

無機水銀이 마우스의 肝臟 및 腎臟內 酵素反應에 미치는 影響

이재형 · 김정현

경희대학교 대학원 환경학과

A Study on the Enzyme Activity in Liver and Kidney of Mouse Administered Mercury Chloride in the Drinking Water

Jae Hyung Lee and Jung Hyun Kim

Department of Environmental Science, Graduate School Kyunghee University

ABSTRACT

The accumulations of mercury, lactate dehydrogenase and antioxidant enzymes activities of which are glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase, and pathological changes were investigated in liver and kidney of mice which were fed the water supplemented with two levels (0.5 mM and 1.0 mM) of mercury chloride (HgCl₂).

During the mercury feeding, the weight gain of mice in experimental groups was less than that of control group mice, while no overt signs related to mercury toxicity were noted in any experimental groups.

Mercury concentrations in liver and kidney increased significantly in the early period (1~2 weeks) after mercury administration, which were measured as high as 100 times in liver and kidney in comparison to those of the control groups, but there were relatively stable for the levels of accumulation in following periods.

The lactate dehydrogenase activities in liver and kidney were relatively increased in the period of 2~3 weeks of mercury administration in the experimental groups, there were normal levels in other periods of administration without the dose-dependencies. The glutathione peroxidase activities were not affected by the dosages of mercury chloride and the duration of ingestion. But the catalase activities significantly increased in 2~3 weeks after ingestion, and the superoxide dismutase activities of kidney also showed a peak in 3 weeks of ingestion while this peak was not found in the results measured in liver tissues.

Keywords : Mouse, mercury, enzyme, liver, kidney

I. 서 론

수은은 상온에서 액체 상태를 이루고 있는 유일한 금속이며 자연 상태에서 고농도의 광석으로 존재하고 쉽게 정련이 되기 때문에 기원전부터 인류가 사용해온 중금속의 하나로서 근래에 이르기까지 이노제, 설사제, 매독의 치료제 등의 의약품과 농업 및 산업분야에서도 광범위하게 사용되고 있으며 수은화합물의 사용증가로서 야기되는 환경오염은 생태계를 통하여 궁극적으로 인체에 피해를 발생시킬

수 있다.

수은중독은 작업환경 내에서 수은에 지속적으로 노출되는 근로자들의 직업성중독과 무기 및 유기수은을 함유한 산업폐수의 환경오염으로부터 생물학적 먹이연쇄(biological food chain)를 통한 간접적인 중독으로 구분된다.^{1) 3)}

특히 후자의 전형적인 예로서 1950년대 일본의 Minamata와 Niigata 지역에서 발생한 소위 Minamata병^{4) 5)}은 불특정대상에게 큰 인명피해를 야기함으로써 수은중독에 대한 경각심을 불러 일으킨 바

있다.

수은중독에 관한 현재까지의 연구는 주로 임상적인 면에서 기질적, 기능적 장애와 더불어 생체조직내 수은축적농도와 독성반현과의 관련성 규명 및 환경오염 평가에 집중되어 왔다.^{6,7)}

한편, 수은의 독성기전에 대해서는 많은 논란이 제기되고 있는데, 이들 논란의 구체적인 내용은 주로 생화학적 측면에서 다음과 같은 두 가지 관점으로 요약될 수 있다.^{2,10)} 첫째는 수은이 체내의 대사과정에 참여하는 여러 효소의 활성을 억제함으로써 독성을 유발한다는 것이고, 둘째는 수은이 일차적으로 세포막을 구성하는 단백질 중, 특히 수은과 친화력이 높은 sulfhydryl(SH)기를 포함하는 단백질과 결합함으로써 독성을 나타낸다는 것인데, SH기는 세포막의 투과성 및 물질이동에 필수적이기 때문에 이와 관련된 세포독성을 일으킨다는 것이다. 수은 외에도 구리, 아연 등 중금속에 노출된 배양세포내에서 항산화효소의 불활성화 및 지질과산화반응(lipid peroxidation)에 따른 세포막의 파괴가 관찰되며,^{11,12)} 정량적 관계가 명확하지는 않으나 수은중독시 간장 및 신장조직의 젖산탈수소효소의 활성증가가 보고되어 있다.^{13,14)}

특히 Stacey와 Klaassen¹⁵⁾은 +2가의 수은이 실험동물의 세포막에서 지질과산화반응을 유발함으로써 세포손상을 초래할 뿐 아니라, 손상세포로부터 유리되었을 것으로 추측되는 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH)의 활성이 증가됨을 관찰함으로써 수은중독시 조직내 젖산탈수소효소의 활성변화가 세포손상의 생화학적 지표로 이용될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 효소의 불활성화나 지질과산화반응의 초기에 O_2 , OH , H_2O_2 등이 관여하여, 반응 후 생성된 malondialdehyde와 같은 물질이 강한 세포독성을 나타내는 것으로 인정되는데,¹⁶⁾ 이는 결과적으로 DNA나선구조의 손상, 단백질 thiol기의 산화 및 항산화효소의 활성변화 등과 관련된다.^{17,18)} 따라서 수은의 생체에 대한 독성기전에 있어서 O_2 , OH 등의 free radical과 과산화반응에 의해 세포내 누적되는 H_2O_2 , organic hydroperoxide, superoxide 등의 생성에 관여하는 항산화효소의 활성변화의 지속적인 관찰이 필요하다.

본 연구에서는 인위적으로 수은을 투여받은 실험동물에서 조직내 축적되는 수은농도와 경시적인 독성학적 반응간에 밀접한 상관성이 존재하리라는 가설하에, 실험동물의 음료수에 일정농도의 수은을 함유하도록 하여 자연스럽게 섭취시키고, 투여기간 및 투여농도에 따라 실험동물의 장기별 수은축적

양상과 장기내의 젖산탈수소효소의 항산화효소의 활성치 및 이들 상호간의 관계를 밝힘으로써 수은중독의 기전 및 독성발현과정의 실험적 기준을 정하는데 일조가 되고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 C57BL/6(수컷)와 BALB/C(암컷) 마우스를 교배하여 잡종강세의 특징을 지니면서도 유전학적으로 균일성(homogeneity)이 높은 제1대 잡종(F_1 hybrid)만을 사용하였으며, 개체간 변이를 최소화 하기 위해 각 실험군과 대조군의 각 소군을 5마리씩을 출생코호트(birth cohort)로 구성하였다.

