

납(Pb)이 배양 섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구

정연태 · 최민규 · 김정중 · 문연자 · 김재민* · 백순기**
원광대 의대 해부학교실, 동신전문대 안경광학과*, 동신대 환경공학과**
(95. 7. 19. 접수)

A Study on the Cytotoxicity of Lead in Cultured Fibroblasts

Yeun-Tai Chung, Min-Kyu Choi, Jeong-Joong Kim,
Yeun-Ja Mun, Jai-Min Kim* and Soon-Ki Baik**

Dept. of Anatomy, Wonkwang University Medical School, Iksan, *Dept. of Ocular Optics, Dongshin Junior College, Kwangju, **Dept. of Environmental Engineering, Dongshin University, Naju, Korea

ABSTRACT : In order to evaluate the cytotoxicity of lead in cultures of Balb/c mouse 3T3 cell line, various cytotoxic assays were carried out after expose cells to various concentrations of lead nitrate. Cytotoxic assays using this study were included NR assay, MTT assay, measurement of LDH and protein, synthetic rate of DNA and UDS. Intracellular Ca^{2+} level was also measured. Light and electron microscopic studies were done for morphological changes of lead-treated cell cultures. The results were as follows;

1. The absorbances of NR and MTT were decreased dose-dependently, and NR_{50} and MTT_{50} values of lead nitrate were 3.4 mM and 1.5 mM, respectively.
2. Amount of LDH released into the medium was increased in dose-dependently and LDH activity at 5 mM concentration of lead nitrate was increased to 335% of control.
3. Amount of total protein was decreased dose-dependently, and which was half of control at 2 mM concentration of lead nitrate.
4. The synthetic rate of DNA was decreased dose-dependently, and also which was remarkably decreased at 3 mM and 5 mM concentrations of lead nitrate.
5. The synthetic rate of UDS was increased at 1 mM concentration of lead nitrate, but which was remarkably decreased at 3 mM and 5 mM concentrations of lead nitrate.
6. Intracellular Ca^{2+} level was remarkably increased at 1 mM concentration of lead nitrate, compared with control.
7. In light microscopy, number of cells and processes were decreased according to the increase of dosage of lead nitrate. Electron microscopic findings showed that many vacuoles and cisternal dilatation of rough endoplasmic reticulum were seen in the cytoplasm at 1 mM concentration of lead nitrate.

From the above results, high dosage treatment of lead nitrate (>3 mM) damaged genetic materials and it also showed cytotoxicity in mouse 3T3 cell line cultures by injury of cell organelles and Ca^{2+} channel.

Key words : Balb/c mouse 3T3 cell line, lead nitrate, cell culture, cytotoxicity assay

서 론

산업의 발달과 함께 중금속 사용이 늘어 가고 있으며, 공장 폐수, 차량배기 등에 의하여 대기나 수질오염이 가속화 되고 있다. 이러한 중금속은 분해되지 않고 축적되어 생물체에 직접, 간접으로 피해를 주며, 또한 생태계의 먹이연쇄를 통하여 인체에까지 각종 질병을 유발시키는 등 많은 부작용을 낳고 있다. 따라서 중금속이 생물체에 미치는 독성에 대하여 국내외 학자들의 많은 연구 결과가 보고되어 왔다(Kobayashi, 1971; Storeng and Jonsen, 1980; Park and Chung, 1986).

중금속 중 납은 차량연료 및 축전지에 많이 사용되고 있으며 수질오염은 물론 인체에 직접적인 영향을 미칠 수 있기 때문에 그 심각성은 날로 증가하고 있다. 납에 의한 부작용으로는 인체 각 기관에 광범위하게 나타나는 것으로 보고되어 있는데 위장관 통종이나 조혈기관, 신경계, 내분비계, 생식기계 및 면역계 기능을 약화(USEPA, 1986; White *et al.*, 1990; Genhart *et al.*, 1992) 시키고, 신경섬유의 수초와 축삭의 퇴화를 유발하며(Pentschew, 1965; Goyer and Rhyne, 1973), 그 밖에 납 중독증으로 신장병변, 골변성, 뇌병변, 정신발육지연을 비롯하여(Hass *et al.*, 1964), 뇌부종, 혈관의 확장 및 혈관내 내피세포의 팽창 등이 보고되어 있다(Ahrens and Vistica, 1977). 또한 납의 독성은 칼슘채널과 관계가 있으며(Busselberg *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1991; Busselberg *et al.*, 1993) 이들 이온 채널에 관한 연구도 시도되고 있다. 납의 독성에 관해서 약리학이나 생화학, 생리학적인 측면에서는 비교적 많은 연구가 되어 왔으나 형태학적 연구는 소수이며, 특히 세포수준에서의 독성 실험은 더욱 그렇다.

일반적으로 독성 실험에 사용되는 각종 배양세포는 분화속도가 빠르고 외부의 환경변화에 매우 민감하기 때문에 어느 독성물질에 대한 각 분화단계에 따른 형태적, 정량적 분석이 가능하며 실험의 반복성 및 재현성이 뛰어나다는 점에서 각종 유해물질들의 안전성 조사에 좋은 재료로 이용되고 있다. 이러한 독성물질의 안전성 검사에는 가장 효과적이고 정확한 분석을 할 수 있는 세포종 및 분석방법의 선택이 무엇보다 중요하다고 하겠다.

본 연구는 중금속의 세포독성을 조사하기 위한 연구의 일환으로, 산업분야에서 많이 사용되고 대기나 수질등을 통하여 우리 일상생활에 많이 노출되는 납을 택하여 이를 포유류의 배양세포에 농도별로 투여한 후 최근 개발된 *in vitro* cytotoxicity assay에 따라 세포독성 정도를 판정하고 세포내 유리칼슘의 변화와 납에 대한 세포소기관 독성의 target organ을 밝힘으로서 납의 세포독성 기전을 규명하기 위하여 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료 : Balb/C Mouse 3T3 Cell line을 사용하였다.

