

세포막 물질수송계의 조절에 의한 유기수은의 세포독성 변화에 대한 연구

염정호[†] · 고대하 · 김준연 · 김남송*

전북대학교 예방의학교실

*원광대학교 예방의학교실

Changes on the Methylmercury-induced Cytotoxicity by Control of Cell Membrane Transport System

Jung Ho Youm[†], Dai Ha Koh, Jun Youn Kim and Nam Song Kim*

Department of Preventive Medicine

*College of Medicine, Chonbuk National University

(Received 19 October 2000 ; Accepted 2 December 2000)

ABSTRACT

The aim of the current study was to evaluate the transport system in EMT-6 cell for the uptake of the methylmercury(MeHg). Several inhibitors were used to test which potential transport system might be involved in MeHg uptake. Probenecid was used to test the organic transport system, valinomycin for testing the effect of the membrane potential, cytochalasin B for testing the facilitated diffusive D-glucose transport system and colchicine for testing the microtubule system. Ouabain for evaluating active transport system, 4',4-diisothiocyano-2',2-stilbenedisulfonic acid(DIDS) the Cl⁻ ion transport system and verapamil for the Ca²⁺ transport system. Significantly, MeHg decreased the synthesis of nitric oxide(NO) and intracellular ATP in EMT-6 cells. In the condition of ouabain containing with MeHg, intracellular ATP level and NO production was not decreased. But other inhibitors containing with MeHg decreased the production of NO and intracellular ATP. In the treatment of inhibitors, ouabain showed protective effect against cytotoxicity of MeHg but other inhibitors not showed protective effects. The protective effects of ouabain against the cytotoxicity of MeHg depended on the concentration of added ouabain to the culture medium for EMT-6 cells. These result showed that the uptake of MeHg might be involved in the active transport system. Active transports system seems to share similarities with the transport systems for the uptake of MeHg when using MeHg and MeHg-glutathione complex.

Keywords : MeHg, Ouabain, Active transport

I. 서 론

유기수은(methylmercury; MeHg)은 위장관을 통하여 쉽게 흡수되고, sulfhydryl(SH)-group과 친화력이 강하여 생체내로 유입되면 thiol인 glutathione(GSH)과 결합하여 MeHg-GSH 복합체를 형성하여 혈관계를 통해서 조직이나 기관으로 이동하여 분포하게 된다.¹⁾ 유기수은의 세포 독성기전은 명확하게 밝혀지지 않아서 많은 논란이 되고 있으나, 일반적으로 다음의 두 가지로 요약된다. 첫째는 세포 밖에서 나타나는 세포독성으로 수은

이 SH-group을 포함하고 있는 막 단백질과 결합하여 독성을 나타내는데, 이는 막 단백질의 -SH group이 세포막 투과성 및 물질수송을 관여하기 때문에 유기수은의 결합으로 인하여 막 단백질의 기능저하를 초래하여 세포독성을 유발하게 된다.^{2,3)} 두 번째는 세포 안에서 나타나는 세포독성으로 수은이 세포 내로 유입된 후 세포 내 대사과정에 참여하는 여러 효소들의 활성을 억제하고 단백질의 기능을 저하시킴으로써 세포 독성을 유발하는 것이다.^{4,5)}

수은의 세포 내 유입기전은 현재 많은 연구자들에 의해 여러 가지 이론과 경로가 제시되고 있다. 특히, 신장에서 수은의 세포내 유입기전은 γ -glutamyltranspeptidase (GGT)에 관련된 기전과 organic anion transport system의 기전에 의해 일어난다고 보고되고 있다.^{6,9)}

[†]Corresponding author : Department of Preventive Medicine
College of Medicine, Chonbuk National University
Tel: 063-270-3191, Fax: 063-274-9881
E-mail: yjho@moak.chonbuk.ac.kr

GGT는 세포막에 위치하여 GSH를 분해하는 효소로 분해된 아미노산을 세포안으로 이동시켜주는 역할을 하는데, 분해된 cysteine을 세포안으로 이동시킬 때 -SH group에 결합된 수은을 세포안으로 유입시키는 것으로 알려져 있다. 실제적으로 GGT의 활성을 인위적으로 저해시키면 조직의 세포내 수은축적이 감소하는 것으로 보고되어 있다.^{7,10)} 또한 수은의 세포내 유입은 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Cl^- 와 같은 세포내외의 이온농도 및 그 상태에 따라 차이가 나는 것으로 보고되어 있다.¹¹⁾ 이 외에도 세포막의 물질수송기작인 active transport system, membrane potential, microtubule, cysteine-facilitated transport system, amino acid transport system^{11,12)}과 Cl^- ion transport system, Ca^{2+} channel¹⁵⁾을 통해서 세포안으로 유입된다고 보고되고 있지만 유기수은의 세포내 유입기전은 현재까지 명확하게 밝혀져 있지 않다.

