

수은이 계배 대뇌의 신경세포 분화에 미치는 영향(III)

정 해 만·김 생 곤·조 광 필*
조선대학교 치과대학 인체생물학교실
*목포 전문대학 물리치료과

Effects of Mercury on the Differentiation Cerebral Neuron of Chick Embryo (III)

Jeong, Hae Man, Saeng Gon Kim and Kwang Phil, Cho*
Dept. of Human biology, College of Dentistry, Chosun University
*Dept. of Physical Therapy, Mokpo Junior College
(Received February 18, 1997)

ABSTRACT

To investigate the effects of mercuric chloride ($HgCl_2$) on the differentiation of the cerebral neuron of chick embryo 10 days, the ultrastructural changes in nerve cells injected with a various doses of mercuric chloride were observed with transmission electron microscope. The enzyme activity of the some dehydrogenases, cerebral proteins and adenosine triphosphate (ATP) were also analyzed.

The results obtained are as follows;

The ultrastructural changes in 1.0 mg-injected group, the nuclear membranes were irregular, outer of mitochondria membranes dispressioned, their cristae were destroyed. In 2.0 mg-injected group, the nuclear envelopes were destroyed and divided, were not observed organelle except of few ribosome, the RER and mitochondria.

The number of polypeptide bands were separated by SDS-PAGE in the normal group were 38 bands. According to the increased dose of mercuric chloride, contents of the bands were increased in 4 bands, but were decreased in 1 band.

The activities of dehydrogenases were declined by increasing the dose of mercuric chloride. Lactate dehydrogenase (LDH) activity failed to 61% in 2.0 mg-injected group. Malate dehydrogenase (MDH) activity failed to 90% in 1.0 mg-injected group, greatly to 76% in 2.0 mg-injected group. Succinate dehydrogenase (SDH) activity decreased to 79% in 1.0 mg-injected group and greatly to 62% in 2.0 mg-injected group.

ATP content in 1.0 mg-injected group was almost near to the normal level, but it was increased greatly in 2.0 mg-injected group.

Key words : Mercuric chloride, Chick embryo, Dehydrogenases, ATP, Ultrastructures

서 론

수은이 환경오염 유발원의 하나로 크게 문제되는 것은 이들이 금속성이기 때문에 원자상태로 계속 잔류하여 유기물과 같이 용해되거나 분해되지 않는다는 데 있다(Lee, 1988). 수은에 의한 환경오염 문제가 발생하게 된 원인은 자연계의 현상으로 인한 것이 아니고 산업의 발달로 인한 수은의 사용량이 증가되면서 배출량이 많아질 뿐만 아니라 석유의 연소산물로서, 산업폐기물로서, 또한 가연 휘발유의 사용으로 많은 수은이 생활주변에 배출되어 환경을 오염시키기 때문이다(Frank and Jerome, 1980). 우리나라에서도 최근에 여천공단의 공단앞 바닷물에서는 언어 마비장애 등을 일으키는 공해질환인 미나마타병의 원인이 되는 수은이 다량 검출되었으며, 공단을 끼고 있는 광양만과 일부 지역 농경지에서 생산되는 어패류와 농작물이 식용제한조치를 취해야 할 정도로 methyl수은 등 중금속에 심하게 오염되었다. 이렇게 각종 산업에 의해 환경중에 배출되는 수은 화합물은 alkyl수은, methyl수은, phenyl수은 및 무기수은 등으로 구분된다.

Alkyl수은 중독의 특성은 생체 내에서 세포막을 통과하여 세포의 유사분열을 저해하고 세포구조의 이상을 초래하는 것이다. 특히 선택적으로 뇌 조직과 간 조직에서 단백질 생합성계의 손상을 가하여 뇌세포를 파괴함으로써 신경중독증상을 발현시키는데, 뇌조직내에 10 µg/g 정도의 수은이 축적되면 재생불능의 신경장애가 나타나고 더 진행하면 사망하게 된다(Rozynkova and Raczkiwicz, 1977). Methyl수은과 phenyl수은은 성염색체 분열을 저해하여 유전물질의 이상을 일으킴으로써 태아에 영향을 주어 정신지체아를 포함한 선천성 기형을 유발시킨다(Omata *et al.*, 1978). 특히 methyl수은은 체내에서 100%에 가까운 높은 흡수율을 갖고 세포막을 통과하여 -SH기 및 -SS기에 대하여 높은 친화성을 갖고 있어서 SS기를 갖는 세포막 효소나 세포 내에서 단백질 합성에 관여하는 효소군과

결합하여 이들의 기능을 저해함으로써 조직의 손상을 초래하며, alkyl수은과 같이 다른 금속에 비해 뇌세포와 선택적으로 높은 친화성이 있어 뇌세포기능에 손상을 가함으로써 각종 신경중독증상을 발현시킨다(Calaham and Weis, 1983; Nagase *et al.*, 1984). 또한 사람을 비롯한 척추동물에서는 성체보다 발생중인 중추신경에서 methyl수은에 대한 친화성이 높아(Reynold and Petkin, 1979), 실제로 사람의 태아가 출생전에 methyl수은에 노출되었을 경우 심한 신경손상을 초래하며(Marsh *et al.*, 1980), 배자 생쥐의 대뇌 상피세포의 유사분열을 저해하는 것으로 알려져 있다(Choi, 1991). 이와 같은 methyl수은의 신경독성은 철의 매개에 의한 산화성 상해에 의하여 야기되기도 한다(Lebel, 1992).