실험전부터 실험동물은 음료수로서 1차 증류수만을 섭취토록 사육하였으며, 실험군은 생후 8주령부터 2개 군으로 분리하여 0.5 mM 및 1.0 mM의 수은($HgCl_2$, Sigma)이 함유된 음료수를 각각 공급하였고, 대조군의 경우는 계속적으로 1차 증류수만을 공급하였다.

실험군은 수은투여 기간별로 1주부터 8주까지 0.5 mM군 및 1.0 mM군 모두 6개씩의 소군(小群, subgroup)으로 구분하여 총 12개군 60마리로 구성하였으며, 대조군도 실험군의 주령과 일치시켜 6개 소군 30마리로 구성하였다.

실험기간 중 실험동물의 사육환경은 자연적인 주야변화에 실내온도 20~25°C 및 비교습도 60~70%를 유지하였다.

2. 실험동물과 시료의 처치

수은투여 후 1주 간격으로 ether 마취하에 심전자하여 최소 0.8 ml의 혈액을 채혈, 치사시켰고, 복벽을 중앙전개하여 간장과 신장을 적출하였다.

혈액은 상온에서 원심하여 혈청을 얻었으며, 적출한 신장, 간장은 각각 생리식염수로 충분히 관류(irrigation)하고, g당 4배 부피의 50 mM PBS(pH=7.0)를 가하여 polytron 조직분쇄기(tissue homogenizer)로 13,500 rpm에서 5분간 마쇄한 후, 다시 초음파분쇄기(ultra sonicator)로 30초씩 분쇄하였다. 이 시료중 조직내 수은축적분을 제외한 나머지는 4°C 100,000G에서 30분간 원침하여 그 상청액을 각각의 효소활성도 측정시료로 사용하였다.

상대적인 효소활성치를 나타내기 위한 총단백질의 정량은 bovine serum albumin을 기준시료로 하여¹⁹⁾ Lowry's method로 측정하였다.

3. 효소활성치의 측정

(1) 젖산탈수소효소

젖산탈수소효소의 활성치는 pyruvate와 NADH가 효소에 의해 젖산(lactic acid)과 NAD⁺를 생성하는 과정에서 NADH의 흡광량이 감소되는 원리를 이용하였다.²⁰⁾

측정과정은 전기한 시료 0.1 ml를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 2.5 ml와 NADH용액(200 μM) 0.2 ml를 혼합하여 37°C에서 5분간 정치한 후, 역시 같은 조건에 정치시켰던 pyruvate용액(0.6 mM) 0.2 ml를 첨가하고 340 nm의 파장에서 10분간에 걸친 흡광도의 변화를 기록하였으며, 최초 흡광도와 최종 흡광도의 차(ΔA)로부터 다음식으로 활성치를 계산하였다.

$$\text{LDH activity} = \frac{\Delta A \times 1,000 \times 3.0}{10 \times 6.23 \times 0.2} = \Delta \times 241 \text{ (IU/l)}$$

위 식에서 1,000은 상수, 3.0은 흡광도 측정에 쓰인 혼합액의 양, 10은 흡광도 측정시간(분), 6.23은 340 nm의 파장에서 1 mM NADH의 흡광도이며, 0.2는 첨가된 NADH용액의 양이다.

(2) Glutathione peroxidase

Flohe²¹⁾와 Gunzler의 방법에 따라 1 mM의 Na₂S₂O₈를 포함하고 있는 0.1 M phosphate buffer(pH=7.0) 500 μl, 효소시료 100 μl, glutathione reductase(0.24 U) 100 μl, 10 mM glutathione 100 μl이 포함된 microcurette를 25°C에서 10분간 배양한 후 1.5 mM NADPH 100 μl을 가하여 3분간 흡광도의 변화를 관찰한 후, 12 mM t-butyl hydroperoxide나 1.5 mM H₂O₂를 100 μl 가하여 340 nm에서 각각 5분간에 걸친 흡광도의 감소를 측정하였다.

활성도는 $A = 0.868(\Delta[\text{NADPH}]/[\text{GSH}]_t)/(V_i/V_s)$ 에 따라 구하여 mg protein당 활성도로 나타냈다(V_i : 배양혼합액의 부피, V_s : 시료의 부피).

3) Catalase

Aebi²²⁾의 방법에 따라 50 mM PBS(pH=7.0)에 용해한 시료 2 ml가 포함된 cuvette에 30 mM H₂O₂ 1 ml를 가하여 반응을 시키고, 30초 동안 흡광도 감소를 측정하였다. 이 결과로부터 활성도는 $K = (2.3/\Delta t) (\log A_1/A_2)$ 에 따라 구하였다($\Delta t = 15 \text{ sec}$, A_1 : $T=0$ 의 흡광도, A_2 : $t=15$ 의 흡광도).

4) Superoxide dismutase

Crapo 등²³⁾의 방법에 따라 0.1 mM ferricytochrome C 100 μl, 0.5 mM xanthine 100 μl에 시료를 포함한 PBS(0.1 mM EDTA를 포함하고 있는 50 mM PBS, pH=7.8) 800 μl를 가하고, 여기에 xanthine

oxidase(0.025 U/ml) 100 μl을 가하여 반응을 시켜 25°C, 550 nm에서 흡광도 변화율로 측정하였으며, 활성도는 SOD 표준곡선으로부터 구하였다.

4. 조직내 수은농도의 측정

조직내 수은농도 측정을 위한 전처리는 Kudsk²⁴⁾의 방법에 따라, 적출한 시료를 냉각기가 부착된 Erlenmeyer flask에 담아 H₂SO₄-HNO₃-HClO₄를 적당량 가하고, 200°C에서 가열분해하여 KMnO₄의 색이 10분간 남을 때까지 반복한 후, 다시 40°C로 냉각하고, NH₂OH-HCl용액(20% w/v)을 가하여 KMnO₄를 제거하였다. 전처리가 끝난 시료에 3차 증류수를 가하여 최종용적을 100 ml로 만들고 이것에 100% w/v의 SnCl₂를 가하여 수은농도를 측정하였다.

전처리 및 측정과정에 쓰인 시약은 모두 유해급속 측정용 및 원자흡광분석용(Wako Co.)을 사용했고, 기기는 atomic absorption spectrophotometer(IL 551)에 mercury vaporizer(IL 440)을 부착하여 측정하였다.