대식세포(macrophage)가 암세포를 죽이거나 증식을 억제 할 때는 cytokine의 자극을 받아 nitric oxide(NO)를 생성하여 세포밖으로 배출하게 되는데, 세포내에서 L-arginine 분자의 guanidino nitrogen이 산화하여 D-citrulline과 동량의 NO가 생성되는 것으로 알려져 있다.^{11,14,15)} NO는 염증반응과 관련된 여러 면역세포들에서 생성되는데, 이는 면역세포에서 생성된 interleukin-1(IL-1)이나 interferon- γ (IFN- γ)와 같은 cytokine의 자극을 받은 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 효소 작용에 의해 생성되는 것으로서,⁷⁾ 면역세포의 NO생성량은 세포성 면역의 분자생물학적 지표로 인정받고 있다.^{18,19)} 그러나 NO는 반감기가 극히 짧아 생성량을 직접 측정하기가 불가능하기 때문에 대신 그 대사물인 nitrite 및 nitrate를 측정하여 NO의 생성을 정량적으로 유추할 수 있는 것으로 보고되어 있다.^{20,21)} 또한 마우스의 유선암에서 기원한 EMT-6 세포주는 세포성 면역세포인 대식세포와 같이 IL-1, INF- γ 등과 같은 cytokine의 자극으로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있어 일반적으로 면역세포에 대한 수은 및 중금속의 독성검정을 위한 실험모델로 이용할 수 있는 것으로 보고되어 있다.²²⁾

본 연구에서는 세포막 물질수송계의 기능을 방해하는 저해제(inhibitor)들을 이용하여 유기수은의 세포내 유입기전에 관련된 세포막 물질수송계를 밝히고자 하였다. 세포막 물질수송계의 저해제는 organic anion transport system의 방해하는 probenecid, membrane potential을 고정시키는 valinomycin, facilitated diffusive D-glucose transport system의 저해제인 cytochalasin B, microtubule system의 기능을 저하시키는 colchicine,

Na^+K^+ -ATPase의 저해제로서 active transport system을 방해하는 ouabain, Cl^- ion transport system을 방해하는 4,4-diisothio-cyano-2',2'-stilbenedisulfonic acid(DIDS), Ca^{2+} transport system을 방해하는 verapamil을 이용하였다. EMT-6 세포의 배양조건에 유기수은(CH_3HgCl)과 GSH 및 세포막 물질수송계의 기능을 방해하는 저해제들을 여러 실험조건으로 동시첨가 하거나 저해제들을 전처리 한 후 유기수은과 GSH를 첨가하여 배양한 후, 세포내 adenosine triphosphate(ATP)의 생성량과 배양액의 NO량을 측정하여 유기수은의 세포독성 변화를 관찰함으로써 유기수은의 세포내 유입기전을 밝히고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. EMT-6 세포의 처리

FBS(Gibco, N.Y. USA)를 보충한 DMEM(Sigma, St. Louis, MO, USA) 10.5 ml에 DMSO(Sigma, St. Louis, MO, USA) 1.2 ml 및 FBS 3.25 ml를 혼합한 동결배양액내에 세포수가 3×10^6 인 상태로 동결보관중인 EMT-6 세포를 37-38°C의 수조에서 가온하였다. 빙결상태가 풀린 세포부유액을 20 ml DMEM으로 2회 원심세척하고, 10% FBS를 보충한 DMEM(10% FBS-DMEM)이 들어 있는 배양병에서 2-3회 계대배양한 다음 24 well plate에 1×10^5 cell/well의 밀도로 배양하였다.

2. 배양조건

1) 유기수은 및 저해제의 단독첨가 배양조건

대조군은 배양조건에 IL-1(Sigma, St. Louis, Missouri), IFN- γ (Sigma, St. Louis, Missouri)외에는 첨가물이 없는 실험조건으로 기본 배양액에 48시간 배양하였다. 유기수은(CH_3HgCl ; Kanto, Japan)은 0.5, 1, 2, 4 μ M을 배양액에 첨가하였고, colchicine과 valinomycin(Sigma, St. Louis, Missouri)은 각각 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 μ M을 첨가하였고, verapamil, ouabain, probenecid, 4,4-diisothio-cyano-2',2'-stilbene-disulfonic acid(DIDS), cytochalasin B(Sigma, St. Louis, Missouri)는 유기수은과 같이 각각 0.5, 1, 2, 4 μ M을 배양액에 첨가하여 48시간 배양하였다.

2) 유기수은, GSH 및 저해제의 동시첨가 배양조건

대조군은 기본 배양조건에서 48시간 배양하였고, 유기수은은 4 μ M을 colchicine 0.2 μ M, valinomycin 0.1 μ M, verapamil, ouabain, probenecid, DIDS 각각 4 μ M, cytochalasin B 2 μ M의 저해제와 각각 동시첨가하여 48시간 배양하였다. 또한 GSH(Sigma, St. Louis,

Missouri) 4 μM 과 동량의 유기수은을 혼합한 후 위와 동일한 양의 저해제를 배양세포에 동시첨가하여 48시간 배양하였다.

3) 저해제의 전처리 배양조건

Colchicine 0.2 μM , valinomycin 0.1 μM , verapamil, ouabain, probenecid, DIDS 각각 4 μM , cytochalasin B 2 μM 의 저해제를 단독첨가하여 24시간 배양한 후 4 μM 의 유기수은 혹은 동량의 GSH가 혼합된 유기수은이 첨가된 배양액으로 교환하여 48시간 배양하였다. 대조군은 기본 배양조건으로 24시간 배양한 후 기본배양액으로 다시 교환한 후 48시간 배양하여 실험군과 비교하였다.

실험군과 대조군의 실험관찰수는 16회(16 plate \times 4 well/group)였다.

3. 배양액내 NO_2^- 의 정량

Hibbs 등(1987a)의 방법을 참조하여 다음과 같이 측정하였다. 배양액 50 μL 을 취해 microtiter plate에 옮기고 100 μL 의 Griess reagents(1:1 mixture of 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 60% acetic acid, and 1% sulfonamide in 30% acetic acid)를 혼합하여 microtiter plate에 혼합한 다음 microplate reader(Dynatech, USA)를 이용하여 543 nm에서 흡광도를 측정하였고, 위와 동일한 방법으로 sodium nitrate(NaNO_2)를 1-100 μM 의 범위에서 흡광도를 측정하여 만들어진 표준곡선(standard curve)을 이용하여 배양액내의 nitrite 농도를 계산하였다.

