

					IV-C-3
제목	국문	수은과 카드뮴에 의한 세포독성 및 이에 대한 GSH 의 역할			
	영문	Immunological Modulation of Mercury and Cadmium and Role of GSH on Their Toxicity in EMT-6 Cell			
저자 및 소속	국문	신새론, 고대하, 염정호, 오경재, 권근상 전북대학교 의과대학 예방의학교실			
	영문	Sae Ron Shin, Dai Ha Koh, Jung Ho Youm, Gyung Jae Oh, Keun Sang Kwon Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Chonbuk National University			
분야	환경및산업보건 [독성물질]	발표자	신새론 [전공의]	발표형식	구연
진행상황	연구완료				
<p>1. 목적</p> <p>대표적인 유해 중금속인 수은과 카드뮴은 환경폭로 또는 산업장에서의 폭로를 통해 직·간접적으로 다중폭로의 양상을 나타낸다. 본 연구에서는 세포수준에서의 수은 및 카드뮴의 다중 폭로시 독성효과의 상승작용을 확인하고 이들 중금속의 다중폭로에 의한 인체 유해성을 세포생존율, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, ATP 등의 지표를 통해 간접적으로 유추하여 중금속 취급에 따른 유해성과 작업관리의 중요성에 대한 기초자료로 이용하고자 한다.</p> <p>2. 방법</p> <p>1) EMT-6 cell 의 배양과 각 중금속 첨가</p> <p>계대배양중인 EMT-6 cell line 을 trypsin 처리하여 현탁액을 만들고, 이를 계수한 뒤 10% FCS-DMEM 기본 배양액에 cytokine(IFN<math>\gamma</math> 20U/ml + IL-1<math>\alpha</math> 40U/ml)을 첨가하여 cell 을 0.5 × 10<sup>6</sup> cell/ml 로 24 well plate 에 접종하였다. 상기의 조건에 0.1 - 0.5 <math>\mu</math>M 농도의 HgCl<sub>2</sub> 과 1.0 - 5.0 <math>\mu</math>M 농도의 CdCl<sub>2</sub> 을 GSH 를 단독 또는 병행첨가하여 36 시간을 배양하였다. 또한 상기 배양조건에 4.0 <math>\mu</math>M 수은 및 40.0 <math>\mu</math>M 카드뮴과 40.0 <math>\mu</math>M GSH 을 여러 조건으로 조합하여 36 시간을 배양하였다.</p> <p>2) 세포의 생존율검사</p> <p>trypan blue exclusion test 로 측정하였다.</p> <p>3) Nitrite 의 정량</p> <p>배양액 100 <math>\mu</math>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 <math>\mu</math>l 를 혼합하여 실온에서 교반하여 분홍의 발색을 확인하고 543nm 에서 흡광도를 읽어 nitrite(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 정량하였다.</p> <p>4) ATP 정량</p> <p>세포를 수거하여 2 회 원심세척한 후, 6% trichloroacetic acid (TCA) 200 <math>\mu</math>l 를 첨가하여 ultrasonicator 를 이용하여 세포막을 파괴시킨 후 4 <math>^{\circ}</math>C 5,000 g 의 조건으로 10 분 간 원심분리한 후 얻은 상층액 20 <math>\mu</math>l 에 100 mM glycine 80 <math>\mu</math>l 을 혼합한 다음 luciferase luciferin 5 mg 을 HEPES buffer 2 ml 에 녹인 후 luciferase 와 ATP 의 반응에 따른 발광정도를 luminometer 로 측정하였다. 표준곡선은 0 - 1,000 <math>\mu</math>M 범위의 adenosine 5'-triphosphate 를 이용하여 구하였다.</p> <p>5) 통계처리</p> <p>측정자료들의 각 군간의 차이를 비교하기 위해서 ANOVA 를 이용하였으며 ANOVA 의</p>					

결과에 따라 post-hoc test 로 Scheffe's test 를 실시하였다.

### 3. 결과

1) 수은 또는 카드뮴 단독첨가시 세포생존율 및 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>와 ATP 생성능  
기본 세포 배양액에 여러 농도의 수은(0 - 0.5 μM)과 카드뮴(0 - 5.0 μM)을 첨가했을 때 EMT-6 세포의 생존율은 0.5 μM 이하 농도의 수은과 5.0 μM 의 카드뮴을 첨가했을 때 세포의 생존율에서 두 경우 모두 90% 이상을 나타내었다.

