

## 수은이 시험관내 사람 다형핵백혈구의 기능에 미치는 영향

한형미\* · 윤은이 · 김순환 · 김옥연 · 김효정 · 선우연

국립보건안전연구원

### Effect of Mercuric Chloride (*In Vitro*) on the Function of Human Polymorphonuclear Leukocytes(PMNs)

Hyung-Mee HAN\*, Eun Yi YOON, Soon Han KIM, Ok Yeon KIM, Hyo Jung KIM and Yearn SUNWOO

National Institute of Safety Research 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul 122-020, Korea

(Received August 30, 1993; accepted September 28, 1993)

**Abstract**—In the present study, the effect of HgCl<sub>2</sub> on the function of human peripheral polymorphonuclear leukocytes(PMNs) was examined. PMNs were isolated from human peripheral blood with density centrifugation in Ficoll-Paque. The cells were then incubated with 0.5~5 μM HgCl<sub>2</sub> and glass adherence, chemotactic activity and erythrocyte-antibody rosette forming activity were measured. HgCl<sub>2</sub> decreased the function of PMNs in all three aspects tested. HgCl<sub>2</sub> significantly diminished glass adherence(0.5 μM: 92±12% (percentage of control, mean±S.D.); 1 μM: 46±11%, P<0.01; 3 μM: 35±7%, P<0.01; 5 μM: 49±10%, P<0.01). Similarly, significant differences were observed in chemotactic activity after HgCl<sub>2</sub> treatment compared with control (control: 0.95±0.14 mm; 0.5 μM: 0.91±0.11 mm; 1 μM: 0.77±0.16 mm, P<0.05; 3 μM: 0.61±0.06 mm, P<0.01; 5 μM: 0.15±0.03 mm, P<0.01). Also, HgCl<sub>2</sub> decreased the percentage of rosette-forming PMNs, indicating diminished phagocytic activity of PMNs upon HgCl<sub>2</sub> exposure compared with control (control: 58±4%; 1 μM: 53±4%, P<0.05; 3 μM: 49±3%, P<0.01; 5 μM: 46±3%, P<0.01). Cell viability was not altered after HgCl<sub>2</sub> treatment (83±5% viability in control PMNs versus 81±8% viability in 5 μM HgCl<sub>2</sub>-treated PMNs), suggesting that the impaired PMN function after HgCl<sub>2</sub> treatment was not due to nonspecific cytotoxicity induced by HgCl<sub>2</sub>. HgCl<sub>2</sub>-induced decrease in the function of PMNs may have some implications in depressed host susceptibility upon bacterial challenge after mercury exposure.

**Keywords** □ heavy metal, mercury, polymorphonuclear leukocyte, immunotoxicity

세균이나 바이러스 등이 체내에 침입했을 경우 혈중 다형핵백혈구는 손상조직으로 급격히 이동한다. 이러한 급성염증반응은 다형핵백혈구가 혈관내피세포에 부착(adhesion)하고 조직으로 이동(chemotaxis)하여 탐식작용(phagocytosis)과 소화작용(digestion)을 나타냄으로써 이루어지는데 이러한 다형핵백혈구의 일련의 작용들은 체내에 세균, 바이러스 등의 침입시 일차적 방어역할을 담당하는 것으로 생각되어지고 있다(Abbas 등, 1991).

환경오염물질인 납, 수은, 카드뮴 등의 중금속은 소화기 독성, 중추신경계 독성, 신경계 근육독성 등을 유발하는 것으로 알려져 왔다(Klaassen, 1991). 또한 근래에는 위에 언급된 여러가지 독성들 이외에도 중금속들의 면

역기능에 미치는 영향에 대한 연구가 시작되고 있다. 그 중 지금까지 보고되어온 수은의 면역계에 대한 영향을 살펴보면 Koller(1975)는 수은에 노출된 마우스에서 encephalomyocarditis 바이러스에 대한 숙주저항력이 감소하였다고 보고하였으며 또한 그의 과학자들은 수은이 체액성 면역 및 세포성 면역을 저하시킨다고 보고하였다(Koller 등, 1977; Gaworski와 Sharma, 1978; Hirokawa와 Hayashi, 1980; Blakley 등, 1990).

이와같이 수은의 체액성 면역, 세포성 면역 및 숙주저항력에 대한 연구는 비교적 활발한 반면에, 수은의 다형핵백혈구에 미치는 효과에 대하여는 아직 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 ring slide를 이용하여 유리면 부착능, agarose plate를 이용하여 화학주성능 등을 측정하였으며, 또한 erythrocyte antibody-rosette

\*To whom correspondence should be addressed.

(EA-로제트) 형성능을 측정하여 수온이 다형핵백혈구의 기능에 미치는 영향을 검색하였다.

