

적출간 관류법을 이용한 카드뮴과 니켈의 간독성 비교

차봉석, 왕승준, 장세진, 이중우¹⁾

연세대학교 원주의과대학 예방의학교실 및 직업의학연구소, 생리학교실¹⁾

Comparative Hepatotoxicity Assessment of Cadmium and Nickel with Isolated Perfused Rat Liver(IPRL)

Bong-suk Cha, Seung-jun Wang, Sei-jin Chang, Jung-woo Lee¹⁾

Department of Preventive Medicine and Institute of Occupational Medicine, Department of Physiology¹⁾
Wonju College of Medicine, Yonsei University

Objectives : It is the objective of this study to compare hepatotoxicity of nickel chloride and cadmium chloride with each other through IPRL(Isolated Perfused Rat Liver) method.

Methods : Biochemical indicator of hepatic function such as AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), LDH(lactate dehydrogenase) and perfusion flow rate were used as the indicator of hepatotoxicity. Oxygen consumption rate were used as viability indicator. 300(±50) g - weighted rats were allocated randomly to each group(0 μM, 50 μM, 200 μM NiCl₂ and CdCl₂ exposure) by 5, totally 25. After Krebs-Ringer bicarbonate buffer solution flowed into the portal vein and passed the liver cell, it flowed out of vena cava. Liver was administered with each NiCl₂ and CdCl₂ of each concentration and observed with buffer solution sampling time. Buffer which got out

of liver was sampled and then biochemical indicator of hepatotoxicity was measured.

Results : AST, ALT, and LDH in buffer increased with sampling time much more in CdCl₂ exposure group than NiCl₂ exposure group in both 50 and 200 μM and statistical significance was verified with 2-way repeated ANOVA. Viability was decreased more and more in all substances during passed time.

Conclusions : It is inferred that CdCl₂ has stronger hepatotoxicity than NiCl₂. IPRL method would be used widely for acute hepatotoxicity when considering the benefit of it.

Korean J Prev Med 2000;33(1):117-124

Key Words: Cadmium chloride, Nickel chloride, IPRL, Hepatotoxicity

서 론

카드뮴은 플라스틱 공업에서 도료나 안정제로서 널리 사용되며 니켈 - 카드뮴 전지 생산공정, 합금 및 은도금 공정 등에 자주 이용되는 물질로 카드뮴을 녹이는 작업에 직접 또는 간접적으로 관여하는 근로자 및 카드뮴 관금작업, 알칼리 건전지 생산공정, 카드뮴 도료를 제작하거나 사용하는 공정 및 용접작업에 종사하는 근로자들에게서 폭로의 위험성이 큰 것으로 알려져 있다. 특히 간독성이 있다는 연구결과가 계속적으로 발표됨으로써 이들 작업에 종사하는 근로자들의 간장질

환의 발생가능성을 간과할 수 없다. Dudley 등(1982)은 실험연구에서 흰쥐의 복부에 카드뮴을 투여한 후 간기능 검사를 시행하여 혈장내 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 등의 활성이 증가함을 확인함으로써 간독성 가능성을 확인한 바 있으며 그 뒤를 이은 연구에서 이들은 간세포를 이용한 실험을 통하여 카드뮴의 급성적 독성효과를 확인했는데 이 연구에서 간세포의 괴사와 더불어 세포내 효소인 ALT 및 AST가 혈장으로 유출됨으로써 그 활성이 증가한다는 사실을 확인함으로써 이 물질의 독성기전이 간세포 괴

사와 직접적인 관련이 있는 것으로 결론 지었다(Dudley와 Klaassen, 1984). 그 후 Lupo 등(1986)은 기존의 *in vitro* 연구와 *in vivo* 연구에서 나타난 제한점을 보완한 적출간 관류법(isolated perfused rat liver, IPRL)을 적용하여 보다 객관적인 결과를 제시하고자 했는데 카드뮴의 투여 농도에 따른 ALT의 증가와 더불어 관류속도의 감소를 확인함으로써 cholestasis가 간독성의 기전일 가능성을 확인한 바 있다.

니켈은 여러 합금제품의 구성성분이며 스테인레스 강철의 경우에는 그 구성비가 15%에 달한다. 그 밖에 전기 및 전자제품의 생산 및 카드뮴-니켈 전지의 생산에 다량 사용된다. 니켈의 간독성에 대해서는 아직 반론이 많으나 Donskoy 등(1986)은 흰쥐를 이용한 *in vivo* 실험을

접수 : 1999년 11월 2일, 채택 : 2000년 1월 24일

이 연구는 1999년도 연세대학교 원주의과 직업의학연구소의 연구비 지원으로 이루어졌음

교신저자 : 왕승준 (연세대학교 원주의과대학 예방의학교실, 전화번호 : 0371-741-0347, 팩스번호 : 0371-747-0409, e-mail : johnking@wonju.yonsei.ac.kr)

통해서 니켈을 복강내에 투여한 폭로군의 간조직에서 AST와 ALT가 증가함을 확인함으로써 니켈의 급성 간독성에 대한 가능성을 시사했으며 Misra 등(1990)은 흰쥐의 간세포를 이용한 *in vitro* 실험을 통하여 니켈폭로군에서 ALT, AST가 증가한다는 사실을 알아냈다. 하지만, 니켈의 경우에는 카드뮴의 경우와는 달리 *in vivo*와 *in vitro*의 제한점을 보완한 실험방법을 이용한 연구가 거의 없었으므로 적출간 관류법과 같은 실험방법의 적용이 필요할 것으로 보인다.

적출간 관류법(IPRL)은 1855년 Claud Bernard가 처음으로 시도한 *in vitro* 실험 방법으로서 기존의 실험방법과 비교해 볼 때 그 장점은 다음과 같다(Miller, 1972).

