

RAW 264.7 Cell에서 납에 의한 NO 생성의 조절에 미치는 Glutathione의 효과

신새론, 오경재¹⁾, 권근상, 윤옥희

전북대학교 의과대학 예방의학교실 및 의과학 연구소, 원광대학교 의과대학 예방의학교실¹⁾

Effect of Glutathione on Lead Induced Modulation of NO Synthesis in RAW 264.7 Cell

Sae-Ron Shin, Gyung-Jae Oh¹⁾, Keun-Sang Kwon, Wook-Hee Yoon

Department of Preventive Medicine and Public Health, Chonbuk National University Medical School and Institute for Medical Sciences; Department of Preventive Medicine and Public Health, Wonkwang University Medical School¹⁾

Objectives : To evaluate the effect of glutathione(GSH) on lead induced modulation of nitric oxide(NO) synthesis, and to examine how lead modulates NO production in macrophages.

Methods : This study was observed in a culture of RAW 264.7 cells, which originated from a tumor in a Balb/c mouse that was induced by the Abelson murine leukemia virus. The compounds investigated were lead chloride, N-acetyl-cystein(NAC), and Buthionine Sulfoximine(BSO).

Results : ATP synthesis in RAW 264.7 cells was unchanged by each lead concentration exposure in a dose dependent manner. The NO synthesis was decreased when exposed to lead(PbCl₂) concentration 0.5 μ M. The presence of 300 μ M NAC, used as a pretreatment in the culture medium, caused the recovery of the

lead induced decrease in NO synthesis, but in the presence of 300 μ M BSO as a pretreatment, there was no recovery. Pretreatment with NAC and BSO had no affect on ATP synthesis at any of the lead concentrations used.

Conclusions : These results indicated that GSH has a protective effect toward lead toxicity, and suggested that the inhibition of NO production in macrophage due to lead toxicity may be related to cofactors of iNOS (inducible nitric oxide synthase)

Korean J Prev Med 2002;35(4):269-274

Key Words: Glutathione, Lead, Buthionine sulfoximine, N-acetylcysteine, Nitric oxide

서론

납은 오래 전부터 중요한 환경 오염물질로 알려져 왔다. Hammond와 Dietrich [1]는 미국에서 3백만명의 학동기 전 아동에서 높은 혈중 납 농도를 보고하는 등, 납은 여전히 심각한 환경적 위험요인임을 시사하고있다. 납에 의한 인체 노출은 먼지, 오염된 물, 교통기관의 배기가스, 화장품, 식품 등의 환경적 노출 [2]과 납광석에서의 납생산, 고연제생, 축전지생산, 납땀, 납 성분의 착색제와 분말제를 포함한 페인트의 생산 및 분사, 도자기제조, 석유정제업 등을 통해서 이루어지고 있다 [3].

납은 세포내 소기관들에 구조적·기능적 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다 [4,5]. 또한 장기간에 걸친 저농도의 납에

의한 노출은 T cell, B cell들의 반응변화와 대식세포에서 nitric oxide(NO)생성능의 억제 등 면역체계에 이상변화를 일으킨다 [6-10]. 대식세포에서 cytokine 등에 자극되어 생성되는 NO는 대식세포의 병원균 및 암세포 등에 대한 방어기전에 중요 구성요소로서 생체의 세포성 면역체계의 조절에 관여한다 [11]. 최근 interferon- γ (IFN- γ) 결핍 마우스에서 Mycobacterium bovis의 감염에 대한 민감도 증가를 통해 IFN- γ 결핍 마우스의 NO 생산능 결핍과 관련성이 있다는 연구 [12]나 납에 의한 마우스의 비장 대식세포에서의 NO 생성억제 [13] 등의 연구 보고들은 납의 세포독성에는 NO가 직접적으로 관련되어 있음을 제시하고 있다.