## 실험방법

### 실험재료 및 시약

Heparin은 녹십자로부터 구입하였고 Ficoll-Paque은 Pharmacia(Piscataway, NJ, USA)로부터 구입하였다. Agarose는 International Biotechnologies Inc.(New Haven, CT, USA)로부터 구입하였으며 그외 formylmethionyl leucyl phenylalanine(FMLP), glutaraldehyde, IgG against sheep red blood cell, Hank's Balanced Salt Solution(HBSS), Modified Eagles's Media(MEM) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

### 말초혈액 다형핵백혈구의 분리

Heparin 처리한 정상 사람 말초혈액 10 ml을 4 ml의 Ficoll-Paque에 조심스럽게 중층한후 400g에서 20분간 비중변화도 원침법(density gradient centrifugation)을 시행하였다. 그 후 상층에 있는 혈장을 조심스럽게 제거하고 Ficoll-Paque와 적혈구층 사이에 있는 다형핵백혈구층을 파스퇴르 피펫으로 조심스럽게 거둬내었다. 거둬낸 과립백혈구 등은 15 ml 시험관에 넣고 섞여있는 적혈구를 용혈시키기 위해 7 ml의 증류수를 첨가하여 10~20초간 hypotonic shock을 시행하였다. 적혈구를 용혈시킨 후 3% NaCl 용액 3 ml을 첨가하여 등장액을 만들어 다형핵백혈구의 파괴를 막은 다음 이를 5분간 1500 rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하고 남은 세포를  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 이 있는 HBSS 용액으로 2회 세척하였다. 세척이 끝난 후  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 이 있는 HBSS 용액으로 희석하여 trypan blue dye exclusion 방법으로 세포수를 측정하고 다음 각 시험에 따라서 적절한 농도로 부유시킨 후 실험에 사용하기까지 얼음위에 보관하였다.

### 유리면 부착능 측정

다형핵백혈구의 유리면 부착능은 slide 방법을 이용하였다(Krause 등, 1982). 다형핵백혈구를 complete MEM(10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 unit/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin 함유)에  $3 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 조정하고 후 동량의  $HgCl_2$ ( $HgCl_2$ 의 최종농도: 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M)와 혼합하여 ring slide에 20  $\mu$ l씩 떨어뜨렸다. 37°C 항온항습기에서 45분간 반응시킨 후 따뜻한(37°C) complete MEM으로 2회 세척한 후 2% glutaraldehyde 용액으로 고정하였다. Slide에 부착된 다형핵백혈구는 400배 현미경하에서 각 well당 대표적인 세개의 시야를 세었다. 모든 실험결과를 ring slide의 네개 well의 평균값으로 하였다.

### 화학주성능 측정

다형핵백혈구의 화학주성능은 agarose plate법을 이용하였다(Nelson 등, 1975). 25 ml의 삼차증류수에 0.5 g의

agarose를 넣고 100°C의 끓는 물에 중탕한 후 57°C 항온수조에서 보관하여 냉각시켰다. 또한 25 ml의 glutamine(2 mM), penicillin(100 unit/ml) 및 streptomycin(100  $\mu$ g/ml)이 포함된 2배 MEM 용액에 0.25g의 gelatin을 57°C 항온수조에서 용해시켰다. 준비된 agarose 용액과 gelatin이 포함된 2배 MEM 용액을 혼합하여 60 mm petri dish에 6 ml씩 분주하여 수평상태로 실온에서 응고시켰다. agarose plate가 응고되면 4°C에서 20분 이상 굳혀서 사용하였다. 실험직전 agarose plate에 직경이 2.4 mm인 소공을 2.4 mm 간격으로 내측과 외측에 뚫고 동일한 소공을 한 조직배양기당 6짝씩 뚫어 놓는다. 다형핵백혈구는 HBSS에  $4 \times 10^7$  cells/ml로 조정하고 후 동량의  $HgCl_2$ ( $HgCl_2$ 의 최종농도: 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M)와 혼합하여 37°C 항온항습기에서 40분간 전처리하였다. 준비된 agarose plate의 내측소공에  $HgCl_2$ 로 전처리된 부유액 혹은 대조 다형핵백혈구 부유액 10  $\mu$ l( $2.0 \times 10^5$  cells)를 주입하고 외측소공에 표준화학 주성인자로 사용하는 FMLP를 주입한 후 37°C 항온항습기에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 2% glutaraldehyde 용액 3 ml을 petri dish에 첨가한 후 1시간 이상 고정하고 조심스럽게 agarose plate를 제거하였다. agarose plate를 제거한 다음 2% Giemsa액으로 염색한 후 40배 광학현미경으로 다형핵백혈구의 이동거리를 측정하였다. 다형핵백혈구의 이동거리는 전산화된 YAP프로그램(Yonsei Anatomy Program)을 사용하여 다형핵백혈구를 넣은 well에서 FMLP를 넣은 well쪽으로 다형핵백혈구가 이동한 거리와 FMLP를 넣은 반대방향으로 이동한 거리, 즉 무작위 이동거리를 측정하였다. 화학주성에 의하여 이동한 거리는 FMLP를 넣은 well쪽으로 다형핵백혈구가 이동한 거리에서 무작위 이동거리를 빼서 계산하였다.

