이용하여 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 확인하였다.

## 8. 자료 분석

연구결과 얻은 자료의 통계학적 분석은 SAS package (version 8.01)를 이용하였으며 평균±표준오차로 나타내었다. 각 군 간의 평균치 비교는 t-검정을 이용하였다.

## 결 과

### 1. 체중변화

ZnS diet 또는 ZnD diet를 공급한 실험동물의 체중증가 양상은 Fig. 1과 같다. 즉, ZnS diet군은 관찰 기간동안 실험동물의 체중이 지속적으로 증가되었으나, ZnD diet군은 식이 공급후 약 1주일까지는 ZnS diet군과 비슷하였으나, 1주 이후에는 체중 증

가가 적은 것으로 관찰되었다.

## 2. 실험동물의 체내 Zn 수준

ZnS diet 또는 ZnD diet를 4주 동안 공급한 실험동물의 혈청내 Zn 농도로서 체내 Zn 수준을 평가한

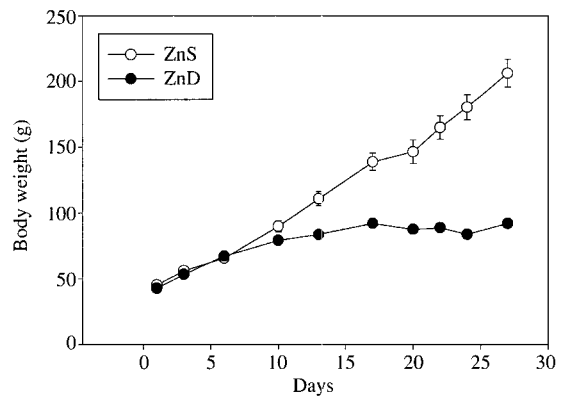


Fig. 1. The change of body weight gain in ZnS (zinc sufficient) or ZnD (zinc deficient) diet fed rats. Data are represented as mean ± SE (n = 7).