4. ATP 정량

배양한 세포를 수거한 다음 세척과정을 통해 배양액을 완전 제거한 후, 6% trichloroacetic acid(TCA) 200 μL 를 첨가하고 초음파분쇄기(ultrasonicator)를 이용하여 세포막을 파괴시킨 다음 4°C, 1200 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 분리된 상층액 20 μL 을 100 mM glycine 80 μL 와 혼합한 다음 0.1% luciferase 100 μL 을 첨가한 후 luminometer(Berthold, Germany)를 이용하여 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 측정하였고, 0.1-10 μM 의 범위내의 표준곡선을 이용하여 ATP 양을 계산하였다.

5. 통계처리

유기수은 단독첨가군과 각 처리군과의 ATP 및 NO의 차이를 비교하기 위하여 Student's t-test와 ouabain 처리농도에 따른 ATP 및 NO의 차이를 비교하기 위하여 ANOVA 검정방법을 이용하였다.

III. 결 과

1. 유기수은 및 세포막 물질수송계 저해제의 단독첨가시 NO_2^- 와 ATP 생성량의 변화

EMT-6 세포에 유기수은을 단독첨가한 배양조건에서 NO_2^- 및 ATP 생성량은 첨가한 유기수은의 용량이 증가할수록 용량의존적으로 감소하였다(Table 1). Colchicine은 0.2 μM , valinomycin은 0.1 μM , cytochalasin은 2 μM , verapamil, ouabain, probenecid, DIDS는 모두 4 μM 이하에서 NO_2^- 및 ATP 생성량이 대조군과 동일한 수준으로 유지되었다(Table 1).

2. 유기수은 또는 유기수은 및 GSH와 세포막 물질수송계 저해제의 동시첨가시 NO_2^- 와 ATP 생성량의 변화

EMT-6 세포에 유기수은과 colchicine, valinomycin, verapamil, ouabain, probenecid, DIDS, cytochalasin

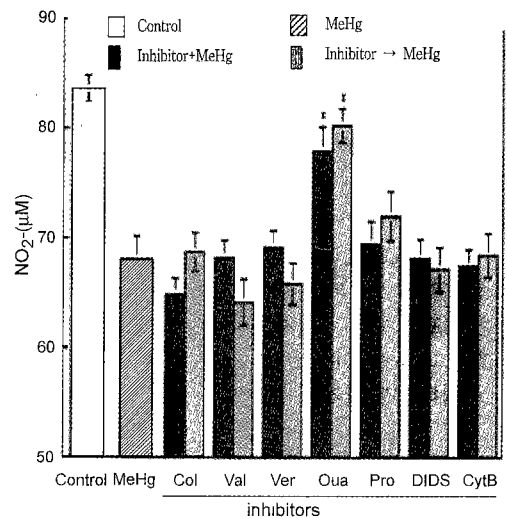


Fig. 1. Effects of inhibitors or inhibitor-pretreatment against methylmercury(MeHg) on the production of NO_2^- in EMT-6 cells. The EMT-6 cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 48 hours in only 4 μM MeHg(▨) or 4 μM MeHg containing with 0.2 μM colchicine or 0.1 μM valinomycin or 2 μM cytochalasin B or 4 μM verapamil, ouabain or probenecid compound (■). Or the cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 24 hours in 0.2 μM , colchicine or 0.1 μM valinomycin, or 2 μM cytochalasin B or 4 μM verapamil, ouabain or probenecid. The cells were further incubated at 37°C for 48 hours in 4 μM GSH(▩). Values are expressed as mean \pm S.D.

*Significantly different from the corresponding MeHg group value at $p < 0.01$ by t-test.

B의 저해제와 각각 동시 첨가한 배양조건에서 NO₂ 및 ATP 생성량은 ouabain의 저해제 처리에서만 유기수은을 단독첨가한 군에 비하여 현저하게 높고(p<0.05) 대조군과 비슷한 수준으로 나타났으며, ouabain을 제외한 다른 저해제들의 경우는 유기수은 단독첨가한 군과 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 1, 2).

유기수은과 동량의 GSH를 혼합한 후 colchicine, valinomycin, verapamil, ouabain, probenecid, DIDS, cytochalasin B의 저해제를 각각 동시 첨가한 배양조건에서 NO₂ 및 ATP 생성량은 ouabain의 저해제에서 유기수은을 단독첨가한 군에 비하여 현저하게 높고(p<0.05) 대조군과 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 3, 4). Colchicine, Probenecid, DIDS, cytochalasin B를 첨가한 경우에서 NO₂ 생성량은 유기수은을 단독첨가한 군과 비슷한 수준으로 나타났고, valinomycin, verapamil을 첨가한 경우는 유기수은을 단독첨가한 군보다 현저하게 낮게 나타났다(p<0.05, Fig. 3). ATP 생

성량은 colchicine과 valinomycin을 첨가한 배양조건에서 유기수은을 단독첨가한 군보다 현저하게 낮았으며(p<0.05), verapamil, probenecid, DIDS, cytochalasin B를 첨가한 배양조건에서는 유기수은을 단독첨가한 군과 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 4).

