J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
28(6), 1355~1363(1999)

한국식품영양과학회지

식이 Vitamin E가 급성 카드뮴중독 흰쥐 간조직의 Cytochrome P_{450} 함량과 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향

김관유 · 채영미* · 이순재*

안산공과대학 식품공업과

*대구효성가톨릭대학교 식품영양학과

Effects of Vitamin E on Liver Cytochrome P_{450} Content and Xanthine Oxidase Activity in Acute Cadmium-Poisoned Rats

Kwan-Ryu Kim, Young-Mi Chai* and Soon-Jae Rhee*

Dept. of Food Engineering, Ansan Technical College, Kyungki-Do 425-792, Korea
**Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyongsan 712-702, Korea*

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of vitamin E on liver microsomal cytochrome P_{450} contents and xanthine oxidase activity in acute cadmium-poisoned rats. Sprague-Dawley male rats weighing 100±10g were randomly assigned to one normal and three cadmium injected groups. Cadmium injected groups were fed vitamin E free diet(0E-Cd group), 40mg vitamin E per kg diet(40E-Cd group) or 400mg vitamin E per kg diet(400E-Cd group). Vitamin E level of normal group was 40mg per kg diet. Animals were injected intraperitoneally with 2.0mg Cd^{2+}/kg bw for 4 days after the rats were fed diets with three different levels of vitamin E for 2 and 4 weeks. Body weight, food intake and feed efficiency ratio of cadmium injected animals, were decreased compared with those of normal group. The weights of liver and kidney in cadmium injected groups were not different from those of normal group. Cadmium contents of liver in cadmium groups were 160-fold higher those that of normal group. Accumulation of cadmium poisoned rat liver was reduced by vitamin E supplementation. Contents of blood hemoglobin and hematocrit in 0E-Cd groups were decreased to 2~14% of those of the other groups. Contents of serum triglyceride in all experimental groups were not significantly different each other. Levels of serum total cholesterol, LDL-cholesterol and antherogenic index in 0E-Cd and 40E-Cd groups were higher than those of normal group, while the contents of HDL-cholesterol in 0E-Cd and 40E-Cd groups were lower than those of normal group. Xanthine oxidase(XOD) activity and cytochrome P_{450} contents in the liver were significantly increased in cadmium injected groups but these were reduced by vitamin E supplementations. The present results indicate that acute cadmium poisoning in rats causes increasing free radical generation systems in the liver and that leads to liver tissue damage. But these abnormalities can be reduced by dietary vitamin E supplementations.

Key words: vitamin E, acute cadmium-poisoned rat, free radical, cytochrome P_{450}, xanthine oxidase

서 론

과학 문명의 발달은 우리에게 많은 편의성을 제공해준 반면 그로 인한 환경오염의 문제는 날로 심화되고 있다. 그 중에서도 카드뮴, 비소, 납, 수은 등과 같은 중금속 화합물에 의한 환경오염은 국민보건을 직·간접적으로 위협함으로 심각한 사회문제로 제기되고 있다(1).

카드뮴은 출생 시에는 인체 내에 존재하지 않으나 출생후 생활을 통하여 축적된다. 카드뮴은 오염된 식품을 통하여 경구적으로 흡수될 뿐만 아니라 흡연 또는 오염된 대기의 호흡을 통하여서도 체내에 이행된다. 흡수된 카드뮴은 비록 미량일지라도 생물학적 반감기가 매우 길기 때문에 체내 축적성이 있으며 간장과 신장이 주된 축적부위로 알려져 있다(2-4).

지금까지 카드뮴의 중독현상에 대하여 많은 연구가 수행되어 왔다(5-11). Artiguez 등(5)과 Ikeda 등(6)은 체내 카드뮴의 축적량이 많아지게 되면 체내 임계 농도에서 신장기능 부전과 조직 손상이 오고 그 첫 신호로서 단백뇨와 함께 β_2-microglobulin, retinol-binding protein과 immunoglobulin 등 저분자 단백질의 배설이 증가하는 것으

†To whom all correspondence should be addressed

로 보고하였다. 또한 카드뮴은 칼슘의 흡수를 방해하여 혈액내 칼슘 농도를 저하시키고 뼈 조직내 칼슘 양을 감소시키며 뇨와 변으로의 칼슘 배설량을 증가시키는 등 칼슘 대사에 지장을 주어 골 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다. 특히 임신 및 수유로 인해 체내 칼슘 보유량이 감소된 여성이나 영양불량상태의 사람에게서 카드뮴 중독 위험이 증가된다고 한다(7). 또한 급성 카드뮴 중독으로서는 카드뮴으로 도금한 깡통에 든 음식을 먹고 중독을 일으킨(8) 예와 같이 일반인에게도 일어날 가능성이 있고 특히, 산업장에서 흔히 볼 수가 있다. 이러한 급성 중독때에는 간, 위장과 중추신경, 고환등 장기의 기능장애 내지는 조직손상을 초래하는 것으로 밝혀졌다.

최근 이러한 임상적 증상의 원인규명을 위한 영양 생화학적 실험의 일환으로 Rhee 등(12)이 흰쥐에 카드뮴을 투여하였을 때 혈청 GOT, GPT, AL-pase 활성 증가 등 간조직의 과산화적 손상이 초래되었으며 또 전보(13)에서 급성 카드뮴 중독에서 항산화계가 약화되는 것을 관찰하였다.

이러한 보고들을 종합해 볼 때 카드뮴은 free radical을 생성하여 생체막 지질을 과산화시킬 수 있으며 지질 과산화물의 증가는 여러조직을 손상시키므로서 각종 효소 활성이나 조직손상으로 대사장애를 초래케한다고 볼 수 있다. 그러므로 카드뮴 중독일 때 이러한 산화적 손상을 일으키는 원인물질인 free radical을 발생시키는 free radical 생성계의 활성변화와 이에 대한 완화물질과의 관련 연구가 필요하나 아직까지 이에 대한 구체적인 연구는 결여되어있다.

