

유기수은의 신경독성에 대한 셀레늄의 보상작용

연세대학교 의과대학 신경과학교실¹⁾, 환경공해연구소²⁾ 및 예방의학교실

박정수¹⁾ · 이효민²⁾ · 정 용 · 신동천 · 노재훈 · 문영한

=Abstract=

Interaction of Sodium Selenite on Neurotoxicity Induced by Methylmercuric Chloride

J. S. Park¹⁾, H. M. Lee²⁾, Y. Chung, D. C. Shin, J. H. Roh, Y. H. Moon

Department of Neurology¹⁾, The Institute of Environmental Research²⁾,

Department of Preventive Medicine & Public Health,

Yonsei University College of Medicine

This study was conducted to investigate the mechanism of protective effect by sodium selenite in methylmercuric chloride neurotoxicity, increasing intracellular Ca^{2+} concentration of the neuron.

Methylmercuric chloride of 3mg/kg of body weight was administered simultaneously with sodium selenite of 5mg/kg and pretreatment of sodium selenite via intraperitoneal injection to rats.

Also, effect of methylmercuric chloride(25 μ M, 50 μ M, 100 μ M) and sodium selenite(200 μ M) on free intrasynaptosomal Ca^{2+} concentration were studied using the fluorescent Ca^{2+} indicator fura-2 in vitro.

After the treatment, at 6, 24, and 48 hours later, mercury in the cerebral cortex, liver and kidney tissues, succinic dehydrogenase activities, adenosin-5'-triphosphate concentration, acetylcholinesterase activities, and intracellular Ca^{2+} concentration in the cerebral cortex were determined in vivo.

Cerebral synaptosomes of rats were incubated with methylmercuric chloride and sodium selenite in HEPES buffer for 10 minutes and free intrasynaptosomal Ca^{2+} concentration were measured with fura-2 in vitro.

The results were summarized as follows :

1. The combined administration of CH_3HgCl and Na_2SeO_3 and pretreatment of Na_2SeO_3 according to time significantly more increased in the cerebral cortex and decreased in the liver, kidney mercury concentrations compared to the administration of CH_3HgCl only.

2. The combined administration of CH_3HgCl and Na_2SeO_3 and pretreatment of Na_2SeO_3 increased more succinic dehydrogenase and acetylcholinesterase activities compared to the administration of CH_3HgCl only. Particularly pretreatment of Na_2SeO_3 significantly more compared to the administration of CH_3HgCl only. The concentration of adenosine-5'-triphosphate in Na_2SeO_3 treatment groups revealed a favourable effect compared to the administration of CH_3HgCl only.

3. Intracellular Ca^{2+} concentration in administration of CH_3HgCl only was increased significantly

more than control group in all test hours but was increased significantly more at 48 hours only after treatment in combined administration of CH_3HgCl and Na_2SeO_3 and pretreatment of Na_2SeO_3 according to time interval more decreased significantly intracellular Ca^{2+} concentration compared to the administration of CH_3HgCl only.

4. Free intrasynaptosomal Ca^{2+} concentration in the combined administration of CH_3HgCl and Na_2SeO_3 was decreased (24%~40%) significantly more than the administration of CH_3HgCl only.

From the above results, the specific dosage of Na_2SeO_3 decreased increment of intracellular Ca^{2+} concentration induced by administration of CH_3HgCl . These findings suggest the protective mechanism of Na_2SeO_3 on the neurotoxicity of CH_3HgCl .

Key words: Sodium selenite, Methylmercuric chloride, Neurotoxicity, Synaptosome.

I. 서 론

유기수은의 신경독성은 신경세포의 핵 주위부(perikaryon)에 일차적으로 나타나며, 특히 spinal cord의 dorsal root ganglion 내의 감각 세포체의 혈액관문(blood barrier)의 결핍으로 더욱더 용이하게 영향을 받는다(Cavanagh, 1977).

Methyl mercury(이하 Met-Hg로 표기)는 지질용해성이 높아 쉽고 빠르게 세포막에 침투되고 특히 세포막 단백질의 thiol기와 친화력이 크며 혈액관문을 통과하여 성숙된 조직에서는 운동신경계보다 감각신경계의 영향이 더 크고, 표적신경세포에서 단백질성을 저해하며 뇌조직으로의 아미노산 전달을 저해한다(Mercury 등, 1986). 그리고 발육조직에서는 소뇌와 대뇌피질에 해당하는 신경세포의 비정상적인 세포분열을 초래하는데, 특히 중기세포분열을 저해한다(Choi 등, 1979).

신경세포내로의 Met-Hg 이동은 적혈구내의 hemoglobin, glutathione과 결합되어 이동되며, 신경독작용은 demethylation 이 되므로 나타나고 신경세포내에서의 축적은 주로 회백질쪽으로 이동하여 돌기부분에 존재하는 것으로 밝혀졌고(Imura 등, 1980), 신경세포내 구체적인 표적은 mitochondria로 mitochondrial Ca^{2+} 흡수의 저하뿐만 아니라 기능장해를 유발하여 세포내 adenosine-5'-triphosphate(이하 ATP로 표기)의 감소 및 신경전달물질들과 관련된 효소들 acetylcholinesterase(이하 AChE로 표기), monoamine oxidase, SH-dependent enzymes인 succinic dehydrogenase(이하 SDH로 표기)와 lactic acid dehydrogenase(이하 LDH로 표기) 등의 활성도를 저해한다고 하였다(Clarkson, 1972; Cheung과 Verity, 1981; 1985).

최근 보고된 바에 의하면 신경독성을 유발시키는 Met-Hg의 세포내 작용기전은 Met-Hg의 신경세포막 침투로 presynaptic Ca^{2+} 의 투과성이 증가되어 intracellular Ca^{2+} (이하 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 로 표기)를 상승시키게 되어 상승된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 은 신경세포 흥분반응의 초기작용이 되고 지속적 탈분극(depolarization)을 유도하여 이온수송의 저해를 초래하므로 세포를 사멸시키게 된다(Clarkson, 1972; Komulainen과 Tuomisto, 1981). 또한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 증가로 acetylcholine(이하 ACh로 표기)과 같은 신경전달물질들의 유리증가와 저류현상을 나타낸다(Atchison, 1986; 1987; Levesque와 Atchison, 1988).

Synaptosome은 isolated presynaptic nerve ending으로 neuronal tissue의 기능적, 형태학적인 성질을 유지하고 있어 신경에 작용하는 물질들의 신경전달물질 유리효과, 약물의 작용기전 연구 및 mammalian nerve terminal activity를 측정하는데 사용된다(Komulainen과 Bondy, 1987a).

Synaptosome의 형태학적 연구에 따르면, 얇은 외막으로 둘러싸인 신경전달물질을 포함하는 synaptic vesicle이 다수 존재하고 free mitochondria(약 9%)와 postsynaptic membrane 조각 및 synaptic cleft가 보이며, myelinated axon조각(약 1%)도 보인다고 하였고, 신경세포가 균질화되는 동안 nerve ending이 axon으로부터 떨어져나가고, 이 순간 nerve ending은 self-sealing property가 있어 단단히 sealing하여 주변의 구성물을 함유하는 연속적인 구조를 형성하는 것으로 알려지고 있다(Gray와 Whittaker, 1962).

Met-Hg는 synaptosomal membrane을 쉽게 통과하여 intracellular Ca^{2+} 의 상승은 물론, 탈분극의 유도와 신경전달물질의 유리를 증가시키는 것으로 나타났다(Komulainen

과 Tuomisto, 1981 ; Atchison 등, 1984).

