

중금속류가 췌장편의 Amylase 분비에 미치는 영향

延世大學校 醫科大學 藥理學敎室

金 惠 英 · 金 源 准

= Abstract =

Effect of Heavy Metals on the Secretion of Amylase in Rat Pancreatic Fragments

Hea Young Kim and Won Joon Kim

Department of Pharmacology Yonsei University College of Medicine, Seoul Korea

Heavy metals which are present as trace elements in human body have been known to modify various enzymatic reaction. These metals can be essential or non-essential. Zinc, copper and calcium are essential in maintaining some biological processes, whereas non-essential metals such as cadmium, lead and mercury produce accumulative toxic effect.

Cadmium accumulated in pancreas can cause toxicity and damage of pancreatic cells, thereby influencing CHO metabolism. Lead compounds are known to produce toxic effects on the kidney, digestive system and brain followed by inhibition of activity of ρ -aminolevulinic acid and biosynthesis of hemoproteins and cytochrome. Evidence has been accumulated that zinc not only acts as a cofactor in enzyme reaction but also prevents toxic effect induced by heavy metal such as copper and cadmium.

To demonstrate the effect of heavy metals on pancreatic secretion, part of uncinata pancreas was taken and incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer with heavy metals used. Additional treatment with CCK-OP was performed when needed. After incubation during different period of time, medium was analyzed for amylase activity using Bernfeld's method.

The present study was attempted in order to elucidate the effect of several kinds of heavy metal on exocrine pancreatic secretion in vitro.

The results obtained are as follows:

- 1) CCK-OP stimulated significantly amylase release from pancreatic fragments in vitro.
- 2) CCK-OP response of amylase release from pancreatic fragments was inhibited by treatment with cadmium, especially high doses of cadmium.
- 3) CCK-OP response of amylase release from pancreatic fragments was inhibited when pretreated with $10^{-4}M$ copper chloride.
- 4) Lead chloride at the concentration of $10^{-3}M$ and $10^{-4}M$ stimulated the basal amylase release in vitro but CCK-OP response did not augment by lead chloride.
- 5) Zinc chloride did not affect amylase release from pancreatic fragments in vitro.

From the results mentioned above, it is suggested that CCK-OP response was inhibited in the amylase release from pancreatic fragments pretreated with cadmium and copper chloride.

본 연구의 일부는 1981년도 연세대학교 의과대학 약리학교실 유한 연구비의 보조로 이루어졌음.

서 론

중금속은 공기 토양 음식 및 물등에 함유되어 있으며 산업의 발달에 따라 최근 중금속 독성에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 또한 산업적인 중금속독성에 못지 않게 농약(김학태 등 1977), 살충제 및 치료제들도 중독의 원인이 되고 있다. 이들 중금속들은 직접 혹은 간접적으로 체내에 들어와 친화력이 큰 조직에 축적된다. 이와같이 축적된 중금속은 동물의 여러장기 즉 신장, 간장, 비장, 장관, 심장, 뇌, 폐 및 피부등에 널리 분포하고 있는 중금속의 독작용을 완화시키는 것으로 알려진 metallothionein의 합성을 촉진시킨다(Oh 및 Whanger 1979). 또한 효소의 활성자리가 되기도 하며 직접 촉매역할도 하고 간접적으로 단백질이나 세포내입자에 영향을 주어 생물학적으로 필수적인 역할도 한다.

대기, 토양, 대양 및 모든 생물체에 광범위하게 함유되어 있는 납(lead)은 중추신경, 말초신경, 신장, 조혈계등에 독작용을 일으키며 무기납보다는 유기납의 독작용이 더욱 크다(이관희 및 홍사석 1967). Raul 등(1979)은 쥐의 복강내 납의 투여로 인해 소장에서 포도당 흡수억제, renal alkaline phosphatase 억제등을 보고 하였고 또한 heme 합성을 억제(Baxter 등 1979), 빈혈을 유발하며 이에 따라 간의 microsomal cytochrome p-450양이 감소한다(Alvito 등 1972; Scoppa 및 Penning 1973). Cadmium은 주로 음식이나 흡연을 통해 체내에 쉽게 흡수되어 주로 간과 신장에 많이 축적되며 신장에 가장 큰 독작용을 일으킨다. Cadmium은 혈청내 α_1 -antitrypsin을 억제하며(Friberg 등 1974; Chowdhury 및 Louria 1976)동물에서 포도당 내성을 일으키고 과혈당을 유발하며 췌장 β -cell의 분비능을 감소시킨다(Havu 1969; Ghafghazi 및 Mennear 1973). 동(Copper)은 자연계에 널리 분포되어 있으며 생물학적 반응에 필수적 요소로서 oxidative enzyme 즉 catalase, peroxidase, cytochrome oxidase 등에 관여하며 골수 및 간장에도 함유되어 있고 주로 담즙으로 분비된다. 독작용으로는 양과 소에서 용혈 hemoglobinuria를 일으키며, 사람에서도 급성중독시 용혈성 빈혈을 볼 수 있다. 아연(Zinc)은 베인트, 고무, 에나멜, 유리 및 종이등에 들어 있으며 효소기능, 단백질 합성, 당의 대사에 관여하는 필수 금속이다. 아연은 근육, 간장, 신장, 췌장에 함유되어 있고 독성으로는 피부염등이 보고되고 있다(Hammond 및 Beliles,

