

유기수은의 세포면역독성과 이에 대한 아연의 방어효과 및 기전

고대하[†] · 염정호 · 오경재
전북대학교 의과대학 예방의학교실

A Study on the Protective Effect and Its Mechanism of Zinc against Immuno-cytotoxicity of Methylmercury

Dai Ha Koh[†], Jung Ho Youm and Gyung Jae Oh

Department of Preventive Medicine and Public Health Chonbuk National University Medical School
(Received 10 April 2001 ; Accepted 21 May 2001)

ABSTRACT

This study was carried out to elucidate the protective effect of zinc chloride(ZnCl₂) and its mechanism against the immuno-cytotoxicity of methylmercury chloride(CH₃HgCl).

This study was observed in the culture of EMT-6 cells which are originated from mammary adenocarcinoma of Balb/c mouse. Cytotoxicity of metals was measured by cell viability and NO₂⁻, and mitochondrial function was evaluated by adenosine triphosphate (ATP) production.

CH₃HgCl significantly decreased the synthesis of nitric oxide(NO), ATP and glutathione(GSH) in a dose-dependent manner. ZnCl₂ significantly increased the synthesis of GSH in a dose-dependent manner, but synthesis of NO and ATP were not changed.

The immuno-cytotoxicity of CH₃HgCl was not fully protected when combined addition of ZnCl₂, whereas ZnCl₂ prior to addition of CH₃HgCl completely protected the Hg-induced immuno-cytotoxicity. Similarly, intracellular accumulation of mercury significantly decreased by ZnCl₂. Degree of diminution of intracellular mercury was larger in ZnCl₂ prior to addition of CH₃HgCl than in combined addition of ZnCl₂ and CH₃HgCl.

Dithiothreitol(DTT) or buthionine sulfoximine(BSO) addition at 50 μ M or less, which was not toxic to the cells, did not affect synthesis of NO and ATP. DTT increased intracellular GSH level and DTT pretreatment protected toxicity induced by CH₃HgCl as shown complete recover in the NO and ATP values. BSO decreased intracellular GSH level and BSO pretreatment exaggerated toxicity induced by CH₃HgCl as shown synergistic reduction in the NO and ATP values.

These results indicated that the protective effects of zinc against immuno-cytotoxicity of methylmercury associated with increasing cellular level of GSH. Increased intracellular GSH transports methylmercury to out of cells. In accordance with intracellular level of mercury decreased, immuno-cytotoxicity of methylmercury decreased.

These results also suggest that the protective mechanism of zinc against the mercury toxicity would be exerted in the immune system in vivo.

Keywords : ZnCl₂, CH₃HgCl, GSH, NO, DTT, BSO

I. 서 론

Nitric oxide(NO)는 생체내에서 다양한 역할을 담당하며 많은 생리학적, 병리학적 기능을 갖고 있다.^{1,2)} 그 중에 면역계에 대해서는 cytokines에 의해 활성화된 대식세포 및 중성구와 기타 염증반응에 동

원되는 면역세포 등에 의해 생성되어 외부에서 침입한 세포 내 미생물이나 종양세포에 대한 저항성을 높여주는 주요 면역방어인자^{1,3,4,5)}임이 밝혀졌다. 한편, 특정 병원체에 감염된 실험동물은 체내의 면역세포들이 생성하는 NO량(量)에 따라 저항성 또는 감수성이 결정^{6,7,8,9)}되는데, Evans 등⁷⁾은 종(種)에 따라 서로 다르게 관찰되는 감수성과 병변의 진행정도도 유전적으로 NO 생성능력의 차이로 설명하면서 NO를 면역반응의 분자생물학적 지표로 이용하고 있다.

따라서 면역능과 밀접한 관련이 있는 NO의 생성과

[†]Corresponding author : Department of Preventive Medicine and Public Health Chonbuk National University Medical School.

Tel : 063-270-3094, Fax : 063-274-9881

E-mail : kohdh@moak.chonbuk.ac.kr

활성도의 적절한 조절은 여러 가지 면역반응과 관련된 질환의 병인을 이해하고 치료하는데 도움을 줄 것이다.

최근 환경과 관련된 독성물질 중에는 면역독성효과를 나타내는 물질들이 있는데 이것들은 NO생성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고¹⁰⁾ 있다.

이러한 물질 중에 수은은 환경 내에 존재하는 대표적인 유해 중금속으로 식품을 통한 생체내 유입은 여전히 문제로 남아 있으며 최근에는 산업장에서의 광범위한 이용으로 인체폭로가 증가하고^{11,12)} 있다. 그간의 많은 연구들은 수은에 의한 생체의 면역기능에 미치는 영향에 대해 보고하고 있는데 수은에 의한 면역반응의 변조는 주로 체액성 면역반응의 억제¹³⁻¹⁵⁾와 세포성 면역반응의 감소¹⁵⁻¹⁷⁾ 등의 결과로 나타난다고 알려져 있다. 그러나 이러한 생체면역반응의 억제와는 상반되게 체액성 면역반응의 항진과 신장에서의 자가면역항체 증가^{18,19)} 등의 결과도 일부 보고되고 있다. 이러한 연구들에서 보고한 대로 수은은 생체의 면역체계에 억제와 촉진의 두가지 상반된 양상으로 공존하고 있다는 사실을 알 수 있으며, 이를 통해 수은의 면역반응의 변조는 면역지표로 알려진 NO와 밀접한 관련성이 존재하리라 여겨진다.

또한, 수은을 포함한 중금속에 의한 세포독성의 세포내 표적기관은 미토콘드리아(mitochondria)이며, 중금속독성의 표적이면서 세포대사에 중요한 역할을 하는 sulfhydryl compounds를 함유하는 효소나 단백질은 세포내 미토콘드리아에 다량 존재하는 것으로 보고되고 있다.^{20,21)} 따라서 세포의 수은에 의한 adenosine triphosphate(ATP) 생성의 변화를 살펴봄으로써 수은에 의한 독성과정이 에너지 대사에 미치는 영향을 알아볼 수 있을 것이다.