무기수은은 쥐의 성상세포 내에서 이온화되어 Na^+ , K^+ -ATPase 활성 및 hexokinase 활성에 영향을 줌으로써 선택적으로 glutamate의 수송을 억제하고(Brookes, 1988a; Brookes and Kristt, 1989), 중추신경계의 기능장애와 신경변성을 일으킨다(Schwarcz and Meldrum, 1985). 수은의 투여량과 방법에 따른 중추신경에 축적되는 수은의 분포(Moller-Madsen, 1990; Moller-Madsen and Danscher, 1991), 수은의 독성작용으로 인한 뇌의 발생에서 신경성장 요인의 변화(Larkfors *et al.*, 1991), amino acid 운반자에 의하여 blood-brain barrier를 통하여 수송되는 수은의 수송기작(Kerper *et al.*, 1992) 발생중인 대뇌피질에서 synaptosome의 ATP diphosphohydrazase에 대한 수은의 영향(Oliveira *et al.*, 1994), 수은투여 후 쥐의 대뇌피질에서 alkaline phosphatase 활성의 변화(Albrecht *et al.*, 1994), 달걀점질의 형성과 점액선의 생화학적인 변화에 대한 수은의 영향(Lundholm, 1995), 섬유아세포에서 신경반응과 신경성장인자에 대한 수은의 영향(Soderstrom and Ebendal, 1995) 등에 대한 연구보고도 있으나 수은에 의한 배자의 대뇌신경세포를 대상으로 한 연구 보고는 미미한 상태다.

따라서 본 연구는 수은의 축적 농도가 계배의 발생에 따른 대뇌의 신경세포에 미치는 영향을 밝히기 위하여 대뇌의 조직 및 세포의 분화과정을 전자현미경으로 관찰하고 SDS-PAGE를 이용하여 단백질의 변화

* 이 논문은 1995년도 조선대학교 우수연구센터 기자재 활용에 의하여 연구되었음.

양상을 비교 분석하는 한편 LDH, MDH 및 SDH의 효소활성도와 ATP함량 변화를 측정, 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

정상 사료로 사육한 Abor acres계 (전남 나주군 노안면 지산 부화장에서 분양)의 수정란 (60 ± 5 g)을 부란기 내에서 최적 조건 (온도 $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 상대 습도 60%)으로 부란하였다. 투여약품은 mercuric chloride (HgCl_2 , 藥理化學, Co., 日本)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) Mercuric chloride의 투여

실험군은 수정란을 24시간 동안 발생시킨후 체중 kg당 0.1mg, 0.5mg, 1.0mg, 2.0mg의 HgCl_2 를 0.9% 생리적 식염수 0.05ml에 희석하여 각각 난각을 통하여 배반 부위에 1회 투여하였고 대조군으로서는 정상군과 0.9% 생리식염수 0.05ml를 동일한 방법으로 투여한 개체들을 사용하였다. 난각에 생긴 구멍은 paraffin으로 봉한후 부란 10일 (stage 35)째 까지 부란시켜 계배를 적출하고 대뇌를 분리하였다.

2) 전자현미경 관찰

계배를 적출하여 대뇌를 분리하고 1mm^3 으로 세절한 후 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde에서 5시간 전고정하고, 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음, 동일한 완충액 내의 1% osmium tetroxide (OsO_4)용액으로 2시간동안 후고정 하였다. 고정된 조직을 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음 alcohol 상순 농도 순으로 탈수하여 propylene oxide로 치환한 후, Epon 포매제로 포매하고, 초박편기 (ultramicrotome LKB-V형)를 사용하여 $1\mu\text{m}$ 두께로 절편제작한 다음 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰 대상부위를 확인하였다. 확인한 부위를 60nm의 초박절편으로 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100CX-II투과형 전자현미경 (80KV)으로 관찰하였다.

3) SDS-PAGE에 의한 단백질 분석

계배대뇌를 적출하여 ultrasonic dismembrator (ARTEK-300, U.S.A.)로 ice bath 상에서 마쇄시킨 후 원심 분리기 (Beckman J2-21)로 0°C 에서 10,000G로 10분간 원심분리하여 상층액을 액체 질소 (liquid nitrogen)통에 보존하면서 단백질 분석 시료로 사용하였다.

전기영동시에 각 well에 동일한 양의 단백질을 가해 주기 위해서 다음과 같이 시료의 단백질 함량을 정량하였다. Sample buffer (0.1g glycerol, 62.5 μl upper tris buffer, 0.02g SDS, 50 μl β -mercaptoethanol, 15 μg brom thymol blue/ml)에 용해된 total protein의 함량을 측정하기 위하여 brom thymol blue를 넣지 않은 sample buffer와 sample을 1:1 비율로 혼합하였다. 그 후 2분간 끓는 물에서 증탕한 다음, microcentrifuge를 사용하여 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하고, 이 상층액을 Bradford (1976)방법에 따라 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 단백질 정량을 하였다. 단백질이 정량된 시료를 Coomassie brilliant blue G-250으로 염색하여 spectrophotometer (Pye Unicam Co., U.K.)로 595nm에서 optical density를 측정하고 표준물질로 표준곡선을 작성하여 단백질 함량을 환산하였다.