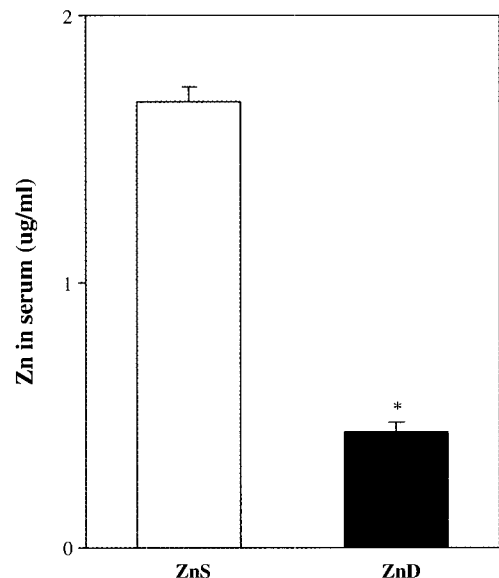


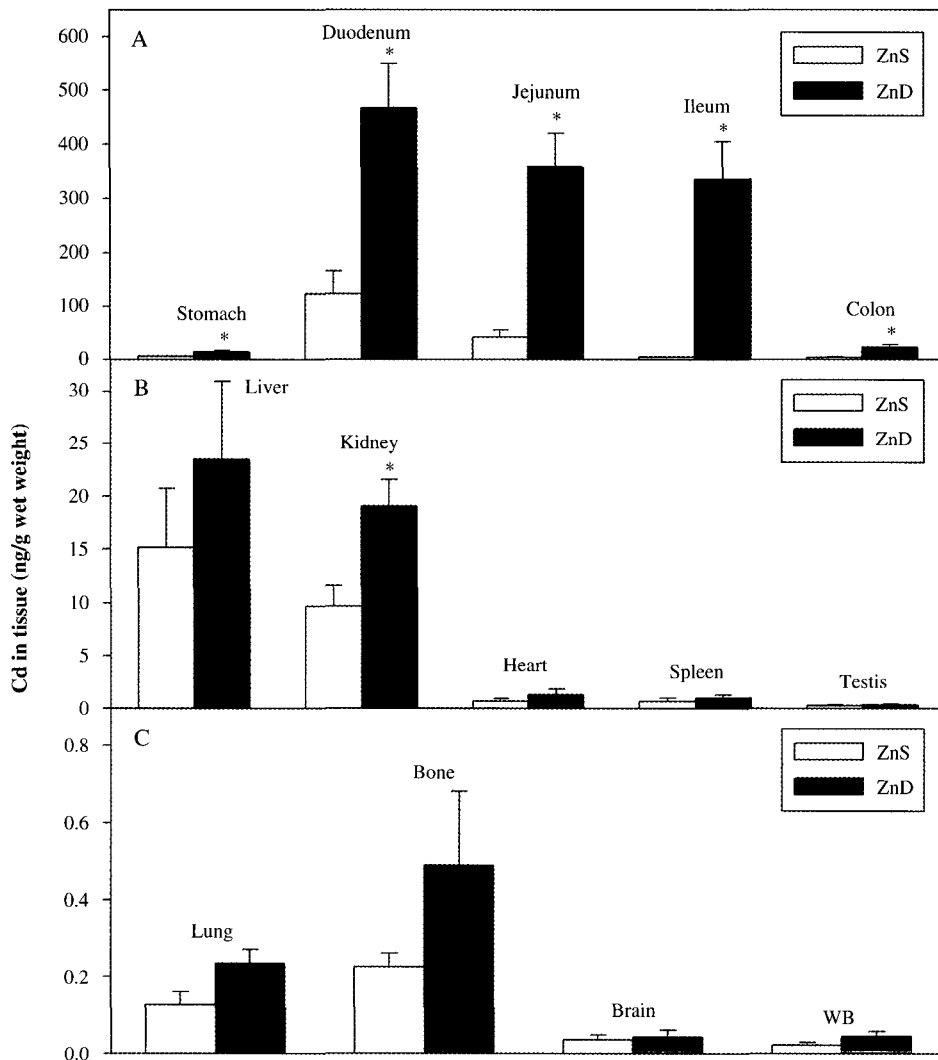
Fig. 2. Serum zinc level in ZnS or ZnD diet fed rats. Data are represented as mean ± SE (n = 7). Asterisk (\*) indicates ZnD diet fed rats are significantly different from ZnS diet fed rats (p < 0.05).

결과 ZnS diet군에 비해 ZnD diet군에서 Zn 결핍이 관찰되었다. 즉, ZnS diet를 공급한 실험동물의 혈청 내 Zn 농도는 1.68  $\mu\text{g/ml}$ 이었고, ZnD diet군에서는 0.44  $\mu\text{g/ml}$ 로서 ZnS diet군에 비해 낮았다(Fig. 2).

### 3. 조직내 카드뮴 농도

ZnS diet 또는 ZnD diet를 4주 동안 공급한 실험동물에 카드뮴을 1회 경구투여한 후 24시간에서의 각 조직내 카드뮴 농도는 Fig. 3과 같다. ZnD 또는

ZnS diet 실험동물군에서 카드뮴 1회 경구 투여한 후 24시간에서 소장내 카드뮴 농도가 가장 높았고 간장, 신장순으로 나타났다. 소장에서는 십이지장에서의 카드뮴 농도가 가장 높았으며, ZnD diet군에서 466.5 ng/g wet weight로서 ZnS diet군의 123.5 ng/g wet weight에 비해 약 3.8배 높았다. ZnD diet군에서 jejunum과 ileum에서의 카드뮴 축적량을 간과 신장에서의 카드뮴 축적량이 대조군에 비해 증가된 것에 비교해 볼 때 상대적으로 현저히 증

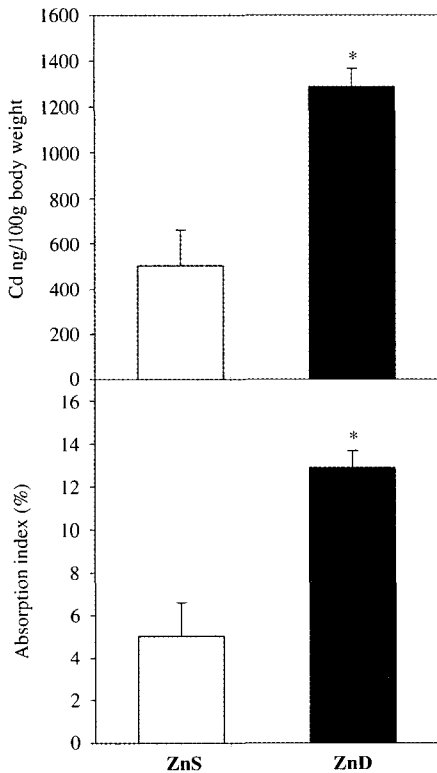


**Fig. 3.** Cadmium concentration in (A) stomach, duodenum, jejunum, ileum, and colon; (B) liver, kidney, heart, spleen and testis; and (C) lung, bone, brain and whole blood (WB) of ZnS or ZnD diet fed rats. Data are represented as mean  $\pm$  SE (n = 7). Asterisk (\*) indicates FeD diet fed rats are significantly different from FeS diet fed rats ( $p < 0.05$ ).

