

Mercury Chloride가 마우스 복강대식세포 및 EMT-6 세포의 Nitric Oxide 생성에 미치는 영향

권근상 · 고대하 · 기노석 · 염정호

전북대학교 의과대학 예방의학교실 및 의과학 연구소

= Abstract =

Effects of Mercury Chloride on Nitric Oxide Syntheses in Mouse Peritoneal Macrophage and EMT-6 Cell

Keun Sang Kwon, Dai Ha Koh, No Suk Ki, Jung Ho Youm

Department of Preventive Medicine and Public Health,

School of Medicine and Institute for Medical Science,

Chonbuk National University

The effects of treatment with mercury chloride on the nitrite and nitrate syntheses were observed in peritoneal macrophages from Balb/c mice and EMT-6 cells in vitro. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) with cytokines.

Amounts of nitrite and nitrate in the culture media after 24 and 36 hours of culture were about 2-fold, and 3-fold of those measured after 12 hours respectively. There were very close associations between the amounts of nitrite and nitrate measured in the culture media according to culture time.

The survival rate of peritoneal macrophages was significantly decreased by mercury chloride added into the media in dose-dependent manner, however the survivals of EMT-6 cells were not influenced by mercury chloride concentration in media. Nitrite and nitrate syntheses were dose-dependently decreased by mercury chloride added in culture media. ATP synthesis also decreased in EMT-6 cells by mercury chloride.

These results reported here suggest that the disorder of cell mediated immunity by mercurials could be related to the inhibition of nitric oxide synthesis which seems to be caused by the inhibition of ATP synthesis.

Key words : Nitrite, Nitrate, ATP, Macrophage, EMT-6 cell, Mercury

※ 본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(기초의학)에 의하여 연구되었음.

I. 서 론

현재까지 알려진 수은중독의 기전은 세포막을 구성하는 단백질 중 특히 수은과 친화력이 있는 sulfhydryl(SH)기에 결합하여 세포막의 손상을 유도하거나(Stacey 등, 1980), 간장 및 신장조직의 손상과 관련된 glutathione peroxidase활성의 저하(Hirota, 1986) 및 물질대사에 관여하는 여러 효소의 활성을 억제(Dieter, 1983; Goyer, 1991)하는 것으로 알려져 있다.

또한 수은을 포함한 일부 중금속들이 실험동물의 면역능에 변화를 초래할 수 있다는 것이 알려진 이후(Polak 등, 1968), 수은이 생체의 면역독성에 미치는 영향을 관찰한 연구로는 대식세포나 임파구의 증식억제 및 탐식능의 감소(Castranova 등, 1980; Nakatsuru 등, 1985; Ilback, 1991), 자가면역성질환의 특징을 설명하는데 용이한 anti-nucleated antibody의 증가(Aten 등, 1988; Hultman 등, 1988; Hultman 등, 1992) 등이 보고되어 있다.

수은의 면역독성에 관해 인간을 대상으로 한 자료는 매우 드물지만 장기간에 걸쳐 수은에 노출된 개체에서 T-임파구의 활성이 떨어지고(Charpentier 등, 1981), 말초혈액내의 B-임파구의 수가 감소된다는 관찰결과(Lawrence 등, 1987)가 있는 반면, Benko 등(1990)은 무기수은에 노출된 근로자에서 체액성면역반응이 항진되어 있음을 관찰한 바 있다.

이상과 같은 여러 관찰결과들은 수은이 생체 및 인간의 면역반응을 자극할 수도 있으나 동시에 억제하는 특성도 갖고 있다는 것을 말해 주며, 이는 실험에 사용된 mitogen의 종류(Dieter 등, 1983), 실험동물의 종간(種間) 차이(Hultman 등, 1991)에서 오는 결과일 뿐 아니라, 제반 실험조건, 특히 수은농도, 투여 또는 처리방법 등에 따라 상이한 결과를 얻을 수 있음을 시사하고 있다.

최근 수은의 면역독성에 관해 밝혀지지 않은 특성과 기전연구는 주로 설치류를 이용한 실험에서 활발히 진행되고 있는데, 대부분은 수은에 감수성이 높은 실험동물에서 관찰되는 신장병변을 자가면역질환의

발생과 유사한 기전으로 파악하고 있는 연구들(Aten 등, 1988; Hultman 등, 1991, 1992; Muranyi 등, 1993)과 수은노출에 따른 세포성면역의 손상을 관찰한 연구들이다(Dieter 등, 1983; Nakatsuru 1985; Ilback, 1991).

한편, Hibbs 등(1987a, 1987b)은 마우스의 대식세포가 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.