### EA-로제트 형성능 측정

면양적혈구를 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 세척하여  $1 \times 10^9$  cells/ml로 조정하였다. 적당량(예비실험을 통하여 결정하며 보통 면양적혈구 부피의 1/200~1/400)의 면양적혈구에 대한 항체(IgG against sheep red blood cell)를 가한 다음 37°C 항온항습기에서 1시간 동안 흔들며 주며 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 후 serum을 함유하지 않은 MEM에  $5 \times 10^8$  cells/ml로 부유시켰다. 이와 같이 제조된 항면양적혈구항체가 결합된 면양적혈구를 EA(erythrocyte-antibody)라고 정의하였다. 다형핵백혈구는 complete MEM을 사용하여  $2 \times 10^7$  cells/ml로 조정하고 후 100  $\mu$ l를 취하여 동량의  $HgCl_2$ ( $HgCl_2$ 의 최종농도: 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M)와 혼합하여 5%  $CO_2$ , 37°C 항온항습기에서 2시간 동안 방치하였다. 2시간 반응시킨 다음 complete MEM으로 3회 세척한 후 200  $\mu$ l complete MEM에 부유시킨 후 100  $\mu$ l EA( $5 \times 10^8$  cells/ml)와 혼합하여 60g에서 10분 동안 원침시켰다. 상등액을 제거하고 25°C에서 20분간 반응시킨후 100배 현미경하에서 200개 이상의 다형핵백혈구를 세어 세개 이상의 EA가

결합한 다형핵백혈구를 EA와 다형핵백혈구 사이의 특이반응이 일어난 것으로 간주하였다.

#### 세포 생존율 측정

HBSS를 사용하여 다형핵백혈구를  $4 \times 10^7$  cells/ml로 조정된 후 동량의  $HgCl_2$  ( $HgCl_2$ 의 최종농도:  $0.5 \mu M$ ,  $1 \mu M$ ,  $3 \mu M$ ,  $5 \mu M$ )와 혼합하여 5%  $CO_2$ ,  $37^\circ C$  항온항습기에서 2~3시간 방치 후 trypan blue dye exclusion method를 사용하여 세포 생존율을 측정된 다음 살아있는 세포수를 전체 세포수에 대한 percentage로 표시하였다.

#### 통계처리

유리면 부착능, 화학주성능, EA-로제트 형성능 및 세포 생존율을 측정된 결과를 one-way analysis of variance를 사용하여 통계처리 하였다. 각 군간의 차이를 비교할 경우에는 Bonferroni's modified t-test를 사용하였고  $P < 0.05$  혹은  $P < 0.01$  수준에서 유의성을 검색하였다.

### 실험결과

#### 수은의 다형핵백혈구의 유리면 부착능에 대한 효과

염증반응에서 혈액내에 있는 다형핵백혈구는 혈관내피세포에 부착하여 병변조직내로 이동한 후 탐식작용을 한다. 혈액내에 있는 다형핵백혈구가 면역반응에 참여하는 첫번째 단계인 다형핵백혈구의 혈관내피세포에의 부착능에 미치는 수은의 영향을 측정하기 위하여 ring slide법을 실시한 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 수은이 다형핵백혈구의 유리면 부착능을 감소시켰음을 알 수 있었다. 대조 다형핵백혈구에 비하여  $0.5 \mu M HgCl_2$ 는 92

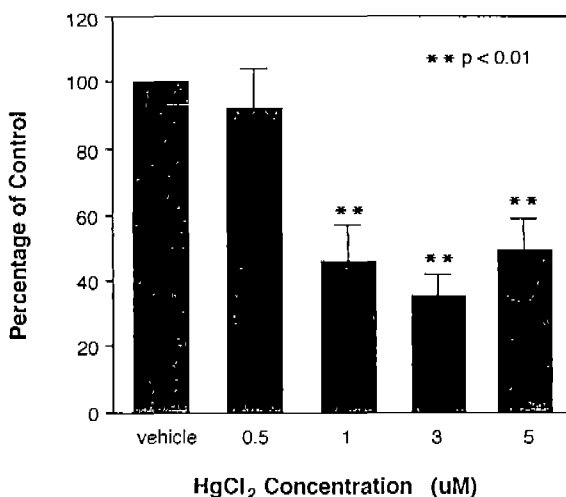


Fig. 1. The effect of  $HgCl_2$  on the glass adherence of PMNs. PMNs were prepared as described in 'Materials and Methods' and mixed with various concentrations of  $HgCl_2$ . Glass adherence was measured as described in 'Materials and Methods'. Data were normalized based on the control value and expressed as the mean percentage of control  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

$\pm 12\%$  (mean  $\pm$  S.D.),  $1 \mu M HgCl_2$ 는  $46 \pm 11\%$  ( $P < 0.01$ ),  $3 \mu M HgCl_2$ 는  $35 \pm 7\%$  ( $P < 0.01$ ), 그리고  $5 \mu M HgCl_2$ 는  $49 \pm 10\%$  ( $P < 0.01$ )의 유리면 부착능을 나타내었다.