3. 세포막 물질수송계 저해제의 전처리 후 유기수은 또는 유기수은 및 GSH첨가한 배양조건에서의 NO₂와 ATP 생성능 변화

Colchicine, valinomycin, verapamil, ouabain, probenecid, DIDS, cytochalasin B를 전처리 후 유기수은을 첨가한 배양조건에서 NO₂ 및 ATP 생성량은 ouabain을 전처리 한 배양조건에서만 유기수은을 단독첨가한 군에 비하여 현저하게 높고(p<0.05) 대조군과 비슷한 수준으로 나타났으며, 다른 저해제들은 유기수은 단독첨가한 군과 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 1, 2). Ouabain을 동시첨가한 배양조건보다 전처리한 배양

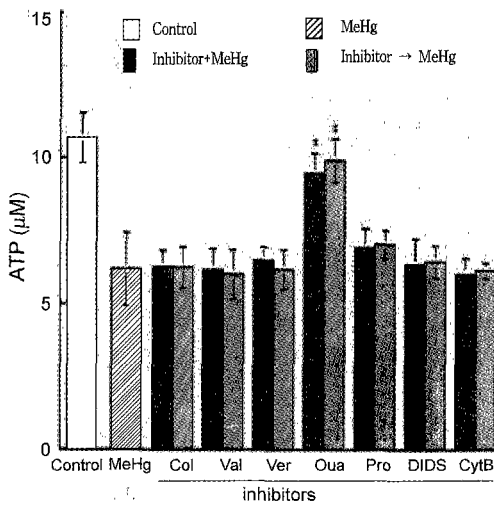


Fig. 2. Effects of inhibitors or inhibitor-pretreatment against methyl mercury(MeHg) on the production of APT in EMT-6 cells. The EMT-6 cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 48 hours in only 4 µM MeHg(▨) or 4 µM MeHg containing with 0.2 µM colchicine or 0.1 µM valinomycin or 2 µM cytochalasin B or 4 µM verapamil, ouabain or probenecid compound(■). Or the cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 24 hours in 0.2 µM, colchicine or 0.1 µM valinomycin, or 2 µM cytochalasin B or 4 µM verapamil, ouabain or probenecid. The cells were further incubated at 37°C for 48 hours in 4 µM GSH (▩). Values are expressed as mean ± S.D.
*Significantly different from the corresponding MeHg group value at p<0.01 by t-test.

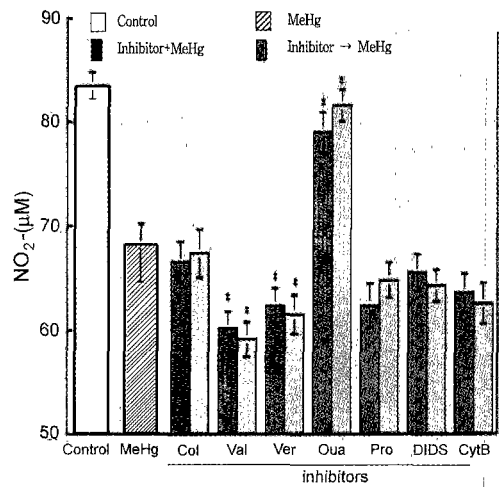


Fig. 3. Effects of inhibitors or inhibitor-pretreatment against MeHg-GSH on the production of NO₂ in EMT-6 cells. The EMT-6 cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 48 hours in 4 µM MeHg or 4 µM MeHg-GSH containing with 0.2 µM colchicine or 0.1 µM valinomycin or 2 µM cytochalasin B or 4 µM verapamil, ouabain or probenecid compound. Or the cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 24 hours in 0.2 µM, colchicine or 0.1 µM valinomycin, or 2 µM cytochalasin B or 4 µM verapamil, ouabain or probenecid. The cells were further incubated at 37°C for 48 hours in 4 µM MeHg-GSH. Values are expressed as mean ± S.D.
*Significantly different from the corresponding MeHg group value at p<0.01 by t-test.

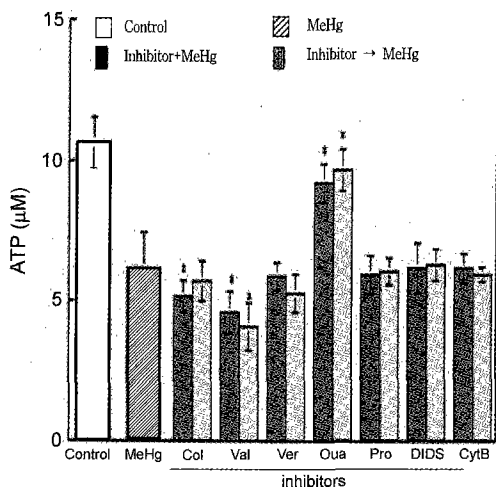


Fig. 4. Effects of inhibitors or inhibitor-pretreatment against MeHg-GSH on the production of APT in EMT-6 cells. The EMT-6 cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 48 hours in only 4 µM MeHg or 4 µM MeHg-GSH containing with 0.2 µM colchicine or 0.1 µM valinomycin or 2 µM cytochalasin B or 4 µM verapamil, ouabain or probenecid compound. Or the cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 24 hours in 0.2 µM, colchicine or 0.1 µM valinomycin, or 2 µM cytochalasin B or 4 µM verapamil, ouabain or probenecid. The cells were further incubated at 37°C for 48 hours in 4 µM MeHg-GSH. Values are expressed as mean ± S.D.
*Significantly different from the corresponding MeHg group value at p<0.01 by t-test.

조건에서 NO₂⁻ 및 ATP 생성량은 더 높게 나타났다 (Fig. 1, 2).