그밖에도 nitric oxide는 생체내에서 혈관이완 및 자극이완, 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). 최근의 연구에서 염증반응에 동원되는 세포들과 기타 면역세포들로 부터 생성되는 nitric oxide는 주로 여러 cytokine의 자극을 받은 소위 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 효소작용에 의해 생성된 것으로써(Snyder 등, 1992), Nathan 등(1991), Evans 등(1991) 및 Green 등(1990)은 이를 세포성면역의 분자생물학적 지표로 인정하고 있으며, 반감기가 극히 짧은 nitric oxide 대신 그 대사물인 nitrite 및 nitrate를 측정하므로써 nitric oxide의 생성을 정량적으로 유추할 수 있게 되었다(Bartholomew, 1984; Hibbs 등, 1988).

본 연구에서는 Balb/c 마우스의 복강으로부터 분리한 대식세포(macrophage)와 Balb/c 마우스의 유선암(mammary adenocarcinoma)에서 기원한 EMT-6 cell-line을 이용하여 nitrite와 nitrate의 생성양상을 관찰하고, 수은이 nitrite 및 nitrate의 생성에 미치는 영향을 파악하므로써 수은에 의한 세포성면역반응의 감소를 설명할 수 있는 기전의 일부를 밝히고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 마우스 복강대식세포의 획득

면역학적으로 활성화된 대식세포를 획득하기 위해서 10^7 의 균락형성단위(colony forming units, CFU)의 BCG를 복강내에 투여하고 7 - 14 일이 경과한 후, 치사시켜 배양액을 복강에 주사하여 exudate pipet으로 수거하는 방법으로 복강세포를 얻었다. 수거액을 원심(遠心)하여 상청액을 버리고 인산완충용액(PBS, pH=7.2)로 3회 세척하여 부유시킨 세포를 배양병에 분주하고, 이를 CO_2 부란기에 2 시간 동안 정치하여 바닥에 부착된 세포군을 제외한 상청액을 제거하여 복강대식세포를 얻었다.

2. EMT-6세포의 처리

5% fetal calf serum(FCS)을 함유하는 Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM) 10.5ml에 dimethyl sulfoxide(DMSO) 1.2ml와 FCS 3.25ml를 혼합한 동결 배양액내에 세포수가 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 인 상태로 동결보관중인 EMT-6 세포를 37 - 38°C의 수조에서 가온하였다. 빙결상태가 풀린 세포부유액을 20ml DMEM에 옮겨 원심과 세척의 과정을 2회 반복하고, 10% FCS가 함유된 DMEM(10% FCS-DMEM)을 첨가한 배양병에서 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 밀도로 2 - 3회 정도 계대한 후 실험에 사용하였다.

3. 배양조건

10% FCS-DMEM을 기본 배양액으로 여기에 40 U/ml의 interleukin(γ Mu IL-1 α , Sigma Chemical Co.)과 20 U/ml농도의 interferon(μ IFN γ , Sigma Chemical Co.)을 첨가하여 사용하였다. 준비된 세포들은 24 혈(well) 배양판(culture plate)의 각 혈에 복강대식세포는 2×10^6 개씩, EMT-6 세포는 1×10^6 개씩 각각 접종하였고, 각 혈당 배양액의 용적은 1ml로 균일화하여 36 시간을 배양하였다. 수은(mercury chloride, HgCl_2 , Sigma Chemical Co.)은 대조군(0 μM)외에 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 μM 의 5개 농도로 첨가하였는데, 24 혈 배양판 1 개를 수은 1 개 농도군에 배정하여, 24 혈중 20 혈은 해당농도의 수은첨가에, 나머지

4 혈은 대조군에 할당하였기 때문에 대조군을 비롯한 각 농도군의 관찰수(n)는 각각 20 씩이다.

4. 배양액내의 nitrite 및 nitrate의 정량

Nitrite 농도는 Hibbs 등(1987)의 방법을 참조하여 다음과 같이 측정하였다. 배양액 50 μM 씩을 microtiter plate에 옮겨 100 μM 의 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 교반하여 분홍의 발색을 확인하고 543 nm에서 흡광도를 읽었으며, 0 - 100 μM 의 sodium nitrite(NaNO_2)에 의한 표준곡선으로부터 농도를 계산하였다.