세포배양 : 세포배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)을 혼합하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂로 조정된 항온기 내에서 배양하였으며, 배양액은 3일마다 교환하였다. 세포수는 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨 후, 0.2% trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 산정하였다.

납(Lead)처리 : Lead nitrate(Pb(NO₃)₂, Sigma)는 증류수에 녹여 저장액을 만들고 배양액으로 희석하여 사용하였다.

NR(neutral red) 정량

Borenfreund와 Puerner(1984) 방법에 의하여 세포를 well당 5×10⁴cells/ml가 되도록 24well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 여러농도의 납이 포함된 배양액으로 교환하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 37°C 어두운 곳에서 overnight 시킨 후 50 µg/ml의 neutral red(Sigma)가 포함된 배양액을 well 당 1 ml씩 넣어 3시간 동안 배양하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2-3회 세척하였다. 1% formaldehyde-1% CaCl₂를 well당 0.5 ml 씩 넣어 세포를 고정하고 1% glacial acetic acid-50% ethanol을 well당 2 ml 씩 넣어 실온에서 15분간 처리하여 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR은 분광광도계 (540 nm)로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

MTT 정량

Mosmann(1983)의 방법에 의하여, 세포를 납이 포함된 배양액에서 24시간 배양한 후 분석 당일 조제한 50 µg/ml의 MTT (Sigma)가 포함된 배양액을 well 당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 dimethylsulfoxide(DMSO)를 well 당 2 ml씩 넣어 실온에서 5분간 처리한 후 MTT formazan을 용해하여 분광광도계(550 nm)로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

LDH 정량

세포를 납이 포함된 배양액에서 24시간 배양한 후, 배양액으로 유출된 LDH의 활성을 변형된 Takahashi 등(1987)의 방법에 따라 측정하였다. LDH 측정 Kit(Atron lab, Japan)의 효소기질액 1 ml를 직경 10 mm인 tube (Palcon)에 넣은 후 배양액을 넣어 잘 혼합하고 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 10분 후 희석 반응 정지액을 3 ml 넣고 잘 혼합한 후 570 nm에서 대조군과

비교조사 하였다. 이때 효소활성은 reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)의 산화량으로 표시하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따랐으며, 표준단백질로는 일정농도의 bovine serum albumin (BSA, Sigma)을 사용하였다.

DNA 합성을 측정

직경 35 mm petri dish에 1×10^5 cells/ml를 분주하여 24시간 배양한 후 세포를 여러농도의 납이 포함된 배양액에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 $[^3\text{H}]$ thymidine이 10 $\mu\text{Ci/ml}$ 포함된 배양액에서 1시간 동안 배양하여 $[^3\text{H}]$ thymidine으로 표식하였다. 1시간 후 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 sodium azide로 DNA 합성을 억제시켜 Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 없는 PBS로 3회 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유시키고 원심분리하여 세포를 모은 후 scintillation cocktail(Sigma)을 8 ml씩 넣어 액체 섬광계수기로 방사능을 측정하였다.

비주기성 DNA 합성을 조사

세포를 35 mm petri dish에 분주하여 24시간 배양한 후 세포를 납과 10^{-2} M의 hydroxy urea가 포함된 배양액에 24시간 배양하였다. 배양완료 후 $[^3\text{H}]$ -thymidine이 5 $\mu\text{Ci/ml}$ 포함된 배양액으로 교환하여 3시간 배양하고 세포를 부유시켜 수확한 후 액체 섬광계수기로 방사능을 측정하였다.

Anchoring Cell Analysis System (ACAS)에 의한 세포 내 유리칼슘의 측정

배양중인 세포를 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS로 2회 세척한 후 Fluo-3AM(Molecular probe 제품)이 최종 5 μM 의 농도가 되게 첨가한 다음 배양기(5% CO_2 , 95% air, 37°C)에서 1시간 동안 염색한다. 1시간 후 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS로 2-3회 세척하여 남아있는 형광물질을 완전히 제거하고 세포내 유리칼슘을 측정하였다. 세포 자극물질로는 calcium ionophore A23187을 최종 농도 50 nM이 되게 처리하여 세포내 칼슘의 변화를 측정 하므로서 확인 하였다. 부착식 세포분석을 위하여 배양세포를 ACAS 570 위상차 현미경으로 관찰하고 488 nm의 세기로 발광된 argon-ion laser beam 200 mW 출력으로 scan을 3-4번하여 기저선을 정한 후 납을 처리하여 세포내 유리칼슘의 변화

를 측정하였다. scan은 30-40회 시행하였고 1회 scan의 시간은 60초로 하였다.

세포의 형태학적 관찰

세포의 광학현미경적 관찰을 위하여 35 mm petri dish에 1×10^5 cells/ml를 분주하여 24시간 배양한 후 여러농도의 납이 포함된 배양액으로 교환하여 24시간 배양하였다. 납 처리 24시간 후 도립위상차 현미경으로 세포형태를 관찰하였다. 배양세포의 전자현미경적 관찰은 Moses와 Claycomb(1982)의 방법을 변형하여 사용하였다. 직경 35 mm petri dish에 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 납이 여러농도로 포함된 배양액에서 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 PBS로 3회 세척하여 1% glutaraldehyde(0.1 M phosphate 완충액, pH 7.4)로 전고정하고 1% OsO_4 로 후고정하였다. 고정된 시료는 ethanol(30-100%)로 탈수시켰다. 100% ethanol 탈수는 2회 반복하였고 100% ethanol과 epoxy 수지(Epon 812, Polysciences)를 1:1로 섞은 혼합액으로 2시간 동안 침투시켰고 epoxy 혼합액에 포매하여 35°C, 45°C, 60°C 오븐내에서 각각 24시간씩 유지시켜 중합을 완료하였다. 수지 중합 후 80 nm두께로 절편을 만들어 uranyl acetate 와 lead citrate로 이중 염색하였다. 세포의 미세구조는 Hitachi H-600 전자현미경을 이용하여 75 kv 가속전압하에서 관찰하였다.