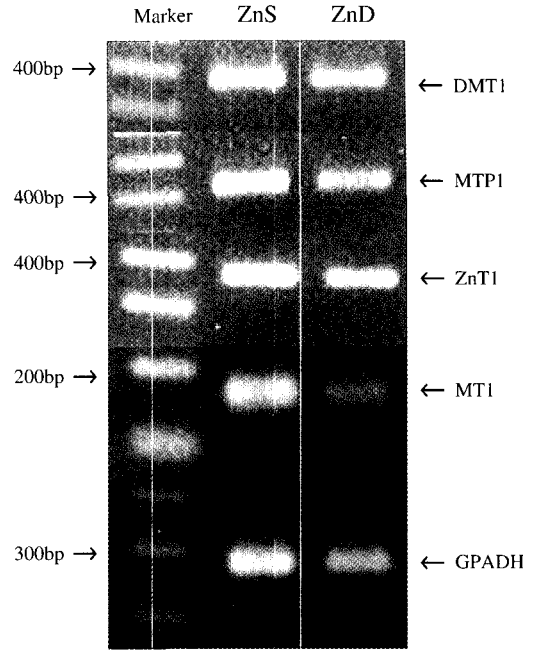
가되었고 colon에서의 카드뮴 축적량도 크게 증가되었다. 심장, 폐, 비장, 뇌, 고환 및 뼈 등 다른 장기의 조직내 카드뮴 농도도 ZnS diet군에 비해 ZnD diet군에서 전반적으로 높은 것으로 관찰되었다.

**4. 실험동물의 체내 총 카드뮴 부하량**

ZnS diet 또는 ZnD diet를 4주 동안 공급한 실험동물에서 각 장기의 조직내 카드뮴농도로부터 산출한 실험동물 체중 100g당으로 표준화한 체내 카드뮴 부하량은 ZnD diet군이 1,287.7 ng/100 g of body weight로서 ZnS diet군의 504.9 ng/100 g of body weight에 비해 약 2.6배 높게 나타났다. 또한, ZnS 또는 ZnD diet 실험동물에 카드뮴을 1회 경구



**Fig. 4.** Total body burden (upper panel) and absorption index (lower panel) of cadmium at 24 hours after a single administration of cadmium orally in ZnS or ZnD diet fed rats. Data are represented as mean  $\pm$  SE (n = 7). Asterisk (\*) indicates FeD diet fed rats are significantly different from FeS diet fed rats (p < 0.05).



**Fig. 5.** Expression level of DMT1, MTP1, ZnT1 and MT1 mRNA in duodenum of ZnS or ZnD diet fed rats.

투여한 후 24시간에서 카드뮴 투여량에 대한 체내 카드뮴 부하량의 비율로 산출한 카드뮴 흡수지수는 ZnD diet군에서는 약 12.9%, ZnS diet군에서는 약 5.1%로 관찰되었다(Fig. 4).

**5. DMT1, MTP1, ZnT1 및 MT1 mRNA 발현**

ZnS diet 또는 ZnD diet를 4주 동안 공급한 실험동물의 십이지장에서 RT-PCR 방법으로 DMT1, MTP1, ZnT1 및 MT1 mRNA의 발현정도를 분석한 결과 Fig. 5와 같다. 즉, DMT1과 MTP1 및 ZnT1 mRNA의 발현정도는 ZnS diet군과 ZnD diet군 간에 특별한 차이가 관찰되지 않았으나, MT1 mRNA는 ZnS군에 비해 ZnD군에서 낮은 수준으로 발현되었다.

