

생쥐 배양섬유 모세포주 L929에 미치는 중금속(Cd, Ni, Zn)류의 세포독성에 관한 연구

이종빈 · 나명석 · 황영진 · 위성욱 · 최진희 · 김선희 · 유춘만 · 김재민*
전남대학교 자연과학대학 생물학과, *동신전문대학 안경광학과

A Study on the Cytotoxic Effect of Heavy metals (Cd, Ni, Zn) on Cultured Mouse Fibroblast L929 Cell line

Jong-Bin Lee, Myung-Suk Ra, Young-Jin Hwang, Seong-Uk Wui, Jin-Hee Choi,
Sun-Hee Kim, Chun-Man Yu and Jae-Min Kim*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Chonnam National University
*Department of Ocular Optics, Dongshin Junior College

ABSTRACT

The study on the cytotoxicity of heavy metals was carried out to evaluate the cytotoxic effect of those on mouse L929 fibroblast cell in 96-well microtiter plates. The cytotoxicity was assayed by the neutral red, tetrazolium MTT, total protein, micronuclei test. The cytotoxicity of the heavy metals by neutral red and tetrazolium MTT was showed in order, cadmium > zinc > nickel for the cationic metals tested. The effect of metal-metal interaction on the cytotoxicity showed a marked reduction of cadmium toxicity by zinc, to a lesser degree, by nickel. The amount of total protein in treated group added heavy metals was less than that of the control and treated cadmium alone was less than those of combination with nickel or zinc. At midpoint cytotoxicity values of heavy metals, the frequency of micronuclei on the cell treated heavy metals was more than that of control and treated cadmium alone was more than those of combination with nickel or zinc. From those results, it could be suggested that the heavy metals decreased the viability of mouse fibroblast L929 cells in a concentration-dependent manner and have cytogenic toxic effects, but mixed group decreased the cytotoxic and cytogenic toxicity on L929 cells.

Keywords : Heavy metal, neutral red(NR), MTT, microcnucleus, L929 cells

I. 서 론

최근 급속한 경제 성장과 산업의 발달로 발생하는 많은 오염물질들이 생태계를 파괴하고 자연의 동, 식물 뿐만 아니라 인간의 건강을 크게 위협하고 있다. 이러한 오염물질 중 특히, 중금속은 생물체의 여러 흡입경로를 통해 체내에 흡수되어지면 거의 배설되지 않고 생체내에 축적되어 만성독성 및 급성독성을 야기시켜 생물체의 형태 및 생리적 변화를 유발하거나 치명적으로 작용하는 것으로 알려지고 있다.^{1,2)} 이러한 중금속중 카드뮴은 독성이 강하고 특히, 호흡기

계의 질환을 유발하여 급성 폐렴과 호흡기 부종을 일으키며, 심장혈관계, 골격계 및 순환계 등에 질환을 유발시키며,³⁾ 1960년대 일본의 Itai-Itai병의 원인으로 밝혀졌다.⁴⁾ 이러한 카드뮴을 chick나 hen에 투여했을 때 골격과 근육, 신장, 간, 심장, 혈관계, 대뇌, 소뇌 등에 축적되며, 난에 축적되어 몸 밖으로 배출되기도 한다.^{5,6)} 계배의 배양시 골격조직에 노출되면 collagen과 미네랄 합성이 감소되며, 깃털 형성에 기형을 초래하기도 한다. 또한 mouse의 난자-난구 복합체의 분산과 성숙에도 저해를 나타내며, 배양 계배 근세포의 융합지수와 총단백질량을 감소시킨다.⁷⁾

니켈은 생산, 사용 뿐만 아니라 무기질의 처리과정을 통해 환경오염을 일으키는 원인이 되는데 주로

*이 논문은 1994년도 전남대학교 학술연구비에 의해 연구되었음.

합금과 금속도금, 촉매, 건전지, 살균제의 구성성분으로 사용되어지며 특히 식품 저장용기에 사용은 식품에 오염을 일으킬 수 있다. 최근 다른 2가 양이온과 같이 니켈은 DNA와 반응하고 고농도인 경우 시험관내 변이원성 실험에서 DNA 손상을 유발하며, 산업적으로 노출시 피부염을 유발하고 신장이상과 현기증, 호흡곤란을 나타낸다.⁸⁾

아연은 일반적으로 도금된 파이프, 황동 등의 배관재에 많이 사용되며 자연환경에서 비교적 풍부한 원소이고 중요한 영양소이다.⁹⁾ 아연은 인간과 동물 모두에게 필수적인 원소이며, alkaline phosphatase, carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase 등을 포함하는 여러 효소계의 작용에 꼭 필요하다.¹⁰⁾ 아연은 비교적 독성이 없는 것으로 알려졌으나 아연이 많이 사용되는 배관재등에서 지속적으로 침출되어질 수 있다.¹¹⁾ 이러한 침출로 인한 만성중독시 구토, 탈수, 전해질 불균형, 복통, 구역질, 현기증, 근육 조정 불능 등을 나타내며, 염화아연에 의해 신장장애를 일으킨다.¹²⁾ 또한 아연은 신진대사를 방해하는 물질로 알려져 있어 많은 양을 섭취하면 구리, 철의 신진대사를 방해하며, 또한 카드뮴의 신진대사를 방해하여 독성효과 억제를 기대할 수 있다.¹³⁾