첫째, 이전의 세포분리법과는 달리 소엽조직을 그대로 보존할 수 있어서 *in vivo*와 거의 동일하게 독성을 평가할 수 있다는 점이며 둘째, 세포분리법은 손상된 세포에서 발견할 수 있는 세포의 유형 중 주조직만을 이용하지만 적출간 관류법은 모든 유형(주조직 및 부조직)의 세포를 다 이용할 수 있다는 점, 셋째, 간세포의 극성을 생체내에서와 동등하게 유지시킬 수 있기 때문에 간장에서 직접 화합물 및 대사물을 확인할 수 있다는 점(Sweeny와 Reinke, 1987), 넷째, *in vivo* 실험과는 달리 다른 생체기관의 영향을 배제할 수 있으므로 원인물질에 대한 간독성 기전을 정확하게 평가할 수 있다는 점이다.

니켈의 간독성과 관련된 이전의 연구에서 상대적으로 카드뮴에 비해 니켈에 대한 간독성 연구가 적은 것으로 보인다. 실제로 동일한 농도로 두 금속물질을 투여함으로써 간독성을 확인함과 동시에 실제로 두 물질간의 간독성의 차이가 어떠한지 기존의 연구에서 실시한 *in vivo* 및 *in vitro*의 제한점을 보완한 적출간 관류법을 이용하여 평가해 보고자 하며 그 세부적인 목적은 첫째, 기존에 실시한 동물실험의 제한점을 보완한 적출간 관류법을 적용하여 관류액내 transaminase 및 lactate dehydrogenase(LDH) 등의 생화

학적 독성지표와 관류속도의 시간에 따른 변화를 관찰함으로써 카드뮴과 니켈의 간독성을 비교하고 둘째, 산소소모율의 시간의 경과에 따른 변화를 관찰함으로써 간의 viability(생존력)에 대한 영향을 비교하고자 한다.

연구방법

1. 연구대상

체중이 300 g정도인 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 대상으로 실험전 일주일부터 실험실내의 환경(온도 및 습도)을 일정하게 유지하여 실험동물을 적응시키고 실험군은 각 물질에 대하여 대조군, 노출군1(50 μ M), 노출군2(200 μ M)별로 5마리씩 무작위로 할당하여 총 25마리를 연구대상으로 하였다.

2. 실험방법

전체적인 실험방법은 고상백 등(1997)이 이용한 Gores 등(1988)의 방법을 이용했으며 그 세부적인 사항은 다음과 같다.

1) 관류액 제조

관류액은 NaCl 117, KCl 4.7, CaCl₂ 1.9, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.4, NaHCO₃ 24.8 mM을 혼합한 Krebs-Ringer bicarbonate buffer(KRB)를 사용한다. 관류액은 온도 36 $^{\circ}$ C로 유지시켜 주고, 95% 산소와 5% 이산화탄소를 충분히 공급하여 pH 7.4가 되도록 유지하였다.

2) 간적출

먼저 Na⁺ thiopental(40 mg/kg)를 복강내에 주입하여 마취시킨 후 복부를 치골로부터 가슴상부에 걸쳐 정중선으로 절개하고 담도와 간문맥이 잘 보이도록 장을 밖으로 꺼내 놓았다. 간의 소엽들을 살짝 위로 든 후 그 공간에 KRB 용액으로 적신 거즈를 대었다. heparine을 복부 하대정맥에 투입한 뒤 관류액이 채워진 폴리에틸렌 튜브(polyethylene tube 1.3 mm)를 간 문맥에 삽입한 후 신장정맥 위의 하대정맥과 간문맥의 pancreatic branch를 묶어 고정시켰다. 이어서 흉곽을 절개하여 노출시키고 같은 직경과 길이의 폴리에틸렌 튜브를 우심방을 경유

하여 간이 위치한 쪽을 향하도록 삽입한 후 소화기관을 건드리지 않고 KRB 용액으로 씻어 가면서 횡경막을 따라 간을 드러내었다. 관류시스템 내부의 평판에 젖은 거즈를 끼워 놓은 뒤 그 위에 적출한 간을 올려 놓고 관류액을 넣은 후 가동시켰다. 간 적출시 관류액에는 계속해서 95%의 산소와 5%의 이산화탄소를 섞은 습한 공기로 산소를 공급하고 간문맥에 꽂은 관류관에 관류액을 통과시켜 간에 관류액이 흐르도록 한 뒤 흉곽에 꽂은 관류관을 통과하도록 하였다. 이 관류관을 용기에 연결하여 재활용할 관류액을 수집하도록 하며 검은 부분이 없는 선흥색의 간을 유지하는지 계속 관찰하고 0.75 M의 탄산수소나트륨으로 관류액의 pH가 항상 7.4정도로 유지되도록 계속적으로 조절 및 감시하면서 관류액의 유속을 측정하여 간의 상태를 점검하였다.

3) 관류속도의 측정

간 관류에 사용하는 KRB 용액량은 약 120 ml 정도였으며, 관류압은 22 cmH₂O 정도가 유지되게 하였다. 이때 Gilmont Flowmeter를 이용하여 염화카드뮴(CdCl₂)과 염화니켈(NiCl₂)을 투여하기 전의 관류속도를 측정한 후 보정표를 이용하여 실제 관류속도를 계산하였다.

4) 카드뮴 및 니켈 투여

순도 99% 이상의 CdCl₂와 NiCl₂를 사용하여 각각 50 μ M과 200 μ M의 수용액으로 제조하여 이 두 물질을 간문맥에 들어가는 관류액에 개별 투여하였다.

5) 간독성 측정

관류액을 시간별(0, 15, 30, 45, 60, 75, 90)로 수집한 후 BM/Hitachi 747(Boehringer Mannheim)을 이용하여 36 $^{\circ}$ C에서 Bergmeyer(1986)방법으로 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), lactate dehydrogenase(LDH)를 측정했다.