최근의 연구에서 염증반응에 동원되는

세포들과 기타 면역세포들로부터 생성되는 NO는 여러 cytokine의 자극을 받은 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 효소작용에 의해 생성된 것으로 [14], 반감기가 극히 짧은 NO 대신 그 대사산물인 NO₂-를 측정함으로써 NO의 생성을 정량적으로 유추하고 있다 [15,16]. 또한 mitochondria에서 L-arginine으로부터 NO를 생성하는 과정, 즉 L-arginine NO 경로에는 ATP가 필수적으로 요구되기 때문에 [17,18] 납처리 후 세포의 ATP 생성정도의 파악은 납에 의한 NO 생성의 변조과정을 이해하는데 중요하다.

Glutathione(L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine, GSH)은 glutamic acid, cysteine, glycine으로 구성된 tripeptide로 동·식물뿐만 아니라 미생물 등, 모든 세포 내에 존재하며 생체에서 가장 풍부한 티올 기 화합물(sulphydryl compounds)의 공급원으로서 세포내 신

진대사, 물질이동의 조효소로 작용하고, 외부로부터 유입된 유해 중금속 등의 독성에 대한 방어작용을 하는 것으로 알려져 있다 [19,20]. GSH는 세포내에서 합성되어 세포 밖으로 이동되고 다시 세포내로 유입되어 합성되는 고유의 순환적인 대사경로(γ -glutamyl cycle)를 이용하여 세포의 물질수송에 관여하는데, cysteine(Cys)의 티올 군들(sulfhydryl groups)에 여러 화합물이 결합한 후 이 대사경로를 통해서 물질수송이 일어나게 되어 독성물질을 세포 밖으로 배출 또는 제거하는 기능을 가지는 것으로 보고되고 있다 [19,21-23].

한편, Tian과 Lawrence [13]는 납에 의한 마우스의 복강대식세포에서의 NO 생성 억제제는 iNOS의 보조인자(cofactor)들에 영향을 미쳐 이뤄질 수 있음을 제시하였다. 그러나 그 동안의 연구들은 납이 NO 생성의 변조에 미치는 영향에 대해서 정확한 기전을 제시하지 못하고 있는 실정이다.

이 연구에서는 Balb/c 마우스의 복강내에 Abelson leukemia virus(A-MuLV)를 주입하여 발생시킨 암종의 복수에서 기원한 RAW 264.7 세포선을 이용하여 여러 농도의 납을 첨가하거나 GSH 합성의 전구물질인 N-acetylcysteine(NAC) 또는 GSH합성의 억제물질인 buthionine sulfoximine (BSO)을 전처리하여 세포 생존율, NO 및 ATP 생성량의 변화를 관찰하여 납의 세포독성에 대한 GSH의 작용에 대해 알아보고자 실시한다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

이 연구에서 이용하고 있는 RAW 264.7 세포는 Balb/c 마우스의 복강내에 Abelson leukemia virus(A-MuLV)를 주입하여 발생시킨 대식세포주로서 IL-1 α 또는 INF- γ 등과 같은 cytokine의 자극만으로도 스스로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있어 일반적으로 세포독성을 갖는 물질들의 독성검정을 위해 유용하게

사용되고 있다 [24,25].

세포독성의 정도는 세포생존율 및 NO와 ATP 생성의 변화를 관찰하여 알아보았으며, NO의 측정은 반감기가 매우 짧은 특성 때문에 안정한 대사산물인 NO₂-를 측정함으로써 정량적으로 유추하였다.

2. 실험방법

1) RAW 264.7 세포의 준비

10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Chemical Co.) 10.5 ml에 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co.) 1.2 ml 및 FBS 3.25 ml를 혼합한 동결배양액 내에 세포수가 $2 \times 10^6/ml$ 인 상태로 동결보관중인 RAW 264.7 세포를 37-38 °C의 수조에서 가온하였다. 빙결상태가 풀린 세포부유액을 20 ml DMEM에 옮겨 원심 후 세척하는 과정을 2회 반복하고, 10% FBS-DMEM을 첨가한 배양병에서 $1 \times 10^5/ml$ 의 밀도로 2 - 3회 정도 계대배양한 다음 96 well plate에 1×10^5 cell/well의 밀도로 배양하였다.