5. 자료의 처리

실험기간 중 마우스의 체중변화와 조직내 수은축적 양상의 경시적인 변화는 일원배치분산분석법(one-way ANOVA)으로 검정하였고, 기타 대조군에 대한 실험군에서의 효소활성치의 차는 t-검정을 이용하였으며, 측정된 효소활성치간 관련 정도에 대해서는 단순상관분석을 시행하였다.

III. 결 과

1. 마우스의 체중변화

마우스의 주령 8주째부터 대조군과 2개 실험군(수은부여농도 0.5 mM군과 1.0 mM군)으로 구분하여 실험기간의 경과에 따른 체중을 계측한 결과, Table 1과 같다.

실험 1주(마우스 주령 9주)에는 대조군의 경우 24.7 ± 1.0 g, 0.5 mM 실험군은 23.8 ± 1.3 g, 1.0 mM 실험군은 23.9 ± 1.3 g의 체중을 나타내 군간의 체중차이가 없었다($p > 0.05$). 그러나 시간이 경과함에 따라 대조군의 경우 지속적인 체중증가를 보였고($p < 0.01$), 0.5 mM군의 경우도 그 폭이 대조군에 비해 다소 적었지만 역시 지속적인 체중증가를 나타냈는데($p < 0.05$), 1.0 mM군은 주령증가에 불구하고 3주 이후부터는 차이가 없었고($p > 0.05$), 8주째(주령 16주)에는 대조군 30.8 ± 1.3 g, 0.5 mM군 27.8 ± 3.0 g, 1.0 mM군 23.7 ± 1.7 g으로 수은부여군의 체중증가폭이

Table 1. The change of body weight (gm) of mice continuously administered mercury chloride by the duration (week)

Duration	Control	0.5 mM group	1.0 mM group
1(9) ^a	24.7± 1.0	23.8± 1.3	23.9± 1.3
2(10)	25.3± 1.1	23.5± 1.5	25.2± 1.7
3(11)	25.4± 1.1	25.0± 1.3	24.7± 1.0
4(12)	27.5± 1.4**	25.7± 1.7	23.3± 1.3
6(14)	30.2± 0.7***	28.3± 2.2**	22.8± 1.5
8(16)	30.8± 1.3***	27.8± 3.0*	23.7± 1.7

^aThe number denoted in parenthesis indicates the real age (weeks) of mouse. 0.5 mM and 1.0 mM groups indicate the experimental groups, which were ingested by mercury chloride 0.5 mM and 1.0 mM. Overall results for the changes of mice body weights are summarized by F-ratio of one-way ANOVA (analysis of variance) as follows,

Control group : F (5, 24) = 25.65, p < 0.01,
 0.5 mM group : F (5, 24) = 5.35, p < 0.05,
 1.0 mM group : F (5, 24) = 1.23, p > 0.05.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 for the differences between the initial (first week) value and the following values in each groups. Each groups were consisted of 5 male mice which were the hybrids (F1) between C57BL/6 (♂) and BALB (♀).

상대적으로 작았다.

한편 실험기간중 대조군과 실험군의 마우스 중 의형적으로 인식되는 신경학적 변화나 수은중독으로 간주할 수 있는 병태를 보인 개체는 없었으며, 1.0 mM군에서는 4주 이후 유모수 및 사료섭취량이 타군에 비해 약간 감소되었으나 유의한 차이는 없었고 (p > 0.05), 투여 6주째에 5마리 중 한마리가 죽었다.

2. 간장, 신장조직내의 수은축적양상

수은투여에 따른 마우스의 각 장기별 수은축적농도는 투여기간의 경과에 따라 증가하는 양상이나 투여농도와 장기별로 차이를 보였는데, Table 2는 0.5 mM군과 1.0 mM군의 결과를 대조군의 것과 각 각 비교한 것이다.

0.5 mM군의 경우 장기별 수은농도는 전반적으로 신장에서 간장조직보다 높았으며, 시간경과에 따라 지속적인 축적을 나타내, 간장의 경우 2.7± 1.7 ppm에서 4.7± 0.5 ppm으로 증가되었으며(p < 0.05), 신장의 경우에도 수은투여 2주군에서 104.4± 16.4 ppm으로 증가(p < 0.05)된 것과 같이 많은 양의 축적을 나타냈으나, 3주가 지나서는 오히려 1주군의

Table 2. The mercury concentrations in liver and kidney of mice continuously administered 0.5 or 1.0 mM mercury chloride by the duration (week)

Duration	0.5 mM group		1.0 mM group	
	Liver (ppm)	Kidney (ppm)	Liver (ppm)	Kidney (ppm)
1	2.7± 1.7 (0.02± 0.01)	79.6± 30.9 (0.15± 0.03)	6.1± 1.3 (0.02± 0.01)	72.7± 34.8 (0.15± 0.03)
2	4.5± 2.0	104.4± 16.4	9.7± 2.2	138.8± 38.3*
3	4.8± 1.5 (0.02± 0.01)	76.8± 11.1 (0.32± 0.04)	7.3± 2.2 (0.02± 0.01)	68.7± 41.3 (0.32± 0.04)
4	5.3± 0.9*	77.6± 11.6	8.4± 3.9	72.1± 46.9
6	4.0± 1.2 (0.05± 0.01)	74.2± 11.8 (0.55± 0.04)	8.9± 0.9**	67.8± 16.8 (0.05± 0.01)
8	4.7± 0.5*	59.2± 5.7	9.4± 0.8**	86.7± 12.2

Mean± S.D.

The concentrations denoted in parenthesis are the control's which were matched to the data of two experimental groups. Overall results for the accumulation of mercury in organs are summarized by F-ratio of one-way ANOVA (analysis of variance) as follows,

0.5 mM group : liver ; F (5, 24) = 2.08, p > 0.05,
 kidney ; F (5, 24) = 3.86, p < 0.05.
 1.0 mM group : liver ; F (5, 24) = 2.11, p > 0.05,
 kidney ; F (5, 24) = 3.22, p > 0.05.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 for the differences between the initial (first week) value and the following values in each organs.

