

수은에 의한 EMT-6 세포의 NO_2^- 및 ATP 생성

오경재 · 고대하 · 엄정호

전북대학교 의과대학 예방의학교실 및 의과학 연구소

= Abstract =

NO_2^- and ATP synthesis in the EMT-6 cell stimulated by mercury chloride

Gyung Jae Oh, Dai Ha Koh, Jung Ho Youm

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

Effect of mercury chloride on the synthesis of NO_2^- and ATP were observed in EMT-6 cells which were cultured with cytokines(IL-1 α and IFN- γ) and various concentrations of mercury chloride from 0.05 to 0.8 μM .

Viability of EMT-6 cells were observed above 90% in almost groups. There were not significant differences in the viability between mercury supplemented groups and control group.

It suggests viability of EMT-6 cells were not influenced by these concentrations of mercury chloride.

Results of the synthesis of nitrite showed significant time and group effect. There is a significant interaction effect between concentration of mercury chloride and culture time. The effect of various concentration of mercury chloride is not the same for all levels of culture time. There were significant differences in the synthesis of nitrite between mercury chloride supplemented groups and control group, and the synthesis of nitrite in EMT-6 cell by the supplement of mercury chloride was significantly decreased in a dose-dependent manner.

Results of the synthesis of ATP showed a significant group effect, and the time main effect and the Group \times Time interaction were also significant. There were significant differences in the synthesis of ATP between mercury chloride supplemented groups and control group, and the synthesis of ATP in EMT-6 cell by the supplement of mercury chloride was significantly decreased in a dose-dependent manner.

These results suggest that the disorder of cell mediated immunity by mercury chloride could be related to the inhibition of nitric oxide synthesis which will be caused by the decreased synthesis of ATP.

Key words: mercury chloride, nitrite, ATP, nitric oxide

I. 서 론

수은의 면역독성에 관하여 Koller 등(1977), Lawrence(1981), Dieter 등(1983)은 수은에 의해 체액성 면역반응이 억제되는 것을 관찰하였고 Gaworski와 Sharma(1978), Lawrence(1981), Dieter 등(1983), Nakatsuru 등(1985)은 세포성 면역반응의 감소를 보고하였다. 또한 Charpentier 등(1981)은 수은에 의하여 인체에서 T 임파구의 활성도가 감소한다는 연구결과를 발표하였으며 Lawrence 등(1987)은 수은에 의한 말초 혈액내의 B 임파구의 감소를 관찰하였다. 이와 같은 연구들은 mercury chloride를 비롯한 수은화합물들이 일반적으로 생체내 면역반응을 억제한다는 사실을 잘 보여주고 있다.

이러한 연구결과들과는 달리 Bencko 등(1990)은 무기수은(Inorganic mercury)에 노출된 근로자에서 체액성 면역반응(humoral immunity)이 항진되어 있음을 보고하고 있고, Hultman 등(1988)은 수은에 노출된 설치류에서 기저막과 핵단백섬유소에 대한 자가면역항체의 증가가 있음을 보고하고 있다.

이는 생체의 면역체계에 미치는 수은의 영향에 대해 생체내 면역반응이 촉진과 억제의 두 가지 양상으로 공존하고 있다는 사실뿐만 아니라 실험재료, 기타 실험조건 및 처리 또는 투여한 수은농도(염정호, 1995), mitogen의 종류(Dieter 등, 1983), 실험동물의 종(Hultman과 Johansson, 1991)에 따라 상이한 연구결과를 얻을 수 있음을 시사하고 있다.

한편, Hibbs 등(1987a; 1987b)은 마우스의 대식세포

가 암세포의 증식을 억제하기 위해서는 L-arginine을 필수적으로 요구한다는 사실과 L-arginine이 세포내에서 대사될 때 guanidino nitrogen의 산화에 의하여 L-citrulline과 동량으로 생성되는 Nitric Oxide(NO)가 target cell에 대한 세포독성을 나타내는데 결정적인 인자라는 것을 증명하였다.

Nitric Oxide(NO)는 생체내에서 혈관이완 및 자궁이완, 신경계에서의 신호전달기능, 유전자 발현조절, 세포내 병원성 미생물에 대한 방어기능과 일부 종양세포들에서 세포독성을 나타내는 등 매우 다양한 기능을 지니고 있다(Amber 등, 1988; Snyder 등, 1992; Kolb 등, 1992). 또한 최근의 연구에서 염증반응에 동원되는 세포들과 기타 면역세포들로부터 생성되는 Nitric Oxide는 주로 cytokine의 자극을 받은 소위 Inducible Nitric Oxide Synthase(INOS)의 효소작용에 의해 생성된 것임이 밝혀졌다(Snyder 등, 1992). 이에 Nathan 등(1991), Evans 등(1991) 및 Green 등(1990)은 Nitric Oxide를 세포성 면역의 분자생물학적 지표로 인정하고 있으며, Bartholomew(1984), Hibbs 등(1988)은 반감기가 극히 짧은 Nitric Oxide(NO)대신하여 그 대사물인 nitrite 및 nitrate를 측정함으로써 Nitric Oxide(NO)의 생성을 정량적으로 유추하고 있다.