세포막 물질수송계의 저해제를 각각 전처리 후 유기수은과 GSH를 동시에 첨가한 배양조건에서 NO₂⁻ 및 ATP 생성량 역시 ouabain을 전처리 한 배양조건에서만 유기수은을 단독첨가한 군과 비교하여 현저하게 높고 (p<0.05) 대조군 수준으로 나타났다(Fig. 3, 4). colchicine, probenecid, DIDS, cytochalasin B를 전처리 한 배양조건에서 NO₂⁻은 유기수은을 단독첨가한 군과 비슷한 수준으로 나타났고, valinomycin, verapamil을 전처리 후 배양조건에서는 유기수은을 단독첨가한 군과 비교하여 현저하게 감소하였다(p<0.05, Fig. 3). ATP는 colchicine, verapamil, probenecid, DIDS, cytochalasin B를 전처리 후 배양조건에서 유기수은을 단독첨가한 군과 비슷한 수준으로 나타났으며, valinomycin을 전처리 한 배양조건에서는 유기수은을 단독첨가한 군에 비하여 현저히 감소하였다(p<0.05, Fig. 4).

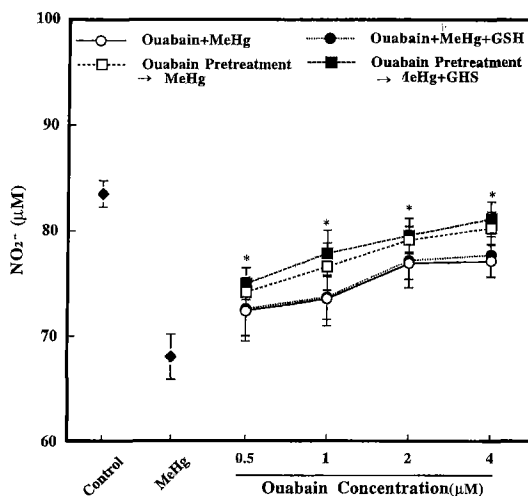


Fig. 5. Effects of ouabain against MeHg or MeHg-GSH on the production of NO₂⁻ in EMT-6 cells. The cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 48 hours in only 4 µM MeHg or MeHg-GSH containing with 0.05, 1.2 or 4 µM ouabain. Or the cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 24 hours in 0.5, 1, 2 or 4 µM ouabain. The cells further incubated at 37°C for 48 hours 4 µM MeHg or MeHg-GSH. Values are expressed as mean ± S.D. The difference between the MeHg group and ouabain-treated groups was tested by ANOVA.
*p<0.05

4. Ouabain 처리에 의한 유기수은의 세포독성 변화

EMT-6세포에 0.5, 1, 2, 4 µM의 ouabain을 유기수은 또는 유기수은 및 GSH와 동시첨가한 배양조건과 동량의 ouabain을 전처리한 후 유기수은 또는 유기수은 및 GSH를 첨가한 배양조건에서의 NO₂⁻ 생성량은 동시첨가한 배양조건과 전처리한 배양조건 모두 ouabain의 농도가 증가할수록 용량의존적으로 높은 양상으로 나타났다. 동시첨가 실험군보다 ouabain 전처리 실험군이 더 높게 나타났다(Fig. 5). ATP 생성량 역시 NO₂⁻ 생성량과 마찬가지로 동시첨가 실험군과 전처리 실험군에서 ouabain의 농도에 따라 용량의존적으로 증가하여 대조군과 근접한 생성량을 나타냈지만 동시첨가 실험군과 전처리 실험군간에는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6).

IV. 고 찰

세포내부에서 나타나는 유기수은의 세포독성 및 세포내 축적량은 유기수은이 세포막을 통과하는 유입전과 밀접한 상관성이 있다. 수은화합물의 세포내 유입기

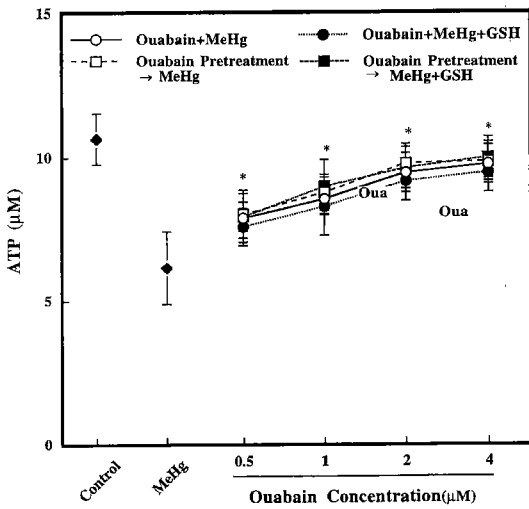


Fig. 6. Effects of ouabain against MeHg 4 µM or MeHg-GSH 4 µM on the production of APT in EMT-6 cells. The cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 48 hours in 4 µM MeHg or MeHg-GSH containing with 0.05, 1.2 or 4 µM ouabain. Or the cells cultured for 48 hours were incubated at 37°C for 24 hours in 0, 0.5, 1, 2 or 4 µM ouabain. The cells further incubated at 37°C for 48 hours 4 µM MeHg or MeHg-GSH. Values are expressed as mean ± S.D. The difference between the MeHg group and ouabain-treated groups was tested by ANOVA. *p<0.05.