이 처럼 중금속은 생체에 여러가지 독성을 나타내고 있어 중금속이 생체에 미치는 영향에 관한 많은 연구가 대부분 동물을 이용한 *in vivo*에서 시행되었으나 최근에는 세포 배양기술을 이용하여 *in vitro*에서 세포의 독성을 시험하는 방법과 분자수준에서의 독성을 조사하는 실험이 진행되고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 이러한 세포 배양기술을 이용한 세포독성 실험에서 세포독성을 검정하는 방법으로 colorimetric assay법인 NR(neutral red), tetrazolium MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]법이 개발되었는데, NR분석법은 세포질내의 용해소체에 축적된 NR을 추출하여 흡광도를 측정하는 것으로서 용해소체에 대한 독성을 규명할 수 있는 방법이고, MTT분석법은 노란색의 용해성 MTT tetrazolium salt가 사립체의 succinic dehydrogenase에 의해 환원되어 파란색의 불용성 MTT formazon을 생성하는데 이 MTT formazon을 용매로 용해시켜 흡광도를 측정하는 것으로서 사립체에 대한 독성을 규명하는 방법이다. 이와 같은 분석법은 세포독성의 평가를 쉽게 할 수 있어 매우 효과적이다.¹⁷⁻²¹⁾

따라서 본 실험은 이들 중금속들의 독성정도를 배

양된 세포를 이용하여 colorimetric assay(NR, MTT)법, 총단백질량과 세포의 분열시 염색체에 미치는 영향을 조사할 수 있는 미소핵 검사방법 등을 통해 중금속들의 독성정도를 비교하고, 중금속과 중금속들에 작용하는 독성효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 및 세포배양

본 실험에 사용된 세포는 mouse fibroblast의 일종인 L929 cell line을 영남대학교 의과대학 해부학 교실로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 세포 배양액은 α -MEM medium(Gibco)에 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco)와 fungizone(30 μ l/ml) 및 antibiotics(10 μ l/ml)를 혼합하여 사용하였다. 세포 배양은 37°C, 5% CO₂로 조정된 incubator(Forma Scientific, U.S.A)내에서 배양하였으며, 배양액은 3일마다 교환하였다. 배양된 세포는 1x trypsin-EDTA(Gibco)로 부유시킨후 0.4% trypan blue로 염색하여 혈구계산기(hemocytometer)로 세포수를 산정하였다.

2. 중금속 처리

본 실험에 사용한 중금속은 CdCl₂, NiCl₂·6H₂O, ZnCl₂이며 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. 중금속은 멸균된 DDW에 녹인 후 α -MEM medium에 희석하여 1M의 Stock solution으로 만들어 냉암소에 보관하였으며 사용당일 직접 배양액을 첨가하여 NR₅₀, MTT₅₀, NR₅₀, MTT₅₀ 농도가 되도록 희석하여 사용하였다.

3. 세포 소기관 독성 검정

1) Neutral Red (NR) 정량

Borenfreud와 Puerner¹⁸⁾의 방법에 의하여 세포를 5×10³ cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 각각 여러농도의 중금속이 포함된 배양액으로 교환하여, 다시 24시간동안 배양하고, 50 μ l/ml의 neutral red(Sigma Chemical Co., U.S.A)가 포함된 배양액을 37°C incubator에 overnight 시킨 후 well당 200 μ l/ml씩 넣어 다시 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2-3회 세척하여 4% formaldehyde-1% CaCl₂(1:1)를 well당 100 μ l/ml씩 넣어 세포를 고정하고 1% glacial acetic acid-50%

ethanol을 well당 200 μ l/ml씩 넣어 15분간 실온에 방치하여 3시간동안 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 값은 microplate reader (Molecular Devices, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

2) MTT 정량

Mosmann²²⁾의 방법에 의하여, 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 세포를 각각의 중금속이 첨가된 배양액에서 24시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 50 μ l/ml가 포함된 배양액을 well당 200 μ l씩 넣은 후 다시 3시간동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 dimethyl-sulfoxide (DMSO; Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 200 μ l/well씩 넣어 5분간 실온방치하여 formazon을 용해한 후, microplate reader(Molecular Devices, U.S.A.)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

3) 독성농도 결정

NR과 MTT농도 결정을 위하여 흡광광도 계수가 대조군의 90%와 50%인 것을 각각 initialpoint cytotoxicity value(ICV; NR₉₀과 MTT₉₀)와 midpoint cytotoxicity value(MCV; NR₅₀, MTT₅₀)로 하였으며 얻어진 NR₉₀과 MTT₉₀값 중 낮은 값을 ICV농도로 NR₉₀, MTT₉₀값 중 낮은 농도의 값을 MCV값으로 정하였다. 모든 실험은 MCV값에서 실시하였다.²⁰⁾

4. 단백질 정량

단백질 정량을 위한 세포주는 직경 100 mm세포 배양용 petri dish(Nunc)에 5×10^5 cell/dish가 되도록 세포를 분주하고 배양액을 10 ml를 넣어 배양하였고, 분주한 세포수가 24시간이 경과한 다음 중금속이 MCV의 농도로 함유된 배양액에서 24시간 다시 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척하고 cell scraper(Nunc)로 긁어 모은 후 ultrasonicator (Branson, U.S.A.)로 세포를 마쇄한 다음 Brad-

ford²³⁾의 방법에 따라 분광광도계(Gilford, U.S.A)를 이용 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준단 백질로는 일정 농도의 bovine serum albumin (Sigma, U.S.A)을 사용하였다.