6) 산소소모율 측정

산소소모율은 산소추출율을, 간문맥의 관류속도 및 간 무게를 측정하여 아래 계산식에 의해 구하였다. 산소추출율은 간문맥으로 들어가는 산소포화도와 하대정맥으로 나가는 산소포화도의 차이이며,

Biological oxygen monitor(YSI Model 53)를 이용하여 측정하였다. 간 무게는 관류를 시행하고 난 후 폴리에틸렌 튜브를 제거하여 저울에 올려 측정하였다.

$$\begin{aligned} & \text{관류액내 산소의 양 : } SO_2(\mu l/ml) \\ & = \alpha \times PO_2 (\alpha : 0.024 \text{ ml } O_2 / \text{ ml } / 760 \text{ mmHg}) \\ & = 0.024 \text{ ml } O_2 / \text{ ml of solution} / 760 \text{ mmHg} \times (760 \times 95 \times 100) \text{ mmHg} \\ & = 0.0228 \text{ ml } O_2 / \text{ ml of solution} (=22.8 \mu l O_2 / \text{ ml of solution}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{간에 의한 산소 섭취량 : } (\mu l/min) \\ & = \text{관류액 내 산소의 양} \times \text{관류속도} \times \text{산소포화도}(\%) \text{의 차이} / 100 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{산소소모율 : } (\mu l O_2 / \text{ min } / \text{ gm}) \\ & = \text{간에 의한 산소 섭취량} \times 1 / \text{간무게} (\text{gm}) \end{aligned}$$

3. 통계처리

각 측정치의 평균을 꺾은 선 그래프를 이용하여 점으로 나타냈으며 같은 시간대에서 농도별로 물질의 종류(대조군, CdCl₂, NiCl₂)에 따른 차이를 확인하기 위해 반복측정된 2요인 분산분석을 실시하였으며 유의수준을 0.05로 하여 통계적 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 50 μM의 카드뮴과 니켈 투여시 시간에 따른 간독성 변화의 비교

50 μM 투여농도에서 물질간 시간의 경과에 따른 생화학적 간독성 지표 및 관류 속도, 산소소모율의 변화를 확인하고자 물질 투여 전과 투여 후 임의로 15분 간격을 두고 90분까지 간을 통과한 관류액을 분석한 결과, AST의 경우, CdCl₂ 노출군이 NiCl₂ 노출군에 비하여 시간의 경과에 따라 급격히 증가했으며 집단간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Figure 1)(Table 1). ALT의 경우, 시간의 경과에 따라 CdCl₂ 노출군이 NiCl₂ 노출군에 비해 급격히 증가했으며 집단간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Figure 2)(Table 1). LDH의 경우, 시간의 경과에 따라 CdCl₂ 노출군이 NiCl₂ 노출군보다

큰 폭으로 증가했으며 집단간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Figure 3)(Table 1). 관류속도의 경우, 대조군에 비하여 두 물질 모두 시간의 경과에 따라 관류속도의 감소가 두드러진 것으로 나타났다으나 집단간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Figure 4). 산소소모율의 경우, 시간의 경과에 따라 CdCl₂ 노출군

이 NiCl₂ 노출군에 비해 감소폭이 증가했으며 집단간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Figure 5).

2. 200 μM의 카드뮴과 니켈 투여시 시간에 따른 간독성 변화의 비교

200 μM 투여농도에서 물질간 시간의

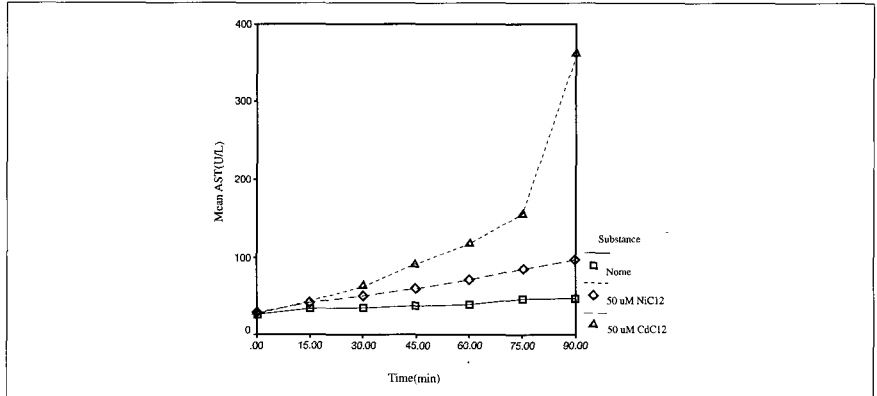


Figure 1. Variation of AST concentration with time in each control, 50 μM CdCl₂ and 50 μM NiCl₂ administration group(p<0.05).

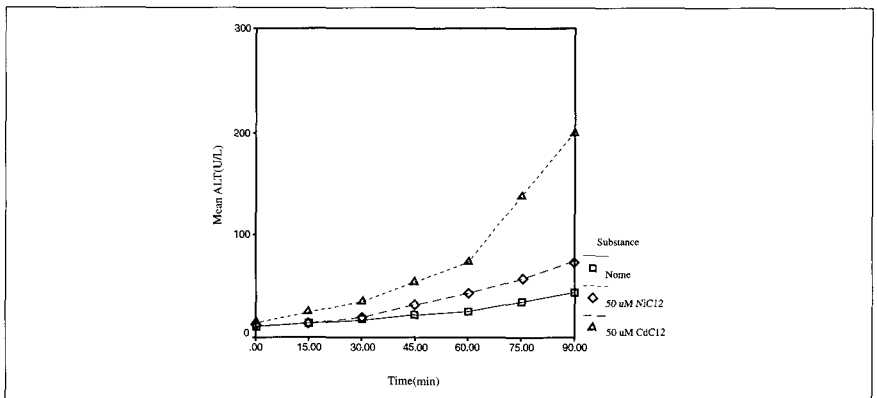


Figure 2. Variation of ALT concentration with time in each control, 50 μM CdCl₂ and 50 μM NiCl₂ administration group(p<0.05).

