

솔잎 열수추출물이 카드뮴으로 유도한 흰쥐의 산화적 손상에 미치는 영향

장주연¹ · 김명주¹ · 이미경² · 김덕진^{3*}

¹대구산업정보대학 식품영양과

²순천대학교 식품과학부

³대구대학교 식품공학부

Effect of Pine Needle Water Extract on Cadmium-Induced Oxidative Stress in Rats

Joo-Yeun Jang¹, Myung-Joo Kim¹, Mi-Kyung Lee² and Duk-Jin Kim^{3*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Daegu Polytechnic College, Daegu 706-022, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Jeonnam 540-742, Korea

³Division of Food Engineering and Nutrition, Daegu University, Gyeongbuk 712-714, Korea

Abstract

Oxidative stress can play a key role in cadmium (Cd)-induced dysfunction. The present study examined the effect of pine needle water extract (PN) on Cd-induced oxidative stress in rats. Sprague-Dawley male rats were divided into three groups: normal group, Cd control group (Cd) and PN-administered Cd group (Cd-PN). CdCl₂ in 0.9% NaCl was administered orally with a dose of 5 mg/kg of body weight/week, while the PN was administered orally with a dose of 1.26 g/kg of body weight/day. Body weight gain was not different between groups, whereas food intakes were significantly lower in the Cd-PN group than in normal or Cd group. Relative liver weight was significantly increased by cadmium administration compared to the normal group. Hepatic cytochrome P450 was significantly lower in Cd and Cd-PN groups than in normal group, while xanthine oxidase and alcohol dehydrogenase activities were significantly higher in the Cd-PN group than in normal or Cd group. Increased hepatic superoxide dismutase, monoamine oxidase, catalase, and glutathione peroxidase activities by cadmium administration were significantly decreased by PN supplement. PN did not affect the hepatic glutathione content in cadmium-administered rats; however, PN significantly lowered the hepatic lipid peroxide level and plasma alanine transferase activity compared to the Cd control group. These results suggest that the PN may alleviate Cd-induced oxidative stress without hepatotoxicity.

Key words: cadmium, pine needle water extract, oxidative stress, hepatotoxicity

서 론

카드뮴은 다른 중금속 화합물에 비하여 적은 양으로도 독성을 나타내는 환경오염물질이며 암을 유발하는 것으로 알려져 있다(1). 현대인들은 페인트, 플라스틱, 안정제, 축전지, 살충제, 비료, 화장품용기, 납땀 등을 통해 카드뮴에 쉽게 노출되어 있으며(2) 특히 흡연, 오염된 물과 식품을 통해 카드뮴에 중독될 수 있다(3). 구미나 일본의 경우 식이를 통한 카드뮴 섭취량은 FAO/WHO에서 정한 주간 잠정 섭취 허용량(PTWI: provisional tolerable weekly Cd intake) 0.5 mg의 20~70% 수준이다(4). 국내에서는 PTWI에 대한 체계적인 연구결과는 보고되지 않았으나, 식품 중 카드뮴에 의한 위해성 평가에서 쌀 섭취를 통한 카드뮴 노출이 가장 높은 요인으로 나타났다(5). 이러한 식품으로 유입된 카드뮴의 장

기내 흡수율은 5% 정도이지만, 철분이나 칼슘 등이 결핍된 경우 20%까지 그 흡수율은 높아질 수 있다(6). 특히 카드뮴은 체내로 들어오면 배출되지 않고 몸속에 남으므로 적은 양이라고 장기간 노출될 경우 위해를 일으킬 수 있다. 카드뮴에 의한 주요 손상 장기는 간과 신장이며, 체내의 생물학적 반감기는 10~30년 정도이다(7).

카드뮴 독성의 중요 기전으로는 조직과 DNA의 산화적인 손상이 알려져 있으나(8,9), 세포독성기전에 대해서는 아직 분명히 밝혀지지 않고 있다. 특히, 중금속의 임상적 중독증상과 해독은 동물체내의 영양상태나 항산화물질의 영향을 받는다는 보고(10,11)들로 인하여 카드뮴의 체외 배설에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있다(12). 최근 카드뮴의 산화적 영향은 간접적이며 주로 주요 분자의 티올기를 불활성하여 항산화 방어계와 DNA 회복기전을 손상시키는 것으로

*Corresponding author. E-mail: djkim@daegu.ac.kr
Phone: 82-53-850-6534, Fax: 82-53-850-6559

보고(13)됨으로써 중금속으로 인한 산화적 손상을 항산화 소재들을 이용하여 예방하려는 노력과 연구가 진행되고 있다.

이 천연 항산화소재 중 솔잎은 전국 산야에서 흔히 자라는 상록 침엽 교목인 소나무(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)의 잎으로 예로부터 신비의 약초로 민간에서 널리 이용되어 왔다. 특히 잎부분은 비타민 C의 원료, 괴혈병과 어린이 영양실조증에, 잎의 chlorophyll은 고약을 만들어 피부병에, 솔잎차는 신경통, 관절염, 동맥경화 치료에 사용되어 왔다(14). 솔잎의 성분은 ascorbic acid, carotene, 비타민 K, flavonoid, anthocyan, 수진, 탄닌, quinic acid, shikimic acid, 정유 등이 있으며 독성이 있는 alkaloid 성분은 들어있지 않는 것이 특징이다. 또한 pinene, terpinene, cymene 및 limonene 등 다양한 종류의 테르펜화합물이 포함되어 있는 것으로 보고되었다(15).

