

HK-2 세포에서 카드뮴 세포독성에 대한 密蒙花의 효과

주성민¹ · 강민수¹ · 전병훈^{1,2,*}

1: 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 2: 한국전통의학연구소

Effect of *Buddleja officinalis* on Cadmium-induced Cytotoxicity in HK-2 Cells

Sung Min Ju¹, Min Soo Kang¹, Byung Hun Jeon^{1,2,*}

1: Department of Pathology, College of Korean Medicine, Wonkwang University,
2: Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Cadmium is an important occupational and environmental pollutant that damages various organs, especially renal proximal tubular cells. We examined the effect of aqueous extract of *Buddleja officinalis* (ABO) on cadmium chloride (CdCl₂)-induced cytotoxicity in HK-2 human renal proximal tubular cells. HK-2 cells were preincubated with ABO (50, 100, 200 and 400 µg/ml) for 3 hr and then treated with 10 µM CdCl₂ for 24 hr. The effect of ABO on CdCl₂-induced cytotoxicity in HK-2 cells was investigated by using MTT assay, morphological observation, flow cytometric analysis and Western blot. The results of the MTT assay and morphological observation indicated that CdCl₂-induced cytotoxicity was prevented by pretreatment with ABO. In flow cytometric analysis, ABO reduced sub-G1 peak (apoptotic peak) in CdCl₂-treated cells. CdCl₂-induced procaspase-3 proteolysis and PARP cleavage reduced by pretreatment with ABO. These results suggest that ABO effectively inhibited CdCl₂-induced cytotoxicity in HK-2 cells.

Key words : *Buddleja officinalis*, Cadmium, Renal proximal tubular, HK-2 cells

서 론

카드뮴은 직업 및 환경의 오염물질로 다양한 생체기관에 손상을 유발한다¹⁾. 카드뮴의 체내 유입되는 과정은 음식물 섭취와 호흡 등의 경로를 통해 유입된다^{2,4)}. 또한, 흡수된 카드뮴은 생체 내에 축적됨으로서 중추신경마비, 근육의 무력화 및 돌연변이성 기형유발, 피부암 및 혈액암 등을 유발하는 생리기능계의 장애와 함께 생화학적 변화를 일으켜 여러 가지 질병을 일으킨다^{5,6)}.

일반적으로, 사람은 출생 초기 체내에 카드뮴이 존재하지 않지만 연령이 증가함에 따라 점진적으로 체내에 축적되고, 체내 카드뮴 총 축적량의 50~80%가 간과 신장에 축적된다⁷⁾. 특히, 신장의 카드뮴 축적은 근위세뇨관을 손상시켜 만성신장질환 (CKD; chronic kidney disease)의 위험성을 증가시킨다^{8,9)}. 따라서, 카드뮴과 같은 유해 중금속의 중독을 해결하고자 자연계에 존재하는 천연물을 이용한 중금속 흡착 연구가 활발히 진행되고

있다¹⁰⁻¹⁴⁾.

밀몽화(*Buddleja officinalis*)는 馬錢科(*Loganiaceae*)에 속한 낙엽 관목으로 꽃이나 꽃봉오리를 건조한 것으로 높이가 1-3 m이며 개화기는 2-3월이고 결실기는 7-8월이다. 봄에 꽃이 아직 피지 않았을 때 채취하여 건조한 것을 사용한다¹⁵⁾. 중국의 湖北, 四川, 河南이 주산지이며, 雲南, 湖南 등에 분포되어 있으며 산비탈, 언덕, 강가, 마을 부근의 관목 숲이나 풀숲에서 잘 자란다. 국내에서는 중남부 지방에서 약재로 재배하고 있다. 氣味가 味甘, 平, 微寒, 無毒하며, 또한, 祛風, 涼血, 潤肝, 明目 등의 효능이 있다¹⁶⁾. 밀몽화는 전통적으로 肝虛하여 눈이 잘 보이지 않는 병증에 주로 사용 하였으며, 서양에서는 결막충혈, 패혈증 등의 치료에 쓰인다고 보고되어 있다^{17,18)}. 밀몽화의 생물학적 효능으로는 항염증, 항균, 항암 효과 등이 알려져 있다¹⁹⁾. 또한, 식품에서 노란색의 천연 색소로 이용이 가능하다고 알려져 있다²⁰⁾.