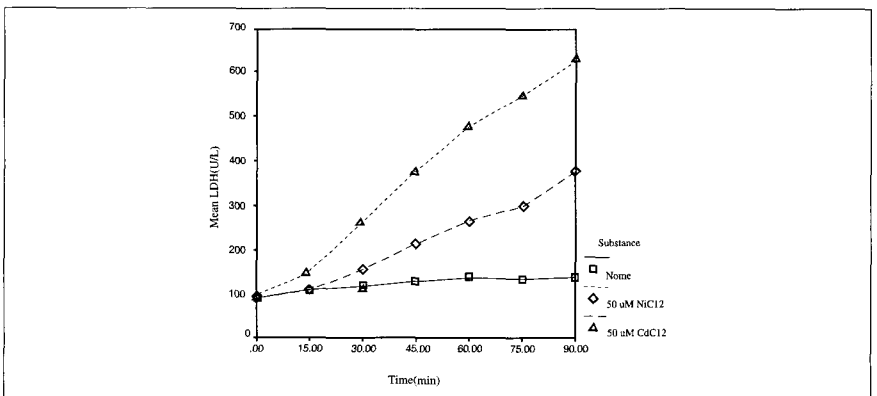


Figure 3. Variation of LDH concentration with time in each control, 50 μM CdCl₂ and 50 μM NiCl₂ administration group(p<0.05).

Table 1. Concentration(Mean ± S.D) of AST, ALT, LDH in KRB solution having passed IPRL by sampling time at control, 50 μM NiCl₂ and 50 μM CdCl₂

Biochemical indicators	Groups	Sampling times(min)						
		0	15	30	45	60	75	90
AST(U/L)*	none	25.80 ± 1.92	35.00 ± 2.92	35.40 ± 5.90	38.20 ± 2.39	39.40 ± 4.39	46.60 ± 2.70	48.80 ± 2.86
	NiCl ₂	30.00 ± 5.66	41.60 ± 1.07	51.40 ± 2.30	60.20 ± 3.19	71.20 ± 3.19	86.40 ± 8.68	98.00 ± 14.14
	CdCl ₂	28.20 ± 2.77	42.40 ± 3.91	63.60 ± 1.34	93.00 ± 2.83	118.40 ± 1.82	156.00 ± 2.83	362.60 ± 32.76
ALT(U/L)*	none	11.20 ± 0.84	13.80 ± 1.64	16.60 ± 1.14	21.80 ± 1.64	25.00 ± 1.87	33.20 ± 3.11	43.40 ± 3.65
	NiCl ₂	10.60 ± 1.14	12.60 ± 0.55	18.60 ± 2.30	31.80 ± 0.84	42.60 ± 0.89	57.20 ± 1.48	75.60 ± 3.85
	CdCl ₂	13.80 ± 1.30	24.00 ± 3.74	35.00 ± 2.45	53.60 ± 2.07	73.20 ± 2.28	138.20 ± 32.26	200.80 ± 23.07
LDH(U/L)*	none	93.20 ± 2.86	106.80 ± 3.27	116.60 ± 2.61	127.20 ± 3.19	137.20 ± 6.76	132.00 ± 2.24	136.80 ± 2.28
	NiCl ₂	89.20 ± 2.39	106.80 ± 4.16	116.60 ± 7.42	213.60 ± 7.06	264.20 ± 5.93	298.80 ± 19.15	376.20 ± 12.79
	CdCl ₂	93.40 ± 5.18	147.40 ± 18.45	259.00 ± 29.15	375.40 ± 15.73	476.40 ± 12.34	542.60 ± 4.83	627.20 ± 15.90

* : statistical significance(p<0.05) : difference among control and two exposure groups by sampling time(two-way repeated ANOVA)
 AST : aspartate aminotransferase ALT : alanine aminotransferase
 LDH : lactate dehydrogenase KRB : Krebs-Ringer bicarbonate
 IPRL : Isolated Perfused Rat Liver

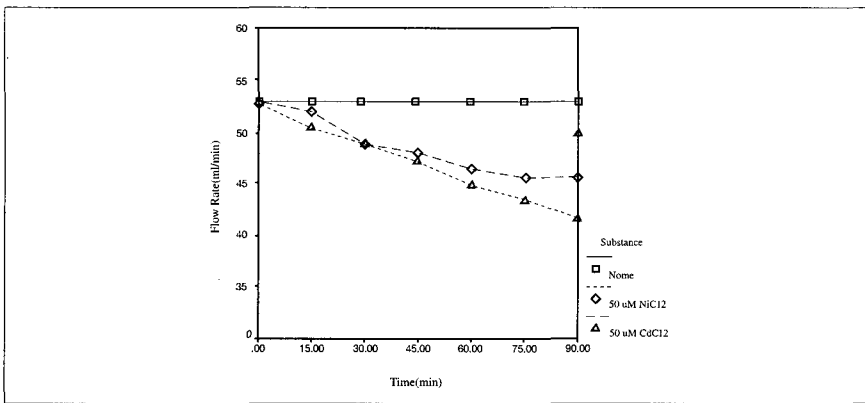


Figure 4. Variation of perfusion flow rate by time in each control, 50 μM CdCl₂ and 50 μM NiCl₂ administration group(p>0.05).

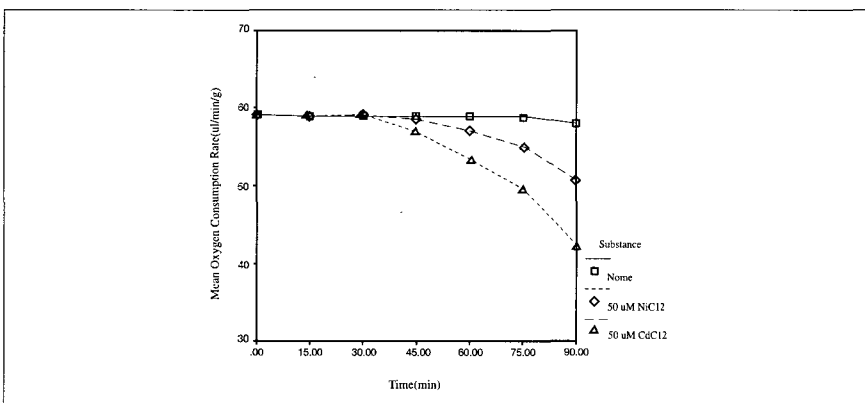


Figure 5. Variation of oxygen consumption rate with time in each control, 50 μM CdCl₂ and 50 μM NiCl₂ administration group(p<0.05).