본 연구는 수은의 세포독성에 관한 연구의 일환으로, 마우스의 유선암종세포인 EMT-6 세포의 배양조건에 수은을 여러 농도로 첨가하여 세포독성의 양상을 파악하였다. 한편, 수은에 노출된 EMT-6 세포가 cytokine의 자극에 의해 생성하는 Nitric Oxide(NO)의 세포내 대사산물의 하나인 nitrite를 정량하고, 같은 조

건에서의 ATP생성을 관찰함으로써 수은이 생체내 세포성 면역에 미치는 영향을 확인하고 그 기전을 제시하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서는 Nitric Oxide(NO)의 생성정도를 보고자 EMT-6 세포를 이용하였다. EMT-6 세포는 Balb/c 마우스에서 자연발생하는 유선암(mammary adenocarcinoma) 세포주로 cytokines의 자극이 있을 때 L-arginine으로부터 대량으로 Nitric Oxide(NO)의 생성을 유도하는 특성이 있어 수은에 의한 세포성 면역의 변화와 세포독성의 정도를 NO의 대사물인 NO₂⁻와 ATP를 이용하여 보았다.

2. 실험방법

1) 세포의 배양 및 수은 첨가

실험은 계대배양중인 EMT-6 cell line을 trypsin처리하여 현탁액을 만들고, 이를 계수한 뒤 10%의 fetal calf serum을 포함한 DMEM(Dulbeco's Modified Eagles Medium)을 첨가하여 24 well plate의 각각의 well에 세포수가 $0.5 \times 10^6/ml$ 되게 하여 접종한다. 상기의 조건에서 4 well씩 6개 그룹으로 나누어 대조군에는 수은을 첨가하지 않고 나머지 실험군에는 0.1~1.6μM의 mercury chloride를 첨가하여 0.05~0.8μM의 수은농도군을 형성하고 모든 군의 24개 well에 cytokine (IFNγ 20U/ml + IL-1 40U/ml)을 동일 조건으로 첨가하여 시간경과에 따른 양상을 보기 위해 12, 24, 36시간 별로 5% CO₂, 37°C 배양조건의 항온기에서 배양한다.

2) 세포의 생존율검사

배양중인 EMT-6 세포를 12시간 간격으로 배양중지시킨 후 상층액은 nitrite측정을 위해 냉동보관하고 trypan blue dye exclusion검사(Phillips, 1973)를 실시

하여 세포수를 계수한 후 이를 생존율(%)로 나타낸다. 세포는 회수하여 0.5ml의 Phosphorous Buffer Saline (PBS)으로 세척한다.

3) Nitrite 정량

NO는 가스성 물질로 6~10초 정도의 짧은 시간밖에는 존재할 수 없어 직접측정이 어렵지만 배양액 속의 산소 및 물과 반응성이 매우 높아 반응 후 곧 안정한 형태인 NO₂⁻, NO₃⁻로 변하여 측정되므로 본 실험에서는 배양액 속의 NO₂⁻의 측정을 통해 NO를 간접 정량한다.

12시간 간격으로 얻은 세포배양중인 각각의 plate well에서 상층배양액 50μl에 Griess reagent(1:1 mixture of 0.1% N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride in 60% acetic acid and 1% sulfonilamide in 30% acetic acid) 100μl를 첨가하여 실온에서 교반한 후 분홍의 발색을 확인하고 대략 10분 가량 방치한다. ELISA reader를 이용, 540nm에서 흡광도를 측정하여 nitrite(NO₂⁻)를 정량한다. 이때 nitrite농도에 대한 표준곡선은 sodium nitrite(NaNO₂)를 계열 희석하여 얻는다.

4) ATP측정

12시간 간격으로 배양한 세포를 채취하여 2회 원심 세척한 후 여기에 6% Trichloroacetic acid(TCA) 200μl를 처리하여 초음파분쇄기(ultra sonicator), 또는 vortex mixer를 이용하여 세포막을 파괴시킨다. 이후 원심분리기로 4°C 1,200rpm상태에서 10분간 원심시켜 얻어진 상층액 20μl에 100mM glycine 80μl을 혼합한 다음 luciferase luciferin 5mg을 HEPES buffer 2ml에 녹인 후 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 luminometer로 측정하여 ATP를 정량한다.

3. 자료의 처리

세포의 생존율과 NO₂⁻ 및 ATP 측정결과는 그룹의 시간별, 수은농도별 변화양상과 결과에 영향을 미칠 수 있는 상호작용을 보기위해 반복측정자료에 대한 분

산분석(repeated measures analysis of variance)과 각 시간대별로 상관분석을 시행하였다.