본 연구에서는 다양한 약리작용을 나타내는 밀몽화 물추출물이 사람 근위세뇨관 세포주인 HK-2 세포의 카드뮴 독성에 미치는 효과에 대하여 실험 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : omdjbh@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6835

· 접수 : 2012/07/23 · 수정 : 2012/08/13 · 채택 : 2012/08/16

재료 및 방법

1. 밀몽화 물추출물 제조

밀몽화(*Buddlejase officinalis*)는 원광대학교 한방병원 (익산, 전북)에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1 kg (Voucher specimen DH)을 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분말로 하였으며, 삼각 플라스크에 밀몽화 300 g과 증류수 1.5 L를 넣고 냉각기를 설치한 후 120 분간 가열하였다. 추출된 전탕액을 3,000 rpm으로 30 분간 원심 분리 후 여과지 (Whatmann No. 3)를 이용하여 여과하였다. 여과된 밀몽화 전탕액을 냉동건조기를 이용하여 동결 건조시킨 후 사용 전까지 -20℃에 보관하였다. 수율은 약 9%였다.

2. 시약 및 항체

Cadmium chloride (CdCl₂), (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), Propidium iodide (PI), Ribonuclease A (RNase A), Protease inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Anti-procaspase-3 항체는 Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Anti-PARP 항체는 Cell Signaling Technology INC. (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다.

3. 세포배양 및 시약처리

HK-2 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 분양받았고, 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 DMEM/F12 배지 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada)를 사용하여 37℃와 5% CO₂상태에서 배양하였다. 세포는 시약처리 전 24시간 전배양하였다. 밀몽화 물추출물(50, 100, 200 and 400 µg/ml)은 3시간 전 처리 후, 10 µM 농도의 카드뮴을 24시간 처리하였다. 시약 처리된 세포는 무혈청(serum-free)배지에서 배양하였다.

4. 세포생존률검사

세포생존률은 MTT 방법을 사용하여 측정하였다. MTT 검사는 미토콘드리아의 숙신산 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 환원되는 원리를 기초로 하고 있다. 카드뮴과 밀몽화 물추출물을 24시간 처리한 세포는 5 mg/ml MTT용액을 첨가하여 4시간 배양 후, 비수용성의 MTT-formazan 결정들은 DMSO를 첨가하여 용해하였다. Formazan의 양은 SpectraMAX 250 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 세포생존률은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{cell viability} = (\text{mean OD of treated cells} / \text{mean OD of control cells}) \times 100$$

5. 세포형태관찰

카드뮴과 밀몽화 물추출물을 24시간 처리한 세포는 광학도립현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, GE)을 이용하여 ×100 배율로 관찰하였다.

6. 유세포분석

카드뮴과 밀몽화 물추출물을 24 시간 처리한 후, 부착되어 있는 또는 부유되어 있는 세포 모두를 수확하여 PBS로 세척하였다. 세척한 세포는 냉각된 70% 에탄올로 4℃에서 1 시간 동안 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 다시 세척하고 1 ml의 PI (10 µg/ml)/RNase A(100 µg/ml)용액으로 재부유시켜 37℃에서 암실조건으로 1 시간 배양하였다. DNA 양은 fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur (BD Biosciences, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 아포토시스가 나타나는 세포는 hypodiploid peak (Sub-G1)와 같은 PI 히스토그램으로 수치화하였다. Sub-G1 세포의 분석은 CellQuest Pro (BD Biosciences, CA, USA) software를 사용하여 측정하였다.

7. Western blot analysis

세포는 얼음 냉장된 PBS (pH 7.4)로 세척하고 1% protease inhibitor 혼합액이 포함된 RIPA buffer로 부유시킨 후, 얼음 위에서 30분간 용해하였다. 세포용해액은 4℃에서 14,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였고, 단백질 농도는 Bradford 검사법을 이용하여 측정하였다. 총 40 µg의 단백질 샘플을 SDS-PAGE 겔로 분리하였고 40V에서 3 시간 nitrocellulose 막 위로 단백질을 전이시켰다. 단백질이 전이된 막은 5% BSA가 포함된 Tris-buffered saline+Tween-20 (20 mM Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 차단시킨 후, 1차 항체를 결합시켰다. 면역 활성은 peroxidase가 붙어있는 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체를 사용하여 SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce, Rockford, IL, USA)에 의해 탐지하였다.