Lamlli (1970) 및 Annapur 등 (1986)의 방법에 따라 vertical slab gel kit (Hoefer, SE 600)를 이용하여 전기영동 (SDS-PAGE)하였다. 먼저 glass plate ($16 \times 17\text{cm}$)에 1.5mm spacer를 고정하여 10% acrylamide gel (*)을 만들고, 단백질 함량이 측정된 시료를 조단백질 (crude protein)함량으로 환산하여 0.8 μg protein/ μl 가 되도록 희석하여 조정후, 이 액 30 μl 와 sample buffer (0.1g glycerol, 62.5 μl upper tris buffer, 0.02g SDS, 50 μl β -mercaptoethanol, 15 μg brom thymol blue/ml) 30l를 혼합하여 끓는 물에서 2분간 증탕한 다음 냉각하였다. 냉각된 시료는 microcentrifuge로 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 40 μl 를 well에 loading 하여 각 well 당 16 μg 의 가용성 단백질을 전기영동하였는데 4°C 하에서 running buffer (3g tris, 14.4g glycerol, 1g SDS/l)를 이용하여 전류 20mA에서 15시간동안 전개하였다. 전개된 gel은 Coomassie brilliant blue (2.5% Coomassie brilliant blue

R, 40% methanol, 7% acetic acid)로 3시간 염색한 후 acetic acid buffer (5% methanol, 7.5% acetic acid)로 탈색하여 각 시료의 영동상을 분석하였고 표준 단백질은 aldolase (158 KD), bovine serum albumin (66 KD), egg albumin (45 KD), glyceraldehyde-3-phosphatate dehydrogenase (36 KD), carbonic anhydrase (29 KD), trypsinogen bovine pancreas (24 KD), trypsin inhibitor soybean (20 KD) 그리고 α -lactalbumin (14 KD)을 사용하였다.

탈색된 gel은 gel dryer (Hoefer, SE 1160)에서 완전히 건조시킨 후에 densitometer (Shimadzu C-9000)로 570 nm에서 protein band의 밀도를 측정하여 상호 비교하였다.

4) 효소활성도 측정

가. Lactate dehydrogenase (LDH)의 활성도 측정

LDH의 활성은 Holbrook 등(1975)의 방법을 이용하여 반응액에 효소원을 가한 후 1분동안 감소되는 NADH의 양을 340 nm에서의 흡광도를 측정하여 감소되는 NADH의 양으로부터 환산하여 측정하였다. 반응액 (3 ml)의 조성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.6 mM sodium pyruvate, 21.3 mM nicotinamide, 0.18 mM NADH로 하고 효소원으로는 추출된 조효소액 0.1 ml를 혼합하여 효소활성도를 측정하였다.

나. Malate dehydrogenase (MDH)의 활성도 측정

MDH의 활성은 Joo와 Han (1976)의 방법을 이용하여 반응액에 효소원을 가하고 상온에서 1분동안에 감소되는 2, 6-dichlorophenol indophenol (DICPIP)의 양을 spectrophotometer (Shimadzu-1201)를 이용하여 600 nm에서 측정하여 환산하였다. 반응액의 조성은 14 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.43 mM NAD⁺, 30 mM nicotinamide, 0.86 mM KCN, 0.034 mM DICPIP, 7.1 mM sodium malate로 하고, 여기에 추출된 조효소액 0.1 ml를 혼합하여 사용하였다.

다. Succinate dehydrogenase (SDH)의 활성도 측정

SDH의 활성은 Joo와 Han (1976)의 방법을 이용하여 반응액에 효소원을 가하고 상온에서 1분동안 환원되는 DICPIP의 양을 spectrophotometer (Shimadzu

-1201)를 이용하여 600 nm에서의 흡광도 변화로써 활성을 측정하였다. 반응액의 조성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.6), 1 mM KCN, 0.04 mM DICPIP, 20 mM sodium succinate로 하고, 추출된 조효소액 0.1 ml를 혼합하여 사용하였다.

5) Adenosine triphosphate(ATP)함량 측정

계배대뇌에서 추출된 시료액 200 μ l와 HEPES 완충용액 (50 mmol Tris acetate buffer, pH 7.75, 1.5 mmol EDTA, 0.075% bovine serum albumin, 10 mmol Magnesium acetate) 200 μ l를 혼합하고 (Wulff, 1983) 여기에 HEPES 완충용액으로 용해시킨 D-luciferin-luciferase (from Firefly; Calbiochem Co.)용액 100 μ l를 혼합한 10초 후에 발광된 광도를 luminometer (Berthold, LB9501)를 이용하여 측정하였다 (Bowie, 1978). 표준곡선은 1.97×10^{-5} mol ATP용액을 HEPES 완충용액으로 희석하여 시료액과 동일하게 측정하였다.

결 과

1. 전자현미경적 소견

발생 10일근 계배의 신경세포는 염색질이 고루 분포해 있었으며 핵막을 뚜렷이 구분할 수 있었다. 세포질을 포함한 조면소포체와 mitochondria 그리고 Golgi 복합체가 비교적 발달되어 있었다 (Fig. 3).

0.1 mg의 투여군의 핵은 염색질이 고르게 분포해 있었으며 핵막은 확실히 구분할 수 있었지만 약간 불규칙하였다. 세포소기관으로는 조면소포체, mitochondria 그리고 Golgi복합체의 발달이 미약하였으며 세포질 전체에 ribosome이 흩어져 있음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 0.5 mg 투여군의 핵은 염색질이 핵질 내에 고르게 분포해 있었으나 핵막은 불규칙하며 균등하게 함유되어 있었다. 세포질의 발달도 미약하였으며 세포질 내에 있는 mitochondria와 Golgi복합체들이 잘 발달되어 있었다. 신경소관과 synaptic 소포들이 축삭의 말단에서 관찰되었다 (Fig. 5).

