

카드뮴이 마우스 뇌에서 아연의 항상성에 관여하는 유전자발현에 미치는 영향

박종안*, 여은영, 남상훈, 장봉기, 이종화, 김완종¹

순천향대학교 환경보건학과, ¹생물학과

Cadmium Altered Gene Expression Related to Zinc Homeostasis in the Mouse Brain

Jong-An Park*, Eun-Young Yoe, Sang-Hun Nam, Bong-Ki Jang,
Jong-Wha Lee and Wan-Jong Kim¹

College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan-Si 336-745, Korea

ABSTRACT

Metallothionein (MT), a small protein molecule which can bind or release metal ions, is involved in the regulation of cellular metal homeostasis. This study was investigated the accumulation of cadmium in blood, tissue (liver, kidney and brain), and the effect of cadmium on several key genes (MT-I, MT-II, ZnT-1) in zinc metabolism in the mouse. Mouses weighing 20~25 g were randomly assigned to control and cadmium treated group (Cd group). Cd group was intraperitoneally injected with cadmium 2, 4, 8 mg/kg and control group was administered with saline. Mouses of each group were sacrificed by decapitation 4 hours after the administration of cadmium. Cadmium contents in blood, liver, kidney and brain were increased by a dose-dependent manner. Accumulation of cadmium was mainly occurred in liver and kidney. Induction of MT-I and MT-II protein was increased, but ZnT-1 expression was decreased in a dose-dependent manner by the treatment of 2~8 mg/kg cadmium. These results suggested that cadmium can be transported to brain and alter the expression of several key genes in zinc homeostasis.

Key words : cadmium, zinc homeostasis, metallothionein, zinc-transporter

서 론

급속한 산업발달로 인한 각종 오염물질의 생태계로의 유입과 환경오염으로 인한 생물학적 농축은 생물의 생존뿐만 아니라 다양한 독성으로 사회적 문제를 야기하고 있다. 특히 중금속은 이미 인간에게 오래 전부터 알려진 독성물질이며 독성학적

으로 주요 관심의 대상이 되고 있다(Goyer, 1996). 환경오염성 중금속 가운데, Itai-Itai 병의 원인물질(Shaikh and Lucis, 1972; Clausen and Rastogi, 1977)로 밝혀진 카드뮴은 산업적 이용에 의해 환경 중으로 방출되는데 도금재료, PVC 안정제, 플라스틱 및 유리 등의 착색제, 니켈-카드뮴 전지의 재료 등으로 사용되고 있다(WHO, 1992; Wren *et al.*, 1995).

카드뮴은 일단 흡수되면 서서히 배설되며 생물학적 반감기가 20~30년으로 길어 맹독성을 나타낸다(Kazantizis, 1979). 체내에 침입한 카드뮴의 독

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-41-530-1266, E-mail: ja-park@sch.ac.kr

성영향은 노출되는 양과 화학형태, 폭로기간 및 체내 흡수경로 등에 따라 다양하게 나타난다(Sendelbach and Klassen, 1988; Hammond and Foulkes, 1994; Goyer, 1996). 일반적으로 신기능 장애, 간조직 손상, 골연화증 및 고혈압 등을 유발시키는 것으로 알려져 있고(Faeder *et al.*, 1977; Dudley *et al.*, 1982), 또한 체내 각종 금속효소의 활성을 저해하는 작용을 하고 적혈구에 손상을 일으키며 성장을 저해함은(Webster, 1978) 물론 발암성(Berg and Burbank, 1972; Schrauzer *et al.*, 1972), 최기성(Kolonel and Winkelstein, 1977; Malcolm, 1979), 염색체이상(O'Riordan *et al.*, 1978) 및 변이원성의 원인(Deaven, 1980)이 된다고 보고되고 있다. 그리고 어린이에게 있어 학습능력저하 및 과도한 반응과 같은 중추신경계에 대한 독작용을 초래한다(Lui *et al.*, 1990; Panayi *et al.*, 2002).

카드뮴의 중추신경계에 대한 독성기전으로는 반응성 산소종(ROS, reactive oxygen species)의 생성 유발(Kumar *et al.*, 1996; Szuster-Ciesielska *et al.*, 2000; Riso-de Faverney *et al.*, 2001), 항산화 방어시스템(antioxidant defence systems)의 장애, 세포내 Ca^{++} 농도의 증가(Wong and Klaassen, 1980), metallothioneins (MTs)을 유도하고 MTs는 혈중에 존재하는 아연(Zn)의 섭취를 통한 아연결핍 유도작용(Wong and Klaassen, 1982) 등이 보고되고 있다. 특히, 카드뮴은 다양한 뇌신경세포에서 반응성 산소종의 합성을 촉진하여 과산화물 생성 증가, 세포내 산화상태 변화, DNA 손상, 세포막 손상, apoptosis를 유발한다(Cantilena and Klaassen, 1981).

최근에 카드뮴에 의해 초래되는 세포내 여러 생리·생화학적 영향들이 알츠하이머병의 유발에 관련이 있다는 사실이 밝혀지고 있다. Kanski 등(2002), Arlt 등(2001) 및 Glabe(2001)는 반응성 산소종이 지방과산화, 단백질 산화 및 신경독성을 유발하며, 이는 알츠하이머병의 촉발(onset) 및 진행(progress)에 기여한다고 보고하였다. 또한 자유라디칼에 의한 산화적 스트레스는 동맥경화증, 당뇨병 및 퇴행성 신경질환에 관련이 있으며, 비타민 E와 C 같은 항산화성 물질이 치매의 임상적 증상을 지연시키거나 억제할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Pitchumoni and Doraiswamy, 1998; Grundman, 2000; Abuja and Albertini, 2001). 카드뮴은 뇌신경세포에서 항산화 방어기전에 중요한 역할을 하는

glutathione, superoxide dismutase 및 glutathione-S-transferase의 함량을 감소시키며, 이는 치매의 발생 및 진행에 관계하는 것으로 조사되었다(Raj *et al.*, 1996; Figueiredo-Pereira and Cohen, 1999; Adams *et al.*, 2001; Karelson *et al.*, 2001).