8. 통계처리

모든 데이터의 결과는 마이크로소프트 오피스 엑셀 (EXCEL) 2010으로 통계처리하여 mean±standard deviation (SD)로 기록하였다.

결 과

1. MTT 방법에 의한 세포생존률 측정

HK-2 세포의 카드뮴 독성에 대한 밀몽화 물추출물의 효과를 조사하기 위해 MTT 방법을 이용하여 세포생존률을 측정하였다. 밀몽화 물추출물은 카드뮴의 세포독성을 농도의존적으로 감소시켰다(Fig. 1). 카드뮴 독성에 의해 감소된 세포생존률은 밀몽화 물추출물에 의해 50 µg/ml 농도에서 2%, 100 µg/ml 농도에서 10%, 200 µg/ml 농도에서 22%, 400 µg/ml 농도에서 30% 정도 세포생존률을 증가시켰다. 또한 밀몽화 물추출물의 농도 증가에 따른 세포독성도 보이지 않았다.

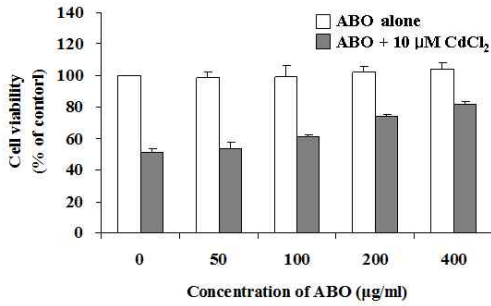


Fig. 1. Effect of ABO on cell viability in CdCl₂-treated HK-2 cells. The cells were pretreated with ABO (50, 100, 200, 400 µg/ml) for 3 hr and then incubated with or without 10 µM CdCl₂ for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Value are means ± SD, N = 3.

2. 세포의 광학현미경적 관찰

HK-2 세포는 24시간 이상 배양하면, 방추형으로 배양접시 바닥에 단층을 이루어 자란다. 카드뮴만 처리한 군에서는 방추형에서 원형으로 변형이 증가된 세포를 관찰 할 수 있었다(Fig. 2). 농도의존적으로 처리된 밀몽화 물추출물은 카드뮴에 의한 원형의 세포를 감소시키고, 방추형의 세포를 증가시키는 것을 관찰 할 수 있었다.

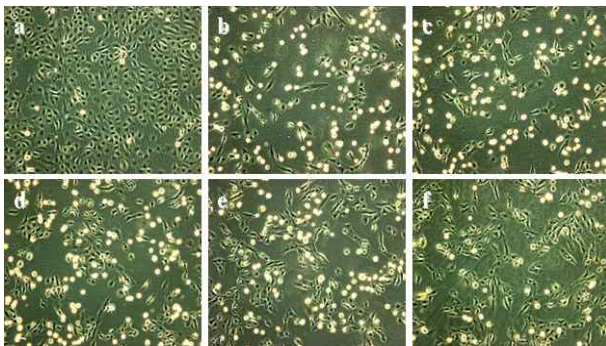


Fig. 2. Effect of ABO on cell morphological changes in CdCl₂-treated HK-2 cells. The cells were pretreated with ABO (50, 100, 200, 400 µg/ml) for 3 hr and then incubated with 10 µM CdCl₂ for 24 hr. The cell morphological changes were observed under the inverted light microscope and photographed ×100.). a: Control, b: CdCl₂ alone, c: CdCl₂+50 µg/ml ABO, d: CdCl₂+100 µg/ml ABO, e: CdCl₂+200 µg/ml ABO, f: CdCl₂+400 µg/ml ABO.

3. 유세포분석에 의한 Sub-G1 세포 측정

카드뮴의 세포독성은 HK-2 세포를 apoptosis로 유도한다. Apoptotic peak를 측정하기 위해 유세포분석을 이용하여 카드뮴과 밀몽화 물추출물을 처리한 세포의 Sub-G1 세포를 측정하였다. 카드뮴 단독처리군의 Sub-G1 세포는 33.38% 이었다(Fig. 3). 밀몽화 물추출물은 50 µg/ml 농도에서 32.55%, 100 µg/ml 농도에서 26.32%, 200 µg/ml 농도에서 19.77%, 400 µg/ml 농도에서 18.38%로 Sub-G1 세포를 감소시켰다.