결 과

NR 정량

생쥐 3T3 세포에 여러 농도의 납을 처리하여 NR의 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출한 결과, 흡광도는 납의 농도 증가에 따라 감소하였으며 NR_{50} 농도는 3.4 mM로 나타났다(Table 1).

Table 1. The effect of lead nitrate on the cultured Balb/c mouse 3T3 cells by NR and MTT assays

Concentration of lead	NR	MTT
	Absorbance (% of control) Mean \pm SE	Absorbance (% of control) Mean \pm SE
1 μM	92 \pm 7	96 \pm 4
10 μM	77 \pm 5	93 \pm 4
100 μM	75 \pm 8	89 \pm 6
1 mM	70 \pm 3	77 \pm 3
2 mM	62 \pm 5	48 \pm 4
3 mM	58 \pm 4	22 \pm 2
5 mM	28 \pm 6	12 \pm 1

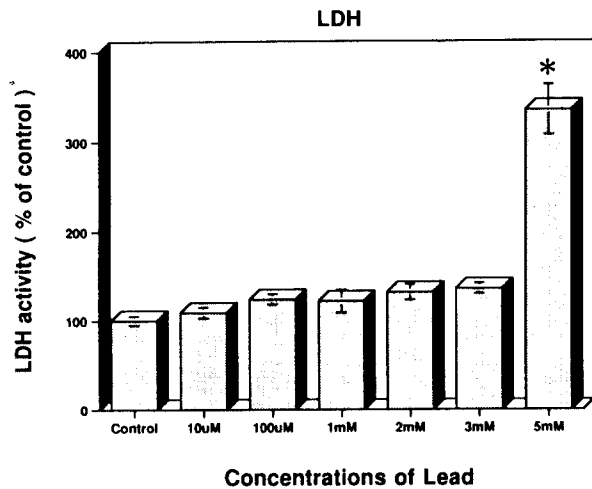


Fig. 1. The amounts of LDH released into the medium in Balb/c mouse 3T3 cells treated with various concentrations of lead nitrate. *P<0.01

MTT 정량

NR 정량과 같은 방법으로 여러 농도의 납을 처리한후 MTT 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 산출하였다. 흡광도는 납의 농도 증가에 따라 감소하였으며 MTT₅₀ 농도는 1.5 mM로 나타났다(Table 1).

LDH 정량

세포내에서 배양액내로 유출된 LDH 양을 측정된 결과 100 μ M 처리군과 1 mM 처리군에서 각각 대조군의 124%와 122%로 증가하였고, 2 mM과 3 mM 처리군에서 대조군에 비하여 각각 132%와 136%로 증가 하였으나 5 mM 처리군의 경우는 대조군에 비하여 335%로 나타나서 배양액내로 유출된 LDH 양이 크게 증가하였다(Fig. 1).

단백질 정량

세포내 총단백질량을 정량한 결과 1 mM 처리군에서 대조군의 80%, 2 mM 처리군에서 49%, 3 mM 처리군에서 33%, 5 mM 처리군에서 23%로 각각 나타나서 납의 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2).

DNA 합성률

세포내 DNA 합성률을 측정하여 대조군과 비교한 결과 10

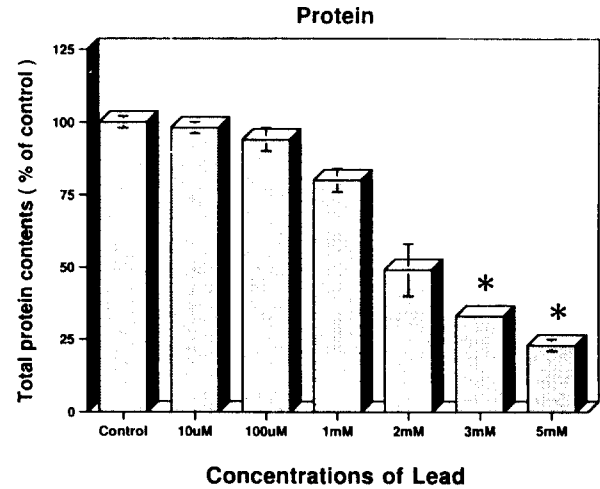


Fig. 2. The amounts of total protein in Balb/c mouse 3T3 cells treated with various concentrations of lead nitrate. *P<0.01

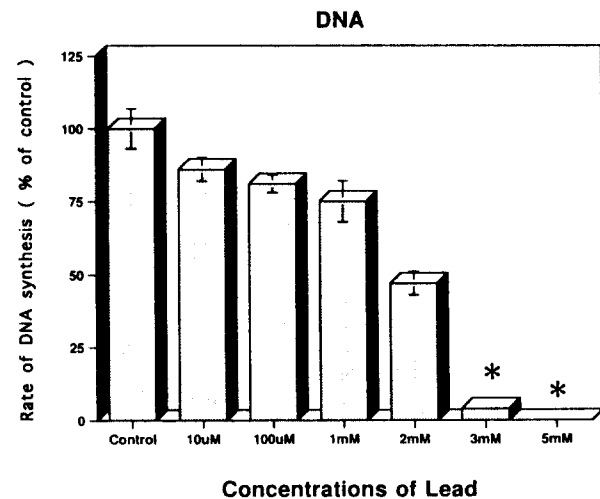


Fig. 3. Rates of DNA synthesis in Balb/c mouse 3T3 cells labelled with [³H] TdR for 1 hour, after expose to various concentrations of lead nitrate for 24 hours. *P<0.01

μ M 처리군에서 대조군의 86%, 100 μ M과 1 mM 처리군에서 각각 대조군의 81%와 75%, 2 mM과 3 mM 처리군에서 각각 대조군의 47%와 4%로 나타났으며, 5 mM에서는 DNA 합성이 일어나지 않아서 3 mM 농도 이상에서는 거의 DNA 합성이 없어짐을 알 수 있었다(Fig. 3).