Nitrate의 정량을 위해서는 microtiter plate에 배양액 75 μM 를 점적하고 여기에 nitrate reductase를 함유하고 있는 Escherichia coli 현탁액, 1M HEPES 완충액(pH=7.4), 2.4M ammonium formate(pH=7.4)를 각각 1:10:10으로 혼합한 용액 75 μM 를 가하여 37 °C에서 1 시간 동안 배양하여 nitrate를 모두 nitrite로 환원시킨 다음 1000 g에서 15 분간 원심하였다. 이것의 상층액중 50 μM 를 취하여 다른 microtiter plate에 옮기고 역시 100 μM 의 Griess reagents를 첨가하여 nitrite의 경우와 같은 방법으로 측정하여 전체 농도에서 앞서 측정된 nitrite 양을 소거(消去)한 나머지로써 nitrate 양을 구하였다.

5. ATP 정량

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

6. 세포생존률 검사

배양이 끝난 후에 복강대식세포와 EMT-6 세포의 생존률은 trypan-blue exclusion 방법(Phillips, 1973)에 의해 관찰하였다.

7. 통계처리

측정자료들의 각 군간 차를 비교하기 위해서는 평균치의 경우 t-test 및 ANOVA를 적용하였으며, post-hoc 검정을 위해서는 Scheffe's test를 사용했다. 한편 nitrite와 nitrate 농도간의 관련성에 대해서는 단 순상관분석과 회귀분석을 시행하였다.

III. 결과

1. 복강대식세포와 EMT-6 세포의 nitrite 및 nitrate 생성능

10% FCS를 포함한 DMEM내에 IL-1 α 40 U/ml과 INF γ 20 U/ml을 첨가한 배양조건에서 BCG에 의해 활성화된 마우스 복강대식세포의 nitrite 및 nitrate 생성량은 시간의 경과에 따라 직선적으로 증가하고 있어, 배양 12 시간 후의 측정치에 비해 24시간 및 36 시간 후의 측정치는 각각 2배 및 3배의 수준으로 현저하게 높았다(p<0.01, Figure 1).

EMT-6 세포의 경우에도 동일 배양조건으로 12, 24, 및 36 시간 배양했을 때 시간의 경과에 따라 배양액내의 nitrite와 nitrate 생성량은 역시 직선적으로 증가하여, 12 시간 후의 측정치에 비해 24 시간 후는 2배 이상, 36시간 후는 3배 이상의 현저한 증가를 보였다(p<0.01, Figure 2).

2. Nitrite 및 nitrate 양의 상관관계

복강대식세포의 배양액내에 생성된 nitrite의 농도는 20 - 29 μ M, nitrate의 농도는 15 - 23 μ M의 범위로 측정되었으며, 양자의 상관계수가 0.89(p<0.01)로써 뚜렷한 직선관계를 보여주고 있다(Figure 3). EMT-6 세포의 배양과정에서 측정된 nitrite와 nitrate의 양 역시 상호간에 밀접한 상관성(r=0.96, p<0.01)을 나타

내고 있다(Figure 4).

3. 수은첨가에 의한 nitrite 및 nitrate 생성능의 변화

복강대식세포 및 EMT-6 세포의 배양조건에 여러 농도의 수은(mercury chloride, 0.05 - 0.8 μ M)을 첨가하여 36 시간 후에 측정된 배양액내의 nitrite와 nitrate 생성량은 용량 의존적(dose-dependent) 관계로 감소하였다.

복강대식세포의 경우, 36 시간을 배양하였을 때 배양액내의 nitrite는 18 - 24 μ M의 농도로 생성되나 수은첨가에 따라 그 농도가 현저히 감소되어 최고농도인 0.8 μ M의 수은을 첨가한 경우 12 - 16 μ M로 감소하였으며, nitrate의 생성도 nitrite의 경우와 같은 양이었다(p<0.05, Figure 5). EMT-6 세포의 배양과정에 첨가된 수은도 역시 농도증가에 따라 nitrite와 nitrate의 생성을 억제시키는 것으로 관찰되었다(p<0.05, Figure 6).

4. 세포생존률

복강대식세포와 EMT-6 세포의 생존률은 일반 배양 조건에서 36 시간을 배양한 경우 최소 90% 이상이다. 수은을 첨가했을 때 그 농도에 따라 생존률의 저하가 관찰되는데, 복강대식세포의 경우 수은이 첨가되지 않은 배양상태에서 평균 92%였던 것이, 최고농도인 0.8 μ M에서는 70%로 현저한 감소를 나타낸(p<0.01) 반면, EMT-6 세포의 경우 수은 첨가에도 불구하고 생존률의 감소가 현저하지 않았으며(p>0.05), 최고농도인 0.8 μ M 조건에서도 90% 이상의 생존률이 유지되었다(Figure 7).