카드뮴의 의하여 금속결합 단백질인 metallothioneins (MTs)의 발현이 유도된다는 것은 오래 전부터 잘 알려진 사실이다. MTs는 cysteine 잔기가 많은 저분자 단백질(6.0~7.0 kD)로서 그들의 특이한 화학적 구조로 인해 오랫동안 많은 생물학자들의 관심의 대상이 되어왔으나 아직 세포내의 기능에 대하여는 불분명한 부분이 많은 실정이다. MTs는 세포내의 중금속 농도를 조절하는 주요한 단백질로서 세균에서 척추동물에 이르기까지 모든 생명체에서 나타나는 공통된 단백질이다. MTs는 현재까지 MT-I, MT-II, MT-III, MT-IV의 크게 4개 주요 아형이 존재하는 것으로 알려져 있다(Kägi and Schaffer, 1988; Uchida *et al.*, 1991; Palmitier *et al.*, 1992). MT-I과 MT-II는 대부분의 조직에서 발현되며, 다양한 화학물질(IL 6, IL 1, TNF, ROS, LPS, NO, 중금속 등)에 의하여 유도된다. MT-III는 처음에 GIF (growth inhibitory factor)로 밝혀졌으며, 중추신경계에서 특이하게 발현되는 것으로 알려졌으나 이자와 장에서도 발견되고 있다. MT-IV는 피부의 상피에 많이 존재한다(Coyle *et al.*, 2002). 현재 MTs는 다기능성 단백질로 밝혀지고 있으며, 다음의 세가지 기본적인 과정을 조절하는 것으로 알려졌다: 1) hydroxy radical 또는 NO와 같은 가스상 매개체의 방출, 2) apoptosis, 3) 아연, 카드뮴, 구리 등과 같은 중금속의 결합 및 교환 등이다. 또한 MTs는 암, 순환성 및 패혈성 속, 관상동맥 질환, 알츠하이머병 등을 포함한 다수의 질환에 관계가 있으며, 면역체계에도 영향을 미친다는 증거가 있다(Cuthbert, 2000).

한편, 중추신경계에서는 MT-I, MT-II 및 MT-III (발현 정도: MT-I > MT-III > MT-II)가 발현되거나 MT-III가 주된 관심의 대상이 되어왔다. 처음에 MT-III는 신경사멸을 일으키는 GIF로 발견되었으나 Palmitier 등(1992)에 의해 MT군에 속하는 단백질임이 밝혀졌다. 뇌 중에서 hypothalamus and olfactory bulb에서 MT-III가 가장 높게 발현된다. MT-III는 뇌에서 아연이 풍부한 부분에서 높게 발현되며, 신경세포체로 아연을 섭취하는 신경(일명

Zn-ergic neuron)에서 주로 발현되는 것으로 밝혀졌다(Choudhuri *et al.*, 1993). 이는 MT-III가 아연이 신경조절자로 이용되는 것에 관여할 수 있음을 의미한다. 뇌에서 MT-III는 MT-I/II와는 다른 기능을 가지고 있는 것으로 알려지고 있다: 1) MT-I/II는 다양한 화학물질에 의하여 유도되지만 MT-III는 유도성이 낮다, 2) 전사 조절과정이 다르다, 3) 뇌 내에서의 발현분포가 서로 다르다, 4) 다른 MTs와는 달리 MT-III만 neuro-inhibitory activity를 지니고 있다(Coyle *et al.*, 2002).

MTs는 카드뮴뿐만 아니라 아연에 대한 친화력이 큰 단백질로 알려져 있다. 따라서 카드뮴에 의해 유도된 MTs가 아연의 항상성에 영향을 줄 수 있다. Keen 등(1989) 및 Taubeneck 등(1994, 1995)은 발육독성과 최기형성을 나타내는 일부 물질들(ethanol, TNF, urethane, valproic acid and α -hederin)이 어미의 간에서 MTs를 유도하고, MTs는 혈중의 아연을 섭취함으로써 아연이 태아로 수송되는 것이 감소된다고 보고하였으며, 결국은 태아에서 아연결핍이 유발되어 되어 발육독성과 최기형성이 초래된다고 보고하였다. 아연은 조인자, 조효소 또는 DNA 합성, 염기서열 인식, 전사조절, apoptosis 및 세포내 에너지 대사와 같은 다양한 생물학적 기능에 관여하는 단백질의 구성성분으로 작용하는 필수 미량원소이며, 300여종의 단백질이 정상적인 기능을 유지하기 위해서 아연을 필요로 하는 것으로 보고되고 있다. 또한, 아연은 산화적 스트레스를 감소시키고, nitric oxide synthase를 강력하게 억제하는 것으로 밝혀졌다(Math and Gordon, 1997). MT-III의 경우 dentate granule 세포와 hippocampal pyramidal neuron과 같은 아연을 함유한 신경조직에서 높게 발현된다. MT-III는 아연을 함유한 신경 또는 고농도의 아연에 노출된 신경에서 아연의 분포, 재순환 또는 완충 수단을 제공하는 것으로 생각된다.

이상에서 언급된 바와 같이 카드뮴은 생체 내에서 광범한 독성작용을 나타내는 대표적인 환경오염물질이다. 카드뮴은 MTs를 유도하며, 이를 통하여 아연의 항상성에 영향을 미칠 뿐 아니라 Alzheimer 질환의 촉발과 진행에도 연관성이 있다고 보고되고 있다. 그러나 MT의 이성체들에 대한 카드뮴의 유도성에 대한 상반된 견해들이 있으며, MTs의 생체 내 기능에 대하여도 많은 부분이 밝혀지지 않고

있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 마우스에 카드뮴을 투여하여 혈중 및 조직(뇌, 간 및 신장) 중의 카드뮴 함량을 측정하고, 뇌(대뇌피질, 시상하부, 소뇌 및 후신경구)에서 MT-I 및 MT-II의 발현에 미치는 영향을 관찰함으로써 카드뮴의 중추신경계에 대한 독성작용 기전을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 카드뮴 처리

20~25 g의 마우스를 동물회사(제일상사, 경기도 일죽)에서 구입하여 실험실에서 일주일간 순응시킨 후에 실험에 사용하였다. 고품사료로 사육하였으며, 먹이와 물은 자유 섭취케 하였다.