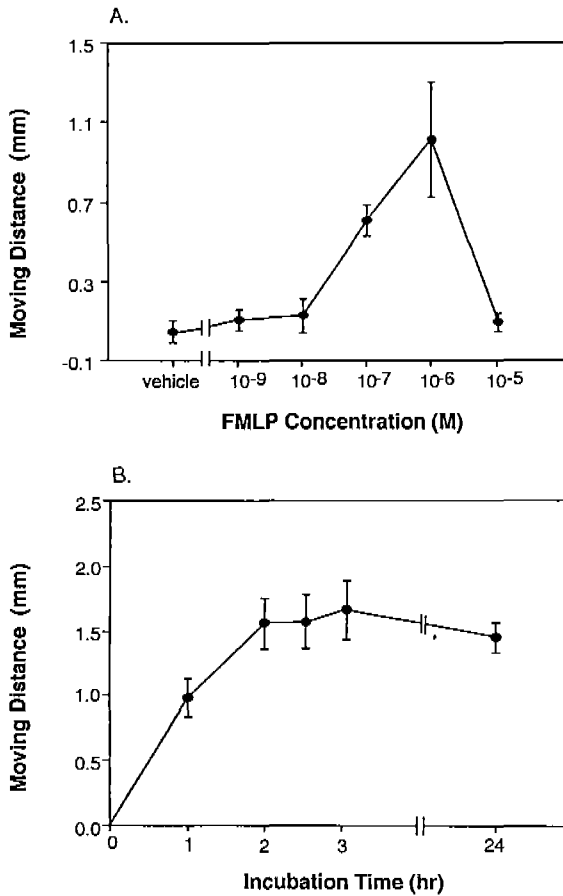
#### FMLP의 최적 농도와 다형핵백혈구 최적 배양시간의 결정

일단 혈관벽을 통과한 다형핵백혈구는 화학주성능인자의 농도차(chemotactic gradient)에 의해서 염증이 일어난 부위로 이동하게 된다. 다음 실험에서는 다형핵백혈구의 화학주성능에 미치는  $HgCl_2$ 의 영향을 검색하였다. 먼저 표준 화학주성능인자로 사용한 FMLP에 대해 다형핵백혈구가 나타내는 화학주성능의 최적조건을 찾기 위하여 FMLP를  $10^{-5} M$ 부터  $10^{-9} M$ 까지 계단 희석하여 임의의 배양시간 동안(이 경우는 2시간) 배양하여 화학주성능을 측정하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이 FMLP의 농도가  $10^{-9} M$ 인 경우  $0.10 \pm 0.05 mm$  (mean  $\pm$  S.D.),  $10^{-8} M$ 인 경우  $0.13 \pm 0.09 mm$ ,  $10^{-7} M$ 인 경우  $0.61 \pm 0.08 mm$ ,  $10^{-6} M$ 인 경우  $1.01 \pm 0.29 mm$ ,  $10^{-5} M$ 인 경우  $0.09 \pm 0.05 mm$ 의 이동거리를 얻었다. 따라서  $10^{-6} M$ 의 FMLP 사용시 FMLP의 농도차(chemotactic gradient)가 가장 효과적으로 형성되어 화학주성능을 가장 효과적으로 측정할 수 있음을 보여주었다. FMLP가  $10^{-5} M$ 인 경우  $10^{-6} M$  사용시보다 이동거리가 줄어든 이유는  $10^{-5} M$  이 고농도이므로 빠른 시간내에 다형핵백혈구가 존재하는 내측 소공주위로 확산되어 농도차(chemotactic gradient)가 소실되기 때문인 것으로 생각되어진다.

다음 실험에서는 최적 배양시간을 결정하기 위하여  $10^{-6} M$  FMLP를 사용하여 각각 1시간, 2시간, 2시간 30분, 3시간, 24시간 배양후 화학주성능을 측정하였다. Fig. 2 B에서 나타난 바와 같이 1시간 배양후  $0.98 \pm 0.15 mm$  (mean  $\pm$  S.D.), 2시간 배양후  $1.56 \pm 0.20 mm$ , 2시간 30분 배양후  $1.56 \pm 0.21 mm$ , 3시간 배양후  $1.64 \pm 0.23 mm$ , 24시간 배양후  $1.45 \pm 0.12 mm$ 의 이동거리를 얻었다. 따라서 2시간 정도까지는 이동거리가 배양시간과 비례하여 증가하나 그 이상에서는 별로 증가하지 않다가 24시간 배양후에는 오히려 약간 감소하는 경향을 보여주었다. 24시간 배양후에 이동거리가 감소한 이유는 다형핵백혈구가 약 3시간 배양후 FMLP가 있는 외측소공의 가장자리까지 이미 도달하여 그 이상의 효과를 측정할 수 없는 반면에 FMLP가 있는 소공으로부터 반대편을 향한 다형핵백혈구의 이동은 계속되어 실제 이동거리가 감소하기 때문인 것으로 생각되어진다. 따라서 본 실험으로부터 FMLP에 대한 다형핵백혈구의 화학주성능은  $10^{-6} M$  FMLP를 사용하여 2시간 동안 배양했을 때 가장 좋은 결과를 관찰할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