셀레늄(이하 Se로 표기)은 인체의 구성요소인 미량 금속 성분으로서 생체에서 항산화제로 작용하여 과산화물을 제거하는 효소인 glutathione peroxidase(이하 GSH-Px로 표기)의 구성성분이기도 하다(Schroeder 등, 1970). 일부 보고에 의하면 Se는 세포내 에너지 공급기관인 mitochondria의 작용을 촉진시켜 에너지 생산을 도울 뿐 아니라 과산화물질의 파괴를 촉매하고 지질과산화물을 억제하므로 mitochondria membrane을 보호하는 막구조 안정화작용이 있다고 하였으며 그 반응양상을 자세히 살펴보면, Se이 초기에 free radical peroxidative chain 반응을 차단하고 후에는 free fatty acylhydroperoxide를 생체막의 hydrophobic 부위로부터 유리될 수 있도록 한다는 것이다. 이외에도 Se는 SDH와 LDH의 활성도를 회복시키고 에너지대사와 관련된 ATPase를 활성화시키므로 정상적인 호흡률을 유지시켜 주는 작용을 지니고 있다(Yeh와 Johnson, 1973).

Met-Hg와 Se과의 관계를 살펴보면 Iwata 등(1973)에 의해 Se이 Met-Hg의 반감기를 변화시켜 대사를 촉진하며 신경독성효과를 지연시키며 밝혀졌으며, Ohi 등(1975, 1976)은 Se의 Met-Hg에 대한 보호효과가 완화된 독작용을 나타내는 Met-Hg의 용량에서 뚜렷하며, 고농도의 Se병용투여에서도 Met-Hg의 신경독성효과는 지연되었다고 하였고, Met-Hg이온이 Se단백물질에 결합하여(-S-Se-Met-Hg-Met-Hg-Se-S-) 뇌조직에서의 조직분배와 단백질 결합능력이 변화한다고 하였다. 한편 Chang 등(1977)은 병리학적인 연구결과 Se이 Met-Hg로 인한 뇌조직의 병리학적인 변화를 완화시킨다고 하였으며, Magos와 Webb(1977, 1980)은 Se이 Met-Hg의 혈액 및 조직으로의 분배를 변화시켜 즉, plasma-Hg complex를 형성하여 뇌조직으로 이동되어 뇌조직으로의 수는 축적을 증가시키는데 이들의 반응양상은 두 물질의 투여방법, 경로, 용량 등에 의해 다양하게 나타나며, 신경계에서의 Se의 보호효과는 뇌조직으로의 수는 축적농도변화와 무관하다고 하였다.

또한 이와 같은 결과에 부합되는 연구결과로서 Imura 등(1980)은 신경세포독성을 유발시키는 농도의 Met-Hg가 뇌조직으로 많이 축적되어도 Se의 투여로 Met-Hg의 demethylation이 지연되어 손상을 적게 받게 된다고 밝혔다.

Ganther(1978)는 과산화물 제거효소인 GSH-Px의 생합성을 Se이 증가시켜 Met-Hg로 인한 지질과산화를 억제하고 Hg의 radical 중간체 형성을 저해함을 입증하였으며,

Nishikido와 Furuyashiki(1987)는 Met-Hg의 대사 연구결과 Met-Hg는 GSH와 complex를 형성하여 배설되는데 Se은 뇌조직에서 Met-Hg-GSH complex 형성량을 증가시킨다고 하였고 Met-Hg에 대한 Se의 해독기전은 Se이 GSH-dependent reductive metabolism에 의해 bis(Met-Hg) selenide를 형성하므로 Met-Hg 해독에 관여한다고 밝혔다.

이처럼 Se이 Met-Hg의 뇌조직내 수는 축적을 증가시킴에도 불구하고 Se의 투여로 인해 Met-Hg의 신경독성이 경감되는 현상에 대해서는 지금까지 여러 보고가 있으나 아직까지 그 상호작용기전에 대한 뚜렷한 반응양상이 밝혀지지 않은 상태에 있으며, 특히 신경조직내 $[Ca^{2+}]_i$ 을 중심으로 Met-Hg와 Se의 상호작용에 대한 연구는 알려지지 않고 있다. 앞선 연구결과들에 의하면, 신경조직내에서의 Met-Hg와 Se간의 특이한 생화학적 반응이 존재함을 예측하면서, 막구조 안정화작용을 지니고 있는 Se이 mitochondria의 대사에 있어 Met-Hg의 독성을 차단할 수 있는 특별한 역할을 기대하고 있으나 아직까지 mitochondrial electron transfer에 있어서 Se의 역할이 확실히 규명되지 않고 있는 상황이다(Magos와 Webb, 1977 ; 1980).

이와 같은 배경하에 본 연구에서는 대뇌신경조직을 대상으로 Met-Hg의 신경세포 손상에 대한 Se의 보상작용을 $[Ca^{2+}]_i$ 을 중심으로 밝혀보고자 하였다.

구체적인 연구목적으로는,

첫째, 흰쥐의 대뇌피질을 대상으로 Met-Hg와 Se을 동시 및 Se 전투여하였을 때 Hg축적농도, SDH 및 AChE 활성도, ATP농도 그리고 신경세포내 Ca^{2+} 농도를 측정하여 Met-Hg 단독투여군과 비교하며,

둘째, 신경세포내 Ca^{2+} 농도를 synaptosome를 이용하여 Met-Hg 투여시 intrasynaptosomal Ca^{2+} 농도에 미치는 Se의 영향을 관찰하는 것이다.

II. 연구방법

1. 실험동물 및 재료

실험동물은 생후 10~12주된 체중 200g전후의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험시작 3주전부터 사육장에서 적응시켜 사료(삼양사, 서울)와 음료를 자유로이 섭취할 수 있도록 하면서 적응시켰다.

실험재료로 사용한 유기수은은 CH_3HgCl (藥理化學, 일본) 셀레늄은 Na_2SeO_3 (藥理化學, 일본)를 사용하였다.

2. 실험동물군 및 투여방법

가. 실험동물의 조직내 관찰

실험동물군은 Table 1과 같이 5군으로 구분하여 정상대조군(제 I 군), CH_3HgCl (3mg / kg) 단독투여군(제 II 군), Na_2SeO_3 (5mg / kg) 단독투여군(제 III 군), CH_3HgCl (3mg / kg)과 Na_2SeO_3 (5mg / kg) 동시투여군(제 V 군), Na_2SeO_3 (5mg / kg) 전투여 후 CH_3HgCl (3mg / kg) 투여군(제 V 군)(이하 Se 전투여군으로 표기)으로 하였으며, 쓰여진 실험동물수는 실험군당 흰쥐 15마리로 정상대조군을 포함하여 75마리를 사용하였다(Table 1).

재료 중금속은 CH_3HgCl 의 경우 olive oil(藥理化學, 일본)에 용해시켜 사용하였고 Na_2SeO_3 는 생리식염수에 용해시켜 각각 복강주사하였다.

동시투여군의 경우 Na_2SeO_3 의 투여는 CH_3HgCl 투여와 함께 실시하였고 Se 전투여군의 경우는 Na_2SeO_3 투여후 1시간뒤 CH_3HgCl 을 투여하였으며 그 이후의 실험시간은 다른 실험군과 동일하게 실시하였다. 시료투여후 모든 실험군은 사료와 음료를 자유로이 섭취하도록 하였으며 실험기간은 6시간, 24시간, 48시간으로 설정하였다. 본 연구에서 투여한 CH_3HgCl 과 Na_2SeO_3 의 용량 그리고 실험기간 등은 예비실험을 기초로 설정한 것으로 실제로 예비실험에서 CH_3HgCl 의 용량을 1mg / kg, 3mg / kg으로 Na_2SeO_3 의 용량을 1mg / kg, 3mg / kg, 5mg / kg 용량으로 세분하여 각각의 경우를 동시 및 전투여하였을 때 가장 의미 있는 결과를 나타내는 CH_3HgCl 3mg / kg과 Na_2SeO_3 5mg / kg를 채택하여 사용하였다. Gregus와 Klaassen(1986)의 연구결과에 의하면 CH_3HgCl 과 Na_2SeO_3 의 요와 변을 통한 대사는 주로 2일이내에 최고치를 형성하는 것으로 보고되어 있어 6시간, 24시간, 48시간의 실험기간을 설정하여 관찰하였다.