한편 카드뮴의 임상적 중독 증상이 동물 체내 영양상태와 관련이 깊은 것으로 여러 연구보고에서 입증되었다(14-18). 카드뮴독성에 대한 해독과 영양물질과의 관련 연구로는 Kim과 Baek(14)은 식이 중에 칼슘수준을 높였을 때, Lee와 Kim(15)은 고단백식이(40% protein)군에서 Cho 등(16)은 칼슘과 비타민 수준을 높였을 때 Yang 등(17)은 알긴산을 공급했을 때 각각 카드뮴 중독이 완화되거나 체내 카드뮴 축적 양을 낮출 수 있는 것으로 발표하였으며, Kim 등(18)은 흰쥐의 혈청과 간 조직의 지질성분에 미치는 비타민 E와 단백질과의 관계를 보고함으로서 여러 가지 영양소가 카드뮴 독성 완화에 기여함을 증명하였다.

또 Rhee(19)의 연구에서 급성 카드뮴 중독에서는 항산화계가 저하되어 뇌조직의 손상이 초래되었으나 식이 비타민 E의 다량 공급으로 항산화계가 강화되고 간조직 손상이 완화됨을 관찰하였다. 또한 Park 등(20)의 연구에서 식이 비타민 E에 의해 당뇨쥐 간조직의 MFO계의 활성이 약화되고 조직손상이 완화됨이 관찰되었다.

따라서 본 연구에서는 급성 카드뮴 중독에서 free radical생성계 활성변화에 미치는 비타민 E의 영향을 관찰코져 흰쥐를 대상으로 식이 vitamin E 함량을 달리하여 일정기간 사육한 후 급성으로 카드뮴을 중독시킨 후 간조직의 microsomal cytochrome P_{450}과 xanthine oxidase 활성을 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물의 사육

실험동물은 체중 100g 내외의 Sprague-Dawley종 수컷을 구입하여 일주일간 예비 사육한 후, 난괴법에 의해 Table 1과 같이 대조군과 카드뮴 투여군으로 나눈 후, 카드뮴 투여군을 다시 식이 내의 비타민 E의 급여수준에 따라 비타민 E를 급여하지 않은 군(0E-Cd), 정상수준(40 mg/kg diet)으로 급여한 군(40E-Cd), 비타민 E를 다량 급여한 군(400E-Cd)등 각 10마리씩 4군으로 나누어 각각 2주 및 4주간 사육하였다. 비타민 E는 사료에 첨가하여 급여하였고 카드뮴은 식이 급여 2주 및 4주후에 LD_{50}의 약 1/2 수준이 되도록 체중 kg당 2.0mg(LD_{50}=5.5mg/kg bw)을 하루에 한 번씩 일정시간에 4일간 투여하였고 마지막 투여 후 24시간 뒤에 쥐를 희생시켰다.

기본 사료 조성은 Table 2와 같고 먹이는 자유로이 섭취케 하였다. 실험기간 동안 체중을 매일 측정하고 체중증가율 및 식이효율을 계산하였다. 사육실의 온도는 22±10°C였고, 습도는 50±10°C였다.

사료섭취량, 체중증가량 및 식이효율

Applegate 등(21)의 방법에 따라 사료와 식수 섭취량 및 체중은 전 실험기간을 통하여 매일 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율은 전 체중증가량을 같은 기간 동안의 사료섭취량으로 나누어줌으로써 계산하였다.

간장 및 신장의 카드뮴 함량

간장 및 신장 중의 카드뮴 함량은 AOAC법(22)에 준하여 측정하였다. 즉, 시료의 일정량을 취하여 500°C muffle furnace에서 건식 회화한 회분을 10%의 HCl로 녹인 후 건조시켜 5%의 HNO_3으로 녹여낸 것을 AAS(automic absorption spectrometer-unicam 929)로 228.8nm에서

Table 1. Classification of experimental groups

Groups	Cd[1)]	Vitamin E[2)]
	(2.0mg Cd^{2+}/kg bw)	(mg/kg diet)
Normal	-	40
0E-Cd	+	0
40E-Cd	+	40
400E-Cd	+	400

[1)]Cadmium dichloride($CdCl_2$ 2½ H_2O)
Rats were injected intraperitoneally with 2.0mg Cd^{2+}/kg bw once a day for 4 days and sacrificed after 24hrs from the last injection of cadmium.
[2)]Vitamin E: dl-α-tocopherylacetate

Table 2. Composition of experimental diet

Ingredients	Amount(g/kg diet)
Corn starch[1)]	660
Casein[2)]	180
DL-Methionine[3)]	2
Corn oil[4)]	50
Salt mixture[5)]	40
Vitamin mixture[6)](V-E free)	10
Cellulose[7)]	50
kcal/kg	3850

[1)]Pung Jin Chem. Co.
[2)]Lactic Casein, 30 mesh, New Zealand Dairy Board, Wington, N. Z.
[3)]Sigma Chem. Co.
[4)]Dong Bang Oil Co.
[5)]Salt mixture: according to Haper's
g per 100g of salt mixture; $CaCO_3$ 30.0g, $CaHPO_4$ 7.5g, K_2HPO_4 32.2g, NaCl 16.7g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10.2g, ferric citrate 2.75g, $MnSO_4$ 0.51g, KI 70mg, $CuCl_2 \cdot 5H_2O$ 35mg, $ZnCl_2$ 25mg, $CoCl_2 \cdot 5H_2O$ 5mg, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 5mg
[6)]Vitamin E free mixture: according to NRC
[7)]Sigma Chem. Co.
CMC(Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber)

측정하였다.

헤모글로빈과 헤마토크리트치 측정

헤모글로빈은 cyanmethemoglobin법(23)으로 측정하였다. 즉, cyanide solution{0.1% $NaHCO_3$, 0.77mM KCN, 0.6mM $K_3Fe(CN)_6$} 5ml에 0.02ml의 혈액을 가하고 잘 혼합한 다음 spectrophotometer를 사용하여 540nm에서 비색 정량하였다.