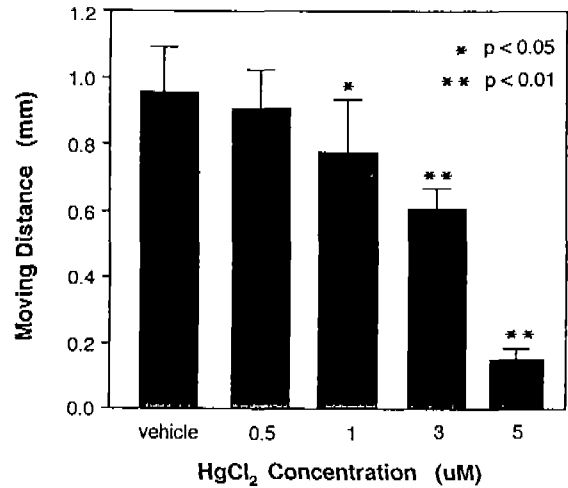
#### 수은의 다형핵백혈구의 화학주성능에 대한 효과

수은의 다형핵백혈구의 화학주성능에 미치는 효과를 검색하기 위하여 다형핵백혈구를 수은으로 전처리한 후  $10^{-6} M$  FMLP를 표준화학 주성능인자로 사용하여 2시간 동안 배양하여 시험을 실시하였다. Fig. 3에 나타난 바와

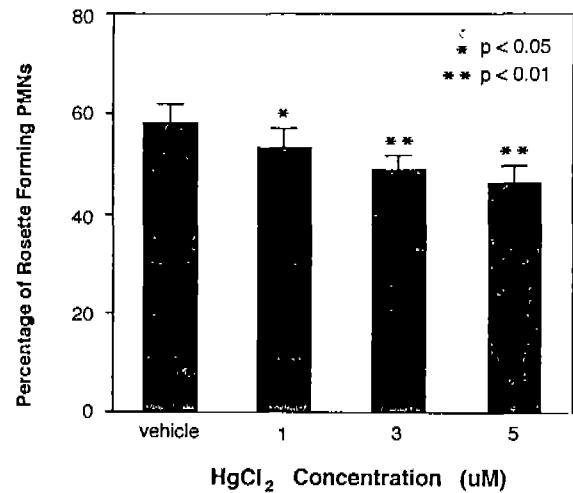


**Fig. 2.** A. The effect of FMLP concentration on the chemotactic activity of PMNs. PMNs were prepared as described in 'Materials and Methods'. Various concentrations of FMLP(10<sup>-9</sup>~10<sup>-5</sup> M) were added to the outer wells of the agarose plate and PMNs were added to the inner wells of the agarose plate. After 2 hour incubation, chemotactic activity was measured as described in 'Materials and Methods'. Data shown are mean±S.D. of 6 experiments. B. The effect of incubation time on the chemotactic activity of PMNs. PMNs were prepared as described in 'Materials and Methods'. 10<sup>-6</sup> M FMLP were added to the outer wells of the agarose plate and PMNs were added to the inner wells of the agarose plate. Cells were then incubated for various durations and the chemotactic activity was measured as described in 'Materials and Methods'. Symbols represent the mean±S.D. of 5~6 experiments.

같이 수은은 다형핵백혈구의 화학주성능을 용량의존적으로 감소시켰다. 대조다형핵백혈구의 이동거리는 0.95±0.14 mm(mean±S.D.)이며 0.5 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리된 다형핵백혈구는 0.91±0.11 mm, 1 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리된 다형핵백혈구는 0.77±0.16 mm(P<0.05), 3 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리된 다형핵백혈구는 0.61±0.06 mm(P<0.01), 5 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리된 다형핵백혈구는 0.15±0.03 mm(P<0.01)의 이동거리를 나타내었다. 수은의 다형핵백혈구의 EA-로제트 형성능에 대한 효과



**Fig. 3.** The effect of HgCl<sub>2</sub> on the chemotactic activity of PMNs. PMNs were prepared as described in 'Materials and Methods' and incubated with various concentrations of HgCl<sub>2</sub>. After incubation with HgCl<sub>2</sub> for 40 minutes, chemotactic activity was measured as described in 'Materials and Methods'. Data shown are mean±S.D. of 6 experiments.



**Fig. 4.** The effect of HgCl<sub>2</sub> on the erythrocyte-antibody rosette formation of PMNs. PMNs were prepared as described in 'Materials and Methods' and incubated with various concentrations of HgCl<sub>2</sub> for 2 hours. Erythrocyte-antibody rosette forming assay were performed as described in 'Materials and Methods'. Bars represent the mean±S.D. of 4~7 experiments.