축적정도와 비슷한 수준이었다. 한편 대조군에 비해 실험군의 간장과 신장조직의 농도는 대체적으로 100 배 이상의 차를 보였다. 1.0 mM군의 경우 장기별 수은축적양상은 0.5 mM군과 유사하여 투여기간의 경과에 따라 많은 축적을 보였는데, 0.5 mM군의 경우와 비교할 때, 축적에 소요되는 시간은 비교적 짧았다.

3. 젖산탈수소효소의 활성치

대조군의 장기별 젖산탈수소효소의 활성치(IU/l)는 간장의 경우 69± 14에서 82± 27, 신장의 경우 97± 18에서 106± 24의 범위로 주령에 관계없이 일정한 수준을 보였는데(p > 0.05), 간장에 비해 신장 조직의 결과가 다소 높았으나 유의한 차는 아니었다.

수은투여군의 젖산탈수소효소 활성치는 전반적으로 대조군에 비해 상승되었다고 할 수 있으나(Table

Table 3. The change of LDH-activities in mice continuously administrated 0.5 mM or 1.0 mM mercury chloride by the duration (week)

Duration	0.5 mM group		1.0 mM group	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney
Control	69± 14	101± 27	69± 14	101± 27
1	78± 20	116± 14	88± 11*	107± 16
2	107± 21**	127± 22	97± 21*	96± 19
3	82± 25	94± 23	94± 24	100± 27
4	85± 35	82± 19	77± 16	92± 9

Mean± S.D.

Each groups were consisted of 5 male mice which were the hybrids (F1) between between C57BL/6 (♂) and BALB/C (♀). LDH activities of liver, kidney were measured from the homogenates diluted by 1,000 times (g/1,000 ml), and unit is IU/l.

*p<0.05, **p<0.01 for the differences between control and experimental groups.

Table 4. The change of glutathione peroxidase (GSH-PX) activity in mice continuously administrated 0.5 mM or 1.0 mM mercury chloride by the duration (week)

Duration	0.5 mM group		1.0 mM group	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney
Control	8.9± 1.1	5.7± 1.5	8.9± 1.1	5.7± 1.5
1	9.9± 1.0	6.5± 1.9	6.8± 1.5	5.4± 1.3
2	9.2± 1.1	5.7± 0.5	5.8± 1.3*	5.7± 0.6
3	9.1± 1.1	5.4± 1.7	7.4± 1.7	5.8± 1.4
4	8.5± 1.5	6.0± 1.4	7.3± 2.0	5.8± 1.2

Mean± S.D.

The unit of GSH-PX activity is μM NADH oxidized/min/mg protein. Each groups were consisted of 5 male mice which were the hybrids (F1) between C57BL/6 (♂) and BALB/C (♀).

*p<0.05 for the differences between control and experimental groups.

3), 투여기간별로 볼때 2주, 3주군에서의 활성치가 증가되는 양상을 나타냈으며, 이같은 양상은 간장에서 신장보다 뚜렷하였고(p<0.05), 신장조직의 활성치는 투여기간에 따른 변화가 상대적으로 작았다. 투여농도별로는 모든 조직에서 1.0 mM군의 활성치가 0.5 mM군의 것보다 약간 높았으나 통계적으로 유의한 차는 아니었다(p>0.05).

4. 항산화효소의 활성치

Table 5. The change of catalase activity in mice continuously administrated 0.5 mM or 1.0 mM mercury chloride by the duration (week)

Duration	0.5 mM group		1.0 mM group	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney
Control	3.9± 0.7	3.4± 1.0	3.9± 0.7	3.4± 1.0
1	4.9± 0.7	4.1± 0.7	3.7± 0.9	2.9± 0.3
2	5.0± 0.7	4.2± 0.7	5.1± 0.7*	4.9± 0.9*
3	6.5± 1.8*	5.7± 1.2*	6.1± 0.7**	3.3± 0.8
4	5.1± 0.9	3.9± 0.8	4.1± 0.8	3.4± 0.3

Mean± S.D.

The unit of catalase activity is unit/mg protein. Each groups were consisted of 5 male mice which were the hybrids (F1) between C57BL/6 (♂) and BLAB.C (♀). *p<0.05, p<0.01 for the differences between control and experimental groups.

(1) Glutathione peroxidase(GSH-PX)

수은투여기간의 경과에도 불구하고 GSH-PX의 활성치는 0.5 mM군과 1.0 mM군 모두 큰 변화를 보이지 않았다. 다만 간장조직의 경우 대조군(8.9± 1.1)에 비해 다소 감소하는 양상을 보여 1.0 mM군의 투여 2주째 간장조직의 활성치는 5.8± 1.3으로서 최저치를 나타냈다(p<0.05, Table 4).

(2) Catalase

대조군의 catalase 활성치는 간장(3.9± 0.7)과 신장(3.4± 1.0)에서 거의 같은 수준을 나타냈는데, 0.5 mM군에서는 투여 1주째부터 활성치의 증가가 관찰되어 신장과 간장 모두 3주째에 최고치를 보였고(p<0.05).1.0 mM군 역시 간장, 신장 모두 2주(p< 0.05) 및 신장의 3주째(p<0.05)에 최고치를 나타냈다 (Table 5).

(3) Superoxide dismutase(SOD)

간장조직에서의 SOD 활성치는 대조군에 비해 거의 변화가 없었으나(p>0.05), 신장조직에서는 투여 1주부터 급속한 상승이 관찰되어, 0.5 mM군의 경우는 3주째에, 1.0 mM군의 경우는 3, 4주에 가장 높은 활성치를 나타냈다(p<0.05, Tabl 6).

5. 조직내 수은농도와 효소활성치간의 상관분석

간장과 신장에서 관찰된 각 효소들의 활성치와 수은농도를 0.5 mM군과 1.0 mM군으로 구분하여 투여 1주부터 4주까지 측정된 전체의 값(n=20)을 망라하여(Fig. 1 and 2), 상관분석을 시행한 결과 Table 7과 8에서 보는 바와 같다.

0.5 mM군의 신장(LDH-Ki)과 간장(LDH-Li)의 것

Table 6. The change of superoxide dismutase (SOD) continuously administrated 0.5 mM or 1.0 mM mercury chloride by the duration (week)

Duration	0.5 mM group		1.0 mM group	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney
Control	10.3± 1.1	5.8± 1.6	10.3± 1.1	5.8± 1.6
1	8.7± 1.0	8.8± 0.7	10.3± 0.5	6.2± 0.9
2	9.3± 1.9	8.4± 0.8	10.2± 0.6	8.9± 1.5
3	10.7± 2.0	10.2± 1.3*	10.7± 1.5	10.3± 1.1*
4	9.1± 1.8	9.4± 1.8	9.9± 1.4	10.3± 1.3*

Mean± S.D.