나. Free intrasynaptosomal Ca^{2+} 측정

실험군은 Table 2와 같이 8군으로 구분하여 정상대조군(제 I 군), CH_3HgCl 단독투여군으로 각각 25 μM 투여군(제 II 군), 50 μM 투여군(제 III 군), 100 μM 투여군(제 IV 군) 등 세 군과 Na_2SeO_3 200 μM 단독투여군(제 V 군), CH_3HgCl 과 Na_2SeO_3 동시투여군으로 CH_3HgCl 25 μM 과 Na_2SeO_3 200 μM (제 VI 군), CH_3HgCl 50 μM 과 Na_2SeO_3 200 μM (제 VII 군), CH_3HgCl 100 μM 과 Na_2SeO_3 200 μM (제 VIII 군)의 세 군으로 하였으며, 실험군당 10단위의 synaptosome을 사용하여 모두 80단위의 synaptosome을 사용하였다. 재료중금속은

Table 1. Experimental animals groups treated with methylmercuric chloride and sodium selenite in the mature organism

Group and doses(mg / kg)	Hour after treatment		
	6	24	48
I Control	5	5	5
II CH_3HgCl (3)	5	5	5
III Na_2SeO_3 (5)	5	5	5
IV CH_3HgCl (3) with Na_2SeO_3 (5)	5	5	5
V CH_3HgCl (3) after Na_2SeO_3 (5)	5	5	5
Total	25	25	25

* Na_2SeO_3 was administered at one hour before administration of CH_3HgCl in V group animals

Table 2. Experimental groups treated with methylmercuric chloride(CH_3HgCl) and sodium selenite(Na_2SeO_3) in synaptosome

Experimental groups and doses(μM)	Units of		
	CH_3HgCl	Na_2SeO_3	Synaptosome
I	—	—	10
II	25	—	10
III	50	—	10
IV	100	—	10
V	—	200	10
VI	25	200	10
VII	50	200	10
VIII	100	200	10
Total			80

CH_3HgCl 의 경우 에탄올(99%, Merck)에 용해시켜 사용하였고 Na_2SeO_3 는 생리식염수에 용해시켜 재료 중금속의 투여용량이 synaptosome당 각각 100 μg 가 되도록 하였다.

복합투여군의 경우 Na_2SeO_3 의 투여는 CH_3HgCl 의 투여와 거의 동시에 실시하였다.

3. 실험방법

가. 실험동물의 조직내 관찰

1) 조직중의 수은농도 측정

흰쥐를 에테르로 마취한 다음 흰쥐의 두부를 고정시키고 경배부의 피부를 절개하여 뇌를 적출한 다음 얼음 위에서 해부하여 대뇌피질 cerebral cortex을 분리하였다. 뇌조직 적출후 곧이어 간장과 신장조직을 취하여 AOAC(Associ-

ation of Official Analytical Chemists, 1984) 방법에 따라서 전처리한 후 환원기화법을 적용한 원자흡광광도계(Shimadzu, AA-650)로 측정하였다.

2) Succinic dehydrogenase(SDH) 활성도 측정

대뇌피질 100mg을 취하여 30% 서당용액(4℃, pH7.2)으로 균질화(potter teflon-glass homogenizer) 시킨후 Laatsch 등의 방법(1962)에 따라 spectrophotometer(Shimadzu, UV-240)로 흡광도를 측정하였다.

3) Adenosine-5'-triphosphate(ATP) 측정

대뇌피질 100mg을 취하여 서당용액(0.25M)을 포함하는 Tris-HCl 완충용액(4℃, pH7.4) 5ml로 Deter의 방법(1973)에 따라 mitochondria 분획을 분리하고 Linklater 등의 방법(1985)에 따라 spectrofluorometer(Perkin-Elmer, LS-5)로 시료의 형광성을 측정하였다.

4) Acetylcholinesterase(AChE) 활성도 측정

대뇌피질 100mg을 취하여 Ellman 등의 방법(1961)에 의해 AChE의 활성도를 spectrophotometer(Shimadzu, UV-240)로 측정하였다.

5) Intracellular Ca²⁺ 농도 측정

대뇌피질 100mg을 취하여 서당용액(0.25M)을 포함하는 Tris-HCl 완충용액(4℃, pH7.5) 5ml로 균질화시킨 후 Dodd 등의 방법(1981)에 따라 brain extract의 intracellular 분획을 얻은 다음 AOAC법(1984)으로 전처리하여 원자흡광광도계(Shimadzu, AA-650)를 이용하여 측정하였다.

나. Free intrasynaptosomal Ca²⁺ 측정

1) Synaptosome의 제조

흰쥐를 단두한 후 즉시 뇌를 적출하여 얼음 위에서 대뇌피질을 분리하여 Dodd 등의 방법(1981)을 수정한 Komulainen 과 Bondy의 방법(1987b)에 따라 purified synaptosome을 제조하였다.

2) Free intrasynaptosomal Ca²⁺ 측정

Komulainen과 Bondy(1987b)의 방법에 따라 fura-2를 이용하여 free intrasynaptosomal Ca²⁺(이하 [Ca²⁺]_{is}로 표기)을 spectrofluorometer (Perkin-Elmer, LS-5)로 측정하였다.

다. Free intrasynaptosomal Ca²⁺ 계산

각 시료중 [Ca²⁺]_{is} 농도는 Gryniewicz 등의 방법(1985)에 따라 다음과 같이 계산하였다.

- Free intrasynaptosomal Ca²⁺([Ca²⁺]_{is}) calculation method described by Gryniewicz et al.(1985)

$$[Ca^{2+}]_{is} = Kd \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \left(\frac{Sf_2}{Sb_2} \right)$$

- Kd: the dissociation constant of the fura-2-Ca²⁺ complex
- R : F₁ / F₂, F₁ = Sf₁Cf + Sb₁Cb
(value detected at the excitation wavelength 340nm)
F₂ = Sf₂Cf + Sb₂Cb
(value detected at the excitation wavelength 380nm)
- Sf₁ = fluorescence of fura-2 at zero Ca²⁺ at the 340 nm
- Sf₂ = fluorescence of fura-2 at zero Ca²⁺ at the 380 nm
- Sb₁ = fluorescence of fura-2 at Ca²⁺ saturation at the 340nm
- Sb₂ = fluorescence of fura-2 at Ca²⁺ saturation at the 380nm
- Rmin = Sf₁ / Sf₂ : the ratio of the fluorescence at zero free Ca²⁺
- Rmax = Sb₁ / Sb₂ : the ratio of the fluorescence at full Ca²⁺ saturation

4. 통계학적 검정

통계학적 검정은 두 실험군간의 차이를 검정하는 비모수 통계방법인 Mann-Whitney U test를 이용하여 실험동물의 조직내 관찰에서의 실험군간의 조직중 Hg 농도, SDH 및 AChE 활성도, ATP 농도 그리고 [Ca²⁺]_i를 비교하였으며 synaptosome에서는 [Ca²⁺]_{is}를 비교하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 실험동물의 조직내 관찰

가. 조직중의 수은농도변화

각 실험군의 뇌조직, 간장 및 신장중의 수은농도변화는 Table 3과 같았다. 뇌조직의 대뇌피질을 대상으로 수은축적 농도를 비교한 결과 모든 투여군에서 시간이 증가함에 따라 수은 축적농도가 증가하는 추세를 보였다.