1980).

이들 중금속들의 축적장기 중 췌장은 여러 소화효소를 생성하여 췌관을 통해 장내로 소화효소를 분비한다. 그러나 중금속들이 췌 amylase 분비에 미치는 영향에 대한 보고는 극히 드물다. 이에 본 실험에서는 몇 종류의 중금속류들이 쥐 췌결편 amylase 분비와 아울러 췌 효소분비 자극호르몬인 cholecystokinin-octapeptide(CCK-OP)에 미치는 영향을 검색하였다.

실험재료 및 방법

실험 동물로는 몸무게 90g 내외의 흰쥐를 1주일 이상 동물실험관에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 기간 중 사료는 단백질 15% 이상, 지방 3% 이상 함유된 혼합사료를 공급하였으며 실험전 24시간은 물을 제외하고는 굶겼다.

실험 방법으로는 Case 및 Clausen(1973)의 방법을 이용하였다. 즉 실험 동물은 단두하여 피를 제거하고 복부 중앙선을 절개하여 췌장의 구상돌기의 일부(part of uncinat process)부위를 취하였다. 췌 결편의 지방조직, 혈관 및 췌관을 제거 후 90 mg 내외의 췌 결편을 2 ml의 Krebs-Ringer bicarbonate 영양액에 부유시켰다. 95% O₂와 5% CO₂의 혼합가스를 통해 주면서 췌결편과 영양액이 평형되게 70분간 방치하였다.

그후 대조군은 10분간격으로 2번 영양액을 바꾸었고 CCK-OP 10⁻⁸M을 함유한 영양액을 10분간격으로 바꾸어 효소분비를 자극하였다. 영양액내로 분비되는 amylase를 Bernfeld(1955)법으로 측정하여 조직 g 당 단위시간당 I.U.로 표시하였다.

실험군은 다음과 같이 나누어 실험하였다.

1) 대조군: 생리적 식염수 첨가

2) 중금속 첨가군

(i) CdCl₂첨가

(ii) CuCl₂첨가

(iii) PbCl₂첨가

(iv) ZnCl₂첨가

상기한 중금속 첨가군은 공히 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M 단 독첨가 하거나 CCK-OP 10⁻⁸M 병용첨가하였다.

실험 성적

1) 대조실험

췌 결편을 Krebs-Ringer bicarbonate 영양액내 부

Table 1. Effect of heavy metals ($10^{-2}M$) on secretion of amylase from rat pancreatic fragments. (I.U./g/min)

Incub. Time Group	No. of Exp.	CCK-OP $10^{-8}M$						
		80	90	100	110	120		
Control	23	4.3±0.29	4.6±0.26	12.3±0.90	13.4±1.05	14.4±0.98	15.1±1.02	15.4±0.96
CdCl ₂	5	4.7±0.71	4.4±0.68	11.5±1.77	13.0±2.13	13.4±1.30	14.7±1.47	15.4±1.96
CuCl ₂	5	3.3±0.57	3.1±0.42	8.5±1.34	4.1±1.24	10.1±1.99	10.1±1.83	11.5±2.10
PbCl ₂	6	4.5±0.55	4.7±0.38	10.0±1.89	12.3±2.24	13.1±1.85	14.6±2.00	14.4±1.62
ZnCl ₂	6	4.4±0.63	4.2±0.15	10.0±2.15	11.0±1.44	12.1±0.97	12.8±0.85	13.1±0.79

Mean±S.E.