The unit of SOD activity of controls are unit/mg protein. Each groups were consisted of 5 male mice which were the hybrids (F1) between C57BL/6 (♂) and BLAB/C (♀).

*p<0.05 for the differences between control and experimental groups.

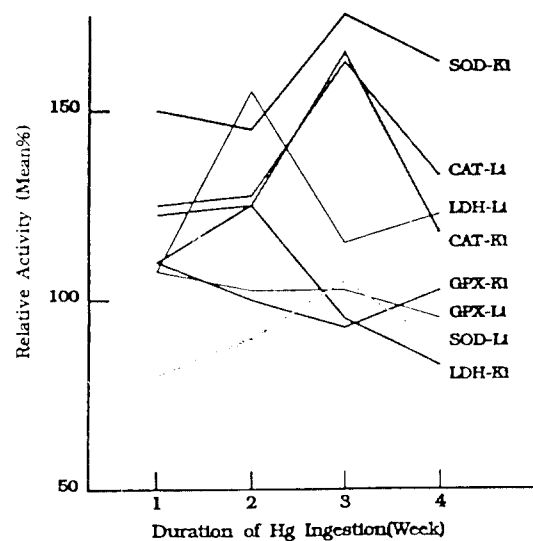


Fig. 1. Relative activities of lactate dehydrogenase (LDH), glutathionine peroxidase (GPX), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) in liver (-Li) and kidney (-Ki) of mice ingested 0.5 mM mercury chloride in drinking water during 1st to 4th week.

신탈수소화성치간에는 $r = +0.518(p < 0.05)$, 신장의 superoxide dismutase활성치(SOD-Ki)와 간장의 catalase활성치(Cat-Li)는 $r = +0.447(p < 0.05)$, 신장의 superoxide dismutase(SOD-Ki)와 catalase(CAT-Ki)

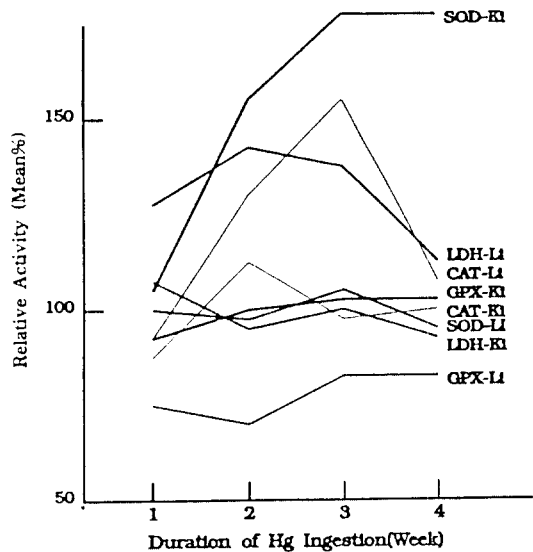


Fig. 2. Relative activities of lactate dehydrogenase (LDH), glutathionine peroxidase (GPX), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) in liver (-Li) and kidney (-Ki) of mice ingested 1.0 mM mercury chloride in drinking water during 1st to 4th week.

활성치는 $r = +0.560(p < 0.05)$ 로서 비교적 높은 상관성을 보이나 기타의 측정치간에는 상호관련성을 관찰할 수 없었다($p > 0.05$).

1.0 mM군의 경우도 각 측정치간의 상관성은 전반적으로 낮은 수준으로서 다만 신장(Con-Ki)과 간장(Con-Li)의 농도간의 $r = +0.730(p < 0.01)$, 신장(LDH-Ki)과 간장(LDH-Li)의 젖산탈수소효소치간의 $r = +0.520(p < 0.05)$, 간장의 GSH-PX활성치(GPX-Li)와 신장의 젖산탈수소효소치(LDH-Ki)간의 $r = +0.445(p < 0.05)$, 신장의 catalase활성치(Cat-Ki)와 신장농도(Con-Ki)간의 $r = +0.561(p < 0.05)$ 등에서 유의한 상관관계를 나타냈다.

IV. 고 찰

활성치의 수은이 생물체의 조직으로 흡수, 축적되는 양상은 수은에 의한 특정장기의 기능손상과 깊은 관련이 있으므로 독성기전의 연구에 앞서 깊은 관심을 불러 일으킨다.

본 연구결과로 미루어 마우스에 음료를 통한 수은의 투여 후 1주 및 2주간에 집중적으로 수은 축적이 일어나고, 이후로는 마우스 체내에서 수은의 흡수와 배설이 어느 정도 균형을 이루는 것으로

Table 7. The simple correlation coefficient (r) between each variables measured in mouse tissues of 0.5 mM group during 1st to 4th week of experiments (n=20)

Variable	Con-Li	Con-Ki	LDH-Li	LDH-Ki	GPX-Li	GPX-Ki	Cat-Li	Cat-Ki	SOD-Li	SOD-Ki
Con-Li	1.000									
Con-Ki	0.299	1.000								
LDH-Li	-0.379	0.056	1.000							
LDH-Ki	-0.397	0.353	0.518*	1.000						
GPX-Li	-0.145	-0.086	-0.200	0.201	1.000					
GPX-Ki	-0.148	-0.186	-0.361	0.052	0.398	1.000				
Cat-Li	0.094	-0.179	0.252	-0.082	-0.333	-0.162	1.000			
Cat-Ki	-0.083	0.109	0.102	0.095	-0.036	-0.181	0.406	1.000		
SOD-Li	-0.264	-0.197	0.119	0.038	0.101	-0.223	0.094	0.287	1.000	
SOD-Ki	-0.121	-0.294	0.043	-0.131	0.050	0.078	0.447*	0.212	0.560*	1.000

Abbreviations : Con, concentration of mercury; LDH, Lactate dehydrogenase; GPX, Glutathione peroxidase; Cat, Catalase; SOD, Superoxide dismutase; -Li, measured in 1 liver; -Ki, measured in kidney. *p<0.05.