4. Procaspase-3와 PARP 발현량 분석

카드뮴에 의해 유도된 HK-2세포의 apoptosis로 인한 procaspase-3 단백질의 가수분해와 PARP 단백질의 절편화에 대한 밀몽화 물추출물의 효과를 조사하였다. 카드뮴 단독처리군에

서 procaspase-3의 감소와 PARP의 절편증가를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 밀몽화 물추출물은 농도의존적으로 procaspase-3를 증가시켰고, PARP의 절편을 감소시켰다(Fig. 4A). 밀몽화 물추출물의 최고농도인 400 µg/ml 농도에서 procaspase-3를 약 1.5배 증가시켰고 PARP의 절편을 약 0.5배 감소시켰다(Fig. 4B).

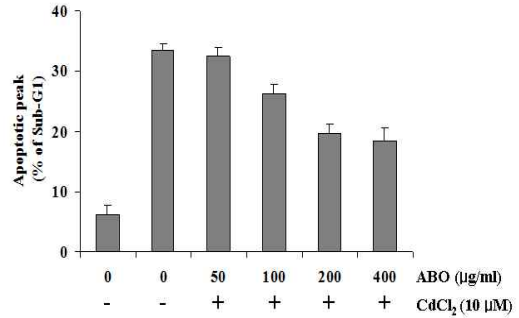
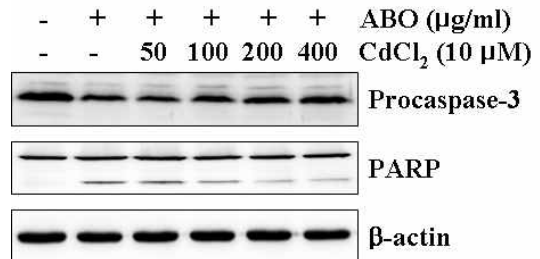


Fig. 3. Effect of ABO on Sub-G1 cell population in CdCl₂-treated HK-2 cells. The cells were pretreated with ABO (50, 100, 200, 400 µg/ml) for 3 hr and then incubated with 10 µM CdCl₂ for 24 hr. The cells were fixed and stained with PI and the DNA content was analyzed by flow cytometry.

A.



B.

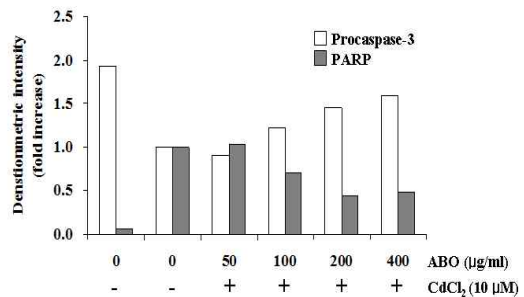


Fig. 4. Effect of ABO on procaspase-3 and PARP cleavage in CdCl₂-treated HK-2 cells. The cells were pretreated with ABO (50, 100, 200, 400 µg/ml) for 3 hr and then incubated with 10 µM CdCl₂ for 24 hr. Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with anti-procaspase-3 and anti-PARP antibodies (A). Intensity of Procaspase-3 and PARP protein bands (B).

고찰

카드뮴은 산업적으로 중요한 시약이면서 환경오염물질로 신장장애의 주요한 원인이 되는 물질이다²¹⁾. 카드뮴의 장기적인 노출은 신장 근위세뇨관의 상피세포에 축적이 되어 다뇨증과 저분자량 단백뇨를 특징으로 하는 제흡수 기능장애를 유발한다.

근위세뇨관 세포에 축적된 카드뮴은 다양한 비특이적 독성효과에 의해 신장의 상피세포를 괴사시키거나 아포토시스 기전을 통해 세포사멸을 유도한다²¹⁾. 카드뮴에 의해 유도된 근위세뇨관의 손상은 과사나 아포토시스가 유도되기 전에 세포-세포 간 부착²²⁻²⁴⁾, 세포신호전달경로²⁵⁾, 자가탐식 반응²⁶⁾에 특이적인 변화를 일으킨다. 현재로서 카드뮴에 의해 유발된 신장질환에 대하여 효과적인 치료방법은 입증되지 않았다. 중금속 제거치료에 사용하는 킬레이트제는 다른 중금속중독 치료에는 효과적으로 작용하나 카드뮴의 경우 세포내 축적을 막는 순기능도 있지만 신장으로의 카드뮴 축적을 촉진시켜 신장손상을 증가시키는 역효과도 나타난다²¹⁾.