헤마토크리트치는 혈액을 채취한 후 heparin으로 처리된 모세관법으로 ⅔정도 채운 다음 micro capillary centrifuge를 사용하여 11,000 rpm에서 5분간 원심분리시킨 후 packed red cell volume의 백분율을 측정하였다.

혈청중의 지질함량 측정

실험종료 후 채혈하여 혈청을 분리하여 지질함량측정에 사용하였다. 혈청중의 중성지질 함량 및 총콜레스테롤과 HDL-cholesterol은 미국 Sigma사의 enzymatic reagent kit를 사용하여 비색정량을 하였고, 이 측정치로부터 LDL-cholesterol은 Friedewald식{total cholesterol-(HLI cholesterol+TG/5)}에 의하여 계산하고(24), atherogenic index는 문헌에 따라 {(total cholesterol-HDL cholesterol)/HDL cholesterol} 식으로 산출하였다.

간조직중의 xanthine oxidase(XOD) 활성

간조직의 XOD 활성도 측정은 xanthine을 기질로 하여 30°C에서 10분간 반응시켜 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하는 Stripe와 Della Corte(25)의 방법을 이용하였다. 활성도 단위는 간조직의 단백질 1mg이 1분 동안 반응하여 기질로부터 생성된 uric acid량을 nmole 농도로 표시하였다.

간조직의 cytochrome P450 함량

간조직의 microsome cytochrome P_{450} 함량은 Omura와 Sato(26)의 방법으로 환원형 일산화탄소 결합물을 450 nm와 490nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. 즉, 냉동 보관한 microsome용액을 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)로 희석시켜 1mg/ml의 단백질 농도로 만든 다음 sodium dithionite를 넣고 CO gas로 bubbling시킨 후 450 nm와 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때의 molar extinction coefficient는 $91mM^{-1}cm^{-1}$로 하였다.

혈청 glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase(GPT)의 활성 측정

혈청 GOT와 GPT 활성도는 Reitman과 Frankel(27)의 방법을 응용한 아산제약의 GOT, GPT 측정용 kit를 사용하여 측정하였다. 즉 GOT기질로써 alanine, α-ketoglutaric acid 용액에 각각 혈청을 가하여 37°C에서 1분간 효소반응시키고 이때 생성된 각 oxaloacetic acid, pyruvic acid 생성물에 2,4-dinitrophenyl hydrazine color reagent를 가하여 hydrazone을 만든 다음 알칼리를 넣어 발색되는 적갈색을 505nm에서 비색 정량하였다.

통계처리

모든 실험 결과에 대한 통계 처리는 각 실험군별로 평균차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석을 수행하였으며, 분산분석 결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's HSD test에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

체중증가, 사료섭취량, 식이효율 측정

체중증가량, 사료섭취량 및 식이효율을 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 전 실험기간 동안 체중변화는 Fig. 1과 같다. 카드뮴을 투여하기전 4주 동안에는 대조군과 실험군 모두 유의적 차이가 없었다. 카드뮴을 4일간 급성으로 투여한 후에는 카드뮴을 투여하지 않은 대조군은 20g이 증가되었으나 카드뮴을 투여하고 비타민 E를 공급하지 않은 실험군인 0E-Cd군은 33.5g(20%)이 감소되었으며 비타민 E를 40mg 공급한 40E-Cd군과 400mg을 공급한 400E-Cd군은 24.2g(13%) 및 11.4g(6%)이 각각 유의적으로 감소되었다($p<0.05$).

사료섭취량과 식이효율도 체중증가와 같은 경향으로 카드뮴 투여후 감소되었고 특히 비타민 E가 부족한 경우 더 현저하게 감소되었다.

Table 3. Effects of vitamin E on changes in body weight gains, food intakes and feed efficiency in cadmium administered rats

Groups	Body weight gain(g)	Food intake(g)	Food efficiency
		During 4 wks before Cd injection	
Normal	196.20± 9.12[1)NS]	21.51±2.10[NS3)]	0.21±0.02[NS]
0E	171.12±12.13	16.49±1.92	0.19±0.03
40E	189.10± 9.12	16.11±2.11	0.19±0.03
400E	196.28± 6.15	17.44±2.55	0.22±0.03
		During 4 days after Cd injection	
Normal	20.4±0.64[a2)]	21.91±0.84[a]	0.23±0.02[a]
0E-Cd	-33.5±0.58[b]	8.52±2.36[b]	-0.99±0.04[b]
40E-Cd	-24.2±1.26[c]	6.50±2.87[b]	-0.93±0.04[b]
400E-Cd	-11.4±1.29[d]	5.92±1.81[b]	-0.48±0.03[c]

[1)]All values are mean±SE (n=10).
[2)]Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.
[3)]Not significant

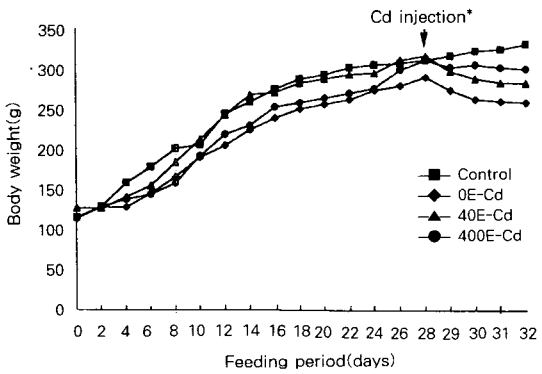

Fig. 1. Changes of body weight of experimental rats during 4 weeks.
Normal : Cd no treatment vitamin E diet (40mg/kg diet)
0E-Cd : Cd injection after vitamin E free diet
40E-Cd : Cd injection after vitamin E supplementation (40mg/kg diet)
400E-Cd : Cd injection after vitamin E supplementation(400mg/kg diet)
*$CdCl_2$ 2½ H_2O : Rats were injected intraperitoneally with 2.0mg Cd^{2+}/kg bw once a day for 4 days and sacrificed after 24hrs from the last injection of cadmium.

