

제 목	국 문	수은 및 셀레늄이 EMT-6 세포에 미치는 효과		
	영 문	Effects of mercury and selenium on the EMT-6 cell		
지 자 및 소 속	국 문	권근상, 오경재, 염정호, 고대하, 기노석 전북대학교 의과대학 예방의학교실		
	영 문	Keun Sang Kwon, Gyung Jae Oh, Jung Ho Youm, Dai Ha Koh, No Suk Ki <i>Chonbuk National University Medical School</i>		
분 야	환 경	발 표 자	권근상(전공의)	
발표 형식	구 연	발표 시간	15 분	
진행 상황	연구완료 (    ), 연구중 ( V ) → 완료 예정 시기 : 96 년 11 월			
<p>1. 연구 목적</p> <p>마우스의 유선암에서 기원한 EMT-6 cell line을 이용하여 유기수은 및 무기수은을 첨가한 배양조건에서 세포의 생존률과 세포내 ATP(adenosine triphosphate)의 생성농도 및 EMT-6 세포의 NO의 생성능이 수은에 의해 변화되는 양상을 비교하였으며, 수은의 독성에 대해 생체내에서 길항작용을 하는 것으로 알려진 셀레늄(selenium)을 첨가하였을 때의 변화를 관찰하므로써, 수은의 세포독성 및 면역독성에 관한 기전연구에 일조할 수 있는 자료를 얻고자 한다.</p> <p>2. 연구 방법</p> <p>1) EMT-6 세포의 배양과 수은첨가</p> <p>10% FCS(fetal calf serum)을 포함한 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium)을 배양액으로 사용하였으며, 40U/ml의 interleukin과 20U/ml농도의 interferon를 첨가하였다. 유기수은은 대조군(0 μM)외의 5개 실험군에 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μM의 농도로, 무기수은 대조군(0 μM)외의 5개 실험군에 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 μM의 농도로 각각 첨가하여 24시간을 배양하였으며, 셀레늄은 각각의 수은화합물과 동일한 농도(mol)로 첨가하였다.</p> <p>2) 세포생존률 검사</p> <p>배양이 끝난 후에 EMT-6 세포의 생존률은 trypan-blue exclusion 방법에 의해 관찰하였다.</p> <p>3) 배양액내 nitrite의 정량</p> <p>배양액 50 μl씩을 취해 microtiter plate에 옮기고 100 μl의 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 543nm에서 흡광도를 읽었으며, 0-100 μM의 sodium nitrate에 의한 표준곡선으로부터 농도를 구하였다.</p>				

#### 4) ATP 정량

배양한 세포를 6% trichloroacetic acid(TCA)를 이용하여 세포막을 파괴시킨후 luciferase luciferin 5mg을 HEPES buffer 2ml와 함께 첨가하여 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 luminometer로 측정하였다.

### 3. 연구결과

#### 1) 셀레늄 단독첨가시 세포생존률 및 nitrite 생성량

EMT-6 세포는 모든군에서 95%이상의 세포생존률을 보였으며 nitrite 생성량은 67-69  $\mu\text{M}$ 의 범위로 관찰되는데, 이는 첨가한 셀레늄의 농도와는 무관하여 일정한 수준으로 대조군에 비해 차이가 없었다( $p>0.05$ ).

#### 2) 수은농도별 EMT-6 세포의 생존률과 nitrite 생성능

수은화합물을 첨가한 배양조건에서 EMT-6 세포의 생존률은 무기수은의 경우는 0.8  $\mu\text{M}$  이하, 유기수은의 경우 0.4  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서는 95% 이상으로 유지되었으며, 그 이상의 농도에서 생존률은 현저히 감소하였으며( $p<0.01$ ), 무기수은에 비해 유기수은의 세포생존률이 전반적으로 높게 관찰되었다( $p<0.05$ ).

#### 3) 수은화합물과 셀레늄의 동시처리시 EMT-6 세포의 nitrite 생성능

배양액에 무기수은과 동일한 농도로 셀레늄을 첨가한 경우에 nitrite 생성량은 모든 실험군에서 67-69  $\mu\text{M}$ 의 범위로써 대조군의 수준으로 회복되었으며( $p>0.05$ ), 무기수은만을 단독으로 첨가한 조건들과 비교할 때 0.4  $\mu\text{M}$  이상의 고농도군에서 특히 현저한 차이를 보였고( $p<0.01$ ), 유기수은 역시 생성량의 감소정도를 현저히 완화시키는 것으로 나타났다( $p<0.05$ ).

#### 4) 수은화합물과 셀레늄의 동시처리시 EMT-6 세포의 ATP 생성능

같은실험조건에서 배양액에 무기수은과 동일한 농도로 셀레늄을 첨가하므로써 ATP 생성량이 19-22 mM의 범위로 회복되었으며( $p<0.05$ ), 유기수은 역시 ATP 생성량의 감소정도를 현저히 완화시키는 것으로 나타났으나( $p<0.01$ ) nitrite 생성의 보상보다는 ATP의 생성량에 대한 셀레늄의 보상효과가 좀 더 현저하게 나타났다.

### 4. 고찰

nitrite생성량과 ATP생성량이 수은첨가로 동시에 감소하는 바, 수은에 의한 세포성 면역의 저하는 면역세포의 NO생성량의 감소에 의한 것으로 사료되며, 이는 수은이 세포내 에너지생산에 관련된 대사과정을 억제시키므로써 나타나는 결과라고 판단된다. 그리고 수은과 동일농도의 셀레늄 첨가로 nitrite 및 ATP 생성량의 감소정도가 완화되는 것을 통해 셀레늄이 수은의 세포독성을 방어하는 능력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.