경과에 따른 생화학적 간독성 지표 및 관류속도, 산소소모율의 변화를 확인하고자 물질 투여 전과 투여 후 임의로 15분 간격을 두고 90분까지 간을 통과한 관류액을 분석한 결과, AST의 경우, CdCl₂ 투여

군이 NiCl₂ 투여군에 비해 시간의 경과에 따라 급격히 증가했으며 집단간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Figure 6)(Table 2). ALT의 경우, 시간의 경과에 따라 CdCl₂ 투여군이 NiCl₂ 투여군에 비

해 더 큰 폭으로 증가했으며 집단간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Figure 7)(Table 2). LDH에 있어서 시간의 경과에 따라 CdCl₂ 투여군이 NiCl₂ 투여군에 비해 큰 폭으로 증가했으며 집단간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Figure 8)(Table 2). 관류속도의 경우, 염화카드뮴과 염화니켈간에는 시간의 경과에 따라 관류속도에 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 보이며 집단간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Figure 9). 산소소모율에 있어서 시간의 경과에 따라 CdCl₂ 투여군이 NiCl₂ 투여군에 비해 큰 폭으로 감소했으며 집단간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Figure 10).

고찰

카드뮴은 체내에 유입되면 그 양의 약 1/2이 간과 신장에 축적되는데 특히 간은 카드뮴의 주요 축적기관이며 그 반감기가 10에서 20년 정도에 달한다. 주요 축적기관이 간이므로 간독성의 가능성을 가늠해 볼 수 있으며 이러한 연구는 이전의 여러 연구를 통하여 실험상으로 증명되었다.

Frazier 등(1976)은 적출간 관류법을 이용한 실험을 통하여 카드뮴의 독성기전을 확인했으며 그 뒤 Panemangalore 등(1978)은 이 방법을 실시한 간을 이용하여 metallothionein의 생성과 카드뮴의 비

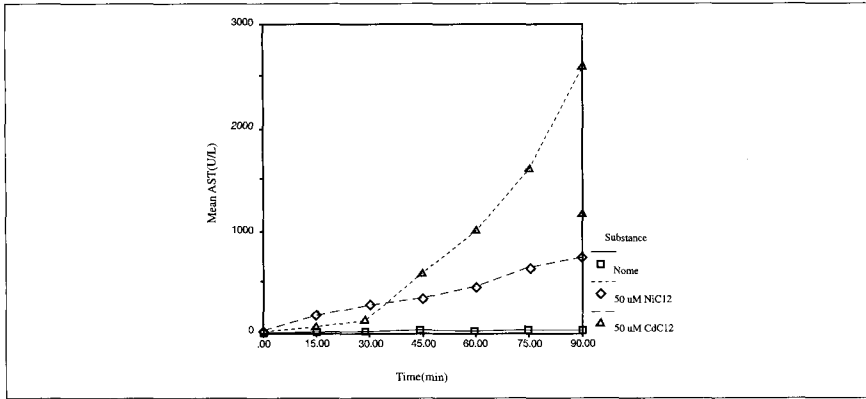


Figure 6. Variation of AST concentration with time in each control, 200 μM CdCl₂ and 200 μM NiCl₂ administration group(P<0.05).

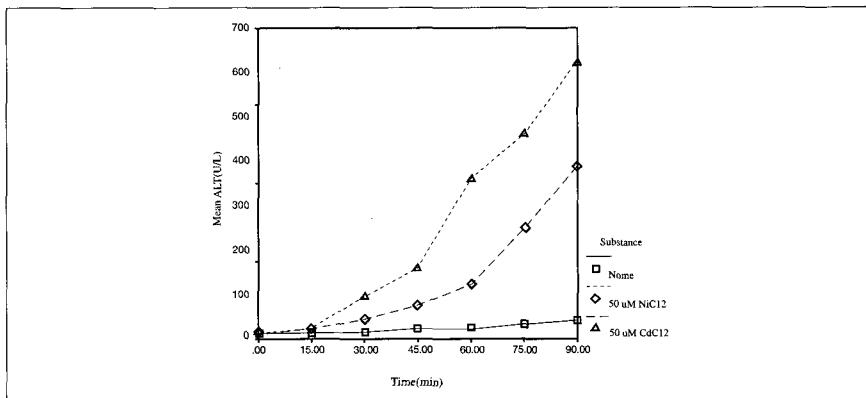


Figure 7. Variation of ALT concentration with time in each control, 200 μM CdCl₂ and 200 μM NiCl₂ administration group(p<0.05).

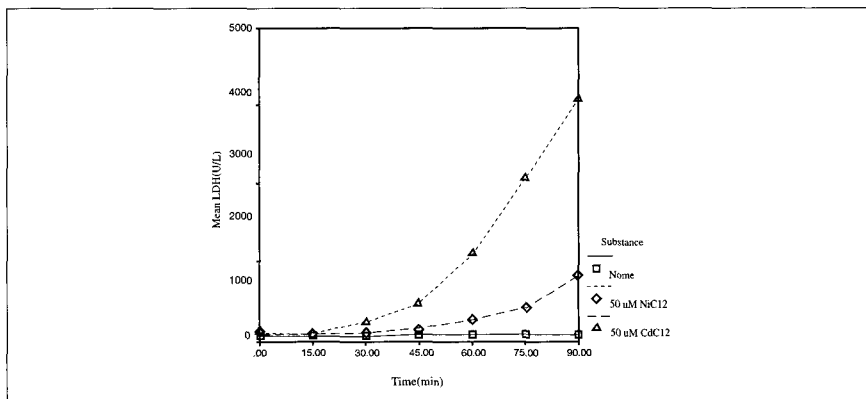


Figure 8. Variation of LDH concentration by time in each control, 200 μM CdCl₂ and 200 μM NiCl₂ administration group(P<0.05).