간장 및 신장의 무게

실험 4주간에서의 간의 무게는 대조군에 비하여 0E-Cd군은 10%, 40E-Cd군은 12%, 400E-Cd군은 14%씩 증가 되었으나 유의적 차이는 없었다(Table 4).

간장 및 신장조직중의 카드뮴 함량 변화

간장 및 신장조직의 카드뮴 함량 변화는 Table 5와 같다. 간장조직 중 카드뮴 함량은 대조군에서는 거의 존재하지 않으나 4주 사육후 카드뮴을 투여한 실험군에서는 대조군보다 0E-Cd군에서는 188배, 40E-Cd군에서는 189배, 400E-Cd군에서는 157배의 높은 축적량을 보였다. 실험군간에는 400E-Cd군은 다른 카드뮴 중독군에 비해 감소되었다($p<0.05$). 신장조직 중의 카드뮴 함량은 간조직 중의 축적량에 비해 훨씬 낮았으며 비타민 E의 영향은 다소 있었으나 유의적인 수준은 아니었다. 이와 같이 비타민 E는 급성 카드뮴 중독시 간조직에서 카드뮴 축적을 감소시켰으나 신장조직에서는 영향이 간조직에 비해 낮았다.

Table 4. Effects of vitamin E on changes of liver and kidney weights of cadmium administered rats
(g/100g bw)

Groups	Liver	Kidney
Normal	3.05±0.19[1)NS2)]	0.63±0.04[NS]
0E-Cd	3.36±0.11	0.66±0.03
40E-Cd	3.42±0.14	0.66±0.03
400E-Cd	3.49±0.18	0.67±0.02

[1)]All values are mean±SE (n=10).
[2)]Not significant

Table 5. Effects of vitamin E on cadmium contents of liver and kidney in cadmium administered rats
(μg/g wet weight)

Groups	Liver	Kidney
Normal	0.46±0.18[1)a2)]	0.22±0.05[a]
0E-Cd	86.68±6.35[b]	24.62±1.40[b]
40E-Cd	87.02±5.87[b]	25.34±1.34[b]
400E-Cd	72.32±3.73[c]	20.76±1.66[b]

[1)]All values are mean±SE (n=10).
[2)]Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

헤모글로빈과 헤마토크리트치

실험 2주간과 4주간의 헤모글로빈과 헤마토크리트치의 변화는 Table 6과 같다. 헤모글로빈은 2주 사육 흰쥐에서는 대조군에 비해 0E- Cd군은 2주와 4주에서 모두 감소되었으나 다른 실험군은 차이가 없었다. 또한 헤마토크리트값은 대조군에 비해 2주에서는 카드뮴 투여군 모두가 감소되었으며 4주에서는 0E-Cd군만 감소되었다. 이와 같이 빈혈의 척도로 알려진 헤모글로빈과 헤마토크리트값은 비타민 E를 공급하지 않은 0E-Cd군에서 유의적인 감소를 보였다($p<0.05$).

Table 6. Effects of vitamin E on hemoglobin and hematocrit contents of cadmium administered rats

Groups	2 weeks	4 weeks
	Hemoglobin(g/dl blood)	
Normal	13.62±0.27[1)a2)]	13.57±0.60[a]
0E-Cd	11.77±0.29[b]	11.64±0.36[b]
40E-Cd	13.31±0.26[a]	12.97±0.36[a]
400E-Cd	13.11±0.38[a]	13.30±0.25[a]
	Hemotocrit(%)	
Normal	44.68±0.18[a]	45.24±0.70[a]
0E-Cd	39.88±2.43[b]	38.00±1.79[b]
40E-Cd	41.21±1.37[b]	42.60±1.45[a]
400E-Cd	43.25±0.69[b]	44.42±1.24[a]

[1)]All values are mean±SE (n=10).
[2)]Values within a column with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

혈청중의 지질함량변화

혈청 중성지방 함량(Table 7)은 대조군과 실험군 사이에 유의적 차이가 없었다. 총 콜레스테롤 함량은 대조군에 비해 0E-Cd군과 40E-Cd군은 대조군에 비해 유의적인 증가를 보였으나($p<0.05$) 400E-Cd군은 감소하는 경향이었지만 유의성은 없었다. LDL-cholesterol은 대조군에 비하여 0E-Cd군과 40E-Cd군이 유의적으로 증가되었으나 반면에 HDL-cholesterol은 대조군보다 400E-Cd군을 제외한 모든 실험군에서 유의적으로 감소되었다($p<0.05$). 동맥경화 발병 지표인 동맥경화지수(atherogenic index)는 대조군에 비해 0E-Cd군, 40E-Cd군은 66%, 55% 증가되었으나 400E-Cd군은 대조군에 가까운 수준이었다. 이와 같이 카드뮴 중독에서는 콜레스테롤 대사이상과 동맥경화 지수의 증가를 볼 수 있었다.

간조직중의 free radical 생성계

Xanthine oxidase(XOD) 활성

Xanthine을 기질로 하여 요산을 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소로 알려진 XOD의 활성을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 40E-Cd군은 대조군에 비해 그 활성이 2주에는 84%, 4주에는 65% 증가되었으며 특히 비타민 E가 결핍된 0E-Cd군은 대조군보다 2주에서는 149%, 4주는 95% 현저하게 증가되어 superoxide radical 효소계가 촉진되는 것을 알 수 있었다. 그러나 비타민 E를 다량 공급한 400E-Cd군에서는 대조군에 비해 2주에 43%, 4주에는 20% 증가되었다. 이러한 결과는 카드뮴 중독에서 식이 비타민 E 공급이 부족할 경우 free radical 생성계를 더욱 활성화시킴을 나타내었다.