한편, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 및 ATP 생성량은 수은 첨가군과 카드뮴 첨가군 모두, 첨가한 농도에 용량의존적으로 저하되었으며, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>는 수은 0.4 μM, 카드뮴 4.0 μM 이상의 첨가군에서, ATP 는 수은 0.3 μM, 카드뮴 2.0 μM 이상 이상의 첨가군에서 대조군에 비해 생성량이 현저히 감소하였다.

2) 수은과 카드뮴 병행첨가시 세포생존율 및 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>와 ATP 생성능  
생활환경이나 산업장에서 발생할 수 있는 수은과 카드뮴의 중복노출에 따른 독성작용의 변화를 살펴보기 위해 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성량을 현저히 저하시키는 농도(수은 0.4 μM, 카드뮴 4.0 μM)를 병행 첨가하였을 때의 실험 결과는 다음과 같다.

각각의 중금속 단독첨가시 90 % 이상을 유지하던 세포생존율이 병행첨가한 조건에서는 대조군 및 각각을 단독첨가한 경우에 비해 현저하게 감소하였다.

두 중금속의 병행첨가시 대조군(86.01 μM)과 비교한 상대적인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성량의 감소정도는 수은 단독첨가시의 8.5 % (78.85 μM), 카드뮴 단독첨가시의 12.6 % (75.24 μM)보다 증가한 29 % (61.24 μM)로서 상승(synergic)효과를 나타내었다.

두 중금속의 병행첨가시 대조군(19.1 μM)과 비교한 상대적인 ATP 생성량의 감소정도 또한 수은 단독첨가시의 25.3 % (14.26 μM), 카드뮴 단독첨가시의 28.5 % (13.66 μM)보다 증가한 52.2 % (9.13 μM)로서 부가효과(additive)을 나타내었다.

3) 수은 또는 카드뮴과 GSH 병행첨가시 세포생존율 및 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>와 ATP 생성량

중금속 독성에 대한 GSH 의 확연한 방어효과를 알아보기 위해 세포생존율이 현저히 감소하는 양상이 나타나는 4.0 μM 수은 및 40.0 μM 카드뮴에 40.0 μM GSH 를 병행 첨가한 실험 결과는 다음과 같다.

GSH 의 병행 첨가로 각 중금속과 GSH 의 농도비, 즉 수은에서는 1:10, 그리고 카드뮴에서는 1:1에서 모두 세포생존율이 95% 이상으로 회복되었다.

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성량은 GSH 첨가로 각 중금속의 단독 및 병행 첨가시의 감소경향이 현저히 완화되어 대조군과 차이가 없었다.

ATP 의 생성량 역시 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 와 마찬가지로 각 중금속의 단독 및 병행 첨가시의 감소경향이 현저히 완화되어 대조군과 차이가 없었다.

### 4. 고찰

연구결과 수은이나 카드뮴의 세포독성은 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, ATP 생성능이 두 중금속에 의해 용량 의존적으로 급격히 저하되었다가 GSH 에 의해 회복되는 것으로 볼 때, 세포내(內)로 유입된 중금속은 에너지생산 과정에 참여하는 효소 및 단백질의 -SH 기에 결합하여 세포독성을 일으키고, 손상된 에너지대사 때문에 세포의 ATP 생성은 감소하고 이어 ATP 를 필수적으로 필요로 하는 NO 의 생성이 감소하는 것으로 사료된다. 또한 GSH 는 그 간의 연구결과와 동일하게 수은 및 카드뮴의 세포독성에 대해 방어효과가 있음을 알 수 있었으며 수은 및 카드뮴은 세포 level 에서는 두 금속 모두 세포독성을 억제하며 독성정도는 수은이 카드뮴보다 강한 것으로 관찰되었다. 수은과 카드뮴의 독성차이는 각 중금속에 대한 GSH 의 방어효과가 나타나는 농도비를 고려할 때, 두 중금속의 세포내 SH 기에 대한 affinity 차이에서 기인한 것으로 사료된다. 한편, 수은과 카드뮴의 병행첨가는 독성효과의 상승작용을 유발하는 것으로 나타나 산업장에서 발현가능한 다중폭로 또한 상승(synergistic)효과를 나타내리라 유추된다.