최근 솔잎의 항당뇨 효과(16), 솔잎증류액의 암세포에 대한 *in vitro* 세포독성(17), 지질저하 및 항산화효과(18), 항균 효과(19) 등 많은 연구결과들이 보고되면서 솔잎은 다양한 약리활성을 가진 천연식물로 인정되고 있다. 따라서 본 연구에서는 카드뮴으로 산화적 손상을 유도한 흰쥐에게 솔잎 열수추출물을 보충한 후 혈장의 바이오마커 및 간조직의 유해활성 산소의 생성과 제거에 관여하는 효소들의 활성도와 과산화지질 함량을 측정하였다.

재료 및 방법

솔잎 열수추출물 제조

본 실험에 사용된 솔잎은 대구 약령시장에서 구입하여 음건한 후 작은 절편으로 만들어 균질기로 파쇄하였다. 분말시료 100 g을 둥근플라스크에 넣고 10배량의 증류수를 가하여 4시간 동안 가열추출하고 그 여액을 회전증발농축기로 감압농축하여 동결건조한 후 사용하였다. 동결건조한 시료의 수율은 19.8%이었으며, 솔잎 열수추출물의 총 페놀성 화합물은 7.81%이었다.

실험동물의 사육

실험동물은 4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 21마리를 1주일간 기본식이로 적응시킨 후 평균 체중 120 ± 10 g인 것을 난피법에 의해 3군으로 나누어 한마리씩 분리하여 4주간 사육하였다. 실험군은 정상군(Normal), 카드뮴 대조군(Cd), 카드뮴과 솔잎 열수추출물 투여군(Cd-PN)으로 나누었다.

솔잎 열수추출물은 사람이 섭취하는 양을 고려하여 매일 일정시각에 체중 kg당 1.26 g 수준이 되도록 경구투여하였다. 카드뮴($CdCl_2$)은 탈이온 증류수에 녹여 LD_{50} 에 근거하여 체중 kg당 5 mg을 매주 1회 일정 시각에 경구투여하였으며 정상군은 0.9% 생리식염수를 투여하였다.

본 실험에 사용한 기본식은 AIN-76(20) 식이조성에 준하여 조제하였으며, 단백질 공급원으로는 카제인(Murray Co.)

을 공급하였고, 탄수화물 공급원으로는 옥수수 전분(신동방), 지방공급원으로는 옥수수 기름(제일제당)을 사용하였다. 사육실 온도는 $20 \pm 2^\circ C$ 로 유지하였으며, 조명은 12시간 주기(08:00~20:00)로 조절하였다. 사육시 일어날 수 있는 무기질의 오염을 방지하기 위하여 실험 시작 전 사육에 필요한 모든 기구는 0.4% EDTA용액으로 세척하여 사용하였으며 실험기간 동안 물은 탈이온 증류수를 공급하였다.

체중은 측정 12시간 전에 식이급여를 중단하여 매주 1회 일정 시각에 측정하였으며, 최종 체중에서 실험 개시전의 체중을 감하여 실험기간 중의 체중증가량으로 나타내었다. 식이섭취량은 매일 일정한 시각에 측정된 후 급여량에서 잔량을 감하여 계산하였다.

혈액 분리 및 조직 적출

희생전 12시간 절식시킨 후 에테르로 마취시켜 개복하여 헤파린 처리된 주사기로 복부대동맥으로부터 채혈하였으며, 간조직은 채혈 직후 빙냉의 0.25 M 수크로오스 용액으로 간을 판류하여 혈액을 제거한 다음 적출하여 생리식염수로 씻어 여과지로 수분을 제거한 후 평량하였다. 헤파린 처리된 혈액은 $4^\circ C$ 에서 20분간 방치한 다음 $600 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다.

간조직의 효소원 조제

간조직은 0.25 M 수크로오스 용액을 가하여 빙냉하에서 마쇄한 균질액(20% w/v%)을 얻어, $600 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상층액을 얻었다. 이를 $10,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리(Hitachi 20PR-520)하여 미토콘드리아 분획을 취하였으며, 분리된 상층액을 $105,000 \times g$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 시토졸 분획과 마이크로소姆 분획을 취하였다.

미토콘드리아 분획은 monoamine oxidase(MAO)와 catalase(CAT) 활성측정에, 시토졸 분획은 xanthine oxidase(XO), alcohol dehydrogenase(ADH), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성 측정에, 마이크로소姆 분획은 cytochrome P450(CYP) 함량 측정에 사용하였다. 효소의 활성도는 소의 혈청 알부민을 표준품으로 하여 Lowry 등의 방법(21)에 준해 측정된 단백질 mg당의 고유 활성도로 나타내었다.

혈장 중의 aminotransferase 활성도 및 알부민과 크레아티닌 함량

Aspartate transferase(AST)와 alanine transferase(ALT) 활성도는 Reitman과 Franke의 방법(22)에 준하여 조제된 kit(아산제약, 한국) 시약을 사용하여 측정하였다. 알부민과 크레아티닌 함량도 kit(아산제약, 한국) 시약을 사용하여 측정하였다.