Microsomal cytochrome P_{450} 함량

체외에서 들어오는 환경물질을 대사하는 과정은 주로 간 소포체에 있는 cytochrome P_{450} 의존성 mixed function oxidase(MFO)계에서 이루어지며, 이 과정 중 superoxide radical이나 H_2O_2를 생성한다. 이 MFO계의 가장 주된 역할을 담당하는 cytochrome P_{450}의 함량을 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 대조군에 비해 0E-Cd군, 40E-Cd군 및 400E-Cd군은 각각 2주는 62%, 46% 및 20% 각각 증가되었지만 4주에는 비타민 E를 투여한 400E-Cd군이 0E-Cd군에 비해 감소하는 경향이었다($p<0.05$). 4주때에는 2주때와 경향은 비슷하였으나 유의성은 없었다. 이와같이 비타민 E는 카드뮴 중독 흰쥐 간조직에서의 free recdial 생성계를 약화시키는 효과가 있음이 관찰되었다.

조직의 산화적 손상

혈청중의 glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), glutamate pyruvate transaminase(GPT) 함량 변화

간조직의 손상을 관찰하기 위하여 혈청 중의 GOT,

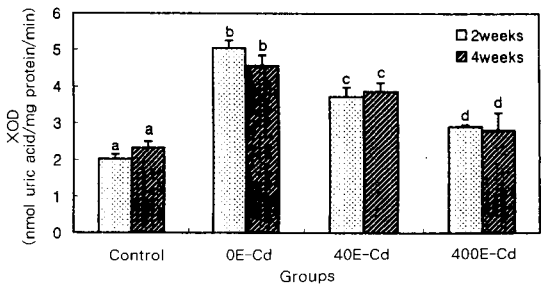

Fig. 2. Effects of vitamin E on liver xanthine oxidase activities of acute cadmium-poisoned rats.
Mean±SE. Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.
Experimental conditions were same as Fig. 1.

Table 7. Effects of vitamin E on serum triglyceride, cholesterol levels and atherogenic indices of cadmium administered rats

(mg/dl)

Groups	TG	Total-chol	HDL-chol	LDL-chol	Atherogenic index
Normal	64.21±4.00[1)NS2)]	59.25±1.37[a3)]	35.84±1.05[a]	10.57±2.06[a]	0.67±0.08[a]
0E-Cd	73.08±8.91	75.44±2.95[b]	28.82±0.83[b]	20.00±7.46[b]	1.11±0.11[b]
40E-Cd	70.24±2.32	66.07±0.74[c]	29.37±1.48[b]	17.86±2.58[b]	1.04±0.13[b]
400E-Cd	65.46±8.93	67.65±5.33[abc]	31.22±5.61[ab]	13.91±1.78[ab]	0.96±0.19[ab]

[1)]All values are mean±SE (n=10).
[2)]Not significant
[3)]Values within a column with different superscrips are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

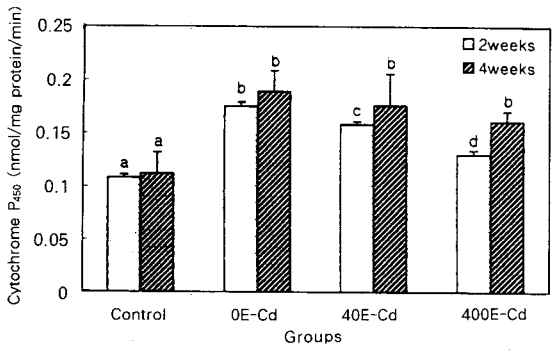

Fig. 3. Effects of vitamin E on liver cytochrome P_{450} activities of acute cadmium-poisoned rats.
Mean±SE. Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.
Experimental conditions were same as Fig. 1.

GPT활성을 측정한 결과 Fig. 4와 같다. GOT, GPT활성은 2주에서는 대조군에 비해 실험군 모두 유의적으로 증가되었다($p<0.05$). 4주에서는 대조군에 비해 0E-Cd군은 높았으나 40E-Cd군과 400E-Cd군은 유의적 차이가 없었고 0E-Cd군은 실험 2주때보다 4주때에 증가폭이 더 높았다($p<0.05$). 따라서 비타민 E를 4주간의 장기간 결핍될 경우에 2주간의 경우보다 간조직 손상이 더 심한 것을 알 수 있었다.

이상과 같이 본 연구는 식이 vitamin E가 급성 카드뮴

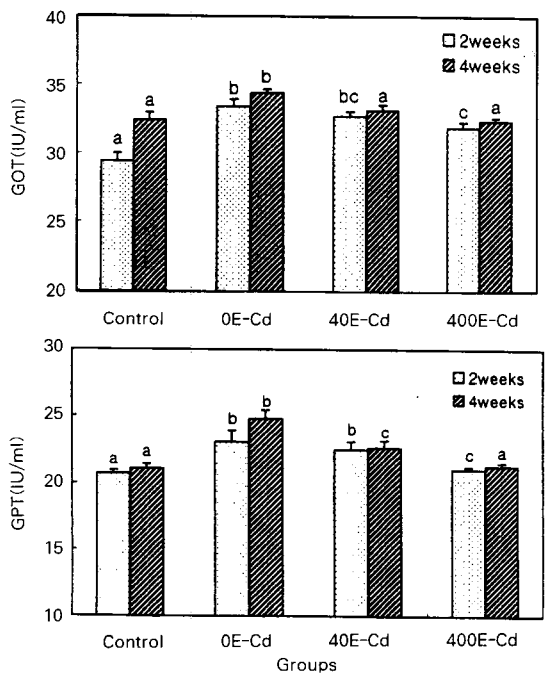

Fig. 4. Effects of vitamin E on serum GOT and GPT activities of acute cadmium-poisoned rats.
Mean±SE. Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.
Experimental conditions were same as Fig. 1.

중독에서 free radical 생성계에 미치는 영향을 규명하고져 흰쥐 간조직의 microsomal cytochrome P_{450}과 xanthine oxidase 활성을 관찰하였다.