2) 배양조건

이 실험에서의 기본 배양조건은 10% FBS를 포함한 DMEM이었으며, 세포에서 다량의 NO 생성을 유도하기 위해서 기본배양조건에 400 U/ml의 interleukin(rMu IL-1 α , Sigma Chemical Co.)와 200 U/ml 농도의 interferon- γ (rMu IFN γ , Sigma Chemical Co.)를 첨가하여 배양하였다. 납(PbCl₂, Aldrich Chemical Co.)을 여러 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μ M)로 첨가하여 48시간동안 배양하고 기본배양조건에서 동일시간 배양한 대조군과 비교하였다.

NAC(Sigma Chemical Co.)와, BSO(Sigma Chemical Co.) 전처리는 기본 배양조건에서 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도인 300 μ M로 첨가하여 24시간을 배양한 후 배양액을 제거하고 각 농도의 납이 첨가된 새로운 배양액으로 교환하여 36시간을 배양하였다. 대조군은 기본 배양조건으로 24시간을 배양

한 후 배양액을 제거한 후 새로운 배양액으로 교환하여 24시간 배양하여 실험군과 비교하였다.

3) 세포생존율 검사

배양이 끝난 후 RAW 264.7 세포의 생존율은 trypan-blue dye exclusion 방법 [26]에 의해 관찰하였다.

4) 배양액내 NO₂-의 정량

Hibbs 등 [17-18]의 방법에 따라 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 실온에서 교반한 후, 분홍의 발색을 확인하고 543 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 0-100 μ M의 sodium nitrate (NaNO₂)를 반응시킨 흡광도에 의한 표준곡선으로부터 NO₂- 농도를 구하였다.

5) ATP 정량

배양이 끝난 세포를 원심하여 PBS(pH 7.4)로 세척한 후, 6%의 trichloroacetic acid(TCA) 200 μ l를 첨가하여 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 파괴시켰다. 이를 4°C, 1,200 rpm의 조건으로 10분간 원심하여 얻은 상층액 20 μ l에 100 mM glycine 80 μ l를 첨가한 다음, HEPES buffer 2 ml에 녹인 luciferase luciferin 5 mg을 혼합하여 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 luminometer로 측정하였다.

3. 자료분석

측정은 같은 조건의 시료 3개를 동시에 실시했으며 자료들의 각 군간의 차이를 비교하기 위하여 ANOVA를 하였으며, 다중비교는 Scheffe 검정을 이용하였다.

결 과

1. 배양시간별 RAW 264.7 세포의 생존율과 NO 생성량

RAW 264.7 세포의 기본배양조건에 cytokines을 첨가한 후 배양했을 때, 세포생존율은 48시간까지는 평균 95% 이상을 유지하였으나, 48시간 이상의 배양 결과에서는 그 생존율이 감소하였다 (Figure 1). NO 생성량은 배양 12시간 후의 측정치에 비해 48시간째의 측정치는 증가하였으며, 48시간 이후에는 그 생성량이 감소하였다 (Figure 2).

2. 납 투여에 의한 시간 경과별 RAW 264.7 세포의 세포생존율

기본 배양조건에 여러 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μM)의 납을 첨가했을 때 배양 후 48시간까지는 0.5 μM 농도 이하에서 세포생존율은 첨가한 납의 농도에 상관없이 95% 이상 수준을 유지하였다 (Figure 3).

3. 납 처리시, NAC, BSO의 전처리와 납의 투여시 NO 생성량

RAW 264.7 세포의 기본배양조건에 여러 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μM)의 납을 첨가했을 때 배양 후 48시간까지 NO 생성량은 0.5 μM 의 납의 농도이상에서부터 대조군보다 현저히 감소하였다 ($p < 0.05$)(Figure 4). NAC을 24시간 전처리한 후 각 농도의 납이 포함된 새로운 배양액으로 교환하여 다시 24시간을 배양했을 때 납의 각 농도군에서 NO 생성량은 대조군 수준으로 회복되었다 (Figure 4). BSO를 24시간 전처리한 후 각 농도의 납이 포함된 새로운 배양액으로 교환하여 다시 24시간을 배양했을 때의 NO 생성량은 납만 투여했을 때와는 달리 저농도에서부터 대조군보다 현저히 저하되었다 ($p < 0.05$) (Figure 4).