간독성이 양적 상관성이 있음을 확인하였다. Kingsley와 Frazier(1979)는 적출간 관류법을 통하여 카드뮴과 아연이 상호경쟁적인 관계가 있음을 확인하였고, Stacey 등(1980)은 isolated rat hepatocyte의 기법을 통하여 카드뮴이 lipid peroxidation을 일으키며 이것이 간독성의 중요한 기전인 것으로 설명했으며

Dudley 등(1982)도 같은 기법을 이용하여 카드뮴이 급성 간독성이 있음을 확인하였다. 그 후 Sato 등(1983)이 동일한 실험방법을 통하여 카드뮴의 간독성 기전을 확인하는 방법으로 transaminase를 이용하는 것이 효과적임을 설명하였고 Harvey와 Klaassen(1983)도 그들의 연구에서 lipid peroxidation과 카드뮴의 간독

성이 서로 무관함을 확인함과 더불어 transaminase의 증가를 관찰함으로써 급성 간독성이 있음을 확인했으며 Dudley와 Klaassen(1984)은 transaminase를 통하여 간독성을 확인하고 이 효소와 glutathione과의 음의 상관성을 확인하였다.

반면, 카드뮴에 비해 니켈의 간독성 및 그 기전은 아직 확실하게 밝혀져 있지 못하며 그 연구의 수도 훨씬 적은 상태이다. Sunderman(1983)은 동물실험을 통하여 니켈을 투여한 군에서 transaminase의 증가를 확인함으로써 간독성을 확인했고 lipid peroxidation이 중요한 기전임을 확인하였다. Chen 등(1998)도 니켈을 투여한 흰쥐의 혈장에서 transaminase가 유의하게 증가함을 확인했으며 lipid peroxidation이 그 중요한 기전일 것으로 추정하였다.

카드뮴 및 니켈의 간독성에 대한 이전의 연구방법을 둘러 볼 때 공통적으로 간독성 평가에 있어서 생화학적 지표가 주로 이용되어 왔으나 실험방법에 있어서 특히 니켈의 경우 간독성 평가에 적출간 관류법을 적용한 연구가 많지 않은 것으로 보인다. 이에 이 연구에서는 기존의 연구에서 카드뮴의 간독성을 비교적 정확하게 평가하고자 이용했던 적출간 관류법을 적용하여 생화학적 독성지표와 관류속도 및 생존력의 측정을 통해 카드뮴과 니켈의 간독성을 비교하였으며 관류속도를 제외하고는 두 물질간에 통계적으로 유의한 차이를 확인함으로써 같은 농도에서 카드뮴이 니켈에 비하여 간독성이 강한 것으로 추정된다.

이 연구에서 카드뮴 및 니켈 투여군에서 시간의 증가에 따른 AST, ALT 및 LDH의 증가를 확인할 수 있었으며 고농도에서 더욱 증가의 폭이 큼을 확인할 수 있었는데 이는 서론에서 제시한 이전의 연구들과 일치하는 것으로 두 물질이 간세포의 괴사를 유도한다는 독성기전을 설명하는 것이다. 카드뮴 투여군에 있어서 시간의 경과에 따라 관류속도가 감소하는 경향을 보였는데 이는 cholestasis를 간접적으로 반영하는 결과로 Lupu 등(1986)의 연구결과와 일치하는 것으로 카

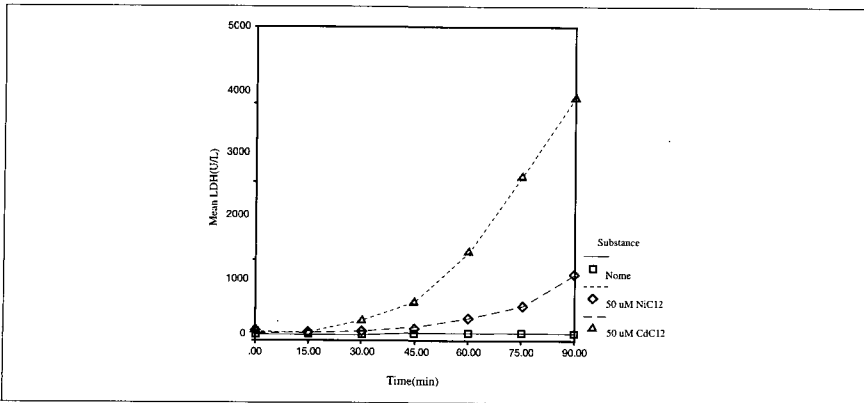


Figure 8. Variation of LDH concentration by time in each control, 200 μ M CdCl₂ and 200 μ M NiCl₂ administration group(P<0.05).

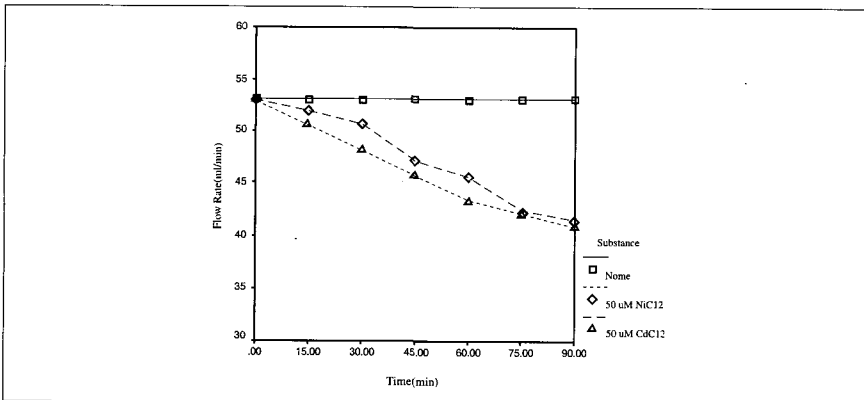


Figure 9. Variation of perfusion flow rate by time in each control, 200 μ M CdCl₂ and 200 μ M NiCl₂ administration group(P>0.05).