Met-Hg와 Se 동시투여군과 Met-Hg 단독투여군을 비교

하였을 때 6시간째의 농도만이 유의한 차이를 나타내어 동시투여군이 1.53 $\mu\text{g/g}$ 으로 높았다($p < 0.05$). Se 전투여군의 경우는 다른 투여군들과 달리 6시간에서 24시간까지의 수는 축적증가율이 그 이후보다 더 커서 24시간째의 2.15 $\mu\text{g/g}$ 의 평균농도는 6시간째의 3.25배정도이었으며 그 수치는 Met-Hg 단독 투여군에 비해 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).

간장조직의 수는 축적정도는 대뇌피질에 비해 모든 투여군과 모든 시간에서 유의하게 높았으며($p < 0.05$, $p < 0.01$) 시간이 경과함에 따라 계속적으로 증가하는 추세를 보였다.

Met-Hg 단독투여군의 6시간, 24시간째의 농도는 각각 4.10, 8.87 $\mu\text{g/g}$ 으로 Met-Hg와 Se 동시투여군의 2.75, 4.05 $\mu\text{g/g}$ 과 비교시 Met-Hg 단독투여군이 유의하게 높았으나($p < 0.05$), 48시간째에는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Se 전투여군의 경우도 동시투여군과 유사한 양상을 보여 6시간, 24시간째의 농도가 Met-Hg 단독투여군에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

신장조직에서의 수는 축적농도는 간장 및 뇌조직과는 다른 양상을 나타내어 모든 투여군에서 48시간째의 축적농도는 24시간째에 비해 유의하게 낮았고($p < 0.05$, $p < 0.01$) 대체로 간장조직에 비해 낮은 축적농도를 나타내었다.

Met-Hg와 Se 동시 투여군과 Se 전투여군은 24시간째까지는 상승하다가 48시간째에는 모두 감소하는 경향을 보였고 Met-Hg 단독투여군과 비교시 동시투여군이 48시간을 제외하고는 유의하게 낮았으며($p < 0.05$) Se 전투여군은 Met-Hg 단독투여군보다 전실험기간에서 모두 유의하게 낮았다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Table 3).

나. Succinic dehydrogenase(SDH) 활성도 변화

Met-Hg와 Se를 투여 후 대뇌피질에서의 SDH 활성도를 측정한 결과 Table 4와 같았다. Met-Hg 단독투여군의 SDH 활성도는 전실험기간에서 대조군에 비해 저해정도의 범위가 26~30%로 모두 유의하게 낮았고($p < 0.05$) Met-Hg와 Se 동시투여군의 경우도 6시간째에는 대조군과 유의한 차이가 없었으나 24시간째에는 대조군에 비해 34% 정도 감소된 활성도를 나타내어 유의하게 낮았으며($p < 0.05$), 48시간째에는 24시간째에 비해 어느 정도 회복된 활성도를 나타내어 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Se 전투여군의 SDH 활성도는 전 실험시간에서 모두 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 6시간, 24시간째의 SDH 활성도는 Met-Hg 단독 투여군보다 각각 58, 42% 상승된 것이어서 유의하게 높았다($p < 0.05$)(Table 4).

Table 3. Concentration of total mercury in brain(cerebral cortex), liver and kidney of rats treated with methylmercuric chloride and sodium selenite

(unit : $\mu\text{g/g}$)

Experimental group	Brain			Liver			Kidney		
	6 ^a	24 ^a	48 ^a	6 ^a	24 ^a	48 ^a	6 ^a	24 ^a	48 ^a
I Control	0.03 (0.01)	ND	0.04 (0.02)	0.10 (0.06)	0.03 (0.02)	N.D	0.09 (0.05)	0.11 (0.06)	0.07 (0.06)
II CH ₃ HgCl	1.01 (0.48)	1.27 (0.32)	2.78 (1.22)	4.10 (0.91)	8.87 (5.15)	11.95 (3.24)	9.12 (5.01)	7.84 (2.20)	3.51 (1.19)
III Na ₂ SeO ₃	0.06 (0.02)	0.05 (0.03)	N.D	0.08 (0.05)	0.03 (0.02)	0.02 (0.01)	0.12 (0.09)	0.11 (0.08)	0.09 (0.05)
IV CH ₃ HgCl with Na ₂ SeO ₃	1.53* (0.72)	1.59 (0.37)	2.41 (0.48)	2.75* (0.84)	4.05* (0.71)	12.06 (1.51)	3.68* (1.61)	4.70* (2.51)	2.73 (1.48)
V CH ₃ HgCl after Na ₂ SeO ₃	0.61 (0.21)	2.15* (1.19)	2.91 (0.21)	2.78* (0.70)	5.16* (1.42)	10.37 (1.54)	1.54** (0.87)	4.04* (2.11)	1.83* (0.72)

Each value represents the mean(S.D.)(n=5)

ND : Not detected, below the detection limit of analysis

Experimental animals were treated with metals by single intraperitoneal injection

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with II group

^aHour after treatment

Table 4. Succinic dehydrogenase activities in brain extract(cerebral cortex) of rats treated with methylmercuric chloride and sodium selenite

(unit : μ M INT formazane / g)

Experimental group	Hour after treatment		
	6	24	48
I Control	973 \pm 101	1073 \pm 329	930 \pm 326
II CH ₃ HgCl	823 \pm 57* (-26)	747 \pm 174* (-30)	682 \pm 215* (-27)
III Na ₂ SeO ₃	850 \pm 161 (-31)	950 \pm 275 (-11)	1095 \pm 317 (+18)
IV CH ₃ HgCl with Na ₂ SeO ₃	1013 \pm 367 (+ 7)	703 \pm 155* (-34)	846 \pm 290 (-9)
V CH ₃ HgCl after Na ₂ SeO ₃	1070 \pm 189 ^a (+17)	1058 \pm 186 ^a (-1)	1004 \pm 361 (+8)

Each value represents the mean \pm S.D(n=5)

Experimental animals were treated with metals by single intraperitoneal injection (+) : increase(%), (-) : decrease(%) to the mean of control

*p<0.05 compared with control gorup

^ap<0.05 compared with II group

Table 5. ATP concentration of mitochondria in brain(cerebral cortex) of rats treated with methylmercuric chloride and sodium selenite

(unit : ng / mg wet brain)

Experimental group	Hour after treatment		
	6	24	48
I Control	74.3 \pm 1.7	79.1 \pm 6.5	78.5 \pm 3.3
II CH ₃ HgCl	69.4 \pm 5.2*	60.8 \pm 17.1	61.2 \pm 9.6*
III Na ₂ SeO ₃	72.5 \pm 1.7	72.9 \pm 4.2	74.3 \pm 2.0
IV CH ₃ HgCl with Na ₂ SeO ₃	72.2 \pm 1.8	75.2 \pm 3.3	74.6 \pm 4.2
V CH ₃ HgCl after Na ₂ SeO ₃	73.4 \pm 4.1	73.2 \pm 2.5	77.8 \pm 5.9

Each value represents the mean \pm S.D(n=5)

Experimental animals were treated with metals by single intraperitoneal injection

*p<0.05 compared with control group

다. Adenosine-5'-triphosphate(ATP) 농도변화

Met-Hg와 Se 투여후 대뇌피질내의 mitochondria 분획에서의 ATP 측정결과 Table 5와 같았다. Met-Hg 단독투여군의 6시간, 24시간, 48시간째의 ATP 농도는 각각 69.4, 60.8, 61.2ng / mg을 나타내어 대조군의 74.3, 79.1 78.5 ng / mg에 비해 유의하게 낮았고(p<0.05) 그 감소 정도는 각각 7, 23, 32%정도였다.

Met-Hg와 Se 동시투여군의 경우는 대조군에 비해 3~5% 정도 감소된 농도를 나타내었으나 유의한 차이를 보이지 않았으며, Se 전투여군의 경우도 역시 유의한 차이를

나타내지 않았다(Table 5).