수은의 생체내 유입시 수은에 특이적으로 결합하여 세포독성을 완화시키는 방어기능을 가지는 대표적인 물질로는 glutathione (GSH)이 있다.²⁰⁾ GSH는 -SH기를 다량 함유하여 세포내로 유입된 유해 중금속 등의 독성에 대해 방어작용을 하는 것으로 알려져 있다.^{20,21)} 수은의 세포독성에 대해 방어기능을 가진 또 다른 물질로는 아연이 있는데²²⁾ 방어기전은 GSH peroxidase 활성과 GSH 농도의 증가와 관련이 있는 것으로 보고되고²²⁻²⁴⁾ 있다. 그러나 이러한 연구결과들은 대부분이 쥐의 신장이나 간장의 조직을 이용한 것으로 수은의 세포수준에서의 면역독성에 대한 아연의 방어기전을 설명하는데는 미흡하다.

이 연구에서 이용하고 있는 EMT-6 세포주는 마우스의 유선암에서 기원한 세포주로서 cytokine의

자극으로 세포성 면역 세포인 대식세포보다 많은 양의 NO를 생성할 수 있어 일반적으로 세포성 면역변조에 대한 독성검정을 알아보기 위한 실험모델로 이용하고^{3,10,25,26)} 있다.

이 연구에서는 EMT-6 세포를 이용하여 수은의 세포면역독성에 대한 아연의 방어효과와 그 기전을 살펴보고 이러한 방어기전에 있어서 GSH의 역할을 밝히기 위해 실시하였다. 이를 위해 -SH기 보호물질로 알려진 dithiothreitol (DTT)와 세포내 GSH를 선택적으로 억제할 수 있는 buthionine sulfoximine (BSO)을 유기수은(methylmercury chloride ; CH₃HgCl) 또는 아연(zinc chloride ; ZnCl₂)과 여러 실험조건으로 처리하여 세포면역반응의 지표인 NO 생성량과 세포내 ATP 및 GSH를 측정하였고 실험조건에 따른 세포내 수은농도를 직접 정량하였다.

II. 재료 및 방법

1. EMT-6 세포의 처리

10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)을 보충한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Sigma Chemical Co., USA) 10.5 ml에 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., USA) 1.2 ml 및 FBS 3.25 ml를 혼합한 동결배양액내에 세포수가 3×10^6 인 상태로 동결보관중인 EMT-6 세포를 37°C의 수조에서 가온하였다. 빙결상태가 풀린 세포 부유액을 20 ml DMEM으로 2회 원심세척하고, 10% FBS를 보충한 DMEM(10% FBS-DMEM)이 들어 있는 배양병에서 2~3회 계대배양한 다음 24 well plate에 1×10^6 cell/well의 밀도로 배양하였다.

2. 배양조건

EMT-6 세포의 기본배양은 10% FBS-DMEM에 IL-1(Sigma Chemical Co.), IFN- γ (Sigma Chemical Co.)을 각각 40 U/ml, 20 U/ml로 첨가하여 배양하였다.

세포생존율이 현저히 저하되는 조건에서는 세포괴사로 인한 NO의 생성은 당연히 감소될 것이기 때문에, 가능한 한 세포생존율을 일정하게 최대한 유지시켜야 하는 전제사항을 만족시키기 위해서 기본배양 조건에 첨가되는 물질은 세포 생존율이 90% 이상 유지되는 농도 이하를 사용하였다.

(1) 유기수은 및 아연의 단독 첨가

유기수은(Kanto Chemical Co., Japan)과 아연(Fluka AG, Swiss)을 세포생존율이 90% 이상 유지

되는 농도이하에서 각각 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M의 농도로 첨가하여 48시간 배양하였다.

(2) 아연의 전처리 또는 유기수은과의 동시 첨가
90% 이상의 생존율을 유지하며 NO생성을 현저히 감소시키는 수은농도(8 μ M)에 동일농도의 아연(8 μ M)을 동시첨가하였고, 수은에 대한 세포 내 아연의 효과만을 알아보기 위해서 아연(8 μ M)을 전처리하여 12시간을 배양한 후 유기수은(8 μ M)을 첨가하여 48시간 배양하였다.

(3) DTT 또는 BSO의 처리

사전실험을 통해 세포생존율에 영향을 미치지 않는 DTT와 BSO 농도((Sigma Chemical Co., USA, 10~50 μ M)를 첨가하여 48시간 배양한 후 세포 내 GSH 농도를 측정하였고, 같은 농도의 DTT와 BSO를 전처리하여 12시간을 배양한 후 유기수은(8 μ M)을 첨가하여 NO와 ATP 농도를 측정하였다.

(4) 아연처리에 따른 세포내 수은 농도

아연처리 방법에 의한 세포내 유기수은의 축적량 변화는 유기수은(8 μ M)에 0.5~8 μ M 농도의 아연을 동시첨가하여 48시간을 배양하거나 아연을 전처리하여 12시간을 배양한 후 유기수은(8 μ M)을 첨가하여 다시 48시간을 배양하여 각각의 경우에서의 세포 내 수은농도를 측정하였다.

3. 배양액내 NO_2^- 의 정량

Hibbs 등²⁷⁾의 방법을 참조하여 다음과 같이 측정하였다. 배양액 50 μ l씩을 취해 microtiter plate에 옮기고 100 μ l의 Griess reagents(1:1 mixture of 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 60% acetic acid, and 1% sulfonilamide in 30% acetic acid)를 혼합하여 microtiter plate에 혼합한 다음 ELISA reader(Dynatech, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 배양액내의 NO_2^- 는 동일한 방법으로 sodium nitrate(NaNO_2)를 1~100 μ M의 범위에서 흡광도를 측정하여 만들어진 표준곡선(standard curve)을 이용하여 구하였다.