비주기성 DNA 합성률 조사

비주기성 DNA 합성률은 10 μ M, 100 μ M 및 1 mM에서는 대조군에 비하여 증가하였고 2 mM에서는 대조군과 유사한

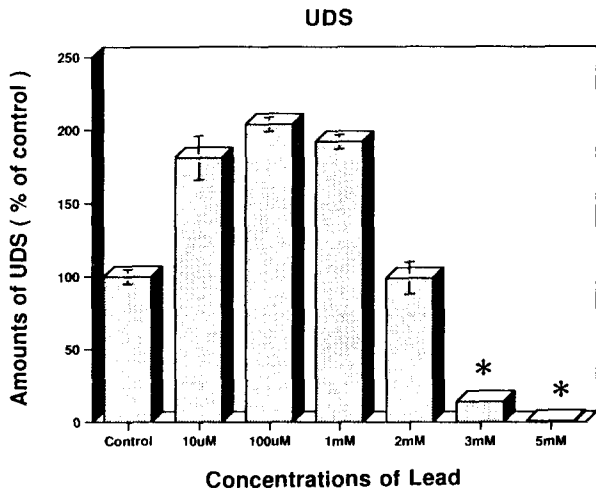


Fig. 4. Rates of unscheduled DNA synthesis in Balb/c mouse 3T3 cells treated with various concentrations of lead nitrate. *P<0.01

수준을 보였으나, 3 mM 처리군에서는 대조군의 14%, 5 mM 처리군에서는 대조군의 1%로 나타나서 3 mM 농도 이상에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 4).

세포내 유리칼슘의 측정

납이 생쥐 3T3 세포내 유리칼슘의 양에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 세포를 유리칼슘에만 특이하게 반응하는 염색액인 Fluo-3 AM으로 염색한 후 납 1 mM을 처리했을 때, 세포내 유리 칼슘의 양이 납 처리 70초 후에 최대로 증가 하였다가 점차 감소 하였다(Fig. 5B). 세포내 칼슘이 정확히 측정 되었는지 조사하기 위하여 calcium ionophore A23187을 처리 하여 세포내 칼슘의 변화를 조사하여 확인 하였다(Fig. 5A). 1 mM 농도의 납을 처리했을 때(Fig. 6A) 세포내 유리 칼슘의 양이 70초 후에 최고치를 보이고(Fig. 6B), 130초 후에 감소하였다(Fig. 6C) 180초 후에는 최저치를 보여서(Fig. 6D) 세포내 유리칼슘의 양이 납의 영향으로 변화함을 볼 수 있었다.

세포의 형태학적 관찰

1) 광학현미경적 관찰 조건

세포의 광학 현미경적 관찰 결과 납의 농도가 증가함에 따라 대조군(Fig. 7A)에 비하여 10 μ M 농도(Fig. 7B) 및 100 μ M 농도(Fig. 7C)에서 세포수가 감소하고 세포 형태가 위축되는 등의 변화를 보였다. 또한 1 mM 농도(Fig. 7D) 이상의 납 처리군에서는 이러한 변화가 현저하였고, 3 mM 처리군(Fig. 7E)에서 세

포수의 감소와 함께 세포의 돌기도 현저하게 감소하였고, 5 mM 처리군(Fig. 7F)에서는 거의 대부분의 세포가 사멸하였다.

2) 전자현미경적 관찰 조건

전자현미경적 관찰 결과 대조군의 세포 형태는 대체로 타원형이었고, 핵은 중앙부에 위치 하였으며, 뚜렷한 핵소체와 핵막을 관찰할 수 있었다. 세포질 내에는 타원형이거나 간상의 사립체가 관찰 되었고 약간의 조면내형질망과 상당량의 유리 리보솜 등이 관찰 되었다(Fig. 8A). 1 mM 농도의 납을 처리한 세포에서의 두드러진 변화는 조면내형질망의 조가 확장되었고 사립체의 파괴와 함께 다수의 공포가 관찰 되었고 소수의 활면내형질망도 관찰 되었다(Fig. 8B).

고 찰

본 연구는 납이 세포소기관에 미치는 독성을 조사하기 위하여 세포독성 검정법으로 널리 사용되고 있는 용해소체의 NR 흡수능력과, MTT 분석법에 의한 사립체의 succinic dehydrogenase 활성도를 측정하였다. colorimetric assay인 NR, MTT 분석법은 각종 화학물질의 세포독성을 일차적으로 검정 하는데 이용되는 방법으로 형태적인 변화를 살아있는 세포를 대상으로 위상차현미경으로 관찰 할 수 있고, NR과 MTT를 추출한 후 분광광도계를 이용하여 세포독성을 정량적으로 측정하여 대조군과 비교할 수 있는 간편한 방법이며, 최근 미국 국립 암연구소에서도 항암제 등 독성물질의 검정을 위한 방법으로 제안한 바 있다(Carmichael *et al.*, 1987). 본 연구에서 납의 NR₅₀과 MTT₅₀ 농도는 각각 3.4 mM과 1.5 mM 로 나타나서 카드뮴의 결과 보다 현저하게 높아서 카드뮴의 독성보다는 적은 것으로 나타났다(Chung *et al.*, 1993).