4. 납 처리시, NAC, BSO의 전처리와 납의 투여시 ATP 생성량

납의 각각의 농도에서 납 처리시, NAC, BSO의 전처리군들에서 ATP 생성

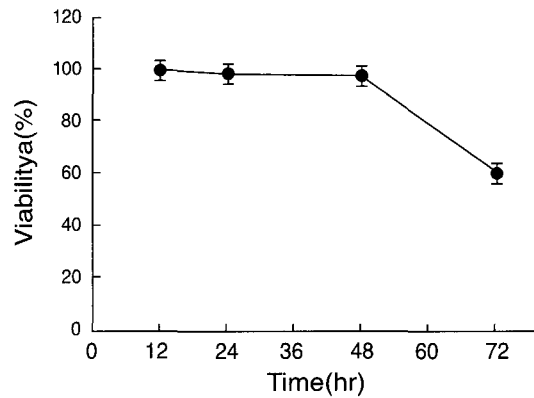


Figure 1. The viability of RAW 264.7 cells in DMEM containing 10% FBS and cytokines (IL-1 α 400 U/ml and IFN- γ 200 U/ml). Viability were continuously measured at 12, 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.

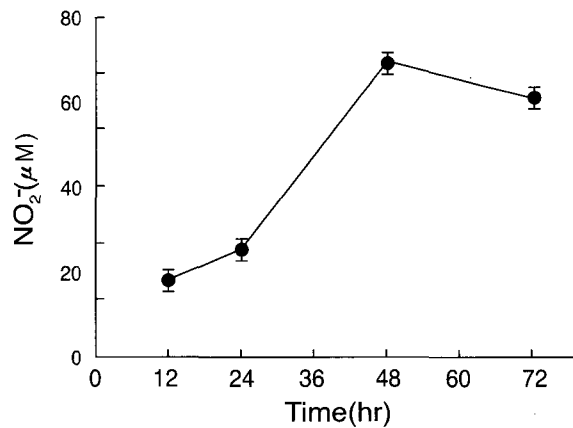


Figure 2. The synthesis of NO₂⁻ from RAW 264.7 cells in DMEM containing 10% FBS and cytokines (IL-1 α 400 U/ml and IFN- γ 200 U/ml). NO₂⁻ were continuously measured at 12, 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.

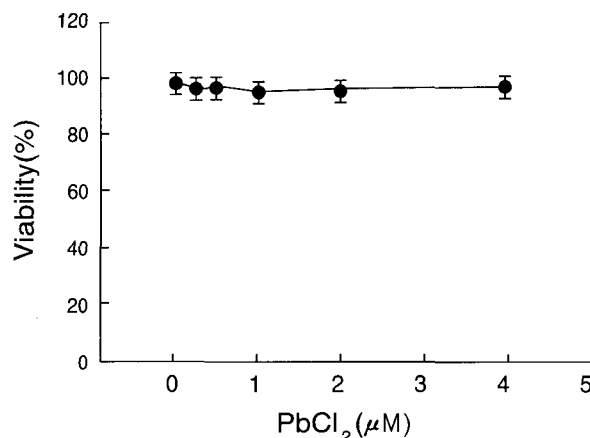


Figure 3. The effect of PbCl₂ on viability of RAW 264.7 cells in DMEM containing 10% FBS, cytokines (IL-1 α 400 U/ml and IFN- γ 200 U/ml). Viability were measured at 48 hours after incubation. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.