한편, 대조군과 실험군의 차이는 세 가지 항목 모두 분산 분석 후에 post-hoc test로서 Scheffe's test를 시행하였다.

III. 실험성적

1. 세포 생존율

EMT-6 세포의 수은농도별, 시간경과에 따른 생존율 측정결과 배양 12시간째 생존율은 대략 96~98%의 수치를 보이고 있으며 24시간째 생존율은 94~96%, 그리고 36시간째는 89~94%로 관찰되었다(Table 1). EMT-6 세포의 생존율은 수은의 첨가량과 시간의 경과에 따라 큰 변화를 보이지 않았으며(Figure 1), 0.8 μ M 수은첨가군에서 36시간째 생존율을 제외한 모든 수은첨가군에서 90%이상의 생존율을 보였고 수은첨가에 따른 각 군간의 차이는 없었다($p > 0.05$, Table 1).

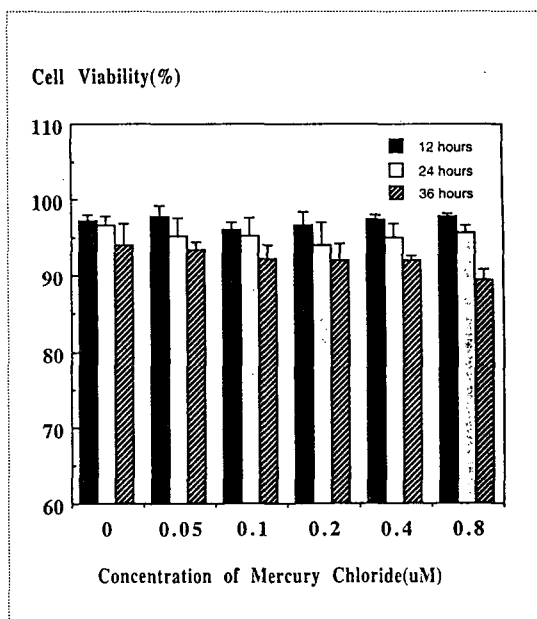


Figure 1. Viability of the EMT-6 cells stimulated by cytokines, IL-4(40U/ml) and IFN γ (20U/ml), for 12, 24 and 36 hours

Table 1. The viability of EMT-6 cells cultured with cytokines and mercury chloride for 12, 24 and 36 hours

Dose(μ M) ^a	Culture Time(hours)		
	12	24	36
0.00 ^b	97.31 ± 0.81	96.63 ± 1.20	94.00 ± 2.94
0.05	97.78 ± 1.54	95.25 ± 2.32	93.55 ± 0.99
0.10	96.02 ± 1.07	95.25 ± 2.32	92.28 ± 1.87
0.20	96.75 ± 1.79	93.97 ± 2.07	92.15 ± 2.20
0.40	97.45 ± 0.55	95.10 ± 1.72	92.05 ± 0.67
0.80	97.82 ± 0.49	95.60 ± 1.08	89.50 ± 1.29

Values represents Mean \pm S.D.

^a: The dose represents concentrations of mercury chloride.

^b: control group.

Each groups are cultured with cytokines, IL-1 α (40U/ml) and IFN γ (20U/ml), and mercury chloride.

Results expressed %.

Over all results for the concentration of nitrite of in medium of EMT-6 cells are summarized by F-ratio of repeated measures ANOVA(analysis of variance) as follows,

Time effects : $p = 0.0001$,

Interactions between time and dose effects : $p = 0.244$,

Dose effects : $p = 0.0464$.

2. Nitrite의 생성량

EMT-6 각 세포의 배양액 내 nitrite의 생성량은 배양 12시간째 7.16~8.56 μ M, 24시간째 17.18~22.41 μ M, 36시간째 27.22~35.22 μ M의 분포를 보였으며(Table 2), 시간이 경과될수록 nitrite생성량은 전반적으로 증가하고 있다(Figure 2). 시간경과별, 수은농도별 nitrite 생성량은 각 군간 현저한 차이가 있었으며($p < 0.01$, Table 2), 시간경과에 따른 영향을 보정했을 때에도 첨가한 수은농도의 변화에 따라 nitrite생성량은 각 군간에 현저한 차이가 있었다($p < 0.01$, Table 2). 한편, 모든 수은 첨가군에서 대조군의 값에 비해 현저하게 낮은 수준의 nitrite 생성량이 관찰되었고($p < 0.01$, Table 2), 세포배양 24시간에서 첨가된 수은농도와 nitrite생성량 사이에는 용량-반응의 관계(dose-dependent)로 감소하는 음의 상관성이 있었다($r = -0.92$, $p < 0.01$, Figure 4). 이러한 감소경향은 12, 36시간에서도 마찬가지로 나타나고 있다(Figure 2).