1.0 mg 투여군의 핵은 염색질이 비교적 고르게 분포되어 있었으나 핵막의 내막과 외막이 불분명하게 관찰되었다. 세포질 내에서는 활면소포체들이 세포중앙

부분에서 관찰되었고 mitochondria의 외막이 함요되었으며 cristae가 불분명하게 관찰되었다(Fig. 6). 2.0 mg 투여군의 핵은 난원형으로 관찰되었으나 이질 염색질이 전 핵질에 분포되었으며 핵의 내막과 외막이 분리된 양상을 보여주었고 일부는 파괴되어 나타났다. 세포질은 수은의 독성에 의한 상해가 뚜렷하여 세포소기관으로는 소수의 ribosome과 활면소포체 그리고 mitochondria를 제외하고는 거의 관찰되지 않는다(Fig. 7).

2. 단백질 조성 및 함량

단백질 band는 총 38개가 분리되었다. 분자량 380 KD와 125 KD의 단백질 band의 농도는 1.0 mg 투여군 이하에서는 다소 증가하였으나 2.0 mg 투여군에서 감소현상을 보였다. 330 KD의 단백질 band는 0.1 mg 투여군(정상군의 85%)에서 감소하였으나, 0.5 mg 투여군 이상에서는 증가현상을 보였고 320 KD, 250 KD, 24 KD 및 17 KD의 단백질 band는 투여량

에 따라 대조군에 비해 크게 증가하는 것으로 나타났으며, 285 KD의 단백질 band는 실험군 모두가 감소하는 것으로 나타났다(Figs. 1, 2).

3. 효소활성도의 변화

1) Lactate dehydrogenase(LDH)의 활성도

LDH 활성은 saline 투여군이 정상군에 비해 93%의 활성을 나타냈고 0.1 mg 투여군에서 78%로 감소되었으며 0.5mg 투여군, 1.0mg 투여군 및 2.0 mg 투여군에서는 70%, 69% 및 61%로 LDH활성이 크게 감소되었다(Table 1).

Table 1. Effects of HgCl₂ on lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cerebrum in chick embryo.

Incubation days	Groups	Enzyme activity ⁺ (unit/cerebrum)	Relative activity ⁺⁺ (%)
10	control	12.12	100
	saline	11.30	93
	0.1 mg/kg	9.50	78
	0.5 mg/kg	8.52	70
	1.0 mg/kg	8.34	69
	2.0 mg/kg	7.44	61

⁺ One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

⁺⁺ Relative activities were expressed as percent of control.

2) Malate dehydrogenase(MDH)의 활성도

MDH활성을 비교해보면 정상군에 비해 saline 투여군, 0.1 mg 투여군, 0.5 mg 투여군 및 1.0 mg 투여군이 각각 96%, 94%, 93%, 90%로 다소 감소를 가져왔으나, 2.0 mg 투여군에서는 76%로 MDH활성이 크게 감소되었다(Table 2).

3) Succinate dehydrogenase(SDH)의 활성도

정상군과 비교하여 saline 투여군에서 98%로 나타났고, 0.1 mg 투여군, 0.5 mg 투여군에서는 각각 96%, 89%의 감소를 보였으며 1.0 mg 투여군에서는 79%, 2.0 mg 투여군에서는 62%의 SDH활성을 보여 크게 감소되었다(Table 3).

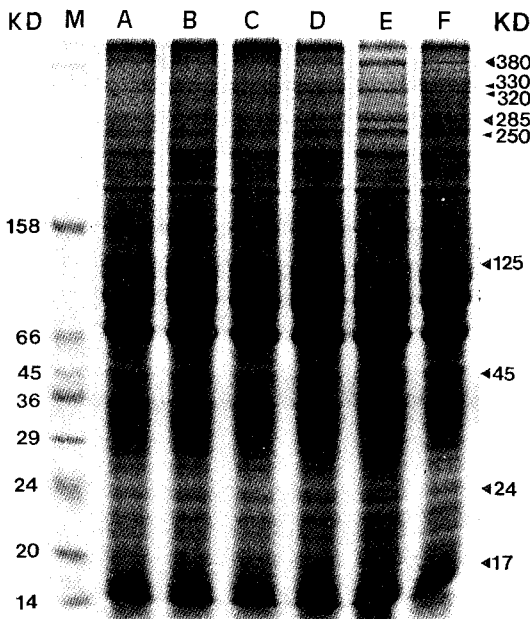


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cerebrum fluid proteins in chick embryo (10-day-old): (M) marker protein, (A) control group, (B) saline, (C) 0.1 mg/kg, (D) 0.5 mg/kg, (E) 1.0 mg/kg, (F) 2.0 mg/kg.

Table 2. Effects of HgCl₂ on malate dehydrogenase (MDH) activity of the cerebrum in chick embryo.

Incubation days	Groups	Enzyme activity ⁺ (unit/cerebrum)	Relative activity ⁺⁺ (%)
10	control	13.44	100
	saline	12.86	96
	0.1 mg/kg	12.62	94
	0.5 mg/kg	12.48	93
	1.0 mg/kg	12.10	90
	2.0 mg/kg	10.16	76

⁺ One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

⁺⁺ Relative activities were expressed as percent of control.

Table 3. Effect of HgCl₂ on succinate dehydrogenase (SDH) activity of the cerebrum in chick embryo.