Table 2. Effect of heavy metals ($10^{-4}M$) on secretion of amylase from rat pancreatic fragments. (I.U./g/min)

Incub. Time Group	No. of Exp.	CCK-OP $10^{-6}M$						
		80	90	100	110	120		
Control	23	4.3±0.29	4.6±0.26	12.3±0.90	13.4±1.05	14.4±0.98	15.1±1.02	15.4±0.96
CdCl ₂	5	4.3±0.62	4.4±0.60	8.6±1.56*	9.1±0.87*	9.6±1.43*	9.0±1.44*	9.0±1.43*
CuCl ₂	5	3.3±0.27	3.5±0.47	8.3±1.09*	8.4±1.39*	10.0±1.95	10.2±0.95	10.5±1.03
PbCl ₂	6	5.3±0.59	5.9±0.70*	15.2±3.81	15.7±3.34	15.2±3.53	16.6±3.33	17.0±3.12
ZnCl ₂	8	4.4±0.43	5.0±0.57	10.9±0.57	11.7±1.44	12.1±1.38	13.2±1.43	13.3±1.27

*p<0.05
Mean±S.E.

Table 3. Effect of heavy metals ($10^{-4}M$) on secretion of amylase from rat pancreatic fragments. (I.U./g/min)

Incub. Time Group	No. of Exp.	CCK-OP $10^{-8}M$						
		80	90	100	110	120		
Control	23	4.3±0.29	4.6±0.26	12.3±0.90	13.4±1.05	14.4±0.98	15.1±1.02	15.4±0.96
CdCl ₂	6	4.8±0.32	4.9±0.22	9.6±1.35	8.4±0.65*	6.7±0.52***	6.1±0.46***	5.3±0.36***
CuCl ₂	6	2.8±0.20*	3.1±0.27**	4.8±0.52***	6.2±0.79***	6.7±0.59***	6.6±0.93***	6.4±0.99***
PbCl ₂	5	6.1±0.60*	6.4±0.47**	10.8±0.70	14.7±1.84	14.9±1.57	16.4±1.40	17.1±1.66
ZnCl ₂	6	4.9±0.24	5.2±0.35	10.6±1.05	12.8±0.89	13.4±0.87	14.2±0.76	14.1±0.87

*<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 Mean±S.E.

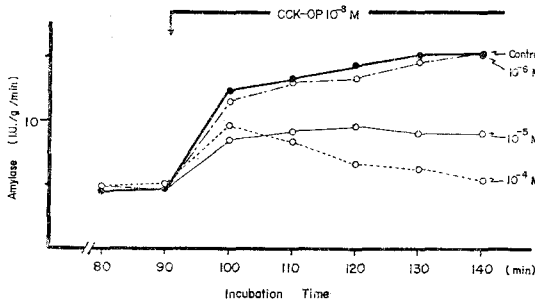


Fig. 1. Effect of cadmium chloride on secretion of amylase from rat pancreatic fragments.

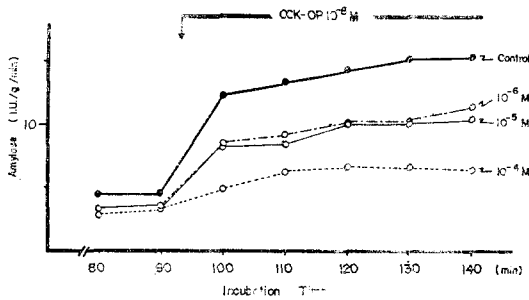


Fig. 2. Effect of copper chloride on secretion of amylase from rat pancreatic fragments.

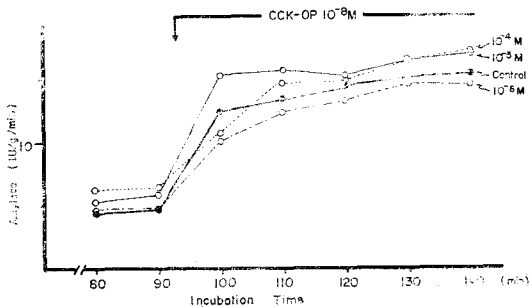


Fig. 3. Effect of lead chloride on secretion of amylase from rat pancreatic fragments.

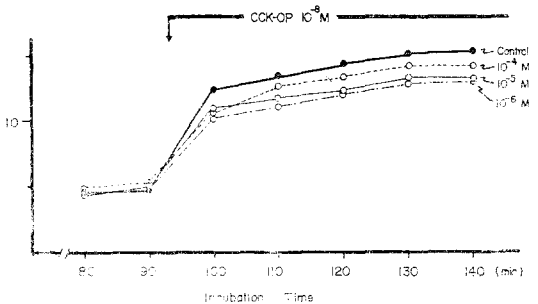


Fig. 4. Effect of zinc chloride on secretion of amylase from rat pancreatic fragments.