4. ATP 정량

배양한 세포를 수거한 다음 세척과정을 통해 배양액을 완전 제거한 후, 6% trichloroacetic acid(TCA) 200 μ l를 첨가하고 초음파분쇄기(ultrasonicator)를 이용하여 세포막을 파괴시킨 다음 4 $^{\circ}$ C, 1200 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 분리된 상층액 20 μ l을 100 mM glycine 80 μ l와 혼합한 다음 0.1% luciferase 100 μ l을 첨가한 후 luminometer

(Berthold, Germany)를 이용하여 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 측정하였고, 0.1~10 μ M의 범위내의 표준곡선을 이용하여 ATP 양을 계산하였다.

5. GSH 정량

세포내 GSH농도 측정은 GSH assay kit(Calbiochem, USA ; cat. #354102)을 이용하여 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 GSH를 정량하였다. 배양된 세포(5×10^6)를 수거하여 500 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심분리하여 분리한 후 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 파괴시킨 다음 10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 상층액과 동량의 10% metaphosphoric acid(MPA)를 혼합하여 다시 10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 8분간 원심분리한 다음 상층액에서 GSH assay kit를 이용하여 GSH를 측정하였다.

6. 세포 내 수은농도의 측정

EMT-6 세포내 축적된 수은의 농도를 측정하기 위한 전처리는 수거한 세포를 냉각기가 부착된 Elenmeyer flask에 담아 H_2SO_4 - HNO_3 - HClO_4 를 가하고 200 $^{\circ}$ C의 sand bath에서 가열 분해하여 KMnO_4 의 색이 10분간 남을 때까지 반복한 후, 다시 40 $^{\circ}$ C로 냉각하고, NH_2OH - HCl 용액(20% w/v)을 가하여 KMnO_4 를 제거하였다. 전처리가 끝나 시료에 3차 증류수를 첨가하여 최종용적 100 ml로 만들고 이것에 10% w/v의 SnCl_2 를 가하여 수은농도를 측정하였다. 전처리 및 측정과정에 쓰인 시약은 모두 유해 금속 측정용 및 원자 흡광분석용을 사용하였으며, 기기는 atomic absorption spectrophotometer(AAS, 선일옵트론, 한국)에 mercury vaporizer를 부착하여 측정하였다.²⁸⁾

7. 통계처리

측정자료들의 각 실험군간의 차이 및 각 처리군에서의 농도에 따른 차이의 비교는 Student's t-test 또는 ANOVA 및 Sheffe's test를 이용하였다.

III. 결 과

1. 유기수은 및 아연의 단독 첨가시 NO_2^- , ATP 및 GSH의 생성량 변화

유기수은(0.5~8 μ M)을 단독 첨가한 배양조건에서 EMT-6 세포의 NO_2^- (83.7~74.9 μ M) 및 ATP(6.6~2.8 μ M) 생성량은 첨가한 양에 따라 용량의존

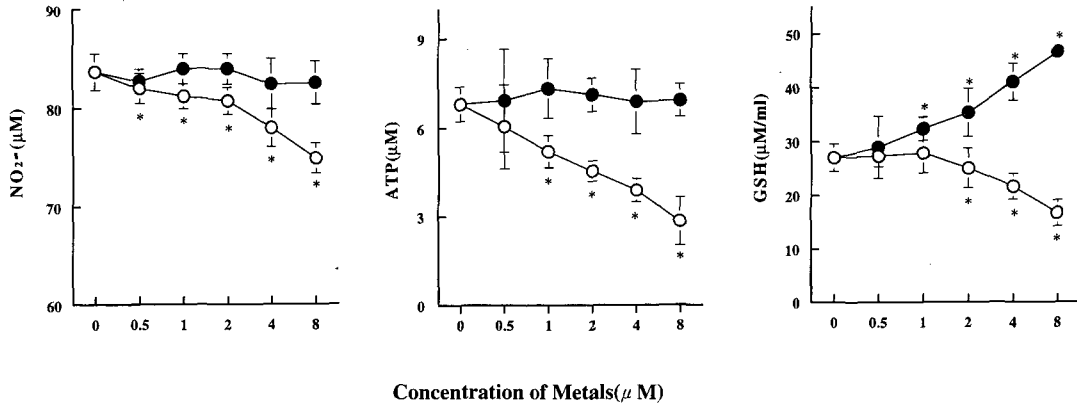


Fig. 1. Effects of CH₃HgCl (○) or ZnCl₂ (●) on the production of NO₂⁻, ATP, and GSH in EMT-6 cells which were cultured for 48 hours. Values are expressed as mean and S.D. *Significantly different from the control value at p<0.05 by Sheffe's test.

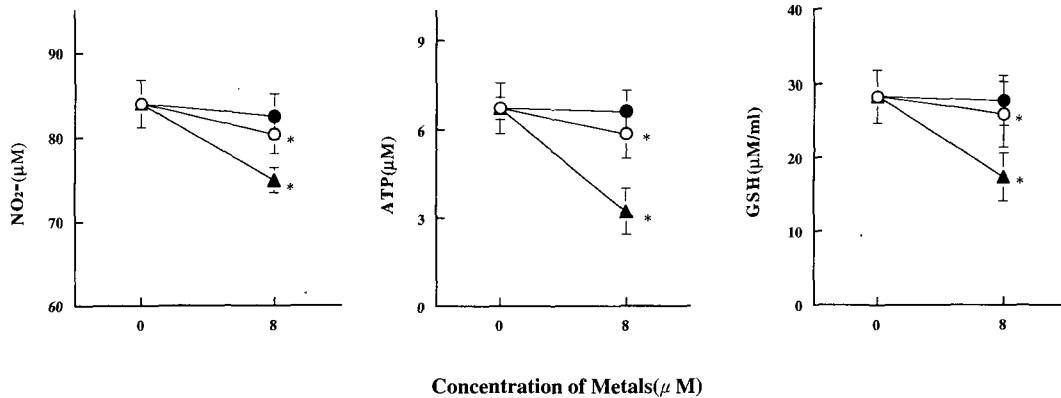


Fig. 2. Effects of ZnCl₂ on the toxicity of CH₃HgCl. EMT-6 cells were cultured with 8 μ M ZnCl₂ prior to addition of 8 μ M CH₃HgCl (●), combined addition of 8 μ M CH₃HgCl and ZnCl₂ (○), or 8 μ M CH₃HgCl only addition (▲) for 48 hours. Values are expressed as mean and S.D. *Significantly different from the value of control value at p<0.05 by t-test.