Incubation days	Groups	Enzyme activity ⁺ (unit/cerebrum)	Relative activity ⁺⁺ (%)
10	control	10.52	100
	saline	10.34	98
	0.1 mg/kg	10.08	96
	0.5 mg/kg	9.40	89
	1.0 mg/kg	8.32	79
	2.0 mg/kg	6.56	62

⁺ One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

⁺⁺ Relative activities were expressed as percent of control.

Table 4. Effects of HgCl₂ on adenosine triphosphate (ATP) contents of the cerebrum in chick embryo.

Incubation days	Groups	ATP mol/ml
10	control	2.10 × 10 ⁻⁶
	saline	2.00 × 10 ⁻⁶
	0.1 mg/kg	1.94 × 10 ⁻⁶
	0.5 mg/kg	3.50 × 10 ⁻⁶
	1.0 mg/kg	3.60 × 10 ⁻⁶
	2.0 mg/kg	2.68 × 10 ⁻⁵

4. Adenosine triphosphate(ATP)의 변화

ATP양은 정상군이 2.10 × 10⁻⁶ mol/ml이었으며,

saline 투여군, 0.1 mg 투여군, 0.5 mg 투여군, 1.0 mg 투여군에서는 각각 2.00 × 10⁻⁶ mol/ml, 1.94 × 10⁻⁶ mol/ml, 3.50 × 10⁻⁶ mol/ml, 3.60 × 10⁻⁶ mol/ml로 나타나 정상군과 비슷하였으나 2.0 mg 투여군은 2.68 × 10⁻⁵ mol/ml로 크게 증가현상을 보였다 (Table 4).

고찰

무기 수은은 소독제, 이뇨제, 항균제, 안정제 및 피부연고제 등 약품의 첨가제로 사용되고 있고 (Kim *et al.*, 1991), 치과용 아말감으로도 사용되고 있는데, 수은이 체내에 축적되면 만성 중독 증상을 나타내며 그 증상으로는 쇠약, 두통, 식욕감퇴, 구토, 설사, 경련, 시야의 축소, 신장장애, 체중의 감소, 정신적 정서불안 등이 나타나고 (Joselow and Goldwater, 1968), 구강 내 증상으로는 구내염, 치은염, 타액 분비과다 등이 유발된다 (Merfield and Taylor, 1976; Kim *et al.*, 1989). 이러한 무기수은은 그 일부가 생체 내에서 필연적으로 methyl화 되고 있으므로 사람과 동식물에 미치는 영향은 다른 수은 화합물과 더불어 중요한 의미를 가지고 있다.

Moller-Madsen (1990)은 HgCl₂를 쥐 정맥을 통하여 주사하였을 때 0.2 mg 이하에서는 대뇌로의 축적이 관찰되지 않았으며 0.4 mg에서는 대뇌와 척수의 무게감소와 더불어 운동기능의 감축현상이 관찰되었으나 신경학적 증후는 나타나지 않았고, 2.0 mg 이상에서는 대뇌와 척수에서 축적현상이 나타났으며 소녀의 경우에는 8.0 mg 이상 투여시에 Purkinje세포와 핵에서 축적이 일어난다고 보고하였다. 또한 HgCl₂의 축적은 감각신경계 보다는 운동신경계의 세포체에서 심하게 일어나 운동신경계에 보다 큰 영향을 미친다고 보고하였으나, 조직학적인 변화에 있어서는 8개월 동안 노출시켰을 때에도 유의한 차이점이 발견되지 않았다고 하였는데, 본 연구와 거의 일치하였다.

Kim 등 (1994a, 1994b) 계배 대뇌 신경세포 분화 과정에서 HgCl₂ 투여시 미세구조적 변화는 핵막의 격리와 2중막의 분리, mitochondria의 cristae 파괴현상이 뚜렷하였고 조면소포체와 Golgi 복합체의 발달이 미약하였다고 보고하였다. 본 연구에서의 미세구조적