배양액내로 유출된 LDH양은 납을 처리한 세포에서 대조군에 비하여 증가하였는데 이는 Takahashi 등(1987)이 심근세포에 adriamycin을 처리한 결과와 일치 하였다. Shell(1973)에 의하면 세포막의 손상시 세포내 LDH가 세포막을 통하여 밖으로 유출된다고 하였다. 따라서 배양액내의 LDH 정량은 세포막의 손상정도를 판정하는 기준이 된다고 하였으며 이는 손상을 받은 골격근이나 간세포를 비롯하여 백서의 심근 및 내피 세포에서도 배양액내로 유출된 LDH 양이 매우 증가되는 것으로 보고되어 있는데, 본 연구 결과 배양액내로 유출된 LDH 양이 증가된 것은 납이 세포막에 손상을 주고 그 결과 세포내 LDH가 배양액내로 유출 되었을 것으로 생각되며, 특히 5 mM 농도 처리군에서 대조군의 3배 이상 증가하여 세포막 손상이 심한 것으로 생각된다.

총단백질량은 Takahashi 등(1987)과 Kim 등(1990)이 심근세

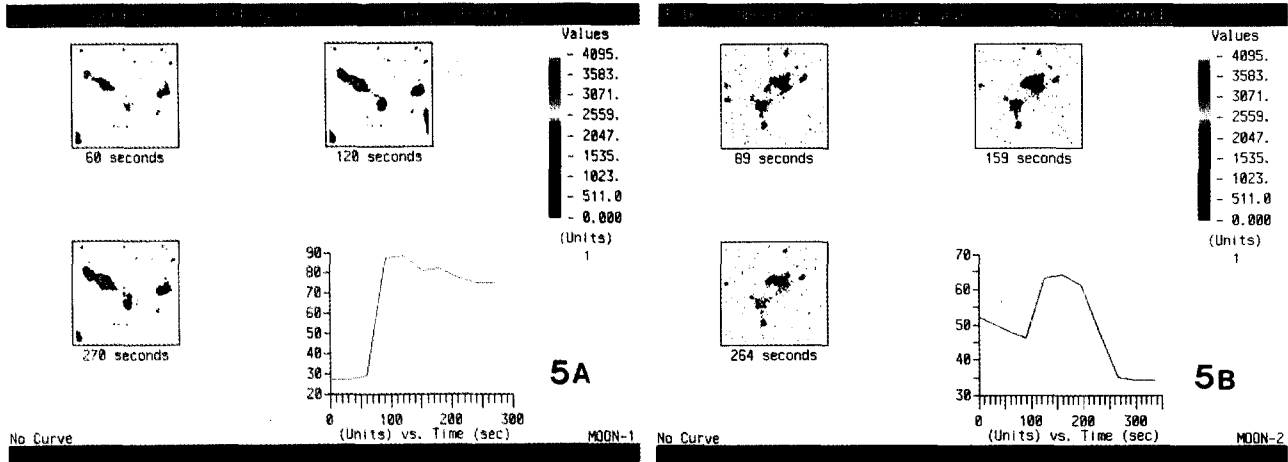


Fig. 5. The lead-induced changes in intracellular Ca^{2+} in Balb/c mouse 3T3 cells. Cells attached to the 35 mm petri dish were incubated with Ca^{2+} , Mg^{2+} free-PBS containing fluo-3 for 1 hour, and washed with fresh PBS, and then the intracellular Ca^{2+} was measured with ACAS 570. Calcium ionophore A23187 treatment group (A), and lead (1 mM) treatment group (B).

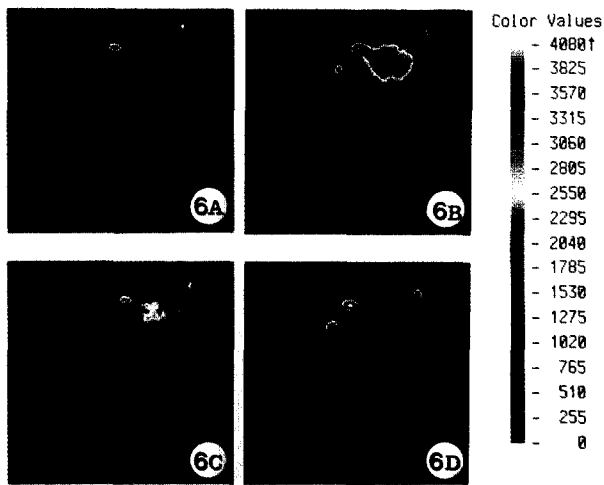


Fig. 6. The lead-induced changes in intracellular Ca^{2+} in Balb/c mouse 3T3 cells. 1 mM of lead nitrate was added and continued to scanning, at 0 time (A), after 70 sec (B), after 130 sec (C) and after 180 sec (D).

포와 섬유모세포에 항암제를 처리한 실험결과와 동일하게 나타나서 세포소기관에 미치는 약제의 농도와 일치하여 감소하였으며 2 mM 농도 처리군에서 49%로 나타나서 MTT 정량에 의한 세포독성 결과와 거의 일치하였다. 이러한 결과는 납이 직접 단백질 합성계에 손상을 주고 이로 인하여 단백질 합성이 저해를 받는 것으로 생각된다.