5. Micronuclei test

미소핵소체 검사는 Fenech와 Morley²⁴⁾의 cytokinesis-block method를 이용하였다. 세포를 5×10^5 cells/flask로 되게 하여 25 cm² flask에 24시간 배양한 후 각 중금속의 MCV농도가 포함된 배양액에서 24시간 배양한 다음 PBS로 3회 세척하고 cytokinesis를 block시키기 위하여 2 μ l/ml의 cytochalasinB (Sigma, U.S.A.)가 포함된 배양액에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 1x trypsin으로 세포를 부유시키고 약간의 저장액인 0.72% NaCl로 10분간 처리한 후 methanol/glacial acetic acid (3:1)의 Carnoy's 고정액으로 고정하여 슬라이드 위에 세포를 떨어뜨려 확산시킨 후 공기건조시켜 2% Giemsa로 염색한 다음 400배 시야에서 cytokinesis-blocked (CB)cell의 미소핵 수를 산정하여 대조군과 비교하였다.

6. 통계처리

본 실험의 자료에 대한 통계처리는 SAS(Statistical Analysis System) package를 이용하여 ANOVA test로 시행하였고 유의수준 $p < 0.05$ 의 범위에서 실시하였다.

III. 결 과

1. 세포 소기관 독성 검정

1) NR 정량

중금속이 여러 농도로 포함된 배양액에서 L929 cell를 24시간 배양한 후 NR의 흡광도를 측정하고 대조군과 비교한 결과 카드뮴처리군은 0.02 mM에서 대조군의 NR₉₀, 0.05 mM에서 NR₅₀의 흡광도를

Table 1. Cytotoxicity of heavy metals as determined by the neutral red and tetrazolium MTT assays.

	NR assay		MTT assay	
	NR ₉₀	NR ₅₀	MTT ₉₀	MTT ₅₀
CdCl ₂	0.02	0.05	0.02	0.06
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.40	0.76	0.40	0.80
ZnCl ₂	0.14	0.24	0.17	0.27

*Concentration(mM) required to reduce absorbance by 10%(NR₉₀ and MTT₉₀) and by 50%(NR₅₀ and MTT₅₀).

나타내었고, 니켈처리군은 0.40 mM과 0.76 mM에서, 아연처리군은 0.14 mM과 0.24 mM에서 각각 대조군의 NR₅₀과 NR₇₀의 흡광도를 나타내었다 (Table 1).

2) MTT 정량

여러 농도별로 중금속류가 포함된 배양액에서 24시간 배양한 다음 MTT의 흡광도를 측정한 다음 대조군과 비교한 결과 카드뮴처리군은 0.02 mM과 0.06 mM에서 각각 대조군에 비해 MTT₅₀과 MTT₇₀의 흡광도값을 나타냈고, 니켈처리군은 0.4 mM, 0.8 mM을 아연처리군은 0.17 mM과 0.27 mM에서 각각 대조군의 MTT₅₀과 MTT₇₀의 흡광도를 나타내었다(Table 1).

3) 카드뮴과 중금속의 혼합처리

카드뮴과 다른 중금속을 동시에 처리했을 때의 세포독성 효과를 알아보기 위해 카드뮴 0.03 mM (NR₈₀)와 0.05 mM(NR₅₀; MCV농도)에 대해 본 실험에서 세포에 독성을 나타내지 않은 아연(<0.12 mM; ICV이하)과 니켈(<0.30 mM; ICV이하)의 농도를 동시 처리하여 단독으로 처리한 군과 동시에 처리한 군의 독성을 비교한 결과 카드뮴 0.03 mM에 아연 0.12mM을 동시처리한 군이 카드뮴 0.03 mM

의 단독처리군(NR₈₀)에 비해 약간의 세포독성 억제 효과(NR₉₅)를 나타내었다. 카드뮴 0.05 mM과 아연 0.12 mM를 동시에 처리한 경우는 카드뮴 단독처리군(NR₅₀)에 비해 NR₇₀정도의 세포독성 억제효과를 나타내었다.

카드뮴 0.03 mM에 니켈 0.3 mM을 동시처리한 군은 카드뮴 단독처리군에 비해 NR₈₇정도의 억제효과를 나타내었고 카드뮴 0.05 mM과 니켈 0.3 mM의 동시 처리군은 카드뮴 단독처리군에 비해 NR₆₀정도의 억제효과를 나타내었다(Fig. 1).

2. 총 단백질량의 변화

1) 중금속 단독 처리군

배양된 세포를 MCV농도의 중금속으로 처리한 결과 카드뮴처리군의 총 단백질량은 MCV농도인 0.05 mM에서 대조군의 흡광도에 비해 50.7%이었고 아연처리군은 0.24 mM에서 69.5%, 니켈처리군은 0.76 mM에서 65.2%이었다(Fig. 2).