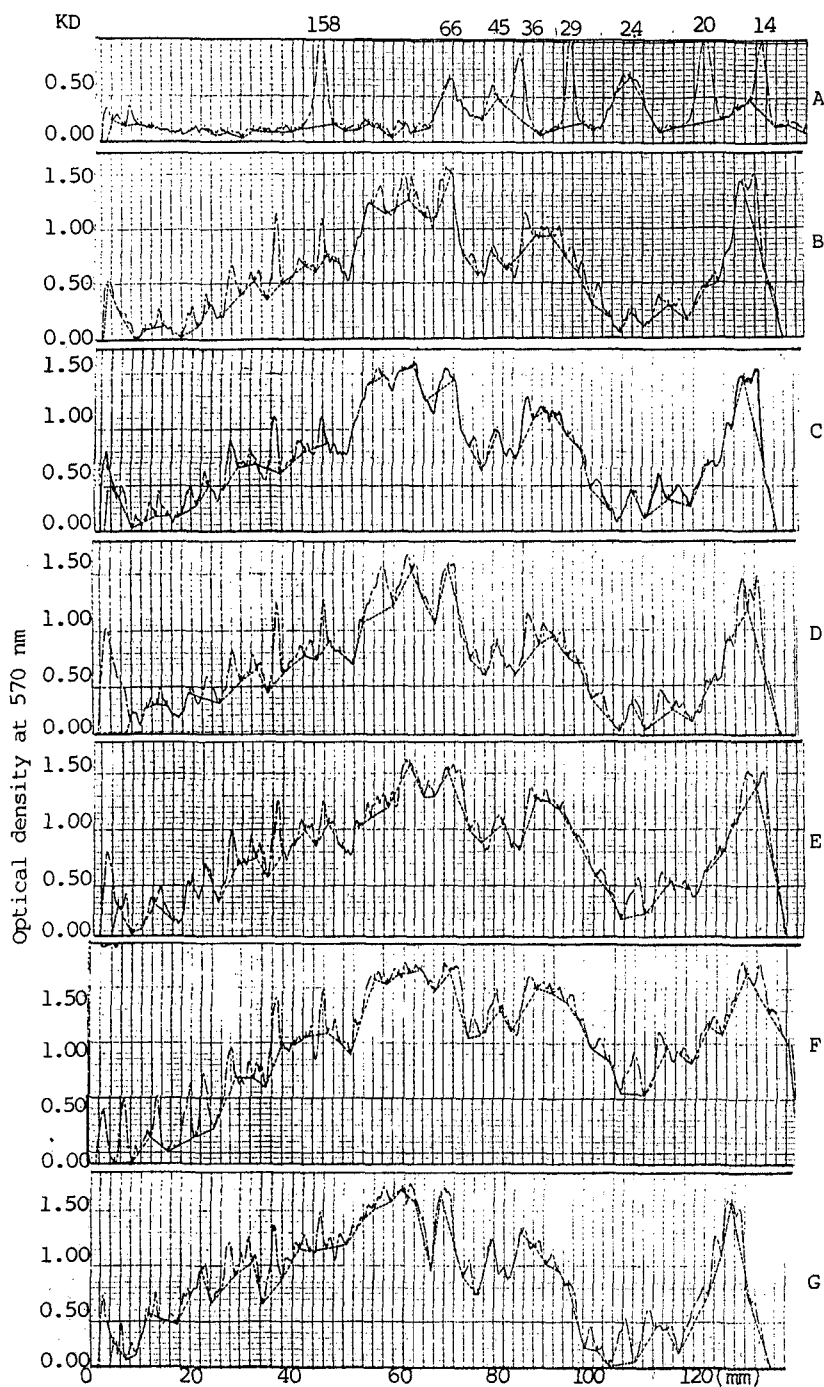


Fig. 2. Densitometric curves of the cerebrum fluid protein fractions (10-day-old) through SDS-PAGE: (A) marker protein, (B) control group, (C) saline, (D) 0.1 mg/kg, (E) 0.5 mg/kg, (F) 1.0 mg/kg, (G) 2.0 mg/kg.

변화는 1.0 mg 투여군에서 핵막이 약간 불규칙했으나 큰 변화는 관찰되지 않았고 2.0 mg 투여군에서는 핵막이 매우 불규칙할 뿐만 아니라 일부는 파괴되어 나타났으며, 세포질에서는 mitochondria가 팽윤되었고 막 일부가 파괴되어 관찰되었다. 이러한 세포내의 미세구조의 변화는 수은 독성이 대뇌세포의 분화와 형태형성에 많은 영향을 미치기 때문인 것으로 생각된다. Hah 등(1987)은 계배의 중추신경조직으로부터 단백질의 주요 band 범위는 90 KD에서 16 KD까지 나타나며, 부란 4일후 약 24~28개의 band가 densitometry에 의해 관찰된다고 보고하였다. 본 연구에서는 계배에서 38개의 단백질 band가 분리되었는데 320 KD의 3조의 단백질은 소량투여군에서 감소하다가 투여량의 증가에 따라 그 농도가 증가하는 현상을 보였다. 이는 수은의 독성효과로 인한 현상으로 생각된다.

Asztalos와 Nemcsok (1985)는 몇 가지 중금속과 살충제에 의한 조직손상의 정도는 LDH활성의 증가와 비례하며 따라서 대뇌조직 및 혈액 내에서 LDH활성이 증가되었는데 이는 약물의 독성작용에 대한 방어기전의 하나로서 나타나는 현상이라고 하였다. 반면 Choe 등(1985)은 phenylalanine, tryptophan, tyrosine과 같은 방향족 아미노산을 투여하고 15일간 부란한 계배의 경우 LDH, MDH 그리고 SDH와 같은 기초대사에 중요한 효소들의 활성도가 크게 감소된다고 보고하였고, Choe 등(1986)은 부란 10일 후 계배 두부의 LDH, MDH, SDH 등의 기초 대사 관련 효소들의 활성도를 측정하였던 바 LDH 활성도는 tryptophan 투여군의 경우 정상군에 비해 80%로 크게 감소되었고, MDH 활성의 경우에는 79%로 활성이 감소되었으며 SDH의 경우도 56%로 감소가 일어남을 보고하였다. 한편, 본 연구에서도 LDH, MDH 및 SDH 활성도는 수은의 투여량이 증가할수록 감소현상을 보였는데 이것은 수은의 축적이 대뇌 세포에 손상이 일어나 탄수화물, 지질, 아미노산 등의 최종 생물학적 산화회로인 TCA 회로의 효소활성이 저해되기 때문인 것으로 생각된다.

수은은 쥐 뇌의 microsomal Na-K-ATPase의 활성을 저해하고 ATP를 비경쟁적으로 억제하며(Magour *et al.*, 1987) 세포 내의 세포질면에 존재하는 Na-K-ATPase도 저해하는 것으로 알려졌다(Anner

and Moosmayer, 1992). 또한 쥐 성상세포 내에서는 수은 이온의 결합으로 인해 Na-K-ATPase활성이 영향을 받음도 보고되었다(Brookes, 1988b).