효소활성도 측정

XO 활성도는 Stürpe와 Della Corte의 방법(23)에 준하여

0.1 M 인산칼륨 완충액(pH 7.5)에 60 μM 크산틴 용액, 0.6 mM NAD⁺ 용액 및 효소액을 가하여 최종 반응액이 4.0 mL 가 되도록 한 후 37°C에서 5분간 정치시킨 후 20% 삼염화아세트산 용액 0.5 mL를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 단백질을 제거한 후 생성된 요산을 292 nm에서 읽고 검량선에 준하여 효소활성도를 산출하였다. ADH 활성도는 Bergmeyer의 방법(24)에 의하여 70 mM 글리신/수산화나트륨 완충액 일정량에 기질인 10 mM 알코올 용액과 0.67 mM NAD⁺ 용액 및 효소액 0.1 mL를 첨가하여 최종 반응액이 4.0 mL가 되게 한 다음 37°C에서 5분간 반응시킨 후 생성된 NADH를 340 nm에서 측정하고 표준검량선에 준하여 활성도를 산출하였다. SOD 활성도는 Marklund와 Marklund의 방법(25)에 준하여 건조적 1 g의 9배량의 10 mM EDTA 용액을 함유한 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.6)으로 마쇄하여 얻은 균질액을 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 얻은 상층액에 알코올:클로로포름(5:3) 혼액 0.4배량을 가하고 5분간 잘 섞은 다음 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이것을 효소액으로 하여 10 mM EDTA 용액을 함유한 50 mM Tris-HCl 완충액에 0.5 mM 피로갈롤 용액과 효소액을 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N 염산용액을 가한 후 440 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 산출하였다.

MAO 활성도는 Kalaria 등의 방법(26)에 준하여 100 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.4) 일정량에 3 mM 아지드화나트륨 용액을 넣고 효소액의 단백질이 100~250 μg이 되도록 준비하고 여기에 1 mL 벤질아민을 첨가한 다음 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1.8 mM 2,2-아지노-비스와 5 unit 호올스라디쉬 퍼옥시다제를 첨가하여 변색된 물질을 414 nm에서 흡광도를 측정 한 후 활성도를 산출하였다.

CAT 활성도는 Aebi의 방법(27)으로 50 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)에 기질인 10 mM 과산화수소 용액 및 효소액을 가하여 최종 반응액이 3.0 mL가 되게 한 다음 25°C에서 30분간 반응시키면서 240 nm에서 소실되는 과산화수소 양을 측정하여 활성도를 산출하였다. GSH-Px 활성도는 Paglia와 Valentine의 방법(28)에 준하여 2,4-디니트로클로로벤젠과 환원형 글루타티온을 기질로 하여 25°C에서 20분간 반응하는 동안 생성된 GSH-DNCB 공액의 분자 흡광도 계수를 이용하여 효소활성도를 측정하였다.

Cytochrome P-450 함량 측정

간조직 중 CYP 함량은 Omura와 Sato의 방법(29,30)에

준하여 시험관내 마이크로소옴 분획을 넣고 바늘을 통해 1 분간 일산화탄소 가스를 발생시킨 후 환원제로 디티오니트 나트륨 30 mg을 넣고 잘 혼합하여 1분간 일산화탄소 가스를 발생시켰다. 이상의 조작은 4°C 이하에서 행하였다.

기포 생성이 끝난 후 분광광도계를 사용하여 파장 400~500 nm에서 마이크로소옴 분획과 CO 결합 마이크로소옴 상호간 스펙트럼 차이를 그려 CYP CO-complex에 의한 흡광량으로 하고, CYP CO-complex의 몰흡광계수(ε=91 mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 함량을 계산하였다. CYP 함량은 마이크로소옴 단백질 1 mg당 nmol로 나타내었다.

글루타티온(GSH) 및 과산화지질 함량

글루타티온 함량은 Ellman의 방법(31)에 준해 비단백성 간조직 1 g당 4배량의 0.25 M 수크로오스 완충액을 가해 마쇄한 다음 균질액 0.2 mL와 4% 술폰살리실산 0.5 mL를 가하여 2,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 상층액 중 0.3 mL에 셀프히드릴기의 발색제인 5,5'-디티오비스를 이용하여 412 nm에서 비색정량한 다음 산화형 글루타티온의 표준 검량선에 의하여 그 양을 산출하였다.

과산화지질 함량은 Ohkawa 등의 방법(32)에 의하여 측정하였다. 건조적 1 g당 4배량의 0.25 M 수크로오스 완충액을 가해 마쇄하여 균질액을 얻은 다음 TBA 방법을 이용하여 생성된 말론디알데히드 양을 측정하였다.

통계처리

실험결과는 SPSS package 프로그램을 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군간의 평균치에 대한 유의성 검정은 one-way ANOVA를 실시하였고, 실험군간의 통계적 유의성은 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

체중증가량, 식이섭취량 및 간조직 무게

카드뮴 투여된 흰쥐에게 솔잎 열수추출물을 4주간 급여하여 사육한 흰쥐의 1일 체중증가량, 식이섭취량과 간조직 무게를 Table 1에 나타내었다.