적으로 현저히 감소하였고(p<0.05), GSH의 생성량은 2 μ M 이상의 농도에서부터 대조군(27.8 μ M)보다 현저히 감소하여(p<0.05) 8 μ M 수은농도에서는 18.7 μ M을 나타내었다(Fig. 1). 아연을 단독 첨가한 배양조건에서는 NO₂⁻와 ATP 생성량은 첨가한 농도에 관계없이 대조군과 유사하였고, GSH 생성량은 첨가한 아연의 양에 따라 용량의존적으로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1).

2. 유기수은과 아연의 동시 첨가 또는 아연 전처리에 의한 NO₂⁻, ATP 및 GSH의 생성량 변화

EMT-6 세포에 8 μ M 아연과 8 μ M의 유기수은을 동시 첨가한 경우나 아연을 전처리한 후 유기수은

을 첨가한 경우, 모두 유기수은만을 단독첨가한 경우보다 NO₂⁻, ATP 및 GSH 농도는 유기수은만을 첨가한 경우보다 현저히 증가하였다(p<0.05). 그러나 증가정도는 아연을 전처리한 경우가 아연과 유기수은을 동시첨가한 경우보다 더 현저하여 대조군(기본 배양조건) 수준으로 회복되었다(p<0.05, Fig. 2).

3. 아연에 의한 유기수은의 세포 내 축적량 변화

아연과 유기수은을 동시에 첨가한 실험조건은 8 μ M의 유기수은만을 첨가한 군(38.3 ppm)과 비교하여 첨가한 아연의 농도 증가에 따라 세포 내 축적량이 35.2~18.9 ppm 범위로 현저하게 감소하였다(p<0.05). 또한 아연을 전처리한 후 유기수은을 첨가

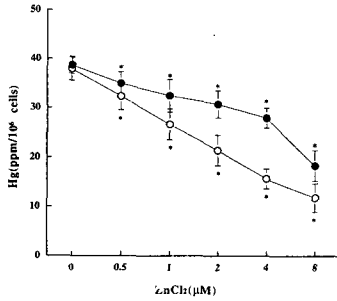


Fig. 3. Intracellular accumulation of mercury (Hg) in EMT-6 cells cultured with combined addition of 8 μ M CH_3HgCl and 0-8 μ M ZnCl_2 (●) or ZnCl_2 prior to addition of 8 μ M CH_3HgCl (○). Values are expressed as mean and S.D. *Significantly different from the values of no addition of ZnCl_2 (only 8 μ M CH_3HgCl added group) at $p < 0.05$ by Sheffe's test.

한 배양조건에서도 역시 아연과 유기수은을 동시에 첨가한 실험조건과 유사한 양상으로 세포 축적량이 감소하였으며 ($p < 0.05$) 감소정도는 아연 전처리 조건에서 (31.8~11.7 ppm) 더 현저하였다(Fig. 3).

4. DTT 또는 BSO 첨가에 따른 GSH의 생성량 변화

기본 배양조건(대조군)에 10~50 μ M의 DTT를 단독으로 첨가하여 배양한 경우 세포 내 GSH 농도는 대조군 (36.6 μ M)과 비슷하거나 30 μ M 이상의 DTT에서는 36.6~43.6 μ M의 범위로서 대조군보다 높았다($p < 0.05$). 한편, 10~50 μ M의 BSO를 첨가한 경우 세포 내 GSH 농도는 35.1~16.8 μ M로서 BSO 농도에 따라 용량의존적으로 감소하였고 30 μ M 이상의 농도에서 감소정도는 대조군에 비해 현저하였다($p < 0.05$, Fig. 4).

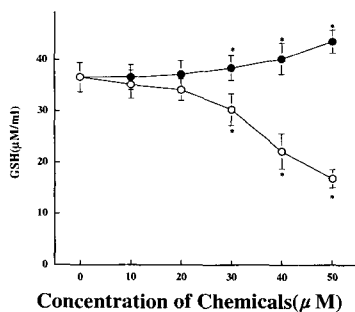


Fig. 4. The synthesis of NO_2^- and ATP from EMT-6 cells were cultured with DTT (●) or BSO (○) prior to addition of 8 μ M CH_3HgCl for 48 hours. Values are expressed as mean and S.D. *Significantly different from the corresponding control values at $p < 0.05$ by Sheffe's test.

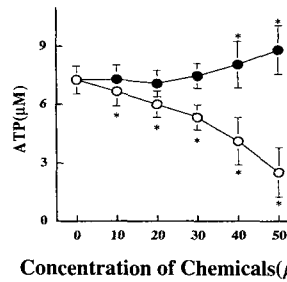
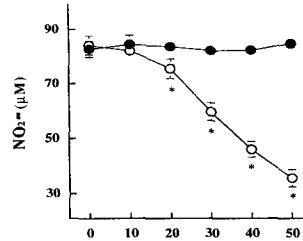


Fig. 5. The production of GSH from EMT-6 cells cultured with DTT (●) or BSO (○) for 48 hours. Values are expressed as mean and S.D. *Significantly different from the corresponding control values at $p < 0.05$ by Sheffe's test.