2) 카드뮴과 중금속의 혼합처리군

카드뮴에 대한 중금속과의 관계에서 카드뮴 0.03 mM을 처리한 경우는 대조군의 총단백질량의 흡광도에 비해 63.3%이었고 카드뮴 0.03 mM과 아연 0.12 mM을 동시에 처리한 경우는 79.7%이었고 카드뮴 0.05 mM과 아연 0.12 mM을 동시에 처리한

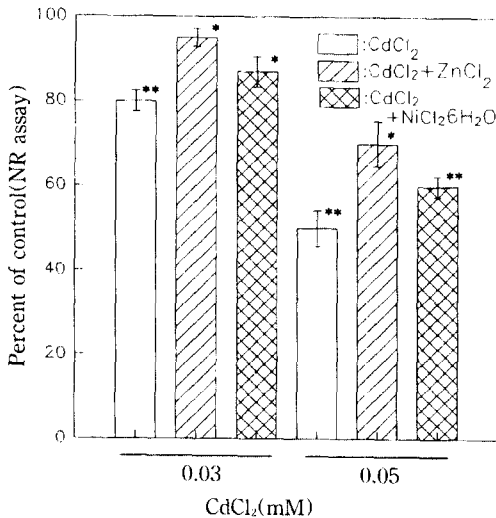


Fig. 1. Comparative cytotoxicity of cadmium incubated for 24 h with L929 cells alone or in combination with 0.12mM of ZnCl₂, 0.30 mM of Ni₂Cl₂·6H₂O as determined by the neutral red assay. The Data are presented as the arithmetic mean percent of the controls ± S.D. *Statistically significant at p<0.05. **Statistically significant at p<0.01.

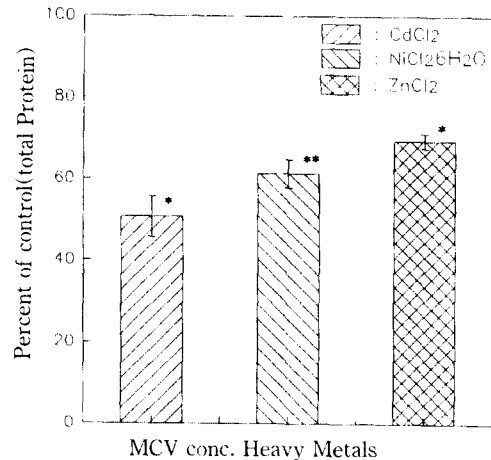


Fig. 2. Comparative cytotoxicity of MCV conc. heavy metals incubated for 24 h with L929 cells as determined by the total protein assay. The Data are presented as the arithmetic mean percent of the controls ± S.D. *Statistically significant at p<0.05. **Statistically significant at p<0.01.

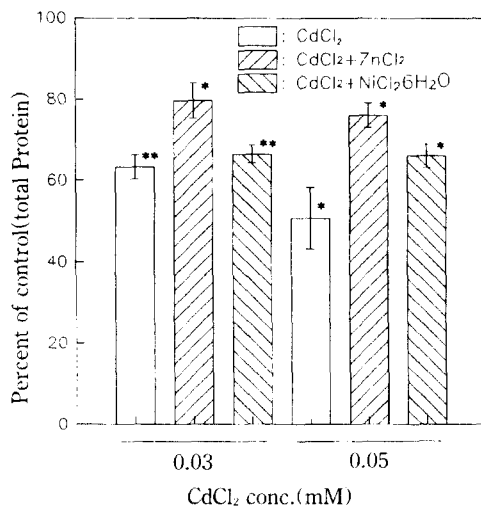


Fig. 3. Comparative cytotoxicity of 0.03 mM, 0.05 mM cadmium incubated for 24h with L929 cells alone or in combination with 0.12 mM of ZnCl₂, 0.30 mM of NiCl₂·6H₂O as determined by the total protein assay. The Data are presented as the arithmetic mean percent of the controls \pm S.D. *Statistically significant at $p < 0.05$. **Statistically significant at $p < 0.01$.

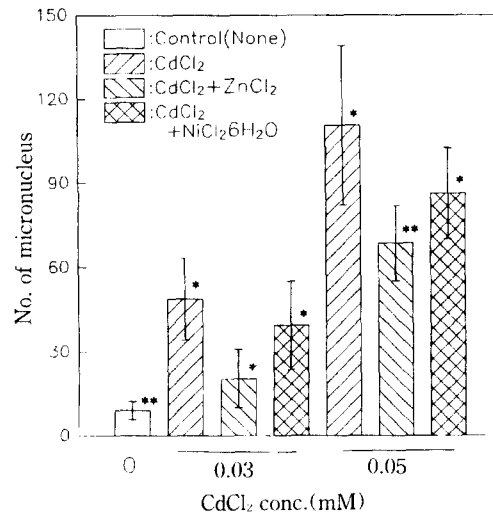


Fig. 4. The frequency of micronuclei of 0.03 mM, 0.05 mM cadmium incubated for 24 h with L929 cells alone or in combination with 0.12 mM of ZnCl₂, 0.30 mM of NiCl₂·6H₂O as determined by the micronucleus assay. The Data are presented as the arithmetic means \pm S.D. *Statistically significant at $p < 0.05$. **Statistically significant at $p < 0.01$.