카드뮴 투여에 의한 체중증가량 및 식이섭취량의 유의적인 변화는 관찰되지 않았는데, 본 실험에서 카드뮴으로 인해 급격한 체중감소를 보인 경우 사망함으로써 실험 종료시 체중변화에는 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다. 카드뮴

Table 1. Effect of pine needle water extract on weight gain, food intakes and relative liver weight in Cd-treated rats

	Normal (n=7) [*]	Cd (n=5)	Cd-PN (n=7)
Net weight gain (g/day)	5.56±0.16 ¹⁾	5.41±0.17	5.38±0.17
Feed intakes (g/day)	22.82±0.64 ²⁾	22.57±0.47 ^a	21.41±1.16 ^b
Liver weight (g/100 g B.W.)	3.20±0.15 ^a	3.41±0.46 ^b	3.32±0.16 ^{ab}

¹⁾Mean±SD. ²⁾Means in the row not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05).

^{*}Numbers of survived rats at the end of experiment.

대조군의 생존율은 71%이었으나 솔잎 열수추출물군은 100%이었다. 최근 카드뮴을 농도별(0, 0.5, 5, 10 mg/kg B.W.)로 폐지에게 투여했을 때 5 mg까지는 체중에 영향을 미치지 않았으나 10 mg 투여시 대조군에 비하여 유의적인 체중감소가 보고(33)되었다.

식이섭취량 역시 카드뮴에 의한 유의적인 변화가 관찰되지 않았는데, Erdogan 등(34)도 카드뮴이 체중감소를 유발하였으나 식이섭취에는 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 반면, 솔잎 열수추출물군은 정상군과 카드뮴 대조군에 비해 식이섭취량이 유의적으로 감소되었다. Kim과 Kim(35)은 솔잎 중에 식욕을 억제하거나 또는 포만감을 통해 식이섭취량을 감소시킬 수 있는 성분의 함유 가능성을 제시한 바 있다.

흰쥐의 100 g 당 간조직 무게는 카드뮴 대조군이 정상군에 비하여 유의적으로 높았으며 솔잎 열수추출물 급여시 유의적이지는 않으나 카드뮴 대조군에 비하여 간조직 무게가 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 카드뮴에 의해 간의 무게가 증가되었다는 Strubelt 등(36)의 보고와 일치하는 결과이다.

혈장의 aminotransferase 활성 변화

간독성 지표로 알려진 혈장 중의 aminotransferase(AST와 ALT) 활성을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다.

AST 활성은 카드뮴 투여시 정상군에 비하여 유의적으로 높았으며 솔잎 열수추출물에 의한 영향은 관찰되지 않은 반면, 카드뮴으로 인해 정상군보다 2배 이상 증가한 ALT 활성은 솔잎 열수추출물 급여로 16%의 유의적인 감소를 보였다.

이와 같이 카드뮴으로 인한 간손상은 혈중의 aminotransferase의 활성을 증가시켰으나 솔잎 열수추출물이 ALT 활성을 유의적으로 감소시켰으므로써 간손상을 완화하는 것으로 사료된다. 또한 Lee(37)는 과산화지질을 급여한 흰쥐에게 솔잎분말을 급여할 경우 AST와 ALT 활성이 감소되었음을 보고하였고, Kim 등(38)도 당뇨유발 흰쥐에게

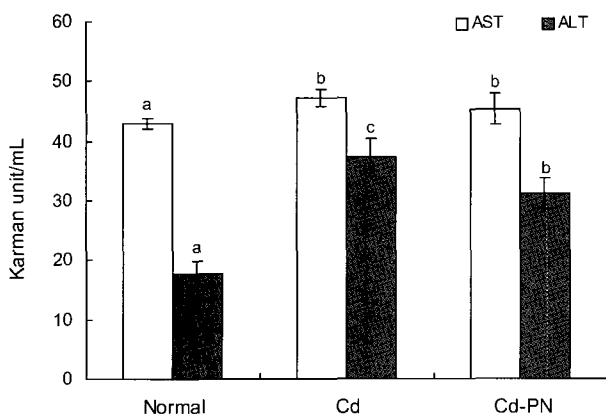


Fig. 1. Effect of pine needle water extract on plasma aminotransferase activity in Cd-treated rats.

Mean ± SD. The means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). Normal, normal group; Cd, cadmium treated group; Cd-PN, cadmium & pine needle water extract group. Numbers of survived rats at the end of experiment are 7, 5, and 7, respectively.

솔잎증류액 투여시 AST 활성에는 영향을 미치지 않았으나 ALT 활성은 유의적으로 저하되는 것으로 보고함으로써 본 실험의 솔잎의 효과와 일치하였다.

혈장의 알부민과 크레아티닌 함량변화

카드뮴은 일차적으로 간독성을 나타내지만(39) 시간이 경과함에 따라 신독성을 나타내고(40) 고분자 물질인 알부민 배설을 증가시킨다. 본 실험에서 크레아티닌 농도를 측정할 결과 정상군과 카드뮴 대조군간의 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 4주간의 카드뮴 투여는 신장손상을 유발하지 않은 것으로 사료되며 카드뮴이 혈청 크레아티닌 농도에 영향을 미치지 않았다는 보고(34)와 일치한다. 또한 본 실험에 사용된 카드뮴 양과 투여기간은 혈장의 알부민 함량에도 영향을 미치지 않았다(Table 2).