전은 많은 연구에 의해서 여러 가지 경로로 제시되고 있지만 GSH 대사과정과 세포막 물질수송계에 의한 유입기전으로 요약된다. GSH에 의한 수산화합물의 세포 내 유입은 생체내로 유입된 수산화합물이 GSH와 결합하여 복합체를 형성하고 이 복합체가 GSH대사과정 중에 세포내로 유입되는 것으로 보고되어 있다.^{8,9,23,24)} Zalups 등의 연구^{23,24)}를 비롯한 대부분의 연구결과들은 *in vivo* 실험을 통하여 GSH 대사과정의 조절에 의한 무기수은의 신장조직내 축적량의 변화로서 유입기전을 밝히고 있다. Wu^{11,12)}는 rat의 erythrocyte에 세포막 물질수송계의 저해제와 GSH-MeHg 복합체를 동시에 첨가하여 저해제에 따른 유기수은의 세포내 유입량의 변화를 통해서 유입경로를 제시하였다.

지금까지 수산화합물의 유입기전을 제시하고 있는 연구들에서 GSH에 의한 수은의 세포내 유입기전은 수은의 표적기관인 신장세포를 통하여 밝혀져 있으므로 수은의 독성에 영향을 받는 면역세포 등 다른 조직의 세포에 적용하는데는 한계가 있을 것으로 사료되고, 연구들 대부분이 무기수은을 사용하고 있어 생체내에서 독

성이 더 강하고 세포내로 유입이 더 빠르게 나타나는 유기수은의 유입기전과는 다르게 나타날 가능성을 배제하지 않을 수 없다. 배양세포나 조직의 세포를 분리하여 1차 배양한 세포를 이용한 연구는 유입된 유기수은의 세포내 축적량을 측정하기 위해서는 1 mM 이상의 높은 농도를 부여해야 하고 실제 배양세포를 이용한 세포내의 유기수은의 축적량이 낮기 때문에 측정값의 오차가 증가하기 때문에 분석하는데 많은 어려움이 따르게 된다. 본 연구에서는 면역세포인 대식세포와 같은 특성을 가지고 있는 EMT-6세포에 유기수은 또는 유기수은 및 GSH와 세포막 물질수송계의 저해제를 처리하여 독성지표인 NO 생성량과 세포내 ATP양의 변화를 관찰함으로써 세포내 유기수은 축적량을 측정하지 않고 유기수은의 세포내 유입기전을 밝히고자 하였다. 유기수은은 10 µM 이상의 농도에서 배양세포의 생존율이 떨어지기 때문에 본 연구와 같이 독성지표를 이용하는 실험에서는 세포생존율이 일정하게 유지되면서 세포독성이 변화하는 유기수은의 농도에서 이루어져야 한다. 독성지표인 NO와 ATP는 유기수은이 세포내로 유입되어야 생성량이 감소되기 때문에 세포생존율이 일정하게 유지하는 조건에서 NO와 ATP의 생성량 감소는 유기수은의 세포내 유입량이 증가하는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 본 연구에서 독성지표인 NO와 ATP의 생성량은 세포내 유입된 유기수은의 양을 간접적으로 나타내는 지표로 이용될 수 있을 것으로 사료되어 유기수은의 세포내 유입기전을 밝히는 실험모델로 이용하였다.

유기수은은 생체내에서는 SH-group과의 강한 친화력으로 GSH와 결합하여 MeHg-GSH 복합체를 형성하기 때문에 실제로 세포내 유입과정에서는 이온상태보다는 MeHg-GSH 복합체로 유입될 가능성이 더 높고, 유기수은이 이온상태로 GSH 대사경로로 유입될 수 없기 때문에 세포막 물질수송계를 통하여 유입될 때 이온상태와 MeHg-GSH 복합체가 서로 다르게 나타날 수 있다. 또한 물질수송계의 저해제를 첨가할 때 유기수은과 동시첨가할때와 저해제를 미리 전처리 한 후에 유기수은을 첨가할 때 유기수은의 세포내 유입량이 다르게 나타날 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 이러한 가능성을 확인하고자 첫 번째로 유기수은을 단독 첨가하는 배양조건과 GSH와 유기수은을 세포에 투여하기 12시간 전에 미리 혼합한 후에 첨가하는 두 가지의 배양조건으로 나누어 수행하였고, 두 번째로 저해제와 유기수은을 동시에 첨가하는 배양조건과 저해제를 24시간 첨가하여 배양한 후 유기수은을 첨가하는 배양조건으로 나누어 유기수은의 두 가지 형태와 저해제의

두가지 처리방법을 조합하여 실험을 수행하였다.

유기수은을 단독첨가한 배양조건에서 NO와 ATP의 생성량은 유기수은 0.5-4 μM 에서 첨가한 수은의 양이 증가함에 따라 NO와 ATP양이 감소하여 세포독성이 증가하였다. 결과에서는 나타나지 않고 있지만 유기수은 4 μM 의 농도에서는 세포생존율이 95% 이상을 유지되었고 5 μM 이상의 농도에서부터 생존율이 감소하기 시작하여 10 μM 이상에서는 세포생존율이 80% 이하로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 유기수은의 첨가량은 앞서 언급한 세포생존율이 유지되면서 세포독성이 나타나는 4 μM 로 투여하였다. 세포막 물질수송계의 저해제를 단독첨가한 배양조건에서 세포독성을 알아본 결과 colchicine은 0.2 μM , valinomycin은 0.1 μM , cytochalasin B는 2 μM 이하의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았고, verapamil, ouabain, probenecid, DIDS는 10 μM 이하에서 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 본 연구에서 유기수은과 GSH는 4 μM 로 첨가하였고, colchicine은 0.2 μM , valinomycin은 0.1 μM , cytochalasin B는 2 μM , verapamil, ouabain, probenecid, DIDS는 각각 4 μM 을 유기수은과 동시첨가하거나 전처리하였다.