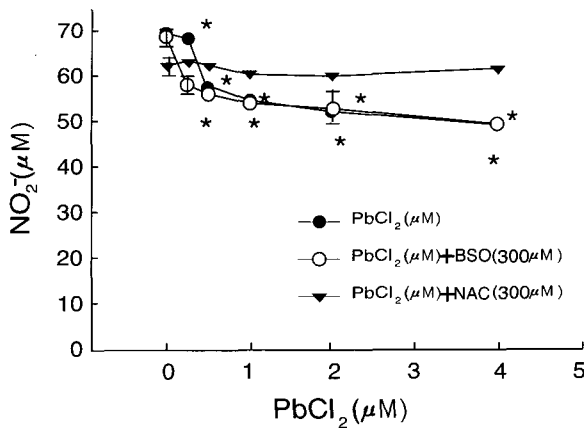


Figure 4. The effect of PbCl₂ on synthesis of NO₂⁻ from RAW 264.7 cells which were cultured in DMEM containing 10% FBS, cytokines (IL-1α 400 U/ml and IFN-γ 200 U/ml). Synthesis of NO₂⁻ were measured at 48 hours after incubation. Production of NO₂⁻ in RAW 264.7 cells cultured with 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μM PbCl₂ after 24 hours-pretreatment of NAC, BSO in DMEM containing 10% FBS, cytokines (IL-1α 400 U/ml and IFN-γ 200 U/ml). Synthesis of NO₂⁻ were measured at 24 hours after incubation. Values are expressed as mean ± S.D. of three experiments. *Significantly different from the control at p<0.05 by Scheffe's test.

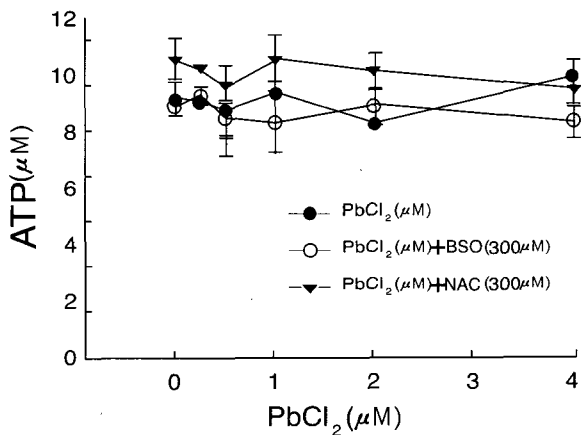


Figure 5. The effect of PbCl₂ on synthesis of ATP from RAW 264.7 cells which were cultured in DMEM containing 10% FBS, cytokines (IL-1α 400 U/ml and IFN-γ 200 U/ml). Synthesis of ATP were measured at 48 hours after incubation. Production of ATP in RAW 264.7 cells cultured with 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μM PbCl₂ after 24 hours-pretreatment of NAC, BSO in DMEM containing 10% FBS, cytokines (IL-1α 400 U/ml and IFN-γ 200 U/ml). Synthesis of ATP were measured at 24 hours after incubation. Values are expressed as mean ± S.D. of three experiments.

량은 대조군과 차이가 없었다 (Figure 5).

고찰

납에 폭로된 동물 등에 대한 연구에서 납 노출군은 대조군에 비해 *Listeria monocytogenes* 같은 세포내 박테리아나 [27,28] *Salmonella typhimurium* 같은 세포외 박테리아 [29] 그리고 *Escherichia coli* [30]의 감염에 더 민감한 것으로 보고되고 있다. 또한 Kaufmann [31]은 NO가 병원물질의 파괴나 억제에 중요한 역할을 담당함을 밝혔으며, Tian과 Lawrence [13]는 납이 대식세포에서 NO 생성을 억제한다고 보고하고 있어 납에 의한 면역활성화의 변화에 NO가 연관되어 있을 개연성을 알 수 있다. 그러나 납이 어떠한 기전에 의해서 NO 생성을 억제한다는 것은 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

납의 독성에 대한 GSH의 방어기능은 많은 연구자의 관심을 끌어들였다. Julian 등 [32]은 human small intestinal epithelial cell line에서 납과 GSH의 동시 처리는 세포생존율을 감소시키지 못했으나 NAC의 전처리후 납을 처리시에는 세포생존율이 감소하는 것을 확인하였고 Ercal 등 [33]과 Manisha 등 [34]은 실험동물에서 NAC 처리에 의한 착화는 간과 혈중에 납의 축적을 감소시켜서 납의 독성에 대한 방어작용을 나타낸다고 보고하고 있다. 그러나 위의 연구들은 거시적으로 세포생존율의 관찰결과의 기술이고 납의 독성에 대한 생체내에서의 다른 방어인자들의 영향을 배제하지 못하고 있다. 따라서 납의 독성에 대한 GSH의 정확한 방어기전을 설명하기 위해서는 여러 인자들의 영향을 통제된 상태의 실험관찰이 요구된다.