Table 8. The simple correlation coefficient (r) between each variables measured in mouse tissues of 1.0 mM group during 1st to 4th week of experiments (n=20)

Variable	Con-Li	Con-Ki	LDH-Li	LDH-Ki	GPX-Li	GPX-Ki	Cat-Li	Cat-Ki	SOD-Li	SOD-Ki
Con-Li	1.000									
Con-Ki	0.730**	1.000								
LDH-Li	-0.175	0.169	1.000							
LDH-Ki	-0.149	0.149	0.520*	1.000						
GPX-Li	-0.413	-0.304	-0.235	0.445*	1.000					
GPX-Ki	0.273	-0.063	-0.018	0.111	-0.073	1.000				
Cat-Li	0.288	-0.083	0.181	-0.155	-0.063	-0.257	1.000			
Cat-Ki	0.385	0.561*	0.076	0.099	0.326	-0.034	0.035	1.000		
SOD-Li	-0.039	0.083	0.393	0.160	0.159	-0.271	0.287	-0.204	1.000	
SOD-Ki	-0.206	0.024	0.110	-0.152	0.284	0.090	0.386	0.223	0.239	1.000

Abbreviations : Con, concentration of mercury; LDH, Lactate dehydrogenase; GPX, Glutathione peroxidase; Cat, Catalase; SOD, Superoxide dismutase; -Li, measured in 1 liver; -Ki, measured in kidney. *p<0.05, **p<0.01.

보여진다. 물론 농도에 따른 차이는 있었지만 장기 별로는 이러한 균형이 간장과 신장에서 보다 뚜렷하며, 본 연구의 관찰기간인 8주 이후에도 비교적 오랜 시간에 걸쳐 지속적인 축적이 일어날 것으로 기대된다.

McKim 등²⁵⁾은 저농도(0.93 µg/l)의 수은화합물은 첨가한 조건에서 사육한 어류의 경우 적어도 20주까지는 지속적인 조직축적이 일어난다고 보고하였고, 기타 여러 연구결과도^{6,7,26)} 실험동물의 종적 특성과 수은화합물의 종류 및 농도의 차이에 따라 수은의 축적양상에 큰 차가 있음을 보고한 바 있다. 또한 수은의 투여기간이 경과함에도 불구하고 간장과 신장조직내의 수은축적이 비교적 일정한 수준으로 유지되는 현상은 수은유입에 따른 간세포의 lyszyme이 급격히 증가하여 세포내로 진입한 수은에

의해 손상받은 세포소기관을 탐식하여 배설시키거나, 수은을 비롯한 각종 중금속의 체내유입에 대해 독성억제와 배설에 관여하는 소위 metallothionein의 합성이 간장과 신장에서 가장 활발하다는 사실과²⁷⁾ 관련이 있는 것으로 사료된다. 한편 본 실험과 유사한 조건으로 무기수은(mercury chlorid)을 성구 투여한 경우, Gaworski²⁸⁾와 Sharma²⁹⁾는 0.5 mM의 농도로는 마우스의 성장둔화나 체중감량이 없다고 보고하였으나, 본 실험의 결과는 1.0 mM군은 물론 0.5 mM군의 경우도 수은투여 이후 같은 수량의 대조군에 비해 체중증가의 분화가 관찰되어 차후 실험에서는 마우스의 체중변화에 앞서 나타날 유류수 및 사료의 섭취량의 변화를 보다 자세히 기록하여 실험결과와 비교하는 것이 바람직 할 것으로 사료 된다.

만성적인 수은중독에 의한 신증후군²⁹⁾은 조직학적 관찰 결과가 보여주는 바와 같이 신사구체염의 진행과 관련되며,^{30, 32)} Tubbs 등은 수은에 폭로된 산업체 근로자들의 신장조직에서 사구체 기저막의 미세변화를 보고하였고, Henry 등³³⁾은 수은을 투여한 실험동물의 조직변화가 몇몇 자가면역질환에서 나타나는 병변과 유사함을 보고하는 등, 최근까지 수은독성기전을 밝히기 위한 접근방향을 반영해오고 있으나, 이들 연구의 대부분이 만성수은중독에 따른 간장의 조직학적 변화에 대해서는 언급하지 않고 있다.

젖산탈수소효소는 심장질환을 비롯한 몇몇 특정 질환에서 그 활성치가 극적으로 변하기 때문에 임상진단에 필요한 정보를 제공한다.^{34, 35)} 기타 비특이적 세포손상의 경우에도 그 활성치가 상승하며,^{36, 37)} 수은중독에 의해서도 그 활성치가 변화됨이 보고되고 있다.^{14, 38)}

李¹³⁾ 및 黃 등³⁹⁾은 조직내 젖산탈수소효소의 활성변화가 수은투여기간과 농도를 잘 반영한다고 하였으나, 본 실험에서는 투여시간이 경과함에 따라 상승되었던 효소활성치가 오히려 정상수준으로 복귀하였으며, 이는 특히 수은독성의 대표적 표적장기인 간장과 신장에서 공통적으로 관찰되었다. 이러한 사실로 미루어 수은의 투여농도보다는 투여기간의 장단에 따라 젖산탈수소효소의 활성치에 변화가 일어나고, 적어도 저농도 만성중독의 경우에는 조직손상 정도와 젖산탈수소효소의 활성치변화가 일치하는 결과로 나타나지 않을 수 있다는 점을 추측케 한다.

중금속들이 생체내에서 독성을 일으키는 기전은 불분명하지만 간세포와 신세포관세포의 손상을 유도한다는 것이 잘 알려져 있다.¹²⁾ 수은외에도 구리나 아연 등의 중금속을 과량투여한 경우 배양세포나 실험동물의 장기에서 항산화효소의 불활성화(inactivation)나 lipid peroxidation의 증가로 인한 세포손상이 관찰되며,^{11, 40)} 이들 반응의 초기에 O_2 , OH , H_2O_2 와 같은 free radical이 관여하여 반응 후 생성된 malondialdehyde 등의 물질이 강한 세포독성을 나타내는 것으로 보고되어 있는데,¹⁶⁾ 이는 결과적으로 DNA나 단백질의 손상, 단백질 thiol기의 산화 및 항산화효소의 활성변화 등과 관련된다고 한다.^{17, 18)} 따라서 수은의 생체에 대한 독성발현과정에 있어서도 O_2 , OH 등의 free radical과 과산화반응에 의해 세포내 누적되는 H_2O_2 , hydroperoxide, superoxide 등의 생성에 관여하는 항산화효소의 활성변화가 관찰될 수 있다는 개인성이 있다.