Murakami 등(28)은 카드뮴 중독의 대표적 증세는 골의 병변과 그로 인한 신장기능 장애이고 특히 급격한 체중감량, 빈혈, 고혈압, 당 및 단백뇨, 골연화증 및 중추신경계 장애 등이 나타나는 것으로 보고하였다. 본 실험에서 체중증가량을 관찰한 결과 카드뮴 중독 이전 4주 동안에는 실험군간에 별 차이 없이 계속적인 증가를 보인 반면 카드뮴 투여 후에는 대조군에 비해 카드뮴 중독 실험군에서 현저한 체중감소를 보였는데 이는 Samuel 등(29)의 연구에서 카드뮴에 중독된 흰쥐에서는 사료 섭취의 감소로 체중이 감소되었다는 보고와 같은 결과이었다.

사료섭취량과 식이효율은 각 실험사료로 4주간 사육하는 동안에는 다소의 차이는 있었지만 유의적인 수준은 아니었다. 그러나 카드뮴 투여 후에는 카드뮴 중독군에서는 감소되었고 특히 0E-Cd군에서 가장 감소되었다. 이러한 결과는 Park 등의 보고(30)에서와 같은 결과를 보였으며 체중과 식이효율의 감소는 카드뮴 투여로 사료 섭취량의 감소와 흡수장애 및 대사저하에 기인된 것(31)으로 생각된다.

또한 본 실험에서 카드뮴 투여군에서의 간의 무게는 대조군에 비해 다소 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 이러한 결과는 본 연구가 만성 카드뮴 중독이 아니고 급성 중독이었기 때문으로 본다. 간과 신장에서의 카드뮴 함량은 대조군에는 거의 존재하지 않았으나 카드뮴중독 실험군은 간에서는 74~87μg/g, 신장에서는 24~25μg/g 정도로 함량이 높았으며 간조직이 신장조직보다 2~3배정도 높았다. 실험군별로 비교해 보았을 때 비타민 E 결핍군이 다량 투여군에 비해 다소 높았으나 유의적인 차이는 아니었다. 이는 Cherian과 Goyer(32)가 실험동물에 정맥주사로 카드뮴을 주입시 주로 간장과 신장에 저장된다는 보고와 일치하였으며 Nordberg(33)는 신장에서 10~200μg cd/g wet의 넓은 범위에서 실험동물이 신장관상의 기능부전이 있음을 보고하였다.

빈혈을 판단하는데 중요한 기준이 되는 헤모글로빈과 헤마토크리트값은 카드뮴에 중독된 실험군에서는 모두 대조군에 비해 헤모글로빈과 헤마토크리트값이 유의적으로 감소되었으나 비타민 E 다량 투여군인 400E-Cd군에서는 대조군 수준으로 거의 회복되었다. 이는 Rhee와 Jun(34)의 보고에서 카드뮴 독성으로 적혈구 생성에 변화가 초래되어 빈혈을 초래한다는 보고에 기인하는 것 같다.

또한 사료 비타민 E의 빈혈방지 효과를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 납중독에 대한 비타민 E의 효과 관찰에서 카드뮴 투여에 의해 heme 합성시 aminolevulinic acid로부터 porphobilinogen을 합성하는데 관여하는 ALAD 활성이 저해되어 조혈작용이 약화되고 헤모글로빈과 헤마토크리트 함량이 감소되었으나 비타민 E의 다량 투여

로 ALAD 활성이 증가되고 이들 값이 증가되었다는 결과(35)와도 일치한다고 볼 수 있겠다.

본 실험결과 중성지질의 함량은 대조군에 비해 실험군 모두 유의적인 차이가 없었다. 총콜레스테롤 함량은 대조군에 비해 비타민 E 비투여군인 0E-Cd군과 비타민 E 정상 공급군인 40E-Cd군은 유의적인 증가를 보였으나 400E-Cd군은 유의적 차이가 없었다. LDL-콜레스테롤도 총콜레스테롤과 같은 경향이었다. HDL-콜레스테롤은 대조군에 비해 0E-Cd군과 40E-Cd군은 유의적 감소를 보였으나 400E-Cd군은 대조군 수준이었다. 또 동맥경화의 발병지표인 동맥경화지수는 대조군에 비해 40E-Cd군은 55%, 0E-Cd군에서는 66% 증가되었으나 400E-Cd군에서는 대조군 수준이었다.

이와 같이 카드뮴 중독쥐에서 total 및 LDL cholesterol의 증가현상은 Myaant의 보고(36)에서 카드뮴에 중독된 흰쥐의 혈장 지질중 총콜레스테롤이 높게 나타난다는 결과와 유사하며 이것은 간장기능의 장애가 있을 때 간장에서 lechithin-cholesterol acyltransferase(LCAT) 합성이 저해되어 cholesterol 함량이 증가한다는 보고에 기인하는 것 같다. 또 Irritani와 Inoguchi(37)는 비타민 E의 투여는 지방산 합성 조절효소인 acetyl CoA carboxylase 활성을 저하시켜 lipoprotein lipase에 의한 VLDL 및 LDL의 분해를 촉진시켜 total 및 LDL-cholesterol의 감소를 가져온다고 하였다(38).

한편, 생체는 내인적 혹은 중금속과 같은 외인적 요인에 의하여 유해산소를 생성하고 생체막에 존재하는 인지질, 당지질, sterol들의 성분인 불포화지방산은 free radical에 의하여 쉽게 산화되어 지질과산화물을 형성한다(39,40). 지질의 과산화반응은 일단 개시되면 산소기들의 도움 없이도 자동연쇄 반응으로 free radical과 지질과산화물을 생성하여 세포막을 손상케하고 나아가 그 기능을 상실케 한다. 체내 조직에서 지질과산화 과정은 $O_2^-\cdot$와 같은 radical이 생체막 밖에서 반응이 일어나 확산에 의해 생체막을 자유롭게 통과한다. 이때 $O_2^-\cdot$나 다른 산소 radical, H_2O_2 등은 $O_2^-\cdot$로 유도되는 생체막 oxidative chain reaction에 의해 발생한다(41).

본 연구에서 XOD는 대조군에 비해 비타민 E가 결핍된 0E-Cd군은 2주에서 149%, 4주에서 95%나 현저하게 증가되어 superoxide radical 생성을 촉진시킬 수 있음을 간접적으로 알 수 있었고 비타민 E를 다량 공급한 400E-Cd군에서는 대조군 수준으로 감소함을 보였다.