혈관벽을 통과하여 화학주성능에 의하여 염증 부위에 도달한 다형핵백혈구는 식균작용에 참여하게 된다. 식균작용의 첫번째 단계는 다형핵백혈구에 있는 IgG의 Fc수용체와 세균에 붙어있는 IgG와의 상호작용에 의하여 opsonized된 세균과 다형핵백혈구가 접촉하게 되는 과정이다. 본 실험에서는 다형핵백혈구의 식균작용의 첫번째 단계인 다형핵백혈구와 opsonized된 세균이 접촉

- and tissues of the immune system. In *Cellular and Molecular Immunology* (A. K. Abbas *et al.*, Ed.), pp13-33. Saunders, Philadelphia.
- Berlin, M., Hua, J., Logdberg, B. and Warvinge, K. (1992). Prenatal exposure to mercury vapor: Effect on brain development. *Toxicologist* **12**, 7.
- Blakley, B. R., Sisodia, C. S. and Mukkur, T. K. (1990). The effect of methylmercury, tetraethyl lead and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **52**, 245-254.
- Clarkson, T. W. (1992). Overview of mercury vapor toxicity, toxicokinetics and critical target organs. *Toxicologist* **12**, 6.
- Dean, J. H. and Murray, M. J. (1991). Toxic responses of the immune system. In *Casarett and Doull's Toxicology* (M. D. Amdur *et al.*, Ed.), pp. 282-332. Pergamon Press, New York.
- Galloway, W. D. and Goering, P. L. (1992). Toxicity assessment of mercury vapor from dental amalgams: Introduction. *Toxicologist* **12**, 6.
- Gaworski, C. L. and Sharma, R. R. (1978). The effects of heavy metals on <sup>3</sup>H-thymidine uptake in lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **46**, 305-313.
- Hirokawa, K. and Hayashi, Y. (1980). Acute methylmercury intoxication in mice. *Acta Pathol. Jpn.* **30**, 23-32.
- Klaassen, C. D. (1991). Heavy metals and heavy-metal antagonists. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (A.G. Gilman *et al.*, Ed.), pp. 1592-1614. Pergamon Press, New York.
- Koller, L. D. (1975). Methylmercury: Effect on oncogenic and nononcogenic viruses in mice. *Am. J. Ver. Res.* **36**, 1501-1504.
- Koller, L. D., Exon, J. H. and Arbogast, B. (1977). Methylmercury: Effect on serum enzymes and humoral antibody. *J. Toxicol. Environ. Health* **2**, 1115-1123.
- Krause, P. J., Maderazo, E. G. and Scroggs, M. (1982). Abnormalities of neutrophil adherence in newborns. *Pediatrics* **69**, 184-187.
- Krause, P. J., Malech, H. L., Kristie, J., Kosciol, C. M., Herson, V. C., Eisenfeld, L., Pastuszak, W. T., Kraus, A. and Seligmann, B. (1986). Polymorphonuclear leukocytes heterogeneity in neonates and adults. *Blood* **68**, 200-204.
- Krause, P. J., Kreutzer, D. L., Eisenfeld, L., Herson, V. C., Weisman, S., Bannon, P. and Greca, N. (1989). Characterization of nonmotile neutrophil subpopulations in neonates and adults. *Pediatr. Res.* **25**, 519-524.
- Lorscheider, F. L., Summers, A. D., Magner, P. O. and Vimy, M. J. (1992). Mercury from amalgam tooth filling: Its tissue distribution and effects on cell function. *Toxicologist* **12**, 6.
- Masuda, K., Kinoshita, Y. and Kobayashi, Y. (1989). Heterogeneity of Fc receptor expression in chemotaxis and adherence of neonatal neutrophils. *Pediatr. Res.* **25**, 6-10.
- Nelson, R. D., Quie, P. G. and Simmons, R. L. (1975). Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.* **115**, 1650-1656.
- Nobumasa, I. (1991). Mechanism of cytotoxicity of methylmercury. Korean Society of Toxicology, S-5.
- Rowland, A., Baird, D., Weinberg, C., Shore, D., Shy, C. and Wilcox, A. (1992). Reduced fertility among dental assistants with occupational exposure to mercury. *Toxicologist* **12**, 7.
- Seligmann, B., Malech, H. L., Melnick, D. A. and Gallin, J. I. (1985). An antibody binding to human neutrophils demonstrates antigenic heterogeneity detected early in myeloid maturation which correlated with functional heterogeneity of mature neutrophils. *J. Immunol.* **135**, 2647-2653.