유시켰을 때 처음 10분간 영양액내로 분비된 amylase는 4.3 ± 0.29 I.U./g/min 이고 다음 10분 간은 4.6 ± 0.26 I.U./g/min 로 거의 일정한 amylase 분비률을 보였다. CCK-OP 10^{-8} M 을 첨가하면 amylase 분비가 처음 100분에는 급격히 증가되며 그 후 계속 완만히 증가하여 140분에는 15.4 ± 0.96 I.U./g/min 을 보였다.

2) 중금속 첨가실험

(1) CdCl₂첨가: CdCl₂ 10^{-6} M 단독이나 CCK-OP 첨가에서 대조군과 별차이를 보이지 않았으나 CdCl₂ 10^{-6} M 첨가에서는 CCK-OP 첨가 반응이 100분에 의의있게 감소 ($p < 0.05$)되고 140분까지 계속되었다.

10^{-4} M 단독첨가에서는 대조군과 별 차이가 없고 CCK-OP 첨가반응은 110분에는 의의있는 ($p < 0.05$) 감소를 보였고 그후 시간 경과에 따라 감소하여 140분에는 현저한 감소 ($p < 0.001$)를 나타내었다(Fig. 1, Table 1, 2, 3).

(2) 동(CuCl₂)첨가: CuCl₂ 10^{-6} M 및 10^{-5} M 을 단독 투여하거나 CCK-OP 첨가로 대조군의 각 반응과 별 차이없는 amylase 분비반응을 볼 수 있었다. 그러나 대조군에 비해 감소경향을 나타냈고 CuCl₂ 10^{-6} M 처치하고 CCK-OP 첨가한 군에서는 처음 100~110분에 의의있는 감소 ($p < 0.05$)를 보였다.

10^{-4} M 단독첨가시 대조군에 비해 의의있는 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 감소를 보였으며 CCK-OP 첨가후에도 현저한 감소를 보여 ($p < 0.001$) 140분까지 계속되었다(Fig. 2, Table 1, 2, 3).

(3) 납(PbCl₂)첨가: 10^{-6} M 단독첨가 및 CCK-OP 첨가실험 모두에서 대조군의 반응과 차이 없었다. 10^{-6} M 및 10^{-4} M 단독첨가로 의의있는 amylase 분비 항진반응을 보이나 CCK-OP 첨가후에는 대조군의 CCK-OP 반응과 비슷하였다(Fig. 3, Table 1, 2, 3).

(4) 아연(ZnCl₂)투여: 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M 단독 및 CCK-OP 첨가 후 췌절편의 amylase 분비는 대조군의 각 반응과 유사하였다(Fig. 4, Table 1, 2, 3).

고 찰

중금속은 생체계순환에 영향을 주며 간접 또는 직접적으로 체내에 들어와 축적되며 독작용을 일으킨다. 이런 독작용은 투여된 경로, 기간, 농도에 따라 다르다. 아연이나 동처럼 체내 미량 있으면서 직접 생화학적 반응의 촉매역할을 하거나 활성자리가 되는 금속류도 있으며 납, cadmium, 수은과 같이 체내 아미노산,

효소, 단백질, 지질과 결합 즉 $-OH$, $-COO^-$, OPO_3H^- , $>C=O$, $-SH$, $-S-S-$, $-NH_2$ 와 결합하여 간, 뇌, 신장등에 축적되어 생리기능을 방해하고 여러 소화기관의 기능을 방해한다.

Elinder 등(1976)은 부검 결과 cadmium은 주로 신장, 간, 췌장에 많이 축적되며 나이와 생활습관 즉 흡연이 크게 관여하고 있다고 하며, 주로 신장에 많이 축적되어 신장기능에 독작용을 보인다고 보고하였다(Elinder 등 1977). Mice에서는 단회 피하주사 24시간 후 췌장에 $5 \mu g/g$ 의 신장과 비슷한 양의 cadmium이 축적된다고 보고하였다(Engström 및 Nordberg 1978). 또한 cadmium은 β -cell에의 Ca^{++} uptake를 방해하여 insulin 분비를 저해하며(Ghafghazi 및 Mennear 1975)로기 췌장에 축적되면 $\alpha : \beta$ cell 비율의 감소를 볼 수 있으며 췌 β -cell 피사를 보고하고 있다(Barbieri 등 1961).