납이 DNA 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DNA 복제나 회복기전을 연구하는데 많이 이용되고 있는 DNA 합성률을 측정(Friedberg, 1985; Kim *et al.*, 1989)한 결과 3 mM 농

도 이상에서는 DNA 합성이 거의 일어나지 않는 것으로 보아 NR 및 MTT 정량에 이용되는 용해소체와 사립체에 미치는 영향보다 DNA에 훨씬 민감한 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 DNA보다 세포소기관에 더 민감한 영향을 미치는 것으로 나타난 카드뮴(Chung *et al.*, 1993)과는 상반되는 결과를 보였다.

DNA에 대한 손상은 DNA의 절체회복률을 조사 하므로서 알아 볼 수 있는데 그 조사방법으로는 비주기성 DNA 합성량의 측정법이 널리 사용되고 있다(Regan *et al.*, 1971). 본 연구에서는 1 mM 농도까지는 대조군보다 증가하여 비주기성 DNA 합성이 활발히 이루어지고 있는 것으로 나타났는데 이는 손상받은 DNA의 회복을 위한 것이 아닌가 생각된다. 그러나 3 mM 농도 이상에서는 급격한 감소를 보여 대조적이었으며, 세포내 유전물질 합성계에 심한 손상을 주는 것으로 생각되고, 한편으로 3 mM 농도 이상에서는 많은 세포가 사멸하여 세포수가 매우 적기 때문에 비주기성 DNA 합성량도 매우 적은 것으로 생각된다.

세포내 유리칼슘량의 변화는 세포간 연결이나 성장에 영향을 주거나 protein kinase C(PKC)와 phosphokinase 등과 같은 여러 효소의 활성화에도 변화를 초래한다고 한다. 본 연구에서 납을 처리한 세포에서 유리칼슘의 양이 증가하였다가 다시 감소하였는데 이는 납이 직접 칼슘채널을 자극하는 것으로 생각되고 선행연구들(Busselberg *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1991; Busselberg *et al.*, 1993; Bressler *et al.*, 1994)에서의 결과와 일치하였고, 세포내 유리칼슘의 증가는 apoptosis나 프로그램된 세포의 사멸에 앞서서 일어나는 현상(McKonkey *et al.*, 1989a,

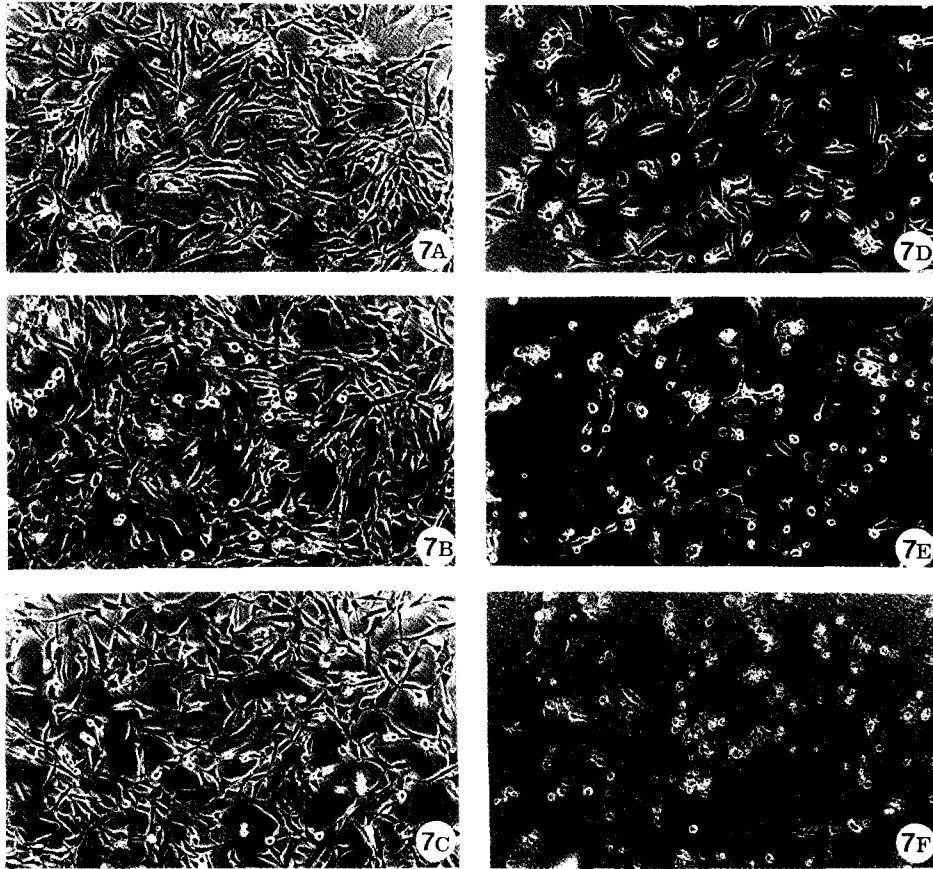


Fig. 7. Inverted photomicrographs of Balb/c mouse 3T3 cells in control medium (A). Cells were cultured for 24 hours in the medium containing 10 μ M (B), 100 μ M (C), 1 mM (D), 3 mM (E) and 5 mM (F) of lead nitrate. These shows the dose-dependent decrease in cell number and processes compared with control. X 400