염증반응과 관련된 세포 및 기타 면역세포들로부터 생성되는 NO는 TNF-α, IL-2, IFN-γ 등의 여러 cytokine의 자극을 받은 iNOS의 효소작용에 의해 생성된 것으로써 외부에서 침입한 세포내 병원체 등에 대항하여 성장을 억제하거나 세포독성을 나타내어 방어작용을 나타낸

다 [14]. 그러나 이 경우 NO는 고농도로 분비되어 외부에서 침입한 미생물에 대해 방어작용을 나타낼 뿐만 아니라 정상적인 주위세포에도 자가독성을 나타내거나 과민반응을 초래할 수도 있다. 이 연구에서 cytokine의 첨가로 RAW 264.7 세포를 활성화시켰을 때 NO 생성량과 세포 생존율은 시간경과에 따라 배양 48시간까지는 현저히 증가하였으나 그 이후로는 감소하였다. 이 결과는 대식세포에서 NO가 고농도로 분비되는 경우 주위세포에 자가독성을 나타내는 특성 [35]을 고려할 때, 다량 생성된 NO는 세포들의 생존율을 낮추었을 것이고 이후 생존율의 급격한 감소에 따라 생존세포에 의한 NO 생성량 또한 감소한 결과로 여겨진다.

한편 NAC과 BSO는 주어진 농도의 그 자체로서는 세포생존율, NO 및 ATP 생성에 영향을 주지 않았다(자료 제시하지 않았음). GSH의 전구물질인 NAC의 전처리하는 저농도의 납에 의해 감소되는 NO 생성을 대조군 수준으로 회복시키고 있고 GSH의 억제물질인 BSO의 전처리하는 오히려 NO 생성을 더욱 저하시키고 있어 GSH는 납에 의한 NO 생성에 영향을 미치고 있음을 보여주고 있다. 이로써 GSH는 세포독성에 대해 방어효과가 있음을 알 수 있다. 그러나 NAC과 BSO의 전처리하는 모두 ATP생성에는 영향을 미치지 않았다. 한편 thiol 기에 대한 친화력이 매우 높은 수은, 카드뮴 등은 미토콘드리아내의 thiol 기를 포함한 효소들의 활성억제를 통해 ATP생성 감소를 유도함으로써 ATP를 필요로 하는 L-arginine-NO 생성경로를 경유하는 NO 생성을 억제한다고 알려져 있다. 그러나 이 연구에서 납이 ATP생성에는 영향을 미치지 않는 결과는 납은 수은 또는 카드뮴의 세포독성과는 다른 기전에 의해 세포독성이 이루어짐을 유추할 수 있다 [36,37]. 또한 Tian과 Lawrence [13]는 iNOS의 thiol 기에 납의 결합만으로는 NO 생성을 억제하지 못한다는 것을 보였고 Stuehr 등 [38]은 대식세포에서 NO 생성에는 FAD, GSH 등이 관여하는데 납을 처리시 NO 생성의 감소는 납이 GSH나 다른

thiol 기에 결합하여 iNOS의 활성도를 감소시킨 결과라는 것을 제시하였다. 즉 저농도에서 납의 NO생성 억제과정은 미토콘드리아 이외의 NO 생성과정에 필요한 thiol 기를 포함한 다른 보조인자들과의 결합에 의해 간접적으로 iNOS의 기능을 억제시켜 나타날 개연성이 높다. cytokine의 자극을 받은 마우스의 대식세포에서 유도된 iNOS의 활성화에 관련된 보조인자들로서는 tetrahydrobiopterin (BH4), calmodulin, GSH, FAD, FMN 등이 있는데 이러한 물질들은 모두 thiol 기를 포함한다.