**고 찰**

동물실험에서 아연과 칼슘, 철 등 필수 금속이온과 카드뮴과 같은 유해 독성금속이온간에 장(intestine)내 흡수에 있어서 상호작용이 있음이 제

시되고 있다(Flanagan *et al.*, 1978; Fox *et al.*, 1984; Brzoska and Moniuszko-Jakoniuk, 1998; Park *et al.*, 2002). 소화기계에서의 흡수에 있어서 이러한 상호작용의 양상과 기전 등에 대해서는 아직 잘 이해되고 있지 않은 편이다. 최근, 체내 철이 결핍된 환경에서 철의 항상성(homeostasis)을 유지하기 위한 기전으로 소장 상피세포(small intestinal epithelial cell)에서 금속이동단백질인 DMT1과 MTP1의 발현이 증가되고, 카드뮴의 흡수도 증가되는 것으로 관찰되어 소장에서 철과 카드뮴의 흡수기전에 있어서 최소한 공통의 금속이동단백질에 의한 상호작용이 보고된 바 있다(Ryu *et al.*, 2004). 이번 연구에서는 아연 결핍식이를 이용하여 제작한 아연 결핍 실험동물모델을 이용하여 아연이 결핍된 환경에서의 카드뮴의 장내 흡수와 체내 분포 및 금속이온의 주 흡수부위인 십이지장에서 금속이동단백질의 발현 등을 관찰하였다.

이번 연구에서 4주 동안 아연 결핍식이를 공급한 실험동물에서 혈청 아연농도가 아연 보완식이를 공급한 실험동물에 비해 현저히 감소되었다. 또한 십이지장에서 대조군에 비해 아연 결핍 식이군에서 MT1 mRNA가 낮은 수준으로 발현되었다. MT는 체내에서 금속이온의 이동 뿐만 아니라 아연과 구리의 항상성을 유지하는 역할을 하는 단백질로서 간접적으로 체내의 아연 수준을 반영한다(Davis and Cousins, 2000; Szczyrek *et al.*, 2001). 이러한 결과는 아연 결핍식이에 의해 실험동물에서 아연결핍이 초래되었음을 의미한다. 이번 연구의 아연 결핍 식이군에서 대조군 실험동물에 비해 실험동물의 체중 증가의 감소 그리고 각 조직내 카드뮴 농도와 체내 카드뮴 부하량 및 카드뮴 흡수율 등이 높게 관찰되었다. 이는 이전 역학조사와 동물실험에서 체내에서 아연 또는 철 등 필수 금속이온이 부족한 경우 체내 카드뮴과 납 등 유해금속의 흡수와 혈중 농도가 높게 관찰된 것과 일치되는 소견이다(Ragan, 1977; Flanagan *et al.*, 1978; Fox *et al.*, 1984; Park *et al.*, 2002).

아연 결핍 식이군에서 조직내 카드뮴 농도가 높게 관찰된 것은 체내 아연 결핍에 의해 소화기계에서 카드뮴의 흡수와 조직내 카드뮴의 분포에 영향을 미친 것으로 설명할 수 있다. 또한 실험동물의 체중을 기반으로 카드뮴을 1회 경구 투여한 이번 연구에서 카드뮴 투여 후 24시간에서 조직내 카드

뮴 농도와 카드뮴 투여량으로부터 산출한 체내 카드뮴 부하량과 흡수지수도 아연 보완식이에 비해 아연 결핍 식이군에서 높게 산출되었다. 이러한 결과는 아연이 소화기계에서 카드뮴 흡수와 상호작용이 있으며, 식이를 통한 아연결핍에 의해 장내에서 유해 금속인 카드뮴의 흡수가 증가되었음을 시사한다.

사람 또는 실험동물을 대상으로 한 연구결과를 볼 때 식이 등으로 인한 아연 결핍시 소화기계에서의 아연 흡수가 up-regulation 됨을 알 수 있다(Istfan *et al.*, 1983; Wada *et al.*, 1985; Polberger *et al.*, 1996). 사람에서 아연의 흡수가 증가되는 경우는 이번 연구모델에서와 같이 외부로부터 부적절한 아연의 공급이나 체내에서 아연의 요구량이 증가되는 환경이다. 우리나라의 경우 과도한 식이제한을 하고 있는 성장이 왕성한 시기의 청소년과 체내 아연 요구량이 급격히 증가하는 임신부 등 다양한 인구집단에서 체내 아연 결핍이 초래될 수 있으며, 이로 인해 카드뮴과 같은 유해 독성금속이온에 동일하게 노출되는 환경일지라도 상대적으로 흡수량이 증가될 수 있어 공중보건학적인 관심이 요구되는 바이다.