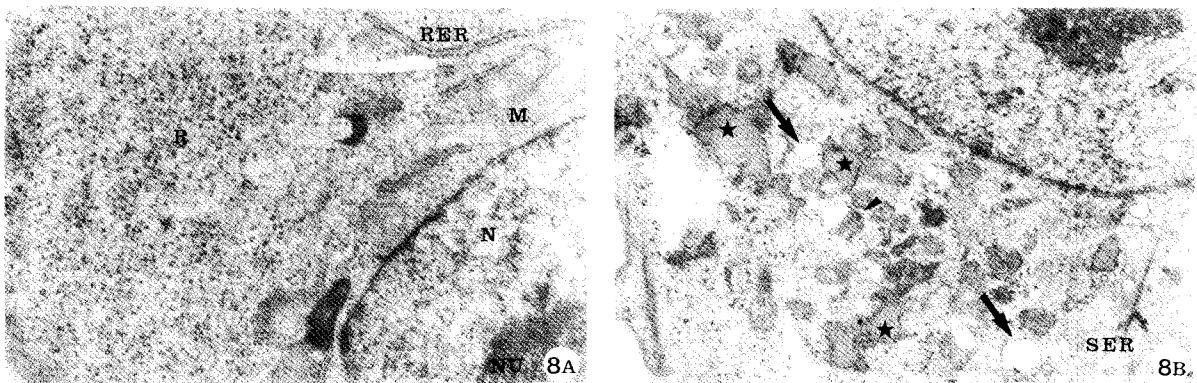


Fig. 8. A. An electron micrograph of Balb/c mouse 3T3 cell in the control medium. It shows nucleus (N), nucleolus (NU), mitochondria(M), free ribosomes (R) and rough endoplasmic reticulum (RER). X 20,000 **B.** An electron micrograph of Balb/c mouse 3T3 cell in the medium containing 1mM of lead nitrate for 24 hours after cells were grown in control medium for 24 hours. It shows dilated endoplasmic reticulum (stars), destructed mitochondria (arrow head), many vacuoles (arrows) and smooth endoplasmic reticulum (SER). X 20,000

b)이라는 보고로 미루어 납의 독성으로 인하여 세포내 유리 칼슘이 일시적으로 증가하고, 그 결과 세포내 탈분극과 함께 칼슘채널의 변화가 일어나고 이러한 변화가 세포를 사멸케 하는 것으로 생각되나 보다 자세한 기전은 칼슘채널과의 관계를 통하여 추후 연구를 계속하여야 할 것으로 생각된다.

광학현미경적 관찰 결과 납의 농도 증가에 따라 세포형태가 타원형 또는 원형으로 변화하였으며 세포수 또한 감소하는 경향을 보였고 세포돌기도 감소하였으며 5 mM 처리군에서는 거의 모든 세포가 사멸하였다. 이러한 변화는 중금속 등의 독성물질 처리시에 공통적으로 나타나는 소견(Chung *et al.*, 1992, 1993)으로서 독성물질에 의하여 세포의 분화 및 분열이 저해받고 있음을 시사한다.

전자현미경적 관찰 결과 1 mM 농도에서 조면내형질망의 조가 확장되었고 다수의 공포와 소수의 활면내형질망이 출현하였다. 이러한 형태학적인 변화들은 Chung 등(1992) 및 Choi 등(1993)의 보고와 일치하는 소견이었다. 일반적으로 독성물질의 영향을 받은 세포들의 전자현미경적 소견에서 조면내형질망과 사립체 등의 파괴가 관찰되고 이와 수반하여 용해소체나 공포의 증가가 관찰되는데(Choi *et al.*, 1993) 본 연구에서는 조면내형질망의 조 확장이 두드러졌으며, 공포도 다수 출현하여 세포소기관의 파괴를 시사하였으며, 활면내형질망이 소수 관찰되어 해독작용과도 관련이 있을 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 납이 조면내형질망의 형태학적인 변화를 초래하여 기능적인 변화가 오고, 이로 인하여 세포가 사멸에 이르는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 납이 생쥐 3T3 세포에 미치는 영향은 유전물질에 가장 심한 손상을 주고 세포소기관에도 독성효과를 미치며, 특히 조면내형질망의 변성으로 인하여 단백질 합성에 치명적인 손상을 주는 것으로 생각된다.

결 론

생쥐 3T3 cell line을 DMEM에서 배양한 후 각 농도별로 조제된 lead nitrate를 배양액에 첨가하여 일정시간 배양한 후 각 종분석을 실시하였으며, 결과를 대조군과 비교조사하여 납의 독성을 검정하였다. 독성분석 방법으로는 NR정량, MTT정량, LDH정량, 단백질 정량, DNA합성률 조사 및 비주기성 DNA합성률 조사 등을 실시하였고, 세포내 유리 칼슘농도를 측정하였다. 이러한 기능적인 독성 검정과 함께 광학 및 전자현미경적 관찰을 병행 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. NR 및 MTT 흡광도는 처리한 납의 농도가 증가함에 따라 감소하였으며, NR₅₀ 및 MTT₅₀ 농도는 각각 3.4 mM과 1.5 mM로 나타났다.

2. 배양액내로 유출된 LDH양은 납 농도 증가에 비례하였으며, 5 mM 농도에서 대조군에 비하여 335%로 증가하였다.

3. 총단백질량은 납의 농도 증가에 따라 감소하였으며, 2 mM 처리군에서 대조군의 1/2로 감소하였다.

4. DNA합성률은 납 농도 증가에 따라 감소하였으며, 3 mM 및 5 mM에서 현저한 감소를 보였다.

5. 비주기성 DNA합성률(UDS)은 1 mM까지는 증가하였고, 3 mM과 5 mM 농도에서 현저한 감소를 보였다.

6. 세포내 칼슘농도를 측정된 결과 1 mM 농도에서 세포내 유리칼슘의 농도가 대조군에 비하여 현저히 증가 하였다.