5. ATP 생성량

EMT-6 세포는 수은이 첨가되지 않은 배양조건에서 24 시간 동안 15 - 21mM의 ATP를 생성한다. 세포생존률이 90 - 95%를 유지하는 상태에서 수은농도의 증가에 따른 ATP 생성량은 용량 의존적 관계로 감소하

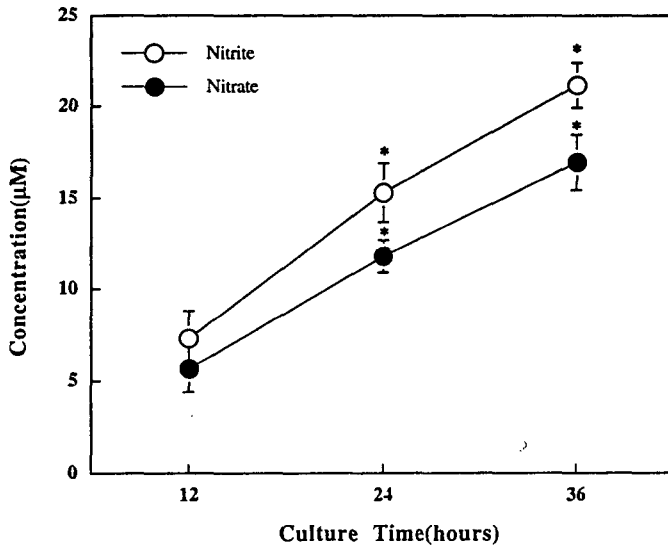


Fig 1. Concentrations of nitrite and nitrate produced by activated peritoneal macrophages from Balb/c mice which were intraperitoneally injected with BCG of 10^7 colony forming units. Those macrophages were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing IL-1 40U/ml and INF 20 U/ml. Values are expressed as mean and standard deviation. * Significantly different from the 12 hours' value, $p < 0.05$.

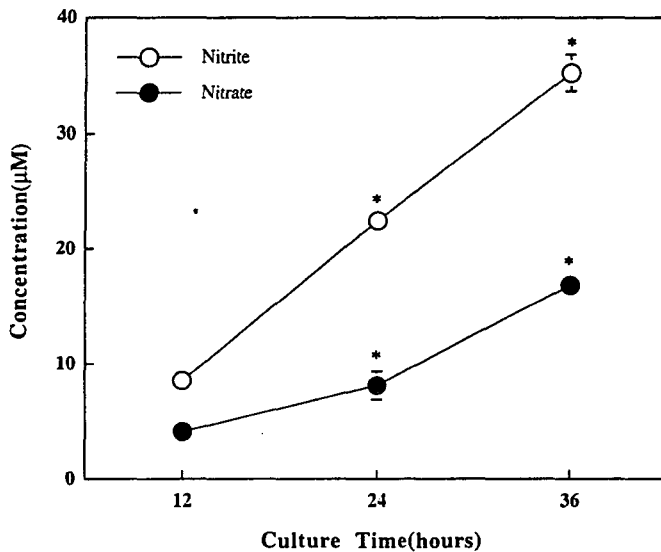


Fig 2. Concentrations of nitrite and nitrate produced by EMT-6 cells which were cultured in DMEM containing IL-1 40 U/ml and INF 20 U/ml. Nitrite and nitrate were continuously measured at 12, 24, and 36 hours after incubation. Values are expressed as mean and standard deviation. * Significantly different from the 12 hours' value, $p < 0.01$.

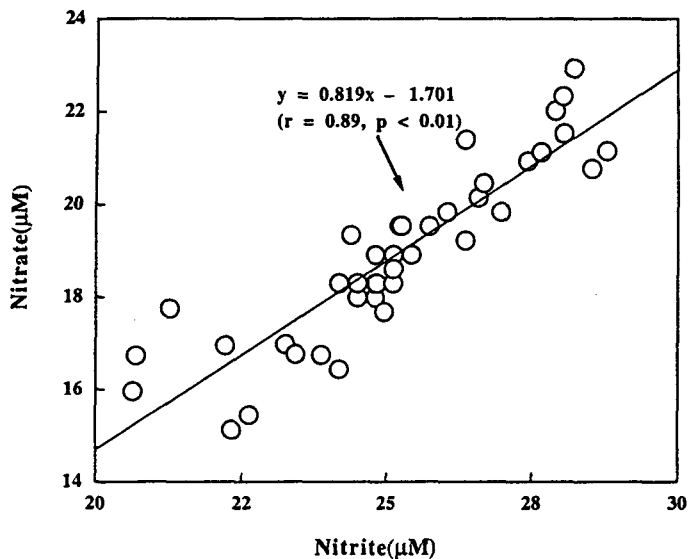


Fig 3. The correlations between the amounts of nitrite and nitrate synthesized by activated peritoneal macrophages from Balb/c mice. Those macrophages were cultured in DMEM containing IL-1 40 U/ml and INF 20 U/ml.