Table 2. Frequency of micronuclei induced by heavy metals in L929 cells.

	Dose (mM)	No. of micronuclei/1,000 binucleated cells (Mean \pm SD)
None	0	9.0 \pm 3.24**
CdCl ₂	0.05	110.6 \pm 28.5*
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.76	73.6 \pm 18.5*
ZnCl ₂	0.24	85.8 \pm 15.8

The Data are presented as the arithmetic means \pm S.D.

*Statistically significant at $p < 0.05$.

**Statistically significant at $p < 0.01$.

경우는 76.1%이었다. 카드뮴 0.03 mM과 니켈 0.30 mM을 동시에 처리한 경우는 66.5%이었고 카드뮴 0.05 mM과 니켈 0.30 mM를 동시에 처리한 경우는 66.1%이었다(Fig. 3).

3. Micronuclei test

1) 중금속 단독 처리군

Cytokinesis-blocked(CB) cell인 이핵세포를 얻기 위해 5×10^5 cells/flask로 24시간 배양된 세포에 2 μ l/ml의 cytochalasin B를 첨가하여 배양한 결과 얻어진 CB cell에서 미소핵 수를 관찰하였다. 대조

군에 있어서 미소핵 수는 1,000개의 세포당 평균 9.0 \pm 3.24개로 나타났으며, 카드뮴처리군은 평균 110.6 \pm 28.5개, 아연처리군은 85.8 \pm 15.8개, 니켈처리군은 73.6 \pm 18.5개로 나타났다(Table 2).

2) 카드뮴과 중금속의 상호관계

카드뮴과 아연, 니켈을 동시에 처리했을 때와 카드뮴의 단독처리군과의 미소핵 출현 빈도는 카드뮴 단독처리군의 0.03 mM에서는 평균 48.7 \pm 14.5개이었고, 0.05 mM에서는 평균 110.6 \pm 28.5개이었는데 아연 0.12 mM(<ICV)과 카드뮴 0.03 mM를 동시에 처리한 군은 평균 20.3 \pm 10.4이었고, 카드뮴 0.05 mM과 아연 0.12 mM를 동시처리한 군은 평균 68.5 \pm 13.3개로 동시처리군이 단독처리군에 비해 미소핵 수가 감소되는 경향을 보여 주었다. 또한 카드뮴 0.03 mM과 니켈 0.30 mM을 동시처리한 군은 평균 39.4 \pm 15.4개, 카드뮴 0.05 mM과 니켈 0.30 mM을 동시에 처리한 군의 미소핵의 수는 86.2 \pm 16.2개로 단독처리군에 비해 약간의 감소를 나타내었다(Fig. 4).

IV. 고 찰

중금속이 세포에 미치는 독성을 알아보기 위해

mouse fibroblast의 L929 cell line을 이용하여 NR, MTT법을 사용 실시하였다. NR, MTT방법은 *in vivo*의 동물실험에 비해 훨씬 경제적이고 간편한 방법으로 분광광도계와 microplate reader등을 이용하여 세포독성을 간단히 정량적으로 검정할 수 있는 방법이며 또한, 미국 국립암연구소에서 독성물질 검정을 위한 좋은 방법으로도 제안한 바 있다.²⁵⁾

본 실험에서 카드뮴의 NR₅₀과 MTT₅₀농도는 모두 0.02 mM이었고 NR₅₀과 MTT₅₀은 0.05 mM과 0.06 mM로 나타났으며 니켈의 경우 NR₅₀과 MTT₅₀농도는 0.40 mM, 0.40 mM, NR₅₀과 MTT₅₀은 0.76 mM, 0.80 mM이었고, 아연의 경우 NR₅₀과 MTT₅₀농도는 0.14 mM, 0.17 mM, NR₅₀과 MTT₅₀은 0.24 mM, 0.27 mM이었다. 이러한 실험결과는 카드뮴에 있어서 blugill(BF-2) cell line을 이용 중금속 세포독성을 검정한 Babich등²⁶⁾에 의해 보고된 결과와 비교해 볼 때 아연과 니켈을 제외한 나머지 중금속류에서는 NR₅₀과 NR₅₀값에 있어서 유사하였으나, 아연의 경우는 NR₅₀과 NR₅₀에서 모두 약간 높게 나타났다. 니켈의 경우는 NR₅₀에서는 유사하나 NR₅₀에서는 Babich등²⁶⁾의 결과에 비해 매우 낮게 나타났다. 또한 이러한 결과중 카드뮴의 경우 정 등^{27,28)}과 Borenfreund등¹⁹⁾의 결과보다 약간 높은 농도를 보여주는데 이는 Borenfreund등¹⁹⁾이 alcohol류를 통한 실험에서 HTD(highest tolerated dose)값에 있어 cell line간에 현저한 값차이를 나타낸다는 보고와 세포간에는 실험실내의 배양조건에 적응과 외적 환경의 반응에 따라 약간의 차이를 보인다는 Taub²⁹⁾의 결과와 비교할 때 본 실험의 결과에 나타난 약간의 독성농도값의 차이도 이와 유사한 결과로 해석되어진다.