실험동물에 카드뮴을 1회 경구 투여한 이번 연구에서 대조군의 조직내 카드뮴 농도는 소장, 특히 십이지장(123.5 ng/g wet weight)에서 가장 높았고, 간, 신장순이었다. 이는 카드뮴의 주 흡수부위가 소장의 십이지장임을 시사한다. 아연 결핍 식이군에서의 조직내 카드뮴 농도도 십이지장에서 466.5 ng/g wet weight로서 가장 높았으며 대조군의 약 3.8배에 해당되었다. 아연 결핍 식이군에서의 조직내 카드뮴 농도는 대부분의 조직에서 아연 보완 식이군에 비해 높았으나, 간과 신장에서의 카드뮴 축적량의 증가에 비해 duodenum을 비롯하여 jejunum과 ileum 등 소장내 카드뮴 축적량이 대조군에 비해 현저히 증가되었고 colon에서의 카드뮴 축적량도 높게 관찰되었다. 반면, 아연 결핍식이군의 심장, 폐, 비장, 뇌, 고환 및 뼈 등의 조직내 카드뮴 축적량은 대조군에 비해 다소 높은 경향을 나타내었다. 이러한 연구결과는 또 다른 필수 금속이온인 철 결핍 실험모델에서 카드뮴을 1회 노출하였을 때 십이지장내 카드뮴 축적량이 매우 증가되었을 뿐만 아니라 대부분 장기내 카드뮴 축적량도 철 보완 식이군에 비해 매우 높게 관찰된 것(Park *et al.*, 2002)과는 다른 양상이었다. 아연 결핍 식이군

에서 duodenum 뿐만 아니라 jejunum과 ileum에서의 카드뮴 축적량이 매우 증가한 것은 십이지장을 포함한 소장 전체가 아연 결핍에 대해 매우 민감한 것으로 판단된다. 아연 결핍 실험동물의 장관조직과 간 및 신장에서의 카드뮴 축적량의 증가에 비해 심장, 폐, 비장, 뇌, 고환 및 뼈 등에서의 카드뮴 축적량이 상대적으로 낮은 것은 아연 결핍으로 인해 체내에서 카드뮴의 이동에도 관여하는 MT의 체내 수준이 낮아진 것도 한 요인으로 작용하리라 사료되나 향후 좀 더 연구되어야 할 분야로 생각한다.

아연 결핍식이를 4주 동안 공급하여 아연결핍이 유도된 실험동물의 십이지장에서 RT-PCR 방법을 이용하여 금속이동단백질을 분석한 결과, DMT1과 MTP1 및 ZnT1 mRNA의 발현은 대조군과 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았으나 MT1 mRNA의 발현은 아연 결핍에 의해 down-regulation 되었다. DMT1과 MTP1은 주로 소장, 특히 십이지장 상피세포의 apical과 basolateral 부위에 각각 위치하며 금속이온을 장관내로부터 장관 상피세포내로의 흡수와 장관 상피세포로부터 순환혈액으로 배출하는 역할을 하며 체내 철 상태에 의해 그 발현이 조절되는 것으로 이해되고 있으나 (Canonne-Hergaux *et al.*, 1999; Abboud and Haile, 2000; Trinder *et al.*, 2000; Zoller *et al.*, 2001) 이번 연구결과 체내 아연 수준에 의해서는 조절되지 않는 것으로 판단된다. ZnT1은 소장에서 가장 발현이 높은 금속이동단백질로서 아연 노출이 과잉인 환경에서 그 발현이 증가되는 것으로 보고된 바 있으나 (Palmiter and Findley, 1995; McMahon and Cousins, 1998), 아연 부족시 소화기계에서 아연의 흡수와 이동에는 그 역할이 미미한 것으로 사료된다. 이번 연구결과로 볼 때 아연 결핍시 장관에서 카드뮴 흡수의 증가는 철 결핍시 DMT1과 MTP1의 발현조절에 의한 카드뮴의 흡수가 증가되는 기전과는 달리 아연과 카드뮴의 또 다른 상호작용 기전에 의해 조절되는 것으로 생각되며, 금속이동단백질중 MT는 아연 결핍시 카드뮴의 흡수와 이동에 있어서 최소한의 역할에 관여하리라 사료된다.