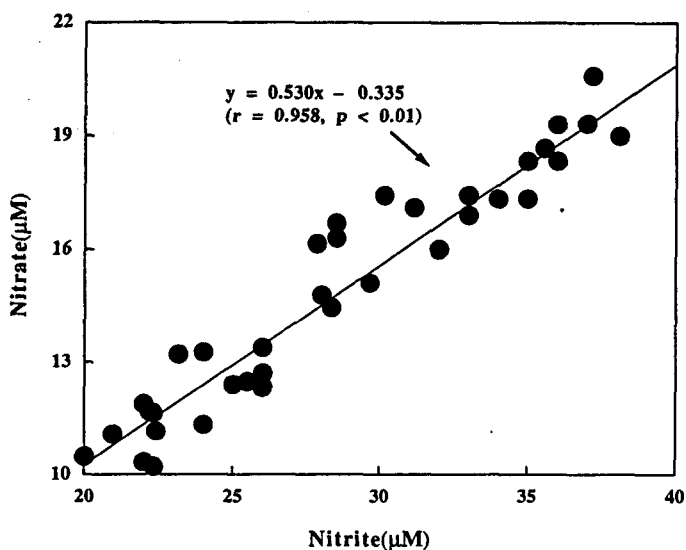


Fig 4. The correlations between the amounts of nitrite and nitrate synthesized by EMT-6 cells cultured in DMEM containing IL-1 40 U/ml and INF 20 U/ml. The simple correlation and regression tests were done for pooling data from several experimental conditions, i.e., culture times and mercury concentrations.

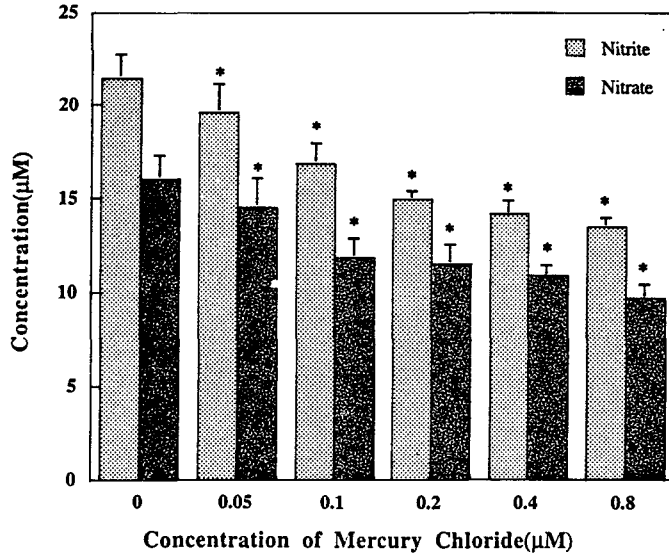


Fig 5. Concentrations of nitrite and nitrate produced by activated peritoneal macrophages from Balb/c mice which were intraperitoneally injected with BCG of 10^7 colony forming units. Those macrophages were cultured for 36 hours in DMEM containing IL-1 40U/ml and INF 20 U/ml and several concentrations of mercury chloride. Values are expressed as mean and standard deviation. * Significantly different from the corresponding control value, $p < 0.05$.

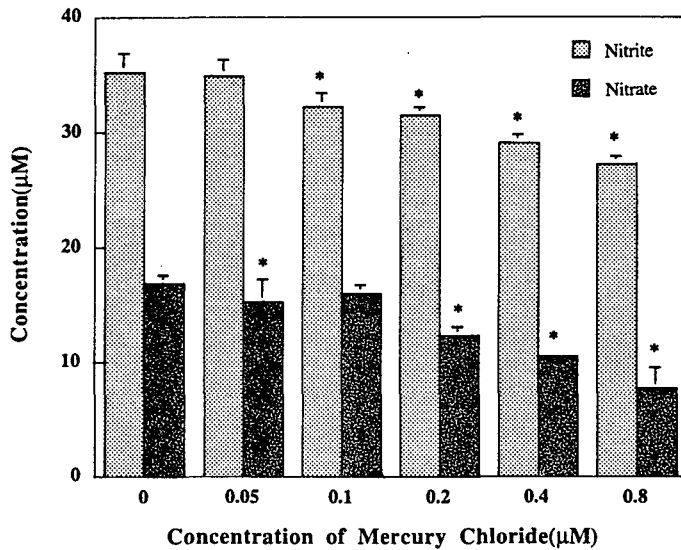


Fig 6. Concentrations of nitrite and nitrate produced by EMT-6 cells which were cultured for 36 hours in DMEM containing IL-1 40 U/ml and INF 20 U/ml and several concentrations of mercury chloride. Values are expressed as mean and standard deviation. * $p < 0.05$. * Significantly different from the corresponding control value, $p < 0.05$.