5. DTT 또는 BSO 전처리 후 유기수은 첨가시 NO_2^- , ATP의 생성량 변화

기본 배양조건(대조군)에 10~50 μ M의 DTT를 전처리하여 12시간을 배양한 후 8 μ M의 유기수은을 첨가하였을 때 세포의 NO_2^- , ATP 생성량은 유기수은 단독첨가시의 현저했던 감소(Fig. 1)가 대조군 수준 (82.9 μ M)으로 회복되었으며, 40 μ M 이상의 DTT 농도에서의 ATP 생성량은 8.0~8.8 μ M로 대조군의 7.3 μ M보다 높았다($p < 0.05$). 한편, 같은 실험조건으로 BSO를 전처리한 경우 세포의 NO_2^- , ATP 생성량은 첨가한 BSO 농도에 용량의존적으로 감소하였고(NO_2^- : 84.2~35.7 μ M, ATP: 7.3~2.5 μ M) 20 μ M 이상의 농도에서 감소정도는 대조군에 비해 현저하였으며 ($p < 0.05$) 감소정도는 수은을 단독 첨가한 경우(Fig. 1)보다 더 현저하게 나타나 상승효과를 보여 주었다(Fig. 5).

IV. 고 찰

수은이 동물의 면역능에 변화를 일으킨다는 사실이 밝혀진 이후²⁹⁾, 수은이 생체의 면역기능에 미치는 영향을 관찰한 많은 연구들이 보고되고 있다. 대표적인 연구로는 대식세포나 임파구의 증식억제 및 탐식

능의 변화^{30,31,32)}, 항체생성능의 변화¹⁴⁾, 표적기관인 신장병변의 특징이 자가면역성질환에서와 같이 여러 종류의 autoantibody의 증가와 동반된다는 관찰결과^{18,33,34)} 등이 있다. 이러한 연구결과들은 수은이 생체 및 인간의 면역반응에 미치는 영향은 촉진과 동시에 억제하는 특성도 갖고 있다는 사실을 보여주고 있으나 연구의 대부분은 실험조건 및 mitogen의 종류, 실험동물의 종에 따라 연구결과가 서로 다르게 나타나고 있어 수은에 의한 세포면역독성의 명확한 기전은 아직 명확히 밝히지 못하고 있다.

아연은 특정 농도조건에서 수은이 갖는 세포독성 및 기타 변이원성의 발현에 길항작용을 한다.³⁵⁾ 수은에 의한 지질과산화반응(lipid peroxidation) 및 기타 세포독성에 대해서 Fukino 등²³⁾은 아연이 생체내-SH 함유물질인 metallothionein(MT)의 생성량을 증가시켜 수은이 독성을 나타내기 전에 MT에 결합되어 독성 발현부위의 친화력을 떨어뜨리거나 항산화효소계의 활성을 증가시켜 길항한다고 하므로써 아연의 중금속에 대한 방어효과는 세포 내-SH 함유물질과 관련이 있음을 시사하고 있다. 생체에서-SH 함유물질 중 대표적인 물질인 GSH는 생체 내 신진대사, 물질이동의 조효소로서 작용하고 외부로부터 유입된 유해 중금속 등의 독성에 대해 방어작용을 하는 것으로 알려져^{20,21)} 있다. 그러나, 이러한 연구들 대부분은 수은독성에 대한 생체 내에서의 다른 방어인자들의 영향을 배제하지 못하거나 중금속의 조직 내 축적과 배출 형태에 따른 중금속의 독성여부를 간접적으로 시사하는데 그치고 있으며 세포를 이용한 in vitro 연구 또한 외부에서 첨가한 GSH는 세포막을 통과하지 못하는 특성³⁶⁾ 때문에 수은의 세포 내(內) 독성과 이에 대한 세포 내 수준에서의-SH 함유물질의 방어효과는 직접적으로 알 수가 없다.

따라서 세포막 투과가 용이하여 세포 내 GSH 농도에 영향을 줄 수 있는 물질들을 EMT-6 세포의 기본 배양조건에 수은 및 아연과 함께 여러 조건으로 첨가하여 세포 내 GSH의 변화에 따른 수은독성의 변화양상을 관찰한다면, 세포 내(內)에서의 수은독성의 발현과 이에 대한 GSH와 관련된 아연의 방어효과를 알 수 있으리라 사료된다. 이러한 효과를 알아보기 위해 이 연구에서는 세포막 투과가 용이하여 세포 내 GSH 농도에 영향을 미칠 수 있는 두 물질을 첨가하여 결과를 관찰하였다. GSH 보호물질인 DTT는 세포막 투과가 용이하고-SH기를 풍부하게 함유하고 있는 물질로-SH기와 친화성이 있는 독성물질이 세포 내로 유입되면 독성물질에 우선적으로 결합하여 세포 내

GSH를 보호한다.^{36,37)} 한편 BSO는 세포막 투과가 용이하고 GSH 합성의 첫 단계인 γ -glutamyl cysteine synthase를 비가역적으로 억제하므로써 세포내 GSH level을 감소시키는³⁸⁾ 특성이 있다.

또한 상기한 여러 물질들의 세포면역에 미치는 영향과 양상은 세포면역지표로 알려진 NO 생성능^{5,7,9)}의 실험조건에 따른 변화를 통해 유추하였으며 NO 생성량은 반감기가 극히 짧은 NO를 대신하여 그 대사물인 NO_2^- 를 측정하므로써 유추하는 Hibbs 등³⁹⁾의 방법에 따랐다.

연구 결과, 수은을 단독첨가한 조건에서 NO_2^- 농도는 염정호¹⁰⁾의 연구결과와 마찬가지로 대조군에 비해 용량의존적으로 현저히 감소하여 그간 보고된 생체에서의 수은에 의한 세포면역의 감소는 세포수준에서도 적용될 수 있으며 생체에서의 수은의 면역독성은 NO와 관련이 있음을 유추할 수 있다.