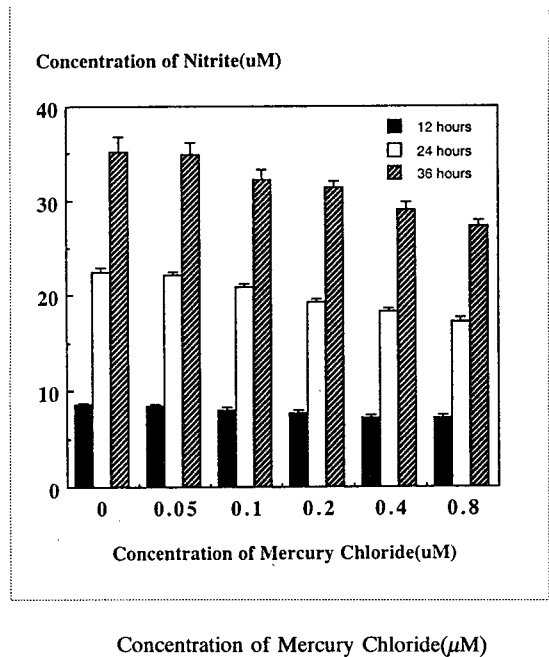


Figure 2. Concentration of nitrite produced by EMT-6 cells cultured with cytokines, IL-1(40U/ml) and IFN γ (20U/ml), and mercury chloride for 12, 24 and 36 hours

Table 2. The concentration of nitrite in medium of EMT-6 cells cultured with cytokines and mercury chloride for 12, 24 and 36 hours

Dose(μ M) ^a	Culture Time(hours)		
	12	24	36
0.00 ^b	8.56 ± 0.22	22.41 ± 0.53	35.22 ± 1.56
0.05	8.39 ± 0.29	22.20 ± 0.22**	34.87 ± 1.34**
0.10	8.01 ± 0.29**	20.95 ± 0.32**	32.22 ± 1.09**
0.20	7.62 ± 0.31**	19.32 ± 0.33**	31.43 ± 0.64**
0.40	7.24 ± 0.21**	18.34 ± 0.32**	29.04 ± 0.70**
0.80	7.16 ± 0.38**	17.18 ± 0.46**	27.22 ± 0.63**

Values represents Mean \pm S.D.

^a: The dose represents concentrations of mercury chloride.

^b: control group.

Each groups are cultured with cytokines, IL-1 α (40U/ml) and IFN γ (20U/ml), and mercury chloride.

Results expressed μ M.

Over all results for the concentration of nitrite of in medium of EMT-6 cells are summarized by F-ratio of repeated measures ANOVA(analysis of variance) as follows,

Time effects : $p = 0.0001$,

Interactions between time and dose effects : $p = 0.0001$,

Dose effects : $p = 0.0001$.

** Significantly different from controls, $p < 0.01$, Scheffe's test.

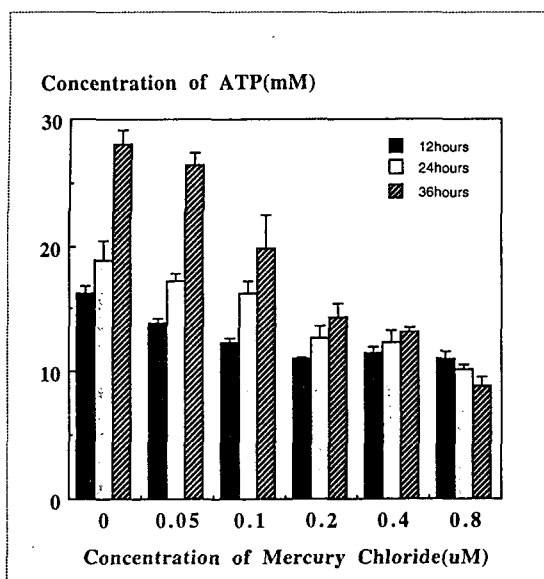


Figure 3. Concentration of ATP produced by EMT-6 cells cultured with cytokines, IL-1(40U/ml) and IFN γ (20U/ml), and mercury chloride for 12, 24 and 36 hours

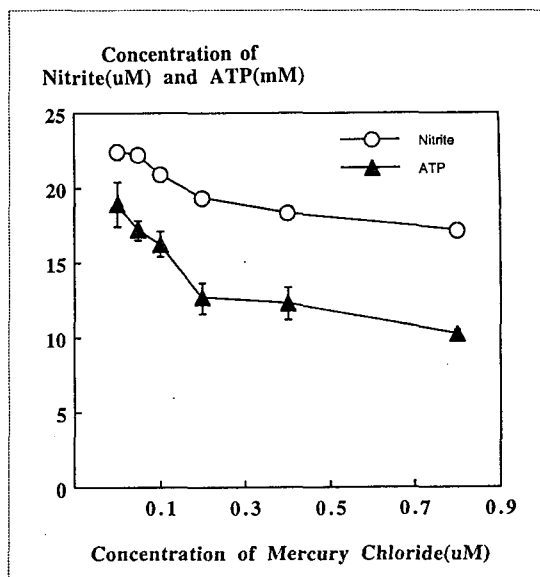


Figure 4. Concentration of nitrite and ATP in the EMT-6 cells cultured with cytokines, IL-1(40U/ml) and IFN γ (20U/ml), and mercury chloride for 24 hours