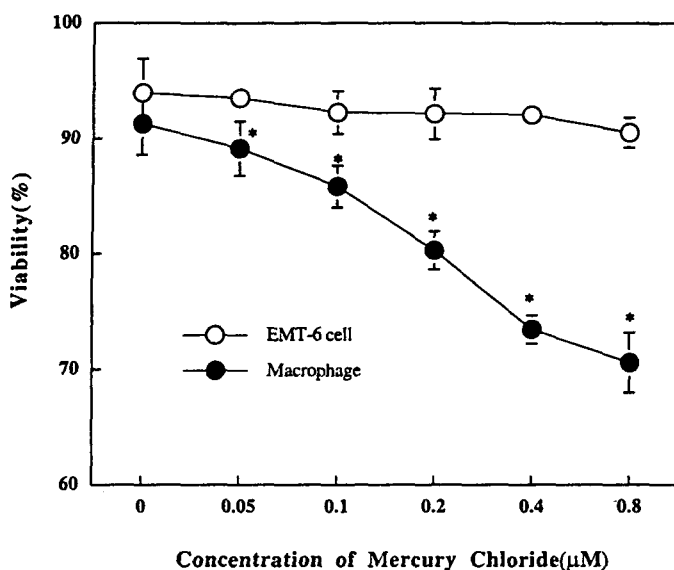


Fig 7. The viability of peritoneal macrophages from Balb/c mice and EMT-6 cells cultured in DMEM containing 10% FCS and several concentrations of mercury chloride. These cells were cultured with cytokines(IL-1 and IFN γ) for 36 hours and measured their viability by the trypan blue exclusion test. Values and expressed as mean and standard deviation. * Significantly different from the corresponding control value, $p < 0.05$.

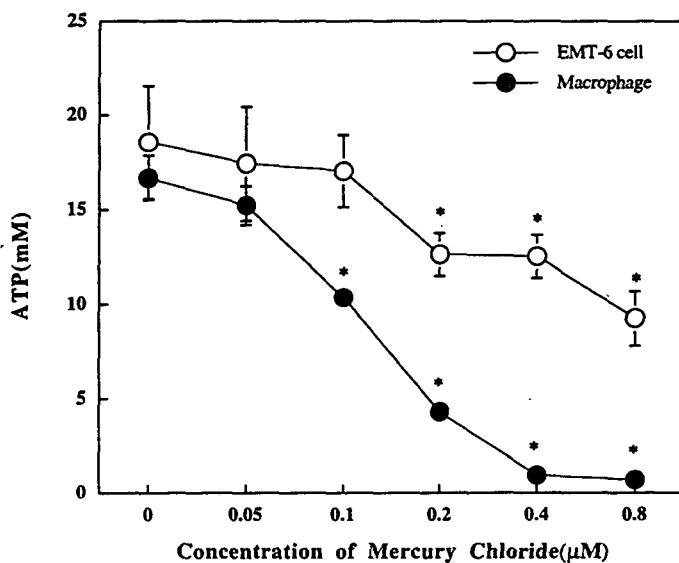


Fig 8. The amount of ATPs in homogenates of EMT-6 cells cultured in DMEM containing IL-1 40 U/ml and INF 20 U/ml and several concentrations of mercury chloride. Values are expressed as mean and standard deviation. * Significantly different from the corresponding control value, $p < 0.05$.

여 0.8 μM 의 수은농도에서는 그 양이 7 - 12 mM로 현저한 차이를 나타냈다. 그러나 복강대식세포의 ATP 생성량은 EMT-6 세포의 생성량에 비해 적었으며, 특히 고농도의 수은 첨가조건에서는 ATP 생성량이 현저히 저하되어 있었다(Figure 8).

IV. 고찰

수은이 면역독성을 초래하는 기전은 아직까지 불분명하다. 그러나 많은 연구들은 수은에 의해 실험동물(Koller, 1973; Koller, 1977; Blakley 등, 1980; Lawrence 등, 1987; Bridger, 1983; Dieter 등, 1983) 또는 인체(Benko 등, 1990)의 세포성 면역과 체액성 면역이 장애될 수 있다는 것을 보고하고 있다. 또한 수은에 노출되어 신증후군(nephrotic syndrome)을 일으킨개체에서 혈액내의 면역복합체(circulating immune complex, CIC)가 증가하거나(Stonard 등, 1983), 신장조직에서 사구체 기저막의 미세변화가 면역복합체의 침착과 관련한 신사구체염(glomerulonephritis)의 소견(Tubbs 등, 1982; Oliveira 등, 1987)을 보이는 등, 기타 자가면역질환의 특성이 관찰되는 것(Aten 등, 1988; Hultman 등, 1992; Pelletier 등, 1986)은 생체에 대한 수은의 독작용을 이해하기 위한 면역학적 접근의 중요성을 시사하고 있다.