Hechtenberg와 Beyersmann (1991)은 중금속이 토끼 근소포체의 Ca^{++} -ATPase의 활성을 저해함으로써 ATP의 가수분해를 억제하는데 카드뮴과 납 보다는 수은이 ATP분해 효소의 활성을 보다 심하게 억제하며 또한 Ca^{++} -pump의 강한 억제자로서 낮은 농도에서도 세포 내 Ca^{++} 의 활동과 항상성을 저해한다고 보고하였다. 본 연구에서는 ATP함량이 1.0 mg 이상 투여군에서 투여량이 증가에 비례하여 증가하는 것으로 나타났는데 이는 mitochondria 내의 탈수소효소에 비해 ATP 가수분해효소가 수은 독성에 보다 큰 영향을 받기 때문인 것으로 생각된다.

결 론

HgCl₂의 투여량에 따른 10일 계배의 대뇌 신경세포 분화에 미치는 영향을 규명하기 위하여 신경세포의 미세구조 변화를 전자현미경을 이용하여 관찰하고, 또한 대뇌단백질, 탈수소효소의 활성도 및 ATP의 변화상을 분석한 결과는 다음과 같다.

대뇌신경세포의 미세구조변화는 0.5 mg 투여군 이하에서는 세포질내에 있는 mitochondria와 Golgi복합체들이 정상군과 차이가 거의 없었으나, 1.0 mg 투여군은 핵막이 불분명하게 관찰되었고, mitochondria의 외막이 함요되었으며 cristae가 불분명하게 관찰되었다. 2.0 mg 투여군은 핵막이 분리·파괴되었고, 세포소기관은 소수의 ribosome과 활면소포체 그리고 mitochondria를 제외하고는 거의 관찰되지 않았다. 정상군 계배대뇌 단백질의 SDS-PAGE를 통하여 38개의 polypeptide band들이 분리되었으며 수은 투여량의 증가에 따라 4개의 band는 그 함량이 증가하였으며, 1개의 band는 모두 감소하는 것으로 나타났다. 탈수소효소의 활성도는 수은 투여량이 증가할수록 감소하는 현상을 보였는데 LDH의 활성도는 2.0 mg 투여군에서 61%로 감소되었고, MDH활성도는 1.0 mg 투여군에서 90%로 감소되었으나, 2.0 mg 투여군에서는 76%로 크게 감소되었다. SDH의 활성도는 1.0 mg 투여군에서는 79% 감소를 보였으며, 2.0 mg 투여군에

서는 62%의 활성을 보여 크게 감소되었다. ATP의 변화는 1.0 mg 투여군 이하에서는 정상군과 비슷하였으나, 2.0 mg 투여군은 크게 증가하는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Albrecht J, Szumanska G, Gadamski R, Gajkowska B, 1994. Changes of activity and ultrastructural localization of alkaline phosphatase in cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuric chloride, *Neurotoxicology* 15(4), 897-902
- Annapur GS, Gundling GI, Benson TA, Spear BB, 1986. Vegetative expression of the δ -endotoxin genes of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *B. subtilis*, *J. bacteriol.* 166, 194-204
- Anner BM, Moosmayer M, 1992. Mercury inhibits Na-K-ATPase primarily at the cytoplasmic side, *Am. J. Physiol.* 262(5), 843-848
- Asztalos B, Nemcsok J, 1985. Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp (*Cyprinus carpio* L.) sera, *Comp. Biochem. Physiol.* 82, 217-219
- Bowie LJ, 1978. In: *Methods in Enzymology*, Academic press, NY, 57, 26.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brookes N, 1988a. Specificity and reversibility of the inhibition by $HgCl_2$ of glutamate transport in astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 50, 1117-1122
- Brookes N, 1988b. The relative sensitivity of amino acid transport systems in astrocytes to inhibition by $HgCl_2$, *J. Faseb.* 2, 1820
- Callahan P, Weis JS, 1983. Methylmercury effects on regeneration and ecdysis in fiddler crabs (*Uca pugilator*, *U. pugnax*) after short term and chronic pre-exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 707
- Choe RS, Joo CN, Choi CK, Kim JK, 1985. Cell biological studies of the effect of aromatic amino acid on early development of chick embryo. *Korean J. Zool.* 28(4), 257-273
- Choe RS, Joo CN, Choi CK, Kim JW, Joo SO, 1986. Cell biological studies on brain formation at the early stage of chick embryogenesis, *Korean J. Zool.* 29(3), 215-233
- Choi BH, 1991. Effects of methylmercury on neuroepithelial germinal cells in the developing telencephalic vesicles of mice. *Acta Neuropathol.* 81, 359-365
- Frank E, Guthvie, Jerome J, 1980. Introduction to environmental toxicology, Perry NY Elsevier North Holland 68, 105
- Hah JC, Han CB, Kim DS, 1987. Studies on the distribution of soluble proteins within the central nervous system during embryogenesis of the chick embryo, *Korean Journal of Zoology* 30(3), 261-271
- Hechtenberg S, Beyersmann D, 1991. Inhibition of sarcoplasmic reticulum $Ca(2+)$ -ATPase activity by cadmium, lead and mercury, *Enzyme.* 45(3), 109-115.
- Holbrook JJ, Liljas A, Steindel SJ, Rossmann MG, 1975. Lactate dehydrogenase, In "The Enzyme (Vol. XI), (Boyer, P.D. ed)". Academic Press Inc., Publishers, NY, pp. 191-292
- Joo CN, Han JH, 1976. The effect of ginseng saponins on chicken's hepatic mitochondrial succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase, *Korean Biochem. J.* 9, 43-51
- Joselow MM, Goldwater LJ. 1968. Absorption and excretion of mercury in man: XV. Occupational exposure among dentists. 17, 39-43
- Kerper LE, Ballatori N, Clarkson TW. 1992. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier, *Am. J. Physiol.* 262(5), 761-765
- Kim DE, Song KB, Kim YJ. 1989. Mercury contents in hair of dental personnel and evaluation of various agents suppressing mercury vaporization. *J. Korean Dental Association.* 27(7), 649-659