실험동물은 대조군과 3개의 실험군으로 구분하였다. 실험군은 생리식염수에 용해시킨 카드뮴($CdCl_2$)을 농도별(2, 4, 8 mg/kg)로 마우스 복강에 투여하였다. 대조군은 같은 양의 생리식염수를 투여하였다. 나머지 조건은 동일하게 유지하여 실험에 사용하였다.

4시간 후에 경추이탈(cervical dislocation)시켜 희생시킨 후 심장을 통하여 채혈하였으며, 각 조직(뇌, 간, 신장)을 카드뮴 함량 측정용과 유전자 발현 측정용으로 분리하여 적출하였다.

2. 혈액 중의 카드뮴 함량 측정

카드뮴 처리된 마우스의 심장에 주사기로 채혈한 후에 EDTA로 처리된 tube (Becton Dickinson 사)에 넣어서 2시간 이상 rolling 후에 혈액 100 μ L와 1% HNO_3 (70% HNO_3 + 1% Triton X-100) 900 μ L를 혼합하였다. 혈중 중금속의 분석에 널리 사용되고 있는 흑연로 원자흡수분광광도계(Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer, Shimadzu, AA-6501S, Japan)로 내부에는 D_2 (중수소) 바탕보정장치가 장착되어 있으며, 자동시료주입장치(ASC-6000, auto sampler)가 부착된 기기를 사용하였다. 파장은 228.8 nm, Argon 가스를 사용하였다. 검량선 작성은 표준물질 첨가법(standard addition method)을 이용하였고, 모든 실험은 2회 반복 측정하여 변이계수(coefficient of variation)가 5%를

초과할 경우에는 3회까지 측정하도록 프로그램 하였다.

혈중 카드뮴 분석 시에는 가열 코팅된 Conventional 흑연 튜브(Shimadzu, Japan)를 이용하여 박종안 등(1996)의 방법에 따라 분석했다. 카드뮴 표준 용액은 1,000 ppm의 원자흡광분석용 원액을 희석하여 사용하였고, 혈중 카드뮴 농도는 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 로 표시하였다.

3. 조직 중의 카드뮴 함량 측정

마우스 조직(뇌, 간, 신장)에 함유된 카드뮴 함량을 측정하기 위해서 마우스에서 각각의 장기들을 적출 후 건조기(110°C, 5시간 이상)에서 수분을 제거한다. 그리고 용기에 장기를 옮겨 70% HNO_3 7 mL를 가하고, overnight를 시킨 후 증류수 3 mL를 더 가하여 microwave를 사용하여 전처리를 하였다. 전처리된 것 중에서 1 mL를 취하여 hot plate에서 휘산 시킨 후 5% HNO_3 1 mL를 넣어 남아있는 흰 앙금을 녹인 후에 10,000 rpm에서 10분간 원심분리를 한 후에 흑연로 원자흡수분광광도계(Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer, Shimadzu, AA-6501S, Japan)로 혈중 카드뮴 함량 측정과 같은 방법으로 분석하였다.

검량선 작성은 calibration법을 이용하였고, 카드뮴 표준용액은 1,000 ppm의 원자흡광분석용 원액을 희석하여 사용하였고, 조직 내 카드뮴 농도는 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 로 표시하였다.

4. 아연의 항상성에 관여하는 유전자 발현에 미치는 영향

1) 총 RNA 추출

마우스 각 장기별로 카드뮴이 아연의 항상성에 관여하는 수종의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간, 신장 및 뇌(hypothalamus, cortex, olfactory bulb 및 cerebellum)를 균질한 후에 RNeasy kit(Qiagen)을 이용하여 조직으로부터 총 RNA를 추출하였다. UV-spectrophotometer로 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정하고, 그 비율로부터 RNA를 정량하였다.

2) 역전사효소 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 및 중합효소연쇄반응(PCR)

1~3 μg 의 RNA를 dithiothreitol, random primers

-MT-I, MT-II 및 ZnT-1(zinc transporter)의 경우에 사용 및 0.2 mM dNTPs 존재하에 Superscript II RT로 역전사시켜 cDNA를 조제하였다.

표적유전자(MT-I, MT-II 및 ZnT-1) 및 대조 유전자(β -actin)에 적합한 primer를 이용하여 cDNA를 증폭시켰다. PCR용 primer로는 MT-I의 경우에 5'-tctcgggaatggacccaactg-3'(sense), 5'-tttacactgttg-gcagcgc-3'(antisense); MT-II의 경우에 5'-cc-atggacccaactgctc-3'(sense), 5'-gcactgtcgggaagcct-ctt-3'(antisense); ZnT-1의 경우에 5'-tgacaatctg-gaagcgggaagacaac-3'(sense), 5'-ggaagcggggtcctcac-atttatg-3'(antisense), β -actin 경우에 5'-aatagtgat-gacctggccgt-3'(sense), 5'-taccacaggcattgtgatgg-3'(antisense)를 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 Ready-to-go PCR bead(Amersham)를 이용하였으며, PCR cycles은 95°C(1 min), 64°C(2 min) 및 72°C(1 min)로 β -actin, MT-I 및 MT-II는 24 cycles, ZnT-1(zinc transporter)은 30 cycles을 사용하였다.

PCR 생성물을 8% polyacrylamide gel 상에서 전기영동하였으며, gel을 ethidium bromide로 염색하였다. Kodak DC40 camera로 사진을 찍어 Kodak's ID photo imaging software를 사용하여 이미지를 분석하였다.

5. 자료 처리

실험자료의 분석은 SPSS 통계프로그램(ver. 11.0)과 Microsoft excel을 이용하였다. 대조군과 실험군의 차이는 t-test로 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 혈중 카드뮴 함량

마우스에 카드뮴 0, 2, 4 및 8 mg/kg을 마우스 복강으로 투여하고 4시간 후에 마우스 혈액 중의 카드뮴 함량을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군에서는 혈중 카드뮴 함량이 $1.5 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{dL}$ 였으며, Cd 8 mg/kg 투여군은 $256.9 \pm 16.7 \mu\text{g}/\text{dL}$ 로서 카드뮴의 투여량에 비례하여 유의하게 증가되었다($p < 0.01$).