일반적으로 진균(Granger 등, 1990), 나균(Adams 등, 1991) 및 독소프라스마(Adams 등, 1990) 등의 특정 균주에 감염된 실험동물의 면역세포들이 생성하는 nitric oxide 양의 대소에 따라 저항성 또는 감수성이 결정되는데(Green 등, 1990; Liew 등, 1990), 마우스의 종(種)에 따라 서로 다르게 관찰되는 감수성과 병변의 진행정도도 유전적으로 nitric oxide 생성능력에서 차이가 나기 때문이라는 것이 밝혀져 있다(Evans 등, 1993). 이처럼 개체가 생물학적 자극을 받았을 때, nitric oxide를 생성하는 과정은 대식세포와 같은 탐식세포들이 분비하는 IL-1, TNF 등의 cytokine들에 의해 조절된다는 것이 밝혀짐에 따라(Ding 등, 1988; Heinzl 등, 1989; Nathan 등, 1991), 생체의 nitric oxide

생성능은 세포성 면역의 간접적인 지표로써 인식되고 있다(Green 등, 1990; Liew 등, 1990).

본 연구에서는 수은이 세포성면역의 장애를 일으킨다는 기노석 등(1994), 염정호(1995) 등의 관찰결과로부터 수은중독에 대해 감수성을 보이는 Balb/c 마우스의 조직세포들의 nitrite 및 nitrate 생성능이 수은노출로 인해 감소할 것이라는 가설하에 이를 시험관내에서 증명하고자 시도하였다. 실험에 앞서 전제되어야 할 것은 세포의 생존률이 수은첨가로 인해 심히 저하된다면, 당연히 nitric oxide의 생성이 감소될 것이고, 이에 따라 nitrite 및 nitrate의 생성량도 비례해서 감소되기 때문에 가능한 세포생존률을 최대한 유지시킬 수 있는 실험조건을 찾아야 한다.

복강대식세포의 경우는 배양조건에 첨가된 수은농도가 0.1 μM 이상인 조건에서는 그 생존률이 85 - 70%의 범위로 감소하기 때문에, 이때 관찰되는 nitrite 및 nitrate 생성량에 절대적인 영향을 주어 수은의 순수한 영향을 관찰할 수가 없었다. 그러나 EMT-6 세포의 생존률은 수은의 첨가농도에 거의 영향을 받지 않아서 적어도 본 연구에서는 1.0 μM 이하의 농도에서는 생존률의 저하가 관찰되지 않았다.

이같은 사실은 EMT-6를 이용한 실험모델이 nitric oxide의 생성을 객관적으로 관찰하는데 더 적합할 수 있음을 시사하며, 특히 EMT-6 세포는 BCG등에 의해 활성화 되어야 nitric oxide를 생성하는 복강대식세포와는 달리 단순히 cytokine의 자극만으로도 충분한 양의 nitric oxide를 생성할 수 있는 특징(Hibbs 등, 1987b; Amber 등, 1988)을 갖고 있어 본 연구에서와 같은 독성기전의 연구에 보다 유용할 것으로 판단된다.

복강대식세포 및 EMT-6 세포가 생성하는 nitrite와 nitrate 양 사이에 밀접한 상관관계는 외부로부터 질소화합물의 유입이 완전히 통제된 상태이므로, 이들이 세포질 또는 배양액내에서 세포내로 이동한 L-arginine을 대사하여 생성한 nitric oxide로부터 연속적인 산화과정을 거친 대사물이라는 것을 확인해 주는 결과이며, 수은농도의 증가에 따라 nitrite의 생성량이

복강대식세포의 경우는 25 - 12 μM , EMT-6 세포의 경우는 40 - 25 μM 의 범위로, nitrate는 nitrite 양의 약 50% 내외의 수준으로 각각 감소하여, 각 농도별 차이를 관찰하는데는 충분한 범위였다. Amber 등 (1988)은 nitric oxide의 생성을 유도하기 위한 cytokine들 중에서 INF γ , IL-1 α , 및 TNF(tumor necrosis factor)를 동시에 사용함으로써 nitric oxide의 생성효율을 현저하게 높일 수 있다고 보고하였으나, 본 실험에서 사용한 INF γ 및 IL-1 α 의 동시 사용으로도 상기의 80%에 달하는 생성률을 얻을 수 있었다.