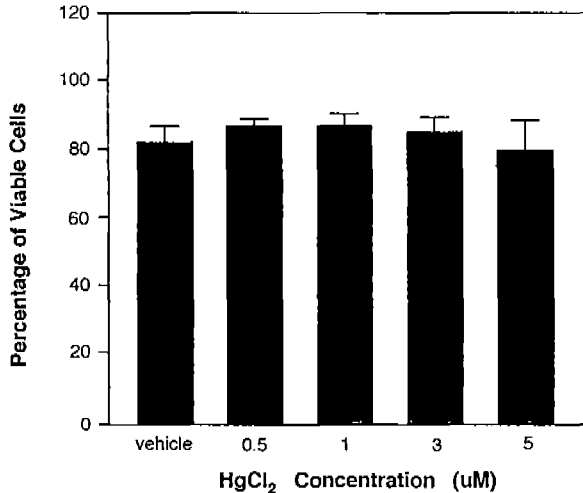


Fig. 5. The effect of HgCl<sub>2</sub> on the viability of PMNs. PMNs were prepared as described in 'Materials and Methods' and incubated with various concentrations of HgCl<sub>2</sub> for 2 hours. Cell viability was measured as described in 'Materials and Methods'. Data shown are mean ± S.D. of 4~15 experiments.

하는 과정에 미치는 수은의 효과를 검색하기 위하여 다형핵백혈구를 HgCl<sub>2</sub>로 처리한 후 EA-로제트 형성능을 측정하였다.

Fig. 4에 나타난 바와 같이 수은은 다형핵백혈구의 EA-로제트 형성능을 용량의존적으로 감소시켰다. 대조 다형핵백혈구의 EA-로제트 형성능은 58.3 ± 3.7% (mean ± S.D.)이며 1 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리된 다형핵백혈구는 53.3 ± 4.0% (P < 0.05), 3 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리된 다형핵백혈구는 48.8 ± 3.1% (P < 0.01), 5 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리된 다형핵백혈구는 46.3 ± 3.4% (P < 0.01)의 EA-로제트 형성능을 나타내었다.

#### 수은의 다형핵백혈구의 생존율에 대한 효과

지금까지의 실험의 결과 수은은 다형핵백혈구의 유리면 부착능, 화학주성능 및 EA-로제트 형성능을 감소시킨다는 것을 알 수 있었다. 다음 실험에서는 이러한 수은의 다형핵백혈구에 대한 효과가 수은이 세포 생존율을 감소시켜 일어나는지의 여부를 검사하기 위하여 다형핵백혈구를 HgCl<sub>2</sub>로 처리한 후 trypan blue dye exclusion 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 본 실험에 사용된 농도(0.5~5 μM)의 수은은 세포 생존율에 유의성있는 변화를 초래하지 않음을 보여주었다. 대조 다형핵백혈구의 세포 생존율은 83 ± 5% (n=15), 0.5 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리후는 88 ± 2% (n=4), 1 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리된 다형핵백혈구는 88 ± 3% (n=8), 3 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리후는 86 ± 4% (n=10), 5 μM HgCl<sub>2</sub>로 처리된 다형핵백혈구는 81 ± 8% (n=9)의 세포 생존율을 각각 나타내었다. 따라서 본 실험의 결과 수은의 다형핵백혈구에 대한 기능 저해 효과는 수은이 세포 생존율을 감소시키므로써 일어나는 현상이 아님을 알 수 있었다.

## 고찰

수은은 오랜 기간에 걸쳐 이노제, 항균제 및 방부제 등으로 사용되어져 왔으나 최근에는 대부분 다른 약물들로 대체되고 있는 경향이다. 따라서 근래에는 이러한 약물들에 의한 수은중독보다 환경에 기인한 수은중독이 문제시되고 있다. 또한 최근에는 치과치료에 주로 사용되는 은, 주석 및 수은의 합금인 dental amalgam의 제조시에 발생하는 수은 증기나 dental amalgam으로 치료된 치아로부터 유리되는 수은에 의한 중독이 논란의 대상이 되고 있는 실정이다(Galloway와 Goering, 1992; Clarkson, 1992; Lorscheider 등, 1992; Berlin 등, 1992; Rowland 등, 1992).

수은은 주로 신경계 독성, 신장 독성 및 소화기계 독성을 일으키는 것으로 알려져 왔으나 최근에는 이들 독성 이외에도 수은의 면역계에 미치는 영향에 대한 보고가 간간히 되고 있는 실정이다(Dean과 Murray, 1991). 본 연구에서는 수은의 사람 다형핵백혈구의 기능에 미치는 영향을 검색하기 위하여 사람 다형핵백혈구를 말초혈액으로부터 분리하여 수은으로 전처리한 다음 유리면 부착능, 화학주성능 및 EA-로제트 형성능을 측정하였다. 그 결과 수은은 다형핵백혈구의 유리면 부착능, 화학주성능 및 EA-로제트 형성능 모두를 저하시킨다는 것을 보여 주었다. 이러한 수은에 의한 다형핵백혈구의 기능 저하는 지금까지 보고되어온(Koller, 1975; Dean과 Murray, 1991) 수은 노출시 숙주저항력의 저하와 연관이 있을 것으로 사료된다.

수은이 과연 어떤 기전에 의하여 다형핵백혈구의 기능을 저하시키는가에 관하여는 아직 분명하지 않다. 최근 발표된 연구 보고(Nobumasa, 1991)를 근거로 하는 한 가지 가능한 해석은 수은이 microtubule의 작용을 억제하여 다형핵백혈구의 운동성을 감소시킴으로써 다형핵백혈구의 기능을 저하시키는 것이 아닌가 하는 것이다.