한편, L-arginine으로부터 NO 생성과정은 ATP를 필요로 하는데⁴⁰⁾ 수은에 의한 ATP 생성량의 감소는 Goyer⁴¹⁾의 연구결과에서 보고한 바와 같이 수은이 에너지 대사에 관여하는 효소의 활성을 저해하므로써 나타나는 결과로 사료된다. 따라서 염정호¹⁰⁾의 주장대로 수은에 의한 세포면역의 장애는 수은에 의해 세포 내 대사과정이 손상을 받아 NO의 생성에 필요한 에너지의 공급이 억제되어 나타난 것으로 사료된다. 또한 수은 첨가로 세포 내 GSH의 농도는 용량의존적으로 감소하고 NO 생성도 용량의존적으로 감소하고 있는데 이는 생체에서 인위적으로 GSH를 감소시키면 수은독성이 커진다는 연구결과^{37,42,43)}와 일치하고 있다. 이러한 결과는 세포 내로 유입된 독성물질은 GSH가 세포 밖으로 이동·분해되는 대사경로(γ -glutamyl cycle)를 따라 GSH의-SH기에 결합되어 세포 밖으로 배출 또는 제거되는^{37,42)} 기전을 고려할 때 세포 내로 유입된 수은은 GSH에 결합되어 세포 외(外)로 배출되거나 제거되면서 세포 내 GSH 농도는 감소하게 되고 첨가하는 수은농도를 증가시킨 경우 GSH 세포 외(外)로의 손실이 심화되어 수은의 면역독성은 점차 현저해졌음을 보여주고 있다.

이 연구에서 아연은 실험에 이용된 농도(8 μM 이하)에서는 NO_2^- 및 ATP의 생성에는 영향을 주지 않아 독성을 나타내지 않으나 세포 내 GSH 농도를 증가시켰다. 아연을 수은과 동시에 첨가하거나 아연을 전처리한 후 수은을 첨가한 배양조건에서는 NO_2^- , ATP 및 GSH의 생성량이 수은의 단독첨가 때보다 현저히 증가하였다. 따라서 수은에 대한 아연의 방어 기전은 전체적으로 아연에 의한 세포 내 GSH 농도의

증가와 밀접한 관계를 지니고 있는 것으로 나타났으며 그간의 생체를 대상으로 한 연구결과에서와 마찬가지로 수은의 면역독성에 대해서도 아연은 방어효과를 나타내는 것으로 사료된다.

한편, 중금속에 의한 세포독성은 생체에 유입된 수은의 세포막이나 세포소기관에 존재하는 결합부위(binding site)에의 접근성(accessibility) 및 결합부위를 구성하는 효소나 단백질에 함유되어 있는-SH compounds와의 친화성(affinity)의 정도와 밀접한 관련이 있는 데^{44,45)} 유기수은은 세포막 투과가 용이한 지용성 물질이면서 세포막의-SH를 함유한 단백질에 결합하여 세포 내로 이동하므로 유입속도가 빠르고 투과율이 높지만²⁶⁾ 아연은 수은보다-SH기에 대한 친화성이 상대적으로 크게 낮아 세포 내 유입속도나 투과율이 낮은 것으로 알려져⁴⁷⁾ 있다. 이 연구에서도 수은 단독첨가시의 억제되었던 NO_2^- , ATP 및 GSH의 생성은 아연을 수은과 동시첨가할 때보다 아연을 전처리한 군에서 확인하여 대조군 수준으로 회복되었다. 이것은 두 물질의 동시첨가시에는 세포 내 이동이 빠른 수은에 의한 독성효과가 먼저 발생되고 세포 내 유입속도가 느린 아연의 방어효과는 완전하게 발휘되지 못하여 나타난 때문이며, 아연의 전처리에서 수은에 대해 방어효과가 완전하게 나타나는 것은 아연의 전처리 후 충분한 시간의 경과로 아연의 세포 내 이동이 충분하게 이루어지므로써 아연에 의한 세포 내 GSH 농도증가도 충분하여 방어효과가 완전하게 나타난 결과이다. 아연에 의한 수은의 세포내 축적량 변화 실험에서도 아연을 동시 첨가한 실험조건과 아연의 전처리 실험 조건에서 세포 내 수은농도는 모두 첨가한 아연의 양에 따라 감소하였으나, 특히 아연의 전처리 실험조건에서 아연과 유기수은을 동시에 첨가한 실험조건에서 보다 현저하게 낮은 농도로 측정되는 바 수은의 면역독성에 대한 아연의 방어효과는 실질적으로 세포 내 수은 농도의 감소를 통해 이루어짐을 알 수 있다.

한편 수은의 면역독성에 대한 아연의 방어기전에서 GSH의 역할을 확인하기 위해 세포 내 GSH 농도에 영향을 줄 수 있는 물질들인 DTT^{36,37)}와 BSO³⁸⁾를 첨가한 실험에서 그간 보고된 연구결과와 마찬가지로 DTT는 세포 내 GSH를 유지 또는 증가시켰으며 BSO는 세포 내 GSH 농도를 현저히 감소시켰다. 또한, DTT 및 BSO를 전처리한 후 독성효과가 뚜렷히 나타나는 농도의($8 \mu\text{M}$) 수은을 첨가하였을 때 DTT를 전처리한 경우에는 NO_2^- 및 ATP가 대조군의 수준으로 유지되는데 BSO를 전처리한 경우에는

NO_2^- 및 ATP는 수은 단독첨가 조건보다도 더 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 수은의 면역독성이 주로 세포 내 GSH 농도감소에 의한 것임을 알 수 있다.

이러한 연구결과들로부터, 생체에서의 수은에 의한 세포성면역의 감소는 NO 생성 감소와 관련이 있음을 유추할 수 있다. 또한 수은의 면역독성에 대한 아연의 방어기전은 주로 세포 내(內)에서 발생되고 있으며 그 기전은 세포 내로 유입된 아연이 세포 내 GSH농도를 증가시키고, 반응산소기(reactive oxygen intermediates, ROI)나 기타 free radical 등의 독성물질에 대한 방어기전과 마찬가지로^{20,37)} 증가된 세포 내 GSH가 수은과 결합하여 수은을 세포 외(外)로 배출시키거나 제거하므로써 세포 내(內) 수은 농도를 감소시켜 이루어지는 것으로 사료된다. 한편 수은의 면역독성에 대한 아연의 방어기전은 생체 내에서 아연과 비슷한 기능을 수행하며 수은에 대해서는 직접 결합하여 저독성의 Hg-Se complex를 형성하므로써 방어효과를 보이는 셀레늄^{48,49)}과는 다른 기전을 통해 이루어지고 있었다.