라. Acetylcholinesterase(AChE) 활성도 변화

Met-Hg와 Se 투여 후 대뇌피질에서의 AChE 활성도 변화는 Table 6과 같았으며, 전투여군이 모두 6시간째에 비해 24시간째에 감소하다가 48시간째에는 어느 정도 회복되는 경향을 보였다. Met-Hg 단독투여군의 경우 6시간, 24시간, 48시간째의 활성도가 각각 829, 590, 718u / 1를 보여 대조군에 비해 33.4, 50.0, 40.9% 정도의 저해정도를 나타내었고 이들 수치는 모두 유의하게 낮았다(p<0.05).

Met-Hg와 Se 동시투여군에 있어서도 시간에 따라 각각 대조군에 비해 6.5, 47.4, 33.4%의 저해정도를 나타내어 6시간째를 제외하고는 24시간, 48시간째의 AChE 활성도가 대조군에 비해 유의하게 낮았으며($p < 0.05$), Se 전투여군의 경우도 가장 낮은 활성도를 보인 24시간째의 943u/l 활성도가 대조군에 비해 20.0% 정도 저하된 것이었으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았고 Met-Hg 단독투여군의 활성도와 비교시 전실험시간의 활성도가 Se 전투여군이 더 높아 24시간, 48시간째의 활성도는 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.05$)(Table 6).

마. Intracellular Ca^{2+} 농도변화

Met-Hg와 Se 투여후 대뇌피질의 $[Ca^{2+}]_i$ 를 측정 비교한 결과 모든 투여군에서 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다(Table 7). Met-Hg 단독투여군의 경우 시간에 따른 326.3, 304.3, 552.5 nM/g의 $[Ca^{2+}]_i$ 이 각각 대조군에 비해 2.6, 1.8, 2.9배 정도 유의하게 높았다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

Met-Hg와 Se 동시투여군의 $[Ca^{2+}]_i$ 은 6시간, 24시간째에 144.5nM/g과 215.5nM/g을 나타내어 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나 48시간째에는 역시 365.0nM/g

Table 6. Acetylcholinesterase activities in the brain extract(cerebral cortex) of rats treated with methylmercuric chloride and sodium selenite

(unit : u/l)

Experimental group	Hour after treatment		
	6	24	48
I Control	1245±168	1179±347	1214±202
II CH_3HgCl	829±233* (33.4)	590±260* (50.0)	718± 83* (40.9)
III Na_2SeO_3	1085±108 (12.9)	774±295 (34.4)	1138±203 (6.3)
IV CH_3HgCl with Na_2SeO_3	1164±459 (6.5)	620± 97* (47.4)	809± 86* (33.4)
V CH_3HgCl after Na_2SeO_3	1199±315 (3.7)	943±186 ^a (20.0)	1068±269 ^a (12.0)

Each value represents the mean±S.D(n=5)
 Experimental animals were treated with metals by single intraperitoneal injection
 (%): Inhibition percentage to the mean of control
 * $p < 0.05$ compared with control group
^a $p < 0.05$ compared with II group

Table 7. Intracellular Ca^{2+} in brain(cerebral cortex) of rats treated with methylmercuric chloride and sodium selenite

(unit : nM/g)

Experimental group	Hour after treatment		
	6	24	48
I Control	127.0± 34.5	168.8± 28.8	193.8± 41.8
II CH_3HgCl	326.3±133.0*	304.3±150.3*	552.5±183.3**
III Na_2SeO_3	336.3± 53.0	211.0± 54.0	337.0± 34.5*
IV CH_3HgCl with Na_2SeO_3	144.5± 59.8 ^a	215.5±151.3	365.0±102.8*
V CH_3HgCl after Na_2SeO_3	213.8± 73.8	176.8± 70.8 ^a	302.0± 87.3 ^a

Each value represents the mean±S.D(n=5)
 Experimental animals were treated with metals by single intraperitoneal injection
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control group
^a $p < 0.05$ compared with II group

의 $[Ca^{2+}]_i$ 을 나타내어 대조군에 비해 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 또한 전실험시간의 $[Ca^{2+}]_i$ 을 Met-Hg 단독투여군과 비교시 동시투여군이 단독투여군에 비해 56, 29, 34% 정도 감소된 $[Ca^{2+}]_i$ 을 보였으나 6시간째의 $[Ca^{2+}]_i$ 만이 유의한 차이를 나타내어 낮았다 ($p < 0.05$).

Se 전투여군의 경우도 Met-Hg와 Se 동시투여군과 같이 48시간째만이 대조군에 비해 유의하게 높은 $[Ca^{2+}]_i$ 을 나타내었으나 매 시간 213.8, 176.8, 302.0 nM/g의 $[Ca^{2+}]_i$ 이 Met-Hg 단독투여군에 비해 낮았고 24시간, 48시간째의 $[Ca^{2+}]_i$ 은 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$) (Table 7).

2. Free intrasynaptosomal Ca^{2+}

Synaptosome을 대상으로 Met-Hg의 농도를 25 μ M, 50 μ M 및 100 μ M로 구분하여 투여한 결과 Table 8과 같은 결과를 얻었다.

Synaptosome 자체의 $[Ca^{2+}]_i$ 을 측정 한 대조군의 11.55nM에 비해 모든 투여군들의 농도가 유의하게 높았 ($p < 0.01$) 그 상승범위는 대조군의 2.1~3.3배에 해당하였다.

Met-Hg의 투여로 인한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가에 Se의 동시투여가 어떠한 영향을 미치는지의 여부를 알아본 결과 Table 9와 같은 결과를 얻었다. Met-Hg 25 μ M과 Se 200 μ M 동시투여군의 경우 19.29nM의 $[Ca^{2+}]_i$ 을 나타내어 25 μ M 단독투여군의 31.91 μ M에 비해 유의하게 낮았고 ($p < 0.01$), Met-Hg 50 μ M과 Se 200 μ M 동시투여군과 Met-Hg 100 μ M과 Se 200 μ M 동시투여군 역시 Met-Hg 단독투여군에 비하여 유의하게 낮은 $[Ca^{2+}]_i$ 을 나타내었으며 ($p < 0.05$), 이들의 감소율은 24~40%의 범위였다. 그러나 Met-Hg와 Se 동시투여군들의 $[Ca^{2+}]_i$ 이 Met-Hg 단독투여군보다 저하된 것이기는 하나 역시 Met-Hg 25 μ M과 Se 200 μ M 동시투여군을 제외하고는 두 실험군 모두 대조군보다 유의하게 높은 농도를 나타내었다 (Table 8,9).

IV. 고찰

일반적으로 알려진 바에 의하면 Met-Hg는 신경독성의 유발과 함께 세포의 전해질 활성을 저해하는 것으로 알려져 있는데, 이와 같은 전해질양상의 변화에서 특히 문제가 되는 것은 생체내 Ca^{2+} 의 변화로서, 최근의 보고에 따르면 정상세포를 괴사시키는 유발요인은 화학적인 손상에 의한 것뿐만 아니라 과량의 $[Ca^{2+}]_i$ 축적이 또 하나의 요인이

Table 8. The free intrasynaptosomal Ca^{2+} treated with methylmercuric chloride in synaptosomes

Experimental group (dose : μ M)	Experimental Number	Concentration (nM)
I Control	10	11.55 \pm 5.91
II CH_3HgCl (25)	10	31.91 \pm 6.39*
III CH_3HgCl (50)	10	36.67 \pm 7.09*
IV CH_3HgCl (100)	10	38.39 \pm 10.14*

Each value represents the mean \pm S.D. Synaptosomes were incubated with each compound at 37 $^\circ$ C for 10 min.