녹차, 홍차, 우롱차와 같은 다류(茶類)의 카드뮴과 다른 중금속 해독작용²⁷⁻³⁰⁾과 부추, 송엽, 인진쑥, 오미자, 고삼 등의 다양한 천연물에서 카드뮴의 해독작용¹⁰⁻¹⁴⁾이 보고되었지만, 밀몽화에 대한 카드뮴 및 중금속 해독작용에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 밀몽화 물추출물이 카드뮴의 세포독성에 대한 HK-2 세포의 보호효과를 확인하였다. 카드뮴의 세포독성으로 인해 감소된 HK-2 세포의 생존률은 밀몽화 물추출물의 처리 농도 증가에 비례하여 증가하였다. 세포형태변화 관찰에서도 카드뮴의 세포독성으로 인한 정상적인 방추형 세포 감소 및 원형 세포 증가는 밀몽화 물추출물에 의한 방추형 세포의 증가에 따라서 원형 세포의 감소가 확인되었다. 이 결과들은 HK-2 세포에서 밀몽화 물추출물이 카드뮴 세포독성을 효과적으로 감소시킨다는 것을 보여주고 있다.

HK-2 세포에서 카드뮴의 세포독성은 아포토시스를 유도한다. HK-2 세포의 카드뮴의 독성에서 아포토시스 세포의 비율을 나타내는 sub-G1기 분획이 증가하였으나 밀몽화 물추출물에 의해 농도의존적으로 이 비율이 감소하였다. 또한 카드뮴 독성에 의해 유도된 HK-2 세포의 아포토시스 유발기전으로 procaspase-3 단백질의 가수분해와 PARP 절편화를 유도하였다. 밀몽화 물추출물은 카드뮴에 의해 감소된 procaspase-3를 증가시켰고, 증가된 PARP 절편은 감소시켰다. 이 결과들은 카드뮴 독성에 의해 유도된 HK-2 세포의 아포토시스를 밀몽화 물추출물이 억제한다는 것을 보여주고 있다.

결 론

밀몽화 물추출물은 HK-2 세포에서 카드뮴의 세포독성을 효과적으로 억제하였다. 밀몽화 물추출물은 카드뮴의 세포독성에 의해 감소된 세포생존률을 증가시켰으며, 아포토시스 과정에서 일어나는 procaspase-3 단백질의 가수분해와 PARP 절편화를 억제하였다. 이상의 결과를 종합하면, 밀몽화 물추출물은 카드뮴에 의해 유도된 아포토시스를 억제함으로써 HK-2 세포에 대한 카드뮴의 세포독성을 감소시키는데 효과적인 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부[교육과학기술부]의 재원으로 한국

연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임[NO. 2010-0029469]