향후 연구들에서는 저농도의 납이 iNOS의 각각의 보조인자들에 미치는 정확한 기전을 알아보기 위해서 분자생물학적 접근이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

Balb/c 마우스의 복강내에 Abelson leukemia virus (A-MuLV)를 주입하여 발생시킨 대식세포주 RAW 264.7 세포의 배양조건에 납과 NAC 및 BSO를 첨가하여 세포생존율과 NO 및 ATP 생성량의 변화를 관찰한 결과, 납을 처리한 기본배양조건에서 RAW 264.7 세포의 생존율은 각 농도에서 차이가 없었으며 NO의 생성량은 0.5 μ M의 납농도에서부터 용량 의존적으로 감소하였으나 ATP의 생성량은 각 농도군에서 차이가 없었다. NAC을 전처리하고 납을 처리한 배양조건에서의 NO 및 ATP의 생성량은 대조군과 차이가 없었다. BSO를 전처리하고 납을 처리한 배양조건에서의 NO의 생성량은 납만 처리했을 때와 달리 각각의 농도군에서 대조군과 차이가 있었다. ATP생성량은 역시 차이가 없었다.

이상의 결과에서 납의 농도가 증가함에 따라 ATP의 생성량은 변화가 없으면서 NO가 감소하는 것을 볼 때, 납에 의한 대식세포에서 NO 생성의 억제기전은 수은 및 카드뮴 등과 같이 미토콘드리아에 영향을 미쳐 ATP생성이 억제됨으로써 L-arginine-NO 경로에서 ATP를 필요로 하는 iNOS가 작용을 못하여 NO생성이

저하되는 기전과는 다른 기전이 있음을 보여준다. 또한 iNOS의 조효소인 세포내 GSH를 증가시키는 NAC을 전처리했을 때 NO의 생성량이 대조군 수준으로 회복되고 세포내 GSH를 감소시키는 BSO를 전처리했을 때는 오히려 NO의 생성량에 영향을 미치지 않는 납의 농도에서조차 NO생성의 감소가 일어난 것으로 볼 때 GSH는 대식세포에서 NO생성을 저하시키는 납의 독성에 보호작용이 있음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Hammond PB, Dietrich KN. Lead exposure in early life: Health consequence. *Rev Environ Contam Toxicol* 1990; 115: 91-124
2. Lochitch, G. Perspectives on lead toxicity. *Clin Biochem* 1993; 26: 371-381
3. Klassen C.D. The basic science of poison. Casarett and Dull's Toxicology. 5th ed. 1995. p. 703-709
4. Klassen. C.D. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.(A. G. Gilman, T. W. Tall, A. S. Nies, and P. Taylor, Eds.). 8th ed. 1990. p. 1592-1614 Pergamon. Elmsford, NY.
5. Keogh, J. P. Lead In Hazardous Materials Toxicology-Clinical Principles of Environmental Health(J. B. Sullivan, Jr., and G. G. Krieger, Eds.), 1992. p. 834-844 Williams & Wilkins. Baltimore.
6. Sachs. H. K. Intercurrent infections in lead poisoning. *Am J Dis Child* 1978; 32: 315-316
7. Ewers. U., Stiller-Winkler, R., Idel, H. Serum immunoglobulin, complement C3, and salivary IgA levels in lead workers. *Environ Res* 1982; 29: 351-35
8. Dean, J.H., Murray, M.I., Ward, E.C. Toxic responses of the immune system. The Basic Science of Poisons. 1996. 3rd ed. p. 245-309
9. Governa. M., Valentino. M., Visona, I. In vitro impairment of human granulocyte function by lead. *Arch Toxicol* 1987; 59: 421-425
10. Kowolenko, M., McCabe, M. J., Lawrence. D. A. Metal induced alterations of immunity. *Int Clin Immunotoxicol* 1992; 401-409
11. Nussler, A. K., Billar, T. R. Inflammation immunoregulation and inducible nitric