요약하면 아연 결핍식이에 의해 실험동물에서의 체중 증가가 감소되었고, 체내 아연 수준의 감소로 아연 결핍상태가 초래되었다. 또한, 십이지장에서 DMT1, MTP1, ZnT1 등의 발현은 조절되지 않았으나 MT1은 down-regulation 되었고, 소화기계에서

의 카드뮴 흡수와 조직내 카드뮴 축적량이 증가되어 아연 결핍시 필수 금속이온인 아연과 비필수 독성금속인 카드뮴간에 장관내 흡수 및 이동에 있어서 상호작용이 있는 것으로 관찰되었다.

## 결 론

아연 (Zinc, Zn)은 인체의 물질대사에 필수적인 금속이온이지만 일반인구집단에서도 아연 결핍이 적지 않은 편이다. 이번 연구에서는 아연과 카드뮴간의 상호작용에 대한 이해를 높이기 위하여 아연 결핍 실험동물을 이용하여 아연 부족이 소화기계로 노출(oral exposure)된 카드뮴의 장관에서의 흡수와 이동 및 금속이동단백질과의 관련성을 관찰하였다. Sprague-Dawley rat에 아연 결핍식이 (0.5~1.0 mg Zn/kg) 또는 아연보완식이 (50 mg Zn/kg)를 각각 4주 동안 공급한 후 <sup>109</sup>CdCl<sub>2</sub>를 구강으로 1회 투여하였다. 카드뮴 투여 후 24시간에서 실험동물의 체내 아연수준과 조직내 카드뮴 농도, 체내 총 카드뮴 부하량과 흡수율 및 십이지장에서 금속이동단백질 (divalent metal transporter 1, DMT1; metal transporter protein 1, MTP1; zinc transporter 1, ZnT1; metallothionein 1, MT1)의 발현정도를 분석하였다. 실험동물의 체내 아연수준은 혈청내 아연농도로 평가하였고, 조직내 카드뮴은 gamma counter로 정량하였으며 조직내 카드뮴 농도를 근거로 실험동물의 체내 총 카드뮴 부하량 및 흡수율을 산출하였다. DMT1, MTP1, ZnT1 및 MT1 mRNA의 발현은 RT-PCR 방법으로 분석하였다. 아연 결핍 식이군에서 체내 아연결핍이 초래되었고, 대조군 실험동물에 비해 체중증가의 감소, 조직내 카드뮴 농도와 체내 총 카드뮴 부하량 및 카드뮴 흡수율이 높게 관찰되었다. 조직내 카드뮴은 특히 소장 (duodenum, jejunum, ileum)과 대장에서 현저히 증가되었다. 십이지장에서의 DMT1, MTP1 및 ZnT1의 발현은 아연 결핍군과 대조군간에 특별한 차이가 관찰되지 않았으나, MT1 mRNA의 발현은 아연 결핍식이에 의해 down-regulation 되었다. 이번 연구에서 아연 결핍식이에 의해 소화기계에서의 카드뮴 흡수와 조직내 카드뮴 축적량이 증가되었고, MT1 발현의 down-regulation은 카드뮴의 흡수와 이동에 있어서 MT1이 최소한의 역할을 하고 있음을 시사



하였다. 이러한 결과는 필수 금속이온의 결핍은 체 내에서 독성 중금속과의 상호작용을 통하여 이들의 독성 증가에 기여할 수 있음을 시사한다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것입니다.