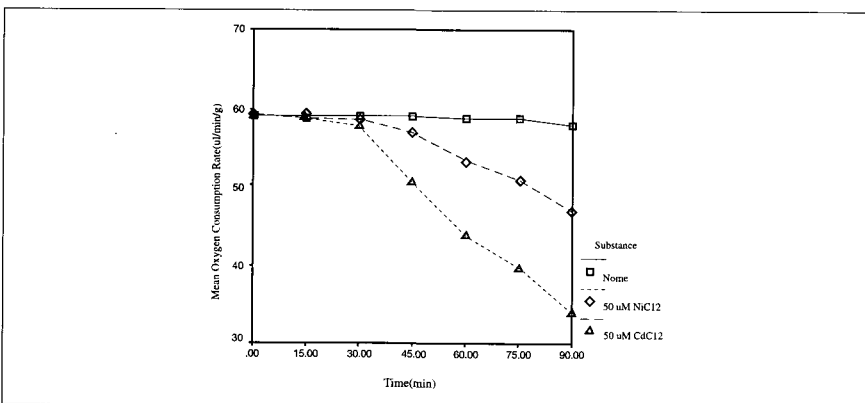


Figure 10. Variation of oxygen consumption rate by time in each control, 200 μ M CdCl₂ and 200 μ M NiCl₂ administration group(P<0.05).

드름의 간독성 기전을 확인할 수 있는 것이다. 니켈의 경우도 각 투여농도에서 시간의 경과에 따라 관류속도가 감소함을 확인함으로써 간독성을 추정할 수 있었다. 두 투여 농도간의 관류속도를 비교할 때 카드뮴의 경우, 농도의 증가에 따라 관류속도가 더 큰 폭으로 감소하는 경향을 확인할 수 있었는데 이는 Lupu 등(1986)

의 연구결과나 Strubelt 등(1996)의 연구결과와 일치하는 것이다. 카드뮴 투여군의 경우, 시간의 경과에 따라 산소소모율의 감소를 확인할 수 있었는데 이는 간세포의 산소대사능력을 반영하는 것이다. 특히, 고농도에서 감소의 폭이 더 큰 것을 확인할 수 있었는데 이 연구결과도 서론에서 제시한 Lupu 등(1986)과 Strubelt

등(1996)의 연구결과와 일치하는 것이며 니켈의 경우도 거의 동일한 경향성을 보임으로써 간독성의 변화를 가늠할 수 있었다.

적출간 관류법은 약물이나 화학물질의 간독성 연구에서 사용빈도가 점점 증가하고 있는 방법으로 monooxygenase의 활성 및 conjugation을 통한 대사능력을 유지시키며 여러 합성 반응을 생체내에서와 같이 유지시켜 준다. 생체와 비슷한 구조로 되어 있는 시스템 내에서 살아 있는 간을 이용하여 실험을 하기 때문에 이 방법을 통하여 확인할 수 있는 대사나 독성의 패턴은 *in vitro*보다 *in vivo*에 가깝다고 볼 수 있다. 이 방법은 특히 실험도중 시료를 채취할 수 있기 때문에 간독성이 진행되는 과정을 세포의 변화를 통하여 살펴 볼 수 있었다. 국내 연구에서 고상백 등(1997)이 적출간 관류법을 이용한 N,N-dimethylformamide의 간독성 평가에 있어서 AST, ALT, LDH 등과 관류속도 및 산소소모율을 이용했는데 이 연구에서는 본 연구와는 달리 산소소모율이 증가하였으며 이를 이 물질의 대사에 cytochrome p-450가 관여한 결과인 것으로 설명하고 있다.

이 연구는 적출간 관류법이 가지고 있는 장점을 활용해 단순히 두 물질의 독성을 비교하는데에 그치지 않고 이전의 연구와는 달리 각 물질에 대하여 시간의 경과에 따른 독성의 변화를 확인함으로써 독성기전을 예측할 수 있었다는 데에 그 의의를 두고 있다. 이 연구를 실시하면서 확인한 적출간 관류법의 단점은 첫째, 실험방법상의 난점으로서 간을 조직에서 손상없이 적출해 내는 것이 매우 어려워 실패의 확률이 높다는 것이며 둘째, 간의 신선도 유지가 어려워 만성 독성에는 적용하는 것이 불가능하다는 것, 셋째, KRB(Krebs-Ringer bicarbonate) 용액에 대한 용해도가 낮은 물질의 경우, 실험에 어려운 점이 많다는 것이다. 하지만 유기용제를 비롯한 수용성이 높은 물질의 급성 간독성 연구에는 매우 적절한 실험방법이라 보며 이 방법을 이용한 독성연구가 국내에서도 활성화 될 수 있을 것으로

Table 2. Concentration(Mean±S.D) of AST, ALT, LDH in KRB solution having passed IPRL by sampling time at control, 200 μM NiCl₂ and 200 μM CdCl₂

Biochemical indicators	Groups	Sampling times(min)							
		0	15	30	45	60	75	90	
AST(U/L)*	none	25.80± 1.92	35.00± 2.92	35.40± 5.90	38.20± 2.39	39.40± 4.39	46.60± 2.70	48.80± 2.86	
	NiCl ₂	34.80± 3.35	183.60± 7.83	285.60±11.10	344.20±25.68	443.60± 31.19	625.60±23.53	746.80± 8.29	
	CdCl ₂	34.40± 1.82	80.60± 7.16	133.40± 5.59	575.20±55.50	982.60± 26.35	1568.40±56.93	2563.40±61.86	
ALT(U/L)*	none	11.20± 0.84	13.80± 1.64	16.60± 1.14	21.80± 1.64	25.00± 1.87	33.20± 3.11	43.40± 3.65	
	NiCl ₂	13.60± 2.07	22.00± 1.00	42.80± 2.49	73.40± 2.07	127.20± 1.79	247.60±11.19	387.40±11.10	
	CdCl ₂	14.40± 3.78	26.40± 2.88	96.80± 2.95	161.60±18.70	358.00± 20.76	460.00±25.11	619.80±17.37	
LDH(U/L)*	none	93.20± 2.86	106.80± 3.27	116.60± 2.61	127.20± 3.19	137.20± 6.76	132.00± 2.24	136.80± 2.28	
	NiCl ₂	93.60± 2.41	120.60± 3.65	184.60± 7.40	241.60±40.48	363.40± 20.88	577.40±12.84	1053.40±38.53	
	CdCl ₂	97.20± 1.30	167.00±19.39	323.40± 9.56	655.80±34.17	1410.20±155.40	2598.80±51.30	3880.80±46.63	