7. 광학현미경적 관찰결과 납의 농도 증가에 따라 세포수와 돌기들이 감소하였으며, 전자현미경적 관찰결과, 1 mM농도에서 세포질내에 다수의 공포가 출현하였고, 조면내형질망의 조가 확장 되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 고농도(3 mM이상)의 납 처리시 유전물질에 심한 손상을 주었고 세포소기관과 칼슘 채널에도 영향을 미쳐 세포독성을 나타내는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ahrens, F.A. and D.T. Vistica, (1977): Microvascular effects of lead in the neonatal rat, *Exp. Mol. Pathol.* **26**: 129-138.
- Borenfreund, E. and J.A. Puerner, (1984): A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90), *J. Tissue Culture Meth.* **9**: 7-9.
- Bressler, J., S. Forman, and G.W. Goldstein, (1994): Phospholipid metabolism in neural microvascular endothelial cells after exposure to lead *in vitro*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **126**: 352-360.
- Busselberg, D., M.L. Evans, H. Rahmann, and D.O. Carpenter, (1991): Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of Aplysia neurons, *J. Neurophysiol.* **65**: 786-795.
- Busselberg, D., M.L. Evans, H.L. Haas, and D.O. Carpenter, (1993): Blockade of mammalian and invertebrate calcium channels by lead. *Neurotoxicology.* **14**: 249-258.
- Carmichael, J.W., W.G. Degraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna, and J.B. Michell, (1987): Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.* **47**: 936-942.
- Choi, M.K., J.M. Kim, Y.I. Kim, H.J. Kim, and Y.T. Chung, (1993): A morphological study on the cytotoxic effect of some heavy metals on cultured mouse fibroblasts, *Wonkwang J. Environ. Sci.* **2**: 33-47.
- Chung, Y.T., S.T. Park, M.K. Choi, J.J. Kim, J.M. Kim, B.K. Choi, D.S. Han, W.H. Woo, and I.S. Wui, (1992):

- A study on the cytotoxicity of several heavy metals(Cr, Hg and Cd) on cultured fibroblasts *In vitro*, *Korean J. Toxicol.* **8**: 119-129
9. Chung, Y.T., S.T. Park, M.K. Choi, J.J. Kim, Y.J. Mun, W.H. Woo, D.S. Han, B.K. Choi, and J.T. Soh, (1993): A study on the cytotoxicity of cadmium *in vitro*, *Korean J. Toxicol.* **9**: 45-60.
 10. Evans, M.L., D. Busselberg, and D.O. Carpenter, (1991): Pb²⁺ blocks calcium, currents of cultured dorsal root ganglion cells, *Neurosci Lett.***129**: 103-106.
 11. Friedberg, E.C., (1985): DNA damage. *In*: DNA Repair, Freeman, New York, 1-78.
 12. Gennart, J.P., J.P. Buchet, H. Roels, P. Ghyselen, E. Ceulemans, and R. Lauwerys, (1992): Fertility of male workers exposed to cadmium, lead, or manganese, *Am. J. Epidemiol.* **135**: 1208-1219.
 13. Goyer, R.A. and B.C. Rhyne, (1973): Pathologic effects of lead, *Int. Rev. Exp. Pathol.* **12**: 1-7.
 14. Hass, G.M., D.V.L. Brown, R. Einsenstein, and A. Hemmens, (1964): Relations between lead poisoning in rabbit and man, *Am. J. Pathol.* **45**: 691-715.
 15. Kim, J.M., K.W. Kim, and Y.T. Chung, (1990): A study on the cytotoxicity of cytosine arabinoside and vinblastine on cultured mouse fibroblasts, *Korean J. Toxicol.* **6**: 29-40.
 16. Kim, J.S., C.B. Lee, H.H. Lee, and S.D. Park, (1989): Replication inhibition and its recovery process in Chinese hamster ovary cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *Environ. Mutagens & Carcinogens* **2**: 63-72.
 17. Kobayashi, N., (1971): Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments.
 18. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, (1951): Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 19. Mckonkey, D.J., P. Hartzell, P. Nicotera, and S. Orrenius, (1989a): Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes, *FASEB J.* **8**: 1843-1849.
 20. Mckonkey, D.J., P. Nicotera, P. Hartzell, G. Bellomo, A. H. Wyllie, and S. Orrenius, (1989b): Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration, *Arch. Biochem. Biophys.* **269**: 365-370.
 21. Moses, R.L. and W.C. Claycomb, (1982): Ultrastructure of terminally differentiate adult rat cardiac muscle cells in culture, *Am. J. Anat.* **164**: 113-131.
 22. Mosmann, T., (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* **65**: 55-63.
 23. Park, S.T. and Y.T. Chung, (1986): The effect of mercury divalent on the early development of mouse embryos *in vitro*, *J. Wonkwang Med. Sci.* **2**: 25-34.
 24. Pentschew, A., (1965): Morphology and morphogenesis of lead encephalopathy, *Acta. Neuropathol.* **5**: 133-160.
 25. Regan, J.D., R.B. Setlow, and R.D. Ley, (1971): Normal defective repair of damaged DNA in human cells: a sensitive assay utilizing the photolysis of bromodeoxyuridine, *Pro. Natl. Aca. Sci. USA* **68**: 708-712.
 26. Shell, W.E., (1973): Early estimation of myocardial damage in conscious dogs and patients with evolving acute myocardial infarction, *Clin. Invest.* **52**: 2579-2584.
 27. Storeng, R. and J. Jonsen, (1980): Effect of nickel chloride and cadmium acetate on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*, *Toxicology* **17**: 183-187.
 28. Takahashi, K., Y. Fujita, T. Mayumi, T. Hama, and T. Kishi, (1987): Effect of adriamycin cultured mouse embryo myocardial cells, *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 326-334.
 29. U.S. Environmental Protection Agency(USEPA): Air quality criteria for lead. June 1986 and Addendum, September 1986. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC. EPA 600/8-83-018F
 30. White, R.F., R.G. Feldman, and P.H. Travers, (1990): Neurobehavioral effects of toxicity due to metals, solvents, and insecticides, *Neuropharmacol.* **13**: 392-412.