* $p < 0.01$ compared with control group

Table 9. Effect of sodium selenite on the free intrasynaptosomal Ca^{2+} treated with methylmercuric chloride

Agent	Concentration (nM)	
	No Na_2SeO_3	200 μ M Na_2SeO_3
Control	11.55 \pm 5.91	28.84 \pm 10.56**
CH_3HgCl	25 μ M	31.91 \pm 6.39
	50 μ M	36.67 \pm 7.09
	100 μ M	38.39 \pm 10.14
		29.21 \pm 6.65*

Each value represents the mean \pm S.D (n=10)

Synaptosomes were incubated with methylmercuric chloride and sodium selenite for 10 min

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the corresponding value in the absence of sodium selenite

된다고 지적하며, 괴사현상과 $[Ca^{2+}]_i$ 축적과의 관계는 세포 내에서 증가한 Ca^{2+} 에 의해 plasma membrane이 손상받기 때문이라고 하였다 (Campbell, 1983).

신경세포에서의 $[Ca^{2+}]_i$ 과 막 탈분극 및 ACh과의 관계를 살펴보면 {[$Ca^{2+}]_i$ 축적 \rightarrow ACh 유리축진 \rightarrow synapse 후막 (postsynaptic membranes)의 활성화, ion flow change \rightarrow synapse 후막의 탈분극 \rightarrow AChE에 의해 ACh의 분해(혹은 신경세포로 다시 uptake) \rightarrow synapse 후막의 재분극 \rightarrow 신경 자극의 재반응 \rightarrow Ca^{2+} 의 유입} 등의 순환하는 흐름으로 진행될 것이다.

이와 같은 세포내 Ca^{2+} 의 증가는 여러 가지 경로를 통해서 이루어질 수 있는데 첫째는 신경세포, 평활근 및 태생기 세포 등에 존재하는 선택적 투과성을 지닌 Ca-channel을

통한 유입을 생각해 볼 수 있는데 이 Ca-channel은 세포막에 가해지는 저분극자극에 의해 열리고 스스로 불활성화되지 않아 저분극이 지속될 때 소량의 세포내 Ca²⁺ 유입이 계속적으로 일어나 presynaptic nerve terminal로부터 신경 전달물질 유리를 활성화시키는 등 매개체 역할을 한다. 둘째는 surface vesicle이나 mitochondria, endoplasmic reticulum 등의 세포내 Ca²⁺ 수송기관이나 저장소에 직접 작용하거나 혹은 Ca²⁺을 치환시킴으로써 Ca²⁺을 유리시키고 또한 이들의 Ca²⁺ 흡수를 저하시켜 얻어지는 [Ca²⁺]_i 증가가 있으며, 셋째는 Na-channel을 통한 유입을 생각해 볼 수 있다. 즉 세포막의 Na⁺ 균형에 영향을 미치는 여러 가지 약물들이나 세포막의 thiol 상태 및 에너지대사에 변화가 있게되면 Na⁺ 수송기능에 이상이 생기면서 경우에 따라 Ca²⁺이 Na⁺과 같이 이동하여 [Ca²⁺]_i 증가가 유도될 수 있다. 이밖에도 내번체로 세포막전압의 변화로 plasma membrane의 구조와 성질이 변화되고 그로인해 얻어지는 완만내향전류(slow inward current)로 유입되는 Ca²⁺을 생각해 볼 수 있다(Pounds와 Rosen, 1988).

본 연구결과에 의하면 Met-Hg로 인하여 [Ca²⁺]_i이 대조군에 비하여 1.8~2.9배 정도의 유의한 증가를 보여 Lev- esque와 Atchison(1988)이 제시한 Met-Hg의 신경세포독성기전과 동일함을 입증하였다. Met-Hg 투여로 인하여 본 실험에서 관찰된 생체내의 생화학적 변화를 정리하여 보면 먼저 대뇌피질의 수은 축적으로 Met-Hg의 신경세포 침투를 확인할 수 있었고 일련의 효과로 탄수화물 대사에 관여하는 SDH 활성도 저하와 함께 그 에너지 화합물인 ATP의 감소 및 [Ca²⁺]_i의 유의한 증가 등이 입증되어 부분적이거나 Met-Hg 신경세포기전을 재확인 할 수 있었다. Met-Hg 단독투여군과 Se 동시 및 전투여군을 비교하여 볼때 Met-Hg와 Se동시투여군의 경우 SDH 활성도나 [Ca²⁺]_i 증가에서 Met-Hg 단독투여군보다는 완화된 독성현상들을 보였으나 시간에 따라 변화가 크고 Se의 동시투여로 AChE의 활성도 저하도 크게 보호되지 못하였다.

그러나 Se 전투여군의 경우는 Met-Hg와 Se 동시투여군과는 매우 다른 양상을 보여 에너지 반응대사와 관련된 SDH 활성도가 Met-Hg 단독투여군에 비하여 유의하게 높고 ATP 농도 또한 정상치를 유지하면서 [Ca²⁺]_i에서도 보다 유의하게 낮은 농도를 나타내어 Se의 전투여는 Met-Hg의 독성으로부터 세포를 보호함이 확실히 밝혀졌고 이같은 결과는 Met-Hg 단독투여군보다 유의하게 높은 AChE 활성도에서도 나타났다. 이러한 Se의 작용은 Yeh

와 Johnson에 (1973)에 의한 Se의 SDH 활성도 회복작용과 정상적인 세포의 호흡률 유지 및 에너지대사와 관련된 ATPase의 활성화 등의 보고와 관련하여 생각해볼 때 5 mg/kg Se의 전투여가 3mg/kg의 Met-Hg 독성은 이와 같은 생체내 작용으로 차단하였음을 알 수 있었다.

지금까지 알려진 유기수은과 셀레늄의 상호작용에 관한 몇몇 보고들을 살펴보면 만성 Met-Hg 독성이 0.5ppm의 섭식투여로 감소되었고(Ganther, 1978), Nishikido와 Furuyashiki (1987)의 연구결과에 의하여 흰쥐를 대상으로 Met-Hg와 Se을 동시에 정맥주사한 후 5분, 20분, 60분 후의 뇌, 간장, 신장, 혈액내에서의 수은농도가 단독투여군에 비하여 동시투여군이 뇌와 간장에서 높고 신장과 혈액에서는 낮다고 보고하였다. 이밖에도 Met-Hg와 Se의 동시투여로 인하여 뇌조직으로의 수은 축적이 절대적으로 증가함을 지적한 연구결과들(Chen 등, 1975; Ohi 등, 1976)이 보고되어 왔으나 그들의 경향은 Met-Hg와 Se의 투여 용량, 방법, 측정시간 등에 의해 매우 다양하게 나타난다(Magos와 Webb, 1977). 본 연구결과에서는 Met-Hg 단독투여군과 Met-Hg와 Se 동시투여군 및 Se 전투여군간의 뇌조직내 수은 축적농도가 전실험시간에서 유의한 차이를 보이지 않은 점이 앞선 연구들과 다르기는 하나 부분적으로 Met-Hg 단독투여군이 유의하게 낮은 축적농도를 나타내었고 신장에서는 뚜렷하게 높은 농도를 나타내는 것으로 보아 본 연구에서는 채택한 Met-Hg와 Se의 용량이 다르고 측정시간이 다르다는 것을 감안해 볼때 기존의 결과들과 유사하다고 생각된다.