* : statistical significance(p<0.05) : difference among control and two exposure groups by sampling time(two-way repeated ANOVA)
 AST : aspartate aminotransferase ALT : alanine aminotransferase
 LDH : lactate dehydrogenase KRB : Krebs-Ringer bicarbonate
 IPRL : Isolated Perfused Rat Liver

본다.

요 약

목적 : 이 연구의 목적은 적출간 관류법을 통하여 염화니켈과 염화카드뮴의 간독성을 비교하는 데에 두었다.

방법 : AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), LDH(lactate dehydrogenase) 등의 간기능을 나타내는 생화학적 지표와 관류속도를 간독성 지표로 이용하였으며 산소소모율은 생존력을 나타내는 지표로 이용하였다. 300(±50) g 정도의 흰쥐를 대조군과 각 노출군(50 μM 및 200 μM의 염화니켈과 염화카드뮴)에 5마리씩 총 25마리를 무작위로 할당하였다. Krebs-Ringer bicarbonate buffer solution을 관류액 용도로 제조하여 간문맥에 투입하고 간세포를 통과하여 vena cava로 배출되는 관류액을 일정한 시간 간격을 두고 계속적으로 채취하였으며 채취한 관류액은 간독성 지표를 측정하는 데에 이용하였다.

결과 : AST, ALT, LDH 모두 염화니켈 보다는 염화카드뮴 투여군에서 시간의 경과에 따라 큰 폭으로 증가하였으며 반복 측정된 2요인 분산분석을 실시한 결과, 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다. 생존력은 두 물질 모두에서 시간의 경과에 따라 감소하는 경향을 나타냈다.

결론 : 결론적으로, 이 실험상에서는 염화니켈 보다 염화카드뮴의 간독성이 더욱 강한 것으로 드러났다. 적출간 관류법의 특성상 급성 간독성 평가에는 적절한 기법으로 보이며 국내 연구에서도 이 방법이 널리 이용되기를 기대한다.

참고문헌

고상백, 차봉석, 강명근, 고상열, 이중우, 권상욱. 적출간 관류법에 의한 N,N - dimethylformamide의 대사 및 간독성. 대한산업의학회지 1997; 9(2): 217-229.
 Bergmeyer HU, Hoder M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry(IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: Approved recommendation(1988) on IFCC methods measurement of catalytic concentration of enzymes. part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *J Clin Chem Biochem* 1986; 24(7): 497-510.
 Bergmeyer HU, Hoder M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry(IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: Approved recommendation(1988) on IFCC methods measurement of catalytic concentration of enzymes. part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Biochem* 1986; 24(7): 481-495.
 Chen CY, Huang YL, Lin TH. Association between oxidative stress and cytokine production in nickel-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 1998; 356(2): 127-132.
 Donskoy E, Donskoy M, Forouhar F, Gillies-CG, Marzouk A, Reid MC, Reid MC, Zaharia O, Sunderman FW Jr. Hepatic toxicity of nickel chloride in rat. *Ann Clin Lab*

Sci 1986; 16(2): 108-117.
 Dudley RE, Klaassen CD. Changes in hepatic glutathione concentration modify cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 72: 530-538.
 Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen CD. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 65: 302-313.
 Frazier JM, Kingsley BS. Kinetics of cadmium transport in the isolated perfused rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976; 38: 583-593.
 Gores GJ, Kost LJ, LaRusso NF : The Isolated Perfused Rat Liver; Conceptual and Practical Considerations, *Hepatology* 1988; 6(3): 511.
 Harvey MJ, Klaassen CD. Interaction of metals and carbon tetrachloride on lipid peroxidation and hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 71: 316-322.
 Kingsley BS, Frazier JM. Cadmium transport in isolated perfused rat liver : zinc-cadmium competition. *Am J Physiol* 1979; 236(3): C139-C143.
 Lupo S, Hewitt WR, Rush GF. Cadmium toxicity in the isolated perfused rat liver. *Toxicol Lett* 1986; 34: 5-11.
 Miller LL. History of isolated liver perfusion and some still unsolved problems, in Bartosek I, Guaitani A, Miller LL(eds) : Isolated liver perfusion and its application. New York, Raven Press, 1972, pp 1-9.
 Misra M, Rodriguez RE, Kasprzak KS. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlatin with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology* 1990; 64: 1-17.
 Panemangalore M, Brady FO, Lindgren P, Kolbeck P. Induction and synthesis of metallothionein in isolated perfused rat liver. *J Biol Chem* 1978; 10: 7898-7904.

- Sato M, Yamanobe K, Nagai Y. Sex-related differences in cadmium-induced lipid peroxidation in the rat. *Life Sciences* 1983; 33: 903-908.
- Stacey NH, Cantilena LR JR., Klaassen CD. Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 53: 470-480.
- Strubelt O, Kremer J, Tilse A, Keogh J, Pentz R. Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium, and copper toward the isolated perfused rat liver. *J Toxicol Environ Health* 1996; 47: 267-283.
- Sunderman FW Jr, Reid MC, Bibeau LM, Linden JV. Nickel induction of microsomal heme oxygenase activity in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 68(1): 87-95.
- Sweeny DJ, Reinke LA. Metabolism of benzo(a)pyrene in the isolated perfused rat liver. Factors affecting the release of phenolic metabolites into bile and perfusate. *Carcinogenesis* 1987; 8: 779-783.