본 실험에서도 cadmium 단독첨가시에는 대조군과 큰 차이를 볼 수 없었으나 CCK-OP 병용첨가시 의의 있는 감소를 보였고 시간의 경과에 따라 그 감소 폭이 커짐을 볼 수 있었고 농도에 비례하였다.

납은 phosphatase, 단백질의 cysteinyl, histidyl 기, purines, porphyrins 등의 물질과 강한 친화력을 가지고 있어 mercaptide를 만들어 $-SH$ 기를 갖는 많은 효소들을 불활성시켜 생화학적 변화를 일으킨다(Hirth 1964). in vitro에서 fish *Channa punctatus*의 장내 lipase의 억제력을 보고하고 있으며(Sastry 및 Gupta 1978)이 억제는 농도에 비례한다고 보고 하였다. 이러한 효소억제는 세포구조 손상과 효소-단백과 중금속의 결합때문이며(Passow 등 1961) 또한 신 및 김(1981)은 흰쥐에 납을 복강내 투여시 췌액량, 췌 효소들의 감소를 보고하며 소화기관의 억제작용이 있음을 보고 하였다. 본 실험에서는 단독첨가시 의의있는 amylase 분비항진을 보였으나 CCK-OP 첨가반응은 대조군과 별 차이없고 농도와도 큰 상관이 없음을 볼 수 있었다.

아연은 여러 효소의 cofactor로 작용하며 정상 성장 발달에 관여하는 필수 금속류이다. 아연은 cadmium의 독성을 줄이며 homeostasis에 관여하고 췌장의 carboxypeptidase 분비를 항진시키고 CCK-항진 amylase 분비에도 관여한다고 한다(Halsted 등 1972). 그러나 부족시(Sullivan 등 1974)혹은 과다시 여러 신체기능의 변화를 초래한다.

이상의 여러 중금속류가 췌절편 amylase 분비에 미치는 영향을 관찰한 바 종류에 따라 그 작용이 다르고 농도와 비례함을 볼 수 있어 앞으로 그 각각의 기전과

길항제 병용투여의 효과에 대한 관찰이 요구되는 바이다.

결 론

몇가지 중금속류가 쥐의 췌 절편 amylase 분비에 미치는 영향을 검색한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 생리적 식염수를 첨가한 대조군은 4.3 및 4.6 I.U./g/min의 amylase 분비를 보였고 CCK-OP $10^{-8}M$ 병용첨가에서는 amylase 분비가 급격히 증가하여 15.4 I.U./g/min 까지 증가되었다.

2) $CdCl_2$ (Cadmium chloride) 10^{-6} , 10^{-5} , $10^{-4}M$ 단독첨가에서는 대조군과 유사한 amylase 분비를 보였으나 CCK-OP $10^{-8}M$ 병용첨가에서는 amylase 분비가 의의있게 감소하였다.

3) $CuCl_2$ (Copper chloride)첨가군에서는 $CuCl_2$ $10^{-6}M$ 단독 혹은 CCK-OP 병용첨가로 대조군과 유사한 amylase 분비 반응을 보이나 $10^{-5}M$ 에서는 amylase 분비억제경향을, $10^{-4}M$ 에서는 현저한 amylase 분비 억제를 나타내었다.

4) $PbCl_2$ (Lead chloride)첨가군에서는 $PbCl_2$ $10^{-6}M$ 단독 혹은 CCK-OP $10^{-8}M$ 병용첨가로 대조군과 유사한 amylase 분비치를 보이나 10^{-5} , $10^{-4}M$ 단독첨가에서는 의의있는 amylase 분비항진을 나타내었고 CCK-OP 병용첨가에서는 CCK-OP 단독첨가한 대조실험과 유사한 분비반응을 보였다.

5) $ZnCl_2$ (Zinc chloride)첨가군에서는 $ZnCl_2$ 10^{-6} , 10^{-5} , $10^{-4}M$ 단독 혹은 CCK-OP 병용첨가에서 대조군과 유사한 분비반응을 보였다.

이상의 결과로 미루어 보아 중금속은 췌 효소분비를 변동시키며 특히 췌 효소분비 촉진 hormone의 작용을 억제시킨다.