그러나 솔잎 열수추출물 급여로 크레아티닌 함량이 유의적으로 낮아졌다(Table 2). 크레아티닌은 근육에서 크레아틴의 대사 최종 물질로 신세뇨관에서 재흡수없이 대부분 요로 배설된다. 일반적으로 혈청 크레아티닌 농도는 정상인 경우 혈액의 농도는 일정하게 유지되나(41) 요독증, 만성신장염 등에서 증가하고 사구체여과율과 상관성이 있으므로 신장기능 장애의 중요한 지표가 된다. 본 실험에서는 솔잎 열수추출물에 의한 크레아티닌 함량 저하는 체중저하와 알부민 함량 변화로 미루어 체내 저장된 단백질이나 아미노산의 분해 때문으로 사료된다.

간조직 중의 CYP 함량 및 XO와 ADH 활성도

체내의 흡수된 독성 이물질은 대부분 간조직 중에서 phase I 반응 또는 phase II 반응을 통해서, 혹은 phase I 과 phase II 반응 모두를 통해 대사되어 체외로 배설된다(42). Phase I 반응의 산화과정은 간세포의 소포체내 다량 존재하는 monooxygenase system에 의해 이루어지는데 이 system을 구성하는 cytochrome P450 reductase와 cytochrome P450은 산소를 받아서 한 원자는 기질을 산화시키고 다른 산소원자는 물로 환원시킨다. 그러나 phase I 반응으로 인해 생성된 반응 중간 생성물의 독성은 더욱 강해져서 조직을 손상시킬 수 있으나 연이어 phase II 반응의 활성화로 조직이 중간 생성물의 독성영향을 받지 않고 배설시킬 수 있어 생체는 항상성 유지된다. 따라서 본 실험에서는 간조직 중의 CYP 함량 및 XO와 ADH 활성도를 측정하여 Table 3에 나타내었다.

Table 2. Effect of pine needle water extract on plasma albumin and creatinine contents in Cd-treated rats (mg/dL)

	Normal (n=7) ^a	Cd (n=5)	Cd-PN (n=7)
Albumin	4.56 ± 0.65 ¹⁾	4.43 ± 0.40	4.81 ± 0.58
Creatinine	0.68 ± 0.01 ²⁾	0.67 ± 0.04 ^a	0.60 ± 0.01 ^b

¹⁾Mean ± SD.

²⁾Means in the row not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$).

^aNumbers of survived rats at the end of experiment.

Table 3. Effect of pine needle water extract on hepatic cytochrome P-450 content, xanthine oxidase and alcohol dehydrogenase activities in Cd-treated rats

	Normal (n=7) [*]	Cd (n=5)	Cd-PN (n=7)
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.56 ± 0.05 ^{1)a2)}	0.17 ± 0.01 ^b	0.17 ± 0.1 ^b
Xanthine oxidase (uric acid nmol/mg protein)	2.21 ± 0.28 ^a	2.18 ± 0.04 ^a	2.58 ± 0.27 ^b
Alcohol dehydrogenase (nmol/min/mg protein)	11.28 ± 0.89 ^a	10.65 ± 0.80 ^a	13.83 ± 1.64 ^b

¹⁾Mean ± SD. ²⁾Means in the row not sharing a common letter are significantly different among groups (p < 0.05).

^{*}Numbers of survived rats at the end of experiment.

Table 4. Effect of pine needle water extract on hepatic superoxide dismutase, monoamine oxidase, catalase, glutathione peroxidase activities and glutathione content in Cd-treated rats

	Normal (n=7) [*]	Cd (n=5)	Cd-PN (n=7)
Superoxide dismutase (Unit/mg protein)	7.99 ± 0.81 ^{1)a2)}	10.07 ± 0.40 ^b	7.76 ± 0.96 ^a
Monoamine oxidase (nmol/min/mg protein)	2.55 ± 0.24 ^a	3.44 ± 0.58 ^b	2.38 ± 0.61 ^a
Catalase (nmol/min/mg protein)	7.47 ± 1.05 ^a	13.21 ± 2.59 ^b	7.73 ± 3.12 ^a
Glutathione peroxidase (nmol/min/mg protein)	3.39 ± 0.30 ^a	4.92 ± 0.68 ^b	4.25 ± 0.82 ^a
Glutathione (µmol/g liver)	3.56 ± 0.16 ^a	4.00 ± 0.11 ^b	4.01 ± 0.18 ^b

¹⁾Mean ± SD. ²⁾Means in the row not sharing a common letter are significantly different among groups (p < 0.05).

^{*}Numbers of survived rats at the end of experiment.

간조직 중의 CYP 함량은 카드뮴 투여시 정상군에 비해 유의적으로 낮았다. 이는 카드뮴이 단백질 합성 저해 또는 ferric CYP인 hemoprotein의 생성을 감소시키거나 분해를 촉진하는(43) microsomal heme oxidase를 활성화시키기 때문에 CYP의 감소는 간의 해독기능을 저하를 의미하는 것으로 사료된다. 술잎 열수추출물은 CYP 함량에는 영향을 미치지 않았는데 CYP 함량은 천연항산화제 첨가가 직접적으로 영향을 미치기보다 독성물질의 종류 및 투여량에 더 밀접한 관계가 있을 수 있다고 보고(44)되었다.