또한 간, 폐, 신장, 뇌, 피부 및 태반 등 전반적인 기관의 endoplasmic reticulum(ER)에 존재하는 cytochrome P_{450}은 체외에서 들어오는 환경물질을 대사하는 중추적인 역할을 하는 효소로서 대사과정중 산소 radical이나 H_2O_2를 생성한다(40). 본 연구에서는 간조직에서의 cytochrome P_{450}을 관찰한 결과 카드뮴 투여군 모두가 대조군에 비해 증가되었으며 그 중에서도 0E-Cd군이 가장 현저하였고 400E-Cd군은 비타민 E 비투여군인 0E-Cd군에 비해 다소 활성이 감소되었다. 이는 비타민 E가 소포체에서의 cytochrome P_{450}의 합성에 유의적인 저해효과를 주어 free radical 생성을 저하시킬 수 있는 가능성을 의미하며 이는 strepzotocin 유발 당뇨 쥐에서 cytochrome P_{450}의 활성이 증가되었으나 비타민 E의 투여로 다소 완화되었다고 보고한 Yang(42)의 결과와 같은 경향을 보였다.

또한 간조직 손상의 지표가 되는 GOT, GPT 활성도 지질과산화물의 축적상태와 비슷한 경향을 보임으로서 비타민 E의 다량 공급시 카드뮴 투여로 인한 간조직의 손상을 현저하게 완화시켜 주는 것을 볼 수 있었다.

요 약

본 연구는 식이 vitamin E가 급성 카드뮴중독된 흰쥐 간조직의 microsomal cytochrome P_{450}과 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향을 관찰하고자 수행하였다. 실험동물은 100 g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐를 대상으로 하여 식이내 비타민 E의 공급 수준에 따라 0E-Cd군(비타민 E 비공급군), 40E-Cd군(비타민 E 40mg/kg of diet), 400E-Cd군(비타민 E 400mg/kg of diet)으로 나누었다. 실험군을 각각 실험식이로 2주간과 4주간 자유섭식으로 사육한 후 하루 한 번씩 4일간 카드뮴(2.0mg Cd^{2+}/kg bw)을 주사하고 24시간이 지난 후 동물을 희생시켰다. 체중, 식이 섭취 및 식이 효율은 카드뮴 투여 이전에는 실험군간에 별 차이가 없었으나 카드뮴 투여 후에는 카드뮴 실험군 모두가 현저하게 감소되었으며 특히 0E-Cd군에서 체중이 가장 감소되었다. 간장 및 신장무게는 카드뮴 투여량에 따른 변화가 없었다. 간장 및 신장에서의 카드뮴 함량은 대조군에 비해 현저하게 높은 축적량을 보였으나 식이 비타민 E에 의해 카드뮴 축적이 유의적으로 감소되었다. 혈중 헤모글로빈과 헤마토크리트값은 비타민 E 비공급군에서 현저한 감소를 하였다. 혈청중의 GOT 및 GPT활성과 간조직중의 과산화지질 함량은 카드뮴 투여군에서 증가하여 조직의 과산화적 손상이 관찰되었으며 특히 비타민 비공급군(0E-Cd군)에서 가장 현저하였다. 그러나 이러한 현상은 비타민 E의 다량 공급으로 현저하게 완화되었다. 혈청 중성지질함량(TG)은 실험군간에 차이가 없었다. 혈청 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 동맥경화지수는 0E-Cd 및 40E-Cd군에서 증가되었고 반대로 HDL콜레스테롤은 감소되었으나 비타민 E의 다량 투여(400E-Cd)로 혈청 콜레스테롤 양상이 개선되어 대조군 수준으로 되었다. 간조직의 microsomal cytochrome P_{450}, XOD 활성이 카드뮴 투여로 크게 증가되었으나 비타민 E의 다량공급으로 현저하게 감소되었다. 결론적으로 급성 카드뮴중독에서는 간조직의 free radical 생성계를 활성화되어 간조직손상을 초래하였으나 비타민 E

의 다량 공급으로 이러한 현상이 완화됨이 규명되었다.