Glutathione peroxidase(GSH-PX)는 분자구조내에 4개의 selenium 원자를 함유하고 있어, Morimoto 등⁴¹⁾은 배양임파구의 자매염색분체 교환비도로 관찰된 수은에 대한 selenium의 항독성이 GSH-PX의 활성증가와 관련하여 나타난다고 주장한 바 있으나, 수은단독투여에 의한 본 연구의 결과에서는 1.0 mM군의 2주째 간장조직내의 측정치를 제외하고는 오히려 타 항산화효소에 비해 GSH-PX 활성치의 변화가 뚜렷하지 않았다. 물론 시험관내의 관찰결과를 생체실험에 적용하기에는 어려움이 있겠으나, 차후의 연구에서 수은투여와 함께 selenium을 동시에 첨가하므로써 나타나는 GSH-PX의 변화와 기타 항산화효소의 활성치를 관찰하는 것이 수은독성기전에서의 lipid peroxidation의 역할을 규명하는데 도움이 될 것으로 기대된다.

본 연구는 항산화효소로서 glutathione peroxidase(GSH-PX), catalase 및 superoxide dismutase(SOD) 등의 활성치를 수은투여 후 1주부터 경시적으로 관찰하였던 바, 간장과 신장조직에서의 catalase 활성치와 신장조직에서의 SOD 활성치가 2주에서 4주에 걸쳐 상승되는 경향을 보였다. 비록 이들 활성치의 변동폭이 매우 크고 전반적으로 용량대반응의 관계를 짐작하기가 어려웠으나, 젖산탈수소효소의 경우와 같이 활성치의 변동시점이 2주 및 3주에 집중적으로 나타난다는 점에서 이 시기에 조직내 수은축적이 집중적으로 일어나고, 그로 인한 생화학적 변화와 밀접한 인과관계가 있음을 시사하고 있다.

V. 요약

실험적인 수은중독시 간장과 신장조직의 젖산탈수소효소 및 항산화효소인 glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase 등의 활성치간의 관계를 밝히고자, 실험동물로 마우스를 택하여 0.5 mM 및 1.0 mM의 수은을 함유한 음료수를 섭취시켜, 투여시간 및 투여농도별로 관찰한 결과, 다음과 같이 요약된다.

1. 주령 8주부터 16주까지의 실험기간동안 대조군과 실험군의 마우스에서 외형적으로 신경학적 변화나 기타 수은중독으로 간주되는 병태를 보인 개체는 없었으나, 실험군은 수은을 투여한 8주 동안 대조군에 비하여 체중증가가 둔화되었다.
2. 간장과 신장내 수은축적은 수은투여 1주(주령 8주)부터 8주(주령 16주)까지 지속적인 축적을 보였으며, 신장의 경우 수은투여 2주군에서 특히

- 많은 양의 수은축적을 보였으며, 대조군에 비해 각 실험군의 농도는 적어도 100배 이상의 높은 수준이었다.
3. 간장과 신장조직으로부터 측정된 췌산탈수소효소의 활성치는 전반적으로 신장조직에서 다소 높았는데, 0.5 mM 및 1.0 mM군 모두 투여시작 후 2~3주에 최고치를 보이다가 이후에는 대조군의 수준으로 회복되는 경향을 나타냈다.
 4. 항산화효소 중, glutathione peroxidase의 활성치는 1.0 mM군의 간장에서 투여 2주째에 현저히 감소되나 기타 실험군에서는 대조군의 값과 유의한 차가 없었다. 반면, catalase의 경우는 전 실험군의 2주 또는 3주군에서 뚜렷한 상승을 나타냈으며, superoxide dismutase의 활성치는 0.5 mM과 1.0 mM군의 신장조직에서 공히 3주째의 상승이 관찰되었다.
 5. 각 장기조직내의 수은축적량 및 효소활성치간의 단순상관분석결과에는 투여농도에 관계없이 전반적으로 매우 낮은 상관계수를 나타냈다.
- 참고문헌**
- 1) Clarkson, T. W. : The Pharmacology of Mercury Compounds. *Ann. Rev. Pharmacol.*, **12**, 375, 1972.
 - 2) Goyer, R. A. : Toxic effects of metals. In Amdur MO, Doull J, Klaassen CD (eds.) Casarett and Doull's Toxicology. 4th ed., Pergamon Press, Inc., New York, pp. 646-651, 1991.
 - 3) Mailman, R. B. : Heavy metal. In Guthrie FE, Perry JJ (eds.), Introduction to environmental toxicology. Elsevier North Holland Inc., New York, pp. 34-43, 1980.
 - 4) Wojtalik, T. A. : Accumulation of mercury and its compounds. *J. WPCF*, **43**, 1280, 1971.
 - 5) Grandjean, P. : Health significance of metals. In Last JM, Wallac RB (eds.), Maxcy-Rosenau-Last Public Health & Preventive Medicine. 13th Ed., Appleton & Lange, Connecticut, pp. 881-401, 1992.
 - 6) Gritzka, T. L. and Trump, B. F. : Renal tubular lesions caused by mercuric chloride. *Am. J. Pathol.*, **52**, 1225, 1968.
 - 7) Rustam, H., Burg, R. V. and Hassani, S. E. : Evidence for a neuromuscular disorder in methylmercury poisoning. *Arch. Environ. Health*, **30**, 190, 1975.
 - 8) Donaldson, M. L. and Gubler, C. J. : Biochemical effects of mercury poisoning in rat. *Am. J. Clin. Nutri.*, **31**, 859, 1978.
 - 9) Roels, H. A., Gennart, J. P., Lauwerys, R., Buchet, J. P., Malchaire, J. and Bernard, A. : Surveillance of workers exposed to mercury vapor : validation of previously proposed biological threshold limit value for mercury concentration in urine. *Am. J. Ind. Med.*, **7**, 45, 1985.
 - 10) W.H.O. : Environmental health criteria; mercury. *World Health Organization*, **30**, 190, 1975.
 - 11) Misra, M., Rodriguez, R. E. and Kasprzak, K. S. : Nickel induced lipid peroxidation in the rat; correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*, **64**, 1, 1990.
 - 12) Manca, D., Ricard, A. D., Frottier, B. and Chevalier, G. : Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*, **67**, 303, 1991.
 - 13) 李春九 : 폐기의 臟器内 LDH isozyme과 蛋白質에 미치는 急性水銀中毒의 影響에 關한 研究. *韓國陸水學會誌*, **18**, 73, 1985.
 - 14) 鄭表憲, 李春九 : 폐기(Parasilurus asptus)의 장기내 췌산탈수소이탈효소 아소자일형에 미치는 동이온의 영향에 관한 연구. *韓國動物學會誌*, **27**, 85, 1984.
 - 15) Stacey, N. H. and Klaassen, C. D. : Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocyte. *J. Toxicol. Environ Health*, **7**, 139, 1980.
 - 16) Kappus, H. and Sies, H. : Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. *experientia*, **37**, 1233, 1981.
 - 17) Ochi, T. : Effects of an organic hydroperoxidase on the activity of antioxidant enzymes in cultured mammalian cells. *Toxicology*, **61**, 229, 1990.
 - 18) Blumm, J. and Fridovich, I. : Inactivation of GSH-peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 500, 1985.
 - 19) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
 - 20) Mauck, J. C. and Davis, J. E. : Clinical enzymology. In Sonnenwirth AC, Jarett L (eds.), Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. 8th ed., Vol. 1. CY Mosby Co., St. Louis, pp. 319-321, 1980.
 - 21) Flohe, L. and Gunzler, W. A. : Assays of glutathione peroxidase. In Packer L (ed.), Methods in Enzymology Vol. 105. Oxygen Radicals in Biolog-