XO 역시 생물체내에서 외래성 독성물질 대사에 관련된 효소로서 이들 물질 대사 중 과산화수소를 통하여 자유기 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다(45). 본 실험에서는 카드뮴 투여에 의한 XO 활성도 변화는 나타나지 않았으나 술잎 열수추출물 급여는 정상군과 대조군에 비하여 XO 활성도를 상승시키는 것으로 나타났다. 이는 카드뮴 독성으로 시토크롬 P450 자동산화가 촉진되어 O₂⁻ 생성이 증가되고 또한 ADH 활성증가로 인해 과잉생성된 NADH로 인해 과산화수소 생성이 증가된 때문으로 사료된다.

ADH 활성 변화 양상은 XO와 유사한 것으로 카드뮴 투여에 의한 ADH 활성변화는 나타나지 않았다. 이는 카드뮴이 metallothionein(MT)을 유도하기 전에 일시적으로 카드뮴을 고립시켜 효소활성에 영향을 주기 않고 카드뮴 독성을 유발할 수 있다는 Suzuki 등의 보고(46)로 설명할 수 있다. 술잎 열수추출물 급여군에서는 카드뮴 대조군에 비해 유의적으로 높았다. 이는 술잎 알코올 추출물 급여시 흰쥐의 ADH 활성을 유의적으로 증가시켰다는 Cho 등의 보고(47)와 유사한 결과이다.

간조직 중의 SOD, MAO, CAT, GSH-Px 활성도 및 글루타티온(GSH) 함량

간조직 중의 항산화방어계 관련 효소들의 활성도를 측정

하여 Table 4에 나타내었다.

강력한 킬레이트제를 사용하여 카드뮴 결합을 통해 배설하는 방법(48)을 제외하고 항산화제가 카드뮴 독성을 치료하는데 매우 효과적인 것으로 제시되고 있다(49). 본 실험에서 간조직 중의 SOD, MAO, CAT 및 GSH-Px 활성도는 카드뮴 대조군에서 정상군에 비하여 높았는데 이는 카드뮴에 의해 SOD, GSH-Px, CAT 등의 항산화 수준이 증가되었다는 Kanter 등의 보고(50)와 카드뮴 투여에 의해 CAT와 SOD가 증가되었다는 Gomes-Junior 등(51)의 보고와 일치한다. 반면 카드뮴을 체중 kg당 7 mg으로 1회 피하주사할 경우 간조직의 CAT와 GSH-Px 활성이 유의적으로 저하되었다는 보고(47)와는 상이한 결과이나 이는 카드뮴의 투여량과 기간에 따른 차이라고 생각된다. 카드뮴 투여에 의한 MAO 활성 증가는 활성산소 생성에 따른 결과로 사료되며 술잎 열수추출물 급여시 유의적인 활성 감소가 관찰되었다. Leung 등(52)은 카드뮴에 의해 MAO 활성이 증가하였으며 카드뮴의 신경독성은 MAO isoform의 직접적인 저해를 통해 나타날 수도 있다고 설명하였다. 본 실험에서 술잎 열수추출물군은 이들 항산화효소의 활성도를 정상군 수준으로 회복시키는 것으로 나타났다.

글루타티온은 주요한 비단백티올이며 중금속과 이물질해독과 연관되어 많은 기능을 하며, 산화적 스트레스에 주요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(53). 간조직 중의 글루타티온 농도는 정상군에 비하여 카드뮴을 투여한 대조군에서 유의적으로 증가되었는데 이는 글루타티온 감소가 phase II 약물대사계의 효능을 감소시키므로 해독계의 활성을 증가시키기 위한 보상기전이라 사료된다. 술잎 열수추출물에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

간조직 중의 과산화지질 함량

카드뮴으로 인한 독성은 여러 반응을 거쳐 지질 과산화

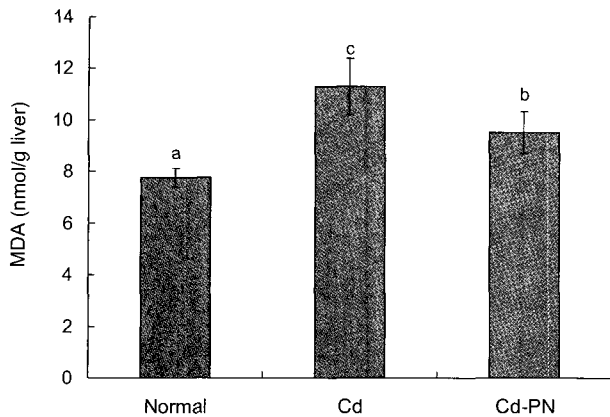


Fig. 2. Effect of pine needle water extract on hepatic lipid peroxide level in Cd-treated rats.

Mean \pm SD. The means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). Normal, normal group; Cd, cadmium treated group; Cd-PN, cadmium & pine needle water extract group. Numbers of survived rats at the end of experiment are 7, 5, and 7, respectively.