Met-Hg 투여후 48시간째까지의 조직내 수은 축적농도를 살펴본 본 연구결과에 따르면 Met-Hg 투여군들이 뇌조직과 간장에서는 48시간째까지 계속적으로 상승추세를 보였고 신장에서는 각기 다른 양상을 보여 Met-Hg 단독투여군의 경우, 6시간 이후로 축적농도가 감소하는 것으로 보아 6시간 이전에 최고 농도에 도달하는데 비하여 그외의 Met-Hg와 Se 동시투여군이나 Se 전투여군에서는 24시간째에 최고치를 이루는 점이 차이가 있으며, 또한 Se 전투여군의 6시간에서 24시간째의 뇌조직내 수은 증가율이 3.52배인 반면 Met-Hg와 Se 동시투여군은 1.04배로 다르고 이같은 경향은 신장에서도 나타나 Se의 동시투여와 전투여 사이의 조직내 수은 이동에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

특히 뇌조직에 있어서도 Howard와 Mottet(1986)의 연구결과에 의하면 Met-Hg의 축적률이 가장 높은 곳은 소뇌이며 각 부위에 따라 그 축적농도가 다르다고 하였으며, 본

연구의 채취부위인 대뇌피질에서의 축적농도가 전체 뇌부위를 대표하기는 무리가 있으며, 앞선 연구결과들로 미루어보아 소뇌부위에서의 축적정도는 더 높아질 것으로 생각된다.

AChE의 활성도를 저해하는 기전에 두 가지가 있어, 하나는 경쟁적 저해제로서 가역적으로 AChE의 anion site에서 결합하여 저해하는 것과 하나는 AChE의 ester site에 불가역적으로 결합하여 저해하는 비경쟁적 저해제가 있다.

본 연구에서도 Met-Hg투여로 인하여 대조군에 비하여 AChE 활성도가 33.4~50.0% 정도의 저해정도를 보였는데 이같은 결과는 본 실험에서 측정하지는 않았지만 신경세포내 ACh의 농도증가 및 축적을 유발시키는 요인이 되었을 것으로 생각되며, 이때 ACh의 양은 AChE 활성도 저하로 인한 reuptake의 양 증가로 인한 것 이외에도 그와 기전이 다른 Met-Hg로 인한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가로 신경세포내 자체 유리 증가 촉진 등을 감안해 볼 때 상대적으로 ACh 누적효과는 더욱더 커질 것으로 예측되어진다.

이상과 같은 생체내 반응결과는 실험관내 synaptosome에서 더욱더 뚜렷하게 관찰되었다. Met-Hg의 25, 50, 100 μ M의 투여로 synaptosome에서의 $[Ca^{2+}]_i$ 이 대조군에 비하여 2.1~3.3배 상승한 것은 투여농도가 다르지만 Met-Hg가 mitochondria에 도달하여 그 기능에 영향을 미친다고 가정하면서 Met-Hg로 인한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가를 밝힌 기존의 Cheung과 Verity(1981)의 연구결과와 일치하는 것이었다.

최근 신경독성을 야기시키는 물질들의 독성기전 규명을 위하여 synaptosome을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있어 본 연구방법으로 채택한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 정량은 Met-Hg와 Se의 상호작용을 실험관내에서 규명하기에 매우 타당하고 합리적인 방법이라고 여겨진다. 특히 생체내에서 Met-Hg의 신경독성에 대한 Se의 작용양상이 어느 정도 뚜렷하였고 또한 그것을 기초로 실험관내 $[Ca^{2+}]_i$ level에서도 Se의 200 μ M 동시투여가 Met-Hg 25, 50, 100 μ M 단독투여에 비해 각기 $[Ca^{2+}]_i$ 를 40, 33, 24% 유의하게 감소시켜 Met-Hg로 인한 synaptosome에서의 Ca^{2+} 상승을 Se이 감소시킴을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 과량의 $[Ca^{2+}]_i$ 유입을 차단하는 것이 뇌조직을 보호하는 것이라고 보고한 Levesque와 Atchison(1988)의 의견을 참고하여 볼 때 Met-Hg로 인한 신경세포 독성을 Se이 경감시켰다고 할 수 있다.

한편, 본 연구에서 관찰된 것은 대조군보다 유의한 $[Ca^{2+}]_i$ s

증가를 나타내는 각각의 Met-Hg와 Se을 각각 단독투여하였을 때 보다 동시투여하였을 때 $[Ca^{2+}]_i$ s 증가율이 적게 나타나 Met-Hg와 Se 상호간에 경쟁적 억제작용이 있음을 알 수 있었고, 비교하기는 어려우나 Met-Hg 25 μ M과 Se 200 μ M의 병용투여가 동시투여군 중 가장 낮은 $[Ca^{2+}]_i$ s를 나타내어, 유사한 독작용을 나타내는 Met-Hg와 Se를 동시 투여하였을 때 가장 효과적이었다는 Gruenwedel (1984)의 보고와 일치하는 결과라고 여겨진다. 그러나 Met-Hg와 Se 상호간의 경쟁적 억제작용에 관한 기전은 아직까지 밝혀져 있지 않고 또한 그들의 실험조건에 따라 반응양상이 달라 추후 이 과제에 대한 연구가 수행되어져야 할 것으로 사료되며, 본 연구에 연결된 연구로서 Met-Hg로 인한 ACh이나 catecholamine의 유리증가 및 Na^+ , K^+ 및 Cl^- 와 같은 이온균형의 저해, ATP 감소효과 등에 대한 Se의 보상효과가 synaptosome과 생체내 실험에서 입증되어져야 할 것으로 여겨진다. 본 연구의 제한점으로 생각되는 것은 첫째, 생체실험에서 Met-Hg 독성에 상응하는 Se의 농도를 실험관내 synaptosome 실험의 Met-Hg, Se농도와 연관시켜 외삽시키지 못한 점으로 이것은 추후 Met-Hg와 Se의 혈중내 molar ratio를 구하고, 또한 Met-Hg와 Se간의 약물동력학적 연구를 통하여 구체화시킬 수 있을 것으로 여겨지며, 둘째로는 이와 같은 결과를 실제로 임상에 적용하기 어렵다는 것이다. 즉, 후투여효과가 삭제되어 있으며, 고용량의 Se를 사용시 그 자체의 독성발현으로 Met-Hg의 용량에 상응하는 최적량의 Se을 결정해야 하는 어려움이 있다. 그러나 앞선 연구결과들에 의하면 Met-Hg 독성에 대한 Se의 후투여효과가 동시투여나 기타 병용투여에 비해 유의한 결과를 나타내지 않는 것으로 보고되어 있고, 각각 고용량의 Met-Hg와 Se을 병용투여시 두 금속의 독성이 똑같이 경감되었다는 결과들이 알려지고 있어 더욱더 세부적인 연구가 요구되어진다.

V. 결 론

유기수은의 신경독성에 대한 셀레늄의 보상효과를 세포내 Ca^{2+} 농도를 중심으로 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CH_3HgCl 과 Na_2SeO_3 의 동시투여와 Na_2SeO_3 의 전부여시 대뇌피질내 수은 축적농도는 CH_3HgCl 단독투여군에 비하여 시간에 따라 통계학적으로 유의하게 높았고 간장 및 신장조직에서의 농도는 역으로 낮았다.

