

제 목	국 문	수은화합물이 EMT-6세포의 생존과 nitrite생성에 미치는 영향		
	영 문	The influence of mercuric compounds on EMT-6 cell viability and nitrite synthesis.		
저 자 및 소 속	국 문	오 경 재 전북대학교 의과대학 예방의학교실		
	영 문	Gyung Jae Oh Chonbuk National University Medical School		
분 야	환 경	발 표 자	오 경 재 (전공의)	
발표 형식	구 연	발표 시간	15분	
진행 상황	연구완료 (), 연구중 (0) → 완료 예정 시기 : 1995 년 11 월			

1. 연구 목적

수은의 세포독성에 관한 연구의 일환으로, 마우스의 adenocarcinoma cell-line 인 EMT-6 세포의 배양조건에 수은을 여러농도로 첨가하여 세포독성의 양상을 파악한다. 한편 수은에 노출된 EMT-6 세포가 cytokine의 자극에 의해 생성하는 nitric oxide(NO)의 세포내 대사산물인 nitrite, nitrate를 정량하고, 같은 조건에서의 ATP생성을 관찰함으로써 수은에 의한 세포성면역의 감소를 설명할 수 있는 기전을 밝히고자 한다.

2. 연구 방법

1) EMT-6 cell의 배양과 수은첨가

계대배양중인 EMT-6 cell line을 trypsin처리하여 현탁액을 만들고, 이를 계수한 뒤 10%의 fetal calf serum을 포함한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium)에 0.5×10^6 cell/ml로 접종하였다. 상기의 조건에 $0 \mu\text{M}$ 및 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, $1.6 \mu\text{M}$ 의 mercury chloride와 cytokine(IFN γ 20U/ml + IL-1 40U/ml)을 첨가하여 36시간을 배양한다.

2) 세포의 생존률검사

배양기간중 12시간 간격으로 배양중인 EMT-6 세포의 생존(survival)을 trypan blue exclusion test로 측정하고 이를 생존률(%)로 나타낸다.

3) Nitrite 및 nitrate의 정량

배양액 $100\mu\text{l}$ 와 Griess reagent(1:1 mixture of 0.1% N-(1-naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride in 60% acetic acid and 1% sulfonilamide in 30% acetic acid) $100\mu\text{l}$ 를 혼합하여 실온에서 교반하여 분홍의 발색을 확인하고 543nm에서 흡광도를 읽어 nitrite(NO_2^-)를 정량한다. 한편 nitrate(NO_3^-)는 nitrate reductase를 함유한 *E. coli*현탁액을 적량 혼합하여 1시간 동안 35°C 에서 배양, nitrate를 nitrite로 환원시켜 이를 측정하였다.

4) ATP측정

배양한 세포를 6% TCA를 이용하여 파괴시킨 후, 여기에 luciferase luciferin을 HEPES buffer와 함께 첨가하여 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광 정도를 측정하여 ATP를 정량한다.

3. 연구결과

1) 세포 생존률

EMT-6 세포는 배양 12-36시간 동안 $0\mu\text{M}$ 에서 $0.8\mu\text{M}$ 의 수은농도군 모두 90%이상의 생존률을 보였으며, 수은농도에 따른 각군간의 차이는 없었다($p>0.05$).

2) Nitrite와 nitrate의 생성량

수은에 노출된 EMT-6세포의 nitrite 및 nitrate생성량은 $0.1\mu\text{M}$ 이상의 모든 실험군의 생성량이 대조군의 값에 비해 현저하게 낮은 수준이었고($p<<0.05$), 첨가된 수은농도와 nitrite생성량 사이에 매우 높은 상관관계($r=-0.92$, $p<0.01$)를 보이고 있어 수은농도의 증가에 따라 nitrite의 생성이 dose-dependent하게 감소하는 경향이 있었다. 한편 nitrate생성량 역시 nitrite의 경우와 같은 양상으로 나타난다($r=-0.91$, $p<0.01$).

3) ATP의 생성량

수은농도의 증가에 따라 ATP생성이 감소하는 경향을 나타냈으나($r=0.44$, $p<0.05$), 최고농도($0.8\mu\text{M}$)를 첨가한 군($p<0.05$)을 제외한 기타 군($0.1-0.4\mu\text{M}$)의 경우 대조군과 큰 차가 없었다($p>0.05$).

4. 고찰

일부 면역세포 또는 암세포가 L-arginine으로부터 nitric oxide(NO)를 생성하는 과정은 그 반응에너지로써 ATP를 필수적으로 요구한다. 그 동안 수은화합물이 실험동물의 세포성면역을 저하시킨다는 것은 여러 연구에 의해 밝혀져 있으나 그 기전은 아직까지 불확실하다. 본연구에서는 EMT-6 cell-line을 이용, 세포성면역의 분자생물학적 지표로 알려진 NO의 생성을 nitrite와 nitrate로써 간접정량하여, 수은노출에 의해 그 생성량이 현저히 저하됨을 관찰하였다. 아울러 같은 실험조건에서 ATP생성량이 동시에 감소하는 것을 관찰하였는 바, 수은에 의한 세포성면역의 저하는 면역세포가 생성하는 NO량의 감소에 의한 것으로 사료되며, 이는 수은이 세포내 에너지생산과 관련된 신진대사를 억제시키므로써 나타나는 결과라고 판단된다.