## 참 고 문 헌

- Abboud S and Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism, *J Biol Chem* 2000; 275: 19906-19912.
- Bauer R, Demeter I, Hasemann V and Johansen JT. Structural properties of the zinc site in Cu, Zn-superoxide dismutase: Perturbed angular correlation of gamma ray spectroscopy on the Cu, IIICd-superoxide dismutase derivative, *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 94: 1296-1302.
- Bieri JG, Stoewsand GS, Briggs GM, Phillips RW, Woodard JC and Knapka JJ. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on standards for nutritional studies, *J Nutr* 1977; 107: 1340-1348.
- Brzoska MM and Moniuszko-Jakoniuk J. The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism, *Arch Toxicol* 1998; 72: 63-73.
- Brzoska MM and Moniuszko-Jakoniuk J. Interactions between cadmium and zinc in the organism, *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 967-980.
- Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P and Gros P. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron, *Blood* 1999; 12: 4406-4417.
- Cho CH. Zinc: absorption and role in gastrointestinal metabolism and disorders, *Diges Dis* 1991; 9: 49-60.
- Cui L, Takagi Y, Wasa M, Sando K, Khan J and Okada A. Nitric oxidase synthase inhibitor attenuates intestinal damage induced by zinc deficiency in rats, *J Nutr* 1999; 129: 792-798.
- Davis SR and Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function, *J Nutr* 2000; 130: 1085-1088.
- Flanagan PR, McLellan JS, Haist J, Cherian MG, Chamberlain MJ and Valberg LS. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency, *Gastroenterology* 1978; 74: 841-846.
- Fox MRS, Tao SH, Stone CL and Fry BE. The effects of zinc, iron, and copper deficiencies on cadmium levels in tissues of Japanese quail, *Environ Health Perspect* 1984; 54: 57-65.
- Goering PL and Klaassen CD. Zinc-induced tolerance to cadmium hepatotoxicity, *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 74: 299-307.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL and Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter, *Nature* 1997; 388: 482-488.
- Hendy HAE, Yousef MI and El-Naga NIA. Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper, and iron in growing rats, *Toxicology* 2001; 167: 163-170.
- Huang L and Gitschier J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse, *Nat Genet* 1997; 17: 292-297.
- IARC. International agency for research on cancer monograph on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, vol. 58, "Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry". IARC Sci Publ Lyon 1993.
- Istfan NW, Janghorbani MJ and Young VR. Absorption of stable Zn in healthy young men in relation to zinc intake, *Am J Clin Nutr* 1983; 38: 187-194.
- King JC, Shames DM and Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans, *J Nutr* 2000; 130: 1360-1366.
- Kreppel H, Liu J, Liu Y, Reichl FX and Klaassen CD. Zinc-induced arsenite tolerance in mice, *Fundam Appl Toxicol* 1994; 23: 32-37.
- McMahon RJ and Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc, *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4841-4846.
- Millar MJ, Fischer MI, Elcoate PV and Mawson CA. The effects of dietary zinc deficiency on the reproductive system of male rats, *Can J Biochem Physiol* 1958; 36: 557-567.
- Nodera M, Yanagisawa H and Wada O. Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats, *Life Sci* 2001; 69: 1639-1649.
- Oteiza PI, Adonaylo VN and Keen CL. Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake, *Toxicology* 1999; 137: 13-22.
- Palmiter RD, Cole TB and Findley SD. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitat-

- ing vesicular sequestration, *EMBO J.* 1996a; 15: 1784–1791.
- Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ and Findley SD. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996b; 93: 14934–14939.
- Palmiter RD and Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc, *EMBO J.* 1995; 14: 639–649.
- Park JD, Cherrington NJ and Klaassen CD. Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats, *Toxicol Sci* 2002; 68: 288–94.
- Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E and Rael LT. Effects of micronutrients on metal toxicity, *Environ Health Perspect* 1998; 106: 203–216.
- Polberger S, Fletcher MP, Graham TW, Vruwink K, Gershwin ME and Lönnnerdal B. Effect of infant formula zinc and iron level on zinc absorption, zinc status, and immune function in infant rhesus monkeys, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 22: 134–143.
- Prasad AS. Zinc deficiency in women, infants and children, *J Am Coll Nutr* 1996; 15: 113–120.
- Ragan HA. Effects of iron deficiency on the absorption and distribution of lead and cadmium in rats, *J Lab Clin Med* 1977; 90: 700–706.
- Ryu DY, Lee SJ, Park DW, Choi BS, Klaassen CD and Park JD. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats, *Toxicol Lett in press*, 2004.
- Szczurek EI, Björnsson CS and Taylor CG. Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats, *J Nutr* 2001; 131: 2132–2138.
- Trinder D, Oates PS, Thomas C, Sadleir J and Morgan EH. Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload, *Gut* 2000; 46: 270–276.
- Wada L, Turnlund JR and King JC. Zinc utilization in young men fed adequate and low zinc intakes, *J Nutr* 1985; 115: 1345–1354.
- Wu FYH and Wu CW. Zinc in DNA replication and transcription, *Ann Rev Nutr* 1987; 7: 251–271.
- Zoller H, Koch RO, Theurl I, Obrist P, Pietrangelo A, Montosi G, Haile DJ, Vogel W and Weiss G. Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload, *Gastroenterology* 2001; 120: 1412–1419.