혈중 카드뮴 농도가 투여량에 따라 유의하게 증가하였는데 Snyder 등(1975)과 Roels 등(1981)의

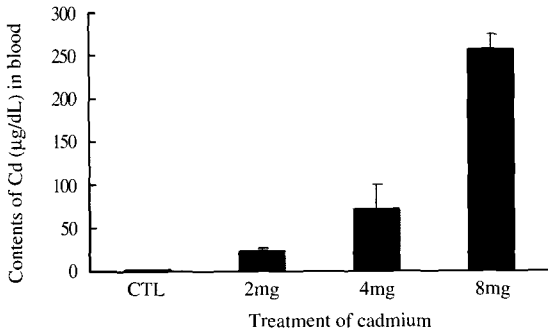


Fig. 1. The contents of cadmium in blood of mouse treated with Cd CTL (0), 2, 4 and 8 mg/kg. The results are expressed as Mean \pm S.D. for an average of three to five experiments.

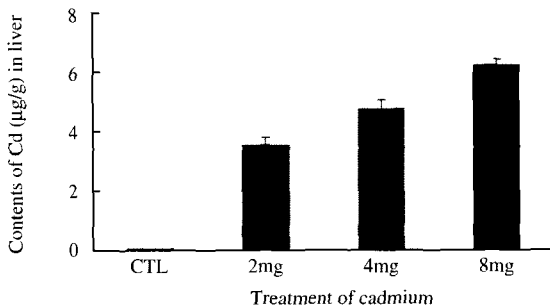


Fig. 2. The contents of cadmium in the liver of mouse treated with Cd CTL (0), 2, 4 and 8 mg/kg. The results are expressed as Mean \pm S.D. for an average of three to five experiments.

연구결과에 의하면 혈액카드뮴의 70%는 적혈구와 결합한 상태로 존재한다고 하였고 혈중 농도의 증가는 최근의 카드뮴 노출에 의한 것이라 하였다. 김판기(1997)의 연구에서 카드뮴 투여 2시간 후부터 혈중 카드뮴 함량이 증가하기 시작하여 4시간 후에 최고 농도에 이르렀다고 보고하고 있다. 하지만 임순혁(1992)의 연구에 의하면 혈액에서의 함량이 일반적으로 투여량에 따라 큰 차이를 보이지 않았다고 보고하여 본 실험결과와 다르게 나타났다.

2. 조직 내의 카드뮴 함량

1) 간의 카드뮴 함량

마우스에 카드뮴 0, 2, 4 및 8 mg/kg을 마우스 복

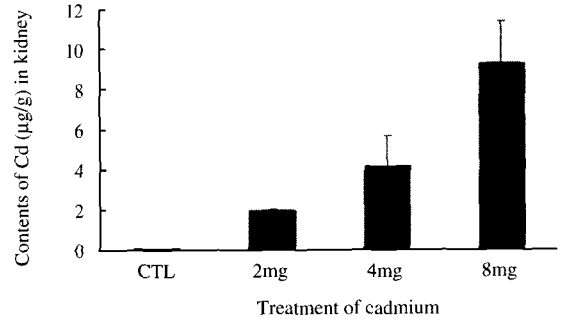


Fig. 3. The contents of cadmium in the kidney of mouse treated with Cd CTL (0), 2, 4 and 8 mg/kg. The results are expressed as Mean \pm S.D. for an average of three to five experiments.

강으로 투여하고 4시간 후에 마우스 간 내의 카드뮴 함량을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 대조군에서는 $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ 이었으며, Cd 8 mg/kg 투여군은 $6.18 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ 으로 카드뮴의 투여량에 비례하여 유의하게 증가되었다 ($p < 0.01$).

2) 신장의 카드뮴 함량

마우스에 카드뮴 0, 2, 4 및 8 mg/kg을 마우스 복강으로 투여하고 4시간 후에 마우스 신장 내의 카드뮴 함량을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 대조군에서는 $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ 이었으며, Cd 8 mg/kg 투여군은 $9.25 \pm 2.06 \mu\text{g/g}$ 으로 카드뮴의 투여량에 비례하여 용량 의존적으로 유의하게 증가되었다 ($p < 0.01$).

카드뮴의 대표적 표적장기로는 급성 중독시 간장과 고환, 만성 중독시 신장으로 알려져 있다(Goyer, 1996; Hammond and Foulkes, 1994). 김남송(1997)의 연구에서는 간장의 카드뮴 농도는 장기간 실험군에 비하여 단기간 실험군에서 높은 농도를 보이고 신장의 카드뮴 농도는 단기간 실험군에 비하여 장기간 실험군에서 높은 농도를 보였다. 흰쥐에 급성으로 카드뮴 중독을 일으킨 이순재(1998)의 연구에서도 간에서는 $87.02 \mu\text{g/g}$ (wet weight), 신장에서는 $25.34 \mu\text{g/g}$ (wet weight) 정도 함량이 높았으며 또 간조직이 신장조직보다 2~3배 정도 높았다. 본 연구에서는 대조군에서 카드뮴 함량이 거의 존재하지 않았고, 카드뮴이 간과 신장에 용량 의존적으로 증가하는 것이 관찰되었다. 하지만, 카드뮴을 복강으로 투여하고 4시간 후에 간과 신장의 카드뮴

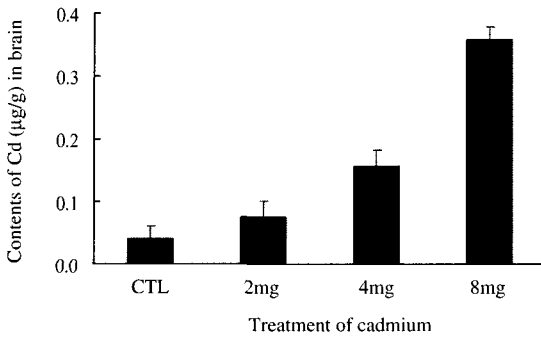


Fig. 4. The contents of cadmium in the brain of mouse treated with Cd CTL(0), 2, 4 and 8mg/kg. The results are expressed as Mean \pm S.D. for an average of three to five experiments.

함량을 비교하였을 때 각각 $6.18 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ 및 $9.25 \pm 2.06 \mu\text{g/g}$ 으로 간과 신장에 비슷한 수준으로 축적되는 것으로 나타났다.