본 실험의 결과 여러 농도의 중금속으로 처리하여 얻어진 NR₅₀과 MTT₅₀ 값중 낮은 값을 ICV농도로 NR₅₀, MTT₅₀ 값중 낮은 농도의 값을 MCV값으로 정하였는데 MTT측정값 보다 NR의 측정값이 더 낮은 중금속농도에서 ICV와 MCV가 결정되었다. 그 결과 중금속간의 ICV와 MCV의 세포독성정도는 카드뮴>아연>니켈 순으로 독성을 나타내었다. 이러한 결과는 Borenfreund등³⁰⁾의 NR, MTT비교의 결과와 유사한 경향을 보였다. 카드뮴과 아연, 니켈을 동시에 처리했을 때와 카드뮴 단독처리했을 때의 세포독성정도를 알아본 결과 카드뮴 0.03 mM(NR₅₀), 0.05 mM(NR₅₀) 각각과 아연 0.12 mM를 동시에 처리한 경우는 카드뮴 단독처리군에 비해 세포독성 억

제효과가 크게 나타났고 또한 카드뮴 0.03 mM, 카드뮴 0.05 mM에 니켈 0.3 mM을 동시에 각각 처리한 군도 카드뮴 단독처리군에 비해 억제효과가 있었다. 카드뮴에 대한 니켈을 동시처리한 군의 세포독성효과는 Borenfreund(1986)등의 BALB/c mouse 3T3 fibroblast를 이용한 실험과 곰팡이(*Aspergillus niger*)를 이용 카드뮴에 대한 니켈의 억제효과를 보고한 결과와 유사하였으나 아연을 처리한 군보다는 독성감소 효과가 낮게 나타났다. 이러한 결과는 분리된 간세포를 이용하여 아연의 존재시 카드뮴에 의한 세포의 독성이 감소됨을 관찰한 Stacey와 Klaassen³¹⁾의 실험과 카드뮴과 아연이 일반적인 운반계(carrier system)에서 경쟁적인 저해작용을 한다^{32,33)}는 것과 유사한 경향을 나타내었다.

총 단백질량은 세포에 미치는 중금속 독성 농도의 증가에 따라 감소되는 결과를 나타내었다. 카드뮴 0.03 mM, 0.05 mM의 단독처리군의 총 단백질량은 대조군의 51%, 64%를 나타내었으나 아연 0.12 mM과 동시 처리한 경우에는 80%, 76%로 증가되었다. 카드뮴 0.03 mM, 0.05 mM에 니켈 0.30 mM을 동시 처리한 경우에는 67%, 66%로 아연처리군에 비해 적게 증가되었다. 이는 세포소기관에 미치는 약제의 농도와 일치하게 감소한다^{27,34,35)}는 결과와 유사하였다.

Micronuclei란 세포가 분열하는 동안 낭핵으로 흡수되지 못한 중심체가 없는 염색체 조각이나 염색체 전부를 말하며, 어떤 약제나 물질에 의하여 염색체가 손상되었을 경우 Wright-Giemsa 염색시에 보라 빛 또는 검정빛의 작은 원형의 점으로 관찰된다.³⁶⁾⁻³⁸⁾ micronuclei test에서는 Countryman과 Heddle³⁹⁾에 의한 미소핵의 판정 기준인 직경이 원래 핵의 1/3이하인 것, 염색상이 동일한 것, 그리고 세포질내에 위치한 것만을 선별하여 1000개의 이핵세포에서 micronuclei를 관찰하였다. 대조군의 수는 1,000의 세포당 평균 9.3개로 나타났으며, 카드뮴처리군은 평균 110.6개, 아연의 처리군은 85.5개, 니켈처리군은 73.6개로 나타났다. 카드뮴의 0.03 mM처리군의 경우 48.7개, 0.05 mM처리군의 경우 110.6개를 나타내었는데 카드뮴 0.03 mM과 0.05 mM에 0.12 mM의 아연을 혼합하여 처리한 경우와 카드뮴 0.03 mM과 0.05 mM에 0.30 mM의 니켈을 혼합처리한 결과에서 모두 미소핵수가 감소되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Vitvitskii등⁴⁰⁾의 크롬과 납을 이용한 미소핵조사와 Itoh⁴¹⁾의 크롬과 셀레늄을 이

용한 미소핵 조사결과 고독성에서 미소핵이 증가됨을 보고한 결과와 비소를 전처리한 후 크롬과 세레늄을 처리 했을 때 미소핵의 수의 감소를 나타내는 기 보고와 비교해 볼 때 중금속이 세포에 미치는 독성이 강할 수록 미소핵의 수도 증가되며 김 등⁴²⁾의 항암제를 통한 실험에서도 독성의 증가가 미소핵의 증가를 나타낸다는 결과와도 일치하였다. 간세포를 이용하여 아연의 존재시 카드뮴에 의한 세포의 독성이 감소됨을 관찰한 Stacey와 Klaassen⁴¹⁾의 실험과 카드뮴과 아연이 일반적인 운반계(carrier system)에서 경쟁적인 저해작용을 한다.^{42,43)}는 것과 비교해 보면 혼합처리시 중금속간의 경쟁에 의해 세포에 미치는 독성이 농도에 따라 감소되는 것으로 사료되어 진다.