2. 대뇌피질내 succinic dehydrogenase 및 acetylcholine esterase 활성도는 CH_3HgCl 단독투여군에 비하여 Na_2SeO_3 전투여군과 동시투여군에서 높았고, 특히 Na_2SeO_3 전투여군에서는 통계학적으로 유의한 차이가 있었으며, adenosine-5'-triphosphate 농도에 있어서도 Na_2SeO_3 투여군들이 CH_3HgCl 단독투여군에 비하여 높은 농도를 나타내었다.
 3. CH_3HgCl 의 단독투여로 세포내 Ca^{2+} 농도가 전실험시간에서 모두 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 높았으나 Na_2SeO_3 전투여군 및 동시투여군에서는 대조군에 비하여 48시간째만이 유의하게 높았고 CH_3HgCl 단독투여군과 비교하면 시간에 따라 통계학적으로 유의하게 낮았다.
 4. Synaptosome에 CH_3HgCl 와 Na_2SeO_3 의 동시투여시 free intrasynaptosomal Ca^{2+} 이 CH_3HgCl 단독투여시보다 유의하게 낮았다.
- 이상의 실험결과를 종합하여 보면 특정 용량의 Na_2SeO_3 는 CH_3HgCl 투여로 인한 세포내 Ca^{2+} 의 증가를 저하시키므로 CH_3HgCl 의 신경독성에 보상효과를 지니고 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Assoc Offic Anal Chemists. *Official methods of analysis of the AOAC, 14 thed.*, 1984
- Atchison WD. *Extracellular calcium-dependent and independent effects of methylmercury on spontaneous and potassium-evoked release of acetylcholine at the neuromuscular junction. J Pharmacol Exp Ther* 237 : 672-680, 1986
- Atchison WD. *Effects of activation of sodium and calcium entry on spontaneous release of acetylcholine induced by methylmercury. J Pharmacol Exp Ther* 24 : 131-139, 1987
- Atchison WD, Clark AW, Narahashi T. *Presynaptic effects of methylmercury at the mammalian neuromuscular junction. In cellular and Molecular Neurotoxicology (Narahashi T Ed.) Raven Press, New York, 1984, pp 23-43*
- Campbell AC. *Intracellular Calcium*. Wiley, New York/London, 1983, 393-454
- Cavanagh JB. *Metabolic mechanisms of neurotoxicity caused by mercury. In Roizin L, Shiraki H, Grcevic N.(eds) : Neurotoxicology. Raven Press, New York, 1977, pp 283-288*
- Chang LW, Dudley AW, Dudley MA, Ganther HE, Sunde ML. *Modification of neurotoxic effects of methylmercury by selenium, in Neurotoxicology Vol. Roisin L, Shiraki H, Groevic N Eds, Raven Press, New York, 1977, pp 275-281*
- Chen RW, Lacy VL, Whanger PD. *Effect of selenium on methylmercury binding to subcellular and soluble protein in rat tissues. Res Comm Chem Pharmacol* 12 : 297-308, 1975
- Cheung M, Verity MA. *Methylmercury inhibition of synaptosome protein synthesis: The role of mitochondrial dysfunction. Environ Res* 24 : 286-298, 1981
- Cheung MK, Verity MA. *Experimental methylmercury neurotoxicity : Locus of mercurial inhibition of brain protein synthesis in vivo and in vitro. J Neurochem* 44 : 1799-1808, 1985.
- Choi BH, Cho KH, Lapham LW. *Effects of methylmercury on human fetal brain cells in culture : a time lapse cinematographic phase and electron microscopic study. J Neuropathol Exp Neurol* 33 : 307, 1979
- Clarkson TW. *The pharmacology of mercury compounds. Ann Rev Pharmacol* 12 : 375-406, 1972
- Dodd PR, Hardy JA, Oakley AE, Edwardson JA, Perry EK, Delaunoy JP. *A rapid method for preparing synaptosomes : Comparison, with alternative procedures. Brain Res* 226 : 107-118, 1981
- Ellman GL, Courtney KD, Andres JRV, Featherstone RM. *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol* 7 : 88-95, 1961
- Ganther HE. *Modification of methylmercury toxicity and metabolism by selenium and vitamine E : Possible mechanism. Environ Health Perspect* 25 : 71-76, 1978
- Gray EG, Whittaker VP. *The isolation of nerve endings from brain : An electron microscopic study of cell fragments divided by homogenization and centrifugation. J Anat(Lond)* 96 : 79-88, 1962
- Gregus Z, Klaassen CD. *Disposition of metals in rats : A comparative study of fecal, urinary and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals, Toxicol Appl Pharmacol* 85 : 24-38, 1986
- Gruenwedel DW. *Differential effects of sodium selenite and methylmercury(II) on membrane permeability and DNA replication in Hela S3 carcinoma cells : a preliminary report regarding the modification of organomercurial toxicity by selenium compounds, A dv Exp Med Biol* 177 : 229-240, 1984

- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.* *J Biol Chem* 260 : 3440–3450, 1985
- Howard JD, Mottet NK. *Effects of methylmercury on the morphogenesis of the rat cerebellum.* *Teratology* 34 : 89–95, 1986
- Imura N, Miura K, Inokawa M, Nakada S. *Mechanism of methylmercury cytotoxicity : by biochemical and morphological experiments using cultured cells.* *Toxicology* 17 : 241–254, 1980
- Iwata H, Okamoto H, Ohsawa Y. *Effect of selenium on methylmercury poisoning.* *Research Commun Pathol Pharmacol* 5 : 673–680, 1973
- Komulainen H, Tuomisto J. *Interference of methylmercury with monoamine uptake and release in rat brain synaptosome.* *Acta Pharmacol Toxicol* 48 : 214–222, 1981
- Komulainen H, Bondy SC. *The estimation of free calcium within synaptosomes and mitochondria with fura-2 : Comparison to quin-2.* *Neurochem Int*, in press, 1987a
- Komulainen H, Bondy SC. *Increased free intrasynaptosomal Ca²⁺ by neurotoxic organometals : Distinctive mechanisms* 88 : 77–86, 1987b
- Laatsch RH, Kies MW, Gordon S, Alvord EC. *The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation.* *J Exp Med* 115 : 777–787, 1962
- Lavesque PC, Atchison WD. *Effect of alteration of nerve terminal Ca²⁺ regulation on increased spontaneous quantal release of acetylcholine by methylmercury.* *Toxicol Appl Pharmacol* 94 : 55–65, 1988
- Linklater HA, Galsworthy PR, Stewart-DeHaan PJ, D'Amore T, Lo TCY, Trevithick JR. *The use of guanidinium chloride in the preparation of stable cellular homogenates containing ATP.* *Analy Biochem* 148 : 44–49, 1985
- Magos L, Webb M. *The effect of selenium on the brain uptake of methylmercury.* *Arch Toxicol* 38 : 201–207, 1977
- Magos L, Webb M. *The interactions of selenium with cadmium and mercury* CRC. *Crit Rev Toxicol* 8 : 1–42, 1980
- Mercury BM, Friberg L, Nordberg GF, Vouk V ed, *Handbook on the toxicology of metals*, 2nd ed, Amsterdam, Oxford, New York, Elsevier Science Publishers, 1986, pp 387–445
- Nishikido N, Furryashiki K. *Maternal selenium deficiency enhanced the fetolethal toxicity of methylmercury.* *Toxicol Appl Pharmacol* 88 : 322–328, 1987
- Ohi G, Nishigakis, Seki H, Tamura Yy, Maki T, Maeda H, Ochiai S, Yamada H, Shimamura Y, Yagyu H. *Interaction of dietary methylmercury and selenium on accumulation and retention of these substances in rat organs.* *Toxicol Appl Pharmacol* 32 : 527, 1975
- Ohi G, Nishigaki S, Seki H, Tamura Y, Maki T, Konno H, Ochiai S, Yamada H, Shimamura Y, Nizoguchi I, Yaguu H. *Efficacy of selenium in tuna and selenite in modifying methylmercury intoxication.* *Environ Res* 12 : 49–58, 1976
- Pounds JC, Rosen JF. *Contemporary issues in toxicology : cellular Ca²⁺ homeostasis and Ca²⁺-mediated cell processes as critical targets for toxicant action : conceptual and methodological pitfalls.* *Toxicol Appl Pharmacol* 94 : 331–341, 1988
- Schroeder HA, Frost DV, Balassa JJ. *Essential trace metals in man: Selenium.* *J Chron Dis* 23 : 227, 1970
- Yeh Y, Johnson RM. *Vitamin E Deficiency in the rat. Alteration in mitochondrial membrane and its relation to respiratory decline.* *Arch Biochem Biophys* 159 : 821–831, 1973