3) 뇌의 카드뮴 함량

마우스에 카드뮴 0, 2, 4 및 8 mg/kg을 마우스 복강으로 투여한 마우스 뇌 내의 카드뮴 함량을 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군에서는 $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ 이었으며, Cd 8 mg/kg 투여군은 $0.36 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ 으로 카드뮴의 투여량에 비례하여 용량 의존적으로 유의하게 증가되었다 ($p < 0.01$).

카드뮴은 아연과 망간과 같은 필수원소와는 달리 중추신경계로 흡수가 잘 되지 않는 것으로 알려져 있다 (Arranz *et al.*, 1984; Arvidson and Tjalve, 1986; Evans and Hastings, 1992). 이것은 혈액-뇌 장벽과 혈액-뇌척수액 (cerebrospinal fluid, CSF) 장벽이 존재하여 카드뮴의 중추신경계로의 이동을 방해하기 때문이다. 그러나 이따이이따이 질환과 카드뮴에 노출된 어린이와 근로자를 대상으로 한 임상연구에서 중추신경계의 이상이 보고되고 있다 (Atsushi *et al.*, 1999). 아직 카드뮴의 중추신경계에 대한 악영향의 작용기전은 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

최근에 고농도의 카드뮴에 급성적으로 노출되거나 저농도에 장기간 노출될 경우에 카드뮴이 산화적 스트레스를 증가시킴으로써 혈액-뇌 장벽 또는 맥락총 (choroid plexus)을 손상시켜 뇌의 카드뮴에 대한 투과성이 변화하는 것으로 보고되고 있다 (Angelo and William, 1989; Shukla *et al.*, 1996). 본

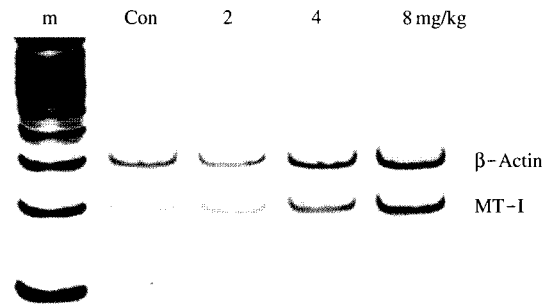


Fig. 5. Effect of cadmium on genes expression in the liver of mouse. Representative gel (negative image) for targets (MT-I) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from the liver of mouse: Con, control (0); 2, 4 and 8 exposed to 2, 4 and 8 mg/kg cadmium earlier.

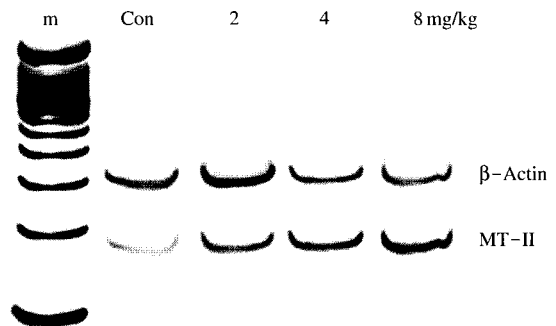


Fig. 6. Effect of cadmium on genes expression in the liver of mouse. Representative gel (negative image) for targets (MT-II) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from the liver of mouse: Con, control (0); 2, 4 and 8 exposed to 2, 4 and 8 mg/kg cadmium earlier.

연구에서 뇌 내의 카드뮴 함량이 용량 의존적으로 유의하게 증가되는 것으로 나타났으며, 이는 본 연구에 사용된 카드뮴이 비교적 고농도이기 때문에 뇌의 투과성을 증가시켜 나타나는 현상으로 판단 된다.

3. 유전자 발현에 미치는 영향

1) 마우스 간에서 MT-I, MT-II 및 ZnT-1의 유전자 발현에 미치는 영향

카드뮴 0, 2, 4, 8 mg/kg을 마우스 복강으로 투여한 후 간에서 RNA를 추출하여 RT-PCR 및 PCR을 통하여 아연의 항상성에 관여하는 MT-I, MT-II 및 ZnT-1의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 카드뮴은 용량 의존적으로 MT-I 및 MT-II의 발현을 증가시켰으나(Figs. 5, 6), 8 mg/kg에서 ZnT-1의 발현은 억제되었다(Fig. 7).

2) 마우스 신장에서 MT-I, MT-II 및 ZnT-1의 유전자 발현에 미치는 영향

카드뮴을 0, 2, 4, 8 mg/kg을 마우스 복강으로 투여한 후 신장에서 RNA를 추출하여 RT-PCR 및 PCR을 통하여 아연의 항상성에 관여하는 MT-I, MT-II 및 ZnT-1의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 카드뮴은 용량 의존적으로 MT-I 및 MT-II의 발현을 증가시켰으나(Figs. 8, 9), 8 mg/kg에서 ZnT-1의 발현은 억제되었다(Fig. 10).

3) 마우스 뇌 (cortex)에서 MT-I 및 ZnT-1의 유전자 발현에 미치는 영향

카드뮴 0, 2, 4, 8 mg/kg을 마우스 복강으로 투여한 후 대뇌피질에서 RNA를 추출하여 RT-PCR 및 PCR을 통하여 아연의 항상성에 관여하는 MT-I 및 ZnT-1의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한

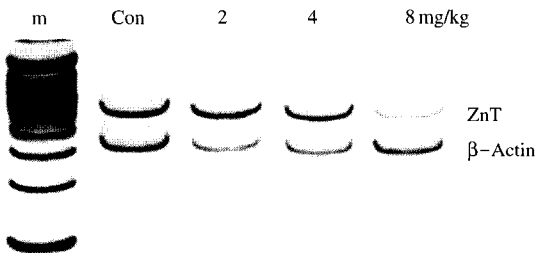


Fig. 7. Effect of cadmium on genes expression in the liver of mouse. Representative gel (negative image) for targets (ZnT-1) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from the liver of mouse: Con, control (0); 2, 4 and 8 exposed to 2, 4 and 8 mg/kg cadmium earlier.

결과 카드뮴은 용량 의존적으로 MT-I의 발현을 증가시켰으나(Fig. 11), 8 mg/kg에서 ZnT-1의 발현은 억제되었다(Fig. 12).