Table 3. The concentration of ATP in the EMT-6 cells cultured with cytokines and mercury chloride for 12, 24 and 36 hours

Dose(μ M) ^a	Culture Time(hours)		
	12	24	36
0.00 ^b	16.31 \pm 0.6	18.91 \pm 1.47	28.09 \pm 1.13
0.05	13.84 \pm 0.33**	17.19 \pm 0.65**	26.41 \pm 1.02**
0.10	12.34 \pm 0.33**	16.28 \pm 0.88**	19.88 \pm 2.58**
0.20	11.04 \pm 0.07**	12.63 \pm 1.05**	14.39 \pm 1.04**
0.40	11.42 \pm 0.58**	12.26 \pm 1.06**	13.10 \pm 0.40**
0.80	10.94 \pm 0.64**	10.16 \pm 0.30**	8.80 \pm 0.74**

Values represents Mean \pm S.D.

^a: The dose represents concentrations of mercury chloride.

^b: control group.

Each groups are cultured with cytokines, IL-1 α (40U/ml) and IFN γ (20U/ml), and mercury chloride.

Results expressed mM.

Over all results for the concentration of nitrite of in medium of EMT-6 cells are summarized by F-ratio of repeated measures ANOVA (analysis of variance) as follows,

Time effects : p=0.0001,

Interactions between time and dose effects : p=0.0001,

Dose effects : p=0.0001.

** Significantly different from controls, p < 0.01, Scheffe's test.

3. ATP의 생성량

EMT-6 세포내에 생성된 ATP량은 배양 12시간에서 10.94~13.84mM, 24시간째 10.16~17.19mM, 36시간째 8.80~28.09mM의 분포를 보이고 있으며(Table 3), 시간의 경과에 따라 세포내 ATP생성량은 증가하고 있다(Figure 3). 시간경과별, 수은농도별 생성량은 각 군간에 현저한 차이를 보였으며($p < 0.01$, Table 3), 시간의 영향을 보정한 후의 첨가한 수은농도의 변화에 따른 ATP 생성량은 대조군에 비해 현저하게 낮았고($p < 0.01$, Table 3), 세포배양 24시간에서 첨가된 수은농도와 ATP생성량 사이에는 용량-반응의 관계(dose-dependent)로 감소하는 음의 상관성이 있었다($r = -0.86$, $p < 0.01$, Figure 4). 이러한 감소경향은 12, 36시간에서도 마찬가지로 나타나고 있다(Figure 3).

IV. 고찰

현재까지 알려진 수은중독의 기전으로서 신장에서 신세뇨관세포의 선택적인 과사와 연관지을 수 있는 glutathione peroxidase활성의 감소(Nielsen 등, 1991; Koh 등, 1992), sulf hydryl(SH)기를 함유한 효소의 비활성화와 관련된 lipid peroxidation의 증가(Koh 등, 1992; Misra 등, 1990) 등이 있으며, 이러한 연구결과 표적 장기인 신장에 미치는 수은의 독성효과는 일부분 밝혀졌다(Misra 등, 1990; Nielsen 등, 1991; Koh 등, 1992).

그러나 수은의 면역독성에 관한 내용에 있어서는 확연히 밝혀진 바가 없다. 그간의 많은 연구들은 수은에 의한 세포성 면역 및 체액성 면역의 장애(Koller, 1977; Blakley 등, 1980; Lawrence, 1981; Dieter 등, 1983), 수은을 포함한 일부 중금속들에 의한 실험동물에서의 면역능 변화(Polak 등, 1968), 생체의 면역독성에 관해 대식세포나 임파구의 증식억제 및 탐식능의 감소(Castranova 등, 1980; Nakatsuru 등, 1985; Ilback, 1991), 자가면역성 질환에서 특징적으로 나타나는 anti-nucleated antibody의 증가(Aten 등, 1988;

Hultman 등, 1988; Hultman 등, 1992) 등의 관찰결과들을 보고하고 있다.

이러한 여러 연구결과들은 수은이 생체 및 인간의 면역반응을 자극할 수도 있으나 동시에 억제하는 특성도 갖고 있다는 것을 보여주고 있으며, 이는 실험에 사용된 mitogen의 종류(Dieter 등, 1983), 실험동물의 종(Hultman 등, 1991)의 차이 및 제반 실험조건, 특히 수은농도(용량), 투여 또는 처리방법 등의 차이에서 오는 결과로서, 동시에 생체에 대한 수은의 독작용을 이해하기 위해서는 면역학적 접근이 중요하다는 것을 시사하고 있다.