- ical System. *Academic Press, New York*, **105**, 121, 1984.
- 22) Aebi, H. : Catalase *in vitro*. In Packer (ed.), *Methods in Enzymology Vol. 105, Oxygen Radicals in Biological System. Academic Press, New York*, **105**, 121, 1984.
- 23) Crapo, J. D., McCord, J. M. and Fridovich, I. : Preparation and assay of superoxide dismutase. In Fleischer S and Packer L (eds.), *Methods in Enzymology Vol. LIII, Biomembranes Part D : Biological Oxidants Mitochondrial and Microbial System. Academic Press, New York*, **53**, 382, 1978.
- 24) Kudsk, F. N. : Determination of mercury in biological materials: A specific and sensitive dithizone method. *Scand J. Clin. Lab. Invest*, **16**, 575, 1964.
- 25) McKim, J. M., Olson, G. F., Holcombe, G. W. and Hunt, E. P. : Longterm effects of methylmercuric chloride on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*): Toxicity, accumulation, distribution, and elimination. *J. Fish Res. Bd. Canada*, **33**, 2726, 1976.
- 26) 황인담, 기노식, 정인호, 이정삼, 이태형 : 수은중독에 관한 실험적 연구. *한국환경위생학회지*, **14**, 103, 1988.
- 27) Cherian, M. G. and Goyer, R. A. : Methallothiones and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Lift Science*, **23**, 1, 1978.
- 28) Gaworski, C. L. and Sharma, R. P. : The effects of heavy metals on [3H]thymidine uptaken in lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **46**, 305, 1978.
- 29) Becker, C. G., Becker, E. L., Maher, J. F. and Schreiner, G. E. : Nephrotic syndrome after contact with mercury. A report of five cases, three after the use of ammoniated mercury. *Arch. Intern. Med.*, **110**, 178, 1962.
- 30) Bariety, J., Druet, P., Laliberte, F. and Sapin, C. : Glomerulonephritis with gamma and beta-1-C globulin deposits induces in rats by mercury chloride. *Am. J. Pathol.*, **65**, 293, 1971.
- 31) Couser, W. G., Spargo, B. H., Stilmant, M. M. and Lewis, E. J. : Experimental glomerulonephritis in guinea pig II. Ultrastructural lesions of the basement membrane associated with proteinuria. *Lab. Invest.*, **32**, 46, 1975.
- 32) Tubbs, R. R., Gephardt, G. N., McMahon, J. T., Phol, M. C., Vidt, D. G., Barenberg, S. A. and Valenzuela, R. : Membranous glomerulonephritis associated with industrial mercury exposure; Study of pathogenic mechanisms. *Am. J. Clin Pathol.*, **77**, 409, 1982.
- 33) Henry, G. A., Jarnot, B. M., Steinhoff, M. M. and Bigazzi, P. E. : Mercury-induced autoimmunity in the MAXX rat. *Clin Immunol. Immunopathol.*, **49**, 187, 1988.
- 34) Hagadorn, J. E., Bloor, C. M. and Yang, M. S. : Elevated plasma activity of lactate dehydrogenase isoenzyme-3(LDH-3) in experimentally induced immunologic lung injury. *Am. J. Pathol.*, **64**, 575, 1971.
- 35) Papadopoulos, N. M. and Kintzios, J. A. : Quantitative electrophoretic determination of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Am. J. Clin Pathol.*, **41**, 96, 1967.
- 36) Jackim, E., Hamlin, J. M. and Sonis, S. : Effects of metal poisoning on five liver enzymes in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). *J. Fish Res. Bd. Canada*, **27**, 383, 1970.
- 37) Rim, C. E. : A study on the alteration of lactic dehydrogenase activity in tissue homogenate of the rabbit exposed to carbon monoxide. *Yonsei J. Med. Sci.*, **3**, 160, 1970.
- 38) Chung, H. W., Lee, C. K. and Choi, S. S. : Toxicological effects of methylmercury on lactate dehydrogenase in organs of killifish, *Oryzias latipes*. *Res. Rep. Env. Sci. Tech. Chungnam Univ.*, **6**, 17, 1988.
- 39) 黃仁濂, 奇老錫, 高大河, 李宰炯, 李定根, 沈雲澤 : 魚類의 臟器內에 蓄積된 mercury chloride가 lactate dehydrogenase isozyme 活性度에 미치는 影響. *大韓保健協會誌*, **15**, 3, 1989.
- 40) Koizumi, A., Weindruch, R. and Walford, R. L. : Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *J. Nutrition*, **117**, 361, 1987.
- 41) Morimoto, K., Iijima, S. and Koizumi, A. : Selenite prevents the induction of sister-chromatid exchanges by methylmercury and mercuric chloride in human whole-blood cultures. *Mutation Res.*, **102**, 183, 1982.