ZnT는 MTs와 동일하게 MTF-1이 promotor

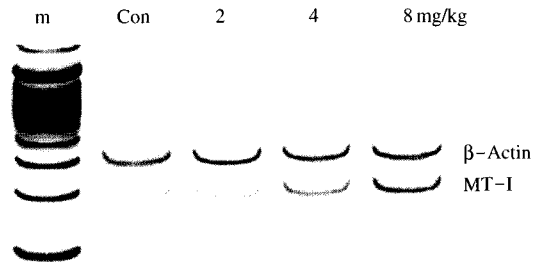


Fig. 8. Effect of cadmium on genes expression in the kidney of mouse. Representative gel (negative image) for targets (MT-I) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from the liver of mouse: Con, control (0); 2, 4 and 8 exposed to 2, 4 and 8 mg/kg cadmium earlier.

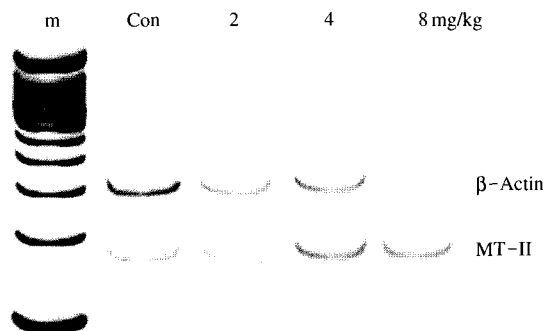


Fig. 9. Effect of cadmium on genes expression in the kidney of mouse. Representative gel (negative image) for targets (MT-II) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from the liver of mouse: Con, control (0); 2, 4 and 8 exposed to 2, 4 and 8 mg/kg cadmium earlier.

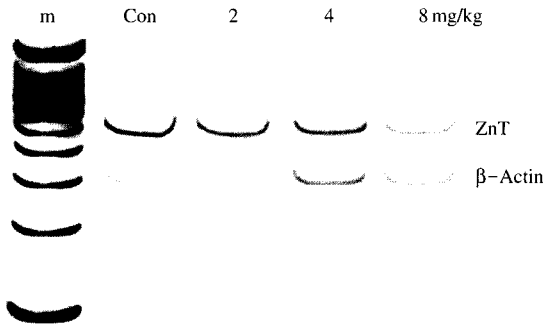


Fig. 10. Effect of cadmium on genes expression in the kidney of mouse. Representative gel (negative image) for targets (ZnT-1) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from the liver of mouse: Con, control (0); 2, 4 and 8 exposed to 2, 4 and 8 mg/kg cadmium earlier.

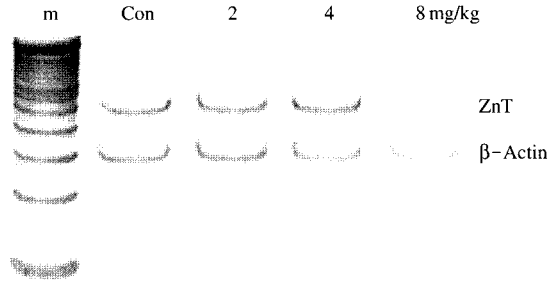


Fig. 12. Effect of cadmium on genes expression in the brain of mouse. Representative gel (negative image) for targets (ZnT-1) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from the liver of mouse: Con, control (0); 2, 4 and 8 exposed to 2, 4 and 8 mg/kg cadmium earlier.

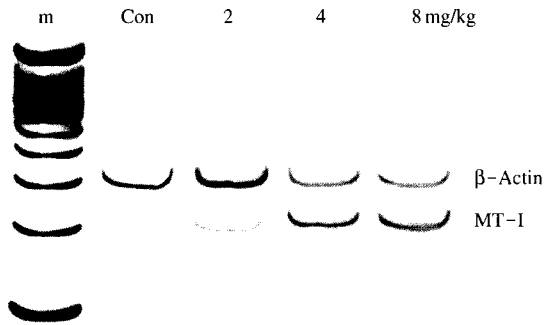


Fig. 11. Effect of cadmium on genes expression in the brain of mouse. Representative gel (negative image) for targets (MT-I) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from the liver of mouse: Con, control (0); 2, 4 and 8 exposed to 2, 4 and 8 mg/kg cadmium earlier.

region에 MREs에 작용함으로써 전사가 조절되는 단백질로서 mucosal-to-serosal surface 아연의 유출자(effluxer) 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다 (McMahon and Cousins, 1998). 최근에 Langmade 등(2000)에 의하면 MTF-1은 MTs와 Zn 유출 단백질인 ZnT-1의 발현을 조절함으로써 세포내 아

연의 농도를 조절한다고 밝혔다. 또한, 그들은 임신 기간 동안 식이 아연결핍은 visceral yolk sac에서 ZnT-1과 MTs를 하향 조절한다고 보고하였다. 본 연구에서 카드뮴을 투여한 마우스의 뇌에 카드뮴의 축적이 증가되는 것으로 나타났으며, 중추신경계로 흡수된 카드뮴으로 인해 대뇌피질에서 MT-I의 발현이 증가되는 것으로 판단된다. 대뇌피질에서의 ZnT-1 발현 감소는 카드뮴에 의하여 발현이 증가된 MT-I 및 MT-II가 아연을 섭취함으로써 세포내 자유 아연의 감소를 초래하고, 결국 아연 유출자인 ZnT-1의 발현이 감소되는 것으로 판단된다. 그러나 간, 신장 등에서 카드뮴은 아연을 대체한다고 보고되고 있기 때문에 세포내 아연의 감소 여부는 향후 연구되어야 할 부분이다.

결론

본 연구에서는 마우스에 카드뮴을 투여하고 4시간 후에 혈중 및 조직(간, 신장 및 뇌) 중의 카드뮴 함량을 측정하고, 뇌(대뇌피질, 시상하부, 소뇌 및 신경구)에서 MT-I 및 MT-II의 발현에 미치는 영향을 관찰함으로써 카드뮴의 중추신경계에 대한 독성작용 기전을 규명하고자 실험을 진행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈중 카드뮴 함량 분석 결과, 카드뮴 0, 2, 4 및 8 mg/kg을 마우스 복강으로 투여한 마우스 혈액 중의 카드뮴 함량을 측정된 결과 대조군에서는 혈중 카드뮴 함량이 $1.5 \pm 0.8 \mu\text{g/dL}$ 였으며, Cd 8 mg/kg 투여군은 $256.9 \pm 16.7 \mu\text{g/dL}$ 로 카드뮴의 투여량에 비례하여 유의하게 증가하였다 ($p < 0.01$).