- oxide synthase. *J Leuk Biol* 1993; 54: 171-178
12. Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A., and Stewart, T. A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. *Science* 1993; 259: 1739-1742
 13. L. Tian and D. A. Lawrence. Metal-induced modulation of nitric oxide production in vitro by murine macrophages: lead, nickel, and cobalt utilize different mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 141: 540-547
 14. Snyder S.H., Brecht D.S. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am May* 1992; 28-35
 15. Bartholomew B. A rapid method for the assay of nitrate in urine using the nitrate reductase enzyme of *Escherichia coli*. *Food Chem Toxicol* 1984; 22: 541-549
 16. Hibbs J.B., Vavrin Z, Taintor R.R., Rachlin E.M. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 87-94
 17. Hibbs J.B., Vavrin Z, Taintor R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987; 138: 550-565
 18. Hibbs J.B., Vavrin Z, Taintor R.R. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235: 473-476
 19. Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983; 220: 472-477
 20. Singhal RH, Anderson ME, Meister A. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J* 1987; 1: 220-223
 21. Guillermina G, Adriana TM, Monica EM. The implication of renal glutathione levels in mercury chloride nephrotoxicity. *Toxicology* 1989; 58: 187-195
 22. Naganuma A, Anderson ME, Meister A. Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercury chloride toxicity. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 693-697
 23. Tanaka T, Naganuma A, Imura N. Role of gamma-glutamyl-transpeptidase in renal uptake and toxicity of inorganic mercury in mice. *Toxicology* 1990; 60: 187-198
 24. Hon W.M., Chhatwal V.J.S., Khoo H. E., Mochhala S.M. Histochemical method for detecting nitric oxide synthase activity in cell cultures. *Biotechnic Histochemistry* 1997; 72(1): 29-32
 25. Wang W.W., Jenkinson C.P., Griscavage J.M., Kern R.M., Arabolos N.S., Byrins R.E., Cederbaum S.D., Ignarro L.J. Co-induced of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 1009-1016.
 26. Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability. In Kruse PR, Patterson MK(Eds.), *Tissue Culture Method and Application*. Academic Press, New York. 1973, pp. 406-408
 27. Lawrence, D.A. In vivo and in vitro effects of lead on humoral and cell-mediated immunity. *Infect Immun* 1981; 31: 136-143
 28. Kowolenko, M., Tracy, L., and Lawrence, D. A. Early effects of lead on bone marrow cell responsiveness in mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *Fundam. Appl. Toxicol* 1991; 17: 75-82
 29. Hemphill, F., Kaerberle, L. M., and Buck, W. B. Lead suppression of mouse resistance to *Salmonella typhimurium*. *Science* 1971; 172: 1031-1033
 30. Cook, J. A., Hoffman, E. O., and Di Luzio, N. R. Influence of lead and cadmium on the susceptibility of rats to bacterial challenge. *Proc Exp Biol Med* 1975; 150: 741-747
 31. Kaufmann, S. H. E. Immunity to intracellular bacteria. In *Fundamental Immunology*; 3rd ed. 1993. p. 1251-1286
 32. Julian P. Keogh, Britta Steffen, Claus-Peter Siegers. Cytotoxicity of heavy metal in the human small intestinal epithelial cell line I-407. *Toxicol Environ Health* 1994; 43: 351-359
 33. Ercal N, Treeratphan P, Hammond TC, Matthews RH, Grannemann NH, Spitz DR. In vivo indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(2): 157-61
 34. Manisha Pande, Ashish Mehta, Bhagwat P, Pant and Swaran J.S. Flora. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001; 9: 173-184
 35. Green S.J., Meltzer M.S., Hibbs J.B., Nacy C.A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 1990; 144: 278-283
 36. Youm JH. A Study on Factors Related to NO Synthesis by Mercurial Compounds in the EMT-6 cell. *Korean J Occupational Medicine* 1997; 9(1): 122-130 (Korean)
 37. Oh GJ, Koh DH, Youm JH. NO₂⁻ and ATP synthesis in the EMT-6 cell stimulated by mercury chloride. *Korean J Prev Med* 1996; 29(3): 495-505 (Korean)
 38. Stuehr. D. J., Kwon. N. S., Nathan, C. F. FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 558-565