V. 요약 및 결론

본 연구는 EMT-6 세포를 이용하여 유기수은의 세포면역독성에 대한 아연의 방어효과 및 기전을 알아보기 위하여 세포의 NO와 ATP 생성량을 독성지표로 이용하였고 각 실험조건에서 세포 내 GSH 농도와 세포 내로 유입된 수은의 양을 측정하여 아연의 방어기전을 밝히고자 하였다. 또한 GSH 합성을 억제하는 BSO와 GSH 보호물질인 DTT를 전처리하여 아연의 방어기전에 있어서 GSH의 역할을 알아보았다.

유기수은을 단독 첨가한 배양조건에서 NO_2^- , ATP 및 GSH 생성량은 대조군에 비해 용량의존적으로 현저히 감소하였다. 아연은 EMT-6 세포의 NO_2^- , ATP 생성량에는 영향을 주지 않는 농도에서 GSH의 생성량을 용량의존적으로 증가시켰다.

EMT-6 세포에 $8 \mu\text{M}$ 아연과 $8 \mu\text{M}$ 의 유기수은을 동시 첨가한 경우나 아연을 전처리한 후 유기수은을 첨가한 경우 모두에서 유기수은만을 단독첨가한 경우보다 NO_2^- , ATP 및 GSH 농도는 현저히 증가하였으며 증가정도는 아연을 전처리한 경우에서 더 현저하였다.

마찬가지로 아연에 의한 수은의 세포 내 축적량 변화에서도 두 경우 모두 현저히 감소하였는데 감소정도는 아연과 유기수은을 동시에 첨가한 실험조건보

다 아연을 전처리한 후 유기수은을 첨가한 배양조건에서 수은의 세포 축적량의 감소가 더 현저하였다.

세포 내 GSH 농도에 영향을 주는 물질을 첨가한 배양 조건에서, 세포 내 GSH 농도는 DTT 첨가시에는 대조군 수준으로 유지되거나 높았으나 BSO를 첨가한 경우에는 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 DTT 또는 BSO를 전처리한 후 유기수은을 첨가한 조건에서도 비슷한 양상으로 나타났으며, 특히 BSO 전처리 조건에서의 세포의 NO_2^- , ATP 생성량은 첨가한 BSO 농도에 용량의존적으로 감소하였고 감소 정도는 수은을 단독첨가한 경우보다 더 현저하였다.

이상의 결과, 수은의 면역독성에 대한 아연의 방어 기전은 GSH의 대사과정과 밀접한 관련이 있으며 그 기전에 있어서 아연이 유기수은과 직접 결합하여 수은의 세포 내 유입을 방해하는 것 보다는 아연이 세포 내 GSH의 생성을 증가시키면 GSH는 세포 내로 유입된 수은과 결합하여 수은의 세포 외(外) 배출 또는 제거를 촉진하므로써 세포 내(內) 수은 농도를 감소시켜 이루어지는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(981-0715-114-1)지원으로 수행되었음.

참고문헌

- 1) Snyder SH, Brecht DS : *Biological roles of nitric oxide. Scientific Am May*, 68-77, 1992.
- 2) Knowles RG, Moncada S : *Nitric oxide synthases in mammals. Biochem. J* 298, 249-258, 1994.
- 3) Amber IJ, Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z : *Cytokine induce an L-arginine-dependent effector system in nonmacrophage cells. J Leuko Biol* 43, 187-192, 1988.
- 4) Kolb H, Kolb-Bachofen V : *Nitric oxide : a pathogenetic factor in autoimmunity. Immunol Today* 13, 157-160, 1992.
- 5) Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA : *Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. J Immunol* 144, 278-283, 1990.
- 6) Nathan CF, Hibbs JB : *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Current Opinion Immunol* 3, 65-70, 1991.
- 7) Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB Jr : *Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine Leishmaniasis. J Immunol* 151, 907-915, 1993.
- 8) Granger DL, Hibbs JB, Perfect JR, Durack DT : *Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. J Clin Invest* 85, 264-273, 1990.
- 9) Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RMJ, Moncada S : *Macrophage killing of leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. J Immunol* 144, 4794-4797, 1990.
- 10) 염정호 : 수은화합물에 의한 EMT-6 세포의 nitric oxide 생성과 관련된 요인에 관한 연구. *산업의학 회지* 9(1), 122-130, 1997.
- 11) Koller LD : *Immunotoxicology of heavy metals. Int J Immunopharmacol* 2, 269-279, 1980.
- 12) Nielson JB : *Toxicokinetics of mercuric chloride and methylmercuric chloride in mice. J Toxicol Environ Health* 37, 85-122, 1992.
- 13) Koller LD, Exon JH, Brauner JA : *Methylmercury : Decreased antibody formation in mice. Proc Soc Exp Biol Med* 155, 602-604, 1977.
- 14) Lawrence DA, Mudzinski S, Rudofsky U, Warner R : *Mechanisms of metal-induced autoimmunity. In Berlin A, Dean J, Draper EH, Smith EMB, Spreafico F(Eds.), Immunotoxicology. Martinus Nijhoff, Dordrecht* 293-307, 1987.
- 15) Dieter MP, Luster MI, Boorman GA, Jameson CT, Dean JH, Cox JW : *Immunological and biochemical response in mice treated with mercury chloride. Toxicol Appl Pharmacol* 68, 218-228, 1983.
- 16) Gaworski CL, Sharma RP : *The effects of heavy metals on [3H]thymidine uptake in lymphocytes. Toxicol Appl Pharmacol* 46 : 305, 1978.
- 17) Nakatsuru S, Ohashi J, Nozaki H, Nakada S, Imura N : *Effect of mercurials on lymphocyte function in vitro. Toxicol* 36, 297-305, 1985.
- 18) Hultman P, Eneström S : *Mercury induced antinuclear antibodies in mice : Characterization and correlation with renal immune complex deposits. Clin Exp Immunol* 71, 269, 1988.
- 19) Benko V, Wagner V, Wagnerova M, Odrejkac V :