2. 카드뮴 0, 2, 4 및 8 mg/kg을 복강으로 투여한 후 마우스 간, 신장 및 뇌 내의 카드뮴 함량을 측정된 결과 대조군에서는 각각 $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g/dL}$, $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g/dL}$ 및 $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g/dL}$ 로 거의 존재하지 않았다. Cd 8mg/kg 투여군에서 간, 신장 및 뇌에서의 카드뮴 함량은 각각 $6.18 \pm 0.20 \mu\text{g/dL}$, $9.25 \pm 2.06 \mu\text{g/dL}$ 및 $0.36 \pm 0.02 \mu\text{g/dL}$ 로 카드뮴의 투여량에 비례하여 용량 의존적으로 유의하게 증가하였다 (각각 $p < 0.01$). 간과 신장은 카드뮴의 주된 축적기관으로 알려져 있는데 본 연구에서도 카드뮴이 용량 의존적으로 간과 신장에 축적되는 것으로 관찰되었다.

3. 카드뮴 0, 2, 4, 8 mg/kg을 마우스 복강 내로 투여한 후 조직 (간, 신장)에서 RNA를 추출하여 RT-PCR 및 PCR을 통하여 아연의 항상성에 관여하는 MT-I, MT-II 및 ZnT-1의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 카드뮴은 간과 신장에서 용량 의존적으로 MT-I 및 MT-II의 발현을 증가시켰으나 ZnT-1의 발현은 억제되었다 ($p < 0.01$).

4. 카드뮴을 0, 2, 4, 8 mg/kg을 마우스 복강 내로 투여한 후 뇌에서 RNA를 추출하여 RT-PCR 및 PCR을 통하여 아연의 항상성에 관여하는 MT-I 및 ZnT-1의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 카드뮴은 용량 의존적으로 MT-I의 발현을 유의하게 증가시켰으나 ZnT-1의 발현은 억제되었다 ($p < 0.01$).

이상의 결과에서 카드뮴은 뇌에서 아연의 항상성을 교란함으로써 중추신경계 독성을 나타낼 수 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2003학년도 순천향대학교 기초과학연구소 학술연구조성비 일반연구과제로 지원받아 수행하였으며, 연구 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

- 김남승. 전처치 기간에 따른 흰쥐의 조직내 카드뮴 및 metallothionein 생성에 관한 연구. *Korean J Toxicol* 1997; 13(1-2): 103-110.
- 김판기. 카드뮴이 랫드에 미치는 독성학적 변화에 관한 연구. 용인대학교 논문집 1997; 13: 507-510.
- 박종안, 오혜정, 이종화. 흑연로 원자흡수분광법에 의한 혈액 중 카드뮴 정량 분석. *한국산업위생학회지* 1996; 6(2): 301-312.
- 이순재. 급성 카드뮴 중독 흰쥐 간조직에서의 유리기 생성계의 활성화와 조직손상. *대구효성카톨릭대학교 석사학위논문집* 1998; 58: 240-242.
- 임순혁. Cadmium 투여에 의한 흰쥐의 간, 신장 및 혈액에서의 축적에 관한 연구. *청주대학교 석사학위논문*: 1992. pp. 5-6.
- Abuja PM and Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306(1-2): 1-7.
- Adams JD Jr, Klaidman LK, Chang ML and Yang J. Brain oxidative stress-analytical chemistry and thermodynamics of glutathione and NADPH. *Curr Top Med Chem* 2001; 1(6): 473-482.
- Angelo A Valois and William S Webster. The choroid plexus as a target site for cadmium toxicity following chronic exposure in the adult mouse. An ultrastructural study. *Toxicology* 1989; 55(1-2): 193-205.
- Arlt S, Kontush A, Muller-Thomsen T and Beisiegel U. Lipid peroxidation as a common pathomechanism in coronary heart disease and Alzheimer's disease. *Gerontol Geriatr* 2001; 34(6): 461-465.
- Arranz MA, Perez MI, Saiz-Vadillo MC, Basagoiti I, Katarneh SM, Ribas B and Cadorniga R. Pharmacokinetics of cadmium-109 in blood and brain structure of the rat. *Rev Esp* 1984; 40(3): 365-370.
- Arvidson B and Tjalve H. Distribution of 109Cd in the nervous system of rats after intravenous injection. *Acta Neuropathol (Berl)* 1986; 69(1-2): 111-116.
- Atsushi Takeda, Sachiyo Takefuta, Hiromi Ijiri, Shoji Okada and Naoto Oku. 109Cd transport in rat brain. *Brain Research Bulletin* 1999; 49(6): 453-457.
- Berg JW and Burbank F. Correlation between carcinogenic trace metals in water supplies and cancer mortality. *Ann N.Y Acad Sci.*; 1972. pp. 249-262.
- Cantilena LR and Klaassen CD. Comparison of the effectiveness of several chelators after single administration on the toxicity, distribution and excretion of cadmium.