다형핵백혈구는 오랫동안 동질군으로 알려져 왔으나 최근에는 탐식능(Seligman 등, 1985), 부착능, 화학주성능(Krause 등, 1986), 운동성(Krause 등, 1989) 및 IgG 수용체 표현율(Masuda 등, 1989) 등에서 차이가 있는 여러군으로 구분할 수 있음이 알려져 있다. 또한 사람 다형핵백혈구에는 세가지 다른 IgG Fc 수용체가 존재하는데 이들 세가지 다른 IgG Fc 수용체는 size, IgG에 대한 affinity 및 역할이 약간씩 다른 것으로 알려져 있다. 수은이 어떤 군의 다형핵백혈구에 선택적으로 작용하는지 또 세가지 다른 IgG Fc 수용체중 어떤 수용체에 선택적으로 작용하는지의 여부를 밝히기 위하여는 보다 더 많은 연구가 필요하다.

## 참고문헌

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. (1991). Cells

- and tissues of the immune system. In *Cellular and Molecular Immunology* (A. K. Abbas *et al.*, Ed.), pp13-33. Saunders, Philadelphia.
- Berlin, M., Hua, J., Logdberg, B. and Warvinge, K. (1992). Prenatal exposure to mercury vapor: Effect on brain development. *Toxicologist* **12**, 7.
- Blakley, B. R., Sisodia, C. S. and Mukkur, T. K. (1990). The effect of methylmercury, tetraethyl lead and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **52**, 245-254.
- Clarkson, T. W. (1992). Overview of mercury vapor toxicity, toxicokinetics and critical target organs. *Toxicologist* **12**, 6.
- Dean, J. H. and Murray, M. J. (1991). Toxic responses of the immune system. In *Casarett and Doull's Toxicology* (M. D. Amdur *et al.*, Ed.), pp. 282-332. Pergamon Press, New York.
- Galloway, W. D. and Goering, P. L. (1992). Toxicity assessment of mercury vapor from dental amalgams: Introduction. *Toxicologist* **12**, 6.
- Gaworski, C. L. and Sharma, R. R. (1978). The effects of heavy metals on <sup>3</sup>H-thymidine uptake in lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **46**, 305-313.
- Hirokawa, K. and Hayashi, Y. (1980). Acute methylmercury intoxication in mice. *Acta Pathol. Jpn.* **30**, 23-32.
- Klaassen, C. D. (1991). Heavy metals and heavy-metal antagonists. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (A. G. Gilman *et al.*, Ed.), pp. 1592-1614. Pergamon Press, New York.
- Koller, L. D. (1975). Methylmercury: Effect on oncogenic and nononcogenic viruses in mice. *Am. J. Ver. Res.* **36**, 1501-1504.
- Koller, L. D., Exon, J. H. and Arbogast, B. (1977). Methylmercury: Effect on serum enzymes and humoral antibody. *J. Toxicol. Environ. Health* **2**, 1115-1123.
- Krause, P. J., Maderazo, E. G. and Scroggs, M. (1982). Abnormalities of neutrophil adherence in newborns. *Pediatrics* **69**, 184-187.
- Krause, P. J., Malech, H. L., Kristie, J., Kosciol, C. M., Herson, V. C., Eisenfeld, L., Pastuszak, W. T., Kraus, A. and Seligmann, B. (1986). Polymorphonuclear leukocytes heterogeneity in neonates and adults. *Blood* **68**, 200-204.
- Krause, P. J., Kreutzer, D. L., Eisenfeld, L., Herson, V. C., Weisman, S., Bannon, P. and Greca, N. (1989). Characterization of nonmotile neutrophil subpopulations in neonates and adults. *Pediatr. Res.* **25**, 519-524.
- Lorscheider, F. L., Summers, A. D., Magner, P. O. and Vimy, M. J. (1992). Mercury from amalgam tooth filling: Its tissue distribution and effects on cell function. *Toxicologist* **12**, 6.
- Masuda, K., Kinoshita, Y. and Kobayashi, Y. (1989). Heterogeneity of Fc receptor expression in chemotaxis and adherence of neonatal neutrophils. *Pediatr. Res.* **25**, 6-10.
- Nelson, R. D., Quie, P. G. and Simmons, R. L. (1975). Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.* **115**, 1650-1656.
- Nobumasa, I. (1991). Mechanism of cytotoxicity of methylmercury. Korean Society of Toxicology, S-5.
- Rowland, A., Baird, D., Weinberg, C., Shore, D., Shy, C. and Wilcox, A. (1992). Reduced fertility among dental assistants with occupational exposure to mercury. *Toxicologist* **12**, 7.
- Seligmann, B., Malech, H. L., Melnick, D. A. and Gallin, J. I. (1985). An antibody binding to human neutrophils demonstrates antigenic heterogeneity detected early in myeloid maturation which correlated with functional heterogeneity of mature neutrophils. *J. Immunol.* **135**, 2647-2653.