한편, Hibbs 등(1987a; 1987b)은 마우스의 대식세포(macrophage)가 암세포의 증식을 억제하기 위해서는 L-arginine을 필수적으로 요구한다는 사실과 L-arginine이 세포내에서 대사될 때 guanidino nitrogen의 산화에 의하여 L-citrulline과 동량으로 생성되는 Nitric Oxide(NO)가 target cell에 대한 세포독성을 나타내는 데 결정적인 인자라는 것을 증명하였다.

이 연구에서 수은의 면역독성의 척도로 사용한 Nitric Oxide(NO)는 불과 몇 년 전까지만 해도 번개나 자동차, 비행기의 매연에 포함된 물질로서 산성비를 초래하거나 오존층을 파괴시키는 발암성을 가진 독성이 매우 강한 가스성 물질 정도로 여겼다(Snyder와 Brecht, 1992). 그러나 최근 많은 학자들은 NO가 생체내에서 다양한 역할을 담당하며 생체에 유익한 물질로서 인식하고 있다. 즉, NO는 혈관이완과 혈류를 조절하는 신호전달물질로서 작용하며 면역계에 대해서는 cytokines에 의해 활성화된 대식세포 및 중성구와 기타 염증반응에 동원되는 면역세포 등에 의해 생성되어 외부에서 침입한 세포내미생물(*Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Schistosoma mansoni* 등)이나 종양세포에 대한 저항성을 높여주는 주요 면역방어 인자임이 밝혀졌다(Amber 등, 1988; Snyder 등, 1992; Kolb 등, 1992).

면역계에서 생성되어지는 NO는 cytokines과 같은 세포활성물질이나 박테리아 세포벽 성분인 lipopolysaccharide

(LPS), 또는 BCG 등에 의해 유도되는 inducible form (Snyder 등, 1992)으로, Nathan 등(1991), Green과 Nacy (1990), 그리고 Evans 등(1991)은 이를 세포성 면역의 분자 생물학적 지표로 이용하고 있으며, 최근에는 반감기가 극히 짧은 NO 대신 그 대사물인 nitrite 및 nitrate를 측정함으로써 NO의 생성을 정량적으로 유추할 수 있게 되었다 (Hibbs 등, 1988).

본 연구에서는 수은이 세포성 면역의 장애를 일으킨다는 기노석 등(1994)과 염정호(1995)의 연구결과로부터 수은중독에 대해 감수성을 보이는 Balb/c 마우스의 조직세포들의 nitrite 생성능은 수은노출로 인한 에너지 대사과정의 억제를 통해 감소될 것이라는 가설을 설정하고 이를 시험관내에서 증명하고자 시도하였다.

본 실험결과 세포배양 후 12시간째에서 24시간째보다 높은 세포생존율을 보이고 있고 24시간째의 세포생존율은 95%내외의 값을 나타내고 있다. 한편 36시간째의 세포생존율은 전반적으로 90%내외의 값과 0.8 μ M 수은첨가군에서는 90%이하의 낮은 값을 보이고 있다. 이러한 세포생존율의 양상은 수은의 독성 자극에 대한 EMT-6 세포의 반응과 성장이 12시간째에는 시간적으로 미흡하였음을 말해주고 있으며 36시간째의 낮은 세포생존율은 세포괴사의 비율이 다른 배양시간대에 비해 상대적으로 높다는 것을 알 수 있다. 따라서 EMT-6 세포모형을 이용한 수은의 세포독성 연구는 주로 배양 후 24시간째 이루어지는 것이 수은에 대한 적절한 세포 반응의 결과를 반영할 수 있으리라 사료된다.

이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 세포배양 24시간째에 주로 반복실험을 실시하였으며 이는 세포의 생존율이 수은첨가로 상당히 저하된다면 당연히 Nitric Oxide(NO)의 생성이 감소될 것이고 이에 따라 nitrite와 ATP 생성량도 비례해서 감소될 것이기 때문에, 가능한 한 세포생존율을 일정하게 최대한 유지시켜야 하는 전제사항을 만족시키기 위해서였다.

Nitrite 및 ATP생성량이 배양시간의 경과에 따라 증가하고 있는 것은 배양시간이 경과할수록 이러한 물질들이 대사산물로서 세포내에 축적되어 나타나는 당연한 결과로 생각되며 첨가한 수은농도의 증가에 따라

nitrite 및 ATP생성량이 용량-반응의 관계로 둘 다 뚜렷하게 감소하는 경향을 보이고 있는데 이는 수은이 세포내 에너지생산과 관련된 어느 대사과정을 억제하고 있다는 것을 간접적으로 보여주는 증거이다.