- Immunological profiles in workers occupationally exposed to inorganic mercury. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 34, 9-15, 1990.
- 20) Meister A : *Selective modification of glutathione metabolism. Science* 220, 472-477, 1983.
- 21) Singhal RH, Anderson ME, Meister A : *Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. FASEB J* 1, 220-223, 1987.
- 22) Liu J, Kershaw WC, Klaassen CD : *Protective effects of zinc on cultured rat primary hepatocytes to metals with low affinity for metallothionein. Toxicol Environ Health* 35, 51-62, 1992.
- 23) Fukino H, Hirai M, Hsueh YM, Yamane Y : *Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. Toxicol Appl Pharmacol* 73, 395-401, 1984.
- 24) Fukino H, Hirai M, Hsueh YM, Moriyasu S, Yamane Y : *Mechanism of protection by zinc against mercuric chloride toxicity in rats : Effects of zinc and mercury on glutathione metabolism. J Toxicol Environ Health* 19, 75-89, 1986.
- 25) Amber IJ, Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z : *Cytokine induce an L-arginine-dependent effector system in nonmacrophage cells. J Leuko Biol* 44, 58-65, 1988.
- 26) Amber IJ, Hibbs JB, Parker CJ, Johnson BB, Taintor RR, Vavrin Z : *Activated macrophage conditioned medium : Identification of the soluble factors inducing cytotoxicity and the L-arginine dependent effector mechanism. J Leukoc Biol* 49, 610-620, 1991.
- 27) Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR : *L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. J Immunol* 138, 550-565, 1987a.
- 28) 이재형, 이정상, 김중서, 정영호, 이황호, 고대하, 기노석 : *Mercury chloride투여에 의한 마우스의 조직내 수은농도와 LDH 활성치 및 병리학적 변화. 전북의대논문집.* 17(1), 33-46, 1993;
- 29) Polak L, Barnes JM, Turk JL : *The genetic control of contact sensitization to inorganic metal compound in guinea-pig. Immunology* 14, 707-711, 1968.
- 30) Blakley BR, Sisodia CS, Mukkur TK : *The effect of methylmercury, tetraethyl lead, and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. Toxicol Appl Pharmacol* 52, 245-254, 1980.
- 31) Castranova V, Bowman L, Miles PR, Reasor MJ : *Toxicity of metal ions to alveolar macrophages. Am J Indust Med* 1, 349-357, 1980.
- 32) Ilback NG : *Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer(NK) cell activity in the mouse. Toxicology* 67, 117-124, 1991.
- 33) Aten J, Bosman CB, Rozing J, Stijnen T, Hoedemaeker PJ, Weening J : *Mercuric chloride-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. Am J Pathol* 133, 127-138, 1988.
- 34) Hultman P, Enestrom S : *Dose-dependent studies in murine mercury-induced autoimmunity and immune-complex disease. Toxicol Appl Pharmacol* 113, 199-208, 1992.
- 35) Goering PL, Klaassen CD : *Zinc-induced tolerance to cadmium hepatotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol* 74, 299-307, 1984.
- 36) Mullaney KJ, Fehm MN, Vitarella D, Wagoner DE, Aschner M : *The role of-SH groups in methylmercuric chloride-induced D-aspartate and rubidium release from rat primary astrocyte cultures. Brain Res* 641, 1-9, 1994.
- 37) Naganuma A, Anderson ME, Meister A : *Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercury chloride toxicity. Biochem Pharmacol* 40, 693-697, 1990.
- 38) Griffith OW, Meister A : *Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine(S-n-Butyl Homocysteine Sulfoximine). J Biol Chem* 254(16), 7558-7560, 1979.
- 39) Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR, Rachlin EM : *Nitric oxide : A cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem Biophys Res Commun* 157, 87-94, 1988.
- 40) Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR : *Macrophage cytotoxicity : Role for L-arginine deamina and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science* 235, 473-476, 1987b.
- 41) Goyer RA : *Toxic effects of metals. In Amdur MO, Doull J, Klaassen CD(Eds.), Casarett and Doull's Toxicology. 5th Ed., Pergamon Press Inc., New York* 646-651, 1991.

- 42) Guillermina G, Adriana TM, Monica EM : *The implication of renal glutathione levels mercury chloride nephrotoxicity. Toxicology* 58, 187-195, 1989.
- 43) Endo T, Sakata M : *Effects of sulfhydryl compounds on the accumulation, removal and cytotoxicity of inorganic mercury by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells. Pharmacol Toxicol* 76, 190-195, 1995.
- 44) Bracken WM, Sharma RP, Bourcier DR : *Cellular distribution of inorganic mercury and its relation to cytotoxicity in bovine kidney cell cultures. J Toxicol Environ Health* 13(4-6), 865-77, 1984.
- 45) Albrecht J, Talbot M, Kimelberg HK, Aschner M : *The role of sulfhydryl groups and calcium in the mercuric chloride-induced inhibition of glutamate uptake in rat primary astrocyte cultures. Brain Res* 607, 249-254, 1993.
- 46) Zalups RK, Knutson KL, Schnellmann RG : *in vitro analysis of the accumulation and toxicity of inorganic mercury in segments of the proximal tubule isolated from the rabbit kidney. Toxicol Appl Pharmacol* 119, 221-227, 1993.
- 47) Matts RL, Schatz JR, Hurst R, Kagen, R : *Toxic heavy metal ions activate the heme-regulated eukaryotic initiation factor-2 α kinase by inhibiting the capacity of hemin-supplemented reticulocyte lysate to reduce disulfide bonds. J Biol Chem* 266, 12695-12702, 1991.
- 48) Yoneda S, Suzuki KT : *Detoxification of mercury by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. Toxicol Appl Pharmacol* 143(2), 274-280, 1997.
- 49) 고대하, 염정호, 고영상, 조선환, 오탁순 : 유기수은의 세포독성에 대한 셀레늄의 방어효과에 관한 연구. *대한산업의학회지* 10(3), 310-319, 1998.