참고문헌

- Nordberg, G.F., Nogawa, K., Nordberg, M., Friberg, L.T. Cadmium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT (eds) Handbook on the toxicology of metals, 3rd edn. Academic Press, Burlington, pp 445-486, 2007.
- 국립보건원. 식품중의 미량금속에 관한 조사연구. 29: 365-377, 1992.
- 최성인, 이정희, 이서래. 동물실험에 의한 녹차음료의 카드뮴 및 납 제거효과. 한국식품과학회지 26: 745-749, 1994.
- Eiinder, C.G. Cadmium: Uses, Occurrence and Intake. Cadmium and Health. L. Friberg, et al, Eds. CRC Press, Boca Raton, FL. 1985.
- WHO. Cadmium in Recommended Health-Based Limits in Occupational Health to Heavy Metals. WHO Technical Report Series, pp 647-655, 1980.
- WHO. Health hazard of the Human Environmental. Geneva, WHO, pp 35-37, 1977.
- Perry, H.M. Jr., Yunice, A. Acute pressor of intra-arterial cadmium and mercuric ions in anesthetized rats. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 120: 469-474, 1965.
- Ginsberg, G.L. Cadmium risk assessment in relation to background risk of chronic kidney disease. J. Toxicol. Environ. Health A. 75: 374-390, 2012.
- Ferraro, P.M., Costanzi, S., Naticchia, A., Sturniolo, A., Gambaro, G. Low level exposure to cadmium increases the risk of chronic kidney disease: analysis of the NHANES 1999-2006. BMC Public Health. 10: 304, 2010.
- 안령미, 김완태, 이희성. 카드뮴 독성에 대한 부추 (*Allium odorum* L.)의 방어효과. 한국환경보건학회지 17: 102-113, 1991.
- 이종섭, 박경옥. 송엽 추출물을 이용한 카드뮴 독성의 해독에 관한 연구. 한국환경위생학회지 22: 88-97, 1996.
- 이치호, 조진국, 최일신, 한규호, 김충용, 인진쑥의 열수 추출물이 흰쥐의 카드뮴 독성에 미치는 영향. 한국축산식품학회, 19: 188-197, 1999.
- 한성희, 신미경, 정영희. 오미자 추출물이 카드뮴을 급여한 흰쥐의 대사와 신장내 카드뮴 함량에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 31: 1102-1106, 2002.
- 양희태, 최화정, 백승화. 고삼으로부터 분리된 Leachianone A의 카드뮴에 대한 독성억제 효과. 동의생리병리학회지 22: 1163-1167, 2008.
- 안민섭. 밀몽화 추출물이 고포도당에 의한 혈관 평활근세포 증식에 미치는 효과, 원광대학교, 2009.
- 박상용, 이강진, 이태후. 밀몽화 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과 및 항산화 활성 효과, 한국두피모발미용학회지 5:

- 1-7, 2009.
17. Kim, C.M., Shin, M.K., Ahn, D.K., Lee, K.S. The encyclopedia of oriental herbal medicine. Jungdam Publishing Co., Seoul, Korea, pp 1461-1462, 1997.
 18. Piao, M.S., Kim, M.R., Lee, D.G., Park, Y., Hahm, K.S., Moon, Y.H., Woo, E.R. Antioxidative constituents from *Buddleja officinalis*. Arch. Pharm. Res. 26: 453-457, 2003.
 19. Houghton, P.J., Hylands, A.Y., Mensah, A., Hensel, A.M. Deters. Invitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as example. J. Ethnopharmacology. 100: 100-107, 2005.
 20. Aoki, H., Kuze, N., Ichi, T., Koda, T. Analytical method for *Buddleja* colorants in foods. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 42: 84-90, 2001.
 21. Prozialeck, W.C., Edwards, J.R. Mechanisms of Cadmium-Induced Proximal Tubule Injury: New Insights with Implications for Biomonitoring and Therapeutic Interventions. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2012.
 22. Prozialeck, W.C. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 164: 231-249, 2000.
 23. Prozialeck, W.C., Lamar, P.C. Lynch, S.M. Cadmium alters the localization of Ncadherin, E-cadherin, and beta-catenin in the proximal tubule epithelium. Toxicol. Appl. Pharmacol. 189: 180-195, 2003.
 24. Prozialeck, W.C., Edwards, J.R. Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. Pharmacol Ther 114: 74-93, 2007.
 25. Thevenod, F. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? Toxicol. Appl. Pharmacol. 238: 221-239, 2009.
 26. Chargui, A., Zekri, S., Jacquillet, G., Rubera, I., Ilie, M., Belaid, A., Durantou, C., Tauc, M., Hofman, P., Poujeol, P., El May, M.V., Mograbi, B. Cadmium-induced autophagy in rat kidney: an early biomarker of subtoxic exposure. Toxicol. Sci. 121: 31-42, 2011.
 27. Yoon, Y.H., Rhee, S.J., Effects of Korean green tea, oolong tea and black tea beverage on the antioxidative detoxification in rat poisoned with cadmium. Korean J. Nutrition. 27: 1007-1017, 1994.
 28. Choi, S.I., Lee, S.R., Lee, J.H. Effect of green tea beverage on the removal of cadmium and lead by metabranece filtration. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 740-744, 1994.
 29. Kim, M.J., Rhee, S.J. Effects of Korean green tea, oolong tea and black tea beverage on the removal of cadmium in rat. J. Korean Soc. Food Nutr. 23: 784-791, 1994.
 30. Lee, S.R., Lee, J.H., Choi, S.I. Effects of green tea beverage for the removal of heavy metal. Prodeeding of the 2nd international symposium on green tea. pp 77-87.