유기수은과 세포막 물질수송계의 저해제를 동시에 첨가하여 각각의 저해제를 첨가한 실험군을 비교한 결과 ouabain을 첨가한 실험군에서만 유기수은의 세포독성이 현저하게 감소하였고, 다른 저해제들은 유기수은을 단독첨가한 군과 비슷한 양상으로 세포독성이 나타났다. ouabain을 첨가한 실험군의 NO와 ATP생성량은 대조군의 수준으로 회복하는 것으로 나타나 유기수은이 세포내로 유입되지 않은 것으로 사료된다. 또한 유기수은과 GSH를 혼합한 후 저해제를 동시첨가한 실험에서도 앞선 실험과 유사하게 ouabain을 첨가한 실험군에서 세포독성이 나타나지 않았다.

colchicine, valinomycin, verapamil을 첨가한 실험군은 유기수은을 단독첨가한 군보다 세포독성이 더 높게 나타났다. 본 연구결과에서 ouabain, colchicine, DIDS를 첨가한 실험군은 Wu¹¹⁾의 연구결과와 유사하거나 동일하였으나, verapamil, valinomycin, cytochalasin B, probenecid를 첨가한 실험군은 서로 상반된 결과를 보이고 있다.¹²⁾ 또한 유기수은과 저해제를 동시첨가한 실험군과 유기수은과 GSH를 혼합한 후 저해제와 동시첨가한 실험군과의 NO 및 ATP 생성량의 차이는 나타나지 않았다.

세포막 물질수송계의 저해제를 전처리한 후 유기수은을 첨가하거나 유기수은과 GSH를 동시에 첨가하여 비교한 결과 동시첨가실험과 비슷한 양상으로 두 배양조

건에서 ouabain을 전처리한 실험군에서만 유기수은의 세포독성이 현저히 감소하였고, 역시 ouabain을 제외한 다른 저해제를 전처리한 실험군에서는 유기수은을 단독첨가한 실험군과 동일한 수준으로 세포독성이 나타났다. ouabain을 첨가한 배양조건에서 전처리한 후 유기수은을 첨가한 실험군은 유기수은과의 동시첨가 실험군보다 NO 및 ATP생성량이 이 더 높게 나타났고, 대조군과 근접하는 수준으로 회복하였다. 이 결과는 ouabain이 유기수은의 유입경로를 미리 차단함으로써 세포내 유입을 방해한 것으로 사료된다. 전처리 실험에서도 유기수은을 단독처리한 군과 유기수은 및 GSH를 동시에 첨가한 실험군과의 세포독성의 차이는 나타나지 않았다. 이러한 실험결과는 MeHg-GSH 복합체 역시 이온상태의 유기수은과 마찬가지로 세포막 물질수송계를 통해서 유입되는 것을 알 수 있었다.

Ouabain 0.5, 1, 2, 4 μM 과 유기수은 또는 유기수은 및 GSH 4 μM 을 동시에 첨가하거나 동량의 ouabain을 전처리한 후 유기수은 또는 유기수은 및 GSH를 첨가한 배양조건에서의 NO와 ATP생성량은 첨가한 ouabain의 양이 증가할수록 용량의존적으로 현저히 증가하였다. 저해제 동시첨가나 전처리 실험군 모두 유기수은을 단독첨가한 군과 비교하여 현저하게 증가하였고, NO 생성량의 경우 전처리 실험군이 동시첨가 실험군보다 더 높은 양상을 보였으며, ATP 생성량에서는 두 실험군간의 차이는 나타나지 않았다. 이 연구결과에서도 유기수은과 MeHg-GSH의 복합체간의 차이는 나타나지 않았다. 연구결과에서는 나타나지 않았지만 ouabain을 제외한 다른 저해제들도 모두 유기수은을 단독첨가한 군과 비슷한 수준으로 세포독성이 나타났다.

본 연구의 결과는 ouabain을 첨가한 배양조건에서만 유기수은의 세포독성으로부터 회복되는 양상을 보였다. ouabain은 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 의 저해제로서 active transport system을 방해하는 기능을 하고 있다. 따라서 유기수은의 세포내 유입은 세포막 물질수송계에서 active transport system을 통해서 이루어지는 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 세포막 물질수송계의 저해제들을 이용하여 유기수은의 세포내 유입기전에 관련된 세포막 물질수송계를 밝히고자 하였다. 세포막 물질수송계의 저해제는 organic anion transport system의 방해하는 probenecid, membrane potential을 고정시키는 valinomycin, facilitated diffusive D-glucose transport

system의 저해제인 cytochalasin B, microtubule system을 기능을 저하시키는 colchicine, Na^+ - K^+ -ATPase의 저해제로서 active transport system을 방해하는 ouabain, Cl^- ion transport system의 방해하는 4,4-diisothio-cyano-2',2'-stilbenedisulfonic acid(DIDS), Ca^{2+} transport system을 방해하는 verapamil을 이용하였다.