본 실험의 결과 중금속이 생쥐섬유모세포주 L929에 미치는 세포독성은 일반적으로 알려진 중금속 독성정도와 유사한 경향을 보였으며 중금속 독성농도의 증가에 따라 세포에 미치는 영향이 크게 작용하며 세포유전독성에도 영향을 주는 것으로 사료된다.

V. 요약 및 결론

본 연구는 생쥐섬유모세포주 L929를 이용하여 중금속과 중금속들이 세포에 미치는 세포독성을 조사하였다. 실험방법으로는 neural red(NR), MTT, 총단백질량 등을 이용 세포독성을 조사하였고, 미소핵 검사법을 이용하여 세포유전독성을 조사하였다.

NR, MTT를 이용 세포독성조사결과 카드뮴>아연>니켈 순으로 나타났고 단백질질량 결과도 NR, MTT조사와 동일하게 세포독성정도가 강할 수록 총단백질량은 감소하였으며 카드뮴과 아연, 카드뮴과 니켈 금속간의 상호관계를 조사한 결과 카드뮴 단독 처리군에 비해 혼합처리군이 세포에 미치는 독성은 약하게 나타났다. 미소핵검사의 결과에서도 미소핵 빈도수가 카드뮴, 아연, 니켈의 순으로 감소되었다. 카드뮴과 아연, 카드뮴과 니켈혼합처리군 간의 미소핵빈도수 또한 단독처리군에 비해 혼합처리군이 감소되는 경향을 나타내었는데 니켈혼합처리군보다 아연혼합처리군에서 빈도수가 더 감소되었다.

이상의 결과로 볼 때 중금속(카드뮴, 니켈, 아연)이 L929 생쥐섬유모세포주에 미치는 세포독성은 카드뮴>아연>니켈 순이었으며 중금속농도에 따라 세포에 미치는 독성은 증가되었고 세포유전독성을 나타내었다. 그러나 카드뮴과 다른 중금속을 혼합처리시 독성은 감소되는 경향을 나타내었다

참고문헌

- 1) Dial, N.A. : Methylmercury. Teratogenic and lethal effects in frog embryos. *Teratol.* **13**, 327-334, 1976.
- 2) Storeng, R. and J. Jonsen : Effect of nickel chloride and cadmium acetate on the development of preimplantation mouse embryos in vitro, *Toxicol.* **17**, 183-187, 1980.
- 3) Friberg, L. and T. Kjellstrom : Cadmium. In Disorders of Mineral Metabolism(Bronner F. and J. W. Coburn, ed.) Academic Press Inc., New York, 318-334, 1981.
- 4) Hagino, N. and K. Yoshioka : A study on the etiology of so-called "Itai-Itai" disease, *J. Japan Orthop. Assoc.* **20**, 812-814, 1961.
- 5) Leach, R. M. Jr., K. W. L. Wang and D. E. Baker : Cadmium and the food chain: the effect of dietary cadmium on tissue composition in chicks and laying hens. *J. Nutr.* **109**(3), 437-443, 1979.
- 6) Hoffmann, G., M. Anke, M. Partscheffel, B. Groppe and H. Kronemann : Absorption and incorporation of cadmium-115m in hens, pigs and monkeys. *Kadmiums-Symp.* 58-62, 1977(pub. 1979).
- 7) Narbaitz, R., K.D. Riedel and S. Kacew : Induction of feather malformation in chick embryos by cadmium : protection by zinc. *Teratol.* **27**, 207-213, 1983.
- 8) Kaalter, K. et al. : Low nickel diet in the treatment of patients with chronic nickel dermatitis. *British Journal of Dermatology.* **98**, 197-201, 1978.
- 9) Browing, E. : Toxicity of industrial metals. 2nd ed. London. Butterworths, 348, 1969.
- 10) Parisic, A.F. & Vallee, B.L. : Zinc metalloenzymes: characteristics and significance in biology and medicine *American Journal of Clinical nutrition.* 1122-1222, 1969.
- 11) Zoeteman, B. C. J. and F. J. J. Brinkman : Human intake of minerals from drinking-water in the European communities. In *Hardness of drinking water and public health. Proceeding of the European scientific Colloquium.* Luxembourg, Oxford, Pergamon Press, 173, 1976.
- 12) Prasad, A.S. et al. : Syndrome of iron, anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *American Journal of Medicine.* **31**, 532, 1961.
- 13) Underwood, E.J. : Trace elements in human and animal nutrition, 4th ed. New York, Academic Press, 545, 1977.
- 14) Babich, H., H. L. Zuckerbraun, I. B. Barber, S. B. Babich and E. Borenfreund : Cytotoxicity of Sanguinarine Chloride to Cultured Human Cells