한편 수은첨가에 따라 nitrite와 nitrate생성량이 감소하는 것과 동시에 각 세포의 ATP생성량의 저하가 관찰되는 것은 수은이 세포내 에너지 생산과 관련된 신진대사의 어느 단계를 억제할 수 있음을 보여준다. 실제 L-arginine으로부터 nitric oxide가 생성되는 것은 반응에너지로서 ATP를 요구하는 과정이므로 생체내 에너지대사에서 Stacey(1980)나 Goyer(1991)등이 지적한 바와 같이 특정 효소의 활성을 수은이 직접 또는 간접으로 억제함으로써 독성을 나타낸다는 가설이 수은의 면역독성에도 적용된다고 판단된다. 따라서 본 연구의 결과는 수은에 의한 세포성 면역의 장애가 일차적으로 세포수준에서 대사과정의 이상이 초래되어 nitric oxide의 생성을 저하시키고, 결과적으로 면역세포의 증식억제 및 탐식능의 감소(Castranova 등, 1980; Nakatsuru 등, 1985; Ilback, 1991)로서 관찰되는 현상임을 암시하고 있다.

향후 이에 대한 생화학적 접근을 통해 EMT-6 세포내의 해당작용(解糖作用, glycolysis)이나 구연산회로(citric acid cycle)와 같은 주요 에너지 공급반응을 조절하는 효소의 활성을 포괄적으로 점검하여, nitric oxide 생성에 미치는 에너지대사의 변조를 밝힐 수 있다면, 수은독성기전에 대해 보다 구체적인 해석을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 요약

Balb/c 마우스의 복강대식세포와 동종 마우스의 유

선암에서 기원한 EMT-6 세포를 배양하는 조건에 여러 농도의 수은을 첨가하여 nitrite와 nitrate 생성의 변화를 관찰한 결과는 다음과 같다.

복강대식세포 및 EMT-6 세포가 생성하는 nitrite와 nitrate 양은 공히 배양시작 12 시간 후의 생성량에 비해 24 시간 후에는 2배, 36 시간 후에는 3배의 농도로 측정되었다. 이때 nitrite와 nitrate 농도 사이에 매우 밀접한 상관관계가 관찰되었다.

수은첨가에 따라 nitrite 및 nitrate 생성량은 용량의존적 관계로 현저한 감소를 보이며, 24 시간 또는 36 시간 후의 세포생존률도 역시 수은농도에 비례하여 감소되는데, 복강대식세포의 생존률 감소가 EMT-6 세포의 것에 비해 더욱 현저하였다. 이들 세포내에서 생성되는 ATP의 양은 복강세포의 경우 그 생존률과 비례하는 경향이었으나, EMT-6세포의 경우는 비교적 높은 생존률에도 불구하고 배양액내에 수은농도를 증가시킴에 따라 ATP생산은 현저히 감소하였다.

이상의 결과는 면역세포인 복강대식세포 뿐아니라 암세포인 EMT-6 세포에서도, L-arginine으로부터 nitric oxide를 생성하는 생화학적 반응이 수은에 의해 공히 억제될 수 있음을 보여준다. 한편 수은의 세포성 면역에 미치는 독성은 수은이 면역세포의 ATP생성과 관련한 에너지 대사과정의 장애를 초래하여 nitric oxide 생성에 필요한 반응에너지의 공급을 억제시키기 때문에 나타나는 현상으로 사료된다.

참고 문헌

- 기노석, 고대하, 김종서, 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, Odrejcek 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 T au cours d'une glomerulonephrite 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
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141:2407-2412.
- 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, pp. 646-651
- Granger DL, Hibbs JB, Perfect JR, Durack DT. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic 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
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman R, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon- γ or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *J Exp Med* 1989;169:59-72.
- 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 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
- Iiback NG. Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer(NK) cell activity in the mouse. *Toxicology* 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. *Toxicology* 1985;36:297-305
- Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion Immunol* 1991;3:65-70
- 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, pp. 406-408
- Polak L, Barnes JM, Turk JL. The genetic control of contact sensitization to inorganic metal compound in guinea-pig. *Immunology* 1968; 14:707-711
- Reardon C, Lucas DO. Heavy-metal mitogenesis: Zn²⁺, Hg²⁺ induce cellular cytotoxicity and interferon production in murine T lymphocytes. *Immunobiology* 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, pp. 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