유도하고 이 과정에서의 최종산물인 MDA를 생성하여 간독성 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(54). 본 실험에서도 정상군에 비하여 카드뮴 대조군은 1.5배 간조직 중의 과산화지질 함량이 높은 것으로 나타났다(Fig. 2). 최근 보고에서도 카드뮴 투여시 지질과산화의 지표로 사용되는 MDA 수준이 증가되어 산화적 스트레스에 의한 간손상을 유발한다고 보고(55)되었다. 그러나 카드뮴 투여 흰쥐에게 솔잎 열수추출물을 급여한 경우 과산화지질 함량이 유의적으로 개선됨으로써 솔잎이 과산화물질 생성을 억제시켜 카드뮴에 의한 간독성을 완화시킨 것으로 사료된다. 이는 솔잎이 과산화지질을 감소시킬 수 있는 특정성분을 내재하고 있을 가능성을 시사하며 솔잎성분 분획에 의한 항산화물질에 대한 실험 필요성을 인식시켜 주었다.

요 약

솔잎 열수추출물이 카드뮴으로 유도한 흰쥐의 산화적 손상에 미치는 영향을 살펴보고자 체중 kg당 5 mg의 카드뮴($CdCl_2$)을 매주 1회 경구투여하였다. 솔잎은 매일 일정시간에 체중 kg당 1.26 g 수준이 되도록 4주간 경구투여 사육한 결과 카드뮴과 솔잎 열수추출은 체중에는 영향을 미치지 않았으며 솔잎 열수추출물은 식이섭취량을 감소시켰다. 체중 100 g당 간조직 무게는 카드뮴 대조군이 정상군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 솔잎 열수추출물은 간조직 무게를 감소시키는 경향이였다. 혈장 중의 AST와 ALT 활성은 카드뮴 투여에 의해 유의적으로 증가되었으나 솔잎 열수추출물에 의해 ALT 활성이 카드뮴 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었다. 혈장 알부민 함량은 실험기간의 차이가 없었으나 크레아티닌 함량은 솔잎 열수추출물 급여시 낮았다.

카드뮴 투여시 간조직의 CYP 함량은 유의적으로 감소되었으며 솔잎 열수추출물에 의한 영향은 없었다. 한편 XO와 ADH 활성은 솔잎 열수추출물군이 정상군과 카드뮴 대조군에 비하여 유의적으로 높았다. 또한 카드뮴 투여에 의해 유의적으로 높아진 SOD, MAO, CAT 및 GSH-Px 활성도는 솔잎 열수추출물에 의해 정상수준으로 회복되었다. 간조직 중의 글루타티온 함량은 솔잎 열수추출물 급여에 의한 차이가 발견되지 않았으나 MDA 함량은 솔잎 열수추출물 급여군에서 카드뮴 대조군에 비하여 유의적인 감소를 보임으로써 카드뮴에 의해 유도된 지질과산화가 솔잎 열수추출물 급여로 개선될 수 있음을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 대구대학교 학술연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-Elkins M, Reilly PE, Williams DJ, Moore MR. 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non occupationally exposed population. *Toxicol Lett* 137: 65-83.
- David RD. 1984. Cadmium a complex environmental problem. Part II. Cadmium in slugs used as fertilizer. *Experientia* (Basel) 40: 117-126.
- WHO/IPCS. 1992. Environmental Health Criteria Document 134 Cadmium. WHO, Geneva.
- FAO/WHO. 1972. Sixteenth Report of the Joint FAO/WHO expert Committee on Food additives. WHO Technical Report Series. No. 505. WHO/Geneva.
- Lee HM, Lim CJ, Yoon EK, Kim JW, Choi SA, Kim HM, Han JY, Kim PY. 2000. Risk assessment on cadmium in foods. The Annual Report of KFDA. Vol 4, p 67-77.
- US NLM. Hazardous Substances Data Bank (hsdb). 2000. Cadmium.
- WHO. Environmental Health Criteria 134. 1992. Cadmium.
- Alam J, Wicks C, Stewart D, Gong P, Touchard C, Otterberin S, Choi AMK. 2000. Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 275: 27694-27702.
- Ciesielska SA, Stachura A, Slotwinska M, Kaminska TM, Sniezko R, Paduch R, Abramczyk D, Filar A, Szerszen MK. 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 145: 159-171.
- Yin SA, Sato I, Hosokawa Y, Niizeki S, Tojo H, Yamagichi K. 1991. Effect of dietary zinc and cadmium on tissue selenium concentration and glutathione peroxidase activity in rats fed DL-selenomethionine and sodium selenite. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 37: 29-37.
- Kwan OR, Kim MK. 1992. The effect of dietary protein and calcium levels on metallothionein and histopathological changes during cadmium intoxication in rat. *Korean J Nutr* 25: 370-378.
- Kim HJ, Bae KH, Lee HJ, Eun JB, Kim MK. 1999. Effect of piperidin extracted from tangerine peel in Cd and lipid

- metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 32: 137-149.
13. Kil IS, Shin SW, Yoe HS, Park JW. 2006. Mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase protects cadmium-induced apoptosis. *Mol Pharmacol* 70: 1053-1061.
 14. MBC. 1988. *Handbook minganyobobdaejeun*. Kumbk Pub. Co., Seoul. p 21-25.
 15. Kim MJ, Ahn JH, Choi KH, Lee YH, Woo GJ, Hong EK, Chung YS. 2006. Effects of pine needle extract oil on blood glucose and serum insulin levels in db/db mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 321-327.
 16. Kim YM, Jeong YK, Wang MH, Lee WY, Rhee HI. 2006. Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* 21: 756-761.
 17. Chung YJ, Bae MW, Chung JS, Chung MS. 2002. Cytotoxic effect of the distilled pine-needle extracts on several cancer cell lines in vitro. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 691-695.
 18. Busserolles J, Gueux E, Balasinska B, Piriou Y, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A. 2006. In vivo antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) barks in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 77: 22-27.
 19. Park NH, Lee SH. 2003. Antimicrobial activity of pine needle extract and horseradish on the growth of vibrio. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 185-190.
 20. AIN: Report of American Institute of Nutrition. 1977. Ad Hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348.
 21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
 22. Reitman S, Franke S. 1957. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 2: 56-63.
 23. Stirpe F, Della Corte E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863.
 24. Bergmeyer HU. 1974. Alcohol dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. Vol 1, p 428-429.
 25. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol & a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
 26. Kalaria T, Mitchell MJ, Harik SI. 1987. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrene neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc Natl Acta Sci* 84: 3521-3525.
 27. Aebi H. 1974. Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU, ed. Academic Press, New York. Vol 2, p 673.
 28. Paglia ED, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
 29. Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2378.
 30. Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J Biol Chem* 239: 2379-2385.
 31. Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
 32. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
 33. Han XY, Xu ZR, Wang YZ, Huang QC. 2006. Effect of cadmium on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in growing pigs. *Biol Trace Elem Res* 110: 251-263.
 34. Erdogan Z, Erdogan S, Celik S, Unlu A. 2005. Effects of ascorbic acid on cadmium-induced oxidative stress and performance of broilers. *Biol Trace Elem Res* 104: 19-32.
 35. Kim ES, Kim MK. 1999. Effect of dried leaf powder and ethanol extracts of persimmon, green tea and pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 32: 337-352.
 36. Strubelt O, Kremer J, Tilse A, Keogh J, Pentz R, Younes M. 1996. Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium, and copper toward the isolated perfused rat liver. *J Toxicol Environ Health* 47: 267-283.
 37. Lee E. 2003. Effects of powdered pine needle (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.) on serum and liver lipid composition and antioxidative capacity in rats fed high oxidized fat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 926-930.
 38. Kim SH, Park OS, Kim MK, Jeong YJ. 2005. Effect of *Pinus densiflora* extract on blood glucose level, OGTT and biochemical parameters in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 973-979.
 39. Agarwal AK. 1988. Metabolic alteration in liver and testes of adult and new born rats following cadmium administration. *Bull Environ Contam Toxicol* 40: 569-575.
 40. Dudley RE, Gammal LM, Klaassen CD. 1985. Cadmium-induced hepatic cadmium metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 77: 414-426.
 41. Guyton AC, Hall JE. 1996. *Textbook of Medical Physiology*. 9th ed. W.B. Saunders, Philadelphia. p 34.
 42. Fry JR, Perry NK. 1981. The effect of aroclor 1254 pretreatment on the phase I and phase II metabolism of 7-hydroxycoumarin in isolated viable rat kidney cells. *Biochem Pharmacol* 30: 1197-1201.
 43. Krasny HC, Holbrook DJ. 1977. Effects of cadmium on microsomal hemoprotein and heme oxygenase in rat liver. *Mol Pharmacol* 14: 759-765.
 44. Chung YJ, Lim EY, Kim H. 1997. Effect of ascorbic acid supplementation on hepatic microsomal and mitochondrial cytochrome P450 system in diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 682-688.
 45. Watts RWE, Watts JEM, Seegmiller JE. 1965. Xanthine oxidase activity in human tissue and its inhibition by allopurinol. *J Lab Med* 66: 688-697.
 46. Suzuki KT, Sunaga H, Yamane Y, Aoki Y. 1991. Binding of cadmium to alcohol dehydrogenase in the liver before induction of metallothionein. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 74: 223-236.
 47. Cho SH, Kim JC, Kim HW. 2001. Effect of plant extract on the activity of alcohol dehydrogenase and the anti-oxidation in alcohol treated rat hepatocyte. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 679-683.
 48. Jones MM, Cherian MG. 1990. The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. *Toxicology* 62: 1-25.
 49. Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J. 2006. Comparative study of natural antioxidants-curcumin, resveratrol and melatonin-in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicol* 225: 150-156.
 50. Kanter M, Coskun O, Gurel A. 2005. Effect of black cumin (*Nigella sativa*) on cadmium-induced oxidative stress in blood of rats. *Biol Trace Elem Res* 107: 277-287.
 51. Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Polpeu GB, Gratao PL, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo RA. 2006.

- Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65: 1330-1337.
52. Leung TK, Lin L, Lai JC. 1992. Differential effects of metal ions on type A and type B monoamine oxidase activities in rat brain and liver mitochondria. *Metab Brain Dis* 7: 139-146.
53. Nocctor G, Foyer CH. 1998. Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. *Anal Biochem* 264: 98-110.
54. MaCay PB, Lai EK, Poyer JL. 1984. Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolis. *J Biol Chem* 259: 2135-2143.
55. Koyu A, Gokcimen A, Ozguner F, Bayram DS, Kocak A. 2006. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Mol Cell Biochem* 284: 81-85.

(2006년 12월 29일 접수; 2007년 3월 29일 채택)