- from Oral Tissue, *Pharmacol & Toxicol*, **78**, 397-403, 1996.
- 15) Sinensky, M.C., A.L.Leiser and H. Babich : Oxidative stress aspects of the cytotoxicity of carbamide peroxide: in vitro studies, *Toxicol, Lett.*, **75**, 101-109, 1995.
 - 16) Beattie, J. H., Marion, M. and Denizeau, F. : The modulation by metallothionein of cadmium-induced cytotoxicity in primary hepatocyte cultures, *Toxicol.*, **44**, 329-339, 1987.
 - 17) Babichi, H. and Borenfreund, E. : Structure activity relationship(SAR) models established in vitro with the neural red cytotoxicity assay, *Toxicol. In Vitro.*, **1** 3-9, 1987.
 - 18) Borenfreund, E. and J.A. Puerner : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays(HTD/NR-90). *J. of Tissue Culture Meth.*, **9**(1), 7-9, 1984.
 - 19) Borenfreund, E. and H. Babichi : In vitro cytotoxicity of heavy metals, acrylamide and organotin salts to neural cells and fibroblasts. *Cell. Biol. Toxic.*, **3**(1), 63-79, 1987.
 - 20) Borenfreund, E., H. Babichi and N.M. Martin-alguacil : Comparison of two in vitro cytotoxicity assays-The Neutral Red(NR) and Tetrazolium MTT tests. *Toxic. In Vitro*, **2**(1), 1-6, 1988.
 - 21) Nemes, Z., R. Diets, J.B. Luth, S. Gomba, E. Hakenthal and F. gross : The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia* **35**, 1475-1476, 1979.
 - 22) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-59, 1983.
 - 23) Bradford, M.M. : A Rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.
 - 24) Fenech, M and Morely, A. A. : Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Research*, **147**, 29-36, 1985.
 - 25) Carmichael, J. Degraff, W. G. Gazdar, A. F.Minna, J. D. and Michell, J. B. : Evaluation of a tetrazoliumbased semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Reserch*, **47**, 936-942, 1987.
 - 26) Babichi, H. Puerner, J. A and Borenfreund, E. : In vitro cytotoxicity of metals to Blue-gill(BF-2) cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 31-37, 1986.
 - 27) 정연태, 박승택, 최 민규, 김정중, 문연자, 우원홍, 한두석, 최봉규, 소진탁 : 중금속 카드뮴의 세포독성에 관한 연구, *한국 독성학회지*, **9**(1), 45-60, 1993.
 - 28) 정연태, 박승택, 최민규, 김정중, 김재민, 우원홍, 한두석, 최봉규, 위인선 : 몇가지 중금속(Cr, Hg 및 Cd)이 배양섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구, *한국 독성학회지*, **8**(1), 119-129, 1992.
 - 29) Taub M. : Review Paper, The use of defined Media in cell and Tissue culture: Toxicity in vitro, **4**(3), 213-225, 1990.
 - 30) Borenfreund, E. and J.A. Puerner : Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal chelator combinations assayed in vitro, *Toxicology*, **39**, 121-134, 1986.
 - 31) Stacey, N. H and Klaassen, C. D. : Interaction of metal ions with cadmium induced cellular toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, **7**, 149, 1981.
 - 32) Huang, P. C, Smith, B. Bohdan, P and Corrigan, A. : Effect of zinc and cadium influx and toxicity in cultured CHO cells. *Biol. Trace. Elements. Res.*, **2**, 211, 1980.
 - 33) Corrigan, A. J. and Huang, D. C. : Cellular uptake of cadium and zinc. *Biol. Trace. Elements. Res.*, **3**, 197, 1981.
 - 34) Takahashi, K., Y. Fujita, T. Mayumi, T. Hama and T. Kishi : Effect of adriamycin cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Phar. Bull.*, **35**, 326-334, 1987.
 - 35) 김현숙, 고기석, 최임순 : 흰쥐 간세포 미토콘드리아에서의 cadmium 독성작용에 대한 glutathione의 영향, *환경생물학회지*, **8**(2), 41-49, 1990.
 - 36) Shinji Nito, Fumio Ariyuki and Azusa Okaniwa : Spontaneous expulsion of micronuclei by enucleation in the micronucleus assay, *Mutation Research*, **207**, 185-192, 1988.
 - 37) Schmuck, G, Lieb, G, Wild, D, Shiffmann, D and D. Henschler : Characterization of an in vitro micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts: *Mutation Reserch*, **203**, 397-404, 1988.
 - 38) Schmid, W. : The micronucleus test : *Mutation Reserch*, **31**, 9-15, 1975.
 - 39) Countryman PI, Heddle JA. : The production of micronuclei from chromosome aberration irradiated cultures of human lymphocytes, *Mut Res.*, **41**, 321-332, 1976.
 - 40) Vitvitskii, V.N., L. M. Bakhitova, L. S. Soboleva, V. A. Shevchenko : Modification of the mutagenic effects of gamma radiation by heavy metal salts. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, **79**, 495-498, 1996.
 - 41) Itoh, S., H. Shimada : Micronucleus Induction by Chromium and Selenium, and Suppression by Metallothionein Inducer. *Mutat. Res.*, **367**, 233-236, 1996.
 - 42) 김재민, 유태진, 정연태 : Cytosin Arabinoside와 Vinblastin이 생쥐섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 형태학적 연구, *원광의과학* **8**(1.2), 67-79, 1989.