실제 L-arginine으로부터 NO가 생성되는 것은 반응에너지로서 ATP를 필요로 하는 과정(Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992)이므로 생체내 에너지대사에서 Stacey(1980)나 Goyer(1991) 등이 보고한 바와 같이 특정 효소의 활성을 수은이 직접 또는 간접으로 억제하므로 독성을 나타낸다는 가설이 수은의 면역독성에도 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구의 결과는 세포수준에서의 대사과정이 수은에 의해 손상되어 ATP 생성의 저하를 가져왔고 그 결과 NO의 생성이 저하되었음을 보여주고 있다. 이러한 일련의 과정은 결과적으로 수은에 의한 세포성 면역의 장애가 면역세포의 증식억제 및 탐식능의 감소(Castranova 등, 1980; Nakatsuru 등, 1985; Ilback, 1991)로 관찰되는 현상임을 짐작케하고 있다. 그러나 수은화합물이 어떠한 방법으로 세포의 에너지 대사과정을 억제하는지에 대한 생화학적인 문제는 본 실험의 목적 및 방법상 제시하지 못하고 있다.

향후 수은화합물이 세포의 NO생성에 미치는 에너지대사의 변화를 밝히기 위하여 적절한 실험동물의 선택을 통한 생체내에서의 생화학적 연구가 진행되어야 하겠고 서로 다른 마우스의 세포분주(cell strain) 사이의 비교연구를 통해 수은의 투여량, 투여시간에 따른 수은의 면역독성의 특성 및 기전을 밝히려는 노력이 있어야 하겠다.

V. 요약

수은이 세포성 면역반응에 미치는 효과와 그 기전을 밝히기 위해 cytokine - EMT-6 cell - NO 모형에 대조군에는 수은을 첨가하지 않았고 나머지 실험군에는 0.05 - 0.8 μ M의 mercury chloride를 처리하였다. 그리고 배양시간별, 수은농도별로 세포생존율, 세포성 면역의 지표인 NO를 nitrite로 간접정량하고 대사과정에

필수 에너지요소인 ATP를 측정 한 결과는 아래와 같이 요약된다.

1. EMT-6 세포의 세포생존율은 대조군과 36시간째 0.8 μ M(89.50%)을 제외한 모든 수은첨가군에서 모두 90%이상의 값을 나타내었으며, 배양시간 및 첨가한 수은농도별 군간 차이는 없었고 모든 수은첨가군과에서 대조군에 비해 큰 차이가 없었다.
2. 수은에 노출된 EMT-6 세포의 nitrite생성량 및 ATP생성량은 배양시간의 경과에 따라 전반적으로 증가하였으며 시간경과에 따른 nitrite 생성량과 ATP 생성량은 첨가한 수은농도의 변화에 따라 각 군간에 현저한 차이를 보였다. 그리고 시간경과의 영향을 보정한 상태에서도 첨가한 수은농도의 변화에 따라 각 군간 차이는 모두 현저하게 나타났다. 한편, Nitrite 생성량과 ATP 생성량은 둘 다 수은첨가군 모두에서 대조군의 값에 비해 현저하게 낮았고, 첨가된 수은농도와 nitrite 생성량 및 ATP 생성량 사이에는 높은 음의 상관관계가 있어 수은농도의 증가에 따라 용량-반응의 관계(dose-dependent)로 감소하는 경향을 보였다.

이상의 결과, 배양조건에 수은의 첨가로 인하여 nitrite생성량과 ATP 생성량이 동시에 감소하는 바, 수은에 의한 세포성 면역의 저하는 면역세포의 NO 생성량의 감소에 의한 것으로 사료되며, 이는 수은이 세포내 에너지생산에 관련된 대사과정을 억제시키므로 나타나는 결과라고 판단된다.

참고문헌

- 기노석, 고대하, 김중서, 이정상, 김남송, 이황호. 수은에 의한 마우스의 면역반응 조절장애. 예방의학회지 1994;27(1):11-24.
- 염정호. 수은이 마우스의 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향. 예방의학회지 1995;28(1):27-41.
- 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* 1991;49:610-620.
- Amber IJ, Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. Cytokine induce an L-arginine-dependent effector system in nonmacrophage cells. *J Leuko Biol* 1988;44:58-65.
- Aten J, Bosman CB, Rozing J, Stijnen T, Hoedemaeker PJ, Weening J. Mercuric chloride-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. *Am J Pathol* 1988;133:127-138.
- 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.
- Benko V, Wagner V, Wagnerova M, Odrejkac V. Immunological profiles in workers occupationally exposed to inorganic mercury. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1990;34:9-15.
- 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* 1980;52:245-254.
- Bridger MA, Thaxton JP. Humoral immunity in chicken as affected by mercury. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1983;12:45-49.
- Castranova V, Bowman L, Miles PR, Reasor MJ. Toxicity of metal ions to alveolar macrophages. *Am J Indust Med* 1980;1:349-357.
- Charpentier B, Moullot P, Faux N, Manigand G, Fries D. Fonctions lymphocytaires Tau cours d'une glomerulonephite extramembraneuse induite par une intoxication chronique au mercure. *Nephrologie* 1981; 2:153-157.
- 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* 1983;68:218-228.
- Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB Jr. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine *Leishmaniasis*. *J Immunol* 1993;151:907-915.
- Gaworski CL, Sharma RP. The effects of heavy metals on [3H]thymidine uptake in lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978;46:305
- Goyer RA. Toxic effects of metals. In Amdur MO, Doull J, Klaassen CD(Eds.), Casarett and Doull's Toxicology. 4th Ed., Pergamon Press Inc., New