유기수은 또는 유기수은 및 GSH와 세포막 물질수송계의 저해제를 동시에 첨가하여 각각의 저해제를 첨가한 실험군을 비교한 결과 ouabain을 첨가한 실험군에서만 유기수은의 세포독성이 현저하게 감소하였고, 다른 저해제들은 유기수은을 단독첨가한 군과 비슷한 양상으로 세포독성이 나타났다. 세포막 물질수송계의 저해제를 전처리한 후 유기수은을 첨가하거나 유기수은과 GSH를 동시에 첨가하여 비교한 결과 동시첨가실험과 비슷한 양상으로 ouabain을 전처리한 실험군에서만 유기수은 세포독성이 현저히 감소하였고, 역시 ouabain을 제외한 다른 저해제를 전처리한 실험군에서는 유기수은을 단독첨가한 군과 동일한 수준으로 세포독성이 나타났다. ouabain을 전처리한 후 유기수은을 첨가한 실험군은 유기수은과의 동시첨가 실험군보다 NO 및 ATP생성량이 더 높게 나타났다. 저해제와 동시첨가나 전처리 배양조건에서 유기수은을 단독으로 첨가한 실험군과 유기수은과 GSH를 혼합하여 첨가한 실험군간의 세포독성의 차이는 나타나지 않았다. Ouabain 0.5, 1, 2, 4 μM 과 유기수은 또는 유기수은 및 GSH 4 μM 을 동시에 첨가하거나 동량의 ouabain을 전처리한 후 유기수은 또는 유기수은 및 GSH를 첨가한 배양조건에서의 NO와 ATP생성량은 첨가한 ouabain의 양이 증가할수록 용량의존적으로 현저히 증가하였다.

본 연구의 결과는 ouabain을 첨가한 배양조건에서만 유기수은의 세포독성으로부터 회복되는 양상을 보였다. ouabain은 Na^+ - K^+ -ATPase의 저해제로서 active transport system을 방해하는 기능을 하고 있다. 따라서 유기수은의 세포내 유입은 세포막 물질수송계에서 active transport system을 통해서 이루어지는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 전북대학교 연구기반조성특별지원으로 수행되었음.

참고문헌

- 1) Akerboom T, Bilzer M, Sies H.: The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, **257**, 4248-4252, 1982.
- 2) Stacey NH, Klaassen CD.: Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J. Toxicol Environ Health.*, **7**, 139-147, 1980.
- 3) Stacey NH, Kappus H.: Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **63**, 29-35, 1982.
- 4) 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.*, **68**, 218-228, 1983.
- 5) Goyer RA: Toxic effects of metals. In Amdur MO, Doull J, Klaassen CD(Eds.), Casarett and Doull's Toxicology, 5th Ed., Pergamon Press Inc., New York. 646-651, 1996.
- 6) Naganuma A, Anderson ME, Meister A.: Cellular glutathione as adeterminant of sensitivity to mercury chloride toxicity. *Biochem Pharmacol.*, **40**, 693-697, 1990.
- 7) Shimada H, Fukudome S, Kiyuzumi M, Funakoshi T, Adachi T, Yasudake A, Kojima S.: Further study of effects of chelating agents on excretion of inorganic mercury in rats. *Toxicol.*, **77**, 157-169, 1993.
- 8) Zalups RK, Knutson KL, Schnellmann RG.: in vitro analysis of the accumulation and toxicity of inorganic mercury in segments of the proximal tubule isolated from the rabbit kidney. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **119**, 221-227, 1993.
- 9) Zalups RK.: Organic anion transport and action of γ -glutamyl transpeptidase in kidney linked mechanistically to renal tubular uptake of inorganic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **132**, 289-298, 1995.
- 10) KimCY, Watanabe C, Kasanuma Y, Satoh H.: Inhibition of γ -glutamyltranspeptidase decreases renal deposition of mercury after mercury vapor exposure. *Arch Toxicol.*, **69**, 722-724, 1995.
- 11) Wu G.: Screening of potential transport systems for methyl mercuryuptake in rat erythrocytes at 5° by use of inhibitors and substrate. *Pharmacol Toxicol.*, **77**, 169-176, 1995.
- 12) Wu G.: Discrimination of transport systems for methylmercury uptake in rat erythrocytes using methylmercury-mercaptopalbumin by inhibitors and other factors. *Pharmacol Res.*, **32**(4), 223-225, 1995.
- 13) Sakamoto M, Ikegami N, Nakano A.: Protective defects of Ca^{2+} channel blockers against methyl mercury toxicity. *Pharmacol. Toxicol.*, **78**, 193-199, 1996.
- 14) Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR.: L-arginine is required forexpression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol.*, **138**, 550-565, 1987.
- 15) Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR.: Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.*, **235**, 473-476, 1987.

1) Akerboom T, Bilzer M, Sies H.: The relationship of

- 16) Snyder SH, Bredt DS.: Biological roles of nitric oxide. *Scientific Am.* May, 68-77, 1992.
- 17) Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA.: Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol.*, **144**, 278-283, 1990.
- 18) Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB Jr.: Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine Leishmaniasis. *J Immunol.*, **151**, 907-915, 1993.
- 19) Nathan CF, Hibbs JB.: Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion Immunol.*, **3**, 65-70, 1991.
- 20) 오경재, 고대하, 염정호 : 수은에 의한 EMT-6 세포의 NO₂ 및 ATP 생성. 예방의학회지, **29**(3), 495-505, 1996.
- 21) Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR, Rachlin EM.: Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.*, **157**, 87-94, 1988.
- 22) 염정호 : 수은화합물에 의한 EMT-6 세포의 nitric oxide 생성과 관련된 요인에 관한 연구. 대한산업의학회지, **9**(1), 122-130, 1997.
- 23) Meister A.: Selective modification of glutathione metabolism. *Science.*, **220**, 472-477, 1983.
- 24) Tanaka T, Naganuma A, Imura N.: Role of gamma-glutamyl-transpeptidase in renal uptake and toxicity of inorganic mercury in mice. *Toxicology.*, **60**, 187-198, 1990.