- Kim DE, Song KB, Sung JH. 1991. The evaluation of mercury accumulation released from amalgam restoration in human body. *J. Kyungpook Dentistry College*. 8(2), 1-17
- Kim SG, Cho KP, Kim JS, 1994a. Effect of mercuric chloride on the differentiation cerebral neuron of chick embryo(I), *Kor. Soc. Elec. Micro*. 24(2), 26-36
- Kim SG, Cho KP, Kim JS, 1994b. Effects of mercuric chloride on the differentiation of cerebrum of chick embryo, *Korean J. Zool*. 37(3), 428-438
- Lammi UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *T. Nature* 227, 680-685
- Larkfors L, Oskarsson A, Sundberg J, Ebendal T, 1991. Methylmercury induced alterations in the nerve growth factor level in the developing brain, *Brain-Res-Dev-brain-Res*. 62(2), 287-291
- Lebel CP, Ali SF, Bondy SC. 1992. Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 112, 161-165
- Lee KM, 1988. Heavy metals in environment. *J. Catholic Medical College* 41(2), 475-478
- Lundholm CE, 1995. Effects of methyl mercury at different dose regimes on eggshell formation and some biochemical characteristics of the eggshell gland mucosa of the domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*. 110(1), 23-8
- Magour S, Maser H, Greim H, 1987. The effect of mercury chloride and methyl mercury on brain microsomal Na^+/K^+ -ATPase after partial delipidation with Lubrol, *Pharmacol. Toxicol*. 60(3), 184-186
- March DO, Myers GJ, Clarkson TW, Amin-Zaki L, Tikriti S, Majeed MA, 1980. Fetal methylmercury poisoning: clinical and toxicological data on 29 cases. *Ann Neurol*. 7, 348-353
- Moller-Madsen B, 1990. Localization of mercury in CNS of the rat. II. Intraperitoneal injection of dimethylmercuric chloride and mercuric chloride, *Toxicology & applied Pharmacology* 103, 303-323
- Moller-Madsen B, Danscher G, 1991. Localization of mercury in CNS of the rat, *Toxicology & applied Pharmacology* 108, 457-473
- Nagase HM, Ose YK, Sato TH. 1984. Distribution and production of methylmercury in the environment. *Eisei Kagaku* 30, 161
- Oliveira EM, Rocha JB, Sarkis JJ, 1994. In vitro and in vivo effects of HgCl_2 on synaptosomal ATP diphosphohydrolase from cerebral cortex of developing rats, *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys*. 102(5), 251-4
- Omata S, Sakimura KJ, Tsubaki HM. 1978. In vivo effect of methylmercury on protein synthesis in brain and liver of the rat. *Toxicol. Appl. Pharma*. 44, 367
- Reynold WA, Pitkin RM. 1979. Transplacental passage of methylmercury and its uptake by primate fetal tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 148, 523-526
- Rozynekowa D, Raczkiwicz B, 1977. Destructive effect of methyl mercury chloride on human mitosis in living cells in vitro. *Mutation Research* 56, 185
- Schwarcz R, Meldrum B, 1985. Excitatory amino acid antagonists provide a therapeutic approach to neurological disorders, *Lancet* 2, 140-143
- Soderstrom S, Ebendal T, 1995. In vitro toxicity of methyl mercury: effect on nerve growth factor (NGF)-responsive neurons and on NGF synthesis in fibroblasts, *Toxicol. Lett*. 75(1-3), 133-144
- Wulff, K. 1983. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. Verlag Chemie, Weinheim. 1, 351-355

FIGURES LEGENDS

- Fig. 3.** Electron micrographs of neurons in the cerebral cortex of normal chick embryo. Neuron contains a nucleus (N) with a prominent nucleolus. The rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex (G) are well developed. A number of mitochondria and neurotubules (Nt) are observed. MB, multivesicular body.
- Fig. 4.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of 0.1 mg/kg of mercuric chloride-injected chick embryo incubated for 10 days. A neuron contains a nucleus (N) with a prominent nucleolus (No), and indented envelope. Ly, lysosomes.
- Fig. 5.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of 0.5 mg/kg of mercuric chloride-injected chick embryo incubated for 10 days. Neurons are polymorphological, and contain a well developed rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex. A lot of neurotubules are observed. Ly, lysosomes; MB, multivesicular body; N, nucleus.
- Fig. 6.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of 1.0 mg/kg of mercuric chloride-injected chick embryo incubated for 10 days. A number of irregular-shaped mitochondria (M) with sparse cristae are observed. N, nucleus; Ly, lysosomes.
- Fig. 7.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of 2.0 mg/kg of mercuric chloride-injected chick embryo incubated for 10 days. The outer membrane of nuclear envelope (NE) is detached. Primary lysosomes and smooth endoplasmic reticulum (SER) are observed. Ly, lysosomes; N, nucleus.