- Toxicol Appl Pharmacol 1981; 58: 452-460.
- Choudhuri S, McKim JM Jr and Klaassen CD. Differential expression of the metallothionein gene in liver and brain of mice and rats. *Toxicol appl Pharmacol* 1993; 119: 1-10.
- Clausen J and Rastogi SC. Heavy metal pollution among autoworkers, lead. *Bri J Ind med* 1977; 34: 208-215.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC and Rofe AM. Metallothionein: The multipurpose protein. *CMLS Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 627-647.
- Cuthbert OS. Metallothionein in human disease. *Cellular and Molecular Biology* 2000; 46 (2): 465-488.
- Deaven LL and Campbell EW. Factors affecting the induction of chromosomal aberrations by cadmium in Chinese hamster cells. *Cytogenet Cell Genet* 1980; 26: 251-260.
- Dudley RE, Svovoda DJ and Klaassen CD. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 65: 302-313.
- Evans J and Hastings L. Accumulation of Cd(II) in the CNS depending on the route of administration: intraperitoneal, intratracheal, or intranasal. *Fundam Appl Toxicol* Aug 1992; 19(2): 275-278.
- Faeder EJ, Chanet SQ and King LC. Biochemical and ultrastructural changes in livers of cadmium treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1977; 39: 473-483.
- Figueiredo-Pereira ME and Cohen G. The ubiquitin/ proteasome pathway: friend or foe in zinc-, cadmium-, and H₂O₂-induced neuronal oxidative stress. *Mol Biol Rep* 1999; 26 (1-2): 65-69.
- Glabe C. Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *Mol Neurosci* 2001; 17(2): 137-145.
- Goyer RA. Toxic effects of metals. In: Klassen CD, Amdur MO and Doull J (eds.), *Casarett and Doull's Toxicology*, 5th Ed., Macmillan Publishing Co., New York; 1996. pp. 699-702.
- Grundman M. Vitamin E and Alzheimer disease: The basis for additional clinical trials. *Clin Nutr* 2000; 71(2): 630-636.
- Hammond PB and Foulkes EC. Metal ion toxicity in man and animals. In: Siegel, H.(ed.), *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, New York 1994; 20: 177-182.
- Kägi JHR and Schaffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 1988; 27: 8509-8515.
- Kanski J, Varadarajan S, Aksenova M and Butterfield DA. Role of glycine-33 and methionine-35 in Alzheimer's amyloid beta-peptide 1-42-associated oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1586 (2): 190-198.
- Karelson E, Bogdanovic N, Garlind A, Winblad B, Zilmer K, Kullisaar T, Vihalemm T, Kairane C and Zilmer M. The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res* 2001; 26 (4): 353-361.
- Kazantzis G. Renal tubular dysfunction and abnormalities of calcium metabolism in cadmium workers. *Environ Health Perspect* 1979; 28: 155.
- Keen CL and Hurley LS. Zinc and reproduction: Effects of deficiency on fetal and postnatal development, in *Zinc and Human Biology*. Springer-Verlag London; 1989. pp. 183-200.
- Kolonel L and Winkelstein W Jr. Cadmium and prostatic carcinoma. *Lancet* 1977; 2: 566-567.
- Kumar R, Agarwal A and Seth PK. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol Letters* 1996; 89: 65-69.
- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ and Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem* 2000; 275: 34803-34809.
- Lui E, Fisman M, Woung C and Diaz F. Metals and the liver in Alzheimer's disease. An investigation of hepatic zinc, copper, cadmium, and metallothionein. *Am Geriatr Soc* 1990; 38 (6): 633-639.
- Malcolm D. Cadmium as a carcinogen. In: *Cadmium toxicity*. Mennear JH.; 1979. pp. 173-180.
- Math PC and Gordon JL. Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease* 1997; 4: 137-169.
- McMahon RJ and Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 4841-4846.
- O'Riordan ML, Hughes EG and Evans HJ. Chromosome studies on blood lymphocytes of men occupationally exposed to cadmium. *Mutat Res* 1978; 58: 305-311.
- Palmitier RD, Findley SD, Whitmore TE and Durnam DM. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 6333-6337.
- Panayi Ae, Spyrou NM, Iversen BS, White MA and Part P. Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Neurol Sci* 2002; 195 (1): 1-10.
- Pitchumoni SS, Doraiswamy PM. Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's Disease. *Am Geriatr Soc* 1998; 46 (12): 1566-1572.

- Risso-de Favorney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B and Rahmani R. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocyte through generation of reactive oxygen species. *Aquat Toxicol* 2001; 53 (1): 65-76.
- Roels HA, Lauwery RR, Buchet JP, Bernard A, Chettle DR, Harrey TC and Al-Haddad IK. In vivo measurement of liver and kidney cadmium in workers exposed to this metal: Its significance with respect to cadmium in blood and urine. *Environ Res* 1981; 26: 217-240.
- Schrauzer GN, White DA and Schneider CJ. Cancer mortality correlation studies. IV. Associations with dietary intakes and blood levels of certain trace elements, notably Se-antagonists. *Bioinorg Chem* 1972; 7: 35-36.
- Sendelbach LE and Klaassen CD. Kidney synthesizes less metallothionein than liver in response to cadmium chloride and cadmium metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 92: 95-102.
- Shaikh ZA and Lucis UJ. Cadmium and zinc binding in mammalian liver and kidneys. *Arch Environ health* 1972; 24: 419-425.
- Shukla A, Shukla GS and Srimal RC. Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Human & Experimental Toxicology* 1996; 15 (5): 400-405.
- Snyder WS, Cook MJ, Nasset ES, Karhausen LR, Howells GP and Tipton IH. International Commission on Radiological Protection. Report of the task group on reference man. New York. ICRP Publication 23.; 1975.
- Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, Kaminska T, Sniezko R, Paduch R, Abramczyk D, Filar J and Kanfer-Szerszen M. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species production in cell cultures. *Toxicology* 2000; 145 (2-3): 159-171.
- Taubeneck MW, Daston GP, Rogers JM and Keen CL. Altered maternal zinc metabolism following exposure to diverse developmental toxicants. *Repro Toxicol* 1994; 8: 25-40.
- Taubeneck MW, Daston GP, Rogers JM, Gershwin ME, Ansari A and Keen CL. Tumor necrosis factor-alpha alters maternal and embryonic zinc metabolism and is developmentally toxic in mice. *J Nutr* 1995; 125: 908-919.
- Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y and Tomonaga M. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991; 7: 337-347.
- Webster WS. Cadmium induced fetal growth retardation in the mouse. *Arch Environ Health* 1978; 32: 16-22.
- WHO (World Health Organization). Cadmium-environmental aspects. *Environmental Health Criteria* 135.; 1992.
- Wong KL and Klaassen CD. Tissue retention of cadmium in rats during postnatal development. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 53: 343-353.
- Wong KL and Klaassen CD. Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 63: 330-337.
- Wren CD, Harris S and Harttrup N. Ecotoxicology of mercury and cadmium. In: *Handbook of ecotoxicology*. Hoffman DS, Rattner BA, Burton GA, Jr and J caims, Jr (Eds.), CRC Press, Boca Raton.; 1995. pp. 392-423.