- York 1991;646–651.
- Granger DL, Hibbs JB, Perfect JR, Durack DT. *Metabolic fate of L-arginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. J Clin Invest* 1990;85:264–273.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. *Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. J Immunol* 1990;144:278–283.
- 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* 1987a; 138:550–565.
- Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR. *Macrophage Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science* 1987b;235:473–476.
- Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR, Rachlin EM. *Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem Biophys Res Commun* 1988;157: 87–94.
- Hirota Y. *Effect of methylmercury on the activity of glutathione peroxidase in rat liver. Am Ind Hyg Assoc J* 1986;47(8):556–558.
- Hultman P, Eneström S. *Mercury induced antinuclear antibodies in mice: Characterization and correlation with renal immune complex deposits. Clin Exp Immunol* 1988;71:269
- Hultman P, Johansson U. *Strain differences in the effect of mercury on murine cell-mediated immune reactions. Food Chem Toxicol* 1991;29(9):633–638.
- Hultman P, Eneström S. *Dose-dependent studies in murine mercury-induced autoimmunity and immune-complex disease. Toxicol Appl Pharmacol* 1992;113:199–208.
- Ilback NG. *Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer(NK) cell activity in the mouse. Toxicol* 1991;67:117–124.
- Kolb H, Kolb-Bachofen V. *Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. Immunol Today* 1992;13: 157–160.
- Koller LD. *Immunosuppression produced by lead, cadmium and mercury. Am J Vet Res* 1973;34: 1457–1458.
- Koller LD, Exon JH, Brauner JA. *Methylmercury: Decreased antibody formation in mice. Proc Soc Exp Biol Med* 1977;155:602–604.
- 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. 1987;293–307.*
- 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* 1990;144:4794–4797
- Muranyi MK, Behmer O, Uhrberg M, Klonmowski H, Bister J, Gleichmann E. *Murine systemic autoimmune disease induced by mercuric chloride (HgCl₂): Hg-specific helper T-cells react to antigen stored in macrophages. Int J Immunopharmacol* 1993;15(2):151–161.
- Nakatsuru S, Oohashi J, Nozaki H, Nakada S, Imura N. *Effect of mercurials on lymphocyte function in vitro. Toxicol* 1985;36:297–305.
- Nathan CF, Hibbs JB. *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Current Opinion Immunol* 1991;3:65–70.
- Nielsen JB, Andersen HR, Andersen O, Starklint H. *Mercuric chloride-induced kidney damage in mice: Time course and effect of dose. J Toxicology and Environmental Health* 1991;34:469–483.
- Oliveira DBG, Foster G, Savill J, Syme PD, Taylor A. *Membranous nephropathy caused by mercury-containing skin-lightening cream. Postgrad Med J* 1987;63:303–304.
- Pelletier L, Pasquier R, Hirsch F, Sapin C, Druet P. *Autoreactive T cells in mercury induce autoimmune disease. In vitro demonstration. J Immunol* 1986; 137:2548–2554.
- Phillips HJ. *Dye exclusion tests for cell viability. In Kruse PR, Patterson MK(Eds.), Tissue Culture Method and Applications. Academic Press, New York. 1973;406–408.*
- Polak L, Barnes JM, Turk JL. *The genetic control of contact sensitization to inorganic metal compound in*

- guinea - pig. *Immunol* 1968;14:707-711.
- Reardon C, Lucas DO. Heavy - metal mitogenesis: Zn^{2+} , Hg^{2+} induce cellular cytotoxicity and interferon production in murine T lymphocytes. *Immunobiol* 1987;175:455-469.
- Spencer TL, Lehninger AL. L - lactate transport in Ehrlich ascites - tumour cells. *Biochem J* 1976;154:405-414.
- Stacey NH, Klaassen CD. Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J Toxicol Environ Health* 1980;7:139-147.
- Stonard MD, Chater BV, Duffield DP, O'Sullivan JJ, Lockwood CM. Circulating immune complexes in individuals occupationally exposed to mercury vapour. In Brown SS, Savory J(Eds.), *Chemical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals*. Academic Press, New York. 1983;135-148.
- Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Scientific Am* 1992;May:68-77.
- Tubbs RR, Gordon DO, Gephardt N, McMahon JT, Pohl MC, Vidt DG, Barenberg SA, Valenzuels R. Membranous glomerulonephritis associated with industrial mercury exposure. *Am J Clin Pathol* 1982; 77:409-413.
-