참 고 문 헌

- Alvito, P.A., Susan, L., Jonathan, C. and Attallah, K.: *Effect of acute exposure on cytochrome P-450 and the mixed function oxidase system in the liver. J. of E. Med., 135:1406-1409, 1972.*
- Barbieri, L., Colombi, R. and Straneo, G.: *Modificazioni istologiche delle isole pancreatiche del conigliodopo intossicazione cronica da cadmio. Folia Med(Naples) 44:1120-1130, 1961.*
- Baxter, C.S., Howard, E.W. and Alan, D.C.: *Evi-*

- dence for specific lead σ -aminolevulinate complex for by c nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Toxicol Appl Pharmacol* 47(3):447-482, 1979.
- Bernfeld P: Amylase α and β , In *Methods in Enzymology Vol. I Ed. by Clowick SP and Kaplan NO. Academic Press pp146-150, 1955*
- Case, R.M. and Clausen, T.: *The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas. J Rhyiol* 235: 75-102, 1973.
- Chowdhury, P. and Louria, D.B.: *Influence of cadmium and other trace metals on human α_1 -antitrypsin: an in vitro study. Science* 191: 480-481, 1976.
- Elinder, C.G., Kjellström, T., Friberg, L. and Linnman, B.L.L.: *Cadmium in kidney cortex liver and pancreas from Swedish autopsies. Estimation of biological half time in kidney cortex, considering calorie intake and smoking habits. Archives of Environmental Health* 292-302, 1976
- Elinder, C.G., Piscator, M. and Linnman, L.: *Cadmium and zinc relationships in kidney cortex liver and pancreas. Environmental Research* 13: 432-440, 1977.
- Engström, B. and Nordberg, G.F.: *Effect of detergent formula chelating agents on the metabolism and toxicity of cadmium in mice. Acta Pharmacol et Toxicol* 43:387-397, 1978.
- Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G.F. and Kjellström, T.: *Cadmium in the environment. 2nd Ed. CRC Press Inc., Cleveland, 1974.*
- Ghafghazi, T. and Mennear, J.H.: *Effects of acute and subacute cadmium administration on carbohydrate metabolism in mice. Toxicol Appl Pharmacol* 26:235-240, 1973.
- Ghafghazi, T. and Mennear, J.H.: *The inhibitory effect of cadmium on the secretory activity of the isolated perfused rat pancreas. Toxicol Appl Pharmacol* 31:134-142, 1975.
- Halsted, J.A, Hossain, A.R., Parichehr, A, Mansour, M, Amirhakemi, G.H, Barakat, R.M. and Reanhold, J.G.: *Zinc deficiency in man. Am J Med* 53:277, 1972.
- Hammond, P.B. and Beliles, R.P.: *Metals. In Toxicology, The basic science of poisons 2nd Ed. pp 409-462, 1980.*
- Havu, N.: *Sulphydryl inhibitors and pancreatic islet tissue. Acta Endocrinol Suppl* 139:1-231, 1969.
- Hirth, L.: *Munchener Medizinische Wochenschrift* 106:985-988, 1964.
- 김학혜, 김경환, 홍사석: 농약중독으로 인한 간취의분 비 변동. 연세의대 논문집, 10:170-180, 1977.
- 이광희, 홍사석: Tetraethyl lead 중독증에. 종합의학 12:573-576, 1967.
- Oh, S.H. and Whanger, P.D.: *Biological function of metallothionein VII. Effect of age on metabolism in rats. Am J Physiol* 237(1):E18-22, 1979.
- Passow, H. Rothstein, A. and Clarkson, T.W.: *The general pharmacology of the heavy metals Pharmacol Rev* 13:185, 1961.
- Raul, A.W., Susan, A.M., Firma, L. and Saul, T.: *Alternation of intestinal and renal functions in rats after intraperitoneal injection of lead acetate. J Lab Clin Med* 94:144-151, 1979.
- Sastry, K.V. and Gupta, P.K.: *In vitro inhibition of digestive enzymes by heavy metals and their reversal by chelating agent: part II. lead nitrate intoxication. Bull Environm Contam Toxicol* 20:736-742, 1978.
- Sastry, K.V. and Gupta, P.K.: *Alteration in the activities of three peptidases and lipase in the digestive system of the fish Channa punctatus exposed to lead nitrate. Bull Environm Contam Toxicol* 21:190-195, 1979.
- Scoppa, R. and Penning: *Hepatic drug metabolising activity in lead poisoning rat. Experientia* 29: 970-972, 1973.
- 신윤용, 김원준: 납(lead)이 취외분비 기능에 미치는 영향. 대한약리학회지, 17:1-10, 1981.
- Sullivan, J.F., Burch, R.E., Quigley, H.J. and Magee, D.F.: *Zinc deficiency and decreased pancreatic secretory response. Am J Physiol* 227:105-108, 1974.