감사의 글

본 과제는 1998년 한국과학재단에서 시행한 핵심과제 연구비(981-0610-052-1) 지원에 의한 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Ahlmark, A. : Further investigations with kidney function and proteinuria in chronic cadmium poisoning. *Int. Cong. Occup. Health*, **13**, 201(1961)
2. Perry, H. M., Tipton, I. H., Schroeder, H. A. and Cook, M. J. : Variability in the metal content of human organs. *J. Lab. Clin. Med.*, **60**, 245-253(1962)
3. Shaikh, Z. A. and Lucis, O. J. : Cadmium and zinc binding in mammalin liver and kidneys. *Arch. Environ. Health*, **24**, 419-425(1972)
4. Kazantzis, G. : Renal tubular dysfunction and abnormalities of calcium metabolism in cadmium workers. *Environmental Health Perspectives*, **28**, 155-159(1979)
5. Artiguez, L. M., Camean, A., Gonzalez, G. and Repetto, M. : Cadmium concentrations in human renal cortex tissue (Necropsies). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**, 841-847(1995)
6. Ikeda, M. C., Moon, C. S., Xhang, Z. W., Iguchi, H., I., Watanabe, T., Iwami, O., Imaj, Y. and Shimbo, S. : Urinary α1-microglobulin, β2-microglobulin, and retinol-binding protein levels in general populations in Japan with references to cadmium in urine, blood, and 24-hour food duplicates. *Environmental Research*, **70**, 35-46(1995)
7. Krejs, G. J., Nicar, M. J., Zerwekh, J. E., Norman, D. A., Kane, M. G. and Pak, C. Y. C. : Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on calcium and magnesium absorption in the healthy human jejunum and lleum. *Am. J. Med.*, **75**, 973-976(1983)
8. Gleason, M. N., Gosselin, R. S., Modge, H. C. and Smith, R. P. : Clinical toxicology of commercial products, Acute poisoning(Home and Farm). PP29(1969)
9. Schroeder, H. A., Kroll, S. S., Little, J. W., Livingston, P. O., Margery, A. G. and Myers, H. : Hypertension in rats from injection of cadmium. *Arch. Environ. Health*, **13**, 788-789(1996)
10. Robert, E. and Carroll, M. P. H. : The relationship of cadmium in the air to cardiovascular disease death rats. *JAMA*, **198**, 267-269(1966)
11. Passow, H., Rothstein, A. and Clarkson, T. W. : The general pharmacology of the heavy matals. *Pharmacol. Rev.*, **13**, 185-188(1961)
12. Rhee, S. J., Kim, S. O., Choe, W. K. and Cho, S. H. : Effect of cadmium dose injection of peroxidative damage in rat liver. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 601-607(1991)
13. Kim, S. O. and Rhee, S. J. : Effect of dietary selenium on antioxidative defense system in cadmium administered rats liver. *Taegu Hyosung Catholic J. Appl. Sci. Res. Institute*, pp.19-30(1992)
14. Kim, M. K. and Baek, S. M. : Effect of dietary calcium level on cadmium and lead toxicity in rats. *Korean J. Nutr.*, **29**, 958-970(1996)
15. Lee, H. Y. and Kim, M. K. : Effects of dietary cadmium and protein levels on the body protein metabolism and cadmium toxicity in growing rats. *Korean J. Nutr.*, **21**, 410-420(1988)
16. Cho, S. Y., Huh, S. Y. and Lee, S. H. : Effect of calcium and vitamin D on the cadmium intoxication of rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **13**, 27-32(1984)
17. Yang, J. S., Hahn, S. H. and Lee, S. R. : A suppressive effect of alginate on the intestinal absorption of cadmium *in vitro*. *Korean J. Nutr.*, **11**, 9-12(1978)
18. Kim, H. J., Cho, S. Y. and Park, J. M. : Effect of dietary vitamin E and protein on cadmium toxicity in rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **19**, 27-34(1990)
19. Rhee, S. J. : Effects of dietary vitamin E and selenium levels on lipid peroxidation in brain of cadmium administered rats. *Kor. J. Gerontol.*, **6**, 35-41(1996)
20. Park, Y. R., Rhee, S. J., Lim, Y. S. and Joo, G. J. : Effect of dietary vitamin E on the microsomal mixed function oxidase system of liver and lung in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25**, 969-975(1996)
21. Applegate, E. A., Uptar, D. E. and Sterm, J. S. : Exercise and detrains. Effect on food intake, adiposity and liplgenesis in osborne-mendol rats mode obese by a high fat diet. *J. Nutr.*, **114**, 447-459(1984)
22. AOAC : *Official methods of analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, p.2(1990)
23. Davidshon, E. and Nelson, D. A. : *Clinical diagnosis by laboratory methods*. Saunders Co., Philadelphia, pp.125-130(1969)
24. Friedwald, W. T., Levy, R. I. and Fedreison, D. S. : Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, **18**, 499(1972)
25. Stripe, J. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855-3863(1969)
26. Omura, T. and Sato, R. : The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2379-2385(1964)
27. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloactic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63(1957)
28. Murakami, M., Cain, K. and Webb, M. : Cd-metallothionein induced mephropathy. *J. Appl. Toxicol.*, **5**, 237(1983)
29. Samuel, A. G., Thelma, C. G. and Anderson, W. A. D. : Selectivity of organ response to cadmium injury and various protective measures. *J. PATH. BACT*, **96**, 89-96(1968)
30. Park, G. Y., Rhee, S. J. and Im, J. G. : Effects of green tea catechin on cytochrome P_{450} xanthine oxidase activities in liver and liver damage in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 901-907(1997)
31. Friberg, L. : Health hazards in the manufacture of alkiline accumulation with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta. Med. Scand.*, **138**, 1(1950)
32. Cherian, M. G. and Goyer, R. A. : Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sciences*, **23**, 1-10(1978)
33. Nordberg, M. : General aspects of cadmium: Transport,

uptake and metabolism by the kidney. *Environmental Health Perspectives*, **54**, 13-20(1984)
34. Rhee, S. J. and Jun, S. Y. : Effect of dietary selenium of metallothionein synthesis and antioxidative detoxification mechanism in cadmium administered rats. *Korean J. Nutr.*, **26**, 286-298(1993)
35. Thompson, J. Jones, D. D. and Beasley, W. H. : The effect of matal ions of- δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Bri. J. Ind. Med.*, **340**, 32-36(1977)
36. Myaant, N. B. : The transport and turnover of the plasma choleterol in plasma lipoprotein, edited by R.M.S. Smellie. Academic press, New York, p.782(1971)
37. Irritani, N. and Inoguchi, K. : Identification of shelfish fatty acids and their effects on lipogenic enzymes. *Biochem. Biophys. Acta*, **618**, 378-383(1990)
38. Sanders, T. A. B. : Influence of fish oil supplements on man. *Proc. Nutr. Soc.* **44**, 391-397(1985)
39. Oh, S. H., Deagen, J. T., Wangner, P. D. and Wesnig, P. H. : Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Am. J. Physiol.*, **234**, E282-E285(1978)
40. Gwebu, E. T., Ttrwyn, R. W., Cornwell, D. G. and Panganamala, R. V. : Vitamin E and inhibition of platelet lipoxygenase. *Res. Common. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **28**, 361-369(1980)
41. Panganamala, R. V. and Cornwell, D. G. : The effect fo vitamin E on arachidonic acid metabolism. *Annu. NY. Acad. Sci.*, **393**, 376-373(1982)
42. Yang, J. A., Kim, S. O., Choi, J. H., Kwag, O. G., Rhee, S. J. and Chang, H. W. : Activities of phospholipase A_2 and cyclooxygenase and syntheses of thromboxane and prostacyclin in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 175-181(1998)

(1999년 8월 12일 접수)